



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109071667 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201780028480.4

(22)申请日 2017.03.08

(30)优先权数据

62/305,092 2016.03.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.11.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/021435 2017.03.08

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/156178 EN 2017.09.14

(71)申请人 马弗里克治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 P·博伊尔勒 R·B·杜布里奇

H·韦舍 L·叶夫宁 J·盖诺

A·潘沙尔 M·维诺格拉多沃娃

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司 11287

代理人 沈锦华

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

C07K 16/30(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

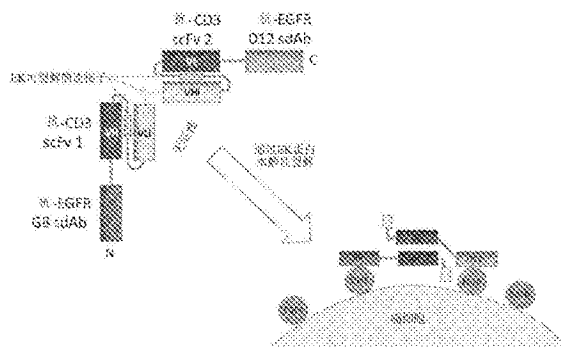
权利要求书6页 说明书50页 附图132页

(54)发明名称

可诱导性结合蛋白和使用方法

(57)摘要

本发明提供经过条件性活化的多肽构建体，所述多肽构建体包含与CD3结合的经过蛋白酶活化的结构域、至少一个半衰期延长结构域以及两个或更多个与一个或多个靶抗原结合的结构域。还提供所述多肽构建体的药物组合物和用于制备所述多肽构建体的核酸、重组表达载体和宿主细胞。还公开了使用所公开的多肽构建体来预防和/或治疗疾病、病症和失调的方法。



1. 一种针对CD3抗原的单链scFv多肽,所述scFv多肽包含第一scFv结构域,所述第一scFv结构域包含第一V_H结构域和第一V_L结构域,所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域通过包含介于所述第一V_H结构域与所述第一V_L结构域之间的第一蛋白酶裂解位点的第一scFv连接子部分接合,所述第一V_H结构域与所述第一V_L结构域交互作用以形成第一V_H/V_L对,所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域中的一个无活性,致使所述第一scFv结构域不会特异性结合所述CD3抗原,所述第一scFv多肽通过任选地包含第二蛋白酶裂解位点的第一结构域连接子部分接合第二scFv结构域,

所述第二scFv结构域包含经由第二scFv连接子部分接合的第二V_H结构域和第二V_L结构域,所述第二scFv连接子部分包含介于所述第二V_H结构域与所述第二V_L结构域之间的第三蛋白酶裂解位点,所述第二V_H结构域与所述第二V_L结构域交互作用以形成第二V_H/V_L对,所述第二V_H结构域和所述第二V_L结构域中的一个无活性,致使所述第二scFv结构域不会特异性结合所述CD3抗原,其中

所述第一scFv结构域通过第二结构域连接子接合第一靶抗原结合结构域,所述第二结构域连接子接合选自所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域的成员与所述第一靶抗原结合结构域;并且

所述第二scFv结构域通过第三结构域连接子与第二靶抗原结合结构域接合,所述第三结构域连接子接合选自所述第二V_H结构域和所述第二V_L结构域的成员与所述第二靶抗原结合结构域。

2. 一种针对CD3抗原的单链scFv多肽,所述scFv多肽包含第一scFv结构域,所述第一scFv结构域包含第一V_H结构域和第一V_L结构域,所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域通过包含介于所述第一V_H结构域与所述第一V_L结构域之间的第一蛋白酶裂解位点的第一scFv连接子部分接合,所述第一V_H结构域与所述第一V_L结构域交互作用以形成第一V_H/V_L对,所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域中的一个为无活性的第一V_H结构域或无活性的第一V_L结构域,致使所述第一scFv结构域不会特异性结合所述CD3抗原,所述第一scFv多肽通过任选地包含第二蛋白酶裂解位点的第一结构域连接子部分与第二scFv结构域接合,

所述第二scFv结构域包含第二V_H结构域和第二V_L结构域,所述第二V_H结构域和所述第二V_L结构域经由包含介于所述第二V_H结构域与所述第二V_L结构域之间的第三蛋白酶裂解位点的第二scFv连接子部分接合,所述第二V_H结构域与所述第二V_L结构域交互作用以形成第二V_H/V_L对,所述第二V_H结构域和所述第二V_L结构域中的一个为无活性的第二V_H结构域或无活性的第二V_L结构域,致使所述第二scFv结构域不会特异性结合所述CD3抗原,其中

所述第一scFv结构域通过第二结构域连接子与第一靶抗原结合结构域接合,所述第二结构域连接子接合选自所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域的成员与所述第一靶抗原结合结构域;并且

所述第二scFv结构域通过第三结构域连接子与第二靶抗原结合结构域接合,所述第三结构域连接子接合选自所述第二V_H结构域和所述第二V_L结构域的成员与所述第二靶抗原结合结构域,

其中当所述单链scFv与能够裂解所述第一scFv连接子部分的所述第一蛋白酶裂解位点的第一蛋白酶接触时,所述无活性的第一V_H结构域或所述无活性的第一V_L结构域从所述单链scFv多肽分离,并且

当所述单链scFv与能够裂解所述第二scFv连接子部分的所述第二蛋白酶裂解位点的第二蛋白酶接触时,所述无活性的第二V_H结构域或所述无活性的第二V_L结构域从所述单链scFv多肽分离,

从而形成能够结合所述CD3抗原的活性单链scFv。

3. 一种针对CD3抗原的单链scFv多肽,所述scFv多肽包含第一scFv结构域,所述第一scFv结构域包含第一V_H结构域和第一V_L结构域,所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域通过包含介于所述第一V_H结构域与所述第一V_L结构域之间的第一蛋白酶裂解位点的第一scFv连接子部分接合,所述第一V_H结构域与所述第一V_L结构域交互作用以形成第一V_H/V_L对,所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域中的一个无活性,致使所述第一scFv结构域不会特异性结合所述CD3抗原,所述第一scFv多肽通过任选地包含第二蛋白酶裂解位点的第一结构域连接子部分与第一靶抗原结合结构域接合,

所述第一结构域连接子接合选自所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域的成员与所述第一靶抗原结合结构域。

4. 根据权利要求1到3中任一项所述的单链scFv多肽,其进一步包含至少一个与选自下组的成员接合的半衰期延长结构域:所述第一V_L结构域、所述第一V_H结构域、所述第一靶抗原结合结构域和其组合。

5. 根据权利要求1到2中任一项所述的单链scFv多肽,其进一步包含至少一个与选自下组的成员接合的半衰期延长结构域:所述第一V_L结构域、所述第一V_H结构域、所述第二V_L结构域、所述第二V_H结构域、所述第一靶抗原结合结构域、所述第二靶抗原结合结构域和其组合。

6. 根据权利要求5所述的单链scFv多肽,其中所述至少一个半衰期延长结构域与除了所述无活性的V_H结构域和所述无活性的V_L结构域之外的结构域结合。

7. 根据权利要求5到6中任一项所述的单链scFv多肽,其中所述至少一个半衰期延长结构域包含能够与血清蛋白结合的部分。

8. 根据权利要求7所述的单链scFv多肽,其中所述血清蛋白为血清白蛋白。

9. 根据权利要求5到8中任一项所述的单链scFv多肽,其中所述至少一个半衰期延长结构域包含scFv、可变重链结构域(VH)、可变轻链结构域(VL)、纳米体、肽、配体或小分子。

10. 根据权利要求5到9中任一项所述的单链scFv多肽,其中至少一个半衰期延长结构域在蛋白酶裂解前位于选自下组的成员处:单链scFv的N端、单链scFv的C端和其组合。

11. 根据权利要求5到9中任一项所述的单链scFv多肽,其中至少一个半衰期延长结构域在蛋白酶裂解前并非位于所述scFv多肽的C端或N端。

12. 根据权利要求5到11中任一项所述的单链scFv多肽,其中所述半衰期延长结构域通过其中包含可裂解的部分的连接子与选自下组的成员结合:所述第一V_L结构域、所述第一V_H结构域、所述第二V_L结构域、所述第二V_H结构域、所述第一靶抗原结合结构域、所述第二靶抗原结合结构域和其组合。

13. 根据权利要求1到12中任一项所述的单链scFv多肽,其中所述CD3抗原选自一个或多个CD3抗原。

14. 根据权利要求1到13中任一项所述的单链scFv多肽,其中所述靶抗原结合结构域与由异常细胞表达的抗原结合。

15. 根据权利要求14所述的单链scFv多肽,其中所述异常细胞为恶性细胞。

16. 根据权利要求1到15中任一项所述的单链scFv多肽,其中所述靶抗原结合结构域与细胞表面受体结合。

17. 根据权利要求1到16中任一项所述的单链scFv多肽,其中所述靶抗原结合结构域包含scFv、V_H结构域、V_L结构域、非Ig结构域、或特异性结合所述靶抗原的配体。

18. 根据权利要求1到17中任一项所述的单链scFv多肽,其中至少一个靶抗原结合结构域特异性结合肿瘤抗原。

19. 根据权利要求16所述的单链scFv多肽,其中所述细胞表面受体为选自下组的成员: EpCAM、EGFR、HER-2、HER-3、cMet、CEA、FoIR和其组合。

20. 根据权利要求1到19中任一项所述的单链scFv多肽,其中所述第一scFv连接子和所述第二scFv连接子为具有相同序列或不同序列的多肽连接子。

21. 根据权利要求1到20中任一项所述的单链scFv多肽,其中所述第一蛋白酶裂解位点和所述第二蛋白酶裂解位点为相同蛋白酶或不同蛋白酶的裂解位点。

22. 根据权利要求1到21中任一项所述的单链scFv多肽,其中所述第一蛋白酶裂解位点和所述第二蛋白酶裂解位点具有相同序列或不同序列。

23. 根据权利要求1到2和4到22中任一项所述的单链scFv多肽,其中所述第一结构域连接子和所述第二结构域连接子为具有相同序列或不同序列的多肽连接子。

24. 根据权利要求1到23中任一项所述的单链scFv多肽,其中所述蛋白酶裂解位点通过下组中的至少一个裂解: 丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天门冬氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、明胶酶和天门冬酰胺肽裂解酶。

25. 根据权利要求1到24中任一项所述的单链scFv多肽,其中所述蛋白酶裂解位点通过下组中的至少一个裂解: 组织蛋白酶B (Cathepsin B)、组织蛋白酶C、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、激肽释放酶 (kallikrein)、hK1、hK10、hK15、纤溶酶 (plasmin)、胶原蛋白酶 (collagenase)、第IV型胶原蛋白酶、溶基质蛋白酶 (stromelysin)、第Xa因子、胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin) 样蛋白酶、胰蛋白酶样蛋白酶、弹性蛋白酶 (elastase) 样蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶 (subtilisin) 样蛋白酶、奇异果蛋白酶 (actinidain)、凤梨蛋白酶 (bromelain)、钙蛋白酶 (calpain)、凋亡蛋白酶 (caspase)、凋亡蛋白酶3、Mir 1-CP、木瓜蛋白酶 (papain)、HIV-1蛋白酶、HSV蛋白酶、CMV蛋白酶、凝乳酶 (chymosin)、肾素 (renin)、胃蛋白酶 (pepsin)、蛋白裂解酶 (matriptase)、天门冬酰胺内肽酶 (legumain)、天门冬氨酸蛋白酶 (plasmepsin)、猪笼草蛋白酶 (nepenthesin)、金属外肽酶 (metalloexopeptidase)、金属内肽酶 (metalloendopeptidase)、基质金属蛋白酶 (MMP)、MMP1、MMP2、MMP3、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、ADAM10、ADAM12、尿激酶纤溶酶原活化剂 (uPA)、肠激酶 (enterokinase)、前列腺特异性抗原 (PSA、hK3)、白介素-1 β 转化酶、凝血酶、FAP (FAP- α)、meprn、粒酶、二肽基肽酶和二肽基肽酶IV (DPPIV/CD26)。

26. 根据权利要求1到25中任一项所述的单链scFv多肽,其中所述蛋白酶裂解结构域是在肿瘤的位点裂解。

27. 根据权利要求1到26中任一项所述的单链scFv多肽,其中裂解所述蛋白酶裂解位点的蛋白酶由在肿瘤微环境中的细胞表达。

28. 根据权利要求1到27中任一项所述的单链scFv多肽,其中所述蛋白酶裂解位点是在

施用所述单链scFv多肽的受试者的血液中裂解。

29. 根据权利要求1到28中任一项所述的单链scFv多肽, 其中所述scFv多肽进一步包含两个或更多个蛋白酶裂解结构域。

30. 根据权利要求5到29中任一项所述的单链scFv多肽, 其中所述蛋白酶裂解结构域位于所述半衰期延长结构域或CD3结合结构域。

31. 根据权利要求5到29中任一项所述的单链scFv多肽, 其中所述蛋白酶裂解结构域不位于所述半衰期延长结构域或CD3结合结构域。

32. 根据权利要求1到31中任一项所述的单链scFv多肽, 其中一个或多个CD3结合结构域包含源自特异于人CD3的单链可变片段(scFv)的多肽。

33. 根据权利要求1到32中任一项所述的单链scFv多肽, 其中所述CD3结合结构域为特异地选自下组的成员的CD3结合结构域: CD3 ϵ 、CD3 δ 和CD3 γ 。

34. 根据权利要求33所述的单链scFv多肽, 其中一个或多个CD3结合结构域包含选自以下所组成的组的互补决定区(CDR): 莫罗单抗-CD3(muromonab-CD3)(OKT3)、奥昔珠单抗(otelixizumab)(TRX4)、替利珠单抗(teplizumab)(MGA031)、维西珠单抗(visilizumab)(Nuvion)、SP34、I2C、X35、VIT3、BMA030(BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3B、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1和WT-31。

35. 根据权利要求1到34中任一项所述的单链scFv多肽, 其中一个或多个CD3结合结构域经过人源化。

36. 根据权利要求33所述的单链scFv多肽, 其中在蛋白酶裂解所述蛋白酶裂解位点之后, 一个或多个所述CD3结合结构域对CD3表达细胞上的CD3的K_D结合为1000nM或更低。

37. 根据权利要求36所述的单链scFv多肽, 其中在蛋白酶裂解所述蛋白酶裂解位点之后, 一个或多个活化的CD3结合结构域对CD3表达细胞上的CD3的K_D结合为100nM或更低。

38. 根据权利要求37所述的单链scFv多肽, 其中在蛋白酶裂解所述蛋白酶裂解位点之后, 一个或多个活化的CD3结合结构域对CD3表达细胞上的CD3的K_D结合为10nM或更低。

39. 根据权利要求1到38中任一项所述的单链scFv多肽, 其中一个或多个CD3结合结构域与食蟹猴CD3具有交叉反应性。

40. 根据权利要求1到39中任一项所述的单链scFv多肽, 其中一个或多个CD3结合结构域为包含本文所提供的氨基酸序列的CD3结合结构域。

41. 根据权利要求1到40中任一项所述的单链scFv多肽, 其中所述靶抗原结合结构域为EGFR结合结构域。

42. 根据权利要求1到41中任一项所述的单链scFv多肽, 其中所述V_L结构域和所述V_H结构域各自包含3个CDR。

43. 根据权利要求1到42中任一项所述的单链scFv多肽, 其中选自所述无活性V_L和所述无活性V_H的成员包含至少一个CDR, 所述至少一个CDR包含至少一个相对于所述V_L和V_H的亲本序列的突变氨基酸。

44. 根据权利要求1到43中任一项所述的单链scFv多肽, 其中选自所述无活性V_L和所述无活性V_H的成员包含CDR2结构域, 所述CDR2结构域包含至少一个相对于所述V_L和V_H的所述CDR2的亲本序列的突变氨基酸。

45. 根据权利要求1到44中任一项所述的单链scFv多肽, 其中选自所述无活性V_L和所述无活性V_H的成员包含至少一个CDR, 所述至少一个CDR相对于所述V_L和V_H的所述CDR的亲本序列突变, 所述突变是通过在所述CDR并入选自所述第一结构域连接子和所述第一scFv连接子的成员。

46. 一种多核苷酸, 其编码根据权利要求1到45中任一项所述的单链scFv多肽。

47. 一种载体, 其包含根据权利要求46所述的多核苷酸。

48. 一种宿主细胞, 其通过根据权利要求47所述的载体转化。

49. 一种药物组合物, 其包含选自下组的成员:

(i) 根据权利要求1到45中任一项所述的单链scFv多肽;

(ii) 根据权利要求46所述的多核苷酸;

(iii) 根据权利要求47所述的载体;

(iv) 根据权利要求48所述的宿主细胞; 和其组合; 和

(v) 药学上可接受的载体。

50. 一种用于制造根据权利要求1到45中任一项所述的单链scFv多肽的方法, 所述方法包含在允许所述单链scFv多肽表达的条件下培养宿主细胞, 所述宿主细胞经过包含编码根据权利要求1到45中任一项所述的单链scFv多肽的核酸序列的载体转化或转染; 和, 从所述培养物回收并纯化所制造的单链scFv多肽。

51. 一种用于治疗或改善增殖性疾病、肿瘤疾病、炎性疾病、免疫病症、自体免疫疾病、感染性疾病、病毒疾病、过敏性反应、寄生虫反应、移植物抗宿主疾病或宿主抗移植物疾病的方法, 其包含对需要所述治疗或改善的受试者施用根据权利要求1到45中任一项所述的单链scFv多肽。

52. 根据权利要求51所述的方法, 其中所述受试者为人。

53. 一种前药组合物, 其包含

i) 编码CD3结合结构域的第一多肽序列, 所述CD3结合结构域包含第一scFv结构域, 所述第一scFv结构域包含第一V_H结构域和第一V_L结构域, 所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域通过包含第一蛋白酶裂解位点的第一scFv连接子部分接合, 致使所述第一scFv结构域不会特异性结合CD3;

ii) 编码肿瘤抗原结合结构域的第二多肽序列, 所述肿瘤抗原结合结构域包含第二scFv结构域, 所述第二scFv结构域包含第二V_H结构域和第二V_L结构域, 所述第二V_H结构域和所述第二V_L结构域通过包含第二蛋白酶裂解位点的第二scFv连接子部分接合, 致使所述第二scFv结构域不会特异性结合肿瘤抗原; 以及

iii) 任选地至少一个半衰期延长结构域。

54. 根据权利要求53所述的前药组合物, 其中所述第一多肽序列和所述第二多肽序列通过任选地包含蛋白酶裂解位点的第一结构域连接子部分可操作地连接。

55. 一种前药组合物, 其包含

i) 第一多肽序列, 其包含a) 包含第一scFv结构域的第一CD3结合结构域, 所述第一scFv结构域包含第一V_H结构域和第一V_L结构域, 所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域通过包含第一蛋白酶裂解位点的第一scFv连接子部分接合, 其中所述第一scFv结构域不会特异性结合CD3; 和b) 第一肿瘤抗原结合结构域;

ii) 第二多肽序列,其包含a) 包含第二scFv结构域的第二CD3结合结构域,所述第二scFv结构域包含第二V_H结构域和第二V_L结构域,所述第二V_H结构域和所述第二V_L结构域通过包含第二蛋白酶裂解位点的第二scFv连接子部分接合,其中所述第二scFv结构域不会特异性结合CD3;和b) 第二肿瘤抗原结合结构域;以及

iii) 任选地至少一个半衰期延长结构域,

其中所述第一V_H结构域和所述第二V_L结构域特异性结合CD3和/或所述第二V_H结构域和所述第一V_L结构域特异性结合CD3。

56. 根据权利要求55所述的前药组合物,其中所述第一肿瘤抗原结合结构域和所述第二肿瘤抗原结合结构域与相同的肿瘤抗原结合。

57. 根据权利要求56所述的前药组合物,其中所述第一肿瘤抗原结合结构域和所述第二肿瘤抗原结合结构域与不同的肿瘤抗原蛋白结合。

58. 根据权利要求56所述的前药组合物,其中所述第一肿瘤抗原结合结构域与呈现在第一肿瘤细胞上的第一肿瘤抗原结合,并且所述第二肿瘤抗原结合结构域与呈现在所述第一肿瘤细胞上的第二肿瘤抗原结合。

可诱导性结合蛋白和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及可诱导性结合蛋白和使用方法。

背景技术

[0002] 在各种临床设置中,选择性破坏个别细胞或特定的细胞类型通常是合乎需要的。例如,癌症治疗的主要目标是特异性破坏肿瘤细胞,同时留下尽可能完整并且未受损的健康细胞和组织。一种所述方法是通过诱导针对所述肿瘤的免疫反应来使免疫效应子细胞(例如自然杀伤(NK)细胞或细胞毒性T淋巴细胞(CTL))攻击和破坏肿瘤细胞。

[0003] 完整单克隆抗体(MAb)(其对肿瘤相关抗原提供优异的结合特异性和亲和力)的使用已成功应用在癌症治疗和诊断领域中。然而,完整MAb的大尺寸、其不良生物分布和在血液池中的长持久性限制了其临床应用。例如,完整抗体在肿瘤区域内可能显现出特异性累积。在生物分布研究中,当精确调查所述肿瘤时会注意到抗体分布不均匀,在外周区域中具有原始积聚。由于肿瘤坏死、不均匀的抗原分布和增加的间质组织压力,使用完整抗体构建体不可能到达肿瘤的中心部分。相反地,较小的抗体片段显示出快速的肿瘤定位、更深入地渗透入肿瘤,还有相对快速地从血液中除去。

[0004] 在临床应用方面,源自亲本MAb的小结合结构域的单链片段(scFv)能提供较完整MAb更好的生物分布,并且可更有效地靶向肿瘤细胞。单链片段可有效地通过工程处理从细菌获得,然而,与其亲本mAb((C(c),D)相比较,由于缺乏二价化合物所具有的强结合性,大部分经过工程处理的scFv具有单价结构并显示出在肿瘤上的累积减少(例如在肿瘤细胞上的停留短暂)并且特异性降低。

[0005] 尽管scFv具有有利性质,但是某些特性却阻碍了其在癌症化疗中全面运用在临床上。特别值得注意的是,由于这些试剂靶向患病和健康组织二者共有的细胞表面受体,因而在患病与健康组织之间具有交叉反应性。具有提升的治疗指数的scFv使得这些药剂的临床用途获得了显著进展。本发明提供所述改善的scFv和那些scFv的制造和使用方法。本发明的改善的scFv通过形成二聚体化合物而具有能够解决单一单位所显现的缺乏结合力这样出人意外的益处。

发明内容

[0006] 在各种实施例中,本发明提供由两部分组成的多肽。参考第53图。在示意性实施例中,所述多肽的两个区通过大小在单键到较大的多肽结构域(其可包括具有一个或多个裂解位点的一个或多个可裂解的连接子(CL)以允许所述两个区在裂解时分离)的范围内的scFv区域连接子(RL)连接。所述多肽的两个区各自含有一个或多个疾病靶向结构域(例如靶抗原结合结构域,其可为任何格式的单链结合结构域,包括scFv、sdAb、细胞受体结构域、外源凝集素(lectin)和类似物),所述一个或多个疾病靶向结构域经由至少一个非可裂解的连接子(NCL¹和NCL²)连接到靶向T细胞活化蛋白(α CD3、 α CD16、 α TCR α 、 α TCR β 、 α CD28和类似物)的去活化的scFv。所述靶向T细胞活化结构域(scFv)的V_H或V_L节段被去活化并且各scFv

的所述两个节段使用易于在患病组织中裂解的可裂解的连接子(CL1和CL2)连接。

[0007] 本文所描述的抗原结合多肽构建体提供数种超越传统单克隆抗体和其它较小的双特异性分子的治疗优点。特别值得注意的是本发明的多肽构建体的条件性活化。所述构建体基本上保持能够结合其所欲的靶抗原,然而,所述CD3信号传导活性取决于被编程在多肽本身的结构中的独特多肽降解步骤。因此,与类似的抗体和抗体片段对非病变的正常组织的特异活性相比较,本发明的示意性多肽对非病变的正常组织的特异活性明显降低。所述多肽在其期望的作用位点“启动”,但在其进展到此位点期间保持“沉默”的能力是特异性结合多肽治疗剂的领域中的显著进步,有希望以易于设计和可表达的药物形式提供强力且特殊的治疗剂。

[0008] 一般来说,重组多肽药物的有效性常受限于所述多肽本身的固有、快速的药代动力学,导致所述多肽被快速清除。本发明的示意性抗原结合多肽所提供的额外益处是延长药代动力学排除半衰期,因为其具有半衰期延长结构域(例如特异性结合HSA的结合结构域)。在这方面,本发明的示意性抗原结合多肽具有延长的血清停留半衰期。在一些实施例中,此基序的示意性多肽构建体的半衰期为约二、三、约五、约七、约十、约十二或约十四天。对比其它结合蛋白这是有利的,其它结合蛋白例如BiTE或DART分子(其具有相对短得多的排除半衰期)。例如,所述BiTE CD19xCD3双特异性scFv-scFv融合分子由于其排除半衰期短,因此需要连续静脉输注(iv)来递送药物。本发明的示意性抗原结合多肽的较长的固有半衰期可补救此缺点,从而提高了治疗潜力(例如低剂量的药物制剂)、减少了周期性投药和/或实现了并入有本发明化合物的新颖药物组合物。

[0009] 本发明的示意性抗原结合多肽还具有用于增强组织渗透和分布并降低首过肾清除率(first pass renal clearance)的最优选尺寸。由于肾一般过滤出低于约50kDa的分子,所以在设计蛋白质治疗剂时关于降低清除率的努力都集中在通过蛋白质融合、糖基化或加入聚乙二醇聚合物(即,PEG)来增加分子大小。然而,虽然增加蛋白质治疗剂的大小可防止肾清除,但是较大的尺寸也会阻止所述分子渗透入靶组织中。本文所描述的示意性抗原结合多肽通过与白蛋白结合来避免肾清除,这种方法将防止快速肾清除,同时又具有允许增强组织渗透和分布并实现最佳效力的小尺寸。在各种实施例中,所述半衰期延长结构域被置于分子中通过可裂解的连接子而与治疗活性组分分开的位置处。因此,例如,当到达期望的目标(在此,试剂裂解所述连接子,例如蛋白酶、酯酶、还原性或氧化性微环境)时,所述半衰期延长结构域从治疗活性组分裂解,减小所述治疗组分的尺寸并促进其渗透入组织中,或由细胞摄取。在其它实施例中,所述半衰期延长结构域将被置于所述抗原结合结构域与活性抗CD3结构域之间。

[0010] 因此,在一个示意性实施例中,本发明提供针对CD3抗原的单链scFv多肽。所述scFv多肽包含通过可裂解的scFv连接子连接的第一scFv结构域和第二scFv结构域。所述第一scFv结构域包含通过第一可裂解的scFv连接子部分接合的第一V_H¹结构域和第一V_L¹结构域。所述V_L或V_H中的一个如本文中所定义是无活性的(即,V_L¹i、V_H¹i)。所述第一V_H结构域与所述第一V_L结构域交互作用以形成第一scFv,然而,由于所述无活性同源物,所述scFv不会特异性结合CD3。所述第一scFv连接子部分(例如CL1)包含介于所述第一V_H¹结构域与第一V_L¹结构域之间的第一蛋白酶裂解位点。当蛋白酶在所述蛋白酶裂解位点裂解所述第一scFv连接子时,所述无活性V_Hi或无活性V_Li结构域与其V_L或V_H结合伙伴分开,然后它们再与其活

性同源物配对,允许正确配对的抗CD3结构域形成并与所述CD3抗原结合。所述靶抗原结合结构域经由连接子连接所述V_H/V_L对的活性同源物。

[0011] 在一个示意性实施例中,所述第一scFv结构域通过任选地包含第二裂解位点(例如蛋白酶裂解位点)的第一连接子部分与第二scFv结构域接合。所述第二scFv结构域的结构很像所述第一结构域并且包含经由第二scFv连接子部分接合的第二V_H结构域和第二V_L结构域。所述第二scFv连接子部分任选地包含介于所述第二V_H结构域与第二V_L结构域之间的第三蛋白酶裂解位点。所述第二V_H结构域与所述第二V_L结构域交互作用以形成第二V_H/V_L对。如同上述的第一V_H/V_L对,所述第二V_H结构域和所述第二V_L结构域中的一个无活性,致使所述第二scFv结构域不会特异性结合所述CD3抗原,所述介于第一与第二scFv结合结构域之间的复合物也不会。所述第二scFv结构域通过第二结构域连接子与第二靶抗原结合结构域接合。此第二结构域连接子接合选自所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域的成员与第二靶抗原结合结构域。所述靶抗原结合结构域经由连接子连接所述V_H/V_L对的活性同源物。

[0012] 本发明的多肽构建体是在可裂解的连接子处被裂解并形成活性CD3结合结构域,此活性CD3结合结构域在展现CD3抗原的细胞的存在下与CD3抗原结合。类似地,所述靶抗原结合结构域与靶抗原结合。

[0013] 在示意性实施例中,本发明提供具有单一scFv结构域的针对CD3抗原的单链scFv多肽。所述scFv多肽包含第一scFv结构域,所述第一scFv结构域包含第一V_H结构域和第一V_L结构域,所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域通过第一scFv连接子部分接合。所述第一scFv连接子部分包含介于所述第一V_H结构域与所述第一V_L结构域之间的第一裂解位点,例如蛋白酶裂解位点。所述第一V_H结构域与所述第一V_L结构域交互作用以形成第一V_H/V_L对,其中所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域中的一个无活性。因此,所述第一scFv结构域不能特异性结合所述CD3抗原。所述第一scFv多肽通过第一结构域连接子部分与第一靶抗原结合结构域接合。所述第一结构域连接子接合选自第一V_H结构域和第一V_L结构域的成员与第一靶抗原结合结构域。所述第一靶抗原结合结构域未连接到无活性的V_L或无活性的V_H。

[0014] 在示意性实施例中,本发明提供一对上述的单一结构域scFv构建体。所述构建体对通过其成对的CD3结合结构域协同结合CD3抗原。所述构建体对的个别scFv分子与成对的CD3位点的CD3抗原的结合作用可通过所述构建体对各成员的靶抗原结构域与其同源抗原结合而被加速、增强和/或驱动。

[0015] 在一些实施例中,提供包含单一多肽链的抗原结合多肽,所述单一多肽链包含两个或更多个可逆地无活性的CD3结合结构域、两个或更多个靶抗原结合结构域、可选择的一个或多个半衰期延长结构域和一个或多个蛋白酶裂解结构域;其中,当所述蛋白酶裂解结构域被蛋白酶裂解时,所述CD3结合结构域变得活跃并与CD3结合。在一个示意性实施例中,在蛋白酶裂解位点被裂解之后,所述CD3结合结构域变得活跃并能与CD3结合。在各种实施例中,所述CD3结合结构域在所述蛋白酶裂解位点裂解后变得活跃,并通过靶抗原结合结构域与靶抗原结合。在一些实施例中,与CD3结合会活化细胞,所述T细胞再破坏患病(例如癌性)细胞。

[0016] 在一个示意性实施例中,本发明的多肽构建体包括scFv,所述scFv包含选择性地结合CD3的结合结构域。所述CD3结合结构域包括能够选择性地结合CD3的V_H或V_L。此V_H或V_L分别与V_L或V_H配对。

[0017] 本文中通过参考条件性CD3结合多肽来说明本发明的多肽,所述条件性CD3结合多肽包含scFv,所述scFv合并CD3结合结构域和蛋白酶裂解位点,当被蛋白酶裂解时,所述蛋白酶裂解位点的无活性V_L或V_H分别与其成对的活性V_H或V_L分开,活化所述CD3结合结构域并允许其与CD3结合。代表性scFv包含经由多肽连接子连接的V_H结构域和V_L结构域,所述多肽连接子包含蛋白酶裂解位点。所述CD3结合结构域可逆地无活性,因此,其基本上无法与CD3结合,直到所述蛋白酶裂解位点被蛋白酶裂解。能够裂解所述蛋白酶裂解位点的代表性蛋白酶为由癌细胞表达或局限在所述肿瘤微环境中的蛋白酶。在一个示意性实施例中,本发明的多肽进一步包含至少一个靶抗原结合位点。代表性靶抗原为在癌细胞表面上发现的抗原,例如EGFR。

[0018] 在一些实施例中,所述蛋白酶裂解结构域在靶抗原结合结构域与靶抗原结合之前被裂解。在一些实施例中,所述蛋白酶裂解结构域在靶抗原结合结构域与靶抗原结合之后被裂解。在一些实施例中,所述多肽包括两个或更多个靶抗原结合结构域。所述两个或更多个抗原结合结构域具有相同或不同的多肽序列。在各种实施例中,所述两个或更多个抗原结合结构域具有相同或不同的多肽序列并且结合相同的靶抗原。在一个示意性实施例中,所述两个或更多个抗原结合结构域的多肽序列不同并且所述两个或更多个结构域结合相同的靶抗原或不同的靶抗原。在一些实施例中,所述两个或更多个靶抗原结合结构域各自结合在相同细胞上的具有不同序列或结构的靶抗原。在一个示意性实施例中,所述两个或更多个靶抗原结合结构域各自结合在各两个或更多个细胞上的具有不同序列的抗原。在各种实施例中,所述两个或更多个抗原结合结构域各自结合在各两个或更多个细胞上的具有相同序列或不同序列的抗原。

[0019] 本文描述条件性结合抗原的结合多肽、其药物组合物和用于制造所述抗原结合多肽的核酸、重组表达载体和宿主细胞,以及使用本发明的抗原结合多肽来治疗疾病、失调或病症的方法。

[0020] 从下文的详细描述中,本发明的其它目的、实施例和优点是显而易见的。

附图说明

[0021] 本发明的新颖特性具体阐述于所附的权利要求书中。通过参考下文具体实施方式,阐述采用本发明的原理的说明性实施例,将能够更充分地理解本发明的特性和优点,附图如下:

[0022] 第1A图显示瞬时表达的Prodent 1到4的SDS-PAGE分布。

[0023] 第1B图显示透析后反算的Pro1-4表达水平。

[0024] 第2A图显示经过纯化的蛋白质的分析性尺寸排阻色谱。

[0025] 第2B图显示经过纯化的蛋白质的分析性尺寸排阻色谱。

[0026] 第2C图显示经过纯化的蛋白质的分析性尺寸排阻色谱。

[0027] 第2D图显示经过纯化的蛋白质的分析性尺寸排阻色谱。

[0028] 第3图显示Pro5:Prodent平台2。

[0029] 第4图显示Pro6和Pro7:双功能伙伴。第4图证实将EK裂解位点插入抗CD3scFv中的V_H或V_L的CDR2中会终止CD3结合和活性。

[0030] 第5图显示Pro8:阳性对照。第5图证实在scFv连接子中插入EK位点不会干扰scFv

折叠和CD3结合。

[0031] 第6图显示Prodent 5到8-在Expi293中的瞬时表达。

[0032] 第7图证明经过纯化的Prodent 5到8在SEC上显示出单体分布的数据。第7A图显示Pro5-G8:(I2ci)×2:D12::His6。

[0033] 第7图证明经过纯化的Prodent 5到8在SEC上显示出单体分布的数据。第7B图显示Pro6-G8(sdAb):I2Ci::His6。

[0034] 第7图显示经过纯化的Prodent 5到8在SEC上显示出单体分布。第7C图显示Pro7-I2Ci:D12(sdAb)::His6。

[0035] 第7图证明经过纯化的Prodent 5到8在SEC上显示出单体分布的数据。第7D图显示Pro8-G8(sdAb):I2Cflag::His6。

[0036] 第8图显示在SDS-PAGE上的经过Ni-excel纯化的平台2蛋白。

[0037] 第9图显示四种类型的结合/活性分析。

[0038] 第10A图显示平台2Prodent与hEGFR结合。第10A图显示Prodent与EGFR结合-ELISA(rhEGFR-Fc,抗His-HRP检测)。

[0039] 第10B图显示平台2Prodent与hEGFR结合。第10B图显示Prodent与EGFR结合-FACS OVCAR8抗His FITC检测。

[0040] 第11A图显示无活性的平台2Prodent不与CD3结合。第11A图显示Prodent与CD3结合-ELISA(cyCD3-Flag-Fc,抗His-HRP检测)。

[0041] 第11B图显示无活性的平台2Prodent不与CD3结合。第11A图显示Prodent与CD3结合-使用FACS jurkat抗His-FITC检测来测定。

[0042] 第12图显示Pro6和Pro7:通过蛋白酶裂解活化CD3结合作用。

[0043] 第13图显示通过重组肠激酶裂解Prodent。

[0044] 第14A图显示用于测试在EK裂解后,Prodent与CD3结合作用的ELISA分析格式(夹心ELISA)。

[0045] 第14B图显示在EK裂解后,Pro6不与CD3结合(夹心ELISA)。第14B图显示Pro6与rEGFR::huFC结合,以生物素-CD3::Flag::huFC,SAV-HRP检测。

[0046] 第14C图显示在EK裂解后,Pro7不与CD3结合(夹心ELISA)。第14C图显示Pro7与rEGFR::huFC结合,以生物素-cyCD3::Flag::huFC,SAV-HRP检测。

[0047] 第14D图显示在EK裂解后,Pro6+Pro7协同与CD3结合(夹心ELISA)。第14D图显示Pro6+Pro7与rEGFR::huFC结合,以生物素-cyCD3::Flag::huFC,SAV-HRP检测。

[0048] 第14E图显示在EK裂解后,Pro6+Pro7协同与CD3结合(夹心ELISA)。

[0049] 第15A图显示FACS分析格式,其测试在EK裂解后,与EGFR表达细胞的表面上的CD3结合(夹心FACS)。

[0050] 第15B图显示在EK裂解后,Pro6不与CD3结合(夹心FACS)。第15B图显示EK分解与OVCAR-8结合的Pro6,以A488-cyCD3::Flag::hFC检测。

[0051] 第15C图显示在EK裂解后,Pro7不与CD3结合(夹心FACS)。第15C图显示EK分解与OVCAR-8结合的Pro7,以A488-cyCD3::Flag::hFC检测。

[0052] 第15D图显示在EK裂解后,Pro6+Pro7协同与CD3结合(夹心FACS)。第15D图显示EK分解与OVCAR-8结合的Pro6+Pro7,以A488-cyCD3::Flag::huFC检测。

- [0053] 第15E图显示在EK裂解后,Pro6+Pro7协同与CD3结合(夹心FACS)。
- [0054] 第16图显示在通过EK进行蛋白水解裂解后,Pro5与CD3的结合作用被活化。第16图显示EK分解与OVCAR-8结合的Pro5,以A488-cyCD3::Flag::huFC检测。
- [0055] 第17图显示Pro8:对照分子。第17图证实在scFv连接子中插入EK位点不会干扰scFv折叠和CD3结合作用。
- [0056] 第18A图显示Pro8:对照分子。第18A图证实在scFv连接子中插入EK位点不会干扰scFv折叠和CD3结合作用。第18A图显示Pro8与rhEGFR::hFC结合,以生物素-cyCD3::Flag::huFC, SAV-HRP检测。
- [0057] 第18B图显示Pro8:对照分子。第18B图证实在scFv连接子中插入EK位点不会干扰scFv折叠和CD3结合作用。第18B图显示EK分解与OVCAR-8结合的Pro8,以A488-cyCD3::flag::hFC检测。
- [0058] 第18C图显示Pro8:阳性对照分子。
- [0059] 第19图显示EK裂解与Pro6+Pro7协同活化T细胞杀死EGFR+靶细胞,但与Pro8协同减少杀死EGFR+靶细胞。第19A图显示Pro6的结果。
- [0060] 第19图显示EK裂解与Pro6+Pro7协同活化T细胞杀死EGFR+靶细胞,但与Pro8协同减少杀死EGFR+靶细胞。第19B图显示Pro7的结果。
- [0061] 第19图显示EK裂解与Pro6+Pro7协同活化T细胞杀死EGFR+靶细胞,但与Pro8协同减少杀死EGFR+靶细胞。第19C图显示Pro6+Pro7的结果。
- [0062] 第19图显示EK裂解与Pro6+Pro7协同活化T细胞杀死EGFR+靶细胞,但与Pro8协同减少杀死EGFR+靶细胞。第19D图显示Pro8的结果。
- [0063] 第20A图显示Pro25。
- [0064] 第20B图显示Pro26。
- [0065] 第20C图显示Pro27。
- [0066] 第21图显示活性CD3结合结构域的产生取决于两个臂结合目标。GFP不表达在OvCar8细胞表面。第21A图显示Pro6+Pro7与rhEGFR结合,以b-cyCD3::Flag::hFC, SAV-HRP检测。
- [0067] 第21图显示活性CD3结合结构域的产生取决于两个臂结合目标。GFP不表达在OvCar8细胞表面。第21B图显示Pro6+Pro9与rhEGFR结合,以b-cyCD4::Flag::hFC, SAV-HRP检测。
- [0068] 第21图显示活性CD3结合结构域的产生取决于两个臂结合目标。GFP不表达在OvCar8细胞表面。第21C图显示Pro6+Pro26与rhEGFR结合,以b-cyCD3::Flag::hFC, SAV-HRP检测。
- [0069] 第21图显示活性CD3结合结构域的产生取决于两个臂结合目标。GFP不表达在OvCar8细胞表面。第21D图显示Pro6+Pro27与rhEGFR结合,以b-cyCD3::Flag::hFC, SAV-HRP检测。
- [0070] 第21图显示活性CD3结合结构域的产生取决于两个臂结合目标。GFP不表达在OvCar8细胞表面。第21E图显示Pro7+Pro25与rhEGFR结合,以b-cyCD3::Flag::hFC, SAV-HRP检测。
- [0071] 第21图显示活性CD3结合结构域的产生取决于两个臂结合目标。GFP不表达在

OvCar8细胞表面。第21F图显示Pro9+Pro25与rhEGFR结合,以b-cyCD3::Flag::huFC,SAV-HRP检测。

[0072] 第22图显示具有间质蛋白酶(matriptase) (M) 裂解位点的Pro8和在亲本Pro8裂解后,裂解的Pro8与癌细胞交互作用的产物。第22图证明所述 α CD3scFv连接子可经过修饰以并入不同长度和蛋白酶特异性。

[0073] 第23A图显示在EK裂解之前和之后,来自Pro8与rhEGFR::hFC结合的夹心ELISA的数据,其以生物素-cyCD3E::Flag::huFC,SAV-HRP检测。

[0074] 第23B图显示在间质蛋白酶裂解之前和之后,来自Pro8MS (14aa连接子) 与rhEGFR::hFC结合的夹心ELISA的数据,其以生物素-cyCD3E::Flag::huFC,SAV-HRP检测。

[0075] 第23C图显示在ST14裂解之前和之后,来自Pro8ML (24aa连接子) 与rhEGFR::hFC结合的夹心ELISA的数据,其以生物素-cyCD3E::Flag::huFC,SAV-HRP检测。

[0076] 第24A图显示通过EK裂解之前和之后,来自Pro8与OVCAR8结合的FACS数据,其以AF488-cyCD3::Flag::hFC检测。

[0077] 第24B图显示通过ST14裂解之前和之后,来自Pro8MS (14aa连接子) 与OVCAR8结合的FACS数据,其以AF488-cyCD3::Flag::hFC检测。

[0078] 第24C图显示通过ST14裂解之前和之后,来自Pro8ML (24aa连接子) 与OVCAR8结合的FACS数据,其以AF488-cyCD3::Flag::hFC检测。

[0079] 第25图显示另外的代表性Prodent示意图。第25图显示具充分活性的 α CD3 scFv I2C (Pro8,Pro11) 和OKT3 (Pro15) 。

[0080] 第26图显示代表性的不完全 α CD3 Prodent组合,缺乏活性CD3结合位点。

[0081] 第27A图显示Pro6+Pro10与rhEGFR结合,以生物素-cyCD3::Flag::FC,SAV-HRP检测。

[0082] 第27B图显示Pro6+Pro14与rhEGFR结合,以生物素-cyCD3::Flag::FC,SAV-HRP检测。

[0083] 第27C图显示Pro7+Pro9与rhEGFR结合,以生物素-cyCD3::Flag::FC,SAV-HRP检测。

[0084] 第27D图显示Pro7+Pro12与rhEGFR结合,以生物素-cyCD3::Flag::FC,SAV-HRP检测。

[0085] 第27E图显示Pro9+Pro12与rhEGFR结合,以生物素-cyCD3::Flag::FC,SAV-HRP检测。

[0086] 第27F图显示Pro10+Pro14与rhEGFR结合,以生物素-cyCD3::Flag::FC,SAV-HRP检测。

[0087] 第28图显示在N端到C端靶向结构域位置中具有变化的代表性Pro结构和Pro结构域取向对CD3结合的影响。

[0088] 第29图显示C端相对于N端目标结合结构域具有类似活性。第29A图显示来自Pro6+Pro9与OVCAR8结合的FACS数据。

[0089] 第29图显示C端相对于N端目标结合结构域具有类似活性。第29B图显示EK分解Pro6+Pro7与OVCAR-8的结合,以AF488-cyCD3::Flag::huFC检测。

[0090] 第30图显示用于探测单特异性结构域相对于双靶向结构域的效果的代表性Pro结

构。

[0091] 第31图.以必须结合单独的靶分子的sdAb进行双重靶向是可行的。第31A图显示Pro9+Pro14与OVCAR8结合的FACS数据,以AF488-cyCD3检测。

[0092] 第31图.以必须结合单独的靶分子的sdAb进行双重靶向是可行的。第31B图显示EK分解Pro6+Pro7与OVCAR-8的结合,以AF488-cyCD3::Flag::huFC检测。

[0093] 第32A图显示具有互补性 α CD3结构域的代表性Prodent组合。

[0094] 第32B图显示具有互补性 α CD3结构域的代表性Prodent组合,即Pro6+Pro9(单-顺式+双重-反式分子靶向)。

[0095] 第32C图显示具有互补性 α CD3结构域的代表性Prodent组合,即Pro9+Pro14(双重分子-仅反式靶向)。

[0096] 第33A图显示Pro6+Pro7与OVCAR8结合的FACS数据,以AF488-cyCD3检测。

[0097] 第33B图显示Pro9+Pro10与OVCAR8结合的FACS数据,以AF488-cyCD3检测。

[0098] 第33C图显示Pro12+Pro14与OVCAR8结合的FACS数据,以AF488-cyCD3检测。

[0099] 第33D图显示Pro7+Pro10与OVCAR8结合的FACS数据,以AF488-cyCD3检测。

[0100] 第33E图显示Pro6+Pro9与OVCAR8结合的FACS数据,以AF488-cyCD3检测。

[0101] 第34A图显示来自Pro6+Pro12与OVCAR8结合的夹心FACS(仅有反式结合)的数据,以AF488-cyCD3检测。

[0102] 第34B图显示来自Pro7+Pro14与OVCAR8结合的夹心FACS(仅有反式结合)的数据,以AF488-cyCD3检测。

[0103] 第34C图显示来自Pro9+Pro14与OVCAR8结合的夹心FACS(仅有反式结合)的数据,以AF488-cyCD3检测。

[0104] 第34D图显示来自Pro10+Pro12与OVCAR8结合的夹心FACS(仅有反式结合)的数据,以AF488-cyCD3检测。

[0105] 第35A图显示TDCC:顺式+反式与仅有反式的活性相似。第35A图显示TDCC, OVCAR8LucB与裂解的和未裂解的Prodent顺式结合。(Pro6+Pro7、Pro6+Pro9、Pro7+Pro10)。

[0106] 第35B图显示TDCC:顺式+反式与仅有反式的活性相似。第35B图显示TDCC, OVCAR8LucB与裂解的和未裂解的Prodent反式结合(Pro9+Pro14;Pro6+Pro18)。

[0107] 第36图显示TDCC-阳性对照Prodent在EK裂解后失去活性:以裂解的和未裂解的Prodent 8、11、15杀死OVCAR8LucB细胞的TDCC数据。

[0108] 第37图显示EK-His6在OVCAR8-lux细胞单峰中的稳定表达的染色为在未转染的细胞上的EK表达,而延长的曲线为以EK表达载体稳定转染的细胞上的EK表达的染色。

[0109] 第38图显示表达EK的OVCAR8细胞系(高、中和低度表达)。

[0110] 第39图显示由表达EK的OVCAR8细胞以剂量依赖方式活化Prodent。第39A图显示使用经过标记的cyCD3 ϵ 检测未裂解的Pro6+Pro9与表达EK的OVCAR-8细胞系的结合。

[0111] 第39图显示由表达EK的OVCAR8细胞以剂量依赖方式活化Prodent。第39B图显示使用经过荧光标记的cyCD3 ϵ 检测未裂解的Pro6+Pro9与表达EK的OVCAR-8细胞系结合的FACS数据。

[0112] 第40A图显示通过具有和不具有EK的Pro6+Pro9杀死OVCAR8细胞的TDCC数据。

[0113] 第40B图显示具有和不具有EK的Pro6+Pro9杀死EK表达OVCAR8细胞系的TDCC数据。

[0114] 第41A图显示用于鉴定 α CD3 V_H 和 V_L 中的去活化CDR变化的结构模型: α CD3e scFv的同源性建模显示使用5fxc.pdb的同源性模型Swiss-Model;scFv-SM3,69%同一性GMQE 0.77QMEAN-1.11。

[0115] 第41B图显示用于鉴定 α CD3 V_H 和 V_L 中的去活化CDR变化的结构模型: α CD3e scFv的同源建模显示与1xiw.pdb,人CD3-e/d二聚体scFv比对的同源性模型。

[0116] 第42A图显示用于CD3e结合(V_H 结构域)的代表性序列和用于突变以形成与最接近的人种序列对准的无活性变体的区域。

[0117] 第42B图显示在本发明的示意性Prodent中用于无活性变体CD3e结合(V_H 结构域)的代表性序列。

[0118] 第43图显示用于CD3e结合(V_L 结构域)和用于突变以形成无活性变体的区域,和用于形成与最接近的人种序列对准的无活性变体的示意性氨基酸位点的代表性序列。

[0119] 第44A图显示在用于结合的octet分析中所使用的示意性Prodent。

[0120] 第44B图显示所选定的Prodent的结合活性-octet分析。

[0121] 第45A图显示Pro23-血清裂解成两半,证明Pro23对通过EK和凝血酶进行的裂解敏感。

[0122] 第45B图显示Pro24-肿瘤裂解成两半,显示EK活性蛋白酶裂解位点。

[0123] 第46图显示来自SDS PAGE的数据,其显示通过EK (2)、通过EK和凝血酶 (3) 和仅有凝血酶 (4) 造成的Pro23 (1) 裂解;通过EK (6) 造成的Pro24 (5) 裂解。

[0124] 第47A图显示通过裂解的和未裂解的Pro23杀死OVCAR8的TDCC数据。

[0125] 第47B图显示通过裂解的和未裂解的Pro24杀死OVCAR8的TDCC数据。

[0126] 第48图提供用于本发明的多肽构建体的代表性scFv和结构域连接子的序列和这些连接子裂解的数据。第48A图显示通过1nM MMP9、Dabcy1-Edans底物的MMP9肽底物的裂解。第48B图显示小鼠血清中MMP9底物的裂解。第48C图显示人血清中MMP9底物的裂解。第48D图显示猕猴血清中的MMP9底物的裂解。

[0127] 第49图用于本发明的多肽构建体中的代表性连接子的各种示意性多肽序列的列表。第49A图显示通过Meprin 1a 3nM所进行的肽底物的裂解)。第49B图显示通过Meprin 1b 3nM所进行的肽底物的裂解)。第49C图显示通过Meprin 1a 3nM所进行的肽底物的裂解)。第49D图显示人血清中的肽底物的裂解。第49E图显示小鼠血清中的肽底物的裂解。第49F图显示猕猴血清中的肽底物的裂解。

[0128] 第50图用于本发明的多肽构建体中的代表性连接子的各种示意性多肽序列的列表。第50A图显示通过间质蛋白酶ST14所进行的肽底物的裂解。第50B图显示小鼠血清中的肽底物的裂解。第50C图显示人血清中的肽底物的裂解。第50D图显示猕猴血清中的肽底物的裂解。

[0129] 第51图显示用于本发明的多肽构建体中的被血液蛋白酶裂解的示意性连接子序列。第51A图显示被凝血酶裂解的示意性肽底物。第51B图显示被弗林蛋白酶(furin)裂解的肽底物。第51C图显示被嗜中性粒细胞弹性蛋白酶裂解的肽底物。

[0130] 第52图显示用于本发明的多肽构建体中的被血清裂解的示意性连接子序列。第52A图显示人血清中的肽底物的裂解。第52B图显示小鼠血清中的肽底物的裂解。第52C图显示猕猴血清中的肽底物的裂解。

[0131] 第53图显示本发明的示意性多肽构建体的组成部分的布置弹性。

[0132] 第53A图显示第一样式,从N到C端读取,其中第一靶抗原结合结构域(α -T1)通过结构域连接子与第一CD3 V_L结合结构域结合,所述第一CD3 V_L结合结构域反过来通过可裂解的结构域连接子(CL1)与第一无活性CD3 V_Hi结合结构域结合。CL1还与第一半衰期延长结构域(HEd)结合,所述第一半衰期延长结构域通过结构域连接子与第二靶抗原结合结构域(α -T2)结合,所述 α -T2本身与第二CD3 V_H结合结构域结合。所述第二CD3 V_H结合结构域通过可裂解的结构域连接子(CL2)与无活性的第二CD3 V_Li结合结构域(V_Li)结合,所述无活性的第二CD3 V_L结合结构域还与第二半衰期延长结构域结合。所述多肽的C-端任选地包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸的阻断基团,例如His6。

[0133] 第53B图显示第二样式,从N到C端读取,其中第二靶抗原结合结构域(α -T2)与第一CD3 V_L结合结构域结合,所述第一CD3 V_L结合结构域反过来通过可裂解的结构域连接子(CL1)与第一无活性CD3 V_Hi结合结构域结合。CD3 V_Hi还与第一半衰期延长结构域结合,所述第一半衰期延长结构域通过结构域连接子与第一靶抗原结合结构域(α -T1)结合,所述第一靶抗原结合结构域本身与第二CD3 V_H结合结构域结合。所述第二CD3 V_H结合结构域通过可裂解的连接子(CL2)与无活性的第二CD3 V_Li结合结构域(V_Li)结合,所述第二CD3 V_L结合结构域还与第二半衰期延长结构域结合。所述多肽的C-端任选地包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸的阻断基团,例如His6。

[0134] 第53C图显示第三样式,从N到C端读取,其中第一靶抗原结合结构域(α -T1)与第一CD3 V_H结合结构域结合,所述第一CD3 V_H结合结构域反过来通过可裂解的结构域连接子(CL1)与第一无活性CD3 V_Li结合结构域结合。CD3V_Li还与第一半衰期延长结构域结合,所述第一半衰期延长结构域通过结构域连接子与第二靶抗原结合结构域(α -T2)结合,所述第二靶抗原结合结构域本身与第二CD3 V_L结合结构域结合。所述第二CD3 V_L结合结构域通过可裂解的连接子(CL2)与无活性的第二CD3 V_Hi结合结构域(V_Hi)结合,所述无活性的第二CD3 V_H结合结构域还与第二半衰期延长结构域结合。所述多肽的C-端任选地包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸的阻断基团,例如His6。

[0135] 第53D图显示第四样式,从N到C端读取,其中第二靶抗原结合结构域(α -T2)与第一CD3 V_H结合结构域结合,所述第一CD3 V_H结合结构域反过来通过可裂解的结构域连接子(CL1)与第一无活性CD3 V_Li结合结构域结合。CD3V_Li还与第一半衰期延长结构域结合,所述第一半衰期延长结构域通过结构域连接子与第一靶抗原结合(α -T1),所述 α -T1本身与第二CD3 V_L结合结构域结合。所述第二CD3 V_H结合结构域通过可裂解的连接子(CL2)与无活性的第二CD3 V_Hi结合结构域(V_Hi)结合,所述无活性的第二CD3 V_H结合结构域还与第二半衰期延长结构域结合。所述多肽的C-端任选地包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸的阻断基团,例如His6。

[0136] 第53E图显示第五样式,从N到C端读取,其中第一半衰期延长结构域连接无活性的第一CD3 V_H结合结构域(V_Hi),并且所述无活性的第一CD3 V_H结合结构域通过第一可裂解的连接子(CL1)与第一CD3 V_L结合结构域结合,所述第一CD3 V_L结合结构域连接第一靶抗原结合结构域(α -T1)。所述第一靶抗原结合结构域通过结构域连接子连接第二半衰期延长结构域,在第二半衰期延长结构域与第二CD3 V_Li结合结构域(V_Li)结合,所述第二CD3 V_L结合结构域(V_Li)无活性并且通过第二可裂解的结构域连接子(CL2)与第二CD3 V_H结构域结合,所

述第二CD3 V_H结构域本身与第二靶抗原结合结构域(α -T2)结合。所述多肽的C-端任选地包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸的阻断基团,例如His6。

[0137] 第53F图显示本发明的多肽构建体的示意性样式,从N到C端读取,其中第一半衰期延长结构域连接无活性的第一CD3 V_H结合结构域(V_{Hi}),所述无活性的第一CD3 V_H结合结构域通过第一可裂解的连接子(CL1)与第一CD3 V_L结合结构域结合,所述第一CD3 V_L结合结构域连接第二靶抗原结合结构域(α -T2)。所述第二靶抗原结合结构域通过结构域连接子连接第二半衰期延长结构域,所述第二半衰期延长结构域连接无活性的第二CD3 V_L结合结构域(V_{Li}),所述无活性的第二CD3 V_L结合结构域通过第二可裂解的结构域连接子(CL2)与第二CD3 V_H结构域结合,所述第二CD3 V_H结构域本身与第一靶抗原结合结构域(α -T1)结合。所述多肽的C-端任选地包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸的阻断基团,例如His6。

[0138] 第53G图显示本发明的多肽构建体的第七示意性样式,从N到C端读取,其中第一半衰期延长结构域连接无活性的第一CD3 V_L结合结构域(V_{Li}),所述无活性的第一CD3 V_L结合结构域通过第一可裂解的连接子(CL1)连接第一CD3V_H结合结构域,所述第一CD3 V_H结合结构域连接第一靶抗原结合结构域(α -T1)。所述第一靶抗原结合结构域通过结构域连接子连接第二半衰期延长结构域,所述第二半衰期延长结构域连接无活性的CD3 V_H结合结构域(V_{Hi}),并且所述无活性的CD3 V_H结合结构域通过第二可裂解的连接子(CL2)与第二CD3V_L结合结构域结合,所述第二CD3 V_L结构域本身与第二靶抗原结合结构域(α -T2)结合。所述多肽的C-端任选地包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸的阻断基团,例如His6。

[0139] 第53H图显示本发明的多肽构建体的第八示意性样式,从N到C端读取,其中第一半衰期延长结构域连接无活性的第一CD3 V_L结合结构域(V_{Li}),所述无活性的第一CD3 V_L结合结构域通过第一可裂解的连接子(CL1)连接第一CD3V_H结合结构域,所述第一CD3 V_H结合结构域连接第二靶抗原结合结构域(α -T2)。所述第二靶抗原结合结构域通过结构域连接子连接第二半衰期延长结构域,所述第二半衰期延长结构域与无活性的第二CD3 V_H结合结构域(V_{Hi})结合,并且所述无活性的第二CD3 V_H结合结构域通过第二可裂解的连接子(CL2)与第二CD3 V_L结构域结合,所述第二CD3 V_L结构域本身与第一靶抗原结合结构域(α -T1)结合。所述多肽的C-端任选地包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸的阻断基团,例如His6。

[0140] 第53I图显示本发明的多肽缀合物的另一示意性样式,从N到C端读取,其中第一靶抗原结合结构域(α -T1)连接第一CD3 V_L结构域,所述第一CD3 V_L结构域通过第一可裂解的连接子(CL1)连接无活性的第一CD3 V_H结构域(V_{Hi}),并且所述无活性的第一CD3 V_H结构域与第一半衰期延长结构域结合,所述第一半衰期延长结构域通过结构域连接子连接第二半衰期延长结构域。所述第二半衰期延长结构域连接无活性的第二CD3 V_L结构域(V_{Li}),并且所述无活性的第二CD3 V_L结构域通过第二可裂解的连接子(CL2)连接第二CD3 V_H结构域,所述第二CD3 V_H结构域连接第二靶抗原结合结构域(α -T2)。所述多肽的C-端任选地包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸的阻断基团,例如His6。

[0141] 第53J图显示本发明的多肽缀合物的另一示意性样式,从N到C端读取,其中第二靶抗原结合结构域(α -T2)连接第一CD3 V_L结构域,所述第一CD3 V_L结构域通过第一可裂解的连接子(CL1)连接无活性的第一CD3 V_H结构域(V_{Hi}),所述无活性的第一CD3 V_H结构域与第

一半衰期延长结构域结合,所述第一半衰期延长结构域通过结构域连接子连接第二半衰期延长结构域。所述第二半衰期延长结构域连接scFv和无活性的第二CD3_{V_L}结构域(V_{Li}),并且所述无活性的第二CD3_{V_L}结构域通过第二可裂解的连接子(CL2)连接第二CD3_{V_H}结构域,所述第二CD3_{V_H}结构域连接第一靶抗原结合结构域(α -T1)。所述多肽的C-端任选地包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸的阻断基团,例如His6。

[0142] 第53K图显示本发明的多肽缀合物的另一示意性样式,从N到C端读取,其中第一靶抗原结合结构域(α -T1)连接第一CD3_{V_H}结构域,所述第一CD3_{V_H}结构域通过第一可裂解的连接子(CL1)连接无活性的第一CD3_{V_L}结构域(V_{Li}),所述无活性的第一CD3_{V_L}结构域与第一半衰期延长结构域结合,所述第一半衰期延长结构域通过结构域连接子连接第二半衰期延长结构域。所述第二半衰期延长结构域连接无活性的第二CD3_{V_H}结构域(V_{Hi}),所述无活性的第二CD3_{V_H}结构域通过第二可裂解的连接子(CL2)连接第二CD3_{V_L}结构域,所述第二CD3_{V_L}结构域连接第二靶抗原结合结构域(α -T2)。所述多肽的C-端任选地包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸的阻断基团,例如His6。

[0143] 第53L图显示本发明的多肽缀合物的另一示意性样式,从N到C端读取,其中第二靶抗原结合结构域(α -T2)连接第一CD3_{V_H}结构域,所述第一CD3_{V_H}结构域通过第一可裂解的连接子(CL1)连接无活性的第一CD3_{V_L}结构域(V_{Li}),所述无活性的第一CD3_{V_L}结构域与第一半衰期延长结构域结合,所述第一半衰期延长结构域通过结构域连接子连接第二半衰期延长结构域。所述第二半衰期延长结构域连接无活性的第二CD3_{V_H}结构域(V_{Hi}),并且所述无活性的第二CD3_{V_H}结构域通过第二可裂解的连接子(CL2)连接第二CD3_{V_L}结构域,所述第二CD3_{V_L}结构域连接第一靶抗原结合结构域(α -T1)。所述多肽的C-端任选地包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸的阻断基团,例如His6。

[0144] 第53M图显示本发明的多肽缀合物的另一示意性样式,从N到C端读取,其中第一半衰期延长结构域连接无活性的第一CD3_{V_H}结构域(V_{Hi}),所述无活性的第一CD3_{V_H}结构域通过第一可裂解的连接子(CL1)连接第一CD3_{V_L}结构域。所述CD3_{V_L}结构域连接第一靶抗原结合结构域(α -T1),所述第一靶抗原结合结构域经由结构域连接子连接第二靶抗原结合结构域(α -T2),所述第二靶抗原结合结构域(α -T2)连接第二CD3_{V_H}结构域,所述第二CD3_{V_H}结构域通过第二可裂解的结构域连接子(CL2)连接无活性的第二CD3_{V_L}结构域(V_{Li})并且所述第二CD3_{V_L}结构域连接第二半衰期延长结构域。所述多肽的C-端任选地包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸的阻断基团,例如His6。

[0145] 第53N图显示本发明的多肽缀合物的另一示意性样式,从N到C端读取,其中第一半衰期延长结构域连接无活性的第一CD3_{V_H}结构域(V_{Hi}),所述第一CD3_{V_H}结构域通过第一可裂解的连接子(CL1)连接第一CD3_{V_L}结构域。所述CD3_{V_L}结构域连接第二靶抗原结合结构域(α -T2),所述第二靶抗原结合结构域经由结构域连接子连接第一靶抗原结合结构域(α -T1),所述第一靶抗原结合结构域(α -T1)连接第二CD3_{V_H}结构域,所述第二CD3_{V_H}结构域通过第二可裂解的结构域连接子(CL2)连接无活性的第二CD3_{V_L}结构域(V_{Li}),并且所述无活性的第二CD3_{V_L}结构域连接第二半衰期延长结构域。所述多肽的C-端任选地包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸的阻断基团,例如His6。

[0146] 第53O图显示本发明的多肽缀合物的另一示意性样式,从N到C端读取,其中第一半衰期延长结构域连接无活性的第一CD3_{V_L}结构域(V_{Li}),所述第一CD3_{V_L}结构域通过第一可

裂解的连接子 (CL1) 连接第一CD3 V_H结构域。所述CD3 V_H结构域连接第一靶抗原结合结构域 (α-T1), 所述第一靶抗原结合结构域经由结构域连接子连接第二靶抗原结合结构域 (α-T2), 所述第二靶抗原结合结构域连接第二CD3 V_L结构域, 所述第二CD3 V_L结构域连接无活性的第二CD3V_H结构域 (V_{Hi}), 并且所述无活性的第二CD3 V_H结构域连接第二半衰期延长结构域。所述多肽的C-端任选地包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸的阻断基团, 例如His6。

[0147] 第53P图显示本发明的多肽缀合物的另一示意性样式, 从N到C端读取, 其中第一半衰期延长结构域连接无活性的第一CD3 V_L结构域 (V_{Li}), 所述第一CD3 V_L结构域通过第一可裂解的连接子 (CL1) 连接第一CD3 V_H结构域。所述第一CD3 V_H结构域连接第二靶抗原结合结构域 (α-T2), 所述第二靶抗原结合结构域经由结构域连接子连接第一靶抗原结合结构域 (α-T1), 所述第一靶抗原结合结构域 (α-T1) 连接第二CD3 V_L结构域, 所述第二CD3 V_L结构域经由第二可裂解的连接子 (CL2) 连接无活性的第二CD3 V_H结构域 (V_{Hi}) 并且所述无活性的第二CD3 V_H结构域与第二半衰期延长结构域结合。所述多肽的C-端任选地包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸的阻断基团, 例如His6。

[0148] 第54图提供用于本发明的示意性多肽构建体的代表性核酸和多肽序列。用于本发明的示意性多肽在C-端被阻断, 因此, 显示出具有His_xC端标签的序列可与这些标签、这些标签的较短或更长的版本一起使用或没有标签。

[0149] 第55图提供本发明的各种多肽构建体的SEQ ID NO和这些构建体的缩写命名的用语索引。

[0150] 第56图提供用于本发明的实施例中的连接子的示意性连接子序列。

具体实施方式

[0151] 引言

[0152] 本文描述可有条件地活化的抗原结合多肽。本发明的示意性多肽包括至少一个靶抗原结合结构域、至少一个针对CD3的scFv (所述scFv具有至少一个V_H/V_L对, 其中V_H和V_L至少一个在特异性结合CD3方面无活性)、与所述多肽构建体组分共价结合的各种scFv和结构域连接子、在一个或多个结构域和/或scFv连接子内的可裂解的位点, 和任选地一个或多个半衰期延长结构域。一种示意性的可裂解位点可被位于或集中在肿瘤微环境中的血清酶 (例如酯酶) 或降解酶 (例如蛋白酶) 裂解, 所述肿瘤为所述多肽构建体所针对的肿瘤。一种示意性的降解酶为所述肿瘤所表达或在所述肿瘤微环境内的蛋白酶。当所述构建体的连接子中至少一个可裂解的位点裂解时, 所述scFv对的无活性成员从构建体去除, 而所述scFv对的活性成员与其活性同源物交互作用 (例如V_H¹/V_L¹变成V_H¹; V_{Hi}²/V_L²变为V_L², 而V_H¹和V_L²交互作用形成特异性结合CD3的功能性scFv。所述构建体还通过靶抗原结合结构域特异性结合选定的靶抗原。在一个示意性实施例中, V_H¹和V_L²通过scFv连接子保持接合, 所述scFv连接子进一步将所述靶抗原结合结构域与V_H¹和V_L²连接在一起。本发明的某些多肽构建体还包括一个或多个半衰期延长结构域, 所述一个或多个半衰期延长结构域在所述多肽被施用给需要所述多肽的受试者后增加所述多肽的半衰期。一种示意性半衰期延长结构域为针对循环血浆蛋白 (例如hHSA) 的抗体或抗体片段。所述半衰期延长结构域可包括在多肽序列内, 在其与所述构建体的其余部分之间具有一个或多个可裂解的连接子, 致使所述半衰期

延长结构域一旦实现其目的(例如将所述构建体递送到肿瘤、或在体内完成所期望的循环半衰期),即可从所述构建体裂解。附图提供本发明的多肽构建体的许多示意性基序的结构。

[0153] 具有超过一个 V_H/V_L 对的本发明的多肽构建体以单一物理(scFv)的形式存在。在各种实施例中,本发明的化合物包括单一 V_H/V_L 对。在这些实施例中,所述多肽构建体对通常成对使用,其中所述成对的一个成员包括 V_H/V_{Li} 和另一个 V_{Hi}/V_L ,致使当所述成对的无活性成员裂解时,所述 V_H/V_L 能够配对并与CD3结合。

[0154] 在本发明的多肽构建体的示意性实施例中,所述疾病细胞靶向结构域通过非可裂解的连接子(NCL1和NCL2)连接所述活性抗T细胞结合节段。所述活性和无活性抗T细胞scFv段通过对所述疾病组织微环境敏感的可裂解连接子(CL1和CL2)连接。所述两个半分子或蛋白质区通过另一个可降解的连接子(RL)连接。第53图。

[0155] 在各种实施例中,初始构建体由两个多肽区所组成,所述两个多肽区可在注射入体内后通过在区域连接子(RL)处裂解来分开。所述疾病目标结合结构域提前活化并能结合其目标,从而富集在所述患病细胞的表面上的无活性蛋白质。然后,所述可裂解的连接子在所述疾病组织微环境中被裂解,而所述活性T细胞结合段(其通过所述靶向结构域和非可裂解的连接子与患病细胞结合)可再重新组合以在所述患病细胞的表面上,但不在溶液中创建活性T细胞结合scFv。此用来创建活性T细胞结合scFv的重组作用使T细胞与患病细胞结合并杀死它。所述1到2个半衰期延长结构域在分子到达患病细胞之前延长分子的循环半衰期,并与无活性的抗T细胞结构域(V_{Li} 或 V_{Hi})一起去除来限制所述裂解/活化的分子如果离开患病组织时的半衰期。如果所述区域连接子是在肿瘤中裂解,那么一个半衰期延长结构域是理想的,如果所述区域连接子是在血液中裂解,那么在完整分子中有两个半衰期延长结构域是理想的,从而确保所述两个半分子/蛋白区域具有足够的半衰期来累积在患病细胞上。包含可被肿瘤相关的酶和血液相关的酶裂解的连接子的多肽构建体在本发明的范围内。

[0156] 本发明还提供所述多肽构建体的药物组合物,以及用于制造所述构建体的核酸、重组表达载体和宿主细胞。本发明还提供使用所公开的多肽来预防和/或治疗疾病、病症和失调的方法。

[0157] 定义

[0158] 为了使本发明可被更全面地理解,下文中阐述几个定义。所述定义意在涵盖文法同等项。

[0159] 如本文所使用的“氨基酸”和“氨基酸同一性”意指所述20种天然存在的氨基酸或可存在于特定的、界定的位置处的任何非天然类似物的其中一个。本文中,“蛋白质”意指至少两个共价连接的氨基酸,其包括蛋白质、多肽、寡肽和肽。所述蛋白质可由天然存在的氨基酸和肽键或合成的拟肽结构,即“类似物”(例如类肽)构成(参见Simon等人,《美国国家科学院院刊(PNAS USA)》89(20):9367(1992)),尤其是当LC肽类欲施用给患者时。因此,本文所使用的“氨基酸”或“肽残基”意指天然存在的和合成的氨基酸。例如高苯丙氨酸、瓜氨酸和正亮氨酸为考虑用于本发明目的的氨基酸。“氨基酸”还包括亚氨基酸残基,例如脯氨酸和羟脯氨酸。侧链可为(R)或(S)构型。在优选的实施例中,所述氨基酸为(S)或L-构型。如果使用非天然存在的侧链,那么可使用非氨基酸取代基,以例如防止或延迟在体内降解。

[0160] 本文中的“氨基酸修饰”意指多肽序列中的氨基酸取代、插入和/或缺失,或对化学连接到蛋白质的部分的改变。例如,修饰可为连接蛋白质的已改变的碳水化合物或PEG结构。本文中“氨基酸修饰”是指多肽序列中的氨基酸取代、插入和/或缺失。为了清楚起见,除非另有说明,否则所述氨基酸修饰总是针对由DNA编码的氨基酸,例如所述DNA和RNA中具有密码子的20种氨基酸。本文中优选的氨基酸修饰为取代。

[0161] 本文中,“氨基酸取代”或“取代”意指以不同氨基酸替换亲本多肽序列中的特定位置处的氨基酸。尤其是,在一些实施例中,所述取代是替换成不是所述特定位置处的天然存在的氨基酸(不是所述生物体内或任何生物体内的天然存在的氨基酸)。例如取代E272Y是指一种变体多肽(在此情况下为Fc变体),其中在位置272的谷氨酸被酪氨酸替换。为了清楚起见,经过工程处理以改变核酸编码序列,但不改变起始氨基酸(例如将CGG(编码精氨酸)换成CGA(仍编码精氨酸)以增加宿主生物体表达水平)的蛋白质并非“氨基酸取代”;即,尽管创建新基因来编码所述相同蛋白质,但是如果所述蛋白质在起始的特定位置上具有相同氨基酸,那么其并非氨基酸取代。

[0162] 本文所使用的“氨基酸插入”或“插入”意指在亲本多肽序列的特定位置添加氨基酸序列。例如-233E或233E表示在位置233之后和位置234之前插入谷氨酸。此外,-233ADE或A233ADE表示在233位置之后和234位置之前插入AlaAspGlu。

[0163] 如本文所使用的“氨基酸缺失”或“缺失”意指从亲本多肽序列的特定位置处除去氨基酸序列。例如E233-或E233#、E233()或E233del表示缺失是在位置233处的谷氨酸。此外,EDA233-或EDA233#表示缺失在位置233处开始的GluAspAla序列。

[0164] 如本文所使用的“多肽”意指至少两个共价连接的氨基酸,其包括蛋白质、多肽、寡肽和肽。所述肽基团可包含天然存在的氨基酸和肽键或合成的拟肽结构,即“类似物”,例如类肽(参见Simon等人,《美国国家科学院院刊》89(20):9367(1992),其全文以引用方式并入本文)。所述氨基酸可为天然存在的或合成的(例如不是由DNA编码的氨基酸);如本领域的技术人员所理解。例如高苯丙氨酸、瓜氨酸、鸟氨酸和正亮氨酸为考虑用于本发明目的的合成氨基酸,并且D-和L-(R或S)两种构型的氨基酸均可使用。本发明的变体可包含修饰,所述修饰包括使用合成的氨基酸,所述氨基酸利用例如由Schultz和同事研发的技术,包括但不限于由Cropp&Shultz,2004,《遗传学趋势(Trends Genet.)》20(12):625-30、Anderson等人,2004,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》101(2):7566-71、Zhang等人,2003,303(5656):371-3和Chin等人,2003,《科学(Science)》301(5635):964-7所描述的方法,其全文以引用方式并入本文。此外,多肽可包括具有一个或多个侧链或端、糖基化、PEG化、致环交换、环化、连接其它分子的连接子、与蛋白或蛋白结构域融合和添加肽标签或标记的合成衍生物。

[0165] 本发明的多肽特异性结合CD3和如本文概述的靶细胞受体。本文的“特异性结合”是指所述多肽的结合常数是在至少 10^{-4} 到 10^{-6}M^{-1} 的范围内,优选的范围为 10^{-7} 到 10^{-9}M^{-1} 。

[0166] 具体包括在“多肽”的定义内的是无糖基化的多肽。本文所使用的“无糖基化的多肽”意指缺乏连接在Fc区的位置297处的碳水化合物的多肽,其中编号是根据如Kabat中的EU系统。所述无糖基化的多肽可以是去糖基化的多肽,即所述Fc碳水化合物已被除去(例如以化学或酶催化方式)的抗体或抗体片段。或者,所述无糖基化的多肽可以是表达时无Fc碳水化合物的非糖基化或未糖基化的抗体或其片段,例如经由将编码所述糖基化格式的一个

或多个残基突变或在不会使碳水化合物与蛋白质连接的生物体,例如细菌中表达。

[0167] 本文所使用的“亲本多肽”或“前体多肽”(包括Fc亲本或前体)是指随后被修饰以产生变体的多肽。所述亲本多肽可以是天然存在的多肽或天然存在的多肽的变体或经过工程处理的版本。亲本多肽可以指所述多肽本身、包含所述亲本多肽的组合物或编码所述亲本多肽的氨基酸序列。因此,本文所使用的“亲本Fc多肽”意指经过修饰以产生变体的未经过修饰的Fc多肽,并且本文所使用的“亲本抗体”意指经过修饰以产生变体抗体的未经过修饰的抗体。

[0168] 本文所使用的“位置”意指在蛋白质序列中的位置。位置可依序编号或根据已设立的格式(例如用于抗体编号的EU索引)编号。

[0169] 本文所使用的“靶抗原”意指被指定抗体的可变区特异性结合的分子。靶抗原可以是蛋白质、碳水化合物、脂质或其它化学化合物。本文中描述一系列合适的示意性靶抗原。

[0170] 本文所使用的“靶细胞”意指表达靶抗原的细胞。

[0171] 本文中“抗体”一词意指由一个或多个基本上由全部或部分被识别的免疫球蛋白基因编码的多肽所组成的蛋白质。所述被识别的免疫球蛋白基因(例如在人类中),包括kappa(κ)、lambda(λ)和重链基因座,其共同包含无数可变区基因和恒定区基因mu(μ)、delta(δ)、gamma(γ)、sigma(ϵ)和alpha(α)(其分别编码IgM、IgD、IgG、IgE和IgA同种异型)。本文中的抗体意图包括全长抗体和抗体片段,并且可以指来自任何生物体的天然抗体、经过工程处理的抗体或经过重组产生的抗体以供用于如下文中进一步定义的实验、治疗或其它目的。因此,“抗体”包括多克隆和单克隆抗体(mAb)。制备和纯化单克隆和多克隆抗体的方法为本领域所已知并且描述于例如Harlow和Lane,《抗体实验室手册(Antibodies: A Laboratory Manual)》(纽约:冷泉港实验室出版社(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1988)中。如本文中所概述的,“抗体”具体包括本文所描述的Fc变体,“全长”抗体包括本文所描述的Fc变体片段和与如本文所描述的其它蛋白融合的Fc变体融合物。

[0172] 术语“抗体”包括如本领域中已知的抗体片段,例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fcs或抗体的其它抗原结合子序列,例如单链抗体(例如scFv)、嵌合型抗体等,无论是通过修饰完整抗体制造的还是使用重组DNA技术重新合成的。术语“抗体”进一步包含多克隆抗体和单克隆抗体,其可以是激动剂或拮抗剂抗体。

[0173] 具体包括在“抗体”的定义内的有含有Fc变体部分的全长抗体。本文中,“全长抗体”意指构成抗体的天然生物形式的结构,包括可变区和恒定区。例如,在大多数哺乳动物(包括人类和小鼠)中,IgG类的全长抗体为四聚体并且由两对完全相同的免疫球蛋白链对所组成,所述免疫球蛋白链对具有两条免疫球蛋白链,每对具有一条轻链和一条重链,各轻链包含免疫球蛋白结构域V_L和C_L,而各重链包含免疫球蛋白结构域V_H、C γ 1、C γ 2和C γ 3。在一些哺乳动物中(例如在骆驼和美洲驼中),IgG抗体可仅由两条重链所组成,各重链包含一连接Fc区的可变结构域。本文所使用的“IgG”意指属于基本上由所识别的免疫球蛋白 γ 基因所编码的抗体类别的多肽。在人类中,此类别包含IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在小鼠中,此类别包含IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3。

[0174] 在一个优选的实施例中,本发明的抗体为人源化抗体。使用目前的单克隆抗体技术,个人可制造针对几乎任何可鉴别的靶抗原的人源化抗体[Stein,《生物科技趋势

(Trends Biotechnol.)》15:88-90 (1997)]。人源化形式的非人类(例如鼠)抗体为免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其含有源自非人免疫球蛋白的最小序列的片段(例如Fv、Fc、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其它抗原结合子序列)的嵌合型分子。人源化抗体包括人免疫球蛋白(受体抗体),其中形成所述受体的互补决定区(CDR)的残基被来自具有所需的特异性、亲和性和能力的非人物种(例如小鼠、大鼠或兔)的CDR(供体抗体)的残基替换。在一些情况下,所述人免疫球蛋白的Fv框架残基被对应的非人残基替换。人源化抗体还包含既无法在受体抗体中,还无法在引入的CDR或框架序列中发现的残基。一般来说,所述人源化抗体将包含基本上全部(至少一个,并且通常为两个)的可变结构域,其中所述CDR区全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白的CDR区并且全部或基本上全部的FR区为人免疫球蛋白共有序列的FR区。所述人源化抗体理想上还将包含的免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常为人免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分 [Jones等人,《自然 (Nature)》321:522-525 (1986); Riechmann等人,《自然》332:323-329 (1988); 和Presta,《结构生物学新见 (Curr.Op.Struct.Biol.)》2:593-596 (1992)]。

[0175] 用于将非人抗体人源化的方法为本领域所周知。一般来说,人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为输入残基,其通常取自输入的可变结构域。人源化可基本上依照Winter和其同事的方法执行 [Jones等人,同上; Riechmann等人,同上; 和Verhoeyen等人,《科学》,239:1534-1536 (1988)],所述方法经由以啮齿类CDR或CDR序列取代人抗体的对应序列来执行。本领域中还知其它人源化的小鼠单克隆抗体的实例,例如与人蛋白C结合的抗体 [O'Connor等人,《蛋白质工程 (Protein Eng.)》11:321-8 (1998)]、与白介素2受体结合的抗体 [Queen等人,《美国国家科学院院刊 (Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A.)》86:10029-33 (1989)]和与人表皮生长因子受体2结合的抗体 [Carter等人,《美国国家科学院院刊》89:4285-9 (1992)]。因此,所述人源化抗体为嵌合型抗体(美国专利第4,816,567号),其中基本上少于完整的人可变结构域已被来自非人物种的对应序列取代。在实行时,人源化抗体通常为其中一些CDR残基和可能地一些FR残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基所取代的人抗体。

[0176] 在一个优选的实施例中,本发明的多肽是基于人序列并且因此人序列被用来作为“基础”序列,针对所述“基础”序列,比较其它序列,例如大鼠、小鼠和猴子序列。为了建立与一级序列或结构的同源性,将前体或亲本抗体或scFv的氨基酸序列直接与人序列相比较。在序列比对后,使用本文所描述的一种或多种同源性比对程序(例如使用保守性残基比对物种),允许必要的插入和缺失以保持对准(即,避免通过任意缺失和插入而排除保守性残基),界定等同于人类多肽的一级序列中的特定氨基酸的残基。优选地,对准的保守性残基应保留100%所述残基。然而,大于75%或少到50%的对准的保守性残基也足以定义同等残基(本文中有时称为“对应残基”)。

[0177] 本文所使用的“残基”意指在蛋白质中的位置和其相关的氨基酸身份。例如,天门冬酰胺297(也称为Asn297或N297)为在人抗体IgG1中的位置297处的残基。

[0178] 相等残基还可以通过测定scFv片段的三级结构层级(其三级结构已通过X射线晶体学测定)的同源性来定义。相等残基的定义为所述亲本或前体序列的特定氨基酸残基的两个或更多个主链原子的原子坐标(N对N,CA对CA、C对C和O对O)在对准之后是在0.13nm之内,并且优选为0.1nm的残基。对准是在最优选模型已定向和定位以使所述scFv变体片段的

非氢蛋白质原子的原子坐标产生最大重叠后实现。

[0179] 本文所使用的“Fv”或“Fv片段”或“Fv区”意指包含单一抗体的V_L和V_H结构域的多肽。如本领域的技术人员将理解,这些通常由两条链所构成,或可组合(通常以如本文所讨论的连接子)以形成scFv。

[0180] 本文中,“单链Fv”或“scFv”意指共价连接可变轻链(V_L)结构域的可变重链(V_H)结构域,其一般使用如本文所讨论的scFv连接子来形成scFv或scFv结构域。scFv结构域可以是N端到C端的任一取向(V_H-连接子-V_L或V_L-连接子-V_H)。

[0181] 如本文所使用的“可变区”意指包含一个或多个Ig结构域的免疫球蛋白的区域,所述一个或多个Ig结构域基本上由分别构成所述κ、λ和重链和轻链免疫球蛋白基因座的V_κ、V_λ、V_L和/或V_H基因中的任一个编码。

[0182] 如本文所使用的“无活性V_H”和“无活性V_L”是指scFv的组分,当其分别与其同源V_L或V_H伙伴配对时会形成V_H/V_L对,此V_H/V_L对不会特异性结合当所述“活性”V_H或“活性”V_L抗原与并非“无活性”的V_L或V_H类似物结合时所结合的抗原。示意性的“无活性V_H”和“无活性V_L”结构域经由使野生型V_H或V_L序列突变来形成。示意性的突变是在V_H或V_L的CDR1、CDR2或CDR3内。一种示意性突变包括在CDR2内放置结构域连接子,从而形成“无活性V_H”或“无活性V_L”结构域。相反地,“活性V_H”或“活性V_L”为当与其“活性”同源伙伴(即,分别为V_L或V_H)配对时能够与其靶抗原特异性结合的那些。

[0183] 相反地,如本文所使用的术语“活性”是指能够特异性结合CD3的CD3结合结构域。所述术语用在两种背景下:(a)当指scFv结合对的单一成员(即,V_H或V_L)时,其为能够与其同源伙伴配对并与CD3特异性结合的序列的成员;和(b)能与CD3特异性结合的序列的同源物对(即,V_H和V_L)。一种示意性“活性”V_H、V_L或V_H/V_L对为野生型或亲本序列。

[0184] “CD_{-x}”是指分化(CD)蛋白簇。在示意性实施例中,CD_{-x}选自那些当受试者被施用本发明的多肽构建体时参与募集或活化受试者的T细胞的CD蛋白。在一个示意性实施例中,CD_{-x}为CD3。

[0185] 当与本发明有关时,术语“结合结构域”表征(特异性)结合/交互作用/识别靶分子(抗原)上的指定的靶抗原决定部位或指定的靶位点(例如:分别为EGFR和CD3)的结构域。所述靶抗原结合结构域(识别EGFR)的结构和功能,并且优选地,还有所述CD3结合结构域(识别CD3)的结构和/或功能是基于抗体(例如全长或完整的免疫球蛋白分子)的结构和/或功能。根据本发明,所述靶抗原结合结构域的特征在于存有三个轻链CDR(即,所述V_L区的CDR1、CDR2和CDR3)和/或三个重链CDR(即,所述V_H区的CDR1、CDR2和CDR3)。优选地,所述CD3结合结构域还至少包含可允许目标结合的抗体的最小结构要求。更优选地,所述CD3结合结构域包含至少三个轻链CDR(即,所述V_L区的CDR1、CDR2和CDR3)和/或三个重链CDR(即,所述V_H区的CDR1、CDR2和CDR3)。在示意性实施例中,设想所述靶抗原和/或CD3结合结构域通过噬菌体展示或集合库筛选法产生或取得。

[0186] 如本文所使用的“Fc”、“Fc区”、“Fc多肽”意指如本文所定义的包括含有抗体的恒定区,排除第一恒定区免疫球蛋白结构域的多肽的抗体。因此,Fc是指IgA、IgD和IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域和IgE和IgM的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域和这些结构域N端的弹性铰链。在IgA和IgM方面,Fc可包括J链。在IgG方面,Fc包含免疫球蛋白结构域Cγ2和Cγ3,和介于Cγ1与Cγ2之间的铰链。虽然Fc区的边界可能有不同,但是所述人IgG

重链Fc区通常被界定为在其羧基端包含残基C226或P230,其中所述编号是根据如Kabat中的EU索引。Fc可以指独立的所述区域,或在抗体、抗体片段或Fc融合物的背景下的所述区域。Fc可以是包含Fc的抗体、Fc融合物或蛋白质或蛋白质结构域。特佳的是Fc变体,其为Fc的非天然存在的变体。

[0187] 如本文所使用的“IgG”意指属于所述基本上由所识别的免疫球蛋白 γ 基因所编码的抗体类别的多肽。在人类,此类别包含IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在小鼠,此类别包含IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3。本文中,“免疫球蛋白(Ig)”意指由一个或多个基本上由免疫球蛋白基因编码的多肽所组成的蛋白质。免疫球蛋白包括但不限于抗体。免疫球蛋白可具有许多结构形式,包括但不限于全长抗体、抗体片段和个别免疫球蛋白结构域。本文中,“免疫球蛋白(Ig)结构域”意指以如蛋白质结构领域的技术人员所确定的独特结构物理存在的免疫球蛋白区域。Ig结构域通常具有特征性夹心折叠拓扑学。在IgG类别的抗体中的已知Ig结构域为V_H、C γ 1、C γ 2、C γ 3、V_L和C_L。

[0188] 本文中,“野生型或WT”意指在自然界中发现的氨基酸序列或核苷酸序列,包括等位基因变异。WT蛋白具有未曾故意修饰的氨基酸序列或核苷酸序列。

[0189] 本文所使用的“变体多肽”意指凭借至少一个氨基酸修饰而与亲本多肽序列不同的多肽序列。修饰可包括取代、缺失和添加。变体多肽可指多肽本身、包含所述多肽的组合物或编码所述多肽的氨基酸序列。优选地,与亲本多肽相比较,所述变体多肽具有至少一个氨基酸修饰,例如约1到约10个氨基酸修饰,优选为约1到约5个氨基酸修饰。优选地,本文的变体多肽序列将与亲本多肽序列具有至少约80%的同源性,最优选为具有至少约90%的同源性,更优选为具有至少约95%的同源性。因此,本文所使用的“Fc变体”意指凭借至少一个氨基酸修饰而与亲本Fc序列不同的Fc序列。类似地,示意性的“无活性V_L结构域”或“无活性V_H结构域”为亲本V_L或V_H多肽的变体。

[0190] 在一些实施例中,本发明的多肽构建体为“经过分离的”或“基本上纯的”多肽构建体。当用于描述本文所公开的多肽构建体时,“经过分离的”或“基本上纯的”意指已经过鉴定,从其制造环境的组分分离和/或回收的多肽构建体。优选地,所述多肽构建体不与或基本不与所有其它来自其制造环境的组分联结。其制造环境的污染组分(例如从经过重组转染细胞产生的)为通常会干扰所述多肽的诊断或治疗用途的物质,并可能包括酶、激素和其它蛋白质性或非蛋白质性溶质。在所述制造培养基中的理想的多肽构建体可构成所述培养基中的全部多肽的至少约5%、至少约25%或至少约50%(按重量计)。

[0191] 本发明的示意性经过分离的多肽构建体大体上或基本上不含用于制造所述物质的组分。在本发明的肽缀合物方面,术语“经过分离的”意指物质大体上或基本上不含所述通常在用于制备所述肽缀合物的混合物中伴随所述物质的组分。“经过分离的”和“纯的”可互换使用。通常,本发明的经过分离的多肽构建体所具有的纯度水平优选以范围形式表示。所述多肽构建体的纯度范围的下限为约60%、约70%或约80%,并且纯度范围的上限为约70%、约80%、约90%或超过约90%。

[0192] 当所述多肽构建体的纯度大于约90%,其纯度也优选以范围形式表示。所述纯度范围的下限为约90%、约92%、约94%、约96%或约98%。纯度范围的上限为约92%、约94%、约96%、约98%或约100%。

[0193] 纯度通过本领域公认的分析方法来测定(例如在银染色的凝胶、聚丙烯酰胺凝胶

电泳、HPLC或类似装置上的谱带强度)。

[0194] 根据本发明,结合结构域为一个或多个多肽的形式。所述多肽可包括蛋白质性部分和非蛋白质性部分(例如化学连接子或化学交联剂,例如戊二醛)。多肽(包括其片段,优选为生物活性片段和肽,通常具有30个以上的氨基酸)包含两个或更多个经由共价肽键彼此偶联(导致氨基酸链)的氨基酸。

[0195] 结合结构域与抗原决定部位或包含所述抗原决定部位的区域之间的交互作用暗示结合结构域对在特定蛋白质或抗原上的抗原决定部位/包含所述抗原决定部位的区域(例如,分别为EGFR和CD3)显示出可感知的亲和力并且,一般来说,不会表达出与EGFR或CD3以外的蛋白质或抗原有显著的反应性。“可感知的亲和力”包括以约 10^{-6} M(KD)或更强的亲和力结合。优选地,当所述结合亲和力为约 10^{-12} 到 10^{-8} M、 10^{-12} 到 10^{-9} M、 10^{-12} 到 10^{-10} M、 10^{-11} 到 10^{-8} M,优选地,约 10^{-11} 到 10^{-8} M时,所述结合被认为是特异性结合。结合结构域是否与目标特异性反应或结合可很容易地通过,尤其是,将所述结合结构域与靶蛋白或抗原的反应与所述结合结构域与非EGFR或CD3的蛋白质或抗原的反应相比较来测试。优选地,本发明的结合结构域大体上不会或基本上不会特异性结合非EGFR或CD3的蛋白质或抗原(即,所述第一结合结构域不会特异性结合非EGFR的蛋白质,并且所述第二结合结构域不会特异性结合非CD3的蛋白质)。

[0196] 可以认为,特异性结合是由所述结合结构域和抗原的氨基酸序列中的特定基序驱动的。因此,结合的实现为其一级、二级和/或三级结构的结果以及所述结构的二级修饰的结果。所述抗原交互作用位点与其特异性抗原的特异性交互作用可导致所述位点与抗原的单纯结合。再者,所述抗原交互作用位点与其特异性抗原的特异性交互作用可能另外或额外导致信号起始,例如由于引起所述抗原的构象改变、所述抗原的寡聚化,等。

[0197] 术语“大体上不特异性结合”、“基本上不特异性结合”或“不能特异性结合”可互换使用并且意指本发明的结合结构域不会与非EGFR或CD3的蛋白质或抗原结合,即,显示出与非EGFR或CD3的蛋白质或抗原不具有超过30%,优选为不超过20%,更优选为不超过10%,特佳为不超过9%、8%、7%、6%或5%的反应性(其中与EGFR或CD3抗原的结合分别设为100%)。这些术语还用于关于 V_H/V_L^1 或 V_L/V_H^1 对的抗原结合性质。

[0198] 本文所使用的术语“双特异性”是指“至少为双特异性”的本发明的多肽构建体(“Pro”或“Prodent”),即,其包含至少一个第一结合结构域(例如靶抗原,例如EGFR)和第二结合结构域(例如CD3,例如CD3),其中所述第一结合结构域与一抗原或目标结合,而所述第二结合结构域与另一抗原或目标结合。因此,根据本发明的多肽构建体包含对至少两种不同抗原或目标的特异性。术语,本发明的“双特异性多肽构建体”还包含多特异性多肽构建体,例如三特异性多肽构建体,后者包括三个结合结构域或具有超过三种(例如四、五、.....)特异性的构建体。

[0199] 鉴于根据本发明的多肽构建体为(至少)双特异性的,它们不会自然发生并且它们与天然存在的产物明显不同。因此,“双特异性”多肽构建体为具有至少两个具有不同特异性的不同结合位点的人工杂合多肽。双特异性多肽构建体可通过多种方法产生。参见,例如Songsivilai&Lachmann,《临床与实验免疫学(Clin.Exp.Immunol.)》79:315-321(1990)。

[0200] 本发明的多肽构建体的至少两个结合结构域和可变结构域可能或可能不包含肽连接子(间隔子肽)。根据本发明,术语“肽连接子”包含氨基酸序列,通过此氨基酸序列,本

发明的抗体构建体的一个(可变和/或结合)结构域与另一个(可变和/或结合)结构域的氨基酸序列可彼此连接。所述肽连接子的必要技术特性为其不包含任何聚合活性。合适的肽连接子有描述于美国专利第4,751,180和4,935,233号或WO 88/09344中的那些。所述肽连接子还可用于连接其它结构域或模块或区域(例如半衰期延长结构域)与本发明的抗体构建体。

[0201] 在那些使用连接子的实施例中,所述连接子优选具有足够的长度和序列以确保每个靶抗原和CD3结合结构域可彼此独立地保持它们的差别结合特异性。在本发明的抗体构建体中用于连接至少两个结合结构域(或两个可变结构域)的肽连接子优选为包含最优选数目的氨基酸残基(例如12个氨基酸残基或更少)的肽连接子。因此,使用具有12、11、10、9、8、7、6或5个氨基酸残基的肽连接子。具有少于5个氨基酸的预想的肽连接子包含4、3、2或1个氨基酸,其中富含Gly的连接子是优选的。在所述“肽连接子”的背景下,特佳的“单一”氨基酸为Gly。因此,所述肽连接子可由单一氨基酸Gly组成。肽连接子的另一个优选实施例的特征为氨基酸序列Gly-Gly-Gly-Gly-Ser,即,Gly₄Ser (SEQ ID NO:1)或其聚合物,即(Gly₄Ser)_x,其中x为整数1或更大(例如2或3)。所述肽连接子的特性(其不包含促进二级结构)为本领域所已知并且描述于,例如Dall'Acqua等人(《生物化学(Biochem.)》(1998) 37, 9266-9273)、Cheadle等人(《分子免疫学(Mol Immunol)》(1992) 29, 21-30)以及Raag和Whitlow(《美国实验生物学学会联合会(FASEB)》(1995) 9(1), 73-80)中。还使用不会进一步促进任何二级结构的肽连接子。所述结构域彼此连接可通过例如实施例中描述的遗传工程提供。用于制备融合并且可操作地连接的双特异性单链构建体并使那些构建体在哺乳动物细胞或细菌中表达的方法为本领域所熟知(例如,WO 99/54440或Sambrook等人,《分子克隆实验指南(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,2001)。

[0202] 本发明的示意性实施例包含至少一个scFv结构域,虽然不是天然存在的,但是其通常包括通过scFv连接子连接在一起的重链可变结构域和轻链可变结构域。如本文中所概述的,虽然所述scFv结构域从N端到C端的取向通常为V_H-scFv连接子-V_L,但此取向在任何scFv结构域(或那些使用来自Fab的V_H和V_L序列所构建的)中均可反转成V_L-scFv连接子-V_H,根据格式可在一端或两端具有可选择的连接子。一般来说,V_L或V_H中的一个“无活性”。

[0203] 如本文所示,有许多合适的scFv连接子可使用,包括通过重组技术产生的传统肽键。所述连接子肽可主要包括下列氨基酸残基:Gly、Ser、Ala或Thr。所述连接子肽应具有适当的长度以连接两个分子,所述连接方式为可令所述两个分子呈现出相对于彼此具有正确构象,致使其保留所需活性。在一个实施例中,所述连接子的长度为约1到50个氨基酸,优选的长度为约1到30个氨基酸长。在一个实施例中,可使用长度为1到20个氨基酸的连接子,在一些实施例中,可使用长度为约5到约10个氨基酸的连接子。有用的连接子包括甘氨酸-丝氨酸聚合物,包括例如(GS)_n、(GSGGS)_n、(GGGGS)_n和(GGGS)_n(其中n为至少是1(并且一般为3到4)的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和其它弹性连接子。或者,多种非蛋白质性聚合物(包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇与聚丙二醇的共聚物)可用来作为连接子,即,可作为连接子。

[0204] 其它连接子序列可包括CL/CH1结构域的任何长度的任何序列,但不包括CL/CH1结构域的所有残基;例如所述CL/CH1结构域的前5到12个氨基酸残基。连接子可源自免疫球蛋白

白轻链,例如C κ 或C λ 。连接子可源自任何同种型的免疫球蛋白重链,包括例如C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4、C α 1、C α 2、C δ 、C ϵ 和C μ 。连接子序列还可源自其它蛋白质,例如Ig样蛋白(例如TCR、FcR、KIR)、源自铰链区的序列和来自其它蛋白质的其它天然序列。

[0205] 在一些实施例中,所述连接子为用于将任何两个如本文概述的结构域连接在一起的“结构域连接子”。虽然可使用任何合适的连接子,但是许多实施例利用甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如(GS) $_n$ 、(GSGGS) $_n$ 、(GGGGS) $_n$ 和(GGGGS) $_n$,其中 n 为至少是1的整数(一般为3到4到5))和具有足够长度和弹性以允许所述两个结构域重组连接时令每个结构域保留其生物学功能的任何肽序列。在一些情况下,注意如下文中概述的“链型(strandedness)”,如在scFv连接子的一些实施例中,可使用带电荷的结构域连接子。示意性结构域连接子为不可裂解的连接子,所述不可裂解的连接子在所述多肽构建体在体内半衰期期间是在例如生理学相关的pH和温度下使用的条件下,基本上未被裂解。结构域连接子可在其框架的范围内包括一个或多个可裂解的部分。

[0206] 在一些实施例中,所述scFv连接子或结构域为带电的scFv连接子或结构域连接子。

[0207] 本文中,“计算筛选法”意指任何用于设计一个或多个本发明的多肽构建体的方法,包括在构建体的组分(例如V $_H$ 、V $_L$)中的突变,其中所述方法利用计算机评估可能的氨基酸侧链取代彼此间和/或与所述蛋白质的其余部分交互作用的能量。如本领域的技术人员将理解,能量的评估(称为能量计算)是指计算一个或多个氨基酸修饰的积分的一些方法。所述方法可能涉及物理或化学能项目或可能涉及基于知识、统计、序列能项目等。本文中,组成运算筛选法的计算称为“运算式筛选计算”。

[0208] 实施例

[0209] 多肽构建体

[0210] 根据优选的实施例和如所附的实施例中的记载,本发明的示意性多肽构建体为“双特异性单链多肽构建体”,更优选为“单链Fv”(scFv),所述scFv包括至少一个靶抗原结合结构域和任选地进一步连接至少一个半衰期延长结构域。虽然所述Fv片段的两个结构域V $_L$ 和V $_H$ 由各自的基因编码,但是其可使用重组方法通过合成连接子(如前文所描述)接合,所述合成连接子使所述两个结构域V $_L$ 和V $_H$ 能够被制成单一蛋白链,在所述单一蛋白链中,V $_L$ 和V $_H$ 区配对以形成无活性的V $_L$ /V $_H$ 对;参见例如Huston等人(1988)《美国国家科学院院刊》85:5879-5883。这些多肽片段使用本领域的技术人员已知的常规技术取得,并且所述片段以评估完整或全长抗体的相同方式来评估其功能。因此,单链可变片段(scFv)为免疫球蛋白的重链(V $_H$)可变区和轻链(V $_L$)可变区的融合蛋白,其通常通过具有约10到约25个氨基酸(优选为约15到20个氨基酸)的短连接子肽连接。所述连接子通常富含甘氨酸以具有弹性,以及富含丝氨酸或苏氨酸以具有溶解度,并且可连接V $_H$ 的N端与V $_L$ 的C端,或者反过来。未变成“无活性”的多肽部分基本上保留所述原始免疫球蛋白的特异性,尽管所述恒定区被除去并引入了连接子。

[0211] 因此,在一个示意性实施例中,本发明提供针对CD3抗原的单链scFv多肽。所述scFv多肽包含第一scFv结构域,所述第一scFv结构域包含第一V $_H$ 结构域和第一V $_L$ 结构域,所述第一V $_H$ 结构域和所述第一V $_L$ 结构域通过第一连接子部分(例如scFv连接子)接合。所述第一连接子部分任选地包含介于所述第一V $_H$ 结构域与所述第一V $_L$ 结构域之间的第一蛋白酶裂

解位点。所述第一V_H结构域与所述第一V_L结构域交互作用以形成第一V_H/V_L对。为了提供能有条件地结合其CD3目标的多肽,所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域中的一个如本文所定义的术语般无活性(即,V_{Hi}或V_{Li})。因此,示意性的第一scFv结构域不会特异性结合CD3抗原。当蛋白酶在所述蛋白酶裂解位点裂解所述第一scFv连接子时,所述无活性V_H或无活性V_L结构域与其活性V_L或活性V_H结合伙伴分离,然后所述活性V_L或活性V_H结合伙伴可与其活性同源物配对,从而允许形成适当配对的抗CD3结构域并与CD3抗原结合。在示意性实施例中,所述两种活性同源物是在相同的多肽链上。在各种实施例中,所述两种活性同源物是在分开的多肽链上,它们被放在一起并在细胞表面上交互作用以形成特异性结合CD3的活性CD3结合结构域。

[0212] 所述第一scFv多肽通过任选地包含第二蛋白酶裂解位点的第一结构域连接子部分与第二scFv结构域接合。所述第二scFv结构域包含第二V_H结构域和第二V_L结构域,所述第二V_H结构域和第二V_L结构域经由所述第二scFv与所述第二V_L结构域之间的第三蛋白酶裂解位点接合。所述第二V_H结构域与所述第二V_L结构域交互作用以形成第二V_H/V_L对。如同上述的第一V_H/V_L对,所述第二V_H结构域和所述第二V_L结构域中的一个无活性,致使所述第二scFv结构域不会特异性结合所述CD3抗原。所述第一scFv结构域通过第二结构域连接子与第一靶抗原结合结构域接合。所述第二结构域连接子接合选自所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域的成员与所述第一靶抗原结合结构域。所述第二scFv结构域通过第三结构域连接子与第二靶抗原结合结构域接合。所述第三结构域连接子接合选自所述第二V_H结构域和所述第二V_L结构域的成员与所述第二靶抗原结合结构域。

[0213] 在一个示意性实施例中,本发明提供针对CD3抗原的单链scFv多肽。所述scFv多肽包含第一scFv结构域,所述第一scFv结构域包含第一V_H结构域和第一V_L结构域,所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域通过第一scFv连接子部分接合。所述第一scFv连接子部分包含介于所述第一V_H结构域与所述第一V_L结构域之间的第一蛋白酶裂解位点。如上文所阐述的,所述第一V_H结构域与所述第一V_L结构域交互作用以形成第一V_H/V_L对,其中所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域中的一个为无活性的第一V_H结构域或无活性的第一V_L结构域。因此,所述第一scFv结构域不会特异性结合所述CD3抗原。所述第一scFv多肽通过任选地包含第二蛋白酶裂解位点的第一结构域连接子部分与第二scFv结构域接合,所述第二scFv结构域包含第二V_H结构域和第二V_L结构域,所述第二V_H结构域和第二V_L结构域经由第二scFv连接子部分接合,所述第二scFv连接子部分包含介于所述第二V_H结构域与所述第二V_L结构域之间的第三蛋白酶裂解位点。所述第二V_H结构域与所述第二V_L结构域交互作用以形成第二V_H/V_L对。如上述,所述第二V_H结构域和所述第二V_L结构域中的一个为无活性的第二V_H结构域或无活性的V_L结构域并且所述第二scFv结构域不会特异性结合所述CD3抗原。

[0214] 此多肽的第一scFv结构域通过第二结构域连接子与第一靶抗原结合结构域接合,所述第二结构域连接子接合选自所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域的成员与所述第一靶抗原结合结构域。所述第二scFv结构域通过第三结构域连接子与第二靶抗原结合结构域接合。所述第三结构域连接子接合选自所述第二V_H结构域和所述第二V_L结构域的成员与所述第二靶抗原结合结构域。当单链scFv与能够裂解所述第一scFv连接子部分的第一蛋白酶裂解位点的第一蛋白酶接触时,所述无活性的第一V_H结构域或所述无活性的第一V_L结构域与所述单链scFv多肽分离。类似地,当所述多肽与能够裂解所述第二scFv连接子部分的第

二蛋白酶裂解位点的第二蛋白酶接触时,所述无活性的第二V_H结构域或所述无活性的第二V_L结构域与所述单链scFv多肽分离。所述无活性的结构域从所述多肽的活性结构域裂解以形成能够特异性结合所述CD3抗原的活性单链scFv。

[0215] 在一个示意性实施例中,本发明提供针对CD3抗原的单链scFv多肽。所述scFv多肽包含第一scFv结构域,所述第一scFv结构域包含第一V_H结构域和第一V_L结构域,所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域通过第一scFv连接子部分接合。所述第一连接子部分包含介于所述第一V_H结构域与所述第一V_L结构域之间的第一蛋白酶裂解位点。所述第一V_H结构域与所述第一V_L结构域交互作用以形成第一V_H/V_L对,其中所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域中的一个无活性。因此,所述第一scFv结构域不会特异性结合所述CD3抗原。所述第一scFv多肽通过任选地包含第二蛋白酶裂解位点的第一结构域连接子部分与第一靶抗原结合结构域接合。所述第一结构域连接子接合选自所述第一V_H结构域和所述第一V_L结构域的成员与所述第一靶抗原结合结构域。

[0216] 在一个示意性实施例中,提供所述如上述的scFv构建体对。所述构建体对通过其配对的CD3结合结构域协同结合CD3抗原。所述构建体对的个别scFv分子的配对的CD3位点与CD3抗原的结合通过所述构建体对各成员的靶抗原结合结构域与其同源抗原结合来促进、增强和/或驱动。

[0217] 所述多肽构建体能与一个或多个靶抗原和CD3,和任选地半衰期延长结构域(例如HSA结合结构域)特异性结合。与CD3结合仅可能在一旦被蛋白酶活化和与靶抗原结合时。应理解的是,在一些实施例中,蛋白酶裂解所述蛋白酶裂解结构域是在靶抗原结合结构域与靶抗原结合之前发生。还应理解的是,在一些实施例中,蛋白酶裂解所述蛋白酶裂解结构域是在靶抗原结合结构域与靶抗原结合之后发生。

[0218] 在一些实施例中,所述scFv多肽进一步包含两个或更多个蛋白酶裂解结构域。在一些实施例中,一个或多个CD3结合结构域包含源自特异于人CD3的单链可变片段(scFv)的多肽。在一个示意性实施例中,所述CD3结合结构域包括V_L和V_H部分,所述V_L和V_H部分通过具有一个蛋白酶裂解结构域的连接子连接。在此CD3结合结构域中,通过已知技术使V_L或V_H无活性(即,基本上不能特异性结合CD3),所述技术为,例如在V_L或V_H中的一个或多个位点制造突变、缺失CDR,等。所述突变的V_L或V_H能够被配对并分别与对应的V_H或V_L配对,所述对应的V_H或V_L当未与突变序列配对(或与其适当的同源序列配对)时,大体上能够选择性地与CD3结合。所述无活性的V_L或V_H与对应的CD3结合V_H或V_L配对时使得所述对应的CD3结合V_H或V_L无活性,直到所述伙伴经由蛋白酶裂解连接子中的蛋白酶裂解结构域而使结合伙伴分开。当蛋白酶裂解结构域裂解时,所述活性CD3结合物种与其无活性伙伴“未配对”,从而允许所述CD3结合结构域大体上特异性结合CD3。在各种实施例中,由于CD3结合V_L或V_H中的一个或多个氨基酸突变而使得所述无活性的结合伙伴无活性,所述突变大体上破坏了所述结合伙伴以特异方式结合CD3,但保留所述突变的物种与CD3结合结构域配对的能力,从而可大体上将CD3结合结构域的CD3结合特性去活化,直到通过蛋白酶裂解所述蛋白酶裂解结构域以使所述结合伙伴分开。

[0219] 如下列实施例中所示,本发明人已发现本发明的多肽构建体的活性和效力几乎不依赖各种结构域的取向。因此,从N端读到C端,V_L可以是V_Hi的上游,反之亦然。此外,V_Li可以是V_H的上游,或者反之亦然。所述半衰期延长结构域可与所述无活性CD3结合结构域中的一

个接合或与靶抗原结合结构域接合。在一个示意性实施例中,所述半衰期延长结构域与多肽构建体的组分接合,其在所述scFv连接子裂解时与所述活性多肽分离。因此,例如,所述半衰期延长结构域与V_{Li}或V_{Hi}接合。

[0220] 在一些实施例中,一个或多个半衰期延长结构域包含与人血清白蛋白结合的结合结构域。在一些实施例中,一个或多个半衰期延长结构域包含scFv、可变重链结构域(V_H)、轻链可变域(V_L)、纳米体、肽、配体或小分子。在一些实施例中,一个或多个半衰期延长结构域包含scFv。在一些实施例中,一个或多个半衰期延长结构域包含Fc结构域。在一些实施例中,所述半衰期延长结构域在蛋白酶裂解前位于多肽的N端。在一些实施例中,所述半衰期延长结构域在蛋白酶裂解前位于多肽的C端。在一些实施例中,所述半衰期延长结构域在蛋白酶裂解前不在多肽的C端或N端。

[0221] 所述半衰期延长结构域允许所述多肽构建体的大小被调整成基本上为任何期望的大小以取得适当的药代动力学参数。因此,在一些实施例中,本文所描述的多肽构建体的大小为约50kD的到约80kD、约50kD到约75kD、约50kD到约70kD或约50kD的到约65kD。因此,所述抗原结合多肽的大小优于IgG抗体,所述IgG抗体的大小为约150kD,而所述BiTE和DART双抗体分子的大小为约55kD但并非半衰期延长的,因此会快速地通过肾脏清除。本文所描述的抗原结合多肽的另一种特性为那些具有单一多肽的设计,其结构域具有弹性连接。这允许所述多肽构建体可容易地产生和制造,因其可由单一eDNA分子编码以轻易地被并入载体中。再者,由于本文所描述的抗原结合多肽为单体型单多肽链,所以没有链配对问题或需要二聚体化。不同于所报告的其它分子(例如双特异性BiTE蛋白质),本文所描述的抗原结合多肽预期发生聚集的趋势降低。

[0222] 双特异性单链分子为本领域所已知并且描述于W099/54440、Mack,《免疫学杂志(J. Immunol.)》(1997),158,3965-3970、Mack,《美国科学院院报(PNAS)》,(1995),92,7021-7025、Kufer,《癌症免疫学与免疫治疗(Cancer Immunol. Immunother.)》,(1997),45,193-197、Loffler,《血液(Blood)》,(2000),95,6,2098-2103、Bruhl,《免疫学(Immunol.)》,(2001),166,2420-2426、Kipriyanov,《分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)》,(1999),293,41-56中。用于制造单链抗体的技术可经过修改(尤其参见美国专利第4,946,778号)以适用于产生特异性识别所选择的目标的单链多肽构建体。

[0223] 具有较高滴度的多肽(二价抗体的类似物)也在本发明的范围内。例如,本发明内包含与两个CD3结合的多肽构建体(例如在T细胞受体中的3个分子或两个CD3亚基)。类似地,本发明的多肽构建体可包括两个或更多个靶抗原结合结构域。因此,本发明的构建体可包括两个或更多个完全相同或两个或更多个不同的抗EGFR结合结构域。所述分子可被认为类似于二价(bivalent)(也称为二价(divalent))或双特异性单链可变片段(具有格式(scFv)₂的双-scFv或二-scFv)。所述构建体可通过连接两个scFv分子(例如使用前述连接子)来进行工程处理。如果这两个scFv分子具有相同的结合特异性,那么所产生的(scFv)₂分子通常被称为“二价”(即,其具有用于相同的目标抗原决定部位的两个滴度)。如果所述2个scFv分子具有不同的结合特异性,那么所产生的(scFv)₂分子通常被称为双特异性。所述连接可通过产生具有两个V_H区和两个V_L区的单一肽链,产生串联scFv来完成(参见例如Kufer P.等人,(2004)《生物科技趋势(Trends in Biotechnology)》22(5):238-244)。

[0224] 本文描述的抗原结合scFv多肽被设计成通过招募细胞毒性T细胞而允许特异性靶

向表达靶抗原的细胞。所述CD3结合结构域保持无活性,直到通过蛋白酶裂解位于V_H和V_{Li}之间或V_{Hi}和V_L之间的蛋白酶裂解位点才被活化,其中“i”表示通过V_H或V_L的亲本多肽序列发生突变而被去活化的亚基。与双特异性T细胞衔接器治疗剂相比较,这改善了特异性,所述双特异性T细胞衔接器治疗剂与CD3和靶抗原(靶细胞,例如肿瘤或癌症细胞可能或可能不表达所述靶抗原)结合。相反地,通过特异性活化在靶细胞的微环境(其中所述靶抗原和蛋白酶高度表达)中的CD3结合,所述多肽构建体可将细胞毒性T细胞与以高度特异性方式表达靶抗原的细胞交联,从而指导所述T细胞的细胞毒性潜能朝向所述靶细胞。本文所描述的多肽构建体经由蛋白酶活化的结合作用来衔接细胞毒性T细胞与表面表达的CD3,这形成T细胞受体复合体的一部分。同时将数个多肽构建体与CD3和与表达在特定细胞表面上的靶抗原结合会引起T细胞活化并介导所述表达特定的靶抗原的细胞随后裂解。因此,预期多肽构建体显示出强、特异性并且有效的靶细胞灭杀。

[0225] 在一些实施例中,本文所描述的多肽构建体刺激由细胞毒性T细胞灭杀靶细胞以排除在富含蛋白酶的微环境中的致病细胞(例如肿瘤细胞、被病毒或细菌感染的细胞、自体反应性T细胞等)。在一些所述实施例中,细胞被选择性地排除,从而降低毒性副作用的可能。在其它实施例中,可使用相同的多肽来增进排除用于治疗效果的内源性细胞,例如在自体免疫性疾病中的B或T淋巴细胞,或用于干细胞移植的造血干细胞(HSC)。已知与患病细胞或组织相关的蛋白酶包括但不限于丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天门冬氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、天门冬酰胺肽裂合酶(lyase)、血清蛋白酶、组织蛋白酶(cathepsin)、组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、激肽释放酶(kallikrein)、hK1、hK10、hK15、纤溶酶(plasmin)、胶原蛋白酶、第IV型胶原蛋白酶、溶基质蛋白酶(stromelysin)、第Xa因子、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)样蛋白酶、胰蛋白酶样蛋白酶、弹性蛋白酶(elastase)样蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶、奇异果蛋白酶(actinidain)、凤梨蛋白酶(bromelain)、钙蛋白酶(calpain)、凋亡蛋白酶(caspase)、凋亡蛋白酶3、Mir 1-CP、木瓜蛋白酶(papain)、HIV-1蛋白酶、HSV蛋白酶、CMV蛋白酶、凝乳酶(chymosin)、肾素(renin)、胃蛋白酶(pepsin)、间质蛋白酶、天门冬酰胺内肽酶(legumain)、天门冬氨酸蛋白酶(plasmepepsin)、猪笼草蛋白酶(nepenthesin)、金属外肽酶(metalloexopeptidase)、金属内肽酶(metalloendopeptidase)、基质金属蛋白酶(MMP)、MMP1、MMP2、MMP3、MMP8、MMP9、MMP13、MMP11、MMP14、尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA)、肠激酶(enterokinase)、前列腺特异性抗原(PSA、hK3)、白介素-1 β 转化酶、凝血酶、FAP(FAP- α)、二肽基肽酶、甲基多巴(meprin)、粒酶和二肽基肽酶IV(DPPIV/CD26)。

[0226] 本文所描述的抗原结合多肽进一步提供超越所识别的单克隆抗体和其它较小的双特异性分子的治疗优点。双特异性分子被设计成经由与致病细胞相关的细胞特异性标记来与靶细胞结合。在某些情况下,当健康细胞或组织表达出与致病细胞相同的标记物时可能会有毒性。本发明的抗原结合多肽构建体的一个优点为与CD3的结合是依赖由所述靶细胞(例如肿瘤细胞)表达的蛋白酶的活化作用以及所述抗原结合结构域与一个或多个靶抗原(例如肿瘤抗原)结合。所述多肽构建体包含无活性CD3结合结构域,所述无活性CD3结合结构域包含被一个或多个蛋白酶裂解位点分开的V_H和V_{Li}或V_{Hi}和V_L。在靶细胞的富含蛋白酶的环境中,所述蛋白酶裂解位点被裂解,使V_H和V_{Li}或V_{Hi}和V_L分离并允许V_H和V_L或V_{Hi}和V_{Li}交

互作用以形成活性CD3结合结构域,然后在一个或多个靶抗原被结合时使所述构建体与CD3结合。当无蛋白酶裂解存在时,所述CD3结合结构域无活性并且无法与CD3结合。

[0227] 还提供由单独分子在蛋白酶裂解后配对形成活性抗CD3 scFv的多肽构建体。因此,为所述配对的第一成员的多肽构建体包括V_H/V_{Li}或V_{Hi}/V_L结构域,V_{Li}或V_{Hi}被蛋白酶从所述配对的第一成员裂解。所述对应的V_{Li}或V_{Hi}被从所述配对的第二成员裂解,允许经由将所述在CD3目标上的两个分开的分子配对来形成V_L/V_H结构域。一方面,这些“半-Pro”分子作为用于工程处理所述“全-Pro”分子的工具,其通过允许所述形成配对的两个分子容易变化和将从这些实验获得的信息翻译成设计并制备对应的“全-Pro”多肽构建体来作用。在各种实施例中,所述“半-Pro”分子必须同时结合CD3目标和靶抗原两者以形成功能性抗CD3 V_L/V_H对。

[0228] 因此,本文还提供所述蛋白质包含单一多肽链的多肽构建体,所述单一多肽链包含蛋白酶裂解结构域(P),此蛋白酶裂解结构域(P)将链分开成第一和第二CD3结合区;其中所述第一区包含抗CD3 V_H结合结构域(CV_H)和靶抗原结合结构域(T₁),而所述第二区包含抗CD3 V_L结合结构域(CV_L)和靶抗原结合结构域(T₂);其中所述蛋白质在第一或第二区中任选地包含半衰期延长结构域(H),并且其中当通过蛋白酶裂解P和由T₁和T₂结合靶抗原来活化时,所述第一和第二区相联结以形成结合CD3的完整抗CD3 V_L/V_H结构域。

[0229] 在某些方面中,本文还提供所述蛋白质包含单一多肽链的多肽构建体,所述单一多肽链包含蛋白酶裂解结构域(P),此蛋白酶裂解结构域(P)将链分开成第一和第二区;其中所述第一区包含抗CD3 V_L结合结构域(CV_L)和靶抗原结合结构域(T₁),而所述第二区包含抗CD3 V_H结合结构域(CV_H)和靶抗原结合结构域(T₂);其中所述蛋白质在第一或第二区中任选地包含半衰期延长结构域(H),并且其中当通过蛋白酶裂解P和由T₁和T₂结合靶抗原来活化时,所述第一和第二区相联结以形成结合CD3的完整抗CD3 V_L/V_H结构域。

[0230] 在某些方面中,本文还提供所述蛋白质包含单一多肽链的多肽构建体,所述单一多肽链包含第一和第二区;其中所述第一区包含抗CD3 V_H结合结构域(CV_H)、与CV_H联结的无活性抗CD3 V_L结合结构域(CV_{Li})和靶抗原结合结构域(T₁);其中所述第二区包含抗CD3 V_L结合结构域(CV_L);与CV_L联结的无活性抗CD3 V_H结合结构域(CV_{Hi})和靶抗原结合结构域(T₂);其中所述蛋白质在第一和/或第二区中任选地包含半衰期延长结构域(H),并且其中CV_{Li}和CV_{Hi}各自包含至少一个蛋白酶裂解结构域;其中当通过蛋白酶裂解所述蛋白酶裂解结构域和由T₁和T₂结合靶抗原来活化时,所述第一和第二区相联结以形成结合CD3的完整抗CD3 V_L/V_H结构域。

[0231] 在某些方面中,本文还提供所述蛋白质包含单一多肽链的多肽构建体,所述单一多肽链包含第一和第二区;其中所述第一区包含抗CD3 V_L结合结构域(CV_L)、与CV_L联结的无活性抗CD3 V_H结合结构域(CV_{Hi})和靶抗原结合结构域(T₁);其中所述第二区包含抗CD3 V_H结合结构域(CV_H);与CV_L联结的无活性抗CD3 V_L结合结构域(CV_{Li})和靶抗原结合结构域(T₂);其中所述蛋白质在第一和/或第二区中任选地包含半衰期延长结构域(H),并且其中CV_{Li}和CV_{Hi}各自包含至少一个蛋白酶裂解结构域;其中当通过蛋白酶裂解所述蛋白酶裂解结构域和由T₁和T₂结合靶抗原来活化时,所述第一和第二区相联结以形成结合CD3的完整抗CD3 V_L/V_H结构域。

[0232] 一方面,预活化形式的抗原结合蛋白包含单一多肽链,所述单一多肽链包含第一

结构域和第二区,所述第一结构域包含至少一个抗CD3结合结构域并且所述第二区包含至少一个抗目标结合结构域。所述第一区和第二区通过多肽连接子分开,所述多肽连接子在其序列中任选地包括一个或多个可裂解部分,例如至少一个蛋白酶裂解结构域(P)。在一个示意性实施例中,所述第一区包含抗CD3 V_H结合结构域(CV_H)和靶抗原结合结构域(T₁)。在一个实施例中,所述第二区包含抗CD3 V_L结合结构域(CV_L)和靶抗原结合结构域(T₂)。在一个实施例中,所述抗原结合结构域在第一区中任选地包含半衰期延长结构域(H)。在一个实施例中,所述抗原结合结构域在第二区中任选地包含半衰期延长结构域(H)。一旦通过蛋白酶裂解所述蛋白酶裂解结构域并由靶抗原结合结构域T₁和T₂结合所述靶抗原来活化时,所述抗CD3结合结构域CV_H和CV_L被活化以结合T细胞上的CD3。在抗原结合蛋白中的结构域预期在各区内以任何顺序排列,并在所述预活化的多肽中心具有一蛋白酶裂解结构域(P)。此外,在所述预活化的多肽内的各区可以是任何顺序。因此(仅用来举例),可预期的是,所述多肽构建体的示意性结构域顺序包括但不限于:

- [0233] a) CV_H-T¹-P-T²-CV_L、
- [0234] b) T¹-CV_H-P-T²-CV_L、
- [0235] c) CV_H-T¹-P-CV_L-T²、
- [0236] d) T¹-CV_H-P-CV_L-T²、
- [0237] e) H-CV_H-T¹-P-T²-CV_L、
- [0238] f) CV_H-H-T¹-P-T²-CV_L、
- [0239] g) CV_H-T¹-H-P-T²-CV_L、
- [0240] h) CV_H-T¹-P-H-T²-CV_L、
- [0241] i) CV_H-T¹-P-T²-H-CV_L、
- [0242] j) CV_H-T¹-P-T²-CV_L-H、
- [0243] k) H-T¹-CV_H-P-T²-CV_L、
- [0244] l) T¹-H-CV_H-P-T²-CV_L、
- [0245] m) T¹-CV_H-H-P-T²-CV_L、
- [0246] n) T¹-CV_H-P-H-T²-CV_L、
- [0247] o) T¹-CV_H-P-T²-H-CV_L、
- [0248] p) T¹-CV_H-P-T²-CV_L-H、
- [0249] q) H-CV_H-T¹-P-CV_L-T²、
- [0250] r) CV_H-H-T¹-P-CV_L-T²、
- [0251] s) CV_H-T¹-H-P-CV_L-T²、
- [0252] t) CV_H-T¹-P-H-CV_L-T²、
- [0253] u) CV_H-T¹-P-CV_L-H-T²、
- [0254] v) CV_H-T¹-P-CV_L-T²-H、
- [0255] w) H-T¹-CV_H-P-CV_L-T²、
- [0256] x) T¹-H-CV_H-P-CV_L-T²、
- [0257] v) T¹-CV_H-H-P-CV_L-T²、
- [0258] z) T¹-CV_H-P-H-CV_L-T²、
- [0259] aa) T¹-CV_H-P-CV_L-H-T²,和

[0260] bb) $T^1-CV_H-P-CV_L-T^2-H$ 。

[0261] 如本领域的技术人员所理解的,在上述a到bb各项中, CV_H 和 CV_L 中的一个无活性,即, CV_{Hi} 或 CV_{Li} 。在上述a-bb各项中的个别组分的顺序与“半-Pro”分子和“全-Pro”分子相关。在“全-Pro”分子方面,“T”和其它部分的数目可依需要而改变以形成有用的本发明的多肽构建体。一般来说,优选地,H与 CV_L 或 CV_H 的无活性版本结合。如第53图所例示,本发明的多肽构建体的组分可在一个顺序范围内连接并且其间以具有各种特性的连接子隔开。

[0262] 在各种实施例中,本发明提供为前药的多肽构建体(或指导所述多肽表达的核酸载体)。因此,提供一种前药组合物,其包含:i) 编码CD3结合结构域的第一多肽序列,所述CD3结合结构域包含含有第一 V_H 结构域和第一 V_L 结构域的第一scFv结构域,所述第一 V_H 结构域和所述第一 V_L 结构域通过包含第一蛋白酶裂解位点的第一scFv连接子部分接合,致使所述第一scFv结构域不会特异性结合CD3;ii) 编码肿瘤抗原结合结构域的第二多肽序列,所述肿瘤抗原结合结构域包含含有第二 V_H 结构域和第二 V_L 结构域的第二scFv结构域,所述第二 V_H 结构域和第二 V_L 结构域通过包含第二蛋白酶裂解位点的第二scFv连接子部分接合,致使所述第二scFv结构域不会特异性结合肿瘤抗原;和iii) 任选地至少一个半衰期延长结构域。

[0263] 在一个示意性实施例中,在所述前药组合物中,所述第一多肽序列和第二多肽序列通过任选地包含蛋白酶裂解位点的第一结构域连接子部分可操作地连接。

[0264] 在各种实施例中,提供一种前药组合物,其包含:i) 第一多肽序列,其包含a) 包含第一scFv结构域的第一CD3结合结构域,所述第一scFv结构域包含第一 V_H 结构域和第一 V_L 结构域,所述第一 V_H 结构域和所述第一 V_L 结构域通过包含第一蛋白酶裂解位点的第一scFv连接子部分接合,其中所述第一scFv结构域不会特异性结合CD3;和b) 第一肿瘤抗原结合结构域;ii) 第二多肽序列,其包含a) 包含第二scFv结构域的第二CD3结合结构域,所述第二scFv结构域包含第二 V_H 结构域和第二 V_L 结构域,所述第二 V_H 结构域和第二 V_L 结构域通过包含第二蛋白酶裂解位点的第二scFv连接子部分接合,其中所述第二scFv结构域不会特异性结合CD3;和b) 第二肿瘤抗原结合结构域;和iii) 任选地至少一个半衰期延长结构域。在一个示意性实施例中,所述第一 V_H 结构域和第二 V_L 结构域特异性结合CD3和/或所述第二 V_H 结构域和第一 V_L 结构域特异性结合CD3。

[0265] 在所述前药组合物中,所述第一肿瘤抗原结合结构域和所述第二肿瘤抗原结合结构域与相同的肿瘤抗原结合。在各种实施例中,所述第一肿瘤抗原结合结构域和所述第二肿瘤抗原结合结构域与不同的肿瘤抗原蛋白结合。在各种实施例中,所述第一肿瘤抗原结合结构域与呈现在第一肿瘤细胞上的第一肿瘤抗原结合,并且所述第二肿瘤抗原结合结构域与呈现在所述第一肿瘤细胞上的第二肿瘤抗原结合。

[0266] CD3结合结构域

[0267] T细胞反应的特异性通过T细胞受体复合物识别抗原来介导(在主要组织相容性复合物,MHC的背景下显示)。作为T细胞受体复合物的一部分,CD3为蛋白质复合物,其包括存在于所述细胞表面上的CD3 γ (gamma) 链、CD3 δ (delta) 链和两个CD3 ϵ (epsilon) 链。CD3与T细胞受体(TCR)的 α (alpha) 和 β (beta) 链以及CD3 ζ (zeta) 全部联结在一起以包含T细胞受体复合物。CD3在T细胞上群集成簇(例如通过固定的抗CD3抗体)而导致类似于T细胞受体接合的T细胞活化,但与其克隆典型特异性无关。在一些实施例中,抗CD3抗体与CD3的结合通

过蛋白酶裂解结构域调节,所述蛋白酶裂解结构域限制CD3抗体与CD3仅在具有提高的蛋白酶水平的患病细胞或组织的微环境(例如在肿瘤微环境中)中结合。

[0268] 一方面,本文所描述的多肽构建体包含当被蛋白酶活化时会特异性结合CD3的结构域。一方面,本文所描述的多肽构建体包含两个或更多个当被蛋白酶活化时会特异性结合人CD3的结构域。在一些方面,本文所描述的多肽构建体包含两个或更多个当被蛋白酶活化时会特异性结合CD3 γ 的结构域。在一些实施例中,本文所描述的多肽构建体包含两个或更多个当被蛋白酶活化时会特异性结合CD3 δ 的结构域。在一些实施例中,本文所描述的多肽构建体包含两个或更多个当被蛋白酶活化时会特异性结合CD3 ϵ 的结构域。

[0269] 在一些实施例中,所述蛋白酶裂解位点位于抗CD3 V_H和V_L结构域之间并使所述CD3 V_H和V_L结构域避免折叠和与T细胞上的CD3结合。一旦所述蛋白酶裂解位点被存在于所述靶细胞的蛋白酶裂解,所述抗CD3 V_H和V_L结构域就会折叠并与T细胞上的CD3结合。在一个替代的实施例中,所述蛋白酶裂解位点被设计成在与所述抗CD3 V_H和V_L结构域结合的非CD3结合V_L和V_H结构域中。通过存在于靶细胞的蛋白酶来裂解所述蛋白酶裂解位点可去除非CD3结合V_L和V_H结构域并允许抗CD3 V_H和V_L折叠和与T细胞上的CD3结合。

[0270] 本文所描述的抗原结合蛋白包含当被蛋白酶活化时会与CD3特异性结合的结构域。在一个实施例中,所述特异性结合CD3的结构域包含被至少一个蛋白酶裂解位点分开的V_H结构域和V_L结构域。当所述蛋白酶裂解位点被裂解时,所述V_H结构域和V_L结构域能够折叠,从而与CD3结合。在一些实施例中,所述蛋白酶裂解位点是在环区中。在一些实施例中,所述蛋白酶裂解位点是在V_H和/或V_L结构域内,所述蛋白酶裂解位点被裂解后露出V_H和/或V_L结构域,允许它们折叠,从而与CD3结合。

[0271] 在进一步的实施例中,本文所描述的多肽构建体包含两个或更多个当被蛋白酶活化时会特异性结合T细胞受体(TCR)的结构域。在某些情况下,本文所描述的多肽构建体包含两个或更多个当被蛋白酶活化时会特异性结合TCR的链的结构域。在某些情况下,本文所描述的多肽构建体包含两个或更多个当被蛋白酶活化时会特异性结合TCR的 β 链的结构域。

[0272] 在某些实施例中,本文所描述的多肽构建体的CD3结合结构域不仅表现出对人CD3的强CD3结合亲和力,还显示出分别与食蟹猴CD3蛋白具有优良的交叉反应性。在一些情况下,所述多肽构建体的CD3结合结构域与来自食蟹猴的CD3交叉反应。在某些情况下,人:食蟹猴对CD3的K_d比是在5和0.2之间。

[0273] 在一些实施例中,所述抗原结合蛋白的CD3结合结构域可以是任何与CD3结合的结构域,包括但不限于来自单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体的结构域。在一些情况下,所述CD3结合结构域源自最终将使用所述抗原结合蛋白的相同物种是有利的。例如,为了用于人体,所述抗原结合蛋白的CD3结合结构域包含来自抗体或抗体片段的抗原结合结构域的人或人源化残基是有利的。

[0274] 因此,一方面,所述抗原结合结构域包含人源化抗体、或人抗体、或抗体片段、或鼠抗体、或抗体片段。在一个实施例中,所述人源化或人抗CD3结合结构域包含一个或多个(例如全部三个)本文所描述的人源化或人抗CD3结合结构域的轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区2(LC CDR2)、轻链互补决定区3(LC CDR3),和/或一个或多个(例如全部三个)本文所描述的人源化或人抗CD3结合结构域的重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如包含一个或多个(例如全部三个)LC CDR

和一个或多个(例如全部三个)HC CDR。

[0275] 在一些实施例中,所述人源化或人抗CD3结合结构域包含特异于CD3的人源化或人轻链可变区,其中所述特异于CD3的轻链可变区包含在人轻链框架区中的人或非人轻链CDR。在某些情况下,所述轻链框架区为 λ (lambda) 轻链框架。在其它情况下,所述轻链框架区为 κ (kappa) 轻链框架。

[0276] 在一些实施例中,一个或多个CD3结合结构域特异于CD3 ϵ 。在一些实施例中,一个或多个CD3结合结构域特异于CD3 δ 。在一些实施例中,一个或多个CD3结合结构域特异于CD3 γ 。

[0277] 在一些实施例中,一个或多个CD3结合结构域为人源化的或全部为人的。在一些实施例中,一个或多个活化的CD3结合结构域与CD3表达细胞上的CD3结合的KD为1000nM或更小。在一些实施例中,一个或多个活化的CD3结合结构域与CD3表达细胞上的CD3结合的KD为100nM或更小。在一些实施例中,一个或多个活化的CD3结合结构域与CD3表达细胞上的CD3结合的KD为10nM或更小。在一些实施例中,一个或多个CD3结合结构域与食蟹猴CD3具有交叉反应性。在一些实施例中,一个或多个CD3结合结构域包含本文所提供的氨基酸序列。

[0278] 在一些实施例中,所述人源化或人抗CD3结合结构域包含特异于CD3的人源化或人重链可变区,其中所述特异于CD3的重链可变区包含在人重链框架区中的人或非人重链CDR。

[0279] 在某些情况下,所述重链和/或轻链的互补决定区源自已知的抗CD3抗体,例如,例如莫罗单抗-CD3 (muromonab-CD3) (OKT3)、奥昔珠单抗 (otelixizumab) (TRX4)、替利珠单抗 (teplizumab) (MGA031)、维西珠单抗 (visilizumab) (Nuvion)、SP34或I2C、TR-66或X35-3、VIT3、BMA030 (BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1和WT-31。

[0280] 在一个实施例中,所述抗CD3结合结构域为单链可变片段(scFv),所述单链可变片段(scFv)包含本文提供的氨基酸序列的轻链和重链。在一个实施例中,所述抗CD3结合结构域包含:轻链可变区,其包含对本文所提供的轻链可变区的氨基酸序列制造至少1、2或3个修饰(例如取代),但不超过30、20或10个修饰(例如取代)所产生的氨基酸序列,或者所述轻链可变区包含的序列与本文所提供的氨基酸序列具有95%到99%的同一性;和/或重链可变区,其包含对本文所提供的重链可变区的氨基酸序列制造至少1、2或3个修饰(例如取代),但不超过30、20或10个修饰(例如取代)所产生的氨基酸序列,或者所述重链可变区包含的序列与本文所提供的氨基酸序列具有95%到99%的同一性。在一个实施例中,所述人源化或人抗CD3结合结构域为scFv,并且包含本文所描述的氨基酸序列的轻链可变区经由scFv连接子连接包含本文所描述的氨基酸序列的重链可变区。所述scFv的轻链可变区和重链可变区可以是例如任何下列取向:轻链可变区域-scFv连接子-重链可变区或重链可变区域-scFv连接子-轻链可变区。

[0281] 在一些实施例中,抗原结合蛋白的CD3结合结构域对CD3表达细胞上的CD3的亲合力的 K_D 为1000nM或更低、100nM或更低、50nM或更低、20nM或更低、10nM或更低、5nM或更低、1nM或更低、或0.5nM或更低。在一些实施例中,抗原结合蛋白的CD3结合结构域对CD3 ϵ 、 γ 或 δ 的亲合力的 K_D 为1000nM或更低、100nM或更低、50nM或更低、20nM或更低、10nM或更低、5nM

或更低、1nM或更低、或0.5nM或更低。在进一步的实施例中，抗原结合蛋白的CD3结合结构域对CD3的亲合力低，即， K_D 为约100nM或更高。

[0282] 对CD3的结合亲和力可例如通过所述抗原结合蛋白本身或其CD3结合结构域与涂布在分析板上的CD3、展现在微生物细胞表面上的CD3、溶液中的CD3等结合的能力来测定。本发明的抗原结合蛋白本身或其CD3结合结构域与CD3结合的活性可通过将所述配体(例如CD3)或抗原结合蛋白本身或其CD3结合结构域固定在小珠、底物、细胞等来测定。作用剂可加入适当的缓冲液中并将结合伙伴在指定的温度下孵育一段时间。在洗涤以除去未结合的物质后，结合蛋白可随着例如SDS、具有高pH的缓冲液等释出并通过例如表面等离子体共振(SPR)分析。

[0283] 连接子

[0284] 两个结构域通过任选地可裂解的连接子接合。示意性裂解位点为蛋白酶裂解位点。裂解域间连接子的示意性蛋白酶包括在血浆中所发现的蛋白酶(例如凝血酶)和在肿瘤微环境中过度表达的蛋白酶。

[0285] 在本文所描述的抗原结合多肽中，结构域通过结构域连接子(例如 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4)连接，其中 L^1 连接多肽构建体的第一和第二结构域， L^2 连接多肽构建体的第二和第三结构域， L^3 连接多肽构建体的第三和第四结构域并且 L^4 连接经过蛋白酶活化的多肽构建体的第四和第五结构域。连接子(例如 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4)具有优化的长度和/或氨基酸组成。在一些实施例中，连接子(例如 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4)并不相同。在某些实施例中，内部连接子 L^1 、 L^2 、 L^3 和/或 L^4 是“短”的，即，由0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸残基所组成。因此，在某些情况下，所述内部连接子由约12个或更少的氨基酸残基所组成。在0个氨基酸残基的情况下，结构域连接子为肽键。在某些实施例中，结构域连接子 L^1 、 L^2 、 L^3 和/或 L^4 是“长”的，即，由15、20或25个氨基酸残基所组成。在一些实施例中，这些结构域连接子由约3到约15个(例如8、9或10个)连续氨基酸残基所组成。关于结构域连接子的氨基酸组成，选择具有能赋予多肽构建体弹性，不会干扰结合结构域和任选地抵抗蛋白酶裂解的性质的肽类。例如，甘氨酸和丝氨酸残基通常提供对蛋白酶裂解的抗性。适合用于连接本发明的多肽中的结构域的内部连接子的实例包括但不限于 $(GS)_n$ 、 $(GGS)_n$ 、 $(GGGS)_n$ 、 $(GGSG)_n$ 、 $(GGSGG)_n$ 或 $(GGGGS)_n$ ，其中 n 为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一个实施例中，内部连接子 L^1 、 L^2 和/或 L^3 为 $(GGGGS)_4$ 或 $(GGGGS)_3$ 。

[0286] 在一些情况下，与CD3结合的scFv根据已知方法制备。例如，scFv分子可经由使用弹性多肽连接子将 V_H 和 V_L 区连接在一起来制造。所述scFv分子包含具有优化的长度和/或氨基酸组成的scFv连接子(例如Ser-Gly连接子)。因此，在一些实施例中，scFv连接子的长度使 V_H 或 V_L 结构域可与其它可变结构域分子间式联结以形成CD3结合位点。在某些实施例中，所述scFv连接子是“短”的，即，由0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸残基所组成。因此，在某些情况下，scFv连接子由约12个或更少的氨基酸残基所组成。在0个氨基酸残基的情况下，scFv连接子为肽键。在一些实施例中，这些scFv连接子由约3到约15个(例如8、9或10个)连续氨基酸残基所组成。关于scFv连接子的氨基酸组成，选择能赋予弹性，不会干扰可变结构域和允许链间折叠以使两个可变结构域连接在一起形成功能性CD3结合位点的肽类。例如，包含甘氨酸和丝氨酸残基的scFv连接子通常提供蛋白酶抗性。在一些实施例中，scFv中的连接子包含甘氨酸和丝氨酸残基。scFv连接子的氨基酸序列可例如通过噬菌体展示法来优化以改善CD3结合和scFv的产量。适合用于连接scFv中的可变轻链结构域和

可变重链结构域的肽scFv连接子的实例包括但不限于 (GS)_n、(GGS)_n、(GGGS)_n、(GGSG)_n、(GGSGG)_n或(GGGGS)_n,其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一个实施例中,scFv连接子可以是(GGGGS)₄或(GGGGS)₃。连接子长度的变化可维持或增强活性,在活性研究中产生优选的效力。

[0287] 其它示意性结构域和scFv连接子阐明于第56图中。

[0288] 蛋白酶裂解结构域

[0289] 本文所描述的抗原结合多肽包含至少一个蛋白酶裂解位点,所述蛋白酶裂解位点包含被至少一种蛋白酶裂解的氨基酸序列。在一些情况下,本文所描述的抗原结合蛋白包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个被至少一种蛋白酶裂解的蛋白酶裂解位点。在一些情况下,包含可被蛋白酶识别的氨基酸序列的蛋白酶裂解位点为MMP9裂解位点,此MMP9裂解位点包含具有氨基酸序列LEATA的多肽。

[0290] 蛋白酶裂解结构域为具有以序列特异性方式被识别和裂解的序列的多肽。在一些情况下,本文所考量的抗原结合蛋白包含以序列特异性方式被基质金属蛋白酶(MMP)(例如MMP9)识别的蛋白酶裂解结构域。在一些情况下,被MMP9识别的蛋白酶裂解结构域包含具有氨基酸序列PR(S/T)(L/I)(S/T)的多肽。在一些情况下,被MMP9识别的蛋白酶裂解结构域包含具有氨基酸序列LEATA的多肽。在一些情况下,蛋白酶裂解结构域以序列特异性方式被MMP11识别。在一些情况下,被MMP11识别的蛋白酶裂解结构域包含具有氨基酸序列GGAANLVRGG的多肽。在一些情况下,蛋白酶裂解结构域被表1中所公开的蛋白酶识别。在一些情况下,被表1中所公开的蛋白酶识别的蛋白酶裂解结构域所包含的多肽具有选自表1中所公开的序列的氨基酸序列。

[0291] 在一些情况下,蛋白酶为以序列特异性方式裂解蛋白质的蛋白质。蛋白酶包括但不限于丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天门冬氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、天门冬酰胺肽裂解酶、血清蛋白酶、组织蛋白酶、组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、激肽释放酶、hK1、hK10、hK15、纤溶酶、胶原蛋白酶、第IV型胶原蛋白酶、溶基质蛋白酶、第Xa因子、胰凝乳蛋白酶样蛋白酶、胰蛋白酶样蛋白酶、弹性蛋白酶样蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶类蛋白酶、奇异果蛋白酶、凤梨蛋白酶、钙蛋白酶、凋亡蛋白酶、凋亡蛋白酶3、Mir 1-CP、木瓜蛋白酶、HIV-1蛋白酶、HSV蛋白酶、CMV蛋白酶、凝乳酶、肾素、胃蛋白酶、蛋白裂解酶、天门冬酰胺内肽、天门冬氨酸蛋白酶、猪笼草蛋白酶、金属外肽酶、金属内肽酶、基质金属蛋白酶(MMP)、MMP1、MMP2、MMP3、MMP8、MMP9、MMP11、MMP13、MMP14、尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA)、肠激酶、前列腺特异性抗原(PSA、hK3)、白介素-1 β 转化酶、凝血酶、FAP(FAP- α)、二肽基肽酶和二肽基肽酶IV(DPP/CD26)。

[0292] 表1:示意性蛋白酶和蛋白酶裂解结构域序列

[0293]

蛋白酶	裂解结构域序列	SEQ ID NO:
MMP7	KRALGLPG	2
MMP7	(DE) ₈ RPLALWRS(DR) ₈	3
MMP9	PR(S/T)(L/I)(S/T)	4
MMP9	LEATA	5
MMP11	GGAANLVRGG	6
MMP14	SGRIGFLRTA	7
MMP	PLGLAG	8
MMP	PLGLAX	9
MMP	PLGC(me)AG	10
MMP	ESPAYYTA	11
MMP	RLQLKL	12
MMP	RLQLKAC	13
MMP2、MMP9、MMP14	EP(Cit)G(Hof)YL	14
尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA)	SGRSA	15
尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA)	DAFK	16
尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA)	GGGRR	17
溶酶体酶	GFLG	18
溶酶体酶	ALAL	19
溶酶体酶	FK	20
组织蛋白酶 B	NLL	21
组织蛋白酶 D	PIC(Et)FF	22
组织蛋白酶 K	GGPRGLPG	23
前列腺特异性抗原	HSSKLQ	24
前列腺特异性抗原	HSSKLQL	25
前列腺特异性抗原	HSSKLQEDA	26
单纯疱疹病毒蛋白酶	LVLASSSFGY	27
HIV 蛋白酶	GVSQNYPIVG	28
CMV 蛋白酶	GVVQASCRLA	29
凝血酶	F(Pip)RS	30
凝血酶	DPRSFL	31
凝血酶	PPRSFL	32
凋亡蛋白酶-3	DEV D	33
凋亡蛋白酶-3	DEVDP	34
凋亡蛋白酶-3	KGSGDVEG	35
白介素 1 β 转化酶	GWEHDG	36
肠激酶	EDDDDKA	37

[0294]

FAP	KQEQNPGST	38
激肽释放酶 2	GKAFRR	39
纤溶酶	DAFK	40
纤溶酶	DVLK	41
纤溶酶	DAFK	42
TOP	ALLLALL	43

[0295] 已知蛋白酶由某些患病细胞和组织(例如肿瘤或癌细胞)分泌,创建富含蛋白酶或蛋白酶丰裕的微环境。在一些情况下,受试者的血液中富含蛋白酶。在一些情况下,肿瘤周围的细胞分泌蛋白酶入肿瘤微环境。肿瘤周围的分泌蛋白酶的细胞包括但不限于肿瘤基质细胞、成肌纤维细胞、血细胞、肥大细胞、B细胞、NK细胞、调节性T细胞、巨噬细胞、细胞毒性T淋巴细胞、树突细胞、间质干细胞、多形核细胞和其它细胞。在一些情况下,蛋白酶存在于受试者的血液中,例如在微生物肽类中发现的靶向氨基酸序列的蛋白酶。此特性允许被靶向的治疗剂(例如抗原结合蛋白)具有额外的特异性,因为T细胞将不会与抗原结合蛋白结合,除了在富含蛋白酶的被靶向的细胞或组织微环境中。

[0296] 在示意性实施例中,多肽构建体包括一个或多个蛋白酶裂解位点,例如上述表1中所阐明的位点。在各种实施例中,这些位点是在scFv中并且位于一个或多个V_{Li}或V_{Hi}和一个或多个V_H或V_L之间,从而在所述位点被相关蛋白酶裂解时,V_{Li}与V_H分开和/或V_{Hi}与V_L分开。如本领域的技术人员所理解的,所述蛋白酶裂解位点可包含介于V_L与V_H结构域之间的整个连接多肽scFv连接子序列,或者,所述裂解位点的一端或两端可邻接额外的氨基酸或肽序列。

[0297] 在一些实施例中,所述蛋白酶裂解结构域是在半衰期延长结构域或CD3结合结构域中。在一些实施例中,所述蛋白酶裂解结构域不在半衰期延长结构域或CD3结合结构域中。

[0298] 半衰期延长结构域

[0299] 本文所考量的为延长抗原结合结构域在半衰期的结构域。所述结构域预计包括但不限于HSA结合结构域、Fc结构域、小分子和本领域中已知的其它半衰期延长结构域。

[0300] 人血清白蛋白(HSA)(分子量约67kDa)为血浆中最丰富的蛋白质,其存在量为约50mg/ml(600μM)并且在人体中的半衰期为约20天。HSA用于维持血浆pH,有助于胶体血压,作为许多代谢物和脂肪酸的载体并作为血浆中的主要药物转运蛋白。

[0301] 与白蛋白非共价结合可延长短期蛋白质的排除半衰期。例如当经由静脉内途径向小鼠和兔子施用白蛋白结合结构域与Fab片段的重组融合物时,与施用单独的Fab片段相比较,可导致分别为25倍和58倍的体内清除并且半衰期分别延长26倍和37倍。在另一个实例中,以脂肪酸将胰岛素酰化以促进与白蛋白联结时,当经由皮下途径注射兔或猪时可观察到拖延效果。总之,这些研究证明结合白蛋白和长期作用之间的关联。

[0302] 一方面,本文所描述的抗原结合蛋白包含半衰期延长结构域,例如特异性结合HSA的结构域。在一些实施例中,抗原结合蛋白的HSA结合结构域可以是结合HSA的任何结构域,包括但不限于来自单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体的结构域。在一些实施例中,所述HSA结合结构域为单链可变片段(scFv)、单结构域抗体,例如源自骆驼科

动物的特异于HSA的纳米抗体、肽、配体或小分子的重链可变结构域(VH)、轻链可变结构域(VL)和可变结构域(VHH)。在某些实施例中,所述HSA结合结构域为单结构域抗体。在其它实施例中,所述HSA结合结构域为肽。在进一步的实施例中,所述HSA结合结构域为小分子。预计所述抗原结合蛋白的HSA结合结构域相当小并且不超过25kD、不超过20kD、不超过15kD,或在一些实施例中,不超过10kD。在某些情况下,如果所述HSA结合结构域为肽或小分子,那么其为5kD或更小。

[0303] 抗原结合蛋白的半衰期延长结构域为抗原结合蛋白本身提供改变的药效学和药代动力学。如上所述,半衰期延长结构域延长排除半衰期。半衰期延长结构域还改变药效学性质,包括改变抗原结合蛋白的组织分布、渗透和扩散。在一些实施例中,相较于无半衰期延长结合结构域的蛋白质,半衰期延长结构域提供改善的组织(包括肿瘤)靶向、组织渗透、组织分布、在组织内的扩散和增进的效力。在一个实施例中,治疗方法有效并且有效率地利用减量的抗原结合蛋白,导致副作用减少,例如非肿瘤细胞的细胞毒性降低。

[0304] 此外,半衰期延长结构域(例如HSA结合结构域)的特征包括HSA结合结构域对HSA的结合亲和力。可对HSA结合结构域的亲和力加以选择,从而靶向特定多肽构建体中的特定排除半衰期。因此,在一些实施例中,HSA结合结构域具有高结合亲和力。在其它实施例中,HSA结合结构域具有中等结合亲和力。在其它实施例中,HSA结合结构域具有低或临界结合亲和力。示意性结合亲和力包括10nM或更小的 K_D 浓度(高亲和力)、介于10nM到100nM的 K_D 浓度(中等亲和力)和大于100nM的 K_D 浓度(低亲和力)。如上所述,与HSA的结合亲和力通过已知方法,例如表面等离子体共振(SPR)测定。

[0305] 靶抗原结合结构域

[0306] 除了所描述的CD3和半衰期延长结构域外,本文所描述的多肽构建体还包含至少一个、或至少2个或更多个与一个或多个靶抗原结合或与单一靶抗原上的一个或多个区域结合的结构域。预计本发明的多肽构建体是在例如受试者的疾病特异性微环境或血液中的蛋白酶裂解结构域被裂解,并且各靶抗原结合结构域将与靶细胞上的靶抗原结合,从而活化CD3结合结构域与T细胞结合。至少一个靶抗原涉及疾病、病症或病况和/或与疾病、病症或病况相关联。示意性靶抗原包括那些与增殖性疾病、肿瘤疾病、发炎疾病、免疫疾病、自体免疫疾病、感染性疾病、病毒性疾病、过敏反应、寄生虫反应、移植物抗宿主疾病或宿主抗移植物疾病相关的靶抗原。在一些实施例中,靶抗原为在肿瘤细胞上表达的肿瘤抗原。或者,在一些实施例中,靶抗原与病原体相关,例如病毒或细菌。至少一种靶抗原还会针对健康组织。

[0307] 在一些实施例中,靶抗原为细胞表面分子,例如蛋白质、脂质或多糖。在一些实施例中,靶抗原是在肿瘤细胞、被病毒感染的细胞、被细菌感染的细胞、受损的红细胞、动脉斑块细胞或纤维化组织细胞上。本文预计当结合超过一个靶抗原时,两个无活性的CD3结合结构域共同定位并在靶细胞的表面上形成活性CD3结合结构域。在一些实施例中,抗原结合蛋白包含超过一个靶抗原结合结构域以活化在抗原结合蛋白中的无活性CD3结合结构域。在一些实施例中,抗原结合蛋白包含超过一个靶抗原结合结构域以增强与靶细胞结合的力度。在一些实施例中,抗原结合蛋白包含超过一个靶抗原结合结构域以增强与靶细胞结合的力量。在一些实施例中,超过一个抗原结合结构域包含相同的抗原结合结构域。在一些实施例中,超过一个抗原结合结构域包含不同的抗原结合结构域。例如,已知将双重表达在患病细

胞或组织(例如肿瘤或癌症细胞)中的两个不同的抗原结合结构域可增强抗原结合蛋白与目标的结合或对目标的选择性。

[0308] 本文所考量的多肽构建体包括至少一个抗原结合结构域,其中抗原结合结构域与至少一个靶抗原结合。在一些情况下,靶抗原在患病细胞或组织(例如肿瘤或癌细胞)的表面上表达。靶抗原包括但不限于EpCAM、EGFR、HER-2、HER-3、c-Met、FoIR和CEA。本文所公开的多肽构建体还包括包含两个抗原结合结构域的蛋白质,所述两个抗原结合结构域与两个已知表达在患病细胞或组织上的不同靶抗原结合。示意性抗原结合结构域对包括但不限于EGFR/CEA、EpCAM/CEA和HER-2/HER-3。

[0309] 本文所描述的多肽构建体的设计允许所述针对一个或多个靶抗原的结合结构域有灵活性,使得所述针对靶抗原的结合结构域可以是任何类型的结合结构域,包括但不限于来自单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体的结构域。在一些实施例中,所述针对靶抗原的结合结构域为单链可变片段(scFv)、单结构域抗体,例如源自骆驼科动物的纳米抗体的重链可变结构域(V_H)、轻链可变结构域(V_L)和可变结构域(VHH)。在其它实施例中,所述针对靶抗原的结合结构域为非Ig结合结构域,即,抗体模拟物,例如抗运载蛋白(anticalin)、人泛素(affilin)、亲和体分子、affimer、阿非廷(affitin)、 α 体(alphabody)、avimer、DARPin、fynomer、Kunitz结构域肽和单抗体。在进一步的实施例中,所述针对一个或多个靶抗原的结合结构域为与一个或多个靶抗原结合或联结的配体或肽。

[0310] 在一些实施例中,所述靶细胞抗原结合结构域独立包含scFv、V_H结构域、V_L结构域、非Ig结构域或特异性结合靶抗原的配体。在一些实施例中,所述靶抗原结合结构域特异性结合细胞表面分子。在一些实施例中,所述靶抗原结合结构域特异性结合肿瘤抗原。在一些实施例中,所述靶抗原结合结构域特异性并且独立地结合选自下列至少一个的抗原:EpCAM、EGFR、HER-2、HER-3、cMet、CEA和FoIR。在一些实施例中,所述靶抗原结合结构域特异性并且独立地结合两种不同抗原,其中所述抗原至少一个选自EpCAM、EGFR、HER-2、HER-3、cMet、CEA和FoIR中的一个。在一些实施例中,所述蛋白质在蛋白酶裂解结构域裂解之前小于约100kDa。在一些实施例中,所述蛋白质在蛋白酶裂解结构域裂解之后为约25到约75kDa。在一些实施例中,所述蛋白质在蛋白酶裂解之前的大小高于首过清除的肾阈值。在一些实施例中,所述蛋白质在蛋白酶裂解之前的排除半衰期为至少约50小时。在一些实施例中,所述蛋白质在蛋白酶裂解之前的排除半衰期为至少约100小时。在一些实施例中,与针对相同靶抗原的IgG相比较,所述蛋白质具有增加的组织渗透。在一些实施例中,与针对相同靶抗原的IgG相比较,所述蛋白质具有增加的组织分布。

[0311] 多肽构建体药代动力学

[0312] 本文所描述的多肽构建体具有本领域的技术人员所能想到的某些优点。例如,本文所描述的多肽构建体具有优于传统抗体治疗剂的改善的药代动力学。本文的多肽构建体的药代动力学改善至少归因于所述半衰期延长结构域和CD3结合结构域。如本文所公开的半衰期延长结构域包括各种多肽,这些多肽包括但不限于与HSA结合的Fc结构域和多肽。本文的CD3结合结构域具有独特的性质,其产生优异的药代动力学。本文的CD3结合结构域不与CD3结合,直到其通过至少一个蛋白酶裂解结构域被裂解并且所述抗原结合结构域与靶抗原结合而使所述CD3结合结构域被活化。因此,本文的抗原结合蛋白的药代动力学增强至少部分归因于通过个人的循环中的CD3结合作用来减少或排除由目标介导的药物沉积。改

善的药物动力学包含较浅的 α 相和较高的 β 相中暴露中的至少一个。因此,相较于传统的抗体治疗剂,本文所描述的抗原结合蛋白具有较大的治疗窗,暴露时的峰/谷差异较小。

[0313] 多肽构建体修饰

[0314] 本文所描述的多肽构建体包含衍生物或类似物,其中(i)氨基酸被并非由遗传密码编码的氨基酸残基所取代,(ii)成熟多肽与另一种化合物(例如聚乙二醇)融合,或(iii)额外的氨基酸与蛋白质融合,例如领导或分泌序列或用于纯化蛋白质的序列。

[0315] 典型的修饰包括但不限于乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、共价连接黄素、共价连接血红素部分、共价连接核苷酸或核苷酸衍生物、共价连接脂质或脂质衍生物、共价连接磷脂酰肌醇、交联、环化、形成二硫键、去甲基化、形成共价交联、形成胱氨酸、形成焦谷氨酸、甲酰化、 γ 羧基化、糖基化、形成GPI锚、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、由转运RNA介导的在蛋白质中添加氨基酸,例如精氨酸酰化和泛素化。

[0316] 修饰在本文所描述的多肽构建体中的任何位置进行,包括肽骨架、氨基酸侧链和氨基或羧基端。可用于修饰多肽构建体的某些常见的肽修饰包括糖基化、脂质连接、硫酸化、谷氨酸残基的 γ -羧基化、羟基化、通过共价修饰阻断多肽中的氨基或羧基或这两者,以及ADP核糖基化。

[0317] 编码抗原结合蛋白的多核苷酸

[0318] 在一些实施例中还提供编码本文所描述的抗原结合蛋白的多核苷酸分子。在一些实施例中,多核苷酸分子以DNA构建体的形式提供。在其它实施例中,多核苷酸分子以信使RNA转录子的形式提供。

[0319] 多核苷酸分子通过已知方法构建,例如通过组合编码三个结合结构域的基因构建,所述三个结合结构域通过肽连接子分开,或者,在其它实施例中通过肽键直接连接成单一遗传构建体,所述构建体可操作地连接合适的启动子和任选地合适的转录终止子,并使所述构建体在细菌或例如CHO细胞的其它合适的表达系统中表达。在目标结合结构域为小分子的实施例中,多核苷酸含有编码与CD3和HSA结合的结构域的基因。在半衰期延长结构域为小分子的实施例中,多核苷酸含有编码与CD3和靶抗原结合的结构域的基因。根据所采用的载体系统和宿主,可使用任何数目的合适的转录和翻译元件,包括组成型和诱导型启动子。所述启动子经过选择以致使其驱动所述多核苷酸在对应的宿主细胞中表达。

[0320] 在一些实施例中,所述多核苷酸被插入载体中(优选为表达载体),其代表另外的实施例。重组载体可根据已知方法构建。特别令人感兴趣的载体包括质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、病毒(例如逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、慢病毒等)和粘粒。

[0321] 多种表达载体/宿主系统可用于包含并表达所述编码所描述的多肽构建体的多肽的多核苷酸。表达载体的实例有利于在大肠杆菌中表达的pSKK(Le Gall等人,《免疫学方法杂志(J Immunol Methods.)》(2004) 285(1):111-27),或用于在哺乳动物细胞中表达的pcDNA5(Invitrogen)。

[0322] 因此,在一些实施例中,如本文所描述的多肽构建体经由将编码如上所述的蛋白质的载体引入宿主细胞,并在能表达所述蛋白结构域的条件下培养所述宿主细胞来制造,所述多肽构建体可被分离和任选地进一步纯化。

[0323] 药物组合物

[0324] 在一些实施例中还提供药物组合物,其包含本文所描述的抗原结合蛋白、包含编码所述多肽构建体的多肽的多核苷酸的载体或通过此载体转化的宿主细胞和至少一种药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的载体”包括但不限于不会干扰所述成分的生物活性的有效性并且对施用所述载体的患者没有毒性的任何载体。合适的药学载体的实例为本领域众所周知的,包括磷酸盐缓冲的盐溶液、水、乳剂(例如油/水乳液)、各种类型的润湿剂、无菌溶液等。所述载体可通过常规方法配制并且可以合适的剂量施用给受试者。优选地,所述组合物为无菌的。这些组合物还可含有佐剂,例如防腐剂、乳化剂和分散剂。预防微生物的作用可通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂来确保。

[0325] 在所述药物组合物的一些实施例中,本文所描述的抗原结合蛋白包封在纳米颗粒中。在一些实施例中,纳米颗粒为富勒烯、液晶、脂质体、量子点(quantum dot)、超顺磁性纳米颗粒、树枝状聚合物(dendrimer)或纳米棒。在所述药物组合物的其它实施例中,所述抗原结合蛋白是连接脂质体。在一些情况下,所述抗原结合蛋白缀合到脂质体的表面上。在一些情况下,所述抗原结合蛋白包封在脂质体的壳体内。在一些情况下,所述脂质体为阳离子脂质体。

[0326] 本文所描述的多肽构建体被考虑作为药物。投药可通过不同方式生效,例如经由静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或皮内投药进行。在一些实施例中,投药途径取决于治疗的种类和包含在药物组合物中的化合物的种类。剂量方案将由主治医师和其它临床因素决定。用于任一患者的剂量取决于许多因素,包括患者的尺寸、体表面积、年龄、性别、欲施用的特定化合物、投药的时间和途径、治疗种类、整体健康状况和其它同时施用的药物。“有效剂量”是指足以影响疾病的过程和严重性,导致所述病态减轻或缓解的活性成分的量并可使用已知的方法测定。

[0327] 治疗方法

[0328] 在一些实施例中,本文还提供用于刺激有此需要的受试者的免疫系统的方法和用途,其包含施用本文所描述的抗原结合蛋白。在一些情况下,施用本文所描述的抗原结合蛋白可诱导和/或维持针对表达靶抗原的细胞的细胞毒性,其中所述表达靶抗原的细胞是在具有增加的蛋白酶活性水平的微环境中。在一些情况下,所述表达靶抗原的细胞为癌症或肿瘤细胞、被病毒感染的细胞、被细菌感染的细胞、自身反应性T细胞或B细胞、受损的红细胞、动脉斑块或纤维组织。在一些情况下,受试者的血液富含蛋白酶。

[0329] 本文还提供用于治疗与靶抗原相关的疾病、失调或病症的方法和用途,其包含对此有需要的受试者施用本文所描述的抗原结合蛋白。与靶抗原相关的疾病、失调或病症包括但不限于病毒感染、细菌感染、自体免疫病、移植排斥、动脉粥样硬化或纤维化。在其它实施例中,所述与靶抗原相关的疾病、失调或病症为增殖性疾病、肿瘤疾病、炎性疾病、免疫疾病、自体免疫疾病、感染性疾病、病毒疾病、过敏性反应、寄生虫反应、移植物抗宿主疾病或宿主抗移植物疾病。在一个实施例中,所述与靶抗原相关的疾病、失调或病症为癌症。在一种情况下,所述癌症为血液癌症。在另一种情况下,所述癌症为实体肿瘤癌症。

[0330] 在一些实施例中,如本文所使用的“治疗(treatment或treating或treated)”是指治疗性处理,其中目标是减缓(减轻)不受欢迎的生理病症、失调或疾病,或取得有益或期望的临床效果。在本文所描述的目的方面,有益或期望的临床结果包括但不限于减轻症状;减少所述病症、失调或疾病的程度;稳定(即,不恶化)所述病症、失调或疾病的状态;延迟所述

病症、失调或疾病发作或减缓进展；改善所述病症、失调或疾病状态；和缓解（无论是部分还是全部），无论是可检测的还是不可检测的，或增进或改善所述病症、失调或疾病。治疗包括引起临床上显著的反应而无过度的副作用水平。治疗还包括当与如果未接受治疗的预期存活相比较时生存期延长。在其它实施例中，“治疗（treatment或treating或treated）”是指预防性措施，其中目标是延迟例如易罹患疾病的个人（例如携带疾病、例如乳癌的遗传标记的受试者）的不受欢迎的生理病症、失调或疾病发作或减轻严重性。

[0331] 本发明的方法中，治疗被用来提供相对于疾病或病症的正面治疗反应。“正面治疗反应”是指疾病或病症改善，和/或与所述疾病或病症相关的症状改善。正面治疗反应例如将指疾病的一种或多种下列改善：(1) 肿瘤细胞的数目减少；(2) 肿瘤细胞死亡增加；(3) 肿瘤细胞存活受抑制；(5) 肿瘤生长受抑制（即，减缓到一定程度，优选停止生长）；(6) 患者的存活率增加；和(7) 一种或多种与所述疾病或病症相关的症状有些缓解。

[0332] 任一指定的疾病或病症的正面治疗反应可通过特异于所述疾病或病症的标准化反应标准来测定。肿瘤反应可使用筛选技术对肿瘤形态中的变化（即，整体肿瘤负荷、肿瘤大小等）进行评估，所述筛选技术有例如磁共振成像（MRI）扫描、x-放射显影成像、计算机断层（CT）扫描、骨扫描成像、内视镜检查和肿瘤活组织切片采样（包括骨髓穿刺（BMA）和计算循环中的肿瘤细胞）。

[0333] 除了这些正面治疗反应外，接受治疗的受试者可能经历与所述疾病相关的症状改善的有益效果。

[0334] 根据本发明的治疗包括使用“治疗有效量”的药物。“治疗有效量”是指取得期望的治疗结果所必要的有效剂量和时间。

[0335] 治疗有效量可根据例如受试者的疾病状态、年龄、性别和体重以及药物在受试者中引出期望的反應的能力等因素而变化。治疗有效量还为治疗的有益效果胜过抗体或抗体部分的任何毒性或有害作用的量。

[0336] 用于肿瘤治疗的“治疗有效量”还可通过其稳定疾病进展的能力来测量。化合物抑制癌症的能力可在预测在人肿瘤中的效力的动物模型系统中评估。

[0337] 或者，此组合物的性质可通过本领域的技术人员已知的体外分析检查所述化合物抑制细胞生长或诱导凋亡的能力来评估。治疗有效量的治疗化合物可缩小肿瘤大小，或改善受试者的症状。本领域的一般技术人员将能够基于例如受试者大小、受试者症状的严重性和选定施用的特定组合物或途径这类因素来确定所述量。

[0338] 调整剂量方案以提供最优选的期望反应（例如治疗反应）。例如，可施用单次推注、可随着时间施用数个分割剂量，或者所述剂量可依治疗情况的紧急程度指示按比例减少或增加。肠胃道外组合物可配制成剂量单位形式以易于投药并使剂量均匀。本文所使用的剂量单位形式是指适合作为用于欲治疗的受试者的单一剂量的物理上离散单位；各单位含有经过计算以与所需要的药物载体联合产生期望的治疗效果的预定量的活性化合物。

[0339] 用于本发明的剂量单位形式的规格由下列(a)和(b)规定并且直接取决于这两项：(a) 所述活性化合物的独特特征和欲达到的特定治疗效果，和(b) 配制所述用于治疗受试者的敏感性的活性化合物的领域中的固有限制。

[0340] 所述用于本发明所使用的双特异性抗体的有效剂量和剂量方案取决于欲治疗的疾病或病症，并且可由本领域的技术人员确定。

[0341] 用于本发明的双特异性抗体的治疗有效量的示意性非限制性范围为约0.1到100mg/kg。

[0342] 在本文所描述的方法的一些实施例中,多肽构建体与用于治疗特定疾病、失调或病症的药剂联合施用。所述药剂包括但不限于涉及抗体、小分子(例如化疗剂)、激素(类固醇、肽等)的治疗、放射治疗(γ 射线、X射线和/或定向投递放射性同位素、微波、紫外线照射等)、基因治疗(例如反义、逆转录病毒治疗等)以及其它免疫治疗。在一些实施例中,多肽构建体与抗腹泻剂、止吐剂、止痛剂、类鸦片和/或非胆固醇类抗炎剂联合施用。在一些实施例中,多肽构建体是在手术之前、期间或之后施用。

[0343] 所有引用的参考文献的全部内容以引用方式明确并入本文。

[0344] 实例

[0345] 材料和方法

[0346] 材料和方法

[0347] 编码多肽构建体的DNA表达构建体的克隆:使用具有蛋白酶裂解位点结构域的抗CD3 scFv来构建抗原结合蛋白与抗CD3 scFv结构域和半衰期延长结构域(例如HSA结合肽或VH结构域)的组合,所述结构域的组织如第53图所示。为了在CHO细胞中表达抗原结合蛋白,将所有蛋白质结构域的编码序列克隆到哺乳动物表达载体系统中。简单地说,分别合成并亚克隆编码所述CD3结合结构域、半衰期延长结构域和CD3结合结构域连同肽连接器L¹和L²的基因序列。然后将所产生的构建体依靶结合结构域-L¹-VH CD3结合结构域-L²-蛋白酶裂解结构域-L³-VLI CD3结合结构域-L⁴-靶结合结构域-L⁵-VLCD3结合结构域-L⁶-蛋白酶裂解结构域-L⁷-VHI CD3结合结构域-L⁸-半衰期延长结构域的顺序连接在一起以产生最终的构建体。所有表达构建体被设计成含有分别用于N端信号肽和C端六或十组氨酸(6x-或10x-his)-标签的编码序列,以促进蛋白质分泌和纯化。

[0348] 多肽构建体在稳定转染的CHO细胞中的表达:使用CHO细胞表达系统(Flp-In®, Life Technologies公司),CHO-K1中国仓鼠卵巢细胞的衍生物(ATCC,CCL-61)(Kao和Puck,《美国国家科学院院刊》1968;60(4):1275-81)。根据由Life Technologies提供的标准细胞培养方案传代培养贴壁细胞。

[0349] 为了适应在悬浮液中生长,将细胞从组织培养瓶中分离并置于不含血清的培养基中。将适应悬浮的细胞冷冻保存在带有10%DMSO的培养基中。

[0350] 通过转染适应悬浮的细胞来产生稳定表达所分泌的多肽构建体的重组CHO细胞系。在用抗生素潮霉素B选择期间,每周测量两次存活细胞的密度,将细胞离心并以 0.1×10^6 个存活细胞/毫升的最大密度再悬浮于新鲜的选择培养基中。在选择后2到3周回收稳定表达多肽构建体的细胞池并在此时将细胞转移到摇动培养瓶中的标准培养基中。经由执行蛋白质凝胶电泳或流式细胞术来证实重组的分泌蛋白质的表达。将稳定的细胞池冷冻保存在含有DMSO的培养基中。

[0351] 在稳定转染的CHO细胞系的10天分批喂料的培养物中,通过分泌到所述细胞培养的上清液中来制造多肽构建体。培养10天后,典型的培养存活率>75%时收获细胞培养上清液。每隔一天从生产培养物收集样品,并评估细胞密度和存活力。在收获当天,在进一步使用前通过离心和真空过滤使细胞培养上清液澄清。

[0352] 通过SDS-PAGE分析细胞培养上清液中的蛋白质表达滴度和产品完整性。

[0353] 多肽构建体的纯化：以二步骤程序从CHO细胞培养上清液纯化多肽构建体。在第一步骤中对构建体进行亲和性色谱分析，接着在第二步骤中在Superdex200上进行制备型尺寸排阻色谱分析(SEC)。将样品进行缓冲液交换并通过超滤浓缩到典型浓度 $>1\text{mg/mL}$ 。在还原和非还原条件下，通过SDS-PAGE评估最终样品的纯度和均匀性(通常 $>90\%$)，随后分别使用抗HSA或抗独特型抗体并且通过分析型SEC进行免疫印迹来评估样品。将纯化的蛋白质的等份储存在 -80°C 下直到使用时。

[0354] 显示CD3结合的夹心ELISA：以PBS中 $1\mu\text{g/mL}$ 恒河猴EGFR::hFC涂布96孔EIA板并在 4°C 下孵育过夜。然后，以含有 0.05% 吐温(Tween)-20的PBS将培养板洗涤三次并在室温下用SuperBlock(PBS)阻断1小时。另外洗涤三次后，在适当的孔中添加连续稀释的Prodent，并在室温下孵育1小时。再次洗涤培养板，添加与生物素缀合的食蟹猴CD3E::hFC，使最终浓度为 $1\mu\text{g/mL}$ 并在室温下孵育1小时。再将培养板洗涤三次后，添加与HRP缀合的链亲和素，浓度为 $0.1\mu\text{g/mL}$ ，并孵育30分钟。最后，再次洗涤培养板并使用SurModics单组分TMB底物显色5分钟。用SurModics 650终止溶液停止所述反应，并在 650nm 处读取所述培养板的结果。

[0355] 显示CD3结合的夹心FACS：用PBS中 20nM EDTA将生长到约 80% 汇合的OvCAR8细胞分离出来。然后，用含有 10% FBS的PBS阻断细胞并将其以 2×10^5 个细胞/孔接种到96孔圆底细胞培养板中。在冰上进行所有进一步的步骤。将培养板在 $800\times g$ 离心5分钟以使细胞沉淀成小丸。丢弃上清液并将细胞重新悬浮于经过连续稀释的Prodent中。将Prodent在冰上孵育1小时后，用含有 1% FBS的PBS洗涤细胞三次。然后，加入浓度为 $0.5\mu\text{g}/1\times 10^6$ 个细胞的经过AF488标记的食蟹猴CD3E::hFC，将其在冰上、黑暗中孵育30分钟。将细胞再次洗涤三次，再悬浮于 $150\mu\text{L}$ 的含有 1% FBS和 $0.5\mu\text{g/mL}$ 碘化丙啶的PBS中并在流式细胞仪上进行分析。

[0356] TDCC分析：令经过荧光素酶转导的OvCAR8细胞生长到约 80% 汇合，用TrypLE express分离。将细胞离心并再悬浮于培养基中，达到 $1\times 10^6/\text{mL}$ 。将经过纯化的人Pan T细胞解冻、离心并再悬浮于培养基中。最后，将OvCAR8细胞和T细胞的共同培养物加入384孔细胞培养板中。然后，将经过连续稀释的Prodent加到所述共同培养物中并孵育48小时。最后，将等体积的SteadyGlo荧光素酶分析试剂加入所述培养板中并孵育20分钟。读取培养板的数值并记录总发光。

[0357] 用于EK裂解的SDS-PAGE：将Prodent的缓冲液换成含有 2mM CaCl_2 的HBS并用两种浓度的重组肠激酶(NEB, P8070L)裂解。在室温下进行裂解反应2小时并用过量的苯甲脒琼脂糖终止所述反应。使裂解产物在 4% 到 20% 的Tris-甘氨酸凝胶上跑胶，并用考马斯G-250染色。

[0358] 用于未纯化的蛋白质的SDS-PAGE：为了测定表达水平，通过SDS-PAGE评估来自瞬时转染的Expi293细胞的培养条件。在还原和非还原的条件下将 $10\mu\text{L}$ 来自各转染的上清液在 $10\text{--}20\%$ Tris-甘氨酸凝胶上跑胶。用考马斯G-250对凝胶染色，并在适当的分子量处观察预期的条带。

[0359] 用于纯化的蛋白质的SDS-PAGE：纯化后，在非还原条件下将 $2\mu\text{g}$ 的各Prodent在 $10\text{--}20\%$ Tris-甘氨酸凝胶上跑胶以评估纯度和稳定性。用考马斯G-250对凝胶染色，并在适当的分子量处观察预期的条带。

[0360] 间接ELISA-Prodent与EGFR或CD3结合：用PBS中 $1\mu\text{g/mL}$ 的捕捉抗原-恒河猴EGFR::hFC或食蟹猴CD3E::Flag::hFC涂布96孔板，并在 4°C 孵育过夜。然后用含有 0.05% 吐温-20

的PBS将培养板洗涤三次并在室温下用SuperBlock (PBS) 阻断1小时。额外洗涤三次后,在适当的孔中添加经过连续稀释的Prodent,并在室温下孵育1小时。再次洗涤培养板,加入浓度为1 μ g/mL的与HRP缀合的抗-6xHis Tag抗体并在室温下孵育1小时。最后,再次洗涤培养板,并用Surmodics单组分TMB底物显色5分钟。用Surmodics650终止溶液停止所述反应,并在650nm处读取所述培养板的结果。

[0361] FACS-Prodent与OvCAR8或Jurkat结合:使用FACS评估未裂解的Prodent,以确认OvCAR8细胞上的EGFR结合和Jurkat上的CD3结合。用含有10%FBS的PBS阻断细胞并以 2×10^5 个细胞/孔将其接种到96孔圆底细胞培养板中。在冰上进行所有进一步的步骤。将培养板在800 $\times$ g离心5分钟以使细胞沉淀成小丸。丢弃上清液并将细胞重新悬于经过连续稀释的Prodent中。将Prodent在冰上孵育1小时后,用含有1%FBS的PBS洗涤所述细胞三次。将细胞重新悬浮于浓度为0.5 μ g/mL的经过FITC标记的抗6 $\times$ His Tag抗体中并孵育30分钟。将细胞再次洗涤三次,再悬浮于150 μ L的含有1%FBS和0.5 μ g/mL碘化丙啶的PBS中并在流式细胞仪上进行分析。

[0362] FACS&MSD-通过EK转染的细胞裂解Prodent:通过FACS和MSD评估通过EK转染的OvCAR8克隆裂解Prodent。令细胞生长到约80%汇合并用PBS中20nM EDTA分离出细胞。在MSD方面,在37 $^{\circ}$ C下,将 2×10^4 个细胞固定在96孔Sector MSD板的各孔中2小时。然后,在室温下用含有10%FBS的PBS阻断所述孔1小时。用分析缓冲液(含有1%FBS的PBS)将培养板洗涤三次。加入经过Sulfo-Tag标记的食蟹猴CD3E::Flag::hFc,使最终浓度为1 μ g/mL并在室温下孵育1小时。再额外洗涤所述培养板三次。加入不含表面活性剂的Read Buffer T并立即测量总发光。

[0363] 在FACS方面,用含有10%FBS的PBS阻断细胞并将其以 2×10^5 个细胞/孔接种到96孔圆底细胞培养板中。在冰上进行所有进一步的步骤。将培养板在800 $\times$ g离心5分钟以使细胞沉淀成小丸。丢弃上清液并将细胞重新悬于经过连续稀释的未裂解的Prodent中。将Prodent在冰上孵育1小时后,用含有1%FBS的PBS洗涤细胞三次。然后,加入浓度为0.5 μ g/ 1×10^6 个细胞的经过AF488标记的食蟹猴CD3E::hFc并在冰上和黑暗中孵育30分钟。将细胞再洗涤三次,再悬浮于150 μ L的含有1%FBS和0.5 μ g/mL碘化丙啶的PBS中并在流式细胞仪上进行分析。

[0364] FACS-表达EK的OvCAR8细胞的生成:使经过带有细胞外6xHis标签的编码肠激酶的载体转染的细胞在选择下生长。挑出克隆并通过FACS分析以测定EK表达的相对水平。使细胞生长到约80%汇合,用PBS中20nM EDTA分离细胞并用含有10%FBS的PBS阻断。在冰上进行所有进一步的步骤。用浓度为0.5 μ g/mL的经过FITC标记的小鼠IgG1抗-6x His Tag抗体为每一个克隆染色,一式两份。使用经过FITC标记的小鼠IgG1同种型对照组作为阴性染色。还用所述两种抗体对未转染的OvCAR8细胞染色作为阴性对照组。在冰上孵育1小时后,将细胞洗涤三次并将其再悬浮于150 μ L含有1%FBS和0.5 μ g/mL碘化丙啶的PBS中。在流式细胞仪上分析并根据EK表达进行分级。

[0365] 经由Octet分析选定的Prodent的结合亲和力:用于测量亲和力的Octet分析布置:抗人IgG捕捉(AHC)生物传感器--->huEGFR.huFc或hCD3e.flag.hFc--->Prodent.6his。Octet分析步骤:基线60秒,加载120秒,基线260秒,结合180秒,解离300秒。在AHC传感器尖

端上加载100nM的huEGFR.huFc或hCD3e.flag.hFc蛋白。Prodent浓度为100nM。缓冲液：在PBS缓冲液中的0.25%酪蛋白，这是用于传感器水合、稀释样品和所有基线和解离步骤。温度为30℃。摇动器速度为1000rpm。阳性对照组为来自BD Pharmingen目录编号555996的抗huEGFR单克隆抗体和来自BD Pharmingen目录编号551916的抗hCD3e单克隆抗体。阴性对照组：小鼠IgG2b、IgG1和Enbrel。使用OctetRED96仪器来产生数据。

[0366] 蛋白A定量分析布置：蛋白A生物传感器--->Prodent.Octet分析步骤：将蛋白A传感器浸入样品中120秒，再生3次并对所有样品重复进行此步骤。缓冲液：在PBS缓冲液或表达基质中的0.25%酪蛋白，传感器水合和样品稀释使用相同的缓冲液。温度为30℃。摇动器速度为400rpm。经过纯化的Prodent的标准曲线范围100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56、0.78μg/mL。

[0367] 间质蛋白酶裂解反应：在蛋白水解反应方面，将作为26kDa蛋白质的人间质蛋白酶ST14 (R&D, 目录#3946-SE) 的重组催化结构域加入69μM Pro8MS和81μM Pro8MS样品中，使最终浓度为0.3μM。使反应在室温下进行24小时并用过量的苯甲脒琼脂糖终止反应。通过SDS PAGE (10-20%Tris/甘氨酸凝胶, Invitrogen公司, 非还原条件) 分析样品。裂解显示出完成超过95%。将未处理的Pro8MS和Pro8ML样品在室温下保持与已处理的样品相同的时间。所述反应是在含有25mM柠檬酸钠、75mM L-精氨酸、75mM氯化钠、4%蔗糖缓冲液 (pH 7.0) 的缓冲液中发生的。

[0368] Prodent SEC分布：在HPLC系统 (Alient Technologies 1290Infinity II) 上使用Yarra 3μm SEC-2000柱 (Phenomenex) 进行分析型尺寸排阻色谱。在AKTA纯色谱分析系统 (GE) 上, 使用HiLoad 26/600Superdex 200柱 (GE), 在31.25mM柠檬酸钠、94mM L-精氨酸、94mM NaCl (pH7.0) 缓冲液中进行制备型尺寸排阻色谱分析。

[0369] 蛋白酶活性分析：使用经过荧光团对标记的肽 (FRET肽) 作为底物来测量市售的重组或经过纯化的蛋白酶和人、小鼠和食蟹猴血清的蛋白水解活性。分别在320nm和420nm的激发波长/发射波长下测量经过Abz-Dnp标记的肽的荧光。分别在340nm和490nm的激发波长/发射波长下测量经过Dabcyl-EDANS标记的肽的荧光。将来自DMSO中的20mM贮存物的肽加入含有蛋白酶特异性缓冲液或血清的反应孔中，使最终浓度为3到120μM。所添加的蛋白酶的浓度为1到10nM。使用96孔板式分析仪记录在线性荧光灵敏度范围内的荧光。

[0370] 实例1：初始PRO平台的制备和表征

[0371] 本研究的目的是为开发“条件式活性”T细胞衔接子，其中T细胞活化和细胞毒性在肿瘤微环境中被增强。策略：在专有的αX/αCD3分子中插入肿瘤-特异性蛋白酶裂解位点，致使裂解和肿瘤结合导致活性分子。αX为用于1个，或优选地，2个肿瘤抗原的结合结构域。所述分子设计利用位于无活性抗CD3 scFv对的scFv连接子中的蛋白酶裂解位点，所述无活性抗CD3 scFv含有互补性活性抗CD3结构域 (V_H和V_L)，原则上，在所述两个抗肿瘤结合结构域与肿瘤细胞的表面结合后，所述两个连接的功能性抗CD3 scFv结合结构域可联结以产生活性CD3结合结构域并起始由T细胞介导的肿瘤细胞灭杀。

[0372] 平台1 (未配对的αCD3 scFv)

[0373] • Pro1-αEGFR G8sdAb-I2C V_H-His 10

[0374] • Pro2-I2C V_L-EGFR D12sdAb-His10

[0375] • Pro3-αEGFR G8sdAb-I2C scFv (V_H-(GS)₃-V_L)-αEGFR D12sdAb-His 10

[0376] • Pro4-αEGFR G8sdAb-I2C V_H-Flag*-I2C V_L-αEGFR D12sdAb-His10

[0377] (短scFv连接子防止αCD3 V_H和V_L配对)

[0378] Flag*为用于蛋白酶-肠激酶(EK)的8个氨基酸裂解位点

[0379] 依下述制备平台1的构建体。将编码Prodent 1到4的基因克隆到哺乳动物表达载体中并产生质粒DNA。在摇瓶中的25毫升生长培养基中在HEK293和CHO细胞系中瞬时表达蛋白质。使用Ni-excel树脂纯化各个经过聚-His标记的蛋白质。结果显示于第1A图和第1B图中。

[0380] scFv CD3结合结构域的产生

[0381] 人CD3ε链标准序列为UniProt登录编号P07766。人CD3γ链标准序列为UniProt登录编号P09693。人CD3δ链标准序列为UniProt登录编号P043234。针对CD3ε、CD3γ或CD3δ的抗体经由已知的技术、例如亲和力成熟产生。在鼠抗CD3抗体作为起始物质的情况下，人源化的鼠抗CD3抗体是临床设置所需要的，其中小鼠特异性残基可在接受本文所描述的抗原结合蛋白治疗的受试者中诱导人抗小鼠抗原(HAMA)反应。人源化通过从小鼠抗CD3抗体移植CDR区到适当的人种系受体框架上来完成，并任选地包括其它对CDR和/或框架区的修饰。如本文所提供的，抗体和抗体片段残基编号是依照Kabat (Kabat E.A.等人,1991;Chothia等人,1987)。

[0382] 因此，使用人或人源化的抗CD3抗体来产生用于多肽构建体的CD3结合结构域的scFv序列。取得编码人或人源化V_L和V_H结构域的DNA序列并将用于构建体的密码子任选地优化以在来自智人的细胞中表达。在V_H与V_L之间包含蛋白酶裂解位点。在所述scFv中，V_H和V_L的出现顺序有变化(即，V_L-V_H或V_H-V_L取向)，所述“G4S”或“G4S”亚基的三个拷贝(G4S)₃连接所述可变结构域以创建scFv结构域。抗CD3 scFv质粒构建体可具有可选择的Flag、His或其它亲和性标签并经过电穿孔进入HEK293或其它合适的人或哺乳动物细胞系中，表达和纯化蛋白质。验证分析包括通过FACS的结合分析、使用Proteon的动力学分析和CD3或目标表达细胞的染色。

[0383] 对已表达的多肽进行尺寸排阻色谱分析，结果发现形成聚集体，也许是双抗体。第2图。

[0384] 上述实验提供下列结果和结论。除了Pro1外，在HEK293细胞中观察到4个经过多聚-His标记的Prodent蛋白的各自表达。因此，这些多肽能够被表达。使用Ni-excel树脂从表达基质纯化所述多肽。然后将样品对PBS透析，通过A280测定多肽浓度并反算表达水平。当在SDS-PAGE凝胶上跑胶时，每一个经过纯化的经过多聚-His标记的蛋白质具有预期的分子量。在经过透析的Ni-excel洗提样品上执行分析性SEC，然而Pro1和Pro2显示出强烈的聚集倾向。在ELISA分析中，具有受限的αCD3 scFv连接子的PRO4与CD3ε蛋白的结合等效于Pro3阳性对照蛋白，所以连接子限制并未创造条件式活性的T-细胞衔接子。

[0385] 实例2：第二代Pro平台的制备和表征

[0386] 设计第二代PRO平台多肽以通过改变此V_L或V_H结构域的多肽序列来获得无活性(即，基本上无CD3结合)的V_L或V_H结构域。示意性第二代Pro多肽列于下文中。

[0387] 平台2(去活化的αCD3 scFv)

[0388] • Pro5-αEGFR G8 sdAb-I2C V_H-Flag-I2CV_{Li}-Flag-I2CV_{Hi}-Flag-I2CV_L-αEGFR D12sdAb-His6

[0389] • Pro6- α EGFR G8sdAb-I2C V_H -Flag-I2CV L_i -His6

[0390] • Pro7-I2CV H_i -Flag-I2CV L - α EGFR D12sdAb-His6

[0391] • Pro8- α EGFR G8sdAb-I2C V_H -Flag-I2CV L -His6

[0392] Pro5的结构显示于第3图中。在Pro5方面,预期未裂解的多肽将与EGFR良好结合,不与CD3结合并且在T细胞依赖性细胞毒性(TDCC)分析中将无活性。裂解后,预期所述活性抗CD3 scFv的两半将经由与EGFR结合而被束缚在癌细胞。所述两个活性scFv结构域将交互作用以形成活性CD3结合scFv,所述构建体在TDCC分析中证明具有活性。

[0393] 第4图中显示所述双功能伙伴,Pro6和Pro7的结构。本文所描述的实验证明在抗CD3 scFv中的 V_H 或 V_L 的CDR2中插入典型蛋白酶裂解位点(EK裂解位点)可废除CD3结合和活性。预计,所述未裂解的分子将与EGFR结合,将不会与CD3结合并且在TDCC分析中不具有活性。裂解后,Pro6和Pro7将产生活性分子,因为完整的 V_H 和 V_L 均通过EGFR被束缚在癌细胞。

[0394] 为了产生具有无活性 V_H 的抗CD3e scFv,制造下列突变:在Pro21中(N30S、K31G、Y32S、A49G、Y55A、N57S、Y61A、D64A、N97K、N100K、S110A、Y111F);在Pro29中(Y32S、Y61A、D64A、S110A、Y111F);在Pro30中(Y32S、Y61A、S110T、Y111F);在Pro31中(N30S、K31G、Y55A、N57S、Y61E、D64A、F104A、Y108A);在Pro32中(N30S、K31G、Y32H、Y55A、N57S、N103A、F104N)。突变被安置在 V_H 的CDR区中:在CDR1中-N30S、K31G、Y32S、Y32H;在CDR2中-A49G、Y55A、N57S、Y61A、D64A、Y55A、N57S、Y61E;在CDR3中-N97K、N100K、N103A、F104N、F104A、Y108A、S110A、S110T、Y111F。突变N30S、K31G、Y32S、Y32H、A49G、Y55A、N57S、Y61A、D64A、Y55A、N57S、Y61E基于所述残基在人种系序列中出现和其在复合物中与CD3结合时在界面上的可能位置来选择。在CDR3区中的突变N103A、F104N、F104A、Y108A被挑选出位于CDR3的暴露的表面部分,远离可能的 V_H - V_L 界面并在可能与CD3e交互作用的界面上。突变S110A、S110T、Y111F被挑选出来以轻微破坏所述可能的 V_H - V_L 界面的稳定,以使稍微更改所述区域的结构。

[0395] 在表达时,Pro29到32产生稳定蛋白质,当通过DSF测量时 T_m 为53-55 $^{\circ}$ C。Pro21未充分表达。

[0396] 为了产生具有无活性 V_L 的抗CD3e scFv,在Pro20中制造下列突变(N32H、K54S、F55N、L56K、A57H、P58S、G59W、W94G、N96R)。将突变置于 V_L 的CDR区中:在CDR1中-N32H;在CDR2中-K54S、F55N、L56K、A57H、P58S、G59W;在CDR3中-W94G、N96R。突变N32H、K54S、F55N、L56K、A57H、P58S、G59W基于所述残基在人种系序列中出现和其在复合物中不利地影响与CD3结合的界面上的可能位置来选择。在CDR3区中的突变W94G、N96R被挑选出位于CDR3的暴露的表面部分,远离可能的 V_H - V_L 界面。

[0397] 在表达时,Pro20产生稳定的蛋白质。

[0398] Pro8为阳性对照组。使用Pro8来确认在scFv连接子中插入典型的蛋白酶裂解位点(EK裂解位点)不会干扰scFv折叠和CD3结合。第5图. 未裂解的Pro8分子应与EGFR结合、与CD3结合并且在TDCC分析中具有活性。裂解后,Pro8应该失去与CD3的结合,因为所述经由与EGFR结合而被束缚在细胞表面的已裂解分子的每一半失去协同影响而导致 V_H 与 V_L 分开。

[0399] 对多肽进行四种类型的结合/活性分析。示意性分析显示于第9图中。

[0400] 利用典型蛋白酶肠激酶将所述位于介于活性和无活性 V_H 和 V_L 结构域之间的蛋白酶裂解位点处的本发明构建体裂解。

[0401] 结果

[0402] 第6图显示本发明的未经过纯化的多肽和各种对照组的SDS-PAGE。如由PAGE所示,所述多肽被充分表达。Pro5到8的尺寸排阻色谱分析显示没有聚集,确认这些Pro结构趋向形成单体物种。第7图.通过Ni-excel色谱纯化所述多肽并且各多肽基本上在SDS-PAGE上提供单一条带。第8图中的表格显示蛋白质表达和纯化的结果。

[0403] EGFR-ELISA分析证明平台2的多肽能与ELISA分析中的EGFR(第10A图)和细胞上的EGFR(第10B图)结合。如通过CD3-ELISA和CD3-FACS所确认,平台2的无活性(即,未裂解的)多肽不与Jurkat细胞上的CD3结合。第11A图和第11B图。

[0404] Pro6和Pro7显示通过蛋白酶裂解被活化,将Pro6的无活性V_{Li}和Pro7的无活性V_{Hi}与其在构建体中的对应的V_H和V_L伙伴分开。所述未裂解的分子与EGFR结合,不与CD3结合并且在TDCC分析中无活性。裂解后,所述Pro6和Pro7的混合物产生活性抗CD3结构域,因为完整的V_H和V_L均经由与EGFR结合而被束缚在癌细胞上。第12图。

[0405] 通过SDS-PAGE,第13图证实肠激酶(EK)显示裂解Pro5到8。通过ELISA,Pro6和Pro7显示出在EK裂解后以协同方式与CD3结合。第14图、第14B图和第14C图显示出Pro6和Pro7分别与CD3有最低限度的结合。当先后加入分析时,Pro6和Pro7在EK裂解后形成活性CD3结合结构域时以协同方式与CD3结合。(第14D图)。所述场景以示意方式显示于第14E图中。通过夹心FACS,Pro6和Pro7还显示出在EK裂解后以协同方式与CD3结合。因此,第15B图和第15C图显示出单独的Pro构建体不与CD3结合,然而,当它们组合在一起并在表达EGFR的OvCar8细胞的表面上形成活性CD3结合结构域时,其能够以协同方式与CD3结合(第15D图)。

[0406] 全长构建体Pro5与CD3的结合是在所述构建体被EK蛋白水解式裂解后被活化。第16图。

[0407] Pro8为具有单一靶结合结构域(抗EGFR)的阳性对照组模型。因此,当此构建体在蛋白酶裂解位点被裂解时,其失去与CD3结合的能力,因为没有形成活性CD3结合结构域:所述未被束缚在靶结合结构域的V_L部分不会以足够有效在V_H和V_L之间产生协同性交互作用的方式与细胞结合。在裂解之前,Pro8通过单独的EGFR结合结构域与EGFR结合、通过活性CD3结合结构域与CD3结合,因此在TDCC分析中具有活性。裂解后,由于scFv组分之间的交互作用弱,所以裂解的构建体失去了与CD3结合的能力。第17图.此结果显示于第18A图和第18B图中。

[0408] Pro6、Pro7和Pro8的TDCC分析显示于第19图(A到D)中。第19A图和第19B图中显示对单独的Pro6和Pro7进行的TDCC分析的结果。在EK裂解后,基本上没有由这些单一构建体诱导的由T细胞介导的细胞毒性。在显著的对比中,当Pro6和Pro7组合在一起并裂解(如第19C图所示)时导致显著的T细胞细胞毒性。相反地,当Pro8被EK裂解时,所述细胞毒性减低(第19D图)。

[0409] 实例3:对多元靶结合结构域的结合依赖性的评估

[0410] 设计实验以评估超过一个靶结合结构域对所述构建体与CD3结合的能力的重要性。设计不具有EGFR靶结合结构域的Pro25到27,这些结构域被绿色荧光蛋白(GFP)结合结构域所替代。第20图.使用抗GFP结合结构域的部分动机为GFP不在OvCar8细胞的表面上表达。将所述含有抗GFP Pro构建体与Pro6和Pro7组合并以EK进行蛋白酶裂解。如第21C图(Pro6+Pro26)、第21D图(Pro6+Pro27)、第21E图(Pro7+Pro25)和第21F图(Pro9+Pro25)中所示,这些构建体在EK裂解后基本上不与CD3结合。因此,各Pro组分有必要包括至少一个靶结

合结构域以供裂解的构建体结合并形成活性CD3结合结构域。

[0411] 实例4:替代的蛋白酶和裂解位点的评估

[0412] 为了确认上文讨论的现象并非仅依赖EK和其共有裂解位点,设计具有用于替代的蛋白酶(包括间质蛋白酶)的蛋白酶裂解位点的Pro构建体。Pro8MS和Pro8ML分别包括14个氨基酸间质蛋白酶敏感连接子和24个氨基酸间质蛋白酶敏感连接子。所述连接子在构建体的V_H和V_L结构域之间。利用前述实例中所阐述的方法,Pro8、Pro8MS和Pro8ML在用相关的连接子特异性蛋白酶裂解之前和之后均具有同等结合特性。因此,在裂解之前,各构建体结合EGFR、结合CD3并且在TDCC分析中为活性的。在裂解后,由于scFv交互作用弱,所以CD3结合活性和TDCC分析中的活性丧失。所述实验的结果阐述于第23图中,其显示出夹心ELISA分析的结果,第24图显示出FACS分析的结果。

[0413] 如上文所讨论的结果证明本发明的构建体在真核平台充分表达。在 α -CD3scFv (V_H或V_L)的CDR(例如CDR2)中插入示意性蛋白酶(例如EK)的裂解位点(Flag)可有效地将 α -CD3scFv去活化。蛋白酶裂解位点的裂解导致形成功能性CD3结合位点。在示意性Pro对(Pro6和Pro7)中,CD3结合位点仅在当Pro6和Pro7非常接近时形成。这些结果使用涂有靶抗原的ELISA板和表达靶抗原的癌细胞(基于ELISA、FACS和TDCC数据)取得。

[0414] 实例5:Pro取向对结合的相关性的调查

[0415] 利用额外的Pro基序调查Pro的取向(从结构域N端到C端的顺序)是否与Pro发生结合作用的能力密切相关(第25图)。在所述图中,Pro10为Pro6的反转类似物,而Pro9为Pro7的反转类似物。Pro8、Pro11和Pro15(OKT3为完全活性的 α -CD3 scFv。第25图的表格显示Pro6、Pro7、Pro9、Pro10、Pro12和Pro14的组合(其为不完整的)结合EGFR,但不结合CD3。所述不完整的CD3对不与CD3结合通过夹心ELISA来证明(第26图)。

[0416] 当Pro6和Pro9组合在一起并发生蛋白酶裂解时,它们形成功能性CD3结合结构域(第27图)。Pro6+Pro9显示出与Pro6+Pro7相比较,具有同等的结合特性(第28、29图)。

[0417] 还调查单特异性相对于双靶向结构域在Pro构建体的结合和活性方面的相关性。将Pro9和Pro14(各具有相同的EGFR结合结构域)组合并裂解(第30图)。第31A图显示出非裂解的和经过EK裂解的Pro9+Pro14的FACS数据,而第31B图显示出Pro6+Pro7的类似数据。

[0418] 还制备和测试了各Pro具有不同EGFR结合结构域的Pro构建体对。第32A图提供的表列出具有EGFR和CD3结合结构域的Pro对。还制备并裂解了第一组Pro对,其中所述对各成员显示出不同的EGFR结合结构域。这一对的成员假定通过不同结合结构域与相同的EGFR分子结合(“顺式”结合)和通过不同结合结构域与不同的EGFR分子结合(“反式”结合)(第32B图)。组装第二组Pro构建体,在这对的每个成员上显示出相同的EGFR结合结构域。在这种情况下,这对的成员必须与不同的EGFR分子结合(“反式”结合),因为在EGFR位点上的靶结合位点被这对的一个成员的EGFR结合结构域占据。第32C图。对这几对进行的夹心ELISA证明了Pro6+Pro7(第33A图)、Pro9+Pro10(第33B图)、Pro12+Pro14(第33C图)、Pro7+Pro10(第33D图)和Pro6+Pro9(第33E图)的顺式+反式结合。相反地,Pro6+Pro12(第34A图)、Pro7+Pro14(第34B图)、Pro9+Pro14(第34C图)和Pro10+Pro12(第34D图)被证明只有反式结合。有趣的是,Pro对的顺式+反式结合和仅具有反式结合的那些在裂解后的活性相似。TDCC分析的结果显示于第35图中。第35A图(顺式+反式)、第35B图(仅有反式)。如第36图所示,阳性对照Pro构建体在EK裂解后失去活性,可能是因为如果没有这对的每个具有功能性EGFR结合

位点的成员来使CD3结合结构域的两个组分靠近时,Pro构建体无法形成功能性CD3结合位点。

[0419] 实例6:通过蛋白酶表达细胞裂解

[0420] 在此实例中,将表达EK的载体转染到荧光素酶+OVCAR8细胞中并选出稳定表达所述蛋白质的克隆。选择100个克隆并通过FACS确认为阳性(α -His6-FITC)。保存对应于高、中、低表达细胞的细胞样品。使用夹心FACS、夹心MSD和TDCC将这些细胞样品针对所选定的本发明的多肽构建体进行测试。

[0421] 第37图证明EK-His6在OvCar8-lux细胞中稳定表达。鉴别高、中、低表达集落。第38图将本发明的未活化的Pro构建体与细胞接触,所述细胞显示出对Pro构建体发挥剂量依赖性活化作用(第39图)。从MSD(第39A图)和FACS(第39B图)得到的结果相当。EK表达的FACS分等可预测Pro裂解。

[0422] 使用EK过表达OvCAR8细胞的TDCC显示出在未裂解的Pro构建体的存在下活化T细胞的细胞毒性。第40图。野生型OvCAR8细胞(其未过度表达EK)没有明显活化Pro构建体并使用未裂解的蛋白质产生最小的由T细胞介导的细胞毒性(第40A图)。相反地,过度表达EK的OvCAR8细胞使用未裂解的蛋白质显示出由T细胞介导的细胞毒性(第40B图)。

[0423] 实例7:去活化的 α -CD3 V_H 和 V_L

[0424] 第41图显示 α -CD3 scFv的同源性模型。亲本 V_H 多肽序列和其最同源种系序列的大致比对显示于第42A图中。被设计成将此示意性变体朝向与CD3结合去活化的示意性变体阐述于第42B图中。类似地,第43图阐述CD3的亲本 V_L 多肽的序列和其与最同源种系序列的大致比对,并提供被设计成使其相关于其与CD3结合而使多肽去活化的示意性变体序列。

[0425] 第44图提供本发明某些多肽Pro构建体的示意图,包括EGFR结合结构域、 V_H 和 V_L 结构域(其中一个无活性,即, V_{Li} , V_{Hi})、半衰期延长结构域(α -HAS)和介于 V_{Li} 和 V_{Hi} 结构域之间的蛋白酶裂解Flag位点标志。第44B图的表阐述这些示意性Pro物种的结合活性。Pro22为阳性对照组,其既不具有无活性 V_H 也不具有无活性 V_L 。此Pro在活化之前同时结合EGFR和CD3。如表中所阐述,其它Pro物种无一在蛋白酶活化前与CD3结合。

[0426] 第45图. 显示出Pro23(第45A图)和Pro24(第45B图)的示意图,其各自包括超过一个Flag EK裂解位点。Pro23还包括凝血酶裂解位点,使其易于在血浆中裂解。Pro23的每个“臂”包括被蛋白酶可裂解Flag位点分开的活性和无活性CD3结合结构域。各个“臂”还包括半衰期延长结构域,例如 α -HSA。由于从Pro24可明显得知,所述凝血酶可裂解位点可被另一个可裂解位点(例如EK可裂解位点)替代。第46图提供Pro23和Pro24蛋白酶裂解的SDS-PAGE数据。Pro23和Pro24的活性数据提供在第47图中。第47A图显示出被EK裂解活化,但不会被凝血酶活化的Pro23的TDCC活性,证实所述活性CD3结合结构域与其无活性伙伴的分离为多肽与CD3结合的条件。类似地,Pro24被EK裂解活化(第47B图)。

[0427] 实例8:使用非EK的蛋白酶裂解来活化

[0428] 为了证实以Pro多肽观察到的裂解/结合现象并不仅限于EK裂解,设计并测试具有非EK蛋白酶裂解位点的另外的Pro物种。所述测试化合物经过工程处理以包括荧光能量转移对,这将在所述多肽在蛋白酶裂解位点裂解时产生信号。第48到52图显示本次研究的数据。已知蛋白酶MMP9在肿瘤细胞中过度表达。将肽经过工程处理以包括MMP9裂解位点。肽GPSGPAGLKGAPG和GPPGPAGMKGLPG在血清中稳定,解其可被重组MMP9裂,但不会被重组间质

蛋白酶ST14、TACE (ADAM17) 纯化的组织蛋白酶B和D裂解 (第48图)。

[0429] 还设计和测试了包括用于蛋白酶Mep1A的裂解位点的另外的肽。第49图。肽GYVADAPK和KKLADEPE在血清中稳定并且可被重组Mep1A和Mep1B裂解, 不会被重组MMP9、TACE (ADAM17)、组织蛋白酶B裂解。肽GGSRPAHLRDSGK在人血清中稳定, 而在小鼠和食蟹猴血清中不太稳定, 可被重组裂解Mep1A裂解, 被重组MMP9部分裂解, 但不会被ADAM17、组织蛋白酶B、间质蛋白酶ST14裂解。

[0430] 还设计和测试了对间质蛋白酶裂解敏感的肽。如第50图所示, 所述肽没有任何一个在血清中是稳定的。肽类SFTQARVVG和LSGRSDNH可被重组间质蛋白酶ST14裂解, 但不会被MMP9、TACE (ADAM17)、组织蛋白酶B裂解。

[0431] 设计并测试对被血液蛋白酶 (凝血酶、嗜中性弹性蛋白酶和弗林蛋白酶) 裂解敏感的多肽 (第51图)。凝血酶 (从人血浆中纯化) 可非常有效地裂解凝血酶-1肽底物 (具有低 K_m 和高 V_{max})。重组中性白细胞弹性蛋白酶可非常有效地裂解弹性蛋白酶1肽底物。第52图显示出血液蛋白酶肽底物在血清中裂解的数据。凝血酶-1、凝血酶-2和弗林酶-2肽底物的裂解在人血清中最有效。由于血清中不存在携带所述活性蛋白酶的嗜中性粒细胞, 所以未观察到嗜中性弹性蛋白酶底物的裂解。

[0432] 虽然本发明的示意性实例已经显示和描述于本文中, 但本领域的技术人员将清楚明白所提供的这些实施例仅用于举例。本领域的技术人员可在不偏离本发明下制作许多变化、改变和替代。应理解的是, 本文所描述的本发明的实施例的各种替代方案可用于实施本发明。下列权利要求书意图限定本发明的范围并从而涵盖在这些权利要求书和其同等物的范围内的方法和结构。

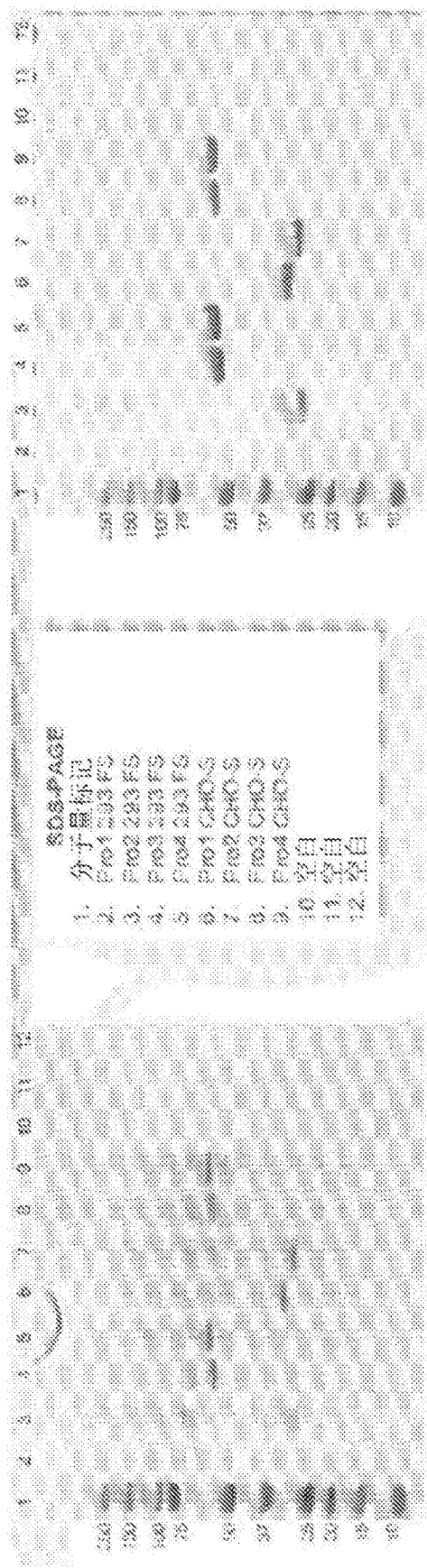


图1A

批号	样品描述	消光系数	浓度 (mg/ml)	体积(ml)	总计(mol)	校正 体积(ml)	校正的浓度 (mg/l)
ER-016-016-1	Pro1293FS	2.28	0.22	5	0.00	24.4	88.0
EP-016-016-2	Pro2293FS	2.03	0.33	5	1.67	23	72.4
EP-016-016-3	Pro3293FS	2.21	0.39	5	1.93	23.9	80.8
ER-016-016-4	Pro4293FS	2.23	0.42	5	2.12	22.7	93.4
EP-016-016-5	Pro1CHO-S	2.28	0.32	5	1.62	21	77.3
EP-016-016-6	Pro3CHO-S	2.09	0.26	5	1.93	20.8	82.9
ER-016-016-7	Pro3CHO-S	2.21	0.31	5	1.66	20.8	144
EP-016-016-8	Pro4CHO-S	2.23	0.39	5	1.97	20.6	90.8

图1B

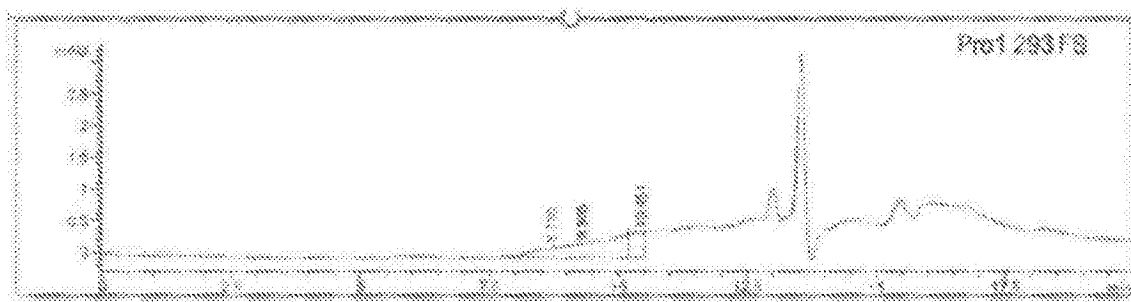


图2A

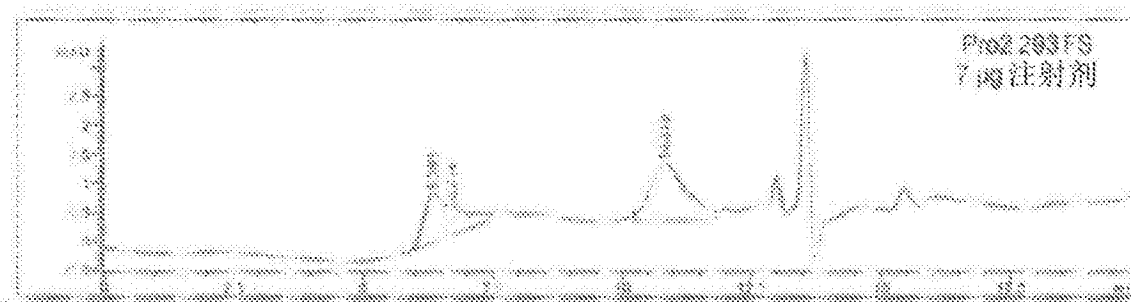


图2B

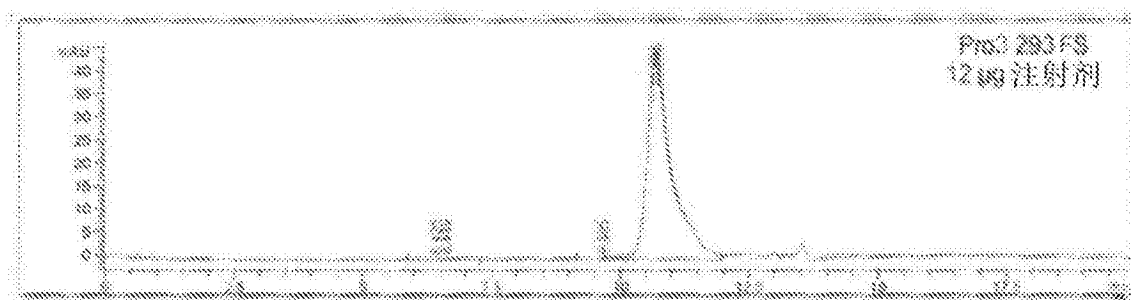


图2C

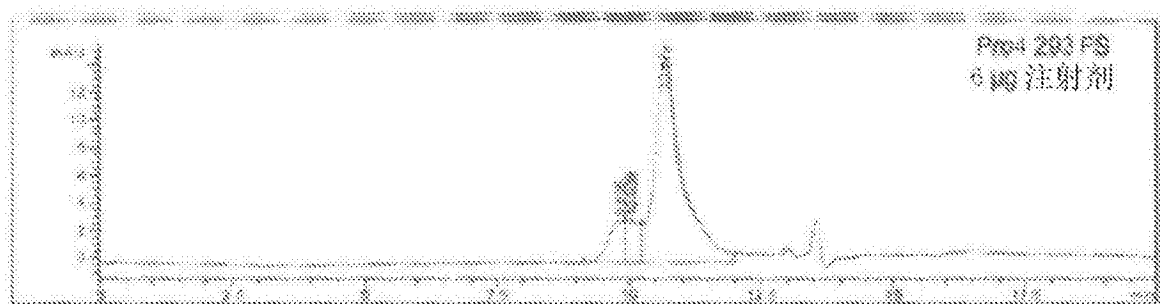


图2D

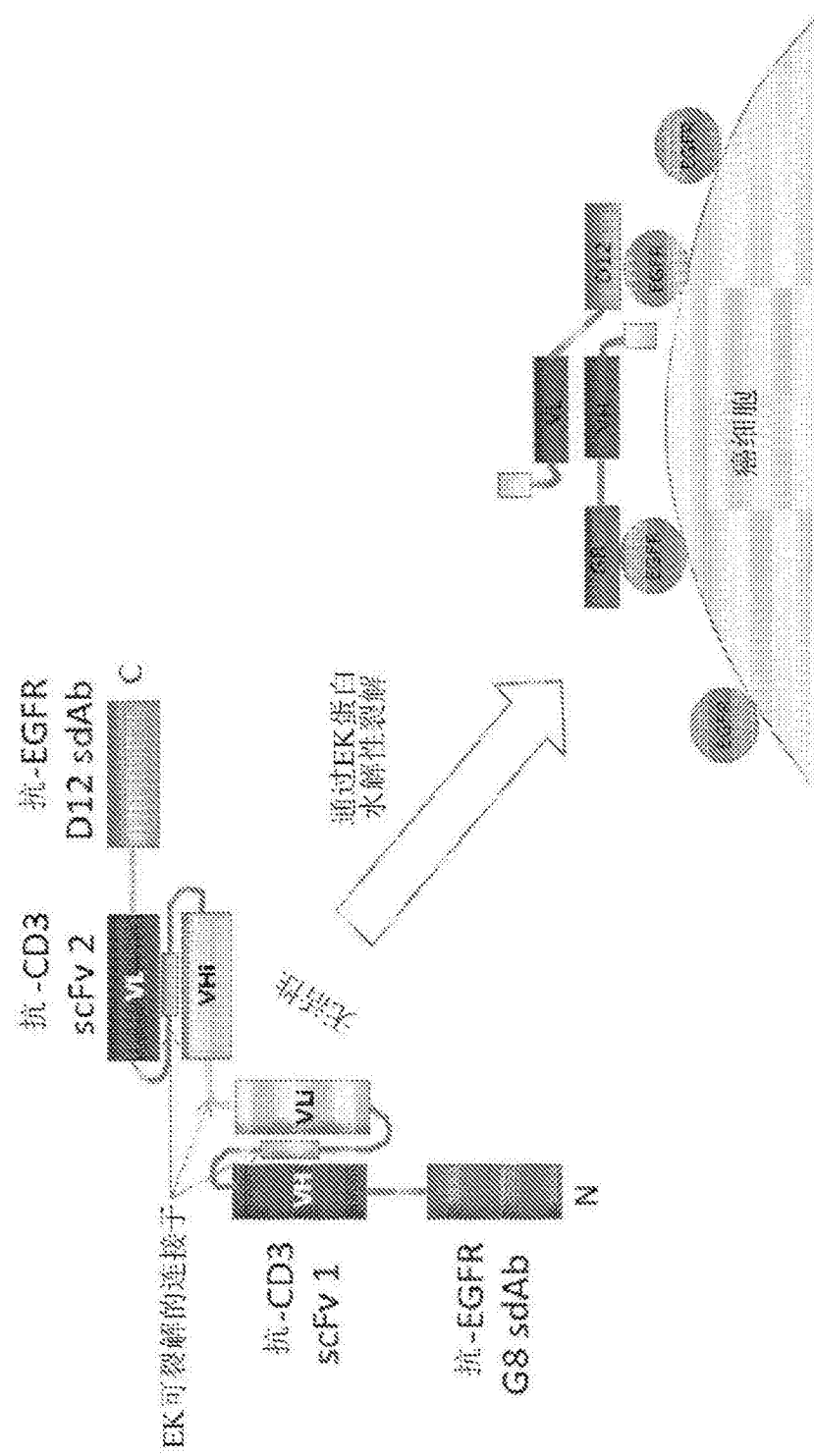


图3

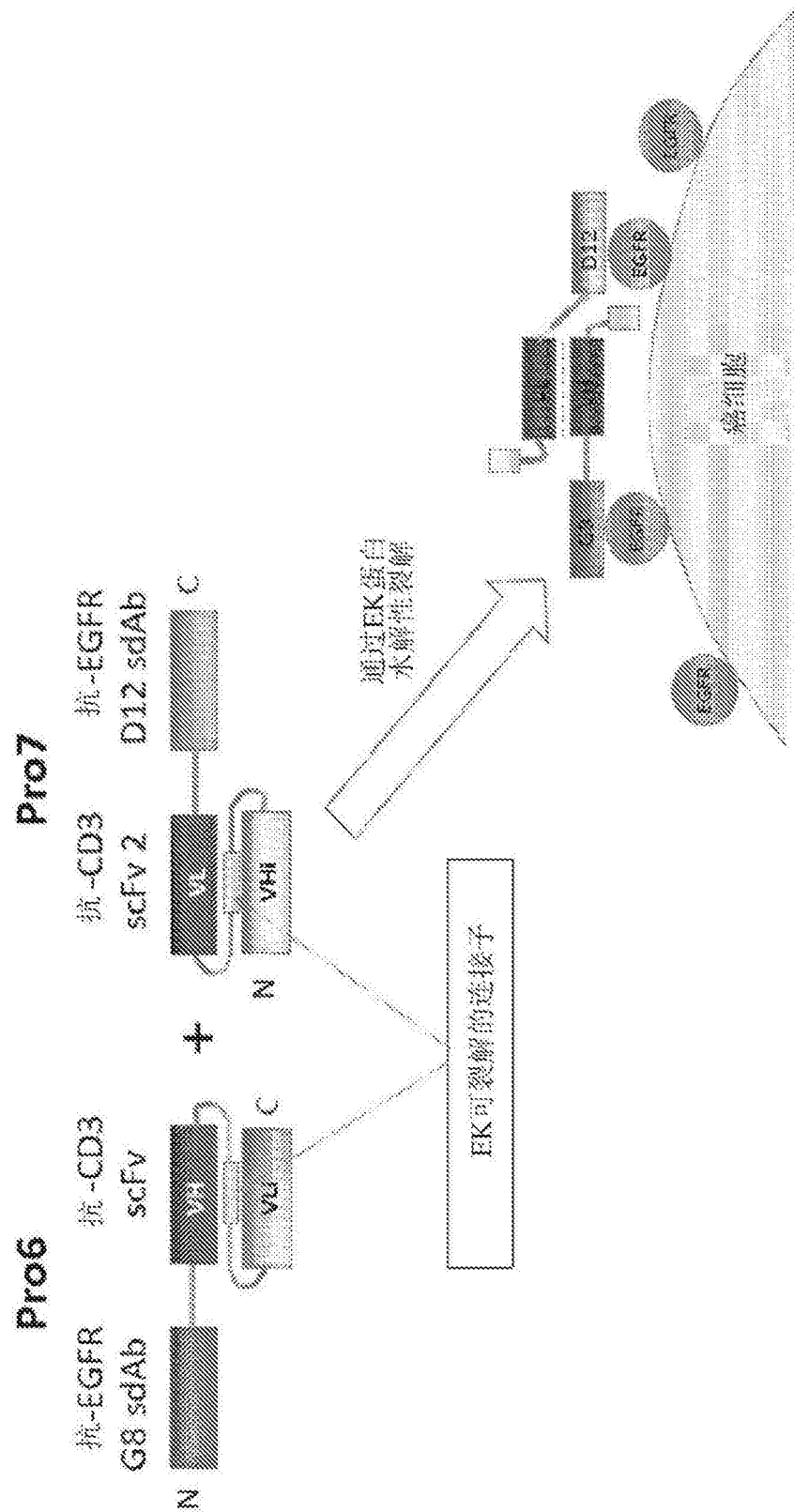


图4

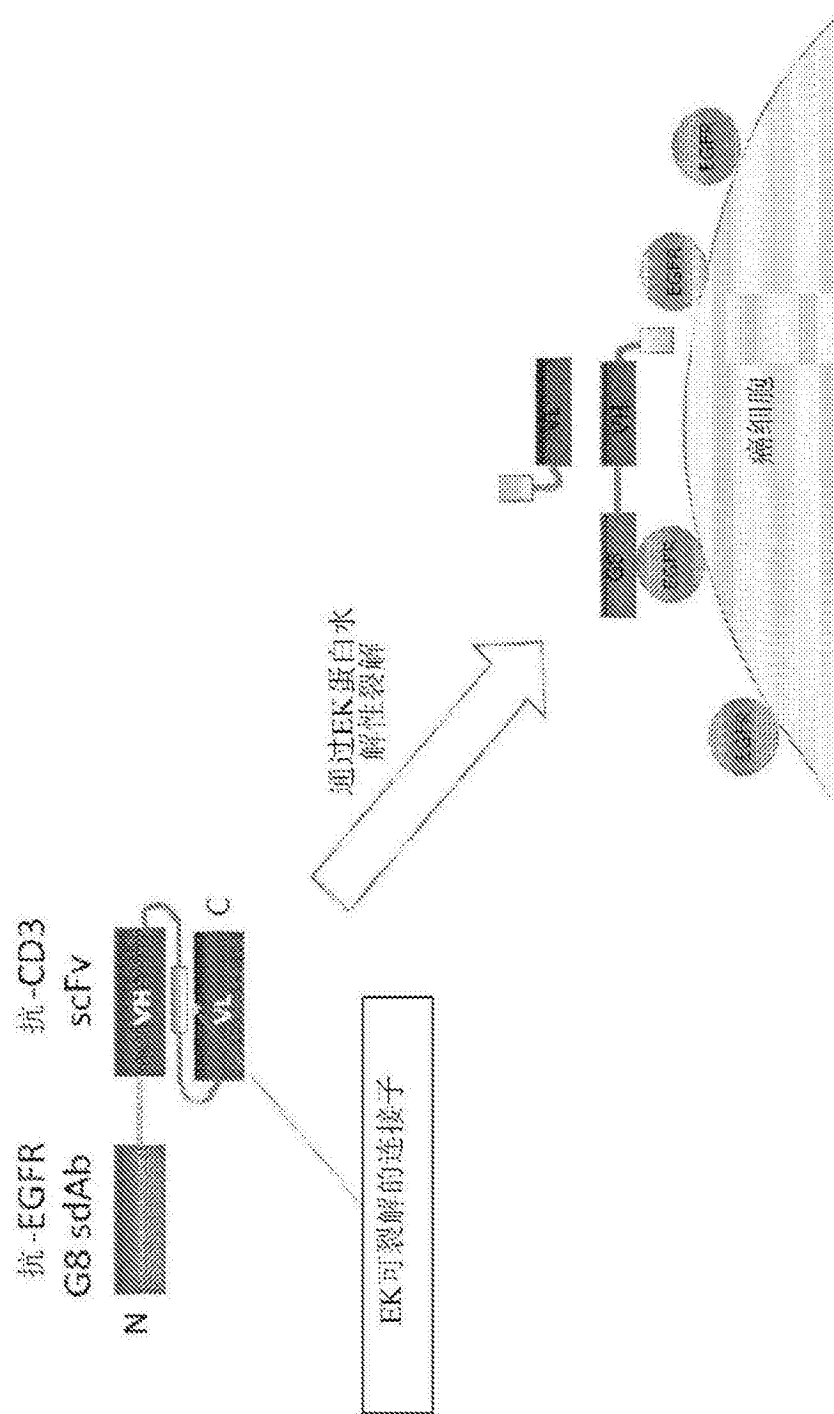


图5

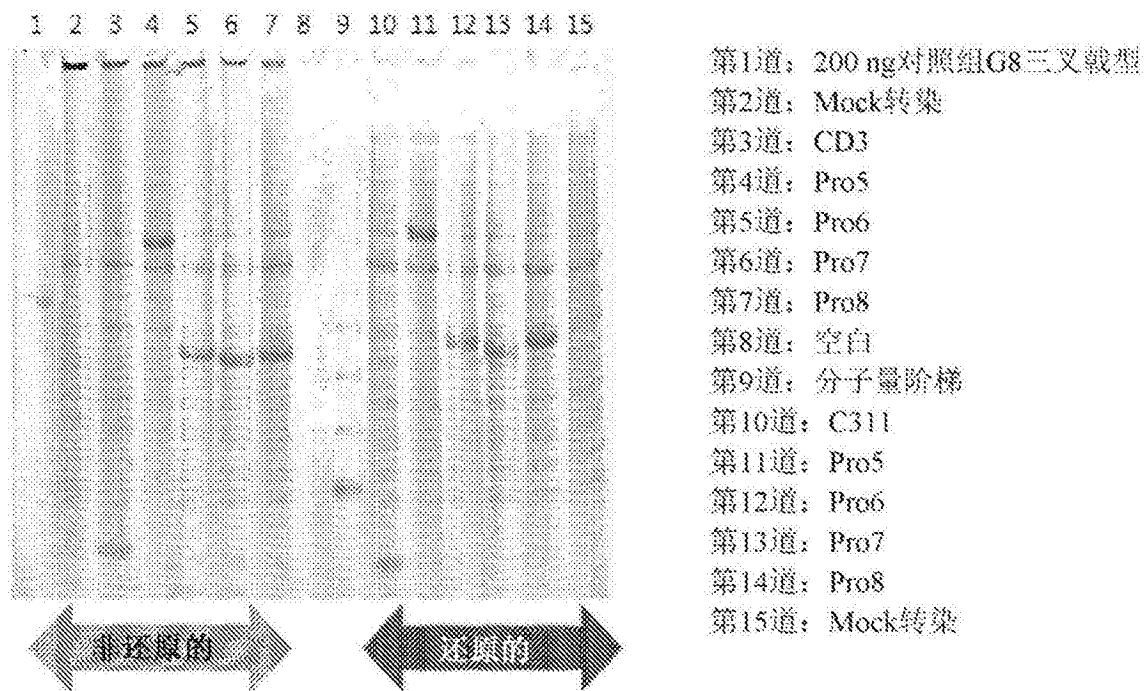
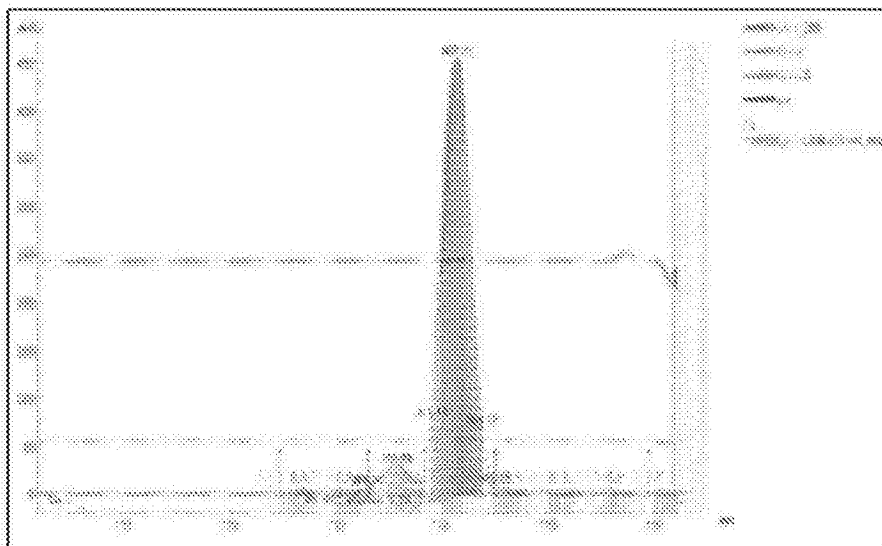
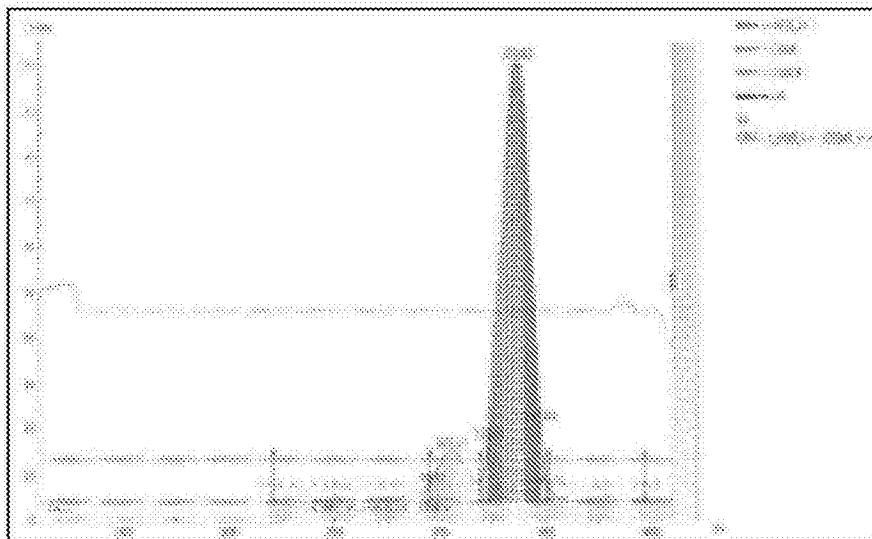
未纯化的Prodent的SDS-PAGE

图6



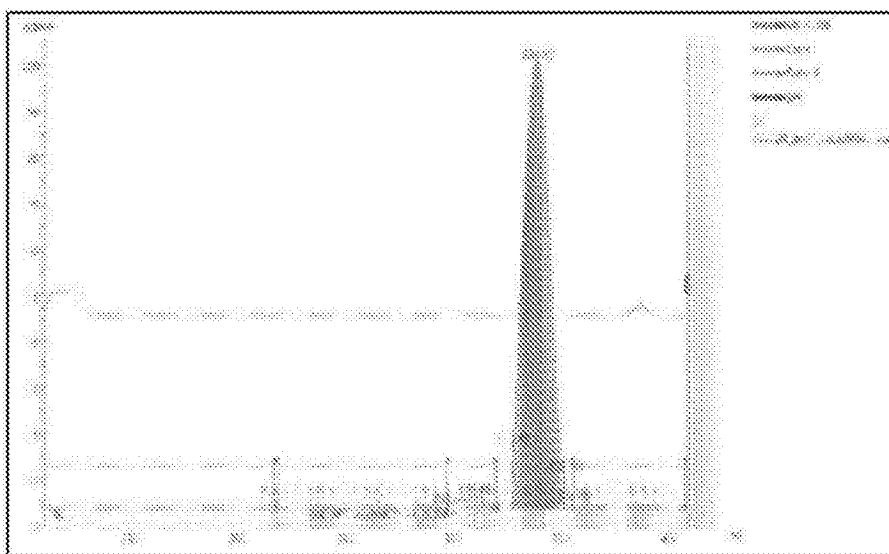
Pro 5
G8:(I2c)x2:D12::His6

图7A



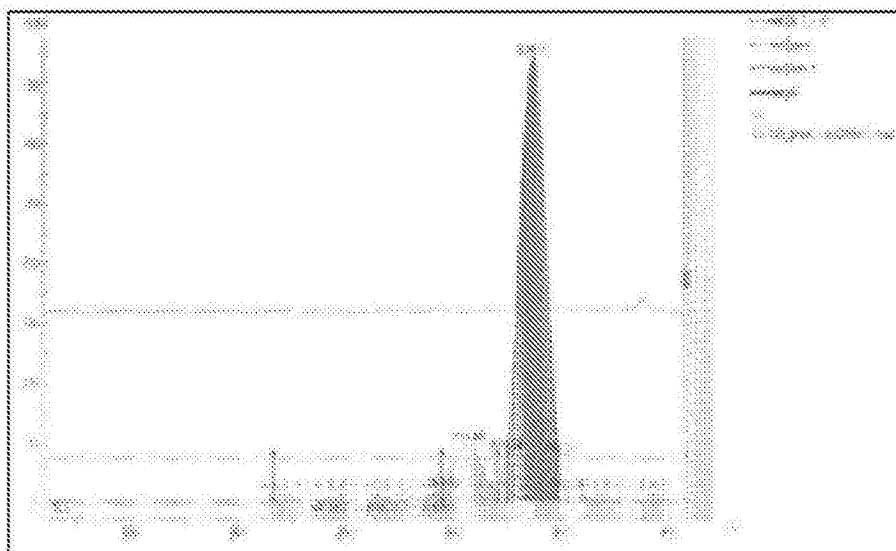
Pro 6
G8(sdAb):I2Ci::His6

图7B



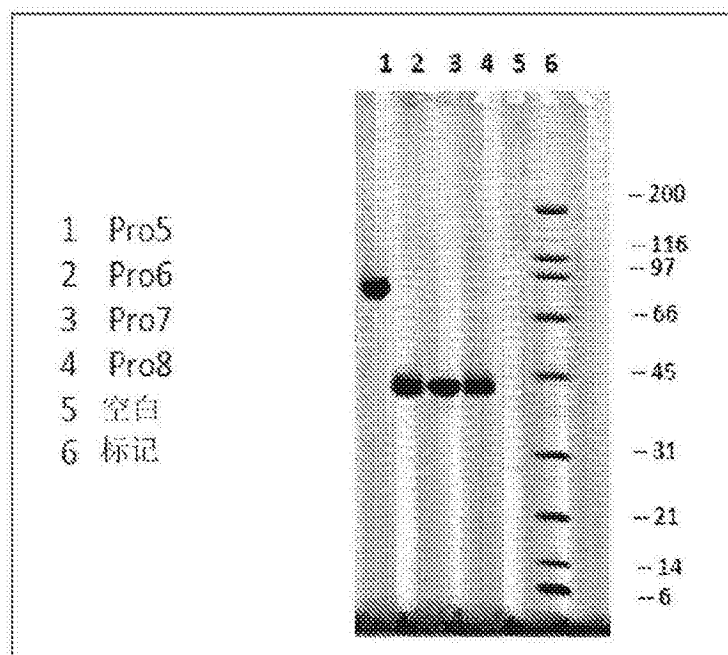
Pro 7
I2Ci:D12(sdAb)::His6

图7C



Pro 8
G8(sdAb):I2Cflag::His6

图7D



蛋白质	MW	批 mg/mL	批 mg	批 mLs	批产 量 mg/L	实验 天数	CMC
Prodent 5 G8(sdAb):i2C1x2-D12(sdAb)::His6	83889	0.473	14.7	31	18.3	5	0.8
Prodent 6 G8(sdAb):i2C::His5	42471	0.205	6.4	31	8.0	5	0.8
Prodent 7 i2C-D12(sdAb)::His6	41686	0.583	30.5	31	33.1	5	0.8
Prodent 8 G2(sdAb):i2CFlag::His6	42191	0.348	10.8	31	13.5	5	0.8

图8

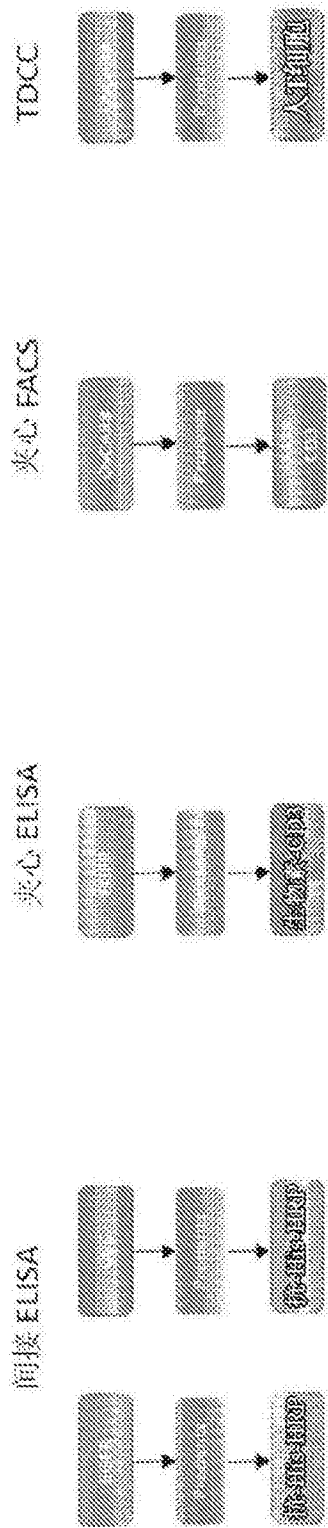


图9

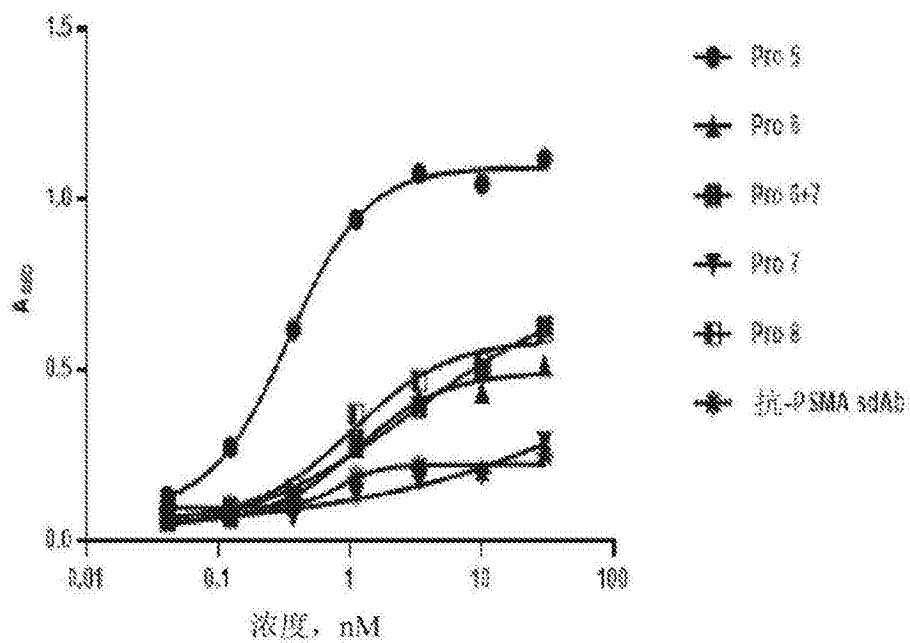


图10A

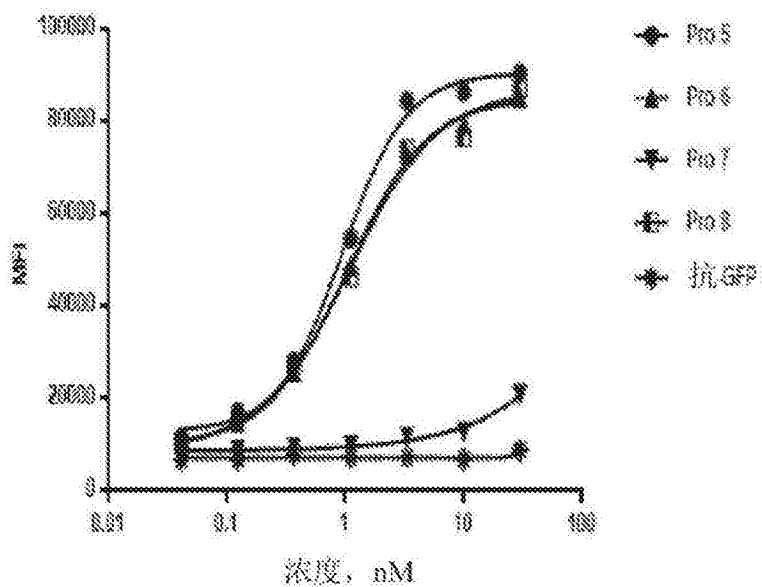


图10B

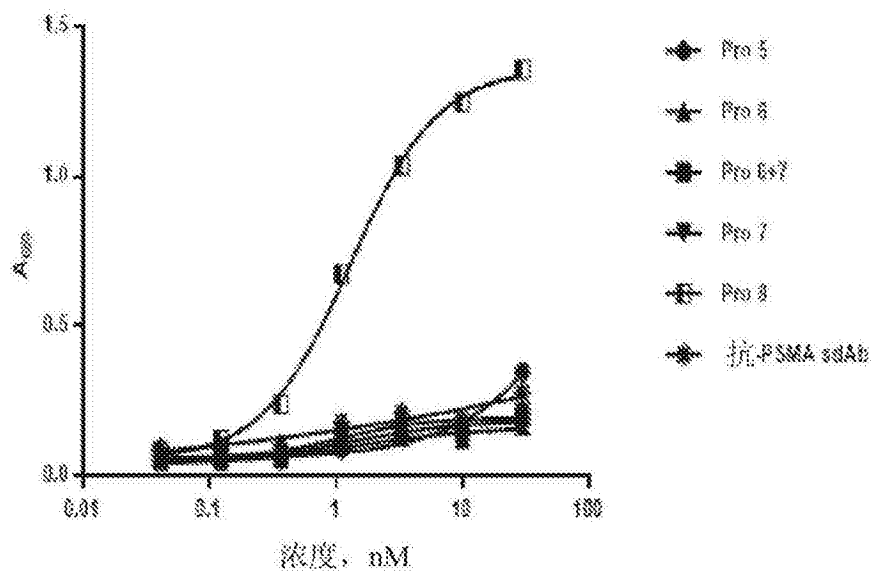


图11A

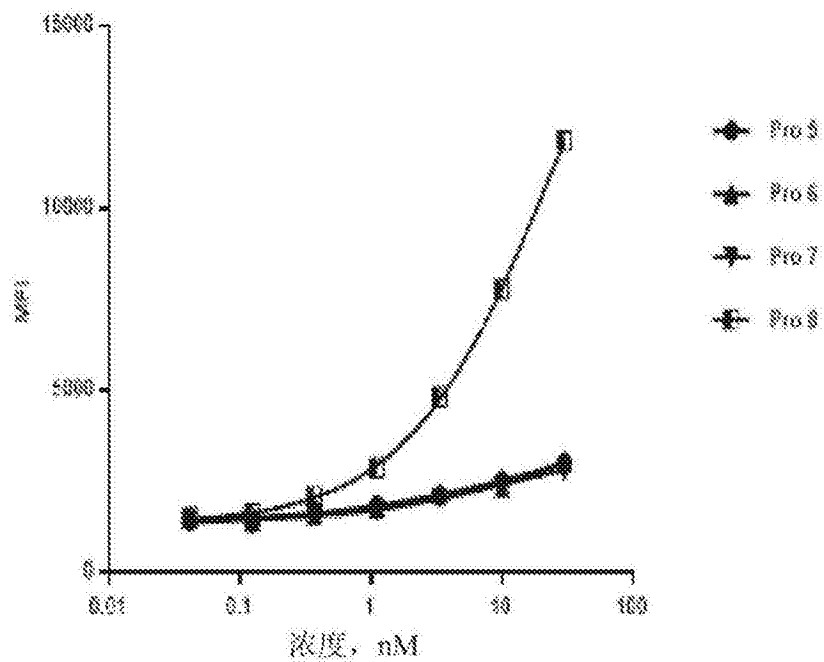


图11B

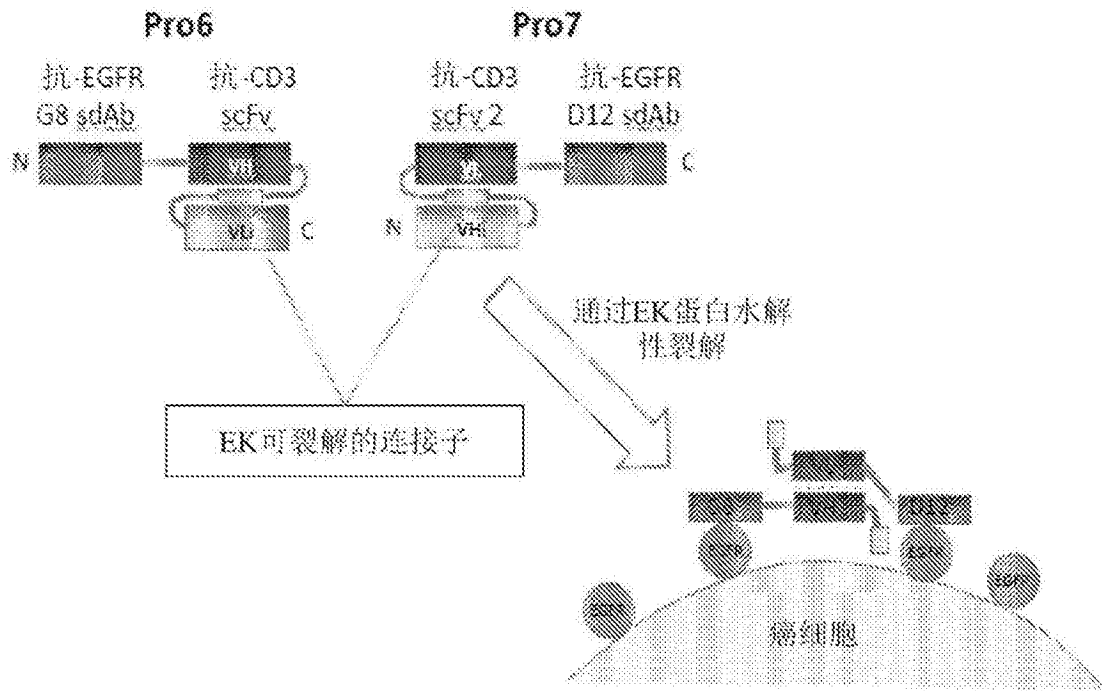


图12

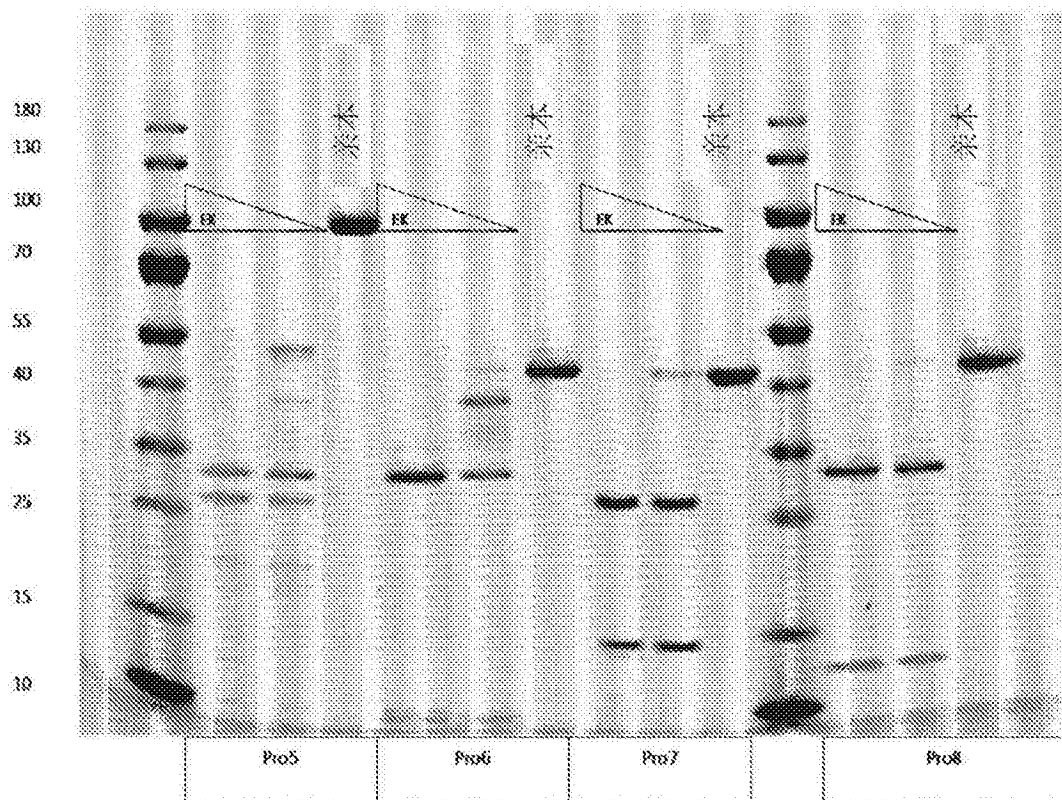


图13

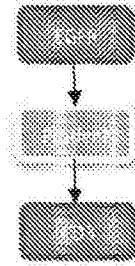


图14A

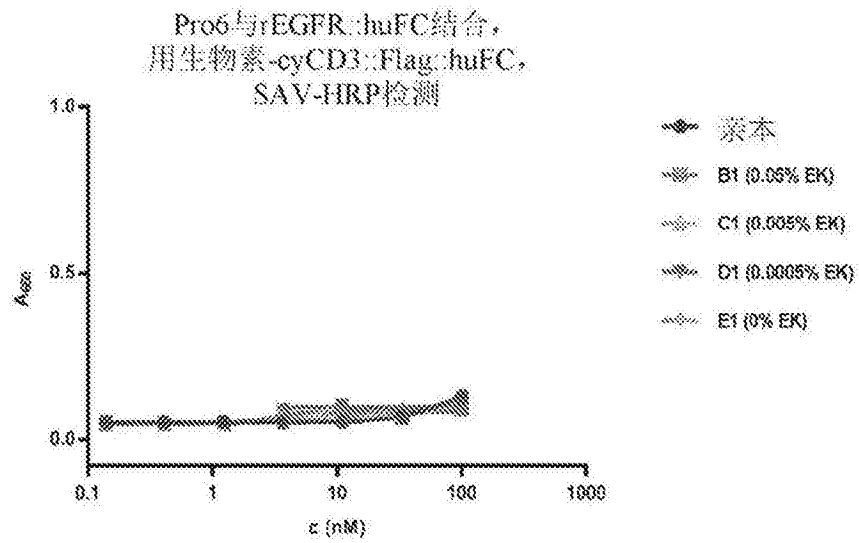


图14B

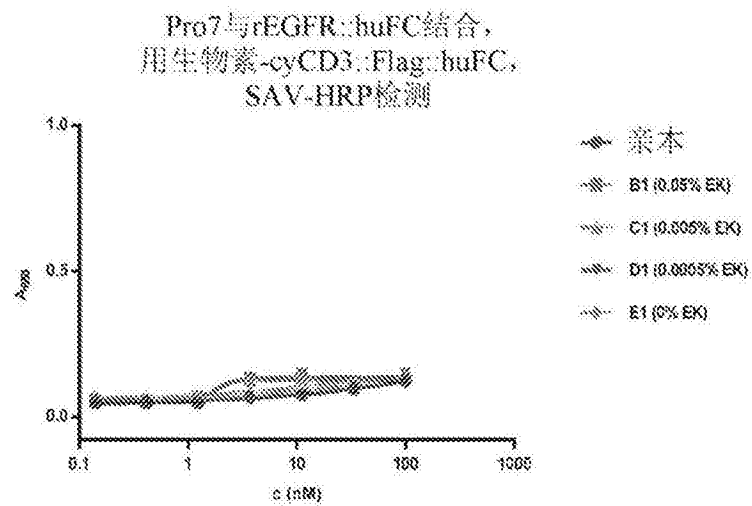


图14C

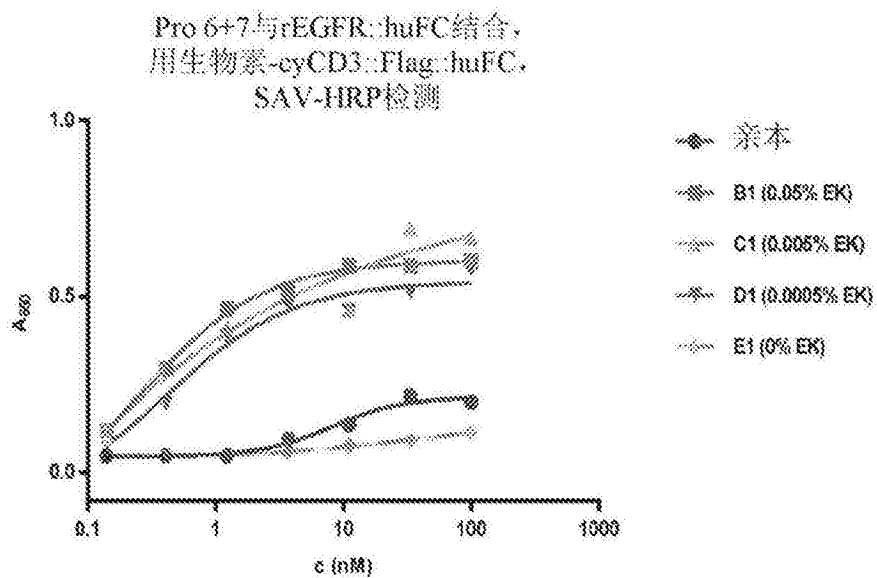


图14D

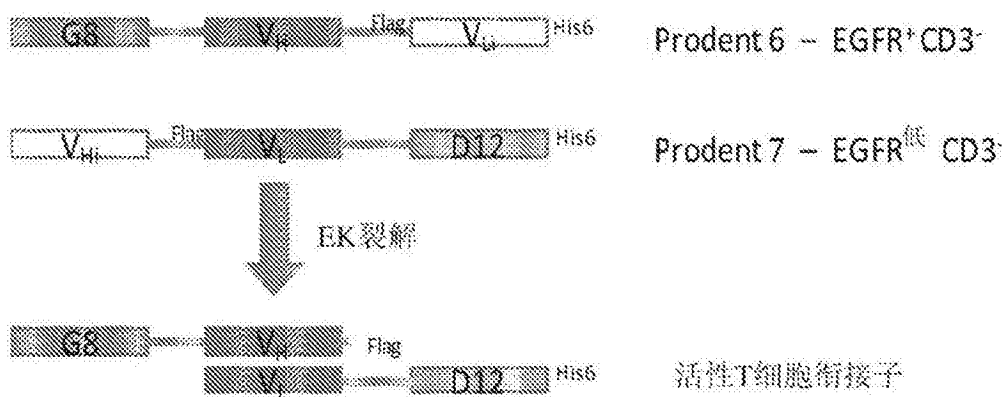


图14E

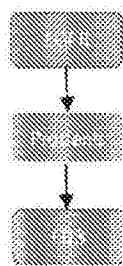


图15A

EK分解Pro6与OVCAR-8的结合,
用A488-cyCD3::Flag: hFC检测

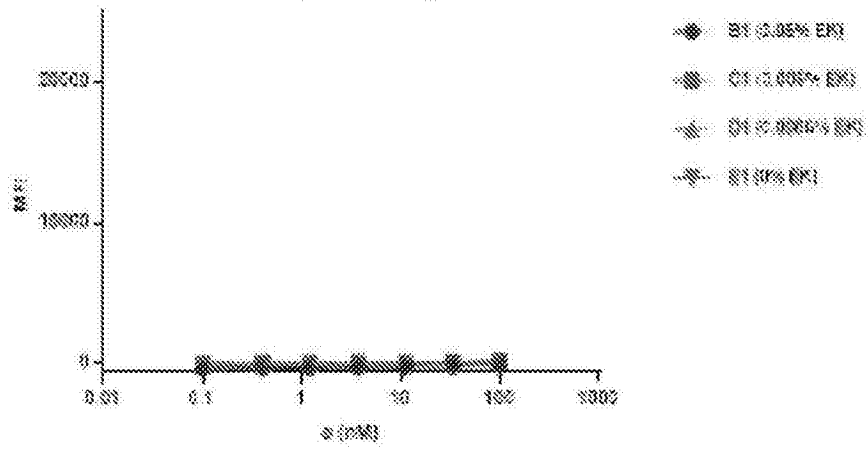


图15B

EK分解Pro7与OVCAR-8的结合,
用A488-cyCD3::Flag: hFC检测

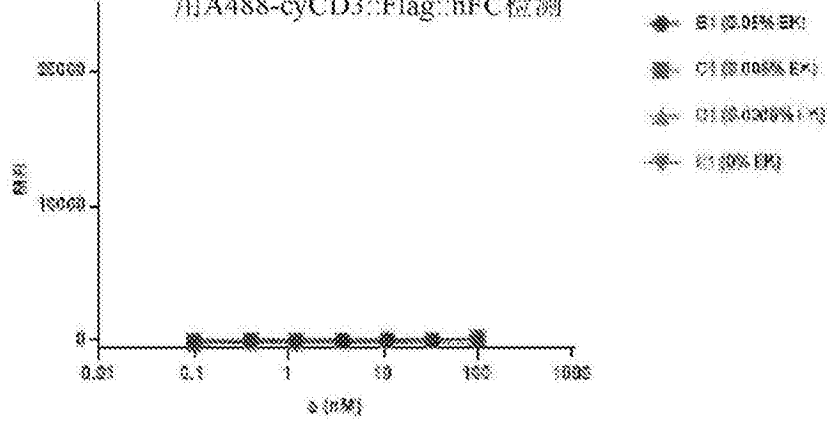


图15C

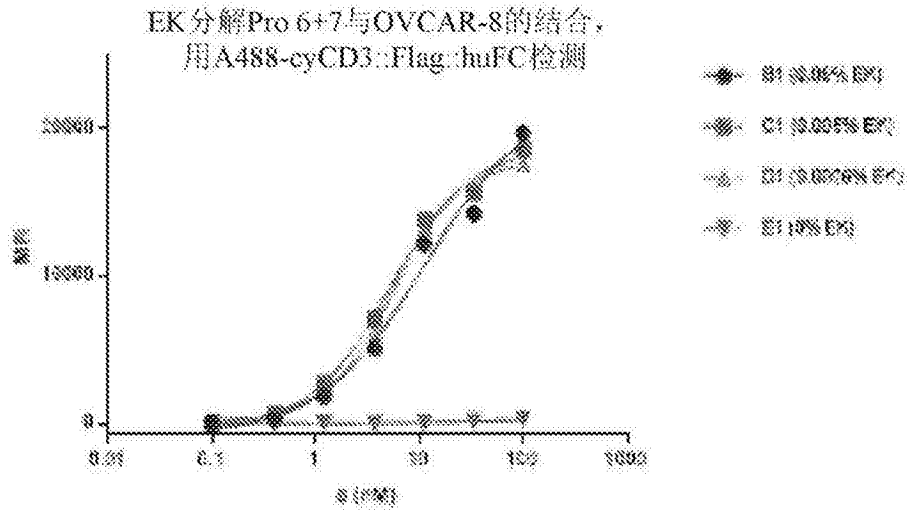


图15D

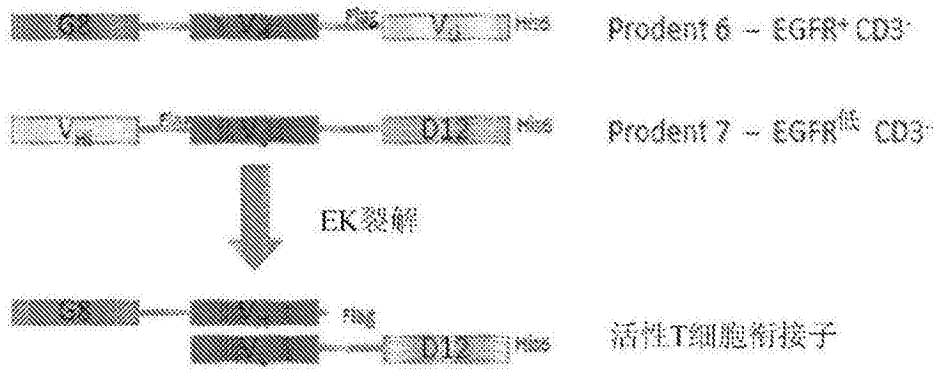


图15E

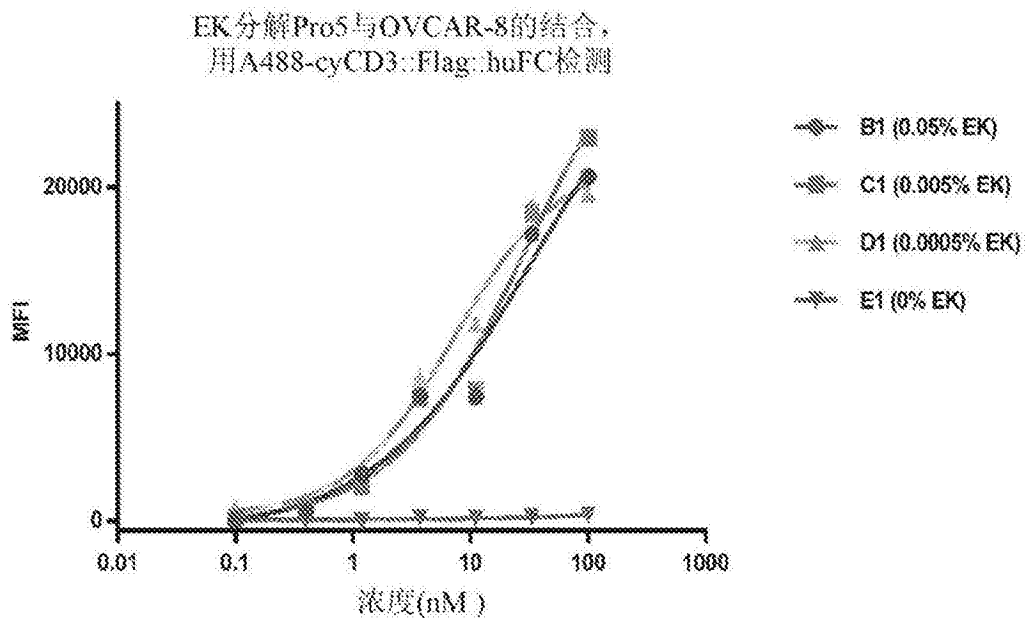


图16

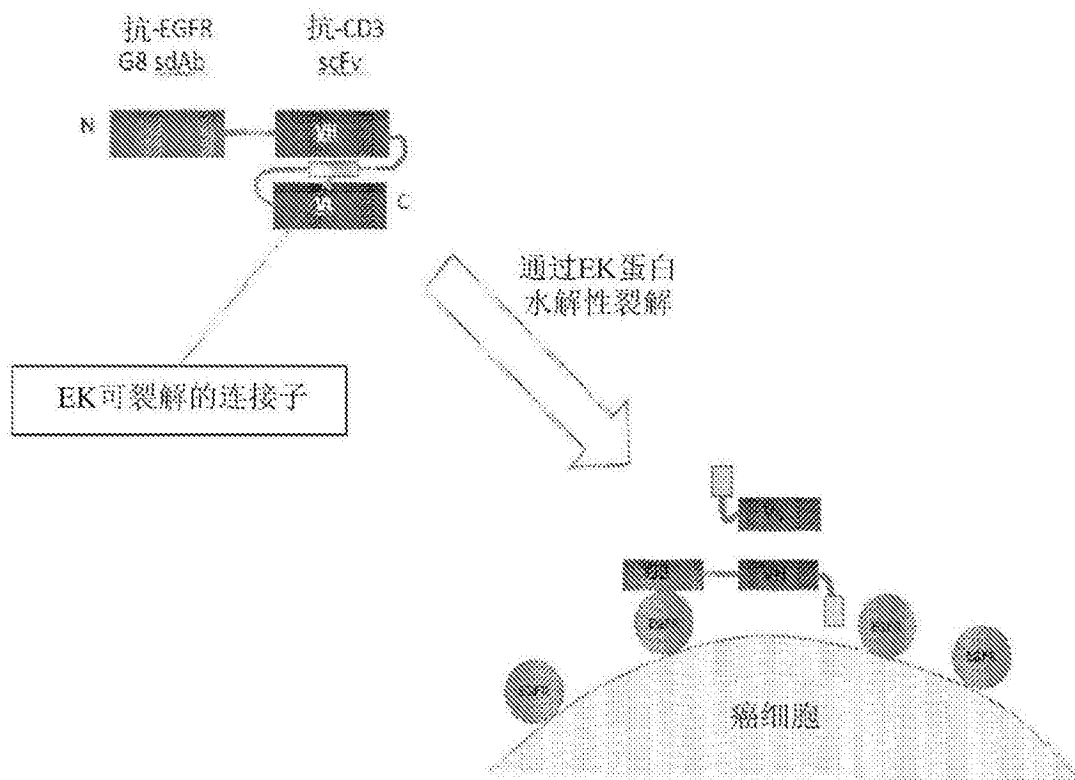


图17

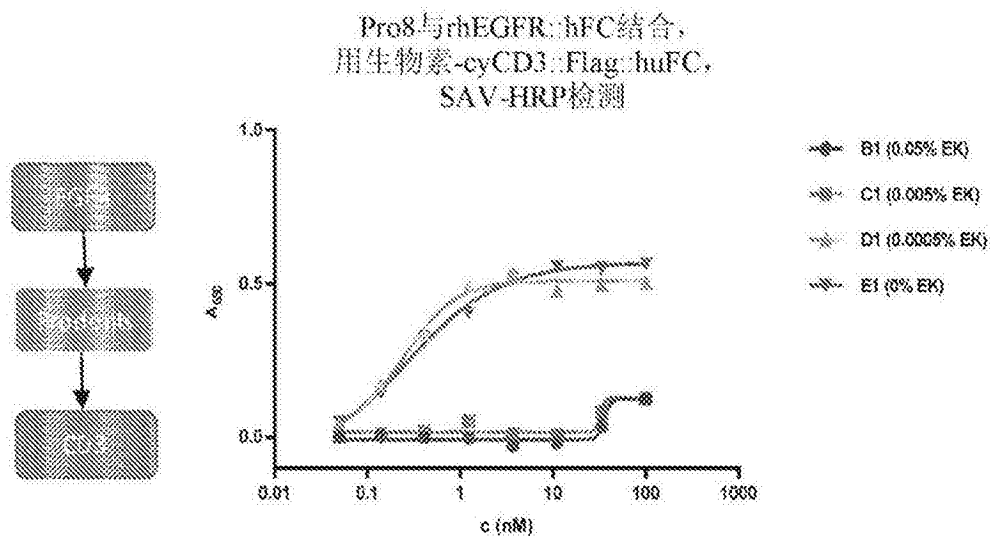


图18A

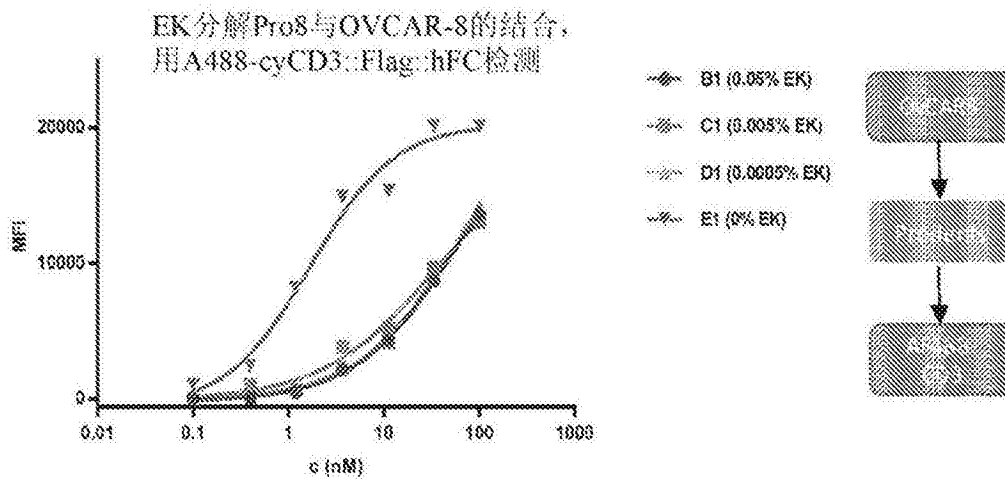


图18B



图18C

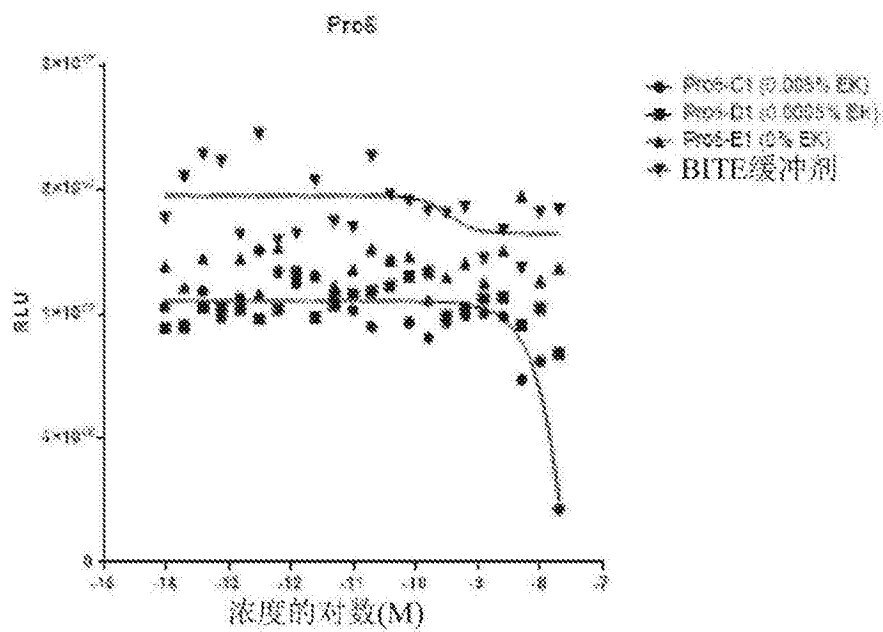


图19A

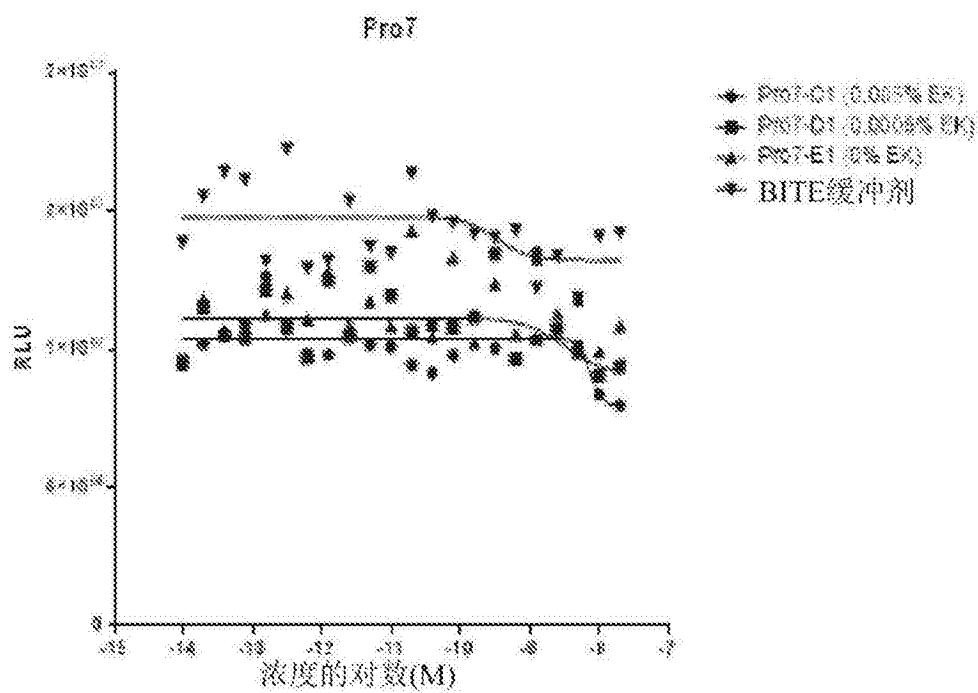


图19B

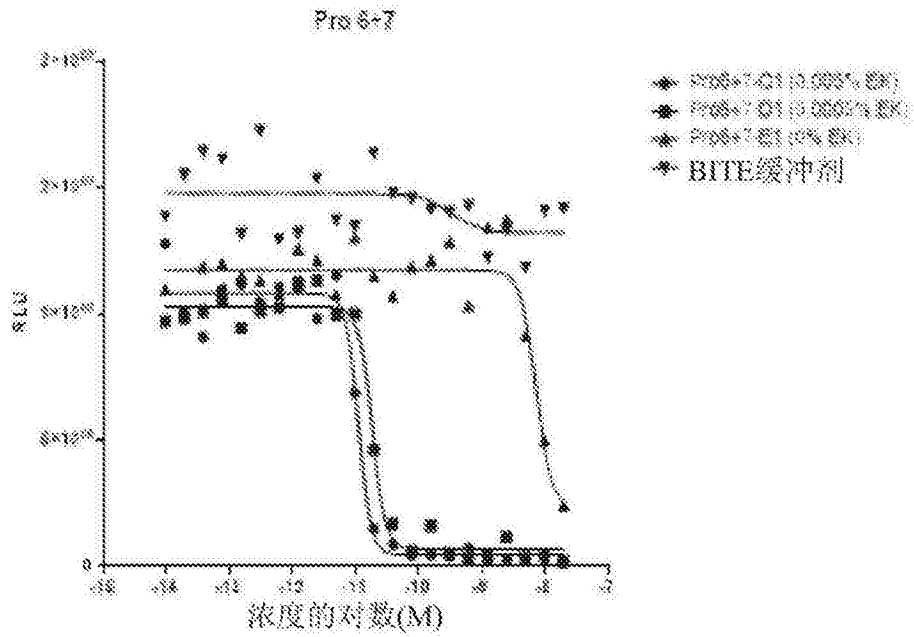


图19C

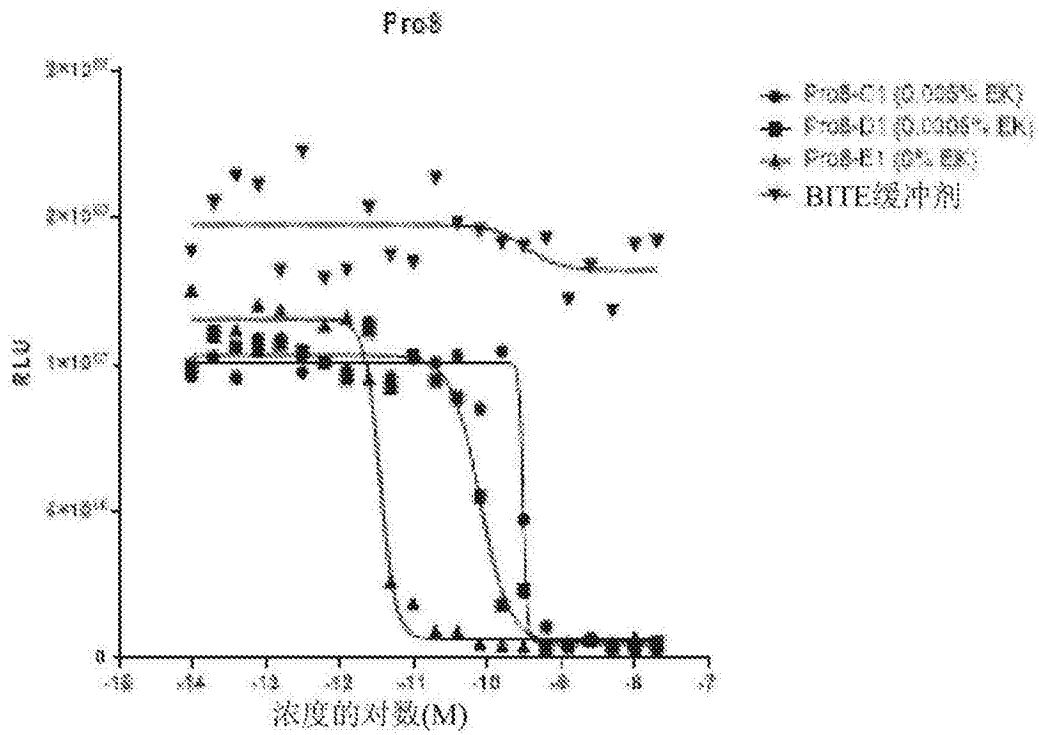


图19D

Prodent 25 — $\alpha\text{GFP}^+ \text{CD}3^+$

图20A

Prodent 26 - αGFP⁺ CD3⁺

图20B

Prodent 27 - αGFP⁺ CD3⁺

图20C

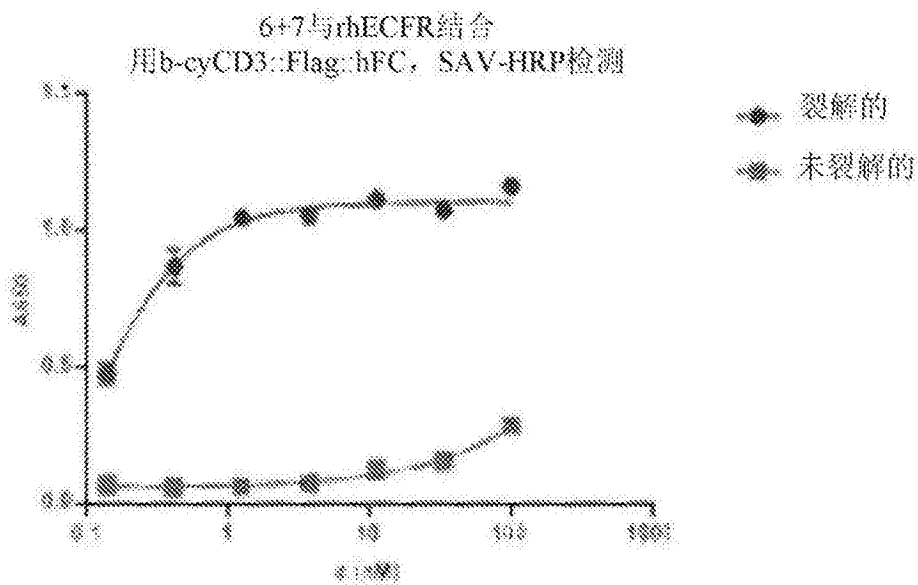


图21A

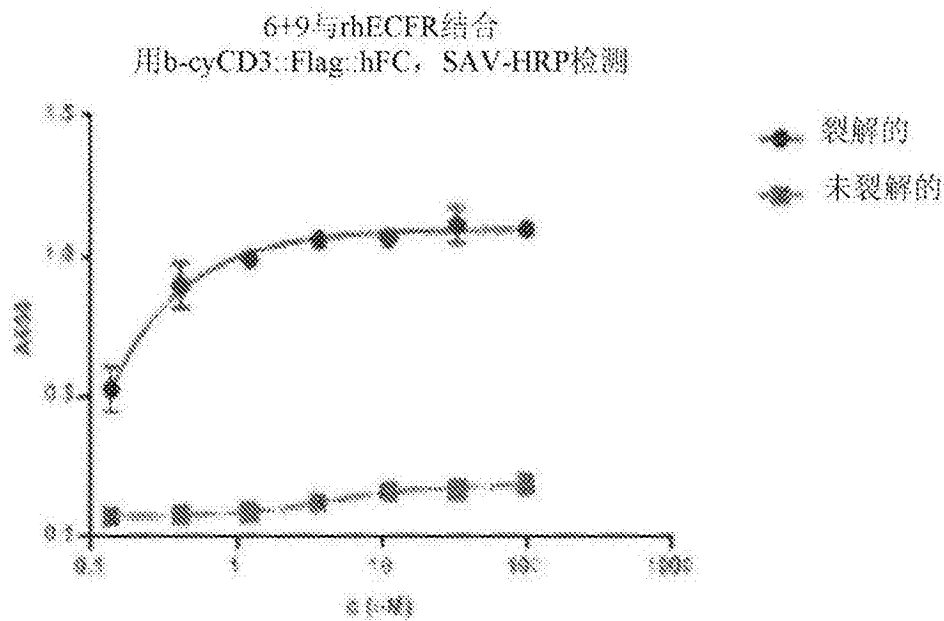


图21B

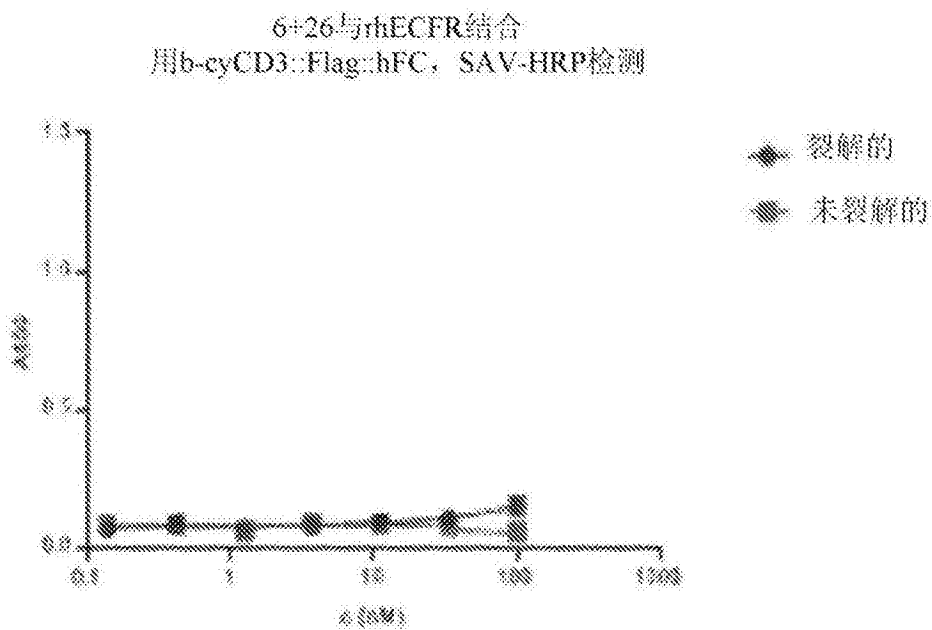


图21C

6+27与rhECFR结合
用b-cyCD3::Flag:hFC, SAV-HRP检测

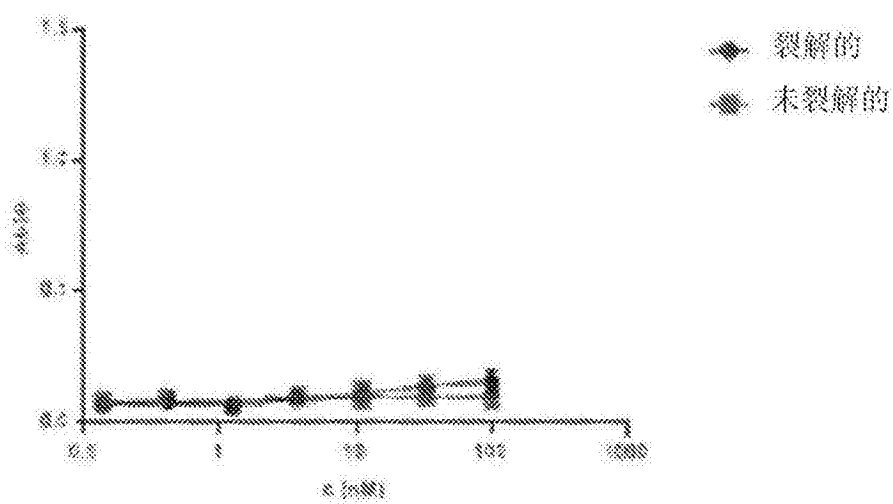


图21D

7+25与rhECFR结合
用b-cyCD3::Flag:hFC, SAV-HRP检测

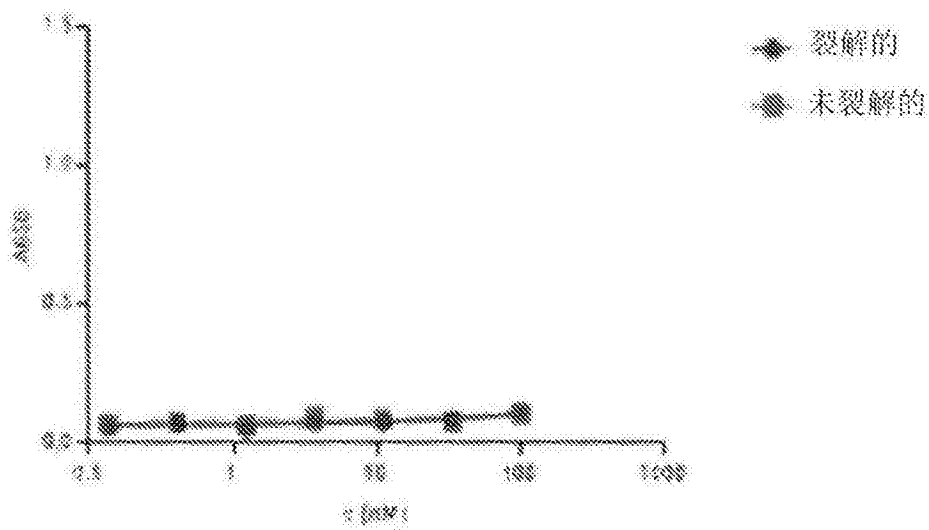


图21E

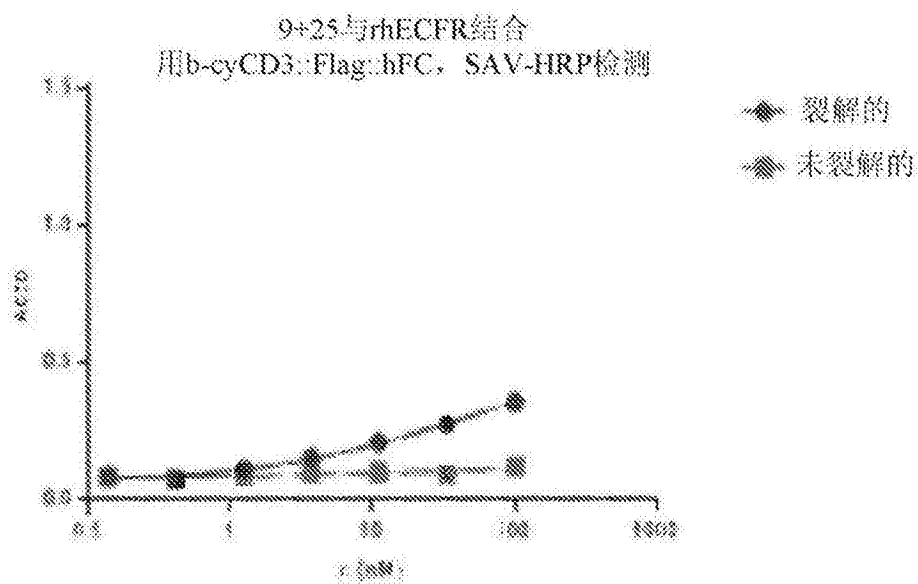


图21F

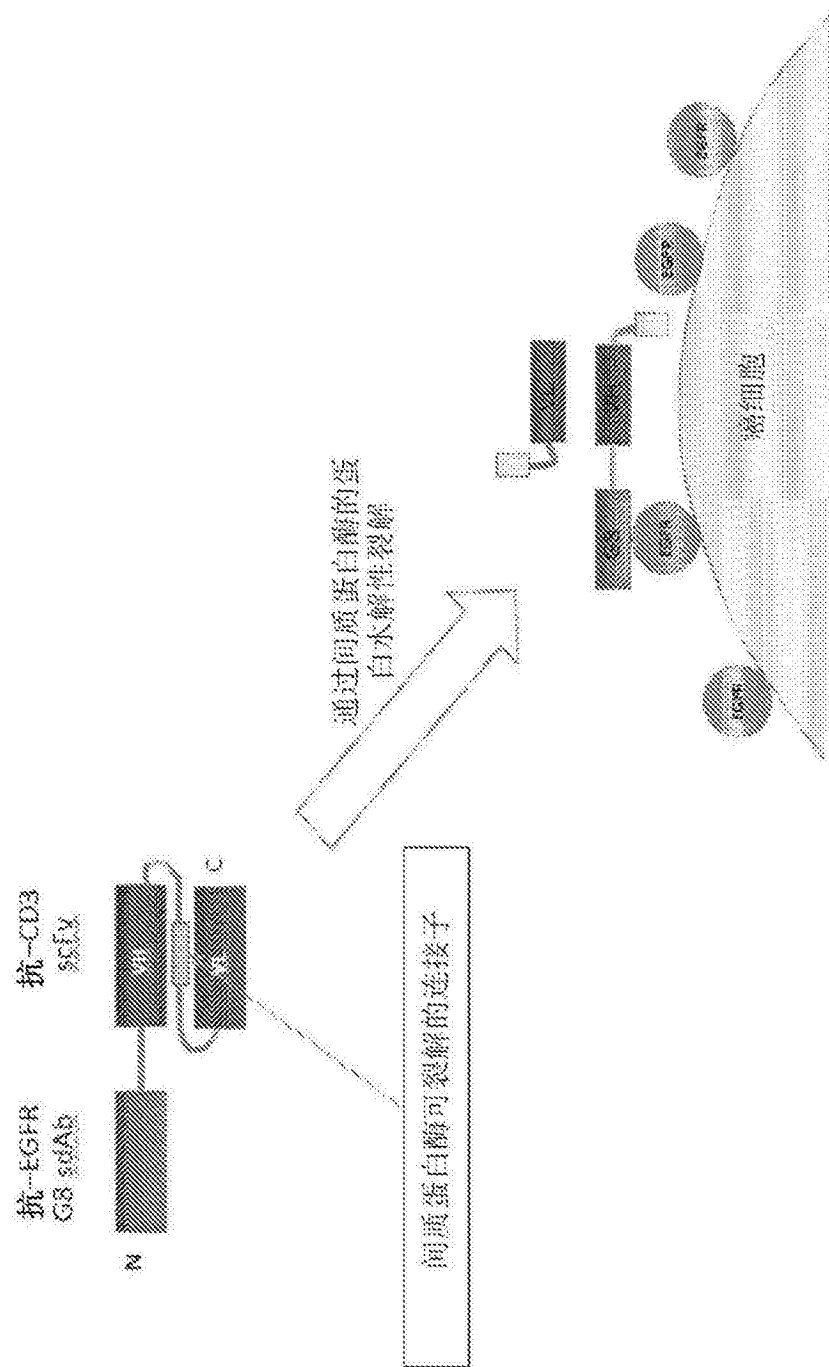


图22

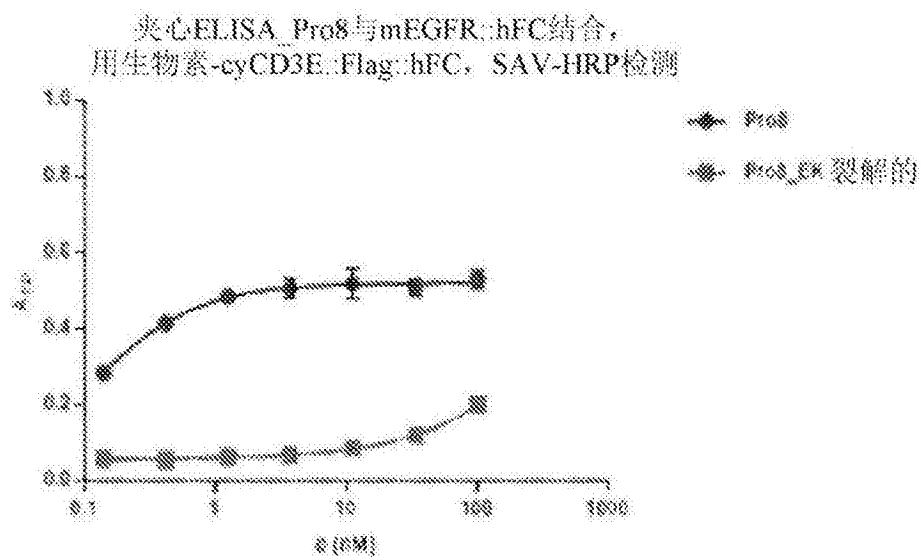


图23A

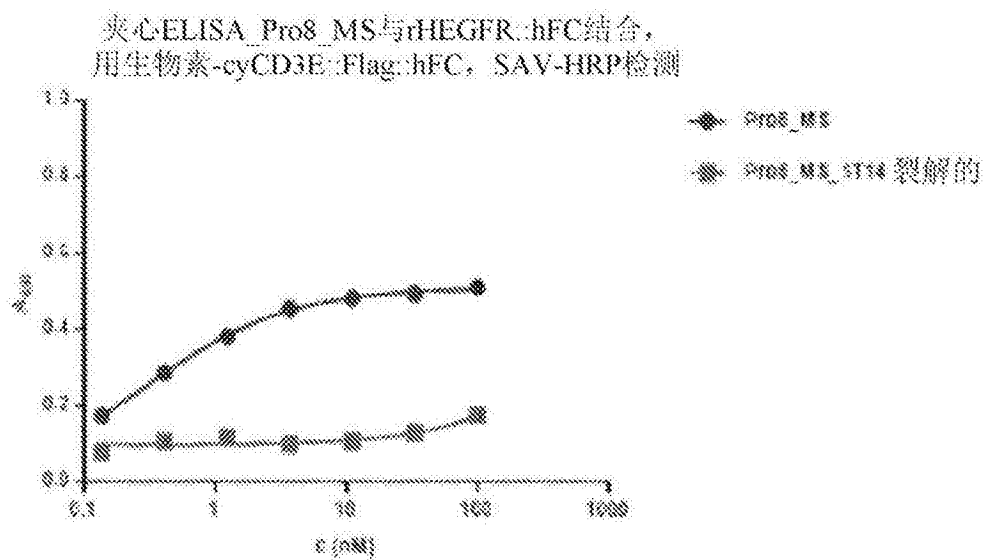


图23B

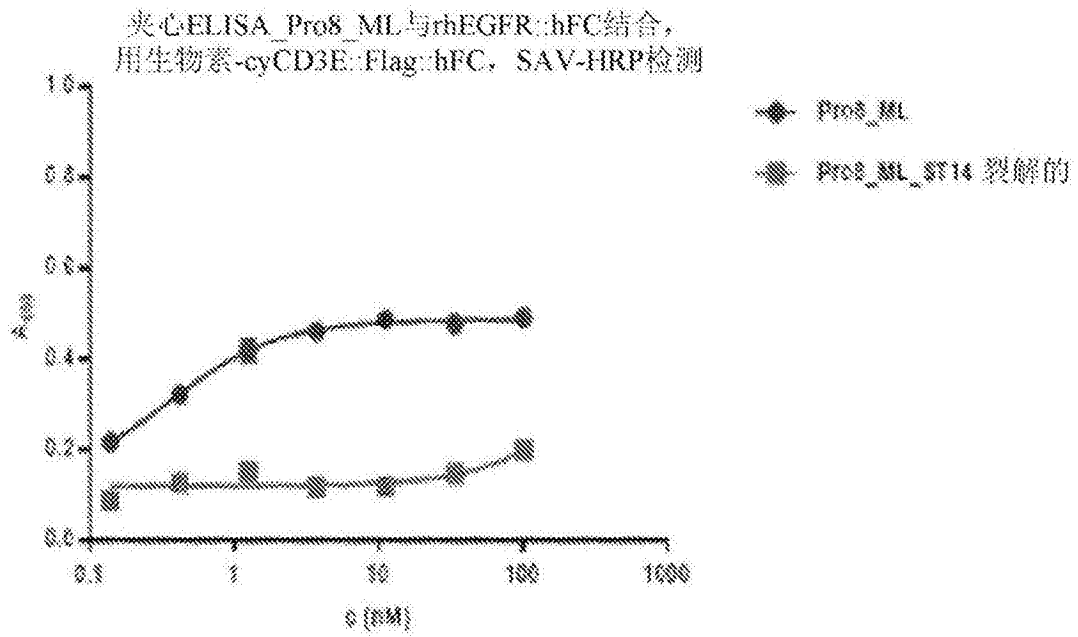


图23C

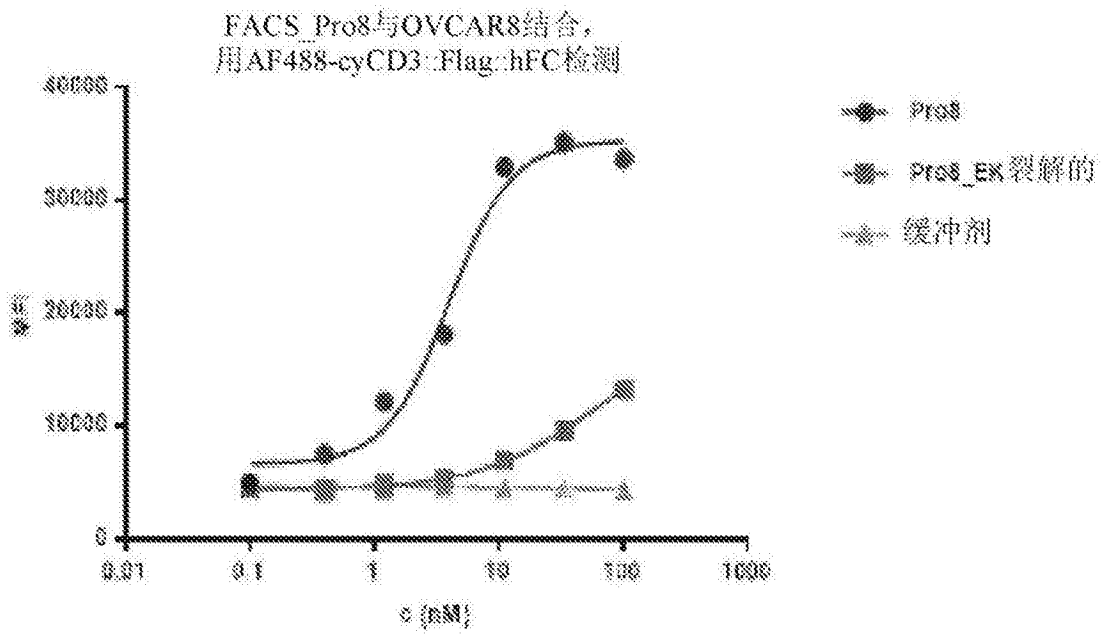


图24A

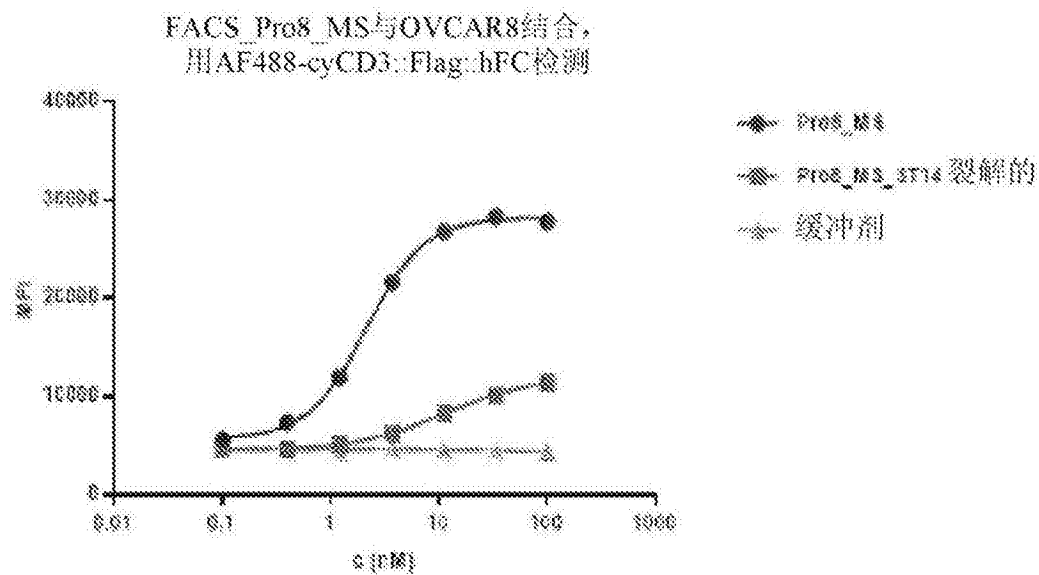


图24B

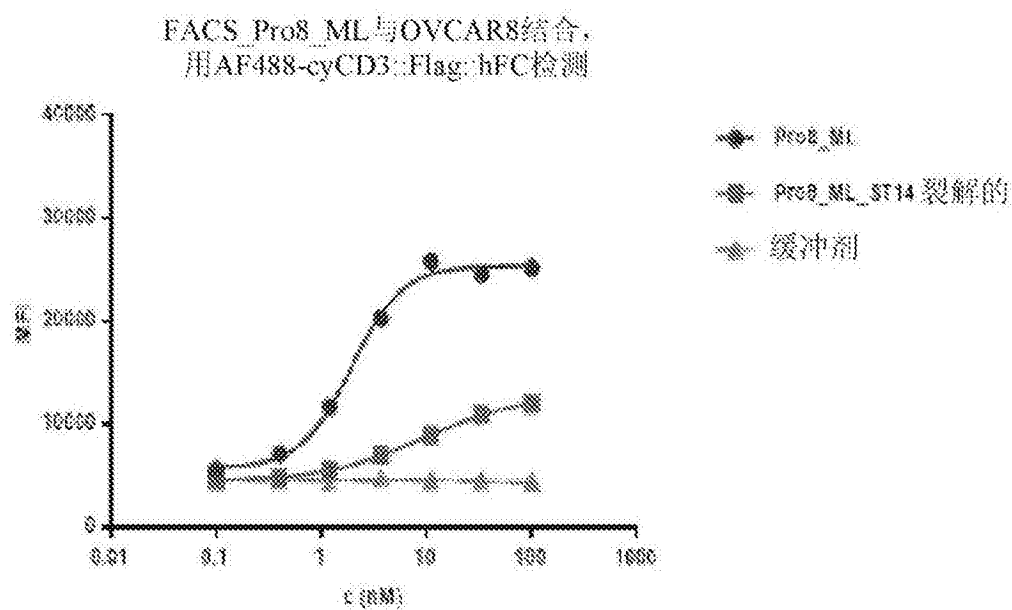


图24C

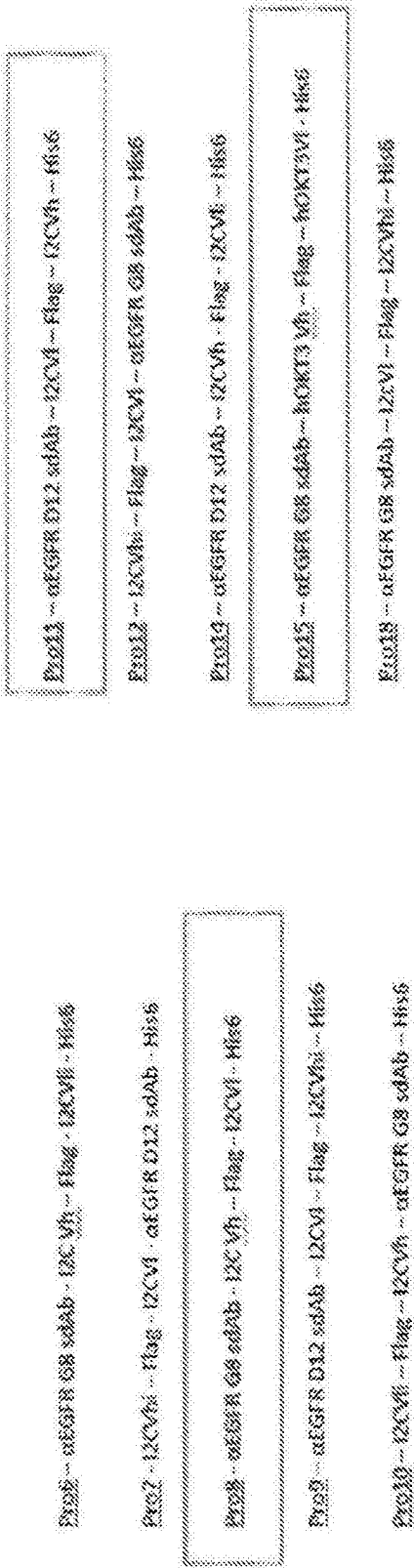
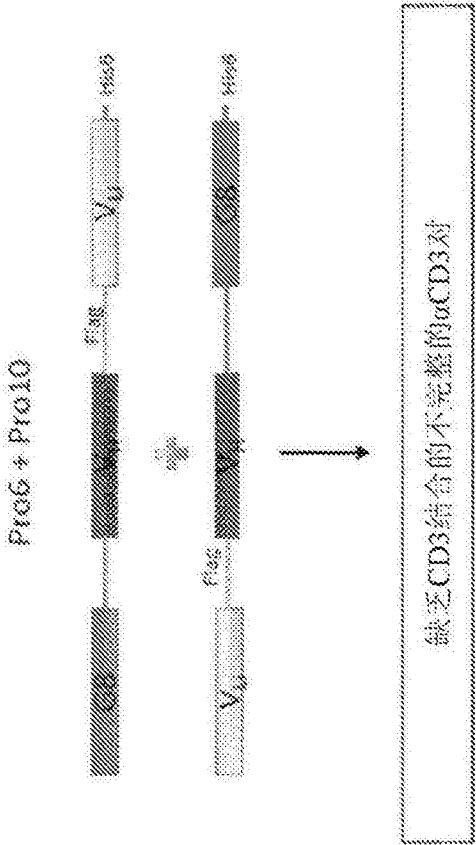


图25



Proteins	EGFP	CD3
6+10	+	+
6+14	+	+
7+9	+	+
7+12	+	+
9+12	+	+
10+14	+	+

图26

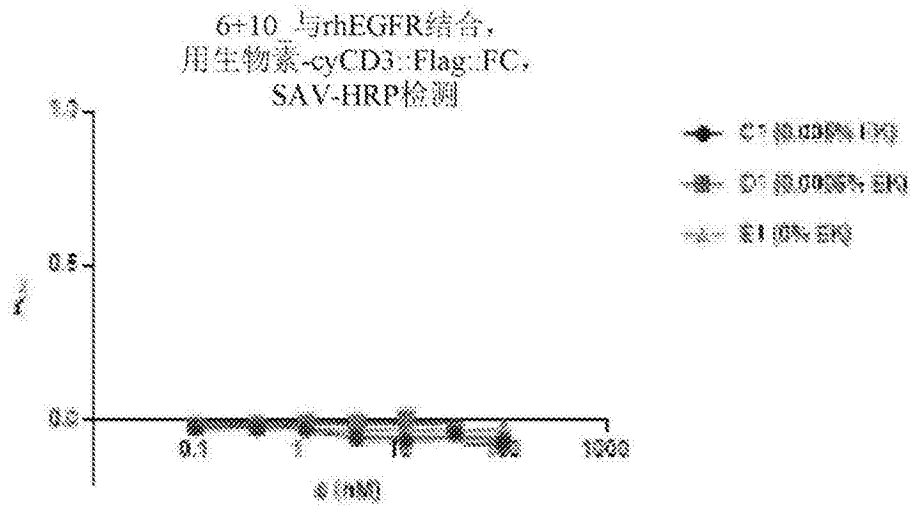


图27A

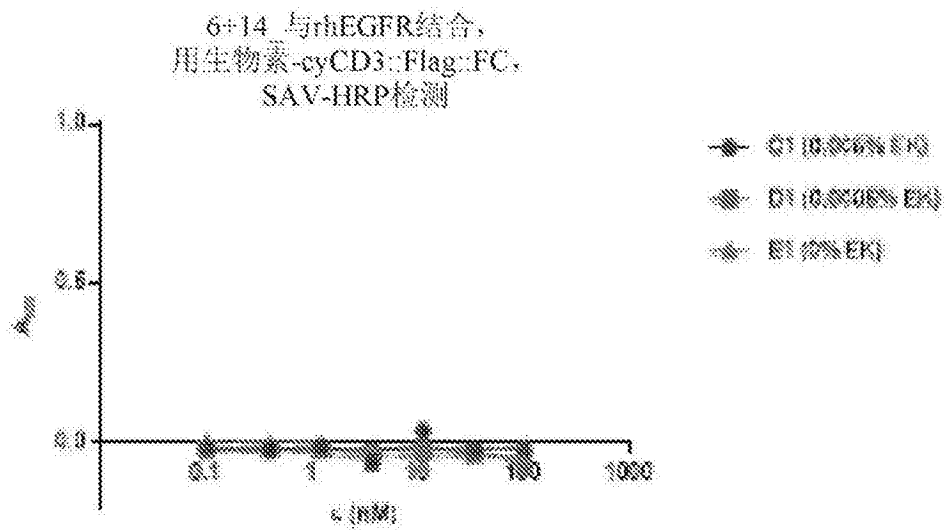


图27B

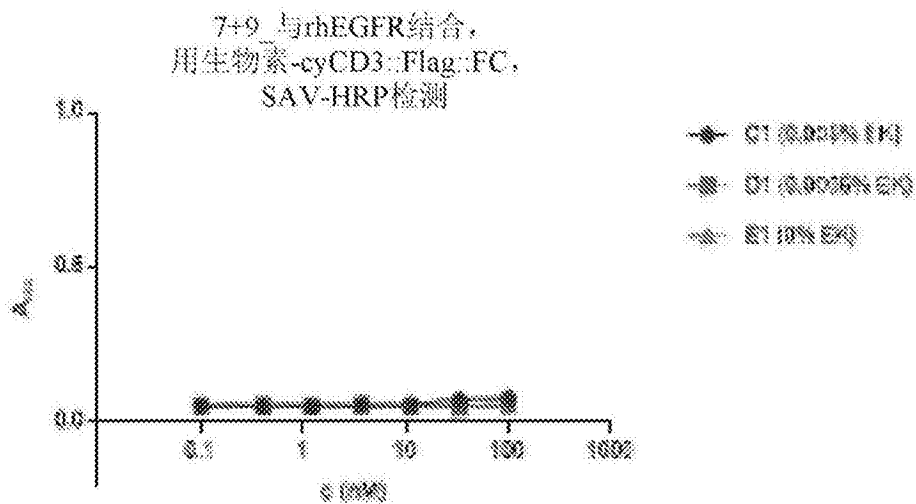


图27C

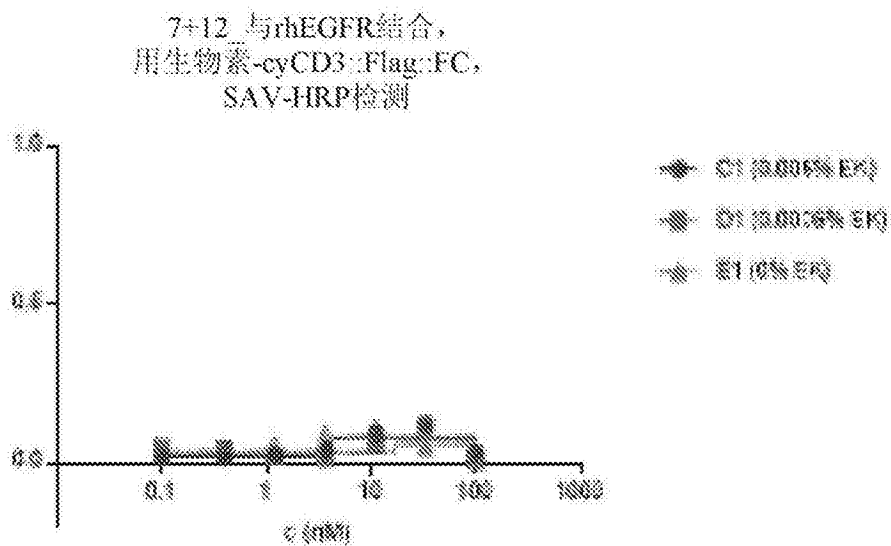


图27D

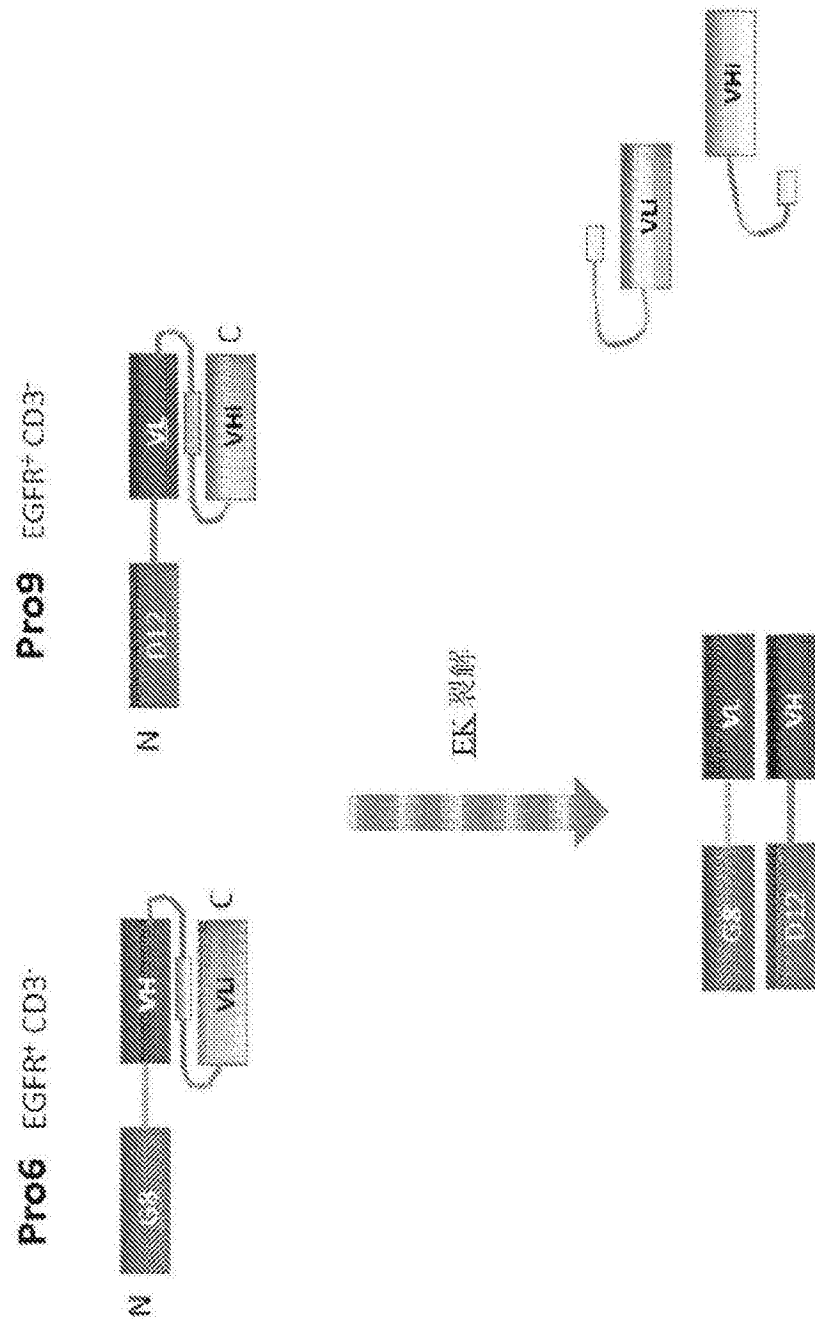


图28

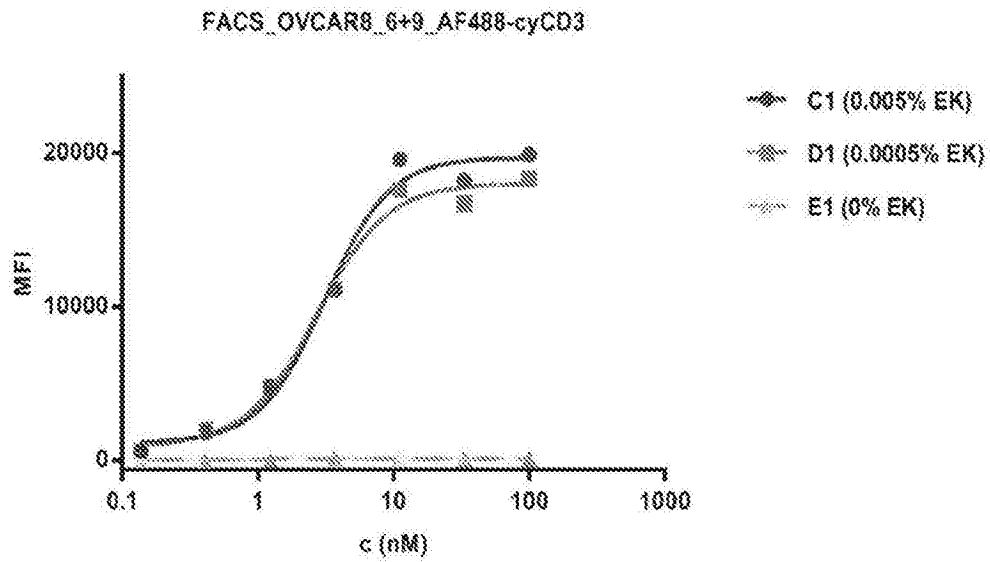


图29A

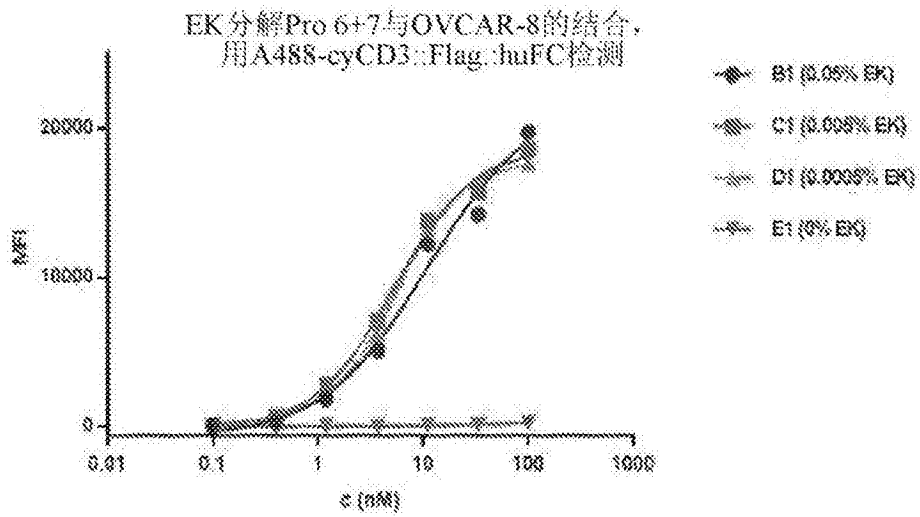


图29B

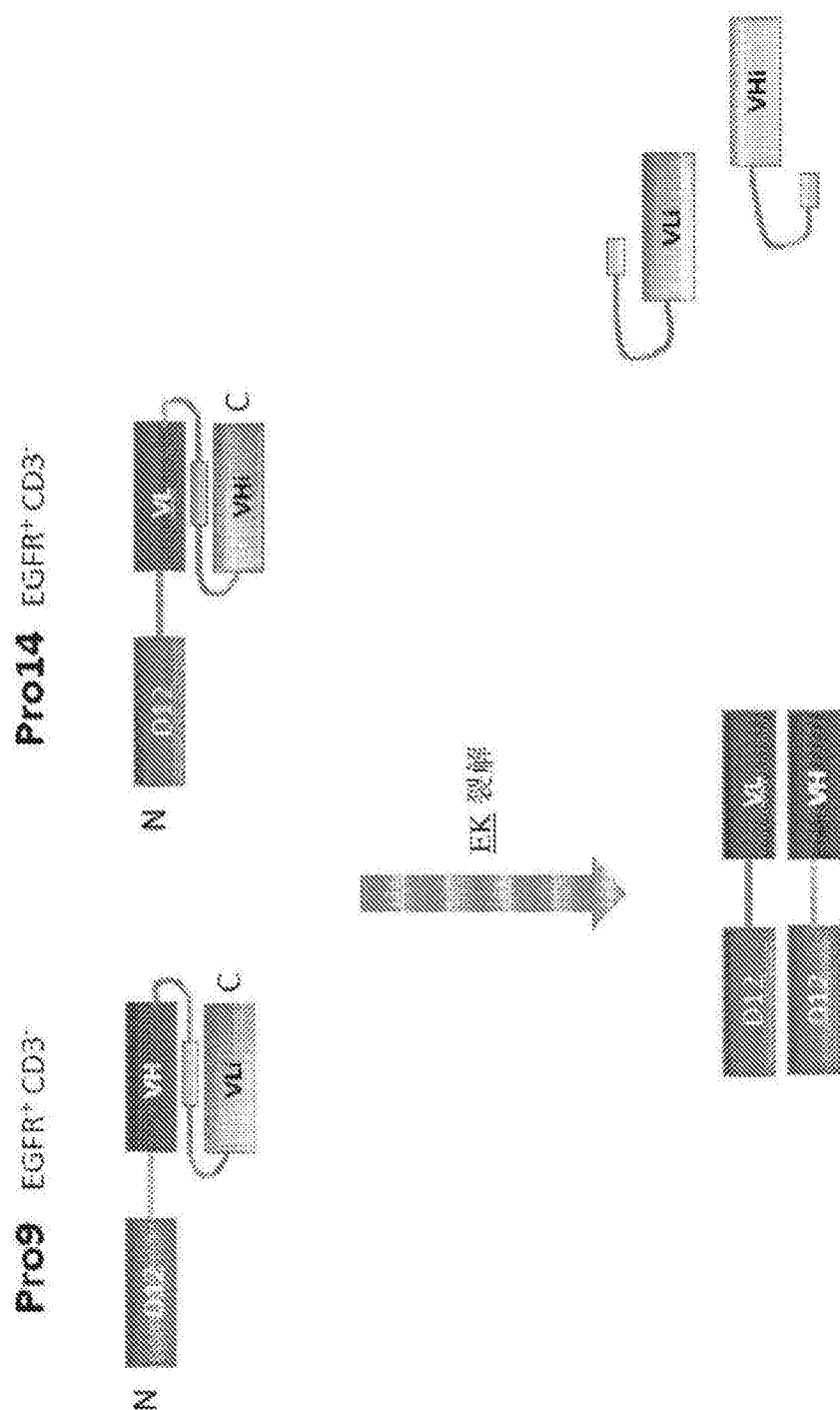


图30

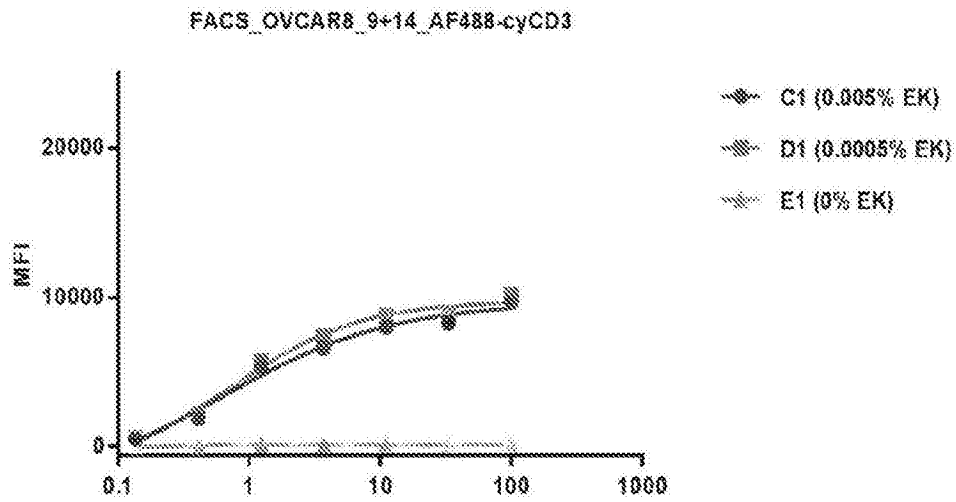


图31A

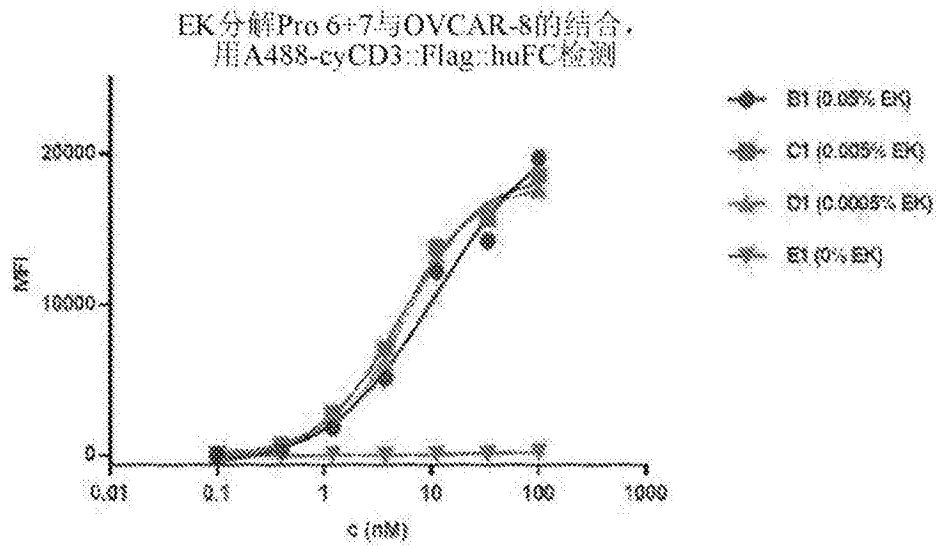


图31B

Prodents	EGFR	CD3	顺式/反式
6+7	+	+	顺式+反式
6+9	+	+	顺式+反式
7+10	+	+	顺式+反式
9+10	+	+	顺式+反式
12+14	+	+	顺式+反式
6+12	+	+	仅反式
7+14	+	+	仅反式
9+14	+	+	仅反式
10+12	+	+	仅反式

图32A

顺式 + 反式

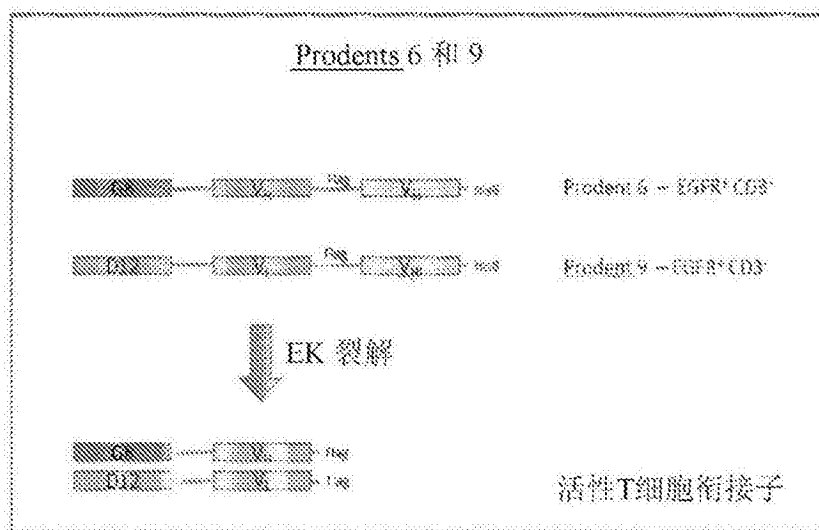


图32B

仅反式

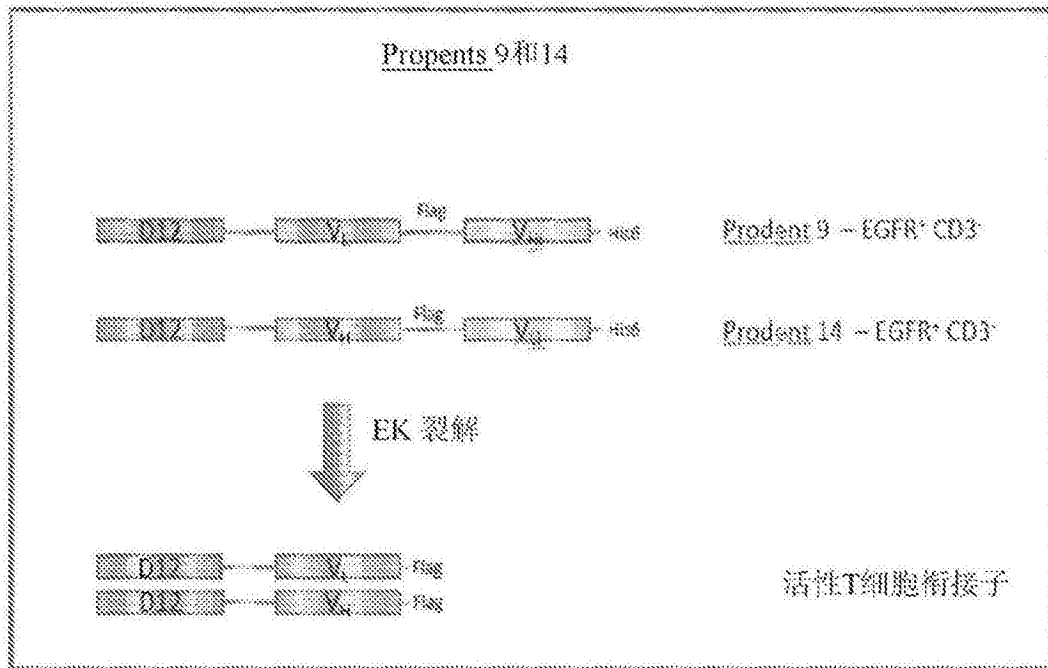


图32C

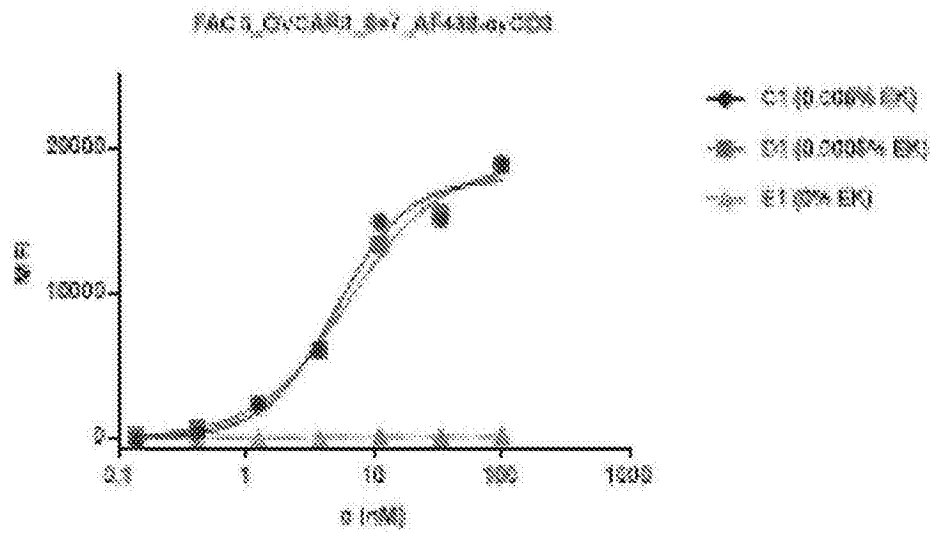


图33A

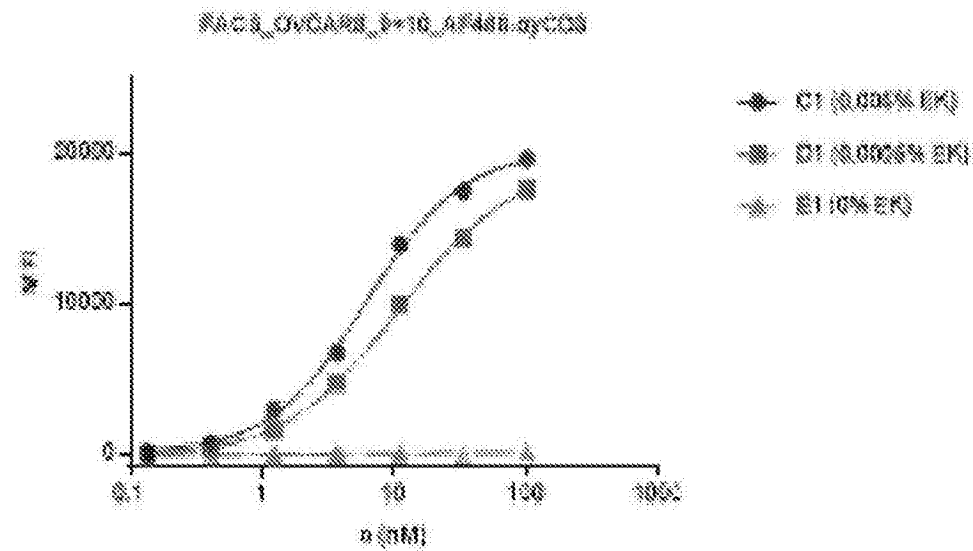


图33B

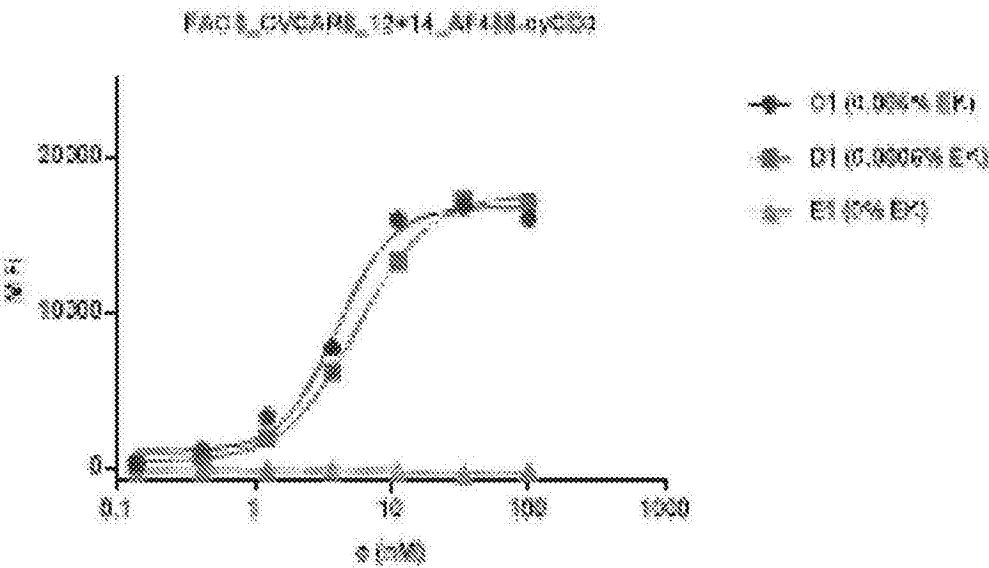


图33C

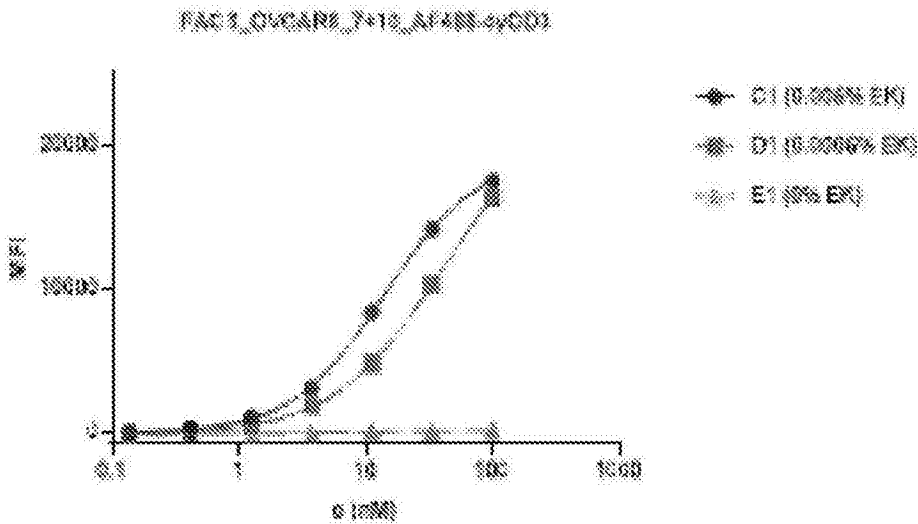


图33D

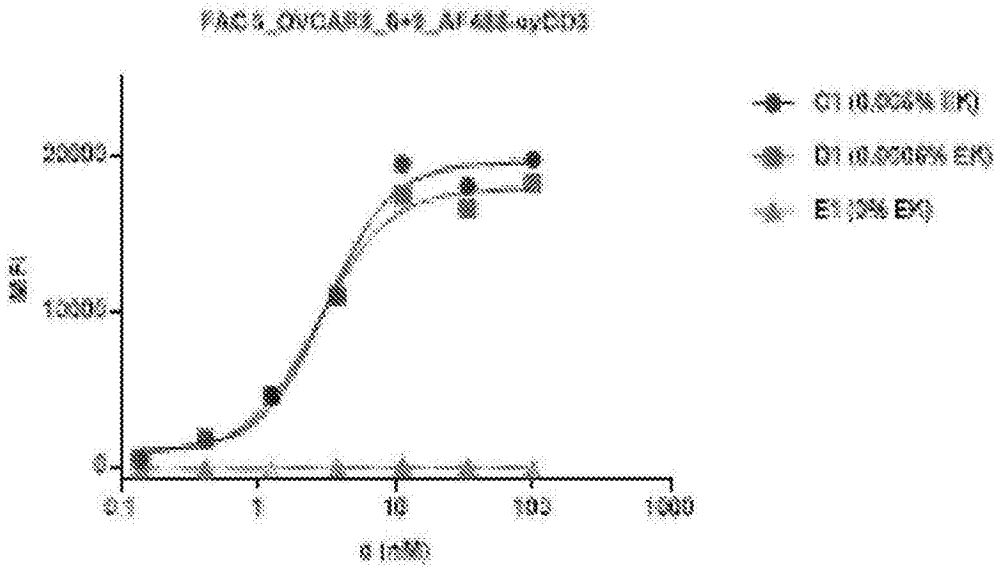


图33E

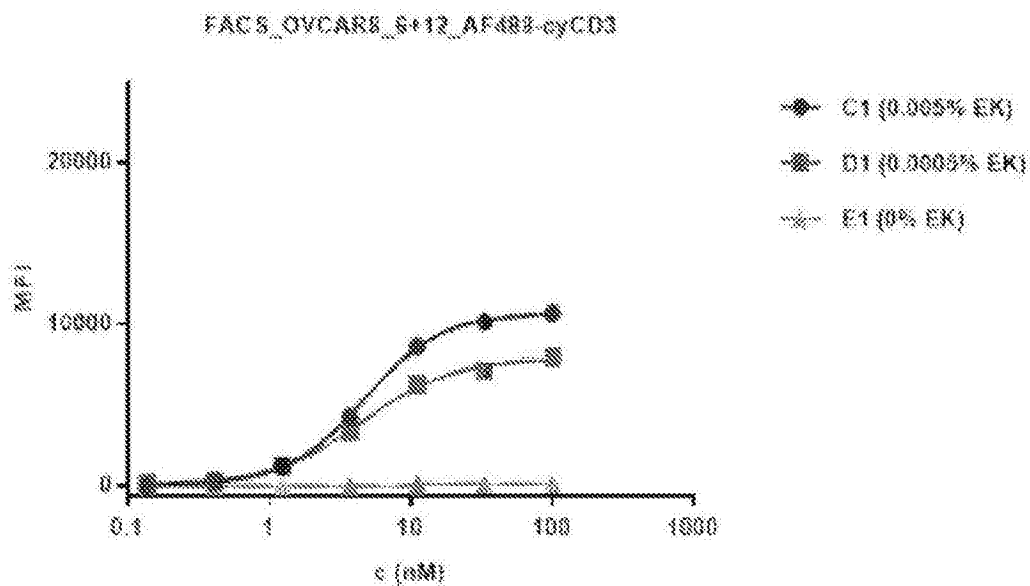


图34A

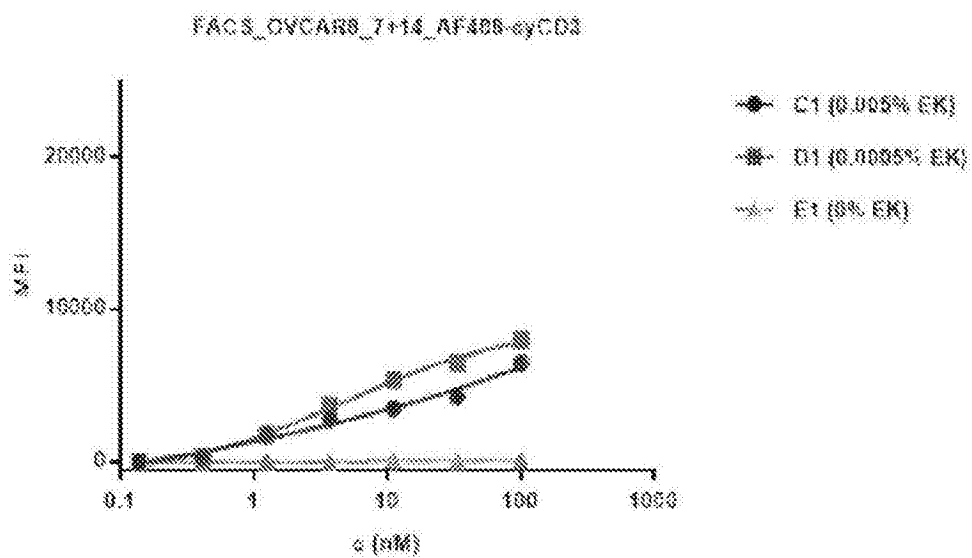


图34B

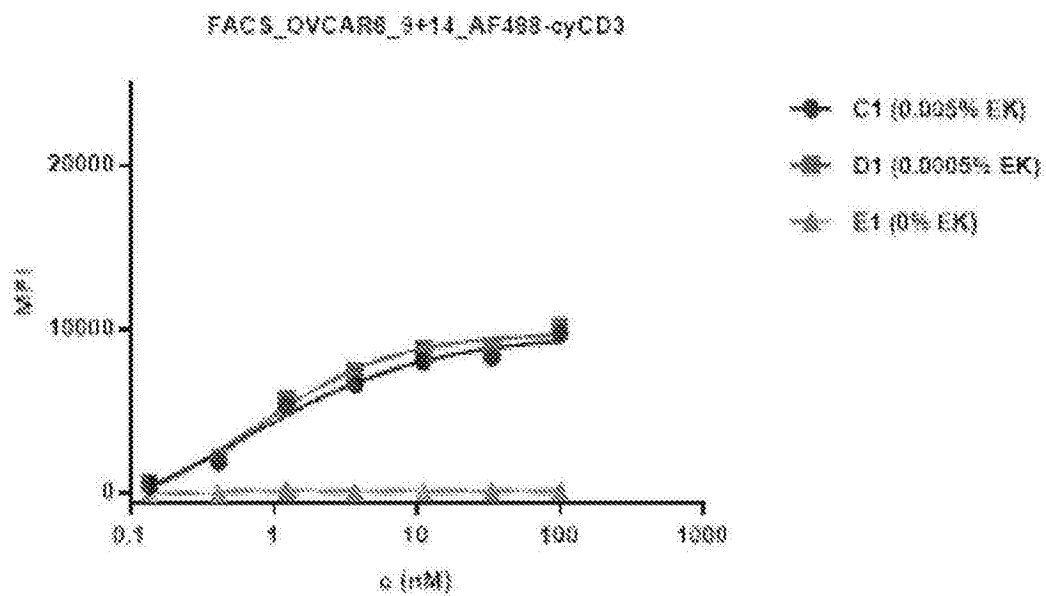


图34C

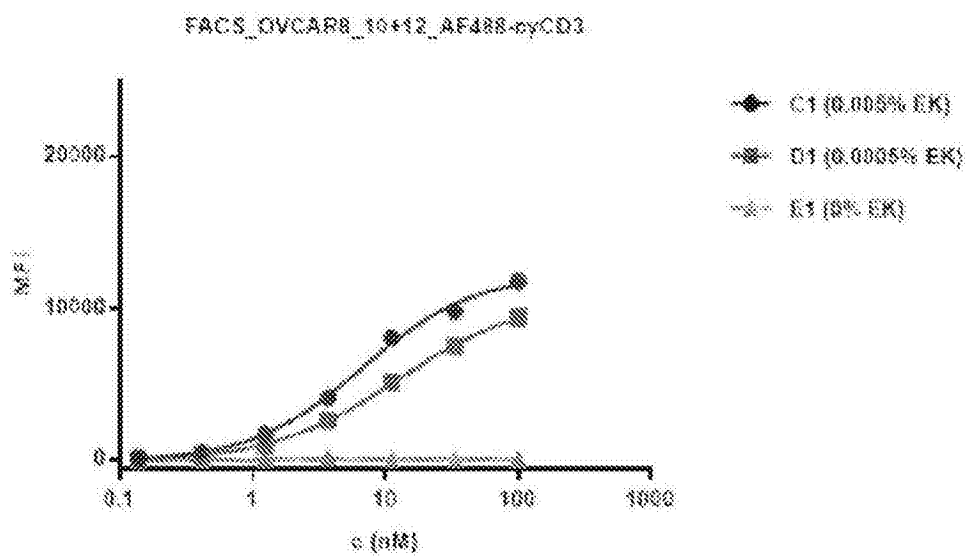


图34D

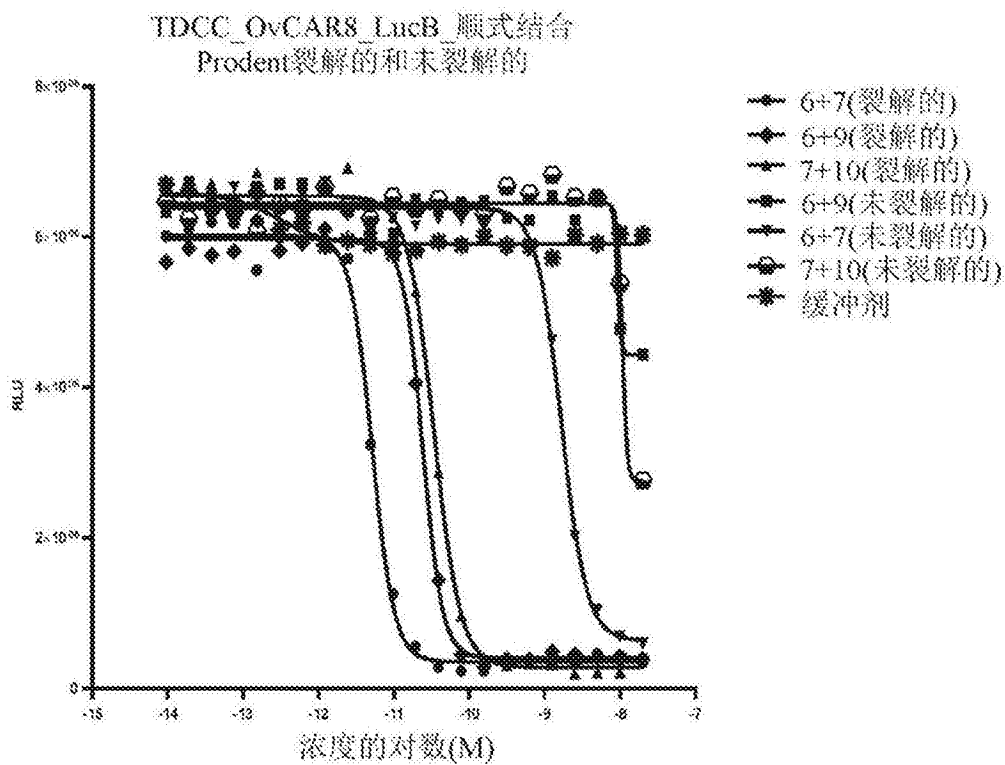


图35A

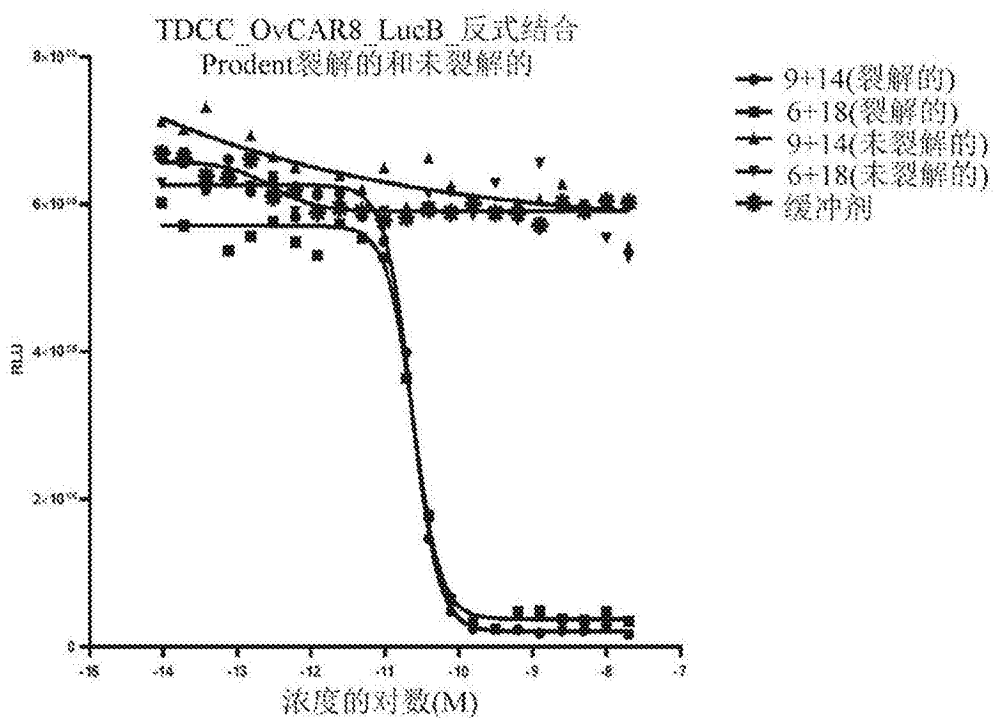


图35B

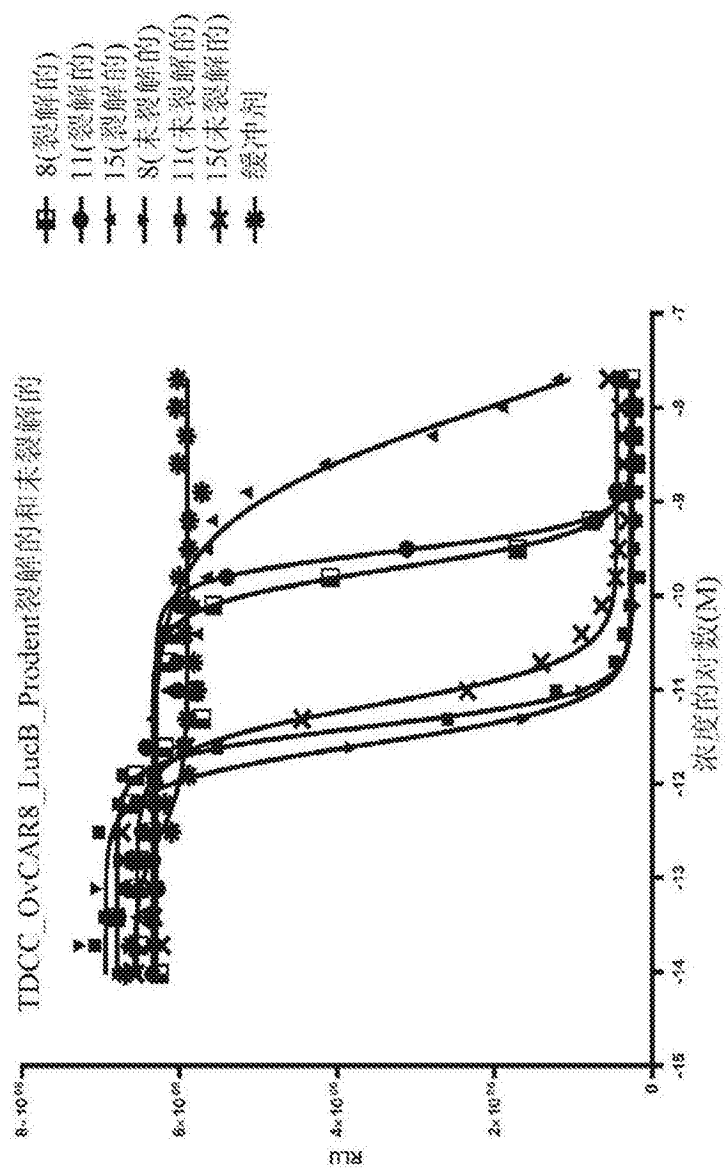


图36

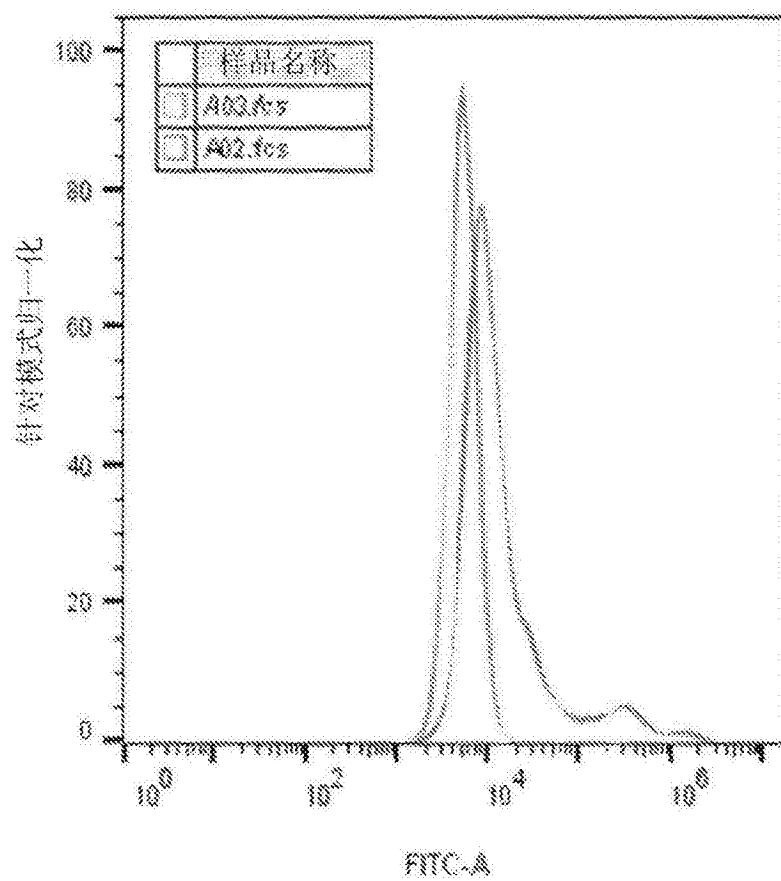


图37

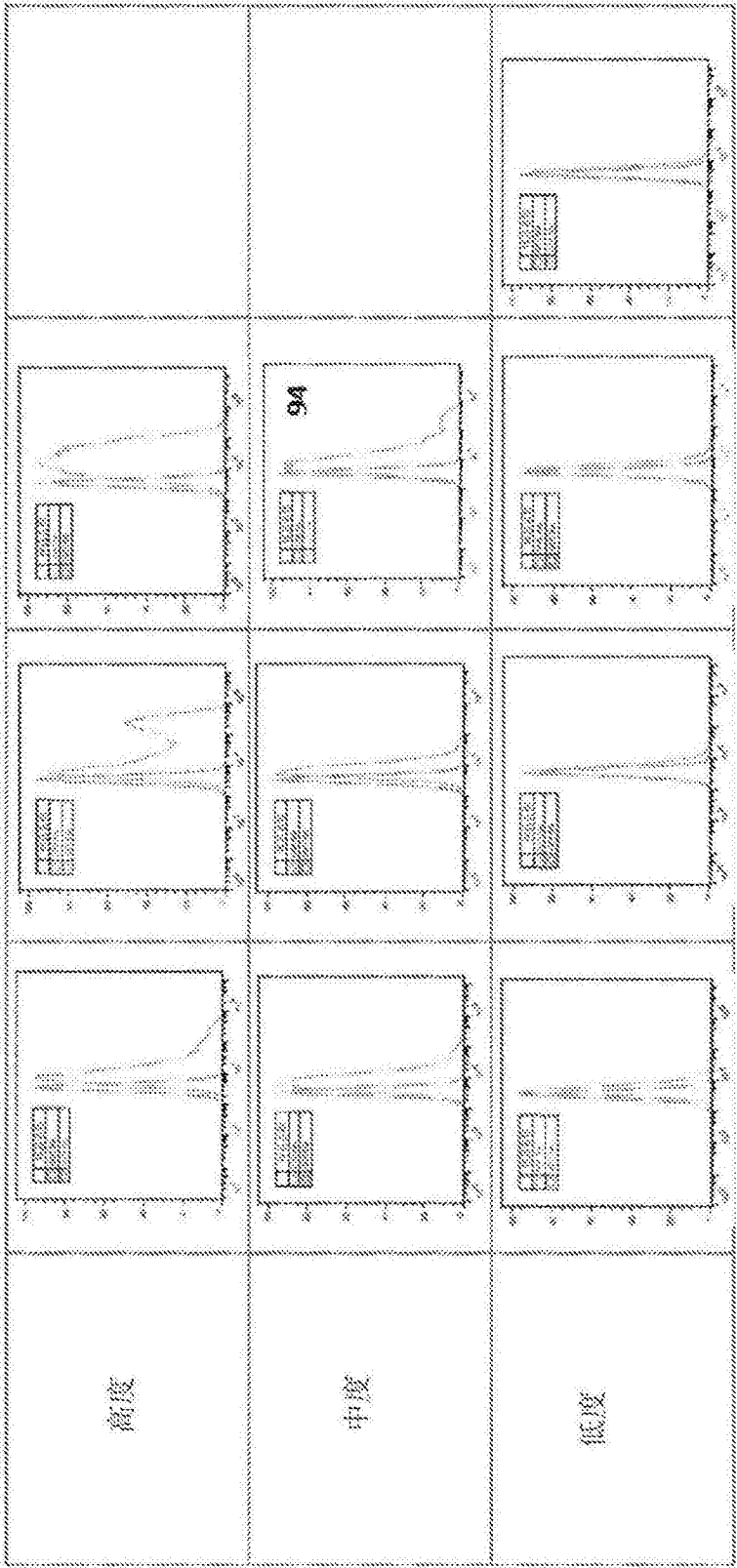


图38

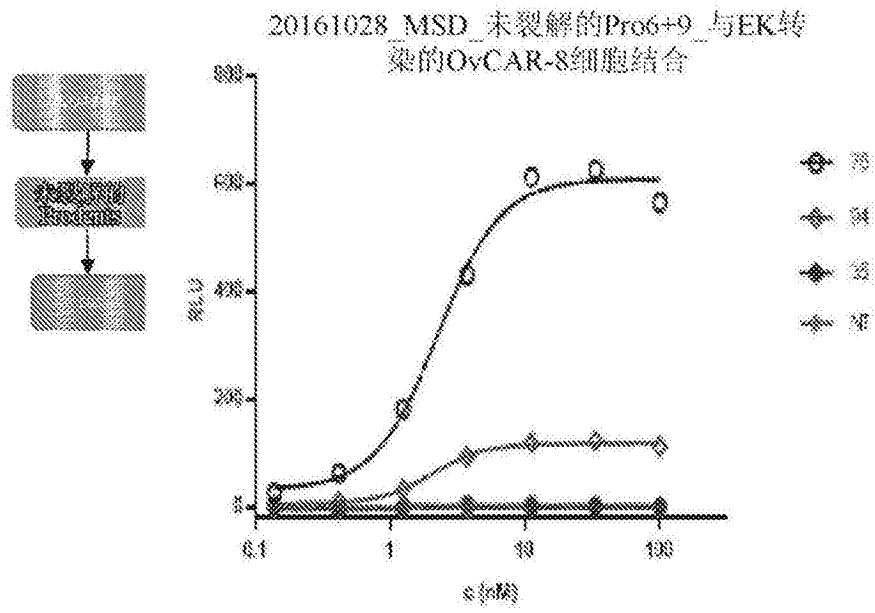


图39A

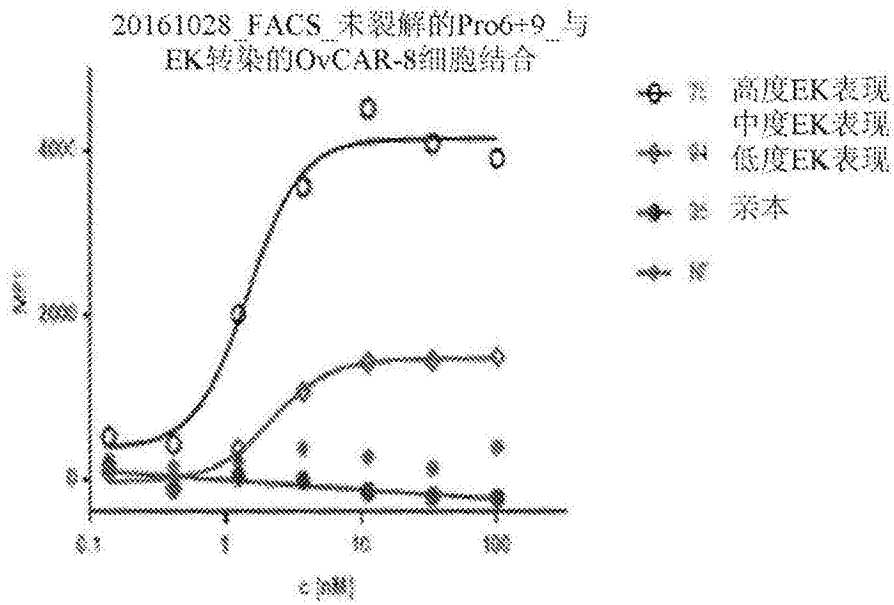


图39B

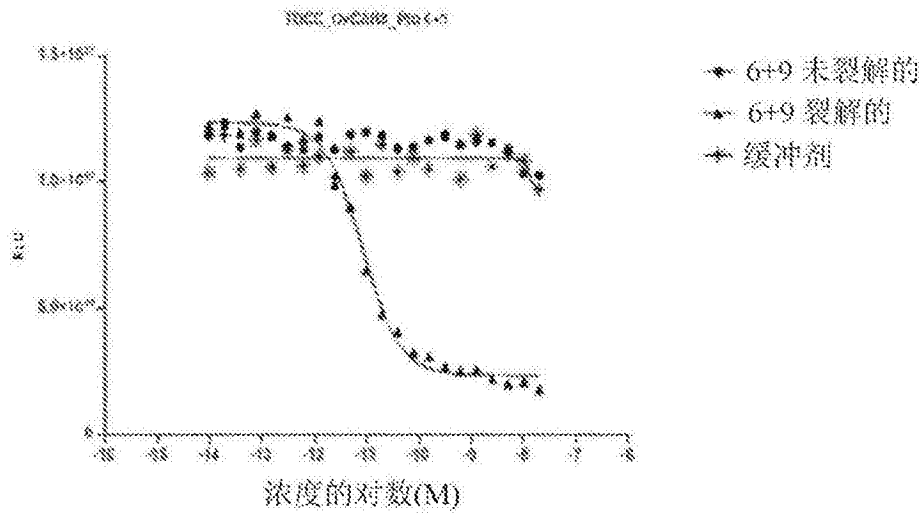


图40A

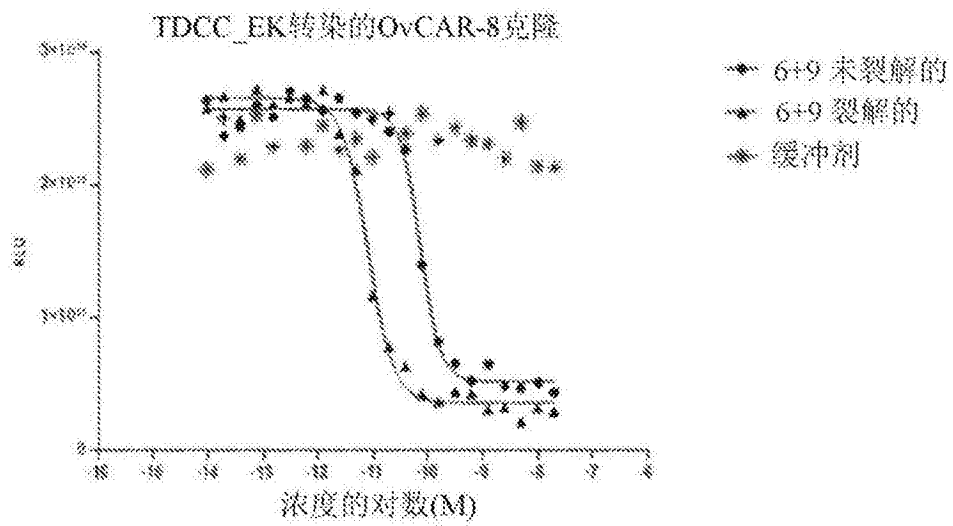


图40B

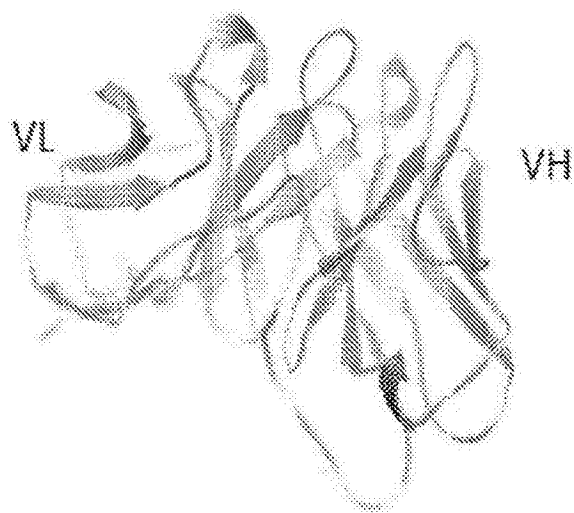


图41A

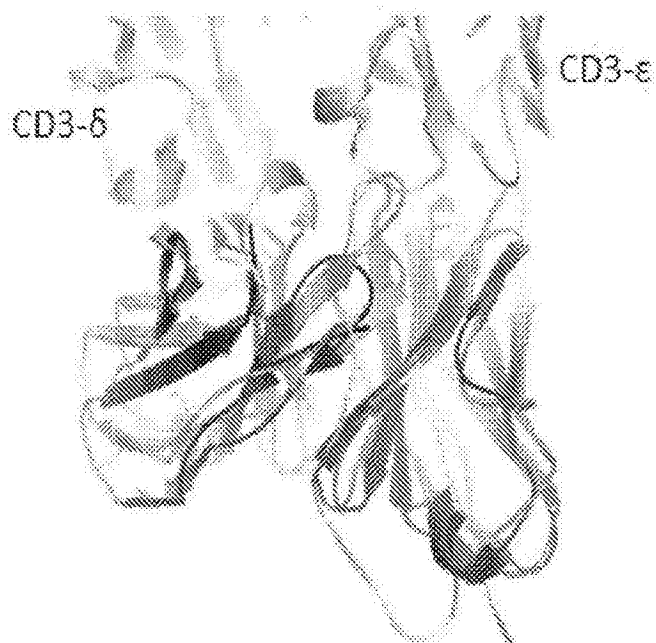


图41B

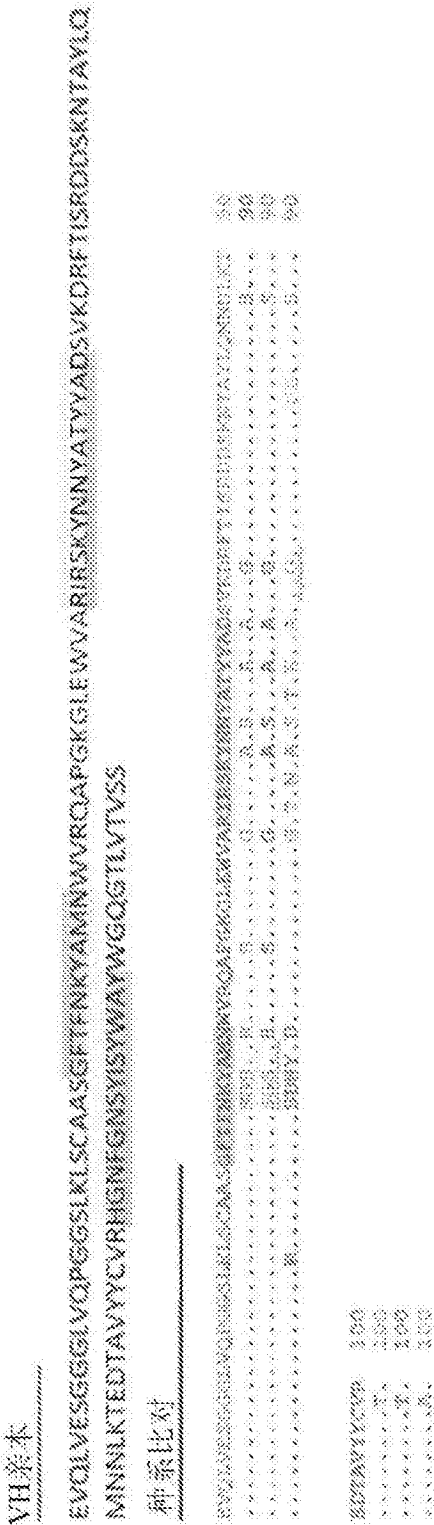


图42A

Pro21
 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXWVROAPGKGLEWVVAIRSKYNNYATTA*SYKDRFTISRDSKNTAYLQMNNLKDT
 EOTAVYYCVRHGGXXXXXXXXXXXXGRSYRA*F*WAWWGCGTLVTSS
 未充分表达

Pro29 [Y32S Y61A D64A S110A Y111F]
 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXWVROAPGKGLEWVVAIRSKYNNYATTA*SYKDRFTISRDSKNTAYLQMNNLKDT
 EOTAVYYCVRHGGXXXXXXXXXXXXGRSYRA*F*WAWWGCGTLVTSS
 已表达, 无活性

Pro30 [Y32S Y61A S110T Y111F]
 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXWVROAPGKGLEWVVAIRSKYNNYATTA*SYKDRFTISRDSKNTAYLQMNNLKDT
 EOTAVYYCVRHGGXXXXXXXXXXXXGRSYRA*F*WAWWGCGTLVTSS
 已表达, 无活性

Pro31 [N30S, K31G, Y55A, N57S, Y61E, D64A, F104A, Y108A]
 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXWVROAPGKGLEWVVAIRSKYNNYATTA*SYKDRFTISRDSKNTAYLQMNNLKDT
 AVYYCVRHGGXXXXXXXXXXXXGRSYRA*F*WAWWGCGTLVTSS
 已表达, 无活性

Pro32 [N30S, K31G, Y32H, Y55A, N57S, N103A, F104H]
 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXWVROAPGKGLEWVVAIRSKYNNYATTA*SYKDRFTISRDSKNTAYLQMNNLKDT
 AVYYCVRHGGXXXXXXXXXXXXGRSYRA*F*WAWWGCGTLVTSS
 已表达, 无活性

图42B

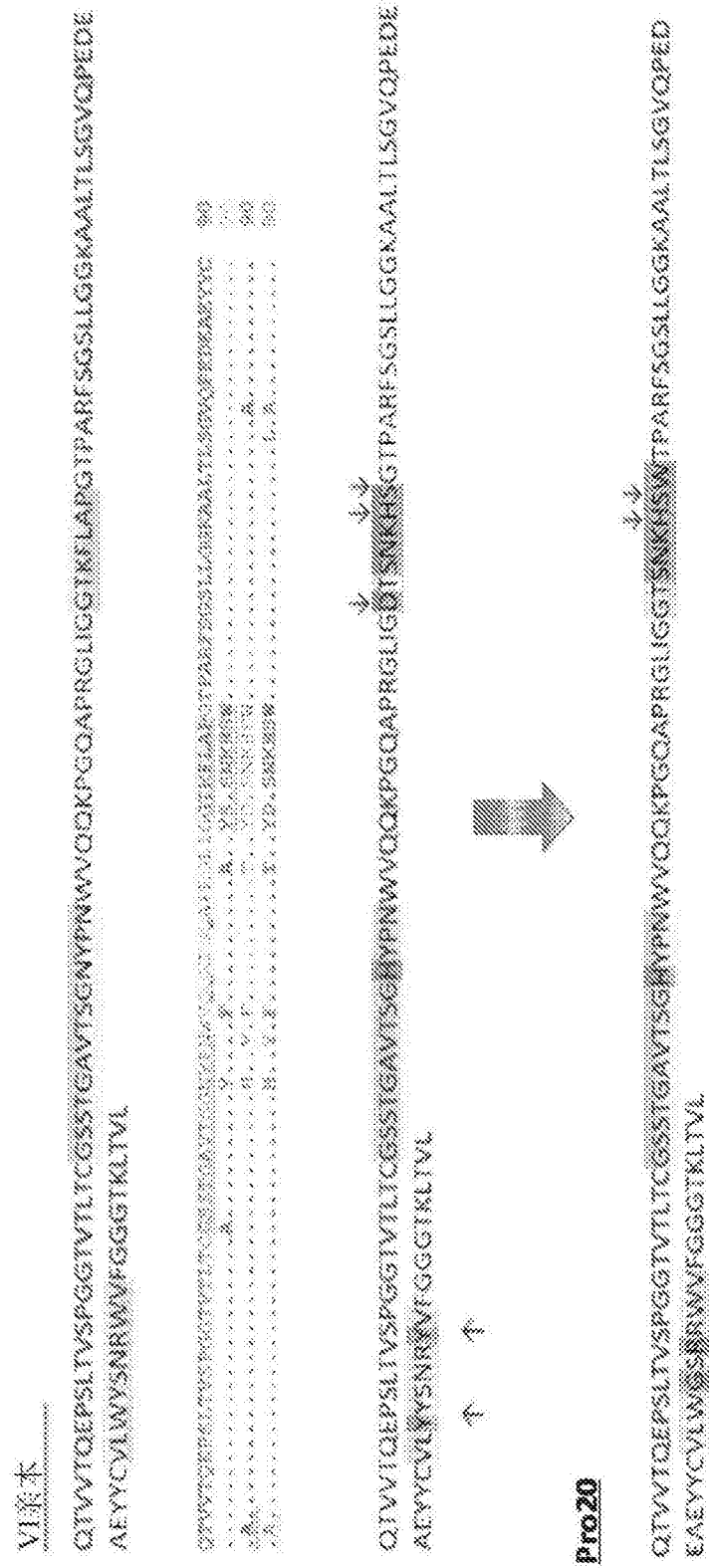


图43

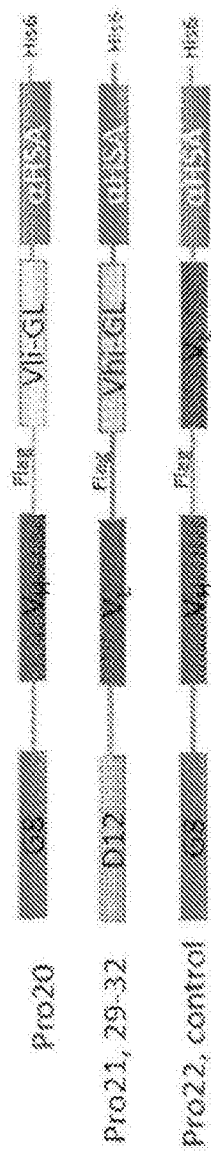


图44A

Protein样品	HEGFR-hfc	hCD3ε-flag-hfc	抗-EGFR-hfc KD值nM	抗-hCD3ε-flag-hfc KD nM	上清液浓度uM
Pro19 (αCO3 VhG1)	+	-	1.49 nM	0	3.25
Pro20 (VhG1)	+	-	0.398 nM	0	1.88
Pro21 (VhG11)	+/	-	0.111 nM	0	0.23
Pro22 (WT αCD3)	+	+	0.882 nM	11.8 nM	3.99
Pro29 (VhG12)	+	-	1.12 nM	0	4.08
Pro30 (VhG13)	+	-	2.21 nM	0	6.88
Pro31 (VhG14)	+	-	1.17 nM	0	6.12
Pro32 (VhG15)	+	-	1.39 nM	0	2.91

图44B

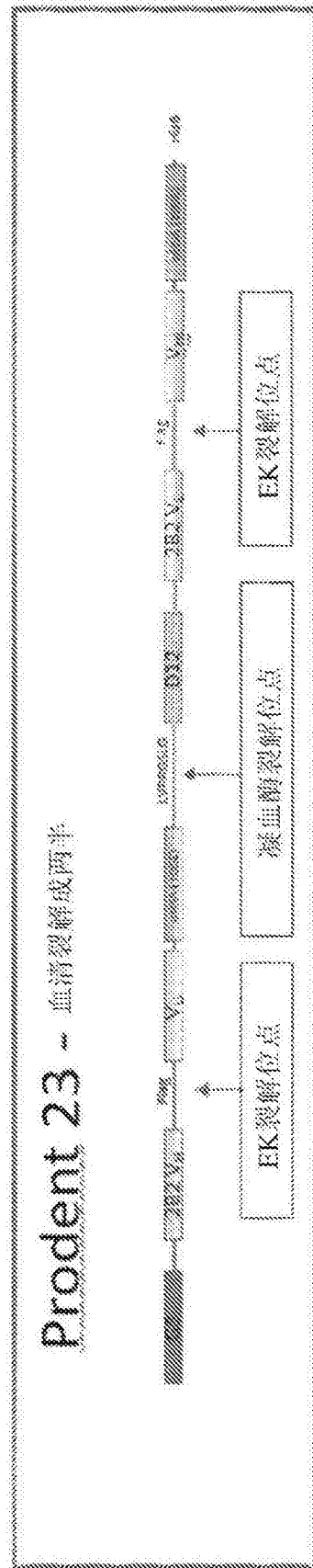


图45A

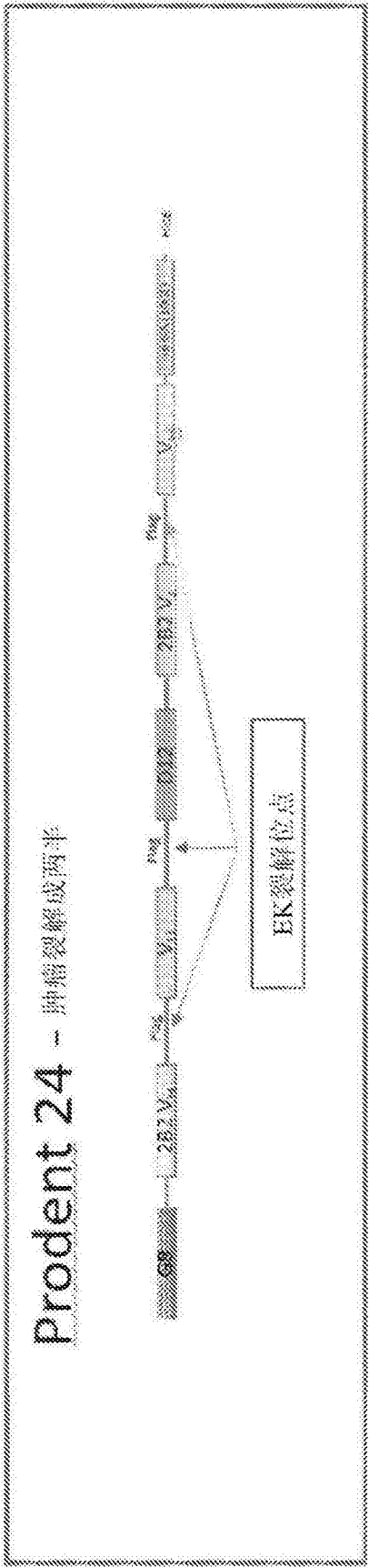


图45B

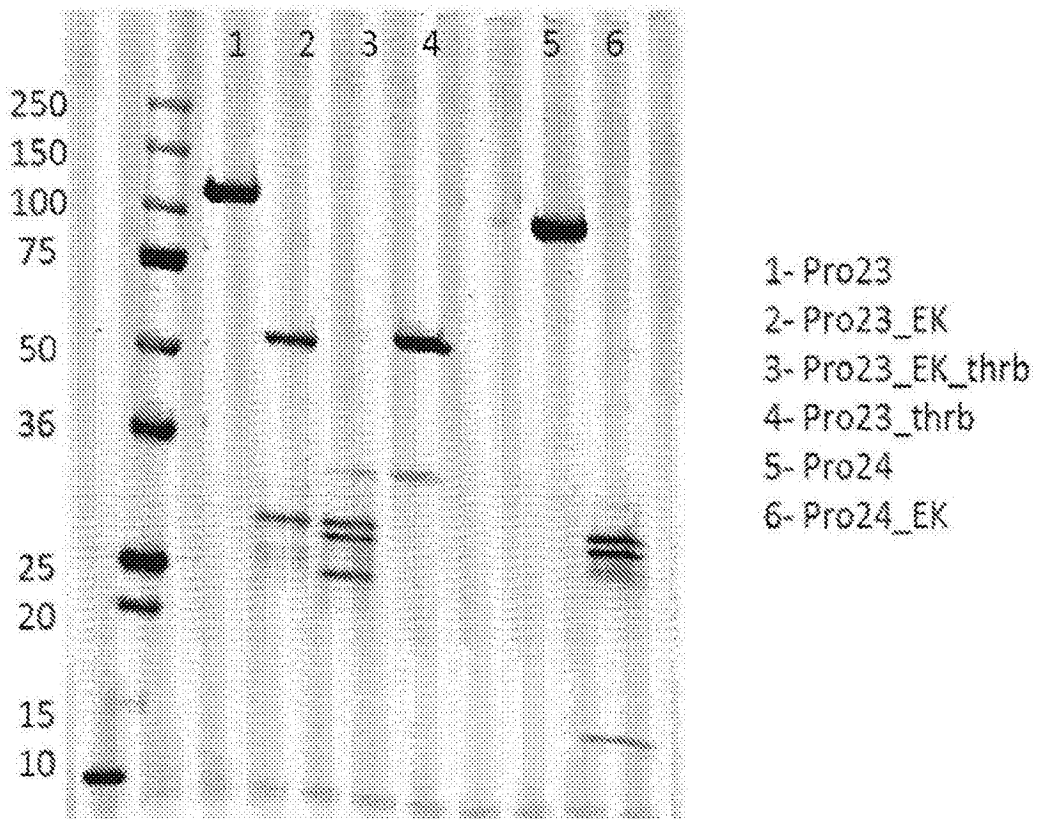


图46

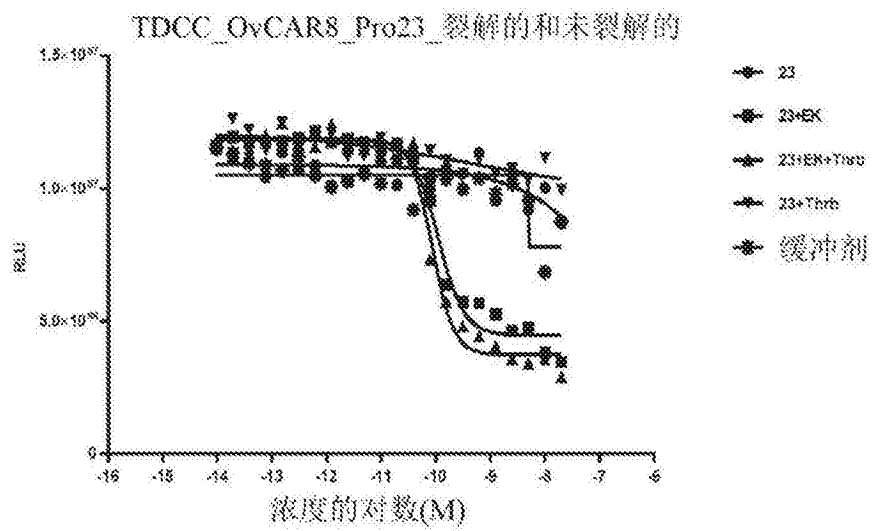


图47A

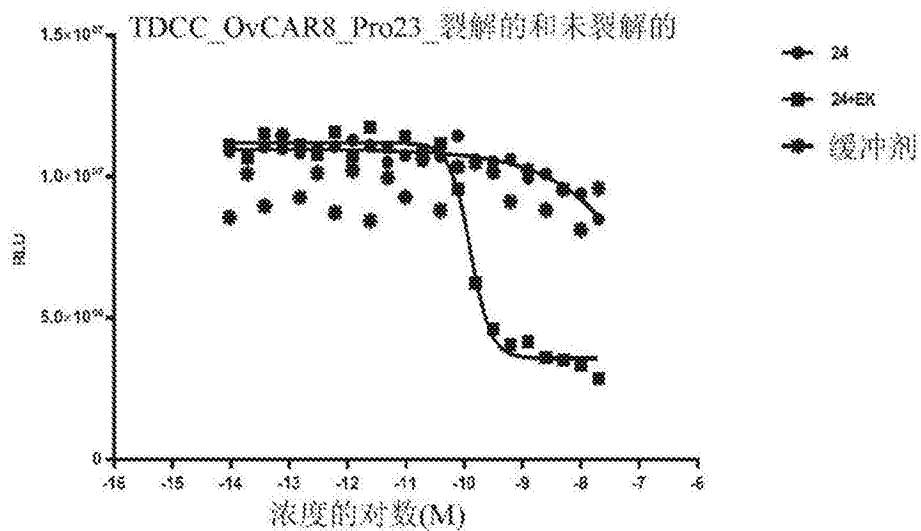


图47B

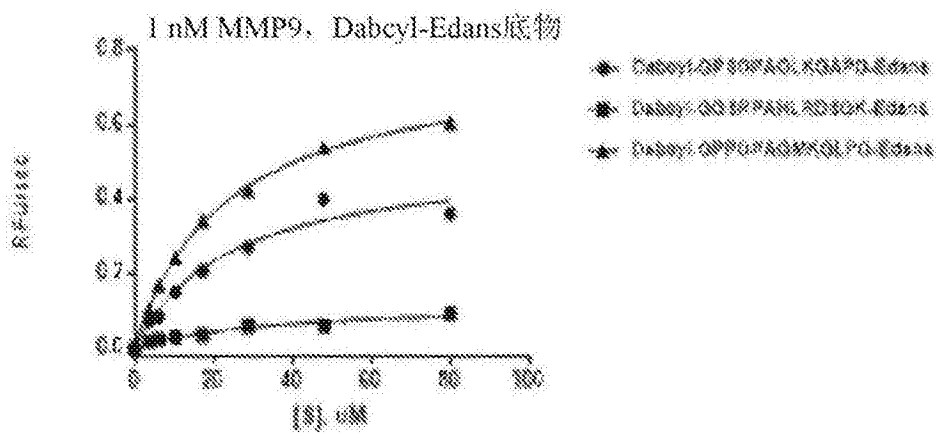


图48A

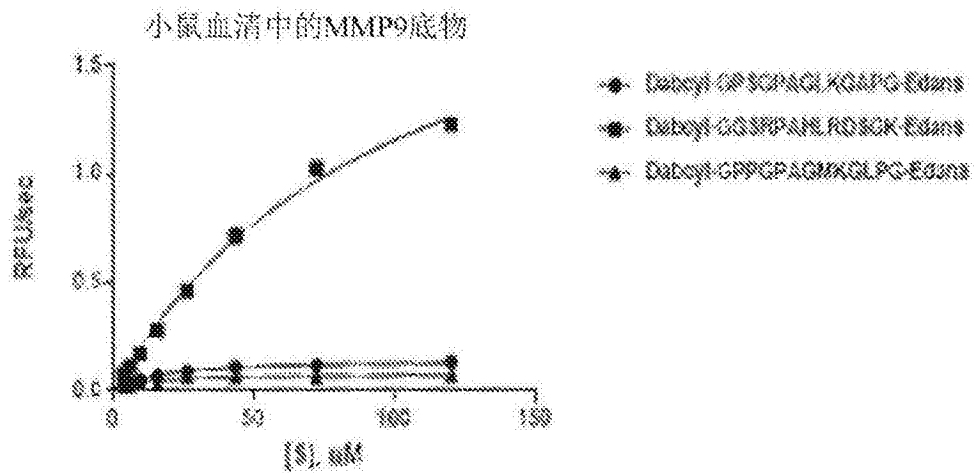


图48B

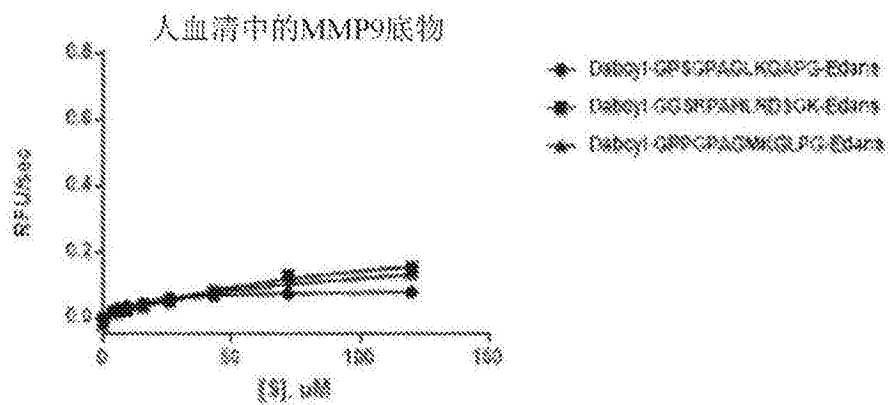


图48C

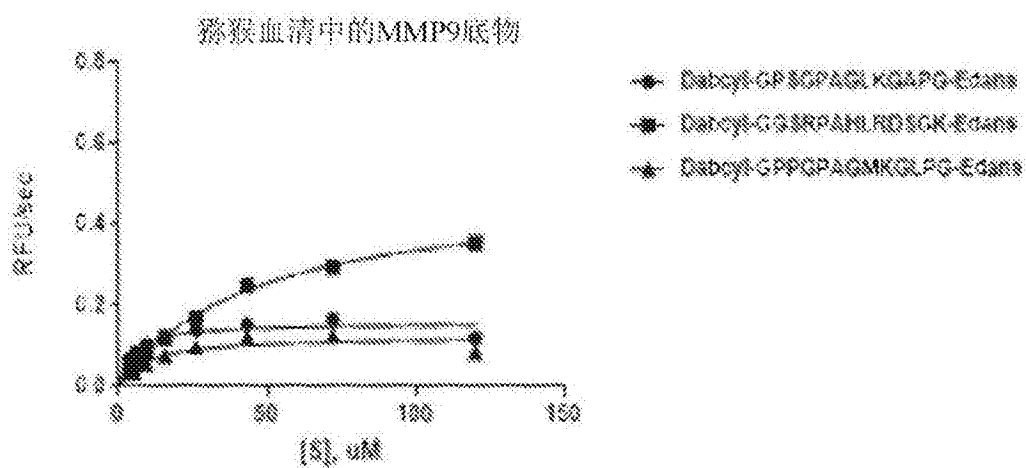


图48D

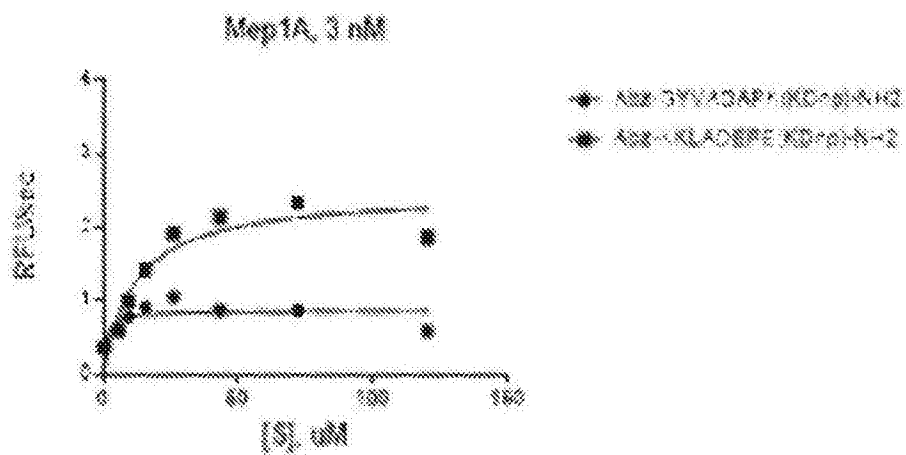


图49A

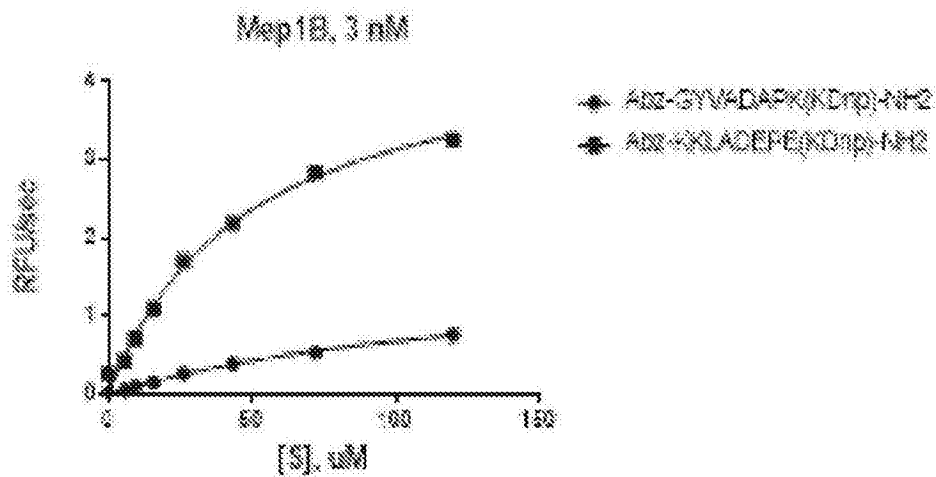


图49B

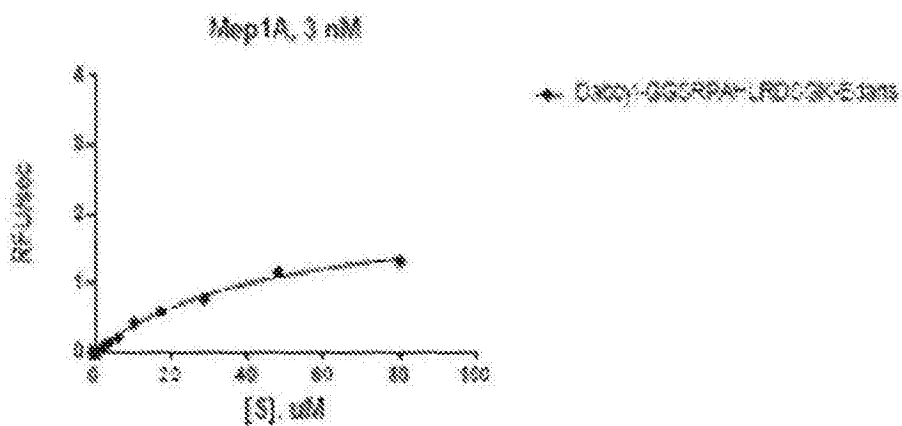


图49C

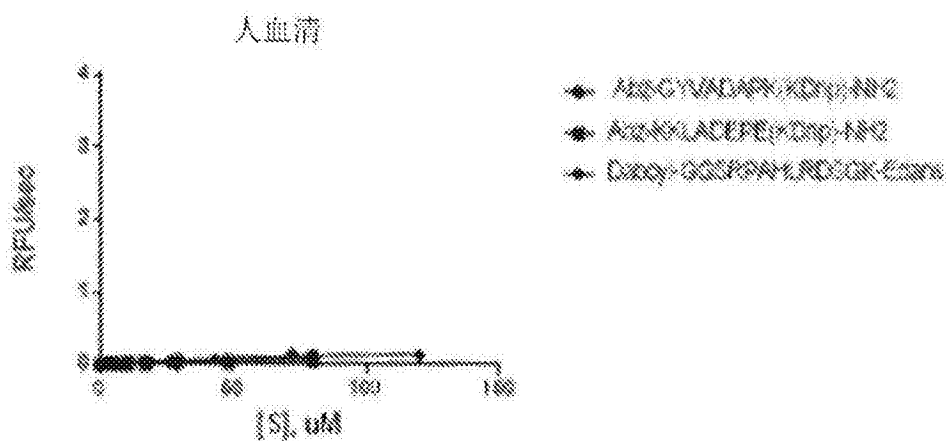


图49D

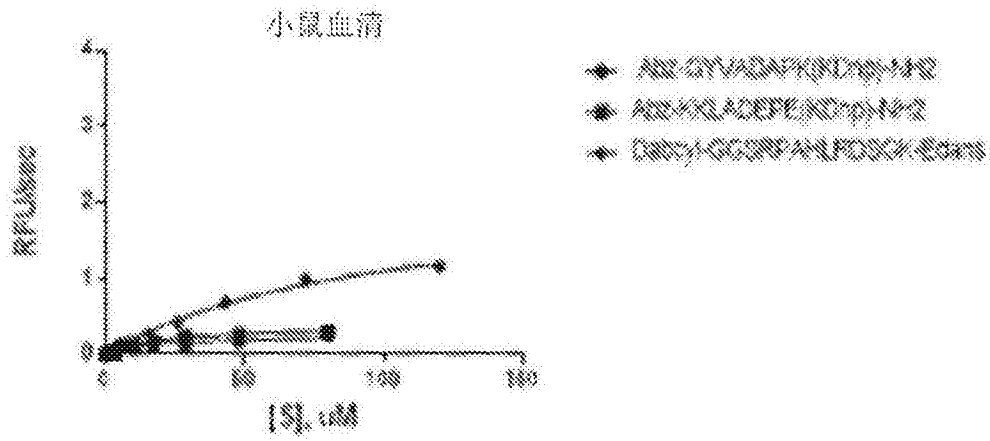


图49E

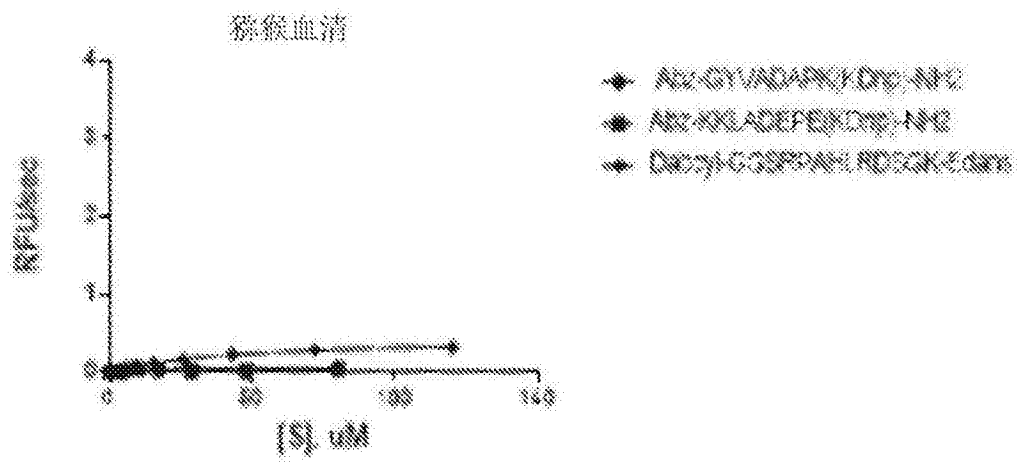


图49F

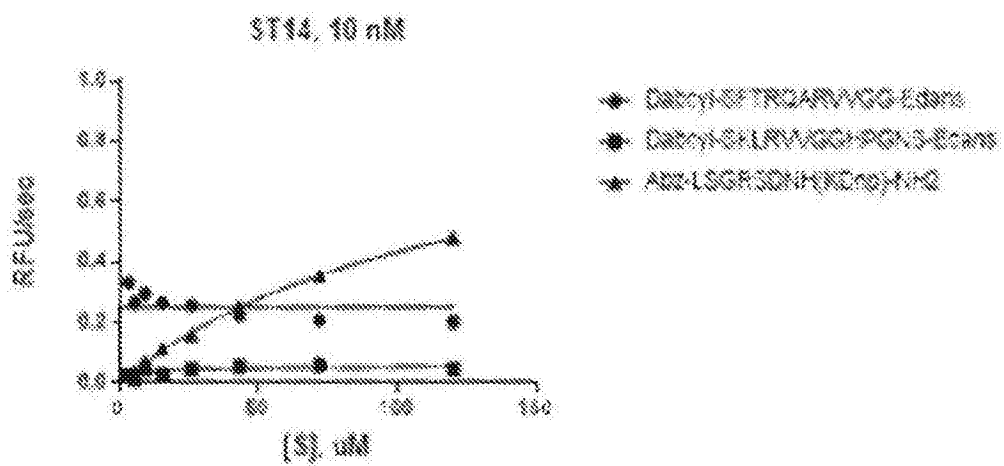


图50A

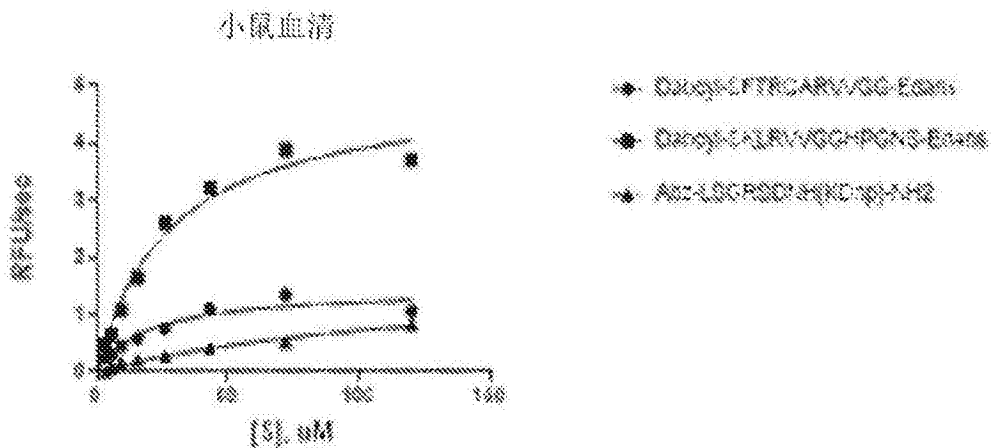


图50B

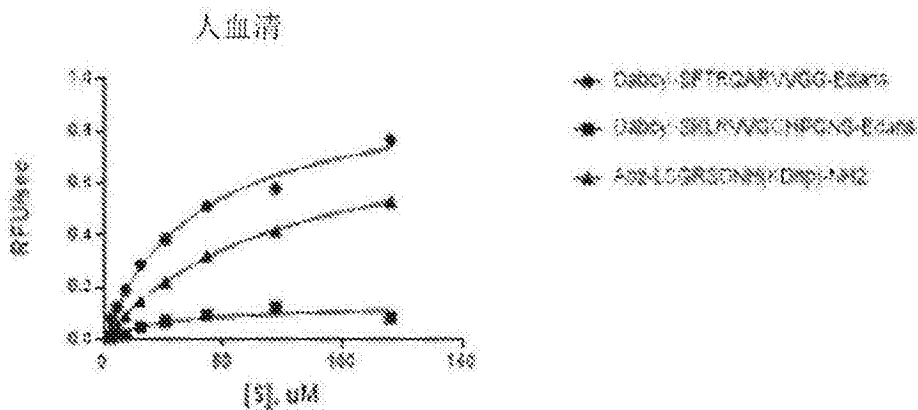


图50C

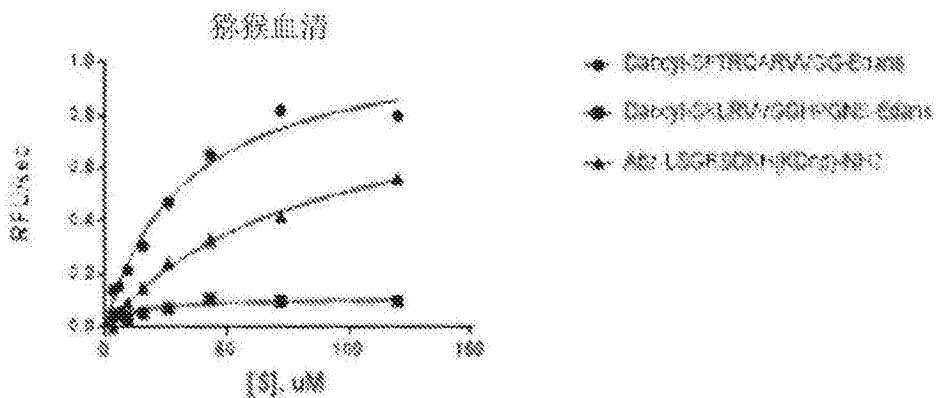


图50D

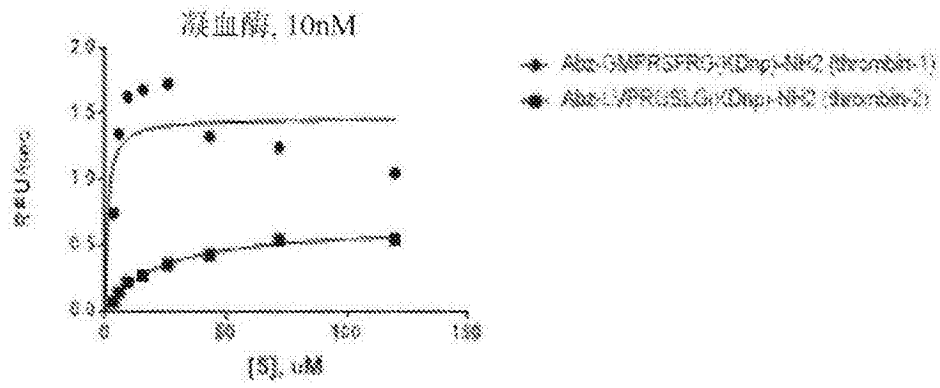


图51A

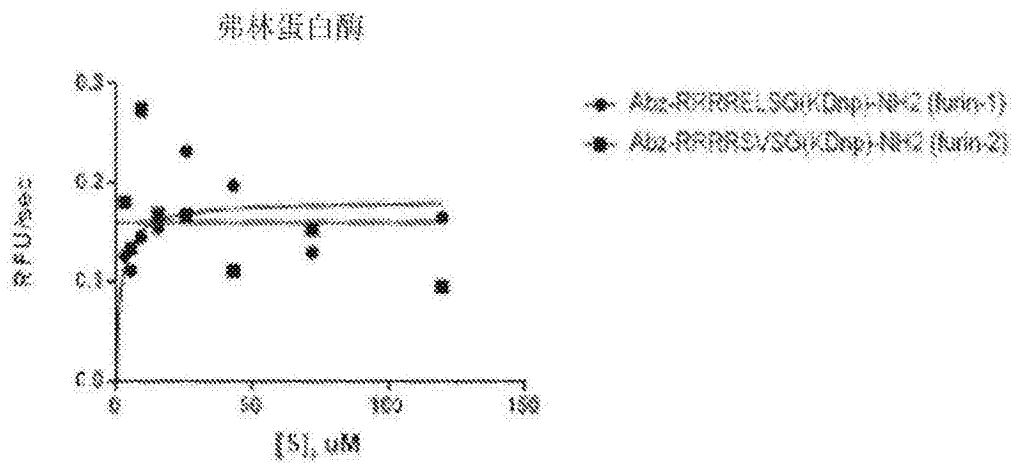


图51B

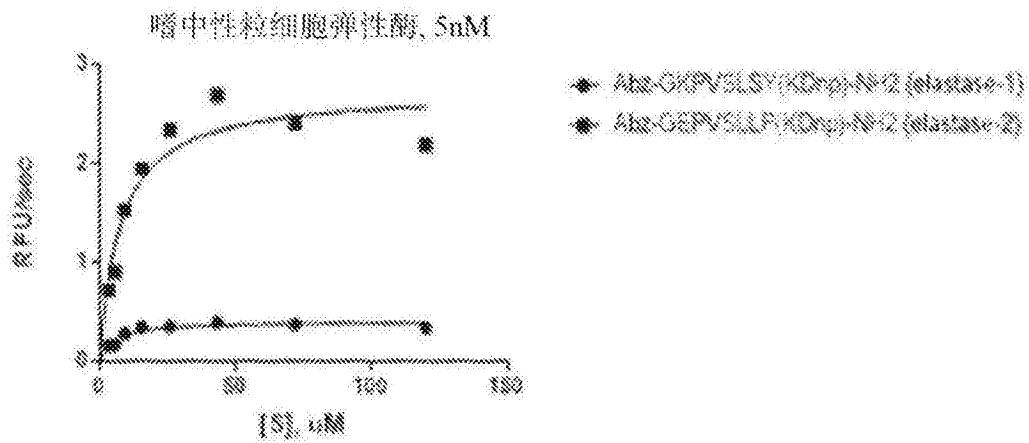


图51C

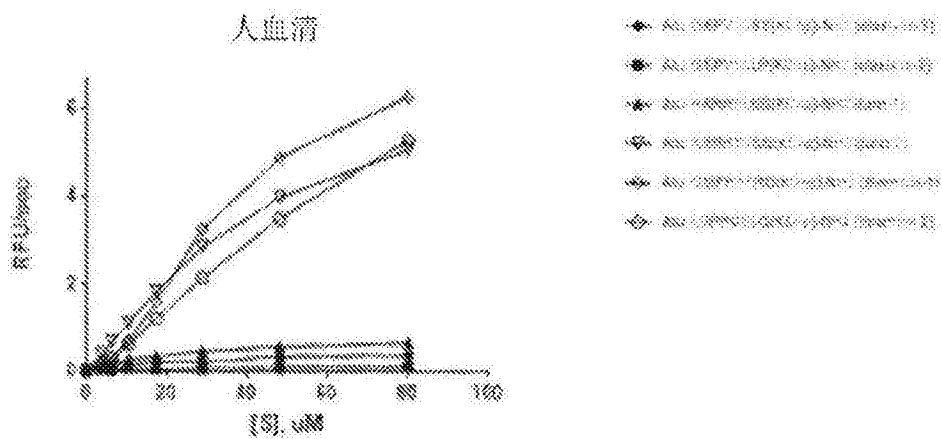


图52A

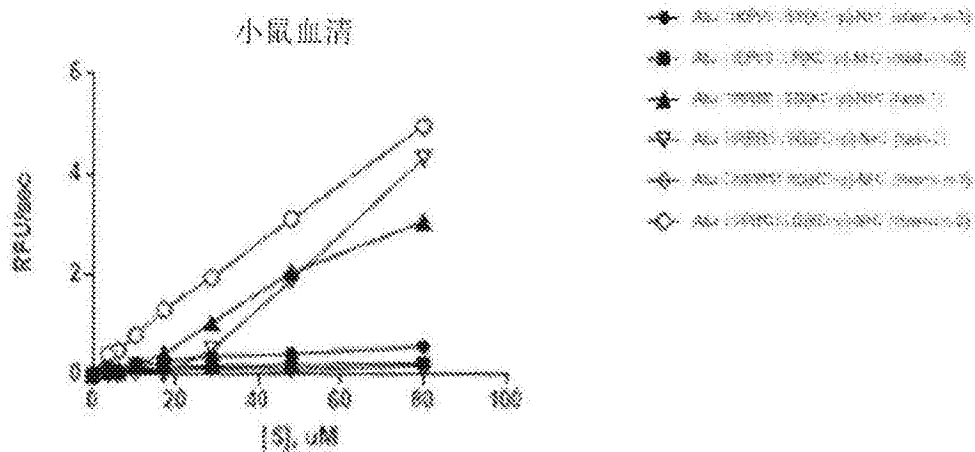


图52B

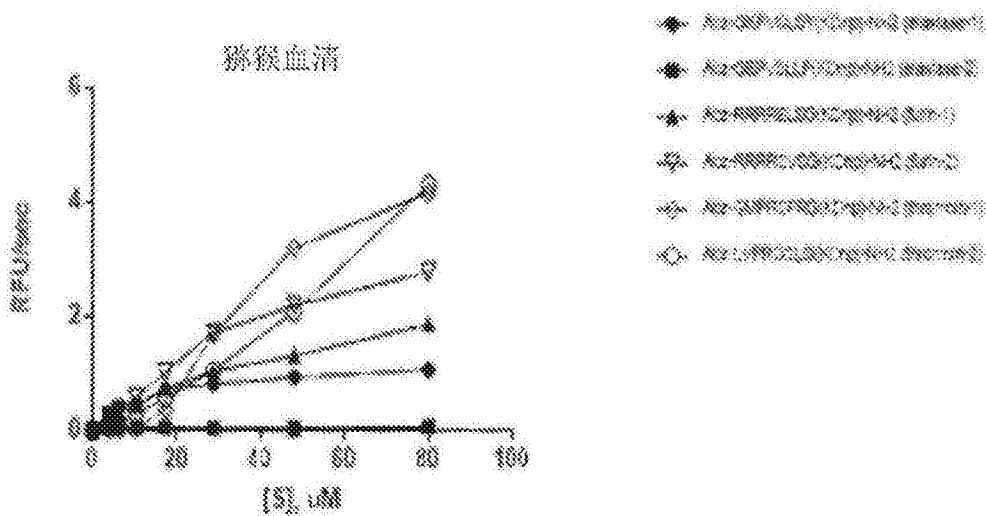


图52C

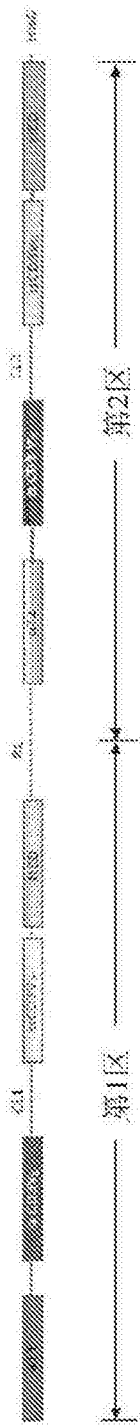


图53A

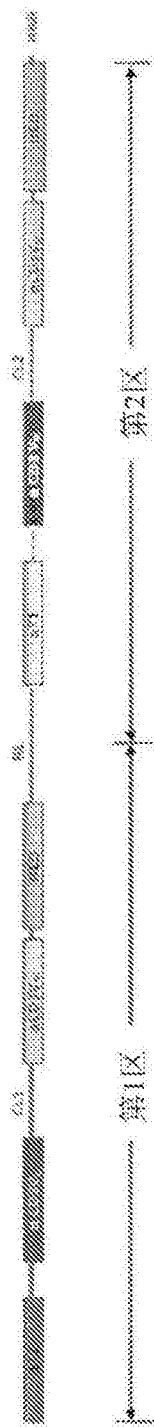


图53B



图53C

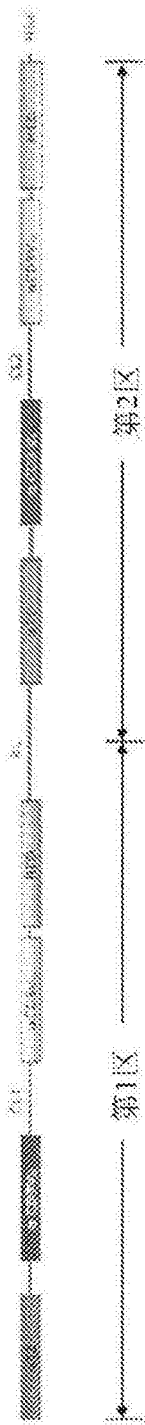


图53D



图53E



图53F



图53G



图53H

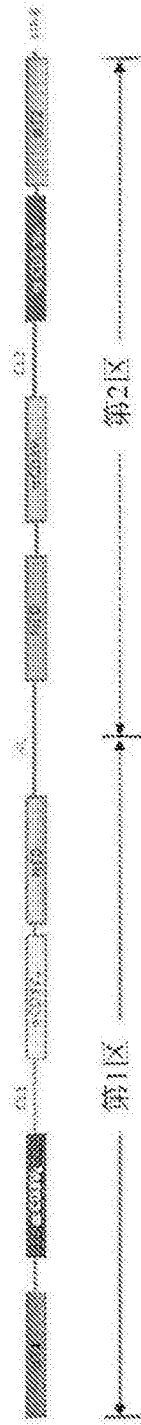


图53I

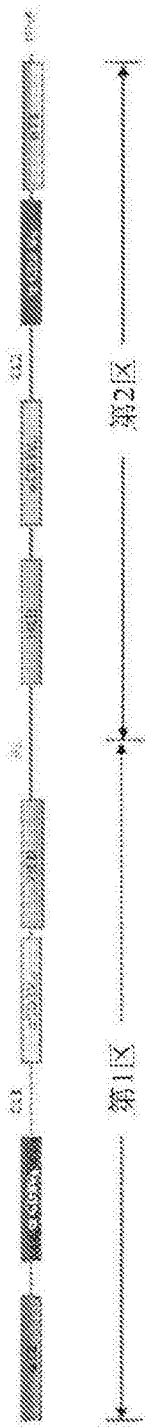


图53J



图53K

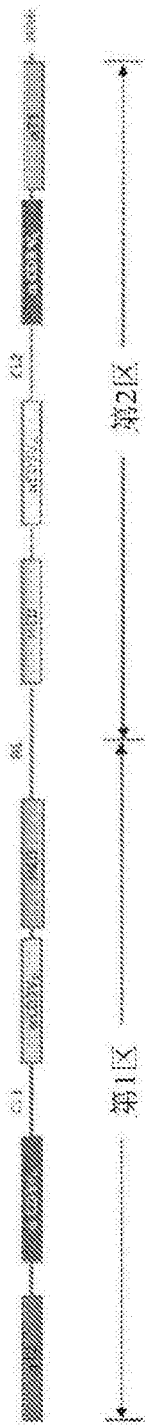


图53L



图53M



图53N

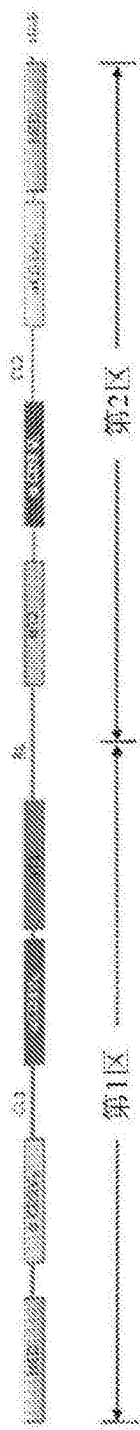


图530

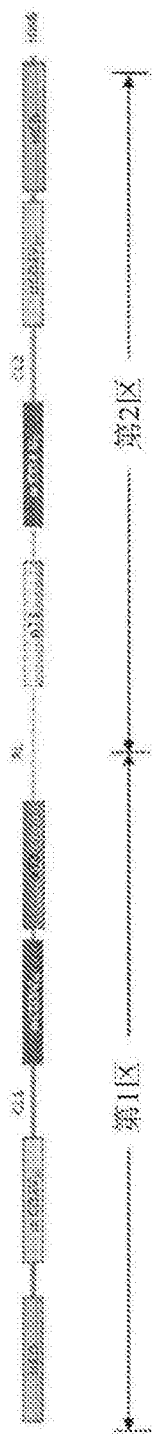


图53P

Proteins 1 - 38

Pro1 - aEGFR C8 sdAb -- aCD3 Vh -- His10

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRITFSYAMGWFRQAPGKEREFYVAINWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTIMYLQMNSL
KPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNEKDY EYDYWGQGTQVTVSSGGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTENKYAMN
WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTL
VTVSSHHHHHHHHH SEQ ID NO: 44

GAAGTCCAAACTGGTGGAAATCGGGCGGTGGACTCGTGCAAGGCCGGAGGTTCCCTGCGCCCTTTCTGTGGGCTTCGGGAAGAACCT
TCTCTCGTATGCCATGGGATGGTTCGCCAAGCCCTCGGAAGAAGCGGGGAATTCGTCTGGCGGATCAATTGGAGCTCCGGTTC
GACTTACTACGCCGACTCCGTGAAGGCCCGGTTCACCAATTAGCCGGGACAATGCTAAGAACACCATGTATCTGCAGATGAACATC
ACTGAACCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCGCTGGGTACCAGATCAATCCGGAACACTACAATTCAGGACTACGA
GTACGACTACTGGGGTCAGGGCACCCAGGTCACCGTGTCACGGGAGGAGGTGGAAGCGGAGCGGTTCCGAAAGTGCAGCTCGT
CGAGTCCGGGGTGGACTGGTCCAACCCGGCGGATCACTGAAGCTGAGCTGCCAGCCTCCGGATTCACCTTCAACAAGTACGC
CATGAACCTGGGTCAGACAGGCACCCGGGAAGGACTGGAATGGGTGGCCCGGATCAGGTCCAAGTACAACAACACTACGCCACCT
ACTACCGGGACAGCGTGAAGGATAGGTTCACCATCTCCCGGACGACAGCAAGAACACTGGCTACCTCCAAATGAACAACCTCA
AGACCGAAGATACCTGGGTGTATTACTGGGTGGCCACGGGAACCTTCGGAAACAGCTACATCAGCTACTGGGCTACTGGGGCC
AGGGCACCTCTGGTGACCGTGTCATCCACCATCACCAACCAATCATCACCATCAC SEQ ID NO: 45

图54A

Pro2 - aCD3 VI - aEGFR D12 sdAb - Hs10
 TQEPSTVSPGGTIVLTGSSSTGAVTSGNYPNVVQKPGQAPRGLIGCTKFLAPCTPARFSGSLGCKAALTLSGVQPEDEAEY
 YCVLWYSNRWVFGGTKLTVLGGGSGGGSQVKLEESGGSVQTGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPCKEREFTVSGISWRGD
 STGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNLSKLPEDTAIYYCAAAGSAWYGILYEYDWGGGTQVTVSSHHHHHHHHHH
 SEQ ID NO: 46

CAGACCGTGGTGACCCAGGAACCCCTCACTGACCGTGTCCCAAGGAGCAACGGTGACCCCTTACCTGTGGCTCTCGACCCGGTGCCG
 TGACGTCCGGGAAC TACCCCACTGGGTCCAGCAAAGCCGGGACAAGCCCTCGGGGACTGATCGGGGAGACTAAGTTCTCTGG
 CCCCTGGCACTCTCCCGCTTCAGCGGACGCTCTGGAGGAAAGCGGCCCTGACACTCTGGGGGTGACGCTGAAGATG
 AGGCCGAATACTACTGCTGTGTACTCCAATCCCTGGGTGTTGGAGGGGCAACAAGCTGACCGTGTGGAGGAGGAG
 GAAGCGCGGAGGTCCAGGTC AAGCTGGAGGAATCGGGTGGAGGCTCAGTGCAGACAGGAGGTAGGCTCCGGCTCACTTGGC
 CCGCTTCGGGAAGGACTTCCCGAGCTACGGGATGGCTGGTTTCGGCAAGCCCCGGAAGGAGAGAGAATTCTGTGTCCGGAA
 TTAGCTGGAGGGCGCACTCACTGGATACCGGACTCCGTCAAGGCGAGATTCACTATCTCTCGGACAACGCCAAGAACACCG
 TGGACTTGC AATGAAATCCCTGAAGCCCGAGGACACTGCCATCTACTACTGTGCTGGCGGACGAGGATCTGCCTGGTACGGCAC
 CCTTTATGAATACGATTACTGGGACAGGGAACCCAGGTCACCGTGTGTCTCCACCATCACCAATCATCACCATC
 SEQ ID NO: 47

图54B

Pro3 - aEGFR G8 sAb - aCD3 scFv - aEGFR D12 sAb - His10
 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTESSYAMGWFRAQPKGEREFVVAINWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSL
 KPEDTAVYYCAAGYQINSNYNFKDYEDYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTFNKYAMN
 WVRQAPKGLEWVARIRSKYNNAITYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNILKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSISYWAYWGQGTIL
 VTVSSGGGSGGGSGGGGSGQIVVTQEPSLTVSPGGIVTLICGSSITGAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGGTIKFLAPGTPARFSQSL
 LGGKAALTLGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGQTKLTVLGGGSGGGGQVKKLEESGGGVQTCGSLRLTCAASGRTSRSYGMG
 WFRQAPKGEREFVSGISWRGDSQYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVT
 VSSHHHHHHHHHH SEQ ID NO: 48

GAACTCCAACTGGTGGAAATCGGGCGGTGGACTCGTGTGACGGCCGGAGGTTCCTCGCCCTTCTGTGCGGCTTCGGGAAGAAACCT
 TCTCTCGTATGCCATGGGATGGTTCGCCAAGCCCTCTGGAAGAGCGGGAATTCGTGTGGCGGATCAATTGGAGCTCCGGTTC
 GACTTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATAGCCGGGACATGTCTAAGAACACCATGTATCTGCAGATGAATC
 ACTGAAACCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGGCCCGTGGTACCATGATCAATCCGGGAACCTACAACCTTCAAGGACTACGA
 GTACGACTACTGGGTCAAGGCAACCCAGGTCAACCGTGTCCACCGGAGGAGGTGGAAGCGGAGGGCGGTTCGGAAGTGCAGCTCGT
 CGAGTCCGGGGTGGACTGGTCCAAACCGGGCGGATCACTGAAGCTGAGCTGCGCAGCTCCGGATTCACCTTCAACAAGTACCGC
 CATGAACCTGGGTACAGACAGGCAACCCGGAAGGGACTGGAATGGGTGGCCCGGATCAGGTCCAACTACCAACAACCTACGCCACCT
 ACTACCGGACAGCGTGAAGGATAGGTTCACCATCTCCCGGACGACAGCAAGAACACTGCCTACCTCCAAATGAACAACCTCA
 AGCCGAAGATACTGGGTGTAATCTGCGTGGCCACCGGAATTCGGAACAGCTACATCAGCTACTGGGCTACTGGGGCC
 AGGCACTCTGGTGACCCTGAGCTCAGGAGGAGGCGCTCCGAGCGGAGGCTCAGGGGAGGAGGTTCGACAGCTGGTG
 ACCAGGAACCCCTACTGACCTGTGTCACAGGAGGAACCTGACCTTACCTGTGCTCTGACCGGTGCGGTGACGTCCGGGA
 ACTACCCCAACTGGTCCAGCAAAAGCCGGGACAAAGCCCTCGGGACTGATCGGGGACTAAGTTCTGCCCCCTGGCACTC
 CTGCCCGCTTCAGCGGCAAGCTCTGGGAGGAAGAGCGCCCTGACACTCTCGGGGTGACGCTGAAGATGAGGCCGAATACT
 ACTGCGTGTGTACTCCAAATCGTGGGTGTGGAGGGGCACCAAGCTGACCGTGTGCTGGAGGAGGAGGAAGCGCGGAG
 GTTCCCAGGTCAAGCTGAGGAATCGGGTGGAGGTCACTGTCAGACAGGAGGTAGCTCCGGCTCACTTGGCGCTTCCGGAA
 GGACTTCCGGAGCTACGGGATGGCTGGTTTCGGCAAGCCCGCGGAAGGAGAGAGAAATTCGTGTCGGAAATTAGCTGGAGGG
 GCGACTCAACTGGATACGCGACTCCGTCAAGGGCAGATTCATCTCTCGGGAACAGCCCAAGAACACCGTGGACTTGCAAA
 TGAATTCCCTGAAGCCCGAGGACACTGCCATCTACTACTGCTGCGGCAAGCAAGGATCTGCTGTACGGCACCCCTTTATGAATA
 CGATTACTGGGACAGGGAACCCAGGTACGGTGTCTGCCACCATCACCAACCATCATCATCATCAC SEQ ID NO: 49

图54C

Pro4 - aEGFR G8 sAb - aCD3 Vb - $\frac{Z}{Z}$ - aCD3 VI - aEGFR D12 sAb - His10
 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSL
 KPEDTAVVYCAAOYQINSONYNFKDYEDYWQGTQVTVSSGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTFNKYAMN
 WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQQGTIL
 VTVSSDYKDDDEKGGQIVVITQEPSTLVSPGGITVILTCSSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGIPARPSGLLGGK
 AALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGSGGGSQVKLEESGGSVQTGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQ
 APGKEREFVSGISWRGDSIGYADSVKGRFTISRDNKNTVLDLQMNLSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSH
 HHHHHHHHH SEQ ID NO: 50

GAAGTCCAACTGGTGGAATCGGGCGGTGGACTCGTGCAGGCCGGAGGTTCCTGEGCCCTTCTCTGTCGGGGAAGAACCCT
 TCTCTCTGATGCCATGGGATGGTTCGCCCAAGCCCTGTGAAAGAGCGGGAATTCGTCTGTGGCGATCAATTGGAGCTCCGGTTC
 GACTTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACATTAGCCGGGACATGTCTAAGAACACCATGTATCTGCAAGATGAATC
 ACTGAACCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGGCCCGTGGGTACCATGATCAATTCGGGAACCTACAACTTCAAGGACTACGA
 GTACGACTACTGGGTACAGGCAACCCAGGTCACCGTGTCCAGCGGAGGAGGTGGAAGGGGAGGGCGGTTCGGAAGTGCAGCTCGT
 CGAGTCCGGGGTGGACTGGTCCAAACCGGGCGGATCATGAAGCTGAGCTGGCGCAGCTCCGGATTCACCTTCAACAACTACGCCACCT
 CATGAACCTGGGTACAGACAGGCAACCCGGGAAGGACTGGAATGGGTGGCCCGGATCAGGTCCAGTACAACTACAACTACAACTCA
 ACTACCGGACAGCGTGAAGGATAGGTTCACCATCTCCCGGACGACAGCAAGAACACTGCCCTACCTCCAAATGAACAACCTCA
 AGCCGAAAGATACTGGGTGTATTACTGCGTGGCCACCGGAACCTTCGGAACAGCTACATCAGCTACTGGGCTACTGGGGCC
 AGGGCACTCTGGTACCCTGTCCTCCGACTACAAGGACGATGACGATAAGGGCGGCCAGACCCTGGTGACCCAGGAACCTTCAC
 TGACCGTGTCCAGGAGAACCGTGACCTTACCTGTGGCTCTGACCGGTGGCGTACGTCCGGGAACCTACCCCAACTGGGT
 CCAGCAAAAGCCGGACAAAGCCCTCGGGGACTGATCGGGGACTAAAGTTCCTGGCCCTGGCACTCTGCTCCGCTTACGCGG
 CAGCTCTGGGAGGAAAGCGGCCCTGACACTCTCGGGGTGACCTGAAGATGAGGCCGAATACCTACTGCTGCTGTGGTA
 CTCCAATCGCTGGGTGTTGGAGGGGCAACCAAGCTGACCGTGTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGCGGAGGTTCAGGTCAAGCT
 GGAGGAATCGGGTGAGGCTCAGTGCAGACAGGAGGTAGCTCCGGCTCCTTCCGCGCTCCGGGAAGGACTTCCCGGAGCTA
 CGGGATGGGCTGTTTCGGCAAGCCCGCGGAAGGAGAGAGAAATCTGTCTCCGAATAGCTGGAGGGGACTCAACTGGATA
 CGGGACTCCGTCAAGGCAAGATTCATATCTCTGGGACACCGCAAGAACACCGTGGACTTGCAATGAATCCCTGAAGCC
 GGAGGACACTGCTACTACTGTGTGGGAGCAGGATCTGCTGTGACGGCACCTTTATGAATACGATTACTGGGGACAG
 GGAAACCAAGTCAACGGTGTCTGCCAACCATCACCAACCAATCATCACCATCAC SEQ ID NO: 51

图54D

Pro5 - aEGFR C8 sAb - aCD3 Vh - gggg[1]agggg - aCD3 Vh - aCD3Vh - gggg[1]agggg - aCD3 Vh - aEGFR D12 sAb - His6
 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLESCAASGRFTSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAJNWSGSTYVADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSL
 KPEDTAVYYCAAGYQINSNYYNFKDYEDYWGQGTQVTVSSGGSGSGSEVOLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMN
 WYRQAPGKGLEWVARIRSKYNNAIYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNILKTEDTAVYYCVRHGFGNSYISYWAYWGGGTIL
 VTVSSGGGGDYKDDDDKGGGQIVVTQEPSTVSPGGIVTLTCSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARF
 SCSLLGKKAALTLGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGLTVLGGGSGSGSEVOLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
 AMNWWRQAPGKGLEWVARIRSKYTYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNILKTEDTAVYYCVRHGFGNSYISYWAYW
 GGGLVTVSSGGGGDYKDDDDKGGGQIVVTQEPSTVSPGGIVTLTCSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTIKFLAPGTP
 ARFSGLLGKKAALTLGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGLTVLGGGSGSGSQVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRIS
 RSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSIOYADSVKGRFTISRDNKNTVLDLQMNILKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYW
 GGQGTQVTVSSHHHHHH SEQ ID NO: 52

GAAGTGCAGCTCGTTGAGTCAGGCGGGGCTTCGTTACGGCGGTGGTGGTTCAGCTGCGCAGCTAGCGGCCGAACC
 TTCTCATCTTACCCAAATGGGTGGTTAGACAGGCCCTGGGAAGGAAGAGAAATTCGTGGTGCATTAACCTGGAGCAGCGGCT
 CAACCTACTATGCCGATTCAGTGAAGGCGAGGTACCAATAGCCGAGACAAATGCCAAACACACCATGTACCTTCAAATGAATA
 GCCTCAACCTGAAGATACCGCGGTTTACTACTGTCAGCTGGCTATCAATAACTCAGGGAATTATAATTTAAGGACTATGA
 GTACGATTACTGGGTCAAGGCACCCAAAGTAACTGTAACTCCGGTGGGGAGGCAGTGGTGGAGGAGCGAAGTACAGTTGGT
 CGAGTCTGGCGGGGTGGTTCACCAAGGTGGTCTCTTAACTAGTTCGGCGGCATCCGGTTCACTTCAACAAATATGCA
 ATGAATTGGGTAGGCAAGCCCCGGGAAGGCCCTCGAATGGTAGCTAGGATTAGATCAAAATACAACTATGTACTTAT
 TACGGGACAGTGTAAAGGACAGGTTTACCATCTCCCGGATGACTCTAAACACACTCGCTAICTGCAAAATGAATAACTTAAG
 ACCGAAGATACGGCGTCTACTATTGTGTCCTGGCATGGTAATTTTGGCACTCATACATAAGCTATGGGCATATTGGGGCCAAAG
 GTACTCTGGTACCGTAAGCAGCGGAGGAGCGCGGACTACAAAGACGATGACGATAAAGGAGGTGGAGTCAAGACGGTGGTG
 ACACAGGAGCTTCCCTGACGGTATCCCGGAGGTACTGTACTCTTACTTGTGGATCAAGCACAGGGCAGTAACCTCTGGCA
 ACTACCCAAACTGGGTACACAGAAGCCAGGTACGGCACCGGAGGCTTGATAGAGATTACAAAGACGAGACGACAAAGGC
 ACTCCAGCAAGATTTCAGGAGGCTGCTGGCGGTAAAGCAGCGCTGACCTGAGCGGAGTCCACCCGAAAGATGAAGCGGAA
 TATTACTGTGTTGTGTTATCTAATCGGTGGTATTCGGTGGTGGAAACCAAGCTACCTGCTGGTGGCGGTGGTAGCGGTG
 GCGGAGTGAAGTTCAGCTTGTGTAATCAGGGGAGGTCTGGTACAGCCAGGCGGAAGTTGAAGCTGAGTGTGGCAGCTTCTG
 GATTACGTTCAACAATAACCCATGAATGGGTGAGACAGGCCACCGGCAGGGGTTGAATGGGTGCAAGGATCCGGTCCA
 AGTACGACTACAAGGACGATGACGATAAGGCTGACTCTGTAAAGACCGGATTACAAATATCCAGAGAGATTCAAAAACACTG
 CGTATCTCCAGATGAACAATTGAAACACAGAGGATACCTCGGCTTACTATTGTGTGAGACACCGCACTTCGGCAACAGCTACAT

图54E

CAGCTATTGGGCTATTGGGGACAGGGCACTCTCGTAACGGTTTCAICCGGGGAGGAGAGACTACAAGGACGATGACGATAA
 GGGCGGAGGCTCTCAGACGGTCGTAACTCAGGAGCCATCTCTCACTGTAGCCCGGGCGGAACCTGTACTCTCACCCTGTGGGAGC
 AGTACTGGGGCGGTTACTTCCGGCAACTACCTAACTGGGTTCACAGAAAGTCAGGTACAGGCACCAAGAGGTCTGATAGCGGGA
 ACTAAATTCCTCGCCCTGTACCCCTGCACGATTCAGCGGATCCCTTTTGGCGGCAAGCGGCTCTTACACTTCTGGAGTCCA
 ACCGGAAGATGAGGCGGAATACATATTTGGTATAGTAAATCGCTGGGTATTCGGCGCGGCAACCAACTCACGTGCTT
 GGAGGAGGAGGAAGCGGCGGAGGTTCACAGGTCAAGCTGGAGGAATCGGTGAGGCTCAGTGCAGACAGGAGGTAGCCTCCG
 GCTCACTTGGCGCCCTTCCGGAAGGACTTCCCGAGCTACGGGATGGCTGGTTTCGGCAAGCCCGGAAAGGAGAGAGAATT
 CGTGTCGGGAATTAGCTGGAGGGCGACTCAACTGGATACCGGACTCCGTCAAGGGCAGATTCACTATCTCTCGGACAAACGC
 CAAGAACACCGTGGACTTGCAAATGAATTCCCTGAAGCGGAGGACACTGCCATCTACTGTGCTGGCGCAGCAGGATCTGC
 CTGGTACGGCACCCCTTTATGAATACGATTACTGGGACACGGGAACCCAGGTACGGTCTCGAGTCAACCAACCACCATCAC
 SEQ ID NO: 53

图54F

Pr06 - aEGFR C8 sdAb - aCD3 Vh - ~~ggggF2agggg~~ - aCD3Vh - His6
 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRITFSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSL
 KPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEDYWGQGTQVTVSSGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTFNKYAMN
 WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNAITYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHNFGNSYISYWAYWGQGTIL
 VTVSSGGGGDYKDDDDKGGGSGQIVVTQEPSLIVSPGGIVTLICGSSTGAVTISGNYPNWWOQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARF
 SGSLLGOKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH SEQ ID NO: 54

 GAAGTTCAACTGGTGAATCCGGTGGTGGCCCTTGTCAGCGGGAGGCTCCCTTCGACTGTCTTGTGGCCGCCAGCGGTCCGACAT
 TCAGCAGTTATGCCATGGATGGTTCGGCAGGCCCTTGGTAAGAGCGGGAGTTCGTCGTCGATCATTTGGAGTAGCGGTTC
 CACGTATTATGCGGATTCGTAAAGGCGAGGTTCACATCTCACCGGATATGCAAAAATACCATGTATCTTCAGATGAACCTCA
 CTGAAGCCCGAGGACACGGCAGTTTATTACTGTGCTGCCGTTACAGATCAATTCGGGAATTACAAATTTCAAGGACTACGAGT
 ACGATTATTGGGTACGGCACCCAGGTAAACCGTCAGCAGCGGGAGGCGGATCAGGAGCGGTTCAGAGGTTCAGCTCGTTG
 AGAGTGGTGAGGGCTGGTTCAGCCAGGGGAAGTTTGAAGCTTTCCTGTGCGGCTCTGGTTCACCTTTAACAAATACGCTAT
 GAACCTGGGTACGACAAAGCCCCCGTAAAGGGCTTGAATGGGTTCAGAAATACGAGTAATACAAATAATATGCGACTTATTA
 TGCCGATAGTGAAGGACCGCTTACTATCAGTAGAGATGACAGTAAGAACAACGGCTATTTCGCAATGAACAACACTGAAGAC
 AGAAGATACGGCGTCTATTATTGTGTACGACACGGTAATTTGGGAATTCATATAAGCTATTGGGCAATACGCGGTCAAGGA
 ACCCTGTACGGTAGCAGCGGGGGCGGTGGTACTATAAGGACGACGATGACAAAGCGCGGCTCCAGACTGTGTAAACA
 CAGGAACCACTTTTGACAGTAAGTCCCTGGAGGTACGGTACGCTCACTGTGGTCCCTCAACCGGGGCTGTAAACGTACGGCAAT
 ACCCTAACCTGGTCCAAACAGAAAGCTGGACAAGCTCCAGGGTCTGATAGGCGATTACAAAGATGATGATGAAGGCACTC
 CAGCGCGCTTACGGGTCTCTCTCTGGGTGGAAAGCAGCCCTCACTCTGAGTGGAGTACAACCCGAGGATGAGGCGGAATATT
 ATTGGGTGCTCTGGTATTCAACCCGCTGGGTCTTCGGTGGGTACGAAACTTACTGTACTGCAATCATCATCAACCCAC
 SEQ ID NO: 55

图54G

Pro7 - aCD3Vh1 - ggggflagggs - aCD3V1 - aEGR D12 sdAb - His6
 EVQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTENKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYD~~EDDDDK~~ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ
 MNNLKTEDTAVYYCVRRHGNFNSYISYWYWQQGTLYTVSSGGG~~EDYKDDDK~~GGGSQTVVTQEPSLTVSPGTVTLTSGSSTGA
 VTSGNYPNWVQKPGQAAPRGLIGTKFLAPGTPARFSGSLLGKKAALTLSCVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGS
 GGSQVKLESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRISRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSITGYADSVKGRFTISRDNNAKNTVDLQM
 NSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGYLYEYDYWGQGTQVTVSSHHHHHH SEQ ID NO: 56

 GAGGTTACGCTTGTTGAATCAGGGGAGGTCTGGTACAGCCAGGCGGAAGTTTGAAACTGAGTTGTGCAGCTTCTGGATTACGT
 TCACACAAATACGCCATGAATTGGGTGAGACAGGCACCGGGCAAGGGGCTTGAATGGGTGCGCAAGGATCCGGTCCAAGTACGACT
 ACAAGGACGATGACGATAAGGCTGACTCTGTAAAGACCGATTACAAATATCCAGAGACGATTCAAAAACACTGCGTATCTCC
 AGATGAACAAATTTGAAAACAGAGGATACCTGCGGTTTACTATTGTGTGAGACACGGCAACTTCGGCAACAGCTACATCAGCTATT
 GGGCTTATTGGGGACAGGGCACTCTCTGTAACGGTTTCAATCCGGGGAGGAGAGACTACAAAGGACGATGACGATAAAGGCGGA
 GGCTCTCAGACGCTCGTAACCTCAGGAGCCATCTCTCAGTGTAGCCCGGGCGGAACGTGTTACTCTCACCCTGTGGGAGCAGTACTG
 GGGCGGTTACTTCGGCAACTACCCCTAACTGGGTTCAACAGAACCCAGGTCAGCCAGGCTCTGATAGCGCGGAACCTAAAT
 TCCTCGCCCTGTACCCCTGCACGATTACAGGGATCCCTTTGGCGGCAAGCGGCTCTTACACTTCTGGAGTCCAACCGGA
 AGATGAGCGCGGAATACTATTGTGTACTTTTGGTATAGTAATCGCTGGTATTCGGCGCGGCAACCAAACTCACTGCTCTTGGAGGA
 GGAGGAAGCGCGGAGGTTCCAGGTCAAGCTGGAGGAATCGGTGGAGGCTCAGTGCAGACAGGAGGTAGCCTCCGGCTCAC
 TTGCGCGCTTCCGGAGGACTTCCCGAGCTACGGGATGGCTGGTTTCGGCAAGCCCGCGGAAAGGAGAGAGAAATTCGIGTC
 CGGAATTAGCTGGAGGCGGACTCAACTGGATACGGGACTCCGTCAAGGGCAGATTCACTATCTCTCGGACAAACGCCAAGAA
 CACCGTGGACTTGCAAATGAATTCCCTGAAGCCGGAGGACACTGCCATCTACTGTGCTCGGCAGCAGGATCTGCTGTGTAC
 GGCACCCCTTTATGAATACGATTACTGGGACAGGGAACCCAGGTACGGTCTCGAGTCAACCAACCATCACCCAC
 SEQ ID NO: 57

图54H

Pro8 - aEGFR G3 sdAb - aCD3 Vh - [gggg#tagggs](#) - aCD3V1 - His6

SVLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGTKLTVLHHHHHH SEQ ID NO: 58

QAGAGTCGAACCTGGTGGAATCGGGCGGTGGACTCGTGCAGGCGCGAGGTCCTCGCCCTTCTGTGCGGCTTCGGGAAGAACCTTCTCTCTGTATGCCATGGGATGGTTCGCCAAGCCCTCGGAAGAAGCGGGAAATCTGTGTGGCATCAATTGGAGTTCGGGTTCGACTTACTAGCCGACTCCGTGAAGGCGCGGTTCACCATAGCCGGGACATGCTAAGAACACCATGTATCTGCAGATGAACCTCACTGAACCTTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGGCCCGCTGGTACCAGATCAATCCGGAACCTCACTCAAGGACTACGAGTACCGAGTCTAGTGGGTCAAGGCAACCCAGGTCAACCGTGTCCACCGGCGGATCACTGAAGCTGGCAGCTCCGGATTCACAAAGTACCGCATGAACTGGGTCAAGAGGACCCGGGAAGGGACTGGAATGGGTGGCCCGGATCAGGTCCAAGTACAACAACCTAGCCACCTCACTACGCGGACAGCGTGAAGGATAGGTTCACCATCTCCGGGACGACAGCAAGAACACTGGCTACCTCCAAATGAACAACCTCAAGACCGAAGATACTGGCGGTATTACTCGTGGCGCACGGGAACCTGGGAACAGGCTACATCAGCTAGGGCTACTGGGCTACTGGGGCCAGGGCACTCTGGTGACCTGAGTCAAGGAGAGCGCGGACTACAGGACGATAGCGATAAGGAGGAGGTTCCGACAGCGGTGTGAGACCAAGAACCTCACTGACCGTGTCCCAAGGAAACCGTGACCCCTTACCTGTGGCTCTCGACCGGTGGCGGTGACGTCCGGAACTACCCCACTGGGTCCAGCAAAAGCCGGGACAGGCCCTCGGGGACTGATCGGGGAACCTAAATTCCTGGCCCTGGCACTCTCGCCCGCTTCAGCGGACGCTCTCGGAGGAAGAAGCGGCCCTGACACTCTGGGGGTGCAGCTGAAGATGAGGCCGATACTACTGGCTGTGGTACTCCAAATCGCTGGGTGTTCGAGGGGCAACCAAGCTTACCGTGTGCACCAACCATCAC

SEQ ID NO: 59

图54I

Pro8 MS - aEGFR C8 sdAb - aCD3 Vh - GGGLSQRSDNHGGS - aCD3V1 - His6
 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSL
 KPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYDYWGQGTQVTVSSGGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTFNKYAMN
 WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSENATAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRRHGNFGNSYISYWAYWQQGTLE
 VTVSSGGGLSQRSDNHGGSQTVVLTQEPSLTVSPGGTIVLTGSSSTGAVTSGNYPNWVQOKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSL
 GGGKAAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH SEQ ID NO: 60

 GAGGTTCAACTGGTGGAAATCAGGAGGCGGTTTGGTTTCAGGCAGGAGGTCATTGGCATTTGTCATGTGCGGCTCCGGCGGACT
 TTCAGTTCTTACGGATGGTTGGTTTAGGCAAGCGCCGGCAAGAGAGAGGAGTTTGTAGTGGCAATTAACTGGAGTTCCTGGAT
 CAACTTATTACGCTGATTCGGTCAAGGACGCTTTACGATTAGCCGGGATAATGCAAAAACACTATGTACCTTCAAAATGAACATC
 TCTGAAACCCGGAGACACCCGGCTCTACTATTGCGCGGCTGGTTATCAGATCAACTCTGGGAATATATAATTTCAAAGACTATGAA
 TATGATTATTGGGGTCAAGGCACGCCAAGTTACAGTTAGCAGCGAGCGGGGTCAGGTGGTGGAGTGAAGTGCATTTGGTCAATTTGGTC
 GAATCTGGAGCGGCTGGTCCAAACCCGGGGCTCATTTGAAGTTGTCCTGTGCCCAAGTGGGATTTACGTTCAATAACTACGCTA
 TGAACCTGGTGAGACAAGCCCTGGAAAGGACTGGATGGTGGCGGCAATAGGTCAAATAACAATAACTACGCAACCTACT
 ATGCCGATAGTGTAAGAGACAGATTACCATTTCTCGAGACGATCTAAATAACCGGCTATCTCAAATGAATAATTTGAAGAC
 CGAGGATACAGCAGTGTATTACTGTGTTAGACATGGCAACTTTGGGAACCTTACATACTTATTGGCGGTATTGGGACAAAGG
 ACCCTGGTGACAGTAAGTAGCGGAGCGGACTGTCCGGCGAAGCGACAACCATGGGGCAGTACAGCATGTGTAACGCAGA
 ACCGAGTCTCACTGTATCACCAAGGAGGTACAGTGACCTCACATGCGGATCTCCACGGGGCAGTCACTGTGTAATTTATCCA
 AATTGGGTTACGAGAAAGCCAGGACAAGCTCCACGAGGATTGATTGGCGGAGCAAATTTCTGGCCCCAGAACCGCGCCAGG
 TTTAGTGGTAGCCTGCTTGGAGGTAAAGCGGCGCTGACGCTTTCCGGGTACAACTGAAAGACGAGGACAGTACTACTGTGTAC
 TCTGGTACTCTAACAGGTGGGTGTTCCGAGGTGGAACCAAACCTCACCGGTTTTCATCACCATCATCATCAT SEQ ID NO: 61

图54J

Pro8 ML - aEGFR C8 sdAb - aCD3 Vh - GGSQGSGLSGZSDNHGSGSGGS - aCD3V1 - His6
 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLESCAASGRFTSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGSTYVADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSL
 KPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEDYWGQGTQVTVSSGGSGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMN
 WVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDNSKNTAYLQMNLLKTEDTAVVYCVRHGNFGNSYISYWAYWGGQGT
 VTVSSGGSGSGSLSDRSDNHGSGSGSGSQTIVVTEQPSLTVSPGGIVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQOKPGQAPRGLIGGTGKFLAPG
 TPARFSGSLLGKKAALTLGVQPEDEAEYVCVLWYSNRWVFEGCGTKLTVLHHHHHHH SEQ ID NO: 62

GAGGTTCAACTGGTGGAAATCAGGAGGCGGTTGGTTCAGGCAGGAGGGTCATTGCGATGTGCGGCGTCCGGCGCGGACT
 TTCAGTTCUACGGGATGGGTGGTTAGGCCAAGCGCCGGCCAAAGAGAGGGAGTGTGTAGTGGCAATTAACTGGAGTTCGGAT
 CAACCTATTACGCTGATTCCTGTC AAGGACGCTTTACGATTAGCCGGGATAATGCAAAAACACTATGTACCTTCAATGAACCTC
 TCTGAACCCGGAGGACACCGCGCTTACTATTGCGCGCTGGTTATCAGATCAACTCTGGGAATATATATTTC AAGACTATGAA
 TATGATTTATTGGGGTCAAGGCACGCCAAGTTACAGTTAGCAGCGGAGCGGGGCTCAGGTGGGAGTGAAGTGC AATTGGTC
 GAACTCTGGAGCGGCCCTGGTCC AACCCTGGAAAGGGACTGGAAATGGTGGCGGCAATAGGTCAA AATACAATAACTACGCAACCTACT
 TGAACCTGGGIGAGACAAGCCCTCTGGAAGGGACTGGAAATGGTGGCGGCAATAGGTCAA AATACAATAACTACGCAACCTACT
 ATGCCGATAGTGTAAAAGACAGATTCAACATTCTCGAGACGATTCTAAA AATACCGCGTATCTTCAAATGAATAAATTTGAAGAC
 CGAGGATACAGCAGTGTATTACTGTGTAGACATGGCAACTTTGGGAACCTTACATACTTATTGGCGGTATTGGGGACAAGGG
 ACCCTGGTGACAGTAAGTAGCGGAGCGGGAGCGGGGATCTGGACTTAGTGCCGGTCAAGATAATCATGGAAGCGCGGATC
 AGGGGCGAGTCAGACAGTGGTAACGCAAGAACCGAGTCTCACTGTATCACCAAGGAGTACAGTGACCTCACATCGCGGATCCTC
 CACGGGGCAGTCACATCTGGTAATTATCCAAATTGGGTTCAGCAGAGCCAGGACAAGCTCCACGAGGATTGATTGGCGGAC
 AAAATTCTGGCCCCAGGAACGCCGGCCAGGTTTAGTGGTAGCCCTGGCTGGAGGTAAAGCGCGCTGACCGCTTCCGGCGTACA
 ACCTGAAGACGAGGCAGAGTACTACTGTGTACTCTGGTACTCTAACAGGTGGGTGTTCCGAGGTGGAACCAAACTCACGGTTTG
 CATCACCATCATCATCAT SEQ ID NO: 63

图54K

Pro9 - aEGFR D12 sdAb - aCD3V1 - ggggE13ggs - aCD3Vh1 - His6
 QVKLEESGGGSVQTGGSRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSGTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVLDQMNSLK
 PEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWQCTQVTVSSGGGSGGGSQTIVTQEPSLTVSPGGTVLTTCSSSTGAVTSGNYPNWWVQQ
 KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAAULTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGGDYKDDDDDKGGGSE
 VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTENKYAMNWWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM
 NNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQQGTLVTVSSHHHHH SEQ ID NO: 64

 CAAGTCAAACTTGAAAGAAAGTGGTGGGATCCGTGCAAAACAGCGGATCCCTGGCCCTGACGTGTGGCGGCTCAGGAAGGACT
 TCTAGGTTCATACGGTATGGGTGGTTCAGGCAGCCCTGGGAAGGAGAGGAGTTCGTTTCAGGCATCAGCTGGAGGGGAGAC
 TCTACTGGCTACGCAGACAGGTCAAAGGCAGATTACAAATCAGCAGAGACAAATGCGAAGACACTGTGTGACCTGCCAAATGAAC
 AGCTTGAAACCAAGATACAGCTATCTACTATTCGCTGCCAGCCGATCAGCTGTGACGCGACGCTGTATGAGTATGATT
 ATTGGGACAAAGCACGCAGGTAAACAGTCAGCTCTGGCGGTGGGGGAGCGGGGAGGAAAGTCAACCCGTCGTTACTCAGGAA
 CCATCACTGACTGTCTCTGGGGGCACTGTAACTCTTACGTGTGGTTCATCTACAGGCGCTGTACAGTGGCAACTATCCTAA
 CTGGGTCCAGCAGAAGCTTGTGAGGCAAGGCTGCCCTCCTACTCTTCCGGCGTCAACCAGAGATGAAGCCGAATATTATGCGGTGT
 AGCGGTCAATTGCTTGGAGGCAAGGCTGCCCTCCTACTCTTCCGGCGTCAACCAGAGATGAAGCCGAATATTATGCGGTGT
 GGTACTCCAATCGATGGGTCTTGGTGGGACTAAGCTGACAGTCTTGGCGGGGCTTGTGCAACCTGGGGTTCCTGAAGCTCAGCTGTGCC
 AGGGGGTGGTCCGAGGTGCAAGCTTGTGATCTGGCGGGGCTTGTGCAACCTGGGGTTCCTGAAGCTCAGCTGTGCC
 CTTCAGGTTTCACATTCAAATAAGTACGCCATGAACCTGGTGGGCAAGGCCCAAGGTAAAGGTCTTGAATGGGTCGCTAGATACG
 CAGTAAGTACGACTACAAAGACGATGACGACAAAGCGGACTCAGTAAAGACCGCTTTACGATAAGTCGCGACGATCCAAAGA
 ACACGGCGTATCTCCAAATGAACAATCTTAAACGGAGGACACAGCAGTCTACTGTGTCCGCCACGGCAATTTTCGGTAATA
 GTTACATCAGTATTGGGCTACTGGGGCCAGGTACTCTCGTGTCTCATCATCACCACCATCAC SEQ ID NO: 65

图54L

Pro10 - aCD3Vh - gggg[3]gggs - aCD3Vh - aEGFR G8 sdAb - His6
 QTVVTQEPSTVSPGGTVILTCGSSTGAVTSNGNYPNWVQKPPQAPRGLIGDYKDDDDKGTTPARESGSLLOGKAAALTLSGVQPEDEA
 EYYCVLWYYSNRWVFEGGKLTVLGGGGDYKDDDDAGGGSEVQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTENKYAMNWVROAPGKGL
 EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHHGNFGNSYISYWYWGQGTILTVSSGGGGS
 GGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRITFSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGSYYADSVKORFTISRDNAAKNTMYLQ
 MNSLKPEDTAVYYCAAGYQINSNGNYNFKDYEYDYWGQGTQVTVSSHHHHHH SEQ ID NO: 66

 CAGACGGTGTCACTCAAGAACCCTTCCTTGACTGTATCTCCGGCGGGACAGTCACCTCTTACGTGTGGATCAAGCACTGGCGCGG
 TTACTAGTGGCAACTACCCCTAATTGGGTACAGCAGAAACCGGCCCAAGCGCCGAGAGGTCTGATTGGGGATTATAAGGATGACG
 ACGACAAGGTACGGCAGCAGCCTTTCTGGGTCTTGTCTGGTGGAAAGGCAGCCCTGACTCTCAGTGGCGTTCAGCCGGAGG
 ACGAGGCTGAATATTATTGGCTCTTGTTGGTACTCCACAGGTGGGTCTTCGGGGCGGTACAAAGTTGACCGTCTCGGGGGCGG
 AGCGGACTATAAAGACGATGATGACAAAGGTGGGTTCAGAAAGTGCAGCTTGTGGAGAGCGGGGTGGTCTGGTGGCAACCGG
 GAGGCTCTCAAGCTCAGTTGCCAGCACTGGGTTACTTTCAACAATACCGGATGAACCTGGTTAGGCAGGCTCCGGGTAA
 GGGCTCGAATGGGTGCCAGATCCGGTCTAAGTATACAACATATGCTACTTATTACGCTGACAGTGTAAAGGATCGCTTTACT
 ATCTCCCGAGATGATCCAAAGAACACCGCGTATTGACAGATGAACAATTGAAGACGGAGGATACCGCTGTTTACTATTGTGTC
 GGCATGGGAATTTGGAACCTCTATATAAGTTACTGGGCATACCTGGGTCAAGGCACACTCGTGAAGTGAAGTCTGGGGCGG
 GTGGAAGCGGAGGGGATCAGAGGTGCAACTCGTTGAGAGCGCGGGGCTTGGTACAGGCAGGGGGTCACTCAGGCTCTCTT
 GTGCGGCTCAGGGAGAACTTTCAGTTCATATGCGATGGGTGGTTAGGCAGGCTCTGGTAAAGAAAGAGAAATTTGTCTGTCG
 AATCAATTGGAGTTCGGTCCACGTATTATGCGGATAGCGTTAAGGGCAGATTCACGATAAGTAGGATACCGGAAAACAC
 CATGTACTGCAAAATGAAATTCCTTAAACCGGAGGACACAGCGTTTATTACTGTGGCGCGGATACCAAAATCAACAGCGGTAAAT
 TATAACTTCAAAGACTACGAATATGATTACTGGGGCAGGGGACTCAGGTAACTGTAGTTCACACCATCACCATCATCAT
 SEQ ID NO: 67

图54M

Pro11 - aEGFR D12 sdAb - aCD3v1 - ~~ggggg~~ - aCD3vh - His6
 QVKLEESGGGSVQTGSLRLTCAASGRTSRSGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSITGYADSVKGRFTISRDNAKNTVLDQMNSLK
 PEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWQGTQVTVSSGGGGGGGSGTIVTQEPSLTVSPGGTVTLTQSSSTGAVTSGNYPNVWVQQ
 KPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPAREFSGSLGKKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDYKDDDDKGGGSE
 VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTEFNKYAMNWRVQAPQKGLEWVARIRSKYNINYYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN
 NLKTEDTAVYYCVRHGNFEGNSYISYWAYWQQGTLVTVSSHHHHHH SEQ ID NO: 68

 CAGGTCAAACCTCGAAGAGTCTGGAGGAGGAAGTGTGCAGACGGGGGTAGCCTGGCGCTTACTTGGCGGGCTCAGGCCGAACA
 TCCAGATCATACGGAATGGGATGGTTTAGACAGCGCTGGTAAAGAGCGGGAGTTCGTTTCAGGAATATCATGGCGGGGAGAT
 TCAACAGGGTATGCCGACAGCGTCAAGGACGCTTCACTATTACAGAGAGACAATGCCAAAATACTGTAGACCTTCAGATGAAT
 TCCCTGAAGCCCGAGGATACGGCTATTTACTATTGCCGGCTGCTGCCGGGTACGCCGTGGTACGGGACATTGTATGAATATGATT
 ATTGGGGGCAAGGAACCCAAAGTTACAGTTAGCAGTGGGGGTGGGGCAGTGGAGGTGGTTCCTCCAAACGGTGGTGACTCAAGAA
 CCATCCCTGACTGTAGTCCGGGAGGACCCGTAACCTCCTACTTGTGGTTCATCCACAGGAGCCGTGACGTCCTGACCTAACTATCCGA
 ACTGGGTACAACAAGCCGGGCAAGCACCCGAGGTCTGATTGGTGGGACAAAGTTTCGGCCCTGGGACACCCGCTGGGT
 TCTCAGGGTCCCTCTGGGCGGAAAGGCCGCGCTTACGTTGCCGGGTGACGCTGAAGATGAGGCAGATACTATTGTGTGCT
 TTGGTACTCTAATAGTGGGTTTTTGGTGGGGTACCAAGTTGACTGTCTGGTGGAGGGGAGACTATAAAGACGATGACGA
 CAAAGGTGGAGGAAGTGAAGGTGCAACTCTGTAGAAAGTGGGGCGGACTTGTTCACCAAGGGGCGAGCCTGAAGCTGTCTGTGC
 AGCAAGTGGGTTCACCTTTAATAAATACGCAATGAATTGGGTGAGACAGGCCACAGGCCCTTGAGTGGGTGCGCGAAT
 ACGAAGCAAGTACAATAACTATGCTACATACTATGGGACTCTGTAAAGGACCGATTACCATCAGTCGAGATGACTCTAAAAAT
 ACGGCTACCTCCAAATGAATAACCTCAAAACGGAAGACACGGCGGTGTTACTGTGTTAGGCATGGCAACTTGGTAAATAGC
 TACATTAGCTACTGGGCTTACTGGGGCCAAAGGCCACTTGGTTACTGTAGTTCCTCCATCACATCATCATCAC SEQ ID NO: 69

图54N

Pro12 -- aCD3Vhi -- gggg[aggggs] -- aCD3V1 -- aEGFR G8 sdAb -- His6
EVQLVESGGGLVQPGGSLKISCAASGFTENKYAMNWVVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ
MNNLKTEDTAVYYCYVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSCGGGDYNDDDEKGGGSQIVVTQEPSLTVSPGGITVLTGGSSTGA
VTSNGYNPNWVQKPKQAPRGIGGTFKLAPGTPARFSQSLGCKAALTLSCVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFEGGKLTVLGGGGS
CGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRSCAASGRITFSYAMGWFRQAPGKREFVVAINWSSGSITYYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQ
MNSLKPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTQVTVSSHIIHHH SEQ ID NO: 70

QAAGTGCAGCTGTAGAGAGCGGTGGTGGTGGCAGCCTGGTGTAGCTTGAAATTGTGCATGTGCGGCATCTGGGTTACTT
TTTAATAAGTACGCCATGAACCTGGTGCCCAAGCCCTGGTAAAGGCTCTTGAGTGGTCGCCAGATAACGGTCTAAATATGATT
ACAAAGATGACGACGACAGGCCGACAGCGTGAAGAGCCGCTTACATAAGTAGGGATGACAGTAAACAACCGCTTATTTCG
AAATGAATAACCTTAAGACGGAGCAGCTGCTGATATTATTGTGAAGCCATGGCACTTCGGGAATTCATACATTTCATATTG
GGCATACTGGGTCAAGCCACGCTCGTAACGGTCAGTCCGGCGCGGGGAGACTATAAGGATGATGACGACAAAGGGCGGAG
GTTCACAGACAGTCGTCACCCAAGAACCCAGCCTTACAGTTCTCTGGCGGTACAGTAAACATTGACCTGTGGCAGCAGCACTGG
TGGCGTGACATCTGGTAAATTACCCAACCTGGGTCAGCAAAAGCTGGCCAAGCCCAAGAGGACTGATTGGTGGCAACCAAGTT
CTTGGCCCTGGCACACCGCGGAGATTTCGGGTCAATTGTGGGGGTAAAGCTGGCTGACTTTGTCTGGTGTCAACCTGAA
GATGAAGCCGAATATTATTGTCTTGTGGTACAGTAATAGATGGGTGTTTGGTGGGGGACTAAGCTAAGGCTCTTGGCGGAG
GGGATCTGGTGGAGATCTGAAGTCCAACTTGTTGAGACGGCGGAGGACTTGTTCAGCCGGAGGCTCACTTCGCCCTTAGCT
GTGCTGCTAGTGGAAAGAACGTTACGTTCTTACGCTATGGGATGGTTTAGACAAGCTCCAGCAAAAGAAAGGGAGTCTGCTGG
CTATAAATTGGTCTTCGGGAGTACATAATTACGCCGACAGCGTCAAGGGAGATTTACGATCTCTCGGACAAAGCTAAATAACA
CGATGTACCTGCAATGAATAGCTTGAAACCCGAGGATACCGCTGTGTACTACTGCGCGCGGATATCAGATCAACAGTGTA
ACTATAAAGCTCAAGGACTACGAGTACGACTACTGGGGCCAGGGAAGTCAAGGTCACCGTGAGTTCTCAACCAACCAAC
SEQ ID NO: 71

图540

Pro14 -- aEGFR D12 sdAb -- aCD3Vh - ~~ggggg~~ -- aCD3Vh -- His6
 QVKLEESGGGSVQTGGSRLTCAASGRTSRSYGMGWFRAQPGKEREFVSGISWRGDSGTGYADSVKGRFTISRDNKNTVLDQMNSLK
 PEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWQQTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGQLVQPGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWWVRQ
 APKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYISYWAYWQQGTLVTVS
 SGGGGDYKDDDDGGGSQIVVTQEPSLIVSPGGIVLTLCSSSIGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGDYKDDDDGGGTPARFSGSL
 LGGKAALTLSGVQPEDEAEYVCVLWYNSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH SEQ ID NO: 72

 CAAGTCAAGTTGGGAAGAGTCCGGTGGTTCAGTACAGACCGCGGGTCTCTCCGACTTACGTGTGCCCGCAAGCGGACGGAACA
 TCCAGGTCCTATGGCATGGGTGGTTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAACGGAGTTCCTCAGTGGGATTAGTIGGCGAGGTGACT
 CCACCTGGGTACGCAGATTCAGTTAAAGGCCGCTTACCATCTCACGAGACAAATGCTAAGAATACAGTIGATCTCCAAATGAATAG
 TCTCAAAACCCGAAGATACAGCTATCTATTATGTGCGGCTGCCGAGGGTCAGCCTGGTATGGAACTTTGTATGAATACGACTAT
 TGGGGGCAGGGGACGCAAGTCACAGTTTCTCCGGTGGAGGTGGATCAGGGGGAGGCTCCGAGGTGCCAACTCGTAGAGTCCGGT
 GCGGACTCGTCCAGCCTGGCGGATCAGTGAAGTTGTCAATGCGCGGCTAGTGGTTTCACTTTCATAAATAACGCCATGAATTTGGG
 TACGCCAAGCGCTGGGAAGGGACTTGAATGGGTGGCGAGATCCGCTCCAAATATAATACTACGCTACGTATTATGCAGACT
 CTGTCAAGGATCGGTTCACAAATATCCAGGGACGACAGTAAACACCGCTTACCTCAGATGAACAAATTTGAAGACGGAAGATA
 CCGCGGTGATTATTGTGTACGCCATGGTAAATTTGGTAACTCTCTATATTCTTACTGGGCTACTGGGACAAAGGAACCTCTGGTC
 ACTGTGTCACTCGGTGGGGAGGCGACTACAAAGATGATGATGACAAAGGAGGAGGAAGCCAAACAGTAGTAACCCAGGAACC
 TAGTCTTACTGTACGTCTGGTGGTACGGTAACCTTGACGTGTGTCTCCAGCACGGGAGCAGTGAATTCAGGCAACTATCTTAAC
 TGGGTACAACAGAAACCCGGACAAGCACCGAGGATTGATGGTGACTACAAGACGACGACGATAAAGGGCACCCCGCTAG
 GTTCTCTGGTAGTCTTTTGGGAGGCAAGGCAGCGTTGACACTCTCAGGGGTGCACCCGAGGATGAGGCAGAAATATTACTGTGTA
 CTGTGGTACTCAATAGATGGGTGTTTGGCGGGGCACAAAACTTACTGTATTGTCATCACCACCACCAC SEQ ID NO: 73

图54P

Pro15 - aEGFR G8 sdAb - hOKT3 Vh - gggg12c222s - hOKT3V1 - His6
 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRITFSYAMGWERQAPGKEREFVAINWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSL
 KPEDIAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEDYWQQGTQVTVSSGGGSGGSOVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCN.ASGYTFIRYTMH
 WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNKNTAFLOMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPTVTVSSGG
 GGDYK.DDDDKGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRAVTHITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTIDYTFH
 SSLQPEDIAITYYCOQWSSNPFTFGQGTCLQTRHHHHHHH SEQ ID NO: 74

GAGGTTCAAGTTGGTGGAGTCAGGTGGGGGCTTGGTTC.AAGCAGGTGGAAGTCTGCGGCTTCTGTCGCGCTAGTGGTCGGACCT
 TCAGTTCATATGCTATGGGATGGTTCGGCAAGCCCGGGCAAGGAGCGCGAGTTTGTCTGTAGCGATTAAATTGGTCAATCAGGGTC
 TACGTATTACGCGGATTCGGTTAAGGGCAGGTTCACAATAATCCCGGGACAAGGCCAAGAATACCATGTATCTTCAAAATGAACCTCC
 CTIAAACCCAGAGGATACGTCTGTTTATCTGCGCGCTGGGTATCAATAAACAGCGGGAACCTACAACTTCAAAGACTATGAGT
 ACGACTACTGGGGTCAAGGAACCCCAAGTCACGTGAGTTCAAGGAGGCGGAGCGGAGGCGGTTCCTCCAAAGTGCACACTGGTTC
 AGTCCGAGGAGCGGTTCAGCCCGGGCGAAGCCTCAGGCTGTCTGTAAAGCATCCGGATATACATTACACAGGTACACCA
 TGCACCTGGGTGAGACAAGCAAGCCTGTAAAGGCTTGAAGTGGATCGGATACATAAACCCCAAGTCGAGGATACACCAATTACCAATC
 AAAAGGTCAAAGACAGGTTCACGATCTCAAGAGATAATTCAAATAACACTGGCTTCTGCAATATGGATAGCTTGGCGCTGAGG
 ATACGGGTGTACTTCTGTGACCGCTACTATGATGACCACTACTGTCTTGATTACTGGGACAAGGGACCCCGGTGACGGTATC
 CTCGGGGAGGCGGCACTACAAAGATGACGACGATAAAGGGGAGGCTCCGACATTCAAATGACCCCAATCTCCAGTAGTCT
 GAGTCTTCGGTGGTACCGGTTACAAATACGTGCTCAGCGTCTCTTCTGTCTTACATGAATTTGGTACCAAGCAACCCCG
 GCAAGCCCCCTAAGAGATGGATCTATGATACCTCCAAATTTGGCTGGCGTGGCTCCCGGATTCAGTGGGTCTGGATCAGGTAC
 GGACTACACCTTCACAAATTCCTCATTTGCAGCCAGAGATATAGCAACCTACTACTGTCAACAATGGTCTCTCAATCCCTTTACCT
 TCGGGCAAGGAACCAAGCTCCAAATCACGCGGCAACCACCAATCACAC SEQ ID NO: 75

图54Q

Pro16 -- aEGFR C8 sdAb -- aCD3 Vh (2B2) -- *ggggg/zzzzzz* -- aCD3VhJ -- aHSA (10GE) - His6
 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSSYAAMGWFRQAPKEREFFVAINWSSGSTYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSL
 KPEDTAVYYCAAGYQINSNYNFKDYEYDYWGQGTQVTVSSGGSGSGGSEVQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTFNKYAINW
 VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNAITYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTILV
 TVSSGGGGDYKDDDDNGGGSQIVVTOEPSLIVSPGIVTLTCSSSTGAVTSGNYPNWVQPKPQOAPRQLIGDYKDDDDKGTIPARFS
 GSLLGGKAALTLGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGRKLTVLGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFG
 MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSRDITLYAESVKGRFTISRDNAKTTLTYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTILVTVSSHHHHHH
 SEQ ID NO: 76

GAAGTTCAACTGGTGAATCCGGTGGTGGCCCTTGTCAGCGGGAGGCTCCCTTCGACTGTCTTGTCGCCCGCCAGCGGTCGCACAT
 TCAGCAGTTATGCCATGGGATGGTTCGGCAGGCCCTTGGTAAGAAGCGGGAGTTCGTCGTTCCGATCAATTGGAGTAGCGGTTC
 CACGTATTATGCGGATTCTGTAAAGGCGAGGTTCATATCTCAGCGGATAATGCAAAATAATACCATGTATCTTCAGATGAACCTCA
 CTGAAGCCCGAGGACACGGCAGTTTATTACTGTGCTGCCGGTTACAGATCAATTCCGGAAATTACAAATTTCAAGGACTACGAGT
 ACGATTATTGGGGTCAAGGCACCCAGGTAAACCGTACGACGGGGAGGGGATCAGGAGCGGTTTCAGAGGTTTCAGCTCGTTG
 AGAGTGGTGAGGGCTGGTTCAGCCAGGGGAAGTTTGAAGCTTTCCTGTGCGGCCCTCTGGTTTCACCTTTAACAAATATACGCTAT
 CAACTGGGTACGACAAGCCCCCGGTAAAGGGCTTGAATGGGTTCGAAGAATACGCAGTAAATACAAATAATTATGCGACTTATTA
 TGCCGATCAAGTAAGGACCGCTTACTATCATAGTAGAGATGACAGTAAGAACACGGCTTATTGGCAATATGCAATATGAACAACTGAAGAC
 AGAAGATACGGCGGTCTATTATTGTGTACGACACGCAAAATTTGGGAATTCATATAAGCTATTGGGCATACCTGGGTCAAGGA
 ACCCTTGTTACGGTAGCAGCGGGGGGTGGTGAATATAAGGACGACGATGACAAAGCGCGGCTCCAGACTGTGGTAACA
 CAGGAACCATCTTTGACAGTAAGTCTGGAGGTACGGTACCGTCACTGTGGGTCTCAACCGGGGCTGTAACTGCAGGCAATT
 ACCCTAACTGGGTCCAAACAGAACCTGGACAAGCTCCAGGGTCTGATAGGCATTACAAAGATGATGATGATAAGGGCACTC
 CAGCGCGCTTTAGCGGATCCCTTCTGGGTGGAAAGCAGCCCTCACTCTGAGTGGAGTACAAACCGAGGATGAGCGGGAATATT
 ATTGGGTGCTCTGGTATTCAAAACCGCTGGGTCTTCGGTGGCGGTACGAAACTTACTGTACTGGGGGAGCGGCTCAGCGGGCGG
 ATCAGAAGTGCAGCTTGTGAAATCTGGCGGAGGTCTGGTCCAGCCAGGTAAACAGCTTGAGACTGTCTGTGCTGCTAGCGGCTTT
 ACCCTCTCTAAATTCCGGTATGAGTTGGTTCGGCAAGCCCTGGAAAGGGTTTGAATGGGTATCAAGCAATTAGTGGTCTTGCGC
 GAGATACACTCTATGCCGAATCAGTGAAGGGCGCTTTACCATTAGTAGGGATAACGCTAAAACACTACTGTGTATCTGCAAAATGAA
 TAGTCTGAGACCAGAGATACCTGCCGTTTACTACTACTGCAATAATAGGGGATCTCTGAGCGTTTTCATCTCAAGGTACACTGTGACT
 GTTAGCAGTCAATCATCATCACCCAC SEQ ID NO: 77

图54R

Pro17 -- aHSA (10GE) -- aCD3v(hj) -- ggggll3222gs -- aCD3v1 (2B2) - aEGER D12 s.dAb - His6
 EVQLVESGGGLVQPGNSLRISCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLGWVSSISGSRDITLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNLSLRP
 EDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLYTVSSGGSGSGGSEVQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLWEVARI
 RSKYDYKDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLSKTEDTAVYYCVRHGNFNGSYISYWAYWGQGTLYTVSSGGGGDYKDD
 DEKGGSSQIVTVQEPSTLVSPGGIVTLICASSIGAVTSGNYPNWVQOKPQAPRGLIGIKELVPGIPARFSGSLGCKAALTLGVO
 PEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGSGGGSQVKLEESGGGSVQIGSLRLICAASGRTSRSYGMGWFQAPGKEREFS
 GISWRGDSIGYADSVKGRFTISRDN AKNTVLDQMNLSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSHHHHHH
 SEQ ID NO: 78

GAAGTGCAGCTTGTTGAATCTGGCCGAGGTCTGGTCCAGCCAGGTAAACAGCTTGAGACTGTCTGTGCTGTAGCGGCTTTACCT
 TCTCTAAATTCGGIATGAGTTGGTTCGGCAAGCCCTGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTATCAAGCATTAGTGTCTTGGCGAGA
 TACACTCTATGCCGAATCAGTGAAGGGCCGTTTACCATTAGTAGGATAACGCTAAACTACTCTGTATCTGCCAAATGAATAGT
 CTGAGACCAGAAAGATACTGCCGTTTACTACTGCCACAATAGGGGATCTCTGAGCGTTTCTCAAGGTACACTTGTGACTGTTA
 GCAGTGGGGAGCGGCTCAGCGCGGATCAGAGTTCAGCTTGTGATCAGGGGAGGTCTGTACAGCCAGCGCGGAAGT
 TTGAAACTGAGTTGTCAGCTTCIGGATTTACGTTCAACAATACGCCATGAATGGGTGAGACAGGCACCGGGCAAGGGGCTT
 GAATGGGTGCAAGGATCCGGTCCAAGTACGACTACAGGACGATGACGATAAGGCTGACTCTGTAAAGACCGGATTTACAATA
 TCCAGAGACGATCAAAAACACTGCCGATCTCCAGATGAACAATTTGAAACAGAGGATACCTGGGTTTACTATGTGTGAGA
 CACGGCAACTTCGGCAACAGCTACATCAGCTATTTGGGCTATTGGGACAGGGCACTCTGTAAACGGTTTCACTCCGGGAGGA
 GGAGACTACAAGGACGATGACGATAAGGGCGGAGGCTCTCAGACGGTCTGTAAGGAGGCACTCTCACTCACTGTAGCCGGGC
 GGAACTGTACTCTACCTGTGTAGCAGTACTGGGCGGTACTTCCGGCAACTACCTAACTGGGTCAACAGAAAGCCAGGTC
 AGGCACCAAGAGGTCGTGATAGGGGAACATAATTCCTCTGTCCTGTACCCCTGCACGATTACGGGTTCCTTTTGGCGGCA
 AGCGGCTCTTACACTTCTGGAGTCCACCGGAAGATGAGCGGAATACTATGTACCTTTGGTATAGTAATCGCTGGGTATTC
 GGCGCGGCACCAAACTCACTGTCTTGGAGGAGGAGGAAGCGCGGAGGTTCAGGTCAAGCTGGAGGAATCGGGTGGAGG
 CTCAGTGCAGACAGGAGGTAGCTTCGGCTCAGTTGCGCGCTTCCGGAGGACTTCCGGAGCTACGGGATGGCTGTGTTTCGG
 CAAGCCCGCGGAAGGAGAGAGAAATTCGTCTCCGGAATTAGCTGGAGGGGACTCAACTGGATACCGGGACTCCGTC AAGGG
 CAGATTCATCTCTCGGACAACGCCAAGAACACCGTGGACTTGC AATGAATTCCTGAAGCCGGAGGACACTGCCATCTA
 CTA CTGTGCTCGGCAAGCAGGATCTGCTGTGATCGCACCTTTATGAATACGATTACTGGGACAGGGAACCCAGGTCAACGTC
 TCGAGTCACCAACCATCACCAC SEQ ID NO: 79

图54S

Pro18 - aEGFR G8 sdAb - aCD3V1 - ~~2222E1aggs~~ - aCD3Vhi - His6
 EVQLVESGGGLVQAAGSLRLSCAASGRFTSSYAMGWERQAPGKEREFVVAINWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSL
 KPEDTAVYYCAAGYQINSNGYNFKDYEDYWQGTQVTVSSGGGSGGGSQIVVTQEPSLTVSPGGIVTLTCSSSIGAVTSGNYPN
 WVQOKPGQAPRLIGGTRFLAPGTPARFSGSLLGKKAALILSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDYEDDDX
 GGGSEYQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFIFNKYAMNWVRQAPCKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTIA
 YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFNSYISYWAWWQQGLVTVSSHHHHHH SEQ ID NO: 80

 GAGGTCCAACTTGTGAGAGCGGTGGGGGACTTGTACAGGCCGGAGGGTCTTGAGGCTGAGTTGTGCTCGTCGGGACGCACC
 TTCAGTAGTTATGCGATGGGATGGTTCGGCAAGCGCCGGGAAAGAGAGAGAAATTTGTGTGCTATATCATTGTGCTCAGTGGG
 AGCACTTATTACGCTGACTCTGTAAAGGAAGATTACTATATCTCGAGATAATGCTAAGAACACCATGTATCTTCAGATGAAC
 CTCTGAAACCAGAGGATACTGTGTGTAATTACTGTGCTGCGGATATCAGATAATTCAGGTAATATACTTTAAAGACTATGA
 GTATGACTACTGGGACAGGGGACTCAAGTTACGGTGAGTTCAGCGGGGTTCTGGGGGTGGAAGCCAGACCGTCTGTGAC
 CCAGGAACCATCTCTTACAGTCTCCCCGGGAGGCACGTGAACCTTACCTGGCGGTCAATCAACTGGCGCTGTAACTGCGGCAAC
 TACCCCAACTGGGTGACAGCAAAACCGGACAGCGCCACGAGGCCCTGATAGGTGGGACTAAGTTTCTTGCTCCAGGAACCTCT
 GCTCGATTTCTGGCAGTCTGTTGGCGGCAAGCGAGCCCTGACACTTCTGGTGTGCAACCGAGGACGAGGCTGAGTACTACT
 GCGTACTCTGTTATTCAAATCGATGGGTTTTTGGGGGTGGAACGAAATTTGACCGTTCTCGGAGGTGGTGTGACTATAAAGATGA
 TGACGACAAAGGTGGTGGATCCGAAGTCCAACTCGTCGAGTCCGGGGAGGACTTGTCCAACTCGAGGATCATTTGAAACTCAG
 TTGTGCAGCTCCGGGTTACATTTAATAATACCCATGAATGGGTCGGCAAGCCCAAGGCAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCG
 CGGATCCGATCAAGTACGACTATAAAGACGATGACGATAAGGCTGATTACGTCAAGACAGAGTTTACCATAAAGTCGCGATGAC
 AGCAAGAACACCGCTTACCTTCAATGAACAATCTGAAACAGAAAGACACCGCAGTACTACTGCGTGGCGCCACCGCAATTTT
 GGTAACAGTTACATTTCTTATTGGGCGTATTGGGGCGAGGGAACCTCTCGTCACGGTAAGTTCCCATCATCACCATCAT

SEQ ID NO: 81

图54T

Pro19 -- aEGFR D12 sdAb -- aCD3V1 (2B2) -- ggggTaggs -- aCD3Vhi -- aHSA (10GE) - His6
 QVKEESGGSVQTGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRAQPKGEREFVSGISWRGDSITGYADSVKGRFTISRDNKNTVLDQMNSLK
 PEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSQTVTQEPSLTVSPGTVTLTCASSTGAVTSIGNYPNVVQQ
 KPGQAPRGLIGGTLKFLVPGTPARFSGSLGKKAALTLGQVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFOGGTKLTVLGGGGDYKDDDDKGGGSE
 VOLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPKQGLEWV ARIRSKYDYNEDDDLAADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM
 NNLKTEDTAVYYCVRHGNFNSYISYWAYWQQGTLVTVSSGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGNLSRLSCAASGFTFSKFGMSWV
 RQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLVSSQGTLVTVSSHHHHHH
 SEQ ID NO: 82

CAAGTCAAACTTGAGGAAAGCGGGGAGGTAGCGTACAGACTGGTGGATCTCTGAGGTGACTTGGCCCCCAGTGGCCCCGAACA
 TCCAGAAGTTACGGGATGGGTGGTTTCACAGGCTCCGGGAAAGAGCGGGAGTTTGTATCTGGCATAAGCTGGAGGGCGGAC
 TCCACTGGTTACCGAGATTCCGTCAAAGGGCGGTTACGATCTCTCGGATAACGCGAAGATACCGTTGATCTCCAAATGAACCT
 CTCTTAACCCGAGGATACAGCAATATACTATTGCGCCGCCCTGCGGGGTCAAGCTTGGTATGGCACATTGTACGAATATGACTA
 TTGGGGTCAAGGTACCCCAAGTAACGGTCAGTTCGGTGGTGGGGGTCTGGGGTCAAGTACAGGTCGTAACTCAAGTAACTACCCGAAT
 ATCCTTGACAGTATCCCCCGGTGACCGGTGACCTGACATGCGCTTCAAGTACAGGTCGTAACTCAAGTAACTACCCGAAT
 TGGGTGCAGCAAAACCTGGACAGCACCCCGGGTCTATATCGGGGGACGAAGTCTTGGTACCGGGTACCCCTGGCGGCTTC
 AGCGGAAGTCTCTGGGTGGAAGAGCCGCTTGACCTTGTCAGCCGTTACGCCGAAGATGAGCCGAATATTATTGACCGCTGT
 GGTAATCTAACCGGTGGTCTTCGGAGGAGGACGAACCTTACTGTACTTGGAGCGCGGTGACTACAAGGACGACGATGACA
 AAGCGCGCGGACGAGGTCCAGTTGGTAGAATCCGGAGGTGATTGTTCAACCGGAGGAAGCTTAAGCTTTTCATCGGCCG
 CATCCGGATTCACTTCAATAAGTACGCAATGAATTGGGTAGACAGGCACCAAGGTAAAGGGTTGGAATGGGTGGCACGCAATTA
 GGTCATAATACGATTACAAGGACGACGACAAAGCTGACAGCGTAAAGAGCCGATTACGATAAGCCGGGATGATTCTAAGA
 ACACCTGCTTATTTCAGATGAATAATTGAAGACCGAGGATACTGCTGTCTATTATTGCTCCGCCACGGTAATTTGGTAACCTCT
 TACATTAGCTATTGGCGTATTGGGGCAGGGCAGCTCTGGTCACTGCTCATCTGGCGGAGGGGCAAGTGGCGGGGTACAGAG
 GTTCAACTTGTGAGTCTGAGGGGCTCTGTACAACCGGGGAATAGTCTCCGACTCTCTTGGCTGGGTCCGGGTTCACGTTCTC
 AAAGTTTGGGATGCTTGGGTAGGCAAGCCCCAGGTAAAGGACTCGAATGGGTCAAGCAGCATCTCAGGCTCCGGCAGAGACAC
 GTTGTATGCCGAAAGTGTCAAAGGGAGGTTCACAATCTCTCGGGACAATGCAAAACCACTTGTATCTCCAATATGAACCTCCTC
 CGGCTGAGGACACAGCAGTTTACTACTGTACGATAGGAGGGTCCCTTAGCGTATCTTCTCAGGGAACCTTTGGTAACGGTCAAGCT
 CCCACCACCATCATCAAC SEQ ID NO: 83

图54U

Pro19 CD3+ - aEGFR D12 sdAb -- aCD3v1 (2B2) -- ggggfljsszgs -- aCD3vh -- aHSA (10GE) - His6
 QVKLEESGGSVQTGSLRLTCAAAGRTSRSYGMGWFQAPGKEREFVSGISWRGDSITGYADSVKGRFTISRDN AKNTVDLQMNSLK
 PEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSGGGSGGSGQTIVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSQNYPNVWVQQ
 KPGQAPRLIGGTGKFLVPGTLPARFSGSLLGKKAALTLGVPQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGGDYKDDDDKGGGSE
 VOLVESGGGLVQPGSLKLSCAAASGFENKYAMNWRQAPKGLWVVARIRSKYNNYATYVADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN
 NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGGTLVTVSSGGGSGGSGEVQLVESGGGLVQPGNLSRLSCAASGFTFSKFGMSWVR
 QAPGKGLWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNLSRDPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLLVTVSSHHHHHH
 SEQ ID NO: 84

CAAGTCAAACTTGAGGAAAGCCGGGGAGGTAGCGTACAGACTGGTGGATCTCTGAGGTGACTTGGCCCGCCAGTGGCCGGAACA
 TCCAGAAAGTTACGGGATGGGTGGTTTCGACAGGCTCCGGGAAAGAGCGGGAGTTTGTATCTGGCATAAGCTGGAGGGGGGAC
 TCCACTGGTTACCGAGATTCGGTCAAAGGGCGGTTACGATCTCTCGGATAACGGGAAGAATACCGTTGATCTCCAAATGAAC
 CTCTTAAACCCGAGGATACAGCAATATACATATGGCCCGCGCTGCGGGTCAAGCTGGTATGGCACATTGTACGAATATGACTA
 TTGGGGTCAAGGTACCCAAAGTAAACGGTCAGTTCGGTGGTGGGGGTCTGGTGGTGAATCCAAACAGTTGTTACTCAGGAGCC
 ATCCTTGACAGTATCCCCCGGTGGAACGGTGACCTGACATGCGCTTCAAGTACAGGTGCTGTAACTCAGGTAACTACCCGAAT
 TGGGTGCAGCAAAACCTGGACAAGCACCCCGGGTCTTATCGGGGGACCAAGTCTTGGTACCGGGTACCCCTGCGGCTTC
 AGCGGAAGTCTCTGGGTGGAAAGCCGGCTTGACCTTGTCAGGCGTTCAGCCGAAGAAGAGGCCGAATATTATTCACCGTGT
 GGTATTCTAACCGTGGTCTTCGGAGGAGGACGAACCTTACTGTACTTGGAGCGCGGTGACTACAAGGACGACGATGACA
 AAGCGCGCGGACGAGGTCAGTTGGTAGAATCCGGAGGTGGATTGGTCAACCGGGAGGAAGCCCTTAAGCTTTCATCCGCCG
 CATCCGGATTCACTTCAATAAGTACGCAATGAATTGGGTAGACAGGCACCAAGGTAAAGGGTTGGAATGGTGGCACCGCAITTA
 GGTCGAAGTACAACAACACTACGCCACCTACTACGGGACAGCGTAAAGACCGAATTAACGATAAGCCGGGATGATTTCTAAGAACA
 CTGCTTATTGGCAGATGAATAATTGAAGACCGAGGATATGCTGTCTATTATGGCTCCGCCACGGTAATTITGGTAACTCTTAC
 ATTAGCTATTGGCGTATTGGGGCAGGGCAGTCTGGTCAACCGTCTCATCTGGCGGAGGGCCAGTGGCGGGTTCAGAGGT
 CAACCTTGTCGAGTCTGGAGCGGTCTCGTACAACCGGGGAATAGTCTCCGACTCTCTGGCTGCTCGGTCAGGTTACGTTCTCAA
 AGTTTGGGATGCTTGGGTAGGCAAGCCCCAGGTAAAGGACTGGAATGGGTACAGCATCTCAGGCTCCGGCAGAGACACCGT
 TGTATGCCGAAGTGTCAAAAGGAGGTTTCAATCTCTCGGACAAATGCAAAACACCTGTATCTCAATGAACCTCACTCCG
 GCTGAGGACACAGCAGTTTACTACTGTACGATAGGAGGTCCCTTAGCGTATCTTCTCAGGGAACCTTGGTACCGGTACAGCTCC
 CACCACCATCATCAC SEQ ID NO: 85

图54V

Pro20 - aEGFR G8 sAb -- aCD3 Vh (2B2) -- ~~ggggf3ss92s~~ -- aCD3Vh// -- aHSA (10GE) - His6
 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSSYAMGWERQAPGKEREFVVAINWSSGSTYVADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSL
 KPEDTAVYYCAAGYQINSQNYNFKDYEDYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTFNKYAINW
 VRQAPQKGLEWVARIRSKYNNAITYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLV
 TVSSGGGGDYKDDDDKGGGSQTVVTDPSLIVSPGGIVLTGSSSTGAVTSGHYPNWVQPKPQAPRQLIGGTSNKHSHWTPARESGS
 LLOGKAAALTILSGVQPEDEAEYYCVLWGSRRWVFGGQTKLTVLGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSRLSCAASGFTFSKFGMS
 WVRQAPQKGLEWVSSISGSRDITYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTHGGSLSVSSQGTLLTVSSHHHHHH
 SEQ ID NO: 86

GAAGTTCAACCTGGTGAATCCGGTGGTGGCCCTTGTCAGGCGGGAGGCTCCCTTCGACTGTCTTGTCGCCCGCCAGCGGTCGCCACAT
 TCAGCAGTTATGCCATGGGATGGTTCGGCAGGCCCTGGTAAGAAGCGGGAGTTCGTCTGTCGATCAATTGGAGTAGCGGTTC
 CACGTATTATGCGGATTCGTAAAGGCGAGGTTCATATCTCACCGGATAATGCCAAAATAATCCATGTATCTCAGATGAACCTCA
 CTGAAGCCCGAGGACACCGCAGTTTATTACTGTGCTGCCGTTACCAATCAGATCAATTCGGGAATTACAAATTCAGGACTACGAGT
 ACGATTATTGGGTCAGGGCACCCAGGTAAACCGTCAGCAGCGGGAGGCGGATCAGGAGCGGCTCAGAGGTTCAAGGACTACGCTG
 AGAGTGGTGGAGGGCTGGTTCAGCCAGGGGAAGTTTGAAGCTTTCCTGTGGGCCCTCTGGTTTCACTTTAACCTTAAACAATACGCTAT
 CAACCTGGGTACGACAAGCCCCCGGTAAAGGGCTTGAATGGGTGCAAGAATACGCAATATACAAATAATTAATGCGACTTATTA
 TGCCGATCAAGTAAAGGACCGCTTACTATCTCTGAGATGACAGTAAGAACAACCGCTTATTGGCAATGAACAACACTTGAAGAC
 AGAAGATACGGCGTCTATTATTGTGTACGACACGCAATTTGGGAATTCATATAAAGCTATTGGCATACCTGGGTCAAGGA
 ACCCTTGTTACGGTGAGCAGCGGGCGGTGGTGACTATAAGGACGACGATGACAAAGCGCGGATCCCAGACTGTGTAAACA
 CAGGAACCATCTTTGACAGTAAGTCTGGAGGTACGGTACGCTCACTTGTGGTCTCAACCGGGCTGTAACTGACGGCCATT
 ACCCTAACTGGGTCCAAACAGAAGCTGGACAAGCTCCAGGGTCTGATAGGCGGAACCTTCAACAAGCACTCTTGGACTCCAG
 CGCGCTTAGCGGTTCCTTCTGGGTGGAAAGCAGCCCTCACTCTGAGTGGAGTACAACCCGAGGATGAGCGGAATATTATTG
 CGTGCTCTGGGTTACGCGCGTGGTCTTCGGTGGCGGTACGAACCTTACTGTACTGGGGGAGGCGGCTCAGCGCGCGGATC
 AGAAGTGCAGCTTGTGAATCTGGCGGAGGTCTGGTCCAGCCAGGTAAACAGCTTGAGACTGTCTGTCTGCTGCAAGCGGCTTTACC
 TTCTCTAAATTCCGTATGAGTTGGTTCGGCAAGCCCCCTGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTATCAAGCATTAGTGTCTTGGCGGAG
 ATACACTCTATGCCGAATCAGTGAAGGCGCTTTACCATTAGTAGGATAACGCTAAACTACTCTGTATCTGCAATGAATAG
 TCTGAGACCAAGATACCTGCGTTTACTACTGCAACAATAGGGGATCTCTGAGCGTTTCACTCAAGGTACACTTGTGACTGTT
 AGCAGTCATCATCATCACCCAC SEQ ID NO: 87

图54W

Pro21 - aEGFR D12 sAb -- aCD3v1 (2B2) -- gggg[33]sggs -- aCD3v1b[22] -- aHSA (10CE) - Hk6
 QVKLEESGGSVQTGSLRLTCAASGRTSRYGMGWFRQAPKEREFSVSGISWRGDSYGVADSVKGRFTISRDNKNTVLDLQMNLSLK
 PEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQTVTQEPSLTVSPGTVTLTCASSTGAVTSIGNYPNWVQQ
 KPGQAPRGLIGTIKFLVPGTIPARFSGSLGKKAALTLQVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGGDYKDDDDKGGGSE
 VOLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTFSGSAMNWVRQAPGKQLEWVGRIRSKANSYATAYAAVSKDRFTISRDDSKNTAYLQMN
 LKTEDTAVYYCVRHGKFKKSYIAFWAYWQGTLLVTVSSGGGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQ
 APGKQLEWVSSISGSRDITLYAESVKGRFTISRDNKNTLLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLLVTVSSHHHHHH
 SEQ ID NO: 88

CAAGTCAAACTTGAGGAAAGCGGGGAGGTAGCGTACAGACTGGTGGATCTCTGAGTTGACTTCGCCCGCCAGTGGCCGAACA
 TCCAGAGATTACGGGATGGGTGTTTCACAGCTCCGGGAAAGAGCGGGAGTTTGTATCTGGCATAAGCTGGAGGGCGGAC
 TCCACTGTTACGCAGATTCCGTCAAAGGGCGGTTACGATCTCTCGGATAACGCGAAGAAATACCGTTGATCTCCAAATGAAC
 CTCCTAAACCCGAGGATACAGCAATATACATATGCCCCGCCCTGCCGGGTCAGCTGGTATGCCACATTGTACGAATATGACTA
 TTGGGGTCAAGGTACCCCAAGTAACGGTACGTTCCGGTGGTGGGGGTCTGGTGGTGGATCCCAACAGTTGTTACTCAGGAGCC
 ATCCTTGACAGTATCCCCCGGTGAACGGTGACCTGACATGCCCTTCAAGTACAGTGTCTGTAACTCAGGTAACTACCCGAAT
 TGGGTGCAGCAAAACCTGGACAAAGCACCCCGGGTCTATCGGGGGGACGAAGTTCTTGGTACCGGGTACCCCTGCGGGCTTC
 AGCGGAAGTCTCTGGTGGAAAGCGCGCTTGACCTTGTCAGCGCTTACGCCGAAGATGAGCCGAATATTATTGACCGCTGT
 GGTATTCTAACCGTGGGTCTTCGGAGGAGGACGAACCTTACTGTACTTGGAGCGCGGTGACTACAAGGACGACGATGACA
 AAGCGCGCGCAGCGAGGTCCAGTTGGTAGAATCCGGAGGTGATGGTTCAACCCGAGGAAGCCCTTAAGCTTTTCATCGGCCG
 CATCCGGATTCACTTCTCTGTTCCGCAATGAATGGGTAGACAGGCACAGGTAAAGGTTGGAAATGGTGGGAAGAATAC
 GCAGTAAAGCCAAITCTTATGCGACTGCTTATGCCGCTAGTGTAAAGGACCGATTACGATAAGCCGGGATGATCTAAGAACA
 TGCTTATTGTCAGATGAATAATTGAAGACCGAGGATACCTGCTCTATTATGCGTCCGCCACGGTAAATTGGTAAAGTCTTACA
 TTGCCCTTTGGCGTATTGGGGCAGGGCACTCTGGTCACTGTCACCGTCTCATCTGGCGAGGGGCGAGTGGCGGGGTCAGAGGTTC
 ACTGTGAGTCTGAGCGGTCTCTGTACAAACCGGGGANTAGTCTCCGACTCTCTTGGCTCGCTCCGGGTTCACGTTCTCAAG
 TTTGGGATGCTTTGGGTAGGCAAGCCCAAGGTAAAGGACTCGAATGGGTACAGCATCTCAGGCTCCGCGAGAGACACGTTG
 TATGCCGAAAGTGTCAAAGGGAGGTTCAATCTCTCGGGACAAATGCAAAACCCACTTGTATCTCCAATGAACCTACCTCCGGC
 CTGAGGACACAGCAGTTTACTACTGTACGATAGGAGGGTCCCTTAGCGTATCTTCTCAGGGAACCTTTGGTAAAGGTACGCTCCCA
 CCACCATCATCATCAC SEQ ID NO: 89

图54X

Pro22 - aEGFR G8 sdAb - aCD3 Vh (2B2) - ~~ggggg~~agggs - aCD3V1 (2B2) - aHSA (10GE) - His6
 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTESSYAMGWERQAPKEREFFVAINWSSGSTYVADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSL
 KPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEDYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTFNKYAINW
 YRQAPGKGLEWVARIRSKYNNAITYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAWWGQGTILV
 TVSSGGGGDYKDDDDKGGGSGTVVTEPSLIVSPGGIVTLTICASSTGAVTSGNYPNWVQPKPQQAPRGLIGIKFLVPGTPARFSGS
 LLGKKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGTRKLTIVLGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS
 WVRQAPGKGLEWVSSISGSRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDIAVYYCTHGGSLSVSSQGTILVTVSSHRRHHH
 SEQ ID NO: 90

GAAGTTCAACTGGGTGAATCCGGTGGTGGCCCTTGTCAGGCAGGCTCCCTTCGACTGCTTGTGCGCCAGCGGTCGCACAT
 TCAGCAGTTATGCCATGGGATGGTTC CGCGAGGCCCTTGGTAAGAGCGGGAGTTCGTCGTCGATCAATTGGAGTAGCGGTTC
 CACGTATTATGCGGATTCGTAAAGGCGAGGTTCACATCTCACCGGATATATGCCAAAATAATCCATGTATCTTCAGATGAATCA
 CTGAAGCCCGAGGACACCGCAGTTTATTACTGTGCTGCCGTTACAGATCAATTCGGGAAATTACAATTTCAAGGACTACGAGT
 ACGATTATTGGGGTCAGGGCACCCAGGTACCGTACAGCGGGGAGCGGATCAGGAGCGGTTTCAGAGGTTCACTCGTTG
 AGAGTGGTGAGGGCTGGTTCAGCCAGGGGAAGTTTGAAGCTTTCCTGTCGGCTCTGCTTTCACCTTAAACAATACGCTAT
 CAACTGGGTACGACAGCCCCCGGTAAAGGGCTTGAATGGGTTCAGAAATACGCAGTAAATACAAATAATATGCGACTTATTA
 TGCCGATCAAGTAAAGGACCGCTTACTATCTCTCGAGATGACAGTAAAGAACACCGCTTATTTGCCAAATGAACAACACTGAAGAC
 AGAAGATACGGCGGTCTATTATGTGTACGACACGCCAAATTTGGGAATTCATATAAAGCTATTGGCATACTGGGTCAAGGA
 ACCCTTGTTACGGTGAACAGCGGGCGGTGGTGAATATAAGACGACGATGACAAAGCGCGGATCCC AAACAGTTGTACT
 CAGGAGCCATCTTGACAGTATCCCCCGGTGGAACGGTGACCTGACATGCGCTTCAAGTACAGGTGCTGAACCTCAGGTAACCT
 ACCCGAATTTGGGTGACGCAAAACCTGGACAGCACCCCGGGTCTTATCGGGGGACGAAAGTTCTTGGTACCGGGTACCCCTG
 CGGCTTCAGCGGAAGTCTTCTGGGTGGAAGAGCGCTTGACCTTGTACAGGCTTCAGCCCGAAGATGAGGCCGAATATTATIG
 CACGCTGTGGTATCTAACCGTGGGTCTTCGGAGGAGGAGCAAACTTACTGTACTTGGGGAGCGGCTCAGGCGCGGATC
 AGAAGTGCAGCTTGTGAATCTGGCGAGGTCTGGTCCAGCCAGGTAAACAGCTTGAGACTGCTGTGCTGCAAGCGGCTTTACC
 TTCTCTAAATTCGGTATGAGTTGGGTTCGGCAAGCCCTGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTATCAAGCATTAGTGGTCTCTGGCGGAG
 ATACACTCTATGCCGAATCAGTGAAGGGCCGCTTTACCATTAGTAGGATAACCGCTAAACTACTGTATCTGCAATGAATAG
 TCTGAGACCAAGAGATACTGCCGTTTACTACTGCAATAGGGGGATCTCTGAGCGTTTCAATCTCAAGGTACACTTGTGACTGTT
 AGCAGTCATCATCATCACCCAC SEQ ID NO: 91

图54Y

Prodent 23 – 血清裂解成阿羊

aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – ~~ggggg~~gggs – aCD3Vh₁ – aHSA (10GE) – ~~gggg~~L VPRGSLGgggs-
aEGFR D12 sdAb – aCD3Vh (2B2) – ~~ggggg~~gggs – aCD3Vh₂ – aHSA (10GE) – His6
EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRITSSYAMGWFRQAPGKEREFVY AINWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSL
KPEDTAVYYCAAGYQINSQNYNEKDY EYDYWGQGTQVTVSSGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTENKY AINW
VRQAPGKLEWVVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLY
TVSSGGGGDYKDDDDKGGGSQTVVTOEPSLTVSPGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGDYNKDDDDKGGTPARFS
GSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGLKLTVLGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNLSRLSCAASGFTFSKFG
MSWVRQAPGKLEWVSSISGSGRDITLYAESVKGRFTISRDNAKTILYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLYTVSSGGGGLY
PRGSLGGGGSQVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYCMGWFRQAPGEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKN
TVDLQMNLSLKPEDTAYYYCAAAGSAWYGHLYEYDYWGQGTQVTVSSGGSGGGGSQTVVTOEPSLTVSPGTVTLTCSSTGAVT
SGNYPNWVQKPGQAPRGLIGTKFLVPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGLKLTVLGGGGSQTVV
DDDDKGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTENKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISR
DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNEFGNSYISYWAYWGQGTLYTVSSGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNLSRLSCAASGF
TFSKFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGRDITLYAESVKGRFTISRDNAKTILYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLYTVSSH
HHHHH SEQ ID NO: 92

GAAGTTCAACTGGTGAATCCGGTGGTGGCCCTTGTCAGGGAGGCTCCCTTCGACTGCTTGTGTCGCCACGGGTCGCCACAT
TCAGCAGTTATGCCATGGATGGTCCGGCAGGCCCTGGTAAAGAGCGGAGTTCGTCGTTGGGATCAATTGGAGTAGCGGTTC
CACGTATTATGCGGATTCGTAAAGGCGAGGTTCACATATCTACCGGATATATGCAAAAATACCATGTATCTTCAGATGAACCTCA
CTGAAGCCCCGAGGACACCGCAGTTTATTACTGTGCTGCCGTTACAGATCAATTCGGGAATTACAAATTCAGGACTACGAGT
ACGATTATTGGGTACGGCACCCAGGTAAACCGTCAGCAGCGGGAGCGGATCAGGAGCGGTTCAGAGGTTCAGCTCGTIG
AGAGTGGTGAGGGCTGGTTCAGCCAGGGGAAGTTTGAAGCTTTCCTGTGCGGCTCTGTGTTACCTTTAACAAATACGCTAT
CAACTGGGTACGACAGCCCCGGTAAAGGGCTTGAATGGGTGCAAGAAATACGAGTAAATACAAATAATTATGCGACTTATTA
TGCCGATCAAGTAAAGGACCGCTTACTATCAGTAGAGATGACAGTAAAGAACACGGCTATTTCGAAATGAACAACTTGAAGAC
AGAAGATACGGCGGTCTATTATTGTGACGACACGCAAAATTTGGGAATTCATATTAAGCTATTGGCATACTGGGTCAGGA
ACCTTGTACGGTGAGCAGCGGGCGGTGGTGAATATAAGGACGACGATGACAAAGCGGGCGCTCCAGACTGTGGTAACA
CAGGAACCATCTTTGACAGTAAGTCTGGAGGTACGGTACCGTCACTTGTGGTCTCAACCGGGCTGTAAAGTTCAGGCAATT
ACCTTAAGTGGTCCAAACAGAGCGCTGGACAGCTCCAGGGGTCTGATAGGCGAATTACAAAGATGATGATGATAAGGGCACTC
CAGCGCGCTTACGGATCCCTTCGTGGTGGAAAGCAGCCCTCCTCTGAGTGGAGTACAAACCGAGGATGAGCGCGAATATT

图54Z

ATTGGCTGCTTGCTATTCAACCCGCTGGCTTCGGTGGCGGTACGAAACTTACTGTACTTGGGGGAGGGGCTCAGGGGGGG
 ATCAGAACTGCAGCTTGTTGAATCTGGCGGAGGTCTGTCTCCAGCAAGTTAGACTGTCTCTGTCTGCTAGCGGCTTT
 ACCTTCTCTAAATTCCGGTATGAGTTGGTTCCGCAAGCCCTGGAAAGGGTTTGGAATGGGTATCAAGCATTAGTGGTTCTGGGC
 GAGATACACTCTATGCCGAATCAGTGAAGGGCCGCTTACCATTAGTAGGGATAACGCTAAACTACTCTGTATCTGCAATGAA
 TAGTCTGAGACCAAGATACTCGCCGTTTACTACCTGCAATAGGGGATCTCTGAGCGTTTCATCTCAAGGTACACTTGTGACT
 GTTAGCAGTGTGGCGGAGGACTTGTACCTCGAGGTAGCTTGGTGGAGGGGATCCCAAGTCAAACTTGAGGAAAGCGGGGG
 AGGTAGCGTACAGACTGGTGGATCTCTGAGGTGACTTGGCGCCAGTGGCCGAAATCCAGAACTTACGGGATGGGTGGTTT
 CGACAGGCTCCGGGAAAGAGCGGGAGTTTGTATCTGGCATAGCTGGAGGGGCACTCCACTGGTTACGCAGATTCCGTCAAA
 GGGCGTTTACGATCTCTCGGATACCGGAAGATACCGTTGTATCTGGCATATGAATCTCTTAAACCCGAGGATACAGCAATAT
 ACTATTGCCCGCCGCTGCCGGGTCAGCTGGTATGGCACATTGTACGAATATGACTATTGGGTCAAGGTACCCAAAGTAACGGT
 CAGTCCGGTGGTGGGTCTGGTGGATCCCAACAGTTGTTACTCAGGAGCCATCTTGACAGTATCCCCCGGTGGAAACG
 GTGACCTGACATGCCCTTCAAGTACAGGTGCTGTAACTCAGGTAACTACCCGAATTGGGTGCAGCAAAACCTGGACAAAGCA
 CCCCCGGGCTTATCGGGGGACGAAGTTCTTGGTACCGGTACCCCTGCGGCTTACGCGGAAGTCTTCTGGGTGGAAAGCCG
 CCTTGACCTTGTACGGCGTTCAGCCCGAAGATGAGGCCGAATATTATGCCACGCTGTGTATCTAAACCGGTGGGTCTTCGGAGG
 AGGGACGAAACTTACTGTACTTGGAGCGCGCGGTGACTACAAAGGACGAGATGACAAAGCGCGCGCACTCCGATTCACCTTCAATAAGTACGC
 TAGAATCCGGAGGTGGATTGGTTCACCCGGAGGAAGCTTAAAGCTTTCATGCCCGCATCCGATTCACCTTCAATAAGTACGC
 AATGAATTGGGTAGACAGGCACCAGGTAAAGGGTTGGATGGGTGGCACGCATTAGGTCTAAATACGATTACAAAGGACGACGA
 CGACAAGCTGACAGCGTAAAGACCGGATTTACGATAAGCCGGGATGATCTAAGAACACTGCTTATTTCAGATGAATAATTT
 GAAGACCGAGGATACTGCTGCTATTATTGCTCCGCCACGGTAAATTTGGTAACTCTTACATTAGCTATTGGCGGTATTGGGGG
 CAGGGCACTCTGGTACCGTCTCATCTGGCGGAGGGGGCAGTGGCGCGGTCCAGAGGTTCAACTTGTGAGTCTGGAGGGCGGT
 CTCGTACAACCGGGGAATAGTCTCCGACTCTCTTGGCTGCGTCCGGGTTCACGTTCTCAAAGTTGGGATGCTTGGGTAGGCA
 AGCCCCAGGTAAAGGCACTCGAATGGGTACAGCAGCATCTCAGGCTCCGGCAGAGACAGTGTATGCCGAAAGTGTCAAAGGGAG
 GTTCACAATCTCTCGGACAAATGCAAAACCACTTGTATCTCAAATGAATCACTCCGGCTGAGGACACAGCAAGTTACTAC
 TGTACGATAGGAGGTCCCTTAGCGTATCTTCTCAGGGAACTTTGGTAAACGGTCAAGCTCCACCAACCATCATCATCAC
 SEQ ID NO: 93

图54AA

TATCTGGCATAGCTGGAGGGCGACTCCACTGGTTACGCAGATTCCGTCAAAGGGCGGTTTACGATCTCTCGGGATAACGGCA
 AGAATACCGTTGATCTCCAAATGAACCTCTCTTAAACCCGAGGATACAGCAATATATCTATTGCGCCGCCGCTGCGGGGTACGCCTG
 GTATGGCACATTGTACGAATATGACTATTGGGGTCAAGGTACCCAGTAACGGTCAAGTTCGGTGGTGGGGGTCTGGTGGTGG
 ATCCCAAACAGTTGTTACTCAGGAGCCATCCTTGACAGTATCCCCCGGTGGAACGGTGACCCCTGACATGCGCTTCAAGTACAGGT
 CCTGTAACTTCAGGTAACTAACCCGAATTGGGTGCAGCAAAACCTGGACAAGCACCCCGGGTCTTATCGGGGGACGAAGTTC
 TTGGTACCCGGTACCCCTGCGGCTTCAGCGGAAGTCTTCTGGGTGGAAAGCCGCTTGACCTTGICAGGGGTTCAGCCCGAAAG
 ATGAGGCCGAATATTATGACGCTGUGGTATCTAACCGTGGGTCTTCGGAGGAGGACGAACCTTACTGTACTTGGAGGGCG
 CCGTGACTACAAGGACGACGATGACAAAGGCGCGGCAGCGAGGTCCAGTTGGTAGAATCCGGAGGTGGATTGGTTCACCCGG
 GAGGAAGCCTTAAGCTTTCATGCGCCGCATCCGGATTCACTTICAAATAGTACGCAATGAATTGGGTAGACAGGCACCAAGGTA
 AAGGGTTGGAATGGGTGGCAACGCATTAGGTCTAAATACGATTACAGGACGACGACGACAAAGCTGACAGCGTAAAGACCGA
 TTTACGATAAGCCGGATGATCTAAGAACACTGCTTATTTGCAGATGAATAATTTGAAGACCGAGGATACTGCTGTCTATTATT
 GGTCCGCCACGGTAATTTGGTAACTCTTACATTAGCTATTGGCGTATTGGGGCAGGGCACTCTGGTCAACCGTCTCATCTGGC
 GGAGGGGCAGTGGCGGCGGTTCAGAGGTTCAACTTGTCGAGCTGGAGCGGTCTCTGTACAACCGGGGAATAGTCTCCGACTC
 TCTTGGCGTGGTCCGGTTCACGTTCTCAAAGTTTGGGATGCTTGGGTAGGCAAGCCCAAGGTAAAGGACTCGAATGGGTCA
 GCAGCATCTCAGGCTCCGGCAGAGACACGTTGTATGCCGAAGTGTCAAAGGGAGGTTTCACAATCTCTCGGGACAAATGCAAAA
 CCACCTTGATCTCCAAATGAACCTCACTCCGGCTGAGGACACAGCAGTTTACTACTGTACGATAGGAGGGTCCCTTAGCGTATC
 TTCTCAGGGAACTTTGGTAACGGTCAGCTCCACCAATCATCATCAC SEQ ID NO: 95

图54AC

Pro25 -- aGFP sdAb -- aCD3 Vh -- 25597122ggs - aCD3 Vh -- H6 (aGFP Pro6)
 QVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQAPKREWEVAGMSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNVTYVYLQMNSL
 KPEDTAVYYCNVNVEFEYWGQGTQVTVSSGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPCKGLEW
 VARIRSKYNNTYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFNGSYISYWAYWGOQGITLVTVSSGGGGDYK
 DDDDKGGGSQTVVTOEPSLIVSPGGITVLICGSSTGAVTSGNYPNWVQOKPGQAPRLIGDYNDDDDDKGTPARESGSLGGKAAALT
 SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTLVHHHHHH SEQ ID NO: 96

 CAGGTACAGTTGGTAGAAAGCGCGCGGTGCATGGTACAAACCCGGCGGCTCTTGAGGCTCAGCTGCGCGCGGTCCGGCTTTCCG
 GTTAACCGCTATTCTATGAGATGGTACAGGCCAAGCACCGGGCAAGAACCGGAGTGGGTCCAGGTATGAGCAGCGCGGGAGA
 CCGATCTCCTATGAAGACTCCGTTAAAGGTAGGTTTACCATAGTCGAGACGATGCTAGAAACACGGTGTACCTTCAGATGAAT
 AGTTTGAAACCAGAAAGATACGGCCGTGTATTATGTAAATGTGAACGTAGGGTTCGAGTACTGGGGGCAAGGAACACAGGTTACC
 GTGAGCAGCGGAGCGGATCTGGCGCGGTCTGAGGTTCAACTTGTTGAAAGTGGAGGAGGTCTCGTTCAACCCGGTGGTCTC
 TTAAACTGAGCTGCCAGCCAGTGGGTTCACATTCATAATAATATCCGATGAACCTGGGTCCCGCAGGCTCCAGGCAAGGCCCTGG
 AATGGTCCGCCGGATCAGGTCTAAATACAAATAATTATGCCACCTATTATGCCGATAGTGTCAAAGATCGCTTACGATATCTAG
 AGATGACTCAAAGAACACAGCGTACCCTGCAATGAATAACCTGAAACAGAGACACAGCTGTATATTATTGTGTACAGACATGG
 TAAATTTGGGAACAGTTACATCAGCTACTGGGCTTATTGGGGACAAGGAACCTCGTGACTGTCTCTGGAGGAGCGGAGAT
 TACAAAGACGACGATGACAAGGCGCGGCTCACAACTGTGCTACACAGGAACCTTCCCTCCTACTGTTAGCCCGCGCGGACA
 GTCACACTTACTTGTGGAGTAGCACCGGAGCCGTAACTCCGGAAACTATCTAAATTGGGTACAGCAGAAACCGGCCAGGCT
 CCTAGAGGCTTGATGGGATTAATAAGGATGATGATGATAAGGCGACGCCGGCTAGGTTCTCTGGTCTTCTGCTGGCGGGAAG
 GCGCTCTTACGTTGTCTGGGTGACGCTGAGGACGAAGATAATTACTGTGTCTCTGGTATTCATAATCGATGGGTGTTTG
 GTGGAGGAACAAAGTTGACTGTACTGCACCACCATCATCAAT SEQ ID NO: 97

图54AD

Pro26 - aCD3 Vh1 - gggg¹¹²²²²²²²² - aCD3 V1 - aGFP sIdAb - H6 (aGFP Pro7)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTENKYAMNWVRQAPGKGLEWVVARIRSKYDYKDDDEKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ
 MNILKTEDTAVYYCYVRHGNFGNSYISYWAWGQGTLVTVSSGGGDDYNDDDEKGGGSQTVVTQEPSLTVSPGQTVTLTGSSTGA
 VTSGNYPNWVQOKPGQAPRGLIGGTLKFLAPGTPARFSGSLGGKAAALTLSCVQPEDEAEYCYVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGS
 GGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQAPKEREWVAGMSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNIVYLQ
 MNSLKPEDTAVYYCNVNVGFYWGQGTQVTVSSHHHHHHH SEQ ID NO: 98

 GAAGTACAGCTCGTTGAGTCCGGAGGGCGCTCGTTCAGCTGGAGGGTCTCTTAAGCTTCTTGTGTCAGCATCTGGATTACGTT
 TAATAAATATGGCGATGAACTGGGTGGCCCAAGCACCCGGAAGGGGCTCGAATGGGTAGCACCGAATCAGGAGCAAGTATGACT
 ACAAGATGACGACGACAAGCTGACTCCGTTAAGACAGATTACGATTTCACGAGACGACAGCAAGAATACGGCGTACCTTC
 AATGAATAATCTTAAACGGAGGATACCGCAGTTTATTATGGGTGAGGCATGGTAACCTTCGGGAACCTTTACATTAGCTACTG
 GGCTTATTGGGTCAAGGGACATTTGGTGACGGTCTCCGGTGGCGCGGAGACTATAAAGATGACGACGACAAAGGGGGCGG
 GTCTCAGACAGTAGTTACACAGGAGCTAGTCTTACCGTATCACCCGGTGGGACCGTAACCTTACCTGGGTCTTCTTACGGGC
 GCAGTAACGTCCGGGAATTACCCGAACCTGGGTTCAGCAAAACCCGGGACAGCTCCGAGGGCCCTCATTTGGTGGTACTAAATTC
 CTCGCACCTGGCACACCTGGCGGTTTTCAGGGAGCTTGCTCGAGGCAAGCGGCCCTGACATTGTCCGGGCTTCAACCGGAGG
 ACGAAGCTGAGTACTATTGCGTACTGTGGTATAGCAATAGGTGGGTATTGGTGGTGGTACGAAGCTCACGGTCTTGGGGGAG
 GCGGCTCTGGGGAGGAGCCAGGTGCAGCTGTGTAATCTGGTGGTGCCCTTGTCAGCCCGGAGGAAGTCTTCGACTCAGTTG
 CGCAGCATCTGGCTTTCGGGTGAATCGATATTCATGCGGTGGTACCGACAGGCGCTGGAAGAAGAACGCGAGTGGGTTCAGG
 TATGAGTTCTGCTGGGATCGGAGTTCCTACGAGGATAGTGTGAAGGGCAGATTACTATTAGTCTGAGATGATGCGCGAATACG
 GTGTACTTGCAGATGAACAGCTGAAAGCCGGAGGATACAGCAGTTTATTATGTGAATGTCAACGTCGGATTGTGAATACTGGGGC
 AGGGGACACAAGTTACTGTAGGCTCACATCATCATCATCAC SEQ ID NO: 99

图54AE

172

Pro28 -- aCD3 Vh -- *ggggg* -- aCD3 Vh -- aGFP sAb -- H6 (aGFP Pro10)
 QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNVWVQKPGQAPRGLIGDYKDDDDK%GTPARFSGSLGGKAAALTLSGVQPEDEA
 EYYCVLWYSNRWVFGGGLKLVLDGGGTYKDDDDK%GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAAGFTENKYAMNWVVRQAPGKGL
 EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFNGSYISYWAYWQGGLVTVSSGGGGS
 GGSQVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQAPGKEREWVAGMSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNTVYLQ
 MNSLKPEDTAVYYCNVNVGFYWGQGIQVTVSSHIIHHH SEQ ID NO: 102

 CAAACCGTTGTACCCAAAGAGCCTAGTTTGACAGTTTCTCCCGGTGGGACAGTCACCTTTGACTTGTGGATCATCCACGGGAGCTG
 TGACCTCAGGGAACCTACCCGAATTGGGTTCAGCAGAGCCCTGGACAGCCACAGGTTTGATAGGAGATTACAAAGATGACG
 ATGATAAAGGCACCCCGCTCGATTTCAGTGGGTCTCTCTTGGCGGGAAGGCTGCTCTCACCTTGAGCGGGGTGCAGCCAGAGG
 ATGAAGCTGAGTACTACTGCGTCTCTGTGGTATAGCAACCGGTGGGTTTTCGGAGGGGTACGAAATTGACTGTCTTGTACAAACCGG
 GGGTGACTATAAGGATGACGACGATAGAGGCGGTGGGCTGAGGTCCAACTCTGGGAAAGTGGAGGAGGTCTTGTACAAACCGG
 GCGGGTCACTTAAGCTCAGTTCCCGGCTCAGGCTTCACCTTCAATAAGTATCCATGAACCTGGGTGAGACAGGCTCCCGGAAA
 GGGACTTGAATGGGTGCGCCGAATTAGGCTAAGTATACAAATTACGCAACCTATTACGCTGATTCAGTAAAGACCGGTTTACA
 ATTTCACGCGACGATAGTAAGAACACCGCATATCTCCAGATGAATAACTTGAAGACCGAGGATACCTGCCGTATATTAATTGTCTC
 GACATGGCAATTTGGAACCTCATATATAAGCTACTGGGCTACTGGGGCAGGGTACTCTTGTACCGTATCTTCTGCGGGTGG
 AGGTTACAGGGGCGGTTCACAGTTCAACTGGTAGAAAGCGGGGTGCTTTGGTGCACCCCGGTGCTCACTGCATTGTCTCTGT
 GCGGCTTCAGGTTTCCCGGTAAACCGGTACTCCATGAGATGGTATCGACAGGCGCGGCGCAAGGAACGCGAGTGGTTGCAGGG
 ATGTCTAGCGCGGTGATCGGTCTTCTTACGAAGATTACAGTCAAGGACGATTCACATCTCCCGGATGACGCGAGGAACACTG
 TATACCTGCAATGAACTCTTAAGCCCGAAGACACCGCTGCTACTACTGTAACGTAAATGTCCGGGTTCGAGTACTGGGGCCA
 AGGCACCAAGTGACGGTTTCCAGTCACCAACCAATCATCAC SEQ ID NO: 103

图54AG

Pro29 - aEGFR D12 sdAb - aCD3v1 (2B2) - gggg[23]gggs - aCD3Vh[23] - aHSA (10GE) - His6
 QVKLEESGGGSVQFGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFQAPGKEREFVSGISWRODSTOYADSVKORFTISRDNAKNTVDLQMNSLK
 PEDTAIYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWQQGTQVTVSSGGGSGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQ
 KPGQAPRGLIGGTFKFLVPGTPARFSGSLGKKAALTLSCVQPEDEAEYCYTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDYKDEDDKGGGSE
 VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFIFENKSAAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATAYAAASVKNDRFTISRDDSKNTAYLQMNIN
 LKTEDTAVYYCVRRHGFNFSYIAFWAYWQQGTLVTVSSGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFIFSKFQMSWVRQ
 APGKGLEWVSSISGSRDITLYAESVKGRFTISRDNAKITLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGLTVTVSSHHHHHH
 SEQ ID NO: 104

CAAGTCAAACTTGAGGAAGCGGGGAGGTAGCGTACAGACTGGTGGATCTCTGAGTTGACTTGGCCCGCCAGTGGCCGAACA
 TCCAGAAGTTACGGATGGGTGGTTHCGACAGGCTCCGGGAAAAGAGCGGGAGTTTGTATCTGGCATAAGCTGGAGGGCGAC
 TCCACTGTTACGCAGATTCGGTCAAGGGCGGTTACGATCTCTCGGGATAACGGGAAGAATACCGTIGATCTCCAAATGAAC
 CTCTTAAACCCGAGGATACAGCAATATACTATTGCGCCGCCGCTGCGGGGTACAGCTGGTATGGCACATTGTACGAATATGACTA
 TTGGGGTCAAGGTACCCAAAGTAAACGGTACGTTCCTGGTGGTGGGGTCTGGTGGTGGATCCCAACAGTTGTTACTCAGGAGCC
 ATCCTTGACAGTATCCCCCGGTGAACGGTGACCTTGACATGCGCTTCAAGTACAGTGTCTGAACCTCAGGTAACTACCCGAAT
 TGGGTCCAGCAAAACCTGGACAAAGCAACCCGGGCTTATCAGGGGGACGAAGTTCTTGGTACCGGGTACCCCTGCGCGCTTC
 AGCGGAAGTCTCTGGTGGAAAGCGCGCTTGACCTTGTCAGCGCTTACGCCGAAGATGAGGCCGAATATTATTGACCGCTGT
 GGTATCTAACCGTGGTCTTCGGAGGAGGACGAACCTTACTGTACTTGGAGCGCGGTGACTACAAGGACGACGATGACA
 AAGCGCGCGCAGCGAGTCCAGTTGGTAGAATCCGGAGTGGATTGTTCAACCGGAGGAAGCCTTAAGCTTTTCATGCGCCG
 CATCCGATTCACTTCAATAAGTCCGCAATGAATTGGTTAGACAGGCACCAGGTAAAGGGTTGGAATGGGTGGCACGCATTAA
 GGTTCAAGTACAACAACTACGCCACCGCTACGGCGCCAGCGTAAAGACCGGATTTACGATAAGCCGGGATGATTTCTAAGAACA
 CTGCTTATTGACAGATGAATAATTGAAGACCGAGGATACCTGTCTTATTATTGCTCCGCCACGGTAATTITGGTAACTCTTAC
 AFTGCCCTTTGGGCGTATTGGGGCAGGGCACTCTGGTCACTGCTCAATCTGGCGAGGGGCAAGTGGCGGGTTCAGAGGTTT
 AAATTGTGAGTCTGGAGCGGTCTCGTACAAACCGGGAAATAGTCTCCGACTCTCTTGGCTGCTCGGGTTACCGTTCTCAAA
 GTTGGGATGTCTTGGTAGGCAAGCCCCAGGTAAAGGACTCGAATGGGTCAAGCAGCATCTCAAGGCTCCGGCAGAGACAGTT
 GTAAGCGGAAGGTGCAAGGGAGGTTTACAAATCTCTCGGGACAAATGCAAAACACCTTGTATCTCCAAATGAACCTCACTCCG
 GCTGAGGACACAGCAGTTTACTACTGTACGATAGGAGGTCCTTAGCGTATCTTCTCAGGGAACCTTGGTAAACGGTACAGCTCC
 CACCACCATCATCATCAC SEQ ID NO: 105

图54AH

Pro30 - aEGFR D12 sdAb - aCD3v1 (2B2) - ggagf333ggs - aCD3Vb2222 - aHSA (J0CE) - His6
 QV KLEESGGGVQ TQGSRLTCAASGRTSRSGMGWFRQAPKREFEVSGISWRGDSFGVADSVKGRFTISRDNAKNTV D LQMNSLK
 PEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSOTVVTQEPSLTVSPGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWWVQQ
 KPGQAPRGLIGGTFKFLVPGTPARFSGSLGKKAALTLQVQPEDEAEYCYTLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGGDYKDDDDKGGGSE
 VQLVESGGGLYQPGSLKLSCAASGFTEFNKSA MNWVRQAPKGLEWVARIRSKYN NYATAYADSVKDRFTISRDSKNTAYLQMN N
 LKTEDTA VYYCVRHGNFNSYITFWAYWQQGTLVTVSSGGGSGGGSVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTESKFGMSWVRQ
 APKQGLEWVSSISGSRD TLYAESVKGRFTISRDNAKTILYLQMNSLRPEDTA VYYCTHGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
 SEQ ID NO: 106

CAAGTCAAACTTGAGGAAAGCGGGGAGGTAGCGTACAGAC TGGTGGATCTCTGAGGTGACTTGC GCGCGCCAGTGGCGCGAACA
 TCCAGAAGTTACGGGATGGGTGGTTCACAGGCTCCGGGAAAAGAGCGGGAGTTTGTATCTGGCATAAGCTGGAGGGCGGAC
 TCCACTGGTTACGCAGATTCCGTCAAAGGGCGGTTACGATCTCTGGGATAACGGGAAGAATACCGTTGATCTCCAAATGAAC T
 CTCTTAAACCCGAGGATACAGCAATATACTATTGCGCCGCCGCTGCGGGTCAGCTGGTATGGCACATTGTACGAATATGACTA
 TTGGGGTCAAGGTACCCCAAGTAACGGTCAGTTCGGTGGTGGGGGTCTGGTGGTATCCCAAACAGTTGTTACTCAGGAGCC
 ATCTTTGACAGTATCCCCGGTGAACGGTGACCTGACATGCGCTTCAAGTACAGGTCTGTAACTCAAGTAACTACCCGAAT
 TGGGTGCAGCAAAACCTGGACAAGCACCCCGGGTCTTATCGGGGGACGAAGTTCTTGGTACCGGGTACCCCTGGCGGCTTC
 AGCGGAAGTCTTCTGGGTGAAAGCGCGCTTGACCTTGTCAGCGGTTACGCCGAAGATGAGCCGGAATATTTATGCACTGCTGT
 GGTAFTCTAACCGTGGTCTTCGGAGGAGGACGAACCTTACTGTACTTGGAGCGCGGTGACTACAAGGACGACGATGACA
 AAGCGCGCGCAGCGAGGTCAGTTGGTAGAATCCGAGGTGGATTGGTCAACCGGAGGAAGCCTTAAGCTTTTCATCGCGCG
 CATCCGGATTCACTTCAAATAAGTCCGCAATGAATTGGTTAGACAGGCACCAAGGTAAAGGGTTGGAATGGGTGGCACGCATT A
 GGTCCAAGTACAACAAC TACGCCACCCCTACGCCGACAGCGTAAAGACCGGATTTACGATAAGCCGGGATGATTTCTAAGAACA
 CTGCTTATTGACAGATGAATAATTGAAGACCGAGGATACTGCTGCTATTATTGGCTCCGCCACGGTAATTTGGTAACTCTTAC
 ATTACCTTTTGGCGTATTGGGGCAGGGCACTCTGGTCACTGCTCAATCTGGCGGAGGGGCGAGTGGCGGCGGTTCAGAGGTT C
 AACTTGTGAGTCTGGAGCGGTCTCGTACAACCGGGGAATAGTCTCCGACTCTCTTGGCTGCTCCGGTTCACGTTCTCAAA
 GTTTGGGATGCTTTGGTTAGGCAAGCCCCAGGTAAAGGAGCTCGAATGGGTCAAGCAGCATCTCAGGCTCCGGCAGAGACAGTT
 GTATGCCGAAAGTGTC AAGGGAGGTTACAAATCTCTCGGGACAATGCAAAACACGCTTGTAATCTCCAAATGAAC TCACTCCG
 GCTGAGGACACAGCAGTTTACTACTGTACGATAGGAGGTCCTTAGCGTATCTTCTCAGGGAAC TTTGGTAACGGTCAGCTCC
 CACCACCATCATCATCAC SEQ ID NO: 107

图54AI

Pro31 - aEGFR D12 - dAb - aCD3v1 (2B2) - ggagT3snggs - aCD3Vh - aHSA (10GE) - His6
 QVKLEESGGSVQTCGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRAQPKGEREFVSGISWRGDSSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVLDQMNSLK
 PEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSSTGAVTSNGYNPNWVQQ
 KPGQAPRGLIGGTFKFLVPGTPARFSGSLLGKKAALTLSQVQPEDEAEYCYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDYKDDDDKGGGSE
 VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFITFSGYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKANSYATEYAAASVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNN
 LKTEDTAVYYCVRHGNAGNSAISYWAWWGQGTLYTVSSGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTSKFGMSWVRQ
 APGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLYTVSSHHHHHH
 SEQ ID NO: 108

CAAGTCAAACTTGAGGAAAGCGGGGAGGTAGCGTACAGACTGGTGATCTCTGAGGTGACTTGGCGCGCCAGTGGCGCGGAACA
 TCCAGAAGTTACGGATGGGTGGTTCACAGCTCCGGGAAAGAGCGGGAGTTTGTAICTGGCCATAAGCTGGAGGGGGGAC
 TCCACTGGTTACGCAGATTCCGTCAAAGGGCGGTTACGATCTCTGGGATAACGGGAAGAATACCGTTGATCTCCAAATGAACCT
 CTCTTAAACCCGAGGATACAGCAATATACTATTGGCCCGGCTGCGGGGTACGCTGGTATGGCACATTGTACGAATATGACTA
 TTGGGGTCAAGGTACCCCAAGTAACGGTCAGTTCGGTGGTGGGGGTCTGGTGGTGAATCCAAACAGTTGTTACTCAGGAGCC
 ATCCTTGACAGTATCCCCGGTGGACCGGTGACCTGACATGCGCTTCAGTACAGGTCGTAACTCAAGTCAAGTAACTACCCGAAT
 TGGGTGCAGCAAAACCTGGACAGCACCCCGGGTCTTATCGGGGGACCAAGTCTTGGTACCGGGTACCCCTGCGCGCTTC
 AGCGGAAGTCTTCTGGTGGAAAGCGCGCTTGACCTTGTCAGCGGTTACGCCGAAGATGAGCCGAATATTATTCACCGTGT
 GGTAATCTAACCGTGGTCTTCGGAGGAGGACGAAACTTACTGTACTTGGAGCGCGGTGACTACAAGGACGACGATGACA
 AAGCGCGCGCAGCGAGGTCAGTTGGTAGAATCCGGAGGTGATTGGTCAACCGGAGGAAGCCCTTAAGCTTTCATCGCGCG
 CATCCGGATTCACTTCAGTGGGTACGCAATGAATTGGTTAGACAGGCACCAAGGTAAAGGGTTGGAATGGTGGCACGCAATTA
 GGTCAGAGCCAAACAGCTACGCCAGTACCGGCCAGCGTAAAGAGACCGATTACGATAAGCCGGGATGATCTAAGAACA
 CTGCTTATTTCAGATGAATAATTGAAGACCGAGGATACCTGTGCTATTATTGGCTCCGCCACGGTAATGCTGGTAACTCTGCC
 ATTAGCTATTGGGCGTATTGGGCGCAGGGCACTCTGGTCACTGTCATCTGGCGGAGGGGCAAGTGGCGCGGTCAGAGGTT
 CAACCTTGTCAGTCTGGAGCGGTCTCGTACAAACCGGGGAATAGTCTCCGACTCTCTGGCTGGCTCGGGTTCAGTTCTCAA
 AGTTTGGGATGCTTGGGTAGGCAAGCCCCAGGTAAAGGAGCTCGAATGGGTACAGCATCTCAGGCTCCGGCAGAGACACGT
 TGTATGCCGAAGTGTCAAAGGAGGTTTACAAATCTCTCGGACAAATGCAAAACACCACTTGTATCTCAAATGAACCTCACTCCG
 GCTGAGGACACAGCAGTTTACTACTGTAGCATAGGAGGTTCCCTTAGCGTATCTTCTCAGGGAACCTTGGTAACCGTACAGCTCC
 CAGCACCATCATCATCAC SEQ ID NO: 109

图54AJ

Pro32 - aEGFR-D12-*sdAb* - aCD3v1 (2B2) - *ggggFls3gggs* - aCD3v1b - aHSA (J0CE) - His6
 QVKNLESGGVSQTGSLRLTCAASGRTSRSGMGWFRQAPKREFEVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNKNTVLDLQMNSLK
 PEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSQTSVTQEPSLTVSPGTVTLTCASSTGAVTSNGNYPNWVQQ
 KPGQAPRGLIGGTFKFLVPGTPARFSGSLGKKAALTLSCVQPEDEAEYCYTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDYKDDDDKGGGSE
 VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGHAMNWVROAPKGLEWVARIRSKANSYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN
 LKTEDTAIYYCVRHGANGNSYISYWAWWGQGTFLTVSSGGGSGGGSQTSVTQEPSLTVSPGTVTLTCASSTGAVTSNGNYPNWVQQ
 APKQGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCYTIGGSLSVSSQGTFLTVSSHHHHHHH
 SEQ ID NO: 110

CAAGTCAAACTTGAGGAAAGCGGGGAGGTAGCGTACAGACITGGTGGATCTCTGAGGTGACITGCCCCGCCAGTGGCCGAACA
 TCCAGAAGTTACGGGATGGGTGGTTCACAGGCTCCGGGAAAGAGCGGGAGTTTGTATCTGGCATAAAGCTGGAGGGCGGAC
 TCCACTGGTTACGCAGATTCGGTCAAAGGGCGGTTACGATCTCGGGATAACGCGAAGAAATACCGTTGATCTCCAAATGAAC
 CTCTTAAACCCGAGGATACAGCAATATATCTATTCGCCCGCGCTGCGGGGTACGCTGGTATGGCACATTGTACGAATATGACTA
 TTGGGGTCAAGGTACCCAAAGTAAAGGTACGTTCCGGTGGTGGGGTCTGGTGGTATCCAAACAGTTGTTACTCAGGAGCC
 ATCCTTGACAGTATCCCCGGTGAACGGTGACCTGACATGCCCTTCAAGTACAGGTGCTGAACCTCAGGTAACTACCCGAAT
 TGGGTGCAGCAAAACCTGGACAAAGCACCCCGGGTCTTATCGGGGGACGAAGTTCTTGGTACCGGGTACCCCTGGCGGCTTC
 AGCGGAAGTCTTCTGGTGGAAAGCGCGCTTGACCTTGTCAGCGGTTACGCCGAAGATGAGCCGAATATTTATTCACCGTGT
 GGTAATCTAACCGTGGGTCTTCGGAGGAGGACGAACCTTACTGTACTTGGAGCGCGGTGACTACAAGGACGACGATGACA
 AAGCGCGCGCAGCGAGGTCAGTTGGTAGAATCCGAGGTGGATTGGTCAACCGGAGGAAGCCCTTAAGCTTTTATCGCGCG
 CATCCGGATTCACCTTCAGTGGCACGCAATGAATTGGGTAGACAGCCACCAAGTAAAGGGTTGGAATGGGTGGCACGCAATTA
 GGTTCAAGGCCAACAGCTACGCCACTACTACGGGACAGCGTAAAGACCGAATTTACGATAAGCCGGGATGATTTCTAAGAACA
 CTGCTTATTGCAATGAATAATTGAAGACCGAGGATACTGCTGTCTATTATTGGTCTCCGCCACGGTGTAAATGGTAACTCTTAC
 ATTAGCTATTGGCGTATTGGGCGCAGGGCCTCTGGTACCGTCTCATCTGGCGGAGGGGCGAGTGGCGGGGTACAGAGGT
 CAACCTTGTCAGTCTGGAGCGGTCTCGTACAAACCGGGAATAGTCTCCGACTCTCTGGCGTGGTCCGGGTTCAGTTCTCAA
 AGTTTGGGATGCTTGGGTAGGCAAGCCCCAGGTAAGGGACTCGAATGGGTACAGCATCTCAGGCTCCGGCAGAGACACGT
 TGTATGCCGAAGTGTCAAAGGAGGTTTCAATCTCTCGGGACAAATGCAAAACACCTTGTATCTCAAATGAACCTCAGTCCG
 GCTGAGGACACAGCAGTTTACTACTGTACGATAGGAGGTCTCTTAGCGTATCTTCTCAGGGAACCTTGGTAAACGGTCAGCTCC
 CAGCACCATCATCATC SEQ ID NO: 111

图54AK

Pro39 (MMP9) - aEGFR G8 sAb - aCD3 Vh (2B2) - 300PQAGNSGLPGS - aCD3VI - aHSA (10GE) - Hh86
 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSSYAMGWERQAPGKEREFVAINWSSGSTYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSL
 KPEDTAVYYCAAGYQINSNYNFKDYEDYWGGGTQVTVSSGGSGSGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINW
 YRQAPGKOLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNILKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAWWGQGTILV
 TVSSSGRGPAGMKLFGNQIVTVTQEPSLTVSPGGIVLTCGSSIGAVTSGHYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTSNKHSWTPARFSGSL
 GSKAALTSLGVQPEDEAEYYCYLVWGSRRWVFGGGLKLVLGSGSGSGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWV
 RQAPGKLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQQGLVTVSSHHHHHH
 SEQ ID NO: 112

GAAGTICAACCTGGTGAATCCGGTGGCTTGTCTCCAGCGGGAGGCTCCCTTCGACTGCTTGTGCGCGCCAGCGGTCGCACAT
 TCAGCAGTTATGCCATGGGATGGTTCGGCAGGCCCTTGGTAAGAGCGGGAGTTCGTGTTCCGATCAATGGAGTAGCGGTTC
 CACGTATTATGCGGATTCGTAAAGGGCAGGTTCATATCTCACCGGATAATGCAAAAATACCATGTATCTCAGATGAACCTCA
 CTGAAGCCCGAGGACACGGCAGTTTATTACTGTGCTGCCGTTACCAAGATCAATTCGGGAATACAAATTCAGGACTACGAGT
 ACGATTATTGGGGTCAGGGCACCCAGGTAAACCTCAGCAGCGGGAGCGGATCAGGAGCGGTCAGAGGTTCAGCTCGTTG
 AGAGTGGTGAGGGCTGGTTCAGCCAGGGGAAGTTTGAAGCTTTCCTGTGCGGCTCTGGTTCACCTTTAACAAATACCGTAT
 CAACTGGGTACGACAAAGCCCCCGTAAAGGGCTTGAATGGGTTCAGAAATACCGAGTAAATACAAATATATGGGACTTATTA
 TGCCGATCAAGTAAAGGACCGCTTACTATCTCTGAGATGACTCTAAGAACACTGCTATTTGCAGATGAACAATCTTAAACA
 GAGGACACAGCGGTACTATTGTGTAGACAATGCCAACTTTGGAACAGCTATATAGCTATTTGGCTTACTGGGGCAGGGC
 ACTCTGTACACCGTCAGTTCCTCTGGGGGCCAGGGCCAGCGGCAATGAAAGGCTTCGGGATCCAGACTGTGGTAAACACAG
 GAACCATCTTTGACAGTAAGTCTGGAGGTACGGTCACGCTCCTTGTGGTCTCAACCGGGCTGTAACTGACGGCCATTACC
 CTAACCTGGGTCCACAGAGCTGGACAAGCTCCAGGGTCTGATAGCGGAACCTTCAACAGCACTCTTGGACTCCAGCGC
 GCTTTAGCGGTTCCTCTGGGTGGAAAGCAGCCCTCACTCTGAGTGGAGTACACCCGAGGATGAGCGGAATATATTTCGT
 GCTCTGGGTTCAGCCGCTGGGTCTTCGGTGGCGGTACGAAACTTACTGTACTGGGGAGCGGCTCAGCGCGGATCAGA
 AGTGCAGCTTGTGAATCTGGCGGAGGTCTGGTCCAGCCAGGTAAACAGCTTGAGACTGTCTGTGCTGCAAGCGGCTTTACCTTC
 TCTAAATTCGGTATGAGTTGGGTTCGGCAAGCCCCCTGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTATCAAGCAATTAGTGGTCTGGGCGAGATA
 CACTCTATGCCGAATCAGTGAAGGCGCGTTTACCAATAGTAGGATACCGTAAACTACTCTGTATCTGCAAAATGAATAGTCT
 GAGACCAGAAAGATACGCGGTACTACTGACAAATAGGGGATCTCTGAGCGTTTCACTCAAGGTACACTTGTGACTGTTAGC
 AGTCATCATCATCACCAC SEQ ID NO: 113

图54AL

Pro40 (MMP2) - aEGFR D12 sdAb - aCD3v1 (2B2) - SGGPQPAQMKGLPGN - aCD3v1b2222 - aHSA (10GE) - His6
 QVKNLESGGGSVQTGSLRLTCAASGRTSRSYGMWFRQAPGKREFVSIGISWRDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVLDLQMNLSLK
 PEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWQQGTQVTVSSGGGSGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGITVLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQ
 KPGQAPRGLIGGTFKFLVPGTIPARFSGSLGKKAALTLSQVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGLKLTIVLSGGPQPAQMKGLPGSEVQ
 LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGYAMNWVROAPGKGLEWVARIRSKANSYATIEY AASVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLSLK
 TEDTAIYYCVVRHGNAGNSAISYWAYWQQGTLVTVSSGGGSGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGITVLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQAP
 GKGLEWVSSISGSRDITLYAESVKGRFTISRDNAKTTLVYLMNLSLRPEDTAIYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHHH
 SEQ ID NO: 114

CAAGTCAAACTTGAGGAAGCGGGGAGGTAGCTACAGACTGGTGGATCTCTGAGGTGACTTCGCCCGCCAGTGGCCGAACA
 TCCAGAAGTTACGGGATGGGTGGTTCGACAGGCTCCGGGAAAGAGCGGGAGTTTGTATCTGGCATAAGCTGGAGGGGGGAC
 TCCACTGGTTACGCAGATTCCGTCAAAGGGCGGTTACGATCTCTCGGATAACGCGAAGAATACCGTTGATCTCCAAATGAACCT
 CTCTTAAACCCGAGGATACAGCAATATACATATTCGCCCGCGCTGCCGGGTACAGCTGGTATGGCACATTGTACGAATATGACTA
 TTGGGGTCAAGGTACCCCAAGTAAAGGTACGTTCCGGTGGTGGGGGTCTGGTGGTGGATCCCAAACAGTTGTTACTCAGGAGCC
 ATCCTTGACAGTATCCCGCGTGAACGGTGACCTGACATGCCCTTCAAGTACAGTCTGTAACTTCAGGTACCTCAGGTAACTACCCGAAT
 TGGGTGCAGCAAAACCTGGACAAGCAACCCCGGGTCTTATCGGGGGGACGAAGTTCTTGGTACCGGGTACCCCTGGCGGCTTC
 AGCGGAAGTCTTCTGGTGGAAAGCGCGCTTGACCTTGTCAGCGGTTACGCCGAAGATGAGCCGAATATTTATTCACGCTGT
 GGTATTTCAACCGTGGGTCTTTGGGGGTGGTACGAAGTTGACCGTCTCAGCGGTGGCCAGGACAGCAGGTATGAAGGGGT
 TGCCCGGCTCAGAAATCCAGTTGGTAGAATCCGGGGGACGTGTTCAACAGGAGGTAGTTTGAAGCTTTCATGGCGCCGAT
 CCGGATTCACCTTCAGTGGTACGCAATGAATTGGTTAGACAGGCACCAAGGTAAAGGGTTGGAATGGGTGGCACGCATTAGGT
 CCAAGGCCAACAGCTACGCCACCGAGTACCGGCCAGCGTAAAGAGCCGATTTACGATAAGCCGGGATGATTTCTAAGAACAATG
 CTTAATTTGCAGATGAATAATTTGAAGACCGAGGATACTGCTGCTATTAATTCGTCGCCACCGTAAATGCTGGTAACTCTGCCAAT
 AGCTATTGGCGTATTGGGGCAGGGCACTCTGGTCAACCGGGAATAGTCTCCGACTCTTGGCTGCGTCCGGGTCAGAGGTTCAA
 CTGTGCGAGTCTGGAGCGGTCTCGTACAACCGGGGAATAGTCTCCGACTCTTGGCTGCGTCCGGGTCAGGTTCCTCAAAGTT
 TGGGATGCTTGGGTAGGCAAGCCCAAGTAAAGGACTCGAATGGGTACGACATCTCAGGCTCCGGCAGAGACACGTGTGA
 TGCCGAAGGTGCAAGGGAGGTTCACAACTCTCGGGACAAATGCAAAACACACTTGATCTCCAATGAACCTCCTCCGGCT
 GAGGACACAGCAGTTTACTACTGTACGATAGGAGGGTCCCTTAGCCGTATCTCTCAGGGAACCTTTGGTACCGGTACGCTCCACC
 ACCATCATCATCAC SEQ ID NO: 115

图54AM

Pro11 (Mem) - aEGFR G8 sdAb - aCD3 Vh (2B2) - SGGGKSLADETEGGG - aCD3V1 - aHSA (10GE) - His6
 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTESSYAMGWERQAPGKEREFVVAINWSSGSTYVADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSL
 KPEDTAVYYCAAGYQINSNYNFKDYEYDWGQGTQVTVSSGGSGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINW
 VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAWYWGQGTLV
 TVSSGGGKKSLADETEGGGSDIVVTQEPSLIVSPGGTIVILTCSSSTGAVTSGHYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTSNKHSWTPARFSGSL
 GSKAALTSLGVQPEDEAEYYCYVLWGSRRWVFGGTKLTVLGGGSGSGGSEVQLVESGGGLVQPGNLSRLSCAASGFTFSKFGMSWV
 RQAPGKGLEWVSSISGSRDITLYAESVKGRFTISRDNAKTTLVYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLVSSSQGLTVTVSSHHHHHH
 SEQ ID NO: 116

GAAGTTCAACTGGGTGAATCCGGTGGTGGCCCTTGTCAGGCGGGAGGCTCCCTTCGACTGCTTGTGGCCGCCAGCGGTCGCCACAT
 TCAGCAGTTATGCCATGGGATGGTTCGGCAGGCCCTTGGTAAGAAGCGGGAGTTCGTCGTCGCAATATGGAGTAGCGGTTC
 CACGTATTATGCGGATTCGTAAAGGCGAGGTTCACATCTCACCGGATAATGCCAAAATAACCATGTATCTCAGATGAACCTCA
 CTGAAGCCCAGGACACGGCAGTTTATTACTGTGCTGCCGTTACCATGATCAATTCGGGAATTACAAATTCAGAGGACTACGAGT
 ACGATTATTGGGTACAGGCACCCAGGTAAACGTCAGCAGCGGGAGCGGATCAGGAGCGGTTCAGAGGTTCAGCTCGTTCG
 AGAGTGGTGGAGGCTGGTTCAGCCAGGGGAAGTTTGAAGCTTTCCTGTGGCCCTCTGGTTCACCTTTAACAAATACGCTAT
 CAACTGGGTACGACAAGCCCCCGTAAAGGGCTTGAATGGGTTCGAAGAATACGCACTAAATACAAATATATGCGACTTATTA
 TGCCGATCAAGTAAAGGACCGCTTACTATCTCTGAGATGATTTCTAAACACCCGATATTTGCAGATGAACAATCTTAAACT
 GAGGACACCGCAGTGTATTACTGCTGGGACATGCGAATCTCGGTAACTCTTACATTTCTACTGGCGTATTTGGGCCAGGGCA
 CGCTTGACCGTTAGTCTAGCGAGGTGGTAAAGCTCGCTGACGAGCCAGAGGGAGGATCCAGACTGTGGTAACACAGG
 AACCATCTTTGACAGTAACTCTGGAGGTACGGTACGCTCACTGTGGTCTCAACCGGGCTGTAACTGTCAGGCCATTACCC
 TAACTGGGTCCAAACAGAGCTGGACAAGCTCCAGGGTCTGATAGCGGAATCTTCAAAACAGCACTCTTGGACTCCAGCGG
 CTTTACGGGTTCACGCCCTGGGTCTTCGGTGGGTACGAAACTTACTGTAGTGGAGTACAAACCGAGGATGAGCGGAATATTATTGCGTG
 CTCTGGGTTCACGCCCTGGGTCTTCGGTGGGTACGAAACTTACTGTAGTGGAGTACAAACCGAGGAGGCGGTCAAGCGCGGATCAGAA
 GTGCAGCTTGTGAAATCTGGCGAGGTCTGGTCCAGCCAGGTAACAGCTTGAGACTGTCTGTGCTGCAAGCGCTTACCTTCT
 CTAAATTCGGTATGAGTTGGGTTCGGCAAGCCCTCGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTATCAAGCAATTAGTGGTCTTGGCGAGATAC
 ACTCTATGCCGAATCAGTGAAGGCCCGCTTACCAATTAGTAGGGATAACGCTAAAACCTACTCTGTATCTGCAATGAATAGTCTG
 AGACCAAGAGATACCTCCGTTTACTACTGCAATAAGGGGATCTCTGAGCGTTTCACTCAAGGTACACTTGTGACTGTGTTAGCA
 GTCATCATCATCACCCAC SEQ ID NO: 117

图54AN

Pro42 (Mep) - aEGFR D12 sdAb - aCD3v1 (2B2) - SGGGKKLADPEEGG - aCD3vH - aHSA (10GE) - His6
 QVKLEESGGSVQTGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFQAPKEREFSGISWRGDSSTGYADSVKQRFTRSDNAKNTVDLQMNLSLK
 PEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSGGGSGGSGQSVTVTOEPSLTVSPGGTVTLTCASTGAVTSGNYPNWWVQQ
 KPGQAPRLIGGKFLVPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFQGGIKLTVLSGGGKKLADPEEGGSEVQ
 LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGYAMNWVRQAPGKGLWVARIRSKANSYATEYAASVKDRFTHSRDDSKNTAYLQMNLSLK
 TEDTAVYYCVVRHGNAGNSAISYWAYWGQGTILTVSSGGGSGGSGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTSFSGFQMSWVRQAP
 CKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKQRFTRSDNAKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLVSSSQGTILTVSSHHHHHH
 SEQ ID NO: 118

CAAGTCAAACTTGAGGAAAGCGGGGAGGTACCGTACAGACTGGTGATCTCTGAGGTGACTTGCGCCGCCAGTGGCCGGAACA
 TCCAGAAAGTTACGGGATGGGTGGTTTCGACAGGCTCCGGGAAAGAGCGGGAGTTGTATCTGGCCATAAGCTGGAGGGCGGAC
 TCCACTGGTTACCGAGATCCGTC AAGGGCGGTTACGATCTTCGGGATAACGGGAAGAATAACCGTTGATCTCCAAATGAACCT
 CTCCTAAACCCGAGGATACAGCAATATACTATTGCGCCGCTGCGGGGTCAGCTGGTATGGCACATTGTACGAATATGACTA
 TTGGGGTCAAGGTACCC AAGTAAACGGTCAAGTTCGGGTGGTGGGGTCTGGTGGATCCCAAACAGTTGTTACTCAGGAGCC
 ATCCTTGACAGTATCCCGCGGTGGAACGGTGACCTGACATGCGCTTCAAGTACAGGTGCTGTAACTCAGGTAACTACCCGAAT
 TGGGTGCAGCAAAACCTGGAC AAGCACCCCGGGTCTTATCGGGGGGACGAAGTCTTGGTACC GGGTACCCCTGCGCGCTTC
 AGCGGAAGTCTTGGGTGGAAAGCCGCTTGACCTTGTCAGGCGTTCAGCCGGAAGATGAGCCGGAATAATATTTGCAACGCTG
 GGTATCTAACCGGTGGGTGTTGGTGGGTACAAATGACCGGTCTTGTCAGGGGTGGAAGAAGAACTGGCAGATGAACCTG
 AGGGCGTTCGAGGTTCAGCTTGTGAGAGCGGTGGCGTCTTGTC AACC GGAGGCTACTCAAGCTTTCATGCGCGGCATC
 CGGATTCACCTTCAGTGGTACGCAATGAATGGGTAGACAGGCACCAAGGTAAAGGGTTGGAATGGGTGGCACGCAATTAGGT
 CAAGGCCAACAGCTACGCCACCGAGTACCGGCCAGCGTAAAGACCGATTAACGATAAGCCGGATGATCTAAGAACAACCTGC
 TTATTGCGAGATGAATAATTGAGACCGAGGATACCTGCTGTCTATTATGCGTCCGCCACGGTAATGCTGGTAACCTTGCCATT
 GCTATTGGCGTATTGGGCGCAGGGCACTCTGGTACCGTCTCACTGGCGGAGGGGCACTGGCGGGTTCAGAGGTTC AAC
 TTGTCGAGTCTGGAGCGGTCTCGTACAAACCGGGAATAGTCTCCGACTCTTGGCTGCTGTCGGGTTCAGTTCTCAAAGTTT
 GGGATGCTTGGGTAGGCAAGCCCAAGTAAGGGACTCGAATGGGTACAGCATCTCAGGCTCCGGCAGAGACACGTTGTAT
 GCGCAAGTGTCAAGGGAGGTTC AATCTCTGGGAC AATGCAAAAACCACTTGTATCTCAAATGAACCTCCTCGGCT
 GAGGACACAGCAAGTTTACTACTGTACCATAGGAGGTCCTTAGCGTATCTTCTCAGGGAACCTTGTGTAACGGTACGCTCCACC
 ACCATCATCATCAC SEQ ID NO: 119

图54A0

Pro43 (ST14#2) - aEGFR G8 sdAb - aCD3 Vh (2B2) - CGSETRQARVVGGS - aCD3Vh - aHSA (10GE) - His6
 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTESSYAMGWERQAPGREFVAINWSSGSTYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSL
 KPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEDYWGQGTQVTVSSGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTENKYAINW
 VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHFANFNSYISYWAYWGQGTLY
 TVSSCGSETRQARVVGGSQIVVTVQEPSLTVSPGGITVLTCSSSTGAVTSGHYPNWVQKPGQAPRGLIGGTSNKHSWTPARFSGSL
 GSKAALTSLGVQPEDEAEYYCYVLWGSRRWVFGGGLKLVLGSGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWV
 RQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLVSSSQOTLVTVSSHHHHHH
 SEQ ID NO: 120

GAAGTTCAACTGGTTGAATCCGGTGGTGGCCCTGTCTCCAGGCGGAGGCTCCCTTCGACTGCTTGTGCGCCGCGGCTCGCACAT
 TCAGCAGTTATGCCATGGGATGGTTCGGCAGGCCCTCGGTAAAGAGCGGAGTGCTGCTGTTCGGATCAATGGGAGTAGCGGTTC
 CACGTATTATGCGGATTCGTAAAGGCGAGGTTCATATCTCACCGGATAATGCAAAAATACCATGTATCTTCAGATGAACCTCA
 CTGAAGCCCGAGGACACGGCAGTTTATTACTGTGCTGCCGTTACAGATCAATTCGGGAAATTACAAATTTCAAGGACTACGAGT
 ACGATTATTGGGTCAGGCAACCCAGGTAAACCTCAGCAGCGGGAGCGGATCAGGAGCGGTCAGAGGTTCAGCTCGTTG
 AGAGTGGTGAGGCTGGTTCAGCCAGGGGAAGTTTGAAGCTTTCCTGTCGGCTCTGGTTTACCTTTAACAAATACGCTAT
 CAACTGGGTACGACAAGCCCCCGTAAAGGGCTTGAATGGGTGCAAGAATACGCACTAAATACAAATATATCGGACTTATTA
 TGCCGATCAAGTAAAGGACCGCTTACTATCTCTGAGATGACTCAAGAATACAGCTTACCTTCAAAATGAATATCTGAAGACA
 GAGGATACCGCGGTGATTACTGCGTCCGACATGCCAATCTTGGAATCTTATATCTTATTGGCTTATTGGCTATTGGGTCAGGGCAC
 GTTGGTTACCGTTCTCTGGAGGTTTATCACCCGCGAGGGGAGTTGTCGGTGAGGATCCAGACTGTGGTAACACAGGAA
 CCATCTTTGACAGTAAGTCTCTGGAGGTACGGTACGGTCACTTGTGGTCTCAACCGGGCTGTAACTGTCAGGCCATTACCTTA
 ACTGGGTCCAACAGAGCTGGACAAGCTCCAGGGTCTGATAGGCGGAATCTCAACAGCACTCTTGGACTCCAGCGGCT
 TTAGCGGTTCCTTCTGGTGGAAAGCAGCCCTCACTCTGAGTGGAGTACAACTGAGGATGAGGCGGAATATTATTGCGTGTCT
 CTGGGTTACCGCGCTGGTCTTCGGTGGCGGTACGAAACTTACTGTACTGGGGGAGGCGGCTCAGGCGGGGATCAGAAAT
 GCAGCTTGTGAATCTGGCGGAGGTCTGGTCCAGCCAGGTAAACAGCTTGAGACTGTCTGTGCTGCAAGCGGCTTACCTTCTCT
 AAATTCGGTATGAGTTGGGTGGCAAGCCCTGGAAAGGGTTGCAATGGGTATCAAGCATTAGTGGTTCGGCGGAGATACA
 CTCATGCGGAATCAGTGAAGGGCGCTTACCAATTAGTAGGGATACGCTAAAGCTACTCTGTATCTGCAATGAATAGTCTGA
 GACCAGAAAGATACGTGCGTTTACTACTGCAATAAGGGGATCTCTGAGCGTTTCACTCAAGGTACACTTGTGACTGTAGCAG
 TCATCATCATCATCAACCAC SEQ ID NO: 121

图54AP

Pro44 (ST14#2) - aEGFR D12 sdAb - aCD3v1 (2B2) - GGNFTROARVVGGS - aCD3v1 (10GE) - HIs6
 QVKLEESGGSVQTGSLRLTCAASGRTSRSGMGWFERQAPKEREFSIGSWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLK
 PEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSQTVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNVVQQ
 KPGQAPRLIGGTFKFLVPGTPARFSGSLGGKAAALTLGQVQPEDEAEYCYTLWYSNRWVFGGKIKLTVLGGSTROARVVGGSSEVQ
 LVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTSGYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKANSYATHEYAASVKDRFTISRDDSENAYLQMNNLK
 TEDTAVVYCVRHGNAGNSAISYWAYWGQGTLYTVSSGGGSGGGSQVQVLESQGLVQPGNSRLSCAASGFTSKFGMSWVRQAP
 QKGLEWVSSISGSRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVVYCTHGGSLVSSQGTLYTVSSHHHHHH
 SEQ ID NO: 122

CAAGTCAAACTTGAGGAAAGCGGGGAGGTACGGTACAGACTGGTGGATCTCTGAGGTGACTTGCGCCGCCAGTGGCGGAACA
 TCCAGAAAGTTACGGGATGGGTGGTTTCGACAGGCTCCGGGAAAGAGCGGGAGTTTGTATCTGGCATAAGCTGGAGGGCGAC
 TCCACTGGTTACGCAGATCCGTCAAGGGGGGTTACGATCTTCGGGATAACGCGAAGAAATACCGTTGATCTCCAAATGAACCT
 CTCTTAAACCCGAGGATACAGCAATATATACTATTGGCCCGCGCTGCGGGTCAAGCTGGTATGGCACATTGTACGAATATGACTA
 TTGGGGTCAAGGTACCCAAAGTAAACGGTCAAGTCCGGTGGTGGGGTCTGGTGGTGAATCCAAACAGTTGTTACTCAGGAGCC
 ATCCTTGACAGTATCCCCCGGTGGAACGGTGAACCTTGACATCGGCTTCAAGTACAGTGTCTGAACCTCAGGTAACTACCCGAAT
 TGGGTGCAGCAAAACCTGGACAGCAACCCCGGGTCTTATCGGGGGACGAAGTTCTTGGTACCGGGTACCCCTGCGCGCTTC
 AGCGGAAGTCTCTGGGTGGAAGAGCGGCTTGACCTTGTCAGCGGTCAGCCGGAAGATGAGGCCGAATATTATTGCAAGCTGT
 GGTATTCTAACCGGTGGGTGGTGGAGGACGAACCTGACGGTATGGGGGATCATTTACGGCCAAAGCTAGAGTGGTGG
 GAGGTGGATCAGAGGTCCAGTTGGTTCGAGAGCGGGGGTCTGGTCCAAACAGGGGTAGTCTCAAGCTTTCATGCGCCGCAT
 CCGGATTCACCTTCAGTGGTACGCAATGAATTGGTTAGACAGGACCAAGGTAAAGGGTTGGAATGGGTGGCACGCAATTAGGT
 CCAAGGCCAACAGCTACGCCACCGAGTACCGGGCCAGCGTAAAGACCGATTAAGCCGGGATGATCTAAGAACACTG
 CTTATTTGCAGATGATAAATTTGAAGACCGAGGATACTGCTGCTATTATTGGTCCGCCACGGTAATGCTGGTAACTCTGCCATT
 AGCTATTGGGGTATTGGGGCCAGGGCACTCTGGTCAACCGTCTCATCTGGCGGAGGGGCAAGTGGCGGGTTCAGAGGTTCAA
 CTGTCTGAGTCTGGAGGGGTCTGTAACACCGGGAAATAGTCTCGACTCTCTTGGCTGGCTGGTCCGGGTTCAGTTCTCAAAAGTT
 TGGGATGCTCTGGGTAGGCAAGCCAGGTAAGGACTCGAATGGGTACAGCATCTCAGGCTCCGGCAGAGACACGTTGTA
 TGCCGAAAGTGTCAAAGGGAGGTTTCACAATCTCTCGGACAAATGCAAAACACACTTGTATCTCCAATGAACCTACCTCGGCT
 GAGGACACAGCAAGTTACTACTGTACGATAGGAGGGTCCCTTAGCGTATCTCTCAGGGAACCTTGGTAACGGTACAGCTCCACC
 ACCATCATCATCAC SEQ ID NO: 123

图54AQ

Pro45 (Thb) - aEGFR C8 sdAb - aCD3 Vh (2B2) - ~~SSGGGNNPSEKGGGS~~ - aCD3Vh - aHSA (10GE) - His6
 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTESSYAMGWERQAPGREFFVAINWSSGSTYVADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSL
 KPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEDYWGQGTQVTVSSGGSGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINW
 VRQAPGKGLEWVARIRSKYNYNATYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAWWGQGTLV
 TVSSSGGGNNPSEKGGGSQIVVTQEPSLTVSPGGIVTLICGSSIGAVTSGHYFNWVQOKPQAPRGLIGGISNKHSHWTPARFSGSLL
 GSKAALTLSGVQPEDEAEYYCYVLWGSRRWVFGGTKLTVLGGGSGSGGSEVQLVESGGGLVQPGNLSRLSCAASGFTFSKFGMSWV
 RQAPGKGLEWVSSISGSRDITLYAESVKORFTISRDNAKITLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
 SEQ ID NO: 124

GAAGTTCAACTGGTTGAATCCGGTGGTGGCCCTTGTCAGGCGGGAGGCTCCCTTCGACTGTCTTGTGGCCGCCAGCGGTCGCCACAT
 TCAGCAGTTATGCCATGGGATGGTTCGGCAGGCCCTTGGTAAGAAGCGGGAGTTCGTCGTTCGGAATCATGGAGTAGCGGTTC
 CACGTATTATGCGGATTCTGTAAAGGCGAGGTTCACTATCTCACCGGATATATGCCAAAATAATACCATGTATCTTCAGATGAATCA
 CTGAAGCCCAGGACACGGCAGTTTATTACTGTGCTGCCGTTACCCAGATCAATTCGGGAATTACAATTTCAAGGACTACGAGT
 ACGATTATTGGGTTCAGGGCACCCAGGTAAACGTCAGCAGCGGGAGCGGATCAGGAGCGGTTCAGAGGTTCAGCTCGTTG
 AGAGTGGTGAGGGCTGGTTCAGCCAGGGGAAGTTTGAAGCTTTCCTGTGGCCCTCTGGTTTCACTTTAACAAATACGCTAT
 CAACTGGGTACGACAAGCCCCCGTTAAAGGGCTTGAATGGGTTCAGAAATACGAGTAATACAAATAATATGCGACTTATTA
 TGCCGATCAAGTAAAGGACCGCTTACTATCTCTGAGATGACTCAAGAATACAGCATATCTGCAATGAACAATTTGAAAAC
 AGAAGACACGGCAGTTTATTACTGCTTAGGCACGCTAACTTCGGTAATTCATACATATATGGGCTTACGGGCGCAAGGG
 ACTTTGGTACAGTATCTCCAGCTCAGGGGTGGTATGCCCTCTTTCAGGGGGCGGATCCAGACTGTGGTAACACAGG
 AACCATCTTTGACAGTAAGTCTGGAGGTACGGTACGCTCACTTGTGGTCTCAACCGGGCTGTAACTGACGGCCATTACCC
 TAACTGGGTCCAAACAGAGCTGGACAAAGCTCCAGGGTCTGATAGCGGAATTCAAAACAGCACTCTTGGACTCCAGCGCG
 CTTTAGCGGTTCCTTCGGGTGGAAAGCAGCCCTCCTCTGAGTGGAGTACAAACCGAGGATGAGCGGAATATTATTGCGTG
 CTCTGGGGTTCAGCGCTGGTCTTCGGTGGCGGTACGAAACTTACTGTACTGGGGAGGGGCTCAGCGGCTCAGCGCGGATCAGAA
 GTGCAGCTTGTGAAATCTGGCGAGGTCTGGTCCAGCCAGGTAAACAGTTGAGACTGTCTGTCTGTCTCAAGCGCTTACCTTCT
 CTAAATTCGGTATGAGTTGGGTTCGGCAAGCCCTCGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTATCAAGCAATTAGTGGTCTTGGCGGAGATAC
 ACTCTATGCCGAATCAGTGAAGGCGCTTTACCATAGTAGGGATAACGCTAAAACACTACTCTGTATCTGCAATGAATAGTCTG
 AGACCAGAGATACCTCCGTTTACTACTGCAATAGGGGATCTCTGAGCGTTTCACTCAAGGTACACTTGTGACTGTGTAGCA
 GTCATCATCATCACCCAC SEQ ID NO: 125

图54AR

Pro46 (Thb) - aEGFR D12 s4Ab - aCD3v1 (2B2) - SSGGCMPESTRGQGS - aCD3Vh - aHSA (10GE) - His6
 QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMWFRQAPKKEFEVSGISWRGSDSTGYADSVKGRFTISRDN AKNTV DLQMNSLK
 PEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSUGGSGGGSQTSQTVTQEPSTVSPGGIVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQO
 KPGQAPRGLIGGTIKFLVPGTPARFSGSLGKKAALTLGQVQPEDEAEYCYTLWYSNRWVFGGKIKLTVLSGCGMERSFRGGGSEVQ
 LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGYAMNWVRQAPKKGLEWVARIRSKANSYAIEYAASVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK
 TEDTAIYYCVRHGNAGNSAISYWAYWGQGTQVTVSSUGGSGGGSQTSQTVTQEPSTVSPGGIVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQO
 CKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKNTV LQMNSLRPEDTAIYYCTIGGSLSVSSQGTLYTVSSHHHHHH
 SEQ ID NO: 126

CAAGTCAAACTTGACGAAAGCGGGGGAGGTACCGTACAGACTGGTGGATCTCTGAGGTGACTTGGCCGCCACGTGGCCGGAACA
 TCCAGAAAGTTACGGGATGGGTGGTTTCGACAGGCTCCGGGAAAGAGCGGGAGTTTGTATCTGGCATAAGCTGGAGGGGGGAC
 TCCACTGGTTACCGAGATCCGTC AAGGGCGGTTACGATCTCTCGGATACCGGAAGAATACCGTTGATCTCCAATGAACCT
 CTCTTAAACCCGAGGATACAGCAATATACTATTGGCCCGCTGCGGGTCAAGCTGGTATGGCACATTGTACGAATATGACTA
 TTGGGGTCAAGGTACCCAAAGTAAACGGTCAAGTCCGGTGGTGGGGTCTGGTGGATCCAAACAGTTGTTACTCAGGAGCC
 ATCCTTGACAGTATCCCCGGTGAACGGTGAACCTTGACATGCGCTTCAAGTACAGTGTCTGAACCTCAGGTAACCTACCCGAAT
 TGGGTGACGCAAAACCTGGACAAAGCACCCCGGGTCTTATCGGGGGACGAAGTTCTTGGTACCGGGTACCCCTGGCGGCTTC
 AGCGGAAGTCTTCTGGGTGGAAAGCGCGCTTGACCTTGTCAGGCGTTCAGCCGGAAGATGAGGCCGAATATTATTGACCGCTGT
 GGTATCTAAACCGGTGGTCTTCGGAGGGGTACCAAGCTGACGGTGTGTCATCTGGCGAGGTATGCCAAGGAGCTTTCGCGG
 TGGAGGCTCAGAAAGTACAACTTGTAGAAAGCGGGGGGTCTGTCTCAGCCAGCGGGAAGCCTCAAGCTTTCATGCGCGGCATC
 CGGATTCACCTTCAGTGGTACGCAATGAATTGGTTAGACAGGCACCAAGGTAAAGGGTTGGAATGGGTGGCACGCAATTAGGTC
 CAAGGCCAACAGCTACGCCACCGAGTACGCGGCCAGCGTAAAGACCGATTACGATAAGCCGGGATGATCTAAGAAACACTGC
 TTAATTGCAGATGAATAATTGAGACCGAGGATACGTCTGTCTATTATTGCGTCCGCCACGGTAATGCTGGTAACCTCTGCCATTA
 GCTAATTGGCGGTATTGGGGCAAGGCACTCTGGTCACTGCTCATCTGGCGGAGGGGCCAGTGGCGCGGGTCAAGAGGTTC AAC
 TTGTGAGTCTGGAGCGGTCTCGTACAAACCGGGAATAGTCTCTTGGCTGGTCCGGTTCACGTTCTCAAAAGTTT
 GGGATGCTTGGTTAGGCAAGCCCCAGGTAAAGGACTCGAATGGGTGAGCATCTCAGGTCGCGGAGAGACACGTTGTAT
 GCGCAAAAGTGTCAAAGGGAGGTTCAATCTCTCGGACAAATGCAAAACCACTTGTATCTCCAATGAACCTCACTCGGCTT
 GAGGACACAGCAGTTTACTACTGATACGATAGGAGGTCCTTAGCGTATCTTCTCAGGGAACCTTTGGTAACGGTCAAGCTCCACG
 ACCATCATCATCAC SEQ ID NO: 127

图54AS

SEQ ID NO. 44	Pro1 - aEGFR G8 sdAb - aCD3 Vh - His10
SEQ ID NO. 46	Pro2 - aCD3 VI - aEGFR D12 sdAb - His10
SEQ ID NO. 48	Pro3 - aEGFR G8 sdAb - aCD3 scFv - aEGFR D12 sdAb - His10
SEQ ID NO. 50	Pro4 - aEGFR G8 sdAb - aCD3 Vh - Flag - aCD3 VI - aEGFR D12 sdAb - His10
SEQ ID NO. 52	Pro5 - aEGFR G8 sdAb - aCD3 Vh - ggggFlaggggs - aCD3 VII - aCD3VhI - ggggFlaggggs - aCD3VI - aEGFR D12 sdAb - His6
SEQ ID NO. 54	Pro6 - aEGFR G8 sdAb - aCD3 Vh - ggggFlaggggs - aCD3VII - His6
SEQ ID NO. 56	Pro7 - aCD3VhI - ggggFlaggggs - aCD3VI - aEGFR D12 sdAb - His6
SEQ ID NO. 58	Pro8 - aEGFR G8 sdAb - aCD3 Vh - ggggFlaggggs - aCD3VI - His6
SEQ ID NO. 60	Pro8 MS - aEGFR G8 sdAb - aCD3 Vh - GGGLSGR/SDNHGGS - aCD3VI - His6
SEQ ID NO. 62	Pro8 ML - aEGFR G8 sdAb - aCD3 Vh - GGGSGGSLSGR/SDNHGSGSGGS - aCD3VI - His6
SEQ ID NO. 64	Pro9 - aEGFR D12 sdAb - aCD3VI - ggggFlaggggs - aCD3VhI - His6
SEQ ID NO. 66	Pro10 - aCD3VII - ggggFlaggggs - aCD3Vh - aEGFR G8 sdAb - His6
SEQ ID NO. 68	Pro11 - aEGFR D12 sdAb - aCD3VI - ggggFlaggggs - aCD3Vh - His6
SEQ ID NO. 70	Pro12 - aCD3VhI - ggggFlaggggs - aCD3VI - aEGFR G8 sdAb - His6
SEQ ID NO. 72	Pro14 - aEGFR D12 sdAb - aCD3Vh - ggggFlaggggs - aCD3VII - His6
SEQ ID NO. 74	Pro15 - aEGFR G8 sdAb - hOKT3 Vh - ggggFlaggggs - hOKT3VI - His6
SEQ ID NO. 76	Pro16 - aEGFR G8 sdAb - aCD3 Vh (2B2) - ggggFlaggggs - aCD3VII - aHSA (10GE) - His6

图55A

SEQ ID NO. 78	Pro17 ~ aHSA (10GE) ~ aCD3Vh1 ~ ggggFlaggggs ~ aCD3V1 (2B2) ~ aEGFR D12 sdAb ~ His6
SEQ ID NO. 80	Pro18 ~ aEGFR G8 sdAb ~ aCD3V1 ~ ggggFlaggggs ~ aCD3Vh1 ~ His6
SEQ ID NO. 82	Pro19 ~ aEGFR D12 sdAb ~ aCD3V1 (2B2) ~ ggggFlaggggs ~ aCD3Vh1 ~ aHSA (10GE) ~ His6
SEQ ID NO. 84	Pro19 CD3* ~ aEGFR D12 sdAb ~ aCD3V1 (2B2) ~ ggggFlaggggs ~ aCD3Vh1 ~ aHSA (10GE) ~ His6
SEQ ID NO. 86	Pro20 ~ aEGFR G8 sdAb ~ aCD3 Vh (2B2) ~ ggggFlaggggs ~ aCD3V1GL ~ aHSA (10GE) ~ His6
SEQ ID NO. 88	Pro21 ~ aEGFR D12 sdAb ~ aCD3V1 (2B2) ~ ggggFlaggggs ~ aCD3Vh1GL1 ~ aHSA (10GE) ~ His6
SEQ ID NO. 90	Pro22 ~ aEGFR G8 sdAb ~ aCD3 Vh (2B2) ~ ggggFlaggggs ~ aCD3V1 (2B2) ~ aHSA (10GE) ~ His6
SEQ ID NO. 92	Prodent 23 ~ 血清裂解成两半 aEGFR G8 sdAb ~ aCD3 Vh (2B2) ~ ggggFlaggggs ~ aCD3Vh1 ~ aHSA (10GE) ~ ggggLVPRGSLGgggs- aEGFR D12 sdAb ~ aCD3V1 (2B2) ~ ggggFlaggggs ~ aCD3Vh1 ~ aHSA (10GE) ~ His6
SEQ ID NO. 94	Prodent 24 ~ 肿瘤裂解成两半 aEGFR G8 sdAb ~ aCD3 Vh (2B2) ~ ggggFlaggggs ~ aCD3Vh1 ~ ggggFlaggggs- aEGFR D12 sdAb ~ aCD3V1 (2B2) ~ ggggFlaggggs ~ aCD3Vh1 ~ aHSA (10GE) ~ His6
SEQ ID NO. 96	Pro25 ~ aGFP sdAb ~ aCD3 Vh ~ ggggFlaggggs ~ aCD3 Vh1 ~ H6 (aGFP Pro6)
SEQ ID NO. 98	Pro26 ~ aCD3 Vh1 ~ ggggFlaggggs ~ aCD3 V1 ~ aGFP sdAb ~ H6 (aGFP Pro7)
SEQ ID NO. 100	Pro27 ~ aGFP sdAb ~ aCD3 V1 ~ ggggFlaggggs ~ aCD3 Vh1 ~ H6 (aGFP Pro9)
SEQ ID NO. 102	Pro28 ~ aCD3 Vh1 ~ ggggFlaggggs ~ aCD3 Vh ~ aGFP sdAb ~ H6 (aGFP Pro10)

图55B

SEQ ID NO. 104	Pro29 - aEGFR D12 sdAb - aCD3Vh (2B2) - ggggFlaggggs - aCD3VhIGL2 - aHSA (10GE) - His6
SEQ ID NO. 106	Pro30 - aEGFR D12 sdAb - aCD3Vi (2B2) - ggggFlaggggs - aCD3VhIGL3 - aHSA (10GE) - His6
SEQ ID NO. 108	Pro31 - aEGFR D12 sdAb - aCD3Vi (2B2) - ggggFlaggggs - aCD3VhIGL4 - aHSA (10GE) - His6
SEQ ID NO. 110	Pro32 - aEGFR D12 sdAb - aCD3Vi (2B2) - ggggFlaggggs - aCD3VhIGL5 - aHSA (10GE) - His6
SEQ ID NO. 112	Pro39 (MMP9) - aEGFR G8 sdAb - aCD3 Vh (2B2) - SGGPGPAGMKGLPGS - aCD3VhIGL - aHSA (10GE) - His6
SEQ ID NO. 114	Pro40 (MMP9) - aEGFR D12 sdAb - aCD3Vi (2B2) - SGGPGPAGMKGLPGS - aCD3VhIGL4 - aHSA (10GE) - His6
SEQ ID NO. 116	Pro41 (Mep) - aEGFR G8 sdAb - aCD3 Vh (2B2) - SGGGKKLADEPEGGS - aCD3ViGL - aHSA (10GE) - His6
SEQ ID NO. 118	Pro42 (Mep) - aEGFR D12 sdAb - aCD3Vi (2B2) - SGGGKKLADEPEGGS - aCD3VhIGL4 - aHSA (10GE) - His6
SEQ ID NO. 120	Pro43 (ST14#2) - aEGFR G8 sdAb - aCD3 Vh (2B2) - GGSFTRQARVVGGGS - aCD3ViIGL - aHSA (10GE) - His6
SEQ ID NO. 122	Pro44 (ST14#2) - aEGFR D12 sdAb - aCD3Vi (2B2) - GGSFTRQARVVGGGS - aCD3VhIGL4 - aHSA (10GE) - His6
SEQ ID NO. 124	Pro45 (Thb) - aEGFR G8 sdAb - aCD3 Vh (2B2) - SSGGGMPSFRGGGS - aCD3ViIGL - aHSA (10GE) - His6
SEQ ID NO. 126	Pro46 (Thb) - aEGFR D12 sdAb - aCD3Vi (2B2) - SSGGGMPSFRGGGS - aCD3VhIGL4 - aHSA (10GE) - His6

图55C

带正电荷的scFv连接子

名称	序列	长度	电荷	SEQ ID NO:
Gly-Ser 15	GGGGSGGGSGGGGS	15	0	44
Whitlow连接子	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	18	+1	45
6paxA_1 (+A)	IRPRAIGGSKPRVA	14	+4	46
+B	GKGGSGKGGSGKGGG	15	+3	47
+C	GGKGGSGKGGSGKGG	15	+3	48
+D	GGGKSGGGKSGGGKS	15	+3	49
+E	GKGGSGKGGSGKGGG	15	+6	50
+F	GGGKSGGGKSGKGGG	15	+3	51
+G	GKPGSGKPGSGKPGS	15	+3	52
+H	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	20	+4	53
+I	GKGGSGKGGSGKGGSGKGGG	20	+8	54

带负电荷的scFv连接子

名称	序列	长度	电荷	SEQ ID NO:
Gly-Ser 15	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	20	0	55
3hsc_2 (-A)	STAGDTHLGEDFD	14	-4	56
-B	GEGSGEGSGEGGS	15	-3	57
-C	GEGSGEGSGEGGS	15	-3	58
-D	GGESGGGESGGGES	15	-3	59
-E	GEGSGEGSGEGGS	15	-6	60
-F	GGESGGGESGGGES	15	-3	61
-G	GEGSGEGSGEGSGEGGS	20	-8	62

图56A

scFv连接子

GGGGSGGGSGGGGS	(SEQ ID NO:63)
GGGGSGGGSGGGSGGGGS	(SEQ ID NO:64)
GSTSGSGKPGSGEGSTKG	(SEQ ID NO:65)
PRGASKSGSASQTGSAPGS	(SEQ ID NO:66)
GTAAAGAGAAGGAAAGAAG	(SEQ ID NO:67)
GTSGSSGSGSGGSGGGG	(SEQ ID NO:68)
GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	(SEQ ID NO:69)

图56B