(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116987189 A
(43)申请公布日 2023.11.03

(21)申请号 202310867140.8
(22)申请日 2017.05.19
(30)优先权数据
62/339,685 2016.05.20 US
(62)分案原申请数据
201780045195.3 2017.05.19
(71)申请人 哈普恩治疗公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 罗伯特·B·杜布里奇 濑户培
理查德·J·奥斯汀
卢克·伊弗宁 吉恩玛丽·盖诺
布莱恩·D·莱蒙
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 刘晓杰 武晶晶
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)

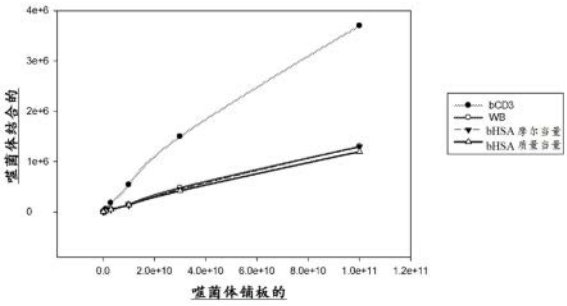
权利要求书3页 说明书54页
序列表（电子公布） 附图2页

(54)发明名称

单链可变片段CD3结合蛋白质

(57)摘要

本文公开了具有改善的结合亲和力和稳健的聚集特性的单链可变片段CD3结合蛋白质。本文还描述了包含根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质的多特异性结合蛋白质。提供了包含本文公开的结合蛋白质的药物组合物和使用这样的制剂的方法。



CN 116987189 A

1.一种单链可变片段CD3结合蛋白质,其包含可变重链区(VH)、可变轻链区(VL)和接头,其中VH包含互补决定区HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3,其中VL包含互补决定区LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3,其中

(a)HC CDR1的氨基酸序列如$GX_1X_2X_3NX_4YX_5X_6N$(SEQ ID NO.2)所示,X_1是苯丙氨酸或天冬酰胺,X_2是苏氨酸、谷氨酸或甲硫氨酸,X_3是苯丙氨酸或酪氨酸,X_4是赖氨酸、苏氨酸、甘氨酸、天冬酰胺或谷氨酸,X_5是丙氨酸或脯氨酸,X_6是甲硫氨酸、亮氨酸、缬氨酸或异亮氨酸;

(b)HC CDR2的氨基酸序列如

$RIRSX_7X_8NX_9YX_{10}TX_{11}YX_{12}DX_{13}VK$(SEQ ID NO.3)所示,$X_7$是赖氨酸或甘氨酸,$X_8$是酪氨酸或丝氨酸,$X_9$是天冬酰胺或赖氨酸,$X_{10}$是丙氨酸或谷氨酸,$X_{11}$是酪氨酸或谷氨酸,$X_{12}$是丙氨酸或赖氨酸,$X_{13}$是丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、丙氨酸或谷氨酰胺;

(c)HC CDR3的氨基酸序列如$HX_{14}NFX_{15}$ $X_{16}SX_{17}ISYWAX_{18}$(SEQ ID NO.4)所示,X_{14}是甘氨酸、丙氨酸或苏氨酸,X_{15}是甘氨酸或天冬酰胺,X_{16}是天冬酰胺或天冬氨酸,X_{17}是酪氨酸、组氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺、亮氨酸或甘氨酸,X_{18}是酪氨酸或苏氨酸;

(d)LC CDR1的氨基酸序列如$X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}GX_{23}VX_{24}X_{25}GX_{26}YPN$(SEQ ID NO.5)所示,$X_{19}$是甘氨酸或丙氨酸,$X_{20}$是丝氨酸或谷氨酸,$X_{21}$是丝氨酸或酪氨酸,$X_{22}$是苏氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸或丝氨酸,$X_{23}$是丙氨酸或酪氨酸,$X_{24}$是苏氨酸或缬氨酸,$X_{25}$是丝氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、组氨酸或缬氨酸,$X_{26}$是天冬酰胺或酪氨酸;

(e)LC CDR2的氨基酸序列如$GX_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}P$(SEQ ID NO.6)所示,$X_{27}$是苏氨酸或异亮氨酸,$X_{28}$是赖氨酸、谷氨酸、酪氨酸、天冬酰胺或丝氨酸,$X_{29}$是苯丙氨酸、亮氨酸、谷氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸或缬氨酸,X_{30}是亮氨酸、天冬酰胺或甘氨酸,X_{31}是丙氨酸或缬氨酸;并且

(f)LC CDR3的氨基酸序列如$X_{32}LWYX_{33}NX_{34}WX_{35}$(SEQ ID NO.7)所示,$X_{32}$是缬氨酸、苏氨酸或丙氨酸,$X_{33}$是丝氨酸、天冬氨酸或丙氨酸,$X_{34}$是精氨酸或丝氨酸,$X_{35}$是缬氨酸、异亮氨酸或丙氨酸,

其中X_1、X_2、X_3、X_4、X_5、X_6、X_7、X_8、X_9、X_{10}、X_{11}、X_{12}、X_{13}、X_{14}、X_{15}、X_{16}、X_{17}、X_{18}、X_{19}、X_{20}、X_{21}、X_{22}、X_{23}、X_{24}、X_{25}、X_{26}、X_{27}、X_{28}、X_{29}、X_{30}、X_{31}、X_{32}、X_{33}、X_{34}和X_{35}不同时分别是苯丙氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、丙氨酸、酪氨酸、丙氨酸、丝氨酸、甘氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、酪氨酸、甘氨酸、丝氨酸、丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、苏氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸、丝氨酸、精氨酸和缬氨酸。

2.如权利要求1所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质包含下式:

f1-r1-f2-r2-f3-r3-f4-r4-f5-r5-f6-r6-f7

其中,r1是SEQ ID NO:2;r2是SEQ ID NO:3;r3是SEQ ID NO:4;r4是SEQ ID NO:5;r5是SEQ ID NO:6;并且r6是SEQ ID NO:7;并且其中f_1、f_2、f_3、f_4和f_5是选定的框架残基,使得所述蛋白质与SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列至少80%相同。

3.如权利要求2所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r1包含SEQ ID NO.29、SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.31、SEQ ID NO.32、SEQ ID NO.33、SEQ ID NO.34、SEQ ID NO.35、SEQ ID NO.36、SEQ ID NO.37、SEQ ID NO.38、SEQ ID NO.39或SEQ ID NO.40。

4.如权利要求2所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r2包含SEQ ID NO.41、SEQ ID NO.42、SEQ ID NO.43、SEQ ID NO.44、SEQ ID NO.45、SEQ ID NO.46、SEQ ID NO.47、SEQ

ID NO.48、SEQ ID NO.49或SEQ ID NO.50。

5.如权利要求2所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中r3包含SEQ ID NO.51、SEQ ID NO.52、SEQ ID NO.53、SEQ ID NO.54、SEQ ID NO.55、SEQ ID NO.56、SEQ ID NO.57、SEQ ID NO.58、SEQ ID NO.50或SEQ ID NO.60。

6.如权利要求2所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中r4包含SEQ ID NO.61、SEQ ID NO.62、SEQ ID NO.63、SEQ ID NO.64、SEQ ID NO.65、SEQ ID NO.66、SEQ ID NO.67、SEQ ID NO.68、SEQ ID NO.69、SEQ ID NO.70、SEQ ID NO.71、SEQ ID NO.72或SEQ ID NO.73。

7.如权利要求2所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中r5包含SEQ ID NO.74、SEQ ID NO.75、SEQ ID NO.76、SEQ ID NO.77、SEQ ID NO.78、SEQ ID NO.79、SEQ ID NO.80、SEQ ID NO.81、SEQ ID NO.82、SEQ ID NO.83、SEQ ID NO.84、SEQ ID NO.85或SEQ ID NO.86。

8.如权利要求2所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中r6包含SEQ ID NO.87、SEQ ID NO.88、SEQ ID NO.89、SEQ ID NO.90、SEQ ID NO.91、SEQ ID NO.92或SEQ ID NO.93。

9.一种单链可变片段CD3结合蛋白质，其包含SEQ ID NO.22(野生型抗CD3)所示的序列，其中选自氨基酸位置27、28、29、31、33、34、54、55、57、59、61、63、65、102、105、106、108、114、163、164、165、166、168、170、171、173、193、194、195、196、197、231、235、237和239的一个或多个氨基酸残基被置换，

其中

氨基酸位置27被天冬酰胺置换，

氨基酸位置28被谷氨酸或甲硫氨酸置换，

氨基酸位置29被酪氨酸置换，

氨基酸位置31被天冬酰胺、甘氨酸、谷氨酸或苏氨酸置换，

氨基酸位置33被脯氨酸置换，

氨基酸位置34被缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸置换，

氨基酸位置54被甘氨酸置换，

氨基酸位置55被丝氨酸置换，

氨基酸位置57被赖氨酸置换，

氨基酸位置59被谷氨酸置换，

氨基酸位置61被谷氨酸置换，

氨基酸位置63被赖氨酸置换，

氨基酸位置65被天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸或谷氨酰胺置换，

氨基酸位置102被丙氨酸或苏氨酸置换，

氨基酸位置105被天冬酰胺置换，

氨基酸位置106被天冬氨酸置换，

氨基酸位置108被组氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸或亮氨酸置换，

氨基酸位置114被苏氨酸置换，

氨基酸位置163被丙氨酸置换，

氨基酸位置164被谷氨酸置换，

氨基酸位置165被酪氨酸置换，

氨基酸位置166被苯丙氨酸、赖氨酸或丝氨酸置换，

氨基酸位置168被酪氨酸置换，

氨基酸位置170被缬氨酸置换，

氨基酸位置171被天冬氨酸、赖氨酸、缬氨酸或组氨酸置换，

氨基酸位置173被酪氨酸置换，

氨基酸位置193被异亮氨酸置换，

氨基酸位置194被谷氨酸、酪氨酸、天冬酰胺或丝氨酸置换，

氨基酸位置195被亮氨酸、谷氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸或缬氨酸置换，

氨基酸位置196被天冬酰胺或甘氨酸置换，

氨基酸位置197被缬氨酸置换，

氨基酸位置231被苏氨酸或丙氨酸置换，

氨基酸位置235被天冬氨酸或丙氨酸置换，

氨基酸位置237被丝氨酸置换，并且

氨基酸位置239被丙氨酸或异亮氨酸置换。

10.一种单链可变片段CD3结合蛋白质，其包含如野生型抗CD3(SEQ ID NO:22)所示的氨基酸序列，其包含可变重链区(VH)、可变轻链区(VL)、包含如GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:1)所示的氨基酸序列的接头，其中VH包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3，其中VL包含互补决定区LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3，其在VH的CDR1、CDR2或CDR3以及VL的LC CDR1、LC CDR2或LC CDR3中包含至少一个突变，其中所述至少一个突变不在氨基酸位置26、30、32、35、50、51、52、53、56、58、60、62、64、66、67、101、103、104、107、109、110、111、112、113、167、169、172、174、175、176、192、198、232、233、234、236或238处。

单链可变片段CD3结合蛋白质

[0001] 本申请是申请日为2017年05月19日、申请号为201780045195.3、发明名称为“单链可变片段CD3结合蛋白质”的中国专利申请(其对应PCT申请的申请日为2017年05月19日、申请号为PCT/US2017/033673)的分案申请。

[0002] 交叉引用

[0003] 本申请要求2016年5月20日提交的美国临时申请号62/339,685的权益,该临时申请通过引用以其全文并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包含序列表,该序列表已经以ASCII格式以电子方式提交,并且通过引用以其全文并入本文。所述ASCII副本于2017年5月19日创建,命名为47517-704_601_SEQ.TXT,并且大小为66,042字节。

[0006] 援引并入

[0007] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,其程度如同特别地且单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请通过引用而并入,并且如同以其全文进行说明。

[0008] 发明背景

[0009] CD3是与T细胞受体复合物(TCR)缔合的在T细胞上表达的同型二聚体或异二聚体抗原,并且是T细胞活化所必需的。抗CD3抗体具有涉及T细胞活化的治疗目的。本公开内容提供了单链可变片段CD3结合蛋白质,包括含有该单链可变片段CD3结合蛋白质的多特异性抗体。

发明内容

[0010] 在一个实施方案中,本文公开了一种单链可变片段CD3结合蛋白质,其包含可变重链区(VH)、可变轻链区(VL)和接头,其中VH包含互补决定区HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3,其中VL包含互补决定区LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3,其中(a)HC CDR1的氨基酸序列如$GX_1X_2X_3NX_4YX_5X_6N$(SEQ ID NO.2)所示,X_1是苯丙氨酸或天冬酰胺,X_2是苏氨酸、谷氨酸或甲硫氨酸,X_3是苯丙氨酸或酪氨酸,X_4是赖氨酸、苏氨酸、甘氨酸、天冬酰胺或谷氨酸,X_5是丙氨酸或脯氨酸,X_6是甲硫氨酸、亮氨酸、缬氨酸或异亮氨酸;(b)HC CDR2的氨基酸序列如$RIRSX_7X_8NX_9YX_{10}TX_{11}YX_{12}DX_{13}VK$(SEQ ID NO.3)所示,$X_7$是赖氨酸或甘氨酸,$X_8$是酪氨酸或丝氨酸,$X_9$是天冬酰胺或赖氨酸,$X_{10}$是丙氨酸或谷氨酸,$X_{11}$是酪氨酸或谷氨酸,$X_{12}$是丙氨酸或赖氨酸,$X_{13}$是丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、丙氨酸或谷氨酰胺;(c)HC CDR3的氨基酸序列如$HX_{14}NFX_{15}$ $X_{16}SX_{17}ISYWAX_{18}$(SEQ ID NO.4)所示,X_{14}是甘氨酸、丙氨酸或苏氨酸,X_{15}是甘氨酸或天冬酰胺,X_{16}是天冬酰胺或天冬氨酸,X_{17}是酪氨酸、组氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺、亮氨酸或甘氨酸,X_{18}是酪氨酸或苏氨酸;(d)LC CDR1的氨基酸序列如$X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}GX_{23}VX_{24}X_{25}GX_{26}YPN$(SEQ ID NO.5)所示,$X_{19}$是甘氨酸或丙氨酸,$X_{20}$是丝氨酸或谷氨酸,$X_{21}$是丝氨酸或酪氨酸,$X_{22}$是苏氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸或丝氨酸,$X_{23}$是丙氨酸或酪氨酸,$X_{24}$是苏氨酸或缬氨酸,$X_{25}$是丝氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、组氨酸或缬氨酸,$X_{26}$是天冬酰胺或酪氨酸;(e)LC CDR2的氨基

酸序列如$GX_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}P$(SEQ ID NO.6)所示，$X_{27}$是苏氨酸或异亮氨酸，$X_{28}$是赖氨酸、谷氨酸、酪氨酸、天冬酰胺或丝氨酸，$X_{29}$是苯丙氨酸、亮氨酸、谷氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸或缬氨酸，X_{30}是亮氨酸、天冬酰胺或甘氨酸，X_{31}是丙氨酸或缬氨酸；并且(f)LC CDR3的氨基酸序列如$X_{32}LWYX_{33}NX_{34}WX_{35}$(SEQ ID NO.7)所示，$X_{32}$是缬氨酸、苏氨酸或丙氨酸，$X_{33}$是丝氨酸、天冬氨酸或丙氨酸，$X_{34}$是精氨酸或丝氨酸，$X_{35}$是缬氨酸、异亮氨酸或丙氨酸，其中$X_1$、$X_2$、$X_3$、$X_4$、$X_5$、$X_6$、$X_7$、$X_8$、$X_9$、$X_{10}$、$X_{11}$、$X_{12}$、$X_{13}$、$X_{14}$、$X_{15}$、$X_{16}$、$X_{17}$、$X_{18}$、$X_{19}$、$X_{20}$、$X_{21}$、$X_{22}$、$X_{23}$、$X_{24}$、$X_{25}$、$X_{26}$、$X_{27}$、$X_{28}$、$X_{29}$、$X_{30}$、$X_{31}$、$X_{32}$、$X_{33}$、$X_{34}$和$X_{35}$不同时分别是苯丙氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、丙氨酸、酪氨酸、丙氨酸、丝氨酸、甘氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、酪氨酸、甘氨酸、丝氨酸、丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、苏氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸、丝氨酸、精氨酸和缬氨酸。

[0011] 在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含下式：f1-r1-f2-r2-f3-r3-f4-r4-f5-r5-f6-r6-f7，其中，r1是SEQ ID NO:2；r2是SEQ ID NO:3；r3是SEQ ID NO:4；r4是SEQ ID NO:5；r5是SEQ ID NO:6；并且r6是SEQ ID NO:7；并且其中f_1、f_2、f_3、f_4和f_5是选定的框架残基，使得所述蛋白质与SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列至少80％相同。

[0012] 在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中r1包含SEQ ID NO.29、SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.31、SEQ ID NO.32、SEQ ID NO.33、SEQ ID NO.34、SEQ ID NO.35、SEQ ID NO.36、SEQ ID NO.37、SEQ ID NO.38、SEQ ID NO.39或SEQ ID NO.40。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中r2包含SEQ ID NO.41、SEQ ID NO.42、SEQ ID NO.43、SEQ ID NO.44、SEQ ID NO.45、SEQ ID NO.46、SEQ ID NO.47、SEQ ID NO.48、SEQ ID NO.49或SEQ ID NO.50。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中r3包含SEQ ID NO.51、SEQ ID NO.52、SEQ ID NO.53、SEQ ID NO.54、SEQ ID NO.55、SEQ ID NO.56、SEQ ID NO.57、SEQ ID NO.58、SEQ ID NO.50或SEQ ID NO.60。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中r4包含SEQ ID NO.61、SEQ ID NO.62、SEQ ID NO.63、SEQ ID NO.64、SEQ ID NO.65、SEQ ID NO.66、SEQ ID NO.67、SEQ ID NO.68、SEQ ID NO.69、SEQ ID NO.70、SEQ ID NO.71、SEQ ID NO.72或SEQ ID NO.73。在一些实施方案中，所述的单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中r5包含SEQ ID NO.74、SEQ ID NO.75、SEQ ID NO.76、SEQ ID NO.77、SEQ ID NO.78、SEQ ID NO.79、SEQ ID NO.80、SEQ ID NO.81、SEQ ID NO.82、SEQ ID NO.83、SEQ ID NO.84、SEQ ID NO.85或SEQ ID NO.86。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中r6包含SEQ ID NO.87、SEQ ID NO.88、SEQ ID NO.89、SEQ ID NO.90、SEQ ID NO.91、SEQ ID NO.92或SEQ ID NO.93。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中r1是SEQ ID NO.39，r2是SEQ ID NO.49，r3是SEQ ID NO.51，r4是SEQ ID NO.61，r5是SEQ ID NO.86，并且r6是SEQ ID NO.87。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中r1是SEQ ID NO.30，r2是SEQ ID NO.43，r4是SEQ ID NO.64，并且r6是SEQ ID NO.89。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中r3是SEQ ID NO.55，r4是SEQ ID NO.67，r5是SEQ ID NO.77，并且r6是SEQ ID NO.92。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中r1是SEQ ID NO.31，r2是SEQ ID NO.42，r3是

SEQ ID NO.60,r4是SEQ ID NO.64,r5是SEQ ID NO.79,并且r6是SEQ ID NO.91。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1是SEQ ID NO.35,r2是SEQ ID NO.46,r3是SEQ ID NO.56,r4是SEQ ID NO.68,并且r5是SEQ ID NO.75。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1是SEQ ID NO.32,r2是SEQ ID NO.47,r3是SEQ ID NO.56,r4是SEQ ID NO.65,r5是SEQ ID NO.80,并且r6是SEQ ID NO.87。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1是SEQ ID NO.29,r2是SEQ ID NO.44,r3是SEQ ID NO.52,r4是SEQ ID NO.73,并且r5是SEQ ID NO.76。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1是SEQ ID NO.33,r2是SEQ ID NO.48,r3是SEQ ID NO.57,r4是SEQ ID NO.69,并且r5是SEQ ID NO.74。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1是SEQ ID NO.38,r4是SEQ ID NO.62,并且r5是SEQ ID NO.81。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1是SEQ ID NO.37,r3是SEQ ID NO.53,r4是SEQ ID NO.70,r5是SEQ ID NO.82,并且r6是SEQ ID NO.88。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1是SEQ ID NO.34,r2是SEQ ID NO.47,r3是SEQ ID NO.56,r4是SEQ ID NO.68,并且r5是SEQ ID NO.75。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1是SEQ ID NO.29,r3是SEQ ID NO.54,r4是SEQ ID NO.71,并且r5是SEQ ID NO.83。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1是SEQ ID NO.33,r2是SEQ ID NO.41,r4是SEQ ID NO.63,r5是SEQ ID NO.84,并且r6是SEQ ID NO.90。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1是SEQ ID NO.30,r2是SEQ ID NO.44,r3是SEQ ID NO.58,r4是SEQ ID NO.66,并且r5是SEQ ID NO.85。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1是SEQ ID NO.40,r2是SEQ ID NO.45,r3是SEQ ID NO.56,r5是SEQ ID NO.78,并且r6是SEQ ID NO.93。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1是SEQ ID NO.36,r2是SEQ ID NO.50,r3是SEQ ID NO.59,r4是SEQ ID NO.72,并且r5是SEQ ID NO.75。

[0013] 在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有选自SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.18、SEQ ID NO.19、SEQ ID NO.20、SEQ ID NO.21、SEQ ID NO.94和SEQ ID NO.95的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.19所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.94所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.13所示的氨

基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.17所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.20所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.21所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.25所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含含有接头的氨基酸序列,其中所述接头包含如GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:1)所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质与选自人CD3和食蟹猴CD3的CD3结合。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质以相当的结合亲和力(Kd)与人CD3和食蟹猴CD3结合。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质以约1nM至约200nM的人Kd(hKd)与人CD3结合,并且以约1nM至约300nM的食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合。在一些实施方案中,所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM、约6nM至约10nM、约11nM至约20nM、约25nM至约40nM、约40nM至约60nM、约70nM至约90nM、约100nM至约120nM、约125nM至约140nM、约145nM至约160nM、约170nM至约200nM、约210nM至约250nM、约260nM至约300nM。

[0014] 在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约1.5倍至约2倍。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。

[0015] 在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列,并且所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列,并且所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列,并且所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列,并且所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。在一些实施方案中,所述

单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列，并且所述hKd和cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列，并且所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列，并且其中所述hKd和cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列，并且所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列，并且所述hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约1.5倍至约2倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列，并且所述hKd和所述cKd为约6nM至约10nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列，并且所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约1.5倍至约2倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列，并且所述hKd和所述cKd为约6nM至约10nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列，并且所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列，并且所述hKd和所述cKd为约11nM至20nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列，并且所述hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列，并且所述hKd和所述cKd为约25nM至约40nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列，并且所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列，并且所述hKd和所述cKd为约11nM至20nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.17所示的氨基酸序列，并且所述hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.17所示的氨基酸序列，并且所述hKd和所述cKd为约40nM至约60nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列，并且所述hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列，并且所述hKd和所述cKd为约11nM至20nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.19所示的氨基酸序列，并且所述hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.19所示的氨基酸序列，并且所述hKd和所述cKd为约40nM至60nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结

合蛋白质具有如SEQ ID NO.20所示的氨基酸序列,并且所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.20所示的氨基酸序列,并且所述hKd和所述cKd为约11nM至约20nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.21所示的氨基酸序列,并且所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.21所示的氨基酸序列,并且所述hKd和所述cKd为约125nM至约140nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.94所示的氨基酸序列,并且所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.94所示的氨基酸序列,并且所述hKd和所述cKd为约100nM至约120nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.95所示的氨基酸序列,并且所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.95所示的氨基酸序列,并且所述hKd和所述cKd为约100nM至约120nM。在另一个实施方案中本文提供了一种单链可变片段CD3结合蛋白质,其包含SEQ ID NO.22(野生型抗CD3)所示的序列,其中选自氨基酸位置27、28、29、31、33、34、54、55、57、59、61、63、65、102、105、106、108、114、163、164、165、166、168、170、171、173、193、194、195、196、197、231、235、237和239的一个或多个氨基酸残基被置换,其中,氨基酸位置27被天冬酰胺置换,氨基酸位置28被谷氨酸或甲硫氨酸置换,氨基酸位置29被酪氨酸置换,氨基酸位置31被天冬酰胺、甘氨酸、谷氨酸或苏氨酸置换,氨基酸位置33被脯氨酸置换,氨基酸位置34被缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸置换,氨基酸位置54被甘氨酸置换,氨基酸位置55被丝氨酸置换,氨基酸位置57被赖氨酸置换,氨基酸位置59被谷氨酸置换,氨基酸位置61被谷氨酸置换,氨基酸位置63被赖氨酸置换,氨基酸位置65被天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸或谷氨酰胺置换,氨基酸位置102被丙氨酸或苏氨酸置换,氨基酸位置105被天冬酰胺置换,氨基酸位置106被天冬氨酸置换,氨基酸位置108被组氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸或亮氨酸置换,氨基酸位置114被苏氨酸置换,氨基酸位置163被丙氨酸置换,氨基酸位置164被谷氨酸置换,氨基酸位置165被酪氨酸置换,氨基酸位置166被苯丙氨酸、赖氨酸或丝氨酸置换,氨基酸位置168被酪氨酸置换,氨基酸位置170被缬氨酸置换,氨基酸位置171被天冬氨酸、赖氨酸、缬氨酸或组氨酸置换,氨基酸位置173被酪氨酸置换,氨基酸位置193被异亮氨酸置换,氨基酸位置194被谷氨酸、酪氨酸、天冬酰胺或丝氨酸置换,氨基酸位置195被亮氨酸、谷氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸或缬氨酸置换,氨基酸位置196被天冬酰胺或甘氨酸置换,氨基酸位置197被缬氨酸置换,氨基酸位置231被苏氨酸或丙氨酸置换,氨基酸位置235被天冬氨酸或丙氨酸置换,氨基酸位置237被丝氨酸置换,并且氨基酸位置239被丙氨酸或异亮氨酸置换。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质在除位置27、28、29、31、33、34、54、55、57、59、61、63、65、102、105、106、108、114、163、164、165、166、168、170、171、173、193、194、195、196、197、231、235、237和239之外的氨基酸位置处包含一个或多个另外的置换。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置27处包含置换。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置28处包含置换。在一

些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置29处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置31处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置33处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置34处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置54处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置55处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置57处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置59处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置61处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置63处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置65处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置102处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置105处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置106处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置108处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置114处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置163处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置164处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置165处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置166处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置168处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置170处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置171处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置173处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置193处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置194处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置195处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置196处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置197处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置231处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置235处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置237处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置239处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置34、65、102、63、197和231处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置28、57、166和235处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置108、168、194和239处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置28、55、114、166、195和237处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置31、63、108、170和194处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置29、65、108、166、195和231处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置27、59、102、173和194处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置31、65、108、171和193处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置34、164和195处包含置换。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置33、105、171、195和231处包含置换。在一些实施方案

中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置31、65、108、170和194处包含置换。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置27、106、171和195处包含置换。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置31、54、165、196和235处包含置换。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置28、59、108、166和196处包含置换。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置34、61、108、194和239处包含置换。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质在位置31、65、108、171和194处包含置换。

[0016] 在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置34、65、102、163、197和231被置换,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置34、65、102、163、197和231被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置28、57、166和235被置换,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置28、57、166和235被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。

[0017] 在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置108、168、194和239被置换,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置108、168、194和239被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置28、55、114、166、195和237被置换,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置28、55、114、166、195和237被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置31、63、108、170和194被置换,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约1.5倍至约2倍。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置31、63、108、170和194被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约6nM至约10nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置29、65、108、166、195和231被置换,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ IDNO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约1.5倍至约2倍。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置29、65、108、166、195和231被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约6nM至约10nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置27、59、102、173和194被置换,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置27、59、102、173和194被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约11nM至20nM。在一些实施方案中,所述单链

可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置31、65、108、171和193被置换，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置31、65、108、171和193被置换，并且其中所述hKd和所述cKd为约25nM至约40nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置34、164、和195被置换，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置34、164和195被置换，并且其中所述hKd和所述cKd为约11nM至约20nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置33、105、171、195和231被置换，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置33、105、171、195和231被置换，并且其中所述hKd和所述cKd为约40nM至约60nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置31、65、108、170和194被置换，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置31、65、108、170和194被置换，并且其中所述hKd和所述cKd为约11nM至20nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置27、106、171和195被置换，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置27、106、171和195被置换，并且其中所述hKd和所述cKd为约40nM至60nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置31、54、165、196和235被置换，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置31、54、165、196和235被置换(10B2)，并且其中所述hKd和所述cKd为约11nM至约20nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置28、59、108、166和196被置换，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约25倍至约50倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置28、59、108、166和196被置换，并且其中所述hKd和所述cKd为约125nM至约140nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置34、61、108、194和239被置换，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置34、61、108、194和239被置换，并且其中所述hKd和所述cKd为约100nM至约120nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置31、65、108、171和194被置换，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。在一些实施方案中，所述

单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置31、65、108、171和194被置换，并且其中所述hKd和所述cKd为约100nM至约120nM。

[0018] 在进一步的实施方案中，本文提供了一种单链可变片段CD3结合蛋白质，其包含如野生型抗CD3(SEQ ID NO:22)所示的氨基酸序列，其包含可变重链区(VH)、可变轻链区(VL)、包含如GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:1)所示的氨基酸序列的接头，其中VH包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3，其中VL包含互补决定区LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3，其在VH的CDR1、CDR2或CDR3和VL的LC CDR1、LC CDR2或LC CDR3中包含至少一个突变，其中所述至少一个突变不在氨基酸位置26、30、32、35、50、51、52、53、56、58、60、62、64、66、67、101、103、104、107、109、110、111、112、113、167、169、172、174、175、176、192、198、232、233、234、236或238处。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在选自27、28、29、31、33、34、54、55、57、59、61、63、65、102、105、106、108、114、163、164、165、166、168、170、171、173、193、194、195、196、197、231、235、237和239的氨基酸位置处包含至少一个突变。在一些实施方案中，氨基酸位置34被突变为异亮氨酸，位置65被突变为谷氨酰胺，位置102被突变为丙氨酸，位置163被突变为丙氨酸，位置197被突变为缬氨酸，并且位置231被突变为苏氨酸。在一些实施方案中，氨基酸位置28被突变为谷氨酸，位置57被突变为赖氨酸，位置166被突变为苯丙氨酸，并且位置235被突变为天冬氨酸。在一些实施方案中，氨基酸位置108被突变为组氨酸，位置168被突变为酪氨酸，位置194被突变为丝氨酸，并且位置239被突变为异亮氨酸。在一些实施方案中，氨基酸位置28被突变为甲硫氨酸，位置55被突变为丝氨酸，位置114被突变为苏氨酸，位置166被突变为苯丙氨酸，位置195被突变为亮氨酸，并且位置237被突变为丝氨酸。在一些实施方案中，氨基酸位置31被突变为苏氨酸，位置63被突变为赖氨酸，位置108被突变为脯氨酸，位置170被突变为缬氨酸，并且位置194被突变为谷氨酸。在一些实施方案中，氨基酸位置29被突变为酪氨酸，位置65被突变为谷氨酸，位置108被突变为脯氨酸，位置166被突变为赖氨酸，位置195被突变为谷氨酸，并且位置231被突变为苏氨酸。在一些实施方案中，氨基酸位置27被突变为天冬酰胺，位置59被突变为谷氨酸，位置102被突变为苏氨酸，位置173被突变为酪氨酸，并且位置194被突变为酪氨酸。在一些实施方案中，氨基酸位置31被突变为天冬酰胺，位置65被突变为丙氨酸，位置108被突变为谷氨酰胺，位置171被突变为天冬氨酸，并且位置193被突变为异亮氨酸。在一些实施方案中，氨基酸位置34被突变为缬氨酸，位置164被突变为谷氨酸，并且位置195被突变为异亮氨酸。在一些实施方案中，氨基酸位置33被突变为脯氨酸，位置105被突变为天冬酰胺，位置171被突变为赖氨酸，位置195被突变为甲硫氨酸，并且位置231被突变为丙氨酸。在一些实施方案中，氨基酸位置31被突变为甘氨酸，位置65被突变为谷氨酸，位置108被突变为脯氨酸，位置170被突变为缬氨酸，并且位置194被突变为谷氨酸。在一些实施方案中，氨基酸位置27被突变为天冬酰胺，位置106被突变为天冬氨酸，位置171被突变为组氨酸，并且位置195被突变为缬氨酸。在一些实施方案中，氨基酸位置31被突变为天冬酰胺，位置54被突变为甘氨酸，位置165被突变为酪氨酸，位置196被突变为天冬酰胺，并且位置235被突变为丙氨酸。在一些实施方案中，氨基酸位置28被突变为谷氨酸，位置59被突变为谷氨酸，位置108被突变为亮氨酸，位置166被突变为丝氨酸，并且位置196被突变为甘氨酸。在一些实施方案中，氨基酸位置34被亮氨酸置换，氨基酸位置61被谷氨酸置换，氨基酸位置108被脯氨酸置换，氨基酸位置194被天冬酰胺置换，并且氨基酸位置239被丙氨酸置换。在一些实施方案中，氨基酸位置31被谷氨酸

置换,氨基酸位置65被天冬氨酸置换,氨基酸位置108被甘氨酸置换,氨基酸位置171被缬氨酸置换,并且氨基酸位置194被谷氨酸置换。

[0019] 在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置34被突变为异亮氨酸,位置65被突变为谷氨酰胺,位置102被突变为丙氨酸,位置163被突变为丙氨酸,位置197被突变为缬氨酸,并且位置231被突变为苏氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置34被突变为异亮氨酸,位置65被突变为谷氨酰胺,位置102被突变为丙氨酸,位置163被突变为丙氨酸,位置197被突变为缬氨酸,并且位置231被突变为苏氨酸,其中所述hKd和所述cKd为约3nM至5nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置28被突变为谷氨酸,位置57被突变为赖氨酸,位置166被突变为苯丙氨酸,并且位置235被突变为天冬氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置28被突变为谷氨酸,位置57被突变为赖氨酸,位置166被突变为苯丙氨酸,并且位置235被突变为天冬氨酸,其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置108被突变为组氨酸,位置168被突变为酪氨酸,位置194被突变为丝氨酸,并且位置239被突变为异亮氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置108被突变为组氨酸,位置168被突变为酪氨酸,位置194被突变为丝氨酸,并且位置239被突变为异亮氨酸,其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置28被突变为甲硫氨酸,位置55被突变为丝氨酸,位置114被突变为苏氨酸,位置166被突变为苯丙氨酸,位置195被突变为亮氨酸,并且位置237被突变为丝氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置28被突变为甲硫氨酸,位置55被突变为丝氨酸,位置114被突变为苏氨酸,位置166被突变为苯丙氨酸,位置195被突变为亮氨酸,并且位置237被突变为丝氨酸,其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置31被突变为苏氨酸,位置63被突变为赖氨酸,位置108被突变为脯氨酸,位置170被突变为缬氨酸,并且位置194被突变为谷氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约1.5倍至约2倍。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置31被突变为苏氨酸,位置63被突变为赖氨酸,位置108被突变为脯氨酸,位置170被突变为缬氨酸,并且位置194被突变为谷氨酸,其中所述hKd和所述cKd为约6nM至约10nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置29被突变为酪氨酸,位置65被突变为谷氨酸,位置108被突变为脯氨酸,位置166被突变为赖氨酸,位置195被突变为谷氨酸,并且位置231被突变为苏氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对

CD3的结合亲和力的约1.5倍至约2倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置29被突变为酪氨酸，位置65被突变为谷氨酸，位置108被突变为脯氨酸，位置166被突变为赖氨酸，位置195被突变为谷氨酸，并且位置231被突变为苏氨酸，其中所述hKd和所述cKd为约6nM至约10nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置27被突变为天冬酰胺，位置59被突变为谷氨酸，位置102被突变为苏氨酸，位置173被突变为酪氨酸，并且位置194被突变为酪氨酸，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置27被突变为天冬酰胺，位置59被突变为谷氨酸，位置102被突变为苏氨酸，位置173被突变为酪氨酸，并且位置194被突变为酪氨酸，其中所述hKd和所述cKd为约11nM至20nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置31被突变为天冬酰胺，位置65被突变为丙氨酸，位置108被突变为谷氨酰胺，位置171被突变为天冬氨酸，并且位置193被突变为异亮氨酸，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置31被突变为天冬酰胺，位置65被突变为丙氨酸，位置108被突变为谷氨酰胺，位置171被突变为天冬氨酸，并且位置193被突变为异亮氨酸，其中所述hKd和所述cKd为约25nM至约40nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置34被突变为缬氨酸，位置164被突变为谷氨酸，并且位置195被突变为异亮氨酸，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置34被突变为缬氨酸，位置164被突变为谷氨酸，并且位置195被突变为异亮氨酸，其中所述hKd和所述cKd为约11nM至20nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置33被突变为脯氨酸，位置90被突变为天冬酰胺，位置105被突变为天冬酰胺，位置171被突变为赖氨酸，位置195被突变为甲硫氨酸，并且位置231被突变为丙氨酸，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置33被突变为脯氨酸，位置90被突变为天冬酰胺，位置105被突变为天冬酰胺，位置171被突变为赖氨酸，位置195被突变为甲硫氨酸，并且位置231被突变为丙氨酸，其中所述hKd和所述cKd为约40nM至60nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置31被突变为甘氨酸，位置65被突变为谷氨酸，位置108被突变为脯氨酸，位置170被突变为缬氨酸，并且位置194被突变为谷氨酸，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置31被突变为甘氨酸，位置65被突变为谷氨酸，位置108被突变为脯氨酸，位置170被突变为缬氨酸，并且位置194被突变为谷氨酸，其中所述hKd和所述cKd为约11nM至20nM。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列，其中氨基酸位置27被突变为天冬酰胺，位置106被突变为天冬氨酸，位置171被突变为组氨酸，并且位置195被突变为缬氨酸，并且其

中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置27被突变为天冬酰胺,位置106被突变为天冬氨酸,位置171被突变为组氨酸,并且位置195被突变为缬氨酸,其中所述hKd和所述cKd为约40nM至60nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置31被突变为天冬酰胺,位置54被突变为甘氨酸,位置165被突变为酪氨酸,位置196被突变为天冬酰胺,并且位置235被突变为丙氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置31被突变为天冬酰胺,位置54被突变为甘氨酸,位置165被突变为酪氨酸,位置196被突变为天冬酰胺,并且位置235被突变为丙氨酸,其中所述hKd和所述cKd为约11nM至约20nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置28被突变为谷氨酸,位置59被突变为谷氨酸,位置108被突变为亮氨酸,位置166被突变为丝氨酸,并且位置196被突变为甘氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置28被突变为谷氨酸,位置59被突变为谷氨酸,位置108被突变为亮氨酸,位置166被突变为丝氨酸,并且位置196被突变为甘氨酸,其中所述hKd和所述cKd为约125nM至约140nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置34被突变为亮氨酸,氨基酸位置61被突变为谷氨酸,氨基酸位置108被突变为脯氨酸,氨基酸位置194被突变为天冬酰胺,氨基酸位置239被突变为丙氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置34被突变为亮氨酸,氨基酸位置61被突变为谷氨酸,氨基酸位置108被突变为脯氨酸,氨基酸位置194被突变为天冬酰胺,氨基酸位置239被突变为丙氨酸,其中所述hKd和所述cKd为约100nM至约120nM。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置31被突变为谷氨酸,氨基酸位置65被突变为天冬氨酸,氨基酸位置108被突变为甘氨酸,氨基酸位置171被突变为缬氨酸,并且氨基酸位置194被突变为谷氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质包含这样的序列,其中氨基酸位置31被突变为谷氨酸,氨基酸位置65被突变为天冬氨酸,氨基酸位置108被突变为甘氨酸,氨基酸位置171被突变为缬氨酸,并且氨基酸位置194被突变为谷氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd为约100nM至约120nM。

[0020] 在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质不与小鼠CD3结合。

[0021] 在一些实施方案中提供了编码根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质的多核苷酸。在一个实施方案中提供了包含本文所述的多核苷酸的载体。在一个实施方案中提供了用本文所述的载体转化的宿主细胞。在进一步的实施方案中提供了药物组合物,其包含(i)根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质、根据本公开内容的多核苷酸、根据本公开内容的载体或根据本公开内容的宿主细胞,以及(ii)药学上可接受的载体。

[0022] 在另一个实施方案中提供了产生根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质的方法,所述方法包括在允许单链可变片段CD3结合蛋白质表达的条件下培养用包含编码根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质的核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。

[0023] 在另一实施方案中提供了一种治疗或改善增生性疾病、肿瘤疾病、炎性疾病、免疫性病症、自身免疫病、感染性疾病、病毒性疾病、变态反应、寄生虫反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质。在一些实施方案中,所述受试者是人。在一些实施方案中,所述方法进一步包括与根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质联合施用药剂。

[0024] 在一些实施方案中,本文提供了包含根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质的多特异性结合蛋白质。一个实施方案描述了包含根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质的抗体。进一步的实施方案提供了一种多特异性抗体、双特异性抗体、单结构域抗体、可变重链结构域、肽或配体,其包含根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质。在一个实施方案中,本文描述了包含根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质的抗体,其中所述抗体是scFv抗体。另一实施方案描述了一种多特异性结合蛋白质或抗体,其包含根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质和血清白蛋白结合域。

[0025] 本发明的新颖特征在所附权利要求中具体阐述。通过参考以下对利用了本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述及其附图,将会获得对本发明特征和优点的更好的理解,在这些附图中:

附图说明

[0026] 图1图示了在生物素-CD3ε和生物素-HSA上的噬菌体滴定。

[0027] 图2图示了人CD3结合蛋白质的氨基酸序列(SEQ ID NO:22)。HC CDR1在第一阴影序列(GFTFNKYAMN(SEQ ID NO:23))中示出,HC CDR2在第二阴影序列(RIRSKYNNYATYYADSVK(SEQ ID NO:24))中示出,HC CDR3在第三阴影序列(HGNFGNSYISYWAY(SEQ ID NO:25))中示出,LC CDR1在第四阴影序列(GSSTGAVTSGNYPN(SEQ ID NO:26))中示出,LC CDR2在第五阴影序列(GTKFLAP(SEQ ID NO:27))中示出,而CDR3在第六阴影序列(VLWYSNRWV(SEQ ID NO:28))中示出。

[0028] 图3图示了为了更精确的K_d测定而选择的16个克隆的概况。

[0029] 图4图示了几种抗huCD3ε scFv变体的疏水暴露温度(T_h℃)。

具体实施方式

[0030] 虽然本文已经显示和描述了本发明的优选实施方案,但是对于本领域技术人员显而易见的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员现将想到许多变化、改变和替换。应当理解,本文所述的本发明实施方案的各种替代方案均可用于实施本发明。以下权利要求旨在限定本发明的范围,并且由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

[0031] 某些定义

[0032] 本文使用的术语仅用于描述特定情况的目的,而非限制性的。如本文所用,除非上

下文另有明确说明，否则单数形式“一个”、“一种”和“该”也旨在包括复数形式。此外，就具体实施方式和/或权利要求书中使用的术语“包括”、“包含”、“具有”或其变化形式而言，这些术语旨在以与术语“包含”类似的方式为包含性的。

[0033] 术语“约”或“大约”意指在本领域普通技术人员测定的特定值的可接受误差范围内，所述可接受误差范围将部分取决于该值如何测量或测定，例如，测量系统的局限性。例如，根据给定值的实践，“约”可以表示在1个或大于1个标准差内。在本申请和权利要求书中描述特定值的情况下，除非另有说明，否则术语“约”应被认为意指该特定值的可接受误差范围。

[0034] 术语“个体”、“患者”或“受试者”可互换使用。这些术语均不要求或不限于以医疗保健工作者(例如，医生、注册护士、护士执业者、医师助理、护理员或临终关怀工作者)的监督(例如，持续或间歇的)为特征的情况。

[0035] 如本文所用，“消除半衰期”以其普通意义使用，如在Goodman和Gillman的The Pharmaceutical Basis of Therapeutics 21-25(Alfred Goodman Gilman、Louis S.Goodman和Alfred Gilman编著，第六版1980)中所述。简言之，该术语意在包括药物消除的时间过程的定量量度。大多数药物的消除是指数性的(即，遵循一级动力学)，因为药物浓度通常并未接近消除过程的饱和所需的浓度。指数过程的速率可由其速率常数k或由其半衰期$t_{1/2}$表示，速率常数k表示每单位时间的分数变化，半衰期$t_{1/2}$表示该过程完成50％所需的时间。这两个常数的单位分别是时间$^{-1}$和时间。反应的一级速率常数和半衰期简单相关($k \times t_{1/2}=0.693$)并且可以相应地互换。由于一级消除动力学指示每单位时间损失恒定分数的药物，因此药物浓度的对数相对于时间的图形在初始分布阶段之后(即在药物吸收和分布完成之后)一直是线性的。可从这样的图形准确地确定药物消除的半衰期。

[0036] 如本文所用，相对于序列的“氨基酸序列同一性百分比(％)”定义为在将序列进行比对并引入缺口(如果需要)以达到最大序列同一性百分比之后，候选序列中的氨基酸残基与特定序列中的氨基酸残基相同的百分比，并且不认为任何保守置换是序列同一性的一部分。为了确定氨基酸序列同一性百分比目的的比对可通过本领域技术范围内的各种方式实现，例如，使用可公开获得的计算机软件，如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定用于测量比对的适当参数，包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0037] 术语“框架”或“FR”残基(或区)是指除如本文定义的CDR或高变区残基之外的可变域残基。“人共有框架”是代表在选择人免疫球蛋白VL或VH框架序列中最常出现的氨基酸残基的框架。

[0038] 如本文所用，“可变区”或“可变域”是指以下情况：可变域的某些部分在抗体之间在序列上广泛不同，并且在每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性中使用。然而，变异性并非均匀地分布在抗体的整个可变域中。其集中在轻链和重链可变域中称为互补决定区(CDR)或高变区的三个区段中。可变域更高度保守的部分被称为框架(FR)。天然重链和轻链的可变域各自包含四个FR区，其主要采取β-折叠构型，且通过三个CDR连接，所述三个CDR形成连接β折叠结构的环，并且在一些情况下形成β折叠结构的一部分。每条链中的CDR通过FR区紧密靠近保持在一起，并且与来自另一条链的CDR一起有助于形成抗体的抗原结合位点(参见Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第五版，

National Institute of Health,Bethesda,Md.(1991))。恒定域虽然不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出各种效应物功能,诸如抗体参与抗体依赖性细胞毒性。“按照Kabat的可变域残基编号”或“按照Kabat的氨基酸位置编号”及其变化形式是指在Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)中用于抗体编译的重链可变域或轻链可变域的编号系统。使用该编号系统,实际的线性氨基酸序列可含有减少或添加的氨基酸,其对应于可变域的FR或CDR的缩短或插入。例如,重链可变域可包含在H2的残基52之后的单氨基酸插入(根据Kabat为残基52a)和在重链FR残基82之后的插入残基(例如,根据Kabat为残基82a、82b和82c等)。可通过将抗体序列在同源性区域与“标准”Kabat编号的序列进行比对来确定给定抗体的残基的Kabat编号。这并不意味着本公开内容的CDR必然对应于Kabat编号约定。

[0039] 如本文所用,术语“结合亲和力”是指本公开内容中描述的蛋白质与其结合靶标的亲和力,并且使用“Kd”值以数字表示。如果表明两种或更多种蛋白质对其结合靶标具有相当的结合亲和力,那么各蛋白质对其结合靶标结合的Kd值在彼此的±2倍之内。如果表明两种或更多种蛋白质对单一结合靶标具有相当的结合亲和力,那么各蛋白质与所述单一结合靶标结合的Kd值在彼此的±2倍之内。如果表明蛋白质以相当的结合亲和力结合两种或更多种靶标,那么所述蛋白质与该两种或更多种靶标结合的Kd值在彼此的±2倍之内。通常,较高的Kd值对应于较弱的结合。在一些实施方案中,使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000(BIAcore,Inc.,Piscataway,N.J.)通过放射性标记的抗原结合测定(RIA)或表面等离子体共振测定来测量“Kd”。在某些实施方案中,还使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000(BIAcore,Inc.,Piscataway,N.J.)通过表面等离子体共振技术来测定“缔合率”或“缔合的速率”或“缔合速率”或“kon”以及“解离率”或“解离的速率”或“解离速率”或“koff”。在其他实施方案中,使用Octet® Systems(Pall Life Sciences)来测定“Kd”、“kon”和“koff”。

[0040] 本文描述了单链可变片段CD3结合蛋白质、药物组合物以及用于制备这样的单链可变片段CD3结合蛋白质的核酸、重组表达载体和宿主细胞。还提供了使用所公开的单链可变片段CD3结合蛋白质预防和/或治疗疾病、病况和病症的方法。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质能够特异性结合CD3结构域,以及靶抗原和半衰期延长结构域,如针对人血清白蛋白(HSA)的单结构域结合抗体。

[0041] CD3结合域

[0042] 通过T细胞受体复合物对抗原(在主要组织相容性复合物MHC的背景下展示)的识别来介导T细胞应答的特异性。作为T细胞受体复合物的一部分,CD3是包含CD3γ(gamma)链、CD3δ(delta)链和存在于细胞表面上的两条CD3ε(epsilon)链的蛋白质复合物。CD3与T细胞受体(TCR)的α(alpha)和β(beta)链缔合并与CD3ζ(zeta)一起构成T细胞受体复合物。CD3在T细胞上的群集(如通过固定的抗CD3抗体)导致T细胞活化,这类似于T细胞受体的接合,但不依赖于其克隆特有的特异性。

[0043] 在一方面,本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质包含与CD3特异性结合的结构域。在一方面,本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质包含与人CD3特异性结合的结构域。在一方面,本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质包含与食蟹猴CD3特异性结合的结构域。在一方面,本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质包含与人CD3和食蟹猴CD3结合的结

构域。在一些实施方案中，本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质包含与CD3γ特异性结合的结构域。在一些实施方案中，本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质包含与CD3δ特异性结合的结构域。在一些实施方案中，本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质包含与CD3ε特异性结合的结构域。

[0044] 在另一方面，还提供了包含根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质的多特异性结合蛋白质。在一些实施方案中，包含根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质的多特异性蛋白质与T细胞受体(TCR)特异性结合。在某些情况下，包含根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质的多特异性蛋白质与TCR的α链结合。在某些情况下，包含根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白的多特异性蛋白质与TCR的β链结合。

[0045] 在某些实施方案中，本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质的CD3结合域不仅表现出强力的对人CD3的CD3结合亲和力，而且还显示出极好的与相应的食蟹猴CD3蛋白质的交叉反应性。在一些情况下，该单链可变片段CD3结合蛋白质的CD3结合域与来自食蟹猴的CD3是交叉反应性的。在某些情况下，与人CD3结合的Kd(hKd)同与食蟹猴CD3结合的Kd(cKd)大致相同。在某些情况下，hKd与cKd之比(hKd:cKd)为约20:1至约1:2。

[0046] 在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质的CD3结合域可以是与CD3结合的任何结构域，包括但不限于来自单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体的结构域。在一些情况下，CD3结合域来源于最终将使用该单链可变片段CD3结合蛋白质的相同物种是有益的。例如，对于用于人类来说，所述单链可变片段CD3结合蛋白质的CD3结合域包含来自抗体或抗体片段的抗原结合域的人或人源化残基可能是有益的。

[0047] 因此，在一方面，所述抗原结合域包含人源化或人抗体或抗体片段或者鼠抗体或抗体片段。在一个实施方案中，人源化或人抗CD3结合域包含本文所述的人源化或人抗CD3结合域的轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)中的一个或多个(例如，全部三个)，和/或本文所述的人源化或人抗CD3结合域的重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(CDR2)和重链互补决定区3(CDR3)中的一个或多个(例如，全部三个)，例如，人源化或人抗CD3结合域包含一个或多个，例如全部三个LC CDR，以及一个或多个，例如全部三个HC CDR。

[0048] 在一些实施方案中，人源化或人抗CD3结合域包含对CD3具有特异性的人源化或人轻链可变区，其中对CD3具有特异性的轻链可变区包含人轻链框架区中的人或非人轻链CDR。在某些情况下，该轻链框架区为λ(lambda)轻链框架。在其他情况下，该轻链框架区为κ(kappa)轻链框架。

[0049] 在一些实施方案中，人源化或人抗CD3结合域包含对CD3具有特异性的人源化或人重链可变区，其中对CD3具有特异性的重链可变区包含人重链框架区中的人或非人重链CDR。

[0050] 在某些情况下，重链和/或轻链的互补决定区衍生自已知的抗CD3抗体，例如，莫罗单抗-CD3(OKT3)、奥昔珠单抗(TRX4)、替利珠单抗(MGA031)、维西珠单抗(Nuvion)、SP34、TR-66或X35-3、VIT3、BMA030(BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1和WT-31。

[0051] 在一个实施方案中，抗CD3结合域为包含本文提供的氨基酸序列的轻链和重链的

单链可变片段(scFv)。如本文所用,“单链可变片段”或“scFv”是指包含轻链可变区的抗体片段和至少一个包含重链可变区的抗体片段,其中该轻链和重链可变区经由短的柔性多肽接头连续连接,并且能够表达为单多肽链,并且其中该scFv保留其所衍生自的完整抗体的特异性。在一个实施方案中,抗CD3结合域包含:轻链可变区,其包含具有本文提供的轻链可变区的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰(例如,置换)但不超过30、20或10个修饰(例如,置换)的氨基酸序列,或与本文提供的氨基酸序列具有95%-99%同一性的序列;和/或重链可变区,其包含具有本文提供的重链可变区的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰(例如,置换)但不超过30、20或10个修饰(例如,置换)的氨基酸序列,或与本文提供的氨基酸序列具有95%-99%同一性的序列。在一个实施方案中,人源化或人抗CD3结合域为scFv,并且包含本文所述氨基酸序列的轻链可变区经由scFv接头附接至包含本文所述氨基酸序列的重链可变区。scFv的轻链可变区和重链可变区可以是例如以下方向中的任何一种:轻链可变区-scFv接头-重链可变区或重链可变区-scFv接头-轻链可变区。

[0052] 在一些实例中,根据已知方法制备与CD3结合的scFv。例如,可通过利用柔性多肽接头使VH和VL区连接在一起来产生scFv分子。该scFv分子包含具有优化的长度和/或氨基酸组成的scFv接头(例如,Ser-Gly接头)。因此,在一些实施方案中,该scFv接头的长度使得VH或VL结构域可以与其他可变域进行分子间缔合,从而形成CD3结合位点。在某些实施方案中,这样的scFv接头是“短的”,即,由0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸残基组成。因此,在某些情况下,该scFv接头由约12个或更少的氨基酸残基组成。在0个氨基酸残基的情况下,该scFv接头为肽键。在一些实施方案中,这些scFv接头由约3个至约15个,例如8、10或15个连续氨基酸残基组成。关于scFv接头的氨基酸组成,选择能赋予柔性、不干扰可变域以及允许链间折叠以使两个可变域一起形成功能性CD3结合位点的肽。例如,包含甘氨酸和丝氨酸残基的scFv接头通常提供蛋白酶抗性。在一些实施方案中,scFv中的接头包含甘氨酸和丝氨酸残基。该scFv接头的氨基酸序列可通过例如噬菌体展示法进行优化,以提高scFv的CD3结合和产率。适合于连接scFv中可变轻链结构域和可变重链结构域的肽scFv接头的实例包括但不限于$(GS)_n$(SEQ ID NO:96)、$(GGS)_n$(SEQ ID NO:97)、$(GGGS)_n$(SEQ ID NO:98)、$(GGSG)_n$(SEQ ID NO:99)、$(GGSGG)_n$(SEQ ID NO:100)、$(GGGGS)_n$(SEQ ID NO:101)、$(GGGGS)_n$(SEQ ID NO:102)或$(GGG)_n$(SEQ ID NO:103),其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一个实施方案中,该scFv接头可以是$(GGGGS)_4$(SEQ ID NO:104)或$(GGGGS)_3$(SEQ ID NO:1)。接头长度的变化可以保持或增强活性,从而在活性研究中产生优异的功效。

[0053] 在一些实施方案中,单链可变片段CD3结合蛋白质的CD3结合域对表达CD3的细胞上的CD3具有亲和力,其K_d为1000nM或更低、500nM或更低、200nM或更低、100nM或更低、80nM或更低、50nM或更低、20nM或更低、10nM或更低、5nM或更低、1nM或更低或0.5nM或更低。在一些实施方案中,单链可变片段CD3结合蛋白质的CD3结合域对CD3ε、CD3γ或CD3δ具有亲和力,其K_d为1000nM或更低、500nM或更低、200nM或更低、100nM或更低、80nM或更低、50nM或更低、20nM或更低、10nM或更低、5nM或更低、1nM或更低或0.5nM或更低。在进一步的实施方案中,单链可变片段CD3结合蛋白质的CD3结合域对CD3具有低亲和力,即,约100nM或更高。

[0054] 在某些实施方案中,本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合并以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合。在一些实施方案中,hKd和cKd为约1nM至约2nM、约3nM至约5nM、约6nM至约10nM、约11nM至约20nM、约25nM至约40nM、约40nM至约60nM、

约70nM至约90nM、约100nM至约120nM、约125nM至约140nM、约145nM至约160nM、约170nM至约200nM、约210nM至约250nM、约260nM至约300nM。

[0055] 在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质的hKd和cKd与具有如SEQ ID NO.22所示序列的CD3结合蛋白质的Kd大致相同。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质的hKd和cKd是具有如SEQ ID NO.22所示序列的CD3结合蛋白质的Kd的约1.1倍至约1.5倍。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质的hKd和cKd是具有如SEQ ID NO.22所示序列的CD3结合蛋白质的Kd的约1.5倍至约2倍。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质的hKd和cKd是具有如SEQ ID NO.22所示序列的CD3结合蛋白质的Kd的约2.5倍至约3倍。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质的hKd和cKd是具有如SEQ ID NO.22所示序列的CD3结合蛋白质的Kd的约3倍至约5倍。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质的hKd和cKd是具有如SEQ ID NO.22所示序列的CD3结合蛋白质的Kd的约6倍至约15倍。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质的hKd和cKd是具有如SEQ ID NO.22所示序列的CD3结合蛋白质的Kd的约15倍至约20倍。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质的hKd和cKd是具有如SEQ ID NO.22所示序列的CD3结合蛋白质的Kd的约20倍至约50倍。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质的hKd和cKd是具有如SEQ ID NO.22所示序列的CD3结合蛋白质的Kd的约55倍至约70倍。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质的hKd和cKd是具有如SEQ ID NO.22所示序列的CD3结合蛋白质的Kd的约75倍至约100倍。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质的hKd和cKd是具有如SEQ ID NO.22所示序列的CD3结合蛋白质的Kd的约120倍至约200倍。

[0056] 在一些实施方案中，hKd与cKd之比(hKd:cKd)在约20:1至约1:2的范围内。与CD3结合的亲和力可通过例如单链可变片段CD3结合蛋白质自身或其CD3结合域与测定板上涂覆的CD3、微生物细胞表面上展示的CD3、溶液中的CD3等结合的能力来测定。本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质自身或其CD3结合域与CD3的结合活性可如下测定：将配体(例如，CD3)或单链可变片段CD3结合蛋白质自身或其CD3结合域固定至珠子、基底、细胞等。可将试剂加入合适的缓冲液中并将结合配偶体在给定的温度下温育一段时间。洗涤以去除未结合的物质后，可采用例如SDS、高或低pH缓冲液等释放结合的蛋白质，并通过例如表面等离子体共振(SPR)进行分析。

[0057] 在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有选自SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.18、SEQ ID NO.19、SEQ ID NO.20、SEQ ID NO.21、SEQ ID NO.94和SEQ ID NO.95的氨基酸序列。

[0058] 在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列，其中hKd为约3.8nM，并且其中cKd为约3.5nM。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列，其中hKd为约4.1nM，并且其中cKd为约3.4nM。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列，其中hKd为约4.3nM，并且其中cKd为约4.2nM。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列，其中hKd为约4.7nM，并且其中cKd为约4.9nM。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID

NO.12所示的氨基酸序列,其中hKd为约6.4nM,并且其中cKd为约6.6nM。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列,其中hKd为约8nM,并且其中cKd为约6.6nM。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列,其中hKd为约20nM,并且其中cKd为约17nM。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列,其中hKd为约37nM,并且其中cKd为约30nM。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列,其中hKd为约14nM,并且其中cKd为约13nM。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.17所示的氨基酸序列,其中hKd为约50nM,并且其中cKd为约47nM。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列,其中hKd为约16nM,并且其中cKd为约16nM。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.19所示的氨基酸序列,其中hKd为约46nM,并且其中cKd为约43nM。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.20所示的氨基酸序列,其中hKd为约18nM,并且其中cKd为约17nM。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.21所示的氨基酸序列,其中hKd为约133nM,并且其中cKd为约134nM。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.94所示的氨基酸序列,其中hKd为约117nM,并且其中cKd为约115nM。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.95所示的氨基酸序列,其中hKd为约109nM,并且其中cKd为约103nM。

[0059] 在一些实施方案中,所述单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列,其中hKd和cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的Kd大致相同。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列,其中hKd和cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的Kd大致相同。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列,其中hKd和cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的Kd大致相同。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列,其中hKd和cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的Kd大致相同。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列,其中hKd和cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的Kd大致相同。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列,其中hKd和cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的Kd大致相同。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列,其中hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的Kd的约3倍至约5倍。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列,其中hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的Kd的约3倍至约5倍。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列,其中hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的Kd的约3倍至约5倍。在一些实施方案中,该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.17所示的氨基酸序列,其中hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的Kd的约

6倍至约15倍。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列，其中hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的Kd的约3倍至约5倍。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.19(2A4)所示的氨基酸序列，其中hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的Kd的约6倍至约15倍。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.20所示的氨基酸序列，其中hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的Kd的约3倍至约5倍。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.21所示的氨基酸序列，其中hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的Kd的约20倍至约50倍。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.94所示的氨基酸序列，其中hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的Kd的约20倍至约50倍。在一些实施方案中，该单链可变片段CD3结合蛋白质具有如SEQ ID NO.95所示的氨基酸序列，其中hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的Kd的约20倍至约50倍。

[0060] 半衰期延长结构域

[0061] 人血清白蛋白(HSA)(分子量为约67kDa)是血浆中最丰富的蛋白质，以约50mg/ml(600μM)存在，并且在人体中具有大约20天的半衰期。HSA用来维持血浆pH，促成胶体血压，用作许多代谢物和脂肪酸的载体，并且充当血浆中主要的药物转运蛋白质。

[0062] 与白蛋白的非共价缔合延长短寿命蛋白质的消除半衰期。例如，与仅施用Fab片段相比，当分别静脉内施用于小鼠和兔时，白蛋白结合域与Fab片段的重组融合导致25倍至58倍的体内清除减少和26倍至37倍的半衰期延长。在另一个实例中，当胰岛素被脂肪酸酰化以促进与白蛋白的缔合时，在兔或猪中皮下注射时观察到长效作用。总之，这些研究证明了白蛋白结合与延长的作用之间的联系。

[0063] 一方面，提供了一种多特异性结合蛋白质，其包含根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质，并且还包含半衰期延长结构域，例如与血清白蛋白特异性结合的结构域。在一些实施方案中，单链可变片段CD3结合蛋白质的血清白蛋白结合域可以是与血清白蛋白结合的任何结构域，包括但不限于来自单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体的结构域。在一些实施方案中，该血清白蛋白结合域是对血清白蛋白具有特异性的单链可变片段(scFv)、单结构域抗体如重链可变域(VH)、轻链可变域(VL)和骆驼科来源的sdAb的可变域(VHH)，或HSA结合抗体的抗原结合片段，如Fab、Fab'、F(ab)2和Fv片段，由一个或多个CDR组成的片段、单链抗体(例如，单链Fv片段(scFv))、二硫键稳定的(dsFv)Fv片段、异源偶联抗体(例如，双特异性抗体)、pFv片段、重链单体或二聚体、轻链单体或二聚体，以及由一条重链和一条轻链组成的二聚体，肽、配体或小分子实体。在某些实施方案中，该HSA结合域是单结构域抗体。在其他实施方案中，该血清白蛋白结合域是肽。在进一步的实施方案中，该血清白蛋白结合域是小分子。在一些实施方案中，考虑到包含单链可变片段CD3结合蛋白质的多特异性结合蛋白质的血清白蛋白结合域相当小并且不超过25kD、不超过20kD、不超过15kD或不超过10kD。在某些情况下，该血清白蛋白结合域如果是肽或小分子实体，则为5kD或更小。

[0064] 包含单链可变片段CD3结合蛋白质的多特异性结合蛋白质的半衰期延长结构域提

供该单链可变片段CD3结合蛋白质自身的改变的药效学和药代动力学。如上所述，该半衰期延长结构域延长消除半衰期。该半衰期延长结构域还改变药效学性质，包括单链可变片段CD3结合蛋白质的组织分布、穿透和扩散的改变。在一些实施方案中，该半衰期延长结构域提供了与不具有半衰期延长结构域的蛋白质相比改善的组织(包括肿瘤)靶向、组织分布、组织穿透、组织内扩散以及增强的功效。在一个实施方案中，治疗方法有效且高效地利用减少量的包含单链可变片段CD3结合蛋白质的多特异性结合蛋白质，从而导致副作用减小，如非肿瘤细胞的细胞毒性减小。

[0065] 此外，可选择半衰期延长结构域的结合亲和力，以便在包含单链可变片段CD3结合蛋白质的特定多特异性结合蛋白质中针对特定的消除半衰期。因此，在一些实施方案中，该半衰期延长结构域具有高结合亲和力。在其他实施方案中，该半衰期延长结构域具有中等结合亲和力。在其他实施方案中，该半衰期延长结构域具有低或微小的结合亲和力。示例性结合亲和力包括10nM或更小(高)、10nM至100nM(中等)和大于100nM(低)的K_D。如上所述，通过已知方法如表面等离子体共振(SPR)测定与血清白蛋白的结合亲和力。

[0066] 靶抗原结合域

[0067] 除了所述CD3以及半衰期延长结构域之外，本文所述的多特异性结合蛋白质在某些实施方案中还包含与靶抗原结合的结构域。靶抗原参与疾病、病症或病况和/或与疾病、病症或病况有关。特别地，靶抗原与增生性疾病、肿瘤疾病、炎性疾病、免疫性病症、自身免疫病、感染性疾病、病毒性疾病、变态反应、寄生虫反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病有关。在一些实施方案中，靶抗原是肿瘤细胞上表达的肿瘤抗原。或者，在一些实施方案中，靶抗原与病原体如病毒或细菌有关。

[0068] 在一些实施方案中，靶抗原是细胞表面分子，如蛋白质、脂质或多糖。在一些实施方案中，靶抗原在肿瘤细胞、病毒感染的细胞、细菌感染的细胞、受损红细胞、动脉斑块细胞或纤维化组织细胞上。

[0069] 本文所述的包含单链可变片段CD3结合蛋白质的多特异性结合蛋白质的设计允许靶抗原的结合域为柔性的，因为靶抗原的结合域可以是任何类型的结合域，其包括但不限于来自单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体的结构域。在一些实施方案中，靶抗原的结合域为单链可变片段(scFv)、单结构域抗体如重链可变域(VH)、轻链可变域(VL)和骆驼科来源的sdAb的可变域(VHH)。在其他实施方案中，靶抗原的结合域为非Ig结合域，即，抗体模拟物，如anticalins、affilins、affibody分子、affimers、affitins、alphabodies、avimers、DARPins、fynomers、kunitz结构域肽和单抗体(monobodies)。在进一步的实施方案中，靶抗原的结合域为与靶抗原结合或缔合的配体或肽。在进一步的实施方案中，靶抗原的结合域为knottin。在进一步的实施方案中，靶抗原的结合域为小分子实体。

[0070] 单链可变片段CD3结合蛋白质修饰

[0071] 本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质包括衍生物或类似物，其中(i)氨基酸被不是由遗传密码编码的氨基酸残基置换，(ii)成熟多肽与另一化合物如聚乙二醇融合，或(iii)附加的氨基酸与该蛋白质融合，如前导序列或分泌序列或阻断免疫原性结构域的序列和/或用于纯化蛋白质的序列。

[0072] 典型的修饰包括但不限于乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价附接、

血红素部分的共价附接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价附接、脂质或脂质衍生物的共价附接、磷脂酰肌醇的共价附接、交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、共价交联形成、胱氨酸形成、焦谷氨酸形成、甲酰化、γ羧化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、十四烷基化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、转移RNA介导的氨基酸向蛋白质的添加，如精氨酰化，和泛素化。

[0073] 在本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质中的任何位置进行修饰，该位置包括肽骨架、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。可用于修饰单链可变片段CD3结合蛋白质的某些常见肽修饰包括糖基化、脂质附接、硫酸化、谷氨酸残基的γ-羧化、羟基化、多肽中的氨基或羧基或两者被共价修饰的阻断，以及ADP-核糖基化。

[0074] 编码单链可变片段CD3结合蛋白质的多核苷酸

[0075] 在一些实施方案中，还提供了编码单链可变片段CD3结合蛋白质或包含根据本公开内容的单链可变片段CD3结合蛋白质的多特异性结合蛋白质的多核苷酸分子。在一些实施方案中，该多核苷酸分子以DNA构建体的形式提供。在其他实施方案中，该多核苷酸分子以信使RNA转录物的形式提供。

[0076] 通过已知方法构建多核苷酸分子，例如通过将编码由肽接头隔开，或在其他实施方案中通过肽键直接连接的三个结合域的基因合并为单个基因构建体，该单个基因构建体与合适的启动子以及可选的合适的转录终止子可操作地连接，并且将其在细菌或其他合适的表达系统例如CHO细胞中表达。在靶抗原结合域为小分子的实施方案中，该多核苷酸含有编码CD3结合域和半衰期延长结构域的基因。在半衰期延长结构域为小分子的实施方案中，该多核苷酸含有编码与CD3和靶抗原结合的结构域的基因。根据所采用的载体系统和宿主，可使用任何数目的合适的转录和翻译元件，包括组成型和诱导型启动子。选择启动子使得其驱动多核苷酸在相应宿主细胞中的表达。

[0077] 在一些实施方案中，将多核苷酸插入载体中，优选表达载体中，这代表进一步的实施方案。该重组载体可根据已知方法来构建。特别感兴趣的载体包括质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、病毒(virii)(例如，逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒、慢病毒等)和粘粒。

[0078] 可利用多种表达载体/宿主系统，以包含并表达编码所述单链可变片段CD3结合蛋白质的多肽的多核苷酸。用于在大肠杆菌(E.coli)中表达的表达载体的实例为pSKK(LeGall等人，J Immunol Methods.(2004)285(1):111-27)，或用于在哺乳动物细胞中表达的pcDNA5(Invitrogen)，PICHIAPINK™酵母表达系统(Invitrogen)，BACUVANCE™杆状病毒表达系统(GenScript)。

[0079] 因此，在一些实施方案中，如本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质通过以下步骤产生：将编码如上所述蛋白质的载体引入宿主细胞中，并在允许蛋白质结构域表达的条件下培养所述宿主细胞，该宿主细胞可进行分离并任选地进一步纯化。

[0080] 单链可变片段CD3结合蛋白质的产生

[0081] 在一些实施方案中，本文公开了用于产生单链可变片段CD3结合蛋白质的方法。在一些实施方案中，该方法包括在允许单链可变片段CD3结合蛋白质表达的条件下培养用包含编码单链可变片段CD3结合蛋白质的核酸序列的载体转化或转染的宿主，并从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。

[0082] 在另外的实施方案中,提供了针对与参考结合化合物相比改善本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质和/或包含单链可变片段CD3结合蛋白质的多特异性结合蛋白质的一种或多种性质的方法,所述性质例如是亲和力、稳定性、耐热性、交叉反应性等。在一些实施方案中,提供了多个单置换文库,每个文库对应于单链可变片段CD3结合蛋白质或参考结合化合物的不同结构域或氨基酸区段,使得单置换文库的每个成员仅编码在其相应的结构域或氨基酸区段中的单氨基酸变化(这允许用少量小文库探测大的蛋白质或蛋白质结合位点中的所有潜在置换)。在一些实施方案中,多个结构域形成或覆盖单链可变片段CD3结合蛋白质或参考结合化合物的氨基酸连续序列。不同单置换文库的核苷酸序列与至少一个其他单置换文库的核苷酸序列重叠。在一些实施方案中,设计多个单置换文库,使得每个成员与编码相邻结构域的每个单置换文库的每个成员重叠。

[0083] 单独选择由这样的单置换文库表达的结合化合物以获得每个文库的变体子集,所述变体子集具有与参考结合化合物的性质至少一样好的性质,并且其得到的文库大小减小(即,编码结合化合物的选定组的核酸数目小于编码原始单置换文库的成员的核酸数目)。这样的性质包括但不限于对靶标化合物的亲和力,在诸如加热、高pH或低pH、酶促降解等各种条件下的稳定性,与其他蛋白质的交叉反应性,等等。来自每个单置换文库的选定化合物在本文可互换地称为“预候选化合物”或“预候选蛋白质”。然后使用基于PCR的基因改组技术,将编码来自单独的单置换文库的预候选化合物的核酸序列在PCR中改组以产生改组文库。

[0084] 本文描述了筛选过程的示例性工作流程。从单置换文库产生预候选化合物的文库并针对与靶蛋白质的结合进行选择,之后将预候选文库改组以产生编码候选化合物的核酸文库,继而将该核酸文库依次克隆到适宜的表达载体如噬菌粒表达系统中。然后使表达候选化合物的噬菌体经历一轮或多轮选择以改善所需性质,如对靶分子的结合亲和力。靶分子可被吸附或以其他方式附着到孔或其他反应容器的表面,或者靶分子可用结合部分如生物素进行衍生化,该结合部分在与候选结合化合物一起温育后可用与珠子如磁珠结合的互补部分如链霉素捕获,以供洗涤。在示例性选择方案中,候选结合化合物经受延长的洗涤步骤,使得仅与靶分子具有非常低的解离速率的候选化合物得以选择。这样的实施方案的示例性洗涤时间为至少8小时;或者在其他实施方案中为至少24小时;或者在其他实施方案中为至少48小时;或者在其他实施方案中为至少72小时。在选择后,将分离的克隆扩增并使其进行另外的选择循环或分析,例如通过测序和通过对结合亲和力的比较测量,例如通过ELISA、表面等离子体共振结合、生物膜干涉法(例如,Octet system,ForteBio,Menlo Park,CA)等。

[0085] 在一些实施方案中,实施该过程以鉴别与参考CD3结合蛋白质(如具有SEQ ID NO.22的氨基酸序列的蛋白质)相比具有改善的热稳定性、改善的与选定组的结合靶标的交叉反应性的一种或多种单链可变片段CD3结合蛋白质和/或包含单链可变片段CD3结合蛋白质的多特异性结合蛋白质。通过改变参考CD3结合蛋白质的VH区和VL区中的密码子来制备单置换文库,该密码子包括框架区和CDR中的密码子;在另一个实施方案中,密码子发生改变的位置包括参考CD3结合蛋白质的重链和轻链的CDR,或者此类CDR的子集,如仅CDR1、仅CDR2、仅CDR3或CDR对。在另一个实施方案中,密码子发生改变的位置仅在框架区中出现。在一些实施方案中,文库仅包含相对于参考CD3结合蛋白质的单密码子变化,该变化仅在编号

范围为10至250的VH和VL两者的框架区中。在另一个实施方案中，密码子发生改变的位置包括参考CD3结合蛋白质的重链和轻链的CDR3或此类CDR3的子集。在另一个实施方案中，VH和VL编码区密码子发生改变的位置的数目在10至250的范围内，使得至多100个位置在框架区中。在如上所述制备单置换文库后进行以下步骤：(a)单独表达每个单置换文库的每个成员作为预候选蛋白质；(b)选择编码与结合配偶体结合的预候选蛋白质的每个单置换文库的成员，该结合配偶体与原始结合靶标[例如，所需的交叉反应靶标]不同；(c)在PCR中改组选定文库的成员以产生组合的改组文库；(d)表达该改组文库的成员作为候选CD3结合蛋白质；以及(e)对该改组文库的成员进行一次或多次选择以获得与原始结合配偶体结合的候选CD3结合蛋白质，并且(f)针对与所需交叉反应性靶标的结合进一步选择候选蛋白质，从而提供核酸编码的CD3结合蛋白质，其相对于参考CD3结合蛋白质对一种或多种物质具有增加的交叉反应性，而不丧失对原始配体的亲和力。在另外的实施方案中，可通过用以下步骤代替步骤(f)来实现该方法，以获得对选定的交叉反应性物质或化合物或表位具有降低的反应性的单链可变片段CD3结合蛋白质：从候选单链可变片段CD3结合蛋白质的子集中一次或多次排除与不需要的交叉反应性化合物结合的候选结合化合物。

[0086] 药物组合物

[0087] 在一些实施方案中，还提供了药物组合物，其包含本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质、包含编码单链可变片段CD3结合蛋白质的多肽的多核苷酸的载体或被该载体转化的宿主细胞，以及至少一种药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的载体”包括但不限于不干扰成分的生物活性的有效性且对所施用的患者无毒的任何载体。合适的药物载体的实例是本领域公知的，且包括磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液如油/水乳液、各种类型的润湿剂、无菌溶液等。这样的载体可以通过常规方法配制，并且可以以合适的剂量施用于受试者。优选地，该组合物是无菌的。这些组合物还可含有佐剂如防腐剂、乳化剂和分散剂。可通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂来确保阻止微生物的作用。

[0088] 在药物组合物的一些实施方案中，本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质被包封在纳米颗粒中。在一些实施方案中，该纳米颗粒是富勒烯、液晶、脂质体、量子点、超顺磁纳米颗粒、树状聚体或纳米棒。在药物组合物的其他实施方案中，将该单链可变片段CD3结合蛋白质附接至脂质体。在一些情况下，该单链可变片段CD3结合蛋白质与脂质体表面缀合。在一些情况下，该单链可变片段CD3结合蛋白质被包封在脂质体的壳内。在一些情况下，该脂质体为阳离子脂质体。

[0089] 本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质被考虑用作药物。施用通过不同方式实现，例如，通过静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或真皮内施用。在一些实施方案中，施用途径取决于疗法的种类和药物组合物中包含的化合物的种类。给药方案将由主治医师并根据其他临床因素来确定。对于任何一名患者的剂量依赖于许多因素，包括患者体型、体表面积、年龄、性别、待施用的具体化合物、施用的时间和途径、疗法的种类、总体健康和其他同时施用的药物。“有效剂量”是指活性成分的量，该量足以影响疾病的过程和严重程度，从而导致这种病理学的减轻或缓解，并且可使用已知方法来确定。

[0090] 治疗方法

[0091] 在一些实施方案中，本文还提供了用于刺激有需要的个体的免疫系统的方法和用途，其包括施用本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质。在一些情况下，本文所述单链可

变片段CD3结合蛋白质的施用诱导和/或保持对表达靶抗原的细胞的细胞毒性。在一些情况下，表达靶抗原的细胞是癌细胞或肿瘤细胞、病毒感染的细胞、细菌感染的细胞、自身反应性T或B细胞、受损红细胞、动脉斑块或纤维化组织。

[0092] 本文还提供了用于治疗与靶抗原有关的疾病、病症或病况的方法和用途，其包括向有需要的个体施用本文所述的单链可变片段CD3结合蛋白质。与靶抗原有关的疾病、病症或病况包括但不限于病毒感染、细菌感染、自身免疫病、移植排斥、动脉粥样硬化或纤维化。在其他实施方案中，与靶抗原有关的疾病、病症或病况为增生性疾病、肿瘤疾病、炎性疾病、免疫性病症、自身免疫病、感染性疾病、病毒性疾病、变态反应、寄生虫反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病。在一个实施方案中，与靶抗原有关的疾病、病症或病况为癌症。在一种情况下，该癌症为血液系统癌症。在另一种情况下，该癌症为实体瘤癌症。

[0093] 在一些实施方案中，如本文所用，“治疗”或“处理”是指治疗性处理，其中目的是减缓(减轻)不期望的生理病况、病症或疾病，或是获得有益或期望的临床结果。对于本文所述的目的，有益或期望的临床结果包括但不限于症状的减轻；病况、病症或疾病程度的减小；病况、病症或疾病状态的稳定(即不恶化)；病况、病症或疾病的延迟发作或进展减缓；病况、病症或疾病状态的改善；以及可检测的或不可检测的缓解(部分或全部的)，或者病况、病症或疾病的增强或改善。治疗包括引发临床上显著的反应，而没有过多的副作用。治疗还包括与不接受治疗的情况下预期的生存期相比延长生存期。在其他实施方案中，“治疗”或“处理”是指预防性措施，其中目的是例如在易患疾病的人(例如，携带疾病如乳腺癌的遗传标志物的个体)中，延迟不期望的生理病况、病症或疾病的发作或者减小其严重程度。

[0094] 在本文所述的方法的一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质与用于治疗特定疾病、病症或病况的药剂联合施用。药剂包括但不限于涉及抗体、小分子(例如，化疗药物)、激素(甾体、肽等)的疗法、放疗(γ射线、X射线和/或放射性同位素的定向递送、微波、UV辐射等)、基因疗法(例如，反义疗法(antisense)、逆转录病毒疗法等)和其他免疫疗法。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质与止泻剂、止吐剂、镇痛药、阿片类药物和/或非甾体抗炎剂联合施用。在一些实施方案中，所述单链可变片段CD3结合蛋白质在手术之前、期间或之后施用。

[0095] 本发明提供了包括但不限于以下实施方式：

[0096] 1.一种单链可变片段CD3结合蛋白质，其包含可变重链区(VH)、可变轻链区(VL)和接头，其中VH包含互补决定区HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3，其中VL包含互补决定区LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3，其中

[0097] (a)HC CDR1的氨基酸序列如$GX_1X_2X_3NX_4YX_5X_6N$(SEQ ID NO.2)所示，X_1是苯丙氨酸或天冬酰胺，X_2是苏氨酸、谷氨酸或甲硫氨酸，X_3是苯丙氨酸或酪氨酸，X_4是赖氨酸、苏氨酸、甘氨酸、天冬酰胺或谷氨酸，X_5是丙氨酸或脯氨酸，X_6是甲硫氨酸、亮氨酸、缬氨酸或异亮氨酸；

[0098] (b)HC CDR2的氨基酸序列如

[0099] $RIRSX_7X_8NX_9YX_{10}TX_{11}YX_{12}DX_{13}VK$(SEQ ID NO.3)所示，$X_7$是赖氨酸或甘氨酸，$X_8$是酪氨酸或丝氨酸，$X_9$是天冬酰胺或赖氨酸，$X_{10}$是丙氨酸或谷氨酸，$X_{11}$是酪氨酸或谷氨酸，$X_{12}$是丙氨酸或赖氨酸，$X_{13}$是丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、丙氨酸或谷氨酰胺；

[0100] (c)HC CDR3的氨基酸序列如$HX_{14}NFX_{15}\ X_{16}SX_{17}ISYWAX_{18}$(SEQ ID NO.4)所示，$X_{14}$是

甘氨酸、丙氨酸或苏氨酸，X_{15}是甘氨酸或天冬酰胺，X_{16}是天冬酰胺或天冬氨酸，X_{17}是酪氨酸、组氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺、亮氨酸或甘氨酸，X_{18}是酪氨酸或苏氨酸；

[0101] (d)LC CDR1的氨基酸序列如$X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}GX_{23}VX_{24}X_{25}GX_{26}$YPN(SEQ ID NO.5)所示，$X_{19}$是甘氨酸或丙氨酸，$X_{20}$是丝氨酸或谷氨酸，$X_{21}$是丝氨酸或酪氨酸，$X_{22}$是苏氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸或丝氨酸，$X_{23}$是丙氨酸或酪氨酸，$X_{24}$是苏氨酸或缬氨酸，$X_{25}$是丝氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、组氨酸或缬氨酸，$X_{26}$是天冬酰胺或酪氨酸；

[0102] (e)LC CDR2的氨基酸序列如$GX_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}$P(SEQ ID NO.6)所示，$X_{27}$是苏氨酸或异亮氨酸，$X_{28}$是赖氨酸、谷氨酸、酪氨酸、天冬酰胺或丝氨酸，$X_{29}$是苯丙氨酸、亮氨酸、谷氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸或缬氨酸，X_{30}是亮氨酸、天冬酰胺或甘氨酸，X_{31}是丙氨酸或缬氨酸；并且

[0103] (f)LC CDR3的氨基酸序列如X_{32}LWYX_{33}NX_{34}WX_{35}(SEQ ID NO.7)所示，X_{32}是缬氨酸、苏氨酸或丙氨酸，X_{33}是丝氨酸、天冬氨酸或丙氨酸，X_{34}是精氨酸或丝氨酸，X_{35}是缬氨酸、异亮氨酸或丙氨酸，

[0104] 其中X_1、X_2、X_3、X_4、X_5、X_6、X_7、X_8、X_9、X_{10}、X_{11}、X_{12}、X_{13}、X_{14}、X_{15}、X_{16}、X_{17}、X_{18}、X_{19}、X_{20}、X_{21}、X_{22}、X_{23}、X_{24}、X_{25}、X_{26}、X_{27}、X_{28}、X_{29}、X_{30}、X_{31}、X_{32}、X_{33}、X_{34}和X_{35}不同时分别是苯丙氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、丙氨酸、酪氨酸、丙氨酸、丝氨酸、甘氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、酪氨酸、甘氨酸、丝氨酸、丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、苏氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸、丝氨酸、精氨酸和缬氨酸。

[0105] 2.如实施方式1所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中所述蛋白质包含下式：

[0106] f1-r1-f2-r2-f3-r3-f4-r4-f5-r5-f6-r6-f7

[0107] 其中，r1是SEQ ID NO:2；r2是SEQ ID NO:3；r3是SEQ ID NO:4；r4是SEQ ID NO:5；r5是SEQ ID NO:6；并且r6是SEQ ID NO:7；并且其中f_1、f_2、f_3、f_4和f_5是选定的框架残基，使得所述蛋白质与SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列至少80％相同。

[0108] 3.如实施方式2所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中r1包含SEQ ID NO.29、SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.31、SEQ ID NO.32、SEQ ID NO.33、SEQ ID NO.34、SEQ ID NO.35、SEQ ID NO.36、SEQ ID NO.37、SEQ ID NO.38、SEQ ID NO.39或SEQ ID NO.40。

[0109] 4.如实施方式2所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中r2包含SEQ ID NO.41、SEQ ID NO.42、SEQ ID NO.43、SEQ ID NO.44、SEQ ID NO.45、SEQ ID NO.46、SEQ ID NO.47、SEQ ID NO.48、SEQ ID NO.49或SEQ ID NO.50。

[0110] 5.如实施方式2所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中r3包含SEQ ID NO.51、SEQ ID NO.52、SEQ ID NO.53、SEQ ID NO.54、SEQ ID NO.55、SEQ ID NO.56、SEQ ID NO.57、SEQ ID NO.58、SEQ ID NO.50或SEQ ID NO.60。

[0111] 6.如实施方式2所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中r4包含SEQ ID NO.61、SEQ ID NO.62、SEQ ID NO.63、SEQ ID NO.64、SEQ ID NO.65、SEQ ID NO.66、SEQ ID NO.67、SEQ ID NO.68、SEQ ID NO.69、SEQ ID NO.70、SEQ ID NO.71、SEQ ID NO.72或SEQ ID NO.73。

[0112] 7.如实施方式2所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中r5包含SEQ ID NO.74、SEQ ID NO.75、SEQ ID NO.76、SEQ ID NO.77、SEQ ID NO.78、SEQ ID NO.79、SEQ ID

NO.80、SEQ ID NO.81、SEQ ID NO.82、SEQ ID NO.83、SEQ ID NO.84、SEQ ID NO.85或SEQ ID NO.86。

[0113] 8.如实施方式2所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r6包含SEQ ID NO.87、SEQ ID NO.88、SEQ ID NO.89、SEQ ID NO.90、SEQ ID NO.91、SEQ ID NO.92或SEQ ID NO.93。

[0114] 9.如实施方式2-8中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r1是SEQ ID NO.39,r2是SEQ ID NO.49,r3是SEQ ID NO.51,r4是SEQ ID NO.61,r5是SEQ ID NO.86,并且r6是SEQ ID NO.87。

[0115] 10.如实施方式2-8中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r1是SEQ ID NO.30,r2是SEQ ID NO.43,r4是SEQ ID NO.64,并且r6是SEQ ID NO.89。

[0116] 11.如实施方式2-8中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r3是SEQ ID NO.55,r4是SEQ ID NO.67,r5是SEQ ID NO.77,并且r6是SEQ ID NO.92。

[0117] 12.如实施方式2-8中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r1是SEQ ID NO.31,r2是SEQ ID NO.42,r3是SEQ ID NO.60,r4是SEQ ID NO.64,r5是SEQ ID NO.79,并且r6是SEQ ID NO.91。

[0118] 13.如实施方式2-8中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r1是SEQ ID NO.35,r2是SEQ ID NO.46,r3是SEQ ID NO.56,r4是SEQ ID NO.68,并且r5是SEQ ID NO.75。

[0119] 14.如实施方式2-8中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r1是SEQ ID NO.32,r2是SEQ ID NO.47,r3是SEQ ID NO.56,r4是SEQ ID NO.65,r5是SEQ ID NO.80,并且r6是SEQ ID NO.87。

[0120] 15.如实施方式2-8中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r1是SEQ ID NO.29,r2是SEQ ID NO.44,r3是SEQ ID NO.52,r4是SEQ ID NO.73,并且r5是SEQ ID NO.76。

[0121] 16.如实施方式2-8中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r1是SEQ ID NO.33,r2是SEQ ID NO.48,r3是SEQ ID NO.57,r4是SEQ ID NO.69,并且r5是SEQ ID NO.74。

[0122] 17.如实施方式2-8中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r1是SEQ ID NO.38,r4是SEQ ID NO.62,并且r5是SEQ ID NO.81。

[0123] 18.如实施方式2-8中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r1是SEQ ID NO.37,r3是SEQ ID NO.53,r4是SEQ ID NO.70,r5是SEQ ID NO.82,并且r6是SEQ ID NO.88。

[0124] 19.如实施方式2-8中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r1是SEQ ID NO.34,r2是SEQ ID NO.47,r3是SEQ ID NO.56,r4是SEQ ID NO.68,并且r5是SEQ ID NO.75。

[0125] 20.如实施方式2-8中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r1是SEQ ID NO.29,r3是SEQ ID NO.54,r4是SEQ ID NO.71,并且r5是SEQ ID NO.83。

[0126] 21.如实施方式2-8中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r1是SEQ ID NO.33,r2是SEQ ID NO.41,r4是SEQ ID NO.63,r5是SEQ ID NO.84,并且r6是SEQ ID

NO.90。

[0127] 22.如实施方式2-8中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r1是SEQ ID NO.30,r2是SEQ ID NO.44,r3是SEQ ID NO.58,r4是SEQ ID NO.66,并且r5是SEQ ID NO.85。

[0128] 23.如实施方式2-8中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r1是SEQ ID NO.40,r2是SEQ ID NO.45,r3是SEQ ID NO.56,r5是SEQ ID NO.78,并且r6是SEQ ID NO.93。

[0129] 24.如实施方式2-8中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中r1是SEQ ID NO.36,r2是SEQ ID NO.50,r3是SEQ ID NO.59,r4是SEQ ID NO.72,并且r5是SEQ ID NO.75。

[0130] 25.如实施方式1所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有选自SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.18、SEQ ID NO.19、SEQ ID NO.20、SEQ ID NO.21、SEQ ID NO.94和SEQ ID NO.95的氨基酸序列。

[0131] 26.如实施方式1所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述接头包含如GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:1)所示的氨基酸序列。

[0132] 27.如实施方式1-26中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质与选自人CD3和食蟹猴CD3的CD3结合。

[0133] 28.如实施方式1-27中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以相当的结合亲和力(Kd)与人CD3和食蟹猴CD3结合。

[0134] 29.如实施方式1-28中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以约1nM至约200nM的人Kd(hKd)与人CD3结合并且以约1nM至约300nM的食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合。

[0135] 30.如实施方式1-29中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM、约6nM至约10nM、约11nM至约20nM、约25nM至约40nM、约40nM至约60nM、约70nM至约90nM、约100nM至约120nM、约125nM至约140nM、约145nM至约160nM、约170nM至约200nM、约210nM至约250nM、约260nM至约300nM。

[0136] 31.如实施方式1-27中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。

[0137] 32.如实施方式1-27中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约1.5倍至约2倍。

[0138] 33.如实施方式1-27中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至5倍。

[0139] 34.如实施方式1-27中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。

[0140] 35.如实施方式1-27中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。

[0141] 36.如实施方式1-27和31-35中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。

[0142] 37.如实施方式1-30中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列,其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。

[0143] 38.如实施方式1-27和31-35中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。

[0144] 39.如实施方式1-30中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列,其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。

[0145] 40.如实施方式1-27和31-35中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。

[0146] 41.如实施方式1-30中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列,其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。

[0147] 42.如实施方式1-27和31-35中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。

[0148] 43.如实施方式1-30中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列,其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。

[0149] 44.如实施方式1-27和31-35中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约1.5倍至约2倍。

[0150] 45.如实施方式1-30中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列,其中所述hKd和所述cKd为约6nM至约10nM。

[0151] 46.如实施方式1-27和31-35中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约1.5倍至约2倍。

[0152] 47.如实施方式1-30中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列,其中所述hKd和所述cKd为约6nM至约10nM。

[0153] 48.如实施方式1-27和31-35中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中

所述蛋白质具有如SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。

[0154] 49.如实施方式1-30中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列,其中所述hKd和所述cKd为约11nM至20nM。

[0155] 50.如实施方式1-27和31-35中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。

[0156] 51.如实施方式1-30中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列,其中所述hKd和所述cKd为约25nM至约40nM。

[0157] 52.如实施方式1-27和31-35中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。

[0158] 53.如实施方式1-30中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列,其中所述hKd和所述cKd为约11nM至20nM。

[0159] 54.如实施方式1-27和31-35中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.17所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。

[0160] 55.如实施方式1-30中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.17所示的氨基酸序列,其中所述hKd和所述cKd为约40nM至约60nM。

[0161] 56.如实施方式1-27和31-35中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。

[0162] 57.如实施方式1-30中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列,其中所述hKd和所述cKd为约11nM至20nM。

[0163] 58.如实施方式1-27和31-35中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.19所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。

[0164] 59.如实施方式1-30中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.19所示的氨基酸序列,其中所述hKd和所述cKd为约40nM至60nM。

[0165] 60.如实施方式1-27和31-35中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.20所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。

[0166] 61.如实施方式1-30中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.20所示的氨基酸序列,其中所述hKd和所述cKd为约11nM至约20nM。

[0167] 62.如实施方式1-27和31-35中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.21所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。

[0168] 63.如实施方式1-30中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.21所示的氨基酸序列,其中所述hKd和所述cKd为约125nM至约140nM。

[0169] 64.如实施方式1-27和31-35中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.94所示的氨基酸序列，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。

[0170] 65.如实施方式1-30中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.94所示的氨基酸序列，其中所述hKd和所述cKd为约100nM至约120nM。

[0171] 66.如实施方式1-27和31-35中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.95所示的氨基酸序列，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。

[0172] 67.如实施方式1-29中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.95所示的氨基酸序列，其中所述hKd和所述cKd为约100nM至约120nM。

[0173] 68.一种单链可变片段CD3结合蛋白质，其包含SEQ ID NO.22(野生型抗CD3)所示的序列，其中选自氨基酸位置27、28、29、31、33、34、54、55、57、59、61、63、65、102、105、106、108、114、163、164、165、166、168、170、171、173、193、194、195、196、197、231、235、237和239的一个或多个氨基酸残基被置换，

[0174] 其中

[0175] 氨基酸位置27被天冬酰胺置换，

[0176] 氨基酸位置28被谷氨酸或甲硫氨酸置换，

[0177] 氨基酸位置29被酪氨酸置换，

[0178] 氨基酸位置31被天冬酰胺、甘氨酸、谷氨酸或苏氨酸置换，

[0179] 氨基酸位置33被脯氨酸置换，

[0180] 氨基酸位置34被缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸置换，

[0181] 氨基酸位置54被甘氨酸置换，

[0182] 氨基酸位置55被丝氨酸置换，

[0183] 氨基酸位置57被赖氨酸置换，

[0184] 氨基酸位置59被谷氨酸置换，

[0185] 氨基酸位置61被谷氨酸置换，

[0186] 氨基酸位置63被赖氨酸置换，

[0187] 氨基酸位置65被天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸或谷氨酰胺置换，

[0188] 氨基酸位置102被丙氨酸或苏氨酸置换，

[0189] 氨基酸位置105被天冬酰胺置换，

[0190] 氨基酸位置106被天冬氨酸置换，

[0191] 氨基酸位置108被组氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸或亮氨酸置换，

[0192] 氨基酸位置114被苏氨酸置换，

[0193] 氨基酸位置163被丙氨酸置换，

[0194] 氨基酸位置164被谷氨酸置换，

[0195] 氨基酸位置165被酪氨酸置换，

[0196] 氨基酸位置166被苯丙氨酸、赖氨酸或丝氨酸置换，

[0197] 氨基酸位置168被酪氨酸置换，

[0198] 氨基酸位置170被缬氨酸置换，

[0199] 氨基酸位置171被天冬氨酸、赖氨酸、缬氨酸或组氨酸置换，

[0200] 氨基酸位置173被酪氨酸置换，

[0201] 氨基酸位置193被异亮氨酸置换，

[0202] 氨基酸位置194被谷氨酸、酪氨酸、天冬酰胺或丝氨酸置换，

[0203] 氨基酸位置195被亮氨酸、谷氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸或缬氨酸置换，

[0204] 氨基酸位置196被天冬酰胺或甘氨酸置换，

[0205] 氨基酸位置197被缬氨酸置换，

[0206] 氨基酸位置231被苏氨酸或丙氨酸置换，

[0207] 氨基酸位置235被天冬氨酸或丙氨酸置换，

[0208] 氨基酸位置237被丝氨酸置换，并且

[0209] 氨基酸位置239被丙氨酸或异亮氨酸置换。

[0210] 69.如实施方式68所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其在除位置27、28、29、31、33、34、54、55、57、59、61、63、65、102、105、106、108、114、163、164、165、166、168、170、171、173、193、194、195、196、197、231、235、237和239之外的氨基酸位置处包含一个或多个另外的置换。

[0211] 70.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其在位置27处包含置换。

[0212] 71.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其在位置28处包含置换。

[0213] 72.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其在位置29处包含置换。

[0214] 73.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其在位置31处包含置换。

[0215] 74.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其在位置33处包含置换。

[0216] 75.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其在位置34处包含置换。

[0217] 76.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其在位置54处包含置换。

[0218] 77.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其在位置55处包含置换。

[0219] 78.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其在位置57处包含置换。

[0220] 79.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其在位置59处包含置换。

[0221] 80.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其在位置61处包含置换。

[0222] 81.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其在位置63处包含置换。

[0223] 82.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置65处包含置换。

[0224] 83.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置102处包含置换。

[0225] 84.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置105处包含置换。

[0226] 85.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置106处包含置换。

[0227] 86.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置108处包含置换。

[0228] 87.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置114处包含置换。

[0229] 88.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置163处包含置换。

[0230] 89.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置164处包含置换。

[0231] 90.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置165处包含置换。

[0232] 91.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置166处包含置换。

[0233] 92.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置168处包含置换。

[0234] 93.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置170处包含置换。

[0235] 94.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置171处包含置换。

[0236] 95.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置173处包含置换。

[0237] 96.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置193处包含置换。

[0238] 97.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置194处包含置换。

[0239] 98.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置195处包含置换。

[0240] 99.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置196处包含置换。

[0241] 100.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置197处包含置换。

[0242] 101.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置231处包含

置换。

[0243] 102.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置235处包含置换。

[0244] 103.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置237处包含置换。

[0245] 104.如实施方式68或69所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其在位置239处包含置换。

[0246] 105.如实施方式68-104中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置34、65、102、163、197和231被置换。

[0247] 106.如实施方式68-104中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置28、57、166和235被置换。

[0248] 107.如实施方式68-104中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置108、168、194和239被置换。

[0249] 108.如实施方式68-104中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置28、55、114、166、195和237被置换。

[0250] 109.如实施方式68-104中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31、63、108、170和194被置换。

[0251] 110.如实施方式68-104中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置29、65、108、166、195和231被置换。

[0252] 111.如实施方式68-104中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置27、59、102、173和194被置换。

[0253] 112.如实施方式68-104中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31、65、108、171和193被置换。

[0254] 113.如实施方式68-104中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置34、164和195被置换。

[0255] 114.如实施方式68-104中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置33、105、171、195和231被置换。

[0256] 115.如实施方式68-104中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31、65、108、170和194被置换。

[0257] 116.如实施方式68-104中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置27、106、171和195被置换。

[0258] 117.如实施方式68-104中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31、54、165、196和235被置换。

[0259] 118.如实施方式68-104中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置28、59、108、166和196被置换。

[0260] 119.如实施方式68-104中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置34、61、108、194和239被置换。

[0261] 120.如实施方式68-104中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31、65、108、171和194被置换。

[0262] 121.如实施方式68-120中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质与选自人CD3和食蟹猴CD3的CD3结合。

[0263] 122.如实施方式68-121中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以相当的结合亲和力(Kd)与人CD3和食蟹猴CD3结合。

[0264] 123.如实施方式68-122中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以约1nM至约200nM的人Kd(hKd)与人CD3结合,并且以约1nM至约300nM的食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合。

[0265] 124.如实施方式123中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM、约6nM至约10nM、约11nM至约20nM、约25nM至约40nM、约40nM至约60nM、约70nM至约90nM、约100nM至约120nM、约125nM至约140nM、约145nM至约160nM、约170nM至约200nM、约210nM至约250nM、约260nM至约300nM。

[0266] 125.如实施方式68-121中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。

[0267] 126.如实施方式68-121中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约1.5倍至约2倍。

[0268] 127.如实施方式68-121中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。

[0269] 128.如实施方式68-121中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。

[0270] 129.如实施方式68-121中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。

[0271] 130.如实施方式68-121和125-129中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置34、65、102、163、197和231被置换,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。

[0272] 131.如实施方式68-124中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置34、65、102、163、197和231被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。

[0273] 132.如实施方式68-121和125-129中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置28、57、166和235被置换,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。

[0274] 133.如实施方式68-124中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置28、57、166和235被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。

[0275] 134.如实施方式68-121和125-129中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置108、168、194和239被置换,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。

[0276] 135.如实施方式68-124中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置108、168、194和239被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。

[0277] 136.如实施方式68-121和125-129中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置28、55、114、166、195和237被置换,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。

[0278] 137.如实施方式68-124中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置28、55、114、166、195和237被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。

[0279] 138.如实施方式68-121和125-129中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31、63、108、170和194被置换,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约1.5倍至约2倍。

[0280] 139.如实施方式68-124中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31、63、108、170和194被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约6nM至约10nM。

[0281] 140.如实施方式68-121和125-129中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置29、65、108、166、195和231被置换,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约1.5倍至约2倍。

[0282] 141.如实施方式68-124中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置29、65、108、166、195和231被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约6nM至约10nM。

[0283] 142.如实施方式68-121和125-129中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置27、59、102、173和194被置换,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。

[0284] 143.如实施方式68-124中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置27、59、102、173和194被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约11nM至20nM。

[0285] 144.如实施方式68-121和125-129中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31、65、108、171和193被置换,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。

[0286] 145.如实施方式68-124中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31、65、108、171和193被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约25nM至约40nM。

[0287] 146.如实施方式68-121和125-129中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置34、164和195被置换,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。

[0288] 147.如实施方式68-124中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置34、164和195被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约11nM至20nM。

[0289] 148.如实施方式68-121和125-129中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置33、105、171、195和231被置换,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生

型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。

[0290] 149.如实施方式68-124中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置33、105、171、195和231被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约40nM至约60nM。

[0291] 150.如实施方式68-121和125-129中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31、65、108、170和194被置换,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。

[0292] 151.如实施方式68-124中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31、65、108、170和194被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约11nM至20nM。

[0293] 152.如实施方式68-121和125-129中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置27、106、171和195被置换,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。

[0294] 153.如实施方式68-124中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置27、106、171和195被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约40nM至60nM。

[0295] 154.如实施方式68-121和125-129中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31、54、165、196和235被置换,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。

[0296] 155.如实施方式68-124中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31、54、165、196和235被置换(10B2),并且其中所述hKd和所述cKd为约11nM至约20nM。

[0297] 156.如实施方式68-121和125-129中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置28、59、108、166和196被置换,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。

[0298] 157.如实施方式68-124中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置28、59、108、166和196被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约125nM至约140nM。

[0299] 158.如实施方式68-121和125-129中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置34、61、108、194和239被置换,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。

[0300] 159.如实施方式68-124中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置34、61、108、194和239被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约100nM至约120nM。

[0301] 160.如实施方式68-121和125-129中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31、65、108、171和194被置换,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。

[0302] 161.如实施方式68-124中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31、65、108、171和194被置换,并且其中所述hKd和所述cKd为约100nM至约120nM。

[0303] 162.一种单链可变片段CD3结合蛋白质,其包含如野生型抗CD3(SEQ ID NO:22)所示的氨基酸序列,其包含可变重链区(VH)、可变轻链区(VL)、包含如GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:1)所示的氨基酸序列的接头,其中VH包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,其中VL包含互补决定区LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3,其在VH的CDR1、CDR2或CDR3以及VL的LC CDR1、LC CDR2或LC CDR3中包含至少一个突变,其中所述至少一个突变不在氨基酸位置26、30、32、

35、50、51、52、53、56、58、60、62、64、66、67、101、103、104、107、109、110、111、112、113、167、169、172、174、175、176、192、198、232、233、234、236或238处。

[0304] 163.如实施方式162所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其在选自27、28、29、31、33、34、54、55、57、59、61、63、65、102、105、106、108、114、163、164、165、166、168、170、171、173、193、194、195、196、197、231、235、237和239的氨基酸位置处包含至少一个突变。

[0305] 164.如实施方式163所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置34被突变为异亮氨酸，位置65被突变为谷氨酰胺，位置102被突变为丙氨酸，位置163被突变为丙氨酸，位置197被突变为缬氨酸，并且位置231被突变为苏氨酸。

[0306] 165.如实施方式163所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置28被突变为谷氨酸，位置57被突变为赖氨酸，位置166被突变为苯丙氨酸，并且位置235被突变为天冬氨酸。

[0307] 166.如实施方式163所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置108被突变为组氨酸，位置168被突变为酪氨酸，位置194被突变为丝氨酸，并且位置239被突变为异亮氨酸。

[0308] 167.如实施方式163所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置28被突变为甲硫氨酸，位置55被突变为丝氨酸，位置114被突变为苏氨酸，位置166被突变为苯丙氨酸，位置195被突变为亮氨酸，并且位置237被突变为丝氨酸。

[0309] 168.如实施方式163所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置31被突变为苏氨酸，位置63被突变为赖氨酸，位置108被突变为脯氨酸，位置170被突变为缬氨酸，并且位置194被突变为谷氨酸。

[0310] 169.如实施方式163所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置29被突变为酪氨酸，位置65被突变为谷氨酸，位置108被突变为脯氨酸，位置166被突变为赖氨酸，位置195被突变为谷氨酸，并且位置231被突变为苏氨酸。

[0311] 170.如实施方式163所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置27被突变为天冬酰胺，位置59被突变为谷氨酸，位置102被突变为苏氨酸，位置173被突变为酪氨酸，并且位置194被突变为酪氨酸。

[0312] 171.如实施方式163所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置31被突变为天冬酰胺，位置65被突变为丙氨酸，位置108被突变为谷氨酰胺，位置171被突变为天冬氨酸，并且位置193被突变为异亮氨酸。

[0313] 172.如实施方式163所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置34被突变为缬氨酸，位置164被突变为谷氨酸，并且位置195被突变为异亮氨酸。

[0314] 173.如实施方式163所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置33被突变为脯氨酸，位置105被突变为天冬酰胺，位置171被突变为赖氨酸，位置195被突变为甲硫氨酸，并且位置231被突变为丙氨酸。

[0315] 174.如实施方式163所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置31被突变为甘氨酸，位置65被突变为谷氨酸，位置108被突变为脯氨酸，位置170被突变为缬氨酸，并且位置194被突变为谷氨酸。

[0316] 175.如实施方式163所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置27被突变为天冬酰胺，位置106被突变为天冬氨酸，位置171被突变为组氨酸，并且位置195被突变

为缬氨酸。

[0317] 176.如实施方式163所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31被突变为天冬酰胺,位置54被突变为甘氨酸,位置165被突变为酪氨酸,位置196被突变为天冬酰胺,并且位置235被突变为丙氨酸。

[0318] 177.如实施方式163所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置28被突变为谷氨酸,位置59被突变为谷氨酸,位置108被突变为亮氨酸,位置166被突变为丝氨酸,并且位置196被突变为甘氨酸。

[0319] 178.如实施方式163所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置34被亮氨酸置换,氨基酸位置61被谷氨酸置换,氨基酸位置108被脯氨酸置换,氨基酸位置194被天冬酰胺置换,并且氨基酸位置239被丙氨酸置换。

[0320] 179.如实施方式163所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31被谷氨酸置换,氨基酸位置65被天冬氨酸置换,氨基酸位置108被甘氨酸置换,氨基酸位置171被缬氨酸置换,并且氨基酸位置194被谷氨酸置换。

[0321] 180.如实施方式162-179中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质与选自人CD3、食蟹猴CD3的CD3结合。

[0322] 181.如实施方式162-180中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以相当的结合亲和力(Kd)与人CD3、食蟹猴CD3结合。

[0323] 182.如实施方式162-181中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以约1nM至约200nM的人Kd(hKd)与人CD3结合,并且以约1nM至约300nM的食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合。

[0324] 183.如实施方式182中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM、约6nM至约10nM、约11nM至约20nM、约25nM至约40nM、约40nM至约60nM、约70nM至约90nM、约100nM至约120nM、约125nM至约140nM、约145nM至约160nM、约170nM至约200nM、约210nM至约250nM、约260nM至约300nM。

[0325] 184.如实施方式162-180中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。

[0326] 185.如实施方式162-180中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约1.5倍至约2倍。

[0327] 186.如实施方式162-180中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。

[0328] 187.如实施方式162-180中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约

6倍至约15倍。

[0329] 188.如实施方式162-180中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质以人Kd(hKd)与人CD3结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴CD3结合,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。

[0330] 189.如实施方式162-180和184-188中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,氨基酸位置34被突变为异亮氨酸,位置65被突变为谷氨酰胺,位置102被突变为丙氨酸,位置163被突变为丙氨酸,位置197被突变为缬氨酸,并且位置321被突变为苏氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。

[0331] 190.如实施方式162-183中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,氨基酸位置34被突变为异亮氨酸,位置65被突变为谷氨酰胺,位置102被突变为丙氨酸,位置163被突变为丙氨酸,位置197被突变为缬氨酸,并且位置231被突变为苏氨酸,其中所述hKd和所述cKd为约3nM至5nM。

[0332] 191.如实施方式162-180和184-188中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置28被突变为谷氨酸,位置57被突变为赖氨酸,位置166被突变为苯丙氨酸,并且位置235被突变为天冬氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。

[0333] 192.如实施方式162-183中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置28被突变为谷氨酸,位置57被突变为赖氨酸,位置166被突变为苯丙氨酸,并且位置235被突变为天冬氨酸,其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。

[0334] 193.如实施方式162-180和184-188中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置108被突变为组氨酸,位置168被突变为酪氨酸,位置194被突变为丝氨酸,并且位置239被突变为异亮氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。

[0335] 194.如实施方式162-183中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置108被突变为组氨酸,位置168被突变为酪氨酸,位置194被突变为丝氨酸,位置239被突变为异亮氨酸,其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。

[0336] 195.如实施方式162-180和184-188中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置28被突变为甲硫氨酸,位置55被突变为丝氨酸,位置114被突变为苏氨酸,位置166被突变为苯丙氨酸,位置195被突变为亮氨酸,并且位置237被突变为丝氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd与具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力大致相同。

[0337] 196.如实施方式162-183中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置28被突变为甲硫氨酸,位置55被突变为丝氨酸,位置114被突变为苏氨酸,位置166被突变为苯丙氨酸,位置195被突变为亮氨酸,并且位置237被突变为丝氨酸,其中所述hKd和所述cKd为约3nM至约5nM。

[0338] 197.如实施方式162-180和184-188中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31被突变为苏氨酸,位置63被突变为赖氨酸,位置108被突变为脯氨酸,

位置170被突变为缬氨酸，并且位置194被突变为谷氨酸，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约1.5倍至约2倍。

[0339] 198.如实施方式162-183中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置31被突变为苏氨酸，位置63被突变为赖氨酸，位置108被突变为脯氨酸，位置170被突变为缬氨酸，位置194被突变为谷氨酸，其中所述hKd和所述cKd为约6nM至约10nM。

[0340] 199.如实施方式162-180和184-188中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置29被突变为酪氨酸，位置65被突变为谷氨酸，位置108被突变为脯氨酸，位置166被突变为赖氨酸，位置195被突变为谷氨酸，并且位置231被突变为苏氨酸，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约1.5倍至约2倍。

[0341] 200.如实施方式162-183中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置29被突变为酪氨酸，位置65被突变为谷氨酸，位置108被突变为脯氨酸，位置166被突变为赖氨酸，位置195被突变为谷氨酸，并且位置231被突变为苏氨酸，其中所述hKd和所述cKd为约6nM至约10nM。

[0342] 201.如实施方式162-180和184-188中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置27被突变为天冬酰胺，位置59被突变为谷氨酸，位置102被突变为苏氨酸，位置173被突变为酪氨酸，并且位置194被突变为酪氨酸，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。

[0343] 202.如实施方式162-183中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置27被突变为天冬酰胺，位置59被突变为谷氨酸，位置102被突变为苏氨酸，位置173被突变为酪氨酸，并且位置194被突变为酪氨酸，其中所述hKd和所述cKd为约11nM至20nM。

[0344] 203.如实施方式162-180和184-188中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置31被突变为天冬酰胺，位置65被突变为丙氨酸，位置108被突变为谷氨酰胺，位置171被突变为天冬氨酸，并且位置193被突变为异亮氨酸，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。

[0345] 204.如实施方式162-183中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置31被突变为天冬酰胺，位置65被突变为丙氨酸，位置108被突变为谷氨酰胺，位置171被突变为天冬氨酸，并且位置193被突变为异亮氨酸，其中所述hKd和所述cKd为约25nM至约40nM。

[0346] 205.如实施方式162-180和184-188中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置34被突变为缬氨酸，位置164被突变为谷氨酸，并且位置195被突变为异亮氨酸，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。

[0347] 206.如实施方式162-183中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置34被突变为缬氨酸，位置164被突变为谷氨酸，并且位置195被突变为异亮氨酸，其中所述hKd和所述cKd为约11nM至20nM。

[0348] 207.如实施方式162-180和184-188中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置33被突变为脯氨酸,位置90被突变为天冬酰胺,位置105被突变为天冬酰胺,位置171被突变为赖氨酸,位置195被突变为甲硫氨酸,并且位置231被突变为丙氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。

[0349] 208.如实施方式162-183中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置33被突变为脯氨酸,位置90被突变为天冬酰胺,位置105被突变为天冬酰胺,位置171被突变为赖氨酸,位置195被突变为甲硫氨酸,并且位置231被突变为丙氨酸,其中所述hKd和所述cKd为约40nM至60nM。

[0350] 209.如实施方式162-180和184-188中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31被突变为甘氨酸,位置65被突变为谷氨酸,位置108被突变为脯氨酸,位置170被突变为缬氨酸,并且位置194被突变为谷氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。

[0351] 210.如实施方式162-183中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31被突变为甘氨酸,位置65被突变为谷氨酸,位置108被突变为脯氨酸,位置170被突变为缬氨酸,并且位置194被突变为谷氨酸,其中所述hKd和所述cKd为约11nM至20nM。

[0352] 211.如实施方式162-180和184-188中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置27被突变为天冬酰胺,位置106被突变为天冬氨酸,位置171被突变为组氨酸,并且位置195被突变为缬氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约6倍至约15倍。

[0353] 212.如实施方式162-183中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置27被突变为天冬酰胺,位置106被突变为天冬氨酸,位置171被突变为组氨酸,并且位置195被突变为缬氨酸,其中所述hKd和所述cKd为约40nM至60nM。

[0354] 213.如实施方式162-180和184-188中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31被突变为天冬酰胺,位置54被突变为甘氨酸,位置165被突变为酪氨酸,位置196被突变为天冬酰胺,并且位置235被突变为丙氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约3倍至约5倍。

[0355] 214.如实施方式162-183中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置31被突变为天冬酰胺,位置54被突变为甘氨酸,位置165被突变为酪氨酸,位置196被突变为天冬酰胺,并且位置235被突变为丙氨酸,其中所述hKd和所述cKd为约11nM至约20nM。

[0356] 215.如实施方式162-180和184-188中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置28被突变为谷氨酸,位置59被突变为谷氨酸,位置108被突变为亮氨酸,位置166被突变为丝氨酸,并且位置196被突变为甘氨酸,并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。

[0357] 216.如实施方式162-183中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中氨基酸位置28被突变为谷氨酸,位置59被突变为谷氨酸,位置108被突变为亮氨酸,位置166被突

变为丝氨酸，并且位置196被突变为甘氨酸，其中所述hKd和所述cKd为约125nM至约140nM。

[0358] 217.如实施方式162-180和184-188中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置34被突变为亮氨酸，氨基酸位置61被突变为谷氨酸，氨基酸位置108被突变为脯氨酸，氨基酸位置194被突变为天冬酰胺，氨基酸位置239被突变为丙氨酸，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。

[0359] 218.如实施方式162-183中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置34被突变为亮氨酸，氨基酸位置61被突变为谷氨酸，氨基酸位置108被突变为脯氨酸，氨基酸位置194被突变为天冬酰胺，氨基酸位置239被突变为丙氨酸，其中所述hKd和所述cKd为约100nM至约120nM。

[0360] 219.如实施方式162-180和184-188中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置31被突变为谷氨酸，氨基酸位置65被突变为天冬氨酸，氨基酸位置108被突变为甘氨酸，氨基酸位置171被突变为缬氨酸，并且氨基酸位置194被突变为谷氨酸，并且其中所述hKd和所述cKd是具有如野生型抗CD3(SEQ ID NO.22)所示序列的蛋白质对CD3的结合亲和力的约20倍至约50倍。

[0361] 220.如实施方式162-183中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中氨基酸位置31被突变为谷氨酸，氨基酸位置65被突变为天冬氨酸，氨基酸位置108被突变为甘氨酸，氨基酸位置171被突变为缬氨酸，并且氨基酸位置194被突变为谷氨酸，并且其中所述hKd和所述cKd为约100nM至约120nM。

[0362] 221.如前述实施方式中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质，其中所述蛋白质不与小鼠CD3结合。

[0363] 222.编码根据实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质的多核苷酸。

[0364] 223.包含如实施方式222所述的多核苷酸的载体。

[0365] 224.用根据实施方式223所述的载体转化的宿主细胞。

[0366] 225.一种药物组合物，其包含(i)根据实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质、根据实施方式232所述的多核苷酸、根据实施方式223所述的载体或根据实施方式224所述的宿主细胞，和(ii)药学上可接受的载体。

[0367] 226.一种产生根据实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质的方法，所述方法包括在允许所述单链可变片段CD3结合蛋白质表达的条件下培养用包含编码根据实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质的核酸序列的载体转化或转染的宿主，以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。

[0368] 227.一种治疗或改善增生性疾病、肿瘤疾病、炎性疾病、免疫性病症、自身免疫病、感染性疾病、病毒性疾病、变态反应、寄生虫反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病的方法，其包括向有需要的受试者施用根据实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质。

[0369] 228.如实施方式227所述的方法，其中所述受试者是人。

[0370] 229.如实施方式228所述的方法，其中所述方法进一步包括与根据实施方式1-138中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质联合施用药剂。

[0371] 230.一种多特异性结合蛋白质,其包含根据实施方式1、实施方式68或实施方式162所述的单链可变片段CD3结合蛋白质。

[0372] 231.一种抗体,其包含根据实施方式1、实施方式68或实施方式162所述的单链可变片段CD3结合蛋白质。

[0373] 232.一种多特异性抗体、双特异性抗体、单结构域抗体、可变重链结构域、肽或配体,其包含根据实施方式1、实施方式68或实施方式162所述的单链可变片段CD3结合蛋白质。

[0374] 233.一种抗体,其包含根据实施方式1、实施方式68或实施方式162所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述抗体是scFv抗体。

[0375] 234.一种多特异性结合蛋白质或抗体,其包含根据实施方式1、实施方式68或实施方式162所述的单链可变片段CD3结合蛋白质和血清白蛋白结合域。

[0376] 235.如实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列。

[0377] 236.如实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列。

[0378] 237.如实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列。

[0379] 238.如实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.19所示的氨基酸序列。

[0380] 239.如实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.94所示的氨基酸序列。

[0381] 240.如实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列。

[0382] 241.如实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列。

[0383] 242.如实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列。

[0384] 243.如实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列。

[0385] 244.如实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列。

[0386] 245.如实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列。

[0387] 246.如实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.17所示的氨基酸序列。

[0388] 247.如实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列。

[0389] 248.如实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.20所示的氨基酸序列。

[0390] 249.如实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.21所示的氨基酸序列。

[0391] 250.如实施方式1-221中任一项所述的单链可变片段CD3结合蛋白质,其中所述蛋白质具有如SEQ ID NO.95所示的氨基酸序列。

[0392] 实施例

[0393] 实施例1:对人CD3ε具有不同亲和力的抗CD3 scFv变体的鉴定

[0394] 亲本抗CD3ε噬菌体的表征

[0395] 亲本抗CD3ε显示出与生物素-CD3ε的良好结合以及与生物素-HSA的弱结合(图1)。

[0396] 抗CD3εscFv噬菌体文库

[0397] 为重链CDR1、重链CDR2、重链CDR3、轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3结构域提供单置换文库。在图2中突出显示的区域中示出了在每个结构域中变化的氨基酸残基。通过NNN诱变,一次改变一个残基。

[0398] 克隆的选择和结合亲和力的测定

[0399] 将单置换文库与生物素化的hu-CD3ε结合,洗涤,洗脱,并计数。使用生物素化的食蟹猴CD3作为第1轮选择靶标,并在来自两个独立文库的组合噬菌体结合后洗涤4小时(约2次选择)。使用生物素化的hu-CD3作为第2轮选择靶标,并在两个文库结合后洗涤3小时(<2次选择)。将通过PCR从第二轮选择获得的插入物亚克隆到pcDNA3.4 His6表达载体("His6"被公开为SEQ ID NO:105)中。挑选180个克隆,并将DNA进行纯化,测序,并转染到Expi293中。选择对人CD3ε具有一定亲和力的一组16个克隆进行更精确的K_d测定(图3)。

[0400] 实施例2:细胞毒性测定

[0401] 在体外评价含有实施例1中鉴定的抗CD3 scFv变体的针对CD20和CD3的双特异性抗体对$CD20^+$靶细胞的T细胞依赖性细胞毒性的介导。

[0402] 在含有实施例1中鉴定的抗CD3 scFv变体的CD20-CD3双特异性抗体的存在下,将荧光标记的$CD20^+$REC-1细胞(套细胞淋巴瘤细胞系,ATCC CRL-3004)与作为效应细胞的从随机供体分离的PBMC或CB15T-细胞(标准化的T细胞系)一起温育。在潮湿的培养箱中于37℃下温育4h后,在分光荧光计中测定荧光染料从靶细胞向上清液中的释放。没有与含有实施例1中鉴定的抗CD3 scFv变体的CD20-CD3双特异性抗体一起温育的靶细胞和在温育结束时通过加入皂苷而完全裂解的靶细胞分别作为阴性和阳性对照。

[0403] 基于所测定的剩余活靶细胞,根据下式计算特定细胞裂解的百分比:[1-(活靶标数$_{(样品)}$/活靶标数$_{(自发的)}$)]×100%。使用GraphPad软件通过非线性回归/4参数逻辑拟合来计算S形剂量响应曲线和EC_{50}值。利用Prism软件通过4参数逻辑拟合分析,使用针对给定变体浓度获得的裂解值计算S形剂量-响应曲线。

[0404] 实施例3:对人CD3ε具有不同亲和力的抗CD3 scFv变体的热稳定性

[0405] 蛋白质的疏水暴露温度(T_h)对应于峰值染料荧光的拐点的导数,并且已知与熔解温度(T_m)—蛋白质稳定性的量度—相关。该研究的目的是评估几种抗人CD3εscFv变体的T_h。

[0406] 蛋白质产生

[0407] 将抗人CD3εscFv结合域的序列克隆到pcDNA 3.4(Invitrogen)中,其之前为前导序列,之后是6x组氨酸标签(SEQ ID NO:105)。将Expi293F细胞(Life Technologies A14527)以0.2-8×1e6个细胞/mL悬浮保持在最佳生长瓶(Optimum Growth Flasks)

(Thomson)中的Expi 293培养基中。根据Expi293表达系统试剂盒(Life Technologies，A14635)方案，将纯化的质粒DNA转染到Expi293F细胞中，并在转染后保持4-6天。通过亲和色谱法和脱盐色谱法对条件培养基进行部分纯化。抗人CD3εscFv蛋白质用Amicon Ultra离心过滤单元(EMD Millipore)浓缩，施加到Superdex 200尺寸排阻培养基(GE Healthcare)中，并溶解在含有赋形剂的中性缓冲液中。通过SDS-PAGE和分析SEC(尺寸排阻色谱法)评估级分合并和最终纯度。使用SpectraMax M2(Molecular Devices)和UV透明的96孔板(Corning 3635)在280nm处测定纯化的蛋白质溶液的吸光度，并从摩尔消光系数计算它们的浓度。

[0408] 差示扫描荧光法

[0409] 将纯化的抗人CD3εscFv蛋白质稀释到0.2至0.25 mg/mL范围内的浓度，连同含有赋形剂的中性缓冲液中0.15％DMSO终浓度的5xSYPRO橙染料(Life Technologies S6651)一起放入MicroAmpEnduraPlate光学微板和胶膜(Applied Biosystems 4483485和4311971)中。将含有稀释的蛋白质和染料混合物的板装载到ABI 7500快速实时PCR仪(Applied Biosytems)中，并使其经受25℃至95℃的多步热梯度。热梯度包括在每一摄氏度步骤保持两分钟，在500 nm处激发并用ROX过滤器收集发射。图4中呈现了几种纯化的抗人CD3εscFv蛋白质的T_h(以摄氏度为单位)。

[0410]

SEQ ID NO:	描述	氨基酸序列
1	接头	GGGGSGGGGSGGGGS
2	具有变异位置的 HC CDR1	$GX_1X_2X_3NX_4YX_5X_6N$
3	具有变异位置的 HC CDR2	R I R S X_7 X_8 N X_9 Y X_{10} T X_{11} Y X_{12} D X_{13} V K
4	具有变异位置的 HC CDR3	H X_{14} N F X_{15} X_{16} S X_{17} I S Y W A X_{18}
5	具有变异位置的 LC CDR1	X_{19} X_{20} X_{21} X_{22} G X_{23} V X_{24} X_{25} G X_{26} Y P N
6	具有变异位置的 LC CDR2	G X_{27} X_{28} X_{29} X_{30} X_{31} P
7	具有变异位置的 LC CDR3	X_{32} L W Y X_{33} N X_{34} W X_{35}
8	抗 CD3，克隆 2B2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA

[0411]

		EYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL
9	抗 CD3，克隆 9F2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFEFNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNKYATYYADSVKDRFTISRD DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSFGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYDNRWVFGGGTKLTVL
10	抗 CD3,克隆 5A2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRD DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSHISYW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGYVTSGNYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTSFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWIFGGGTKLTVL
11	抗 CD3,克隆 6A2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFMFNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRD DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYW ATWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSFGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTKLLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNSWVFGGGTKLTVL
12	抗 CD3,克隆 2D2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYKDSVKDRFTISRD DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSPISYW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVVSGNYPNWVQQKPGQAP RGLIGGTEFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
13	抗 CD3,克隆 3F2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTYNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADEVKDRFTISRD DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSPISYW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSKGAVTSGNYPNWVQQKPGQAP RGLIGGTKELAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE

[0412]

		AEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL
14	抗 CD3,克隆 1A2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGNTFNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYETYYADSVKDRFTISRD DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHTNFGNSYISYW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTYFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
15	抗 CD3,克隆 1C2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNNYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADAVKDRFTISR DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSQISY WAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQE PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTDGNYPNWVQQKPGQA PRGLIGGIKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
16	抗 CD3,克隆 2E4	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAVNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRD DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGESTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTKILAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
17	抗 CD3,克隆 10E4	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYPMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRD DSKNTAYLQMNNLKNEDTAVYYCVRHGNFNNSYISYW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTKGNYPNWVQQKPGQAP RGLIGGTKMLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED EAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
18	抗 CD3,克隆 2H2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNGYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADEVKDRFTISRD DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSPISYW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVVSGNYPNWVQQKPGQAP RGLIGGTEFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL

[0413]

19	抗 CD3,克隆 2A4	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGNTFNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRD DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGDSYISYW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTHGNYPNWVQQKPGQAP RGLIGGTKVLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
20	抗 CD3,克隆 10B2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNNYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSGYNNYATYYADSVKDRFTISRD DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSYTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAP RGLIGGTKFNAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYANRWVFGGGTKLTVL
21	抗 CD3，克隆 1G4	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFEFNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYETYYADSVKDRFTISRD DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSLISYW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSSGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTKFGAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
22	野生型抗 CD3	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRD DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
23	野生型抗 CD3 HC CDR1	GFTFNKYAMN
24	野生型抗 CD3 HC CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVK
25	野生型抗 CD3 HC	HGNFGNSYISYWAY

[0414]

	CDR3	
26	野生型抗 CD3 LC CDR1	GSSTGAVTSGNYPN
27	野生型抗 CD3 LC CDR2	GTKFLAP
28	野生型抗 CD3 LC CDR3	VLWYSNRWV
29	HC CDR1 变体 1	GNTFNKYAMN
30	HC CDR1 变体 2	GFEFNKYAMN
31	HC CDR1 变体 3	GFMFNKYAMN
32	HC CDR1 变体 4	GFTYNKYAMN
33	HC CDR1 变体 5	GFTFNNYAMN
34	HC CDR1 变体 6	GFTFNGYAMN
35	HC CDR1 变体 7	GFTFNTYAMN
36	HC CDR1 变体 8	GFTFNEYAMN
37	HC CDR1 变体 9	GFTFNKYPMN
38	HC CDR1 变体 10	GFTFNKYAVN
39	HC CDR1 变体 11	GFTFNKYAIN
40	HC CDR1 变体 12	GFTFNKYALN
41	HC CDR2 变体 1	RIRSGYNNYATYYADSVK
42	HC CDR2 变体 2	RIRSKSNNYATYYADSVK
43	HC CDR2 变体 3	RIRSKYNKYATYYADSVK
44	HC CDR2 变体 4	RIRSKYNNYETYYADSVK
45	HC CDR2 变体 5	RIRSKYNNYATEYADSVK
46	HC CDR2 变体 6	RIRSKYNNYATYYKDSVK
47	HC CDR2 变体 7	RIRSKYNNYATYYADEVK
48	HC CDR2 变体 8	RIRSKYNNYATYYADAVK
49	HC CDR2 变体 9	RIRSKYNNYATYYADQVK
50	HC CDR2 变体 10	RIRSKYNNYATYYADDVK
51	HC CDR3 变体 1	HANFGNSYISYWAY

[0415]

52	HC CDR3 变体 2	HTNFGNSYISYWAY
53	HC CDR3 变体 3	HGNFNNSYISYWAY
54	HC CDR3 变体 4	HGNFGDSYISYWAY
55	HC CDR3 变体 5	HGNFGNSHISYWAY
56	HC CDR3 变体 6	HGNFGNSPISYWAY
57	HC CDR3 变体 7	HGNFGNSQISYWAY
58	HC CDR3 变体 8	HGNFGNSLISYWAY
59	HC CDR3 变体 9	HGNFGNSGISYWAY
60	HC CDR3 变体 10	HGNFGNSYISYWAT
61	LC CDR1 变体 1	ASSTGAVTSGNYPN
62	LC CDR1 变体 2	GESTGAVTSGNYPN
63	LC CDR1 变体 3	GSYTGAVTSGNYPN
64	LC CDR1 变体 4	GSSFGAVTSGNYPN
65	LC CDR1 变体 5	GSSKGAVTSGNYPN
66	LC CDR1 变体 6	GSSSGAVTSGNYPN
67	LC CDR1 变体 7	GSSTGYVTSGNYPN
68	LC CDR1 变体 8	GSSTGAVVSGNYPN
69	LC CDR1 变体 9	GSSTGAVTDGNYPN
70	LC CDR1 变体 10	GSSTGAVTKGNYPN
71	LC CDR1 变体 11	GSSTGAVTHGNYPN
72	LC CDR1 变体 12	GSSTGAVTVGNYPN
73	LC CDR1 变体 13	GSSTGAVTSGYYPN
74	LC CDR2 变体 1	GIKFLAP
75	LC CDR2 变体 2	GTEFLAP
76	LC CDR2 变体 3	GTYFLAP
77	LC CDR2 变体 4	GTSFLAP
78	LC CDR2 变体 5	GTNFLAP
79	LC CDR2 变体 6	GTKLLAP
80	LC CDR2 变体 7	GTKELAP

[0416]

81	LC CDR2 变体 8	GTKILAP
82	LC CDR2 变体 9	GTKMLAP
83	LC CDR2 变体 10	GTKVLAP
84	LC CDR2 变体 11	GTKFNAP
85	LC CDR2 变体 12	GTKFGAP
86	LC CDR2 变体 13	GTKFLVP
87	LC CDR3 变体 1	TLWYSNRWV
88	LC CDR3 变体 2	ALWYSNRWV
89	LC CDR3 变体 3	VLWYDNRWV
90	LC CDR3 变体 4	VLWYANRWV
91	LC CDR3 变体 5	VLWYSNSWV
92	LC CDR3 变体 6	VLWYSNRWI
93	LC CDR3 变体 7	VLWYSNRWA
94	抗 CD3,克隆 2G5	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYALNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATEYADSVKDRFTISRD DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSPISYW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTNFLAPGTPERFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWAFGGGTKLTVL
95	抗 CD3,克隆 8A5	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNEYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADDVKDRFTISR DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSGISY WAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQE PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTVGNYPNWVQQKPGQA PRGLIGGTEFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED EAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
96	示例性接头序列	(GS)n
97	示例性接头序列	(GGS)n
98	示例性接头序列	(GGGS)n
99	示例性接头序列	(GGSG)n

[0417]

100	示例性接头序列	(GGSGG)n
101	示例性接头序列	(GGGGS)n
102	示例性接头序列	(GGGGG)n
103	示例性接头序列	(GGG)n
104	示例性接头序列	(GGGGS)4
105	6X 组氨酸	HHHHHH

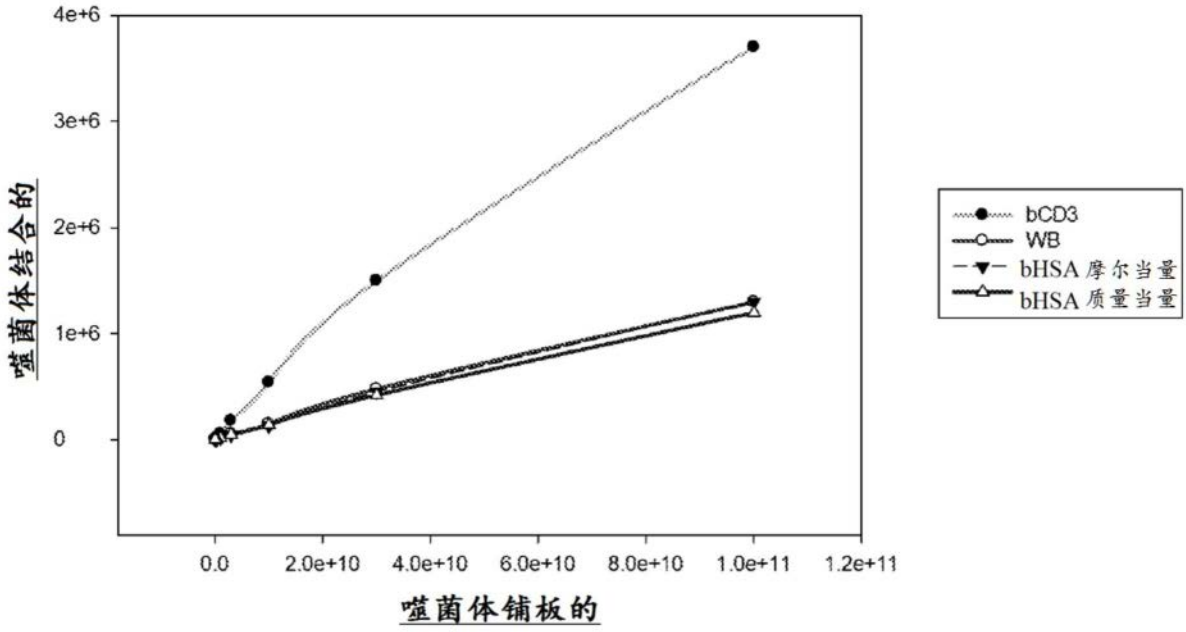


图1

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNW
VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS
RDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYIS
YWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQ
EPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG
QAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ
PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL

图2

抗CD3ε scFv	KD (nM) 人CD3ε	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	KD (nM) 食蟹猴CD3ε	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	食蟹猴/人之比
野生型	4.4	4.71E+05	2.07E-03	3.9	4.63E+05	1.83E-03	0.9
2B2	3.8	6.08E+05	2.32E-03	3.5	5.57E+05	1.93E-03	0.9
9F2	4.1	3.61E+05	1.33E-03	3.4	3.38E+05	1.05E-03	0.8
5A2	4.3	5.66E+05	2.36E-03	4.2	4.75E+05	1.93E-03	1.0
6A2	4.7	5.22E+05	2.48E-03	4.9	4.56E+05	2.22E-03	1.0
2D2	6.4	5.27E+05	3.38E-03	6.6	4.71E+05	3.09E-03	1.0
3F2	8.0	7.04E+05	5.02E-03	6.6	7.12E+05	4.38E-03	0.8
2E4	14.4	4.16E+05	5.99E-03	13.2	4.04E+05	5.32E-03	0.9
2H2	16.0	5.87E+05	9.06E-03	16.0	5.25E+05	8.37E-03	1.0
10B2	17.9	4.90E+05	8.74E-03	16.6	4.93E+05	8.15E-03	0.9
1A2	19.9	5.99E+05	1.19E-02	17	5.31E+05	9.03E-03	0.9
1C2	36.8	6.63E+05	2.44E-02	30	6.69E+05	1.97E-02	0.8
2A4	46.3	3.64E+05	1.66E-02	43.4	3.53E+05	1.53E-02	0.9
10E4	49.8	5.22E+05	2.60E-02	46.8	5.08E+05	2.38E-02	0.9
8A5	109	7.46E+05	8.10E-02	103	7.23E+05	7.44E-02	0.9
2G5	117	9.94E+05	1.15E-01	115	9.64E+05	1.11E-01	1.0
1G4	132.9	1.67E+05	2.20E-02	133.7	1.64E+05	2.19E-02	1.0

图3

抗huCD3ε变体	T_h (^{0}C)
野生型	59.2
2B2	57.4
3F2	52.2
2E4	55
2H2	53
10B2	51.5
2A4	56.2
2G5	58
1G4	60.3

图4