I718098

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本　**(11)證書號數：TW I718098 B**

(45)公告日： 中華民國 110 (2021) 年 02 月 11 日

(21)申請案號：104117564　(22)申請日： 中華民國 104 (2015) 年 05 月 29 日

(51)Int. Cl.：　*C07K16/30* *(2006.01)*　*A61K39/395* *(2006.01)*

A61P35/00 *(2006.01)*

(30)優先權：2014/05/29　美國　62/004,571

2014/06/05　美國　62/008,229

2015/01/26　美國　62/107,824

(71)申請人：美商宏觀基因股份有限公司 (美國) MACROGENICS, INC.　(US)

美國

(72)發明人：強生　萊斯利 JOHNSON, LESLIE S. (US)；黃　玲 HUANG, LING (US)；齊齊李古蘭那達瑞迪 CHICHILI, GURUNADH REDDY (IN)；尚　坎帕納 SHAH, KALPANA (US)；郭家穎 KAO, LAM CHIA-YING (TW)；柏克　史蒂芬詹姆士 BURKE, STEPHEN JAMES (US)；劉麗勤 LIU, LIQIN (CN)；摩爾　保羅 MOORE, PAUL (GB)；波維尼　愛利歐 BONVINI, EZIO (US)；巴拉特　巴斯娃緹 BARAT, BHASWATI (US)

(74)代理人：李文賢

(56)參考文獻：

US	5601819A	US	2010/0174053A1
US	2010/0291112A1	US	2014/0099318A1

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：17 項　圖式數：29　共 476 頁

(54)名稱

三特異性結合分子及其使用方法

(57)摘要

一種三特異性結合分子，其是具備三個結合結構域的多鏈多肽分子，因此能夠介導與三個表位的配位結合。此些結合結構域受選，以使得三特異性結合分子能夠結合任何三個不同表位。此些表位可以是相同抗原的表位或兩個或三個不同抗原的表位。在一些實施方式中，第一個表位能夠結合 CD3，第二個表位能夠結合 CD8，和第三個表位能夠結合疾病相關的抗原的表位。此外，更提供一種新的 ROR1 結合抗體、其衍生物以及此些組合物的用途。

Tri-specific binding molecules are multi-chain polypeptide molecules that possess three Binding Domains and are thus capable of mediating coordinated binding to three epitopes. The Binding Domains may be selected such that the Tri-Specific Binding Molecules are capable of binding to any three different epitopes. Such epitopes may be epitopes of the same antigen or epitopes of two or three different antigens. In a embodiment, one of such epitopes will be capable of binding to CD3, the second of such epitopes will be capable of binding to an epitope of a Disease-Associated Antigen. A novel ROR1-binding antibody, as well as derivatives thereof and uses for such compositions are provided.

指定代表圖：

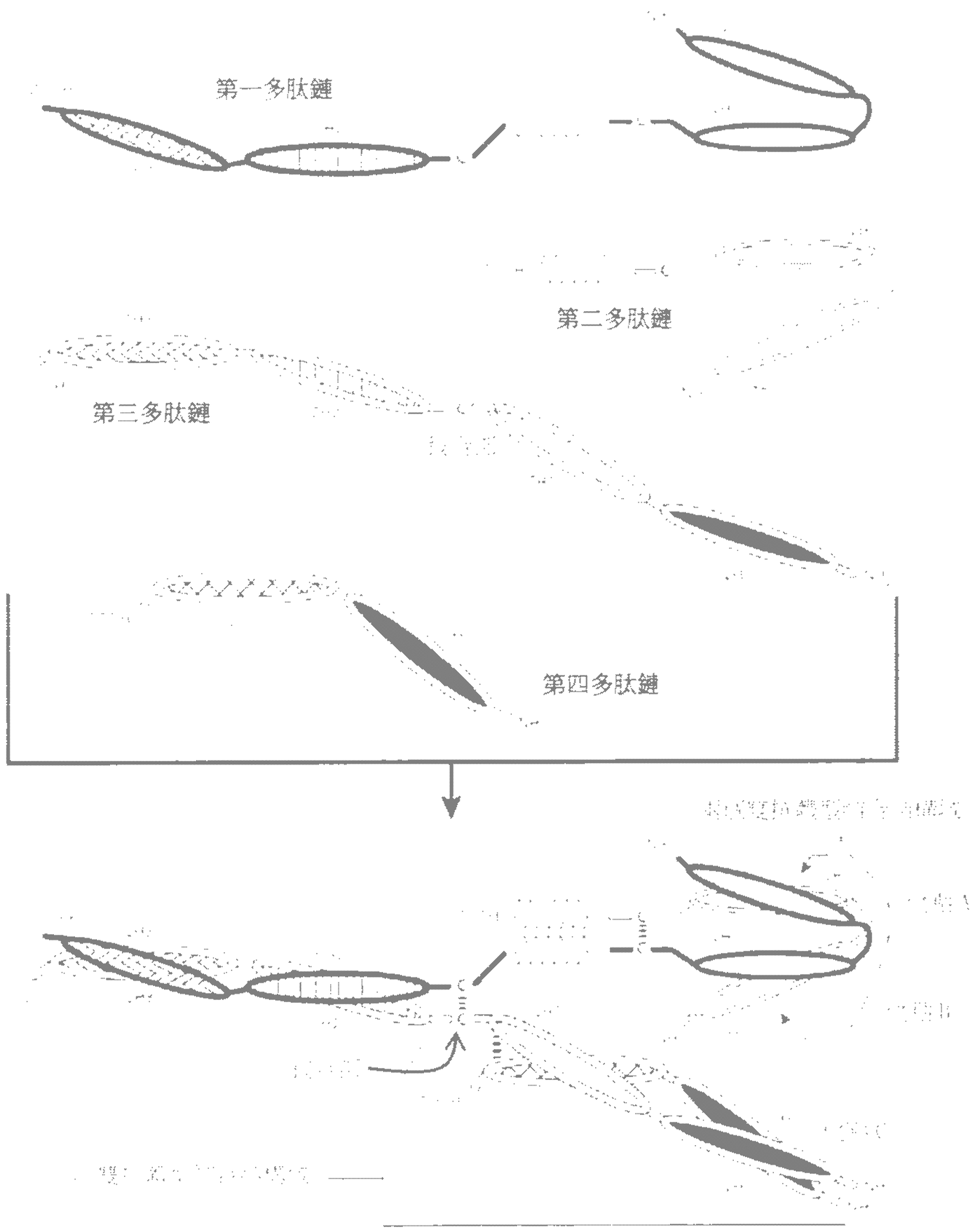


圖 4A

符號簡單說明：

VL・・・結構域

VL1・・・結構域

VL2・・・結構域

VH・・・結構域

VH1・・・結構域

VH2・・・結構域

CH1・・・結構域

CH2・・・結構域

CH3・・・結構域

CL・・・結構域

專利案號：104117564

公告本

申請日：

I718098

IPC分類：

【發明摘要】

【中文發明名稱】 三特異性結合分子及其使用方法

【英文發明名稱】 Tri-Specific Binding Molecules and Methods of Use Thereof

【中文】

一種三特異性結合分子，其是具備三個結合結構域的多鏈多肽分子，因此能夠介導與三個表位的配位結合。此些結合結構域受選，以使得三特異性結合分子能夠結合任何三個不同表位。此些表位可以是相同抗原的表位或兩個或三個不同抗原的表位。在一些實施方式中，第一個表位能夠結合CD3，第二個表位能夠結合CD8，和第三個表位能夠結合疾病相關的抗原的表位。此外，更提供一種新的ROR1結合抗體、其衍生物以及此些組合物的用途。

【英文】

Tri-specific binding molecules are multi-chain polypeptide molecules that possess three Binding Domains and are thus capable of mediating coordinated binding to three epitopes. The Binding Domains may be selected such that the Tri-Specific Binding Molecules are capable of binding to any three different epitopes. Such epitopes may be epitopes of the same antigen or epitopes of two or three different antigens. In a embodiment, one of such epitopes will be capable of binding to CD3, the second of such epitopes will be capable of binding to CD8, and the third of such epitopes will be capable of binding to an epitope of a Disease-Associated Antigen. A novel

ROR1-binding antibody, as well as derivatives thereof and uses for such compositions are provided.

【指定代表圖】　　第 4 A 圖

【代表圖之符號簡單說明】

VL　　結構域

VL1　　結構域

VL2　　結構域

VH　　結構域

VH1　　結構域

VH2　　結構域

CH1　　結構域

CH2　　結構域

CH3　　結構域

CL　　結構域

【特徵化學式】　　無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 三特異性結合分子及其使用方法

【英文發明名稱】 Tri-Specific Binding Molecules and Methods of Use Thereof

【技術領域】

【0001】 本發明涉及三特異性結合分子，其是具備三個結合結構域的多鏈多肽分子，因此能夠介導與三個表位的配位結合。此些結合結構域受選而使得三特異性結合分子能夠結合任何三個不同表位。此些表位可以是相同抗原的表位，或兩個或三個不同抗原的表位。在一些實施方式中，第一個表位能夠結合CD3，第二個表位能夠結合CD8，和第三個表位能夠結合疾病相關的抗原的表位。此外，本發明也涉及新的ROR1結合抗體，以及其衍生物和這樣的組合物的用途。

【先前技術】

【0002】 I. 哺乳動物免疫系統

【0003】 哺乳動物免疫系統用作抵抗各種病況，包括例如損傷、感染和瘤形成的防禦。人和其他哺乳動物發展對病原體、外源物質和癌症抗原的免疫應答的效率取決於兩個特徵：對抗原識別的免疫應答的精巧的特異性，和當用相同的抗原再啟動時允許更快和更強力應答的免疫記憶(參見Portolés, P.等(2009) "*The TCR/CD3 Complex: Opening the Gate to Successful Vaccination*," Current Pharmaceutical Design 15:3290-3300；Guy, C.S.等(2009) "*Organization of Proximal Signal Initiation at the TCR:CD3 Complex*," Immunol Rev. 232(1):7-21)。

【0004】 哺乳動物免疫系統由下述兩個分開但是相互關聯的系統介導：細胞和體液免疫系統。一般而言，體液系統由可溶性產物(抗體或免疫球蛋白)介導，此可溶性產物具有結合並中和被系統識別為身體外源的產物的能力。相反，細胞免疫系統涉及動員某些細胞，稱為“T細胞”，其具有各種治療作用。T細胞是淋巴細胞，其源自胸腺，並且在組織、淋巴系統和循環系統之間迴圈。回應外源結構(抗原)的存在和識別，T細胞被“**啟動**”，以啟動免疫應答。在許多情況下，這些外源抗原由於瘤形成或感染而在宿主細胞上表達。儘管T細胞它們本身不分泌抗體，但是它們對於通過第二類淋巴細胞——B細胞(其源自骨髓)的抗體分泌通常是必要的。關鍵地，T細胞展示非凡的免疫特異性，以便能夠區分一個抗原與另一個抗原)。兩種類型的T細胞——“T輔助細胞”和“細胞毒性T細胞”尤其相關。

【0005】 T輔助細胞特徵在於它們的糖蛋白，CD4的表達(即，它們是“$CD4^+$”)。$CD4^+$ T細胞是大部分哺乳動物免疫和自體免疫應答的主要組織者(參見Dong, C.等(2003) “*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*,” Immunolog. Res. 28(1):39-48)。已經發現$CD4^+$ T細胞的啟動通過排列於抗原呈遞細胞(比如B細胞、巨噬細胞或樹突細胞)的表面上的抗原：II類主要組織相容性(**MHC II**)分子複合物和排列於初始$CD4^+$ T細胞的表面上的兩個分子——T細胞受體(“TCR”)和CD3細胞表面受體配體的複合物之間的共刺激相互作用而被介導。啟動的T輔助細胞能夠增殖成Th1細胞，其能夠介導對靶細胞的炎症反應。

【0006】 細胞毒性T細胞特徵在於它們對**CD8**的表達(即，它們是“$CD8^+$”以及$CD3^+$)。已經發現$CD8^+$ T細胞的啟動通過排列於靶細胞的

表面上的抗原：I類主要組織相容性(**MHC I**)分子複合物和排列於$CD8^+$ T細胞表面上的CD8和T細胞受體複合物之間的共刺激相互作用而被介導。與僅僅由某些免疫系統細胞表達的MHC II分子不同，MHC I分子被非常廣泛地表達。因此，細胞毒性T細胞能夠結合各種細胞類型。啟動的細胞毒性T細胞通過它們釋放細胞毒素穿孔蛋白、粒酶和粒溶素(granulysin)而介導細胞殺傷。通過穿孔蛋白的作用，粒酶進入靶細胞的細胞質，並且它們的絲氨酸蛋白酶功能觸發胱天蛋白酶級聯，其是最終導致靶細胞的細胞凋亡(程式性細胞死亡)的一系列半胱氨酸蛋白酶。

【0007】 T細胞受體(“TCR”)是α和β鏈的共價連接的異源二聚體(“TCRαβ”)。這些鏈是長度為259 (α)和296 (β)個氨基酸的I類膜多肽。CD3分子是T細胞共受體，由五條不同的多肽鏈組成(CD3 γ鏈、CD3 δ鏈、兩條CD3 ε鏈和兩條ζ鏈)。獨立的多肽鏈締合，以形成三個二聚體的複合物(εγ、εδ、ζζ) (參見Wucherpfennig, K.W.等(2010) “*Structural Biology Of The T Cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, And Initiation of Signaling*,” Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2(4):a005140；1-14頁；Chetty, R.等(1994) “*CD3: Structure, Function And The Role Of Immunostaining In Clinical Practice*,” J. Pathol. 173:303-307；Guy, C.S.等(2009) “*Organization of Proximal Signal Initiation at the TCR:CD3 Complex*,” Immunol Rev. 232(1):7-21；Call, M.E.等(2007) “*Common Themes In The Assembly And Architecture Of Activating Immune Receptors*,” Nat. Rev. Immunol. 7:841-850；Weiss, A. (1993) “*T Cell Antigen Receptor Signal Transduction: A Tale Of Tails And Cytoplasmic Protein-Tyrosine Kinases*,” Cell 73:209-212)。CD3複合物與TCR結

合以便在T淋巴細胞中產生啟動信號。在缺少CD3的情況下，TCR不能適當組裝，並被降解(參見Thomas, S.等(2010) "*Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T Cell Receptor Gene Transfer*," Immunology 129(2):170–177)。發現CD3結合所有成熟T細胞的膜，並且事實上不結合其他細胞類型的膜(參見Janeway, C.A.等(2005)在以下中：Immunobiology: THE IMMUNE SYSTEM IN HEALTH AND DISEASE,"第6版，Garland Science Publishing, NY, 214-216頁；Sun, Z. J.等(2001) "*Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3ε:γ Heterodimer*," Cell 105(7):913-923；Kuhns, M.S.等(2006) "*Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex*,"Immunity. 2006年2月；24(2):133-139)。

【0008】 TCR和CD3複合物以及CD3 ζ鏈ζ鏈(也稱為T細胞受體T3 ζ鏈或CD247)包括TCR複合物(參見van der Merwe, P.A.等(2010年12月3日電子公開) "*Mechanisms For T Cell Receptor Triggering*," Nat. Rev. Immunol. 11:47-55；Wucherpfennig, K.W.等(2010) "*Structural Biology Of The T Cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, And Initiation of Signaling*," Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2:a005140)。複合物非常重要，因為其包含大量的(十個)免疫受體酪氨酸基的啟動基序(ITAMs)。

【0009】 兩種相互作用對於T細胞啟動是必要的(參見Viglietta, V.等 (2007) "*Modulating Co-Stimulation*," Neurotherapeutics 4:666-675；Korman, A.J.等(2007) "*Checkpoint Blockade in Cancer*

Immunotherapy," Adv. Immunol. 90:297-339)。在第一相互作用中，細胞必須展示結合細胞主要組織相容性複合物的相關靶抗原，從而其可結合初始T淋巴細胞的T細胞受體("TCR")。在第二相互作用中，細胞的配體必須結合T淋巴細胞的共受體(參見Dong, C.等(2003) "*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*," Immunolog. Res. 28(1):39-48；Lindley, P.S.等(2009) "*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation*," Immunol. Rev. 229:307-321)。經歷兩種刺激信號的T細胞然後能夠響應細胞因數(比如白介素-2和白介素-12)。在TCR結合期間缺少兩種共刺激信號的情況下，T細胞進入功能上無應答的狀態，稱為克隆無能(參見Khawli, L.A.等(2008) "*Cytokine, Chemokine, and Co-Stimulatory Fusion Proteins for the Immunotherapy of Solid Tumors*," Exper. Pharmacol. 181:291-328)。在病理學狀態下，T細胞是各種器官特異性自身免疫性疾病，比如I型糖尿病、類風濕性關節炎和多發性硬化症的關鍵參與者(參見Dong, C.等(2003) "*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*," Immunolog. Res. 28(1):39-48)。

【0010】 認為啟動T細胞需要兩種信號以便它們實現適應性免疫應答提供了這樣一種機制：避免對在系統中其可能被T細胞識別的位置可能存在於抗原呈遞細胞上的自體抗原的應答。在T細胞與細胞的接觸導致產生兩種必要的信號中的僅僅一種信號的情況下，T細胞不被啟動並且不發生適應性免疫應答。

【0011】 II．抗體和其他表位結合分子

【0012】 A．抗體

【0013】 "**抗體**"是免疫球蛋白分子，其能夠通過位於免疫球蛋白分

子的可變結構域中的至少一個抗原識別位點特異性結合靶，比如碳水化合物、多核苷酸、脂質、多肽等。如本文所使用，該術語不僅僅包括完整的多克隆或單克隆抗體，而且也包括其突變體、天然存在的變體、包括具有需要的特異性的抗原識別位元點的抗體部分的融合蛋白、人源化的抗體、和嵌合抗體、以及包括具有必要特異性的抗原識別位點的免疫球蛋白分子的任何其他修飾結構。遍及本申請，抗體輕鏈和重鏈的氨基酸殘基的編號是根據EU索引，如在以下中：Kabat等(1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST，國立衛生研究院公開號91-3242。如本文所使用，“抗體的抗原結合片段”是抗體的具有至少一個抗原識別位元點的部分。如本文所使用，此術語包括片段(例如，Fab、Fab’、$F(ab')_2$ Fv)和單鏈分子(例如，scFv)。

【0014】 天然抗體(比如IgG抗體)由與兩條**重鏈**複合的兩條**輕鏈**組成。每條輕鏈包含可變結構域(**VL**結構域)和固定結構域(**CL**結構域)。每條重鏈包含可變結構域(**VH**結構域)、三個固定結構域(**CH1**、**CH2**和**CH3**結構域)和位於CH1和CH2結構域之間的鉸鏈結構域。因此，天然存在的免疫球蛋白(例如，IgG)的基礎結構單元是具有兩條輕鏈和兩條重鏈的四聚體，通常表示為約150,000 Da的糖蛋白。每條鏈的氨基末端(“N-末端”)部分包括具有約100至110或更多個氨基酸的可變區，其主要負責抗原識別。每條鏈的羧基末端(“C-末端”)部分限定固定區，其中輕鏈具有單個固定結構域和重鏈通常具有三個固定結構域和鉸鏈區。因此，IgG分子的輕鏈結構是n-VL-CL-c和IgG重鏈的結構是n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c (其中H是鉸鏈區，並且n和c分別表示多肽的N-末端和C-末端)。

【0015】 完整的、未修飾的抗體(例如，IgG抗體)結合抗原的表位

的能力取決於免疫球蛋白輕鏈和重鏈上是否存在可變結構域(即，分別為VL結構域和VH結構域)。抗體輕鏈和抗體重鏈的相互作用，尤其地，其VL和VH結構域的相互作用形成抗體的表位結合位點中的一個。IgG分子的可變區由互補決定區(CDR)和非CDR區段組成，此互補決定區(CDR)包含接觸表位的殘基和此非CDR區段被稱為框架區段(FR)，其一般維持結構和確定CDR環的定位，以便允許這樣的接觸(儘管某些框架殘基也可接觸抗原)。因此，VL和VH結構域具有結構n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c。作為(或可用作)抗體輕鏈的第一、第二和第三CDR的多肽在本文分別命名為**CDR_L1結構域**、**CDR_L2結構域**和**CDR_L3結構域**。類似地，作為(或可用作)抗體重鏈的第一、第二和第三CDR的多肽在本文分別命名為**CDR_H1結構域**、**CDR_H2結構域**和**CDR_H3結構域**。因此，術語CDR_L1結構域、CDR_L2結構域、CDR_L3結構域、CDR_H1結構域、CDR_H2結構域和CDR_H3結構域指多肽，其在摻入到蛋白質中時，使得此蛋白質能夠結合特異性表位，無論這樣的蛋白質是否是具有輕鏈和重鏈的抗體或雙抗體或單鏈結合分子(例如，scFv，BiTe等)，或是另一類型的蛋白質。與這樣的抗體相反，scFv構建物包括包含在單個多肽鏈中的抗體的VL和VH結構域，其中結構域被足夠長的靈活接頭分開，允許兩個結構域自組裝成功能性表位結合位點。在由於不足長度的接頭(小於約12個氨基酸殘基)而導致VL和VH結構域的自組裝是不可能的情況下，兩個scFv構建物可彼此相互作用形成二價分子，其中一條鏈的VL結構域締合另一條鏈的VH結構域(參見Marvin等(2005) *"Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies,"* Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658)。

【0016】 除了它們在診斷中的已知用途，已經顯示抗體可用作治療

劑。過去數十年已經看到對抗體治療潛能的興趣的復興，並且抗體已經成為一類重要的源自生物技術的藥物(參見Chan, C.E.等(2009) "*The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases*," Singapore Med. J. 50(7):663-666)。接近200種基於抗體的藥物已經被批准使用或正在開發。

【0017】 術語"**單克隆抗體**"指同質性(homogenous)抗體群體，其中單克隆抗體由參與抗原的選擇性結合的氨基酸(天然存在的和非天然存在的)組成。單克隆抗體是高度特異性的，針對單個表位(或抗原位點)。術語"單克隆抗體"不僅僅包括完整的單克隆抗體和全長單克隆抗體，而且也包括其片段(比如Fab、Fab'、$F(ab')_2$ Fv)、單鏈(scFv)，其突變體、包括抗體部分的融合蛋白、人源化的單克隆抗體、嵌合單克隆抗體，和包括具有必要特異性和結合抗原能力的抗原識別位點的免疫球蛋白分子的任何其他修飾結構。就抗體來源或製備其的方式(例如，通過雜交瘤、噬菌體選擇、重組表達、轉基因動物等)而言不期望受到限制。此術語包括完整的免疫球蛋白以及上面根據定義"抗體"描述的片段。製備單克隆抗體的方法是本領域已知的。可採用的一種方法是Kohler, G.等的方法(1975) "*Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity*," Nature 256:495-497或其改良方法。典型地，單克隆抗體在小鼠、大鼠或兔子中開發。通過用包含期望的表位的免疫原量的細胞、細胞提取物或蛋白製品免疫動物而產生抗體。免疫原可以是，但不限於原代細胞、培養的細胞系、癌細胞、蛋白質、肽、核酸或組織。用於免疫的細胞可培養一段時間(例如，至少24小時)，然後它們用作免疫原。細胞可通過它們本身或結合非變性佐劑比如Ribi用作免疫原(參見Jennings, V.M. (1995) "*Review of Selected*

Adjuvants Used in Antibody Production," ILAR J. 37(3):119-125)。

【0018】 一般而言，當用作免疫原時，細胞應保持完整和優選地能存活。相比於破裂的細胞，完整的細胞可允許抗原被免疫的動物更好地檢測。變性或烈性佐劑，例如，弗氏佐劑的使用，可使細胞破裂，因此，其應用受阻。免疫原可以週期性間隔被多次施用，諸如兩週一次或一週一次，或者可以維持在動物(例如，在組織重組體中)中的生存力這樣的方式被施用。可選地，對於期望的致病表位是免疫特異性的現有單克隆抗體和任意其他等價抗體可被測序並通過本領域中已知的任意手段重組產生。在一個實施方式中，對這樣的抗體測序，然後將多核苷酸序列克隆至載體用於表達或增殖。編碼感興趣的抗體的序列可在宿主細胞中保持在載體中，並且，可然後擴張和冷凍宿主細胞用於將來的使用。這樣的抗體的多核苷酸序列可被用於遺傳操作，以產生嵌合抗體、人源化的抗體或犬源化(caninized)的抗體，或改善抗體的親和性，或其他特徵。人源化抗體的一般原理涉及保留抗體的抗原結合部分的基礎序列，同時用人抗體序列交換抗體的非人剩餘部分。使單克隆抗體人源化大體上有四個步驟:(1)測定起始抗體輕鏈和重鏈可變結構域的核苷酸和預測的氨基酸序列；(2)設計人源化的抗體或犬源化的抗體，即，確定在人源化或犬源化過程期間使用哪個抗體框架區;(3)實際人源化或犬源化方法/技術；和(4)轉染和表達人源化的抗體。參見美國專利號4,816,567、5,807,715、5,866,692和6,331,415。

【0019】 這樣的抗體的表位結合結構域可包括融合在固定結構域上的完整可變結構域或僅僅包括移植在可變結構域中適當的框架區上的互補決定區(CDR)。抗原結合位點可以是野生型的或被一個或多個氨基酸取代而修飾。這消除了固定區在人個體中作為免疫原，但是仍存在

對外源可變區的免疫應答的可能性(參見LoBuglio, A.F.等(1989) "*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*," Proc. Natl. Acad. Sci. (美國) 86:4220-4224)。另一方法不僅僅關注提供源自人的固定區，而且也修飾可變區以便重塑它們盡可能接近人形式。已知重鏈和輕鏈二者的可變區包含三個互補決定區(CDR)，其回應所討論的抗原而改變並且決定結合能力，其由四個框架區(FR)側接，此些框架區在給定的物種中相對保守並且推測為CDR提供支架材料(scaffolding)。當就具體的抗原製備非人抗體時，可變區可通過將源自非人抗體的CDR移植在待修飾的人抗體中存在的FR上被"重塑"或"人源化"。下述文獻已經報導了此方法應用於各種抗體：Sato, K. 等 (1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. 等 (1988) "*Reshaping Human Antibodies for Therapy*," Nature 332:323-327；Verhoeyen, M.等(1988) "*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity*," Science 239:1534-1536；Kettleborough, C. A.等(1991) "*Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation*," Protein Engineering 4:773-3783；Maeda, H.等(1991) "*Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity*," Human Antibodies Hybridoma 2:124-134；Gorman, S. D.等(1991) "*Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody*," Proc. Natl. Acad. Sci. (美國) 88:4181-4185；Tempest, P.R.等(1991) "*Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo*,"Bio/Technology 9:266-271；Co, M. S.等(1991) "*Humanized*

Antibodies For Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (美國) 88:2869-2873 ; Carter, P. 等 (1992) "*Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy*," Proc. Natl. Acad. Sci. (美國) 89:4285-4289；和Co, M.S.等(1992) "*Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen*," J. Immunol. 148:1149-1154。在一些實施方式中，人源化的抗體保留所有的CDR序列(例如，包含來自小鼠抗體的所有六個CDR的人源化的小鼠抗體)。在其他實施方式中，人源化的抗體具有序列相對於原始抗體不同的一個或多個CDR (一、二、三、四、五或六個)。

【0020】 B. 雙特異性抗體、多特異性雙抗體和DART™雙抗體

【0021】 天然抗體僅僅能夠結合一個表位種類(即，它們是"單特異性的")，儘管它們可能夠結合此種類的多個拷貝(即，它們可展示二效價或多效價)。已經開發了各種重組雙特異性抗體形式(參見PCT公開號WO 2008/003116、WO 2009/132876、WO 2008/003103、WO 2007/146968、WO 2007/146968、WO 2009/018386、WO 2012/009544、WO 2013/070565)，其大部分使用接頭肽，以將抗體核心(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)融合至抗體核心的或其中的進一步結合的蛋白(例如，scFv，VL VH等)，或融合多個抗體部分或將(例如兩個Fab片段或scFv)融合至異源二聚化-促進結構域比如CH2-CH3結構域或可選的多肽(參見PCT公開號WO 2005/070966、WO 2006/107786A WO 2006/107617A、WO 2007/046893)。典型地，這樣的方法涉及折中和權衡。例如，PCT公開號WO 2013/174873、WO 2011/133886和WO 2010/136172公開了接頭的使用可在治療情形中引起問題，並且教導了三特異性抗體，其中CL和CH1結構域由它們各自的天然位置被交換

以及VL和VH結構域已經被多樣化(參見PCT公開號WO 2008/027236、WO 2010/108127)，以允許它們結合多於一個抗原。因此，這些文件中公開的分子用結合特異性換取結合另外抗原種類的能力。PCT公開號WO 2013/163427和WO 2013/119903公開了修飾CH2結構域，以包含包括結合結構域的融合蛋白加合物。此些文件敘述了CH2結構域可能在介導效應子功能中僅起到最小的作用。PCT公開號WO 2010/028797、WO2010028796和WO 2010/028795公開了重組抗體，其Fc結構域已經用另外的VL和VH結構域取代，以便形成三價結合分子。PCT公開號WO 2003/025018和WO2003012069公開了重組雙抗體，其單條鏈包含scFv結構域。PCT公開號WO 2013/006544公開多價Fab分子，其作為單條多肽鏈被合成並且然後進行蛋白酶解以產生異源二聚結構。因此，這些文件中公開的分子用所有或一些介導效應子功能的能力換取結合另外抗原種類的能力。PCT公開號WO 2014/022540、WO 2013/003652、WO 2012/162583、WO 2012/156430、WO 2011/086091、WO 2007/075270、WO 1998/002463、WO 1992/022583和WO 1991/003493公開了添加另外的結合結構域或官能團至抗體或抗體部分(例如，添加雙抗體至抗體的輕鏈，或添加另外的VL和VH結構域至抗體的輕鏈和重鏈，或添加異源融合蛋白或彼此連接的多個Fab結構域)。因此，這些文件中公開的分子用天然抗體結構換取結合另外的抗原種類的能力。

【0022】 現有技術已經另外敘述了產生雙抗體的能力，此雙抗體與這樣的天然抗體的不同之處在於能夠結合兩個或更多個不同表位種類(即，除了雙效價或多效價之外還展示雙特異性或多特異性)(參見Holliger等(1993) "'Diabodies': Small Bivalent And Bispecific

Antibody Fragments," Proc. Natl. Acad. Sci. (美國) 90:6444-6448；US 2004/0058400 (Hollinger等)；US 2004/0220388 (Mertens等)；Alt等(1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94；Lu, D.等(2005) "*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672；WO 02/02781 (Mertens等)；Olafsen, T.等(2004) "*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications*," Protein Eng Des Sel. 17(1):21-27；Wu, A.等(2001) "*Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single-chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange*," Protein Engineering 14(2):1025-1033；Asano等(2004) "*A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain*," Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992；Takemura, S.等(2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*," Protein Eng. 13(8):583-588；Baeuerle, P.A.等(2009) "*Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy*," Cancer Res. 69(12):4941-4944)。

【0023】 雙抗體的設計是基於單鏈可變結構域片段(scFv)的結構。這樣的分子通過經短連接肽彼此連接輕鏈和/或重鏈可變結構域而製備。Bird等(1988) ("*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*," Science 242:423-426)描述了連接肽的例子，其在一個可變結構域的羧基末端和

另一可變結構域的氨基末端之間橋跨約3.5 nm。已經設計和使用了其他序列的接頭(Bird等(1988) "*Single-Chain Antigen-Binding Proteins,*" Science 242:423-426)。接頭可進而被修飾用於另外的功能，比如藥物的附著或附著至固體載體。可經重組或經合成產生單鏈變體。對於合成產生scFv，可使用自動合成儀。對於重組產生scFv，包含編碼scFv的多核苷酸的適當質粒可被引入適當的宿主細胞——真核細胞比如酵母細胞，植物細胞，昆蟲細胞或哺乳細胞，或原核細胞比如大腸埃希氏菌(*E. coli*)。編碼scFv的多核苷酸可通過常規的操作比如多核苷酸的連接而製備。所得scFv可使用本領域已知的標準蛋白質純化技術分離。

【0024】 美國專利號7,585,952和美國專利公開號2010-0173978涉及對ErbB2免疫特異性的scFv分子。已經描述了雙特異性T細胞連接子(engager)("**BiTEs**")，其是一類scFv分子(參見WO 05/061547；Baeuerle, P等(2008) "*BiTE: A New Class Of Antibodies That Recruit T Cells,*" Drugs of the Future 33: 137-147；Bargou, 等2008) "*Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-Engaging Antibody,*" Science 321: 974-977)。這樣的分子由具有兩個抗原結合結構域的單個多肽鏈分子組成，其中一個抗原結合結構域免疫特異性結合CD3表位和其第二個免疫特異性結合靶細胞表面上存在的抗原。

【0025】 提供非單特異性雙抗體提供了明顯的優勢：共連接和共定位表達不同表位的細胞的能力。二價雙抗體因此具有寬的應用範圍，包括治療和免疫診斷。二價允許在各種應用中在設計和工程化雙抗體時更大的靈活性，提供對多聚體抗原的增強的抗體親抗原性，交聯不同的抗原，和依賴於兩個靶抗原的存在引導靶向特定的細胞類型。由於它們增

加的效價，低解離速率和從迴圈的快速清除(對於~50 kDa或更低的小尺寸雙抗體)，本領域已知的雙抗體分子也已經顯示在腫瘤成像領域的具體用途(參見Fitzgerald等(1997) *"Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris,"* Protein Eng. 10:1221)。尤其重要的是不同細胞的共連接，例如，細胞毒性T細胞與腫瘤細胞的交聯(參見Staerz等(1985) *"Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells,"*Nature 314:628-631，和Holliger等(1996) *"Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody,"* Protein Eng. 9:299-305)。

【0026】 雙抗體表位結合結構域可以針對任何免疫效應細胞比如CD3、CD16、CD32、CD64等的表面決定簇，此免疫效應細胞在T淋巴細胞、天然殺傷細胞(NK)細胞或其他單核細胞上表達。在許多研究中，也發現結合效應細胞決定簇例如Fcγ受體(FcγR)的雙抗體啟動效應細胞(參見Holliger等(1996) *"Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody,"* Protein Eng. 9:299-305 ； Holliger 等 (1999) *"Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins,"* Cancer Res. 59:2909-2916 ； WO 2006/113665 、 WO 2008/157379 、 WO 2010/080538 、 WO 2012/018687、WO 2012/162068)。通常，通過經Fc-FcγR相互作用使結合抗原的抗體結合效應細胞激發效應細胞啟動；因此，在這方面，雙抗體分子可展示Ig樣功能，這不依賴於它們是否包括Fc結構域(例如，

如在本領域已知的或本文列舉的任何效應功能試驗中所分析的(例如，ADCC試驗))。通過交聯腫瘤和效應細胞，雙抗體不僅僅使效應細胞接近腫瘤細胞而且導致有效的腫瘤殺傷(參見Cao等(2003) *"Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics,"* Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197)。

【0027】 例如，美國專利號6,171,586涉及如下產生雙特異性抗體：通過蛋白酶解切割兩個抗體，以獲得它們的$F(ab')_2$片段，在用於防止分子間二硫鍵形成的條件下還原這樣的片段，並且然後混合片段，以產生雙特異性抗體)。美國專利號6,551,592、6,994,853和8,277,806和PCT公開號WO 2012/156430、WO 2002/020039、WO 2000/018806和WO 1998/003670涉及產生三特異性抗體，其能夠同時結合腫瘤細胞上的T細胞和其他抗原，並且，經雙特異性抗體的Fc部分結合具有這樣的受體的細胞的Fc受體。PCT公開號WO 2000/018806、WO 1998/003670和WO 2006/072152涉及產生能夠同時結合T細胞和其他抗原的三特異性抗體。美國專利公開號2008-0057054公開了雙特異性綴合物，其對於針對澱粉狀蛋白β寡聚物的結合元件和針對跨膜蛋白質端腦蛋白 (telencephalin)的結合元件是特異性的。美國專利公開號2010-0291112涉及雙特異性和三特異性單鏈Fv分子，其特異性結合一個(或兩個)腫瘤抗原和效應細胞抗原(比如CD3、CD16、CD32、CD64等)。

【0028】 PCT公開號WO 1999/042597和WO 1998/006749公開了抗體衍生物，其包括人主要組織相容性複合物結合結構域，有或沒有結合的MHC結合肽。PCT公開號WO 02/072141涉及多特異性結合分子，其結合速率(on-rate)(它們結合靶分子的速率)和解離速率(off-rate)(它

們釋放靶分子的速率)不同，以便相比它們與另一這樣的靶分子的結合優選結合一個靶。三特異性分子，例如這樣的分子，其具有作為抗CD3或抗CD28抗體的單價第一部分和第二部分，此第二部分包括發揮二價免疫功能的部分，其免疫特異性結合靶患病細胞或免疫細胞上的一個或多個靶配體。

【0029】 美國專利號7,695,936和專利公開2007/0196363涉及由兩個抗體的重鏈形成的雙特異性抗體，其中一個抗體具有工程化至其重鏈的突出(protuberance)和其第二個具有工程化至其重鏈的互補的腔。這樣互補的“杵(knob)”和“臼(hole)”的存在教導相對於包含相同抗體的兩個重鏈的單特異性同源抗體，優選形成雙特異性異源抗體(具有每個這樣的抗體的一個重鏈)。提出了各種雙特異性異源抗體，包括對CD3和腫瘤細胞抗原免疫特異性的那些。也提出了各種三特異性異源抗體，包括對下述免疫特異性的一些三特異性異源抗體：CD3、CD8和CD37 (主要在參與T細胞增殖調節的B細胞上表達的跨膜蛋白質(參見Robak, T. 等 (2014) “*Anti-CD37 Antibodies For Chronic Lymphocytic Leukemia*,” Expert Opin. Biol. Ther. 14(5):651-661)，但是，沒有提供它們產生的機制也沒有公開它們的結構。

【0030】 PCT公開WO2012-162561涉及雙特異性、四價結合分子，其包括兩個多肽，其每個多肽包括兩個雙抗體結構，由間插CH2-CH3結構域分開。此文件也涉及由四個多肽鏈組成的四價結合分子，其中多肽鏈中的兩個包含兩個抗原的輕鏈可變結構域和重鏈可變結構域，和其中其他兩個多肽鏈包含抗原的互補的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域和末端CH2-CH3結構域。通過它們各自CH2-CH3結構域的締合形成雙特異性、四價結合分子。在四個多肽鏈構建物中，”輕”鏈不

是共價結合至重鏈，因此導致不穩定(參見Lu, D.等(2005) "*A Fully Human Recombinant IgG-like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672)。此文件公開了第三構建物，其中鏈被改變，以提供這樣的共價鍵合，但是代價是消除了它們的雙特異性(即，分子是單特異性的)。公開了對CD2、CD3、CD4、CD8、CD161、趨化因數受體、CD95、CCR5等具有特異性的分子。未公開能夠結合CD3和CD8二者的雙特異性分子。

【0031】 但是，上述優勢需要顯著的成本。形成這樣的非單特異性雙抗體需要成功組裝兩個或更多個有區別的和不同多肽(即，這樣的形成需要通過異源二聚化不同的多肽鏈種類形成雙抗體)。此事實與單特異性的雙抗體相反，其通過相同多肽鏈的同二聚化形成。因為必須提供至少兩個不同的多肽(即，兩個多肽種類)以便形成非單特異性雙抗體，並且因為這樣的多肽的同二聚化導致無活性的分子(參見Takemura, S.等(2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*," Protein Eng. 13(8):583-588)，產生這樣的多肽必須以防止相同種類的多肽之間的共價結合的方式完成(參見Takemura, S.等(2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*," Protein Eng. 13(8):583-588)。所以現有技術教導了非共價締合這樣的多肽(參見Olafsen等(2004) "*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications*," Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27；

Asano等(2004) "*A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain*," 摘要3P-683，J. Biochem. 76(8):992；Takemura, S.等(2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*," Protein Eng. 13(8):583-588；Lu, D.等(2005) "*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672)。

【0032】 但是，現有技術已經認識到由非共價締合的多肽組成的雙特異性雙抗體不穩定並且容易解離成非功能性單體(參見Lu, D.等(2005) "*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672)。

【0033】 面對此挑戰，現有技術已經成功開發了穩定、共價結合的異源二聚非單特異性雙抗體，稱為**DARTs™** (參見美國專利公開號2013-0295121、2010-0174053和2009-0060910；歐洲專利公開號EP 2714079、EP 2601216、EP 2376109、EP 2158221和PCT公開號WO 2012/162068、WO 2012/018687、WO 2010/080538；和Moore, P.A.等(2011) "*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma*," Blood 117(17):4542-4551；Veri, M.C.等(2010) "*Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb*

(CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold,"Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943；Johnson, S.等(2010) "*Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion*," J. Mol. Biol. 399(3):436-449)。這樣的雙抗體包括兩個或更多個共價複合的多肽並且涉及將一個或多個半胱氨酸殘基工程化至每個採用的多肽種類，這允許形成二硫鍵並且從而共價鍵合兩個多肽鏈。例如，添加半胱氨酸殘基至這樣的構建物的C-末端已經顯示允許多肽鏈之間的二硫鍵合，穩定所得異源二聚體而不干擾二價分子的結合特徵。

【0034】 有許多DART™實施方式。最簡單DART™實施方式的兩個多肽的每一個包括三個結構域(**圖1A**)。第一多肽包括：(i)第一結構域(VL1)，其包括第一免疫球蛋白的輕鏈可變結構域的結合區；(ii)第二結構域(VH2)，其包括第二免疫球蛋白的重鏈可變結構域的結合區；和(iii)第三結構域，其包含半胱氨酸殘基(或包含半胱氨酸的結構域)和異源二聚化-促進結構域，其用於促進與第二多肽鏈的異源二聚化(**圖1B**)。第三結構域的半胱氨酸殘基(或包含半胱氨酸的結構域)用於促進雙抗體的第一多肽鏈與第二多肽鏈的共價鍵合。第二多肽包含：(i)互補的第一結構域(包含VL2的結構域)；(ii)互補的第二結構域(包含VH1的結構域)；和(iii)第三結構域，其包含半胱氨酸殘基(或包含半胱氨酸的結構域)和，任選地，互補的異源二聚化-促進結構域，其與第一多肽鏈的異源二聚化-促進結構域複合，以便促進與第一多肽鏈的異源二聚化。第二多肽鏈的第三結構域的半胱氨酸殘基(或包含半胱氨酸的結構域)用於促進雙抗體的第二多肽鏈與第一多肽鏈的共價鍵合。這樣的分子是穩定、

有效力的並且能夠同時結合兩個或更多個抗原。它們能夠促進重定向T細胞介導的表達靶抗原的細胞的殺傷。

【0035】 在一個實施方式中，第一和第二多肽的第三結構域每個包含半胱氨酸殘基，其用於將多肽經二硫鍵結合在一起。多肽中的一個或兩個的第三結構域可另外具有CH2-CH3結構域的序列，使得雙抗體多肽的複合形成Fc結構域，其能夠結合細胞(比如B淋巴細胞、樹突細胞、天然殺傷細胞、巨噬細胞、嗜中性粒細胞、嗜伊紅粒細胞、嗜鹼性粒細胞和肥大細胞)的Fc受體 (**圖2A-2B**)。

【0036】 已經描述了這樣的分子的許多變型(參見美國專利公開號2013-0295121、2010-0174053和2009-0060910；歐洲專利公開號EP 2714079、EP 2601216、EP 2376109、EP 2158221和PCT公開號WO 2012/162068、WO 2012/018687、WO 2010/080538)。這些具有Fc的DART™可包括三條多肽鏈(例如，**圖2B**)。這樣的雙抗體的第一多肽鏈包含三個結構域：(i)包含VL1的結構域、(ii)包含VH2的結構域、(iii)包含半胱氨酸殘基的結構域(或包含半胱氨酸的結構域)和異源二聚化-促進結構域、和(iv)半胱氨酸殘基(或包含半胱氨酸的結構域和CH2-CH3結構域。這樣的DART™的第二多肽鏈包含：(i)包含VL2的結構域、(ii)包含VH1的結構域、和(iii)包含半胱氨酸殘基的結構域(或包含半胱氨酸的結構域)和異源二聚化-促進結構域，其促進與第一多肽鏈的異源二聚化。第二多肽鏈的第三結構域的半胱氨酸殘基(或包含半胱氨酸的結構域)用於促進雙抗體的第二多肽鏈與第一多肽鏈的共價結合。這樣的DART™的第三多肽包括半胱氨酸殘基(或包含半胱氨酸的結構域)和CH2-CH3結構域。因此，這樣的DART™的第一和第二多肽鏈締合在一起形成能夠結合表位的VL1/VH1結合位點以及能夠結合第二

表位的VL2/VH2結合位點。第一和第二多肽通過在它們各自第三結構域中涉及半胱氨酸殘基的二硫鍵彼此結合。注意，第一和第三多肽鏈彼此複合形成經二硫鍵穩定的Fc結構域。這樣的雙抗體具有增強的效力。這樣具有Fc的**DART™**可具有兩個取向之一(**表1**)：

【0037】 **表1**

第一取向	第三鏈	NH_2-CH2-CH3-COOH
	第一鏈	NH_2-VL1-VH2-Cys-異源二聚體-促進結構域-CH2-CH3-COOH
	第二鏈	NH_2-VL2-VH1-Cys-異源二聚體-促進結構域-COOH
第二取向	第三鏈	NH_2-CH2-CH3-COOH
	第一鏈	NH_2-CH2-CH3-VL1-VH2-Cys-異源二聚體-促進結構域-COOH
	第二鏈	NH_2-VL2-VH1-Cys-異源二聚體-促進結構域-COOH

【0038】已經描述了甚至更複雜的DART™雙抗體，稱為**Ig-DART™**(**圖 3A-3B**)和**Fc-DART™**雙抗體(**圖 3C**)(參見WO 2012/018687)。Fc-DARTs™具有四條多肽鏈。這樣的雙抗體的第一和第三多肽鏈包含三個結構域：(i)包含VL1的結構域、(ii)包含VH2的結構域、和(iii)包含CH2-CH3序列的結構域。Fc-DART™的第二和第四多肽包含：(i)包含VL2的結構域、(ii)包含VH1的結構域、和(iii)促進與Fc-DART™的第一多肽鏈的異源二聚化和共價結合的結構域。第三和第四可以相同或不同，以及第一和第二多肽鏈可以相同或不同，以便允許是單特異性的、雙特異性的或四特異性的四價結合。這樣更複雜的DART™分子也具有包含半胱氨酸的結構域，其用於形成共價結合的複

合物。Fc-DART™雙抗體包含CH1和CL結構域。

【0039】 可選的構建物是本領域已知的，用於其中期望四價分子但是不需要Fc的應用，包括但不限於四價串聯抗體，也稱為“**TandAbs**”(參見美國專利公開號2005-0079170、2007-0031436、2010-0099853、2011-020667 2013-0189263；歐洲專利公開號EP 1078004、EP 2371866、EP 2361936和EP 1293514；PCT公開號WO 1999/057150、WO 2003/025018和WO 2013/013700)，其通過兩個相同鏈的同二聚化形成，每條鏈各具有VH1、VL2、VH2和VL2結構域。

【0040】 **III.重定向殺傷**

【0041】 如上所討論，CD8、MHC I和T細胞受體之間的相互作用導致細胞毒性T細胞的啟動和它們殺傷附近細胞的能力。結合CD3和腫瘤抗原的雙特異性雙抗體可用於共定位細胞毒性CD8+ T細胞至腫瘤細胞，實現這樣的細胞的“重定向殺傷”(參見WO 2010/080538、WO 2012/018687、WO/2012/162068、US 2010/0174053、US 2013/0295121)。

【0042】 但是，通過將$CD3^+$ T細胞共定位至腫瘤或病原體細胞的基因座治療癌症或傳染性疾病的嘗試還未完全成功。靶向CD3的抗體結合$CD3^+$ $CD8^+$細胞毒性T細胞和結合$CD3^+$ $CD4^+$ T輔助細胞，導致兩種這樣的細胞的啟動。但是，通過啟動$CD3^+$ $CD4^+$ T輔助細胞產生的細胞因數，造成嚴重的副作用，例如，威脅生命的細胞因數風暴(參見Ferran, C. 等 (1990) “*Cytokine-Related Syndrome Following Injection Of Anti-CD3 Monoclonal Antibody: Further Evidence For Transient In Vivo T Cell Activation*,” Eur. J. Immunol. 20:509-515)。另外，這樣的抗CD3抗體結合其他細胞類型，包括在啟動時表達細胞因數的$CD3^+$

CD4⁻CD8⁻雙陰性T細胞等(參見Johansson, Martina等(2003) "*A Unique Population of Extrathymically Derived αβTCR⁺ CD4⁻ CD8⁻ T Cells with Regulatory Functions Dominates the Mouse Female Genital Tract*," J. Immunol. 170:1659-1666；Blank, C.等(2003) "*Absence of Programmed Death Receptor 1 Alters Thymic Development and Enhances Generation of CD4/CD8 Double-Negative TCR-Transgenic T Cells*," J. Immunol. 171:4574-4581; McIntyre, M.S.F. 等 (2011) "*Consequences Of Double Negative Regulatory T Cell And Antigen Presenting Cell Interaction On Immune Response Suppression*," Intl. Immunopharmacol. 11:597-603)，並且此些細胞類型抑制$CD3^+$ $CD8^+$ T細胞介導的細胞毒性(參見Hillhouse, E.E.(2013) "*A Comprehensive Review Of The Phenotype And Function Of Antigen-Specific Immunoregulatory Double Negative T Cells*," J. Autoimmun. 40:58-65)。

【0043】 已經建議與施用靶向CD3的抗體相關的細胞因數產生可使用靶向CD8和腫瘤抗原的雙特異性抗體而避免(參見Michalk, I.等(2014) "*Characterization of a Novel Single-Chain Bispecific Antibody for Retargeting of T Cells to Tumor Cells via the TCR Co-Receptor CD8*," PLOS One 9(4):e95517，1-8頁)。所以已經研究了抗CD8抗體，以確定當單獨使用時，它們是否能夠誘導效應子功能。Clement, M.等報導了測試的七個抗人CD8抗體中的六個不能啟動$CD8^+$ T細胞，但是這樣的啟動可使用非常高濃度(10-100 μg/mL)的抗人CD8抗體"OKT8"實現(參見Clement, M.等(2011) "*Anti-CD8*

Antibodies Can Trigger CD8+ T Cell Effector Function In The Absence Of TCR Engagement And Improve Peptide-MHCI Tetramer Staining," J. Immunol. 187(2):654-663)。對於這樣的作用協同結合兩個CD8分子是必要的，因為發現OKT8 F(ab)'$_2$片段能夠介導此作用，而發現OKT8 Fab不能夠這樣做。

【0044】 因此，儘管這樣的研究，還未充分理解致力於抗CD4或抗CD8抗體使用的細胞因數介導的毒性。研究已經揭示了在施用抗CD3抗體時看到的細胞因數毒性未通過消耗$CD3^+$ $CD4^+$ T細胞或通過缺失$CD3^+$ $CD8^+$ T細胞而被消除。因此，$CD3^+$ $CD4^+$ T細胞和$CD3^+$ $CD8^+$ T細胞造成抗CD3抗體的毒性作用，和介導完全的作用需要相對較少的細胞(參見Finck, B.K.等(1992) "*The Role Of T-Cell Subsets In The Response To Anti-CD3 Monoclonal Antibodies*," Clin Immunol Immunopathol. 1992 Dec;65(3):234-41)。

【0045】 而且，靶向CD8和腫瘤抗原的雙特異性抗體對於$CD3^+$ $CD8^+$ T細胞和腫瘤細胞不是特異的，而是僅僅對$CD8^+$細胞和腫瘤細胞是特異性的。尤其，天然殺傷細胞(NK)的$CD3^-CD8^+$亞類被這樣的抗體靶向。代表大部分NK細胞的這樣的細胞是細胞因數的有效產生者並且它們的啟動可能產生細胞因數風暴。$CD3^-CD8^+$ NK細胞是感染HIV-1的黑猩猩中的IFN-γ的主要來源(參見Rodriquez, A.R.等(2007) "*Influence Of Interleukin-15 On CD8+ Natural Killer Cells In Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Chimpanzees*," J. Gen. Virol. 88:641-651)。

【0046】 從而，儘管所有之前的進步，仍需要改善的組合物，其能夠更強力引導身體的免疫系統攻擊癌症細胞或感染病原體的細胞，尤其

以更低的治療性濃度。

【發明內容】

【0047】 如下面詳細描述，本發明通過提供三特異性結合分子解決了上述需要。此三特異性結合分子可結合：(1)CD3的表位、(2) CD8的表位和(3)在靶細胞(尤其癌症細胞，或感染病原體的細胞)上表達的疾病相關的抗原的表位，並且介導細胞毒性T細胞與呈遞疾病相關抗原的細胞的配位結合。

【0048】 本發明涉及一種三特異性結合分子，其是具有三個結合結構域的多鏈多肽分子，因此能夠介導與三個表位的配位結合。可選擇結合結構域，以便三特異性結合分子能夠結合任何三個不同表位。這樣的表位可以是相同抗原的表位或兩個或三個不同抗原的表位。本發明也涉及一種新的ROR1結合抗體，以及其衍生物和這樣的組合物的用途。

【0049】 在一些實施方式中，選擇三個表位，以便這樣的表位中的一個或兩個是免疫系統細胞，尤其是細胞毒性淋巴細胞免疫系統細胞(CTL)的表位(一個或多個)，和其中剩餘的表位(一個或多個)是疾病相關的抗原的表位(一個或多個)。這樣尤其優選的三特異性結合分子能夠將細胞毒性淋巴細胞定位至表達疾病相關的抗原的細胞，並且從而促進殺傷表達疾病相關的抗原的細胞。疾病相關的抗原可以是癌症抗原，或可以是以病原體(例如，細菌、真菌、病毒或原生動物)感染為特徵的抗原。更具體地，三特異性結合分子能夠介導與以下的配位結合：(1)CD3的表位、(2) CD8的表位和(3)疾病相關的抗原的表位。通過結合CD3和CD8以及結合疾病相關的抗原，這樣的分子將細胞毒性T細胞共定位至呈遞疾病相關的抗原的細胞，導致啟動這樣的T細胞和啟動針對表達疾

病相關的抗原的細胞的細胞毒性應答。

【0050】 詳細地，此三特異性結合分子能夠免疫特異性結合三個不同的表位，其中結合分子包括共價複合在一起的四條不同的多肽鏈，並且包括：(I)抗原結合結構域I，其能夠免疫特異性結合第一抗原上存在的表位I，和抗原結合結構域II，其能夠免疫特異性結合第二抗原上存在的表位II，其中抗原結合結構域I和抗原結合結構域II都是雙抗體型結合結構域；(II)非雙抗體型抗原結合結構域III，其能夠免疫特異性結合第三抗原上存在的表位III；和(III)Fc結構域，其通過兩個CH2-CH3結構域的彼此締合而形成。

【0051】 其中，第一、第二和第三抗原是相同的抗原，或獨立地與抗原中的另一個相同或不同。

【0052】 在一些實施方式中，表位I、表位II和表位III其中之一是細胞受體的表位。

【0053】 在一些實施方式中，表位I、表位II和表位III其中之一是疾病相關的抗原的表位(尤其地，其中疾病相關的抗原是癌症抗原，其排列於癌症細胞的表面，或是病原體抗原，其排列於病原體或感染病原體的細胞的表面)。

【0054】 在一些實施方式中，Fc結構域能夠結合排列在細胞表面上的Fc受體。

【0055】 在一些實施方式中，表位I、表位II和表位III其中的第一個是CD3的表位，表位I、表位II和表位III其中的第二個是CD8的表位，和表位I、表位II和表位III其中的第三個是疾病相關的抗原的表位，和其中三特異性結合分子的抗原結合結構域I、II和III介導細胞毒性T細胞和表達疾病相關抗原的細胞的配位結合。本發明尤其涉及這樣的三特異

性結合分子的實施方式，其中CD3、CD8排列在T細胞的表面上和其中疾病相關的抗原排列在癌症細胞、病原體或感染病原體的細胞的表面上，和其中免疫特異性結合足夠共定位CD3和CD8以及疾病相關的抗原，從而促進針對排列疾病相關的抗原的細胞啟動排列CD8的T細胞。

【0056】 在一些實施方式中，非雙抗體型結合結構域III包括Fab型結合結構域(VL_{III}/VH_{III})，其能夠免疫特異性結合表位III，其中分子包括：(A)第一多肽鏈、(B)第二多肽鏈、(C)第三多肽鏈、和(D)第四多肽鏈。(A)第一多肽鏈(I)在N-末端至C-末端方向包括：(1)免疫球蛋白的輕鏈可變結構域(VL_I)，其能夠結合三個表位中的第一個；(2)免疫球蛋白的重鏈可變結構域(VH_{II})，其能夠結合三個表位中的第二個；(3)(a)第一包含半胱氨酸的結構域和異源二聚體-促進結構域、或(b)包含半胱氨酸的異源二聚體-促進結構域；(5)第二包含半胱氨酸的結構域；和(6)IgG的CH2和CH3結構域。或者，(A)第一多肽鏈亦可是(II)在N-末端至C-末端方向包括：(1)第一包含半胱氨酸的結構域；(2)IgG的CH2和CH3結構域；(3)免疫球蛋白的輕鏈可變結構域(VL_I)，其能夠結合三個表位中的第一個；(4)免疫球蛋白的重鏈可變結構域(VH_{II})，其能夠結合三個表位中的第二個；(5)(a)第二包含半胱氨酸的結構域和異源二聚體-促進結構域、或(b)包含半胱氨酸的異源二聚體-促進結構域。(B)第二多肽鏈，其在N-末端至C-末端方向包括：(1)免疫球蛋白的輕鏈可變結構域(VL_{II})，其能夠結合三個表位中的第二個；(2)免疫球蛋白的重鏈可變結構域(VH_I)，其能夠結合三個表位中的第一個；(3)(a)第一包含半胱氨酸的結構域和異源二聚體-促進結構域、或(b)包含半胱氨酸的異源二聚體-促進結構域；其中第二多肽鏈的異源二聚體-促進結構域與第一多肽鏈的異源二聚體-促進結構域互補。(C)第三多肽鏈，其在N-末端至C-末端

方向包括：(1)免疫球蛋白的重鏈可變結構域(VH_{III})，其能夠結合三個表位中的第三個；和(2)CH1結構域、包含半胱氨酸的鉸鏈結構域和IgG的CH2-CH3結構域。(D)第四多肽鏈，其在N-末端至C-末端方向包括：(1)免疫球蛋白的輕鏈可變結構域(VL_{III})，其能夠結合三個表位中的第三個；和(2)包含半胱氨酸的輕鏈固定結構域(CL)。其中，(i)VL_I和VH_I結構域締合形成能夠結合表位I的結構域；(ii)VL_{II}和VH_{II}結構域締合形成能夠結合表位II的結構域；(iii)VL_{III}和VH_{III}結構域締合形成能夠結合表位III的結構域；(iv)第一多肽鏈的CH2-CH3結構域和第三多肽鏈的CH2-CH3結構域締合形成Fc結構域；(v)第一和第二多肽鏈彼此共價結合；(vi)第一和第三多肽鏈彼此共價結合；和(vii)第三和第四多肽鏈彼此共價結合。

【0057】 在一些實施方式中，(A)異源二聚體-促進結構域是E-螺旋和互補的異源二聚體-促進結構域是K-螺旋；或(B)異源二聚體-促進結構域是K-螺旋和互補的異源二聚體-促進結構域是E-螺旋。

【0058】 在一些實施方式中，(A)第一和第三多肽鏈的CH2-CH3結構域各具有序列**SEQ ID NO:6**，以便由它們締合形成的Fc結構域展示正常的FcγR介導的效應子功能；或(B)第一和第三多肽鏈的CH2-CH3結構域包括相對於**SEQ ID NO:6**的序列的至少一個氨基酸取代，以便由它們締合形成的Fc結構域展示改變的FcγR介導的效應子功能。

【0059】 在一些實施方式中，其中第一和第三多肽鏈的CH2-CH3結構域彼此不同並且具有選自下述的氨基酸序列：**SEQ ID NO:7**和**SEQ ID NO:8**。

【0060】 在一些實施方式中，(A)表位I、表位II和表位III分別是CD3的表位、CD8的表位和疾病相關的抗原的表位；(B)表位I、表位II和表

位III分別是CD3的表位、疾病相關的抗原的表位和CD8的表位；(C)表位I、表位II和表位III分別是CD8的表位、CD3的表位和疾病相關的抗原的表位；(D)表位I、表位II和表位III分別是CD8的表位、疾病相關的抗原的表位和CD3的表位；(E)表位I、表位II和表位III分別是疾病相關的抗原的表位、CD3的表位和CD8的表位；或(F)表位I、表位II和表位III分別是疾病相關的抗原的表位、CD8的表位和CD3的表位。

【0061】 在一些實施方式中：(A)CD3的表位是由抗體OKT3、M291、YTH12.5、CD3 mAb 1或CD3 mAb 2識別的CD3表位；或(B)CD8的表位是由抗體TRX2或OKT8識別的CD8表位。

【0062】 本發明另外涉及一種藥學組合物，其包括上述三特異性結合分子和藥學上可接受的載體、賦形劑或稀釋劑。

【0063】 本發明另外涉及一種治療癌症的方法，其包括向需要其的個體施用有效量的上述藥學組合物，其中疾病相關的抗原是癌症抗原。

【0064】 本發明另外涉及一種治療與病原體的存在相關的疾病方法，其包括向需要其的個體施用有效量的權利要求15的藥學組合物，其中疾病相關的抗原是病原體抗原。

【0065】 本發明另外涉及一種抗ROR1抗體，或ROR1結合片段，其中抗體包括：(A)輕鏈可變結構域，其包括CDR_L1，其具有序列**SEQ ID NO:117**，CDR_L2，其具有序列**SEQ ID NO:118**，和CDR_L3，其具有序列**SEQ ID NO:119**；和(B)重鏈可變結構域，其包括CDR_H1，其具有序列**SEQ ID NO:120**，CDR_H2，其具有序列**SEQ ID NO:121**，和CDR_H3，其具有序列**SEQ ID NO:122**。

【0066】 在一些實施方式中，抗體具有輕鏈可變結構域，其具有序列**SEQ ID NO:51**。本發明另外涉及這樣的抗ROR1抗體或其ROR1結

合片段的實施方式，其中抗體具有重鏈可變結構域，其具有序列**SEQ ID NO:52**，或同時具有具有序列**SEQ ID NO:51**的輕鏈可變結構域和具有序列**SEQ ID NO:52**的重鏈可變結構域。

【0067】 本發明另外涉及一種雙抗體、BiTe或單鏈抗體，其包括任何這些權利要求抗ROR1抗體的ROR1結合片段。

【0068】 本發明另外涉及一種藥學組合物，其包括任何上述抗ROR1抗體或其ROR1結合片段和藥學上可接受的載體、賦形劑或稀釋劑。本發明另外涉及治療癌症的方法，其包括向需要其的個體施用有效量的這樣的藥學組合物。

【圖式簡單說明】

【0069】

[**圖1A-1B**]顯示DART™雙抗體的結構域。**圖1A**為基本的DART™雙抗體的結構域的示意圖。**圖1B**為由兩條多肽鏈組成的共價結合的雙抗體的示意圖，其中每條多肽鏈各具有識別相同表位的異源二聚體-促進結構域VL和VH結構域——使用相同的陰影顯示。

[**圖2A-2B**]提供了由兩條多肽鏈組成的共價結合的雙抗體的示意圖，每條多肽鏈具有CH2和CH3結構域(**圖2A**)或其中僅僅一條多肽鏈具有CH2和CH3結構域(**圖2B**)，以便締合的鏈形成Fc結構域，其包括天然存在的Fc結構域的全部或一部分。於此，使用相同的陰影顯示識別相同表位的VL和VH結構域。

[**圖3A-3C**]提供了顯示由兩對多肽鏈組成的四價雙抗體的示意圖。此些多肽鏈對是不同的，因此產生雙特異性分子，其對於兩個表位中的每一個而言是二價的，其中一個表位是DR5的表位和另一個表位是效應細胞的表面上存在的分子的表位。每個對的一個多肽具有CH2和CH3結

構域，以便締合的鏈形成Fc結構域，其包括天然存在的Fc結構域的全部或一部分。使用相同的陰影顯示識別相同表位的VL和VH結構域。僅僅一對表位(用相同的陰影顯示)能夠結合DR5。**圖3A**顯示Ig雙抗體。**圖3B**顯示Ig雙抗體，其包含E-螺旋和K-螺旋異源二聚體-促進結構域。**圖3C**顯示Fc-DART™雙抗體，其包含抗體CH1和CL結構域。符號“**VL1**”和“**VH1**”分別表示結合“第一”表位的輕鏈可變結構域和重鏈可變結構域。類似地，符號“**VL2**”和“**VH2**”分別表示結合“第二”表位的輕鏈可變結構域和重鏈可變結構域。

[圖4A-4L]提供了優選的三特異性結合分子的結構域的圖示。**圖4A**和**4B**分別示意性地圖示了優選的三特異性結合分子的結構域，其中三特異性結合分子的非雙抗體型結合結構域是Fab型結合結構域或T細胞受體結合結構域。**圖4C**和**4D**分別示意性地圖示了優選的具有不同的結構域取向的三特異性結合分子的結構域，其中非雙抗體型結合結構域是Fab型結合結構域或T細胞受體型結合結構域。**圖4E-4J**描繪了具有三條多肽鏈的分子。分子可具有鉸鏈和CL結構域(**圖4E**、**4H**)或可包含可選的接頭肽(**圖4F**、**4I**)。**圖4K-4L**描繪了具有五條多肽鏈的類似的分子。

[圖5A-5D]顯示B7-H3 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1三特異性結合分子結合A498靶細胞(**圖5A**)和JIMT-1靶細胞(**圖5B**)、CD5+/CD4-門控PBMC (**圖5C**)和CD5+/CD4+門控PBMC (**圖5D**)的能力。

[圖6A-6C]顯示了根據本發明一實施方式的三特異性結合分子介導重定向殺傷靶細胞的能力。**圖6A**顯示了細胞裂解JIMT-1細胞的螢光素酶試驗的結果。**圖6B**顯示了JIMT-1細胞的細胞毒性的LDH試驗的結果。**圖6C**顯示了A498細胞的細胞毒性的LDH試驗的結果。

[圖7A-7D]顯示了根據本發明一實施方式的三特異性結合分子在用

JIMT-1細胞(**圖7A**：CD4/CD69 T細胞；**圖7B**：CD4/CD25 T細胞；**圖7C**：CD8/CD69 T細胞；**圖7D**：CD8/CD25 T細胞)溫育時介導T細胞啟動的能力。

[**圖8A-8D**]顯示了根據本發明一實施方式的三特異性結合分子在用A498細胞(**圖8A**：CD4/CD69 T細胞；**圖8B**：CD4/CD25 T細胞；**圖8C**：CD8/CD69 T細胞；**圖8D**：CD8/CD25 T細胞)溫育時介導T細胞啟動的能力。

[**圖9A-9B**]顯示人PMBC的$CD5^+$ $CD4^+$門控的(**圖9A**)或$CD5^+$ $CD4^-$門控的(**圖9B**)細胞群，其隨著增加濃度的**B7-H3 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**三特異性結合分子或**B7-H3 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2**三特異性結合分子而變化。B7-H3 X CD3 DART™ (有和沒有Fc結構域)用作對照。

[**圖10A-10C**]顯示了不同的CD8結合結構域對**B7-H3 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8**三特異性結合分子的細胞毒性的作用。

[**圖11A-11C**]顯示了通過選擇針對CD3結合結構域的位元點A、位點B或位點C調節根據本發明一實施例的三特異性結合分子結合的能力。採用的三特異性結合分子能夠免疫特異性結合疾病相關的抗原，B7-H3。使用螢光素酶試驗測量細胞毒性。

[**圖12A-12C**]使用LDH試驗表明了位置選擇(位點A、位點B或位點C)對由根據本發明一實施方式的三特異性結合分子介導的細胞毒性的作用。

[**圖13A-13E**]使用**B7-H3 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**三特異性結合分子、**CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 /B7-H3 mAb 1**三特異性結合分子和**B7-H3 mAb 1 /CD8 mAb 1 /CD3 mAb 2**三特異性結合分子顯

示了位置變化對細胞毒性的作用。具有Fc結構域的B7-H3 X CD3 DART™用作對照。

[**圖14A-14B**]在位點C佈置CD3結合結構域，大大降低了與$CD5^+$ $CD4^+$細胞(**圖14A**)和$CD5^+$ $CD4^-$細胞(**圖14B**)二者的結合。

[**圖15A-15B**]顯示人PMBC的$CD5^+$ $CD4^+$門控的(**圖15A**)或$CD5^+$ $CD4^-$門控的(**圖15B**)細胞群，其隨著增加濃度的**5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**三特異性結合分子或**5T4 mAb2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2**三特異性結合分子而變化。5T4 X CD3 DART™ (有和沒有Fc結構域)用作對照。

[**圖16A-16C**]顯示了位置變化對細胞毒性的觀察作用不取決於採用的CD8結合結構域。

[**圖17A-17C**]顯示了根據本發明一實施方式的三特異性結合分子介導重定向殺傷表達ROR1的靶細胞的能力。

[**圖18A-18C**]顯示了**HIV mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**和**HIV mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**三特異性結合分子結合可溶性、固定的gp140蛋白質(**圖18A**)、人CD3 (**圖18B**)和gp140蛋白質和人CD3 (**圖18C**)二者的能力。

[**圖19A-19C**]顯示了**HIV mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**和**HIV mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**三特異性結合分子，與對照三特異性結合分子相比(**圖19C**)，結合表達HIV env的HEK293/D375細胞的能力。

[**圖20A-20B**]顯示了**HIV mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**和**HIV mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**三特異性結合分子結合以展示對人PBMC的CD5+/CD5–細胞群體的特異性結合的能力。

[**圖21A-21F**]顯示了由**HIV mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**或**HIV mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**三特異性結合分子在存在或沒有四環素的情況下(**圖21A-21B**；**圖21C-21D**)對Jurkat細胞介導的細胞毒性活性。**圖21E-21F**顯示了對照抗RSV抗體(帕利珠單抗(Palivizumab)；RSV mAb 1)三特異性結合分子的細胞毒性活性。

[**圖22A-22B**]顯示了在用純化的全(pan) T細胞和**HIV mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**或**HIV mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**三特異性結合分子溫育之後1天和2天時，活的表達HIV env的Jurkat 522 FY細胞的百分數。

[**圖23A-23C**]顯示了使用CD4+、CD8+或全T細胞評估**HIV mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**三特異性結合分子對表達HIV env的Jurkat 522 FY細胞的CTL活性的結果。

[**圖24A-24C**]顯示了使用CD4+、CD8+或全T細胞評估**HIV mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**三特異性結合分子對表達HIV env的Jurkat 522 FY細胞的CTL活性的結果。

[**圖25A-25C**]顯示了具有CD3 mAb 2結合結構域的DART™分子(**圖25A**)和其CD3 mAb 2Low(低) (**圖25B**)和CD3 mAb 2Fast(快速) (**圖25C**)親和性變體的結合動力學。

[**圖26A-26B**]顯示了人PMBC的$CD5^+$ $CD4^+$門控的(**圖26A**)或$CD5^+$ $CD4^-$門控的(**圖26B**)細胞群，其隨著增加濃度的**5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**三特異性結合分子、**5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Low /CD8 mAb 1**三特異性結合分子和**5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Fast /CD8 mAb 1**三特異性結合分子的變化而變化。5T4 X CD3 DART™ (以野生型，Low和Fast CD3特異性作為對照。

[**圖27A-27C**]顯示了使用LDH試驗，CD3 mAb變體(CD3 mAb 2 Low和CD3 mAb 2 Fast)對**5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**三特異性結合分子的細胞毒性的作用。

[**圖28A-28F**]顯示了在存在增加濃度的**5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**三特異性結合分子、**5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Low /CD8 mAb 1**三特異性結合分子和**5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Fast /CD8 mAb 1**三特異性結合分子的情況下，從來自供體1的PBMC釋放的IFN-γ(**圖28A**)、TNF-α(**圖28B**)、IL-10 (**圖28C**)、IL-6 (**圖28D**)、IL-4 (**圖28E**)和IL-2 (**圖28F**)的水準。

[**圖29A-29F**]顯示了在存在增加濃度的5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1三特異性結合分子、5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Low /CD8 mAb 1三特異性結合分子和5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Fast /CD8 mAb 1三特異性結合分子的情況下，從來自供體2的PBMC釋放的IFN-γ(**圖29A**)、TNF-α(**圖29B**)、IL-10 (**圖29C**)、IL-6 (**圖29D**)、IL-4 (**圖29E**)和IL-2 (**圖29F**)的水準。

【實施方式】

【0070】 本申請要求美國專利申請號62/008,229 (2014年6月5日提交；未決)、62/004,571 (2014年5月29日提交；未決)和62/107,824 (2015年1月26日提交)的優先權，其每一篇申請均通過引用以其整體併入本文。

【0071】 本發明涉及三特異性結合分子，其是具有三個結合結構域的多鏈多肽分子，因此能夠介導與三個表位的配位結合。可選擇結合結構域以便三特異性結合分子能夠結合任何三個不同表位。這樣的表位可

以是相同抗原的表位或兩個或三個不同抗原的表位。本發明也涉及新的ROR1結合抗體，以及其衍生物和這樣的組合物的用途。

【0072】 **I.一般技術和一般定義**

【0073】 除非另外指出，否則本發明任一實施方式的實踐將採用分子生物學(包括重組技術)、微生物學、細胞生物學、生物化學和免疫學的常規的技術，其在本領域的技術範圍內。在下述文獻中充分闡釋了這樣的技術，比如：MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL,第三版(Sambrook等Eds., 2001) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY；OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS: METHODS AND APPLICATIONS (Methods in Molecular Biology), Herdewijn, P., Ed., Humana Press, Totowa, NJ；OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (Gait, M.J., Ed., 1984)；METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Humana Press, Totowa, NJ；CELL BIOLOGY: A LABORATORY NOTEBOOK (Cellis, J.E., Ed., 1998) Academic Press, New York, NY；ANIMAL CELL CULTURE (Freshney, R.I., Ed., 1987)；INTRODUCTION TO CELL AND TISSUE CULTURE (Mather, J.P. and Roberts, P.E., Eds., 1998) Plenum Press, New York, NY；CELL AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES (Doyle, A.等, Eds., 1993-8) John Wiley and Sons, Hoboken, NJ；METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.) New York, NY；WEIR'S HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY (Herzenberg, L.A.等 Eds. 1997) Wiley-Blackwell Publishers, New York, NY；GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (Miller, J.M.等 Eds., 1987)

Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY ; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel, F.M.等, Eds., 1987) Greene Pub. Associates, New York, NY ; PCR: THE POLYMERASE CHAIN REACTION, (Mullis, K.等, Eds., 1994) Birkhäuser, Boston MA ; CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (Coligan, J.E.等, eds., 1991) John Wiley and Sons, Hoboken, NJ ; SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (John Wiley and Sons, 1999) Hoboken, NJ ; IMMUNOBIOLOGY 7 (Janeway, C.A.等 2007) Garland Science, London, UK; Antibodies (P. Finch, 1997) Stride Publications, Devoran, UK ; ANTIBODIES: A PRACTICAL APPROACH (D. Catty., ed., 1989) Oxford University Press, USA, New York NY) ; MONOCLONAL ANTIBODIES: A PRACTICAL APPROACH (Shepherd, P.等 Eds., 2000) Oxford University Press, USA, New York NY ; USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Harlow, E.等 Eds., 1998) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY ; THE ANTIBODIES (Zanetti, M.等 Eds. 1995) Harwood Academic Publishers, London, UK) ; 和 DEVITA, HELLMAN, AND ROSENBERG'S CANCER: PRINCIPLES & PRACTICE OF ONCOLOGY, EIGHTH EDITION, DeVita, V.等 Eds. 2008, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA。

【0074】 II.本發明優選的三特異性結合分子

【0075】 **A．結合能力**

【0076】 在一些實施方式中，三特異性結合分子能夠協同和同時結合三個不同的表位。其中，三特異性結合分子包括：(I) “**結合結構域 I**”和“**結合結構域 II**”、(II)“**非雙抗體型**” “**結合結構域 III**”、以及(III)**Fc 結構域**。

【0077】 (I)“**結合結構域 I**”，其能夠免疫特異性結合第一抗原上存在的“表位 I”，和“**結合結構域 II**”，其能夠免疫特異性結合第二抗原上存在的“表位 II”，其中此**結合結構域 I** 和此**結合結構域 II** 都是“**雙抗體型結合結構域**”；

【0078】 (II)“**非雙抗體型**” “**結合結構域 III**”，其能夠免疫特異性結合第三抗原上存在的“表位 III”；和

【0079】 (III)**Fc 結構域**，其通過兩個 **CH2-CH3 結構域**彼此複合而形成。

【0080】 典型地，在一些實施方式中，三特異性結合分子包括四條不同多肽鏈，每條鏈各具有氨基末端和羧基末端(見**圖 4A-4D**、**圖 5A** 和**圖 5B**)，但是，通過彼此融合這樣的多肽鏈(例如，經肽鍵)或通過將這樣的多肽鏈分開形成另外的多肽鏈，分子可包括更少或更多數量的多肽鏈。**圖 4E-4J** 通過示意性描繪這樣的具有三條多肽鏈的分子。**圖 4K-4L** 通過示意性描繪具有五條多肽鏈的分子。

【0081】 儘管這樣的三特異性結合分子是特別優選的，但是在另一些實施方式中，另外具體考慮這樣的三特異性結合分子：其包括足以產生具有三種結合特異性的分子的結合結構域的任何組合，其中兩種特異性是針對癌症抗原的結合特異性，並且，一種特異性是針對效應細胞抗原的結合特異性。因此，例如，三特異性結合分子包括三個 Fab 型結合

結構域；三特異性結合分子包括一個二價、雙特異性抗體結構域(通過例如複合兩個不同輕鏈和兩個不同重鏈形成)和一個 Fab 型結合結構域；三特異性結合分子包括兩個二價、雙特異性抗體結構域(通過例如複合四個不同的輕鏈和兩個不同的重鏈形成)，但是使其中一個抗體結構域無活性等。

【0082】 術語“**多肽**”、“**多肽鏈**”和“**肽**”在本文中可互換使用，指任何長度——但是尤其是長度大於 3、5、10、15、20 或 25 個氨基酸殘基——的氨基酸的聚合物，其中兩個，更優選地，所有氨基酸殘基經醯胺(肽)鍵(-NH-C(O)-)連接。但是，聚合物可以是線性的或分支的，其可包括修飾的氨基酸，並且其可被非氨基酸中斷。此術語也包括經天然修飾的或通過干預修飾的氨基酸聚合物；例如，二硫鍵形成、糖基化、脂質化(lipidation)、乙醯化、磷酸化或任何其他操作或修飾，比如結合標籤組分。同樣包括在定義中的是，例如，多肽，其包含一個或多個氨基酸的類似物(包括，例如，非天然氨基酸等)以及本領域已知的其他修飾。本發明的多肽可作為單鏈或複合的鏈存在。

【0083】 “**雙抗體型結合結構域**”是雙抗體，尤其是 DART®雙抗體的表位結合結構域。術語“**雙抗體**”和“**DART®雙抗體**”已經在上面討論了，其指這樣的分子：其包括優選地通過共價相互作用彼此複合的至少兩條多肽鏈，以形成至少兩個表位結合位點，其可識別相同的或不同的表位。雙抗體或 DART®雙抗體的多肽鏈中的兩條均包括免疫球蛋白輕鏈可變區和免疫球蛋白重鏈可變區，但是這些區域不相互作用形成表位結合位點(即，它們不是相互“**互補的**”)。相反，雙抗體或 DART®雙抗體鏈中的一個(例如，第一)的免疫球蛋白重鏈可變區與不同的(例如，第二)雙抗體或 DART®雙抗體多肽鏈的免疫球蛋白輕鏈可變區相互作

用，形成表位結合位點。類似地，雙抗體或 DART®雙抗體多肽鏈中的一個(例如，第一)的免疫球蛋白輕鏈可變區與不同的(例如，第二)雙抗體或 DART®雙抗體多肽鏈的免疫球蛋白重鏈可變區相互作用，形成表位結合位點。DART®雙抗體分子公開在下述文獻中：美國專利公開號 2013-0295121、2010-0174053 和 2009-0060910；歐洲專利公開號 EP 2714079、EP 2601216、EP 2376109、EP 2158221；和 PCT 公開號 WO 2012/162068、WO 2012/018687、WO 2010/080538、WO 2006/113665、WO 2008/157379；和 Moore, P.A. 等 (2011) "*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma*," Blood 117(17):4542-4551；Veri, M.C.等(2010) "*Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold*,"Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943；和 Johnson, S.等(2010) "*Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion*," J. Mol. Biol. 399(3):436-449。

【0084】 **結合結構域 III 優選地是"非雙抗體型"結合結構域**，其旨在表示結合結構域 III 不具有雙抗體型結合結構域的結構。優選地，結合結構域 III 是非雙抗體型結合結構域，其是 **Fab 型結合結構域**或**受體型結合結構域**。如本文所使用，術語"**Fab 型結合結構域**"指這樣的表位結合結構域，其通過免疫球蛋白輕鏈的 VL 結構域和免疫球蛋白重鏈的互補的 VH 結構域的相互作用形成。Fab 型結合結構域與雙抗體型結合結構域的不同之處在於形成 Fab 型結合結構域的兩個多肽鏈僅僅包括單

個表位結合結構域，而形成雙抗體型結合結構域的兩個多肽鏈包括至少兩個表位結合結構域。因此，如本文所使用 Fab 型結合結構域與雙抗體型結合結構域不同。如本文所使用，術語“**受體型結合結構域**”指通過兩個多肽的相互作用形成的細胞受體的表位結合結構域。本文通過參考 **T 細胞受體型結合結構域**例證了受體型結合結構域，此 T 細胞受體型結合結構域通過 T 細胞受體 α 鏈的可變結構域和 T 細胞受體 β 鏈的可變結構域相互作用而形成。這樣的 T 細胞受體結合結構域識別在 MHC 背景下展示的肽，因此能夠識別細胞內表位。儘管本發明參考這樣的受體型結合結構域得以闡釋，但是應認識到也可採用 T 細胞受體型結合結構域之外的受體型結合結構域，並且其包括在本發明中。具有受體型結合結構域的受體的其他例子包括 IL-2 受體、IL-4 受體、IL-7 受體、IL-9 受體、IL-15 受體、IL-21 胰島素受體和胸腺基質淋巴細胞生成素。

【0085】 因此，根據本發明的任一實施方式的三特異性結合分子與四價結合分子比如由二價抗體二聚化產生的那些四價結合分子不同，並且優選地具備三個而不是四個結合結構域。如下面所討論，本發明的三特異性分子可具有另外的結合結構域(比如白蛋白-結合結構域、FcγR-結合結構域等)。這樣另外的結合結構域不旨在被視為或考慮是本發明的三特異性結合分子的三個結合結構域之一。

【0086】 如本文所使用，術語“**締合(association)**”或“**締合(assoiating)**”，就多肽(例如，一個雙抗體多肽與另一雙抗體多肽締合、免疫球蛋白輕鏈與免疫球蛋白重鏈締合、一個 CH2-CH3 結構域與另一 CH2-CH3 結構域締合等)而言，旨在表示多肽的非共價結合。術語”複合(complexes)”或“複合(complexing)”旨在表示多肽的共價結合。

【0087】 如本文所使用，如果至少其兩個結合結構域，優選地，其所有的結合結構域，能夠同時結合它們各自識別的表位或結合配體，則認為三特異性結合分子的結合結構域介導“**配位結合(coordinated binding)**”。這樣的結合可以是同時的。但是，本發明的一個方面涉及修飾這樣的結合結構域結合它們識別的表位的”結合速率”和/或“解離速率”。如本文所使用，結合的“結合速率(on rate)”適對這樣的結合結構域識別和啟動與它們識別表位的結合的親和性的度量。相反，結合的“解離速率”是對結合結構域：表位複合物穩定性程度的度量。結合的”結合速率”和/或“解離速率”可通過改變結合結構域的 CDR 的氨基酸序列修飾。如下面所討論，不依賴於任何 CDR 修飾，本發明分子的配位結合的程度可通過改變它們的結合結構域的構型來調節，從而具體的結合結構域(即，VLx/VHx 結構域)作為結合結構域 III 而存在或作為相對於結合結構域 III 的內部或外部雙抗體型結合結構域(下面詳細討論)而存在。

【0088】 根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子的結合結構域的結合速率和解離速率可容易通過本領域熟知的方法測量，例如通過下述方法測量：Biacore®分析(Jason-Moller, L.等(2006) “*Overview Of Biacore Systems And Their Applications*,” Curr. Protoc. Protein Sci. Chapter 19:Unit 19.13；；Swanson, S.J. (2005) “*Characterization Of An Immune Response*,” Dev. Biol. (Basel). 122:95-101； ；Buijs, J. 等 (2005) “*SPR-MS In Functional Proteomics*,” Brief Funct. Genomic Proteomic. 4(1):39-47；Karlsson, R.等(2004) “*SPR For Molecular Interaction Analysis: A Review Of Emerging Application Areas*,” J. Mol. Recognit. 17(3):151-161；Van Regenmortel, M.H. (2003) “*Improving The Quality Of BIACORE-Based Affinity*

Measurements," Dev. Biol. (Basel) 112:141-151；Malmqvist, M. (1999) "*BIACORE: An Affinity Biosensor System For Characterization Of Biomolecular Interactions*," Biochem. Soc. Trans. 27(2):335-340；Malmqvist, M.等(1997) "*Biomolecular Interaction Analysis: Affinity Biosensor Technologies For Functional Analysis Of Proteins*," Curr. Opin. Chem. Biol. 1(3):378-383；Fivash, M.等(1998) "*Biacore For Macromolecular Interaction*," Curr. Opin. Biotechnol. 9(1):97-101；Malmborg, A.C.等(1995) "*Biacore As A Tool In Antibody Engineering*," J. Immunol. Methods. 183(1):7-13)。根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子的結合結構域的結合速率和解離速率可容易通過如下方式改變：編碼這樣的結合結構域的核酸分子的隨機或定向誘變，隨後針對它們編碼展示這樣的改變結合動力學的突變蛋白質的能力，常規篩選收穫的核酸分子。

【0089】 根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子的結合結構域以"**免疫特異性**"方式結合表位。如本文所使用，如果其相對於可選的表位，與此表位更頻繁、更快速地以更大的持續時間和/或以更大的親和性反應或締合，則認為抗體、雙抗體或其他表位結合分子"**免疫特異性**"結合另一分子的區域(即，表位)。例如，免疫特異性結合病毒表位的抗體是這樣的抗體：與其免疫特異性結合其他病毒表位或非病毒表位相比，此抗體以更大的親和性、抗體親抗原性、更容易和/或以更持久的時間結合此病毒表位。通過閱讀此定義，應理解，例如，免疫特異性結合第一靶的抗體(或部分或表位)可能或可能不特異性或優選結合第二靶。因此，"特異性結合"不一定要求(儘管其可包括)排他性結合。一般而言，

但是不一定，提及結合則意味著”特異性”結合。如果，這樣的結合展示受體結合它們各自配體的特異性，則認為兩個分子能夠彼此以“生理特異性”方式結合。

【0090】 因此，在它們最簡單的實施方式中，優選的結合分子是至少三特異性的——能夠介導與三個不同表位的配位結合。顯著地，這樣的分子具有能夠結合抗原的至少三個“**位點**”：“**外部**”雙抗體型結合結構域，其距離結合結構域 III 最遠；“**內部**”雙抗體型結合結構域，其距離結合結構域 III 最近；和結合結構域 III 本身。這樣的結構域的位置分別命名為**位點 A**、**位點 B** 和**位點 C (圖 4A-4D)**。

【0091】 選擇彼此不同的結合表位 I、II 和 III 的結合結構域。但是，表位 I、II 和 III 可以是相同抗原的表位、兩個不同抗原的表位或三個不同抗原的表位。因此，根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子可能夠協同結合 1、2 或 3 個不同的抗原分子。對於任何可能的表位和任何可能的抗原，可採用根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子。例如，三特異性結合分子可具有 1、2 或 3 個結合結構域，其結合效應細胞的表位(例如，CD2、CD3、CD16、CD19、CD20、CD22、CD32B、CD64、B 細胞受體(BCR)、T 細胞受體(TCR)和 NKG2D 受體)，或結合細胞毒性 T 細胞的表位(例如，細胞毒性 T 細胞上存在的 CD8)或結合疾病相關的抗原的表位，或這樣的可能結合結構域的任何組合。

【0092】 如本文所使用，“**疾病相關的抗原**”是在“**感染病原體的**”細胞或“**癌症細胞**”上特徵性表達但是在正常細胞上不是特徵性表達的的抗原。

【0093】 如本文所使用，術語“**感染病原體的**”細胞指已經被下述感染的細胞：**細菌**(例如，大腸埃希氏菌、艱難梭菌(C. difficile)、傷寒沙

門氏菌(Salmonella thyphimurium)、銅綠假單胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、霍亂弧菌(Vibrio cholerae)、淋病奈瑟氏菌(Neisseria gonorrhoeae)、幽門螺旋桿菌(Helicobacter pylori)、流感嗜血桿菌(Hemophilus influenzae)、痢疾志賀菌(Shigella dysenteriae)、金黃色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、結核分支桿菌(Mycobacterium tuberculosis)和肺炎鏈球菌等(Streptococcus pneumonia))，真菌(例如，念珠菌屬(Candida)、曲黴菌屬(Aspergillus)、隱球菌屬(Cryptococcus)、球孢子菌屬(Coccidioides)、組織胞漿菌屬(Histoplasma)、肺孢菌屬(Pneumocystis)、葡萄穗黴菌屬(Stachybotrys)等)、原生動物(變形蟲類(Amoebozoa)、古蟲類(Excavata)、囊泡藻類(Chromalveolata)、內變形蟲類(Entamoeba)、瘧原蟲屬(Plasmodium)、賈第蟲(Giardia)、錐體蟲屬(Trypanosoma)、球蟲亞綱(Coccidia)、貝諾屬(Besnoitia)、岐腔屬(Dicrocoelium)、利什曼蟲屬(Leishmania)等)或病毒(尤其是腺病毒、腺伴隨病毒、B 病毒(恒河猴皰疹病毒 I 型(macacine herpesvirus I))、BK 病毒、布尼亞病毒、切昆貢亞(chikungunya)病毒、柯薩奇(cocksackie)病毒、冠狀病毒、巨細胞病毒、東部馬腦炎(eastern equine encephalitis)病毒、埃博拉病毒、腸道病毒、愛潑斯坦-巴爾病毒、漢坦病毒(hantavirus)、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒，單純性皰疹病毒 1 型、單純性皰疹病毒 2 型、人泡沫病毒(human foamy virus)、人皰疹病毒 3 型、人皰疹病毒 5 型、人皰疹病毒 6 型、人皰疹病毒 7 型、人免疫缺陷病毒、人乳頭瘤病毒、人 β-嗜淋巴細胞病毒、人 T 細胞白血病病毒 I 型、人 T 細胞白血病病毒 II 型、流感病毒、JC 病毒、JEV、卡波西氏肉瘤相關的皰疹病毒、拉沙病毒、淋巴細胞脈絡叢腦膜炎病

毒、瑪律堡病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、尼帕病毒(Nipah virus)、諾如病毒(norovirus)、諾瓦克(Norwalk)病毒、正呼腸孤病毒(orthoreovirus)、副流感病毒、細小病毒、脊髓灰質炎病毒(poliovirus)、狂犬病病毒、呼腸病毒、呼吸道合胞病毒、鼻病毒、裂谷熱病毒、輪狀病毒、風疹病毒、天花病毒、聖路易腦炎病毒、重型天花病毒(variola major virus)、卡菲爾痘病毒(variola minor virus)、水痘-皰疹病毒(vericella-zoster virus)、西尼祿病毒、西部馬腦炎病毒或黃熱病病毒)。

【0094】 如本文所使用，術語“**癌症細胞**”指下述的惡性細胞：腎上腺腫瘤、AIDS 相關的癌症、軟組織腺泡狀肉瘤、星形細胞腫瘤、膀胱癌、骨癌、腦和脊髓癌、轉移性腦腫瘤、乳腺癌、頸動脈體腫瘤、宮頸癌、軟骨肉瘤、脊索瘤、嫌色細胞腎細胞癌、透明細胞癌、結腸癌、結直腸癌、皮膚良性纖維組織細胞瘤、成纖維細胞性小圓細胞腫瘤、室管膜瘤、尤文氏腫瘤、骨外黏液樣軟骨肉瘤、不完全性骨纖維生成、骨纖維發育不良、膽囊或膽管癌、胃癌、妊娠滋養層疾病、生殖細胞腫瘤、頭頸癌、肝細胞癌、胰島細胞腫瘤、卡波西氏肉瘤、腎癌、白血病、脂瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/惡性脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神經管細胞瘤、黑素瘤、腦膜瘤、多發性內分泌瘤形成、多發性骨髓瘤、骨髓增生異常綜合征、成神經細胞瘤、神經內分泌腫瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳頭狀甲狀腺癌、甲狀旁腺腫瘤、兒科癌症(pediatric cancer)、末梢神經鞘腫瘤、嗜鉻細胞瘤(phaeochromocytoma)、垂體腫瘤、前列腺癌、後眼色素層(posterious uveal)黑素瘤、罕見的血液疾病、腎轉移性癌、杆狀(rhabdoid)腫瘤、橫紋肌肉瘤(rhabdomysarcoma)、肉瘤、皮膚癌、

軟組織肉瘤、鱗狀細胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睪丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲狀腺轉移性癌或子宮癌。

【0095】 由癌症細胞特徵性表達的抗原的例子包括“**癌症抗原**”比如乳腺癌抗原、卵巢癌抗原、前列腺癌抗原、宮頸癌抗原、胰腺癌抗原、肺癌抗原、膀胱癌抗原、結腸癌抗原、睾丸癌抗原、膠質母細胞瘤癌症抗原、與 B 細胞惡性腫瘤相關的抗原、與多發性骨髓瘤相關的抗原、與非霍奇金淋巴瘤相關的抗原，或與慢性淋巴細胞白血病相關的抗原。由癌症細胞特徵性表達的示例性抗原包括下述抗原：結腸癌抗原 **19.9**、胃癌黏蛋白**抗原 4.2**；結直腸癌抗原 **A33** (參見 Almqvist, Y. 2006，*Nucl Med Biol.* Nov; 33(8):991-998)；**ADAM-9** (參見美國專利公開號 2006/0172350、PCT 公開號 WO 06/084075)；**AFP** 癌胚抗原-甲胎蛋白(參見 Malaguarnera, G.等(2010) “*Serum markers of hepatocellular carcinoma*,” Dig. Dis. Sci. 55(10):2744-2755)；**ALCAM** (參見 PCT 公開號 WO 03/093443)；**BAGE** (參見 Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther.* 2(6):577-84)；**β-聯蛋白**(參見 Prange W.等 2003 *J Pathol.* 201(2):250-9)；**CA125** (參見 Bast, R.C. Jr.等 2005 *Int J Gynecol Cancer* 15 Suppl 3:274-81)；**羧肽酶 M** (參見美國專利公開號 2006/0166291)；**B1** (參見 Egloff, A.M.等 2006，*Cancer Res.* 66(1):6-9)；**CD5** (參見 Calin, G.A.等 2006 *Semin Oncol.* 33(2):167-73；**CD19** (參見 Troussard, X.等 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48)；CD20 (參見 Thomas, D.A.等 2006 Hematol Oncol Clin North Am. 20(5):1125-36)；**CD20** (參見 Cang, S.等(2012) ”*Novel CD20 Monoclonal Antibodies For Lymphoma Therapy*,” J. Hematol. Oncol. 5:64 pp.1-9)；**CD22** (參見 Kreitman, R.J. 2006 AAPS J.

18;8(3):E532-51)；**CD23**（參見 Rosati，S.等 2005 *Curr Top Microbiol Immunol*. 5;294:91-107)；**CD25**（參見 Troussard, X.等 1998 *Hematol Cell Ther*. 40(4):139-48)；**CD27**（參見 Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40)；CD28（參見 Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40)；**CD30**（參見 Muta, H.等(2013) "*CD30: From Basic Research To Cancer Therapy*," Immunol. Res. 57(1-3):151-158)；**CD33**（參見 Walter, R.B.等(2012) "Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy," Blood 119(26):6198-6208)；**CD36**（參見 Ge, Y. 2005 *Lab Hematol*. 11(1):31-7)；**CD40/CD154**（參見 Messmer, D.等 2005 *Ann N Y Acad Sci*. 1062:51-60)；**CD45**（參見 Jurcic, J.G. 2005 *Curr Oncol Rep*. 7(5):339-46)；**CD56**（參見 Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40)；**CD46**（參見美國專利號 7,148,038；PCT 公開號 WO 03/032814；Russell, S.等(2004) "*CD46: A Complement Regulator And Pathogen Receptor That Mediates Links Between Innate And Acquired Immune Function*," Tissue Antigens 64(2):111-118)；**CD52**（參見 Hoelzer, D.等(2013) "Targeted therapy with monoclonal antibodies in acute lymphoblastic leukemia," Curr. Opin. Oncol. 25(6):701-706)；**CD79a/CD79b**（參見 Troussard, X.等 1998 *Hematol Cell Ther*. 40(4):139-48；Chu P.G.等 2001 Appl Immunohistochem Mol Morphol. 9(2):97-106)；**CD103**（參見 Troussard, X.等 1998 *Hematol Cell Ther*. 40(4):139-48)；**CD317**（參見 Palma, G.等(2012) "*Plasmacytoids Dendritic Cells Are A Therapeutic Target In Anticancer Immunity*," Biochim. Biophys. Acta. 1826(2):407-414)；

CDK4 (參見 Lee, Y.M.等 2006 *Cell Cycle* 5(18):2110-4)；**CEA** (參見 carcinoembryonic antigen；Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil.* 34(7-8):638-46；Tellez-Avila, F.I.等 2005 *Rev Invest Clin.* 57(6):814-9)；**CEACAM5** 和 **CEACAM6** (參見 PCT 公開號 WO 2011/034660 ； Zheng, C. 等 (2011) "*A Novel Anti-CEACAM5 Monoclonal Antibody, CC4, Suppresses Colorectal Tumor Growth and Enhances NK Cells-Mediated Tumor Immunity*," PLoS One 6(6):e21146，pp. 1-11)；**CO17-1A** (參見 Adkins, J.C.等(1998) "*Edrecolomab (Monoclonal Antibody 17-1A)*," Drugs 56(4):619-626；**CO-43** (血型 Leb)和 **CO-514** (血型 Lea) (參見 Garratty, G. (1995) "*Blood Group Antigens As Tumor Markers, Parasitic/Bacterial/Viral Receptors, And Their Association With Immunologically Important Proteins*," Immunol. Invest. 24(1-2):213-232)；**CTLA-1**和**CTLA-4** (參見 Peggs, K.S.等 2006 Curr Opin Immunol. 18(2):206-13)；**細胞角蛋白 8** (參見 PCT 公開號 WO 03/024191)；抗原 D1.1 (參見 Dao, T.等(2009) "*Identification Of A Human Cyclin D1-Derived Peptide That Induces Human Cytotoxic CD4 T Cells*," PLoS One. 4(8):e6730)；DR5 (參見 Abdulghani, J.等 (2010) "*TRAIL Receptor Signaling And Therapeutics*," Expert Opin. Ther. Targets 14(10):1091-1108 ； Andera, L. (2009) "*Signaling Activated By The Death Receptors Of The TNFR Family*," Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub. 153(3):173-180 ； Carlo-Stella, C. 等 (2007) "*Targeting TRAIL Agonistic Receptors for Cancer Therapy*," Clin, Cancer

13(8):2313-2317；Chaudhari, B.R.等(2006) "*Following the TRAIL to Apoptosis*," Immunologic Res. 35(3):249-262)；**E1 系列**(血型 B)；**EGF-R** (表皮生長因數受體)(參見 Adenis, A.等 2003 *Bull Cancer*. 90 Spec No:S228-32)；**肝配蛋白受體**(尤其 EphA2)(參見美國專利號 7,569,672；PCT 公開號 WO 06/084226)；**Erb** (ErbB1；ErbB3；ErbB4) (參見 Zhou, H.等 2002 *Oncogene* 21(57):8732-40；Rimon, E.等 2004 Int J Oncol. 24(5):1325-38)；肺腺癌抗原 **F3** (參見 Greulich, H.等 (2012) "*Functional analysis of receptor tyrosine kinase mutations in lung cancer identifies oncogenic extracellular domain mutations of ERBB2*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 109(36):14476-14481)；**抗原 FC10.2** (參見 Loveless, W.等(1990) "*Developmental Patterning Of The Carbohydrate Antigen FC10.2 During Early Embryogenesis In The Chick*," Development 108(1):97-106)；**GAGE** (GAGE-1；GAGE-2)(參見 Akcakanat, A.等 2006 *Int J Cancer*. 118(1):123-8)；**GD2/GD3/GD49/GM2/GM3**(參見 Livingston, P.O.等 2005 Cancer Immunol Immunother. 54(10):1018-25)；**GICA 19-9**(參見 Herlyn 等 (1982) "*Monoclonal Antibody Detection Of A Circulating Tumor-Associated Antigen. I. Presence Of Antigen In Sera Of Patients With Colorectal, Gastric, And Pancreatic Carcinoma*," J. Clin. Immunol. 2:135-140)；**gp37**(參見人白血病 T 細胞抗原 ((Bhattacharya-Chatterjee 等 (1988) "*Idiotype Vaccines Against Human T Cell Leukemia. II. Generation And Characterization Of A Monoclonal Idiotype Cascade (Ab1, Ab2, and Ab3)*," J. Immunol. 141:1398-1403)；**gp75** (黑素瘤抗原)(參見 Vijayasardahl 等(1990)

*"The Melanoma Antigen Gp75 Is The Human Homologue Of The Mouse B (Brown) Locus Gene Product,"*J. Exp. Med. 171(4):1375-1380)；**gp100**(參見 Lotem，M.等 2006 *J Immunother.* 29(6):616-27)；**HER-2/neu**(參見 Kumar, Pal S 等 2006 Semin Oncol. 33(4):386-91)；人 **B-淋巴瘤抗原-CD20**(參見 Reff 等(1994) *"Depletion Of B Cells In Vivo By A Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody To CD20,"*Blood 83:435-445)；**人乳脂肪球(milk fat globule)抗原；人乳頭瘤病毒-E6/人乳頭瘤病毒-E7** (參見 DiMaio, D.等 2006 *Adv Virus Res.* 66:125-59)；**HMW-MAA(高分子量黑素瘤抗原)**(參見 Natali 等(1987) *"Immunohistochemical Detection Of Antigen In Human Primary And Metastatic Melanomas By The Monoclonal Antibody 140.240 And Its Possible Prognostic Significance,"*Cancer 59:55-63；Mittelman 等(1990) *"Active Specific Immunotherapy In Patients With Melanoma. A Clinical Trial With Mouse Antiidiotypic Monoclonal Antibodies Elicited With Syngeneic Anti-High-Molecular-Weight-Melanoma-Associated Antigen Monoclonal Antibodies,"*J. Clin. Invest. 86:2136-2144)；**I 抗原(分化抗原)**(參見 Feizi (1985) *"Demonstration By Monoclonal Antibodies That Carbohydrate Structures Of Glycoproteins And Glycolipids Are Onco-Developmental Antigens,"*Nature 314:53-57)諸如在胃腺癌發現的 **I(Ma)**；整聯蛋白 α-V-β-6 整聯蛋白 β6 **(ITGB6)**(參見 PCT 公開號 WO 03/087340)；JAM-3 (參見 PCT 公開號 WO 06/084078)；白介素-13 受體 α2 (**IL13Rα2**) (參見 Bodhinayake, I.等(2014) *"Targeting A Heterogeneous Tumor: The Promise Of The*

Interleukin-13 Receptor α2," Neurosurgery 75(2):N18-9)；**JAM-3**(參見 PCT 公開號 WO 06/084078)；**KID3**(參見 PCT 公開號 WO 05/028498)；**KID3**(參見 PCT 公開號 WO 05/028498)；**KID31**(參見 PCT 公開號 WO 06/076584)；**KID31**(參見 PCT 公開號 WO 06/076584)；**KS 1/4 全癌抗原**(參見 Perez 等(1989) *"Isolation And Characterization Of A cDNA Encoding The Ks1/4 Epithelial Carcinoma Marker,"*J. Immunol. 142:3662-3667；Möller 等(1991) *"Bispecific-Monoclonal-Antibody-Directed Lysis Of Ovarian Carcinoma Cells By Activated Human T Lymphocytes,"*Cancer Immunol. Immunother. 33(4):210-216；Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res*. 123:157-80)；**KS 1/4** 全癌抗原(參見 Perez 等(1989) *"Isolation And Characterization Of A cDNA Encoding The Ks1/4 Epithelial Carcinoma Marker,"*J. Immunol. 142:3662-3667；Möller 等 (1991) *"Bispecific-Monoclonal-Antibody-Directed Lysis Of Ovarian Carcinoma Cells By Activated Human T Lymphocytes,"*Cancer Immunol. Immunother. 33(4):210-216；Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res*. 123:157-80)；**KSA** (17-1A)(參見 Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res*. 123:157-80)；人肺癌抗原 **L6** 和 **L20**(參見 Hellström 等(1986) *"Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinoma,"*Cancer Res. 46:3917-3923)；**LEA**(參見 Velázquez-Márquez, N.等(2012) "Sialyl Lewis x expression in cervical scrapes of premalignant lesions," J. Biosci. 37(6):999-1004)；**LUCA-2**(參見美國專利公開號 2006/0172349；PCT 公開號 WO 06/083852)；**M1:22:25:8**、**M18**、

M39(參見 Cambier, L.等(2012) "*M19 Modulates Skeletal Muscle Differentiation And Insulin Secretion In Pancreatic B-Cells Through Modulation Of Respiratory Chain Activity*," PLoS One 7(2):e31815；Pui, C.H.等(1991) "Characterization of childhood acute leukemia with multiple myeloid and lymphoid markers at diagnosis and at relapse," Blood 78(5):1327-1337)；**MAGE**(MAGE-1；MAGE-3)(參見 Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther.* 2(6):577-84)；**MART**(參見 Kounalakis, N.等 2005 *Curr Oncol Rep.* 7(5):377-82；**Myl、MUC-1**(參見 Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil.* 34(7-8):638-46)；**MUM-1**(參見 Castelli, C.等 2000 *J Cell Physiol.* 182(3):323-31)；**N-乙醯葡糖氨基轉移酶**(參見 Dennis, J.W. 1999 *Biochim Biophys Acta.* 6;1473(1):21-34)；**新糖蛋白**(neoglycoprotein)(參見 Legendre, H.等(2004) "*Prognostic Stratification Of Dukes B Colon Cancer By A Neoglycoprotein*," Int. J. Oncol. 25(2):269-276)；**NS-10**；**OFA-1** 和 **OFA-2**(參見 Takahashi, M. (1984) "A Study On Clinical Significance Of Oncofetal Antigen-1 In Gynecologic Tumors," Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi. 36(12):2613-2618)；**制瘤素 M**(制瘤素受體 β)(參見美國專利號 7,572,896；PCT 公開號 WO 06/084092)；**p15**(參見 Gil, J.等 2006 *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(9):667-77)；**PSA**(前列腺特異性抗原)(參見 Cracco, C.M.等 2005 *Minerva Urol Nefrol.* 57(4):301-11)；**PSMA**(參見 Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res.* 123:157-80)；**PEMA**(**多態上皮黏蛋白抗原**)(參見 Chu, N.J.等(2015) "*Nonviral Oncogenic Antigens and the Inflammatory Signals Driving Early Cancer*

Development as Targets for Cancer Immunoprevention," Clin. Cancer Res. 21(7):1549-1557)；**PIPA** (參見美國專利號 7,405,061；PCT 公開號 WO 04/043239)；**前列腺酸性磷酸鹽**(參見 Tailor 等(1990) *"Nucleotide Sequence Of Human Prostatic Acid Phosphatase Determined From A Full-Length cDNA Clone,"*Nucl. Acids Res. 18(16):4928)；**R24**（參見 Zhou, M. 等 (2008) "*Constitutive Overexpression Of A Novel 21 Kda Protein By Hodgkin Lymphoma And Aggressive Non-Hodgkin Lymphomas*," Mol. Cancer 7:12)；**ROR1** (參見美國專利號 5,843,749；Rabbani, H.等(2010) "*Expression Of ROR1 In Patients With Renal Cancer--A Potential Diagnostic Marker*," Iran Biomed. J. 14(3):77-82)；**鞘脂**(參見 Hakomori, S. (1998) "*Cancer-Associated Glycosphingolipid Antigens: Their Structure, Organization, And Function*," Acta Anat. (Basel) 161(1-4):79-90)；**SSEA-1**、**SSEA-3** 和 **SSEA-4** (參見 Muramatsu, T. 等(2004) "*Carbohydrate Antigens Expressed On Stem Cells And Early Embryonic Cells*," Glycoconj. J. 21(1-2):41-45)；**sTn** (參見 Holmberg, L.A. 2001 *Expert Opin Biol Ther*. 1(5):881-91)；**源自 T 細胞受體的肽**(參見 Edelson (1998) *"Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Model For Selective Immunotherapy,"*Cancer J Sci Am. 4:62-71)；**T_5A_7**(參見 Hogg, R.J.等(1991) "*A monoclonal antibody exhibiting reactivity with both X-hapten- and lactose-bearing glycolipids*," Tissue Antigens 37(1):33-38)；**TAG-72** (參見 Yokota 等(1992) *"Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv And Comparison With Other Immunoglobulin Forms,"*Cancer Res. 52:3402-3408)；

TL5（血型 A)(參見 Gooi, H.C.等(1983) “Monoclonal antibody reactive with the human epidermal-growth-factor receptor recognizes the blood-group-A antigen,” Biosci. Rep. 3(11):1045-1052)；**TNF 受體**(TNF-α 受體、TNF-ß 受體或 **TNF-γ 受體**(參見 van Horssen, R.等 2006 *Oncologist*. 11(4):397-408；Gardnerova, M.等 2000 *Curr Drug Targets*. 1(4):327-64)；**TRA-1-85**(血型 H) (參見 Williams, B.P.等(1988) “Biochemical and genetic analysis of the OKa blood group antigen,” Immunogenetics 27(5):322-329)；**轉鐵蛋白受體**(參見美國專利號 7,572,895；PCT 公開號 WO 05/121179)；**TSTA** 腫瘤特異性移植抗原(參見 Hellström 等(1985) *“Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens Shared By Chemically Induced Mouse Bladder Carcinomas,”*Cancer. Res. 45:2210-2188)；**VEGF-R**（參見 O’Dwyer. P.J. 2006 *Oncologist*. 11(9):992-8)；和 Y 半抗原，Le^y (Durrant, L.G.等(1989) “*Development Of An ELISA To Detect Early Local Relapse Of Colorectal Cancer*,” Br. J. Cancer 60(4):533-537)。

【0096】 可用於提供任一實施方式的三特異性結合分子的可變輕鏈結構域、可變重鏈結構域、抗體輕鏈或抗體重鏈的、免疫特異性結合疾病相關的抗原表位的示例性抗體提供在**表 2** 中。

【0097】 **表 2**

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
3F8	Gd2	成神經細胞瘤
8H9	B7-H3	成神經細胞瘤、肉瘤、轉移性腦癌症

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
阿巴伏單抗 (Abagovomab)	CA-125	卵巢癌
阿昔單抗 (Abciximab)	CD41	血小板聚集抑制劑
Actoxumab	艱難梭菌(*Clostridium Difficile*)	艱難梭菌感染
阿達木單抗 (Adalimumab)	TNF-A	類風濕性關節炎、克羅恩病、斑塊狀銀屑病、牛皮癬性關節炎、強直性脊柱炎、青少年特發性關節炎、新生兒的溶血病
阿德木單抗 (Adecatumumab)	Epcam	前列腺和乳腺癌
Aducanumab	β-澱粉樣蛋白	阿爾茨海默氏疾病
阿非莫單抗 (Afelimomab)	TNF-A	膿毒症
阿托珠單抗 (Afutuzumab)	CD20	淋巴瘤
阿珠單抗 (Alacizumab)	VEGFR2	癌症
Ald518	Il-6	類風濕性關節炎

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
阿侖珠單抗 (Alemtuzumab)	CD52	多發性硬化症
阿裡若庫單抗 (Alirocumab)	NARP-1	高膽固醇血症
阿妥莫單抗 (Altumomab)	CEA	結直腸癌
阿麥妥昔單抗 (Amatuximab)	間皮素	癌症
麻安莫單抗 (Anatumomab Mafenatox)	TAG-72	非小細胞肺癌
Anifrolumab	干擾素 A/B 受體	系統性紅斑狼瘡
安蘆珠單抗 (Anrukinzumab)	IL-13	癌症
阿泊珠單抗 (Apolizumab)	HLA-DR	血液學癌症
阿西莫單抗 (Arcitumomab)	CEA	胃腸道癌症
阿塞珠單抗 (Aselizumab)	L-選擇蛋白(CD62L)	嚴重受傷的患者
阿替奴單抗 (Atinumab)	RTN4	癌症

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
阿利珠單抗 (Atlizumab)	IL-6 受體	類風濕性關節炎
阿托木單抗 (Atorolimumab)	獼猴因數	新生兒的溶血病
巴匹珠單抗 (Bapineuzumab)	β-澱粉樣蛋白	阿爾茨海默氏疾病
巴厘昔單抗 (Basiliximab)	CD25	預防器官移植排斥
巴維昔單抗 (Bavituximab)	磷脂醯絲氨酸	癌症、病毒感染
貝妥莫單抗 (Bectumomab)	CD22	非霍奇金淋巴瘤(檢測)
貝利木單抗 (Belimumab)	BAFF	非霍奇金淋巴瘤
貝那利珠單抗 (Benralizumab)	CD125	哮喘
柏替木單抗 (Bertilimumab)	CCL11(嗜酸細胞活化趨化因數(Eotaxin-1))	嚴重過敏不適
貝西索單抗 (Besilesomab)	CEA-相關的抗原	炎症損害和轉移(檢測)
貝伐單抗 (Bevacizumab)	VEGF-A	轉移性癌症、早熟性視網膜病

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
貝茲羅圖單抗 (Bezlotoxumab)	艱難梭菌	艱難梭菌感染
比西單抗 (Biciromab)	纖維蛋白 II，β 鏈	血栓栓塞(診斷)
比麥蘆單抗 (Bimagrumab)	ACVR2B	Myostatin 抑制劑
比伐單抗 (Bivatuzumab)	CD44 V6	鱗狀細胞癌
蘭妥莫單抗 (Blinatumomab)	CD19	癌症
布索珠單抗 (Blosozumab)	SOST	骨質疏鬆症
貝倫妥單抗 (Brentuximab)	CD30 (TNFRSF8)	血液學癌症
佈雷奴單抗 (Briakinumab)	IL-12、IL-23	牛皮癬、類風濕性關節炎、炎性腸炎、多發性硬化症
巴羅達魯單抗 (Brodalumab)	IL-17	炎性疾病
卡那單抗 (Canakinumab)	IL-1	類風濕性關節炎
莫坎妥珠單抗	黏蛋白 Canag	結直腸癌

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
(Cantuzumab Mertansine)		
坎妥珠單抗 (Cantuzumab)	MUC1	癌症
普拉西珠單抗 (Caplacizumab)	VWF	癌症
卡羅單抗 (Capromab)	前列腺癌細胞	前列腺癌(檢測)
卡魯單抗 (Carlumab)	MCP-1	腫瘤學/免疫適應症
卡妥索單抗 (Catumaxomab)	Epcam、CD3	卵巢癌、惡性的腹水、胃癌
Cc49	Tag-72	腫瘤檢測
賽托珠單抗 (Certolizumab)	TNF-A	克羅恩病
西妥昔單抗 (Cetuximab)	EGFR	轉移性結直腸癌和頭頸癌
Ch.14.18	未確定	成神經細胞瘤
西他妥珠單抗 (Citatuzumab)	Epcam	卵巢癌和其他實體瘤
西妥木單抗 (Cixutumumab)	IGF-1 受體	實體瘤

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
克拉紮珠單抗 (Clazakizumab)	家　兔　(*Oryctolagus Cuniculus*)	類風濕性關節炎
克立瓦妥珠單抗 (Clivatuzumab)	MUC1	胰腺癌
坎妥木單抗 (Conatumumab)	TRAIL-R2	癌症
扣西珠單抗 (Concizumab)	TFPI	出血
克雷內珠單抗 (Crenezumab)	1-40-B-澱粉樣蛋白	阿爾茨海默氏疾病
Cr6261	流感 A 血凝素	感染疾病/流感 A
達西妥珠單抗 (Dacetuzumab)	CD40	血液學癌症
達克珠單抗 (Daclizumab)	CD25	預防器官移植排斥
達洛妥珠單抗 (Dalotuzumab)	胰島素樣生長因數 I 受體	癌症
達拉妥木單抗 (Daratumumab)	CD38	癌症
德美西珠單抗 (Demcizumab)	DLL4	癌症
地諾單抗	RANKL	骨質疏鬆症、骨轉移

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
(Denosumab)		
地莫單抗 (Detumomab)	B-淋巴瘤細胞	淋巴瘤
阿托度單抗 (Dorlimomab Aritox)	未確定	癌症
卓齊妥單抗 (Drozitumab)	DR5	癌症
度利戈妥單抗 (Duligotumab)	HER3	癌症
度匹魯單抗 (Dupilumab)	IL4	異位性疾病
斯吉妥單抗 (Dusigitumab)	ILGF2	癌症
依美昔單抗 (Ecromeximab)	GD3 神經節苷酯	惡性黑素瘤
依庫珠單抗 (Eculizumab)	C5	陣發性夜間血紅蛋白尿症
埃巴單抗 (Edobacomab)	內毒素	革蘭氏陰性細菌造成的膿毒症
決洛單抗 (Edrecolomab)	Epcam	結直腸癌
依法利珠單抗	LFA-1 (CD11a)	牛皮癬(阻斷 T 細胞遷

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
(Efalizumab)		移)
依夫單抗 (Efungumab)	Hsp90	侵入性念珠菌感染
Eldelumab	干擾素-γ-誘導蛋白質	克羅恩病、潰瘍性結腸炎
依洛妥珠單抗 (Elotuzumab)	SLAMF7	多發性骨髓瘤
艾西莫單抗 (Elsilimomab)	IL-6	癌症
依納伐妥珠單抗 (Enavatuzumab)	TWEAK 受體	癌症
恩莫單抗 (Enlimomab)	ICAM-1 (CD54)	癌症
依諾珠單抗 (Enokizumab)	IL9	哮喘
依諾替庫單抗 (Enoticumab)	DLL4	癌症
恩西妥昔西單抗 (Ensituximab)	5AC	癌症
西-依匹妥莫單抗 (Epitumomab Cituxetan)	上皮唾液蛋白	癌症

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
依帕珠單抗 (Epratuzumab)	CD22	癌症、SLE
厄利珠單抗 (Erlizumab)	ITGB2 (CD18)	心臟病發作、中風、外傷性休克
厄馬索單抗 (Ertumaxomab)	HER2/Neu、CD3	乳腺癌
艾達珠單抗 (Etaracizumab)	整聯蛋白 $A_v\beta_3$	黑素瘤、前列腺癌、卵巢癌
Etrolizumab	整聯蛋白 A_7 B_7	炎性腸炎
伏洛單抗 (Evolocumab)	PCSK9	低膽甾醇血
艾韋單抗 (Exbivirumab)	乙型肝炎表面抗原	乙型肝炎
法索單抗 (Fanolesomab)	CD15	闌尾炎(診斷)
法拉莫單抗 (Faralimomab)	干擾素受體	癌症
法勒珠單抗 (Farletuzumab)	葉酸受體 1	卵巢癌
法西奴單抗 (Fasinumab)[51]	HNGF	癌症
Fbta05	CD20	慢性淋巴細胞白血病

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
泛維珠單抗 (Felvizumab)	呼吸道合胞病毒	呼吸道合胞病毒感染
非紮奴單抗 (Fezakinumab)	IL-22	類風濕性關節炎、牛皮癬
芬克拉妥珠單抗 (Ficlatuzumab)	HGF	癌症
芬妥木單抗 (Figitumumab)	IGF-1 受體	腎上腺皮質癌、非小細胞肺癌
弗拉伏妥單抗 (Flanvotumab)	TYRP1 (糖蛋白 75)	黑素瘤
芳妥珠單抗 (Fontolizumab)	IFN-γ	克羅恩病
佛拉韋蘆單抗 (Foravirumab)	狂犬病病毒糖蛋白	狂犬病(預防)
夫蘇木單抗 (Fresolimumab)	TGF-B	特發性肺纖維化、局灶節段性腎小球硬化症、癌症
弗拉奴單抗 (Fulranumab)	NGF	疼痛
弗妥昔單抗 (Futuximab)	EGFR	癌症
加利昔單抗	CD80	B 細胞淋巴瘤

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
(Galiximab)		
甘尼妥單抗 (Ganitumab)	IGF-I	癌症
甘特蘆單抗 (Gantenerumab)	β-澱粉樣蛋白	阿爾茨海默氏疾病
加維莫單抗 (Gavilimomab)	CD147 (Basigin)	移植物抗宿主疾病
吉妥單抗奧佐米星 (Gemtuzumab Ozogamicin)	CD33	急性骨髓性白血病
吉沃珠單抗 (Gevokizumab)	IL-1β	糖尿病
吉瑞妥昔單抗 (Girentuximab)	碳酸酐酶 9 (CA-IX)	透明細胞腎細胞癌[64]
格列姆巴妥木單抗維多汀 (Glembatumumab Vedotin)	GPNMB	黑素瘤、乳腺癌
戈利木單抗 (Golimumab)	TNF-A	類風濕性關節炎、牛皮癬性關節炎、強直性脊柱炎
戈米昔單抗	CD23 (Ige 受體)	過敏性哮喘

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
(Gomiliximab)		
Guselkumab	IL13	牛皮癬
替伊莫單抗 (Ibritumomab Tiuxetan)	CD20	非霍奇金淋巴瘤
伊克蘆庫單抗 (Icrucumab)	VEGFR-1	癌症
伊戈伏單抗 (Igovomab)	CA-125	卵巢癌(診斷)
Imab362	Cldn18.2	胃腸腺癌和胰腺腫瘤
英加妥珠單抗 (Imgatuzumab)	EGFR	癌症
英克勒庫單抗 (Inclacumab)	選擇蛋白 P	癌症
英達妥昔單抗拉夫坦辛 (Indatuximab Ravtansine)	SDC1	癌症
英夫利昔 (Infliximab)	TNF-A	類風濕性關節炎、強直性脊柱炎、牛皮癬性關節炎、牛皮癬、克羅恩病、潰瘍性結腸炎

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
英特妥木單抗 (Intetumumab)	CD51	實體瘤（前列腺癌、黑素瘤）
伊諾莫單抗 (Inolimomab)	CD25 (IL-2 受體的鏈)	移植物抗宿主疾病
伊珠奧佐米星 (Inotuzumab Ozogamicin)	CD22	癌症
伊匹單抗 (Ipilimumab)	CD152	黑素瘤
伊拉妥木單抗 (Iratumumab)	CD30 (TNFRSF8)	霍奇金淋巴瘤
伊托珠單抗 (Itolizumab)	CD6	癌症
伊克塞珠單抗 (Ixekizumab)	IL-17A	自身免疫性疾病
凱利昔單抗 (Keliximab)	CD4	慢性哮喘
拉貝妥珠單抗 (Labetuzumab)	CEA	結直腸癌
Lambrolizumab	PDCD1	抗腫瘤劑
蘭帕珠單抗 (Lampalizumab)	CFD	癌症

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
來金珠單抗 (Lebrikizumab)	IL-13	哮喘
來馬索單抗 (Lemalesomab)	NCA-90 (粒細胞抗原)	診斷劑
樂德木單抗 (Lerdelimumab)	TGF β 2	減少青光眼外科手術之後的結疤
來沙木單抗 (Lexatumumab)	TRAIL-R2	癌症
利韋單抗 (Libivirumab)	乙型肝炎表面抗原	乙型肝炎
利格珠單抗 (Ligelizumab)	IGHE	癌症
林妥株單抗 (Lintuzumab)	CD33	癌症
利利單抗 (Lirilumab)	KIR2D	癌症
羅戴西珠單抗 (Lodelcizumab)	PCSK9	高膽固醇血症
Lorvotuzumab	CD56	癌症
魯卡妥木單抗 (Lucatumumab)	CD40	多發性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
魯米昔單抗 (Lumiliximab)	CD23	慢性淋巴細胞白血病
馬帕妥木單抗 (Mapatumumab)	TRAIL-R1	癌症
Margetuximab	Ch4d5	癌症
Mavrilimumab	GMCSF 受體 A-鏈	類風濕性關節炎
馬妥珠單抗 (Matuzumab)	EGFR	結直腸、肺和胃癌
美泊利單抗 (Mepolizumab)	IL-5	哮喘和白細胞疾病
美特木單抗 (Metelimumab)	TGF β 1	系統性硬皮病
米拉珠單抗 (Milatuzumab)	CD74	多發性骨髓瘤和其他血液學惡性腫瘤
明瑞莫單抗 (Minretumomab)	TAG-72	癌症
米妥莫單抗 (Mitumomab)	GD3 神經節苷酯	小細胞肺癌
莫加木珠單抗 (Mogamulizumab)	CCR4	癌症
莫羅木單抗 (Morolimumab)	獼猴因數	癌症

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
莫他韋珠單抗 (Motavizumab)	呼吸道合胞病毒	呼吸道合胞病毒(預防)
莫西妥莫單抗假單胞菌外毒素 (Moxetumomab Pasudotox)	CD22	癌症
莫羅單抗 (Muromonab)-CD3	CD3	預防器官移植排斥
他那可單抗 (Nacolomab Tafenatox)	C242 抗原	結直腸癌
那米魯單抗 (Namilumab)	CSF2	癌症
他那莫單抗 (Naptumomab Estafenatox)	5T4	非小細胞肺癌、腎細胞癌
納那妥單抗 (Narnatumab)	RON	癌症
那他株單抗 (Natalizumab)	整聯蛋白 A4	多發性硬化症、克羅恩病
奈巴庫單抗 (Nebacumab)	內毒素	膿毒症

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
奈昔妥木單抗 (Necitumumab)	EGFR	非小細胞肺癌
奈瑞莫單抗 (Nerelimomab)	TNF-A	癌症
耐斯伐庫單抗 (Nesvacumab)	血管位蛋白 2	癌症
尼莫珠單抗 (Nimotuzumab)	EGFR	鱗狀細胞癌、頭頸癌、鼻咽癌症、神經膠質瘤
尼伏魯單抗 (Nivolumab)	Igg4	癌症
蔬諾莫單抗 (Nofetumomab Merpentan)	未確定	癌症
奧卡拉妥珠單抗 (Ocaratuzumab)	CD20	癌症
奧瑞珠單抗 (Ocrelizumab)	CD20	類風濕性關節炎、紅斑狼瘡
奧度莫單抗 (Odulimomab)	LFA-1 (CD11a)	預防器官移植排斥、免疫學疾病
奧法木單抗 (Ofatumumab)	CD20	慢性淋巴細胞白血病
奧拉妥單抗	PDGF-R A	癌症

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
(Olaratumab)		
奧洛珠單抗 (Olokizumab)	IL6	癌症
奧納妥珠單抗 (Onartuzumab)	人分散因數受體激酶	癌症
Ontuxizumab	TEM1	癌症
莫奧珠單抗 (Oportuzumab Monatox)	Epcam	癌症
奧戈伏單抗 (Oregovomab)	CA-125	卵巢癌
奧替庫單抗 (Orticumab)	Oxldl	癌症
Otlertuzumab	CD37	癌症
奧昔魯單抗 (Oxelumab)	OX-40	哮喘
奧紮尼珠單抗 (Ozanezumab)	NOGO-A	ALS 和多發性硬化症
奧左拉珠單抗 (Ozoralizumab)	TNF-A	炎症
帕吉巴昔單抗 (Pagibaximab)	脂磷壁質	膿毒症(葡萄球菌(*Staphylococcus*))

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
帕利珠單抗 (Palivizumab)	呼吸道合胞病毒的 F 蛋白質	呼吸道合胞病毒(預防)
帕尼單抗 (Panitumumab)	EGFR	結直腸癌
Pankomab()	MUC1 的腫瘤特異性糖基化	卵巢癌
帕諾巴庫單抗 (Panobacumab)	銅綠假單胞菌	銅綠假單胞菌感染
巴薩妥珠單抗 (Parsatuzumab)	EGFL7	癌症
帕考珠單抗 (Pascolizumab)	IL-4	哮喘
派特克珠單抗 (Pateclizumab)	LTA	TNF
帕曲妥單抗 (Patritumab)	HER3	癌症
培妥莫單抗 (Pemtumomab)	MUC1	癌症
培拉珠單抗 (Perakizumab)	IL17A	關節炎
培妥珠單抗 (Pertuzumab)	HER2/Neu	癌症

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
培克珠單抗 (Pexelizumab)	C5	減少賁門外科手術的副作用
皮地珠單抗 (Pidilizumab)	PD-1	癌症和感染疾病
皮那妥珠單抗維多汀 (Pinatuzumab Vedotin)	CD22	癌症
平妥莫單抗 (Pintumomab)	腺癌抗原	腺癌
普拉庫魯單抗 (Placulumab)	人 TNF	癌症
泊拉妥珠單抗維多汀 (Polatuzumab Vedotin)	CD79B	癌症
泊尼珠單抗 (Ponezumab)	人 β-澱粉樣蛋白	阿爾茨海默氏疾病
普立托昔單抗 (Pritoxaximab)	大腸埃希氏菌 1 型志賀毒素	癌症
普立妥木單抗 (Pritumumab)	波形蛋白	腦癌症
Pro 140	Ccr5	HIV 感染
奎利珠單抗	IGHE	癌症

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
(Quilizumab)		
雷妥莫單抗 (Racotumomab)	N-羥乙醯神經氨酸 (N-Glycolylneuraminic Acid)	癌症
雷得妥單抗 (Radretumab)	纖連蛋白特有的結構域 -B(Extra Domain-B)	癌症
雷韋單抗 (Rafivirumab)	狂犬病病毒糖蛋白	狂犬病(預防)
雷莫蘆單抗 (Ramucirumab)	VEGFR2	實體瘤
雷珠單抗 (Ranibizumab)	VEGF-A	黃斑變性(濕性型)
雷西庫單抗 (Raxibacumab)	炭疽病毒素、保護性抗原	炭疽病(預防和治療)
瑞加韋單抗 (Regavirumab)	巨細胞病毒糖蛋白 B	巨細胞病毒感染
瑞利珠單抗 (Reslizumab)	IL-5	呼吸道、皮膚和胃腸道的炎症
利妥木單抗 (Rilotumumab)	HGF	實體瘤
利妥昔單抗	CD20	淋巴瘤、白血病、一些

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
(Rituximab)		自身免疫病症
羅妥木單抗 (Robatumumab)	IGF-1 受體	癌症
羅度單抗 (Roledumab)	RHD	癌症
羅莫索珠單抗 (Romosozumab)	硬化蛋白	骨質疏鬆症
羅利珠單抗 (Rontalizumab)	IFN-α	系統性紅斑狼瘡
羅維珠單抗 (Rovelizumab)	CD11、CD18	出血性休克
盧利珠單抗 (Ruplizumab)	CD154 (CD40L)	風濕性疾病
沙馬珠單抗 (Samalizumab)	CD200	癌症
沙裡魯單抗 (Sarilumab)	IL6	類風濕性關節炎、強直性脊柱炎
沙妥莫單抗噴地肽 (Satumomab Pendetide)	TAG-72	癌症
司庫奴單抗 (Secukinumab)	IL-17A	眼色素層炎、類風濕性關節炎牛皮癬

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
司裡班妥單抗 (Seribantumab)	ERBB3	癌症
司托昔抗 (Setoxaximab)	大腸埃希氏菌 1 型志賀毒素	癌症
司韋單抗 (Sevirumab)	巨細胞病毒	巨細胞病毒感染
西羅珠單抗 (Sibrotuzumab)	FAP	癌症
Sgn-CD19a	CD19	急性淋巴細胞白血病和 B 細胞非霍奇金淋巴瘤
Sgn-CD33a	CD33	急性髓細胞性白血病
西法木單抗 (Sifalimumab)	IFN-A	SLE、皮肌炎、多發性肌炎
司妥昔單抗 (Siltuximab)	IL-6	癌症
西妥珠單抗 (Simtuzumab)	LOXL2	纖維化
西利珠單抗 (Siplizumab)	CD2	牛皮癬、移植物抗宿主疾病(預防)
西蘆庫單抗 (Sirukumab)	IL-6	類風濕性關節炎

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
索蘭珠單抗 (Solanezumab)	β-澱粉樣蛋白	阿爾茨海默氏疾病
索利托單抗 (Solitomab)	Epcam	癌症
索耐珠單抗 (Sonepcizumab)	鞘氨醇-1-磷酸鹽	脈絡膜和視網膜新血管形成
松妥珠單抗 (Sontuzumab)	上皮唾液蛋白	癌症
司他木魯單抗 (Stamulumab)	肌肉抑制素 (Myostatin)	肌營養不良
硫索單抗 (Sulesomab)	NCA-90 (粒細胞抗原)	骨髓炎
蘇韋珠單抗 (Suvizumab)	HIV-1	病毒感染
他巴魯單抗 (Tabalumab)	BAFF	B 細胞癌症
他珠單抗 (Tacatuzumab Tetraxetan)	甲胎蛋白	癌症
他度珠單抗 (Tadocizumab)	整聯蛋白 AIIBβ3	經皮冠狀動脈介入 (Percutaneous Coronary

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
		Intervention)
他尼珠單抗 (Tanezumab)	NGF	疼痛
帕他莫單抗 (Taplitumomab Paptox)	CD19	癌症
替非珠單抗 (Tefibazumab)	聚集因數 A	金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus Aureus*)感染
阿替莫單抗 (Telimomab)	未確定	癌症
替妥莫單抗 (Tenatumomab)	生腱蛋白 C	癌症
替奈昔單抗 (Teneliximab)	CD40	癌症
替妥木單抗 (Teprotumumab)	CD221	血液學腫瘤
替昔木單抗 (Ticilimumab)	CTLA-4	癌症
替拉珠單抗 (Tildrakizumab)	IL23	免疫介導炎症病症
替加珠單抗	TRAIL-R2	癌症

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
(Tigatuzumab)		
Tnx-650	Il-13	霍奇金淋巴瘤
塔西單抗 (Tocilizumab)	IL-6 受體	類風濕性關節炎
托拉珠單抗 (Toralizumab)	CD154 (CD40L)	類風濕性關節炎、狼瘡腎炎
托西莫單抗 (Tositumomab)	CD20	濾泡淋巴瘤
Tovetumab	CD140a	癌症
特拉羅奴單抗 (Tralokinumab)	IL-13	哮喘
曲妥珠單抗 (Trastuzumab)	HER2/Neu	乳腺癌
TrbSO7	Gd2	黑素瘤
曲美木單抗 (Tremelimumab)	CTLA-4	癌症
西莫白介素妥可妥珠單抗 (Tucotuzumab Celmoleukin)	Epcam	癌症
妥韋單抗 (Tuvirumab)	肝炎 B 病毒	慢性乙型肝炎

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
優利妥昔單抗 (Ublituximab)	MS4A1	癌症
優瑞魯單抗 (Urelumab)	4-1BB	癌症
優托珠單抗 (Urtoxazumab)	大腸埃希桿菌	大腸埃希氏菌造成的腹瀉
優特克單抗 (Ustekinumab)	IL-12、IL-23	多發性硬化症、牛皮癬、牛皮癬性關節炎
Vantictumab	捲曲(Frizzled)受體	癌症
伐利昔單抗 (Vapaliximab)	AOC3 (VAP-1)	癌症
伐特珠單抗 (Vatelizumab)	ITGA2	癌症
維多珠單抗 (Vedolizumab)	整聯蛋白 A4β7	克羅恩病、潰瘍性結腸炎
維妥珠單抗 (Veltuzumab)	CD20	非霍奇金淋巴瘤
韋帕莫單抗 (Vepalimomab)	AOC3 (VAP-1)	炎症
維森庫單抗 (Vesencumab)	NRP1	癌症
伏洛昔單抗	整聯蛋白 A5β1	實體瘤

抗體名稱	疾病相關的抗原	治療性靶應用
(Volociximab)		
伏司妥珠單抗 (Vorsetuzumab)	CD70	癌症
伏妥莫單抗 (Votumumab)	腫瘤抗原 CTAA16.88	結直腸腫瘤
紮魯妥木單抗 (Zalutumumab)	EGFR	頭頸部的鱗狀細胞癌
紮妥昔單抗 (Zatuximab)	HER1	癌症
齊拉木單抗 (Ziralimumab)	CD147	癌症
阿左莫單抗 (Zolimomab Aritox)	CD5	系統性紅斑狼瘡、移植物抗宿主疾病

【0098】 疾病相關的抗原可在感染病原體的細胞或癌症細胞中特徵性表達並且在 MHC 複合物的背景下在細胞表面上被處理和展示，但是不在正常細胞中特徵性表達。識別這樣的肽片段的抗體是本領域已知的或可使用熟知的方法產生，包括 WO 2002/014870 中描述的那些。

【0099】 根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子的多肽可適於包含這樣的抗體的輕鏈可變結構域或重鏈可變結構域(這樣的分子的第一和第二多肽鏈的情況)或重鏈或輕鏈(這樣的分子的第三和第四多肽鏈的情況)。因此，上述抗體可用於產生根據本發明任一實施方式的

三特異性結合分子，其位點 A、位點 B 或位點 C 能夠結合這樣的疾病相關的抗原的表位。

【0100】 **B.優選的結構屬性**

【0101】 典型地，根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子包括四條不同的多肽鏈，其各具有氨基末端和羧基末端(見**圖 4A-4D**)，但是，通過彼此融合這樣的多肽鏈(例如，經肽鏈)或通過將這樣的多肽鏈分開形成另外的多肽鏈，或通過經二硫鍵締合更少或另外的多肽鏈，分子可包括更少或更多數量的多肽鏈。**圖 4E-4J** 通過示意性描繪具有三條多肽鏈的這樣的分子。**圖 4K-4L** 通過示意性描繪具有五條多肽鏈的分子。

【0102】 這樣的分子的各種免疫球蛋白結構域可源自任何同種型或同種異型的免疫球蛋白，包括但不限於 IgA、IgD、IgG、IgE 和 IgM。在優選的實施方式中，如下面所討論，這樣的免疫球蛋白源自 IgG 免疫球蛋白。在具體的實施方式中，使用的 IgG 同種型是 IgG1，但是可採用其他同種型的 IgG (例如，IgG2、IgG3 或 IgG4 或其同種異型)。當使用 IgG4 Fc 結構域時，更包括引入穩定突變比如 S228P，其通過如 Kabat 中闡釋的 EU 索引編號(參見 Lu 等，(2008) "*The Effect Of A Point Mutation On The Stability Of Igg4 As Monitored By Analytical Ultracentrifugation*," J. Pharmaceutical Sciences 97:960-969)，以減少鏈交換的發生。可將本領域已知的其他穩定突變引入 IgG4 Fc 結構域(參見 Peters, P 等，(2012) "*Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced Disulfide Bond Heterogeneity and Increased Fab Domain Thermal Stability*," J. Biol. Chem., 287:24525-24533；PCT 專利公開號：WO 2008/145142)。因為 N297A、L234A、L235A 和

D265A 取代消除了效應子功能，在期望效應子功能的情況下，優選不採用這些取代。

【0103】 **圖 4A-4D** 提供了優選的三特異性結合分子的結構域的示意圖。**圖 4A** 和 **4B** 分別示意性圖示了優選的三特異性結合分子的結構域，其中非雙抗體型結合結構域是 Fab 型結合結構域或受體型結合結構域。**圖 4C** 和 **4D** 分別示意性圖示了具有不同的結構域取向的優選的三特異性結合分子的結構域，其中非雙抗體型結合結構域是 Fab 型結合結構域或受體型結合結構域。

【0104】 如上面所示，由這樣的示例性優選的三特異性結合分子的結合結構域結合的表位 I、表位 II 或表位 III 之一可以是疾病相關的抗原的表位。最優選地，結合這樣的疾病相關的抗原的表位的這樣的示例性優選的三特異性結合分子的結合結構域是 Fab 型結合結構域。本發明的這樣的三特異性結合分子的多肽可適於包含可變輕鏈結構域或可變重鏈結構域(這樣的分子的第一和第二多肽鏈的情況)或重鏈或輕鏈(在這樣的分子的第三和第四多肽鏈的情況下)。因此，這樣的抗體可用於產生根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子，其位點 A、位點 B 或位點 C 能夠結合這樣的疾病相關的抗原的表位。

【0105】 **1.優選的第一多肽鏈**

【0106】 優選的三特異性結合分子的第一多肽鏈包括能夠結合表位 I 的可變輕鏈結構域($\mathbf{VL_I}$)、能夠結合表位 II 的可變重鏈結構域($\mathbf{VH_{II}}$)、半胱氨酸殘基或包含半胱氨酸的結構域和異源二聚體-促進結構域和 CH2-CH3 結構域。

【0107】 因為第一多肽的可變輕鏈結構域和可變重鏈結構域針對不同表位，它們不能締合在一起形成能夠結合表位 I 或表位 II 的結合結

構域。第一多肽的可變輕鏈結構域和可變重鏈結構域通過間插接頭肽彼此間隔開，此間插接頭肽足夠短以基本上防止這些結構域的締合。示例性接頭——稱為“**接頭 1**”——具有序列(**SEQ ID NO:1**)：GGGSGGGG。

【0108】 第一多肽的可變重鏈結構域和此多肽的異源二聚體-促進結構域優選地通過包含 1、2、3 或更多個半胱氨酸殘基的間插接頭肽而彼此間隔開。優選的包含半胱氨酸的結構域(“接頭 2”)具有的序列為 **SEQ ID NO:2**：GGCGGG。可選地，或另外，可使用包含半胱氨酸的異源二聚體-促進結構域，如下面描述的。

【0109】 因此，在一些實施方式中，一個或多個半胱氨酸殘基(或包含半胱氨酸的結構域，比如包含半胱氨酸的肽接頭)被併入到第一多肽鏈(和/或併入到三特異性結合分子的第二、第三、第四或另外的多肽鏈)中，以便將兩個這樣的多肽鏈共價結合在一起，而在等同的實施方式中，這樣的半胱氨酸殘基(一個或多個)可被併入到異源二聚體-促進結構域，或併入另一結構域以便實現相同的結果。

【0110】 協同選擇第一多肽的異源二聚體-促進結構域和第二多肽的異源二聚體-促進結構域。結構域彼此不同並且被設計為彼此締合以便促進第一和第二多肽鏈的締合。例如，異源二聚體-促進結構域中的一個被工程化以在 pH 7 具有負電荷，而兩條多肽鏈中的另一條被工程化，以在 pH 7 具有正電荷。這樣帶電荷的結構域的存在促進第一和第二多肽之間的締合，因此促進異源二聚化。哪個異源二聚體-促進結構域被提供至哪條鏈不重要，只要在第一和第二多肽鏈上採用的結構域不同以便促進這樣的鏈之間的異源二聚化。

【0111】 優選地，第一多肽鏈的異源二聚體-促進結構域是“**E-螺旋**”結構域(**SEQ ID NO:3**)：**E**VAAL**E**K**E**VA ALEKEVAALE

K**E**VAAL***E***K，或“**K-螺旋**”結構域(**SEQ ID NO:4**)：**K**VAAL**K**E**K**VAAL**K** E**K**VAAL**K**E。更優選地，第一多肽鏈具備“**E-螺旋**”結構域。第一多肽鏈可包含僅僅單個這樣的螺旋分隔子，或其可包含大於一個這樣的螺旋分隔子(例如，兩個分隔子)並且可以是相同電荷，優選地具有相反電荷。

【0112】 優選地，第一多肽鏈的異源二聚體-促進結構域包括四個串聯“E-螺旋”螺旋狀結構域(**SEQ ID NO:3**：**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K)，其谷氨酸殘基在 pH 7 形成負電荷，或包括四個串聯“K-螺旋”結構域(**SEQ ID NO:4**：**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E)，其賴氨酸殘基在 pH 7 形成正電荷。這樣的帶電荷結構域的存在促進第一和第二多肽鏈之間的締合，並且因此促進異源二聚化。尤其優選的是這樣的異源二聚體-促進結構域：其中四個串聯的具有 **SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4** 的“E-螺旋”螺旋狀結構域之一 **ID NO:ID NO:** 已經被修飾以包含半胱氨酸殘基：**E**VAA**C**E**C**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K (**SEQ ID NO:115**) 或其中四個串聯的具有 **SEQ ID NO:4** 的“K-螺旋”螺旋狀結構域 **ID NO:** 之一已經被修飾以包含半胱氨酸殘基：**K**VAA**C**K**C**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E (**SEQ ID NO:116**)。下面另公開了其他可採用的 E-螺旋和 K-螺旋結構域：Woolfson, D.N. (2005) “*The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies*,” Adv. Prot. Chem. 70:79-112；Straussman, R.等(2007) “*Kinking the Coiled Coil – Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface*,” J. Molec. Biol. 366:1232-1242；Apostolovic, B.等(2008) “*pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil*,” Biomacromolecules

9:3173-3180；Arndt, K.M.等(2001) "*Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain*," J. Molec. Biol. 312:221-228；Steinkruger, J.D.等(2012) "*The d'--d--d' Vertical Triad is Less Discriminating Than the a'--a--a' Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif*," J. Amer. Chem. Soc. 134(5):2626–2633；Ghosh, T.S.等(2009) "*End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures*," Acta Crystallographica D65:1032-1041；Grigoryan, G.等(2008) "*Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions*," Curr. Opin. Struc. Biol. 18:477-483；Boucher, C.等(2010) "*Protein Detection By Western Blot Via Coiled–Coil Interactions*," Analytical Biochemistry 399:138-140；Cachia, P.J.等(2004) "*Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy*," J. Mol. Recognit. 17:540-557；De Crescenzo, G.D.等(2003) "*Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding*," Biochemistry 42:1754-1763；Tripet, B.等(2002) "*Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide*

Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance," J. Molec. Biol. 323:345–362；和 Zeng, Y. 等 (2008) "*A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism*," J. Gene Med. 10:355-367。

【0113】 優選地，採用的第一多肽鏈的異源二聚體-促進結構域和 CH2-CH3 結構域通過包含半胱氨酸的間插接頭肽而彼此間隔開，此接頭肽為異源二聚體-促進結構域提供改善的穩定性。優選的包含半胱氨酸的接頭肽("**接頭 3**") 具有氨基酸序列 (**SEQ ID NO:5**)：DKTHTCPPCP。

【0114】 野生型 CH2-CH3 結構域的氨基酸序列如下(如在以下文獻中的 EU 索引中進行定位：Kabat 等(1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST，國立衛生研究院(National Institutes of Health)公開號 91-3242) (**SEQ ID NO:6**)：

|CH2→

```
APELLGGPS  VFLFPPKPKD  TLMISRTPEV  TCVVVDVSHE  DPEVKFNWYV  DGVEVHNAKT
231        240         250         260         270         280

                                                ←CH2|CH3→

KPREEQYNST  YRVVSVLTVL  HQDWLNGKEY  KCKVSNKALP  APIEKTISKA  K  GQPREPQVY
290         300         310         320         330         340

TLPPSREEMT  KNQVSLTCLV  KGFYPSDIAV  EWESNGQPEN  NYKTTPPVLD  SDGSFFLYSK
350         360         370         380         390         400

                                                ←CH3|

LTVDKSRWQQ  GNVFSCSVMH  EALHNHYTQK  SLSLSPGK
410         420         430         440
```

。

【0115】 在一些表達系統中，CH3 結構域的 C-末端氨基酸殘基可被翻譯後去除。因此，CH3 結構域的 C-末端殘基是任選的氨基酸殘基。

【0116】 第一多肽鏈的 CH2-CH3 結構域優選地被修飾，以促進第

三多肽鏈的 CH2-CH3 結構域之間的異源二聚化(如下所述)。例如，可將氨基酸取代(優選地用包括形成‘杵’的大側基例如色氨酸的氨基酸進行取代)引入第一多肽鏈的 CH2 或 CH3 結構域中，以便空間干擾防止與類似突變的結構域相互作用並且迫使突變的結構域與其中已經工程化引入了互補的或適應性突變的結構域，即，‘臼’(例如，用甘氨酸進行取代) 配對。這樣的突變組可被工程化到任何對的包括雙抗體分子的多肽中，而且，進一步地，可被工程化到此對的多肽鏈的任何部分。進行蛋白質工程以相對於同二聚化更偏愛異源二聚化的方法是本領域熟知的——尤其就免疫球蛋白樣分子的工程化而言，並且包括在本文中(參見美國專利號 7,695,936 和專利公開 2007/0196363，Ridgway 等(1996) *"'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization,"* Protein Engr. 9:617-621；Atwell 等 (1997) *"Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,"* J. Mol. Biol. 270: 26-35；和 Xie 等(2005) *"A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis,"* J. Immunol. Methods 296:95-101；其每一篇通過引用以其整體併入本文)。通過修飾天然 IgG Fc 結構域以包含修飾 T366W 而產生優選的杵。通過修飾天然 IgG Fc 結構域以包含修飾 T366S、L368A 和 Y407V 而產生優選的臼。為了有助於純化本發明的三特異性結合分子，包含臼突變的多肽鏈另外包括在 435 位的取代 (H435R)，以去除蛋白 A 結合位點。因此，包含臼突變的多肽的同二聚體不結合蛋白 A，而由於包含異源二聚體的杵和臼形成的三特異性結合分子經在包含杵突變的多肽鏈上的蛋白 A 結合位點將保持其結合蛋白 A

的能力。

【0117】 第一多肽鏈的 CH2-CH3 結構域優選地被修飾，以減少或消除 Fc 與 Fc 受體的結合。這樣的突變是本領域熟知的並且包括在 234、235、265 和 297 位的取代(參見美國專利號 5,624,821)。優選的取代包括 L234A 和 L235A，D265A 和 N297Q 中的一個或多個。

【0118】 因此，優選地，第一多肽鏈的 CH2-CH3 結構域具有“**攜帶杵的**”序列(**SEQ ID NO:7**)：

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHN**H**YTQKS LSLSPGK

或具有具有 H435R 取代以消除蛋白 A 結合的“**攜帶臼的**”序列(**SEQ ID NO:8**)：

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSL**S**C**A**VK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFL**V**SKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHN**R**YTQKS LSLSPGK。

【0119】 優選地，第一多肽鏈具有“攜帶杵的” CH2-CH3 序列，比如 **SEQ ID NO:7** 的序列。

【0120】 如將認識到，可在第一多肽鏈中採用“攜帶臼的”CH2-CH3 結構域(例如，**SEQ ID NO:8**)，在此情況下，將在第三多肽鏈中採用“攜帶杵的”CH2-CH3 結構域(例如，**SEQ ID NO:7**)。

【0121】 因此，三特異性結合分子的第一多肽鏈優選地包括結構域和接頭：(VL_I 結構域)—(接頭 1)—(VH_{II} 結構域)—(包含半胱氨酸的結構域)—(接頭 2)—(E-螺旋異源二聚體-促進結構域)—(接頭 3)—(攜帶杵的 CH2-CH3 結構域)、或(VL_I 結構域)—(接頭 1)—(VH_{II} 結構域)—(接頭 2)—(包含半胱氨酸的 E-螺旋異源二聚體-促進結構域)—(接頭 3)—(攜帶杵的 CH2-CH3 結構域)。

【0122】 **2.優選的第二多肽鏈**

【0123】 這樣優選的三特異性結合分子的第二多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向包括能夠結合表位 II 的可變輕鏈結構域(**VL_{II}**)、能夠結合表位 I 的可變重鏈結構域(**VH_I**)、半胱氨酸殘基或包含半胱氨酸的結構域和異源二聚體-促進結構域。

【0124】 因為第二多肽的可變輕鏈結構域和可變重鏈結構域針對不同表位，它們不能締合在一起形成能夠結合表位 I 或表位 II 的結合結構域。第二多肽的可變輕鏈結構域和可變重鏈結構域通過足夠短以基本上防止這些結構域締合的間插接頭肽而彼此間隔開。具有序列(**SEQ ID NO:1**)：GGGSGGGG 的“**接頭 1**”是用於此目的的示例性接頭。

【0125】 如在第一多肽鏈的情況下，第二多肽的可變重鏈結構域和此多肽的異源二聚體-促進結構域優選地通過包含 1、2、3 或更多個半胱氨酸殘基的包含半胱氨酸的間插結構域而彼此間隔開。具有序列(**SEQ ID NO:2**) GGCGGG 的“接頭 2”是用於此的示例性接頭。這樣的半胱氨酸殘基可與包含半胱氨酸的間隔肽中的半胱氨酸殘基形成二硫

鍵，此間隔肽分開第一多肽的可變重鏈結構域和此多肽的異源二聚體-促進結構域。因此，三特異性結合分子的第一和第二多肽彼此共價結合。可選地，可使用包含半胱氨酸的異源二聚體-促進結構域，如上所述。

【0126】 如上所討論，選擇第二多肽鏈的異源二聚體-促進結構域，以便與第一多肽鏈的異源二聚體-促進結構域協同作用。因此，在優選的實施方式中，第一多肽鏈的異源二聚體-促進結構域是“**K-螺旋**”結構域(例如，**SEQ ID NO:4** 或 **SEQ ID NO:116**)或“ **E-螺旋**”結構域(例如，**SEQ ID NO:3** 或 **SEQ ID NO:115**)。因為第一多肽鏈優選地具備“ **E-螺旋**”結構域，所以第二多肽鏈優選地包含“**K-螺旋**”結構域。

【0127】 因為第一和第二多肽鏈是雙抗體的多肽鏈，它們能夠締合在一起形成識別和免疫特異性結合表位 I 的結構域 I 結合結構域(VL_A/VH_A)，和識別和免疫特異性結合表位 II 的結構域 II 結合結構域(VL_B/VH_B)。

【0128】 因此，總之，三特異性結合分子的第二多肽鏈優選地包括結構域和接頭：(VL_{II}結構域)—(接頭 1)—(VH_I結構域)—(包含半胱氨酸的結構域)—(接頭 2)—(K-螺旋異源二聚體-促進結構域)、或(VL_{II} 結構域)—(接頭 1)—(VH_I結構域)—(接頭 2)—(包含半胱氨酸的 K-螺旋異源二聚體-促進結構域)。

【0129】 **3.優選的第三多肽鏈**

【0130】 優選的三特異性結合分子的第三多肽鏈是這樣的多肽：其在 N-末端至 C-末端方向上包括結合結構域、可任選地包括 CH1-鉸鏈結構域的包含半胱氨酸的結構域和 CH2-CH3 結構域。本發明優選的三特異性結合分子的第三多肽鏈的結合結構域可以是能夠結合表位 III 的

可變重鏈結構域($\mathbf{VH_{III}}$)，在此情況下，本發明優選的三特異性結合分子的第四多肽鏈(下面討論)是包括能夠結合表位 III 的可變輕鏈結構域($\mathbf{VL_{III}}$)的多肽，以便結合結構域能夠免疫特異性結合具備表位 III 的抗原。可選地，本發明優選的三特異性結合分子的第三多肽鏈的結合結構域可包括 T 細胞受體型結合結構域，在此情況下，本發明優選的三特異性結合分子的第四多肽鏈(下面討論)是包括互補的 T 細胞受體型結合結構域的多肽，以便兩個多肽鏈的相互作用形成能夠生理特異性結合排列在細胞表面上的 MHC 複合物中呈現的抗原分子的結合結構域。第三多肽鏈可從天然存在的抗體分離。可選地，其可被重組構建。示例性 CH1 結構域是人 IgG1 CH1 結構域，其具有氨基酸序列(**SEQ ID NO:9**)：ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKV。

【0131】 示例性鉸鏈結構域是人 IgG1 鉸鏈結構域，其具有氨基酸序列(**SEQ ID NO:10**)：EPKSCDKTHTCPPCP。如將認識到，示例性鉸鏈結構域包括多個半胱氨酸殘基(Elkabetz 等(2005) "*Cysteines In CH1 Underlie Retention Of Unassembled Ig Heavy Chains*," J. Biol. Chem. 280:14402-14412)，其可參與鏈間共價鍵合。可選地，可採用不同的包含半胱氨酸的結構域(例如，具有以下氨基酸序列的肽：VEPKSC(**SEQ ID NO:12**)、AEPKSC (**SEQ ID NO:127**)，GVEPKSC (**SEQ ID NO:133**)或 GGCGGG (**SEQ ID NO:2**))。

【0132】 儘管可採用野生型 CH2-CH3 結構域，但是，如上所述，優選採用修飾的 CH2-CH3 結構域，其促進與第一多肽鏈的 CH2-CH3 結構域的異源二聚化。

【0133】 因此，優選地，第三多肽鏈的 CH2-CH3 結構域是“攜帶臼的” CH2-CH3 結構域，其氨基酸序列與第一多肽中採用的“ 攜帶杵的” CH2-CH3 結構域(**SEQ ID NO:7**)互補。如上所討論，攜帶臼的 CH2-CH3 結構域優選地應包括在 435 位的取代(H435R)，以去除蛋白 A 結合位點。對於第三多肽，具有 H435R 取代的示例性“攜帶臼的” CH2-CH3 結構域是 **SEQ ID NO:8**。

【0134】 如將認識到，在第三多肽鏈中可採用“ 攜帶杵的” CH2-CH3 結構域(例如，**SEQ ID NO:7**)，在此情況下，在第一多肽鏈中採用“攜帶臼的” CH2-CH3 結構域(例如，**SEQ ID NO:8**)。

【0135】 在其中本發明優選的三特異性結合分子的第三(和第四)多肽鏈各包括 T 細胞受體型結合結構域多肽鏈的實施方式中，其在 I 類 MHC 背景下識別在細胞表面上呈現的抗原。產生這樣的 T 細胞受體型結合結構域的方法是本領域熟知的(例如，US2012/0294874A1)。

【0136】 因此，三特異性結合分子的第三多肽鏈優選地包括結構域和接頭：**(VH_{III} 結構域)—(包含半胱氨酸的結構域(任選地 CH1 結構域和/或鉸鏈結構域)—(攜帶臼的 CH2-CH3 結構域)**，或**(受體型結合結構域；其第一或第二多肽)—(包含半胱氨酸的結構域(任選地 CH1 結構域和/或鉸鏈結構域)—(攜帶臼的 CH2-CH3 結構域)**。

【0137】 **4.優選的第四多肽鏈**

【0138】 優選的三特異性結合分子的第四多肽鏈是受體型結合結構域的多肽(其中第三和第四多肽鏈形成受體型結合結構域)，或更優選地，是上述抗體的輕鏈的多肽部分，其免疫特異性結合表位 III 和/或其與第三多肽鏈的結合結構域互補。

【0139】 因此，在第三和第四多肽形成 Fab 型結合結構域的情況下，這樣的第四多肽鏈在 N-末端至 C-末端方向上包括能夠結合表位 III 的可變輕鏈結構域(VL_{III})和用於促進與第三多肽鏈共價結合的包含半胱氨酸的結構域，或結合結構域和用於促進與第三多肽鏈共價結合的這樣的包含半胱氨酸的結構域。這樣的包含半胱氨酸的結構域可以是 CL 結構域，或其包含半胱氨酸的部分，比如(**SEQ ID NO:11**) FNRGEC 或(**SEQ ID NO:128**) GFNRGEC 或接頭比如接頭 2 (具有序列(**SEQ ID NO:2**) GGCGGG。與這樣的接頭 2 形成二硫鍵的包含半胱氨酸的示例性結構域包括氨基酸序列 VEPKSC(**SEQ ID NO:12**)或鉸鏈結構域。

【0140】 第四多肽鏈可從天然存在的抗體分離。可選地，其可被重組構建。優選的 CL 結構域是人 IgG1 CLκ 結構域，其具有氨基酸序列(**SEQ ID NO:13**)：

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC。

【0141】 可選地，示例性 CL 結構域是人 IgG1 CL λ 2 結構域，其具有氨基酸序列(**SEQ ID NO:14**)：

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS。

【0142】 如將注意到，第四多肽鏈的 CL 結構域或其他包含半胱氨酸的結構域包括半胱氨酸殘基，其能夠共價結合第三多肽鏈的包含半胱氨酸的結構域(例如，CH1 結構域)的半胱氨酸殘基，從而彼此共價複合

本發明的三特異性結合分子的第三和第四多肽鏈。因此第三和第四多肽鏈彼此共價結合。

【0143】 另外，第一多肽鏈的 CH2-CH3 結構域的半胱氨酸殘基可與第三多肽鏈的 CH2-CH3 結構域的半胱氨酸殘基形成二硫鍵。因此第一和第三多肽鏈彼此共價結合。

【0144】 因此，三特異性結合分子的第四多肽鏈優選地包括結構域和接頭：**(VL_{III}結構域)—(包含半胱氨酸的結構域(任選地 CL 結構域)**，或**(受體型結合結構域;其第一或第二多肽)—(包含半胱氨酸的結構域(任選地 CL 結構域)**。

【0145】 **C.可選的第一多肽鏈**

【0146】 在一個實施方式中，上述結構域的取向為 N-末端至 C-末端方向。但是，也考慮其變化，其中第一多肽鏈的結構域的取向是：**NH_2-(攜帶杵的 CH3-CH2 結構域)-(VL_I結構域)—(接頭 1)—(VH_{II}結構域)—(包含半胱氨酸的結構域接頭 2)—(E-螺旋異源二聚體-促進結構域)**。優選地，包含半胱氨酸的結構域存在於這樣的 CH2-CH3 結構域的 N-末端。示例性肽的序列是(**SEQ ID NO:5**)：DKTHTCPPCP，但是，可採用可選的接頭，例如，EPKSCDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:129**) 或 LEPKSSDKTHTCPPCP；**SEQ ID NO:130**)。在此實施方式中，優選地，CH3 結構域通過間插肽接頭與 VL_I 結構域間隔開，此間插肽接頭比如具有氨基酸序列(**SEQ ID NO:15**)：APSSS，更優選地，具有氨基酸序列(**SEQ ID NO:16**) APSSSPME 的接頭，但是，可採用可選的接頭，例如，ASTKG (**SEQ ID NO:131**)、LEPKSS (**SEQ ID NO:132**)、GGC 或 GGG。

【0147】 **D.白蛋白-結合結構域**

【0148】 如 WO 2012/018687 中公開，為了改善雙抗體的體內藥物代謝動力學特性，雙抗體可被修飾，以在雙抗體的一個或多個末端包含血清-結合蛋白的多肽部分。這樣的考慮也適合本發明的三特異性結合分子。最優選地，當期望將血清-結合蛋白的多肽部分併入本發明的三特異性結合分子時，這樣的多肽部分將被安置於三特異性結合分子的一條多肽鏈的 C-末端。

【0149】 白蛋白是血漿中最豐富的蛋白質並且在人中的半衰期為 19 天。白蛋白具有數個小分子結合位點，允許其非共價結合其他蛋白質，從而延長它們的血清半衰期。的鏈球菌屬(Streptococcus)菌株 G148 的蛋白質 G 的白蛋白-結合結構域 3 (ABD3)由形成穩定的三-螺旋束的 46 個氨基酸殘基組成，並且具有寬的白蛋白-結合特異性(參見 Johansson, M.U. 等 (2002) "*Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules*," J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120)。因此，用於改善雙抗體體內藥物代謝動力學特性的、尤其優選的血清-結合蛋白的多肽部分是來自鏈球菌蛋白質 G 的白蛋白-結合結構域(ABD)，和更優選地，鏈球菌屬菌株 G148 的蛋白質 G 的白蛋白-結合結構域 3 (ABD3) (**SEQ ID NO:123**)：LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP。

【0150】 如 WO 2012/162068 (通過參考併入本文)中公開，**SEQ ID NO:123** 的"**去免疫化的(deimmunized)**"變體具有減弱或消除 II 類 MHC 結合的能力。基於組合突變結果，考慮下述取代組合是用於形成這樣的去免疫化的白蛋白-結合結構域的優選的取代：66S/70S +71A；66S/70S +79A ； 64A/65A/71A+66S ； 64A/65A/71A+66D ；

64A/65A/71A+66E ； 64A/65A/79A+66S ； 64A/65A/79A+66D ； 64A/65A/79A+66E。變體 ABD 具有修飾 L64A、I65A 和 D79A 或修飾 N66S、T70S 和 D79A。具有氨基酸序列：LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKN**A**$_{64}$**A**$_{65}$NNAKT VEGVKALI**A**$_{79}$E ILAALP (**SEQ ID NO:124**)，或氨基酸序列：LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLI**S**$_{66}$NAK**S**$_{70}$VEGVKALI**A**$_{79}$E ILAALP (**SEQ ID NO:125**)的變異的去免疫化的 ABD 是尤其優選的，因為這樣的去免疫化白蛋白-結合結構域展示基本上野生型的結合，同時提供減弱的 II 類 MHC 結合。儘管這樣的白蛋白-結合結構域可被併入到本發明的三特異性結合分子的任何多肽鏈中，但是優選將這樣的結構域佈置於第一或第三多肽鏈的 E-螺旋(或 K-螺旋)結構域的 C-末端(經間插在 E-螺旋(或 K-螺旋)結構域和白蛋白-結合結構域(其優選地是去免疫化白蛋白-結合結構域)之間的接頭)。對於這樣的接頭，優選的序列是 **SEQ ID NO:126**：GGGS。

【0151】 E. Fc 結構域的功能

【0152】 在一個實施方式中，第一多肽鏈的 CH2-CH3 結構域和第三多肽的 CH2-CH3 結構域複合形成基本上不能夠結合 Fc 受體的 Fc 結構域(即，以小於 10%野生型 Fc 結構域的程度進行結合。可選地，這樣的分子的 Fc 結構域能夠在生理學條件下結合 Fc 受體，從而這樣的三特異性結合分子是四特異性的，能夠介導與四個分子的配位結合(表位 I、表位 II 和表位 III 和 Fc 受體)。最優選地，能夠結合 Fc 受體的這樣的分子另外介導 Fc 受體-依賴性效應子功能。

【0153】 三特異性結合分子包括變異的 Fc 結構域，相對於可比較的野生型 Fc 結構域，此變異的 Fc 結構域包括一個或多個氨基酸取代、插入或缺失。包括變異的 Fc 結構域的分子相對於包括野生型 Fc 結構域的

分子通常具有改變的表型。變異的表型可表現為改變的血清半衰期、改變的穩定性、改變的對細胞酶的易感性或改變的效應子功能，如在 NK 依賴性或巨噬細胞依賴性試驗中測定的。鑒定為改變效應子功能的 Fc 結構域修飾是本領域已知的，包括增加與啟動受體(例如，FcγRIIA (CD16A))結合的修飾和降低與抑制受體(例如，FcγRIIB (CD32B))結合的修飾(參見 Stavenhagen, J.B.等(2007) "*Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcgamma Receptors*," Cancer Res. 57(18):8882-8890)。具有 y 與 CD32B 降低的結合和/或與 CD16A 增加的結合的人 IgG1 Fc 結構域的示例性變體包含 F243L、R292P、Y300L、V305I 或 P296L 取代。這些氨基酸取代可以任何組合出現在人 IgG1 Fc 結構域中。在一個實施方式中，人 IgG1 Fc 結構域變體包含 F243L、R292P 和 Y300L 取代。在另一實施方式中，人 IgG1 Fc 結構域變體包含 F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P296L 取代。在另一實施方式中，人 IgG1 Fc 結構域變體包含 N297Q 取代、L234A 和 L235A 取代或 D265A 取代，因為這些突變消除了 FcR 結合。

【0154】 III.三特異性結合分子的例證：具有結合 CD3 和 CD8 的表位和結合疾病相關的抗原的表位的結合結構域的三特異性結合分子

【0155】 如上述，在一些實施方式中，在三特異性結合分子選擇三個表位，使得這樣的表位中的一個或兩個是免疫系統細胞的表位(一個或多個)，尤其是細胞毒性淋巴細胞免疫系統細胞(CTL)的表位(一個或多個)，並且，其中剩餘的表位(一個或多個)是疾病相關的抗原的表位(一個或多個)。在一些實施方式中，三特異性結合分子的結合結構域使得

表位 I、表位 II 和表位 III 其中的第一個是 CD3 的表位，表位 I、表位 II 和表位 III 其中的第二個是 CD8 的表位，和表位 I、表位 II 和表位 III 其中的第三個是疾病相關的抗原的表位，其中這樣的三特異性結合分子的結合結構域 I、II 和 III 介導細胞毒性 T 細胞和表達疾病相關抗原的細胞的配位結合。這樣的三特異性結合分子能夠將細胞毒性淋巴細胞定位至表達疾病相關的抗原的細胞，和從而利於殺傷表達疾病相關的抗原的細胞。疾病相關的抗原可以是癌症抗原，或可以是特徵為病原體(例如，細菌、真菌、病毒或原生動物)感染的抗原。更具體地，本發明涉及這樣的三特異性結合分子，其能夠介導與以下的配位結合：(1)CD3 的表位、(2)CD8 的表位、和(3)疾病相關的抗原的表位。通過結合 CD3 和 CD8 和結合疾病相關的抗原，這樣的分子將細胞毒性 T 細胞共定位至呈遞疾病相關的抗原的細胞，導致這樣的 T 細胞的啟動和針對表達疾病相關的抗原的細胞的細胞毒性應答的啟動。

【0156】 抗 CD3 或抗 CD8 抗體的重鏈可被採用作為根據本發明任一實施方式的示例性三特異性結合分子的第三多肽鏈。同樣地，這樣的抗體的輕鏈可被採用作為根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子的第四多肽鏈。可選地，這樣的抗體的輕鏈可變結構域和/或重鏈可變結構域可結合其他免疫球蛋白固定區以獲得這樣的第三和第四多肽鏈。因此，這樣的抗體可用於產生根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子，其位點 C 能夠結合 CD3 或 CD8。

【0157】 類似地，這樣的可變結構域可併入到根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子的第一和第三多肽的可變結構域部分，從而產生根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子，其位點 A 能夠結合 CD3 或 CD8，或其位點 B 能夠結合 CD3 或 CD8。

【0158】 **1.示例性抗 CD3 抗體**

【0159】 可採用下面提供的任何示例性抗 CD3 或抗 CD8 抗體製備根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子的 CD3 或 CD8 結合結構域。

【0160】 **《OKT3》**

【0161】 OKT3 輕鏈可變結構域(**SEQ ID NO:17**) (CDR 以底線顯示)：

QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTC**SASSSVS YMN**WYQQKSG TSPKRWIY**DT SKLAS**GVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYC**QQW SSNPFTF**GSG TKLEINR。

【0162】 OKT3 重鏈可變結構域(**SEQ ID NO:18**) (CDR 以底線顯示)：

QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT **RYTMH**WVKQR PGQGLEWIG**Y INPSRGYTNY NQKFKD**KATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCAR**YY DDHYCL**DYWG QGTTLTVSSA KTTAPSVYPL APVCGDTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT SS。

【0163】 **《M291》**

【0164】 M291 輕鏈可變結構域(**SEQ ID NO:19**) (CDR 以底線顯示)：

DIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTC**SASSSVS YMN**WYQQKSG TSPKRWTY**DT SKLAS**GVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DADTYYC**QQW SSNPPT**FGSG TKLEIK。

【0165】 M291 重鏈可變結構域(**SEQ ID NO:20**) (CDR 以底線顯示)：

QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFI **SYTMH**WVKQR PGQGLEWIG**Y INPRSGYTHY NQKLKD**KATL TADKSSSSAY MQLSSLTSED SAVYYCAR**SA YYDYDGFAY**W GQGTLVTVSA。

【0166】 **《YTH12.5》**

【0167】 YTH12.5 輕鏈可變結構域(**SEQ ID NO:21**) (CDR 以底線顯示)：

MGWSCIILFL VATATGVHSD IQLTQPNSVS TSLGSTVKLS C**TLSSGNIEN NYVH**WYQLYE GRSPTTMIY**D DDKRPD**GVPD RFSGSIDRSS NSAFLTIHNV AIEDEAIYFC **HSYVSSFNV**F GGGTKLTVLR。

【0168】 YTH12.5 重鏈可變結構域(**SEQ ID NO:22**) (CDR 以底線顯示)：

MGWSCIILFL VATATGVHSE VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTF**SS FPMA**WVRQAP GKGLEWVS**TI STSGGRTYYR DSVKG**RFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCAK**FRQ YSGGFDY**WGQ GTLVTVSS。

【0169】 **《人源化的抗 CD3 抗體 1 (“CD3 mAb 1”) (參見 US2014/0099318A1)》**

【0170】 CD3 mAb 1 輕鏈可變結構域(**SEQ ID NO:23**)變體 1 (CDR 以底線顯示)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**SASSSVS** **YMN**WYQQKPG KAPKRLIY**DS SKLAS**GVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYC**QQW SRNPPT**FGGG TKVEIK。

【0171】 CD3 mAb 1 輕鏈可變結構域(**SEQ ID NO:24**)變體 2 (CDR 以底線顯示)：

DVVMTQSPAI MSAFPGEKVT ITC**SASSSVS** **YMN**WYQQKPG KAPKRWIY**DS SKLAS**GVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYC**QQW SRNPPT**FGGG TKVEIK。

【0172】 CD3 mAb 1 重鏈可變結構域(**SEQ ID NO:25**)變體 1 (CDR 以底線顯示)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT **RSTMH**WVRQA PGQGLEWIG**Y INPSSAYTNY** **NQKFKD**RVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAS**PQ VHYDYNGFPY** WGQGTLVTVS S。

【0173】 《人源化的抗 CD3 抗體 2 (“CD3 mAb 2”) (參見 US2014/0099318A1) 》

【0174】 CD3 mAb 2 輕鏈可變結構域(**SEQ ID NO:26**) (CDR 以底線顯示)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCR**SSTGAVT** **TSNYAN**WVQQ KPGQAPRGLI G**GTNKRAP**WT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC **ALWYSNLWV**F GGGTKLTVLG。

【0175】 CD3 mAb 2 重鏈可變結構域(**SEQ ID NO:27**) (CDR 以底線顯示)：

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVGR **IRSKYNNYAT** **YYADSVKD**RF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR **HGNFGNSYVS** **WFAY**WGQGTL VTVSS。

【0176】 CD3 mAb 2 重鏈可變結構域 **D65G** 變體(**SEQ ID NO:28**) (CDR 以底線顯示)：

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVGR **IRSKYNNYAT** **YYADSVKG**RF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR **HGNFGNSYVS** **WFAY**WGQGTL VTVSS。

【0177】 2.示例性抗 CD8 抗體

【0178】 《OKT8 (“CD8 mAb 1”)》

【0179】 OKT8 輕鏈可變結構域(**SEQ ID NO:29**) (CDR 以底線顯示)：

DIVMTQSPAS LAVSLGQRAT ISC**RASESVD** **SYDNSLMH**WY QQKPGQPPKV LIY**LASNLES** GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YC**QQNNEDPY T**FGGGTKLEI KR。

【0180】 OKT8 重鏈可變結構域(**SEQ ID NO:30**) (CDR 以底線顯示)：

QVQLLESGPE LLKPGASVKM SCKA**SGYTFT** **DYNMH**WVKQS HGKSLEWIG**Y IYPYTGGTGY** **NQKFKN**KATL TVDSSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCARNF RYTYWYFDVW GQGTTVTVSS。

【0181】 《TRX2 (“CD8 mAb 2”)》

【0182】 TRX2 輕鏈可變結構域(**SEQ ID NO:31**) (CDR 以底線顯示)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**KGSQDIN NYLA**WYQQKP GKAPKLLIY**N TDILHT**GVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYC**YQ YNNGYT**FGQG TKVEIK。

【0183】 TRX2 重鏈可變結構域(**SEQ ID NO:32**) (CDR 以底線顯示)：

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS **DFGMN**WVRQA PGKGLEWVA**L IYYDGSNKFY ADSVKG**RFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAK**PH YDGYYHFFDS** WGQGTLVTVS S。

【0184】 **3.結合疾病相關的抗原的表位的示例性結合結構域**

【0185】 **(a) HIV gp41**

【0186】 示意性疾病相關的抗原是 HIV gp41。示例性 gp41 抗體是 7B2 ("**HIV mAb 1**")。

【0187】 7B2 輕鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ **ID NO:35**)：

DIVMTQSPDS LAVSPGERAT IHCK**SSQTLL YSSN**NRHSIA WYQQRPGQPP KLLLYWASMR LSGVPDRFSG S**GSGTD**FTLT INNLQAEDVA IYYCHQY**SSH PPT**FGHGTRV EIK。

【0188】 7B2 重鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ **ID NO:36**)：

QVQLVQSGGG VFKPGGSLRL SCE**ASGFTFT EY**YMTWVRQA PGKGLEWLAY ISKNGEYSKY SPSSNGRFTI SR**DNAKNS**VF LQLDRLSADD TAVYYCAR**AD GLTYFSELLQ YIFDL**WGQGA RVTVSS。

【0189】 **(b) HIV gp120**

【0190】 第二示意性疾病相關的抗原是 HIV gp120。示例性 gp120 抗體是 A32 ("**HIV mAb 2**")。

【0191】 A32 VL 輕鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ **ID NO:33**):

QSALTQPPSA SGSPGQSVTI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQH HPGKAPKLII SEVNNRPSGV PDRFSGSKSG NTASLTVSGL QAEDEAEYYC SSYTDIHNFV FGGGTKLTVL。

【0192】 A32 VH 重鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ **ID NO:34**):

QVQLQESGPG LVKPSQTLSL SCTVSGGSSS SGAHYWSWIR QYPGKGLEWI GYIHYSGNTY YNPSLKSRIT ISQHTSENQF SLKLNSVTVA DTAVYYCARG TRLRTLRNAF DIWGQGTMVT VSS。

【0193】 **(c) RSV 糖蛋白 F**

【0194】 另外的示意性疾病相關的抗原是 RSV 糖蛋白 F。示例性抗 RSV 糖蛋白 F 抗體是帕利珠單抗("**RSV mAb 1**")。

【0195】 帕利珠單抗輕鏈可變結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:37**):

DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCRASQSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSRFSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIK。

【0196】 帕利珠單抗重鏈可變結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:38**):

QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLS TSGMSVGWIR

QPPGKALEWL ADIWWDDKKD YNPSLKSRLT ISKDTSKNQV

VLKVTNMDPA DTATYYCARS MITNWYFDVW GAGTTVTVSS

【0197】 **(d) B7-H3**

【0198】 尤其優選的示意性疾病相關的抗原是 B7-H3，其在各種癌症細胞上表達(例如，成神經細胞瘤、胃癌、卵巢癌和非小細胞肺癌等)。已經在腫瘤細胞系中免疫組織學檢測到 B7-H3 蛋白質表達(Chapoval, A.等(2001) "*B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN-γ Production*," Nature Immunol. 2:269–274；Saatian, B.等(2004) "*Expression Of Genes For B7-H3 And Other T Cell Ligands By Nasal Epithelial Cells During Differentiation And Activation*," Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 287:L217–L225；Castriconi 等(2004) "*Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis*," Proc. Natl. Acad. Sci. (美國) 101(34):12640-12645)；Sun, M.等(2002) "*Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes*," J. Immunol. 168:6294-6297)。已經在心臟、腎、睾丸、肺、肝、胰腺、前列腺、結腸和成骨細胞細胞中發現了 mRNA 表達(參見 Collins, M.等(2005) "*The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands*," Genome Biol. 6:223.1-223.7)。在蛋白質水準，在人肝、肺、膀胱、睾丸、前列腺、乳房、胎盤和淋巴器官中發現 B7-H3 (參見 Hofmeyer, K.等(2008) "*The Contrasting Role Of B7-H3*," Proc. Natl. Acad. Sci. (美國) 105(30):10277-10278)。結合 B7-H3 的示意性抗體包括人源化的

“**BRCA84D**”、“**BRCA69D**”和“**PRCA157**”(參見 WO 2011/109400)。示例性輕鏈和重鏈可變鏈具有下述序列(CDR 以底線顯示)。

【0199】 示例性人源化的 BRCA84D-5VL 輕鏈可變結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:39**):

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITC**KASQNVD TNVA**WYQQKP GQAPKALIY**S ASYRYS**GVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC**QQ YNNYPFT**FGQ GTKLEIK。

【0200】示例性人源化的 BRCA84D-2VH 重鏈可變結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:40**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFTFS SFGMH**WVRQA PGKGLEWVA**Y ISSDSSAIYY ADTVK**GRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCGR**GR ENIYYGSRLD Y**WGQGTTVTV SS。

【0201】 示例性 BRCA69D (“**B7-H3 mAb 1**”)輕鏈可變結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:41**):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**RASQDIS NYLN**WYQQKP GKAPKLLIY**Y TSRLHS**GVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYC**QQ GNTLPPT**FGG GTKLEIK。

【0202】 示例性 BRCA69D (“**B7-H3 mAb 1**”)重鏈可變結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:42**):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKAS**GYTFT SYWMQ**WVRQA PGQGLEWMG**T IYPGDGDTRY TQKFK**GRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG IPRLWYFDVW GQGTTVTVSS。

【0203】 示例性 PRCA157 輕鏈可變結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:43**)：

DIQMTQSPAS LSVSVGETVT ITC**RASESIY SYLA**WYQQKQ GKSPQLLVY**N TKTLPE**GVPS RFSGSGSGTQ FSLKINSLQP EDFGRYYC**QH HYGTPPW**TFG GGTNLEIK。

【0204】示例性 PRCA157 重鏈可變結構域的氨基酸序列(**SEQ ID NO:44**)：

EVQQVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS **SYGMS**WVRQT PDKRLEW**VAT INSGGSNTYY PDSLKG**RFTI SRDNAKNTLY LQMRSLKSED TAMYYCAR**HD GGAMDY**WGQG TSVTVSS。

【0205】 **(e) A33 腫瘤抗原**

【0206】 A33 腫瘤抗原是另一示意性疾病相關的抗原。示例性人源化的抗 A33 抗體(“**gpA33 mAb 1**”)的輕鏈可變結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:45**)：

QIVLTQSPAI MSASPGERVT MTC**SARSSIS FMY**WYQQKPG SSPRLLIY**DT SNLAS**GVPVR FSGSGSGTSY SLTISRMEAE DAATYYC**QQW SSYPLT**FGSG TKLELKR。

【0207】這樣的示例性人源化的抗 A33 (**gpA33 mAb 1**)抗體的重鏈可變結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:46**)：

QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYTFS GSWMN**WVKQR PGQGLEWIG**R IYPGDGETNY NGKFKD**KATL TADKSSTTAY MELSSLTSVD SAVYFCAR**IY GNNVYFDV**WG AGTTVTVSS。

【0208】 **(f) 5T4 腫瘤抗原**

【0209】 5T4 腫瘤抗原是另一示意性疾病相關的抗原。示例性人源化的抗 5T4 mAb 1 抗體(“**5T4 mAb 1**”)的輕鏈可變結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:47**)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**RASQGIS NYLA**WFQQKP GKAPKSLIY**R ANRLQS**GVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYC**LQ YDDFPWT**FGQ GTKLEIK。

【0210】 這樣的示例性人源化的 5T4 mAb 1 的重鏈可變結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:48**)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKAS**GYTFT SFWMH**WVRQA PGQGLEWMG**R IDPNRGGTEY NEKAKS**RVTM TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAG**GN PYYPMDY**WGQ GTTVTVSS。

【0211】 第二示例性人源化的 5T4 mAb 2 抗體(“**5T4 mAb 2**”)的輕鏈可變結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:49**)：

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISC**RSSQSIV YSNGNTYLE**W YLQKPGQSPK LLIY**KVSNRF S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYC**FQGSHVP FT**FGSGTKLE IK。

【0212】 這樣的第二示例性人源化的 5T4 mAb 2 的重鏈可變結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:50**)：

QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKAS**GYTFT SYWIT**WVKQR PGQGLEWIG**D IYPGSGRANY NEKFKS**KATL TVDTSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCAR**YG PLFTTVVDPN SYAMDY**WGQG TSVTVSS。

【0213】 **(g) ROR1 抗原**

【0214】ROR1 腫瘤抗原是另一示意性疾病相關的抗原。示例性抗 ROR1 抗體包括抗體 2A2 (參見 WO 2010/124188)、R11 (參見 WO 2012/075158)和 R12 (參見 WO 2012/075158)。

【0215】 2A2 抗體的輕鏈可變結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:53**)：

DIVMTQSQKI MSTTVGDRVS ITC**KASQNVD AAVA**WYQQKP GQSPKLLIY**S ASNRYT**GVPD RFTGSGSGTD FTLTISNMQS EDLADYFC**QQ YDIYPYT**FGG GTKLEIK。

【0216】 2A2 抗體的重鏈可變結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:54**)：

QVQLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFS **DYEMH**WVIQT PVHGLEWIG**A IDPETGGTAY NQKFKG**KAIL TADKSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCTG**YY DYDSFTY**WGQ GTLVTVSA。

【0217】 R11 抗體的輕鏈可變結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:55**)：

ELVMTQTPSS TSGAVGGTVT INC**QASQSID SNLA**WFQQKP GQPPTLLIY**R ASNLAS**GVPS RFSGSRSGTE YTLTISGVQR EDAATYYC**LG GVGNVSYRTS** FGGGTEVVVK。

【0218】 R11 抗體的重鏈可變結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:56**)：

QSVKESEGDL VTPAGNLTLT CTASGSDIN**D YPIS**WVRQAP GKGLEWIG**FI NSGGSTWYAS WVKG**RFTISR TSTTVDLKMT SLTTDDTATY FCAR**GYSTYY GDFNI**WGPGT LVTISS。

【0219】 R12 抗體的輕鏈可變結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:57**)：

ELVLTQSPSV SAALGSPAKI TC**TLSSAHKT** **DTID**WYQQLQ GEAPRYLMQV QSD**GSYTKRP** GVPDRFSGSS SGADRYLIIP SVQADDEADY YC**GADYIGGY V**FGGGTQLTV TG。

【0220】 R12 抗體的重鏈可變結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:58**)：

QEQLVESGGR LVTPGGSLTL SCKASGFDFS **AYYMS**WVRQA PGKGLEWIA**T IYPSSGKTYY** **ATWVNG**RFTI SSDNAQNTVD LQMNSLTAAD RATYFCAR**DS YADDGALFNI** WGPGTLVTIS S。

【0221】 在另一個方面(下面詳細討論)中，提供了一種人源化的抗 ROR1 抗體(“**ROR1 mAb 1**”)。優選地，ROR1 mAb 1 的輕鏈可變結構域具有序列(**SEQ ID NO:51**)：

QLVLTQSPSA SASLGSSVKL TC**TLSSGHKT** **DTID**WYQQQP GKAPRYLMK**L EGSGSY**NKGS GVPDRFGSGS SSGADRYLTI SSLQSEDEAD YYC**GTDYPGN YL**FGGGTQLT VL。

【0222】 這樣的更優選的人源化的 ROR1 mAb 1 的重鏈可變結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:52**)：

QEQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFTFS** **DYYMS**WVRQA PGKGLEWVA**T IYPSSGKTYY** **ADSVKG**RFTI SSDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAR**DS YADDAALFDI** WGQGTTVTVS S。

【0223】 IV. 結合位點：位點 A、位點 B 和位點 C 的選擇

【0224】 如上述，優選地，三特異性結合分子至少是三特異性的，

其具有“**外部**”**雙抗體型結合結構域(位點 A)**，其距離結合結構域 III 最遠；“內部”**雙抗體型結合結構域(位點 B)**，其距離結合結構域 III 最近；和**結合結構域 III** 本身**(位點 C)**。如本文所使用，三特異性結合分子比如“**X/Y/Z**”的描述指示 X 結合結構域是在位點 A，Y 結合結構域是在位點 B 和 Z 結合結構域是在位點 C。例如，三特異性結合分子命名“**B7-H3 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**”指示 B7-H3 mAb 1 可變結構域佔據三特異性結合分子的位點 A，CD3 mAb 2 可變結構域佔據位元點 B 和 CD8 mAb 1 可變結構域佔據三特異性結合分子的位點 C。

【0225】 因此允許選擇這樣的位點中的哪一個用於結合具體的期望的表位。指導這樣選擇的一個因素，尤其結合 CD3、CD8 和疾病相關的抗原的三特異性結合分子，涉及考慮胞啃(trogocytosis)的作用和對其的期望。“**胞啃**”是細胞可獲取一部分接觸細胞的細胞膜的過程(參見 Masuda, S. 等 (2013) “*Possible Implication Of Fc γ Receptor-Mediated Trogocytosis In Susceptibility To Systemic Autoimmune Disease*,” Clin. Dev. Immunol. 2013: 文章 ID 345745，6 頁)；Dhainaut, M.等(2014) “*Regulation of Immune Reactivity by Intercellular Transfer*,” Front Immunol. 5:112；Ahmed, K.A.等(2011) “*Mechanisms Of Cellular Communication Through Intercellular Protein Transfer*,” J. Cell. Mol. Med. 15(7):1458-1473；Ahmed, K.A. 等(2008) “*Intercellular Trogocytosis Plays An Important Role In* Modulation *Of Immune Responses*,” Cell. Mol. Immunol. 5(4):261-269；LeMaoult, J.等(2007) “*Exchanges Of Membrane Patches (Trogocytosis) Split Theoretical And Actual Functions Of Immune Cells*,” Hum. Immunol. 68(4):240-243；Caumartin. J.等

(2006) "*Intercellular Exchanges Of Membrane Patches (Trogocytosis) Highlight The Next Level Of Immune Plasticity*," Transpl. Immunol. 17(1):20-22)。

【0226】 通過胞啃採集相關的 I 類 MHC 配體誘導細胞毒性 T 淋巴細胞成為"**獲取的 Treg**"細胞，其介導殺傷("**殘殺**")其他細胞毒性 T 細胞，從而有助於清除 $CD8^+$細胞(參見 D'Acquisto, F.等(2011) "*$CD3^+$ $CD4^-$ $CD8^-$ (Double Negative) T Cells: Saviours Or Villains Of The Immune Response?*" Biochem. Pharmacol. 82:333-340；Joly, E.等(2003) "*What Is Trogocytosis And What Is Its Purpose*?" Nat. Immunol. 4:815-；Hudrisier, D.等(2007) "*Capture Of Target Cell Membrane Components Via Trogocytosis Is Triggered By A Selected Set Of Surface Molecules On T Or B Cells*," J. Immunol. 178:3637-3647)。

【0227】 在一些實施方式中，具備 CD3 結合結構域作為其位元點 C 位置的三特異性結合分子具有抗 CD3 抗體的屬性，並且類似地具備 CD8 結合結構域作為其位元點 C 位置的這樣的三特異性結合分子具有抗 CD8 抗體的屬性。已經顯示具有結合抗 CD8 抗體 (已經結合 T 細胞的 CD8 分子)的 Fc 結構域的 Fc 受體的嗜中性粒細胞、單核細胞或巨噬細胞能夠經胞啃將抗體和結合的 CD8 分子從 T 細胞轉移至其本身並且然後能夠快速內化抗體；旁觀者(bystander)分子，比如 TCR 和 CD3 也可在此過程中轉移(參見 Masuda, S. 等，(2013) "*Possible Implication of Fcg Receptor-Mediated Trogocytosis in Susceptibility to Systemic Autoimmune Disease*," Clin. Develop. Immunol. 2013: 文章 ID 345745，6 頁)。

【0228】 CD3 和 CD8 的結構不同在於 CD3 靠近細胞膜，而 CD8 進一步從細胞膜伸展。因此預期，CD3 通過抗 CD3 抗體的 Fc 受體胞啃比 CD8 通過抗 CD8 抗體的 Fc 受體胞啃更有效。

【0229】 此現象指示，CD3 結合結構域位於位元點 C 位置上的結合 CD3、CD8 和疾病相關的抗原的本發明的三特異性結合分子將展示比 CD3 結合結構域位於位元點 A 或位點 B 上的類似三特異性結合分子更少的細胞毒性。因此，通過選擇將 CD3 結合結構域佈置於位元點 C 位置上(與位點 A 或 B 相反)，可調節細胞毒性的程度。另外，可使包含“位點 C”和“位點 A (或 B)” CD3 的混合物的藥學組合物複合(compound)，以便獲得優選程度的細胞毒性。

【0230】 **V. 抗 ROR1 mAb 1 抗體**

【0231】 如上述，在另一個方面中，更提供了一種人源化的抗 ROR1 抗體(“**ROR1 mAb 1**”)，其輕鏈可變結構域具有氨基酸序列(**SEQ ID NO:51**)：

QLVLTQSPSA SASLGSSVKL TC**TLSSGHKT DTID**WYQQQP GKAPRYLMK**L EGSGSY**NKGS GVPDRFGSGS SSGADRYLTI SSLQSEDEAD YYC**GTDYPGN YL**FGGGTQLT VL；

和其重鏈可變結構域具有氨基酸序列(**SEQ ID NO:52**)：

QEQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFTFS DYYMS**WVRQA PGKGLEWVA**T IYPSSGKTYY ADSVKG**RFTI SSDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAR**DS YADDAALFDI** WGQGTTVTVS S。

【0232】 這樣的 ROR1 mAb 1 抗體的輕鏈可變結構域的 CDR_L1、CDR_L2 和 CDR_L3 的序列是：輕鏈可變結構域 CDR_L1(**SEQ ID**

NO:117)：TLSSGHKTDTID、輕鏈可變結構域 CDR_L2(**SEQ ID NO:118**)：LEGSGSY、輕鏈可變結構域 CDR_L3(**SEQ ID NO:119**)：GTDYPGNYL。

【0233】 這樣的 ROR1 mAb 1 抗體的重鏈可變結構域的 CDR_H1、CDR_H2 和 CDR_H3 的序列是：重鏈可變結構域 CDR_H1 (**SEQ ID NO:120**)：GFTFSDYYMS、重鏈可變結構域 CDR_H2(**SEQ ID NO:121**)：TIYPSSGKTYYADSVKG、重鏈可變結構域 CDR_H3(**SEQ ID NO:122**)：DSYADDAALFDI。

【0234】 ROR1 mAb 1 抗體介導增加的細胞毒性並且相對於現有技術抗 ROR1 抗體(例如，抗 ROR1 抗體 R12)免疫原性較小。

【0235】 不僅僅包括這樣的序列，而也包括完整的 ROR1 mAb 1 抗體衍生物(包括其嵌合或人源化的衍生物)，其具有這樣的輕鏈可變結構域的 CDR 中的 1、2 或 3 個(**SEQ ID NO:51**，CDR 以底線顯示)或這樣的重鏈可變結構域的 CDR 中的 1、2 或 3 個 (**SEQ ID NO:52**；CDR 以底線顯示)，並且其免疫特異性結合 ROR1。更優選地，這樣被包括的抗體、嵌合抗體和人源化的抗體具有這樣的輕鏈可變結構域的 CDR 中的 1、2 或 3 個 (**SEQ ID NO:51**，CDR 以底線顯示)並且也具備這樣的重鏈可變結構域的 CDR 中的 1、2 或 3 個(**SEQ ID NO:52**；CDR 以底線顯示)，並且免疫特異性結合 ROR1。最優選地，這樣被包括的抗體、嵌合抗體和人源化的抗體具有這樣的輕鏈可變結構域的所有 3 個 CDR，和這樣的重鏈可變結構域的所有 3 個 CDR，並且能夠免疫特異性結合 ROR1。

【0236】 另外，被包括的 ROR1 mAb 1 抗體的片段和衍生物，其包括 Fab、Fab'、$F(ab')_2$ Fv、單鏈(ScFv)，“BiTEs®”、“DART™”

雙抗體分子，其突變體、天然存在的變體和融合蛋白，其均包括輕鏈可變結構域 CDR 中的 1、2 或 3 個、或重鏈可變結構域 CDR 中的 1、2 或 3 個、或輕鏈可變結構域 CDR 中的 1、2 或 3 個以及重鏈可變結構域 CDR 中的 1、2 或 3 個，並且其能夠免疫特異性結合 ROR1。

【0237】 在優選的實施方式中， ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段或衍生物可具有變異的 Fc 結構域。Fc 結構域的修飾通常導致改變的表型，例如改變的血清半衰期、改變的穩定性、改變的對細胞酶的易感性或改變的效應子功能。就效應子功能而言，可期望修飾抗體，以便增強例如抗體治療癌症的效力。在某些情況下，例如在作用機制涉及阻斷或拮抗但是不殺傷攜帶靶抗原的細胞的抗體的情況下，期望降低或消除效應子功能。當針對非期望的細胞，比如腫瘤和外源細胞時，通常期望增加效應子功能，其中 FcγRs 以低水準表達，例如，具有低水準 FcγRIIB 的腫瘤特異性 B 細胞(例如，非霍奇金淋巴瘤、CLL 和伯基特淋巴瘤)。在此實施方式中，具有賦予的或增強效應子功能活性的根據本發明任一實施方式的分子可用於治療和/或預防其中期望增強效應子功能活性的效力的疾病、病症或感染。

【0238】 在某些實施方式中， ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段或衍生物包括對 Fc 結構域氨基酸的一個或多個修飾，其降低這樣的分子的 Fc 結構域對一個或多個 FcγR 受體的親和性和抗體親抗原性。在其他實施方式中， ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段或衍生物可包括對 Fc 結構域的氨基酸的一個或多個修飾，其增加這樣的分子的 Fc 結構域對一個或多個 FcγR 受體的親和性和抗體親抗原性。在其他實施方式中，分子包括變異的 Fc 結構域，其中此變異相對於不包括 Fc 結構域或包括野生型 Fc 結構域的分子賦予或介導增加的 ADCC 活性和/或對 FcγRIIA

增加的結合。在可選的實施方式中，分子包括變異的 Fc 結構域，其中此變異相對於不包括 Fc 結構域或包括野生型 Fc 結構域的分子，賦予或介導降低的 ADCC 活性(或其他效應子功能)和/或對 FcγRIIB 增加的結合。

【0239】 在一些實施方式中，ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段或衍生物，其包括變異的 Fc 結構域，此變異的 Fc 結構域相對於包括野生型 Fc 結構域的可比較的分子不顯示對任何 FcγR 的可檢測的結合。在其他實施方式中，這樣的 ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段或衍生物，其包括變異的 Fc 結構域，此變異的 Fc 結構域僅僅結合單個 FcγR，優選地 FcγRIIA、FcγRIIB，或 FcγRIIIA 中之一。

【0240】 ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段或衍生物可包括對啟動和/或抑制 Fcγ 受體的改變的親和力。在一個實施方式中，抗體或分子包括變異的 Fc 結構域，其相對於具有野生型 Fc 結構域的可比較的分子，對於 FcγRIIB 具有增加的親和性和對於 FcγRIIIA 和/或 FcγRIIA 具有降低的親和性。在另一實施方式中， ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段或衍生物可包括變異的 Fc 結構域，其相對於具有野生型 Fc 結構域的可比較的分子，對於 FcγRIIB 具有降低親和性和對於 FcγRIIIA 和/或 FcγRIIA 具有增加的親和性。在又另一實施方式中，ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段或衍生物包括變異的 Fc 結構域，其相對於具有野生型 Fc 結構域的可比較的分子，對於 FcγRIIB 具有降低的親和性和對於 FcγRIIIA 和/或 FcγRIIA 具有降低的親和性。在又另一實施方式中，ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段或衍生物可包括變異的 Fc 結構域，其相對於具有野生型 Fc 結構域的可比較的分子，對於 FcγRIIB 具有不變親和性和對於 FcγRIIIA 和/或 FcγRIIA 具有降低的(或增加)親和性。

【0241】 在某些實施方式中，ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段或衍生物，其包括變異的 Fc 結構域，具有對於 FcγRIIIA 和/或 FcγRIIA 改變的親和性，使得免疫球蛋白具有增強的效應子功能，例如，ADCC。效應細胞功能的非限制性例子包括 ADCC，抗體依賴性細胞吞噬(ADCP)、吞噬、調理作用、調理吞噬、細胞結合、蓮座(rosetting)、C1q 結合和 CDC。

【0242】 在優選的實施方式中，相對於包括野生型 Fc 結構域的可比較的分子，親和性或效應子功能的改變是至少 2 倍，優選地至少 4 倍、至少 5 倍、至少 6 倍、至少 7 倍、至少 8 倍、至少 9 倍、至少 10 倍、至少 50 倍或至少 100 倍。在本發明的其他實施方式中，相對於包括野生型 Fc 結構域的分子，變異的 Fc 結構域以至少 65%，優選地至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、225%或 250%更大的親和性特異性結合一個或多個 FcR。這樣的測量可以是體內或體外試驗，並且，在優選的實施方式中，是體外試驗比如 ELISA 或表面等離子共振試驗。

【0243】 在不同的實施方式中，ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段或衍生物包括變異的 Fc 結構域，其中此變異激動(agonize) FcγR 受體的至少一種活性，或拮抗 FcγR 受體的至少一種活性。在優選的實施方式中，分子包括變體，其激動(或拮抗)FcγRIIB 的一個或多個活性，例如，B 細胞受體介導的信號傳導、B 細胞的啟動、B 細胞增殖、抗體產生、B 細胞的細胞內鈣流入、細胞週期進程、FcγRIIB 介導的 FcεRI 信號傳導的抑制、FcγRIIB 的磷酸化、SHIP 募集、SHIP 磷酸化和與 Shc 的締合，或激動(或拮抗)FcγRIIB 信號轉導途徑中一個或多個下游分子(例如，MAP 激酶、JNK、p38 或 Akt)的活性。在另一實施方式中，分子

包括變體，其激動(或拮抗)FcεRI 的一個或多個活性，例如，肥大細胞啟動、鈣動員、脫粒、細胞因數產生或血清素釋放。

【0244】 在某些實施方式中， ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段包括來自兩個或更多個 IgG 同種型(例如，IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4)的包含 Fc 結構域的結構域。各種 IgG 同種型展示不同的物理和功能特性，包括血清半衰期，補體活化，FcγR 結合親和力和效應子功能活性(例如 ADCC、CDC 等)，原因是它們鉸鏈和/或 Fc 結構域的氨基酸序列的差異，例如如在以下文獻中描述的：Flesch, B.K.和 Neppert, J. (1999)“*Functions Of The Fc Receptors For Immunoglobulin G*,” J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156；Chappel, M.S.等(1993) “*Identification Of A Secondary Fc Gamma RI Binding Site Within A Genetically Engineered Human IgG Antibody*,” J. Biol. Chem. 33:25124-25131；Chappel, M.S.等(1991) “*Identification Of The Fc Gamma Receptor Class I Binding Site In Human IgG Through The Use Of Recombinant IgG1/IgG2 Hybrid And Point-Mutated Antibodies*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:9036-9040；Brüggemann, M.等(1987) “*Comparison Of The Effector Functions Of Human Immunoglobulins Using A Matched Set Of Chimeric Antibodies*,” J. Exp. Med 166:1351-1361。此類型的變異的 Fc 結構域可單獨使用，或結合氨基酸修飾使用，以影響 Fc 介導的效應子功能和/或結合活性。氨基酸修飾和 IgG 鉸鏈/Fc 結構域的組合可展示類似的功能(例如，對於 FcγRIIA 的增加的親和性)並且可另外地或，更優選地，協同作用，以相對於包括野生型 Fc 結構域的分子，修飾分子的效應子功能。在其他實施方式中，氨基酸修飾和 IgG Fc 結構域可展示相反的功能(例如，分別增加和降低對於 FcγRIIA

的親和性)並且可用於相對於不包括 Fc 結構域或包括相同同種型的野生型 Fc 結構域的分子，選擇性調和或降低分子的特定功能。

【0245】 在優選的具體實施方式中，ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段包括變異的 Fc 結構域，其中此變異的 Fc 結構域相對於野生型 Fc 結構域包括至少一個氨基酸修飾，使得分子具有對於 FcR 改變的親和性，前提是此變異的Fc結構域基於Fc-FcR相互作用的晶體學和結構分析比如 Sondermann, P.等(2000)“*The 3.2-A Crystal Structure Of The Human IgG1 Fc Fragment-Fc GammaRIII Complex*,”Nature 406:267-273 中公開的那些，在直接接觸 FcγR 的位置沒有取代。Fc 結構域中直接接觸 FcγR 的位置的例子是氨基酸殘基 234-239 (鉸鏈結構域)、氨基酸殘基 265-269 (B/C 環)、氨基酸殘基 297-299 (C’/E 環)和氨基酸殘基 327-332 (F/G 環)。在一些實施方式中，本發明的分子包括變異的 Fc 結構域，其包括基於結構和晶體學分析不直接接觸 FcγR——例如不在 Fc-FcγR 結合位點中——的至少一個殘基的修飾。

【0246】 變異的 Fc 結構域是本領域熟知的，並且和任何已知的 Fc 變體可在任一實施方式中使用，以賦予或修飾 ROR1 mAb 1 抗體或包括 Fc 結構域(或其部分)的它們的片段展示的效應子功能，如在功能上分析的，例如，在 NK 依賴性或巨噬細胞依賴性試驗中。例如，鑒定為改變效應子功能的 Fc 結構域變體公開在下述文獻中：PCT 公開號 WO 04/063351、WO 06/088494、WO 07/024249、WO 06/113665、WO 07/021841、WO 07/106707、WO 2008/140603，並且其中公開的任何適當的變體可用於本分子。

【0247】 在某些實施方式中，ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段包括變異的 Fc 結構域，其在一個或多個位點中具有一個或多個氨基酸修飾，

此修飾(一個或多個)改變(相對於野生型 Fc 區)變異 Fc 區與啟動 FcγR (諸如 FcγRIIA 或 FcγRIIIA)相對於抑制性 FcγR (諸如 FcγRIIB)的親和性比：

$$\text{親和性比} = \frac{\text{在對}Fc\gamma R_{\text{啟動}}\text{的親和性中野生型到變體的變化}}{\text{在對}Fc\gamma R_{\text{抑制}}\text{的親和性中野生型到變體的變化}}。$$

【0248】 在 Fc 變體的親和力的比大於 1 的情況下，本發明的方法在提供期望增強 FcγR 介導的效應細胞功能(例如，ADCC)的效力的疾病、病症或感染——例如，癌症或感染疾病——的治療性或預防性治療或改善其症狀方面尤其有用，。在 Fc 變體的親和力的比小於 1 的情況下，本發明的方法在提供期望降低 FcγR 介導的效應細胞功能的效力疾病或病症——例如，自身免疫或炎症病症——的治療性或預防性治療或改善其症狀方面尤其有用。**表 3** 根據它們的親和力的比是否大於或小於 1 列舉了示例性單、雙、三、四和五個突變，並且有關這些突變的更多資訊可見 PCT 公開號 WO 04/063351、WO 06/088494、WO 07/024249、WO 06/113665、WO 07/021841、WO 07/106707、WO 2008/140603。

【0249】 **表 3：根據親和力的比列舉的示例性單和多突變**

比	單	雙	三	四	五
> 1	F243L D270E R292G R292P	F243L & R292P F243L & F243L & Y300L F243L & F243L & P396L	F243L 、 P247L & N421K F243L 、 R292P & Y300L	L234F 、 F243L 、 R292P & Y300L L235I 、 F243L 、	L235V 、 F243L 、 R292P 、 Y300L & P396L L235P 、

比	單	雙	三	四	五
		D270E & P396L R292P & Y300L R292P & V305I R292P & P396L Y300L & P396L P396L & Q419H	F243L 、R292P & V305I R292P & P396L F243L 、Y300L & P396L F243L 、P247L 、N421K R255L 、D270E & P396L F243L 、D270E 、G316D & R416G D270E 、K392T & P396L D270E 、P396L & F243L 、	R292P & Y300L L235Q 、F243L 、R292P & Y300L F243L 、R292P & Y300L D270E & N421K	F243L 、R292P 、Y300L & P396L F243L 、R292P 、V305I 、Y300L & P396L

比	單	雙	三	四	五
			Q419H、V284M、R292L & K370N、R292P、Y300L & P396L	D270E、P396L & Q419H、F243L、R292P、Y300L、& P396L、F243L、R292P、V305I & P396L、P247L、D270E、Y300L & N421K、R255L、D270E、R292G & P396L、R255L、D270E、Y300L & P396L	

比	單	雙	三	四	五
				D270E 、G316D 、P396L & R416G	
< 1	Y300L P396L	F243L & P396L P247L & N421K R255L & P396L R292P & V305I K392T & P396L P396L & Q419H	F243L 、R292P & V305I		

【0250】 在具體的實施方式中，在變異的 Fc 結構域中，任何氨基酸修飾(例如，取代)在下述任何位置：235、240、241、243、244、247、262、263、269、298、328，或 330，和優選地一個或多個下述殘基：A240、I240、L241、L243、H244、N298、I328 或 V330。在不同的具體實施方式中，在變異的 Fc 結構域中，任何氨基酸修飾(例如，取代)在下述任何位置：268、269、270、272、276、278、283、285、286、289、292、293、301、303、305、307、309、331、333、334、335、

337、338、340、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438 或 439，和優選地一個或多個下述殘基：H280、Q280、Y280、G290、S290、T290、Y290、N294、K295、P296、D298、N298、P298、V298、I300 或 L300。

【0251】 在優選的實施方式中，在以改變的親和性結合 FcγR 的變異的 Fc 結構域中，任何氨基酸修飾(例如，取代)在下述任何位置：255、256、258、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、300、301、303、305、307、309、312、320、322、326、329、330、332、331、333、334、335、337、338、339、340、359、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438 或 439。優選地，變異的 Fc 結構域具有任何下述殘基：A256、N268、Q272、D286、Q286、S286、A290、S290、A298、M301、A312、E320、M320、Q320、R320、E322、A326、D326、E326、N326、S326、K330、T339、A333、A334、E334、H334、L334、M334、Q334、V334、K335、Q335、A359、A360 或 A430。

【0252】 在不同的實施方式中，在以降低的親和性結合 FcγR (經其 Fc 結構域)的變異的 Fc 結構域中，任何氨基酸修飾(例如，取代)在下述任何位置：252、254、265、268、269、270、278、289、292、293、294、295、296、298、300、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438 或 439。

【0253】 在不同的實施方式中，在以增強的親和性結合 FcγR (經其 Fc 結構域)的變異的 Fc 結構域中，任何氨基酸修飾(例如，取代)在下

述任何位置：280、283、285、286、290、294、295、298、300、301、305、307、309、312、315、331、333、334、337、340、360、378、398，或 430。在不同的實施方式中，在以增強的親和性結合 FcγRIIA 的變異的 Fc 結構域中，任何下述殘基：A255、A256、A258、A267、A268、N268、A272、Q272、A276、A280、A283、A285、A286、D286、Q286、S286、A290、S290、M301、E320、M320、Q320、R320、E322、A326、D326、E326、S326、K330、A331、Q335、A337 或 A430。

【0254】 優選的變體包括在下述任何位置的一個或多個修飾：228、230、231、232、233、234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、271、273、275、281、284、291、296、297、298、299、302、304、305、313、323、325、326、328、330 或 332。

【0255】 尤其優選的變體包括選自 A-AI 組的一個或多個修飾:

A	228E、228K、228Y 或 228G；
B	230A、230E、230Y 或 230G；
C	231E、231K、231Y、231P 或 231G；
D	232E、232K、232Y、232G；
E	233D；
F	234I 或 234F；
G	235D、235Q、235P、235I 或 235V；
H	239D、239E、239N 或 239Q；
I	240A、240I、240M 或 240T；

J	243R、243、243Y、243L、243Q、243W、243H 或 243I；
K	244H；
L	245A；
M	247G、247V 或 247L；
N	262A、262E、262I、262T、262E 或 262F；
O	263A、263I、263M 或 263T；
P	264F、264E、264R、264I、264A、264T 或 264W；
Q	265F、265Y、265H、265I、265L、265T、265V、265N 或 265Q；
R	266A、266I、266M 或 266T；
S	271D、271E、271N、271Q、271K、271R、271S、271T、271H、271A、271V、271L、271I、271F、271M、271Y、271W 或 271G；
T	273I；
U	275L 或 275W；
V	281D、281K、281Y 或 281P；
W	284E、284N、284T、284L、284Y or284M；
X	291D、291E、291Q、291T、291H、291I 或 291G；
Y	299A、299D、299E、299F、299G、299H、299I、299K、299L、299M、299N、299P、299Q、299R、299S、299V、299W 或 299Y；
Z	302I；
AA	304D、304N、304T、304H 或 304L
AB	305I；
AC	313F；
AD	323I；

AE	325A、325D、325E、325G、325H、325I、325L、325K、325R、325S、325F、325M、325T、325V、325Y、325W 或 325P；
AF	328D、328Q、328K、328R、328S、328T、328V、328I、328Y、328W、328P、328G、328A、328E、328F、328H、328M 或 328N；
AG	330L、330Y、330I 或 330V；
AH	332A、332D、332E、332H、332N、332Q、332T、332K、332R、332S、332V、332L、332F、332M、332W、332P、332G 或 332Y；和
AI	336E、336K 或 336Y

【0256】 仍更尤其優選的變體包括選自 1-105 組的一個或多個修飾:

組	變體	組	變體
1	A330L /I332E	54	S239D /D265L /N297D /I332E
2	D265F /N297E /I332E	55	S239D /D265T /N297D /I332E
3	D265Y /N297D /I332E	56	S239D /D265V /N297D /I332E
4	D265Y /N297D /T299L /I332E	57	S239D /D265Y /N297D /I332E
5	F241E /F243Q /V262T /V264F	58	S239D /I332D
6	F241E /F243Q /V262T /V264E /I332E	59	S239D /I332E
7	F241E /F243R /V262E /V264R	60	S239D /I332E /A330I

8	F241E /F243R /V262E /V264R /I332E	61	S239D /I332N
9	F241E /F243Y /V262T /V264R	62	S239D /I332Q
10	F241E /F243Y /V262T /V264R /I332E	63	S239D /N297D /I332E
11	F241L /F243L /V262I /V264I	64	S239D /N297D /I332E /A330Y
12	F241L /V262I	65	S239D /N297D /I332E /A330Y /F241S /F243H /V262T /V264T
13	F241R /F243Q /V262T /V264R	66	S239D /N297D /I332E /K326E
14	F241R /F243Q /V262T /V264R /I332E	67	S239D /N297D /I332E /L235D
15	F241W /F243W /V262A /V264A	68	S239D /S298A /I332E
16	F241Y /F243Y /V262T /V264T	69	S239D /V264I /A330L /I332E
17	F241Y /F243Y /V262T /V264T /N297D /I332E	70	S239D /V264I /I332E
18	F243L /V262I /V264W	71	S239D /V264I /S298A /I332E
19	P243L /V264I	72	S239E /D265N

20	L328D /I332E	73	S239E /D265Q
21	L328E /I332E	74	S239E /I332D
22	L328H /I332E	75	S239E /I332E
23	L328I /I332E	76	S239E /I332N
24	L328M /I332E	77	S239E /I332Q
25	L328N /I332E	78	S239E /N297D /I332E
26	L328Q /I332E	79	S239E /V264I /A330Y /I332 E
27	L328T /I332E	80	S239E /V264I /I332 E
28	L328V /I332E	81	S239E /V264I /S298A /A330Y /I332E
29	N297D /A330Y /I332E	82	S239N /A330L /I332E
30	N297D /I332E	83	S239N /A330Y /I332E
31	N297D /I332E /S239D /A330L	84	S239N /I332D
32	N297D /S298A /A330Y /I332E	85	S239N /I332E
33	N297D /T299L /I332E	86	S239N /I332N
34	N297D /T299F /I332E /N297D /T299H /I332E	87	S239N /I332Q
35	N297D /T299I /I332E	88	S239N1S298A /I332E
36	N297D /T299L /I332E	89	S239Q /I332D
37	N297D /T299V /I332E	90	S239Q /I332E
38	N297E /I332E	91	S239Q /I332N

39	N297S /I332E	92	S239Q /I332Q
40	P230A /E233D /I332E	93	S239Q /V264I /I332E
41	P244H /P245A /P247V	94	S298A /I332E
42	S239D /A330L /I332E	95	V264E /N297D /I332E
43	S239D /A330Y /I332E	96	V264I /A330L /I332E
44	S239D /A330Y /I332E /K326E	97	V264I /A330Y /I332E
45	S239D /A330Y /I332E /K326T	98	V264I /I332E
46	S239D /A330Y /I332E /L234I	99	V264I /S298A /I332E
47	S239D /A330Y /I332E /L235D	100	Y296D /N297D /I332E
48	S239D /A330Y /I332E /V240I	101	Y296E /N297D /I332 E
49	S239D /A330Y /I332E /V264T	102	Y296H /N297D /I332E
50	S239D /A330Y /I332E /V266I	103	Y296N /N297D /I332E
51	S239D /D265F /N297D /I332E	104	Y296Q /N297I /I332E
52	S239D /D265H /N297D /I332E	105	Y296T /N297D /I332E

53	S239D /D265I /N297D /I332E		

【0257】 在一個實施方式中， ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段包括變異的 Fc 結構域，其在 Fc 結構域中具有至少一個修飾。在某些實施方式中，變異的 Fc 結構域包括選自下述的至少一個取代：L235V、F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P396L，其中此編號是如在 Kabat 中的 EU 索引的編號。在具體的實施方式中，變異的 Fc 結構域包括：(A)選自下述的至少一個取代：F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P396L；(B)選自下述的至少兩個取代：(1)F243L 和 P396L；(2)F243L 和 R292P；和(3)R292P 和 V305I；(C)選自下述的至少三個取代：(1)F243L、R292P 和 Y300L；(2)F243L、R292P 和 V305I；(3)F243L、R292P 和 P396L；和(4)R292P、V305I 和 P396L；(D)選自下述的至少四個取代：(1)F243L、R292P、Y300L 和 P396L；和(2)F243L、R292P、V305I 和 P396L；或(E)選自下述的至少五個取代：(1)F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P396L；和(2)L235V、F243L、R292P、Y300L 和 P396L。

【0258】 在另一具體的實施方式中，變異的 Fc 結構域包括下述取代：(A) F243L、R292P 和 Y300L；(B)L235V、F243L、R292P、Y300L 和 P396L；或(C)F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P396L。

【0259】 在其他實施方式中， ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段可具有本領域已知的任何 Fc 變體，比如下述文獻中公開那些：Jefferis, R. 等(2002) "*Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcgammaR: Current* Models," Immunol. Lett. 82:57-65；Presta, L.G.等(2002) "*Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function*,"

Biochem. Soc. Trans. 30:487-90；Idusogie, E.E. 等 (2001) "*Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement,*" J. Immunol. 166:2571-75；Shields, R.L. 等 (2001) "*High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc Gamma RI, Fc Gamma RII, Fc Gamma RIII, And FcRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc gamma R,*" J. Biol. Chem. 276:6591-6604；Idusogie, E.E.等(2000) "*Mapping Of The C1q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc,*" J. Immunol. 164:4178-84；Reddy, M.P.等(2000) "*Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4,*" J. Immunol. 164:1925-1933；Xu, D.等(2000) "*In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies,*" Cell. Immunol. 200:16-26；Armour, K.L.等(1999) "*Recombinant human IgG Molecules Lacking Fcgamma Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities,*" Eur. J. Immunol. 29:2613-24；Jefferis, R. 等 (1996) "*Modulation Of Fc(Gamma)R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions,*" Immunol. Lett. 54:101-04；Lund, J.等(1996) "*Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc Gamma Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains,*" J. Immunol. 157:4963-4969；Hutchins 等 (1995) "*Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A*

Gamma 4 Variant Of Campath-1H," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11980-84；Jefferis, R.等(1995) "*Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation*," Immunol. Lett. 44:111-17 ； Lund, J. 等 (1995) "*Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors*," FASEB J. 9:115-19 ； Alegre, M.L. 等 (1994) "*A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo*," Transplantation 57:1537-1543；Lund 等(1992) "*Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma R11*," Mol. Immunol. 29:53-59；Lund 等(1991) "*Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG*," J. Immunol. 147:2657-2662；Duncan, A.R.等(1988) "*Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG*," Nature 332:563-564；美國專利號 5,624,821、5,885,573、6,194,551、7,276,586；和 7,317,091；和 PCT 公開 WO 00/42072 和 PCT WO 99/58572。

【0260】 在一些實施方式中，ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段可進一步包括一個或多個糖基化位點，以便一個或多個碳水化合物部分共價連接至分子。優選地，相比未修飾的 ROR1 mAb 1 抗體或片段，在 Fc 結構域具有一個或多個糖基化位點和/或一個或多個修飾的這樣的 ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段賦予或具有增強的抗體介導效應子功能，例如，增強的 ADCC 活性。在一些實施方式中，ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段，其包括一個或多個已知直接或間接與 Fc 結構域的碳

水化合物部分相互作用的氨基酸修飾，包括但不限於在下述位置的氨基酸：241、243、244、245、245、249、256、258、260、262、264、265、296、299 和 301。直接或間接與 Fc 結構域的碳水化合物部分相互作用的氨基酸是本領域已知的，參見 Jefferis, R. 等(1995) "*Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation*," Immunol. Lett. 44:111-17。

【0261】 在另一實施方式中，ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段，其已經通過將一個或多個糖基化位點引入分子的一個或多個位點而被修飾，優選地不改變分子的功能，例如，與靶抗原或 FcγR 的結合活性。糖基化位點可引入本發明分子的可變區和/或固定區。如本文所使用，"糖基化位點"包括與寡糖(即，包含兩個或更多個連接在一起的單糖的碳水化合物)特異性和共價連接的抗體中任何具體的氨基酸序列。寡糖側鏈通常經 N-或 O-鍵連接至抗體的骨架。N-連接的糖基化指寡糖部分連接至天冬醯胺殘基的側鏈。O-連接的糖基化指寡糖部分連接至羥基氨基酸，例如，絲氨酸、蘇氨酸。這樣的 ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段可包括一個或多個糖基化位點，包括 N-連接和 O-連接的糖基化位點。本領域已知的用於 N-連接的或 O-連接的糖基化的任何糖基化位元點可根據本發明使用。示例性 N-連接的糖基化位點是氨基酸序列：Asn-X-Thr/Ser，其中 X 可以是任何氨基酸和 Thr/Ser 指示蘇氨酸或絲氨酸。這樣的一個或多個位點可使用本發明所屬領域熟知的方法引入根據本發明任一實施方式的分子(參見 *In vitro* Mutagenesis, Recombinant DNA: A Short Course, J. D. Watson 等 W.H. Freeman and Company, New York, 1983, 第 8 章, 106-116 頁，其通過引用以其整體併入本文)。用於將糖基化位點引入 ROR1 mAb 1 抗體或它們的

片段的示例性方法可包括：修飾或突變分子的氨基酸序列從而獲得期望的 Asn-X-Thr/Ser 序列，或表達具有這樣序列的編碼 ROR1 mAb 1 抗體的核酸分子。

【0262】 在一些實施方式中，通過添加或刪除糖基化位點，修飾 ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段的碳水化合物含量的方法。修飾抗體(和包括抗體結構域，例如 Fc 結構域，的分子)的碳水化合物含量的方法是本領域熟知的，並且包括在本發明內，參見美國專利號 6,218,149、EP 0 359 096 B1；美國公開號 US 2002/0028486、WO 03/035835、美國公開號 2003/0115614、美國專利號 6,218,149、美國專利號 6,472,511；其所有均通過引用以其整體併入本文。在其他實施方式中，通過刪除分子的一個或多個內源碳水化合物部分而修飾 ROR1 mAb 1 抗體或它們的片段的碳水化合物含量的方法。在具體的實施方式中，通過修飾臨近 297 的位置而移動抗體 Fc 結構域的糖基化位點。在具體的實施方式中，修飾 296 位以便 296 位而不是 297 位被糖基化。

【0263】 可通過比如下面描述的那些技術修飾效應子功能：PCT 公開號 WO 04/063351、WO 06/088494、WO 07/024249、WO 06/113665、WO 07/021841、WO 07/106707、WO 2008/140603，或通過其他方式。例如，可在 Fc 結構域中引入半胱氨酸殘基(一個或多個)，從而允許在此區域中的鏈間二硫鍵形成，導致產生可具有改善的內化能力和/或增強的補體介導的細胞殺傷和 ADCC 的同二聚抗體。參見 Caron, P.C.等(1992) "*Engineered Humanized Dimeric Forms Of IgG Are More Effective Antibodies*," J. Exp. Med. 176:1191-1195；Shopes, B. (1992) "*A Genetically Engineered Human IgG Mutant With Enhanced Cytolytic Activity*," J. Immunol. 148(9):2918-2922。

也可使用如 Wolff, E.A.等(1993) "*Monoclonal Antibody Homodimers: Enhanced Antitumor Activity In Nude Mice*," Cancer Research 53:2560-2565 中描述的異雙官能交聯劑製備具有增強的抗腫瘤活性的同二聚抗體。可選地，抗體可被工程化，其具有雙 Fc 結構域並且可從而具有增強的補體分解和 ADCC 能力(參見 Stevenson, G.T.等(1989) "*A Chimeric Antibody With Dual Fc Domains (bisFabFc) Prepared By Manipulations At The IgG Hinge*," Anti-Cancer Drug Design 3:219-230)。

【0264】 CDR 殘基的單個氨基酸改變可導致喪失功能的結合的事實(參見 Rudikoff, S.等。(1982) "*Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Spec*ificity," Proc. Natl. Acad. Sci. (美國) 79(6):1979-1983)提供了系統鑒定可選的功能 CDR 序列的手段。在用於獲得這樣的變異 CDR 的一個優選方法中，對編碼 CDR 的多核苷酸進行誘變(例如經隨機誘變或通過位點定向方法(例如，用編碼突變的基因座的引物進行聚合酶鏈介導的擴增))，以產生具有取代的氨基酸殘基的 CDR。通過比較原始(功能) CDR 序列的相關殘基的同一性(identity)與取代的(非功能)變體 CDR 序列的同一性，可鑒定此取代的 BLOSUM62.iij 取代分數。BLOSUM 系統提供了通過分析用於可信比對的序列的資料庫而產生的氨基酸取代的矩陣(參見 Eddy, S.R.(2004) "*Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?*," Nature Biotech. 22(8):1035-1036；Henikoff, J.G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks," Proc. Natl. Acad. Sci. (美國) 89:10915-10919；Karlin, S.等(1990) "*Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence*

Features By Using General Scoring Schemes," Proc. Natl. Acad. Sci. (美國) 87:2264-2268；Altschul, S.F. (1991) "*Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective*," J. Mol. Biol. 219, 555-565)。目前，最先進的 BLOSUM 資料庫是 BLOSUM62 資料庫(BLOSUM62.iij)。**表 4** 顯示了 BLOSUM62.iij 取代分數(分數越高取代越保守，因此取代越可能不影響功能)。例如，如果包括所得 CDR 的抗原結合片段不能結合 ROR1，那麼 BLOSUM62.iij 取代分數視為不足夠保守，並且選擇和產生具有更高取代分數的新的候選取代。因此，例如，如果原始殘基是谷氨酸(E)，和非功能取代殘基是組氨酸(H)，那麼 BLOSUM62.iij 取代分數是 0，並且更高保守的改變(比如對天冬氨酸鹽、天冬醯胺、穀氨醯胺或賴氨酸的改變)是優選的。

【0265】 **表 4**

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3

L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

【0266】 因此，考慮使用隨機誘變鑒定改善的 CDR。噬菌體展示技術可選地用於增加(或降低) CDR 親和性。稱為親和力成熟(affinity maturation)的此技術採用誘變或“CDR 步移(walking)”，並且重新選擇使用靶抗原或其抗原片段鑒定具有當與初始或親代抗體比較時，以更高(或更低)親和性結合抗原的 CDR 的抗體(見，例如 Glaser 等(1992) J. Immunology 149:3903)。使整個密碼子而不是單個核苷酸進行誘變導致氨基酸突變的半隨機的庫(repertoire)。可構建由變異克隆的庫組成的文庫，此變異克隆每個通過在單一 CDR 中的單個氨基酸改變而不同，並且其包含表示對於每個 CDR 殘基的每個可能的氨基酸取代的變體。可通過使固定的突變體接觸標記抗原來篩選對於抗原具有增加的(或降低的)結合親和力的突變體。本領域已知的任何篩選方法可用於鑒定對於抗原具有增加的或降低的親和性的突變抗體(例如，ELISA) (參見 Wu 等 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. (美國) 95:6037；Yelton 等，1995, J.

Immunology 155:1994)。可能使用使輕鏈隨機化的 CDR 步移(參見 Schier 等, 1996, J. Mol. Bio. 263:551)。

【0267】 完成這種親和力成熟的方法描述在例如下述中：Krause, J.C.等(2011) "*An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody*," MBio. 2(1) pii：e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10；Kuan, C.T.等(2010) "*Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas*," Int. J. Cancer 10.1002/ijc.25645；Hackel, B.J.等(2010) "*Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes*," J. Mol. Biol. 401(1):84-96；Montgomery, D.L.等(2009) "*Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41*," MAbs 1(5):462-474；Gustchina, E.等(2009) "*Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naïve Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth*," Virology 393(1):112-119；Finlay, W.J.等(2009) "*Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions*," J. Mol. Biol. 388(3):541-558；Bostrom, J.等(2009) "*Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development*," Methods

Mol. Biol. 525:353-376；Steidl, S.等(2008) "*In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification*," Mol. Immunol. 46(1):135-144；和 Barderas, R.等(2008) "Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling," Proc. Natl. Acad. Sci. (美國) 105(26):9029-9034。作為例子，可用選擇的 ROR1 mAb 1 抗體塗覆多孔板(例如，碳酸鹽緩衝液中 100 ng/孔，在室溫下 2 hrs)和隨後用 1/10 稀釋的可溶性 ROR1 溫育並且在室溫下溫育 16 小時或在 PBS-T-BSA 中稀釋至 50 ng/ml 的濃度(0.05 ml 添加至每個孔並且在室溫下溫育至少 2 h)。然後沖洗板，並且然後添加在 PBS-T-BSA 中以 0.5 μg/ml 開始的重組抗體的稀釋物，並且在室溫下溫育 1 小時。然後使用，例如，抗人 IgG-HRP 綴合物和 TMB 底物測量重組抗體與捕獲的抗原的結合。在使用稀釋硫酸停止顯色之後，在 450 nM 下讀取板並且鑒定更高的親和性抗體(見，例如，美國專利號 7,351,803)。

【0268】 VI. 藥學組合物

【0269】 在一個實施方式中，一種用於治療特徵在於存在疾病相關的抗原的癌症或疾病的藥學組合物，其包括用於製造藥學組合物的散裝藥物組合物(例如，不純的或非無菌組合物)和可用於製備單位劑型的藥學組合物(即，適於施用至受試者或患者的組合物)。此組合物包括預防或治療有效量的本發明的修飾雙抗體，或這樣的劑和藥學上可接受的載體的組合。優選地，此組合物包括預防或治療有效量的一種或多種分子和藥學上可接受的載體。在一個實施方式中，一種藥學組合物和藥學上可接受的載體，此藥學組合物包括這樣修飾的雙抗體和對具體的疾病抗原具有特異性的第二治療性抗體。

【0270】 如本文所使用，術語“治療(**treatment**)”或“**治療(treating)**”表示獲得有益的或期望的結果的途徑，此有益的或期望的結果包括並且優選地是有益的或期望的臨床結果。這樣的有益的或期望的臨床結果包括但不限於下述的一個或多個：減少(或破壞)受感染細胞或其他患病的細胞的增殖、減輕由於疾病產生的症狀，提高遭受疾病的那些的生活品質、減少治療疾病需要的其他藥物治療的劑量、延遲疾病的進展，和/或延長陪伴(companion)動物接受者的生存。

【0271】 在具體的實施方式中，術語“**藥學上可接受的**”表示被聯邦或國家政府的管理機構批准，或列舉在美國藥典中或其他通常認可的用於動物，尤其是人的藥典中(參見 Remington: The Science 和 Practice of Pharmacy (2012) Allen, Loyd V., Jr。. (Ed.) 22nd Edition, Pharmaceutical Press, London UK)。術語“載體”指稀釋劑、佐劑(例如，弗氏佐劑(完全的和不完全的)、賦形劑或利用其施用治療劑的媒介。這樣的藥學載體可以是無菌液體，比如水和油，包括石油、動物、蔬菜或合成起源的那些，比如花生油、大豆油、礦物質油、芝麻油等。當靜脈內施用藥學組合物時，水是優選的載體。鹽水溶液和水性右旋糖和丙三醇溶液可也可用作液體載體，尤其用於可注射的溶液。適當的藥學賦形劑包括澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、米、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、滑石、氯化鈉、脫脂乳粉、丙三醇、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果期望，組合物也可包含少量的濕潤劑或乳化劑，或 pH 緩衝劑。這些組合物可為下述形式：溶液、懸液、乳液、片劑、丸劑、膠囊、粉末、緩釋製劑等。

【0272】 一般而言，分別或以單位劑型混合在一起來提供本發明組合物的成分，例如，在密封容器比如指示活性劑的量的安瓿或袋

(sachette)中作為乾燥凍幹粉末或無水濃縮物。在組合物通過輸注施用的情況下，其可用包含無菌藥學級的水或鹽水的輸注瓶進行分配。在通過注射施用組合物的情況下，可提供用於注射的無菌水或鹽水的安瓿，從而可混合成分然後施用。

【0273】 根據本發明任一實施方式的組合物可配製為中性或鹽形式。藥學上可接受的鹽包括但不限於用陰離子形成的那些，比如衍生自鹽酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些，和用陽離子形成的那些，比如衍生自鈉、鉀、銨、鈣、氫氧化鐵、異丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、組氨酸、普魯卡因等的那些。

【0274】 在一些實施方式中，一種藥學包裝或試劑盒，其包括一個或多個包含前述之修飾的雙抗體——單獨的或結合這樣的藥學上可接受的載體——的容器。另外，用於治療疾病的一種或多種其他預防劑或治療劑可也包括在藥學包裝或試劑盒中。本發明也提供了藥學包裝或試劑盒，其包括填充根據本發明任一實施方式的藥學組合物的一種或多種成分的一個或多個容器。任選地與這樣的容器(一個或多個)結合的可以是監管藥物製劑或生物製品的製造、使用或售賣的政府管理局規定的形式的公告(notice)，此公告反映管理局對用於人施用的製造、使用或售賣的批准。

【0275】 在一些實施方式中，一種可用於上述方法的試劑盒，其包括前述的一種或多種分子。在另一實施方式中，試劑盒進一步包括用於治療特徵在於存在疾病相關的抗原的癌症或疾病一種或多種其他預防劑或治療劑，其在一個或多個容器中。在另一實施方式中，試劑盒進一步包括結合一個或多個疾病相關的抗原的一種或多種抗體或雙抗體。在某些實施方式中，其他預防劑或治療劑是化療劑。在其他實施方式中，

預防劑或治療劑是生物或激素治療劑。

【0276】 **VII. 產生本發明的三特異性結合分子的方法**

【0277】 三特異性結合分子最優選地通過重組表達編碼這樣的多肽的核酸分子產生，如本領域熟知的。

【0278】 前述之多肽可便利地使用固相肽合成而被方便地製備(參見 Merrifield, B. (1986) "*Solid Phase Synthesis*," Science 232(4748):341-347；Houghten, R.A. (1985) "*General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of* Individual *Amino Acids*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15):5131-5135；Ganesan, A. (2006) "*Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century*," Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10)。

【0279】 可選地，可使用本領域已知的任何方法重組製備和表達抗體。可如下重組製備抗體：首先分離從宿主動物製備的抗體、獲得基因序列和使用基因序列在宿主細胞(例如，CHO 細胞)中重組表達抗體。可採用的另一方法是在植物(例如，煙草)或轉基因奶中表達抗體序列。已經公開了在植物或奶中重組表達抗體的適當的方法(參見 Peeters 等(2001) "*Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants*," Vaccine 19:2756；Lonberg, N.等(1995) "*Human Antibodies From Transgenic Mice*," Int. Rev. Immunol 13:65-93；和 Pollock 等(1999) "*Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies*," J. Immunol Methods 231:147-157)。製備抗體衍生物，例如，嵌合的、人源化的，單鏈的等的適當的方法是本領域已知的。在另一可選方案中，抗體可通過噬菌體展示技術重組製備(參

見美國專利號 5,565,332、5,580,717、5,733,743、6,265,150 和 Winter, G.等(1994) "*Making Antibodies By Phage Display Technology*," Annu. Rev. Immunol. 12.433-455)。

【0280】 可通過 Edman 降解法對感興趣的抗體或蛋白質測序，此 Edman 降解法對於本領域技術人員是熟知的。由質譜或 Edman 降解法產生的肽資訊可用於設計探針或引物，其被用於克隆感興趣的蛋白質。

【0281】 克隆感興趣的蛋白質的可選的方法是通過使用純化蛋白質或其部分"淘洗"表達感興趣的抗體或蛋白質的細胞。"淘洗"程式可如下述：從在第二細胞類型中表達或過表達期望的 cDNA 的組織或細胞獲得 cDNA 文庫，和篩選特異性結合期望蛋白質的第二細胞類型的轉染的細胞。用於通過"淘洗"克隆編碼細胞-表面蛋白質的哺乳基因的方法的詳細描述可見於現有技術(參見 Aruffo, A.等(1987) "*Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84:8573-8577 和 Stephan, J.等(1999) "*Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation*," Endocrinol. 140:5841-5854)。

【0282】 可根據現有技術的標準方法通過從具體的細胞類型逆轉錄 mRNA 獲得編碼抗體和其他肽激動劑、拮抗劑和調諧劑的 cDNA。具體而言，可使用各種裂解酶或化學溶液根據上文 Sambrook 等闡釋的程式分離 mRNA，或通過商業上可得的核酸-結合樹脂根據製造商提供的伴隨說明書提取 mRNA (例如，Qiagen, Invitrogen, Promega)。然後將合成的 cDNA 引入表達載體，以在第二類型細胞中產生感興趣的抗體或蛋白質。暗示表達載體在宿主細胞中必須是可複製的——作為游離

體(episome)或作為染色體 DNA 的不可缺少的部分。適當的表達載體包括但不限於質粒、病毒載體，包括腺病毒、腺伴隨病毒、逆轉錄病毒和黏粒。

【0283】 包含感興趣的多核苷酸的載體可通過許多適當的方式中的任意方式被引入宿主細胞，此適當方式包括電穿孔，採用氯化鈣、氯化銣、磷酸鈣、DEAE-葡聚糖或其他物質進行轉染；微彈轟擊(microprojectile bombardment)；脂轉染；和感染(例如，在載體是感染劑比如牛痘病毒的情況下)。引入載體或多核苷酸的選擇通常取決於宿主細胞的特徵。

【0284】 任何能夠過表達異源 DNA 的宿主細胞均可用於分離編碼感興趣的抗體、多肽或蛋白質的基因的目的。適當的哺乳宿主細胞的非限制性例子包括但不限於 COS、HeLa 和 CHO 細胞。優選地，相比於宿主細胞中相應的感興趣的內源抗體或蛋白質(如果存在)，宿主細胞以高約 5 倍，更優選地高 10 倍，更優選地高 20 倍、更優選地高 50 倍或更優選地高 100 倍的水準表達 cDNA。優選地通過免疫試驗或 FACS 實現對特異性結合期望的蛋白質的宿主細胞的篩選。由此可鑒定過表達感興趣的抗體或蛋白質的細胞。

【0285】 各種技術也是可用的，其現在可用以產生突變肽激動劑、拮抗劑和調諧劑，其相對於親代肽激動劑、拮抗劑或調諧劑分子編碼所得蛋白質的氨基酸序列中的添加、缺失或改變。

【0286】 在一些實施方式中，一種對根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子的修飾和具有增強的或降低的活性的變體，此修飾不顯著影響它們的特性。多肽的修飾是現有技術的常規實踐。修飾的多肽的例子包括具有氨基酸殘基的保守取代的多肽，不顯著不利改變功能活性

的氨基酸的一個或多個缺失或添加，或使用化學類似物。可彼此保守取代的氨基酸殘基包括但不限於：甘氨酸/丙氨酸；纈氨酸/異亮氨酸/亮氨酸；天冬醯胺/穀氨醯胺；天冬氨酸/谷氨酸；絲氨酸/蘇氨酸；賴氨酸/精氨酸；和苯丙氨酸/酪氨酸。這些多肽也包括糖基化和非糖基化的多肽，以及具有其他翻譯後修飾的多肽，比如例如用不同糖的糖基化、乙醯化和磷酸化。優選地，氨基酸取代是保守的，即，取代的氨基酸應具備與原始氨基酸類似的化學特性。這樣的保守取代是本領域已知的，並且上面已經提供了例子。氨基酸修飾的範圍可從改變或修飾一個或多個氨基酸到區域，比如可變結構域的完全重新設計(redesign)。可變結構域的改變可改變結合親和力和/或特異性。修飾的其他方法包括使用本領域已知的偶聯技術，包括但不限於酶促方式、氧化取代和螯合作用。修飾可用於，例如，連接用於免疫試驗的標籤，比如連接用於放射免疫分析的放射性部分。使用現有技術確立的程式製備修飾的多肽並且可使用本領域已知的標準試驗篩選。

【0287】 在一些實施方式中，一種融合蛋白，其包括來自本發明多肽和抗體的一個或多個片段或區域。在一個實施方式中，一種融合多肽，其包括可變輕鏈區的至少 10 個連續氨基酸和可變重鏈區的至少 10 個氨基酸。在另一實施方式中，融合多肽包含異源免疫球蛋白固定區。在另一實施方式中，融合多肽包含由公共保藏的雜交瘤產生的抗體的輕鏈可變結構域和重鏈可變結構域。為了本發明的目的，抗體融合蛋白包含一個或多個多肽結構域和在天然分子中未連接的另一氨基酸序列，例如，來自另一區域的異源序列或同源的序列，此多肽結構域特異性結合期望的病毒表位或期望的免疫效應細胞的啟動受體或表達這樣的啟動受體的免疫效應細胞表面上存在的蛋白質。

【0288】 在一些實施方式中，一種多肽，其包括根據本發明任一實施方式之抗體的氨基酸序列。此多肽可通過本領域已知的程式製備。可如下產生多肽：抗體的蛋白酶解或其他降解、如上述的重組方法(即，單個或融合多肽)或化學合成。抗體的多肽，尤其多達約 50 個氨基酸的短多肽，便利地通過化學合成製備。化學合成的方法是本領域已知的並且是商業上可得的。例如，這樣的多肽可通過採用固相方法的自動多肽合成儀產生。

【0289】 VIII. 本發明的組合物的用途

【0290】 本發明涉及一種藥學組合物，其包括根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子、源自這樣的分子的多肽、包括編碼這樣的分子或多肽的序列的多核苷酸和如本文所描述的其他劑。

【0291】 根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子能夠協同結合三個表位，因此主要用於診斷、化學分離和與這樣的表位相關的療法。例如，這樣的分子可在夾心免疫測試中用作試劑。

【0292】 在三特異性結合分子結合疾病相關的抗原的表位的實施方式中，這樣的分子可用於治療與這樣的疾病相關抗原的表達相關或特徵在於這樣的疾病相關抗原的表達的疾病或病況。因此，不受限制的，包括這樣的分子的藥學組合物可用於診斷或治療癌症和由病原體(例如，細菌、真菌、病毒或原生動物)感染造成的疾病。

【0293】 IX. 施用方法

【0294】 通過向受試者施用有效量的根據本發明任一實施方式的藥學組合物，此組合物可被提供用於治療、預防和改善與疾病、病症或感染相關的一個或多個症狀。在優選的方面中，此組合物基本上是純化的(即，基本上不含限制其作用或產生非期望的副作用的物質)。在具體

的實施方式中，受試者是動物，優選哺乳動物比如非靈長類(例如，牛、馬、貓科動物、犬科動物、齧齒動物等)或靈長類(例如，猴比如，食蟹猴、人等)。在優選的實施方式中，受試者是人。

【0295】 各種遞送系統是已知的並且可用於施用本發明的組合物，例如，封裝在脂質體中、微粒、微膠囊、能夠表達抗體或融合蛋白的重組細胞、受體介導的內吞作用(參見 Wu 等(1987) *"Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA* Carrier *System,"*J. Biol. Chem. 262:4429-4432)，構建作為逆轉錄病毒或其他載體一部分的核酸等。

【0296】 施用根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子的方法包括但不限於腸胃外施用(例如，皮內、肌內、腹膜內、靜脈內和皮下)、硬膜外和粘膜(例如，鼻內和口服途徑)。在具體的實施方式中，肌內、靜脈內或皮下施用本發明的分子。可通過任何方便的途徑施用組合物，例如，通過輸注或丸劑注射，通過經上皮或黏膜皮膚被覆(lining)(例如口腔粘膜、直腸和腸粘膜等)吸收，並且可以與其他生物活性劑一起施用。施用可以是全身性的或局部的。另外，可也採用肺部施用，例如，通過使用吸入器或噴霧器，和具有氣霧化試劑的製劑。參見美國專利號 6,019,968、5,985，320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540 和 4,880,078；和 PCT 公開號 WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346 和 WO 99/66903，其每一篇通過引用以其整體併入本文。

【0297】 在一些實施方式中，根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子可包裝在密封容器比如指示這樣的分子的量的安瓿或袋中。在一個實施方式中，三特異性結合分子被供應作為密封容器中的乾燥滅菌

凍幹粉末或無水濃縮物並且可，例如，用水或鹽水重構至適當的濃度用於施用至受試者。優選地，三特異性結合分子被供應作為密封容器中的乾燥無菌凍幹粉末，單位劑量為至少 5 μg，更優選地至少 10 μg、至少 15 μg、至少 25 μg、至少 50 μg、至少 100 μg 或至少 200 μg。

【0298】 凍幹的三特異性結合分子應在它們的原始容器中在 2 和 8 ℃之間儲存並且分子應在重構之後的 12 小時內，優選地 6 小時內、5 小時內、3 小時內或 1 小時內施用。在可選的實施方式中，三特異性結合分子以液體形式供應在指示分子、融合蛋白或綴合分子的量和濃度的密封容器中。優選地，液體形式的三特異性結合分子被供應在密封容器中，其中分子存在的濃度為至少 1 μg/ml，更優選地至少 2.5 μg/ml、至少 5 μg/ml、至少 10 μg/ml、至少 50 μg/ml 或至少 100 μg/ml。

【0299】 如本文所使用，在一個實施方式中，“**有效量**”的藥學組合物是足夠實現有益的或期望的結果的量，包括但不限於臨床結果比如減輕由於疾病造成的症狀、減輕感染的**症狀**(例如，病毒量、發燒、疼痛，膿毒症等)或癌症的症狀(例如，癌細胞的增殖、腫瘤存在、腫瘤轉移等)，從而提高遭受疾病的那些的生活品質、減少治療疾病需要的其他藥物的劑量、加強另一藥物的作用——比如經靶向和/或內化、延遲疾病的進展和/或延長個體的生存。

【0300】 有效量可在一次或多次施用中施用。有效量的藥物、化合物或藥學組合物是這樣的量：此量足夠直接或間接減少病毒存在的增殖(或作用)和減輕和/或延遲病毒疾病的發展。在一些實施方式中，有效量的藥物、化合物或藥學組合物可能或不能實現結合另一藥物、化合物或藥學組合物。因此，“有效量”可在施用一種或多種化療劑的背景下考慮，並且如果結合一種或多種其他試劑，期望的結果可以或得以實現，

則單個試劑可視為以有效量給予。儘管個體需要不同，測定每種組分的有效量的最佳範圍仍在現有技術的範圍內。對於抗體施用，典型的劑量包括在 0.1-至 100 mg/kg/體重之間的一個或多個單位劑量。

【0301】 有效治療、預防或改善與病症相關的一個或多個症狀的根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子的量可通過標準臨床技術來測定。製劑中採用的精確劑量也取決於施用的途徑和病況的嚴重性，並且應根據從業者的判斷和每個患者的情況決定。有效的劑量可從源自體外或動物模型測試系統的劑量回應曲線外推。對於本發明的三特異性結合分子，施用至患者的劑量按受試者的體重計，通常至少約 0.01 μg/kg/天、至少約 0.05 μg/kg/天、至少約 0.1 μg/kg/天、至少約 0.2 μg/kg/天、至少約 0.5 μg/kg/天、至少約 1 μg/kg/天、至少約 2 μg/kg/天、至少約 5 μg/kg/天、至少約 10 μg/kg/天、至少約 20 μg/kg/天、至少約 50 μg/kg/天、至少約 0.1 mg/kg/天或更多。

【0302】 優選地，施用至患者的劑量按受試者的體重計，在約 0.01 μg/kg/天和約 0.1 mg/kg/天之間，更優選地，約 0.01 μg/kg/天和約 50 μg/kg/天之間，更優選地，約 0.01 μg/kg/天和約 50 μg/kg/天之間，更優選地，約 0.01 μg/kg/天和約 10 μg/kg/天之間，更優選地，約 0.01 μg/kg/天和約 1 μg/kg/天之間，更優選地，約 0.01 μg/kg/天和約 0.5 μg/kg/天之間，和更優選地，約 0.01 μg/kg/天和約 0.1 μg/kg/天之間。施用根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子的劑量和頻率可通過修飾比如例如脂化增強三特異性結合分子的吸收和組織滲透而降低或改變。

【0303】 在另一實施方式中，患者施用的治療方案包括一個或多個劑量的這樣的預防或治療有效量的三特異性結合分子，其中治療方案在

2 天、3 天、4 天、5 天、6 天或 7 天內施用。在某些實施方式中，治療方案包括間歇地施用預防或治療有效量的三特異性結合分子的劑量(例如，在給定周的第 1 天、第 2 天、第 3 天和第 4 天施用劑量並且在相同周的第 5 天、第 6 天和第 7 天不施用預防或治療有效量的三特異性結合分子的劑量)。典型地，有 1、2、3、4、5 或更多個治療療程。每個療程可以是相同的方案或不同的方案。

【0304】 在另一實施方式中，施用的劑量在四分之一、二分之一或三分之二或四分之三的方案(一個或多個)內(例如，在 4 個治療療程的第一、第二、或協力廠商案內)內逐漸上升直到實現每日預防或治療有效量的三特異性結合分子。

【0305】 在一個實施方式中，可計算施用至患者的根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子的劑量用作單一試劑療法。在另一實施方式中，根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子結合其他治療性組合物使用，並且施用至患者的劑量比這樣的三特異性結合分子用作單一試劑療法時更低。

【0306】 在具體的實施方式中，可期望局部施用根據本發明任一實施方式的藥學組合物至需要治療的區域；這可通過，但不限於例如如下方式實現：局部輸注、通過注射、或通過植入體，此植入體是多孔的、非多孔的、或膠狀材料，包括膜，比如矽橡膠膜(sialastic)或纖維。優選地，當施用根據本發明任一實施方式的分子時，必須注意使用不吸收此分子的材料。

【0307】 在另一實施方式中，組合物可在小泡，尤其是脂質體中遞送(參見 Langer (1990) “New Methods Of Drug Delivery,” Science 249:1527-1533)；Treat 等，在 Liposomes in the Therapy of Infectious

Disease and Cancer（傳染病和癌症療法中的脂質體）中，Lopez-Berestein 和 Fidler (eds.), Liss, New York,353-365 頁(1989)；Lopez-Berestein，同上，317-327 頁；一般見上)。

【0308】 在又另一實施方式中，組合物可在控釋或緩釋系統中遞送。本領域技術人員已知的任何技術可用於產生包括根據本發明任一實施方式的一個或多個分子的緩釋製劑。參見美國專利號 4,526,938；PCT 公開 WO 91/05548、PCT 公開 WO 96/20698；Ning 等(1996) *"Intratumoral Radioimmunotheraphy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel,"*Radiotherapy & Oncology 39:179-189；Song 等(1995) *"Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions,"*PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397；Cleek 等 (1997) *"Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application,"* Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854；和 Lam 等(1997) *"Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery,"*Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760，其各通過引用以其整體併入本文。在一個實施方式中，泵可用於控釋系統中(參見 Langer，同上；Sefton, (1987) *"Implantable Pumps,"*CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240；Buchwald 等 (1980) *"Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis,"* Surgery 88:507-516；和 Saudek 等(1989) *"A Preliminary Trial Of The Programmable*

*Implantable Medication System For Insulin Delivery,"*N. Engl. J. Med. 321:574-579)。在另一實施方式中，聚合物材料可用於實現抗體的控釋(參見 Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974)；Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley New York (1984)；Levy 等(1985) *"Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate,"*Science 228:190-192；During 等 (1989) *"Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization,"* Ann. Neurol. 25:351-356；Howard 等 (1989) *"Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits,"*J. Neurosurg. 7(1):105-112)；美國專利號 5,679,377、美國專利號 5,916,597、美國專利號 5,912,015、美國專利號 5,989,463、美國專利號 5,128,326；PCT 公開號 WO 99/15154；和 PCT 公開號 WO 99/20253)。在緩釋製劑中使用的聚合物的例子包括但不限於聚(甲基丙烯酸 2-羥乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、乙烯-乙烯基乙酸酯共聚物(poly(ethylene-co-vinyl acetate))、聚(甲基丙烯酸)、聚乙醇酸交酯(PLG)、聚酐，聚(N-乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯基醇)、聚丙烯醯胺，聚(乙二醇)、聚交酯(PLA)、聚交酯-乙交酯共聚物 (PLGA)和聚原酸酯(polyorthoeste)。在又另一實施方式中，控釋系統可放置在治療性靶(例如，肺)附近，因此僅僅需要一部分全身性劑量(參見 Goodson, 在 Medical Applications of Controlled Release 中，同上，vol. 2, pp. 115-138 (1984))。在另一實施方式中，根據 Dunn 等使用用作控釋移植物的聚合組合物(見美國

5,945,155)。具體的方法基於來自聚合物系統的生物活性材料的原位-控釋的療效。植入可一般發生在患者需要治療性治療的身體內的任何地方。在另一實施方式中，使用非聚合物持續遞送系統，由此受試者身體中的非聚合物植入物被用作藥物遞送系統。當植入身體時，植入物的有機溶劑將從組合物消散，分散或滲漏到周圍組織流體中，並且非聚合材料逐漸凝聚或沉澱形成固體、多微孔基質(參見美國 5,888,533)。

【0309】 Langer 的綜述 (1990, *"New Methods Of Drug Delivery,"*Science 249:1527-1533)討論了控釋系統。本領域技術人員已知的任何技術可用於產生包括根據本發明任一實施方式的一種或多種治療劑的緩釋製劑。參見美國專利號 4,526,938；國際公開號 WO 91/05548 和 WO 96/20698；Ning 等 (1996) *""Intratumoral Radioimmunotheraphy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel,"*Radiotherapy & Oncology 39:179-189；Song 等(1995) *"Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions,"*PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397；Cleek 等(1997) *"Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application,"* Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854；和 Lam 等 (1997) *"Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery,"*Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760，其每一篇通過引用以其整體併入本文。

【0310】 在其中根據本發明任一實施方式的組合物是編碼根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子的核酸的情況下的具體實施方式中，通過將其構建為適當的核酸表達載體的一部分並且施用其從而其

變成是細胞內的，例如，通過使用逆轉錄病毒載體(參見美國專利號4,980,286)，或通過直接注射，或通過使用微粒轟擊(例如，基因槍；生物彈道技術(Biolistic)，Dupont)，或用脂質或細胞-表面受體或轉染試劑塗覆，或通過將其連接至已知進入核的同源框樣肽施用(參見 Joliot 等 (1991) *"Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis,"*Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868)等，核酸可被體內施用以促進其編碼的三特異性結合分子的表達。可選地，可以將核酸引入細胞內並通過同源重組整合到宿主細胞 DNA 中，以進行表達。

【0311】 用治療或預防性有效量的根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子治療受試者可包括單一治療或，優選地，可包括一系列治療。在優選的實施例中，受試者用根據本發明任一實施方式的分子每週治療一次，持續約 1 至 10 周，優選地 2 至 8 周，更優選地約 3 至 7 周，甚至更優選地持續約 4、5 或 6 周。在其他實施方式中，每天一次、每天兩次或每天三次施用根據本發明任一實施方式的藥學組合物。在其他實施方式中，每週一次、每週兩次、每兩週一次、每月一次、每六週一次、每兩個月一次、每年兩次或每年一次施用藥學組合物。也認識到用於治療的有效劑量的分子可在具體的治療療程內增加或降低。

【0312】 現已經大體上描述了本發明的實施方式，通過參考下述實施例其更容易理解。這樣的實施例通過示例的方式提供，並且不旨在限制本發明，除非另外指出。

【0313】 實施例 1

【0314】 示例性抗 CD3、抗 CD8、抗 B7-H3 三特異性結合分子的產生和特性

【0315】 為了開發展示對CD8+ T細胞更大特異性和更有效的重定向殺傷的治療性分子，構建具有能夠協同結合 CD3、CD8 和疾病相關的抗原的三特異性結合分子。產生的三特異性結合分子另外具備 Fc 結構域，以增強三特異性結合分子體內的半衰期。三特異性結合分子的通式結構顯示在**圖 4A–4D** 中。構建了對疾病相關的抗原 B7-H3 特異性的示例性三特異性結合分子。三特異性結合分子稱為 **B7-H3 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb1**，以表示三特異性結合分子中結合結構域的相關位置。B7-H3 結合結構域佔據位元點 A 位置，CD3 結合結構域佔據位元點 B 位置和 CD8 結合結構域佔據位元點 C 位置(**圖 4A**)。**B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子由四條不同的多肽鏈組成(**表 5**)。

【0316】 **表 5**

多肽鏈	結構域	結合親和力
1	VL(B7-H3 mAb 1)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3)	輕鏈：B7-H3 重鏈：CD3
2	VL(CD3 mAb 2)-VH(B7-H3 mAb 1)-K-螺旋	輕鏈：CD3 重鏈：B7-H3
3	重鏈 CD8 mAb 1	CD8
4	輕鏈 CD8 mAb 1	CD8

【0317】 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:59**)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP

EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV

ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVRQAPGKGL

EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISRD DSKNSLYLQM

NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS

GGCGGGEVAA LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT

HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV

VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV

SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP

REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES

NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF

SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK。

【0318】 在第一多肽鏈中，VL(B7-H3 mAb 1)具有氨基酸序列 **SEQ ID NO:41**，VH(CD3 mAb 2)具有氨基酸序列 **SEQ ID NO:27**，E-螺旋具有氨基酸序列 **SEQ ID NO:3** 和(CH2-CH3)具有 **SEQ ID NO:7** 的“**攜帶杵的**”氨基酸序列的氨基酸序列。

【0319】 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第二多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:60**)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ

KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA

QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV

QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSY WMQWVRQAPG

QGLEWMGTIY PGDGDTRYTQ KFKGRVTITA DKSTSTAYME

LSSLRSEDTA VYYCARRGIP RLWYFDVWGQ GTTVTVSSGG

CGGGKVAALK EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE。

【0320】 在第二多肽鏈中，VL(CD3 mAb 2)具有氨基酸序列 **SEQ ID NO:26**，VH(B7-H3 mAb 1)具有氨基酸序列 **SEQ ID NO:42**，和 K-螺旋具有氨基酸序列 **SEQ ID NO:4**。

【0321】 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:61**)：

EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHFVRQR
PEQGLEWIGR IDPANDNTLY ASKFQGKATI TADTSSNTAY
MHLCSLTSGD TAVYYCGRGY GYYVFDHWGQ GTTLTVSSAS
TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN
SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS
VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT
KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK
SLSLSPGK。

【0322】 在第三多肽鏈中，採用的 CD8 mAb 1 重鏈可變結構域的氨基酸序列具有 **SEQ ID NO:30** 的氨基酸序列、鉸鏈結構域、CH1 結構域和“**攜帶臼的**” CH2-CH3 結構域，其具有 H435R 取代，以去除蛋白 A 結合位點(**SEQ ID NO:8**)。

【0323】 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:62**)：

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTSRSIS QYLAWYQEKP

GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTISGLEP

EDFAMYYCQQ HNENPLTFGA GTKLELRRTV AAPSVFIFPP

SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ

ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG

LSSPVTKSFN RGEC。

【0324】 在第四多肽鏈中，採用 CD8 mAb 1 輕鏈可變結構域的氨基酸序列具有 **SEQ ID NO:29** 的氨基酸序列和 κ 輕鏈固定結構域。

【0325】 將表達的 B7H3 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 三特異性結合分子載入到 MSA 樹脂上，用 10mM $NaPO_4$ (pH6)；10mM $NaPO_4$、1M NaCl (pH6)和 10mM $NaPO_4$ (pH6)沖洗。用 50mM 甘氨酸(pH3)從樹脂洗脫多肽，並且用 1M Tris (pH8)中和。發現表達是 1.7mg/L；三特異性結合分子製劑是 0.6 mg/ml，具有的終產量為 0.42 mg。

【0326】 比較 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的特性與具有 Fc 結構域的 B7-H3 X CD3 DART 和 B7-H3 X CD3 DART 的特性。如**圖 5A-5B** 中顯示，**B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子相比具有 Fc 結構域的 B7-H3 X CD3 DART 和 B7-H3 X CD3 DART 顯示類似的靶細胞結合(A498 細胞(**圖 5A**)；JIMT-1 (**圖 5B**))。但是，如**圖 5C-5D** 中顯示，**B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子相比 CD4+ T 細胞顯示對 CD8+ T 細胞的大大提高的結合。

【0327】 為了顯示本發明的 **B7-H3 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子介導重定向殺傷靶細胞的能力，在存在 T 細

胞和 JIMT-1 或 A498 靶細胞的情況下溫育這樣的分子。JIMT-1 細胞是曲妥珠單抗抗性癌系(參見 Tanner, M.等 (2004) "*Characterization Of A Novel Cell Line Established From A Patient With Herceptin-Resistant Breast Cancer*," Mol. Cancer Ther. 3(12):1585-1592)。A498 細胞系是腎細胞癌細胞系(Gogh, J. (1978) "*Cultivation, Characterization, And Identification Of Human Tumor Cells With Emphasis On Kidney, Testis, And Bladder Tumors*," Natl. Cancer Inst. Monogr. 49:5-9)。如**圖 6A-6C** 中顯示，觀察到了對靶細胞的重定向殺傷。出人意料地，這些殺傷實質上比針對具有 Fc 結構域的相應的 B7-H3 X CD3 DART 和 B7-H3 X CD3 DART 觀察到的殺傷更有效。觀察的重定向殺傷總結在**表 6** 中。

【0328】 **表 6**

結合分子	重定向殺傷				
	JIMT-1 細胞			**A498 細胞**	
試驗	LDH	LDH	螢光素酶	LDH	LDH
	最大殺傷(%)	EC50 (pM)	EC50 (pM)	最大殺傷(%)	EC50 (pM)
B7-H3 X CD3 **DART™**	60.72	27	22	61.95	11
具有 Fc 結構域的 B7-H3 X CD3 **DART™**	59.95	343	245	63.2	168
B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 三	54.88	0.4	0.6	53.5	4

特異性結合分子					

【0329】 **圖 7A-7D** 顯示了 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子在用 **JIMT-1** 細胞溫育之後介導 **T** 細胞啟動的能力。**圖 8A-8D** 顯示了 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子在用 A498 細胞溫育之後介導 T 細胞啟動的能力。在兩種情況下，這樣的啟動出人意料地優於用具有 Fc 結構域的可比較的 B7-H3 X CD3 DART™和 B7-H3 X CD3 DART™觀察的啟動。**表 7** 總結了 EC50 結果。

【0330】 **表 7**

腫瘤細胞	**T 細胞亞組**	**B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 三特異性結合分子相比 DART 的 EC50 值**		
		DART™	**具有 Fc 結構域的 DART™**	**三特異性結合分子**
A498	CD4/CD69	51	95	75
	CD4/CD25	75	291	22
	CD8/CD69	70	185	4
	CD8/CD25	115	339	4
	CTL	10	48	4
JIMT-1	CD4/CD69	116	339	253
	CD4/CD25	257	1034	185
	CD8/CD69	70	185	3
	CD8/CD25	140	678	37
	CTL	7	68	1

【0331】 表達的 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子使用 CD8+效應細胞相比 CD4+效應細胞展示大得多的(13倍)溶細胞活性。相比DART™，使用‘全’T細胞作為效應子，**B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子也展示大大增加的(85倍)總體效力。

【0332】 **實施例 2**

【0333】 **CD8 結合結構域對重定向的細胞毒性的作用**

【0334】 為了評估 CD8 特異性的作用，利用不同 CD8 抗體可變結構域序列構建針對疾病相關的抗原 B7-H3 特異性的第二個三特異性結合分子。B7-H3 可變結構域特異性和 CD3 可變結構域特異性與用於構建 B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 三特異性結合分子的那些相同。三特異性結合分子稱為 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 並且由四條不同的多肽鏈組成(**表 8**)。

【0335】 **表 8**

多肽鏈	結構域	結合親和力
1	VL(B7-H3 mAb 1)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3)	輕鏈：B7-H3 重鏈：CD3
2	VL(CD3 mAb 2)-VH(B7-H3 mAb 1)-K-螺旋	輕鏈：CD3 重鏈：B7-H3
3	重鏈 CD8 mAb 2	CD8
4	輕鏈 CD8 mAb 2	CD8

【0336】 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:63**)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP
GKAPKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP
EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV
ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVRQAPGKGL
EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISRD DSKNSLYLQM
NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS
GGCGGGEVAA LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT
HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES
NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF
SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK。

【0337】 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子的第二多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:64**)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ
KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA
QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGGQV
QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSY WMQWVRQAPG
QGLEWMGTIY PGDGDTRYTQ KFKGRVTITA DKSTSTAYME
LSSLRSEDTA VYYCARRGIP RLWYFDVWGQ GTTVTVSSGG
CGGGKVAALK EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE。

【0338】 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:65**)：

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DFGMNWVRQA

PGKGLEWVAL IYYDGSNKFY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY

LQMNSLRAED TAVYYCAKPH YDGYYHFFDS WGQGTLVTVS

SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV

SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ

TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAAG

GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN

WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG

KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE

EMTKNQVSLS CAVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP

VLDSDGSFFL VSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNRY

TQKSLSLSPG K。

【0339】 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子的第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:66**)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKGSQDIN NYLAWYQQKP

GKAPKLLIYN TDILHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP

EDIATYYCYQ YNNGYTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS

DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE

SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL

SSPVTKSFNR GEC。

【0340】 為了比較 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** (結構和序列如上述)或 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子結合 T 細胞的能力，用 Ficoll 純化健康的供體的人 PBMC，用 PBS 沖洗兩次，並且再懸浮在包含 10%人 AB 血清的 FACS 緩衝液

中，並且在室溫下溫育 20 分鐘，使細胞旋降(spin down)並且將 4 x 10^6 細胞/mL 細胞再懸浮在 FACS 緩衝液中。50 µl 連續滴定的 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 或 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子或 DART™ (具有 Fc 結構域的 B7-H3 X CD3 或 B7-H3 X CD3)被添加至 96 孔深板的孔中。然後將包含 0.01%氮化鈉的 FACS 緩衝液中 50 µL (4 x 10^6 細胞/mL)的充分混合的細胞添加至相應的孔並且使用移液管充分混合。在暗處 2-8℃下溫育板約 45 分鐘。溫育結束時，通過添加 300 µL 的 FACS 緩衝液至每個孔沖洗細胞兩次，在 1,200 rpm 下使板離心 5 分鐘，並丟棄上清液。在包含 0.01%氮化鈉的 FACS 緩衝液中，將細胞小球再懸浮在 1:500 稀釋的 PE 綴合山羊抗人 Fcγ、CD5-APC 和 CD4-PerCP5.5 的 100 µL 混合物中，並且在暗處 2-8℃下溫育約 45 分鐘。溫育結束時，用 FACS 緩衝液沖洗細胞，再懸浮，並且用 BD Caliber 流式細胞儀進行分析。將細胞門控(gated)至 $CD5^+$ $CD4^+$ (**圖 9A**)或 $CD5^+$ $CD4^-$(**圖 9B**)。相比具備或缺少 CD8 特異性的結合分子，在 $CD5^+$ $CD4^-$群體上觀察差別染色。

【0341】 比較 **B7-H3 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的細胞毒性與 **B7-H3 mAb1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子的細胞毒性。採用螢光素酶試驗和 LDH 試驗。兩個試驗的結果一致。兩個三特異性結合分子在存在啟動 CD8+ T 細胞或全 T 細胞群的情況下造成等同的重定向的細胞毒性。相比 B7H3 X CD3 DART，具有 CD8 mAb 1 結合結構域的三特異性結合分子在存在 CD8+ 細胞群或全 T 細胞的情況下展示更大的重定向的細胞毒性(**圖 10A-10C**)。

【0342】 相比 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子，對於 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子也觀察到 CD8+對 CD4+效應細胞的 EC50 的增加(60 倍)。對於 **B7-H3 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子，當全 T 細胞用作效應細胞時，觀察導致大於 100 倍的 EC50 下降的增加的效力。

【0343】 **實施例 3**

【0344】 **結構域位置對重定向的細胞毒性的作用**

【0345】 為了評估三特異性結合分子中給定結合結構域(CD3、CD8 和疾病相關抗原)的位置(位點 A、位點 B 和位點 C)的作用，構建了數個另外的三特異性結合分子。**表 9** 顯示了具有各種結合結構域(CD3、CD8 和疾病相關的抗原)的三特異性結合分子和位置(位點 A、位點 B 和位點 C)。

【0346】 表 9

三特異性結合分子	位點 A	位點 B	位點 C
B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 三特異性結合分子	B7-H3 mAb 1	CD3 mAb 2	CD8 mAb 1
CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 /B7-H3 mAb 1 三特異性結合分子	CD3 mAb 2	CD8 mAb 1	B7-H3 mAb 1
B7-H3 mAb 1/CD8 mAb 1 /CD3 mAb 2 三特異性結合分子	B7-H3 mAb 1	CD8 mAb 1	CD3 mAb 2

【0347】 上面描述了 **B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的結構和序列。對於另外兩個三特異性結合分子(**CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 /B7-H3 mAb 1** 和 **B7-H3 mAb 1/CD8 mAb 1 /CD3 mAb 2**)，B7-H3 可變結構域特異性，CD3 可變結構域特異性和

CD8 可變結構域特異性與用於構建 B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 三特異性結合分子的那些相同。**CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 /B7-H3 mAb 1** 三特異性結合分子由四條不同的多肽鏈組成(**表 10**)。

【0348】 **表 10**

多肽鏈	結構域	結合親和力
1	VL(CD3 mAb 2)-VH(CD8 mAb 1)-E-螺旋-(CH2-CH3)	輕鏈：CD3 重鏈：CD8
2	VL(CD8 mAb 1)-VH(CD3 mAb 2)-K-螺旋	輕鏈：CD8 重鏈：CD3
3	重鏈 B7-H3 mAb 1	B7-H3
4	輕鏈 B7-H3 mAb 1	B7-H3

【0349】 **CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 /B7-H3 mAb 1** 三特異性結合分子的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:67**)：

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTSRSIS QYLAWYQEKP

GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTISGLEP

EDFAMYYCQQ HNENPLTFGA GTKLELRGGG SGGGGEVQLV

ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVRQAPGKGL

EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISRD DSKNSLYLQM

NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS

GGCGGGEVAA LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT

HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV

VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV

SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP

REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK。

【0350】 **CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 /B7-H3 mAb 1** 三特異性結合分子的第二多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:68**)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLQQSGAELV KPGASVKLSC TASGFNIKDT YIHFVRQRPE QGLEWIGRID PANDNTLYAS KFQGKATITA DTSSNTAYMH LCSLTSGDTA VYYCGRGYGY YVFDHWGQGT TLTVSSGGCG GGKVAALKEK VAALKEKVAA LKEKVAALKE。

【0351】 **CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 /B7-H3 mAb 1** 三特異性結合分子的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:69**)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMQWVRQA PGQGLEWMGT IYPGDGDTRY TQKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG IPRLWYFDVW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLSC AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV

LDSDGSFFLV SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNRYT QKSLSLSPGK。

【0352】 **CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 /B7-H3 mAb 1** 三特異性結合分子的第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:70**)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC。

【0353】 **B7-H3 mAb 1/CD8 mAb 1 /CD3 mAb 2** 三特異性結合分子由四條不同的多肽鏈組成(**表 11**)。

【0354】 **表 11**

多肽鏈	結構域	結合親和力
1	VL(B7-H3 mAb 1)-VH(CD8 mAb 1)-E-螺旋-(CH2-CH3)	輕鏈：B7-H3 重鏈：CD8
2	VL(CD8 mAb 1)-VH(B7-H3 mAb1)-K-螺旋	輕鏈：CD8 重鏈：B7-H3
3	重鏈 CD3 mAb 2	CD3
4	輕鏈 CD3 mAb 2	CD3

【0355】 **B7-H3 mAb 1/CD8 mAb 1 /CD3 mAb 2** 三特異性結合分子的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:71**)：

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTSRSIS QYLAWYQEKP

GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTISGLEP

EDFAMYYCQQ HNENPLTFGA GTKLELRGGG SGGGGQVQLV

QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMQ WVRQAPGQGL

EWMGTIYPGD GDTRYTQKFK GRVTITADKS TSTAYMELSS

LRSEDTAVYY CARRGIPRLW YFDVWGQGTT VTVSSGGCGG

GEVAALEKEV AALEKEVAAL EKEVAALEKG GGDKTHTCPP

CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH

EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV

LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV

YTLPPSREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE

NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM

HEALHNHYTQ KSLSLSPGK。

【0356】 **B7-H3 mAb 1/CD8 mAb 1 /CD3 mAb 2** 三特異性結合分子的第二多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:72**)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP

GKAPKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP

EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG GTKLEIKGGG SGGGGEVQLQ

QSGAELVKPG ASVKLSCTAS GFNIKDTYIH FVRQRPEQGL

EWIGRIDPAN DNTLYASKFQ GKATITADTS SNTAYMHLCS

LTSGDTAVYY CGRGYGYYVF DHWGQGTTLT VSSGGCGGGK

VAALKEKVAA LKEKVAALKE KVAALKE。

【0357】 **B7-H3 mAb 1/CD8 mAb 1 /CD3 mAb 2** 三特異性結合分子的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:73**)：

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA
PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS
LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL
VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE
PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS
LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KRVEPKSCDK THTCPPCPAP
EAAGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP
PSREEMTKNQ VSLSCAVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK
TTPPVLDSDG SFFLVSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
HNRYTQKSLS LSPGK。

【0358】 B7-H3 mAb 1/CD8 mAb 1 /CD3 mAb 2 三特異性結合分子的第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:74**)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ
KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA
QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG RTVAAPSVFI
FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT
HQGLSSPVTK SFNRGEC。

【0359】 此研究的結果顯示在**圖 11A-11C**、**圖 12A-12C**、**圖 13A-13E** 和**表 26** 中。**圖 11A-11C** 和**圖 12A-12C** 獨立地顯示了將 CD3 結合結構域放置在三特異性結合分子的位點 C 降低了分子的細胞毒

性。**圖 13A-13E** 顯示了觀察到降低的細胞毒性，無論是採用 CD4+、CD8+還是全 T 細胞。

【0360】 如**圖 14A-14B** 中所顯示，在位點 C 佈置 CD3 結合結構域，大大降低了與 $CD5^+$ $CD4^+$細胞(**圖 14A**)和 $CD5^+$ $CD4^-$細胞(**圖 14B**)二者的結合。但是，注意，無論 CD3 結合結構域的佈置如何，所有的三特異性結合分子均能夠介導重定向的細胞毒性。

【0361】 **實施例 4**

【0362】 **示例性抗 CD3，抗 CD8，抗 5T4 三特異性結合分子的產生和特性**

【0363】 構建了對疾病相關的抗原 5T4 特異性的另外的示例性三特異性結合分子。**5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子由四條不同的多肽鏈組成(**表 12**)。

【0364】 表 12

多肽鏈	結構域	結合親和力
1	VL(5T4 mAb 2)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3)	輕鏈：5T4 重鏈：CD3
2	VL(CD3 mAb 2)-VH(5T4 mAb 2)-K-螺旋	輕鏈：CD3 重鏈：5T4
3	重鏈 CD8 mAb 1	CD8
4	輕鏈 CD8 mAb 1	CD8

【0365】 **5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:75**)：

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV YSNGNTYLEW
YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP FTFGSGTKLE IKGGGSGGGG
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA
PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS
LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL
VTVSSGGCGG GEVAALEKEV AALEKEVAAL EKEVAALEKG
GGDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE
VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA
VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK。

【0366】 **5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第二多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:76**)：

【0367】 QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT
TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT
PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC
ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV
QLQQPGAELV KPGASVKMSC KASGYTFTSY
WITWVKQRPG QGLEWIGDIY PGSGRANYNE
KFKSKATLTV DTSSSTAYMQ LSSLTSEDSA
VYYCARYGPL FTTVVDPNSY AMDYWGQGTS

VTVSSGGCGG GKVAALKEKV AALKEKVAAL KEKVAALKE。

【0368】 **5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:77**)：E VQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHFVRQR PEQGLEWIGR IDPANDNTLY ASKFQGKATI TADTSSNTAY MHLCSLTSGD TAVYYCGRGY GYYVFDHWGQ GTTLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK。

【0369】 **5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:78**)：

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTSRSIS QYLAWYQEKP GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTISGLEP EDFAMYYCQQ HNENPLTFGA GTKLELRRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC。

【0370】 **5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子由四條不同的多肽鏈組成(**表 13**)。

【0371】 **表 13**

多肽鏈	結構域	結合親和力
1	VL(5T4 mAb 2)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3)	輕鏈：5T4 重鏈：CD3
2	VL(CD3 mAb 2)-VH(5T4 mAb 2)-K-螺旋	輕鏈：CD3 重鏈：5T4
3	重鏈 CD8 mAb 2	CD8
4	輕鏈 CD8 mAb 2	CD8

【0372】 **5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:79**)：

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV YSNGNTYLEW
YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP FTFGSGTKLE IKGGGSGGGG
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA
PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS
LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL
VTVSSGGCGG GEVAALEKEV AALEKEVAAL EKEVAALEKG
GGDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE
VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA

VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK。

【0373】 **5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子的第二多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:80**)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLQQPGAELV KPGASVKMSC KASGYTFTSY WITWVKQRPG QGLEWIGDIY PGSGRANYNE KFKSKATLTV DTSSSTAYMQ LSSLTSEDSA VYNCARYGPL FTTVVDPNSY AMDYWGQGTS VTVSSGGCGG GKVAALKEKV AALKEKVAAL KEKVAALKE。

【0374】 **5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:81**)：

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DFGMNWVRQA PGKGLEWVAL IYYDGSNKFY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKPH YDGYYHFFDS WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAAG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLS CAVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP

VLDSDGSFFL VSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNRY TQKSLSLSPG K。

【0375】 **5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子的第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:82**)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKGSQDIN NYLAWYQQKP GKAPKLLIYN TDILHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCYQ YNNGYTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC。

【0376】 如上述表達和純化 **5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 和 **5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子。比較這兩個三特異性結合分子結合 CD5+/CD4+門控和 CD5+/CD4-門控人 PBMC 的能力與具有 Fc 結構域的 5T4 X CD3 DART 的那些的能力。如**圖 15A-15B** 中顯示，相比 CD4+ T 細胞(**圖 15A**)，**5T4 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 和 **5T4 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子顯示對 CD8+ T 細胞的大大增加的結合(**圖 15B**)。

【0377】 為了顯示 **5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 和 **5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子介導重定向殺傷靶細胞的能力，這樣的分子在存在 T 細胞和 JIMT-1 靶細胞的情況下被溫育。如**圖 16A-16C** 中所顯示，觀察到了靶細胞的重定向殺傷。如上述對於 B7-H3 三特異性結合分子觀察到的，相比對於包含 Fc 結構域的相應 5T4 X CD3 DART 觀察到的，殺傷實質上更有效。同樣地，如對於 B7-H3 三特異性結合分子觀察到的，使用不同的 CD8 可變結構域對

5T4 三特異性結合分子重定向 CD8+ T 細胞至靶細胞的能力沒有作用。也發現 **5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子非常有活性，並且使用 CD8+對 CD4+效應細胞顯示更大的 CTL 活性(23 倍更低的 EC50)。相比 5T4 X CD3 DART™，使用全 T 細胞效應子，**5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子為 22 倍更有效，並且 **5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子是 25 倍更有效。

【0378】 **實施例 5**

【0379】 **示例性抗 CD3、抗 CD8、抗 ROR1 三特異性結合分子的特性**

【0380】 構建了對疾病相關的抗原 ROR1 具有特異性的另外示例性三特異性結合分子。**ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子由四條不同的多肽鏈組成(**表 14**)。

【0381】 **表 14**

多肽鏈	結構域	結合親和力
1	VL(ROR1 mAb 1)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3)	輕鏈：ROR1 重鏈：CD3
2	VL(CD3 mAb 2)-VH(ROR1 mAb 1)-K-螺旋	輕鏈：CD3 重鏈：ROR1
3	重鏈 CD8 mAb 1	CD8
4	輕鏈 CD8 mAb 1	CD8

【0382】 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:83**)：

QLVLTQSPSA SASLGSSVKL TCTLSSGHKT DTIDWYQQQP

GKAPRYLMKL EGSGSYNKGS GVPDRFGSGS SSGADRYLTI

SSLQSEDEAD YYCGTDYPGN YLFGGGTQLT VLGGGGSGGG

GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF STYAMNWVRQ

APGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKGR FTISRDDSKN

SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHGNFGNSYV SWFAYWGQGT

LVTVSSGGCG GGEVAALEKE VAALEKEVAA LEKEVAALEK

GGGDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP

EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN

STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS

KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI

AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW

QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK。

【0383】 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第二多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:84**)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ

KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA

QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQE

QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSDY YMSWVRQAPG

KGLEWVATIY PSSGKTYYAD SVKGRFTISS DNAKNSLYLQ

MNSLRAEDTA VYYCARDSYA DDAALFDIWG QGTTVTVSSG

GCGGGKVAAL KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE。

【0384】 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:85**)：

EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHFVRQR
PEQGLEWIGR IDPANDNTLY ASKFQGKATI TADTSSNTAY
MHLCSLTSGD TAVYYCGRGY GYYVFDHWGQ GTTLTVSSAS
TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN
SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS
VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT
KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK
SLSLSPG。

【0385】 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:86**)：

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTSRSIS QYLAWYQEKP
GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTISGLEP
EDFAMYYCQQ HNENPLTFGA GTKLELRRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ
ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC。

【0386】 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子由四條不同的多肽鏈組成(**表 15**)。

【0387】 **表 15**

多肽鏈	結構域	結合親和力

1	VL(ROR1 mAb 1)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3)	輕鏈:ROR1 重鏈：CD3
2	VL(CD3 mAb 2)-VH(ROR1 mAb 1)-K-螺旋	輕鏈：CD3 重鏈:ROR1
3	重鏈 CD8 mAb 2	CD8
4	輕鏈 CD8 mAb 2	CD8

【0388】 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:87**)

QLVLTQSPSA SASLGSSVKL TCTLSSGHKT DTIDWYQQQP GKAPRYLMKL EGSGSYNKGS GVPDRFGSGS SSGADRYLTI SSLQSEDEAD YYCGTDYPGN YLFGGGTQLT VLGGGGSGGG GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF STYAMNWVRQ APGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKGR FTISRDDSKN SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHGNFGNSYV SWFAYWGQGT LVTVSSGGCG GGEVAALEKE VAALEKEVAA LEKEVAALEK GGGDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK。

【0389】 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子的第二多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:88**)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQE QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSDY YMSWVRQAPG KGLEWVATIY PSSGKTYYAD SVKGRFTISS DNAKNSLYLQ MNSLRAEDTA VYYCARDSYA DDAALFDIWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAL KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE。

【0390】 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:89**)：

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DFGMNWVRQA PGKGLEWVAL IYYDGSNKFY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKPH YDGYYHFFDS WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAAG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLS CAVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL VSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNRY TQKSLSLSPG K。

【0391】 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子的第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:90**)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKGSQDIN NYLAWYQQKP GKAPKLLIYN TDILHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCYQ YNNGYTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC。

【0392】 比較 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 和 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子的特性與包含 Fc 結構域的 ROR1 X CD3 DART™的特性。使用來自結合 ROR-1 抗原的抗 ROR1 單克隆抗體 ROR1 mAb 1 的 Fv 序列構建 DART™和 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 和 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子。

【0393】 兩個 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 和 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子和 DART 在 CTL 試驗中都針對 JIMT1-luc 和 A549 靶細胞是有活性的。但是，**ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 和 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子用 CD8+ T 細胞和全 T 細胞效應子展示明顯增加的活性。

【0394】 使用螢光素酶試驗和 LDH 試驗測量 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 和 **ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2** 三特異性結合分子介導重定向殺傷靶細胞的能力。在兩種情況下，觀察到了重定向殺傷。**圖 17A-17C** 顯示對靶細胞的重定向殺傷，如使用螢光素酶試驗測量的。結果總結在**表 16** 中。

【0395】 **表 16**

三特異性結合分子	EC50			比		
	效應細胞			CD4 / CD8	CD4 / CD8	全 T
	CD4	CD8	全 T			
	JIMT-1 LUC 靶細胞(螢光素酶試驗)					
ROR1 X CD3 **DART™**	0.45	0.4064	0.3931	1.1	1.0	1.0
ROR 1 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 三特異性結合分子	0.131	0.0009	0.0015	145.3	131.3	262.1
ROR 1 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2 三特異性結合分子	0.174	0.0011	0.0016	158.0	142.7	245.7
	JIMT-1 LUC 靶細胞(LDH 試驗)					
ROR1 X CD3 **DART™**	0.291	0.7761	0.7643	0.4	1.0	1.0
ROR 1 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 三特異性結合分子	0.095	0.0017	0.0053	55.9	149.0	144.2
ROR 1 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2 三特異性結合分子	0.277	0.0021	0.0057	131.8	351.3	134.1
	A549					
ROR1 X CD3 **DART™**	0.762	0.468	0.5305	1.6	1.0	1.0
ROR 1 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 三	0.879	0.0102	0.0231	86.2	53.0	23.0

特異性結合分子						
ROR 1 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2 三特異性結合分子	1.257	0.009	0.0126	139.7	85.8	42.1

【0396】 **實施例 6**

【0397】 **示例性抗 CD3、抗 CD8、抗 Env 三特異性結合分子的特性**

【0398】 構建對疾病相關的抗原 HIV (gp140 抗原)具有特異性的另外示例性三特異性結合分子。**HIV mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子由四條不同的多肽鏈組成(**表 17**)。

【0399】 **表 17**

多肽鏈	結構域	結合親和力
1	VL(HIV mAb 1)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3)	輕鏈：HIV 重鏈：CD3
2	VL(CD3 mAb 2)-VH(HIV mAb 1)-K-螺旋	輕鏈：CD3 重鏈：HIV
3	重鏈 CD8 mAb 1	CD8
4	輕鏈 CD8 mAb 1	CD8

【0400】 **HIV mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:91**)：

DIVMTQSPDS LAVSPGERAT IHCKSSQTLL YSSNNRHSIA

WYQQRPGQPP KLLLYWASMR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLT

INNLQAEDVA IYYCHQYSSH PPTFGHGTRV EIKGGGSGGG

GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF STYAMNWVRQ APGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKGR FTISRDDSKN SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHGNFGNSYV SWFAYWGQGT LVTVSSASTK GEVAACEKEV AALEKEVAAL EKEVAALEKG GGDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK。

【0401】 **HIV mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子多肽的第二多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:92**)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGGGVF KPGGSLRLSC EASGFTFTEY YMTWVRQAPG KGLEWLAYIS KNGEYSKYSP SSNGRFTISR DNAKNSVFLQ LDRLSADDTA VYYCARADGL TYFSELLQYI FDLWGQGARV TVSSASTKGK VAACKEKVAA LKEKVAALKE KVAALKE。

【0402】 **HIV mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:93**)：

EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHFVRQR PEQGLEWIGR IDPANDNTLY ASKFQGKATI TADTSSNTAY MHLCSLTSGD TAVYYCGRGY GYYVFDHWGQ GTTLTVSSAS

TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPG。

【0403】 **HIV mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第四多肽鏈的氨基酸序列是 **SEQ ID NO:94**)：

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTSRSIS QYLAWYQEKP GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTISGLEP EDFAMYYCQQ HNENPLTFGA GTKLELRRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC。

【0404】 **HIV mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子由四條不同的多肽鏈組成(**表 18**)。

【0405】 表 **18**

多肽鏈	結構域	結合親和力
1	VL(HIV mAb 2)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3)	輕鏈：HIV 重鏈：CD3
2	VL(CD3 mAb 2)-VH(HIV mAb 2)-K-螺旋	輕鏈：CD3

		重鏈：HIV
3	重鏈 CD8 mAb 1	CD8
4	輕鏈 CD8 mAb 1	CD8

【0406】 **HIV mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第一多肽鏈的氨基酸序列是 **SEQ ID NO:95**)：

QSALTQPPSA SGSPGQSVTI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQH
HPGKAPKLII SEVNNRPSGV PDRFSGSKSG NTASLTVSGL
QAEDEAEYYC SSYTDIHNFV FGGGTKLTVL GGGSGGGGEV
QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSTY AMNWVRQAPG
KGLEWVGRIR SKYNNYATYY ADSVKGRFTI SRDDSKNSLY
LQMNSLKTED TAVYYCVRHG NFGNSYVSWF AYWGQGTLVT
VSSASTKGEV AACEKEVAAL EKEVAALEKE VAALEKGGGD
KTHTCPPCPA PEAAGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC
VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLWCLVKG FYPSDIAVEW
ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK。

【0407】 **HIV mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第二多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:96**)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ
KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA
QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV
QLQESGPGLV KPSQTLSLSC TVSGGSSSSG AHYWSWIRQY

PGKGLEWIGY IHYSGNTYYN PSLKSRITIS QHTSENQFSL KLNSVTVADT AVYYCARGTR LRTLRNAFDI WGQGTLVTVS SASTKGKVAA CKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE。

【0408】 **HIV mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:97**)：

EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHFVRQR PEQGLEWIGR IDPANDNTLY ASKFQGKATI TADTSSNTAY MHLCSLTSGD TAVYYCGRGY GYYVFDHWGQ GTTLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPG。

【0409】 **HIV mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:98**)：

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTSRSIS QYLAWYQEKP GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTISGLEP EDFAMYYCQQ HNENPLTFGA GTKLELRRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ

ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC。

【0410】 製備具有夠結合人免疫缺陷病毒(HIV)的 gp140 抗原的結合結構域的三特異性結合分子(即，HIV mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 三特異性結合分子和 HIV mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 三特異性結合分子)。

【0411】 作為初始步驟，評估 **HIV mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 和 **HIV mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的能力。0.2 M 碳酸鹽-碳酸氫鹽緩衝液(pH 9.4)中 2 μg/ml 的 JR-FL 菌株 gp140 蛋白質被塗布在固體載體上，然後用三特異性結合分子溫育(開始濃度為 5 μg/ml，隨後 1:2 進行連續稀釋)。試驗結束時，用包含 3%牛血清白蛋白(BSA)的磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)阻斷結合。使用其已經綴合辣根過氧化物酶(HRP)的抗人 IgG，通過 ELISA (pico (ThermoScientific-Pierce)檢測結合。試驗也與固定的人 CD3 (2 μg/ml)一起使用，以便評估分子結合 CD3 的能力。發現兩個三特異性結合分子能夠結合可溶的、固定的 gp140 蛋白質(**圖 18A**)和結合人 CD3 (**圖 18B**)。進行夾心 ELISA，以證明三特異性結合分子能夠配位結合 gp140 和 CD3 二者。為了此，0.2 M 碳酸鹽-碳酸氫鹽緩衝液(pH 9.4)中的 2 μg/ml 的 JR-FL 菌株 gp140 蛋白質被塗布在固體載體上，然後用三特異性結合分子溫育(開始濃度為 5 μg/ml，隨後 1:2 進行連續稀釋)。然後添加用生物素標記的人 CD3 (0.5 μg/ml)。使用鏈黴抗生物素-HRP 綴合物，通過 ELISA (pico (ThermoScientific-Pierce)檢測結合。**圖 18C** 顯示三特異性結合分子，其能夠配位結合 gp140 和 CD3 二者。

【0412】 發現三特異性結合分子能夠結合表達 HIV env 蛋白質的細胞的表面。為了顯示本發明的此方面，在多西環素誘導下表達 HIV env 的 HEK293/D375 細胞用三特異性結合分子溫育。使用生物素化的抗人 Fc 抗體和鏈黴抗生物素-APC 進行結合的檢測。如**圖 19A-19C** 中顯示，發現與對照三特異性結合分子相反，兩個三特異性結合分子都能夠結合 HEK293/D375 細胞(**圖 19C**)。

【0413】 為了顯示這樣的三特異性結合分子介導重定向殺傷 HIV-感染細胞的能力，評估這樣的分子結合 PBMC 的能力。用 ACK 裂解緩衝液裂解人血液，用 PBS 沖洗 2X 並且再懸浮在包含 10%人 AB 血清的 FACS 緩衝液中，並且在室溫下溫育 20 分鐘。其後，通過離心使細胞成小球，並且再懸浮(4 x 10^6 細胞/mL)在 FACS 緩衝液中。50 µL 的連續滴定的三特異性結合分子被添加至 96 孔深板的孔中。然後，將包含 0.01%氮化鈉的 FACS 緩衝液中 50 µL 的細胞(4 x 10^6 細胞/mL)充分混合的細胞添加至相應的孔，並且使用移液管充分混合。在暗處 2-8℃下溫育板約 45 分鐘。溫育結束時，通過添加 300 µL 的 FACS 緩衝液至每個孔沖洗細胞兩次，板在 1,200 rpm 下離心 5 分鐘，並丟棄上清液。將細胞小球再懸浮於在包含 0.01%氮化鈉的 FACS 緩衝液中製備的山羊抗人 IgG Fcγ-PE、CD5-APC 和 CD4-PerCP5.5 的 100 µL 混合物中，並且細胞在暗處 2-8℃下溫育約 45 分鐘。溫育結束時，沖洗細胞，用 FACS 緩衝液再懸浮，並且用 BD Caliber 流式細胞儀進行分析。如**圖 20A-20B** 中所顯示，發現三特異性結合分子展示對 CD5+/CD4–細胞群體的特異性結合。

【0414】 在存在或沒有四環素的情況下，三特異性結合分子在 37℃在存在表達 HIV env 的 Jurkat 522 FY 細胞和全 T 細胞的情況下溫育

24 小時，並且使用 LDH 試驗測量細胞毒性。如**圖 21A-21F** 中顯示，三特異性結合分子介導大量的細胞毒性。

【0415】 使用純化全 T 細胞和表達 HIV env 的 Jurkat 522 FY 細胞進行細胞毒性分析，並且測量活細胞的百分數。此分析的結果顯示在**圖 22A-22B** 中。

【0416】 使用 CD4+、CD8+或全 T 細胞，評估三特異性結合分子對表達 HIV env 的 Jurkat 522 FY 細胞的 CTL 活性。針對 **HIV mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子，此評估的結果顯示在**圖 23A-23C** 中。針對 **HIV mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子，此評估的結果顯示在**圖 24A-24C** 中。**表 19** 總結了結果。

【0417】 **表 19 Jurkat 細胞 522FY(相對於來自靶細胞 w/o 結合分子的 LDH MR 的%細胞毒性)**

HIV mAb 1，CD3 mAb 2 **DART™**		HIV mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 三特異性結合分子		HIV mAb 2，CD3 mAb 2 **DART™**		HIV mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 三特異性結合分子	
EC_{50} (nM)	**$E_{最大}$ (%)**	**EC_{50} (nM)**	**$E_{最大}$ (%)**	**EC_{50} (nM)**	**$E_{最大}$ (%)**	**EC_{50} (nM)**	**$E_{最大}$ (%)**
CD4							
0.67	13	0.36	15	0.25	9	0.45	8
CD8							

0.20	18	0.00781	37	0.052	16	0.00040	27
全 T							
0.31	19	0.044	38	0.26	16	0.0015	23

【0418】 評估不同比或靶：效應細胞的影響。**表 20** 總結了獲得的結果。

【0419】 **表 20**

	Jurkat 細胞 522FY **(相對於來自靶細胞 w/o 結合分子的 LDH MR 的%細胞毒性**							
	HIV mAb 1 結合結構域				**HIV mAb 2 結合結構域**			
	E/T = 5:1		**E/T = 10:1**		**E/T = 5:1**		**E/T = 10:1**	
	EC_{50} (nM)	**$E_{最大}$ (%)**	**EC_{50} (nM)**	**$E_{最大}$ (%)**	**EC_{50} (nM)**	**$E_{最大}$ (%)**	**EC_{50} (nM)**	**$E_{最大}$ (%)**
DART™	0.076	26	0.066	27	0.00057	24	0.00061	25
DART™	0.0092	15	0.0066	15	0.0058	15	0.0054	15
三特異性結合分子	0.00019	22	0.00029	24	0.00032	25	0.00026	24

【0420】 使用 CD4+、CD8+或全 T 細胞，也評估三特異性結合分子對表達 HIV env 的 HEK293 細胞的 CTL 活性。此評估的結果總結在**表 21** 中。

【0421】 表 21 (相對於來自靶細胞 w/o 三特異性結合分子的 LDH MR 的%細胞毒性)

HEK293 D371 細胞				HEK293 D375 細胞			
HIV mAb 1，CD3 mAb 2 DART™		HIV mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 三特異性結合分子		HIV mAb 2，CD3 mAb 2 DART™		HIV mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 三特異性結合分子	
EC_{50} (nM)	**E 最大 (%)**	**EC_{50} (nM)**	**E 最大 (%)**	**EC_{50} (nM)**	**E 最大 (%)**	**EC_{50} (nM)**	**E 最大 (%)**
CD4							
0.45	0.64	3.16	1.12	0.15	0.14	0.84	0.18
CD8							
0.029	0.0062	1.77	0.0043	0.018	0.0012	1.00	0.0020
全 T							
0.082	0.025	2.06	N/A	0.042	0.0085	1.08	N/A

【0422】 **實施例 7**

【0423】 **CD3 結合結構域親和性變體的比較**

【0424】 如上述，根據本發明任一實施方式的三特異性結合分子的 CD3、CD8 或疾病相關的抗原結合結構域可以被突變，以便分離具有更期望的結合特徵的結合結構域。使 CD3 mAb 2 結合結構域進行這樣的誘變，並且分離兩個親和性變體(CD3 mAb 2 Low 和 CD3 mAb 2 Fast)。

【0425】 抗人 CD3 mAb 2 Low 的可變輕鏈結構域的氨基酸序列是 (**SEQ ID NO:99**)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TC**RSSTGAVT** **TSNYAN**WVQQ KPGQAPRGLI G**GTNKRAP**WT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC **ALWYSNLWV**F GGGTKLTVLG。

【0426】 抗人 CD3 mAb 2 Low 的可變重鏈結構域的氨基酸序列是 (**SEQ ID NO:100**)：

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFTFS** **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVG**R IRSKYNNYAT** **YYADSVKG**RF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR **HGNFGNSYVT** **WFAY**WGQGTL VTVSS。

【0427】 抗人 CD3 mAb 2 Fast 的可變輕鏈結構域的氨基酸序列是 (**SEQ ID NO:101**)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TC**RSSTGAVT** **TSNYAN**WVQQ KPGQAPRGLI G**GTNKRAP**WT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC **ALWYSNLWV**F GGGTKLTVLG。

【0428】 抗人 CD3 mAb 2 Fast 的可變重鏈結構域的氨基酸序列是 (**SEQ ID NO:102**)：

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFTFS** **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVG**R IRSKYNNYAT** **YYADSVKG**RF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR **HKNFGNSYVT** **WFAY**WGQGTL VTVSS。

【0429】 **圖 25A-25C** 顯示這些變體的結合的動力學。CD3 mAb 2 Low (**圖 25A**)是低親和性變體，而 CD3 mAb 2 Fast (**圖 25B**)相對於野生型 CD3 mAb 2 具有更快的解離速率(**圖 25C**)。

【0430】 為了評估 CD3 結合特徵的作用，使用兩個 CD3 結合結構域突變體。利用野生型 CD3 mAb 2 可變結構域序列、對於 CD3 具有低親和性的 CD3 mAb 2 可變結構域序列和具有野生型親和性但是更快的解離速率的 CD3 mAb 2 可變結構域序列構建了三個對疾病相關的抗原 5T4 具有特異性的三特異性結合分子。5T4 可變結構域特異性和 CD8 可變結構域特異性在三個三特異性結合分子之間相同。第一個三特異性結合分子稱為 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**，並且由四條不同的多肽鏈組成(**表 22**)。

【0431】 **表 22**

多肽鏈	結構域	結合親和力
1	VL(5T4 mAb 1)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3)	輕鏈：5T4 重鏈：CD3
2	VL(CD3 mAb 2)-VH(5T4 mAb 1)-K-螺旋	輕鏈：CD3 重鏈：5T4
3	重鏈 CD8 mAb 1	CD8
4	輕鏈 CD8 mAb 1	CD8

【0432】 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:103**)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS NYLAWFQQKP GKAPKSLIYR ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP

EDVATYYCLQ YDDFPWTFGQ GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV

ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVRQAPGKGL

EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISRD DSKNSLYLQM

NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS

GGCGGGEVAA LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT

HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV

VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV

SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP

REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES

NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF

SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK。

【0433】 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第二多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:104**)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ

KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA

QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV

QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSF WMHWVRQAPG

QGLEWMGRID PNRGGTEYNE KAKSRVTMTA DKSTSTAYME

LSSLRSEDTA VYYCAGGNPY YPMDYWGQGT TVTVSSGGCG

GGKVAALKEK VAALKEKVAA LKEKVAALKE。

【0434】 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:105**)：

EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHFVRQR

PEQGLEWIGR IDPANDNTLY ASKFQGKATI TADTSSNTAY

MHLCSLTSGD TAVYYCGRGY GYYVFDHWGQ GTTLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK。

【0435】 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:106**)：

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTSRSIS QYLAWYQEKP GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTISGLEP EDFAMYYCQQ HNENPLTFGA GTKLELRRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC。

【0436】 第二個三特異性結合分子稱為 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Low /CD8 mAb 1**，並且由四條不同的多肽鏈組成(**表 23**)。

【0437】 **表 23**

多肽鏈	結構域	結合親和力
1	VL(5T4 mAb 1)-VH(CD3 mAb 2 Low)-E-螺旋-(CH2-CH3)	輕鏈：5T4 重鏈：CD3

2	VL(CD3 mAb 2 Low)-VH(5T4 mAb 1)-K-螺旋	輕鏈：CD3 重鏈：5T4
3	重鏈 CD8 mAb 1	CD8
4	輕鏈 CD8 mAb 1	CD8

【0438】 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Low /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:107**)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS NYLAWFQQKP
GKAPKSLIYR ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP
EDVATYYCLQ YDDFPWTFGQ GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV
ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVRQAPGKGL
EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISRD DSKNSLYLQM
NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVTWFAYW GQGTLVTVSS
ASTKGEVAAC EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH
TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV
DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN
GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK。

【0439】 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Low /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第二多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:108**)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ
KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA
QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGGQV

QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSF WMHWVRQAPG QGLEWMGRID PNRGGTEYNE KAKSRVTMTA DKSTSTAYME LSSLRSEDTA VYYCAGGNPY YPMDYWGQGT TVTVSSASTK GKVAACKEKV AALKEKVAAL KEKVAALKE。

【0440】 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Low /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:109**)：

EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHFVRQR PEQGLEWIGR IDPANDNTLY ASKFQGKATI TADTSSNTAY MHLCSLTSGD TAVYYCGRGY GYYVFDHWGQ GTTLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK。

【0441】 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Low /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:110**)：

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTSRSIS QYLAWYQEKP GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTISGLEP EDFAMYYCQQ HNENPLTFGA GTKLELRRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ

ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC。

【0442】 第三個三特異性結合分子稱為 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Fast/CD8 mAb 1**，並且由四條不同的多肽鏈組成(**表 24**)。

【0443】 **表 24**

多肽鏈	結構域	結合親和力
1	VL(5T4 mAb 1)-VH(CD3 mAb 2 Fast)-E-螺旋-(CH2-CH3)	輕鏈：5T4 重鏈：CD3
2	VL(CD3 mAb 2 Fast)-VH(5T4 mAb 1)-K-螺旋	輕鏈：CD3 重鏈：5T4
3	重鏈 CD8 mAb 1	CD8
4	輕鏈 CD8 mAb 1	CD8

【0444】 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Fast /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第一多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:111**)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS NYLAWFQQKP GKAPKSLIYR ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCLQ YDDFPWTFGQ GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISRD DSKNSLYLQM NSLKTEDTAV YYCVRHKNFG NSYVTWFAYW GQGTLVTVSS ASTKGEVAAC EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS

VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK。

【0445】 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Fast /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第二多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:112**)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSF WMHWVRQAPG QGLEWMGRID PNRGGTEYNE KAKSRVTMTA DKSTSTAYME LSSLRSEDTA VYYCAGGNPY YPMDYWGQGT TVTVSSASTK GKVAACKEKV AALKEKVAAL KEKVAALKE。

【0446】 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Fast /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第三多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:113**)：

EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHFVRQR PEQGLEWIGR IDPANDNTLY ASKFQGKATI TADTSSNTAY MHLCSLTSGD TAVYYCGRGY GYYVFDHWGQ GTTLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT

KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK。

【0447】 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Fast /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:114**)：

【0448】 DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTSRSIS QYLAWYQEKP GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTISGLEP EDFAMYYCQQ HNENPLTFGA GTKLELRRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC。

【0449】 如上述處理健康供體的人 PBMC，並且用 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子、**5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Low /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子和 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Fast /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子溫育。5T4 X CD3 DART™ (具有野生型、Low 和 Fast CD3 特異性)用作對照。**5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Low /CD8 mAb 1** 和 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Fast /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子包含突變的 CD3 結合結構域，其展示對於 CD3 改變的親和性和結合動力學。

【0450】 相比 DART™對照，發現三特異性結合分子展示對 $CD5^+$ $CD4^+$細胞更弱的結合(**圖 26A**)，但是對 $CD5^+$ $CD4^-$細胞更強的結合(**圖 26B**)。

【0451】 使用 LDH 試驗，**圖 27A-27C** 顯示 CD3 mAb 變體對 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的細胞毒性的作用。使用螢光素酶試驗並且用使 B7-H3 結合結構域代替 5T4 mAb 1 結合結構域的三特異性結合分子，獲得類似的結果。結果顯示，CD3 mAb 2 Low 三特異性結合分子展示最小的細胞毒性，但是 CD3 mAb 2 Fast 三特異性結合分子用 CD8+ T 細胞和全 T 細胞比用 CD4+ T 細胞展示更大程度的細胞毒性。

【0452】 為了評估三特異性結合分子對細胞因數特徵的作用，在存在增加濃度的 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子、**5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Low /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子和 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Fast /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的情況下溫育來自兩個供體的 PBMC 24 小時。測量六個細胞因數(IFN-γ、TNF-α、IL-10、IL-6，IL-4 和 IL-2)的水準。結果顯示在圖 28A-28F (供體 1)和圖 29A-29F (供體 2)中。結果令人吃驚地顯示，相比僅僅靶向 CD3 並且對 CD8+ T 細胞無選擇性的 DART™，從 PBMC 釋放的細胞因數的急劇下降。

【0453】 使用全 T 細胞作為效應子，**5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子展示與 DART™類似的效力，1 pM EC50 相比 DART™的 1.3 pM。DART™的活性對於 CD4+和 CD8+ T 細胞可能已經最大。三特異性結合分子的確使活性朝著 CD8+群體偏移並且遠離 CD4+群體，就細胞因數釋放，尤其是 IL-2 和 TNFα 而言，這是有益的。

【0454】 儘管 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Low /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子能夠結合 CD4+和 CD8+ T 細胞，但是相比非突變的 CD3

mAb 2 結合結構域，其重定向這些細胞的細胞溶解的能力或由這些細胞進行細胞溶解的能力大大降低。相比 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子(EC50 的 7 倍差異)，**5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Fast /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子另一方面保持 CTL 活性，尤其用 CD8+ T 細胞相比/相對於 CD4+ T 細胞(EC50 的 75 倍差異)。**5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Fast/CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的 EC50 與 **5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1** 三特異性結合分子的類似(2.8 對 1.3 pM)，但是 CD8+對 CD4+ T 細胞靶向的顯著不同實際上消除了用人 PBMC 培養中的 5T4 X CD3 DART™觀察的細胞因數釋放。

【0455】 **實施例 8**

【0456】 **示例性三特異性結合分子的 EC50 資料總結**

【0457】 總之，構建了一系列的 14 種三特異性結合分子(**表 25**)，每個具有兩個雙抗體型結合結構域(位點 A 和位點 B)，和一個 Fab 型結合結構域(位點 C)。

【0458】 **表 25**

名稱	結合結構域		
	位點 A	位點 B	位點 C
B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1	B7-H3	CD3	CD8
CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 /B7-H3 mAb 1	CD3	CD8	B7-H3
B7-H3 mAb 1/CD8 mAb 1 /CD3 mAb 2	B7-H3	CD8	CD3
B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1	B7-H3	CD3	CD8
5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1	5T4	CD3	CD8
5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Low /CD8 mAb 1	5T4	CD3	CD8

名稱	結合結構域		
	位點 A	位點 B	位點 C
		Low	
5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Fast /CD8 mAb 1	5T4	CD3 Fast	CD8
5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1	5T4	CD3	CD8
5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2	5T4	CD3	CD8
帕利珠單抗/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1	RSV	CD3	CD8
ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1	ROR1	CD3	CD8
ROR1 mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2	ROR1	CD3	CD8
HIV mAb 1 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1	HIV	CD3	CD8
HIV mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1	HIV	CD3	CD8

【0459】 這樣的三特異性結合分子的 EC50 資料總結在**表 26** 中(靶細胞：JIMT1-luc；效應子：靶細胞比 5:1)。在一些情況下(如**表 26** 中 **NR** 顯示)，EC50 可能無法從資料計算，因為未實現最大殺傷。

【0460】 **表 26**

靶	**結合分子**	**EC50 (nM)**				**對 DART CD4/ CD8**	**對 DART EC50 w/全 T**
		CD8+	**CD4+**	**全 T**	**CD4/ CD8**		
B7H3	**B7-H3/CD3 mAb 2 DART™**	0.5090	1.1370	0.6943	2.2	1.0	1.0

靶	結合分子	EC50 (nM)				對 DART CD4/ CD8	對 DART EC50 w/全 T
		CD8+	**CD4+**	**全 T**	**CD4/ CD8**		
	B7-H3/CD8 mAb 1 DART™	**NR**	**NR**	**NR**	**—**	**—**	**—**
	B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 三特異性結合分子	0.0054	0.0721	0.0082	13.3	5.9	85.1
	B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2 三特異性結合分子	0.0051	0.3138	0.0058	61.5	27.5	119.7
	CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 /B7-H3 mAb 1 三特異性結合分子	0.0053	0.1055	0.0113	19.8	8.9	61.4
	B7-H3 mAb	0.4125	1.1030	0.5347	2.7	1.2	1.3

靶	結合分子	EC50 (nM)				對 DART CD4/ CD8	對 DART EC50 w/全 T
		CD8+	**CD4+**	**全 T**	**CD4/ CD8**		
	1/CD8 mAb 2 /CD3 mAb 2 三特異性結合分子						
5T4	**5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 DART™**	0.0012	0.0013	0.0013	1.1	1.0	1.0
	5T4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 三特異性結合分子	0.0007	0.0045	0.0009	6.8	6.4	1.5
	5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2 Low/CD8 mAb 1 三特異性結合分子	**NR**	**NR**	**NR**	**—**	**—**	**—**
	5T4 mAb 1 /CD3 mAb 2	0.0021	0.1598	0.0028	74.7	70.6	**0.5**

靶	結合分子	EC50 (nM)				對 DART CD4/ CD8	對 DART EC50 w/全 T
		CD8+	**CD4+**	**全 T**	**CD4/ CD8**		
	Fast/CD8 mAb 1 三特異性結合分子						
	5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2DART™	0.0362	0.0561	0.0449	1.6	1.0	1.0
	5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 三特異性結合分子	0.0013	0.0435	0.0020	32.7	21.1	22.1
	5T4 mAb 2 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2 三特異性結合分子	0.0015	0.0336	0.0018	23.2	14.9	25.0
RSV	**帕利珠單抗 /CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1**	**NR**	**NR**	**NR**	**—**	**—**	**—**

靶	結合分子	EC50 (nM)				對DART CD4/CD8	對DART EC50 w/全 T
		CD8+	CD4+	全 T	CD4/CD8		
	三特異性結合分子						
ROR1	ROR1 /CD3 mAb 2 DART™	0.7761	0.2911	0.7643	0.4	1.0	1.0
	ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 1 三特異性結合分子	0.0017	0.095	0.0053	55.9	149.0	144.2
	ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2 /CD8 mAb 2 三特異性結合分子	0.0021	0.2767	0.0057	131.8	351.3	134.1

【0461】 本說明書中提到的所有出版物和專利通過參考以如同每個出版物或專利申請具體和單獨說明通過引用以其整體併入相同的程度併入本文。儘管已經結合其具體的實施方式描述了本發明，但是應當理解，其能夠進一步修飾並且本申請旨在覆蓋本發明的任何變型、用途

或改編，此變型、用途或改編大體上遵循本發明原則並且包括這樣的與本公開的偏離，如同其在本發明所屬領域的已知或常規實施範圍內和如同其可應用於上文闡釋的本質特徵一樣。

【符號說明】

【0462】

VL	結構域
VL1	結構域
VL2	結構域
VH	結構域
VH1	結構域
VH2	結構域
CH1	結構域
CH2	結構域
CH3	結構域
CL	結構域

【序列表】

〈110〉 宏觀基因股份有限公司

〈120〉 三特異性結合分子和其使用方法

〈130〉 1301.0114PCT

〈150〉 US 62/107,824
〈151〉 2015-01-26

〈150〉 US 62/008,229
〈151〉 2014-06-05

〈150〉 US 62/004,571
〈151〉 2014-05-29

〈160〉 133

〈210〉 1
〈211〉 8
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 接頭 1

〈400〉 1

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

〈210〉 2
〈211〉 5
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 含有半胱氨酸的結構域（"接頭 2"）

〈400〉 2

Gly Gly Cys Gly Gly

1 5

〈210〉 3
〈211〉 28
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 E-螺旋異源二聚體促進結構域

〈400〉 3

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

〈210〉 4
〈211〉 28
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 K-螺旋異源二聚體促進結構域

〈400〉 4

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

〈210〉 5
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

<220>
<223> 含有半胱氨酸的接頭肽("接頭 3")

<400> 5

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 6
<211> 219
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(218)
<223> 人野生型 IgG CH2-CH3 結構域

<400> 6

Ala Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
1 5 10 15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
20 25 30

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
35 40 45

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
50 55 60

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
65 70 75 80

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
85 90 95

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
115 120 125

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
130 135 140

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
145 150 155 160

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
165 170 175

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
180 185 190

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
195 200 205

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

〈210〉 7
〈211〉 217
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 "攜帶杵的" CH2-CH3 結構域

〈400〉 7

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

〈210〉 8
〈211〉 217
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 "攜帶臼的" IgG CH2-CH3 結構域

〈400〉 8

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

〈210〉 9
〈211〉 98
〈212〉 PRT
〈213〉 智人

〈220〉
〈221〉 MISC_FEATURE
〈222〉 (1)..(98)
〈223〉 人 IgG1 CH1 結構域

<400> 9

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(15)
<223> 人 IgG1 鉸鏈結構域

<400> 10

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(6)
<223> 含有半胱氨酸的人 CL 結構域的部分

<400> 11

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(6)
<223> 含有半胱氨酸的人 IgG 鉸鏈結構域的部分

<400> 12

Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> 人 IgG1 CL κ 結構域

<400> 13

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 14
<211> 104
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(104)

〈223〉 人 IgG1 CL λ2 結構域

〈400〉 14

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
50 55 60

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100

〈210〉 15
〈211〉 5
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 肽接頭

〈400〉 15

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽接頭

<400> 16

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu
1 5

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> OKT3 抗-CD3 抗體輕鏈可變結構域

<400> 17

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
100 105

<210> 18
<211> 192
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(192)
<223> OKT3 抗-CD3 抗體重鏈可變結構域

<400> 18

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
180 185 190

〈210〉 19
〈211〉 106
〈212〉 PRT
〈213〉 小家鼠

〈220〉
〈221〉 MISC_FEATURE
〈222〉 (1)..(106)
〈223〉 M291 抗-CD3 抗體輕鏈可變結構域

〈400〉 19

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Thr Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 20
<211> 120
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> M291 抗-CD3 抗體重鏈可變結構域

<400> 20

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr His Tyr Asn Gln Lys Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ser Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 21
<211> 130
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(130)
<223> YTH12.5 抗-CD3 抗體輕鏈可變結構域

<400> 21

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Pro Asn Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Leu Gly Ser Thr Val Lys Leu Ser Cys Thr Leu Ser Ser Gly Asn Ile
35 40 45

Glu Asn Asn Tyr Val His Trp Tyr Gln Leu Tyr Glu Gly Arg Ser Pro
50 55 60

Thr Thr Met Ile Tyr Asp Asp Asp Lys Arg Pro Asp Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Arg Ser Ser Asn Ser Ala Phe Leu Thr
85 90 95

Ile His Asn Val Ala Ile Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys His Ser
100 105 110

Tyr Val Ser Ser Phe Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
115 120 125

Leu Arg
130

〈210〉 22
〈211〉 138
〈212〉 PRT
〈213〉 小家鼠

〈220〉
〈221〉 MISC_FEATURE
〈222〉 (1)..(138)
〈223〉 YTH12.5 抗-CD3 抗體重鏈可變結構域

<400> 22

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Phe Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Thr Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Phe Arg Gln Tyr Ser Gly Gly Phe Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 23
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化的抗-CD3 "mAb 1"輕鏈可變結構域變體 1

<400> 23

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Asp Ser Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 24
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化的抗-CD3 "mAb 1"輕鏈可變結構域變體 2

<400> 24

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Ser Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 25
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化的抗-CD3 "mAb 1"重鏈可變結構域

<400> 25

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Ser
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Pro Gln Val His Tyr Asp Tyr Asn Gly Phe Pro Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

〈210〉 26
〈211〉 110
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人源化的抗-CD3 "mAb 2"輕鏈可變結構域

〈400〉 26

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

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

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

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

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

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

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

〈210〉 27
〈211〉 125
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人源化的抗-CD3 "mAb 2"重鏈可變結構域

〈400〉 27

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

〈210〉 28
〈211〉 125
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人源化的抗-CD3 "mAb 2"重鏈可變結構域 D65G
變體

〈400〉 28

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser

65 70 75 80

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

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

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

〈210〉 29
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 小家鼠

〈220〉
〈221〉 MISC_FEATURE
〈222〉 (1)..(112)
〈223〉 OKT8 抗-CD8 抗體輕鏈可變結構域

〈400〉 29

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

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

Asp Asn Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Val Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 30
<211> 120
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> OKT8 抗-CD8 抗體重鏈可變結構域

<400> 30

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Ser Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Phe Arg Tyr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 31
<211> 106
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(106)
<223> TRX2 抗-CD8 抗體輕鏈可變結構域

<400> 31

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Gly Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Asn Asn Gly Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 32
<211> 121
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(121)
<223> TRX2 抗-CD8 抗體重鏈可變結構域

<400> 32

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe
20 25 30

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

Ala Leu Ile Tyr Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Pro His Tyr Asp Gly Tyr Tyr His Phe Phe Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

〈210〉 33
〈211〉 110
〈212〉 PRT
〈213〉 小家鼠

〈220〉
〈221〉 MISC_FEATURE
〈222〉 (1)..(110)
〈223〉 A32 抗-HIV gp120 抗體輕鏈可變結構域

〈400〉 33

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

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln His His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

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

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Asp Ile
85 90 95

His Asn Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 34
<211> 123
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(123)
<223> A32 抗-HIV gp120 抗體重鏈可變結構域

<400> 34

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

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

Ala His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Tyr Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Gln His Thr Ser Glu Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Val Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Arg Thr Leu Arg Asn Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 113
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(113)
<223> 7B2 抗-HIV gp41 抗體輕鏈可變結構域

<400> 35

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

Glu Arg Ala Thr Ile His Cys Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Arg His Ser Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Trp Ala Ser Met Arg Leu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Asn Asn Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95

Tyr Ser Ser His Pro Pro Thr Phe Gly His Gly Thr Arg Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 36
<211> 126
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(126)
<223> 7B2 抗-HIV gp41 抗體重鏈可變結構域

<400> 36

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Phe Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Lys Asn Gly Glu Tyr Ser Lys Tyr Ser Pro Ser Ser
50 55 60

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

Leu Gln Leu Asp Arg Leu Ser Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ala Asp Gly Leu Thr Tyr Phe Ser Glu Leu Leu Gln Tyr Ile
100 105 110

Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Ala Arg Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 37
〈211〉 106
〈212〉 PRT
〈213〉 小家鼠

〈220〉
〈221〉 MISC_FEATURE
〈222〉 (1)..(106)
〈223〉 帕利珠單抗抗-RSV 糖蛋白 F 抗體輕鏈可變結構域

〈400〉 37

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

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

〈210〉 38
〈211〉 120
〈212〉 PRT
〈213〉 小家鼠

〈220〉
〈221〉 MISC_FEATURE
〈222〉 (1)..(120)
〈223〉 帕利珠單抗抗-RSV 糖蛋白 F 抗體重鏈可變結構域

〈400〉 38

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

〈210〉 39
〈211〉 107
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 "BRCA84D-5VL" 人源化的抗-B7-H3 抗體輕鏈可變結構域

〈400〉 39

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 40
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> "BRCA84D-2VH" 人源化的抗-B7-H3 抗體重鏈可變結構域

<400> 40

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> "BRCA69D" 人源化的抗-B7-H3 抗體輕鏈可變結構域

<400> 41

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85 90 95

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

〈210〉 42
〈211〉 120
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 "BRCA69D" 人源化的抗-B7-H3 抗體重鏈可變結構域

〈400〉 42

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

〈210〉 43

<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> "PRCA157" 人源化的抗-B7-H3 抗體輕鏈可變結構域

<400> 43

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Arg Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 44
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> "PRCA157" 人源化的抗-B7-H3 抗體重鏈可變結構域

<400> 44

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Asp Gly Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 45
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化的抗-A33 抗體輕鏈可變結構域

<400> 45

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Ile Ser Phe Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 46
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化的抗-A33 抗體重鏈可變結構域

<400> 46

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

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

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

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

〈210〉 47
〈211〉 107
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人源化的抗-5T4 抗體 "mAb 1"輕鏈可變結構域

〈400〉 47

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

〈210〉 48
〈211〉 118
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人源化的抗-5T4 抗體 "mAb 1"重鏈可變結構域

〈400〉 48

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Arg Gly Gly Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Ala
50 55 60

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

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

Ala Gly Gly Asn Pro Tyr Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

〈210〉 49
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人源化的抗-5T4 抗體 "mAb 2"輕鏈可變結構域

〈400〉 49

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

〈210〉 50
〈211〉 127
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人源化的抗-5T4 抗體 "mAb 2"重鏈可變結構域

〈400〉 50

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Gly Pro Leu Phe Thr Thr Val Val Asp Pro Asn Ser Tyr
100 105 110

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 51
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化的抗-ROR1 mAb 1 抗體輕鏈可變結構域

<400> 51

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

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gly His Lys Thr Asp Thr
20 25 30

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

Lys Leu Glu Gly Ser Gly Ser Tyr Asn Lys Gly Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Gly Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Asp

85 90 95

Tyr Pro Gly Asn Tyr Leu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 52
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化的抗-ROR1 mAb 1抗體重鏈可變結構域

<400> 52

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Ala Ala Leu Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> 2A2 抗-ROR1 抗體輕鏈可變結構域

<400> 53

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Ile Met Ser Thr Thr Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Ala Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Ile Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 54
<211> 118
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(118)
<223> 2A2 抗-ROR1 抗體重鏈可變結構域

<400> 54

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

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Glu Met His Trp Val Ile Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Gly Tyr Tyr Asp Tyr Asp Ser Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

<210> 55
<211> 110
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(110)
<223> R11 抗-ROR1 抗體輕鏈可變結構域

<400> 55

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

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Arg
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Val Gly Asn Val Ser
85 90 95

Tyr Arg Thr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 56
<211> 116
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(116)
<223> R11 抗-ROR1 抗體重鏈可變結構域

<400> 56

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Ser Asp Ile Asn Asp Tyr Pro
20 25 30

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Phe Ile Asn Ser Gly Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Val Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
65 70 75 80

Ser Leu Thr Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Tyr
85 90 95

Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Ile Ser Ser
115

<210> 57
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(112)
<223> R12 抗-ROR1 抗體輕鏈可變結構域

<400> 57

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

Pro Ala Lys Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Ala His Lys Thr Asp Thr
20 25 30

Ile Asp Trp Tyr Gln Gln Leu Gln Gly Glu Ala Pro Arg Tyr Leu Met
35 40 45

Gln Val Gln Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Lys Arg Pro Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ile Ile Pro
65 70 75 80

Ser Val Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ala Asp Tyr
85 90 95

Ile Gly Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Thr Gly
100 105 110

<210> 58
<211> 121

<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(121)
<223> R12 抗-ROR1 抗體重鏈可變結構域

<400> 58

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

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ala Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Arg Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Gly Ala Leu Phe Asn Ile Trp Gly
100 105 110

Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser
115 120

<210> 59

〈211〉 504
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 B7-H3 mAb 1/ CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 三特異性結合分子(VL(B7-H3 mAb 1)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3))的第一多肽鏈

〈400〉 59

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
115 120 125

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

130 135 140

Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
165 170 175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
180 185 190

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
210 215 220

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
245 250 255

Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu
260 265 270

Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
275 280 285

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
290 295 300

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

305 310 315 320

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
325 330 335

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
340 345 350

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
355 360 365

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
370 375 380

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
385 390 395 400

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
405 410 415

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
420 425 430

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
435 440 445

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
450 455 460

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
465 470 475 480

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

485 490 495

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500

<210> 60
<211> 272
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性 B7-H3 mAb 1/ CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 三特異性結合分子(VL(CD3 mAb 2)-VH(B7-H3 mAb 1)-K-螺旋)的第二多肽鏈

<400> 60

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

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

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

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

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

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly

100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr
165 170 175

Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr
210 215 220

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
225 230 235 240

Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
245 250 255

Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

〈210〉 61

<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性 B7-H3 mAb 1/ CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 三特異性結合分子(重鏈 CD8 mAb 1)的第三多肽鏈

<400> 61

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

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

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

〈210〉 62
〈211〉 214
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 B7-H3 mAb 1/ CD3 mAb 2 /
CD8 mAb 1 三特異性結合分子(輕鏈 CD8 mAb 1)的第四多肽鏈

〈400〉 62

```
Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

〈210〉 63
〈211〉 504
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 B7-H3 mAb 1/ CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 三特異性結合分子(VL(B7-H3 mAb 1)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3))的第一多肽鏈

〈400〉 63

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
115 120 125

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

Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
165 170 175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
180 185 190

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
210 215 220

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
245 250 255

Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu
260 265 270

Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
275 280 285

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
290 295 300

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
305 310 315 320

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
325 330 335

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
340 345 350

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
355 360 365

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
370 375 380

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
385 390 395 400

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
405 410 415

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
420 425 430

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
435 440 445

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
450 455 460

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
465 470 475 480

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
485 490 495

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500

〈210〉 64
〈211〉 272
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 B7-H3 mAb 1/ CD3 mAb 2 /
CD8 mAb 2 三特異性結合分子(VL(CD3 mAb 2)-VH(B7-H3
mAb 1)-K-螺旋)的第二多肽鏈

〈400〉 64

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr
165 170 175

Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr
210 215 220

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
225 230 235 240

Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
245 250 255

Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

〈210〉 65
〈211〉 451
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 B7-H3 mAb 1/ CD3 mAb 2 / CD8
mAb 2 三特異性結合分子(重鏈 CD8 mAb 2)的第三多肽鏈

〈400〉 65

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe
20 25 30

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

Ala Leu Ile Tyr Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Pro His Tyr Asp Gly Tyr Tyr His Phe Phe Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

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

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

〈210〉 66
〈211〉 213
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 B7-H3 mAb 1/ CD3 mAb 2 /
CD8 mAb 2 三特異性結合分子(輕鏈 CD8 mAb 2)的第四多肽鏈

〈400〉 66

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Gly Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Asn Asn Gly Tyr Thr
85 90 95

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

100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

〈210〉 67
〈211〉 504
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 / B7-H3 mAb 1 三特異性結合分子(VL(CD3 mAb 2)-VH(CD8 mAb 1)-E-螺旋-(CH2-CH3))的第一多肽鏈

〈400〉 67

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
115 120 125

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

Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
165 170 175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser

180 185 190

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
210 215 220

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
245 250 255

Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu
260 265 270

Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
275 280 285

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
290 295 300

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
305 310 315 320

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
325 330 335

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
340 345 350

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

355 360 365

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
370 375 380

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
385 390 395 400

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
405 410 415

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
420 425 430

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
435 440 445

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
450 455 460

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
465 470 475 480

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
485 490 495

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500

〈210〉 68
〈211〉 270
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

<220>

<223> 示例性 CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 / B7-H3 mAb 1 三特異性結合分子(VL(CD8 mAb 1)-VH(CD3 mAb 2)-K-螺旋)的第二多肽鏈

<400> 68

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu

145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr
165 170 175

Leu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr
180 185 190

Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp
210 215 220

His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly
225 230 235 240

Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

〈210〉 69
〈211〉 450
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 /
B7-H3 mAb 1 三特異性結合分子重鏈 B7-H3 mAb
1)的第三多肽鏈

〈400〉 69

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 70
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性 CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 / B7-H3 mAb 1 三特異性結合分子(輕鏈 B7-H3 mAb 1)的第四多肽鏈

<400> 70

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 71
<211> 499
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性 B7-H3 mAb 1/ CD8 mAb 1 / CD3 mAb 2 三特異性結合分子(VL(B7-H3 mAb 1)-VH(CD8 mAb 1)-E-螺旋-(CH2-CH3))的第一多肽鏈

<400> 71

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Gly Gly Gly Ser Gly

100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Met Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr
165 170 175

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr Phe Asp Val
210 215 220

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly
225 230 235 240

Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu
245 250 255

Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly
260 265 270

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

275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys

〈210〉 72
〈211〉 267
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 B7-H3 mAb 1/ CD8 mAb 1 / CD3 mAb 2 三特異性結合分子(VL(CD8 mAb 1)-VH(B7-H3 mAb1)-K-螺旋)的第二多肽鏈

〈400〉 72

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

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

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

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

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
130 135 140

Lys Asp Thr Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala
165 170 175

Ser Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
180 185 190

Thr Ala Tyr Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val
195 200 205

Tyr Tyr Cys Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys
225 230 235 240

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala

245 250 255

Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265

〈210〉 73
〈211〉 455
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 B7-H3 mAb 1/ CD8 mAb 1 / CD3
mAb 2 三特異性結合分子(重鏈 CD3 mAb 2)的第三多肽鏈

〈400〉 73

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

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

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 74
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性 B7-H3 mAb 1/ CD8 mAb 1 / CD3 mAb 2 三特異性結合分子(輕鏈 CD3 mAb 2)的第四多肽鏈

<400> 74

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 75
<211> 509
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性 5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 三特異性結合分子(VL(5T4 mAb 2)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3))的第一多肽鏈

<400> 75

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn
165 170 175

Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195 200 205

Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe
210 215 220

Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu
245 250 255

Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
260 265 270

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys
275 280 285

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
290 295 300

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
305 310 315 320

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
325 330 335

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
340 345 350

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

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
370 375 380

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
385 390 395 400

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
405 410 415

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
420 425 430

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
435 440 445

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
450 455 460

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
465 470 475 480

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
485 490 495

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505

〈210〉 76
〈211〉 279
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 三特異性結合分子(VL(CD3 mAb 2)-VH(5T4 mAb 2)-K-螺旋)的第二多肽鏈

〈400〉 76

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu
115 120 125

Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Ala
165 170 175

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

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
195 200 205

Ser Ala Val Tyr Asn Cys Ala Arg Tyr Gly Pro Leu Phe Thr Thr Val
210 215 220

Val Asp Pro Asn Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu
245 250 255

Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
275

<210> 77
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性 5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 三特異性結合分子(重鏈 CD8 mAb 1)的第三多肽鏈

<400> 77

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

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

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

〈210〉 78
〈211〉 214
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 三特異性結合分子(輕鏈 CD8 mAb 1)的第四多肽鏈

〈400〉 78

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

〈210〉 79

〈211〉 509
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 三特異性結合分子(VL(5T4 mAb 2)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3))的第一多肽鏈

〈400〉 79

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn
165 170 175

Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195 200 205

Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe
210 215 220

Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu
245 250 255

Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
260 265 270

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys
275 280 285

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
290 295 300

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

305 310 315 320

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
325 330 335

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
340 345 350

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

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
370 375 380

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
385 390 395 400

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
405 410 415

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
420 425 430

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
435 440 445

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
450 455 460

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
465 470 475 480

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

485 490 495

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505

〈210〉 80
〈211〉 279
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 三特異性結合分子(VL(CD3 mAb 2)-VH(5T4 mAb 2)-K-螺旋)的第二多肽鏈

〈400〉 80

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

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

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

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

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

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly

100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu
115 120 125

Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Ala
165 170 175

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

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
195 200 205

Ser Ala Val Tyr Asn Cys Ala Arg Tyr Gly Pro Leu Phe Thr Thr Val
210 215 220

Val Asp Pro Asn Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu
245 250 255

Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu

〈210〉 81
〈211〉 451
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 2 三特異性結合分子(重鏈 CD8 mAb 2)的第三多肽鏈

〈400〉 81

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe
20 25 30

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

Ala Leu Ile Tyr Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Pro His Tyr Asp Gly Tyr Tyr His Phe Phe Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

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

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

〈210〉 82
〈211〉 213

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性 5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 2 三特異性結合分子(輕鏈 CD8 mAb 2)的第四多肽鏈

<400> 82

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Gly Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Asn Asn Gly Tyr Thr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

〈210〉 83
〈211〉 510
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 三特異性結合分子(VL(ROR1 mAb 1)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3))的第一多肽鏈

〈400〉 83

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

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gly His Lys Thr Asp Thr
20 25 30

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

Lys Leu Glu Gly Ser Gly Ser Tyr Asn Lys Gly Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Gly Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Asp
85 90 95

Tyr Pro Gly Asn Tyr Leu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
130 135 140

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
145 150 155 160

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
165 170 175

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
180 185 190

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
195 200 205

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
210 215 220

Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala
245 250 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
260 265 270

Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr
275 280 285

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
290 295 300

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
305 310 315 320

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
325 330 335

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
340 345 350

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

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
370 375 380

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
385 390 395 400

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
405 410 415

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
420 425 430

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
435 440 445

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
450 455 460

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
465 470 475 480

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
485 490 495

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505 510

<210> 84
<211> 273
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性 ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 三特異性結合分子(VL(CD3 mAb 2)-VH(ROR1 mAb 1)-K-螺旋)的第二多肽鏈

<400> 84

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr
165 170 175

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn
180 185 190

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Ala Ala
210 215 220

Leu Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala
245 250 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
260 265 270

Glu

〈210〉 85
〈211〉 447
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 三特異性結合分子(重鏈 CD8 mAb 1)的第三多肽鏈

〈400〉 85

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

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

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

〈210〉 86
〈211〉 214
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉

〈223〉 示例性 ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 /
CD8 mAb 1 三特異性結合分子(輕鏈 CD8 mAb 1)的第四多肽鏈

〈400〉 86

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

〈210〉 87
〈211〉 510
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

<220>

<223> 示例性 ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 三特異性結合分子(VL(ROR1 mAb 1)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3))的第一多肽鏈

<400> 87

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

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gly His Lys Thr Asp Thr
20 25 30

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

Lys Leu Glu Gly Ser Gly Ser Tyr Asn Lys Gly Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Gly Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Asp
85 90 95

Tyr Pro Gly Asn Tyr Leu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
130 135 140

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln

145 150 155 160

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
165 170 175

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
180 185 190

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
195 200 205

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
210 215 220

Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala
245 250 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
260 265 270

Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr
275 280 285

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
290 295 300

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
305 310 315 320

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

325 330 335

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
340 345 350

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

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
370 375 380

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
385 390 395 400

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
405 410 415

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
420 425 430

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
435 440 445

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
450 455 460

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
465 470 475 480

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
485 490 495

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

500 505 510

〈210〉 88
〈211〉 273
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 三特異性結合分子(VL(CD3 mAb 2)-VH(ROR1 mAb 1)-K-螺旋)的第二多肽鏈

〈400〉 88

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

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

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

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

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

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

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

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

115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr
165 170 175

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn
180 185 190

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Ala Ala
210 215 220

Leu Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala
245 250 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
260 265 270

Glu

〈210〉 89

〈211〉 451
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 三特異性結合分子(重鏈 CD8 mAb 2)的第三多肽鏈

〈400〉 89

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe
20 25 30

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

Ala Leu Ile Tyr Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Pro His Tyr Asp Gly Tyr Tyr His Phe Phe Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

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

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

〈210〉 90
〈211〉 213
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉

<223> 示例性 ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 /
CD8 mAb 2 三特異性結合分子(輕鏈 CD8 mAb 2)的第四多肽鏈

<400> 90

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Gly Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Asn Asn Gly Tyr Thr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

〈210〉 91
〈211〉 509
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 三特異性結合分子(VL(HIV mAb 1)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3))的第一多肽鏈

〈400〉 91

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

Glu Arg Ala Thr Ile His Cys Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Arg His Ser Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Trp Ala Ser Met Arg Leu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Asn Asn Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95

Tyr Ser Ser His Pro Pro Thr Phe Gly His Gly Thr Arg Val Glu Ile
100 105 110

Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
130 135 140

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
145 150 155 160

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
165 170 175

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
180 185 190

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
195 200 205

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
210 215 220

Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Glu Val Ala Ala Cys
245 250 255

Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
260 265 270

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys
275 280 285

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
290 295 300

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
305 310 315 320

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
325 330 335

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
340 345 350

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

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
370 375 380

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
385 390 395 400

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
405 410 415

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
420 425 430

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
435 440 445

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
450 455 460

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
465 470 475 480

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
485 490 495

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505

〈210〉 92
〈211〉 277
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 三特異性結合分子(VL(CD3 mAb 2)-VH(HIV mAb 1)-K-螺旋)的第二多肽鏈

〈400〉 92

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Val Phe Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala Tyr Ile Ser Lys Asn Gly Glu Tyr Ser
165 170 175

Lys Tyr Ser Pro Ser Ser Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
180 185 190

Ala Lys Asn Ser Val Phe Leu Gln Leu Asp Arg Leu Ser Ala Asp Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Asp Gly Leu Thr Tyr Phe Ser
210 215 220

Glu Leu Leu Gln Tyr Ile Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Ala Arg Val
225 230 235 240

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu
245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
260 265 270

Ala Ala Leu Lys Glu
275

〈210〉 93
〈211〉 447
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 三特異性結合分子(重鏈 CD8 mAb 1)的第三多肽鏈

〈400〉 93

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

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

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

〈210〉 94
〈211〉 214
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 三特異性結合分子(輕鏈 CD8 mAb 1)的第四多肽鏈

〈400〉 94

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

〈210〉 95
〈211〉 506
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 三特異性結合分子(VL(HIV mAb 2)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3))的第一多肽鏈

<400> 95

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

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln His His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

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

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Asp Ile
85 90 95

His Asn Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr

165 170 175

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
180 185 190

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
210 215 220

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu
245 250 255

Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
260 265 270

Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
275 280 285

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
290 295 300

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
305 310 315 320

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
325 330 335

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

340 345 350

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
355 360 365

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
370 375 380

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
385 390 395 400

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
405 410 415

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
420 425 430

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
435 440 445

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
450 455 460

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
465 470 475 480

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
485 490 495

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505

〈210〉 96

〈211〉 274
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 三特異性結合分子(VL(CD3 mAb 2)-VH(HIV mAb 2)-K-螺旋)的第二多肽鏈

〈400〉 96

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
115 120 125

Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly

130 135 140

Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ala His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Tyr
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Asn
165 170 175

Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Gln His
180 185 190

Thr Ser Glu Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Val Ala
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Arg Thr Leu
210 215 220

Arg Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
225 230 235 240

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
260 265 270

Lys Glu

〈210〉 97
〈211〉 447
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

<220>

<223> 示例性 HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 三特異性結合分子(重鏈 CD8 mAb 1)的第三多肽鏈

<400> 97

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

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

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

〈210〉 98
〈211〉 214
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 三特異性結合分子(輕鏈 CD8 mAb 1)的第四多肽鏈

〈400〉 98

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 99
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-人 CD3 mAb 2 Low 的可變輕鏈結構域

<400> 99

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

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

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

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

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

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105 110

〈210〉 100
〈211〉 125
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 抗-人 CD3 mAb 2 Low 的可變重鏈結構域

〈400〉 100

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

<210> 101
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-人 CD3 mAb 2 Fast 的可變輕鏈結構域

<400> 101

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

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

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

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

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

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

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

<210> 102
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-人 CD3 mAb 2 Fast 的可變重鏈結構域

<400> 102

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

<210> 103
<211> 504
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8

mAb 1 三特異性結合分子(VL(5T4 mAb 1)-VH(CD3 mAb 2)-E-螺旋-(CH2-CH3))的第一多肽鏈

<400> 103

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
115 120 125

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

Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
165 170 175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
180 185 190

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
210 215 220

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
245 250 255

Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu
260 265 270

Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
275 280 285

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
290 295 300

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
305 310 315 320

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
325 330 335

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
340 345 350

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
355 360 365

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
370 375 380

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
385 390 395 400

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
405 410 415

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
420 425 430

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
435 440 445

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
450 455 460

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
465 470 475 480

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
485 490 495

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500

<210> 104
<211> 270
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 三特異性結合分子(VL(CD3 mAb 2)-VH(5T4 mAb
1)-K-螺旋)的第二多肽鏈

<400> 104

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Phe Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Asn Arg Gly Gly Thr
165 170 175

Glu Tyr Asn Glu Lys Ala Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Asn Pro Tyr Tyr Pro Met Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly
225 230 235 240

Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

〈210〉 105
〈211〉 448
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8

mAb 1 三特異性結合分子(重鏈 CD8 mAb 1)的第三多肽鏈

〈400〉 105

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

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

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

〈210〉 106
〈211〉 214
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 三特異性結合分子(輕鏈 CD8 mAb 1)的第四多肽鏈

〈400〉 106

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 107
<211> 503
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Low / CD8 mAb 1 三特異性結合分子(VL(5T4 mAb 1)-VH(CD3 mAb 2 Low)-E-螺旋-(CH2-CH3))的第一多肽鏈

<400> 107

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
115 120 125

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

Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
165 170 175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
180 185 190

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
210 215 220

Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Ala Ser Thr Lys Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala
245 250 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
260 265 270

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

275 280 285

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
290 295 300

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
305 310 315 320

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
325 330 335

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
340 345 350

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
355 360 365

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
370 375 380

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
385 390 395 400

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
405 410 415

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
420 425 430

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
435 440 445

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

450 455 460

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
465 470 475 480

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
485 490 495

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500

<210> 108
<211> 269
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Low / CD8 mAb 1 三特異性結合分子(VL(CD3 mAb 2 Low)-VH(5T4 mAb 1)-K-螺旋)的第二多肽鏈

<400> 108

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

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

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

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

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Phe Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Asn Arg Gly Gly Thr
165 170 175

Glu Tyr Asn Glu Lys Ala Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Asn Pro Tyr Tyr Pro Met Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys

245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265

〈210〉 109
〈211〉 448
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Low /
CD8 mAb 1 三特異性結合分子(重鏈 CD8 mAb 1)的第三多肽鏈

〈400〉 109

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

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

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

〈210〉 110
〈211〉 214

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Low / CD8 mAb 1 三特異性結合分子(輕鏈 CD8 mAb 1)的第四多肽鏈

<400> 110

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

〈210〉 111
〈211〉 503
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Fast /
CD8 mAb 1 三特異性結合分子(VL(5T4 mAb 1)-VH(CD3
mAb 2 Fast)-E-螺旋-(CH2-CH3))的第一多肽鏈

〈400〉 111

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
115 120 125

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

Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
165 170 175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
180 185 190

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Lys Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
210 215 220

Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Ala Ser Thr Lys Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala
245 250 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
260 265 270

Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
275 280 285

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
290 295 300

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
305 310 315 320

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
325 330 335

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
340 345 350

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
355 360 365

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
370 375 380

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
385 390 395 400

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
405 410 415

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
420 425 430

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
435 440 445

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
450 455 460

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
465 470 475 480

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
485 490 495

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500

<210> 112
<211> 269
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Fast / CD8 mAb 1 三特異性結合分子(VL(CD3 mAb 2 Fast)-VH(5T4 mAb 1)-K-螺旋)的第二多肽鏈

<400> 112

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Phe Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Asn Arg Gly Gly Thr
165 170 175

Glu Tyr Asn Glu Lys Ala Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Asn Pro Tyr Tyr Pro Met Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys
245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265

〈210〉 113
〈211〉 448
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Fast /
CD8 mAb 1 三特異性結合分子(重鏈 CD8 mAb 1)的第三多肽鏈

〈400〉 113

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

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

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

〈210〉 114
〈211〉 214
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 示例性 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Fast / CD8 mAb 1 三特異性結合分子(輕鏈 CD8 mAb 1)的第四多肽鏈

〈400〉 114

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

〈210〉 115
〈211〉 28
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 含有半胱氨酸的 E-螺旋異源二聚體促進結構域

〈400〉 115

Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

〈210〉 116
〈211〉 28
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 含有半胱氨酸的 K-螺旋異源二聚體促進結構域

〈400〉 116

Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

〈210〉 117
〈211〉 12
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 抗-ROR1 mAb 1 輕鏈可變結構域 CDRL1

〈400〉 117

Thr Leu Ser Ser Gly His Lys Thr Asp Thr Ile Asp
1 5 10

〈210〉 118
〈211〉 7

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-ROR1 mAb 1 輕鏈可變結構域 CDRL2

<400> 118

Leu Glu Gly Ser Gly Ser Tyr
1 5

<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-ROR1 mAb 1 輕鏈可變結構域 CDRL3

<400> 119

Gly Thr Asp Tyr Pro Gly Asn Tyr Leu
1 5

<210> 120
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-ROR1 mAb 1 重鏈可變結構域 CDRH1

<400> 120

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ser
1 5 10

<210> 121
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-ROR1 mAb 1 重鏈可變結構域 CDRH2

<400> 121

Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 122
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-ROR1 mAb 1 重鏈可變結構域 CDRH3

<400> 122

Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Ala Ala Leu Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 123
<211> 46
<212> PRT
<213> 停乳鏈球菌(Streptococcus dysgalactiae)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(46)
<223> 鏈球菌屬菌株 G148 的蛋白質 G 的白蛋白結合結構域 3 (ABD3)

<400> 123

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

〈210〉 124
〈211〉 46
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 鏈球菌屬菌株 G148 的蛋白質 G 的變異的去免疫化的白蛋白結合結構域 3 (ABD3)

〈400〉 124

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ala Ala Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

〈210〉 125
〈211〉 46
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 鏈球菌屬菌株 G148 的蛋白質 G 的變異的去免疫化的白蛋白結合結構域 3 (ABD3)

〈400〉 125

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Ser Asn Ala Lys Ser Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

〈210〉 126
〈211〉 4
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 肽接頭

〈400〉 126

Gly Gly Gly Ser
1

〈210〉 127
〈211〉 6
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 含有半胱氨酸的結構域

〈400〉 127

Ala Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

〈210〉 128
〈211〉 7
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 含有半胱氨酸的人 CL 結構域的部分的變體

<400> 128

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 129
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 可選的含有半胱氨酸的接頭肽("接頭 3")

<400> 129

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 130
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 可選的含有半胱氨酸的接頭肽("接頭 3")

<400> 130

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 131
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽接頭

<400> 131

Ala Ser Thr Lys Gly
1 5

<210> 132
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽接頭

<400> 132

Leu Glu Pro Lys Ser Ser
1 5

<210> 133
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 含有半胱氨酸的人 IgG 鉸鏈結構域的部分的變體

<400> 133

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種能夠免疫特異性結合三個不同的表位的三特異性結合分子，包括：

(I) 共價複合在一起的四條不同的多肽鏈；

(II) 能夠免疫特異性結合第一抗原上存在的表位I的抗原結合結構域I、能夠免疫特異性結合第二抗原上存在的表位II的抗原結合結構域II、和能夠免疫特異性結合第三抗原上存在的表位III的抗原結合結構域III；和

(III) Fc結構域，其中：

(A)第一多肽鏈在N-末端至C-末端方向上包括：(VL_I結構域)─(接頭1)─(VH_{II}結構域)─(接頭2)─(異源二聚體-促進結構域)─(接頭3)─(CH2-CH3結構域);

(B)第二多肽鏈在N-末端至C-末端方向上包括：(VL_{II}結構域)─(接頭1)─(VH_I結構域)─(接頭2)─(異源二聚體-促進結構域)；

(C)第三多肽鏈在N-末端至C-末端方向上包括：(VH_{III}結構域)─(包含半胱氨酸的結構域)─(CH2-CH3結構域)；

(D)第四多肽鏈在N-末端至C-末端方向上包括：(VL_{III}結構域)─(包含半胱氨酸的結構域)；

(E)該VL_I結構域是能夠結合表位I的免疫球蛋白的輕鏈可變結構域，該VH_I結構域是能夠結合表位I的免疫球蛋白的重鏈可變結構域，該VL_{II}結構域是能夠結合表位II的免疫球蛋白的輕鏈可變結構域，該VH_{II}結構域是能夠結合表位II的免疫球蛋白的重鏈可變結構域，該VL_{III}結構域是能夠結合表位III的免疫球蛋白的輕鏈可變結構域，並且該VH_{III}結構域是能夠結合表位III的免疫球蛋白的重鏈可變結構域；

(F)該VL_I結構域和該VH_I結構域締合形成該抗原結合結構域I，該VL_{II}結構域和該VH_{II}結構域締合形成該抗原結合結構域II，該VL_{III}結構域和該VH_{III}結構域締合形成該抗原結合結構域III，並且該第一多肽鏈的該CH2-CH3結構域和該第三多肽鏈的該CH2-CH3結構域締合形成該Fc結構域，該抗原結合結構域I和該抗原結合結構域II為雙抗體型結合結構域、且該抗原結合結構域III為非雙抗體型結合結構域；

(G)該第一抗原、該第二抗原和該第三抗原是相同的抗原，或獨立地與該第一抗原、該第二抗原和該第三抗原中的另一抗原相同或不同；

(H) 該第一多肽鏈和該第二多肽鏈彼此共價結合；該第一多肽鏈和該第三多肽鏈彼此共價結合；和該第三多肽鏈和該第四多肽鏈彼此共價結合；和

(I) 該接頭1包括序列SEQ ID NO:1；

該接頭2包括序列SEQ ID NO:2或131；

該接頭3包括序列SEQ ID NO:5或GGG；

該第一多肽鏈上的該異源二聚體-促進結構域是E-螺旋結構域，並且該第二多肽鏈上的該異源二聚體-促進結構域是K-螺旋結構域；或該第一多肽鏈上的該異源二聚體-促進結構域是K-螺旋結構域，並且該第二多肽鏈上的該異源二聚體-促進結構域是E-螺旋結構域，該E-螺旋結構域獨立地包括序列SEQ ID NO:3或115，和該K-螺旋結構域獨立地包括序列SEQ ID NO:4或116；和

該包含半胱氨酸的結構域獨立地包括序列SEQ ID NO：2、5、10、11、12、127、128、129、130或133。

【第2項】 如請求項1所述的三特異性結合分子，其中該第三多肽鏈包含CH1結構域，並且該第四多肽鏈包含CL結構域。

【第3項】 如請求項2所述的三特異性結合分子，其中該CH1結構域包括序列SEQ ID NO:9；和該CL結構域包括序列SEQ ID NO:13或14。

【第4項】 如請求項1所述的三特異性結合分子，其中：

第一多肽鏈的該CH2-CH3結構域是攜帶杵的CH2-CH3結構域，並且該第三多肽鏈的該CH2-CH3結構域是攜帶臼的CH2-CH3結構域；或者

該第三多肽鏈的該CH2-CH3結構域是攜帶杵的CH2-CH3結構域，並且該第一多肽鏈的該CH2-CH3結構域是攜帶臼的CH2-CH3結構域。

【第5項】 如請求項4所述的三特異性結合分子，其中：

該第一多肽鏈和該第三多肽鏈的該CH2-CH3結構域包括至少一個相對於**SEQ ID NO:6**的氨基酸取代，並且由它們締合形成的該Fc結構域展示改變的FcγR介導的效應子功能。

【第6項】 如請求項5所述的三特異性結合分子，其中該第一多肽鏈和該第三多肽鏈的該CH2-CH3結構域包括：

(A) 選自由F243L、R292P、Y300L、V305I和P396L組成的組中的一個取代；

(B)選自由以下組成的組中的兩個取代：

(1) F243L和P396L；

(2) F243L和R292P；和

(3) R292P和V305I；

(C)選自由以下組成的組中的三個取代：

(1) F243L、R292P和Y300L；

(2) F243L、R292P和V305I；

(3) F243L、R292P和P396L；和

(4) R292P、V305I和P396L；

(D)選自由以下組成的組中的四個取代：

(1) F243L、R292P、Y300L和P396L；和

(2) F243L、R292P、V305I和P396L；或

(E)選自由以下組成的組中的五個取代：

(1) F243L、R292P、Y300L、V305I和P396L；和

(2) L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L。

【第7項】 如請求項4所述的三特異性結合分子，其中：

該攜帶杵的CH2-CH3結構域包括序列SEQ ID NO:7，和

該攜帶臼的CH2-CH3結構域包括序列SEQ ID NO:8。

【第8項】 如請求項1所述的三特異性結合分子，其中：

當該接頭2包括序列SEQ ID NO:131時，SEQ ID NO:115的該E-螺旋結構域或SEQ ID NO:116的該K螺旋結構域與該接頭2相鄰；

當該接頭2包括序列SEQ ID NO:2時，SEQ ID NO:3的該E-螺旋結構域或SEQ ID NO:4的該K-螺旋結構域與該接頭2相鄰；或

當該接頭2包括序列SEQ ID NO:2時，SEQ ID NO:115的該E-螺旋結構域或SEQ ID NO:116的該K-螺旋結構域與該接頭2相鄰。

【第9項】 如請求項1所述的三特異性結合分子，其中表位I、II或III中的一個是：

CD2、CD3、CD16、CD19、CD20、CD22、CD32B、CD64、B細胞受體(BCR)、T細胞受體(TCR)或NKG2D受體的表位；或

CD8的表位；或

疾病相關的抗原的表位，其中：

該疾病相關的抗原是選自結腸癌抗原19.9；胃癌黏蛋白抗原4.2；結直腸癌抗原A33；ADAM-9；AFP癌胚抗原-甲胎蛋白；ALCAM；B7-H3；BAGE；β-聯蛋白；CA125；羧肽酶M；B1；CD5；CD19；CD20；CD22；CD23；CD25；CD27；CD28；CD30；CD33；CD36；CD40/CD154；CD45；CD56；CD46；CD52；CD79a/CD79b；CD103；CD317；CDK4；CEA癌胚抗原；CEACAM5和CEACAM6；CO-43 (血型Leb)和CO-514 (血型Lea)；CTLA-1和CTLA-4；細胞角蛋白8；DR5；E1系列(血型B)；EGF-R表皮生長因數受體；肝配蛋白受體(EphA2)；Erb (ErbB1；ErbB3；ErbB4)；肺腺癌抗原F3；抗原FC10.2；GAGE (GAGE-1；GAGE-2)；GD2/GD3/GD49/GM2/GM3；GICA 19-9；gp37(人白血病T細胞抗原)；gp75 (黑素瘤抗原)；gp100；HER-2/neu；人B-淋巴瘤抗原-CD20；人乳脂肪球抗原；人乳頭瘤病毒-E6/人乳頭瘤病毒-E7；HMW-MAA(高分子量黑素瘤抗原)；I抗原(分化抗原)；在胃腺癌中發現的I(Ma)；整聯蛋白α-V-β-6整聯蛋白β6 (ITGB6)；白介素-13受體α2 (IL13Rα2)；JAM-3；KID3；KID31；KSA (17-1A)；人肺癌抗原L6和L20；LEA；LUCA-2；M1:22:25:8；M18、M39；MAGE (MAGE-1；MAGE-3)；MART；Myl、MUC-1；MUM-1；N-乙醯葡糖氨基轉移酶；NS-10；OFA-1和OFA-2；制瘤素M (制瘤素受體β)；p15；PSA (前列腺特異性抗原)；PSMA；PEMA (多態上皮黏蛋白抗原)；PIPA；前列腺酸性磷酸鹽；R24；ROR1；SSEA-1、SSEA-3和SSEA-4；sTn；源自T細胞受體的肽；T_5A_7；組織抗原37；TAG-72；TL5 (血型A)；TNF受體(TNF-α受體、TNF-ß受體或TNF-γ受體)；TRA-1-85 (血型H)；轉鐵蛋白受體；TSTA腫瘤特異性移植抗原；VEGF-R；Le^y；或5T4的癌症抗原；或者

該疾病相關的抗原是選自病毒、和/或人類免疫缺陷病毒（HIV）或者呼吸道合胞體病毒（RSV）、和/或HIV gp41，HIV gp120或者RSV糖蛋白F的在病原體的表面或感染病原體的細胞的表面上的病原體抗原。

【第10項】如請求項9所述的三特異性結合分子，其中：

(A)該表位I、該表位II和該表位III分別是CD3的表位、CD8的表位和該疾病相關的抗原的表位；

(B)該表位I、該表位II和該表位III分別是CD3的表位、該疾病相關的抗原的表位和CD8的表位；

(C)該表位I、該表位II和該表位III分別是CD8的表位、CD3的表位和該疾病相關的抗原的表位；

(D)該表位I、該表位II和該表位III分別是CD8的表位、該疾病相關的抗原的表位和CD3的表位；

(E)該表位I、該表位II和該表位III分別是該疾病相關的抗原的表位、CD3的表位和CD8的表位；或

(F)該表位I、該表位II和該表位III分別是該疾病相關的抗原的表位、CD8的表位和CD3的表位。

【第11項】如請求項10所述的三特異性結合分子，其中：該表位I、表位II或表位III中的一個是CD3的表位，並且能夠免疫特異性結合CD3的表位的抗原結合結構域：

(a) 包括SEQ ID NO：17的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：18的重鏈可變結構域，或包括包含含有SASSSVSYMN的CDR_L1、含有DTSKLAS的CDR_L2和含有QQWSSNPFTF的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有RYTMH的CDR_H1、含

有YINPSRGYTNYNQKFKD的CDR_H2和含有YYDDHYCL的CDR_H3的重鏈可變結構域；

(b) 包括SEQ ID NO：19的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：20的重鏈可變結構域，或包括包含含有SASSSVSYMN的CDR_L1、含有DTSKLAS的CDR_L2和含有QQWSSNPPT的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有SYTMH的CDR_H1、含有YINPRSGYTHYNQKLKD的CDR_H2和含有SAYYDYDGFAY的CDR_H3的重鏈可變結構域；

(c) 包括SEQ ID NO：21的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：22的重鏈可變結構域，或包括包含含有TLSSGNIENNYVH的CDR_L1、含有DDDKRPD的CDR_L2和含有HSYVSSFNV的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有SSFPMA的CDR_H1、含有TISTSGGRTYYRDSVKG的CDR_H2和含有FRQYSGGFDY的CDR_H3的重鏈可變結構域；

(d) 包括SEQ ID NO：23的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：25的重鏈可變結構域，或包括包含含有SASSSVSYMN的CDR_L1、含有DSSKLAS的CDR_L2和含有QQWSRNPPT的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有RSTMH的CDR_H1、含有YINPSSAYTNYNQKFKD的CDR_H2和含有PQVHYDYNGFPY的CDR_H3的重鏈可變結構域；

(e) 包括SEQ ID NO：24的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：25的重鏈可變結構域，或包括包含含有SASSSVSYMN的CDR_L1、含有DSSKLAS的CDR_L2和含有QQWSRNPPT的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有RSTMH的CDR_H1、含有YINPSSAYTNYNQKFKD的CDR_H2和含有PQVHYDYNGFPY的CDR_H3的重鏈可變結構域；

(f) 包括SEQ ID NO：26的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：27的重鏈可變結構域，或包括包含含有SSTGAVTTSNYAN的CDR_L1、含有GTNKRAP的CDR_L2和含有ALWYSNLWV的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有TYAMN的CDR_H1、含有IRSKYNNYATYYADSVKD的CDR_H2和含有HGNFGNSYVSWFAY的CDR_H3的重鏈可變結構域；

(g) 包括SEQ ID NO：26的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：28的重鏈可變結構域，或包括包含含有SSTGAVTTSNYAN的CDR_L1、含有GTNKRAP的CDR_L2和含有ALWYSNLWV的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有TYAMN的CDR_H1、含有IRSKYNNYATYYADSVKG的CDR_H2和含有HGNFGNSYVSWFAY的CDR_H3的重鏈可變結構域；或者

(h) 包括SEQ ID NO：101的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：102的重鏈可變結構域，或包括包含含有RSSTGAVTTSNYAN的CDR_L1、含有GTNKRAP的CDR_L2和含有ALWYSNLWV的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有GFTFSTYAMN的CDR_H1、含有RIRSKYNNYATYYADSVKG的CDR_H2和含有HKNFGNSYVTWFAY的CDR_H3的重鏈可變結構域。

【第12項】如請求項10所述的三特異性結合分子，其中該表位I、表位II或表位III中的一個是CD8的表位，並且能夠免疫特異性結合CD8的表位的抗原結合結構域：

(a) 包括SEQ ID NO：29的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：30的重鏈可變結構域；或者

(b) 包括SEQ ID NO：31的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：32的重鏈可變結構域，或包括包含含有KGSQDINNYLA的CDR_L1、含有NTDILHT的CDR_L2和含

有YQYNNGYT的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有DFGMN的CDR_H1、含有LIYYDGSNKFYADSVKG的CDR_H2和含有PHYDGYYHFFDS的CDR_H3的重鏈可變結構域。

【第13項】如請求項10所述的三特異性結合分子，其中表位I、表位II或表位III中的一個是B7-H3、A33、5T4或ROR1的表位，並且能夠免疫特異性結合B7-H3, A33, 5T4或ROR1的該表位的抗原結合結構域：

(a) 包括SEQ ID NO：39的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：40的重鏈可變結構域，或包括包含含有KASQNVDTNVA的CDR_L1、含有SASYRYS的CDR_L2和含有QQYNNYPFT的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有GFTFSSFGMH的CDR_H1、含有YISSDSSAIYYADTVK的CDR_H2和含有GRENIYYGSRLDY的CDR_H3的重鏈可變結構域；

(b) 包括SEQ ID NO：41的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：42的重鏈可變結構域，或包括包含含有RASQDISNYLN的CDR_L1、含有YTSRLHS的CDR_L2和含有QQGNTLPPT的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有SYWMQ的CDR_H1、含有TIYPGDGDTRYTQKFK的CDR_H2和含有RGIPRLWYFDV的CDR_H3的重鏈可變結構域；

(c) 包括SEQ ID NO：43的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：44的重鏈可變結構域，或包括包含含有RASESIYSYLA的CDR_L1、含有NTKTLPE的CDR_L2和含有QHHYGTPPW的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有SYGMS的CDR_H1、含有VATINSGGSNTYYPDSLKG的CDR_H2和含有HDGGAMDY的CDR_H3的重鏈可變結構域；

(d) 包括SEQ ID NO：45的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：46的重鏈可變結構域，或包括包含含有SARSSISFMY的CDR_L1、含有DTSNLAS的CDR_L2和含有QQWSSYPLT的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有GYTFSGSWMN的CDR_H1、含有RIYPGDGETNYNGKFKD的CDR_H2和含有IYGNNVYFDV的CDR_H3的重鏈可變結構域；

(e) 包括SEQ ID NO：47的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：48的重鏈可變結構域，或包括包含含有RASQGISNYLA的CDR_L1、含有RANRLQS的CDR_L2和含有LQYDDFPWT的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有GYTFTSFWMH的CDR_H1、含有RIDPNRGGTEYNEKAKS的CDR_H2和含有GNPYYPMDY的CDR_H3的重鏈可變結構域；

(f) 包括SEQ ID NO：49的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：50的重鏈可變結構域，或包括包含含有RSSQSIVYSNGNTYLE的CDR_L1、含有KVSNRFS的CDR_L2和含有FQGSHVPFT的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有GYTFTSYWIT的CDR_H1、含有DIYPGSGRANYNEKFKS的CDR_H2和含有YGPLFTTVVDPNSYAMDY的CDR_H3的重鏈可變結構域；

(g) 包括SEQ ID NO：51的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：52的重鏈可變結構域，或包括包含含有TLSSGHKTDTID的CDR_L1、含有LEGSGSY的CDR_L2和含有GTDYPGNYL的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有GFTFSDYYMS的CDR_H1、含有TIYPSSGKTYYADSVKG的CDR_H2和含有DSYADDAALFDI的CDR_H3的重鏈可變結構域；

(h) 包括SEQ ID NO：53的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：54的重鏈可變結構域，或包括包含含有KASQNVDAAVA的CDR_L1、含有SASNRYT的CDR_L2和

含有QQYDIYPYT的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有DYEMH的CDR_H1、含有AIDPETGGTAYNQKFKG的CDR_H2和含有YYDYDSFTY的CDR_H3的重鏈可變結構域；

(i) 包括SEQ ID NO：55的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：56的重鏈可變結構域，或包括包含含有QASQSIDSNLA的CDR_L1、含有RASNLAS的CDR_L2和含有LGGVGNVSYRTS的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有DYPIS的CDR_H1、含有FINSGGSTWYASWVKG的CDR_H2和含有GYSTYYGDFNI的CDR_H3的重鏈可變結構域；或者

(j) 包括SEQ ID NO：57的輕鏈可變結構域和SEQ ID NO：58的重鏈可變結構域，或包括包含含有TLSSAHKTDTID的CDR_L1、含有GSYTKRP的CDR_L2和含有GADYIGGYV的CDR_L3的輕鏈可變結構域和包含含有AYYMS的CDR_H1、含有TIYPSSGKTYYATWVNG的CDR_H2和含有DSYADDGALFNI的CDR_H3的重鏈可變結構域。

【第14項】如請求項10所述的三特異性結合分子，其中表位I、表位II或表位III中的一個是HIV gp41的、HIV gp120的或者RSV糖蛋白F的表位，並且能夠免疫特異性結合HIV gp41的、HIV gp120的或者RSV糖蛋白F的該表位的抗原結合結構域包括：

輕鏈可變結構域SEQ ID NO: 33和重鏈可變結構域SEQ ID NO: 34，

輕鏈可變結構域SEQ ID NO: 35和重鏈可變結構域SEQ ID NO: 36，或

輕鏈可變結構域SEQ ID NO: 37和重鏈可變結構域SEQ ID NO: 38。

【第15項】 如請求項10所述的三特異性結合分子，其中表位I是HIV的表位、表位II是CD3的表位和表位III是CD8的表位，或者表位I是CD3的表位、表位II是HIV的表位和表位III是CD8的表位。

【第16項】 一種藥學組合物，其包括如請求項1-15中的任一項所述的三特異性結合分子，和藥學上可接受的載體、賦形劑或稀釋劑。

【第17項】 一種如請求項1-15中任一項所述的三特異性結合分子或者如請求項16所述的藥學組合物在製造用於治療癌症或病原體感染的藥物中的用途。

【發明圖式】

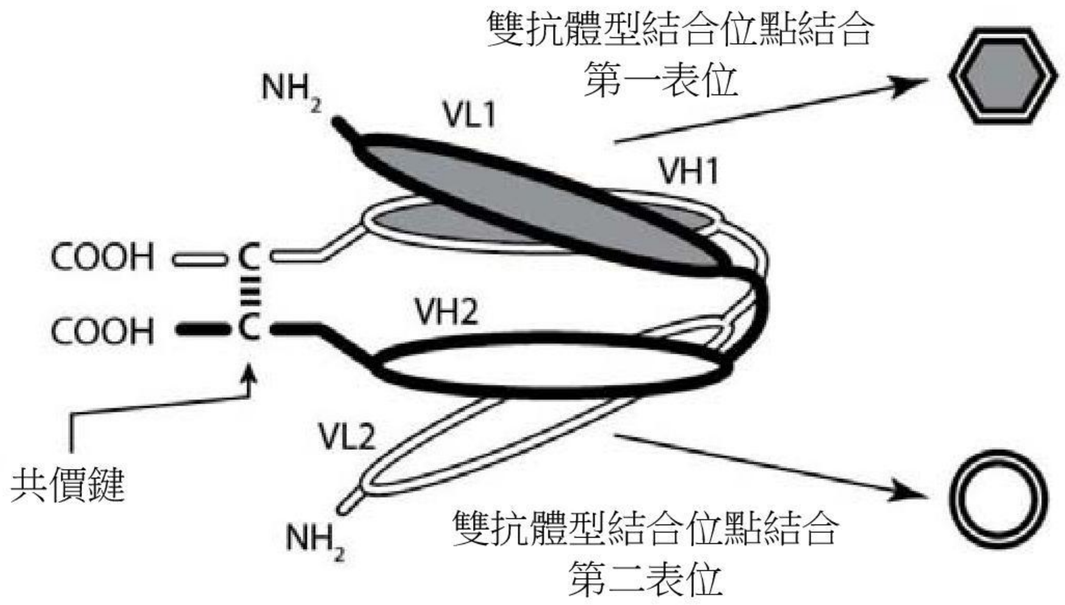
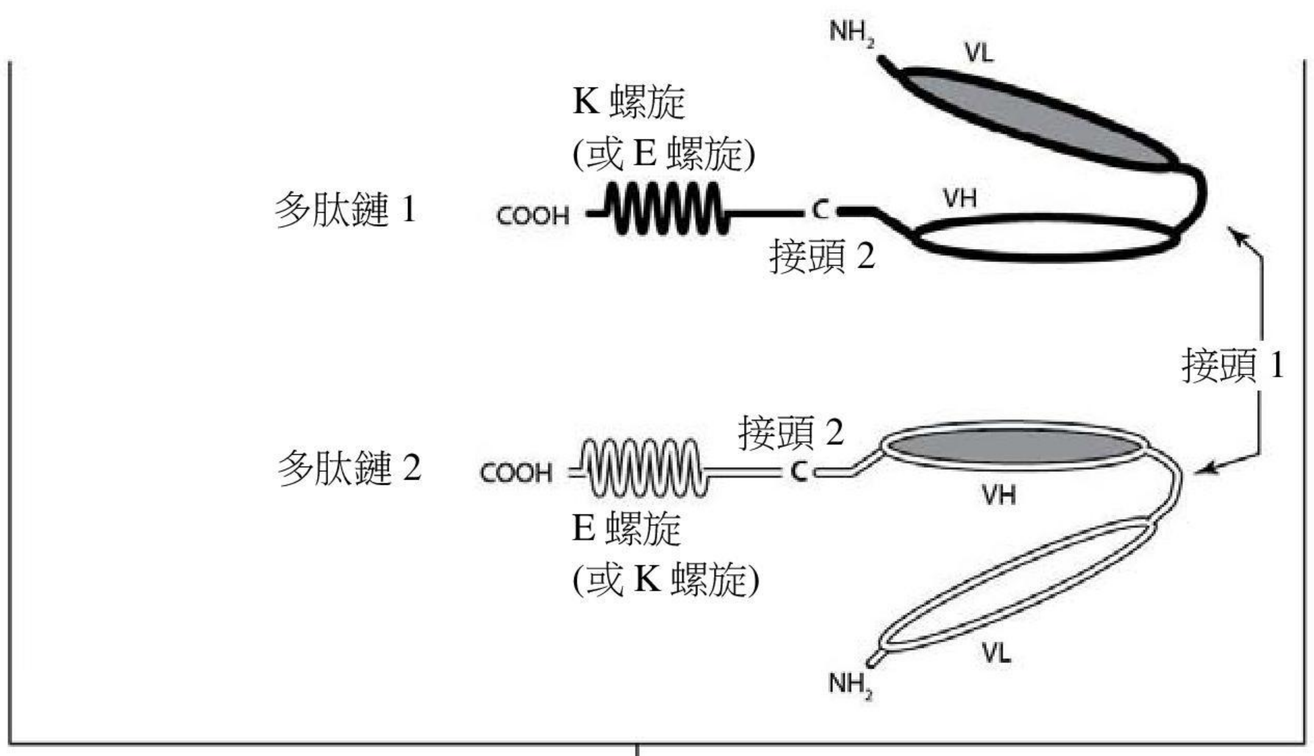

雙抗體型結合位點結合
第一表位
NH2
VL1
VH1
COOH
C
COOH
C
VH2
VL2
共價鍵
NH2
雙抗體型結合位點結合
第二表位

圖 1A


NH2
VL
K 螺旋
(或 E 螺旋)
多肽鏈 1
COOH
C
VH
接頭 2
接頭 1
多肽鏈 2
COOH
C
接頭 2
VH
E 螺旋
(或 K 螺旋)
VL
NH2

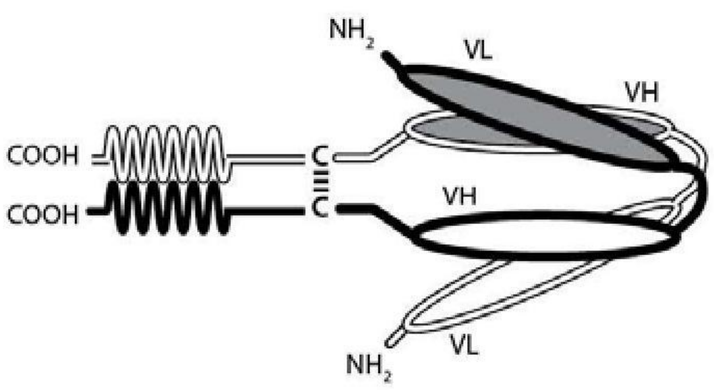

組裝的雙抗體
NH2
VL
VH
COOH
C
COOH
C
VH
VL
NH2

圖 1B

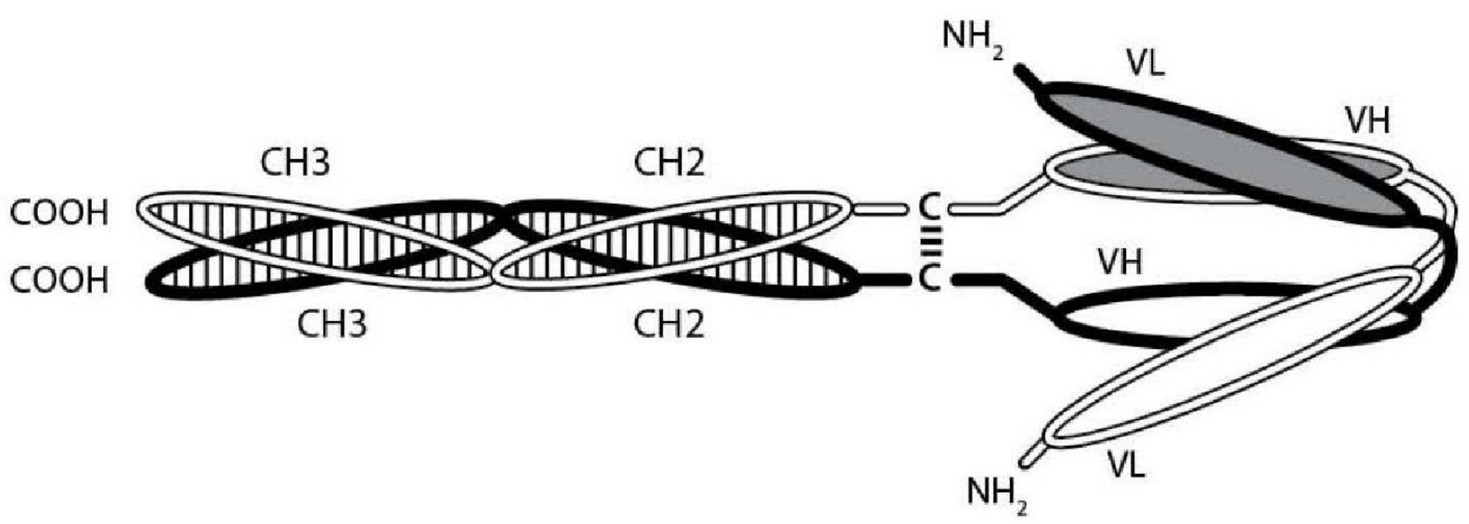

NH2
VL
VH
CH3
CH2
COOH
COOH
CH3
CH2
VH
VL
NH2

圖 2A

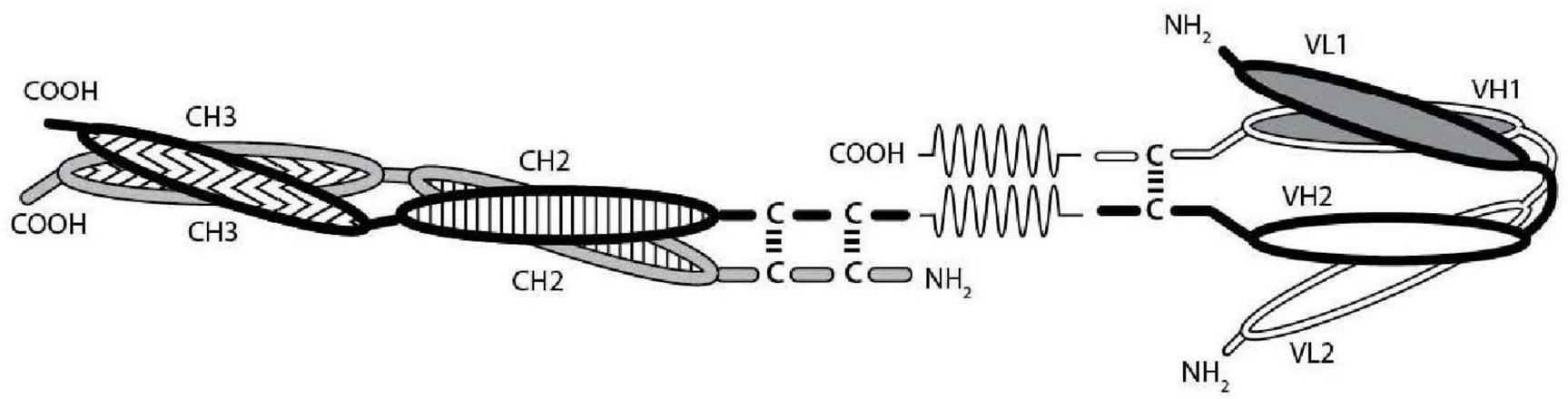

NH2
VL1
VH1
COOH
CH3
CH2
COOH
CH3
COOH
VH2
CH2
NH2
VL2
NH2

圖 2B

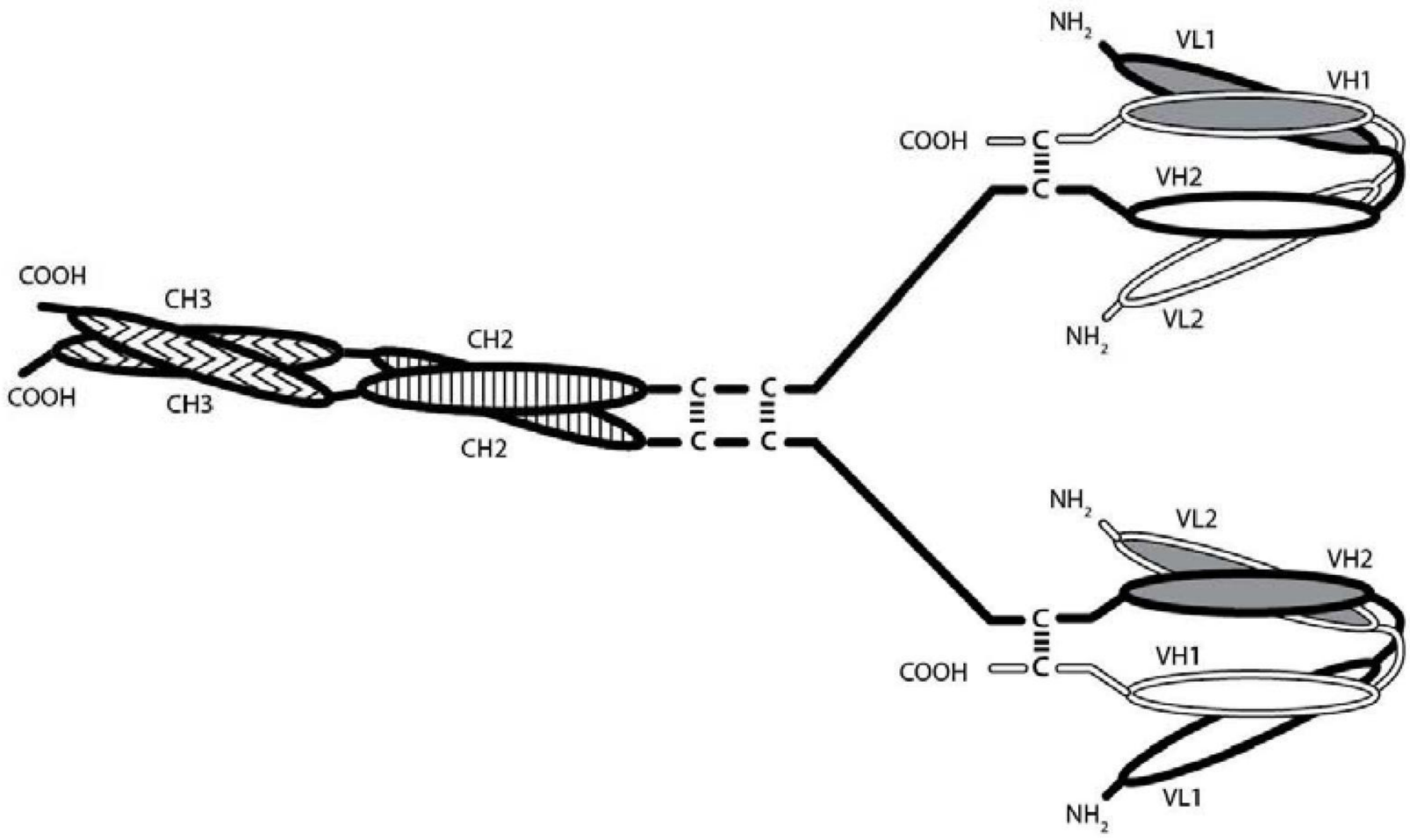

NH2
VL1
VH1
COOH
VH2
NH2
VL2
COOH
CH3
CH2
COOH
CH3
CH2
NH2
VL2
VH2
VH1
COOH
NH2
VL1

圖 3A

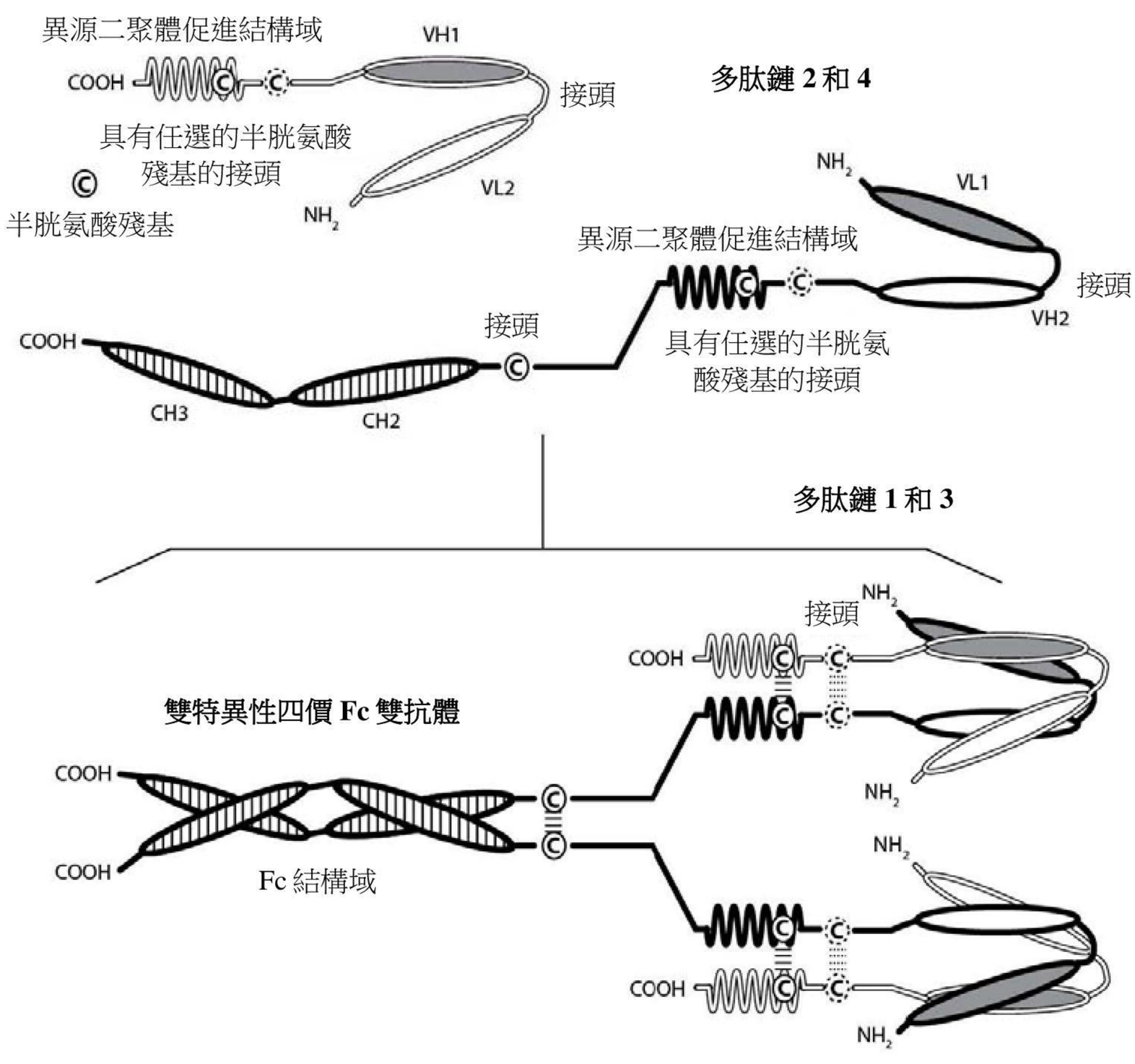

異源二聚體促進結構域
VH1
COOH
接頭
多肽鏈 2 和 4
具有任選的半胱氨酸
殘基的接頭
VL2
NH2
半胱氨酸殘基
NH2
VL1
異源二聚體促進結構域
接頭
VH2
COOH
接頭
具有任選的半胱氨
酸殘基的接頭
CH3
CH2
多肽鏈 1 和 3
NH2
接頭
COOH
雙特異性四價 Fc 雙抗體
NH2
COOH
COOH
Fc 結構域
NH2
COOH
NH2

圖 3B

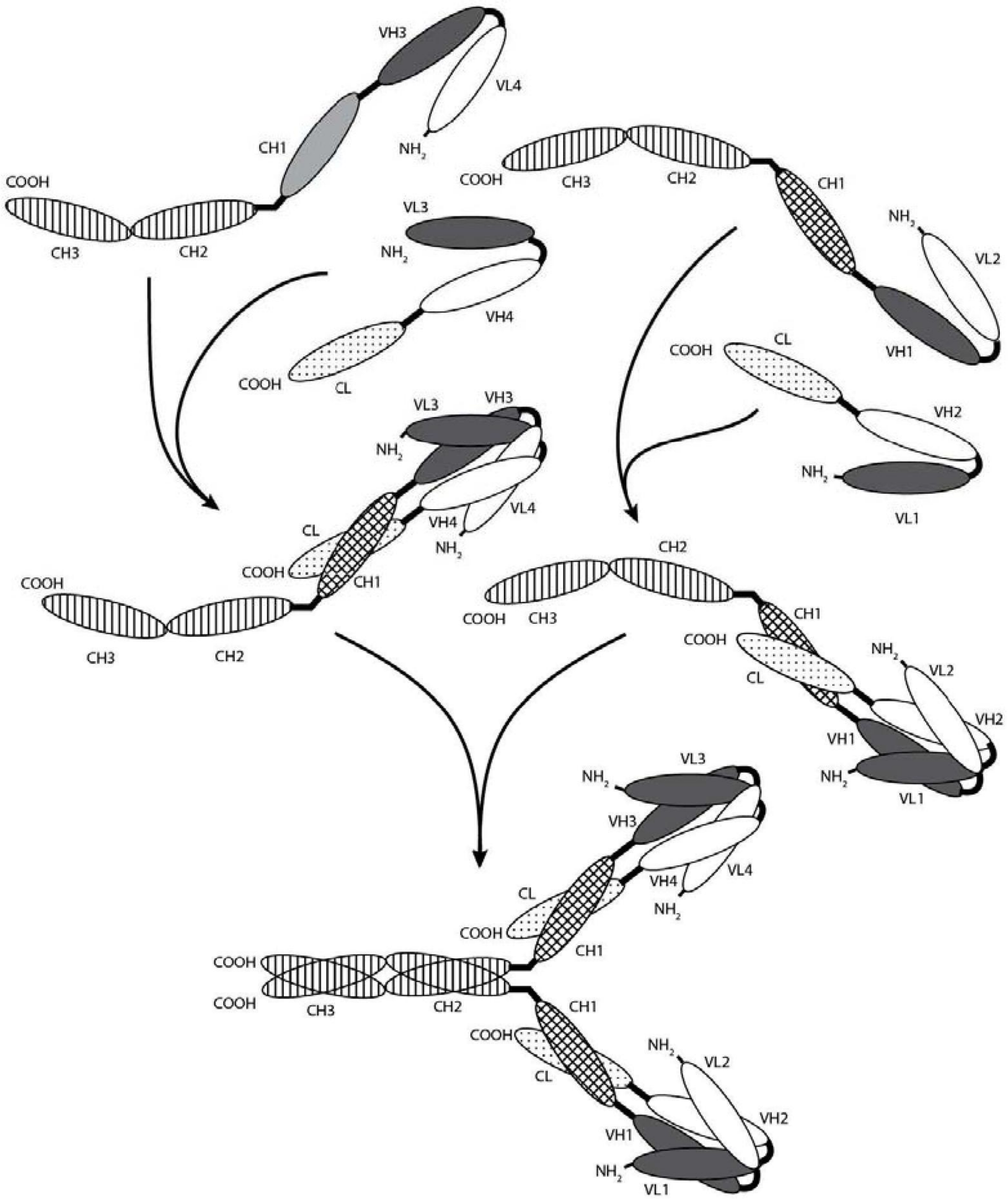

VH3
VL4
CH1
NH2
COOH
CH3
CH2
VL3
NH2
VH4
COOH
CL
COOH
CH3
CH2
CH1
NH2
VL2
VH1
CL
COOH
VH2
NH2
VL1
VL3
VH3
NH2
VL4
VH4
CL
COOH
CH1
COOH
CH3
CH2
COOH
CH3
CH2
CH1
COOH
CL
NH2
VL2
VH2
VH1
NH2
VL1
VL3
NH2
VH3
VL4
VH4
NH2
CL
COOH
CH1
COOH
CH3
CH2
CH1
COOH
CL
NH2
VL2
VH2
VH1
NH2
VL1

圖 3C

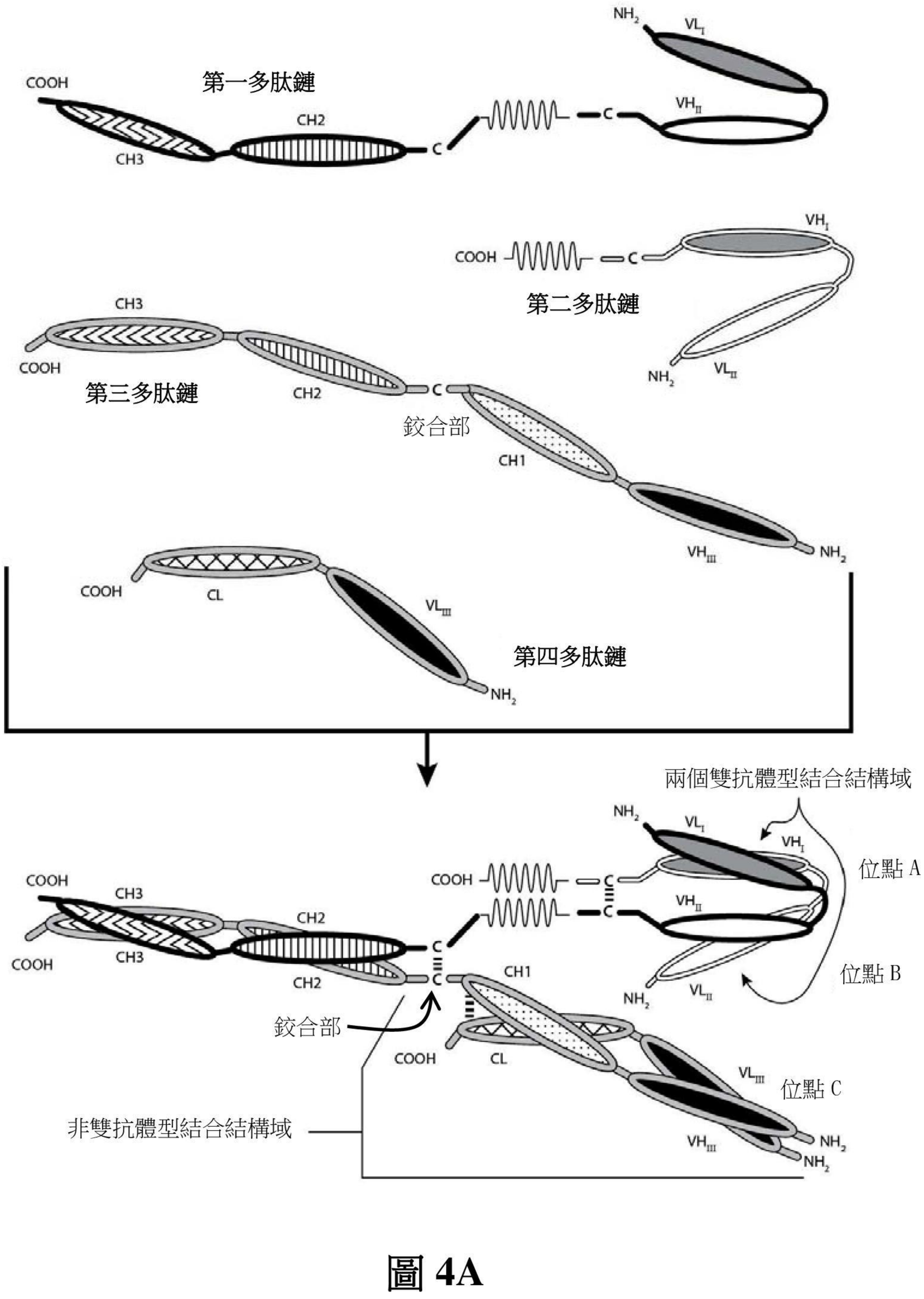

NH2
VL I
COOH
第一多肽鏈
CH2
C
VH II
CH3
CH1
VH I
COOH
C
第二多肽鏈
CH3
COOH
第三多肽鏈
CH2
C
鉸合部
CH1
VH III
NH2
COOH
CL
VL III
第四多肽鏈
NH2
兩個雙抗體型結合結構域
NH2
VL I
VH I
位點 A
COOH
COOH
CH3
CH3
CH2
CH2
C
C
VH II
位點 B
CH1
NH2
VL II
鉸合部
COOH
CL
VL III
位點 C
非雙抗體型結合結構域
VH III
NH2
NH2

圖 4A

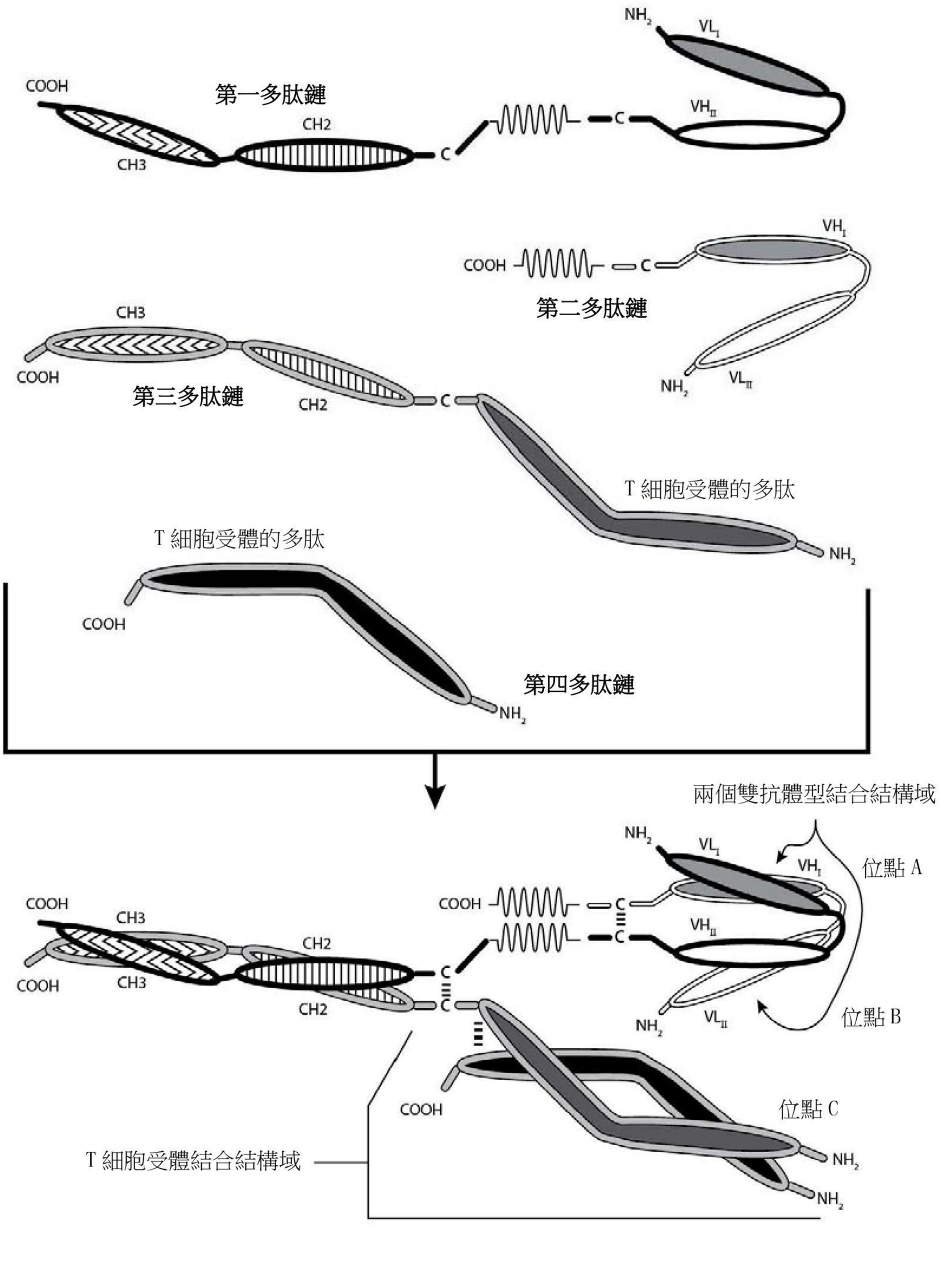

NH2
VL I
COOH
第一多肽鏈
CH2
C
VH II
CH3
VH I
COOH
C
第二多肽鏈
CH3
COOH
NH2
VL II
第三多肽鏈
CH2
C
T 細胞受體的多肽
NH2
T 細胞受體的多肽
COOH
第四多肽鏈
NH2
兩個雙抗體型結合結構域
NH2
VL1
VH1
位點 A
COOH
CH3
COOH
C
CH3
CH2
VH II
CH2
C
NH2
VL II
位點 B
COOH
位點 C
T 細胞受體結合結構域
NH2
NH2

圖 4B

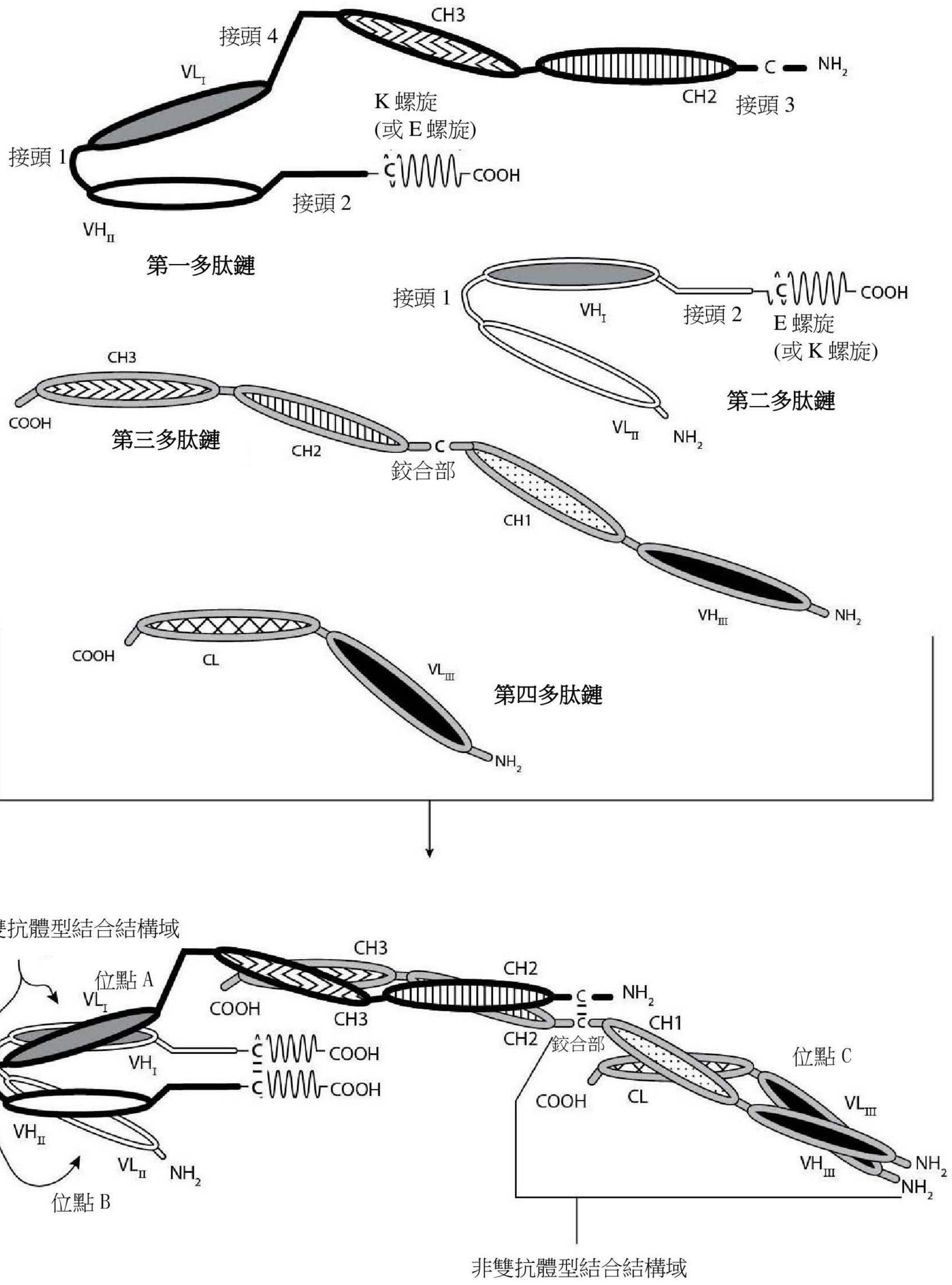

CH3
接頭 4
VL_I
K 螺旋
(或 E 螺旋)
CH2
接頭 3
C
NH2
接頭 1
COOH
接頭 2
VH_II
第一多肽鏈
接頭 1
VH_I
接頭 2
COOH
E 螺旋
(或 K 螺旋)
第二多肽鏈
VL_II
NH2
CH3
COOH
第三多肽鏈
CH2
C
鉸合部
CH1
VH_III
NH2
COOH
CL
VL_III
第四多肽鏈
NH2
兩個雙抗體型結合結構域
位點 A
VL_I
CH3
COOH
CH2
NH2
CH3
CH2
C
CH1
鉸合部
VH_I
COOH
COOH
位點 C
COOH
CL
VL_III
VH_II
VL_II
NH2
VH_III
NH2
NH2
位點 B
非雙抗體型結合結構域

圖 4C

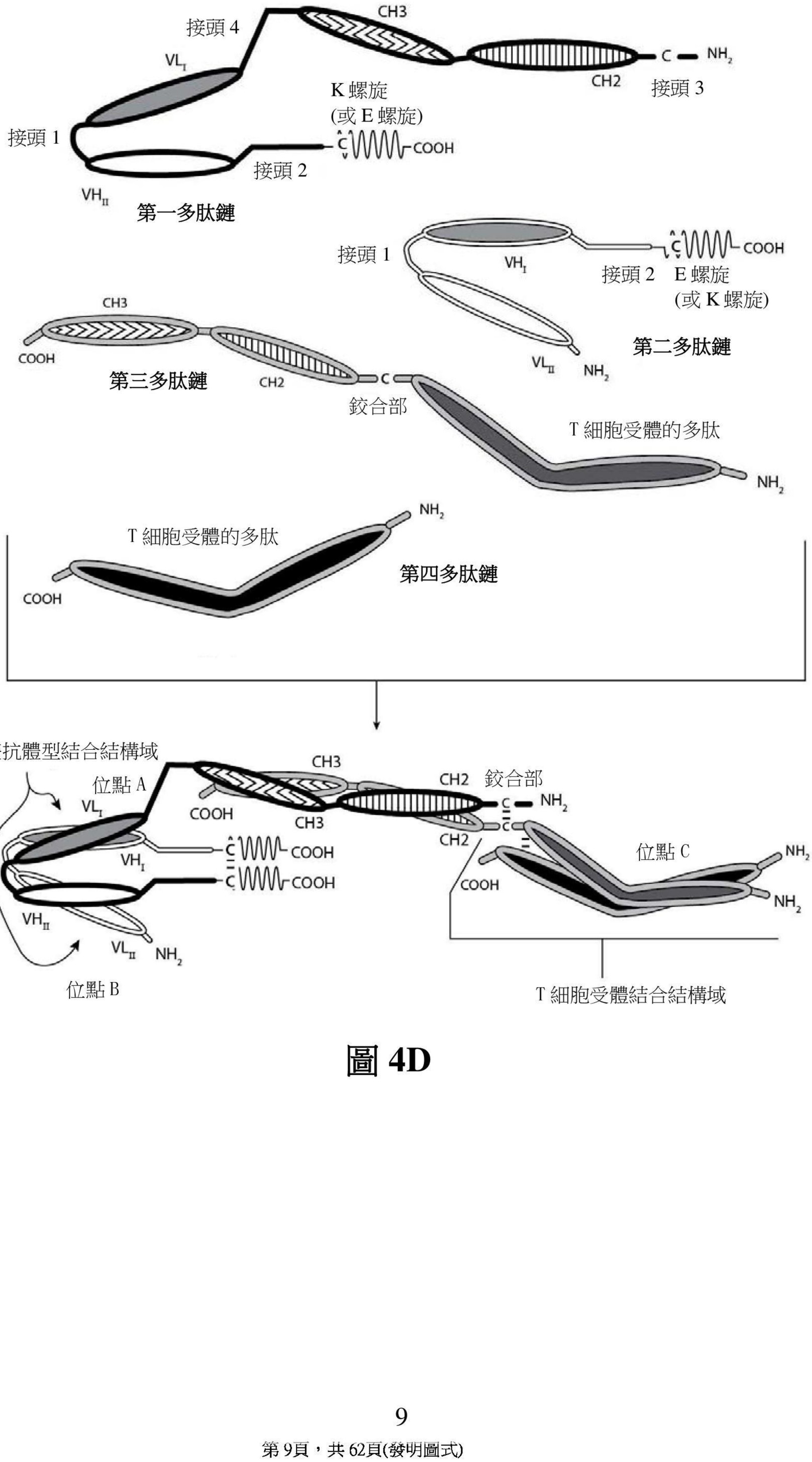

接頭 4
CH3
VL
K 螺旋
(或 E 螺旋)
CH2
C
NH2
接頭 3
接頭 1
COOH
接頭 2
VH
第一多肽鏈
接頭 1
VH
COOH
接頭 2 E 螺旋
(或 K 螺旋)
VL
NH2
第二多肽鏈
CH3
COOH
第三多肽鏈
CH2
C
鉸合部
T 細胞受體的多肽
NH2
T 細胞受體的多肽
NH2
COOH
第四多肽鏈
兩個雙抗體型結合結構域
位點 A
CH3
CH2 鉸合部
VL
COOH
CH3
C
NH2
CH2
VH
COOH
COOH
位點 C
NH2
NH2
VH
VL
NH2
位點 B
T 細胞受體結合結構域

圖 4D

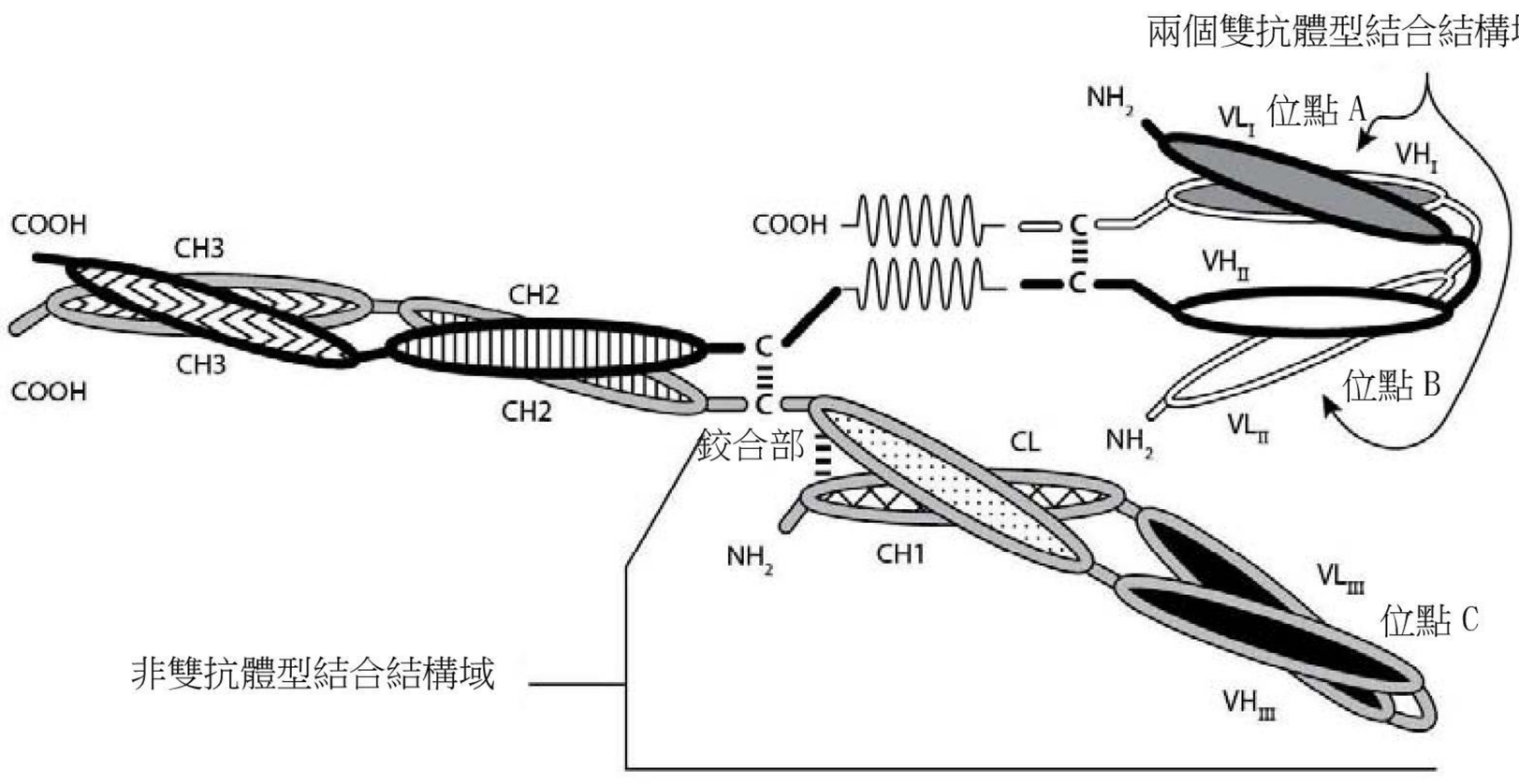

兩個雙抗體型結合結構域
COOH
CH3
CH3
COOH
CH2
CH2
NH2
VL I
位點 A
VH I
VH II
位點 B
VL II
鉸合部
CL
NH2
CH1
VL III
位點 C
VH III
非雙抗體型結合結構域

圖 4E

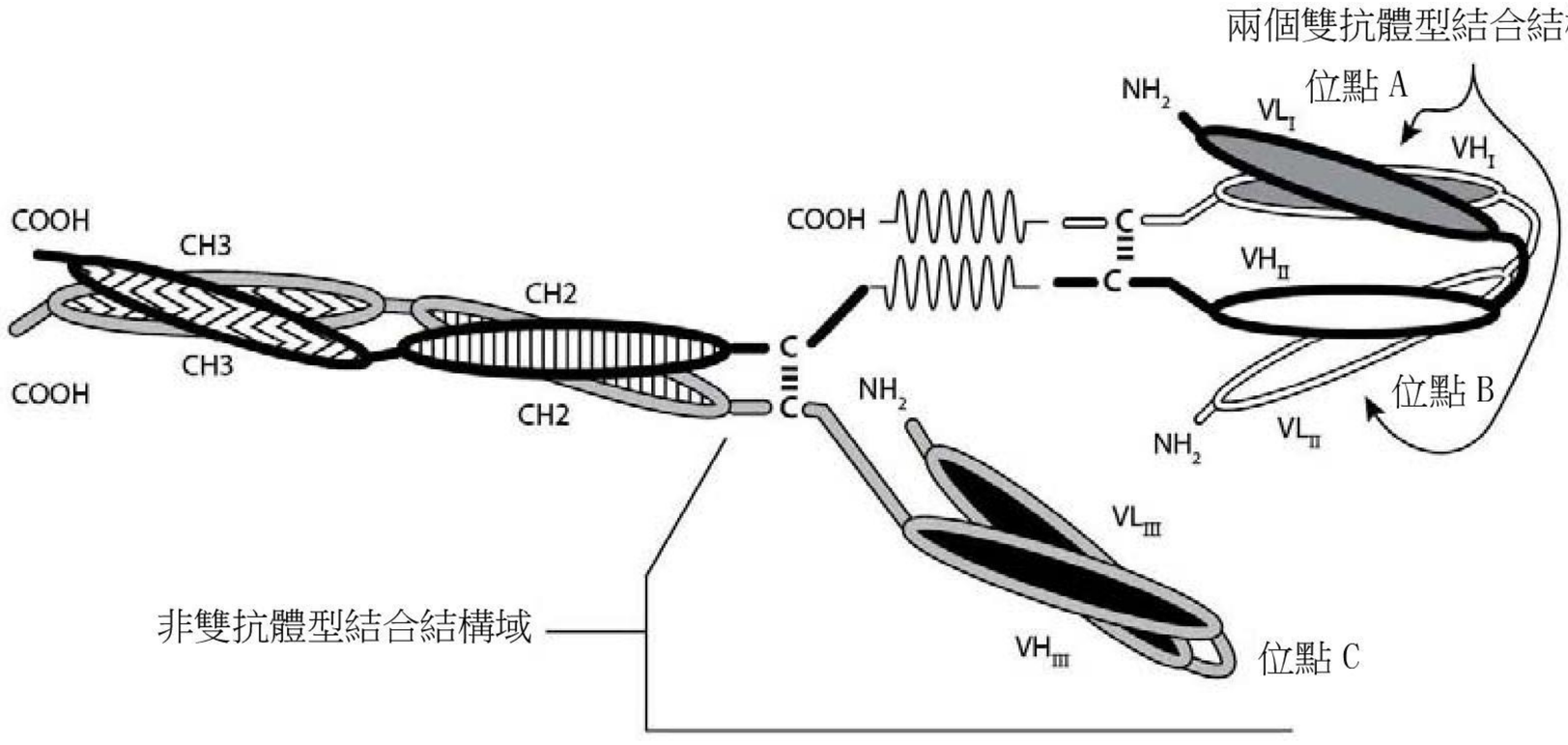

兩個雙抗體型結合結構域
COOH
CH3
CH3
COOH
CH2
CH2
NH2
VL I
位點 A
VH I
VH II
位點 B
VL II
NH2
VL III
VH III
位點 C
非雙抗體型結合結構域

圖 4F

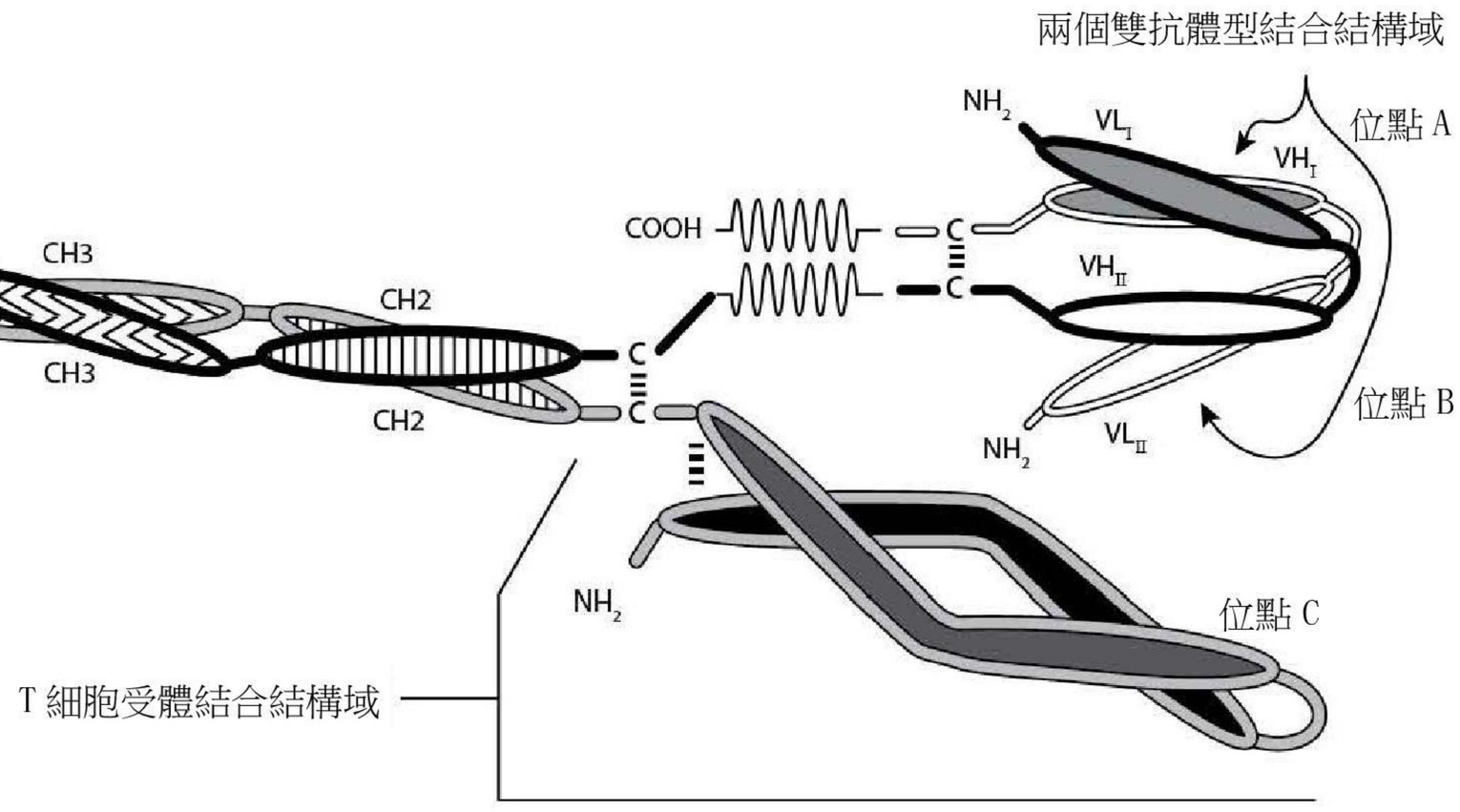

兩個雙抗體型結合結構域
NH2
VL I
VH I
位點 A
COOH
CH3
CH2
COOH
CH3
CH2
COOH
C
C
VH II
位點 B
NH2
VL II
NH2
位點 C
T 細胞受體結合結構域

圖 4G

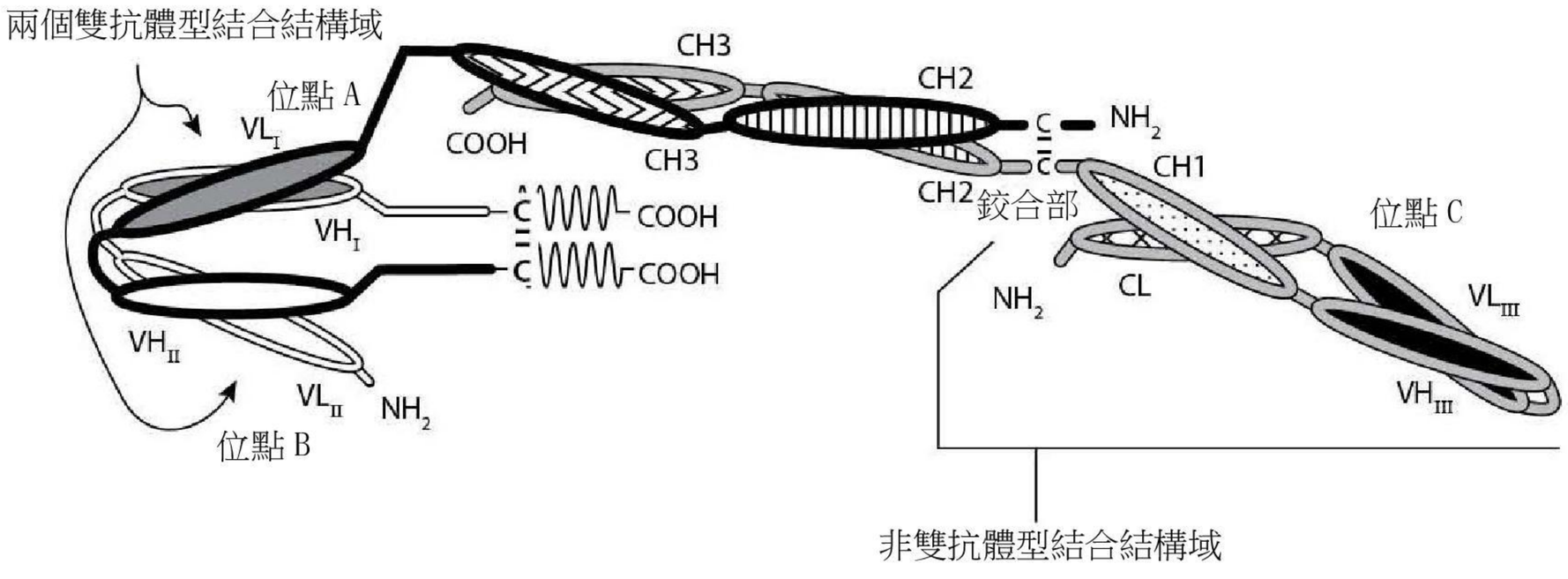

兩個雙抗體型結合結構域
位點 A
VL_I
VH_I
VH_II
VL_II
NH_2
位點 B
COOH
CH3
CH3
CH2
CH2
C
C
NH_2
CH1
CL
鉸合部
位點 C
VL_III
VH_III
非雙抗體型結合結構域

圖 4H

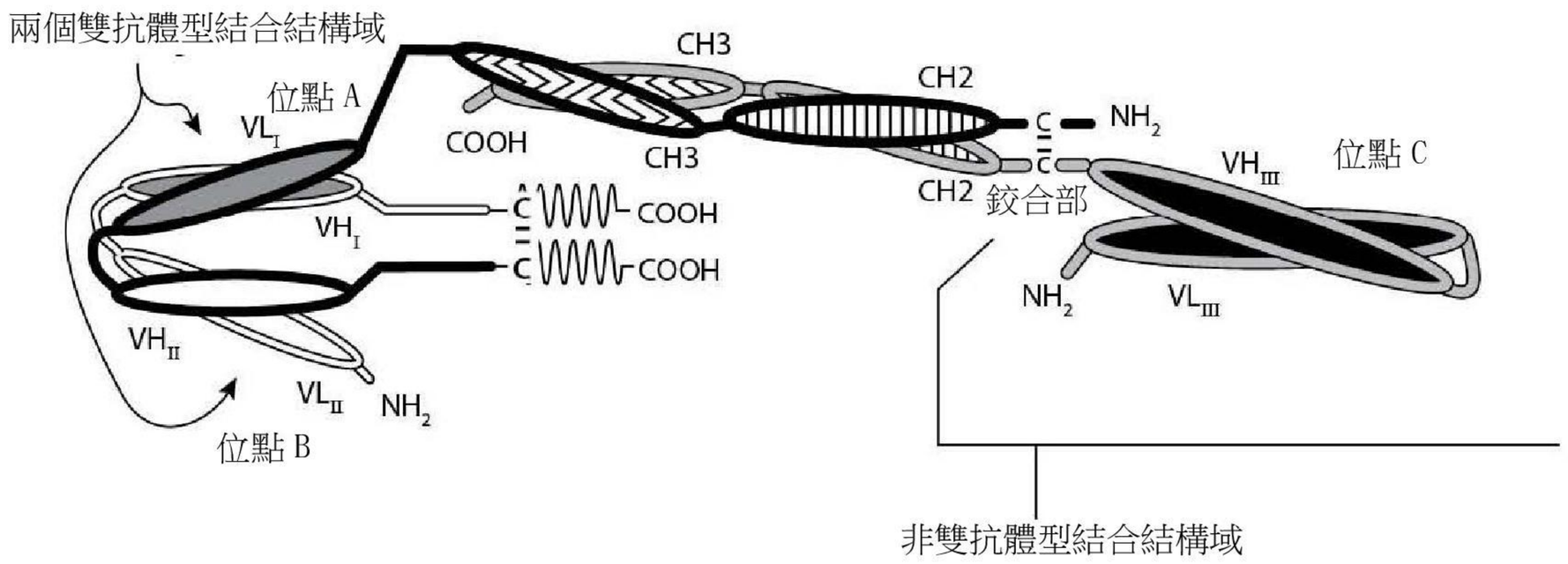

兩個雙抗體型結合結構域
位點 A
VL_I
VH_I
VH_II
VL_II
NH_2
位點 B
COOH
CH3
CH3
CH2
CH2
C
C
NH_2
VH_III
位點 C
鉸合部
NH_2
VL_III
非雙抗體型結合結構域

圖 4I

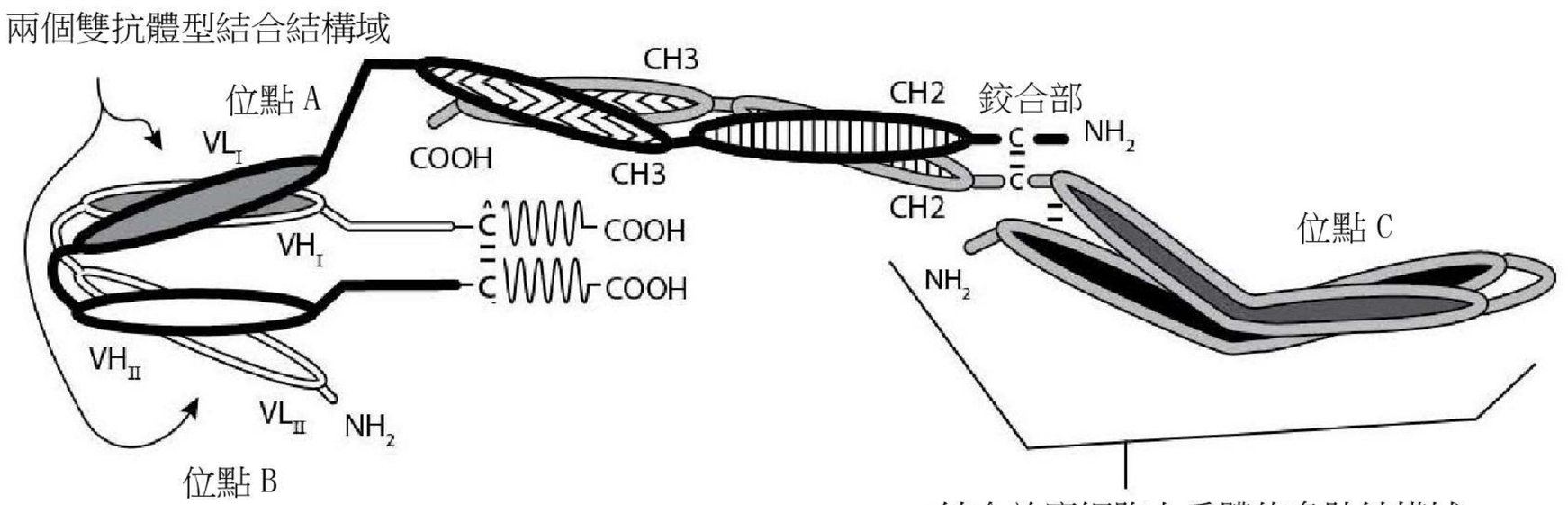

兩個雙抗體型結合結構域
位點 A
VL_I
VH_I
VH_II
VL_II
NH2
位點 B
CH3
COOH
CH3
CH2
鉸合部
NH2
CH2
位點 C
NH2
結合效應細胞上受體的多肽結構域

圖 4J

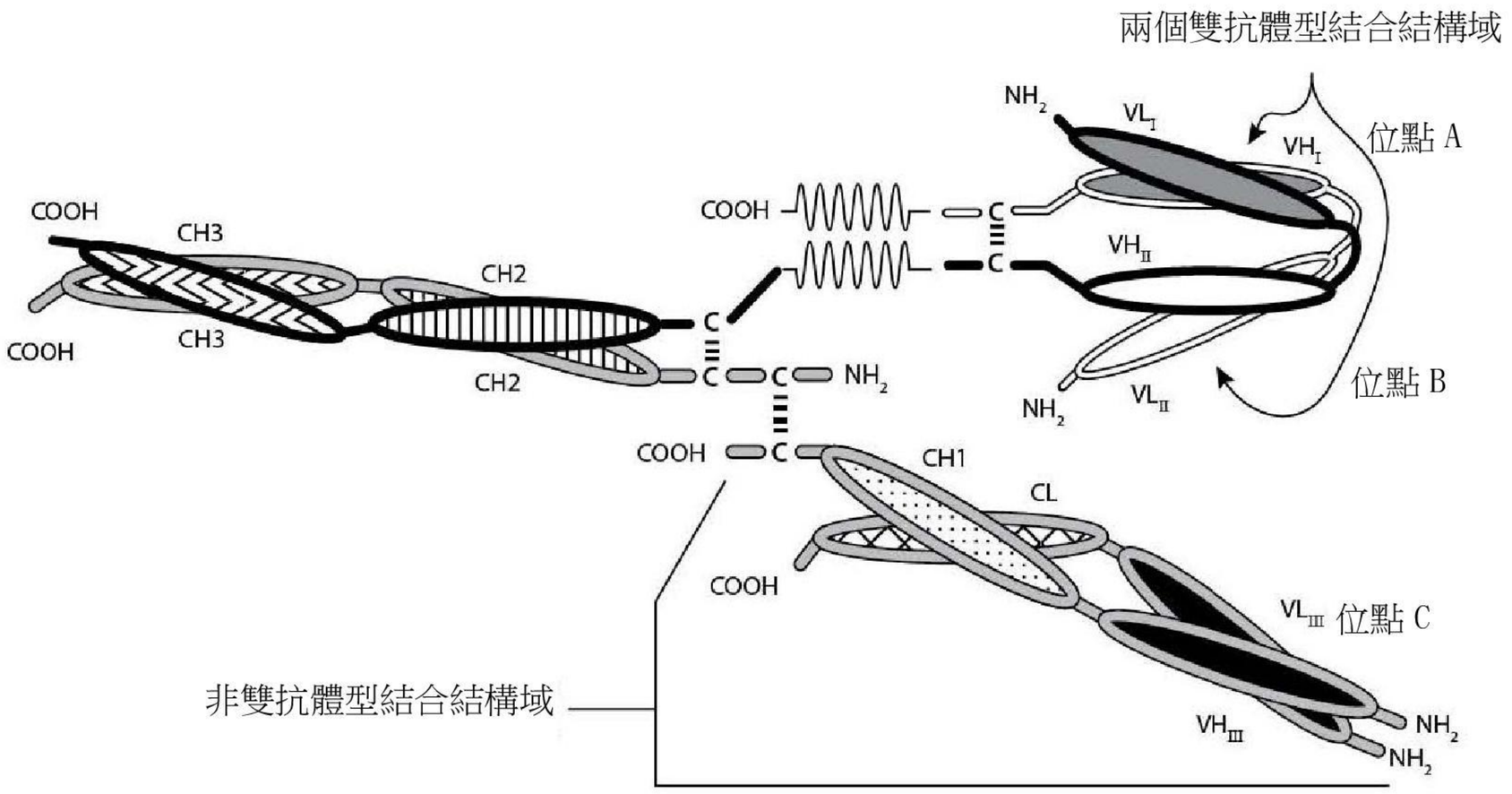

兩個雙抗體型結合結構域
NH2
VLI
VHI
位點 A
COOH
CH3
CH2
COOH
CH3
CH2
COOH
C
C
C
C
C
NH2
VHII
NH2
VLII
位點 B
COOH
C
CH1
CL
COOH
VLIII 位點 C
VHIII
NH2
NH2
非雙抗體型結合結構域

圖 4K

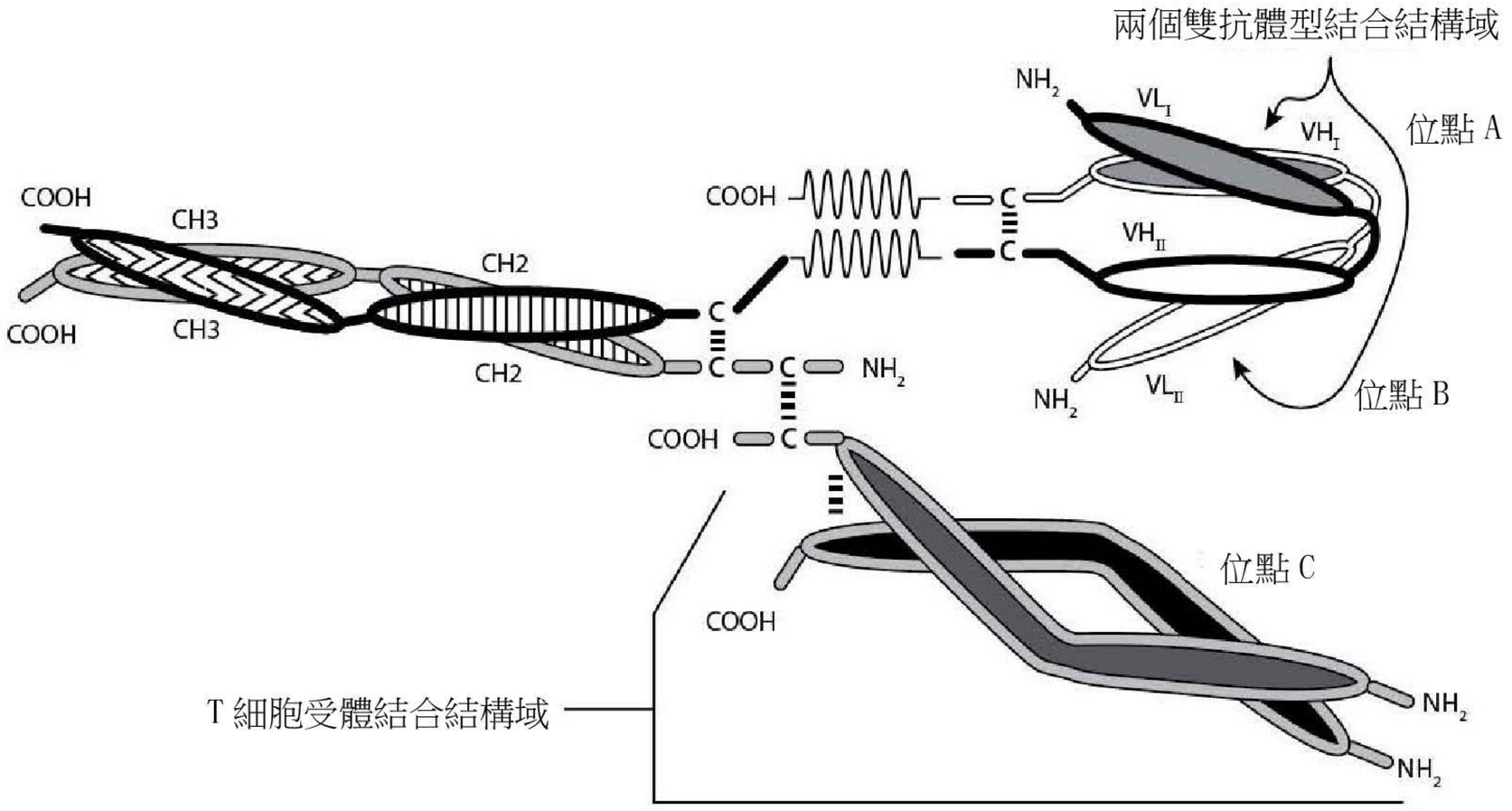

兩個雙抗體型結合結構域
NH2
VLI
VHI
位點 A
COOH
CH3
CH2
COOH
CH3
CH2
COOH
C
C
C
C
C
NH2
VHII
NH2
VLII
位點 B
COOH
C
位點 C
COOH
NH2
NH2
T 細胞受體結合結構域

圖 4L

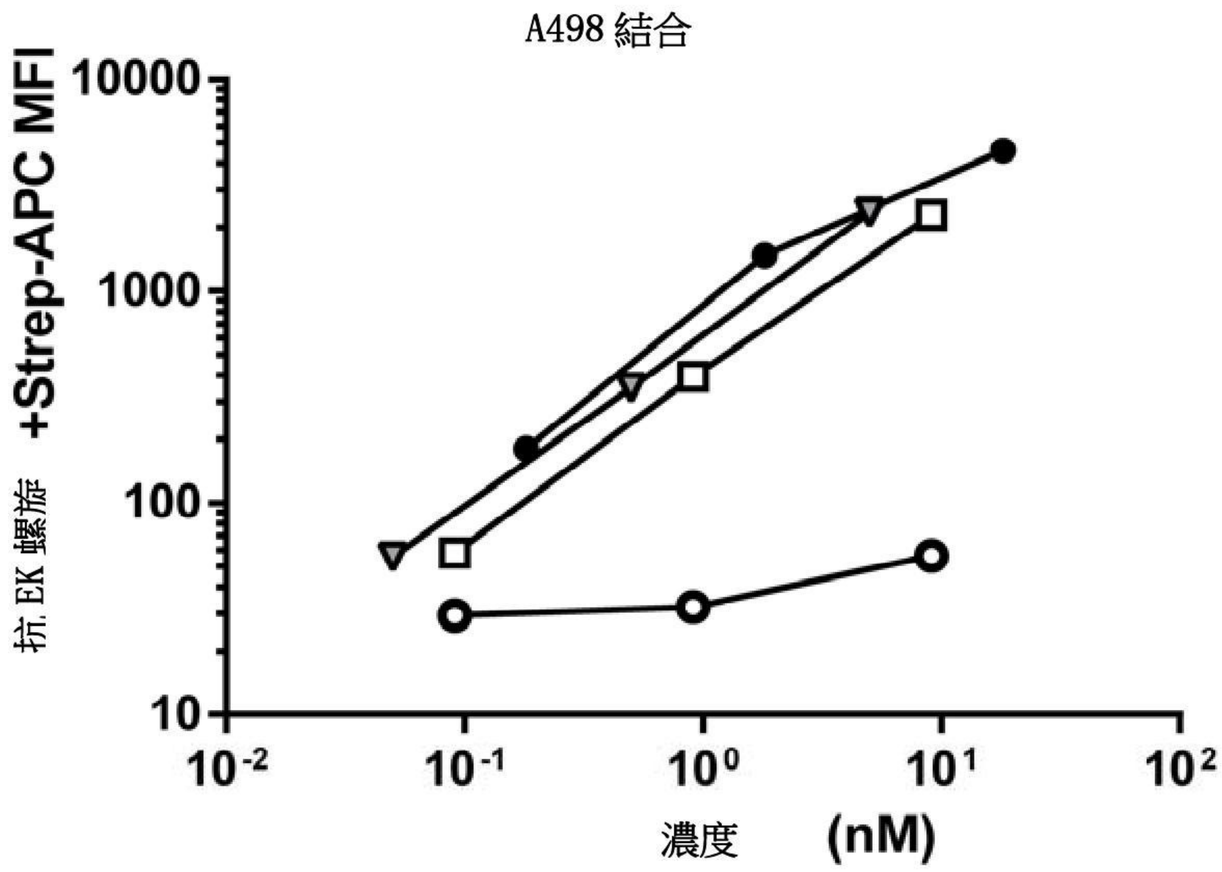


圖 5A

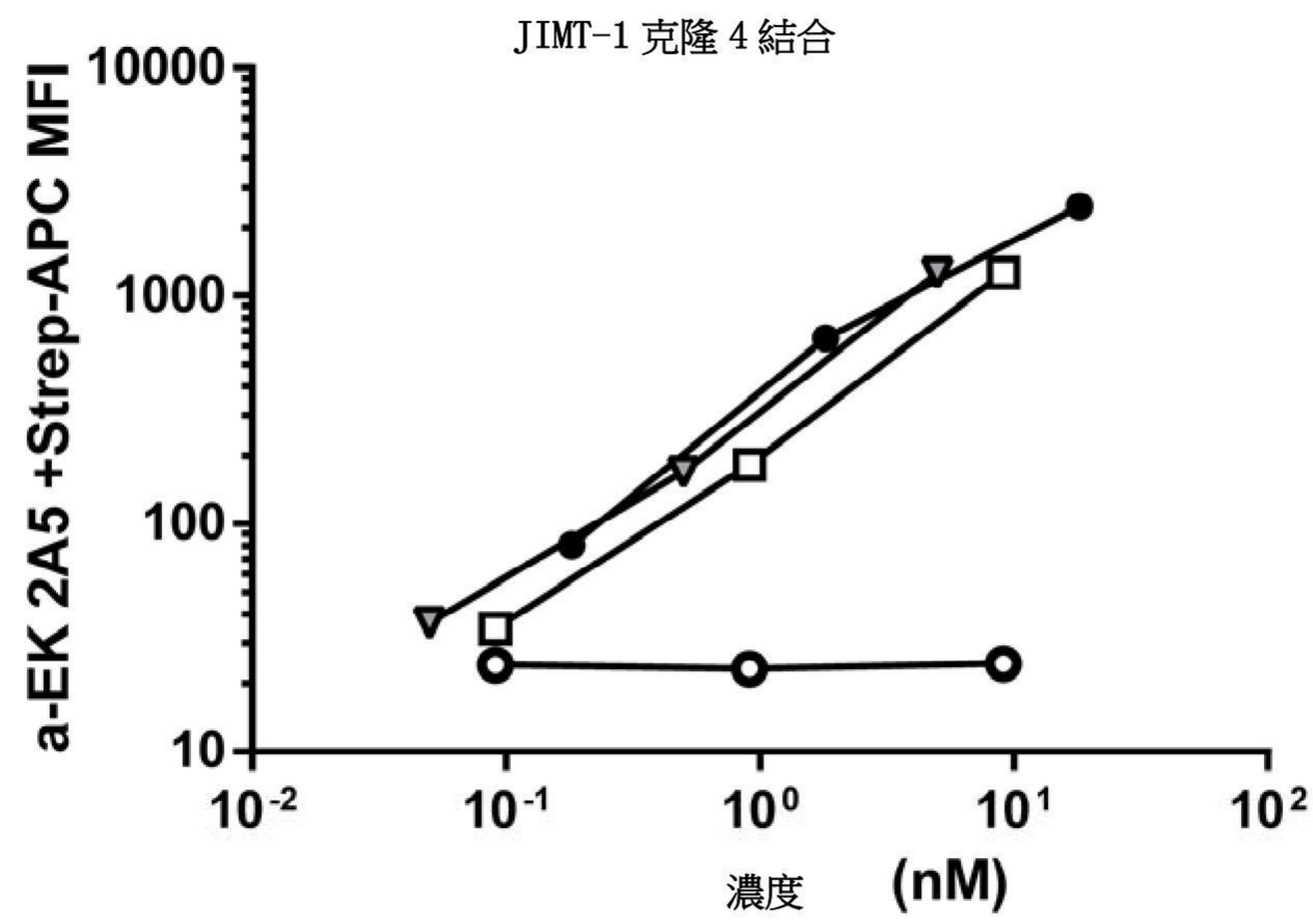


圖 5B

B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™

B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域

B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

螢光素 mAb 1 X CD3 mab 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域

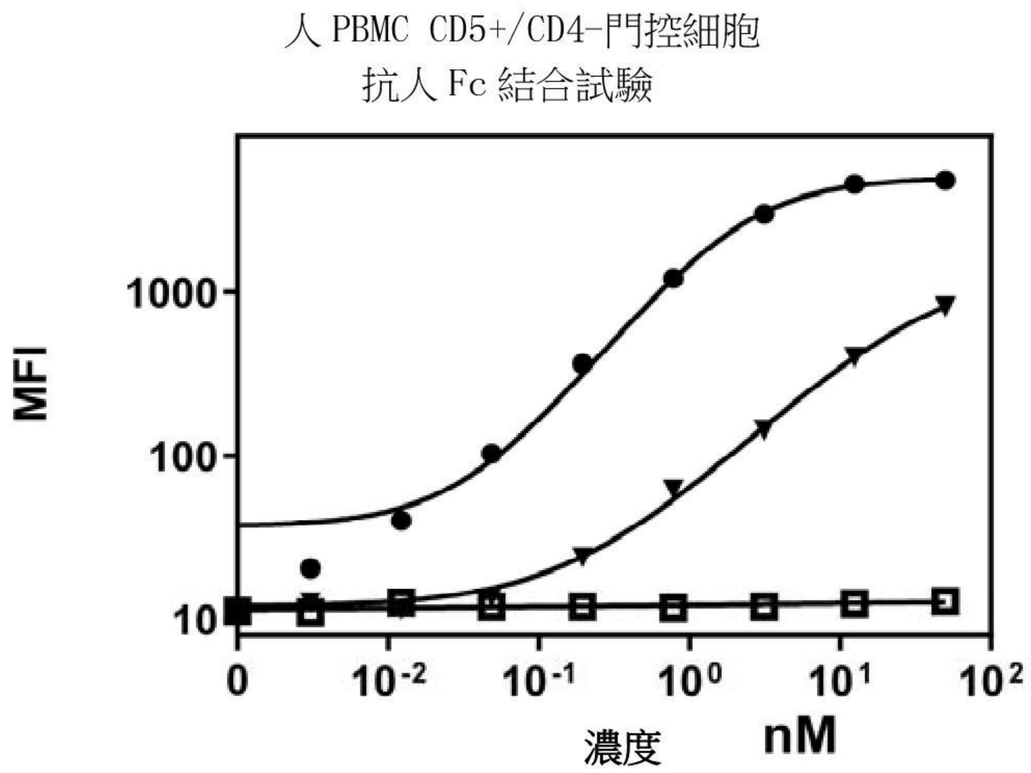


圖 5C

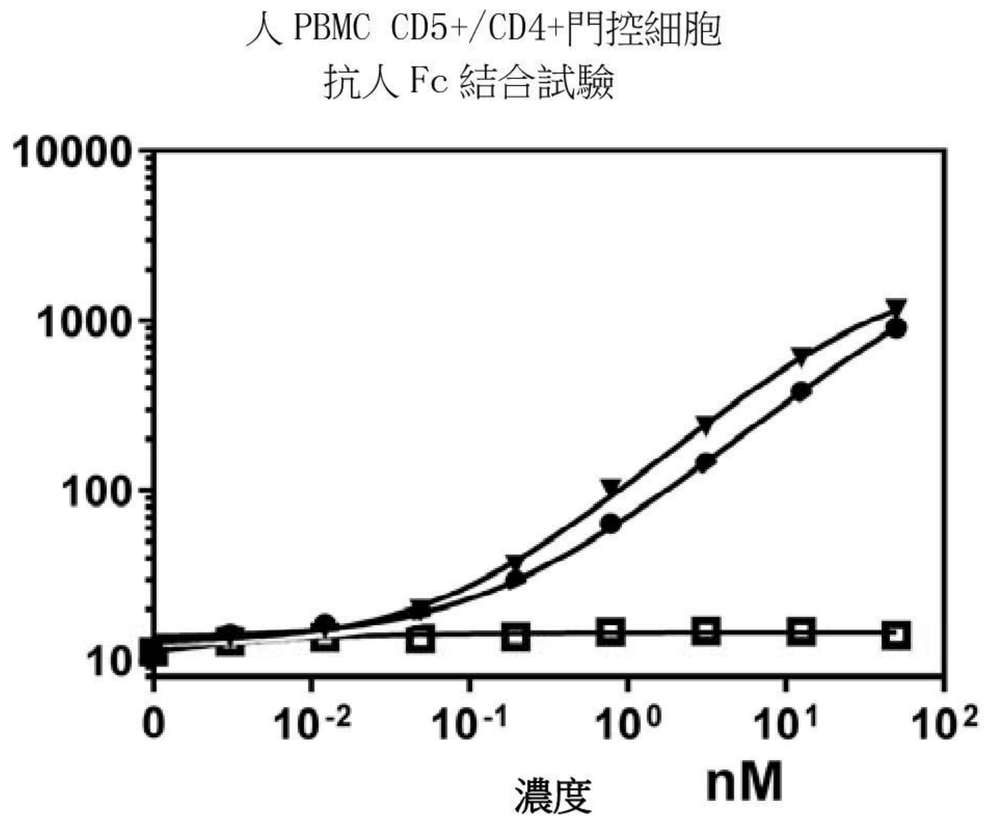
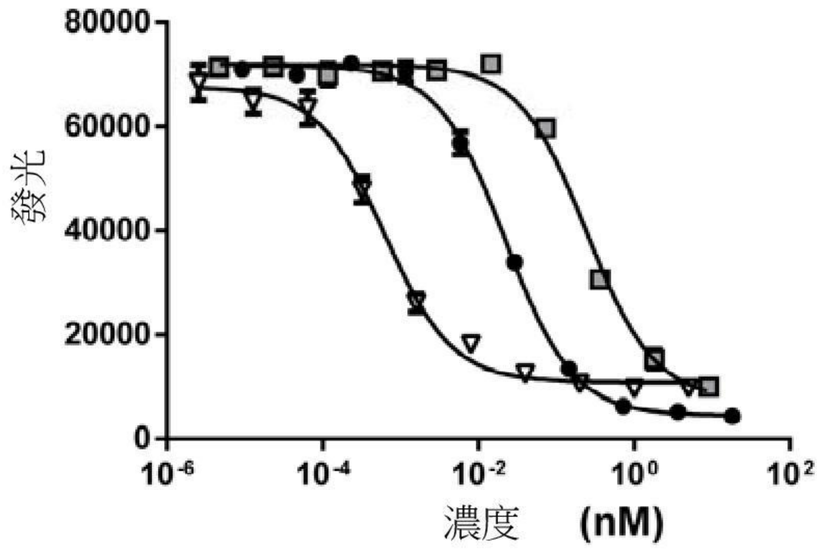


圖 5D

B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

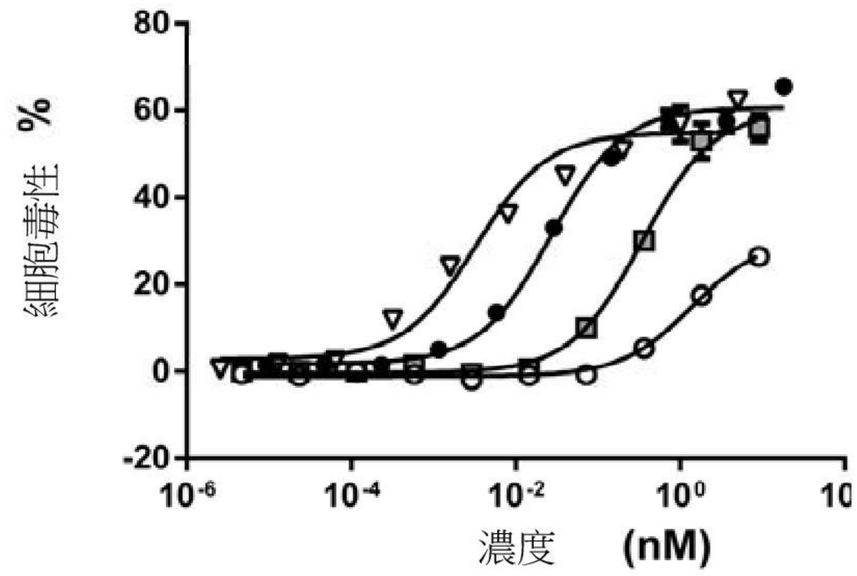
B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™

B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域



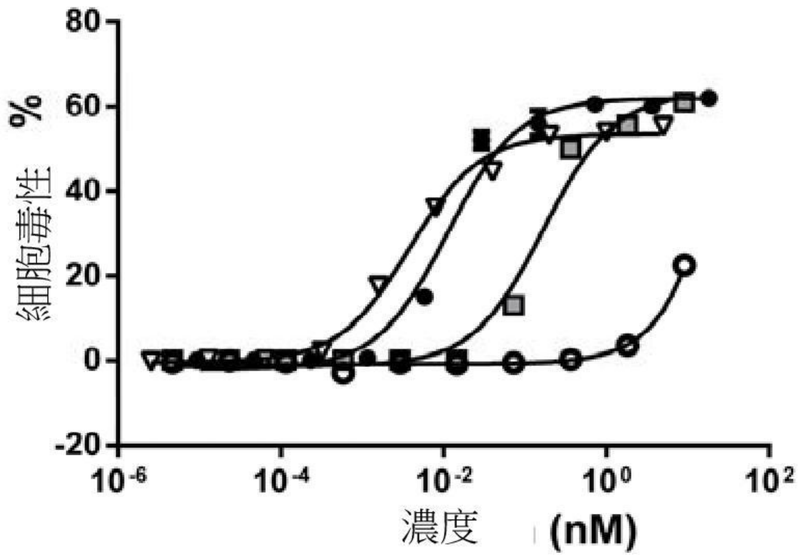
JIMT-1 克隆 4 **(20k) + T**
細胞
螢光素酶試驗
24 h E:T 10:1

圖 6A



JIMT-1 克隆 4 **(20k) + T**
細胞
LDH 試驗
24 h E:T 10:1

圖 6B



A498 (20k) +
T 細胞
LDH 試驗
24 h E:T 10:1

圖 6C

B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™

B7-H3 mAb 1 X Anti-CD3 mAb 2 DART™，其具有 Fc 結構域

B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

螢光素 **mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™** 其具有 Fc 結構域

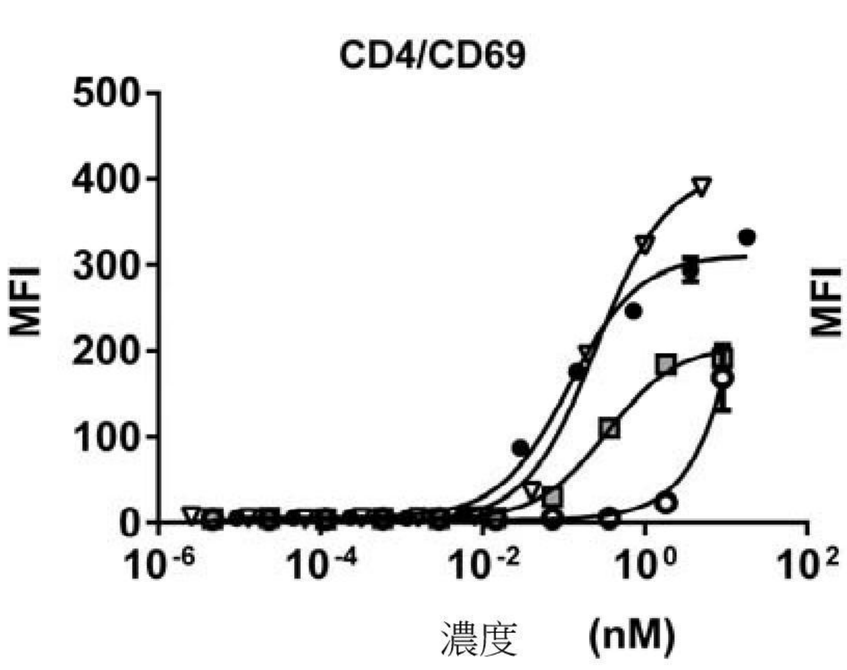


圖 7A

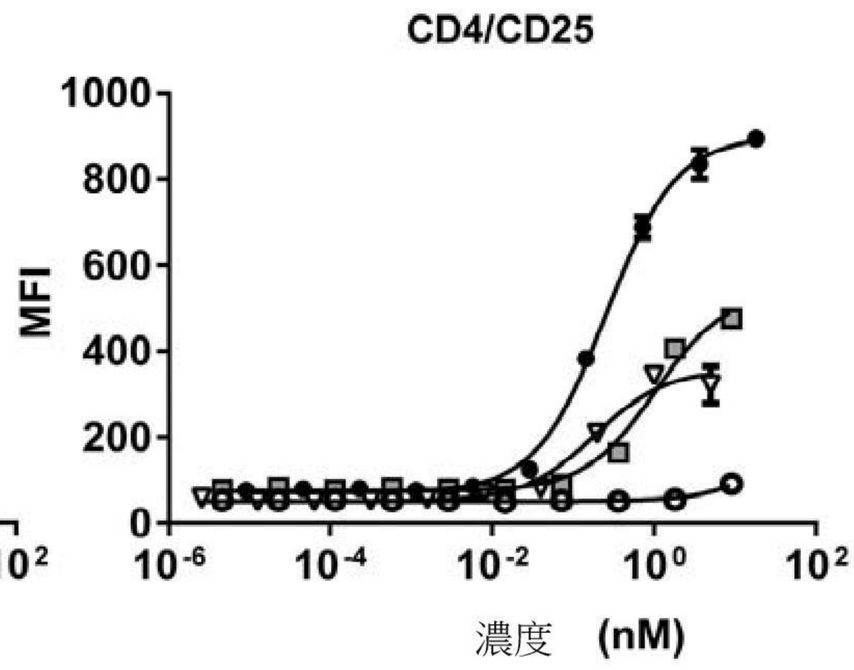


圖 7B

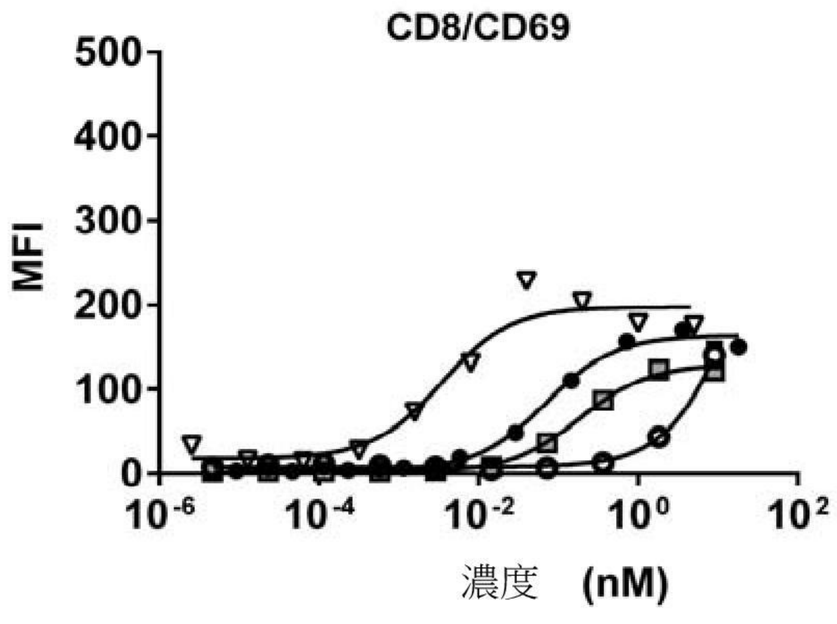


圖 7C

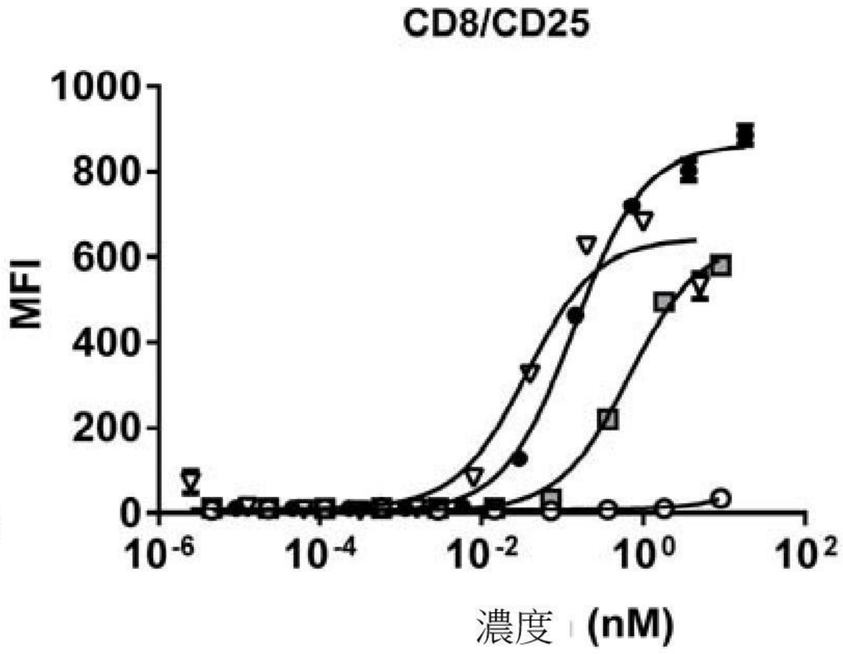


圖 7D

B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™

B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域

B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

螢光素 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域

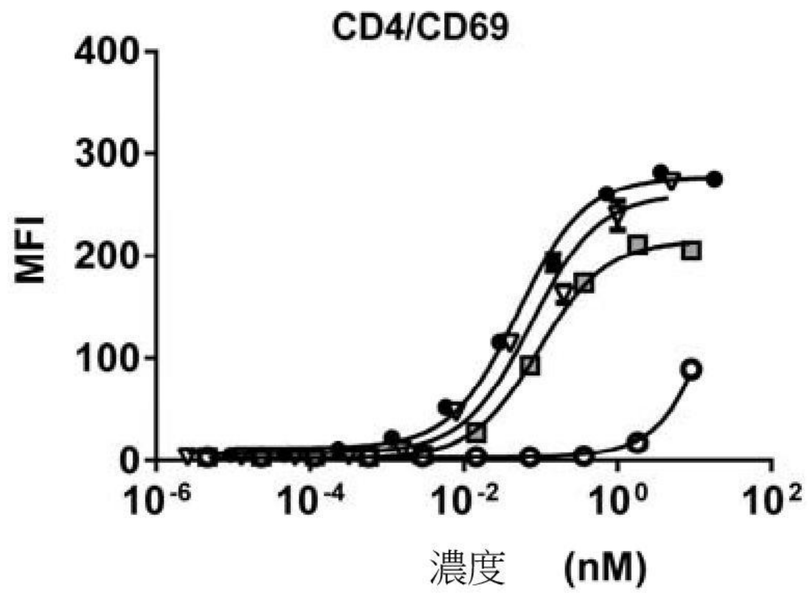


圖 8A

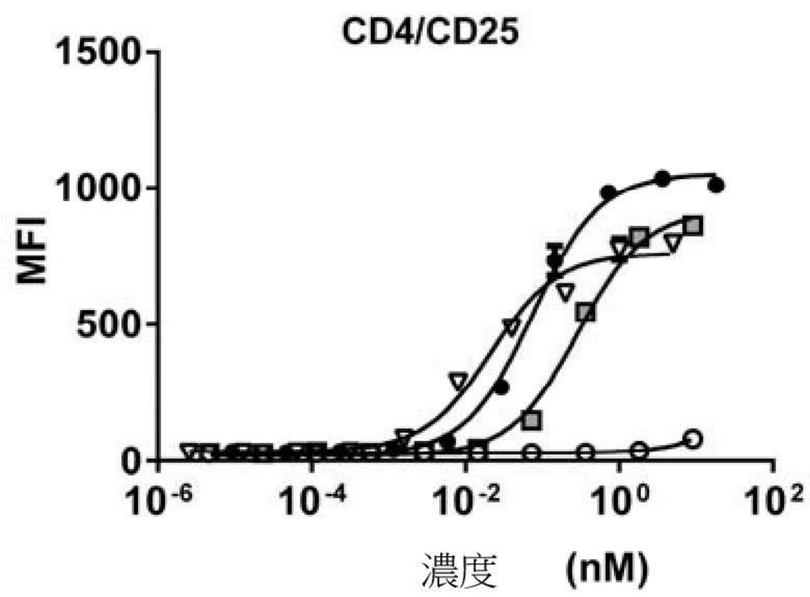


圖 8B

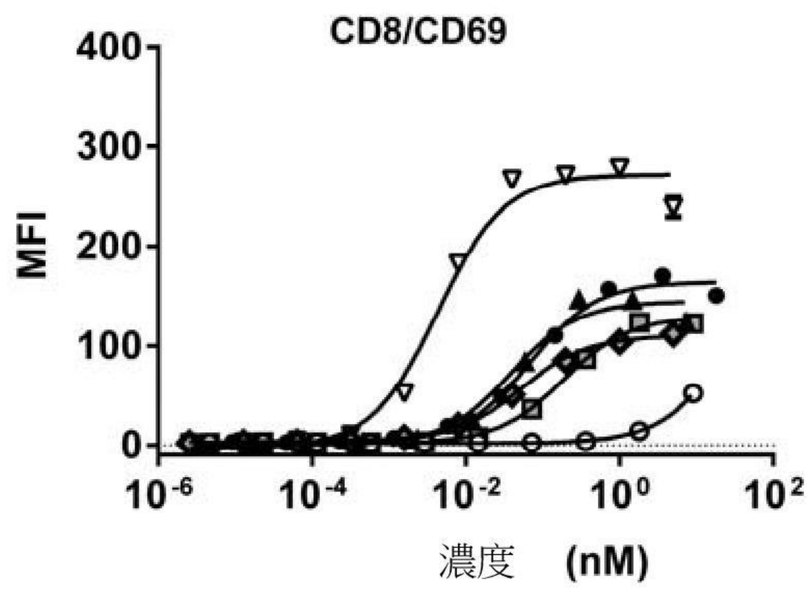


圖 8C

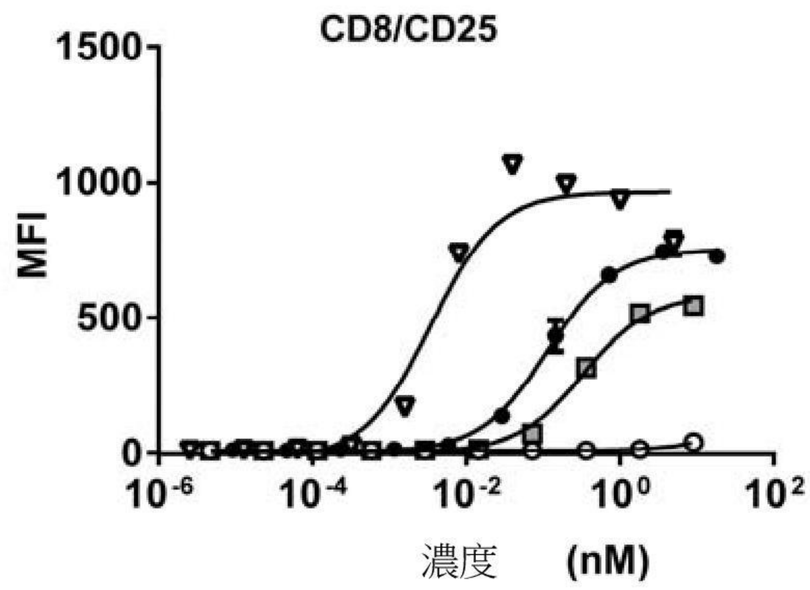


圖 8D

- B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
- gpA33 mAb 1 CD3 mAb 2 DART™
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 Fc DART™
- 螢光素 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™，其具有 Fc 結構域

與人 CD5+/CD4+細胞的結合

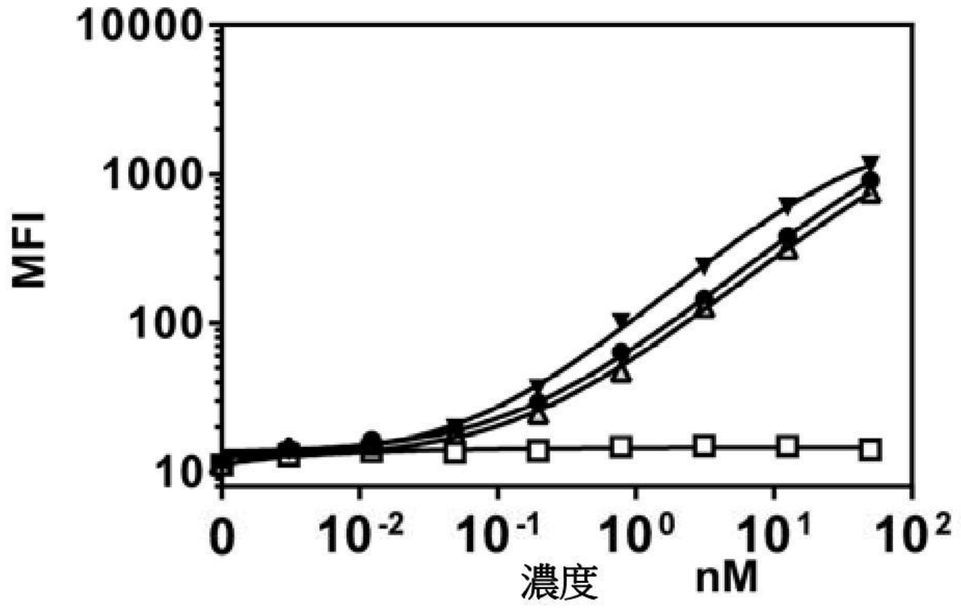


圖 9A

與人 CD5+/CD4-細胞的結合

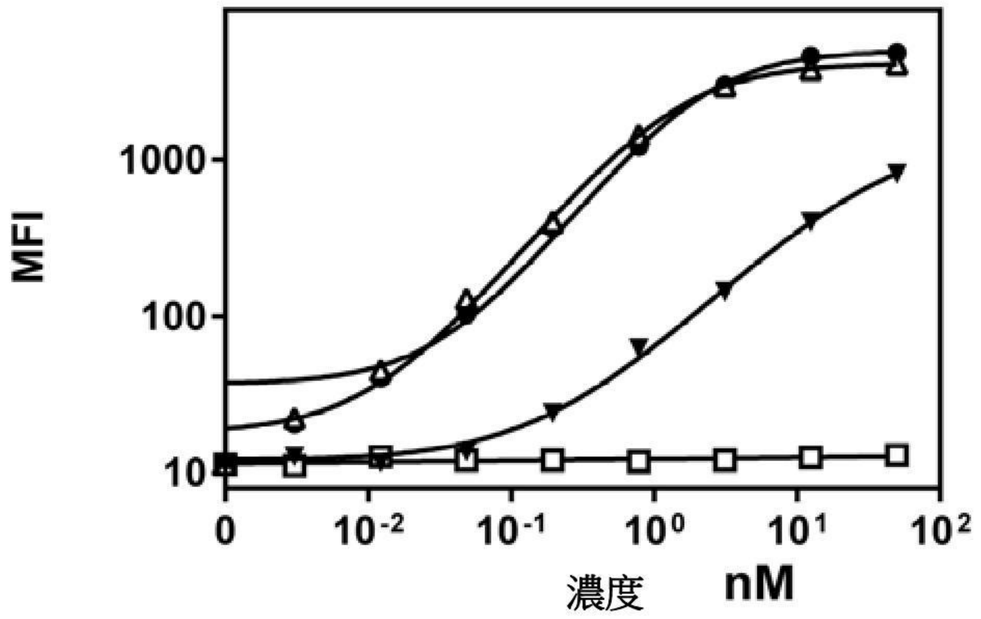


圖 9B

B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

B7-H3 mAb 1 x CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域

B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 結合分子

B7-H3 mAb 1 X B7-H3 mAb 1 DART™ ，其具有 Fc 結構域

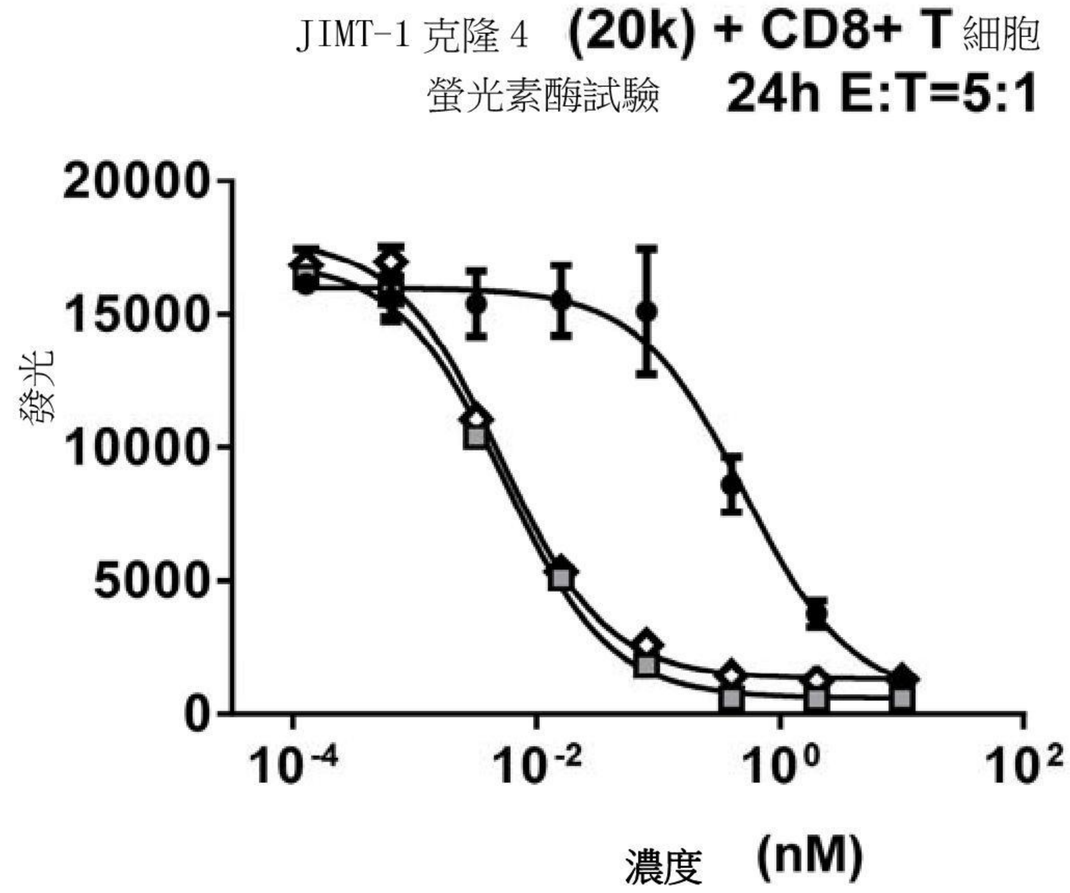


圖 10A

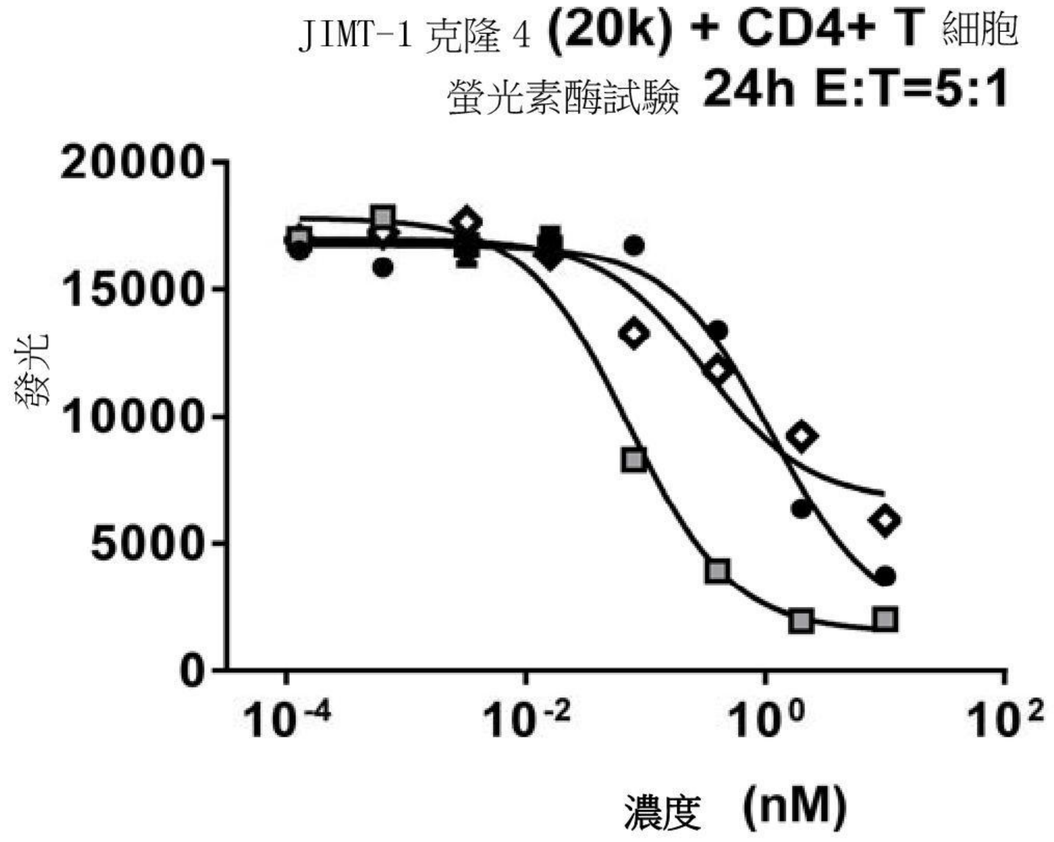


圖 10B

B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 結合分子

B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™

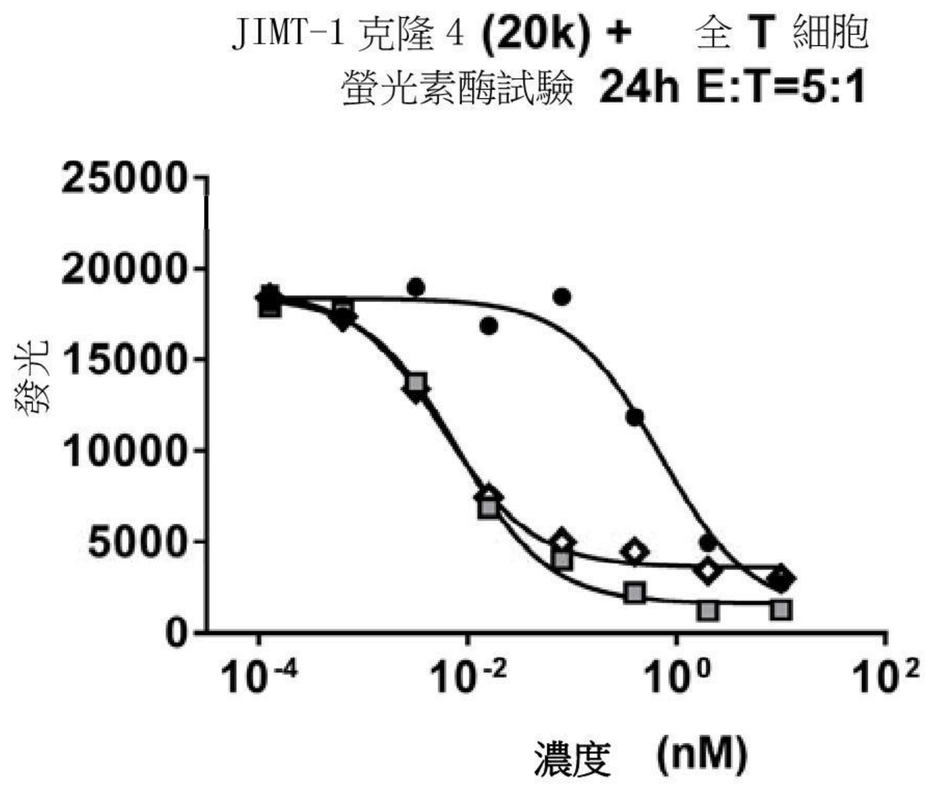


圖 10C

- B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
- B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 結合分子
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域

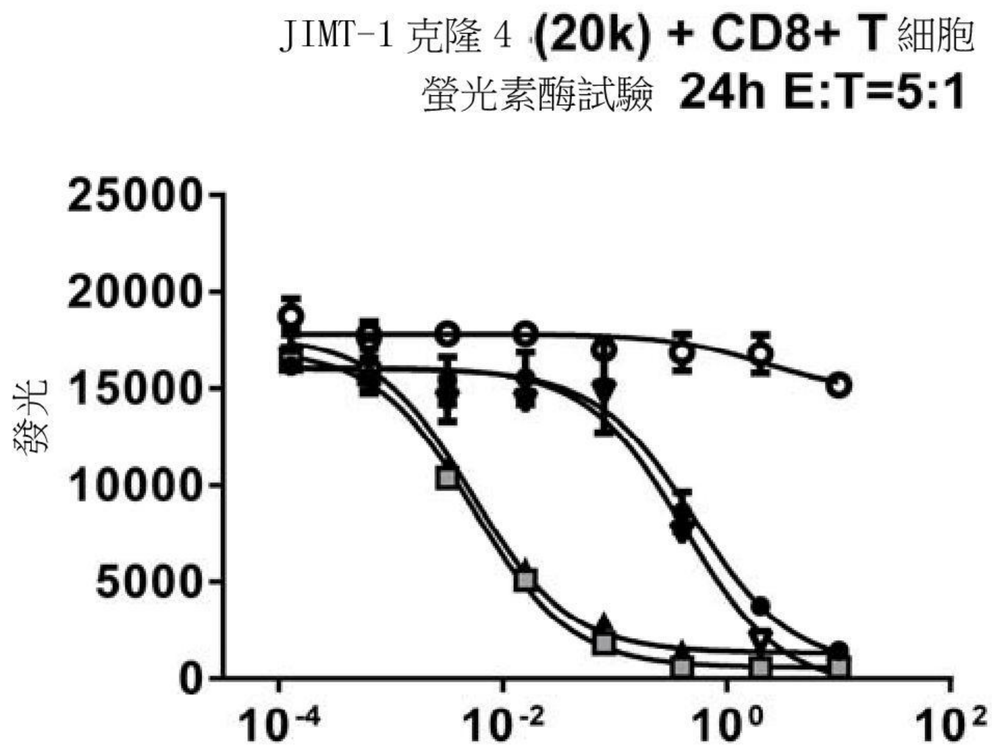


圖 11A

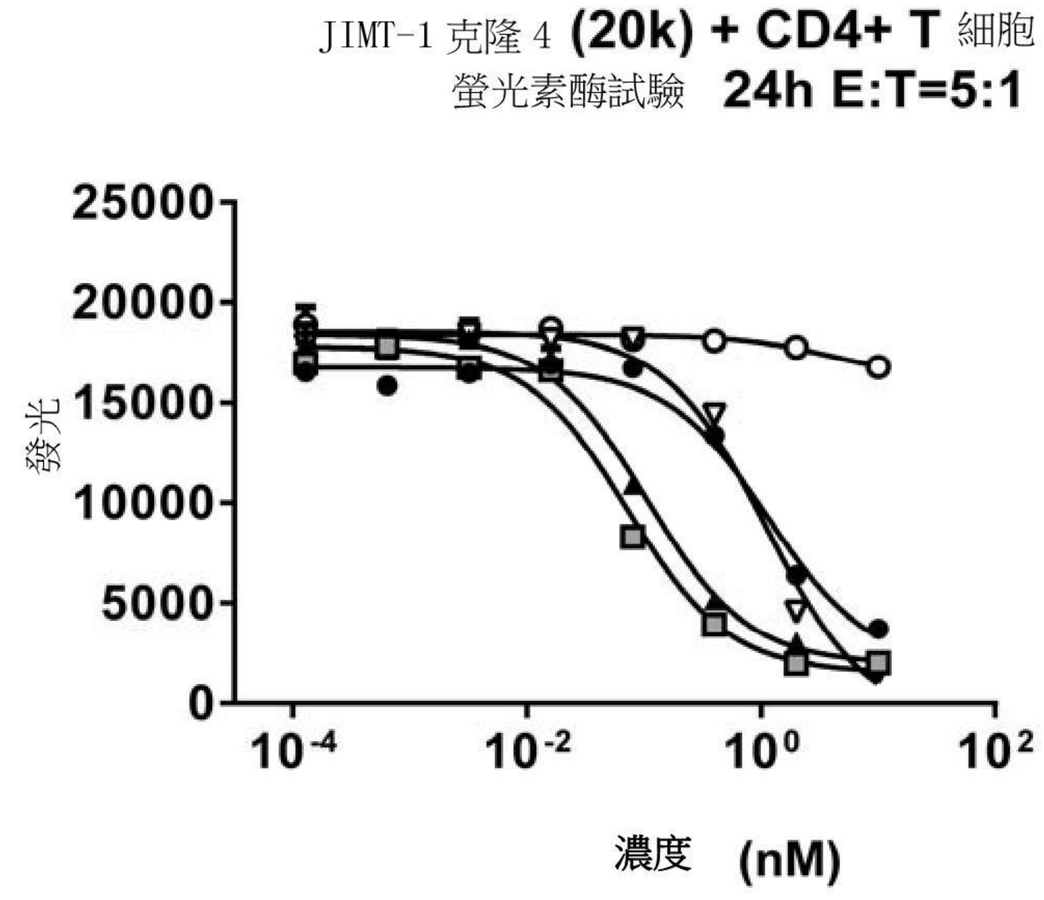


圖 11B

B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 / B7-H3 mAb 1 結合分子

B7-H3 mAb 1 / CD8 mAb 1 / CD3 mAb 2 結合分子

B7-H3 mAb 1 X CD8 mAb 1 DART™ ，其具有 Fc 結構域

B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域

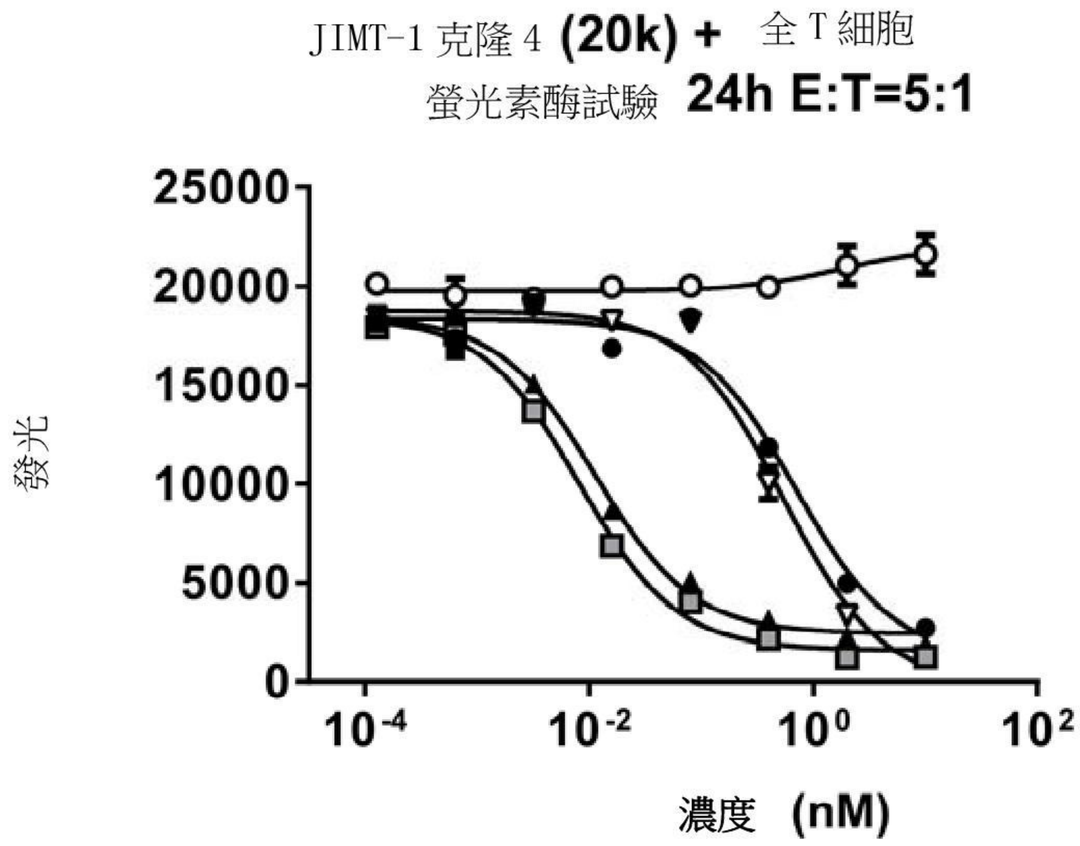


圖 11C

- B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
- CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 / B7-H3 mAb 1 結合分子
- B7-H3 mAb 1 / CD8 mAb 1 / CD3 mAb 2 結合分子
- B7-H3 mAb 1 X CD8 mAb 1 DART™ ，其具有 Fc 結構域
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域

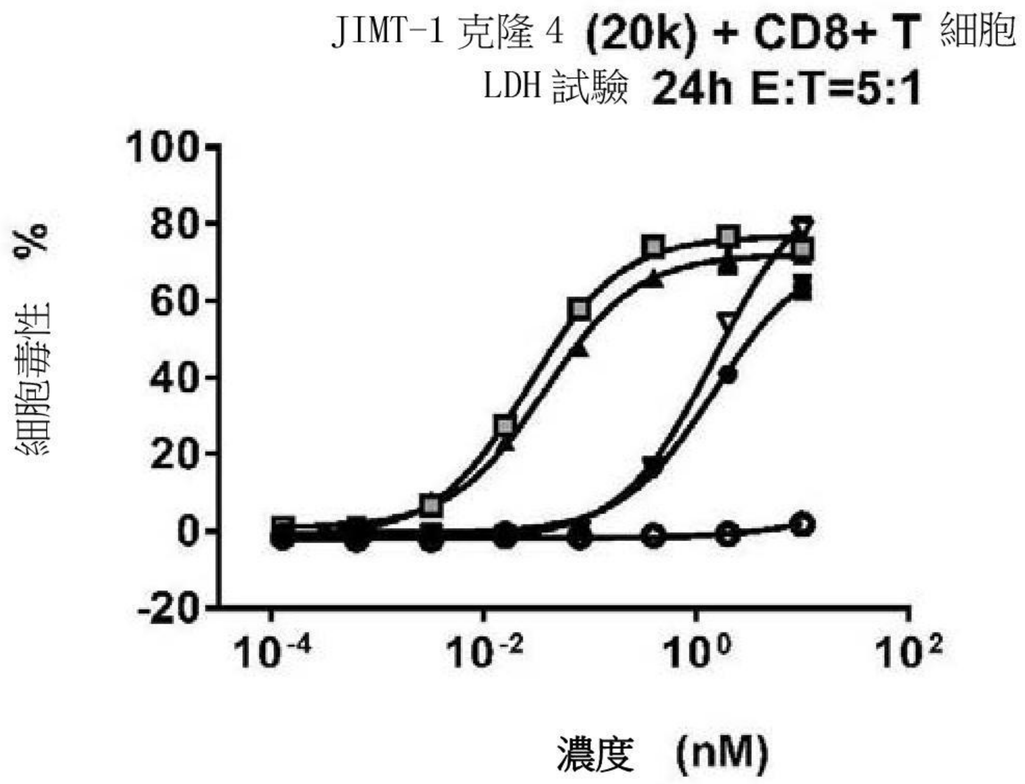


圖 12A

- B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
- CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 / B7-H3 mAb 1 結合分子
- B7-H3 mAb 1 / CD8 mAb 1 / CD3 mAb 2 結合分子
- B7-H3 mAb 1 X CD8 mAb 1 DART™ ，其具有 Fc 結構域
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域

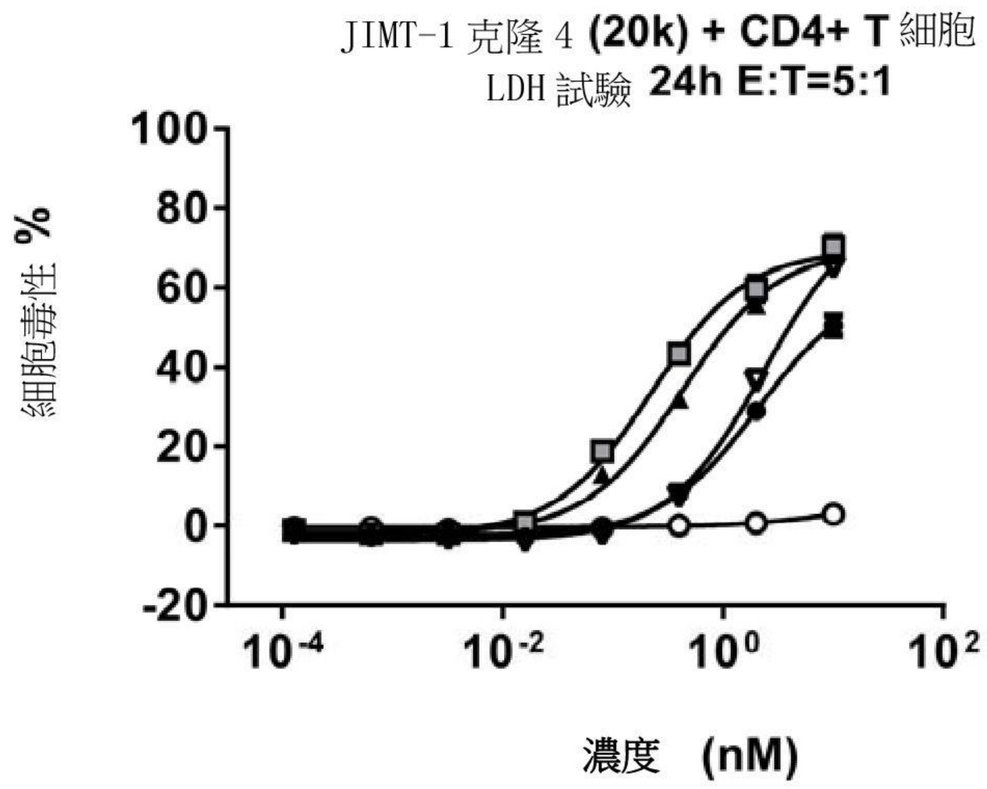

JIMT-1 克隆 4 (20k) + CD4+ T 細胞
LDH 試驗 24h E:T=5:1
細胞毒性 %
100
80
60
40
20
0
-20
10-4
10-2
100
102
濃度 (nM)

圖 12B

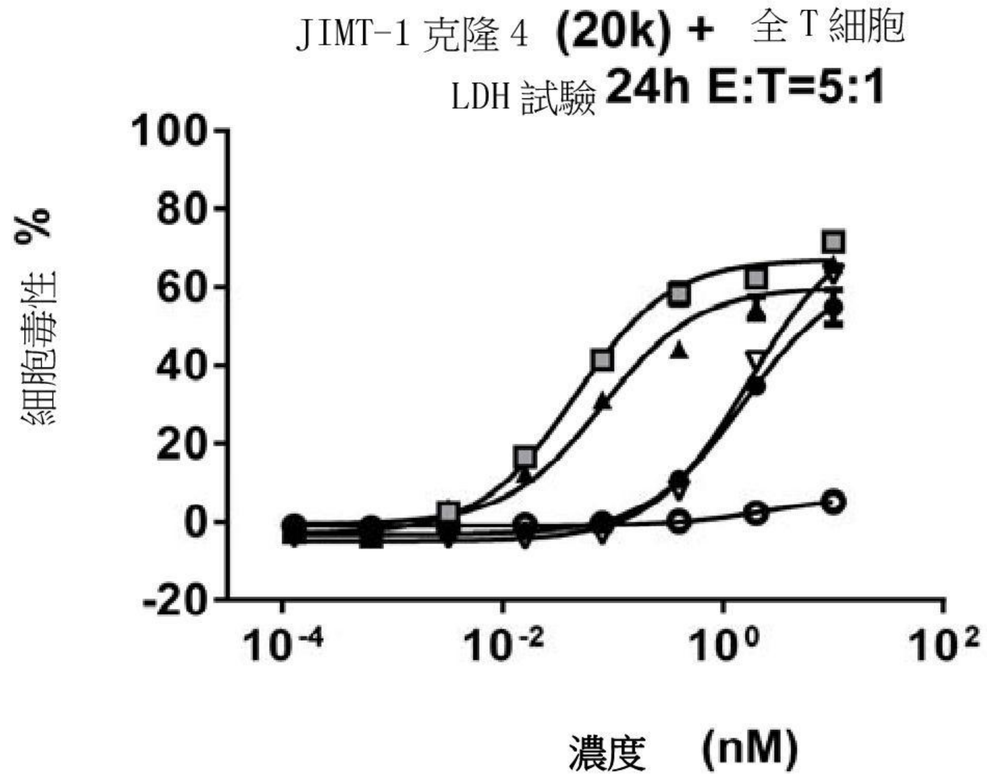

JIMT-1 克隆 4 (20k) + 全 T 細胞
LDH 試驗 24h E:T=5:1
細胞毒性 %
100
80
60
40
20
0
-20
10-4
10-2
100
102
濃度 (nM)

圖 12C

B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 / B7-H3 mAb 1 結合分子
B7-H3 mAb 1 / CD8 mAb 1 / CD3 mAb 2 結合分子
B7-H3 mAb 1 X CD8 mAb 1 DART™ ，其具有 Fc 結構域
B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ Fc 結構域

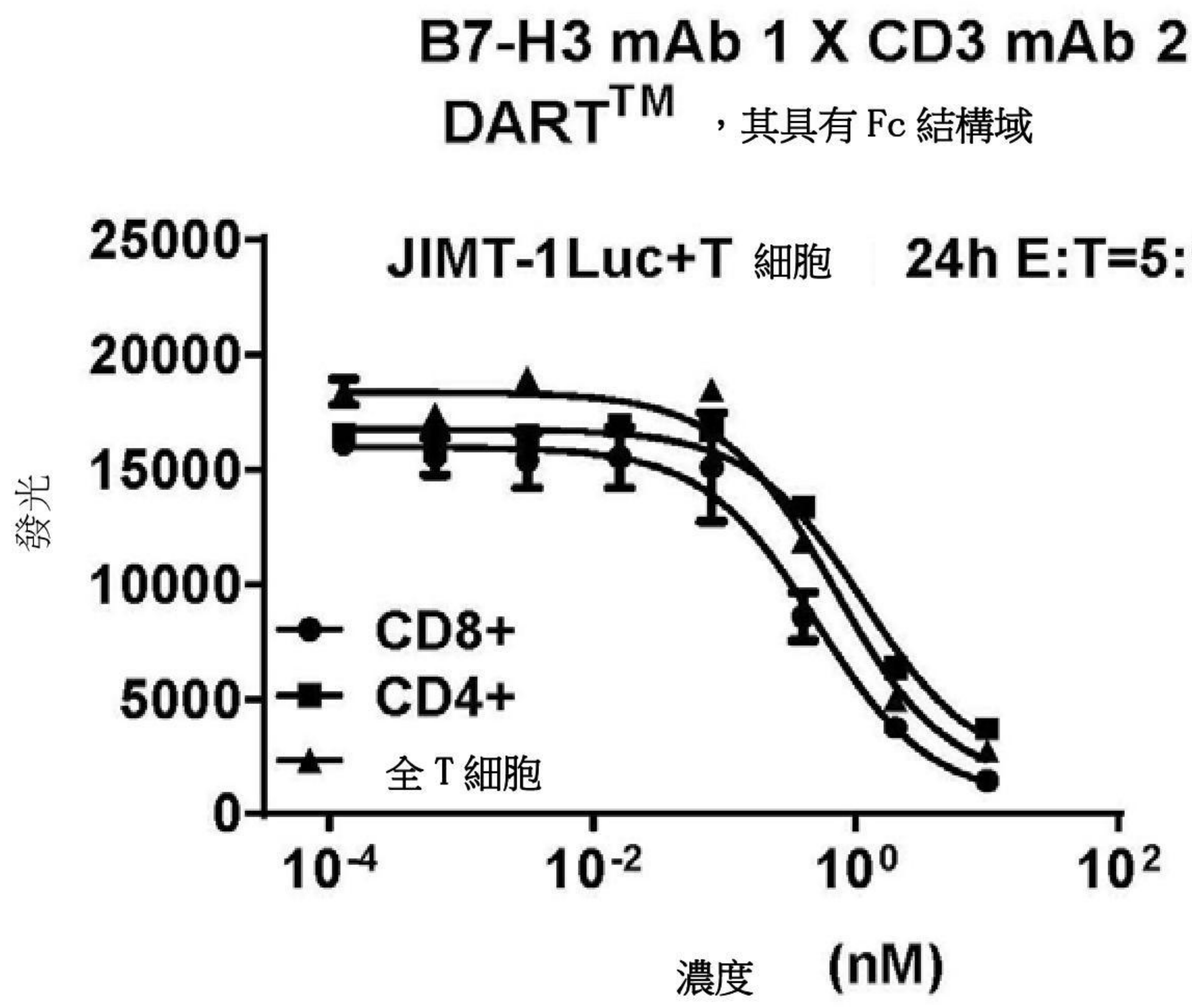

B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2
DART™ ，其具有 Fc 結構域
JIMT-1Luc+T 細胞 24h E:T=5:1
25000
20000
15000
10000
5000
0
發光
CD8+
CD4+
全 T 細胞
10-4
10-2
100
102
濃度 (nM)

圖 13A

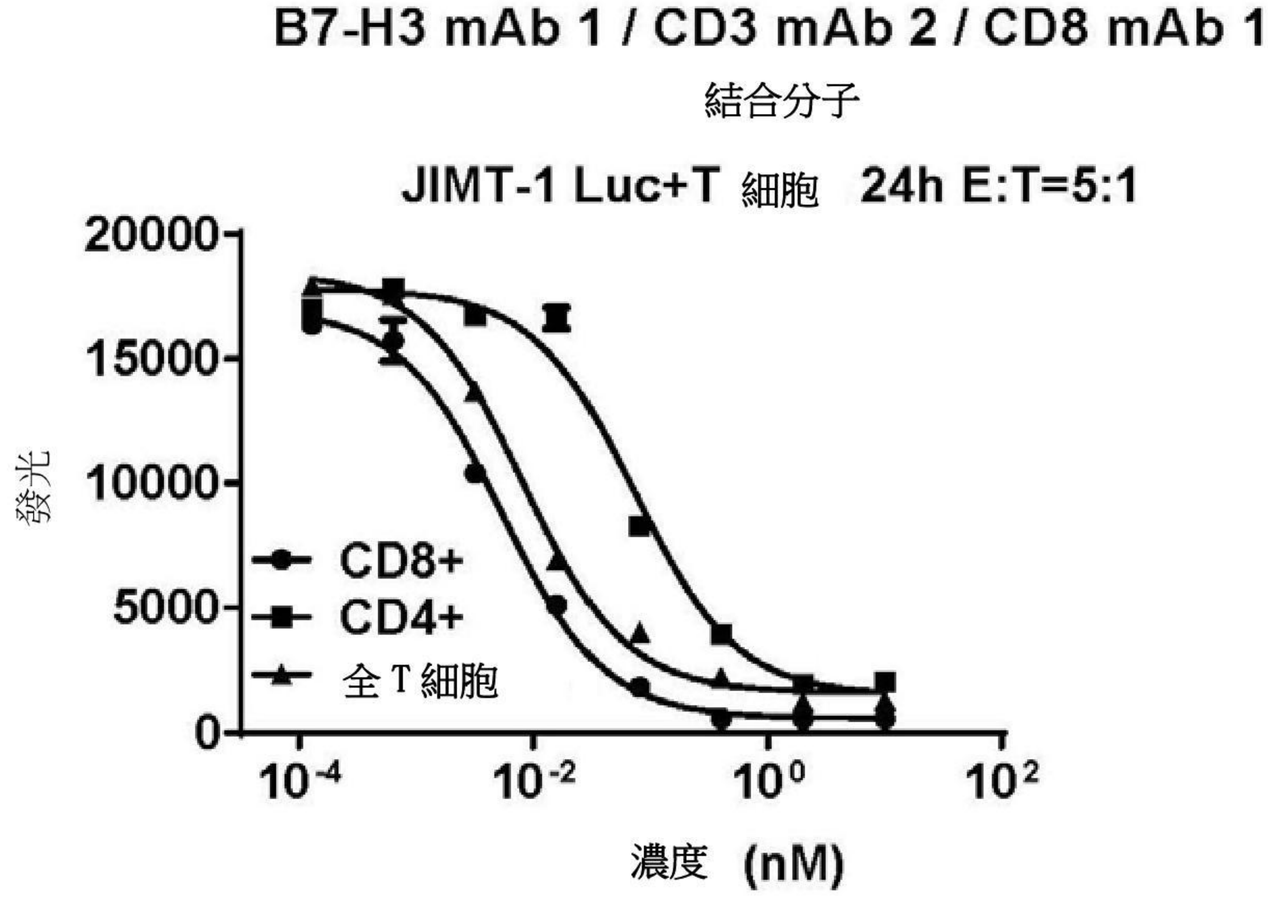

B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1
結合分子
JIMT-1 Luc+T 細胞 24h E:T=5:1
20000
15000
10000
5000
0
發光
CD8+
CD4+
全 T 細胞
10-4
10-2
100
102
濃度 (nM)

圖 13B

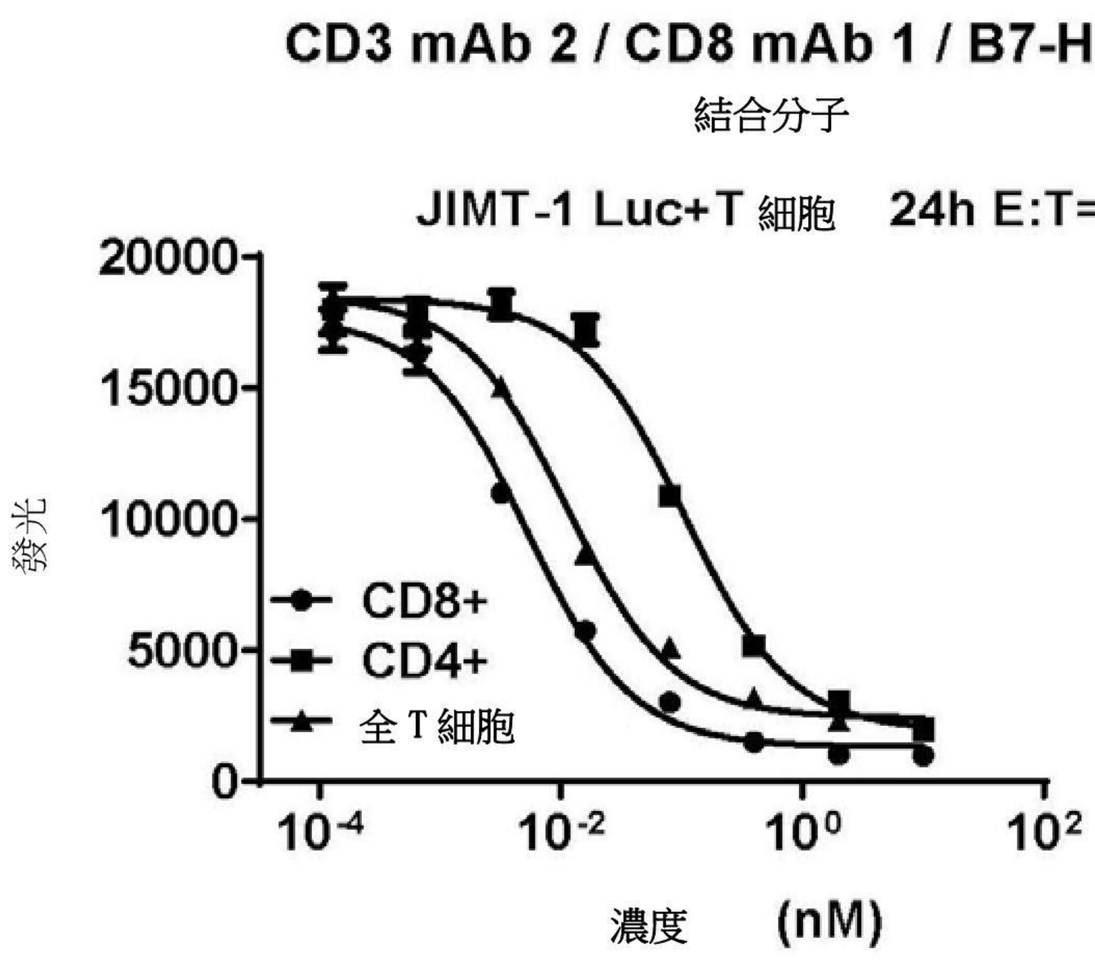

CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 / B7-H3 mAb 1
結合分子
JIMT-1 Luc+T 細胞 24h E:T=5:1
20000
15000
10000
5000
0
發光
CD8+
CD4+
全 T 細胞
10-4
10-2
100
102
濃度 (nM)

圖 13C

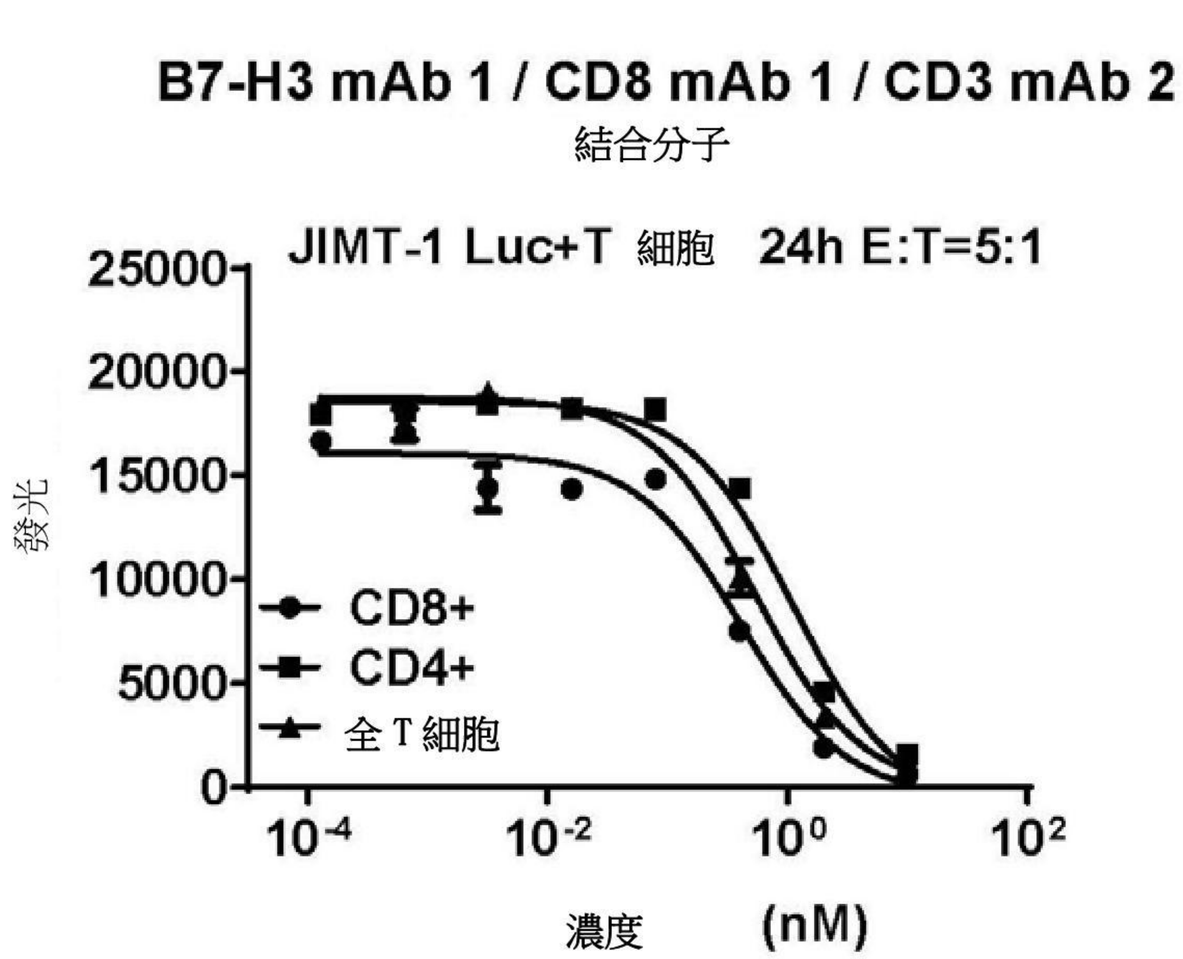

B7-H3 mAb 1 / CD8 mAb 1 / CD3 mAb 2
結合分子
JIMT-1 Luc+T 細胞 24h E:T=5:1
25000
20000
15000
10000
5000
0
發光
CD8+
CD4+
全 T 細胞
10-4
10-2
100
102
濃度 (nM)

圖 13D

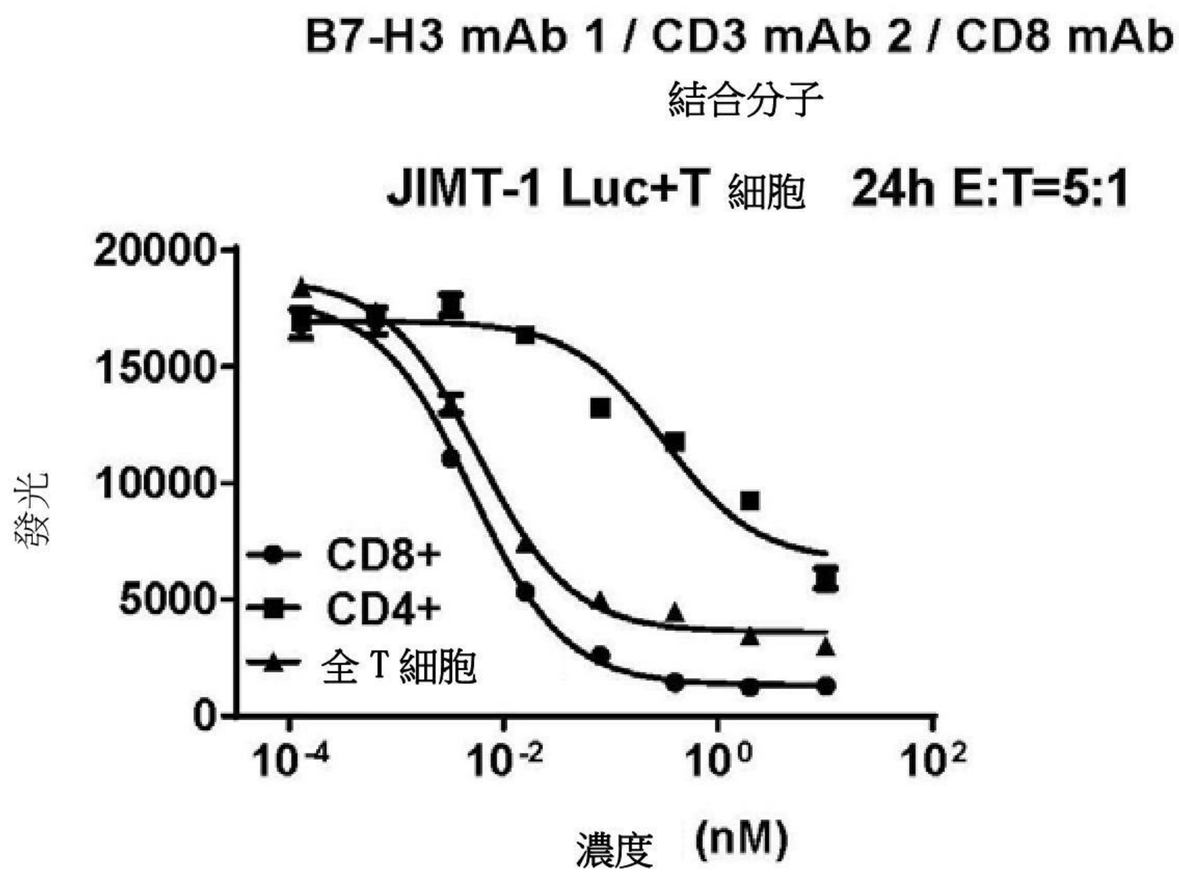

B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2
結合分子
JIMT-1 Luc+T 細胞 24h E:T=5:1
20000
15000
10000
5000
0
發光
CD8+
CD4+
全 T 細胞
10-4
10-2
100
102
濃度 (nM)

圖 13E

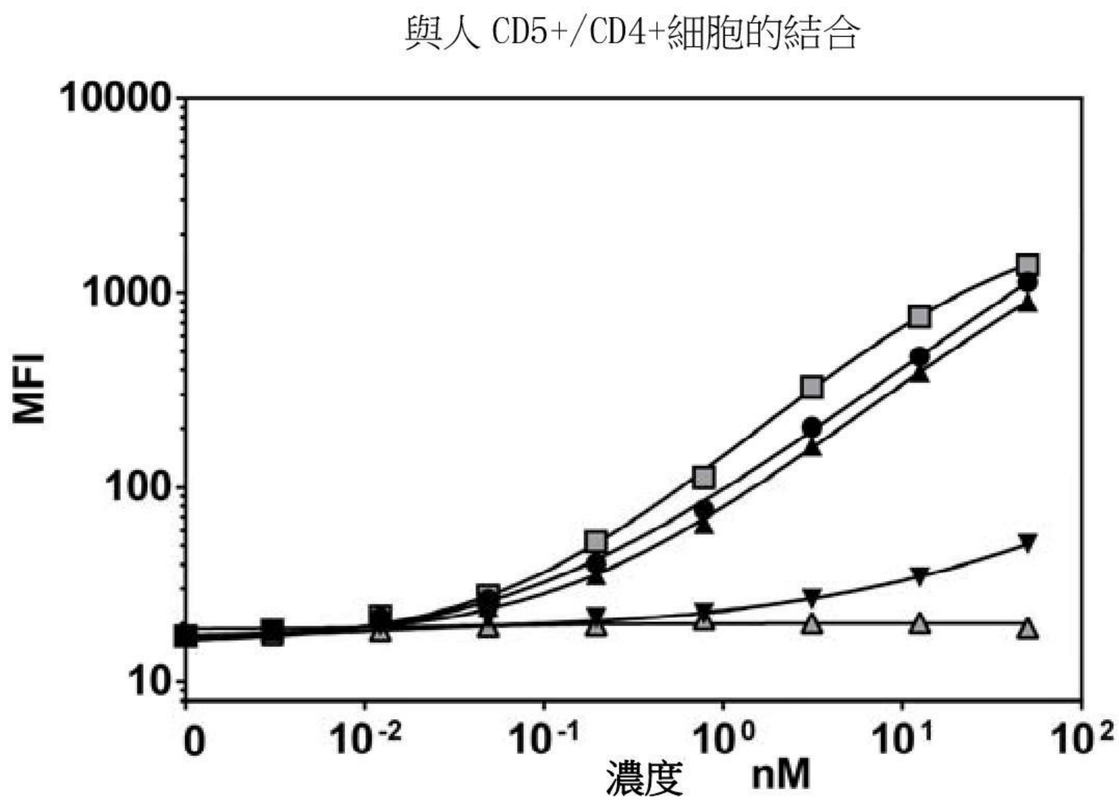

與人 CD5+/CD4+細胞的結合
10000
1000
100
10
MFI
0
10-2
10-1
100
101
102
濃度 nM

圖 14A

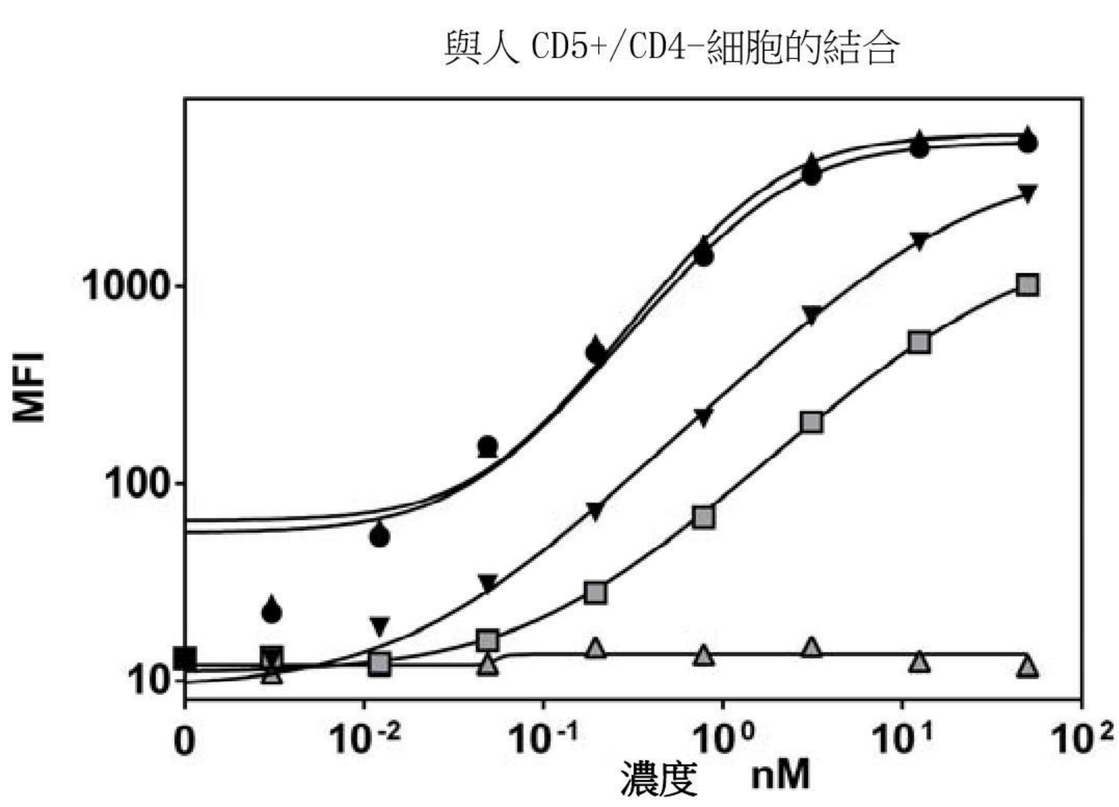

與人 CD5+/CD4-細胞的結合
1000
100
10
MFI
0
10-2
10-1
100
101
102
濃度 nM

圖 14B

B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 / B7-H3 mAb 1 結合分子
B7-H3 mAb 1 / CD8 mAB 1 / CD3 mAb 2 結合分子
B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™
B7-H3 mAb 1 X B7-H3 mAb 1 DART™

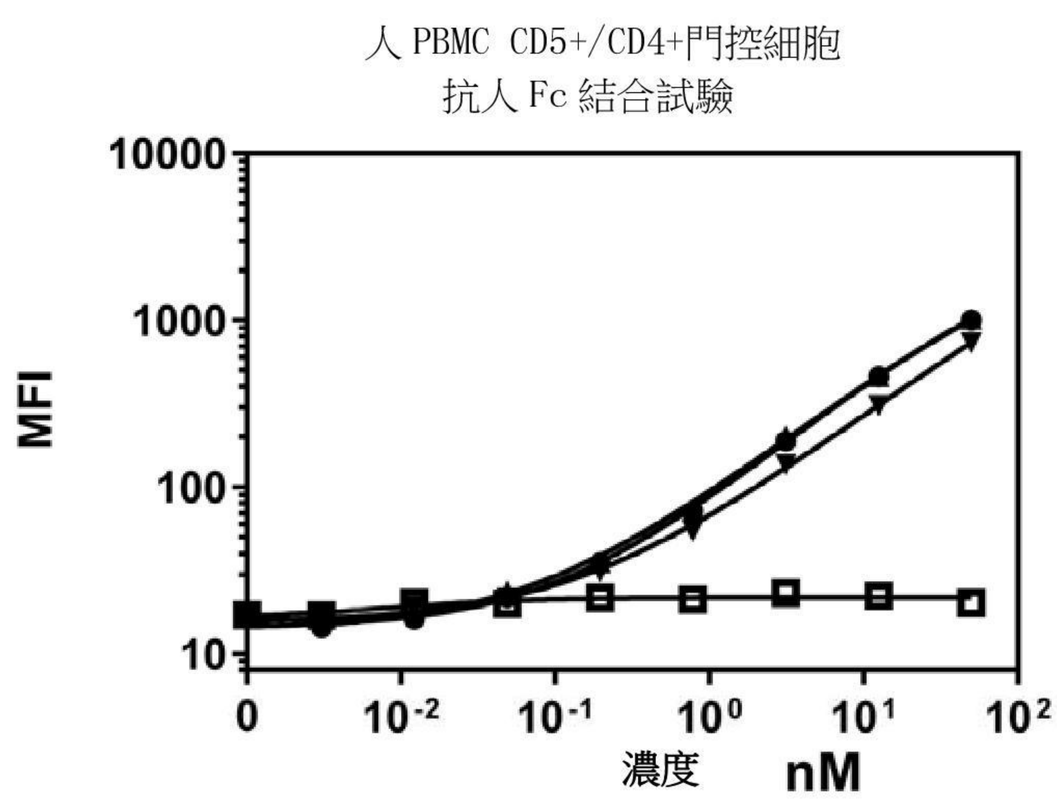


圖 15A

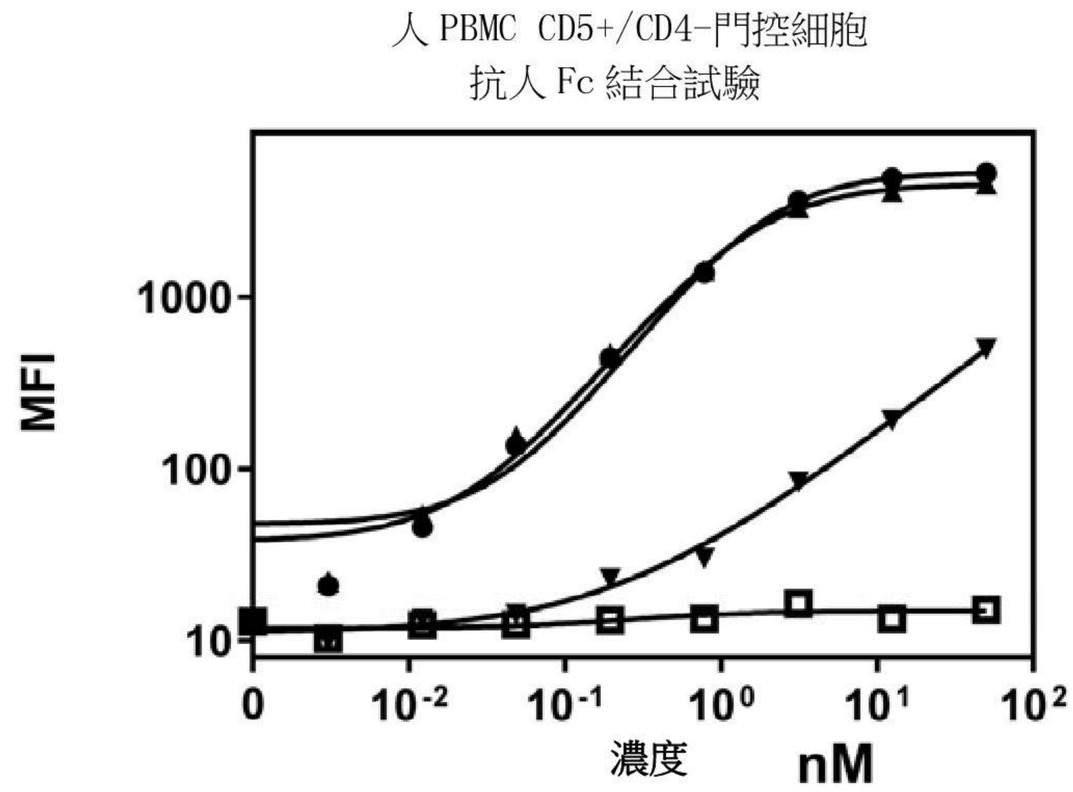


圖 15B

- ST4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
- ST4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 結合分子
- ST4 mAb 2 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域
- ST4 mAb 2 X ST4 mAb 2 Fc DART

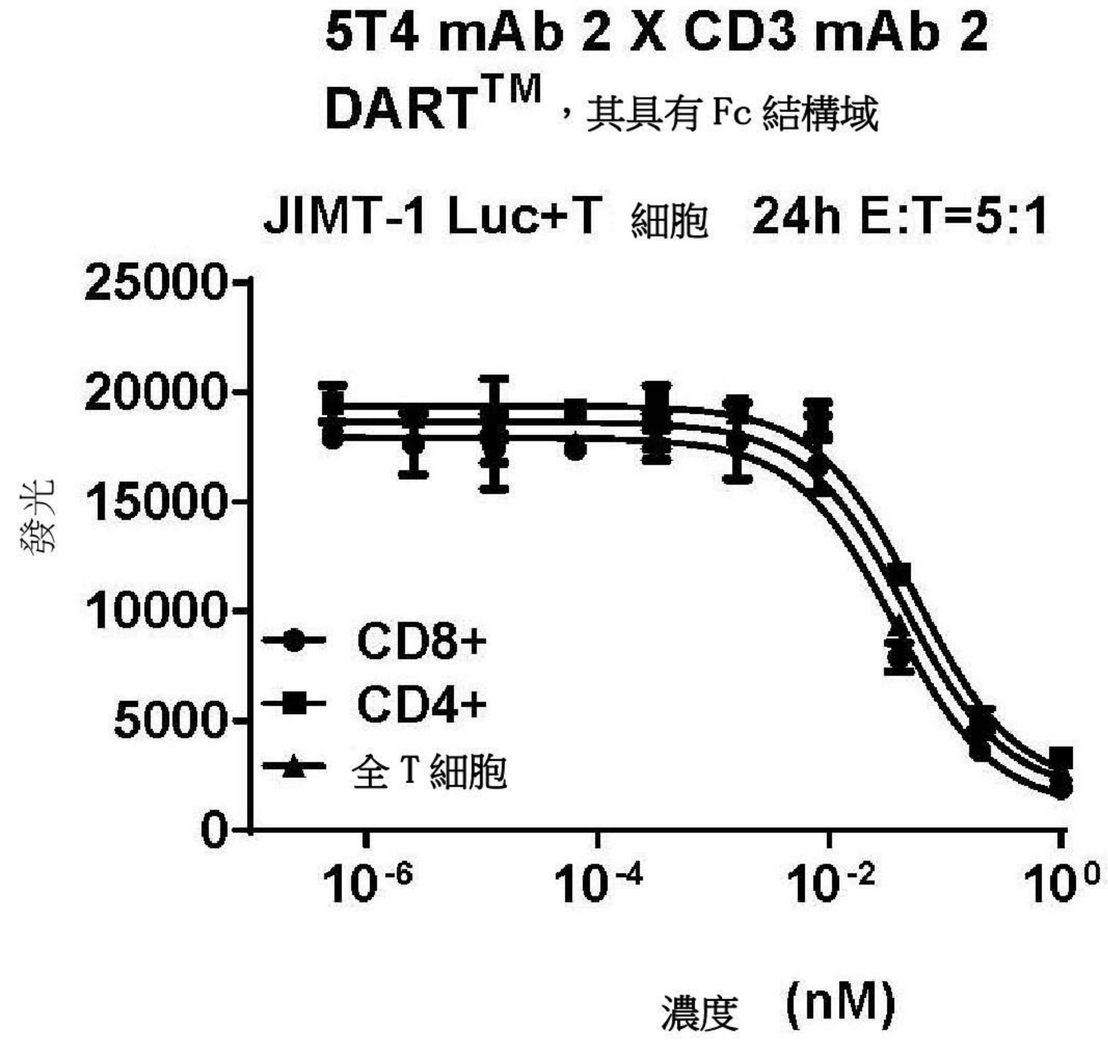

5T4 mAb 2 X CD3 mAb 2
DART™，其具有 Fc 結構域
JIMT-1 Luc+T 細胞 24h E:T=5:1
25000
20000
15000
10000
5000
0
發光
CD8+
CD4+
全 T 細胞
10-6
10-4
10-2
100
濃度 (nM)

圖 16A

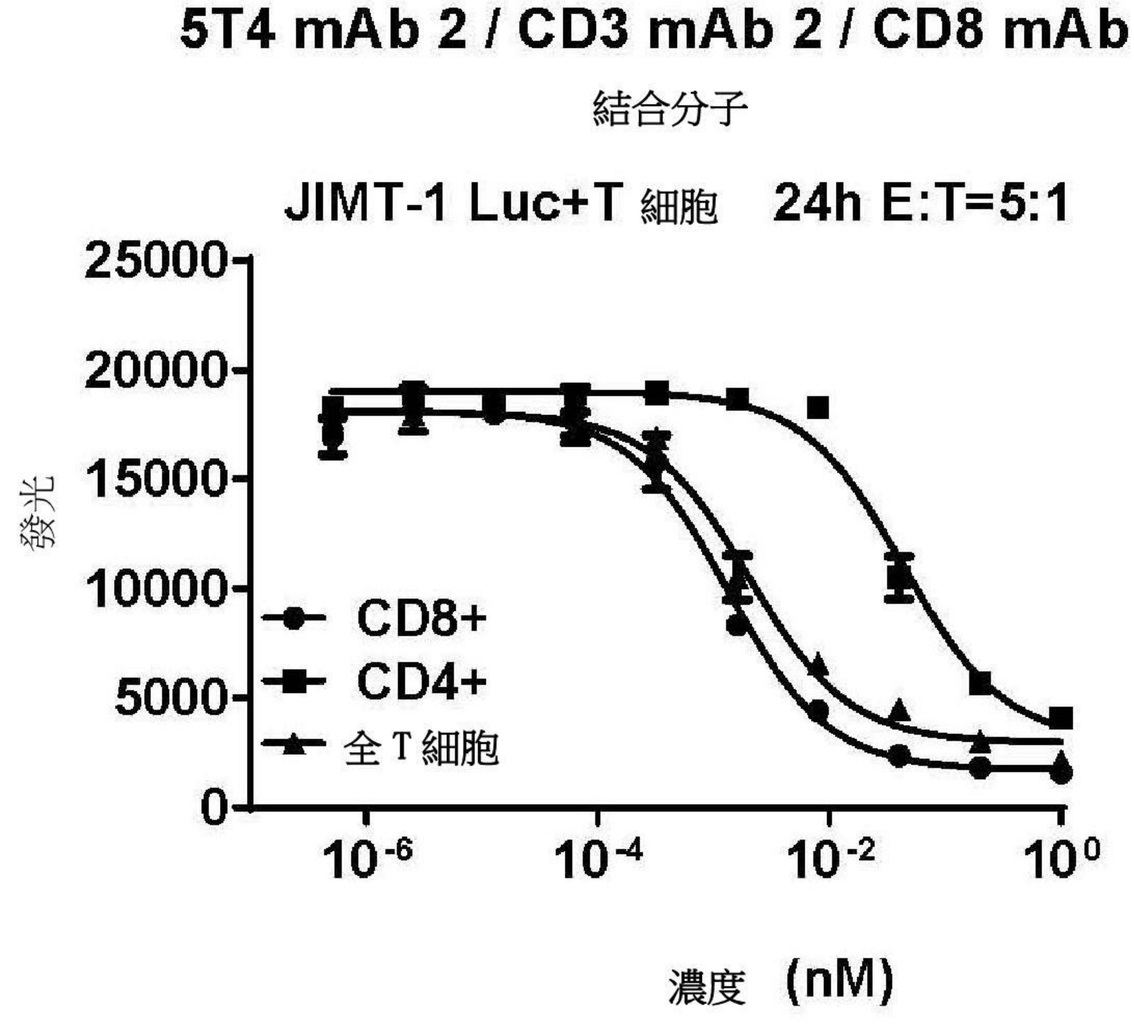

5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1
結合分子
JIMT-1 Luc+T 細胞 24h E:T=5:1
25000
20000
15000
10000
5000
0
發光
CD8+
CD4+
全 T 細胞
10-6
10-4
10-2
100
濃度 (nM)

圖 16B

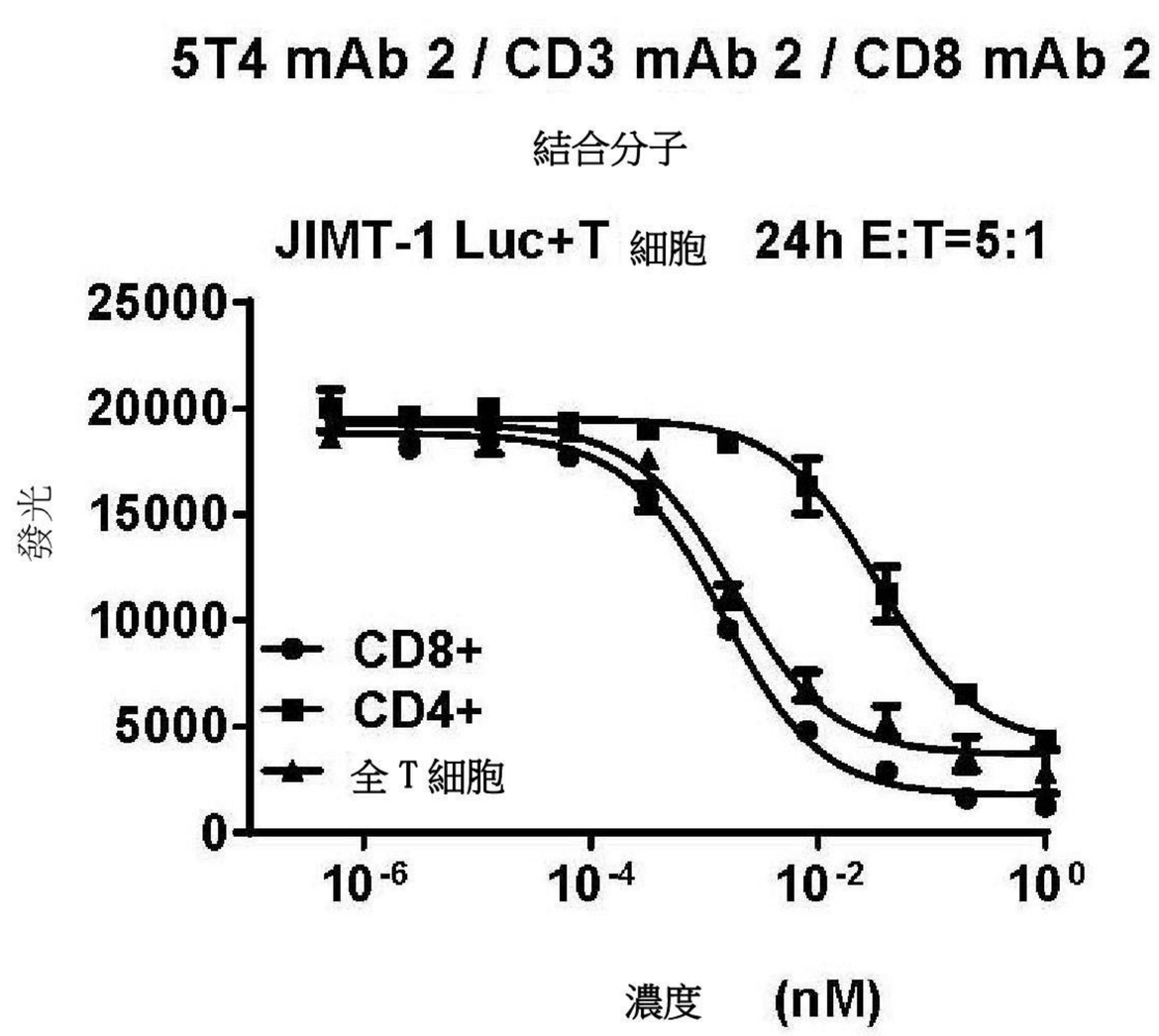

5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2
結合分子
JIMT-1 Luc+T 細胞 24h E:T=5:1
發光
25000
20000
15000
10000
5000
0
CD8+
CD4+
全 T 細胞
10-6
10-4
10-2
100
濃度 (nM)

圖 16C

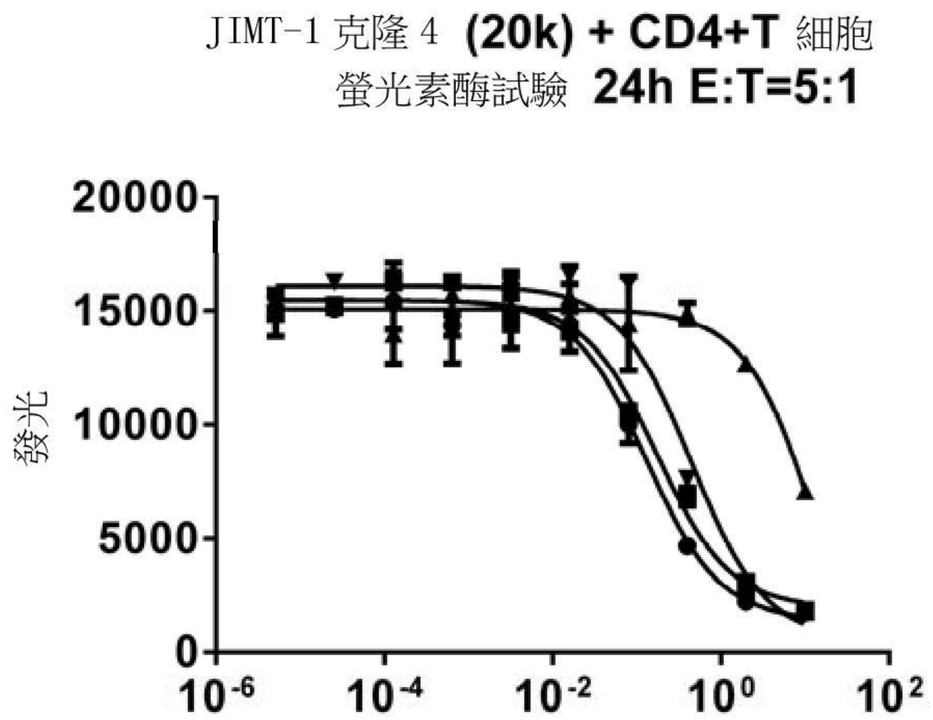

JIMT-1 克隆 4 (20k) + CD4+T 細胞
螢光素酶試驗 24h E:T=5:1
20000
15000
10000
5000
0
發光
10-6
10-4
10-2
100
102
濃度 (nM)
ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 結合分子
RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
ROR1 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域

圖 17A

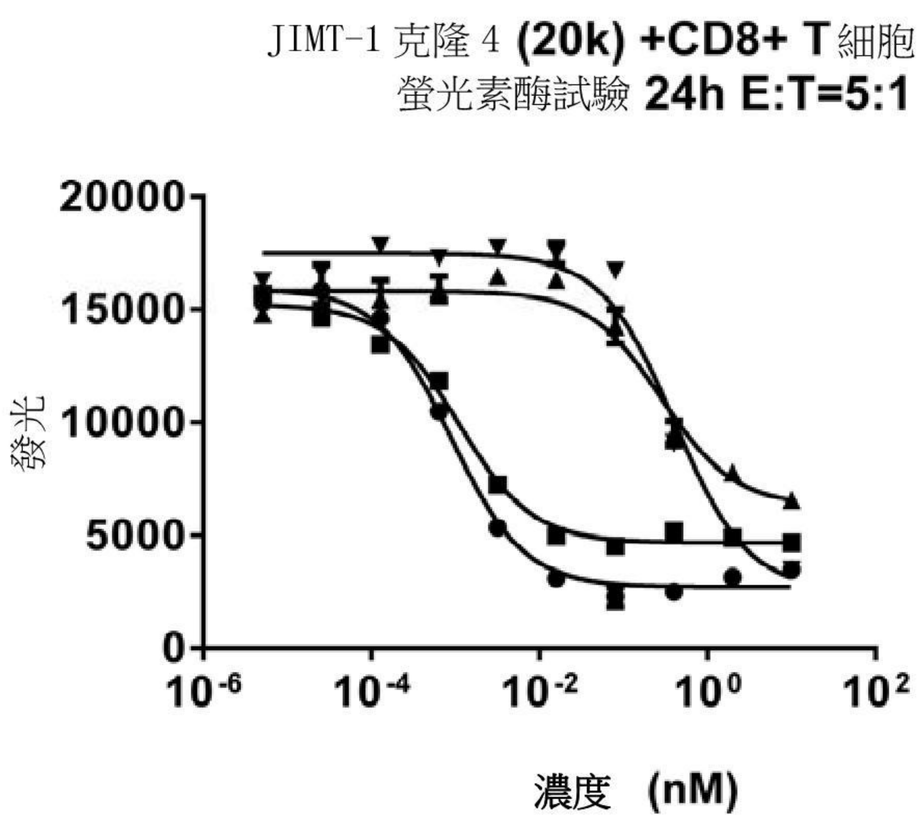

JIMT-1 克隆 4 (20k) +CD8+ T細胞
螢光素酶試驗 24h E:T=5:1
20000
15000
10000
5000
0
發光
10-6
10-4
10-2
100
102
濃度 (nM)
ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 結合分子
RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
ROR1 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域

圖 17B

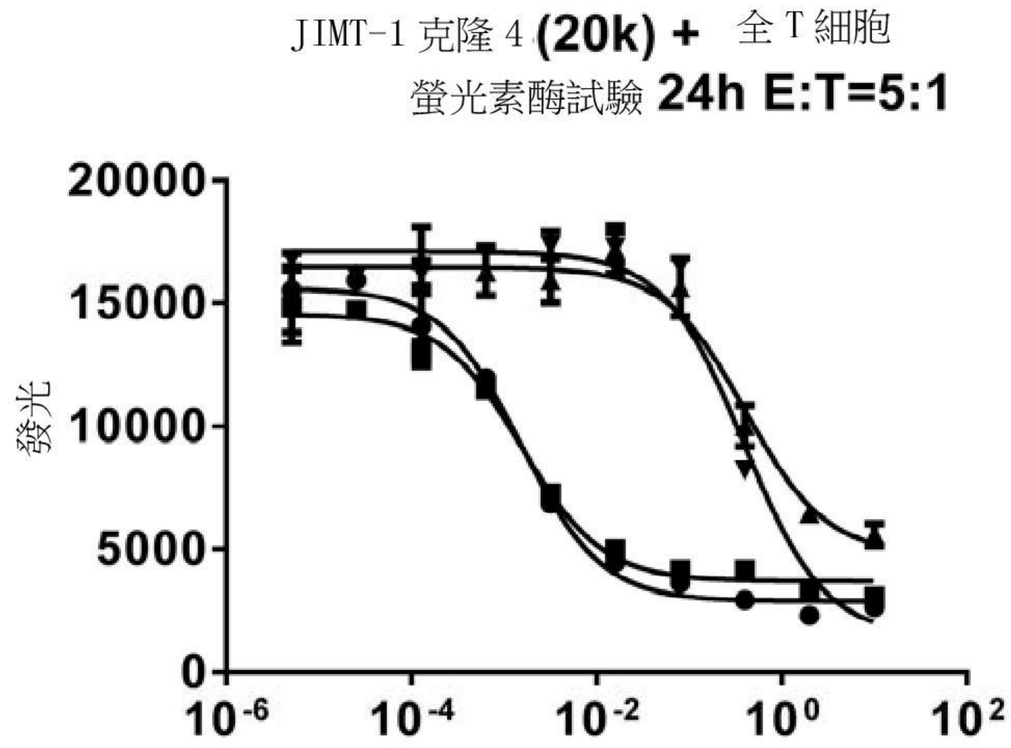

JIMT-1 克隆 4 (20k) + 全 T 細胞
螢光素酶試驗 24h E:T=5:1
20000
15000
10000
5000
0
發光
10-6
10-4
10-2
100
102
濃度 (nM)
ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 結合分子
RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
ROR1 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™，其具有 Fc 結構域

圖 17C

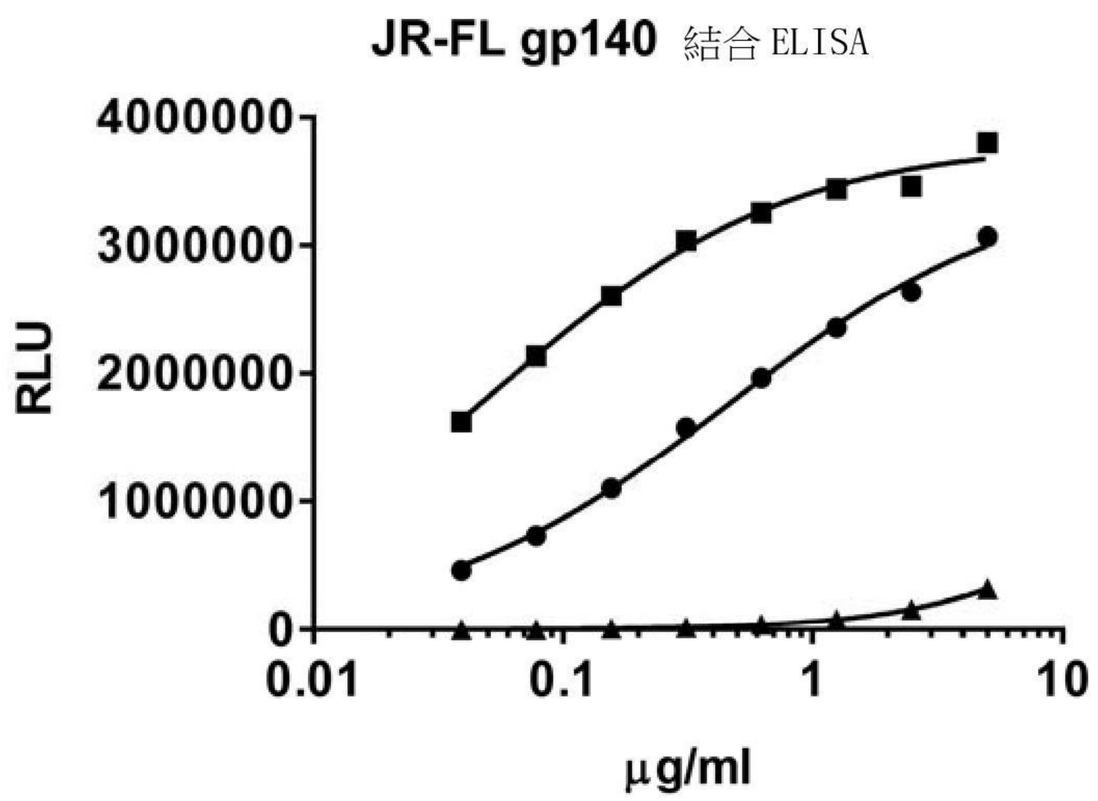

JR-FL gp140 結合 ELISA
RLU
4000000
3000000
2000000
1000000
0
0.01
0.1
1
10
μg/ml

圖 18A

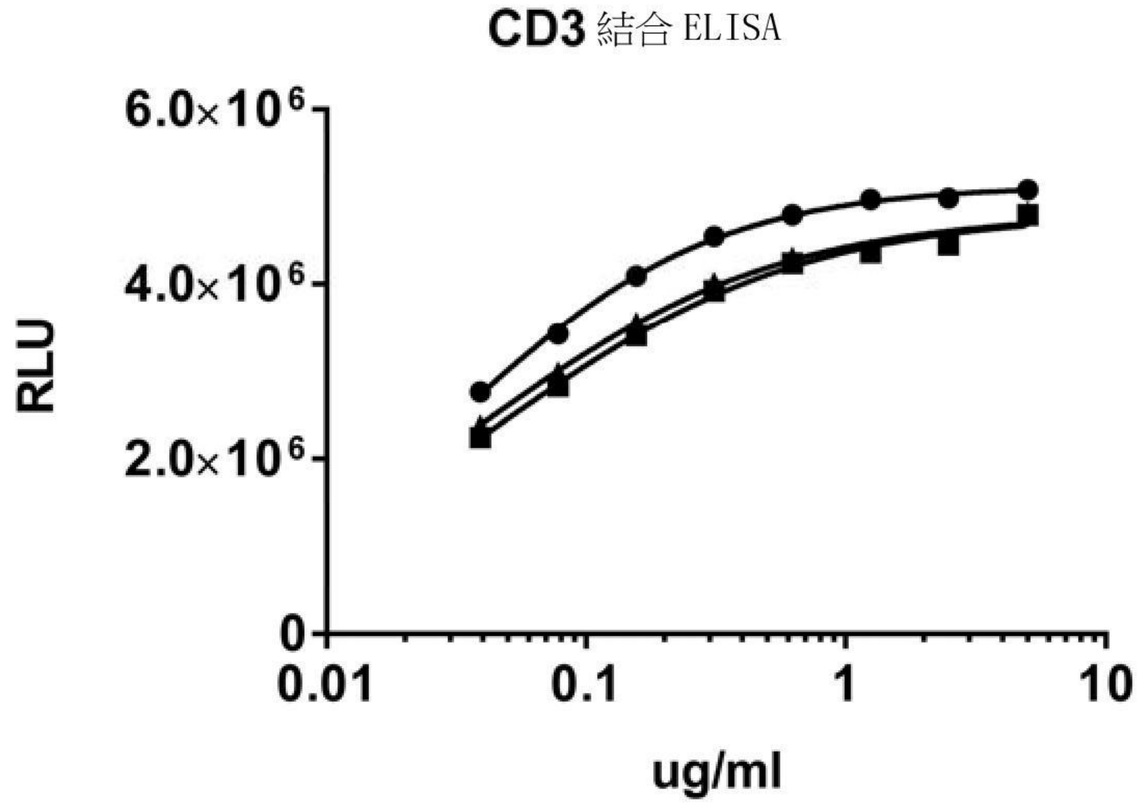
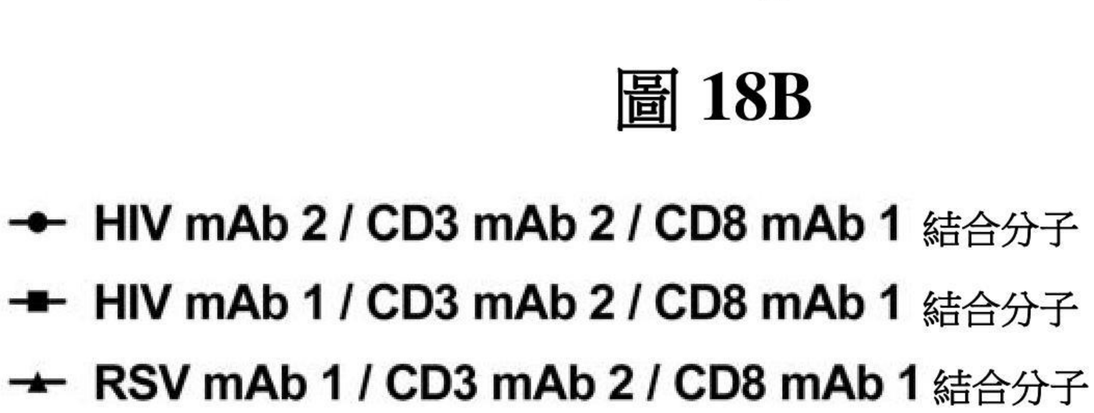

CD3 結合 ELISA
RLU
6.0×10⁶
4.0×10⁶
2.0×10⁶
0
0.01
0.1
1
10
ug/ml

圖 18B


HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

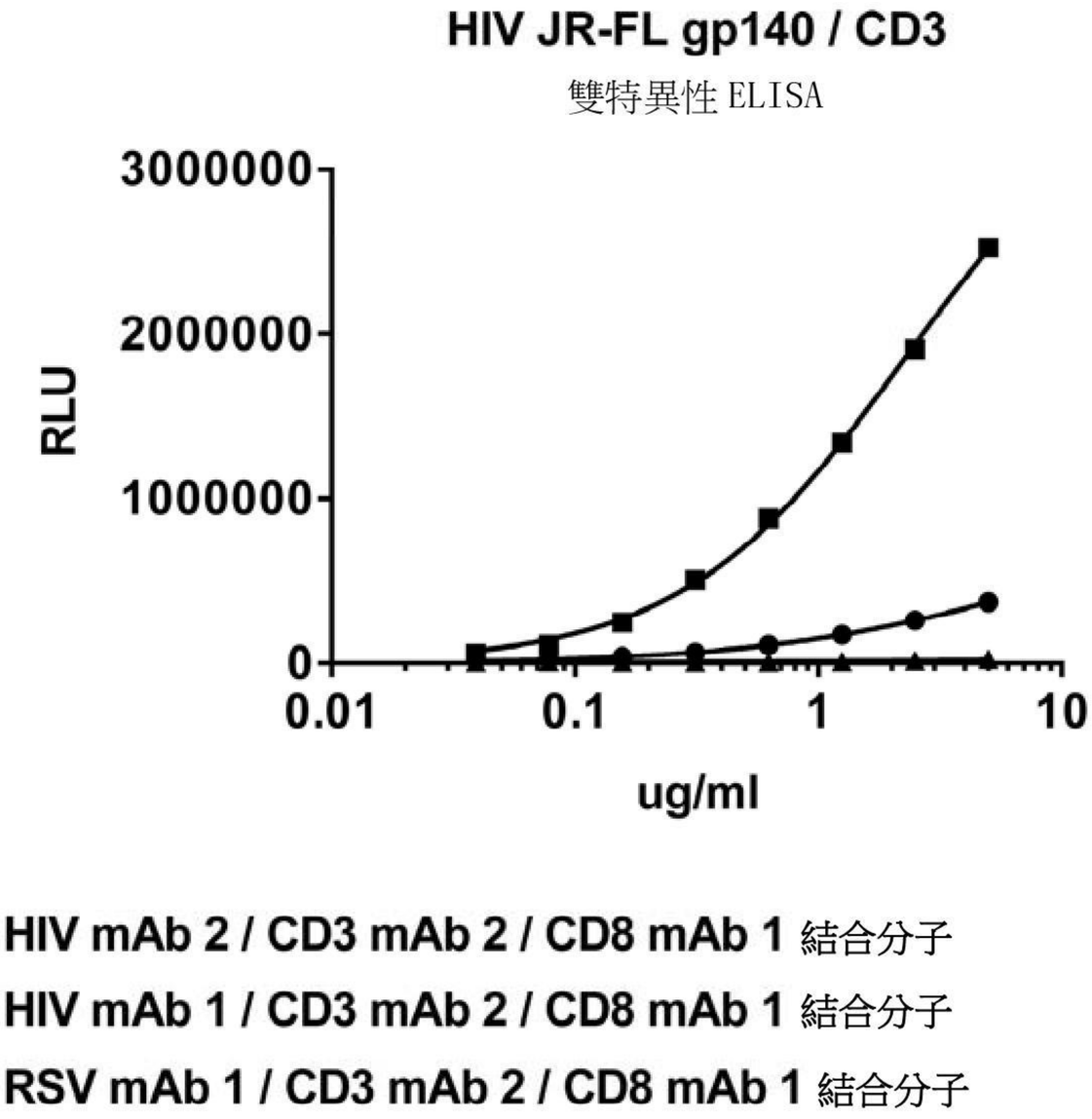
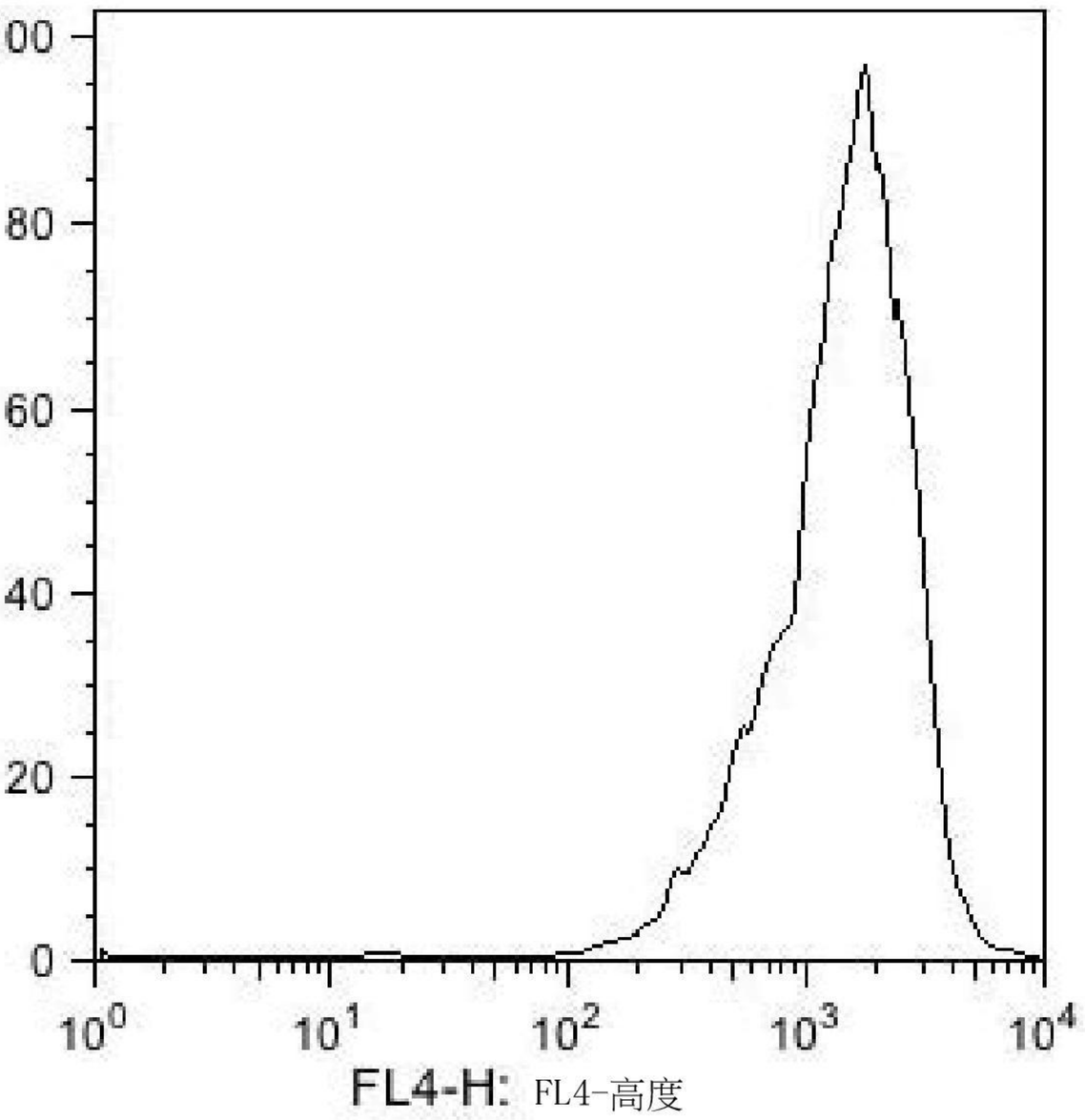
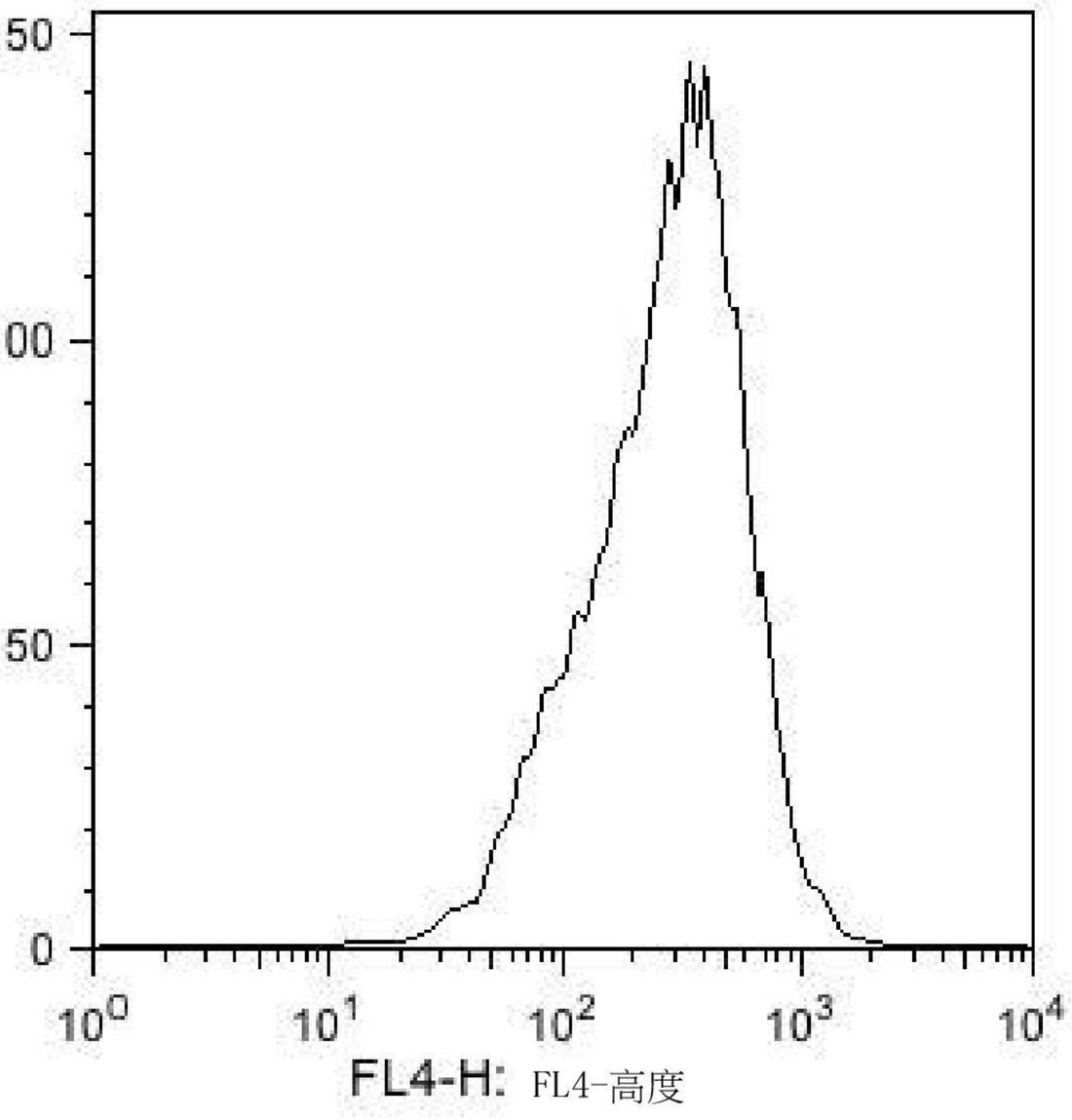

HIV JR-FL gp140 / CD3
雙特異性 ELISA
3000000
2000000
1000000
0
RLU
0.01
0.1
1
10
ug/ml
HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

圖 18C



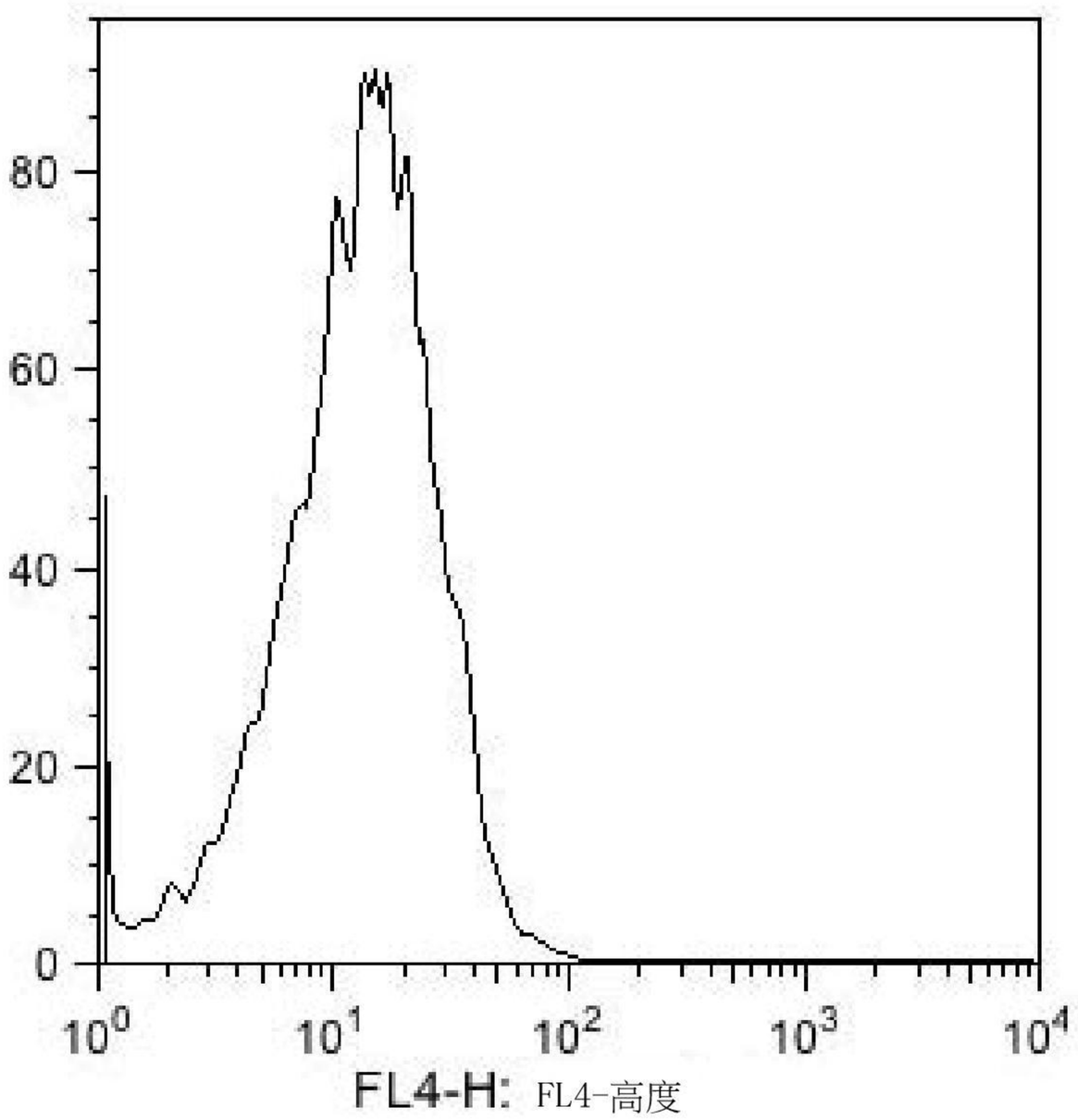
與 HIV mAb1/CD3 mAb2/CD8 mAb1 的結合
表達 HIV env 的 HEK 293 細胞的結合分子

圖 19A



與 HIV mAb2/CD3 mAb2/CD8 mAb1 的結合
表達 HIV env 的 HEK 293 細胞的結合分子

圖 19B



與 RSV mAb1/CD3 mAb2/CD8 mAb1 的結合
表達 HIV env 的 HEK 293 的結合分子

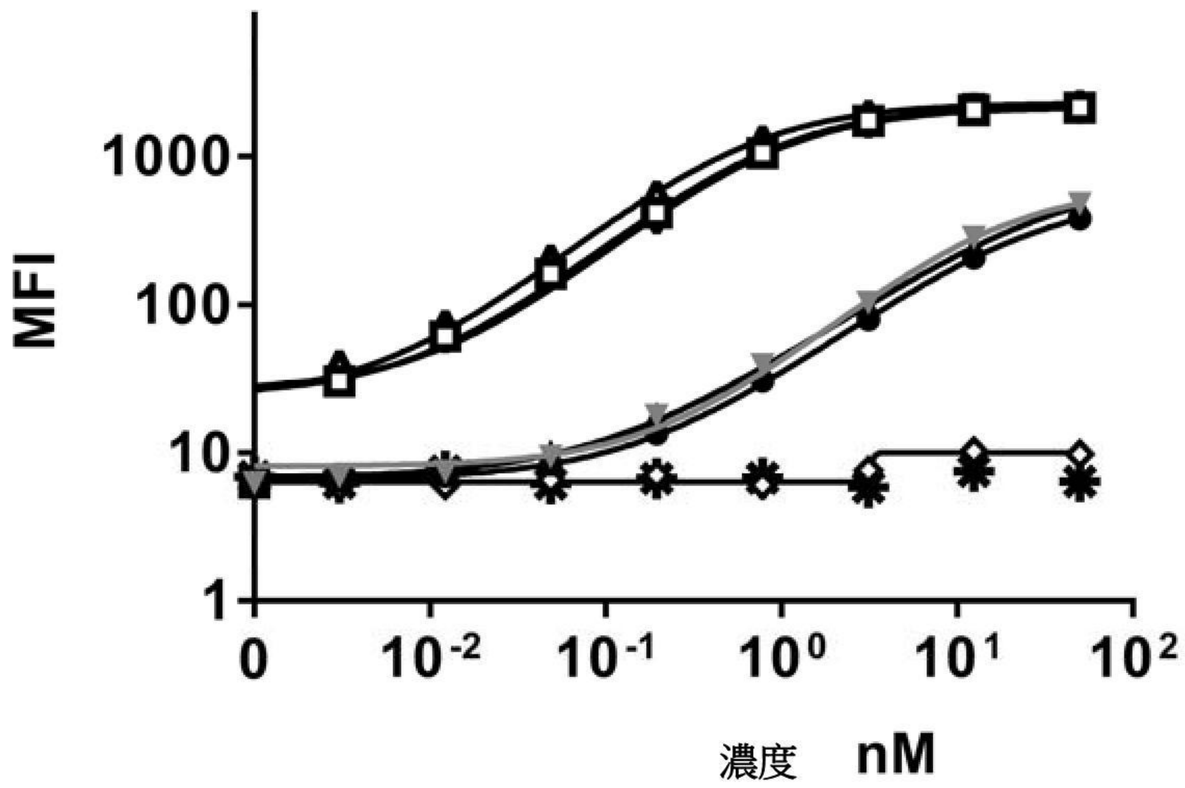
圖 19C

人 PBMC CD5+/CD4+門控細胞
抗人 Fc 結合實驗

HIV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域
HIV mAb 2 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域
RSV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™，其具有 Fc 結構域
HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
HIV mAb 1 X RSV mAb 1 DART™，其具有 Fc 結構域
HIV mAb 2 X RSV mAb 1 DART™，其具有 Fc 結構域

圖 20A

人 PBMC CD5+/CD4-門控細胞
抗人 Fc 結合實驗



- HIV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域
- HIV mAb 2 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域
- RSV mAb 1 X CD3 2 DART™，其具有 Fc 結構域
- HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
- HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
- RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
- HIV mAb 1 X RSV mAb 1 DART™ ，其具有 Fc 結構域
- HIV mAb 2 X RSV mAb 1 DART™ ，其具有 Fc 結構域

圖 20B

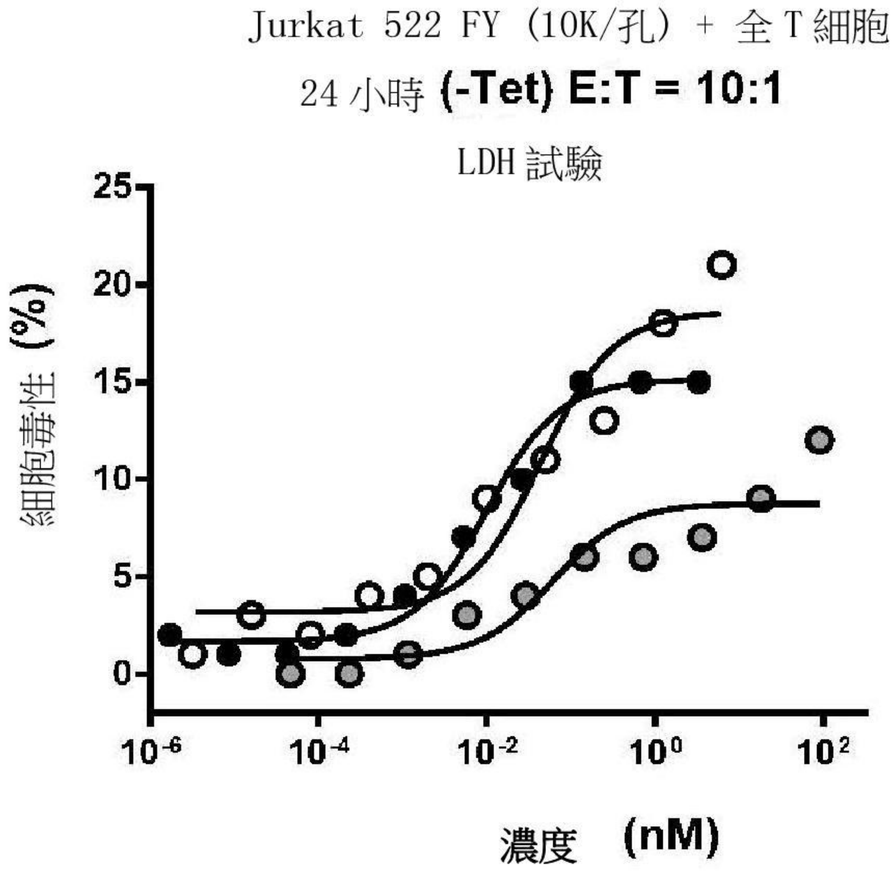


圖 21A

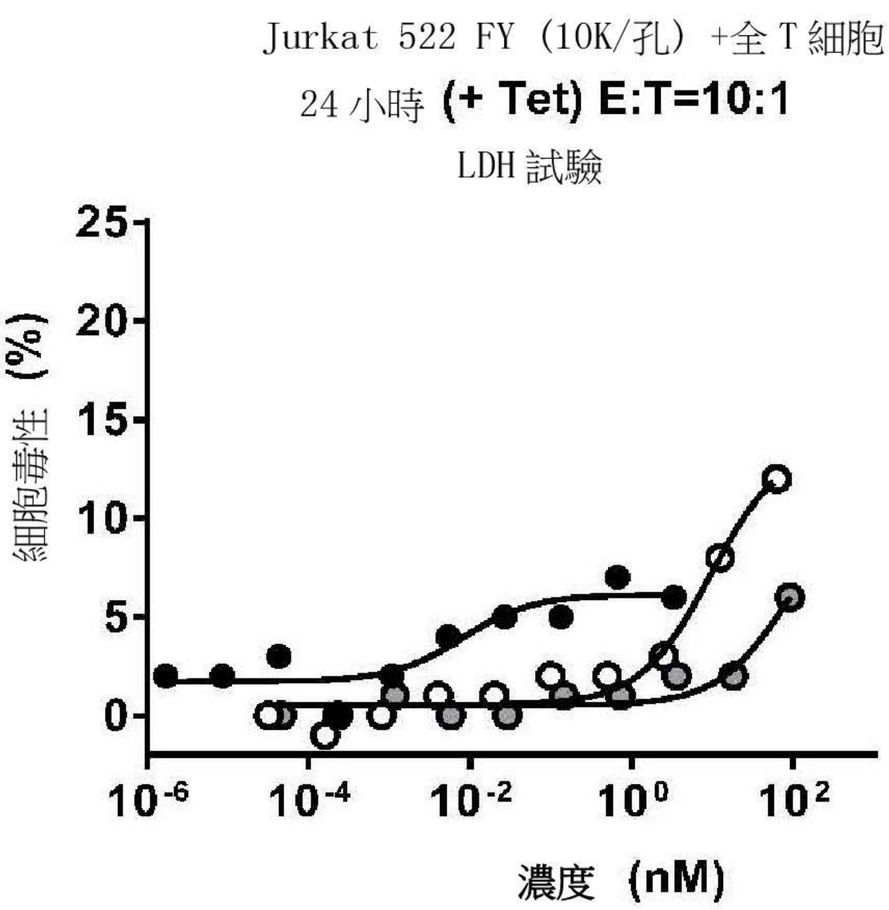


圖 21B

- HIV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™
- HIV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域
- HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

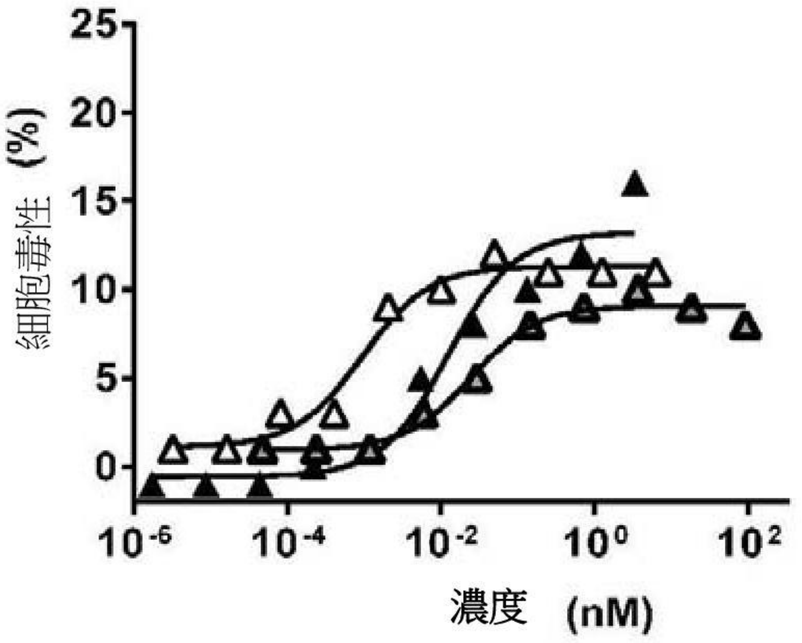


圖 21C

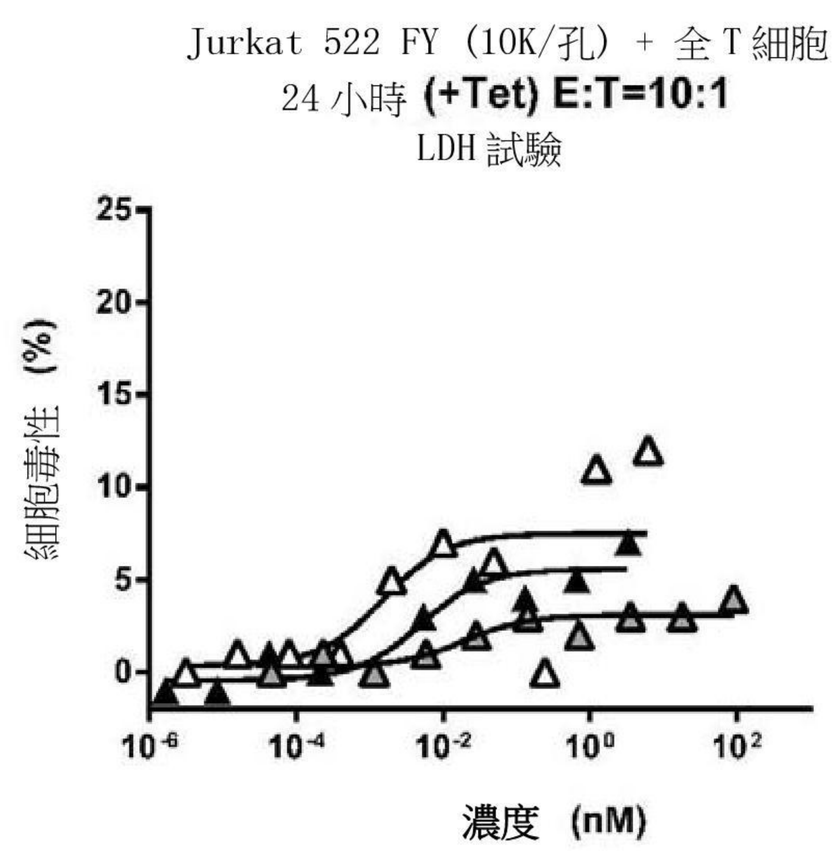


圖 21D

HIV mAb 2 X CD3 mAb 2 DART™

HIV mAb 2 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域

HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 /CD8 mAb1 結合分子

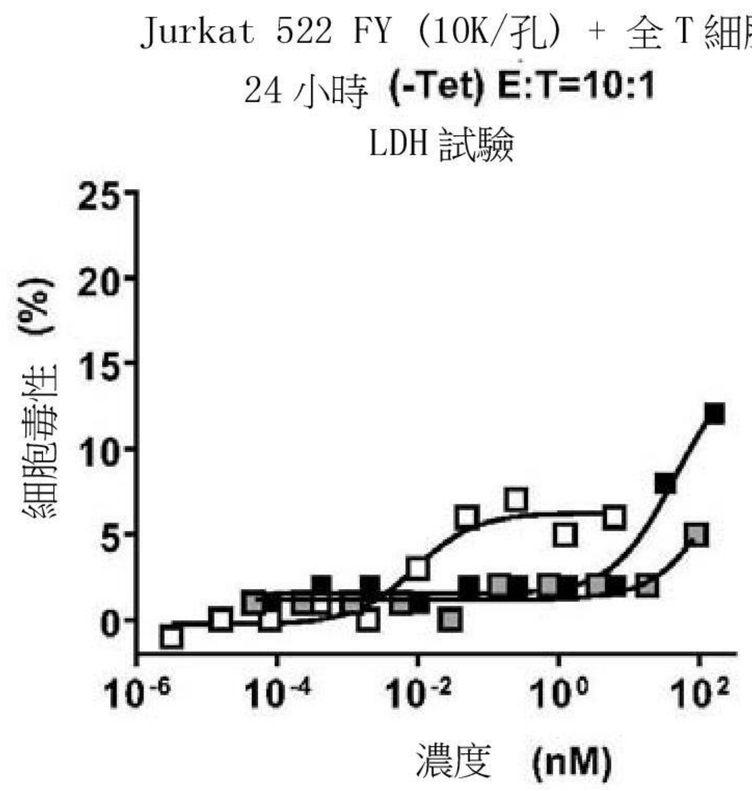


圖 21E

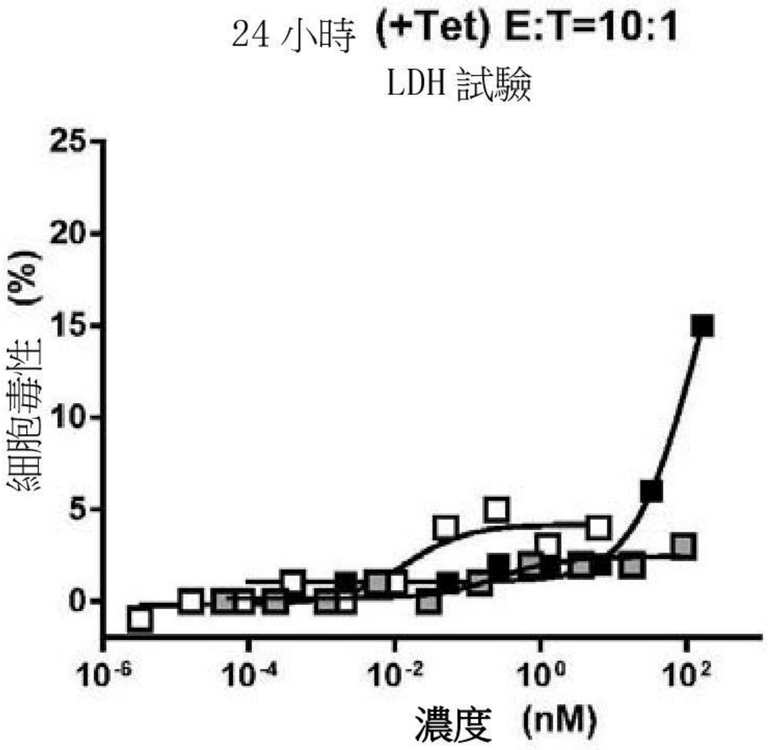


圖 21F

RSV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™

RSV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™，其具有 Fc 結構域

RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

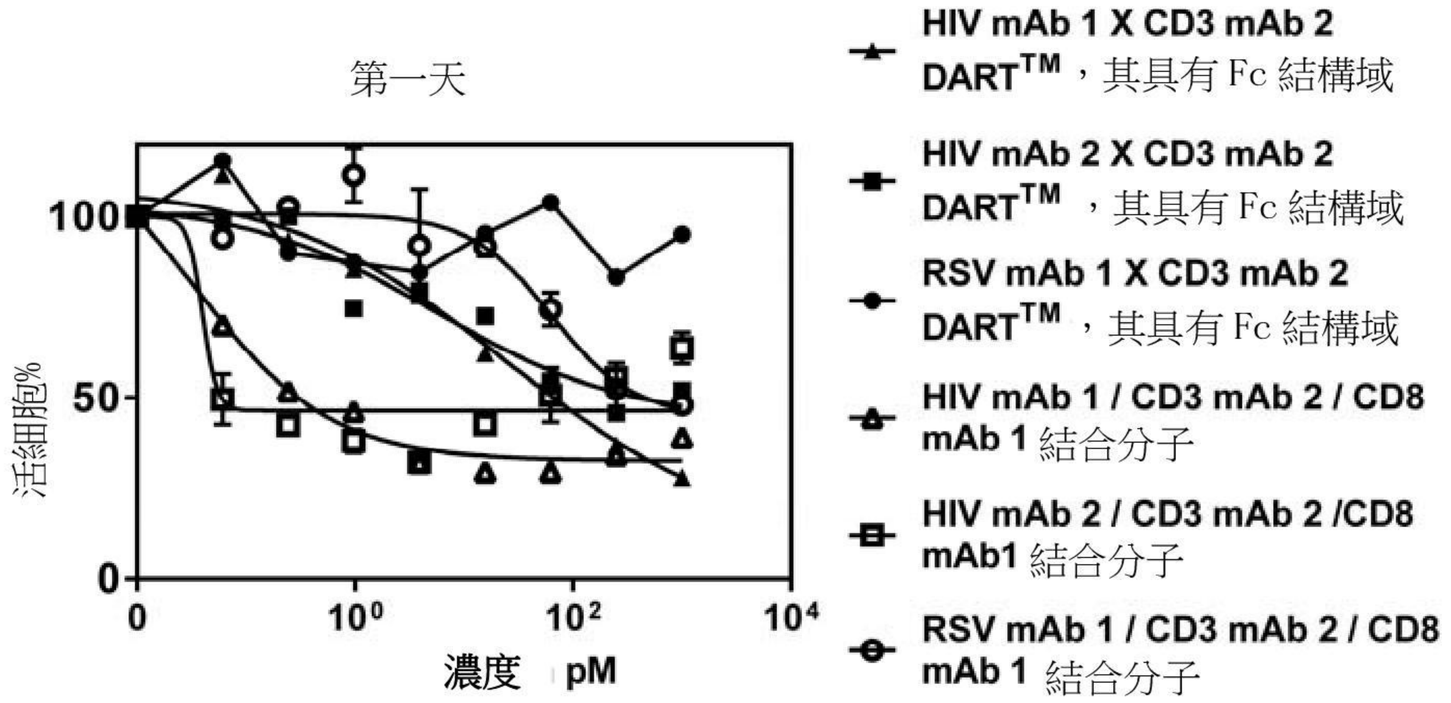

第一天
100
50
0
活細胞%
0
10^0
10^2
10^4
濃度 pM
HIV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™，其具有 Fc 結構域
HIV mAb 2 X CD3 mAb 2 DART™，其具有 Fc 結構域
RSV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™，其具有 Fc 結構域
HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 /CD8 mAb1 結合分子
RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

圖 22A

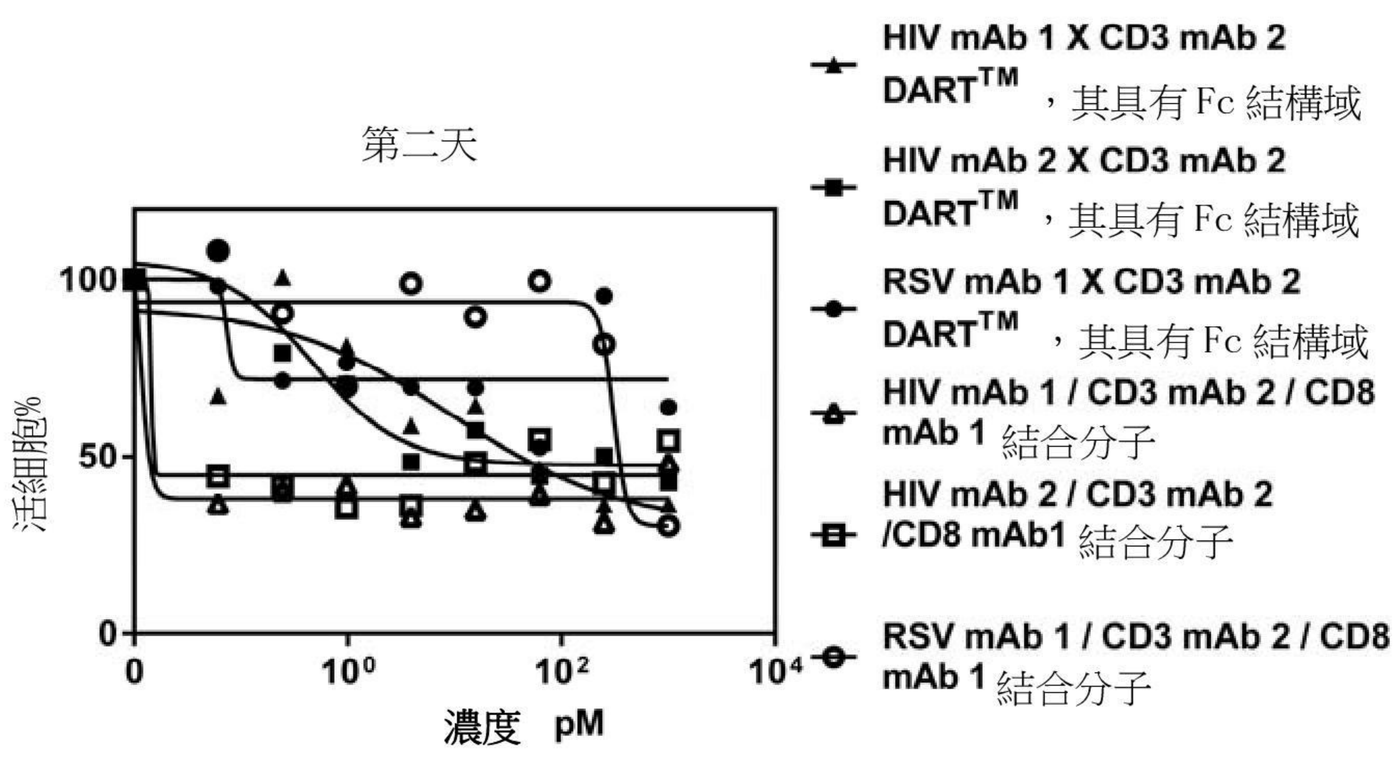

第二天
100
50
0
活細胞%
0
10^0
10^2
10^4
濃度 pM
HIV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™，其具有 Fc 結構域
HIV mAb 2 X CD3 mAb 2 DART™，其具有 Fc 結構域
RSV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™，其具有 Fc 結構域
HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 /CD8 mAb1 結合分子
RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

圖 22B

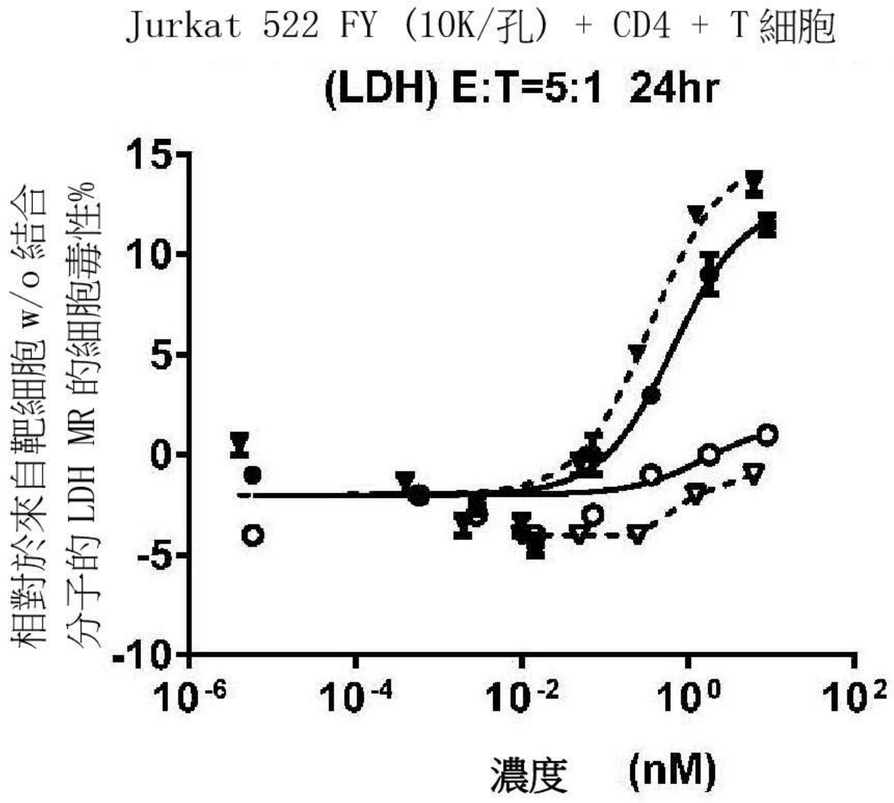


圖 23A

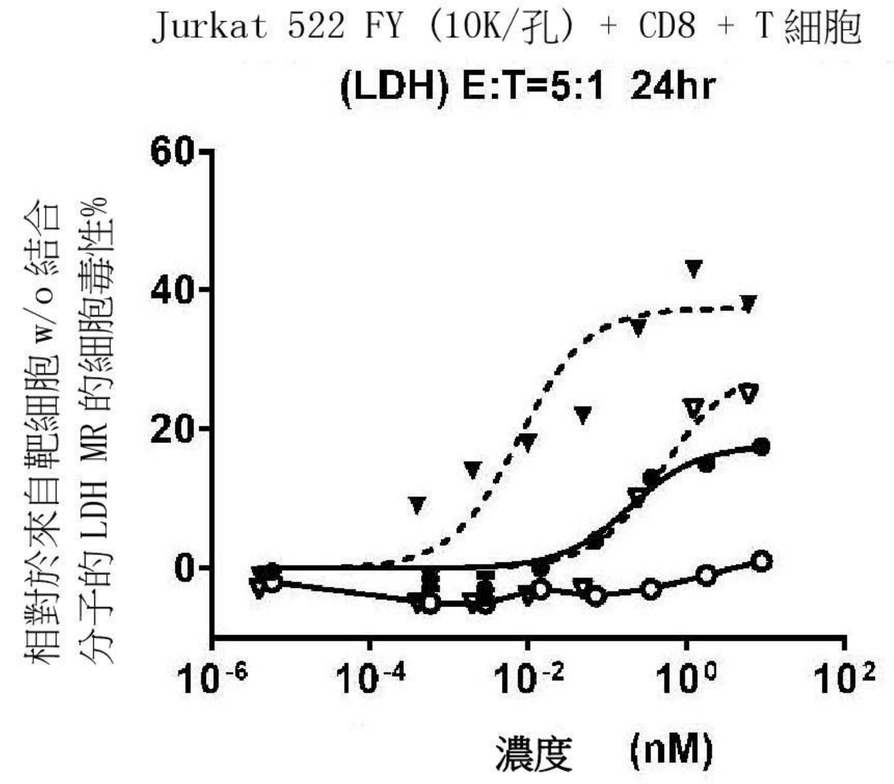


圖 23B

- HIV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域
- HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
- RSV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域
- RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

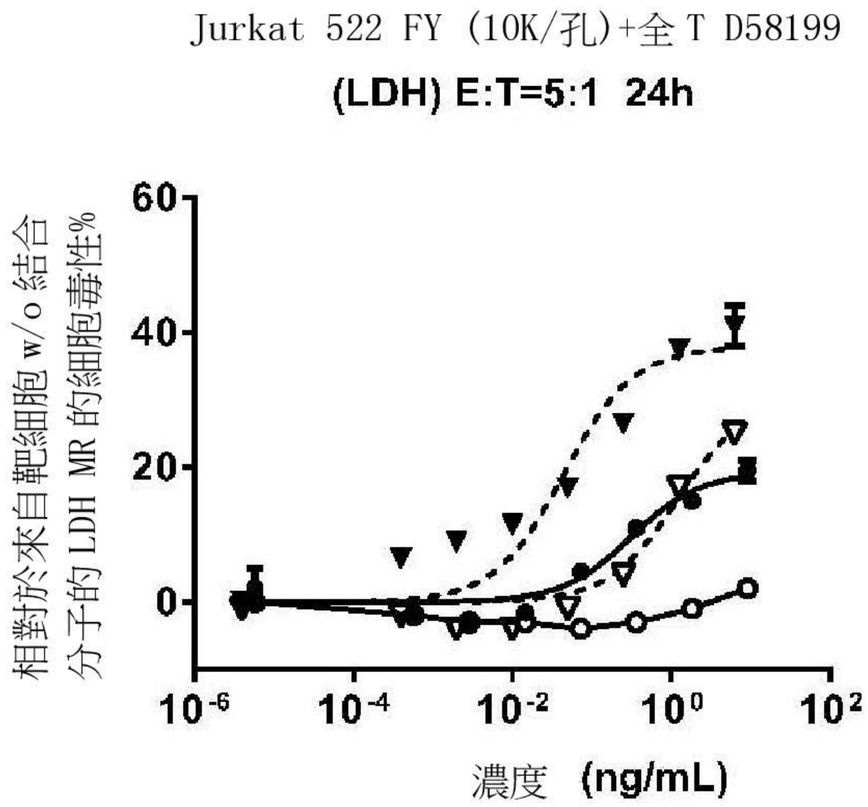


圖 23C

- HIV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™，其具有 Fc 結構域
- HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
- RSV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™，其具有 Fc 結構域
- RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

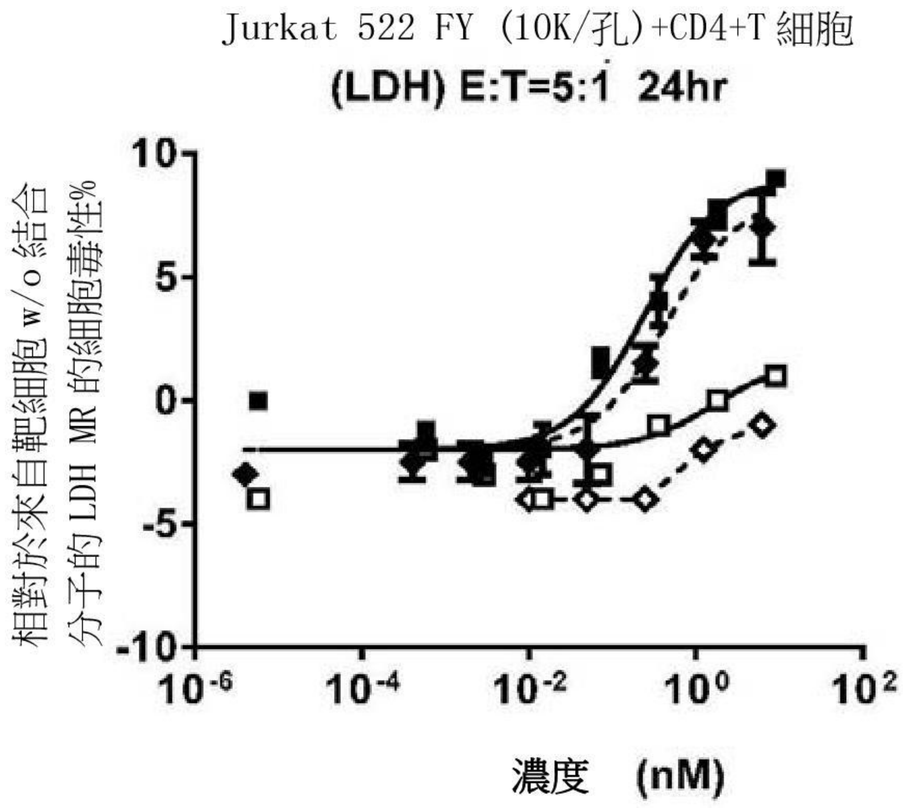


圖 24A

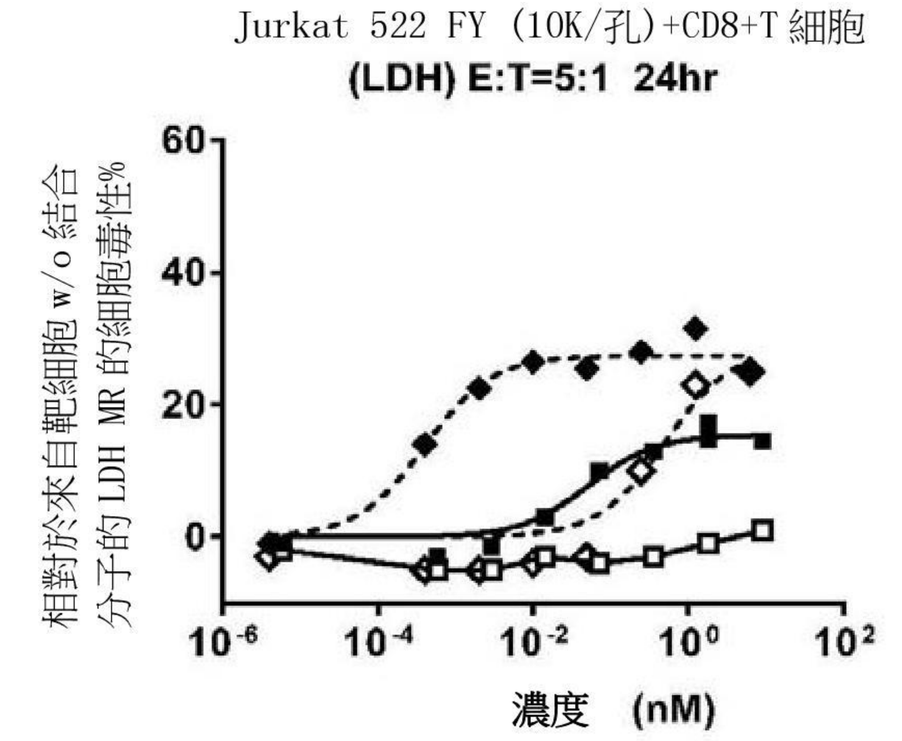


圖 24B

HIV mAb 2 X CD3 mAb 2 DART™，其具有 Fc 結構域

HIV- mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

RSV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™，其具有 Fc 結構域

RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

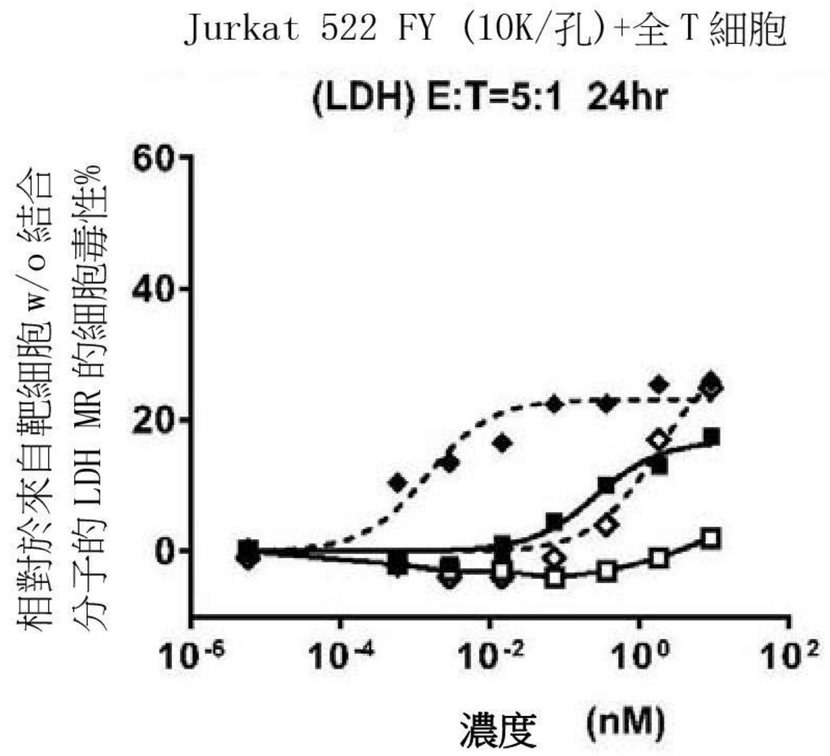


圖 24C

- HIV mAb 2 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域
- HIV- mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
- RSV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域
- RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

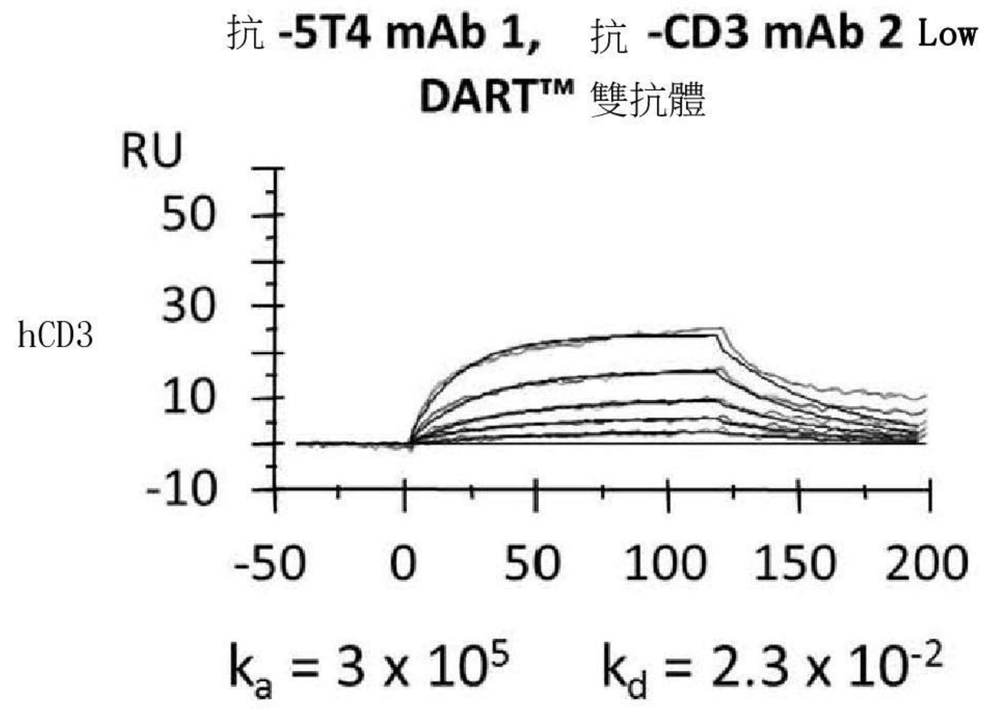

抗 -5T4 mAb 1, 抗 -CD3 mAb 2 Low
DART™ 雙抗體
hCD3
RU
50
30
10
-10
-50
0
50
100
150
200
$k_a = 3 \times 10^5$
$k_d = 2.3 \times 10^{-2}$

圖 25A

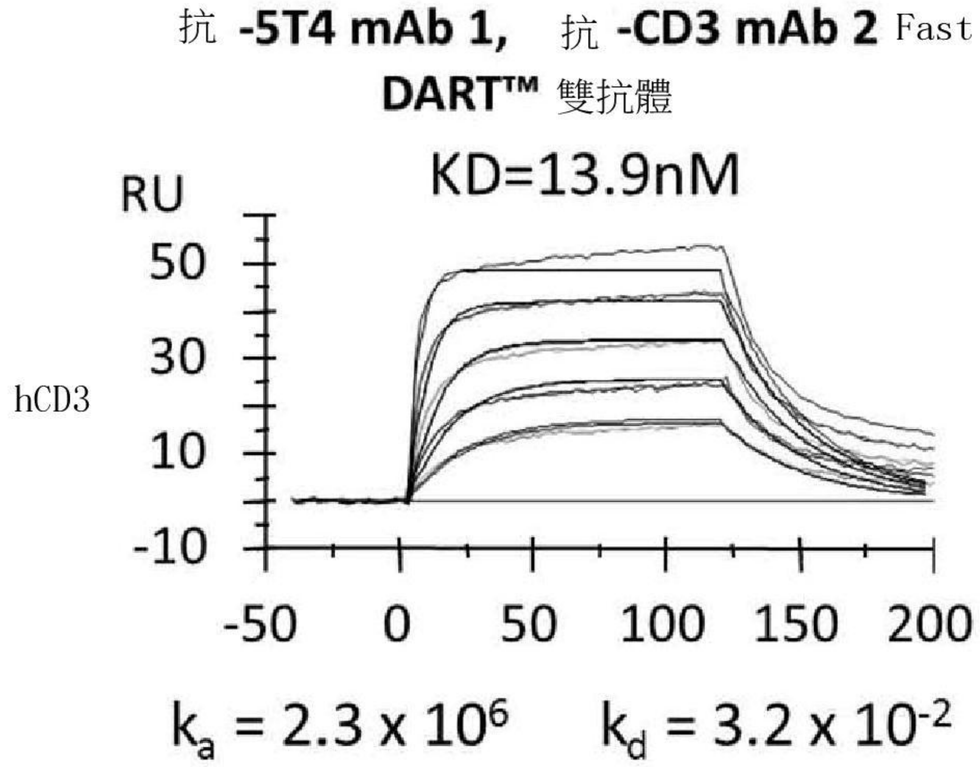

抗 -5T4 mAb 1, 抗 -CD3 mAb 2 Fast
DART™ 雙抗體
KD=13.9nM
hCD3
RU
50
30
10
-10
-50
0
50
100
150
200
$k_a = 2.3 \times 10^6$
$k_d = 3.2 \times 10^{-2}$

圖 25B

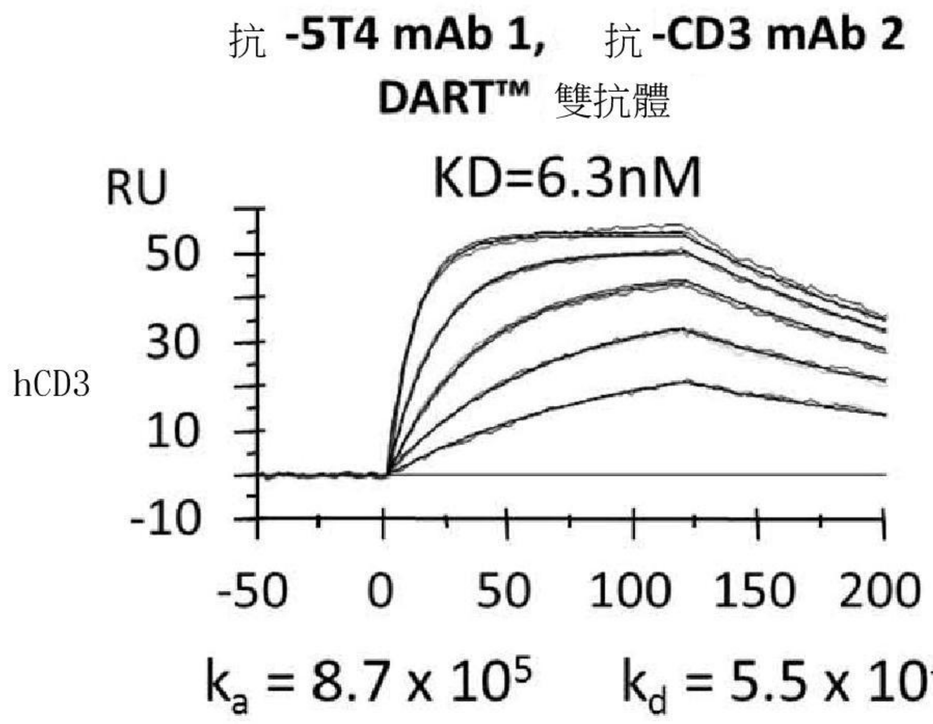

抗 -5T4 mAb 1, 抗 -CD3 mAb 2
DART™ 雙抗體
KD=6.3nM
RU
50
30
10
-10
hCD3
-50
0
50
100
150
200
$k_a = 8.7 \times 10^5$
$k_d = 5.5 \times 10^{-3}$

圖 25C

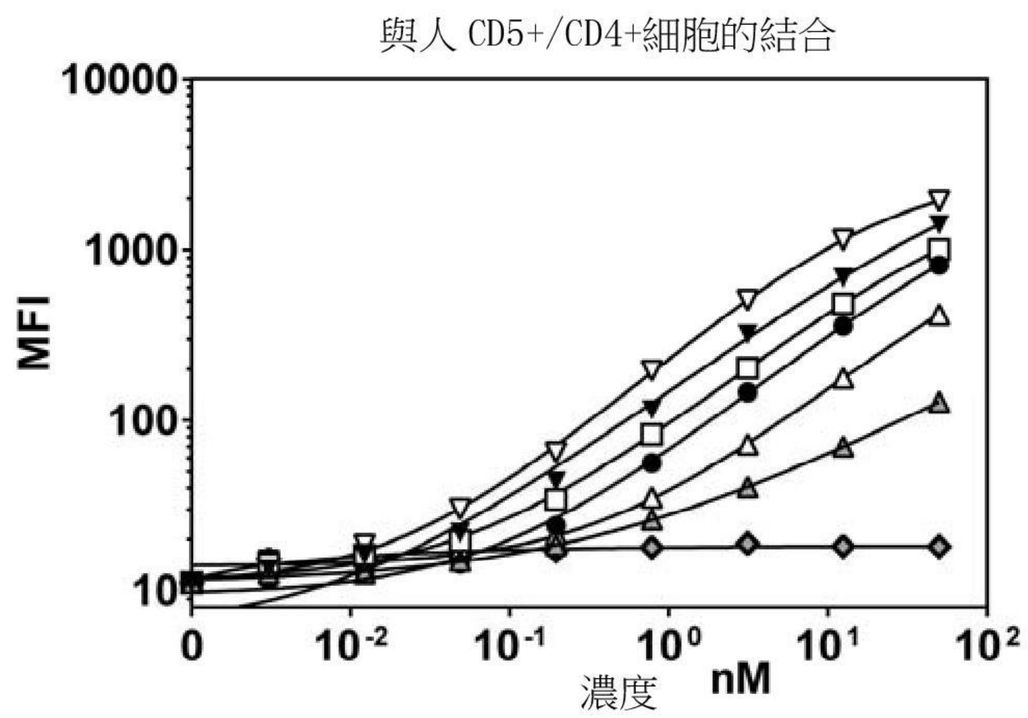


圖 26A

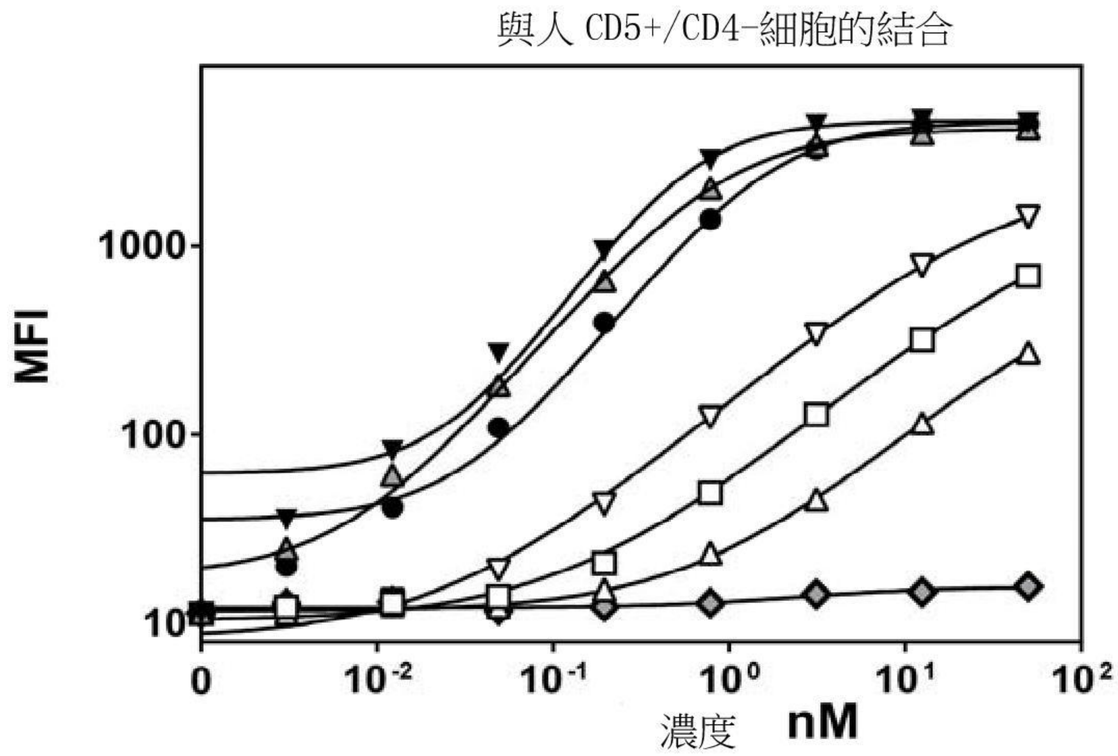


圖 26B

- 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
- 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Low / CD8 mAb 1 結合分子
- 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Fast / CD8 mAb 1 結合分子
- 5T4 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域
- 5T4 mAb 1 X CD3 mAb 2 Low DART™ ，其具有 Fc 結構域
- 5T4 mAb 1 X CD3 mAb 2 Fast DART™ ，其具有 Fc 結構域
- 5T4 mAb 1 X 5T4 mAb 1 Fc DART™

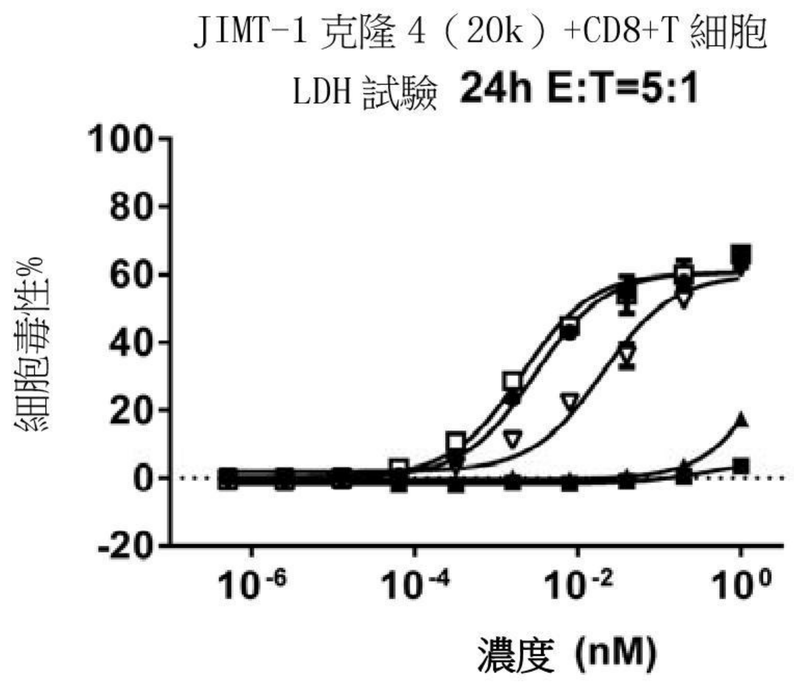


圖 27A

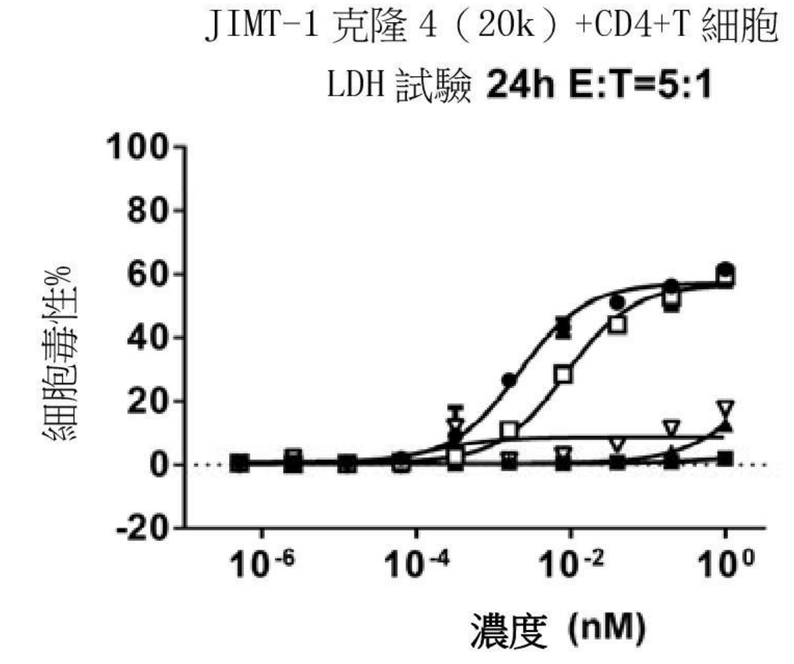


圖 27B

- 5T4 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域
- 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
- 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Low / CD8 mAb 1 結合分子
- 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Fast / CD8 mAb 1 結合分子
- RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

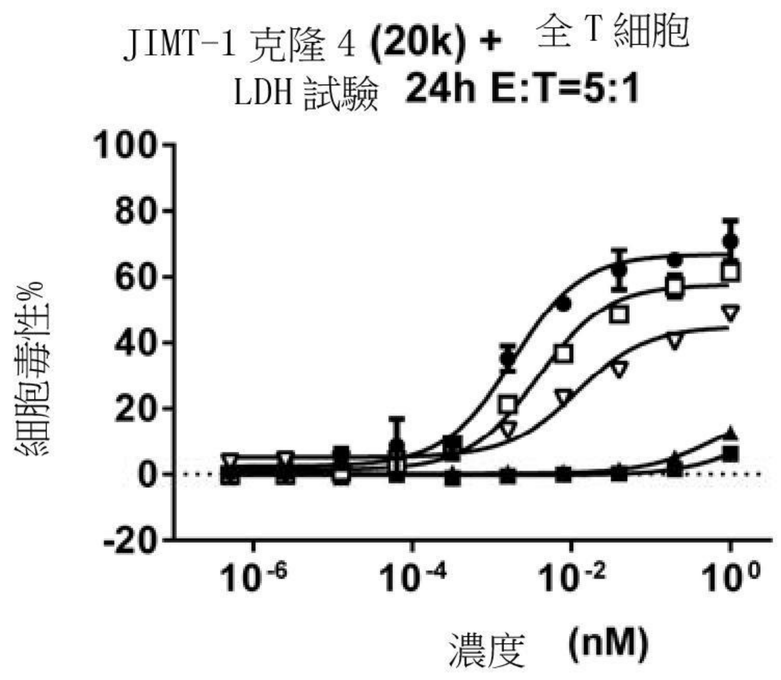


圖 27C

- 5T4 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ ，其具有 Fc 結構域
- 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子
- 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Low / CD8 mAb 1 結合分子
- 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Fast / CD8 mAb 1 結合分子
- RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 結合分子

供體 1

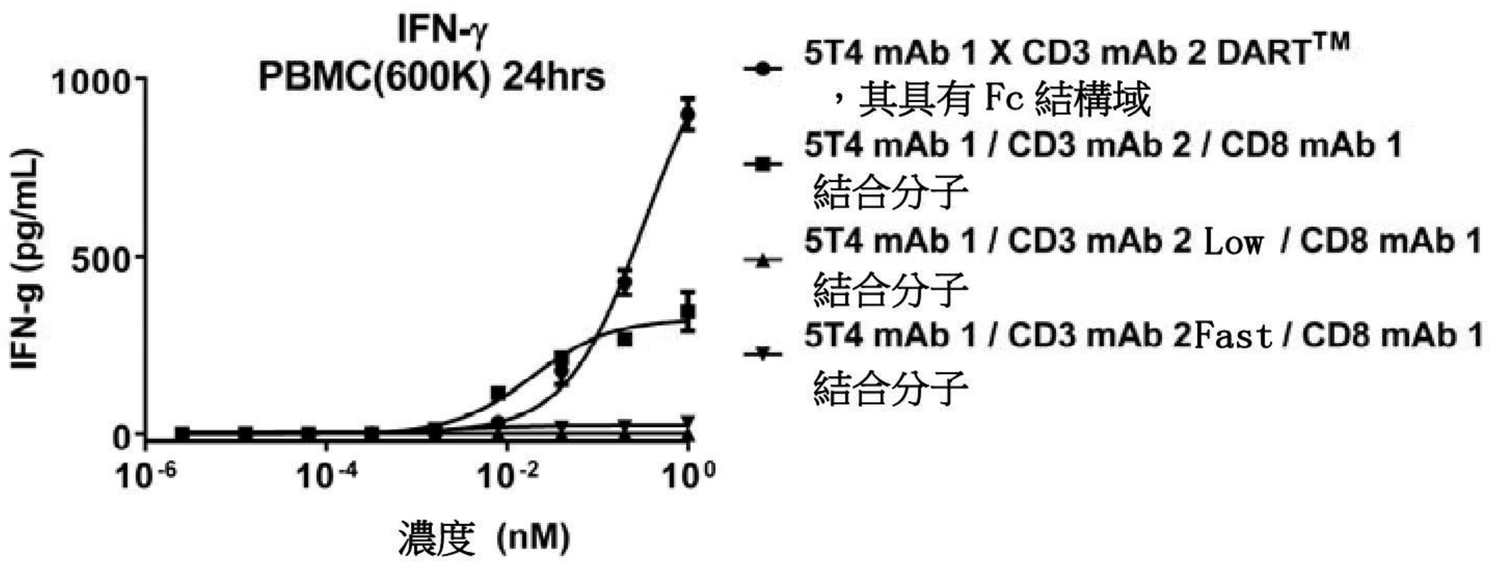


圖 28A

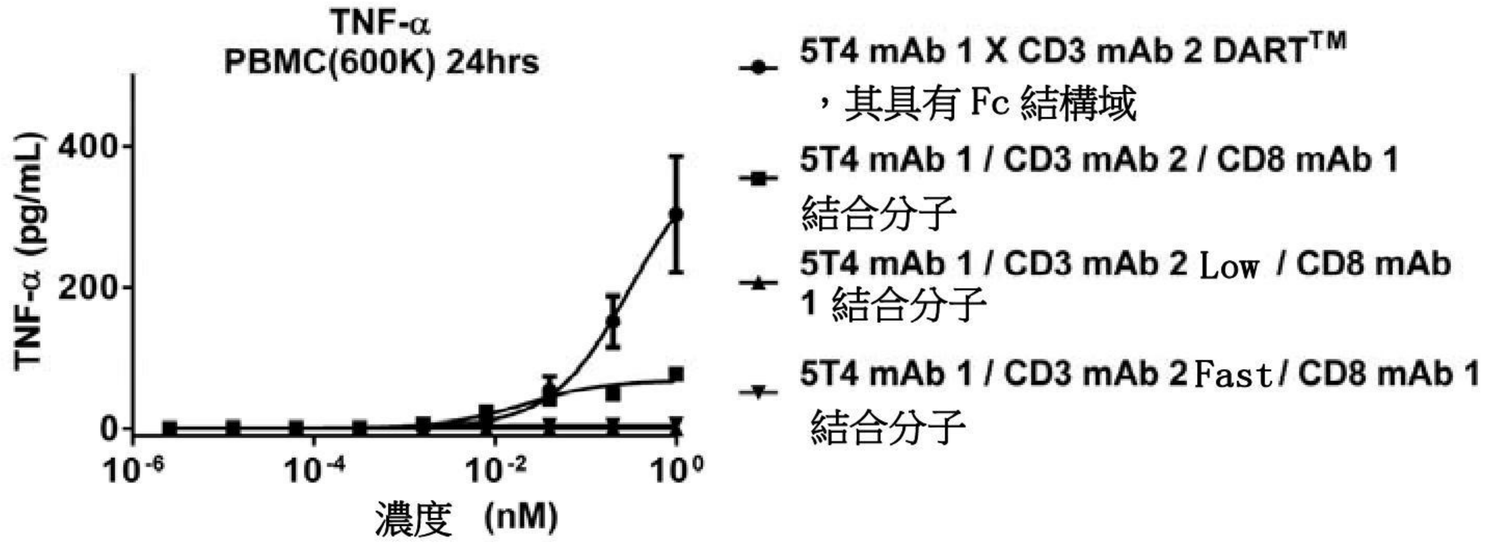


圖 28B

供體 1

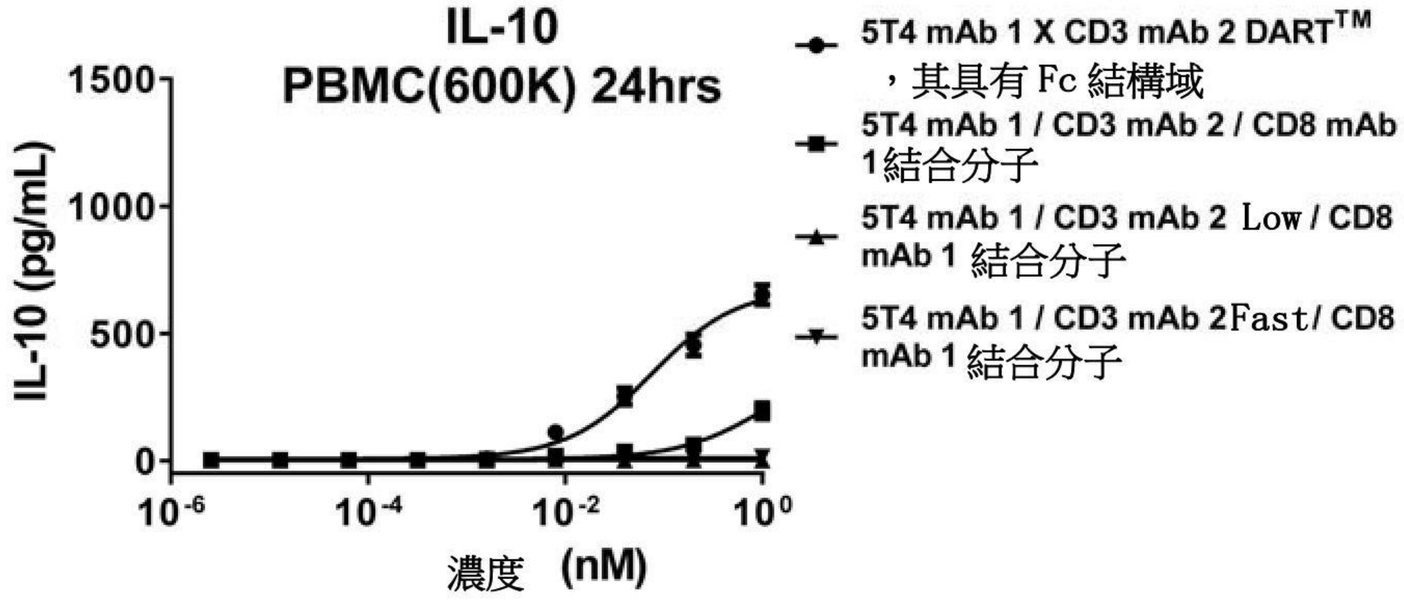


圖 28C

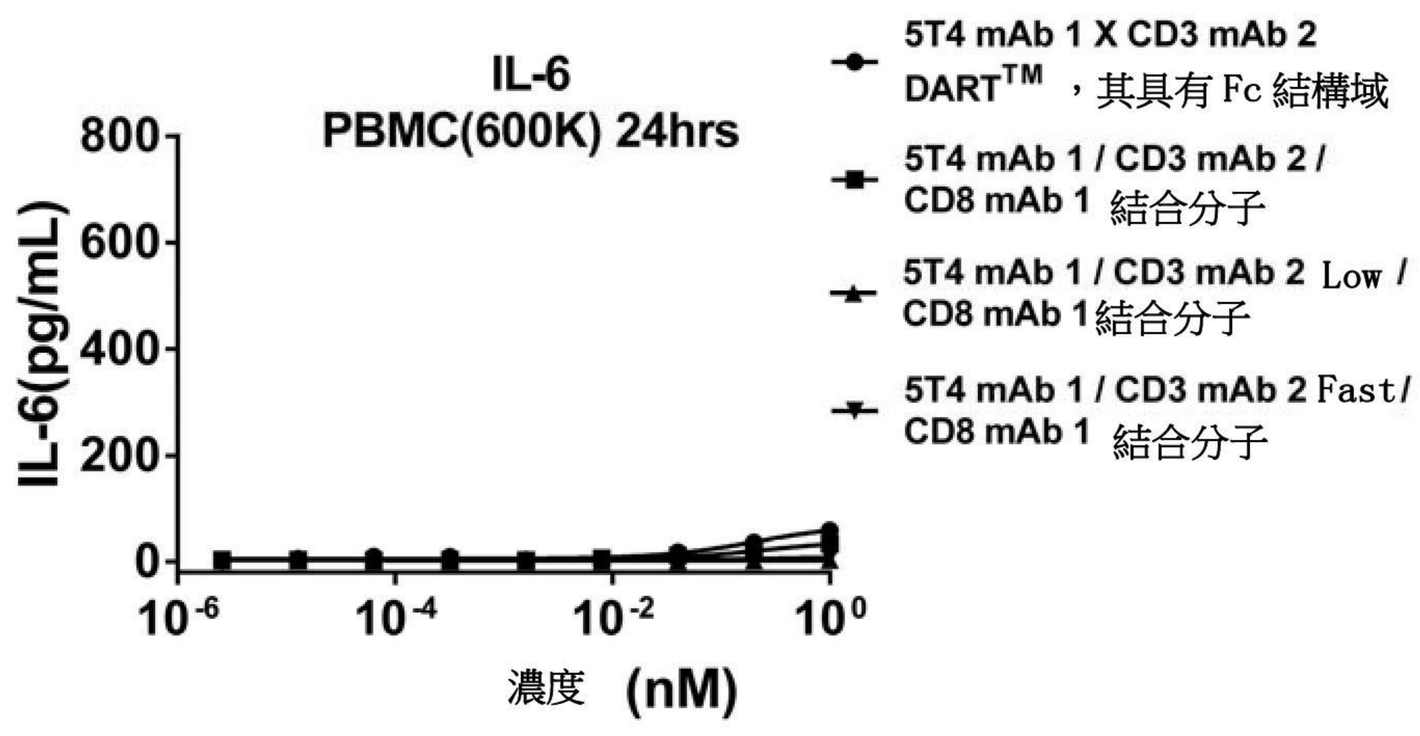


圖 28D

供體 1

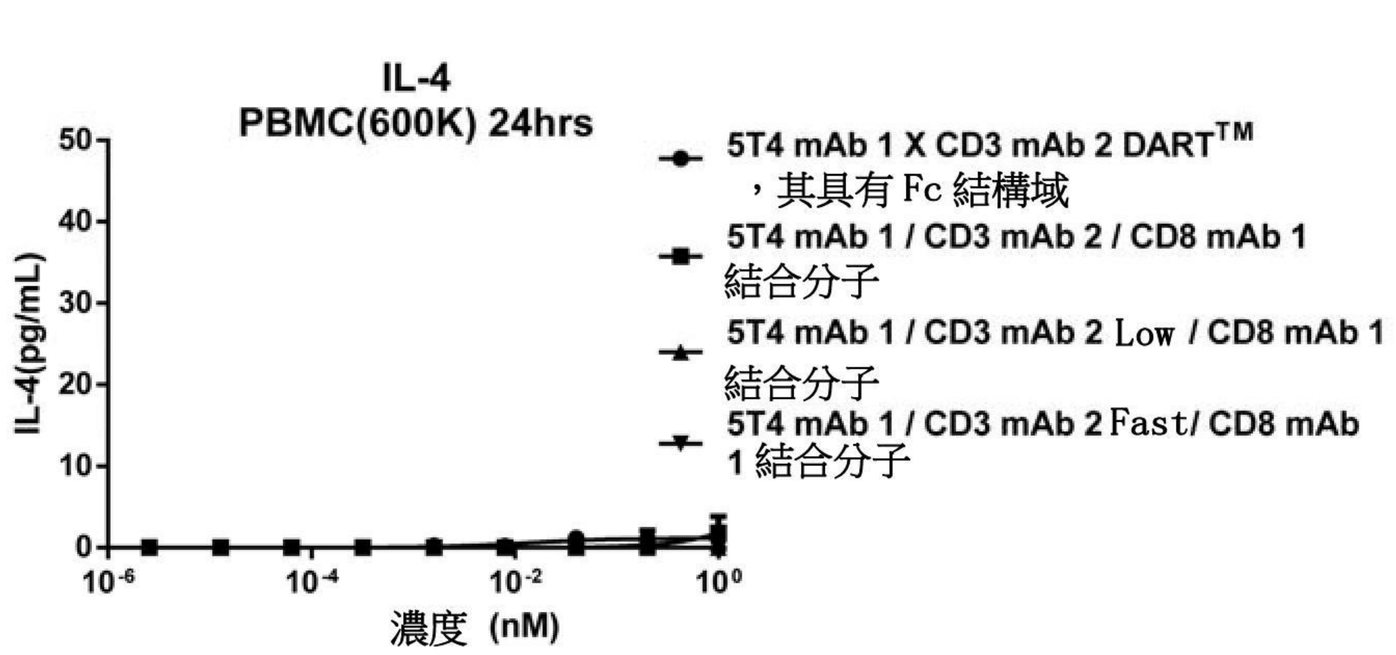


圖 28E

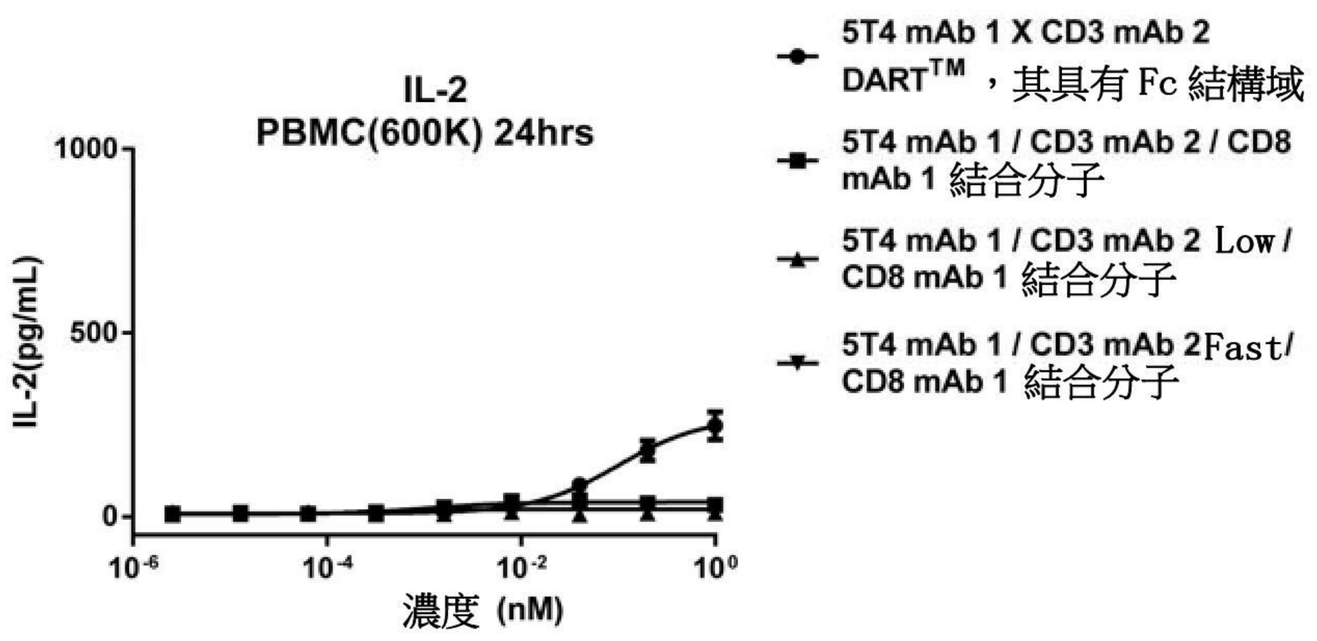


圖 28F

供體 2

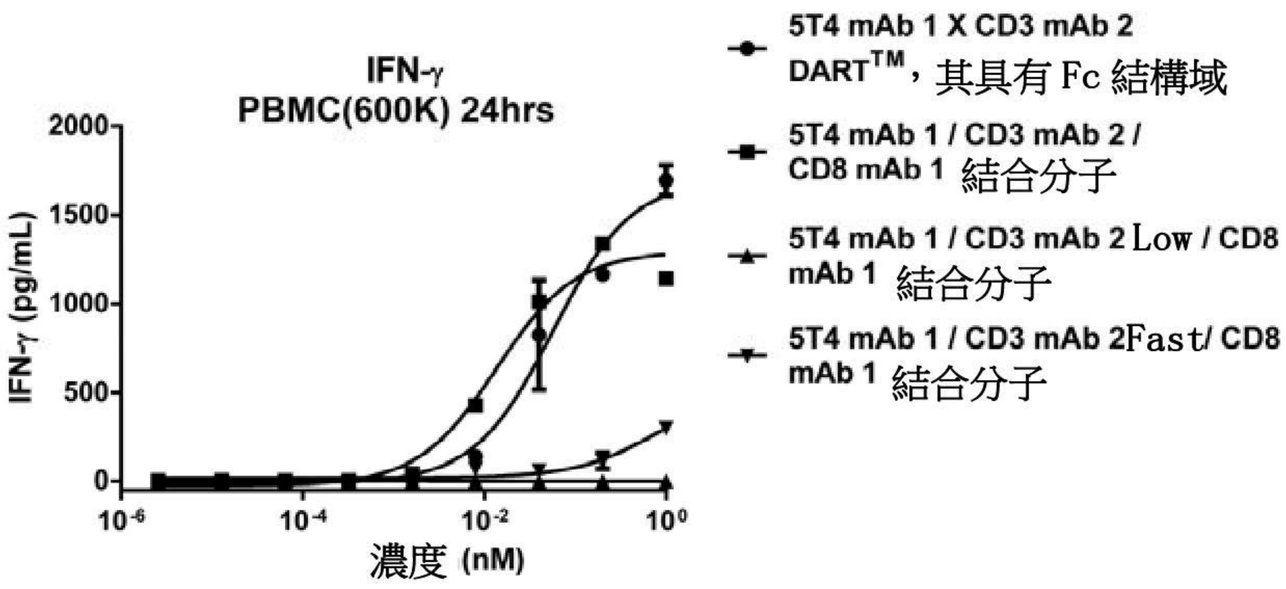


圖 29A

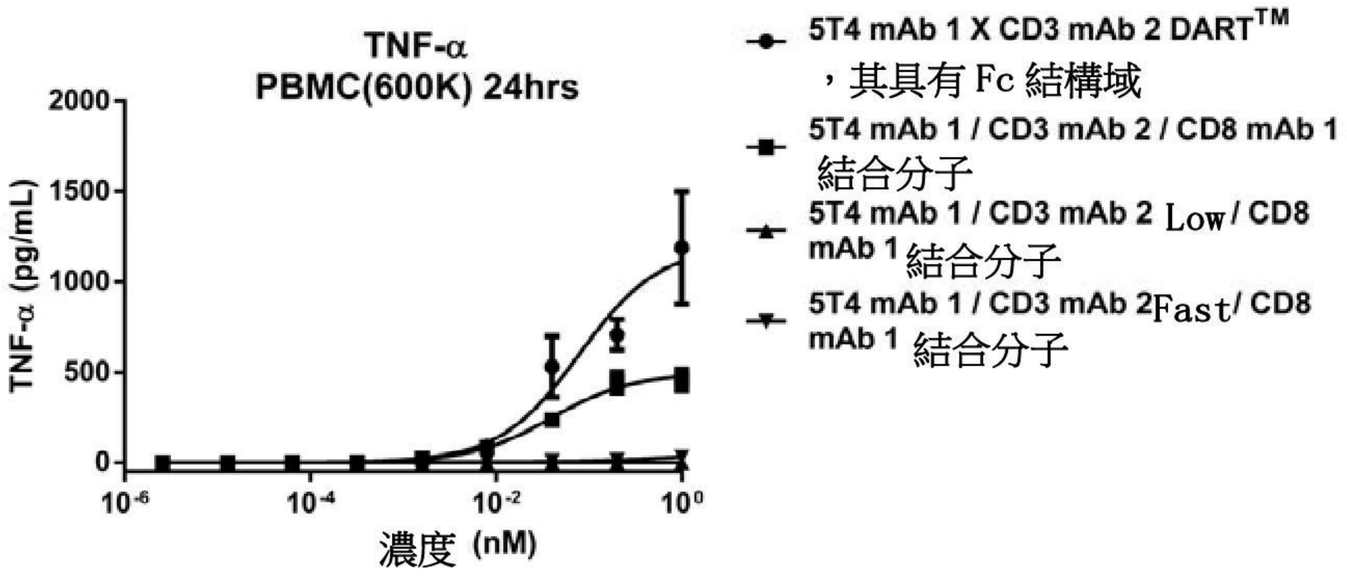


圖 29B

供體 2

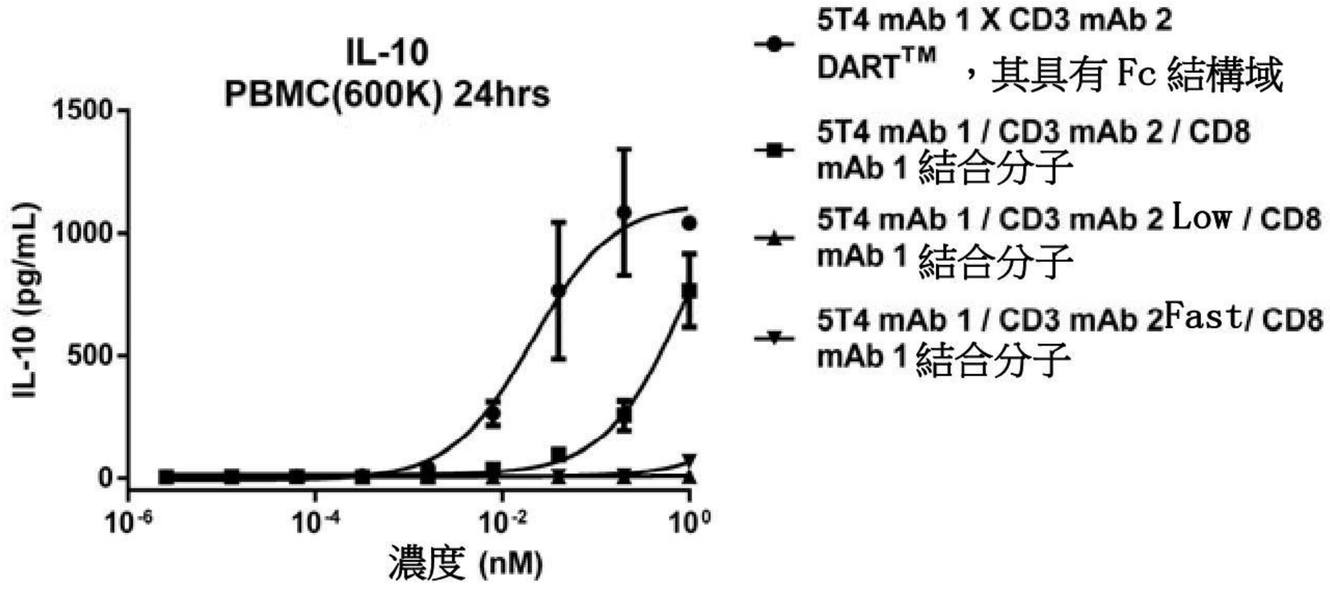


圖 29C

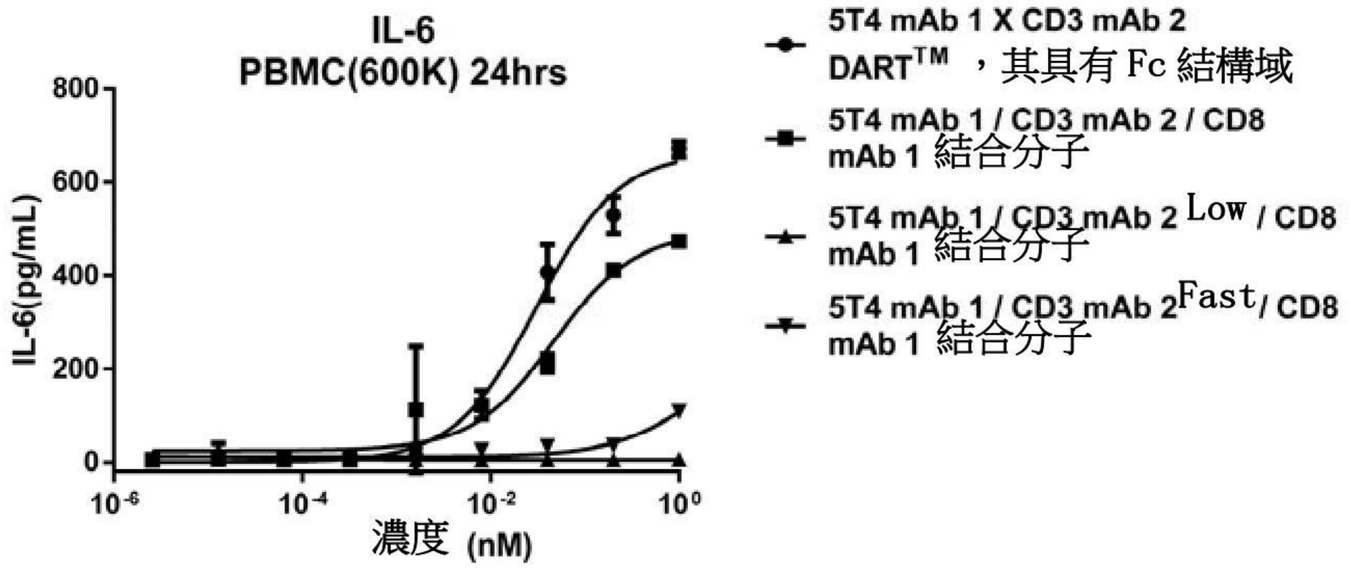


圖 29D

供體 2

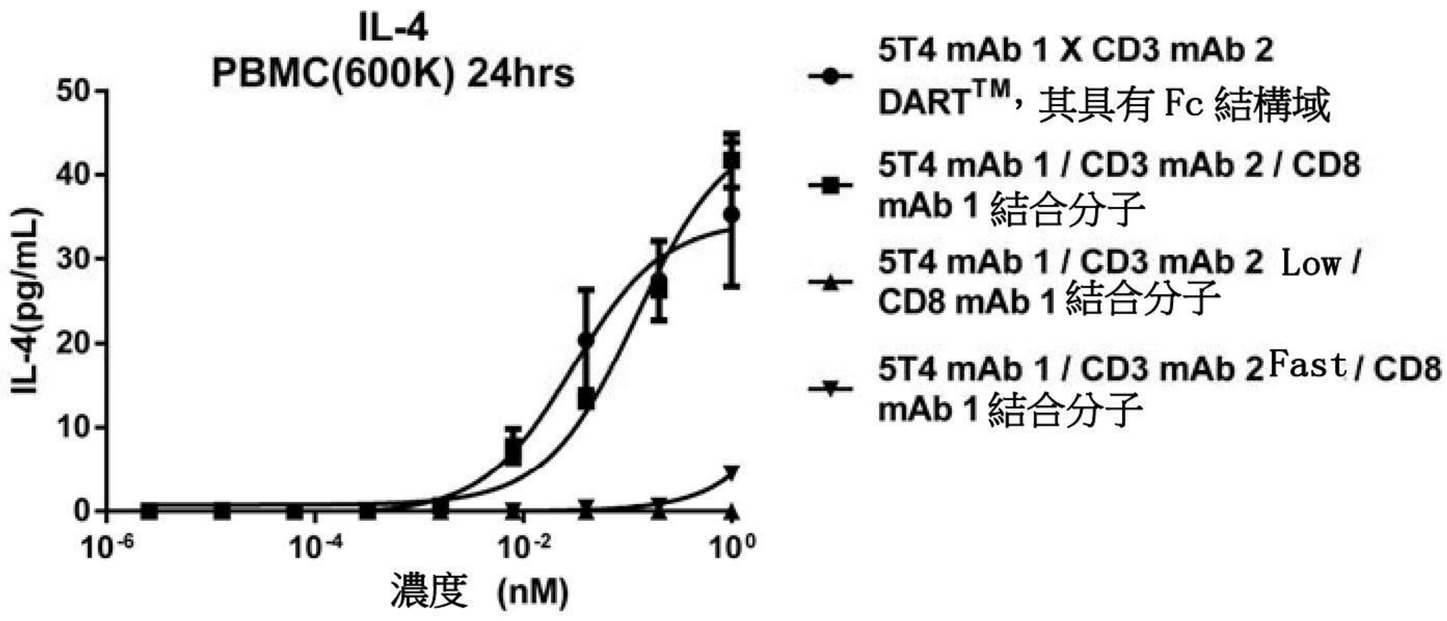


圖 29E

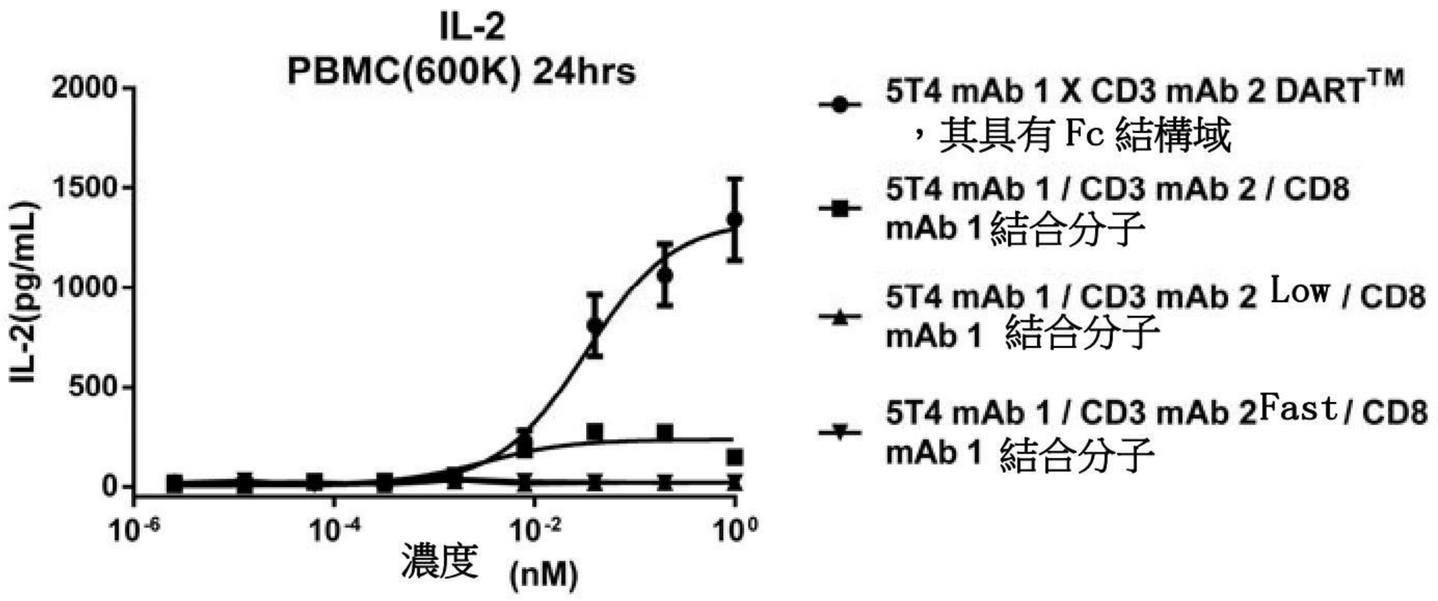


圖 29F