(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119278215 A
(43)申请公布日 2025.01.07

(21)申请号 202380043024.2
(22)申请日 2023.03.31
(30)优先权数据
63/326668 2022.04.01 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/017130 2023.03.31
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/192606 EN 2023.10.05
(71)申请人 西托姆克斯治疗公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 M·M·派敦加特 S·米特拉
L·M·博斯塔尼
E·A·M·富克斯 T·T·T·武
L·黄 V·维诺德
N·G·拉普亚德 M·特里乌
V·达拉尔
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 权陆军 彭昶
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书6页 说明书90页

(54)发明名称

CD3结合蛋白和其使用方法

(57)摘要

本公开包括具有重链可变结构域和轻链可变结构域的靶标结合蛋白,所述重链可变结构域和所述轻链可变结构域具有结合于CD3ε的特定序列并且其中所述重链可变结构域和所述轻链可变结构域位于一种或多种多肽内。本公开还包括组合物、核酸、载体、细胞以及制造和使用所述蛋白质、组合物和核酸的方法。

CN 119278215 A

1.一种靶标结合蛋白,所述靶标结合蛋白包含:

重链可变结构域,所述重链可变结构域包含

可变重链互补决定区1(VH CDR1),其包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的序列,

可变重链互补决定区2(VH CDR2),其包含RIRSKYNNYATYY ADSVKD(SEQ ID NO:5)的序列,以及

可变重链互补决定区3(VH CDR3),其包含HGNFGNSYVSWX 1AY(SEQ ID NO:6)的序列,其中X_1为W或F;和

轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含

可变轻链互补决定区1(VL CDR1),其包含X_2SSTGAVTTSNY X_3N(SEQ ID NO:10)的序列,其中X_2为R或G;并且X_3为P或V,

可变轻链互补决定区2(VL CDR2),其包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的序列,以及

可变轻链互补决定区3(VL CDR3),其包含X_4LWYSNX$_5$WV(SEQ ID NO:15)的序列,其中X_4为V或I;并且X_5为R或L,

其中所述重链可变结构域和所述轻链可变结构域位于一种或多种多肽内,

其中所述靶标结合蛋白特异性结合于CD3ε。

2.如权利要求1所述的靶标结合蛋白,其中:

a.所述VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的序列;

b.所述VH CDR2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的序列;

c.所述VH CDR3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)或HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:8)的序列;

d.所述VL CDR1包含RSSTGAVTTSNYPN(SEQ ID NO:11)、RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)或GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的序列;

e.所述VLCDR2包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的序列;并且

f.所述VL CDR3包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)、VLWYSNLWV(SEQ ID NO:17)或ILWYSNRWV(SEQ ID NO:18)的序列。

3.如权利要求1所述的靶标结合蛋白,其中

所述VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),所述VH CDR 2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),所述VH CD R3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),所述VL CDR1包含RSSTGAVTTSNYPN(SEQ ID NO:11),所述VL CDR2包含G TNKRAP(SEQ ID NO:14),并且所述VL CDR3包含VLWYSNR WV(SEQ ID NO:16);

所述VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),所述VH CDR 2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),所述VH CD R3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),所述VL CDR1包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13),所述VL CDR2包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且所述VL CDR3包含VLWYSNR WV(SEQ ID NO:16);

所述VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),所述VH CDR 2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),所述VH CD R3包含HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:8),所述VL CDR1包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13),所述VL CDR2包含G TNKRAP(SEQ ID NO:14),并且所述VL CDR3包含VLWYSNR WV(SEQ ID NO:16);

所述VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),所述VH CDR2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ

ID NO:5),所述VH CDR3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),所述VL CDR1包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12),所述VL CDR2包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且所述VL CDR3包含ILWYSNRWV(SEQ ID NO:18);

所述VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),所述VH CDR2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),所述VH CDR3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),所述VL CDR1包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13),所述VL CDR2包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且所述VLCDR3包含VLWYSNLWV(SEQ ID NO:17);或

所述VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),所述VH CDR 2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),所述VH CD R3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),所述VL CDR1包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12),所述VL CDR2包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且所述VL CDR3包含VLWYSNR WV(SEQ ID NO:16)。

4.如权利要求3所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的所述VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的所述VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的所述VH CDR3,并且所述轻链可变结构域包含:包含RSSTGAVTTSNYPN(SEQ ID NO:11)的所述VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的所述VL CDR2以及包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的所述VL CDR3。

5.如权利要求4所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列;并且所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:49至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列。

6.如权利要求4所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列。

7.如权利要求3所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的所述VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的所述VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的所述VH CDR3,并且所述轻链可变结构域包含:包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的所述VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的所述VL CDR2以及包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的所述VL CDR3。

8.如权利要求7所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列;并且所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:64至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列。

9.如权利要求7所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列,并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:64的序列。

10.如权利要求3所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的所述VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的所述VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:8)的所述VH CDR3,并且所述轻链可变结构域包含:包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的所述VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的所述VL CDR2以及包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的所述VL CDR3。

11.如权利要求10所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:

128至少90％或至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一的序列;并且所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:122至少90％或至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一的序列。

12.如权利要求10所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:128的序列,并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:122的序列。

13.如权利要求3所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的所述VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的所述VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的所述VH CDR3,并且所述轻链可变结构域包含:包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)的所述VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的所述VL CDR2以及包含ILWYSNRWV(SEQ ID NO:18)的所述VL CDR3。

14.如权利要求13所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少90％或至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一的序列;并且所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:113至少90％或至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一的序列。

15.如权利要求13所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列,并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:113的序列。

16.如权利要求3所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的所述VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的所述VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的所述VH CDR3,并且所述轻链可变结构域包含:包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的所述VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的所述VL CDR2以及包含VLWYSNLWV(SEQ ID NO:17)的所述VL CDR3。

17.如权利要求16所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少90％或至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一的序列;并且所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:98至少90％或至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一的序列。

18.如权利要求16所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列,并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:98的序列。

19.如权利要求3所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的所述VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的所述VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的所述VH CDR3,并且所述轻链可变结构域包含:包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)的所述VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的所述VL CDR2以及包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的所述VL CDR3。

20.如权利要求19所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少90％或至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一的序列;并且所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:107至少90％或至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一的序列。

21.如权利要求19所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列,并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:107的序列。

22.一种靶标结合蛋白,所述靶标结合蛋白包含:

重链可变结构域,所述重链可变结构域包含序列EVQLVESGGG LVQPGGSLKLSCAASGFTFS TYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSWX$_1$AYWGX$_6$GTLVTVSS(SEQ ID NO:20);和

轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含序列QTVVTQEPSL TVSPGGTVTLTCX$_2$SSTGAVT TSNYX$_3$NWVQQKPGX$_7$APRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLJGGKAALTLSGX$_9$QPEDEAEYYCX$_4$LWYSNX$_5$WVFGGGTKLTVL(SEQ ID NO:21),

其中:

X_1为W或F;X_2为R或G;X_3为P或V;X_4为V或I;X_5为R或L,

X_6为Q并且X_7为Q;或X_6为C并且X_7为C,

当X_9为V时J为L;或当X_9为A时J为I,并且

所述靶标结合蛋白特异性结合于CD3ε。

23.如权利要求22所述的靶标结合蛋白,其中X_6为Q并且X_7为Q。

24.如权利要求22所述的靶标结合蛋白,其中X_6为C并且X_7为C。

25.如权利要求22所述的靶标结合蛋白,其中

所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:49的序列;

所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:64的序列;

所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:113的序列;

所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:98的序列;

所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:107的序列;或

所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:128的序列并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:122的序列。

26.如权利要求1-25中任一项所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域和所述轻链可变结构域位于同一多肽内。

27.如权利要求26所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域和所述轻链可变结构域经由接头偶联。

28.如权利要求27所述的靶标结合蛋白,其中所述接头的长度为5至30个、6至29个、7至28个、8至27个、9至26个、10至25个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个或24个氨基酸。

29.如权利要求26所述的靶标结合蛋白,其包含SEQ ID NO:50、28、114、99、108或32的序列。

30.如权利要求26-29中任一项所述的靶标结合蛋白,其中所述靶标结合蛋白包含单链可变片段(scFv)。

31.如权利要求1-30中任一项所述的靶标结合蛋白,其中所述靶标结合蛋白包含BiTE、(scFv)$_2$、NANOBODY®、纳米抗体-HSA VH H-scAb、VHH-Fab、双scFab、F(ab')2、双链抗

体、CROSSMAB®、DAF(二合一)、DAE(四合一)、DUTAMAB®、DT-IgG、杵臼共同轻链、杵臼装配、电荷对、Fab臂交换、SEEDbody、LUZ-Y、FcAb、k1-body、正交Fab、DVD-IgG、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、ZYBODY™、DVI-IgG、双链抗体-CH3、三联抗体、微型抗体、微抗体、TriBi微抗体、scFv-CH3 KIH、Fab-scFv、F(ab')2-scFv2、scFv-KI'H、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、sc双链抗体-Fc、双链抗体-Fc、串联scFv-Fc、VHH-Fc、串联VHH-Fc、L'HH-Fc KiH、Fab-VHH-Fc、胞内抗体、对接和锁定、ImmTAC®(针对癌症的免疫动员单克隆TCR(T细胞受体))、IgG-IgG缀合物、Cov-X-Body、scFv1-PEG-scFv2、Adnectin、DARPin®、纤连蛋白、IgG、IgM、IgA、IgE、IgD或DEP缀合物、TMEAbody™、SAFEbody®、TRITAC®或SHIELD抗体。

32.如权利要求1-30中任一项所述的靶标结合蛋白,其中所述靶标结合蛋白包含IgG、IgM、IgA、IgE或IgD抗体或其片段。

33.如权利要求32所述的靶标结合蛋白,其中所述靶标结合蛋白包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。

34.如权利要求1-33中任一项所述的靶标结合蛋白,其中所述靶标结合蛋白是人源化的。

35.如权利要求1-34中任一项所述的靶标结合蛋白,其还包含抑制非活性状态下所述靶标结合蛋白与CD3的结合的掩蔽部分。

36.如权利要求35所述的靶标结合蛋白,其中所述掩蔽部分经由可裂解部分与所述靶标结合蛋白偶联,并且所述可裂解部分为蛋白酶的底物。

37.如权利要求36中任一项所述的靶标结合蛋白,其中所述蛋白酶为ADAMS、ADAMTS、ADAM8、ADAM9、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS4、ADAMTS5、天冬氨酸蛋白酶、BACE、肾素、天冬氨酸组织蛋白酶、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、凋亡蛋白酶、凋亡蛋白酶1、凋亡蛋白酶2、凋亡蛋白酶3、凋亡蛋白酶4、凋亡蛋白酶5、凋亡蛋白酶6、凋亡蛋白酶7、凋亡蛋白酶8、凋亡蛋白酶9、凋亡蛋白酶10、凋亡蛋白酶14、半胱氨酸组织蛋白酶、组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶S、组织蛋白酶V/L2、组织蛋白酶X/Z/P、半胱氨酸蛋白酶、克鲁兹蛋白酶、豆荚蛋白、Otubain-2、KLK、KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14、金属蛋白酶、穿膜肽酶、脑啡肽酶、PSMA、BMP-1、MMP、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26、MMP27、丝氨酸蛋白酶、活化蛋白C、组织蛋白酶A、组织蛋白酶G、糜蛋白酶、凝血因子蛋白酶、FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa、弹性蛋白酶、颗粒酶B、胍基苯甲酸酶、HtrA1、人中性粒细胞弹性蛋白酶、乳铁蛋白、马拉素、NS3/4A、PACE4、纤溶酶、PSA、tPA、凝血酶、类胰蛋白酶、uPA、II型跨膜、丝氨酸蛋白酶、TTSP、DESC1、DPP-4、FAP、黑珀素、间质蛋白酶-2、MT-SP1/间质蛋白酶、TMPRSS2、TMPRSS3或TMPRSS4。

38.如权利要求1-37中任一项所述的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域和/或所述轻链可变结构域经由缀合部分与毒素、放射性同位素、小分子、诊断剂、治疗性大分子、靶向部分或可检测部分缀合。

39.如权利要求38所述的靶标结合蛋白,其中所述缀合部分能被蛋白酶裂解。

40.如权利要求38所述的靶标结合蛋白,其中所述缀合部分不能被蛋白酶裂解。

41.一种组合物,所述组合物包含如权利要求1-40中任一项所述的靶标结合蛋白和载体。

42.如权利要求41所述的组合物,其中所述组合物为药物组合物,并且其中所述载体为药学上可接受的载体。

43.一种容器、小瓶、注射器、注射笔或药盒,其包含至少一剂的如权利要求41或42所述的组合物。

44.一种核酸,所述核酸包含编码如权利要求1-40中任一项所述的靶标结合蛋白的序列。

45.一种载体,所述载体包含如权利要求44所述的核酸。

46.一种细胞,所述细胞包含如权利要求44所述的核酸或如权利要求45所述的载体。

47.一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的如权利要求1-40中任一项所述的靶标结合蛋白或如权利要求41或42所述的组合物。

48.如权利要求47所述的方法,其中所述受试者已被鉴定或诊断为患有癌症、炎性疾患、病症或疾病或自身免疫疾患、病症或疾病。

49.一种产生靶标结合蛋白的方法,所述方法包括:

在培养基中在足以产生所述靶标结合蛋白的条件下培养如权利要求46所述的细胞;以及

从所述细胞或所述培养基回收所述靶标结合蛋白。

50.如权利要求49所述的方法,所述方法还包括分离从所述细胞或所述液体培养基回收的所述靶标结合蛋白。

51.如权利要求50所述的方法,所述方法还包括将所述靶标结合蛋白配制成药物组合物。

CD3结合蛋白和其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年4月1日提交的美国临时申请No.US 63/326,668的优先权益,所述临时申请以引用的方式整体并入本文中。

[0003] 序列表

[0004] 与本申请一起由EFS提交的序列表名为“4862-124PCT.xml”,创建于2023年3月31日,大小为643,441字节,以引用的方式整体并入本文中。

技术领域

[0005] 本公开涉及生物技术领域,更具体地说,涉及靶标结合分子,包括结合CD3的分子。

背景技术

[0006] 抗CD3ε(CD3ε)抗体已使用数年,旨在发挥多种作用并对抗多种疾病。这些抗CD3ε抗体中的多种仅来源于少数变体,包括SP-34。为了进一步提高抗CD3ε分子的功效、安全性和可制造性,需要另外的抗CD3ε结合蛋白。需要与SP-34抗体具有不同结合亲和力的抗CD3ε结合蛋白、改良的可制造性、提高的稳定性以及具有定制CD3ε结合亲和力以治疗特定疾病的相关治疗剂。还需要抗CD3ε结合蛋白,在除全长抗体之外的分子结构背景下(包括在多价和单价结合蛋白的背景下)其表现出改良的结合亲和力、稳定性和可制造性。

发明内容

[0007] 本公开提供了具有CD3ε结合结构域的靶标结合蛋白,以及相关组合物和方法。

[0008] 在一个方面,本公开提供了一种靶标结合蛋白,所述靶标结合蛋白包含:重链可变结构域,所述重链可变结构域包含:可变重链互补决定区1(VH CDR1),其包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的序列;可变重链互补决定区2(VH CDR2),其包含RIRSKYNNYATYYADSV KD(SEQ ID NO:5)的序列;以及可变重链互补决定区3(VH CDR 3),其包含HGNFGNSYVSWX1AY(SEQ ID NO:6)的序列,其中X_1为W或F;和轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含:可变轻链互补决定区1(VL CDR1),其包含X_2SSTGAVTTSNYX$_3$N(SEQ ID NO:10)的序列,其中X_2为R或G,并且X_3为P或V;可变轻链互补决定区2(VL CDR2),其包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的序列;以可变轻链互补决定区3(VL CDR3),其包含X_4LWYSNX$_5$WV(SEQ ID NO:15)的序列,其中X_4为V或I,并且X_5为R或L,其中所述重链可变结构域和所述轻链可变结构域位于一种或多种多肽内,其中所述靶标结合蛋白特异性结合于CD3ε。

[0009] 在一些实施方案中,VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的序列;VH CDR2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的序列;VH CDR3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)或HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:8)的序列;VL CDR1包含RSSTGAVTTSNYPN(SEQ ID NO:11)、RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)或GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的序列;VL CDR2包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的序列;并且VL CDR3包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)、VLWYSNLWV(SEQ ID NO:17)或ILWYSNRWV(SEQ ID NO:18)的序列。

[0010] 在一些实施方案中,VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),VH CDR2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),VH CDR3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),VL CDR1包含RSSTGAVTTSNYPN(SEQ ID NO:11),VL CDR2包含GTNKR AP(SEQ ID NO:14),并且VL CDR3包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16);VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),VH CDR2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),VH CDR3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),VL CDR1包含GSSTG AVTTSNYVN(SEQ ID NO:13),VL CDR2包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且VL CDR3包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16);VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),VH CDR2包含RIRSK YNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),VH CDR3包含HGNFGN SYVSWFAY(SEQ ID NO:8),VL CDR1包含GSSTGAVTTSNYV N(SEQ ID NO:13),VL CDR2包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且VL CDR3包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16);VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),VH CDR2包含RIRSKYNNYATYY ADSVKD(SEQ ID NO:5),VH CDR3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),VL CDR1包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12),VL CDR2包含GTNKRAP,并且VL CDR3包含ILWYSNRWV(SEQ ID NO:18);VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),VH CDR2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),VH CDR3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),VL CDR1包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13),VL CDR2包含GTN KRAP(SEQ ID NO:14),并且VL CDR3包含VLWYSNLWV(SE Q ID NO:17);或VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),VH CDR2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),VH CD R3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),VL CDR1包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12),VL CDR2包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且VL CDR3包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)。

[0011] 在一些实施方案中,重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3,并且轻链可变结构域包含:包含RSSTGAVTTSNYPN(SEQ ID NO:11)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2以及包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VL CDR3。在一些实施方案中,重链可变结构域包含前述VH CDR并包含与SEQ ID NO:46至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列;并且轻链可变结构域包含前述VL CDR并包含与SEQ ID NO:49至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列。在一些实施方案中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列。

[0012] 在一些实施方案中,重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3,并且轻链可变结构域包含:包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2以及包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VL CDR3。在一些实施方案中,重链可变结构域包含前述VH CDR并包含与SEQ ID NO:46至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列;并且轻链可变结构域包含前述VL CDR并包含与SEQ ID NO:64至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列。在一些实施方案中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列,并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:64的序列。

[0013] 在一些实施方案中,重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2,包含HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:8)

的VH CDR3,并且轻链可变结构域包含:包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2以及包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VL CDR3。在一些实施方案中,重链可变结构域包含前述VH CDR并包含与SEQ ID NO:128至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列;并且轻链可变结构域包含前述VL CDR并包含与SEQ ID NO:122至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列。在一些实施方案中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:128的序列,并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:122的序列。

[0014] 在一些实施方案中,重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3,并且轻链可变结构域包含:包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2以及包含ILWYSNRWV(SEQ ID NO:18)的VL CDR3。在一些实施方案中,重链可变结构域包含前述VH CDR并包含与SEQ ID NO:46至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列;并且轻链可变结构域包含前述VL CDR并包含与SEQ ID NO:113至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列。在一些实施方案中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列,并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:113的序列。

[0015] 在一些实施方案中,重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3,并且轻链可变结构域包含:包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2以及包含VLWYSNLWV(SEQ ID NO:17)的VL CDR3。在一些实施方案中,重链可变结构域包含前述VH CDR并包含与SEQ ID NO:46至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列;并且轻链可变结构域包含前述VL CDR并包含与SEQ ID NO:98至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列。在一些实施方案中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列,并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:98的序列。

[0016] 在一些实施方案中,重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3,并且轻链可变结构域包含:包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)的VL CDR1,包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2以及包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VL CDR3。在一些实施方案中,重链可变结构域包含前述VH CDR并包含与SEQ ID NO:46至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列;并且轻链可变结构域包含前述VL CDR并包含与SEQ ID NO:107至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列。在一些实施方案中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列,并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:107的序列。

[0017] 在另一态样中,本公开提供了一种靶标结合蛋白,所述靶标结合蛋白包含:重链可变结构域,所述重链可变结构域包含序列EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKG LEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWX1AYWGX6GTLVTVSS(SEQ ID NO:20);和轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含序列QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCX$_2$SSTGAVTTSNYX$_3$NWVQQKPGX $_7$APRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLJGGKAALTLS

$GX_9QPEDEAEYY\ CX_4LWYSNX_5WVFGGGTKLTVL$(SEQ ID NO:21),其中:$X_1$为a)W或F;$X_2$为R或G;$X_3$为P或V;$X_4$为V或I;$X_5$为R或L,b)$X_6$为Q并且$X_7$为Q;或$X_6$为C并且$X_7$为C,c)当$X_9$为V时J为L;或当$X_9$为A时J为I,以及d)所述靶标结合蛋白特异性结合于CD3ε。

[0018] 在一些实施方案中,X_6为Q并且X_7为Q。在一些实施方案中,X_6为C并且X_7为C。

[0019] 在一些实施方案中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:49的序列;重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:64的序列;重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:113的序列;重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:98的序列;重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:107的序列;或重链可变结构域包含SEQ ID NO:128的序列并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:122的序列。

[0020] 在一些实施方案中,重链可变结构域和轻链可变结构域位于同一多肽内。在一些实施方案中,重链可变结构域和轻链可变结构域经由接头偶联。在一些实施方案中,接头的长度为5至30个、6至29个、7至28个、8至27个、9至26个、10至25个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个或24个氨基酸。

[0021] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白包含SEQ ID NO:50、28、114、99、108或32的序列。在一些实施方案中,靶标结合蛋白包含单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,靶标结合蛋白包含BiTE、$(scFv)_2$、NANOBODY®、纳米抗体-HSA VHH-scAb、VHH-Fab、双scFab、F(ab')2、双链抗体、CROSSMAB®、DAF(二合一)、DAE(四合一)、DUTAMAB®、DT-IgG、杵臼共同轻链、杵臼装配、电荷对、Fab臂交换、SEEDbody、LUZ-Y、FcAb、k1-body、正交Fab、DVD-IgG、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、ZYBODY™、DVI-IgG、双链抗体-CH3、三联抗体、微型抗体、微抗体、TriBi微抗体、scFv-CH3 KIH、Fab-scFv、F(ab')2-scFv2、scFv-KI'H、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、sc双链抗体-Fc、双链抗体-Fc、串联scFv-Fc、VHH-Fc、串联VHH-Fc、L'HH-Fc KiH、Fab-VHH-Fc、胞内抗体、对接和锁定、ImmTAC®(针对癌症的免疫动员单克隆TCR(T细胞受体))、IgG-IgG缀合物、Cov-X-Body、scFv1-PEG-scFv2、Adnectin、DARPin或纤连蛋白、IgG、IgM、IgA、IgE、IgD或DEP缀合物、TMEAbody™、SAFEbody®、TRITAC®或SHIELD抗体。

[0022] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白为或包含IgG、IgM、IgA、IgE或IgD抗体或其片段。在一些实施方案中,靶标结合蛋白为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在一些实施方案中,靶标结合蛋白是人源化的。

[0023] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白还包含抑制非活性状态下靶标结合蛋白与CD3的结合的掩蔽部分。在一些实施方案中,掩蔽部分经由可裂解部分与靶标结合蛋白偶联(直接或间接,例如经由一个或多个接头),并且可裂解部分为蛋白酶的底物。在一些实施方案中,蛋白酶为ADAMS、ADAMTS、ADAM8、ADAM9、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS4、ADAMTS5、天冬氨酸蛋白酶、BACE、肾素、天冬氨酸组织蛋白酶、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、凋亡蛋白酶、凋亡蛋白酶1、凋亡蛋白酶2、凋亡蛋白酶3、凋亡蛋白酶4、凋亡蛋白酶5、凋亡蛋白酶6、凋亡蛋白酶7、凋亡蛋白酶8、凋亡蛋白酶9、凋亡蛋白酶

10、凋亡蛋白酶14、半胱氨酸组织蛋白酶、组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶S、组织蛋白酶V/L2、组织蛋白酶X/Z/P、半胱氨酸蛋白酶、克鲁兹蛋白酶(Cruzipain)、豆荚蛋白(Legumain)、Otubain-2、KLK、KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14、金属蛋白酶、穿膜肽酶(Meprin)、脑啡肽酶(Neprilysin)、PSMA、BMP-1、MMPs、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26、MMP27、丝氨酸蛋白酶、活化蛋白C、组织蛋白酶A、组织蛋白酶G、糜蛋白酶、凝血因子蛋白酶、FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa、弹性蛋白酶、颗粒酶B、胍基苯甲酸酶、HtrA1、人中性粒细胞弹性蛋白酶、乳铁蛋白、马拉素(Marapsin)、NS3/4A、PACE4、纤溶酶、PSA、tPA、凝血酶、类胰蛋白酶、uPA、II型跨膜、丝氨酸蛋白酶、TTSP、DESC1、DPP-4、FAP、黑珀素(Hepsin)、间质蛋白酶(Matriptase)-2、MT-SP1/间质蛋白酶、TMPRSS2、TMPRSS3或TMPRSS4。

[0024] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白还包含特异性结合于第二靶标的第二靶标结合结构域。

[0025] 在一些实施方案中,重链可变结构域和/或轻链可变结构域经由缀合部分与毒素、放射性同位素、小分子、诊断剂、治疗性大分子、靶向部分或可检测部分缀合。在一些实施方案中,缀合部分能被蛋白酶裂解。在一些实施方案中,缀合部分不能被蛋白酶裂解。

[0026] 在另一态样中,本公开提供了一种组合物,所述组合物包含本文中的靶标结合蛋白和载体。在一些实施方案中,组合物为药物组合物,其中所述载体为药学上可接受的载体。

[0027] 在另一态样中,本公开提供了一种容器、小瓶、注射器、注射笔或药盒,其包含至少一剂本文中的组合物。

[0028] 在另一态样中,本公开提供了一种核酸,所述核酸包含编码本文中的靶标结合蛋白的序列。

[0029] 在另一态样中,本公开提供了一种载体,所述载体包含本文中的核酸。

[0030] 在另一态样中,本公开提供了一种细胞,所述细胞包含本文中的核酸或本文中的载体。

[0031] 在另一态样中,本公开提供了一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文中的靶标结合蛋白或本文中的组合物。在一些实施方案中,受试者已被鉴定或诊断为患有癌症。

[0032] 在另一态样中,本公开提供了一种产生靶标结合蛋白的方法,所述方法包括:在培养基中在足以产生所述靶标结合蛋白的条件下培养本文中的细胞;并且从细胞或培养基回收靶标结合蛋白。在一些实施方案中,所述方法还包括分离从所述细胞或所述液体培养基回收的所述靶标结合蛋白。在一些实施方案中,所述方法还包括将所述靶标结合蛋白配制成药物组合物。

[0033] 参考以下阐述利用了本发明原理的说明性实施方案的详细描述以及附图将获得对本发明特征和优点的更好理解。

具体实施方式

[0034] 本文提供了特异性结合于分化簇3(CD3)(例如,CD3ε)的靶标结合蛋白。在一个方

面,靶标结合蛋白可包括重链可变结构域和轻链可变结构域,其形成特异性结合于CD3(例如,CD3ε)的靶标结合结构域。在一些实施方案中,与已知的从非人类物种产生的抗CD3蛋白(例如,sp34小鼠抗人CD3抗体)相比,本文中的CD3结合分子在其氨基酸序列中包含一个或多个突变,所述突变使其更加人源化,例如,增加其与人中天然产生的CD3结合分子的相似性。

[0035] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白可以是单链蛋白,例如单链抗体。例如,单链抗体可以是单链片段可变(scFv)抗体。在一些实施方案中,靶标结合蛋白可以是多链蛋白(例如,多链抗体),其包括由多个多肽形成的蛋白质复合物。

[0036] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白可以是可激活分子,例如包括经由可裂解部分(直接或间接,例如经由一个或多个接头)与CD3结合结构域偶联的掩蔽部分的可激活CD3结合分子。可裂解部分可以在某些条件下(例如,当暴露于肿瘤微环境中的蛋白酶时)裂解,从而从CD3结合结构域中释放掩蔽部分。

[0037] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白可以是多特异性(例如,双特异性)结合蛋白,其与除CD3之外的一个或多个另外的靶标结合。例如,多特异性蛋白质可以特异性结合于CD3和肿瘤相关抗原,例如HER2、Jagged、EGFR等。

[0038] 本文还提供了相关组合物、药盒、核酸、载体和重组细胞,以及相关方法,包括使用本文所述的任何可靶标结合蛋白的方法和产生本文所述的任何靶标结合蛋白的方法。

[0039] 定义

[0040] 除非另有限定,否则本文中所使用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域内的普通技术人员通常所理解相同的含义。本文描述了用于本公开中的方法和材料;还可使用本领域中已知的其它适合的方法和材料。材料、方法和实例仅是说明性的,不意图是限制性的。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目以及其它参考文献都以引用的方式整体并入本文中。在冲突的情况下,将以本说明书为准,包括定义。

[0041] 术语“一个(种)(a/an)”是指所述冠词的一个(种)或多个(种)(即,至少一个(种))语法对象。借助于实例,“一个细胞”涵盖一个或多个细胞。

[0042] 如本文所用,术语“约”和“大约”当用于修饰数值或范围内指定的量时,表示数值以及与本领域技术人员已知的值的合理偏差。例如,在适当的情况下,±20%、±10%或±5%在所述值的预期含义内。

[0043] 浓度、量和其它数值数据可在本文中以范围格式表示或呈现。应了解,这类范围格式仅为了方便和简洁而使用,因此应灵活解释为不仅包括明确叙述为范围的限值的数值,而且还包括涵盖在该范围内的所有个别数值或子范围,就好像每个数值和子范围被明确叙述一样。作为说明,“约0.01至2.0”的数值范围应解释为不仅包括明确叙述的约0.01至约2.0的值,而且还包括所指示范围内的个别值和子范围。因此,这个数值范围内包括个别值,例如0.5、0.7和1.5,以及子范围,例如0.5至1.7、0.7至1.5和1.0至1.5等。此外,无论范围的宽度或所描述的特征如何,这种解释都应适用。另外,应注意,除非另外指定,否则所有百分比都以重量计。

[0044] 在理解本公开的范围时,如本文所用的术语“包括”或“包含”和它们的派生词意图是指定所陈述的特征、要素、组分、组、整数和/或步骤的存在,但不排除其它未陈述的特征、要素、组分、组、整数和/或步骤的存在的开放式术语。前述内容也适用于具有类似含义的词

语,例如术语“包括”、“具有”和它们的派生词。如本文所用的术语“由……组成”和它的派生词意图是指定所陈述的特征、要素、组分、组、整数和/或步骤的存在,但排除其它未陈述的特征、要素、组分、组、整数和/或步骤的存在的封闭式术语。如本文所用的术语“基本上由……组成”意图指定所陈述的特征、要素、组分、组、整数和/或步骤以及不实质上影响特征、要素、组分、组、整数和/或步骤的一种或多种基本和新颖特征的那些特征、要素、组分、组、整数和/或步骤的存在。应了解,提及这些过渡术语(即“包含”、“由……组成”或“基本上由……组成”)中的任一者都为替换成未具体使用的任何其它过渡术语提供直接支持。举例来说,由于这个定义针对在本公开通篇公开的任何要素,所以将术语从“包含”修改为“基本上由……组成”或“由……组成”将得到直接支持。基于这个定义,本文公开或以引用的方式并入的任何要素都可包括在要求的发明中或从要求的发明排除。

[0045] 如本文所用,为了方便起见,多个化合物、要素或步骤可呈现在共同的清单中。然而,这些清单应解释为好像清单的每个成员被单独地标识为单独和独特成员一样。因此,仅基于它们在共同组中呈现而没有相反指示,这种清单的个别成员不应解释为同一清单的任何其它成员的事实上的等效物。

[0046] 本文使用的术语“示例性”意指作为实例、例子或说明。本文中描述为“示例性”的任何方面或设计不一定被解释为优于或优于其它方面或设计。相反,使用“示例性”一词是为了以更具体的方式呈现概念。

[0047] 此外,某些分子、构建体、组合物、要素、部分、赋形剂、病症、疾患、性质、步骤等可在一个具体实施方案或方面的上下文中或在本公开的单独段落或章节中讨论。应了解,这仅是为了方便和简洁,并且任何这种公开内容都可同样适用于在本公开和权利要求书中的任何地方所见的任何其它实施方案或方面,并且意图与所述任何其它实施方案或方面组合,这些都形成本申请和在申请日要求的发明。举例来说,关于构建体、组合物或方法描述的构建体、分子、方法步骤、药盒或组合物的清单意图并且确实为与本公开的任何其它部分中描述的构建体、组合物、制剂和方法相关的实施方案找到直接支持,即使那些方法步骤、活性剂、药盒或组合物未在该实施方案或方面的上下文或章节中重新列出。

[0048] 靶标结合蛋白

[0049] 本文中的靶标结合蛋白可包含重链可变结构域和轻链可变结构域,所述重链可变结构域和轻链可变结构域形成特异性结合于CD3(例如CD3ε)的靶标结合结构域。可被本文中的蛋白质结合的示例性CD3ε分子是野生型人CD3ε(SEQ ID NO:1)。

[0050] 在一些实施方案中,重链可变结构域和轻链可变结构域位于同一多肽内。在某些实施方案中,重链可变结构域和轻链可变结构域通过一个或多个接头偶联在一起。接头可以是下文接头部分中描述的肽接头。在一些实例中,单链多肽中的靶标结合结构域可以是scFv。或者,重链可变结构域和轻链可变结构域位于两个不同的多肽内。

[0051] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白可以是包含多个多肽(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个多肽)的蛋白质复合物。在一些实例中,多个多肽中的一些或全部(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个多肽)可以是相同的。在一些实例中,靶标结合复合物中的多个多肽中的每一个都彼此不同。

[0052] 靶标结合结构域可存在于多种不同构建体中的任一者内,包括抗体或其片段、VH结构域、VHH结构域、VNAR结构域和单链可变片段(scFv)、BiTE或其组分、$(scFv)_2$、

NANOBODY®、纳米抗体-HSA、VHH-scAb、VHH-Fab、双scFab、F(ab')2、双链抗体、CROSSMAB®、DAF(二合一)、DAE(四合一)、DUTAMAB®、DT-IgG、杵臼共同轻链、杵臼装配、电荷对、Fab臂交换、SEEDbody、LUZ-Y、FcAb、kl-body、正交Fab、DVD-IgG、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、ZYBODY™、DVI-IgG、双链抗体-CH3、三联抗体、微型抗体、微抗体、TriBi微抗体、scFv-CH3 KIH、Fab-scFv、F(ab')2-scFv2、scFv-KI'H、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、sc双链抗体-Fc、双链抗体-Fc、串联scFv-Fc、VHH-Fc、串联VHH-Fc、L'HH-Fc KiH、Fab-VHH-Fc、胞内抗体、对接和锁定、ImmTAC®(针对癌症的免疫动员单克隆TCR(T细胞受体))、IgG-IgG缀合物、Cov-X-Body、scFv1-PEG-scFv2、Adnectin、DARPin®、纤连蛋白、IgG、IgM、IgA、IgE、IgD、DEP缀合物、TMEAbodyTM、SAFEbody®、TRITAC®或SHIELD抗体。VHH结构域是可在骆驼科动物中发现的单个单体可变抗体结构域。VNAR结构域是可在软骨鱼中发现的单个单体可变抗体结构域。VHH结构域和VNAR结构域的非限制性方面描述于例如Cromie等人,Curr.Top.Med.Chem.15:2543-2557,2016;De Genst等人Dev.Comp.Immunol.30:187-198,2006;De Meyer等人,Trends Biotechnol 32:263-270,2014;Kijanka等人,Nanomedicine 10:161-174,2015;Kovaleva等人,Expert.Opin.Biol.Ther.14:1527-1539,2014;Krah等人,Immunopharmacol.Immunotoxicol.38:21-28,2016;Mujic-Delic等人,Trends Pharmacol.Sci.35:247-255,2014;Muyldermans,J.Biotechnol.74:277-302,2001;Muyldermans等人,Trends Biocheni.Sci.26:230-235,2001;Muyldermans,Ann.Rev.Biochem.82:775-797,2013;Rahbarizadeh等人,Immunol,invest.40:299-338,2011;Van Audenhove等人,EBioMedicine 8:40-48,2016;Van Bockstaele等人,Curr.Opin.Investig.Drugs 10:1212-1224,2009;Vincke等人Methods Mol,Biol,911:15-26,2012;以及Wesolowski等人Med.Microbiol.Immunol.198:157-174,2009,其中每一者以引用的方式整体并入本文中。

[0053] 术语"抗体"在本文中以其最广义使用,包括某些类型的免疫球蛋白分子,其包括一个或多个特异性结合于抗原或表位的靶标结合结构域。抗体的实例包括完整抗体(例如,完整免疫球蛋白)、抗体片段、双特异性抗体和多特异性抗体。靶标结合结构域的一个实例由V_H-V_L二聚体形成。本文描述了抗体的另外的实例。抗体的另外的实例是本领域已知的。

[0054] "轻链"包括一个可变结构域(VL)和一个恒定结构域(CL)。有两种不同的轻链,分别称为κ或λ。"重链"由一个可变结构域(VH)和三个恒定区结构域(CH1、CH2、CH3)组成。重链主要有五个类别或同种型,其中一些有几种亚型,这些决定了抗体分子的功能活性。免疫球蛋白的五大类是免疫球蛋白M(IgM)、免疫球蛋白D(IgD)、免疫球蛋白G(IgG)、免疫球蛋白A(IgA)和免疫球蛋白E(IgE)。IgG是迄今为止最丰富的免疫球蛋白,有几个亚类(人的IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。

[0055] "片段抗原结合"(Fab)包括与重链的VH结构域和CH1结构域配对的完整轻链。当抗体在铰链区以下被胃蛋白酶裂解(或以其它方式截短)时,会形成$F(ab')_2$片段,在这种情况下,抗体分子的两个片段靶标结合结构域(Fab)仍然保持连接。$F(ab')_2$片段含有两条完整的轻链,与通过铰链区接合在一起的重链的两个VH和CH1结构域配对。"可结晶片段"(Fc)片段(本文也称为F_C结构域)对应于配对的CH2和CH3结构域,是抗体分子中与效应分子和细胞

相互作用的部分。重链同种型之间的功能差异主要在于Fc片段。“单链片段可变”(scFv)仅含有通过一段肽连接到重链可变结构域(VH)的轻链可变结构域(VL)。单链Fv这个名称来源于片段可变。“铰链区”或“域间”是接合或连接Fab片段到Fc结构域的柔性氨基酸段。“合成铰链区”是接合或连接Fab片段到Fc结构域的氨基酸序列。

[0056] “Fv”片段包括一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的非共价连接的二聚体。“双可变结构域免疫球蛋白G”或“DVD-IgG”是指多价和多特异性靶标结合蛋白,例如以下中所述:DiGiammarino等人,Methods Mol.Biol.899:145-156,2012;Jakob等人,MABs5:358-363,2013;以及美国专利No.7,612,181、8,258,268、8,586,714、8,716,450、8,722,855、8,735,546以及8,822,645,均以引用的方式全文并入本文中。DART的实例描述于例如Garber,Nature Reviews Drug Discovery 13:799-801,2014中。

[0057] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白可以是小鼠、大鼠、兔、山羊、骆驼、驴、灵长类动物、嵌合、人或人源化蛋白。在一个实例中,靶标结合蛋白可以是人蛋白质。在一个实例中,靶标结合蛋白可以是人源化(例如,完全人源化)蛋白质。

[0058] 术语“人源化”是指具有如下氨基酸序列的靶标结合蛋白,该氨基酸序列包括在非人类物种(例如小鼠)中产生的参考蛋白的VH和VL区序列,但也包括相对于参考蛋白对这些序列的修饰,旨在使其更“类似人类”,即更类似于人类种系可变序列。在一些实施方案中,“人源化”靶标结合蛋白是与感兴趣抗原免疫特异性结合并且具有与人蛋白质具有基本上相同的氨基酸序列的框架(FR)区的蛋白质,并且与非人蛋白质具有基本上相同的氨基酸序列的互补决定区(CDR)含有人源化的VH和VL区。

[0059] 术语“人蛋白质”旨在包括具有由人类免疫球蛋白序列生成、装配或衍生的可变区和恒定区的靶标结合蛋白。在一些实施方案中,即使靶标结合蛋白的氨基酸序列例如在一个或多个CDR中包括非由人种系免疫球蛋白序列编码的残基或元件(例如,包括序列变异,例如可能(最初)通过体外随机或位点特异性诱变或体内体细胞突变引入),靶标结合蛋白也可被视为“人”的。

[0060] 在一些实施方案中,在靶标结合蛋白中,重链可变结构域可包含三个互补决定区(CDR)(VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3)并且轻链可变结构域可包含三个CDR(VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3)。VH CDR1可包含序列SEQ ID NO:3。VH CDR2可包含序列SEQ ID NO:5。VH CDR3可包含序列SEQ ID NO:6。举例来说,VH CDR3可包含序列SEQ ID NO:7或8。VL CDR1可包含序列SEQ ID NO:10。举例来说,VL CDR1可包含序列SEQ ID NO:11、12或13。VL CDR2可包含序列SEQ ID NO:14。VL CDR3可包含序列SEQ ID NO:15。举例来说,VL CDR3可包含序列SEQ ID NO:16、17或18。

[0061] 靶标结合蛋白可包含:重链可变结构域,所述重链可变结构域包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;和轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含VL CDR1、VL CDR2和VLCDR3。在一些实例中,在靶标结合蛋白中,VH CDR1可包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的序列;VH CDR2可包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的序列;VH CDR3可包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)或HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:8)的序列;VL CDR1可包含RSSTGAVTTSNYPN(SEQ ID NO:11)、RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)或GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的序列;VL CDR2可包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的序列;并且VL CDR3可包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)、VLWYSNLWV(SEQ ID NO:17)或ILWYSNRWV(SEQ ID NO:18)的序列。

[0062] 在一个实例中,在靶标结合蛋白中,VH CDR1可包含TYAMN(SEQ ID NO:3),VH CDR2可包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),VH CDR3可包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),VL CDR1可包含RSSTGAVTTSNYPN(SEQ ID NO:11),VL CDR2可包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且VL CDR3可包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)。在另一实例中,VH CDR1可包含TYAMN(SEQ ID NO:3),VH CDR2可包含RIRSKYNNYA TYYADSVKD(SEQ ID NO:5),VH CDR3可包含HGNFGNSYVS WWAY(SEQ ID NO:7),VL CDR1可包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13),VL CDR2可包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且VL CDR3可包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)。在另一实例中,VH CDR1可包含TYAMN(SEQ ID NO:3),VH CDR2可包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),VH CDR3可包含HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:8),VL CDR1可包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13),VL CDR2可包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且VL CDR3可包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)。在另一实例中,VH CDR1可包含TYAMN(SEQ ID NO:3),VH CDR2可包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),VH CDR3可包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),VL CDR1可包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12),VL CDR2可包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且VL CDR3可包含ILWY SNRWV(SEQ ID NO:18)。在另一实例中,VH CDR1可包含TYAMN(SEQ ID NO:3),VH CDR2可包含RIRSKYNNYATYYADSV KD(SEQ ID NO:5),VH CDR3可包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),VL CDR1可包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13),VL CDR2可包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且VL CDR3可包含VLWYSNLWV(SEQ ID NO:17)。在另一实例中,VH CDR1可包含TYAMN(SEQ ID NO:3),VH CDR2可包含RIRS KYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),VH CDR3可包含HGNF GNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),VL CDR1可包含RSSTGAVTTS NYVN(SEQ ID NO:12),VL CDR2可包含GTNKRAP(SEQ IDNO:14),并且VL CDR3可包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)。

[0063] VH CDR1的另外的实例包括表9B中的重链可变结构域的位置31-35处的氨基酸序列。VH CDR2的另外的实例包括表9B中的重链可变结构域的位置50-68处的氨基酸序列。VH CDR3的另外的实例包括表9B中的重链可变结构域的位置101-114处的氨基酸序列。VL CDR1的另外的实例包括表9B中的轻链可变结构域的位置23-36处的氨基酸序列。VH CDR2的另外的实例包括表9B中的轻链可变结构域的位置52-58处的氨基酸序列。VH CDR3的另外的实例包括表9B中的轻链可变结构域的位置91-99处的氨基酸序列。

[0064] 在一些实施方案中,在靶标结合蛋白中,重链可变结构域可包含序列SEQ ID NO:20并且轻链可变结构域可包含序列SEQ ID NO:21。

[0065] 在一些实例中,重链可变结构域和轻链可变结构域可包含一个或多个形成二硫键的半胱氨酸。在一些实例中,二硫键可以提高稳定性,同时不干扰分子的靶标结合。举例来说,重链结构域可包含序列SEQ ID NO:24并且轻链结构域可包含序列SEQ ID NO:25。在一些实例中,重链和轻链可变结构域没有这样的半胱氨酸突变。举例来说,重链结构域可包含序列SEQ ID NO:22并且轻链结构域可包含序列SEQ ID NO:23。

[0066] 举例来说,重链可变结构域可包含SEQ ID NO:46的序列或128,并且轻链可变结构域中的轻链可变结构域可包含SEQ ID NO:49的序列、64、113、98、107或122。在一些实例中,重链可变结构域包括包含序列SEQ ID NO:3的VH CDR1、包含序列SEQ ID NO:5的VH CDR2和包含序列SEQ ID NO:6、7或8的VH CDR3,并且重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46或128中的任一者至少80%同一(例如至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少

92％、至少94％、至少96％、至少98％、至少99％或100％同一)的序列;并且轻链可变结构域包括包含序列SEQ ID NO:10、11、12或13的LH CDR1、包含序列SEQ ID NO:14的LH CDR2和包含序列SEQ ID NO:15、16、17或18的LH CDR3,并且轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:49、64、113、98、107或122中的任一者至少80％同一(例如至少82％、至少84％、至少86％、至少88％、至少90％、至少92％、至少94％、至少96％、至少98％、至少99％或100％同一)的序列。在一个实例中,重链可变结构域包括包含序列SEQ ID NO:3的VH CDR1、包含序列SEQ ID NO:5的VH CDR2和包含序列SEQ ID NO:6、7或8的VH CDR3,并且重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46或128中的任一者至少95％同一的序列;并且轻链可变结构域包括包含序列SEQ ID NO:10、11、12或13的LH CDR1、包含序列SEQ ID NO:14的LH CDR2和包含序列SEQ ID NO:15、16、17或18的LH CDR3,并且轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:49、64、113、98、107或122中的任一者至少95％同一的序列。在一个实例中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列;并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:49的序列。在一些实例中,重链可变结构域包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3,并且重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少80％同一(例如至少82％、至少84％、至少86％、至少88％、至少90％、至少92％、至少94％、至少96％、至少98％、至少99％或100％同一)的序列;并且轻链可变结构域包括包含RSSTGAVTTSNYPN(SEQ ID NO:11)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VL CDR3,并且轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:49至少80％同一(例如至少82％、至少84％、至少86％、至少88％、至少90％、至少92％、至少94％、至少96％、至少98％、至少99％或100％同一)的序列。

[0067] 在一个实例中,重链可变结构域中的重链可变结构域包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3,并且重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少95％同一的序列;并且轻链可变结构域包括包含RSSTGAVTTSNYPN(SEQ ID NO:11)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VL CDR3,并且轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:49至少95％同一的序列。

[0068] 在另一实例中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列;并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:64的序列。在一些实例中,重链可变结构域包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3,并且重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少80％同一(例如至少82％、至少84％、至少86％、至少88％、至少90％、至少92％、至少94％、至少96％、至少98％、至少99％或100％同一)的序列;并且轻链可变结构域包括包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2、包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VL CDR3,并且轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:64至少80％同一(例如至少82％、至少84％、至少86％、至少88％、至少90％、至少92％、至少94％、至少96％、至少98％、至少99％或100％同一)的序列。在一个实例中,重链可变结构域包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3,并且重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少95％同一的序列;并且轻链可变结构域包括包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的

VLCDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2、包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VL CDR3,并且轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:64至少95%同一的序列。

[0069] 在另一实例中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:113的序列。在一些实例中,重链可变结构域包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3,并且重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少80%同一(例如至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%、至少99%或100%同一)的序列;并且轻链可变结构域包括包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含ILWYSNRWV(SEQ ID NO:18)的VL CDR3,并且轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:113至少80%同一(例如至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%、至少99%或100%同一)的序列。在一个实例中,重链可变结构域包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3,并且重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少95%同一的序列;并且轻链可变结构域包括包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)的VLCDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含ILWYSNRWV(SEQ ID NO:18)的VL CDR3,并且轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:113至少95%同一的序列。

[0070] 在另一实例中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:98的序列。在一些实例中,重链可变结构域包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2和包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3,并且重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少80%同一(例如至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%、至少99%或100%同一)的序列,并且轻链可变结构域包括包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VLCDR2和包含VLWYSNLWV(SEQ ID NO:17)的VL CDR3,并且轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:98至少80%同一(例如至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%、至少99%或100%同一)的序列。在一个实例中,重链可变结构域包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2和包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3,并且重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少95%同一的序列;并且轻链可变结构域包括包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的VLCDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含VLWYSNLWV(SEQ ID NO:17)的VL CDR3,并且轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:98至少95%同一的序列。

[0071] 在另一实例中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:107的序列。在一些实例中,重链可变结构域包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3,并且重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少80%同一(例如至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%、至少99%或100%同一)的序列;并且轻链可变结构域包括包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:

16)的VL CDR3,并且轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:107至少80%同一(例如至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%、至少99%或100%同一)的序列。在一个实例中,重链可变结构域包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3,并且重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少95%同一的序列;并且轻链可变结构域包括包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)的VLCDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VL CDR3,并且轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:107至少95%同一的序列。

[0072] 在另一实例中,重链可变结构域中的重链可变结构域可包含SEQ ID NO:128的序列并且轻链可变结构域中的轻链可变结构域可包含SEQ ID NO:122的序列。在一些实例中,重链可变结构域包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:8)的VH CDR3,重链可变结构域包含与SEQ ID NO:128至少80%同一(例如至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%、至少99%或100%同一)的序列;并且轻链可变结构域包括包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VL CDR3,并且轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:122至少80%同一(例如至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%或100%同一)的序列。在一个实例中,重链可变结构域包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:8)的VH CDR3,重链可变结构域包含与SEQ ID NO:128至少95%同一的序列;并且轻链可变结构域包括包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VL CDR3,并且轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:122至少95%同一的序列。

[0073] 重链可变结构域和轻链可变结构域的另外的实例包括表9B中的那些。

[0074] 在靶标结合蛋白为单链蛋白(例如scFv)的情况下,单链靶标结合蛋白可包含SEQ ID NO:50、28、114、99、108或32的序列。在一些实例中,单链靶标结合蛋白包括包含序列SEQ ID NO:3的VH CDR1、包含序列SEQ ID NO:5的VH CDR2、包含序列SEQ ID NO:6、7或8的VH CDR3、包含序列SEQ ID NO:10、11、12或13的LH CDR1、包含序列SEQ ID NO:14的LH CDR2和包含序列SEQ ID NO:15、16、17或18的LH CDR3,并且单链靶标结合蛋白包含与SEQ ID NO:50、28、114、99、188或32中的任一者至少80%同一(例如至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%、至少99%或100%同一)的序列。举例来说,单链靶标结合蛋白包括包含序列SEQ ID NO:3的VH CDR1、包含序列SEQ ID NO:5的VH CDR2、包含序列SEQ ID NO:6、7或8的VH CDR3、包含序列SEQ ID NO:10、11、12或13的LH CDR1、包含序列SEQ ID NO:14的LH CDR2和包含序列SEQ ID NO:15、16、17或18的LH CDR3,并且单链靶标结合蛋白包含与SEQ ID NO:50、28、114、99、188或32中的任一者至少95%同一的序列。

[0075] 在一些实例中,单链靶标结合蛋白可包含序列SEQ ID NO:50。在一些实例中,单链靶标结合蛋白包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3、包含RSSTGAVTTSNYPN

(SEQ ID NO:11)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VL CDR3,,并且单链靶标结合蛋白包含与SEQ ID NO:50至少80%同一(例如至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%同一)的序列。举例来说,单链靶标结合蛋白包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3、包含RSSTGAVTTSNYPN(SEQ ID NO:11)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VLCDR3,并且单链靶标结合蛋白包含与SEQ ID NO:50至少95%同一的序列。

[0076] 在一些实例中,单链靶标结合蛋白可包含序列SEQ ID NO:28。在一些实例中,单链靶标结合蛋白包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3、包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2、包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VL CDR3,并且单链靶标结合蛋白包含与SEQ ID NO:28至少80%同一(例如至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%同一)的序列。举例来说,单链靶标结合蛋白包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3、包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2、包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VLCDR3,并且单链靶标结合蛋白包含与SEQ ID NO:28至少95%同一的序列。

[0077] 在一些实例中,单链靶标结合蛋白可包含序列SEQ ID NO:114。在一些实例中,单链靶标结合蛋白包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3、包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)的VL CDR 1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含ILWYSN RWV(SEQ ID NO:18)的VL CDR3,并且单链靶标结合蛋白包含与SEQ ID NO:114至少80%同一(例如至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%同一)的序列。举例来说,单链靶标结合蛋白包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYAT YYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3、包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含ILWYSNRWV(SEQ ID NO:18)的VL CDR3,并且单链靶标结合蛋白包含与SEQ ID NO:114至少95%同一的序列。

[0078] 在一些实例中,单链靶标结合蛋白可包含序列SEQ ID NO:99。在一些实例中,单链靶标结合蛋白包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2和包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3、包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含VLWYSNLWV(SEQ ID NO:17)的VLCDR3,并且单链靶标结合蛋白包含与SEQ ID NO:99至少80%同一(例如至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%同一)的序列。举例来说,单链靶标结合蛋白包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2和包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3、包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的VL

CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含VLWYSNLWV(SEQ ID NO:17)的VLCDR3,并且单链靶标结合蛋白包含与SEQ ID NO:99至少95%同一的序列。

[0079] 在一些实例中,单链靶标结合序列SEQ ID NO:108。在一些实例中,单链靶标结合蛋白包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3、包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VL CDR3,并且单链靶标结合蛋白包含与SEQ ID NO:108至少80%同一(例如至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%同一)的序列。举例来说,单链靶标结合蛋白包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的VH CDR3、包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VLCDR3,并且单链靶标结合蛋白包含与SEQ ID NO:108至少95%同一的序列。

[0080] 在一些实例中,单链靶标结合蛋白可包含序列SEQ ID NO:32。在一些实例中,单链靶标结合蛋白包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:8)的VH CDR3、包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VL CDR3,并且单链靶标结合蛋白包含与SEQ ID NO:32至少80%同一(例如至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%同一)的序列。举例来说,单链靶标结合蛋白包括包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:8)的VH CDR3、包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的VL CDR2和包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的VLCDR3,并且单链靶标结合蛋白包含与SEQ ID NO:32至少95%同一的序列。

[0081] 单链靶标结合蛋白的另外的实例包括表9B中公开的那些。

[0082] 靶标结合蛋白可以特异性地结合于CD3(例如,CD3ε)。如本文所用,术语“特异性结合(specific binding)”和“免疫性结合(specifically binds)”是指在免疫球蛋白分子与所述免疫球蛋白具有特异性的抗原之间发生的类型的非共价相互作用。免疫结合相互作用的强度或亲和力可根据相互作用的解离常数(K_d或K_D)来表示,其中K_d越小表示亲和力越大。结合相互作用的强度或亲和力可以用缔合速率(Kon)或解离速率(Koff)来表示。结合相互作用的强度或亲和力是指靶标结合结构域与其结合配偶体(例如抗原或表位)之间非共价相互作用总和的强度。除非另外说明,否则如本文所用的“结合亲和力”是指反映靶标结合结构域和抗原或表位的成员之间1:1相互作用的内在结合亲和力。亲和力可通过本领域已知的常用方法(包括本文中描述的那些方法)进行测量。例如,可以使用表面等离子体共振(SPR)技术(例如,BIACORE®)或生物层干涉法(例如,FORTEBIO®)来确定亲和力。确定靶标结合结构域与其相应抗原或表位的亲和力的另外的方法是本领域已知的。

[0083] 如本文所用,CD3结合蛋白“特异性结合”于CD3的说法是指与CD3结合的蛋白质的解离常数(Kd)小于100μM(例如,小于5μM或10μM)。靶标结合蛋白可以约0.01nM至约500nM(例如约0.01nM至约450nM、约0.01nM至约400nM、约0.01nM至约350nM、约0.01nM至约300、约

0.01nM至约250nM、约0.01nM至约200nM、约0.01nM至约150nM、约0.01nM至约100nM、约0.01nM至约80nM、约0.01nM至约60nM、约0.01nM至约50nM、约0.01nM至约40nM、约0.01nM至约25nm、约0.01nM至约20nM、约0.01nM至约15nM、约0.01nM至约10nM、约0.01nM至约8nM、约0.01nM至约6nM、约0.01nM至约5nM、约0.01nM至约4nM、约0.01nM至约3nM、约0.01nM至约2nM、约0.01nM至约1nM、约0.01nM至约0.8nM、约0.01nM至约0.6nM、约0.01nM至约0.4nM、约0.01nM至约0.2nM、约0.01nM至约0.1nM、约0.01nM至约0.05nM、约0.05nM至约500nM、约0.05nM至约450nM、约0.05nM至约400nM、约0.05nM至约350nM、约0.05nM至约300、约0.05nM至约250nM、约0.05nM至约200nM、约0.05nM至约150nM、约0.05nM至约100nM、约0.05nM至约80nM、约0.05nM至约60nM、约0.05nM至约50nM、约0.05nM至约40nM、约0.05nM至约25nm、约0.05nM至约20nM、约0.05nM至约15nM、约0.05nM至约10nM、约0.05nM至约8nM、约0.05nM至约6nM、约0.05nM至约5nM、约0.05nM至约4nM、约0.05nM至约3nM、约0.05nM至约2nM约0.05nM至约1nM、约0.05nM至约0.8nM、约0.05nM至约0.6nM、约0.05nM至约0.4nM、约0.05nM至约0.2nM、约0.05nM至约0.1nM、约0.1nM至约500nM、约0.1nM至约450nM、约0.1nM至约400nM、约0.1nM至约350nM、约0.1nM至约300、约0.1nM至约250nM、约0.1nM至约200nM、约0.1nM至约150nM、约0.1nM至约100nM、约0.1nM至约80nM、约0.1nM至约60nM、约0.1nM至约50nM、约0.1nM至约40nM、约0.1nM至约25nm、约0.1nM至约20nM、约0.1nM至约15nM、约0.1nM至约10nM、约0.1nM至约8nM、约0.1nM至约6nM、约0.1nM至约5nM、约0.1nM至约4nM、约0.1nM至约3nM、约0.1nM至约2nM、约0.1nM至约1nM、约0.1nM至约0.8nM、约0.1nM至约0.6nM、约0.1nM至约0.4nM、约0.1nM至约0.2nM、约0.2nM至约500nM、约0.2nM至约450nM、约0.2nM至约400nM、约0.2nM至约350nM、约0.2nM至约300、约0.2nM至约250nM、约0.2nM至约200nM、约0.2nM至约150nM、约0.2nM至约100nM、约0.2nM至约80nM、约0.2nM至约60nM、约0.2nM至约50nM、约0.2nM至约40nM、约0.2nM至约25nM、约0.2nM至约20nM、约0.2nM至约15nM、约0.2nM至约10nM、约0.2nM至约8nM、约0.2nM至约6nM、约0.2nM至约5nM、约0.2nM至约4nM、约0.2nM至约3nM、约0.2nM至约2nM、约0.2nM至约1nM、约0.2nM至约0.8nM、约0.2nM至约0.6nM、约0.2nM至约0.4nM、约0.4nM至约500nM、约0.4nM至约450nM、约0.4nM至约400nM、约0.4nM至约350nM、约0.4nM至约300、约0.4nM至约250nM、约0.4nM至约200nM、约0.4nM至约150nM、约0.4nM至约100nM、约0.4nM至约80nM、约0.4nM至约60nM、约0.4nM至约50nM、约0.4nM至约40nM、约0.4nM至约25nm、约0.4nM至约20nM、约0.4nM至约15nM、约0.4nM至约10nM、约0.4nM至约8nM、约0.4nM至约6nM、约0.4nM至约5nM、约0.4nM至约4nM、约0.4nM至约3nM、约0.4nM至约2nM、约0.4nM至约1nM、约0.4nM至约0.8nM、约0.4nM至约0.6nM、约0.5nM至约500nM、约0.5nM至约450nM、约0.5nM至约400nM、约0.5nM至约350nM、约0.5nM至约300、约0.5nM至约250nM、约0.5nM至约200nM、约0.5nM至约150nM、约0.5nM至约100nM、约0.5nM至约80nM、约0.5nM至约60nM、约0.5nM至约50nM、约0.5nM至约40nM、约0.5nM至约25nm、约0.5nM至约20nM、约0.5nM至约15nM、约0.5nM至约10nM、约0.5nM至约8nM、约0.5nM至约6nM、约0.5nM至约5nM、约0.5nM至约4nM、约0.5nM至约3nM、约0.5nM至约2nM、约0.5nM至约1nM、约0.5nM至约0.8nM、约0.5nM至约0.6nM、约0.6nM至约500nM、约0.6nM至约450nM、约0.6nM至约400nM、约0.6nM至约350nM、约0.6nM至约300、约0.6nM至约250nM、约0.6nM至约200nM、约0.6nM至约150nM、约0.6nM至约100nM、约0.6nM至约80nM、约0.6nM至约60nM、约0.6nM至约50nM、约0.6nM至约40nM、约0.6nM至约25nM、约0.6nM至约20nM、约0.6nM至约15nM、约0.6nM至约10nM、约0.6nM

至约8nM、约0.6nM至约6nM、约0.6nM至约5nM、约0.6nM至约4nM、约0.6nM至约3nM、约0.6nM至约2nM、约0.6nM至约1nM、约0.6nM至约0.8nM、约1nM至约500nM、约1nM至约450nM、约1nM至约400nM、约1nM至约350nM、约1nM至约300、约1nM至约250nM、约1nM至约200nM、约1nM至约150nM、约1nM至约100nM、约1nM至约80nM、约1nM至约60nM、约1nM至约50nM、约1nM至约40nM、约1nM至约25nm、约1nM至约20nM、约1nM至约15nM、约I nM至约10nM、约1nM至约8nM、约1nM至约6nM、约I nM至约5nM、约1nM至约4nM、约1nM至约3nM、约1nM至约2nM、约2nM至约500nM、约2nM至约450nM、约2nM至约400nM、约2nM至约350nM、约2nM至约300、约2nM至约250nM、约2nM至约200nM、约2nM至约150nM、约2nM至约100nM、约2nM至约80nM、约2nM至约60nM、约2nM至约50nM、约2nM至约40nM、约2nM至约25nrn、约2nM至约20nM、约2nM至约15nM、约2nM至约10nM、约2nM至约8nM、约2nM至约6nM、约2nM至约5nM、约2nM至约4nM、约2nM至约3nM、约5nM至约500nM、约5nM至约450nM、约5nM至约400nM、约5nM至约350nM、约5nM至约300、约5nM至约250nM、约5nM至约200nM、约5nM至约150nM、约5nM至约100nM、约5nM至约80nM、约5nM至约60nM、约5nM至约50nM、约5nM至约40nM、约5nM至约25nm、约5nM至约20nM、约5nM至约15nM、约5nM至约10nM、约5nM至约8nM、约5nM至约6nM、约10nM至约500nM、约10nM至约450nM、约10nM至约400nM、约10nM至约350nM、约10nM至约300、约10nM至约250nM、约10nM至约200nM、约10nM至约150nM、约10nM至约100nM、约10nM至约80nM、约10nM至约60nM、约10nM至约50nM、约10nM至约40nM、约10nM至约25nm、约10nM至约20nM、约10nM至约15nM、约20nM至约500nM、约20nM至约450nM、约20nM至约400nM、约20nM至约350nM、约20nM至约300、约20nM至约250nM、约20nM至约200nM、约20nM至约150nM、约20nM至约100nM、约20nM至约80nM、约20nM至约60nM、约20nM至约50nM、约20nM至约40nM、约50nM至约500nM、约50nM至约450nM、约50nM至约400nM、约50nM至约350nM、约50nM至约300、约50nM至约250nM、约50nM至约200nM、约50nM至约150nM、约50nM至约100nM、约50nM至约80nM、约100nM至约500nM、约100nM至约450nM、约100nM至约400nM、约100nM至约350nM、约100nM至约300、约100nM至约250nM、约100nM至约200nM、约100nM至约150nM、约250nM至约500nM、约250nM至约450nM、约250nM至约400nM、约250nM至约350nM、约250nM至约300、约400nM至约500nM或约400nM至约450nM)的Kd特异性结合于CD3。

[0084] 接头

[0085] 靶标结合蛋白可能包含一个或多个接头。接头可以包含连接两个组分(例如,重链可变结构域与轻链可变结构域之间、靶标结合结构域与可裂解部分之间、靶标结合结构域与掩蔽部分之间、掩蔽部分与可裂解部分之间、或半衰期延长部分与靶标结合蛋白中的另一个组分之间)的一段氨基酸序列。接头可以是任何蛋白酶都不能裂解的,或者是任何人类天然存在的蛋白酶都不能裂解的。在一些实施方案中,一个或多个接头可以是柔性接头,其可引入靶标结合蛋白中以在一个或多个在结构域之间的接界、在部分之间的接界、在部分与结构域之间的接界处,或在接头将有益的任何其它接界处提供柔性。在一些实施方案中,当靶标结合蛋白以构象受约束构建体形式提供时,可插入接头以有助于结构的形成和维持。

[0086] 本文所述的任何接头都可提供所需柔性以有助于抑制靶标的结合,或有助于蛋白酶对可裂解部分的裂解。在一些实施方案中,接头可以是完全或部分柔性的,使得接头可包括柔性接头以及一个或多个赋予较小柔性的结构的部分以提供所需靶标结合蛋白。一些接

头可包括半胱氨酸残基,其可形成二硫键并降低构建体的柔性。

[0087] 在一些实施方案中,当靶标结合蛋白包含掩蔽部分时,与掩蔽部分偶联的接头可以具有一定长度,使得掩蔽部分处于三级或四级结构中有效地掩蔽蛋白质中的靶标结合结构域的位置,从而允许掩蔽部分掩蔽靶标结合蛋白中的靶标结合结构域。例如,在三级或四级结构中,掩蔽部分可能位于要掩蔽的靶标结合结构域的近端。

[0088] 在大多数情况下,接头长度通过在N至C方向上对从接头的与前面组分的C端氨基酸邻接的N端到接头的与后面组分的N端氨基酸邻接的C端的氨基酸数目进行计数来确定(即其中接头长度不包括前面组分的C端氨基酸或后面组分的N端氨基酸)。

[0089] 在一些实施方案中,接头可包含总共1至50、1至40、1至30、1至25个(例如,1至24、1至22、1至20、1至18、1至16、1至15、1至14、1至12、1至10、1至8、1至6、1至5、1至4、1至3、1至2、2至25、2至24、2至22、2至20、2至18、2至16、2至15、2至14、2至12、2至10、2至8、2至6、2至5、2至4、2至3、4至25、4至24、4至22、4至20、4至18、4至16、4至15、4至14、4至12、4至10、4至8、4至6、4至5、5至25、5至24、5至22、5至20、5至18、5至16、5至15、5至14、5至12、5至10、5至8、5至6、6至25、6至24、6至22、6至20、6至18、6至16、6至15、6至14、6至12、6至10、6至8、8至25、8至24、8至22、8至20、8至18、8至16、8至15、8至14、8至12、8至10、10至25、10至24、10至22、10至20、10至18、10至16、10至15、10至14、10至12、12至25、12至24、12至22、12至20、12至18、12至16、12至15、12至14、14至25、14至24、14至22、14至20、14至18、14至16、14至15、15至25、15至24、15至22、15至20、15至18、15至16、16至25、16至24、16至22、16至20、16至18、18至25、18至24、18至22、18至20、20至25、20至24、20至22、22至25、22至24或24至25个氨基酸)。在一些实施方案中,接头可包含总共1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。

[0090] 在一些实施方案中,接头可富含甘氨酸(Gly或G)残基。在一些实施方案中,接头可富含丝氨酸(Ser或S)残基。在一些实施方案中,接头可富含甘氨酸和丝氨酸残基。在一些实施方案中,接头可具有一对或多对甘氨酸-丝氨酸残基(GS)(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10对或更多对GS)。

[0091] 在一些实施方案中,接头可具有一个或多个Gly-Gly-Gly-Ser(GGGS)序列(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个GGG S序列)。在一些实施方案中,接头可具有一个或多个Gly-Gly-Gly-Gl y-Ser(GGGGS)序列(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个GGGGS序列)。在一些实施方案中,接头可具有一个或多个Gl y-Gly-Ser-Gly(GGSG)序列(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个GGSG序列)。接头的实例包括甘氨酸聚合物(G)n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如(GS)n、(GGS)n、(GSGGS)n和(GGGS)n,其中n为至少1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其它柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对无结构的,因此可能能够充当组分之间的中性连接。甘氨酸甚至比丙氨酸接近显著更大的φ-ψ空间,并且受到的限制远小于具有较长侧链的残基(参见Scheraga,Rev.Computational Chem.11173-142(1992))。示例柔性接头包括以下中的一者或一者或多者的组合:GGSG、GGSGG(SEQ ID NO:667)、GSGSG(SEQ ID NO:668)、GSGGG(SEQ ID NO:669)、GGGSG(SEQ ID NO:670)、GSSSG(SEQ ID NO:671)、GSSGGSGGSGG(SEQ ID NO:672)、GGGS(SEQ ID NO:673)、GGGSGGGS(SEQ ID NO:674)、GGGSGGGSGGGS(SEQ ID NO:675)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:676)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:677)、GGGG

SGGGGS(SEQ ID NO:678)、GGGGS(SEQ ID NO:679)、GS、GGGGSGS(SEQ ID NO:680)、GGGGSGGGGSGGGGSGS(SEQ ID NO:681)、GGSLDPKGGGGS(SEQ ID NO:682)、PKSCDKTHTCPPCPAPELLG(SEQ ID NO:683)、SKYGPPCPPCPAPEFLG(SEQ ID NO:684)、GKSSGSGSESKS(SEQ ID NO:685)、GSTSGSGK SSEGKG(SEQ ID NO:686)、GSTSGSGKSSEGSGSTKG(SEQ ID NO:687)、GSTSGSGKPGSGEGSTKG(SEQ ID NO:688)和GSTS GSGKPGSSEGST(SEQ ID NO:689)或GSTSGSGKPGSSEGST(SE Q ID NO:690)。

[0092] 接头的实例还可包括与本文所述的示例接头至少70%同一(例如至少72%、至少74%、至少75%、至少76%、至少78%、至少80%、至少82%、至少84%、至少85%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一)的序列。普通技术人员将认识到,设计可包括完全或部分柔性的接头,以使得接头可包括柔性接头以及赋予柔性较小的结构以提供所需的靶标结合蛋白结构的一个或多个部分。

[0093] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白可包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个接头(例如本文所述或本领域中已知的任何示例性接头序列的相同或不同的接头序列)。在一些实施方案中,接头可以包含不基于氨基酸的接头,包括但不限于磺基-SIAB(磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯)、SMPB(琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯)和磺基-SMPB(磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯),其中接头与伯胺巯基反应。

[0094] 半衰期延长部分(EM)

[0095] 靶标结合蛋白还可以包含半衰期延长部分(EM)。在一些实例中,半衰期延长部分可以是血清半衰期延长部分,即能够延长与EM附接的分子的血清半衰期。

[0096] 在一些实例中,EM可包含抗体的片段可结晶区域(Fc结构域)。例如,EM可以是IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的Fc结构域。在一些实例中,EM可包含由两个Fc结构域形成的二聚体。Fc结构域可以是野生型肽或突变体。例如,EM可包含由两个Fc结构域突变体形成的二聚体。在这种情况下,两个Fc结构域突变体可以是Fc结构域臼突变体和Fc结构域杵突变体。杵突变体和臼突变体可彼此相互作用以促进两个Fc结构域的二聚化。在一些实施方案中,杵突变体和臼突变体可在两个Fc结构域之间的界面内(例如在CH3结构域中)包含一个或多个氨基酸修饰。在一个实例中,修饰包含在一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代T366W和任选的氨基酸取代S354C,以及在另一个IgGFc结构域中的氨基酸取代T366S、L368A、Y407V和任选的Y349C(根据EU编号系统编号)。Fc突变体的实例还包括SEQ ID NO:26-27。

[0097] Fc结构域突变体的实例还包括美国专利No.7,695,936中描述的那些,该专利以引用的方式整体并入本文中。在一个实例中,修饰包含在一个IgGFc结构域中的氨基酸取代T366Y,以及在另一个IgGFc结构域中的氨基酸取代Y407T。在一个实例中,修饰包含在一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代T366W,以及在另一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代Y407A。在一个实例中,修饰包含在一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代F405A,以及另一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代T394W。在一个实例中,修饰包含在一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代T366Y和F405A,以及在另一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代T394W和Y407T。在一个实例中,修饰包含在一个IgGFc结构域中的氨基酸取代T366W和F405W,以及在另一个IgGFc结构域中的氨基酸取代T394S和Y407A。在一个实例中,修饰包含在一个IgG Fc结构域中的氨基酸取

代F405W和Y407A,以及在另一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代T366W和T394S。在一个实例中,修饰包含在一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代F405W,以及在另一个IgGFc结构域中的氨基酸取代T394S。Fc结构域中的突变位置按照EU编号系统进行编号。IgGFc结构域可以包含SEQ ID NO:34-37(IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的序列。在这些序列中,氨基酸1-107对应于EU编号341-447。

[0098] 在一些实例中,Fc结构域突变体可能具有降低的效应功能。这类Fc结构域的实例包括US20190135943中公开的那些,其以引用的方式整体并入本文中。Fc结构域的其它实例包括SEQ ID NO:38-42。

[0099] EM的其它实例包括免疫球蛋白(例如IgG)、血清白蛋白(例如人类血清白蛋白(HSA))、六帽GST(谷胱甘肽S-转移酶)谷胱甘肽亲和力、钙调蛋白(Calmodulin)结合肽(CBP)、Strep-tag、纤维素结合结构域、麦芽糖结合蛋白、S肽标签、几丁质结合标签、免疫反应性表位、表位标签、E2Tag、HA表位标签、Myc表位、FLAG表位、AU1和AU5表位、Glu-Glu表位、KT3表位、IRS表位、Btag表位、蛋白激酶-C表位和VSV表位。

[0100] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白的血清半衰期可能比参考蛋白(例如,基本上相同的、但不具有半衰期延长部分的靶标结合蛋白)的血清半衰期更长,例如,靶标结合蛋白的pK比参考蛋白的pK更长。在一些实例中,具有EM的靶标结合蛋白的血清半衰期可能比相同但不具有EM的参考靶标结合蛋白的血清半衰期长至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、4倍、6倍、8倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍。在一些实施方案中,当施用于生物体时,靶标结合蛋白的血清半衰期可以为至少15天、12天、11天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天、1天、20小时、18小时、16小时、14小时、12小时、10小时、8小时、6小时、4小时、3小时、2小时或1小时。

[0101] 另外的靶标结合结构域

[0102] 除了本文所述的CD3结合结构域之外,靶标结合蛋白还可以包含一个或多个靶标结合结构域。在一些实施方案中,靶标结合蛋白可包含额外的轻链可变结构域和额外的重链可变结构域。额外的轻链可变结构域和额外的重链可变结构域可以形成额外的靶标结合结构域。在一些实例中,CD3结合结构域和额外的靶标结合结构域可以是相同的。在一些实例中,CD3结合结构域和额外的靶标结合结构域可以彼此不同(例如,可以特异性地结合相同或不同的抗原或表位)。

[0103] 在一些实施方案中,CD3结合结构域和额外的靶标结合结构域可以都是Fv片段,或者至少一个可以是Fv片段。在一些实施方案中,CD3结合结构域和额外的靶标结合结构域可以都是Fab片段,或者至少一个可以是Fab片段。在一些实施方案中,CD3结合结构域和额外的靶标结合结构域可以是Fab'片段,或者至少一个可以是Fab'片段。

[0104] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白可以是多特异性的(例如双特异性、三特异性、四特异性和其它多特异性靶标结合蛋白),例如结合CD3和一个或多个额外靶标。在一些实施方案中,多特异性靶标结合蛋白可以是多价的,例如包含多个靶标结合位点,不管结合位点识别相同还是不同的靶标。在一些实施方案中,靶标结合蛋白可以是双特异性的。术语“双特异性”意指靶标结合蛋白能够特异性地结合两个不同的靶标。通常,双特异性靶标结合蛋白包含两个靶标结合结构域,每个靶标结合结构域能够特异性结合不同的靶标。在一些实施方案中,双特异性靶标结合蛋白能够同时结合两个靶标,例如在两个不同细胞上表

达的两个靶标蛋白。

[0105] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白可以包含CD3结合结构域和能够结合与疾病相关的细胞(例如,肿瘤细胞)表面上的分子的额外靶标结合结构域。这类靶标结合蛋白可以同时与免疫细胞(例如,T细胞)和与疾病相关的细胞(例如,肿瘤细胞)结合,从而激活免疫细胞并将激活的免疫细胞同与疾病相关的细胞交联。在一些实施方案中,靶标结合蛋白可以配制为嵌合抗原受体(CAR)、T细胞接合抗体(例如,T细胞接合双特异性抗体)、前双特异性T细胞接合剂(前BITE)分子、前嵌合抗原受体(前CAR)修饰的T细胞或其它工程化受体或其它免疫效应细胞(例如CAR修饰的NK细胞)的一部分。

[0106] 在一些实例中,靶标结合蛋白可以是包含CD3结合结构域和本文描述的额外靶标结合结构域的单价双特异性抗体。如本文所用,术语"单价双特异性抗体"是指只有一个抗原结合结构域针对给定靶标的双特异性抗体。本发明人意外地发现,在单价CD3结合蛋白(包括特异性结合CD3的单价双特异性抗体(例如,抗CD3 scFv))的背景下本文所述的某些CD3结合结构域表现出改善的稳定性、可制造性和/或CD3结合亲和力。

[0107] 额外的靶标结合结构域的靶标可以是蛋白质或其它类型的分子,例如细胞表面受体和分泌结合蛋白(例如生长因子)、可溶性酶、结构蛋白(例如胶原蛋白、纤连蛋白)等。

[0108] 在一些实例中,额外靶标结合结构域可以结合作为与疾病相关的细胞上或细胞内的分子的靶标。举例来说,额外靶标结合结构域可以与肿瘤细胞结合。在这类情况下,额外靶标结合结构域可能与肿瘤相关抗原结合。如本文所用,术语"肿瘤相关抗原"是指与癌症相关的任何抗原,包括蛋白质、糖蛋白、神经节苷脂、碳水化合物、脂质。这种抗原可能在肿瘤细胞(例如恶性细胞)上表达,也可能在肿瘤微环境(如肿瘤相关血管、细胞外基质、间充质基质或免疫浸润物)中表达。在一些实施方案中,肿瘤相关抗原可以是人表皮生长因子受体2(HER2)。举例来说,额外靶标结合结构域可以是曲妥珠单抗(trastuzumab)或其片段。在另一实例中,额外靶标结合结构域可以是帕妥株单抗(pertuzumab)或其片段。

[0109] 可激活靶标结合蛋白

[0110] 在一个方面,本文中的靶标结合蛋白包括可激活靶标结合蛋白。一般来说,可激活靶标结合蛋白可包含前结构域,其指的是当与靶标结合蛋白连接时起到抑制靶标结合蛋白的靶标结合作用的多肽,并且包括形成蛋白酶可裂解底物的氨基酸序列。抑制靶标结合的前结构域部分称为掩蔽部分(MM),而作为蛋白酶可裂解底物的氨基酸序列称为可裂解部分(CM)。前结构域可以包括位于MM与CM之间和/或前结构域末端(例如,羧基端和/或氨基端,以促进前结构域与靶标结合蛋白的连接)的接头(L)。在某些实施方案中,前结构域可以包含以下式之一(表示从N端到C端方向的氨基酸序列):MM-CM、MM-L-CM、MM-CM-L、MM-L-CM-L、CM-MM、CM-L-MM、L-CM-MM或L-CM-L-MM,其中每个"-"表示直接或间接(例如,经由接头)连接。

[0111] 如本文所用,术语"可激活靶标结合蛋白"是指处于非活性(未裂解或天然)状态的靶标结合蛋白。对于普通技术人员来说显而易见的是,在一些实施方案中,裂解的可激活靶标结合蛋白可以连接到不会降低、抑制或干扰靶标结合结构域与其靶标之间的结合的MM。在一些实施方案中,由于CM的裂解(例如,被蛋白酶裂解),导致MM的释放,使得裂解的可激活靶标结合蛋白可能缺少MM。如本文所用,术语"裂解状态"或"活性状态"是指在通过至少一种蛋白酶裂解CM后可激活靶标结合蛋白的状况。术语"未裂解状态"或"非活性状态"是指

在不存在蛋白酶对CM裂解的情况下可激活靶标结合蛋白的状况。

[0112] 可激活意指当可激活靶标结合蛋白处于受抑制、掩蔽或未裂解状态(即第一构象)时,可激活靶标结合蛋白表现出与靶标的第一结合水平,并且当处于未受抑制、未掩蔽和/或裂解状态(即第二构象)时,可激活靶标结合蛋白表现出与靶标的第二结合水平,其中第二靶标结合水平大于第一结合水平。一般来说,与不存在能够裂解CM的裂解剂(即蛋白酶)的情况相比,在这种裂解剂存在下,靶标更接近可激活靶标结合蛋白的靶标结合结构域。因此,当可激活靶标结合蛋白处于未裂解状态时,靶标结合结构域与靶标的结合受到抑制并且其靶标结合可被掩蔽(即,第一构象使得靶标结合结构域不能结合靶标或者结合靶标受到抑制),并且在裂解状态下,靶标结合结构域的靶标结合不受抑制或未被掩蔽。

[0113] 在一些实施方案中,可通过选择感兴趣的靶标结合结构域并构建可激活靶标结合蛋白的剩余部分来设计可激活靶标结合蛋白,以便在构象受限时,MM提供靶标结合结构域的掩蔽或靶标结合结构域与其靶标的结合的减少。可考虑结构设计标准以提供该功能特征。

[0114] 本文中的可激活靶标结合蛋白在受抑制的构象对比未受抑制的构象中表现出靶标结合的所需动态范围的可激活表型。动态范围一般是指(a)在第一组条件下参数的最大检测水平与(b)在第二组条件下该参数的最小检测值的比率。例如,在可激活靶标结合蛋白的背景下,动态范围是指(a)在存在能够裂解可激活靶标结合蛋白中的CM的蛋白酶的情况下与可激活靶标结合蛋白结合的靶标蛋白的最大检测水平与(b)在不存在该蛋白酶的情况下与可激活靶标结合蛋白结合的靶标蛋白的最小检测水平的比率。可激活靶标结合蛋白的动态范围可计算为可激活靶标结合蛋白裂解剂(例如,酶)处理的解离常数与可激活靶标结合蛋白裂解剂处理的解离常数的比率。可激活靶标结合蛋白的动态范围越大,可激活靶标结合蛋白的可激活表型越好。具有相对较高的动态范围值(例如,大于1)的可激活靶标结合蛋白表现出更期望的可激活表型,使得在存在能够裂解可激活靶标结合蛋白的CM的裂解剂(例如,酶)的情况下与不存在裂解剂的情况相比,可激活靶标结合蛋白对靶标蛋白的结合发生的程度更大(例如,主要发生)。

[0115] 本文中的可激活靶标结合蛋白可以包含靶标结合结构域(TB)、降低、抑制或干扰靶标结合结构域与其靶标的结合的一个或多个掩蔽部分(MM)、将一个或多个MM与TB偶联的一个或多个可裂解部分(CM)以及任选的一个或多个半衰期延长部分(EM)。在一些实施方案中,可激活靶标结合蛋白可包含特异性结合CD3的TB,以及抑制TB与CD3结合的掩蔽部分(MM),其中MM经由可裂解部分(CM)与TB偶联(直接或间接,例如经由一个或多个接头)。如本文所用并且除非另有说明,可激活靶标结合蛋白的“偶联”组分可以经由直接共价键或间接共价键偶联,例如经由一个或多个连接肽(也称为“接头”)、可裂解部分或可激活蛋白的其它组分。

[0116] 在一些实施方案中,可激活靶标结合蛋白可以包含超过一个靶标结合结构域(TB)。举例来说,可激活靶标结合蛋白可包含特异性结合CD3的第一TB、抑制TB1与CD3结合的第一MM(MM1)、特异性结合第二靶标的第二靶标结合结构域(TB2)、抑制TB2与第二靶标结合的第二掩蔽部分(MM2),其中MM1经由第一可裂解部分(CM1)与TB1偶联(直接或间接,例如经由一个或多个接头),其中MM2经由第二可裂解部分(CM2)与TB2偶联(直接或间接,例如经由一个或多个接头)。可激活靶标结合蛋白还可以包含半衰期延长部分(EM)。在一个实例

中,可激活靶标结合蛋白包括含有TB1的scFv。

[0117] 掩蔽部分(MM)

[0118] 本文中的可激活靶标结合蛋白可包含一个或多个能够干扰TB与靶标结合的掩蔽部分(MM)。可激活分子(尚未激活)中的掩蔽部分“掩蔽”或减少或以其它方式抑制靶标结合结构域与其靶标的结合。在一些实施方案中,靶标结合蛋白与MM的偶联或修饰可以通过本领域已知的抑制方法(例如,结构变化和竞争抗原结合结构域)抑制蛋白质特异性结合其靶标的能力。在一些实施方案中,靶标结合蛋白与MM的偶联或修饰可能会引起结构变化,从而降低或抑制蛋白质特异性结合其靶标的能力。在一些实施方案中,靶标结合蛋白与MM的偶联或修饰在空间上阻断、降低或抑制抗原结合结构域特异性结合其靶标的能力。

[0119] MM通过CM和任选的一个或多个本文所述的接头与TB偶联。在一些实施方案中,当可激活靶标结合蛋白未被激活时,MM会阻止TB与靶标结合;但是当可激活靶标结合蛋白被激活时(当CM被蛋白酶裂解时),MM不会实质上或显著地干扰TB与靶标的结合。

[0120] 在可激活靶标结合蛋白中,干扰TB靶标结合的MM可以与TB偶联(直接或间接,例如经由一个或多个接头)。或者,干扰TB靶标结合的MM可以直接或间接地与非TB的可激活靶标结合蛋白组分偶联。例如,MM可以直接或间接地与不同的TB偶联。在另一个实例中,MM可以直接或间接地与EM偶联。在任一情况下,在可激活结构的三级或四级结构中,MM可能处于允许MM掩蔽TB的位置(例如,靠近要掩蔽的TB)。

[0121] 在一些实施方案中,MM可与TB相互作用,由此降低或抑制TB与它的结合配偶体之间的相互作用。在一些实施方案中,MM可包含TB的天然存在的结合配偶体的至少部分或全部氨基酸序列。举例来说,MM可为天然存在的结合配偶体的片段。片段可保留与天然存在的结合配偶体至多95%、90%、80%、75%、70%、60%、50%、40%、30%、25%或20%核酸或氨基酸序列同源性。在一些实施方案中,MM可以是TB的同源肽。例如,MM可包含TB表位的序列或其片段。如本文所用,术语“天然存在”当应用于对象时是指对象可在自然界中找到的事实。例如,可从自然界中的来源分离并且不通过人在实验室中或以其它方式有意修饰的存在于生物(包括病毒)中的多肽或多核苷酸序列为天然存在的。

[0122] 在一些实施方案中,MM包含非天然存在的氨基酸序列,或不含有天然存在的结合配偶体或靶标蛋白的氨基酸序列。在某些实施方案中,MM不是TB的天然结合配偶体。MM可为TB的修饰结合配偶体,其含有降低与TB的结合亲和力和/或亲合力的氨基酸变化。在一些实施方案中,MM不含或基本上不含与TB的天然结合配偶体的核酸或氨基酸同源性。在其它实施方案中,MM与TB的天然结合配偶体至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%类似。

[0123] 在一些实施方案中,MM可不特异性结合于TB,而是通过非特异性相互作用如空间位阻来干扰TB与它的结合配偶体结合。举例来说,MM可位于可激活靶标结合蛋白中,使得可激活靶标结合蛋白的三级或四级结构允许MM通过基于电荷的相互作用掩蔽TB,由此将TB保持在适当位置以干扰结合配偶体接近TB。

[0124] 在一些实施方案中,MM与TB结合的解离常数不超过TB与靶标的解离常数。在一些实施方案中,在裂解状态下MM不干扰或竞争TB与靶标的结合。

[0125] 可根据例如干扰蛋白质与靶标结合所需的最小氨基酸序列、感兴趣的靶标蛋白质-蛋白质结合对、TB的大小、接头的存在或不存在等因素选择MM的结构性质。

[0126] 在一些实施方案中,对于偶联的TB来说,MM是独特的。MM的实例包括被特异性筛选以结合TB或其片段的结合结构域的MM(例如亲和力掩蔽)。本文提供了用于筛选MM以获得对于TB来说独特的MM和特异性和/或选择性结合结合配偶体/靶标的结合结构域的那些MM的方法,并且可包括蛋白质展示方法。

[0127] 如本文所用,术语“掩蔽效率”是指可激活靶标结合蛋白在非活性状态下的活性(例如EC_{50})除以对照抗体的活性,其中对照抗体可以是可激活靶标结合蛋白的裂解产物,或者是用作可激活靶标结合蛋白的TB的抗体或其片段。具有降低水平的TB活性的可激活靶标结合蛋白可以具有大于10的掩蔽效率。在一些实施方案中,本文所述的可激活靶标结合蛋白具有大于10、100、1000或5000的掩蔽效率。

[0128] 在一些实施方案中,MM可以是长度为约2至50个氨基酸的多肽。例如,MM可以是长度为2至40、2至30、2至20、2至10、5至15、10至20、15至25、20至30、25至35、30至40、35至45、40至50个氨基酸的多肽。例如,MM可以是长度为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个氨基酸的多肽。在一些实例中,MM可以是长度超过50个氨基酸,例如100、200、300、400、500、600、700、800或更多个氨基酸的多肽。

[0129] 在一些实施方案中,当在例如如US20200308243A1中所述的体外免疫吸附测定中测量时,在具有TB和干扰MM的可激活靶标结合蛋白的非活性状态下,在存在TB靶标下,TB与靶标无结合或基本上无结合,或者与无干扰MM的对应抗体的结合相比,TB与靶标的结合至多为0.001%、0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%或50%,持续至少0.1、0.5、1、2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84、96小时,或5、10、15、30、45、60、90、120、150、180天,或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月。

[0130] 在干扰MM下TB对靶标或结合配偶体的结合亲和力可比在没有干扰MM下TB对它的结合配偶体的结合亲和力低至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000倍,或比在没有干扰MM下TB对它的结合配偶体的结合亲和力低5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、100,000-1,000,000或100,000-10,000,000倍。

[0131] MM对其掩蔽的TB的解离常数可能大于TB对靶标的解离常数。MM对掩蔽的TB的解离常数可比TB对靶标的解离常数大至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000或甚至10,000,000倍。相反,MM对掩蔽的TB的结合亲和力可能低于TB对靶标的结合亲和力。MM对TB的结合亲和力可比TB对靶标的结合亲和力低至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000或甚至10,000,000倍。

[0132] 在一些实施方案中,MM可含有遗传编码氨基酸或遗传非编码氨基酸。遗传非编码氨基酸的实例包括但不限于D-氨基酸、β-氨基酸和γ-氨基酸。在具体实施方案中,MM含有至多50%、40%、30%、20%、15%、10%、5%或1%的遗传非编码氨基酸。

[0133] 在一些实施方案中,一旦自可激活靶标结合蛋白释放并处于游离状态,MM可具有

生物活性或治疗作用,例如结合能力。举例来说,游离肽可与相同或不同的结合配偶体结合。在某些实施方案中,游离MM可发挥治疗作用,从而为本文公开的组合物提供次要功能。在一些实施方案中,一旦与可激活靶标结合蛋白解偶联并处于游离状态,MM可有利地不展现生物活性。举例来说,在一些实施方案中,处于游离状态的MM不在受试者中引发免疫反应。

[0134] 适合的MM可通过筛选程序从具有可变MM的候选可激活靶标结合蛋白的文库鉴定和/或进一步优化。举例来说,可选择TB和CM以提供所需酶/靶标组合,并且可通过下文所述的鉴定提供可转换表型的MM的筛选程序鉴定MM的氨基酸序列。举例来说,随机肽文库(例如包含2至40个氨基酸或更多个氨基酸的肽的随机肽文库)可在本文公开的筛选方法中用于鉴定适合的MM。

[0135] 在一些实施方案中,对TB具有特异性结合亲和力的MM可通过筛选程序鉴定,所述筛选程序包括提供包含候选MM的肽支架文库,其中每个支架由跨膜蛋白和候选MM组成。接着可使文库与整个蛋白质或一部分(例如全长蛋白质、天然存在的蛋白质片段或含有蛋白质的非天然存在的片段(也能够结合感兴趣的结合配偶体))接触,并且鉴定一种或多种具有可检测地结合的蛋白质的候选MM。筛选可通过一轮或多轮磁激活分选(MACS)或荧光激活分选(FACS),以及测定MM对TB的结合亲和力并后续测定掩蔽效率来进行,例如以引用的方式整体并入本文中的WO2009025846和US20200308243A1中所述。

[0136] 在一些实施方案中,可选择MM与特异性抗体或抗体片段一起使用。例如,适合与结合表位的TB一起使用的MM可包含该表位的序列。在一些实例中,适合于掩蔽本文公开的抗CD3结合蛋白的MM包括包含GYLWGCEWNCGGITT(SEQ ID NO:691)、NAFRCW WDPPCQPMT(SEQ ID NO:692)、ARGLCWWDPPCTHDL(SEQ ID NO:693)或NHSLCYWDPPCEPST(SEQ ID NO:694)的序列的MM。抗CD3结合蛋白的另外的掩蔽部分包括MMYCGGNEVLCGP RV(SEQ ID NO:695)、GYRWGCEWNCGGITT(SEQ ID NO:696)、MMYCGGNEIFCEPRG(SEQ ID NO:697)、GYGWGCEWNCGGSSP(SEQ ID NO:698)和MMYCGGNEIFCGPRG(SEQ ID NO:699)的序列。

[0137] 适合的MM的实例公开于WO2021207657、WO2021142029、WO2021061867、WO2020252349、WO2020252358、WO2020236679、WO2020176672、WO2020118109、WO2020092881、WO2020086665、WO2019213444、WO2019183218、WO2019173771、WO2019165143、WO2019075405、WO2019046652、WO2019018828、WO2019014586、WO2018222949、WO2018165619、WO2018085555、WO2017011580、WO2016179335、WO2016179285、WO2016179257、WO2016149201和WO2016014974,其以引用的方式整体并入本文中。

[0138] 可裂解部分(CM)

[0139] 可激活靶标结合蛋白可包含一个或多个可裂解部分(CM)。术语“可裂解部分”和“CM”在本文中可互换用于指代氨基酸序列包含序列特异性蛋白酶的底物的肽。在一些实施方案中,CM可位于TB与MM之间。

[0140] 可以选择可激活靶标结合蛋白的CM和TB,使得TB代表给定靶标的缀合部分,而CM代表一种或多种蛋白酶的底物,其中蛋白酶与组织中的靶标共定位(例如,在受试者的治疗部位或诊断部位)。当可激活靶标结合蛋白暴露于蛋白酶时,蛋白酶可能会裂解可激活靶标结合蛋白中的CM。在一些实施方案中,可激活靶标结合蛋白可具有特殊用途,其中例如,能

够裂解CM中的位点的一种或多种蛋白酶在治疗部位或诊断部位的含靶标组织中以比非治疗部位的组织中(例如在健康组织中)相对更高的水平存在。

[0141] 在一些实施方案中,本文中的CM可包含已在多种癌症中报道过已知底物的蛋白酶的底物。参见例如La Roca等人,British J.Cancer90(7):1414-1421,2004。适用于本文采用的CM组分中的底物包括更普遍见于癌性细胞和组织中的那些。因此,在某些实施方案中,CM可包含更普遍见于与癌症相关的患病组织中的蛋白酶的底物。癌症的实例包括胃癌、乳腺癌、骨肉瘤、食管癌、乳腺癌、HER2阳性癌症、卡波西肉瘤(Kaposi sarcoma)、毛细胞白血病、慢性髓系白血病(CML)、滤泡性淋巴瘤、肾细胞癌(RCC)、黑素瘤、神经母细胞瘤、基底细胞癌、皮肤T细胞淋巴瘤、鼻咽腺癌、卵巢癌、膀胱癌、BCG抗性非肌层浸润性膀胱癌(NMIBC)、子宫内膜癌、胰腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、结直肠癌、食管癌、胆囊癌、胶质瘤,头颈癌、子宫癌、宫颈癌或睾丸癌等。在一些实施方案中,CM组分包含在肿瘤组织中更普遍的蛋白酶的底物。例如,蛋白酶可以由受试者的肿瘤产生。

[0142] 在一些实施方案中,可激活靶标结合蛋白可包含两个CM(例如,用于将MM与多个TB偶联)。在一些实例中,第一和第二CM可包含相同蛋白酶的底物。在一些实例中,第一和第二CM可包含不同蛋白酶的底物。在一些实例中,第一和第二CM可包含相同的序列或者由相同的序列组成。在一些实例中,第一和第二CM可包含不同的序列或者由不同的序列组成。

[0143] 适用于本文的可激活靶标结合蛋白的CM包括本领域已知的任何蛋白酶底物。在一些实例中,CM可包含丝氨酸蛋白酶的底物(例如,u型纤溶酶原激活剂(uPA,也称为尿激酶)、蛋白裂解酶(本文中也称为MT-SP1或MTSP1)。在一些实例中,CM可包含基质金属蛋白酶(MMP)的底物。在一些实例中,CM可包含半胱氨酸蛋白酶(CP)的底物(例如,豆荚蛋白)。

[0144] 在一些实施方案中,CM可包含以下各者的底物:解整合素和金属蛋白酶(ADAM)或具有凝血酶敏感素基元的解整合素和金属蛋白酶(ADAMTS)(例如ADAM8、ADAM9、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADEMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS4、ADAMTS5)、天冬氨酸蛋白酶(例如BACE、肾素)、天冬氨酸组织蛋白酶(例如组织蛋白酶D、组织蛋白酶E)、凋亡蛋白酶(例如凋亡蛋白酶1、凋亡蛋白酶2、凋亡蛋白酶3、凋亡蛋白酶4、凋亡蛋白酶5、凋亡蛋白酶6、凋亡蛋白酶7、凋亡蛋白酶8、凋亡蛋白酶9、凋亡蛋白酶10、凋亡蛋白酶14)、半胱氨酸组织蛋白酶(例如组织蛋白酶A、组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶G、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶S、组织蛋白酶V/L2、组织蛋白酶X/Z/P)、半胱氨酸蛋白酶(例如克鲁兹蛋白酶(Cruzipain)、豆荚蛋白、Otubain-2)、糜蛋白酶、DESC1、DPP-4、FAP、弹性蛋白酶、FVIIa、FIXA、FXa、FXIa、FXIIa、颗粒酶B、胍基苯甲酸酶、黑珀素(Hepsin)、HtrA1、人中性粒细胞弹性蛋白酶、KLK(例如KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14)、金属蛋白酶(例如穿膜肽酶(Meprin)、脑啡肽酶、PSMA、BMP-1)、乳铁蛋白、马拉素(Marapsin)、间质蛋白酶-2、MT-SP1/间质蛋白酶、NS3/4A、PACE4、纤溶酶、PSA、MMP(例如MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26、MMP27)、TMPRSS2、TMPRSS3、TMPRSS4、tPA、凝血酶、类胰蛋白酶和uPA。

[0145] 在一些实施方案中,CM中的蛋白酶底物可包含与由相同蛋白酶天然裂解的任何多肽序列基本上不同一(例如,不超过90%、80%、70%、60%或50%同一)的肽序列。

[0146] 在一些实施方案中,CM可为或包含下表6中任一个序列的共有序列所涵盖的序列。

[0147] 表6.示例性CM序列

[0148]

序列	SEQ ID NO	序列	SEQ ID NO
AANALAHGLF	167	HMMQYARH	418
AANL	168	HTGRSGAL	419
AANLGSGGSS	169	HVPRQ	420
AAPRS	170	HVPRQV	421
AAPRSF	171	HVPRQVAPRSF	422

[0149]

AARGPAIH	172	HVPRQVLSGRS	423
AAYHLVSQ	173	HVPRQVLSGRSAN	424
AFPDMRSVRS	174	HWHLGPPT	425
AFQALRM	175	IANLLSMV	426
AFRHLR	176	IDGR	427
AGLGISST	177	IEGR	428
AGLGVVER	178	ILNLLSMV	429
AGPR	179	ILPRSPAF	430
AHGL	180	IPFSWSRF	431
AHGLF	181	IQNLLSMV	432
AHQALRM	182	ISSGL	433
AIPRVRLFDV	183	ISSGLL	434
ALAHG	184	ISSGLLS	435
ALAHGL	185	ISSGLLSGRSANI	436
ALAHGLF	186	ISSGLLSGRSANP	437
ALAHGLFAPRSF	187	ISSGLLSGRSANPRG	438
ALAHGLFSGRSAN	188	ISSGLLSGRSDDH	439
ALAHGLPTFVHL	189	ISSGLLSGRSDIH	440
ALGLLRLP	190	ISSGLLSGRSDNH	666
ALPSVKMVSE	191	ISSGLLSGRSDNI	441
ALRAP	192	ISSGLLSGRSDNP	442
ANQALRM	193	ISSGLLSGRSDQH	443
ANQALRMA	194	ISSGLLSGRSDTH	444
APPLVKSMVV	195	ISSGLLSGRSDYH	445
APPSFKLVNA	196	ISSGLLSGRSGNH	446
APRS	197	ISSGLLSGRSNI	447
APRSALAHGLF	198	ISSGLLSGRSNIG	448
APRSF	199	ISSGLLSGRSNIGS	449
AQFVLTEG	200	ISSGLLSS	450
AQNLLGMV	201	ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH	451
ARGP	202	ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH	452
ARGPS	203	ISSGLSS	453
ARGPSF	204	IVSRSA	454
ARGPSFK	205	KGLTGRSDRHQA	455
ASGLLRFP	206	KGPKVKVVTL	456
ASPTMKTVGL	207	KNLYGRSENNGN	457
AVGLLAPP	208	KRMPVQFL	458
AVGLLAPPGGLSGRSANI	209	LAAPLGLL	459
AVGLLAPPGGLS	210	LAHG	460

[0150]

GRSANP			
AVGLLAPPGGLS GRSDDH	211	LAHGL	461
AVGLLAPPGGLS GRSDIH	212	LAHGLF	462
AVGLLAPPGGLS GRSDNH	213	LAPLGLQRR	463
AVGLLAPPGGLS GRSDNI	214	LARAG	464
AVGLLAPPGGLS GRSDNP	215	LARAGI	465
AVGLLAPPGGLS GRSDQH	216	LARAGL	466
AVGLLAPPGGLS GRSDTH	217	LKAAPRWA	467
AVGLLAPPGGLS GRSDYH	218	LKAAPRWF	468
AVGLLAPPGGLS GRSNI	219	LKAAPVWA	469
AVGLLAPPGGLS GRSNIG	220	LKAAPVWF	470
AVGLLAPPGGLS GRSNIGS	221	LKGRSYYY	471
AVGLLAPPGGTST SGRSANPRG	222	LLAPSHRA	472
AVGLLAPPSGRSA NPRG	223	LLEALRAL	473
AVGLLAPPTSGRS ANPRG	224	LLESLRAL	474
AVPKVRVVPE	225	LLLPAHGG	475
CGPPLGR	226	LLLPLLGS	476
CSPPLGR	227	LLNALRAL	477
DEVDGSGGSS	228	LLNSLRAL	478
DEXXXC(A/S)		LLQALRAL	479
DISHWRRS	229	LLQSLRAL	480
DLAHPLL	230	LLSALRAL	481
DLPLVKSLPS	231	LLSSLRAL	482
DLXXT(A/S)		LNGRSDNH	483
DRLSGRSANHKK	232	LPAGLLL	484
DRLSGRSDNHKK	233	LPAGLLLR	485
DRPEMKSLSG	234	LPAHLVLL	486
DRPKVKTMDF	235	LPAHLVLV	487
DVAQFVLT	236	LPGGLSPW	488
DVPPMKTLRP	237	LPSHLVLL	489

[0151]

DWLYWMGI	238	LPSHLVLV	490
DWLYWMSI	239	LPTFV	491
DWLYWPGI	240	LPTFVH	492
DWLYWPSI	241	LPTFVHL	493
EAPKVKALPK	242	LRSGW	494
EHPRVKVVSE	243	LSGR	495
EKPRMKLFQG	244	LSGRS	496
EPQALAMS	245	LSGRSA	497
EQPEVKMVKG	246	LSGRSALAHGLF	498
ERPGVKSLVL	247	LSGRSAN	499
ESLPVVAV	248	LSGRSANI	500
ESPVMKSMAL	249	LSGRSANP	501
ESRRW	250	LSGRSD	502
ESRRWM	251	LSGRSDD	503
ESRRWMP	252	LSGRSDDH	665
ETPSVKTMGR	253	LSGRSDI	504
ETPSVKTMGRSS	254	LSGRSDIH	505
FPRPLGITGL	255	LSGRSDN	506
FRLLDWQW	256	LSGRSDNH	507
GCGPPLGR	257	LSGRSDNHGGAVG LLAPP	508
GCSPPLGR	258	LSGRSDNHGGSGG SISSGLLSS	509
GFPHMKTFQH	259	LSGRSDNHGGSGG SQNQALRMA	510
GFPHMKTFQHSS	260	LSGRSDNHGGVHM PLGFLGP	511
GGGPPLGR	261	LSGRSDNI	512
GGPPLGR	262	LSGRSDNP	513
GGQPSGMWGW	263	LSGRSDQ	514
GGSIDGR	264	LSGRSDQH	515
GGSPPLGR	265	LSGRSDT	516
GGWHTGRN	266	LSGRSDTH	517
GIAGQ	267	LSGRSDY	518
GLGTPRGLFA	268	LSGRSDYH	519
GLPTFV	269	LSGRSENH	520
GLPTFVH	270	LSGRSG	521
GLPTFVHL	271	LSGRSGN	522
GLPTFVHLPRQV	272	LSGRSGNH	523
GLSGRSDNHGSS	273	LSGRSGNHGGSGG SISSGLLSS	524
GPEGLRVG	274	LSGRSGNHGGSGG SQNQALRMA	525
GPLGIAGI	275	LSGRSGNP	526

[0152]

GPLNGRSDNHKA	276	LSGRSVTQ	527
GPLNGRSDNHKK	277	LSQARWRK	528
GPLNGRSDNHKR	278	LTFPTYIF	529
GPLNGRSDNHQA	279	LTFPTYWF	530
GPLNGRSDNHQK	280	LTGRSDRH	531
GPLNGRSDNHQR	281	LTGRSGA	532
GPLNGRSDNHRA	282	LTGRSGA	533
GPLNGRSDNHRK	283	LYAAPRWA	534
GPLNGRSDNHRR	284	LYAAPRWF	535
GPLSGRSDNHKA	285	LYAAPVWA	536
GPLSGRSDNHKK	286	LYAAPVWF	537
GPLSGRSDNHKR	287	LYGRSENN	538
GPLSGRSDNHQA	288	MDAFLESS	539
GPLSGRSDNHQK	289	MGLFSEAG	540
GPLSGRSDNHQR	290	MGPWFM	541
GPLSGRSDNHRA	291	MIAPVAYR	542
GPLSGRSDNHRK	292	MLRSGW	543
GPLSGRSDNHRR	293	MLRSGWR	544
GPPLGR	294	MLRSGWRG	545
GPQGIAGQ	295	MLRSGWRL	546
GPQGLLGA	296	MLRSGWRS	547
GPRSFG	297	MTFPTYIF	548
GPRSFGL	298	MTFPTYWF	549
GPSHLVLT	299	NHRIGRSDNHRR	550
GPTN	300	NMPSFKLVTG	551
GPTNALAHGLF	301	NTLSGRSENHSG	552
GRSML	302	NTLSGRSGNHGS	553
GRSMLL	303	NZPRVRLVLP	554
GRSMLLG	304	PAGLWLDP	555
GRSMLLGG	305	PAGRR	556
GRSMLLGP	306	PAGRRS	557
GRSMLLGS	307	PAGRRSL	558
GRSMLLP	308	PASLWYTQ	559
GRSMLLPG	309	PESRRWMP	560
GRSMLLPP	310	PFHLSR	561
GRSMLLPS	311	PHGFFQ	562
GRSMLLS	312	PLARAGI	563
GRSMLLSG	313	PLARAGL	564
GRSMLLSP	314	PLGL	565
GRSMLLSS	315	PLGLAG	566
GRSMLM	316	PLGLWA	567
GRSMLMG	317	PLGVRGK	568
GRSMLMGG	318	PLTGRSGG	569

[0153]

GRSMLMGP	319	PLTGRSGGGGSS	570
GRSMLMGS	320	PPLGR	571
GRSMLMP	321	PPPDMKLFPG	572
GRSMLMPG	322	PPPEVRSFSV	573
GRSMLMPP	323	PPPVLKLLEW	574
GRSMLMPS	324	PPSIARSDNLAN	575
GRSMLMS	325	PQHRIVSF	576
GRSMLMSG	326	PRFKIIGG	577
GRSMLMSP	327	PRFRIIGG	578
GRSMLMSS	328	PRPFVKSVDQ	579
GSGPPLGR	329	PRQV	580
GSPPLGR	330	PRSF	581
GSSPPLGR	331	PSPPVKMMPE	582
GTGRGPSWVGSS	332	PTNGGSGGSS	583
PTNL	333	RVPKVKVMLD	584
PTNLGSGGSS	334	SAGFSLPA	585
PVGYTSSL	335	SAPAVESE	586
PVPRLKLIKD	336	SAPYFRMMDM	587
PVQPIGPQ	337	SARGPSRW	588
QALAMSAI	338	SCGPPLGR	589
QFQALRM	339	SCSPPLGR	590
QGPMFKSLWD	340	SGGPLGVR	591
QGRAITFI	341	SGGPPLGR	592
QHQALRM	342	SGPPLGR	593
QNQALRIA	343	SGRS	594
QNQALRM	344	SGRSA	595
QNQALRMA	345	SGRSAN	596
QNQALRMAGGS GGSLSGRSDNH	346	SGRSANI	597
QNQALRMAGGS GGSLSGRSGNH	347	SGRSANP	598
QSRRVP	348	SGRSANPRG	599
QSRRVPL	349	SGRSD	600
QSRRVPV	350	SGRSDD	601
QTRRVP	351	SGRSDDH	602
QTRRVPL	352	SGRSDI	603
QTRRVPV	353	SGRSDIH	604
QYIVSRSA	354	SGRSDN	605
RALRAP	355	SGRSDNI	606
REPFMKSLPW	356	SGRSDNP	607
RFPLKV	357	SGRSDQ	608
RFPSLKSFPL	358	SGRSDQH	609
RFPYGVW	359	SGRSDT	610

[0154]

RFYRNQFF	360	SGRSDTH	611
RGPA	361	SGRSDY	612
RGPAFNPM	362	SGRSDYH	613
RGPATPIM	363	SGRSG	614
RGPKLYW	364	SGRSGN	615
RHLAKL	365	SGRSGNH	616
RIGRSDNH	366	SGSPPLGR	617
RKMPNITV	367	SIARSDNL	618
RKSSIIIRMRDVVL	368	SISSGLLSGRSDNI	619
RKTVQHWW	369	SNPFKY	620
RLGRSDNN	370	SPLPLRVP	621
RMHLRSLG	371		
RPLARAGI	372	SPLTGRSG	622
RPLARAGL	373	SPPLGR	623
RPLNGRSDNHKA	374	SRRVP	624
RPLNGRSDNHKK	375	SRRVPL	625
RPLNGRSDNHKR	376	SRRVPV	626
RPLNGRSDNHQA	377	SSGPPLGR	627
RPLNGRSDNHQK	378	SSPPLGR	628
RPLNGRSDNHQR	379	SSRGPAYL	629
RPLNGRSDNHRA	380	SSRHRRALD	630
RPLNGRSDNHRK	381	SSSFDKGKYKKGDDA	631
RPLNGRSDNHRR	382	SSSFDKGKYKRGDDA	632
RPLSGRSDNHKA	383	SSSPPLGR	633
RPLSGRSDNHKK	384	STFPFGMF	634
RPLSGRSDNHKR	385	STVFHM	635
RPLSGRSDNHQA	386	SVHHLI	636
RPLSGRSDNHQK	387	SVSGLLSH	637
RPLSGRSDNHQR	388	SVSGLLSS	638
RPLSGRSDNHRA	389	SVSGLRSH	639
RPLSGRSDNHRK	390	SVSGLRSS	640
RPLSGRSDNHRR	391	TARG	641
RPSPMWAY	392	TARGP	642
RRHDGLRA	393	TARGPALAHGLF	643
RRHDGLRS	394	TARGPS	644
RSLVFAPI	395	TARGPSF	645
RSPSRLKC	396	TARGPSFK	646
VAGRSMRP	397	TARGPSW	647
VAPQLKSLVP	398	TARGPSW	648
VAQFVLTE	399	TARGPVPRQV	649

[0155]

VHMPLGFLGP	400	TFVH	650
VHMPLGFLGPGG LSGRSDNH	401	TGLSGRSVTQTS	651
VHMPLGFLGPGG TSTSGRSANPRG	402	TGRGPSWV	652
VLPELRSVFS	403	TLRLGRSDNNKN	653
VLSKQMSF	404	TLSGLRSP	654
VPAGRRS	405	TSGRSANP	655
VPAGRRSL	406	TSGRSGNP	656
VPRQ	407	TSLSGRSANPRG	657
VPRQV	408	TSLSGRSGNPRG	658
VSRSA	409	TSSGLRSP	659
VVPEGRRS	410	TSTSGRSANPRG	660
WATPRPMR	411	TSTSGRSANPRGG GAVGLLAPP	661
WDHPISLL	412	TSTSGRSANPRGG GVHMPLGFLGP	662
XXQAR(A/V)X		TSTSGRSGNPRG	663
YDPZVKVVLA	413	TVSGLRSP	664
YGAGLGVV	414	YVPRVKALEM	417
YIVSRSA	415	YKKFVGSL	416

[0156] CM的实例还包括以下中描述的CM:WO 2010/081173、WO2021207669、WO2021207657、WO2021142029、WO2021061867、WO2020252349、WO2020252358、WO2020236679、WO2020176672、WO2020118109、WO2020092881、WO2020086665、WO2019213444、WO2019183218、WO2019173771、WO2019165143、WO2019075405、WO2019046652、WO2019018828、WO2019014586、WO2018222949、WO2018165619、WO2018085555、WO2017011580、WO2016179335、WO2016179285、WO2016179257、WO2016149201、WO2016014974,这些以引用的方式整体并入本文中以达成所有目的。

[0157] 在一些实施方案中,CM可为或包含上述示例序列的组合、C端截短变体或N端截短变体。适用于CM中的以上提及的氨基酸序列的截短变体可以是保留相应蛋白酶的识别位点的任何截短变体。这些包括保留蛋白酶的识别位点的包含上述氨基酸序列的至少3个相连氨基酸或前述氨基酸序列的至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸的C端和/或N端截短变体。在某些实施方案中,上述氨基酸序列的截短变体可以是对应于任何上述的氨基酸序列,但C端和/或N端截短1至10个氨基酸、1至9个氨基酸、1至8个氨基酸、1至7个氨基酸、1至6个氨基酸、1至5个氨基酸、1至4个氨基酸或1至3个氨基酸,并且:(1)具有至少三个氨基酸残基;以及(2)保留蛋白酶的识别位点。在一些前述实施方案中,截短的CM是N端截短的CM。在一些实施方案中,截短的CM是C端截短的CM。在一些实施方案中,截短的C是C末端和N末端截短的CM。

[0158] 在一些实施方案中,CM可总共包含3个氨基酸至25个氨基酸。在一些实施方案中,CM可总共包含3至25、3至20、3至15、3至10、3至5、5至25、5至20、5至15、5至10、10至25、10至20、10至15、15至25、15至20或20至25个氨基酸。

[0159] 在一些实施方案中,CM通过至少一种蛋白酶以约0.001-1500×$10^4M^{-1}S^{-1}$或至少0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2.5、5、7.5、10、15、20、25、50、75、100、125、150、200、250、500、750、1000、1250或1500×$10^4M^{-1}S^{-1}$的速率特异性地裂解。该速率可以通过底物裂解动力学(k_{cat}/K_m)来测量,如WO2016118629中公开的那样。

[0160] 缀合剂

[0161] 在一些方面,靶标结合蛋白(包括可激活靶标结合蛋白)还可以包含一种或多种另外的剂,例如,促进递送至感兴趣的细胞或组织的靶向部分、治疗剂(例如,抗肿瘤剂如化疗剂或抗肿瘤剂)、毒素、放射性同位素、小分子、诊断剂、靶向部分或可检测部分或其片段。另外的剂可以与靶标结合蛋白结合。术语"剂"在本文中用于表示化学化合物、化学化合物的混合物、生物大分子或由生物材料制成的提取物。

[0162] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白可以与细胞毒性剂(例如毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段))或放射性同位素缀合。在一些实施方案中,靶标结合蛋白可以与T细胞激活剂缀合,例如toll样受体(TLR)(包括TLR3、TLR7、TLR8和TLR9)的小分子激动剂。这类激活剂的非限制性例子包括:TLR3激动剂,例如(Riboxxol)、RGC100、ARNAX和poly-IC;TLR7/8激动剂,例如瑞喹莫德(Resiquimod)(R848)和莫托莫德(motolimod)(VTX-2337)(咪喹莫特(imiquimod,一种咪唑喹啉)的第二代实验衍生物)、PF-4878691、BDC-1001、LHC165、NKTR-262、TQ-A3334、RO7119929、DSP-0509、BNT411和NJH395;TLR9激动剂,例如卡介苗(Bacillus Calmette-Guérin,BCG)、卡夫罗莫德(Cavrotolimod)/AST-008(Exicur e)、CMP-001(Checkmate)、CpG-28(University of Paris)、EnanDIM(Mologen AG)、IMO-2055(Idera)、IMO-2125/替索莫德(tilsotolimo d)(Idera)、MGN1703/来托莫德(Lefitolimod)(Mologen AG)、NZ-TLR 9(LIDDS)、PF-3512676(Pfizer)、SD-101(Dynavax)和S-540956(Shionogi)。

[0163] 可与靶标结合蛋白缀合的细胞毒性剂的实例包括:多拉司他汀(dolastatin)和其衍生物(例如澳瑞他汀E(auristatin E)、AFP、单甲基澳瑞他汀D(MMAD)、单甲基澳瑞他汀F(MMAF)、单甲基澳瑞他汀E(MMAE)、去甲基澳瑞他汀E(DMAE)、澳瑞他汀F、去甲基澳瑞他汀F(DMAF)、多拉司他汀16(DmJ)、多拉司他汀16(Dpv)、澳瑞他汀衍生物(例如澳瑞他汀酪胺(auristatin tyramine)、澳瑞他汀喹诺酮(auristatin quinolone))、类美登素(maytansinoid)(例如DM-1、DM-4)、类美登素衍生物、倍癌霉素(duocarmycin)、α-鹅膏蕈碱(alpha-amaniti n)、涡轮他汀(turbostatin)、芬他汀(phenstatin)、羟基芬他汀(hydroxyp henstatin)、海绵抑制素5(spongistatin 5)、海绵抑制素7、哈利他汀1(halistatin 1)、哈利他汀2、哈利他汀3、哈坎他汀(halocomstatin)、吡咯并苯并咪唑(PBI)、西博他汀6(cibrostatin6)、多沙利仿(doxalifor m)、西马多丁(cemadotin)类似物(CemCH2-SH)、假单胞菌毒素A(PE S8)变体、假单胞菌毒素A(ZZ-PE38)变体、ZJ-101、蒽环霉素(anthr acycline)、多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、苔藓抑素(bryostatin)、喜树碱(camptothecin)、7-取代的喜树碱、10,11-二氟亚甲基二氧基喜树碱、考布他汀(combretastatin)、脱溴海兔毒素(debromoa plysiatoxin)、KahaMide-F、圆皮海绵内酯(discodermolide)和海鞘素(Ecteinascidin)。

[0164] 可与靶标结合蛋白缀合的酶活性毒素的实例包括:白喉毒素(diphtheriatoxin)、来自铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)的外毒素A链(exotoxinAchain)、篦麻毒素A

链(ricinAchain)、相思子毒素A链(abrinAchain)、蒴莲根毒素A链(modeccinAchain)、α-帚曲菌素(alpha-sarcin)、油桐(Aleuriies fordii)蛋白、石竹素(dianfhin)蛋白、美洲商陆(PhytoiacaAmericana)蛋白(例如PAPI、PAPII和PAP-8)、苦瓜(momordica charantia)抑制剂、泻果素(curcin)、巴豆毒素(crotirs)、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制剂、白树毒素(gelonin)、米托洁林(mitogeliin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、新霉素(neomycin)和新月毒素(tricothecene)。

[0165] 可与靶标结合蛋白缀合的抗肿瘤剂的实例包括:阿霉素(adriamycin)、司比定(cerubidine)、博来霉素(bleomycin)、爱克兰(alkeran)、维尔班(velban)、昂可文(oncovin)、氟尿嘧啶(fluorouracil)、甲氨蝶呤(methotrexate)、噻替派(thiotepa)、比生群(bisantrene)、诺凡特龙(novantrone)、硫鸟嘌呤(thioguanine)、丙卡巴肼(procarabizine)和阿糖胞苷(cytarabine)。

[0166] 可与靶标结合蛋白缀合的抗病毒剂的实例包括:阿昔洛韦(acyclovir)、vira A和symmetrel。可与靶标结合蛋白缀合的抗真菌剂的实例包括:制霉菌素(nystatin)。可与靶标结合蛋白缀合的可检测试剂的实例包括:荧光素及其衍生物、异硫氰酸荧光素(FITC)。可与靶标结合蛋白缀合的抗菌剂的实例包括:氨基糖苷(aminoglycoside)、链霉素(streptomycin)、新霉素(neomycin)、卡那霉素(kanamycin)、阿米卡星(amikacin)、庆大霉素(gentamicin)和妥布霉素(tobramycin)。可与靶标结合蛋白缀合的3β,16β,17α-三羟基胆甾-5-烯-22-酮16-O-(2-O-4-甲氧基苯甲酰基-β-D-吡喃木糖基)-(1-->3)-(2-O-乙酰基-α-L-吡喃阿拉伯糖苷)(OSW-1)包括:O6-苯甲基鸟嘌呤的s-硝基苯甲基氧基羰基衍生物、拓扑异构酶抑制剂、哈米特林(hemiasterlin)、三尖杉碱(cephalotaxine)、高三尖杉酯碱(homoharringionine)、吡咯并苯并二氮䓬二聚体(PBD)、官能化吡咯并苯并二氮䓬、卡奇霉素(calcicheamicin)、鬼臼毒素(podophyiitoxin)、紫杉烷和长春花生物碱。可与靶标结合蛋白缀合的放射性药物的实例包括:^{123}I、^{89}Zr、^{125}I、^{131}I、^{99}mTc、^{201}T1、^{62}Cu、^{18}F、^{68}Ga、^{13}N、^{15}O、^{38}K、^{82}Rb、^{111}In、^{133}Xe、^{11}C和^{99}mTc(Technetium)。可与靶标结合蛋白缀合的重金属的实例包括:钡、金和铂。可与靶标结合蛋白缀合的抗支原体剂的实例包括:泰乐菌素(tylosine)、壮观霉素(spectinomycin)、链霉素B(streptomycin B)、氨苄青霉素(ampicillin)、磺胺(sulfanilamide)、多粘菌素(polymyxin)和氯霉素(chloramphenicol)。

[0167] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白可包含信号肽。如果包含多个肽,则靶标结合蛋白可包含多个信号肽,例如多个肽中的每一个肽都有一个信号肽。信号肽可以是位于新合成的蛋白质末端(例如,N端或C端)的肽(例如,10-30个氨基酸长),所述新合成的蛋白质的目的地为分泌途径。在一些实施方案中,信号肽可经由间隔子与靶标结合蛋白缀合。在一些实施方案中,间隔子在不存在信号肽的情况下与靶标结合蛋白缀合。

[0168] 本领域普通技术人员将认识到大量可能的剂可缀合于本文所述的任何靶标结合蛋白。剂可以通过缀合部分与靶标结合蛋白的另一个组分缀合,该缀合部分可以是接头、CM或能够连接两个分子的其它分子或其片段。在一些实例中,缀合部分可以被酶(例如蛋白酶)裂解。在一些实例中,缀合部分不能被酶*(例如蛋白酶)裂解。

[0169] 缀合可包括将使两个分子结合的任何化学反应,只要靶标结合蛋白和其它部分保留它们的相应活性即可。缀合可包括许多化学机制,例如共价结合、亲和结合、嵌入、配位结

合和络合。在一些实施方案中,结合可以是共价结合。共价结合可通过现有侧链的直接缩合或通过掺入外部桥接分子实现。许多二价或多价连接剂可用于缀合本文所述的任何靶标结合蛋白。举例来说,缀合可包括有机化合物,例如硫代酸酯、碳二亚胺、琥珀酰亚胺酯、戊二醛、重氮苯和六亚甲基二胺。在一些实施方案中,靶标结合蛋白可包括或以其它方式引入一个或多个非天然氨基酸残基以提供适合的缀合位点。

[0170] 在一些实施方案中,剂和/或缀合物可通过二硫键(例如半胱氨酸分子上的二硫键)附接于抗原结合结构域。因为许多癌症天然地释放高水平的还原剂谷胱甘肽,所以存在于癌性组织微环境中的谷胱甘肽可还原二硫键,随后在递送部位处释放剂和/或缀合物。

[0171] 在一些实施方案中,当缀合物在靶标部位(例如患病组织(例如癌性组织))内在补体存在下结合于它的靶标时,将缀合物和/或剂附接于接头的酰胺键或酯键发生裂解,从而使缀合物和/或剂以其活性形式释放。当施用至受试者时,这些缀合物和/或剂可实现缀合物和/或剂在靶标部位(例如患病组织(例如癌性组织))处的递送和释放。这些缀合物和/或剂可有效地在体内递送本文所述的任何缀合物和/或剂。

[0172] 在一些实施方案中,缀合部分不能被补体系统的酶裂解。举例来说,缀合物和/或剂在无补体活化的情况下释放,因为补体活化最终会溶解靶标细胞。在这类实施方案中,缀合物和/或剂将被递送到靶标细胞(例如激素、酶、皮质类固醇、神经递质或基因)。此外,缀合部分略微有点容易被血清蛋白酶裂解,并且缀合物和/或剂在靶标部位处缓慢释放。

[0173] 在一些实施方案中,缀合物和/或剂可被设计成使得缀合物和/或剂递送到靶标部位(例如疾病组织(例如癌性组织)),但缀合物和/或剂不释放。

[0174] 在一些实施方案中,缀合物和/或剂可直接附接到抗原结合结构域,或者经由氨基酸(例如D-氨基酸)、肽、含硫醇部分、或可被修饰成包括随后可用于通过本文所述的方法附接到抗原结合结构域的官能团的其它有机化合物附接。

[0175] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白可包括剂的至少一个缀合点。在一些实施方案中,所有可能的缀合点都可用于与剂的缀合。在一些实施方案中,一个或多个缀合点可包括二硫键中涉及的硫原子、链间二硫键中涉及的硫原子、链间硫键中涉及的硫原子而非链内二硫键中涉及的硫原子、和/或半胱氨酸或含有硫原子的其它氨基酸残基的硫原子。在这类情况下,残基可天然地存在于蛋白质构建体结构中,或可使用包括定点诱变、化学转化、或非天然氨基酸的错误掺入的方法掺入蛋白质构建体中。

[0176] 本公开还提供了用于制备具有一种或多种缀合剂的靶标结合蛋白的方法和材料。在一些实施方案中,靶标结合蛋白可以被修饰成包括一个或多个链间二硫键。举例来说,二硫键可在暴露于还原剂,例如但不限于TCEP、DTT或β-巯基乙醇之后进行还原。在一些情况下,二硫键的还原仅是部分的。如本文所用,术语部分还原是指其中使靶标结合蛋白与还原剂接触,并且所有可能的缀合位点的一部分进行还原(例如并非所有的二硫键都被还原)的情况。在一些实施方案中,如果在与还原剂接触之后所有可能的缀合位点中的少于99%(例如少于98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%)被还原,那么靶标结合蛋白被部分还原。在一些实施方案中,有一个或多个链间二硫键还原的靶标结合蛋白可缀合于与游离硫醇具有反应性的药物。

[0177] 本公开还提供了用于使治疗剂缀合于靶标结合蛋白上的特定位置的方法和材料。

在一些实施方案中,可以修饰靶标结合蛋白,使得治疗剂可以在靶标结合蛋白的特定位置与靶标结合蛋白缀合。例如,可以通过有利于与靶标结合蛋白结合的方式部分还原靶标结合蛋白。在这类情况下,靶标结合蛋白的部分还原以靶标结合蛋白中的缀合位点不被还原的方式发生。在一些实施方案中,选择靶标结合蛋白上的一个或多个缀合位点以有助于剂在蛋白质构建体上的特定位置处缀合。各种因素可影响在用还原剂处理后靶标结合蛋白的"还原水平"。不加限制地举例来说,还原剂与靶标结合蛋白的比率、孵育的时长、孵育温度和/或还原反应溶液的pH值可需要优化以用本文所述的方法和材料实现靶标结合蛋白的部分还原。因素(例如还原剂与靶标结合蛋白的比率、与还原剂一起孵育的时长和温度和/或还原剂的pH值)的任何适当组合可用于实现靶标结合蛋白的部分还原(例如可能的缀合位点的普遍还原或在特定缀合位点处的还原)。

[0178] 有效的还原剂与靶标结合蛋白的比率可为以允许与剂缀合的方式至少部分地还原靶标结合蛋白(例如可能的缀合位点的普遍还原或在特定缀合位点处的还原)的任何比率。在一些实施方案中,还原剂与靶标结合蛋白的比率可在约20:1至1:1、10:1至1:1、9:1至1:1、8:1至1:1、7:1至1:1、6:1至1:1、5:1至1:1、4:1至1:1、3:1至1:1、2:1至1:1、20:1至1:1.5、10:1至1:1.5、9:1至1:1.5、8:1至1:1.5、7:1至1:1.5、6:1至1:1.5、5:1至1:1.5、4:1至1:1.5、3:1至1:1.5、2:1至1:1.5、1.5:1至1:1.5或1:1至1:1.5的范围内。

[0179] 用还原剂处理靶标结合蛋白的有效孵育时间和温度可为以允许剂与靶标结合蛋白缀合的方式至少部分地还原靶标结合蛋白(例如可能的缀合位点的普遍还原或在特定缀合位点处的还原)的任何时间和温度。在一些实施方案中,用于处理靶标结合蛋白的孵育时间和温度可在37℃下约1小时至37℃下约12小时的范围(或其中的任何子范围)内。

[0180] 用还原剂处理靶标结合蛋白的还原反应的有效pH值可为以允许靶标结合蛋白与剂缀合的方式至少部分地还原靶标结合蛋白(例如可能的缀合位点的普遍还原或在特定缀合位点处的还原)的任何pH值。

[0181] 当使部分还原的靶标结合蛋白与含有硫醇的剂接触时,该剂可缀合于靶标结合蛋白中的链间硫醇。剂可使用含有硫醇的试剂(例如半胱氨酸或N-乙酰基半胱氨酸)以包括硫醇的方式来修饰。举例来说,靶标结合蛋白可在约37℃下以还原剂与靶标结合蛋白的所需比率与还原剂(例如TEPC)一起孵育约1小时之后来部分还原。有效的还原剂与靶标结合蛋白的比率可为以允许含有硫醇的剂缀合的方式部分地还原至少两个位于靶标结合蛋白中的链间二硫键(例如可能的缀合位点的普遍还原或在特定缀合位点处的还原)的任何比率。

[0182] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白以避免还原任何链内二硫键的方式被还原剂还原。在一些实施方案中,靶标结合蛋白以避免还原任何链内二硫键并且还原至少一个链间二硫键的方式被还原剂还原。

[0183] 在一些实施方案中,剂(例如缀合于靶标结合蛋白的剂)是可检测部分,例如像标记或其它标志物。举例来说,剂可以是或包括放射性标记氨基酸、一种或多种可通过标记亲和素(例如含有可通过光学或量热方法检测的荧光标志物或酶活性的链霉亲和素)检测的生物素基部分、一种或多种放射性同位素或放射性核素、一种或多种荧光标记、一种或多种酶标记和/或一种或多种化学发光剂。在一些实施方案中,可检测部分可通过间隔分子来附接。在一些实施方案中,可检测标记可包括显像剂、造影剂、酶、荧光标记、发色团、染料、一种或多种金属离子或基于配体的标记。在一些实施方案中,显像剂可包含放射性同位素。在

一些实施方案中,放射性同位素可为铟或锝。在一些实施方案中,造影剂可包含碘、钆或铁氧化物。在一些实施方案中,酶可包含辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或β-半乳糖苷酶。在一些实施方案中,荧光标记可包含黄色荧光蛋白(YFP)、青色荧光蛋白(CFP)、绿色荧光蛋白(GFP)、修饰的红色荧光蛋白(mRFP)、红色荧光蛋白tdimer2(RFPtdimer2)、HCRED或铕衍生物。在一些实施方案中,发光标记可包含N-甲基吖啶衍生物。在一些实施方案中,标记可包含Alexa Fluor®标记,例如Alex Fluor®680或Alexa Fluor® 750。在一些实施方案中,基于配体的标记可包含生物素、亲和素、链霉亲和素或一种或多种半抗原。

[0184] 可检测标记的其它实例还包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性物质。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素;合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的一实例包括鲁米诺;生物发光材料的实例包括荧光素酶、荧光素和水母发光蛋白,并且合适的放射性物质的实例包括^{125}I、^{131}I、^{35}S或^{3}H。

[0185] 在一些实施方案中,剂可使用碳水化合物部分、氢硫基、氨基或羧酸酯基缀合于靶标结合蛋白。在一些实施方案中,剂可经由本文所述的接头和/或CM缀合于靶标结合蛋白。在一些实施方案中,剂可与靶标结合蛋白中的半胱氨酸或赖氨酸缀合。在一些实施方案中,剂可与靶标结合蛋白的另一个残基(例如本文公开的那些残基)缀合。

[0186] 在一些实施方案中,多种双官能蛋白质偶联剂可用于使剂与靶标结合蛋白缀合,包括但不限于N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫杂环戊烷(IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(例如二亚胺代己二酸二甲酯盐酸盐)、活性酯(例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(例如戊二醛)、双叠氮基化合物(例如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮鎓衍生物(例如双(对重氮鎓苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(例如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。举例来说,篦麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人,Science 238:1098(1987)中所述来制备。在一些实施方案中,碳-14标记的1-异硫氰基苯甲基-3-甲基二乙三胺五乙酸(MX-DTPA)螯合剂可用于使放射性核苷酸与靶标结合蛋白缀合。(参见例如WO94/11026)。

[0187] 合适的缀合部分包括文献中描述的那些。(参见例如Ramakrishnan,S.等人,Cancer Res.44:201-208(1984),其描述了MBS(M-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)的使用)。还参见美国专利第5,030,719号,其描述了经由寡肽偶联于靶标结合蛋白的卤化乙酰基酰肼衍生物的使用。在一些实施方案中,适合缀合部分包括:(i)EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基-丙基)碳二亚胺盐酸盐;(ii)SMPT(4-琥珀酰亚胺基氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基-二硫基)-甲苯(Pierce Chem.公司,目录号(21558G));(iii)SPDP(琥珀酰亚胺-6-[3-(2-吡啶基二硫基)丙酰胺基]己酸酯(Pierce Chem.公司,目录号21651G);(iv)磺基-LC-SPDP(6-[3-(2-吡啶基二硫基)-丙酰胺基]己酸磺基琥珀酰亚胺酯(Pierce Chem.公司,目录号2165-G);以及(v)缀合于EDC的磺基-NHS(N-羟基磺基-琥珀酰亚胺:Pierce Chem.公司,目录号24510)。另外的示例缀合部分包括SMCC、磺基-SMCC、SPDB和磺基-SPDB。

[0188] 上文所述的缀合部分可含有具有不同属性的组分,因此使得缀合物具有不同的物理化学性质。举例来说,烷基羧酸酯的磺基-NHS酯比芳族羧酸酯的磺基-NHS酯稳定。含有NHS酯的接头的溶解性小于磺基-NHS酯。此外,SMPT含有具有空间位阻的二硫键,并且可形

成稳定性增加的缀合物。一般来说,二硫键联的稳定性小于其它键联,因为二硫键联在体外裂解,从而导致可用的缀合物较少。特别地,磺基-NHS可增强碳二亚胺偶联的稳定性。相比于单独碳二亚胺偶联反应,在与磺基-NHS联合使用时碳二亚胺偶联(例如EDC)形成对水解更加具有抗性的酯。

[0189] 本领域普通技术人员将认识到多种可能的部分可与本公开的靶标结合蛋白偶联。(参见例如"Conjugate Vaccines",Contributions to Microbiology and Immunology,J.M.Cruse和R.E.Lewis,Jr(编),CargerPress,NewYork,(1989),其全部内容以引用的方式并入本文)。一般来说,剂(例如细胞毒性剂)与靶标结合蛋白的有效缀合可通过将剂结合于靶标结合蛋白,同时还允许剂和靶标结合蛋白保留功能性的任何化学反应来实现。

[0190] 核酸和载体

[0191] 在一些方面,本公开还提供了包含编码靶标结合蛋白或其组分或片段的序列的核酸。核酸可包含靶标结合蛋白中的重链可变结构域、轻链可变结构域、TB、CM、MM、EM和接头的编码序列。在靶标结合蛋白包含多个肽(例如,不同肽上的多个TB,或TB包含多个肽)的情况下,核酸可包含多个肽的编码序列。在一些实例中,其中一种肽的编码序列位于一个核酸内,而另一种肽的编码序列位于另一个核酸内。在一些实例中,多个肽中的两个或多个肽的编码序列位于同一核酸内。本公开包括编码如本文所述的蛋白质或其部分的多核苷酸,以及这类多核苷酸用于产生蛋白质和/或用于治疗目的的用途。这类多核苷酸可包括编码如本文定义的蛋白质的DNA和RNA分子(例如,mRNA、自我复制型RNA、自我扩增型mRNA等)。本公开包括包含这类多核苷酸的组合物。在一些方面,这类组合物可以治疗性或预防性使用。

[0192] 除非另外指定,否则"编码蛋白质的核酸序列"包括彼此是简并形式,因此编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。术语"核酸"是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA),或它们的组合。除非具体限制,否则该术语涵盖含有与参考核苷酸具有类似结合性质的天然核苷酸的已知类似物的核酸。除非另外指示,否则特定核酸序列还隐含地涵盖互补序列以及明确指示的序列。在一些实施方案中,核酸为DNA。在一些实施方案中,核酸为RNA。在一些实施方案中,核酸包含DNA与RNA的混合物或杂合物。

[0193] 当提及多肽一级氨基酸序列中第一结构域或序列相对于第二结构域或序列的位置时,术语"N端定位"意指第一结构域位置更靠近多肽一级氨基酸序列的N端。在一些实施方案中,在第一结构域或序列与第二结构域或序列之间可存在另外的序列和/或结构域。当提及多肽一级氨基酸序列中第一结构域或序列相对于第二结构域或序列的位置时,术语"C端定位"意指第一结构域位置更靠近多肽一级氨基酸序列的C端。在一些实施方案中,在第一结构域或序列与第二结构域或序列之间可存在另外的序列和/或结构域。

[0194] 修饰可通过本领域中已知的标准技术,例如定点诱变和聚合酶链式反应(PCR)介导的诱变来引入核苷酸序列中。保守性氨基酸取代是其中氨基酸残基经具有类似侧链的氨基酸残基替换的氨基酸取代。本领域中已定义了具有类似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括:具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸和谷氨酸)、具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、非极性氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸)、不带电荷的极性氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸)、亲水性氨基酸(例如精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸和苏氨酸)、疏水性氨基酸(例如丙氨酸、半胱氨酸、

异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸)。其它氨基酸家族包括:脂肪族-羟基氨基酸(例如丝氨酸和苏氨酸)、酰胺家族(例如天冬酰胺和谷氨酰胺)、脂肪族家族(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)和芳香族家族(例如苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)。

[0195] 本公开还提供了包含本文所述的任何核酸的载体和载体组。本领域技术人员将能够选择适用于制备本文所述的任何靶标结合蛋白的载体或载体组(例如表达载体),并使用所述载体或载体组表达本文所述的任何靶标结合蛋白。举例来说,在选择载体或载体组时,可选择细胞类型,使得一种或多种载体可需要能够整合到细胞的染色体中和/或在细胞中复制。本文还描述了可用于产生靶标结合蛋白的示例性载体。如本文所用,术语“载体”是指能够诱导重组蛋白(例如第一或第二单体)在细胞(例如本文所述的任何细胞)中表达的多核苷酸。“载体”能够将核酸和其片段递送到宿主细胞中,并且包括调节序列(例如启动子、增强子、多腺苷酸(poly(A))信号)。外源性多核苷酸可插入至表达载体中以进行表达。术语“载体”还包括人工染色体、质粒、逆转录病毒和杆状病毒载体。

[0196] 用于构建包含本文所述的任何核酸并且适于对细胞(例如哺乳动物细胞)进行转化的适合载体的方法在本领域中是众所周知的。参见例如Sambrook等人编,“Molecular Cloning:ALaboratoryManual,”第2版,Cold Spring Harbor Press,1989和Ausubel等人编,“Current Protocols in MolecularBiology”,CurrentProtocols,1993。

[0197] 载体的实例包括质粒、转座子、粘粒和病毒载体(例如任何腺病毒载体(例如pSV或pCMV载体)、腺相关病毒(AAV)载体、慢病毒载体和逆转录病毒载体)以及任何Gateway®载体。载体可例如包括足以达成表达的顺式作用元件;用于表达的其它元件可由宿主哺乳动物细胞或在体外表达系统中提供。熟练从业者将能够选择适用于制备本文所述的任何靶标结合蛋白的载体和哺乳动物细胞。

[0198] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白可使用重组DNA技术以及在真核或原核物种中的表达来以生物合成方式制备。

[0199] 细胞

[0200] 在一些方面,本公开提供了包含本文所述的任何载体或核酸的宿主细胞。细胞可用于产生本文所述的靶标结合蛋白。在一些实施方案中,细胞可以是动物细胞、哺乳动物细胞(例如人细胞)、啮齿动物细胞(例如小鼠细胞、大鼠细胞、仓鼠细胞或豚鼠细胞)、非人灵长类动物细胞、昆虫细胞、细菌细胞、真菌细胞或植物细胞。在一些实施方案中,细胞可以是真核细胞。如本文所用,术语“真核细胞”是指具有明显的、有膜包围的细胞核的细胞。这类细胞可包括例如哺乳动物(例如啮齿动物、非人灵长类动物或人)、昆虫、真菌或植物细胞。在一些实施方案中,真核细胞是酵母细胞,例如酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)。在一些实施方案中,真核细胞是高等真核细胞,例如哺乳动物、鸟类、植物或昆虫细胞。哺乳动物细胞的非限制性实例包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞和人胚肾细胞(例如HEK293细胞)。在一些实施方案中,细胞是原核细胞。

[0201] 将核酸和载体(例如本文所述的任何载体或任何载体组)引入细胞中的方法是本领域中已知的。可用于将核酸引入细胞中的方法的实例包括:脂质体转染、转染、磷酸钙转染、阳离子聚合物转染、病毒转导(例如腺病毒转导、慢病毒转导)、纳米颗粒转染和电穿孔。

[0202] 在一些实施方案中,引入步骤包括向细胞中引入包括编码组成本文所述的任何靶

标结合蛋白的单体的核酸的载体(例如本文所述的任何载体或载体组)。

[0203] 组合物和药盒

[0204] 本公开还提供了包含本文所述的靶标结合蛋白的组合物和药盒。所述组合物和药盒还可以包含一种或多种赋形剂、载体、试剂、使用靶标结合蛋白所需的说明书。

[0205] 在一些实施方案中,组合物可以是药物组合物,其包含靶标结合蛋白、其衍生物、片段、类似物和同源物。药物组合物可包含靶标结合蛋白和药学上可接受的载体。如本文所用,术语"药学上可接受的载体"意图包括与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。合适的载体在Remington's Pharmaceutical Sciences的最新版本中进行了描述,该书是本领域的标准参考文本,其以引用的方式并入本文中。这类载体或稀释剂的适合实例包括水、盐水、林格氏溶液(ringer's solution)、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。还可以使用脂质体和非水性媒介物,如不挥发油。用于药学活性物质的这类介质和试剂的用途是本领域众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,否则预期其用于组合物中。补充性活性化合物也可并入组合物中。

[0206] 可将药物组合物配制成与其预期施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外,例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如吸入)、透皮(例如局部)、透粘膜和直肠施用。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可包括以下组分中的一种或多种:无菌稀释剂,例如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗细菌剂,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于调节张力的剂,例如氯化钠或右旋糖。可用酸或碱(例如盐酸或氢氧化钠)调节pH值。肠胃外制剂可封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。在一些,本文所述的任何靶标结合蛋白与防止从身体快速消除的载体一起制备,例如持续和控制释放制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可使用生物可降解的生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。这类药物组合物和制剂的制备方法对本领域的技术人员来说是显而易见的。举例来说,靶标结合蛋白可包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(例如分别为羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中、包埋在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)中或包埋在粗乳液中。

[0207] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的适合实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半渗透性基质,所述基质呈成形物品,例如膜或微胶囊的形式。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚丙交酯、L-谷氨酸与L-谷氨酸y乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物(例如由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)组成的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然例如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸的聚合物能够释放分子超过100天,但某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。

[0208] 在一些实施方案中,适用于可注射用途的药物组合物包括无菌水溶液(可溶于水的情况下)或分散体和临用方制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF,Parsippany,N.J.)、磷酸盐缓冲

盐水(PBS)等。组合物必须为无菌的且应当为易于注射的流体。在制造和储存的条件下它必须稳定并且必须进行防腐以防止例如细菌和真菌的微生物的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)和它们适合的混合物。例如,通过使用例如卵磷脂的包衣,在分散体的情况下通过维持所需的粒径,和通过使用表面活性剂,可以维持适当的流动性。对微生物作用的预防可通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现。在一些实施方案中,组合物中可包括等渗剂,例如糖类、多元醇(例如甘露醇、山梨醇)和氯化钠。可通过在组合物中包括延迟吸收的剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的延长吸收。

[0209] 在一些实施方案中,药物组合物可包含无菌注射溶液。可通过根据需要将所需量的活性化合物与一种上文列举的成分或其组合并入适当的溶剂中,随后进行过滤灭菌来制备无菌注射溶液。通常,可通过将活性化合物并入无菌媒介物中来制备分散体,所述媒介物含有碱性分散介质和上文列举的那些成分中所需要的其它成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉剂的情况下,制备方法是真空干燥和冷冻干燥,从先前无菌过滤溶液中得到活性成分加任何另外所需成分的粉末。

[0210] 在一些实施方案中,药物组合物可包含口服组合物。口服组合物可包括惰性稀释剂或可食用载体。可将它们封装在明胶胶囊中或压成片剂。处于口服治疗剂施用的目的,活性化合物可以与赋形剂掺混并以片剂、含片或胶囊的形式使用。还可以使用流体载体来制备口服组合物以用作漱口水,其中将流体载体中的化合物口服并漱口、咳出或吞咽。可包括药物相容性结合剂和/或佐剂材料作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊、含片等可含有以下成分中的任一种或具有类似性质的化合物:粘合剂,例如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,例如淀粉或乳糖;崩解剂例如海藻酸、Primogel或玉米淀粉;润滑剂,例如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂,例如胶体二氧化硅;甜味剂,例如蔗糖或糖精;或调味剂,例如薄荷、水杨酸甲酯或橙子调味剂。

[0211] 在一个实施方案中,药物组合物可被配制用于通过吸入施用。举例来说,可将化合物以气溶胶喷雾的形式从含有合适的推进剂(例如气体,例如二氧化碳)的压力容器或分配器或者喷雾器中递送。

[0212] 在一个实施方案中,药物组合物可被配制用于全身施用。例如,全身施用可以是静脉内,也可以是透粘膜或透皮方式。对于透粘膜或透皮施用,可在制剂中使用适于待渗透的屏障的渗透剂。这类渗透剂在本领域中通常是已知的,并且包括例如用于经粘膜施用的去垢剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。经粘膜施用可以通过使用鼻腔喷雾剂或栓剂实现。对于透皮施用,可将活性化合物配制成软膏、药膏、凝胶或乳膏,如本领域通常已知的。

[0213] 在一些实施方案中,药物组合物可被制备为栓剂(例如,具有常规栓剂基质如可可脂和其它甘油酯)或保留灌肠剂的形式,以用于直肠递送。

[0214] 在一个实施方案中,药物组合物可与防止从身体快速消除的载体一起制备,例如持续和控制释放制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可使用生物可降解的生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这类制剂的方法对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0215] 宜将口服或肠胃外组合物配制成易于施用和均匀剂量的单位剂型。如本文所用的单位剂型是指适合作为待治疗的受试者的单一剂量的物理离散单位;每个单位含有经过计

算,与所需药物载体结合可产生所需治疗效果的预定量的活性化合物。本公开的单位剂型的规格由以下情况规定并且直接取决于以下情况:活性化合物的独特特征和待实现的特定治疗效果,以及混配这类用于治疗个体的活性化合物的领域内的固有限制。

[0216] 在一些实施方案中,组合物(例如药物组合物)可包括在容器、小瓶、注射器、注射笔、包装或分配器中,任选地连同施用说明书。

[0217] 本文还提供了包括本文所述的任何靶标结合蛋白、包括本文所述的任何靶标结合蛋白的任何组合物或包括本文所述的任何靶标结合蛋白的任何药物组合物的药盒。还提供了除本文所述的靶标结合蛋白之外还包括一种或多种第二治疗剂的药盒。一种或多种第二治疗剂可以与靶标结合蛋白分开的剂量施用形式提供。或者,一种或多种第二治疗剂可与靶标结合蛋白一起配制。

[0218] 本文所述的任何药盒都可包括关于使用本文所述的任何组合物(例如药物组合物)和/或任何靶标结合蛋白的说明书。在一些实施方案中,药盒可包括关于进行本文所述的任何方法的说明书。在一些实施方案中,药盒可包括至少一剂本文所述的任何组合物(例如药物组合物)。在一些实施方案中,药盒可提供用于施用本文所述的任何药物组合物的注射器。

[0219] 本文还提供了通过本文所述的任何方法产生的靶标结合蛋白。还提供了包含通过本文所述的任何方法产生的任何靶标结合蛋白的组合物(例如药物组合物)。本文还提供了包括至少一剂的本文所述的任何组合物(例如药物组合物)的药盒。

[0220] 产生靶标结合蛋白的方法

[0221] 本文提供了产生本文所述的任何靶标结合蛋白的方法,所述方法包括:(a)在液体培养基中在足以产生所述靶标结合蛋白的条件下培养本文所述的任何重组宿主细胞;以及(b)从所述宿主细胞和/或所述液体培养基回收所述靶标结合蛋白。

[0222] 培养细胞的方法在本领域中是众所周知的。在一些实施方案中,可在有利于细胞增殖、细胞分化和细胞生长的条件下在体外维持细胞。举例来说,可通过使细胞(例如本文所述的任何细胞)与包括足以支持细胞活力和生长的必需的生长因子和补充剂的细胞培养基接触来培养细胞。

[0223] 在一些实施方案中,方法还可包括分离回收的靶标结合蛋白。靶标结合蛋白的分离可使用任何蛋白质分离或纯化技术来进行,例如分离方法的实例包括:使用蛋白纯化标签(例如His标签)分离、硫酸铵沉淀、聚乙二醇沉淀、尺寸排阻色谱法、配体亲和色谱法、离子交换色谱法(例如阴离子或阳离子)和疏水性相互作用色谱法。

[0224] 本文所述的组合物和方法可涉及使用允许在靶标结合蛋白的MM与TB之间形成二硫键的非还原性或部分还原性条件。

[0225] 在一些实施方案中,方法还包括将分离的靶标结合蛋白配制成药物组合物。各种制剂是本领域中已知的,并且在本文中进行了描述。本文所述的任何分离的靶标结合蛋白都可被配制用于任何施用途径(例如静脉内、肿瘤内、皮下、真皮内、口服(例如吸入)、经皮(例如局部)、透黏膜或肌肉内)。

[0226] 使用靶标结合蛋白的方法

[0227] 在一些方面,本公开还提供了使用本文中的靶标结合蛋白的方法。在一些实施方案中,本公开提供了治疗受试者的疾病(例如癌症(例如本文所述的任何癌症))的方法,所

述方法包括将治疗有效量的本文所述的任何靶标结合蛋白施用至所述受试者。在一些实施方案中,本公开提供了预防受试者的疾病、延迟疾病的进展、治疗疾病、缓解疾病的症状或以其它方式改善疾病的方法,所述方法通过将治疗有效量的本文所述的靶标结合蛋白施用至有需要的受试者来进行。术语"治疗"是指改善病症的至少一种症状。病症可以是癌症、自身免疫性疾病、传染病、慢性炎症或移植排斥反应(例如肾脏、肝脏或心脏移植)。在一些实施方案中,所治疗的病症是癌症、自身免疫性疾病(例如,1型糖尿病、类风湿性关节炎(RA)、银屑病/银屑病性关节炎、多发性硬化、系统性红斑狼疮、炎症性肠病(例如,克罗恩病(Crohn's disease)、溃疡性结肠炎)、阿狄森病(Addison's disease)、格雷夫斯病(Graves'disease)、舍格伦综合征(Sjögren's syndrome)、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、重症肌无力、自身免疫性血管炎、恶性贫血、乳糜泻)或传染病(例如,水痘、普通感冒、白喉、大肠杆菌、贾第虫病(Giardiasis)、HIV/AIDS、传染性单核细胞增多症、流行性感冒(流感)、莱姆病(Lyme disease)、疟疾、麻疹、脑膜炎、腮腺炎、脊髓灰质炎(Poliomyelitis)(脊髓灰质炎(polio))、肺炎、落基山斑疹热(Rocky mountain spotted fever)、风疹(德国麻疹(German measles))、沙门氏菌感染(Salmonella infections)、严重急性呼吸道综合征(SARS)、性传播疾病、带状疱疹(Shingles)(带状疱疹(herpes zoster))、破伤风、中毒性休克综合征、肺结核、病毒性肝炎、西尼罗河病毒(WestNilevirus)、百日咳(Whooping cough)(百日咳(pertussis))并且治疗是为了改善癌症、自身免疫性疾病或传染病的至少一种症状。

[0228] 如本文所用,术语"受试者"是指任何哺乳动物。在一些实施方案中,受试者是猫科动物(例如猫)、犬科动物(例如狗)、马科动物(例如马)、兔、猪、啮齿动物(例如小鼠、大鼠、仓鼠或豚鼠)、非人灵长类动物(例如猴(例如猴(例如狒狒、狨猴)或猿(例如黑猩猩、大猩猩、猩猩或长臂猿))或人。在一些实施方案中,受试者是人。术语受试者和患者在本文可互换使用。在一些实施方案中,受试者先前已被鉴定或诊断为患有疾病(例如癌症(例如本文所述的任何癌症))。

[0229] 在一些实施方案中,可以鉴定受试者为具有增加哺乳动物细胞(例如,本文所述的任何哺乳动物细胞)中HER2的表达和/或活性的HER2基因突变。例如,增加哺乳动物细胞中HER2的表达和/或活性的HER2基因突变可以是基因重复,该突变导致具有一个或多个氨基酸取代的HER2表达(例如,选自由以下组成的组的一个或多个氨基酸取代:G309A、G309E、S310F、R678Q、L755S、L755W、I767M、D769H、D769Y、V777L、Y835F、V842I、R896C和G1201V)(与野生型蛋白质相比)。参见例如Weigelt和Reis-Filho,CancerDiscov.2013,3(2):145-147。

[0230] 检测受试者的HER2相关疾病的方法的非限制性实例包括:免疫组织化学、荧光原位杂交(FISH)、显色原位杂交(CISH)。例如参见Yan等人,CancerMetastasisRev.2015,34:157-164。

[0231] 本公开的靶标结合蛋白的治疗有效量通常涉及实现治疗目标所需的量。如上所述,这可能是抗体与其靶标抗原之间的结合相互作用,在某些情况下会干扰靶标的功能。施用所需要的量还将取决于靶标结合蛋白对其特定靶标的结合亲和力,并且还将取决于施用的靶标结合蛋白从其施用到的其它受试者的自由体积中消耗的速率。本公开的靶标结合蛋白的治疗有效剂量的常见范围可为(借助于非限制性实例)约0.001、0.01、0.1、0.3、0.5、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50mg/kg体重或更高。本公

开的靶标结合蛋白的结构使得与常规靶标结合蛋白相比以及与常规抗体相比,可以减少施用于受试者的靶标结合蛋白的剂量。例如,以单位剂量为基础的施用剂量或在一个给药方案期内的总剂量与相应的常规靶标结合蛋白或相应的常规抗体的相应剂量相比,可以减少10%、20%、30%、40%或50%。

[0232] 常见的给药频率可以在例如每天一次或两次、每周一次、每两周一次或每月一次的范围内。

[0233] 治疗的有效性是结合任何已知的诊断或治疗特定疾病的方法来确定的。筛选具有所需特异性的靶标结合蛋白的方法包括但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)和本领域已知的其它免疫介导技术。

[0234] 在另一个实施方案中,针对两个或更多个靶标的靶标结合蛋白用于本领域内已知的与靶标定位和/或定量有关的方法(例如,用于测量适当生理样品内一个或多个靶标的水平,用于诊断方法,用于对蛋白质进行成像等)。在给定的实施方案中,针对两个或更多个靶标的靶标结合蛋白,或其含有抗体衍生的抗原结合结构域的衍生物、片段、类似物或同源物,用作药理活性化合物(以下称为"治疗剂")。

[0235] 这些方法和用途的任意实施方案中使用的靶标结合蛋白可以在疾病的任何阶段施用。例如,可以将这种靶标结合蛋白施用于任何阶段的癌症患者,从早期到转移性。在一些实施方案中,可以将靶标结合蛋白和其制剂施用于患有或易患与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症的受试者。

[0236] 可使用本领域已知的多种方法中的任一种来鉴别患有或易患与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症的受试者。例如,可使用多种临床和/或实验室测试(例如身体检查和血液、尿液和/或粪便分析)中的任一种评估健康状况来鉴别患有癌症或其它肿瘤疾患的受试者。例如,可使用多种临床和/或实验室测试(例如身体检查和/或体液分析,例如血液、尿液和/或粪便分析)中的任一种评估健康状况来鉴别患有炎症和/或炎性病症的受试者。

[0237] 在一些实施方案中,如果实现了多种实验室或临床目标中任一种,则认为将靶标结合蛋白施用于患有与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症的患者是成功的。例如,如果与疾病或病症相关的一种或多种症状得到缓解、减轻、抑制或不进展到进一步(即,更糟)状态,则认为将靶标结合蛋白施用于患有与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症的患者是成功的。如果疾病或病症进入缓解期或不进展到进一步(即,更糟)状态,则认为将靶标结合蛋白施用于患有与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症的患者是成功的。

[0238] 如本文所用,术语"治疗"包括降低受试者(例如本文所述的任何受试者)的疾病(例如癌症(例如本文所述的任何癌症))的一种或多种(例如1、2、3、4或5种)症状或体征的严重性、频率或数目。在疾病是癌症的一些实施方案中,治疗在患有癌症的受试者中减少癌症生长,抑制癌症进展,抑制癌症转移,或降低癌症复发的风险。

[0239] 在一些实施方案中,疾病可以是癌症。在一些实施方案中,受试者可已被鉴定或诊断为患有癌症。癌症的实例包括:实体瘤、血液肿瘤、肉瘤、骨肉瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、黑素瘤、横纹肌肉瘤、尤因肉瘤(Ewing sarcoma)、骨肉瘤、B细胞肿瘤、多发性骨髓瘤、淋巴瘤(例如B细胞淋巴瘤、B细胞非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin'slymphoma)、霍奇金淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤)、白血病(例如毛细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性髓系

白血病(AML)、慢性髓系白血病(CML)、急性淋巴细胞白血病(ALL))、骨髓增生异常综合征(MDS)、卡波西肉瘤、视网膜母细胞瘤、胃癌、尿路上皮癌、肺癌、肾细胞癌、胃癌和食管癌、胰腺癌、前列腺癌、脑癌、结肠癌、骨癌、肺癌、乳腺癌、结直肠癌、卵巢癌、鼻咽腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈部鳞状细胞癌、子宫内膜癌、膀胱癌、宫颈癌、肝癌和肝细胞癌。在一些实施方案中,癌症是淋巴瘤。在一些实施方案中,淋巴瘤是伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)。在一些方面,受试者已被鉴定或诊断为患有家族性癌症综合征,例如利-弗劳梅尼综合征(Li Fraumeni Syndrome)、家族性乳腺癌-卵巢癌(BRCA1或BRAC2突变)综合征等。所公开方法还可用于治疗非实体癌症。示例性实体瘤包括各种器官系统的恶性病(例如肉瘤、腺癌和癌瘤),例如肺、乳腺、淋巴、胃肠(例如结肠)和泌尿生殖(例如肾、尿路上皮或睾丸肿瘤)道、咽、前列腺和卵巢的恶性病。示例性腺癌包括结直肠癌、肾细胞癌、肝癌、非小细胞肺癌和小肠癌。本文的组合物和方法可治疗的癌症的其它实例包括:成人急性淋巴母细胞白血病;儿童急性淋巴母细胞白血病;成人急性髓系白血病;肾上腺皮质癌;儿童肾上腺皮质癌;AIDS相关淋巴瘤;AIDS相关恶性病;肛门癌;儿童小脑星形细胞瘤;儿童大脑星形细胞瘤;肝外胆管癌;膀胱癌;儿童膀胱癌;骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤骨癌;儿童脑干胶质瘤;成人脑肿瘤;儿童脑干胶质瘤脑肿瘤;儿童小脑星形细胞瘤脑肿瘤;儿童大脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤脑肿瘤;儿童室管膜瘤脑肿瘤;儿童髓母细胞瘤脑肿瘤;儿童幕上原始神经外胚层肿瘤脑肿瘤;儿童视路和下丘脑胶质瘤脑肿瘤;儿童脑肿瘤(其它);乳腺癌;乳腺癌和妊娠;儿童乳腺癌;男性乳腺癌;儿童支气管腺瘤/类癌;儿童类癌肿瘤;胃肠类癌肿瘤;肾上腺皮质癌;胰岛细胞癌;原发灶不明癌(Carcinoma of Unknown Primary);原发性中枢神经系统淋巴瘤;儿童小脑星形细胞瘤;儿童大脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤;宫颈癌;儿童癌症;慢性淋巴细胞白血病;慢性骨髓性白血病;慢性骨髓增生性病症;腱鞘透明细胞肉瘤;结肠癌;儿童结直肠癌;皮肤T细胞淋巴瘤;子宫内膜癌;儿童室管膜瘤;卵巢上皮癌;食管癌;儿童食管癌;尤因家族肿瘤;儿童颅外生殖细胞肿瘤;性腺外生殖细胞肿瘤;肝外胆管癌;眼内黑素瘤眼癌;视网膜母细胞瘤眼癌;胆囊癌;胃(胃部)癌;儿童胃(胃部)癌;胃肠类癌肿瘤;儿童颅外生殖细胞肿瘤;性腺外生殖细胞肿瘤;卵巢生殖细胞肿瘤;妊娠滋养细胞肿瘤;儿童脑干胶质瘤;儿童视路和下丘脑胶质瘤;毛细胞白血病;头颈癌;成人(原发性)肝细胞(肝)癌;儿童(原发性)肝细胞(肝)癌;成人霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's Lymphoma);儿童霍奇金淋巴瘤;妊娠期霍奇金淋巴瘤;下咽癌;儿童下丘脑和视路胶质瘤;眼内黑素瘤;胰岛细胞癌(内分泌胰腺);卡波西肉瘤;肾癌;喉癌;儿童喉癌;成人急性淋巴母细胞白血病;儿童急性淋巴母细胞白血病;成人急性髓系白血病;儿童急性髓系白血病;慢性淋巴细胞白血病;慢性骨髓性白血病;毛细胞白血病;唇和口腔癌;成人(原发性)肝癌;儿童(原发性)肝癌;非小细胞肺癌;小细胞肺癌;成人急性淋巴母细胞白血病;儿童急性淋巴母细胞白血病;慢性淋巴细胞白血病;AIDS相关淋巴瘤;中枢神经系统(原发性)淋巴瘤;皮肤T细胞淋巴瘤;成人霍奇金淋巴瘤;儿童霍奇金淋巴瘤;妊娠期霍奇金淋巴瘤;成人非霍奇金淋巴瘤;儿童非霍奇金淋巴瘤;妊娠期非霍奇金淋巴瘤;原发性中枢神经系统淋巴瘤;华氏巨球蛋白血症(Macroglobulinemia,Waldenstrom's);男性乳腺癌;成人恶性间皮瘤;儿童恶性间皮瘤;恶性胸腺瘤;儿童髓母细胞瘤;黑素瘤;眼内黑素瘤;梅克尔细胞癌(Merkel Cell Carcinoma);恶性间皮瘤;原发灶隐匿的转移性颈部鳞癌;儿童多发性内分泌瘤形成综合征;多发性骨髓瘤/浆细胞赘生物;蕈样肉芽肿病;骨髓增生异常综合征;慢性骨髓性白血

病;儿童急性髓系白血病;多发性骨髓瘤;慢性骨髓增生性病症;鼻腔和鼻旁窦癌;鼻咽癌;儿童鼻咽癌;神经母细胞瘤;成人非霍奇金淋巴瘤;儿童非霍奇金淋巴瘤;妊娠期非霍奇金淋巴瘤;非小细胞肺癌;儿童口腔癌;口腔和唇癌;口咽癌;骨肉瘤/恶性骨纤维组织细胞瘤;儿童卵巢癌;卵巢上皮癌;卵巢生殖细胞肿瘤;卵巢低度恶性潜能肿瘤;胰腺癌;儿童胰腺癌;胰岛细胞胰腺癌;鼻旁窦和鼻腔癌;甲状旁腺癌;阴茎癌;嗜铬细胞瘤;儿童松果体和幕上原始神经外胚层肿瘤;垂体肿瘤;浆细胞赘生物/多发性骨髓瘤;胸膜肺母细胞瘤;妊娠和乳腺癌;妊娠和霍奇金淋巴瘤;妊娠和非霍奇金淋巴瘤;原发性中枢神经系统淋巴瘤;成人原发性肝癌;儿童原发性肝癌;前列腺癌;直肠癌;肾细胞(肾)癌;儿童肾细胞癌;肾盂和输尿管移行细胞癌;视网膜母细胞瘤;儿童横纹肌肉瘤;唾液腺癌;儿童唾液腺癌;尤因家族肿瘤肉瘤;卡波西肉瘤;肉瘤(骨肉瘤)/恶性骨纤维组织细胞瘤;儿童横纹肌肉瘤;成人软组织肉瘤;儿童软组织肉瘤;塞扎里综合征(Sezary Syndrome);皮肤癌;儿童皮肤癌;皮肤癌(黑素瘤);梅克尔细胞皮肤癌;小细胞肺癌;小肠癌;成人软组织肉瘤;儿童软组织肉瘤;原发灶隐匿的转移性颈部鳞癌;胃部(胃)癌;儿童胃部(胃)癌;儿童幕上原始神经外胚层肿瘤;皮肤T细胞淋巴瘤;睾丸癌;儿童胸腺瘤;恶性胸腺瘤;甲状腺癌;儿童甲状腺癌;肾盂和输尿管移行细胞癌;妊娠滋养细胞肿瘤;原发部位未知的儿童癌症;不寻常的儿童癌症;输尿管和肾盂移行细胞癌;尿道癌;子宫肉瘤;阴道癌;儿童视路和下丘脑胶质瘤;外阴癌;华氏巨球蛋白血症;维尔姆斯氏肿瘤(Wilms'Tumor);弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL);以及套细胞淋巴瘤(MCL)。以上提及的癌症的转移也可根据本文所述的方法来治疗或预防。

[0240] 在一些实施方案中,本文中的方法可引起受试者的癌症的一种或多种症状的数目、严重性或频率降低(例如相较于在治疗之前受试者的癌症的一种或多种症状的数目、严重性或频率)。

[0241] 所述方法还可包括向受试者施用一种或多种另外的剂。在一些实施方案中,一种或多种另外的剂为化学治疗剂,例如选自由以下组成的组的化学治疗剂:多西他赛(docetaxel)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、abraxane(即,白蛋白缀合的太平洋紫杉醇)、多柔比星(doxorubicin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、卡铂、顺铂、伊立替康(irinotecan)和吉西他滨(gemcitabine)。在一些实施方案中,一种或多种另外的剂可为检查点抑制剂、激酶抑制剂、靶向肿瘤微环境中的抑制剂的剂和/或T细胞或NK激动剂。在一些实施方案中,一种或多种另外的剂为单独的或与另外一种或多种另外的剂如化学治疗剂或抗肿瘤剂组合的放射疗法。在一些实施方案中,一种或多种另外的剂可以是疫苗、肿瘤病毒和/或DC激活剂,以非限制性实例的方式,例如toll样受体(TLR)激动剂和/或α-CD40。在一些实施方案中,一种或多种另外的剂可以是被设计成经由ADCC或经由与毒素直接缀合(例如,抗体药物缀合物(ADC))来杀死肿瘤的肿瘤靶向抗体。

[0242] 在一些实施方案中,检查点抑制剂可以是例如CTLA-4、LAG-3、PD-1、PD-1、TIGIT、TIM-3、B7H4、BTLA或Vista等蛋白质的抑制剂。在一些实施方案中,激酶抑制剂可以是B-RAFi、MEKi、Btk抑制剂、依鲁替尼(ibrutinib)或克唑替尼(crizotinib)。在一些实施方案中,肿瘤微环境抑制剂可以是IDO抑制剂、α-CSF1R抑制剂、α-CCR4抑制剂、TGF-β、髓源性抑制细胞或T调节细胞。在一些实施方案中,激动剂可以是Ox40、GITR、CD137、ICOS、CD27或HVEM。

[0243] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白可以在治疗期间和/或治疗之后与一种或多种

另外的剂联合施用。在一些实施方案中,靶标结合蛋白可以配制成单一治疗组合物,并且可以同时施用靶标结合蛋白和一种或多种另外的剂。或者,靶标结合蛋白和一种或多种另外的剂可以彼此分开,例如,各自配制成单独的治疗组合物,并且靶标结合蛋白和另外的剂同时施用,或者靶标结合蛋白和另外的剂在治疗方案期间的不同时间施用。举例来说,可以在施用另外的剂之前、在施用另外的剂之后、或者以交替方式施用靶标结合蛋白。靶标结合蛋白和一种或多种另外的剂可以单剂量或多剂量施用。

[0244] 本文中的一种或多种靶标结合蛋白可以与一种或多种抗炎药物、免疫抑制剂或代谢或酶抑制剂共同配制和/或共同施用。可以使用的药物或抑制剂的实例包括以下一种或多种:非甾体抗炎药(NSAID),例如布洛芬(ibuprofen)、替尼达普(tenidap)、萘普生(naproxen)、美洛昔康(meloxicam)、吡罗昔康(piroxicam)、双氯芬酸(diclofenac)和吲哚美辛(indomethacin);柳氮磺吡啶;皮质类固醇,例如泼尼松龙(prednisolone);细胞因子抑制抗炎药(CSAID);核苷酸生物合成抑制剂,例如嘌呤生物合成抑制剂、叶酸拮抗剂(例如甲氨蝶呤(N-[4-[[(2,4-二氨基-6-蝶啶基)甲基]甲氨基]苯甲酰基]-L-谷氨酸);以及嘧啶生物合成抑制剂,例如二氢乳清酸脱氢酶(DHODH)抑制剂。适合与本公开的抗体组合使用的治疗剂包括NSAID、CSAID、(DHODH)抑制剂(例如来氟米特(leflunomide))和叶酸拮抗剂(例如甲氨蝶呤)。另外的抑制剂的实例包括以下一种或多种:皮质类固醇(口服、吸入和局部注射);免疫抑制剂,例如环孢菌素(cyclosporin)、他克莫司(tacrolimus)(FK-506);以及mTOR抑制剂,例如西罗莫司(sirolimus)(雷帕霉素(rapamycin)或雷帕霉素衍生物,例如可溶性雷帕霉素衍生物(例如酯类雷帕霉素衍生物,例如CCI-779);干扰促炎细胞因子如TNFα或IL-1信号传导的剂(例如IRAK、NIK、IKK、p38或MAP激酶抑制剂);COX2抑制剂,例如塞来昔布(celecoxib)、罗非昔布(rofecoxib)和其变体;磷酸二酯酶抑制剂,例如R973401(IV型磷酸二酯酶抑制剂);磷脂酶抑制剂,例如胞浆磷脂酶2(cPLA2)抑制剂(例如三氟甲基酮类似物);血管内皮细胞生长因子或生长因子受体抑制剂,例如VEGF抑制剂和/或VEGF-R抑制剂;以及血管生成抑制剂。适合与本公开的抗体组合使用的治疗剂是免疫抑制剂,例如环孢菌素、他克莫司(FK-506);mTOR抑制剂,例如西罗莫司(雷帕霉素)或雷帕霉素衍生物,例如可溶性雷帕霉素衍生物(例如酯类雷帕霉素衍生物,例如CCI-779);COX2抑制剂,例如塞来昔布和其变体;以及磷脂酶抑制剂,例如胞浆磷脂酶2(cPLA2)抑制剂,例如三氟甲基酮类似物。可与本公开的抗体组合的治疗剂的另外的实例包括以下中的一种或多种:6-巯基嘌呤(6-MP);硫唑嘌呤柳氮磺吡啶;美沙拉嗪(mesalazine);奥沙拉嗪(olsalazine);氯喹/羟氯喹;青霉胺;金硫脲(肌肉内和口服);硫唑嘌呤;秋水仙碱;β-2肾上腺素受体激动剂(沙丁胺醇(salbutamol)、特布他林(terbutaline)、沙美特罗(salmeteral));黄嘌呤(茶碱、氨茶碱);色甘酸盐;奈多罗米(nedocromil);酮替芬(ketotifen);异丙托铵(ipratropium)和氧托铵(oxitropium);霉酚酸酯(mycophenolate mofetil);腺苷激动剂;抗血栓剂;补体抑制剂;以及肾上腺素能剂。

[0245] 本公开还提供了检测受试者或样品中裂解剂和/或靶标的存在或不存在的方法。这类方法可包括:(i)使受试者或生物样品与靶标结合蛋白接触,其中靶标结合蛋白包括可检测标记,该可检测标记位于靶标结合蛋白的在CM底物裂解后释放的部分上;以及(ii)测量受试者或生物样品中激活的靶标结合蛋白的水平,其中受试者或生物样品中可检测水平的激活的靶标结合蛋白指示受试者或生物样品中不存在和/或不充分存在裂解剂、靶标或

裂解剂和靶标两者,使得在受试者或生物样品中不能检测到靶标结合蛋白的靶标结合和/或蛋白酶裂解,并且其中受试者或生物样品中激活的靶标结合蛋白的可检测水平降低指示受试者或生物样品中存在裂解剂和靶标。

[0246] 可检测标记水平的降低可以是例如降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%或基本上降低100%。在一些实施方案中,可检测标记可以与靶标结合蛋白的组分(例如TB)缀合。在一些实施方案中,可使用特异性结合于激活抗体的二级试剂来测量受试者或样品中靶标结合蛋白的水平,其中试剂包含可检测标记。二级试剂可以是包含可检测标记的抗体。

[0247] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白也可用于检测患者样品中的靶标,因此可用作诊断剂。例如,靶标结合蛋白可用于体外测定,例如ELISA,以检测患者样品中的靶标水平。举例来说,靶标结合蛋白可以固定在固体支持物上(例如,微量滴定板的孔)。固定的靶标结合蛋白可用作可存在于测试样品中的任何靶标的捕获抗体。在使固定的抗体与患者样品接触之前,可冲洗固体支持物并用封闭剂(例如乳蛋白或白蛋白)处理以防止分析物的非特异性吸附。

[0248] 在一些实施方案中,基于使用靶标结合蛋白在体外诊断测定中获得的结果,可以基于靶标抗原的表达水平对受试者的疾病进行分期。对于给定的疾病,从被诊断为处于疾病进展的各个阶段和/或处于疾病治疗性治疗的各个时间点的受试者中抽取血液样品。使用为进展或治疗的每个阶段提供统计学上显著结果的样品群体,指定了可被认为是每个阶段的特征的抗原浓度范围。

[0249] 本文中的靶标结合蛋白也可用于诊断和/或成像方法。在一些实施方案中,这类方法可以是体外方法。在一些实施方案中,这类方法可以是体内方法。在一些实施方案中,这类方法可以是原位方法。在一些实施方案中,这类方法可以是离体方法。例如,具有CM的靶标结合蛋白可用于检测能够裂解CM的酶的存在或不存在。这类靶标结合蛋白可用于诊断中,其可包括通过测量给定宿主生物体的给定细胞或组织中激活的抗体(即,由靶标结合蛋白的裂解产生的抗体)的积聚来在体内检测(例如,定性或定量)酶活性(或在一些实施方案中,具有增加的还原电位的环境,例如可提供二硫键还原的环境)。激活的抗体的这种积聚不仅表明组织表达酶活性(或根据CM底物的性质而增加的还原电位),而且还表明组织表达激活的抗体结合的靶标。

[0250] 例如,可选择CM作为在肿瘤部位、生物限制部位的病毒或细菌感染部位(例如像脓肿、器官等)等处发现的蛋白酶的蛋白酶底物。TB可为结合靶标抗原的TB。使用本领域技术人员熟悉的方法,可将可检测标记(例如,荧光标记或放射性标记或放射性示踪剂)缀合于靶标结合蛋白的TB或其它区域。可在上述筛选方法的背景下讨论合适的可检测标记,并且下文提供了另外的具体实例。使用对疾病状态的蛋白质或肽具有特异性的TB以及在感兴趣的疾病组织中活性升高的蛋白酶,靶标结合蛋白将表现出相对于CM特异性酶不以可检测水平存在或以低于疾病组织中的水平存在或无活性(例如,呈酶原形式或呈与抑制剂的复合物)的组织,增加的与疾病组织的结合率。由于肾脏过滤系统迅速清除血液中的小蛋白质和多肽,并且由于对CM具有特异性的酶不以可检测水平存在(或以较低水平存在于非疾病组织中或以无活性构象存在),相对于非疾病组织,激活的抗体在疾病组织中的积累增加。

[0251] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白可用于体内成像,其中在受试者(例如,哺乳动

物,包括人)中检测到荧光信号表明疾病部位含有靶标并且含有对靶标结合蛋白的CM具有特异性的蛋白酶。体内成像可用于鉴别或以其它方式细化适用于用本公开的靶标结合蛋白治疗的患者群体。例如,对于靶标和裂解正测试的靶标结合蛋白的CM中的底物的蛋白酶均测试为阳性(例如,活化的抗体在疾病部位积聚)的患者被鉴定为适合用包含这种CM的这种靶标结合蛋白治疗的候选者。同样,测试为阴性的患者可被鉴定为另一种疗法的合适候选者(即不适合用所测试的靶标结合蛋白进行治疗)。在一些实施方案中,可用包含不同CM的其它靶标结合蛋白测试对于第一靶标结合蛋白测试为阴性的这类患者,直到鉴别出适用于治疗的靶标结合蛋白(例如,包含在疾病部位被患者裂解的CM的靶标结合蛋白)。

[0252] 在一些实施方案中,原位成像可用于鉴别要治疗的患者的方法。例如,在原位成像中,靶标结合蛋白可用于筛选患者样品,以鉴别在适当位置,例如肿瘤部位具有适当的蛋白酶和靶标的那些患者。在一些实施方案中,原位成像用于鉴别或以其它方式细化适用于用本公开的靶标结合蛋白治疗的患者群体。例如,对于靶标和裂解正测试的靶标结合蛋白的CM中的底物的蛋白酶均测试为阳性(例如,活化的抗体在疾病部位积聚)的患者被鉴定为适合用包含这种CM的这种靶标结合蛋白治疗的候选者。同样,对于靶标和裂解正使用这些方法测试的靶标结合蛋白中的CM底物中的底物的蛋白酶中的一者或两者测试为阴性的患者被鉴定为另一种疗法的合适候选者(即不适合用所测试的靶标结合蛋白进行治疗)。在一些实施方案中,可用包含不同CM的其它靶标结合蛋白测试对于第一靶标结合蛋白测试为阴性的这类患者,直到鉴别出适用于治疗的靶标结合蛋白(例如,包含在疾病部位被患者裂解的CM的可激活靶标结合蛋白)。

[0253] 本公开包括以下编号项目的任何组合:

[0254] 1.一种靶标结合蛋白,所述靶标结合蛋白包含:

[0255] 重链可变结构域,所述重链可变结构域包含

[0256] 可变重链互补决定区1(VH CDR1),其包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的序列,

[0257] 可变重链互补决定区2(VH CDR2),其包含RIRSKYNNYATYY ADSVKD(SEQ ID NO:5)的序列,以及

[0258] 可变重链互补决定区3(VH CDR3),其包含HGNFGNSYVSWX 1AY(SEQ ID NO:6)的序列,其中X_1为W或F;和

[0259] 轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含

[0260] 可变轻链互补决定区1(VL CDR1),其包含X_2SSTGAVTTSNY X_3N(SEQ ID NO:10)的序列,其中X_2为R或G;并且X_3为P或V,

[0261] 可变轻链互补决定区2(VL CDR2),其包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的序列,以及

[0262] 可变轻链互补决定区3(VL CDR3),其包含X_4LWYSNX_5WV(SEQ ID NO:15)的序列,其中X_4为V或I;并且X_5为R或L,

[0263] 其中所述重链可变结构域和所述轻链可变结构域位于一种或多种多肽内,

[0264] 其中所述靶标结合蛋白特异性结合于CD3ε。

[0265] 2.项目1的靶标结合蛋白,其中:

[0266] a.所述VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的序列;

[0267] b.所述VH CDR2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的序列;

[0268] c.所述VH CDR3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)或HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID

NO:8)的序列;

[0269] d.所述VL CDR1包含RSSTGAVTTSNYPN(SEQ ID NO:11)、RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)或GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的序列;

[0270] e.所述VLCDR2包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的序列;并且

[0271] f.所述VL CDR3包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)、VLWYSNLWV(SEQ ID NO:17)或ILWYSNRWV(SEQ ID NO:18)的序列。

[0272] 3.项目1的靶标结合蛋白,其中

[0273] 所述VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),所述VH CDR 2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),所述VH CD R3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),所述VL CDR1包含RSSTGAVTTSNYPN(SEQ ID NO:11),所述VL CDR2包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且所述VL CDR3包含VLWYSNR WV(SEQ ID NO:16);

[0274] 所述VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),所述VH CDR 2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),所述VH CD R3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),所述VL CDR1包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13),所述VL CDR2包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且所述VL CDR3包含VLWYSNR WV(SEQ ID NO:16);

[0275] 所述VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),所述VH CDR2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),所述VH CD R3包含HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:8),所述VL CDR1包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13),所述VL CDR2包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且所述VL CDR3包含VLWYSNR WV(SEQ ID NO:16);

[0276] 所述VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),所述VH CDR 2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),所述VH CD R3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),所述VL CDR1包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12),所述VL CDR2包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且所述VL CDR3包含ILWYSNR WV(SEQ ID NO:18);

[0277] 所述VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),所述VH CDR 2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),所述VH CD R3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),所述VL CDR1包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13),所述VL CDR2包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且所述VL CDR3包含VLWYSNL WV(SEQ ID NO:17);或

[0278] 所述VH CDR1包含TYAMN(SEQ ID NO:3),所述VH CDR 2包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5),所述VH CD R3包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7),所述VL CDR1包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12),所述VL CDR2包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14),并且所述VL CDR3包含VLWYSNR WV(SEQ ID NO:16)。

[0279] 4.项目3的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的所述VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的所述VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的所述VH CDR3,并且所述轻链可变结构域包含:包含RSSTGAVTTSNYPN(SEQ ID NO:11)的所述VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的所述VL CDR2以及包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的所述VL CDR3。

[0280] 5.项目4的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列;并且所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:49至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、

97％、98％或99％同一的序列。

[0281] 6.项目4的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列。

[0282] 7.项目3的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的所述VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的所述VH CDR2、包含HGNFGNSYVSWWAY(SEQ ID NO:7)的所述VH CDR3,并且所述轻链可变结构域包含:包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的所述VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的所述VL CDR2以及包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的所述VL CDR3。

[0283] 8.项目7的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少90％或至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一的序列;并且所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:64至少90％或至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一的序列。

[0284] 9.项目7的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列,并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:64的序列。

[0285] 10.项目3的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的所述VH CDR1、包含RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的所述VH CDR2,包含HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:8)的所述VH CDR3,并且所述轻链可变结构域包含:包含GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的所述VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的所述VL CDR2以及包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的所述VL CDR3。

[0286] 11.项目10的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:128至少90％或至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一的序列;并且所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:122至少90％或至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一的序列。

[0287] 12.项目10的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:128的序列,并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:122的序列。

[0288] 13.项目3的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的所述VH CDR1、包含RIRSKYNNYA TYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的所述VH CDR2、包含HGNFGNS YVSWWAY(SEQ ID NO:7)的所述VH CDR3,并且所述轻链可变结构域包含:包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)的所述VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的所述VL CDR2以及包含ILWYSNRWV(SEQ ID NO:18)的所述VL CDR3。

[0289] 14.项目13的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少90％或至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一的序列;并且所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:113至少90％或至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一的序列。

[0290] 15.项目13的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列,并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:113的序列。

[0291] 16.项目3的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的所述VH CDR1、包含RIRSKYNNYA TYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的所述VH CDR2、包含HGNFGNS YVSWWAY(SEQ ID NO:7)的所述VH CDR3,并且所述轻链可变结构域包含:包含

GSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:13)的所述VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的所述VL CDR2以及包含VLWYSNLWV(SEQ ID NO:17)的所述VL CDR3。

[0292] 17.项目16的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列;并且所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:98至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列。

[0293] 18.项目16的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列,并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:98的序列。

[0294] 19.项目3的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含:包含TYAMN(SEQ ID NO:3)的所述VH CDR1、包含RIRSKYNNYA TYYADSVKD(SEQ ID NO:5)的所述VH CDR2、包含HGNFGNS YVSWWAY(SEQ ID NO:7)的所述VH CDR3,并且所述轻链可变结构域包含:包含RSSTGAVTTSNYVN(SEQ ID NO:12)的所述VL CDR1、包含GTNKRAP(SEQ ID NO:14)的所述VL CDR2以及包含VLWYSNRWV(SEQ ID NO:16)的所述VL CDR3。

[0295] 20.项目19的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:46至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列;并且所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:107至少90%或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列。

[0296] 21.项目19的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列,并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:107的序列。

[0297] 22.一种靶标结合蛋白,所述靶标结合蛋白包含:

[0298] 重链可变结构域,所述重链可变结构域包含序列EVQLVESGGG LVQPGGSLKLSCAASG FTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSWX$_1$AYWGX$_6$GTLVTVSS(SEQ ID NO:20);和

[0299] 轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含序列QTVVTQEPSL TVSPGGTVTLTCX$_2$SS TGAVTTSNYX$_3$NWVQQKPGX$_7$APRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLJGGKAALTLSGX$_9$QPEDEAEYYCX$_4$LWYSNX$_5$WVFGGGTKLTVL(SEQ ID NO:21),

[0300] 其中:

[0301] X$_1$为W或F;X$_2$为R或G;X$_3$为P或V;X$_4$为V或I;X$_5$为R或L,

[0302] X$_6$为Q并且X$_7$为Q;或X$_6$为C并且X$_7$为C,

[0303] 当X$_9$为V时J为L;或当X$_9$为A时J为I,并且

[0304] 所述靶标结合蛋白特异性结合于CD3ε。

[0305] 23.项目22的靶标结合蛋白,其中X$_6$为Q并且X$_7$为Q。

[0306] 24.项目22的靶标结合蛋白,其中X$_6$为C并且X$_7$为C。

[0307] 25.项目22的靶标结合蛋白,其中

[0308] 所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:49的序列;

[0309] 所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:64的序列;

[0310] 所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且所述轻链可变结构域包含SEQ

ID NO:113的序列;

[0311] 所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:98的序列;

[0312] 所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:46的序列并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:107的序列;或

[0313] 所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:128的序列并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:122的序列。

[0314] 26.项目1-25中任一项或组合的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域和所述轻链可变结构域位于同一多肽内。

[0315] 27.项目26的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域和所述轻链可变结构域经由接头偶联。

[0316] 28.项目27的靶标结合蛋白,其中所述接头的长度为5至30个、6至29个、7至28个、8至27个、9至26个、10至25个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个或24个氨基酸。

[0317] 29.项目26的靶标结合蛋白,其包含SEQ ID NO:50、28、114、99、108或32的序列。

[0318] 30.项目26-29中任一项或组合的靶标结合蛋白,其中所述靶标结合蛋白包含单链可变片段(scFv)。

[0319] 31.项目1-30中任一项或组合的靶标结合蛋白,其中所述靶标结合蛋白包含BiTE、$(scFv)_2$、NANOBODY®、纳米抗体-HSAVHH-scAb、VHH-Fab、双scFab、F(ab')2、双链抗体、CROSSMAB®、DAF(二合一)、DAE(四合一)、DUTAMAB®、DT-IgG、杵臼共同轻链、杵臼装配、电荷对、Fab臂交换、SEEDbody、LUZ-Y、FcAb、kl-body、正交Fab、DVD-IgG、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、ZYBODY™、DVI-IgG、双链抗体-CH3、三联抗体、微型抗体、微抗体、TriBi微抗体、scFv-CH3 KIH、Fab-scFv、F(ab')2-scFv2、scFv-KI'H、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、sc双链抗体-Fc、双链抗体-Fc、串联scFv-Fc、VHH-Fc、串联VHH-Fc、L'HH-Fc KiH、Fab-VHH-Fc、胞内抗体、对接和锁定、ImmTAC®(针对癌症的免疫动员单克隆TCR(T细胞受体))、IgG-IgG缀合物、Cov-X-Body、scFv1-PEG-scFv2、Adnectin、DARPin®、纤连蛋白、IgG、IgM、IgA、IgE、IgD或DEP缀合物、TMEAbody™、SAFEbody®、TRITAC®或SHIELD抗体。

[0320] 32.项目1-30中任一项或组合的靶标结合蛋白,其中所述靶标结合蛋白包含IgG、IgM、IgA、IgE或IgD抗体或其片段。

[0321] 33.项目32的靶标结合蛋白,其中所述靶标结合蛋白包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。

[0322] 34.项目1-33中任一项或组合的靶标结合蛋白,其中所述靶标结合蛋白是人源化的。

[0323] 35.项目1-34中任一项或组合的靶标结合蛋白,其还包含抑制非活性状态下所述靶标结合蛋白与CD3的结合的掩蔽部分。

[0324] 36.项目35的靶标结合蛋白,其中所述掩蔽部分经由可裂解部分与所述靶标结合蛋白偶联,并且所述可裂解部分为蛋白酶的底物。

[0325] 37.项目36中任一项或组合的靶标结合蛋白,其中所述蛋白酶为ADAMS、ADAMTS、ADAM8、ADAM9、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS4、ADAMTS5、天冬氨酸蛋白酶、BACE、肾素、天冬氨酸组织蛋白酶、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、凋亡蛋白酶、凋亡蛋白酶1、凋亡蛋白酶2、凋亡蛋白酶3、凋亡蛋白酶4、凋亡蛋白酶5、凋亡蛋白酶6、凋亡蛋白酶7、凋亡蛋白酶8、凋亡蛋白酶9、凋亡蛋白酶10、凋亡蛋白酶14、半胱氨酸组织蛋白酶、组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶S、组织蛋白酶V/L2、组织蛋白酶X/Z/P、半胱氨酸蛋白酶、克鲁兹蛋白酶、豆荚蛋白、Otubain-2、KLKs、KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14、金属蛋白酶、穿膜肽酶、脑啡肽酶、PSMA、BMP-1、MMPs、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26、MMP27、丝氨酸蛋白酶、活化蛋白C、组织蛋白酶A、组织蛋白酶G、糜蛋白酶、凝血因子蛋白酶、FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa、弹性蛋白酶、颗粒酶B、胍基苯甲酸酶、HtrA1、人中性粒细胞弹性蛋白酶、乳铁蛋白、马拉素、NS3/4A、PACE4、纤溶酶、PSA、tPA、凝血酶、类胰蛋白酶、uPA、II型跨膜、丝氨酸蛋白酶、TTSPs、DESC1、DPP-4、FAP、黑珀素、间质蛋白酶-2、MT-SP1/间质蛋白酶、TMPRSS2、TMPRSS3或TMPRSS4。

[0326] 38.项目1-37中任一项或组合的靶标结合蛋白,其中所述重链可变结构域和/或所述轻链可变结构域经由缀合部分与毒素、放射性同位素、小分子、诊断剂、治疗性大分子、靶向部分或可检测部分缀合。

[0327] 39.项目38的靶标结合蛋白,其中所述缀合部分能被蛋白酶裂解。

[0328] 40.项目38的靶标结合蛋白,其中所述缀合部分不能被蛋白酶裂解。

[0329] 41.一种组合物,所述组合物包含项目1-40中任一项或组合的靶标结合蛋白和载体。

[0330] 42.项目41的组合物,其中所述组合物为药物组合物,并且其中所述载体为药学上可接受的载体。

[0331] 43.一种容器、小瓶、注射器、注射笔或药盒,其包含至少一剂的项目41或42的组合物。

[0332] 44.一种核酸,所述核酸包含编码项目1-40中任一项或组合的靶标结合蛋白的序列。

[0333] 45.一种载体,所述载体包含项目44的核酸。

[0334] 46.一种细胞,所述细胞包含项目44的核酸或项目45的载体。

[0335] 47.一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项或组合的靶标结合蛋白或项目41或42的组合物。

[0336] 48.项目47的方法,其中所述受试者已被鉴定或诊断为患有癌症、炎性疾患、病症或疾病或自身免疫疾患、病症或疾病。

[0337] 49.一种产生靶标结合蛋白的方法,所述方法包括:

[0338] 在培养基中在足以产生所述靶标结合蛋白的条件下培养项目46的细胞;以及

[0339] 从所述细胞或所述培养基回收所述靶标结合蛋白。

[0340] 50.项目49的方法,其还包括分离从所述细胞或所述液体培养基回收的所述靶标结合蛋白。

[0341] 51.项目50的方法,其还包括将所述靶标结合蛋白配制成药物组合物。

[0342] 实施例

[0343] 在以下实施例中进一步描述本发明,所述实施例不限制权利要求书中所述的本发明的范围。

[0344] 实施例1:包含抗CD3 scFv的单价双特异性抗体的产生

[0345] 本实施例展示了一种产生包含抗CD3 scFv和Her2结合结构域的单价双特异性抗体的示例性方法。通过重组方法制备单价双特异性抗体。通过用包含SEQ ID NO:50、28、114、32、99、108或164的抗CD3 scFv的编码序列和单价双特异性抗体的其它组分的多核苷酸的表达载体转化宿主细胞,然后在适合于产生包含抗CD3 scFv的单价双特异性抗体的条件下培养所得重组宿主细胞来制备蛋白质。转化后第5天收获上清液,使用Octet测定法对蛋白A结合材料进行滴度测定(表7),随后使用亲和色谱法(蛋白A和/或CH1)和尺寸排阻色谱法纯化单价双特异性抗体。较高的蛋白A Octet滴度通常与理想的较高产量相关,并且几种CD3变体表现出这种理想的特性(表7)。

[0346] 实施例2:包含抗CD3 scFv的单价双特异性抗体的表征

[0347] 使用Octet测定法测定实施例1中产生的单价双特异性抗体的CD3结合。使用Octet系统(Sartorius,Octet RED96)上的生物层干涉法分析抗CD3 scFv与人CD3ε的结合动力学。所有蛋白质均在动力学缓冲液(PBS、2%BSA、0.1%Tween-20)中稀释。在数据采集前使超级链霉亲和素(SSA)包被的生物传感器(Sartorius,18-5057)在室温下在动力学缓冲液中平衡10分钟,实验在30℃下以1000rpm搅动进行。初始基线水平持续60秒(“s”)。将10nM重组his标记和生物素化的CD3ε蛋白(AcroBiosystems,CDE-H8223)加载到SSA生物传感器上120s。在分析物缔合之前,建立另一个基线水平,持续60s。在解离速率筛选中,负载的传感器与200nM单价CD3模块缔合,并在完整动力学测定中以150s进入200nM至3.125nM的浓度范围,然后在动力学缓冲液中进行300s的解离步骤。每个解离速率筛选测定均包括一个包含v12_LH(SEQ ID NO:164)的参考分子。在拟合之前,从数据中减去一个装有配体但没有分析物的参考传感器。使用物质输运模型来拟合数据。使用ForteBio DataAnalysis 10.0软件进行分析。CD3单价双特异性抗体表现出与CD3的特异性结合,如下表7中的K_d和K_{off}数据所示。

[0348] 使用分析型尺寸排阻色谱法(SEC)分析单价双特异性抗体的单体含量。分析采用Agilent 1260Infinity HPLC系统进行,以280nm吸光度进行紫外检测。将亲和色谱(蛋白质A或CH1)纯化材料的蛋白质等分试样(约25μg)注入7.8mm×15cm TSKgel QC-PAK GFC300柱(TOSOH Biosciences,King ofPrussia,PA),该柱用0.1M磷酸钠、0.1M硫酸钠pH 6.8平衡,流速为1.0mL/min。亲和纯化材料的单体含量%低(尺寸排阻精制步骤之前)通常是不可取的,因为它会对精制步骤的总产量产生负面影响。表7中描述的CD3变体在亲和纯化步骤中均具有可接受的≥50%单体含量。

[0349] 使用Nanotemper Prometheus NT.48(NanoTemper Technologies,Munich)研究热变性。样品浓度在0.8mg/ml-1mg/ml之间,加热速率为1℃/min。使用发射波长为330nm和350nm时色氨酸荧光随温度的变化记录稳定性数据。在330和350nm波长下测量色氨酸和酪氨酸(Trp/Try)的固有荧光,并在1℃/分钟的加热速率下绘制展开过程中固有荧光对比15至95℃的温度的图。展开/变性导致色氨酸残基周围的微环境极性发生变化,从而导致荧光

发生变化,这反映在熔化曲线中。荧光比F350/F330与温度的图产生了清晰的熔化转变,可用于分析熔化温度。通过检测荧光比(F350/F330)的一阶导数的最大值来确定熔化温度。熔化温度(Tm)是通过F350/330图的一阶导数计算的。Tm值越高,表明蛋白质越稳定。表7中描述的所有CD3变体(参考v12_LH除外)均具有理想的Tm,高于55℃,并且明显高于参考v12_LH。单价双特异性抗体通过下表7中的CD3结合结构域进行识别。Koff数据以相对测量值报告,其中"+++"指示CD3结合的Koff率与包含v12_LH(SEQ ID NO:164)作为抗CD3 scFv的参考单价双特异性抗体大致相同或更好。

[0350] 表7

[0351]

单价双特异性抗体	Octet 滴度 (mg/mL)	单体%	Tm	K_D (nM)	K_{off}
v619_HLc (SEQ ID NO: 50)	76/258*	80	58/57	0.92 – 2.62	+++
v619_HLh (SEQ ID NO: 28)	102/248*	84	56/58	1.66 – 5.64	+++
v619-HLh-CC4 (SEQ ID NO: 32)	140	62	59	约 11	+++
v619_Hh8 (SEQ ID NO: 99)	110	50	57		+++
v619_HLp2 (SEQ ID NO: 114)	98		56		+++
v619_Hh13 (SEQ ID NO: 108)	64		57		+++
v12_LH (参考, SEQ ID NO: 164)	58	85	53		+++

[0352] *两个数字来自两个独立的转化,并代表转化/表达的变化。

[0353] 实施例3包含抗CD3 scFv和Her2结合结构域的单价双特异性抗体的细胞毒性

[0354] 通过细胞毒性测定法确定单价双特异性抗体的体外效力。简单地说,将SKOV3-luc2靶细胞和人PBMC效应细胞(Stemcell technologies)以1:10的靶细胞与效应细胞比率在补充有5%人血清(MP Bio目录号2930949)的RPMI培养基(Gibco目录号22400071)中一起涂铺进行共培养。向该共培养物中添加实施例1中产生的单价双特异性抗体的滴定物,并将板在37℃和5%CO_2下孵育约48小时。孵育后,使用ONE-Glo™荧光素酶测定系统(Promega目录号E6130)评估细胞毒性,并在平板读数器(TECAN)上测量发光度。细胞毒性百分比计算如下:(1-(实验的RLU/未处理的平均RLU))×100。使用GraphPadPRISM绘制了细胞毒性百分比数据并计算EC_{50}值。结果在下表8中示出,为与包含v12-LH作为抗CD3 scFv(SEQ ID NO:164)的内部对照单价双特异性抗体的EC50相比的EC50的相对值。每种分子至少测试两次,所得结果范围报告于表8中。典型的测定误差约为2-3倍,因此约0.5至约2的比率表明,测试的单价双特异性抗体具有与包含v12-LH作为抗CD3结合蛋白的参考单价双特异性抗体相似的效力。小于约0.5的比率表明测试的单价双特异性抗体比包含v12-LH抗CD3 scFv的参考单价双特异性抗体更有效。单价双特异性抗体通过其CD3结合结构域来识别。表8中的大多数CD3变体(v619_HLp2除外)的EC50比率表明其效力优于v12-LH,在测定变化限度内。

[0355] 表8.包含抗CD3 scFv的单价双特异性抗体的细胞毒性。

[0356]

单价双特异性抗体	v619_HLc (SEQ ID NO: 50)	v619_HLh (SEQ ID NO: 28)	v619-HLh-CC4 (SEQ ID NO: 32)	v619_Hh8 (SEQ ID NO: 99)	v619_HLp2 (SEQ ID NO: 114)	v619_Hh13 (SEQ ID NO: 108)
相比于参考(v12-LH，SEQ ID NO: 164)的EC50的EC50比率	0.01– 0.13	0.11 - 1.15	0.35 – 1.51	0.23-0.61	0.57 – 1.84	0.14-0.26

[0357] 序列的实例列于下表9A和9B中。

[0358] 表9A示例性序列

[0359]

SEQ ID NO	注释	序列
1	野生型人CD3 ε	DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGS EILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEF SELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVC ENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYW SKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPP VPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI

[0360]

3	VH CDR1	TYAMN
5	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
6	VH CDR3 共有序列	HGNFGNSYVSWX$_1$AY 其中 X_1 为 W 或 F
7	VH CDR3	HGNFGNSYVSWWAY
8	VH CDR3	HGNFGNSYVSWFAY
10	VL CDR1 共有序列	X$_2$SSTGAVTTSNYX$_3$N 其中 X_2 为 R 或 G; X_3 为 P 或 V
11	VL CDR1	RSSTGAVTTSNYPN
12	VL CDR1	RSSTGAVTTSNYVN
13	VL CDR1	GSSTGAVTTSNYVN
14	VL CDR2	GTNKRAP
15	VL CDR3 共有序列	X$_4$LWYSNX$_5$WV 其中 X_4 为 V 或 I; X_5 为 R 或 L
16	VL CDR3	VLWYSNRWV
17	VL CDR3	VLWYSNLWV
18	VL CDR3	ILWYSNRWV
20	重链可变结构域共有序列	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWX$_1$AYWGX$_6$GTLVTVSS 其中 X_1 为 W 或 F; X_6 与 SEQ ID NO: 21 中的 X_7 相同并且为 Q 或 C
21	轻链可变结构域共有序列	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCX$_2$SSTGAVTTSNYX$_3$NWVQQKPGX$_7$APRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLJGGKAALTLSGX$_9$QPEDEAEYYCX$_4$LWYSNX$_5$WVFGGGTKLTVL 其中: X_2 为 R 或 G; X_3 为 P 或 V; X_4 为 V 或 I; X_5 为 R 或 L; X_7 与 SEQ ID NO: 20 中的 X_6 相同并且为 Q 或 C，并且 当 X_9 为 V 时 J 为 L; 或当 X_9 为 A 时 J 为 I
22	重链可变结构域共有序列(无二硫键突变)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWX$_1$AYWGX$_6$GTLVTVSS 其中 X_1 为 W 或 F; **X_6 为 Q**
23	轻链可变结构域共有序列(无二硫化物突变)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCX$_2$SSTGAVTTSNYX$_3$NWVQQKPGX$_7$APRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLJGGKAALTLSGX$_9$QPEDEAEYYCX$_4$LWYSNX$_5$WVFGGGTKLTVL 其中: X_2 为 R 或 G; X_3 为 P 或 V; X_4 为 V 或 I; X_5 为 R 或 L;

[0361]

		X_7为 Q，并且 当 X_9 为 V 时 J 为 L；或当 X_9 为 A 时 J 为 I
24	重链可变结构域共有序列(有二硫键突变)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYA MNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYVSWX_1AYWGX_6GTLVTVS S 其中 X_1 为 W 或 F；**X_6为 C**
25	轻链可变结构域共有序列(有二硫化物突变)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCX_2SSTGAVTTS NYX$_3$NWVQQKPGX$_7$APRGLIGGTNKRAPGTPA RFSGSLJGGKAALTLSGX$_9$QPEDEAEYYCX$_4$LW YSNX$_5$WVFGGGTKLTVL 其中： X_2 为 R 或 G；X_3 为 P 或 V；X_4 为 V 或 I；X_5 为 R 或 L； **X_7为 C**，并且 当 X_9 为 V 时 J 为 L；或当 X_9 为 A 时 J 为 I
26	Fc 结构域白突变体	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGX X 为赖氨酸或不存在。
27	Fc 结构域杵突变体(HC179(HC_FcK_IgG4_EN))	GSSKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGX X 为赖氨酸或不存在。
28	v619h	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYA MNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRG LIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
29	v619h+20gg	QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSG GLSGRSDDHGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWA

[0362]

		YWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVN WVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSL IGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWV FGGGTKLTVL
30	v619h-CC 4+20gg	QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSG GLSGRSDDHGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAY WGCGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVT QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVNW VQQKPGCAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIG GKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFG GGTKLTVL
31	v619h-CC 45,240+20 gg	QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSG GLSGRSDDHGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGCEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWA YWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVN WVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSL IGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWV CGGGTKLTVL
32	v619h-CC 4	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYA MNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGCGTLVTVSSG GGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTV TLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGCAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
33	v619h-CC 45,240	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYA MNWVRQASGKGCEWVGRIRSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRG LIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVCGGGTKLTVL
34	人 IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS

[0363]

		KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGX X 为赖氨酸或不存在。
35	人 IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGX X 为赖氨酸或不存在
36	人 IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRV ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEP KSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTF RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPM LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMH EALHNRFTQKSLSLSPGX X 为赖氨酸或不存在
37	人 IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGX X 为赖氨酸或不存在
38	hIgG4 S228P 和 L235E CH1-Fc	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT

[0364]

		VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGX X 为赖氨酸或不存在。
39	IgG4-EN KiHSS - H 链仅 Fc	SKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGX X 为赖氨酸或不存在
40	IgG4-EN KiHSS - K 链-仅 Fc	GPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG X X 为赖氨酸或不存在。
41	IgG1 KiHSS - H 链仅 Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG X X 为赖氨酸或不存在。
42	IgG1 KiHSS - K 链-仅 Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGX X 为赖氨酸或不存在。

[0365] 表9B重链可变结构域、轻链可变结构域和相关分子的示例性序列。

[0366] 重链可变结构域中的CDR分别包含重链可变结构域第31-35位氨基酸序列、第50-68位氨基酸序列和第101-114位氨基酸序列。轻链可变结构域中的CDR分别包含轻链可变结构域第23-36位氨基酸序列、第52-58位氨基酸序列和第91-99位氨基酸序列。

[0367]

抗 CD3 模块	多肽	序列	SEQ ID NO
v619_HL15	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	43
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	44
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	45
v619_Hla	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVSS	46
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL	47
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL	48
v619_HLc	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVSS	46
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	49

[0368]

	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYPNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	50
v619_HLc1	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCTVHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	51
	抗 CD3 轻链可变结构域	SQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	52
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCTVHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYPNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	53
v619_HLd	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYI SYWAYWGQGTLVTVSS	54
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	55
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYI SYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYPNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	56
V619_H	抗 CD3	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT	57

[0369]

le	重链可变结构域	FNKYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSS	
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTSGNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTV L	58
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTSGNYANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGT KLTVL	59
v619_HLf	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSS	57
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL	60
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGT KLTVL	61
v619_HLg	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSS	43
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	62
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK	63

[0370]

		YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLI GGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGT KLTVL	
v619_H Lh	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	46
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV L	64
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	28
v619_H Lh1	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCTVHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	51
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV L	64
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCTVHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	65
v619_Hl	抗 CD3	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT	66

[0371]

i	重链可变结构域	FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYI SYWAYWGQGTLVTVSS	
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	67
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYI SYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI GGTKFLAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGT KLTVL	68
V619_HLj	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYI SYWAYWGQGTLVTVSS	54
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	67
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYI SYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI GGTKFLAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGT KLTVL	69
v619_HLk	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSS	70
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	71
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY	72

[0372]

		LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGT KLTVL	
v619_H LL	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	73
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL	74
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLI GGTKFLAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGT KLTVL	75
v619_H Lm	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYI SYWAYWGQGTLVTVSS	76
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL	74
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYI SYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLI GGTKFLAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGT KLTVL	77
v619_H Ln	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV	78

[0373]

		SWWAYWGQGTLVTVSS	
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL	74
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLI GGTKFLAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGT KLTVL	79
V619_HLo	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	78
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGV VTSSNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL	80
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGSGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGVVTSSNYPNWVQQKPGQAPRGLI GGTKFLAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGT KLTVL	81
v619 HLv2	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSS	82
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	44
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR	83

		SSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGT KLTVL	
v619 HLK1	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSS	82
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	71
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGT KLTVL	84
v619_Hh1	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSS	70
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV L	64
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	85
v619_Hh2	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSS	70
	抗 CD3	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA	86

[0374]

[0375]

	轻链可变结构域	VTTSNYAVWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYAVWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	87
v619_Hh3	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSS	70
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYAFWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	88
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYAFWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	89
v619_Hh4	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	90
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV L	64
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI	91

		GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	
v619_H h5	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMIWVRQASGKGLEWVGRIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WWAYWGQGTLVTVSS	92
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV L	64
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMIWVRQASGKGLEWVGRIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGS STGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTK LTVL	93
v619_H h6	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMLWVRQASGKGLEWVGRIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WWAYWGQGTLVTVSS	94
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV L	64
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMLWVRQASGKGLEWVGRIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGS STGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTK LTVL	95
v619_H h7	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSS	70
	抗 CD3	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA	96

[0376]

[0377]

	轻链可变结构域	VTTSNYAYWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYAYWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	97
v619_Hh8	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	46
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTV L	98
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGT KLTVL	99
v619_Hh9	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	46
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL	100
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI	101

[0378]

		GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGT KLTVL	
v619_H h10	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMIWVRQASGKGLEWVGRIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGTLVTVSS	102
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYAYWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL	103
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMIWVRQASGKGLEWVGRIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRS STGAVTTSNYAYWVQQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTK LTVL	104
v619_H h12	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	46
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	105
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	106
v619_H h13	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	46
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP	107

[0379]

		EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV L	
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	108
v619_Hh15	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	46
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTV L	109
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGT KLTVL	110
v619_Hh17	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	111
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV L	64
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI	112

[0380]

		GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	
v619_H Lp2	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	46
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCILWYSNRWVFGGGTKLTVL	113
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCILWYSNRWVFGGGTK LTVL	114
v619_H Lp3	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	46
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCILWYSNLWVFGGGTKLTVL	115
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCILWYSNLWVFGGGTK LTVL	116
v619_H Lp4	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	46
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCPSSTGA VTTSNYGNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP	117

[0381]

		EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV L	
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCP SSTGAVTTSNYGNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	118
v619_HLp5	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	46
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCPSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV L	119
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCP SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	120
v619-HLh-CC1	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWCQGTLVTVSS	121
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGCAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	122
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWCQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGCAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS	123

[0382]

		GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	
v619-HL h-CC2	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWCQGTLVTVSS	121
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQCPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	124
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWCQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQCPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	125
v619-HL h-CC3	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWCQGTLVTVSS	121
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQACRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV L	126
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWCQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQACRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	127
v619-HL h-CC4	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGCGTLVTVSS	128
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGCAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE	122

[0383]

		DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGCGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGCAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	32
v619-HLh-CC5	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGCGTLVTVSS	128
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQCPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	124
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGCGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQCPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	129
v619-HLh-CC6	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGCGTLVTVSS	128
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQACRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV L	126
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGCGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQACRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT	130

[0384]

		KLTVL	
v619-HLh-CC7	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQCTLVTVS	131
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGCAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	122
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQCTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGCAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	132
v619-HLh-CC8	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQCTLVTVSS	131
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQCPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	124
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQCTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQCPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	133
v619-HLh-CC9	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQCTLVTVSS	131
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQACRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	126

[0385]

	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQCTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQACRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	134
v619_HLh-CC10	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKCLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	135
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFGCGTKLTV L	136
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKCLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGCGT KLTVL	137
v619_HLa1	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCTVHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	51
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL	47
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCTVHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI GGTKFLAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGT KLTVL	138

[0386]

v619_HLd1	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTVHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS	139
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	55
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTVHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	140
v619-HLL1	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	57
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL	141
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL	142
v619_HLB	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS	66
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	143
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK	144

[0387]

		YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYI SYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYPNWVQQKPGQAPRGLI GGTKFLAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGT KLTVL	
v619h-RE	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYARSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	145
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCVLWYSNEWVFGGGTKLTV L	165
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYARSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNEWVFGGGT KLTVL	166
v619h-RD	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYARSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	145
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCVLWYSNDWVFGGGTKLTV L	146
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYARSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNDWVFGGGT KLTVL	147
v619h-R	抗 CD3	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT	46

[0388]

237K	重链可变结构域	FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVSS	
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNKWVFGGGTKLTVL	148
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNKWVFGGGTKLTVL	149
v619_hh9-CC4	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGCGTLVTVSS	150
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGCAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL	151
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGCGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGCAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL	152
v619_hh9-PA-CC4_	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGCGTLVTVSS	153
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGCAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL	151
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK	154

[0389]

		YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGCGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYANWVQQKPGCAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGT KLTVL	
v619_hh9F-CC4PA	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGCGTLVTVSS	155
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQQKPGCAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL	151
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGCGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYANWVQQKPGCAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGT KLTVL	156
v619_Hh9-CC4-PAV	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGCGTLVTVSS	153
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGCAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL	157
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGCGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGCAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGT KLTVL	158
v619_Hh9F-CC4-PAV	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY	155

[0390]

		LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGCGTLVTVSS	
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGCAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL	157
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGCGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGCAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGT KLTVL	159
v619_53 1V Tras 1/2 TCB	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	46
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTV L	160
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGT KLTVL	161
v619_c1 5	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWWAYWGQGTLVTVSS	46
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	49
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV	50

[0391]

		SWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	
v619_h15	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVSS	46
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	64
	抗 CD3 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	28
V12 (参考抗 CD3 scFv)	抗 CD3 重链可变结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	162
	抗 CD3 轻链可变结构域	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	163
	抗 CD3 scFv	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	164

[0392] 其它实施方案

[0393] 应了解尽管已结合本发明的详细描述对本发明进行描述,但先前描述意图说明而非限制由随附权利要求书的范围限定的本发明的范围。其它方面、优势和修改在以上权利

要求书的范围内。

[0394] 本文提及的所有出版物、专利申请、专利以及其它参考文献均以引用的方式整体并入。在冲突的情况下,将以本说明书为准,包括定义。材料、方法和实例仅是说明性的,并且不意图是限制性的。