202112824

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：TW 202112824 A

(43)公開日：中華民國 110 (2021) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：109125975　(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 07 月 31 日

(51)Int. Cl.：　*C07K16/28* (2006.01)　*A61K39/395* (2006.01)

C07H21/04 (2006.01)　*C12N15/63* (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/08/02　德國　10 2019 121 022.4

2019/08/02　美國　62/882,364

(71)申請人：德商英麥提克生物技術股份有限公司 (德國) IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (DE)

德國

(72)發明人：佐拉　加百列 PSZOLLA, GABRIELE (DE)；霍夫曼　馬丁 HOFMANN, MARTIN (DE)；尤佛多本　菲力士 UNVERDORBEN, FELIX (DE)；胡特　麥克 HUTT, MEIKE (DE)；馬友若　多明尼克 MAURER, DOMINIK (DE)；邦克　賽巴斯汀 BUNK, SEBASTIAN (DE)

(74)代理人：李世章；彭國洋

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：21 項　圖式數：10　共 306 頁

(54)名稱

進一步與 MHC 分子結合的募集因子

(57)摘要

本發明涉及針對 MHC 提呈靶抗原 (TA) 的雙特異性抗原結合蛋白。本發明特別提出了包含至少兩個抗原結合位點（A 和 B）的雙特異性抗原結合蛋白，其中，抗原結合位點 A 與 CD3 結合而抗原結合位點 B 與靶抗原 (TA) 肽/MHC 複合體結合。特別地，本發明的雙特異性抗原結合蛋白包含親和力下降的新型改造抗 CD3 抗體的 V_L 和 V_H 結構域的 CDR。本發明的雙特異性抗原結合蛋白可用於診斷、治療和預防 TA 相關疾病，例如，表達腫瘤相關抗原 (TAA) 的癌性疾病。還提出了編碼本發明雙特異性抗原結合蛋白的核酸、包含這些核酸的載體、表達抗原結合蛋白的重組細胞以及包含本發明雙特異性抗原結合蛋白的藥物組合物。

The present invention concerns bispecific antigen binding proteins directed against MHC presented target antigens (TA). The invention in particular provides bispecific antigen binding proteins comprising at least two antigen binding sites (A and B), wherein the antigen binding site A binds to CD3 and the antigen binding site B binds to a target antigenic (TA) peptide/MHC complex. The bispecific antigen binding proteins of the invention comprise, in particular, the CDRs of the VL and VH domains of novel engineered anti-CD3 antibodies having a reduced affinity. The bispecific antigen binding proteins of the invention are of use for the diagnosis, treatment and prevention of TA associated diseases, such as tumor-associated antigen (TAA) expressing cancerous diseases. Further provided are nucleic acids encoding the bispecific antigen binding protein of the invention, vectors comprising these nucleic acids, recombinant cells expressing the antigen binding protein and pharmaceutical compositions comprising the bispecific antigen binding proteins of the invention.

TW 202112824 A

指定代表圖：

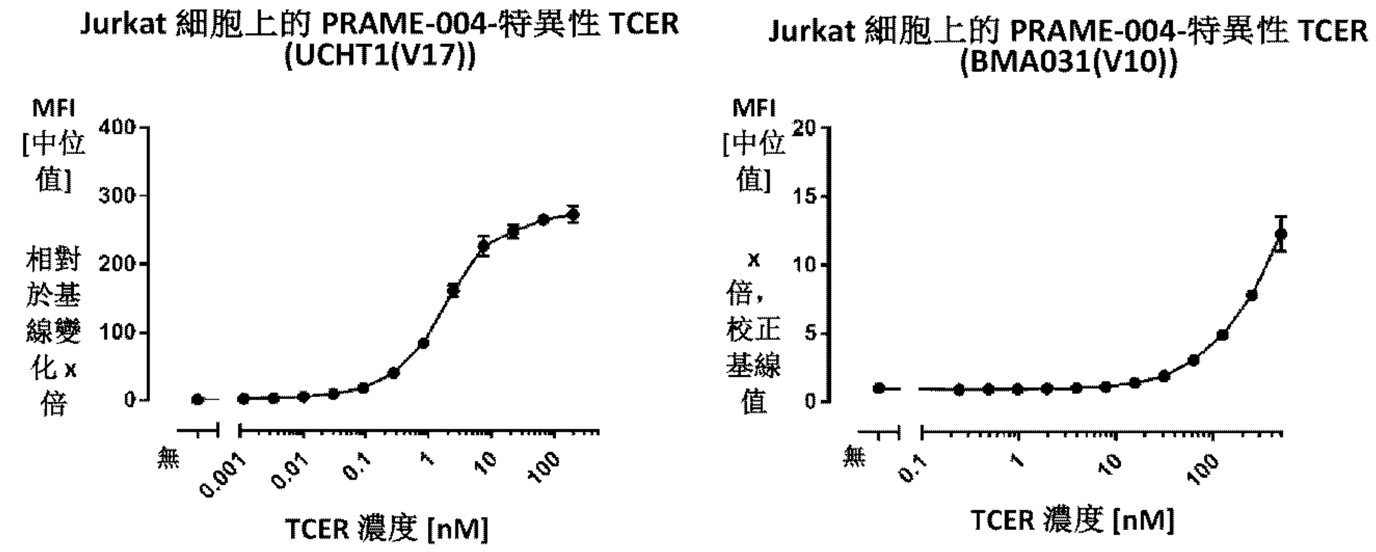


圖 3

202112824

【發明摘要】

【中文發明名稱】進一步與 MHC 分子結合的募集因子

【英文發明名稱】RECRUITING AGENT FURTHER BINDING AN MHC MOLECULE

【中文】

本發明涉及針對 MHC 提呈靶抗原（TA）的雙特異性抗原結合蛋白。本發明特別提出了包含至少兩個抗原結合位點（A 和 B）的雙特異性抗原結合蛋白，其中，抗原結合位點 A 與 CD3 結合而抗原結合位點 B 與靶抗原（TA）肽/MHC 複合體結合。特別地，本發明的雙特異性抗原結合蛋白包含親和力下降的新型改造抗 CD3 抗體的 V_L 和 V_H 結構域的 CDR。本發明的雙特異性抗原結合蛋白可用於診斷、治療和預防 TA 相關疾病，例如，表達腫瘤相關抗原（TAA）的癌性疾病。還提出了編碼本發明雙特異性抗原結合蛋白的核酸、包含這些核酸的載體、表達抗原結合蛋白的重組細胞以及包含本發明雙特異性抗原結合蛋白的藥物組合物。

【英文】

The present invention concerns bispecific antigen binding proteins directed against MHC presented target antigens (TA). The invention in particular provides bispecific antigen binding proteins comprising at least two antigen binding sites (A and B), wherein the antigen binding site A binds to CD3 and the antigen binding site B binds to a target antigenic (TA) peptide/MHC complex. The bispecific antigen binding proteins

of the invention comprise, in particular, the CDRs of the VL and VH domains of novel engineered anti-CD3 antibodies having a reduced affinity. The bispecific antigen binding proteins of the invention are of use for the diagnosis, treatment and prevention of TA associated diseases, such as tumor-associated antigen (TAA) expressing cancerous diseases. Further provided are nucleic acids encoding the bispecific antigen binding protein of the invention, vectors comprising these nucleic acids, recombinant cells expressing the antigen binding protein and pharmaceutical compositions comprising the bispecific antigen binding proteins of the invention.

【指定代表圖】第（３）圖。

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】進一步與 MHC 分子結合的募集因子

【英文發明名稱】RECRUITING AGENT FURTHER BINDING AN MHC MOLECULE

【技術領域】

【0001】 本發明涉及針對主要組織相容性（MHC）提呈靶抗原（TA）的雙特異性抗原結合蛋白。本發明特別提出了包含至少兩個抗原結合位點（A 和 B）的雙特異性抗原結合蛋白，其中，抗原結合位點 A 與 CD3 結合而抗原結合位點 B 與靶抗原（TA）肽/MHC 複合體結合。特別地，本發明的雙特異性抗原結合蛋白包含親和力下降的新型改造抗 CD3 抗體的 V_L 和 V_H 結構域的互補決定區(CDR)。本發明的雙特異性抗原結合蛋白可用於診斷、治療和預防 TA 相關疾病，例如，表達腫瘤相關抗原(TAA)的癌性疾病。還提出了編碼本發明雙特異性抗原結合蛋白的核酸、包含這些核酸的載體、表達抗原結合蛋白的重組細胞以及包含本發明雙特異性抗原結合蛋白的藥物組合物。

【先前技術】

【0002】 T 細胞透過其克隆特異性 T 細胞受體（TCR）檢測疾病特異性肽是否存在從而識別（病毒）感染的細胞和腫瘤細胞，所述疾病特異性肽由主要組織相容性（MHC）

複合體提呈在該等細胞表面。因此，基於 TCR 的分子對開發疾病或腫瘤特異性免疫療法引起高度關注。雖然在開發用於癌症治療的分子靶向藥物方面取得了進展，但是，本領域仍然需要開發抗癌新藥，其特異性靶向作用於對癌細胞具有高度特異性但對正常細胞不具特異性的分子。類似地，對患病細胞具有高度特異性但對正常細胞無高度特異性的靶向分子對於開發靶向作用於感染性疾病（例如，HIV）的藥物也非常重要。

【0003】 在本發明背景下，靶抗原（TA）肽的來源蛋白被蛋白酶體降解為短肽、轉運至內質網、包裝於新合成 MHC 分子凹槽、並以肽-MHC（pMHC）複合體的形式傳遞至細胞膜（TA 肽/MHC）。TA 誘導的識別模式可讓免疫系統從周圍正常組織細胞中區分出患病細胞（例如，TAA 抗原肽情況下的轉化腫瘤細胞），並觸發針對這些細胞的免疫級聯反應。

【0004】 為了開發此類靶向作用於 TA 的藥物，已鑒定出特異性靶向作用於 TA 的 TCR，並且將 V_α 和 v_β 結構域用於改造新型靶向作用於 TA 的分子，特別是靶向作用於 TAA 的分子。

【0005】 關於靶向作用於 TAA 的分子，需要注意的是，相較於與 MHC 提呈病毒抗原特異性結合的 T 細胞受體（TCR），與 MHC 提呈癌症抗原特異性結合的天然 TCR 親和力通常較低（K_D = 1-300 μM）。此現象的部分解釋似乎為：胸腺中發育的 T 細胞在自身肽 MHC 配體上被負

選擇（耐受誘導），從而刪除了對此類自身肽 MHC 親和力過高的 T 細胞。這種低親和力是腫瘤免疫逃逸的一種可能解釋（Aleksic et al.2012, Eur J Immunol.2012 Dec;42(12):3174-9)。因此，似乎需要設計與癌症抗原具有更高結合親和力的 TCR 變體，用作過繼細胞療法（ACT）中的抗原識別構建體，或者作為可溶性方法的識別模組，即，使用雙特異性分子（Hickman et al.2016, J Biomol Screen.2016 Sep;21(8):769-85)。

【0006】 但是，僅增加 TCR 的親和力也可能增加副作用的風險。如上所述，自然中抗腫瘤相關抗原（自身蛋白）的高親和力 TCR 透過胸腺選擇被排除，從而避免透過交叉反應識別存在於正常組織上的自身肽。因此，簡單增加 TCR 對靶序列的親和力也可能增加對相似非癌特異性肽的親和力，從而增加對正常組織交叉反應和有害細胞毒性作用的風險。這不僅僅是理論上的風險，因為已在靶向作用於黑色素瘤相關抗原 A3（MAGE-A3）的改造 TCR 痛苦地發現。特別是，之前發表的結果顯示：兩名患者發生致命的毒性，這兩名患者輸注了經改造以表達靶向作用於 MAGE-A3 的 TCR 的 T 細胞，該 TCR 與肌肉蛋白 Titin 中的肽發生交叉反應，但臨床前研究中未預測到交叉反應性（Linette GP et al.Blood 2013;122:863-71, Cameron BJ, et al. Sci. Transl. Med. 2013; 5:197-103)。這些患者表明，TCR 改造的 T 細胞可能具有嚴重且不可預測的脫靶和器官特異性毒性。

【0007】 因此，儘管 TCR 技術取得了進步，但是仍然需要額外的治療劑，特別是癌症治療劑，特別是能有效靶向作用於並殺死患病細胞（特別是癌細胞）同時保持高度安全性特徵的治療劑。

【0008】 如上所述，天然 TCR 通常對其靶 TAA/MHC 複合體的親和力很低，而低親和力可避免透過交叉反應識別正常組織上存在的自身肽。但是，增加對其靶 TAA/MHC 複合體的親和力對於製造有效抗癌藥物為優選。

【發明內容】

【0009】 為了解決此問題，本發明的發明人在一個分子中將與相關 TA/MHC 結合的親和力成熟 TCR 可變結構域與靶向作用於 CD3 的可變輕鏈和重鏈結構域（其親和力低於現有抗 CD3 重鏈和輕鏈可變結構域）組合。所得分子的優勢為：即使 TA（例如，TAA）僅少量存在於患病細胞表面，這些分子仍能識別患病細胞（例如，癌細胞）而同時又能保持高度安全性特徵。特別地，由於 CD3 結合結構域的親和力很低，所得分子模擬天然 T 細胞/分子(TCR)/TA 的關係，因為在本發明雙特異性抗原結合蛋白的情況下，低親和力結合發生於 T 細胞和雙特異性抗原結合蛋白的 CD3 結合結構域之間的介面，而不是發生於 TCR 和 TA/MHC 複合體之間的介面，就像在與 TA/MHC 結合的天然 TCR 表達 T 細胞中的情況一樣。

【0010】 使用低親和力 CD3 結合結構域的技術優勢之一為：所得雙特異性抗原結合蛋白由於使用了高親和力 TCR 可變結構域而對相關 TA 具有特異性，同時具有高度安全性特徵，即，安全窗口，據此，將需要大約 1000 倍以上用來治療 TA 提呈細胞（例如癌細胞）的劑量才能殺死正常或健康組織的細胞（例如，表達脫靶肽的正常組織細胞）。因此，高親和力抗原結合蛋白和低親和力 CD3 結合結構域組合可導致對靶肽的特異性結合，且對健康組織上脫靶肽（例如，脫靶肽）的交叉識別降低或不能交叉識別，從而提供了令人驚訝的大安全窗口。

【0011】 因此，將低親和力 CD3 結合結構域與親和力成熟 TA/MHC 結合結構域組合的本發明雙特異性抗原結合蛋白具有以下優勢：所得雙特異性抗原結合蛋白可有效靶向作用於患病細胞（而不是健康細胞）並且也具有有益的安全性特徵，甚或改善的安全性特徵。有利的是，與本領域已知的使用抗 CD3 結構域的雙特異性分子相比，所得雙特異性抗原分子的穩定性和/或溶解度進一步提高，從而提出適合於醫療用途的具有前景的雙特異性分子。

【0012】 總之，本發明的 CD3 結合結構域若以雙特異性形式與 TCR 或其 MHC-肽複合體結合片段或抗原結合蛋白結合使用，與本領域相比尤其具有以下優點：(i) 降低給定 TCR 或抗原結合蛋白與在健康組織上的相似肽的交叉反應性，同時保持高腫瘤選擇性和/或特異性；(ii) 提高 TCR 或其 MHC-肽複合體結合片段或抗原結合蛋白的

安全性特徵；(iii) 降低 TCR 或其 MHC-肽複合體結合片段或抗原結合蛋白的脫靶和脫腫瘤細胞毒性作用；以及 (iv) 提出特異性、選擇性和安全性改善的 TCR 或其 MHC-肽複合體結合片段或抗原結合蛋白。

定義

【0013】 本文中的術語「抗原結合蛋白」系指能夠與至少一種抗原結合的多肽或結合蛋白。

【0014】 本文使用的術語「抗原」系指能夠與至少一個抗原結合位點結合的分子或分子或複合體的一部分，其中，例如，所述一個抗原結合位點存在於常規抗體、常規 TCR 中和/或本發明的雙特異性抗原結合蛋白中。

【0015】 本發明的「雙特異性抗原結合蛋白」對至少兩種不同抗原具有至少兩種效價和結合特異性，抗原結合位點 A 與 CD3 結合而抗原結合位點 B 與靶抗原 (TA) 肽/MHC 複合體結合。

【0016】 在本發明背景下，對 CD3 具有特異性的抗原結合位點 A 來源於小鼠單克隆抗體 UCHT1 的新人源化版本，更具體地說，來源於小鼠單克隆抗體 UCHT1 的改良人源化版本，優選為抗原結合位點 B 來源於 TCR。

【0017】 本發明的「雙特異性抗原結合蛋白」在本文中也稱為「本發明抗原結合蛋白」，其包含本發明背景下定義的至少 6 個CDR，更優選為，抗原結合蛋白包含源自改良人源化 UCHT1 抗體的 V_L 和 V_H 結構域，特別是 V_L 和

V_H 結構域變體。本發明背景下的抗原結合位點 B 與靶抗原（TA）肽/MHC 複合體結合，特別是與腫瘤相關抗原(TAA)肽/MHC 複合體結合，可源自抗體或 TCR，優選源自 TCR。因此，在一優選實施方案中，本發明的抗原結合蛋白包含與靶抗原（TA）肽/MHC 複合體結合的雙特異性抗原結合位點 B，其中所述抗原結合位點 B 優選包含源自 TCR 的至少一個可變 α 結構域（v_α）和至少一個可變 β 結構域（v_β）。

【0018】 該雙特異性抗原結合蛋白在本文中也可稱為「雙特異性分子」。

【0019】 在本發明背景下使用的「靶抗原（TA）肽」系指從感染或腫瘤物質中分離和鑒定的肽，所述感染或腫瘤物質例如，從結核病患者或從愛潑斯坦-巴爾病毒感染者或癌症患者中分離的物質。TA 肽的來源蛋白在受感染細胞或腫瘤細胞中接受抗原加工，從而透過 MHC 分子和細胞在細胞表面提呈的十個（特別是 TA肽/MHC 複合體）可被宿主的免疫效應細胞（例如 T 細胞或 NKT 細胞）識別。本發明背景下的 TA 肽包含 10、12 或 14（諸如 8 至 14、8 至 12，例如，9 至 11）個氨基酸或由其組成。在本發明背景下，當提及特異性 TA 肽時，其稱為 TA-C。TA 抗原肽（例如，TA-C 肽）的實例為病毒抗原肽、細菌抗原肽或腫瘤相關抗原（TAA）抗原肽，優選為 TAA 抗原肽。因此，在一實施方案中，TA 抗原肽（特別是 TA-C）為

病毒肽、細菌肽或腫瘤相關抗原（TAA）抗原肽，優選為TAA 抗原肽。

【0020】 本發明背景下的「病毒抗原肽」為 MHC 分子提呈於患病細胞表面上且為病毒來源的抗原肽，即，該細胞通常被所述病毒感染。此類病毒抗原肽已經在例如人類免疫缺陷病毒（HIV）、人巨細胞病毒（HCMV）、巨細胞病毒（CMV）、人乳頭瘤病毒（HPV）、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒（HCV）、愛潑斯坦-巴爾病毒(EBV)、流感病毒的感染背景下發現。因此，本發明背景下的病毒抗原肽可為選自由 HIV 抗原肽、HCMV 抗原肽、CMV 抗原肽、HPV 抗原肽、HBV 抗原肽、HCV 抗原肽、EBV 抗原肽、流感抗原肽（優選為 HIV、HBV、流感和 HCMV 抗原肽）組成的組中的抗原肽。

【0021】 能夠與本文所述方法和實施方案一起使用的病毒抗原肽包括例如下表中所述的那些病毒抗原肽。一方面，能夠與本文描述方法和實施方案一起使用的病毒抗原肽包括至少一種病毒抗原肽，其包含選自 SEQ ID NO: 146 至 SEQ ID NO: 148 的氨基酸序列中的氨基酸序列或由其組成，如下表 1 所示。

表 1：病毒抗原肽列表

SEQ ID NO:	肽	病毒	MHC
146	SLYNTVATL	HIV	HLA-A*02:01
147	GILGFVFTL	甲型流感	HLA-A*02:01
148	NLVPMVATV	HCMV	HLA-A*02:01

【0022】 本發明背景下的「細菌抗原肽」為 MHC 分子提呈於患病細胞表面上且為細菌來源的抗原肽，即，該細胞通常被所述細菌感染。此類細菌抗原肽已經在例如結核分枝桿菌的感染背景下發現。因此，本發明背景下的細菌抗原肽可為結核分枝桿菌抗原肽。

【0023】 「腫瘤相關抗原（TAA）肽」在本文中也稱為「TAA 肽」，是指從腫瘤材料中分離和鑒定的肽，並且在腫瘤細胞中進行抗原加工，從而可被宿主的免疫效應細胞識別。TAA 肽包含 10、12 或 14（諸如 8 至 14、8 至 12，例如，9 至 11）個氨基酸或由其組成。本發明背景下的 TAA 肽可為例如癌症/睪丸（CT）抗原肽。癌症/睪丸（CT）抗原肽的實例有氨基酸序列 SEQ ID NO: 10 的 MAGE-A 抗原肽和氨基酸序列 SEQ ID NO: 9 的 PRAME 抗原肽。本發明背景下的 TAA 肽包含 T 細胞表位，在一般情況下也可以稱為 TAA 肽，當稱為一種特異性 TAA 肽時，在本發明背景下也可稱為 TAA 肽 C。

【0024】 一方面，能夠與本文所述的方法和實施方案一起使用的腫瘤相關抗原（TAA）肽包括，例如，美國專利公開號 20160187351、美國專利公開號 20170165335、美國專利公開號 20170035807、美國專利公開號 20160280759、美國專利公開號 20160287687、美國專利公開號 20160346371、美國專利公開號 20160368965、美國專利公開號 20170022251、美國專利公開號 20170002055、美國專利公開號

20170029486、美國專利公開號 20170037089、美國專利公開號 20170136108、美國專利公開號 20170101473、美國專利公開號 20170096461、美國專利公開號 20170165337、美國專利公開號 20170189505、美國專利公開號 20170173132、美國專利公開號 20170296640、美國專利公開號 20170253633、美國專利公開號 20170260249、美國專利公開號 20180051080 和美國專利公開號 20180164315 所述的 TAA 肽，本文所述的這些專利公開內容和序列表透過引用整體併入本文。

【0025】 一方面，本文所述的雙特異性抗原結合蛋白，特別是本發明背景下的抗原結合位點 B，可選擇性地識別提呈上述一種或多種專利和出版物中所述的 TAA 肽的細胞。另一方面，能夠與本文描述的方法和實施方案一起使用的 TAA 包括至少一個 TAA，其由選自 SEQ ID NO: 52 至 65、67 至 96、98 至 110、SEQ ID NO: 172 至 182、184 至 268、SEQ ID NO: 9 和 10，優選為 SEQ ID NO: 9 和 10 的氨基酸序列中的氨基酸序列組成。一方面，雙特異性抗原結合蛋白，特別是雙特異性抗原結合蛋白的抗原結合位點 B，可選擇性地識別提呈 TAA 肽/MHC 複合體的細胞，其中 TAA 肽包含 SEQ ID NO: 52 至 65、67 至 96、98、SEQ ID NO: 172 至 182、184 至 268、SEQ ID NO: 9 和 10 的氨基酸序列或本

文所述專利或申請中描述的任何氨基酸序列（優選為SEQ ID NO: 9 和 10）或由其組成。

表 2：TAA 列表

SEQ ID NO:	氨基酸序列	SEQ ID NO:	氨基酸序列	SEQ ID NO:	氨基酸序列
52	YLYDSETKNA	105	VLDGKVAVV	219	KMSELQTYV
53	HLMDQPLSV	106	GLLGKVTSV	220	ALLEQTGDMSL
54	GLLKKINSV	107	KMISAIPTL	221	VIIKGLEEITV
55	FLVDGSSAL	108	GLLETTGLLAT	222	KQFEGTVEI
56	FLFDGSANLV	109	TLNTLDINL	223	KLQEEIPVL
57	FLYKIIDEL	110	VIIKGLEEI	224	GLAEFQENV
58	FILDSAETTTL	172	YLEDGFAYV	225	NVAEIVIHI
59	SVDVSPPKV	173	KIWEELSVLEV	226	ALAGIVTNV
60	VADKIHSV	174	LLIPFTIFM	227	NLLIDDKGTIKL
61	IVDDLTINL	175	ISLDEVAVSL	228	VLMQDSRLYL
62	GLLEELVTV	176	KISDFGLATV	10	KVLEHVVRV
63	TLDGAAVNQV	177	KLIGNIHGNEV	229	LLWGNLPEI
64	SVLEKEIYSI	178	ILLSVLHQL	230	SLMEKNQSL
65	LLDPKTIFL	179	LDSEALLTL	231	KLLAVIHEL
67	YLMDDFSSL	180	VLQENSSDYQSNL	232	ALGDKFLLRV
68	KVWSDVTPL	181	HLLGEGAFAQV	233	FLMKNSDLYGA
69	LLWGHPRVALA	182	SLVENIHVL	234	KLIDHQGLYL
70	KIWEELSVLEV	184	SLSEKSPEV	235	GPGIFPPPPPQP
71	LLIPFTIFM	185	AMFPDTIPRV	236	ALNESLVEC
72	FLIENLLAA	186	FLIENLLAA	237	GLAALAVHL
73	LLWGHPRVALA	187	FTAEFLEKV	238	LLLEAVWHL
74	FLLEREQLL	188	ALYGNVQQV	239	SIIEYLPTL
75	SLAETIFIV	189	LFQSRIAGV	240	TLHDQVHLL

76	TLLEGISRA	190	ILAEEPIYIRV	241	SLLMWITQC
77	ILQDGQFLV	191	FLLEREQLL	242	FLLDKPQDLSI
78	VIFEGEPMYL	192	LLLPLELSLA	243	YLLDMPLWYL
79	SLFESLEYL	193	SLAETIFIV	244	GLLDCPIFL
80	SLLNQPKAV	194	AILNVDEKNQV	245	VLIEYNFSI
81	GLAEFQENV	195	RLFEEVLGV	246	TLYNPERTITV
82	KLLAVIHEL	196	YLDEVAFML	247	AVPPPPSSV
83	TLHDQVHLL	197	KLIDEDEPLFL	248	KLQEELNKV
84	TLYNPERTITV	198	KLFEKSTGL	249	KLMDPGSLPPL
85	KLQEKIQEL	199	SLLEVNEASSV	250	ALIVSLPYL
86	SVLEKEIYSI	200	GVYDGREHTV	251	FLLDGSANV
87	RVIDDSLVVGV	201	GLYPVTLVGV	252	ALDPSGNQLI
88	VLFGELPAL	202	ALLSSVAEA	253	ILIKHLVKV
89	GLVDIMVHL	203	TLLEGISRA	254	VLLDTILQL
90	FLNAIETAL	204	SLIEESEEL	255	HLIAEIHTA
91	ALLQALMEL	205	ALYVQAPTV	256	SMNGGVFAV
92	ALSSSQAEV	206	KLIYKDLVSV	257	MLAEKLLQA
93	SLITGQDLLSV	207	ILQDGQFLV	258	YMLDIFHEV
94	QLIEKNWLL	208	SLLDYEVSI	259	ALWLPTDSATV
95	LLDPKTIFL	209	LLGDSSFFL	260	GLASRILDA
96	RLHDENILL	210	VIFEGEPMYL	261	ALSVLRLAL
98	GLPSATTTV	211	ALSYILPYL	262	SYVKVLHHL
99	GLLPSAESIKL	212	FLFVDPELV	263	VYLPKIPSW
100	KTASINQNV	213	SEWGSPHAAVP	264	NYEDHFPLL
9	SLLQHLIGL	214	ALSELERVL	265	VYIAELEKI
101	YLMDDFSSL	215	SLFESLEYL	266	VHFEDTGKTLLF
102	LMYPYIYHV	216	KVLEYVIKV	267	VLSPFILTL
103	KVWSDVTPL	217	VLLNEILEQV	268	HLLEGSVGV

104	LLWGHPRVALA	218	SLLNQPKAV		

【0026】 此外，在本發明背景下的 TA 抗原肽為 MHC-I 類分子或 MHC-II 類分子（優選為 MHC-I 類分子）的特異性配體。

【0027】 在本發明背景下，TAA 抗原肽 C 優選為選自由 SEQ ID NO: 52 至 65、67 至 96、98 至 110、SEQ ID NO: 172 至 182、184 至 268、SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列組成的 TAA 抗原肽組，優選為包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列「SLLQHLIGL」或由其組成的 PRAME 抗原肽，或包含 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列「KVLEHVVRV」或由其組成的 MAGE-A 抗原肽，更優選為 SEQ ID NO: 10，其中 MHC 優選為 HLA-A*02。

【0028】 「PRAME」或「在黑色素瘤中優先表達抗原」是首先被鑒定為在黑色素瘤中過度表達的抗原（Ikeda et al Immunity.1997 Feb;6(2):199-208）；也稱為 CT130、MAPE、OIP-4，Uniprot 登錄號為 P78395（2019 年 1 月 11 日可用）。該蛋白充當視黃酸受體信號傳導的阻遏物（Epping et al., Cell.2005 Sep 23; 122(6):835-47）。PRAME 屬於種系編碼抗原（稱為癌症睪丸抗原）家族。睪丸癌抗原是免疫治療干預有吸引力的靶標，因為這些抗原在正常成人組織中表達有限或無表達。PRAME 在許多實體瘤以及白血病和淋巴瘤中表達（Doolan et al Breast Cancer Res Treat.2008 May;

109(2):359-65; Epping et al Cancer Res.2006 Nov 15;66(22):10639-42; Ercolak et al Breast Cancer Res Treat.2008 May; 109(2):359-65; Matsushita et al Leuk Lymphoma.2003 Mar;44(3):439-44; Mitsuhashi et al Int.J Hematol.2014; 100(1):88-95; Proto-Sequeire et al Leuk Res.2006 Nov;30(11):1333-9; Szczepanski et al Oral Oncol.2013 Feb;49(2):144-51; Van Baren et al Br J Haematol.1998 Sep; 102(5):1376-9)。本發明的PRAME 靶向療法可能特別適合於治療癌症，包括但不限於肺癌（例如：非小細胞肺癌、小細胞肺癌）、肝癌、頭頸癌、皮膚癌、腎細胞癌、腦癌、胃癌、結直腸癌、肝細胞癌、胰腺癌、攝護腺癌、白血病、乳腺癌、默克爾細胞癌、黑色素瘤、卵巢癌、膀胱癌、子宮癌、膽囊和膽管癌以及食道癌。

【0029】 本發明背景下的「PRAME 衍生肽」包含氨基酸序列 SLLQHLIGL（SEQ ID NO: 9）或由其組成，其對應於 SEQ ID NO: 7 氨基酸序列的全長 PRAME 蛋白的氨基酸 425-433，可用 Uniprot 登錄號 P78395 查詢（2019 年 1 月 11 日可用）。包含氨基酸序列 SLLQHLIGL（SEQ ID NO: 9）或由其組成的 PRAME 衍生肽在本文中也稱為 PRAME-004。PRAME-004 肽是衍生自腫瘤相關蛋白或腫瘤特異性蛋白的肽表位，並透

過主要組織相容性複合體（MHC）的分子提呈於細胞表面。更具體地，PRAME-004 衍生肽與 HLA-A*02 複合而提呈於細胞表面上（Med. 2001 Jan 1;193(1):73-88）。在本發明背景下，「PRAME 衍生肽」或「PRAME-004」可互換使用，均系指包含氨基酸序列 SLLQHLIGL（SEQ ID NO: 9）或由其組成的 PRAME 衍生肽。

【0030】 「MAGE-A」或「黑色素瘤相關抗原 A」亞家族蛋白是分子水平上確定的首批腫瘤相關抗原（van der Bruggen P, et al. Science. 1991; 254:1643-47）。MAGE-A 是位於 X 染色體 q28 區域的 12 個基因（MAGE-A1 至 MAGE-A12）亞家族。MAGE-A 亞家族蛋白成員通常僅在睾丸或胎盤中表達，其限制性表達表明它們可能在生殖細胞發育中發揮作用。在中樞神經系統以及脊髓和腦幹早期發育時也檢測到了 MAGE-A 蛋白，顯示 MAGE-A 蛋白也可能參與神經元發育。此家族的成員編碼相互具有 50% 至 80% 序列同一性的蛋白，並且所有 MAGE 蛋白質具有一個共同的 MAGE 同源結構域(MHD)，該結構域是由大約 170 個氨基酸組成的高度保守結構域。MAGE-A 蛋白在癌症中表達的生物學功能和潛在調節機制目前尚不完全清楚。

【0031】 「MAGE-A4」或「黑色素瘤相關抗原 4」蛋白是 MAGE-A 基因家族成員，具有 SEQ ID NO: 111 的 Uniprot 登錄號 P43358（2019 年 7 月 8 日可用）。

MAGE-A4 位置被描述為在細胞質內。但是，在細胞核中也檢測到了 MAGE-A4 染色，在分化良好與分化較差的癌症中細胞核和細胞質之間具有差異性分佈（Sarcevic B et. al., 2003, Oncology 64, 443-449）。MAGE-A4 用作一種雄性生殖細胞標誌物。它在生殖母細胞中不表達，但在前精原細胞和成熟生殖細胞中表達（Mitchell et al., 2014, Mod. Pathol. 27, 1255-1266）。MAGE-A4 蛋白和 mRNA 的表達與各種癌症的發展和預後有關。

【0032】 「MAGE-A8」或「黑色素瘤相關抗原 8」蛋白是 MAGE-A 超家族成員，具有 SEQ ID NO: 112 的 Uniprot 登錄號 P43361（2019 年 7 月 8 日可用）。

【0033】 根據使用 BLASTP 2.9.0 演算法透過蛋白序列比對所確定的，「MAGE-A4」和「MAGE-A8」蛋白具有 72% 的序列同一性（Stephen F et al. (1997) Nucleic Acids Res.25:3389-3402). 此外，「MAGE-A4」和「MAGE-A8」均包含 MAG-003 肽，即，KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 10)。

【0034】 本發明背景下的術語「表位」包含術語「結構性表位」和「功能性表位」。「結構性表位」為當抗原結合蛋白與抗原（例如，肽-MHC 複合體）結合時，所述抗原被所述抗原結合蛋白覆蓋的該些氨基酸。通常情況下，認為抗原在抗原結合蛋白氨基酸任何原子的 5Å 內的所有氨基酸為被覆蓋。抗原的結構性表位可透過本領域已知的方

法（包括 X 射線晶體學或 NMR 分析）確定。抗體的結構性表位通常包含 20 至 30 個氨基酸。TCR 的結構性表位通常包含 20 至 30 個氨基酸。「功能性表位」是形成結構性表位的氨基酸的子集，包含對形成本發明抗原結合蛋白介面至關重要抗原的氨基酸（方式為：透過直接形成非共價相互作用，例如：H 鍵、鹽橋、芳族堆積或疏水相互作用；或透過間接穩定抗原的結合構象），例如透過突變掃描測定。通常情況下，與抗體結合的抗原的功能性表位包含 4 至 6 個氨基酸。通常情況下，肽-MHC 複合體的功能性表位包含 2 至 6 個肽氨基酸和 2 至 7 個 MHC 分子氨基酸。由於 MHC I 提呈肽的長度通常為 8 至 10 個氨基酸，因此，每個給定肽僅氨基酸子集為肽-MHC 複合體的功能性表位的一部分。在本發明背景中，表位，特別是與本發明雙特異性抗原結合蛋白結合的功能性表位包含形成結合介面所需的抗原氨基酸或由其組成，因此，功能性表位包含 SEQ ID NO: 10 的 MAGE-A 抗原肽的至少 3 個氨基酸，優選為至少 4 個氨基酸。

【0035】 本發明背景下的「CD3」表示作為多分子 T 細胞受體複合體一部分在 T 細胞上表達的抗原，其由至少三個不同的鏈 CD3ε、CD3δ 和 CD3γ 組成。CD3δ 和 CD3γ 與人 CD3ε 的序列同一性和/或相似性較低（相似性和同一性小於 20%）。「CD3ε/δ 複合體」系指由 CD3ε 和 CDR3δ 形成的複合體。CD3ε 還與 CDR3γ 形成複合體，即所謂的「CD3ε/γ 複合體」。CD3 透過例如固定的抗 CD3

抗體在 T 細胞上聚集可導致 T 細胞啟動，這類似於 T 細胞受體結合，但獨立於其克隆的典型特異性。「CD3ε」包含三個結構域--細胞內結構域、跨膜結構域和細胞外結構域。

【0036】 本發明背景下的「UCHT1」單克隆抗體與人 CD3δ 鏈和 CD3ε 鏈的複合體（在本文中稱為 CD3ε/δ 複合體，是 CD3/T 細胞抗原受體複合體的 36kDa 亞基）特異性結合。小鼠單克隆抗體 UCHT-1 包含 V_L 結構域（包含 SEQ ID NO: 36 的氨基酸序列或由其組成）和 V_H 結構域（包含 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列或由其組成）。UCHT1 人源化的描述見例如 Shalaby et al.(J. Exp. Med. (1992); 175(1):217-225)，然後對其進行進一步修飾，得到人源化 UCHT1 變體 9，稱為 hUCHT1(V9)，描述參見 Zhu et al.(J Immunol, 1995, 155, 1903-1910)。hUCHT1(V9) 包含 V_L 結構域（包含 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列或由其組成）和 V_H 結構域（包含 SEQ ID NO: 39 的氨基酸序列或由其組成）。但是，人源化 UCHT 現有技術中的變體溶解度低，難以用於可溶性分子的分子環境中。此外，那些現有技術的變體對 CD3 具有高親和力，如在本發明背景下發現的，這可能為不利因素。

【0037】 本發明背景下的「BMA031」表示對人 α/β TCR 具有特異性的單克隆抗體（mAb）WT31。在本領域中已公開了不同的人源化變體，包括例如，α/β TCR 特異性

人源化抗體 BMA031，描述參見 Shearman et al.(J Immunol, 1991, 147, 4366-73)。Sherman et al.(J Immunol, 1991, 147, 4366-73) 描述的人源化抗體包含含有 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列或由其組成的 V_L 結構域和含有 SEQ ID NO: 41 的氨基酸序列或由其組成的 V_H 結構域。

【0038】 本發明背景下的「主要組織相容性複合體」(MHC) 是一組細胞表面蛋白，對於獲得性免疫系統識別脊椎動物中的外來分子至關重要，這反過來又決定了組織相容性。MHC 分子的主要功能是與源自病原體的抗原結合，並將它們展示於細胞表面上，以透過適當的 T 細胞識別。人 MHC 也稱為 HLA（人白細胞抗原）複合體（通常只稱為 HLA）。MHC 基因家族分為三個亞組：I 類、II 類和 III 類。肽和 MHC I 類的複合體由負載適當 T 細胞受體 (TCR) 的 CD8 陽性 T 細胞進行識別，而肽和 MHC II 類分子的複合體由負載適當 TCR 的 CD4 陽性輔助 T 細胞進行識別。由於 CD8 依賴性和 CD4 依賴性這兩種反應共同並協同地促進抗腫瘤作用，因此，確定和表徵腫瘤相關抗原和相應 T 細胞受體在開發癌症免疫治療（如：疫苗和細胞治療）中非常重要。HLA-A 基因位於染色體 6 的短臂上並編碼 HLA-A 的較大 α-鏈成分。HLA-A α-鏈的變異是 HLA 功能的關鍵。這種變異促進了人群中的遺傳多樣性。由於每種 HLA 對某些結構的肽均具有不同的親和力，因此，更多種類的 HLA 意味著在

細胞表面上「提呈」更多種類的抗原。每個人最多可以表達兩種類型的 HLA-A，其中一種來自其父母。有些人將從父母雙方遺傳相同的 HLA-A，這降低了其個體 HLA 多樣性；但是，大多數人都遺傳兩種不同拷貝的 HLA-A。所有 HLA 組都具有相同的模式。換句話說，每個人只能表達 2432 種已知 HLA-A 等位基因中的一種或兩種。

【0039】 在本發明的背景下，MHC I 類 HLA 蛋白可以是 HLA-A、HLA-B 或 HLA-C 蛋白，優選為 HLA-A 蛋白，更優選為 HLA-A*02。

【0040】 「HLA-A*02」表示特定的 HLA 等位基因，其中字母 A 表示基因，而字尾「*02」表示 A2 血清型。

【0041】 在 MHC I 類依賴性免疫反應中，肽不僅能與腫瘤細胞表達的某些 MHC-I 類分子結合，而且它們之後還必須能被負載特異性 T 細胞受體（TCR）的T 細胞識別。

【0042】 本發明背景下的「TCR」是免疫球蛋白超家族的異二聚體細胞表面蛋白，其與參與介導信號轉導的 CD3 複合體的不變蛋白質相關。TCR 以 αβ 和 γδ 形式存在，其結構相似，但解剖位置非常不同，也很可能功能也非常不同。天然異二聚體 αβ TCR 和 γδ TCR 的細胞外部分各自含有兩個多肽，每個多肽都有一個膜近端恒定結構域和一個膜遠端可變結構域。每個恒定和可變結構域都包括一個鏈內二硫鍵。可變結構域包含與抗體互補決定區（CDR）類似的高度多態性環。

【0043】 本文中的術語「TCR」表示TCR及其片段，以及單鏈TCR及其片段，特別是單結構域TCR以及嵌合、人源化、雙特異性或多特異性TCR的可變α和β結構域。

【0044】 「TCR片段」包含完整或天然TCR的一部分，特別是完整或天然TCR的抗原結合區或可變區。TCR片段的實例包括α、β、δ、γ鏈的片段，例如：V_α-C_a或V_β-C_β或其部分，此類片段還可能進一步包含相應的鉸鏈區或單個可變結構域，例如：V_α、V_β、V_δ、V_γ、單鏈VαVβ片段或由TCR片段形成的雙特異性和多特異性TCR。與天然存在的全長TCR相比，TCR的片段發揮相同的功能，即，片段選擇性地且特異性地與其靶肽結合。

【0045】 在本文中，「單鏈TCR（scTCR）」表示一種蛋白，其中TCR的可變結構域，例如：V_α和V_β或V_δ和V_γ位於一個多肽上。通常，可變結構域被連接子分開，其中所述連接子通常包含5至20個，例如5至15個氨基酸。

【0046】 在例如「天然TCR」措辭中使用的「天然」指野生型TCR。天然α-β異二聚體TCR具有α鏈和β鏈。每個α鏈都包括可變、連接和恒定區域，β鏈通常還包括可變區和連接區之間的短多樣性區域，但是該多樣性區域常被視為連接區域的一部分。TCRα和β鏈的恒定區或C區分別稱為TRAC和TRBC（Lefranc,(2001),Curr Protoc Immunol附錄1：附錄10）。每個可變區（本

文稱為 α 可變結構域和 β 可變結構域）都包括嵌入在框架序列中的三個互補決定區（CDR），其中一個是稱為CDR3 的高度可變區。α 可變結構域 CDR 在本文中稱為CDRa1、CDRa2、CDRa3，而 β 可變結構域 CDR 在本文中稱為 CDRb1、CDRb2、CDRb3。存在幾種類型的 α 鏈可變（V_α）區和幾種類型的 β 鏈可變（V_β）區，由其框架、CDR1 和 CDR2 序列及部分定義的 CDR3 序列區分。V_α 類型透過唯一的 TRAV 號在 IMGT 命名中提及，V_β 類型透過唯一的 TRBV 號在 IMGT 命名中提及 (Folch and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(1):42-54; Scaviner and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(2):83-96; LeFranc and LeFranc, (2001), "T cell Receptor Factsbook", Academic Press)。關於免疫球蛋白抗體和 TCR 基因的更多資訊，參見國際免疫基因學資訊系統®，Lefranc MP 等人 (Nucleic Acids Res.2015 Jan;43 (Database issue):D413-22; and http://www.imgt.org/)。因此，常規的 TCR 抗原結合位點通常包括六個 CDR，包含來自 α 和 β 鏈可變區的 CDR 組，其中 CDR1 和 CDR3 序列與 HLA 蛋白結合的肽抗原的識別和結合有關，而 CDR2 序列與 HLA 蛋白的識別和結合有關。

【0047】 與抗體類似，「TCR 框架區」(FR) 是指插入 CDR 之間的氨基酸序列，即，指與單個物種中的不同 TCR 之

間某種程度上保守的 TCR α 和 β 鏈可變區的那些部分。每個 TCR 的 α 和 β 鏈各有四個 FR，本文中分別稱為 FR1-a、FR2-a、FR3-a、FR4-a 和 FR1-b、FR2-b、FR3-b、FR4-b。因此，α 鏈可變結構域可稱為 (FR1-a)-(CDRa1)-(FR2-a)-(CDRa2)-(FR3-a)-(CDRa3)-(FR4-a)，β 鏈可變結構域可稱為 (FR1-b)-(CDRb1)-(FR2-b)-(CDRb2)-(FR3-b)-(CDRb3)-(FR4-b)。

【0048】 在本發明的背景下，α 或 β 鏈或 γ 或 δ 鏈中的 CDR/FR 定義基於 IMGT 定義確定 (Lefranc et al. Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77; www.imgt.org)。因此，根據所述 IMGT 定義，提示了與 TCR 或 TCR 衍生結構域相關的 CDR/FR 氨基酸位置。在一實施例中，第一可變結構域 CDR/FR 氨基酸位置的 IMGT 位置類似於 TRAV5 的 IMGT 編號和/或第二可變結構域 CDR/FR 氨基酸位置的 IMGT 位置類似於 TRBV12-4 的 IMGT 編號，例如，針對 SEQ ID NO: 10 的 MAGE-A 抗原肽的抗原結合位點 B 可變結構域就是這種情況。

【0049】 就 γ/δ TCR 而言，如本文所用的術語「TCRγ 可變結構域」系指無前導區 (L) 的TCR γ V (TRGV) 區與 TCR γ J (TRGJ) 區的串連物；術語 TCR γ 恒定結構域系指細胞外 TRGC 區或 C 末端截短 TRGC 序列。同樣地，術語「TCR δ 可變結構域」系指無前導區 (L) 的

TCRδV(TRDV)區與TCRδD/J(TRDD/TRDJ)區的串連物，術語TCRδ恒定結構域系指細胞外TRDC區域或C末端截短TRDC序列。

【0050】 在「抗體」（也稱為「免疫球蛋白」）中，兩條重鏈透過二硫鍵相互連接，且每條重鏈透過一條二硫鍵與輕鏈連接。輕鏈有兩種類型，即，λ（l）和κ（k）。重鏈有五個主要類型（或同種型），它們決定了抗體分子的功能活性：IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。每條鏈包含不同的序列結構域。輕鏈包括兩個結構域或區，即，可變結構域（V_L）和恒定結構域（C_L）。重鏈包括四個結構域，即，一個可變結構域（V_H）和三個恒定結構域（C_{H1}、C_{H2}和C_{H3}，統稱C_H）。輕鏈可變區（V_L）和重鏈可變區（V_H）決定了對抗原的結合識別和特異性。輕鏈恒定區結構域（C_L）和重鏈恒定區結構域（C_H）具有重要的生物學特性，例如：抗體鏈締合、分泌、跨胎盤遷移、補體結合以及與F_c受體（F_cR）的結合。Fv片段是免疫球蛋白Fab片段的N-端部分，由一條輕鏈和一條重鏈的可變部分組成。抗體的特異性取決於抗體結合位點（antibody combining site，等同於antibody binding site）和抗原決定因子之間的結構互補性。抗體結合位點由主要來自高可變或互補決定區（CDR）的殘基組成。有時，來自非高可變區或框架區（FR）的殘基會影響整體結構域結構，從而影響結合位點。互補決定區或CDR是指一起確定天然免疫球蛋白結合位點天然Fv區結合親和力和特異性的氨基酸序

列。免疫球蛋白輕鏈和重鏈各有三個 CDR，分別稱為 CDR1-L、CDR2-L、CDR3-L 和 CDR1-H、CDR2-H、CDR3-H。因此，常規抗體抗原結合位點包括六個 CDR，其包含來自各重鏈和輕鏈 V 區的 CDR 組。

【0051】 在本發明的背景下，抗體或免疫球蛋白為 IgM、IgD、IgG、IgA 或 IgE。

【0052】 「抗體框架區」(FR) 是指插入 CDR 之間的氨基酸序列，即，指與單個物種中的不同免疫球蛋白中相對保守的免疫球蛋白輕鏈和重鏈可變區的那些部分。每個免疫球蛋白的輕鏈和重鏈各有四個 FR，分別稱為 FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L 和 FR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-H。因此，輕鏈可變結構域可稱為 (FR1-L)-(CDR1-L)-(FR2-L)-(CDR2-L)-(FR3-L)-(CDR3-L)-(FR4-L)，重鏈可變結構域可稱為 (FR1-H)-(CDR1-H)-(FR2-H)-(CDR2-H)-(FR3-H)-(CDR3-H)-(FR4-H)。

【0053】 在本發明的背景下，免疫球蛋白輕鏈或重鏈（特別是本發明背景下的抗 CD3 抗體變體的免疫球蛋白輕鏈或重鏈）中的 CDR/FR 定義基於 Kabat 確定 (Kabat EA, Te, Wu T, Foeller C, Perry HM, Gottesman KS.(1992) Sequences of Proteins of Immunological Interest.)。但是，免疫球蛋白輕鏈或重鏈（特別是本發明背景下的 UCHT1 變體）的 CDR/FR 氨基酸的位置編號為序數。因此，例如根據 Kabat 確定

的 CDRH1 的範圍為氨基酸位置 31 至 35，根據 Kabat 確定的 CDRH2 的範圍為氨基酸位置 50 至 66，根據 Kabat 確定的 CDRH3 的範圍為氨基酸位置 99 至 111。因此，例如根據 Kabat 確定的 CDRL1 的範圍為氨基酸位置 24 至 34，根據 Kabat 確定的 CDRL2 的範圍為氨基酸位置 50 至 56。

【0054】 本文所使用的「人框架區」是與天然抗原結合蛋白（例如：天然人抗體或人 TCR）框架區基本相同（約 85% 或更高，特別是 90%、95%、97%、99% 或 100% 相同）的框架區。

【0055】 術語「抗體」表示抗體及其片段，以及單結構域抗體及其片段，特別是單結構域抗體以及嵌合、人源化、雙特異性或多特異性抗體的可變重鏈。

【0056】 本文所指的「常規抗體」是與從自然界分離的抗體具有相同結構域且包含抗體衍生 CDR 和框架區的抗體。同樣，本文所指的「常規 TCR」是包含與天然 TCR 具有相同結構域並包含 TCR 衍生 CDR 和框架區的 TCR。

【0057】 術語「人源化抗體」系指完全或部分非人類來源的抗體，該抗體已被修飾以取代某些氨基酸，特別是非人類單克隆抗體的重鏈和輕鏈框架區中的氨基酸，從而避免或最大程度地減少人體中的免疫反應。人源化抗體的恒定結構域大多數情況下主要是指人 C_H 和 C_L 結構域。

【0058】 本領域中已知有很多抗體序列人源化處理方法；例如，參見綜述 Almagro & Fransson（2008）Front

Biosci. 13: 1619-1633。一種常用的方法是 CDR 移植或抗體重構，其涉及將供體抗體（通常為小鼠抗體）的 CDR 序列移植入具有不同特異性的人抗體骨架中。由於 CDR 移植可降低 CDR 移植非人抗體的結合特異性和親和力，從而降低其生物學活性，因此，可在 CDR 移植抗體的選定位置引入回復突變，以保持親本抗體的結合特異性和親和力。使用文獻和抗體數據庫中的現有資訊可鑒定可能的回復突變位置。CDR 移植和回復突變的另一種人源化技術是表面重塑，其中保留非人來源的非表面暴露殘基，而表面殘基則變為人殘基。另一種替代技術稱為「引導選擇」(Jespers et al. (1994) Biotechnology 12, 899)，可用於從鼠抗體等中衍生出保留表位和親本抗體結合特徵的完全人抗體。人源化處理的另一種方法為所謂的 4D 人源化。例如，專利申請 US20110027266 A1 (WO2009032661A1) 中描述了 4D 人源化方案，其透過引用整體併入本文。在本發明背景下，按本文實施例 1 中詳細描述，單克隆小鼠抗體 UCHT1 已被人源化。對於嵌合抗體，人源化通常涉及修飾可變區序列框架區。

【0059】 本發明背景下的「游標區」系指框架區域內的鼠殘基，其已被證實可影響 CDR 環的構象以及抗體的親和力。這些殘基也稱為「游標殘基」，位於緊靠 CDR 下方的 β-折疊片框架區域，不參與對抗原的直接相互作用，即，這些殘基保留於「人源化」抗體中 (Foote & Winter, 1992)。

【0060】 儘管在某些情況下可能希望改變單個 CDR 氨基酸殘基，例如，去除糖基化位點、脫醯胺位點、異構化位點或不理想的半胱氨酸殘基，但作為 CDR 一部分的氨基酸殘基通常不會作與人源化相關的改變。N-連接糖基化透過將寡糖鏈連接至三肽序列 Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr 的天冬醯胺殘基而發生，其中 X 可以為除 Pro 之外的任何氨基酸。N-糖基化位點的移除可透過將 Asn 或 Ser/Thr 殘基突變為不同的殘基來實現，特別是透過保守取代的方式實現。天冬醯胺和穀氨醯胺殘基的脫醯胺可能取決於諸如 pH 和表面暴露等因素。天冬醯胺殘基尤其容易發生脫醯胺（主要是存在於 Asn-Gly 序列中時），而在其他二肽序列（如 Asn-Ala）中時則較少發生。當此類脫醯胺位點（特別是 Asn-Gly）存在於 CDR 序列中時，可能希望移除該位點，通常是透過保守取代法移除其中一個涉及的殘基。CDR 序列中取代以移除其中一個涉及的殘基也是本發明的意圖。

【0061】 本發明背景下的「抗體片段」包含完整抗體的一部分，特別是完整抗體的抗原結合區或可變區。抗體片段的實例包括 Fv、Fab、F(ab')2、Fab'、dsFv、(dsFv)2、scFv、sc(Fv)2、雙抗體、由抗體片段形成的雙特異性和多特異性抗體。抗體的片段也可以是單結構域抗體，例如：重鏈抗體或 VHH。

【0062】 術語「Fab」表示分子量約為 50,000 道爾頓且具有抗原結合活性的抗體片段，其中在使用蛋白酶（例如

木瓜蛋白酶）處理 IgG 而獲得的片段中，H 鏈的 N 端側約一半和整個 L 鏈透過二硫鍵而結合在一起。

【0063】 本發明背景下的術語「形式」是指雙特異性抗原結合蛋白，其包含存在於所述雙特異性抗原結合蛋白中的特定數目和類型的結構域及其空間組織。

【0064】 本領域描述了許多不同的形式，例如：雙特異性形式，通常在抗體的背景下，此類形式包括非限制性實例，例如：雙抗體、交叉雙可變結構域（CODV）和/或雙可變結構域（DVD）蛋白。這些不同雙特異性抗體及其製備方法的概述公開於，例如，Brinkmann U. and Kontermann R.E. MAbs. 2017 Feb-Mar; 9(2):182-212。更具體地，例如，以下科學文章中公開了 DVD 形式（Wu C et al.Nat Biotechnol 2007; 25:1290-7; PMID:17934452; Wu C. et al.MAbs 2009; 1:339-47; Lacy SE et al.MAbs 2015; 7:605-19; PMID:25764208; Craig RB et al.PLoS One 2012; 7:e46778; PMID:23056448; Piccione EC et al.MAbs 2015）。例如，CODV 公開於 Onuoha SC et al.Arthritis Rheumatol.2015 Oct; 67(10):2661-72 或例如，公開於 WO2012/135345、WO2016/116626。例如，雙特異性雙抗體的描述參見 Holliger P et al.Protein Eng 1996; 9:299-305; PMID:8736497; Atwell JL et al.Mol Immunol 1996; 33:1301-12; PMID:9171890; Kontermann

RE, Nat Biotechnol 1997; 15:629-31; PMID:9219263; Kontermann RE et al.Immunotechnology 1997; 3:137-44; PMID:9237098; Cochlovius B et al.Cancer Res 2000; 60:4336-41; PMID:10969772; and DeNardo DG et al.Cancer Biother Radiopharm 2001; 16:525-35; PMID:11789029。

【0065】 在抗體背景下所使用的「雙抗體」通常系指由兩條鏈組成的二價分子，每條鏈均包含來自相同或不同抗體的 VH 和 VL 結構域。兩條鏈通常具有構型 VHA-VLB 和 VHB-VLA（A 和 B 代表兩種不同的特異性）或 VLA-VHB 和 VLB-VHA。

【0066】 在本發明的背景下，本文的「雙抗體（Db）」或「雙抗體形式」系指由兩條多肽鏈組成的二價分子，每條多肽鏈包含透過連接子（L_{Db1} 和 L_{Db2}）連接的兩個可變結構域，其中兩個結構域在本發明背景下定義為第一結構域和第二結構域（V_1 和 V_2），而另外兩個結構域可能為 TCR 衍生或抗體衍生可變結構域（V_A、V_B）。V_1 和 V_2 結構域位於兩個不同多肽上，V_A 和 V_B 結構域位於兩個不同多肽上，並且這些結構域按從頭到尾的方向進行二聚化。因此，方向可能為 V_1-L_{Db1}-V_A 和 V_B-L_{Db2}-V_2、V_2-L_{Db1}-V_A 和 V_B-L_{Db2}-V_1、V_1-L_{Db1}-V_B 和 V_A-L_{Db2}-V_2 或 V_2-L_{Db1}-V_B 和 V_A-L_{Db2}-V_1。為了使結構域進行頭對尾的二聚化，連接子（即 L_{Db1} 和 L_{Db1}）

可相同或不同且為短連接子。短連接子是長度通常為 2 至 12、3 至 13 個氨基酸之間的連接子，諸如 3、4、5、6、7、8、9 個氨基酸長度，例如：4、5 個氨基酸長度(Brinkmann U. and Kontermann R.E. (MAbs.2017 Feb-Mar; 9(2):182-212) 或 8 個氨基酸長度，諸如：SEQ ID NO: 114 的「GGGS」、SEQ ID NO: 115 的「GGGGS」或 SEQ ID NO: 118 的「GGGSGGGG」。

【0067】 「雙可變結構域免疫球蛋白(DVD-Ig™)」形式的描述初見 Wu C. 等人 2007 年的文章(Nat Biotechnol.2007 Nov; 25(11):1290-7)。以該形式中，通常將第二種單克隆抗體(B)的靶結合可變結構域與常規抗體(A)(包含 V_{LA} 和 V_{HA} 結構域)進行融合，其中常規抗體(A)的輕鏈因此包含額外的輕鏈可變結構域(V_{LB})，而常規抗體(A)的重鏈包含額外的重鏈可變結構域(V_{HB})。因此，本領域中所述的 DVD-Ig™ 通常由兩條多肽鏈--一條重鏈(包含 V_{HB}-L-V_{HA}-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3})和一條輕鏈(包含 V_{LB}-L-V_{LA}-C_L)組成。因此，V_{LA}/V_{HA} 和 V_{LA}/V_{LA} 結構域對並行配對。

【0068】 在本發明的背景下，「雙可變結構域 Ig 形式」系指包含兩條多肽鏈的蛋白，每條多肽鏈包含透過連接子(L_1, L_3)連接的兩個可變結構域，其中兩個結構域在本發明背景下定義為第一結構域和第二結構域(V_1 和 V_2)，而另外兩個結構域為抗體衍生重鏈和輕鏈可變結構域

（V_{HA} 和 V_{HB}）。在本發明背景下的 DVD-Ig 形式中，例如，多肽鏈含有組織 V_1-L_1-V_{HA}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} 和 V_2-L_3-V_{LA}-L_4-C_L 或 V_2-L_1-V_{HA}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} 和 V_1-L_3-V_{LA}-L_4-C_L。連接連接子 L_1 和 L_3 的長度優選為 5 至 20 個氨基酸殘基之間，例如 5 至 15 個氨基酸殘基，和/或連接連接子 L_2 和 L_4 可能存在也可能不存在。

【0069】 抗體領域中所述的「交叉雙可變結構域-Ig 樣蛋白」代表一種形式，其中兩個 V_H 和兩個 V_L 結構域以允許可變 V_H-V_L 結構域交叉配對的方式連接，所述結構域（從 N-端到 C-端）以 V_{HA}-V_{HB} 和 V_{LB}-V_{LA} 的順序或以 V_{HB}-V_{HA} 和 V_{LA}-V_{LB} 的順序排列。

【0070】 在本發明的背景下，「交叉雙可變結構域-Ig 樣蛋白」系指包含兩條多肽鏈的蛋白，每條多肽鏈包含透過連接子（L_1、L_2、L_3 和 L_4）連接的兩個可變結構域，其中兩個結構域在本發明背景下定義為第一結構域和第二結構域（V_1 和 V_2），而另外兩個結構域為抗體衍生重鏈和輕鏈可變結構域（V_{HA}、V_{HB}）。在本發明背景下的 CDVD-Ig 形式中，例如，多肽鏈含有組織

V_1-L_1-V_{HA}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} 和

V_{LA}-L_3-V_2-L_4-C_L、V_2-L_1-V_{HA}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} 和

V_{LA}-L_3-V_1-L_4-C_L、V_{HA}-L_1-V_1-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} 和

V_2-L_3-V_{LA}-L_{DVD3}-C_L 或

V_{HA}-L_1-V_2-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} 和

V_1-L_3-V_{LA}-L_4-C_L。在此CDVD形式中，連接子（L_1至L_4）通常具有不同的長度，包括全甘氨酸連接子以及下文連接子部分中所述的連接子。例如，L_1的長度為3至12個氨基酸殘基、L_2的長度為3至14個氨基酸殘基、L_3的長度為1至8個氨基酸殘基、L_4的長度為1至3個氨基酸殘基，或L_1的長度為5至10個氨基酸殘基、L_2的長度為5至8個氨基酸殘基、L_3的長度為1至5個氨基酸殘基、L_4的長度為1至2個氨基酸殘基，或L_1的長度為7個氨基酸殘基，L_2的長度為5個氨基酸殘基，L_3的長度為1個氨基酸殘基，L_4的長度為2個氨基酸殘基。

【0071】 本文中「至少一個」系指一個或多個指定物件，例如1、2、3、4、5或6個或更多指定對象。例如，本文中至少一個結合位點系指1、2、3、4、5或6個或更多結合位點。

【0072】 「與參考序列至少85%相同」的序列系指其全長與參考序列全長具有85%或更高序列同一性，特別是90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

【0073】 在本申請的背景下，使用整體成對比對法來計算「同一性百分比」（即，比較兩個序列的全長）。比較兩個或更多個序列同一性的方法是本領域所周知的。例如，可使用「針具」程序，其使用Needleman-Wunsch整體比對演算法（Needleman and Wunsch, 1970 J.

Mol. Biol. 48:443-453）以找到兩個序列（考慮其全長）的最佳比對方法（包括間隙）。例如，針具程序可從萬維網上下載，並在以下出版物中進一步描述(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite(2000) Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp.276-277)。根據本發明，兩個多肽之間同一性百分比的計算方法為：EMBOSS:針具(整體)程序，「Gap Open」參數等於 10.0、「Gap Extend」參數等於 0.5、矩陣為 Blosum62。

【0074】 由與參考序列「至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同」的氨基酸序列組成的蛋白可能包含相對於參考序列的氨基酸突變，例如缺失、插入和/或取代。在發生取代時，由與參考序列至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的氨基酸序列組成的蛋白可能對應於衍生自其他物種的同源序列（不同於參考序列）。

【0075】 「氨基酸取代」可以是保守的也可以是非保守的。優選情況是，取代為保守取代，其中一個氨基酸被具有相似結構和/或化學性質的另一氨基酸所取代。

【0076】 在一實施方案中，保守取代可能包括由 Dayhoff 在「The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5」, Natl.Biomedical Research 中所述的取代，其內容透過引用整體併入本文。例如，一方面，屬於

以下組之一的氨基酸可彼此交換，因此構成保守交換：第 1 組：丙氨酸（A）、脯氨酸（P）、甘氨酸（G）、天冬醯胺（N）、絲氨酸（S）、蘇氨酸（T）；第 2 組：半胱氨酸（C）、絲氨酸（S）、酪氨酸（Y）、蘇氨酸（T）；第 3 組：纈氨酸（V）、異亮氨酸（I）、亮氨酸（L）、甲硫氨酸（M）、丙氨酸（A）、苯丙氨酸（F）；第 4 組：賴氨酸（K）、精氨酸（R）、組氨酸（H）；第 5 組：苯丙氨酸（F）、酪氨酸（Y）、色氨酸（W）、組氨酸（H）；和第 6 組：天冬氨酸（D）、谷氨酸（E）。一方面，保守氨基酸取代可選自以下取代：T → A、G → A、A → I、T → V、A → M、T → I、A → V、T → G 和/或 T → S。

【0077】 在另一實施方案中，保守氨基酸取代可包括用相同類別的另一個氨基酸取代一種氨基酸，例如，(1) 非極性：Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trp；(2) 不帶電的極性：Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Gln；(3) 酸性：Asp、Glu；和 (4) 鹼性：Lys、Arg、His。其他保守氨基酸取代也可以按如下進行：(1) 芳香族：Phe、Tyr、His；(2) 質子供體：Asn、Gln、Lys、Arg、His、Trp；和 (3) 質子受體：Glu、Asp、Thr、Ser、Tyr、Asn、Gln（參見美國專利號 10,106,805，其內容透過引用整體併入本文）。

【0078】 在另一實施方案中，保守取代可以根據表 3 進行。用於預測蛋白質修飾耐受性的方法可參見，例如，Guo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA,

101(25):9205-9210（2004），其內容透過引用整體併入。

表 3：保守的氨基酸取代

保守的氨基酸取代	
氨基酸	取代（其他在本領域中已知）
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

【0079】 在另一實施方案中，保守取代可能為表 3 中「保守取代」標題下所示的取代。如果此類取代導致生物活性改變，則可能引入表 4 中稱為「代表性取代」的重大改變，並且在需要時篩選產品。

表 4：氨基酸取代

	氨基酸取代	
原殘基（天然氨基酸）	保守取代	代表性取代
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸
Leu (L)	Ile	正亮氨酸 ; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸

【0080】 在一些實施方案中，雙特異性抗原結合蛋白可能包括變體抗原結合蛋白，其中所述變體雙特異性抗原結合蛋白包括第一多肽鏈（例如 α 鏈）和第二多肽鏈（例如 β 鏈），其與變體所衍生自的雙特異性抗原結合蛋白相比，包含至多 8、9、10、11、12、13、14、15 個或更多氨基酸取代基，優選為在第一個可變結構域（例如 V_α 結構域）和第二個可變結構域（例如 V_β 結構域）的 CDR 區中。就這點而言，在雙特異性抗原結合蛋白的 各 CDR 區或第一和/或第二可變結構域的所有 CDR 區中可能有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或更多氨基酸取代基。取代基可在第一和/或第二可變結構域的 CDR 中。

【0081】 在一實施方案中，變體為功能性變體。

【0082】 本文所用的術語「功能性變體」系指與親本雙特異性抗原結合蛋白具有基本或明顯序列同一性或相似性的雙特異性抗原結合蛋白，例如：含有保守氨基酸取代基的那些雙特異性抗原結合蛋白，其中所述功能性變體保留了親本雙特異性抗原結合蛋白的生物學活性。一方面，例如，功能性變體包括本文所述雙特異性抗原結合蛋白的那些變體（那麼，本文所述的雙特異性抗原結合蛋白本身稱為親本抗原結合蛋白），其保留與親本雙特異性抗原結合蛋白相似、相同或更高程度的靶細胞識別能力。相較於親本雙特異性抗原結合蛋白，例如，功能性變體可以含有一種氨基酸序列，該序列與親本雙特異性抗原結合蛋白的氨基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同。

【0083】 例如，功能性變體可以包含具有至少一個保守氨基酸取代基的親本雙特異性抗原結合蛋白的氨基酸序列。可選或另外的情況是，功能性變體可以包含具有至少一個非保守氨基酸取代基的親本雙特異性抗原結合蛋白的氨基酸序列。在這種情況下，非保守氨基酸取代優選為不干擾或不抑制功能性變體的生物學活性。優選情況是，非保守氨基酸取代可增強功能性變體的生物學活性，從而增加相對於親本雙特異性抗原結合蛋白的功能性變體生物學活性。

【0084】 本發明的修飾TCR、多肽和抗原結合蛋白（包括功能性部分、片段和功能性變體）可能具有任何長度，即，可以包含任何數目的氨基酸，但前提是修飾TCR、多肽或蛋白（或其功能性部分或功能性變體）保留其生物學活性，例如：與抗原特異性結合、檢測宿主中患病細胞或治療或預防宿主中疾病的能力等。

【0085】 本發明的雙特異性抗原結合蛋白（包括功能性部分、片段和功能性變體）可以包含替代一種或多種天然氨基酸的合成氨基酸。此類合成氨基酸為本領域所已知的，例如，可以包括氨基環己烷羧酸、正亮氨酸、α-氨基正癸酸、高絲氨酸、S-乙醯氨基甲基-半胱氨酸、反式3-和反式4-羥脯氨酸、4-氨基苯基丙氨酸、4-硝基苯基丙氨酸、4-氯苯基丙氨酸、4-羧基苯基丙氨酸、β-苯基絲氨酸、β-羥基苯丙氨酸、苯甘氨酸、α-萘丙氨酸、環己基丙氨酸、環己基甘氨酸、吲哚啉-2-羧酸、1,2,3,4-四氫異喹啉-3-羧酸、氨基丙二酸、氨基丙二酸單醯胺、N'-苄基-N'-甲基賴氨酸、N',N'-二苄基賴氨酸、6-羥基賴氨酸、鳥氨酸、α-氨基環戊烷羧酸、α-氨基環己烷羧酸、α-氨基環庚烷羧酸、α-（2-氨基-2-降冰片烷）-羧酸、α,γ-二氨基丁酸、α,β-二氨基丙酸、高苯丙氨酸和 α-叔丁基甘氨酸。

【0086】 在一實施方案中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白（包括功能性部分和功能性變體）可以被糖基化、醯胺化、羧基化、磷酸化、酯化、N-醯化、環化（例如，透過

二硫鍵）或轉化成酸加成鹽和/或任選地被二聚化或多聚化或共軛。

【0087】 本公開的雙特異性抗原結合蛋白可以為合成的、重組的、分離的和/或純化的。

【0088】 本文的「共價鍵」系指，例如：二硫鍵或透過多肽連接子等連接子或連接子序列連接的肽鍵或共價鍵。

【0089】 本文所用的術語「連接子」系指一個或多個氨基酸殘基，其插入兩個結構域之間從而為例如單鏈構建體中、本發明雙特異性抗原結合蛋白的第一可變結構域和第二可變結構域之間和任選地輕鏈和重鏈可變結構域的可變結構域之間的結構域提供充分遷移性，從而正確折疊以形成抗原結合位點，或者在雙特異性抗原結合蛋白的情況下以本發明雙特異性抗原結合蛋白的交叉配對（以CODV形式或某些雙抗體形式）或平行配對形式（例如：以DVD形式）形成抗原結合位點和至少一個其他抗原結合位點。

【0090】 在一些實施方案中，連接子由0個氨基酸組成，這表示該連接子不存在。在氨基酸序列水平上，在可變結構域之間或可變結構域與恒定結構域之間的轉換處分別插入連接子。由於已熟知免疫球蛋白結構域以及TCR結構域的大致尺寸，因此，可確定結構域之間的轉換。本領域技術人員已知，結構域轉換的精確位置可透過定位不會形成二級結構元件（例如β-折疊或α-螺旋）的肽延伸段來確定（如透過實驗資料證明），或者可使用建模或二級結構預測技術鑒定或假設。在本發明背景下使用的連接子術語

系指但不限於稱為 L_1,、L_2、L_3、L_4、L_5 和 L_6 的連接子。

【0091】 只要不在各自背景下另行指定，連接子（例如 L_1,、L_2、L_3、L_4、L_5 和 L_6）的長度可以為至少 1 至 30 個氨基酸。在一些實施方案中，連接子（例如 L_1,、L_2、L_3、L_4、L_5 和 L_6）的長度可以為 2-25、2-20或 3-18 個氨基酸。在一些實施方案中，連接子（例如 L_1,、L_2、L_3、L_4、L_5 和 L_6）可以為長度不超過 14、13、12、11、10、9、8、7、6 或 5 個氨基酸的肽。在其他實施方案中，連接子（例如 L_1,、L_2、L_3、L_4、L_5 和 L_6）的長度可以為 5-25、5-15、4-11、10-20 或 20-30 個氨基酸。在其他實施方案中，連接子（例如 L_1,、L_2、L_3、L_4、L_5 和 L_6）的長度可以約為 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 個氨基酸。在特定實施方案中，連接子（例如 L_1、L_2、L_3、L_4、L_5 和 L_6）長度可能為小於 24、小於 20、小於 16、小於 12、小於 10（例如 5 至 24、10 至 24 或 5-10）個氨基酸殘基。在一些實施方案中，所述連接子的長度等於 1 個或多個氨基酸殘基，例如：長度大於 1、大於 2、大於 5、大於 10、大於 20 個氨基酸殘基、大於 22 個氨基酸殘基。示例性連接子（例如 L_1、L_2、L_3、L_4、L_5 和 L_6）包含選自氨基酸組的氨基酸序列或由其組成，所述氨基酸組由 TVAAP（SEQ ID NO: 113）、GGGS（SEQ

ID NO:114)、GGSGG (SEQ ID NO:28)、GGGGS (SEQ ID NO:115)、TVLRT (SEQ ID NO:116)、TVSSAS (SEQ ID NO:117)、GGGSGGGG (SEQ ID NO:118)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:119)、GGGGSAAA (SEQ ID NO:120)、GGSGGGGSGG (SEQ ID NO:29)、GGSGGGGSGGGGSGG (SEQ ID NO:32)、GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:121)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGS (SEQ ID NO:122)、GGSGGGGSGGGGSGGGGSGG (SEQ ID NO:33)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:123)、GGSGGGGSGGGGSGGGGSGG (SEQ ID NO:66)、GSADDAKKDAAKKDGKS (SEQ ID NO:97)、GGQGSGGTGSGGQGSGGTGSGGQGS (SEQ ID NO:143)、TVLSSAS (SEQ ID NO:124)、GGGGSGT (SEQ ID NO:183) 和 GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:125)，特別是 GGGSGGGG (SEQ ID NO:118)、GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:125) 和 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:123) 組成。

【0092】 在本發明背景下使用的術語「F_c結構域」包含下文進一步定義的天然 F_c 結構域以及 F_c 結構域變體和序

列。與 F_c 變體和天然 F_c 分子一樣，術語「F_c 結構域」包括單體或多聚體形式的分子，無論其是從完整抗體中酶切還是透過其他方式產生。

【0093】 本文所用的術語「天然 F_c」是指包含由抗體酶切或透過其他方式產生的非抗體結合片段的序列的分子，不論其為單體形式還是多聚體形式，並且可能包含鉸鏈區。天然 F_c 的原始免疫球蛋白來源特別是來源於人，可以為任何免疫球蛋白，優選為 IgG1 或 IgG2，最優選為 IgG1。天然 F_c 分子由單體多肽組成，而所述單體多肽可透過共價鍵（即，二硫鍵）和非共價鍵締合為二聚體或多聚體形式。天然 F_c 分子的單體亞基之間的分子間二硫鍵數量為 1-4 個，具體取決於類別（例如：IgG、IgA 和 IgE）或亞類別（例如：IgG1、IgG2、IgG3、IgA1 和 IgGA2）。天然 F_c 的一個實例為由木瓜蛋白酶酶切 IgG 產生的二硫鍵結合二聚體。本文所用的術語「天然 F_c」是單體、二聚體和多聚體形式的通稱。天然 F_c 氨基酸序列的一個實例為 SEQ ID NO: 126 的氨基酸序列，其是 IGHG1*01 的天然 F_c 氨基酸序列。

【0094】 「鉸鏈」或「鉸鏈區」或「鉸鏈結構域」通常是指位於 C_{H1} 結構域和 C_{H2} 結構域之間重鏈的柔性部分。它長約 25 個氨基酸，分為「上鉸鏈」、「中間鉸鏈」或「核心鉸鏈」和「下鉸鏈」。「鉸鏈子結構域」是指上鉸鏈、中（或核心）鉸鏈或下鉸鏈。本文中 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 分子鉸鏈的氨基酸序列如下所示：

IgG1: E_{216}PKSCDKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID No. 127)

IgG2: E_{216}RKCCVECPPCPAPPVAGP (SEQ ID No. 128)

IgG3:ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPE$_{216}$PKSCDTPPPCPRCPAPELLG (SEQ ID No. 129)

IgG4: E_{216}SKYGPPCPSCPAPEFLG (SEQ ID No. 130)。

【0095】 在本發明背景下，它是指 F_c 結構域中的氨基酸位置，這些氨基酸位置或殘基根據例如 Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) 中所述的 EU 編號系統來顯示。

【0096】 本文所用的術語「F_c 變體」是指根據天然 F_c 修飾但仍包含挽救受體 F_cRn（新生 F_c 受體）結合位點的分子或序列。示例性 F_c 變體及其與挽救受體的相互作用是本領域已知的。因此，術語「F_c 變體」可包含根據非人天然 F_c 人源化的分子或序列。此外，天然 F_c 包含可被移除的區域，因為這些區域提供了本發明雙特異性抗原結合蛋白不需要的結構特徵或生物學活性。因此，術語「F_c 變體」包含缺少一個或多個天然 F_c 位點或殘基或其中一個或多個 F_c 位點或殘基已被修飾的分子或序列，其影響或涉及：(1) 二硫鍵形成，(2) 與選定宿主細胞不相容，(3) 在選定宿主細胞中表達後具有 N-端異質性，(4) 糖基化，

（5）與補體相互作用，（6）與挽救受體之外的 F_c 受體結合，或（7）抗體依賴性細胞毒性（ADCC）。

【0097】 因此，在一實施方案中，F_c 結構域（例如 F_{c1} 和/或 F_{c2}）包含鉸鏈結構域。

【0098】 在一實施方案中，F_c 結構域為人 IgG F_c 結構域，優選為衍生自人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4，優選為 IgG1 或 IgG2，更優選為 IgG1。

【0099】 在一些實施方案中，特別地，當雙特異性抗原結合蛋白包含兩個 F_c 結構域（即，在下文所述的TCER® 形式中，例如：F_{c1} 和 F_{c2}）時，所述兩個 F_c 結構域可能具有相同的免疫球蛋白同種型或同種型亞類或不同的免疫球蛋白同種型或同種型亞類，優選為相同。因此，在一些實施方案中，F_{c1} 和 F_{c2} 為 IgG1 亞類或 IgG2 亞類或 IgG3 亞類或 IgG4 亞類，優選為 IgG1 亞類或 IgG2 亞類，更優選為 IgG1 亞類。

【0100】 在一些實施方案中，F_c 結構域為變體 F_c 結構域，因而包含下文所述的一個或多個氨基酸取代基。

【0101】 在一些實施方案中，F_c 結構域包含或進一步包含「RF」和/或「杵臼結構」突變，優選為「杵臼結構」。

【0102】 「RF突變」通常是指 F_c 結構域的 C_{H3} 結構域中將氨基酸 HY 取代為 RF 的氨基酸取代基，如 C_{H3} 結構域中的氨基酸取代基 H435R 和 Y436F，如 Jendeberg, L. 等人（1997, J. Immunological Meth., 201:25-34）一文所述，由於其消除了與蛋白 A

的結合而被描述為有利於純化之目的。在雙特異性抗原結合蛋白包含兩個 F_c 結構域的情況下，RF 突變可能發生於一個或兩個 F_c 結構域，優選為發生於一個 F_c 結構域。

【0103】 「杵臼結構」（也稱為「杵臼結構」技術）是指均在 C_{H3}-C_{H3} 介面中能促進異源多聚體形成的氨基酸取代基 T366S、L368A 和 Y407V（臼）和 T366W（杵）。透過引入額外半胱氨酸氨基酸取代基 Y349C 和 S354C，可進一步穩定那些杵臼結構突變。US5731168 和 US8216805 專利中描述了「杵臼結構」技術以及起穩定作用的半胱氨酸氨基酸取代基。

【0104】 在本發明背景下，「杵」突變與半胱氨酸氨基酸取代基 S354C 存在於例如包含 SEQ ID NO: 131 氨基酸序列或由其組成的 F_c 結構域中，「臼」突變與半胱氨酸氨基酸取代基 Y349C1 存在於包含 SEQ ID NO: 132 氨基酸序列或由其組成的 F_c 結構域中。

【0105】 在一些實施方案中，其中一個多肽的 F_c 結構域（例如 F_{c1}）在其 C_{H3} 結構域中包含氨基酸取代基 T366W（杵），而另一個多肽的 F_c 結構域（例如 F_{c2}）在其 C_{H3} 結構域中包含氨基酸取代基 T366S、L368A 和 Y407V（臼），反之亦然。

【0106】 在一些實施方案中，其中一個多肽的 F_c 結構域（例如 F_{c1}）在其 C_{H3} 結構域中包含或進一步包含氨基酸取代基 S354C，而另一個多肽的 F_c 結構域（例如 F_{c2}）

在其 C_{H3} 結構域中包含或進一步包含氨基酸取代基 Y349C，反之亦然。

【0107】 因此，在一些實施方案中，其中一個多肽的 F_c 結構域（例如 F_{c1}）在其 C_{H3} 結構域中包含氨基酸取代基 S354C 和 T366W（杵），而另一個多肽的 F_c 結構域（例如 F_{c2}）在其 C_{H3} 結構域中包含氨基酸取代基 Y349C、T366S、L368A 和 Y407V（臼），反之亦然。

【0108】 如 Wei 等人所述，透過納入一個多肽上的氨基酸取代基 K409A 和另一多肽上的 F405K 可以進一步擴展該組氨基酸取代基(Structural basis of a novel heterodimeric Fc for bispecific antibody production, Oncotarget.2017)。因此，在一些實施方案中，其中一個多肽的 F_c 結構域（例如 F_{c1}）在其 C_{H3} 結構域中包含或進一步包含氨基酸取代基 K409A，而另一個多肽的 F_c 結構域（例如 F_{c2}）在其 C_{H3} 結構域中包含或進一步包含氨基酸取代基 F405K，反之亦然。

【0109】 在某些情況下，人工引入的半胱氨酸橋可改善雙特異性抗原結合蛋白的穩定性，最理想狀況是不干擾雙特異性抗原結合蛋白的結合特性。此類半胱氨酸橋可進一步改善異二聚化。

【0110】 在本領域中，例如在 EP 2 970 484 中已描述了進一步的氨基酸取代（例如：帶電對取代），從而改善所得蛋白的異二聚化。

【0111】 因此，在一些實施方案中，其中一個多肽的 F_c 結構域（例如 F_{c1}）包含或進一步包含帶電對取代基 E356K、E356R、D356R 或 D356K 和 D399K 或 D399R，而另一個多肽的 F_c 結構域（例如 F_{c2}）包含或進一步包含帶電對取代基 R409D、R409E、K409E 或 K409D 和 N392D、N392E、K392E 或 K392D，反之亦然。

【0112】 在另一實施方案中，一條或兩條（優選為兩條多肽鏈）上的 F_c 結構域可包含一個或多個抑制 $F_c\gamma$ 受體 ($F_c\gamma R$) 結合的改變。此類改變可以包括 L234A、L235A。

【0113】 透過將由鉸鏈、C_{H2} 和 C_{H3} 結構域或其部分組成的 F_c 部分納入抗原結合蛋白中，更具體地納入雙特異性抗原結合蛋白中，出現了由 F_c:F_c-γ受體 (F_cgR) 相互作用誘導的這些分子的非特異性固定的問題。F_cgR 由不同的細胞表面分子（F_cgRI、F_cgRIIa、F_cgRIIb、F_cgRIII）組成，其與 IgG 分子的 F_c 部分顯示的表位具有不同的親和力。由於 i) 對分子的藥代動力學的影響和 ii) 對免疫效應細胞的脫靶激活，這種非特異性（即，不是由雙特異性分子的兩個結合結構域中的任一個誘導）固定是不利的，因此，已確定消融 F_cgR 結合性的各種 F_c 變體和突變。在此背景下，Morgan et al.1995, Immunology (The N-terminal end of the CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is

necessary for C1q, FcyRI and FcyRIII binding)公開了人 IgG1 的殘基233-236與來自人 IgG2 的相應序列交換(即，殘基 233P、234V 和 235A，其中在第 236 位置不存在氨基酸），導致消除 F_cgRI 結合、消除 C1q 結合並減少 F_cgRIII 結合。EP1075496 公開了具有 F_c 區變異的抗體和其他含 F_c 的分子（例如，233P、234V、235A 中的一個或多個，且在第 236 位置無殘基或 G 以及 327G、330S 和 331S），其中重組抗體能夠與靶分子結合而不引發顯著的補體依賴性裂解或細胞介導的靶標破壞。

【0114】 因此，在一些實施方案中，F_c 區包含或進一步包含一種或多種選自 233P、234V、235A、236（無殘基）或 G、327G、330S、331S 組成組中的氨基酸或缺失，優選為 F_c 區包含或進一步包含氨基酸 233P、234V、235A、236（無殘基）或 G 以及選自 327G、330S、331S 組成組中的一個或多個氨基酸，最優選為 F_c 區包含或進一步包含氨基酸 233P、234V、235A、236（無殘基）和 331S。

【0115】 在另一實施方案中，F_c 結構域包含或進一步包含氨基酸取代基 N297Q、N297G 或 N297A，優選為 N297Q。

【0116】 氨基酸取代基「N297Q」、「N297G」或「N297A」是指消除 F_c 結構域內天然 N-糖基化位點的第 297 位置的氨基酸取代基。此氨基酸取代基可進一步阻止 F_c-γ-受

體相互作用，並可降低終蛋白產物（即本發明的雙特異性抗原結合蛋白）的變異性，這是由糖殘基所致，描述參見，例如，Tao, MH and Morrison, SL (J Immunol.1989 Oct 15;143(8):2595-601.) 一文。

【0117】 在一進一步實施方案中，特別是無輕鏈時，F_c 結構域包含或進一步包含氨基酸取代基 C220S。氨基酸取代「C220S」可刪除形成 C_{H1}-CL 二硫鍵的半胱氨酸。

【0118】 在一些實施方案中，F_c 結構域包含或進一步包含至少兩個額外的半胱氨酸殘基，例如：S354C 和 Y349C 或 L242C 和 K334C，其中 S354C 位於一個多肽的 F_c 結構域中（例如：F_{c1}），而 Y349C 位於另一個多肽的 F_c 結構域（例如：F_{c2}），以形成異二聚體和/或其中 L242C 和 K334C 位於一個或兩個多肽的F_{c1} 或 F_{c2} 的同一 F_c 結構域中，以形成結構域內 C-C 橋。

【0119】 當提及多肽（即，本發明的雙特異性抗原結合蛋白）或核苷酸序列時，「純化的」和「分離的」系指所示的分子在基本上不存在同類型其他生物大分子的情況下存在。本文所用的術語「純化的」特別是指存在至少 75%、85%、95% 或 98% 重量的相同類型生物大分子。

【0120】 編碼特定多肽的「分離的」核酸分子系指一種核酸分子，其基本上沒有不編碼目標多肽的其他核酸分子；但是，所述分子可能包括一些額外的鹼基或部分，其不會對組合物的基本特性產生有害影響。

【0121】 「結構域」可以是任何蛋白質區域，其通常根據序列同源性定義並通常與特定的結構性或功能性實體有關。

【0122】 「重組」分子是透過重組手段製備、表達、產生或分離的分子。

【0123】 術語「基因」是指編碼或對應於特定氨基酸序列的 DNA 序列，所述特定氨基酸序列包含一種或多種蛋白質或酶的全部或部分，可能包括也可能不包括調節性 DNA 序列，例如：啟動子序列，其確定例如基因表達的條件。某些不是結構性基因的基因可能由 DNA 轉錄為 RNA，但不會轉譯為氨基酸序列。其他基因可充當結構性基因的調節因子或 DNA 轉錄的調節因子。特別地，術語基因可用於編碼蛋白質的基因組序列，即，包含調節因子、啟動子、內含子和外顯子序列的序列。

【0124】 「親和力」理論上定義為雙特異性抗原結合蛋白與抗原之間的平衡結合，在本發明背景下，定義為雙特異性抗原結合蛋白與其抗原 TA/MHC 或 TA-C/MHC 或 CD3 之間的平衡結合。例如，親和力可以一半最大有效濃度（EC_{50}，有時也稱為一半最大結合濃度（EC_{50}））或平衡解離常數（K_D）表示。

【0125】 「K_D」是雙特異性抗原結合蛋白與其抗原之間的平衡解離常數，即 k_{off}/k_{on} 之比。K_D 和親和力成反比。K_D 值與雙特異性抗原結合蛋白濃度有關，K_D 值越低，雙特異性抗原結合蛋白的親和力越高。親和力，即 K_D 值，

可透過多種已知方法進行實驗評估，例如：使用表面等離振子共振（SPR）或生物膜層干涉（BLI）技術測量締合和解離速率，下文「雙特異性抗原結合蛋白」章節做更詳細的描述。

【0126】 「一半最大有效濃度」，也稱為「EC_{50}」，通常是指在指定的暴露時間之後誘導介於基線和最大值中間的反應的分子濃度。EC_{50} 和親和力成反比，EC_{50} 值越低，分子的親和力越高。在一實施例中，「EC_{50}」是指本發明的雙特異性抗原結合蛋白濃度，其在指定的暴露時間之後誘導介於基線和最大值中間的反應，更具體地，是指在指定的暴露時間之後誘導介於基線和最大值中間的反應的本發明的雙特異性抗原結合蛋白濃度。EC_{50} 值可透過多種已知方法進行實驗評估，例如：使用 IFN-γ 釋放測定法或 LDH 釋放測定法，實施例 2 和 5 中的實驗章節做更詳細的描述。本發明背景下，EC_{50} 值優選為透過 LDH 釋放測定法測定，因此指誘導細胞毒性。

【0127】 本文中的「診斷劑」系指可檢測的分子或物質，例如：螢光分子、放射性分子或本領域已知的（直接或間接）提供信號的任何其他標記物。

【0128】 本領域已知的「螢光分子」包括異硫氰酸螢光素(FITC)，藻紅蛋白(PE)，用於藍色鐳射的螢光團(例如，PerCP、PE-Cy7、PE-Cy5、FL3 和 APC 或 Cy5、FL4），用於紅色、紫色或紫外鐳射的螢光團（例如，太平洋藍、太平洋橙）。

【0129】 「放射性分子」包括但不限於用於閃爍顯像檢查的放射性原子，例如：I^{123}、I^{124}、In^{111}、Re^{186}、Re^{188}、Tc^{99}。本發明的雙特異性抗原結合蛋白可能還包含用於核磁共振（NMR）成像（也稱為磁共振成像，MRI）的自旋標記物，例如：碘-123、銦-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、釓、錳或鐵。

【0130】 此類診斷劑可能與雙特異性抗原結合蛋白直接偶聯（即，物理連接），也可間接連接。

【0131】 本文中的「治療劑」系指具有治療作用的藥物。在一實施方案中，此類治療劑可為生長抑制劑，例如：細胞毒性劑或放射性同位素。

【0132】 可無差別使用的「生長抑制劑」或「抗增生劑」系指在體外或體內抑制細胞（特別是腫瘤細胞）生長的化合物或組合物。

【0133】 本文所用的術語「細胞毒性劑」系指抑制或妨礙細胞功能和/或導致細胞破壞的物質。術語「細胞毒性劑」意圖包括化學治療劑、酶、抗生素和毒素（例如：細菌、真菌、植物或動物來源的小分子毒素或酶活性毒素，包括其片段和/或變體）以及下文公開的各種抗腫瘤劑或抗癌藥。在一些實施方案中，細胞毒性劑為紫杉醇、長春蔓、紫杉烷、美登木素或美登木素類似物（例如，DM1 或DM4）、小分子藥物、妥美黴素或吡咯苯二氮卓衍生物、隱藻素衍生物、瘦黴素衍生物、奧瑞他汀或海兔毒素類似

物、前藥、拓撲異構酶 II 抑制劑、DNA 烷基化劑、抗微管蛋白劑、CC-1065 或 CC-1065 類似物。

【0134】 術語「放射性同位素」意圖包括適合於治療癌症的放射性同位素，例如：At^{211}、Bi^{212}、Er^{169}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、In^{111}、P^{32}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Sr^{89} 以及 Lu 的放射性同位素。此類放射性同位素通常主要發射 β 射線。在一實施方案中，放射性同位素為 α 發射體同位素，更確切地說為發射 α 輻射線的鈈 227。

【0135】 本文的「PK 修飾部分」系指修飾本發明雙特異性抗原結合蛋白藥代動力學（PK）的部分。因此，所述部分特別修飾本發明雙特異性抗原結合蛋白的體內半衰期和分佈。在一優選實施方案中，PK 修飾部分增加雙特異性抗原結合蛋白的半衰期。PK 修飾部分的實例包括但不限於 PEG（Dozier et al.,（2015）Int J Mol Sci.Oct 28;16(10):25831-64 and Jevsevar et al.,（2010）Biotechnol J.Jan;5(1):113-28）、PAS 化（Schlapschy et al.,（2013）Protein Eng Des Sel.Aug;26(8):489-501）、白蛋白（Dennis et al.,（2002）J Biol Chem.Sep 20;277(38):35035-43）、抗體和/或非結構化多肽的 F_c 部分（Schellenberger et al.,（2009）Nat Biotechnol.Dec;27(12):1186-90）。

雙特異性抗原結合蛋白

【0136】 本發明的發明人按實施例 1 中所述將小鼠單克隆抗體抗 CD3 抗體 UCHT1 進行人源化，獲得了人源化單克隆抗體 UCHT1（V17）。與本領域已知的 UCHT1（V9）相比，所得的人源化單克隆抗體 UCHT1（V17）穩定性增加和/或溶解度增加。

【0137】 然後，發明人使用原理驗證實驗在實施例 2 中證明，當對其靶標具有中等親和力的 T 細胞募集抗體（例如，靶向作用於 TCRαβ 的 BMA31）的可變結構域與成熟 TCR 可變結構域組合使用時，相較於使用高親和力抗 CD3 抗體（例如，UCHT1（V17））與相同 TCR 可變結構域的抗原結合蛋白，所得雙特異性抗原結合蛋白的安全窗更廣得多。

【0138】 這些新的抗原結合蛋白，特別是 TCER® 分子形式的抗原結合蛋白，對腫瘤細胞顯示出高細胞毒性。例如，對於 TCER® 分子形式的新抗原結合蛋白，對 NCI-H1755、Hs695T 細胞和 U2OS 的半數最大有效濃度（EC_{50}）為 1 pM 至 100 pM，更特別地，對細胞為 1 pM 至 20 pM，因此，與正常組織細胞的 EC_{50} 相比，本發明的抗原結合蛋白對患病細胞的 EC_{50} 降低 1000 倍以上（如：腫瘤細胞系 Hs695T 對比原代細胞），顯示出較高的安全性。

【0139】 因此，發明人產生了高親和力抗 CD3 抗體 UCHT1(V17) 的中等親和力變體（V20、V21、V23、V17opt、V20opt、V21opt 和 V23opt），從而創建

多種適合與 TCR 可變結構域組合使用的 T 細胞募集可變結構域，從而獲得具有有利安全性窗口的雙特異性抗體。

【0140】 因此，本發明涉及包含至少兩個抗原結合位點（A 和 B）的雙特異性抗原結合蛋白，其中，抗原結合位點 A 與 CD3 結合，優選為與 CD3ε/δ 複合體結合，其中抗原結合位點 B 與靶抗原（TA）肽/MHC 複合體結合，優選為與 TAA 抗原肽/MHC 複合體結合，其中抗原結合位點 A 包含重鏈可變結構域（V_H）和輕鏈可變結構域（V_L），且

a) 其中所述 V_L 包含三個互補決定區（CDR）CDRL1、CDRL2 和 CDRL3，其中

CDRL1 包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列「RASQDIRNYLN」或由其組成，

CDRL2 包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列「YTSRLHS」或由其組成，和

CDRL3 包含 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列「QQGQTLPWT」或由其組成，和

b) 其中所述 V_H 包含三個互補決定區（CDR）CDRH1、CDRH2 和 CDRH3，其中

CDRH1 包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列「X_1YTMN」或由其組成，其中 X_1 為 G 或 E，優選為 G，

CDRH2 包含「LINPX_2X_3GVX_4TYAQKX_5QX_6」SEQ ID NO:5 的氨基酸序列或由其組成，其中 X_2 為任何氨基酸，優選為 Q、Y 或 E，更優選為 Q 或 Y（例如 Q），

X_3 為任何氨基酸，優選為 R、K 或 E，更優選為 R 或 K（例如 K），X_4 為任何氨基酸，優選為 S 或 T，更優選為 S，X_5 為任何氨基酸，優選為 F 或 V，更優選為 F，X_6 為任何氨基酸，優選為 G 或 D，更優選為 D，和 CDRH3 包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列「SGYYYGX$_7$SWYFDV」或由其組成，其中 X_7 為任何氨基酸，優選為 E 或 D，更優選為 D。

【0141】 在一實施方案中，當 CDRH2 包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列「LINPYKGVSTYAQKFQD」或由其組成且 CDRH3 包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列「SGYYYGDSDWYFDV」或由其組成時，CDRH1 的 X_1 為 E。

【0142】 在一實施方案中，所述 VH 包含根據 SEQ ID NO: 4 的 CDRH1、根據 SEQ ID NO: 5 的 CDRH2 和根據 SEQ ID NO: 7 的 CDRH3，條件是 CDRH1 不包含 SEQ ID NO: 133 或不由其組成，CDRH2 不包含 SEQ ID NO: 7 或不由其組成，CDRH3 不包含 SEQ ID NO: 8 或不由其組成。

【0143】 在一特別實施方案中，本發明涉及包含至少兩個抗原結合位點（A 和 B）的雙特異性抗原結合蛋白，其中，抗原結合位點 A 與 CD3 結合，優選為與 CD3ε/δ 複合體結合，其中抗原結合位點 B 與靶抗原（TA）肽/MHC 複合體結合，優選為與 TAA 抗原肽/MHC 複合體結合，其

中抗原結合位點 A 包含重鏈可變結構域（V_H）和輕鏈可變結構域（V_L），且

a） 其中所述 VL 包含三個互補決定區（CDR）CDRL1、CDRL2 和 CDRL3，其中

CDRL1 包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列「RASQDIRNYLN」或由其組成，

CDRL2 包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列「YTSRLHS」或由其組成，和

CDRL3 包含 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列「QQGQTLPWT」或由其組成，和

b） 其中所述 VH 包含三個互補決定區（CDR）CDRH1、CDRH2 和 CDRH3，其中

CDRH1 包含 SEQ ID NO: 133 的氨基酸序列「GYTMN」或 SEQ ID NO: 134 的「EYTMN」，優選為 SEQ ID NO: 133 的 GYTMN，或任選地與 SEQ ID NO: 133 或 134 不同的氨基酸序列（不同點為：至少有一個氨基酸取代基，優選為一個或兩個氨基酸取代基，或僅一個氨基酸取代基）或由其組成，其中優選與 SEQ ID NO: 133 或 134 不同的氨基酸序列包含 31G 或 31E，

CDRH2 包含選自由 SEQ ID NO: 135 至 142 的氨基酸序列組成組的氨基酸序列或由其組成，或任選地與 SEQ ID NO: 133 或 134 不同的氨基酸序列（不同點為：至少有一個氨基酸取代基，優選為一個、兩個、三或四個氨

基酸取代基，優選為一個或兩個氨基酸取代基，或僅一個氨基酸取代基），其中優選為與SEQ ID NO: 133或134不同的氨基酸序列包含氨基酸 61A 以及任選地氨基酸54Q、54E 或 54Y、55R 或 55E、58S 或 58T、64F 或 64V、65Q、66D 或 66G 中的至少一個，優選為 66D，和

CDRH3 包含 SEQ ID NO: 8 或 144 的氨基酸序列或由其組成，或任選地與 SEQ ID NO: 8 或 144 不同的氨基酸序列（不同點為：至少有一個氨基酸取代基，優選為一個、兩個、三或四個氨基酸取代基，優選為一個或兩個氨基酸取代基，或僅一個氨基酸取代基），其中優選為與 SEQ ID NO: 8 或 134 不同的氨基酸序列包含氨基酸 104E。

【0144】 本發明進一步涉及抗原結合蛋白，其包含本發明背景下所公開 CDR 氨基酸序列的變體，通常為 CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2 和/或 CDRH3 的變體，此類變體可能至少包含一個，例如四個、三個、兩個或一個，優選為一個、兩個或三個氨基酸取代基，其中優選的氨基酸取代基數量優選的取決於各 CDR 的長度。

【0145】 在一些實施方案中，CDRL1 包含與本文所公開 CDRL1 氨基酸序列不同的氨基酸序列或由其組成，不同點為：至少有一個氨基酸取代基，優選為一個、兩個、三個或四個氨基酸取代基，優選為一個、兩個或三個氨基酸取代基，優選為一個或兩個氨基酸取代基（例如一個氨基

酸取代基），其中所述氨基酸取代基優選為在第27、28、30和31位置處。

【0146】 在一些實施方案中，CDRL2包含與本文所公開CDRL2氨基酸序列不同的氨基酸序列或由其組成，不同點為：至少有一個氨基酸取代基，優選為一個、兩個或三個氨基酸取代基，優選為一個或兩個氨基酸取代基（例如一個氨基酸取代基），其中所述氨基酸取代基優選為在第51、52和53位置處。

【0147】 在一些實施方案中，CDRL3包含與本文所公開CDRL3氨基酸序列不同的氨基酸序列或由其組成，不同點為：至少有一個氨基酸取代基，優選為一個、兩個、三個或四個氨基酸取代基，優選為一個或兩個氨基酸取代基（例如一個氨基酸取代基），其中所述氨基酸取代基優選為在氨基酸第93、94和95任意位置處。

【0148】 在一優選實施方案中，突變可發生於抗原結合位點A的重鏈可變結構域的CDR。

【0149】 因此，在一些實施方案中，CDRH1包含與本文所公開CDRH1氨基酸序列不同的氨基酸序列或由其組成，不同點為：至少有一個氨基酸取代基，優選為一個或兩個或三個氨基酸取代基，優選為一個氨基酸取代基，其中所述氨基酸取代基優選為在氨基酸第31至35任意位置處。

【0150】 在一些實施方案中，CDRH2包含與本文所公開CDRH2氨基酸序列不同的氨基酸序列或由其組成，不同

點為：至少有一個氨基酸取代基，優選為一個、兩個、三個或四個氨基酸取代基，優選為一個、兩個或三個氨基酸取代基，優選為一個或兩個氨基酸取代基（例如一個氨基酸取代基），其中所述氨基酸取代基優選為在氨基酸第54、55和57至59任意位置處。

【0151】 在一些實施方案中，CDRH3包含與本文所公開CDRH3氨基酸序列不同的氨基酸序列或由其組成，不同點為：至少有一個氨基酸取代基，優選為一個、兩個、三個或四個氨基酸取代基，優選為一個或兩個氨基酸取代基（例如一個氨基酸取代基），其中所述氨基酸取代基優選為在氨基酸第105、107和110任意位置處。

【0152】 在一優選實施方案中，輕鏈可變結構域和重鏈可變結構域進一步包含輕鏈和重鏈框架區。

【0153】 在一實施方案中，所述輕鏈可變結構域還包含一個或多個框架區，優選為選自由FR1-L、FR2-L、FR3-L和FR4-L組成組的FR1-L、FR2-L、FR3-L和FR4-L，其中

FR1-L包含SEQ ID NO: 11的「DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC」氨基酸序列或與SEQ ID NO: 11具有至少85%同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與SEQ ID NO: 11具有至少85%同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸6Q和/或23C，

FR2-L包含SEQ ID NO: 12的「WYQQKPGKAPKLLIY」或SEQ ID NO: 13的

「WYQQKPGKAVKLLIY」的氨基酸序列（優選為SEQ ID NO: 12）或與SEQ ID NO: 12或13具有至少85%同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與SEQ ID NO: 12或13具有至少85%同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸35W、36Y、38Q、44P、46L和/或49Y，

FR3-L包含SEQ ID NO: 14的「GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYFC」氨基酸序列或與SEQ ID NO: 14具有至少85%同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與SEQ ID NO: 14具有至少85%同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸57G、59P、62F、64G、66G、71Y、82D、86Y、87F、88C，

FR4-L包含SEQ ID NO: 15的「FGQGTKVEIKR」氨基酸序列或與SEQ ID NO: 15具有至少85%同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與SEQ ID NO: 15具有至少85%同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸98F和/或101G，

其中，VH還包含選自由FR1-H、FR2-H、FR3-H和FR4-H組成組中的一個或多個框架區，並且其中

FR1-H包含SEQ ID NO: 16的「EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT」氨基酸序列或與SEQ ID NO: 16具有至少85%同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與SEQ ID NO: 16具有至少85%同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸6Q、

14P、22C、24A、26G、27Y、28S、29F 和/或 30T 且任選地包含氨基酸取代基 Q5V、P9A、L11V、V12K、M18V 和/或 I20V 中的至少一個，

FR2-H 包含 SEQ ID NO: 17 的「WVRQAPGQGLEWMG」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 17 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 17 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選包含 36W、37V、39Q、45L、46E 和/或 47W 且任選地包含氨基酸取代基 K38R、S40A、H41P、K43Q、N44G 中的至少一個，

FR3-H 包含 SEQ ID NO: 18 的「RVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 18 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 18 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選包含 70L、72V、79A、90D、94Y、95Y、96C、97A 和/或 98R 且任選地包含氨基酸取代基 K67R、A68V、K74T、S76T、L84S、T87R 和/或 S91T 中的至少一個，和

FR4-H 包含 SEQ ID NO: 19 的「WGQGTLVTVSS」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 19 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 19 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選為包含 112W、113G、115G 且任選地包含氨基酸取代基 A114Q 和/或 T117L 中的至少一個。

【0154】 在另一實施方案中，所述輕鏈可變結構域還包含選自由 FR1-L、FR2-L、FR3-L 或 FR4-L 組成組中的一個或多個框架區，優選為 FR1-L、FR2-L、FR3-L 和 FR4-L，其中

FR1-L 包含 SEQ ID NO: 11 的「DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 11 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 11 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸 6Q 和/或 23C，

FR2-L 包含 SEQ ID NO: 12 的「WYQQKPGKAPKLLIY」或 SEQ ID NO: 13 的「WYQQKPGKAVKLLIY」的氨基酸序列或由其組成，優選為 SEQ ID NO: 12 或與 SEQ ID NO: 12 或 13 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列，其中與 SEQ ID NO: 12 或 13 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸 35W、36Y、38Q、44P、46L 和/或 49Y，

FR3-L 包含 SEQ ID NO: 14 的「GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYFC」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 14 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 14 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸 57G、59P、62F、64G、66G、71Y、82D、86Y、87F、88C，

FR4-L 包含 SEQ ID NO: 285 的「FGQGTKVEIK」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 15 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 15 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸 98F 和/或 101G，

其中，VH 還包含選自由 FR1-H、FR2-H、FR3-H 和 FR4-H 組成組中的一個或多個框架區，並且其中

FR1-H 包含 SEQ ID NO: 16 的「EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 16 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 16 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸 6Q、14P、22C、24A、26G、27Y、28S、29F 和/或 30T 且任選地包含氨基酸取代基 Q5V、P9A、L11V、V12K、M18V 和/或 I20V 中的至少一個，

FR2-H 包含 SEQ ID NO: 17 的「WVRQAPGQGLEWMG」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 17 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 17 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選包含 36W、37V、39Q、45L、46E 和/或 47W 且任選地包含氨基酸取代基 K38R、S40A、H41P、K43Q、N44G 中的至少一個，

FR3-H 包含 SEQ ID NO: 18 的「RVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR

」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 18 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 18 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選包含 70L、72V、79A、90D、94Y、95Y、96C、97A 和/或 98R 且任選地包含氨基酸取代基 K67R、A68V、K74T、S76T、L84S、T87R 和/或 S91T 中的至少一個，和

FR4-H 包含 SEQ ID NO: 19 的「WGQGTLVTVSS」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 19 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 19 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選為包含 112W、113G、115G 且任選地包含氨基酸取代基 A114Q 和/或 T117L 中的至少一個。

【0155】 在另一實施方案中，所述輕鏈可變結構域還包含選自由 FR1-L、FR2-L、FR3-L 或 FR4-L 組成組中的一個或多個框架區，優選為 FR1-L、FR2-L、FR3-L 和 FR4-L，其中

FR1-L 包含 SEQ ID NO: 11 的「DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 11 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 11 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸 6Q 和/或 23C，

FR2-L 包含 SEQ ID NO: 12 的「WYQQKPGKAPKLLIY」或 SEQ ID NO: 13 的「WYQQKPGKAVKLLIY」的氨基酸序列或由其組成，

優選為 SEQ ID NO: 12 或與 SEQ ID NO: 12 或 13 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，其中與 SEQ ID NO: 12 或 13 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸 35W、36Y、38Q、44P、46L 和/或 49Y，

FR3-L 包含 SEQ ID NO: 14 的「GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYFC」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 14 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 14 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸 57G、59P、62F、64G、66G、71Y、82D、86Y、87F、88C，

FR4-L 包含 SEQ ID NO: 285 的「FGQGTKVEIK」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 15 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 15 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸 98F 和/或 101G，

其中，VH 還包含選自由 FR1-H、FR2-H、FR3-H 和 FR4-H 組成組中的一個或多個框架區，並且其中

FR1-H 包含 SEQ ID NO: 16 的「EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 16 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 16 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸 6Q、14P、22C、24A、26G、27Y、28S、29F 和/或 30T 且

任選地包含氨基酸取代基 Q5V、P9A、L11V、V12K、M18V 和/或 I20V 中的至少一個，

FR2-H 包含 SEQ ID NO: 17 的「WVRQAPGQGLEWMG」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 17 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 17 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列優選包含 36W、37V、39Q、45L、46E 和/或 47W 且任選地包含氨基酸取代基 K38R、S40A、H41P、K43Q、N44G 中的至少一個，

FR3-H 包含 SEQ ID NO: 18 的「RVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 18 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 18 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列優選包含 70L、72V、79A、90D、94Y、95Y、96C、97A 和/或 98R 且任選地包含氨基酸取代基 K67R、A68V、K74T、S76T、L84S、T87R 和/或 S91T 中的至少一個，和

FR4-H 包含 SEQ ID NO: 19 的「WGQGTLVTVSS」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 19 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 19 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列優選為包含 112W、113G、115G 且任選地包含氨基酸取代基 A114Q 和/或 T117L 中的至少一個。

【0156】 在另一實施方案中，所述輕鏈可變結構域還包含選自由 FR1-L、FR2-L、FR3-L 或 FR4-L 組成組中的一個或多個框架區，優選為 FR1-L、FR2-L、FR3-L 和 FR4-L，其中

FR1-L 包含 SEQ ID NO: 11 的「DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 11 具有至少 95% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 11 具有至少 95% 同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸 6Q 和/或 23C，

FR2-L 包含 SEQ ID NO: 12 的「WYQQKPGKAPKLLIY」或 SEQ ID NO: 13 的「WYQQKPGKAVKLLIY」的氨基酸序列或由其組成，優選為 SEQ ID NO: 12 或與 SEQ ID NO: 12 或 13 具有至少 95% 同一性的氨基酸序列，其中與 SEQ ID NO: 12 或 13 具有至少 95% 同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸 35W、36Y、38Q、44P、46L 和/或 49Y，

FR3-L 包含 SEQ ID NO: 14 的「GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYFC」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 14 具有至少 95% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 14 具有至少 95% 同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸 57G、59P、62F、64G、66G、71Y、82D、86Y、87F、88C，

FR4-L 包含 SEQ ID NO: 285 的「FGQGTKVEIK」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 15 具有至少 95% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 15 具有至少 95% 同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸 98F 和/或 101G，

其中，VH 還包含選自由 FR1-H、FR2-H、FR3-H 和 FR4-H 組成組中的一個或多個框架區，並且其中

FR1-H 包含 SEQ ID NO: 16 的「EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 16 具有至少 95% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 16 具有至少 95% 同一性的氨基酸序列優選為包含氨基酸 6Q、14P、22C、24A、26G、27Y、28S、29F 和/或 30T 且任選地包含氨基酸取代基 Q5V、P9A、L11V、V12K、M18V 和/或 I20V 中的至少一個，

FR2-H 包含 SEQ ID NO: 17 的「WVRQAPGQGLEWMG」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 17 具有至少 95% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 17 具有至少 95% 同一性的氨基酸序列優選包含 36W、37V、39Q、45L、46E 和/或 47W 且任選地包含氨基酸取代基 K38R、S40A、H41P、K43Q、N44G 中的至少一個，

FR3-H 包含 SEQ ID NO: 18 的「RVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR

」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 18 具有至少 95% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 18 具有至少 95% 同一性的氨基酸序列優選包含 70L、72V、79A、90D、94Y、95Y、96C、97A 和/或 98R 且任選地包含氨基酸取代基 K67R、A68V、K74T、S76T、L84S、T87R 和/或 S91T 中的至少一個，和 FR4-H 包含 SEQ ID NO: 19 的「WGQGTLVTVSS」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 19 具有至少 95% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 19 具有至少 95% 同一性的氨基酸序列優選為包含 112W、113G、115G 且任選地包含氨基酸取代基 A114Q 和/或 T117L 中的至少一個。

【0157】 發明人確定 FR2-L 的氨基酸 35W、36Y、46L 和 49Y 以及 FR3-L 的氨基酸 64G、71Y 位於游標區，並且優選為不被取代。

【0158】 發明人確定 FR-1H 的氨基酸27Y、28S、29F 和 30T、FR2-H 的氨基酸 47W、FR3-H 的氨基酸 70L、72V、79A、97A 和 98R、FR4-H 的 112W 位於游標區，並且優選為不被取代。

【0159】 本文所述抗原結合蛋白的變體考慮並明確指使用「與參考序列至少85% 相同」的措辭，如上文定義章節所定義。例如，序列 FR1-L、FR2-L、FR3-L 和 FR4-L 以及 FR1-H、FR2-H、FR3-H 和 FR4-H 可適當地與參考序列 SEQ ID NO: 11 至 SEQ ID NO: 19 不同，

不同點在於：至少有一個氨基酸取代基，特別是至少有一個保守氨基酸取代基和/或規範殘基取代基。特別是，輕鏈和重鏈可變結構域的序列 FR1-L、FR2-L、FR3-L 和 FR4-L 以及 FR1-H、FR2-H、FR3-H 和 FR4-H 可與參考序列 SEQ ID NO: 11 至 SEQ ID NO: 19 不同，不同點僅在於保守氨基酸取代基。

【0160】 可對本發明雙特異性抗原結合蛋白的氨基酸序列和相應的 DNA 序列分別進行修飾和改變，並且仍可產生具有所需特性的功能性抗原結合蛋白或多肽。修飾可在抗原結合位點 A 的重鏈和輕鏈可變結構域中或在抗原結合位點 B 的 α 和 β 或 γ 和 δ 可變結構域中進行，特別是在抗原結合位點 A 的重鏈和輕鏈可變結構域包含的框架區中或每個 CDR 中或所有 CDR 中或在 α 和 β 或 γ 和 δ 可變結構域包含的框架區中或每個 CDR 中或所有 CDR 中進行。

【0161】 雙特異性抗原結合蛋白可能包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 FR2-L，其中該 FR2-L 的氨基酸序列與 SEQ ID NO: 12 或 13 至少具有 85% 同一性且包含氨基酸 44P。此氨基酸 44P（位於人種系序列 Vk1-018）具有使人源化可變結構域去免疫的優勢，因為在 10 種最相似人種系中的此位置常見脯氨酸。

【0162】 本文的「去免疫」是指降低免疫原性，即，在受試者中誘導免疫反應的能力。這透過用人類種系中最常見

的氨基酸取代氨基酸來完成，從而使免疫系統無法將其識別為外來物。

【0163】 因此，在一實施方案中，在本發明雙特異性抗原結合蛋白的背景下，抗原結合位點 A 包含重鏈可變結構域（V_H）和輕鏈可變結構域（V_L），

其中所述 V_L 包含 SEQ ID NO: 145 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO 145 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 145 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 1 的 CDRL1、SEQ ID NO: 2 的 CDRL2 和 SEQ ID NO: 3 的 CDRL3 的氨基酸序列，和

其中所述 V_H 包含以下或由以下組成：選自 SEQ ID NO: 149 至 SEQ ID NO: 160 的氨基酸序列的氨基酸序列組中選擇的氨基酸序列或與選自由 SEQ ID NO: 149 至 SEQ ID NO: 160 的氨基酸序列組成的氨基酸序列組中的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 149 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 138 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 150 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID

NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 139 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 151 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 134 的 CDRH1、SEQ ID NO: 138 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 152 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 140 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 153 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 141 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 154 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 142 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 155 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 134 的 CDRH1、SEQ ID NO: 142 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 156 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID

NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 7 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 144 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 157 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 138 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 144 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 158 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 134 的 CDRH1、SEQ ID NO: 7 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 159 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 134 的 CDRH1、SEQ ID NO: 7 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 144 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 160 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 134 的 CDRH1、SEQ ID NO: 138 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 144 的 CDRH3 的氨基酸序列。

【0164】 因此，在一實施方案中，在本發明雙特異性抗原結合蛋白的背景下，抗原結合位點 A 包含重鏈可變結構域（V_H）和輕鏈可變結構域（V_L），

其中所述 V_L 包含 SEQ ID NO: 286 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO 286 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID

NO: 286 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 1 的 CDRL1、SEQ ID NO: 2 的 CDRL2 和 SEQ ID NO: 3 的 CDRL3 的氨基酸序列，和

其中所述 V_H 包含以下或由以下組成：選自 SEQ ID NO: 149 至 SEQ ID NO: 160 的氨基酸序列的氨基酸序列組中選擇的氨基酸序列或與選自由 SEQ ID NO: 149 至 SEQ ID NO: 160 的氨基酸序列組成的氨基酸序列組中的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列，並且其中，優選為與 SEQ ID NO: 149 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 138 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 150 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 139 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 151 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 134 的 CDRH1、SEQ ID NO: 138 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 152 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID

NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 140 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 153 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 141 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 154 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 142 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 155 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 134 的 CDRH1、SEQ ID NO: 142 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 156 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 7 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 144 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 157 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 138 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 144 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 158 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID

NO: 134 的 CDRH1、SEQ ID NO: 7 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 159 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 134 的 CDRH1、SEQ ID NO: 7 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 144 的 CDRH3 的氨基酸序列，和

其中，優選為與 SEQ ID NO: 160 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 134 的 CDRH1、SEQ ID NO: 138 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 144 的 CDRH3 的氨基酸序列。

【0165】 在一優選實施方案中，所述 V_L 包含 SEQ ID NO: 286 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO 286 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 286 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 1 的 CDRL1、SEQ ID NO: 2 的 CDRL2 和 SEQ ID NO: 3 的 CDRL3 的氨基酸序列，和

其中所述 V_H 包含 SEQ ID NO: 156 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO 156 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中優選為與 SEQ ID NO: 156 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 7 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 144 的 CDRH3 的氨基酸序列，或

其中所述 V_H 包含 SEQ ID NO: 149 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO 149 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 149 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 138 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，或

其中所述 V_H 包含 SEQ ID NO: 151 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO 151 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 151 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 134 的 CDRH1、SEQ ID NO: 138 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列。

【0166】 在一優選實施方案中，所述 V_L 包含 SEQ ID NO: 286 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO 286 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 286 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的所述氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 1 的 CDRL1、SEQ ID NO: 2 的 CDRL2 和 SEQ ID NO: 3 的 CDRL3 的氨基酸序列，和

其中所述 V_H 包含 SEQ ID NO: 156 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO 156 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中優選為與 SEQ

ID NO: 156 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的所述氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 7 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 144 的 CDRH3 的氨基酸序列，或

其中所述 V_H 包含 SEQ ID NO: 149 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO 149 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 149 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的所述氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 138 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，或

其中所述 V_H 包含 SEQ ID NO: 151 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO 151 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 151 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的所述氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 134 的 CDRH1、SEQ ID NO: 138 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列。

【0167】 在一優選實施方案中，所述 V_L 包含 SEQ ID NO: 286 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO 286 的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 286 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 1 的

CDRL1、SEQ ID NO: 2 的 CDRL2 和 SEQ ID NO: 3 的 CDRL3 的氨基酸序列，和

其中所述 V_H 包含 SEQ ID NO: 156 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO 156 的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中優選為與 SEQ ID NO: 156 的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的所述氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 7 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 144 的 CDRH3 的氨基酸序列，或

其中所述 V_H 包含 SEQ ID NO: 149 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO 149 的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 149 的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的所述氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 133 的 CDRH1、SEQ ID NO: 138 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列，或

其中所述 V_H 包含 SEQ ID NO: 151 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO 151 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中與 SEQ ID NO: 151 的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的所述氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 134 的 CDRH1、SEQ ID NO: 138 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 8 的 CDRH3 的氨基酸序列。

【0168】 在一些實施方案中，本發明雙特異性抗原結合蛋白的抗原結合位點 B 包含抗體或其片段或 α 鏈可變結構域（v_α）和 β 鏈可變結構域（v_β）或 γ 鏈可變結構域（v_γ）或 δ 鏈可變結構域（v_δ）或由其組成。抗體及其片段的定義見上文「定義」章節。

【0169】 在一些實施方案中，本發明雙特異性抗原結合蛋白的抗原結合位點 B 包含 α 鏈可變結構域（v_α）和 β 鏈可變結構域（v_β）或 γ 鏈可變結構域（v_γ）或 δ 鏈可變結構域（v_δ），優選為 v_α 和 v_β 結構域。在本發明背景下可能使用的且與特異性 TA 結合的 α 鏈可變結構域（v_α）和 β 鏈可變結構域（v_β）或 γ 鏈可變結構域（v_γ）或 δ 鏈可變結構域（v_δ）的詳細描述參見 WO2018172533、WO2018033291、WO2017158103、WO2018104438、WO2018104478、WO2019002444、WO2017158116。

【0170】 因此，在一實施方案中，所述 v_α 和 v_β 或 v_γ 和 v_δ 包含 WO2018172533、WO2018033291、WO2017158103、WO2018104438、WO2018104478、WO2019002444、WO2017158116 中公開的氨基酸序列或由其組成，並且現有技術中引述的 v_α 和 v_β 或 v_γ 和 v_δ 與同一專利申請中公開的 TA 肽（特別是 TAA 肽）結合。

【0171】 在一實施方案中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白包含 v_α 和 v_β 結構域或 v_γ 和 v_δ 結構域，其中

i) v_α 或 v_γ 包含選自由以下組成組的氨基酸序列或由其組成：

「EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP」SEQ ID NO:20、

「EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP」SEQ ID NO:21、

「EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTESSSTYLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP」SEQ ID NO:22，或與選自由 SEQ ID NO: 20、21 和 22 組成組的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列，並且其中優選與 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 23 的 CDRa1、SEQ ID NO: 24 的 CDRa2 和 SEQ ID NO: 25 的 CDRa3 的氨基酸序列，其中優選與 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 23 的 CDRa1、SEQ ID NO: 26 的 CDRa2 和 SEQ ID NO: 25 的 CDRa3 的氨基酸序列，其中優選與 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選

包含 SEQ ID NO: 27 的 CDRa1、SEQ ID NO: 26 的 CDRa2 和 SEQ ID NO: 25 的 CDRa3 的氨基酸序列，並且其中所述第一可變結構域的氨基酸優選包含氨基酸 19V 和/或 48K，和

v_β 或 v_δ 包含「DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYL FWYRQTMMRGLELLFYFCYGTPCDDSGMPEDRF SAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRADTG ELFFGEGSRLTVL」SEQ ID NO:30 的氨基酸序列或與由 SEQ ID NO 30 組成的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中優選為與 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選分別包含 SEQ ID NO: 31 的 CDRb1、SEQ ID NO: 34 的 CDRb2 和 SEQ ID NO: 35 的 CDRb3 的氨基酸序列並任選地包含氨基酸 54F 和/或 66C，或

(ii) v_α 或 v_γ 包含 SEQ ID NO: 48 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO 48 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中優選為與 SEQ ID NO: 48 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 49 的 CDRa1、SEQ ID NO: 50 的 CDRa2 和 SEQ ID NO: 51 的 CDRa3 的氨基酸序列，和

v_β 或 v_δ 包含 SEQ ID NO: 44 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 44 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中優選為與SEQ ID NO: 44 的氨基

酸序列具有至少85%同一性的所述氨基酸序列包含SEQ ID NO: 45的CDRb1、SEQ ID NO: 46的CDRb2和SEQ ID NO: 47的CDRb3的氨基酸序列。

【0172】 在一實施方案中，本文在本發明抗原結合蛋白背景下所定義的第一可變結構域和第二可變結構域根據IMGT編號在第44位置處可能包含氨基酸取代基。在一優選實施方案中，第44位置處的所述氨基酸被另一種合適氨基酸取代，以改善配對。在特定的實施方案中，優選為其中所述抗原結合蛋白為TCR的實施方案中，所述氨基酸取代改善例如鏈的配對（即α和β鏈的配對或γ和δ的配對）。在一優選實施方案中，第一可變結構域第44位置處（$v_1$44）以及第二可變結構域第44位置處（$v_2$44）存在的一個或兩個氨基酸被取代為選自由$v_1$44D/$v_2$44R、$v_1$44R/$v_2$44D、$v_1$44E/$v_2$44K、$v_1$44K/$v_2$44E、$v_1$44D/$v_2$44K、$v_1$44K/$v_2$44D、$v_1$44R/$v_2$44E; $v_1$44E/$v_2$44R、$v_1$44L/$v_2$44W、$v_1$44W/$v_2$44L、$v_1$44V/$v_2$44W、$v_1$44W/$v_2$44V組成的氨基酸對組的氨基酸對 $v_1$44/$v_2$44。

【0173】 因此，在另一實施方案中，抗原結合蛋白可進一步包括選自由以下組成組的優選取代對之一（$v_1$44/$v_2$44）：v_1Q44D/v_2Q44R; v_1Q44R/v_2Q44D; v_1Q44E/v_2Q44K; v_1Q44K/v_2Q44E; v_1Q44D/v_2Q44K; v_1Q44K/v_2Q44D; v_1Q44E/v_2Q44R; v_1Q44R/v_2Q44E;

v_1Q44L/v_2Q44W;		v_1Q44W/v_2Q44L;
v_1Q44V/v_2Q44W;	和	v_1Q44W/v_2Q44V;
v_1W44D/v_2Q44R;		v_1W44R/v_2Q44D;
v_1W44E/v_2Q44K;		v_1W44K/v_2Q44E;
v_1W44D/v_2Q44K;		v_1W44K/v_2Q44D;
v_1W44E/v_2Q44R;		v_1W44R/v_2Q44E;
v_1W44L/v_2Q44W;		v_1W44/v_2Q44L;
v_1W44V/v_2Q44W;	和	v_1W44/v_2Q44V;
v_1H44D/v_2Q44R;		v_1H44R/v_2Q44D;
v_1H44E/v_2Q44K;		v_1H44K/v_2Q44E;
v_1H44D/v_2Q44K;		v_1H44K/v_2Q44D;
v_1H44E/v_2Q44R;		v_1H44R/v_2Q44E;
v_1H44L/v_2Q44W;		v_1H44W/v_2Q44L;
v_1H44V/v_2Q44W;	和	v_1H44W/v_2Q44V;
v_1K44D/v_2Q44R;		v_1K44R/v_2Q44D;
v_1K44E/v_2Q44K;		v_1K44/v_2Q44E;
v_1K44D/v_2Q44K;		v_1K44/v_2Q44D;
v_1K44E/v_2Q44R;		v_1K44R/v_2Q44E;
v_1K44L/v_2Q44W;		v_1K44W/v_2Q44L;
v_1K44V/v_2Q44W;	和	v_1K44W/v_2Q44V;
v_1E44D/v_2Q44R;		v_1E44R/v_2Q44D;
v_1E44/v_2Q44K;		v_1E44K/v_2Q44E;
v_1E44D/v_2Q44K;		v_1E44K/v_2Q44D;
v_1E44/v_2Q44R;		v_1E44R/v_2Q44E;

v_1E44L/v_2Q44W;		v_1E44W/v_2Q44L;
v_1E44V/v_2Q44W;	和	v_1E44W/v_2Q44V;
v_1Q44D/v_2R44;		v_1Q44R/v_2R44D;
v_1Q44E/v_2R44K;		v_1Q44K/v_2R44E;
v_1Q44D/v_2R44K;		v_1Q44K/v_2R44D;
v_1Q44E/v_2R44;		v_1Q44R/v_2R44E;
v_1Q44L/v_2R44W;		v_1Q44W/v_2R44L;
v_1Q44V/v_2R44W;	和	v_1Q44W/v_2R44V;
v_1W44D/v_2R44;		v_1W44R/v_2R44D;
v_1W44E/v_2R44K;		v_1W44K/v_2R44E;
v_1W44D/v_2R44K;		v_1W44K/v_2R44D;
v_1W44E/v_2R44;		v_1W44R/v_2R44E;
v_1W44L/v_2R44W;		v_1W44/v_2R44L;
v_1W44V/v_2R44W;	和	v_1W44/v_2R44V;
v_1H44D/v_2R44;		v_1H44R/v_2R44D;
v_1H44E/v_2R44K;		v_1H44K/v_2R44E;
v_1H44D/v_2R44K;		v_1H44K/v_2R44D;
v_1H44E/v_2R44;		v_1H44R/v_2R44E;
v_1H44L/v_2R44W;		v_1H44W/v_2R44L;
v_1H44V/v_2R44W;	和	v_1H44W/v_2R44V;
v_1K44D/v_2R44;		v_1K44R/v_2R44D;
v_1K44E/v_2R44K;		v_1K44/v_2R44E;
v_1K44D/v_2R44K;	v_1K44/v_2R44D;	v_1K44E/v_2R44;
v_1K44R/v_2R44E;		v_1K44L/v_2R44W;

v_1K44W/v_2R44L；　v_1K44V/v_2R44W；　和

v_1K44W/v_2R44V；　v_1E44D/v_2R44；

v_1E44R/v_2R44D；　v_1E44/v_2R44K；

v_1E44K/v_2R44E；　v_1E44D/v_2R44K；

v_1E44K/v_2R44D；　v_1E44R/v_2R44E；

v_1E44L/v_2R44W；　v_1E44W/v_2R44L；

v_1E44V/v_2R44W；　和　v_1E44W/v_2R44V；

v_1Q44D/v_2K44R；　v_1Q44R/v_2K44D；

v_1Q44E/$v_2$44K；　v_1Q44K/v_2K44E；

v_1Q44D/$v_2$44K；　v_1Q44K/v_2K44D；

v_1Q44E/v_2K44R；　v_1Q44R/v_2K44E；

v_1Q44L/v_2K44W；　v_1Q44W/v_2K44L；

v_1Q44V/v_2K44W；　和　v_1Q44W/v_2K44V；

v_1W44D/v_2K44R；　v_1W44R/v_2K44D；

v_1W44E/$v_2$44K；　v_1W44K/v_2K44E；

v_1W44D/$v_2$44K；　v_1W44K/v_2K44D；

v_1W44E/v_2K44R；　v_1W44R/v_2K44E；

v_1W44L/v_2K44W；　v_1W44/v_2K44L；

v_1W44V/v_2K44W；　和　v_1W44/v_2K44V；

v_1H44D/v_2K44R；　v_1H44R/v_2K44D；

v_1H44E/$v_2$44K；　v_1H44K/v_2K44E；

v_1H44D/$v_2$44K；　v_1H44K/v_2K44D；

v_1H44E/v_2K44R；　v_1H44R/v_2K44E；

v_1H44L/v_2K44W；　v_1H44W/v_2K44L；

v_1H44V/v_2K44W；　　和　　v_1H44W/v_2K44V；

v_1K44D/v_2K44R；　　v_1K44R/v_2K44D；

v_1K44E/$v_2$44K；　v_1K44/v_2K44E；　v_1K44D/$v_2$44K；

v_1K44/v_2K44D；　　v_1K44E/v_2K44R；

v_1K44R/v_2K44E；　　v_1K44L/v_2K44W；

v_1K44W/v_2K44L；　　v_1K44V/v_2K44W；　　和

v_1K44W/v_2K44V；　　v_1E44D/v_2K44R；

v_1E44R/v_2K44D；　v_1E44/$v_2$44K；　v_1E44K/v_2K44E；

v_1E44D/$v_2$44K；　v_1E44K/v_2K44D；　v_1E44/v_2K44R；

v_1E44R/v_2K44E；　　v_1E44L/v_2K44W；

v_1E44W/v_2K44L；　　v_1E44V/v_2K44W；　　和

v_1E44W/v_2Q44V。

【0174】　在上面的內容中，例如「v_1Q44R/v_2Q44D」是指：在第一可變結構域中，Q44 被 R 取代，而在第二可變結構域中，Q44 被 D 取代。其他取代和描述可參見美國專利申請號 2018-0162922。

【0175】　在一實施方案中，雙特異性抗原結合蛋白為雙特異性抗體或其片段、雙特異性 T 細胞受體（TCR）或其片段或雙特異性單鏈 TCR（scTCR）或雙特異性單鏈抗體。

【0176】　雙特異性抗體和 TCR 及各自的片段的定義見上文「定義」章節。

【0177】　在一實施方案中，抗原結合蛋白來源於人，其被理解為由人抗原基因座產生，因此包含人序列，特別是人 TCR 或抗體序列。

【0178】 在一實施方案中，輕鏈可變結構域和重鏈可變結構域連接在一起和/或 v_α 和 v_β 或 v_γ 和 v_δ 結構域連接在一起，優選為透過共價鍵連接。

【0179】 在一實施方案中，雙特異性抗原結合蛋白包含至少兩個多肽。

【0180】 在一相關實施方案中，輕鏈可變結構域和重鏈可變結構域位於相同或不同的多肽上，優選為不同的多肽上。

【0181】 在同一實施方案中，α 鏈可變結構域（v_α）和 β 鏈可變結構域（v_β）或 γ 鏈可變結構域（v_γ）或 δ 鏈可變結構域（v_δ），優選為 v_α 和 v_β 結構域，位於相同或不同的多肽上。

【0182】 在一優選實施方案中，抗原結合蛋白為一種可溶性蛋白。

【0183】 「共價鍵」、「連接子序列」或「多肽連接子」的定義見上文「連接子」下定義章節。

【0184】 在一實施方案中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白還包含以下一種或多種：

(i) 診斷劑；

(ii) 治療劑；或

(iii) PK 修飾部分。

【0185】 「診斷劑」、「治療劑」和「PK 修飾部分」的定義見上文定義章節。

【0186】 在一些實施方案中，本發明的抗原結合蛋白直接或經由可裂解或不可裂解連接子共價附著於至少一種生長

抑制劑。附著於此類至少一種生長抑制劑的抗原結合蛋白也可稱為綴合物。

【0187】 製備此類綴合物（例如：免疫綴合物）的描述參見申請 WO2004/091668 或 Hudecz, F., Methods Mol. Biol. 298:209-223（2005）和 Kirin et al., Inorg Chem.44(15): 5405-5415（2005），並且可能被本領域技術人員轉移至製備本發明的抗原結合蛋白，所述抗原結合蛋白附著有此類至少一種生長抑制劑。

【0188】 在至少一種生長抑制劑附著背景下的「連接子」系指包含共價鍵或原子鏈的化學部分，其將多肽共價附著於藥物部分。

【0189】 綴合物可透過體外方法製備。為了使藥物或前藥與抗體連接，使用連接基團。合適的連接基團為本領域所熟知的，包括二硫鍵、硫醚基團、酸不穩定基團、光不穩定基團、肽酶不穩定基團和酯酶不穩定基團。本發明的抗原結合蛋白與細胞毒性劑或生長抑制劑的綴合可使用多種雙功能蛋白偶聯劑進行，包括但不限於 N-琥珀醯亞胺基吡啶二硫代丁酸鹽（SPDB）、丁酸 4-[（5-硝基-2-吡啶基）二硫]-2,5-二氧-1-吡咯烷基酯（硝基 SPDB）、4-（吡啶-2-基二硫烷基）-2-磺基丁酸（磺基-SPDB）、N-琥珀醯亞胺基（2-吡啶二硫基）丙酸酯（SPDP）、琥珀醯亞胺基（N-馬來醯亞胺甲基）環己烷-1-羧酸鹽（SMCC）、亞氨基噻烷（IT）、亞氨基酯的雙功能衍生物（如：己二亞氨二甲酯 HCL）、活性酯（如：辛二酸二琥珀醯亞胺酯）、

醛（如：戊二醛）、雙疊氮化合物（如：雙-（對疊氮苯甲醯基）-己二胺）、雙重氮衍生物（如：雙-（對重氮苯甲醯基）-乙二胺）、二異氰酸酯（如：甲苯2,6-二異氰酸酯）和雙活性氟化合物（如：1,5-二氟-2,4-二硝基苯）。例如，可按 Vitetta et al（1987）一文所述製備蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳標記1-異硫氰酸根合苄基甲基二亞乙基三胺五乙酸（MX-DTPA）是用於放射性核苷酸與抗體綴合的一種示例性螯合劑（WO 94/11026）。

【0190】 連接子可以為「可裂解連接子」，其促進細胞毒性劑或生長抑制劑在細胞中釋放。例如，可使用酸不穩定連接子、肽酶敏感連接子、酯酶不穩定連接子、光不穩定連接子或含二硫鍵連接子（參見，例如美國專利號5,208,020）。連接子也可能為「不可裂解連接子」（例如 SMCC連接子），在某些情況下可能使耐受性更好。

【0191】 或者，包含本發明雙特異性抗原結合蛋白以及細胞毒性或生長抑制性多肽的融合蛋白可透過重組技術或肽合成製備。DNA 的長度可能包含編碼綴合物的兩個部分的相應區域，所述兩個部分彼此相鄰或由編碼連接子肽的區域隔開，所述連接子肽不破壞綴合物所需性質。

【0192】 本發明的抗原結合蛋白還可用於依賴性酶介導前藥療法中，方法為：透過使多肽與前藥活化酶綴合，所述前藥活化酶將前藥（例如：肽基化學治療劑，參見 WO 81/01145）轉化為活性抗癌藥物（參見，例如，WO 88/07378 和美國專利號 4,975,278）。

【0193】 在一實施方案中，本發明抗原結合蛋白還包含以下一種或多種：酶、細胞因子（例如：人IL-2、IL-7或IL-15）、納米載體或核酸。

【0194】 在本領域中描述了不同的雙特異性形式，並在上文「定義」章節中的「形式」下進行了描述。製備不同形式蛋白質的技術在本領域中也進行了公開（在相應章節中引用），因此本領域技術人員可以用不同形式（特別是本文公開的形式）較容易地使用本發明背景下定義的可變結構域。在本文實施例章節中也公開了抗原結合蛋白（特別是可溶性雙特異性結合蛋白，例如：TCER®）的製備。本領域技術人員會瞭解，當抗原結合蛋白包含兩個多肽時，輕鏈和重鏈可變結構域可以為例如平行方向，且α和β可變結構域可以為平行方向，如以DVD形式一樣，或者輕鏈和重鏈可變結構域可以為例如交叉方向，且α和β可變結構域可以為交叉方向，如以CODV形式一樣。

【0195】 因此，本發明進一步涉及包含兩條形成兩個抗原結合位點（A和B）的多肽鏈的雙特異性抗原結合蛋白，其中第一條多肽鏈具有下式表示的結構：

$$V_3 - L_1 - V_4 - L_2 - C_L \qquad [I]$$

其中，V_3為第三可變結構域；V_4為第四可變結構域；L_1和L_2為連接子；L_2可能存在也可能不存在；C_L為輕鏈恒定結構域或其一部分且可能存在也可能不存在；

其中第二條多肽鏈具有下式表示的結構：

$$V_5 - L_3 - V_6 - L_4 - C_{H1} \qquad [II]$$

其中，V_5 為第五可變結構域；V_6 為第六可變結構域；L_3 和 L_4 為連接子；L_4 可能存在也可能不存在；C_{H1} 為重鏈恒定結構域 1 或其一部分且存在或不存在；其中

V_3 為上文所定義的 V_α 或 V_γ 可變結構域而 V_5 為 V_β 或 V_δ 可變結構域，並且 V_4 為輕鏈可變結構域而 V_6 為重鏈可變結構域，或者 V_4 為重鏈可變結構域而 V_6 為輕鏈可變結構域，或，

V_3 為上文所定義的 V_β 或 V_δ 可變結構域而 V_5 為 V_α 或 V_γ 可變結構域，並且 V_4 為輕鏈可變結構域而 V_6 為重鏈可變結構域，或者 V_4 為重鏈可變結構域而 V_6 為輕鏈可變結構域，或，

V_3 為上文所定義的 V_α 或 V_γ 可變結構域而 V_6 為 V_β 或 V_δ 可變結構域，並且 V_4 為輕鏈可變結構域而 V_5 為重鏈可變結構域，或者 V_4 為重鏈可變結構域而 V_5 為輕鏈可變結構域，或

V_3 為上文所定義的 V_β 或 V_δ 可變結構域而 V_6 為 V_α 或 V_γ 可變結構域，並且 V_4 為輕鏈可變結構域而 V_5 為重鏈可變結構域，或者 V_4 為重鏈可變結構域而 V_5 為輕鏈可變結構域，

V_4 為上文所定義的 V_α 或 V_γ 可變結構域而 V_5 為 V_β 或 V_δ 可變結構域，並且 V_3 為輕鏈可變結構域而 V_6 為重鏈可變結構域，或者 V_3 為重鏈可變結構域而 V_6 為輕鏈可變結構域，或

V_4 為上文所定義的 V_β 或 V_δ 可變結構域而 V_5 為 V_α 或 V_γ 可變結構域，並且 V_3 為輕鏈可變結構域而 V_6 為重鏈可變結構域，或者 V_3 為重鏈可變結構域而 V_6 為輕鏈可變結構域，

其中，輕鏈可變結構域和重鏈可變結構域一起形成抗原結合位點 A，並且V_α 和 V_β 或 V_γ 和 V_δ 可變結構域形成抗原結合位點 B，其中，V_α 或 V_γ 可變結構域優選為 V_α，V_β 或 V_δ 優選為 V_β。連接子 L_1、L_2、L_3、L_4 的定義見上文「定義」章節。但是，在一些實施方案中，有些連接子長度對於特定形式可能為優選。但是，關於連接子長度及其氨基酸序列的知識屬於本領域的常識，而連接子以及用於不同形式的連接子和氨基酸序列屬於現有技術的一部分，並在上文引用的公開中披露。

【0196】 在一優選實施方案中，V_3 為上文定義的 V_α 而 V_6 為上文定義的 V_β，並且 V_4 為本發明背景下定義的輕鏈可變結構域而 V_5 為本發明背景下定義的重鏈可變結構域或

V_3 為上文定義的 V_α 而 V_6 為上文定義的 V_β，並且 V_4 為本發明背景下定義的重鏈可變結構域而 V_5 為本發明背景下定義的輕鏈可變結構域。

【0197】 在一實施方案中，式 [I] 的多肽在式 [I] 多肽的 C-端還包含連接子（L_5）和 F_c 結構域或其部分，和/或其中，式 [II] 的多肽在式 [II] 多肽的 C-端還包括連接子（L_6）和 F_c 結構域或其部分。

【0198】 F_c 結構域的定義見上文「定義」章節。

【0199】 在一實施方案中，抗原結合蛋白包含兩條形成兩個抗原結合位點（A 和 B）的多肽鏈，

其中一條多肽鏈具有式 [III] 表示的結構：

$$V_3\text{-}L_1\text{-}V_4\text{-}L_2\text{-}C_L\text{-}L_5\text{-}F_{c1} \quad [III]$$

以及一條多肽鏈具有式 [IV] 表示的結構：

$$V_5\text{-}L_3\text{-}V_6\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-}L_6\text{-}F_{c2} \quad [IV]$$

其中 V_3、L_1、V_4、L_2、C_L、V_5、L_3、V_6、L_4、C_{H1} 的定義見上文，並且其中 L_5 和 L_6 為存在或不存在的連接子，且其中 F_{c1} 和 F_{c2} 為 F_c結構域，且其中 F_{c1} 和 F_{c2} 同一或不同，優選為不同。F_c 結構域的定義見上文「定義」章節。

【0200】 在一實施方案中，F_{c1} 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 132（臼）或由其組成，F_{c2} 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 131（杵）或由其組成，反之亦然，

更優選地，當 V_4 或 V_3 為重鏈可變結構域時，F_{c1} 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 132 或由其組成，因此，當 V_5 或 V_6 為輕鏈可變結構域時，F_{c2} 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 131 或由其組成，或

當 V_4 或 V_3 為輕鏈可變結構域時，F_{c1} 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 131 或由其組成，因此，當 V_5 或 V_6 為重鏈可變結構域時，F_{c2} 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 132 或由其組成。

【0201】 從實施例中可以看出，本發明的發明人在原理上證明了低親和力募集物（抗原結合位點 A）與成熟 TCR 可變結構域可以 TCER® 形式組合使用（實施例 2）。

【0202】 因此，在一優選實施方案中，抗原結合蛋白包含形成兩個抗原結合位點（A 和 B）的兩條多肽鏈，其中一條多肽鏈具有由式 [III] 表示的結構：

$$V_3\text{-}L_1\text{-}V_4\text{-}L_2\text{-}C_L\text{-}L_5\text{-}F_{c1} \quad [III]$$

以及一條多肽鏈具有式 [IV] 表示的結構：

$$V_5\text{-}L_3\text{-}V_6\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-}L_6\text{-}F_{c2} \quad [IV]$$

其中 L_2、C_L、L_5 和 L_4、C_{H1}、L_6 不存在，並且

其中 V_3、L_1、V_4、V_5、L_3、V_6 如上文所定義，

優選情況是，V_3 為本發明背景下所定義的 V_α 或 V_γ 結構域而 V_6 為 V_β 或 V_δ 結構域，並且 V_4 為本發明背景下所定義的輕鏈可變結構域而 V_5 為重鏈可變結構域，或

優選情況是，V_3 為本發明背景下所定義的 V_α 或 V_γ 可變結構域而 V_6 為 V_β 或 V_δ 結構域，並且 V_4 為本發明背景下所定義的重鏈可變結構域而 V_5 為輕鏈可變結構域，和

優選為，L1 和 L_3 包含（SEQ ID NO: 118）的氨基酸序列「GGGSGGGG」或由其組成，和

優選為，F_{c1} 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 132 或由其組成，F_{c2} 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 131 或由其組成，反之亦然，

更優選為，當 V_4 為重鏈可變結構域時，F_{c1} 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 132 或由其組成，因此，當 V_5 為輕鏈可變結構域時，F_{c2} 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 131 或由其組成，或

更優選為，當 V_4 為輕鏈可變結構域時，F_{c1} 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 131 或由其組成，因此，當 V_5 為重鏈可變結構域時，F_{c2} 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 132 或由其組成，和

輕鏈可變結構域和重鏈可變結構域一起形成與 CD3 結合的一個抗原結合位點 A，

並且其中 V_α 和 V_β 或 V_γ 和 V_δ可變結構域形成一個抗原結合位點 B，其與本發明背景下定義的 TA 抗原肽/MHC 複合體（優選為 TAA 抗原肽/MHC 複合體）特異性結合。

【0203】 本實施方案的抗原結合蛋白也可稱為 TCER®。

【0204】 「TCER®」為雙特異性 T 細胞受體（TCR），是可溶性抗原結合蛋白，其包含兩個抗原結合結構域--如本發明背景下定義的結合 CD3 的重鏈和輕鏈可變結構域和如本發明背景下定義的 V_α 和 V_β 或 V_γ 和 V_δ 結構域。

【0205】 在一實施方案中，本發明涉及一種抗原結合蛋白，其包含式 $V_3\text{-}L_1\text{-}V_4\text{-}L_2\text{-}C_L\text{-}L_5\text{-}F_{c1}$ [III] 的第一多肽（包含 SEQ ID NO: 165 至 167 的氨基酸序列或由其組成），以及式 $V_5\text{-}L_3\text{-}V_6\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-}L_6\text{-}F_{c2}$ [IV] 的第二多肽（其包含 SEQ ID NO: 163 或 164 的氨基酸序列或由組成）。

【0206】 針對效應子功能，還可能需要對本發明的抗原結合蛋白進行修飾，從而增強或降低抗原結合蛋白的抗原依賴性細胞介導細胞毒性（ADCC）和/或補體依賴性細胞毒性（CDC）。這可透過在抗原結合蛋白的 F_c 區中引入一個或多個氨基酸取代基來實現，本文中在本發明抗原結合蛋白的背景下也稱為 F_c-變體。替代地或另外地，可在 F_c 區中引入半胱氨酸殘基，從而在該區形成鏈間二硫鍵。由此產生的同二聚體抗原結合蛋白可改善或降低內在化能力和/或增加補體介導細胞殺傷力和/或抗體依賴性細胞的細胞毒性（ADCC）（Caron PC. et al.1992; and Shopes B. 1992）。

【0207】 本發明抗原結合蛋白的另一類型氨基酸修飾可用於改變抗原結合蛋白的原始糖基化模式，即，透過刪除抗原結合蛋白中存在的一個或多個碳水化合物部分，和/或添加抗原結合蛋白中不存在的一個或多個糖基化位點。三肽序列天冬醯胺-X-絲氨酸和天冬醯胺-X-蘇氨酸中出現任何一個（其中 X 為脯氨酸以外的任何氨基酸）都會產生潛在的糖基化位點。添加或刪除抗原結合蛋白的糖基化位點可透過改變氨基酸序列以使其包含一個或多個上述三肽序列（用於 N-連接的糖基化位點）而方便地實現。

【0208】 另一類型的修飾涉及移除透過電腦或實驗方法鑒定的序列，這可能導致抗原結合蛋白製備產生降解產物或異質性。例如，天冬醯胺和穀氨醯胺殘基的脫醯胺可能取決於諸如 pH 和表面暴露等因素。天冬醯胺殘基尤其容易

發生脫醯胺（主要是存在於 Asn-Gly 序列中時），而在其他二肽序列（如 Asn-Ala）中時則較少發生。當此類脫醯胺位點（特別是 Asn-Gly）存在於本發明的抗原結合蛋白中時，可能希望移除該位點，通常是透過保守取代法移除其中一個涉及的殘基。序列中此類取代以移除其中一個或多個涉及的殘基也是本發明的意圖。

【0209】 另一種類型的共價修飾涉及將糖苷在化學或酶學上偶聯至抗原結合蛋白。這些程序的優點在於：它們無需在對 N-或O-連接糖基化具有糖基化能力的宿主細胞中產生抗原結合蛋白。根據所使用的偶聯方式，糖可附著至（a）精氨酸和組氨酸，（b）游離羧基，（c）游離巯基團，例如：半胱氨酸基團，（d）游離羥基團，例如：絲氨酸、蘇氨酸或羥脯氨酸基團，（e）芳香殘基，例如：苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸殘基，或（f）穀氨醯胺的醯胺基團。例如，WO 87/05330 中描述了此類方法。

【0210】 移除抗原結合蛋白上存在的任何碳水化合物部分可在化學上或酶學上實現。化學去糖基化需要將抗原結合蛋白暴露於化合物三氟甲磺酸或等效化合物。此處理可導致連接糖（N-乙醯氨基葡糖或 N-乙醯半乳糖胺）之外的大多數或所有糖裂解，同時讓抗原結合蛋白保持完整。化學脫糖基化的描述見 Sojahr H. et al.(1987) 和 Edge, AS. et al.(1981)。抗體上碳水化合物部分的酶切可透過使用多種內切和外切糖苷酶來實現，參見 Thotakura, NR. et al. (1987)。

【0211】 抗原結合蛋白的另一種類型共價修飾包含將抗原結合蛋白與多種非蛋白質聚合物（例如：聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯）之一連接，方法為美國專利號4,640,835；4,496,689；4,301,144；4,670,417；4,791,192 或 4,179,337 規定的方法。

【0212】 本發明還包括展示本發明抗原結合蛋白的顆粒，並包含顆粒文庫的所述顆粒。此類顆粒包括但不限於噬菌體、酵母、核糖體或哺乳動物細胞。產生此類顆粒和文庫的方法為本領域已知的（例如，參見WO2004/044004；WO01/48145，Chervin et al.(2008) J. Immuno. Methods 339.2: 175-184)。

【0213】 如本文所公開的，本發明的抗原結合蛋白以抗原結合位點 A 與 CD3 結合，以抗原結合位點 B 與靶抗原(TA)肽/MHC複合體結合。CD3 分子通常存在於 CD3 提呈細胞（例如：效應細胞，優選為 T 細胞）的表面上。靶抗原 (TA) 肽/MHC 複合體通常存在於靶抗原 (TA) 肽/MHC複合體提呈細胞（例如患病細胞，例如癌細胞）的表面上。抗原結合蛋白與 CD3 和靶抗原 (TA) 肽/MHC 複合體結合使效應細胞和靶細胞彼此接近，因而雙特異性抗原結合蛋白的結合可在結合後引發免疫反應。因此，本發明的抗原結合蛋白可在效應細胞中誘導免疫反應。

【0214】 因此，在一實施方案中，本發明的抗原結合蛋白可在 CD3 提呈細胞（例如效應細胞，例如 T 細胞或 NK 細胞）中誘導免疫應答，優選為其中免疫反應的特徵在於

干擾素（IFN）γ水平增加。因此，在一實施例中，免疫反應的特徵可透過優選使用IFN-γ釋放測定法測定的EC_{50}值來描述。

【0215】 在本發明的背景下，本發明的雙特異性抗原結合蛋白以K_D(A)與CD3結合，抗原結合位點B以K_D(C)與TA抗原肽C（TA-C)/MHC複合體（優選為TAA抗原肽C（TAA-C)/MHC複合體）結合，且K_D(A)/K_D(C)之比大於1、大於4、大於6、大於8、大於10、大於15、大於20、大於25、大於30、大於40、大於50，例如：1至150、4至140、6至100、8至100、10至100之間，優選為10至100之間。

【0216】 術語「親和力」和「K_D」的定義見上文「定義」章節。測量親和力（如K_D）的方法為本領域技術人員已知的，包括：例如表面等離子體共振和生物膜層干涉法。如本領域技術人員所知，用於那些實驗的實驗條件（例如，所使用的緩衝液、蛋白質濃度或溫度）可能影響結果。

【0217】 因此，在一實施例中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白表達為例如上文所述的可溶性TCER®，並分析其對複合體HLA-A*02/MAG-003單體的結合親和力。通常，例如使用製造商推薦的設置在Octet RED384系統上進行測量。簡言之，通常在30°C和例如1000rpm轉速下以例如PBS、0.05%吐溫-20、0.1% BSA用作緩衝液來測量結合動力學。在分析抗原結合蛋白（特別是TCER®）之前，將肽HLA-A:02複合體載入到生物感測

器（例如HIS1K）上。然後，通常進一步分析相同抗原結合蛋白對CD3的結合親和力。因此，如上文所述對CD3結合進行測量。

【0218】 在一些實施方案中，抗原結合位點A以≥3 nM、≥5 nM、≥8 nM、≥10 nM、≥12 nM、≥14 nM、≥16 nM、≥18 nM、≥20 nM、≥25 nM、≥30 nM、≥35 nM、≥40 nM、≥45 nM和≤1000 nM、≤800 nM、≤600 nM、≤500 nM、≤400 nM（例如：3 nM至1000 nM、3 nM至600 nM、5 nM至600 nM、10 nM至600 nM、12 nM至600 nM、14 nM至600 nM、16 nM至600 nM、18 nM至600 nM、20 nM至600 nM，優選為5 nM至100 nM）的K_D(A)與CD3結合，所述K_D(A)優選為使用表面等離振子共振（SPR）或生物膜層干涉法(BLI)、優選生物膜層干涉法（BLI）測定。

【0219】 在一些實施方案中，抗原結合位點B與TA抗原肽C（TA-C)/MHC複合體（優選為TAA抗原肽C(TAA-C）/MHC複合體）結合，K_D(C)為≤100 μM、≤1 μM、≤100 nM、≤50 nM、≤10 nM，例如：0.01 nM至150 nM、0.05 nM至150 nM、0.1 nM至150 nM、0.1 nM至100 nM、0.1 nM至50 nM、0.1 nM至10 nM、0.5 nM至10 nM、0.5 nM至5 nM、0.1 nM至5 nM（優選為0.5 nM至5 nM），所述K_D(C)使用表面等離振子共振（SPR）或生物膜層干涉法（BLI)、優選生物膜層干涉法（BLI）測定。

【0220】 在一實施例中，抗原結合蛋白與包含氨基酸序列SEQ ID NO: 10的「KVLEHVVRV」或由其組成的MAGE-A抗原肽優選HLA-A*02結合，K_D為≤100 nM、≤50 nM、≤10 nM、≤1nM，例如，10pM至100 nM、10 pM至50 nM、10 pM至10 nM，特別是50pM至100 nM、100 pM至50 nM、100 pM至10 nM、500 pM至10 nM，優選為500 pM至10 nM，所述K_D使用表面等離振子共振（SPR）或生物膜層干涉法(BLI)、優選生物膜層干涉法（BLI）測定。

【0221】 在一實施例中，抗原結合蛋白與包含氨基酸序列SEQ ID NO: 9或由其組成的PRAME肽/MHC複合體結合，K_D為≤100 nM、≤50 nM、≤10 nM、≤1 nM、≤1nM，例如，10 pM至100 nM、10 pM至150 nM、10 pM至100 nM，特別是50 pM至100 nM、100 pM至100 nM、100 pM至50 nM，所述K_D優選為使用表面等離振子共振（SPR）或生物膜層干涉法(BLI)、優選生物膜層干涉法（BLI）測定。

【0222】 在一實施方案中，雙特異性抗原結合蛋白對TA-C/MHC提呈細胞（優選為TAA-C/MHC提呈細胞）的EC_{50}比針對正常組織細胞的EC_{50}值低≥5倍、≥10倍、≥20倍、≥50倍、≥100倍、≥500倍、≥1000倍，其中EC_{50}優選為針對誘導的細胞毒性確定。

【0223】 本文中的「TA-C/MHC提呈細胞」或「TA提呈細胞」系指在其表面提呈與MHC蛋白複合的TA抗原

肽（例如，特定的 TA-C 抗原肽）的細胞，其中，細胞表面上的所述 TA肽/MHC 複合體拷貝數通常可用本領域技術人員已知的方法確定。在一實施方案中，TA/MHC 提呈細胞為 TA-C/MHC 提呈細胞，優選為 TAA/MHC 提呈細胞。在一些實施例中，TA 抗原肽為病毒或細菌肽，在此類實施例中，TA/MHC 提呈細胞通常為患病細胞或受感染細胞，其中所述患病細胞被相應的病毒或細菌感染。在一些實施例中，TA 抗原肽為 TAA 抗原肽，並且在所述實施例中，TAA/MHC 提呈細胞通常為癌細胞。

【0224】 在一實施方案中，TA/MHC 提呈細胞，優選為 TAA/MHC 提呈細胞，例如，TAA/MHC 提呈癌細胞的 TA/MHC 拷貝數或 TAA/MHC 拷貝數分別為大於 50、大於 100、大於 150、大於 200、大於 300、大於 600、大於 800、大於 1000、大於 1500、大於 2000，優選為 TAA/MHC 拷貝數為 50 至 5000。

【0225】 本文中的「拷貝數」系指在存在於細胞（如，TA/MHC 提呈細胞，例如 TAA/MHC 提呈細胞，如，癌細胞或正常健康細胞）的細胞表面上的 TA抗原肽/MHC 複合體數。

【0226】 此類拷貝數取決於例如特定的 TA 和細胞類型，可用本領域技術人員已知的方法（例如，FACS 分析、質譜（MS）和RNA 測序，優選為質譜（MS）和 RNA 測序）進行檢測。

【0227】 「健康細胞」也可稱為「正常細胞」，本文系指無癌細胞的細胞，優選為本文中的健康細胞系指在 TA 提呈細胞周圍的組織細胞。優選情況為，當 TA 為病毒或細菌抗原肽時，健康細胞優選為不患病，即未受到相應病毒或細菌的細菌或病毒感染。但是，在某些情況下，健康細胞也可能在其表面表達並提呈 TA 肽/MHC 複合體，例如 TAA 肽/MHC 複合體，如 TAA-C/MHC 複合體。通常情況下，如本領域技術人員瞭解的，在本發明背景下的健康細胞中 TA 肽/MHC 複合體提呈數量（拷貝數）比在 TA 提呈細胞（如，癌細胞）中少。

【0228】 因此，在一實施方案中，健康細胞的 TA/MHC 拷貝數，優選為 TAA/MHC 拷貝數（如，TAA-C/MHC 拷貝數）小於 5000、小於 1000、小於 500、小於 100、小於 50、小於 20、小於 10，優選為 TAA/MHC 拷貝數小於 10，優選為 TAA/MHC 拷貝數為 0 至 10（例如，0 至 5）之間。

【0229】 健康細胞優選為選自由星形細胞、GABA 神經元、心肌細胞、心臟微血管內皮細胞、軟骨細胞、冠狀動脈內皮細胞、皮膚微血管內皮細胞、間充質幹細胞、鼻上皮細胞、外周血單核細胞、肺動脈平滑肌細胞（優選為 GABA 神經元、心肌細胞、心臟微血管內皮細胞、軟骨細胞、冠狀動脈內皮細胞、鼻上皮細胞、外周血單核細胞、肺動脈平滑肌細胞）組成的組。

【0230】 在一實施方案中，抗原結合蛋白對 TA/MHC 複合體提呈細胞（如 TA-C/MHC 複合體提呈細胞），例如 MAGE-A/MHC 複合體提呈細胞的 EC_{50} 比對健康細胞的 EC_{50} 值低 ≥ 1000、≥ 15000、≥ 9000 倍，優選為健康細胞選自由星形細胞、GABA 神經元、心肌細胞、心臟微血管內皮細胞、軟骨細胞、冠狀動脈內皮細胞、皮膚微血管內皮細胞、間充質幹細胞、鼻上皮細胞、外周血單核細胞、肺動脈平滑肌細胞（優選為 GABA 神經元、心肌細胞、心臟微血管內皮細胞、軟骨細胞、冠狀動脈內皮細胞、鼻上皮細胞、外周血單核細胞、肺動脈平滑肌細胞）組成的組。

【0231】 本發明的雙特異性抗原結合蛋白具有高安全性特徵。

【0232】 本文中「安全性特徵」系指區分腫瘤細胞與正常健康組織細胞或類似肽提呈細胞的能力。在本領域中，使用安全窗描述了安全性特徵。

【0233】 本文中的「安全窗」或「治療窗」系指誘導腫瘤細胞系中 100% 細胞毒性所需化合物的一半最大濃度與誘導正常組織細胞中 100% 細胞毒性所需化合物的一半最大濃度相比的倍數。如果對於相關抗原結合蛋白，針對腫瘤細胞系測定的 EC_{50} 為 1pM 而針對例如原代細胞測定的 EC_{50} 值為 1000pM，則安全窗為 1000，這是因為針對腫瘤細胞系的 EC_{50} 比針對原代細胞的 EC_{50} 小 1000 倍。

【0234】 在一實施方案中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白對 TA/MHC 複合體提呈細胞，優選為 TAA/MHC 複合體提呈細胞（如 TAA-C/MHC 複合體提呈細胞）的 EC_{50} 比針對正常組織細胞的 EC_{50} 低 ≥100 倍、≥500 倍、≥1000 倍、≥2000 倍、≥3000 倍、≥4000 倍、≥5000 倍、≥6000 倍，例如，針對 TA/MHC 複合體提呈細胞，優選為 TAA/MHC 複合體提呈細胞（如 TAA-C/MHC 複合體提呈細胞）的 EC_{50} 比針對正常組織細胞的 EC_{50} 值低 500 至 12,000 倍，優選為低 1000 至 10000 倍。

【0235】 在無法計算 EC_{50} 的情況下，還可透過分別計算 TCER® 分子在靶細胞和正常組織細胞上的「最低觀測效應水平」（LOEL）之比來確定安全窗。

【0236】 本文的「LOEL」定義為超過臨界值反應的首個 TCER® 濃度。臨界值定義為測定背景（未添加 TCER® 分子的健康組織細胞和 PBMC 的共培養物）與所有測定孔內標準偏差的三倍之和。

【0237】 在一實施方案中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白對 TA/MHC 複合體提呈細胞，優選為 TAA/MHC 複合體提呈細胞（如 TAA-C/MHC 複合體提呈細胞）的 LOEL 比針對正常細胞的 LOEL 低 ≥100 倍、≥500 倍、≥1000 倍、≥2000 倍、≥3000 倍、≥4000 倍、≥5000 倍、≥6000 倍，例如，針對 TA/MHC 複合體提呈細胞，優選為 TAA/MHC 複合體提呈細胞（如 TAA-C/MHC 複

合體提呈細胞)的LOEL比針對正常細胞的LOEL低500至12,000倍，優選為低1,000至10,000倍。

【0238】 在一實施方案中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白對TA/MHC複合體提呈細胞，優選為TAA/MHC複合體提呈細胞（如TAA-C/MHC複合體提呈細胞）的EC_{50}比類似肽/MHC提呈細胞的EC_{50}值低≥5倍、≥10倍、≥20倍、≥50倍、≥100倍、≥500倍、≥1000倍、≥2,000倍、≥3,000倍、≥4,000倍、≥5000倍、≥6,000倍，其中EC_{50}優選為根據誘導細胞毒性來確定，例如TA/MHC複合體提呈細胞的EC_{50}，優選為TAA/MHC複合體提呈細胞的EC_{50}比類似肽/MHC提呈細胞的EC_{50}值低500至12,000倍，優選為低1,000至12000倍。

【0239】 在本發明背景下的「類似肽」也可以稱為「脫靶物」，涉及長度通常包含8至16個氨基酸的肽。本發明背景下的類似肽通常由MHC提呈。此外，本發明背景下的類似肽包含與TA抗原肽的氨基酸序列相似的氨基酸序列或由其組成，在本發明背景下的一更優選實施例中，與TA抗原肽表位相比，這些肽包含表位，其中與TA抗原肽表位相比，所述表位的至少一個氨基酸（例如，至少1、2或3個，優選為1、2或3個，更優選為1個）被取代。由於這種序列相似性，類似肽可能會被本發明雙特異性抗原結合蛋白結合，在這種情況下，例如，如果類似肽由MHC蛋白提呈並因此被雙特異性抗原結合蛋白結合，

則給定的雙特異性抗原結合蛋白與類似肽結合的能力不會導致所需的效應細胞反應，但可能導致不良反應。此類不良反應可能為「腫瘤外」副作用，例如在 Lowdell 等人 2018 年 12 月 4 日發表的《細胞療法》(Cytotherapy) 第 7 頁報告的與正常組織肽交叉反應的特定 TCR 的交叉反應。本發明背景下的類似肽可選自例如正常組織提呈的 HLA-A 1類結合肽的數據庫（XPRESIDENT 數據庫），如在 MAGE-A 情況下的 HLA-A*02 結合肽，依據是，基於例如對TA 抗原肽（如，MAG-003）的高度序列相似性（相似性 BLAST 搜索）。由於這些不良反應，本發明的雙特異性抗原結合蛋白因此被改造以避免對提呈相似肽的正常組織細胞產生細胞毒性。

【0240】 本文的「類似肽/MHC 提呈細胞」表示在其細胞表面上提呈類似肽/MHC 複合體的細胞。

【0241】 在一實施方案中，相似肽/MHC 提呈細胞的相似肽/MHC 拷貝數為大於 50、大於 100、大於 150、大於 200、大於 300、大於 600、大於 800、大於 1000、大於 1500、大於 2000，優選為 TAA/MHC 拷貝數為 50 至 5000。

【0242】 在一實施方案中，相似肽/MHC 提呈細胞為 MAGE-A/MHC 複合體提呈細胞，且 MAGE-A/MHC 複合體的拷貝數為大於 50、大於 80、大於 100、大於 120、大於 150、大於 300、大於 400、大於 600、大於 800、大於 1000、大於 1500、大於 2000，優選為

MAGE-A/MHC 拷貝數為 50 至 2000，例如，80 至 2000，例如，100 至 2000，例如，120 至 2000。

【0243】 在一實施方案中，TA 抗原肽為 Mage-A 抗原肽，且類似肽選自由以下肽組成的列表：由 SEQ ID NO: 269 的氨基酸序列組成的 RABGAP1L-001，由 SEQ ID NO: 270 的氨基酸序列組成 AXIN1-001，由 SEQ ID NO: 271 的氨基酸序列組成的 ANO5-001，由 SEQ ID NO: 272 的氨基酸序列組成的 TPX2-001，由 SEQ ID NO: 273 的氨基酸序列組成的 SYNE3-001，由 SEQ ID NO: 274 的氨基酸序列組成的MIA3-001，由 SEQ ID NO: 275 的氨基酸序列組成的 HERC4-001，由 SEQ ID NO: 276 的氨基酸序列組成的 PSME2-001，由 SEQ ID NO: 277 的氨基酸序列組成的 HEATR5A-001，由 SEQ ID NO: 278 的氨基酸序列組成的 CNOT1-003，由 SEQ ID NO: 279 的氨基酸序列組成的 TEP1-003，由 SEQ ID NO: 281 的氨基酸序列組成的 ZFC-001，由 SEQ ID NO: 280 的氨基酸序列組成的 PITPNM3-001。

【0244】 因此，在一實施方案中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白不結合或不顯著結合於至少 1 個類似肽，例如至少 2 個、至少 3 個、至少 4 個、至少 5 個，例如 1、2、3、4、5 個，優選為至少 3 個，或 3 個或所有選自由 RABGAP1L-001、AXIN1-001、ANO5-001、TPX2-001、SYNE3-001、MIA3-001、HERC4-001、PSME2-001、HEATR5A-001、CNOT1-003、

TEP1-003、PITPNM3-001、ZFC-001，優選為HEATR5A-001、HERC4-001和ZFC-001組成的肽組中的類似肽，條件是：當所述類似肽與MHC蛋白形成複合體，優選與HLA-A*02複合時。

【0245】 在類似肽的背景下以及在本文雙特異性抗原結合蛋白的背景下，「不顯著與……結合」的特徵在於結合信號較低和/或K_D值較高。例如，在本發明的背景下，雙特異性抗原結合蛋白對至少一個類似肽/MHC複合體的結合反應小於50%、小於45%、小於40%、小於30%、小於20%、小於10%、小於5%、小於4%、小於3%相同雙特異性抗原結合蛋白對MAGE-A抗原肽/MHC複合體的結合反應，條件為：實驗環境相同、雙特異性抗原結合蛋白濃度相同，和/或，例如，在本發明的背景下，雙特異性抗原結合蛋白與至少一種類似肽/MHC複合體結合，其親和力與其對特定抗原（即，本文所述的MAGE-A抗原肽/MHC複合體）的親和力相比下降，其中，對各類似肽的相應K_D增加5、7、10、15、20、30、40、50、100倍，優選為20至100倍，更優選為30至100倍，例如40至100倍，通常為40到50倍。例如，當雙特異性抗原結合蛋白以1nM的K_D與MAG-003/MHC複合體結合，而雙特異性抗原結合蛋白以100nM的K_D與例如RABGAP1L-001/MHC複合體結合時，則雙特異性抗原結合蛋白與RABGAP1L-001/MHC結合的K_D增加100倍，因而親和力降低100倍。在這些實施例中，

結合反應、解離常數和結合親和力優選使用例如實施例 4 和 5 中所述的生物膜層干涉技術來測量。

【0246】 從實施例，特別是實施例 1 和圖 8 中可進一步看出，本發明的雙特異性抗原結合蛋白不僅可溶，而且還可在 CHO 細胞中以 > 10mg/L(細胞培養物)、> 20mg/L 甚或 40mg/L 的量進行暫態表達。因此，在一實施方案中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白可在宿主細胞中以高產量表達，其中優選宿主細胞為 CHO 細胞，並且其中優選產量大於 10、大於 15、18、20、22、24、26、28、30、35、40、45 mg/L（細胞培養物），例如，5 至 50、5 至 45、5 至 40、5 至 35、10 至 35、10 至 30、10 至 25、10 至 20 mg/L（細胞培養物）。在一實施例中，抗原結合蛋白在暫態轉染的 CHO-S 細胞中表達，其中，細胞在總體積為 320 mL 的 GE Healthcare™ 培養基中培養，培養條件為 T=0、密度 $4x10^6$/mL、37°C。一天後，添加進料溶液（CellBoost 7a 和 b），溫度降低至 32°C。在培養總共 12 天和進料 3 次後收穫了細胞並因此收穫了抗原結合蛋白。

【0247】 從實施例中可進一步看出，本發明人證明，與參考蛋白相比，例如與含有包含 SEQ ID NO: 39 的氨基酸序列或由其組成的 V_H 結構域和包含 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列或由其組成的 V_L 結構域或包含 SEQ ID NO: 137 的氨基酸序列或由其組成的 V_H 結構域和包含 SEQ ID NO: 145 的氨基酸序列或由其組成的 V_L 結構

域（優選為包含 SEQ ID NO: 137 的氨基酸序列或由其組成的 V_H 結構域和包含 SEQ ID NO: 145 的氨基酸序列或由其組成的 V_L 結構域）的抗原結合蛋白相比，本發明的雙特異性抗原結合蛋白的穩定性相當甚或更高。

【0248】 因此，在一實施方案中，任選地與參考蛋白相比，本發明的抗原結合蛋白的穩定性相當或改善。在本發明的背景下，穩定性相當或改善系指，例如，當暴露於熱應力時物理穩定性相當或增加。因此，本發明的新開發抗原結合蛋白與參考抗原結合蛋白相比，相當地或更好地耐受應力條件，特別是熱應力，其中所述抗原結合蛋白優選為相同形式。

【0249】 本發明背景下的術語「穩定性」系指物理穩定性，並且可以使用本領域中描述的各種分析技術進行定性和/或定量評估，綜述參見，例如，Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs.(1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993). 在本發明的背景下，這些方法特別涉及評估聚集物形成（例如：使用尺寸排阻色譜法、透過測量濁度和/或透過目視檢查）。為了測量穩定性，可在穩定性研究中測試包含本發明抗原結合蛋白的樣本，其中樣本在選定時間段內被暴露於應力條件，然後使用適當的分析技術對化學和物理穩定性進行定量和任選進行定性分析。

【0250】 在一實施方案中，例如，當暴露於應力條件下一定時間，例如：暴露於 40℃ 的溫度下 14 天後，本發明的抗原結合蛋白具有物理穩定性。

【0251】 在本發明的背景下，「物理穩定性」基本上系指抗原結合蛋白無聚集、沉澱和/或變性跡象。

【0252】 評估物理穩定性的方法的實例如：尺寸排阻色譜法（SEC）、動態光散射法（DLS）、光遮蔽法（LO）以及顏色和淨度。

【0253】 「無聚集跡象」意指，例如，包含抗原結合蛋白的樣本在緩衝液（如 PBS）中暴露於應力條件（例如 40°C 的溫度）14 天後，單體含量大於 80%、大於 86%、大於 88%、大於 90%、大於 92%、大於 94%、大於 96%、大於 97%、大於 98%、大於 99%，例如，當透過 SEC（例如SEC-HPLC）在緩衝液（例如 PBS）中測量時，單體含量為 94% 至 99%、95% 至 99%、96% 至 99%、97% 至 99%。

【0254】 因此，在一實施方案中，例如與參考蛋白相比，本發明的抗原結合蛋白具有相同或較低的聚集性。

【0255】 使用尺寸排阻色譜法（SEC）時，根據所用的色譜柱、操作壓力和緩衝液流速，在受測條件下，1%、2%、3%、4%，優選為 1% 或 2%，更優選為 2% 的單體含量差異在本發明背景下被視為具有顯著差異。

【0256】 這意味著，當參考抗原結合蛋白的單體含量為 96% 而本發明抗原結合蛋白的單體含量為 98% 時，本發

明抗原結合蛋白的單體含量具有顯著差異，因此，在相同條件下測量時，與參考抗原結合蛋白相比顯著增加。

核酸、載體和重組宿主細胞

【0257】 本發明的另一個目的涉及一種分離的核酸序列，其包含編碼上文定義的本發明雙特異性抗原結合蛋白的序列或由其組成。

【0258】 通常情況下，所述核酸為 DNA 或 RNA分子，其可以包含於任何合適的載體（例如：質粒、粘粒、附加體、人工染色體、噬菌體或病毒載體）中。

【0259】 術語「載體」、「克隆載體」和「表達載體」意指可將 DNA 或 RNA 序列（例如，外源基因）引入宿主細胞以轉化宿主並促進所引入序列表達（例如，轉錄和翻譯）的載體。

【0260】 因此，本發明的另一個目的涉及包含本發明核酸的一種載體。

【0261】 此類載體可包含調節元件，諸如啟動子、增強子、終止子等，以在受試者給藥後引起或對準所述多肽的表達。用於動物細胞表達載體的啟動子和增強子實例包括 SV40 的早期啟動子和增強子（Mizukami T. et al. 1987）、Moloney 小鼠白血病病毒的 LTR 啟動子和增強子（Kuwana Y et al. 1987）、免疫球蛋白 H 鏈的啟動子(Mason JO et al. 1985) 和增強子（Gillies SD et al. 1983）等。

【0262】 只要可以插入和表達編碼人抗體 C 區的基因，即可使用任何動物細胞的表達載體。合適的載體實例包括(Miyaji H et al. 1990)、pAGE103 (Mizukami T et al. 1987)、pHSG274 (Brady G et al. 1984)、pKCR (O'Hare K et al. 1981)、pSG1 β d2-4-(Miyaji H et al. 1990) 等。質粒的其他實例包括：包含複製起點的複製質粒或整合質粒，例如 pUC、pcDNA、pBR 等。

【0263】 病毒載體的其他實例包括腺病毒、逆轉錄病毒、皰疹病毒和 AAV 載體。此類重組病毒可透過本領域已知的技術生產，例如：透過轉染包裝細胞或透過以輔助質粒或病毒暫態轉染。病毒包裝細胞的典型實例包括 PA317 細胞、PsiCRIP 細胞、GPenv+ 細胞、293 細胞等。產生此類複製缺陷的重組病毒的詳細方案可參見，例如：WO 95/14785、WO 96/22378、US 5,882,877、US 6,013,516、US 4,861,719、US 5,278,056 和 WO 94/19478。

【0264】 術語「病毒載體」系指核酸載體構建體，其包括至少一種病毒來源的元件，有被包裝入病毒載體顆粒的能力，並編碼至少一種外源核酸。載體和/或顆粒可用於在體外或體內將任何核酸轉移至細胞之目的。多種形式的病毒載體為本領域已知。術語「病毒體」指單個感染性病毒顆粒。「病毒載體」、「病毒載體顆粒」和「病毒顆粒」也指具有其 DNA 或 RNA 核心和蛋白質外殼的完整病毒顆粒，因為該病毒存在於細胞外部。例如，病毒載體可選自

腺病毒、痘病毒、α 病毒、暈病毒、黃病毒、彈狀病毒、逆轉錄病毒、慢病毒、皰疹病毒、副粘病毒或微小核糖核酸病毒。

【0265】 病毒可指天然存在的病毒以及人造病毒。根據本發明一些實施方案的病毒可能是包膜病毒或無包膜病毒。細小病毒（例如 AAV）是無包膜病毒的實例。在一優選實施方案中，病毒可能是包膜病毒。在優選實施方案中，病毒可能是逆轉錄病毒，特別是慢病毒。可以促進真核細胞病毒感染的病毒包膜蛋白可能包括 HIV-1 衍生慢病毒載體（LV），這些載體用水皰性口炎病毒（VSV-G）的包膜糖蛋白（GP）、修飾的貓內源性逆轉錄病毒（RD114TR）和修飾的長臂猿白血病病毒（GALVTR）處理成為假型。這些包膜蛋白可以有效地促進其他病毒的進入，例如細小病毒，包括腺相關病毒（AAV），從而證明它們的廣泛效率。例如，可使用其他病毒包膜蛋白，包括莫洛尼鼠白血病病毒（MLV）4070 env（如 Merten et al., J. Virol. 79:834-840, 2005 一文中所述；其內容透過引用併入本文）、RD114 env、嵌合包膜蛋白 RD114pro 或 RDpro（透過用 HIV-1 基質/衣殼（MA/CA）切割序列取代 RD114 的 R 肽切割序列構建的 RD114-HIV嵌合體，如 Bell et al. Experimental Biology and Medicine 2010; 235:1269-1276 一文中所述；其內容透過引用併入本文）、桿狀病毒 GP64 env（如 Wang et al. J. Virol. 81:10869-10878, 2007 一文中所

述；其內容透過引用併入本文）或GALV env（如Merten et al., J. Virol. 79:834-840, 2005一文中所述；其內容透過引用併入本文）或其衍生物。

【0266】 本發明的另一目的涉及用根據本發明的核酸和/或載體轉化、轉導或轉染的宿主細胞。

【0267】 術語「轉化」原先系指基因轉移入宿主細胞中的自然過程，所述過程涉及細胞透過細胞膜吸收基因物質（例如：核酸，如DNA或RNA），從而使宿主細胞表達引入的基因或序列以產生所需的物質，所述物質通常為引入基因或序列編碼的蛋白質或酶。有兩種類型的轉化，稱為自然轉化以及人工或誘導轉化。人工或誘導轉化方法在實驗室條件下進行。

【0268】 透過轉化過程接受和表達外源核酸（例如，DNA或RNA）的宿主細胞已被「轉化」。

【0269】 術語「轉染」系指基因轉移的一種方式，涉及在宿主細胞的細胞膜上創建孔，使宿主細胞能夠接收外來基因物質。通常情況下，轉染系指真核細胞（例如，昆蟲或哺乳動物細胞）的轉化。化學介導的轉染涉及使用例如磷酸鈣或陽離子聚合物或脂質體。非化學介導的轉染方法通常為電穿孔、聲穿孔、穿刺轉染、光學轉染或水動力遞送。基於顆粒的轉染使用基因槍技術，其中納米顆粒用於將核酸轉移至宿主細胞，或透過另一種稱為磁轉染的方法。核轉染和使用熱休克是成功轉染的另外的演變方法。透過轉染方法接收外來核酸的宿主細胞已被「轉染」。

【0270】 術語「轉導」通常理解為涉及將外來核酸（例如，DNA 或 RNA）透過病毒或病毒載體轉移至細胞中。透過病毒或病毒載體接受和表達外來核酸（例如，DNA 或 RNA）的宿主細胞已被「轉導」。

【0271】 在一些實施方案中，可使用 US20190216852 描述的方法轉導細胞，該專利內容透過引用整體併入本文。

【0272】 本發明的核酸可用於在合適的表達系統中產生本發明的重組抗原結合蛋白。

【0273】 術語「表達系統」意指合適條件下的宿主細胞和相容性載體，例如，用於表達由載體攜帶並引入宿主細胞的外來 DNA 編碼的蛋白質。

【0274】 常見的表達系統包括：大腸桿菌宿主細胞和質粒載體、昆蟲宿主細胞和桿狀病毒載體以及哺乳動物宿主細胞和載體。宿主細胞的其他實例包括但不限於：原核細胞（例如，細菌）和真核細胞（例如，酵母細胞、哺乳動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞等）。特定的實例包括：大腸桿菌、克魯維酵母或釀酒酵母、哺乳動物細胞系（例如，Vero 細胞、CHO 細胞、3T3 細胞、COS 細胞等）以及原代或確定的哺乳動物細胞培養物（例如，由淋巴母細胞、成纖維細胞、胚胎細胞、上皮細胞、神經細胞、脂肪細胞等形成的培養物）。實例還包括：小鼠 SP2/0-Ag14 細胞（ATCC CRL1581）、小鼠 P3X63-Ag8.653 細胞（ATCC CRL1580）、CHO 細胞（其中二氫葉酸還原酶基因（下稱「DHFR基因」）有缺陷，Urlaub G et al;

1980）、大鼠 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞（ATCC CRL1662，下稱「YB2/0 細胞」）等。在一些實施方案中，可優選 YB2/0 細胞，這是因為當嵌合或人源化抗體在該細胞中表達時，其 ADCC 活性增強。

【0275】 本發明還涉及包含根據本發明的雙特異性抗原識別構建體的宿主細胞。具體地，本發明的宿主細胞包含如上所述的核酸或載體。宿主細胞可以是真核細胞，例如植物、動物、真菌或藻類，也可以是原核細胞，例如細菌或原生動物。宿主細胞可以是培養細胞或原代細胞，即直接從生物體（例如人）分離。宿主細胞可以是貼壁細胞或懸浮細胞（即，在懸浮液中生長的細胞）。為了產生雙特異性抗原結合蛋白（例如，雙特異性 TCR、多肽或蛋白）之目的，宿主細胞優選為哺乳動物細胞。

【0276】 在一特別實施方案中，宿主細胞為幹細胞，優選為間充質幹細胞。

【0277】 根據以上內容，在一實施方案中，本發明涉及一種包含上文定義的本發明雙特異性抗原結合蛋白或本發明核酸或載體的宿主細胞，其中所述宿主細胞優選為 a）間充質幹細胞，或 b）用於重組表達的細胞，諸如中國倉鼠卵巢（CHO）細胞。

【0278】 特別是，為了表達本發明的一些雙特異性抗原結合蛋白，表達載體的類型可以是：其中編碼第一多肽（例如，抗體重鏈或 α 鏈）的基因和編碼第二多肽（例如，抗體輕鏈或 β 鏈）的基因存在於分開的載體上；也可以是這

樣的類型：其中兩種基因都存在於同一載體上（串聯型）。從構建雙特異性抗原結合蛋白表達載體的容易程度、引入動物細胞的容易程度以及動物細胞中抗體 H 和 L 鏈表達水平之間的平衡方面考慮，優選串聯型人源化抗體表達載體（Shitara K et al.J Immunol Methods.1994 Jan. 3; 167(1-2):271-8）。串聯型人源化抗體表達載體的實例包括：pKANTEX93（WO 97/10354）、pEE18 等。

【0279】 在一實施方案中，此類重組宿主細胞可用於產生至少一種本發明的抗原結合蛋白。

產生本發明雙特異性抗原結合蛋白的方法

【0280】 本發明還涉及產生上文定義的抗原結合蛋白的方法，其包含

a. 提出合適的宿主細胞，

b. 提出一種基因構建體，其包含編碼本發明雙特異性抗原結合蛋白的編碼序列，

c. 提出一種基因構建體，其包含編碼本發明雙特異性抗原結合蛋白的編碼序列，

d. 由所述合適的宿主細胞表達所述基因構建體，且任選地

e. 選擇表達和/或分泌所述抗體的細胞。

【0281】 本發明的雙特異性抗原結合蛋白的定義見相應章節。

【0282】 本文的「基因構建體」表示可在宿主中表達編碼區的核酸，因此系指核酸（如上文所述的載體）或RNA。

【0283】 在一特定實施方案中，所述方法可能進一步包括在所述合適宿主細胞上進行細胞表面提呈所述雙特異性抗原識別構建體的步驟。

【0284】 在其他的優選實施方案中，b）中的基因構建體包含編碼本發明雙特異性抗原結合蛋白的核酸。此類核酸的定義見上文「核酸、載體和重組宿主細胞」章節。

【0285】 在一相關實施方案中，所述基因構建體是包含與所述編碼序列可操作地連接的啟動子序列的表達構建體。

【0286】 在一相關實施方案中，使用轉化、轉導或轉染方法將基因構建體引入合適的宿主。轉化、轉導或轉染的定義見上文相關章節。

【0287】 理想情況是，用於將基因構建體引入所述合適宿主細胞的轉導系統為上文核酸、載體和重組宿主細胞章節中所述的逆轉錄病毒或慢病毒載體系統。此類系統是本領域技術人員所熟知的。

【0288】 在一實施方案中，所述方法進一步包括從宿主細胞中分離和純化雙特異性抗原結合蛋白，以及任選地在T細胞中重建雙特異性抗原結合蛋白。

【0289】 本發明的雙特異性抗原結合蛋白可透過本領域已知的任何技術產生，例如但不限於，任何化學、生物學、基因學或酶學技術，可以單獨或組合使用。

【0290】 產生多肽（如，抗體或其片段和 TCR 或其片段）的標準技術為本領域已知，並且本領域技術人員可使用這些技術產生本發明的雙特異性抗原結合蛋白。例如，可使用熟知的固相方法進行合成，特別是使用市售的肽合成設備（例如，加利福尼亞州福斯特城 Applied Biosystems 製造的肽合成設備）並按照製造商的說明進行合成。或者，本發明的雙特異性抗原結合蛋白（例如，抗體或其片段和 TCR 或其片段）可透過本領域熟知的重組 DNA 技術進行合成。例如，在將編碼所需（多）肽的 DNA 序列摻入表達載體中並將此類載體引入表達所需多肽的合適真核或原核宿主之後，可獲得片段作為 DNA 表達產物，之後可使用熟知的技術進行將其分離。

【0291】 在一實施例中，即在 TCER® 雙特異性分子的情況下，可透過例如基因合成獲得編碼 V_H 和 V_L 以及可變 α（Vα）和可變 β（Vβ）各種組合的 DNA 序列，以及編碼連接子的序列。可將得到的 DNA 序列分別框內克隆至編碼衍生自人 IgG4 [登錄號：K01316] 和 IgG1 [登錄號：P01857] 的鉸鏈區、C_{H2} 和 C_{H3} 結構域的表達載體中，並進一步進行改造。可進行改造以將杵臼突變併入到 C_{H3} 結構域中，其具有和不具有額外的鏈間二硫鍵穩定性；去除 C_{H2} 中的 N-糖基化位點（例如：N297Q 突變）；或引入 F_c 沉寂突變；根據 Reiter et al. (Stabilization of the Fv Fragments in Recombinant Immunotoxins by Disulfide Bonds

Engineered into Conserved Framework Regions.Biochemistry, 1994, 33, 5451 - 5459）所述的方法，分別將額外的二硫鍵穩定化引入 V_L 和 V_H 中。

【0292】 本發明的雙特異性抗原結合蛋白可透過免疫球蛋白純化方法（例如，蛋白A-瓊脂糖凝膠、羥磷灰石色譜、凝膠電泳、透析或親和色譜）從培養基中適當地分離。

【0293】 在一實施方案中，本文中回收表達雙特異性抗原結合蛋白或多肽系指實施蛋白 A 色譜、κ選擇色譜和/或尺寸排阻色譜，優選為蛋白 A 色譜和/或尺寸排阻色譜，更優選為蛋白 A 色譜和尺寸排阻色譜法。

【0294】 產生本發明雙特異性抗原結合蛋白的方法涉及重組DNA，基因轉染技術為本領域熟知的（參見 Morrison SL. et al.（1984）和專利文獻 US5,202,238 以及 US5,204,244）。

【0295】 此外，基於常規重組 DNA 和基因轉染技術產生人源化抗體的方法為本領域熟知的（參見，例如，Riechmann L. et al. 1988；Neuberger MS. et al. 1985），並可容易地應用於生產本發明的雙特異性抗原結合蛋白。

【0296】 在一實施例中，用於表達本發明重組抗原結合蛋白的載體設計為單順反子，例如，由 HCMV 衍生的啟動子元件 pUC19-衍生物控制。例如，根據標準培養方法在大腸桿菌中擴增質粒 DNA，隨後使用市售套件(Macherey& Nagel) 純化。例如，根據製造商的說明

書（ExpiCHO™ system；Thermo Fisher Scientific）或利用電穿孔系統（MaxCyte STX），將純化的質粒 DNA 用於 CHO-S 細胞的暫態轉染。例如，將轉染的 CHO 細胞在 32℃ 至 37℃ 下培養 6-14 天，並接受一至兩次 ExpiCHO™ Feed 或 Cellboost 7a 和 7b（GE Healthcare™）溶液進料。

【0297】 例如，利用 Sartoclear Dynamics® Lab Filter Aid（Sartorius）透過過濾（0.22 μm）澄清條件細胞上清液。例如，使用配備的 Äkta Pure 25 L FPLC 系統（GE Lifesciences）純化雙特異性抗原結合蛋白，以線上進行親和力和尺寸排阻色譜。例如，按照標準親和色譜方案，在蛋白 A 或 L 色譜柱（GE Lifesciences）上進行親和層析。例如，在從親和柱洗脫（pH 2.8）後直接進行尺寸排阻色譜，以使用 Superdex 200 pg 16/600 柱（GE Lifesciences）按照標準方案獲得高純度單體蛋白。例如，使用根據預測的蛋白質序列計算的消光係數，在 NanoDrop 系統（Thermo Scientific）上測定蛋白質濃度。如有需要，使用 Vivaspin 裝置（Sartorius）調整濃度。最後，將純化的分子在 2-8℃ 溫度下以約 1 mg/mL 的濃度保存在例如磷酸鹽緩衝鹽水中。

【0298】 純化的雙特異性抗原結合蛋白的品質，透過例如 HPLC-SEC 在 MabPac SEC-1 色譜柱（5 μm，4x300 mm）上測定，所述色譜柱在 Vanquish uHPLC 系統內

例如包含 300 mM NaCl 的 50mM 磷酸鈉 pH 6.8 中運行。

藥物組合物

【0299】 本發明還涉及一種藥物組合物，其包含本發明的雙特異性抗原結合蛋白、本發明的核酸、本發明的載體或本發明的宿主細胞以及藥用載體。

【0300】 本發明還涉及根據本發明所述的用作藥劑的雙特異性抗原結合蛋白。本發明還涉及用作藥劑的本發明藥物組合物。

【0301】 本發明還涉及根據本發明所述的雙特異性抗原結合蛋白和/或本發明藥物組合物在製備藥劑中的用途。

【0302】 本文使用的術語「藥物組合物」或「治療組合物」系指正確給予受試者時能夠誘導所期望治療效果的化合物或組合物。

【0303】 在一些實施方案中，受試者也可稱為患者。

【0304】 此類治療或藥物組合物可包含有效治療量的本發明雙特異性抗原結合蛋白或進一步包含治療劑，與被選擇為適合於給藥方式的藥學上或生理上可接受的製劑混合。

【0305】 本發明的雙特異性抗原結合蛋白通常作為無菌藥物組合物的一部分提供，其通常包括藥用載體。

【0306】 「藥學的」或「藥用」系指當正確給予哺乳動物，特別是人時，不會產生不良、過敏性或其他不良反應的分子實體和組合物。藥用載體或賦形劑系指任何類型的無毒

固體、半固體或液體填充劑、稀釋劑、包囊材料或製劑助劑。

【0307】 「藥用載體」也可稱為「藥用稀釋劑」或「藥用溶媒」，可包括溶劑、填充劑、穩定劑、分散介質、包衣、抗菌劑、抗真菌劑、等滲劑和吸收延遲劑等，它們在生理學上是相容的。因此，在一實施方案中，載體為水性載體。

【0308】 另一方面，當與本文所述的雙特異性抗原結合蛋白組合時，水性載體能夠改善性質，例如改善溶解度、療效和/或改進免疫治療。

【0309】 藥物組合物的劑型、給藥途徑、劑量和給藥方案自然取決於需治療的病症、疾病的嚴重程度、患者的年齡、體重和性別、期望的治療持續時間等。此藥物組合物可為任何合適的劑型（取決於患者用藥的所需方法）。它可以以單位劑型提供，通常以密封容器中提供，並且可以作為套件的一部分提供。此類套件通常（但不一定）包括使用說明書。它可包括多個所述單位劑型。

【0310】 經驗考慮因素（如，生物半衰期）通常將有助於確定劑量。給藥頻率可在治療過程中確定和調整，並且基於癌細胞減少數量、維持減少癌細胞、減少癌細胞增生或殺滅癌細胞。或者，雙特異性抗原結合蛋白的持續緩釋製劑可能合適。用於實現緩釋的各種製劑和裝置為本領域已知。

【0311】 在一實施方案中，抗原結合蛋白的劑量可在已接受一次或多次給藥的個體中憑經驗確定。個體的抗原結合

蛋白劑量逐漸增加。為了評估抗原結合蛋白的療效，可追蹤癌細胞狀態的標誌物。這些包括透過 FACS、其他成像技術直接測量癌細胞的增生和細胞死亡；透過此類測量方法評估健康改善狀況，或透過公認的檢測測量生活品質提高情況或生存時間延長情況。對於本領域技術人員顯而易見的是，劑量將根據個體、疾病階段以及所使用的既往和伴隨治療而變化。

【0312】 特別是，藥物組合物包含溶媒，其對於可注射的製劑是藥學上可接受的。特別是，這些可為等滲無菌鹽水溶液（磷酸一鈉或磷酸二鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣或氯化鎂等，或此類鹽的混合物）或乾燥的，尤其是凍乾組合物，其根據情況添加無菌水或生理鹽水後，可配製可注射溶液。

【0313】 為了製備藥物組合物，可將有效量的本發明雙特異性抗原結合蛋白溶解或分散於藥用載體或水性介質中。

【0314】 適用於注射用途的藥物劑型包括無菌水溶液或分散液；製劑包括麻油、花生油或丙二醇水溶液；以及用於臨時製備無菌注射液或分散液的無菌粉劑。所有情況下，劑型必須為無菌的且必須具備易於注射程度的流動性。它在生產和儲存條件下必須穩定，並且保存時必須防止受到微生物（如，細菌和真菌）污染。

【0315】 作為遊離鹼或藥用鹽的活性化合物溶液可在與表面活性劑（如，羥丙基纖維素）適當混合的水中製備。分散液也可在甘油、液體聚乙二醇及其混合物和油中製備。

在常規儲存和使用條件下，這些製劑含有防腐劑以防止微生物生長。

【0316】 本發明的抗原結合蛋白可使用藥用鹽配製為中性或鹽形式的組合物。

【0317】 無菌注射溶液的製備方法為：將所需量的活性化合物摻入根據需要含有上述各種其他成分的適當溶劑中，然後進行過濾滅菌。通常情況下，分散液的製備方法為：將各種滅菌的活性成分摻入無菌溶媒，所述無菌溶媒包含基本分散介質和上述所需的其他成分。對於用於製備無菌注射溶液的無菌粉末，優選的製備方法為真空乾燥和冷凍乾燥技術，其可從先前的無菌過濾溶液中產生活性成分加上任何其他所需成分的粉末。

【0318】 也考慮了製備更多或高度濃縮的溶液用於直接注射，其中設想使用 DMSO 作為溶劑以使之以極快的速度滲透，從而將高濃度的活性劑遞送至小腫瘤區域。

【0319】 配製後，以與劑量製劑相容的方式和以治療有效量來給予溶液。所述製劑易於以多種劑型給予，例如上述可注射溶液類型，但是也可採用藥物釋放膠囊等。

治療方法和用途

【0320】 發明人已在體外實驗章節的實施例 2 中顯示了 MAG-003 靶向抗原結合蛋白與作為募集物的 BMA031 (V36) 或 UCHT1(V17) 組合，特別是以 TCER® 形式時，這些分子對於不同 MAG-003 陽性癌細胞系的細胞毒

性活性。本發明人還證明了所述細胞毒性活性具有高度特異性，並且限於 TAA 陽性細胞（例如 MAG-003 陽性細胞），這是因為在表達 HLA-A*02 但不提呈 TAA 肽（例如 MAG-003）的細胞系中，雙特異性抗原結合蛋白僅誘導少量裂解。因此，這些實施例證明了將針對 CD3 的低親和力結合結構域（本發明背景下公開的）與高親和力 TCR 可變結構域組合的技術優點。在這些實施例中，此類 TCR 可變結構域與 TAA MAGE-A 特異性結合，但是，本領域技術人員會理解，在 TAA 作為靶標的背景下示例性雙特異性抗原結合蛋白的優點還可轉移至靶向作用於另一種 TA（例如，病毒抗原肽或細菌抗原肽，而非 TAA）的雙特異性抗原結合蛋白。本領域技術人員會理解，在幾項實施方案中，抗原結合蛋白一旦給予受試者，便與靶細胞（例如，TA/MHC 複合體提呈細胞）結合並募集內源性效應細胞、透過 CD3 與它們結合、啟動它們，從而將那些效應細胞定位於靶細胞（特別是靶癌細胞）附近，以實現對所述靶細胞的殺傷，特別是實現抗癌活性。

【0321】 一方面，抗原結合蛋白與靶細胞和效應細胞的 CD3 結合會引發免疫反應，此類反應可能指在體外或體內效應功能的增殖和啟動。對於 MHC I 類限制性細胞毒性 T 細胞，例如，效應子功能可能為溶解肽脈衝的、肽前體脈衝的或天然肽提呈的靶細胞、分泌細胞因子，優選為肽誘導的干擾素-γ、TNF-α 或 IL-2、分泌效應分子，例如，肽誘導的顆粒酶或穿孔素，或脫顆粒。

【0322】 因此，本發明的雙特異性抗原結合蛋白，特別是TCER®分子，可用於治療廣泛的疾病，包括例如，各種形式的癌症和/或感染疾病。本發明的雙特異性抗原結合蛋白可用於人和/或非人類哺乳動物(特別是人)之治療目的。

【0323】 在一實施方案中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白可與患病細胞結合，並使其細胞表面上提呈 TA 肽/MHC 複合體的患病細胞生長減緩和/或將其殺滅。在一優選實施方案中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白可與腫瘤細胞結合，並使其細胞表面上提呈 TAA 肽/MHC 複合體的腫瘤細胞生長減緩和/或將其殺滅。可理解，雙特異性抗原結合蛋白的給藥濃度為在生理（例如，體內）條件下可促進結合。

【0324】 因此，在一實施方案中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白可用於針對不同組織（例如，結腸、肺、乳腺、攝護腺、卵巢、胰腺、腎臟等）腫瘤細胞的免疫療法。在另一實施方案中，本發明的抗原結合蛋白可與腫瘤細胞結合並減少腫瘤細胞的生長和/或殺滅腫瘤細胞。

【0325】 因此，本發明涉及一種治療或預防增生性疾病或病症的方法，所述方法包括向有需要的受試者給予有效治療量的根據本發明所述的雙特異性抗原結合蛋白、核酸或載體、宿主細胞或藥物組合物，定義參見上文「雙特異性抗原結合蛋白」、「核酸」或「藥物組合物」章節。

【0326】 在一特定實施方案中，本發明涉及一種治療患病受試者的方法，所述方法包括向所述受試者給予本發明的雙特異性抗原結合蛋白。

【0327】 在另一實施方案中，本發明涉及在患病受試者中引發免疫反應的方法，所述方法包括向所述受試者給予一種組合物，其包含在宿主細胞中任選表達的本發明抗原識別構建體。

【0328】 在一實施方案中，本發明涉及根據本發明所述的雙特異性抗原結合蛋白、核酸或載體、宿主細胞或藥物組合物在治療或預防受試者疾病中的用途。

【0329】 在一實施方案中，所述方法中提及的免疫反應為細胞毒性 T 細胞反應。所述細胞毒性 T 細胞反應透過抗原結合蛋白與效應細胞上的 CD3 結合以及與 TA 抗原肽/MHC 複合體結合誘導，從而使效應細胞和靶細胞相互接近。

【0330】 本發明還涉及用於診斷、預防和/或治療疾病的本發明的雙特異性抗原結合蛋白、本發明的核酸或本發明的載體、本發明的宿主細胞或本發明的藥物組合物。

【0331】 本發明還涉及本發明的雙特異性抗原結合蛋白、本發明的核酸或本發明的載體、本發明的宿主細胞的用途或本發明的藥物組合物在製造用於診斷、預防和/或治療疾病的一種藥劑中的用途。

【0332】 術語「受試者」或「個體」可互換使用，例如，可以為人或非人哺乳動物，優選為人。

【0333】 在本發明的背景下，術語「治療」系指治療性用途（即，用於患有特定疾病的受試者），意指逆轉、減輕、抑制此類疾病或病症的一種或多種症狀進展。因此，治療不僅指使疾病完全治癒的治療，而且還指減緩疾病進展和/或延長受試者生存期的治療。

【0334】 「預防」意指預防性用途（即，用於易患特定疾病的受試者）。

【0335】 術語「需要治療」系指已經患有病症受試者以及需要預防該病症的受試者。因此，在一實施方案中，受試者為患者。

【0336】 在一實施方案中，「疾病」或「病症」是從本發明抗原結合蛋白治療中受益的任何狀況。在一實施方案中，這包括慢性和急性病症或疾病，包括讓受試者易患所述病症的那些病理狀況。特別是在本發明背景下涉及的疾病可以為增生性疾病或病毒或細菌引起的疾病。由病毒或細菌引起的疾病也可稱為病毒感染或細菌感染。在本發明的背景下，導致疾病的病毒可選自例如人類免疫缺陷病毒(HIV)、人巨細胞病毒（HCMV）、巨細胞病毒（CMV）、人乳頭瘤病毒（HPV）、乙型肝炎病毒（HBV）、丙型肝炎病毒（HCV）、愛潑斯坦-巴爾病毒（EBV）、流感病毒（優選為人類免疫缺陷病毒（HIV））組成的組。在本發明的背景下，引起疾病的細菌，包括例如：結核分枝桿菌。本領域技術人員會理解，當雙特異性抗原結合蛋白靶向作用於病毒抗原肽（例如 HIV）時，則雙特異性抗原結合蛋白用

於治療 HIV。因此，靶向作用於病毒或細菌抗原肽 TA-C 的雙特異性抗原結合蛋白可用於治療所述抗原性病毒或細菌抗原肽所源自的病毒或細菌。

【0337】 「增生性疾病」（例如，癌症）涉及細胞的失調控和/或不適當增生。

【0338】 在一實施方案中，增生性病症或疾病為，例如，以所述腫瘤疾病的癌症或腫瘤細胞有 TA（更特別是 TAA）表達為特徵的腫瘤疾病。

【0339】 因此，特別優選的癌症為 TA 陽性癌症，特別是 TAA 陽性癌症。

【0340】 在另一實施方案中，增生性病症或疾病為，例如，以所述腫瘤疾病的癌症或腫瘤細胞有 MAGEA4 和/或 MAGEA8 表達為特徵的腫瘤疾病。

【0341】 因此，特別優選的癌症為 MAGEA4 和/或 MAGEA8 陽性癌症。

【0342】 在另一實施方案中，增生性病症或疾病為，例如，以所述腫瘤疾病的癌症或腫瘤細胞有 PRAME 表達為特徵的腫瘤疾病。

【0343】 因此，特別優選的癌症為 PRAME 陽性癌症。

【0344】 在本發明的背景下，如果根據 NCI 指南，>98% 所有癌症中提呈相關 TAA 肽（如，本上文「定義」章節中定義的其中一種 TAA 肽，例如 MAG-003 肽或 PRAME-004），則該癌症視為「TAA 陽性」，如，「MAGEA4 和/或 MAGEA8 陽性」或「PRAME 陽性」。

在本文指出的所有其他適應症中，可進行活檢，因為這是這些癌症治療中的標準手段，並且可根據XPRESIDENT®和相關方法鑒定肽（根據WO 03/100432；WO 2005/076009；WO 2011/128448；WO 2016/107740、US 7,811,828、US 9,791,444和US 2016/0187351，各文獻內容透過引用整體併入本文）。在一實施方案中，例如透過使用本發明的雙特異性抗原結合蛋白可較容易地測定（即，診斷）癌症。使用抗原結合蛋白鑒定抗原表達癌症的方法為本領域技術人員已知。

【0345】 在一實施方案中，所述癌症選自由肺癌（例如，非小細胞肺癌、小細胞肺癌）、肝癌、頭頸癌、皮膚癌、腎細胞癌、腦癌、胃癌、結直腸癌、肝細胞癌、胰腺癌、攝護腺癌、白血病、乳腺癌、默克爾細胞癌、黑色素瘤、卵巢癌、膀胱癌、子宮癌、膽囊和膽管癌、骨肉瘤和食道癌組成的列表。

【0346】 Cancer, Principles and Practice of Oncology, 4th Edition, DeVita et al, Eds. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa.（1993）是為癌症治療提供指導的文章。適當的治療方法根據相關領域公認的癌症具體類型和其他因素（例如，患者一般狀況）選擇。本發明的雙特異性抗原結合蛋白可單獨使用，也可加入其他抗癌藥物（常用於治療癌症患者）的治療方案中。

【0347】 因此，在一些實施方案中，本發明的雙特異性抗原結合蛋白可在廣泛用於癌症治療的多種藥物和治療方法（例如，化學治療劑、非化學治療劑、抗腫瘤劑和/或放射療法，優選為化學治療劑）的同時、之前或之後給予。

【0348】 在進一步的實施方案中，雙特異性抗原結合蛋白還可用於治療感染疾病，例如，感染性病毒或細菌疾病，其中病毒疾病選自由人類免疫缺陷病毒（HIV）、人巨細胞病毒（HCMV）、巨細胞病毒（CMV）、人乳頭瘤病毒(HPV)、乙型肝炎病毒（HBV）、丙型肝炎病毒（HCV）、人乳頭瘤病毒感染（HPV）、愛潑斯坦-巴爾病毒（EBV）、流感病毒（優選為 HIV、HBV、流感和 HCMV）組成的組，其中細菌疾病為，例如，結核。

【0349】 本發明的抗原結合蛋白或其藥物組合物可以單獨給藥，也可在給予治療此類感染性疾病的其他治療藥物同時、之前或之後給藥。

【0350】 本文中的「診斷」系指醫學診斷，並指確定哪種疾病或狀況可解釋患者的症狀和體徵。

【0351】 「有效治療量」的雙特異性抗原結合蛋白或其藥物組合物意指足夠量的雙特異性抗原結合蛋白以適用於任何醫學治療的合理受益/風險比來治療所述增生性疾病。但是，應瞭解，本發明的抗原結合蛋白、核酸或載體、宿主細胞或藥物組合物的每日或每月總使用量將由主治醫師在合理醫療判斷範圍內來決定。對於任何特定患者而言，具體有效治療劑量水平將取決於多種因素，包括：所治療的

病症或疾病以及病症的嚴重程度；所使用的特定雙特異性抗原結合蛋白的活性；所使用的特定組合物，患者的年齡、體重、一般健康狀況、性別和飲食；所使用特定多肽的給藥時間、給藥途徑和排泄速率；治療持續時間；與所使用的特定多肽聯合或同時使用的藥物；以及醫學領域熟知的因素。例如，為本領域技術人員熟知的是，以低於達到期望治療作用所需的劑量水平開始使用化合物的劑量，並逐漸增加劑量直至達到期望的效果。

【0352】 在一實施方案中，本發明雙特異性抗原結合蛋白的治療療效在體內測定，例如，在癌症小鼠模型中測定，並透過測量例如治療組和對照組之間的腫瘤體積變化來測定。

【0353】 本發明的藥物組合物、載體、核酸和細胞可以以基本上純的形式提供，例如，其中，存在按重量計至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的相同類型雙特異性抗原結合蛋白。

【0354】 本發明的雙特異性抗原結合蛋白、本發明的核酸或本發明的載體、本發明的宿主細胞或本發明的藥物組合物可透過任何可行的方法給予。

【0355】 本發明還提出了一種殺傷患者靶細胞的方法，所述方法包括給予患者抗原結合蛋白。在此方法的背景下，

抗原結合蛋白給予受試者後，與靶細胞和表達 CD3 的效應細胞結合，優選引發免疫反應。

【0356】 在一特定方法中，宿主細胞可以為幹細胞（例如，間充質幹細胞）並改造成表達本發明的雙特異性抗原結合蛋白。在此實施例中，雙特異性抗原結合蛋白為本文所述的 TCER®。

【0357】 因此，本發明的宿主細胞，優選為上文定義的幹細胞，可用作治療組合物的活性成分。因此，本發明也提出了一種殺傷患者靶細胞的方法，所述方法包括給予患者以上定義的有效量的宿主細胞，優選為間充質幹細胞。

【0358】 為了本發明方法之目的，其中將宿主細胞或細胞群給予受試者，宿主細胞可以是受試者的同種異體（來自另一名受試者）或自體細胞。優選情況是，細胞為受試者的自體細胞。

【0359】 如果宿主細胞為同種異體細胞，也就是來自另一名受試者，則所述另一名受試者是健康的。

【0360】 「健康的」意指受試者一般狀況良好，優選為免疫系統合格，更優選為無任何可很容易測試或檢測的疾病。

【0361】 因此，宿主細胞用根據本發明所述的核酸和/或載體轉化、轉導或轉染，定義見上文「核酸、載體和重組宿主細胞」章節。

【0362】 當宿主細胞被轉化、轉導或轉染以表達本發明的雙特異性抗原結合蛋白時，優選為所述細胞包含能夠表達

抗原結合蛋白的表達載體。當宿主細胞表達了本發明的雙特異性抗原結合蛋白後，所述宿主細胞可稱為啟動的宿主細胞。

【0363】 一方面，TCR 引發的免疫反應或 T 細胞反應可指透過在體外或體內與 T 細胞和 TA 抗原肽/MHC 複合體（如，TA-C/MHC 複合體）結合的雙特異性抗原結合而誘導效應子功能的增殖和啟動。對於 MHC I 類限制性細胞毒性 T 細胞，例如，效應子功能可能為溶解肽脈衝的、肽前體脈衝的或天然肽提呈的靶細胞、分泌細胞因子，優選為肽誘導的干擾素-γ、TNF-α 或 IL-2、分泌效應分子，例如，肽誘導的顆粒酶或穿孔素，或脫顆粒。

【0364】 因此，本發明的另一方面提出了用本發明前述方法製得的激活宿主細胞。

【0365】 透過上述方法產生的激活宿主細胞可選擇性地識別靶細胞。

【0366】 本文中的「靶細胞」系指上文「雙特異性抗原結合蛋白」章節中定義的 TA-C/MHC 提呈細胞或 TA 提呈細胞。

【0367】 在一優選實施方案中，即，當 TA/MHC 複合體為 TAA/MHC 複合體時，靶細胞為癌細胞，其中所述癌症如上文所定義。

【0368】 根據本發明，CD3 陽性效應細胞的體內靶細胞可為腫瘤細胞（有時表達 MHC-II 類抗原）和/或腫瘤（腫瘤細胞）周圍的基質細胞（有時也表達 MHC-II 類抗原；

(Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res 12 (2006): 4163-4170)。

套件

【0369】 最後，本發明還提出了套件，其包含至少一種本發明的雙特異性抗原結合蛋白。

【0370】 在一實施方案中，套件包含

a) 上文「雙特異性抗原結合蛋白」章節中所定義的至少一種本發明的雙特異性抗原結合蛋白，

b) 任選為包裝材料，以及

c) 任選為所述包裝材料內所含的標籤或藥物仿單，提示所述雙特異性抗原結合蛋白可有效治療疾病，優選為癌症或可用於治療疾病，優選為癌症。

【0371】 在一相關實施方案中，本發明的至少一種抗原結合蛋白包含於單室和/或多室預填充式注射器（例如，液體注射器和凍乾注射器）中。

【0372】 在一實施方案中，本發明包括用於產生單劑量給藥單位的套件。

【0373】 因此，在一實施方案中，如本發明套件的 a) 中提及的本發明至少一種雙特異性抗原結合蛋白為第一容器中包含的本發明的乾燥雙特異性抗原結合蛋白。套件進一步包含具有水性製劑的第二容器。

【0374】 因此，在一實施方案中，套件包含

a）　第一容器，其包含至少一種上文「抗原結合蛋白」章節中所定義的本發明的乾燥雙特異性抗原結合蛋白，

b）　第二容器，其包含水性製劑；

c）　任選為包裝材料，以及

d）　任選為所述包裝材料內所含的標籤或藥物仿單，提示所述雙特異性抗原結合蛋白可有效治療疾病，優選為癌症或可用於治療疾病，優選為癌症。

【0375】　水性製劑通常指包含上文「藥物組合物」章節中所定義的藥用載體的水溶液。

【0376】　在一相關實施方案中，「第一容器」和「第二容器」系指多室預填充式注射器（例如，凍乾注射器）的腔室。

【0377】　本發明背景下的癌症定義見上文。

【0378】　本發明還涉及下文引用的項目和方面。

【0379】　在另一方面，本發明涉及包含至少兩個抗原結合位點（D 和 B）的雙特異性抗原結合蛋白，其中，抗原結合位點 D 與 TCRα/β 結合，其中抗原結合位點 B 與靶抗原（TA）肽/MHC 複合體結合，其中抗原結合位點 D 包含重鏈可變結構域（V_H）和輕鏈可變結構域（V_L），其中所述 V_L 包含 SEQ ID NO: 42 的氨基酸序列或由其組成，其中所述 V_H 包含 SEQ ID NO: 43 的氨基酸序列或由其組成。

【0380】　在所述方面的一相關項目中，所述方面的雙特異性抗原結合蛋白的抗原結合位點 D 以 K_D(D) 與 TCRα/β

結合，抗原結合位點 B 以 K_D(C) 與靶抗原肽 C (TA-C)/MHC 複合體結合，其中K_D(D)/K_D(C) 之比大於 1、大於 4、大於 6、大於 8、大於 10、大於 15、大於 20、大於 25、大於 30、大於 40、大於 50，例如：1 至 150、4 至 140、6 至 100、8 至 100、10 至 100 之間，優選為 10 至 100 之間。

【0381】 在所述方面的另一相關項目中，抗原結合位點 D 以 ≥3 nM、≥5 nM、≥8 nM、≥10 nM、≥12 nM、≥14 nM、≥16 nM、≥18 nM、≥20 nM、≥25 nM、≥30 nM、≥35 nM、≥40 nM、≥45 nM 和優選為 ≤1000 nM、≤800 nM、≤600 nM、≤500 nM、≤400 nM（例如：3 nM 至 1000 nM、3 nM 至 600 nM、5 nM 至 600 nM、10 nM 至 600 nM、12 nM 至 600 nM、14 nM 至 600 nM、16 nM 至 600 nM、18 nM 至 600 nM、20nM 至 600nM，優選為 5 nM 至 100 nM）的 K_D(D) 與 TCRα/β 結合，所述 K_D(D) 優選為使用表面等離振子共振（SPR）或生物膜層干涉法（BLI）、優選生物膜層干涉法（BLI）測定。

【0382】 在所述方面的另一相關項目中，抗原結合位點 B 以 ≤100 μM、≤1 μM、≤100 nM、≤50 nM、≤10 nM，例如：0.01 nM 至 150 nM、0.05 nM 至 150 nM、0.1 nM 至 150 nM、0.1 nM 至 100 nM、0.1 nM 至 50 nM、0.1 nM 至 10 nM、0.5 nM 至 10 nM、0.5 nM 至 5 nM（優選為 0.5 nM 至 5 nM）的 K_D(C) 與

靶抗原肽C（TA-C)/MHC複合體結合，所述K_D(C）使用表面等離振子共振（SPR）或生物膜層干涉法（BLI)、優選生物膜層干涉法（BLI）測定。

【0383】 在所述方面的另一相關項目中，所述抗原結合蛋白對TA-C/MHC提呈細胞的EC_{50}比對正常組織細胞的EC_{50}值低≥100、≥500、≥1000倍。

【0384】 在所述方面的另一相關項目中，TA抗原肽C為病毒肽、細菌肽或腫瘤相關抗原（TAA）肽，優選為腫瘤相關抗原（TAA）肽。

【0385】 在所述方面的另一相關項目中，所述抗原結合蛋白對TA-C/MHC複合體提呈細胞的EC_{50}比對正常組織細胞的EC_{50}值低≥5倍、≥10倍、≥20倍、≥50倍、≥100倍、≥500倍、≥1000倍。

【0386】 在所述方面的另一相關項目中，TA抗原肽C為腫瘤相關抗原（TAA）肽C，其中所述TAA-C選自包含SEQ ID NO: 162至317、SEQ ID NO: 9和10的氨基酸序列或由其組成的TAA抗原肽的組，如，包含SEQ ID NO: 9的氨基酸序列「SLLQHLIGL」或由其組成的PRAME抗原肽，或包含SEQ ID NO: 10的氨基酸序列「KVLEHVVRV」或由其組成的MAGE-A抗原肽，其中MHC優選為HLA-A*02。

【0387】 在所述方面的另一相關項目中，TA抗原肽C為包含SEQ ID NO: 10的氨基酸序列「KVLEHVVRV」或由其組成的MAGE-A抗原肽，其中類似肽選自由以下

組成的列表：RABGAP1L-001、AXIN1-001、ANO5-001、TPX2-001、SYNE3-001、MIA3-001、HERC4-001、PSME2-001、HEATR5A-001、CNOT1-003、TEP1-003、PITPNM3-001、ZFC-001，優選為HEATR5A-001、HERC4-001和CNOT1-003。

【0388】 在所述方面的另一相關項目中，雙特異性抗原結合蛋白為雙特異性抗體或其片段、雙特異性T細胞受體(TCR)或其片段或雙特異性單鏈TCR(scTCR)或雙特異性單鏈抗體。

【0389】 在所述方面的另一相關項目中，抗原結合位點B包含抗體或其片段或α鏈可變結構域(v_α)和β鏈可變結構域(v_β)或γ鏈可變結構域(v_γ)或δ鏈可變結構域(v_δ)，優選為α鏈可變結構域(v_α)和β鏈可變結構域(v_β)或γ鏈可變結構域(v_γ)和δ鏈可變結構域(v_δ)，優選為v_α和v_β。

【0390】 在所述方面的另一相關項目，

i) v_α包含選自由以下組成組的氨基酸序列或由其組成：

「EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLY WYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDSKQDQRLTVLLN KKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIF GSGTRLSIRP」SEQ ID NO:20、

「EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLY

WYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLN

KKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIF

GSGTRLSIRP」SEQ ID NO:21、

「EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTESSSTYLYW

YKQEPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNK

KDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGS

GTRLSIRP」SEQ ID NO:22，或與選自由 SEQ ID NO: 20、21 和 22 組成組的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列，並且其中優選與 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 23 的 CDRa1、SEQ ID NO: 24 的 CDRa2 和 SEQ ID NO: 25 的 CDRa3 的氨基酸序列，其中優選與 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 23 的 CDRa1、SEQ ID NO: 26 的 CDRa2 和 SEQ ID NO: 25 的 CDRa3 的氨基酸序列，其中優選與 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 27 的 CDRa1、SEQ ID NO: 26 的 CDRa2 和 SEQ ID NO: 25 的 CDRa3 的氨基酸序列，並且其中所述第一可變結構域的氨基酸優選包含氨基酸 19V 和/或 48K，和

V_β 包含

「DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYL

FWYRQTMMRGLELLFYFCYGTPCDDSGMPEDRF

SAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRADTG ELFFGEGSRLTVL」SEQ ID NO:30 的氨基酸序列或與由 SEQ ID NO 30 組成的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中優選為與 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選分別包含 SEQ ID NO: 31 的 CDRb1、SEQ ID NO: 34 的 CDRb2 和 SEQ ID NO: 35 的 CDRb3 的氨基酸序列並任選地包含氨基酸 54F 和/或 66C，或

(ii) v_α 或 v_γ 包含 SEQ ID NO: 48 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO 48 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中優選為與 SEQ ID NO: 48 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 49 的 CDRa1、SEQ ID NO: 50 的 CDRa2 和 SEQ ID NO: 51 的 CDRa3 的氨基酸序列，和

v_β 或 v_δ 包含 SEQ ID NO: 44 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 44 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中優選為與SEQ ID NO: 44 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 45 的 CDRb1、SEQ ID NO: 46 的 CDRb2 和 SEQ ID NO: 47 的 CDRb3 的氨基酸序列。

【0391】 在所述方面的一項中，抗原結合蛋白包含式 V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1} [III] 的第一多肽（包含 SEQ ID NO: 282 或 284 的氨基酸序列或由其組成），以及

式 V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-Fc_2 [IV] 的第二多肽（其包含 SEQ ID NO: 283 的氨基酸序列或由組成）。

【0392】 在所述方面的另一相關項目中，雙特異性抗原結合蛋白還包含以下一種或多種：

(i) 診斷劑；

(ii) 治療劑；或

(iii) 藥代動力學（PK）修飾部分。

【0393】 在所述方面的另一相關項目中，分離的核酸包含編碼上述方面和項目中所定義的雙特異性抗原結合蛋白的序列，或核酸載體包含所述核酸。

【0394】 在所述方面的另一相關項目中，重組宿主細胞包含上述方面和項目中所定義的雙特異性抗原結合蛋白、或上述項目中所定義的核酸或載體，其中所述宿主細胞優選為 a）幹細胞，優選為間充質幹細胞，或 b）用於重組表達的細胞，諸如，中國倉鼠卵巢（CHO）細胞。

【0395】 所述方面的另一相關項目涉及一種藥物組合物，其包含上述方面和項目中所定義的雙特異性抗原結合蛋白、上述方面和項目中所定義的核酸或載體、或上述方面和項目中所定義的宿主細胞，以及藥用載體、稀釋穩定劑和/或賦形劑。

【0396】 所述方面的另一相關項目涉及產生上述方面和項目中所定義的雙特異性抗原結合蛋白的方法，包含

a) 提出合適的宿主細胞，

b）　提出基因構建體，其包含編碼上述方面和項目中所定義的雙特異性抗原結合蛋白的編碼序列，

c）　將所述基因構建體引入所述合適的宿主細胞，和

d）　由所述合適的宿主細胞表達所述基因構建體。

【0397】　在另一相關項目中，上述方面和項目中所定義的方法還包括從合適的宿主細胞中分離和純化雙特異性抗原結合蛋白。

【0398】　所述方面的另一相關項目涉及上述方面和項目中所定義的雙特異性抗原結合蛋白、上述方面和項目中所定義的核酸或載體、上述方面和項目中所定義的宿主細胞或根據上述方面和項目中所定義的藥物組合物在藥物中的用途。

【0399】　在另一相關項目中，涉及上述方面和項目中所定義的雙特異性抗原結合蛋白、上述方面和項目中所定義的核酸或載體、上述方面和項目中所定義的宿主細胞或根據上述方面和項目中所定義的藥物組合物在診斷、預防和/或治療疾病（如病毒或細菌感染或增生性疾病，優選為癌症，更優選為 TAA/MHC 陽性癌症）中的用途。

【0400】　本專利申請中所使用的定義和實施方案經適當修改後適用於本文的上述方面和項目。

【0401】　在整個當前申請中，術語「和/或」為語法上連詞，應解釋為包含與其連接的一個或多個情況可能發生。例如，措辭「可使用標準重組和/或合成方法製備此類天然序列蛋白」表示可使用標準重組和合成方法來製備天然序列

蛋白，或者可使用標準重組方法來製備天然序列蛋白或可使用合成方法製備天然序列蛋白。

【0402】 此外，在整個當前申請中，術語「包含」應解釋為包含所有特別提及的特徵以及可選的、附加的、未指定的特徵。如本文中所用的，術語「包含」的使用還公開了實施方案，其中不存在特別提及特徵之外的特徵（即，「由……組成」）。

【0403】 此外，不定冠詞「一」或「一個」不排除有多個。在相互不同的附屬項中敘述某些措施這一事實並不表示不能使用這些措施的組合。

【0404】 現在將參考以下附圖和實施例對本發明進行更詳細的描述。本文引用的所有文獻和專利檔透過引用整體併入本文。雖然本發明已經在前面的描述中進行了詳細的說明和描述，實施例被認為是說明性的或示例性的而非限制性的。

【圖式簡單說明】

【0405】 圖 1 顯示了 UCHT1 VL 結構域與已確定人類受體框架的比對。圖中確定的 CDR 根據 Cothia 定義確定。

【0406】 圖 2 顯示了 UCHT1 V_H 結構域與已確定人類受體框架的比對。圖中確定的 CDR 根據 Cothia 定義確定。

【0407】 圖 3 顯示了透過流式細胞術測得的 PRAME-004 特異性 TCER® 分子與 Jurkat 細胞的濃度依賴性結合。

【0408】 圖 4 顯示了使用健康 HLA-A*02 陽性供體的 PBMC 進行的代表性 LDH 釋放測定結果。在 MAG-003 陽性和 MAG-003 陰性以及脫靶陽性腫瘤細胞系上測試了使用 UCHT1（V17）或 BMA031（V36）的 MAG-003 特異性 TCER® 分子。受測的細胞系（從左到右）：H695T、A375、T98G、BV173。誤差柱表示三次重複的標準偏差。

【0409】 圖 5 顯示了用基於 UCHT1（V17）的 MAG-003 特異性 TCER® 孵育的健康細胞上 LDH 釋放測定結果。各細胞毒性圖顯示了在 PBMC 和遞增濃度的 TCER 分子共孵育後，在相同培養基組合物下，原代健康細胞類型（空心圓圈）相對於對照腫瘤細胞系 Hs695T（實心圓圈）的 LDH 釋放。還描繪了基於 EC_{50} 值算得的安全窗。

【0410】 圖 6 顯示了用基於 BMA031(V36) 的 MAG-003 特異性 TCER® 孵育的健康細胞上 LDH 釋放測定結果。各細胞毒性圖顯示了在 PBMC 和遞增濃度的 TCER 分子共孵育後，在相同培養基組合物下，原代健康細胞類型（空心圓圈）相對於對照腫瘤細胞系 Hs695T（實心圓圈）的 LDH 釋放。還描繪了基於 EC_{50} 值或基於 LOEL 算得的安全窗。

【0411】 圖 7 顯示了引入點突變的視覺化。A 圖顯示了 UCHT1 重鏈位置 31 的新引入 Asp 側鏈以及位於其空間附近 CD3ε 的帶負電荷側鏈。B 圖顯示了 UCHT1 重鏈位置 54 的 wt Tyr 和取代 Gln。芳香族側鏈被較小的極性氨基酸取代可消除 CD3ε 位置 48 上 Asp 非極性幹的疏水相互作用。C 圖顯示了 UCHT1 重鏈位置 54 上相同的 Tyr 被 Glu 取代以及位於空間附近的 CD3ε（48D、49E、50D、51D）上的帶負電荷側鏈，這些側鏈可能會導致新引入 Glu 在 UCHT1 上產生靜電排斥。D 圖顯示了 UCHT1 重鏈位置 55 上的 wt Lys 與 CD3ε 位置 56 上的 Ser 骨架形成氫鍵（虛線）（左）。用 Arg 取代所述 Lys 可消除極性相互作用並引入了更大體積，使 Arg 側鏈變為應變旋轉異構體（右）。E 圖顯示了 UCHT1 重鏈位置 55 上相同的賴氨酸，並被 Glu 取代；這種突變還可消除 CD3ε 位置 56 上 Lys 和 Ser 之間形成的 H 鍵。此外，它在由 Asp 48、Glu 49、Asp 50 和 Asp 51 形成的 CD3ε 表面上帶負電荷補丁空間附近引入帶負電荷側鏈。

【0412】 圖 8 顯示了基於人源化 UCHT1 變體的 TCER® 分子的產量和穩定性特徵摘要。(na) 不適用，(nd) 未做。

【0413】 圖 9A 顯示了透過生物層干涉法測得的 TCER® 抗原結合蛋白（包含不同 UCHT1 變體）對於與 HLA-A*02 複合的 MAG-003 的結合曲線。溶液中 TCER® 分子的濃度遞增，單位為 nM。

【0414】 圖 9B 顯示了透過生物層干涉法測得的 TCER® 抗原結合蛋白（包含不同 UCHT1 變體）對於 CD3δε-F_c 的結合曲線。溶液中 TCER® 分子的濃度遞增，單位為 nM。

【0415】 圖 10 顯示了使用兩名健康 HLA-A*02 陽性供體的 PBMC（HBC-982 和 HBC-720）進行的兩次獨立 LDH 釋放測定結果。在 MAG-003 陽性腫瘤細胞系上測試了使用各種親和力 UCHT1 變體的 MAG-003 特異性 TCER® 分子。誤差柱表示三次重複的標準偏差。

【實施方式】

【0416】 實施例 1：小鼠單克隆抗體 UCHT1 的人源化

【0417】 小鼠單克隆抗體 UCHT1 的人源化根據公開的方法透過 CDR 移植進行。因此，根據 Cothia 定義確定 V_H 和 V_L 的 CDR。產生可將 UCHT1 可變結構域與人種系進行比較的序列比對。根據整體序列同一性、匹配的介面位置和分類相似的 CDR 規範位置，為每條輕鏈和重鏈確定一個種系作為最有前景的受體框架，為輕鏈確定 VK1-O18，為重鏈確定 VH-1-46。將 J 段基因的 FR4 與親本序列進行比較，分別為輕鏈和重鏈選定 J 段 JK1 和 JH4。

【0418】 生成了親本和受體框架之間含有不同殘基的所有位置列表。在分離以及其他可能取代的情況下分析和考慮了所有位置。各位置被列為中性、關鍵或貢獻，並提出了

哪些殘基可在人源化變體中取代和評估的相關建議。使用Epibase™（Lonza）篩選了潛在的人源化變體序列。對於各表位或表位簇，分析了可消除表位或進一步降低預測免疫原性的取代。進一步確定CDR內翻譯後修飾的潛在位點，並提出了相應補救措施。總體上，這導致產生四個不同的V_H結構域和五個不同的V_L結構域。因此，產生UCHT1的17種人源化變體。所有變體在CHO細胞中均表達為Fab分子。對表達蛋白進行純化，並根據表達力價、聚集水平和與Jurkat細胞結合的EC_{50}值進行排列。根據這些結果，選擇由SEQ ID No: 137和SEQ ID No: 145定義的人源化UCHT1（V17）來確定發明人的TCER®分子。

【0419】 分別利用人源化UCHT1（V17）（獲得包含SEQ ID No: 171和SEQ ID No.170的分子）的募集結構域或人源化BMA031（V10）（獲得SEQ ID No: 168和SEQ ID No: 169）構建PRAME-004（SEQ ID No: 9）靶向TCER®分子。用於表達重組蛋白的載體設計為單順反子，由HCMV衍生的啟動子元件pUC19衍生物控制。根據標準培養方法在大腸桿菌中擴增質粒DNA，隨後使用市售套件（Macherey& Nagel）純化。根據製造商的說明書（ExpiCHO™ system；Thermo Fisher Scientific），將純化的質粒DNA用於CHO-S細胞的暫態轉染。將轉染的CHO細胞在32℃至37℃下培

養 6-14 天，並接受一至兩次 ExpiCHO™ Feed 溶液進料。

【0420】 透過離心（4000×g；30 分鐘）收集條件細胞上清液，並透過過濾（0.22 μm）澄清。使用配備的 Äkta Pure 25 L FPLC 系統（GE Lifesciences）純化雙特異性分子，以線上進行親和力和尺寸排阻色譜。按照標準親和層析方案，在蛋白 A 柱（GE Lifesciences）上進行親和層析。在從親和柱洗脫（pH 2.8）後直接進行尺寸排阻色譜，以使用 Superdex 200 pg 16/600 柱（GE Lifesciences）按照標準方案獲得高純度單體蛋白。使用根據預測的蛋白質序列計算的消光係數，在 NanoDrop 系統（Thermo Scientific）上測定蛋白質濃度。使用 Vivaspin 裝置（Sartorius）進行濃縮（如果需要）和緩衝液交換。最後，將純化的分子在 2-8℃ 溫度下以約 1mg/mL 的濃度保存在磷酸鹽緩衝鹽水中。

【0421】 這些 TCER® 分子對效應細胞的結合親和力透過流式細胞術評估。因此，將 Jurkat 細胞（CD3+ 和 TCRab+）與升高濃度的 TCER® 一起孵育。洗滌後，使用 PE 標記的第二試劑 （#709-116-098, Jackson ImmunoResearch）對細胞結合的 TCER® 分子進行染色。最後在 Intellicyt® iQue 細胞篩選儀上對細胞進行分析。圖 3 顯示了四次獨立實驗之一的結果，證明 PRAME-004 特異性 TCER® 分子與 Jurkat 細胞呈濃度依賴性結合。很明顯，基於 UCHT1 的 TCER® 分子

結合 EC_{50} 約為 2-3 nM，而基於 BMA031 的 TCER® 分子對 Jurkat 細胞的結合至少弱 50-100 倍。

【0422】 實施例 2：使用不同親和力的募集物證明細胞毒性的原理

【0423】 靶向作用於肽MAG-003（SEQ ID No: 10）的抗原結合蛋白的生成方法為：在 TCER® 構建體內將 T 細胞受體的改造可變結構域（SEQ ID No: 20 和 SEQ ID No: 30）與 UCHT1(V17)（SEQ ID No: 137 和 SEQ ID No: 145）或 BMA031(V36)（SEQ ID No: 42 和 SEQ ID No: 43）的可變結構域分別組合。

【0424】 用於表達各個 TCER® 分子的載體設計為單順反子，由 HCMV 衍生的啟動子元件 pUC19衍生物控制。根據標準培養方法在大腸桿菌中擴增質粒 DNA，隨後使用市售套件（Macherey& Nagel）純化。純化的質粒 DNA 用於透過電穿孔系統（MaxCyte STX）暫態轉染 CHO-S 細胞。將轉染的 CHO 細胞在 32℃ 至 37℃ 下培養 10-12 天，並接受一至三次 Cellboost 7a 和 7b（GE Healthcare™）溶液進料。

【0425】 利用 Sartoclear Dynamics® Lab Filter Aid（Sartorius）透過過濾（0.22 μm）澄清條件細胞上清液。使用配備的 Äkta Pure 25 L FPLC 系統（GE Lifesciences）純化雙特異性抗原結合蛋白，以線上進行親和力和尺寸排阻色譜。按照標準親和層析方案，在 MAbSelect SuRE 或蛋白 L 柱（GE Lifesciences）上

進行親和層析。在從親和柱洗脫（pH 2.8）後直接進行尺寸排阻色譜，以使用 Superdex 200 pg 26/600 柱（GE Lifesciences）按照標準方案獲得高純度單體蛋白。使用根據預測的蛋白質序列計算的消光係數，在 NanoDrop 系統（Thermo Scientific）上測定蛋白質濃度。如有需要，使用 Vivaspin 裝置（Sartorius）調整濃度。最後，將純化的分子在 2-8℃ 溫度下以約 1mg/mL 的濃度保存在磷酸鹽緩衝鹽水中。

【0426】 雙特異性分子對抗 MAG 陽性和 MAG 陰性腫瘤細胞系的細胞毒性活性分別透過 LDH-釋放測定法分析。因此，在 TCER® 分子濃度遞增情況下，將細胞表面上提呈不同量 HLA-A*02/MAG-003 的腫瘤細胞系與分離自健康供體（HLA-A*02+）的 PBMC 共同孵育。48 小時後，利用 CytoTox 96 非放射性細胞毒性測定套件（PROMEGA）測量靶細胞系的裂解情況。

【0427】 此類測定的示例性結果見附圖（實施例 2）。表 5 匯總了所得的 EC_{50} 值。

表 5：比較不同募集抗體的殺滅測定所得 EC_{50} 值匯總。

募集物	對靶標高的 EC_{50}	對靶標低的 EC_{50}	對脫靶陽性的 EC_{50}	對陰性的 EC_{50}
UCHT1(V17)	3 pM	4 pM	146 pM	11559 pM
BMA031(V36)	69 pM	383 pM	21555 pM	n/a

【0428】 這些結果表明，與基於 UCHT1（V17）的分子相比，基於 BMA031（V36）的 TCER® 分子的效力降低（對靶標高表達細胞系降低 23 倍，對靶標低表達細胞

系降低 96 倍）。根據 EC_{50} 值，可按上文「定義」章節所述計算安全窗。簡言之，安全窗定義為殺滅脫靶表達細胞的 EC_{50} 與殺滅表達靶標（TAA）表達細胞的 EC_{50} 之比。這意味著基於 UCHT1（V17）的 TCER® 安全窗約為 49 倍，而基於 BMA031（V36）的 TCER®安全窗增加約 312 倍（脫靶表達腫瘤細胞系與靶標（TAA）高表達腫瘤細胞系比較）。

【0429】 這些發現表明，一般而言，利用低親和力募集結構域可改善靶標與脫靶之間的區別，從而提高安全窗。為了進一步驗證此假設，評估了 MAG-003 特異性 TCER® 分子對原代健康組織細胞（HLA-A*02+）的細胞毒性活性。為此，在 11 種不同原代健康組織細胞（HLA-A*02+）與來自健康 HLA-A*02+ 供體的 PBMC 效應細胞以 E:T 比例 10:1 的共培養物且 TCER® 濃度遞增的情況中測定 LDH。細胞在原代組織細胞特異性培養基和最佳 T 細胞培養基的50% 混合物中進行了共孵育。為了確定安全窗，在原代細胞以及 100% 最佳 T 細胞培養基的相應培養基組合物中，TCER® 分子在相同的環境下用 MAG-003 陽性腫瘤細胞系 Hs695T 進行了共孵育，以排除不同培養基造成的偏差。共培養 48 小時後，收集上清液，並使用 LDH-Glo™ 套件（Promega）透過測量 LDH 釋放來分析細胞的裂解情況。

【0430】 在圖 5 和圖 6 中，各細胞毒性圖顯示了在 PBMC 和遞增濃度的 TCER 分子共孵育後，在相同培養基組合物

下，原代健康細胞類型（空心圓圈）相對於對照腫瘤細胞系 Hs695T（實心圓圈）的 LDH 釋放。圖 5 匯總了基於 UCHT1（V17）的 MAG-003 特異性 TCER® 分子的結果。對於所有受測的細胞類型，除了鼻上皮細胞和 PBMC 外，都可以檢測到強反應性，並可確定各自的 EC_{50} 值。根據 EC_{50} 值，按上文定義章節所述計算安全窗。圖中標出了 x 倍的安全窗。對於基於 UCHT1（V17）的 TCER®，對於以下細胞確定了最關鍵的安全窗：星形膠質細胞（48 倍）、真皮微血管內皮細胞（94 倍）和間充質幹細胞（170 倍）。

【0431】 使用基於BMA031（V36）的 TCER® 分子時，對健康原代細胞的所有反應都過低，無法計算EC_{50}。相反，我們基於最低觀測效應水平（LOEL）定義了安全窗，所述 LOEL 確定為超過臨界值反應的首個 TCER® 濃度。臨界值定義為

（[所有三次重複值的標準差 x 3] + [無 TCER 對照]）

（無 TCER 對照在各細胞毒性圖中以虛線表示），用作確定健康組織細胞和腫瘤對照細胞系之間 LOEL 和安全窗的閾值。基於 BMA031（V36）的 TCER® 的所有確定安全窗都大於 1000 倍。

【0432】 從圖 5 和圖 6 的比較可以明顯得出，在 MAG-003 特異性 TCER® 分子的背景下利用低親和力募集物 BMA031（V36）可使安全窗顯著擴大。

【0433】 實施例3：親和力降低人源化UCHT1變體的產生

【0434】 為了獲得CD3特異性人源化抗體UCHT1(V17)的低親和力變體，對變體進行了結構導向設計。基於UCHT1與其靶標CD3δ/ε (PDB ID:1xiw)複合的解析結構，在抗體上引入了點突變，所述突變假定可降低親和力而不破壞蛋白本身的穩定性。

【0435】 為了實現此目標，主要在CDR中選擇位置；從所解析的結構可以推斷，兩種蛋白之間的介面主要在CD3ε和抗體重鏈之間形成，因此僅考慮重鏈中位置的突變。

【0436】 為了澄清起見，CD3ε上的位置按ID 1xiw、鏈ID: A的PDB條目順序進行編號。

【0437】 G31E將在面對CD3ε48D、CD3ε49E、CD3ε50D和CD3ε51D所形成帶負電荷的表面補丁的抗體表面上引入負電荷，這可能引起靜電排斥，從而降低親和力。

【0438】 Y54Q改變結合表面的形狀互補性，並消除Y54芳香環與CD3ε48D非極性幹之間的疏水相互作用。

【0439】 Y54E改變結合表面的形狀互補性，消除Y54芳香環與CD3ε48D非極性幹之間的疏水相互作用，並另外引入面對CD3ε48D、CD3ε49E、CD3ε50D和CD3ε51D所形成帶負電荷補丁的負電荷。

【0440】 K55R 引入具有類似理化性質的較大側鏈，從而消除 55K 的 Nζ 和 CD3ε56S 骨架之間形成的 H 鍵。側鏈尺寸增加也可導致結合幾何的輕微變化。

【0441】 K55E 將正電荷替換為負電荷，從而消除 55K 的 Nζ 和 CD3ε36S 骨架之間形成的 H 鍵。另外，引入負電荷可導致與 CD3ε57D、CD3ε58E 和 CD3ε59D 所形成帶負電荷補丁產生靜電排斥。

【0442】 基於這些發現，生成了編碼 UCHT1（V20）至 UCHT1（V27）的序列，匯總於表 6。

【0443】 在嘗試進一步優化人源化 UCHT1 序列時，透過引入 106E 消除 CDR-H3 內的潛在翻譯後修飾位點（Asp-異構化、106D107S）。將此修飾引入 UCHT1（V17）、UCHT1（20）、UCHT1（V21）和 UCHT1（V23）中，分別產生了變體 UCHT1（V17opt）、UCHT1（V20opt）、UCHT1（V21opt）和 UCHT1（V23opt）。

【0444】 表 6：產生人源化 UCHT1 變體的序列組合。

UCHT 變體	SEQ ID No. [V_H]	SEQ ID No. [V_L]
V20	158	145
V21	149	145
V22	150	145
V23	151	145
V24	152	145
V25	153	145
V26	154	145
V27	155	145
V17opt	156	145
V20opt	159	145
V21opt	157	145

V23opt	161	145

【0445】 使用表 6 中所述的人源化 UCHT1 變體，可按如上所述分別產生、製備和純化 PRAME-004 特異性（Vα：SEQ ID No: 48，Vβ：SEQ ID No: 44）和 MAG-003 特異性（Vα：SEQ ID No: 21，Vβ：SEQ ID No: 30）TCER® 分子。

【0446】 實施例 4：所設計 UCHT1 變體的親和力測定

【0447】 為了使用生物膜層干涉法測定親和力，產生了分子 CD3δε-F_c。因此，將人 CD3δ 和 CD3ε 的細胞外結構域與 F_c 結構域的 N 端融合，如 TCER® 構建體（包含杵臼結構突變和其他 C 端 His-標籤）內使用的一樣，從而分別產生 SEQ ID No: 161 和 SEQ ID No: 162。

【0448】 CD3δε-F_c 分子在 ExpiCHO 細胞中表達，先使用蛋白 A 親和力色譜法、接著使用如上所述的尺寸排阻色譜法進行純化。

【0449】 對於包含不同 UCHT1 變體（如表 6 所示）的雙特異性 TCER® 抗原結合蛋白，使用生物膜層干涉法對其對於與 HLA-A*02複合的 MAGE-A 抗原肽（SEQ ID NO: 10）（圖 9A、表 7）和對於 CD3δε-F_c（圖 9B、表 7）的結合親和力特徵進行了分析。使用製造商推薦的設置在 Octet RED384 系統上進行測量。簡言之，在 30 癈和 1000 rpm 轉速下以 PBS、0.05% 吐溫-20、0.1% BSA 用作緩衝液來測量結合動力學。在分析連續稀釋的雙特異性 TCER® 分子之前，將肽-HLA-A*02 複合體或

CD3δε-F_c 載入到生物感測器（HIS1K）上。所有 TCER® 分子均顯示與 HLA-A*02/MAG-003 的結合性相似，K_D 值為 ~2 nM。CD3δε 親和力包含了 200 倍以上的窗，K_D 值為 3 至 750 nM 之間。

【0450】 表 7：包含根據表 6 所述不同 UCHT1 變體的 TCER® 分子親和力分析。K_D 值透過生物膜層干涉法測定

UCHT 變體	K_D HLA-A*02/MAG-003 [nM]	K_D CD3δε-F_c [nM]
V17	1.9	3.4
V20	2.0	17.8
V21	2.3	7.9
V23	2.1	46.1
V17opt	2.0	22.6
V20opt	1.7	373.0
V21opt	2.1	106.4
V23opt	2.4	747.1

【0451】 實施例 5：低親和力人源化 UCHT1 變體效力降低

【0452】 如上文實施例 2 中所述，MAG-003 特異性 TCER® 分子的細胞毒性效力用 LDH 釋放測定法評估。代表性測定的結果如圖 10 所示。如預期的一樣，與包含 UCHT1(V17) 高親和力募集結構域的 TCER® 相比，新設計的變體（UCHT1(V17opt)、UCHT1(V20)、UCHT1(V21)、UCHT1(V23)）的效力降低。根據其效力對 TCER® 分子進行排名也密切反映了各募集物變體的親和力（最高效力：UCHT1(V17) < UCHT1(V21) < UCHT1(V20) < UCHT1(V17opt) < UCHT1V23）。這些對效力的影響只能歸因於募集結構域，因為 TCR 結

構域對與 HLA-A*02 複合的 MAG-003 的親和力相當（圖 9）。

【符號說明】

【0453】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊(請依寄存機構、日期、號碼順序註記)

無

國外寄存資訊(請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記)

無

【序列表】

<110> 德商英麥提克生物技術股份有限公司 (Immatics Biotechnologies GmbH)

<120> 進一步與 MHC 分子結合的募集因子

<130> 1017-23 TW

<150> DE 10 2019 121 022.4
<151> 2019-08-02

<150> US 62/882,364
<151> 2019-08-02

<160> 286

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL5_CDRL1

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL5_CDR_L2

<400> 2

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL5_CDRL3

<400> 3

Gln Gln Gly Gln Thr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH1_一致

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 其中 Xaa 為任意氨基酸序列，較佳為 G 或 E，更佳為 G

<400> 4

Xaa Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH2_一致

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa 為任意氨基酸序列，較佳為 Q,Y 或 E，更佳為 Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa 為任意氨基酸序列，較佳為 R, K 或 E，更佳為 R 或 K，例如 K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> 其中 Xaa 為任意氨基酸序列，較佳為 S 或 T，更佳為 S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> 其中 Xaa 為任意氨基酸序列，較佳為 F 或 V，更佳為 F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> 其中 Xaa 為任意氨基酸序列，較佳為 G 或 D，更佳為 D

<400> 5

Leu Ile Asn Pro Xaa Xaa Gly Val Xaa Thr Tyr Ala Gln Lys Xaa Gln
1 5 10 15

Xaa

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH3_一致

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa 為任意氨基酸序列，preferably D 或 E，更佳為 D

<400> 6

Ser Gly Tyr Tyr Gly Xaa Ser Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH2_ VH2,8,16,19,20

<400> 7

Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Asp

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH3_VH2-15,19,21

<400> 8

Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PRAME-004

<400> 9

Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> MAG-003

<400> 10

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Val
1 5

<210> 11
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR1-a (L)

<400> 11

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> FR2-a (L)

<400> 12

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2-a (L)

<400> 13

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 14
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3-a (L)

<400> 14

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR4-a (L)

<400> 15

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 16
<211> 30
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> FR1-b (H)

<400> 16

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

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

<210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2-b (H)

<400> 17

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 18
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3-b (H)

<400> 18

Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

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

<220>
<223> FR3-b (H)

<400> 19

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 20
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Va_114_iso0

<400> 20

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile
35 40 45

Tyr Ser Ser Gln Asp Ser Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro
100 105

<210> 21
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Va_114_iso1

<400> 21

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr

20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile
35 40 45

Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro
100 105

<210> 22
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Va_114_iso2

<400> 22

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Glu Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile
35 40 45

Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro
100 105

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Va_114_iso0/1_CDRa1

<400> 23

Asp Ser Ser Ser Thr Tyr
1 5

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Va_114_iso0_CDRa2

<400> 24

Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Ser
1 5

<210> 25
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Va_114_CDRa3

<400> 25

Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys Ile Ile Phe
1 5 10

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Va_114_iso1/2_CDRa2

<400> 26

Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Gln

1 5

<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Va_114_iso2_CDRa1

<400> 27

Glu Ser Ser Ser Thr Tyr
1 5

<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 28

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 29

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 30
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vb_114

<400> 30

Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly
1 5 10 15

Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Pro Gly His Asp Tyr Leu
20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu Phe Tyr
35 40 45

Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg
50 55 60

Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln
65 70 75 80

Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Ala
85 90 95

Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vb_114_CDRb1 (確切為 PGHDY)

<400> 31

Gly His Asp Tyr
1

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 32

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

<210> 33
<211> 20
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 33

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly
20

<210> 34
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vb_114_CDRb2

<400> 34

Phe Cys Tyr Gly Thr Pro
1 5

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vb_114_CDRb3

<400> 35

Cys Ala Ser Arg Ala Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe
1 5 10

<210> 36
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL mUCHT1

<400> 36

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 37
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH_mUCHT1

<400> 37

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

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

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL_V9_Shalaby

<400> 38

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 39
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH_V9_Shalaby

<400> 39

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL_BMA_Shearman

<400> 40

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

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 41
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH_BMA_Shearman

<400> 41

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42
<211> 106

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL_BMA(36)

<400> 42

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 43
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH_BMA(36)

<400> 43

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Glu Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 44
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HiAff1_Vb

<400> 44

Lys Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Ile Lys Thr Arg Gly
1 5 10 15

Gln Gln Val Thr Leu Ser Cys Ser Pro Ile Pro Gly His Arg Ala Val
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Gln Phe Leu Phe Glu
35 40 45

Tyr Val His Gly Glu Glu Arg Asn Lys Gly Asn Phe Pro Gly Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Arg Gln Phe Ser Asn Ser Ser Ser Glu Met Asn Ile Ser Asn
65 70 75 80

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

Asp Ser Pro Asn Val Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val
100 105 110

Thr Glu Asp Leu Lys Asn
115

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HiAff1_CDRb1

<400> 45

Pro Gly His Arg Ala
1 5

<210> 46
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HiAff1_CDRb2

<400> 46

Tyr Val His Gly Glu Glu
1 5

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HiAff1_CDRb3

<400> 47

Cys Ala Ser Ser Pro Trp Asp Ser Pro Asn Val Gln Tyr Phe
1 5 10

<210> 48
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HiAff1_Va

<400> 48

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

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser
20 25 30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met
35 40 45

Ser Ile Tyr Gln Glu Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln
50 55 60

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln
65 70 75 80

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Val Ile Asp Asn Asp
85 90 95

Gln Gly Gly Ile Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Arg Leu Thr Ile Ile
100 105 110

Pro Asn Ile Gln Asn
115

<210> 49
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HiAff1_CDRa1

<400> 49

Asp Arg Gly Ser Gln Ser
1 5

<210> 50
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HiAff1_CDRa2

<400> 50

Ile Tyr Gln Glu Gly Asp
1 5

<210> 51
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HiAff1_CDRa3

<400> 51

Cys Ala Ala Val Ile Asp Asn Asp Gln Gly Gly Ile Leu Thr Phe
1 5 10 15

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 52

Tyr Leu Tyr Asp Ser Glu Thr Lys Asn Ala
1 5 10

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 53

His Leu Met Asp Gln Pro Leu Ser Val
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 54

Gly Leu Leu Lys Lys Ile Asn Ser Val

1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 55

Phe Leu Val Asp Gly Ser Ser Ala Leu
1 5

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 56

Phe Leu Phe Asp Gly Ser Ala Asn Leu Val
1 5 10

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 57

Phe Leu Tyr Lys Ile Ile Asp Glu Leu
1 5

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 58

Phe Ile Leu Asp Ser Ala Glu Thr Thr Thr Leu
1 5 10

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 59

Ser Val Asp Val Ser Pro Pro Lys Val
1 5

<210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 60

Val Ala Asp Lys Ile His Ser Val
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 61

Ile Val Asp Asp Leu Thr Ile Asn Leu
1 5

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 62

Gly Leu Leu Glu Glu Leu Val Thr Val
1 5

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 63

Thr Leu Asp Gly Ala Ala Val Asn Gln Val
1 5 10

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 64

Ser Val Leu Glu Lys Glu Ile Tyr Ser Ile
1 5 10

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 65

Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu
1 5

<210> 66
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 66

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 67

Tyr Leu Met Asp Asp Phe Ser Ser Leu
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 68

Lys Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu
1 5

<210> 69
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 69

Leu Leu Trp Gly His Pro Arg Val Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 70

Lys Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Leu Glu Val

1 5 10

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 71

Leu Leu Ile Pro Phe Thr Ile Phe Met
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 72

Phe Leu Ile Glu Asn Leu Leu Ala Ala
1 5

<210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 73

Leu Leu Trp Gly His Pro Arg Val Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 74

Phe Leu Leu Glu Arg Glu Gln Leu Leu
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 75

Ser Leu Ala Glu Thr Ile Phe Ile Val
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 76

Thr Leu Leu Glu Gly Ile Ser Arg Ala
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 77

Ile Leu Gln Asp Gly Gln Phe Leu Val
1 5

<210> 78
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 78

Val Ile Phe Glu Gly Glu Pro Met Tyr Leu
1 5 10

<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 79

Ser Leu Phe Glu Ser Leu Glu Tyr Leu
1 5

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 80

Ser Leu Leu Asn Gln Pro Lys Ala Val
1 5

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 81

Gly Leu Ala Glu Phe Gln Glu Asn Val
1 5

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 82

Lys Leu Leu Ala Val Ile His Glu Leu
1 5

<210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 83

Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu
1 5

<210> 84
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 84

Thr Leu Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr Val
1 5 10

<210> 85
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 85

Lys Leu Gln Glu Lys Ile Gln Glu Leu
1 5

<210> 86
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 86

Ser Val Leu Glu Lys Glu Ile Tyr Ser Ile
1 5 10

<210> 87

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 87

Arg Val Ile Asp Asp Ser Leu Val Val Gly Val
1 5 10

<210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 88

Val Leu Phe Gly Glu Leu Pro Ala Leu
1 5

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 89

Gly Leu Val Asp Ile Met Val His Leu
1 5

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 90

Phe Leu Asn Ala Ile Glu Thr Ala Leu
1 5

<210> 91
<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 91

Ala Leu Leu Gln Ala Leu Met Glu Leu
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 92

Ala Leu Ser Ser Ser Gln Ala Glu Val
1 5

<210> 93
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 93

Ser Leu Ile Thr Gly Gln Asp Leu Leu Ser Val
1 5 10

<210> 94
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 94

Gln Leu Ile Glu Lys Asn Trp Leu Leu
1 5

<210> 95
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 95

Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu
1 5

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 96

Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Leu Leu
1 5

<210> 97
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 97

Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 98

Gly Leu Pro Ser Ala Thr Thr Thr Val
1 5

<210> 99
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 99

Gly Leu Leu Pro Ser Ala Glu Ser Ile Lys Leu
1 5 10

<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 100

Lys Thr Ala Ser Ile Asn Gln Asn Val
1 5

<210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 101

Tyr Leu Met Asp Asp Phe Ser Ser Leu
1 5

<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 102

Leu Met Tyr Pro Tyr Ile Tyr His Val
1 5

<210> 103

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 103

Lys Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu
1 5

<210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 104

Leu Leu Trp Gly His Pro Arg Val Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 105

Val Leu Asp Gly Lys Val Ala Val Val
1 5

<210> 106
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 106

Gly Leu Leu Gly Lys Val Thr Ser Val
1 5

<210> 107
<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 107

Lys Met Ile Ser Ala Ile Pro Thr Leu
1 5

<210> 108
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 108

Gly Leu Leu Glu Thr Thr Gly Leu Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 109

Thr Leu Asn Thr Leu Asp Ile Asn Leu
1 5

<210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 110

Val Ile Ile Lys Gly Leu Glu Glu Ile
1 5

<210> 111
<211> 317
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> MAGE-A4_P43358

<400> 111

Met Ser Ser Glu Gln Lys Ser Gln His Cys Lys Pro Glu Glu Gly Val
1 5 10 15

Glu Ala Gln Glu Glu Ala Leu Gly Leu Val Gly Ala Gln Ala Pro Thr
20 25 30

Thr Glu Glu Gln Glu Ala Ala Val Ser Ser Ser Ser Pro Leu Val Pro
35 40 45

Gly Thr Leu Glu Glu Val Pro Ala Ala Glu Ser Ala Gly Pro Pro Gln
50 55 60

Ser Pro Gln Gly Ala Ser Ala Leu Pro Thr Thr Ile Ser Phe Thr Cys
65 70 75 80

Trp Arg Gln Pro Asn Glu Gly Ser Ser Ser Gln Glu Glu Glu Gly Pro
85 90 95

Ser Thr Ser Pro Asp Ala Glu Ser Leu Phe Arg Glu Ala Leu Ser Asn
100 105 110

Lys Val Asp Glu Leu Ala His Phe Leu Leu Arg Lys Tyr Arg Ala Lys
115 120 125

Glu Leu Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Glu Arg Val Ile Lys Asn Tyr
130 135 140

Lys Arg Cys Phe Pro Val Ile Phe Gly Lys Ala Ser Glu Ser Leu Lys
145 150 155 160

Met Ile Phe Gly Ile Asp Val Lys Glu Val Asp Pro Ala Ser Asn Thr
165 170 175

Tyr Thr Leu Val Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu Gly
180 185 190

Asn Asn Gln Ile Phe Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Gly
195 200 205

Thr Ile Ala Met Glu Gly Asp Ser Ala Ser Glu Glu Glu Ile Trp Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Val Met Gly Val Tyr Asp Gly Arg Glu His Thr Val Tyr
225 230 235 240

Gly Glu Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Asp Trp Val Gln Glu Asn Tyr
245 250 255

Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asn Pro Ala Arg Tyr Glu Phe
260 265 270

Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Ala Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu
275 280 285

Glu His Val Val Arg Val Asn Ala Arg Val Arg Ile Ala Tyr Pro Ser
290 295 300

Leu Arg Glu Ala Ala Leu Leu Glu Glu Glu Glu Gly Val
305 310 315

<210> 112
<211> 318
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> MAGE-A8_P43361

<400> 112

Met Leu Leu Gly Gln Lys Ser Gln Arg Tyr Lys Ala Glu Glu Gly Leu
1 5 10 15

Gln Ala Gln Gly Glu Ala Pro Gly Leu Met Asp Val Gln Ile Pro Thr
20 25 30

Ala Glu Glu Gln Lys Ala Ala Ser Ser Ser Ser Thr Leu Ile Met Gly
35 40 45

Thr Leu Glu Glu Val Thr Asp Ser Gly Ser Pro Ser Pro Pro Gln Ser
50 55 60

Pro Glu Gly Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Thr Asp Ser Thr Leu Trp

65 70 75 80

Ser Gln Ser Asp Glu Gly Ser Ser Ser Asn Glu Glu Glu Gly Pro Ser
85 90 95

Thr Ser Pro Asp Pro Ala His Leu Glu Ser Leu Phe Arg Glu Ala Leu
100 105 110

Asp Glu Lys Val Ala Glu Leu Val Arg Phe Leu Leu Arg Lys Tyr Gln
115 120 125

Ile Lys Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Glu Ser Val Ile Lys
130 135 140

Asn Tyr Lys Asn His Phe Pro Asp Ile Phe Ser Lys Ala Ser Glu Cys
145 150 155 160

Met Gln Val Ile Phe Gly Ile Asp Val Lys Glu Val Asp Pro Ala Gly
165 170 175

His Ser Tyr Ile Leu Val Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu
180 185 190

Leu Gly Asp Asp Gln Ser Thr Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Val
195 200 205

Leu Gly Met Ile Leu Met Glu Gly Ser Arg Ala Pro Glu Glu Ala Ile
210 215 220

Trp Glu Ala Leu Ser Val Met Gly Leu Tyr Asp Gly Arg Glu His Ser
225 230 235 240

Val Tyr Trp Lys Leu Arg Lys Leu Leu Thr Gln Glu Trp Val Gln Glu
245 250 255

Asn Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Ser Asp Pro Val Arg Tyr
260 265 270

Glu Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Ala Glu Thr Ser Tyr Val Lys
275 280 285

Val Leu Glu His Val Val Arg Val Asn Ala Arg Val Arg Ile Ser Tyr
290 295 300

Pro Ser Leu His Glu Glu Ala Leu Gly Glu Glu Lys Gly Val
305 310 315

<210> 113
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 113

Thr Val Ala Ala Pro
1 5

<210> 114
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 114

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 115
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 115

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 116
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 116

Thr Val Leu Arg Thr
1 5

<210> 117
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 117

Thr Val Ser Ser Ala Ser
1 5

<210> 118
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 118

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 119
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 119

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 120
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 120

Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala
1 5

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

<220>
<223> 連接子

<400> 121

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 122
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 122

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser
20 25

<210> 123
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 123

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 124
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 124

Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser
1 5

<210> 125
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 126
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc_IGHG1*01

<400> 126

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

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 127
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列 IgG1_鉸鏈

<220>
<223> TAA

<400> 127

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

Pro Glu Leu Leu Gly

<210> 128
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG2_鉸鏈

<400> 128

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
1 5 10 15

Ala Gly Pro

<210> 129
<211> 53
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG3_鉸鏈

<400> 129

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala
35 40 45

Pro Glu Leu Leu Gly
50

<210> 130
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG4_鉸鏈

<400> 130

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly

<210> 131
<211> 229
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc_杵

<400> 131

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

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro
225

<210> 132
<211> 229
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc_臼

<400> 132

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

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro
225

<210> 133
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH1_VH2,6,7,9,10,12,13,14,16,18

<400> 133

Gly Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 134
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH1_VH8,11,15,19,20,21,22

<400> 134

Glu Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 135
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH2_VH6

<400> 135

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

Gly

<210> 136
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH2_VH7

<400> 136

Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Val Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 137
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH2

<400> 137

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

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

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

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 138
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH2_VH9,11,18,21,22

<400> 138

Leu Ile Asn Pro Gln Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Asp

<210> 139
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH2_VH10

<400> 139

Leu Ile Asn Pro Tyr Glu Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Asp

<210> 140
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH2_VH12

<400> 140

Leu Ile Asn Pro Glu Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Asp

<210> 141
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH2_VH13

<400> 141

Leu Ile Asn Pro Tyr Arg Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Asp

<210> 142
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH2_VH14, VH15

<400> 142

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

Asp

<210> 143
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 143

Gly Gly Gln Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser Gly Gly Gln Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Thr Gly Ser Gly Gly Gln Gly Ser
20 25

<210> 144
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH3_VH16, VH18, VH20, VH22

<400> 144

Ser Gly Tyr Tyr Gly Glu Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 145
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL5

<400> 145

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Gln Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 146
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV-005

<400> 146

Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu
1 5

<210> 147
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 流感 A MP

<400> 147

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 148
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HCMV pp65

<400> 148

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
1 5

<210> 149
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH9 = VH17

<400> 149

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

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

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

Gly Leu Ile Asn Pro Gln Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 150
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH10

<400> 150

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

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

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 151
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH11 = VH21

<400> 151

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

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

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

Gly Leu Ile Asn Pro Gln Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 152
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH12

<400> 152

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

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

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

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

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 153
<211> 122
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> VH13

<400> 153

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

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

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

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

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 154
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH14

<400> 154

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

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

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

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

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 155
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH15

<400> 155

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

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

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

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

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 156
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH16

<400> 156

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

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

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

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Glu Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 157
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> VH18

<400> 157

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

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

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

Gly Leu Ile Asn Pro Gln Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Glu Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 158
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH8 = VH19

<400> 158

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

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

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

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 159
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH20

<400> 159

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

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

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

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Glu Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 160
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH22

<400> 160

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

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

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

Gly Leu Ile Asn Pro Gln Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Glu Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 161
<211> 315
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3delta-FcKO

<400> 161

Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys
1 5 10 15

Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser
20 25 30

Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly
35 40 45

Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Thr
50 55 60

Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys Val Glu Leu Asp Pro
65 70 75 80

Ala Thr Val Ala Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
85 90 95

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
100 105 110

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
115 120 125

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
130 135 140

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
145 150 155 160

Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
165 170 175

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
180 185 190

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
195 200 205

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
210 215 220

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
225 230 235 240

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
245 250 255

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
260 265 270

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
275 280 285

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
290 295 300

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
305 310 315

<210> 162
<211> 341
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3epsilon-FcKO

<400> 162

Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys Val
1 5 10 15

Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro Gly
20 25 30

Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp Glu
35 40 45

Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys Glu
50 55 60

Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly
65 70 75 80

Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val

Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
100 105 110

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
130 135 140

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
145 150 155 160

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
165 170 175

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
180 185 190

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
195 200 205

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile
210 215 220

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
225 230 235 240

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
245 250 255

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
260 265 270

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
275 280 285

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
290 295 300

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
305 310 315 320

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys His
325 330 335

His His His His His
340

<210> 163
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 114-iso1-UCHT1(VL)-杵

<400> 163

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile
35 40 45

Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
115 120 125

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
130 135 140

Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
145 150 155 160

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
165 170 175

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
180 185 190

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
195 200 205

Gln Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

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

Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 164
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 114-iso2-UCHT1(VL)-杵

<400> 164

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Glu Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile
35 40 45

Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
115 120 125

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
130 135 140

Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
145 150 155 160

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
165 170 175

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
180 185 190

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
195 200 205

Gln Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

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

Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 165
<211> 471
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 114-isoX-UCHT1(17opt)-臼

<400> 165

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

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

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

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Glu Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

Gly Gly Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu
130 135 140

Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Pro Gly His Asp
145 150 155 160

Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu
165 170 175

Phe Tyr Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu
180 185 190

Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys
195 200 205

Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser
210 215 220

Arg Ala Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr
225 230 235 240

Val Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
245 250 255

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
305 310 315 320

Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
340 345 350

Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
420 425 430

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
465 470

<210> 166
<211> 471
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 114-isoX-UCHT1(23)-臼

<400> 166

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

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

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

Gly Leu Ile Asn Pro Gln Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

Gly Gly Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu
130 135 140

Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Pro Gly His Asp
145 150 155 160

Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu
165 170 175

Phe Tyr Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu
180 185 190

Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys
195 200 205

Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser
210 215 220

Arg Ala Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr
225 230 235 240

Val Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
245 250 255

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
305 310 315 320

Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
340 345 350

Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
420 425 430

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
435 440 445

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

450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
465 470

<210> 167
<211> 471
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 114-isoX-UCHT1(21)-白

<400> 167

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

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

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

Gly Leu Ile Asn Pro Gln Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

Gly Gly Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu
130 135 140

Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Pro Gly His Asp
145 150 155 160

Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu
165 170 175

Phe Tyr Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu
180 185 190

Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys
195 200 205

Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser
210 215 220

Arg Ala Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr
225 230 235 240

Val Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
245 250 255

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
305 310 315 320

Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
340 345 350

Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
370 375 380

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

385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
420 425 430

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
465 470

<210> 168
<211> 461
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PRAME-BMA031(VL3B)-杵

<400> 168

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Lys Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Ile Lys Thr
115 120 125

Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Ser Cys Ser Pro Ile Pro Gly His Arg
130 135 140

Ser Val Ser Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Gln Phe Leu
145 150 155 160

Phe Glu Tyr Val His Gly Glu Glu Arg Asn Lys Gly Asn Phe Pro Gly
165 170 175

Arg Phe Ser Gly Arg Gln Phe Ser Asn Ser Ser Ser Glu Met Asn Ile
180 185 190

Ser Asn Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser
195 200 205

Pro Trp Asp Ser Pro Asn Val Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
210 215 220

Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

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

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
370 375 380

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

<210> 169
<211> 474
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PRAME-BMA031(VH2)-臼

<400> 169

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

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser
20 25 30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met
35 40 45

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

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln
65 70 75 80

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Val Ile Asp Asn Asp
85 90 95

Gln Gly Gly Ile Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Arg Leu Thr Ile Ile
100 105 110

Pro Asn Ile Gln Asn Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln
115 120 125

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
130 135 140

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr Val Met His
145 150 155 160

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile
165 170 175

Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Ala Glu Lys Phe Gln Gly Arg
180 185 190

Val Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
195 200 205

Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val His Tyr Cys Ala Arg Gly
210 215 220

Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
245 250 255

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
260 265 270

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

275 280 285

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
290 295 300

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
305 310 315 320

Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
325 330 335

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
340 345 350

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
355 360 365

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg
370 375 380

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly
385 390 395 400

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
405 410 415

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
420 425 430

Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
435 440 445

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
450 455 460

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
465 470

<210> 170
<211> 479
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> PRAME-UCHT1(V17)-白

<400> 170

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

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

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

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

Gly Gly Gly Lys Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Ile Lys Thr
130 135 140

Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Ser Cys Ser Pro Ile Pro Gly His Arg
145 150 155 160

Ala Val Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Gln Phe Leu
165 170 175

Phe Glu Tyr Val His Gly Glu Glu Arg Asn Lys Gly Asn Phe Pro Gly
180 185 190

Arg Phe Ser Gly Arg Gln Phe Ser Asn Ser Ser Ser Glu Met Asn Ile
195 200 205

Ser Asn Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser

210 215 220

Pro Trp Asp Ser Pro Asn Val Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
225 230 235 240

Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
245 250 255

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
260 265 270

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
275 280 285

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
290 295 300

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
305 310 315 320

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
325 330 335

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
340 345 350

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile
355 360 365

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
370 375 380

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
385 390 395 400

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
405 410 415

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
420 425 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
435 440 445

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
450 455 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 171
<211> 463
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PRAME-UCHT1(V17)-杵

<400> 171

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

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser
20 25 30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met
35 40 45

Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln
50 55 60

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln
65 70 75 80

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Val Ile Asp Asn Asp
85 90 95

Gln Gly Gly Ile Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Arg Leu Thr Ile Ile
100 105 110

Pro Asn Ile Gln Asn Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asp Ile Gln
115 120 125

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
130 135 140

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr
165 170 175

Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
180 185 190

Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile
195 200 205

Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Gln Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

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

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
370 375 380

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 172
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 172

Tyr Leu Glu Asp Gly Phe Ala Tyr Val
1 5

<210> 173
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 173

Lys Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Leu Glu Val
1 5 10

<210> 174
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 174

Leu Leu Ile Pro Phe Thr Ile Phe Met
1 5

<210> 175
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 175

Ile Ser Leu Asp Glu Val Ala Val Ser Leu
1 5 10

<210> 176
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 176

Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val
1 5 10

<210> 177
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 177

Lys Leu Ile Gly Asn Ile His Gly Asn Glu Val
1 5 10

<210> 178
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 178

Ile Leu Leu Ser Val Leu His Gln Leu
1 5

<210> 179
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 179

Leu Asp Ser Glu Ala Leu Leu Thr Leu
1 5

<210> 180
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 180

Val Leu Gln Glu Asn Ser Ser Asp Tyr Gln Ser Asn Leu
1 5 10

<210> 181
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 181

His Leu Leu Gly Glu Gly Ala Phe Ala Gln Val
1 5 10

<210> 182
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 182

Ser Leu Val Glu Asn Ile His Val Leu
1 5

<210> 183
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 183

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Thr
1 5

<210> 184
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 184

Ser Leu Ser Glu Lys Ser Pro Glu Val
1 5

<210> 185
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 185

Ala Met Phe Pro Asp Thr Ile Pro Arg Val
1 5 10

<210> 186
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 186

Phe Leu Ile Glu Asn Leu Leu Ala Ala
1 5

<210> 187
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 187

Phe Thr Ala Glu Phe Leu Glu Lys Val
1 5

<210> 188
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 188

Ala Leu Tyr Gly Asn Val Gln Gln Val
1 5

<210> 189
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 189

Leu Phe Gln Ser Arg Ile Ala Gly Val
1 5

<210> 190
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 190

Ile Leu Ala Glu Glu Pro Ile Tyr Ile Arg Val

1 5 10

<210> 191
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 191

Phe Leu Leu Glu Arg Glu Gln Leu Leu
1 5

<210> 192
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 192

Leu Leu Leu Pro Leu Glu Leu Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 193
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 193

Ser Leu Ala Glu Thr Ile Phe Ile Val
1 5

<210> 194
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 194

Ala Ile Leu Asn Val Asp Glu Lys Asn Gln Val
1 5 10

<210> 195
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 195

Arg Leu Phe Glu Glu Val Leu Gly Val
1 5

<210> 196
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 196

Tyr Leu Asp Glu Val Ala Phe Met Leu
1 5

<210> 197
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 197

Lys Leu Ile Asp Glu Asp Glu Pro Leu Phe Leu
1 5 10

<210> 198
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 198

Lys Leu Phe Glu Lys Ser Thr Gly Leu
1 5

<210> 199
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 199

Ser Leu Leu Glu Val Asn Glu Ala Ser Ser Val
1 5 10

<210> 200
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 200

Gly Val Tyr Asp Gly Arg Glu His Thr Val
1 5 10

<210> 201
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 201

Gly Leu Tyr Pro Val Thr Leu Val Gly Val
1 5 10

<210> 202
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 202

Ala Leu Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala
1 5

<210> 203
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 203

Thr Leu Leu Glu Gly Ile Ser Arg Ala
1 5

<210> 204
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 204

Ser Leu Ile Glu Glu Ser Glu Glu Leu
1 5

<210> 205
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 205

Ala Leu Tyr Val Gln Ala Pro Thr Val
1 5

<210> 206
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 206

Lys Leu Ile Tyr Lys Asp Leu Val Ser Val
1 5 10

<210> 207

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 207

Ile Leu Gln Asp Gly Gln Phe Leu Val
1 5

<210> 208
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 208

Ser Leu Leu Asp Tyr Glu Val Ser Ile
1 5

<210> 209
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 209

Leu Leu Gly Asp Ser Ser Phe Phe Leu
1 5

<210> 210
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 210

Val Ile Phe Glu Gly Glu Pro Met Tyr Leu
1 5 10

<210> 211
<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 211

Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Pro Tyr Leu
1 5

<210> 212
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 212

Phe Leu Phe Val Asp Pro Glu Leu Val
1 5

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

<220>
<223> TAA

<400> 213

Ser Glu Trp Gly Ser Pro His Ala Ala Val Pro
1 5 10

<210> 214
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 214

Ala Leu Ser Glu Leu Glu Arg Val Leu
1 5

<210> 215
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 215

Ser Leu Phe Glu Ser Leu Glu Tyr Leu
1 5

<210> 216
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 216

Lys Val Leu Glu Tyr Val Ile Lys Val
1 5

<210> 217
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 217

Val Leu Leu Asn Glu Ile Leu Glu Gln Val
1 5 10

<210> 218
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 218

Ser Leu Leu Asn Gln Pro Lys Ala Val
1 5

<210> 219
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 219

Lys Met Ser Glu Leu Gln Thr Tyr Val
1 5

<210> 220
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 220

Ala Leu Leu Glu Gln Thr Gly Asp Met Ser Leu
1 5 10

<210> 221
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 221

Val Ile Ile Lys Gly Leu Glu Glu Ile Thr Val
1 5 10

<210> 222
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 222

Lys Gln Phe Glu Gly Thr Val Glu Ile
1 5

<210> 223
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 223

Lys Leu Gln Glu Glu Ile Pro Val Leu
1 5

<210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 224

Gly Leu Ala Glu Phe Gln Glu Asn Val
1 5

<210> 225
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 225

Asn Val Ala Glu Ile Val Ile His Ile
1 5

<210> 226
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 226

Ala Leu Ala Gly Ile Val Thr Asn Val
1 5

<210> 227
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> TAA

<400> 227

Asn Leu Leu Ile Asp Asp Lys Gly Thr Ile Lys Leu
1 5 10

<210> 228
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 228

Val Leu Met Gln Asp Ser Arg Leu Tyr Leu
1 5 10

<210> 229
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 229

Leu Leu Trp Gly Asn Leu Pro Glu Ile
1 5

<210> 230
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 230

Ser Leu Met Glu Lys Asn Gln Ser Leu
1 5

<210> 231
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 231

Lys Leu Leu Ala Val Ile His Glu Leu
1 5

<210> 232
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 232

Ala Leu Gly Asp Lys Phe Leu Leu Arg Val
1 5 10

<210> 233
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 233

Phe Leu Met Lys Asn Ser Asp Leu Tyr Gly Ala
1 5 10

<210> 234
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 234

Lys Leu Ile Asp His Gln Gly Leu Tyr Leu
1 5 10

<210> 235
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 235

Gly Pro Gly Ile Phe Pro Pro Pro Pro Pro Gln Pro
1 5 10

<210> 236
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 236

Ala Leu Asn Glu Ser Leu Val Glu Cys
1 5

<210> 237
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 237

Gly Leu Ala Ala Leu Ala Val His Leu
1 5

<210> 238
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 238

Leu Leu Leu Glu Ala Val Trp His Leu
1 5

<210> 239
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 239

Ser Ile Ile Glu Tyr Leu Pro Thr Leu
1 5

<210> 240
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 240

Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu
1 5

<210> 241
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 241

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
1 5

<210> 242
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 242

Phe Leu Leu Asp Lys Pro Gln Asp Leu Ser Ile
1 5 10

<210> 243
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 243

Tyr Leu Leu Asp Met Pro Leu Trp Tyr Leu
1 5 10

<210> 244
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 244

Gly Leu Leu Asp Cys Pro Ile Phe Leu
1 5

<210> 245
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 245

Val Leu Ile Glu Tyr Asn Phe Ser Ile
1 5

<210> 246
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 246

Thr Leu Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr Val
1 5 10

<210> 247
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 247

Ala Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser Val

1 5

<210> 248
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 248

Lys Leu Gln Glu Glu Leu Asn Lys Val
1 5

<210> 249
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 249

Lys Leu Met Asp Pro Gly Ser Leu Pro Pro Leu
1 5 10

<210> 250
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 250

Ala Leu Ile Val Ser Leu Pro Tyr Leu
1 5

<210> 251
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 251

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val
1 5

<210> 252
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 252

Ala Leu Asp Pro Ser Gly Asn Gln Leu Ile
1 5 10

<210> 253
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 253

Ile Leu Ile Lys His Leu Val Lys Val
1 5

<210> 254
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 254

Val Leu Leu Asp Thr Ile Leu Gln Leu
1 5

<210> 255
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 255

His Leu Ile Ala Glu Ile His Thr Ala
1 5

<210> 256
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 256

Ser Met Asn Gly Gly Val Phe Ala Val
1 5

<210> 257
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 257

Met Leu Ala Glu Lys Leu Leu Gln Ala
1 5

<210> 258
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 258

Tyr Met Leu Asp Ile Phe His Glu Val
1 5

<210> 259
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 259

Ala Leu Trp Leu Pro Thr Asp Ser Ala Thr Val
1 5 10

<210> 260
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 260

Gly Leu Ala Ser Arg Ile Leu Asp Ala
1 5

<210> 261
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 261

Ala Leu Ser Val Leu Arg Leu Ala Leu
1 5

<210> 262
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 262

Ser Tyr Val Lys Val Leu His His Leu
1 5

<210> 263
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 263

Val Tyr Leu Pro Lys Ile Pro Ser Trp
1 5

<210> 264

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 264

Asn Tyr Glu Asp His Phe Pro Leu Leu
1 5

<210> 265
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 265

Val Tyr Ile Ala Glu Leu Glu Lys Ile
1 5

<210> 266
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 266

Val His Phe Glu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Leu Phe
1 5 10

<210> 267
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 267

Val Leu Ser Pro Phe Ile Leu Thr Leu
1 5

<210> 268
<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAA

<400> 268

His Leu Leu Glu Gly Ser Val Gly Val
1 5

<210> 269
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> RABGAP1L-001

<400> 269

Phe Leu Leu Glu Thr Val Val Arg Val
1 5

<210> 270
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AXIN1-001

<400> 270

Ile Leu Asp Glu His Val Gln Arg Val
1 5

<210> 271
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ANO5-001

<400> 271

Ile Val Met Glu His Val Val Phe Leu
1 5

<210> 272
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> TPX2-001

<400> 272

Lys Ile Leu Glu Asp Val Val Gly Val
1 5

<210> 273
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SYNE3-001

<400> 273

Lys Leu Leu Asp Leu Gln Val Arg Val
1 5

<210> 274
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> MIA3-001

<400> 274

Lys Val Leu Asp Lys Val Phe Arg Ala
1 5

<210> 275
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HERC4-001

<400> 275

Lys Val Leu Glu Ile Leu His Arg Val
1 5

<210> 276
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PSME2-001

<400> 276

Lys Val Leu Glu Arg Val Asn Ala Val
1 5

<210> 277
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HEATR5A-001

<400> 277

Lys Val Leu Glu Thr Leu Val Thr Val
1 5

<210> 278
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CNOT1-003

<400> 278

Lys Val Leu Gly Ile Val Val Gly Val
1 5

<210> 279
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CNOT1-003

<400> 279

Ala Val Glu Glu His Val Val Ser Val
1 5

<210> 280
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PITPNM3-001

<400> 280

Ser Val Leu Glu Lys Val Thr Arg Ala
1 5

<210> 281
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ZFC-001

<400> 281

Lys Leu Gln Glu Gln Ile His Arg Val
1 5

<210> 282
<211> 466
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 100(D)-NB(V36)-R7P1D5#114-iso0-dsFcKO-GK (alpha-VH)

<400> 282

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile
35 40 45

Tyr Ser Ser Gln Asp Ser Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
115 120 125

Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
130 135 140

Lys Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
145 150 155 160

Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys
165 170 175

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

Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
195 200 205

Ala Val His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Glu Gly Phe
210 215 220

Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
245 250 255

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro
465

<210> 283
<211> 455
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 100(D)-NB(V36)-R7P1D5#114-dsFcKO-GK (VL-beta)

<400> 283

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu
115 120 125

Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Pro Gly His Asp
130 135 140

Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu
145 150 155 160

Phe Tyr Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu
165 170 175

Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys
180 185 190

Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser
195 200 205

Arg Ala Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr
210 215 220

Val Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225 230 235 240

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
245 250 255

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

260 265 270

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
275 280 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
290 295 300

Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
325 330 335

Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
340 345 350

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455

<210> 284
<211> 466
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 100(D)-NB(V36)-R7P1D5#114-iso2-dsFcKO-GK (alpha-VH)

<400> 284

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Glu Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile
35 40 45

Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
115 120 125

Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
130 135 140

Lys Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
145 150 155 160

Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys
165 170 175

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

Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
195 200 205

Ala Val His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Glu Gly Phe

210 215 220

Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
245 250 255

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro
465

<210> 285
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR-4-L

<400> 285

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 286
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL

<400> 286

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Gln Thr Leu Pro Trp
85 90 95

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

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種雙特異性抗原結合蛋白，其包含至少兩個抗原結合位點（A和B），其中，抗原結合位點A與CD3結合，其中抗原結合位點B與靶抗原（TA）肽/MHC複合體結合，其中抗原結合位點A包含重鏈可變結構域（V_H）和輕鏈可變結構域（V_L），且

a） 其中所述 V_L 包含三個互補決定區（CDR）CDRL1、CDRL2和CDRL3，其中

- CDRL1包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列「RASQDIRNYLN」或由其組成，

- CDRL2包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列「YTSRLHS」或由其組成，和

- CDRL3包含SEQ ID NO: 3的氨基酸序列「QQGQTLPWT」或由其組成，和

b） 其中所述 V_H 包含三個互補決定區（CDR）CDRH1、CDRH2和CDRH3，其中

- CDRH1包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列「X_1YTMN」或由其組成，其中 X_1 為G或E，優選為G，

- CDRH2包含

「LINPX_2X_3GVX_4TYAQKX_5QX_6」SEQ ID NO:5的氨基酸序列或由其組成，其中 X_2 為Q、Y或E，X_3 為R、K或E，X_4 為S或T，X_5 為F或V，X_6 為G或D，和

- CDRH3 包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列「SGYYGX$_7$SWYFDV」或由其組成，其中 X$_7$ 為 E 或 G。

【請求項2】 如請求項 1 所述的雙特異性抗原結合蛋白，其中抗原結合位點 A 以 K$_D$(A) 與 CD3 結合，抗原結合位點 B 以 K$_D$(C) 與靶抗原肽 C (TA-C)/MHC 複合體結合，其中 K$_D$(A)/K$_D$(C) 之比大於 1、大於 4、大於 6、大於 8、大於 10、大於 15、大於 20、大於 25、大於 30、大於 40、大於 50，例如：1 至 150、4 至 140、6 至 100、8 至 100、10 至 100 之間，優選為 10 至 100 之間。

【請求項3】 如請求項 1 或 2 所述的雙特異性抗原結合蛋白，其中，抗原結合位點 A 以 ≥3 nM、≥5 nM、≥8 nM、≥10 nM、≥12 nM、≥14 nM、≥16 nM、≥18 nM、≥20 nM、≥25 nM、≥30 nM、≥35 nM、≥40 nM、≥45 nM 和 ≤1000 nM、≤800 nM、≤600 nM、≤500 nM、≤400 nM（例如：3 nM 至 1000 nM、3 nM 至 600 nM、5 nM 至 600 nM、10 nM 至 600 nM、12 nM 至 600 nM、14 nM 至 600 nM、16 nM 至 600 nM、18 nM 至 600 nM、20 nM 至 600 nM，優選為 5 nM 至 100 nM）的 K$_D$(A) 與 CD3 結合，所述 K$_D$(A) 使用表面等離振子共振 (SPR) 或生物膜層干涉法 (BLI)、優選生物膜層干涉法 (BLI) 測定。

【請求項4】 如請求項 1 所述的雙特異性抗原結合蛋白，

其中，抗原結合位點 B 以 ≤100 μM、≤1 μM、≤100 nM、≤50 nM、≤10 nM，例如：0.01 nM 至 150 nM、0.05 nM 至 150 nM、0.1 nM 至 150 nM、0.1 nM 至 100 nM、0.1 nM 至 50 nM、0.1 nM 至 10 nM、0.5 nM 至 10 nM、0.5 nM 至 5 nM（優選為 0.5 nM 至 5 nM）的 K_D(C) 與靶抗原肽 C (TA-C)/MHC 複合體結合，所述 K_D(C) 使用表面等離振子共振 (SPR) 或生物膜層干涉法 (BLI)、優選生物膜層干涉法 (BLI) 測定。

【請求項5】 如請求項 1 所述的雙特異性抗原結合蛋白，其中，所述抗原結合蛋白對 TA-C/MHC 提呈細胞的 EC_{50} 比對正常組織細胞的 EC_{50} 值低 ≥100、≥500、≥1000 倍。

【請求項6】 如請求項 2 所述的雙特異性抗原結合蛋白，其中，TA 抗原肽 C 為病毒肽、細菌肽或腫瘤相關抗原 (TAA) 肽，優選為腫瘤相關抗原 (TAA) 肽。

【請求項7】 如請求項 1 所述的雙特異性抗原結合蛋白，其中，所述抗原結合蛋白對 TA-C/MHC 複合體提呈細胞的 EC_{50} 比對正常組織細胞的 EC_{50} 值低 ≥5 倍、≥10 倍、≥20 倍、≥50 倍、≥100 倍、≥500 倍、≥1000 倍。

【請求項8】 如請求項 2 所述的雙特異性抗原結合蛋白，其中，TA 抗原肽 C 為腫瘤相關抗原 (TAA) 肽 C，其中所述 TAA-C 選自包含 SEQ ID NO: 52 至 65、67 至 96、98、SEQ ID NO: 172 至 182、184 至

268、SEQ ID NO: 9 和 10 的氨基酸序列或由其組成的 TAA 抗原肽的組，如，包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列「SLLQHLIGL」或由其組成的 PRAME 抗原肽，或包含 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列「KVLEHVVRV」或由其組成的 MAGE-A 抗原肽，其中 MHC 優選為 HLA-A*02。

【請求項9】 如請求項 8 所述的雙特異性抗原結合蛋白，其中，TA 抗原肽 C 為包含 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列「KVLEHVVRV」或由其組成的 MAGE-A 抗原肽，其中類似肽選自由以下組成的列表：RABGAP1L-001、AXIN1-001、ANO5-001、TPX2-001、SYNE3-001、MIA3-001、HERC4-001、PSME2-001、HEATR5A-001、CNOT1-003、TEP1-003、PITPNM3-001、ZFC-001，優選為 HEATR5A-001、HERC4-001 和 CNOT1-003。

【請求項10】如請求項 1 所述的雙特異性抗原結合蛋白，其中，雙特異性抗原結合蛋白為雙特異性抗體或其片段、雙特異性 T 細胞受體（TCR）或其片段或雙特異性單鏈 TCR（scTCR）或雙特異性單鏈抗體。

【請求項11】如請求項 1 所述的雙特異性抗原結合蛋白，其中，所述 VL 結構域還包含選自由 FR1-L、FR2-L、FR3-L 和 FR4-L 組成組中的一個或多個框架區，其中

- FR1-L 包含 SEQ ID NO:11 的

「DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 11 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，

- FR2-L 包含 SEQ ID NO: 12 的「WYQQKPGKAPKLLIY」或 SEQ ID NO: 13 的「WYQQKPGKAVKLLIY」的氨基酸序列（優選為 SEQ ID NO: 12）或與 SEQ ID NO: 12 或 13 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，

- FR3-L 包含 SEQ ID NO:14 的「GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYFC」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 14 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，

- FR4-L 包含 SEQ ID NO:15 的「FGQGTKVEIKR」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 15 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，且

其中，V_H 還包含選自由 FR1-H、FR2-H、FR3-H 和 FR4-H 組成組中的一個或多個框架區，並且其中

- FR1-H 包含 SEQ ID NO: 16 的「EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 16 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，

- FR2-H 包含 SEQ ID NO: 17 的「WVRQAPGQGLEWMG」氨基酸序列或與 SEQ ID

NO: 17 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，

- FR3-H 包含 SEQ ID NO: 18 的「RVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 18 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，或

- FR4-H 包含 SEQ ID NO: 19 的「WGQGTLVTVSS」氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 19 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成。

【請求項12】如請求項 1 所述的雙特異性抗原結合蛋白，其中，抗原結合位點 B 包含抗體或其片段或 α 鏈可變結構域（v_α）和 β 鏈可變結構域（v_β）或 γ 鏈可變結構域（v_γ）或 δ 鏈可變結構域（v_δ），優選為 α 鏈可變結構域（v_α）和 β 鏈可變結構域（v_β）或 γ 鏈可變結構域（v_γ）和 δ 鏈可變結構域（v_δ），優選為 v_α 和 v_β。

【請求項13】如請求項 12 所述的雙特異性抗原結合蛋白，其中

i) v_α 包含選自由以下組成組的氨基酸序列或由其組成：

「EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYL

YWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDSKQDQRLTV

LLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSE

SKIIFGSGTRLSIRP」SEQ ID NO:20、

「EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYL

YWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTV

LLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSE

SKIIFGSGTRLSIRP」SEQ ID NO:21、

「EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTESSSTYL

YWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTV

LLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSE

SKIIFGSGTRLSIRP」SEQ ID NO:22，或與選自由 SEQ ID NO: 20、21 和 22 組成組的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列，並且其中優選與 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 23 的 CDRa1、SEQ ID NO: 24 的 CDRa2 和 SEQ ID NO: 25 的 CDRa3 的氨基酸序列，其中優選與 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 23 的 CDRa1、SEQ ID NO: 26 的 CDRa2 和 SEQ ID NO: 25 的 CDRa3 的氨基酸序列，其中優選與 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選包含 SEQ ID NO: 27 的 CDRa1、SEQ ID NO: 26 的 CDRa2 和 SEQ ID NO: 25 的 CDRa3 的氨基酸序列，並且其中所述第一可變結構域的氨基酸優選包含氨基酸 19V 和/或 48K，和

V_β 包含

「DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHD

YLFWYRQTMMRGLELLFYFCYGTPCDDSGMP EDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCA SRADTGELFFGEGSRLTVL」SEQ ID NO:30 的氨基酸序列或與由 SEQ ID NO 30 組成的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中優選為與 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列優選分別包含 SEQ ID NO: 31 的 CDRb1、SEQ ID NO: 34 的 CDRb2 和 SEQ ID NO: 35 的 CDRb3 的氨基酸序列並任選地包含氨基酸 54F 和/或 66C，或

(ii) v_α 或 v_γ 包含 SEQ ID NO: 48 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO 48 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中優選為與 SEQ ID NO: 48 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 49 的 CDRa1、SEQ ID NO: 50 的 CDRa2 和 SEQ ID NO: 51 的 CDRa3 的氨基酸序列，和

v_β 或 v_δ 包含 SEQ ID NO: 44 的氨基酸序列或與 SEQ ID NO: 44 具有至少 85% 同一性的氨基酸序列或由其組成，其中優選為與 SEQ ID NO: 44 的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 45 的 CDRb1、SEQ ID NO: 46 的 CDRb2 和 SEQ ID NO: 47 的 CDRb3 的氨基酸序列。

【請求項14】如請求項1所述的雙特異性抗原結合蛋白，其還包含以下一種或多種：

(i) 診斷劑；

(ii) 治療劑；或

(iii)藥代動力學（PK）修飾部分。

【請求項15】一種分離的核酸，其包含編碼如請求項1至14任一項所述的雙特異性抗原結合蛋白的序列，或包含所述核酸的核酸載體。

【請求項16】一種重組宿主細胞，其包含如請求項1至14中任一項所述的雙特異性抗原結合蛋白或如請求項15所述的核酸或載體，其中所述宿主細胞優選為a）幹細胞，優選為間充質幹細胞，或b）用於重組表達的細胞，諸如，中國倉鼠卵巢（CHO）細胞。

【請求項17】一種藥物組合物，其包含如請求項1至14中任一項所述的雙特異性抗原結合蛋白、如請求項15所述的核酸或載體或如請求項16所述的宿主細胞，以及藥用載體、稀釋穩定劑和/或賦形劑。

【請求項18】一種製造如請求項1至14中任一項定義的雙特異性抗原結合蛋白的方法，包括

a）提出合適的宿主細胞，

b）提出基因構建體，其包含編碼如請求項1至14中任一項所述的雙特異性抗原結合蛋白的編碼序列，

c）將所述基因構建體引入所述合適的宿主細胞，和

d）由所述合適的宿主細胞表達所述基因構建體。

【請求項19】如請求項18所述的方法，進一步包括從合適的宿主細胞分離和純化雙特異性抗原結合蛋白。

【請求項20】如請求項1至14中任一項所述的雙特異性抗原結合蛋白、如請求項15所述的核酸或載體、如請求項16所述的宿主細胞或如請求項17所述的藥物組合物，用於藥物。

【請求項21】如請求項1至14中任一項所述的雙特異性抗原結合蛋白、如請求項15所述的核酸或載體、如請求項16所述的宿主細胞或如請求項17所述的藥物組合物，用於診斷、預防和/或治療疾病，如病毒或細菌感染或增生性疾病，優選為癌症，更優選為TAA/MHC陽性癌症。

【發明圖式】

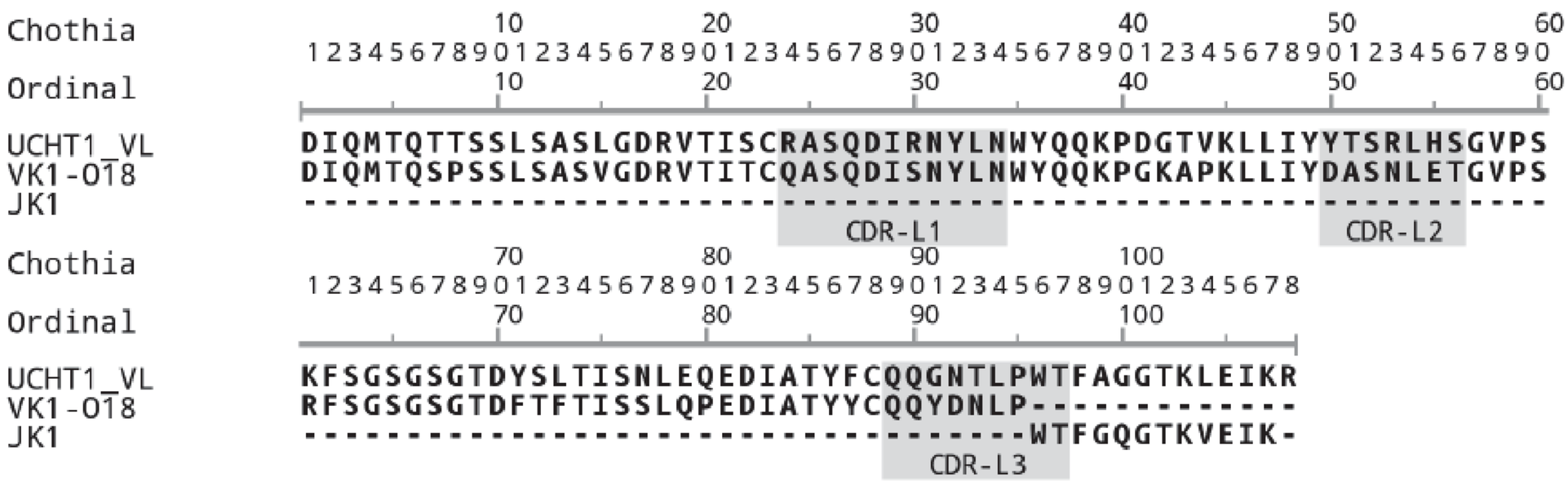

Chothia
Ordinal
UCHT1_VL
VK1-O18
JK1
DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIRNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPS
CDR-L1
CDR-L2
KFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFAGGTKLEIKR
RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYDNLP
WTFGQGTKVEIK-
CDR-L3

圖 1

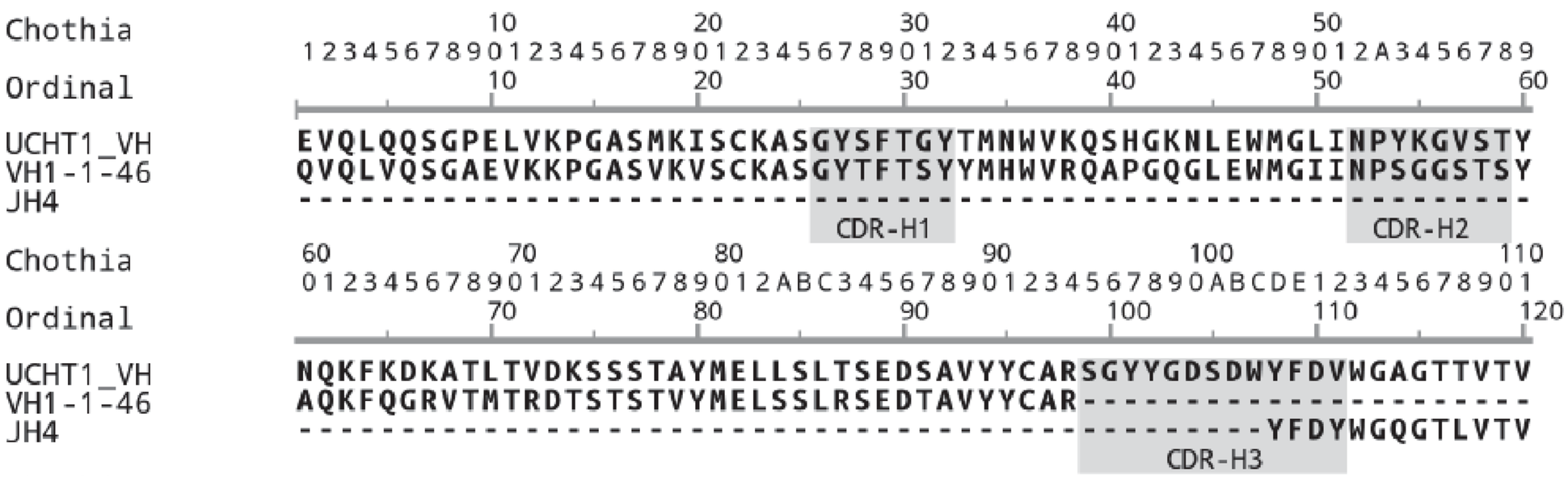

Chothia
Ordinal
UCHT1_VH
VH1-1-46
JH4
EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWMGLINPYKGVSTY
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY
CDR-H1
CDR-H2
NQKFKDKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGAGTTVTV
AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
YFDYWGQGTLVTV
CDR-H3

圖 2

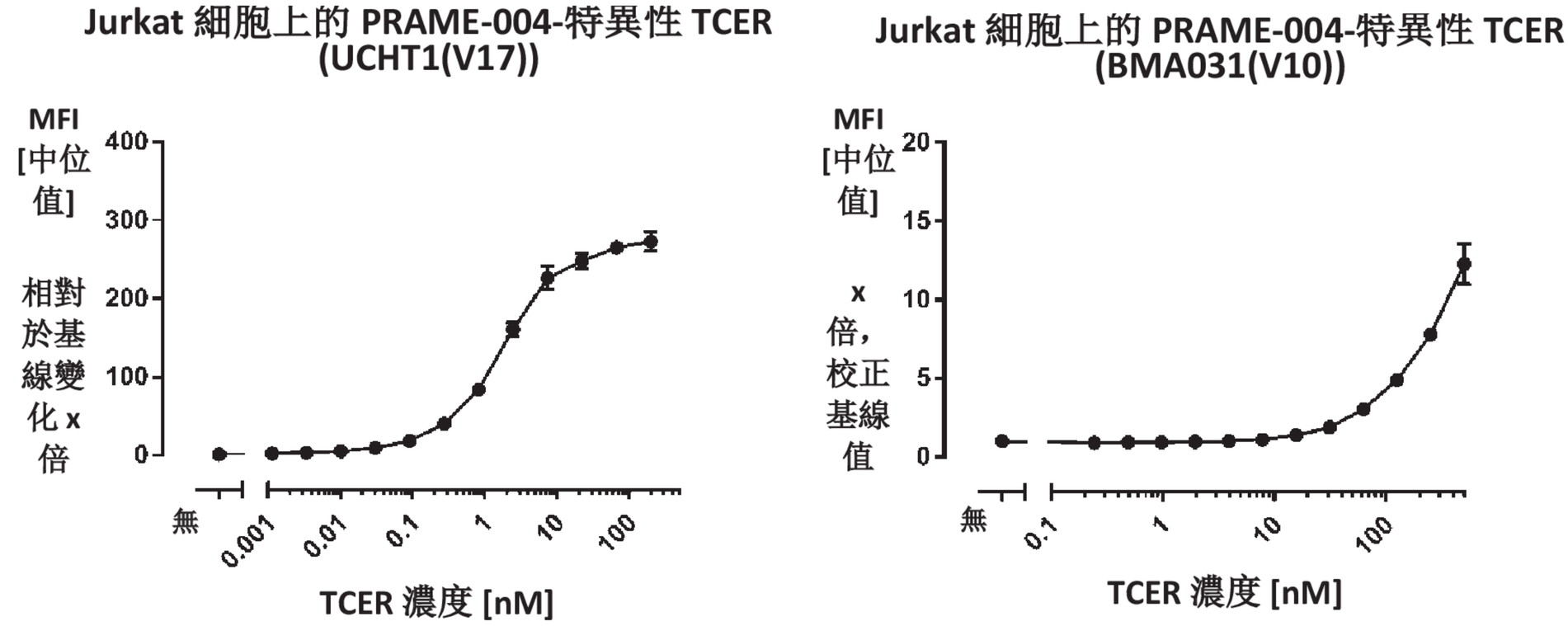

Jurkat 細胞上的 PRAME-004-特異性 TCER (UCHT1(V17))
MFI [中位值]
相對於基線變化 x 倍
400
300
200
100
0
無
0.001
0.01
0.1
1
10
100
TCER 濃度 [nM]
Jurkat 細胞上的 PRAME-004-特異性 TCER (BMA031(V10))
MFI [中位值]
x 倍，校正基線值
20
15
10
5
0
無
0.1
1
10
100
TCER 濃度 [nM]

圖 3

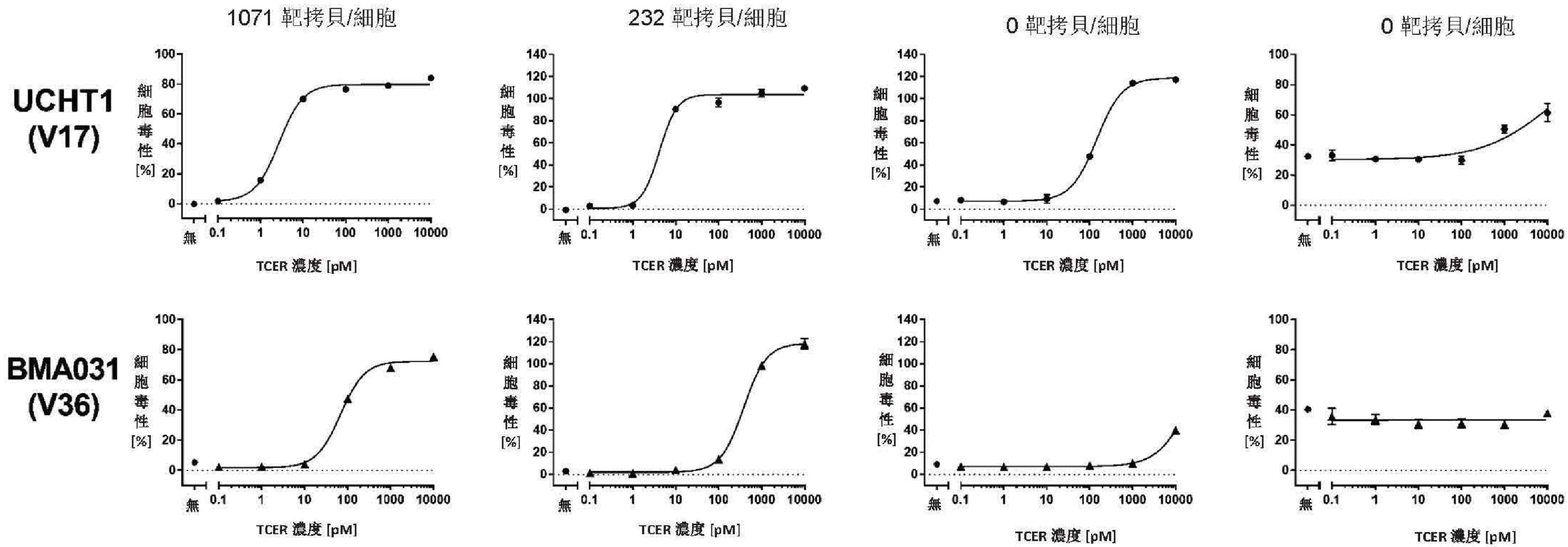

1071 靶拷貝/細胞
232 靶拷貝/細胞
0 靶拷貝/細胞
0 靶拷貝/細胞
UCHT1 (V17)
BMA031 (V36)
細胞毒性 [%]
無
0.1
1
10
100
1000
10000
TCER 濃度 [pM]

圖 4

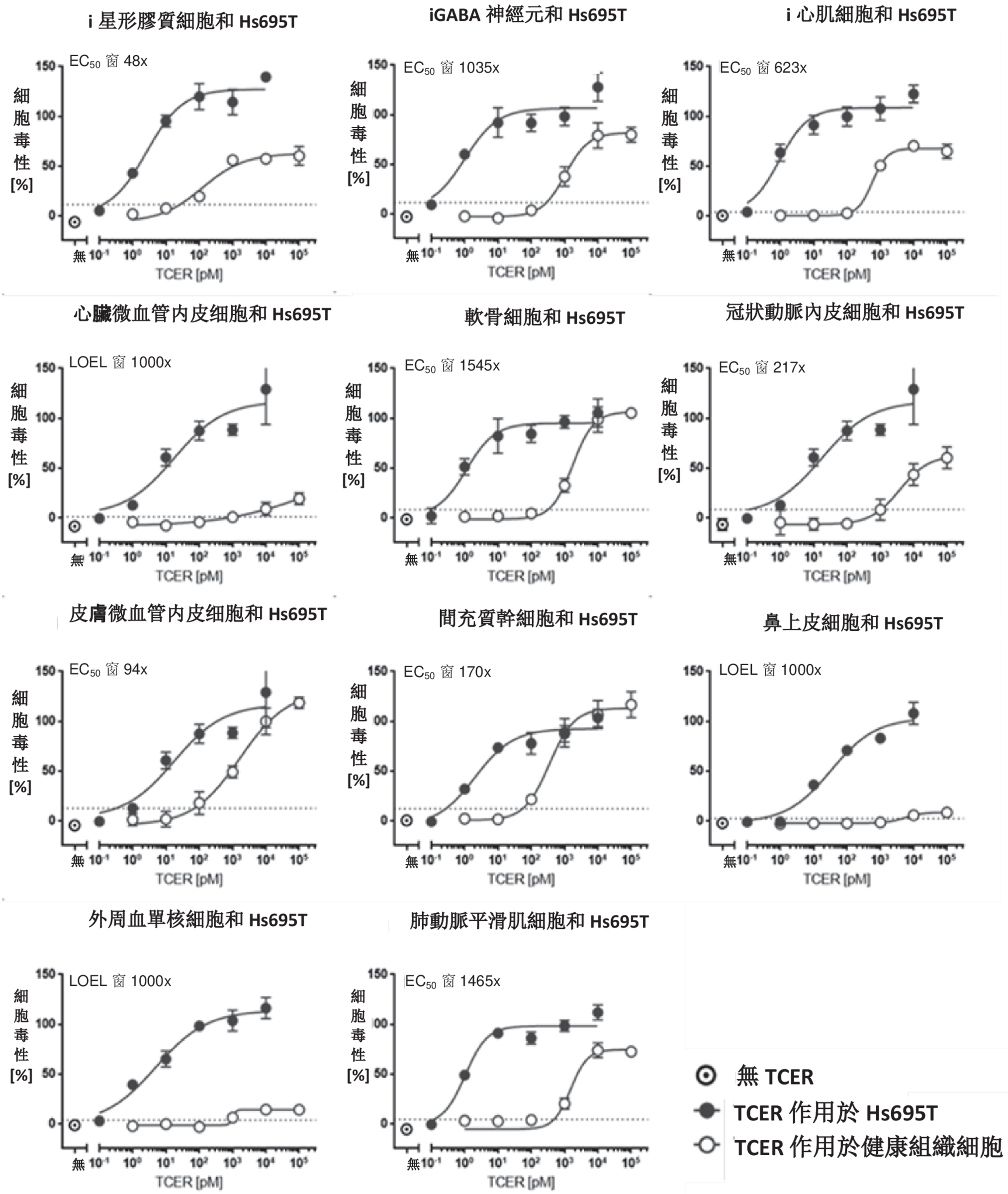
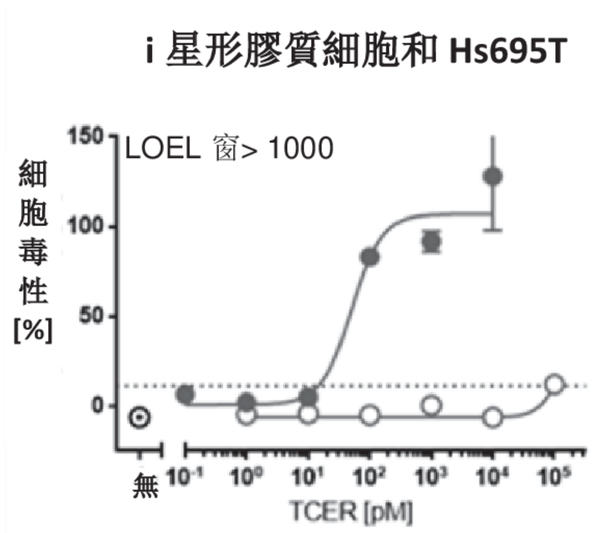
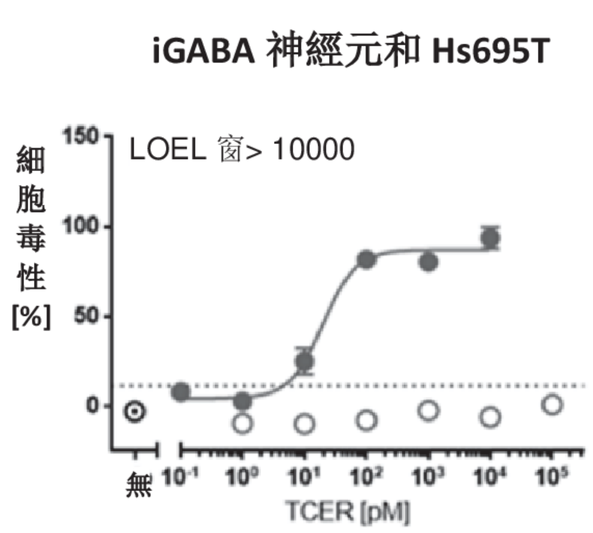
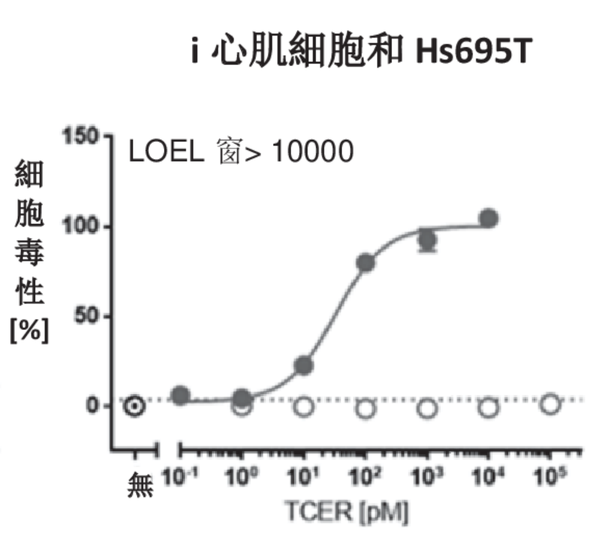

i 星形膠質細胞和 Hs695T
EC50 窗 48x
iGABA 神經元和 Hs695T
EC50 窗 1035x
i 心肌細胞和 Hs695T
EC50 窗 623x
心臟微血管內皮细胞和 Hs695T
LOEL 窗 1000x
軟骨細胞和 Hs695T
EC50 窗 1545x
冠狀動脈內皮細胞和 Hs695T
EC50 窗 217x
皮膚微血管內皮细胞和 Hs695T
EC50 窗 94x
間充質幹細胞和 Hs695T
EC50 窗 170x
鼻上皮細胞和 Hs695T
LOEL 窗 1000x
外周血單核細胞和 Hs695T
LOEL 窗 1000x
肺動脈平滑肌細胞和 Hs695T
EC50 窗 1465x
細胞毒性 [%]
TCER [pM]
無 TCER
TCER 作用於 Hs695T
TCER 作用於健康組織細胞

圖 5



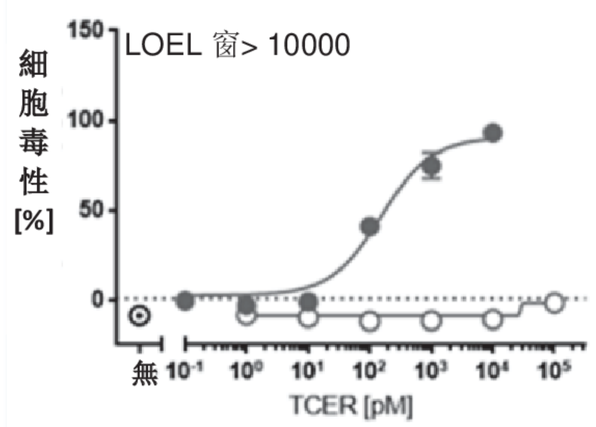


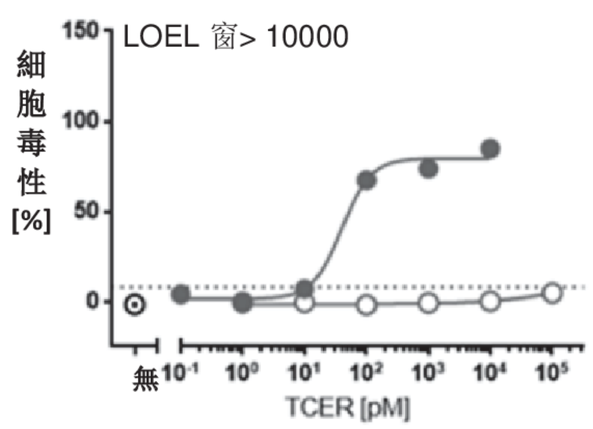


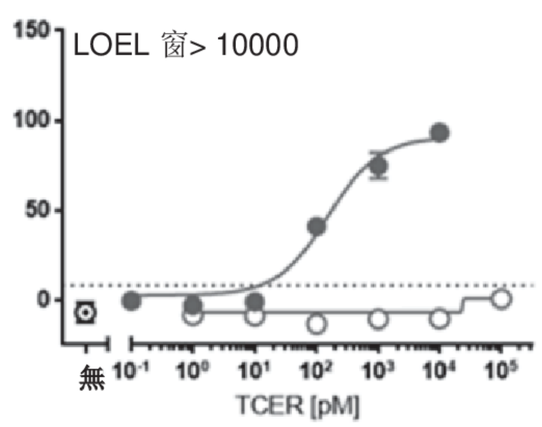
心臟微血管内皮细胞和 Hs695T

軟骨細胞和 Hs695T

冠狀動脈內皮細胞和 Hs695T



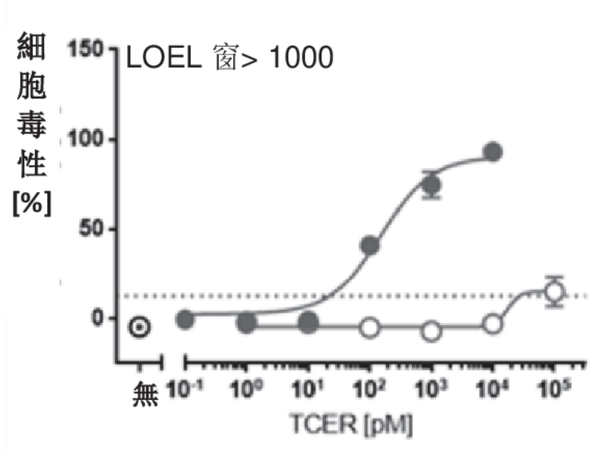


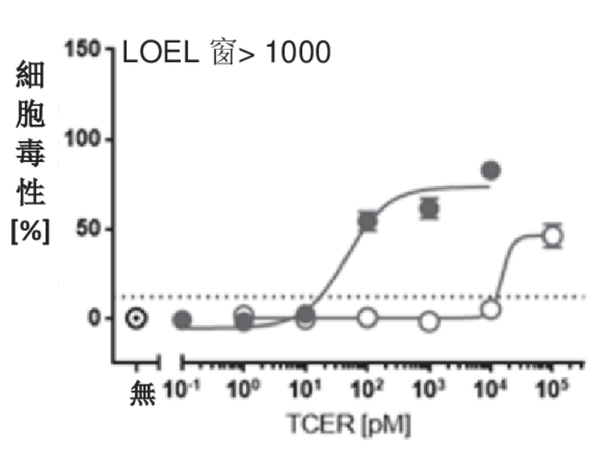


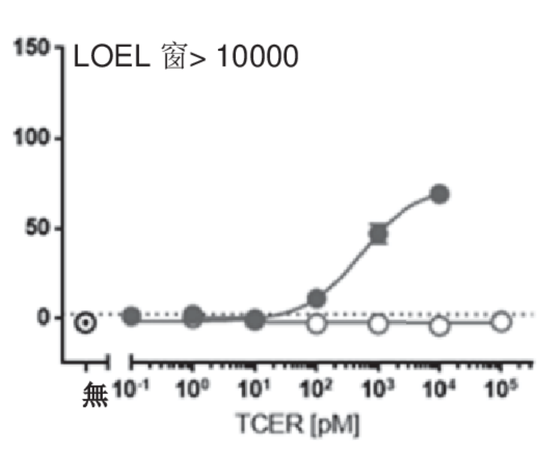
皮膚微血管内皮细胞和 Hs695T

間充質幹細胞和 Hs695T

鼻上皮細胞和 Hs695T

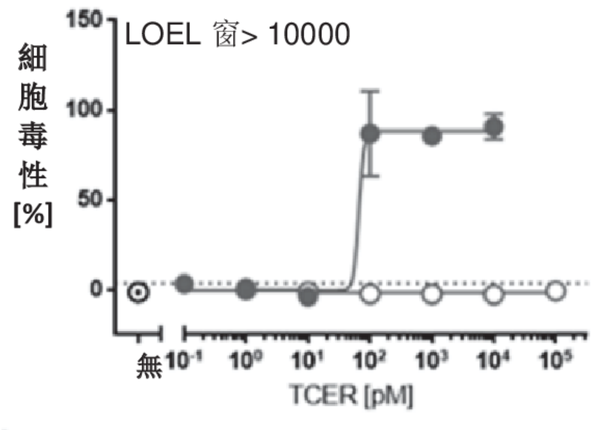






外周血單核細胞和 Hs695T

肺動脈平滑肌細胞和 Hs695T



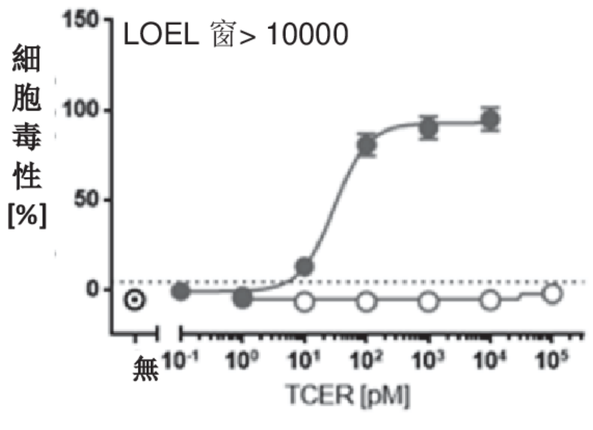




圖 6

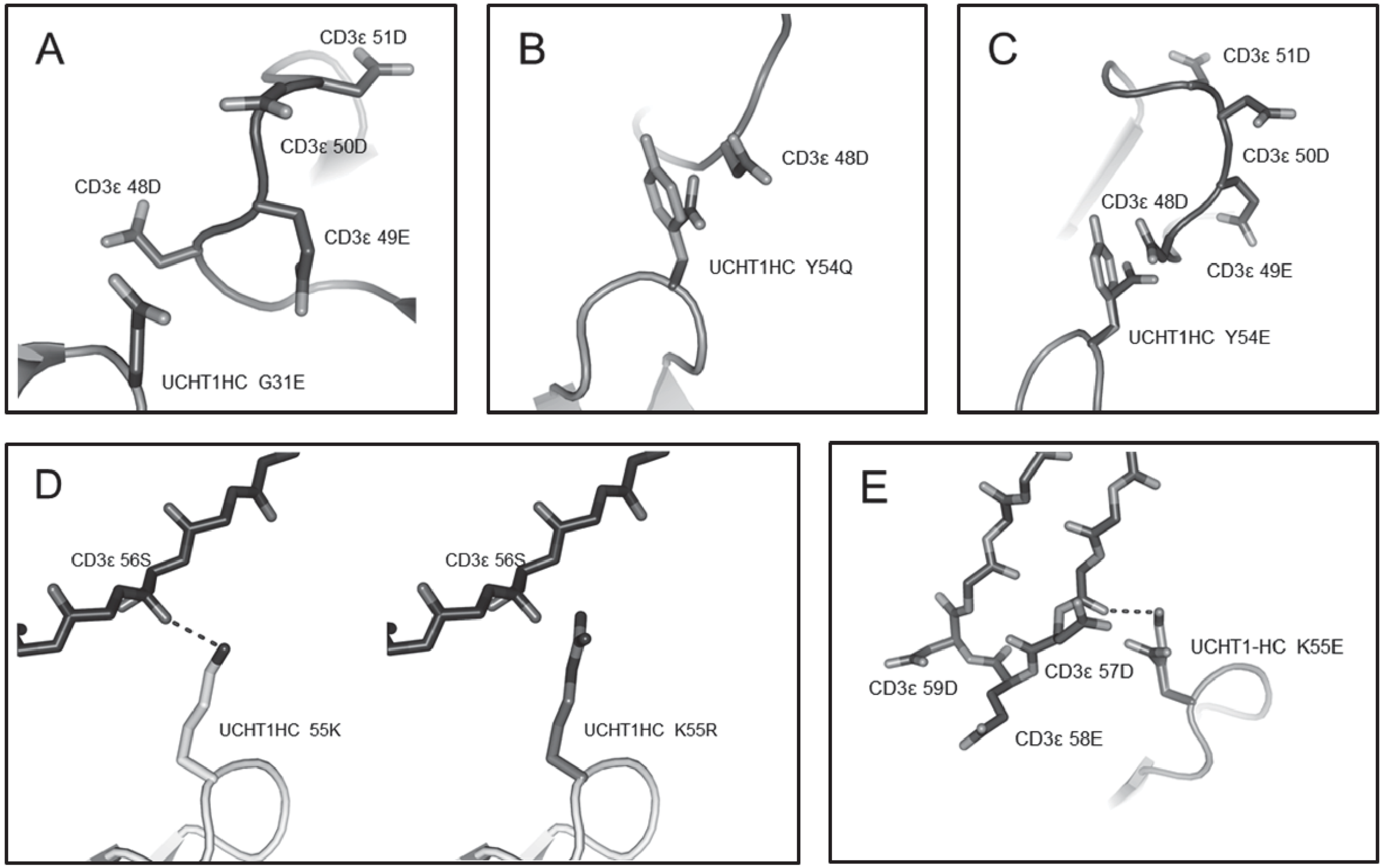
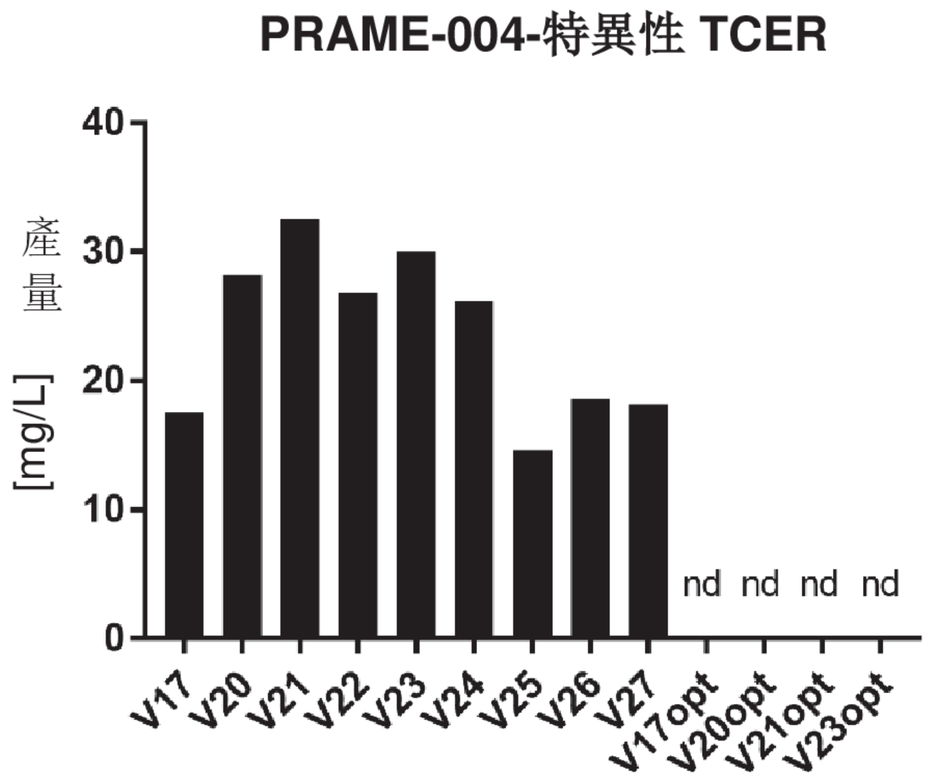
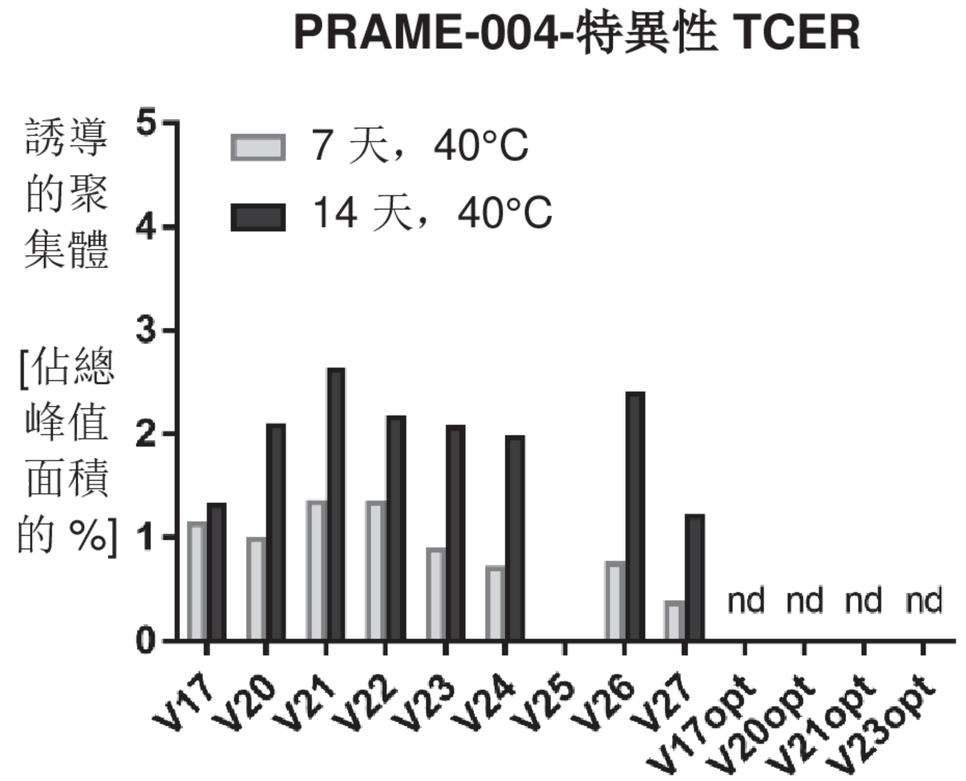
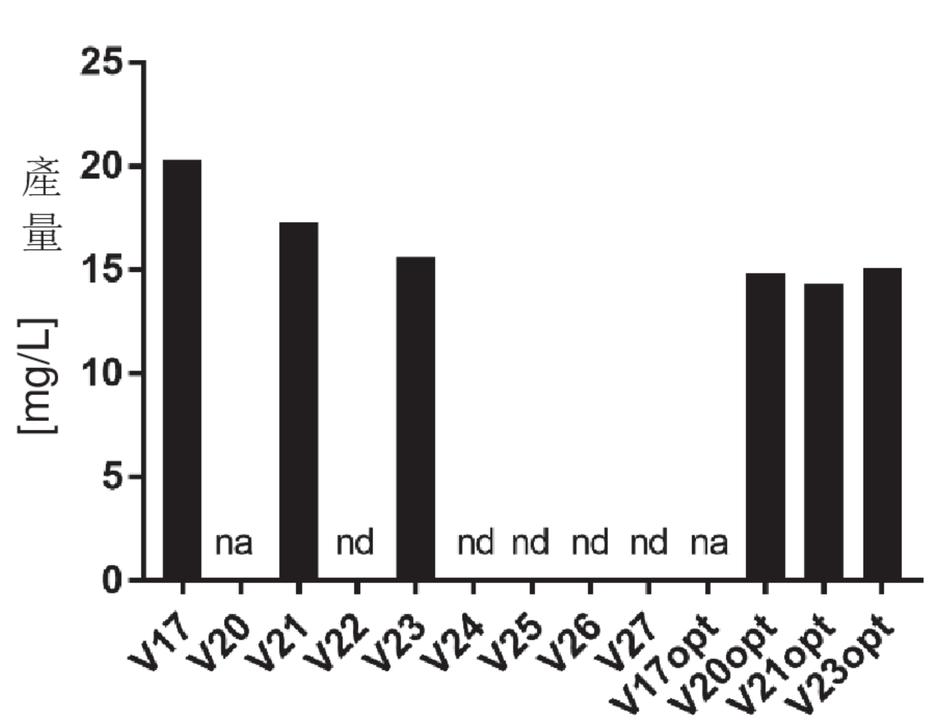

A
CD3ε 51D
CD3ε 50D
CD3ε 48D
CD3ε 49E
UCHT1HC G31E
B
CD3ε 48D
UCHT1HC Y54Q
C
CD3ε 51D
CD3ε 50D
CD3ε 48D
CD3ε 49E
UCHT1HC Y54E
D
CD3ε 56S
UCHT1HC 55K
CD3ε 56S
UCHT1HC K55R
E
UCHT1-HC K55E
CD3ε 59D
CD3ε 57D
CD3ε 58E

圖 7


PRAME-004-特異性 TCER
產量 [mg/L]
40
30
20
10
0
nd nd nd nd
V17 V20 V21 V22 V23 V24 V25 V26 V27 V17opt V20opt V21opt V23opt


PRAME-004-特異性 TCER
誘導的聚集體 [佔總峰值面積的 %]
7 天，40°C
14 天，40°C
5
4
3
2
1
0
nd nd nd nd
V17 V20 V21 V22 V23 V24 V25 V26 V27 V17opt V20opt V21opt V23opt


MAG-003-特異性 TCER
產量 [mg/L]
25
20
15
10
5
0
na nd nd nd nd nd na
V17 V20 V21 V22 V23 V24 V25 V26 V27 V17opt V20opt V21opt V23opt

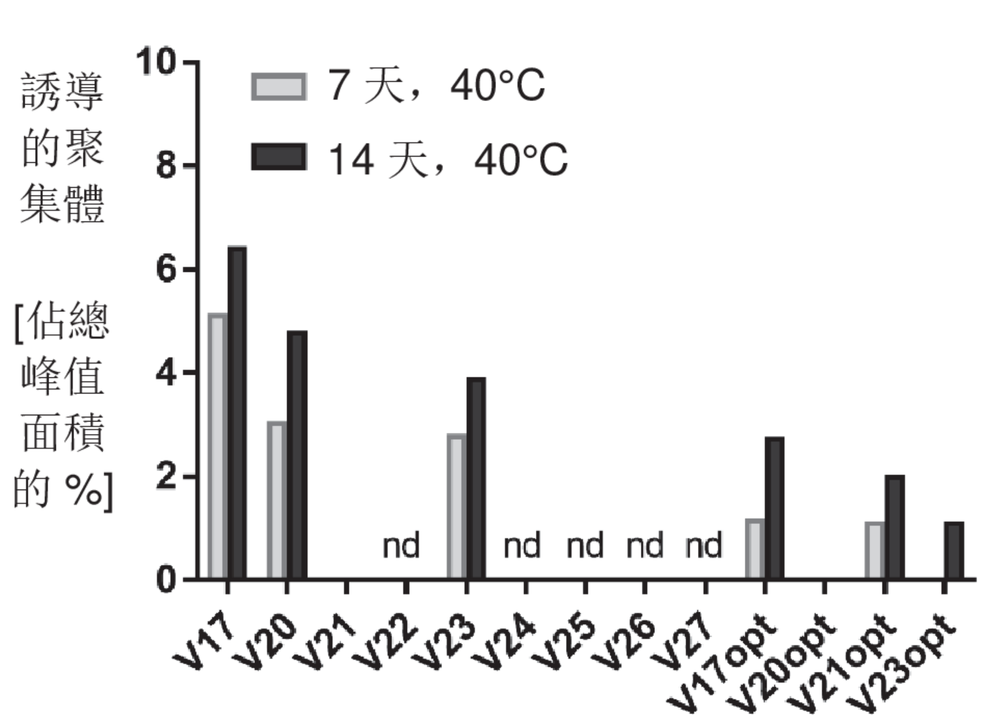

MAG-003-特異性 TCER
誘導的聚集體 [佔總峰值面積的 %]
7 天，40°C
14 天，40°C
10
8
6
4
2
0
nd nd nd nd
V17 V20 V21 V22 V23 V24 V25 V26 V27 V17opt V20opt V21opt V23opt

圖 8

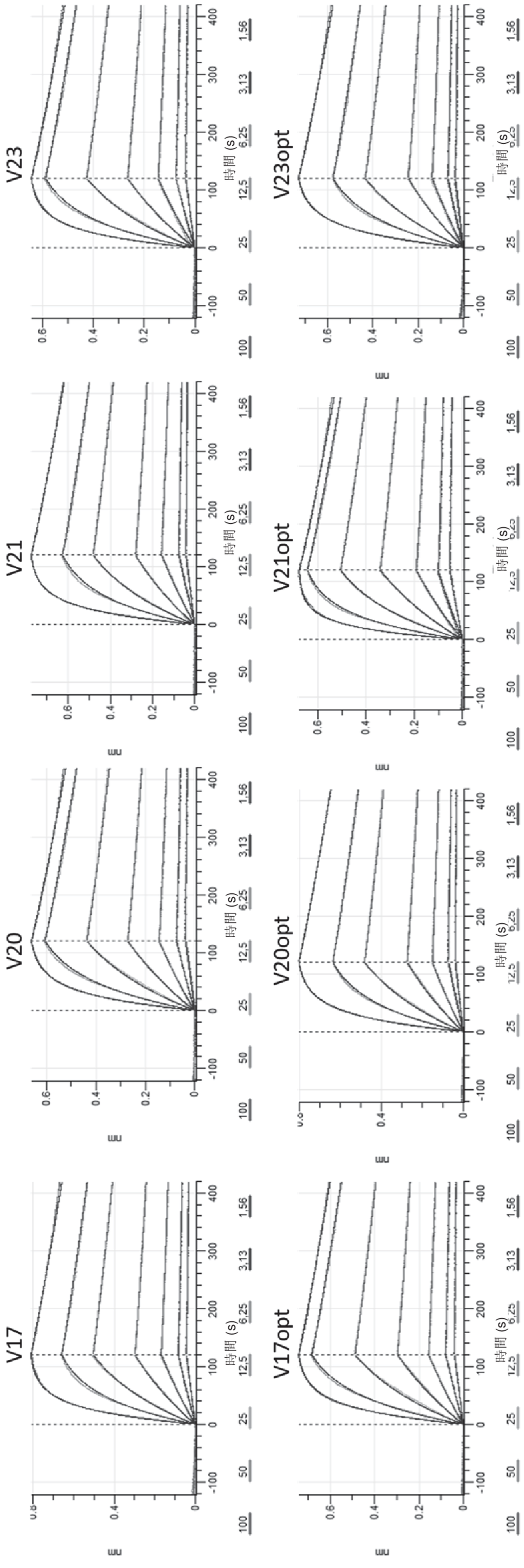

V23
V23opt
V21
V21opt
V20
V20opt
V17
V17opt
時間 (s)
0
25
50
100
12.5
6.25
3.13
1.56
-100
100
200
300
400
0.2
0.4
0.6
0.8

圖 9A

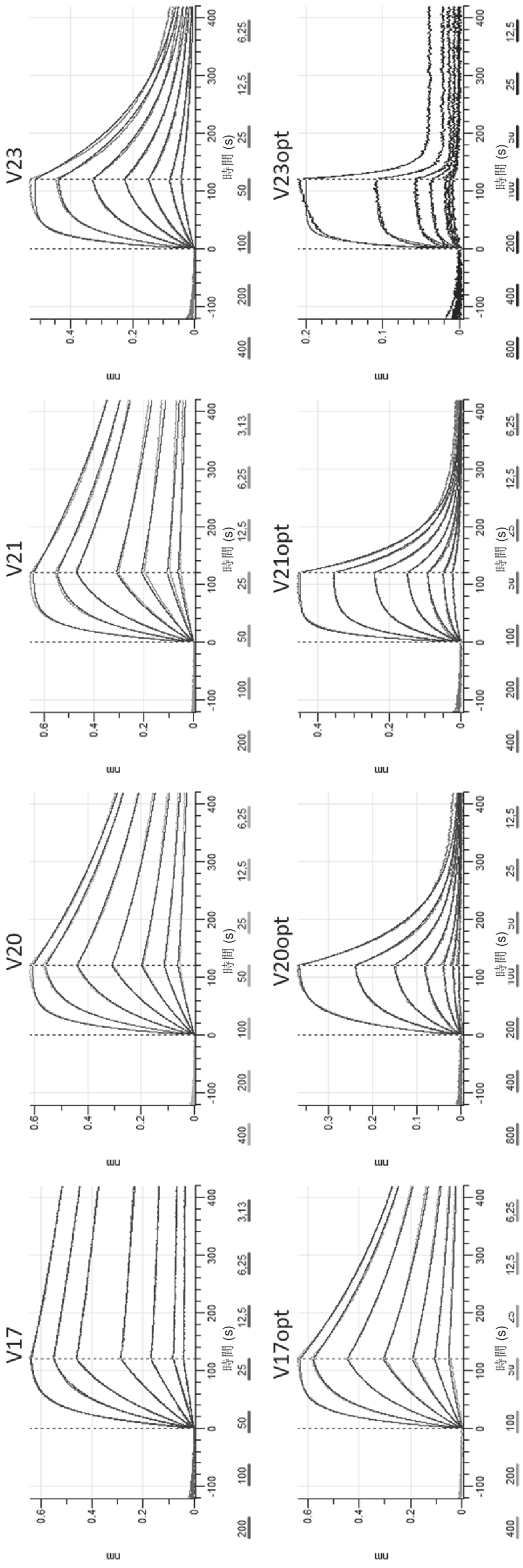


圖 9B

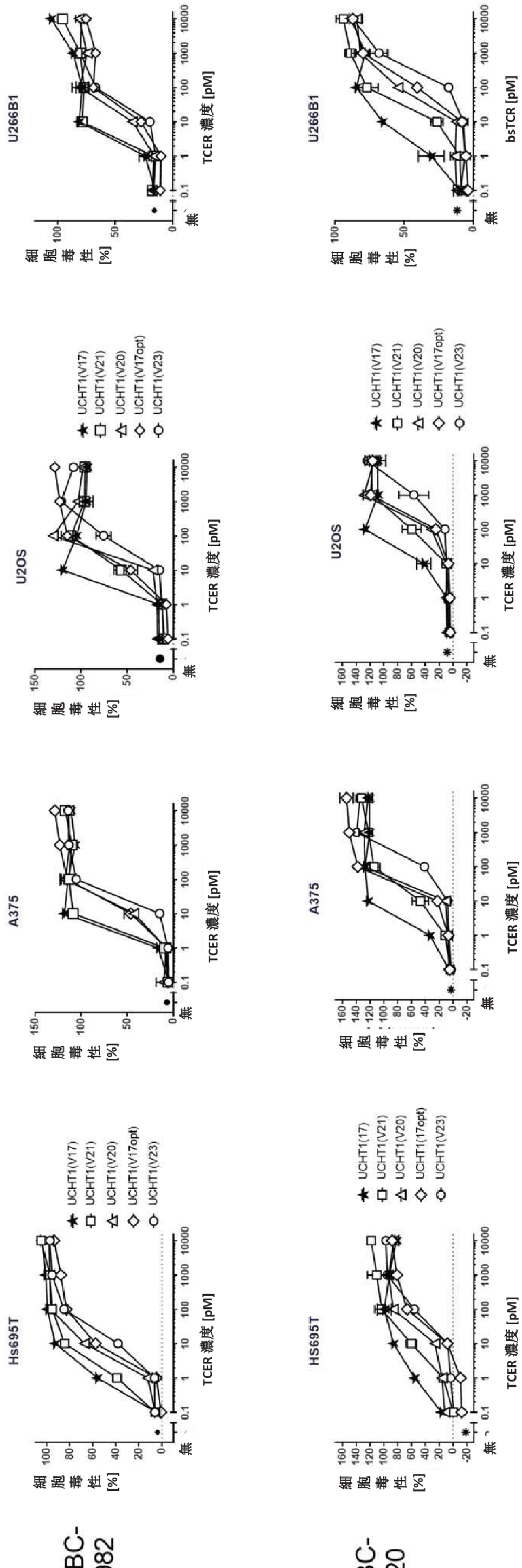

HBC-982
HBC-720
U266B1
U2OS
A375
Hs695T
HS695T
細胞毒性 [%]
TCER 濃度 [pM]
bsTCR [pM]
無
0.1
1
10
100
1000
10000
UCHT1(V17)
UCHT1(V21)
UCHT1(V20)
UCHT1(V17opt)
UCHT1(V23)

圖 1