(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116419925 A
(43)申请公布日 2023.07.11

(21)申请号 202180066644.9
(22)申请日 2021.08.17
(30)优先权数据
63/066,565 2020.08.17 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.03.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/046217 2021.08.17
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/040128 EN 2022.02.24
(71)申请人 武田药品工业有限公司
地址 日本大阪市
(72)发明人 R·B·杜布里奇 T-H·T·陈
P·A·卡尔普 C·M·梅
D·德特兰 J·德根哈特
(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责任公司 11287
专利代理师 蒋林清
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)

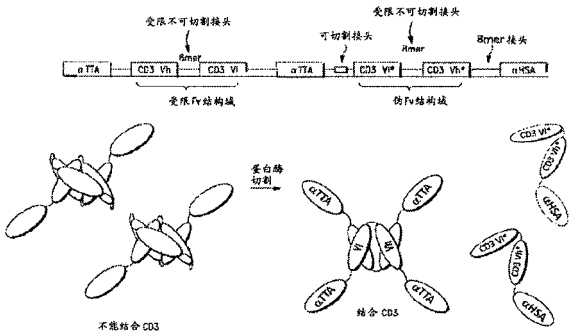
权利要求书10页 说明书85页
序列表（电子公布） 附图233页

(54)发明名称

受限的条件激活的结合蛋白

(57)摘要

本发明涉及以活性前药形式施用的条件双特异性重导向激活构建体或COBRA。暴露于肿瘤蛋白酶后，构建体被切割和激活，使得它们可以结合一种或多种肿瘤靶抗原(TTA)以及CD3，从而将表达CD3的T细胞募集至肿瘤，从而导致治疗。在一些实施方案中，肿瘤靶抗原包括B7H3、CA9(CAIX)、EGFR、EpCAM、FOLR1、HER2、LyPD3和/或Trop2。



CN 116419925 A

1.一种融合蛋白,其从N末端至C末端包含:

a)第一sdABD,其结合HER2(sdABD-HER2);

b)第一结构域接头;

c)受限Fv结构域,其包含:

i)含有vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3的第一可变重结构域;

ii)受限不可切割接头(CNCL);和

iii)包含vlCDR1、vlCDR2和vlCDR3的第一可变轻结构域;

d)第二结构域接头;

e)第二sdABD-HER2;

f)可切割接头(CL);

g)受限伪Fv结构域,其包含:

i)第一伪可变轻结构域;

ii)不可切割接头(NCL);和

iii)第一伪可变重结构域;

h)第三结构域接头;和

i)第三sdABD,其结合人血清白蛋白(sdABD-HSA);

其中所述受限Fv结构域的所述第一可变重结构域和所述第一可变轻结构域能够结合人CD3,但所述受限伪Fv结构域不结合CD3;

所述第一可变重结构域和所述第一伪可变轻结构域分子内缔合形成无活性Fv;并且

所述第一可变轻结构域和所述第一伪可变重结构域分子内缔合形成无活性Fv。

2.如权利要求1所述的融合蛋白,其中所述第一和/或第二sdABD-HER2具有氨基酸序列,所述氨基酸序列包含选自由以下组成的组的一组CDR:

a)SEQ ID NO:194的sdCDR1、SEQ ID NO:195的sdCDR2和SEQ ID NO:196的sdCDR3;

b)SEQ ID NO:218的sdCDR1、SEQ ID NO:219的sdCDR2和SEQ ID NO:220的sdCDR3;

c)SEQ ID NO:226的sdCDR1、SEQ ID NO:227的sdCDR2和SEQ ID NO:228的sdCDR3;

d)SEQ ID NO:238的sdCDR1、SEQ ID NO:239的sdCDR2和SEQ ID NO:240的sdCDR3;

e)SEQ ID NO:142的sdCDR1、SEQ ID NO:143的sdCDR2和SEQ ID NO:144的sdCDR3;

f)SEQ ID NO:146的sdCDR1、SEQ ID NO:147的sdCDR2和SEQ ID NO:148的sdCDR3;

g)SEQ ID NO:150的sdCDR1、SEQ ID NO:151的sdCDR2和SEQ ID NO:152的sdCDR3;

h)SEQ ID NO:154的sdCDR1、SEQ ID NO:155的sdCDR2和SEQ ID NO:156的sdCDR3;

i)SEQ ID NO:158的sdCDR1、SEQ ID NO:159的sdCDR2和SEQ ID NO:160的sdCDR3;

j)SEQ ID NO:162的sdCDR1、SEQ ID NO:163的sdCDR2和SEQ ID NO:164的sdCDR3;

k)SEQ ID NO:166的sdCDR1、SEQ ID NO:167的sdCDR2和SEQ ID NO:168的sdCDR3;

l)SEQ ID NO:170的sdCDR1、SEQ ID NO:171的sdCDR2和SEQ ID NO:172的sdCDR3;

m)SEQ ID NO:174的sdCDR1、SEQ ID NO:175的sdCDR2和SEQ ID NO:176的sdCDR3;

n)SEQ ID NO:178的sdCDR1、SEQ ID NO:179的sdCDR2和SEQ ID NO:180的sdCDR3;

o)SEQ ID NO:182的sdCDR1、SEQ ID NO:183的sdCDR2和SEQ ID NO:184的sdCDR3;

p)SEQ ID NO:186的sdCDR1、SEQ ID NO:187的sdCDR2和SEQ ID NO:188的sdCDR3;

q)SEQ ID NO:190的sdCDR1、SEQ ID NO:191的sdCDR2和SEQ ID NO:192的sdCDR3;

r)SEQ ID NO:194的sdCDR1、SEQ ID NO:195的sdCDR2和SEQ ID NO:196的sdCDR3;

s)SEQ ID NO:198的sdCDR1、SEQ ID NO:199的sdCDR2和SEQ ID NO:200的sdCDR3;

t)SEQ ID NO:202的sdCDR1、SEQ ID NO:203的sdCDR2和SEQ ID NO:204的sdCDR3;

u)SEQ ID NO:206的sdCDR1、SEQ ID NO:207的sdCDR2和SEQ ID NO:203的sdCDR3;

v)SEQ ID NO:210的sdCDR1、SEQ ID NO:211的sdCDR2和SEQ ID NO:212的sdCDR3;

w)SEQ ID NO:214的sdCDR1、SEQ ID NO:215的sdCDR2和SEQ ID NO:216的sdCDR3;

x)SEQ ID NO:218的sdCDR1、SEQ ID NO:219的sdCDR2和SEQ ID NO:220的sdCDR3;

y)SEQ ID NO:222的sdCDR1、SEQ ID NO:223的sdCDR2和SEQ ID NO:224的sdCDR3;

z)SEQ ID NO:226的sdCDR1、SEQ ID NO:227的sdCDR2和SEQ ID NO:228的sdCDR3;

aa)SEQ ID NO:230的sdCDR1、SEQ ID NO:231的sdCDR2和SEQ ID NO:232的sdCDR3;

ab)SEQ ID NO:234的sdCDR1、SEQ ID NO:235的sdCDR2和SEQ ID NO:236的sdCDR3;

ac)SEQ ID NO:238的sdCDR1、SEQ ID NO:239的sdCDR2和SEQ ID NO:240的sdCDR3;

ad)SEQ ID NO:242的sdCDR1、SEQ ID NO:243的sdCDR2和具有SEQ ID NO:244的sdCDR3;和

ae)SEQ ID NO:500的sdCDR1、SEQ ID NO:501的sdCDR2和具有SEQ ID NO:502的sdCDR3;

af)SEQ ID NO:504的sdCDR1、SEQ ID NO:505的sdCDR2和具有SEQ ID NO:506的sdCDR3;

ag)SEQ ID NO:508的sdCDR1、SEQ ID NO:509的sdCDR2和具有SEQ ID NO:510的sdCDR3;和

ah)SEQ ID NO:512的sdCDR1、SEQ ID NO:513的sdCDR2和具有SEQ ID NO:5的sdCDR3。

3.如权利要求1所述的融合蛋白,其中所述第一和/或第二sdABD-HER2包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:193、SEQ ID NO:217、SEQ ID NO:225、SEQ ID NO:237、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:153、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:161、SEQ ID NO:165、SEQ ID NO:169、SEQ ID NO:173、SEQ ID NO:177、SEQ ID NO:181、SEQ ID NO:185、SEQ ID NO:189、SEQ ID NO:197、SEQ ID NO:201、SEQ ID NO:205、SEQ ID NO:209、SEQ ID NO:213、SEQ ID NO:221、SEQ ID NO:229、SEQ ID NO:233、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:499、SEQ ID NO:503、SEQ ID NO:507和SEQ ID NO:511。

4.如权利要求1-3中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一sdABD-HER2和所述第二sdABD-HER2相同。

5.如权利要求1或3所述的融合蛋白,其中所述第一sdABD-HER2和所述第二sdABD-HER2不同。

6.如权利要求1-5中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一可变重结构域位于所述第一可变轻结构域的N末端,并且所述伪可变轻结构域位于所述伪可变重结构域的N末端。

7.如权利要求1-5中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一可变重结构域位于所述第一可变轻结构域的N末端,并且所述伪可变重结构域位于所述伪可变轻结构域的N末端。

8.如权利要求1-5中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一可变轻结构域位于所述第一可变重结构域的N末端,并且所述伪可变轻结构域位于所述伪可变重结构域的N末端。

9.根据权利要求1-5中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一可变轻结构域位于所述

第一可变重结构域的N末端,并且所述伪可变重结构域位于所述伪可变轻结构域的N末端。

10.如权利要求1-9中任一项所述的融合蛋白,其中结合HSA的所述第三sdABD(sdABD-HSA)具有包含以下的氨基酸序列:

(a)一组CDR,其选自由以下组成的组:(i)SEQ ID NO:246的sdCDR1、SEQ ID NO:247的sdCDR2和SEQ ID NO:248的sdCDR3;和(ii)SEQ ID NO:250的sdCDR1、SEQ ID NO:251的sdCDR2和SEQ ID NO:252的sdCDR3;或

(b)选自由SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:249组成的组的氨基酸序列。

11.如权利要求1-10中任一项所述的融合蛋白,其中所述可切割接头包含选自由SEQ ID NO:339-408和532-535组成的组的切割结构域序列。

12.如权利要求1-11中任一项所述的融合蛋白,其中所述可切割接头被选自由以下组成的组的人蛋白酶切割:MMP2、MMP9、甲基多巴A、甲基多巴B、组织蛋白酶S、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、颗粒酶B、uPA、kallekriein7、蛋白裂解酶和凝血酶。

13.如权利要求1-12中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白具有选自由SEQ ID NO:459-484和491-494组成的组的氨基酸序列。

14.一种核酸,其编码如权利要求1-13中任一项所述的融合蛋白。

15.一种表达载体,其包含如权利要求14所述的核酸。

16.一种宿主细胞,其包含如权利要求15所述的表达载体。

17.一种制备融合蛋白的方法,其包括:(i)在表达所述融合蛋白的条件下培养如权利要求16所述的宿主细胞,和(ii)回收所述融合蛋白。

18.一种治疗受试者的癌症的方法,其包括向所述受试者施用如权利要求1-13中任一项所述的融合蛋白。

19.一种单结构域抗原结合结构域(sdABD),其结合人HER2(sdABD-HER2),包含:

(i)选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:153、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:161、SEQ ID NO:165、SEQ ID NO:169、SEQ ID NO:173、SEQ ID NO:177、SEQ ID NO:181、SEQ ID NO:185、SEQ ID NO:189、SEQ ID NO:193、SEQ ID NO:197、SEQ ID NO:201、SEQ ID NO:205、SEQ ID NO:209、SEQ ID NO:213、SEQ ID NO:217、SEQ ID NO:221、SEQ ID NO:225、SEQ ID NO:229、SEQ ID NO:233、SEQ ID NO:237、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:499、SEQ ID NO:503、SEQ ID NO:507和SEQ ID NO:511;或

(ii)氨基酸序列,其包含选自由以下组成的组的一组CDR:

a)SEQ ID NO:194的sdCDR1、SEQ ID NO:195的sdCDR2和SEQ ID NO:196的sdCDR3;

b)SEQ ID NO:218的sdCDR1、SEQ ID NO:219的sdCDR2和SEQ ID NO:220的sdCDR3;

c)SEQ ID NO:226的sdCDR1、SEQ ID NO:227的sdCDR2和SEQ ID NO:228的sdCDR3;

d)SEQ ID NO:238的sdCDR1、SEQ ID NO:239的sdCDR2和SEQ ID NO:240的sdCDR3;

e)SEQ ID NO:142的sdCDR1、SEQ ID NO:143的sdCDR2和SEQ ID NO:144的sdCDR3;

f)SEQ ID NO:146的sdCDR1、SEQ ID NO:147的sdCDR2和SEQ ID NO:148的sdCDR3;

g)SEQ ID NO:150的sdCDR1、SEQ ID NO:151的sdCDR2和SEQ ID NO:152的sdCDR3;

h)SEQ ID NO:154的sdCDR1、SEQ ID NO:155的sdCDR2和SEQ ID NO:156的sdCDR3;

i)SEQ ID NO:158的sdCDR1、SEQ ID NO:159的sdCDR2和SEQ ID NO:160的sdCDR3;

j)SEQ ID NO:162的sdCDR1、SEQ ID NO:163的sdCDR2和SEQ ID NO:164的sdCDR3;

k)SEQ ID NO:166的sdCDR1、SEQ ID NO:167的sdCDR2和SEQ ID NO:168的sdCDR3;

l)SEQ ID NO:170的sdCDR1、SEQ ID NO:171的sdCDR2和SEQ ID NO:172的sdCDR3;

m)SEQ ID NO:174的sdCDR1、SEQ ID NO:175的sdCDR2和SEQ ID NO:176的sdCDR3;

n)SEQ ID NO:178的sdCDR1、SEQ ID NO:179的sdCDR2和SEQ ID NO:180的sdCDR3;

o)SEQ ID NO:182的sdCDR1、SEQ ID NO:183的sdCDR2和SEQ ID NO:184的sdCDR3;

p)SEQ ID NO:186的sdCDR1、SEQ ID NO:187的sdCDR2和SEQ ID NO:188的sdCDR3;

q)SEQ ID NO:190的sdCDR1、SEQ ID NO:191的sdCDR2和SEQ ID NO:192的sdCDR3;

r)SEQ ID NO:194的sdCDR1、SEQ ID NO:195的sdCDR2和SEQ ID NO:196的sdCDR3;

s)SEQ ID NO:198的sdCDR1、SEQ ID NO:199的sdCDR2和SEQ ID NO:200的sdCDR3;

t)SEQ ID NO:202的sdCDR1、SEQ ID NO:203的sdCDR2和SEQ ID NO:204的sdCDR3;

u)SEQ ID NO:206的sdCDR1、SEQ ID NO:207的sdCDR2和SEQ ID NO:203的sdCDR3;

v)SEQ ID NO:210的sdCDR1、SEQ ID NO:211的sdCDR2和SEQ ID NO:212的sdCDR3;

w)SEQ ID NO:214的sdCDR1、SEQ ID NO:215的sdCDR2和SEQ ID NO:216的sdCDR3;

x)SEQ ID NO:218的sdCDR1、SEQ ID NO:219的sdCDR2和SEQ ID NO:220的sdCDR3;

y)SEQ ID NO:222的sdCDR1、SEQ ID NO:223的sdCDR2和SEQ ID NO:224的sdCDR3;

z)SEQ ID NO:226的sdCDR1、SEQ ID NO:227的sdCDR2和SEQ ID NO:228的sdCDR3;

aa)SEQ ID NO:230的sdCDR1、SEQ ID NO:231的sdCDR2和SEQ ID NO:232的sdCDR3;

ab)SEQ ID NO:234的sdCDR1、SEQ ID NO:235的sdCDR2和SEQ ID NO:236的sdCDR3;

ac)SEQ ID NO:238的sdCDR1、SEQ ID NO:239的sdCDR2和SEQ ID NO:240的sdCDR3;

ad)SEQ ID的sdCDR1 NO:242,SEQ ID的sdCDR2 NO:243和具有SEQ ID的sdCDR3 NO:244;

ae)SEQ ID NO:500的sdCDR1、SEQ ID NO:501的sdCDR2和具有SEQ ID NO:502的sdCDR3;

af)SEQ ID NO:504的sdCDR1、SEQ ID NO:505的sdCDR2和具有SEQ ID NO:506的sdCDR3;

ag)SEQ ID NO:508的sdCDR1、SEQ ID NO:509的sdCDR2和具有SEQ ID NO:510的sdCDR3;和

ah)SEQ ID NO:512的sdCDR1、SEQ ID NO:513的sdCDR2和具有SEQ ID NO:514的sdCDR3。

20.一种融合蛋白,其从N末端至C末端包含:

a)第一sdABD,其结合肿瘤靶抗原(sdABD-TTA);

b)第一结构域接头;

c)受限Fv结构域,其包含:

i)含有vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3的第一可变重结构域;

ii)受限不可切割接头(CNCL);和

iii)包含vlCDR1、vlCDR2和vlCDR3的第一可变轻结构域;

d)第二结构域接头;

e)第二sdABD-TTA;

f)可切割接头(CL);

g)受限伪Fv结构域,其包含:

i)第一伪可变轻结构域;

ii)不可切割接头(NCL);和

iii)第一伪可变重结构域;

h)第三结构域接头;和

i)第三sdABD,其结合人血清白蛋白(sdABD-HSA);

其中所述受限Fv结构域的所述第一可变重结构域和所述第一可变轻结构域能够结合人CD3,但所述受限伪Fv结构域不结合CD3;所述第一可变重结构域和所述第一伪可变轻结构域分子内缔合形成无活性的Fv;所述第一可变轻结构域和所述第一伪可变重结构域分子内缔合形成无活性的Fv,并且

其中要么(1)所述第一sdABD-TTA是sdABD-HER2或sdABD-LyPD3,并且所述第二sdABD-TTA选自由以下组成的组:sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2;要么(2)所述第一sdABD-TTA选自由以下组成的组:sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2,并且所述第二sdABD-TTA是sdABD-HER2或sdABD-LyPD3。

21.如权利要求20所述的融合蛋白,其中所述第一和第二sdABD-TFA各自是sdABD-LyPD3。

22.如权利要求21所述的融合蛋白,其中所述第一和第二sdABD-LPYD3相同。

23.如权利要求21所述的融合蛋白,其中所述第一和第二sdABD-LPYD3不同。

24.如权利要求20所述的融合蛋白,其中

(a)所述第一sdABD-TTA是sdABD-HER2,并且所述第二sdABD-TTA选自由以下组成的组:sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2;

(b)所述第一sdABD-TTA是sdABD-LyPD3,并且所述第二sdABD-TTA选自由以下组成的组:sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2和sdABD-Trop2;

(c)所述第一sdABD-TTA选自由以下组成的组:sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2,并且所述第二TTA是sdABD-HER2;或

(d)所述第一sdABD-TTA选自由以下组成的组:sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2,并且所述第二TTA是sdABD-LyPD3。

25.如权利要求20或24所述的融合蛋白,其中所述sdABD-HER2包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

(a)一组CDR,其包含SEQ ID NO:194的sdCDR1、SEQ ID NO:195的sdCDR2和SEQ ID NO:196的sdCDR3;

(b)一组CDR,其包含SEQ ID NO:218的sdCDR1、SEQ ID NO:219的sdCDR2和SEQ ID NO:220的sdCDR3;

(c)一组CDR,其包含SEQ ID NO:226的sdCDR1、SEQ ID NO:227的sdCDR2和SEQ ID NO:

228的sdCDR3；

(d)一组CDR，其包含SEQ ID NO:238的sdCDR1、SEQ ID NO:239的sdCDR2和SEQ ID NO:240的sdCDR3；

(e)一组CDR，其包含SEQ ID NO:142的sdCDR1、SEQ ID NO:143的sdCDR2和SEQ ID NO:144的sdCDR3；

(f)一组CDR，其包含SEQ ID NO:146的sdCDR1、SEQ ID NO:147的sdCDR2和SEQ ID NO:148的sdCDR3；

(g)一组CDR，其包含SEQ ID NO:150的sdCDR1、SEQ ID NO:151的sdCDR2和SEQ ID NO:152的sdCDR3；

(h)一组CDR，其包含SEQ ID NO:154的sdCDR1、SEQ ID NO:155的sdCDR2和SEQ ID NO:156的sdCDR3；

(i)一组CDR，其包含SEQ ID NO:158的sdCDR1、SEQ ID NO:159的sdCDR2和SEQ ID NO:160的sdCDR3；

(j)一组CDR，其包含SEQ ID NO:162的sdCDR1、SEQ ID NO:163的sdCDR2和SEQ ID NO:164的sdCDR3；

(k)一组CDR，其包含SEQ ID NO:166的sdCDR1、SEQ ID NO:167的sdCDR2和SEQ ID NO:168的sdCDR3；

(l)一组CDR，其包含SEQ ID NO:170的sdCDR1、SEQ ID NO:171的sdCDR2和SEQ ID NO:172的sdCDR3；

(m)一组CDR，其包含SEQ ID NO:174的sdCDR1、SEQ ID NO:175的sdCDR2和SEQ ID NO:176的sdCDR3；

(n)一组CDR，其包含SEQ ID NO:178的sdCDR1、SEQ ID NO:179的sdCDR2和SEQ ID NO:180的sdCDR3；

(o)一组CDR，其包含SEQ ID NO:182的sdCDR1、SEQ ID NO:183的sdCDR2和SEQ ID NO:184的sdCDR3；

(p)一组CDR，其包含SEQ ID NO:186的sdCDR1、SEQ ID NO:187的sdCDR2和SEQ ID NO:188的sdCDR3；

(q)一组CDR，其包含SEQ ID NO:190的sdCDR1、SEQ ID NO:191的sdCDR2和SEQ ID NO:192的sdCDR3；

(r)一组CDR，其包含SEQ ID NO:194的sdCDR1、SEQ ID NO:195的sdCDR2和SEQ ID NO:196的sdCDR3；

(s)一组CDR，其包含SEQ ID NO:198的sdCDR1、SEQ ID NO:199的sdCDR2和SEQ ID NO:200的sdCDR3；

(t)一组CDR，其包含SEQ ID NO:202的sdCDR1、SEQ ID NO:203的sdCDR2和SEQ ID NO:204的sdCDR3；

(u)一组CDR，其包含SEQ ID NO:206的sdCDR1、SEQ ID NO:207的sdCDR2和SEQ ID NO:203的sdCDR3；

(v)一组CDR，其包含SEQ ID NO:210的sdCDR1、SEQ ID NO:211的sdCDR2和SEQ ID NO:212的sdCDR3；

(w)一组CDR,其包含SEQ ID NO:214的sdCDR1、SEQ ID NO:215的sdCDR2和SEQ ID NO:216的sdCDR3;

(x)一组CDR,其包含SEQ ID NO:218的sdCDR1、SEQ ID NO:219的sdCDR2和SEQ ID NO:220的sdCDR3;

(y)一组CDR,其包含SEQ ID NO:222的sdCDR1、SEQ ID NO:223的sdCDR2和SEQ ID NO:224的sdCDR3;

(z)一组CDR,其包含SEQ ID NO:226的sdCDR1、SEQ ID NO:227的sdCDR2和SEQ ID NO:228的sdCDR3;

(aa)一组CDR,其包含SEQ ID NO:230的sdCDR1、SEQ ID NO:231的sdCDR2和SEQ ID NO:232的sdCDR3;

(ab)一组CDR,其包含SEQ ID NO:234的sdCDR1、SEQ ID NO:235的sdCDR2和SEQ ID NO:236的sdCDR3;

(ac)一组CDR,其包含SEQ ID NO:238的sdCDR1、SEQ ID NO:239的sdCDR2和SEQ ID NO:240的sdCDR3;

(ad)一组CDR,其包含SEQ ID NO:242的sdCDR1、SEQ ID NO:243的sdCDR2和SEQ ID NO:244的sdCDR3;

(ae)SEQ ID NO:141;(af)SEQ ID NO:145;(ag)SEQ ID NO:149;(ah)SEQ ID NO:153;(ai)SEQ ID NO:157;(aj)SEQ ID NO:161;(ak)SEQ ID NO:165;(al)SEQ ID NO:169;(am)SEQ ID NO:173;(an)SEQ ID NO:177;(ao)SEQ ID NO:181;(ap)SEQ ID NO:185;(aq)SEQ ID NO:189;(ar)SEQ ID NO:193;(as)SEQ ID NO:197;(at)SEQ ID NO:201;(au)SEQ ID NO:205;(av)SEQ ID NO:209;(aw)SEQ ID NO:213;(ax)SEQ ID NO:217;(ay)SEQ ID NO:221;(az)SEQ ID NO:225;(ba)SEQ ID NO:229;(bb)SEQ ID NO:233;(bc)SEQ ID NO:237;和(bd)SEQ ID NO:241。

26.如权利要求20-25中任一项所述的融合蛋白,其中所述sdABD-LyPD3包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

(a)一组CDR,其包含SEQ ID NO:118的sdCDR1、SEQ ID NO:119的sdCDR2和SEQ ID NO:120的sdCDR3;

(b)一组CDR,其包含SEQ ID NO:122的sdCDR1、SEQ ID NO:123的sdCDR2和SEQ ID NO:124的sdCDR3;

(c)一组CDR,其包含SEQ ID NO:126的sdCDR1、SEQ ID NO:127的sdCDR2和SEQ ID NO:128的sdCDR3;

(d)一组CDR,其包含SEQ ID NO:130的sdCDR1、SEQ ID NO:131的sdCDR2和SEQ ID NO:132的sdCDR3;

(e)一组CDR,其包含SEQ ID NO:134的sdCDR1、SEQ ID NO:135的sdCDR2和SEQ ID NO:136的sdCDR3;

(f)一组CDR,其包含SEQ ID NO:138的sdCDR1、SEQ ID NO:139的sdCDR2和SEQ ID NO:140的sdCDR3;

(g)SEQ ID NO:117;(h)SEQ ID NO:121;(i)SEQ ID NO:125;(j)SEQ ID NO:129;(k)SEQ ID NO:133;和(l)SEQ ID NO:137。

27.如权利要求20和24-26中任一项所述的融合蛋白,其中所述sdABD-B7H3包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

(i)一组CDR,其包含SEQ ID NO:34的sdCDR1、SEQ ID NO:35的sdCDR2和SEQ ID NO:36的sdCDR3;(ii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:38的sdCDR1、SEQ ID NO:39的sdCDR2和SEQ ID NO:40的sdCDR3;(iii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:42的sdCDR1、SEQ ID NO:43的sdCDR2和SEQ ID NO:44的sdCDR3;(iv)一组CDR,其包含SEQ ID NO:46的sdCDR1、SEQ ID NO:47的sdCDR2和SEQ ID NO:48的sdCDR3;(v)一组CDR,其包含SEQ ID NO:50的sdCDR1、SEQ ID NO:51的sdCDR2和SEQ ID NO:52的sdCDR3;(vi)一组CDR,其包含SEQ ID NO:54的sdCDR1、SEQ ID NO:55的sdCDR2和SEQ ID NO:56的sdCDR3;(vii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:58的sdCDR1、SEQ ID NO:59的sdCDR2和SEQ ID NO:60的sdCDR3;(ix)SEQ ID NO:33;(x)SEQ ID NO:37;(xi)SEQ ID NO:41;(xii)SEQ ID NO:45;(xiii)SEQ ID NO:49;(xiv)SEQ ID NO:53;和(xv)SEQ ID NO:57。

28.如权利要求20和24-26中任一项所述的融合蛋白,其中所述sdABD-CA9包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

(i)一组CDR,其包含SEQ ID NO:102的sdCDR1、SEQ ID NO:103的sdCDR2和SEQ ID NO:104的sdCDR3;(ii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:106的sdCDR1、SEQ ID NO:107的sdCDR2和SEQ ID NO:108的sdCDR3;(iii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:110的sdCDR1、SEQ ID NO:111的sdCDR2和SEQ ID NO:112的sdCDR3;(iv)一组CDR,其包含SEQ ID NO:114的sdCDR1、SEQ ID NO:115的sdCDR2和SEQ ID NO:116的sdCDR3;(v)SEQ ID NO:101;(vi)SEQ ID NO:105;(vii)SEQ ID NO:109;和(viiii)SEQ ID NO:113。

29.如权利要求20和24-26中任一项所述的融合蛋白,其中所述sdABD-EGFR包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:(i)一组CDR,其包含SEQ ID NO:2的sdCDR1、SEQ ID NO:3的sdCDR2和SEQ ID NO:4的sdCDR3;(ii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:6的sdCDR1、SEQ ID NO:7的sdCDR2和SEQ ID NO:8的sdCDR3;(iii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:10的sdCDR1、SEQ ID NO:11的sdCDR2和SEQ ID NO:12的sdCDR3;(iv)一组CDR,其包含SEQ ID NO:14的sdCDR1、SEQ ID NO:15的sdCDR2和SEQ ID NO:16的sdCDR3;(v)一组CDR,其包含SEQ ID NO:18的sdCDR1、SEQ ID NO:19的sdCDR2和SEQ ID NO:20的sdCDR3;(vi)SEQ ID NO:1;(vii)SEQ ID NO:5;(viii)SEQ ID NO:9;(ix)SEQ ID NO:13;和(x)SEQ ID NO:17。

30.如权利要求20和24-26中任一项所述的融合蛋白,其中所述sdABD-EpCAM包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

(i)一组CDR,其包含SEQ ID NO:62的sdCDR1、SEQ ID NO:63的sdCDR2和SEQ ID NO:64的sdCDR3;(ii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:66的sdCDR1、SEQ ID NO:67的sdCDR2和SEQ ID NO:68的sdCDR3;(iii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:70的sdCDR1、SEQ ID NO:71的sdCDR2和SEQ ID NO:72的sdCDR3;(iv)一组CDR,其包含SEQ ID NO:74的sdCDR1、SEQ ID NO:75的sdCDR2和SEQ ID NO:76的sdCDR3;(v)一组CDR,其包含SEQ ID NO:496的sdCDR1、SEQ ID NO:497的sdCDR2和SEQ ID NO:498的sdCDR3;(vi)SEQ ID NO:61;(vii)SEQ ID NO:65;(viii)SEQ ID NO:69;(ix)SEQ ID NO:73;和(x)SEQ ID NO:495。

31.如权利要求20和24-26中任一项所述的融合蛋白,其中所述sdABD-FOLR1包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

(i)一组CDR,其包含SEQ ID NO:22的sdCDR1、SEQ ID NO:23的sdCDR2和SEQ ID NO:24的sdCDR3;(ii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:26的sdCDR1、SEQ ID NO:27的sdCDR2和SEQ ID NO:28的sdCDR3;(iii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:30的sdCDR1、SEQ ID NO:31的sdCDR2和SEQ ID NO:32的sdCDR3;(iv)SEQ ID NO:21;(v)SEQ ID NO:25;和(vi)SEQ ID NO:29。

32.如权利要求20和24-26中任一项所述的融合蛋白,其中所述sdABD-Trop2包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

(i)一组CDR,其包含SEQ ID NO:78的sdCDR1、SEQ ID NO:79的sdCDR2和SEQ ID NO:80的sdCDR3;(ii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:82的sdCDR1、SEQ ID NO:83的sdCDR2和SEQ ID NO:84的sdCDR3;(iii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:86的sdCDR1、SEQ ID NO:87的sdCDR2和SEQ ID NO:88的sdCDR3;(iv)一组CDR,其包含SEQ ID NO:90的sdCDR1、SEQ ID NO:91的sdCDR2和SEQ ID NO:92的sdCDR3;(v)一组CDR,其包含SEQ ID NO:94的sdCDR1、SEQ ID NO:95的sdCDR2和SEQ ID NO:96的sdCDR3;(vi)一组CDR,其包含SEQ ID NO:98的sdCDR1、SEQ ID NO:99的sdCDR2和SEQ ID NO:100的sdCDR3;(vii)SEQ ID NO:77;(viii)SEQ ID NO:81;(ix)SEQ ID NO:85;(x)SEQ ID NO:89;(xi)SEQ ID NO:93;和(xii)SEQ ID NO:97。

33.如权利要求20-32中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一可变重结构域位于所述第一可变轻结构域的N末端,并且所述伪可变轻结构域位于所述伪可变重结构域的N末端。

34.如权利要求20-32中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一可变重结构域位于所述第一可变轻结构域的N末端,并且所述伪可变重结构域位于所述伪可变轻结构域的N末端。

35.如权利要求20-32中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一可变轻结构域位于所述第一可变重结构域的N末端,并且所述伪可变轻结构域位于所述伪可变重结构域的N末端。

36.如权利要求20-32中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一可变轻结构域位于所述第一可变重结构域的N末端,并且所述伪可变重结构域位于所述伪可变轻结构域的N末端。

37.如权利要求20-36中任一项所述的融合蛋白,其中与HSA结合的所述第三sdABD具有包含以下的氨基酸序列:(a)CDR组,其选自由以下组成的组:(i)SEQ ID NO:246的sdCDR1、SEQ ID NO:247的sdCDR2和SEQ ID NO:248的sdCDR3;和(ii)SEQ ID NO:250的sdCDR1、SEQ ID NO:251的sdCDR2和SEQ ID NO:252的sdCDR3;或(b)选自由SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:249组成的组的氨基酸序列。

38.如权利要求20-37中任一项所述的融合蛋白,其中所述可切割接头包含选自由SEQ ID NO:339-408和532-535组成的组的切割结构域序列。

39.如权利要求20-38中任一项所述的融合蛋白,其中所述可切割接头被选自由以下组成的组的人蛋白酶切割:MMP2、MMP9、甲基多巴A、甲基多巴B、组织蛋白酶S、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、颗粒酶B、uPA、kallekriein7、蛋白裂解酶和凝血酶。

40.如权利要求20-39中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:453、SEQ ID NO:454、SEQ ID NO:455、SEQ ID NO:456、SEQ ID NO:457和SEQ ID NO:458。

41.一种核酸,其编码如权利要求20-40中任一项所述的融合蛋白。

42.一种表达载体,其包含如权利要求41所述的核酸。

43.一种宿主细胞,其包含如权利要求42所述的表达载体。

44.一种制备融合蛋白的方法,其包括:(a)在表达所述融合蛋白的条件下培养如权利

要求43所述的宿主细胞，和(b)回收所述融合蛋白。

45.一种单结构域抗原结合结构域，其结合人LyPD3(sdABD-LyPD3)，包含(i)选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:129、SEQ ID NO:133和SEQ ID NO:137或(ii)氨基酸序列，其包含选自由以下组成的组的一组CDR:(a)SEQ ID NO:118的sdCDR1、SEQ ID NO:119的sdCDR2和SEQ ID NO:120的sdCDR3;(b)SEQ ID NO:122的sdCDR1、SEQ ID NO:123的sdCDR2和SEQ ID NO:124的sdCDR3;(c)SEQ ID NO:126的sdCDR1、SEQ ID NO:127的sdCDR2和SEQ ID NO:128的sdCDR3;(d)SEQ ID NO:130的sdCDR1、SEQ ID NO:131的sdCDR2和SEQ ID NO:132的sdCDR3;(e)SEQ ID NO:134的sdCDR1、SEQ ID NO:135的sdCDR2和SEQ ID NO:136的sdCDR3;和(f)SEQ ID NO:138的sdCDR1、SEQ ID NO:139的sdCDR2和SEQ ID NO:140的sdCDR3。

46.一种核酸，其编码如权利要求19或45所述的单结构域抗原结合结构域(sdABD)。

47.一种表达载体，其包含如权利要求46所述的核酸。

48.一种宿主细胞，其包含如权利要求47所述的表达载体。

49.一种制备单结构域抗原结合结构域(sdABD)的方法，其包括:(a)在表达所述sdABD的条件下培养如权利要求48所述的宿主细胞;和(b)回收所述sdABD。

50.一种药物组合物，其包含如权利要求1-13和20-40中任一项所述的融合蛋白或如权利要求19或45所述的单结构域抗原结合结构域(sdABD)。

51.如权利要求50所述的药物组合物，其还包含药学上可接受的载体或赋形剂。

52.一种治疗受试者的癌症的方法，其包括施用如权利要求1-13和20-40中任一项所述的融合蛋白、如权利要求19或45所述的单结构域抗原结合结构域(sdABD)或如权利要求50或51所述的药物组合物。

受限的条件激活的结合蛋白

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年8月17日提交的美国临时申请号63/066,565的优先权,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,所述序列表已经以ASCII格式以电子方式提交并且特此通过引用整体并入。所述ASCII副本创建于2021年8月13日,名称为118459-5014-WO_SL.txt并且大小为1,341,889字节。

背景技术

[0005] 在多种临床环境中通常期望对单个细胞或特定细胞类型进行选择性破坏。例如,癌症疗法的主要目的是特异性地破坏肿瘤细胞,同时使健康细胞和组织尽可能完整和无损伤。一种这样的方法是通过诱导针对肿瘤的免疫应答,使免疫效应细胞(诸如天然杀伤(NK)细胞或细胞毒性T淋巴细胞(CTL))攻击并破坏肿瘤细胞。

[0006] 为肿瘤相关抗原提供优异的结合特异性和亲和力的完整的单克隆抗体(mAb)的使用已经成功地应用于癌症治疗和诊断领域。然而,完整mAb的大尺寸、它们的较差生物分布、低功效以及在血液池中的持久存在限制了它们的临床应用。例如,完整抗体可以在肿瘤区域内表现出特异性累积。在生物分布研究中,当精确检查肿瘤时,注意到抗体分布不均匀,主要累积在外周区域中。由于肿瘤坏死,不均匀的抗原分布和增加的间质组织压力,不可能以完整抗体构建体到达肿瘤的中心部分。相比之下,较小的抗体片段显示出快速的肿瘤定位,更深地渗透到肿瘤中,并且也相对快速地从血流中去除。然而,许多抗体,包括scFv和其他构建体,显示出“中靶(on target)/脱肿瘤(off tumor)”效应,其中分子在非肿瘤细胞上具有活性,从而引起副作用,其中一些可能是有毒的。本发明涉及在肿瘤蛋白酶的存在下被选择性激活的新型构建体。

发明内容

[0007] 在一个方面,提供了一种融合蛋白,其从N末端至C末端包含:(a)结合HER2的第一sdABD(sdABD-HER2);(b)第一结构域接头;(c)受限Fv结构域,其包含:(i)包含vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3的第一可变重结构域;(ii)受限的不可切割接头(CNCL);和(iii)包含vlCDR1、vlCDR2和vlCDR3的第一可变轻结构域;(d)第二结构域接头;(e)第二sdABD-HER2;(f)可切割接头(CL);(g)受限的伪Fv结构域,其包含:(i)第一伪可变轻结构域;(ii)不可切割接头(NCL);和(iii)第一伪可变重结构域;(h)第三结构域接头;和(i)与人血清白蛋白结合的第三sdABD(sdABD-HSA);其中受限Fv结构域的第一可变重结构域和第一可变轻结构域能够结合人CD3,但受限的伪Fv结构域不结合CD3;第一可变重结构域和第一伪可变轻结构域分子内缔合形成无活性的Fv;并且第一可变轻结构域和第一伪可变重结构域分子内缔合形成无活性的Fv。

[0008] 在一些实施方案中,第一和/或第二sdABD-HER2具有氨基酸序列,所述氨基酸序列

包含选自由以下组成的组的一组CDR:(a)SEQ ID NO:194的sdCDR1、SEQ ID NO:195的sdCDR2和SEQ ID NO:196的sdCDR3;(b)SEQ ID NO:218的sdCDR1、SEQ ID NO:219的sdCDR2和SEQ ID NO:220的sdCDR3;(c)SEQ ID NO:226的sdCDR1、SEQ ID NO:227的sdCDR2和SEQ ID NO:228的sdCDR3;(d)SEQ ID NO:238的sdCDR1、SEQ ID NO:239的sdCDR2和SEQ ID NO:240的sdCDR3;(e)SEQ ID NO:142的sdCDR1、SEQ ID NO:143的sdCDR2和SEQ ID NO:144的sdCDR3;(f)SEQ ID NO:146的sdCDR1、SEQ ID NO:147的sdCDR2和SEQ ID NO:148的sdCDR3;(g)SEQ ID NO:150的sdCDR1、SEQ ID NO:151的sdCDR2和SEQ ID NO:152的sdCDR3;(h)SEQ ID NO:154的sdCDR1、SEQ ID NO:155的sdCDR2、和SEQ ID NO:156的sdCDR3;(i)SEQ ID NO:158的sdCDR1、SEQ ID NO:159的sdCDR2、和SEQ ID NO:160的sdCDR3;(j)SEQ ID NO:162的sdCDR1、SEQ ID NO:163的sdCDR2、和SEQ ID NO:164的sdCDR3;(k)SEQ ID NO:166的sdCDR1、SE ID NO:167的sdCDR2、和SEQ ID NO:168的sdCDR3;(l)SEQ ID NO:170的sdCDR1、SEQ ID NO:171的sdCDR2、和SEQ ID NO:172的sdCDR3;(m)SEQ ID NO:174的sdCDR1、SEQ ID NO:175的sdCDR2、和SEQ ID NO:176的sdCDR3;(n)SEQ ID NO:178的sdCDR1、SEQ ID NO:179的sdCDR2、和SEQ ID NO:180的sdCDR3;(o)SEQ ID NO:182的sdCDR1、SEQ ID NO:183的sdCDR2、和SEQ ID NO:184的sdCDR3;(p)SEQ ID NO:186的sdCDR1、SEQ ID NO:187的sdCDR2、和SEQ ID NO:188的sdCDR3;(q)SEQ ID NO:190的sdCDR1、SEQ ID NO:191的sdCDR2、和SEQ ID NO:192的sdCDR3;(r)SEQ ID NO:194的sdCDR1、SEQ ID NO:195的sdCDR2、和SEQ ID NO:196的sdCDR3;(s)SEQ ID NO:198的sdCDR1、SEQ ID NO:199的sdCDR2、和SEQ ID NO:200的sdCDR3;(t)SEQ ID NO:202的sdCDR1、SEQ ID NO:203的sdCDR2、和SEQ ID NO:204的sdCDR3;(u)SEQ ID NO:206的sdCDR1、SEQ ID NO:207的sdCDR2、和SEQ ID NO:203的sdCDR3;(v)SEQ ID NO:210的sdCDR1、SEQ ID NO:211的sdCDR2、和SEQ ID NO:212的sdCDR3;(w)SEQ ID NO:214的sdCDR1、SEQ ID NO:215的sdCDR2、和SEQ ID NO:216的sdCDR3;(x)SEQ ID NO:218的sdCDR1、SEQ ID NO:219的sdCDR2、和SEQ ID NO:220的sdCDR3;(y)SEQ ID NO:222的sdCDR1、SEQ ID NO:223的sdCDR2、和SEQ ID NO:224的sdCDR3;(z)SEQ ID NO:226的sdCDR1、SEQ ID NO:227的sdCDR2、和SEQ ID NO:228的sdCDR3;(aa)SEQ ID NO:230的sdCDR1、SEQ ID NO:231的sdCDR2、和SEQ ID NO:232的sdCDR3;(ab)SEQ ID NO:234的sdCDR1、SEQ ID NO:235的sdCDR2、和SEQ ID NO:236的sdCDR3;(ac)SEQ ID NO:238的sdCDR1、SEQ ID NO:239的sdCDR2、和SEQ ID NO:240的sdCDR3;(ad)SEQ ID NO:242的sdCDR1、SEQ ID NO:243的sdCDR2、和具有SEQ ID NO:244的sdCDR3;和(ae)SEQ ID NO:500的sdCDR1、SEQ ID NO:501的sdCDR2、和具有SEQ ID NO:502的sdCDR3;(af)SEQ ID NO:504的sdCDR1、SEQ ID NO:505的sdCDR2、和具有SEQ ID NO:506的sdCDR3;(ag)SEQ ID NO:508的sdCDR1、SEQ ID NO:509的sdCDR2、和具有SEQ ID NO:510的sdCDR3;和(ah)SEQ ID NO:512的sdCDR1、SEQ ID NO:513的sdCDR2、和具有SEQ ID NO:5的sdCDR3。

[0009] 在一些实施方案中,第一和/或第二sdABD-HER2包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:193、SEQ ID NO:217、SEQ ID NO:225、SEQ ID NO:237、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:153、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:161、SEQ ID NO:165、SEQ ID NO:169、SEQ ID NO:173、SEQ ID NO:177、SEQ ID NO:181、SEQ ID NO:185、SEQ ID NO:189、SEQ ID NO:197、SEQ ID NO:201、SEQ ID NO:205、SEQ ID NO:209、SEQ ID

NO:213、SEQ ID NO:221、SEQ ID NO:229、SEQ ID NO:233、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:499、SEQ ID NO:503、SEQ ID NO:507和SEQ ID NO:511。

[0010] 在一些实施方案中,第一sdABD-HER2和第二sdABD-HER2相同。

[0011] 在一些实施方案中,第一sdABD-HER2和第二sdABD-HER2不同。

[0012] 在一些实施方案中,第一可变重结构域位于第一可变轻结构域的N末端,并且伪可变轻结构域位于伪可变重结构域的N末端。

[0013] 在一些实施方案中,第一可变重结构域位于第一可变轻结构域的N末端,并且伪可变重结构域位于伪可变轻结构域的N末端。

[0014] 在一些实施方案中,第一可变轻结构域位于第一可变重结构域的N末端,并且伪可变轻结构域位于伪可变重结构域的N末端。

[0015] 在一些实施方案中,第一可变轻结构域位于第一可变重结构域的N末端,并且伪可变重结构域位于伪可变轻结构域的N末端。

[0016] 在一些实施方案中,与HSA结合的第三sdABD(sdABD-HSA)具有包含以下的氨基酸序列:(a)一组CDR,其选自由以下组成的组:(i)SEQ ID NO:246的sdCDR1、SEQ ID NO:247的sdCDR2和SEQ ID NO:248的sdCDR3;和(ii)SEQ ID NO:250的sdCDR1、SEQ ID NO:251的sdCDR2和SEQ ID NO:252的sdCDR3;或(b)选自由SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:249组成的组的氨基酸序列。

[0017] 在一些实施方案中,可切割接头包含选自由SEQ ID NO:339-408和532-535组成的组的切割结构域序列。

[0018] 在一些实施方案中,可切割接头被选自由以下组成的组的人蛋白酶切割:MMP2、MMP9、甲基多巴A(meprin A)、甲基多巴B、组织蛋白酶S、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、颗粒酶B、uPA、kallekriein7、蛋白裂解酶(matriptase)和凝血酶。

[0019] 在一些实施方案中,融合蛋白具有选自由SEQ ID NO:459-484和491-494组成的组的氨基酸序列。

[0020] 本文提供了编码所述融合蛋白中任一种的核酸。

[0021] 本文提供了包含所述核酸中的任一种的表达载体。

[0022] 本文提供了包含所述表达载体中的任一种的宿主细胞。

[0023] 在一些方面,提供了一种制备本公开的融合蛋白的方法,其包括:(i)在表达融合蛋白的条件下培养所述宿主细胞,和(ii)回收融合蛋白。

[0024] 在一些方面,提供了一种治疗受试者的癌症的方法,其包括向受试者施用所述融合蛋白中的任一种。

[0025] 在一些方面,提供了单结构域抗原结合结构域(sdABD),其结合人HER2(sdABD-HER2),包含:(i)选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:153、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:161、SEQ ID NO:165、SEQ ID NO:169、SEQ ID NO:173、SEQ ID NO:177、SEQ ID NO:181、SEQ ID NO:185、SEQ ID NO:189、SEQ ID NO:193、SEQ ID NO:197、SEQ ID NO:201、SEQ ID NO:205、SEQ ID NO:209、SEQ ID NO:213、SEQ ID NO:217、SEQ ID NO:221、SEQ ID NO:225、SEQ ID NO:229、SEQ ID NO:233、SEQ ID NO:237、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:499、SEQ ID NO:503、SEQ ID NO:507和SEQ ID NO:511;或(ii)包含选自由以下组成的组的一组CDR的氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:194的

sdCDR1、SEQ ID NO:195的sdCDR2和SEQ ID NO:196的sdCDR3;(b)SEQ ID NO:218的sdCDR1、SEQ ID NO:219的sdCDR2和SEQ ID NO:220的sdCDR3;(c)SEQ ID NO:226的sdCDR1、SEQ ID NO:227的sdCDR2和SEQ ID NO:228的sdCDR3;(d)SEQ ID NO:238的sdCDR1、SEQ ID NO:239的sdCDR2和SEQ ID NO:240的sdCDR3;(e)SEQ ID NO:142的sdCDR1、SEQ ID NO:143的sdCDR2和SEQ ID NO:144的sdCDR3;(f)SEQ ID NO:146的sdCDR1、SEQ ID NO:147的sdCDR2和SEQ ID NO:148的sdCDR3;(g)SEQ ID NO:150的sdCDR1、SEQ ID NO:151的sdCDR2和SEQ ID NO:152的sdCDR3;(h)SEQ ID NO:154的sdCDR1、SEQ ID NO:155的sdCDR2、和SEQ ID NO:156的sdCDR3;(i)SEQ ID NO:158的sdCDR1、SEQ ID NO:159的sdCDR2、和SEQ ID NO:160的sdCDR3;(j)SEQ ID NO:162的sdCDR1、SEQ ID NO:163的sdCDR2、和SEQ ID NO:164的sdCDR3;(k)SEQ ID NO:166的sdCDR1、SEQ ID NO:167的sdCDR2、和SEQ ID NO:168的sdCDR3;(l)SEQ ID NO:170的sdCDR1、SEQ ID NO:171的sdCDR2、和SEQ ID NO:172的sdCDR3;(m)SEQ ID NO:174的sdCDR1、SEQ ID NO:175的sdCDR2、和SEQ ID NO:176的sdCDR3;(n)SEQ ID NO:178的sdCDR1、SEQ ID NO:179的sdCDR2、和SEQ ID NO:180的sdCDR3;(o)SEQ ID NO:182的sdCDR1、SEQ ID NO:183的sdCDR2、和SEQ ID NO:184的sdCDR3;(p)SEQ ID NO:186的sdCDR1、SEQ ID NO:187的sdCDR2、和SEQ ID NO:188的sdCDR3;(q)SEQ ID NO:190的sdCDR1、SEQ ID NO:191的sdCDR2、和SEQ ID NO:192的sdCDR3;(r)SEQ ID NO:194的sdCDR1、SEQ ID NO:195的sdCDR2、和SEQ ID NO:196的sdCDR3;(s)SEQ ID NO:198的sdCDR1、SEQ ID NO:199的sdCDR2、和SEQ ID NO:200的sdCDR3;(t)SEQ ID NO:202的sdCDR1、SEQ ID NO:203的sdCDR2、和SEQ ID NO:204的sdCDR3;(u)SEQ ID NO:206的sdCDR1、SEQ ID NO:207的sdCDR2、和SEQ ID NO:203的sdCDR3;(v)SEQ ID NO:210的sdCDR1、SEQ ID NO:211的sdCDR2、和SEQ ID NO:212的sdCDR3;(w)SEQ ID NO:214的sdCDR1、SEQ ID NO:215的sdCDR2、和SEQ ID NO:216的sdCDR3;(x)SEQ ID NO:218的sdCDR1、SEQ ID NO:219的sdCDR2、和SEQ ID NO:220的sdCDR3;(y)SEQ ID NO:222的sdCDR1、SEQ ID NO:223的sdCDR2、和SEQ ID NO:224的sdCDR3;(z)SEQ ID NO:226的sdCDR1、SEQ ID NO:227的sdCDR2、和SEQ ID NO:228的sdCDR3;(aa)SEQ ID NO:230的sdCDR1、SEQ ID NO:231的sdCDR2、和SEQ ID NO:232的sdCDR3;(ab)SEQ ID NO:234的sdCDR1、SEQ ID NO:235的sdCDR2、和SEQ ID NO:236的sdCDR3;(ac)SEQ ID NO:238的sdCDR1、SEQ ID NO:239的sdCDR2、和SEQ ID NO:240的sdCDR3;(ad)SEQ ID NO:242的sdCDR1、SEQ ID NO:243的sdCDR2、和具有SEQ ID NO:244的sdCDR3;(ae)SEQ ID NO:500的sdCDR1、SEQ ID NO:501的sdCDR2、和具有SEQ ID NO:502的sdCDR3;(af)SEQ ID NO:504的sdCDR1、SEQ ID NO:505的sdCDR2、和具有SEQ ID NO:506的sdCDR3;(ag)SEQ ID NO:508的sdCDR1、SEQ ID NO:509的sdCDR2、和具有SEQ ID NO:510的sdCDR3;和(ah)SEQ ID NO:512的sdCDR1、SEQ ID NO:513的sdCDR2、和具有SEQ ID NO:514的sdCDR3。

[0026] 在一些方面,提供了一种融合蛋白,其从N末端至C末端包含:(a)结合肿瘤靶抗原的第一sdABD(sdABD-TTA);(b)第一结构域接头;(c)受限Fv结构域,其包含:(i)包含vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3的第一可变重结构域;(ii)受限的不可切割接头(CNCL);和(iii)包含vlCDR1、vlCDR2和vlCDR3的第一可变轻结构域;(d)第二结构域接头;(e)第二sdABD-TTA;(f)可切割接头(CL);(g)受限的伪Fv结构域,其包含:(i)第一伪可变轻结构域;(ii)不

可切割接头(NCL);和(iii)第一伪可变重结构域;(h)第三结构域接头;和(i)与人血清白蛋白结合的第三sdABD(sdABD-HSA);其中受限Fv结构域的第一可变重结构域和第一可变轻结构域能够结合人CD3,但受限的伪Fv结构域不结合CD3;第一可变重结构域和第一伪可变轻结构域分子内缔合形成无活性的Fv;第一可变轻结构域和第一伪可变重结构域分子内缔合形成无活性的Fv并且其中要么(1)第一sdABD-TTA是sdABD-HER2或sdABD-LyPD3,并且第二sdABD-TTA选自由以下组成的组:sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2;要么(2)第一sdABD-TTA选自由以下组成的组:sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2,并且第二sdABD-TTA是sdABD-HER2或sdABD-LyPD3。

[0027] 在一些实施方案中,第一和第二sdABD-TTA各自是sdABD-LyPD3。在一些实施方案中,第一和第二sdABD-LPYD3相同。在一些实施方案中,第一和第二sdABD-LPYD3不同。

[0028] 在融合蛋白的一些实施方案中,(a)第一sdABD-TTA是sdABD-HER2并且第二sdABD-TTA选自由以下组成的组:sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2;(b)第一sdABD-TTA是sdABD-LyPD3,并且第二sdABD-TTA选自由以下组成的组:sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2和sdABD-Trop2;(c)第一sdABD-TTA选自由以下组成的组:sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2,并且第二TTA是sdABD-HER2;或(d)第一sdABD-TTA选自由以下组成的组:sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2,并且第二TTA是sdABD-LyPD3。

[0029] 在一些实施方案中,sdABD-HER2包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:(a)一组CDR,其包含SEQ ID NO:194的sdCDR1、SEQ ID NO:195的sdCDR2和SEQ ID NO:196的sdCDR3;(b)一组CDR,其包含SEQ ID NO:218的sdCDR1、SEQ ID NO:219的sdCDR2和SEQ ID NO:220的sdCDR3;(c)一组CDR,其包含SEQ ID NO:226的sdCDR1、SEQ ID NO:227的sdCDR2和SEQ ID NO:228的sdCDR3;(d)一组CDR,其包含SEQ ID NO:238的sdCDR1、SEQ ID NO:239的sdCDR2和SEQ ID NO:240的sdCDR3;(e)一组CDR,其包含SEQ ID NO:142的sdCDR1、SEQ ID NO:143的sdCDR2和SEQ ID NO:144的sdCDR3;(f)一组CDR,其包含SEQ ID NO:146的sdCDR1、SEQ ID NO:147的sdCDR2和SEQ ID NO:148的sdCDR3;(g)一组CDR,其包含SEQ ID NO:150的sdCDR1、SEQ ID NO:151的sdCDR2和SEQ ID NO:152的sdCDR3;(h)一组CDR,其包含SEQ ID NO:154的sdCDR1、SEQ ID NO:155的sdCDR2、和SEQ ID NO:156的sdCDR3;(i)一组CDR,其包含SEQ ID NO:158的sdCDR1、SEQ ID NO:159的sdCDR2、和SEQ ID NO:160的sdCDR3;(j)一组CDR,其包含SEQ ID NO:162的sdCDR1、SEQ ID NO:163的sdCDR2、和SEQ ID NO:164的sdCDR3;(k)一组CDR,其包含SEQ ID NO:166的sdCDR1、SEQ ID NO:167的sdCDR2、和SEQ ID NO:168的sdCDR3;(l)一组CDR,其包含SEQ ID NO:170的sdCDR1、SEQ ID NO:171的sdCDR2、和SEQ ID NO:172的sdCDR3;(m)一组CDR,其包含SEQ ID NO:174的sdCDR1、SEQ ID NO:175的sdCDR2、和SEQ ID NO:176的sdCDR3;(n)一组CDR,其包含SEQ ID NO:178的sdCDR1、SEQ ID NO:179的sdCDR2、和SEQ ID NO:180的sdCDR3;(o)一组CDR,其包含SEQ ID NO:182的sdCDR1、SEQ ID NO:183的sdCDR2、和SEQ ID NO:184的sdCDR3;(p)一组CDR,其包含SEQ ID NO:186的sdCDR1、SEQ ID NO:187的sdCDR2、和SEQ ID NO:188的sdCDR3;(q)一组CDR,其包含SEQ ID

NO:190的sdCDR1、SEQ ID NO:191的sdCDR2、和SEQ ID NO:192的sdCDR3;(r)一组CDR,其包含SEQ ID NO:194的sdCDR1、SEQ ID NO:195的sdCDR2、和SEQ ID NO:196的sdCDR3;(s)一组CDR,其包含SEQ ID NO:198的sdCDR1、SEQ ID NO:199的sdCDR2、和SEQ ID NO:200的sdCDR3;(t)一组CDR,其包含SEQ ID NO:202的sdCDR1、SEQ ID NO:203的sdCDR2、和SEQ ID NO:204的sdCDR3;(u)一组CDR,其包含SEQ ID NO:206的sdCDR1、SEQ ID NO:207的sdCDR2、和SEQ ID NO:203的sdCDR3;(v)一组CDR,其包含SEQ ID NO:210的sdCDR1、SEQ ID NO:211的sdCDR2、和SEQ ID NO:212的sdCDR3;(w)一组CDR,其包含SEQ ID NO:214的sdCDR1、SEQ ID NO:215的sdCDR2、和SEQ ID NO:216的sdCDR3;(x)一组CDR,其包含SEQ ID NO:218的sdCDR1、SEQ ID NO:219的sdCDR2、和SEQ ID NO:220的sdCDR3;(y)一组CDR,其包含SEQ ID NO:222的sdCDR1、SEQ ID NO:223的sdCDR2、和SEQ ID NO:224的sdCDR3;(z)一组CDR,其包含SEQ ID NO:226的sdCDR1、SEQ ID NO:227的sdCDR2、和SEQ ID NO:228的sdCDR3;(aa)一组CDR,其包含SEQ ID NO:230的sdCDR1、SEQ ID NO:231的sdCDR2、和SEQ ID NO:232的sdCDR3;(ab)一组CDR,其包含SEQ ID NO:234的sdCDR1、SEQ ID NO:235的sdCDR2、和SEQ ID NO:236的sdCDR3;(ac)一组CDR,其包含SEQ ID NO:238的sdCDR1、SEQ ID NO:239的sdCDR2、和SEQ ID NO:240的sdCDR3;和(ad)一组CDR,其包含SEQ ID NO:242的sdCDR1、SEQ ID NO:243的sdCDR2和具有SEQ ID NO:244的sdCDR3;(ae)SEQ ID NO:141;(af)SEQ ID NO:145;(ag)SEQ ID NO:149;(ah)SEQ ID NO:153;(ai)SEQ ID NO:157;(aj)SEQ ID NO:161;(ak)SEQ ID NO:165;(al)SEQ ID NO:169;(am)SEQ ID NO:173;(an)SEQ ID NO:177;(ao)SEQ ID NO:181;(ap)SEQ ID NO:185;(aq)SEQ ID NO:189;(ar)SEQ ID NO:193;(as)SEQ ID NO:197;(at)SEQ ID NO:201;(au)SEQ ID NO:205;(av)SEQ ID NO:209;(aw)SEQ ID NO:213;(ax)SEQ ID NO:217;(ay)SEQ ID NO:221;(az)SEQ ID NO:225;(ba)SEQ ID NO:229;(bb)SEQ ID NO:233;(bc)SEQ ID NO:237;和(bd)SEQ ID NO:241。

[0030] 如权利要求20-25中任一项所述的融合蛋白,其中所述sdABD-LyPD3包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:(a)一组CDR,其包含SEQ ID NO:118的sdCDR1、SEQ ID NO:119的sdCDR2和SEQ ID NO:120的sdCDR3;(b)一组CDR,其包含SEQ ID NO:122的sdCDR1、SEQ ID NO:123的sdCDR2和SEQ ID NO:124的sdCDR3;(c)一组CDR,其包含SEQ ID NO:126的sdCDR1、SEQ ID NO:127的sdCDR2和SEQ ID NO:128的sdCDR3;(d)一组CDR,其包含SEQ ID NO:130的sdCDR1、SEQ ID NO:131的sdCDR2和SEQ ID NO:132的sdCDR3;(e)一组CDR,其包含SEQ ID NO:134的sdCDR1、SEQ ID NO:135的sdCDR2和SEQ ID NO:136的sdCDR3;(f)一组CDR,其包含SEQ ID NO:138的sdCDR1、SEQ ID NO:139的sdCDR2和SEQ ID NO:140的sdCDR3;(g)SEQ ID NO:117;(h)SEQ ID NO:121;(i)SEQ ID NO:125;(j)SEQ ID NO:129;(k)SEQ ID NO:133;和(l)SEQ ID NO:137。

[0031] 在一些实施方案中,sdABD-B7H3包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:(i)一组CDR,其包含SEQ ID NO:34的sdCDR1、SEQ ID NO:35的sdCDR2和SEQ ID NO:36的sdCDR3;(ii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:38的sdCDR1、SEQ ID NO:39的sdCDR2和SEQ ID NO:40的sdCDR3;(iii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:42的sdCDR1、SEQ ID NO:43的sdCDR2和SEQ ID NO:44的sdCDR3;(iv)一组CDR,其包含SEQ ID NO:46的sdCDR1、SEQ ID NO:47的sdCDR2和SEQ ID NO:48的sdCDR3;(v)一组CDR,其包含SEQ ID NO:50的sdCDR1、SEQ ID NO:51的sdCDR2和SEQ ID NO:52的sdCDR3;(vi)一组CDR,其包含SEQ ID NO:54的sdCDR1、SEQ ID

NO:55的sdCDR2和SEQ ID NO:56的sdCDR3;(vii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:58的sdCDR1、SEQ ID NO:59的sdCDR2和SEQ ID NO:60的sdCDR3;(ix)SEQ ID NO:33;(x)SEQ ID NO:37;(xi)SEQ ID NO:41;(xii)SEQ ID NO:45;(xiii)SEQ ID NO:49;(xiv)SEQ ID NO:53;和(xv)SEQ ID NO:57。

[0032] 在一些实施方案中,sdABD-CA9包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:(i)一组CDR,其包含SEQ ID NO:102的sdCDR1、SEQ ID NO:103的sdCDR2和SEQ ID NO:104的sdCDR3;(ii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:106的sdCDR1、SEQ ID NO:107的sdCDR2和SEQ ID NO:108的sdCDR3;(iii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:110的sdCDR1、SEQ ID NO:111的sdCDR2和SEQ ID NO:112的sdCDR3;(iv)一组CDR,其包含SEQ ID NO:114的sdCDR1、SEQ ID NO:115的sdCDR2和SEQ ID NO:116的sdCDR3;(v)SEQ ID NO:101;(vi)SEQ ID NO:105;(vii)SEQ ID NO:109;和(viiii)SEQ ID NO:113。

[0033] 在一些实施方案中,sdABD-EGFR包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:(i)一组CDR,其包含SEQ ID NO:2的sdCDR1、SEQ ID NO:3的sdCDR2和SEQ ID NO:4的sdCDR3;(ii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:6的sdCDR1、SEQ ID NO:7的sdCDR2和SEQ ID NO:8的sdCDR3;(iii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:10的sdCDR1、SEQ ID NO:11的sdCDR2和SEQ ID NO:12的sdCDR3;(iv)一组CDR,其包含SEQ ID NO:14的sdCDR1、SEQ ID NO:15的sdCDR2和SEQ ID NO:16的sdCDR3;(v)一组CDR,其包含SEQ ID NO:18的sdCDR1、SEQ ID NO:19的sdCDR2和SEQ ID NO:20的sdCDR3;(vi)SEQ ID NO:1;(vii)SEQ ID NO:5;(viii)SEQ ID NO:9;(ix)SEQ ID NO:13;和(x)SEQ ID NO:17。

[0034] 在一些实施方案中,sdABD-EpCAM包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:(i)一组CDR,其包含SEQ ID NO:62的sdCDR1、SEQ ID NO:63的sdCDR2和SEQ ID NO:64的sdCDR3;(ii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:66的sdCDR1、SEQ ID NO:67的sdCDR2和SEQ ID NO:68的sdCDR3;(iii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:70的sdCDR1、SEQ ID NO:71的sdCDR2和SEQ ID NO:72的sdCDR3;(iv)一组CDR,其包含SEQ ID NO:74的sdCDR1、SEQ ID NO:75的sdCDR2和SEQ ID NO:76的sdCDR3;(v)一组CDR,其包含SEQ ID NO:496的sdCDR1、SEQ ID NO:497的sdCDR2和SEQ ID NO:498的sdCDR3;(vi)SEQ ID NO:61;(vii)SEQ ID NO:65;(viii)SEQ ID NO:69;(ix)SEQ ID NO:73;和(x)SEQ ID NO:495。

[0035] 在一些实施方案中,sdABD-FOLR1包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:(i)一组CDR,其包含SEQ ID NO:22的sdCDR1、SEQ ID NO:23的sdCDR2和SEQ ID NO:24的sdCDR3;(ii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:26的sdCDR1、SEQ ID NO:27的sdCDR2和SEQ ID NO:28的sdCDR3;(iii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:30的sdCDR1、SEQ ID NO:31的sdCDR2和SEQ ID NO:32的sdCDR3;(iv)SEQ ID NO:21;(v)SEQ ID NO:25;和(vi)SEQ ID NO:29。

[0036] 在一些实施方案中,sdABD-Trop2包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:(i)一组CDR,其包含SEQ ID NO:78的sdCDR1、SEQ ID NO:79的sdCDR2和SEQ ID NO:80的sdCDR3;(ii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:82的sdCDR1、SEQ ID NO:83的sdCDR2和SEQ ID NO:84的sdCDR3;(iii)一组CDR,其包含SEQ ID NO:86的sdCDR1、SEQ ID NO:87的sdCDR2和SEQ ID NO:88的sdCDR3;(iv)一组CDR,其包含SEQ ID NO:90的sdCDR1、SEQ ID NO:91的sdCDR2和SEQ ID NO:92的sdCDR3;(v)一组CDR,其包含SEQ ID NO:94的sdCDR1、SEQ ID NO:95的sdCDR2和SEQ ID NO:96的sdCDR3;(vi)一组CDR,其包含SEQ ID NO:98的sdCDR1、SEQ ID

NO:99的sdCDR2和SEQ ID NO:100的sdCDR3;(vii)SEQ ID NO:77;(viii)SEQ ID NO:81;(ix)SEQ ID NO:85;(x)SEQ ID NO:89;(xi)SEQ ID NO:93;和(xii)SEQ ID NO:97。

[0037] 在一些实施方案中,第一可变重结构域位于第一可变轻结构域的N末端,并且伪可变轻结构域位于伪可变重结构域的N末端。

[0038] 在一些实施方案中,第一可变重结构域位于第一可变轻结构域的N末端,并且伪可变重结构域位于伪可变轻结构域的N末端。

[0039] 在一些实施方案中,第一可变轻结构域位于第一可变重结构域的N末端,并且伪可变轻结构域位于伪可变重结构域的N末端。

[0040] 在一些实施方案中,第一可变轻结构域位于第一可变重结构域的N末端,并且伪可变重结构域位于伪可变轻结构域的N末端。

[0041] 在一些实施方案中,与HSA结合的第三sdABD具有包含以下的氨基酸序列:(a)选自由以下组成的组的一组CDR:(i)SEQ ID NO:246的sdCDR1、SEQ ID NO:247的sdCDR2和SEQ ID NO:248的sdCDR3;和(ii)SEQ ID NO:250的sdCDR1、SEQ ID NO:251的sdCDR2和SEQ ID NO:252的sdCDR3;或(b)选自由SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:249组成的组的氨基酸序列。

[0042] 在一些实施方案中,可切割接头包含选自由SEQ ID NO:339-408和532-535组成的组的切割结构域序列。

[0043] 在一些实施方案中,可切割接头被选自由以下组成的组的人蛋白酶切割:MMP2、MMP9、甲基多巴A、甲基多巴B、组织蛋白酶S、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、颗粒酶B、uPA、kallekriein7、蛋白裂解酶和凝血酶。

[0044] 在一些实施方案中,融合蛋白包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:453、SEQ ID NO:454、SEQ ID NO:455、SEQ ID NO:456、SEQ ID NO:457和SEQ ID NO:458。

[0045] 本文提供了编码所述融合蛋白中任一种的核酸。本文提供了包含所述核酸中的任一种的表达载体。本文提供了包含所述表达载体中的任一种的宿主细胞。

[0046] 在一些方面,提供了一种制备本公开的融合蛋白的方法,其包括:(i)在表达融合蛋白的条件下培养所述宿主细胞,和(ii)回收融合蛋白。

[0047] 在一些方面,提供了与人LyPD3结合的单结构域抗原结合结构域(sdABD-LyPD3),其包含(i)选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:129、SEQ ID NO:133和SEQ ID NO:137或(ii)氨基酸序列,其包含选自由以下组成的组的一组CDR:(a)SEQ ID NO:118的sdCDR1、SEQ ID NO:119的sdCDR2和SEQ ID NO:120的sdCDR3;(b)SEQ ID NO:122的sdCDR1、SEQ ID NO:123的sdCDR2和SEQ ID NO:124的sdCDR3;(c)SEQ ID NO:126的sdCDR1、SEQ ID NO:127的sdCDR2和SEQ ID NO:128的sdCDR3;(d)SEQ ID NO:130的sdCDR1、SEQ ID NO:131的sdCDR2和SEQ ID NO:132的sdCDR3;(e)SEQ ID NO:134的sdCDR1、SEQ ID NO:135的sdCDR2和SEQ ID NO:136的sdCDR3;和(f)SEQ ID NO:138的sdCDR1、SEQ ID NO:139的sdCDR2和SEQ ID NO:140的sdCDR3。

[0048] 还提供了编码所述单结构域抗原结合结构域(sdABD)中的任一种的核酸。还提供了包含核酸中的任一种的表达载体。提供了包含所述表达载体中的任一种的宿主细胞。

[0049] 在一些方面,提供了制备单结构域抗原结合结构域(sdABD)的方法,其包括:(a)在表达sdABD的条件下培养本文所述的宿主细胞中的任一种,和(b)回收sdABD。

[0050] 还提供了一种药物组合物,其包含所述融合蛋白中的任一种或所述单结构域抗原结合结构域(sdABD)中的任一种。

[0051] 在一些实施方案中,药物组合物还包含药学上可接受的载体或赋形剂。

[0052] 在一些方面,提供了治疗受试者癌症的方法,其包括施用所述融合蛋白中的任一种、所述单结构域抗原结合结构域(sdABD)中的任一种或本公开的药物组合物中的任一种。

附图说明

[0053] 图1描绘了本发明的“形式1”类型的蛋白酶激活,其在本文中称为“受限、可切割的构建体”或“cc构建体”。在该实施方案中,代表性构建体包括用于两种TTA的ABD(如图1所描绘,这两者都是相同的,但如本文所述它们可以不同)。切割后,前药构建体分裂成三个组分,含有通过结构域接头连接至αCD3的活性VH的α-TTA结构域的一个组分,含有通过结构域接头连接至αCD3的活性VL的α-TTA结构域的第二个组分,以及包含与无活性VH和VL连接的半衰期延长结构域的“剩余”片段。然后两个活性可变结构域可以自由缔合形成功能性抗CD3结合结构域。应当注意,在“形式1”实施方案中,所得活性组分是三价的:存在与CD3的单价结合和与TTA的二价结合,使得形成双特异性结合蛋白,但在一些情况下,这种三价可能是三特异性的,具有与CD3的单价结合、与第一TTA的单价结合、以及与第二TTA的单价结合。图1还示出了作为半衰期延长结构域的抗人血清白蛋白(HSA)结构域,在许多实施方案中为如本文所定义的sdABD,但如本文所讨论,这是任选的且/或可以被其他半衰期延长结构域替换;此外,半衰期延长结构域也可以位于构建体的N末端或内部。图1还具有特定顺序的Fv的VH和VL以及伪Fv的iVH和iVL,例如从N末端至C末端,VH-接头-VL(和iVL-接头-iVH),但如本领域技术人员将理解的,这些可以颠倒(VL-接头-VH和iVH-接头-iVL)。或者,这些Fv中的一个可以在一个方向上,而另一个在另一个方向上,但如此处所示的方向上的蛋白质表达出人意料地高于其他方向。

[0054] 图2描绘了本发明的“形式2”类型的蛋白酶激活,其在本文中称为“受限、不可切割的构建体”或“CNCL构建体”,有时在本文中也称为如本文所讨论的“二聚化构建体”。这些构建体不如本文所讨论的那样异构化。切割后,两个前药构建体分裂成四个组分,连接至两个伪结构域(其可以能够或不可以能够自我缔合,这取决于接头长度和失活性突变)的两个半衰期延长结构域(在这个情况下为针对HSA的sdABD),以及自我组装成含有四个抗TTA结构域(其可以全部相同或两个相同并且另外两个不同)的二聚体活性部分的两个活性部分。应当注意,在“形式2”实施方案中,所得活性组分是六价的:存在与CD3的二价结合和与TTA的四价结合,使得形成双特异性结合蛋白,但在一些情况下,这种六价可能是三特异性的,具有与CD3的二价结合、与第一TTA的二价结合、以及与第二TTA的二价结合。图2还示出了作为半衰期延长结构域的抗人血清白蛋白(HSA)结构域,在许多实施方案中为如本文所定义的sdABD,但如本文所讨论,这是任选的且/或可以被其他半衰期延长结构域替换;此外,半衰期延长结构域也可以位于构建体的N末端或内部。图2还具有特定顺序的Fv的VH和VL以及伪Fv的iVH和iVL,例如从N末端至C末端,VH-接头-VL(和iVL-接头-iVH),但如本领域技术人员将理解的,这些可以颠倒(VL-接头-VH和iVH-接头-iVL)。或者,这些Fv中的一个可以在一个方向上,而另一个在另一个方向上,但如此处所示的方向上的蛋白质表达出人意料地高于其他方向。

[0055] 图3A-3B描绘了“形式3”类型的构建体，其有时也称为如本文所概述的“半构建体”或“半COBRA™”，因为它们是共同构成如本文进一步讨论的MCE治疗剂的两条不同多肽链。在该实施方案中，构建体成对递送，预切割分子内自我组装形成无活性的抗CD3 Fv结构域。切割后，释放惰性可变结构域，然后两个活性可变域分子间组装形成活性抗CD3结合结构域。两个sdABD-TTA与肿瘤细胞表面上的对应受体结合，并且通过蛋白酶完成切割。这允许分子间组装，因为分子物理固定在适当的位置，从而有利于活性抗CD3结构域的组装。如上文的形式1和2，在该实施方案中，可变结构域的N末端至C末端顺序可以颠倒，或者也可以混合。此外，sdABD(HSA)可以位于每个半构建体的N末端或C末端。Pro16在C末端具有sdABD(HSA)，而Pro17在N末端具有sdABD(HSA)。Pro19在C末端具有sdABD(HSA)。图3A示出了每个半构建体具有单个sdABD-TTA结构域的形式3构建体，而图3B示出了每个半构建体具有两个sdABD-TTA、采用“双重靶向”或“异源靶向”形式的形式3构建体。请注意，图3B使用FOLR1和EGFR作为两个TTA，但也可以使用如本文所概述的其他组合。

[0056] 图4描绘了与“形式2”构建体类似但只有单个sdABD-TTA的“形式4”类型的构建体。图片示出了针对EGFR的sdABD-TTA，但本领域技术人员将理解的，也可以使用其他TTA。切割后，前药构建体分裂成两个组分，连接至伪Fv的半衰期延长结构域(在这个情况下为针对HSA的sdABD)，以及活性部分，其在第二活性部分的存在下由不同的切割的分子自组装成含有两个抗TTA结构域的二聚体活性部分。应当注意，在“形式4”实施方案中，所得活性成分是四价的：存在与CD3的二价结合和与TTA的二价结合，使得形成双特异性结合蛋白。图4还示出了作为半衰期延长结构域的抗人血清白蛋白(HSA)结构域，在许多实施方案中为如本文所定义的sdABD(1/2)，但如本文所讨论，这是任选的且/或可以被其他半衰期延长结构域替换；此外，半衰期延长结构域也可以位于构建体的N末端或内部。图4还具有特定顺序的Fv的VH和VL以及伪Fv的iVH和iVL，例如从N末端至C末端，VH-接头-VL(和iVL-接头-iVH)，但如本领域技术人员将理解的，这些可以颠倒(VL-接头-VH和iVH-接头-iVL)。或者，这些Fv中的一个可以在一个方向上，而另一个在另一个方向上，但如此处所示的方向上的蛋白质表达出人意料地高于其他方向。

[0057] 图5A-5M描绘了本发明的多个单结构域肿瘤靶抗原结合结构域(sdTTA-ABD)序列，CDR加下划线。如本文更充分地概述，这些结构域可以在本发明中以多种构型组装，包括“形式1”、“形式2”、“形式3”和“形式4”方向。

[0058] 图6描绘了许多半衰期延长结构域。

[0059] 图7A和7B描绘了许多αCD3可变重结构域和可变轻结构域，包括活性(例如“V_L”或“V_H”，有时也称为“aVL”或“aVH”)和无活性(例如“V_{Li}”或“V_{Hi}”，有时也称为“iVL”或“iVH”)结构域。CDR加下划线。

[0060] 图8A-8D描绘了许多合适的蛋白酶切割位点。如本领域技术人员将理解的，这些切割位点可以用作可切割接头。在一些实施方案中，例如当需要更柔性的可切割接头时，在这些切割位点的N末端和C末端中的任一者或两者可以存在另外的氨基酸(通常是甘氨酸和丝氨酸)。

[0061] 图9A-9V示出了本发明的许多序列，但许多额外的序列也可见于序列表。CDR加下划线并加粗，接头加双下划线(可切割接头为斜体并且加双下划线)并且结构域分离用“/”表示。所有His6标签都是任选地，因为它们可以用于降低人类的免疫原性以及用作纯化标

签。

[0062] 图10A-10EE描绘了包含许多sdABD-B7H3和伪Fv结构域(例如,Vli2/Vhi2结构域)的示例性形式2构建体的氨基酸序列。

[0063] 图11说明了COBRA设计和预测的折叠机制,未切割分子的预测结构在顶部,其仍结合肿瘤抗原(EGFR,在MVC-101的情况下),CD3结合受损,并且结合人血清白蛋白。中间示出了预测的切割产物,并且左侧示出了活性二聚体。

[0064] 图12A-12Q描绘了本发明的一些COBRA的额外序列。

[0065] 图13显示,本发明的形式2构建体一旦被切割和二聚化,就迅速从注射的小鼠中清除。

[0066] 图14示出了Pro225的结合动力学。

[0067] 图15A-15B示出了形式2构建体,在这种情况下为Pro225,使小鼠中已形成的实体瘤消退。

[0068] 图16A-16B示出了本发明的形式2构建体,在这种情况下为Pro225,显示出相对于固有活性T细胞接合物的增加的耐受性。图16C和16D显示,与固有活性双特异性相比,用Pro225处理导致小鼠体内细胞因子释放较低。与固有活性T细胞接合物相比,Pro 225不在NHP中诱导IL2、TNFa和IL10,并且不在小鼠中诱导小鼠IL6。

[0069] 图17示出了本发明的许多形式2构建体在如实施例2中概述的T细胞依赖性细胞毒性(TDCC)测定中的功效。Pro233是具有MMP9切割位点的aEGFR构建体;Pro565是具有MMP9切割位点的aEpCAM(h664)构建体;Pro566是具有MMP9切割位点的aEpCAM(h665)构建体;Pro623是aEGFR和aEpCAM(h664)和MMP9位点的异源COBRA;并且Pro624是aEGFR和aEpCAM(h665)和MMP9位点的异源COBRA。

[0070] 图18示出了本发明的许多形式2构建体在如实施例2中概述的TDCC测定中的功效。Pro233是具有MMP9切割位点的aEGFR构建体;Pro311是具有MMP9切割位点的aFOLR1构建体;并且Pro421是aEGFR和aFOLR1和MMP9位点的异源COBRA。

[0071] 图19示出了本发明的许多形式2构建体在如实施例2中概述的TDCC测定中的功效。Pro225是具有MMP9切割位点的aB7H3构建体;Pro566是具有MMP9切割位点的aEpCAM构建体;Pro656是aB7H3和aEpCAM和MMP9位点的异源COBRA;并且Pro658是aEpCAM和aB7H3和MMP9位点的异源COBRA。

[0072] 图20示出了本发明的许多形式2构建体在如实施例2中概述的对两种不同细胞系的TDCC测定中的功效。Pro225是具有MMP9切割位点的aB7H3构建体;Pro566是具有MMP9切割位点的aEpCAM构建体;并且Pro656是aB7H3和aEpCAM和MMP9位点的异源COBRA。HT29是一种上皮细胞系,与Raji细胞系不同,它可以在小鼠体内形成良好的异种移植物。HT29表达两个靶基因(B7H3和EpCAM),并且在这种情况下,使用CRISPR敲除B7H3表达。因此,异源COBRA和EpCAM单一靶向COBRA杀死了两者,而B7H3单一靶向COBRA没有。

[0073] 图21示出了本发明的许多形式2构建体在具有高EpCAM表达和低Trop2表达的HT29细胞系上的如实施例2中概述的TDCC测定中的功效。Pro824是具有MMP9接头的aEpCAM X aTrop2异源COBRA。Pro825是具有NCL的aEpCAM X aTrop2异源COBRA(例如,不可切割对照构建体)。Pro826是具有MMP9接头的aTrop2 X aEpCAM异源COBRA。Pro827是具有NCL的aTrop2 X aEpCAM异源COBRA(不可切割对照构建体)。Pro677是aTrop2/MMP9 COBRA,并且Pro566是

aEpCAM/MMP9 COBRA。由于两种抗原的水平不同,因此异源COBRA保持良好的杀伤力,而单特异性(例如,单肿瘤抗原靶向)COBRA的杀伤力有所不同。当单特异性COBRA的特定抗原(在这种情况下为Trop2)的表达水平下降时,其杀伤力也会降低;图22和23也是如此。

[0074] 图22示出了如实施例2中概述的本发明的许多形式2构建体在具有高EpCAM表达和非常低Trop2表达的HT116细胞系上的TDCC测定中的功效。Pro824是具有MMP9接头的aEpCAM X aTrop2异源COBRA。Pro825是具有NCL的aEpCAM X aTrop2异源COBRA(不可切割对照)。Pro826是具有MMP9接头的aTrop2 X aEpCAM异源COBRA。Pro827是具有NCL的aTrop2 X aEpCAM异源COBRA(不可切割对照)。Pro677是aTrop2/MMP9单特异性COBRA,而Pro566是aEpCAM/MMP9单特异性COBRA。

[0075] 图23示出了如实施例2中概述的本发明的许多形式2构建体在具有中等EpCAM表达和高Trop2表达的BXPC3细胞系上的TDCC测定中的功效。Pro824是具有MMP9接头的aEpCAM X aTrop2异源COBRA。Pro825是具有NCL的aEpCAM X aTrop2异源COBRA(不可切割对照)。Pro826是具有MMP9接头的aTrop2 X aEpCAM异源COBRA。Pro827是具有NCL的aTrop2 X aEpCAM异源COBRA(不可切割对照)。Pro677是aTrop2/MMP9单特异性COBRA,而Pro566是aEpCAM/MMP9单特异性COBRA。

[0076] 图24示出了使用实施例3的方案2的具有MMP9切割位点的aEpCAM COBRA的体内功效。Pro566显示对LoVo肿瘤以及HT29、BxPC3和SW403肿瘤异种移植物的功效。

[0077] 图25示出了使用实施例3的方案2的具有MMP9切割位点的aTrop2 COBRA的体内功效。Pro677显示对BxPC3肿瘤以及HCC827肿瘤异种移植物的功效。

[0078] 图26示出了使用实施例3的方案3的具有MMP9切割位点的aB7H3 COBRA的体内功效。Pro225显示对A549肿瘤的功效。

[0079] 图27A-27E是一系列图表,其证明了含有两个sdABD-HER2(aHer2 hVIB1139)的单特异性COBRA在T细胞依赖性细胞毒性(TDCC)测定中有条件地杀死表达人或食蟹猴HER2的肿瘤细胞系。图27A:用各种融合蛋白测试人HER2-Raji细胞。图27B:用各种融合蛋白测试食蟹猴Her2-Raji细胞。图27C:用各种融合蛋白测试Raji细胞。图27D:用各种融合蛋白测试具有高HER2表达的SKOV3细胞。图27E:用各种融合蛋白测试具有低HER2表达的HT29细胞。测试的融合蛋白是:Pro1123 NCL(不可切割对照)、Pro1117 MMP9(未切割的含有MMP9的COBRA)或Pro1117 MMP9cl(切割的含有MMP9的COBRA)或Pro1060 Pro51形式(阳性对照的形式类似于抗EGFR x CD3阳性对照Pro51,如US2020/0347132和WO2020/181140中所述)和Pro1069 AD(仅活性结构域)。Pro1117的氨基酸序列在图74和SEQ ID NO:493中提供。

[0080] 图28A-28E是一系列图表,其证明了含有两个sdABD-HER2(aHer2 h1159)的单特异性COBRA在TDCC测定中有条件地杀死表达人或食蟹猴HER2的肿瘤细胞系。图28A:用各种融合蛋白测试人HER2-Raji细胞。图28B:用各种融合蛋白测试食蟹猴HER2-Raji细胞。图28C:用各种融合蛋白测试Raji细胞。图28D:用各种融合蛋白测试具有高HER2表达的SKOV3细胞。图28E:用各种融合蛋白测试具有低HER2表达的HT29细胞。测试的融合蛋白是:Pro1110NCL、Pro1109 MMP9、Pro1109 MMP9cl、Pro 1062 Pro51(阳性对照的形式类似于抗EGFR x CD3阳性对照Pro51,如US2020/0347132和WO2020/181140中所述)和Pro1071 AD。Pro1109的氨基酸序列在图73和SEQ ID NO:491中提供。

[0081] 图29A-29E是一系列图表,其证明了含有两个sdABD-HER2(aHER2 h1162)的单特异

性COBRA在TDCC测定中有条件地杀死表达人或食蟹猴HER2的肿瘤细胞系。图29A:用各种融合蛋白测试人HER2-Raji细胞。图29B:用各种融合蛋白测试食蟹猴HER2-Raji细胞。图29C:用各种融合蛋白测试Raji细胞。图29D:用各种融合蛋白测试具有高HER2表达的SKOV3细胞。图29E:用各种融合蛋白测试具有低HER2表达的HT29细胞。测试的融合蛋白是:Pro1112 NCL、Pro1111 MMP9、Pro 1111 MMP9cl、Pro1064 Pro51和Pro1073 AD。Pro1111的氨基酸序列在图73和SEQ ID NO:492中提供。

[0082] 图30A-30E是一系列图表,其证明了含有两个sdABD-HER2(aHer2 h1156)的单特异性COBRA在TDCC测定中有条件地杀死表达人或食蟹猴HER2的肿瘤细胞系。图30A:用各种融合蛋白测试人HER2-Raji细胞。图30B:用各种融合蛋白测试食蟹猴HER2-Raji细胞。图30C:用各种融合蛋白测试Raji细胞。图30D:用各种融合蛋白测试具有高HER2表达的SKOV3细胞。图30E:用各种融合蛋白测试具有低HER2表达的HT29细胞。测试的融合蛋白是:Pro1124 NCL、Pro1118 MMP9、Pro 1118 MMP9cl和Pro106 Pro51。Pro1118的氨基酸序列在图74和SEQ ID NO:494中提供。

[0083] 图31A-31C是一系列图表,其描绘了aHER2 Pro51融合蛋白导致Pro1043 VIB1139、Pro 1044 VIB1156、Pro1045 VIB1159和Pro1047 VIB1162的结果,它们被选择用于证明在TDCC测定中的良好的活性和食蟹猴交叉反应性,而Pro1036 VIB1055和Pro1038 VIB1059表现出较差的活性。

[0084] 图32是图表,其证明了HER2/MMP9 COBRA使已形成的N87异种移植物消退。Pro1118在此测定中以100ug/kg使用。

[0085] 图33是图表,其证明了HER2/MMP9 COBRA PK与鼠HER2结合一致。Pro1111在此测定中以30ug/kg使用。

[0086] 图34是描绘了各种HER2 sdAb的表位分箱的表格。100nM的竞争抗体用333nM的饱和抗体测试。测试的aHER2抗体是:VIB1121、VIB1139、VIB1058、VIB1097、曲妥珠单抗、VIB1156、VIB1160、VIB1159和VIB1162。“B”指竞争抗体的结合,而“NB”指竞争抗体不结合。

[0087] 图35是描绘了各种HER2 sdAb的表位分箱的表格。100nM的竞争抗体用333nM的饱和抗体测试。测试的抗体是:Pro1118、Pro1111、曲妥珠单抗(trastuzumab)和培妥珠单抗(pertuzumab)。“B”指竞争抗体的结合,而“NB”指竞争抗体不结合。

[0088] 图36是HER2 sdAb h1156(SEQ ID NO:503)和HER2 sdAb h1162(SEQ ID NO:511)表位作图的氨基酸位置和序列的列表。

[0089] 图37是表格,其描绘了Pro51形式的HER2 sdAb的亲和力。在人、食蟹猴和小鼠中评估了各种sdAb和融合蛋白组合。组合如下:1055和Pro1036;1058和Pro1037;1059和Pro1038;1091和Pro1039;1092和Pro1040;1097和Pro1041;1121和Pro1042;1139和Pro1043;1156和Pro1044;1159和Pro1045;1160和Pro1046;1162和Pro1047;h1058和Pro1056;h1092和Pro1057;h1097和Pro1058;h1121和Pro1059;h1139和Pro1060;h1156和Pro1061;h1159和Pro1062;h1160和Pro1063;和h1162和Pro1064。

[0090] 图38A-38C是一系列图表,其证明了含有两个sdABD-CA9(aCA9 h407)的单特异性COBRA在TDCC测定中有条件地杀死表达人或食蟹猴CA9的肿瘤细胞系。图38A:用各种融合蛋白测试人CA9-Raji细胞。图38B:用各种融合蛋白测试食蟹猴CA9-Raji细胞。图38C:用各种融合蛋白测试HT29细胞。测试的融合蛋白是:Pro514NCL、Pro518 MMP9、Pro518 MMP9cl、

Pro511 Pro51和Pro521 AD。Pro518的氨基酸序列在图10AA和SEQ ID NO:331中提供。

[0091] 图39A-39C是一系列图表,其证明了含有两个sdABD-CA9(aCA9 h445)的单特异性COBRA有条件地杀死表达人或食蟹猴CA9的肿瘤细胞系。图39A:用各种融合蛋白测试人CA9-Raji细胞。图39B:用各种融合蛋白测试食蟹猴CA9-Raji细胞。图39C:用各种融合蛋白测试HT29细胞。测试的融合蛋白是:Pro515 NCL、Pro519 MMP9、Pro519 MMP9cl和Pro512 Pro51。Pro519的氨基酸序列在图10BB和SEQ ID NO:332中提供。

[0092] 图40A-40C是一系列图表,其证明了含有两个sdABD-CA9(aCA9 h456)的单特异性COBRA在TDCC测定中有条件地杀死表达人或食蟹猴CA9的肿瘤细胞系。图40A:用各种融合蛋白测试人CA9-Raji细胞。图40B:用各种融合蛋白测试食蟹猴CA9-Raji细胞。图40C:用各种融合蛋白测试HT29细胞。测试的融合蛋白是:Pro1095 NCL、Pro516 MMP9、Pro516 MMP9cl和Pro509 Pro51。Pro516的氨基酸序列在图10Z和SEQ ID NO:329中提供。

[0093] 图41A-41C是一系列图表,其证明了含有两个sdABD-CA9(aCA9 h476)的单特异性COBRA在TDCC测定中有条件地杀死表达人或食蟹猴CA9的肿瘤细胞系。图41A:用各种融合蛋白测试人CA9-Raji细胞。图41B:用各种融合蛋白测试食蟹猴CA9-Raji细胞。图41C:用各种融合蛋白测试HT29细胞。测试的融合蛋白是:Pro513 NCL、Pro517 MMP9、Pro517 MMP9cl、Pro520 AD和Pro510 Pro51。Pro517的氨基酸序列在图10AA和SEQ ID NO:330中提供。

[0094] 图42是表格,其描绘了Pro51形式的CA9 sdAb的亲和力。各种sdAb、sdAb与融合蛋白的组合在人、食蟹猴和小鼠中进行评估。sdAb如下:h407、h445、h456、h472和h476,并且组合如下:h445和Pro512;h456和Pro509;和h476和Pro510。

[0095] 图43A-43B是一系列图表,其证明了CA9/MMP9异源COBRA使形成的肿瘤异种移植物消退。Pro513、不可切割对照、Pro517和Pro518的存在下的肿瘤SNU-16,所有剂量均为300ug/kg。Pro513和Pro517的存在下的肿瘤786-0,所有剂量均为100ug/kg。

[0096] 图44是示出了CA9/MMP9异源COBRA的图表。Pro516的PK与其与小鼠CA9蛋白的结合一致。Pro517和Pro516均以100ug/kg的剂量使用。

[0097] 图45A-45D是一系列图表,其证明了EGFR/EpCAM异源COBRA诱导表达一种或两种抗原的Raji细胞的TDCC。Raji-亲本细胞(图45A)、Raji-EGFR细胞(图45B)、Raji-EpCAM细胞(图45C)和Raji-EGFR/EpCAM细胞(图45D)用单特异性COBRA(Pro233 EGFR/EGFR单特异性COBRA)和Pro566(EpCAM/EpCAM单特异性COBRA)进行测试,并且用异源COBRA(Pro624 EGFR/EpCAM异源COBRA)和Pro698(EpCAM/EGFR异源COBRA)进行测试。对所有COBRA进行预切割。

[0098] 图46A-46C是一系列图表,其证明了包含EGFR sdABD hD12和EpCAM sdABD h665的EGFR/EpCAM异源COBRA在表达两种抗原的HT29细胞上诱导TDCC。图46A:EGFR/EpCAM异源COBRA用Pro623 MMP9、切割的Pro623、Pro625 NCL进行测试,并且用缓冲液作为对照进行测试。图46B:EGFR/EpCAM异源COBRA(EpCAM sdABD h665/EGFR sdABD hD12)用Pro698 MMP9、Pro698 MMP9cl、Pro699 NCL进行测试,并且用缓冲液作为对照进行测试。图46C:EGFR/EpCAM异源COBRA(hD12/h665)用Pro624 MMP9、Pro624 MMP9cl、Pro626 NCL进行测试,并且用缓冲液作为对照进行测试。Pro624的氨基酸序列在图10W和SEQ ID NO:323中提供。Pro623的氨基酸序列在图10X和SEQ ID NO:322中提供。Pro698的氨基酸序列在图10X和SEQ ID NO:324中提供。

[0099] 图47A-47C是一系列图表,其证明了EGFR/FOLR1异源COBRA诱导表达一种或两种抗

原的Raji细胞上的TDCC。Raji-EGFR细胞(图47A)、Raji-FOLR1细胞(图47B)、Raji-EGFR/FOLR1细胞(图47C)用单特异性COBRA:Pro233(EGFR/EGFR)和Pro311(FOLR1/FOLR1)进行测试,并且用异源COBRA:Pro421(EGFR/FOLR1)和Pro420(FOLR1/EGFR)进行测试。对所有COBRA进行预切割。Pro420的氨基酸序列在图9G和SEQ ID NO:421中提供。Pro421的氨基酸序列在图9G和SEQ ID NO:422中提供。Pro233的氨基酸序列在图9D和SEQ ID NO:415中提供。Pro311的氨基酸序列在图9D和SEQ ID NO:416中提供。

[0100] 图48A-48C是一系列图表,其证明了包含EGFR D12和FOLR1 h59-3的aFOLR1/aEGFR异源COBRA有条件地杀死表达FOLR1和EGFR两者的肿瘤细胞系。图48A:用单特异性COBRA:Pro214 NCL(EGFR D12)、Pro186 MMP9(EGFR D12)和Pro186 MMP9cl(EGFR D12)测试H292细胞。图48B:用单特异性COBRA:Pro303 NCL(FOLR1 h59-3)、Pro312 MMP9(FOLR1 h59-3)和Pro312 MMP9cl(FOLR1 h59-3)测试H292细胞。图48C:用异源COBRA:Pro550 NCL(EGFR D12/FOLR1 h59-3)、Pro551 MMP9(EGFR D12/FOLR1 h59-3)和Pro551(MMP9cl EGFR D12/FOLR1 h59-3)测试H292细胞。Pro551的氨基酸序列在图10V和SEQ ID NO:320中提供。

[0101] 图49A-49D是一系列图表,其证明了aFOLR1(h77.2)/aEGFR(hD12)有条件地杀死表达FOLR1和EGFR两者的肿瘤细胞系。图49A:用单特异性COBRA:Pro600 NCL(EGFR/EGFR)、Pro233 MMP9 EGFR/EGFR和Pro233 MMP9cl(EGFR/EGFR)测试H292细胞。图49B:用单特异性COBRA:Pro299 NCL FOLR1/FOLR1、Pro311 MMP9(FOLR1/FOLR1)和Pro311 MMP9cl(FOLR1/FOLR1)测试H292细胞。图49C:用异源COBRA:Pro420 MMP9(FOLR1/EGFR)和Pro420 MMP9cl(FOLR1/EGFR)测试H292细胞。图49D:用异源COBRA:Pro421 MMP9(EGFR/FOLR1)和Pro421 MMP9cl(EGFR/FOLR1)测试H292细胞。Pro420的氨基酸序列在图9G和SEQ ID NO:421中提供。Pro421的氨基酸序列在图9G和SEQ ID NO:422中提供。

[0102] 图50是列出了EGFR/FOLR1异源COBRA与Pro51形式分子的亲和力的表格。

[0103] 图51A-51D是一系列图表,其证明了Pro566 aEpCAM(h664)有条件地杀死EpCAM Raji转染子和表达EpCAM的肿瘤细胞系。Trop2-Raji细胞(图51A)、EpCAM-Raji细胞(图51B)、SKOV3细胞(图51C)和HT29细胞(图51D)都用Pro566和切割的Pro566(Pro566cl)进行测试。

[0104] 图52A-52D是一系列图表,其证明了Pro677 aTrop2(h557)有条件地杀死Trop2 Raji转染子和表达Trop2的肿瘤细胞系。Trop2-Raji细胞(图52A)、EpCAM-Raji细胞(图52B)、SKOV3细胞(图52C)和HT29细胞(图52D)都用Pro677和切割的Pro677(Pro677cl)进行测试。

[0105] 图53A-53D是一系列图表,其证明了Pro824 aEpCAM(h664)/aTROP2(h557)有条件地杀死Raji转染子和表达TROP2和EpCAM两者的肿瘤细胞系。Trop2-Raji细胞(图53A)、EpCAM-Raji细胞(图53B)、SKOV3细胞(图53C)和HT29细胞(图53D)都用Pro824和切割的Pro824(Pro824cl)进行测试。

[0106] 图54A-54D是一系列图表,其证明了Pro826 aTROP2(h557)/aEpCAM(h664)有条件地杀死Raji转染子和表达TROP2和EpCAM两者的肿瘤细胞系。Trop2-Raji细胞(图54A)、EpCAM-Raji细胞(图54B)、SKOV3细胞(图54C)和HT29细胞(图54D)都用Pro826和切割的Pro826(Pro826cl)进行测试。

[0107] 图55A-55D是一系列图表,其证明了EpCAM和Trop2 COBRA和异源COBRA在BXPC3上

都表现良好。图55A:用Pro569 NCL、Pro566 MMP9和Pro566 MMP9cl测试BXPC3细胞。图55B:用Pro681 NCL、Pro677 MMP9和Pro677 MMP9cl测试BXPC3细胞。图55C:用Pro825 NCL、Pro824 MMP9和Pro824 MMP9cl测试BXPC3细胞。图55D:用Pro827 NCL、Pro826 MMP9和Pro826 MMP9cl测试BXPC3细胞。

[0108] 图56A-56D是一系列图表,其证明了EpCAM和Trop2 COBRA和异源COBRA在HCT116上都表现良好。图56A:用Pro569 NCL、Pro566 MMP9和Pro566 MMP9cl测试HCT116细胞(人结肠癌细胞系)。图56B:用Pro681 NCL、Pro677 MMP9和Pro677 MMP9cl测试HCT116细胞。图56C:用Pro825 NCL、Pro824 MMP9和Pro824 MMP9cl测试HCT116细胞。图56D:用Pro827 NCL、Pro826 MMP9和Pro846 MMP9cl测试HCT116细胞。

[0109] 图57A-57D是一系列图表,其证明了EpCAM和Trop2 COBRA和异源COBRA在SCC25上都表现良好。图57A:用Pro569 NCL、Pro566 MMP9和Pro566 MMP9cl测试SCC25细胞。Pro566的氨基酸序列在图10F和SEQ ID NO:289中提供。图57B:用Pro681 NCL、Pro677 MMP9和Pro677 MMP9cl测试SCC25细胞。Pro677的氨基酸序列在图10K和SEQ ID NO:298中提供。图57C:用Pro825 NCL、Pro824 MMP9和Pro824 MMP9cl测试SCC25细胞。Pro824的氨基酸序列在图12Q和SEQ ID NO:485中提供。图57D:用Pro827 NCL、Pro826 MMP9和Pro826 MMP9cl测试SCC25细胞。Pro826的氨基酸序列在图12Q和SEQ ID NO:486中提供。

[0110] 图58A-58D是一系列图表,其证明了B7H3/EpCAM异源COBRA诱导表达一种或两种抗原的细胞上的TDCC。Raji-亲本细胞(图58A)、Raji-B7H3细胞(图58B)、Raji-EpCAM细胞(图58C)和Raji-B7H3/EpCAM细胞(图58D)用单特异性COBRA:Pro225(B7H3/B7H3)和Pro566(EpCAM/EpCAM)进行测试,并且用异源COBRA:Pro656(B7H3/EpCAM)和Pro658(EpCAM/B7H3)进行测试。对所有COBRA进行预切割。Pro225的氨基酸序列在图10DD和SEQ ID NO:336中提供。Pro566的氨基酸序列在图10F和SEQ ID NO:289中提供。Pro656的氨基酸序列在图10Y和SEQ ID NO:326中提供。Pro658的氨基酸序列在图10Z和SEQ ID NO:328中提供。

[0111] 图59A-59D是一系列描绘了CRISPR敲除系的结果的图表。HT29细胞(图59A)、HT29-B7H3 KO细胞(图59B)、HT29-EpCAM KO细胞(图59C)和HT29-B7H3/EpCAM KO细胞(图59D)全部用单特异性COBRA:Pro225(B7H3/B7H3)和Pro566(EpCAM/EpCAM)进行测试,并且用异源COBRA:Pro656(B7H3/EpCAM)进行测试。对所有COBRA进行预切割。Pro225的氨基酸序列在图10DD和SEQ ID NO:336中提供。Pro566的氨基酸序列在图10F和SEQ ID NO:289中提供。Pro656的氨基酸序列在图10Y和SEQ ID NO:326中提供。

[0112] 图60A-60D是一系列图表,其证明了包含aEpCAM sdABD(h664)和aB7H3 sdABD(hF7)的EpCAM/B7H3异源COBRA有条件地杀死表达EpCAM和B7H3两者的肿瘤细胞系。图60A:用Pro295 NCL(B7H3)、Pro225 MMP9(B7H3)和Pro225 MMP9cl(B7H3)测试IGROV细胞。图60B:用Pro568 NCL(EpCAM)、Pro565 MMP9(EpCAM)和Pro565 MMP9cl(EpCAM)测试IGROV细胞。图60C:用Pro659 NCL(B7H3/EpCAM)、Pro655 MMP9(B7H3/EpCAM)和Pro655 MMP9cl(B7H3/EpCAM)测试IGROV细胞。图60D:用Pro661 NCL(EpCAM/B7H3)、Pro657 MMP9(EpCAM/B7H3)和Pro657 MMP9cl(EpCAM/B7H3)测试IGROV细胞。Pro655的氨基酸序列在图10X和SEQ ID NO:325中提供。Pro657的氨基酸序列在图10Y和SEQ ID NO:327中提供。

[0113] 图61A-61D是一系列图表,其证明了包含aEpCAM sdABD(h665)和aB7H3 sdABD(hF7)sdABD的aEpCAM/aB7H3异源COBRA有条件地杀死表达EpCAM和B7H3两者的肿瘤细胞系。

图61A:用Pro295NCL(B7H3)、Pro225 MMP9(B7H3)和Pro225 MMP9cl(B7H3)测试IGROV细胞。图61B:用Pro569 NCL(EpCAM)、Pro566 MMP9(EpCAM)和Pro566 MMP9cl(EpCAM)测试IGROV细胞。图61C:用Pro660 NCL(B7H3/EpCAM)、Pro656 MMP9(B7H3/EpCAM)和Pro656 MMP9cl(B7H3/EpCAM)测试IGROV细胞。图61D:用Pro662 NCL(EpCAM/B7H3)、Pro658 MMP9(EpCAM/B7H3)和Pro658 MMP9cl(EpCAM/B7H3)测试IGROV细胞。Pro656的氨基酸序列在图10Y和SEQ ID NO:326中提供。Pro658的氨基酸序列在图10Z和SEQ ID NO:328中提供。

[0114] 图62A-62D是一系列图表,其证明了包含aEpCAM sdABD(h664)和aB7H3 sdABD(hF7)的aEpCAM/aB7H3异源COBRA有条件地杀死表达EpCAM和B7H3两者的肿瘤细胞系。图62A:用Pro295 NCL(B7H3)、Pro225 MMP9(B7H3)和Pro225 MMP9cl(B7H3)测试H292细胞。图62B:用Pro568 NCL(EpCAM)、Pro565 MMP9(EpCAM)和Pro565 MMP9cl(EpCAM)测试H292细胞。图62C:用Pro659 NCL(B7H3/EpCAM)、Pro655 MMP9(B7H3/EpCAM)和Pro655 MMP9cl(B7H3/EpCAM)测试H292细胞。图62D:用Pro661 NCL(EpCAM/B7H3)、Pro657 MMP9(EpCAM/B7H3)和Pro657 MMP9cl(EpCAM/B7H3)测试H292细胞。

[0115] 图63A-63D是一系列图表,其证明了包含aEpCAM sdABD(h665)和aB7H3 sdABD(hF7)的aEpCAM/aB7H3异源COBRA有条件地杀死表达EpCAM和B7H3两者的肿瘤细胞系。图63A:用Pro295 NCL(B7H3)、Pro225 MMP9(B7H3)和Pro225 MMP9cl(B7H3)测试H292细胞。图63B:用Pro569 NCL(EpCAM)、Pro566 MMP9(EpCAM)和Pro566 MMP9cl(EpCAM)测试H292细胞。图63C:用Pro660 NCL(B7H3/EpCAM)、Pro656 MMP9(B7H3/EpCAM)和Pro656 MMP9cl(B7H3/EpCAM)测试H292细胞。图63D:用Pro662 NCL(EpCAM/B7H3)、Pro658 MMP9(EpCAM/B7H3)和Pro658 MMP9cl(EpCAM/B7H3)测试H292细胞。

[0116] 图64A-64D是一系列描绘T细胞依赖性细胞毒性(TDCC)对肿瘤细胞系的影响的图表。HT29细胞(图64A)、U87-MG(EpCAM阴性)细胞(图64B)、Capan2细胞(图64C)和VCAP细胞(图64D)全部用单特异性COBRA:Pro225(B7H3/B7H3)和Pro566(EpCAM/EpCAM)进行测试,并且用异源COBRA:Pro656(B7H3/EpCAM)和Pro658(EpCAM/B7H3)进行测试。对所有COBRA进行预切割。

[0117] 图65是描绘HT29细胞上的Jurkat萤光素酶T细胞激活的图表。HT29细胞用单特异性COBRA:Pro225(B7H3/B7H3)和Pro566(EpCAM/EpCAM)进行测试,并且用异源COBRA:Pro656(B7H3/EpCAM)和Pro658(EpCAM/B7H3)进行测试。对所有COBRA进行预切割。

[0118] 图66A-66D是一系列图表,其示出了与单特异性COBRA相比,HT29细胞上的异源COBRA的活性对可溶性抗原的抑制不太敏感。用可溶性EpCAM、可溶性B7H3-4Ig和无抗原(对照)与单特异性COBRA:图66A中的Pro225(B7H3/B7H3)和图66B中的Pro566(EpCAM/EpCAM)一起测定细胞,并且与异源COBRA:图66C中的Pro656 B7H3/EpCAM和图66D中的Pro658 EpCAM/B7H3一起测定细胞。用单特异性COBRA检测到更强的抑制。对所有COBRA进行预切割。

[0119] 图67是描绘B7H3/EpCAM异源COBRA的结合亲和力的表格。包括单独的huB7H3-4Ig、huEpCAM和huB7H3-4Ig以及单独的huEpCAM在内的抗原用异源COBRA Pro656(B7H3/EpCAM)和Pro658(EpCAM/B7H3)进行测定。

[0120] 图68是描绘各种B7H3/EpCAM异源COBRA的药代动力学的图表。

[0121] 图69是图表,其示出了B7H3/EpCAM异源COBRA在小鼠HT29细胞系衍生的异种移植物模型中具有活性。异源COBRA的剂量,诸如Pro660 NCL(B7H3/EpCAM;0.3mg/kg)、Pro656

MMP9(B7H3/EpCAM;0.01mg/kg)、Pro656 MMP9(B7H3/EpCAM;0.03mg/kg)和Pro656 MMP9(0 B7H3/EpCAM;1mg/kg),以不同的时间间隔施用。

[0122] 图70是图表,其示出了B7H3/EpCAM异源COBRA在小鼠HT29细胞系衍生的异种移植物模型中具有活性。异源COBRA的剂量,诸如Pro662 NCL(EpCAM/B7H3;0.1mg/kg)和Pro658 MMP9(EpCAM/B7H3;0.1mg/kg),以不同的时间间隔施用。

[0123] 图71-72提供了本文所述的示例性异源COBRA(双重靶向COBRA)的额外序列。

[0124] 图73-74提供了示例性单特异性HER2 COBRA(单一靶向COBRA)的额外序列。

[0125] 图75提供了本文所述的人源化抗EpCAM sdAb h664和人源化抗HER2 sdAb h1139、h1156、h1159和h1162的序列。

具体实施方式

[0126] 引言

[0127] 本发明涉及降低与重要的生理靶标(诸如CD3和肿瘤抗原)结合的双特异性抗体(包括抗体样功能蛋白)的毒性和副作用的方法。许多抗原结合蛋白(诸如抗体)可能具有通过靶向正常组织而产生的显著副作用,并且因此需要仅激活治疗分子在疾病组织附近的结合能力,以避免正常组织相互作用。因此,本发明涉及具有许多功能性蛋白质结构域的多价条件有效("MCE")蛋白质。一般而言,这些结构域之一是将结合靶肿瘤抗原(TTA)的抗原结合结构域(ABD),并且另一个是将在特定条件下结合T细胞抗原(诸如CD3)的ABD。此外,MCE蛋白还包括一个或多个蛋白酶切割位点。也就是说,治疗分子以"前药"样形式制备,其中CD3结合结构域没有活性,直至暴露于肿瘤环境。肿瘤环境含有蛋白酶,使得在暴露于蛋白酶时,前药被切割并变得有活性。

[0128] 这通常在本文中通过使用包括针对T细胞抗原(诸如CD3)的"伪"可变重结构域和"伪"可变轻结构域的蛋白质来实现,所述结构域将MCE的CD3 Fv抑制成如本文所讨论的无活性形式。由于TTA将MCE靶向到肿瘤附近,因此MCE暴露于蛋白酶。切割后,活性可变重结构域和活性可变轻结构域现在能够配对形成一个或多个针对CD3的活性ABD,从而将T细胞募集至肿瘤,从而导致治疗。

[0129] 一般而言,CD3结合结构域("Fv")是受限形式,其中传统地形成Fv的活性可变重结构域和活性可变轻结构域之间的接头太短,无法允许两个活性可变结构域彼此结合;这被称为"受限接头";这些可以是受限和可切割的(CCL,如形式1中所用)或受限和不可切割的(CNCL,如形式2中所用)。相反,在前药(例如,未切割的)形式中,前药多肽还包含"伪Fv结构域"。伪Fv结构域包含具有标准框架区,但具有"惰性"或"无活性"CDR的可变重结构域和轻结构域。伪Fv结构域还具有无活性可变重结构域和无活性可变轻结构域之间的受限接头。由于空间约束,Fv和伪Fv结构域都不能自我组装,因此存在将aVL与iVH配对、将aVH与iVL配对的分子内组装,这是由于每个框架区域的亲和力。然而,由于伪结构域的"惰性"CDR,所得的ABD将不结合CD3,从而防止疾病组织(诸如肿瘤)外的毒性。然而,在肿瘤中或附近存在蛋白酶的情况下,前药构建体被切割,使得伪Fv结构域从表面释放,从而允许"真正的"可变重结构域和可变轻结构域分子内缔合(例如,两个切割的构建体结合在一起),从而触发活性CD3结合和所得肿瘤功效。这些构建体在本文中通常称为条件性双特异性重导向激活构建体(COnditional Bispecific Redirected Activation)或"COBRA™"。分子内组装的稳定性

由本文中的条件性实验显示，由此在不存在蛋白酶的情况下，未切割的构建体没有活性(例如，未形成活性CD3结合结构域)。

[0130] 有趣的是，为了便于描述，虽然这些构建体在本文中都被称为“受限的”，但额外的工作表明，即使Fv结构域之一不受限，分子内组装也是有利的，例如，结构域之一可以具有更长的灵活的接头。也就是说，如图37-39所示，如果只有Fv结构域(具有活性VL和VH的Fv结构域或伪Fv结构域)中的一个受限

[0131] ，分子内组装仍然发生(例如，未切割的构建体在不存在蛋白酶切割的情况下是无活性的)。然而，在目前的系统中，当两个接头都受限时，蛋白质具有更好的表达。然而，如本领域技术人员将理解的，本文中的形式1、形式2或形式4构建体中的任一种可以具有这些具有“不受限的”或“灵活的”接头的Fv结构域中的一种。为了便于参考，构建体以受限形式与两个Fv结构域一起显示。

[0132] 本发明的结构和形式是WO2017/156178、WO2019/051102、WO2020/181140、US2019/0076524和US2020/0347132中描述的实施方案的变体，所述文献特此通过引用整体明确并入。如WO2017/156178的图17-21、WO2019/051102的图、和WO2020/181140的图所示，由于在单个多肽中存在两组VH和VL结构域，先前的构建体具有异构化的能力，从而形成二价scFv和单链双抗体。即使在纯化每个同种型后，二价构建体仍可以与双抗体同种型达到平衡。由于单链双抗体在不存在蛋白酶切割的情况下具有结合CD3的能力，因此构建体的效用降低。

[0133] 为了解决这个问题，本发明提供了四种不同类型的构建体来完成这种条件激活。前药激活可以以四种一般方式之一发生，如图中一般所示。在图1中，示出了“形式1”机制。在该实施方案中，前药构建体具有两个切割位点：一个在受限Fv的VH和VL结构域之间，从而释放两个可变结构域以缔合，而第二个位于从前药构建体释放伪Fv结构域的位点，留下由于可变重结构域和可变轻结构域的先天自组装而缔合的两个分子，每个分子也具有针对肿瘤抗原的抗原结合结构域，从而允许将T细胞募集到肿瘤部位。

[0134] 在替代实施方案中，前药构建体在图2中示出，即“形式2”机制。在该实施方案中，活性可变重链和活性轻链之间的结构域接头是受限但不可切割的接头(“CNCL”)。在前药形式中，受限的伪Fv结构域的无活性VH和VL与受限Fv结构域的VH和VL缔合，使得不存在CD3结合。然而，一旦在肿瘤环境中发生切割，两个不同的激活的蛋白质(每个都包含活性的可变重结构域和轻结构域)缔合形成两个抗CD3结合域。这种形式2具有两个如下文更充分地描述的靶肿瘤抗原结合结构域(“TTA-ABD”)，它们可以相同(例如“同源COBRA”)或不同(例如“异源COBRA”)。如果不同，它们可以各自针对不同的肿瘤抗原，或者它们可以针对相同的肿瘤抗原，但针对不同的表位，如下文更充分地描述。

[0135] 除了上文讨论的“单链蛋白”COBRA形式(其中所有组分都包含在单个氨基酸序列中)之外，还存在依赖于成对发挥作用的两种蛋白质“半COBRA”的构建体，如图3所示。在该实施方案中，每个蛋白质具有由蛋白酶切割位点分开的一个活性可变结构域和一个惰性可变结构域。每个分子都含有TTA结合结构域，使得当分子与TTA结合并暴露于肿瘤蛋白酶时，惰性结构域被切割掉，并且两个活性可变结构域自组装形成抗CD3结合结构域。

[0136] 此外，本发明还提供了“形式4”构建体，如图4所示。这些类似于“形式2”设计，不同之处在于使用针对TTA的单个ABD，使得在切割时，两个前药分子现在形成含有两个活性抗CD3结构域的四价双特异性构建体，如下文进一步描述。

[0137] 因此,本发明的形式和构建体可用于治疗疾病。

[0138] 定义

[0139] 为了更全面地理解本申请,下文阐述了几个定义。此类定义意图在涵盖语法等同物。

[0140] 如本文所用的“氨基酸”和“氨基酸同一性”意指20种天然存在的氨基酸中的一种或可能存在于特定的、确定的位置上的任何非天然类似物。在许多实施方案中,“氨基酸”意指20种天然存在的氨基酸中的一种。本文中的“蛋白质”意指至少两个共价附接的氨基酸,其包括蛋白质、多肽、寡肽和肽。

[0141] 本文中的“氨基酸修饰”意指多肽序列中的氨基酸置换、插入和/或缺失或者对与蛋白质化学连接的部分的改变。例如,修饰可以是与蛋白质附接的改变的碳水化合物或PEG结构。为清楚起见,除非另有说明,氨基酸修饰总是指由DNA编码的氨基酸,例如在DNA和RNA中具有密码子的20种氨基酸。本文中的优选氨基酸修饰是置换。

[0142] 本文中的“氨基酸置换”或“置换”意指用不同的氨基酸替代在亲本多肽序列中特定位置上的氨基酸。特别地,在一些实施方案中,所述置换是指在特定位置上非天然存在的氨基酸,不是在生物体内或在任何生物体中天然存在的。为清楚起见,已经被工程化以改变核酸编码序列但不改变起始氨基酸(例如,将CGG(编码精氨酸)交换为CGA(仍编码精氨酸)以增加宿主生物体表达水平)的蛋白质不是“氨基酸置换”;即,尽管产生了编码相同蛋白质的新基因,如果所述蛋白质在其起始的特定位置上具有相同的氨基酸,则它不是氨基酸置换。

[0143] 如本文所用的“氨基酸插入”或“插入”意指在亲本多肽序列的特定位置上添加氨基酸序列。

[0144] 如本文所用的“氨基酸缺失”或“缺失”意指去除在亲本多肽序列中特定位置上的氨基酸序列。

[0145] 本发明的多肽特异性地结合CD3和靶肿瘤抗原(TTA)诸如靶细胞受体,如本文所概述。“特异性结合”或“特异性地结合于”或“特异于”特定抗原或表位意指可测量地不同于非特异性相互作用的结合。特异性结合可例如通过测定与对照分子结合相比的分子结合来测量,对照分子通常是不具有结合活性的类似结构的分子。例如,可通过与类似于靶标的对照分子竞争来测定特异性结合。

[0146] 特定抗原或表位的特异性结合可以例如通过针对抗原或表位的KD为至少约10^{-4}M、至少约10^{-5}M、至少约10^{-6}M、至少约10^{-7}M、至少约10^{-8}M、至少约10^{-9}M,可替代地,至少约10^{-10}M、至少约10^{-11}M、至少约10^{-12}M或更大的抗体来展现,其中KD是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。通常,特异性地结合抗原的抗体对于对照分子的KD为相对于所述抗原或表位的20、50、100、500、1000、5,000、10,000或更高倍数。

[0147] 此外,对特定抗原或抗原表位的特异性结合可例如由对于抗原或抗原表位的KA或Ka为对于对照物的至少20、50、100、500、1000、5,000、10,000或更高倍数的抗体展现,其中KA或Ka是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率。结合亲和力通常使用本领域已知的Biacore测定或Octet来测量。

[0148] 如本文所用的“亲本多肽”或“前体多肽”(包括Fc亲本或前体)意指随后被修饰以生成变体的多肽。所述亲本多肽可以是天然存在的多肽、或天然存在的多肽的变体或工程

化版本。亲本多肽可以指多肽本身、包含亲本多肽的组合物或编码所述多肽的氨基酸序列。因此，如本文所用的“亲本Fc多肽”意指被修饰以生成变体的未经修饰的Fc多肽，并且如本文所用的“亲本抗体”意指被修饰以生成变体抗体的未经修饰的抗体。

[0149] 如本文所用的“位置”意指蛋白质序列中的位置。位置可以按顺序编号，或者根据已建立的形式来编号，例如抗体编号的EU索引。

[0150] 如本文所用的“靶抗原”意指被给定抗体的可变区特异性地结合的分子。靶抗原可以是蛋白质、碳水化合物、脂质或其他化学化合物。本文描述了一系列合适的示例性靶抗原。

[0151] 如本文所用的“靶细胞”意指表达靶抗原的细胞。一般而言，出于本发明的目的，靶细胞是表达TTA的肿瘤细胞或表达CD3抗原的T细胞。

[0152] 如本文所用的“Fv”或“Fv结构域”或“Fv区”意指包含通常来自抗体的抗原结合结构域的VL和VH结构域的多肽。如果Fv结构域含有活性VH和VL结构域，它们通常形成如本文所讨论的“抗原结合结构域”或“ABD”(但在一些情况下，使用含有受限接头的Fv，使得在切割前不形成活性ABD)。如下文所讨论，Fv结构域在本发明中可以以多种方式组织，并且可以是“活性的”或“无活性的”，诸如呈scFv形式、受限Fv形式、伪Fv形式等。应理解，在本发明中，在一些情况下，Fv结构域由在单一多肽链上的VH和VL结构域组成，诸如图1和图2中所示，但是使用受限接头使得不能形成分子内ABD。在这些实施方案中，在切割后形成两个活性ABD。在一些情况下，Fv结构域由VH和VL结构域组成，其中之一是惰性的，使得仅在切割后形成分子间ABD。如下文所讨论，Fv结构域在本发明中可以以多种方式组织，并且可以是“活性的”或“无活性的”，诸如呈scFv形式、受限Fv形式、伪Fv形式等。此外，如本文所讨论的，含有VH和VL的Fv结构域可以是/形成ABD，并且其他不含有VH和VL结构域的ABD可以使用sdABD形成。

[0153] 本文中的“可变结构域”意指包含一个或多个Ig结构域的免疫球蛋白的区域，所述一个或多个Ig结构域基本上由分别构成κ链、λ链和重链免疫球蛋白基因座的Vκ、Vλ和/或VH基因中的任一个编码。在一些情况下，可以使用单个可变结构域，诸如sdFv(在本文中也称为sdABD)。

[0154] 在利用可变重(VH)结构域和可变轻(VL)结构域的实施方案中，每个VH和VL由三个高变区(“互补决定区”、“CDR”)和四个“框架区”、或“FR”构成，从氨基末端至羧基末端按以下顺序排列:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。因此，VH结构域具有结构vhFR1-vhCDR1-vhFR2-vhCDR2-vhFR3-vhCDR3-vhFR4，并且VL结构域具有结构vlFR1-vlCDR1-vlFR2-vlCDR2-vlFR3-vlCDR3-vlFR4。如本文更充分描述的，vhFR区和vlFR区自组装形成Fv结构域。一般而言，在本发明的前药形式中，存在其中VH和VL结构域不能自缔合的“受限Fv结构域”和其中CDR在自缔合时不形成抗原结合结构域的“伪Fv结构域”。

[0155] 高变区赋予抗原结合特异性，并且通常涵盖来自轻链可变区中的约氨基酸残基24-34(LCDR1;“L”表示轻链)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)以及重链可变区中的大致约氨基酸残基31-35B(HCDR1;“H”表示重链)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3)的氨基酸残基(Kabat等人，SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST，第5版Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，Md.(1991))和/或形成轻链可变区中的高变环的那些残基(例如，残基26-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)和91-96(LCDR3))以及形

成重链可变区中的高变环的那些残基26-32(HCDR1)、53-55(HCDR2)和96-101(HCDR3)(Chothia和Lesk(1987)J.Mol.Biol.196:901--917。下文描述了本发明的具体CDR。

[0156] 如本领域技术人员将理解的,CDR的确切编号和布置在不同的编号系统中可能不同。然而,应理解,可变重和/或可变轻序列的公开内容包括相关(固有)CDR的公开内容。因此,每个可变重链区的公开是vhCDR(例如,vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3)的公开,并且每个可变轻链区的公开是vlCDR(例如,vlCDR1、vlCDR2和vlCDR3)的公开。

[0157] CDR编号的有用比较如下,参见Lafranc等人,Dev.Comp.Immunol.27(1):55-77(2003):

[0158] 表1

[0159]

	Kabat+ Chothia	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
vhCDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
vhCDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
vhCDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
vlCDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
vlCDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
vlCDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

[0160] 在整个本说明书中,当提及可变结构域中的残基(轻链可变区的大约残基1-107和重链可变区的大约残基1-113)时通常使用Kabat编号系统,并且对于Fc区通常使用EU编号系统(例如Kabat等人,同上(1991))。

[0161] 本发明提供了大量不同的CDR组。在这种情况下,抗CD3组分的上下文中的“完整CDR组”包含三个可变轻CDR和三个可变重CDR,例如vlCDR1、vlCDR2、vlCDR3、vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3。如本领域技术人员将理解的,每组CDR(VH和VL CDR)可以单独地和作为一组与抗原结合。例如,在受限Fv结构域中,vhCDR可以结合例如CD3,并且vlCDR可以结合CD3,但在受限形式中它们不能结合CD3。

[0162] 在诸如本文通常用于结合靶肿瘤抗原(TTA)的单结构域ABD(“sdABD”)的上下文中,一组CDR只有三个CDR;这些在本领域中有时被称为“VHH”结构域。

[0163] 这些CDR可以分别是较大可变轻结构域或可变重结构域的一部分。此外,如本文更充分概述的,可变重结构域和可变轻结构域可以在分开的多肽链上,或者在scFv序列的情况下在单一多肽链上,这取决于本文中的部分的形式和构型。

[0164] CDR有助于形成抗原结合位点,或更具体地,表位结合位点。“表位”是指与可变区中称为互补位的特异性抗原结合位点相互作用的决定簇。表位是分子(诸如氨基酸或糖侧链)的分组,并且通常具有特定的结构特征以及特定的电荷特征。单个抗原可以具有多于一个表位。

[0165] 表位可以包含直接参与结合的氨基酸残基(也称为表位的免疫显性组分)和不直接参与结合的其他氨基酸残基,诸如被特异性抗原结合肽有效地阻断的氨基酸残基;换言之,所述氨基酸残基在特异性抗原结合肽的足迹内。

[0166] 表位可以是构象的或线性的。构象表位由线性多肽链的不同区段的空间并置氨基酸产生。线性表位是由多肽链中相邻的氨基酸残基产生的一种表位。构象和非构象表位的区别可能在于,在变性溶剂的存在下丧失了与前者而不是后者的结合。

[0167] 表位通常在独特的空间构象中包括至少3个以及更通常至少5个或8-10个氨基酸。可以在显示一种抗体阻断另一种抗体与靶抗原结合的能力的简单免疫测定(例如“框并法(binning)”)中验证识别相同表位的抗体。如下文所概述,本发明不仅包括本文中所列举的抗原结合结构域和抗体,而且包括与由所列举的抗原结合结构域结合的表位竞争结合的那些。

[0168] 本发明的可变重链和可变轻结构域可以是“活性”或“无活性”的。

[0169] 如本文所用,“无活性VH”(“iVH”)和“无活性VL”(“iVL”)是指伪Fv结构域的组分,当其分别与其同源的VL或VH配偶体配对时,形成不特异性地结合“活性”VH或“活性”VL将结合的抗原的所得VH/VL对,其中所述抗原结合“无活性”的类似的VL或VH。示例性的“无活性VH”和“无活性VL”结构域通过如下文更充分概述的野生型VH或VL序列的突变而形成。示例性突变在VH或VL的CDR1、CDR2或CDR3内。示例性突变包括将结构域接头置于CDR2内,从而形成“无活性VH”或“无活性VL”结构域。相比之下,“活性VH”或“活性VL”是在分别与其“活性”同源配偶体(即VL或VH)配对后能够与其靶抗原特异性地结合的一种序列。因此,应理解,伪Fv可以是VH/iVL对、iVH/VL对、或iVH/iVL对。

[0170] 相比之下,如本文所用,术语“活性”是指能够与CD3特异性地结合的CD3结合结构域。此术语在两种背景中使用:(a)当提及Fv结合对的单个成员(即VH或VL)时,所述单个成员属于能够与其同源配偶体配对并特异性地结合CD3的序列;和(b)能够特异性地结合CD-的序列的同源对(即VH和VL)。示例性的“活性”VH、VL或VH/VL对是野生型或亲本序列。

[0171] “CD-x”是指分化簇(CD)蛋白。在示例性实施方案中,CD-x选自在已经施用本发明的多肽构建体的受试者中在T细胞的募集或激活方面具有作用的那些CD蛋白。在示例性实施方案中,CD-x是CD3,其序列在图7中示出。

[0172] 与本发明有关的术语“结合结构域”表征识别靶分子(抗原)上的给定靶表位或给定靶位点(例如:分别为EGFR和CD3)/与其(特异性地)结合/相互作用的结构域。靶抗原结合结构域(识别EGFR)的结构和功能以及优选地还有CD3结合结构域(识别CD3)的结构和/或功能是基于抗体的结构和/或功能,例如全长或完整免疫球蛋白分子(包括sdABD)的结构和/或功能。根据本发明,靶抗原结合结构域的特征通常在于存在三个结合靶肿瘤抗原的CDR(在本领域中通常称为可变重结构域,但是不存在相应的轻链CDR)。或者,针对TTA的ABD可以包括三个轻链CDR(即,VL区的CDR1、CDR2和CDR3)和/或三个重链CDR(即,VH区的CDR1、CDR2和CDR3)。CD3结合结构域优选地还至少包含允许靶标结合的抗体的最小结构需求。更优选地,CD3结合结构域包含至少三个轻链CDR(即,VL区的CDR1、CDR2和CDR3)和/或三个重链CDR(即,VH区的CDR1、CDR2和CDR3)。设想在示例性实施方案中,靶抗原和/或CD3结合结构域通过噬菌体展示或文库筛选方法产生或可通过其获得。

[0173] 如本文所用的“结构域”意指具有如本文所概述的功能的蛋白质序列。本发明的结构域包括肿瘤靶抗原结合结构域(TTA结构域)、可变重结构域、可变轻结构域、scFv结构域、接头结构域和半衰期延长结构域。

[0174] 本文中的“结构域接头”意指连接如本文所概述的两个结构域的氨基酸序列。结构域接头可以是可切割接头、受限可切割接头、不可切割接头、受限不可切割接头、scFv接头等。

[0175] 本文中的“可切割接头”(“CL”)意指可以被蛋白酶(优选地如本文所概述的疾病组

织中的人蛋白酶)切割的氨基酸序列。可切割接头的长度通常为至少3个氨基酸,其中4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或更多个氨基酸可用于本发明,这取决于所需的柔性。许多可切割接头序列可见于图6和图7。

[0176] 本文中的“不可切割接头”(“NCL”)意指在正常生理条件下不能被人蛋白酶切割的氨基酸序列。

[0177] 本文中的“受限可切割接头”(“CCL”)意指含有蛋白酶切割位点(如本文所定义)的短多肽,所述蛋白酶切割位点连接如本文所概述的两个结构域,其连接方式使得所述两个结构域不能彼此显著地相互作用,直到它们驻留在不同多肽链上之后,例如在切割之后。当CCL连接如本文所定义的VH和VL结构域时,由于分子内方式的空间限制,VH和VL在切割之前不能自组装形成功能性Fv(但他们可以以分子内方式组装成伪Fv结构域)。在被相关蛋白酶切割后,VH和VL可以以分子间方式组装形成活性抗原结合结构域。一般而言,CCL的长度小于10个氨基酸,其中9个、8个、7个、6个、5个和4个氨基酸可用于本发明。一般而言,蛋白酶切割位点的长度通常为至少4+个氨基酸以赋予足够的特异性,如图6中所示。

[0178] 本文中的“受限不可切割接头”(“CNCL”)意指连接如本文所概述的两个结构域的短多肽,其连接方式使得所述两个结构域不能彼此显著地相互作用并且在生理条件下不被人蛋白酶显著地切割。

[0179] 本文中的“受限Fv结构域”意指包含活性可变重结构域和活性可变轻结构域的Fv结构域,所述活性可变重结构域和活性可变轻结构域用如本文所概述的受限接头共价地连接,其连接方式使得所述活性重可变结构域和轻可变结构域不能在分子内相互作用以形成将结合抗原(诸如CD3)的活性Fv。因此,受限Fv结构域是与scFv相似但由于受限接头的存在而不能结合抗原的一种结构域(但它们可以与惰性可变结构域分子内组装成伪Fv结构域)。

[0180] 本文中的“伪Fv结构域”意指包含伪或无活性可变重结构域、或伪或无活性可变轻结构域、或两者的结构域,所述可变重结构域和可变轻结构域使用结构域接头连接(所述接头可以是可切割的、受限的、不可切割的、不受限的等)。当彼此缔合(iVH/iVL)或与活性VH或VL缔合时,伪Fv结构域的iVH和iVL结构域不与人抗原结合;因此,iVH/iVL、iVH/VL和iVL/VH Fv结构域不与人蛋白质明显地结合,使得这些结构域在人体内是惰性的。

[0181] 本文中的“单链Fv”或“scFv”意指通常使用如本文所讨论的结构域接头将可变重(VH)结构域与可变轻(VL)结构域共价附接以形成scFv或scFv结构域。scFv结构域可以是N末端至C末端的任一方向(VH-接头-VL或VL-接头-VH)。

[0182] 本文中的“单结构域Fv”、“sdFv”或“sdABD”意指仅具有三个CDR的抗原结合结构域,通常基于骆驼科(camelid)抗体技术。参见:Protein Engineering 9(7):1129-35(1994);Rev Mol Biotech 74:277-302(2001);Ann Rev Biochem 82:775-97(2013)。如本文所概述,本文使用两种一般类型的sdABD:与TTA结合并如此注释(sdABD-TTA为通用术语,或sdABD-EGFR为结合EGFR的一种,sdABD-FOLR1为结合FOLR1的一种等)的sdABD和与HSA结合的sdABD(“sdABD-HSA”或“sdABD(1/2)”。

[0183] “蛋白酶切割位点”是指被蛋白酶识别和切割的氨基酸序列。合适的蛋白酶切割位点在下文进行概述,并且在图7和图6中示出。

[0184] 如本文所用,“蛋白酶切割结构域”是指掺入“蛋白酶切割位点”以及在单个蛋白酶切割位点之间和在蛋白酶切割位点与本发明构建体的其他功能组分(例如,VH、VL、iVH、

iVL、靶抗原结合结构域、半衰期延长结构域等)之间的任何接头的肽序列。如本文所概述，如果需要，蛋白酶切割结构域还可以包括额外的氨基酸，例如以赋予柔性。

[0185] 术语“COBRA™”和“条件性双特异性重导向激活”是指具有许多功能性蛋白质结构域的双特异性条件性有效的蛋白质。在一些实施方案中，功能结构域之一是结合靶肿瘤抗原(TTA)的抗原结合结构域(ABD)。在某些实施方案中，另一个结构域是在特定条件下与T细胞抗原结合的ABD。T细胞抗原包括但不限于CD3。术语“半COBRA™”是指在由于在靶表达细胞的表面上浓缩时固有的自组装而使半COBRA的可变重链可以与另一个半COBRA™(互补的半COBRA™)的可变轻链缔合时能够结合T细胞抗原的条件性有效的蛋白质。

[0186] 具体实施方式

[0187] I.本发明的融合蛋白

[0188] 本发明的融合蛋白具有许多不同的组分，在本文中通常被称为结构域，它们以各种方式连接在一起。一些结构域是各自结合靶抗原(例如，TTA或CD3)的结合结构域。由于它们与多于一种的抗原结合，因此它们在本文中被称为“多特异性的”；例如，本发明的前药构建体可以与TTA和CD3结合，因此是“双特异性的”。蛋白质还可以具有更高的特异性；例如，如果第一个αTTA与EGFR结合，第二个与EpCAM结合，并且存在抗CD3结合结构域，这将是一个“三特异性”分子。类似地，向此构建体添加抗HSA结合结构域将是“四特异性的”，如图3B所示。

[0189] 如本领域技术人员将理解的，本发明的蛋白质可以具有不同的化合价并且是多特异性的。也就是说，本发明的蛋白质可以结合具有多于一个结合位点的靶标；例如，Pro186对于EGFR是二价的。

[0190] 本发明的蛋白质可以包括以如本文所概述的多种方式排列的CD3抗原结合结构域、肿瘤靶抗原结合结构域、半衰期延长结构域、接头等。

[0191] A.CD3抗原结合结构域

[0192] T细胞应答的特异性由T细胞受体复合物识别抗原(在主要组织相容性复合物MHC的背景下展示)介导。作为T细胞受体复合物的一部分，CD3是包括存在于细胞表面上的CD3γ(伽马)链、CD3δ(德尔塔)链、两条CD3e(伊普西隆)链和两条CD3ζ(泽塔)链的蛋白质复合物。CD3分子与T细胞受体(TCR)的α(阿尔法)和β(贝塔)链缔合以包含TCR复合物。CD3在T细胞上的聚集，诸如通过与CD3结合的Fv结构域，导致类似于T细胞受体的参与但不依赖于其克隆典型特异性的T细胞激活。

[0193] 然而，如本领域已知的，CD3激活可能引起许多毒性副作用，并且因此本发明涉及仅在发现特定蛋白酶的肿瘤细胞的存在下提供本发明多肽的活性CD3结合，所述特定蛋白酶然后切割本发明的前药多肽以提供活性CD3结合结构域。因此，在本发明中，抗CD3 Fv结构域与CD3的结合受蛋白酶切割结构域调节，所述蛋白酶切割结构域仅在具有升高水平的蛋白酶的患病细胞或组织的微环境中(例如在本文所述的肿瘤微环境中)限制CD3 Fv结构域与CD3的结合。

[0194] 因此，本发明提供两组VH和VL结构域，即活性组(VH和VL)和无活性组(无活性VH和无活性VL；也分别称为“iVH”和“iVL”)，所有四种都存在于前药构建体中。对构建体进行形式化，使得VH和VL组不能自缔合，而是与无活性的配偶体缔合，例如iVH和VL和iVL和VH如本文所示。

[0195] 1.活性抗CD3可变重结构域和可变轻结构域

[0196] 存在许多本领域已知的可用于本发明的合适的活性CDR组、和/或VH和VL结构域。例如,CDR和/或VH和VL结构域衍生自已知的抗CD3抗体,诸如例如莫罗单抗(muromonab)-CD3(OKT3)、奥昔珠单抗(TRX4)、替利珠单抗(MGA031)、维西珠单抗(Nuvion)、SP34或I2C、TR-66或X35-3、VIT3、BMA030(BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-486、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1和WT-31。

[0197] 在一个实施方案中,形成与人CD3结合的活性Fv结构域的VH和VL序列在图7A-7B中示出。如本文所示,这些活性VH(“aVH”)和活性VL(“aVL”)结构域可以用于不同的构型和形式1、2、3和4。

[0198] 2.无活性抗CD3可变重结构域和可变轻结构域

[0199] 无活性iVH和iVL结构域含有允许缔合的“规则”框架区(FR),使得无活性可变结构域将与活性可变结构域缔合,从而使得所述对无活性,例如不能结合CD3。

[0200] 如本领域技术人员将理解的,存在许多可用于本发明的“无活性”可变结构域。基本上,可以使用具有允许与另一个可变结构域自组装的人框架区的任何可变结构域,无论在可变区中的CDR位置上有什么氨基酸。为清楚起见,无活性结构域据说包括CDR,但是在技术上无活性可变结构域不赋予结合能力。

[0201] 如本领域将理解的,生成无活性VH或VL结构域通常是直接的,并且可以以多种方式完成。在一些实施方案中,无活性可变结构域的生成通常通过改变活性Fv的CDR中的一个或多个来完成,包括改变活性可变结构域的三个CDR中的一个或多个。这可以通过以下方式完成:在一个或多个CDR中的功能重要的残基处进行一个或多个氨基酸置换、用随机序列替换一些或所有CDR残基、用标签或标记序列替换一个或多个CDR、和/或将CDR和/或可变区与来自不相关抗体(例如,针对不同生物体蛋白质的抗体)的那些进行交换。

[0202] 在一些情况下,只可以改变可变区中的CDR中的一个以使其失活,但其他实施方案包括一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR中的改变。

[0203] 在一些情况下,可以将无活性结构域工程化以促进在前药形式中的选择性结合,以促进在切割之前形成分子内iVH-VL和VH-iVL结构域(例如,通过分子间配对形成)。参见例如,Igawa等人,Protein Eng.Des.Selection 23(8):667-677(2010),其特此通过引用整体并且尤其是关于界面残基氨基酸置换部分明确地并入。

[0204] 在某些实施方案中,本文所述的多肽构建体的CD3结合结构域不仅表现出与人CD3的有效CD3结合亲和力,而且还表现出与相应的食蟹猴CD3蛋白质的优异交叉反应性。在一些情况下,多肽构建体的CD3结合结构域与来自食蟹猴的CD3交叉反应。在某些情况下,针对CD3的人:食蟹猴KD比率在5与0.2之间。

[0205] 在一些实施方案中,抗原结合蛋白的CD3结合结构域可以是结合CD3的任何结构域,包括但不限于来自单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体的结构域。在一些情况下,CD3结合结构域衍生自抗原结合蛋白将最终用于其中的相同物种是有益的。例如,用于人时,抗原结合蛋白的CD3结合结构域包含来自抗体或抗体片段的抗原结合结构域的人或人源化残基可能是有益的。

[0206] 因此,在一个方面,抗原结合结构域包含人源化或人结合结构域。在一个实施方案

中,人源化或人抗CD3结合结构域包含本文所述的人源化或人抗CD3结合结构域的一个或多个(例如,所有三个)轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3),和/或本文所述的人源化或人抗CD3结合结构域(例如包含一个或多个(例如,所有三个)LC CDR和一个或多个(例如,所有三个)HC CDR的人源化或人抗CD3结合结构域)的一个或多个(例如,所有三个)重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。

[0207] 在一些实施方案中,人源化或人抗CD3结合结构域包含对CD3具有特异性的人源化或人轻链可变区,其中对CD3具有特异性的轻链可变区包含在人轻链框架区中的人或非人轻链CDR。在某些情况下,轻链框架区是λ(兰布达)轻链框架。在其他情况下,轻链框架区是K(卡帕)轻链框架。

[0208] 在一些实施方案中,一个或多个CD3结合结构域是人源化的或完全人的。在一些实施方案中,一个或多个激活的CD3结合结构域对在CD3表达细胞上的CD3具有1000nM或更小的KD结合。在一些实施方案中,一个或多个激活的CD3结合结构域对在CD3表达细胞上的CD3具有100nM或更小的KD结合。在一些实施方案中,一个或多个激活的CD3结合结构域对在CD3表达细胞上的CD3具有10nM或更小的KD结合。在一些实施方案中,一个或多个CD3结合结构域与食蟹猴CD3具有交叉反应性。在一些实施方案中,一个或多个CD3结合结构域包含本文所提供的氨基酸序列。

[0209] 在一些实施方案中,人源化或人抗CD3结合结构域包含对CD3具有特异性的人源化或人重链可变区,其中对CD3具有特异性的重链可变区包含在人重链框架区中的人或非人重链CDR。

[0210] 在一个实施方案中,抗CD3结合结构域是包含本文所提供的氨基酸序列的轻链和重链的Fv。在一个实施方案中,抗CD3结合结构域包含:轻链可变区,所述轻链可变区包含具有本文所提供的轻链可变区的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰(例如,置换)但不多于30个、20个或10个修饰(例如,置换)的氨基酸序列、或者与本文所提供的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,所述重链可变区包含具有本文所提供的重链可变区的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰(例如,置换)但不多于30个、20个或10个修饰(例如,置换)的氨基酸序列、或者与本文所提供的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,人源化或人抗CD3结合结构域是scFv,并且包含本文所述的氨基酸序列的轻链可变区经由scFv接头与包含本文所述的氨基酸序列的重链可变区附接。scFv的轻链可变区和重链可变区可以是例如以下方向中的任一种:轻链可变区-scFv接头-重链可变区或重链可变区-scFv接头-轻链可变区。

[0211] 在一些实施方案中,抗原结合蛋白的CD3结合结构域具有KD为1000nM或更小、100nM或更小、50nM或更小、20nM或更小、10nM或更小、5nM或更小、1nM或更小、或0.5nM或更小的对在CD3表达细胞上的CD3的亲和力。在一些实施方案中,抗原结合蛋白的CD3结合结构域具有KD为1000nM或更小、100nM或更小、50nM或更小、20nM或更小、10nM或更小、5nM或更小、1nM或更小、或0.5nM或更小的对CD3ε的亲和力。在其他实施方案中,抗原结合蛋白的CD3结合结构域具有低的对CD3的亲和力,即约100nM或更大。

[0212] 与CD3结合的亲和力可通过例如以下来测定:通过抗原结合蛋白本身或其CD3结合结构域与包被在测定板上;在微生物细胞表面上展示;在溶液中;等等的CD3结合的能力,如

本领域已知的，通常使用Biacore或Octet。本公开的抗原结合蛋白本身或其CD3结合结构域对CD3的结合活性可以通过将配体(例如，CD3)或抗原结合蛋白本身或其CD3结合结构域固定至珠粒、底物、细胞等上来测定。可以将药剂添加到适当的缓冲液中并将结合配偶体在给定温度下孵育一段时间。在洗涤去除未结合的物质之后，结合的蛋白质可以用例如SDS、高pH缓冲液等释放，并通过例如表面等离子体共振(SPR)进行分析。

[0213] 在许多实施方案中，优选的活性和惰性结合结构域是图7中示出的那些。图7描绘了已经以不同方式失活的一个活性VH和VL以及三个无活性VHi和三个无活性VLi。

[0214] 如图7所示，一对特别有用的活性抗CD3 VL和VH结构域具有VL和VH，所述VL具有具有SEQ ID NO:255的vlCDR1、具有SEQ ID NO:256的vlCDR2和具有SEQ ID NO:257的vlCDR3，并且所述VH具有具有SEQ ID NO:271的vhCDR1、具有SEQ ID NO:272的vhCDR2和具有SEQ ID NO:273的vhCDR3。

[0215] 如图7所示，一对特别有用的活性抗CD3 VL和VH结构域具有具有SEQ ID NO:254的VL和具有SEQ ID NO:270的VH。

[0216] B.针对肿瘤靶抗原的抗原结合结构域

[0217] 除了所述CD3和半衰期延长结构域之外，本文所述的多肽构建体还包含靶结构域，所述靶结构域结合一个或多个靶抗原或单个靶抗原上的一个或多个区域。本文预期本发明的多肽构建体在例如疾病特异性微环境中或在受试者的血液中在蛋白酶切割结构域处被切割，并且每个靶抗原结合结构域将结合靶细胞上的靶抗原，由此激活CD3结合结构域以结合T细胞。一般而言，TTA结合结构域可以在蛋白酶切割之前结合它们的靶标，因此它们可以在靶细胞上“等待”以被激活为T细胞接合物。至少一种靶抗原参与和/或与疾病、病症或病状相关。示例性的靶抗原包括与增生性疾病、肿瘤性疾病、炎症性疾病、免疫性障碍、自身免疫性疾病、感染性疾病、病毒性疾病、过敏反应、寄生虫反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病相关的那些。在一些实施方案中，靶抗原是在肿瘤细胞上表达的肿瘤抗原。或者，在一些实施方案中，靶抗原与病原体诸如病毒或细菌相关。至少一种靶抗原也可能针对健康组织。

[0218] 在一些实施方案中，靶抗原是细胞表面分子诸如蛋白质、脂质或多糖。在一些实施方案中，靶抗原是在肿瘤细胞、病毒感染细胞、细菌感染细胞、受损红细胞、动脉斑块细胞或纤维化组织细胞上。

[0219] 本发明的优选实施方案利用sdABD作为靶向结构域。这些优于scFv ABD，因为将其他VH和VL结构域添加到本发明的构建体中可能会使伪Fv结构域的形成复杂化。

[0220] 在一些实施方案中，本发明的前药构建体利用单个TTA结合结构域(诸如图3A中一般描绘的)作为sdABD-TTA对和作为“形式4”构型(图4)。图4示出了单个抗EGFRABD的使用，但可以使用其他TTA结合结构域。

[0221] 在一些实施方案中，特别是在形式1和形式2构建体中，本发明的前药构建体利用两个TTAABD，同样优选地以sdABD-TTA形式。当使用双重靶向结构域时，它们可以结合同一TTA的同一表位。例如，如本文所讨论的，本文的许多构建体利用两个相同的靶向结构域。在一些实施方案中，可以使用结合同一TTA的不同表位的两个靶向结构域，例如如图7所示，两个EGFR sdABD结合人EGFR上的不同表位。在一些实施方案中，两个靶向结构域结合不同的TTA，如下文更充分描述。

[0222] 本文考虑的多肽构建体包括至少一个抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域结合至少一种靶抗原。在一些实施方案中,靶抗原结合结构域特异性地结合细胞表面分子。在一些实施方案中,靶抗原结合结构域特异性地结合肿瘤抗原。在一些实施方案中,靶抗原结合结构域特异性地且独立地结合选自EpCAM、EGFR、HER-2、LyPD3、B7H3、CA9、Trop2和FOLR1中的至少一种的肿瘤靶抗原("TTA")。如下文所讨论的,这些可以以多种方式组合。

[0223] (a)EGFR sdABD

[0224] 如图5A所示,存在许多与人EGFR结合的特别有用的sdABD,在本文中称为"αEGFR"、"aEGFR"、"sdABD-EGFR"、"EGFR sdABD"、"EGFR sdAb"、"EGFR ABD"或"EGFRABD"。

[0225] 在一些实施方案中,sdABD-EGFR(例如,sdABD-αEGFR1)具有具有SEQ ID NO:2的sdCDR1、具有SEQ ID NO:3的sdCDR2和具有SEQ ID NO:4的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-EGFR具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列,如图5A所提供。

[0226] 在一些实施方案中,sdABD-EGFR(例如,sdABD-αEGFR2)具有具有SEQ ID NO:6的sdCDR1、具有SEQ ID NO:7的sdCDR2和具有SEQ ID NO:8的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-EGFR具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列,如图5A所提供。

[0227] 在一些实施方案中,sdABD-EGFR(例如,sdABD-hαEGFR1)具有具有SEQ ID NO:10的sdCDR1、具有SEQ ID NO:11的sdCDR2和具有SEQ ID NO:12的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-EGFR具有SEQ ID NO:9的氨基酸片列,如图5A所提供。

[0228] 在一些实施方案中,sdABD-EGFR(例如,sdABD-aEGFR2a)具有具有SEQ ID NO:14的sdCDR1、具有SEQ ID NO:15的sdCDR2和具有SEQ ID NO:16的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-EGFR具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列,如图5A所提供。

[0229] 在一些实施方案中,sdABD-EGFR(例如,sdABD-hαEGFR2d)具有具有SEQ ID NO:18的sdCDR1、具有SEQ ID NO:19的sdCDR2和具有SEQ ID NO:20的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-EGFR具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列,如图5A所提供。

[0230] (b)EpCAM sdABD

[0231] 如图5D-5E所示,存在许多与人EpCAM结合的特别有用的sdABD,在本文中称为"αEpCAM"、"aEpCAM"、"sdABD-EpCAM"、EpCAM sdABD"、"EpCAM sdAb"、"EpCAM ABD"或"EpCAMABD"。

[0232] 在一些实施方案中,sdABD-EpCAM(例如,sdABD-EpCAM h13)具有具有SEQ ID NO:62的sdCDR1、具有SEQ ID NO:63的sdCDR2、具有SEQ ID NO:64的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-EpCAM具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列,如图5D所提供。

[0233] 在一些实施方案中,sdABD-EpCAM(例如,sdABD-EpCAM h23)具有具有SEQ ID NO:66的sdCDR1、具有SEQ ID NO:67的sdCDR2、具有SEQ ID NO:68的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-EpCAM具有SEQ ID NO:65的氨基酸序列,如图5D所提供。

[0234] 在一些实施方案中,sdABD-EpCAM(例如,sdABD-EpCAM hVIB665)具有具有SEQ ID NO:70的sdCDR1、具有SEQ ID NO:71的sdCDR2、具有SEQ ID NO:72的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-EpCAM具有SEQ ID NO:69的氨基酸序列,如图5E所提供。应当注意,与h13和h23 EpCAM sdABD相比,hVIB665(也称为"acEpCAM hVIB665")结合EpCAM的切割和未切割形式(已知EpCAM在体内经历切割)。

[0235] 在一些实施方案中,sdABD-EpCAM(例如,sdABD-EpCAM hVIB666)具有具有SEQ ID

NO:74的sdCDR1、具有SEQ ID NO:75的sdCDR2、具有SEQ ID NO:76的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-EpCAM具有SEQ ID NO:73的氨基酸序列，如图5E所提供。应当注意，与h13和h23 EpCAM sdABD相比，hVIB666(也称为“acEpCAM hVIB666”)结合EpCAM的切割和未切割形式(已知EpCAM在体内经历切割)。

[0236] 在一些实施方案中，sdABD-EpCAM(例如，人源化EpCAM sdAb)具有具有SEQ ID NO:496的sdCDR1、具有SEQ ID NO:497的sdCDR2、具有SEQ ID NO:498的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-EpCAM具有SEQ ID NO:495的氨基酸序列，如图75所提供。

[0237] (c)B7H3 sdABD

[0238] 如图5B-5D所示，存在许多与人B7H3结合的特别有用的sdABD，在本文中称为“αB7H3”、“aB7H3”、“sdABD-B7H3”、“B7H3 sdAb”、“B7H3 ABD”、“B7H3ABD”或“B7H3-ABD”。

[0239] 在一个有用的实施方案中，sdABD-B7H3(例如，sdABD-B7H3 hF7)具有具有SEQ ID NO:34的sdCDR1、具有SEQ ID NO:35的sdCDR2、具有SEQ ID NO:36的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-B7H3具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列，如图5B所提供。

[0240] 在一个有用的实施方案中，sdABD-B7H3(例如，sdABD-B7H3 hF12)具有具有SEQ ID NO:38的sdCDR1、具有SEQ ID NO:39的sdCDR2、具有SEQ ID NO:40的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-B7H3具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列，如图5C所提供。

[0241] 在一个有用的实施方案中，sdABD-B7H3(例如，sdABD-B7H3 hF12(N57Q))具有具有SEQ ID NO:42的sdCDR1、具有SEQ ID NO:43的sdCDR2、具有SEQ ID NO:44的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-B7H3具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列，如图5C所提供。与hF7和hF12 B7H3 sdABD相反，氨基酸置换N57Q去除了糖基化位点。

[0242] 在一个有用的实施方案中，sdABD-B7H3(例如，sdABD-B7H3 HF12(N57E))具有具有SEQ ID NO:46的sdCDR1、具有SEQ ID NO:47的sdCDR2和具有SEQ ID NO:48的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-B7H3具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列，如图5C所提供。与hF7和hF12 B7H3 sdABD相反，氨基酸置换N57E去除了糖基化位点。

[0243] 在一个有用的实施方案中，sdABD-B7H3(例如，sdABD-B7H3 hF12(N57D))具有具有SEQ ID NO:50的sdCDR1、具有SEQ ID NO:51的sdCDR2、具有SEQ ID NO:52的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-B7H3具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列，如图5B所提供。与hF7和hF12 B7H3 sdABD相反，氨基酸置换N57D去除了糖基化位点。

[0244] 在一个有用的实施方案中，sdABD-B7H3(例如，sdABD-B7H3 hF12(S59A))具有具有SEQ ID NO:54的sdCDR1、具有SEQ ID NO:55的sdCDR2、具有SEQ ID NO:56的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-B7H3具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列，如图5D所提供。与hF7和hF12 B7H3 sdABD相反，氨基酸置换S59A去除了糖基化位点。

[0245] 在一个有用的实施方案中，sdABD-B7H3(例如，sdABD-B7H3 hF12(S59Y))具有具有SEQ ID NO:58的sdCDR1、具有SEQ ID NO:59的sdCDR2、具有SEQ ID NO:60的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-B7H3具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列，如图5D所提供。与hF7和hF12 B7H3 sdABD相反，氨基酸置换NS59Y去除了糖基化位点。

[0246] (d)FOLR1 sdABD

[0247] 如图5B所示，存在许多与人FOLR1结合的特别有用的sdABD，在本文中称为“αFOLR1”、“aFOLR1”、“sdABD-FOLR1”、“FOLR1sdAb”、“sdABDs FOLR1”、“FOLR1 ABD”、

“FOLR1ABD”或“FOLR1-ABD”。

[0248] 在一个有用的实施方案中，sdABD-FOLR1(例如，sdABD-FOLR1h77-2)具有具有SEQ ID NO:22的sdCDR1、具有SEQ ID NO:23的sdCDR2、具有SEQ ID NO:24的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-FOLR1具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列，如图5B所提供。

[0249] 在一个有用的实施方案中，sdABD-FOLR1(例如，sdABD-FOLR1 h59.3)具有具有SEQ ID NO:26的sdCDR1、具有SEQ ID NO:27的sdCDR2、具有SEQ ID NO:28的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-FOLR1具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列，如图5B所提供。

[0250] 在一个有用的实施方案中，sdABD-FOLR1(例如，sdABD-FOLR1h22-4)具有具有SEQ ID NO:30的sdCDR1、具有SEQ ID NO:31的sdCDR2、具有SEQ ID NO:32的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-FOLR1具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列，如图5B所提供。

[0251] (e)Trop2 sdABD

[0252] 如图5E所示，存在许多与人Trop2结合的特别有用的sdABD，在本文中称为“αTrop2”、“aTrop2”、“sdABD-Trop2”、“sdABD Trop2”、“Trop2 sdAb”、“Trop2ABD”或“Trop2-ABD”。

[0253] 在一个有用的实施方案中，sdABD-Trop2(例如，sdABD-Trop2 hVIB557)具有具有SEQ ID NO:78的sdCDR1、具有SEQ ID NO:79的sdCDR2、具有SEQ ID NO:80的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-Trop2具有SEQ ID NO:77的氨基酸序列，如图5E所提供。

[0254] 在一些实施方案中，sdABD-Trop2(例如，sdABD-Trop2 hVIB565)具有具有SEQ ID NO:82的sdCDR1、具有SEQ ID NO:83的sdCDR2、具有SEQ ID NO:84的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-Trop2具有SEQ ID NO:81的氨基酸序列，如图5E所提供。

[0255] 在一些实施方案中，sdABD-Trop2(例如，sdABD-Trop2 hVIB575)具有具有SEQ ID NO:86的sdCDR1、具有SEQ ID NO:87的sdCDR2、具有SEQ ID NO:88的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-Trop2具有SEQ ID NO:85的氨基酸序列，如图5F所提供。

[0256] 在一些实施方案中，sdABD-Trop2(例如，sdABD-Trop2 hVIB578)具有具有SEQ ID NO:90的sdCDR1、具有SEQ ID NO:91的sdCDR2、具有SEQ ID NO:92的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-Trop2具有SEQ ID NO:89的氨基酸序列，如图5F所提供。

[0257] 在一些实施方案中，sdABD-Trop2(例如，sdABD-Trop2 hVIB609)具有具有SEQ ID NO:94的sdCDR1、具有SEQ ID NO:95的sdCDR2、具有SEQ ID NO:96的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-Trop2具有SEQ ID NO:93的氨基酸序列，如图5F所提供。

[0258] 在一些实施方案中，sdABD-Trop2(例如，sdABD-Trop2 hVIB619)具有具有SEQ ID NO:98的sdCDR1、具有SEQ ID NO:99的sdCDR2、具有SEQ ID NO:100的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-Trop2具有SEQ ID NO:97的氨基酸序列，如图5F所提供。

[0259] (f)CA9 sdABD

[0260] 如图5F-5G所示，存在许多与人CA9结合的特别有用的sdABD，在本文中称为“αCA9”、“aCA9”、“sdABD-CA9”、“sdABD CA9”、“CA9 sdAb”、“CA9 ABD”或“CA9-ABD”。

[0261] 在一些实施方案中，sdABD-CA9(例如，sdABD-CA9 hVIB456)具有具有SEQ ID NO:102的sdCDR1、具有SEQ ID NO:103的sdCDR2、具有SEQ ID NO:104的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-Trop2具有SEQ ID NO:101的氨基酸序列，如图5F所提供。

[0262] 在一些实施方案中，sdABD-CA9(例如，sdABD-CA9 hVIB476)具有具有SEQ ID NO:

106的sdCDR1、具有SEQ ID NO:107的sdCDR2、具有SEQ ID NO:108的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-Trop2具有SEQ ID NO:105的氨基酸序列，如图5G所提供。

[0263] 在一些实施方案中，sdABD-CA9(例如，sdABD-CA9 hVIB407)具有具有SEQ ID NO:110的sdCDR1、具有SEQ ID NO:111的sdCDR2、具有SEQ ID NO:112的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-Trop2具有SEQ ID NO:109的氨基酸序列，如图5G所提供。

[0264] 在一些实施方案中，sdABD-CA9(例如，sdABD-CA9 hVIB445)具有具有SEQ ID NO:114的sdCDR1、具有SEQ ID NO:115的sdCDR2、具有SEQ ID NO:116的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-Trop2具有SEQ ID NO:113的氨基酸序列，如图5G所提供。

[0265] (g)LyPD3 sdABD

[0266] 如图5G-5H所示，存在许多与人LyPD3结合的特别有用的sdABD，在本文中称为“αLyPD3”、“sdABD-LyPD3”、“sdABD LyPD3”、“LyPD3 sdAb”、“LyPD3 ABD”、“LyPD3ABD”或“LyPD3-ABD”。

[0267] 在一个有用的实施方案中，sdABD-LyPD3(例如，sdABD-LyPD3 h787)具有具有SEQ ID NO:118的sdCDR1、具有SEQ ID NO:119的sdCDR2、具有SEQ ID NO:120的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-LyPD3具有SEQ ID NO:117的氨基酸序列，如图5G所提供。

[0268] 在一个有用的实施方案中，sdABD-LyPD3(例如，sdABD-LyPD3 h790)具有具有SEQ ID NO:122的sdCDR1、具有SEQ ID NO:123的sdCDR2、具有SEQ ID NO:124的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-LyPD3具有SEQ ID NO:121的氨基酸序列，如图5G所提供。

[0269] 在一个有用的实施方案中，sdABD-LyPD3(例如，sdABD-LyPD3 H804)具有具有SEQ ID NO:126的sdCDR1、具有SEQ ID NO:127的sdCDR2、具有SEQ ID NO:128的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-LyPD3具有SEQ ID NO:125的氨基酸序列，如图5H所提供。

[0270] 在一个有用的实施方案中，sdABD-LyPD3(例如，sdABD-LyPD3 h773)具有具有SEQ ID NO:130的sdCDR1、具有SEQ ID NO:131的sdCDR2、具有SEQ ID NO:132的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-LyPD3具有SEQ ID NO:129的氨基酸序列，如图5H所提供。

[0271] 在一个有用的实施方案中，sdABD-LyPD3(例如，sdABD-LyPD3 h840)具有具有SEQ ID NO:134的sdCDR1、具有SEQ ID NO:135的sdCDR2、具有SEQ ID NO:136的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-LyPD3具有SEQ ID NO:133的氨基酸序列，如图5H所提供。

[0272] 在一个有用的实施方案中，sdABD-LyPD3(例如，sdABD-LyPD3 h885)具有具有SEQ ID NO:138的sdCDR1、具有SEQ ID NO:139的sdCDR2、具有SEQ ID NO:140的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-LyPD3具有SEQ ID NO:137的氨基酸序列，如图5H所提供。

[0273] (h)HER2 sdABD

[0274] 如图5H-5M所示，存在许多与人HER2结合的特别有用的sdABD，在本文中称为“αHER2”、“aHER2”、“sdABD-HER2”、“sdABD HER2”、“HER2 sdAb”、“HER2 ABD”、“HER2ABD”或“HER2-ABD”。

[0275] 在一些实施方案中，sdABD-HER2(例如，sdABD-HER2 1054)具有具有SEQ ID NO:142的sdCDR1、具有SEQ ID NO:143的sdCDR2、具有SEQ ID NO:144的sdCDR3。在一些情况下，sdABD-HER2具有SEQ ID NO:141的氨基酸序列，如图5H所提供。

[0276] 在一些实施方案中，sdABD-HER2(例如，sdABD-HER2 1055)具有具有SEQ ID NO:146的sdCDR1、具有SEQ ID NO:147的sdCDR2、具有SEQ ID NO:148的sdCDR3。在一些情况下，

sdABD-HER2具有SEQ ID NO:145的氨基酸序列,如图5I所提供。

[0277] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1058)具有具有SEQ ID NO:150的sdCDR1、具有SEQ ID NO:151的sdCDR2、具有SEQ ID NO:153的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:149的氨基酸序列,如图5I所提供。

[0278] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1059)具有具有SEQ ID NO:154的sdCDR1、具有SEQ ID NO:155的sdCDR2、具有SEQ ID NO:156的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:153的氨基酸序列,如图5I所提供。

[0279] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1065)具有具有SEQ ID NO:158的sdCDR1、具有SEQ ID NO:159的sdCDR2、具有SEQ ID NO:160的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:157的氨基酸序列,如图5I所提供。

[0280] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1090)具有具有SEQ ID NO:162的sdCDR1、具有SEQ ID NO:163的sdCDR2、具有SEQ ID NO:164的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:161的氨基酸序列,如图5I所提供。

[0281] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1191)具有具有SEQ ID NO:166的sdCDR1、具有SEQ ID NO:167的sdCDR2、具有SEQ ID NO:168的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:165的氨基酸序列,如图5J所提供。

[0282] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1092)具有具有SEQ ID NO:170的sdCDR1、具有SEQ ID NO:171的sdCDR2、具有SEQ ID NO:172的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:169的氨基酸序列,如图5J所提供。

[0283] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1097)具有具有SEQ ID NO:174的sdCDR1、具有SEQ ID NO:175的sdCDR2、具有SEQ ID NO:176的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:173的氨基酸序列,如图5J所提供。

[0284] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1118)具有具有SEQ ID NO:178的sdCDR1、具有SEQ ID NO:179的sdCDR2、具有SEQ ID NO:180的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:177的氨基酸序列,如图5J所提供。

[0285] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1121)具有具有SEQ ID NO:182的sdCDR1、具有SEQ ID NO:183的sdCDR2、具有SEQ ID NO:184的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:181的氨基酸序列,如图5J所提供。

[0286] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1134)具有具有SEQ ID NO:186的sdCDR1、具有SEQ ID NO:187的sdCDR2、具有SEQ ID NO:188的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:185的氨基酸序列,如图5K所提供。

[0287] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1138)具有具有SEQ ID NO:190的sdCDR1、具有SEQ ID NO:191的sdCDR2、具有SEQ ID NO:192的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:189的氨基酸序列,如图5K所提供。

[0288] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1139)具有具有SEQ ID NO:194的sdCDR1、具有SEQ ID NO:195的sdCDR2、具有SEQ ID NO:196的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:193的氨基酸序列,如图5K所提供。

[0289] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1140)具有具有SEQ ID NO:198的sdCDR1、具有SEQ ID NO:199的sdCDR2、具有SEQ ID NO:200的sdCDR3。在一些情况下,

sdABD-HER2具有SEQ ID NO:197的氨基酸序列,如图5K所提供。

[0290] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1145)具有具有SEQ ID NO:202的sdCDR1、具有SEQ ID NO:203的sdCDR2、具有SEQ ID NO:204的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:201的氨基酸序列,如图5K所提供。

[0291] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1146)具有具有SEQ ID NO:206的sdCDR1、具有SEQ ID NO:207的sdCDR2、具有SEQ ID NO:203的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:205的氨基酸序列,如图5L所提供。

[0292] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1149)具有具有SEQ ID NO:210的sdCDR1、具有SEQ ID NO:211的sdCDR2、具有SEQ ID NO:212的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:209的氨基酸序列,如图5L所提供。

[0293] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1150)具有具有SEQ ID NO:214的sdCDR1、具有SEQ ID NO:215的sdCDR2、具有SEQ ID NO:216的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:213的氨基酸序列,如图5L所提供。

[0294] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1156)具有具有SEQ ID NO:218的sdCDR1、具有SEQ ID NO:219的sdCDR2、具有SEQ ID NO:220的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:217的氨基酸序列,如图5L所提供。

[0295] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1158)具有具有SEQ ID NO:222的sdCDR1、具有SEQ ID NO:223的sdCDR2、具有SEQ ID NO:224的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:221的氨基酸序列,如图5L所提供。

[0296] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1159)具有具有SEQ ID NO:226的sdCDR1、具有SEQ ID NO:227的sdCDR2、具有SEQ ID NO:228的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:225的氨基酸序列,如图5M所提供。

[0297] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1160)具有具有SEQ ID NO:230的sdCDR1、具有SEQ ID NO:231的sdCDR2、具有SEQ ID NO:232的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:229的氨基酸序列,如图5M所提供。

[0298] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1161)具有具有SEQ ID NO:234的sdCDR1、具有SEQ ID NO:235的sdCDR2、具有SEQ ID NO:236的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:233的氨基酸序列,如图5M所提供。

[0299] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1162)具有具有SEQ ID NO:238的sdCDR1、具有SEQ ID NO:239的sdCDR2、具有SEQ ID NO:240的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:237的氨基酸序列,如图5M所提供。

[0300] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,sdABD-HER2 1163)具有具有SEQ ID NO:242的sdCDR1、具有SEQ ID NO:243的sdCDR2、具有SEQ ID NO:244的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:241的氨基酸序列,如图5M所提供。

[0301] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,人源化aHER2 sdAb h1130)具有具有SEQ ID NO:500的sdCDR1、具有SEQ ID NO:501的sdCDR2、具有SEQ ID NO:502的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:499的氨基酸序列,如图75所提供。

[0302] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,人源化aHER2 sdAb h1156)具有具有SEQ ID NO:504的sdCDR1、具有SEQ ID NO:505的sdCDR2、具有SEQ ID NO:506的sdCDR3。在一些

情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:503的氨基酸序列,如图75所提供。表位作图揭示了人源化aHER2 sdAb h1156结合HER2蛋白的氨基酸位置147-148处的氨基酸序列WK、氨基酸位置157-161处的氨基酸序列LALTL(SEQ ID NO:515)和氨基酸位置194-198处的TRTVC(SEQ ID NO:516)(图36)。

[0303] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,人源化aHER2 sdAb h1159)具有具有SEQ ID NO:508的sdCDR1、具有SEQ ID NO:509的sdCDR2、具有SEQ ID NO:510的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:507的氨基酸序列,如图75所提供。

[0304] 在一些实施方案中,sdABD-HER2(例如,人源化aHER2 sdAb h1162)具有具有SEQ ID NO:512的sdCDR1、具有SEQ ID NO:513的sdCDR2、具有SEQ ID NO:514的sdCDR3。在一些情况下,sdABD-HER2具有SEQ ID NO:511的氨基酸序列,如图75所提供。表位作图揭示了人源化aHER2 sdAb h1162结合HER2蛋白的氨基酸位置462-472处的氨基酸序列QLTFRNPHQALL(图36)。

[0305] 在一些实施方案中,在切割蛋白酶切割结构域之前的蛋白质为小于约100kDa。在一些实施方案中,在切割蛋白酶切割结构域之后的蛋白质为约25至约75kDa。在一些实施方案中,在蛋白酶切割之前的蛋白质具有高于肾的首过清除阈值的大小。在一些实施方案中,在蛋白酶切割之前的蛋白质具有至少约50小时的消除半衰期。在一些实施方案中,在蛋白酶切割之前的蛋白质具有至少约100小时的消除半衰期。在一些实施方案中,与针对相同靶抗原的IgG相比,蛋白质具有增加的组织穿透。在一些实施方案中,与针对相同靶抗原的IgG相比,蛋白质具有增加的组织分布。

[0306] C.半衰期延长结构域

[0307] 本发明的MCE蛋白(同样,在本文中也称为“COBRA™”蛋白或构建体)任选地包括半衰期延长结构域。预期此类结构域包括但不限于HSA结合结构域、Fc结构域、小分子和本领域已知的其他半衰期延长结构域。

[0308] 人血清白蛋白(HSA)(分子量约67kDa)是血浆中最丰富的蛋白质,以约50mg/ml(600μM)存在,并且在人中具有约20天的半衰期。HSA用于维持血浆pH,有助于胶质血压,用作许多代谢物和脂肪酸的载体,并且用作血浆中的主要药物转运蛋白。

[0309] 与白蛋白的非共价缔合延长了短寿命蛋白质的消除半衰期。例如,当分别静脉内地施用于小鼠和兔时,与施用单独的Fab片段相比,白蛋白结合结构域与Fab片段的重组融合导致体内清除率降低25倍和58倍,以及半衰期延长26倍和37倍。在另一个实例中,当将胰岛素用脂肪酸酰化以促进与白蛋白的缔合时,当皮下注射到兔或猪中时观察到延长的效果。总之,这些研究证明了在白蛋白结合与延长作用之间的联系。

[0310] 在许多实施方案中,半衰期延长结构域是来自结合HSA的单结构域抗体的单结构域抗原结合域。这种结构域在本文中通常称为针对人HSA的“sdABD”(sdABD-HSA),或者“sdABD(1/2)”,以将这些结合结构域与针对TIA的sdABD区分开。图6示出了特别有用的sdABD(1/2)。

[0311] 在一些实施方案中,sdABD-HSA(例如,sdABD-HSA(10GE))具有具有SEQ ID NO:246的sdCDR1、具有SEQ ID NO:247的sdCDR2、具有SEQ ID NO:248的sdCDR3。在一些实施方案中,sdABD-HSA具有SEQ ID NO:245的氨基酸序列。在某些实施方案中,sdABD-HSA(例如,具有组氨酸(His)标签的sdABD-HSA)具有具有SEQ ID NO:250的sdCDR1、具有SEQ ID NO:251

的sdCDR2、具有SEQ ID NO:252的sdCDR3。在一些实施方案中,sdABD-HSA具有SEQ ID NO:249的氨基酸序列。

[0312] 抗原结合蛋白的半衰期延长结构域提供抗原结合蛋白本身的改变的药效学和药代动力学。如上所述,半衰期延长结构域延长了消除半衰期。半衰期延长结构域还改变了药效学性质,包括改变抗原结合蛋白的组织分布、穿透和扩散。在一些实施方案中,与不具有半衰期延长结合结构域的蛋白质相比,半衰期延长结构域提供了改善的组织(包括肿瘤)靶向、组织穿透、组织分布、组织内扩散和增强的功效。在一个实施方案中,治疗方法有效且高效地利用减少量的抗原结合蛋白,导致副作用减少,诸如非肿瘤细胞的细胞毒性减少。

[0313] 此外,半衰期延长结构域(例如HSA结合结构域)的特征包括HSA结合结构域对HSA的结合亲和力。可以选择HSA结合结构域的亲和力,以便靶向特定多肽构建体中的特异性消除半衰期。因此,在一些实施方案中,HSA结合结构域具有高结合亲和力。在其他实施方案中,HSA结合结构域具有中等结合亲和力。在又其他实施方案中,HSA结合结构域具有低的或边际结合亲和力。示例性的结合亲和力包括10nM或更小(高)、在10nM与100nM之间(中等)和大于100nM(低)的KD浓度。如上所述,通过已知方法诸如表面等离子体共振(SPR)确定对HSA的结合亲和力。

[0314] D.蛋白酶切割位点

[0315] 本发明的蛋白质组合物,特别是前药构建体,包括一个或多个通常驻留在可切割接头中的蛋白酶切割位点,如本文所概述。

[0316] 如本文所述,本发明的前药构建体包括至少一个蛋白酶切割位点,所述蛋白酶切割位点包含被至少一种蛋白酶切割的氨基酸序列。在一些情况下,本文所述的MCE蛋白包含被至少一种蛋白酶切割的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个蛋白酶切割位点。如本文更充分讨论的,当在前药构建物中使用多于一个蛋白酶切割位点时,它们可以是相同的(例如,被单一蛋白酶切割的多个位点)或不同的(两个或更多个切割位点被至少两种不同的蛋白酶切割)。如本领域技术人员将理解的,含有三个或更多个蛋白酶切割位点的构建体可以利用一个、两个、三个等;例如,一些构建体可以利用三个位点用于两种不同的蛋白酶等。

[0317] 蛋白酶切割位点的氨基酸序列将取决于所靶向的蛋白酶。如本领域已知的,在体内发现了许多人蛋白酶,并且它们可能与疾病状态相关。

[0318] 已知蛋白酶由一些患病细胞和组织(例如肿瘤或癌细胞)分泌,产生富含蛋白酶的微环境或富蛋白酶微环境。在一些情况下,受试者的血液富含蛋白酶。在一些情况下,肿瘤周围的细胞将蛋白酶分泌到肿瘤微环境中。肿瘤周围的分泌蛋白酶的细胞包括但不限于肿瘤基质细胞、肌成纤维细胞、血细胞、肥大细胞、B细胞、NK细胞、调节性T细胞、巨噬细胞、细胞毒性T淋巴细胞、树突细胞、间充质干细胞、多形核细胞和其他细胞。在一些情况下,蛋白酶存在于受试者的血液中,例如靶向微生物肽中发现的氨基酸序列的蛋白酶。该特征允许靶向治疗剂诸如抗原结合蛋白具有另外的特异性,因为除了在靶向细胞或组织的富蛋白酶微环境中,T细胞将不被抗原结合蛋白结合。

[0319] 蛋白酶是在一些情况下以序列特异性方式切割蛋白质的蛋白质。蛋白酶包括但不限于丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、天冬酰胺肽裂解酶、血清蛋白酶、组织蛋白酶(例如,组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组

织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶S,等)、激肽释放酶、hK1、hK10、hK15、KLK7、颗粒酶B、纤溶酶、胶原酶、IV型胶原酶、基质降解酶、因子XA、胰凝乳蛋白酶样蛋白酶、胰蛋白酶样蛋白酶、弹性蛋白酶样蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶、猕猴桃蛋白酶(actinidain)、菠萝蛋白酶、钙蛋白酶(calpain)、胱天蛋白酶(例如,胱天蛋白酶3)、Mir1-CP、木瓜蛋白酶、HIV-1蛋白酶、HSV蛋白酶、CMV蛋白酶、凝乳酶、肾素、胃蛋白酶、蛋白裂解酶、天冬酰胺内肽酶(legumain)、疟原虫天冬氨酸蛋白酶(plasmepsin)、猪笼草天冬氨酸蛋白酶(nepenthesin)、金属外肽酶、金属内肽酶、基质金属蛋白酶(MMP)、MMP1、MMP2、MMP3、MMP8、MMP9、MMP13、MMP11、MMP14、甲基多巴、尿激酶血纤溶酶原活化因子(uPA)、肠激酶、前列腺特异性抗原(PSA、hK3)、白介素-1β转化酶,凝血酶、FAP(FAP-α)、二肽基肽酶和二肽基肽酶IV(DPPIV/CD26)。

[0320] 一些合适的蛋白酶和蛋白酶切割序列在图8A-8D中示出。在一些实施方案中,本文所述的融合蛋白中的任一种包含可切割接头,所述可切割接头包含SEQ ID NO:339-408和532-535中任一个所示的蛋白酶切割结构域序列。

[0321] E.接头

[0322] 如本文所讨论,本发明的不同结构域通常使用氨基酸接头连接在一起,所述氨基酸接头也可以赋予功能性(包括柔性或非柔性(例如空间限制))以及使用原位蛋白酶切割的能力。可以以多种方式对这些接头进行分类。

[0323] 本发明提供了“结构域接头”,其用于连接两个或更多个结构域,例如VH和VL,将靶肿瘤抗原结合结构域(TTABD,有时在本文中也称为“αTTA”(对于“抗TTA”))连接至VH或VL,将半衰期延长结构域连接至另一种组分等。结构域接头例如可以是不可切割的(“NCL”)、可切割的(“CL”)、受限和可切割的(“CCL”)以及受限和不可切割的(“CNCL”)。

[0324] 1.不可切割接头

[0325] 在一些实施方案中,结构域接头是不可切割的。一般而言,这些可以是两种类型之一:不可切割的和柔性的接头,其允许构建体中的接头的“上游”和“下游”组件以某些方式进行分子内自组装;或不可切割的和受限的接头,其中由接头分开的两个组件不能进行分子内自组装。然而,应当注意的是,在后一种情况下,虽然由不可切割的受限接头分开的两个组件结构域不会在分子内自组装,但其他分子内组件将自组装形成伪Fv结构域。

[0326] (a)不可切割但柔性的接头

[0327] 在该实施方案中,接头用于连接结构域以保持结构域的功能性,通常通过在患者中不被原位蛋白酶切割的较长的柔性结构域。适用于连接本发明的多肽中的结构域的内部不可切割接头的实例包括但不限于(GS)n、(GGS)n、(GGGS)n[SEQ ID NO:518]、(GGSG)n[SEQ ID NO:519]、(GGSGG)n[SEQ ID NO:520]或(GGGGS)n[SEQ ID NO:521],其中n是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些实施方案中,接头的长度可以是约15个氨基酸。

[0328] (b)不可切割和受限接头

[0329] 在一些情况下,接头不含有切割位点,并且也太短而不能允许由接头分开的蛋白质结构域分子内地自组装,并且是“受限不可切割接头”或“CNCL”。例如,在Pro186中,活性VH和活性VL被8个氨基酸(“8-mer”或“8mer”)隔开,所述氨基酸不允许VH和VL自组装成活性抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述接头仍然是柔性的;例如,(GGGS)n,其中n=2。在其他实施方案中,尽管通常不太优选,但可以使用更刚性的接头,诸如包括脯氨酸或庞大氨

基酸的那些。

[0330] 2.可切割接头

[0331] 本文中的所有前药构建体包括至少一个可切割接头。因此,在一个实施方案中,结构域接头是可切割的(CL),在本文中有时被称为“蛋白酶切割结构域”(“PCD”)。在该实施方案中,CL含有蛋白酶切割位点,如本文所概述并且如图8A-8D中所描绘。在一些情况下,CL仅含有蛋白酶切割位点。任选地,取决于切割识别位点的长度,可以在CL的N末端或C末端中的任一者或两者处存在额外的少数连接氨基酸;例如,在切割位点的N末端和C末端中的任一者或两者上可以存在1个、2个、3个、4个或5个氨基酸。因此,可切割接头也可以是受限(例如,8mer)或柔性的。

[0332] 本发明中特别感兴趣的是MMP9可切割接头和甲基多巴可切割接头,特别是MMP9受限可切割接头和甲基多巴受限可切割接头。

[0333] II.本发明的结构域

[0334] 本发明为本发明的前药多肽提供了许多不同的形式。本发明提供了受限Fv结构域和受限的伪Fv结构域。此外,本发明提供了多价条件有效(“MCE”)蛋白质,其含有两个Fv结构域但为非异构化构建体。如本文所概述,这些可以是非异构化可切割形式或非异构化不可切割形式,但每个构建体含有至少一个蛋白酶切割结构域。

[0335] 重要的是,虽然这两个结构域(Fv结构域和伪Fv结构域)在本文中都称为“受限的”,这意味着如上文所讨论并且如图1-5中所示,但只有其中一个需要受限,尽管通常当两个接头都受限时,蛋白质具有更好的表达。

[0336] 本领域技术人员将理解,对于形式1、2和4,本发明的受限和伪Fv结构域(接头未示出)的N末端至C末端顺序有四种可能性:aVH-aVL和iVL-iVH、aVH-aVL和iVH-iVL、aVL-aVH和iVL-iVH、aVL-aVH和iVH-iVL。测试了所有四种顺序,并且所有四种顺序都具有活性,但第一种顺序aVH-aVL和iVL-iVH显示出比其他三种更好的表达。因此,虽然此处的描述通常以这种aVH-aVL和iVL-iVH形式显示,但本文中的所有公开内容也包括这些结构域的其他顺序。

[0337] 请注意,一般而言,本发明的全长构建体的N末端至C末端顺序是基于aVH-aVL和iVL-iVH方向。

[0338] 此外,本领域已知在人类中可能存在来源于某些ABD的C末端序列的免疫原性。因此,一般而言,特别是当构建体的C末端终止于sdABD(例如,许多构建体的sdABD-HSA结构域)时,可以使用组氨酸标签(His6或His10)。出于纯化原因,本文的许多或大部分序列是使用His6 C末端标签生成的,但这些序列也可以用于降低人类的免疫原性,如Holland等人,DOI 10.1007/s10875-013-9915-0和WO2013/024059所示。

[0339] A.受限Fv结构域

[0340] 本发明提供了受限Fv结构域,其包含使用受限接头(如本文所概述,其可以是可切割的(形式1)或不可切割的(形式2和4))共价附接的活性VH和活性VL结构域。在不存在切割的情况下,受限接头防止在aVH和aVL之间的分子内缔合。因此,受限Fv结构域通常包含在可变结构域内所含的一组六个CDR,其中VH的vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3结合人CD3,并且VL的vlCDR1、vCDR2和vlCDR3结合人CD3,但呈前药形式(例如,未切割的),所述VH和VL不能空间缔合形成活性结合结构域,相反,优选与伪Fv分子内配对。

[0341] 受限Fv结构域可以包含如本文所述的活性VH和活性VL(aVH和aVL)或无活性VH和

VL(iVH和iVL,在这种情况下它是受限伪Fv结构域)或其组合。

[0342] 如本领域技术人员将理解的,受限Fv结构域中VH和VL的顺序可以是(N末端至C末端)VH-接头-VL或VL-接头-VH。

[0343] 如本文所概述,对于形式1构建体,在诸如图1中所示的那些情况下,受限Fv结构域可以包含使用可切割接头连接的VH和VL。在该实施方案中,受限Fv结构域具有vhFR1-vhCDR1-vhFR2-vhCDR2-vhFR3-vhCDR3-vhFR4-CCL-vlFR1-vlCDR1-vlFR2-vlCDR2-vlFR3-vlCDR3-vlFR4的结构(N末端至C末端)。一般而言,受限Fv结构域含有活性VH和VL结构域(例如,缔合时能够结合CD3),因此具有vhFR1-avhCDR1-vhFR2-avhCDR2-vhFR3-avhCDR3-vhFR4-CCL-vlFR1-avlCDR1-vlFR2-avlCDR2-vlFR3-avlCDR3-vlFR4的结构(N末端至C末端)。

[0344] 如本文所概述,对于形式2构建体,受限Fv结构域可以包含使用不可切割接头连接的VH和VL。在该实施方案中,受限Fv结构域具有vhFR1-vhCDR1-vhFR2-vhCDR2-vhFR3-vhCDR3-vhFR4-CNCL-vlFR1-vlCDR1-vlFR2-vlCDR2-vlFR3-vlCDR3-vlFR4的结构(N末端至C末端)。一般而言,受限Fv结构域含有活性VH和VL结构域(例如,缔合时能够结合CD3),因此具有vhFR1-avhCDR1-vhFR2-avhCDR2-vhFR3-avhCDR3-vhFR4-CNCL-vlFR1-avlCDR1-vlFR2-avlCDR2-vlFR3-avlCDR3-vlFR4的结构(N末端至C末端)。

[0345] 在本发明中特别有用的是受限不可切割Fv结构域,其具有带有SEQ ID NO:270的VH、带有SEQ ID NO:254的VL和带有SEQ ID NO:287的结构域接头。

[0346] B.受限伪Fv结构域

[0347] 本发明提供了受限伪Fv结构域,其包含使用受限接头(如本文所概述,其可以是可切割的或不可切割的)共价附接的无活性或伪iVH和iVL结构域。在不存在切割的情况下,受限接头防止在iVH和iVL之间的分子内缔合。因此,受限伪Fv结构域通常包含iVH和iVL,其具有允许iVH和iVL的缔合(当处于非受限形式时)的框架区,但所得伪Fv结构域不与人类蛋白质结合。iVH结构域可以与aVL结构域组装,并且iVL结构域可以与aVH结构域组装,但所得结构不与CD3结合。

[0348] 受限伪Fv结构域包含无活性VH和VL(iVH和iVL)。

[0349] 如本领域技术人员将理解的,受限伪Fv结构域中VH和VL的顺序可以是(N末端至C末端)VH-接头-VL或VL-接头-VH。

[0350] 如本文所概述,受限伪Fv结构域可以包含使用不可切割接头(如形式1、2和4所示)或使用可切割接头(如形式3所示)连接的iVH和iVL。

[0351] 一般而言,受限Fv结构域含有惰性VH和VL结构域(例如,缔合时能够结合CD3),因此具有vhFR1-ivlCDR1-vhFR2-ivlCDR2-vhFR3-ivlCDR3-vhFR4-CNCL-vlFR1-ivhCDR1-vlFR2-ivhCDR2-vlFR3-ivhCDR3-vlFR4的结构(N末端至C末端)。

[0352] 在本发明中特别有用的是受限不可切割的伪Fv结构域,其具有(i)具有SEQ ID NO:274(αCD3 VHi)、SEQ ID NO:278(αCD3 VHi2)或SEQ ID NO:282(αCD3 VHiGL4)的iVH(ii)具有SEQ ID NO:258(αCD3 VLi)、SEQ ID NO:262(αCD3 VLi2)或SEQ ID NO:266(αCD3VLiGL)的iVL,和(iii)具有SEQ ID NO:287的结构域接头。在一些实施方案中,受限不可切割的伪Fv结构域包含(i)具有SEQ ID NO:274的氨基酸序列的iVH(αCD3 VHi),(ii)具有SEQ ID NO:258的氨基酸序列的iVL(αCD3 VLi),和(iii)具有SEQ ID NO:287的氨基酸序列

的结构域接头。在一些实施方案中,受限不可切割的伪Fv结构域包含(i)具有SEQ ID NO:278的氨基酸序列的iVH(αCD3 VHi2),(ii)具有SEQ ID NO:262的氨基酸序列的iVL(αCD3 VLi2),和(iii)具有SEQ ID NO:287的氨基酸序列的结构域接头。在一些实施方案中,受限不可切割的伪Fv结构域包含(i)具有SEQ ID NO:282的氨基酸序列的iVH(αCD3 VHi2GL4),(ii)具有SEQ ID NO:266的氨基酸序列的iVL(αCD3 VLi2GL),和(iii)具有SEQ ID NO:287的氨基酸序列的结构域接头。

[0353] III.本发明的形式

[0354] 如本文所讨论,本发明的前药构建体可以采用多种不同的形式,包括具有双重TTA结合结构域的可切割形式、具有双重TTA结合结构域的不可切割形式(其中任一种可以具有相同的TTA结合结构域或不同的结合结构域)和具有单个靶向结构域的不可切割形式。

[0355] A.“形式2”构建体

[0356] 如图2所示,本发明提供了非异构化的不可切割形式。在该实施方案中,应理解,“不可切割”仅适用于受限Fv结构域的连接,因为在前药构建体中存在激活切割位点。在该实施方案中,受限Fv结构域包含使用受限不可切割接头连接的VH结构域和VL结构域,并且受限伪Fv结构域使用受限不可切割接头。

[0357] 如本领域技术人员将理解的,受限Fv结构域或受限伪Fv结构域中VH和VL的顺序可以是(N末端至C末端)VH-接头-VL或VL-接头-VH。

[0358] 本发明提供了前药蛋白,其从N末端至C末端包含:(sdABD-TTA1)-结构域接头-受限Fv结构域-结构域接头-(sdABD-TTA2)-可切割接头-受限伪Fv结构域-结构域接头-(sdABD-HSA)。

[0359] 如本领域技术人员将理解的,受限Fv结构域或受限伪Fv结构域中VH和VL的顺序可以是(N末端至C末端)VH-接头-VL或VL-接头-VH。

[0360] 因此,在一个实施方案中,前药蛋白从N末端至C末端包含:(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。

[0361] 因此,在一个实施方案中,前药蛋白从N末端至C末端包含:(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVH-CNCL-iVL-结构域接头-(sdABD-HSA)。

[0362] 因此,在一个实施方案中,前药蛋白从N末端至C末端包含:(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVL-CNCL-aVH-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。

[0363] 因此,在一个实施方案中,前药蛋白从N末端至C末端包含:(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVL-CNCL-aVH-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVH-CNCL-iVL-结构域接头-(sdABD-HSA)。

[0364] 在一些实施方案中,本文所述的前药蛋白提供在包括图9C-9V以及如SEQ ID NO:413-452所示的对应序列的图中,其代表示例性蛋白质Pro225、Pro226、Pro233、Pro311、Pro312、Pro313、Pro246、Pro256、Pro420、Pro421、Pro393、Pro394、Pro395、Pro396、Pro429、Pro430、Pro431、Pro258、Pro221、Pro222、Pro223、Pro224、Pro254、Pro255、Pro262、Pro356、Pro359、Pro364、Pro388、Pro429、Pro430、Pro431、Pro432、Pro448、Pro449、Pro450、Pro451、

Pro479、Pro480和Pro495。在一些实施方案中，本文所述的前药蛋白提供在图中，所述图包括(i)图10A-10EE以及如SEQ ID NO:288-290、291-302、304-334、336、338和522-530所示的对应序列，其代表示例性蛋白质Pro601、Pro602、V3、V4、Pro664、Pro665、Pro667、Pro694、Pro695、Pro565、Pro566、Pro567、Pro727、Pro728、Pro729、Pro730、Pro731、Pro676、Pro677、Pro678、Pro679、Pro808、Pro819、Pro621、Pro622、Pro640、Pro641、Pro642、Pro643、Pro744、Pro746、Pro108、Pro109、Pro396、Pro476、Pro706、Pro709、Pro470、Pro471、Pro551、Pro552、Pro623、Pro624、Pro698、Pro655、Pro656、Pro657、Pro658、Pro516、Pro517、Pro518、Pro519、Pro513、Pro186、Pro225和Pro817，(ii)图12A-12Q以及如SEQ ID NO:453-486所示的对应序列，其代表示例性蛋白质aLyPD3 h787 COBRA、aLyPD3 h790 COBRA、aIyPD3 h804 COBRA、aLyPD3 h773 COBRA、aLyPD3 h840 COBRA、aLyPD3 h885 COBRA、aHER2 1054 COBRA、aHER2 1055 COBRA、aHER2 1058 COBRA、aHER2 1059 COBRA、aHER2 1065 COBRA、aHER2 1090 COBRA、aHER2 1091 COBRA、aHER2 1092 COBRA、aHER2 1097 COBRA、aHER2 1118 COBRA、aHER2 1121 COBRA、aHER2 1134 COBRA、aHER2 1138 COBRA、aHER2 1139 COBRA、aHER2 1140 COBRA、aHER2 1145 COBRA、aHER2 1146、aHER2 1149 COBRA、aHER2 1150 COBRA、aHER2 1156 COBRA、aHER2 1158 COBRA、aHER2 1159 COBRA、aHER2 1160 COBRA、aHER2 1161 COBRA、aHER2 1162 COBRA、aHER2 1163 COBRA、Pro824和Pro826，(iii)图71-74以及如SEQ ID NO:487-494所示的对应序列，其代表示例性蛋白质Pro751、Pro752、Pro824、Pro826、Pro1109、Pro1111、Pro1117和Pro1118。

[0365] 1.单一靶向形式2构建体:“单特异性COBRA”

[0366] 在一些实施方案中，两个αTTA结构域结合相同的肿瘤靶抗原(TTA)。因此，在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含:(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在该实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在该实施方案中，两个靶向结构域结合相同的TTA，其可以是EGFR、EpCAM、FOLR1、Trop2、CA9、B7H3、LyPD3或HER2，其序列在图5A-5M中描绘。

[0367] 在一些实施方案中，sdABD-TTA1选自由以下组成的组:sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2。在一些实施方案中，sdABD-TTA2选自由以下组成的组:sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2。在一些实施方案中，sdABD-TTA1和sdABD-TTA2结合相同的靶抗原。在一些实施方案中，sdABD-TTA1和sdABD-TTA2结合相同的靶抗原，但在不同的位置。在一些实施方案中，sdABD-TTA1和sdABD-TTA2结合相同的靶抗原，但在相同的位置。在一些实施方案中，sdABD-TTA1和sdABD-TTA2具有相同的氨基酸序列。本文所述的sdABD的任何序列可以是sdABD-TTA1、sdABD-TTA2或两者的序列。在一些实施方案中，sdABD-TTA1的sdCDR1、sdCDR2和sdCDR3分别与sdABD-TTA2的sdCDR1、sdCDR2和sdCDR3相同。

[0368] 在一些实施方案中，示例性单特异性COBRA(也称为单一肿瘤抗原靶向COBRA)结合选自由B7H3、CA9、EGFR、EpCAM、FOLR1、HER2、LyPD3和Trop2组成的组的肿瘤靶抗原。在一些实施方案中，单特异性COBRA含有本文提供的sdABD的序列中的任一个，包括附图和正式序列表。在一些实施方案中，结合B7H3(例如人B7H3)的单特异性COBRA包括以下图中的任何融

合蛋白:图9C,诸如Pro225(SEQ ID NO:413)和Pro226(SEQ ID NO:414);图10A-10E,诸如Pro601(SEQ ID NO:522)、Pro602(SEQ ID NO:523)、V3(SEQ ID NO:524)、V4(SEQ ID NO:525)、Pro664(SEQ ID NO:526)、Pro665(SEQ ID NO:527)、Pro667(SEQ ID NO:528)、Pro694(SEQ ID NO:529)、和Pro695(SEQ ID NO:530);图10O-10Q,诸如Pro640(SEQ ID NO:306)、Pro641(SEQ ID NO:307)、Pro642(SEQ ID NO:308)、Pro643(SEQ ID NO:309)、Pro774(SEQ ID NO:310)和Pro746(SEQ ID NO:311);和图10DD-10EE,诸如Pro225(SEQ ID NO:336)和Pro817(SEQ ID NO:338)。

[0369] 在一些实施方案中,结合CA9(例如人CA9)的单特异性COBRA包括图10Z-10BB的任何融合蛋白,诸如Pro516(SEQ ID NO:329)、Pro517(SEQ ID NO:330)、Pro518(SEQ ID NO:331)和Pro519(SEQ ID NO:332)。

[0370] 在一些实施方案中,结合EGFR(例如人EGFR)的单特异性COBRA包括图10S-10T的任何融合蛋白,诸如Pro396(SEQ ID NO:314)、Pro476(SEQ ID NO:315)、Pro706(SEQ ID NO:316)和Pro709(SEQ ID NO:317)。

[0371] 在一些实施方案中,结合EpCAM(例如,人EpCAM)的单特异性COBRA包括图10F-10J的任何融合蛋白,诸如Pro565(SEQ ID NO:288)、Pro566(SEQ ID NO:289)、Pro567(SEQ ID NO:290)、Pro727(SEQ ID NO:292)、Pro728(SEQ ID NO:293)、Pro729(SEQ ID NO:294)、Pro730(SEQ ID NO:295)和Pro731(SEQ ID NO:296)。

[0372] 在一些实施方案中,结合FOLR1(例如人FOLR1)的单特异性COBRA包括图9D和9E的任何融合蛋白,诸如Pro311(SEQ ID NO:416)、Pro312(SEQ ID NO:417)和Pro313(SEQ ID NO:418)。

[0373] 在一些实施方案中,结合HER2(例如人HER2)的单特异性COBRA包括图12D-12P的任何融合蛋白,诸如SEQ ID NO:459-484中的任一个;以及图73和74的任何融合蛋白,诸如Pro1109(SEQ ID NO:491)、Pro1111(SEQ ID NO:492)、Pro1117(SEQ ID NO:493)和Pro1118(SEQ ID NO:494)。

[0374] 在一些实施方案中,结合LyPD3(例如人LyPD3)的单特异性COBRA包括图12A-12C的任何融合蛋白,诸如SEQ ID NO:453-458中的任一个。

[0375] 在一些实施方案中,结合Trop2(例如人Trop2)的单特异性COBRA包括图10J-10M的任何融合蛋白,诸如Pro676(SEQ ID NO:297)、Pro677(SEQ ID NO:298)、Pro678(SEQ ID NO:299)、Pro679(SEQ ID NO:300)、Pro808(SEQ ID NO:301)和Pro819(SEQ ID NO:302)。

[0376] 2.双重靶向形式2构建体:“异源COBRA”

[0377] 在一些实施方案中,αTTA结构域中的每一个结合不同的肿瘤靶标。因此,在一些实施方案中,前药蛋白从N末端至C末端包含:(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在该实施方案中,aVH、aVL、iVH、iVL具有图5A-5B中所示的序列。在该实施方案中,两个靶向结构域结合不同的TTA。

[0378] 在形式2中,优选的双重肿瘤抗原靶向构建体(有时在本文中称为“异源特异性COBRA”或“异源COBRA”)包括靶向EGFR和EpCAM、EGFR和Trop2、EGFR和FOLR1、EGFR和B7H3、EGFR和LyPD3、EGFR和HER2、EpCAM和FOLR1、EpCAM和B7H3、EpCAM和Trop2、EpCAM和LyPD3、EpCAM和HER2、FOLR1和B7H3、FOLR1和HER2、FOLR1和Trop2、FOLR1和LyPD3、B7H3和HER2、B7H3

和Trop2、B7H3和LyPD3、HER2和Trop2、HER2和LyPD3、和Trop2和LyPD3的组合。这些有时在本文中被讨论为“EGFR X EpCAM”等构建体。

[0379] 在一些实施方案中，sdABD-TTA1选自由以下组成的组：sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2。在一些实施方案中，sdABD-TTA2选自由以下组成的组：sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2。在一些实施方案中，sdABD-TTA1和sdABD-TTA2结合不同的靶抗原。

[0380] 在一些实施方案中，sdABD-TTA1是sdABD-B7H3，并且sdABD-TTA2选自由sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2组成的组。在一些实施方案中，sdABD-TTA1是sdABD-CA9，并且sdABD-TTA2选自由sdABD-B7H3、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2组成的组。在一些实施方案中，sdABD-TTA1是sdABD-EGFR，并且sdABD-TTA2选自由sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、dABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2.组成的组。在一些实施方案中，sdABD-TTA1是sdABD-EpCAM，并且sdABD-TTA2选自由sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2组成的组。在一些实施方案中，sdABD-TTA1是sdABD-FOLR1，并且sdABD-TTA2选自由sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-pCAM、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2组成的组。在一些实施方案中，sdABD-TTA1是sdABD-HER2，并且sdABD-TTA2选自由sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2组成的组。在一些实施方案中，sdABD-TTA1是sdABD-LyPD3，并且sdABD-TTA2选自由sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2和sdABD-Trop2组成的组。在一些实施方案中，sdABD-TTA1是sdABD-Trop2，并且sdABD-TTA2选自由sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2和sdABD-LyPD3组成的组。本文描述的sdABD-TTA的任何序列，诸如sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2的序列，可用于双重靶向形式2构建体或异源COBRA。

[0381] 在许多实施方案中，sdABD-TTA1选自由sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2组成的组，并且sdABD-TTA2是sdABD-B7H3。在许多实施方案中，sdABD-TTA1选自由sdABD-B7H3、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2组成的组，并且sdABD-TTA2是sdABD-CA9。在许多实施方案中，sdABD-TTA1选自由sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2组成的组，并且sdABD-TTA2是sdABD-EGFR。在许多实施方案中，sdABD-TTA1选自由sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2组成的组，并且sdABD-TTA2是sdABD-EpCAM。在许多实施方案中，sdABD-TTA 1选自由sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2组成的组，并且sdABD-TTA2是sdABD-FOLR1。在许多实施方案中，sdABD-TTA 1选自由sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2组成的组，并且sdABD-TTA2是sdABD-HER2。在许多实施方案中，sdABD-TTA1选自由sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-

EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、dABD-HER2和sdABD-Trop2组成的组，并且sdABD-TTA2是sdABD-LyPD3。在许多实施方案中，sdABD-TTA1选自由sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-FOLR1、sdABD-HER2和sdABD-LyPD3组成的组，并且sdABD-TTA2是sdABD-Trop2。本文描述的sdABD-TTA的任何序列，诸如sdABD-B7H3、sdABD-CA9、sdABD-EGFR、sdABD-EpCAM、sdABD-HER2、sdABD-LyPD3和sdABD-Trop2的序列，可用于此类双重靶向形式2构建体或异源COBRA。

[0382] a.EGFR X EpCAM

[0383] 在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在该实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在该实施方案中，两个靶向结构域结合EGFR和EpCAM，并且sdABD-TTA具有图5A、5D、5E和75中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中，EGFR sdABD和EpCAM sdABD的一些组合包括：

[0384]

叉	EGFR1	hEGFR1	EGFR2	EGFR2a	EGFR2d
EpCAM h13	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
EpCAM h23	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
EpCAM hVIB665	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
EpCAM hVIB666	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
EpCAM h664	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0385] 在这种情况下，“任一方向”意指EpCAM sdABD在本发明的构建体中的EGFR sdABD的N末端，或者EpCAM sdABD在它的C末端。

[0386] b.EGFR X FOLR1

[0387] 在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中，两个靶向结构域结合EGFR和FOLR1，并且sdABD-TTA具有图5A-5B中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在一些实施方案中，EGFR sdAb和FOLR1 sdAb的一些组合包括：

[0388]

叉	EGFR1	hEGFR1	EGFR2	EGFR2a	EGFR2d
FOLR1 h77-2	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
FOLR1 h59.3	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
FOLR h22-4	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0389] 在这种情况下，“任一方向”意指FOLR1 sdABD在本发明的构建体中的EGFR sdABD的N末端，或者FOLR1 sdABD在它的C末端。

[0390] c.EGFR X B7H3

[0391] 在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在该实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中，两个靶向结构域结合EGFR和B7H3，并且sdABD-TTA具有图5A-5D中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在一些实施方案中，EGFR sdABD和B7H3 sdABD的一些组合包括：

[0392]

叉	EGFR1	hEGFR1	EGFR2	EGFR2a	EGFR2d
B7H3 hF7	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (N57Q)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0393]

B7H3 hF12 (N57E)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (N57D)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (S59A)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (S59Y)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0394] 在这种情况下，“任一方向”意指B7H3 sdABD在本发明的构建体中的EGFR sdABD的N末端，或者B7H3 sdABD在它的C末端。

[0395] d.EGFR X Trop2

[0396] 在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7中所示的序列。在一些实施方案中，两个靶向结构域结合EGFR和Trop2，并且sdABD-TTA具有图5A、5E和5F中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中，EGFR sdABD和Trop2 sdABD的一些组合包括：

[0397]

叉	EGFR1	hEGFR1	EGFR2	EGFR2a	EGFR2d
aTrop2 hVIB557	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aTrop2 hVIB565	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aTrop2 hVIB575	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aTrop2 hVIB578	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0398]

aTrop2 hVIB609	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aTrop2 hVIB619	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0399] 在这种情况下,“任一方向”意指Trop2 sdABD在本发明的构建体中的EGFR sdABD的N末端,或者Trop2 sdABD在它的C末端。

[0400] e.EGFR X LyPD3

[0401] 在一些实施方案中,前药蛋白从N末端至C末端包含:(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中,aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中,两个靶向结构域结合EGFR和LyPD3,并且sdABD-TTA具有图5A、5G和5H中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中,EGFR sdABD和Trop2 sdABD的一些组合包括:

[0402]

叉	EGFR1	hEGFR1	EGFR2	EGFR2a	EGFR2d
aLyPD3 h790	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h804	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h773	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h840	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h885	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h787	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0403] 在这种情况下,“任一方向”意指Trop2 sdABD在本发明的构建体中的EGFR sdABD的N末端,或者Trop2 sdABD在它的C末端。

[0404] f.EGFR X HER2

[0405] 在一些实施方案中,前药蛋白从N末端至C末端包含:(sdABD-TTA1)-结构域接头-

aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中,aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中,两个靶向结构域结合EGFR和HER2,并且sdABD-TTA具有图5A、5H-5M和75中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中,EGFR sdABD和HER2 sdABD的一些组合包括:

[0406]

叉	EGFR1	hEGFR1	EGFR2	EGFR2a	EGFR2d
aHER2 1054	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1055	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1058	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1059	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1065	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1090	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1091	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1092	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1097	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1118	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1121	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1134	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0407]

aHER2 1138	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1139	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1140	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1145	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1146	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1149	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1150	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1156	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1158	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1159	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1160	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1161	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1162	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1163	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1139	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1156	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1159	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1162	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0408] 在这种情况下，“任一方向”意指HER2 sdABD在本发明的构建体中的EGFR sdABD的N末端，或者在它的C末端。

[0409] g.EpCAM X FOLR1

[0410] 在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中，两个靶向结构域结合EpCAM和FOLR1，并且sdABD-TTA具有图5B、5D、5E和75中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中，EpCAM sdABD和FOLR1 sdABD的一些组合包括：

[0411]

叉	FOLR1h77-2	FOLR1 h59.3	FOLR h22-4
EpCAM h13	在任一方向	在任一方向	在任一方向
EpCAM h23	在任一方向	在任一方向	在任一方向
EpCAM hVIB665	在任一方向	在任一方向	在任一方向
EpCAM hVIB666	在任一方向	在任一方向	在任一方向
EpCAM h664	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0412] 在这种情况下，“任一方向”意指EpCAM sdABD在本发明的构建体中的FOLR1 sdABD的N末端，或者EpCAM sdABD在它的C末端。

[0413] h.EpCAM X B7H3

[0414] 在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中，两个靶向结构域结合EpCAM和B7H3，并且sdABD-TTA具有图5B-5E和75中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中，EpCAM sdABD和B7H3 sdABD的一些组合包括：

[0415]

叉	EpCAM h13	EpCAM h23	EpCAM hVIB665	EpCAM hVIB666	EpCAM h664
B7H3 hF7	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (N57Q)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (N57E)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (N57D)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (S59A)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (S59Y)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0416] 在这种情况下，“任一方向”意指B7H3 sdABD在本发明的构建体中的EpCAM sdABD的N末端，或者B7H3 sdABD在它的C末端。

[0417] i.EpCAM X Trop2

[0418] 在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中，两个靶向结构域结合EpCAM和Trop2，并且sdABD-TTA具有图5D、5E、5F和75中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中，EpCAM sdABD和Trop2 sdABD的优选组合包括：

[0419]

叉	EpCAM h13	EpCAM h23	EpCAM hVIB665	EpCAM hVIB666	EpCAM h664
aTrop2 hVIB557	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aTrop2 hVIB565	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aTrop2 hVIB575	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aTrop2 hVIB578	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aTrop2 hVIB609	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aTrop2 hVIB619	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0420] 在这种情况下，“任一方向”意指Trop2 sdABD在本发明的构建体中的EpCAM sdABD的N末端，或者Trop2 sdABD在它的C末端。

[0421] j.EpCAM X LyPD3

[0422] 在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中，两个靶向结构域结合EpCAM和LyPD3，并且sdABD-TTA具有图5D、5E、5H和75中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中，LyPD3 sdABD和EpCAM sdABD的一些组合包括：

[0423]

叉	EpCAM h13	EpCAM h23	EpCAM hVIB665	EpCAM hVIB666	EpCAM h664
aLyPD3 h790	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0424]

aLyPD3 h804	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h773	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h840	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h885	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h787	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0425] 在这种情况下，“任一方向”意指LyPD3 sdABD在本发明的构建体中的EpCAM sdABD的N末端，或者在它的C末端。

[0426] k.EpCAM X HER2

[0427] 在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中，两个靶向结构域结合HER2和EpCAM，并且sdABD-TTA具有图5D、5E、5H-5M和75中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中，HER2 sdABD和EpCAM sdABD的一些组合包括：

[0428]

叉	EpCAM h13	EpCAM h23	EpCAM hVIB665	EpCAM hVIB666	EpCAM h664
aHER2 1054	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1055	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1058	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1059	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0429]

aHER21065	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21090	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21091	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21092	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21097	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21118	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21121	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21134	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21138	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21139	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21140	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21145	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21146	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21149	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21150	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21156	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21158	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21159	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0430]

aHER2 1160	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1161	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1162	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1163	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1139	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1156	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1159	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1162	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0431] 在这种情况下，“EO”是“任一方向”，其意指LyPD3 sdABD在本发明的构建体中的EpCAM sdABD的N末端，或者在它的C末端。

[0432] 1.FOLR1 X B7H3

[0433] 在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中，两个靶向结构域结合FOLR1和B7H3，并且sdABD-TTA具有图5B-5D中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中，FOLR1 sdABD和B7H3 sdABD的一些组合包括：

[0434]

叉	FOLR1h77-2	FOLR1 h59.3	FOLR h22-4
B7H3 hF7	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (N57Q)	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0435]

B7H3 hF12 (N57E)	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (N57D)	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (S59A)	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (S59Y)	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0436] 在这种情况下，“任一方向”意指B7H3 sdABD在本发明的构建体中的FOLR1 sdABD的N末端，或者在它的C末端。

[0437] m.FOLR1 X HER2

[0438] 在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中，两个靶向结构域结合FOLR1和HER2，并且sdABD-TTA具有图5B、5H-5M和75中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中，FOLR1 sdABD和HER2 sdABD的一些组合包括：

[0439]

叉	FOLR1h77-2	FOLR1 h59.3	FOLR h22-4
aHER2 1054	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1055	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1058	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1059	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1065	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1090	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1091	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1092	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1097	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1118	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1121	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1134	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0440]

aHER2 1138	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1139	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1140	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1145	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1146	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1149	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1150	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1156	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1158	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1159	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1160	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1161	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1162	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1163	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1139	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1156	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1159	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1162	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0441] 在这种情况下，“任一方向”意指HER2 sdABD在本发明的构建体中的FOLR1 sdABD

的N末端，或者HER2 sdABD在它的C末端。

[0442] n.FOLR1 X Trop2

[0443] 在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中，两个靶向结构域结合FOLR1和Trop2，并且sdABD-TTA具有图5B、5E和5F中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中，FOLR1 sdABD和Trop2 sdABD的优选组合包括：

[0444]

叉	FOLR1h77-2	FOLR1 h59.3	FOLR h22-4
aTrop2 hVIB557	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0445]

aTrop2 hVIB565	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aTrop2 hVIB575	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aTrop2 hVIB578	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aTrop2 hVIB609	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0446] 在这种情况下，“任一方向”意指Trop2 sdABD在本发明的构建体中的FOLR1 sdABD的N末端，或者Trop2 sdABD在它的C末端。

[0447] o.FOLR1 X LyPD3

[0448] 在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中，两个靶向结构域结合FOLR1和LyPD3，并且sdABD-TTA具有图5B、5G和5H中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中，FOLR1 sdABD和LyPD3 sdABD的一些组合包括：

[0449]

叉	FOLR1h77-2	FOLR1 h59.3	FOLR h22-4
aLyPD3 h790	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h804	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h773	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h840	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h885	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h787	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0450] 在这种情况下，“任一方向”意指LyPD3 sdABD在本发明的构建体中的FOLR1 sdABD的N末端，或者LyPD3 sdABD在它的C末端。

[0451] p.B7H3 X HER2

[0452] 在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中，两个靶向结构域结合B7H3和HER2，并且sdABD-TTA具有图5C、5D、5H-5M和75中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中，B7H3 sdABD和HER2 sdABD的一些组合包括：

[0453]

叉	B7H3 hF7	B7H3 hF12	B7H3 hF12 (N57Q)	B7H3 hF12 (N57E)	B7H3 hF12 (N57D)	B7H3 hF12 (S59A)	B7H3 hF12 (S59Y)
aHER2 054	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1055	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1058	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1059	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1065	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1090	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1091	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1092	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1097	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0454]

aHER21118	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21121	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21134	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21138	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21139	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21140	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21145	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21146	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21149	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21150	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21156	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21158	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0455]

aHER21159	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21160	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21161	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21162	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER21163	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2h1139	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2h1156	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2h1159	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2h1162	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0456] 在这种情况下,“任一方向”意指HER2 sdABD在本发明的构建体中的B7H3 sdABD的N末端,或者HER2 sdABD在它的C末端。

[0457] q.B7H3 X Trop2

[0458] 在一些实施方案中,前药蛋白从N末端至C末端包含:(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中,aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中,两个靶向结构域结合B7H3和Trop2,并且sdABD-TTA具有图5B-5F中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中,B7H3 sdABD和Trop2 sdABD的一些组合包括:

[0459]

叉	aTrop2 hVIB557	aTrop2 hVIB565	aTrop2 hVIB575	aTrop2 hVIB578	aTrop2 hVIB609	aTrop2 hVIB619
B7H3 hF7	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (N57Q)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (N57E)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (N57D)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (S59A)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (S59Y)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0460] 在这种情况下，“任一方向”意指Trop2 sdABD在本发明的构建体中的B7H3 sdABD的N末端，或者Trop2 sdABD在它的C末端。

[0461] r.B7H3 X LyPD3

[0462] 在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中，两个靶向结构域结合B7H3和LyPD3，并且sdABD-TTA具有图5B-5D、5G和5H中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中，B7H3 sdABD和LyPD3 sdABD的一些组合包括：

[0463]

叉	aLyPD3 h787	aLyPD3 h790	aLyPD3 h804	aLyPD3 h773	aLyPD3 h840	aLyPD3 h885
B7H3 hF7	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (N57Q)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (N57E)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (N57D)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (S59A)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
B7H3 hF12 (S59Y)	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0464] 在这种情况下，“任一方向”意指LyPD3 sdABD在本发明的构建体中的B7H3 sdABD的N末端，或者LyPD3 sdABD在它的C末端。

[0465] s.HER2 X Trop2

[0466] 在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中，两个靶向结构域结合HER2和Trop2，并且sdABD-TTA具有图5E、5F、5H-5M和75中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中，HER2 sdABD和Trop2 sdABD的一些组合包括：

[0467]

叉	aTrop2 hVIB557	aTrop2 hVIB565	aTrop2 hVIB575	aTrop2 hVIB578	aTrop2 hVIB609	aTrop2 hVIB619
aHER2 1054	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1055	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1058	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1059	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1065	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1090	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1091	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1092	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1097	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1118	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1121	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1134	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1138	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1139	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0468]

aHER2 1140	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1145	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1146	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1149	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1150	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1156	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1158	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1159	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1160	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1161	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1162	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1163	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1139	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1156	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1159	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1162	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0469] 在这种情况下，“任一方向”意指HER2 sdABD在本发明的构建体中的Trop2 sdABD的N末端，或者HER2 sdABD在它的C末端。

[0470] t.HER2 X LyPD3

[0471] 在一些实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-

aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中,aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中,两个靶向结构域结合HER2和LyPD3,并且sdABD-TTA具有图5G、5H-5M和75中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中,HER2 sdABD和LyPD3 sdABD的一些组合包括:

[0472]

叉	aLyPD3 h790	aLyPD3 h790	aLyPD3 h790	aLyPD3 h790	aLyPD3 h790	aLyPD3 h790
aHER2 1054	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1055	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1058	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1059	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1065	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1090	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1091	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1092	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1097	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1118	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0473]

aHER2 1121	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1134	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1138	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1139	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1140	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1145	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1146	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1149	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1150	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1156	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1158	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1159	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1160	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1161	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1162	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 1163	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1139	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1156	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0474]

aHER2 h1159	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aHER2 h1162	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0475] 在这种情况下,“任一方向”意指HER2 sdABD在本发明的构建体中的Trop2 sdABD的N末端,或者在它的C末端。

[0476] u.Trop2 X LyPD3

[0477] 在一些实施方案中,前药蛋白从N末端至C末端包含:(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在一些实施方案中,aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中,两个靶向结构域结合Trop2和LyPD3,并且sdABD-TTA具有图5E-5G和5H中的序列以及其中提供的序列和对应的序列表。在该实施方案中,Trop2 sdABD和LyPD3 sdABD的一些组合包括:

[0478]

叉	aTrop2 hVIB557	aTrop2 hVIB565	aTrop2 hVIB575	aTrop2 hVIB578	aTrop2 hVIB609	aTrop2 hVIB619
aLyPD3 h787	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h790	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h804	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h773	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h840	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向
aLyPD3 h885	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向	在任一方向

[0479] 在这种情况下,“任一方向”意指Trop2 sdABD在本发明的构建体中的LyPD3 sdABD的N末端,或者Trop2 sdABD在它的C末端。

[0480] 在一些实施方案中,前药蛋白从N末端至C末端包含:(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。在该实施方案中,aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在一些实施方案中,两个靶向结构域结合相同的TTA,所述TTA可以是EGFR、FOLR1、B7H3、CA9、Trop2、LyPD3、HER2或EpCAM,其序列在图5A-M和75中描绘,并且CCL和CL选自被MMP9或甲基多巴切割的接头,并且sdABD(1/2)具有SEQ ID NO:249。

[0481] 在形式2中,优选结构域接头是SEQ ID NO:287(它也用作优选的受限不可切割接头)。

[0482] B.具有双重靶向的可切割形式

[0483] 本发明提供图1中的“形式1”类型的非聚合不可切割形式。在该实施方案中,受限

Fv结构域包含使用受限可切割接头连接的VH结构域和VL结构域，并且受限伪Fv结构域使用受限不可切割接头。为了便于讨论，这两者在本文中都称为“受限的”，但如上文所讨论以及WO2019/051102的图37、图38和图39中所示，只有其中一个需要受限，但通常当两个接头都受限时，蛋白质具有更好的表达。

[0484] 形式1(以及其他形式)中的所有构建体也具有被人类肿瘤蛋白酶切割的可切割接头(CL)。

[0485] 本发明提供了前药蛋白，其从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-受限Fv结构域-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-受限伪Fv结构域-结构域接头-(sdABD-HSA)。

[0486] 如本领域技术人员将理解的，受限Fv结构域或受限伪Fv结构域中VH和VL的顺序可以是(N末端至C末端)VH-接头-VL或VL-接头-VH。

[0487] 因此，在一个实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。

[0488] 因此，在一个实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVH-CCL-aVL-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVH-CCL-iVL-结构域接头-sdABD-HSA。

[0489] 因此，在一个实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVL-CCL-aVH-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。

[0490] 因此，在一个实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA1)-结构域接头-aVL-CCL-aVH-结构域接头-(sdABD-TTA2)-CL-iVH-CCL-iVL-结构域接头-(sdABD-HSA)。

[0491] 在一些实施方案中，前药构建体包含sdABD(TTA1)-结构域接头-aVH-CCL-aVL-结构域接头-sdABD(TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-NCL-sdABD(1/2)。在该实施方案中，aVH、aVL、iVH和iVL具有图7A-7B中所示的序列。

[0492] 在一些实施方案中，前药构建体包含sdABD(TTA1)-结构域接头-aVH-CCL-aVL-结构域接头-sdABD(TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-sdABD(1/2)。在该实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在该实施方案中，两个靶向结构域结合相同的TTA，其可以是EGFR、EpCAM、FOLR1、Trop2、CA9、LyPD3、HER2或B7H3，其序列在图5A-5M和75中描绘。

[0493] 在一些实施方案中，前药构建体包含sdABD(TIA1)-结构域接头-aVH-CCL-aVL-结构域接头-sdABD(TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-sdABD(1/2)。在该实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在该实施方案中，两个靶向结构域结合不同的TTA。

[0494] 在一些实施方案中，前药构建体包含sdABD(TTA1)-结构域接头-aVH-CCL-aVL-结构域接头-sdABD(TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-sdABD(1/2)。在该实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在该实施方案中，两个靶向结构域结合EGFR和EpCAM，并且sdABD-TTA具有图5A-5M和75中的序列。

[0495] 在一些实施方案中，前药构建体包含sdABD(TTA1)-结构域接头-aVH-CCL-aVL-结构域接头-sdABD(TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-sdABD(1/2)。在该实施方案中，

aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在该实施方案中，两个靶向结构域结合EGFR和FOLR1，并且sdABD-TTA具有图5A-5M和75中的序列。

[0496] 在一些实施方案中，前药构建体包含sdABD(TTA1)-结构域接头-aVH-CCL-aVL-结构域接头-sdABD(TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-sdABD(1/2)。在该实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在该实施方案中，两个靶向结构域结合EGFR和B7H3，并且sdABD-TTA具有图5A-5M和75中的序列。

[0497] 在一些实施方案中，前药构建体包含sdABD(TTA1)-结构域接头-aVH-CCL-aVL-结构域接头-sdABD(TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-sdABD(1/2)。在该实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在该实施方案中，两个靶向结构域结合EpCAM和FOLR1，并且sdABD-TTA具有图5A-5M和75中的序列。

[0498] 在一些实施方案中，前药构建体包含sdABD(TTA1)-结构域接头-aVH-CCL-aVL-结构域接头-sdABD(TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-sdABD(1/2)。在该实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在该实施方案中，两个靶向结构域结合EpCAM和B7H3，并且sdABD-TTA具有图5A-5M和75中的序列。

[0499] 在一些实施方案中，前药构建体包含sdABD(TTA1)-结构域接头-aVH-CCL-aVL-结构域接头-sdABD(TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-sdABD(1/2)。在该实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在该实施方案中，两个靶向结构域结合B7H3和FOLR1，并且sdABD-TTA具有图5A-5M和75中的序列。

[0500] 在一些实施方案中，前药构建体包含sdABD(TTA1)-结构域接头-aVH-CCL-aVL-结构域接头-sdABD(TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-sdABD(1/2)。在该实施方案中，aVH、aVL、iVH、iVL具有图7中示出的序列。在该实施方案中，两个靶向结构域结合相同的TTA，所述TTA可以是EGFR、FOLR1、B7H3、Trop2、CA9、LyPD3、HER2或EpCAM，其序列在图5中描绘，并且CCL和CL选自被MMP9或甲基多巴切割的接头，并且sdABD(1/2)具有SEQ ID NO:245或SEQ ID NO:249。

[0501] 在形式1中，优选接头是SEQ ID NO:287(它也用作优选的受限不可切割接头)。

[0502] C.单一TTA构建体

[0503] 如图4所示，“形式4”构建体也包括在本发明的组合物中，其类似于形式2构建体，但没有第二个TTA ABD。在该实施方案中，应理解，“不可切割”仅适用于受限Fv结构域的连接，因为在前药构建体中存在激活切割位点。在该实施方案中，受限Fv结构域包含使用受限不可切割接头连接的VH结构域和VL结构域，并且受限伪Fv结构域使用受限不可切割接头。

[0504] 如本领域技术人员将理解的，受限Fv结构域或受限伪Fv结构域中VH和VL的顺序可以是(N末端至C末端)VH-接头-VL或VL-接头-VH。

[0505] 本发明提供了前药蛋白，其从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA)-结构域接头-受限Fv结构域-可切割接头-(sdABD-HSA)-受限伪Fv结构域。请注意，对于这种形式的所有构建体，sdABD-HSA通常没有His6标签，但它可以包括在内。

[0506] 如本领域技术人员将理解的，受限Fv结构域或受限伪Fv结构域中VH和VL的顺序可以是(N末端至C末端)VH-接头-VL或VL-接头-VH。

[0507] 因此，在一个实施方案中，前药蛋白从N末端至C末端包含：(sdABD-TTA)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-CL-(sdABD-HSA)-结构域接头-iVL-CNCL-iVH。

[0508] 因此,在一个实施方案中,前药蛋白从N末端至C末端包含:(sdABD-TTA)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-CL-(sdABD-HSA)-结构域接头-iVH-CNCL-iVL。

[0509] 因此,在一个实施方案中,前药蛋白从N末端至C末端包含:(sdABD-TTA)-结构域接头-aVL-CNCL-aVH-CL-(sdABD-HSA)-结构域接头-iVH-CNCL-iVL。

[0510] 因此,在一个实施方案中,前药蛋白从N末端至C末端包含:(sdABD-TTA)-结构域接头-aVL-CNCL-aVH-CL-(sdABD-HSA)-结构域接头-iVL-CNCL-iVH。

[0511] 因此,在一个实施方案中,前药蛋白从N末端至C末端包含:(sdABD-TTA)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-CL-(sdABD-HSA)-结构域接头-iVL-CNCL-iVH。在该实施方案中,aVH、aVL、iVH、iVL具有图7A-7B中所示的序列。在该实施方案中,靶向结构域结合TTA,其可以是EGFR、EpCAM、FOLR1、Trop2、CA9、LyPD3、HER2或B7H3,其序列在图5A-5M和75中描绘。

[0512] D.两种蛋白质组合物

[0513] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含两种不同的分子,有时称为"半COBRA™"或"半构建体",其在不存在切割的情况下分子内缔合形成伪Fv。在蛋白酶的存在下,切割位点被切割,从而释放惰性可变结构域,然后蛋白质对形成针对CD3的活性抗原结合结构域,如图3一般描绘。

[0514] 在半构建体的设计中重要的是活性可变结构域和sdABD-TTA在切割后保持在一起,使得两个切割的部分被肿瘤表面上的肿瘤抗原受体保持在一起,然后可以形成活性抗CD3结合结构域。

[0515] 存在两种不同的通用形式3构建体,其中每个成员都具有单个sdABD-TTA的那些(图3A),和具有两个不同的sdABD-TTA,每个针对不同的TTA的那些(图3B)。

[0516] 1.半COBRA™构建体具有单个TTA结合结构域(形式3A)。

[0517] 在一些实施方案中,第一个半COBRA™从N末端至C末端具有sdABD(TTA1)-结构域接头-aVH-CL-iVL-结构域接头-sdABD(1/2),并且第二个具有sdABD(1/2)-结构域接头-iVH-CL-aVL-结构域接头-sdABD(TTA2)。在该实施方案中,aVH、aVL、iVH、iVL和sdABD(1/2)序列图6和7中示出的序列,并且sdABD-TTAa结合人EGFR、EpCAM、Trop2、CA9、LyPD3、HER2、FOLR1和/或B7H3,并且具有图5A-5M和75中描绘的序列。

[0518] 2.具有双重TTAABD的半COBRA™构建体

[0519] 在一些实施方案中,成对的前药构建体的每个构建体可以具有两个sdABD-TTA结合结构域,如图3B所示。在该实施方案中,所述对的第一个成员从N末端至C末端包含sdABD-TTA1-结构域接头-sdABD-TTA2-结构域接头-aVH-CL-iVL-结构域接头-sdABD(HAS),并且第二个成员从N末端至C末端包含sdABD-TTA1-结构域接头-sdABD-TTA2-aVL-CL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。

[0520] 所述对的每个成员上的两个sdABD-TTA是不同的,但通常两个成员(半COBRA™)具有相同的两个sdABD-TTA,例如都具有EGFR和FOLR1或EGFR和B7H3等。

[0521] 在一些实施方案中,两个sdABD-TTA选自图5A-5M和75中所示的那些。

[0522] IV.制备本发明的组合物的方法

[0523] 本发明的前药组合物如本领域技术人员将一般理解的和下文所概述的进行制备。

[0524] 本发明提供编码本发明的前药组合物的核酸组合物。如本领域技术人员将理解的,核酸组合物将取决于前药多肽的形式。因此,例如,当形式需要两个氨基酸序列时,诸如

“形式3”构建体，可以将两个核酸序列掺入一个或多个表达载体中用于表达。类似地，作为单一多肽(形式1、2和4)的前药构建体需要单一表达载体中的单一核酸用于生产。

[0525] 如本领域已知的，编码本发明的组分的核酸可以掺入到本领域已知的表达载体中，并且取决于用于产生本发明的前药组合物的宿主细胞。一般理解，核酸可操作地连接至任何数量的调控元件(启动子、复制起点、选择性标记、核糖体结合位点、诱导物等)。表达载体可以是染色体外或整合载体。

[0526] 然后将本发明的核酸和/或表达载体转化到本领域众所周知的任何数量的不同类型的宿主细胞中，包括哺乳动物、细菌、酵母、昆虫和/或真菌细胞，哺乳动物细胞(例如CHO细胞、293细胞)可用于许多实施方案。

[0527] 本发明的前药组合物通过培养包含本领域众所周知的表达载体的宿主细胞来制备。一旦产生，传统的抗体纯化步骤就完成了，所述步骤包括蛋白A亲和色谱法步骤和/或离子交换色谱法步骤。

[0528] V.前药组合物的配制和施用

[0529] 根据本发明使用的前药组合物的制剂通过将具有期望纯度的前药(形式1、2和4的情况下为单一蛋白质，而形式3的情况下为两种蛋白质)与任选的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(如Remington’s Pharmaceutical Sciences第16版，Osol，A.编辑[1980]中一般概述)以冻干制剂或水溶液的形式混合来制备用于储存。

[0530] 根据已知方法将本发明的前药组合物施用于受试者，诸如作为团注(bolus)或通过在一段时间内连续输注来静脉内施用。

[0531] 本发明的前药组合物可用于治疗癌症。本文提供了治疗患者癌症的方法，其包括所述前药组合物中的任一种。本文描述的是用作药物的前药组合物。提供了一种用于治疗癌症的药物组合物，其包含所述前药组合物中的任一种。提供了一种药物组合物，其包含所述用于治疗有需要的患者的癌症的前药组合物中的任一种。提供一种如所述用于治疗或用于治疗癌症的方法的前药组合物。提供了一种本文所述用于治疗有需要的患者的癌症的前药组合物。提供了前药组合物在制造用于治疗癌症的药物中的用途。

[0532] VI.示例性实施方案

[0533] 本发明提供了多种用于治疗癌症的不同蛋白质组合物。因此，在一个方面，本发明提供了“形式2”蛋白质，其从N末端至C末端包含：第一单结构域抗原结合结构域(sdABD)，其结合人肿瘤靶抗原(TTA)(sdABD-TTA)；b)结构域接头；c)受限Fv结构域，其包含：i)包含vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3的可变重结构域；ii)受限不可切割接头(CNCL)；和iii)包含vlCDR1、vlCDR2和vlCDR3的可变轻结构域；d)第二结构域接头；e)第二sdABD-TTA；f)可切割接头(CL)；g)受限伪Fv结构域，其包含：i)伪轻可变结构域；ii)受限不可切割接头(CNCL)；和iii)伪重可变结构域；h)第三结构域接头；和i)第三sdABD，其结合人血清白蛋白；其中可变重结构域和可变轻结构域能够结合人CD3，但受限Fv结构域不结合CD3；可变重结构域和伪可变轻结构域分子内缔合形成无活性Fv；并且可变轻结构域和伪可变重结构域分子内缔合形成无活性Fv。在一些实施方案中，人肿瘤靶抗原是B7H3。

[0534] 在另一方面，本发明提供了蛋白质，其从N末端至C末端包含：第一单结构域抗原结合结构域(sdABD)，其结合人肿瘤靶抗原(TTA)(sdABD-TTA)，包含sdFR1-sdCDR1-sdFR2-sdCDR2-sdFR3-sdCDR3-sdFR4；b)第一结构域接头；c)受限Fv结构域，其包含：i)包含vhFR1-

vhCDR1-vhFR2-vhCDR2-vhFR3-vhCDR3-vhFR4的可变重结构域;ii)受限不可切割接头(CNCL);和iii)包含vlFR1-vlCDR1-vlFR2-vlCDR2-vlFR3-vlCDR3-vlFR4的可变轻结构域;d)第二结构域接头;e)第二sdABD-TTA;f)可切割接头(CL);g)受限伪Fv结构域,其包含:i)包含sdFR1-sdCDR1-sdFR2-sdCDR2-sdFR3-sdCDR3-sdFR4的伪轻可变结构域;ii)受限不可切割接头(CNCL);和iii)包含vlFR1-vlCDR1-vlFR2-vlCDR2-vlFR3-vlCDR3-vlFR4的伪重可变结构域;h)第三结构域接头;和i)第三sdABD,其结合人血清白蛋白,包含sdFR1-sdCDR1-sdFR2-sdCDR2-sdFR3-sdCDR3-sdFR4;其中可变重结构域和可变轻结构域能够结合人CD3,但受限Fv结构域不结合CD3;可变重结构域和伪可变轻结构域分子内缔合形成无活性Fv;并且可变轻结构域和伪可变重结构域分子内缔合形成无活性Fv。在一些实施方案中,人肿瘤靶抗原是B7H3。

[0535] 在形式2蛋白质的一些实施方案中,可变重结构域位于可变轻结构域的N末端,并且伪轻可变结构域位于伪可变重结构域的N末端。在一些实施方案中,可变重结构域位于可变轻结构域的N末端,并且伪可变轻结构域位于伪可变重结构域的C末端。在一些实施方案中,可变重结构域位于可变轻结构域的C末端,并且伪可变轻结构域位于伪可变重结构域的N末端。在一些实施方案中,可变重结构域位于可变轻结构域的C末端,并且伪可变轻结构域位于伪可变重结构域的C末端。

[0536] 在形式2蛋白质的一些实施方案中,第一sdABDTTA和第二sdABDTTA是相同的。在一些实施方案中,第一sdABDTTA和第二sdABDTTA是不同的。在这些实施方案中,sdABD-TTA选自图7中描绘的那些,包括SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13;SEQ ID NO:17;SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:73,77、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:109和SEQ ID NO:113。

[0537] 在形式2蛋白质的一些实施方案中,受限伪Fv结构域的伪重可变结构域选自由SEQ ID NO:146(V_{Hi})、SEQ ID NO:150(V_{Hi2})和SEQ ID NO:154(VHiGL4)组成的组,如图7所示。在一些实施方式中,受限伪Fv结构域的伪轻可变结构域选自由SEQ ID NO:130(V_{Li})、SEQ ID NO:134(V_{Li2})和SEQ ID NO:138(V_{LiGL})组成的组,如图7所示。

[0538] 在另一方面,本发明提供了“形式1”蛋白质,其从N末端至C末端包含:a)第一sdABD-TTA;b)第一结构域接头;c)受限Fv结构域,其包含:i)包含vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3的第一可变重结构域;ii)受限可切割接头(CCL);和iii)包含vlCDR1、vlCDR2和vlCDR3第一可变轻结构域;d)第二结构域接头;e)第二sdABD-TTA;f)可切割接头(CL);g)受限伪Fv结构域,其包含:i)第一伪轻可变结构域;ii)受限不可切割接头(CNCL);和iii)第一伪轻可重结构域;h)第三结构域接头;和i)第三sdABD,其结合人血清白蛋白;其中第一可变重结构域和第一可变轻结构域能够结合人CD3,但受限Fv结构域不结合CD3;其中第一可变重结构域和第一伪可变轻结构域分子内缔合形成无活性Fv;并且其中第一可变轻结构域和第一伪可变重结构域分子内缔合形成无活性Fv。在另一方面,本发明提供了“形式4”蛋白质,其从N末端至C末端包含:a)单结构域抗原结合结构域(sdABD),其结合人肿瘤靶抗原(TTA)(sdABD-TTA);b)第一结构域接头;c)受限Fv结构域,其包含:i)包含vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3的第一

可变重结构域;ii)受限不可切割接头(CNCL);和iii)包含vlCDR1、vlCDR2和vlCDR3的第一可变轻结构域;d)可切割接头(CL);e)第二sdABD,其结合人血清白蛋白;f)结构域接头;g)受限伪Fv结构域,其包含:i)第一伪轻可变结构域;ii)受限不可切割接头(CNCL);和iii)第一伪重可变结构域;其中第一可变重结构域和第一可变轻结构域能够结合人CD3,但受限Fv结构域不结合CD3;其中第一可变重结构域和第一伪可变轻结构域分子内缔合形成无活性Fv;并且其中第一可变轻结构域和第一伪可变重结构域分子内缔合形成无活性Fv。

[0539] 在上文列出的形式1、形式2、和形式4蛋白的另一方面,第一可变重结构域在第一可变轻结构域的N末端,并且伪轻可变结构域在伪可变重结构域的N末端。

[0540] 在上文列出的形式1、形式2、和形式4蛋白的另一方面,第一可变重结构域在第一可变轻结构域的N末端,并且伪可变重结构域在伪可变轻结构域的N末端。

[0541] 在上文列出的形式1、形式2、和形式4蛋白的另一方面,第一可变轻结构域在第一可变重结构域的N末端,并且伪轻可变结构域在伪可变重结构域的N末端。

[0542] 在上文列出的形式1、形式2、和形式4蛋白的另一方面,第一可变轻结构域在第一可变重结构域的N末端,并且伪可变重结构域在伪可变轻结构域的N末端。

[0543] 在另一方面,本发明提供了形式1和形式2蛋白质,其中第一和第二TTA相同。在另一方面,本发明提供了形式1和形式2蛋白质,其中第一和第二TTA不同。

[0544] 在另一方面,本发明提供了形式1、形式2和形式4蛋白质,其中第一和第二TTA选自EGFR、EpCAM、FOLR1、Trop2、ca9和B7H3。这些序列可以选自由以下组成的组:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17;SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:73,77、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:109和SEQ ID NO:113。

[0545] 在另一方面,本发明提供了形式1、形式2和形式4蛋白质,其中半衰期延长结构域具有SEQ ID NO:117(aHSA(10GE))和SEQ ID NO:121(具有His标签的aHSA)。

[0546] 在另一方面,本发明提供了形式1、形式2和形式4蛋白质,其中可切割接头被人蛋白酶切割,所述人蛋白酶选自由以下组成的组:MMP2、MMP9、甲基多巴A、甲基多巴B、组织蛋白酶S、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、颗粒酶B、uPA、Kallekriein7、蛋白裂解酶和凝血酶或图6中描绘的其他蛋白酶。

[0547] 在另一方面,本发明提供了选自由以下组成的组的蛋白质:Pro186、Pro225、Pro226、Pro233、Pro262、Pro311、Pro312、Pro313,Pro356、Pro359、Pro364、Pro388、Pro448、Pro449、Pro450、Pro451、Pro495、Pro246、Pro254、Pro255、Pro256、Pro420、Pro421、Pro432、Pro479、Pro480、Pro187、Pro221、Pro222、Pro223、Pro224、Pro393、Pro394、Pro395、Pro396、Pro429、Pro430、Pro431、Pro601、Pro602、V3和V4、Pro664、Pro665、Pro667、Pro694、Pro695、Pro565、Pro566、Pro567、Pro727、Pro728、Pro729、Pro730、Pro731、Pro676、Pro677、Pro678、Pro679、Pro808、Pro819、Pro621、Pro622、Pro640、Pro641、Pro642、Pro643、Pro744、Pro746、Pro638、Pro639、Pro396、Pro476、Pro706、Pro709、Pro470、Pro471、Pro551、Pro552、Pro623、Pro624、Pro698、Pro655、Pro656、Pro657、Pro658、Pro516、Pro517、Pro518和Pro519。

[0548] 在另一方面,本发明了提供编码如本文所述的形式1、形式2或形式4蛋白质的核

酸,以及包含编码所述蛋白质的核酸的表达载体和宿主细胞。

[0549] 在另一方面,本发明提供了制备本发明的蛋白质的方法和治疗有需要的患者的方法。

[0550] 在另一方面,本发明提供了包含前药蛋白的“形式3A”对的组合物,其包含:a)第一蛋白质,其从N末端至C末端包含:i)第一sdABD-TTA;ii)第一结构域接头;iii)伪Fv结构域,其从N末端至C末端包含:1)包含vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3的可变重链;2)可切割接头;和3)包含iVLCDR1、iVLCDR2和iVLCDR3的第一伪可变轻结构域;iv)第二结构域接头;v)sdABD-HSA;a)第二蛋白质,其从N末端至C末端包含:i)第三sdABD,其结合人肿瘤靶抗原;ii)第三结构域接头;iii)伪Fv结构域,其从N末端至C末端包含:1)包含VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3的可变轻链;2)可切割接头;和3)包含iVHCDR1、iVHCDR2和iVHCDR3的第一伪可重轻结构域;iv)第四结构域接头;v)sdABD-HSA;其中第一可变重结构域和第一可变轻结构域在缔合时能够结合人CD3;其中第一可变重结构域和第一伪可变轻结构域分子内缔合形成无活性Fv;其中第一可变轻结构域和第一伪可变重结构域分子内缔合形成无活性Fv;并且其中第一和第三sdABD选自由以下组成的组:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13;SEQ ID NO:17;SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:73,77、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:109和SEQ ID NO:113。

[0551] 在另一方面,本发明提供了包含前药蛋白的“形式3B”对的组合物,其包含:a)第一蛋白质,其从N末端至C末端包含:i)第一sdABD-TTA;ii)第一结构域接头;iii)第二sdABD-TTA;iv)第二结构域接头;iii)伪Fv结构域,其从N末端至C末端包含:1)包含vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3的可变重链;2)可切割接头;和3)包含iVLCDR1、iVLCDR2和iVLCDR3的第一伪可变轻结构域;iv)第三结构域接头;和v)a sdABD-HSA;a)第一第二蛋白质,其从N末端至C末端包含:i)第三sdABD-TTA;ii)第四结构域接头;iii)第四sdABD-TTA;iv)第五结构域接头;iii)伪Fv结构域,其从N末端至C末端包含:1)包含VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3的可变轻链;2)可切割接头;和3)包含iVHCDR1、iVHCDR2和iVHCDR3的第一伪可变重结构域;iv)第六结构域接头;v)sdABD-HSA;其中第一可变重结构域和第一可变轻结构域在缔合时能够结合人CD3;其中第一可变重结构域和第一伪可变轻结构域分子内缔合形成无活性Fv;并且其中第一可变轻结构域和第一伪可变重结构域分子内缔合形成无活性Fv。

[0552] 在另一方面,形式3A和形式3B蛋白质具有sdABD-HSA,其具有SEQ ID NO:117或SEQ ID NO:121。在另一方面,形式3A和形式3B蛋白质具有sdABD-TTA,其结合选自EGFR、EpCAM、Trop2、CA9、FOLR1和B7H3的TTA。sdABD-TTA可以选自由以下组成的组:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:73、77、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:109和SEQ ID NO:113。

[0553] 在另一方面,本发明提供了结合人Trop2的sdABD,其具有选自SEQ ID NO:77、SEQ

ID NO:81、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:93的序列。在另一方面，本发明提供了结合人B7H3的sdABD，其具有选自SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:57的序列。在另一方面，本发明提供了结合人CA9的sdABD，其具有选自SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:105，SEQ ID NO:109和SEQ ID NO:113的序列。在另一方面，本发明提供了结合人EpCAM的sdABD，其具有选自SEQ ID NO:69和SEQ ID NO:73的序列。

[0554] 在一些方面，本文提供了一种融合蛋白，其从N末端至C末端包含：(a)第一sdABD，其结合肿瘤靶抗原(sdABD-TTA)；(b)第一结构域接头；(c)受限Fv结构域，其包含(i)包含vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3的第一可变重结构域；(ii)受限不可切割接头(CNCL)；和(iii)包含vlCDR1、vlCDR2和vlCDR3的第一可变轻结构域；(d)第二结构域接头；(e)第二sdABD-TTA；(f)可切割接头(CL)；(g)受限伪Fv结构域，其包含：(i)第一伪轻可变结构域；(ii)不可切割接头(NCL)；和(iii)第一伪重可变结构域；(h)第三结构域接头；和(i)第三sdABD，其结合人血清白蛋白(sdABD-HSA)；其中所述第一可变重结构域和所述第一可变轻结构域能够结合人CD3，但受限Fv结构域不结合CD3；第一可变重结构域和第一伪可变轻结构域分子内缔合形成无活性Fv；并且第一sdABD-TTA和第二sdABD-TTA结合选自由B7H3、CA9、EGFR、EpCAM、FOLR1、HER2、LyPD3和Trop2组成的组的相同TTA。在一些实施方案中，第一和/或第二sdABD-TTA可以是本文公开的任何sdABD-TTA。

[0555] 在一些方面，本文提供了一种融合蛋白，其从N末端至C末端包含：(a)第一sdABD，其结合肿瘤靶抗原(sdABD-TTA)；(b)第一结构域接头；(c)受限Fv结构域，其包含：(i)包含vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3的第一可变重结构域；(ii)受限不可切割接头(CNCL)；和(iii)包含vlCDR1、vlCDR2和vlCDR3的第一可变轻结构域；(d)第二结构域接头；(e)第二sdABD-TTA；(f)可切割接头(CL)；(g)受限伪Fv结构域，其包含：(i)第一伪轻可变结构域；(ii)不可切割接头(NCL)；和(iii)第一伪重可变结构域；(h)第三结构域接头；和(i)第三sdABD，其结合人血清白蛋白(sdABD-HSA)；其中所述第一可变重结构域和所述第一可变轻结构域能够结合人CD3，但受限Fv结构域不结合CD3；第一可变重结构域和第一伪可变轻结构域分子内缔合形成无活性Fv；并且第一sdABD-TTA结合选自由B7H3、CA9、EGFR、EpCAM、FOLR1、HER2、LyPD3和Trop2组成的组的TTA，并且第二sdABD-TTA结合选自由B7H3、CA9、EGFR、EpCAM、FOLR1、HER2、LyPD3和Trop2组成的组的不同TTA。在一些实施方案中，第一和/或第二sdABD-TTA可以是本文公开的任何sdABD-TTA。

[0556] 融合蛋白包含由选自由以下组成的组中的任一个组成的氨基酸序列：SEQ ID NO:288(Pro565)、SEQ ID NO:289(Pro566)、SEQ ID NO:290(Pro567)、SEQ ID NO:292(Pro727)、SEQ ID NO:293(Pro728)、SEQ ID NO:294(Pro729)、SEQ ID NO:295(Pro730)、SEQ ID NO:296(Pro731)、SEQ ID NO:297(Pro676)、SEQ ID NO:298(Pro677)、SEQ ID NO:299(Pro678)、SEQ ID NO:300(Pro679)、SEQ ID NO:301(Pro808)、SEQ ID NO:302(Pro819)、SEQ ID NO:304(Pro621)、SEQ ID NO:305(Pro622)、SEQ ID NO:306 Pro640、SEQ ID NO:307(Pro641)、SEQ ID NO:308(Pro642)、SEQ ID NO:309(Pro643)、SEQ ID NO:310(Pro744)、SEQ ID NO:311(Pro746)、SEQ ID NO:312(Pro108)、SEQ ID NO:313(Pro109)、SEQ ID NO:314(Pro396,)SEQ ID NO:315(Pro476)、SEQ ID NO:316(Pro706)、SEQ ID NO:317(Pro709)、SEQ ID NO:318(Pro470)、SEQ ID NO:319(Pro471)、SEQ ID NO:320(Pro551)、SEQ ID NO:321(Pro552)、SEQ ID NO:322(Pro623)、SEQ ID NO:323(Pro624)、

SEQ ID NO:324(Pro698)、SEQ ID NO:325(Pro655)、SEQ ID NO:326(Pro656)、SEQ ID NO:327(Pro657)、SEQ ID NO:328(Pro658)、SEQ ID NO:329(Pro516)、SEQ ID NO:330(Pro517)、SEQ ID NO:331(Pro518)、SEQ ID NO:332(Pro519)、SEQ ID NO:333(Pro513)、SEQ ID NO:336(Pro225)、SEQ ID NO:338(Pro817)、SEQ ID NO:416(Pro311)、SEQ ID NO:417(Pro312)、SEQ ID NO:418(Pro313)、SEQ ID NO:419(Pro246)、SEQ ID NO:420(Pro256)、SEQ ID NO:421(Pro420)、SEQ ID NO:422(Pro421)、SEQ ID NO:487(Pro751)、SEQ ID NO:488(Pro752)、SEQ ID NO:489(Pro824)、and SEQ ID NO:490(Pro826)SEQ ID NO:522(Pro601)、SEQ ID NO:523(Pro602)、SEQ ID NO:524(V3)、SEQ ID NO:525(V4)、SEQ ID NO:526(Pro664)、SEQ ID NO:527(Pro665)、SEQ ID NO:528(Pro667)、SEQ ID NO:529(Pro694)、SEQ ID NO:530(Pro695)和SEQ ID NO:531(Pro565)。

[0557] 在另一方面,本发明提供了核酸组合物,其包含编码前药对的第一蛋白质成员的第一核酸和编码所述对的第二蛋白质成员的第二核酸,以及含有所述核酸的表达载体和宿主细胞。

[0558] 实施例

[0559] 实施例1:前药构建体的构建和纯化

[0560] 转染

[0561] 每个蛋白质(例如,形式1、2和4的单个蛋白质)或构建体对(形式3)由单独的表达载体(pcdna3.4衍生物)表达。将等量的编码半cobra对或单链构建体的质粒DNA混合,并且按照制造商的转染方案转染到Expi293细胞中。转染后5天通过离心(6000rpm x 25')和过滤(0.2uM过滤器)收获条件培养基。通过SDS-PAGE确认蛋白质表达。纯化构建体,并且最终缓冲液的组成为:25mM柠檬酸盐、75mM精氨酸、75mM NaCl、4%蔗糖,pH 7。将最终制剂储存在-80℃。

[0562] MMP9的激活

[0563] 根据以下方案激活重组人(rh)MMP9。重组人MMP-9(R&D#911-MP-010)为0.44mg/ml(4.7uM)。在DMSO中以100mM的储备液浓度制备对氨基苯基醋酸汞(APMA)(Sigma)。测定缓冲液为50mM Tris pH 7.5、10mM CaCl2、150mM NaCl、0.05%Brij-35。

[0564] -用测定缓冲液稀释rhMMP9至约100ug/ml(25ul hMMP9+75uL测定缓冲液)

[0565] -从DMSO中的100mM储备液添加对氨基苯基醋酸汞(APMA)至终浓度为1mM(1uL至100uL)。

[0566] -在37℃下孵育24小时

[0567] -将MMP9稀释至10ng/ul(向100ul激活溶液中添加900ul测定缓冲液)

[0568] 激活的rhMMP9的浓度为约100nM。

[0569] 用于TDCC测定的构建体的切割

[0570] 为了切割构建体,向配制缓冲液(25mM柠檬酸、75mM L-精氨酸、75mM NaCl、4%蔗糖)中的浓度为1mg/ml(10.5uM)的100ul蛋白质样品中补充至多10mM的$CaCl_2$。添加激活的rhMMP9至浓度20-35nM。将样品在室温下孵育过夜(16-20小时)。使用SDS PAGE(10-20%TG,TG运行缓冲液,200v,1小时)验证切割的完全性。样品通常98%被切割。

[0571] 实施例2:T细胞依赖性细胞毒性(TDCC)测定

[0572] 使萤火虫荧光素酶转导的HT-29细胞生长至大约80%融合,并用Versene(0.48mM

EDTA于PBS-Ca-Mg中)进行分离。将细胞离心并重悬于TDCC培养基(含HEPES、GlutaMax、丙酮酸钠、非必需氨基酸和β-巯基乙醇的具有5%热灭活FBS的RPMI 1640)中。将纯化的人Pan-T细胞解冻,离心并重悬于TDCC培养基中。

[0573] 将HT-29_Luc细胞和T细胞的共培养物添加到384孔细胞培养板中。然后将连续稀释的COBRA添加到共培养物中并在37℃下孵育48小时。最终,将等体积的SteadyGlo荧光素酶测定试剂添加到板中并孵育20分钟。以0.1s/孔的暴露时间在Perkin Elmer Envision上读取板。记录总发光并在GraphPad Prism 7上分析数据(取决于时间)。

[0574] 实施例3:体内过继性T细胞转移功效模型的通用方案设计

[0575] 这些方案用于许多数字实验。

[0576] 方案1:

[0577] 将肿瘤细胞皮下(SC)植入到NSG(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ)小鼠(The Jackson Laboratory,目录号005557)的右腹侧,并且允许生长,直到形成的肿瘤的平均体积达到大约200mm^3。平行地,在具有来自T细胞激活/扩增试剂盒(Miltenyi目录号130-091-441)的MACSiBead的G-Rex100M透气烧瓶(Wilson Wolf目录号81100S)中,在T细胞培养基(X-VIVO 15[Lonza,目录号04-418Q],5%人血清,1%青霉素/链霉素,0.01mM 2-巯基乙醇)中培养人T细胞大约10天,并且补充重组人IL-2蛋白。协调小鼠和人T细胞激活/扩增的肿瘤生长,使得在研究的第0天,基于肿瘤大小将小鼠随机分组(N=6);然后每只小鼠静脉内注射(IV)2.5x10^6个培养的人T细胞,并且施用第一剂COBRA或对照分子。小鼠每3天给药一次,总共7剂(第0、3、6、9、12、15和18天),然后再后续观察2-3周,直到肿瘤体积达到大于2000mm^3或研究终止。每3天测量一次肿瘤体积。

[0578] 人PBMC移植模型的方案2

[0579] NSG-β2M-/-小鼠(Jackson)静脉内移植人PBMC;移植后3天,对小鼠皮下植入肿瘤细胞系。一旦形成肿瘤生长,基于肿瘤体积将小鼠随机分组,并且将测试品按指示进行静脉内给药。通过卡尺测量评估肿瘤体积。给药后4小时收集血浆,以评估细胞因子水平(MesoScale Discovery)和肝酶升高。

[0580] 请注意,两个方案之间的主要差异在于,人T细胞与第一次COBRA剂量同时注射,而在方案2中,人PBMC与肿瘤细胞同时注射,并且COBRA注射在约10天后开始。

[0581] 实施例4:EGFR/MMP9半COBRA对Pro77和Pro53的体内活性。

[0582] 将5 x 10^6个LoVo细胞或5 x 10^6个HT29细胞皮下植入到NSG(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ)小鼠(The Jackson Laboratory,目录号005557)的右腹侧,并且允许生长,直到形成肿瘤。平行地,在具有来自T细胞激活/扩增试剂盒(Miltenyi目录号130-091-441)的MACSiBead的G-Rex100M透气烧瓶(Wilson Wolf目录号81100S)中,在T细胞培养基(X-VIVO 15[Lonza,目录号04-418Q],5%人血清,1%青霉素/链霉素,0.01mM 2-巯基乙醇)中培养人T细胞大约10天,并且补充重组人IL-2蛋白。协调小鼠和人T细胞激活/扩增的肿瘤生长,使得在研究的第0天,基于肿瘤大小将小鼠随机分组(N=6);然后每只小鼠静脉内注射(IV)2.5x10^6个培养的人T细胞,并且施用第一剂COBRA或对照分子。小鼠每3天给药一次,总共7剂(第0、3、6、9、12、15和18天),然后进行后续观察,直到肿瘤体积达到大于2000mm^3或研究终止。各组接受0.2mg/kg(mpk)的抗EGFR x CD3阳性对照Pro51双特异性抗体(bsAb)、0.5mpk的阴性对照抗鸡卵溶菌酶(HEL)x CD3 bsAb Pro98、0.5mpk的含有抗EGFR半COBRA对

Pro77和Pro53的MMP9可切割接头中的每一种、或0.5mpk的含有抗EGFR半COBRA对Pro74和Pro72的不可切割接头(NCL)中的每一种。每3天测量一次肿瘤体积。

[0583] 实施例5:EGFR/MMP9 COBRA Pro140的体内活性。

[0584] 将5 x 10^6个LoVo细胞或5 x 10^6个HT29细胞皮下植入到NSG(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ)小鼠(The Jackson Laboratory,目录号005557)的右腹侧,并且允许生长,直到形成肿瘤。平行地,在具有来自T细胞激活/扩增试剂盒(Miltenyi目录号130-091-441)的MACSiBead的G-Rex100M透气烧瓶(Wilson Wolf目录号81100S)中,在T细胞培养基(X-VIVO 15[Lonza,目录号04-418Q],5%人血清,1%青霉素/链霉素,0.01mM 2-巯基乙醇)中培养人T细胞大约10天,并且补充重组人IL-2蛋白。协调小鼠和人T细胞激活/扩增的肿瘤生长,使得在研究的第0天,基于肿瘤大小将小鼠随机分组(N=6);然后每只小鼠静脉内注射(IV)2.5x10^6个培养的人T细胞,并且施用第一剂COBRA或对照分子。小鼠每3天给药一次,总共7剂(第0、3、6、9、12、15和18天),然后进行后续观察,直到肿瘤体积达到大于2000mm^3或研究终止。各组接受0.2mpk的抗EGFR x CD3阳性对照Pro51双特异性抗体(bsAb)、0.5mpk的阴性对照抗鸡卵溶菌酶(HEL)x CD3 bsAb Pro98或0.5mpk的含有抗EGFR COBRA Pro140的MMP9可切割接头。每3天测量一次肿瘤体积。

[0585] 实施例6:EGFR/MMP9 COBRA Pro186的体内活性。

[0586] 将5 x 10^6个HT29细胞皮下植入到NSG(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ)小鼠(The Jackson Laboratory,目录号005557)的右腹侧,并且允许生长,直到形成肿瘤。平行地,在具有来自T细胞激活/扩增试剂盒(Miltenyi目录号130-091-441)的MACSiBead的G-Rex100M透气烧瓶(Wilson Wolf目录号81100S)中,在T细胞培养基(X-VIVO 15[Lonza,目录号04-418Q],5%人血清,1%青霉素/链霉素,0.01mM 2-巯基乙醇)中培养人T细胞大约10天,并且补充重组人IL-2蛋白。协调小鼠和人T细胞激活/扩增的肿瘤生长,使得在研究的第0天,基于肿瘤大小将小鼠随机分组(N=6);然后每只小鼠静脉内注射(IV)2.5x10^6个培养的人T细胞,并且施用第一剂COBRA或对照分子。小鼠每3天给药一次,总共7剂(第0、3、6、9、12、15和18天),然后进行后续观察,直到肿瘤体积达到大于2000mm^3或研究终止。各组接受0.1mg/kg(mpk)的抗EGFR x CD3阳性对照Pro51双特异性抗体(bsAb)、0.3mpk的含有抗EGFR COBRA Pro214的不可切割(NCL)对照接头、0.1或0.3mpk的含有抗EGFR COBRA Pro140的MMP9可切割接头、或0.1或0.3mpk的含有抗EGFR COBRA Pro186的MMP9可切割接头。每3天测量一次肿瘤体积。

[0587] 实施例7A:抗EGFR序列的成功人源化

[0588] 结果在下表中示出。

[0589]

分子	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis(1/s)
Pro22 (亲本 EGFR)	2.58E-09M/2.6 nM	2.05E+05	5.27E-04
Pro90 (hEGFR1)	2.00E-09M/2.0 nM	2.21E+05	4.40E-04
Pro48 (EGFR2)	2.89E-09M/2.9 nM	6.09E+05	1.76E-03
Pro137 (hEGFR2)	4.36E-09M/4.4. nM	5.85E+05	2.55E-03
Pro51 (hEGFR2)	3.27E-09M/3.2 nM	6.45E+05	2.11E-03
Pro201 (具有 2 个结合位点的 hEGFR2)	2.25E-12M/2.3 pM	1.55E+06	3.48E-06

[0590] 这些结果显示,EGFR结合结构域的人源化是成功的,并且当分子上有两个结合位点时,对靶EGFR具有强亲合力。

[0591] 实施例7B:EpCAM sdABD的成功人源化

[0592] 结果在下表中示出。

[0593]

克隆	人类结合亲和力(nM)	食蟹猴结合亲和力(nM)	食蟹猴/人类交叉反应性
VIB-13	2.3	11.6	5
hVIB-13	2.8	12.7	4.5
VIB-23	4.2	46.7	11.1
hVIB-23	4.1	58.8	12.6

[0594] 这些结果显示,EpCAM结合结构域的人源化是成功的。

[0595] 实施例8:COBRA™:使小鼠体内已形成的实体瘤消退的新型条件活性双特异性抗体-单特异性和异源特异性COBRA

[0596] 尽管靶向血液恶性肿瘤的双特异性抗体(bsAb)(例如博纳吐单抗(blinatumomab),一种CD19xCD3 bsAb)取得了临床成功,但实体瘤适应症的功效仍然是一个重大挑战。因为重导向bsAb的T细胞非常有效,所以即使是正常组织上非常低水平的细胞表面靶抗原表达也可能很快成为安全隐患,并且严重限制可以在患者中实现的剂量水平。这限制了达到有效浓度的可能性,并且降低了这些高活性分子的治疗潜力。此外,鉴定在肿瘤上而不在正常组织上独特表达的"干净"靶抗原在最好情况下也是非常困难的。

[0597] 为克服这些挑战,我们开发了一种称为COBRA™(条件双特异性重导向激活)的新型重组bsAb平台。对COBRA进行工程化,以实现通过聚焦肿瘤微环境中的T细胞参与,来靶向更广泛表达和验证的肿瘤细胞表面抗原。COBRA分子被设计成结合靶抗原,所述靶抗原可能在肿瘤和正常细胞上都表达,但除非暴露于蛋白水解微环境,否则不会与T细胞结合,这在肿瘤中很常见,但在正常健康组织中并不常见。一旦与肿瘤靶抗原结合,蛋白酶依赖性接头切割允许COBRA将无活性抗CD3 scFv转化为活性抗CD3 scFv结合结构域。转化后,COBRA然后能够同时与T细胞和靶抗原共结合,从而产生针对肿瘤细胞的有效细胞溶解性T细胞反应。此外,COBRA被设计为具有半衰期延长部分,所述部分在蛋白水解切割时从活性分子中去除。这允许在肿瘤靶标结合之前,在循环中持续存在无活性COBRA,并且更快地清除未结合的活性COBRA分子,从而降低正常组织中的细胞毒性活性的可能性。

[0598] 在此处,我们揭示了COBRA分子的新型设计,并且证明了其结合CD3和表皮生长因子受体(EGFR)以在T细胞培养物和植入人T细胞的荷瘤小鼠中引发有效细胞毒性活性的能力。我们已经报道了体外低至亚皮摩尔的T细胞激活和细胞毒性,以及COBRA接头切割依赖性T细胞介导的NSG小鼠体内已形成的实体瘤异种移植物的消退。

[0599] 图11A-11C说明了COBRA设计和预测的折叠机制。图11A描绘了PRO186 COBRA的示意图。图11B示出了预测的COBRA折叠。COBRA包括与抗CD3 VH和VL结构域配对的无活性VH和VL。未切割的PRO186 COBRA结合EGFR,CD3结合受损,并且结合血清白蛋白。图11C示出了

PRO186的分析性尺寸排阻色谱图。数据示出了未切割的PRO186折叠成单一结构。

[0600] 图11A-图11D说明了COBRA设计和预测的折叠机制,未切割分子的预测结构在左侧,其仍结合肿瘤抗原(EGFR,在MVC-101的情况下),CD3结合受损,并且结合人血清白蛋白。中间示出了预测的切割产物,并且左侧示出了活性二聚体。

[0601] 图12A-图12Q描绘了本发明的一些COBRA的额外序列。

[0602] 图13显示,本发明的形式2构建体一旦被切割和二聚化,就迅速从注射的小鼠中清除。

[0603] 图14示出了Pro225的结合动力学。

[0604] 图15A和15B示出了形式2构建体,在这种情况下为Pro225,使小鼠中已形成的实体瘤消退。

[0605] 图16A和16B示出了本发明的形式2构建体,在这种情况下为Pro225,显示出相对于固有活性T细胞接合物的增加的耐受性。图16C和16D显示,与固有活性双特异性相比,用Pro225处理导致小鼠体内细胞因子释放较低。与固有活性T细胞接合物相比,Pro 225不在NHP中诱导IL2、TNFa和IL10,并且不在小鼠中诱导小鼠IL6。

[0606] 图17示出了本发明的许多形式2构建体在如实施例2中概述的T细胞依赖性细胞毒性(TDCC)测定中的功效。Pro233是具有MMP9切割位点的aEGFR构建体;Pro565是具有MMP9切割位点的aEpCAM(h664)构建体;Pro566是具有MMP9切割位点的aEpCAM(h665)构建体;Pro623是aEGFR和aEpCAM(h664)和MMP9位点的异源COBRA;并且Pro624是aEGFR和aEpCAM(h665)和MMP9位点的异源COBRA。

[0607] 图18示出了本发明的许多形式2构建体在如实施例2中概述的TDCC测定中的功效。Pro233是具有MMP9切割位点的aEGFR构建体;Pro311是具有MMP9切割位点的aFOLR1构建体;并且Pro421是aEGFR和aFOLR1和MMP9位点的异源COBRA。

[0608] 图19示出了本发明的许多形式2构建体在如实施例2中概述的TDCC测定中的功效。Pro225是具有MMP9切割位点的aB7H3构建体;Pro566是具有MMP9切割位点的aEpCAM构建体;Pro656是aB7H3和aEpCAM和MMP9位点的异源COBRA;并且Pro658是aEpCAM和aB7H3和MMP9位点的异源COBRA。

[0609] 图20示出了本发明的许多形式2构建体在如实施例2中概述的对两种不同细胞系的TDCC测定中的功效。Pro225是具有MMP9切割位点的aB7H3构建体;Pro566是具有MMP9切割位点的aEpCAM构建体;并且Pro656是aB7H3和aEpCAM和MMP9位点的异源COBRA。HT29是一种上皮细胞系,与Raji细胞系不同,它可以在小鼠体内形成良好的异种移植物。HT29表达两个靶基因(B7H3和EpCAM),并且在这种情况下,使用CRISPR敲除B7H3表达。因此,异源COBRA和EpCAM单一靶向COBRA杀死了两者,而B7H3单一靶向COBRA没有。

[0610] 图21示出了本发明的许多形式2构建体在具有高EpCAM表达和低Trop2表达的HT29细胞系上的如实施例2中概述的TDCC测定中的功效。Pro824是aEpCAM X aTrop2(具有MMP9接头)异源COBRA。Pro825是具有NCL(不可切割对照)的aEpCAM X aTrop2异源COBRA。Pro826是具有MMP9接头的aTrop2 X aEpCAM异源COBRA。Pro827是具有NCL(不可切割对照)的aTrop2 X aEpCAM异源COBRA。Pro677是aTrop2/MMP9 COBRA,并且Pro566是aEpCAM/MMP9 COBRA。由于两种抗原的水平不同,因此异源COBRA保持良好的杀伤力,而单特异性COBRA的杀伤力有所不同。当其特定抗原(在这种情况下为Trop2)的表达水平下降时,单特异性

COBRA的杀伤力也会降低;图22和23也是如此。

[0611] 图22示出了如实施例2中概述的本发明的许多形式2构建体在具有高EpCAM表达和非常低Trop2表达的HT116细胞系上的TDCC测定中的功效。Pro824是aEpCAM X aTrop2(具有MMP9接头)异源COBRA。Pro825是具有NCL(不可切割对照)的aEpCAM X aTrop2异源COBRA。Pro826是具有MMP9接头的aTrop2 X aEpCAM异源COBRA。Pro827是具有NCL(不可切割对照)的aTrop2 X aEpCAM异源COBRA。Pro677是aTrop2/MMP9 COBRA,并且Pro566是aEpCAM/MMP9 COBRA。

[0612] 图23示出了如实施例2中概述的本发明的许多形式2构建体在具有中等EpCAM表达和高Trop2表达的BXPC3细胞系上的TDCC测定中的功效。Pro824是aEpCAM X aTrop2(具有MMP9接头)异源COBRA。Pro825是具有NCL(不可切割对照)的aEpCAM X aTrop2异源COBRA。Pro826是具有MMP9接头的aTrop2 X aEpCAM异源COBRA。Pro827是具有NCL(不可切割对照)的aTrop2 X aEpCAM异源COBRA。Pro677是aTrop2/MMP9 COBRA,并且Pro566是aEpCAM/MMP9 COBRA。

[0613] 图24示出了使用实施例3的方案2的具有MMP9切割位点的aEpCAM COBRA的体内功效。Pro566显示对LoVo肿瘤以及HT29、BxPC3和SW403肿瘤异种移植物的功效。

[0614] 图25示出了使用实施例3的方案2的具有MMP9切割位点的aTrop2 COBRA的体内功效。Pro677显示对BxPC3肿瘤以及HCC827肿瘤异种移植物的功效。

[0615] 图26示出了使用实施例3的方案3的具有MMP9切割位点的aB7H3 COBRA的体内功效。Pro225显示对A549肿瘤的功效。

[0616] 结论:我们设计了一种多价sdAb-双抗体融合体,它在蛋白水解作用时转化为高效的双特异性重导向T细胞治疗剂。体外测定表明,蛋白酶依赖性接头切割使T细胞介导的杀伤效力增加200倍,从而产生具有亚皮摩尔效力的治疗剂。在已经形成异种移植物的小鼠中施用PRO186(Pro186)会导致多种肿瘤模型中的蛋白酶切割依赖性T细胞介导的肿瘤消退。PRO186表现出(1)施用后体内半衰期延长,和(2)蛋白水解激活后快速清除,从而证明PRO186是一种比常规T细胞重导向双特异性药物安全性更高的治疗剂。

[0617] 实施例9:抗HER2单特异性COBRA在TDCC实验中有条件地杀死肿瘤细胞系

[0618] 人HER2-Raji细胞、食蟹猴(cyno)HER2-Raji细胞、SKOV3细胞(低表达HER2细胞)、Raji亲本细胞、HT29细胞(高表达HER2细胞)用各种融合蛋白进行了测试:Pro1123 NCL、Pro1117 MMP9、Pro 1117 MMP9cl、Pro1060 Pro51和Pro1069 AD(图27A-27E);Pro1110 NCL、Pro1109 MMP9、Pro 1109 MMP9cl、Pro 1062 Pro51和Pro1071 AD(图28A-28E);Pro1112 NCL、Pro1111 MMP9、Pro 1111 MMP9cl、Pro1064 Pro51和Pro1073 AD(图29A-29E);Pro1124 NCL、Pro1118 MMP9、Pro 1118 MMP9cl、Pro1061 Pro51和Pro1069 AD(图30A-30E)。结果显示,包含aHER2 sdABD(aHer2 h1139、h1159、h1162和h1156)的单特异性COBRA能够在TDCC测定中有条件地杀死肿瘤细胞系。

[0619] Pro51形式的并且含有一个aHER2 sdABD(诸如VIB1139 HER2 sdABD、VIB1156 HER2 sdABD、VIB1159 HER2 sdABD或VIB1162 HER2 sdABD)的aHER2融合蛋白在TDCC实验中展示出良好的抗人活性和与食蟹猴的交叉反应性(图31A-31C)。此外,形式2的并且包含MMP9可切割接头的aHER2单特异性COBRA(HER2/MMP9 COBRA)能够消除形成的肿瘤异种移植物(图32),特别地,Pro1118以100ug/kg向小鼠施用。图33描绘了图表,其示出了包含MMP9可

切割接头的单特异性HER2 COBRA的小鼠PK数据。结果表明Pro1111活性与鼠HER2结合一致。

[0620] 如本领域技术人员所理解的那样执行各种HER2 sdAb的表位合并实验。100nM的竞争抗体用333nM的饱和抗体进行测试。测试的竞争抗体是:Pro1118、Pro1111、曲妥珠单抗和培妥珠单抗。饱和测试抗体是:VIB1121 HER2 sdABD、VIB1139 HER2 sdABD、VIB1058 HER2 sdABD、VIB1097 HER2 sdABD、曲妥珠单抗、VIB1156 HER2 sdABD、VIB1160 HER2 sdABD、VIB1159 HER2 sdABD和VIB1162 HER2 sdABD(图34)。

[0621] 如本领域技术人员所认可的那样执行各种HER2 sdAb的表位合并实验。100nM的竞争抗体用333nM的饱和抗体测试。测试的抗体是:Pro1118、Pro1111、曲妥珠单抗和培妥珠单抗。“B”表示竞争抗体的结合,而“NB”表示竞争抗体不结合(图35)。

[0622] HER2 sdAb h1156(Pro1061)和HER2 sdAb h1162(Pro1064)的表位作图分析的氨基酸位置和序列使用HDX(氢-氘交换)进行鉴定,如本领域技术人员所认可的那样执行(图36)。

[0623] 确定了Pro51形式的HER2 sdAb的结合亲和力。使用来自人、食蟹猴和小鼠的靶标评估了各种sdAb和融合蛋白组合。组合如下:1055和Pro1036;1058和Pro1037;1059和Pro1038;1091和Pro1039;1092和Pro1040;1097和Pro1041;1121和Pro1042;1139和Pro1043;1156和Pro1044;1159和Pro1045;1160和Pro1046;1162和Pro1047;h1058和Pro1056;h1092和Pro1057;h1097和Pro1058;h1121和Pro1059;h1139和Pro1060;h1156和Pro1061;h1159和Pro1062;h1160和Pro1063;和h1162和Pro1064(图37)。

[0624] 实施例10:抗CA9单特异性COBRA在TDCC实验中有条件地杀死肿瘤细胞系

[0625] 人CA9-Raji细胞、食蟹猴CA9-Raji细胞和HT29-亲本细胞用各种融合蛋白进行测试:Pro514 NCL、Pro518 MMP9、Pro518 MMP9cl、Pro511 Pro51和Pro521 AD(图38A-38C)。靶向CA9的单特异性COBRA,诸如包含aCA9 sdABD的那些(aCA9 h407),能够有条件地杀死表达人或食蟹猴CA9的肿瘤细胞系。

[0626] 人CA9-Raji细胞、食蟹猴CA9-Raji细胞和HT29-亲本细胞用各种融合蛋白进行测试:Pro515 NCL、Pro519 MMP9、Pro519 MMP9cl和Pro512 Pro51。靶向CA9的单特异性COBRA,诸如包含aCA9 sdABD的那些(aCA9 h445),能够有条件地杀死表达人或食蟹猴CA9的肿瘤细胞系(图39A-39C)。

[0627] 人CA9-Raji细胞、食蟹猴CA9-Raji细胞和HT29-亲本细胞用各种融合蛋白进行测试:Pro1095 NCL、Pro516 MMP9、Pro516 MMP9cl和Pro509 Pro51。靶向CA9的单特异性COBRA,诸如包含aCA9 sdABD的那些(aCA9 h456),能够有条件地杀死表达人或食蟹猴CA9的肿瘤细胞系(图40A-40C)。

[0628] 人CA9-Raji细胞、食蟹猴CA9-Raji细胞和HT29-亲本细胞用各种融合蛋白进行测试:Pro513 NCL、Pro517 MMP9、Pro517 MMP9cl、Pro520 AD和Pro510 Pro51。靶向CA9的单特异性COBRA,诸如包含aCA9 sdABD的那些(aCA9 h4),能够有条件地杀死表达人或食蟹猴CA9的肿瘤细胞系(图41A-41C)。

[0629] 图42是表格,其描绘了Pro51形式的CA9 sdAb的结合亲和力。各种sdAb和sdAb与融合蛋白的组合在人、食蟹猴和小鼠中进行评估。sdAb如下:407、445、456、472和476,并且组合如下:h445和Pro512;h456和Pro509;和h476和Pro510。

[0630] 形式2的并且包含MMP9切割接头的CA9单特异性COBRA(CA9/MMP9 COBRA)能够消退

已形成的肿瘤异种移植物。图43A-43B是一系列图表,其证明了CA9/MMP9 COBRA在形成的肿瘤异种移植物模型中消退。Pro513、Pro517和Pro518的存在下的肿瘤SNU-16,所有剂量均为300ug/kg。Pro513和Pro517的存在下的肿瘤786-0,所有剂量均为100ug/kg。图44是图表,其示出了CA9/MMP9 COBRA的小鼠PK数据,所述数据与Pro516的鼠靶标结合一致。Pro517和Pro516均以100ug/kg的剂量使用。

[0631] 实施例11:EGFR/EpCAM异源COBRA诱导表达EGFR和EpCAM的细胞的TDCC

[0632] Raji-亲本细胞(图45A)、Raji-EGFR细胞(图45B)、Raji-EpCAM细胞(图45C)和Raji-EGFR/EpCAM细胞(图45D)用单特异性COBRA:Pro233(EGFR/EGFR)和Pro566(EpCAM/EpCAM)进行测试,并且用异源COBRA Pro624(EGFR/EpCAM)和Pro698(EpCAM/EGFR)进行测试。结果显示,靶向EGFR和EpCAM两者的异源特异性COBRA在表达一种或两种抗原(例如,单独的EGFR、单独的EpCAM或EGFR和EpCAM两者)的Raji细胞上诱导TDCC。

[0633] Pro624从N末端至C末端包含:(sdABD-EGFR)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-EpCAM)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。Pro698从N末端至C末端包含:(sdABD-EpCAM)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-EGFR)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。EGFR/EpCAM异源COBRA还能够在表达一种或两种抗原的HT29细胞上诱导TDCC。

[0634] 包含aEGFR sdABD(aEGFR hD 12)和aEpCAM sdABD(aEpCAM h644)的EGFR/EpCAM异源COBRA用Pro623 MMP9、切割的Pro623、Pro625 NCL进行测试(图46A)。Pro623从N末端至C末端包含:(sdABD-EGFR)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-EpCAM)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。

[0635] 包含aEGFR sdABD(aEGFR hD12)和aEpCAM sdABD(aEpCAM h665)的EGFR/EpCAM异源COBRA用Pro698 MMP9、切割的Pro698、699 NCL进行测试(图46B)。Pro699从N末端至C末端包含:(sdABD-EpCAM)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-EGFR)-NCL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。包含aEGFR sdABD(aEGFR hD12)和aEpCAM sdABD(aEpCAM h665)的EGFR/EpCAM异源COBRA用Pro624 MMP9、切割的Pro624、Pro699 NCL进行测试(图46C)。EGFR/EpCAM异源COBRA能够在表达一种或两种抗原的多种细胞中诱导TDCC。

[0636] 实施例12:EGFR/FOLR1异源COBRA诱导表达EGFR和FOLR1的细胞的TDCC

[0637] Raji-EGFR细胞(图47A)、Raji-FOLR1细胞(图47B)、Raji-EGFR/FOLR1细胞(图47C)用靶向EGFR或FOLR1的单特异性COBRA:Pro233(EGFR/EGFR)和Pro311(FOLR1/FOLR1)进行测试,并且用靶向EGFR和FOLR1两者的异源COBRA:Pro421(EGFR/FOLR1)和Pro420(FOLR1/EGFR)进行测试。Pro421从N末端至C末端包含:(sdABD-EGFR)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-FOLR1)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。Pro420从N末端至C末端包含:(sdABD-FOLR1)-结构域接头-aVH-CNCL-aVL-结构域接头-(sdABD-EGFR)-CL-iVL-CNCL-iVH-结构域接头-(sdABD-HSA)。这些实验的结果表明,EGFR/FOLR1异源COBRA(诸如Pro421)在表达一种或两种抗原的Raji细胞上诱导TDCC。

[0638] 图48A:用Pro214 NCL(EGFR hD12)、Pro186 MMP9(EGFR hD12)和Pro186 MMP9cl(EGFR hD12)测试H292细胞。图48B:用Pro303NCL(FOLR1 h59-3)、Pro312 MMP9(FOLR1 h59-3)和Pro312 MMP9cl(FOLR1 h59-3)测试H292细胞。图48C:用Pro550 NCL(EGFR/FOLR1 h59-3)、Pro551 MMP9(EGFR/FOLR1 h59-3)和Pro551 MMP9cl(EGFR/FOLR1 h59-3)测试H292细

胞。这些实验的结果表明,aFOLR1(h59-3)/aEGFR(D12)能够有条件地杀死表达FOLR1和EGFR两者的肿瘤细胞系。

[0639] 图49A:用Pro600 NCL EGFR/EGFR、Pro233 MMP9 EGFR/EGFR和Pro233 MMP9cl EGFR/EGFR测试H292细胞。图49B:用Pro299 NCL FOLR1/FOLR1、Pro311 MMP9 FOLR1/FOLR1和Pro311 MMP9cl FOLR1/FOLR1测试H292细胞。图49C:用Pro420 MMP9 FOLR1/EGFR和Pro420 MMP9cl FOLR1/EGFR测试H292细胞。图49D:用Pro421 MMP9 EGFR/FOLR1和Pro421 MMP9cl EGFR/FOLR1测试H292细胞。这些实验的结果表明,aFOLR1(h77-2或h57-3)/aEGFR(hD12)能够有条件地杀死表达FOLR1和EGFR两者的肿瘤细胞系。

[0640] 评估了EGFR/FOLR1异源COBRA与Pro51形式分子的亲和力,并且在图50中列出。

[0641] 实施例13:Trop2/EpCAM异源COBRA诱导表达Trop2和EpCAM的细胞的TDCC

[0642] Raji-Trop2细胞(图51A)、Raji-EpCAM(图51B)、SKOV3细胞(图51C)和HT29细胞(图51D)都用Pro566和Pro566cl进行测试。这些实验表明,Pro566 aEpCAM(h664)能够有条件地杀死转染以表达EpCAM的Raji细胞和表达EpCAM的肿瘤细胞系。

[0643] Raji-Trop2细胞(图52A)、Raji-EpCAM细胞(图52B)、SKOV3细胞(图52C)和HT29细胞(图52D)都用Pro677和切割的Pro677(Pro677cl)进行测试。这些实验表明,Pro677(aTrop2 h557)能够有条件地杀死转染以表达Trop2的Raji细胞和表达Trop2的肿瘤细胞系。

[0644] Raji-Trop2细胞(图53A)、Raji-EpCAM细胞(图53B)、SKOV3细胞(图53C)和HT29细胞(图53D)都用Pro824和切割的Pro824(Pro824cl)进行测试。这些实验表明,Pro824(aEpCAM h664/aTrop2 h557)能够有条件地杀死转染以表达EpCAM或Trop2的Raji和表达EpCAM和Trop2两者的肿瘤细胞系。

[0645] Raji-Trop2细胞(图54A)、Raji-EpCAM细胞(图54B)、SKOV3细胞(图54C)和HT29细胞(图54D)都用Pro826和切割的Pro826(Pro826cl)进行测试。这些实验表明,Pro826(aTROP2 h557/aEpCAM h664)能够有条件地杀死转染以表达Trop2或EpCAM的Raji和表达Trop2和EpCAM两者的肿瘤细胞系。

[0646] 图55A:用Pro569、Pro566和Pro566cl测试BXPC3细胞(人胰腺癌细胞系)。图55B:用Pro681、Pro677和Pro677cl测试BXPC3细胞。图55C:用Pro825、Pro824和Pro824cl测试BXPC3细胞。图55D:用Pro827、Pro826和Pro826cl测试BXPC3细胞。这些实验表明,EpCAM单特异性COBRA、Trop2单特异性COBRA和Trop2/EpCAM异源特异性COBRA都很好地有条件地杀死BXPC3细胞。

[0647] 图56A:用Pro569、Pro566和Pro566cl测试HCT116细胞(人结肠癌细胞系)。图56B:用Pro681 NCL、Pro677 MMP9和Pro677 MMP9cl测试HCT116细胞。图56C:用Pro825、Pro824和Pro824cl测试HCT116细胞。图56D:用Pro827、Pro826和Pro826cl测试HCT116细胞。这些实验表明,EpCAM单特异性COBRA、Trop2单特异性COBRA和Trop2/EpCAM异源特异性COBRA都很好地有条件地杀死HCT116细胞。

[0648] 图57A:用Pro569、Pro566和Pro566cl测试SCC25细胞(人鳞状细胞癌细胞系)。图57B:用Pro681、Pro677和Pro677cl测试SCC25细胞。图57C:用Pro825、Pro824和Pro824cl测试SCC25细胞。图57D:用Pro827、Pro826和Pro826cl测试SCC25细胞。这些实验表明,EpCAM单特异性COBRA、Trop2单特异性COBRA和Trop2/EpCAM异源特异性COBRA都很好地有条件地杀

死SCC25细胞。

[0649] 实施例14:B7H3/EpCAM异源COBRA诱导表达B7H3和EpCAM的细胞的TDCC

[0650] B7H3/EpCAM异源COBRA显示诱导表达一种或两种抗原的细胞上的TDCC。Raji-亲本细胞(图58A)、Raji-B7H3细胞(图58B)、Raji-EpCAM细胞(图58C)和Raji-B7H3/EpCAM细胞(图58D)用单特异性COBRA:Pro225(B7H3/B7H3和Pro566(EpCAM/EpCAM)进行测试,并且用异源COBRA Pro656(B7H3/EGFR)和Pro658(EpCAM/B7H3)进行测试。

[0651] 实验在CRISPR敲除系中执行:HT29细胞(图59A)、HT29-B7H3KO细胞(图59B)、HT29-EpCAM KO细胞(图59C)和HT29-B7H3/EpCAM KO细胞(图59D)全部用单特异性COBRA(Pro225 BN7H3/B7H3和Pro566 EpCAM/EpCAM)进行测试,并且用异源COBRA(Pro656 B7H3/EpCAM)进行测试。对所有COBRA进行预切割。

[0652] 图60A:用Pro295 NCL(B7H3 hF7)、Pro225 MMP9(B7H3 hF7)和Pro225 MMP9cl(B7H3 hF7)测试IGROV细胞。图60B:用Pro568 NCL(EpCAM h664)、Pro565 MMP9(EpCAM h664)和Pro565 MMP9cl(EpCAM h664)测试IGROV细胞。图60C:用Pro659 NCL(B7H3 hF7/EpCAM h664)、Pro655 MMP9(B7H3 hF7/EpCAM h664)和Pro655 MMP9cl(B7H3 hF7/EpCAM h664)测试IGROV细胞。图60D:用Pro661 NCL(EpCAM h664/B7H3 hF7)、Pro657 MMP9(EpCAM h664/B7H3 hF7)和Pro657 MMP9cl(EpCAM h664/B7H3 hF7)测试IGROV细胞。结果显示,aEpCAM(aEpCAM h664)/aB7H3(aB7H3 hF7)异源COBRA能够有条件地杀死表达EpCAM和B7H3两者的肿瘤细胞系。

[0653] 图61A:用Pro295 NCL(B7H3 hF7)、Pro225 MMP9(B7H3 hF7)和Pro225 MMP9cl(B7H3 hF7)测试IGROV细胞。图61B:用Pro569 NCL(EpCAM h665)、Pro566 MMP9(EpCAM h665)和Pro566 MMP9cl(EpCAM h665)测试IGROV细胞。图61C:用Pro660 NCL(B7H3/EpCAM h665)、Pro656 MMP9(B7H3/EpCAM h665)和Pro656 MMP9cl(B7H3/EpCAM h665)测试IGROV细胞。图61 D:用Pro662 NCL(EpCAM h665/B7H3)、Pro658 MMP9(EpCAM h665/B7H3)和Pro658(EpCAM h665/B7H3)测试IGROV细胞。结果显示,aEpCAM(aEPCAM h665)/aB7H3(aB7H3 hF7)能够有条件地杀死表达EpCAM和B7H3两者的肿瘤细胞系。

[0654] 图62A:用Pro295 NCL(B7H3 hF7)、Pro225 MMP9(B7H3 hF7)和Pro225 MMP9cl(B7H3 hF7)测试H292细胞。图62B:用Pro568 NCL(EpCAM h664)、Pro565 MMP9(EpCAM h664)和Pro565 MMP9cl(EpCAM h664)测试H292细胞。图62C:用Pro659 NCL(B7H3/EpCAM h664)、Pro655 MMP9(B7H3/EpCAM h664)和Pro655 MMP9cl(B7H3/EpCAM h664)测试H292细胞。图62D:用Pro661 NCL(EpCAM h664/B7H3)、Pro657MMP9(EpCAM h664/B7H3)和Pro657 MMP9cl(EpCAM h664/B7H3)测试H292细胞。结果显示,aEpCAM(aEpCAM h664)/aB7H3(aB7H3 hF7)异源COBRA能够有条件地杀死表达EpCAM和B7H3两者的肿瘤细胞系。

[0655] 用Pro295 NCL(B7H3 hF7)、Pro225 MMP9(B7H3 hF7)和Pro225 MMP9cl(B7H3 hF7)(图63A);Pro569 NCL(EpCAM h665)、Pro566 MMP9(EpCAM h665)和Pro566 MMP9cl(EpCAM h665)(图63B);Pro660 NCL(B7H3/EpCAM h665)、Pro656 MMP9(B7H3/EpCAM h665)和Pro656 MMP9cl(B7H3/EpCAMh665)(图63C);和Pro662 NCL(EpCAM h665/B7H3)、Pro658 MMP9(EpCAMh665/B7H3)和Pro658 MMP9cl(EpCAM h665/B7H3)(图63D)测试H292细胞。结果显示,aEpCAM(aEPCAM h665)/aB7H3(aB7H3 hF7)异源COBRA能够有条件地杀死表达EpCAM和B7H3两者的肿瘤细胞系。

[0656] HT29细胞(图64A)、U87-MG(EpCAM阴性)细胞(图64B)、Capan2细胞(图64C)和VCAP细胞(图64D)全部用单特异性COBRA:Pro225(B7H3/B7H3和Pro566(EpCAM/EpCAM)处理,并且用异源COBRA Pro656(B7H3/EpCAM和Pro658 EpCAM/B7H3)处理,以显示TDCC对肿瘤细胞系的效果。

[0657] 使用本领域技术人员已知的标准Jurkat荧光素酶测定来确定HT29细胞存在下的T细胞激活。HT29细胞用单特异性COBRA:Pro225(B7H3/B7H3)和Pro566(EpCAM/EpCAM)处理,并且用异源COBRA:Pro656(B7H3/EpCAM)和Pro658(EpCAM/B7H3)(图65)处理。

[0658] Jurkat激活测定中的异源COBRA的活性显示,与HT29细胞上的单特异性COBRA相比,对可溶性抗原抑制的敏感性较低。用可溶性EpCAM、可溶性B7H3-4Ig和无抗原(对照)与单特异性COBRA:Pro225(B7H3/B7H3)(图66A)和Pro566(EpCAM/EpCAM)(图66B)一起测定细胞,并且与异源COBRA:Pro656 B7H3/EpCAM(图66C)和Pro658 EpCAM/B7H3(图66D)一起测定细胞。在不同浓度的可溶性抗原的存在下,对于每种COBRA,以EC90添加预切割的COBRA。用单特异性COBRA检测到对Jurkat激活的更强抑制。

[0659] 抗原huB7H3-4Ig、huEpCAM和具有huEpCAM的huB7H3-4Ig用异源COBRA:Pro656 B7H3/EpCAM和Pro658 EpCAM/B7H3进行测定,并且图67提供了B7H3/EpCAM异源COBRA的亲和力的列表。

[0660] B7H3/EpCAM异源COBRA的药代动力学(图68)显示EpCAM sdAb不结合小鼠B7H3。包括两个EpCAM sdAb的Pro566(Pro 566 EpCAM/EpCAM)表现出最高的循环浓度。与小鼠B7H3蛋白结合的B7H3 sdAb和包括两个B7H3 sdAb的Pro225(Pro225 B7H3/B7H3)由于组织介导的药物处置,在循环中表现出最低的暴露。具有一个B7H3 sdAB和一个EpCAM sdAb的异源COBRA(Pro656 B7H3/EpCAM和Pro658 EpCAM/B7H3)表现出两个亲本单特异性COBRA之间的暴露。

[0661] 在小鼠的HT29细胞系异种移植物模型中确定了异源COBRA的体内活性。异源COBRA按照以下剂量施用:Pro660 NCL(B7H3/EpCAM;0.3mg/kg)、Pro656 MMP9(B7H3/EpCAM;0.01mg/kg)、Pro656 MMP9(B7H3/EpCAM;0.03mg/kg)和Pro656 MMP9(B7H3/EpCAM;0.1mg/kg)。B7H3/EpCAM异源COBRA在小鼠体内有活性(图69)。

[0662] 在HT29细胞系异种移植物模型中测试了额外的异源COBRA,并且按照以下剂量施用:Pro662 NCL(EpCAM/B7H3;0.1mg/kg)和Pro658 MMP9(EpCAM/B7H3;0.1mg/kg)。B7H3/EpCAM异源COBRA在小鼠体内有活性(图70)。

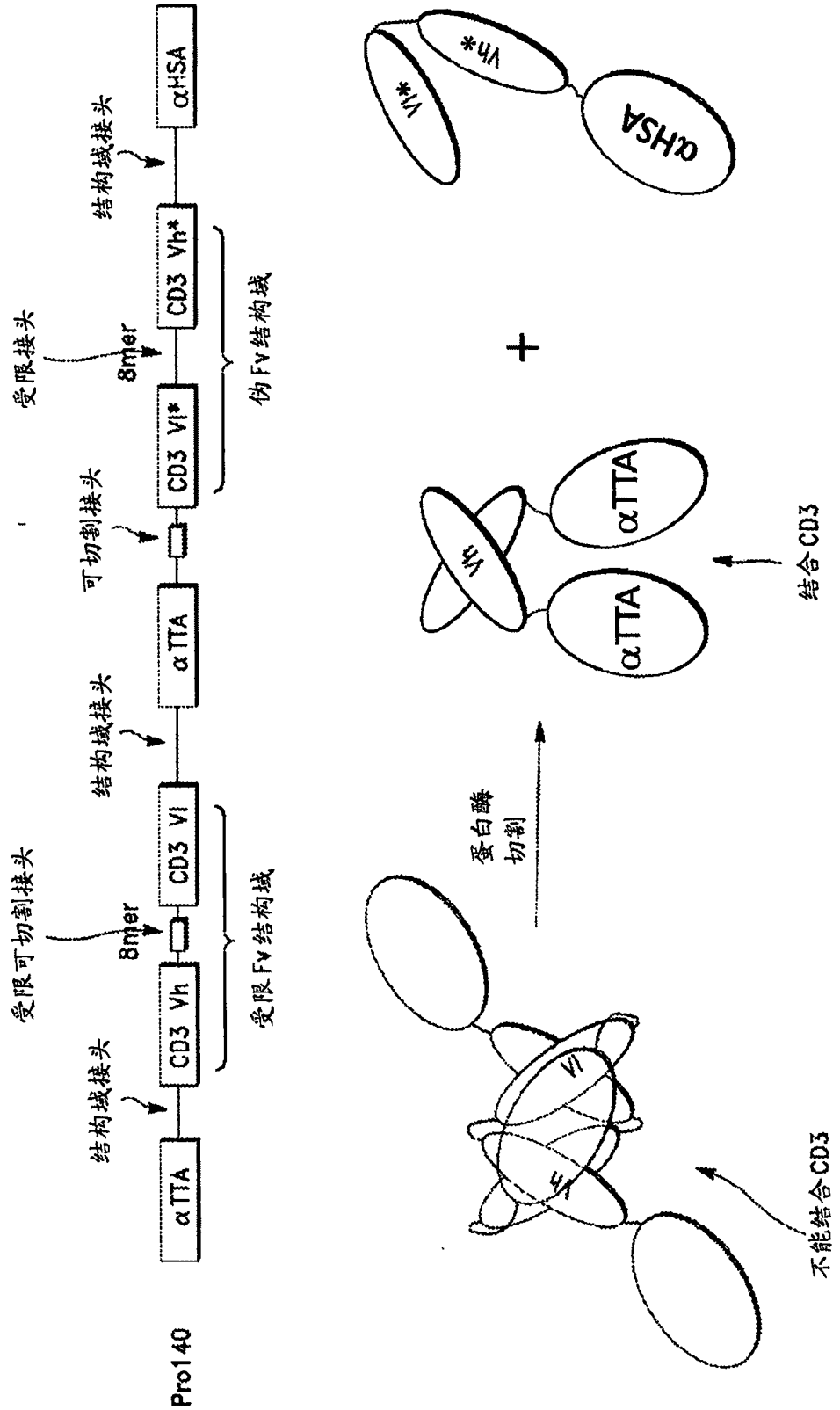

Pro140
αTTA
结构域接头
CD3 Vh
受限可切割接头
8mer
CD3 Vl
结构域接头
αTTA
可切割接头
CD3 Vl*
8mer
受限接头
CD3 Vh*
结构域接头
αHSA
受限Fv结构域
伪Fv结构域
蛋白酶
切割
αTTA
αTTA
结合CD3
αHSA
不能结合CD3

图1

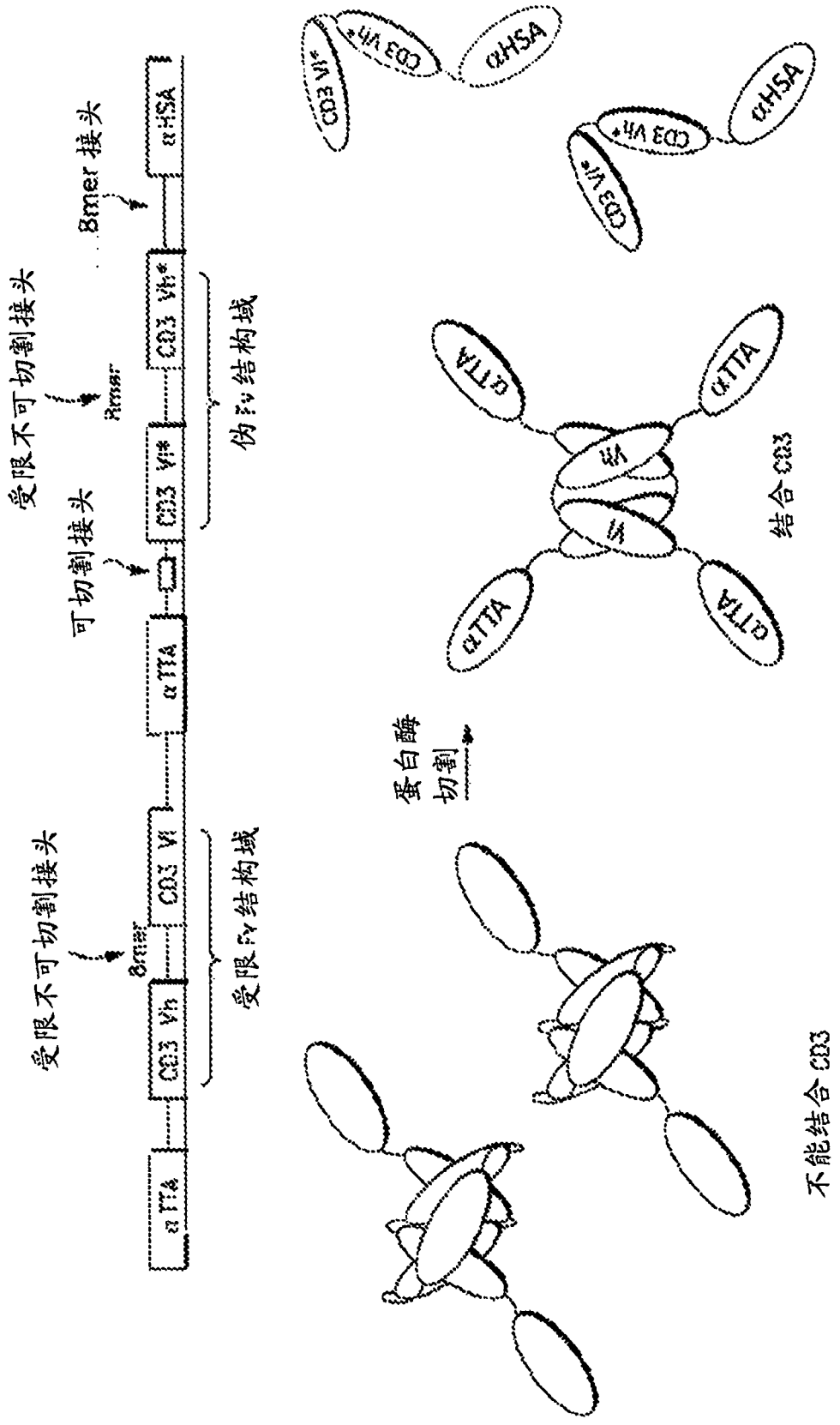

受限不可切割接头
8mer
CD3 Vh
受限Fv结构域
αTTA
可切割接头
CD3 Vl*
伪Fv结构域
受限不可切割接头
8mer
8mer接头
CD3 Vh*
αHSA
蛋白酶
切割
αTTA
αTTA
αTTA
αTTA
结合CD3
CD3 Vh*
CD3 Vl*
αHSA
不能结合CD3

图2

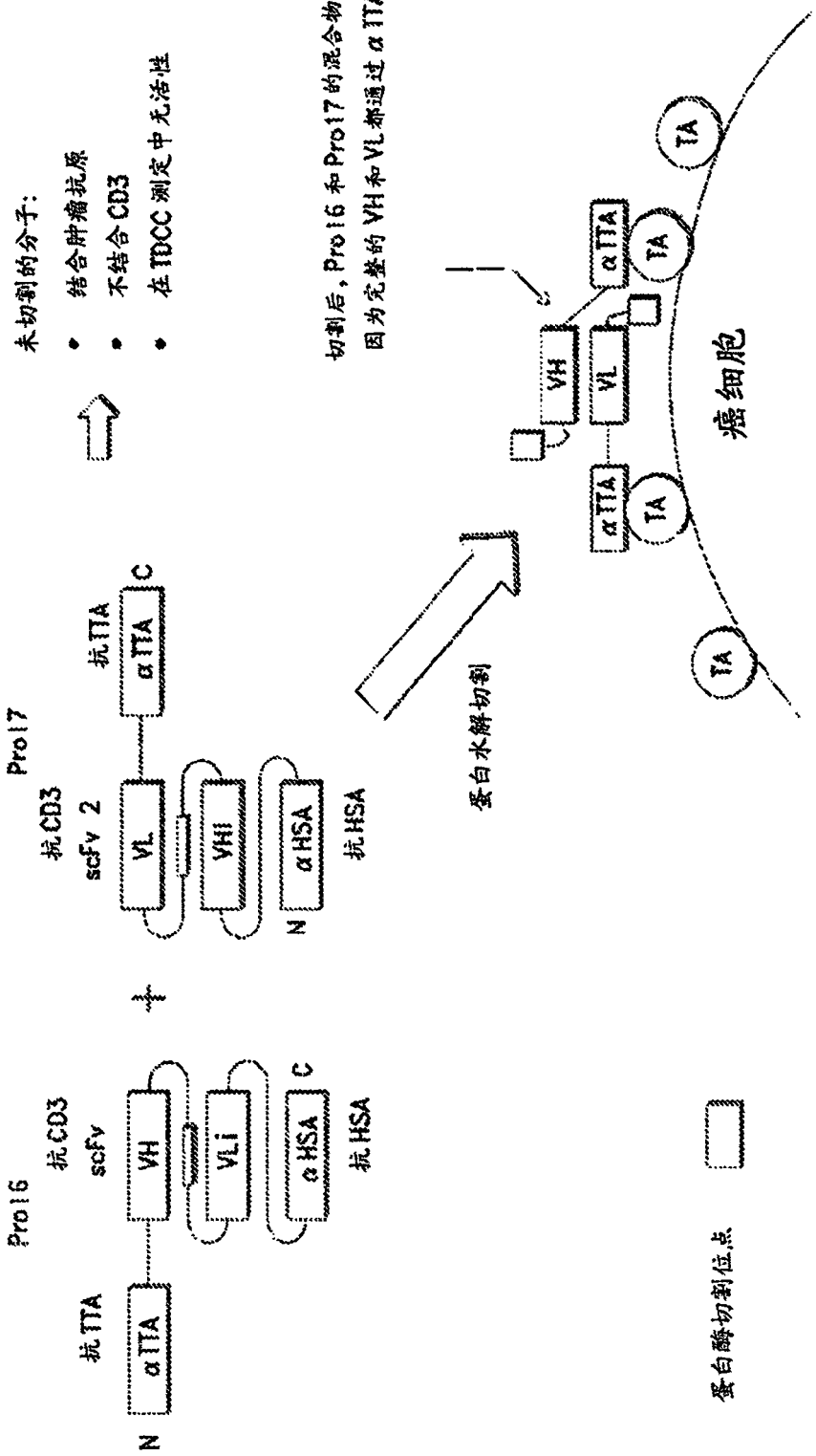

Pro16
抗CD3
scFv
抗TTA
αTTA
VH
VLi
αHSA
抗HSA
N
C
Pro17
抗CD3
scFv 2
抗TTA
αTTA
VL
VHi
αHSA
抗HSA
N
C
蛋白酶切割位点
蛋白水解切割
未切割的分子:
• 结合肿瘤抗原
• 不结合CD3
• 在TDCC测定中无活性
切割后，Pro16和Pro17的混合物将产生活性分子，
因为完整的VH和VL都通过αTTA与癌细胞相连
VH
VL
αTTA
TA
癌细胞

图3A

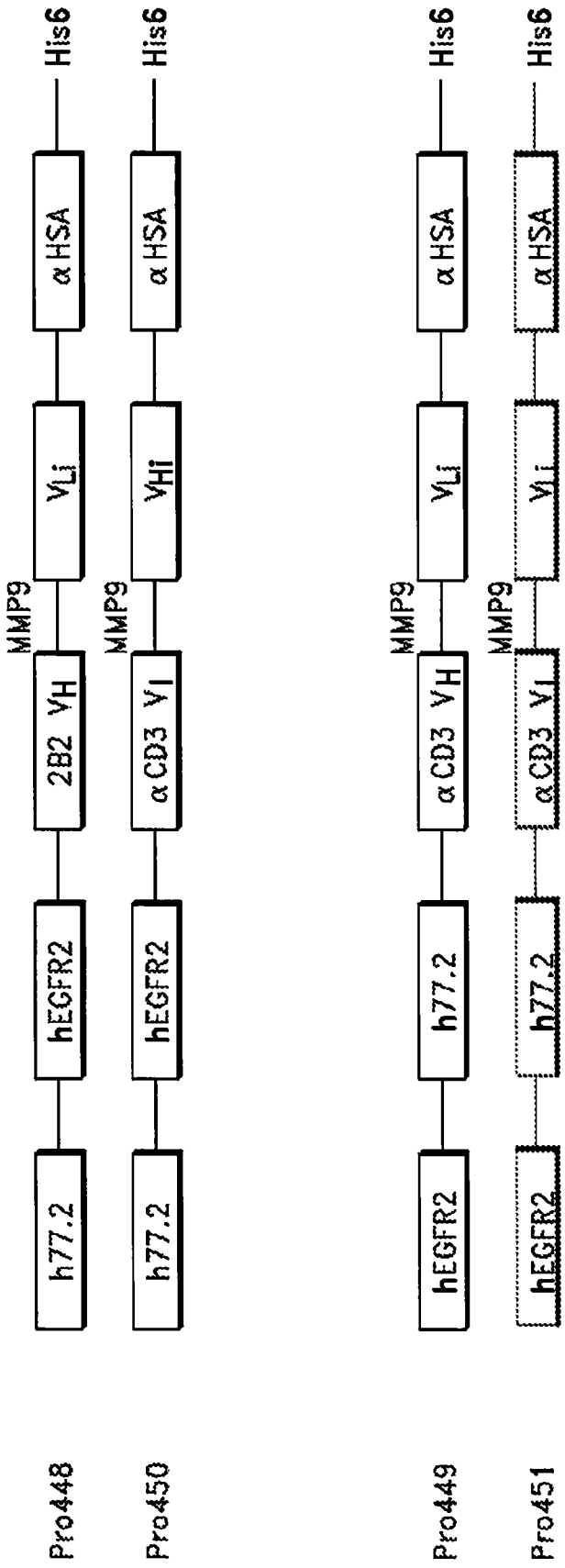

Pro448
h77.2
hEGFR2
2B2 VH
MMP9
VLi
αHSA
His6
Pro450
h77.2
hEGFR2
αCD3 VI
MMP9
VHi
αHSA
His6
Pro449
hEGFR2
h77.2
αCD3 VH
MMP9
VLi
αHSA
His6
Pro451
hEGFR2
h77.2
αCD3 VI
MMP9
VLi
αHSA
His6

图3B

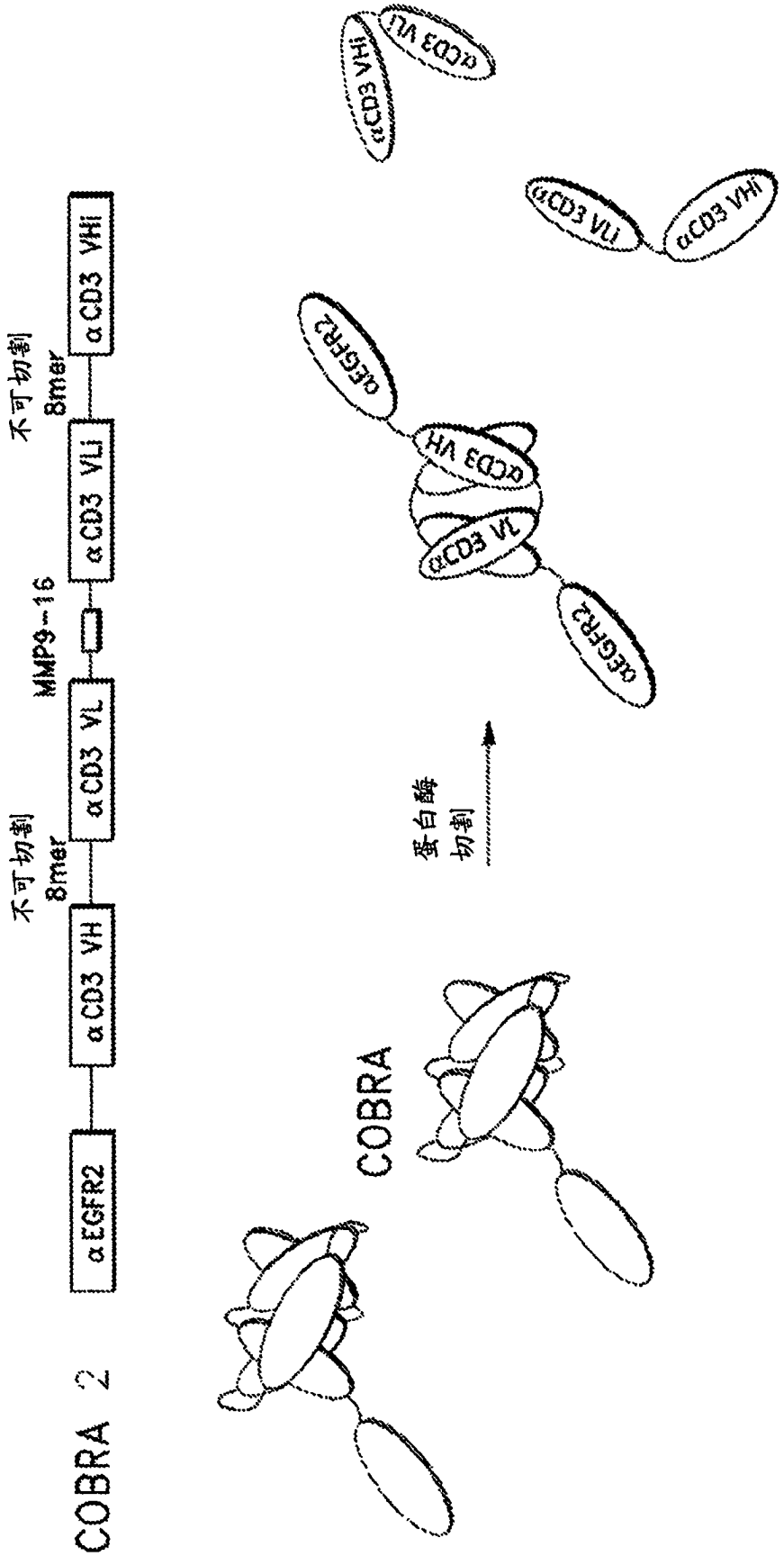

COBRA 2
αEGFR2
αCD3 VH
αCD3 VL
MMP9-16
αCD3 VLi
αCD3 VHi
不可切割
8mer
不可切割
8mer
蛋白酶
切割
COBRA
αEGFR2
αCD3 VH
αCD3 VL
αEGFR2
αCD3 VLi
αCD3 VHi
αCD3 VHi
αCD3 VLi

图4

αEGFR1

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GRTFSSYAMG**WFRQAPGKEREFVVA**INWSSGSTY YADSVKG**RFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAA**GYQINSGNYNFKDYEYDY**WG QGTQVTVSS (SEQ ID NO:1)

sdCDR1 **GRTFSSYAMG** (SEQ ID NO:2)
sdCDR2 **INWSSGSTYYADSVKG** (SEQ ID NO:3)
sdCDR3 **GYQINSGNYNFKDYEYDY** (SEQ ID NO:4)

αEGFR2

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDST GYADSVKG**RFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQG TQVTVSS (SEQ ID NO:5)

sdCDR1 **GRTSRSYGMG** (SEQ ID NO:6)
sdCDR2 **GISWRGDSTGYADSVKG** (SEQ ID NO:7)
sdCDR3 **AAGSAWYGTLYEYDY** (SEQ ID NO:8)

hαEGFR1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSSYAMG**WFRQAPGKEREFVVA**INWSSGSTY YADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GYQINSGNYNFKDYEYDY**WGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:9)

sdCDR1 **GRTFSSYAMG** (SEQ ID NO:10)
sdCDR2 **INWSSGSTYYADSVKG** (SEQ ID NO:11)
sdCDR3 **GYQINSGNYNFKDYEYDY** (SEQ ID NO:12)

aEGFR2a sdAb

EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDST GYADSVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:13)

sdCDR1 **GRTSRSYGMG** (SEQ ID NO:14)
sdCDR2 **GISWRGDSTGYADSVKG** (SEQ ID NO:15)
sdCDR3 **AAGSAWYGTLYEYDY** (SEQ ID NO:16)

hαEGFR2d

QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDST GYADSVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:17)

sdCDR1 **GRTSRSYGMG** (SEQ ID NO:18)
sdCDR2 **GISWRGDSTGYADSVKG** (SEQ ID NO:19)
sdCDR3 **AAGSAWYGTLYEYDY** (SEQ ID NO:20)

图5A

αFOLR1 h77-2

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTVSNSVMA**WYRQTPGNEREFVA**IINSIGITNYAD SVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCNR**NFDRIY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:21)

sdCDR1 **GFTVSNSVMA** (SEQ ID NO:22)
sdCDR2 **IINSIGITNYADSVKG** (SEQ ID NO:23)
sdCDR3 **NFDRIY** (SEQ ID NO:24)

αFOLR1 h59.3

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAP**GNTFSISAMG**WYRQAPGKQREWVA**VTHSDYSTNY ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKH**YGIDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:25)

sdCDR1 **GNTFSISAMG** (SEQ ID NO:26)
sdCDR2 **VTHSDYSTNYADSVKG** (SEQ ID NO:27)
sdCDR3 **YGIDY** (SEQ ID NO:28)

αFOLR1 h22-4

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**GTTFSRDVMG**WYRQAPGKQRELVA**IISRGGSTNY ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNA**NTATWGRVF**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:29)

sdCDR1 **GTTFSRDVMG** (SEQ ID NO:30)
sdCDR2 **IISRGGSTNYADSVKG** (SEQ ID NO:31)
sdCDR3 **NTATWGRVF** (SEQ ID NO:32)

αB7H3 hF7

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPS**RRTFHTYHMG**WFRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTV YADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTL VTVSS (SEQ ID NO:33)

sdCDR1 **RRTFHTYHMG** (SEQ ID NO:34)
sdCDR2 **VINWSGGSTVYADSVKG** (SEQ ID NO:35)
sdCDR3 **GGATTQRATEASYDY** (SEQ ID NO:36)

图5B

αB7H3 hF12

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTS YADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:37)

sdCDR1 **PRTFSTYSMA** (SEQ ID NO:38)
sdCDR2 **AINWSGGNTSYADSVKG** (SEQ ID NO:39)
sdCDR3 **GGVLAHHNYEYDY** (SEQ ID NO:40)

αB7H3 hF12 (N57Q)

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGQTS YADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:41)

sdCDR1 **PRTFSTYSMA** (SEQ ID NO:42)
sdCDR2 **AINWSGGQTSYADSVKG** (SEQ ID NO:43)
sdCDR3 **GGVLAHHNYEYDY** (SEQ ID NO:44)

αB7H3 hF12 (N57E)

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGETS YADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:45)

sdCDR1 **PRTFSTYSMA** (SEQ ID NO:46)
sdCDR2 **AINWSGGETSYADSVKG** (SEQ ID NO:47)
sdCDR3 **GGVLAHHNYEYDY** (SEQ ID NO:48)

αB7H3 hF12 (N57D)

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGDTS YADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:49)

sdCDR1 **PRTFSTYSMA** (SEQ ID NO:50)
sdCDR2 **AINWSGGDTSYADSVKG** (SEQ ID NO:51)
sdCDR3 **GGVLAHHNYEYDY** (SEQ ID NO:52)

图5C

αB7H3 hF12 (S59A)

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTA YADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:53)

sdCDR1 **PRTFSTYSMA** (SEQ ID NO:54)
sdCDR2 **AINWSGGNTAYADSVKG** (SEQ ID NO:55)
sdCDR3 **GGVLAHHNYEYDY** (SEQ ID NO:56)

αB7H3 hF12 (S59Y)

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTY YADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:57)

sdCDR1 **PRTFSTYSMA** (SEQ ID NO:58)
sdCDR2 **AINWSGGNTYYADSVKG** (SEQ ID NO:59)
sdCDR3 **GGVLAHHNYEYDY** (SEQ ID NO:60)

αEpCAM h13

QVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAAS**GTGSIFSINLMG**WYRQAPGKQRELVA**RITSGDSTV YADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNL**LLRSSPGATTPY**WGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:61)

sdCDR1 **GTGSIFSINLMG** (SEQ ID NO:62)
sdCDR2 **RITSGDSTVYADSVKG** (SEQ ID NO:63)
sdCDR3 **LLRSSPGATTPY** (SEQ ID NO:64)

αEpCAM h23

QVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCVIS**GSFSALWAMR**WYRQAPGQQRELVA**SSRGGTTSYA DSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNAI**DGHLAY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:65)

sdCDR1 **GSFSALWAMR** (SEQ ID NO:66)
sdCDR2 **SSRGGTTSYADSVKG** (SEQ ID NO:67)
sdCDR3 **IDGHLAY** (SEQ ID NO:68)

图5D

acEpCAM hVIB665

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGHT NYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTTTPETYDY**WGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:69)

sdCDR1 **GRTFSDYDMG** (SEQ ID NO:70)
sdCDR2 **AISWSGGHTNYADSVKG** (SEQ ID NO:71)
sdCDR3 **DLRFTGGDTTTPETYDY** (SEQ ID NO:72)

acEpCAM hVIB666

QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGST DYAYSVTG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:73)

sdCDR1 **GRTLDNYDMG** (SEQ ID NO:74)
sdCDR2 **AISWSGGSTDYAYSVTG** (SEQ ID NO:75)
sdCDR3 **DLRFTGGDTMTPETYDY** (SEQ ID NO:76)

aTrop2 hVIB557

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSSQSMG**WFRQAPGKEREFVS**AISWTGANPT YADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DTSGGSYYYERATAETSYDY**W GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:77)

sdCDR1 **GRTFSSQSMG** (SEQ ID NO:78)
sdCDR2 **AISWTGANPTYADSVKG** (SEQ ID NO:79)
sdCDR3 **DTSGGSYYYERATAETSYDY** (SEQ ID NO:80)

aTrop2 hVIB565

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFDYYAIG**WFRQAPGKEREGVS**CISSSHGSTYY ADSVKG**RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAT**AGDGGDYHCSGLVDYGMDY**WG KGTLVTVSS (SEQ ID NO:81)

sdCDR1 **GFTFDYYAIG** (SEQ ID NO:82)
sdCDR2 **CISSSHGSTYYADSVKG** (SEQ ID NO:83)
sdCDR3 **AGDGGDYHCSGLVDYGMDY** (SEQ ID NO:84)

图5E

aTrop2 hVIB575

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLAS**GRTVGRTAMG**WFRQPPGKEREFVA**TISWAGGTTY YADFVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**SEPYSDYDPSGMVY**WGKGTLV TVSS (SEQ ID NO:85)

sdCDR1 **GRTVGRTAMG** (SEQ ID NO:86)
sdCDR2 **TISWAGGTTYYADFVKG** (SEQ ID NO:87)
sdCDR3 **SEPYSDYDPSGMVY** (SEQ ID NO:88)

aTrop2 hVIB578

图5F

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFGRAAMG**WFRQPPGKEREFAA**TISWSGSNTY YADFVKG**RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**SEPYSDYDPSGMVY**WGKGTLV TVSS (SEQ ID NO:89)

sdCDR1 **GRTFGRAAMG** (SEQ ID NO:90)
sdCDR2 **TISWSGSNTYYADFVKG** (SEQ ID NO:91)
sdCDR3**SEPYSDYDPSGMVY** (SEQ ID NO:92)

aTrop2 hVIB609

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCALS**GLTFNTYPMA**WFRQPPGQEREFVA**DMSWSGTNTY YADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GWPYSGTGRSTTDYTY**WGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:93)

sdCDR1 **GLTFNTYPMA** (SEQ ID NO:94)
sdCDR2 **DMSWSGTNTYYADSVKG** (SEQ ID NO:95)
sdCDR3 **GWPYSGTGRSTTDYTY** (SEQ ID NO:96)

aTrop2 hVIB619

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRSFSRYGMG**WLRQAPGKERELVA**SISWSGHSTY YADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**ESLPYESGSPRLTDFAS**WGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:97)

sdCDR1 **GRSFSRYGMG** (SEQ ID NO:98)
sdCDR2 **SISWSGHSTYYADSVKG** (SEQ ID NO:99)
sdCDR3 **ESLPYESGSPRLTDFAS** (SEQ ID NO:100)

aCA9 hVIB456 sdAb

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GSALIINAMG**WYRQAPGKQRELVA**TVTRSGRTNY ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNV**ALWIADGEYDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:101)
sdCDR1 **GSALIINAMG** (SEQ ID NO:102)
sdCDR2 **TVTRSGRTNYADSVKG** (SEQ ID NO:103)
sdCDR3 **ALWIADGEYDY** (SEQ ID NO:104)

图5F

aCA9 hVIB476 sdAb

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GNIFIINVMG**WYRQAPGKQRELVA**TITNGGRTHYA DSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNA**NHIELGDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:105)

sdCDR1 **GNIFIINVMG** (SEQ ID NO:106)
sdCDR2 **TITNGGRTHYADSVKG** (SEQ ID NO:107)
sdCDR3 **NHIELGDY** (SEQ ID NO:108)

aCA9 hVIB407 sdAb

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS**GIIFSVYDMG**WYRQTPGKQREFVA**RITAGGGTYLT DSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTGVYYCNA**AWIGDDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:109)

sdCDR1 **GIIFSVYDMG** (SEQ ID NO:110)
sdCDR2 **RITAGGGTYLTDSVKG** (SEQ ID NO:111)
sdCDR3 **AWIGDDY** (SEQ ID NO:112)

aCA9 hVIB445 sdAb

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GITFNLHAMR**WYRRAPGKQRELVA**YISARDWTNY ADSVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCNT**DLVGEDY**WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:113)

sdCDR1 **GITFNLHAMR** (SEQ ID NO:114)
sdCDR2 **YISARDWTNYADSVKG** (SEQ ID NO:115)
sdCDR3 **DLVGEDY** (SEQ ID NO:116)

αLyPD3 h787 sdAb
QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTLDYYAIG**WFRQAPGKEHEAVS**CISSSDGSTYY ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT**VKSCYSDGYALWGS**WGQGTLV TVSS (SEQ ID NO:117)

sdCDR1 **GFTLDYYAIG** (SEQ ID NO:118)
sdCDR2 **CISSSDGSTYYADSVKG** (SEQ ID NO:119)
sdCDR3 **VKSCYSDGYALWGS** (SEQ ID NO:120)

αLyPD3 h790 sdAb

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTLDYYSIG**WFRQAPGKEREGVS**CISSSDGSTYY ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT**VKSCYVDGYILWGS**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:121)

sdCDR1 **GFTLDYYSIG** (SEQ ID NO:122)
sdCDR2 **CISSSDGSTYYADSVKG** (SEQ ID NO:123)
sdCDR3 **VKSCYVDGYILWGS** (SEQ ID NO:124)

图5G

αLyPD3 H804 sdAb

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTLDYYAIG**WFRQAPGKEHEGVS**CISSSDGSTYYADSVKG**RFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT**VRSCASPYELGS**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:125)

sdCDR1 **GFTLDYYAIG** (SEQ ID NO:126)
sdCDR2 **CISSSDGSTYYADSVKG** (SEQ ID NO:127)
sdCDR3 **VRSCASPYELGS** (SEQ ID NO:128)

αLyPD h773 sdAb (Pro929)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRSFSSYGMG**WFRQAPGKEREIVA**AISWGGSAVYYANSVKG**R FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**NRQGRALVRKEFYDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:129)

sdCDR1 **GRSFSSYGMG** (SEQ ID NO:130)
sdCDR2 **AISWGGSAVYYANSVKG** (SEQ ID NO:131)
sdCDR3 **NRQGRALVRKEFYDY** (SEQ ID NO:132)

αLyPD3 h840 sdAb (Pro980)

QVQLLESGGGKVQPGGSLRLSCVVS**GDTSSIYLMG**WYRQTPGKQRELVA**HIRGNGRTNYADSVKG**RF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNV**RNFWGSAEY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:133)

sdCDR1 **GDTSSIYLMG** (SEQ ID NO:134)
sdCDR2 **HIRGNGRTNYADSVKG** (SEQ ID NO:135)
sdCDR3 **RNFWGSAEY** (SEQ ID NO:136)

αLyPD3 h885 sdAb (Pro981)

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVAS**RGTFSRYSMG**WFRQAPGKEREFVG**RISWSGDMTYYADSVKG**R FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**STLGYVWNHPNMYGY**WGHGTLVTVSS (SEQ ID NO:137)

sdCDR1 **RGTFSRYSMG** (SEQ ID NO:138)
sdCDR2 **RISWSGDMTYYADSVKG** (SEQ ID NO:139)
sdCDR3 **STLGYVWNHPNMYGY** (SEQ ID NO:140)

αHer-2 1054 sdAb

QVQLQESGGGLVQAGGSLILSCAAS**GRTFSNYAMG**WFRQAPGKEREFVA**AINWSGTHTDYADSVKG** RFTISRDNVKRTVYLQMNSLKPEDTATYFCSR**GWSVFDPDY**RGQGTQVTVSS(SEQ ID NO:141)

sdCDR1 **GRTFSNYAMG** (SEQ ID NO:142)

sdCDR2 **AINWSGTHTDYADSVKG** (SEQ ID NO:143)
sdCDR3 **GWSVFDPDY** (SEQ ID NO:144)

图5H

αHer-2 1055 sdAb

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCEVS**GRAISSYAIS**WFRQAPGEEREFVA**AINWSGTHTNYADSVKG**RF
TISRDNVKNTVYLQMNSLKPEDTATYFCSR**GWSVFDPDYR**GQGTQVTVSS (SEQ ID NO:145)
sdCDR1 **GRAISSYAIS** (SEQ ID NO:146)
sdCDR2 **AINWSGTHTNYADSVKG** (SEQ ID NO:147)
sdCDR3 **GWSVFDPDYR** (SEQ ID NO:148)

αHer-2 1058 sdAb

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCAAS**GRAISSYAIS**WFRQAPGEEREFVA**AINWSGTHTNYADSVKG**RF
TISRDNVKNTVYLQMNSLKPEDTATYFCSR**GWSVFDPDY**RGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:149)
sdCDR1 **GRAISSYAIS** (SEQ ID NO:150)
sdCDR2 **AINWSGTHTNYADSVKG** (SEQ ID NO:151)
sdCDR3 **GWSVFDPDY** (SEQ ID NO:152)

αHer-2 1059 sdAb

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCAAS**GRAISSYAIS**WFRQAPGEEREFVA**AINWSGTHTDYADSVKG**RF
TISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYFCSR**GWSVFDPDY**RGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:153)
sdCDR1 **GRAISSYAIS** (SEQ ID NO:154)
sdCDR2 **AINWSGTHTDYADSVKG** (SEQ ID NO:155)
sdCDR3 **GWSVFDPDY** (SEQ ID NO:156)

αHer-2 1065 sdAb

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCEVS**GRAISSYAIS**WFRQAPGEEREFVA**AINWSGTHTNYADSVKG**RF
TISRDNVKRTVYLQMNSLKPEDTATYFCSR**GWSVFDPDY**RGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:157)
sdCDR1 **GRAISSYAIS** (SEQ ID NO:158)
sdCDR2 **AINWSGTHTNYADSVKG** (SEQ ID NO:159)
sdCDR3 **GWSVFDPDY** (SEQ ID NO:160)

αHer-2 1090 sdAb

QVQLQESGGGLVQTGGSLRLTCEVS**GRAISSYAIS**WFRQAPGEEREFVA**AINWSGTHTNYADSVKG**RF
TISRDNVKNTVYLQMNSLKPEDTATYFCSR**GWSLFDPDY**RGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:161)
sdCDR1 **GRAISSYAIS** (SEQ ID NO:162)
sdCDR2 **AINWSGTHTNYADSVKG** (SEQ ID NO:163)
sdCDR3 **GWSLFDPDY** (SEQ ID NO:164)

图5I

αHer-2 1091 sdAb

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFDDYAMS**WVRQAPGKGLEWVS**SINWSGTHTDYADSVKG**
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDSAVYYCVK**GWRLTGGYYDSV**QGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:165)
sdCDR1 **GFTFDDYAMS** (SEQ ID NO:166)
sdCDR2 **SINWSGTHTDYADSVKG** (SEQ ID NO:167)
sdCDR3 **GWRLTGGYYDSV** (SEQ ID NO:168)

αHer-2 1092 sdAb

QVQLQESGGGLVQAGASLRLSCAAS**GFTFDDYALS**WVRQAPGKGLEWVS**SINWSGTHTDYADSVKG**
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDSAVYYCVK**GWRLTGGYYDSV**QGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:169)
sdCDR1 **GFTFDDYALS** (SEQ ID NO:170)
sdCDR2 **SINWSGTHTDYADSVKG** (SEQ ID NO:171)
sdCDR3 **GWRLTGGYYDSV** (SEQ ID NO:172)

αHer-2 1097 sdAb

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFIFDDYAMT**WVRQAPGKGLEWVS**SINWSGTHTDYADSVKG**
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDSAVYYCVK**GWRHTDNYYAGV**QGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:173)
sdCDR1 **GFIFDDYAMT** (SEQ ID NO:174)
sdCDR2 **SINWSGTHTDYADSVKG** (SEQ ID NO:175)
sdCDR3 **GWRHTDNYYAGV** (SEQ ID NO:176)

αHer-2 1118 sdAb

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GFTFDDYAMS**WVRQTPGKGLEWVS**SINWSGTHTNYADSVKG**
RFTISRDNAKKTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAR**GWMVVPDST**RGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:177)
sdCDR1 **GFTFDDYAMS** (SEQ ID NO:178)
sdCDR2 **SINWSGTHTNYADSVKG** (SEQ ID NO:179)
sdCDR3 **GWMVVPDST** (SEQ ID NO:180)

αHer-2 1121 sdAb

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GFIFSDYAMT**WVRQAPGKGLEWVS**SINWSGTHTNYADSVKG**
RFTISRDNAKKTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAR**GWMVVPDST**RGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:181)
sdCDR1 **GFIFSDYAMT** (SEQ ID NO:182)
sdCDR2 **SINWSGTHTNYADSVKG** (SEQ ID NO:183)
sdCDR3 **GWMVVPDST** (SEQ ID NO:184)

图5J

αHer-2 1134 sdAb

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GRIFSAAVMA**WYRQPPGEQRELVA**SITHRGFTRYADSVKD**RFT ISRDNVNNTMYLQMNRLSPEDTAIYYCRL**LNGDY**WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:185)
sdCDR1 **GRIFSAAVMA** (SEQ ID NO:186)
sdCDR2 **SITHRGFTRYADSVKD** (SEQ ID NO:187)
sdCDR3 **LNGDY** (SEQ ID NO:188)

αHer-2 1138 sdAb

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFDDYAMS**WVRQAPGKEMEWVS**GINWSGTHTRYADSVK G**RFTISRDNAKNTLDLQMNSLISEDTAVYYCAR**GFAADSRST**RGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:189)
sdCDR1 **GFTFDDYAMS** (SEQ ID NO:190)
sdCDR2 **GINWSGTHTRYADSVKG** (SEQ ID NO:191)
sdCDR3 **GFAADSRST** (SEQ ID NO:192)

αHer-2 1139 sdAb

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFDDYAMS**WIRQAPGKEMEWVS**GINWSGTHTRYADSVK G**RFTISRDNAKNTLDLQMNSLISEDTAVYYCAR**GFAADSRST**RGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:193)
sdCDR1 **GFTFDDYAMS** (SEQ ID NO:194)
sdCDR2 **GINWSGTHTRYADSVKG** (SEQ ID NO:195)
sdCDR3 **GFAADSRST** (SEQ ID NO:196)

αHer-2 1140 sdAb

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVAS**GFTFDDYAMS**WVRQAPGKEMEWVS**GINWSGTHTRYADSVK G**RFTISRDNAKNTLDLQMNSLISEDTAVYYCAR**GFAADSRST**RGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:197)
sdCDR1 **GFTFDDYAMS** (SEQ ID NO:198)
sdCDR2 **GINWSGTHTRYADSVKG** (SEQ ID NO:199)
sdCDR3 **GFAADSRST** (SEQ ID NO:200)

αHer-2 1145 sdAb

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GRIFKNYPMG**WFRQPPGKDREFVA**AITSSGGTTHYRDSVKG**R FTISRDNAKNTVYLQMNSLKPDDTAVYYCAG**SSTPWDIPLGPNEVGY**WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:201)
sdCDR1 **GRIFKNYPMG** (SEQ ID NO:202)
sdCDR2 **AITSSGGTTHYRDSVKG** (SEQ ID NO:203)
sdCDR3 **SSTPWDIPLGPNEVGY** (SEQ ID NO:204)

图5K

αHer-2 1146 sdAb

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GRIFKNYPMG**WFRQPPGKDREFVA**AITSSGGTTPYRDSVKG**RF TISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAG**SSTPWDIPLGPNEVGF**WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:205)
sdCDR1 **GRIFKNYPMG** (SEQ ID NO:206)
sdCDR2 **AITSSGGTTPYRDSVKG** (SEQ ID NO:207)
sdCDR3 **SSTPWDIPLGPNEVGF** (SEQ ID NO:208)

αHer-2 1149 sdAb

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVAS**GNIFGFNVMG**WYRQVPGKQRELVA**ISTGGRSTDYADSAKG**RF TISRNNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKM**TMASSDY**WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:209)
sdCDR1 **GNIFGFNVMG** (SEQ ID NO:210)
sdCDR2 **ISTGGRSTDYADSAKG** (SEQ ID NO:211)
sdCDR3 **TMASSDY** (SEQ ID NO:212)

αHer-2 1150 sdAb

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVAS**GNIFGFNVMG**WYRQVPGKQRELVA**ISTGGGSTNYADSAKG**RF TVSRNNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKM**TMASVDY**WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:213)
sdCDR1 **GNIFGFNVMG** (SEQ ID NO:214)
sdCDR2 **ISTGGGSTNYADSAKG** (SEQ ID NO:215)
sdCDR3 **TMASVDY** (SEQ ID NO:216)

αHer-2 1156 sdAb

QVQLQESGGGLVQAGGSLKVSCAAS**RNIGSNYAVG**WFRQAPGKEREPVA**ALRWTGSIIGYDDSLRG**R FTISKDDAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCAA**RILDRSSYDY**WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:217)
sdCDR1 **RNIGSNYAVG** (SEQ ID NO:218)
sdCDR2 **ALRWTGSIIGYDDSLRG** (SEQ ID NO:219)
sdCDR3 **RILDRSSYDY** (SEQ ID NO:220)

αHer-2 1158 sdAb

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS**GRTFSSYAMG**WFRQAPEKEREFVA**AITWSGGTTHYAESVKG**R FTISRDNAKNTVYLQMNTLEPEDTAVYYCAA**RINYSTISSNEKMYHY**WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:221)
sdCDR1 **GRTFSSYAMG** (SEQ ID NO:222)
sdCDR2 **AITWSGGTTHYAESVKG** (SEQ ID NO:223)
sdCDR3 **RINYSTISSNEKMYHY** (SEQ ID NO:224)

图5L

αHer-2 1159 sdAb

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCATSGRTFSSLAMGWFRQAPGKERELVAGISWSGSTTYYADSVKGR FAISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARTSSIATIGREYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:225)

sdCDR1 GRTFSSLAMG (SEQ ID NO:226)

sdCDR2 GISWSGSTTYYADSVKG (SEQ ID NO:227)

sdCDR3 RTSSIATIGREYDY (SEQ ID NO:228)

αHer-2 1160 sdAb

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNERLGWFRQAPGKERELVAAIRWSGVIIGYADSVRGRF TISRDNAKSTVYLQMNSLRPEDTAVYFCAADRGVYGTWDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:229)

sdCDR1 GRTFSNERLG (SEQ ID NO:230)

sdCDR2 AIRWSGVIIGYADSVRG (SEQ ID NO:231)

sdCDR3 DRGVYGTWDY (SEQ ID NO:232)

αHer-2 1161 sdAb

QVQLQESGGGLVQPGKSLRLSCAVSGDIFGTYGMAWYRQAPGKQREPVASISIGGIINYADSVKGRFTI SRDNVKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKLLDWNYWGRGTQVTVSS (SEQ ID NO:233)

sdCDR1 GDIFGTYGMA (SEQ ID NO:234)

sdCDR2 SISIGGIINYADSVKG (SEQ ID NO:235)

sdCDR3 LDWNY (SEQ ID NO:236)

αHer-2 1162 sdAb

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFSGNAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGDSTYYADSVKG RFTISRDNDENTAYLQMNSLKPEDTAVYYCAATRSFYSRTYYTRPSDYNYWGPGTQVTVSS (SEQ ID NO:237)

sdCDR1 GRPFSGNAMG (SEQ ID NO:238)

sdCDR2 AISWSGDSTYYADSVKG (SEQ ID NO:239)

sdCDR3 TRSFYSRTYYTRPSDYNY (SEQ ID NO:240)

αHer-2 1163 sdAb

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRRFNNYFMGWFRQAPGKEREFVALLRESGDNTYYTNSVKGR FTISRDNARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARLDTGFVLYSANSYAYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:241)

sdCDR1 GRRFNNYFMG (SEQ ID NO:242)

sdCDR2 LLRESGDNTYYTNSVKG (SEQ ID NO:243)

sdCDR3 RLDTGFVLYSANSYAY (SEQ ID NO:244)

图5M

αHSA半衰期延长结构域(aHSA(10GE))

EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTL YAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSS (SEQ ID NO:245)

sdCDR1 **GFTFSKFGMS** (SEQ ID NO:246)
sdCDR2 **SISGSGRDTLYAESVKG** (SEQ ID NO:247)
sdCDR3 **GGSLSV** (SEQ ID NO:248)

具有His标签的αHSA半衰期延长结构域

EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTL YAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSS/HHHHH H (SEQ ID NO:249)

sdCDR1 **GFTFSKFGMS** (SEQ ID NO:250)
sdCDR2 **SISGSGRDTLYAESVKG** (SEQ ID NO:251)
sdCDR3 **GGSLSV** (SEQ ID NO:252)

图6

αCD3 scFv结构域

αCD3 V_L

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GT
PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL (SEQ ID
NO:254)

aVLCDR1 **ASSTGAVTSGNYPN** (SEQ ID NO:255)
aVLsdCDR2 **GTKFLVP** (SEQ ID NO:256)
aVLsdCDR3 **TLWYSNRWV** (SEQ ID NO:257)

αCD3 V_{Li}

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**
GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL (SEQ ID
NO:258)

iVLCDR1 **GSSTGAVTSGNYPN** (SEQ ID NO:259)
iVLsdCDR2 **DYKDDDDK** (SEQ ID NO:260)
iVLsdCDR3 **VLWYSNRWV** (SEQ ID NO:261)

αCD3 V_{Li2}

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKDDAP**G
TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL (SEQ ID
NO:262)

iVLCDR1 **GSSTGAVTSGNYPN** (SEQ ID NO:263)
iVLsdCDR2 **GTKDDAP** (SEQ ID NO:264)
iVLsdCDR3 **VLWYSNRWV** (SEQ ID NO:265)

αCD3 V_{Li}GL

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGHYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTSNKHS**W
TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWGSRRWV**FGGGTKLTVL (SEQ ID
NO:266)

aV_{Li}GLCDR1 **GSSTGAVTSGHYPN** (SEQ ID NO:267)
aV_{Li}GLCDR2 **GTSNKHS** (SEQ ID NO:268)
aV_{Li}GLCDR3 **VLWGSRRWV** (SEQ ID NO:269)

图7A

αCD3 V_H

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYAT YYADQVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTL VTVSS (SEQ ID NO:270)

aVHCDR1 **GFTFNKYAIN** (SEQ ID NO:271)
aVHsdCDR2 **RIRSKYNNYATYYADQVKD** (SEQ ID NO:272)
aVHsdCDR3 **HANFGNSYISYWAY** (SEQ ID NO:273)

αCD3 V_{Hi}

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKD DDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:274)

iVHsdCDR1 **GFTFNKYAMN** (SEQ ID NO:275)
iVHsdCDR2 **RIRSKYDYKDDDDKADSVKD** (SEQ ID NO:276)
iVHsdCDR3 **HGNFGNSYISYWAY** (SEQ ID NO:277)

αCD3 V_{Hi2}

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKHAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYA TAYADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:278)

iVHsdCDR1 **GFTFNKHAMN** (SEQ ID NO:279)
iVHsdCDR2 **RIRSKYNNYATAYADSVKD** (SEQ ID NO:280)
iVHsdCDR3 **HGNFGNSYISYWAY** (SEQ ID NO:281)

αCD3 VHiGL4
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFSGYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKANSYA TEYAASVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNAGNSAISYWAY**WGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:282)

aVHiGL4CDR1 **GFTFSGYAMN** (SEQ ID NO:283)
aVHiGL4CDR2 **RIRSKANSYATEYAASVKD** (SEQ ID NO:284)
aVHiGL4CDR3 **HGNAGNSAISYWAY** (SEQ ID NO:285)

αCD3 scFv接头

正常/不可切割接头

GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:286)

受限接头

GGGSGGGS (SEQ ID NO:287)

图7B

可切割接头(识别位点为粗体，切割位点用"/"标记)

MMP 2/9

GPAG/MKGL (SEQ ID NO:339)

SGGP**GPAG/MKGL**PGS (SEQ ID NO:340)

SGGGP**GPAG/MKGL**PGGS (SEQ ID NO:341)

甲基多巴A/B

GGGG**KKLA/DEPE**GGGS (SEQ ID NO:342)

SGGG**KKLA/DEPE**GGS (SEQ ID NO:343)

KKLA/DEPE (SEQ ID NO:344)

甲基多巴A/B (变体，高效率)

GGG**KFLA/DEPE**GG (SEQ ID NO:345)

组织蛋白酶S, K, L

GGG**ARLQ/SAAP**GGGS (SEQ ID NO:346)

SGGG**ARLQ/SAAP**GGGS (SEQ ID NO:347)

ARLQ/SAAP (SEQ ID NO:348)

甲基多巴/颗粒酶B

SGGG**GVYADSLEDG**GGGS (SEQ ID NO:349)

GVYADSLEDG (SEQ ID NO:350

蛋白裂解酶/uPA (MS)

GGGS**LSGR/SDNH**GGGS (SEQ ID NO:351)

G**LSGR/SDNH**G (SEQ ID NO:352)

蛋白裂解酶(MV)

SGGG**SFTR/QARVV**GGGS (SEQ ID NO:353)

SFTR/QARVV (SEQ ID NO:354)

组织蛋白酶S/MMP9/甲基多巴A

ARLQ/SAAPAG/LKGA (SEQ ID NO:355)

G**ARLQ/SAAPAG/LKGA**G (SEQ ID NO:356)

图8A

MMP9 (变体，高效率)

GGPGPAG/MHGLPG (SEQ ID NO:357)

GSGGPGPAG/MHGLPGGS (SEQ ID NO:358)

MMP9 (变体，低效率)

GGPGPAG/MEGLPG (SEQ ID NO:359)

MMP9-15 (K>E)

SGGPGPAG/MEGLPGS (SEQ ID NO:360)

MMP9-15 (M>P)

SGGPGPAG/PKGLPGS (SEQ ID NO:361)

可切割接头(识别位点为粗体，切割位点用"/"标记)

凝血酶1

GGGGLVPR/GSLGGGGS (SEQ ID NO:362)

凝血酶2

SSGGGMPR/SFRGGGS (SEQ ID NO:363)

肠激酶/Flag

GGGGDYKDDDDK/GGGS (SEQ ID NO:364)

KLK7-6

SGGGQNPY/SAGRGGGS (SEQ ID NO:365)

KLK7-13

SGGGQNPY/SAGGGSGG (SEQ ID NO:366)

KLK7-11

SGGGRNVY/SAGGGSGG (SEQ ID NO:367)

KLK7-10

SGGGQNTW/SAGKGGGS (SEQ ID NO:368)

uPA

GGGSHTGR/SAYFGGGS (SEQ ID NO:369)

MMP9-2

SGGPGPAG/LKGAPGS (SEQ ID NO:370)

图8B

蛋白酶	切割结构域序列	SEQ ID NO:
MMP7	KRALGLPG	371
MMP7	$(DE)_8$RPLALWRS$(DR)_8$	372
MMP9	PR(S/T)(L/I)(S/T)	373
MMP9	LEATA	374
MMP11	GGAANLVRGG	375
MMP14	SGRIGFLRTA	376
MMP	PLGLAG	532
MMP	PLGLAX	533
MMP	PLGC(ME)AG	534
MMP	ESPAYYTA	535
MMP	RLQLKL	377
MMP	RLQLKAC	378
MMP2, MMP9, MMP14	EP(CIT)G(HOF)YL	379
尿激酶血纤蛋白溶酶原活化因子(upa)	SGRSA	380
尿激酶血纤蛋白溶酶原活化因子(upa)	DAFK	381
尿激酶血纤蛋白溶酶原活化因子(upa)	GGGRR	382
溶酶体酶	GFLG	383
溶酶体酶	ALAL	384
溶酶体酶	FK	385
组织蛋白酶B	NLL	386
组织蛋白酶D	PIC(ET)FF	387
组织蛋白酶K	GGPRGLPG	388
前列腺特异性抗原	HSSKLQ	389
前列腺特异性抗原	HSSKLQL	390
前列腺特异性抗原	HSSKLQEDA	391
单纯疱疹病毒蛋白酶	LVLASSSFGY	392
HIV蛋白酶	GVSQNYPIVG	393
CMV蛋白酶	GVVQASCRLA	394

图8C

蛋白酶	切割结构域序列	SEQ ID NO:
凝血酶	F(PIP)RS	395
凝血酶	DPRSFL	396
凝血酶	PPRSFL	397
胱天蛋白酶-3	DEVD	398
胱天蛋白酶-3	DEVDP	399
胱天蛋白酶-3	KGSGDVEG	400
白介素1β转化酶	GWEHDG	401
肠激酶	EDDDDKA	402
Fap	KQEQNPGST	403
激肽释放酶2	GKAFRR	404
纤溶酶	DAFK	405
纤溶酶	DVLK	406
纤溶酶	DAFK	407
Top	ALLLALL	408

图8D

Pro140(单特异性,具有两个aEGFR/D12、两个MMP9接头)形式1

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**R
FTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/*GPAGMKGL*/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLR
LTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**RFTISRDNAKNTVDLQMNSL
KPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVS
PGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSG
VQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFT
FNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSS (SEQ ID NO:409)

Pro140b(单特异性,具有两个aEGFR/D12、两个甲基多巴接头)形式1

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**R
FTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/*KKLADEPE*/QT
VVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGG
KAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLT
CAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**RFTISRDNAKNTVDLQMNSLKP
EDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/*GGGSKKLADEPEGGGS*/QTVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGV
QPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTF
NKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA
VYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSS (SEQ ID NO:410)

图9A

Pro186 (单特异性,具有两个aEGFR/D12、MMP9接头)形式2

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**R
FTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLR
LTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**RFTISRDNAKNTVDLQMNSL
KPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVS
PGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSG
VQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFT
FNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSS (SEQ ID NO:411)

Pro187 (单特异性,具有两个aEGFR/D12、甲基多巴接头)形式2

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**R
FTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLR
LTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**RFTISRDNAKNTVDLQMNSL
KPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/*GGGSKKLADEPEGGGS*/QTVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSG
VQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFT
FNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSS (SEQ ID NO:412)

图9B

Pro225 (单特异性FL aB7H3 hF7 MMP9接头)形式2

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPSRRTFHTYHMGWFRQAPGKEREFVAVINWSGGSTVYADSVKGR
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGGATTQRATEASYDYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS
CAPSRRTFHTYHMGWFRQAPGKEREFVAVINWSGGSTVYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAAGGATTQRATEASYDYWGQGTLVTVSS/***SGGPGPAGMKGLPGS***/QTVVTQEPSLTVSPGG
TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE
DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC
VRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS
KFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG
GSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:413)

Pro226 (单特异性FL aB7H3 hF12 MMP9接头)形式2

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASPRTFSTYSMAWFRQAPGKERSFVAAINWSGGNTSYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGGVLAHHNYEYDYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQL
VESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTIS
RDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVT
QEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAA
LTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCE
ASPRTFSTYSMAWFRQAPGKERSFVAAINWSGGNTSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCAAGGVLAHHNYEYDYWGQGTLVTVSS/***SGGPGPAGMKGLPGS***/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT
CGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY
YCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNW
VRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN
FGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS
WVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVS
SQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:414)

图9C

Pro233(人源化Pro186,单特异性,具有两个aEGFR/D12、MMP9接头)形式2

QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSC
AASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED
TALYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLVTVSS/***SGGPGPAGMKGLPGS***/QTVVTQEPSLTVSPGGT
VTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED
EAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA
MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV
RHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSK
FGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGG
SLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:415)

Pro311 (FL单特异性aFOLR1 h77.2 MMP9接头)形式2

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGNEREFVAIINSIGITNYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQP
GGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYL
QMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPG
GTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED
EAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNSV
MAWYRQTPGNEREFVAIINSIGITNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCNRNFDRIY
WGQGTLVTVSS/***SGGPGPAGMKGLPGS***/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQ
QKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKL
TVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY
DYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLV
TVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG
SGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH
(SEQ ID NO:416)

图9D

Pro312 (FL单特异性 aFOLR1 h59.3 MMP9接头)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAPGNTFSISAMGWYRQAPGKQREWVAVTHSDYSTNYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKHYGIDYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQ
PGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAY
LQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPG
GTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED
EAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAPGNTFSISA
MGWYRQAPGKQREWVAVTHSDYSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKHYGI
DYWGQGTLVTVSS/***SGGPGPAGMKGLPGS***/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNW
VQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG
TKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIR
SKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQG
TLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI
SGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH
(SEQ ID NO:417)

Pro313 (FL单特异性aFOLR1 h22.4 MMP9接头)形式 2

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGTTFSRDVMGWYRQAPGKQRELVAIISRGGSTNYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNANTATWGRVFWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGG
GLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSK
NTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLT
VSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV
QPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGTTFS
RDVMGWYRQAPGKQRELVAIISRGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNAN
TATWGRVFWGQGTLVTVSS/***SGGPGPAGMKGLPGS***/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSG
NYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRW
VFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLE
WVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWA
YWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKG
LEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS/
HHHHHH (SEQ ID NO:418)

图9E

Pro246 (FL haEGFR1/haEGFR2异源特异性COBRA MMP9接头)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGSTYYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKD
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLVESGGGVVRPGGSLT
LSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR
AEDTALYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLVTVSS/***SGGPGPAGMKGLPGS***/QTVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ
PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNK
YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY
CVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF
SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG
GSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:419)

Pro256 (FL haEpCAM VIB13/haEGFR1异源特异性COBRA MMP9接头)

QVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASGTGSIFSINLMGWYRQAPGKQRELVARITSGDSTVYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNLLLRSSPGATTPYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVES
GGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDD
SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEP
SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLS
GVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSCAASGR
TSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYY
CAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLVTVSS/***SGGPGPAGMKGLPGS***/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC
GSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY
CVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWV
RQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF
GNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSW
VRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQ
GTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:420)

图9F

Pro420 (FL aFOLR1 h77.2/haEGFR1异源特异性COBRA MMP9接头)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGNEREFVAIINSIGITNYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNRNFDRIYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQP
GGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYL
QMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPG
GTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED
EAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSCAASGRTSRSYG
MGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAAAAG
SAWYGTLYEYDYWGQGTLVTVSS/***SGGPGPAGMKGLPGS***/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA
VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS
NRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGK
GLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY
WAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAP
GKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVT
VSS/HHHHHH (SEQ ID NO:421)

Pro421 (FL haEGFR1/aFOLR1 h77.2异源特异性COBRA MMP9接头)

QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVQLVESGGGLVQPGGSLRLS
CAASGFTVSNSVMAWYRQTPGNEREFVAIINSIGITNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCNRNFDRIYWGQGTLVTVSS/***SGGPGPAGMKGLPGS***/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA
VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS
NRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGK
GLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY
WAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAP
GKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVT
VSS/HHHHHH (SEQ ID NO:422)

图9G

Pro393 (Pro186,单特异性单靶标,具有两个aEGFR/D12 COBRA S9接头)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTC
AASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPE
DTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/*GARLQSAAPAGLKGAG*/QTVVTQEPSLTVSPG
GTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP
EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC
VRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS
KFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG
GSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:423)

Pro394 (Pro186,单特异性单靶标,具有两个aEGFR/D12 COBRA ST14(MV)接头)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTC
AASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPE
DTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/*GGGSFTRQARVVGGGS*/QTVVTQEPSLTVSPG
GTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP
EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC
VRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS
KFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG
GSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:424)

图9H

Pro395 (Pro186,单特异性单靶标,具有两个aEGFR/D12 COBRA CathS接头)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTC
AASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPE
DTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/*GGGSARLQSAAPGGGS*/QTVVTQEPSLTVSPG
GTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP
EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC
VRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS
KFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG
GSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:425)

Pro396 (Pro186,单特异性单靶标,具有两个aEGFR/D12 COBRA MMP9v接头)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTC
AASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPE
DTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/*GSGGPGPAGMHGLPGGS*/QTVVTQEPSLTVS
PGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV
QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF
NKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV
YYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF
TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYC
TIGGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:426)

图9I

Pro429 (Pro186,单特异性单靶标,具有两个 aEGFR/D12 COBRA甲基多巴/颗粒酶B接头)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**GGGSGGGS**/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTC
AASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPE
DTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/***SGGGVYADSLEDGGGS***/QTVVTQEPSLTVSPG
GTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP
EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC
VRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS
KFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG
GSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:427)

Pro430 (Pro186,单特异性单靶标,具有两个aEGFR/D12 COBRA MMP9-2接头)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**GGGSGGGS**/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTC
AASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPE
DTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/***SGGPGPAGLKGAPGS***/QTVVTQEPSLTVSPGG
TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE
DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC
VRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS
KFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG
GSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:428)

图9J

Pro431 (Pro186,单特异性单靶标,具有两个aEGFR/D12 COBRA ST14(MS)接头)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**GGGSGGGS**/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTC
AASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPE
DTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/***GGGSLSGRSDNHGGGS***/QTVVTQEPSLTVSPG
GTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP
EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC
VRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS
KFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG
GSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:429)

Pro258 (Pro186,单特异性单靶标,具有两个aEGFR/D12 COBRA,具有单个aEGFR结构域和中心aHSA结构域)

QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/***SGGPGPAGMKGLPGS***/EVQLVESGGGLVQP
GNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQM
NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA
VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS
NRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGK
GLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY
WAYWGQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:430)

图9K

Pro221 (Pro186,单特异性,具有两个aEGFR/D12 COBRA、激肽释放酶7-6接头)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**GGGSGGGS**/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTC
AASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPE
DTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/***SGGGQNPYSAGRGGGS***/QTVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ
PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNK
YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY
CVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF
SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG
GSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:431)

Pro222 (Pro186,单特异性,具有两个aEGFR/D12 COBRA、激肽释放酶7-13接头)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**GGGSGGGS**/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTC
AASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPE
DTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/***SGGGQNPYSAGGGSGG***/QTVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ
PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNK
YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY
CVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF
SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG
GSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:432)

图9L

Pro223 (Pro186,单特异性,具有两个aEGFR/D12、激肽释放酶7-11接头)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNA
KNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQP
GGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK
TEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAV
TSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGG
TKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTG
YADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/*SGGGRNVY
SAGGGSGG*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARF
SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKL
SCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED
TAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSK
FGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQ
GTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:433)

Pro224 (Pro186,单特异性,具有两个 aEGFR/D12 、激肽释放酶 7-10 接头)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNA
KNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQP
GGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK
TEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAV
TSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGG
TKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTG
YADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/*SGGGQNT
WSAGKGGGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPA
RFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSL
KLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTE
DTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS
KFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSS
QGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:434)

图9M

Pro254(异源特异性,具有aEGFR/hD12d和aEGFR/hG8、MMP9接头)

QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC
AASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPG
GTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP
EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC
VRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS
KFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG
GSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:435)

Pro255(异源特异性,具有aEGFR/hD12d和aEpCAM hVIB12、MMP9接头)

QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLVESGGGLVQPGGSLTLS
CAASGTGSIFSINLMGWYRQAPGKQRELVARITSGDSTVYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPED
TAVYYCNLLLRSSPGATTPYWGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT
CGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY
YCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNW
VRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN
FGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS
WVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVS
SQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:436)

图9N

Pro262(单特异性,有或没有aEGFR/D12、NCL15活性结构域接头,MMP9接头)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**GGGSGGGS**/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGGSG
GGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARF
SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQT
GGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQ
MNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/***SGGPGPAGMKGLPGS***/QTVVTQEP
SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAAL
TLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA
SGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT
EDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSC
AASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDT
AVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:437)

Pro356(单特异性,具有一个aEGFR/hG8、MMP9接头)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGSTYYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKD
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/***SGGPGPAGMKGLPGS***/EVQLVESGGGLV
QPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQ
MNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSST
GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL
WYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ
APGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGN
SYISYWAYWGQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:438)

图90

Pro359(单特异性,具有一个aB7H3/hF7、MMP9接头)

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPSRRTFHTYHMGWFRQAPGKEREFVAVINWSGGSTVYADSVKGR
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGGATTQRATEASYDYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/***SGGPGPAGMKGLPGS***/EVQLVESGGGLVQP
GNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQM
NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA
VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS
NRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGK
GLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY
WAYWGQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:439)

Pro364(单特异性,具有一个aFOLR1/h59.3、MMP9接头)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAPGNTFSISAMGWYRQAPGKQREWVAVTHSDYSTNYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKHYGIDYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQ
PGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAY
LQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPG
GTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED
EAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/***SGGPGPAGMKGLPGS***/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASG
FTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYY
CTIGGSLSVSSQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWV
QQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTK
LTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK
YDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTL
VTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:440)

图9P

Pro388 (单特异性,具有一个aFOLR1/h77-2、MMP9接头)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGNEREFVAIINSIGITNYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQP
GGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYL
QMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPG
GTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED
EAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/***SGGPGPAGMKGLPGS***/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASG
FTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYY
CTIGGSLSVSSQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWV
QQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTK
LTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK
YDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTL
VTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:441)

Pro429 (Pro186,单特异性,具有两个aEGFR/D12、甲基多巴/颗粒酶B接头)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**GGGSGGGS**/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTC
AASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPE
DTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/***SGGGVYADSLEDGGGS***/QTVVTQEPSLTVSPG
GTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP
EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC
VRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS
KFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG
GSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:442)

图9Q

Pro430 (Pro186,单特异性,具有两个aEGFR/D12、MMP9-2接头)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**GGGSGGGS**/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTC
AASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPE
DTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/***SGGPGPAGLKGAPGS***/QTVVTQEPSLTVSPGG
TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE
DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC
VRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS
KFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG
GSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:443)

Pro431 (Pro186,单特异性,具有两个aEGFR/D12、ST14(MS)接头)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**GGGSGGGS**/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTC
AASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPE
DTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/***GGGSLSGRSDNHGGGS***/QTVVTQEPSLTVSPG
GTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP
EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC
VRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS
KFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG
GSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:444)

图9R

Pro432 (异源特异性，具有 aEpCAM/hVIB13和aEGFR/hG8、MMP9接头)

QVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASGTGSIFSINLMGWYRQAPGKQRELVARITSGDSTVYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNLLLRSSPGATTPYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVES
GGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDD
SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEP
SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLS
GVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR
TFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
AAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTLVTVSS/***SGGPGPAGMKGLPGS***/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTL
TCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAE
YYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMN
WVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRH
GNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFG
MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS
VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:445)

Pro448 (异源特异性，具有 aFOLR1/h77-2、aEGFR/hD12、MMP9接头、VH-VLi 半 COBRA)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGNEREFVAIINSIGITNYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/QVKLVESGGGVV
RPGGSLTLSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL
QMNSLRAEDTALYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQ
PGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAY
LQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/***SGGPGPAGMKGLPGS***/QTVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAA
LTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSC
AASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDT
AVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:446)

图9S

Pro449 (异源特异性,具有 aEGFR/hD12、aFOLR1/h77-2、MMP9接头、VH-VLi半COBRA)

QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/Q
VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGNEREFVAIINSIGITNYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQP
GGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYL
QMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/***SGGPGPAGMKGLPGS***/QTVVTQEP
SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAAL
TLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCA
ASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTA
VYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:447)

Pro450 (异源特异性,具有 aFOLR1/h77-2、aEGFR/hD12、MMP9接头、VL-VHi半COBRA)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGNEREFVAIINSIGITNYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/QVKLVESGGGVV
RPGGSLTLSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL
QMNSLRAEDTALYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE
DEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/***SGGPGPAGMKGLPGS***/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS
GFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTE
DTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCA
ASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTA
VYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:448)

图9T

Pro451(异源特异性,具有aEGFR/hD12、aFOLR1/h77-2、MMP9接头、VL-VH|半COBRA)

QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/Q
VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGNEREFVAIINSIGITNYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE
DEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/*SGGPGPAGMKGLPGS*/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS
GFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTE
DTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCA
ASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTA
VYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:449)

Pro479(异源特异性,一个靶标、两个表位、haB7H3/F7和haB7H3/F12、MMP9接头)

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPSRRTFHTYHMGWFRQAPGKEREFVAVINWSGGSTVYADSVKGR
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGGATTQRATEASYDYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS
CEASPRTFSTYSMAWFRQAPGKERSFVAAINWSGGNTSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAAGGVLAHHNYEYDYWGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVT
LTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA
EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMN
WVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRH
GNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFG
MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS
VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:450)

图9U

Pro480 (异源特异性，一个靶标、两个表位、haB7H3/F12和haB7H3/F7、MMP9接头)

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASPRTFSTYSMAWFRQAPGKERSFVAAINWSGGNTSYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGGVLAHHNYEYDYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQL
VESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTIS
RDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVT
QEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAA
LTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCA
PSRRTFHTYHMGWFRQAPGKEREFVAVINWSGGSTVYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCAAGGATTQRATEASYDYWGQGTLVTVSS/***SGGPGPAGMKGLPGS***/QTVVTQEPSLTVSPGGTV
TLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE
AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAM
NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR
HGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKF
GMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS
LSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:451)

Pro495 (单特异性，具有两个haB7H3/F7、MMP9接头、Vli2-Vhi2)

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPSRRTFHTYHMGWFRQAPGKEREFVAVINWSGGSTVYADSVKGR
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGGATTQRATEASYDYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF
TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS
CAPSRRTFHTYHMGWFRQAPGKEREFVAVINWSGGSTVYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAAGGATTQRATEASYDYWGQGTLVTVSS/***SGGPGPAGMKGLPGS***/QTVVTQEPSLTVSPGG
TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKDDAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED
EAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKHA
MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATAYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR
HGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKF
GMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS
LSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:452)

图9V

Pro601

aB7H3 hF7 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF7 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli2 –NCL-8 - aCD3Vhi2 – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPS**RRTFHTYHMGW**FRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA**AGGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV**RHANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY**CTLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPS**RRTFHTYHMGW**FRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA**AGGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKDDAP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKHAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATAYADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT**IGGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:522)

Pro602

aB7H3 hF12 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF12 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli2 –NCL-8 - aCD3Vhi2 – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMAW**FRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTSYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA**AGGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV**RHANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMAW**FRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTSYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA**AGGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKDDAP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKHAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATAYADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT**IGGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:523)

图10A

V3

aB7H3 hF7 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF12 sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli2 –NCL-8 - aCD3Vhi2 – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPS**RRTFHTYHMGW**FRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA**AGGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK**
DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV**RHANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL
GGKAALTLSGVQPEDEAEYY**CTLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGS
LRLSCEAS**PRTFSTYSMAW**FRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTSYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCA**AGGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKDDAP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ
PEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFN**
KHAMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATAYADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVY
YCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFT**
FSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT
IGGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:524)

V4

aB7H3 hF12 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF7 sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli2 –NCL-8 - aCD3Vhi2 – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMAW**FRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTSYADSVKG**R
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA**AGGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQ
LVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFT
ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV**RHANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYY**CTLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS
CAPS**RRTFHTYHMGW**FRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA
EDTAVYYCA**AGGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPG
GTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKDDAP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE
DEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKH**
AMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATAYADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC
VR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFS**
KFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT**IG**
GSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:525)

图10B

Pro664

aB7H3 hF12 (S59Y) sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF12 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhl – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTYYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTYYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:526)

Pro665

aB7H3 hF12 (N57Q) sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF12 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhl – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGQTSYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGQTSYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:527)

图10C

Pro667

aB7H3 hF12 (N57E) sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF12 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGETSYADSVKG**R
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQ
LVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFT
ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS
CEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGETSYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGT
VTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE
DEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKY
AMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY
CVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTF
SKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI
GGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:528)

Pro694

aB7H3 hF12 (S59A) sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF12 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTAYADSVKG**R
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQ
LVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFT
ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS
CEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTAYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGT
VTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE
DEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKY
AMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY
CVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTF
SKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI
GGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:529)

图10D

Pro695

aB7H3 hF12 (N57D) sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF12 sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGDTSYADSVKG**R
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQ
LVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFT
ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS
CEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGDTSYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGT
VTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE
DEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKY
AMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY
CVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTF
SKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI
GGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:530)

Pro766

aB7H3 hF12 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF12 sdAb

– NCL-15 - aCD3Vli –NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTYYADSVKG**R
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQ
LVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFT
ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS
CEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTYYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGGSGGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGT
VTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE
DEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKY
AMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY
CVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTF
SKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI
GGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:531)

图10E

Pro565

acEpCAM hVIB664 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – acEpCAM hVIB664 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:288)

Pro566

acEpCAM hVIB665 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – acEpCAM hVIB665 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGHTNYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTTTPETYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGHTNYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTTTPETYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:289)

图10F

Pro567

acEpCAM hVIB666 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – acEpCAM hVIB666 sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVTG**R
FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS
/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK
D**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLVESGGGLVQPGRSL
RLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVTG**RFTISRDNAKNSLYLQMNS
LRAEDTALYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSL
TVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTL
SGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**G
FTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTE
DTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSC
AAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDT
AVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:290)

Pro568

acEpCAM hVIB664 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – acEpCAM hVIB664 sdAb

– NCL-16 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**R
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS
/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK
D**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSL
RLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGGSGGGGS/QTVVTQEPS
LTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALT
LSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS
GFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT
EDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSC
AAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDT
AVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:291)

图10G

Pro727

acEpCAM hVIB664 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – acEpCAM hVIB664 sdAb – 甲基多巴-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**R FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS /EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK D**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/ QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGGKKLADEPEGGS*/QTVVTQEPSLT VSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GF TFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA S**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:292)

Pro728

acEpCAM hVIB664 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – acEpCAM hVIB664 sdAb – MMP9v - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**R FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS /EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK D**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/ QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/*GSGGPGPAGMHGLPGGS*/QTVVTQE PSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCA AS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNL KTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRL SCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPE DTAVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:293)

图10H

Pro729

acEpCAM hVIB664 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – acEpCAM hVIB664 sdAb – CathS - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**R FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS /EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK D**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/ QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/*GGGSARLQSAAPGGGS*/QTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS **GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT EDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSC AAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDT AVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:294)

Pro730

acEpCAM hVIB664 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – acEpCAM hVIB664 sdAb – S9 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**R FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS /EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK D**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/ QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/*GARLQSAAPAGLKGAG*/QTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS **GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT EDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSC AAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDT AVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:295)

图10I

Pro731

acEpCAM hVIB664 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – acEpCAM hVIB664 sdAb – ST14-MS - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**R FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS /EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK D**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/ QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/*GGGSLSGRSDNHGGGS*/QTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS **GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT EDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSC AAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDT AVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:296)

Pro676

aTrop2 hVIB565 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aTrop2 hVIB565 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFDYYAIG**WFRQAPGKEREGVS**CISSSHGSTYYADSVKG**RFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAT**AGDGGDYHCSGLVDYGMDY**WGKGTLVTVSS/GGGSGGG S/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQV KD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGG S/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAAS**GFTFDYYAIG**WFRQAPGKEREGVS**CISSSHGSTYYADSVKG**RFTISRDNSKNTVYLQMNSL RAEDTAVYYCAT**AGDGGDYHCSGLVDYGMDY**WGKGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQE PSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCA AS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNL KTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRL SCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPE DTAVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:297)

图10J

Pro677

aTrop2 hVIB557 sdAb sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aTrop2 hVIB557 sdAb sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSSQSMG**WFRQAPGKEREFVS**AISWTGANPTYADSVKG**R
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DTSGGSYYYERATAETSYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGG
GS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQ
VKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGG
GS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFS
GSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQP
GGSLRLSCAAS**GRTFSSQSMG**WFRQAPGKEREFVS**AISWTGANPTYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCAA**DTSGGSYYYERATAETSYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLK
LSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQ
MNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQP
GNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQM
NSLRPEDTAVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:298)

Pro678

aTrop2 hVIB575 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aTrop2 hVIB575 sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLAS**GRTVGRTAMG**WFRQPPGKEREFVA**TISWAGGTTYYADFVKG**R
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**SEPYSDYDPSGMVY**WGKGTLVTVSS/GGGSGGGS/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**R
FTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QT
VVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGG
KAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSLRL
SCLAS**GRTVGRTAMG**WFRQPPGKEREFVA**TISWAGGTTYYADFVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA
EDTAVYYCAA**SEPYSDYDPSGMVY**WGKGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGG
TVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE
DEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKY
AMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY
CVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTF
SKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI
GGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:299)

图10K

Pro679

aTrop2 hVIB578 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aTrop2 hVIB578 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFGRAAMG**WFRQPPGKEREFAA**TISWSGSNTYYADFVKG**R FTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**SEPYSDYDPSGMVY**WGKGTLVTVSS/GGGSGGGS/EV QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**R FTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAAS**GRTFGRAAMG**WFRQPPGKEREFAA**TISWSGSNTYYADFVKG**RFTISRDNSKNTVYLQMNSLR AEDTAVYYCAA**SEPYSDYDPSGMVY**WGKGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPG GTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFN KYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GF TFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYC TI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:300)

Pro808

aTROP2 hVIB609 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aTROP2 hVIB609 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli –NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCALS**GLTFNTYPMA**WFRQPPGQEREFVA**DMSWSGTNTYYADSVKG** RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GWPYSGTGRSTTDYTY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS /EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK D**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/ QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCALS**GLTFNTYPMA**WFRQPPGQEREFVA**DMSWSGTNTYYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAA**GWPYSGTGRSTTDYTY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLT VSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GF TFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA S**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:301)

图10L

Pro819

aTROP2 hVIB619 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aTROP2 hVIB619 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli –NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRSFSRYGMG**WLRQAPGKERELVA**SISWSGHSTYYADSVKG**RF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**ESLPYESGSPRLTDFAS**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EV QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**R FTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAAS**GRSFSRYGMG**WLRQAPGKERELVA**SISWSGHSTYYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAA**ESLPYESGSPRLTDFAS**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSP GGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTF NKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS **GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY YCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:302)

Pro681

aTrop2 hVIB557 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aTrop2 hVIB557 sdAb – NCL-16 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSSQSMG**WFRQAPGKEREFVS**AISWTGANPTYADSVKG**R FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DTSGGSYYYERATAETSYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGG GS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQ VKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGG GS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFS GSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAAS**GRTFSSQSMG**WFRQAPGKEREFVS**AISWTGANPTYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAA**DTSGGSYYYERATAETSYDY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGGSGGGGS/QTV VTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLK LSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQP GNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:303)

图10M

Pro621

aB7H3 hF7 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF7 sdAb

– CathS-16 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPS**RRTFHTYHMG**WFRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK**
DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGS
LRLSCAPS**RRTFHTYHMG**WFRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/*GGGSARLQSAAPGGGS*/QTVVTQEPSLT
VSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLS
GVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GF**
TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED
TAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA
S**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV
YYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:304)

Pro622

aB7H3 hF12 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF12 sdAb

– CathS-16 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTSYADSVKG**R
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQ
LVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFT
ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS
CEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTSYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/*GGGSARLQSAAPGGGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGT
VTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE
DEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKY**
AMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY
CVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTF**
SKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI
GGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:305)

图10N

Pro640

aB7H3 hF7 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF7 sdAb

– MMP9v - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPS**RRTFHTYHMG**WFRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK**
DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGS
LRLSCAPS**RRTFHTYHMG**WFRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/*GSGGPGPAGMHGLPGGS*/QTVVTQEPS
LTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALT
LSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS
GFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT
EDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSC
AAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDT
AVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:306)

Pro641

aB7H3 hF12 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF12 sdAb

– MMP9v - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTSYADSVKG**R
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQ
LVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFT
ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS
CEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTSYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/*GSGGPGPAGMHGLPGGS*/QTVVTQEPSLTVSPG
GTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ
PEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFN**
KYAMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV
YYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GF**
TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYC
TI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:307)

图100

Pro642

aB7H3 hF7 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF7 sdAb

– MMP9v - aCD3Vli2 – NCL-8 - aCD3Vhi2 – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPS**RRTFHTYHMG**WFRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK**
DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGS
LRLSCAPS**RRTFHTYHMG**WFRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/*GSGGPGPAGMHGLPGGS*/QTVVTQEPS
LTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKDDAP**GTPARFSGSLLGGKAALTL
SGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**G**
FTFNKHAMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATAYADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED
TAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA
S**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV
YYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:308)

Pro643

aB7H3 hF12 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF12 sdAb

– MMP9v - aCD3Vli2 – NCL-8 - aCD3Vhi2 – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTSYADSVKG**R
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQ
LVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFT
ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS
CEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTSYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/*GSGGPGPAGMHGLPGGS*/QTVVTQEPSLTVSPG
GTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKDDAP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE
DEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKH**
AMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATAYADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC
VR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFS**
KFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**G**
GSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:309)

图10P

Pro744

aB7H3 hF7 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF7 sdAb

– MMP9-15 (K->E) - aCD3Vli –NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPS**RRTFHTYHMG**WFRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK**
DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGS
LRLSCAPS**RRTFHTYHMG**WFRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMEGLPGS*/QTVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSG
VQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFT**
FNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:310)

Pro746

haB7H3 F7 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - haB7H3 F7 sdAb

– MMP9-15 (M->P) - aCD3Vli –NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPS**RRTFHTYHMG**WFRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK**
DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGS
LRLSCAPS**RRTFHTYHMG**WFRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGPKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVS
PGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSG
VQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFT**
FNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:311)

图10Q

Pro 108

aFOLR1 h77-2 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aFOLR1 h77-2 sdAb

– MMP9v - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTVSNSVMA**WYRQTPGNEREFVA**IINSIGITNYADSVKG**RFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCNR**NFDRIY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQ
PGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKNTA
YLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP
EDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTVSN
SVMA**WYRQTPGNEREFVA**IINSIGITNYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCNR**NFD
RIY**WGQGTLVTVSS/*GSGGPGPAGMHGLPGGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYP
N**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**F
GGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWV
A**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**
WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGL
EWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/
HHHHHH (SEQ ID NO:312)

Pro 109

aFOLR1 h59.3 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aFOLR1 h59.3 sdAb

– MMP9v - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAP**GNTFSISAMG**WYRQAPGKQREWVA**VTHSDYSTNYADSVKG**R
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKH**YGIDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLV
QPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKNT
AYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGV
QPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAP**GNTF
SISAMG**WYRQAPGKQREWVA**VTHSDYSTNYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCK
H**YGIDY**WGQGTLVTVSS/*GSGGPGPAGMHGLPGGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSG
NYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNR
WV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGL
EWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISY
WAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAP
GKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVT
VSS/HHHHHH (SEQ ID NO:313)

图10R

Pro396

aEGFR sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aEGFR sdAb

– MMP9v-16 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**R
FTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLR
LTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**RFTISRDNAKNTVDLQMNSL
KPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/*GSGGPGPAGMHGLPGGS*/QTVVTQEPSL
TVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTL
SGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**G
FTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTE
DTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSC
AAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDT
AVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:314)

Pro476

aEGFR sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aEGFR sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli2 – NCL-8 - aCD3Vhi2 – aHSA (10GE) - His6

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**R
FTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLR
LTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**RFTISRDNAKNTVDLQMNSL
KPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVS
PGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKDDAP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGV
QPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTF
NKHAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATAYADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV
YYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GF
TFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYC
TI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:315)

图10S

Pro706

aEGFR sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aEGFR sdAb

– uPA - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) – His6

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**R
FTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLR
LTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**RFTISRDNAKNTVDLQMNSL
KPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/*GGGSHTGRSAYFGGGS*/QTVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSG
VQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFT
FNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:316)

Pro709

aEGFR sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aEGFR sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**R
FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGVVRPGGSLR
LSCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLR
AEDTALYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGV
QPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTF
NKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA
VYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:317)

图10T

Pro470

aFOLR1 h77.2 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aEGFR sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTVSNSVMA**WYRQTPGNEREFVA**IINSIGITNYADSVKG**RFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCNR**NFDRIY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQ
PGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKNTA
YLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP
EDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSCAAS**GRTSRSY
GMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAA**A
AGSAWYGTLYEYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSST
GAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VL
WYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQ
APGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFG
NSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**W
VRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLS**VSS
QGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:318)

Pro471

aEGFR sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aFOLR1 h77.2 sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**R
FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLVESGGGLVQPGGSLR
LSCAAS**GFTVSNSVMA**WYRQTPGNEREFVA**IINSIGITNYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED
TAVYVCNR**NFDRIY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTG
AVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLW
YSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAP
GKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNS
YISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVR
QAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLS**VSSQG
TLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:319)

图10U

Pro551

EGFR sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aFOLR1 h59.3 sdAb

– MMP9-16 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**R
FTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLVESGGGLVQPGGSLR
LSCAAP**GNTFSISAMG**WYRQAPGKQREWVA**VTHSDYSTNYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLR
AEDTAVYYCKH**YGIDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSS**
TGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**V**
LWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVR
QAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNF**
GNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**
WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLS**VS
SQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:320)

Pro552

aFOLR1 h59.3 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – EGFR sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAP**GNTFSISAMG**WYRQAPGKQREWVA**VTHSDYSTNYADSVKG**R
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKH**YGIDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLV
QPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKNT
AYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGV
QPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAAS**GRTS**
RSYGMGWFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**RFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYC
AA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC
GSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY
YC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**
WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**H**
GNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFG**
MSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSL**
SVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:321)

图10V

Pro623

aEGFR sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – acEpCAM hVIB664 sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**R
FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSLR
LSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSL
RAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLT
VSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLS
GVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GF
TFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED
TAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA
S**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV
YYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:322)

Pro624

aEGFR sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – acEpCAM hVIB665 sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**R
FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSLR
LSCAAS**GRTFSDYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGHTNYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSL
RAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTTTPETYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLT
VSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLS
GVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GF
TFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED
TAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA
S**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV
YYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:323)

图10W

Pro698

acEpCAM hVIB665 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aEGFR sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGHTNYADSVKG**
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTTTPETYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS
/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK**
DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLVESGGGVVRPGGSL
TLSCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSL
RAEDTALYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVS
PGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSG
VQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFT**
FNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:324)

Pro655

aB7H3 hF7 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – acEpCAM hVIB664 sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPS**RRTFHTYHMG**WFRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK**
DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSL
RLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSL
TVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTL
SGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**G**
FTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTE
DTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSC
AAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDT
AVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:325)

图10X

Pro656

aB7H3 hF7 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – acEpCAM hVIB665 sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPS**RRTFHTYHMG**WFRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK**
DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSL
RLSCAAS**GRTFSDYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGHTNYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTTTPETYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLT
VSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLS
GVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GF**
TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED
TAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA
S**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV
YYCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:326)

Pro657

acEpCAM hVIB664 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - haB7H3 F7 sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**R
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS
/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK**
DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGS
LRLSCAPS**RRTFHTYHMG**WFRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSG
VQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFT**
FNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:327)

图10Y

Pro658

acEpCAM hVIB665 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - haB7H3 F7 sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGHTNYADSVKG**
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTTTPETYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS
/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK**
DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGS
LRLSCAPS**RRTFHTYHMG**WFRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSG
VQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFT**
FNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTI**GGSLS**VSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:328)

Pro516

aCA9 hVIB456 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aCA9 hVIB456 sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GSALIINAMG**WYRQAPGKQRELVA**TVTRSGRTNYADSVKG**RF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNV**ALWIADGEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVE
SGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISR
DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQ
EPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAAL
TLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA
S**GSALIINAMG**WYRQAPGKQRELVA**TVTRSGRTNYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCNV**ALWIADGEYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GS**
STGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC
VLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WV
RQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGN**
FGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**
WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLS**VS
SQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:329)

图10Z

Pro517

aCA9 hVIB476 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aCA9 hVIB476 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GNIFIINVMG**WYRQAPGKQRELVA**TITNGGRTHYADSVKG**RFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNA**NHIELGDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGL VQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKN TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLT VSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GNIFI INVMG**WYRQAPGKQRELVA**TITNGGRTHYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNA **NHIELGDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSG NYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNR WV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGL EWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISY WAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAP GKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVT VSS/HHHHHH (SEQ ID NO:330)

Pro518

aCA9 hVIB407 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aCA9 hVIB407 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS**GIIFSVYDMG**WYRQTPGKQREFVA**RITAGGGTYLTDSVKG**RFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTGVYYCNA**AWIGDDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGL VQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKN TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLT VSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS**GIIFS VYDMG**WYRQTPGKQREFVA**RITAGGGTYLTDSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTGVYYCNA **AWIGDDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSG NYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNR WV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGL EWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISY WAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAP GKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVT VSS/HHHHHH (SEQ ID NO:331)

图10AA

Pro519

aCA9 hVIB445 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aCA9 hVIB445 sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GITFNLHAMR**WYRRAPGKQRELVA**YISARDWTNYADSVKG**RF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCNT**DLVGEDY**WGRGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGL
VQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKN
TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLT
VSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGV
QPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GITF
NLHAMR**WYRRAPGKQRELVA**YISARDWTNYADSVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCN
T**DLVGEDY**WGRGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSG
NYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNR
WV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGL
EWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISY
WAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAP
GKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVT
VSS/HHHHHH (SEQ ID NO:332)

Pro513

aCA9 hVIB476 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aCA9 hVIB476 sdAb

– NCL-16 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GNIFIINVMG**WYRQAPGKQRELVA**TITNGGRTHYADSVKG**RFT
ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNA**NHIELGDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGL
VQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKN
TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLT
VSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGV
QPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GNIFI
INVMG**WYRQAPGKQRELVA**TITNGGRTHYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNA
NHIELGDYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGSGGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTS
GNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNR
WV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGL
EWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISY
WAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAP
GKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLS**VSSQGTLVT
VSS/HHHHHH (SEQ ID NO:333)

图10BB

Pro186

aEGFR sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aEGFR sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli –NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**R
FTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLR
LTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**RFTISRDNAKNTVDLQMNSL
KPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVS
PGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSG
VQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFT
FNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:334)

Pro214

aEGFR sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aEGFR sdAb

– NCL-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**R
FTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLR
LTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**RFTISRDNAKNTVDLQMNSL
KPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/GGGGSGGGGSGGGGS/QTVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSG
VQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFT
FNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:335)

图10CC

Pro225

aB7H3 hF7 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF7 sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli –NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPS**RRTFHTYHMGW**FRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK**
DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGS
LRLSCAPS**RRTFHTYHMGW**FRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSG
VQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFT**
FNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:336)

Pro295

aB7H3 hF7 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aB7H3 hF7 sdAb

– NCL-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPS**RRTFHTYHMGW**FRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK**
DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGS
LRLSCAPS**RRTFHTYHMGW**FRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAA**GGATTQRATEASYDY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGGSGGGGS/QTVVTQEPSLT
VSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLS
GVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GF**
TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED
TAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA
S**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV
YYCTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:337)

图10DD

Pro 817

aEGFR sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - aEGFR sdAb

– MMP9-15 - aCD3Vli –NCL-8 - aCD3Vhi – HSA

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**R
FTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLR
LTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVS**GISWRGDSTGYADSVKG**RFTISRDNAKNTVDLQMNSL
KPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVS
PGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSG
VQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFT
FNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ
EPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAF
TECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLV
TDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAA
DFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYKTTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFK
PLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPC
AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASRAALGL (SEQ
ID NO:338)

图10EE

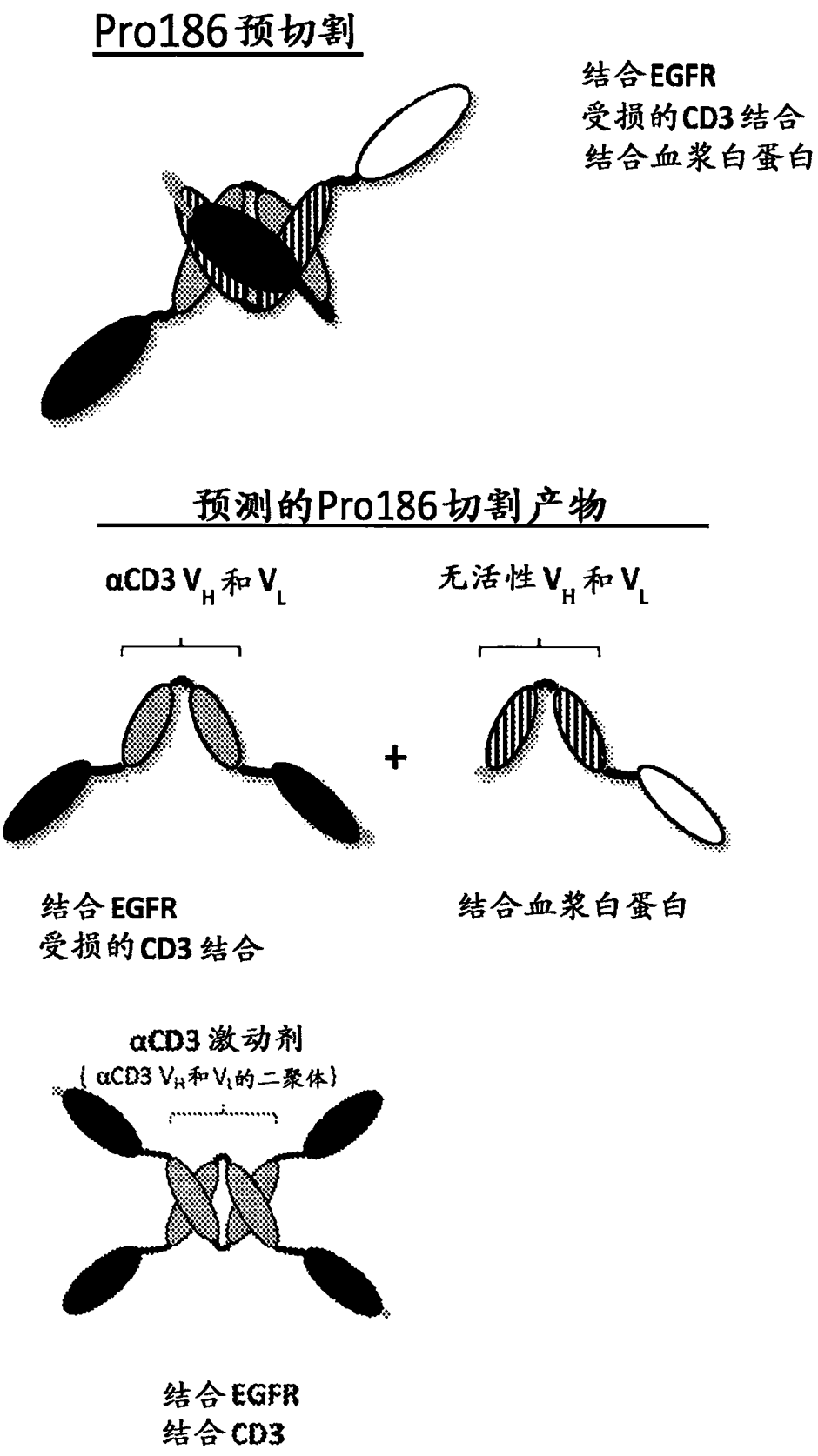

Pro186预切割
结合EGFR
受损的CD3结合
结合血浆白蛋白
预测的Pro186切割产物
αCD3 V_H和V_L
无活性V_H和V_L
+
结合EGFR
受损的CD3结合
结合血浆白蛋白
αCD3激动剂
(αCD3 V_H和V_L的二聚体)
结合EGFR
结合CD3

图11

αLyPD3 h787 COBRA

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEHEAVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVKSCYSDGYALWGSWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQL
VESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTI
SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVV
TQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKA
ALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC
AASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEHEAVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCATVKSCYSDGYALWGSWGQGTLVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTL
TCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA
EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAM
NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR
HGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKF
GMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS
LSVSSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:453)

αLyPD3 h790 COBRA

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYSIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVKSCYVDGYILWGSWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLV
ESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTIS
RDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVT
QEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKA
ALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC
AASGFTLDYYSIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCATVKSCYVDGYILWGSWGQGTLVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTL
TCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA
EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAM
NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR
HGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKF
GMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS
LSVSSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:454)

图12A

αLyPD3 H804 COBRA

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEHEGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVRSCASPYELGSWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESG
GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDD
SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEP
SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTL
SGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
FTLDYYAIGWFRQAPGKEHEGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ATVRSCASPYELGSWGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTG
AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLW
YSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP
GKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNS
YISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR
QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG
TLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:455)

αLyPD3 h773 COBRA

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSFSSYGMGWFRQAPGKEREIVAAISWGGSAVYYANSVKGR
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAANRQGRALVRKEFYDYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKD
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLVESGGGLVQPGGSLR
LSCAASGRSFSSYGMGWFRQAPGKEREIVAAISWGGSAVYYANSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR
AEDTAVYYCAANRQGRALVRKEFYDYWGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV
QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF
NKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA
VYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:456)

图12B

αLyPD3 h840 COBRA

QVQLLESGGGKVQPGGSLRLSCVVSGDTSSIYLMGWYRQTPGKQRELVAHIRGNGRTNYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNVRNFWGSAEYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESG
GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDD
SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEP
SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTL
SGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGKVQPGGSLRLSCVVSG
DTSSIYLMGWYRQTPGKQRELVAHIRGNGRTNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY
CNVRNFWGSAEYWGQGTLVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTG
AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLW
YSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP
GKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNS
YISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR
QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG
TLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:457)

αLyPD3 h885 COBRA

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVASRGTFSRYSMGWFRQAPGKEREFVGRISWSGDMTYYADSVKGR
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASTLGYVWNHPNMYGYWGHGTLVTVSS/GGGSGGGS/
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVK
DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLL
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSL
RLSCVASRGTFSRYSMGWFRQAPGKEREFVGRISWSGDMTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL
RAEDTAVYYCAASTLGYVWNHPNMYGYWGHGTLVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSG
VQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT
FNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:458)

图12C

αHER2 1054 COBRA

QVQLQESGGGLVQAGGSLILSCAASGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVAAINWSGTHTDYADSVKG
RFTISRDNVKRTVYLQMNSLKPEDTATYFCSRGWSVFDPDYRGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVES
GGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRD
DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALT
LSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQAGGSLILSCAAS
GRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVAAINWSGTHTDYADSVKGRFTISRDNVKRTVYLQMNSLKPEDTA
TYFCSRGWSVFDPDYRGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSST
GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL
WYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ
APGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFG
NSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSW
VRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSS
QGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:459)

αHER21055 COBRA

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCEVSGRAISSYAISWFRQAPGEEREFVAAINWSGTHTNYADSVKGRF
TISRDNVKNTVYLQMNSLKPEDTATYFCSRGWSVFDPDYRGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESG
GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDD
SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEP
SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTL
SGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCEVSG
RAISSYAISWFRQAPGEEREFVAAINWSGTHTNYADSVKGRFTISRDNVKNTVYLQMNSLKPEDTATYF
CSRGWSVFDPDYRGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA
VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWY
SNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP
GKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNS
YISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR
QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG
TLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:460)

图12D

αHER2 1058 COBRA

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCAASGRAISSYAISWFRQAPGEEREFVAAINWSGTHTNYADSVKGRF
TISRDNVKNTVYLQMNSLKPEDTATYFCSRGWSVFDPDYRGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESG
GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDD
SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEP
SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTL
SGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCAAS
GRAISSYAISWFRQAPGEEREFVAAINWSGTHTNYADSVKGRFTISRDNVKNTVYLQMNSLKPEDTATY
FCSRGWSVFDPDYRGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTG
AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLW
YSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP
GKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNS
YISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR
QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG
TLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:461)

αHER2 1059 COBRA

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCAASGRAISSYAISWFRQAPGEEREFVAAINWSGTHTDYADSVKGRF
TISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYFCSRGWSVFDPDYRGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESG
GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDD
SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEP
SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTL
SGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCAAS
GRAISSYAISWFRQAPGEEREFVAAINWSGTHTDYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAV
YFCSRGWSVFDPDYRGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSST
GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL
WYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ
APGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFG
NSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSW
VRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSS
QGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:462)

图12E

αHER2 1065 COBRA

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCEVSGRAISSYAISWFRQAPGEEREFVAAINWSGTHTNYADSVKGRF
TISRDNVKRTVYLQMNSLKPEDTATYFCSRGWSVFDPDYRGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESG
GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDD
SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEP
SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTL
SGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCEVSG
RAISSYAISWFRQAPGEEREFVAAINWSGTHTNYADSVKGRFTISRDNVKRTVYLQMNSLKPEDTATYF
CSRGWSVFDPDYRGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA
VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWY
SNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP
GKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNS
YISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR
QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG
TLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:463)

αHER2 1090 COBRA

QVQLQESGGGLVQTGGSLRLTCEVSGRAISSYAISWFRQAPGEEREFVAAINWSGTHTNYADSVKGRF
TISRDNVKNTVYLQMNSLKPEDTATYFCSRGWSLFDPDYRGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESG
GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDD
SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEP
SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTL
SGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQTGGSLRLTCEVSG
RAISSYAISWFRQAPGEEREFVAAINWSGTHTNYADSVKGRFTISRDNVKNTVYLQMNSLKPEDTATYF
CSRGWSLFDPDYRGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA
VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWY
SNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP
GKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNS
YISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR
QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG
TLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:464)

图12F

αHER2 1091 COBRA

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKG
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDSAVYYCVKGWRLTGGYYDSVQGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQ
LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFT
ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS
CAASGFTFDDYAMSWVRQAPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKS
EDSAVYYCVKGWRLTGGYYDSVQGQGTQVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGT
VTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE
DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY
CVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF
SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI
GGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:465)

αHER2 1092 COBRA

QVQLQESGGGLVQAGASLRLSCAASGFTFDDYALSWVRQAPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKG
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDSAVYYCVKGWRLTGGYYDSVQGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQ
LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFT
ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQAGASLRLS
CAASGFTFDDYALSWVRQAPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKS
EDSAVYYCVKGWRLTGGYYDSVQGQGTQVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGT
VTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE
DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY
CVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF
SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI
GGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:466)

图12G

αHER2 1097 COBRA

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFDDYAMTWVRQAPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKG
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDSAVYYCVKGWRHTDNYYAGVQGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDR
FTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QT
VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGG
KAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRL
SCAASGFIFDDYAMTWVRQAPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLK
SEDSAVYYCVKGWRHTDNYYAGVQGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGG
TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE
DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY
CVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF
SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI
GGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:467)

αHER2 1118 COBRA

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQTPGKGLEWVSSINWSGTHTNYADSVKG
RFTISRDNAKKTLYLQMNSLKSEDTAVYYCARGWMVVPDSTRGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVE
SGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISR
DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQ
EPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAAL
TLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAA
SGFTFDDYAMSWVRQTPGKGLEWVSSINWSGTHTNYADSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNSLKSEDT
AVYYCARGWMVVPDSTRGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG
SSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY
CVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNW
VRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG
NFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGM
SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSV
SSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:468)

图12H

αHER2 1121 COBRA

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFIFSDYAMTWVRQAPGKGLEWVSSINWSGTHTNYADSVKG RFTISRDNAKKTLYLQMNSLKSEDTAVYYCARGWMVVPDSTRGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVE SGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISR DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQ EPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAAL TLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAA SGFIFSDYAMTWVRQAPGKGLEWVSSINWSGTHTNYADSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNSLKSEDTA VYYCARGWMVVPDSTRGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGS STGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN FGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVS SQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:469)

αHER2 1134 COBRA

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSAAVMAWYRQPPGEQRELVASITHRGFTRYADSVKDRFT ISRDNVNNTMYLQMNRLSPEDTAIYYCRLLNGDYWGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLV QPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTV SPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIF SAAVMAWYRQPPGEQRELVASITHRGFTRYADSVKDRFTISRDNVNNTMYLQMNRLSPEDTAIYYCRL LNGDYWGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWV FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAY WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGL EWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSH HHHHH (SEQ ID NO:470)

图12I

αHER2 1138 COBRA

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAPGKEMEWVSGINWSGTHTRYADSVKG RFTISRDNAKNTLDLQMNSLISEDTAVYYCARGFAADSRSTRGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVE SGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISR DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQ EPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAAL TLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFDDYAMSWVRQAPGKEMEWVSGINWSGTHTRYADSVKGRFTISRDNAKNTLDLQMNSLISED TAVYYCARGFAADSRSTRGQGTQVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGS STGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN FGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVS SQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:471)

αHER2 1139 COBRA

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWIRQAPGKEMEWVSGINWSGTHTRYADSVK GRFTISRDNAKNTLDLQMNSLISEDTAVYYCARGFAADSRSTRGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVE SGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISR DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQ EPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAAL TLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFDDYAMSWIRQAPGKEMEWVSGINWSGTHTRYADSVKGRFTISRDNAKNTLDLQMNSLISEDT AVYYCARGFAADSRSTRGQGTQVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSS TGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCV LWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVS SQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:472)

图12J

αHER2 1140 COBRA

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFDDYAMSWVRQAPGKEMEWVSGINWSGTHTRYADSVKG RFTISRDNAKNTLDLQMNSLISEDTAVYYCARGFAADSRSTRGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVE SGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISR DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQ EPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAAL TLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVA SGFTFDDYAMSWVRQAPGKEMEWVSGINWSGTHTRYADSVKGRFTISRDNAKNTLDLQMNSLISED TAVYYCARGFAADSRSTRGQGTQVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGS STGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN FGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSV SSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:473)

αHER2 1145 COBRA

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFKNYPMGWFRQPPGKDREFVAAITSSGGTTHYRDSVKGR FTISRDNAKNTVYLQMNSLKPDDTAVYYCAGSSTPWDIPLGPNEVGYWGQGTQVTVSS/GGGSGGGS /EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/ QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQAGGS LRLSCAASGRIFKNYPMGWFRQPPGKDREFVAAITSSGGTTHYRDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNS LKPDDTAVYYCAGSSTPWDIPLGPNEVGYWGQGTQVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLT VSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA SGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:474)

图12K

αHER2 1146 COBRA

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFKNYPMGWFRQPPGKDREFVAAITSSGGTTPYRDSVKGRF
TISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAGSSTPWDIPLGPNEVGFWGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKD
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQAGGSL
RLSCAASGRIFKNYPMGWFRQPPGKDREFVAAITSSGGTTPYRDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSL
KPEDTAVYYCAGSSTPWDIPLGPNEVGFWGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSG
VQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT
FNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:475)

αHER2 1149 COBRA

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVASGNIFGFNVMGWYRQVPGKQRELVAISTGGRSTDYADSAKGRF
TISRNNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKMTMASSDYWGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGG
GLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDS
KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPS
LTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLS
GVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVASG
NIFGFNVMGWYRQVPGKQRELVAISTGGRSTDYADSAKGRFTISRNNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYY
CKMTMASSDYWGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAV
TSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS
NRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPG
KGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYI
SYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQ
APGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTL
VTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:476)

图12L

αHER2 1150 COBRA

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVASGNIFGFNVMGWYRQVPGKQRELVAISTGGGSTNYADSAKGRF
TVSRNNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKMTMASVDYWGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESG
GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDD
SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEP
SLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTL
SGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVAS
GNIFGFNVMGWYRQVPGKQRELVAISTGGGSTNYADSAKGRFTVSRNNAKDTVYLQMNSLKPEDTA
VYYCKMTMASVDYWGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSST
GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL
WYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ
APGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFG
NSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSW
VRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSS
QGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:477)

αHER2 1156 COBRA

QVQLQESGGGLVQAGGSLKVSCAASRNIGSNYAVGWFRQAPGKEREPVAALRWTGSIIGYDDSLRGR
FTISKDDAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCAARILDRSSYDYWGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVES
GGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRD
DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALT
LSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQAGGSLKVSCAA
SRNIGSNYAVGWFRQAPGKEREPVAALRWTGSIIGYDDSLRGRFTISKDDAKNTVYLQMNSLKPEDTG
VYYCAARILDRSSYDYWGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSS
TGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCV
LWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVR
QAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF
GNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS
WVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVS
SQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:478)

图12M

αHER2 1158 COBRA

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRTFSSYAMGWFRQAPEKEREFVAAITWSGGTTHYAESVKGR
FTISRDNAKNTVYLQMNTLEPEDTAVYYCAARINYSTISSNEKMYHYWGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKD
RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/Q
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQAGGSL
RLSCTASGRTFSSYAMGWFRQAPEKEREFVAAITWSGGTTHYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNTL
EPEDTAVYYCAARINYSTISSNEKMYHYWGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVS
PGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSG
VQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT
FNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS
GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY
YCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:479)

αHER2 1159 COBRA

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCATSGRTFSSLAMGWFRQAPGKERELVAGISWSGSTTYYADSVKGR
FAISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARTSSIATIGREYDYWGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQ
LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFT
ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQAGGSLRLS
CATSGRTFSSLAMGWFRQAPGKERELVAGISWSGSTTYYADSVKGRFAISRDNAKNTVYLQMNSLKPE
DTAVYYCAARTSSIATIGREYDYWGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTV
TLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE
AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA
MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC
VRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS
KFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG
GSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:480)

图12N

αHER2 1160 COBRA

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNERLGWFRQAPGKERELVAAIRWSGVIIGYADSVRGRF
TISRDNAKSTVYLQMNSLRPEDTAVYFCAADRGVYGTWDYWGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVE
SGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISR
DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQ
EPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAAL
TLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAA
SGRTFSNERLGWFRQAPGKERELVAAIRWSGVIIGYADSVRGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLRPEDTAV
YFCAADRGVYGTWDYWGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGS
STGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC
VLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWV
RQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN
FGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS
WVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVS
SQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:481)

αHER2 1161 COBRA

QVQLQESGGGLVQPGKSLRLSCAVSGDIFGTYGMAWYRQAPGKQREPVASISIGGIINYADSVKGRFTI
SRDNVKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKLLDWNYWGRGTQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQ
PGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA
YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP
EDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGKSLRLSCAVSGDIFGT
YGMAWYRQAPGKQREPVASISIGGIINYADSVKGRFTISRDNVKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKLLD
WNYWGRGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPN
WVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFG
GGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA
RIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYW
GQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLE
WVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHH
HHHH (SEQ ID NO:482)

图120

αHER2 1162 COBRA

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFSGNAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGDSTYYADSVKG RFTISRDNDENTAYLQMNSLKPEDTAVYYCAATRSFYSRTYYTRPSDYNYWGPGTQVTVSS/GGGSGG GS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQ VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGG GS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFS GSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRPFSGNAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGDSTYYADSVKGRFTISRDNDENTAYL QMNSLKPEDTAVYYCAATRSFYSRTYYTRPSDYNYWGPGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVT QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNS LRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:483)

αHER2 1163 COBRA

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRRFNNYFMGWFRQAPGKEREFVALLRESGDNTYYTNSVKGR FTISRDNARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARLDTGFVLYSANSYAYWGQGTQVTVSS/GGGSGGGS/ EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/ QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQAGGS LRLSCAASGRRFNNYFMGWFRQAPGKEREFVALLRESGDNTYYTNSVKGRFTISRDNARNTVYLQMNS LKPEDTAVYYCAARLDTGFVLYSANSYAYWGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLT VSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA SGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:484)

图12P

Trop-2/EpCAM异源COBRA

Pro824 (aEpCAM h665/aTrop-2 h557)

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGHTNYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTTTPETYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSSQSMG**WFRQAPGKEREFVS**AISWTGANPTYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DTSGGSYYYERATAETSYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:485)

Pro826 (aTrop-2 h557/aEpCAM h665)

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSSQSMG**WFRQAPGKEREFVS**AISWTGANPTYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DTSGGSYYYERATAETSYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGHTNYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTTTPETYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYDYKDDDDKADSVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HGNFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO:486)

图12Q

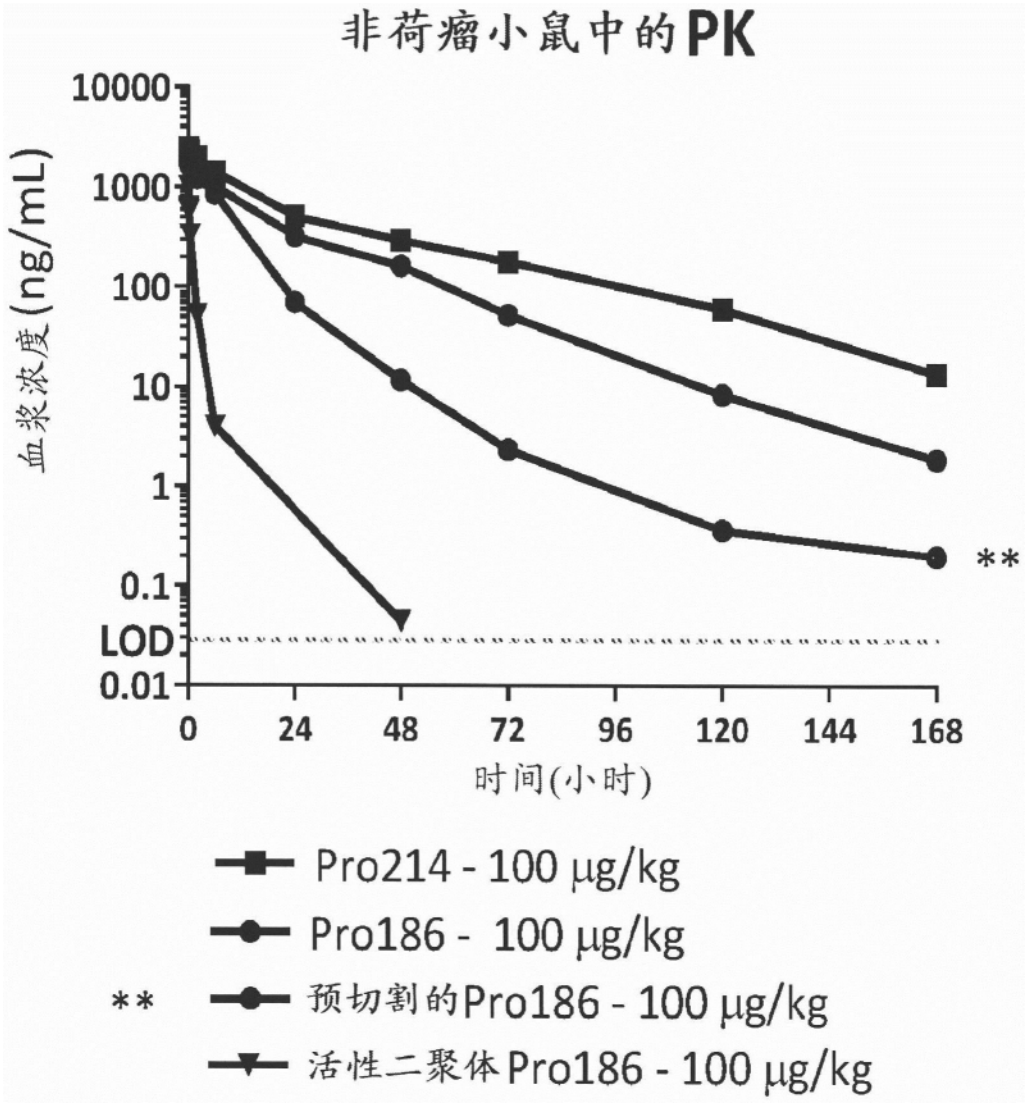
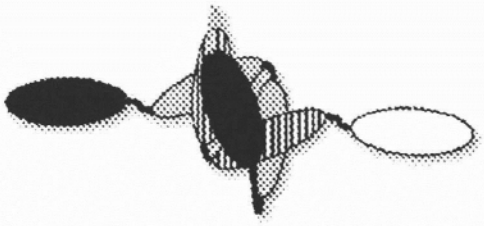

非荷瘤小鼠中的PK
血浆浓度(ng/mL)
10000
1000
100
10
1
0.1
LOD
0.01
0
24
48
72
96
120
144
168
时间(小时)
**
Pro214 - 100 μg/kg
Pro186 - 100 μg/kg
** 预切割的Pro186 - 100 μg/kg
活性二聚体Pro186 - 100 μg/kg

图13

Pro225



等效B7H3结合

物种	αB7H3 K_D (nM)	αCD3 K_D (nM)	αHSA K_D (nM)
人	0.3 (4Ig) 0.6 (2Ig)	ND*	11.3
食蟹猴	0.1 (4Ig) 0.2 (2Ig)	ND	10.8
小鼠	0.1 (2Ig)	ND	106.3

*ND = 无法测出

图14

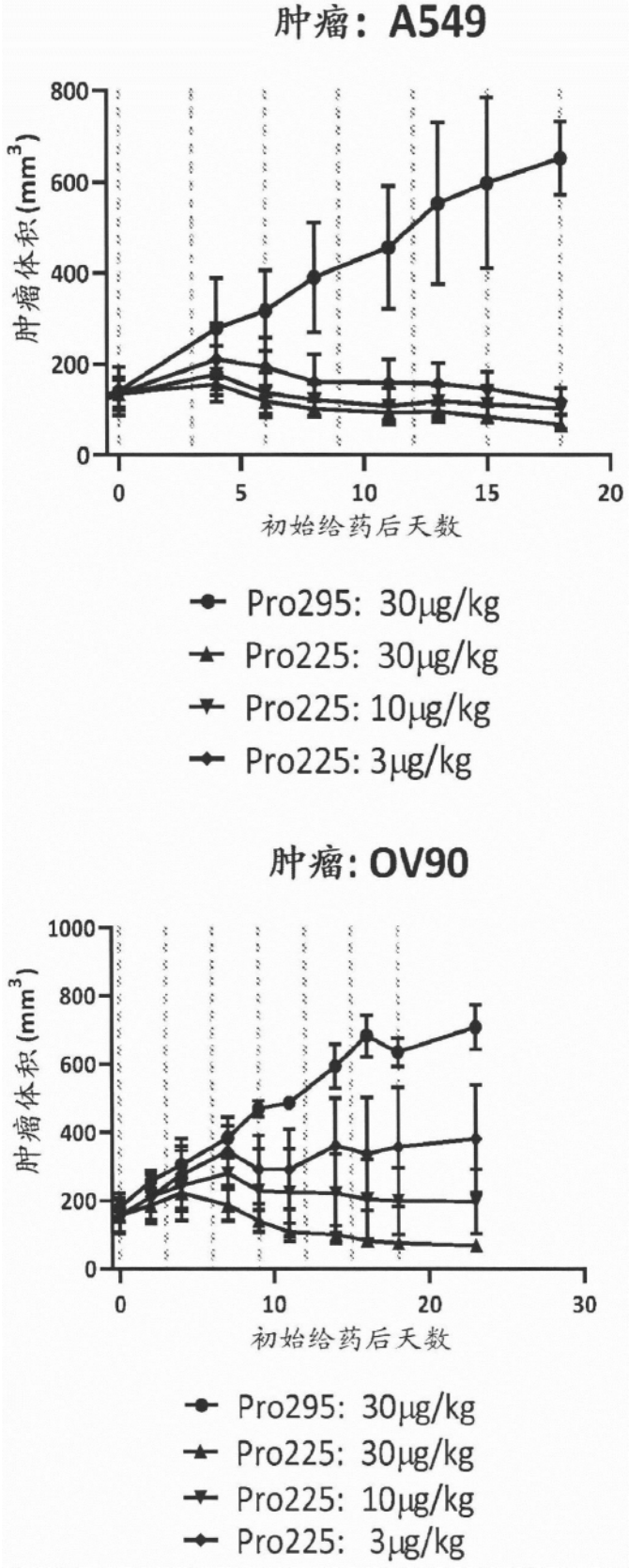

肿瘤：A549
肿瘤体积 (mm3)
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
初始给药后天数
Pro295: 30μg/kg
Pro225: 30μg/kg
Pro225: 10μg/kg
Pro225: 3μg/kg
肿瘤：OV90
肿瘤体积 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
初始给药后天数
Pro295: 30μg/kg
Pro225: 30μg/kg
Pro225: 10μg/kg
Pro225: 3μg/kg

图15A

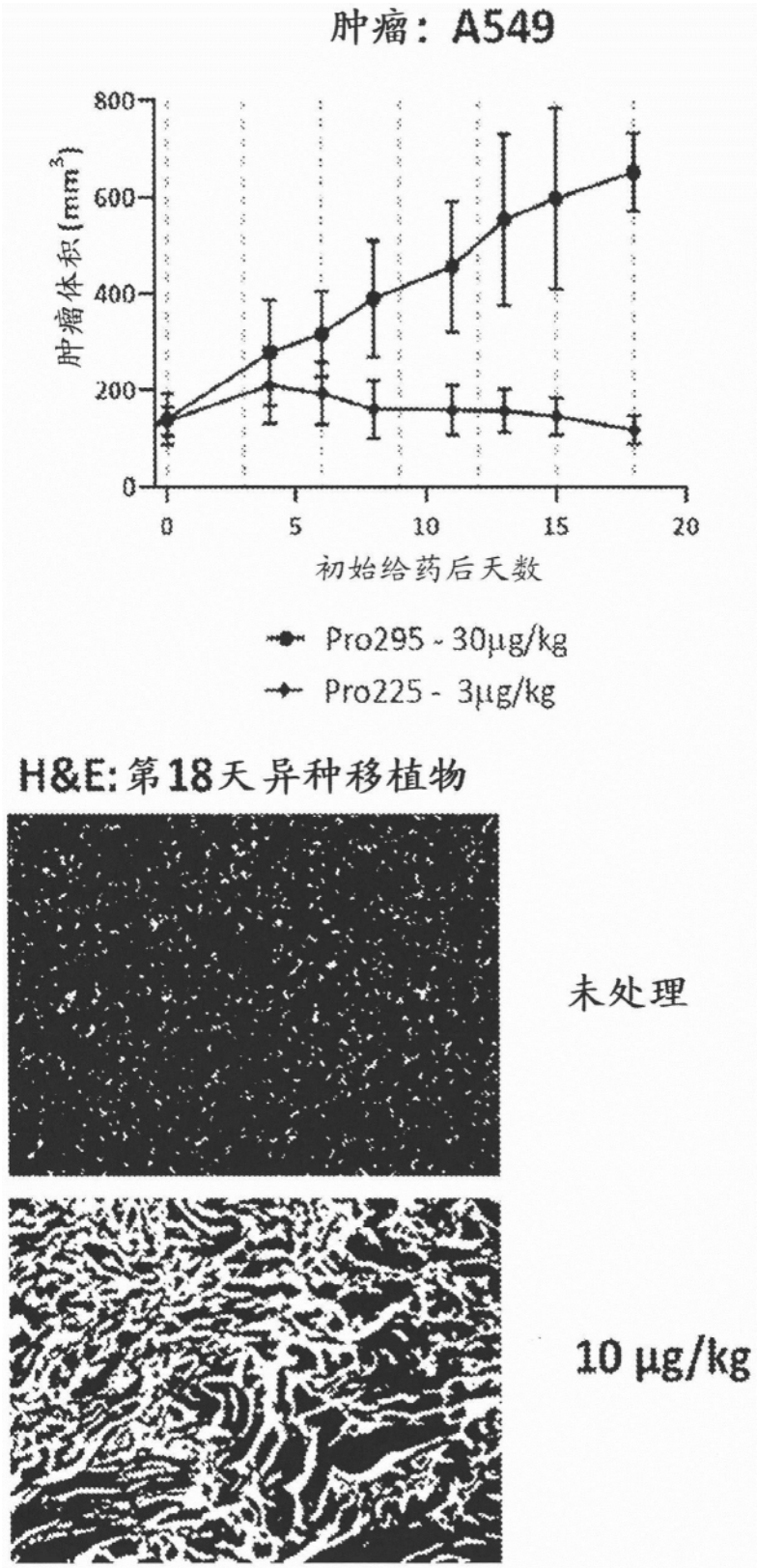

肿瘤：A549
肿瘤体积 (mm³)
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
初始给药后天数
Pro295 - 30μg/kg
Pro225 - 3μg/kg
H&E: 第18天异种移植物
未处理
10 μg/kg

图15B

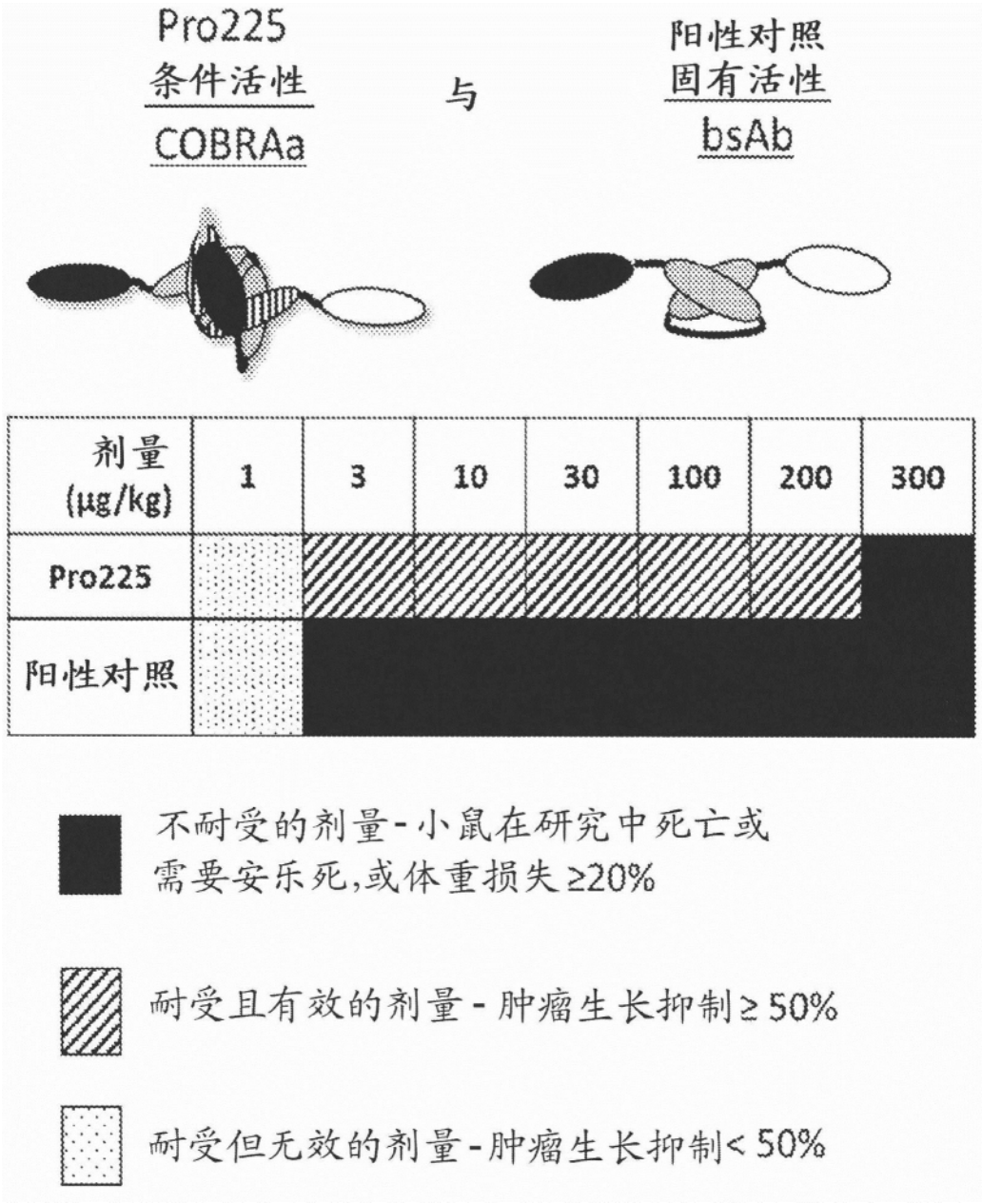

Pro225
条件活性
COBRAa
与
阳性对照
固有活性
bsAb
剂量 (μg/kg)
1
3
10
30
100
200
300
Pro225
阳性对照
不耐受的剂量-小鼠在研究中死亡或需要安乐死,或体重损失≥20%
耐受且有效的剂量-肿瘤生长抑制≥50%
耐受但无效的剂量-肿瘤生长抑制<50%

图16A

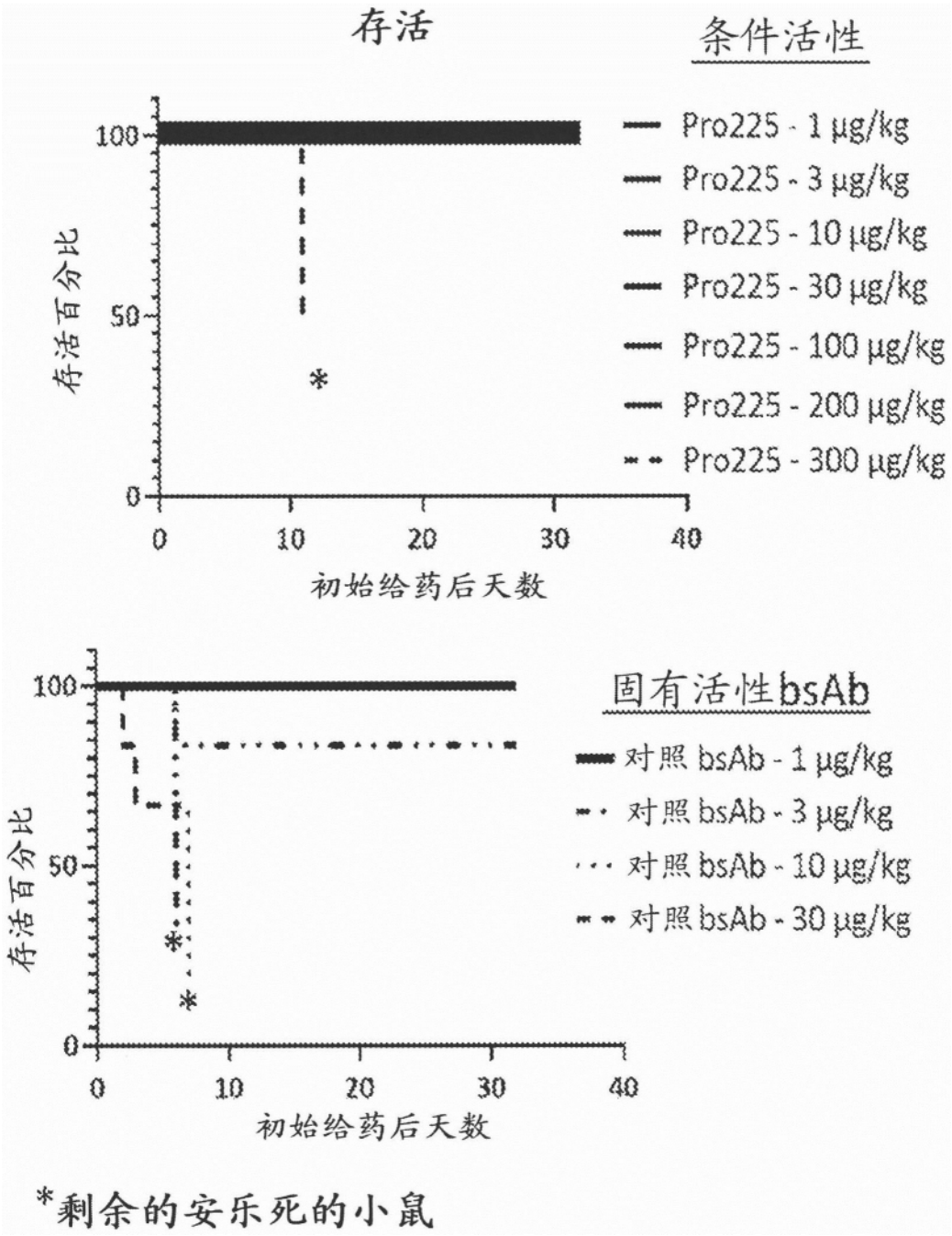

存活
条件活性
100
50
0
存活百分比
0
10
20
30
40
初始给药后天数
Pro225 - 1 μg/kg
Pro225 - 3 μg/kg
Pro225 - 10 μg/kg
Pro225 - 30 μg/kg
Pro225 - 100 μg/kg
Pro225 - 200 μg/kg
Pro225 - 300 μg/kg
固有活性bsAb
对照 bsAb - 1 μg/kg
对照 bsAb - 3 μg/kg
对照 bsAb - 10 μg/kg
对照 bsAb - 30 μg/kg
*剩余的安乐死的小鼠

图16B

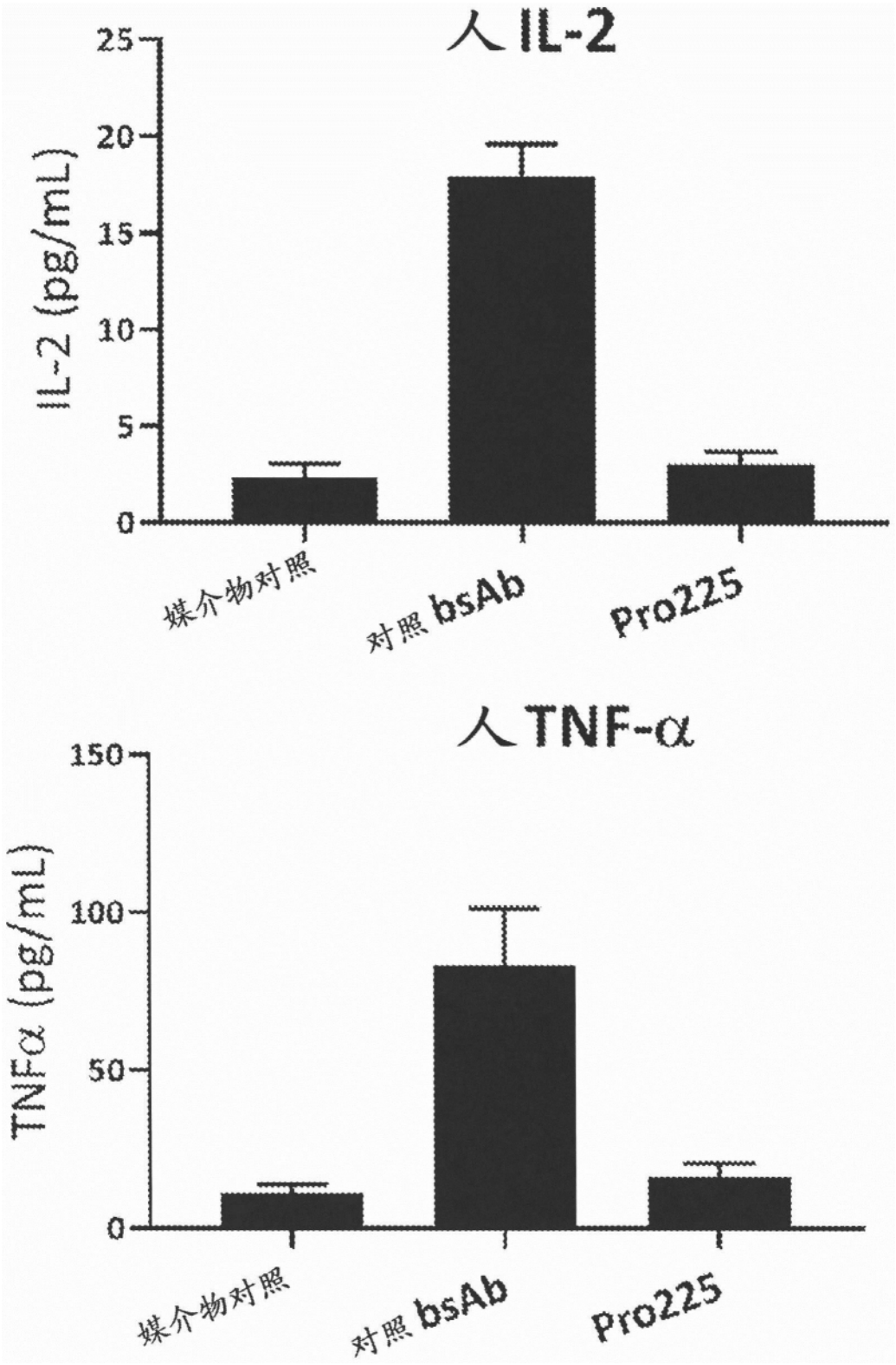

人IL-2
IL-2 (pg/mL)
25
20
15
10
5
0
媒介物对照
对照 bsAb
Pro225
人TNF-α
TNFα (pg/mL)
150
100
50
0
媒介物对照
对照 bsAb
Pro225

图16C

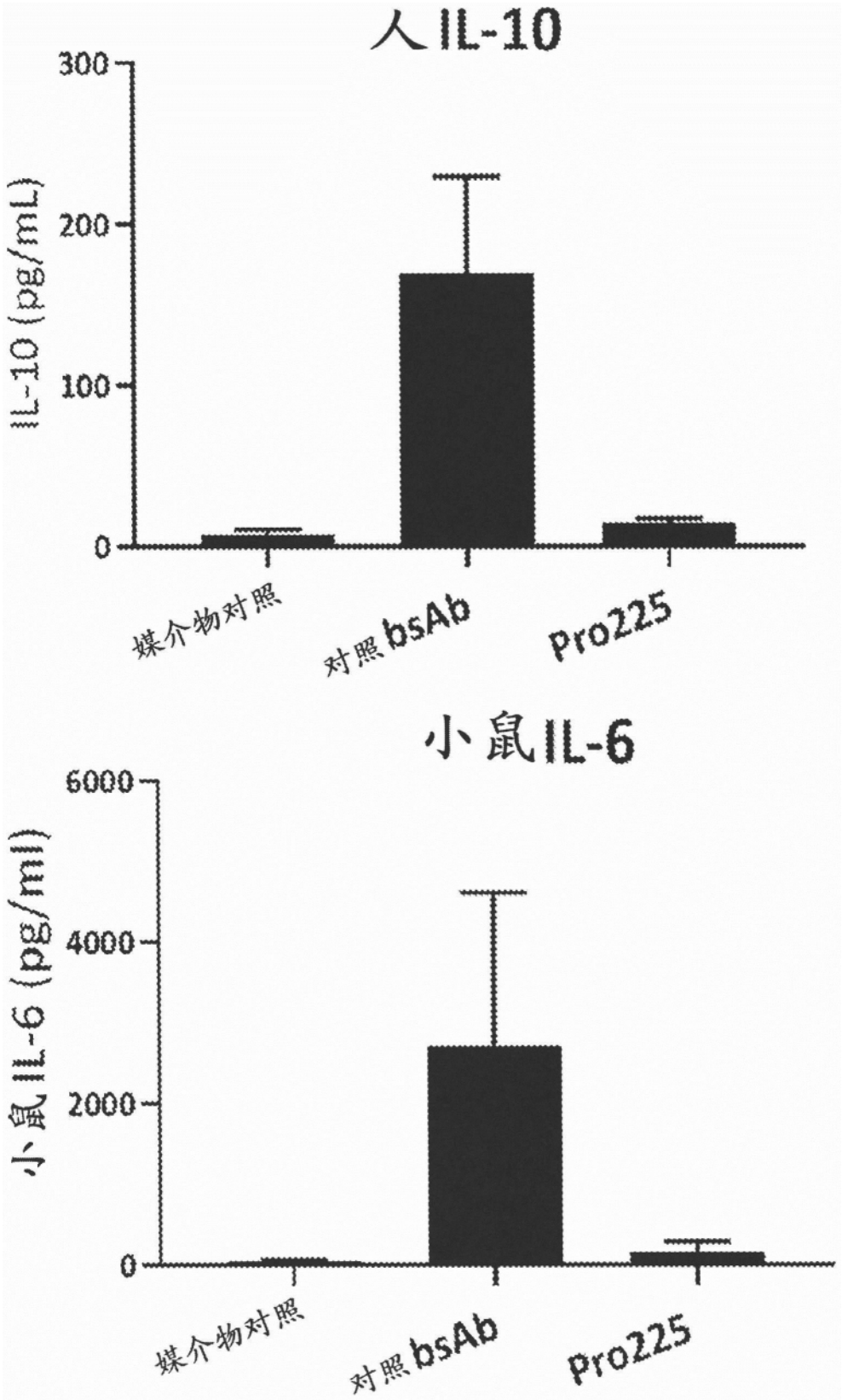

人IL-10
IL-10 (pg/mL)
300
200
100
0
媒介物对照
对照bsAb
Pro225
小鼠IL-6
小鼠IL-6 (pg/ml)
6000
4000
2000
0
媒介物对照
对照bsAb
Pro225

图16D

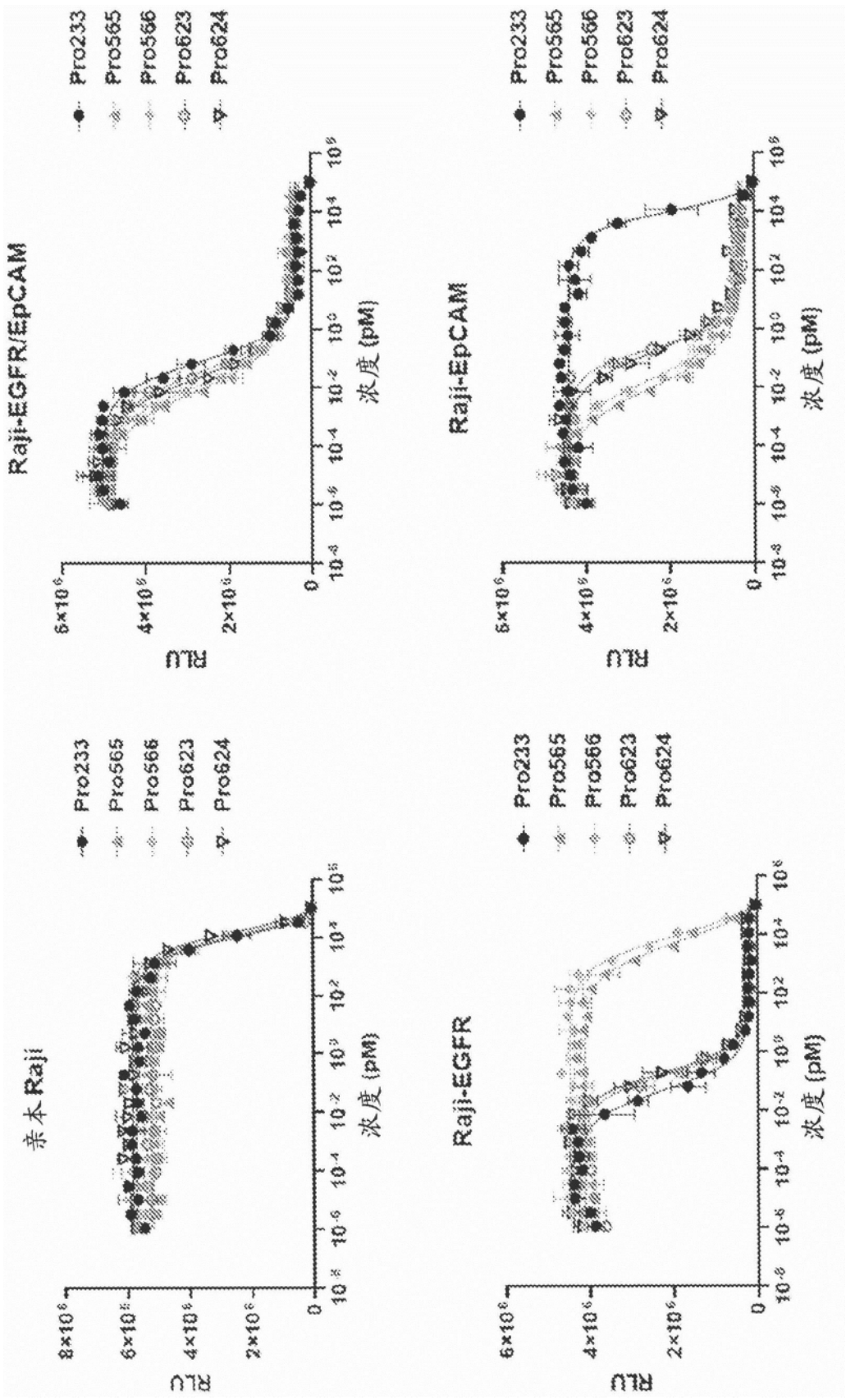

Raji-EGFR/EpCAM
Raji-EpCAM
亲本Raji
Raji-EGFR
Pro233
Pro565
Pro566
Pro623
Pro624
RLU
浓度 (pM)

图17

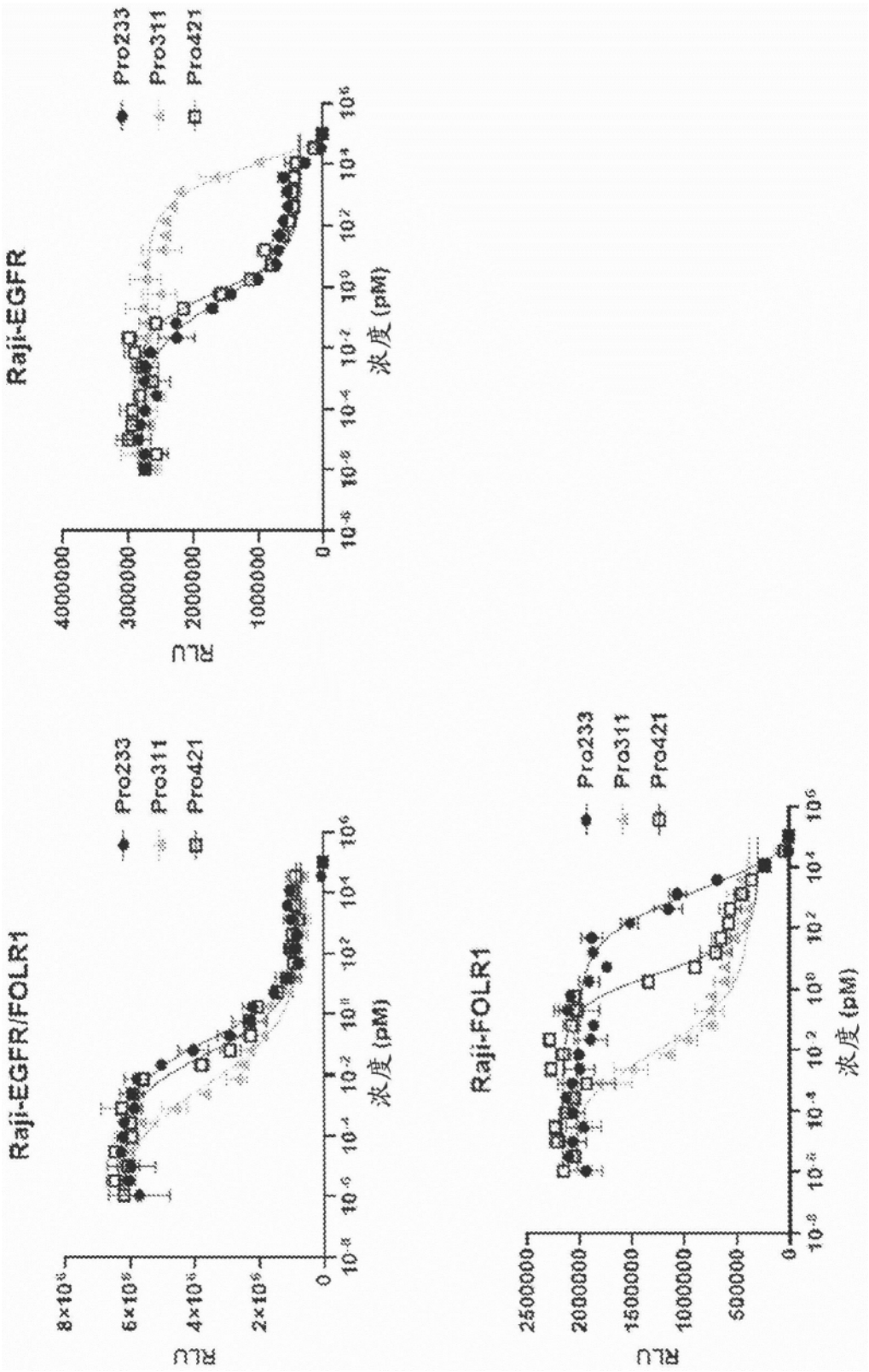

Raji-EGFR
Raji-EGFR/FOLR1
Raji-FOLR1
Pro233
Pro311
Pro421
RLU
浓度(pM)

图18

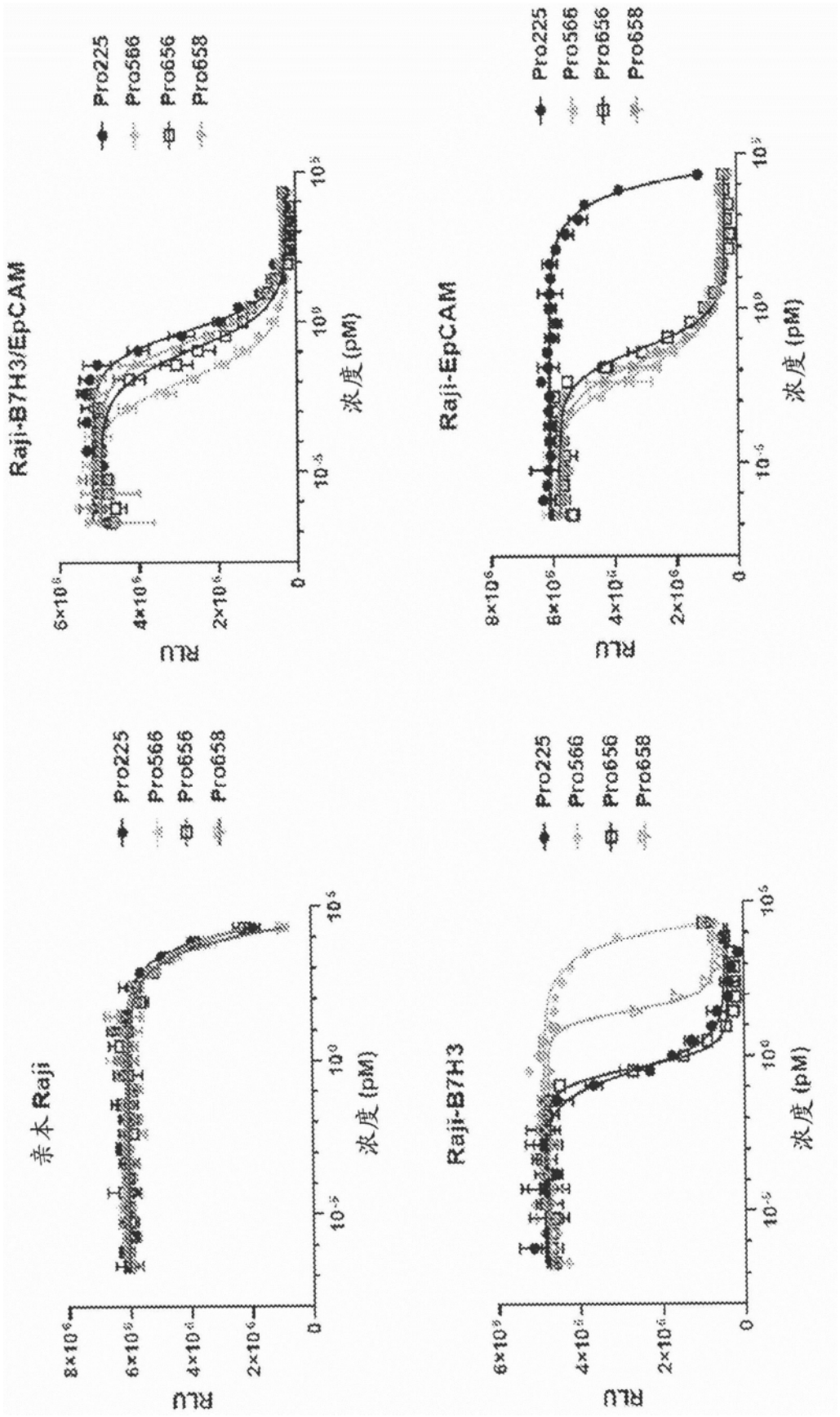

Raji-B7H3/EpCAM
Raji-EpCAM
亲本 Raji
Raji-B7H3
Pro225
Pro566
Pro656
Pro658
RLU
浓度 (pM)

图19

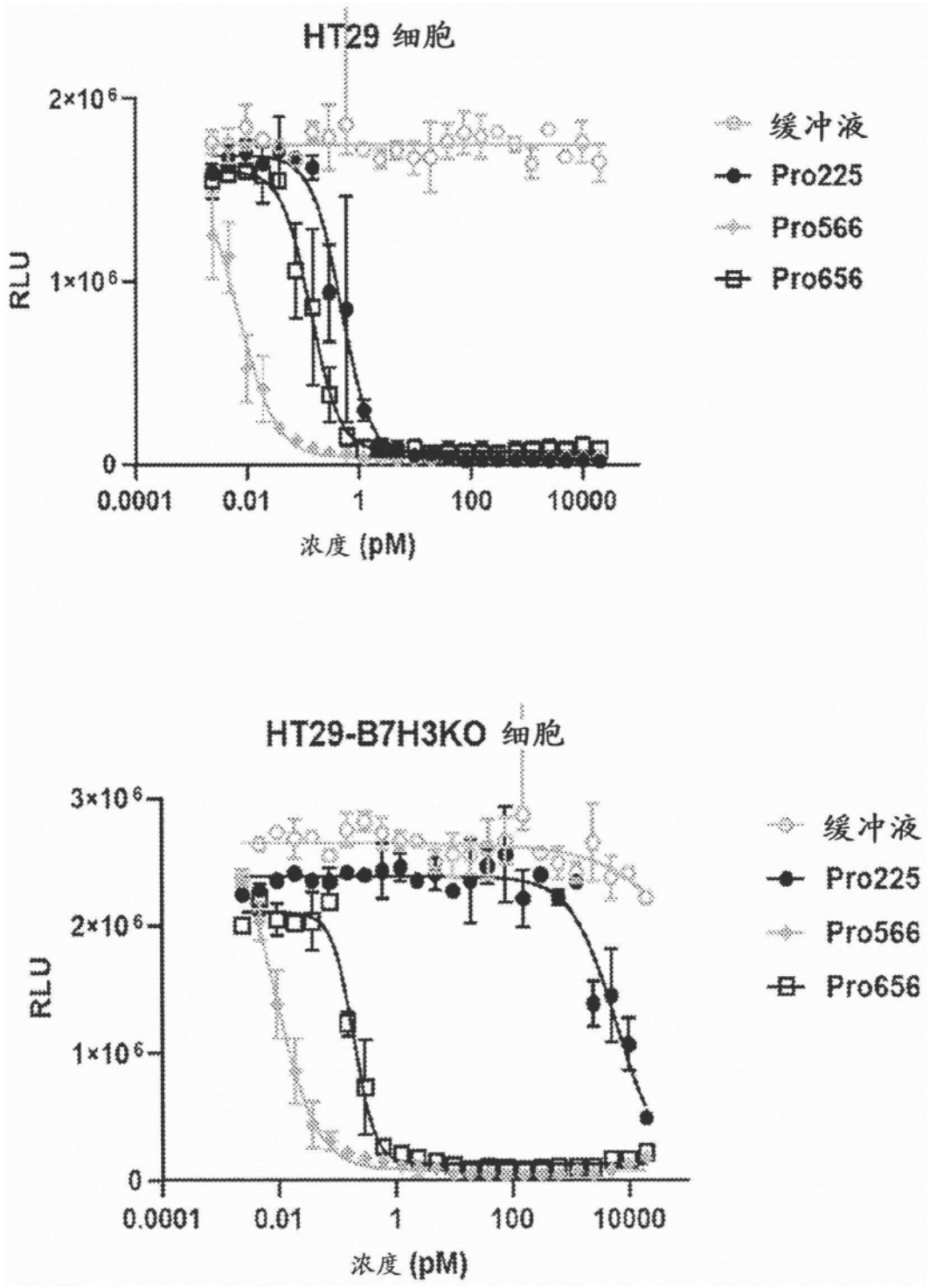
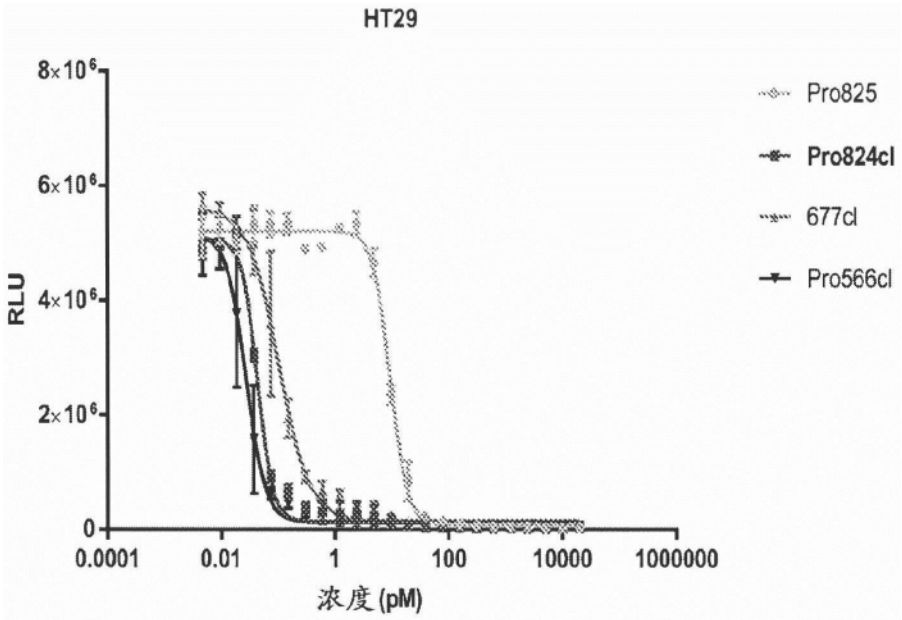
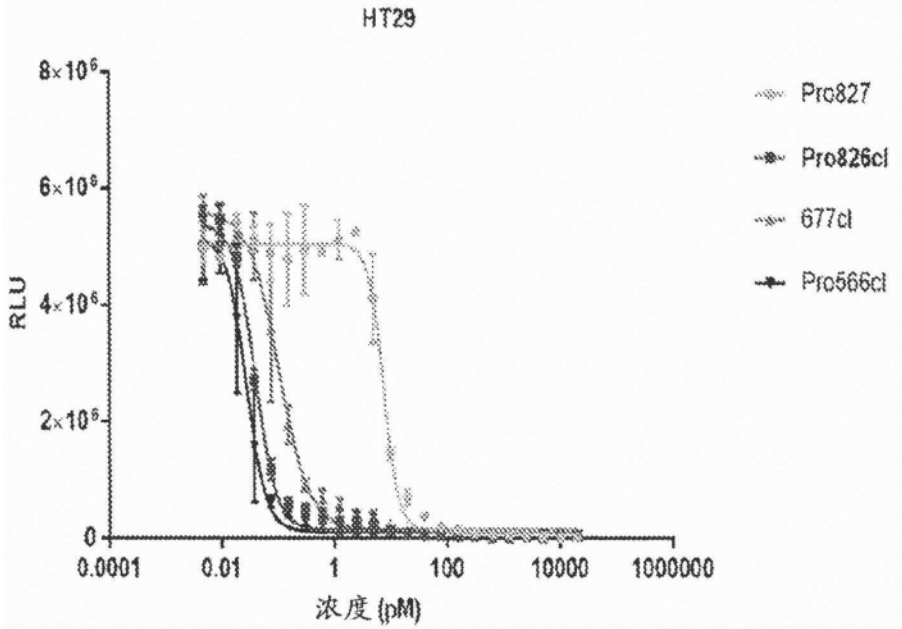

HT29 细胞
2×10⁶
1×10⁶
0
RLU
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度 (pM)
缓冲液
Pro225
Pro566
Pro656
HT29-B7H3KO 细胞
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
RLU
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度 (pM)
缓冲液
Pro225
Pro566
Pro656

图20

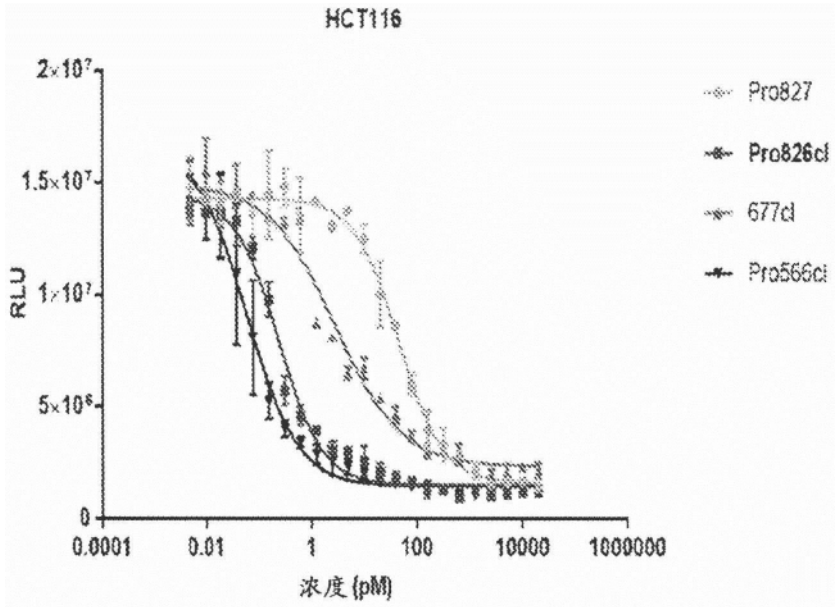


	EC50
Pro825	9.458
Pro824cl	0.04444
677cl	0.1066
Pro566cl	0.02773

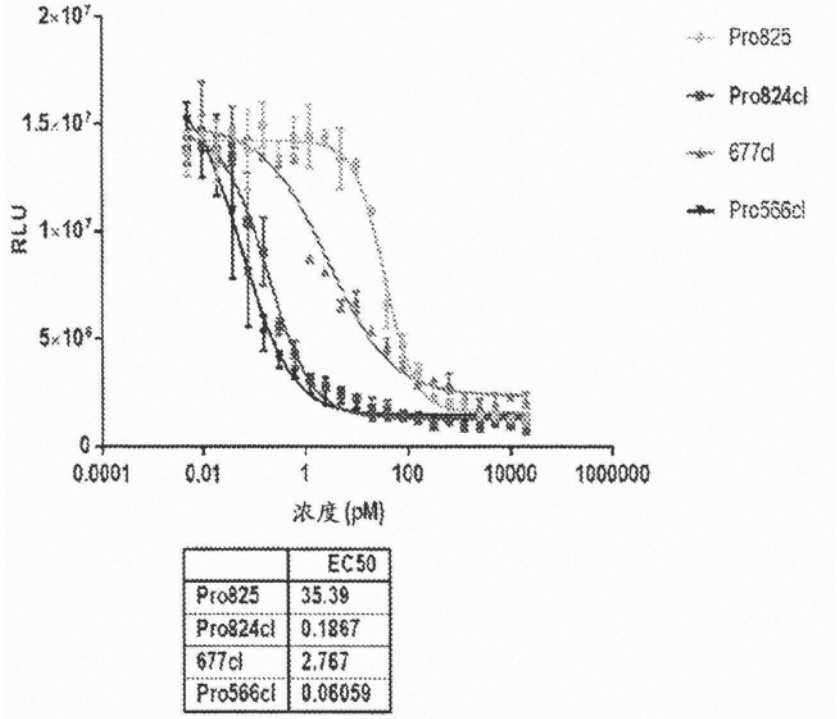


	EC50
Pro827	7.487
Pro826cl	0.04025
677cl	0.1066
Pro566cl	0.02773

图21

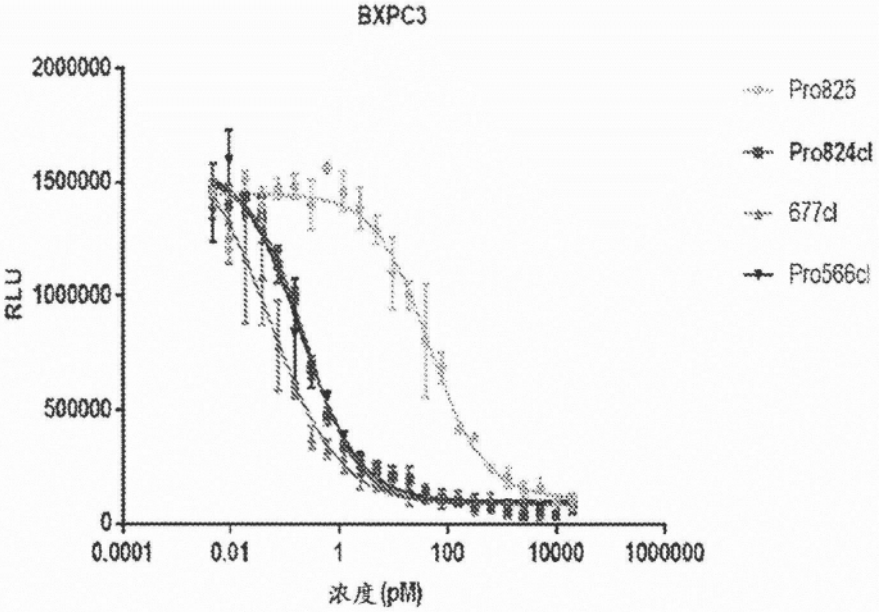


	EC50
Pro827	43.65
Pro826cl	0.2354
677cl	2.767
Pro566cl	0.06059

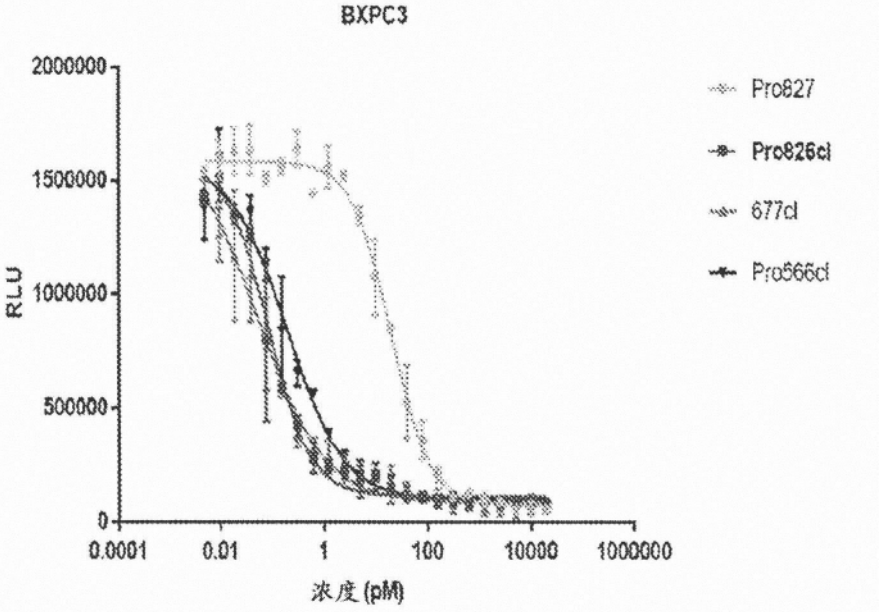


	EC50
Pro825	35.39
Pro824cl	0.1867
677cl	2.767
Pro566cl	0.06059

图22



	EC50
Pro825	46.44
Pro824cl	0.2398
677cl	0.05422
Pro566cl	0.1972



	EC50
Pro827	19.84
Pro826cl	0.09672
677cl	0.05422
Pro566cl	0.1972

图23

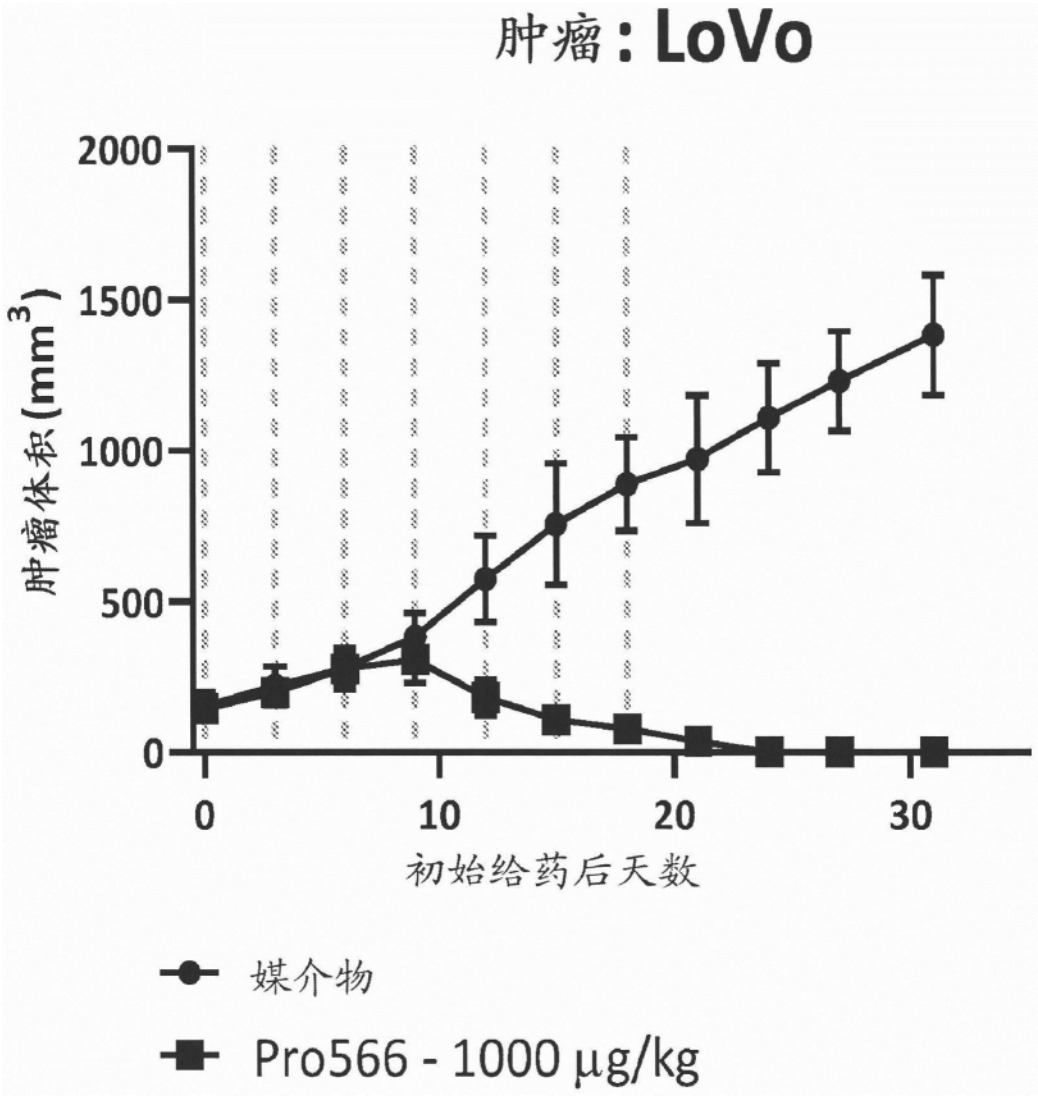

肿瘤：LoVo
肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
初始给药后天数
媒介物
Pro566 - 1000 µg/kg

图24

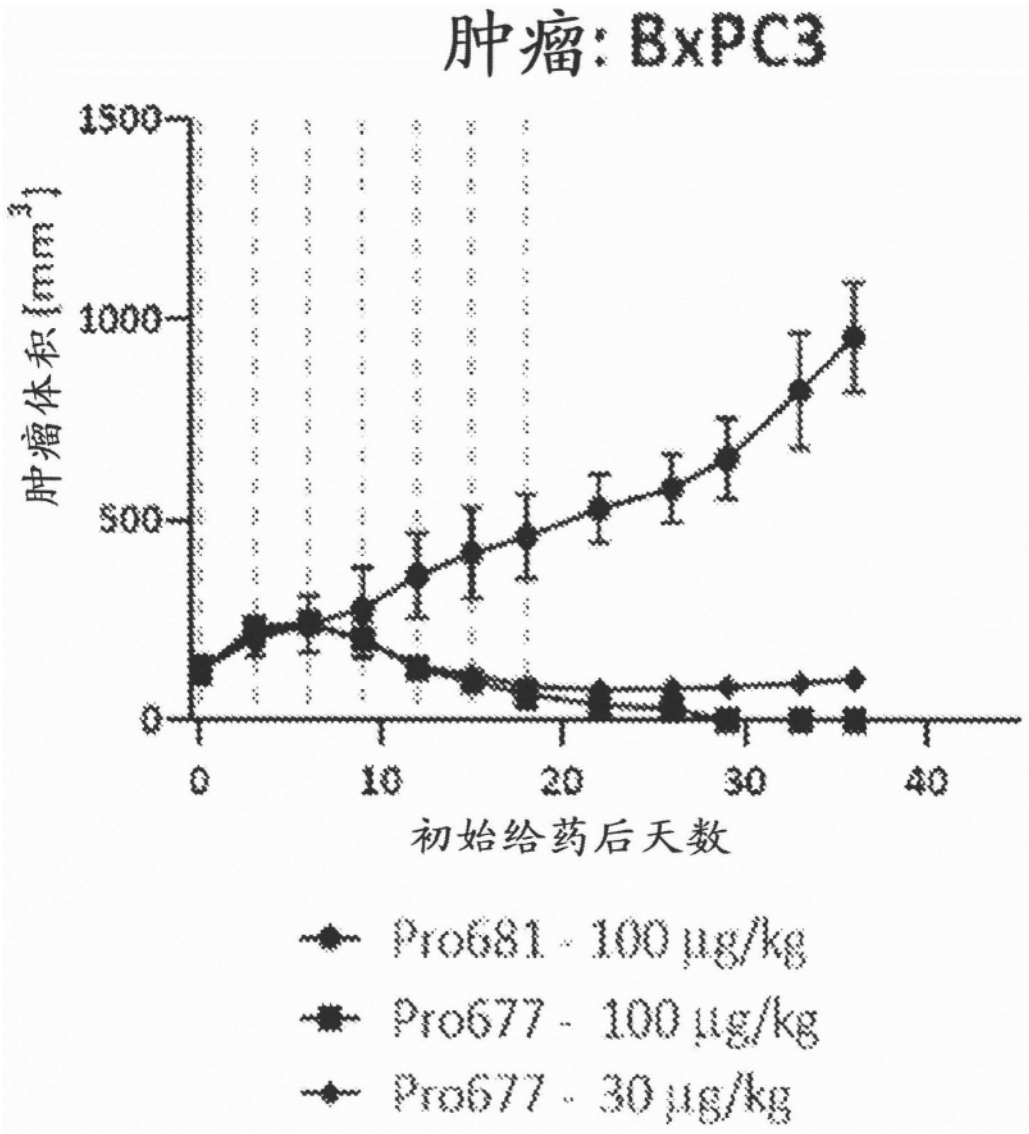

肿瘤: BxPC3
肿瘤体积 [mm3]
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
初始给药后天数
Pro681 - 100 µg/kg
Pro677 - 100 µg/kg
Pro677 - 30 µg/kg

图25

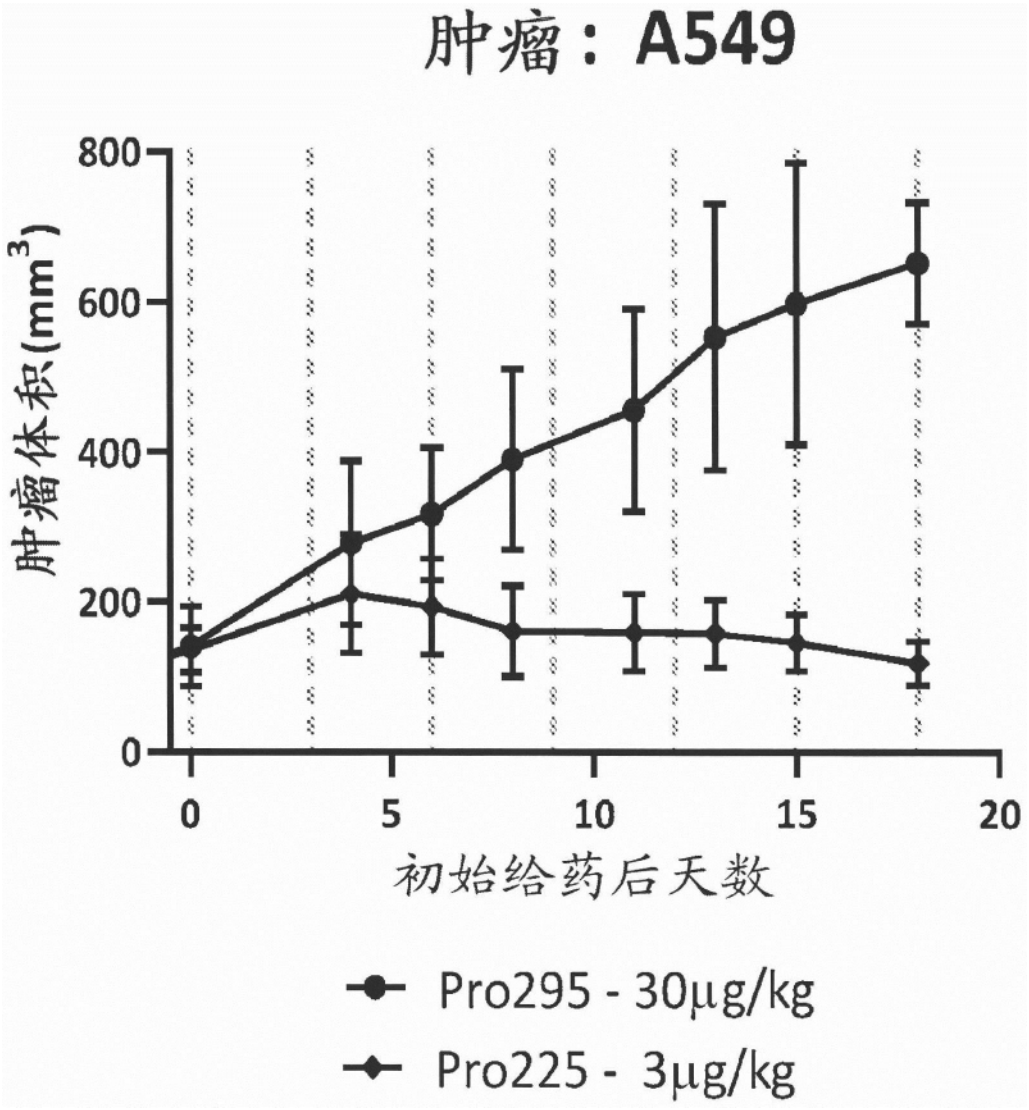
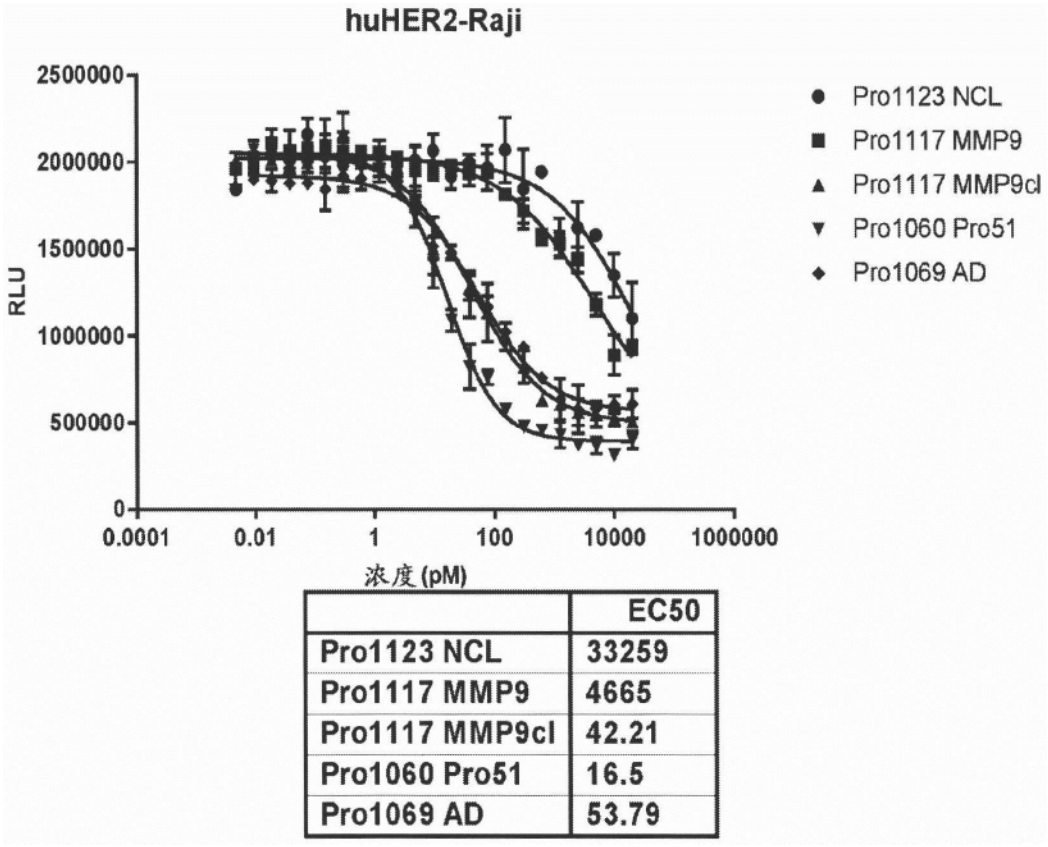
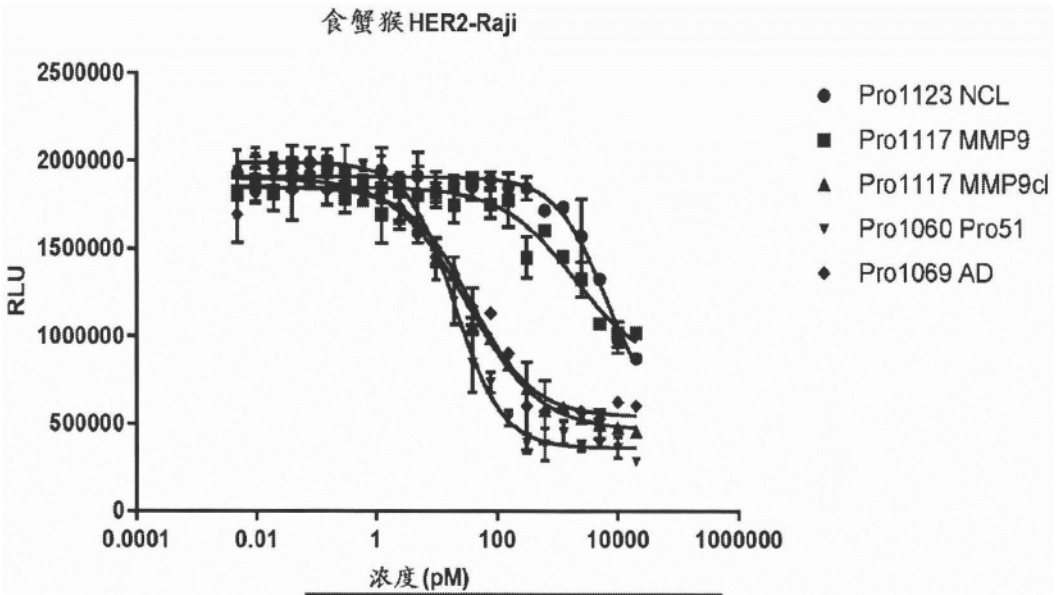

肿瘤：A549
肿瘤体积(mm3)
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
初始给药后天数
Pro295 - 30μg/kg
Pro225 - 3μg/kg

图26



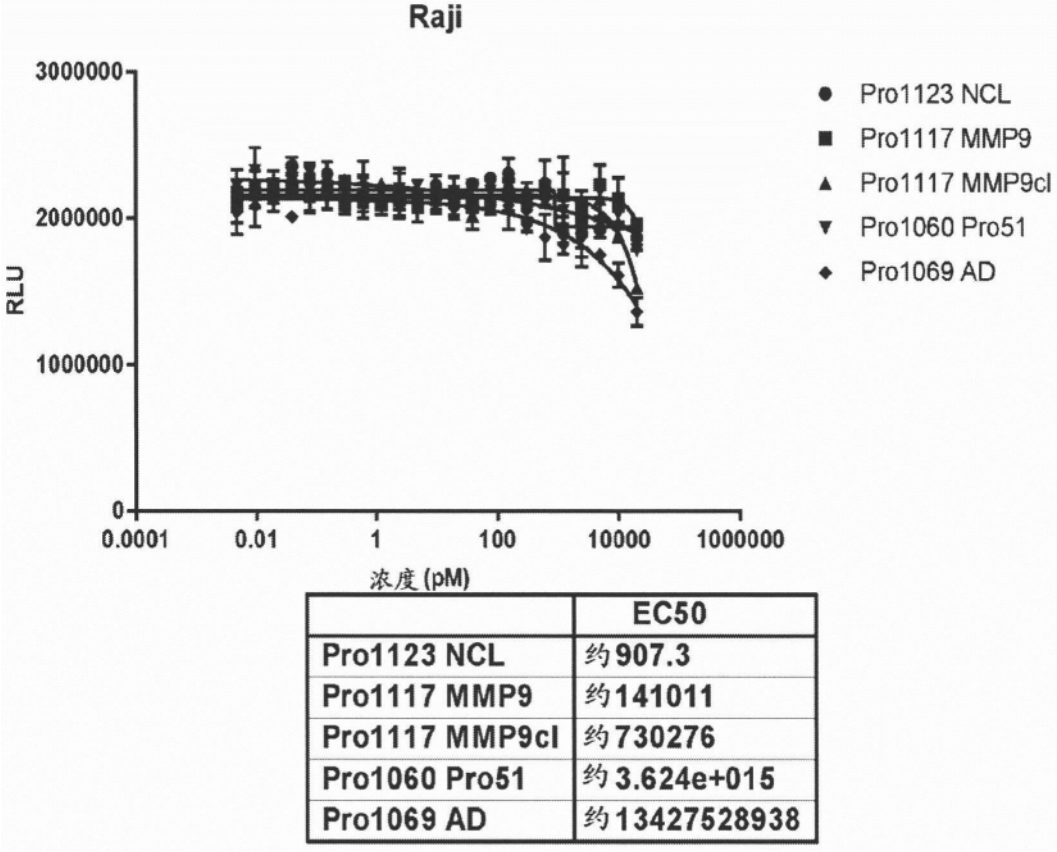
	EC50
Pro1123 NCL	33259
Pro1117 MMP9	4665
Pro1117 MMP9cl	42.21
Pro1060 Pro51	16.5
Pro1069 AD	53.79

图27A



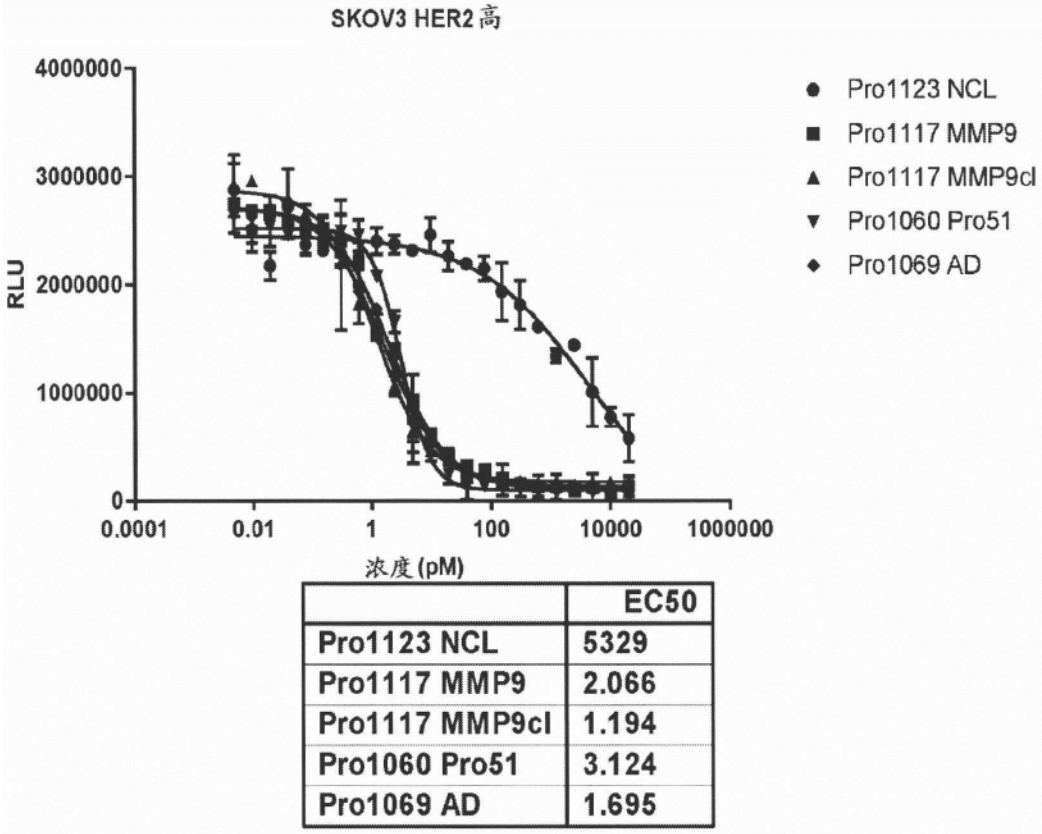
	EC50
Pro1123 NCL	6671
Pro1117 MMP9	1972
Pro1117 MMP9cl	33.02
Pro1060 Pro51	20.15
Pro1069 AD	37.22

图27B



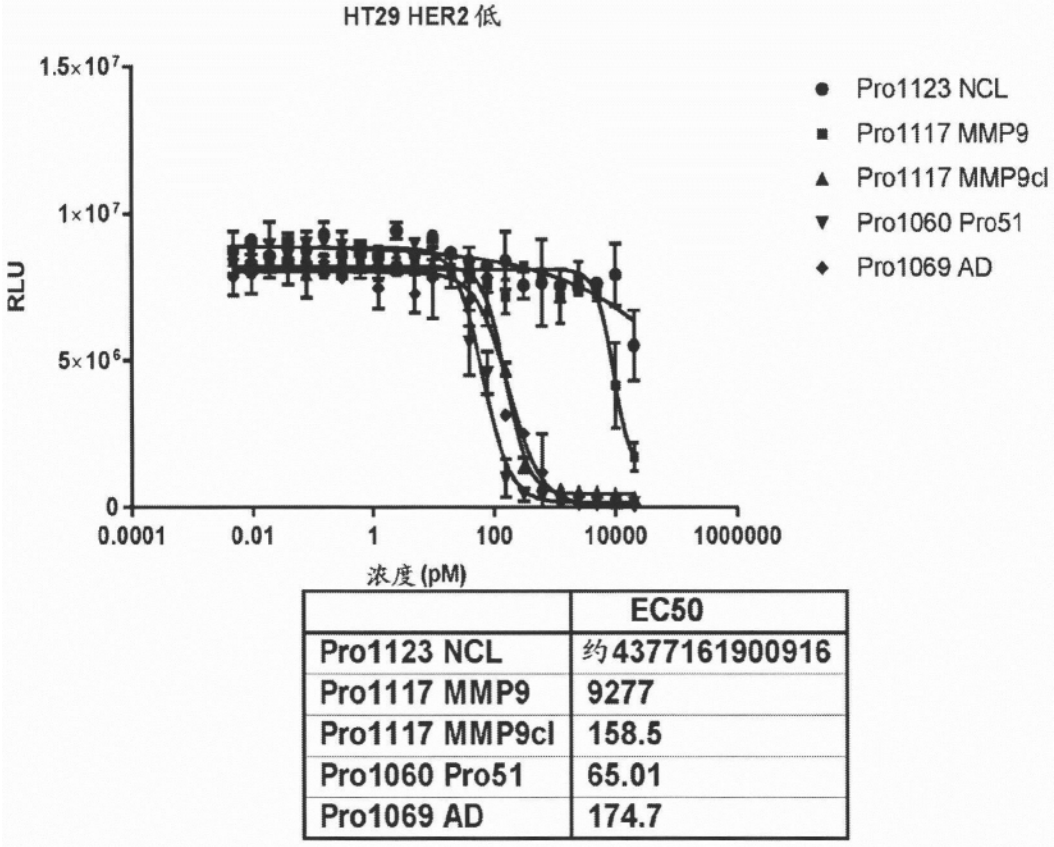
	EC50
Pro1123 NCL	约907.3
Pro1117 MMP9	约141011
Pro1117 MMP9cl	约730276
Pro1060 Pro51	约3.624e+015
Pro1069 AD	约13427528938

图27C



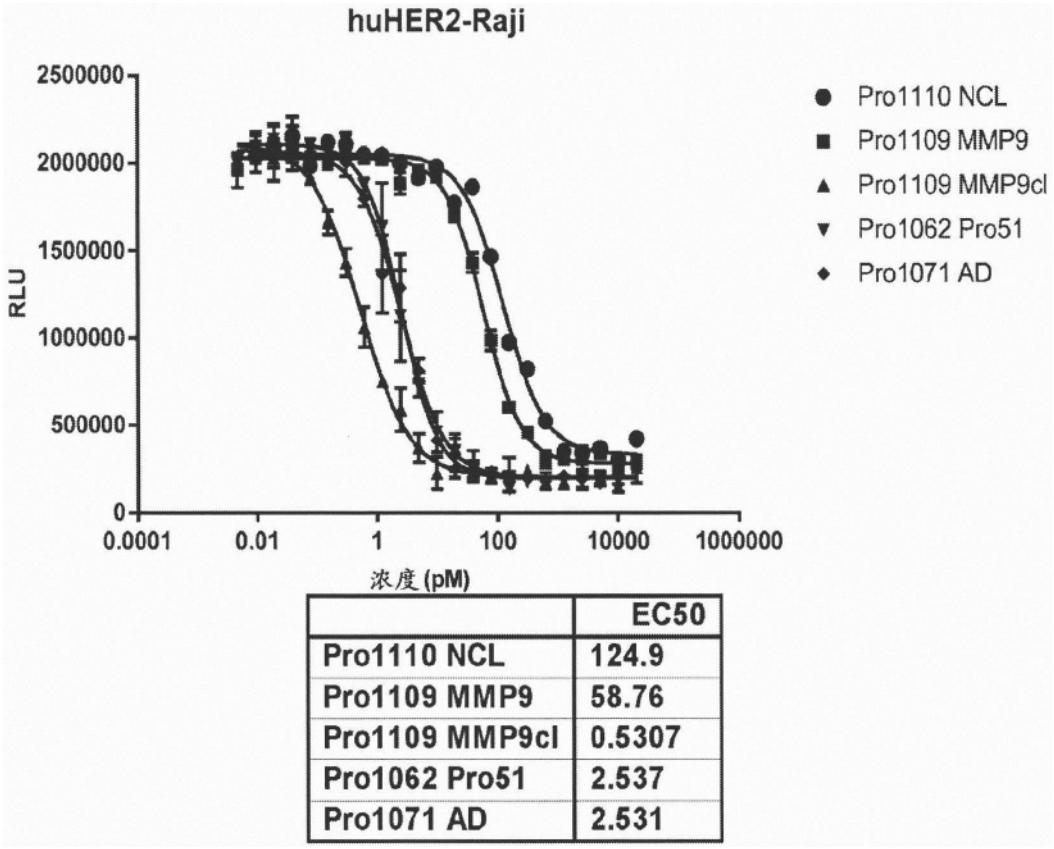
	EC50
Pro1123 NCL	5329
Pro1117 MMP9	2.066
Pro1117 MMP9cl	1.194
Pro1060 Pro51	3.124
Pro1069 AD	1.695

图27D



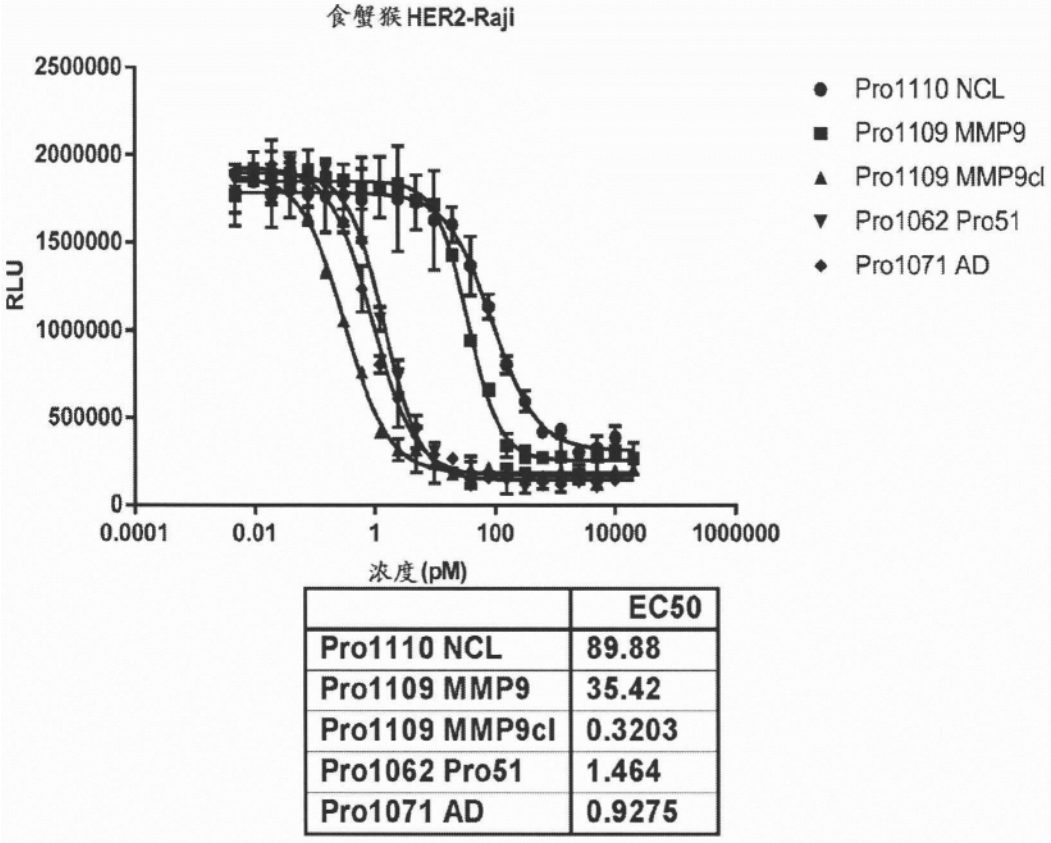
	EC50
Pro1123 NCL	约4377161900916
Pro1117 MMP9	9277
Pro1117 MMP9cl	158.5
Pro1060 Pro51	65.01
Pro1069 AD	174.7

图27E



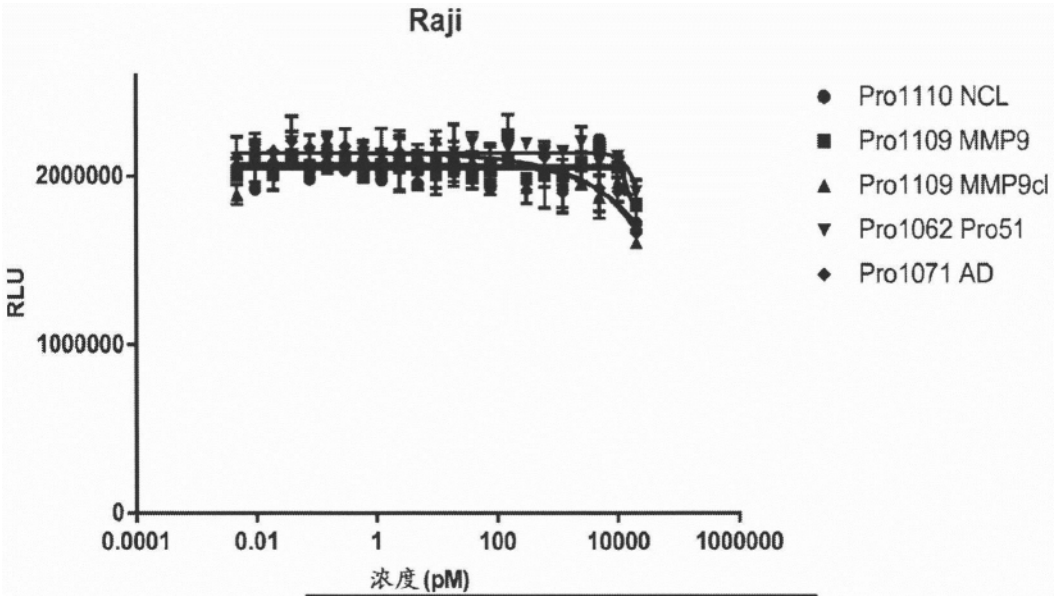
	EC50
Pro1110 NCL	124.9
Pro1109 MMP9	58.76
Pro1109 MMP9cl	0.5307
Pro1062 Pro51	2.537
Pro1071 AD	2.531

图28A



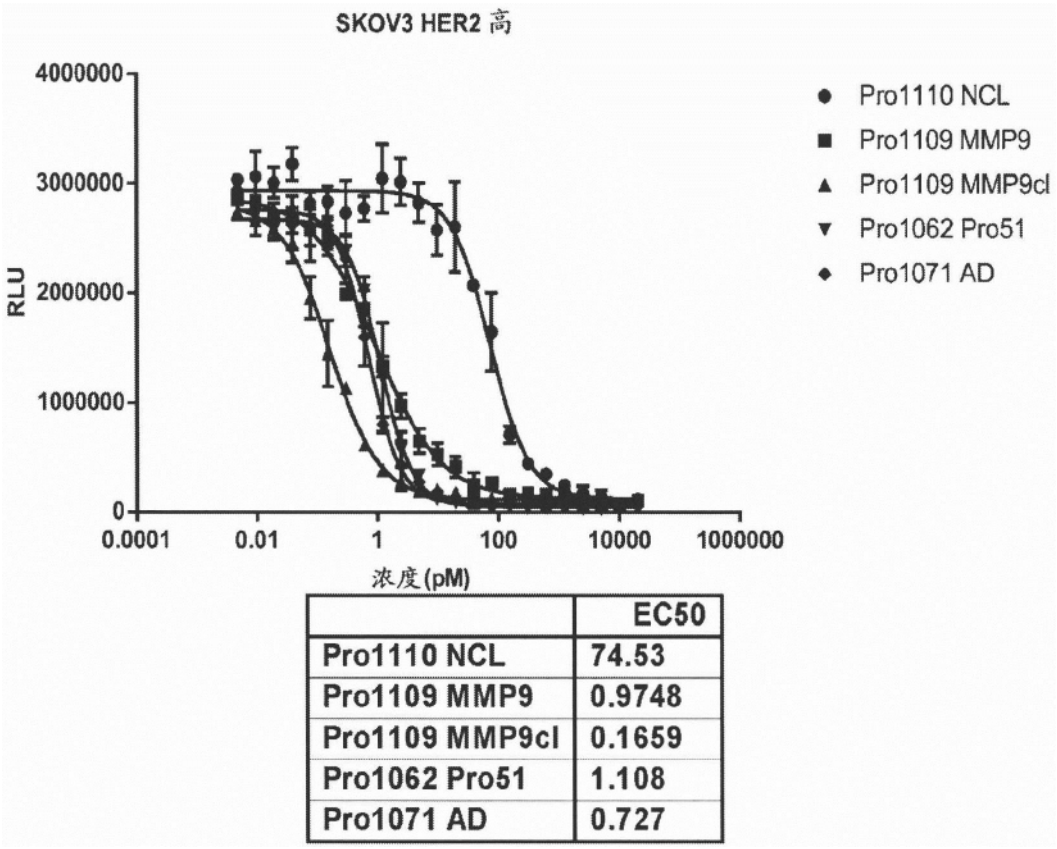
	EC50
Pro1110 NCL	89.88
Pro1109 MMP9	35.42
Pro1109 MMP9cl	0.3203
Pro1062 Pro51	1.464
Pro1071 AD	0.9275

图28B



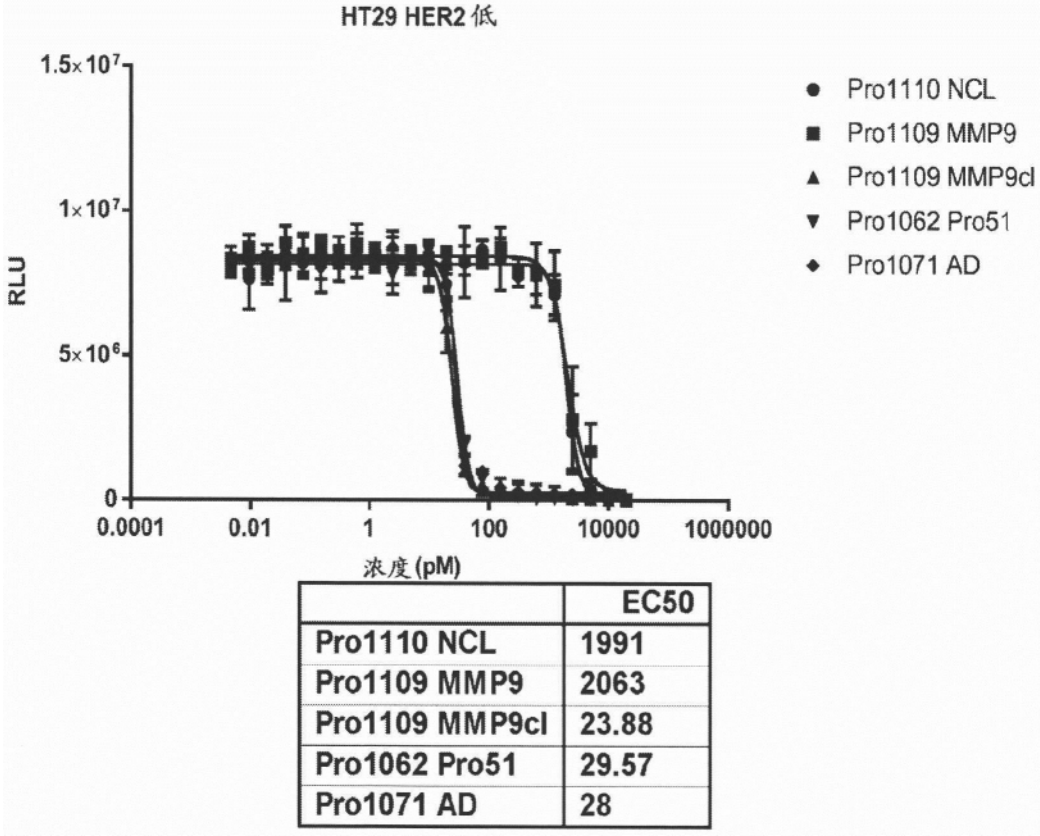
	EC50
Pro1110 NCL	12914
Pro1109 MMP9	约13960
Pro1109 MMP9cl	约329519827
Pro1062 Pro51	约73414
Pro1071 AD	约12279495900

图28C



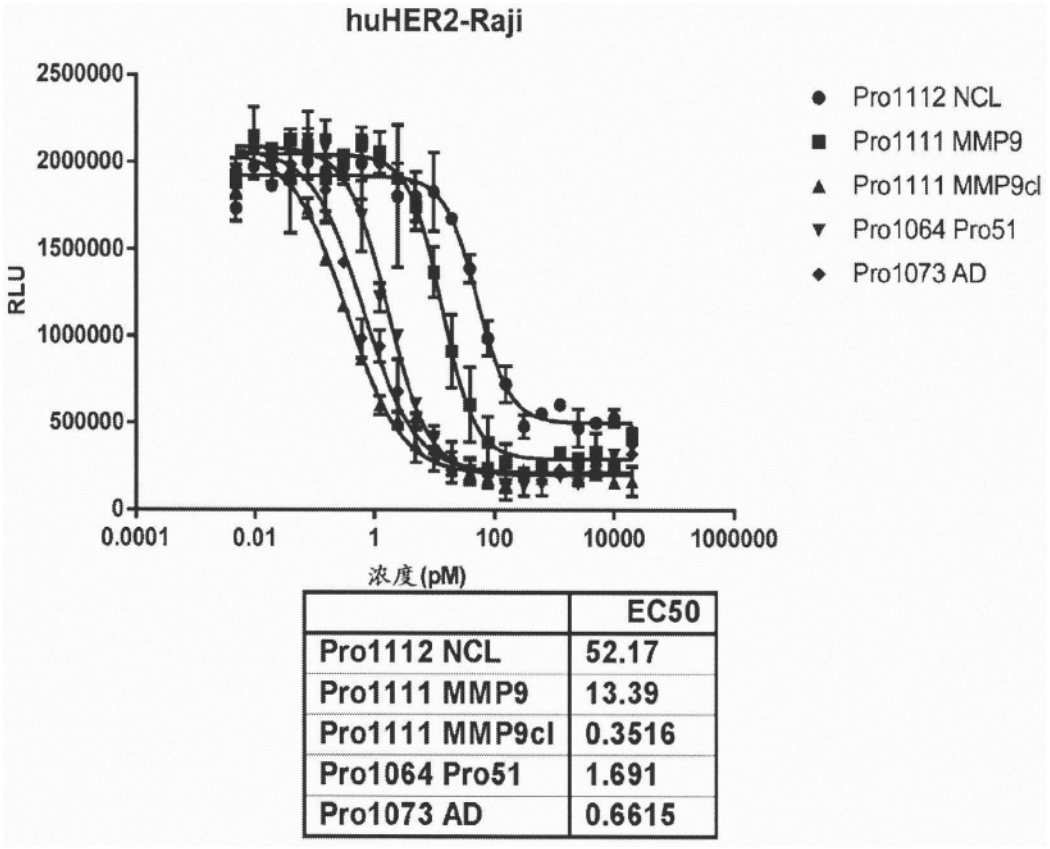
	EC50
Pro1110 NCL	74.53
Pro1109 MMP9	0.9748
Pro1109 MMP9cl	0.1659
Pro1062 Pro51	1.108
Pro1071 AD	0.727

图28D



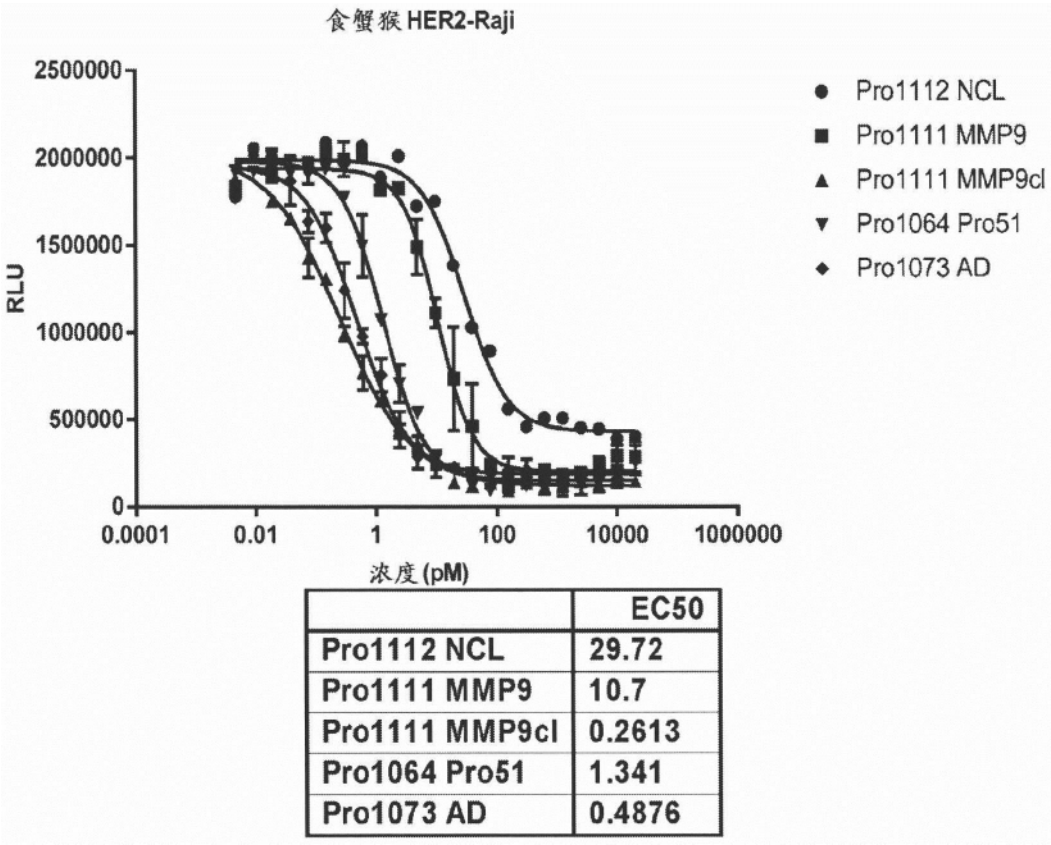
	EC50
Pro1110 NCL	1991
Pro1109 MMP9	2063
Pro1109 MMP9cl	23.88
Pro1062 Pro51	29.57
Pro1071 AD	28

图28E



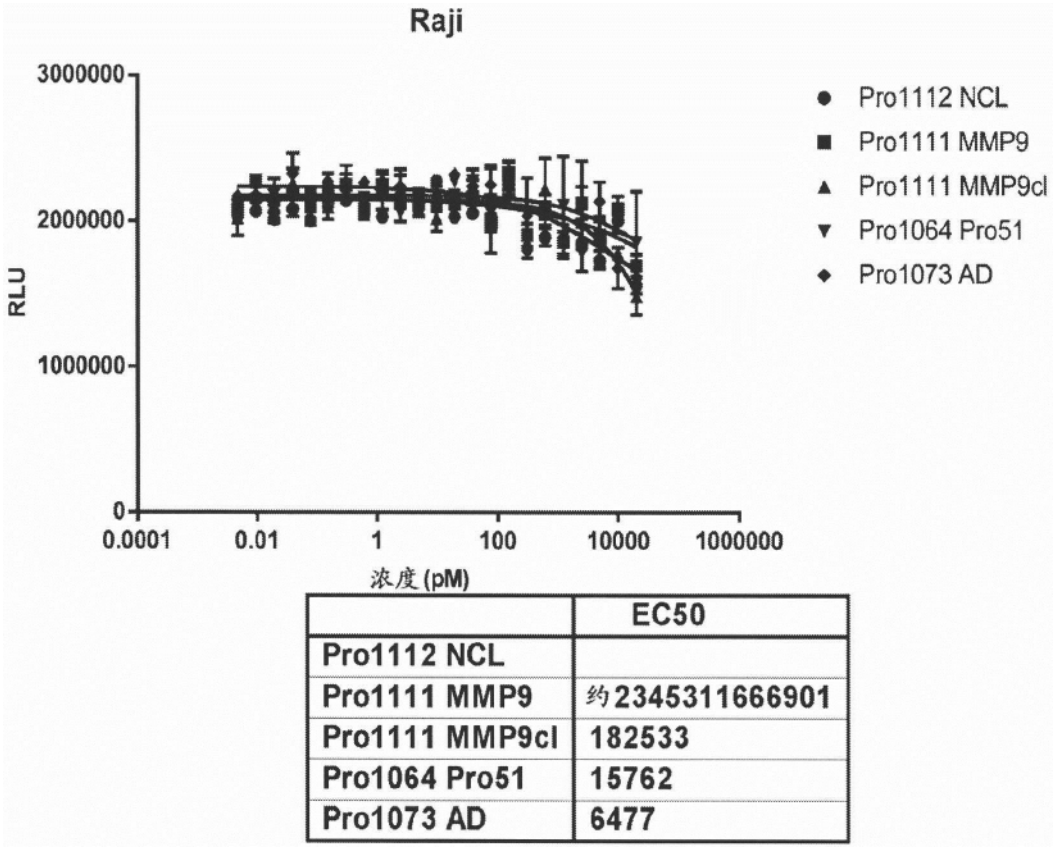
	EC50
Pro1112 NCL	52.17
Pro1111 MMP9	13.39
Pro1111 MMP9cl	0.3516
Pro1064 Pro51	1.691
Pro1073 AD	0.6615

图29A



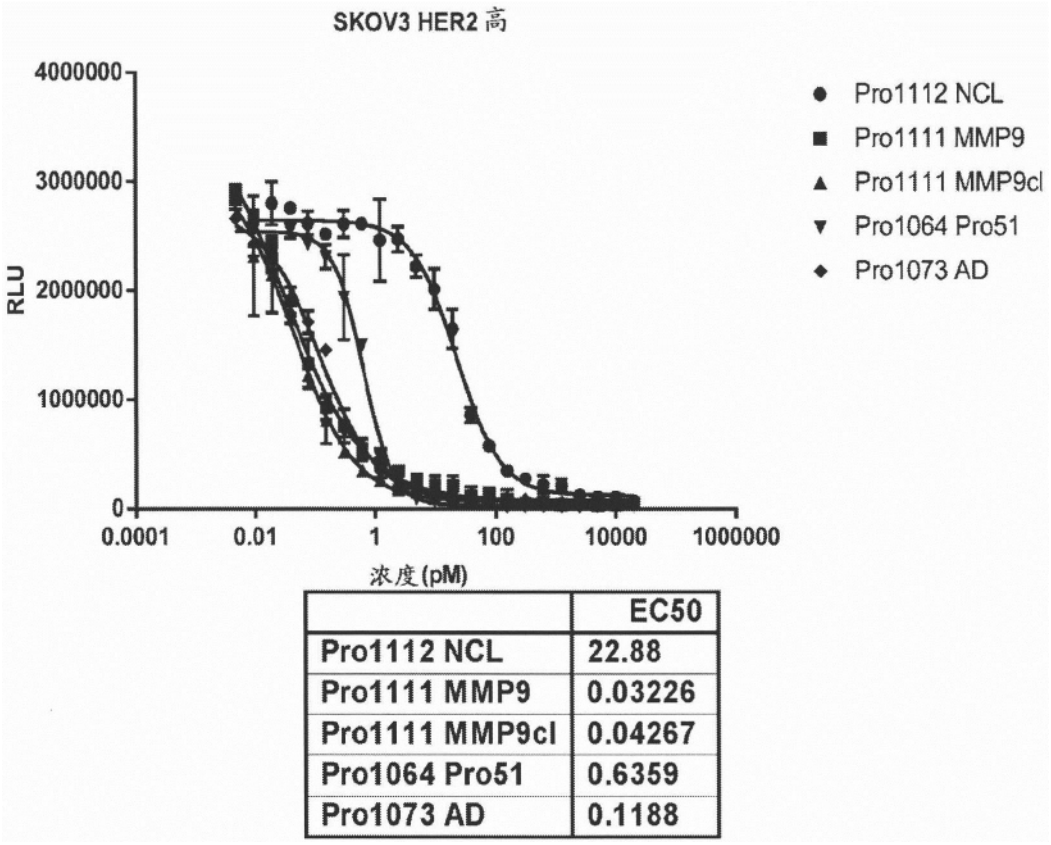
	EC50
Pro1112 NCL	29.72
Pro1111 MMP9	10.7
Pro1111 MMP9cl	0.2613
Pro1064 Pro51	1.341
Pro1073 AD	0.4876

图29B



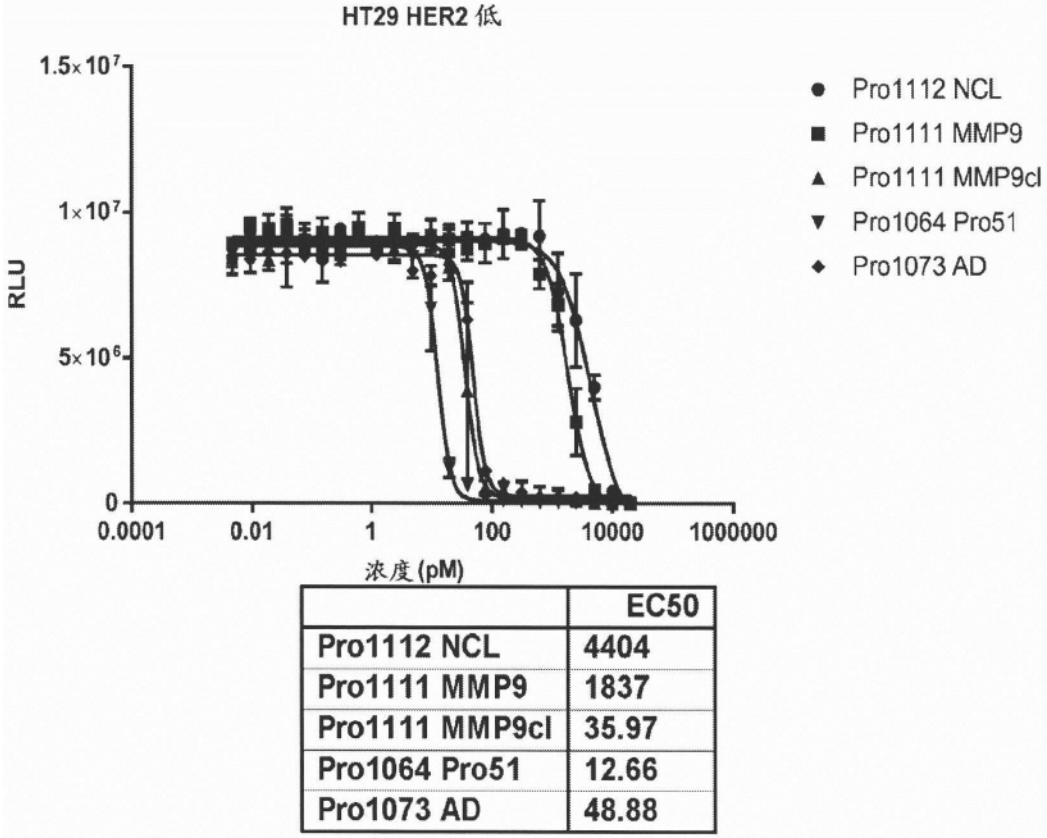
	EC50
Pro1112 NCL	
Pro1111 MMP9	约2345311666901
Pro1111 MMP9cl	182533
Pro1064 Pro51	15762
Pro1073 AD	6477

图29C



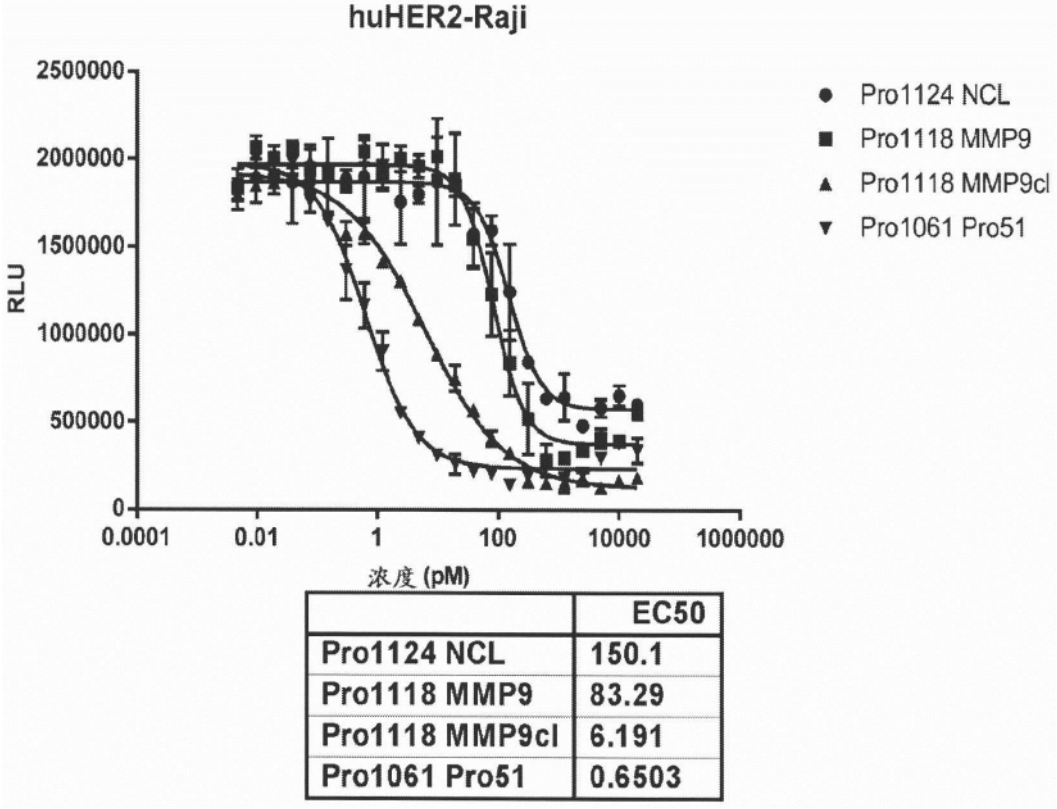
	EC50
Pro1112 NCL	22.88
Pro1111 MMP9	0.03226
Pro1111 MMP9cl	0.04267
Pro1064 Pro51	0.6359
Pro1073 AD	0.1188

图29D



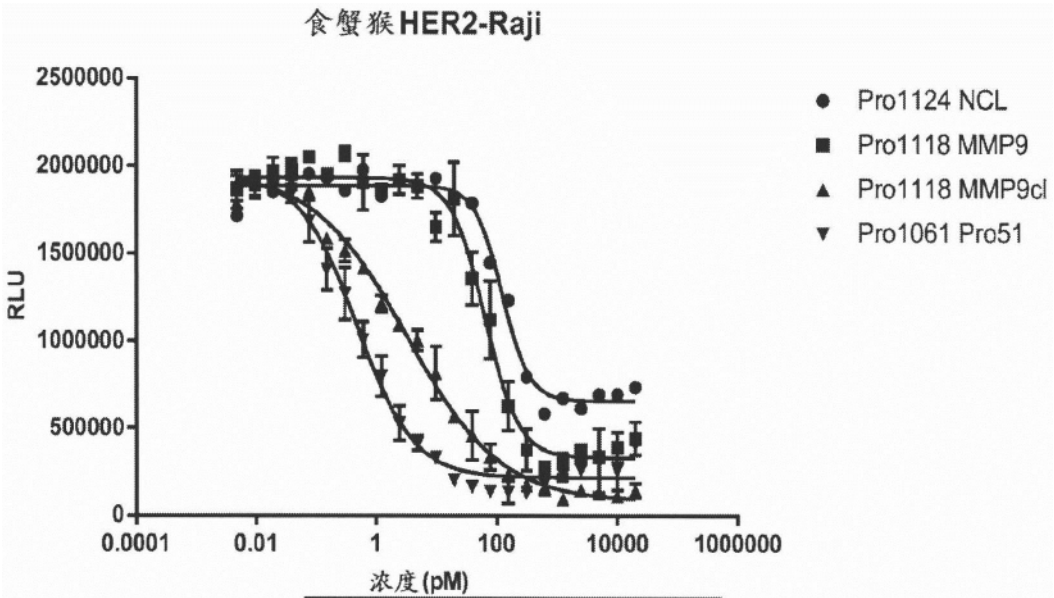
	EC50
Pro1112 NCL	4404
Pro1111 MMP9	1837
Pro1111 MMP9cl	35.97
Pro1064 Pro51	12.66
Pro1073 AD	48.88

图29E



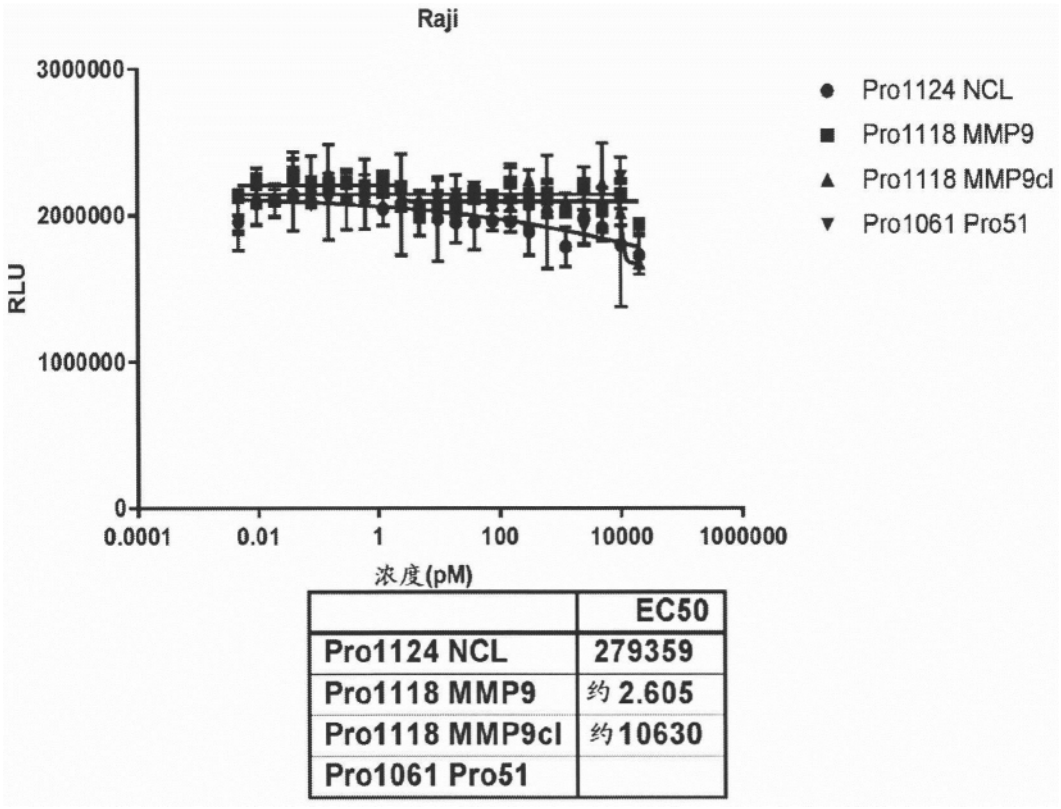
	EC50
Pro1124 NCL	150.1
Pro1118 MMP9	83.29
Pro1118 MMP9cl	6.191
Pro1061 Pro51	0.6503

图30A



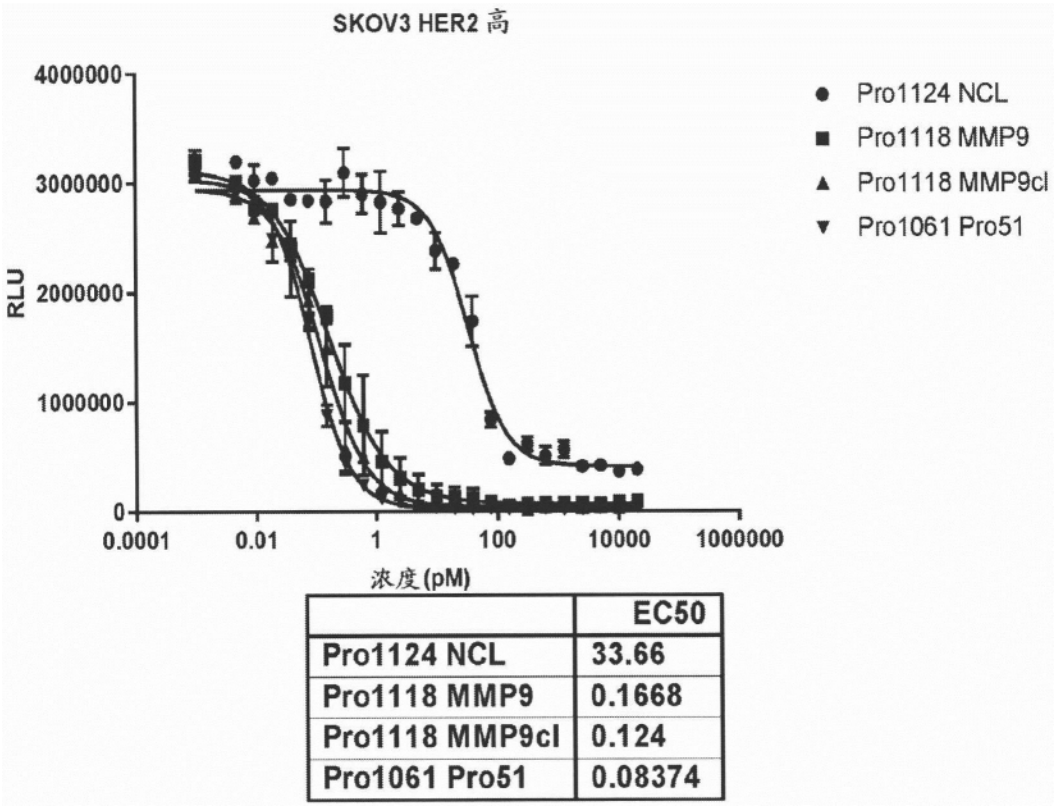
	EC50
Pro1124 NCL	122.5
Pro1118 MMP9	64.39
Pro1118 MMP9cl	3.295
Pro1061 Pro51	0.4918

图30B



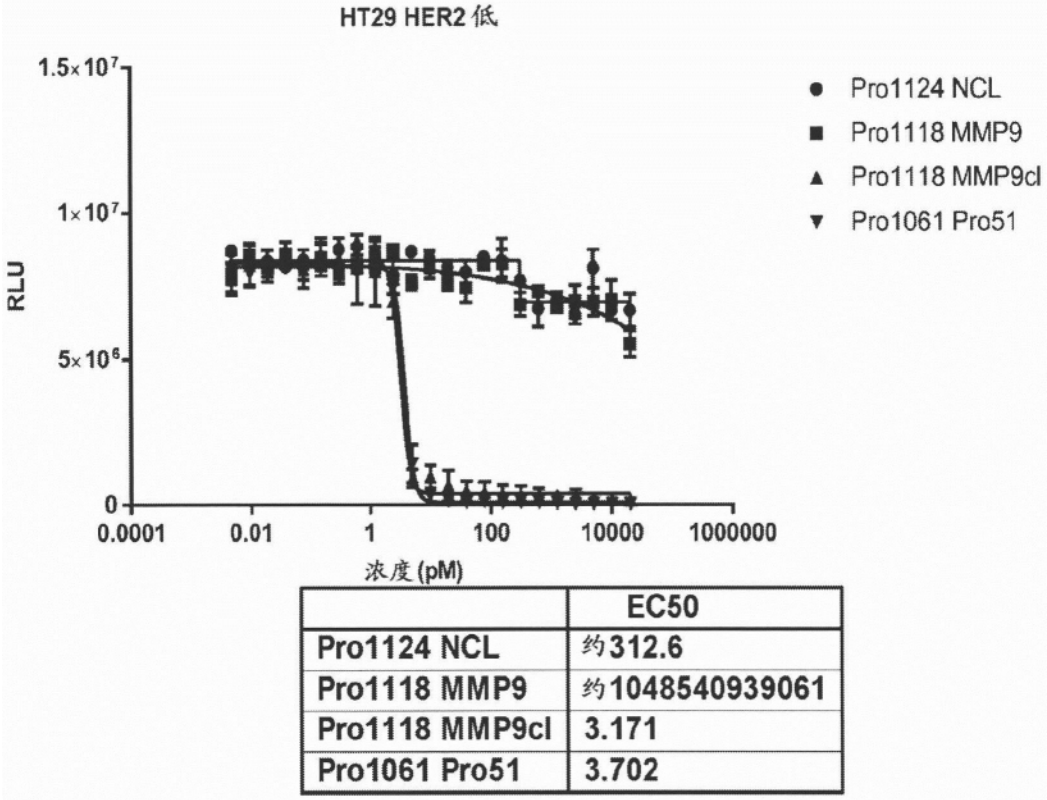
	EC50
Pro1124 NCL	279359
Pro1118 MMP9	约 2.605
Pro1118 MMP9cl	约10630
Pro1061 Pro51	

图30C



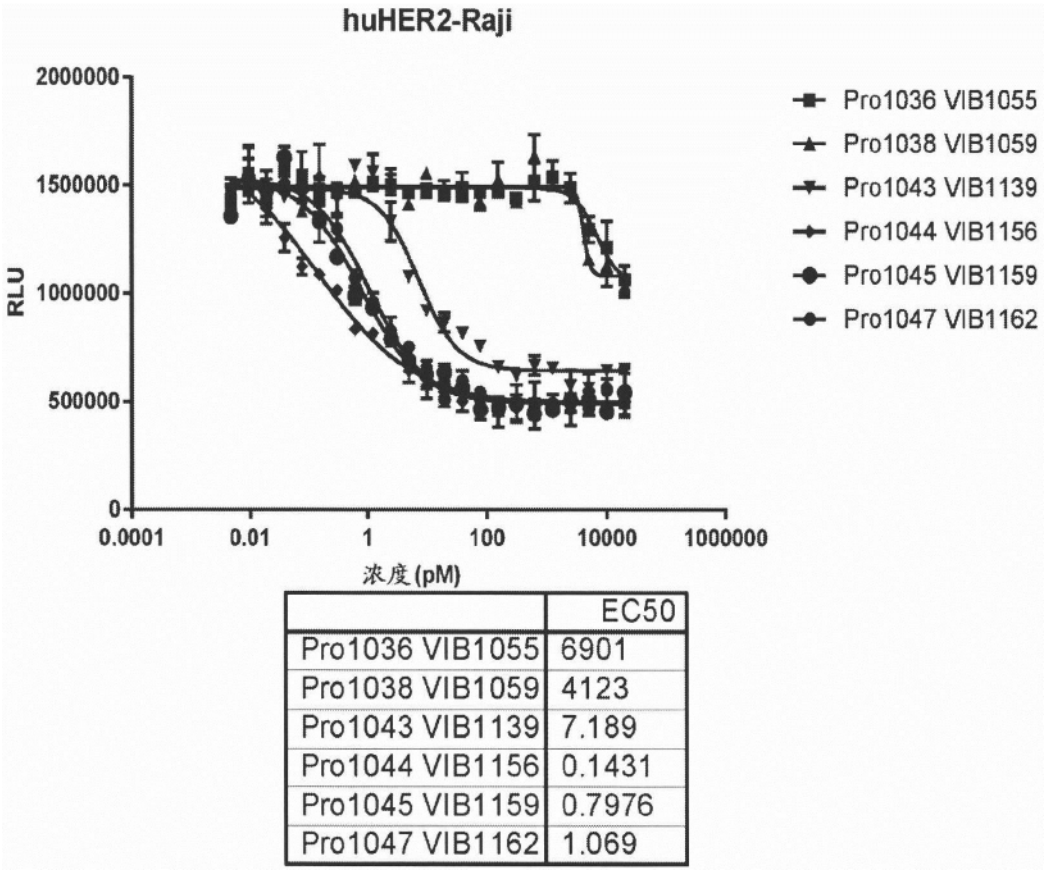
	EC50
Pro1124 NCL	33.66
Pro1118 MMP9	0.1668
Pro1118 MMP9cl	0.124
Pro1061 Pro51	0.08374

图30D



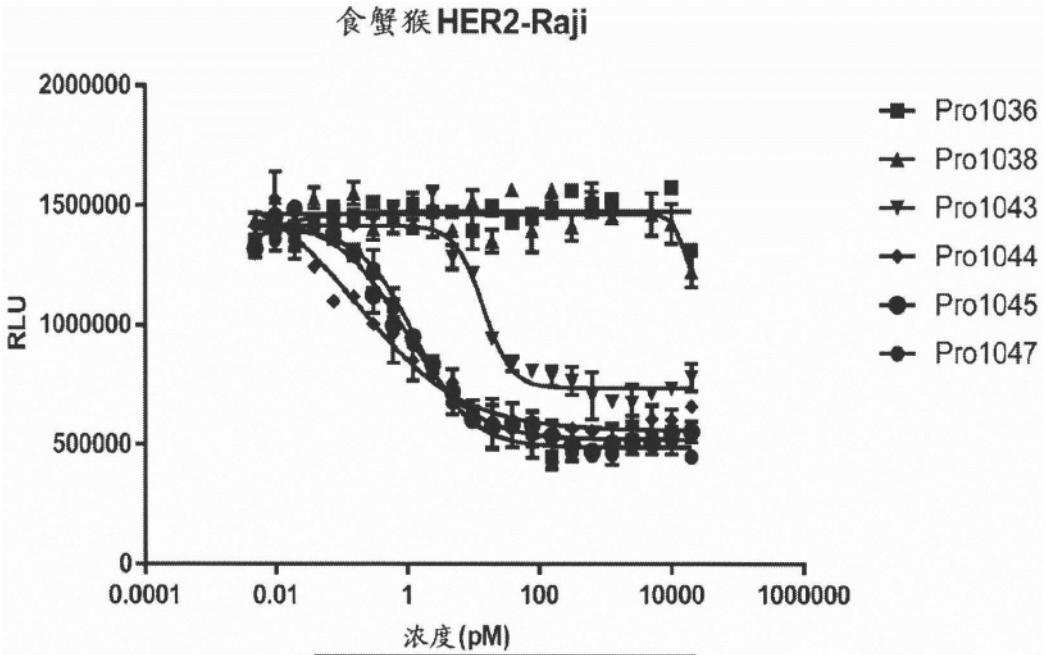
	EC50
Pro1124 NCL	约312.6
Pro1118 MMP9	约1048540939061
Pro1118 MMP9cl	3.171
Pro1061 Pro51	3.702

图30E



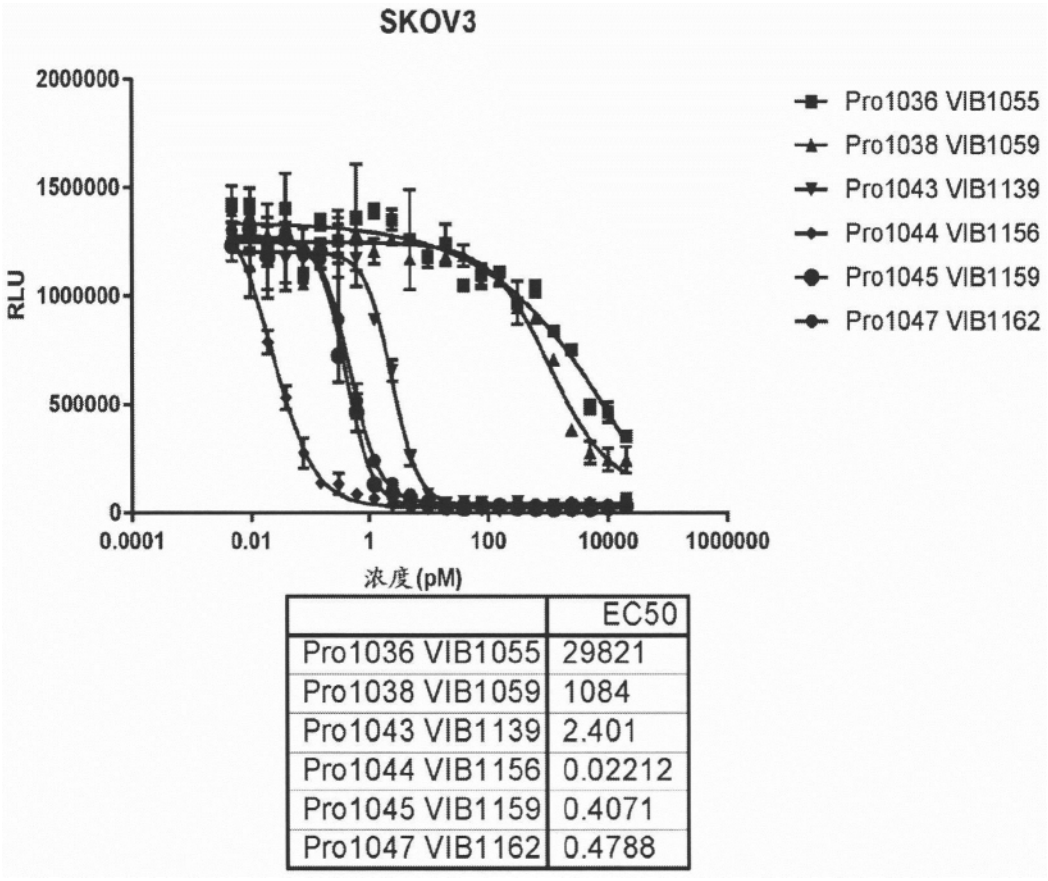
	EC50
Pro1036 VIB1055	6901
Pro1038 VIB1059	4123
Pro1043 VIB1139	7.189
Pro1044 VIB1156	0.1431
Pro1045 VIB1159	0.7976
Pro1047 VIB1162	1.069

图31A



	EC50
Pro1036	约8.307e-005
Pro1038	16608
Pro1043	14.21
Pro1044	0.1837
Pro1045	0.8972
Pro1047	1.348

图31B



	EC50
Pro1036 VIB1055	29821
Pro1038 VIB1059	1084
Pro1043 VIB1139	2.401
Pro1044 VIB1156	0.02212
Pro1045 VIB1159	0.4071
Pro1047 VIB1162	0.4788

图31C

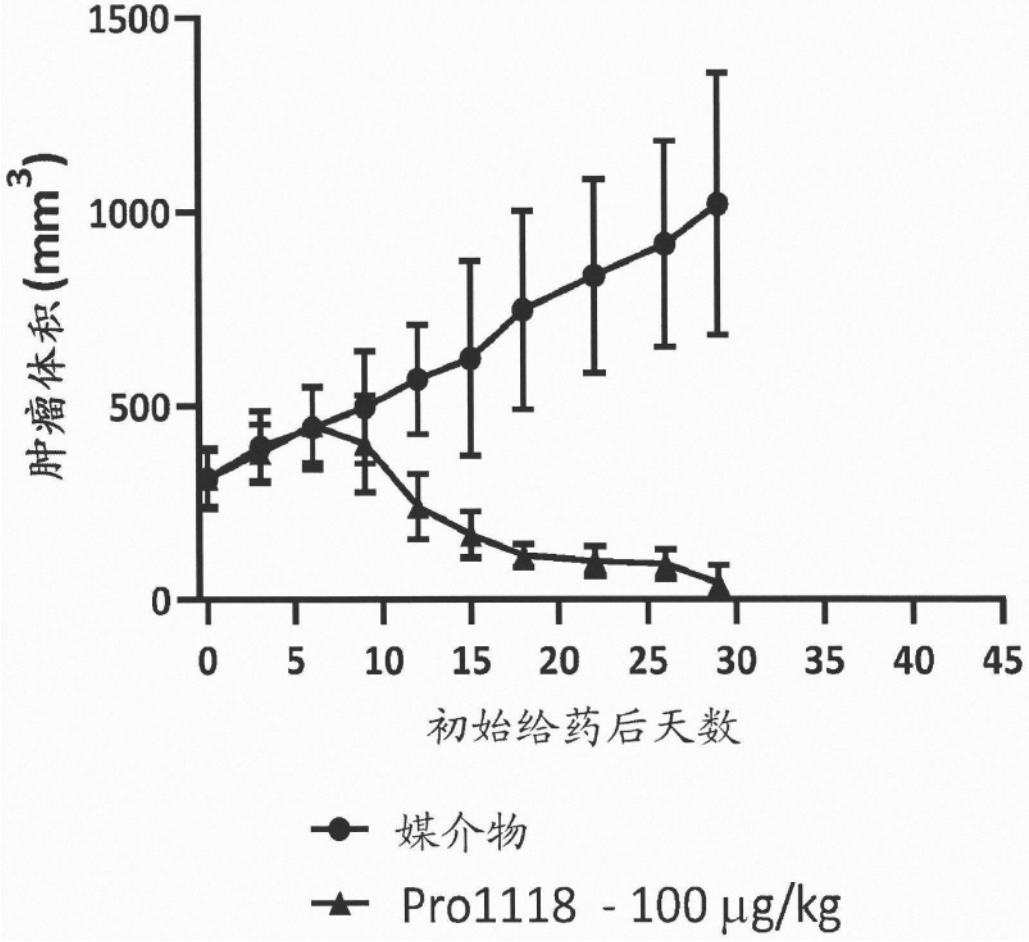

1500
1000
500
0
肿瘤体积 (mm3)
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45
初始给药后天数
媒介物
Pro1118 - 100 μg/kg

图32

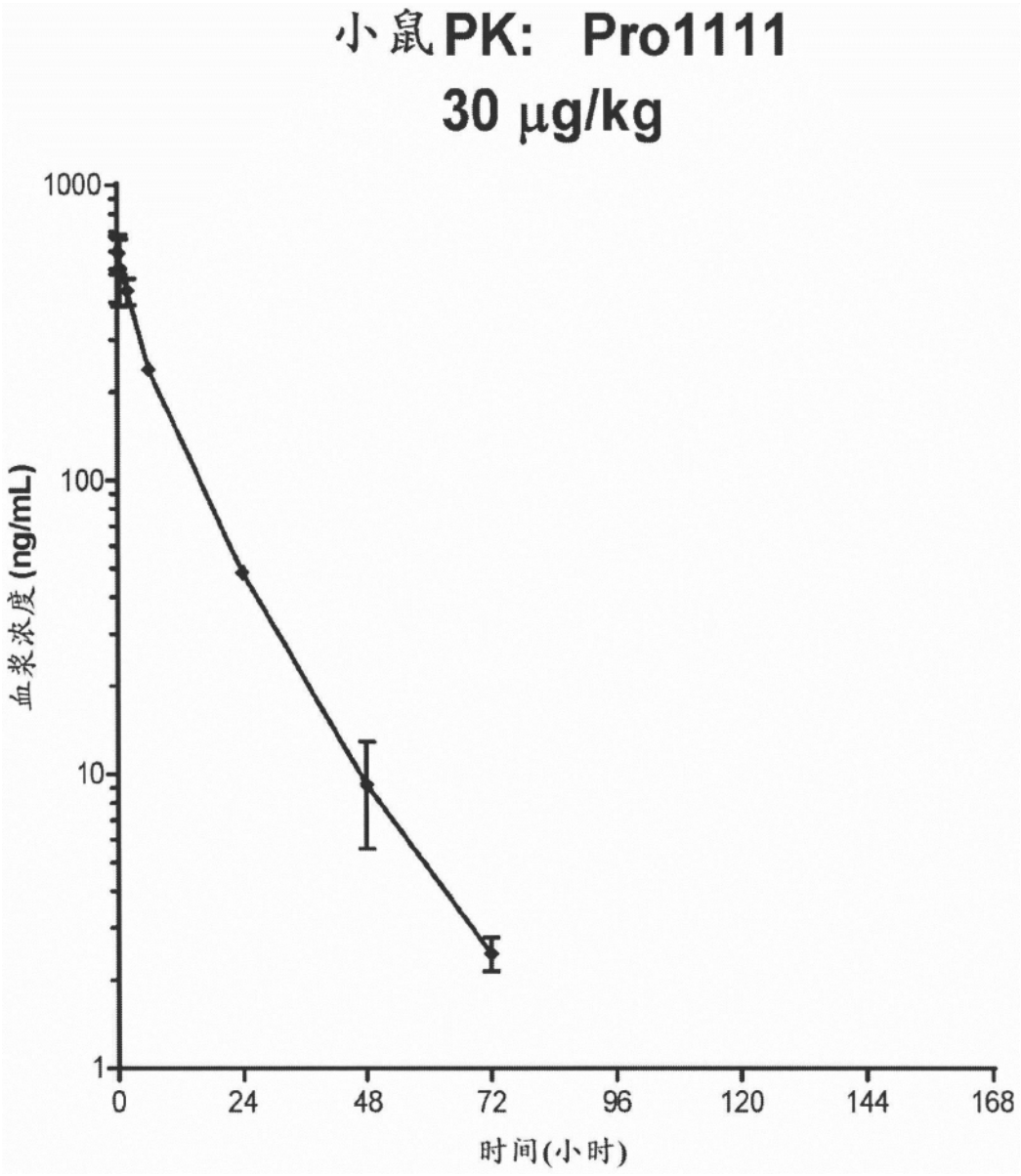

小鼠PK: Pro1111
30 μg/kg
1000
100
10
1
血浆浓度(ng/mL)
0
24
48
72
96
120
144
168
时间(小时)

图33

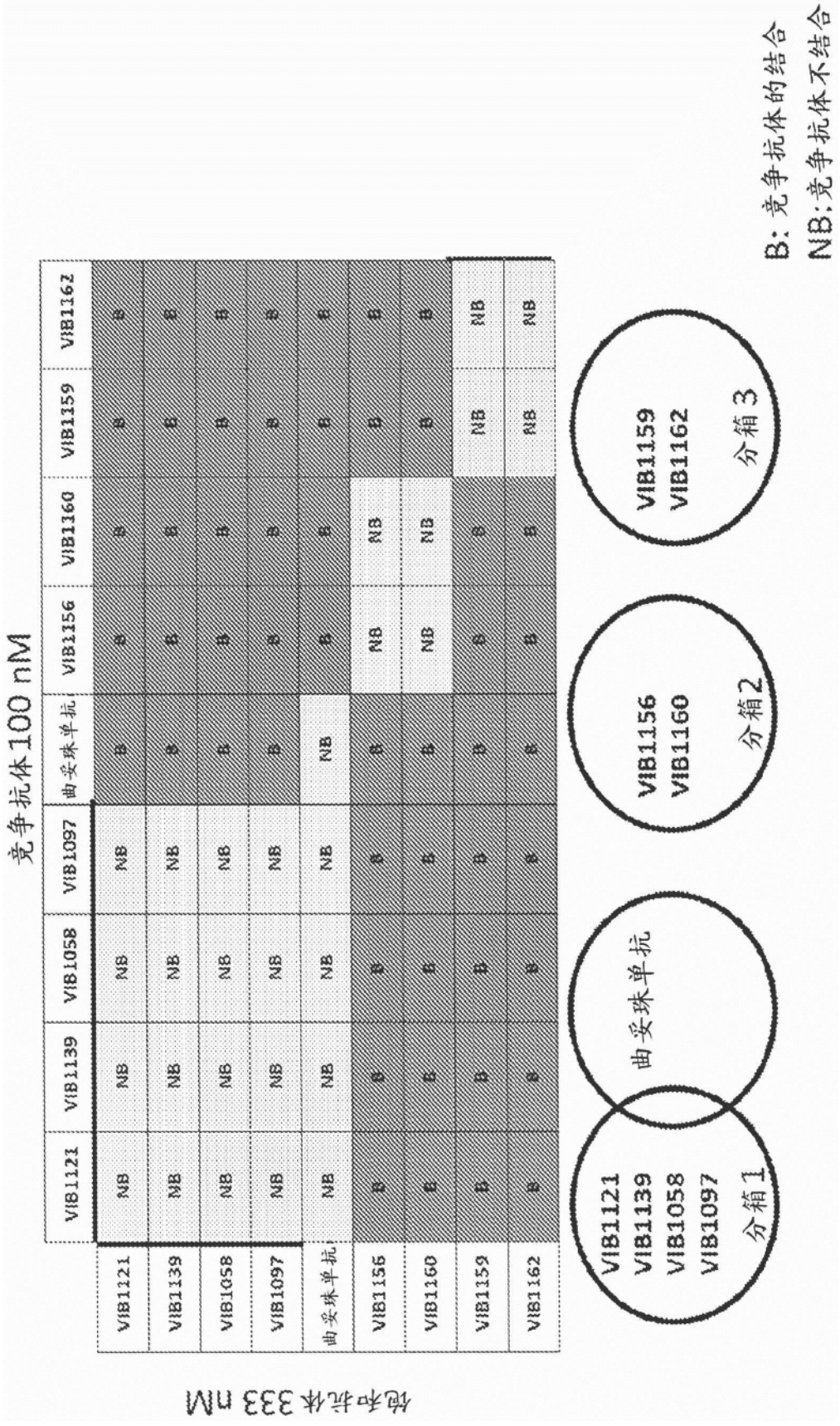

包衣抗体 333 nM
竞争抗体100 nM
VIB1121
VIB1139
VIB1058
VIB1097
曲妥珠单抗
VIB1156
VIB1160
VIB1159
VIB1162
B
NB
VIB1121
VIB1139
VIB1058
VIB1097
分箱1
曲妥珠单抗
VIB1156
VIB1160
分箱2
VIB1159
VIB1162
分箱3
B: 竞争抗体的结合
NB:竞争抗体不结合

图34

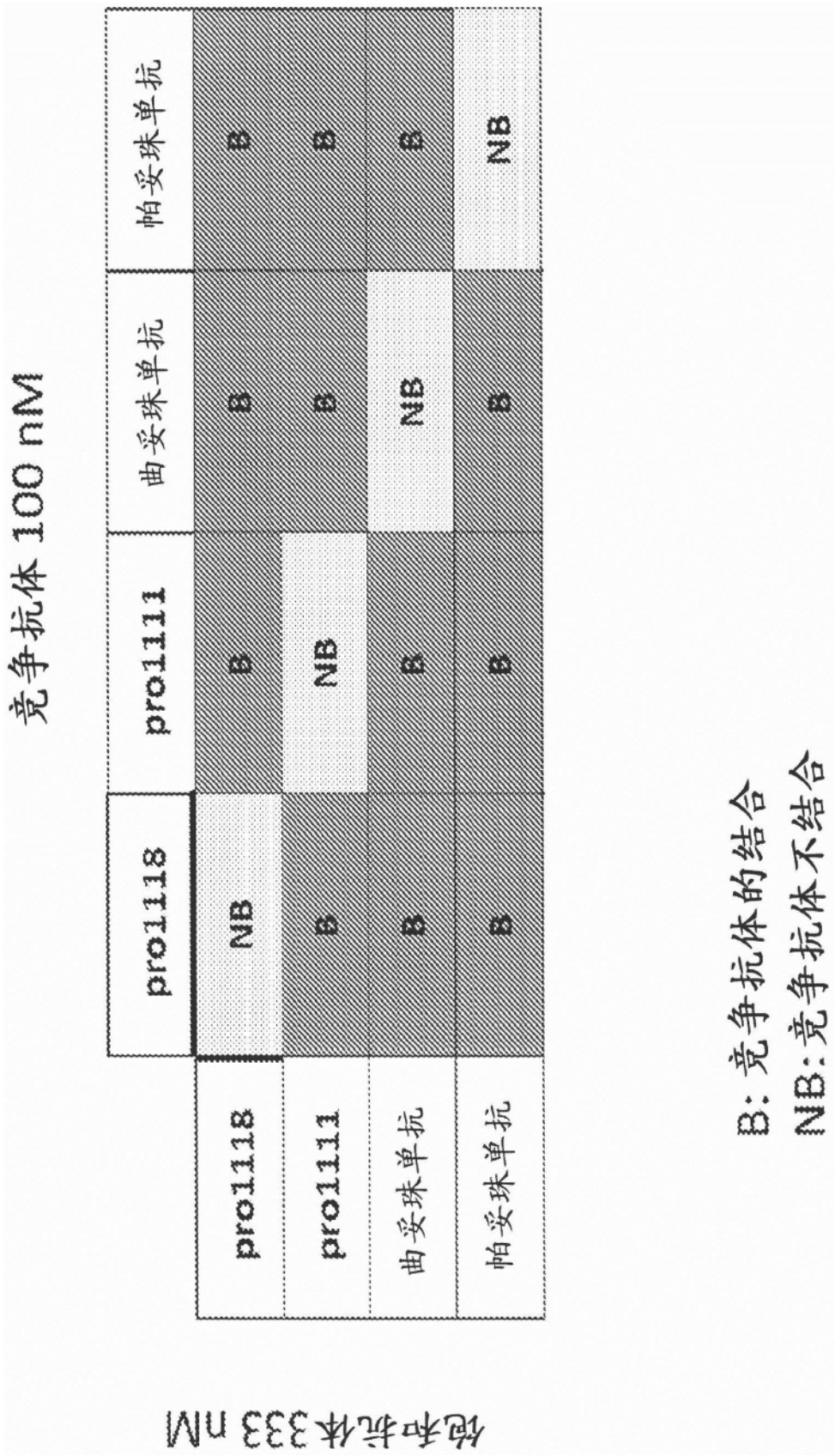
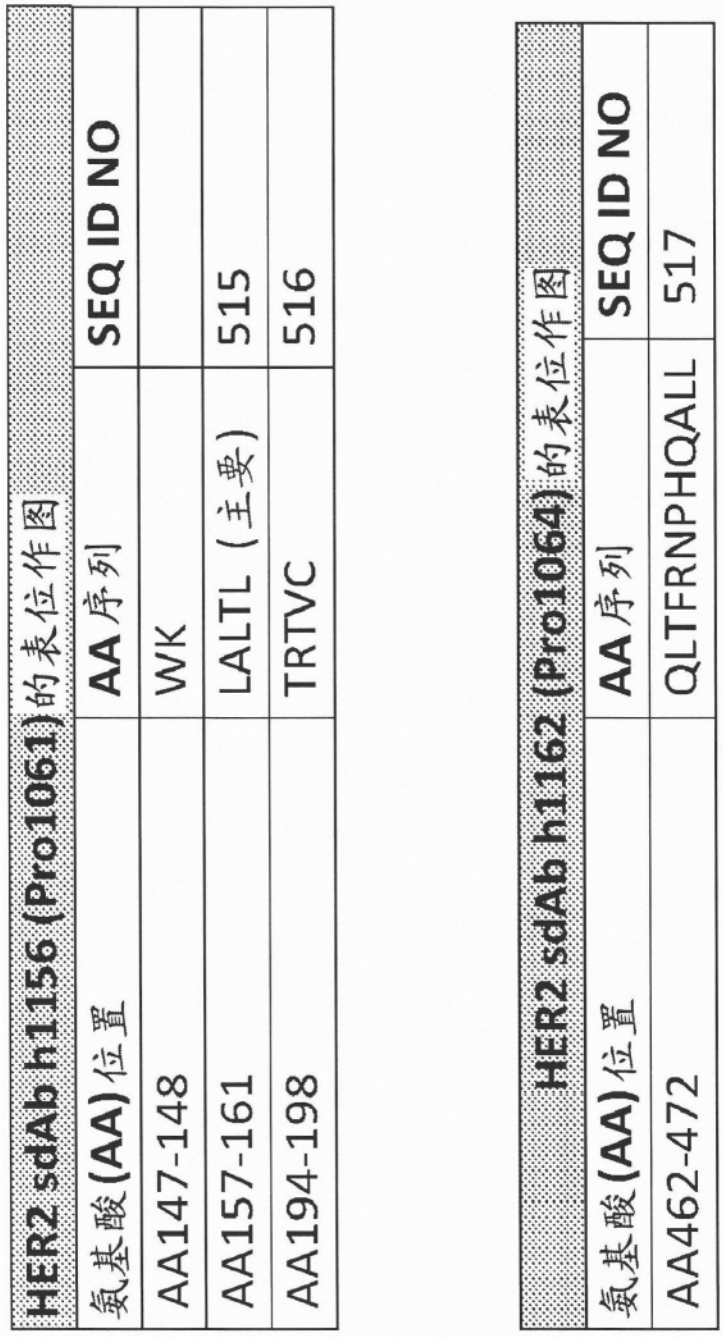

竞争抗体 100 nM
pro1118
pro1111
曲妥珠单抗
帕妥珠单抗
pro1118
pro1111
曲妥珠单抗
帕妥珠单抗
NB
B
B
B
B
NB
B
B
B
B
B
B
B
NB
B: 竞争抗体的结合
NB: 竞争抗体不结合

图35



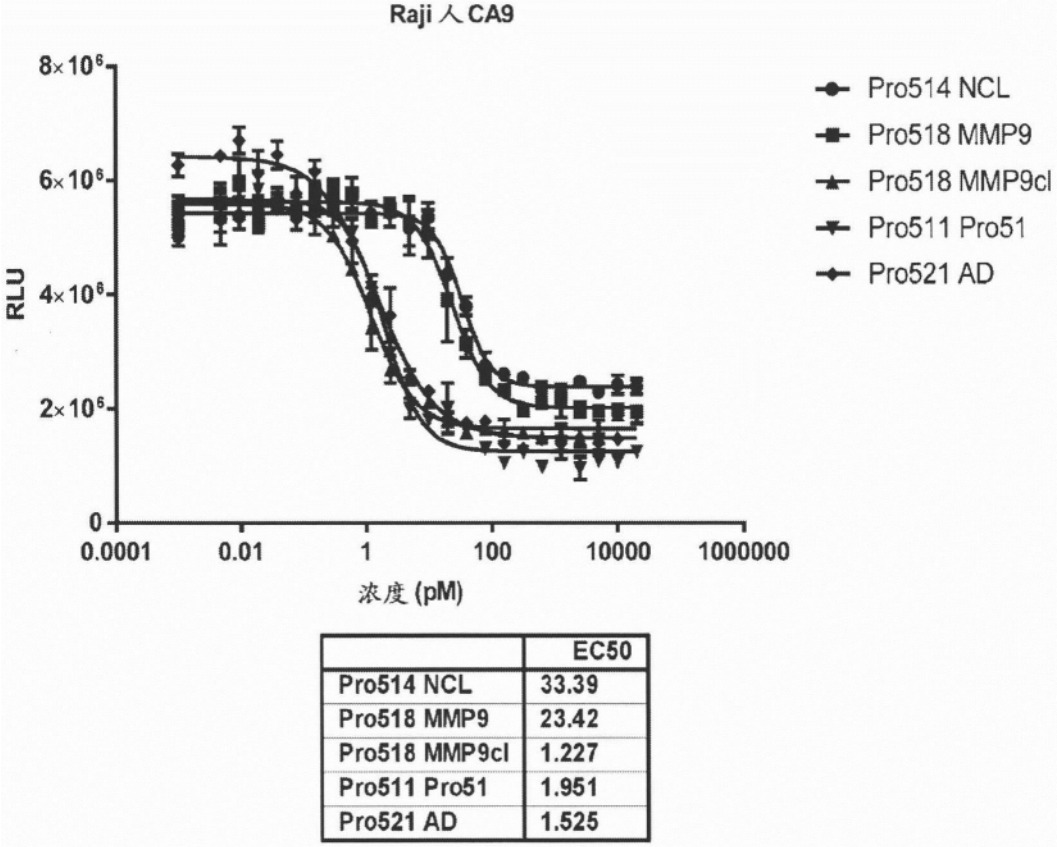
HER2 sdAb h1156 (Pro1061)的表位作图		
氨基酸(AA)位置	AA序列	SEQ ID NO
AA147-148	WK	
AA157-161	LALTL（主要）	515
AA194-198	TRTVC	516

HER2 sdAb h1162 (Pro1064)的表位作图		
氨基酸(AA)位置	AA序列	SEQ ID NO
AA462-472	QLTFRNPHQALL	517

图36

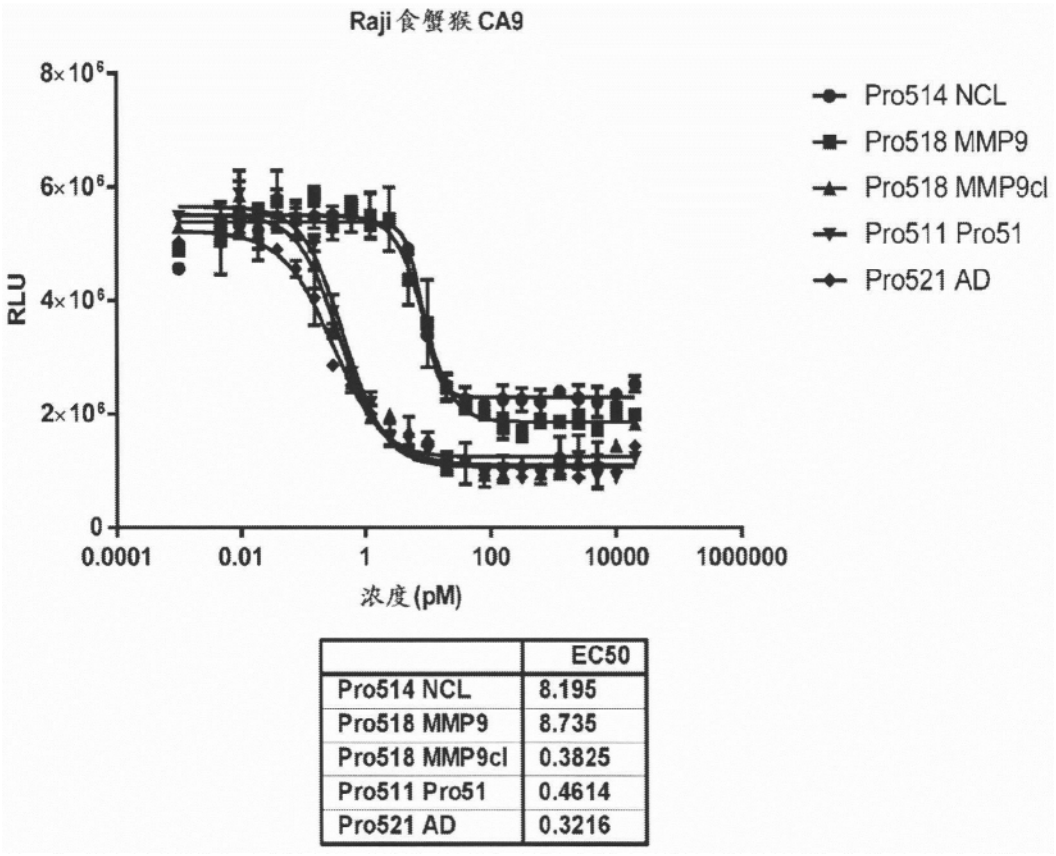
		人HER2			食蟹猴HER2			小鼠HER2		
sdAb	Prodent	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
1055	Pro1036	3.20E+05	1.70E-02	53.1	3.49E+05	2.44E-02	69.9	nb		
1058	Pro1037	2.15E+05	1.85E-03	8.6	3.15E+05	3.06E-03	9.7	nb		
1059	Pro1038	3.86E+05	8.86E-03	23.0	2.40E+05	2.04E-02	85.0	nb		
1091	Pro1039	1.19E+05	7.12E-04	6.0	1.36E+05	1.15E-03	8.5	nb		
1092	Pro1040	1.13E+05	3.49E-04	3.1	1.19E+05	5.39E-04	4.5	nb		
1097	Pro1041	1.20E+05	3.04E-04	2.5	1.46E+05	6.30E-04	4.3	nb		
1121	Pro1042	2.26E+05	8.53E-04	3.8	1.77E+05	8.09E-04	4.6	nb		
1139	Pro1043	3.08E+05	1.71E-03	5.6	3.91E+05	2.61E-03	6.7	nb		
1156	Pro1044	9.44E+03	6.24E-05	6.6	1.07E+04	9.58E-05	9.0	nb		
1159	Pro1045	2.57E+04	4.63E-04	18.0	2.68E+04	4.55E-04	17.0	4.20E+04	3.36E-03	80.0
1160	Pro1046	3.00E+03	1.70E-04	56.7	1.57E+04	1.69E-04	10.8	nb		
1162	Pro1047	1.52E+05	3.26E-03	21.4	1.72E+05	3.64E-03	21.2	1.36E+06	7.35E-02	54.0
h1058	Pro1056	2.28E+05	4.82E-03	21.1	2.83E+05	8.27E-03	29.2	nb		
h1092	Pro1057	1.11E+05	4.71E-04	4.2	1.68E+05	8.52E-04	5.1	nb		
h1097	Pro1058	1.05E+05	5.42E-04	5.2	2.05E+05	1.25E-03	6.1	nb		
h1121	Pro1059	3.09E+05	2.99E-03	9.7	3.02E+05	2.79E-03	9.2	nb		
h1139	Pro1060	3.12E+05	2.29E-03	7.3	5.16E+05	3.84E-03	7.4	nb		
h1156	Pro1061	1.66E+05	<1.0e-7	<0.01	1.88E+05	<1.0e-7	<0.01	nb		
h1159	Pro1062	8.41E+03	8.93E-04	106.2	2.36E+04	8.74E-04	37.0	2.71E+02	5.18E-03	19114.4
h1160	Pro1063	9.90E+03	4.22E-04	42.6	1.14E+04	5.10E-04	44.7	nb		
h1162	Pro1064	1.74E+05	3.99E-03	22.9	2.14E+05	4.67E-03	21.8	9.66E+05	1.18E-01	122.2

图37



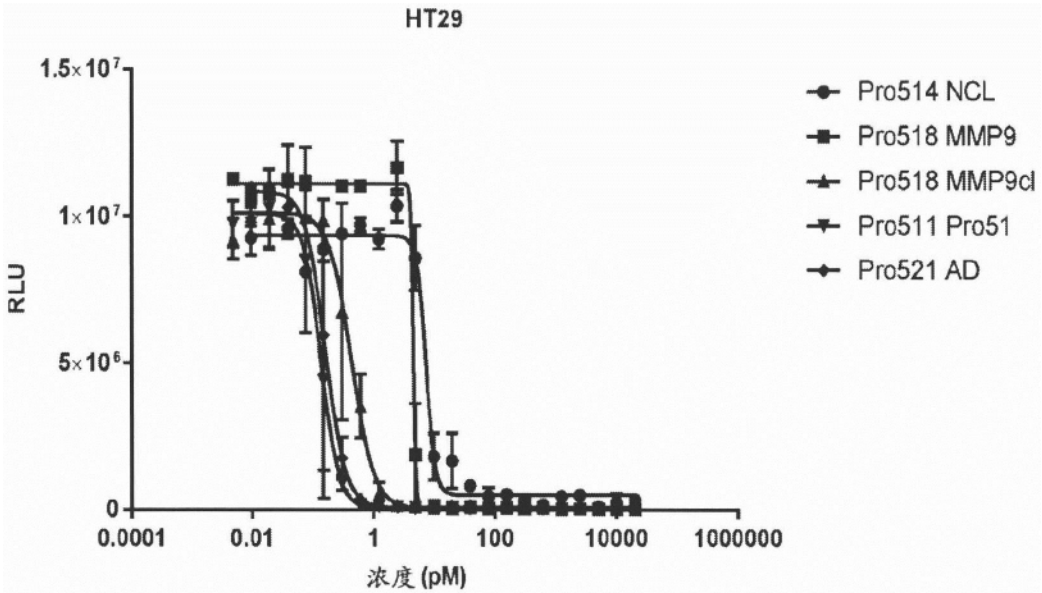
	EC50
Pro514 NCL	33.39
Pro518 MMP9	23.42
Pro518 MMP9cl	1.227
Pro511 Pro51	1.951
Pro521 AD	1.525

图38A



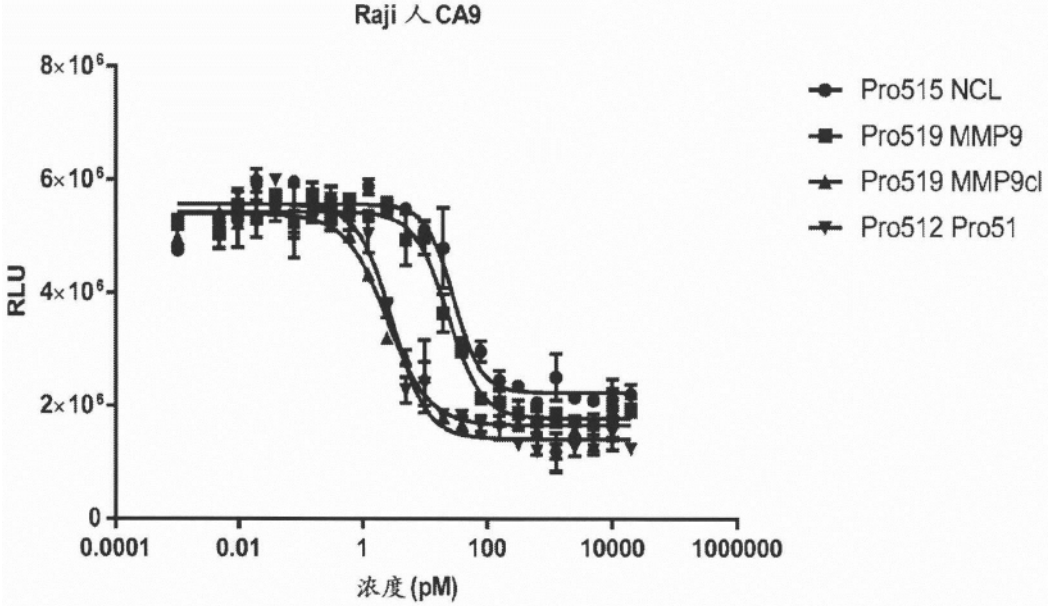
	EC50
Pro514 NCL	8.195
Pro518 MMP9	8.735
Pro518 MMP9cl	0.3825
Pro511 Pro51	0.4614
Pro521 AD	0.3216

图38B



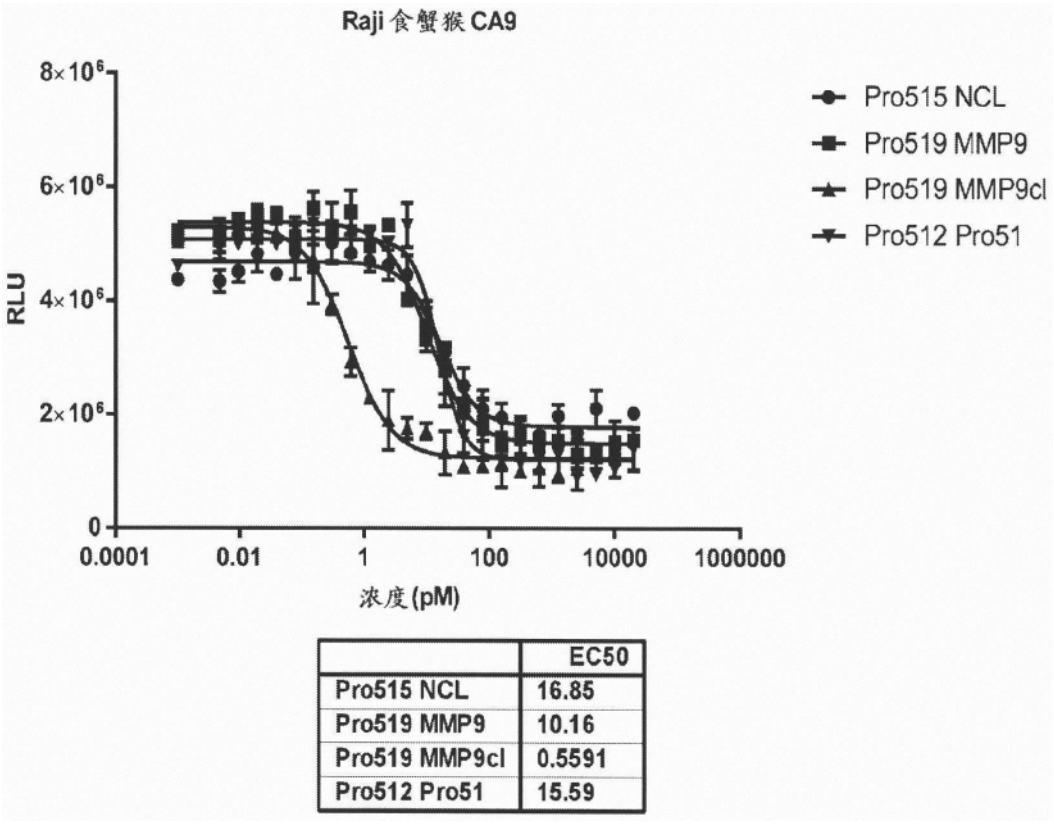
	EC50
Pro514 NCL	7.288
Pro518 MMP9	约4.544
Pro518 MMP9cl	0.4366
Pro511 Pro51	0.1392
Pro521 AD	0.163

图38C



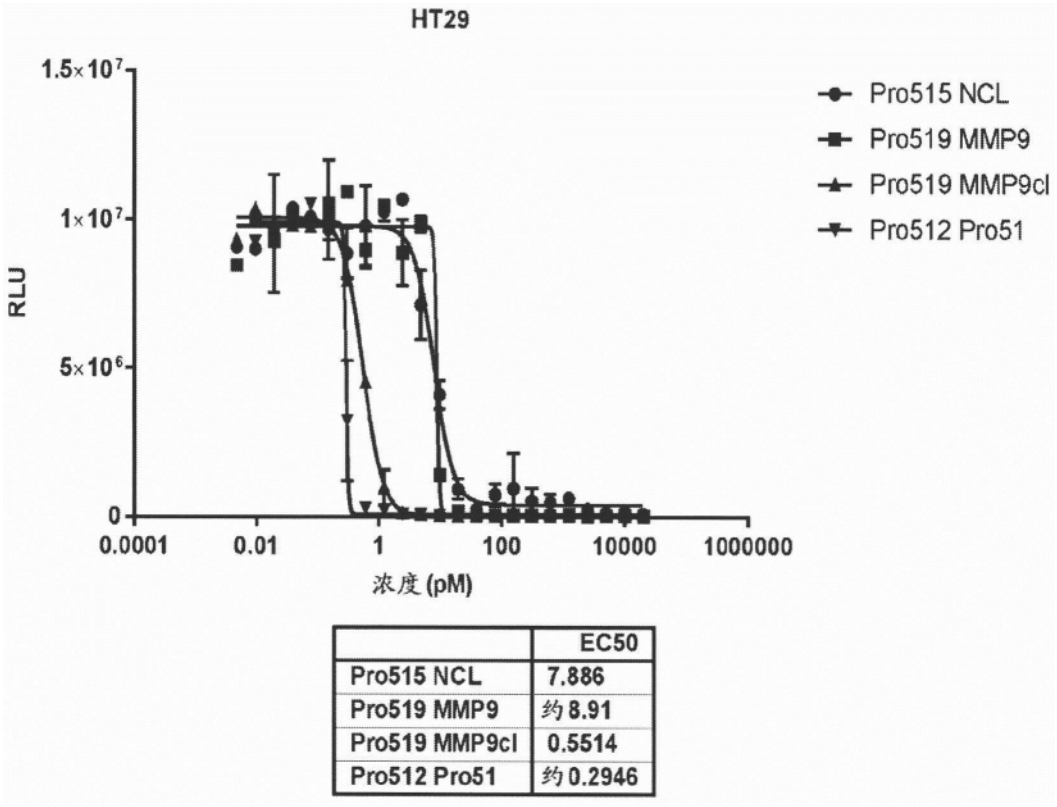
	EC50
Pro515 NCL	28.91
Pro519 MMP9	23.5
Pro519 MMP9cl	2.466
Pro512 Pro51	2.984

图39A



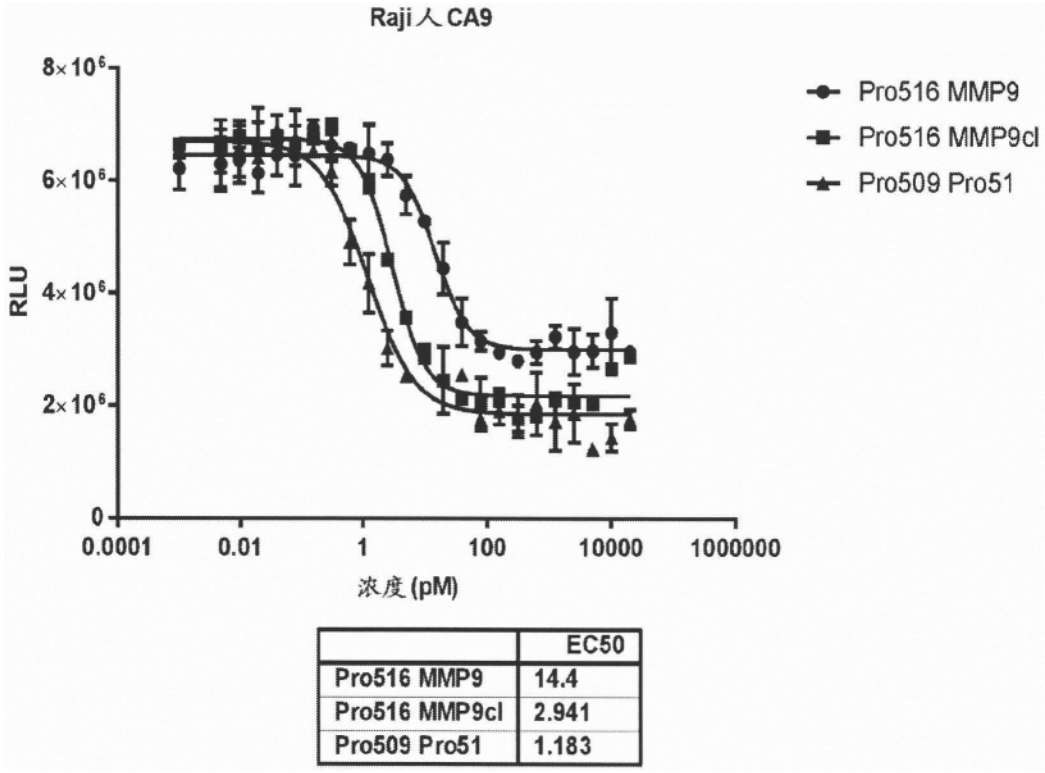
	EC50
Pro515 NCL	16.85
Pro519 MMP9	10.16
Pro519 MMP9cl	0.5591
Pro512 Pro51	15.59

图39B



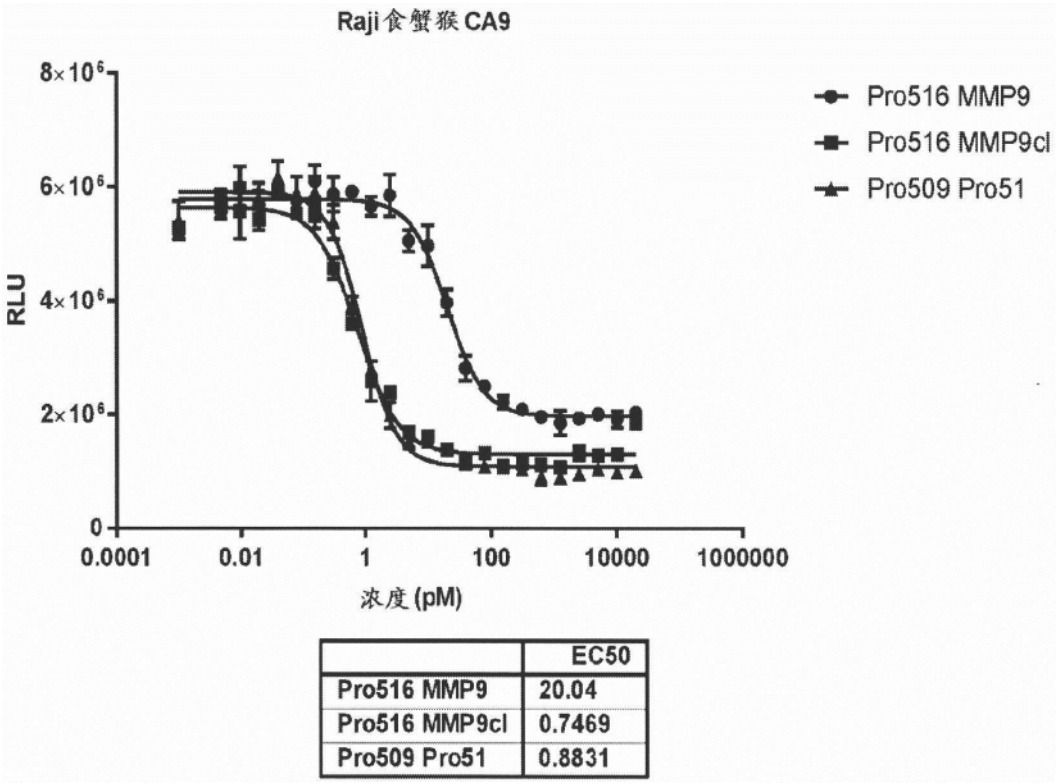
	EC50
Pro515 NCL	7.886
Pro519 MMP9	约8.91
Pro519 MMP9cl	0.5514
Pro512 Pro51	约0.2946

图39C



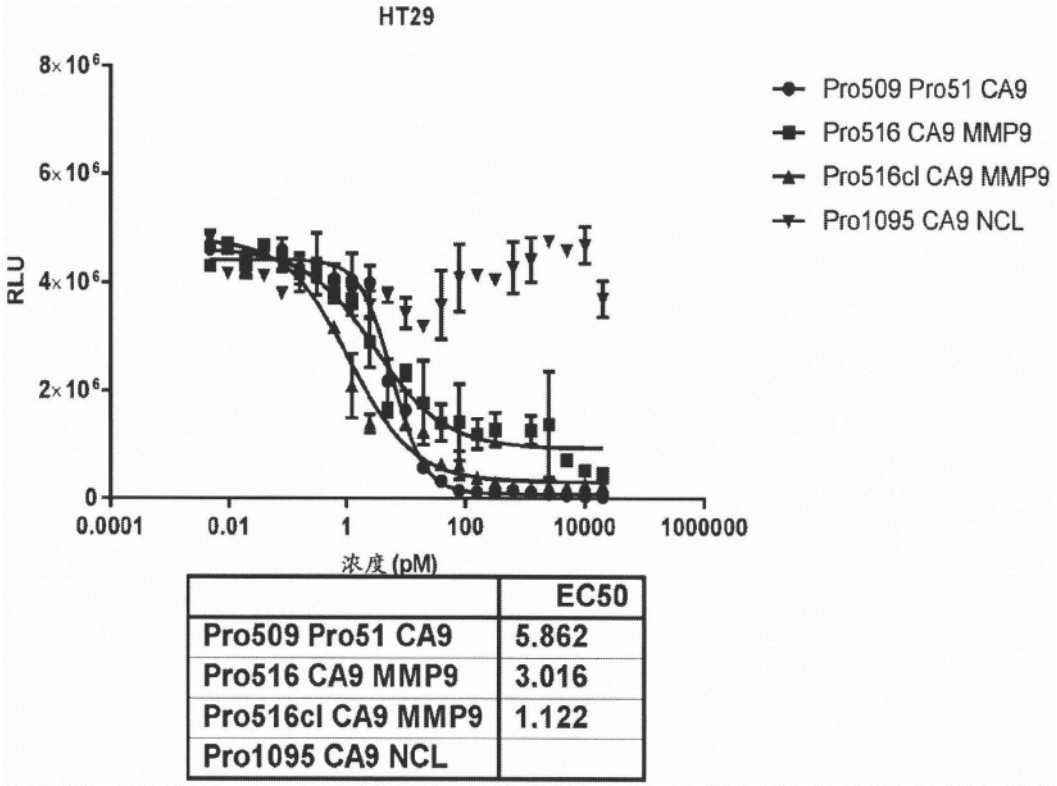
	EC50
Pro516 MMP9	14.4
Pro516 MMP9cl	2.941
Pro509 Pro51	1.183

图40A



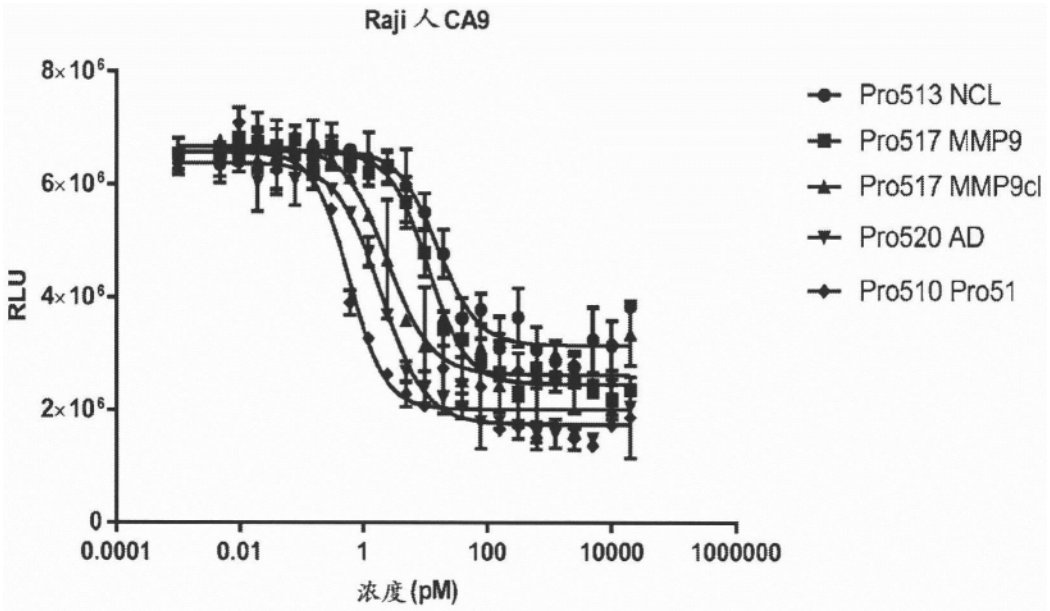
	EC50
Pro516 MMP9	20.04
Pro516 MMP9cl	0.7469
Pro509 Pro51	0.8831

图40B



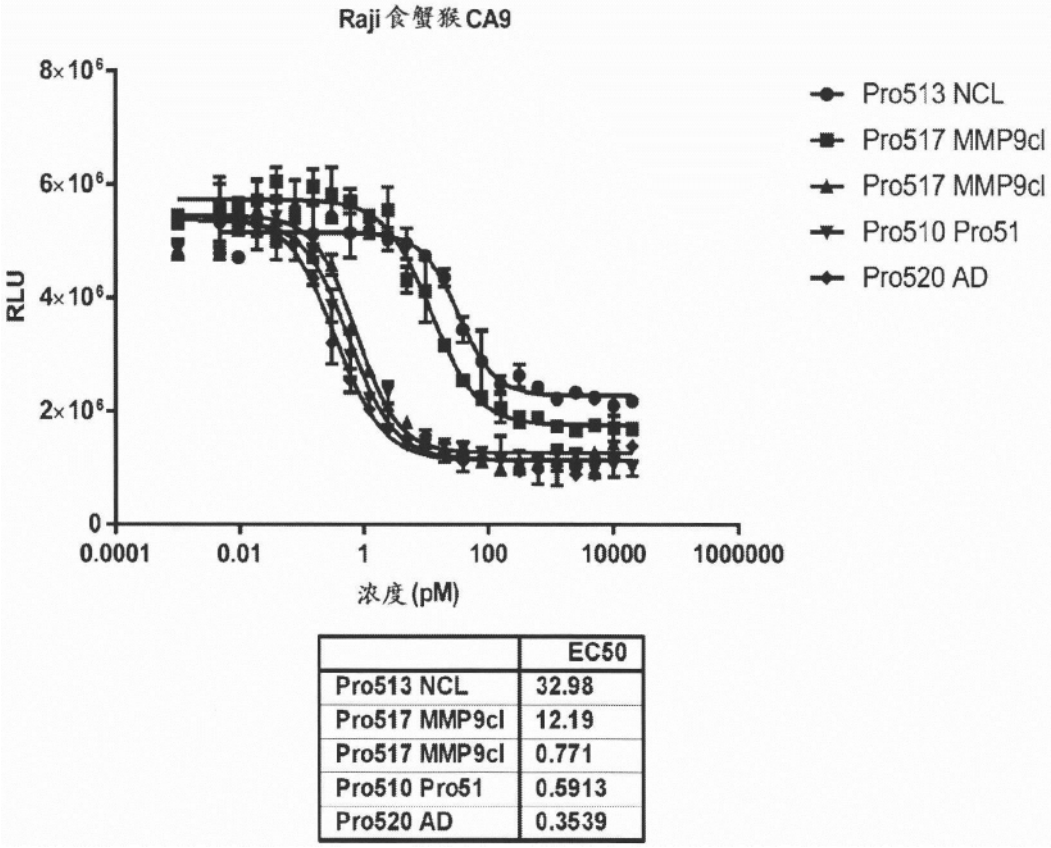
	EC50
Pro509 Pro51 CA9	5.862
Pro516 CA9 MMP9	3.016
Pro516cl CA9 MMP9	1.122
Pro1095 CA9 NCL	

图40C



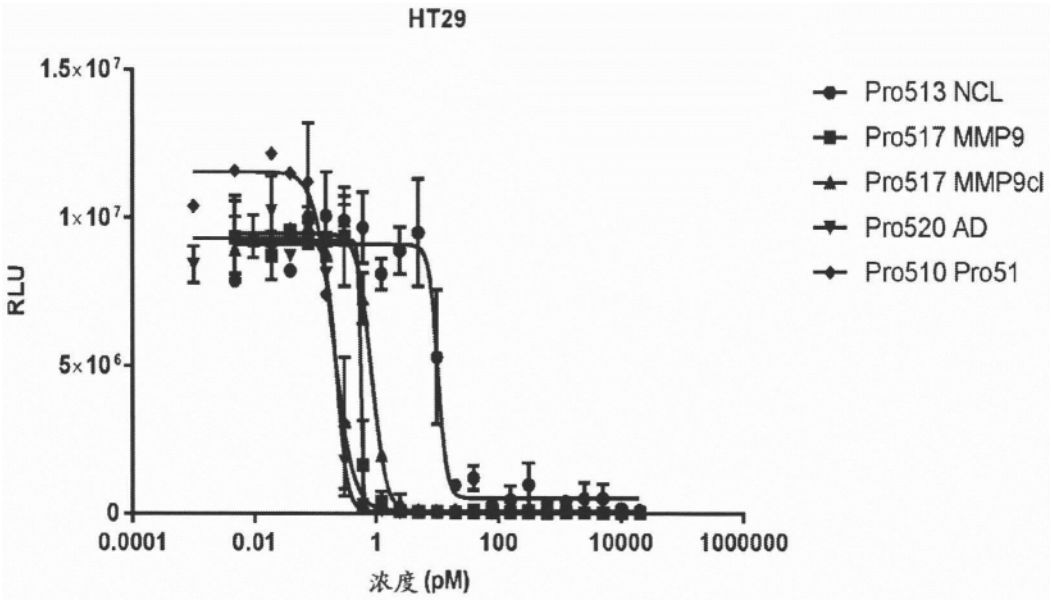
	EC50
Pro513 NCL	16.09
Pro517 MMP9	11.28
Pro517 MMP9cl	2.455
Pro520 AD	1.946
Pro510 Pro51	0.6043

图41A



	EC50
Pro513 NCL	32.98
Pro517 MMP9cl	12.19
Pro517 MMP9cl	0.771
Pro510 Pro51	0.5913
Pro520 AD	0.3539

图41B



	EC50
Pro513 NCL	10.17
Pro517 MMP9	约0.5645
Pro517 MMP9cl	0.8497
Pro520 AD	0.2265
Pro510 Pro51	0.2015

图41C

		K_D (nM)		
sdAb	Prodent	人CA9	食蟹猴CA9	小鼠CA9
407		1.0	<0.001	nb
445		2.6	3.4	nb
456		2.1	7.2	8.2
472		3.5	4.0	nb
476		1.7	2.1	nb
h445	Pro512	3.1	4.9	nb
h456	Pro509	0.7	1.1	1.4
h476	Pro510	1.6	1.2	nb

图42

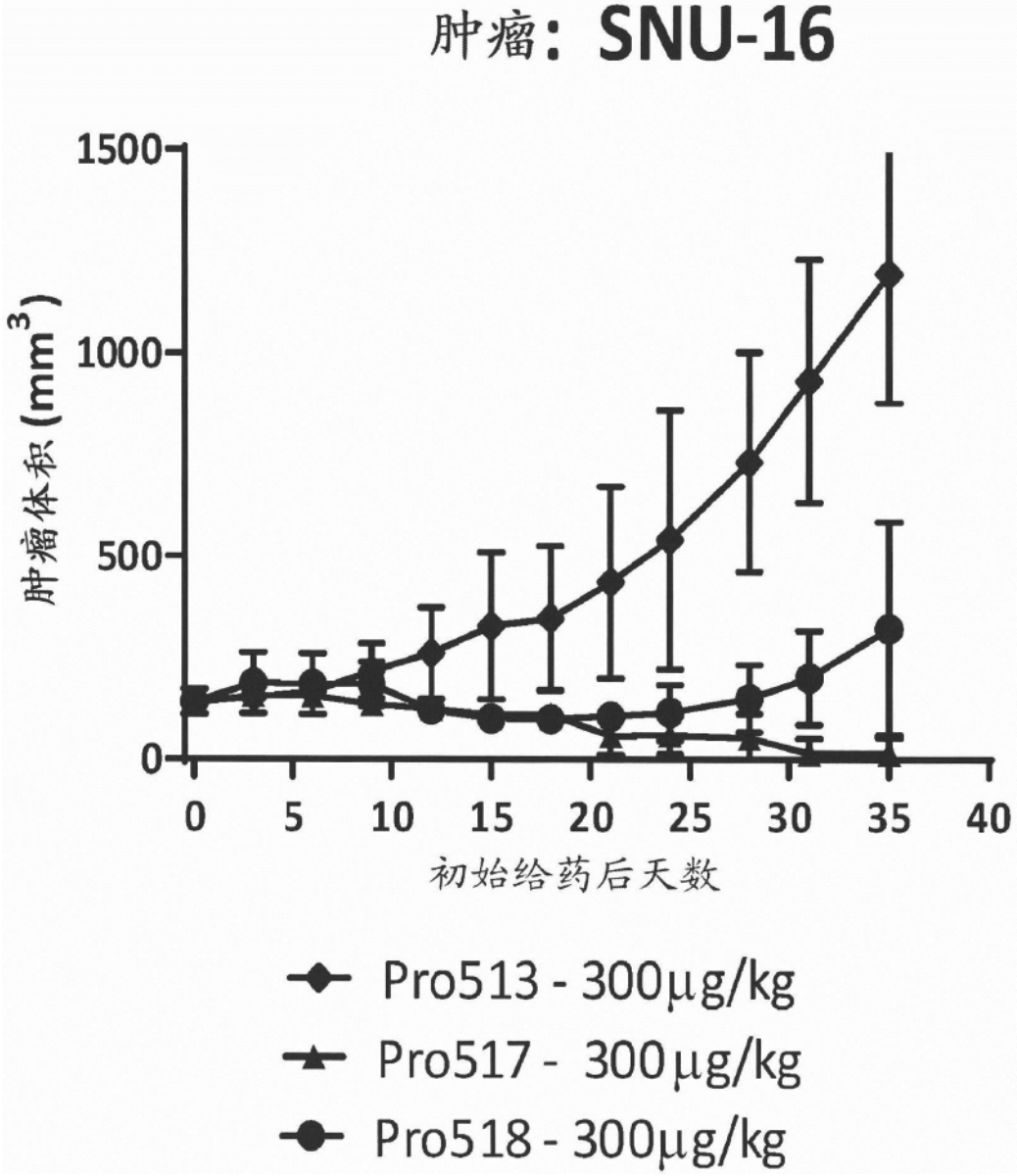

肿瘤：SNU-16
肿瘤体积 (mm3)
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
初始给药后天数
Pro513 - 300μg/kg
Pro517 - 300μg/kg
Pro518 - 300μg/kg

图43A

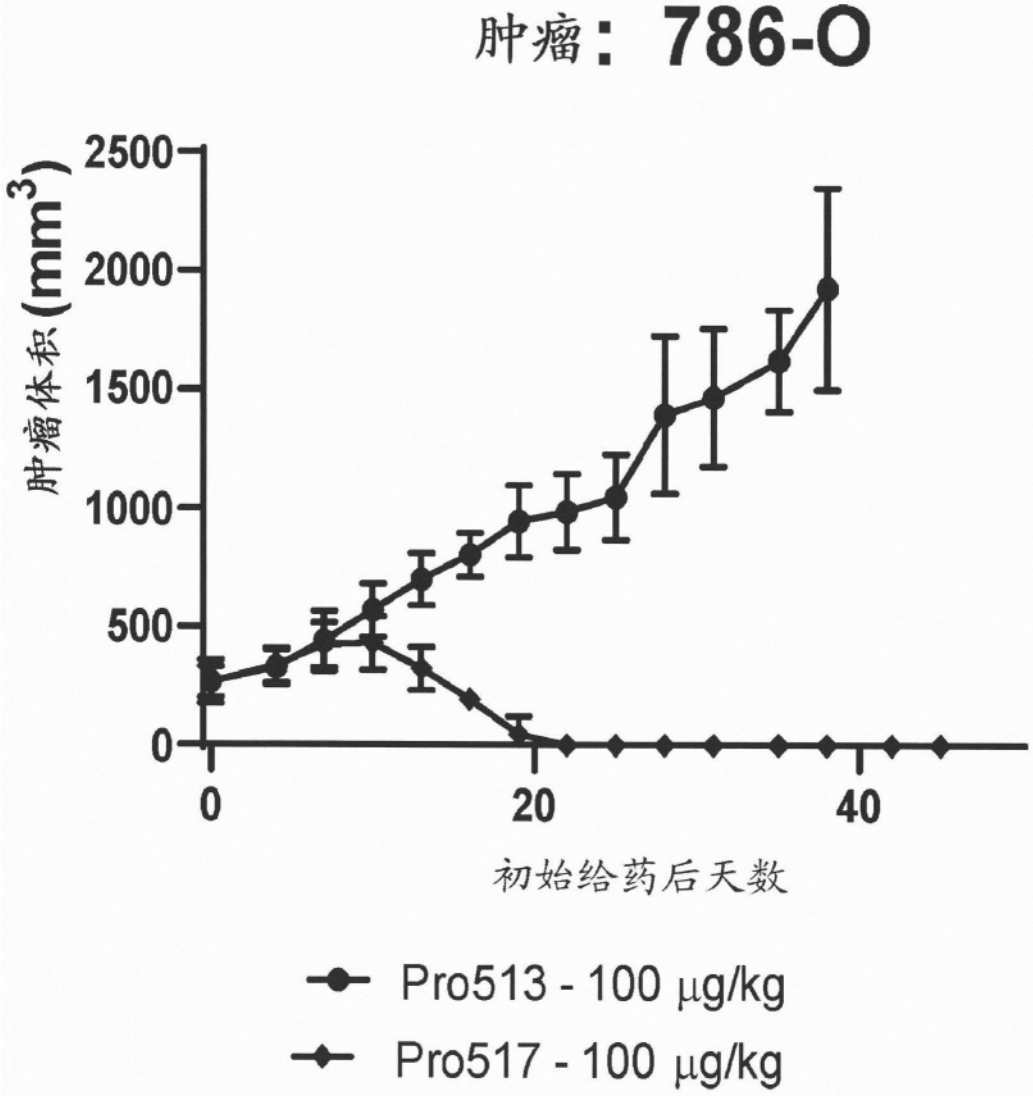

肿瘤：786-O
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
初始给药后天数
Pro513 - 100 μg/kg
Pro517 - 100 μg/kg

图43B

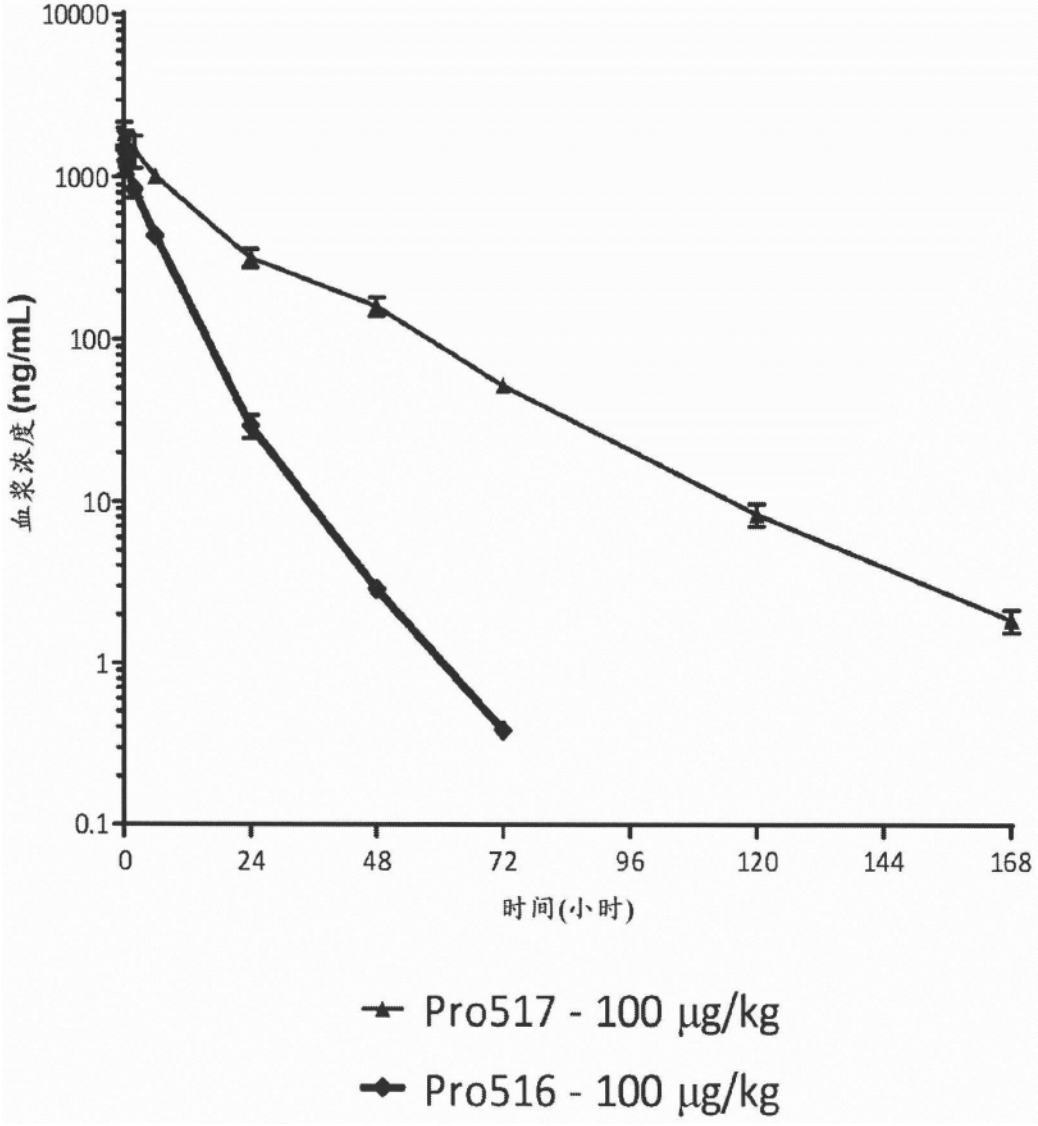

10000
1000
100
10
1
0.1
血浆浓度(ng/mL)
0
24
48
72
96
120
144
168
时间(小时)
Pro517 - 100 μg/kg
Pro516 - 100 μg/kg

图44

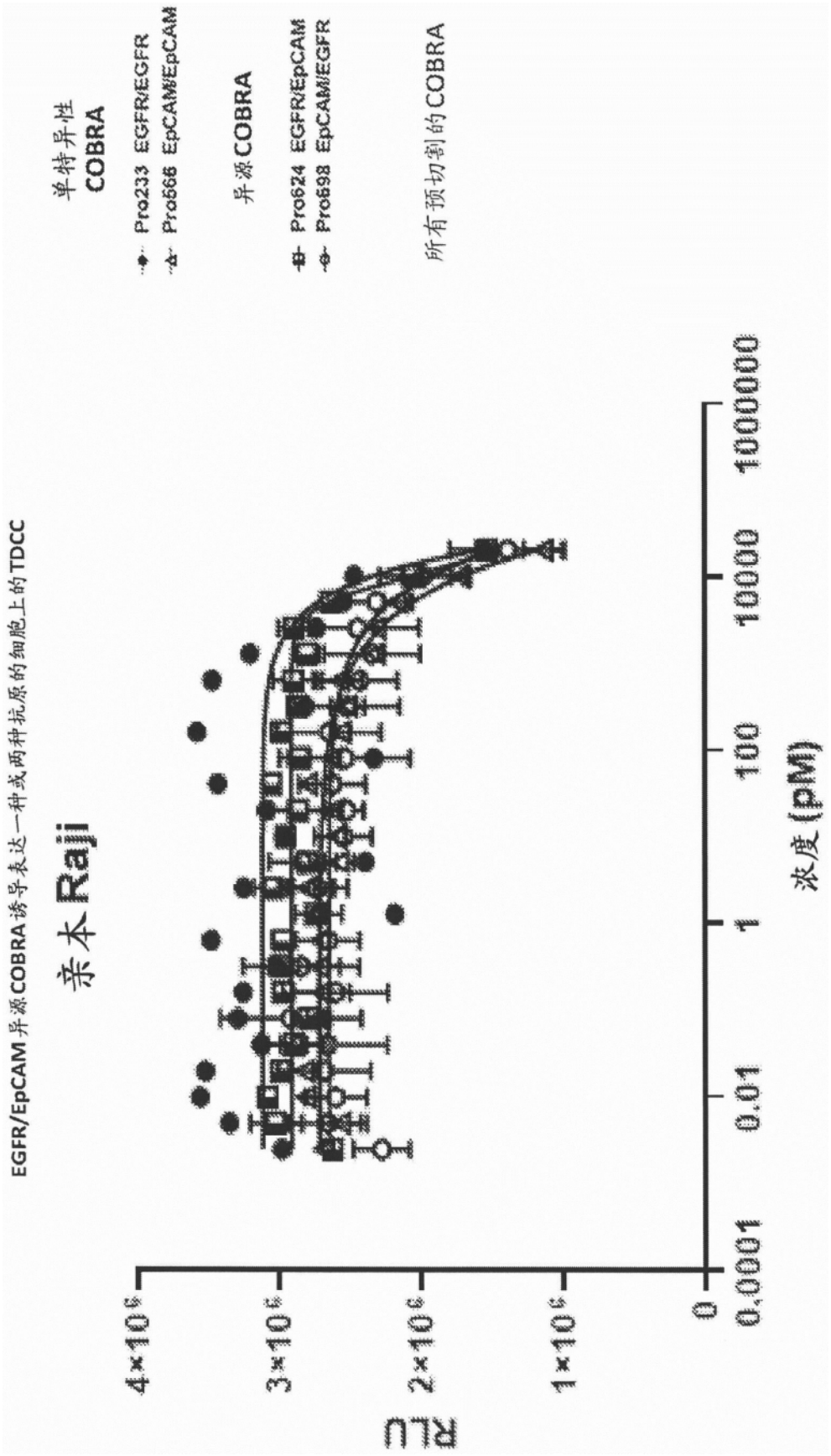

EGFR/EpCAM异源COBRA诱导表达一种或两种抗原的细胞上的TDCC
亲本Raji
单特异性
COBRA
Pro233 EGFR/EGFR
Pro566 EpCAM/EpCAM
异源COBRA
Pro624 EGFR/EpCAM
Pro698 EpCAM/EGFR
所有预切割的COBRA
RLU
4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)

图45A

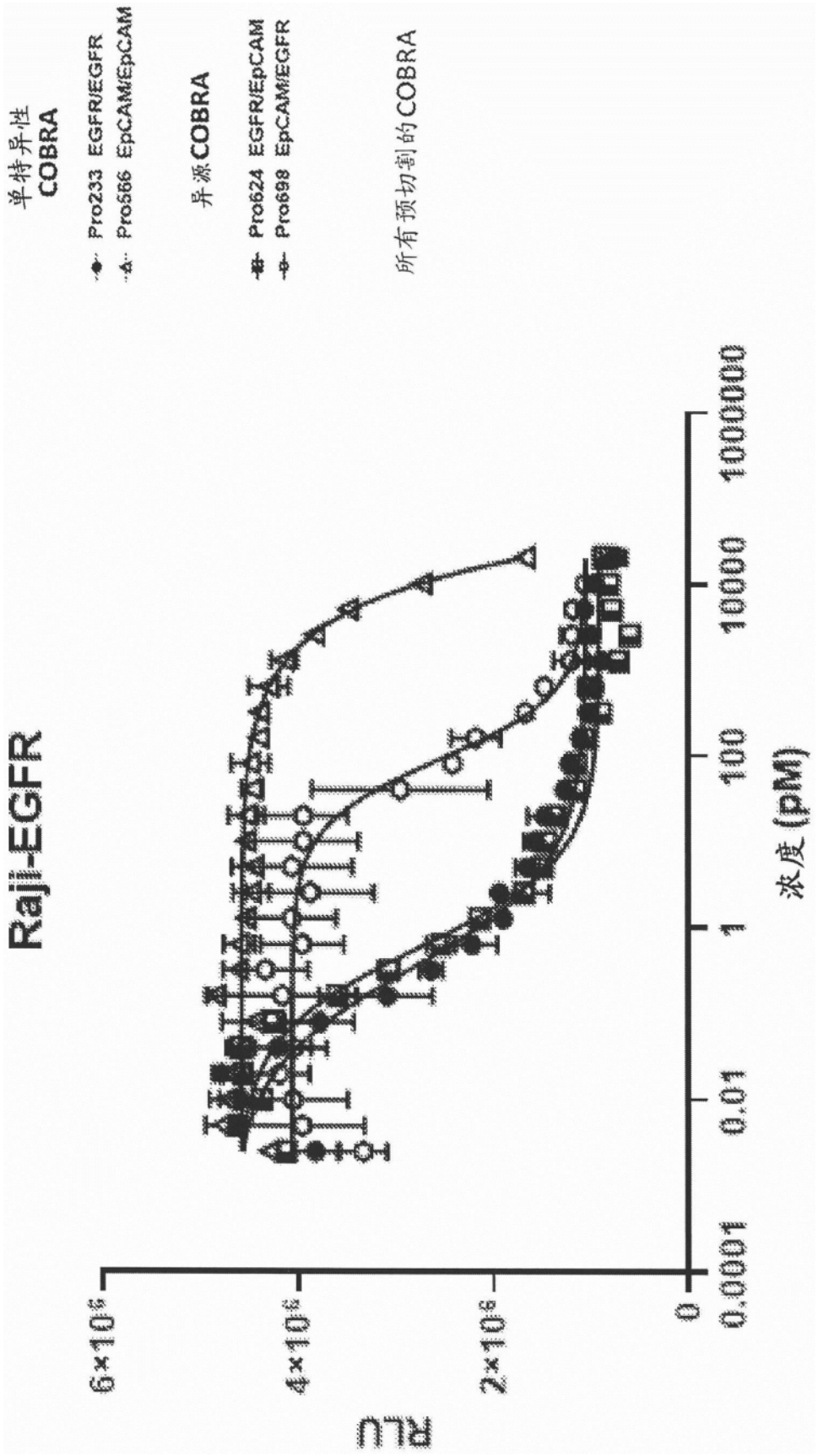

Raji-EGFR
单特异性
COBRA
Pro233 EGFR/EGFR
Pro566 EpCAM/EpCAM
异源COBRA
Pro624 EGFR/EpCAM
Pro698 EpCAM/EGFR
所有预切割的COBRA
RLU
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度 (pM)

图45B

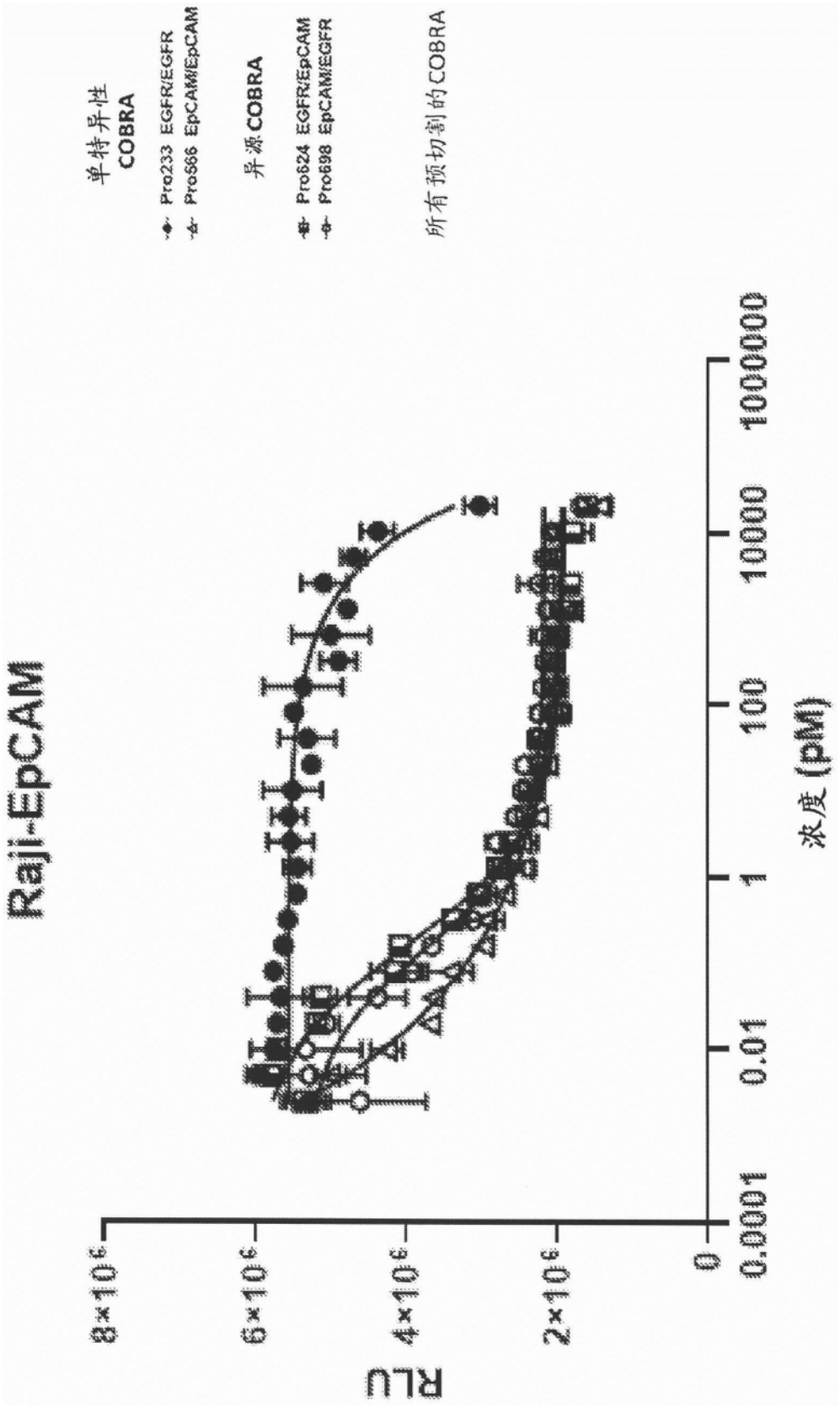

Raji-EpCAM
RLU
8×10⁶
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度 (pM)
单特异性
COBRA
Pro233 EGFR/EGFR
Pro566 EpCAM/EpCAM
异源 COBRA
Pro624 EGFR/EpCAM
Pro698 EpCAM/EGFR
所有预切割的COBRA

图45C

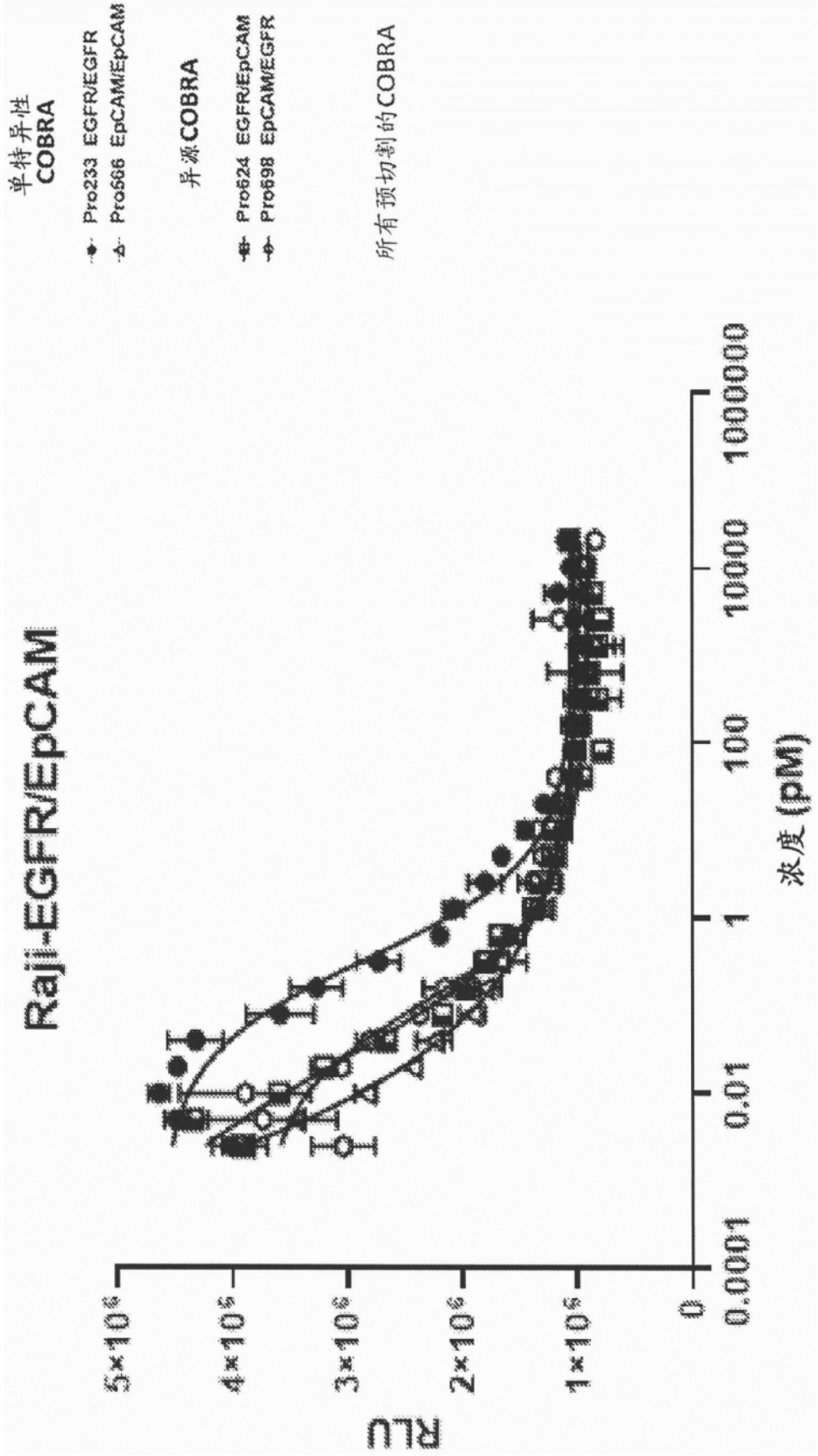

Raji-EGFR/EpCAM
RLU
5×10⁵
4×10⁵
3×10⁵
2×10⁵
1×10⁵
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)
单特异性
COBRA
Pro233 EGFR/EGFR
Pro566 EpCAM/EpCAM
异源COBRA
Pro624 EGFR/EpCAM
Pro698 EpCAM/EGFR
所有预切割的COBRA

图45D

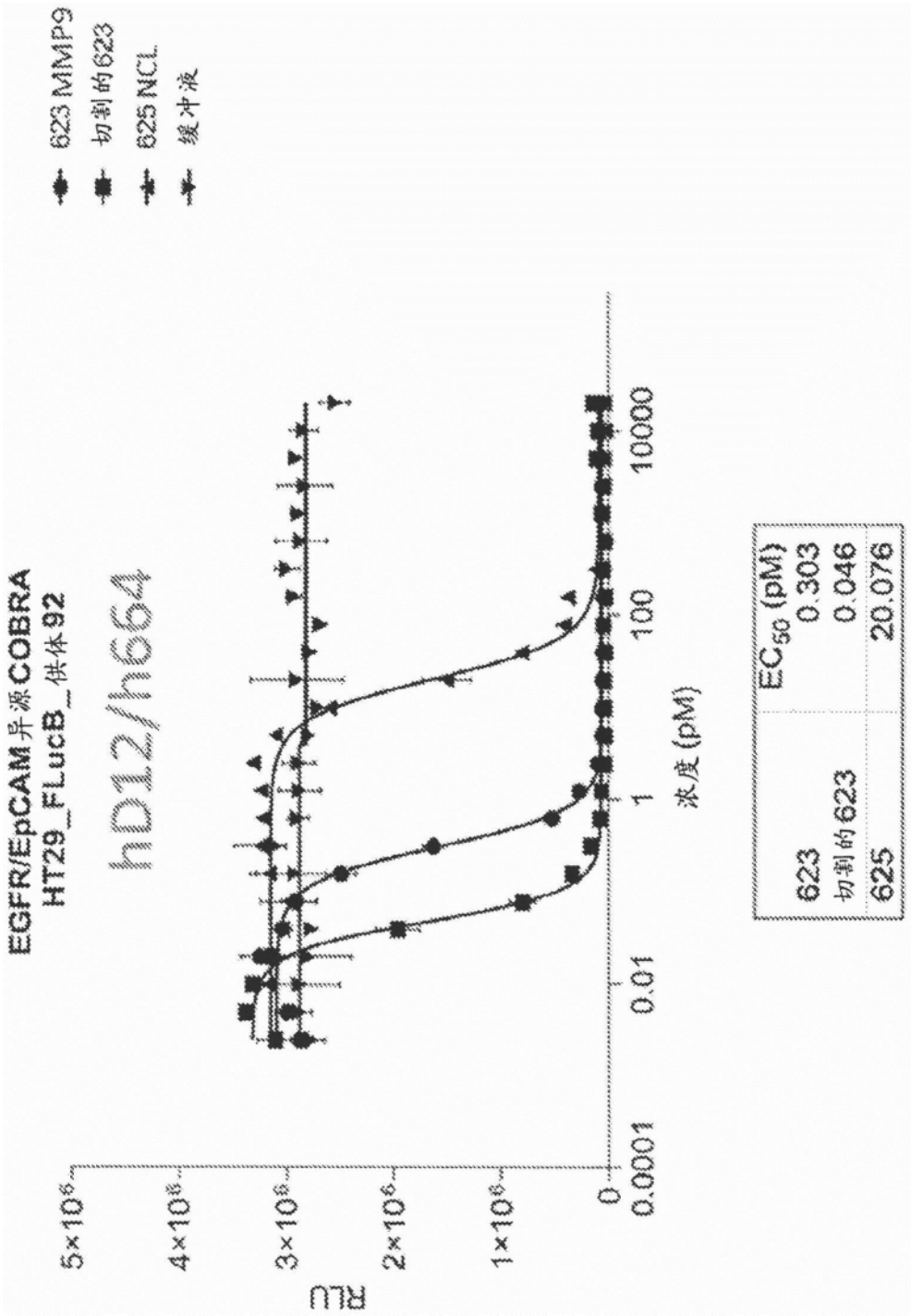

623 MMP9
切割的623
625 NCL
缓冲液
EGFR/EpCAM异源COBRA
HT29_FLucB_供体92
hD12/h664
RLU
5×10⁶
4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度 (pM)
EC50 (pM)
623 0.303
切割的623 0.046
625 20.076

图46A

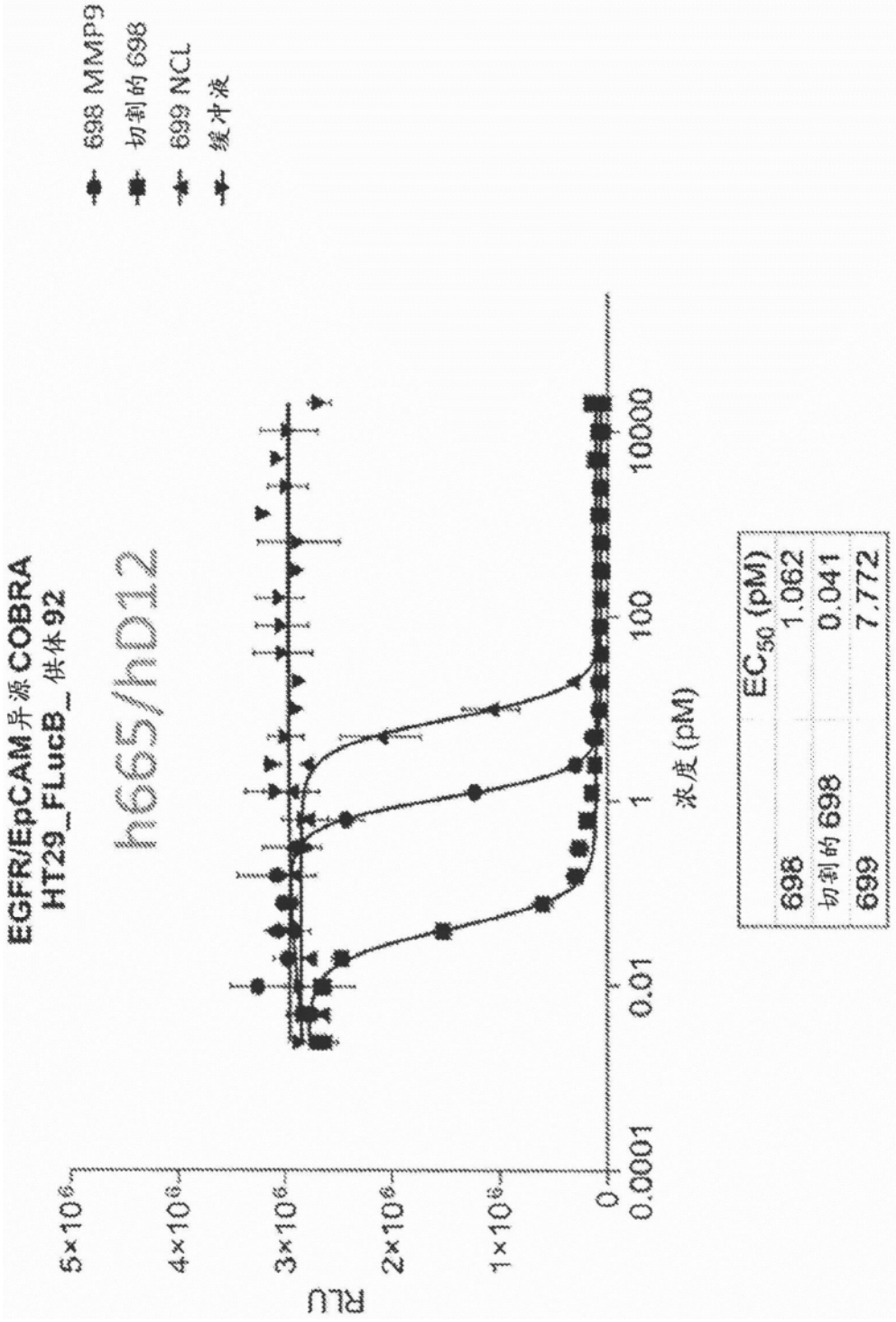

698 MMP9
切割的698
699 NCL
缓冲液
EGFR/EpCAM异源COBRA
HT29_FLucB_供体92
h665/hD12
RLU
5×10⁶
4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度(pM)
EC50 (pM)
698 1.062
切割的698 0.041
699 7.772

图46B

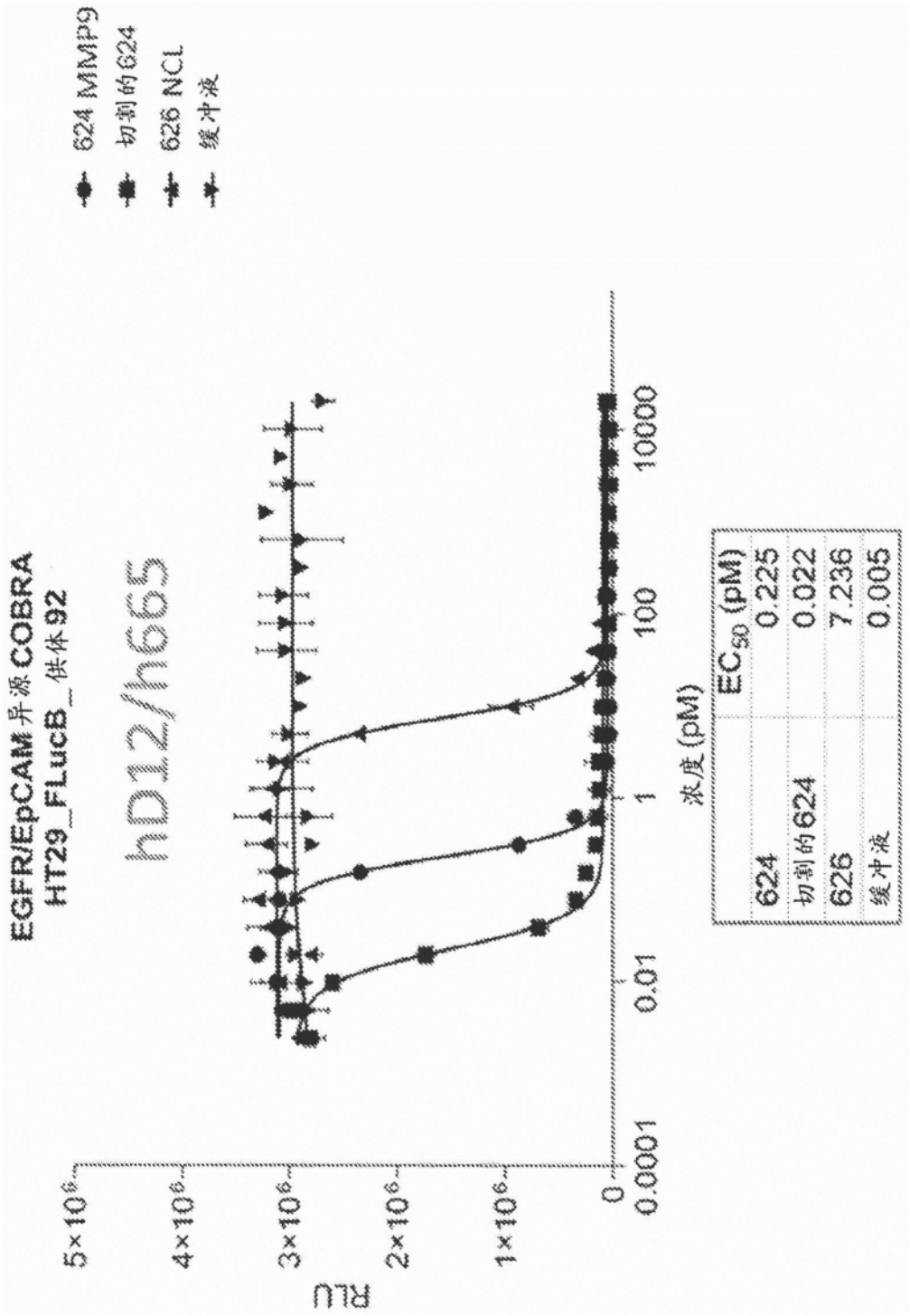

624 MMP9
切割的624
626 NCL
缓冲液
EGFR/EpCAM异源COBRA
HT29_FLucB_供体92
hD12/h665
RLU
浓度(pM)
EC50 (pM)
624 0.225
切割的624 0.022
626 7.236
缓冲液 0.005

图46C

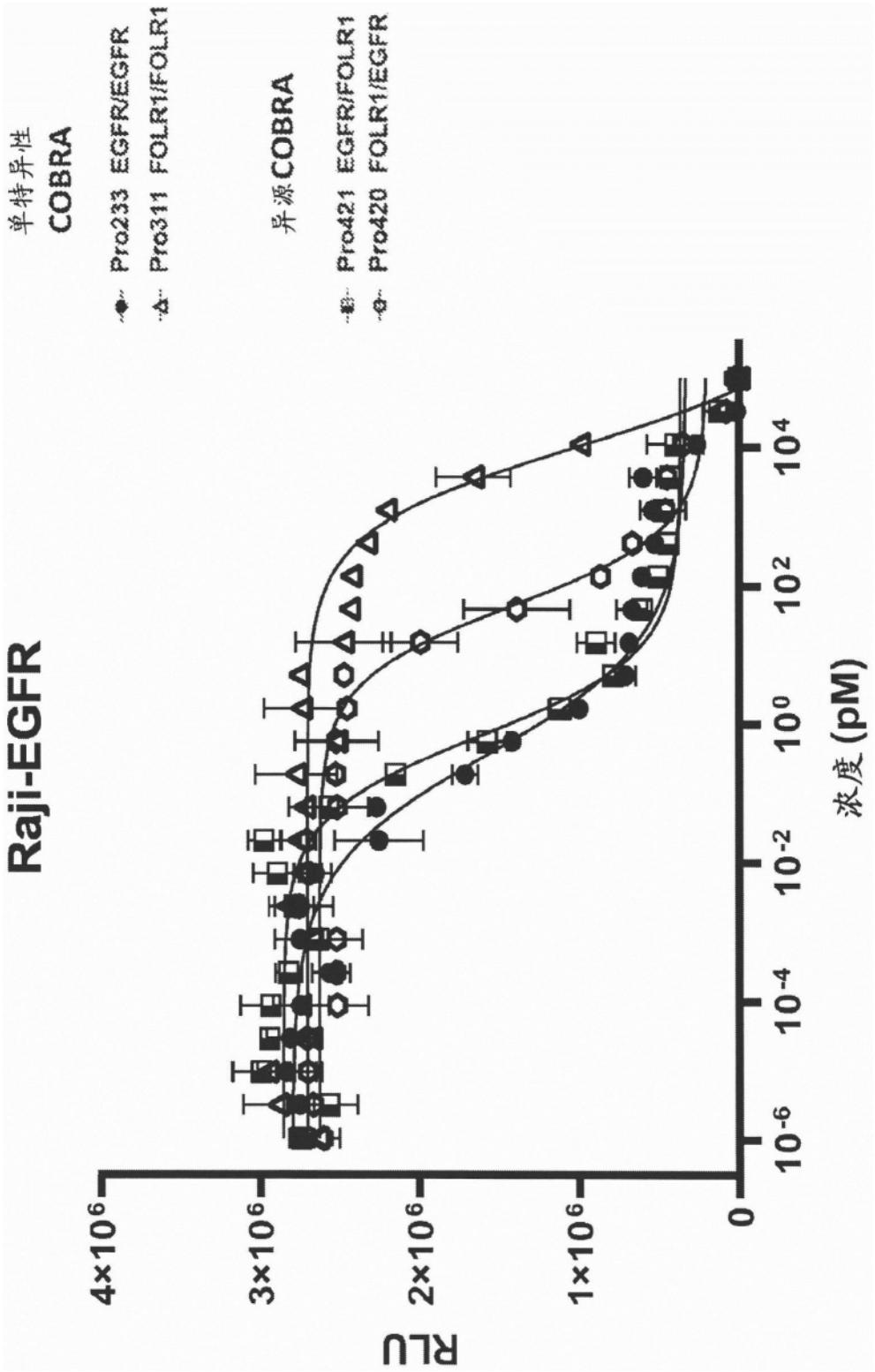

单特异性
COBRA
Pro233 EGFR/EGFR
Pro311 FOLR1/FOLR1
异源COBRA
Pro421 EGFR/FOLR1
Pro420 FOLR1/EGFR
Raji-EGFR
RLU
4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
10⁻⁶
10⁻⁴
10⁻²
10⁰
10²
10⁴
浓度(pM)

图47A

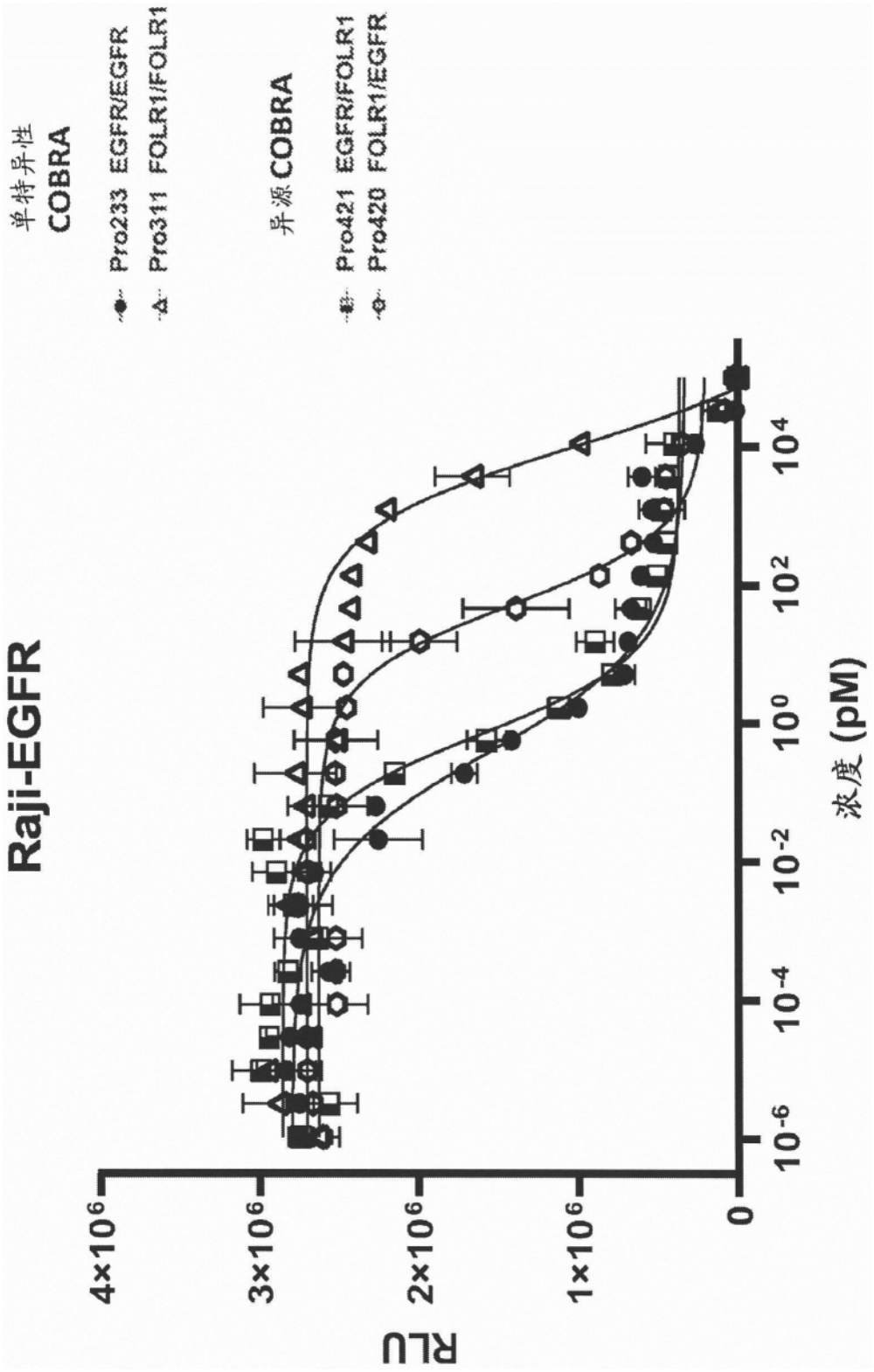

Raji-EGFR
单特异性
COBRA
Pro233 EGFR/EGFR
Pro311 FOLR1/FOLR1
异源COBRA
Pro421 EGFR/FOLR1
Pro420 FOLR1/EGFR
RLU
4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
10⁻⁶
10⁻⁴
10⁻²
10⁰
10²
10⁴
浓度 (pM)

图47A

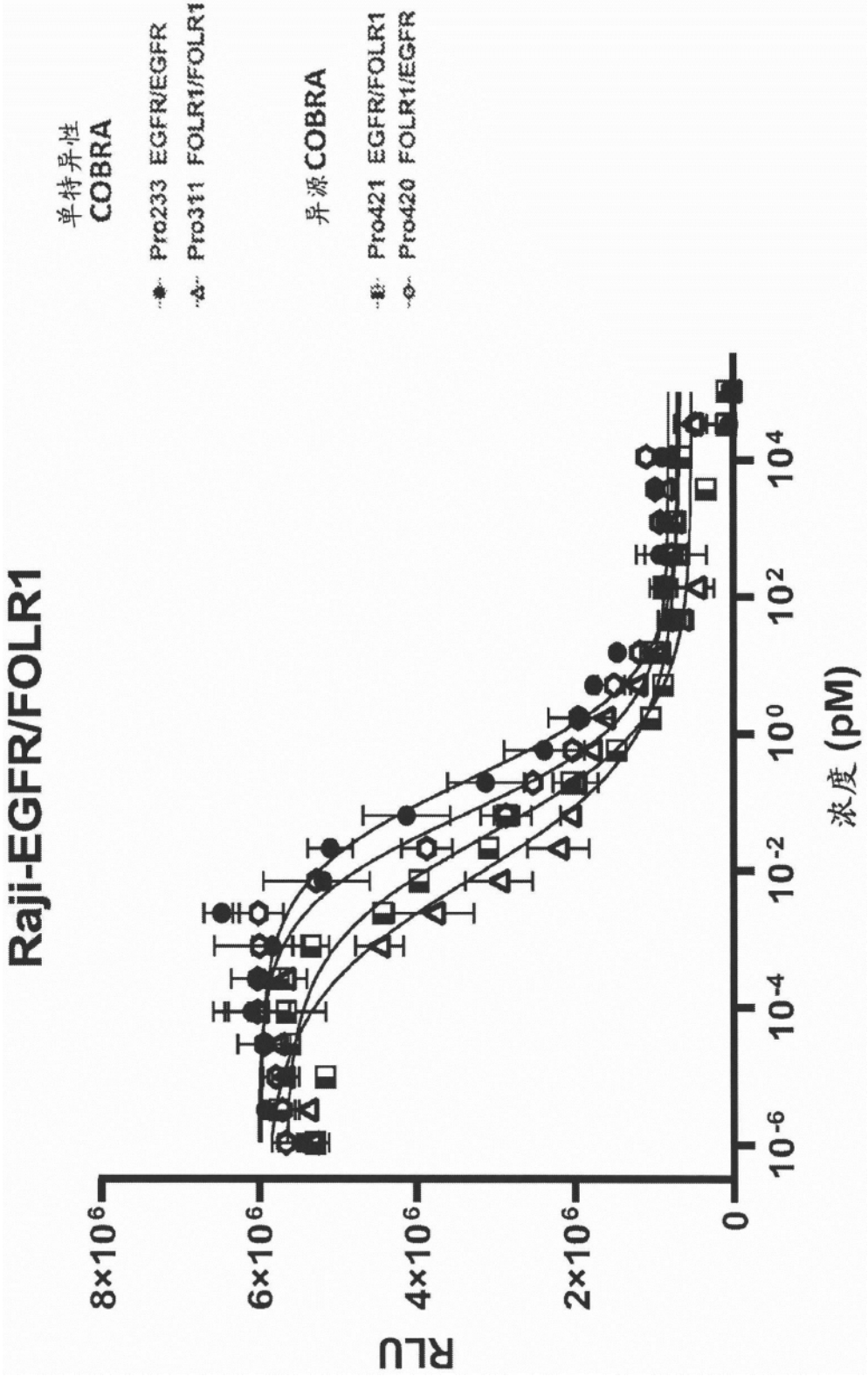
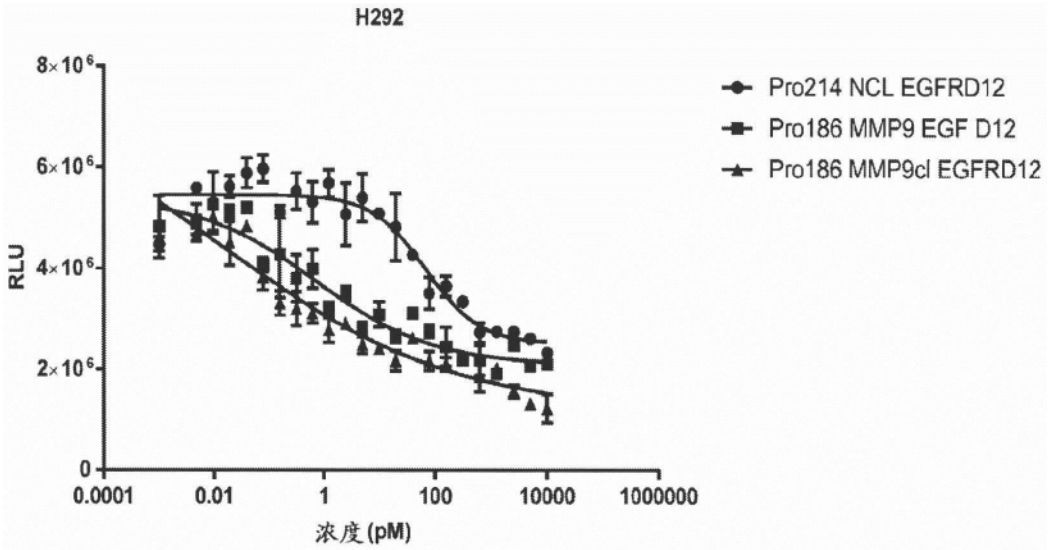

Raji-EGFR/FOLR1
RLU
8×10⁶
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
10⁻⁶
10⁻⁴
10⁻²
10⁰
10²
10⁴
浓度 (pM)
单特异性
COBRA
Pro233 EGFR/EGFR
Pro311 FOLR1/FOLR1
异源COBRA
Pro421 EGFR/FOLR1
Pro420 FOLR1/EGFR

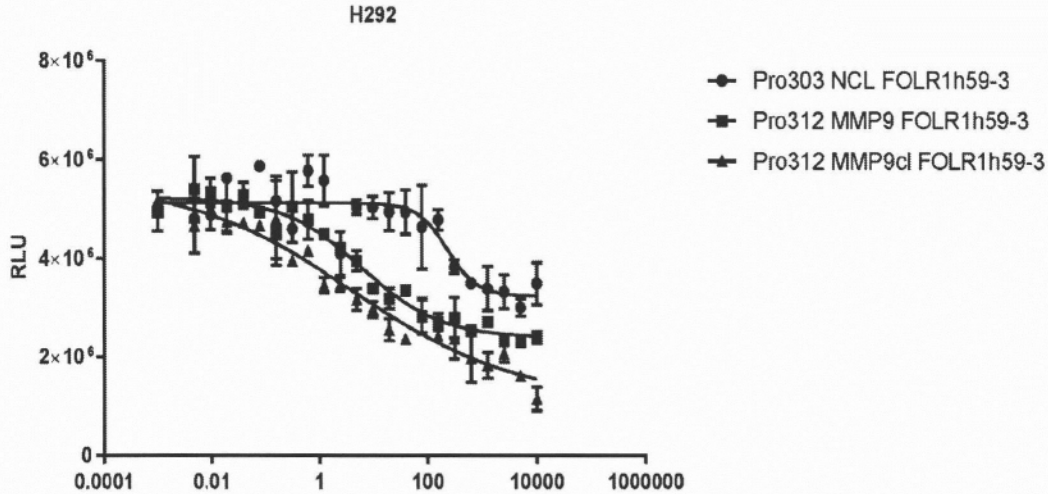
图47C



	EC50
Pro214 NCL EGFRD12	67.09
Pro186 MMP9 EGF D12	0.714
Pro186 MMP9cl EGFRD12	0.01319

图48A

aFOLR1(h59-3)/aEGFR (D12) 有条件地杀死表达 FOLR1 和 EGFR 两者的肿瘤细胞系



	EC50
Pro303 NCL FOLR1h59-3	231.3
Pro312 MMP9 FOLR1h59-3	6.128
Pro312 MMP9cl FOLR1h59-3	4.303

图48B

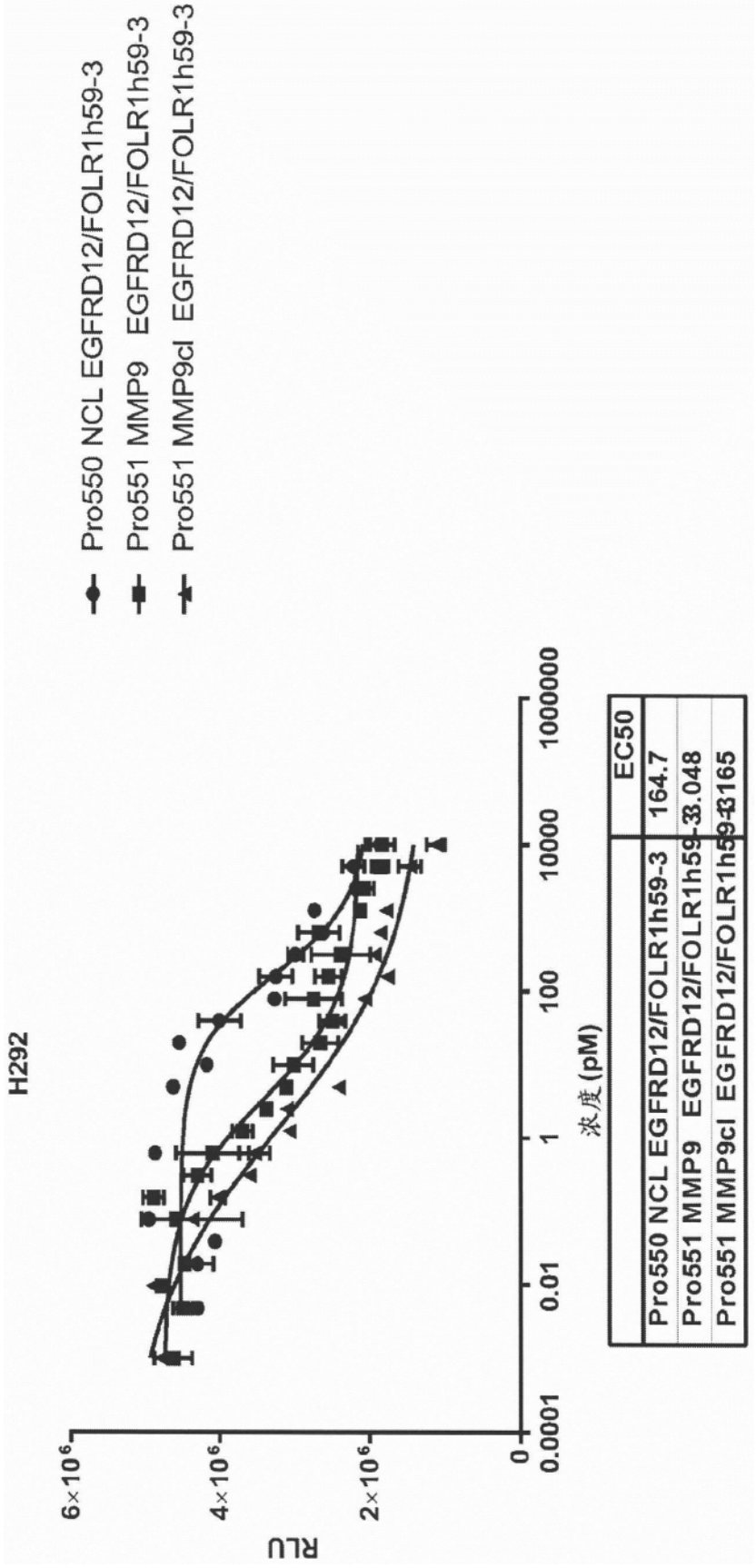

H292
Pro550 NCL EGFRD12/FOLR1h59-3
Pro551 MMP9 EGFRD12/FOLR1h59-3
Pro551 MMP9cl EGFRD12/FOLR1h59-3
RLU
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)
EC50
Pro550 NCL EGFRD12/FOLR1h59-3 164.7
Pro551 MMP9 EGFRD12/FOLR1h59-3 38.048
Pro551 MMP9cl EGFRD12/FOLR1h59-3 3165

图48C

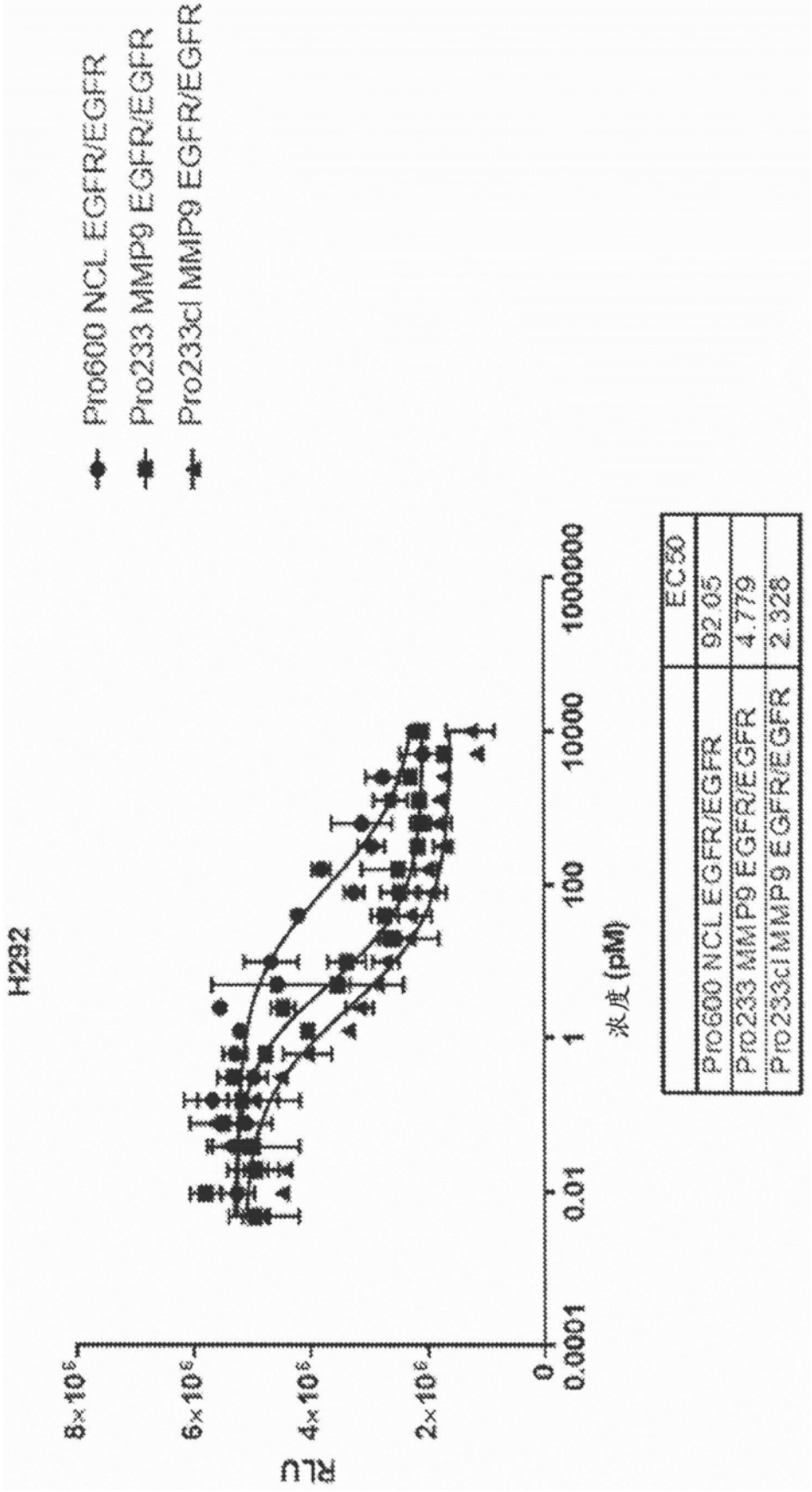

Pro600 NCL EGFR/EGFR
Pro233 MMP9 EGFR/EGFR
Pro233cl MMP9 EGFR/EGFR
H292
RLU
8×10⁶
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度 (pM)
EC50
Pro600 NCL EGFR/EGFR 92.05
Pro233 MMP9 EGFR/EGFR 4.779
Pro233cl MMP9 EGFR/EGFR 2.328

图49A

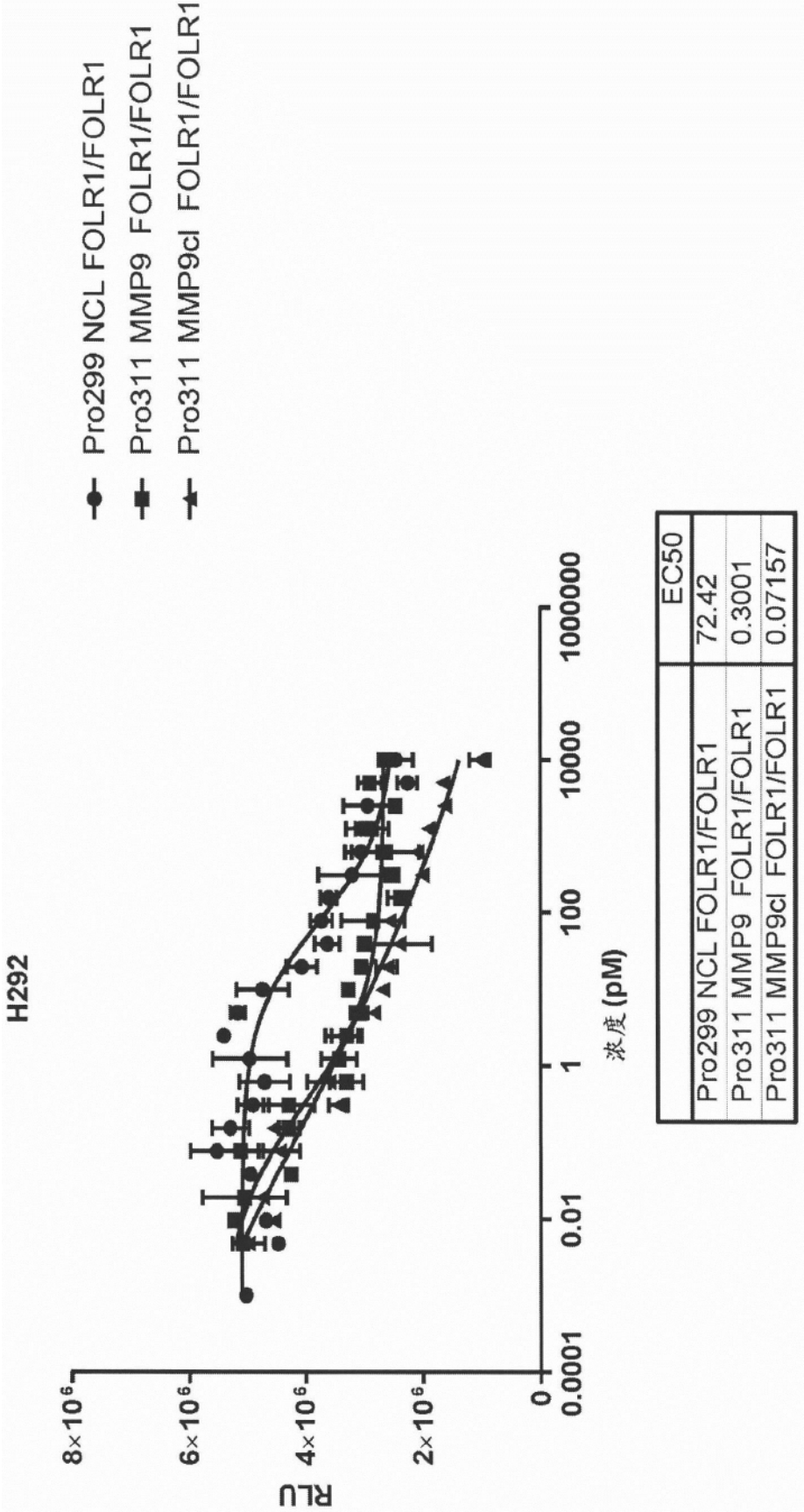

H292
Pro299 NCL FOLR1/FOLR1
Pro311 MMP9 FOLR1/FOLR1
Pro311 MMP9cl FOLR1/FOLR1
RLU
8×10⁶
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度 (pM)
EC50
Pro299 NCL FOLR1/FOLR1 72.42
Pro311 MMP9 FOLR1/FOLR1 0.3001
Pro311 MMP9cl FOLR1/FOLR1 0.07157

图49B

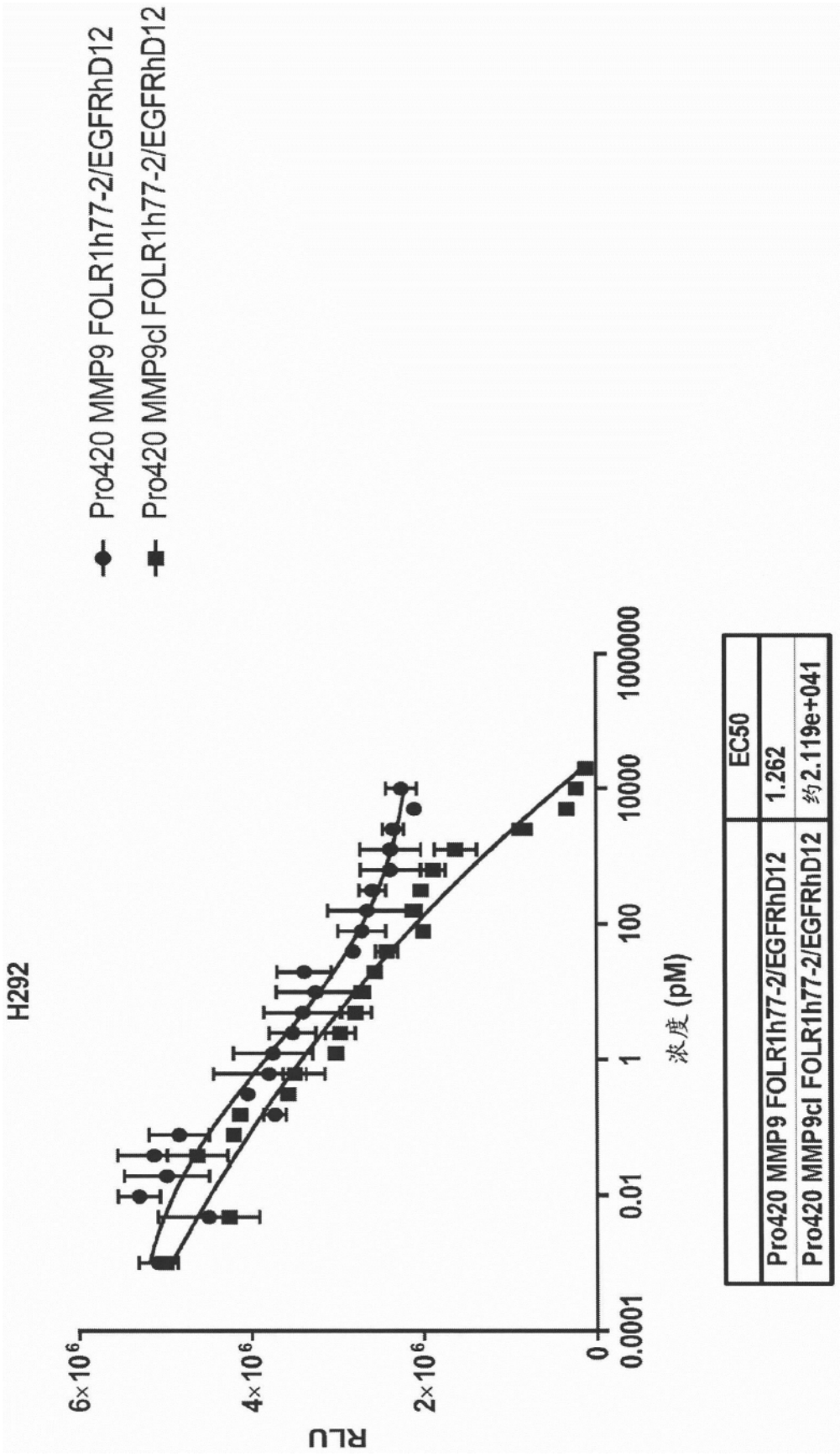

Pro420 MMP9 FOLR1h77-2/EGFRhD12
Pro420 MMP9cl FOLR1h77-2/EGFRhD12
H292
RLU
6×10^6
4×10^6
2×10^6
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度 (pM)
EC50
Pro420 MMP9 FOLR1h77-2/EGFRhD12 1.262
Pro420 MMP9cl FOLR1h77-2/EGFRhD12 约2.119e+041

图49C

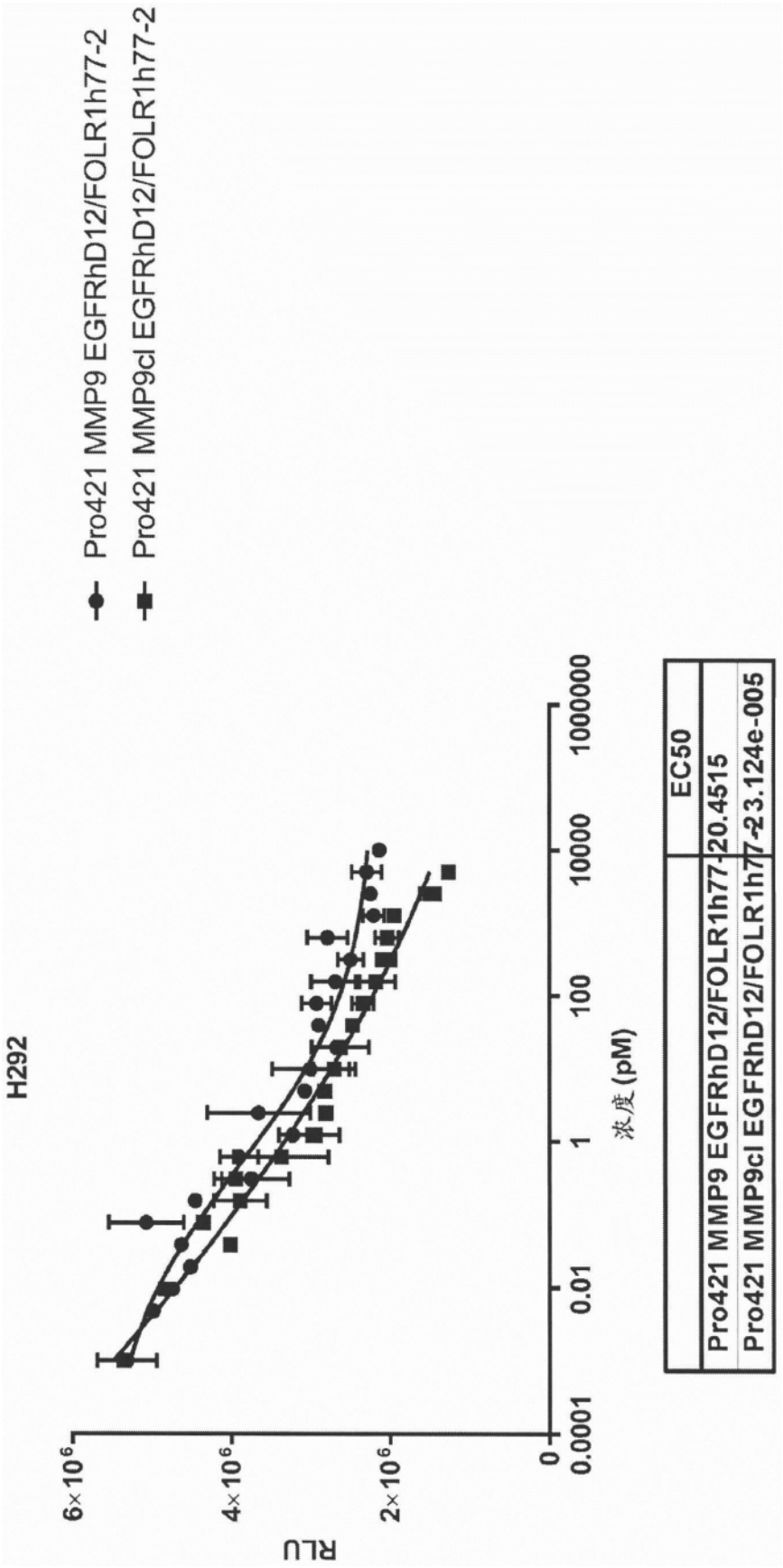

Pro421 MMP9 EGFRhD12/FOLR1h77-2
Pro421 MMP9cl EGFRhD12/FOLR1h77-2
H292
RLU
6×10^6
4×10^6
2×10^6
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)
EC50
Pro421 MMP9 EGFRhD12/FOLR1h77-2 0.4515
Pro421 MMP9cl EGFRhD12/FOLR1h77-2 3.124e-005

图49D

Prodent	分子类型	第一/第二位置	K_D (nM)		
			人EGFR	huFOLR1	人EGFR + huFOLR1
Pro473	NCL	EGFR/FOLR1	5.1	3	0.15
Pro51	Pro51	EGFR/-	2.5		
Pro300	Pro51	FOLR1/-		2.1	

图50

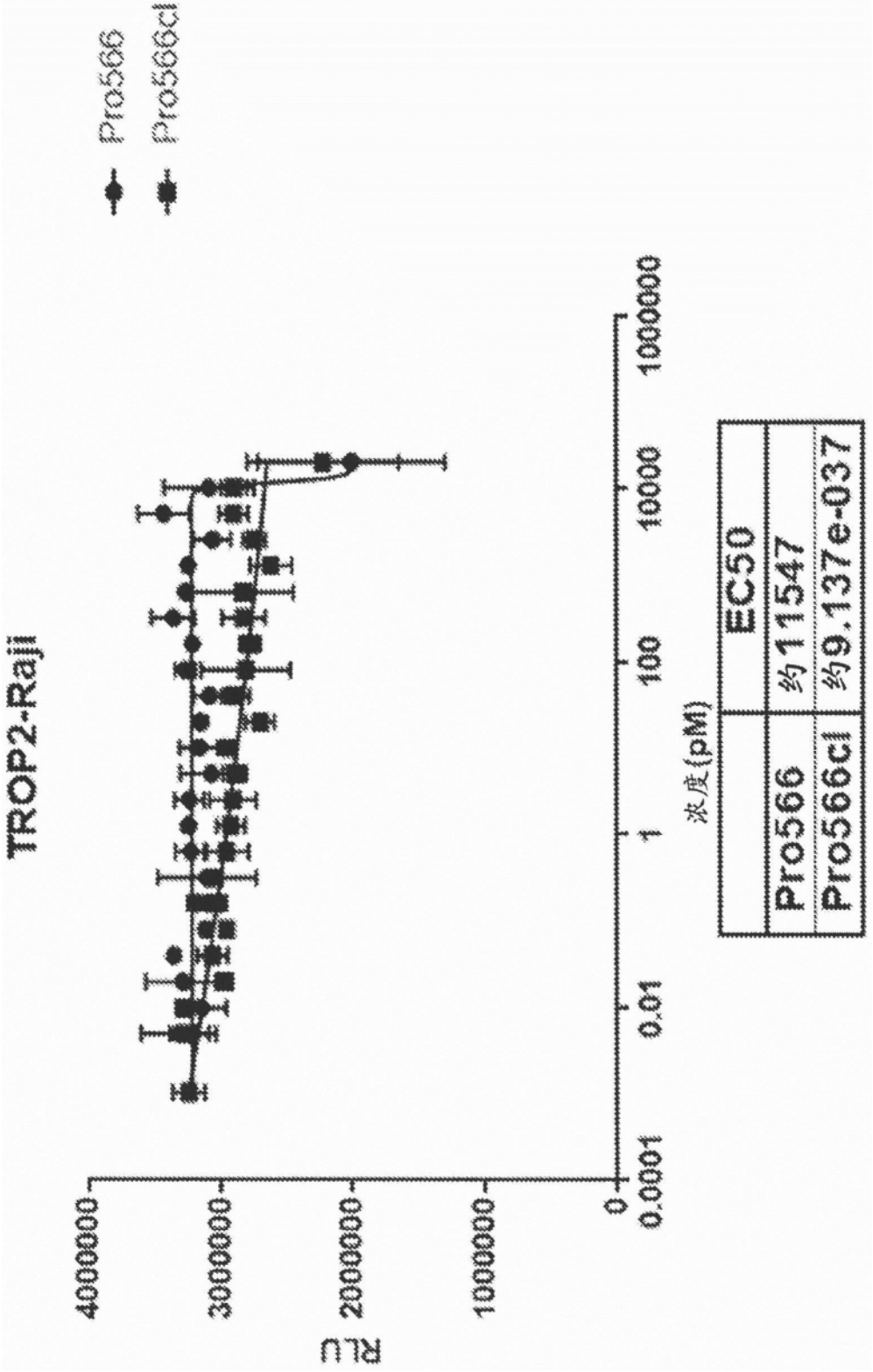
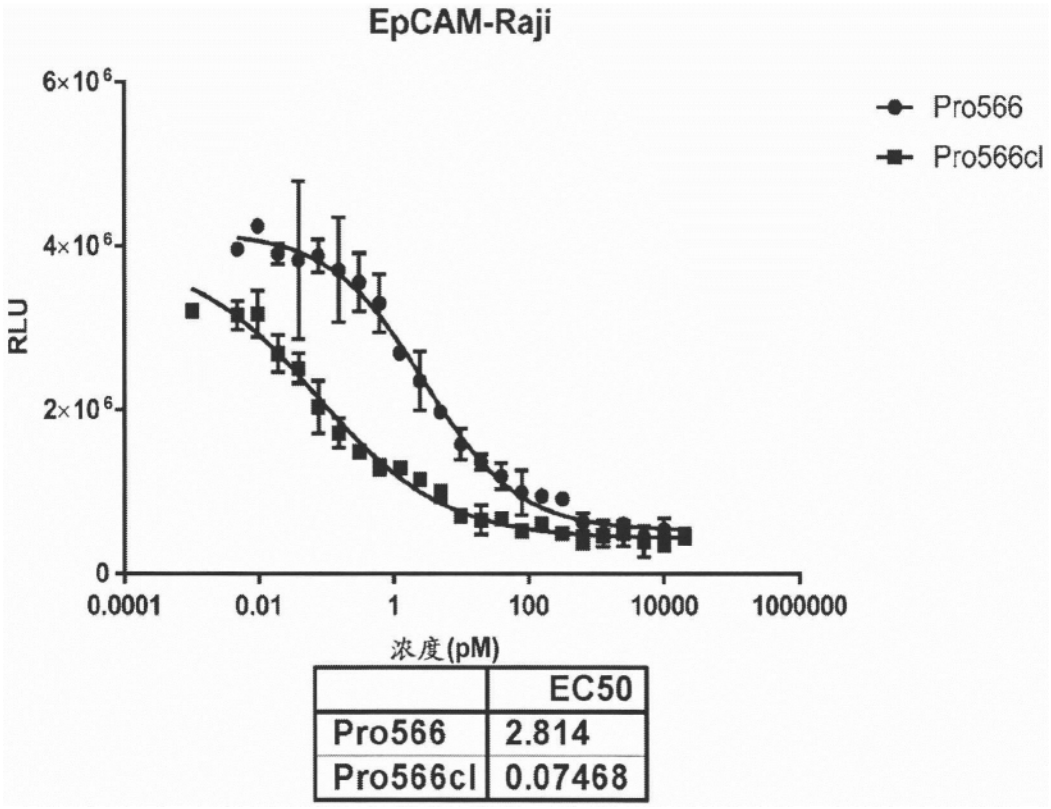

Pro566
Pro566cl
TROP2-Raji
RLU
4000000
3000000
2000000
1000000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)
EC50
Pro566
约11547
Pro566cl
约9.137e-037

图51A



	EC50
Pro566	2.814
Pro566cl	0.07468

图51B

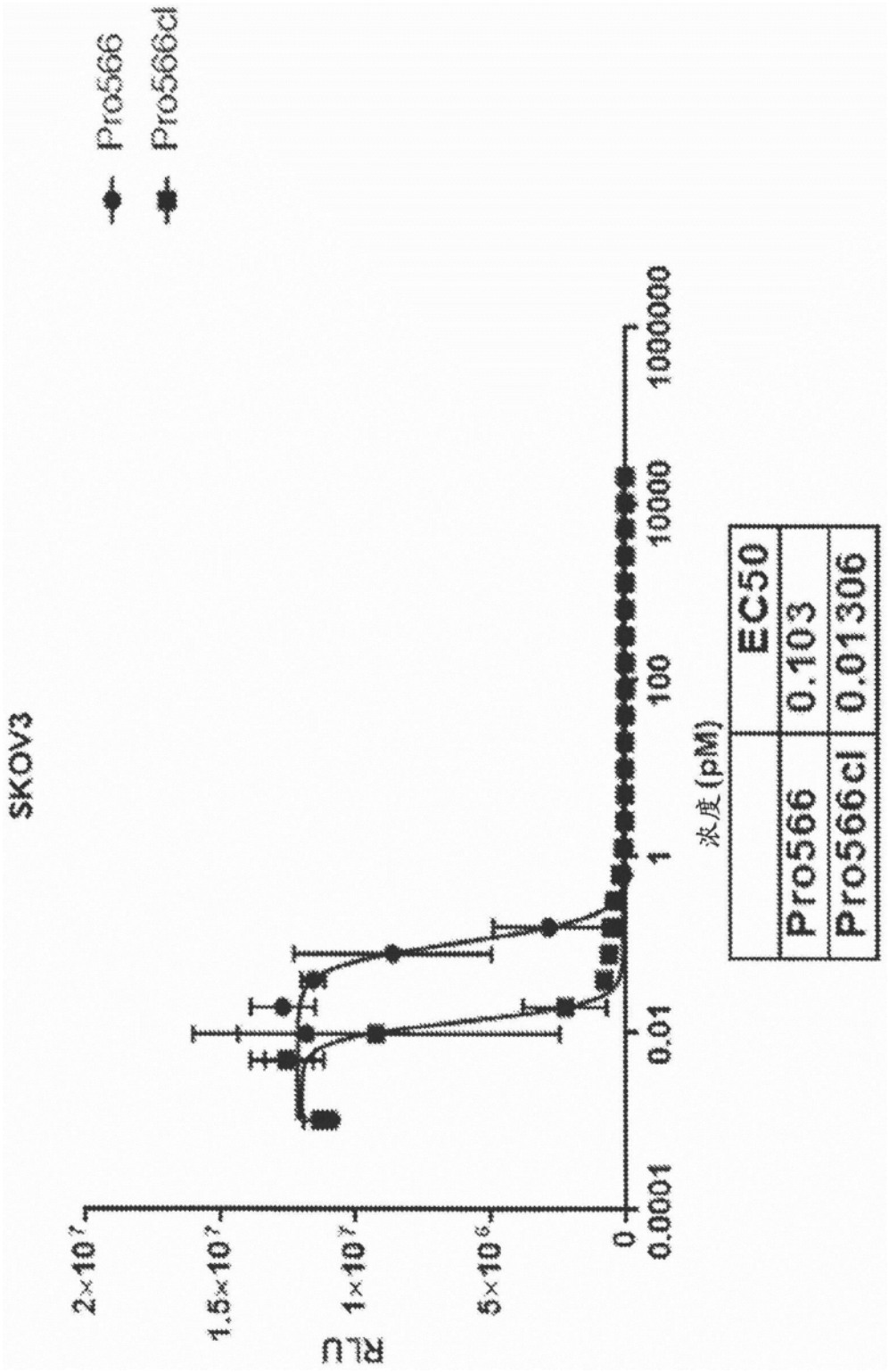

Pro566
Pro566cl
SKOV3
RLU
2×10⁷
1.5×10⁷
1×10⁷
5×10⁶
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)
EC50
Pro566 0.103
Pro566cl 0.01306

图51C

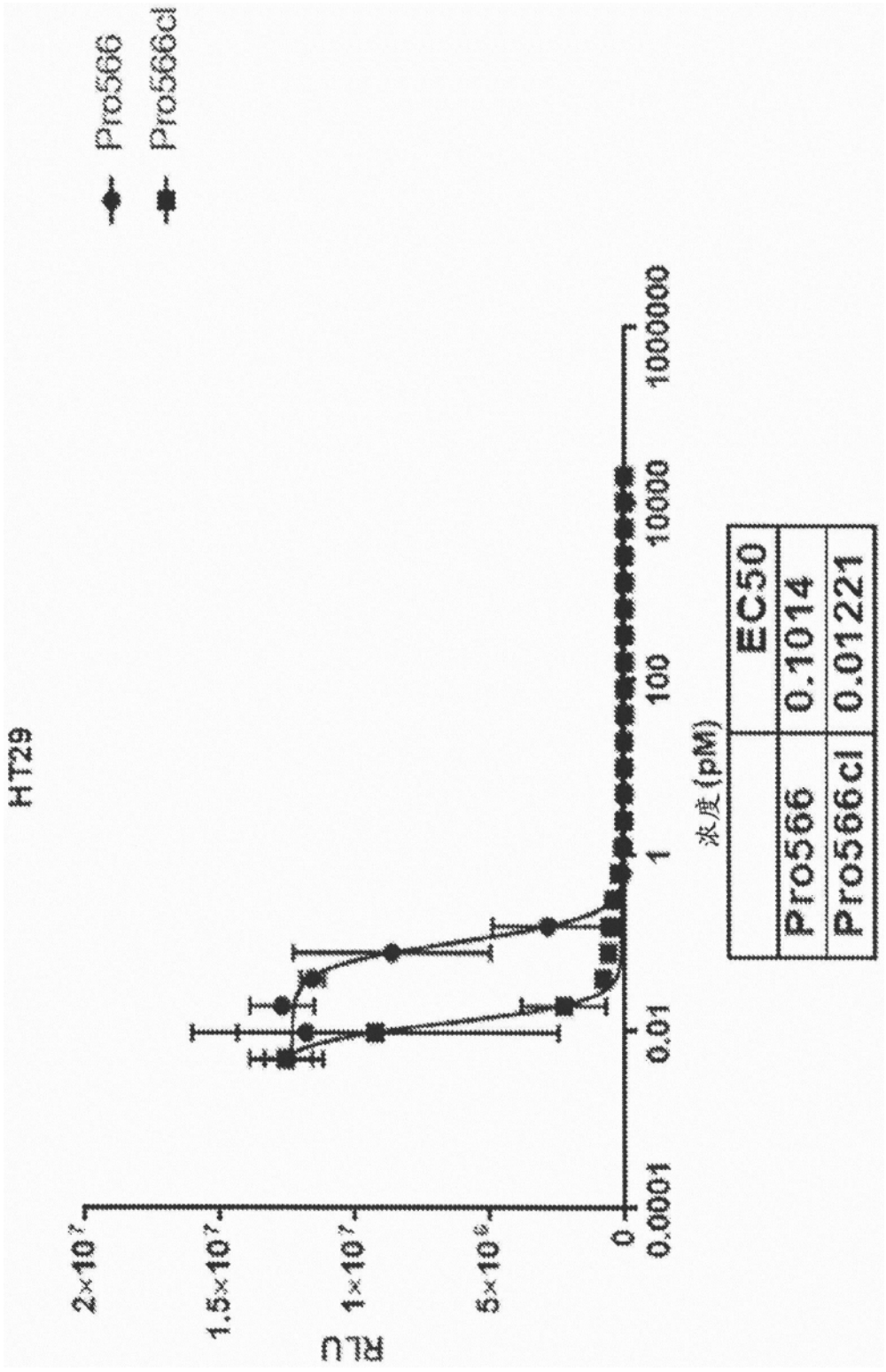

Pro566
Pro566cl
HT29
RLU
2×10⁷
1.5×10⁷
1×10⁷
5×10⁶
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)
EC50
Pro566 0.1014
Pro566cl 0.01221

图51D

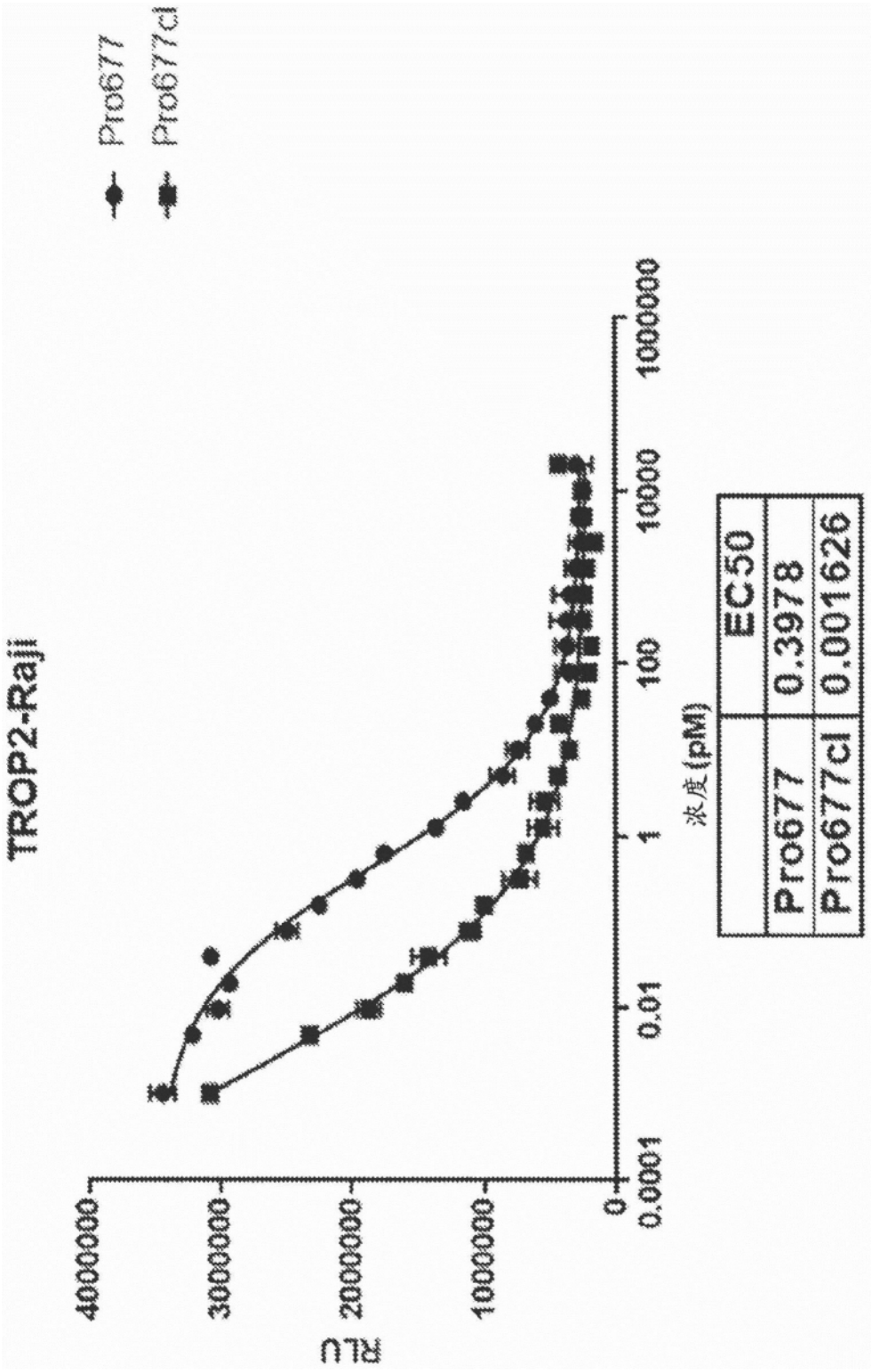
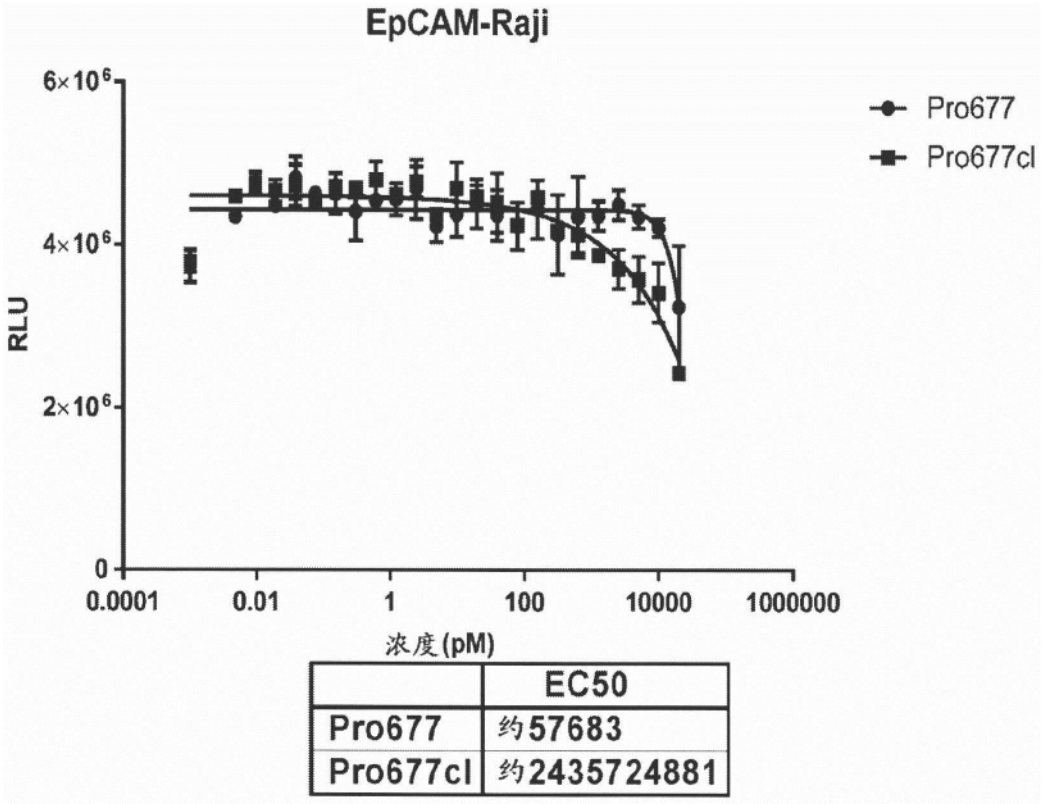
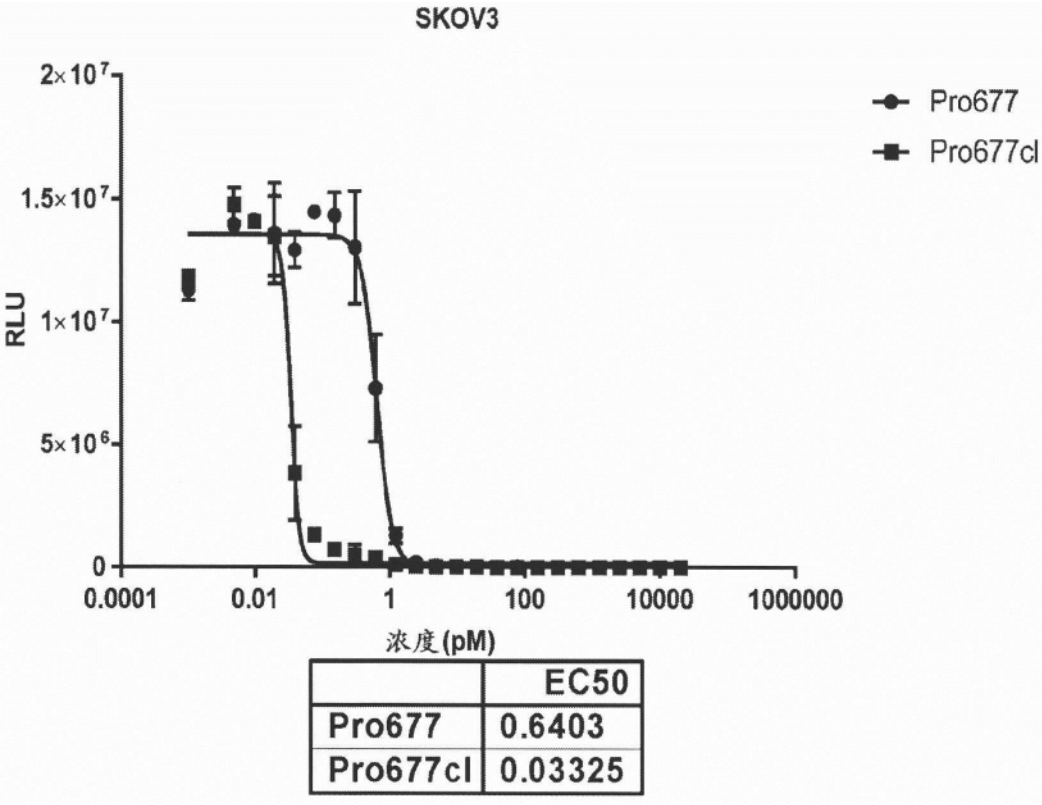

Pro677
Pro677cl
TROP2-Raji
RLU
4000000
3000000
2000000
1000000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)
EC50
Pro677 0.3978
Pro677cl 0.001626

图52A



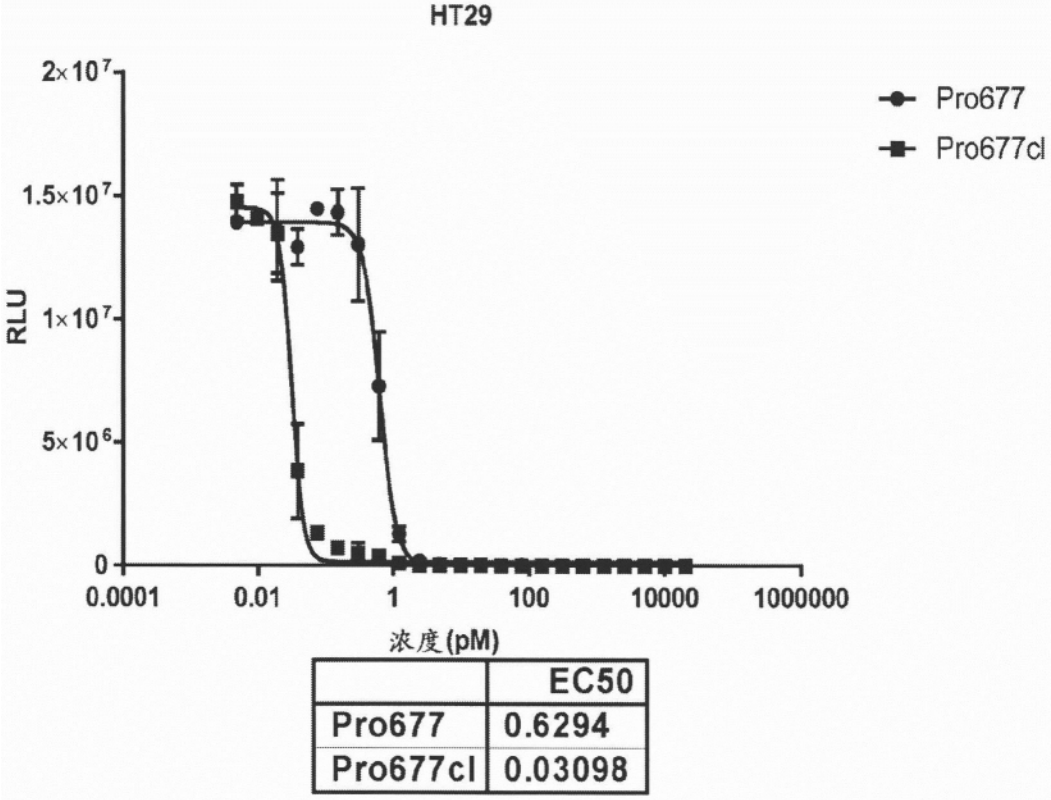
	EC50
Pro677	约57683
Pro677cl	约2435724881

图52B



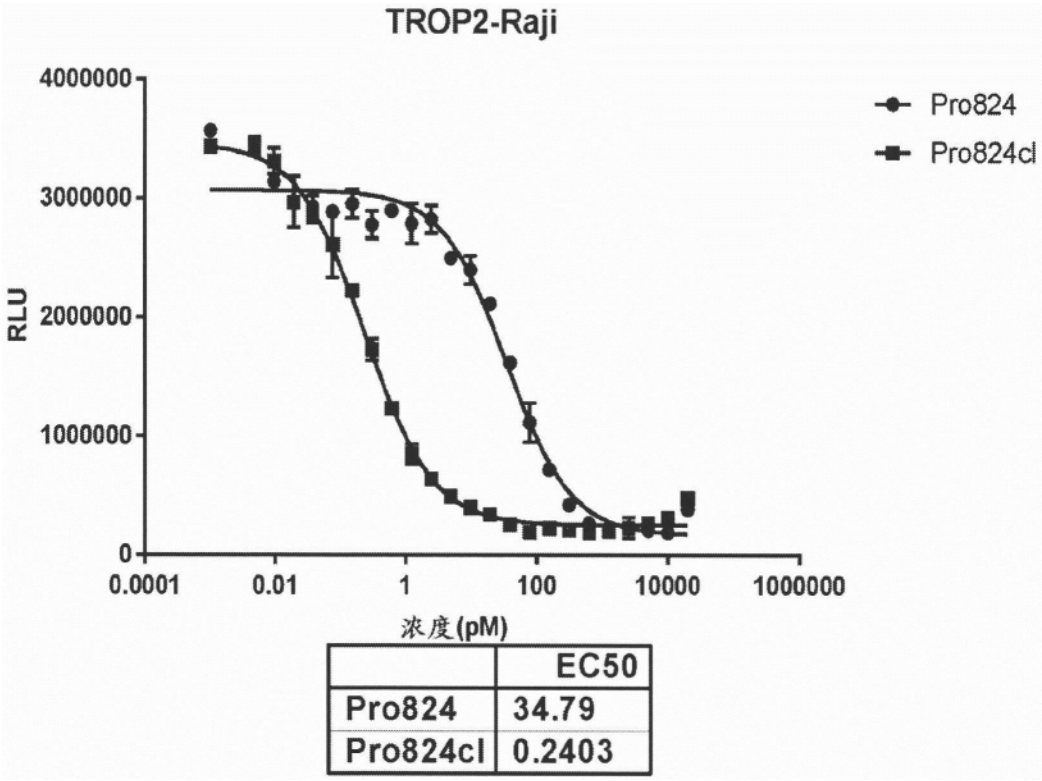
	EC50
Pro677	0.6403
Pro677cl	0.03325

图52C



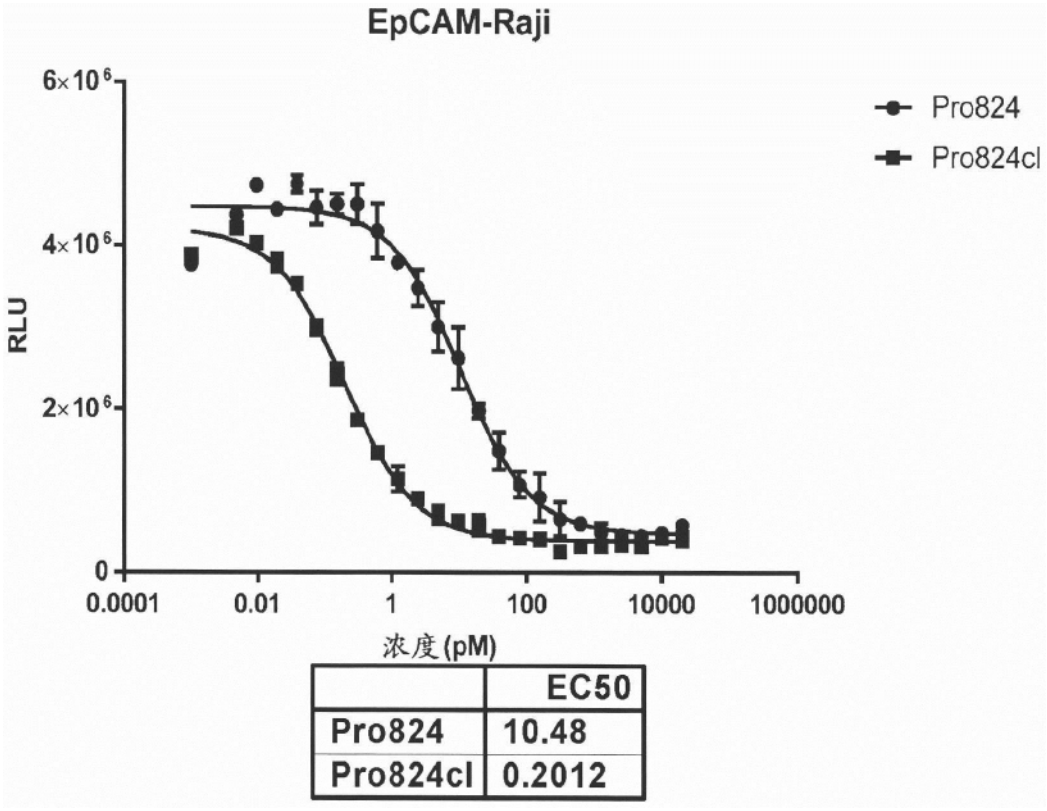
	EC50
Pro677	0.6294
Pro677cl	0.03098

图52D



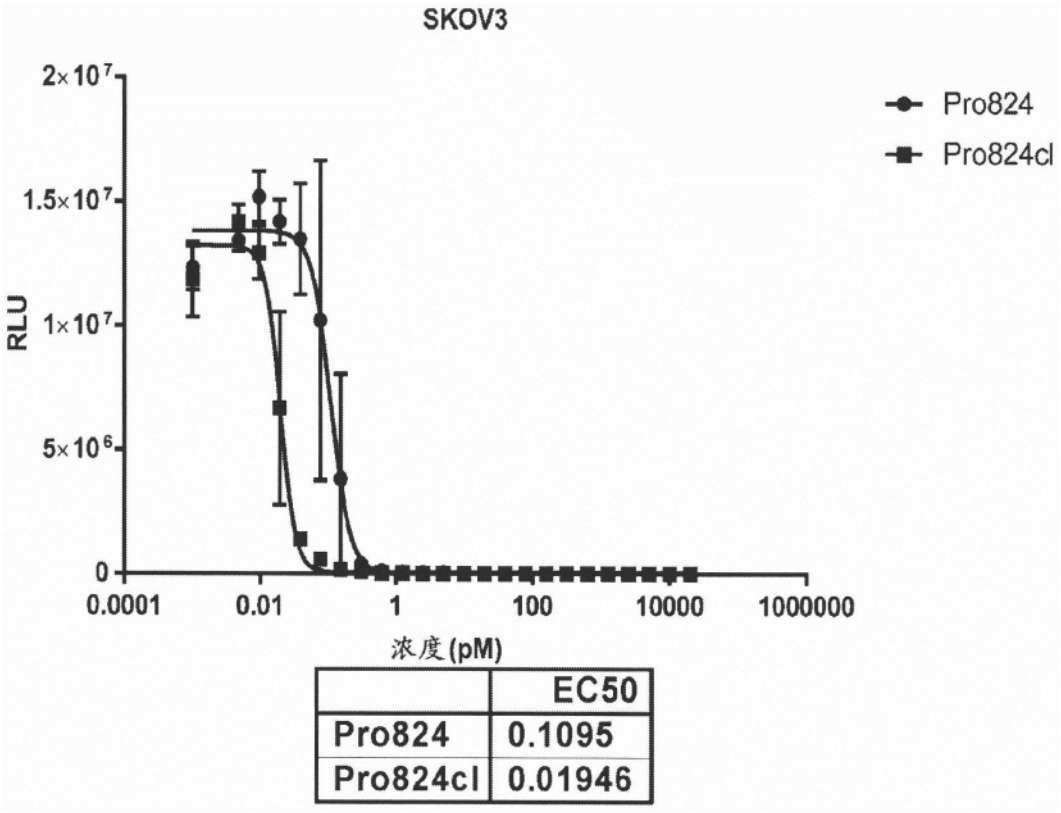
	EC50
Pro824	34.79
Pro824cl	0.2403

图53A



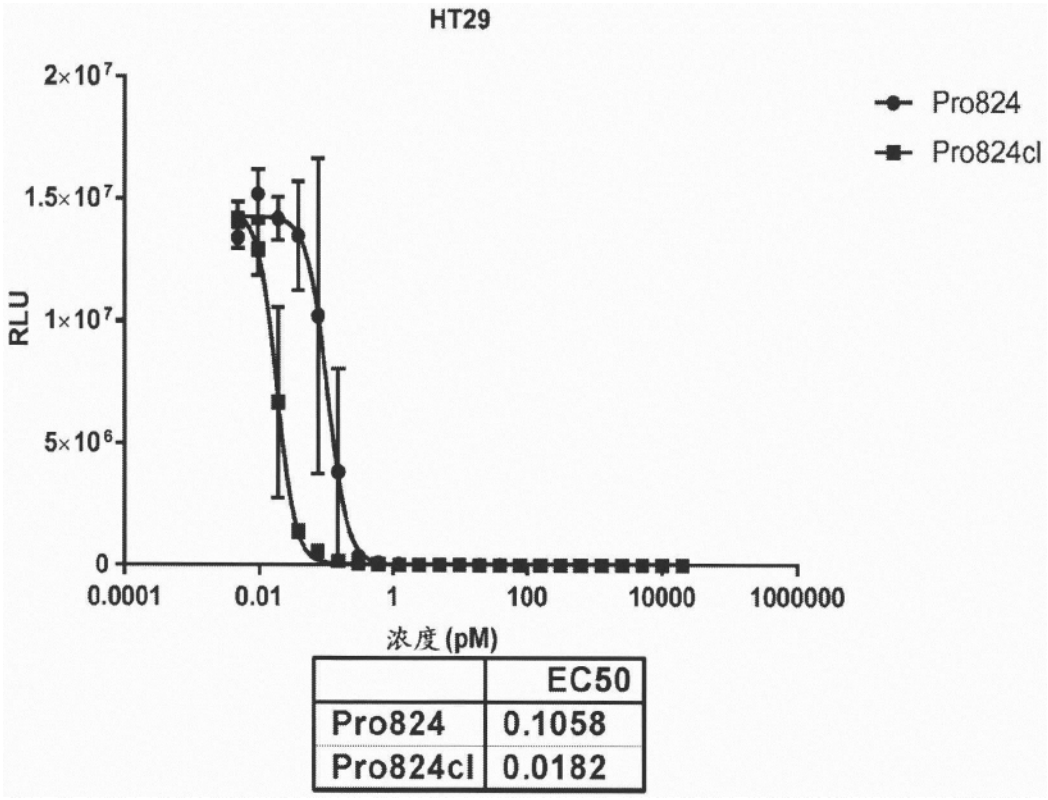
	EC50
Pro824	10.48
Pro824cl	0.2012

图53B



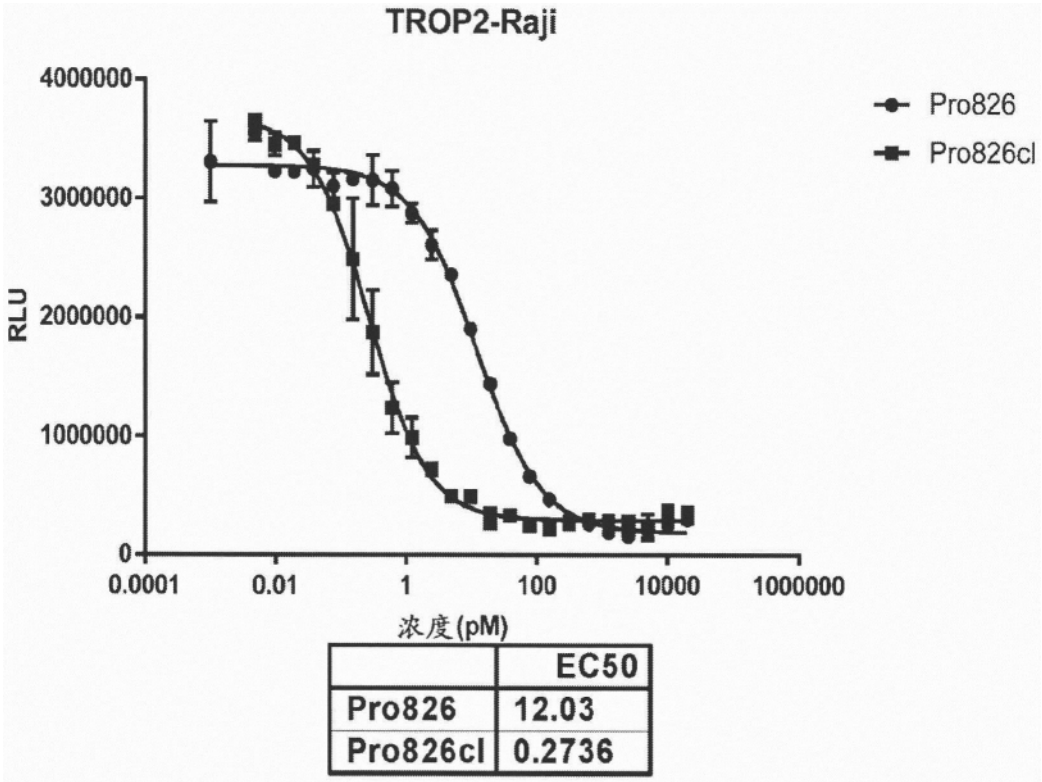
	EC50
Pro824	0.1095
Pro824cl	0.01946

图53C



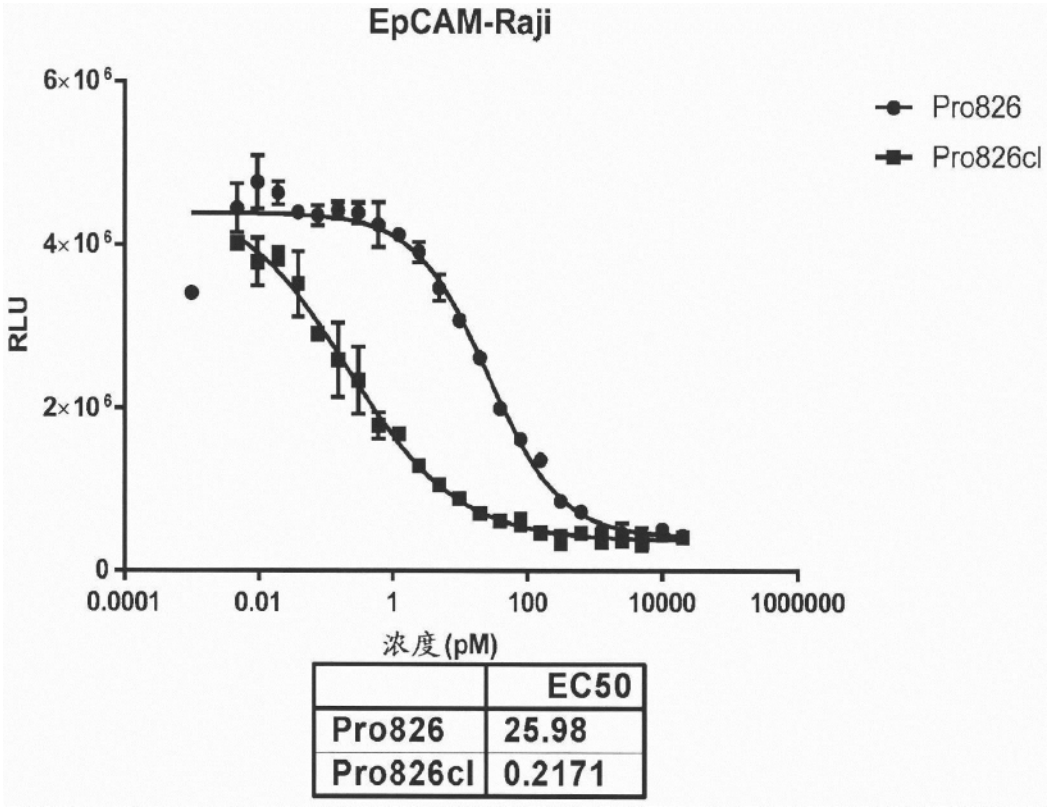
	EC50
Pro824	0.1058
Pro824cl	0.0182

图53D



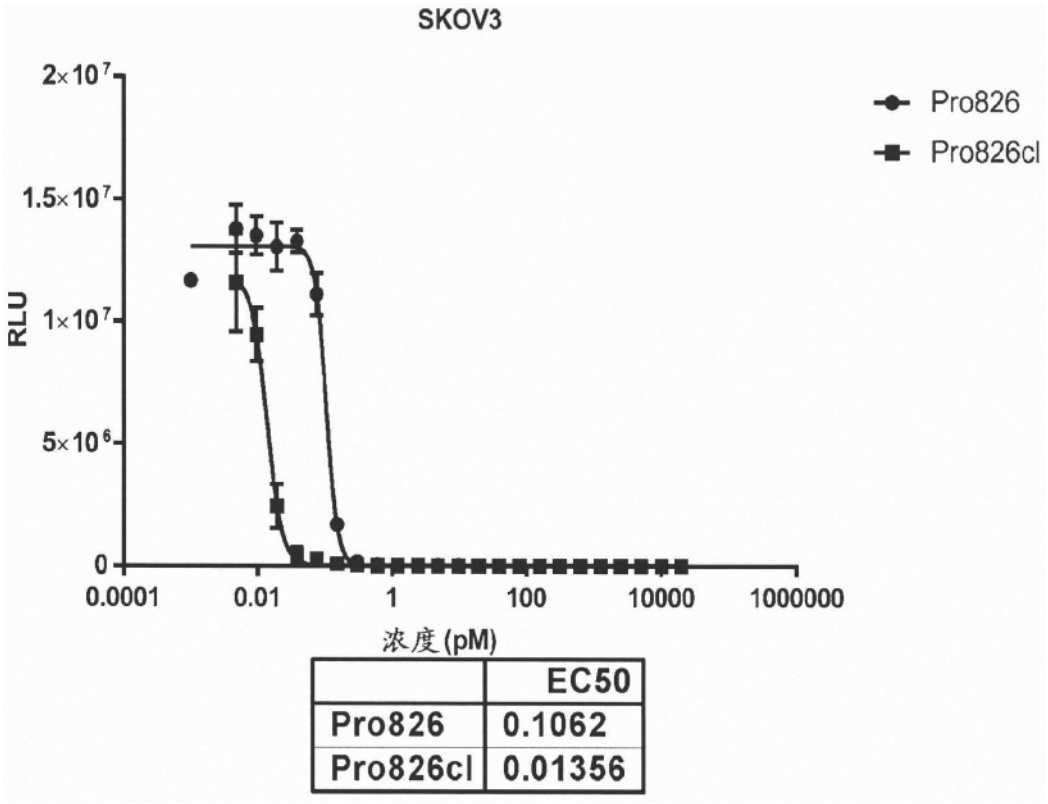
	EC50
Pro826	12.03
Pro826cl	0.2736

图54A



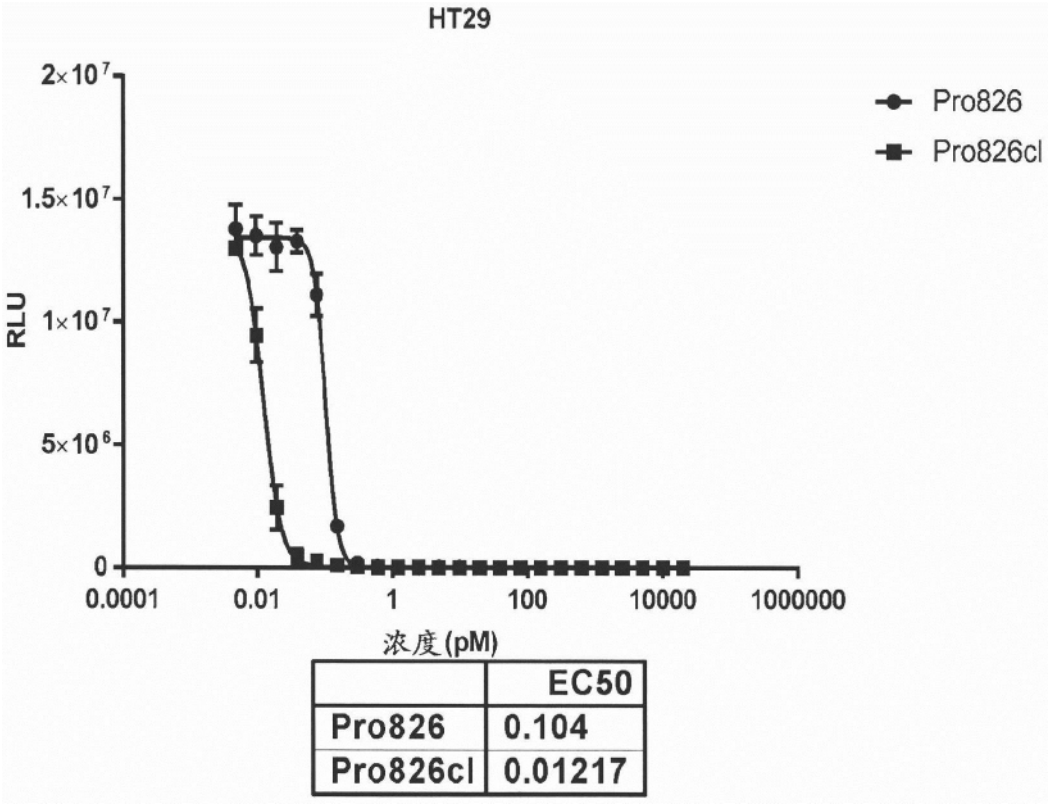
	EC50
Pro826	25.98
Pro826cl	0.2171

图54B



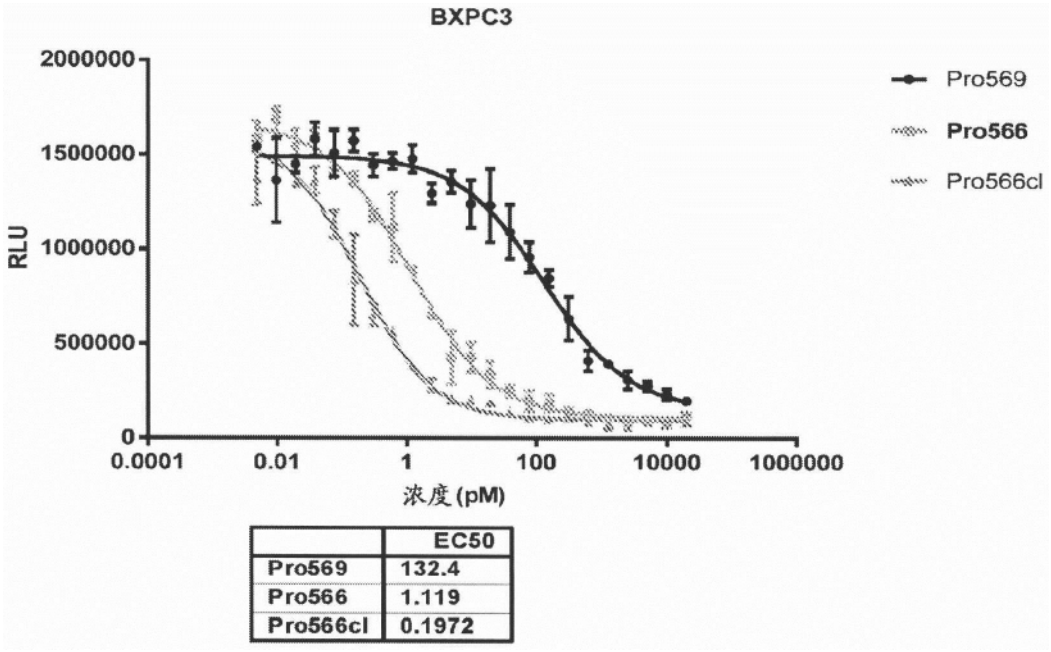
	EC50
Pro826	0.1062
Pro826cl	0.01356

图54C



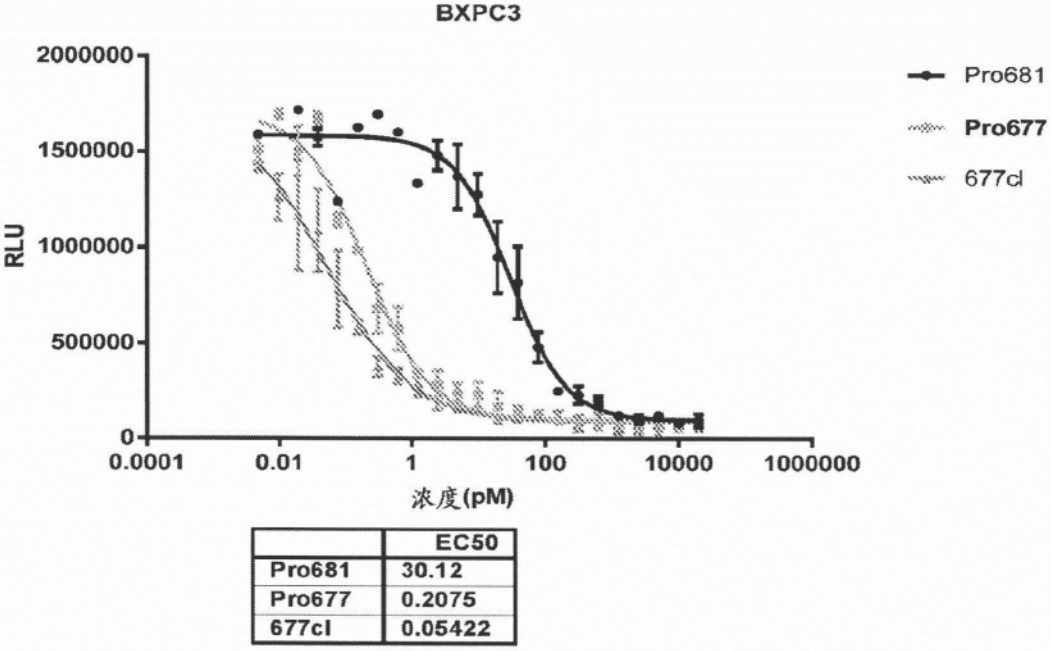
	EC50
Pro826	0.104
Pro826cl	0.01217

图54D



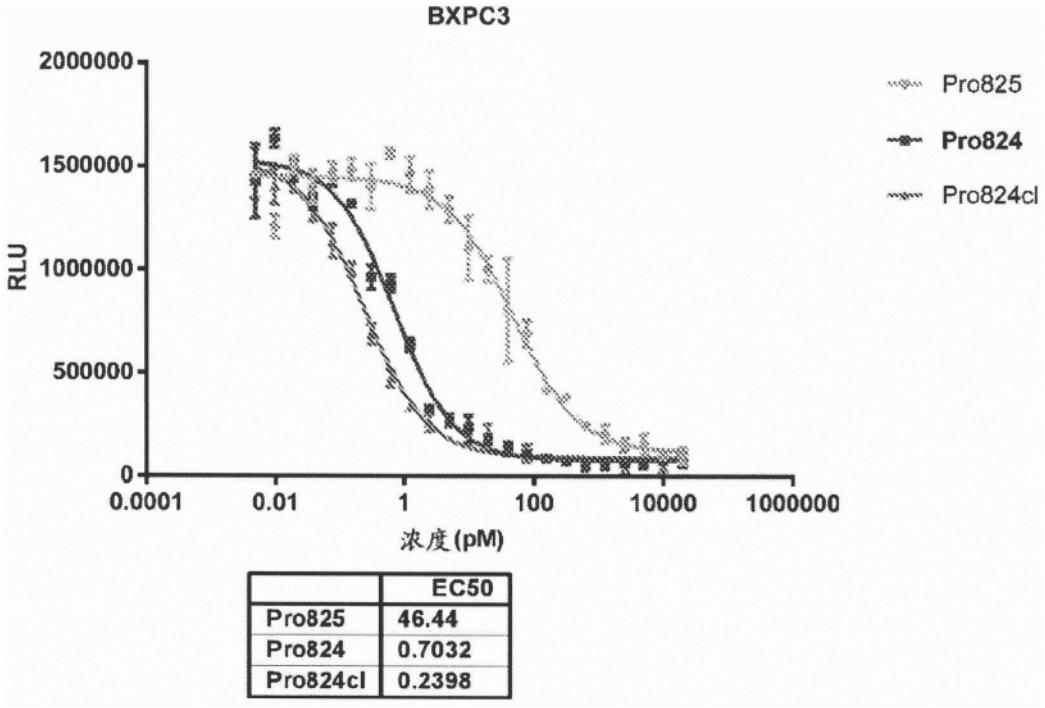
	EC50
Pro569	132.4
Pro566	1.119
Pro566cl	0.1972

图55A



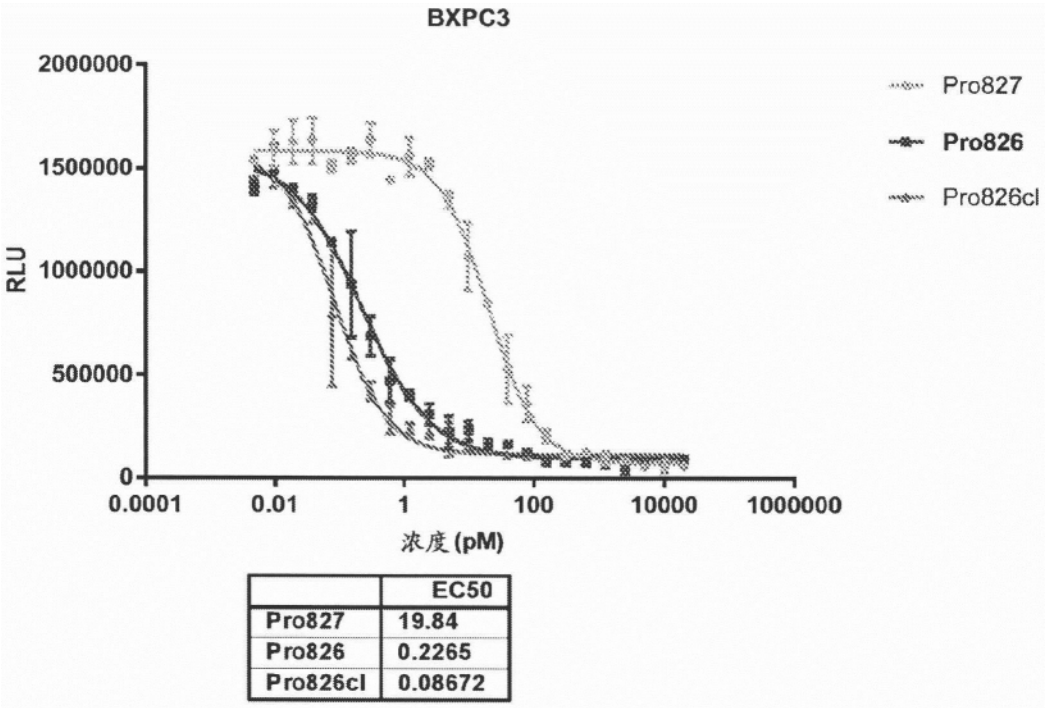
	EC50
Pro681	30.12
Pro677	0.2075
677cl	0.05422

图55B



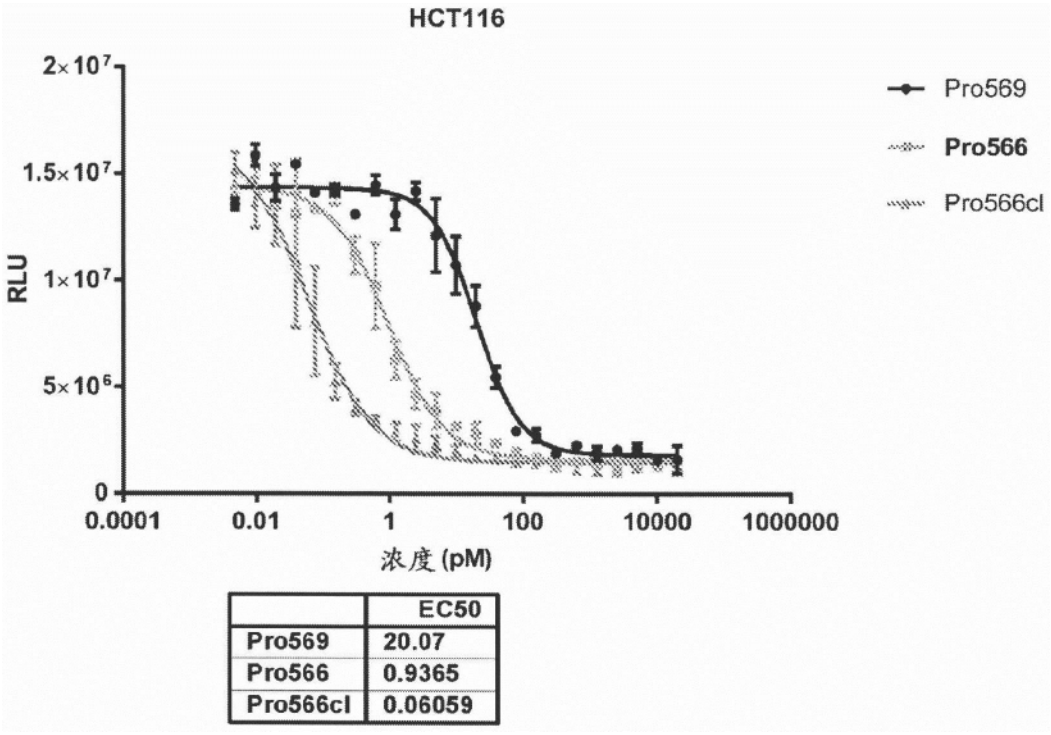
	EC50
Pro825	46.44
Pro824	0.7032
Pro824cl	0.2398

图55C



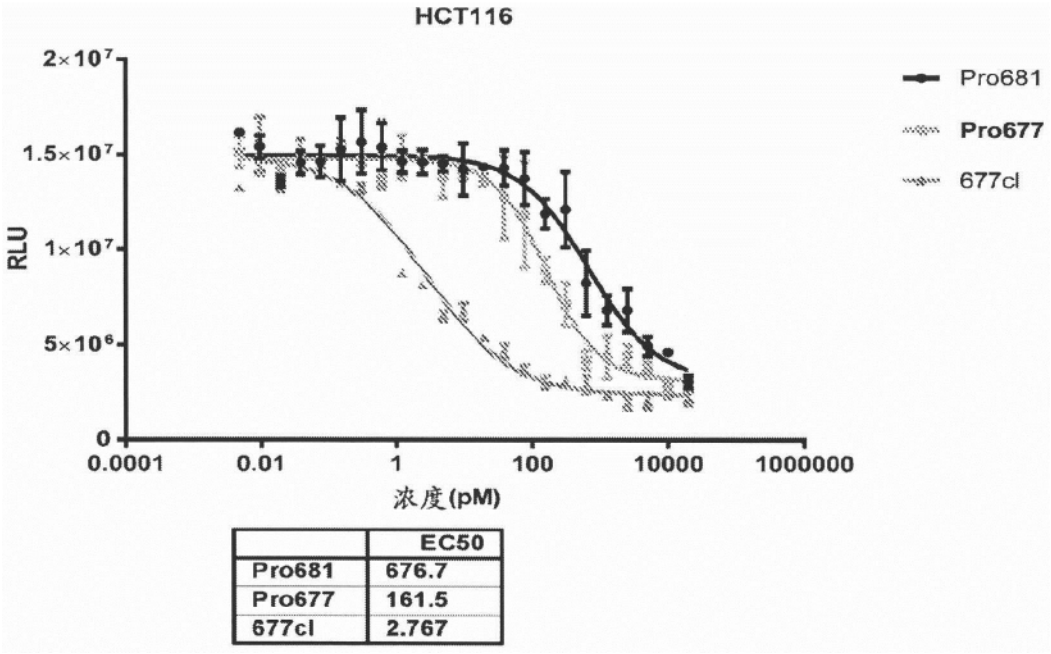
	EC50
Pro827	19.84
Pro826	0.2265
Pro826cl	0.08672

图55D



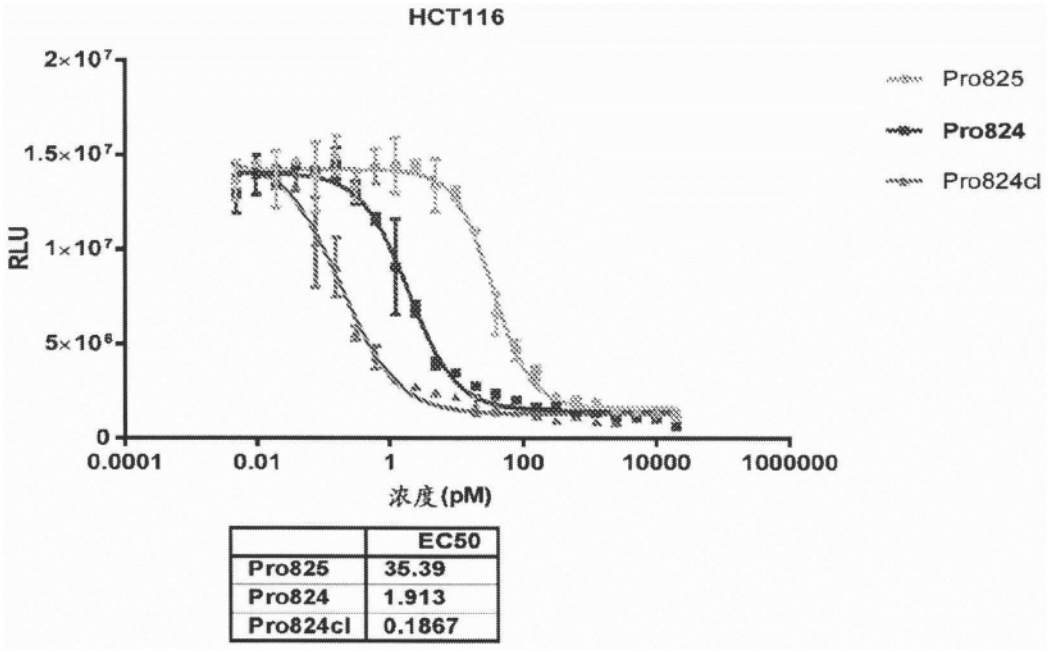
	EC50
Pro569	20.07
Pro566	0.9365
Pro566cl	0.06059

图56A



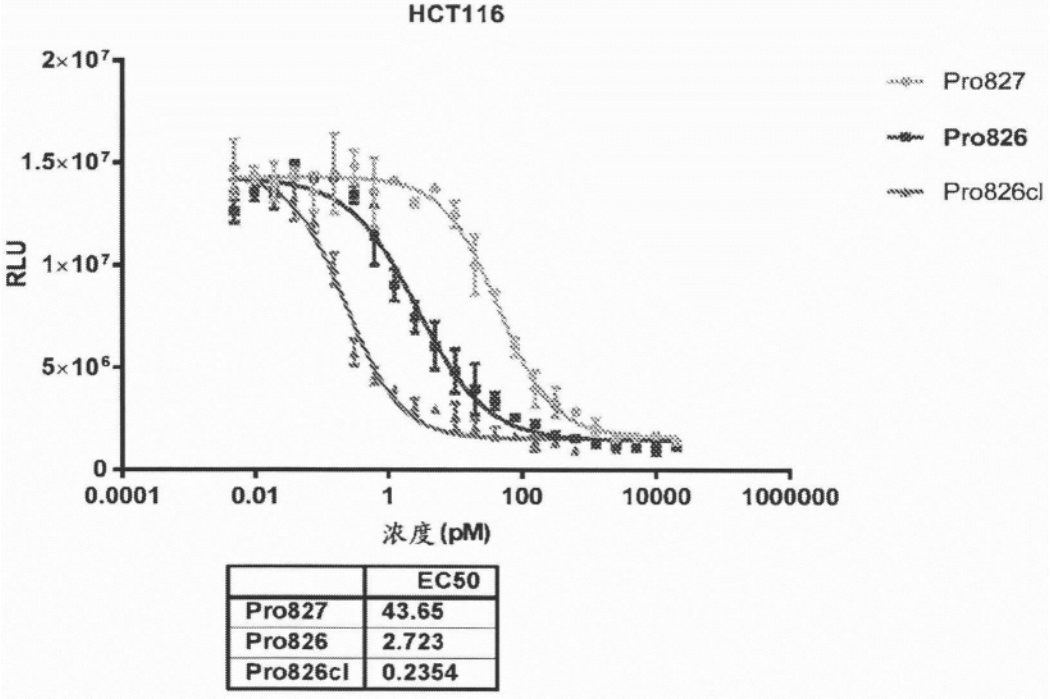
	EC50
Pro681	676.7
Pro677	161.5
677cl	2.767

图56B



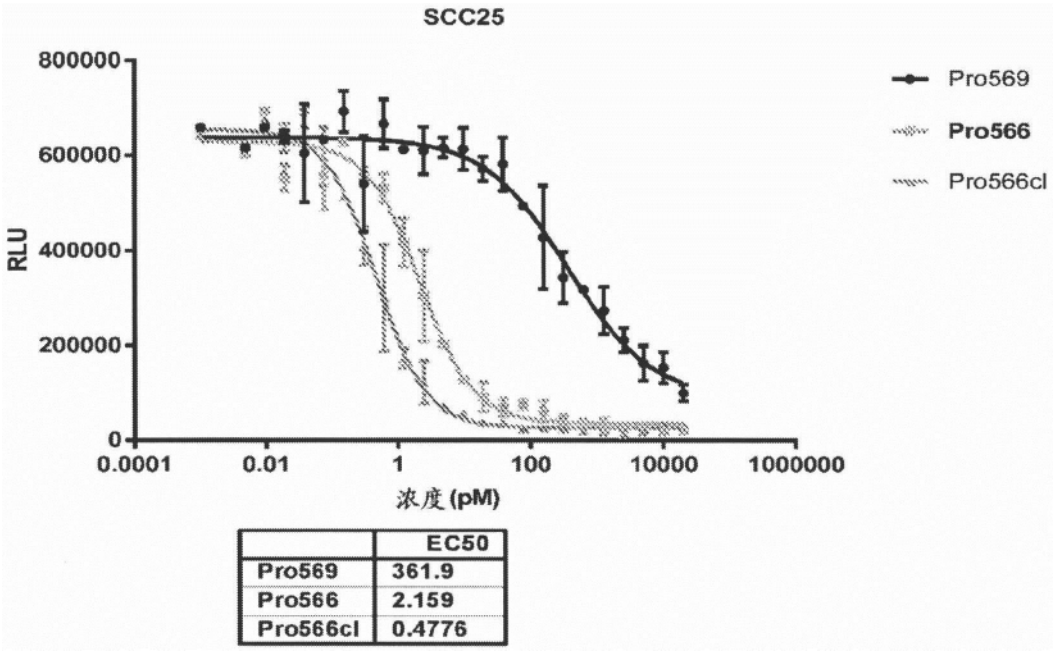
	EC50
Pro825	35.39
Pro824	1.913
Pro824cl	0.1867

图56C



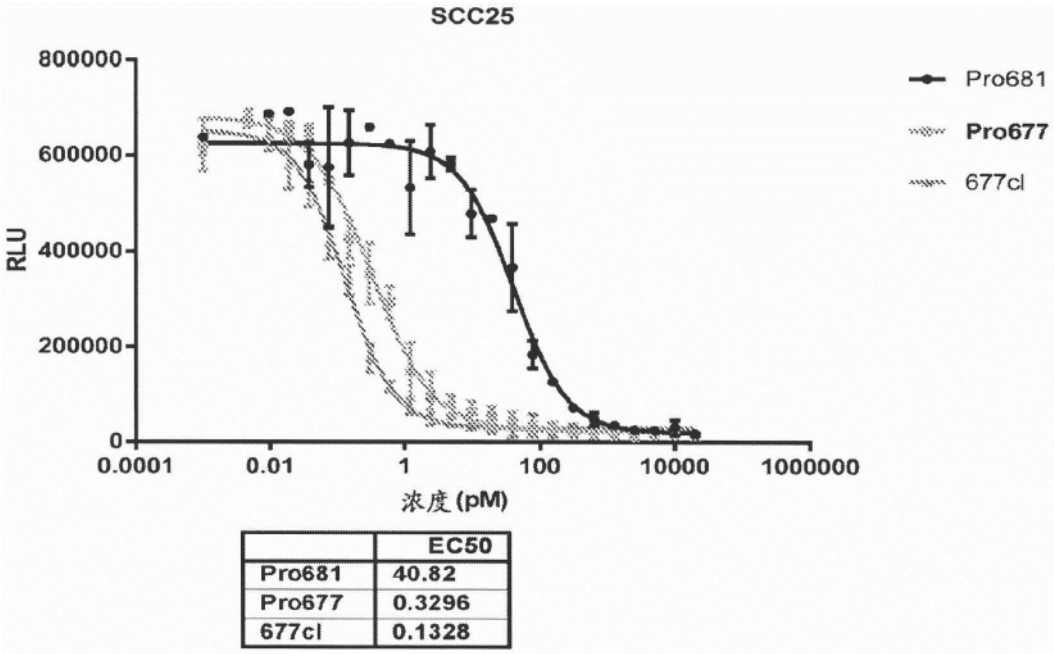
	EC50
Pro827	43.65
Pro826	2.723
Pro826cl	0.2354

图56D



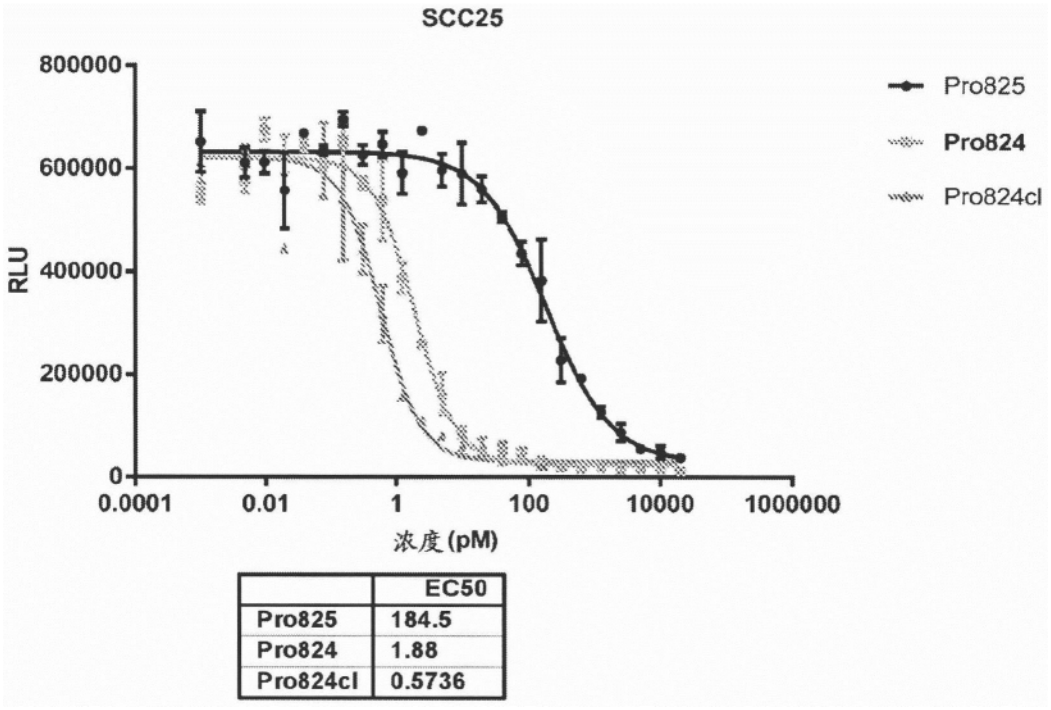
	EC50
Pro569	361.9
Pro566	2.159
Pro566cl	0.4776

图57A



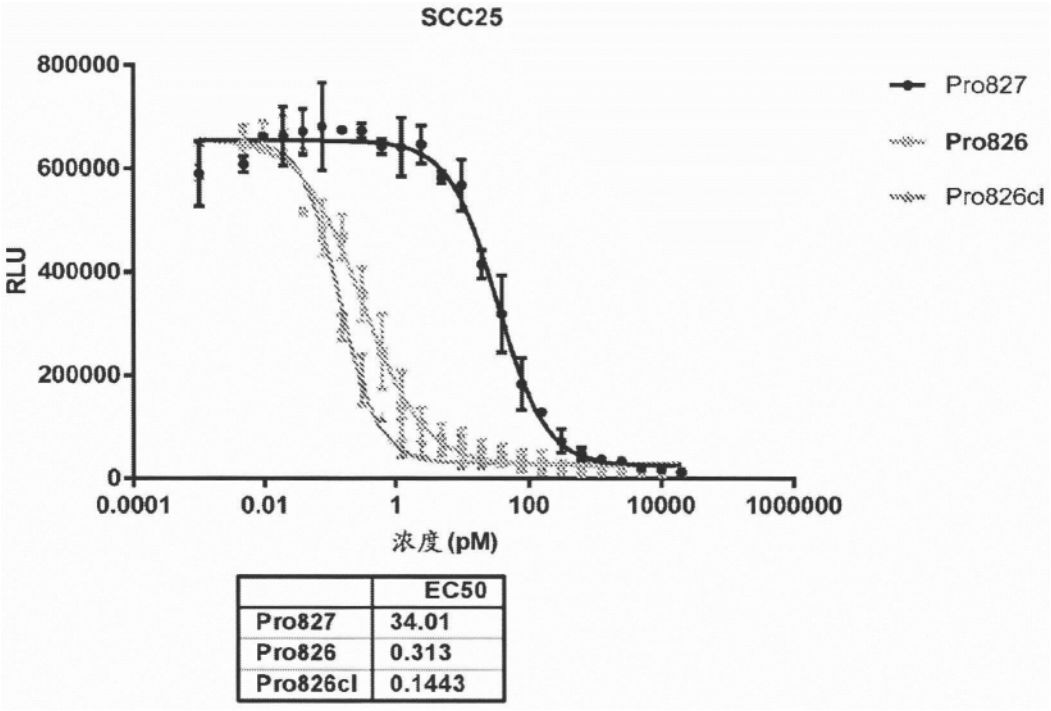
	EC50
Pro681	40.82
Pro677	0.3296
677cl	0.1328

图57B



	EC50
Pro825	184.5
Pro824	1.88
Pro824cl	0.5736

图57C



	EC50
Pro827	34.01
Pro826	0.313
Pro826cl	0.1443

图57D

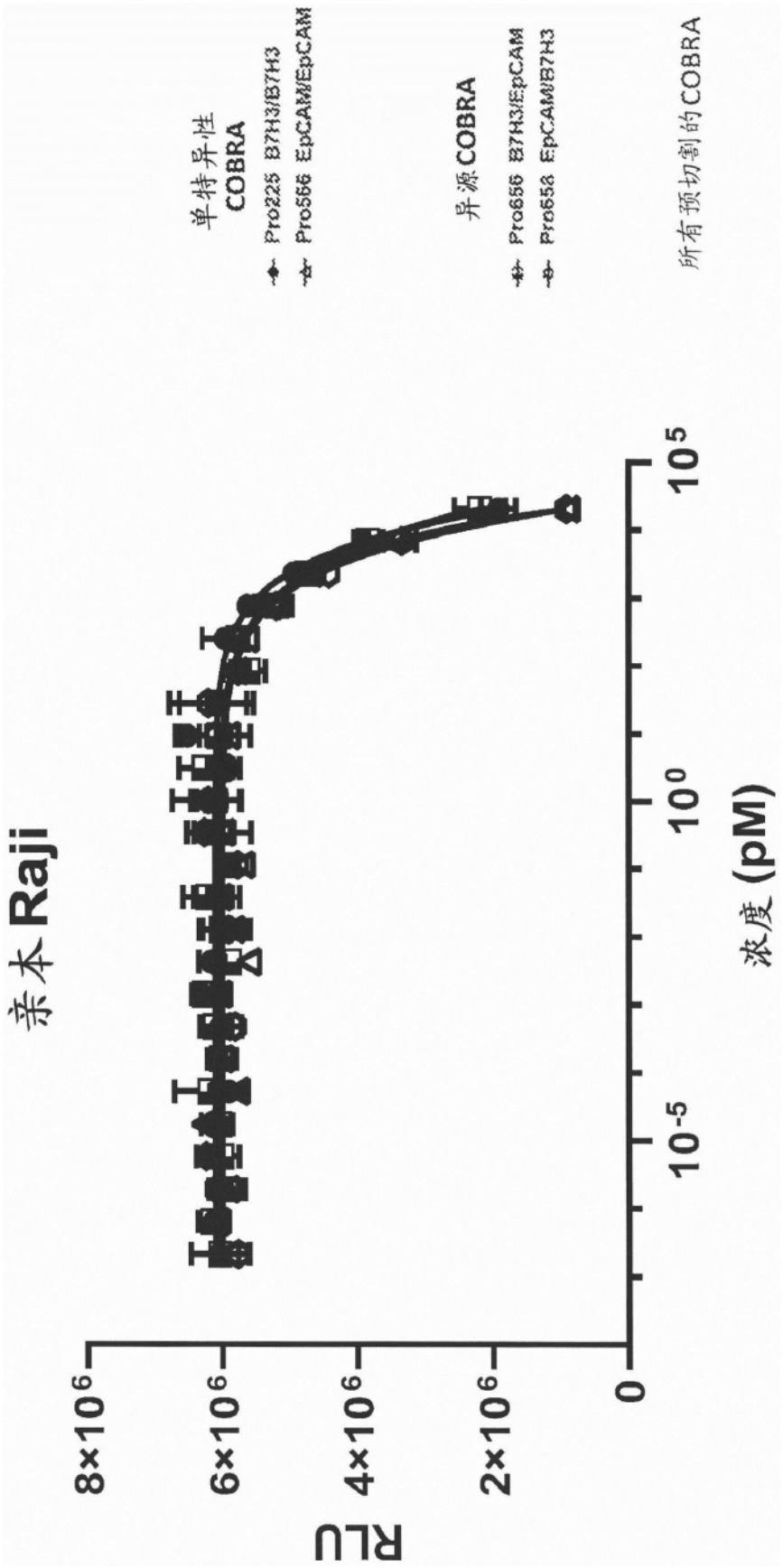

单特异性
COBRA
Pro225 B7H3/B7H3
Pro566 EpCAM/EpCAM
异源COBRA
Pro656 B7H3/EpCAM
Pro658 EpCAM/B7H3
所有预切割的COBRA
亲本 Raji
RLU
8×10^6
6×10^6
4×10^6
2×10^6
0
10^-5
10^0
10^5
浓度 (pM)

图58A

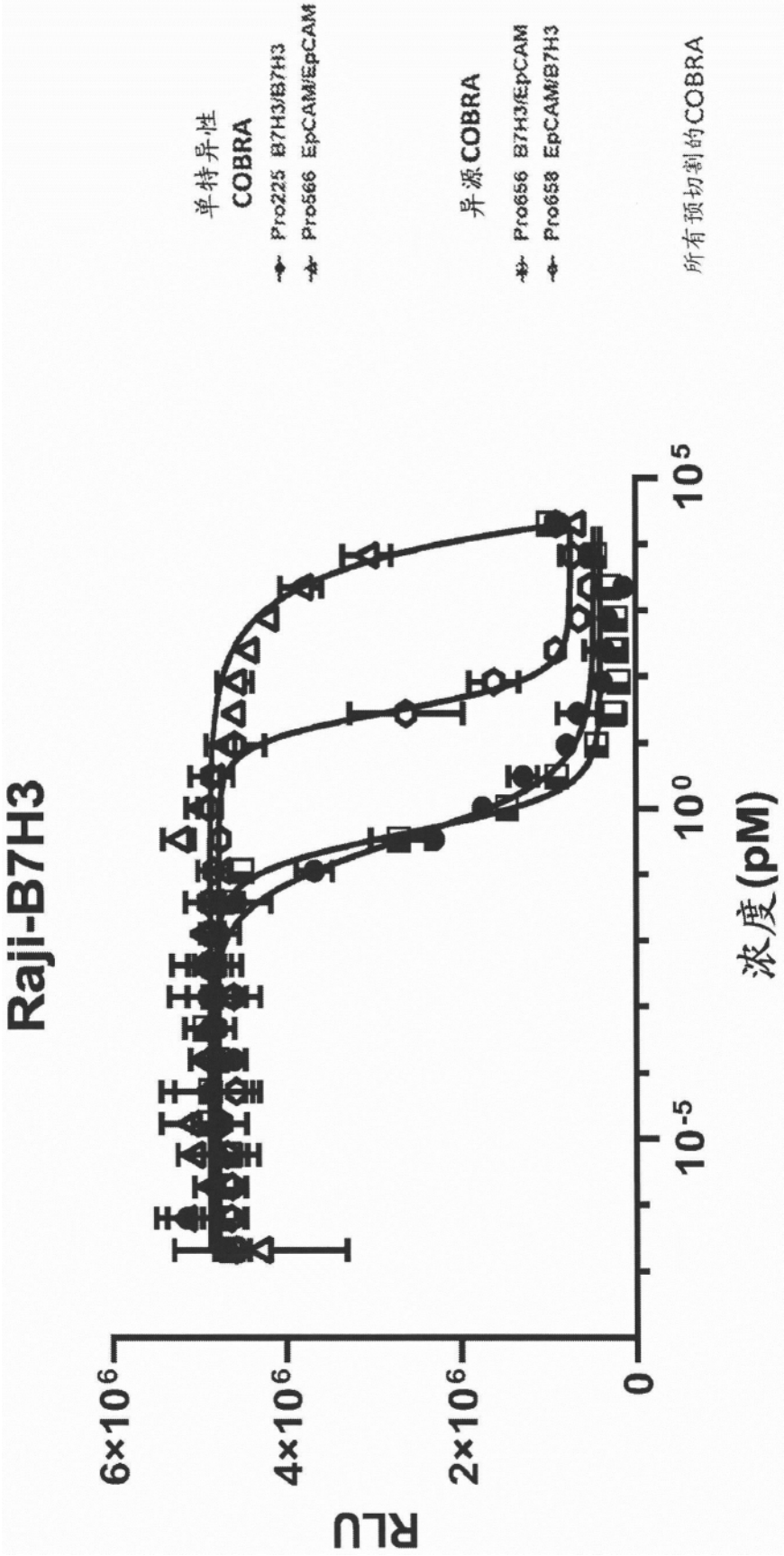

Raji-B7H3
RLU
6×10^6
4×10^6
2×10^6
0
10^-5
10^0
10^5
浓度(pM)
单特异性
COBRA
Pro225 B7H3/B7H3
Pro566 EpCAM/EpCAM
异源COBRA
Pro656 B7H3/EpCAM
Pro658 EpCAM/B7H3
所有预切割的COBRA

图58B

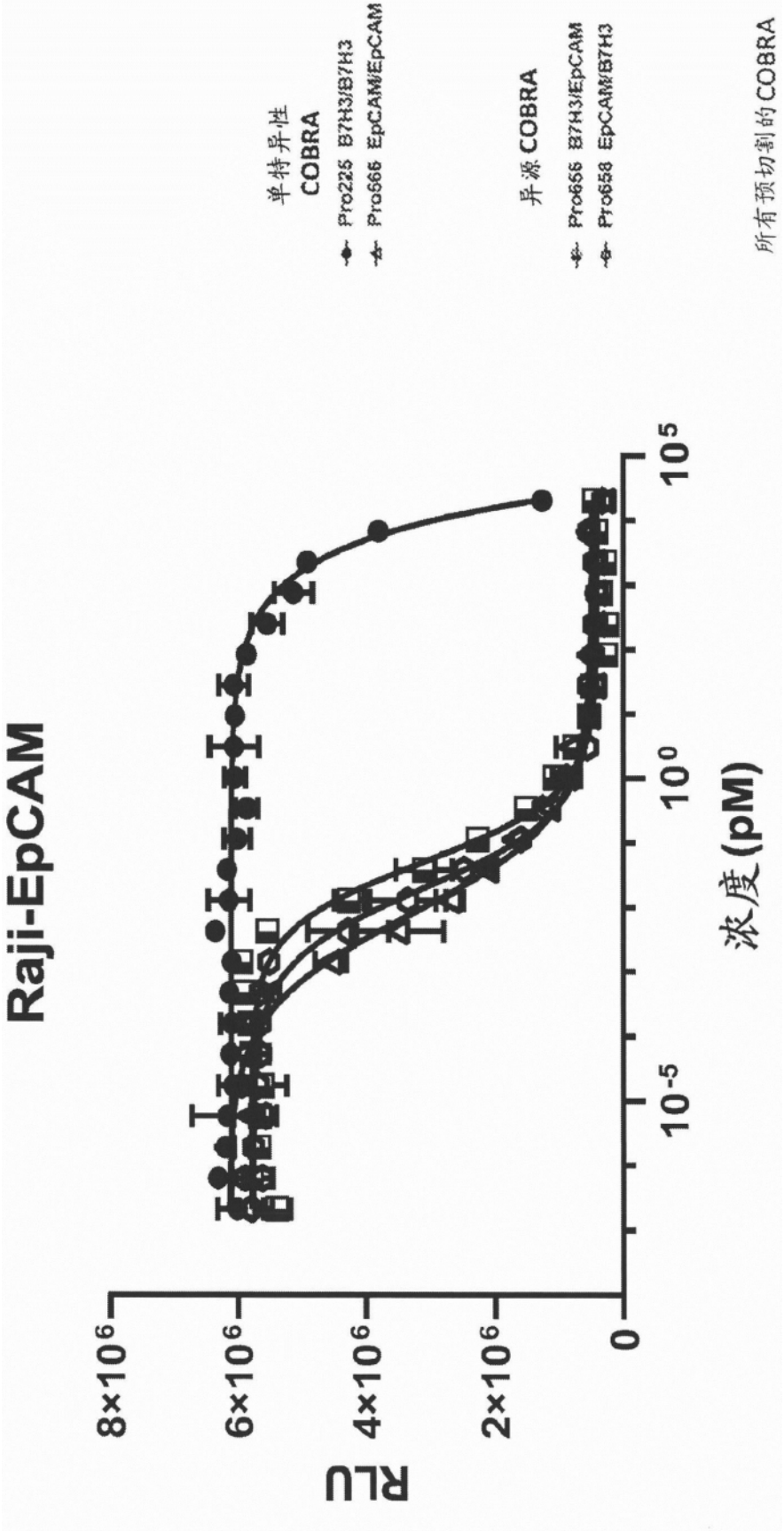

Raji-EpCAM
RLU
8×10⁶
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
10⁻⁵
10⁰
10⁵
浓度(pM)
单特异性
COBRA
Pro225 B7H3/B7H3
Pro566 EpCAM/EpCAM
异源 COBRA
Pro566 B7H3/EpCAM
Pro658 EpCAM/B7H3
所有预切割的COBRA

图58C

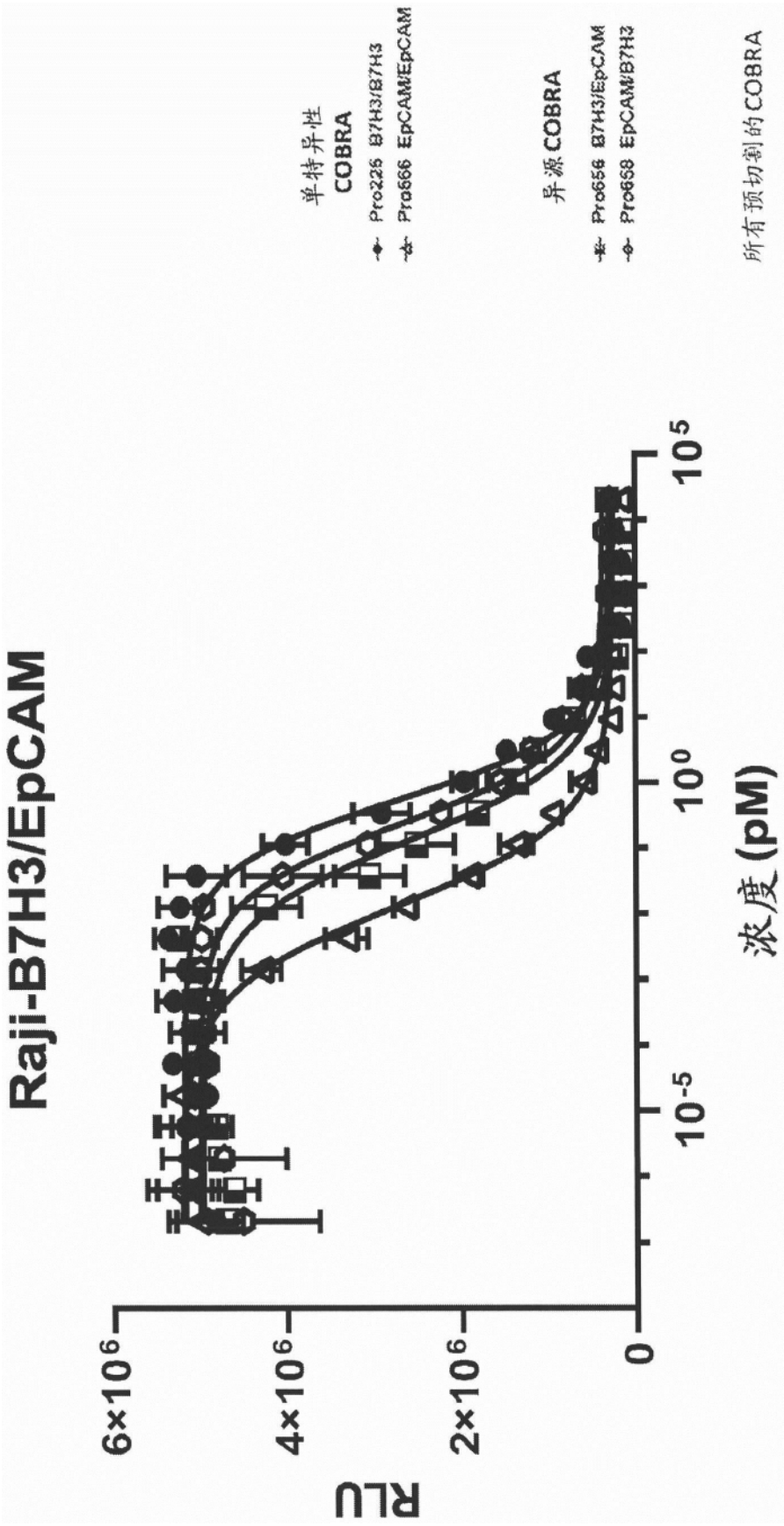

Raji-B7H3/EpCAM
RLU
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
10⁻⁵
10⁰
10⁵
浓度(pM)
单特异性
COBRA
Pro225 B7H3/B7H3
Pro666 EpCAM/EpCAM
异源COBRA
Pro656 B7H3/EpCAM
Pro658 EpCAM/B7H3
所有预切割的COBRA

图58D

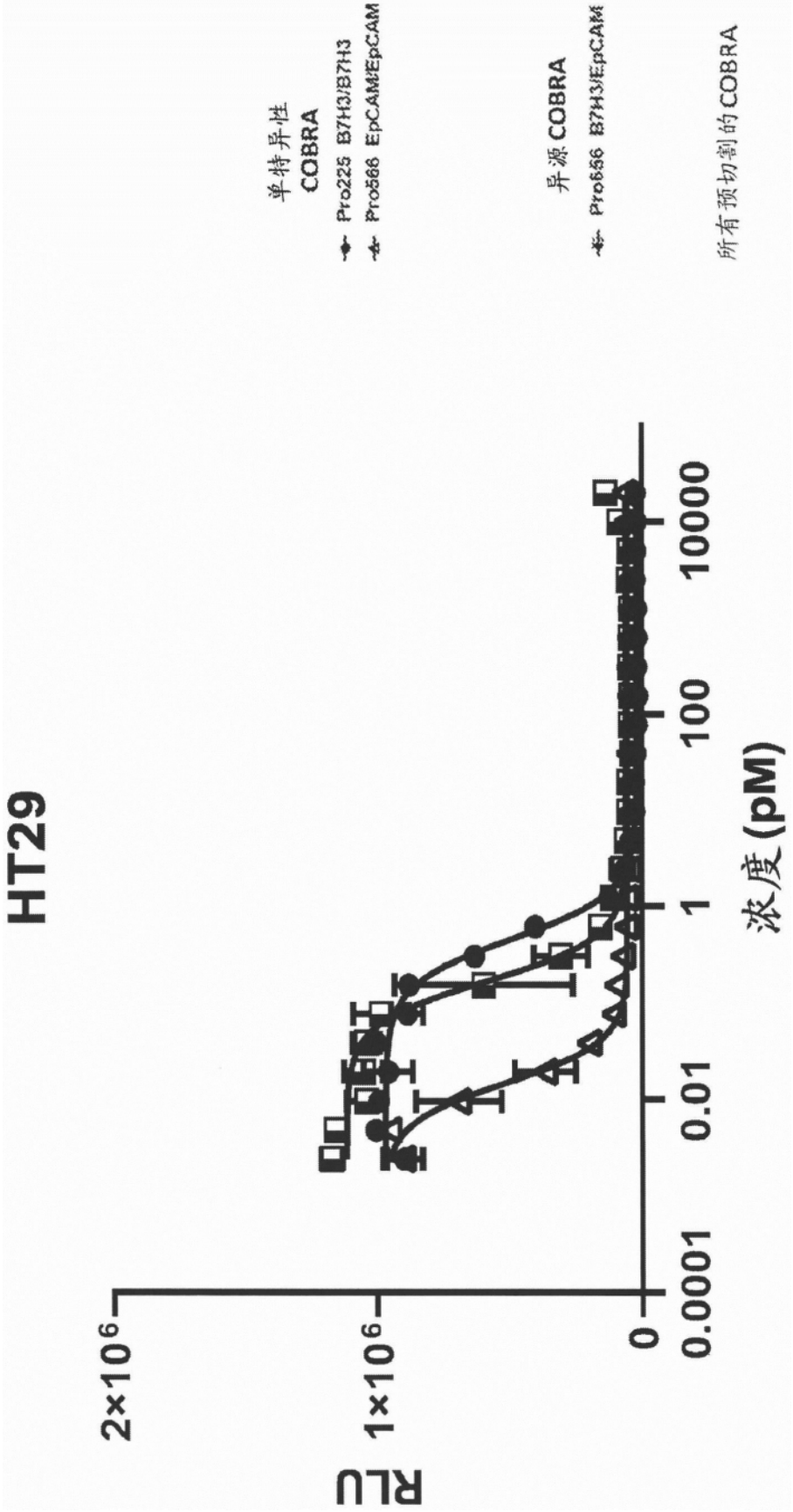

HT29
RLU
2×10^6
1×10^6
0
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度(pM)
单特异性
COBRA
Pro225 B7H3/B7H3
Pro566 EpCAM/EpCAM
异源 COBRA
Pro656 B7H3/EpCAM
所有预切割的 COBRA

图59A

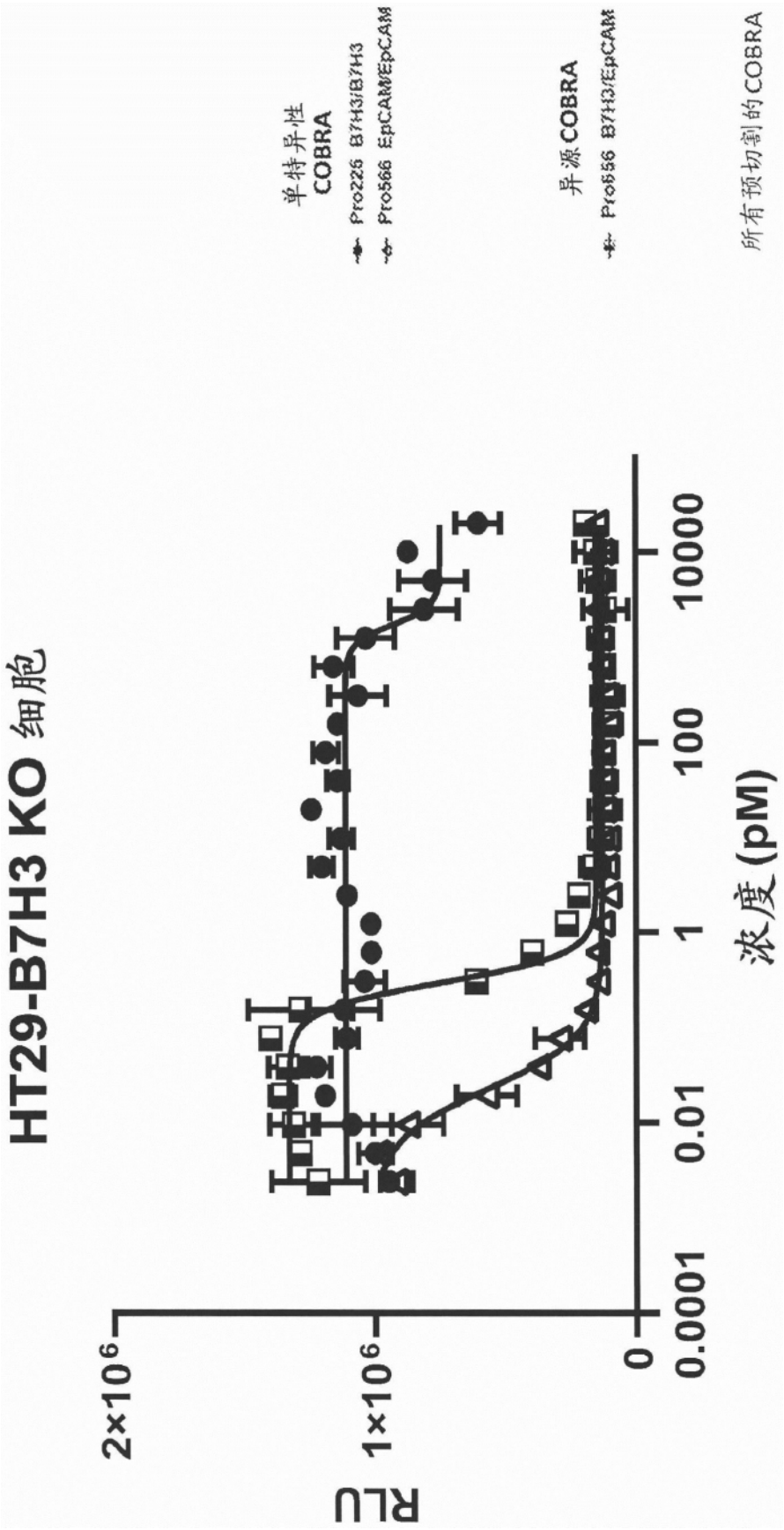

HT29-B7H3 KO 细胞
RLU
2×10⁶
1×10⁶
0
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度 (pM)
单特异性
COBRA
Pro225 B7H3iB7H3
Pro566 EpCAMiEpCAM
异源 COBRA
Pro556 B7H3iEpCAM
所有预切割的 COBRA

图59B

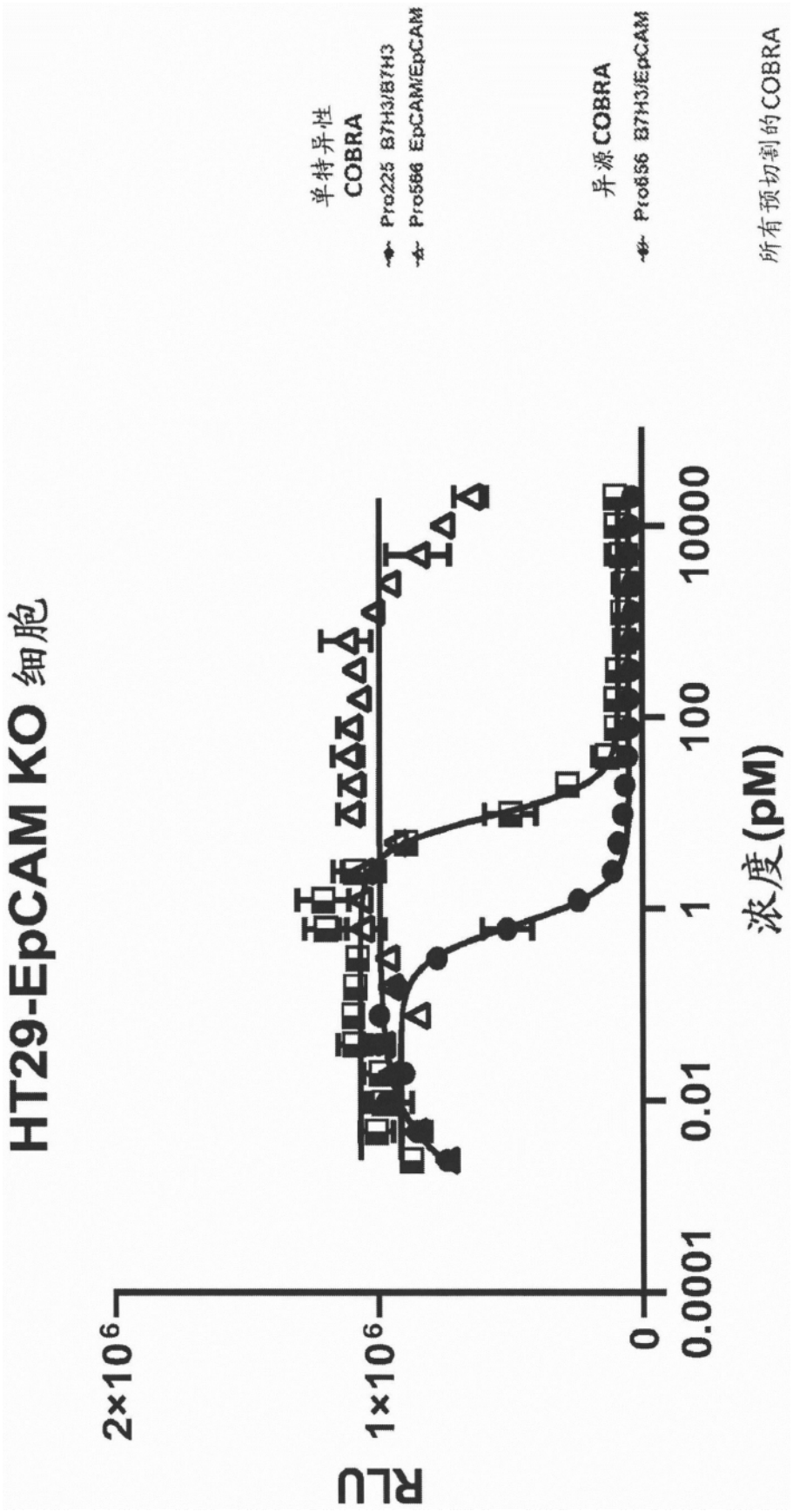

HT29-EpCAM KO 细胞
RLU
2×10^6
1×10^6
0
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度(pM)
单特异性
COBRA
Pro225 B7H3/B7H3
Pro586 EpCAM/EpCAM
异源 COBRA
Pro656 B7H3/EpCAM
所有预切割的COBRA

图59C

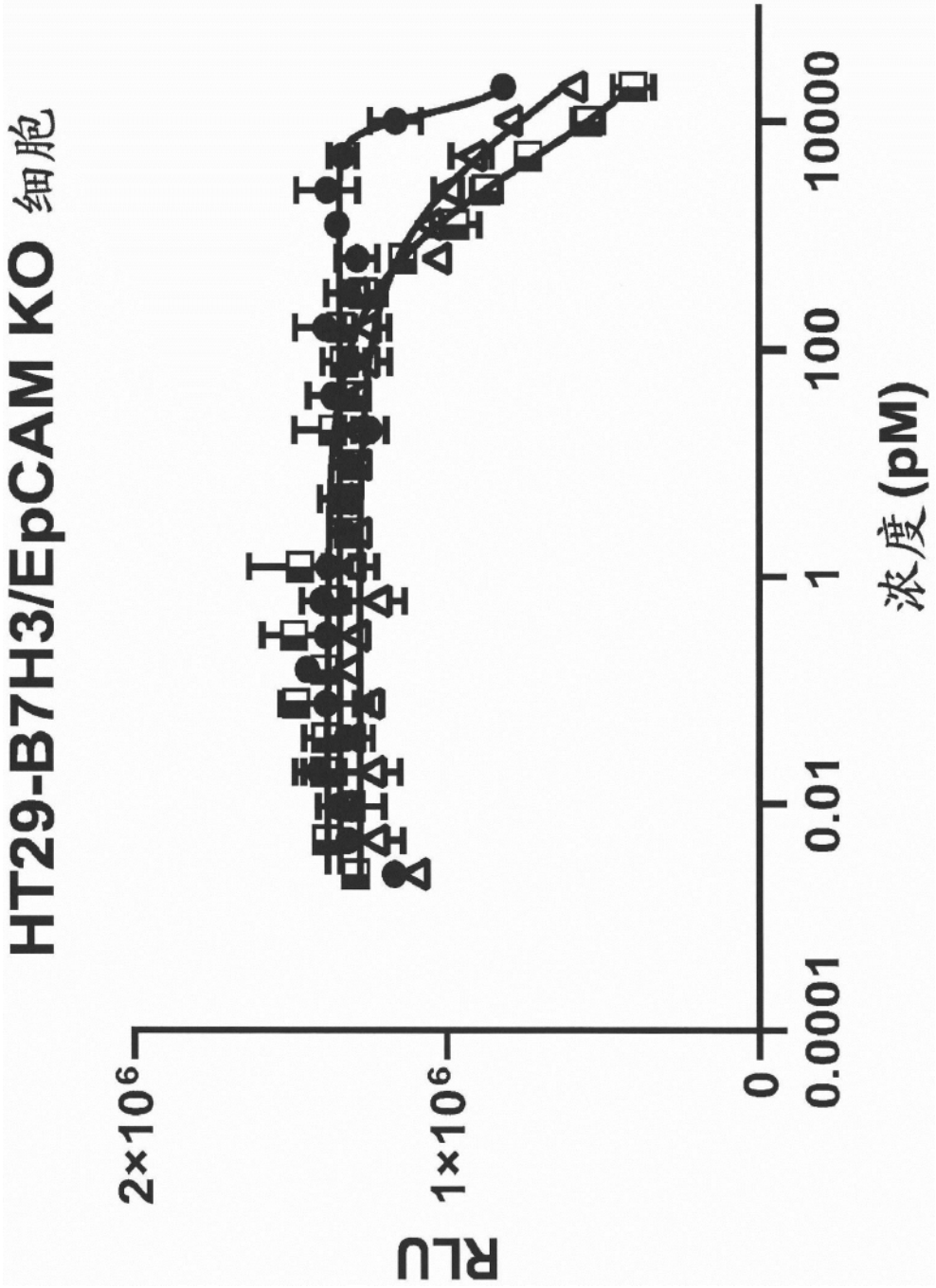

HT29-B7H3/EpCAM KO 细胞
RLU
2×10⁶
1×10⁶
0
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度(pM)

图59D

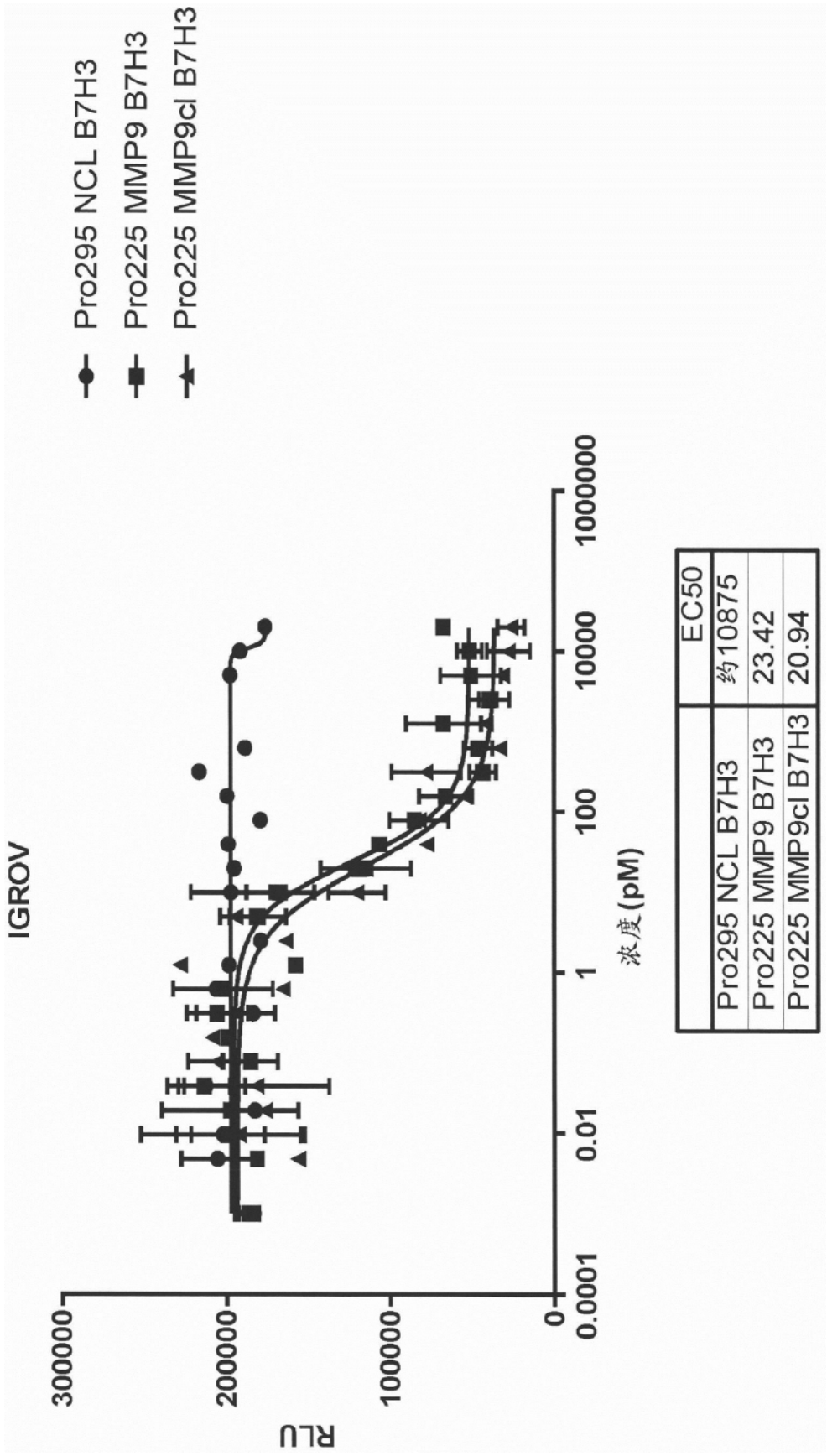

Pro295 NCL B7H3
Pro225 MMP9 B7H3
Pro225 MMP9cl B7H3
IGROV
RLU
300000
200000
100000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)
EC50
Pro295 NCL B7H3 约10875
Pro225 MMP9 B7H3 23.42
Pro225 MMP9cl B7H3 20.94

图60A

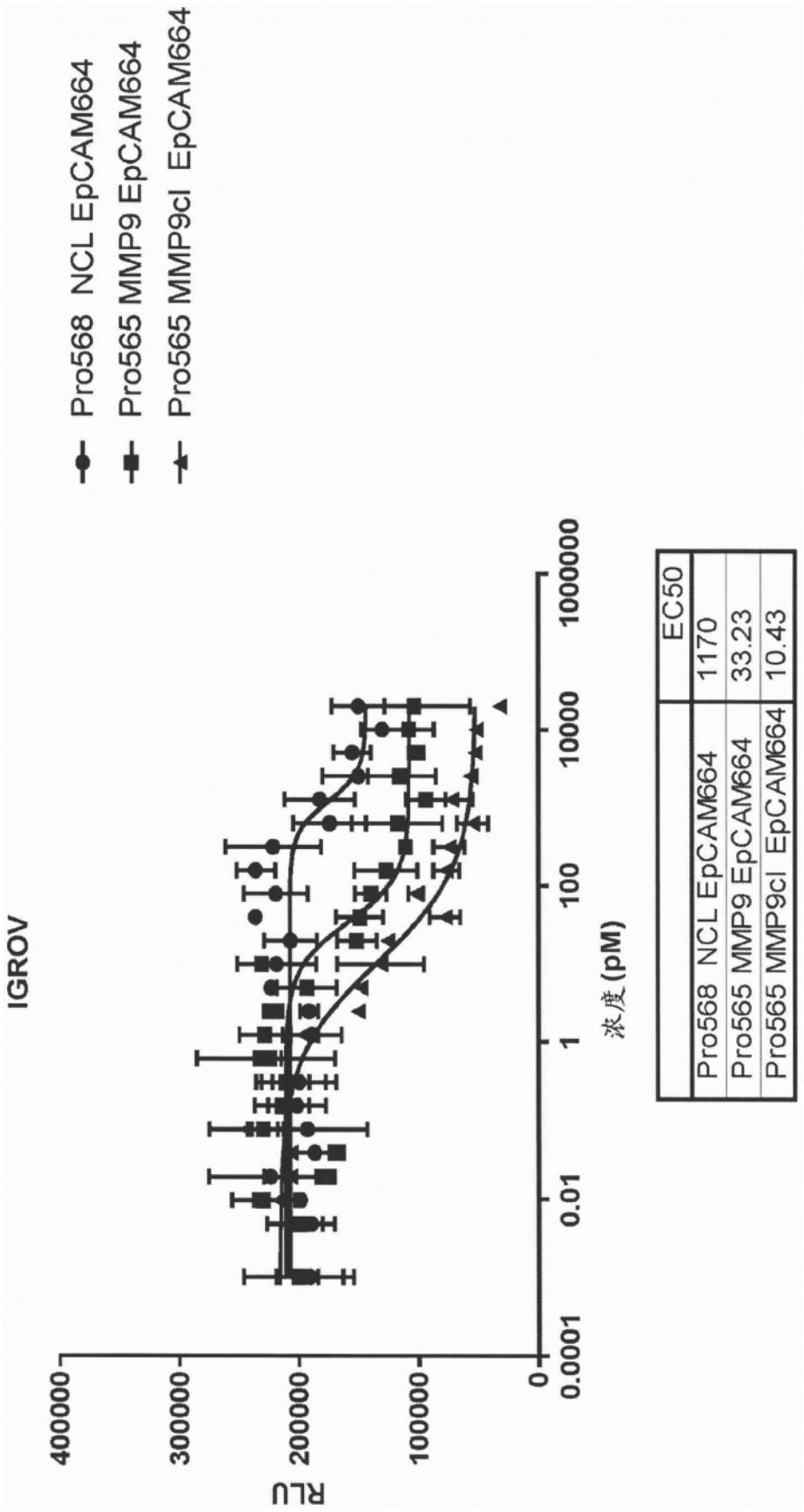

Pro568 NCL EpCAM664
Pro565 MMP9 EpCAM664
Pro565 MMP9cl EpCAM664
IGROV
RLU
400000
300000
200000
100000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)
EC50
Pro568 NCL EpCAM664 1170
Pro565 MMP9 EpCAM664 33.23
Pro565 MMP9cl EpCAM664 10.43

图60B

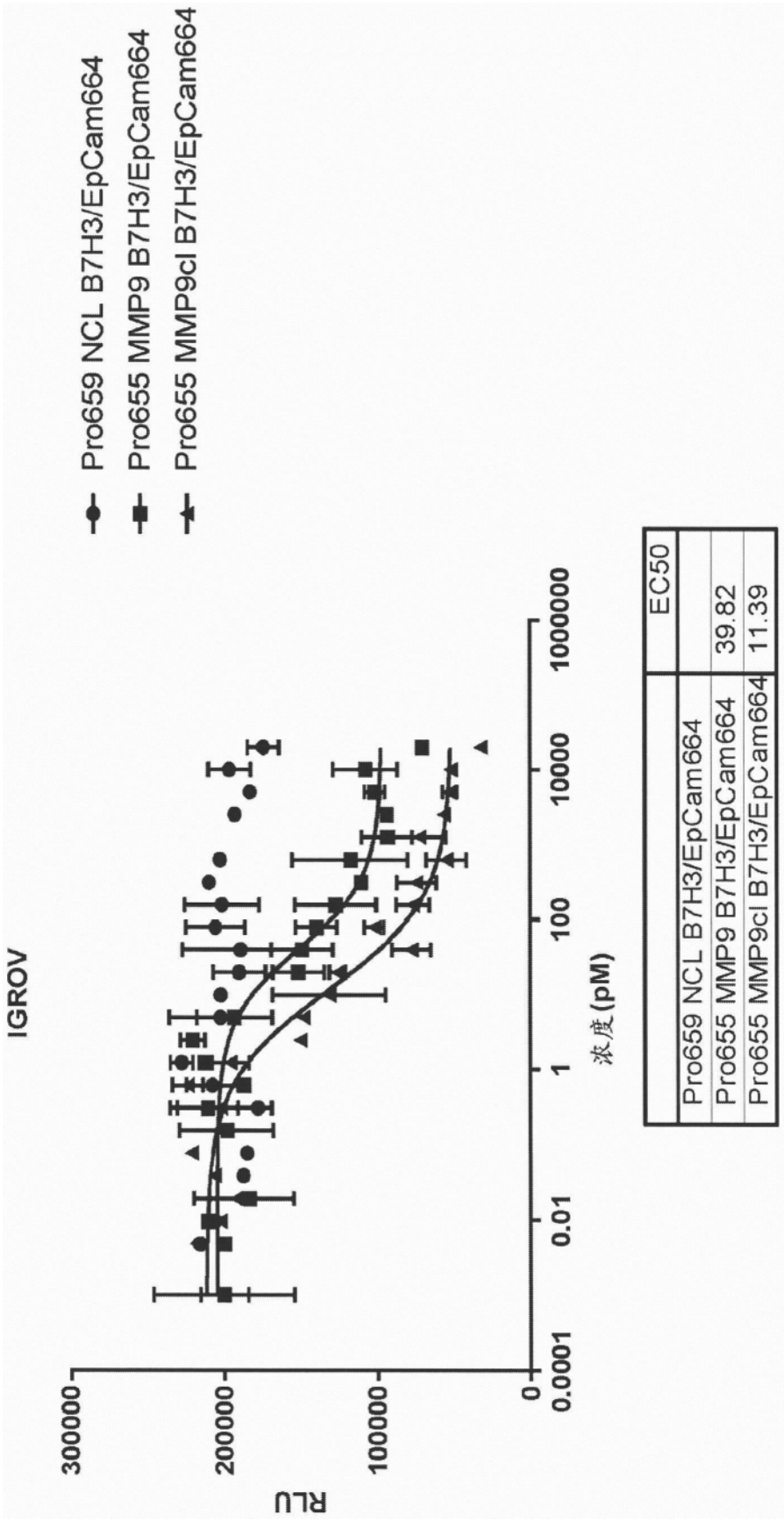

Pro659 NCL B7H3/EpCam664
Pro655 MMP9 B7H3/EpCam664
Pro655 MMP9cl B7H3/EpCam664
IGROV
RLU
300000
200000
100000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)
EC50
Pro659 NCL B7H3/EpCam664
Pro655 MMP9 B7H3/EpCam664 39.82
Pro655 MMP9cl B7H3/EpCam664 11.39

图60C

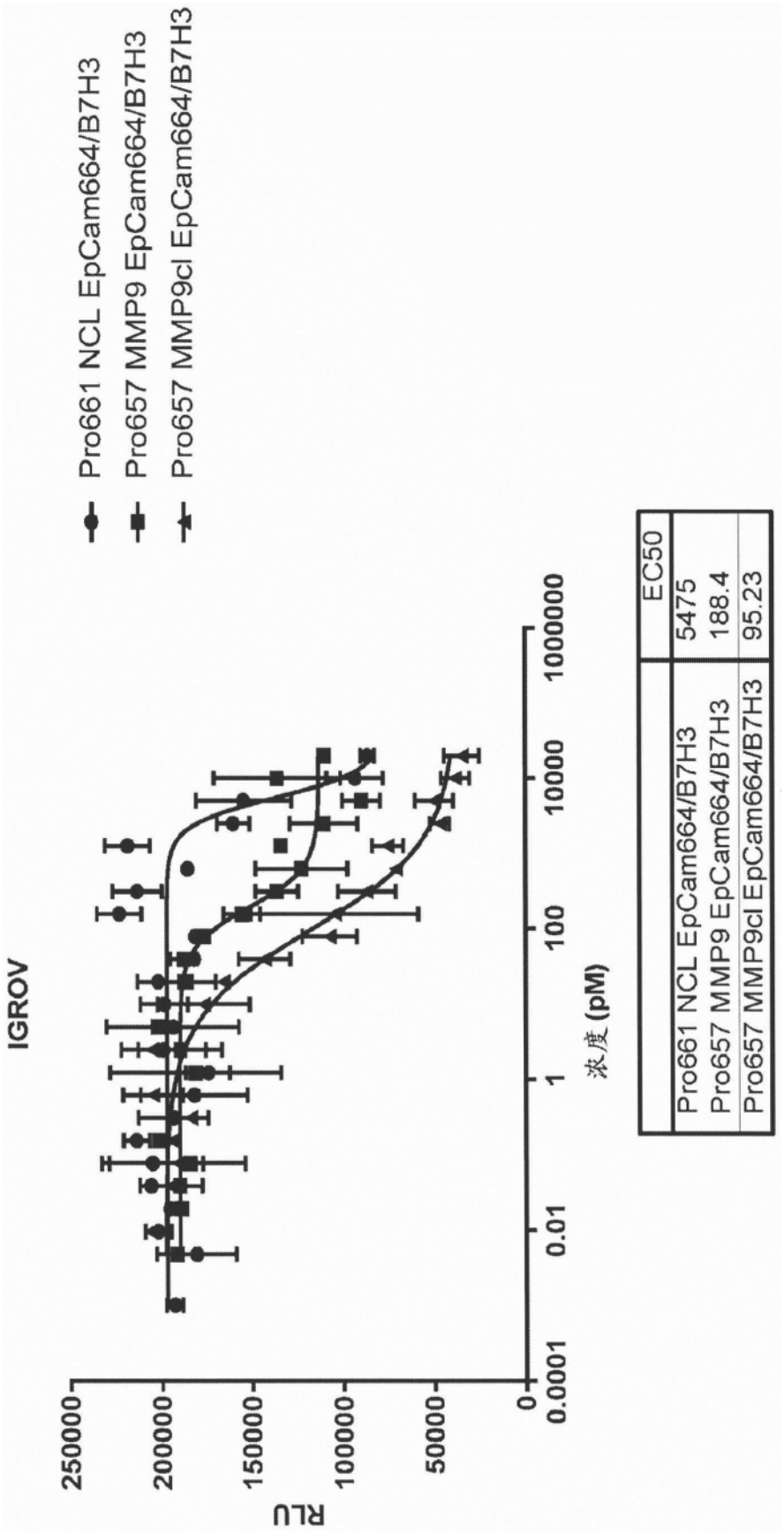

Pro661 NCL EpCam664/B7H3
Pro657 MMP9 EpCam664/B7H3
Pro657 MMP9cl EpCam664/B7H3
IGROV
RLU
250000
200000
150000
100000
50000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度 (pM)
EC50
Pro661 NCL EpCam664/B7H3 5475
Pro657 MMP9 EpCam664/B7H3 188.4
Pro657 MMP9cl EpCam664/B7H3 95.23

图60D

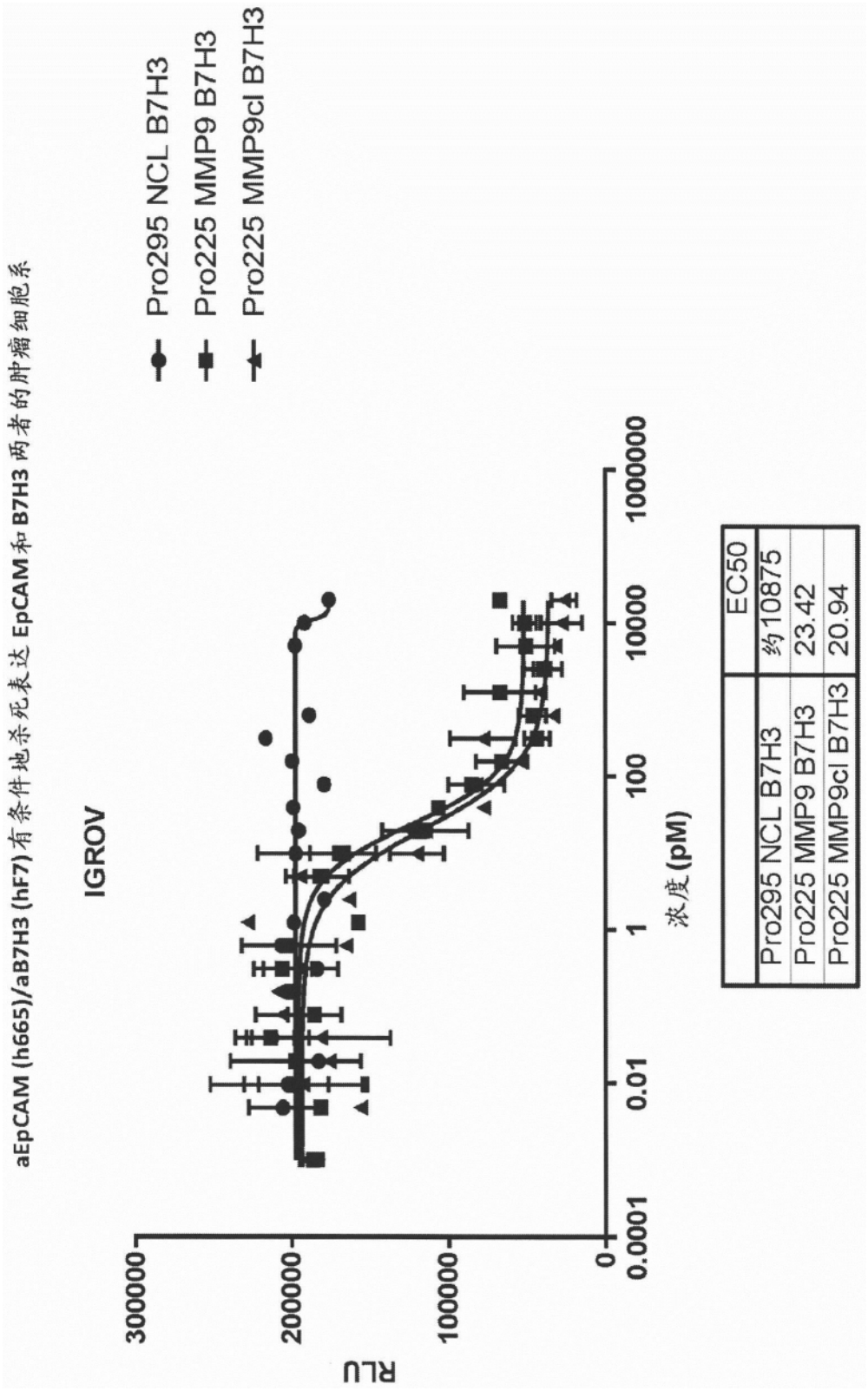

aEpCAM (h665)/aB7H3 (hF7)有条件地杀死表达 EpCAM和 B7H3 两者的肿瘤细胞系
IGROV
Pro295 NCL B7H3
Pro225 MMP9 B7H3
Pro225 MMP9cl B7H3
RLU
300000
200000
100000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度 (pM)
EC50
Pro295 NCL B7H3 约10875
Pro225 MMP9 B7H3 23.42
Pro225 MMP9cl B7H3 20.94

图61A

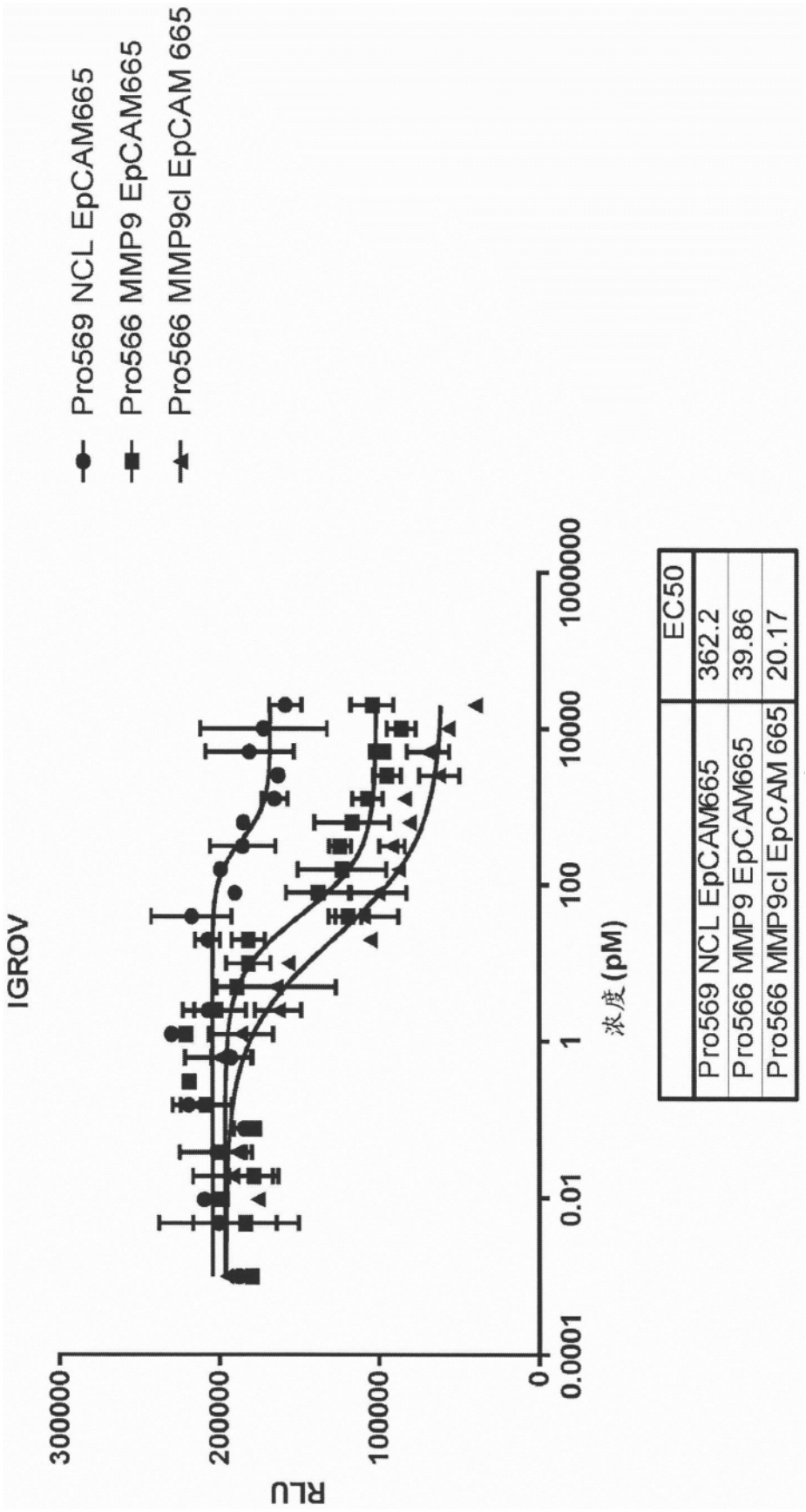

Pro569 NCL EpCAM665
Pro566 MMP9 EpCAM665
Pro566 MMP9cl EpCAM 665
IGROV
RLU
300000
200000
100000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)
EC50
Pro569 NCL EpCAM665 362.2
Pro566 MMP9 EpCAM665 39.86
Pro566 MMP9cl EpCAM 665 20.17

图61B

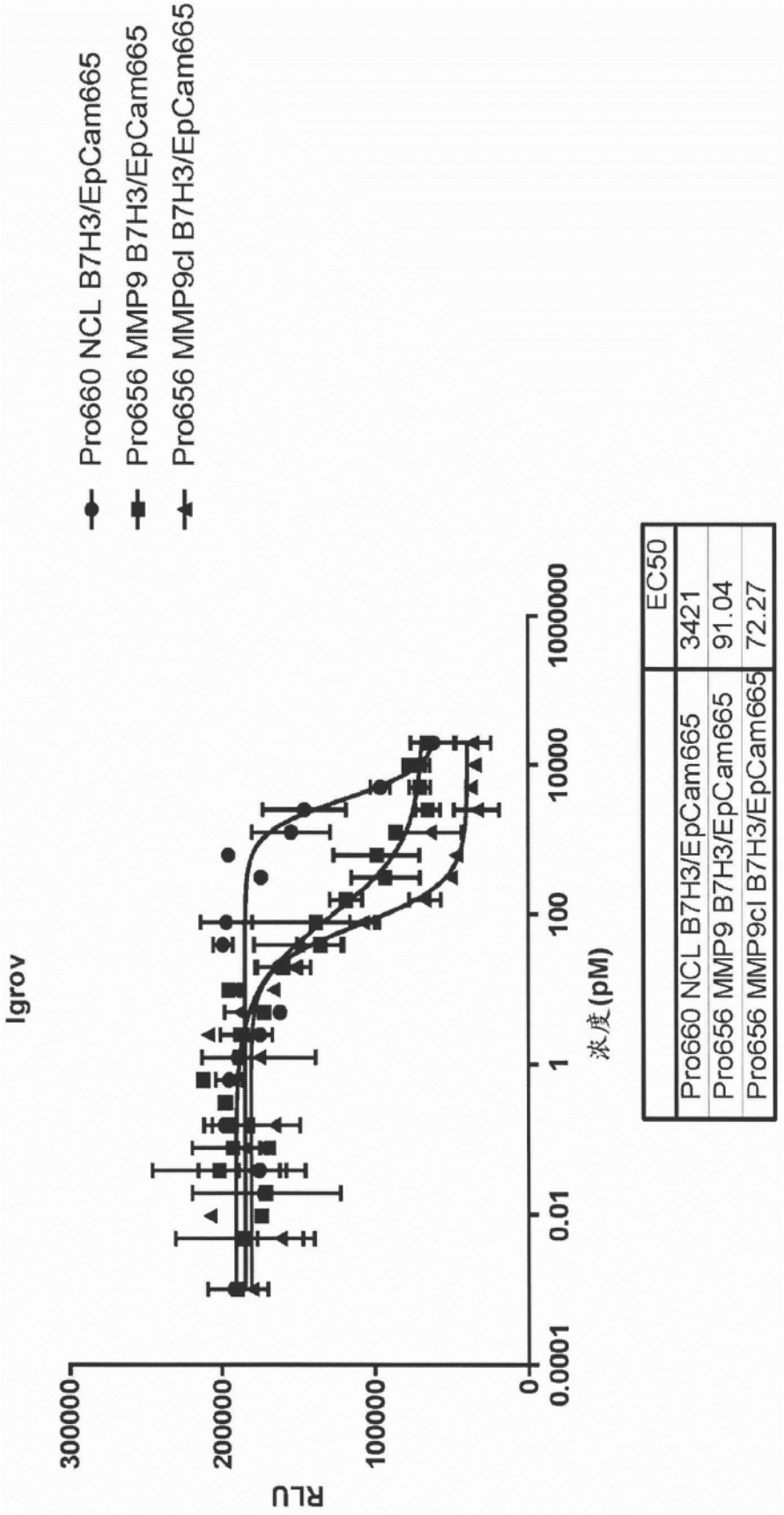

Pro660 NCL B7H3/EpCam665
Pro656 MMP9 B7H3/EpCam665
Pro656 MMP9cl B7H3/EpCam665
Igrov
RLU
300000
200000
100000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)
EC50
Pro660 NCL B7H3/EpCam665 3421
Pro656 MMP9 B7H3/EpCam665 91.04
Pro656 MMP9cl B7H3/EpCam665 72.27

图61C

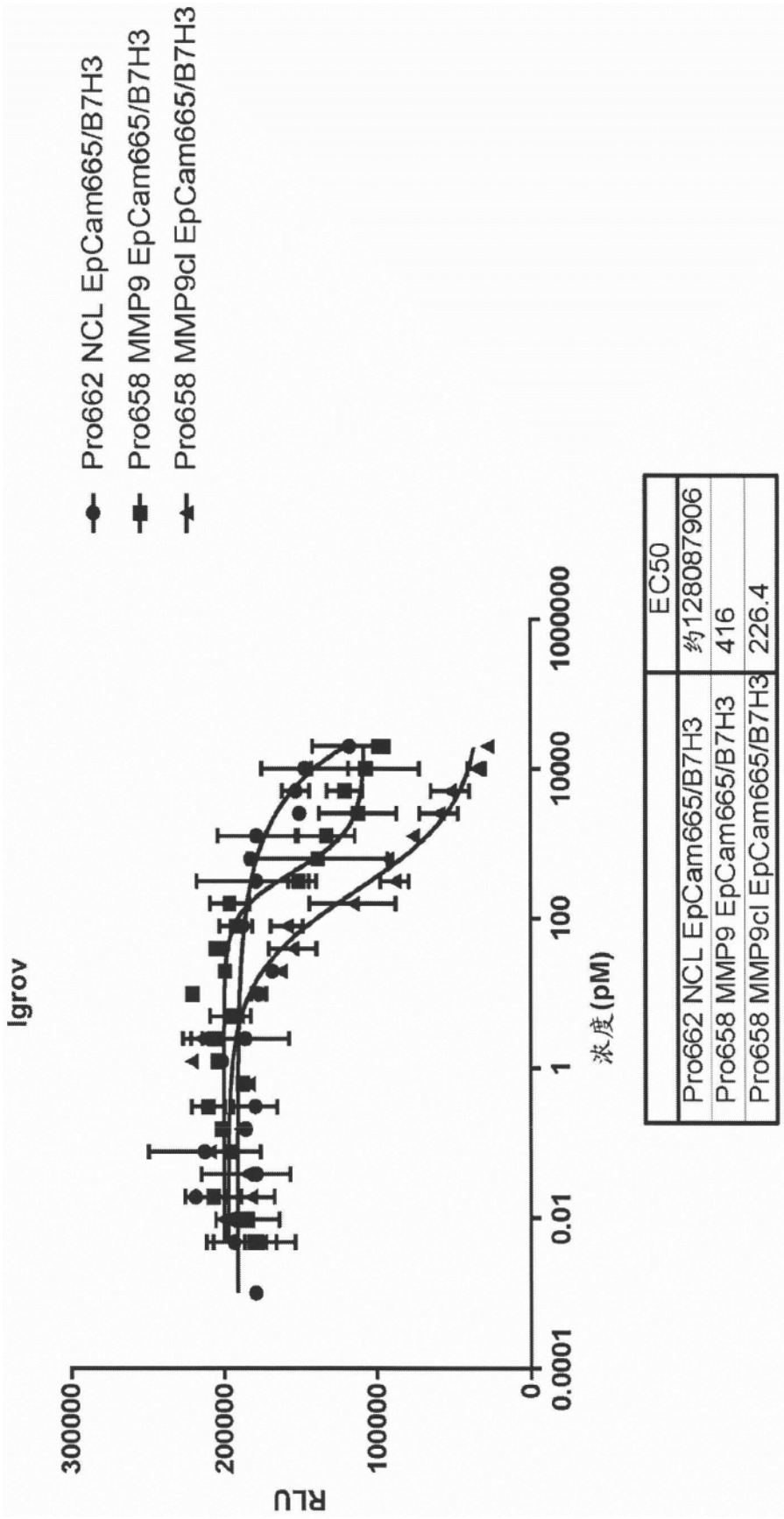

Pro662 NCL EpCam665/B7H3
Pro658 MMP9 EpCam665/B7H3
Pro658 MMP9cl EpCam665/B7H3
Igrov
RLU
300000
200000
100000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)
EC50
Pro662 NCL EpCam665/B7H3 约128087906
Pro658 MMP9 EpCam665/B7H3 416
Pro658 MMP9cl EpCam665/B7H3 226.4

图61D

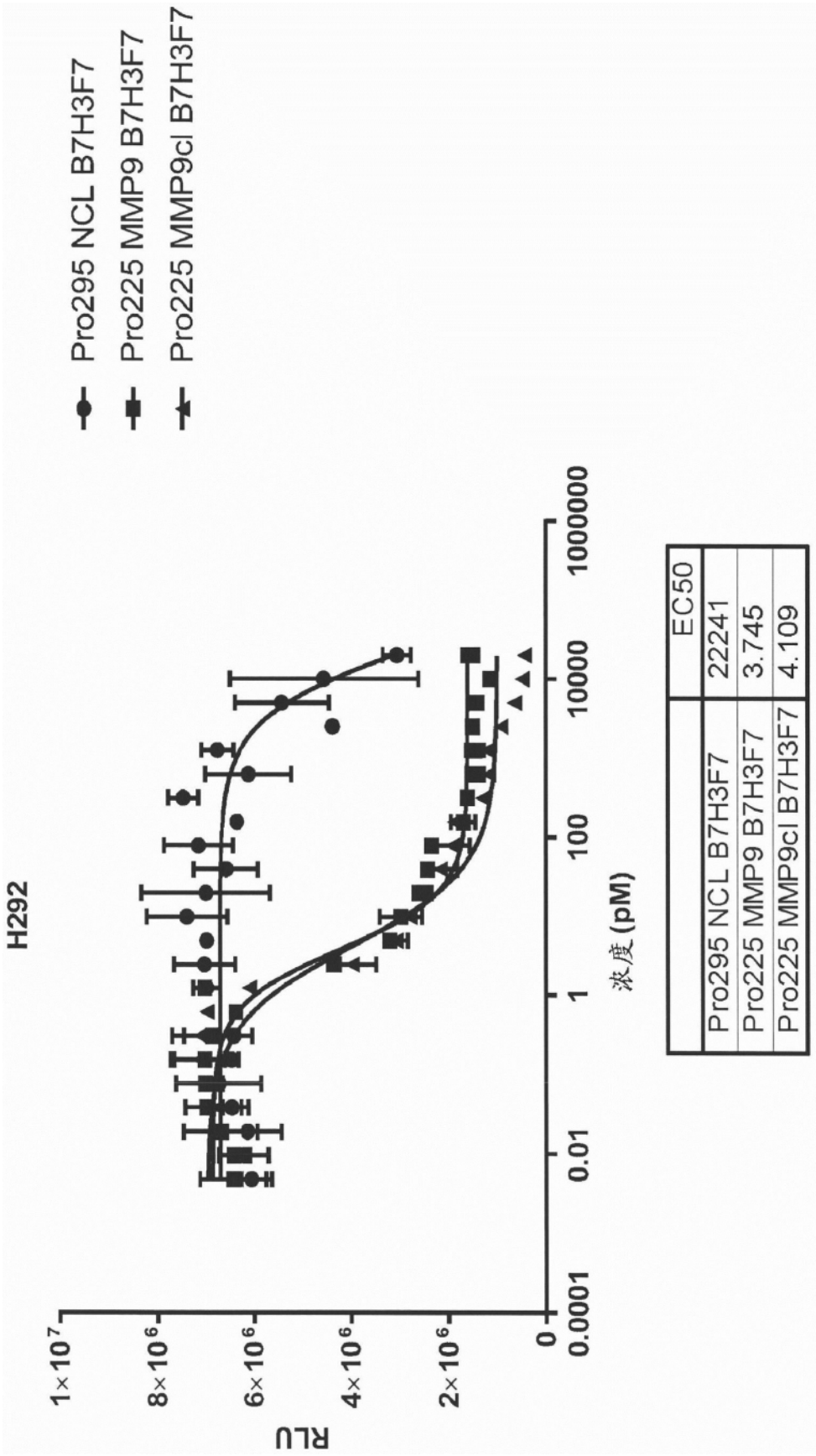

Pro295 NCL B7H3F7
Pro225 MMP9 B7H3F7
Pro225 MMP9cl B7H3F7
H292
RLU
1×10^7
8×10^6
6×10^6
4×10^6
2×10^6
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)
EC50
Pro295 NCL B7H3F7 22241
Pro225 MMP9 B7H3F7 3.745
Pro225 MMP9cl B7H3F7 4.109

图62A

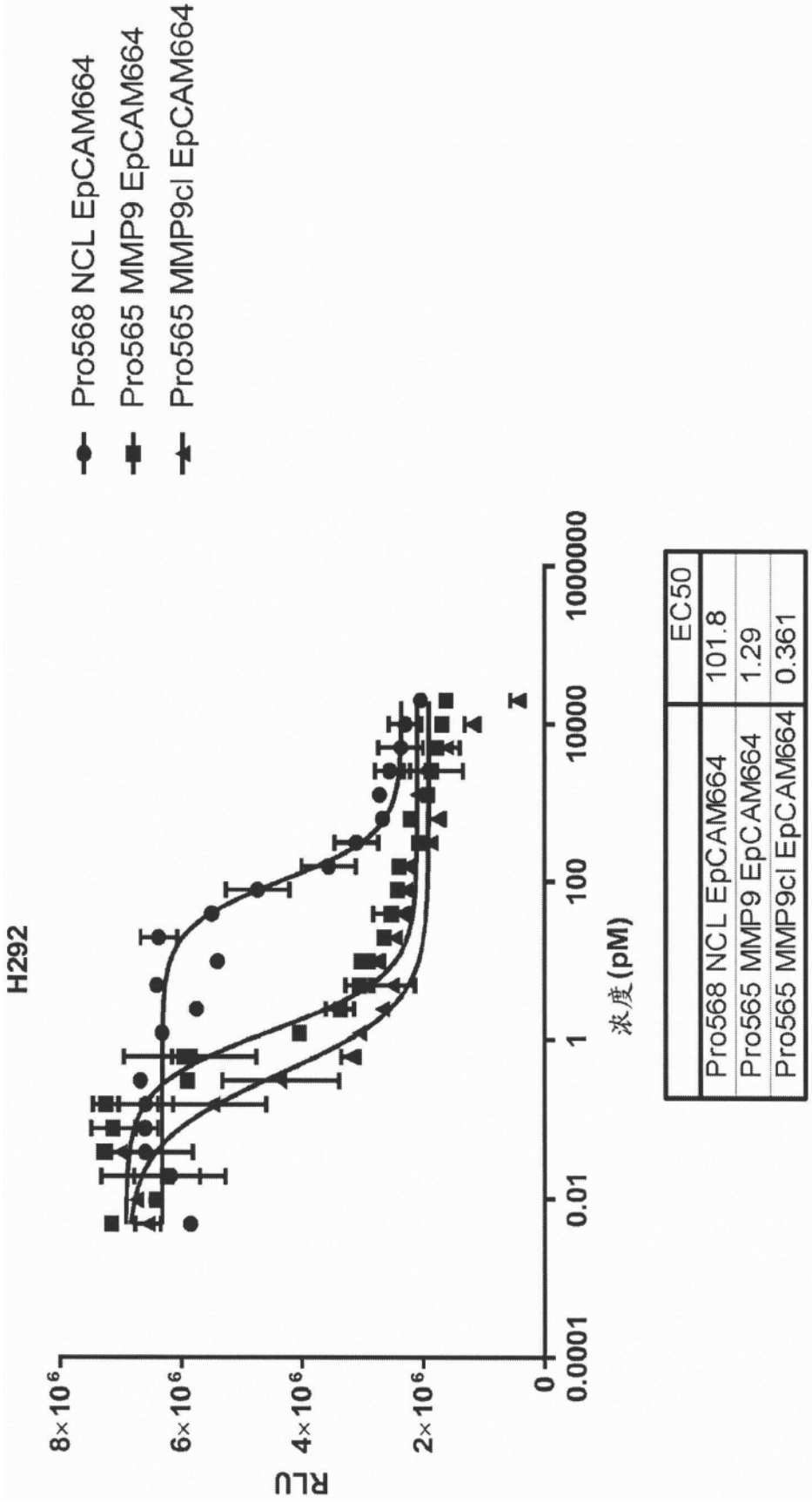

Pro568 NCL EpCAM664
Pro565 MMP9 EpCAM664
Pro565 MMP9cl EpCAM664
H292
RLU
8×10^6
6×10^6
4×10^6
2×10^6
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)
EC50
Pro568 NCL EpCAM664 101.8
Pro565 MMP9 EpCAM664 1.29
Pro565 MMP9cl EpCAM664 0.361

图62B

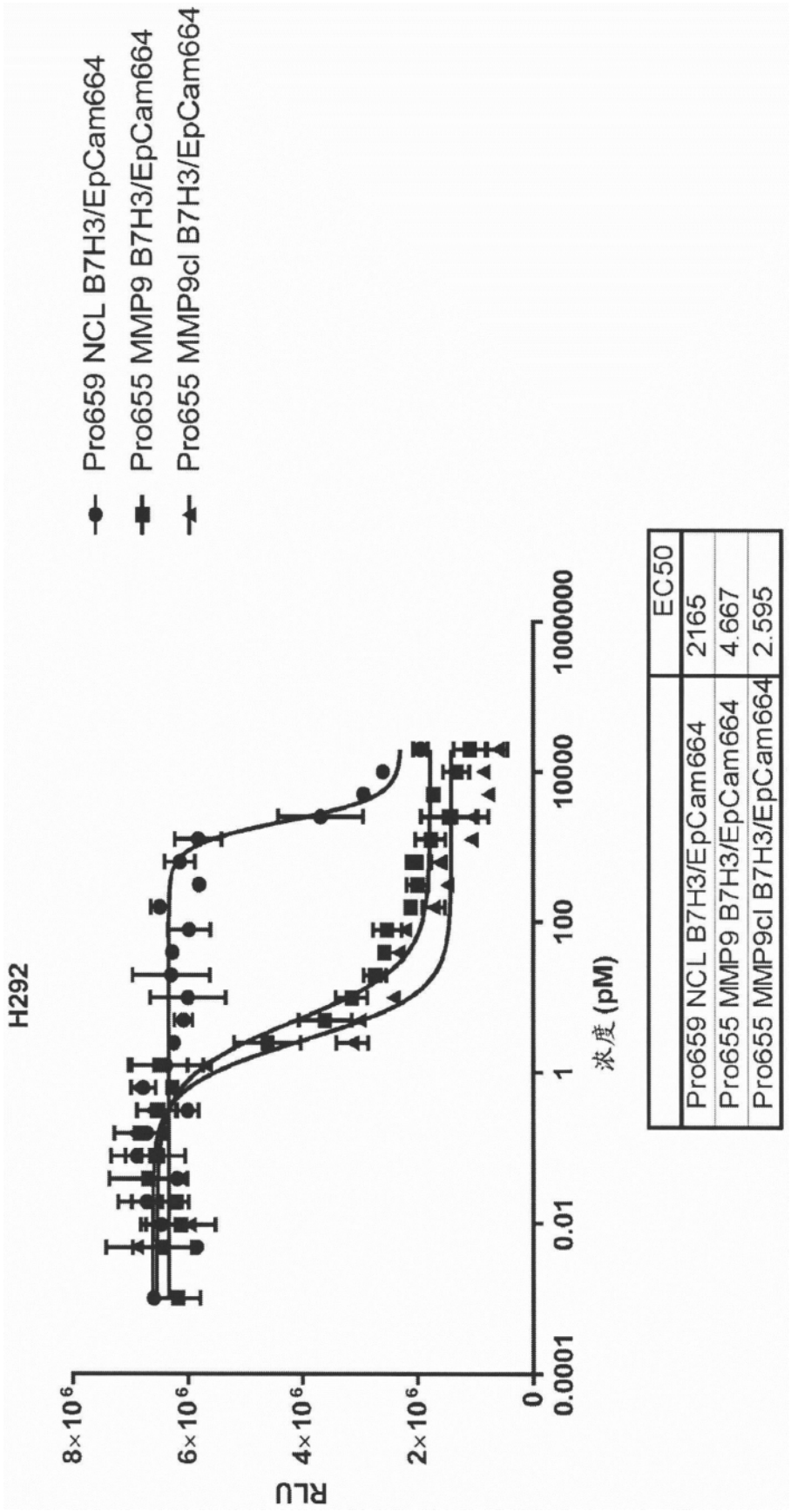

Pro659 NCL B7H3/EpCam664
Pro655 MMP9 B7H3/EpCam664
Pro655 MMP9cl B7H3/EpCam664
H292
RLU
8×10^6
6×10^6
4×10^6
2×10^6
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度 (pM)
EC50
Pro659 NCL B7H3/EpCam664 2165
Pro655 MMP9 B7H3/EpCam664 4.667
Pro655 MMP9cl B7H3/EpCam664 2.595

图62C

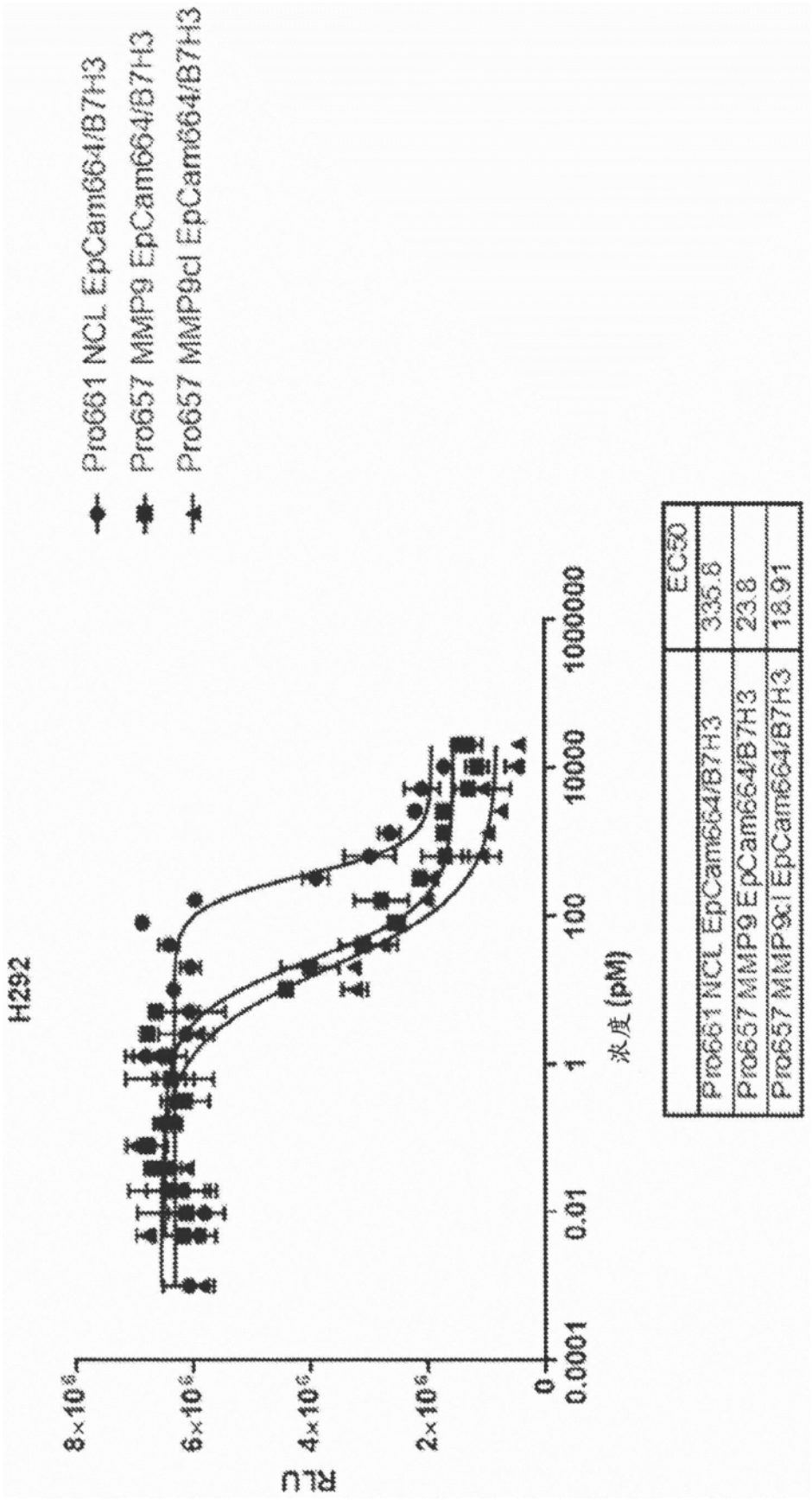

Pro661 NCL EpCam664/B7H3
Pro657 MMP9 EpCam664/B7H3
Pro657 MMP9cl EpCam664/B7H3
H292
RLU
8×10^6
6×10^6
4×10^6
2×10^6
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度 (pM)
EC50
Pro661 NCL EpCam664/B7H3 335.8
Pro657 MMP9 EpCam664/B7H3 23.8
Pro657 MMP9cl EpCam664/B7H3 18.91

图62D

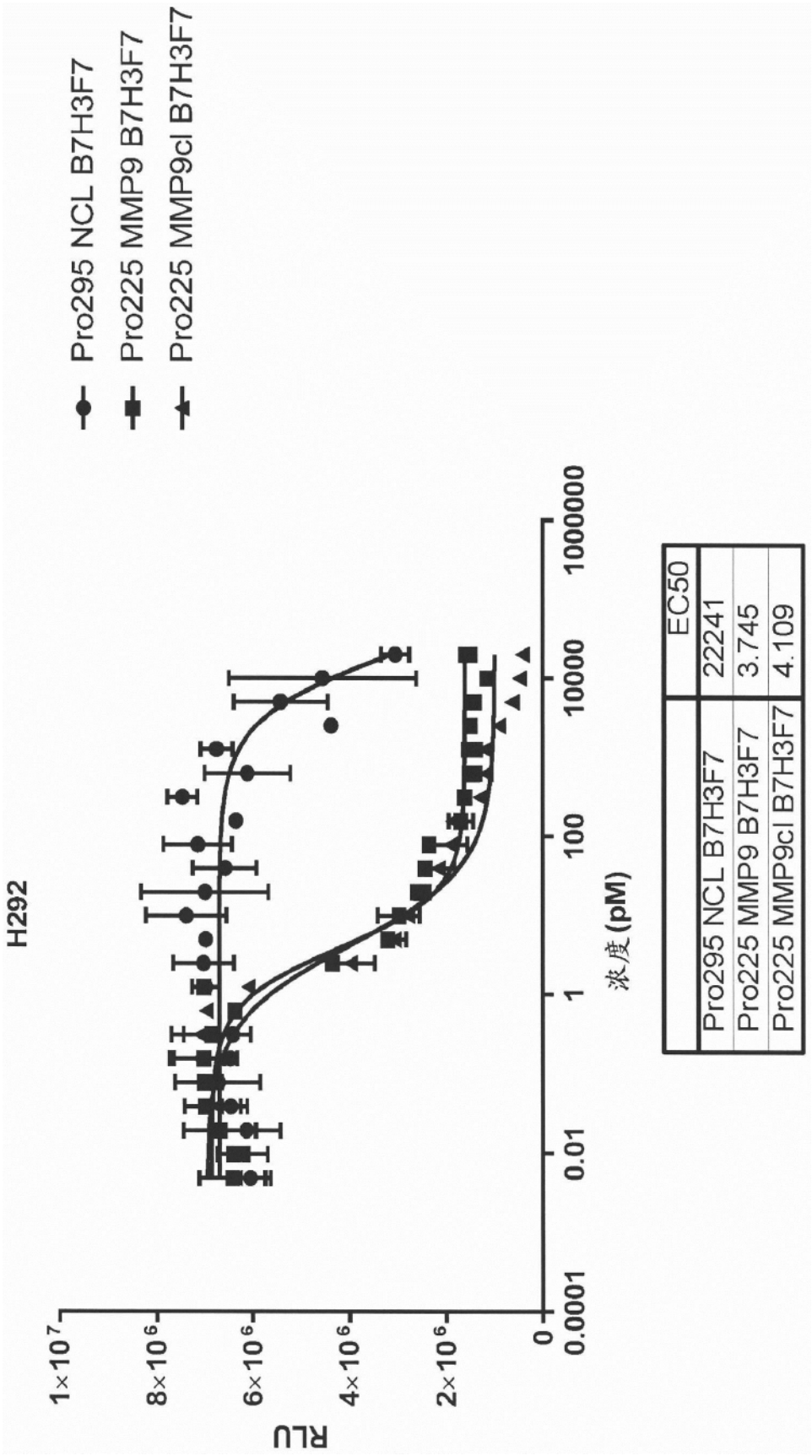

Pro295 NCL B7H3F7
Pro225 MMP9 B7H3F7
Pro225 MMP9cl B7H3F7
H292
RLU
1×10^7
8×10^6
6×10^6
4×10^6
2×10^6
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)
EC50
Pro295 NCL B7H3F7 22241
Pro225 MMP9 B7H3F7 3.745
Pro225 MMP9cl B7H3F7 4.109

图63A

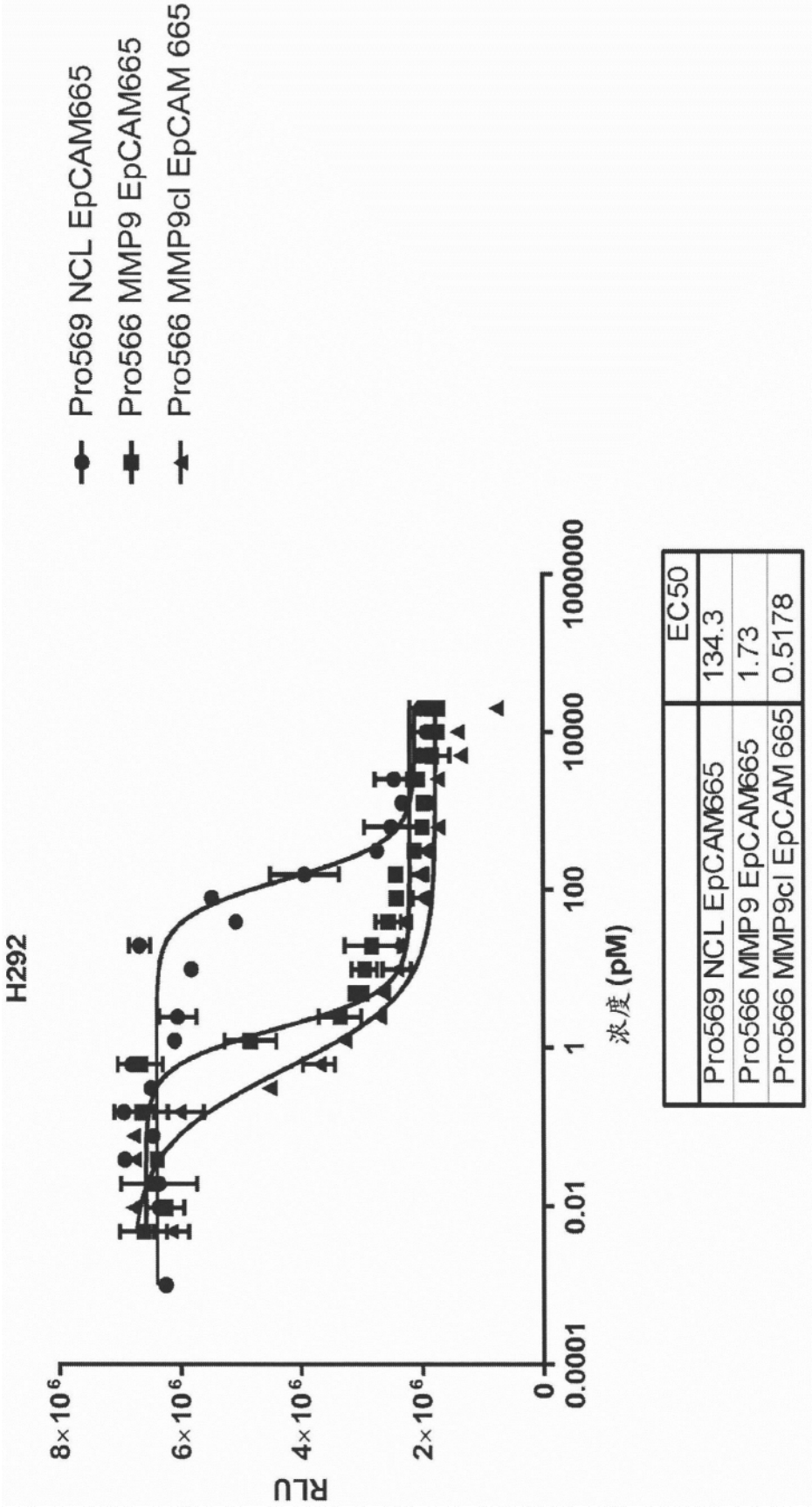

Pro569 NCL EpCAM665
Pro566 MMP9 EpCAM665
Pro566 MMP9cl EpCAM 665
H292
RLU
8×10⁶
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度 (pM)
EC50
Pro569 NCL EpCAM665 134.3
Pro566 MMP9 EpCAM665 1.73
Pro566 MMP9cl EpCAM 665 0.5178

图63B

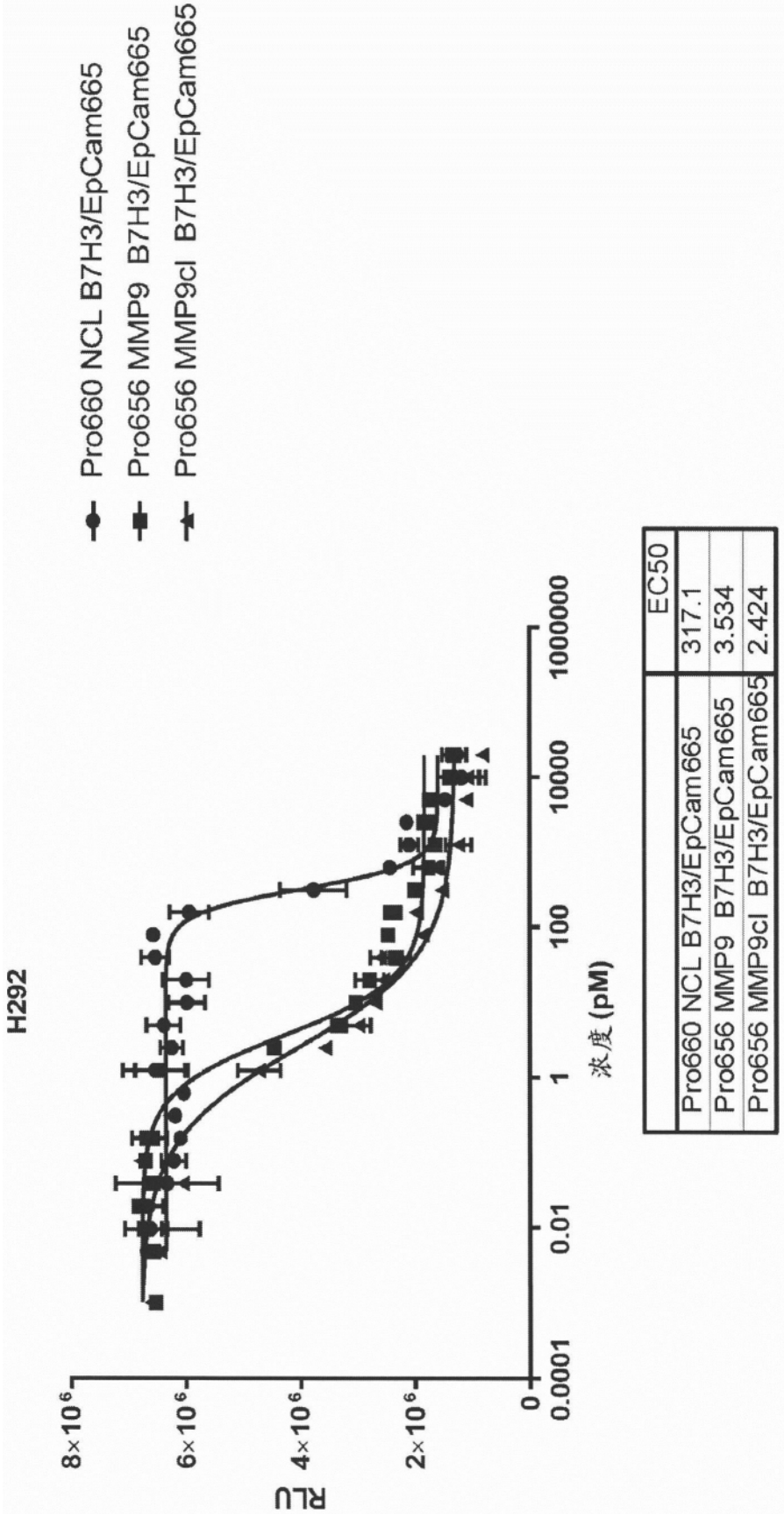

Pro660 NCL B7H3/EpCam665
Pro656 MMP9 B7H3/EpCam665
Pro656 MMP9cl B7H3/EpCam665
H292
RLU
8×10⁶
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度 (pM)
EC50
Pro660 NCL B7H3/EpCam665 317.1
Pro656 MMP9 B7H3/EpCam665 3.534
Pro656 MMP9cl B7H3/EpCam665 2.424

图63C

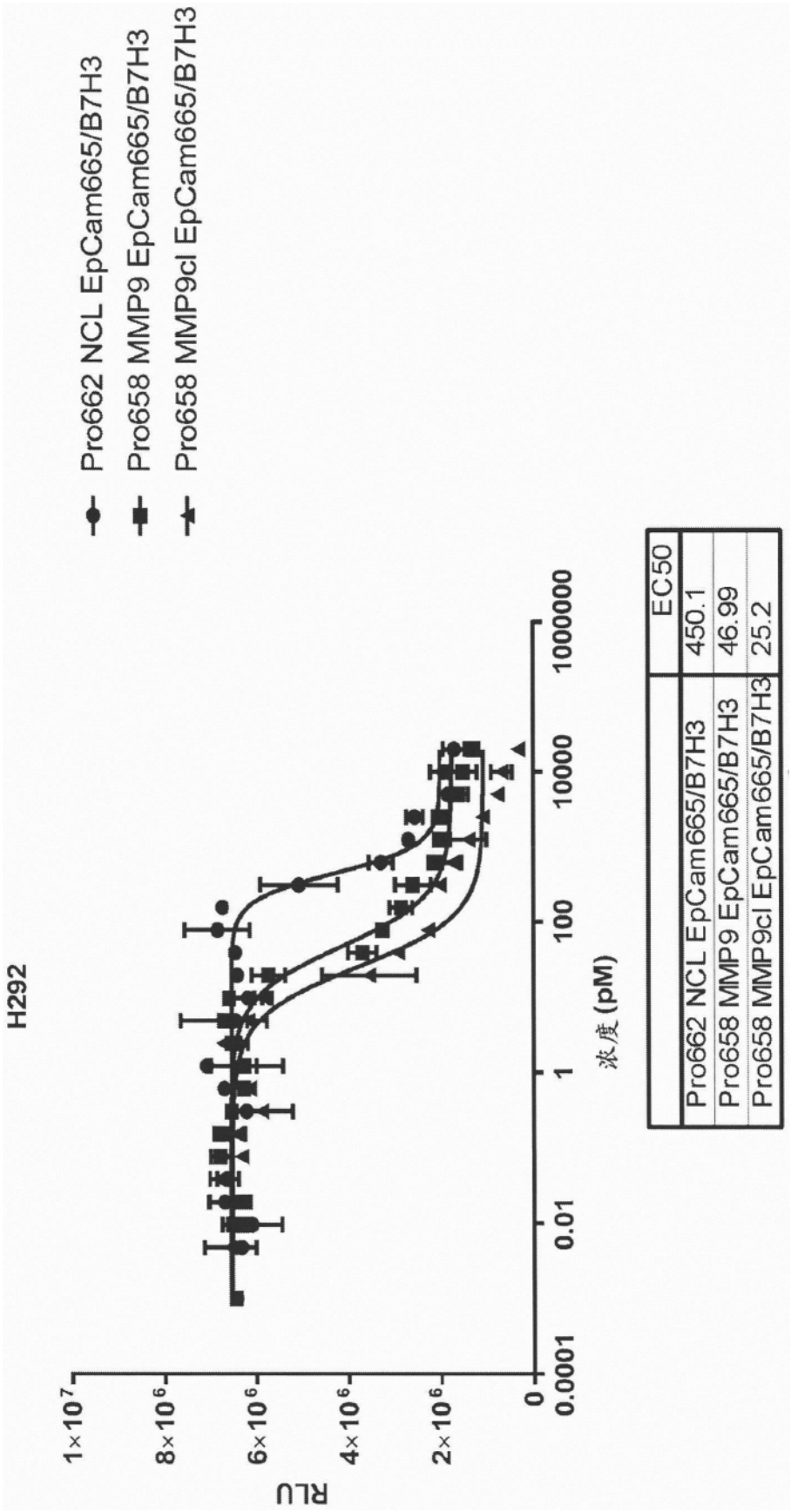

Pro662 NCL EpCam665/B7H3
Pro658 MMP9 EpCam665/B7H3
Pro658 MMP9cl EpCam665/B7H3
H292
RLU
1×10^7
8×10^6
6×10^6
4×10^6
2×10^6
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度 (pM)
EC50
Pro662 NCL EpCam665/B7H3 450.1
Pro658 MMP9 EpCam665/B7H3 46.99
Pro658 MMP9cl EpCam665/B7H3 25.2

图63D

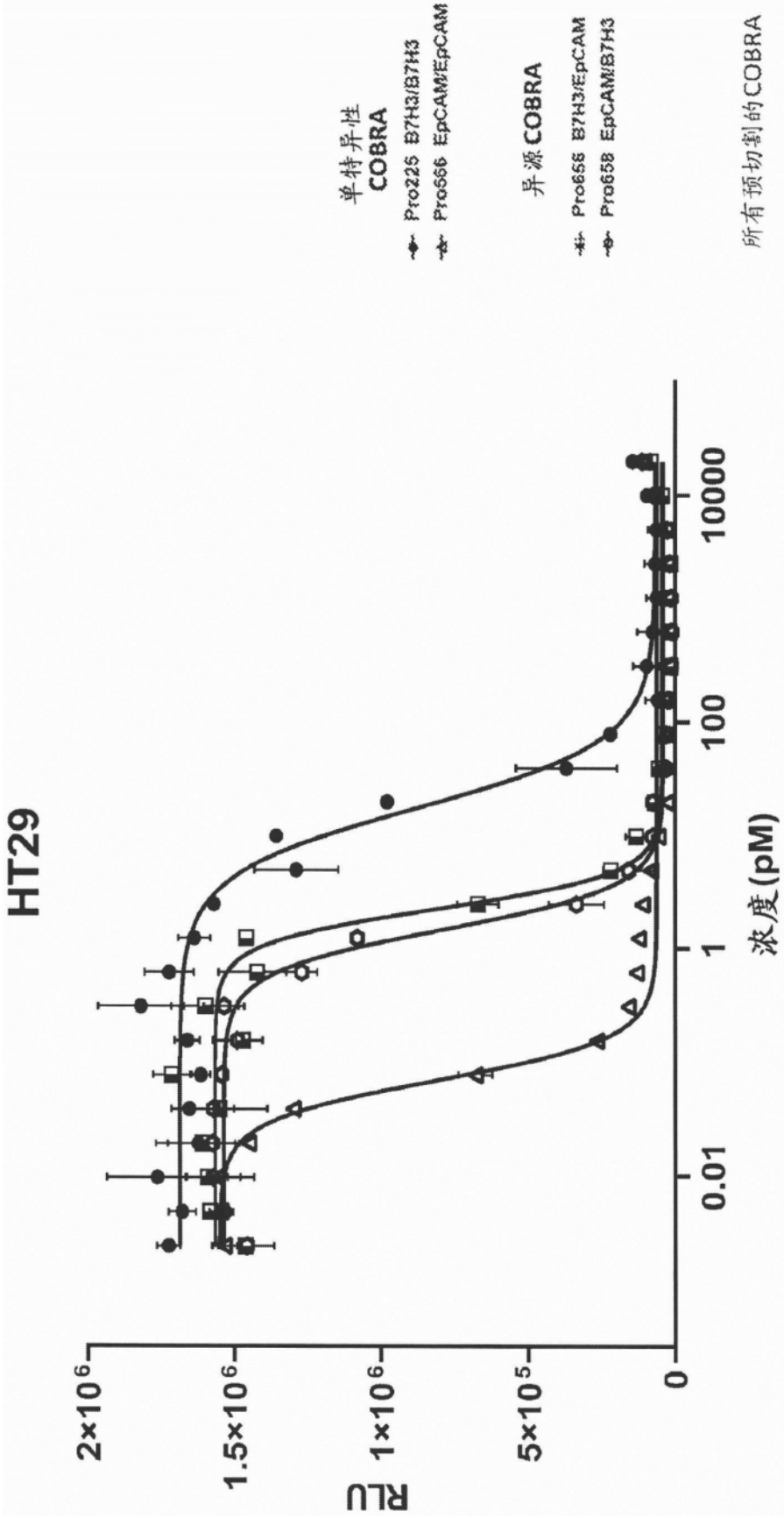

HT29
RLU
2×10^6
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
0.01
1
100
10000
浓度(pM)
单特异性
COBRA
Pro225 B7H3/B7H3
Pro566 EpCAM/EpCAM
异源COBRA
Pro656 B7H3/EpCAM
Pro658 EpCAM/B7H3
所有预切割的COBRA

图64A

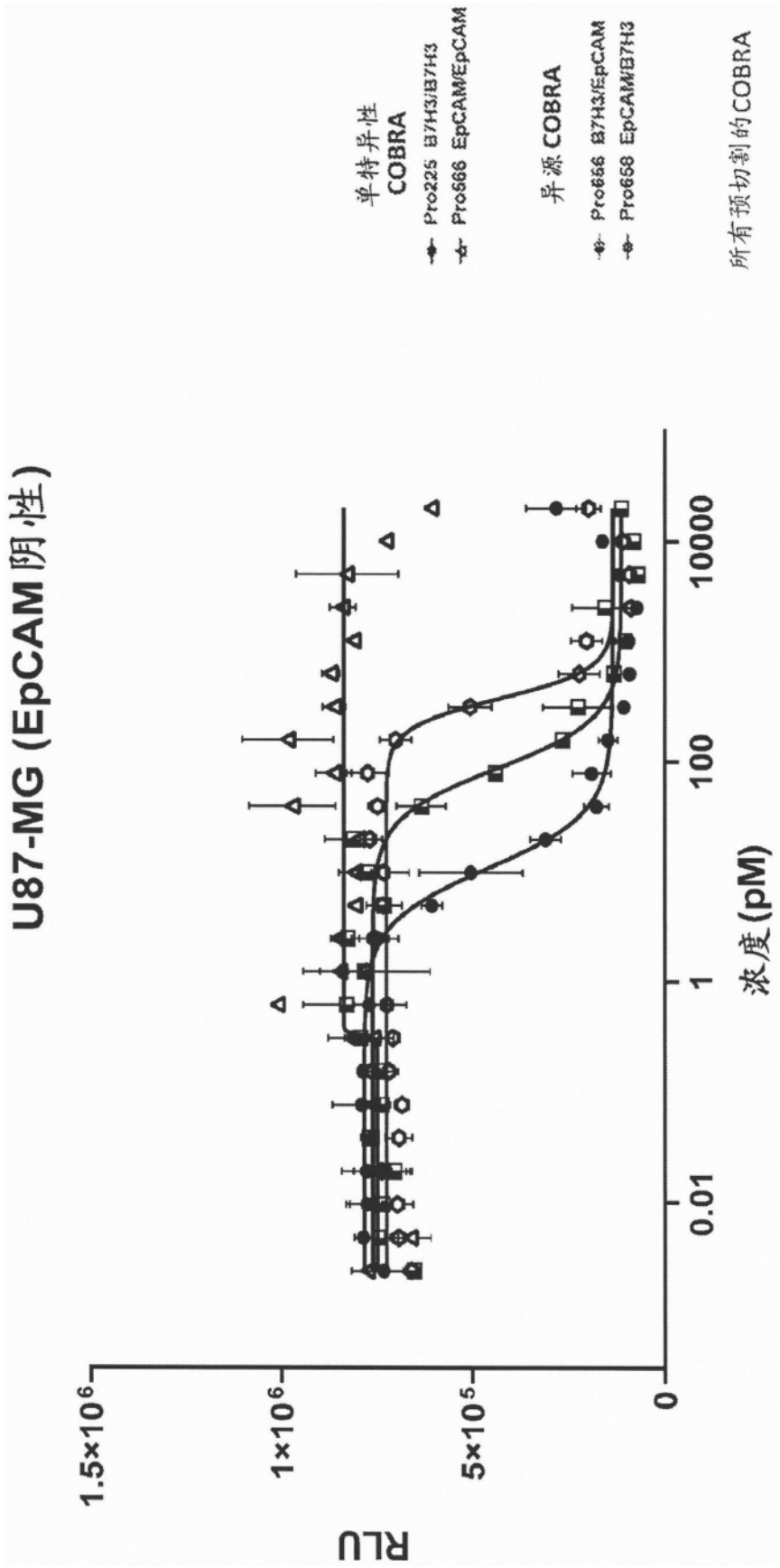

U87-MG (EpCAM 阴性)
RLU
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
0.01
1
100
10000
浓度 (pM)
单特异性
COBRA
Pro225 B7H3/B7H3
Pro666 EpCAM/EpCAM
异源 COBRA
Pro666 B7H3/EpCAM
Pro668 EpCAM/B7H3
所有预切割的COBRA

图64B

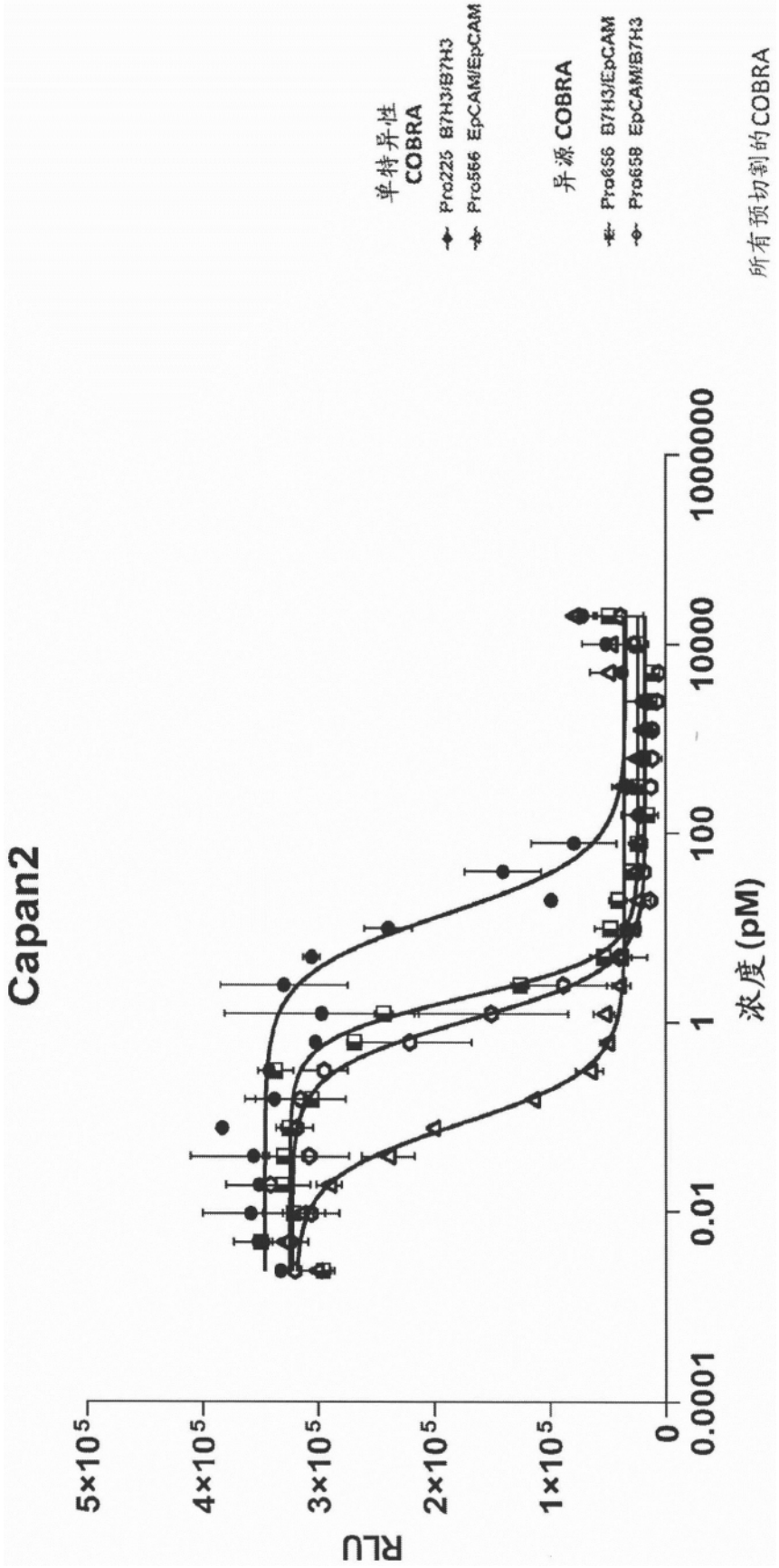

Capan2
RLU
5×10^5
4×10^5
3×10^5
2×10^5
1×10^5
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(pM)
单特异性
COBRA
Pro225 B7H3/B7H3
Pro566 EpCAM/EpCAM
异源 COBRA
Pro656 B7H3/EpCAM
Pro658 EpCAM/B7H3
所有预切割的COBRA

图64C

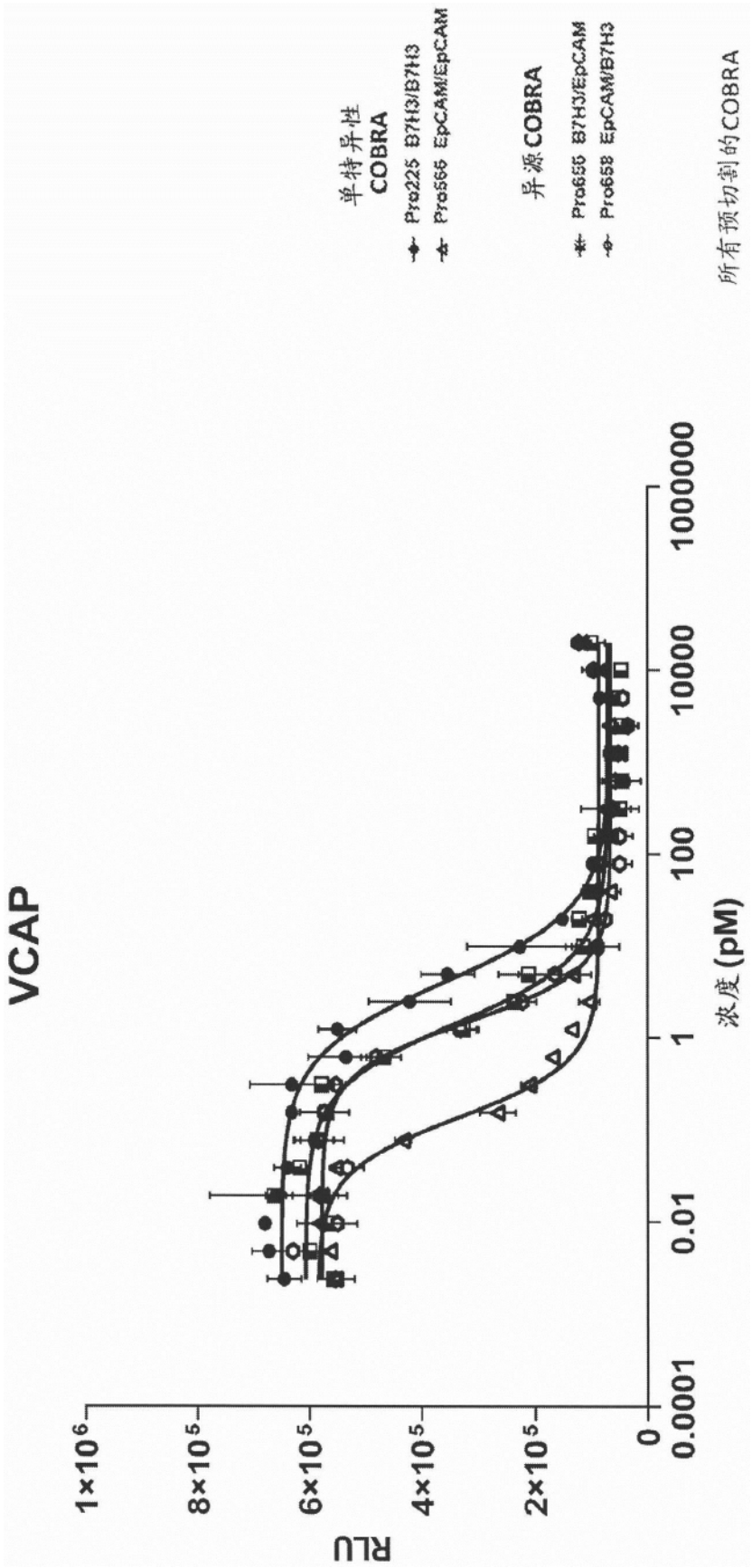

VCAP
RLU
1×10^6
8×10^5
6×10^5
4×10^5
2×10^5
0
0.0001
0.01
1
100
10000
1000000
浓度 (pM)
单特异性
COBRA
Pro225 B7H3/B7H3
Pro566 EpCAM/EpCAM
异源 COBRA
Pro655 B7H3/EpCAM
Pro658 EpCAM/B7H3
所有预切割的COBRA

图64D

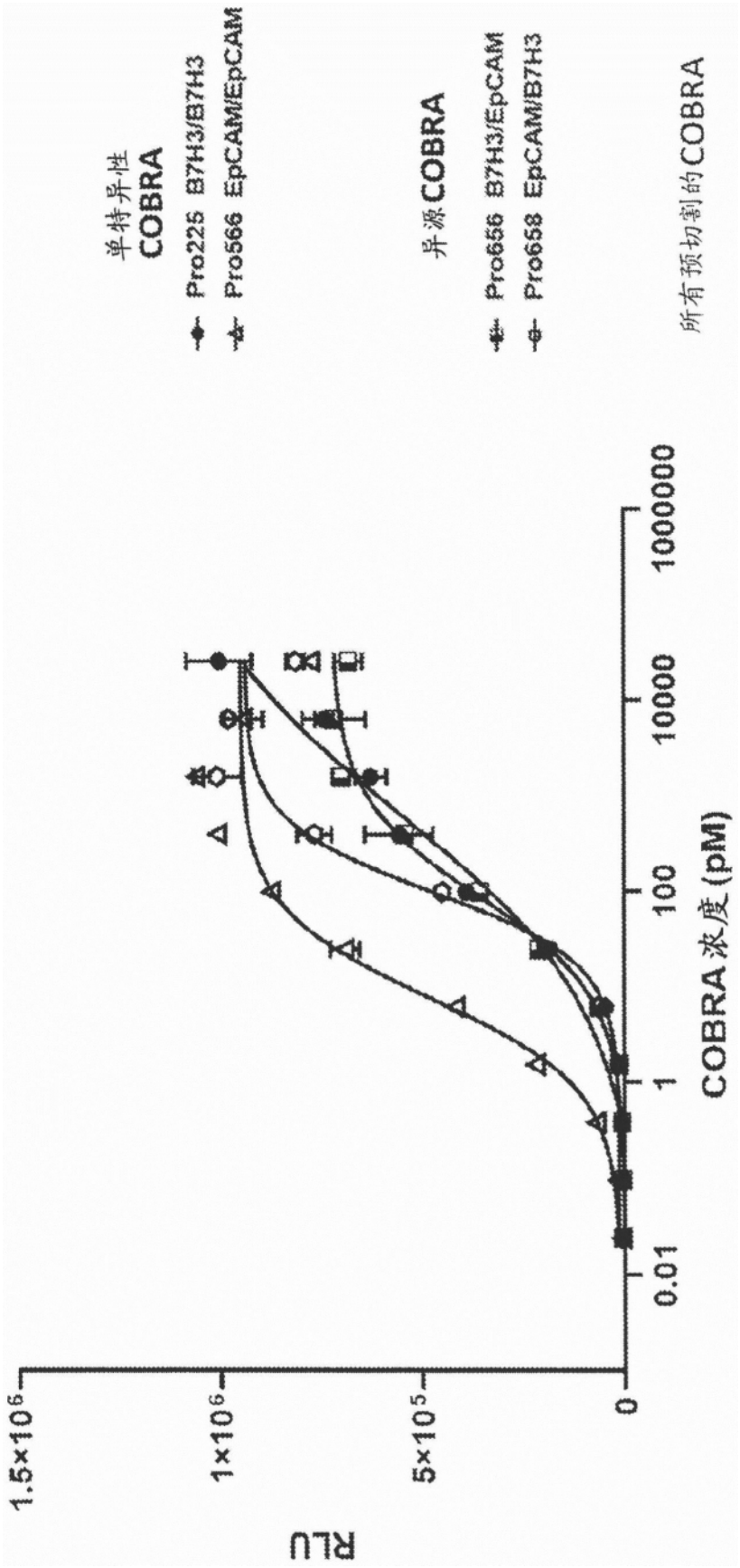

单特异性
COBRA
Pro225 B7H3/B7H3
Pro566 EpCAM/EpCAM
异源COBRA
Pro656 B7H3/EpCAM
Pro658 EpCAM/B7H3
所有预切割的COBRA
RLU
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
0.01
1
100
10000
1000000
COBRA浓度(pM)

图65

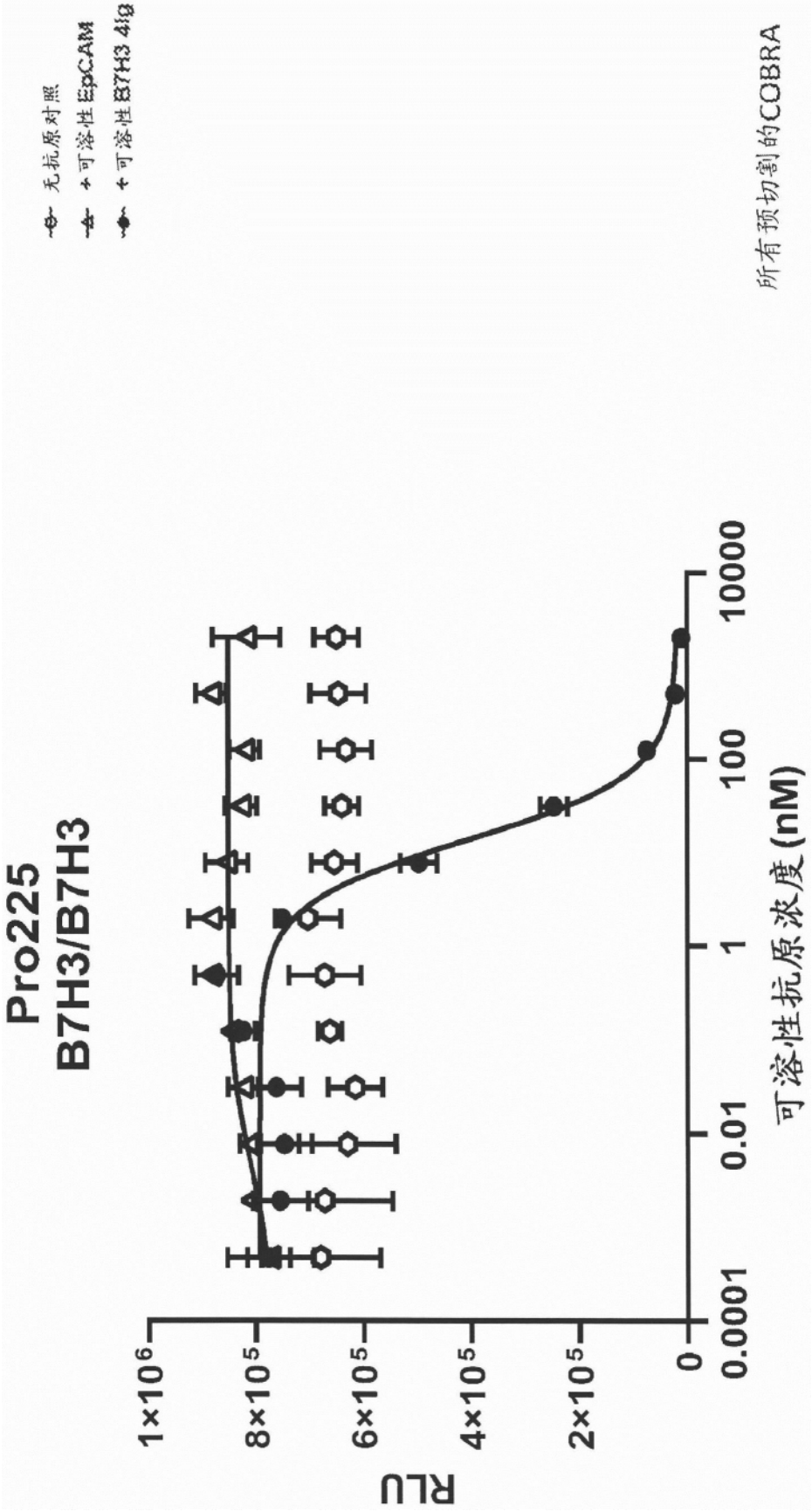

无抗原对照
+可溶性EpCAM
+可溶性B7H3 4Ig
所有预切割的COBRA
Pro225
B7H3/B7H3
RLU
1×10^6
8×10^5
6×10^5
4×10^5
2×10^5
0
0.0001
0.01
1
100
10000
可溶性抗原浓度(nM)

图66A

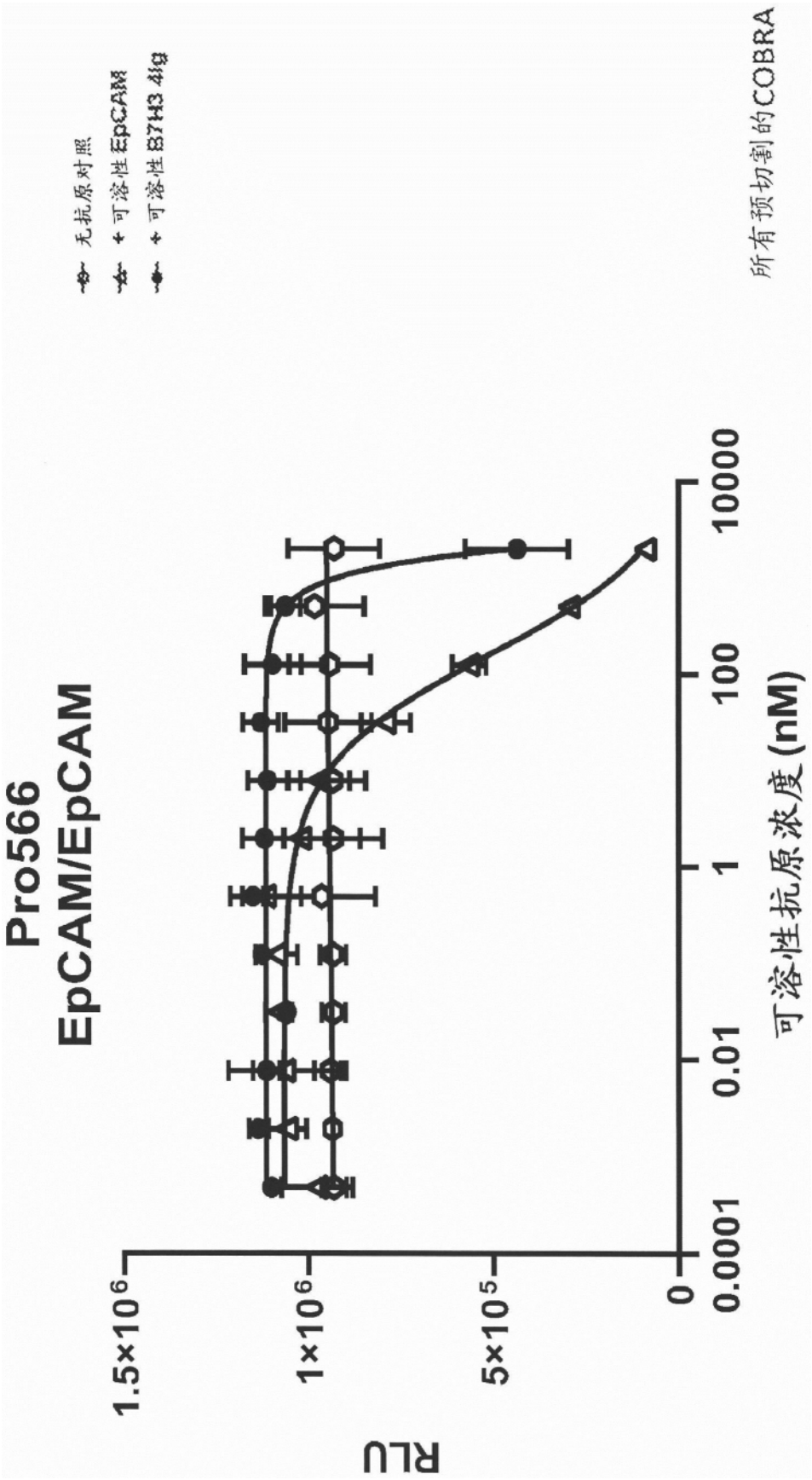

Pro566
EpCAM/EpCAM
无抗原对照
+ 可溶性EpCAM
+ 可溶性B7H3 4Ig
所有预切割的COBRA
RLU
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
0.0001
0.01
1
100
10000
可溶性抗原浓度(nM)

图66B

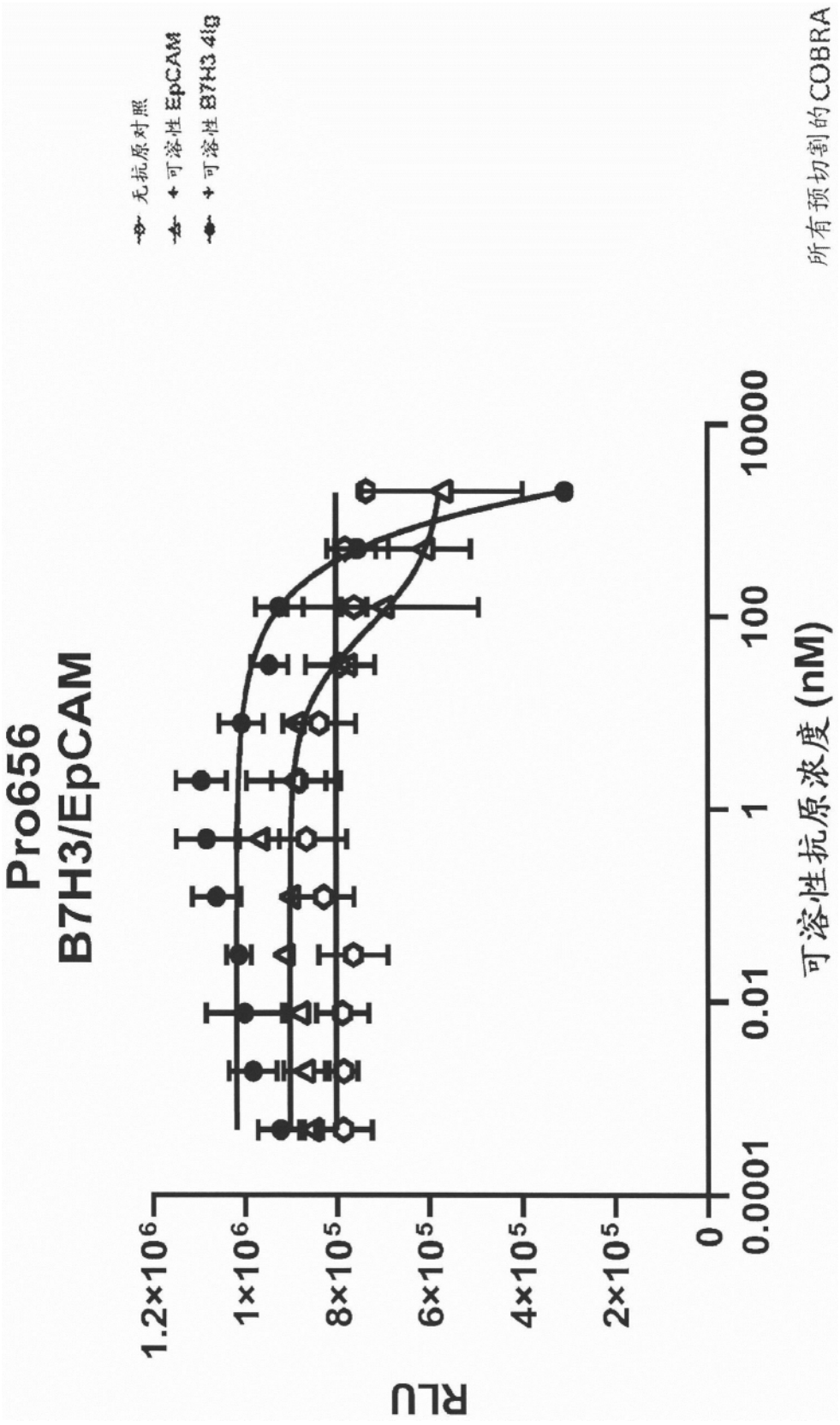

Pro656
B7H3/EpCAM
无抗原对照
可溶性 EpCAM
可溶性 B7H3 4Ig
所有预切割的COBRA
RLU
1.2×10⁶
1×10⁶
8×10⁵
6×10⁵
4×10⁵
2×10⁵
0
0.0001
0.01
1
100
10000
可溶性抗原浓度 (nM)

图66C

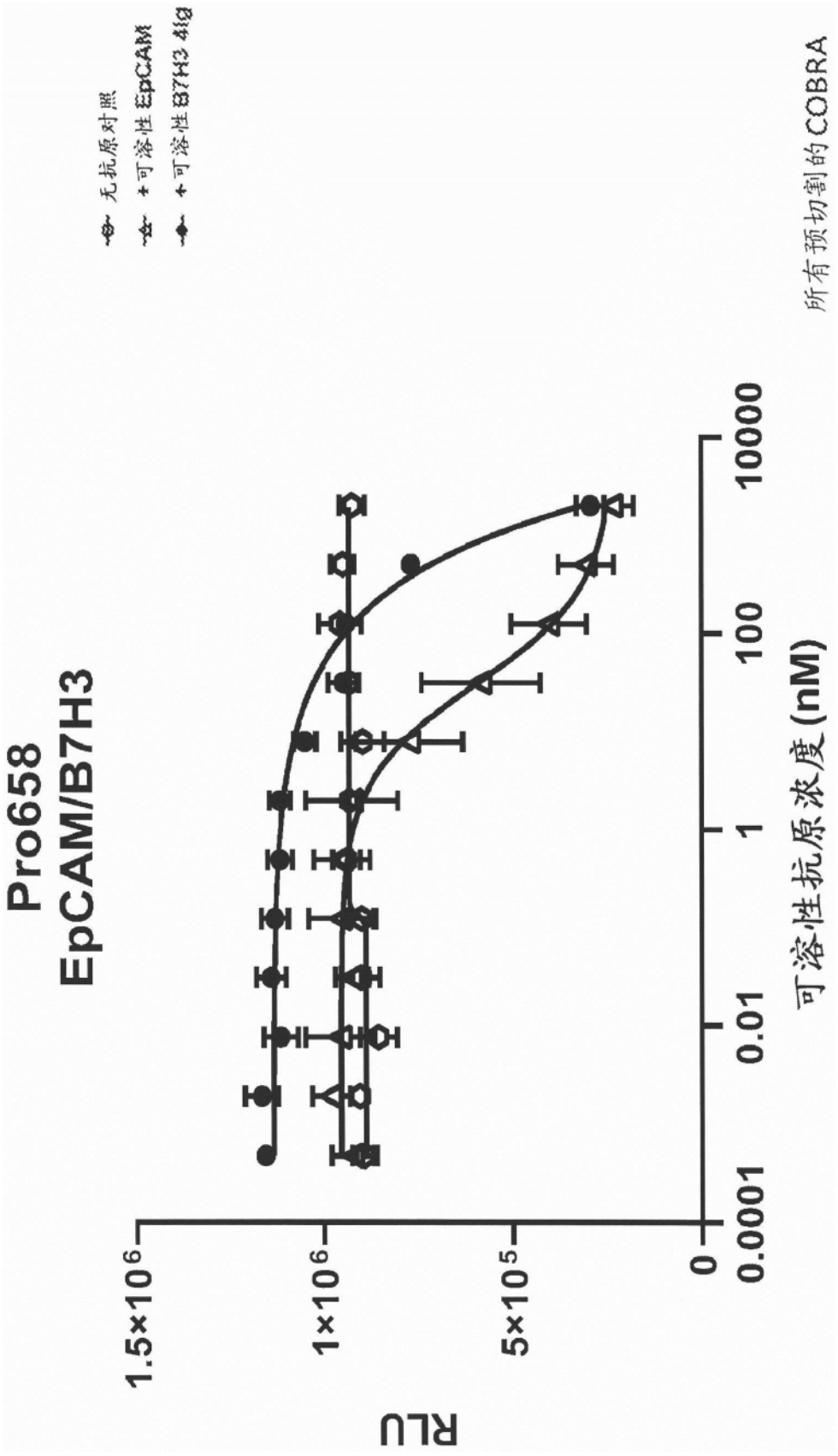

Pro658
EpCAM/B7H3
RLU
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
0.0001
0.01
1
100
10000
可溶性抗原浓度(nM)
所有预切割的COBRA
无抗原对照
+可溶性EpCAM
+可溶性B7H3 4Ig

图66D

B7H3/EpCAM异源COBRA的亲和力

Prodent	第一/第二位置	K_D (nM)		
		huB7H3-4Ig	huEpCAM	huB7H3-4Ig + huEpCAM
Pro656	B7H3/EpCAM	6.9	13.6	0.13
Pro658	EpCAM/B7H3	7.8	7.7	0.061

图67

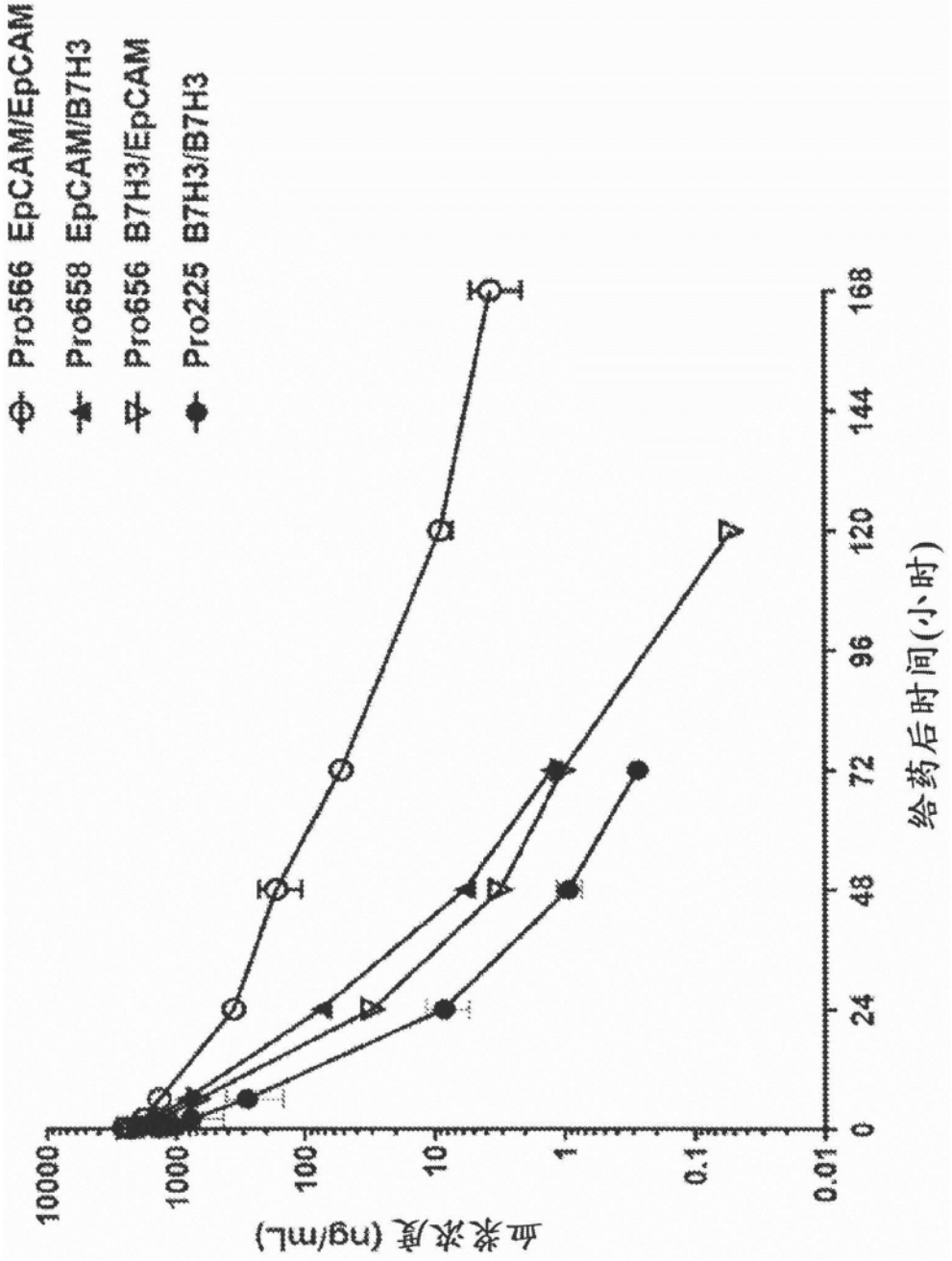

Pro566 EpCAM/EpCAM
Pro658 EpCAM/B7H3
Pro656 B7H3/EpCAM
Pro225 B7H3/B7H3
血浆浓度 (ng/mL)
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
24
48
72
96
120
144
168
给药后时间(小时)

图68

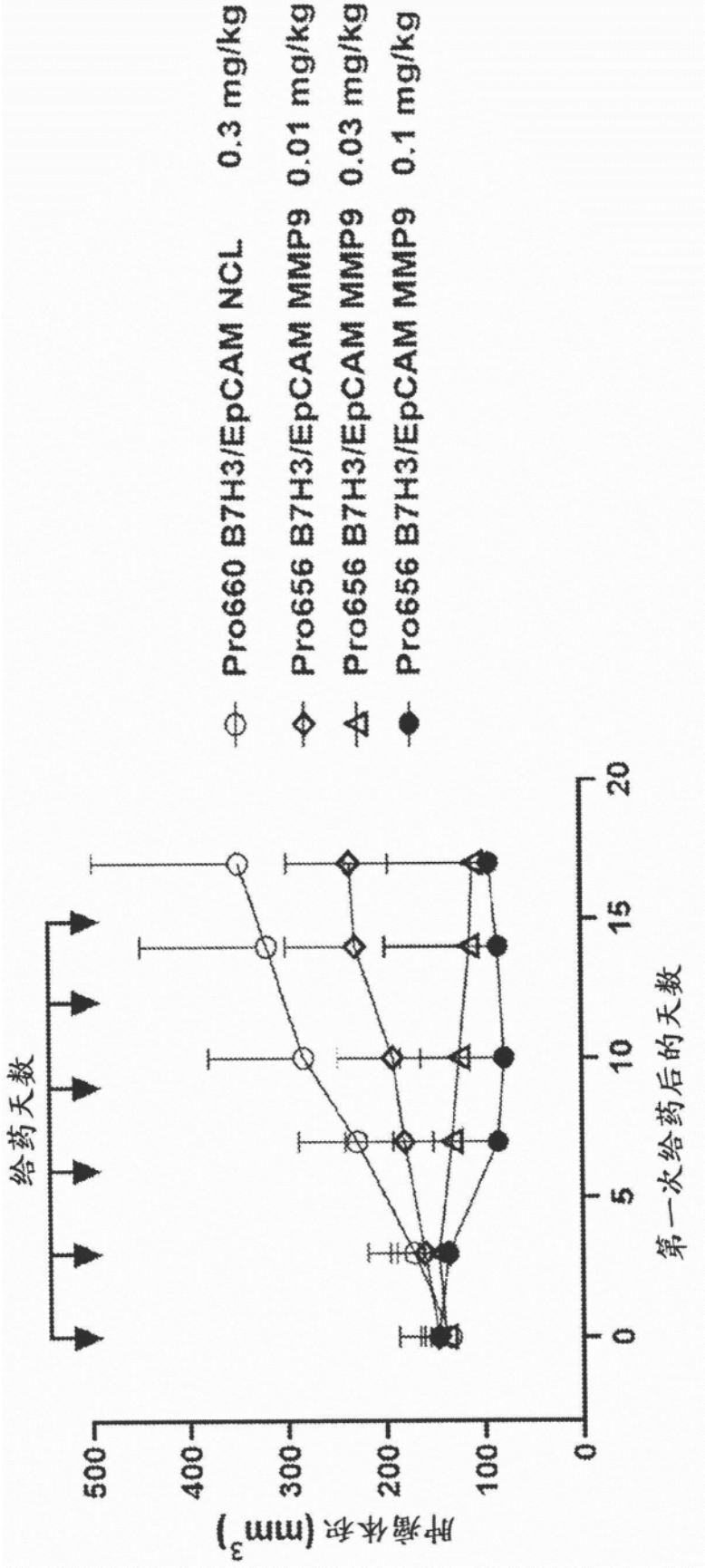

Pro660 B7H3/EpCAM NCL 0.3 mg/kg
Pro656 B7H3/EpCAM MMP9 0.01 mg/kg
Pro656 B7H3/EpCAM MMP9 0.03 mg/kg
Pro656 B7H3/EpCAM MMP9 0.1 mg/kg
给药天数
肿瘤体积 (mm³)
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
第一次给药后的天数

图69

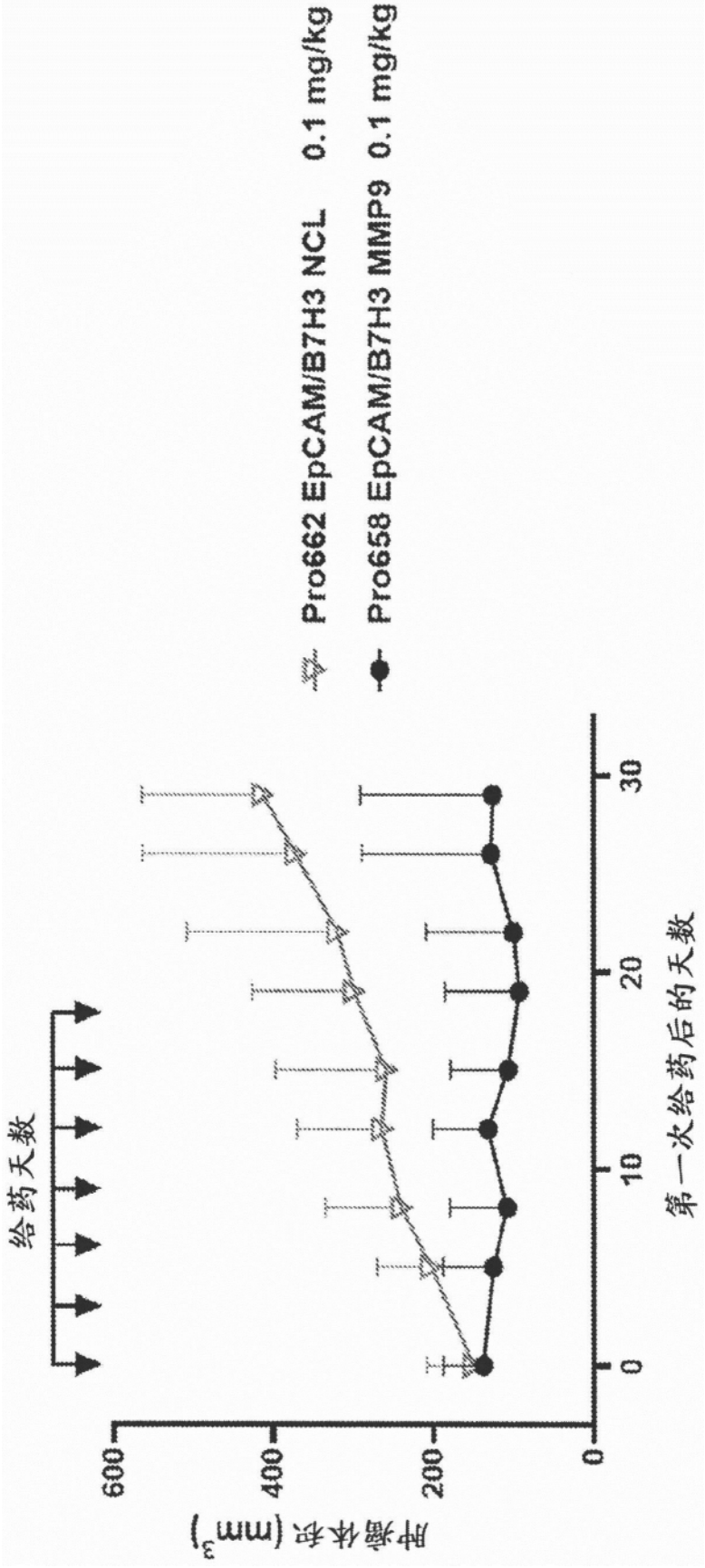

Pro662 EpCAM/B7H3 NCL 0.1 mg/kg
Pro658 EpCAM/B7H3 MMP9 0.1 mg/kg
给药天数
肿瘤体积 (mm³)
600
400
200
0
0
10
20
30
第一次给药后的天数

图70

B7H3/EpCAM异源COBRA

Pro751

aB7H3 hF12 sdAb (S59Y) – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – acEpCAM hVIB665 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli –NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTYYADSVKG**R
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQ
LVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFT
ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGK
AALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSLRLS
CAAS**GRTFSDYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGHTNYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA
EDTAVYYCAA**DLRFTGGDTTTPETYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGV
QPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTF**
NKYAMNWVRQAPGKGLEWVA**RIR**SKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA
VYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**G**
FTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYY
CTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:487)

Pro752

acEpCAM hVIB665 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) - haB7H3 F12 sdAb (S59Y) – MMP9-15 - aCD3Vli –NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGHTNYADSVKG**
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTTTPETYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS
/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK**
DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLL
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLQESGGGLVQPGGS
LRLSCEAS**PRTFSTYSMA**WFRQAPGKERSFVA**AINWSGGNTYYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAA**GGVLAHHNYEYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGV
QPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTF**
NKYAMNWVRQAPGKGLEWVA**RIR**SKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA
VYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**G**
FTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYY
CTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:488)

图71

Trop2/hEpCAM异源COBRA

Pro824

acEpCAM hVIB665 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aTrop2 hVIB557 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli –NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGHTNYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTTTPETYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVK**DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSSQSMG**WFRQAPGKEREFVS**AISWTGANPTYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DTSGGSYYYERATAETSYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIR**SKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:489)

Pro826

aTrop2 hVIB557 sdAb sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – acEpCAM hVIB665 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli – NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSSQSMG**WFRQAPGKEREFVS**AISWTGANPTYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DTSGGSYYYERATAETSYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGHTNYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTTTPETYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIR**SKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:490)

图72

人源化Her2 COBRA

Pro1109

aHER2 hVIB1159 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aHER2 hVIB1159 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli –NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCATSGRTFSSLAMGWFRQAPGKERELVAGISWSGSTTYYADSVKGRF AISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARTSSIATIGREYDYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLV ESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTIS RDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVT QEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC ATSGRTFSSLAMGWFRQAPGKERELVAGISWSGSTTYYADSVKGRFAISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAARTSSIATIGREYDYWGQGTLVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAM NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKF GMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS LSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:491)

Pro1111

aHER2 hVIB1162 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aHER2 hVIB1162 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli –NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPFSGNAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGDSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAATRSFYSRTYYTRPSDYNYWGPGTLVTVSS/GGGSGGGS/ EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/ QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGRPFSGNAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGDSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAATRSFYSRTYYTRPSDYNYWGPGTLVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVVTQEPSLT VSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY YCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:492)

图73

Pro1117

aHER2 hVIB1139 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aHER2 hVIB1139 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli –NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6

QVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAAS**GFTFDDYAMS**WIRQAPGKEMEWVS**GINWSGTHTRYADSVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAR**GFAADSRST**RGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAAS**GFTFDDYAMS**WIRQAPGKEMEWVS**GINWSGTHTRYADSVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAR**GFAADSRST**RGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIR**SKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:493)

Pro1118

aHER2 hVIB1156 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – NCL-8 – aCD3Vl (2B2) – aHER2 hVIB1156 sdAb – MMP9-15 - aCD3Vli –NCL-8 - aCD3Vhi – aHSA (10GE) – His6

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**RNIGSNYAVG**WFRQAPGKEREPVA**ALRWTGSIIGYDDSLRG**RFTISKDNSKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAA**RILDRSSYDY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAIN**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADQVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**RNIGSNYAVG**WFRQAPGKEREPVA**ALRWTGSIIGYDDSLRG**RFTISKDNSKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAA**RILDRSSYDY**WGQGTLVTVSS/*SGGPGPAGMKGLPGS*/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WVQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**GFTFNKYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RIR**SKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS**GFTFSKFGMS**WVRQAPGKGLEWVS**SISGSGRDTLYAESVKG**RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI**GGSLSV**SSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:494)

图74

人源化 aEpCAM sdAb

h664

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTLDNYDMG**WFRQGPGKEREFVA**AISWSGGSTDYAYSVKG**R FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**DLRFTGGDTMTPETYDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:495)

sdCDR1 **GRTLDNYDMG** (SEQ ID NO:496)

sdCDR2 **AISWSGGSTDYAYSVKG** (SEQ ID NO:497)

sdCDR3 **DLRFTGGDTMTPETYDY** (SEQ ID NO:498)

人源化 aHer2 sdAb

h1139

QVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAAS**GFTFDDYAMS**WIRQAPGKEMEWVS**GINWSGTHTRYADSVKG** RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAR**GFAADSRST**RGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:499)

sdCDR1 **GFTFDDYAMS** (SEQ ID NO:500)

sdCDR2 **GINWSGTHTRYADSVKG** (SEQ ID NO:501)

sdCDR3 **GFAADSRST** (SEQ ID NO:502)

h1156

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**RNIGSNYAVG**WFRQAPGKEREPVA**ALRWTGSIIGYDDSLRG**RF TISKDNSKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAA**RILDRSSYDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:503)

sdCDR1 **RNIGSNYAVG** (SEQ ID NO:504)

sdCDR2 **ALRWTGSIIGYDDSLRG** (SEQ ID NO:505)

sdCDR3 **RILDRSSYDY** (SEQ ID NO:506)

h1159

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCATS**GRTFSSLAMG**WFRQAPGKERELVA**GISWSGSTTYYADSVKG**RF AISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**RTSSIATIGREYDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:507)

sdCDR1 **GRTFSSLAMG** (SEQ ID NO:508)

sdCDR2 **GISWSGSTTYYADSVKG** (SEQ ID NO:509)

sdCDR3 **RTSSIATIGREYDY** (SEQ ID NO:510)

h1162

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRPFSGNAMG**WFRQAPGKEREFVA**AISWSGDSTYYADSVKG**R FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**TRSFYSRTYYTRPSDYNY**WGPGTLVTVSS (SEQ ID NO:511)

sdCDR1 **GRPFSGNAMG** (SEQ ID NO:512)

sdCDR2 **AISWSGDSTYYADSVKG** (SEQ ID NO:513)

sdCDR3 **TRSFYSRTYYTRPSDYNY** (SEQ ID NO:514)

图75