



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I814749 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 09 月 11 日

(21)申請案號：107138674

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 10 月 31 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

C07K16/46 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

(30)優先權：2017/11/01

歐洲專利局

17199608.5

(71)申請人：瑞士商赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)

瑞士

(72)發明人：彼克曼儂 奧里奇 BRINKMANN, ULRICH (DE)；迪克歐普夫 史帝芬 DICKOPF, STEFFEN (DE)；喬治絲 蓋 GEORGES, GUY (BE)；索瑞 俄姆葛德 THOREY, IRMGARD (DE)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

期刊 Klaus Mayer et al., TriFabs-Trivalent IgG-Shaped Bispecific Antibody Derivatives: Design, Generation, Characterization and Application for Targeted Payload Delivery. International Journal Of Molecular Sciences. 16(11): doi: 10.3390/ijms161126037. 2015 Nov 17; 27497-27507.

審查人員：吳淑君

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：16 共 160 頁

(54)名稱

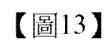
三 Fab-康特斯體(Contorsbody)

(57)摘要

本發明係關於一種包含兩個環形融合多肽之多特異性抗體，該等環形融合多肽各包含 VH/VL-對及藉此之第一及第二結合位點，由此第三 VH/VL-對及藉此之第三結合位點會由該兩個環形融合多肽之締合形成。

Herein is reported a multispecific antibody comprising two circular fusion polypeptides each of them comprising a VH/VL-pair and thereby a first and a second binding site, whereby a third VH/VL-pair and thereby a third binding site is formed by the associated of the two circular fusion polypeptides.

指定代表圖：





公告本

I814749

【發明摘要】

【中文發明名稱】

三Fab-康特斯體(Contorsbody)

【英文發明名稱】

TRIFAB-CONTORSBODY

【中文】

本發明係關於一種包含兩個環形融合多肽之多特異性抗體，該等環形融合多肽各包含VH/VL-對及藉此之第一及第二結合位點，由此第三VH/VL-對及藉此之第三結合位點會由該兩個環形融合多肽之締合形成。

【英文】

Herein is reported a multispecific antibody comprising two circular fusion polypeptides each of them comprising a VH/VL-pair and thereby a first and a second binding site, whereby a third VH/VL-pair and thereby a third binding site is formed by the associated of the two circular fusion polypeptides.

【指定代表圖】

圖13

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

三Fab-康特斯體(Contorsbody)

【英文發明名稱】

TRIFAB-CONTORSBODY

【技術領域】

【0001】 本發明屬於標靶結合分子之領域。本文報導一種包含至少三個抗原結合位點之多特異性抗體，由此分子極緊湊且具有相對低分子量。

【先前技術】

【0002】 自從1974年Koehler及Milstein研發第一單株抗體以來，已做出大量努力來研發適合於人類中療法之抗體。已在小鼠及大鼠中研發出第一種可用的單株抗體。此等抗體在用於人類療法時由於係抗嚙齒動物抗體而引起不合需要之副作用。已進行大量工作來減少或甚至消除該等不合需要之副作用。

【0003】 在過去幾年中，日益增加之人類單株抗體或人類化單株抗體已進入市場。熟知實例包括例如來自Hoffmann-La Roche, Basel之Herceptin®及MabThera®。

【0004】 此外，已研發源自野生型四鏈Y形抗體形式之新穎抗體形式。此等形式主要係二特異性形式及多特異性形式。關於綜述，參見例如Kontermann, R., mAbs 4 (2012) 182-197。

【0005】 在US 2009/0175867中，報導具有效應功能之單鏈多價結合蛋白。

【0006】 WO 2014/131711中報導第二及第三抗原結合部分可直接或經由免疫球蛋白鉸鏈區與Fc域融合之雙特異性抗體。

【0007】 在EP 15176083中，報導與全長抗體相比分子量減小之新穎抗體形式及其用途。

【0008】 WO 2007/048022揭示抗體-多肽融合蛋白及產生及使用其之方法。

【0009】 WO 2007/146968揭示具有效應功能之單鏈多價結合蛋白。

【0010】 EP 1 378 520揭示環狀單股三特異性抗體。

【0011】 WO 2016/087416揭示包含至少三個抗原結合位點之多特異性抗體，其中兩個抗原結合位點由第一抗原結合部分及第二抗原結合部分形成且第三抗原結合位點由可變重鏈域(VH3)及可變輕鏈域(VL3)形成。

【發明內容】

【0012】 本文報導一種新穎標靶黏合劑。此新穎標靶黏合劑係三價的二或三特異性雙環多肽，其中環形多肽各包含三個可變域-恆定域(V-C)二聚體。更詳細地，在第一多肽中，N端二聚體V_{1a}-C_{1a}包含第一結合位點之第一部分，中心二聚體V_{2a}-C_{2a}包含第二結合位點之第一部分，且C端二聚體V_{1b}-C_{1b}包含第一結合位點之第二部分，V_{1a}-C_{1a}及V_{1b}-C_{1b}。第二多肽包含作為中心二聚體之第二結合位點之第二部分V_{2b}-C_{2b}，及作為N及C端二聚體之第三結合位點之第一及第二部分。第一、第二及第三結合位點之各別第一及第二部分彼此締合以形成完整或官能性第一至第三結合位點。藉由第一及第三結合位點之第一及第二部分之締合，第一及第二多肽各係

環化多肽。締合各彼此獨立地可為非共價或共價締合。在共價締合之情況下，其並非藉由肽鍵，但例如藉由二硫鍵實現

【0013】 如本文所報導之一個態樣係包含三個抗原結合位點之多特異性抗體，其中

a)第一抗原結合位點由第一環形融合多肽形成，該第一環形融合多肽包含第一結合域之第一部分、第一結合域之第二部分及第三結合域之第一部分，其中

- 第一結合域之第一部分直接或經由第一肽連接子與第三結合域之第一部分之N端融合，且

- 第一結合域之第二部分直接或經由第二肽連接子與第三結合域之第一部分之C端融合，且

- 第一結合域之第一部分係重鏈Fab片段(VH₁-CH1)或輕鏈Fab片段(VL₁-CL)，其中若第一結合域之第一部分係重鏈Fab片段，則第一結合域之第二部分係輕鏈Fab片段，或反之亦然，且

- 第一結合域之第一部分及第一結合域之第二部分彼此締合且形成第一抗原結合位點，

b)第二抗原結合位點由第二環形融合多肽形成，該第二環形融合多肽包含第二結合域之第一部分、第二結合域之第二部分及第三結合域之第二部分，其中

- 第二結合域之第一部分直接或經由第三肽連接子與第三結合域之第二部分之N端融合，且

- 第二結合域之第二部分直接或經由第四肽連接子與第三結合域之第二部分之C端融合，且

- 第二結合域之第一部分係重鏈Fab片段(VH₂-CH1)或輕鏈Fab片段(VL₂-CL)，其中若第二結合域之第一部分係重鏈Fab片段，則第二結合域之第二部分係輕鏈Fab片段，或反之亦然，(其中第二結合位點之第一部分獨立於第一結合位點之第一部分進行選擇)，且

- 第二結合域之第一部分及第二結合域之第二部分彼此締合且形成第二抗原結合位點，

c)第三抗原結合位點由第三結合域之第一部分及第三結合域之第二部分形成，其中

- 第三結合域之第一部分係可變重鏈-連接子-CH3域融合多肽(VH₃-L-CH3)或可變輕鏈-連接子-CH3域融合多肽(VL₃-L-CH3)，且

- 若第一環形融合多肽中之第三結合域之第一部分係可變輕鏈-CH3域融合多肽，則第三結合域之第二部分係可變重鏈-CH3域融合多肽，或反之亦然，且

- 第三結合域之第一部分及第三結合域之第二部分彼此締合且形成第三抗原結合位點，

其中兩個恆定重鏈域3 (CH3)藉由以下而改變以促進雜二聚：

i) 在CH3域中之一者中藉由至少一個原始胺基酸殘基經側鏈體積大於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基取代產生隆凸，及在CH3域中之另一者中藉由至少一個原始胺基酸殘基經側鏈體積小於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基取代產生空腔，以使得在CH3域中之一者中產生之隆凸可定位於CH3域中之另一者中產生之空腔中，或

CH3域中之一者中之至少一個原始胺基酸殘基經帶正電胺基酸取代，及CH3域中之另一者中之至少一個原始胺基酸殘基經帶負電胺基酸取

代，或

ii) 在各CH3域中引入至少一個半胱胺酸殘基，以使得在CH3域之間形成二硫鍵，或

iii) i)與ii)之修改。

【0014】 在一個實施例中，多特異性抗體包含該CH3域之各N端之恆定重鏈域2 (CH2)，但不包含鉸鏈區。

【0015】 在一個實施例中，多特異性抗體不含恆定重鏈域2 (CH2)及鉸鏈區。

【0016】 在一個實施例中，第一及第二環形融合多肽各包含恰好一個在第三抗原結合域之一部分之N端的結合域之部分、及恰好一個但不同的在第三結合域之一部分之C端的結合域之部分。

【0017】 在一個實施例中，第一環形融合多肽中之第一結合域之第一部分及第一結合域之第二部分彼此共價締合，及/或第二環形融合多肽中之第二結合域之第一部分及第二結合域之第二部分彼此共價締合。在一個實施例中，共價締合藉由除肽鍵外之鍵實現。在一個較佳實施例中，共價締合藉由二硫鍵實現。

【0018】 在一個實施例中，

i) 第一或第二結合位點之第一部分之CH1域之C端與第三結合域之一部分之N端結合，且第一或第二結合位點之第二部分之VL域之N端與第三結合域之C端結合，或

ii) 第一或第二結合位點之第一部分之VH域之C端與第三結合域之一部分之N端結合，且第一或第二結合位點之第二部分之CL域之N端與第三結合域之C端結合。

【0019】 在一個實施例中，第一及/或第二及/或第三抗原結合位點藉由彼此獨立地在以下位置下引入半胱胺酸殘基以在VH與VL域之間形成二硫鍵(根據Kabat編號)而二硫鍵穩定：

- VH之位置44處及VL之位置100處，
- VH之位置105處及VL之位置43處，或
- VH之位置101處及VL之位置100處。

【0020】 在一個實施例中，第一或第二結合域之第一部分係抗體重鏈Fab片段(VH+CH1)且第一或第二結合域之第二部分係抗體輕鏈Fab片段(VL+CL)，或反之亦然。

【0021】 在一個實施例中，多特異性抗體融合多肽發揮效應功能。在一個實施例中，效應功能係ADCC或/及CDC。

【0022】 在一個實施例中，第一結合域之第一部分經由SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 17之第一肽連接子與第三結合域之一部分之N端融合，且第一結合域之第二部分經由SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 17之第二肽連接子與第三結合域之一部分之C端融合，其中第一及第二肽連接子彼此獨立地進行選擇。

【0023】 在一個實施例中，第二結合域之第一部分經由SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 17之第一肽連接子與第三結合域之一部分之N端融合，且第二結合域之第二部分經由SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 17之第二肽連接子與第三結合域之一部分之C端融合，其中第一及第二肽連接子彼此獨立地進行選擇。

【0024】 在一個較佳實施例中，第一結合域之第一部分經由SEQ ID NO: 38之第一肽連接子與第三結合域之一部分之N端融合且第一結合域之

第二部分經由SEQ ID NO: 16之第二肽連接子與第三結合域之一部分之C端融合，且第二結合域之第一部分經由SEQ ID NO: 38之第一肽連接子與第三結合域之一部分之N端融合，且第二結合域之第二部分經由SEQ ID NO: 16之第二肽連接子與第三結合域之一部分之C端融合。

【0025】 在一個實施例中，第三結合位點特異性結合至人類CD3或人類CD4或人類CD28。

【0026】 在一個實施例中，包含三個抗原結合位點之多特異性抗體包含

第一環形融合多肽，其在N端至C端方向上包含作為第一結合域之第一一部分的重鏈Fab片段(VH-CH1)、SEQ ID NO: 38之連接子、作為第三結合域之第一一部分的可變重鏈-CH3域融合多肽(其中CH3域包含突變T366W(視情況另外包含突變S354C或Y349C))、SEQ ID NO: 16之連接子及作為第一結合域之第二部分的輕鏈Fab片段(VL-CL)，

及

第二環形融合多肽，其在N端至C端方向上包含作為第二結合域之第一一部分的輕鏈Fab片段(VL-CL)、SEQ ID NO: 38之連接子、作為第三結合域之第二一部分的可變輕鏈-CH3域融合多肽(其中CH3域包含突變T366S、L368A及Y407V(視情況另外包含突變Y349C或S354C))、SEQ ID NO: 16之連接子及作為第二結合域之第二一部分的重鏈Fab片段(VH-CH1)，

(根據Kabat EU索引編號)

及

特異性結合至人類CD3或CD4或CD28之第三結合位點。

【0027】 在一個實施例中，各(環形)(單鏈)融合多肽在N端至C端方向上在第三結合域之一部分之前(亦即第三結合域之一部分之N端)包含恰好一個抗體可變域，且在第三結合域之一部分之後(亦即第三結構域之一部分之C端)包含恰好一個抗體可變域。

【0028】 在一個實施例中，標靶係細胞表面抗原或細胞表面受體之可溶性配體。

【0029】 在一個實施例中，結合域係Fab、DAF或雙特異性Fab。

【0030】 在一個實施例中，第一及/或第二結合域係(習知)Fab，其中結合域之第一部分包含抗體重鏈可變域(VH)及至少(或完整)第一抗體重鏈恆定域(CH1)之N端片段，且結合域之各別其他部分包含抗體輕鏈可變域(VL)及至少(或完整)抗體輕鏈恆定域(CL)之N端片段，或反之亦然。在一個實施例中，結合域之第一部分在N端至C端方向上包含VH-CH1，且結合域之第二部分在N端至C端方向上包含VL-CL，或反之亦然。

【0031】 在一個實施例中，側鏈體積大於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基選自R、F、Y及W。

【0032】 在一個實施例中，側鏈體積小於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基選自A、S、T及V。

【0033】 在一個實施例中，側鏈體積大於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基選自R、F、Y及W，且側鏈體積小於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基選自A、S、T及V。

【0034】 在一個實施例中，第三結合位點之CH3域包含T366W突變(杵突變；杵側)，且第三結合位點之另一CH3域包含突變T366S、L368A及Y407V(臼突變；臼側)(根據Kabat之EU索引編號)。

【0035】 在一個實施例中，第三結合位點之CH3域包含T366W突變(杵突變；杵側)，且第三結合位點之另一CH3域包含突變T366S、L368A及Y407V(臼突變；臼側)(根據Kabat之EU索引編號)。

【0036】 在一個實施例中，第三結合位點之CH3域包含S354C及T366W突變(杵-cys突變；杵-cys側)，且第三結合位點之另一CH3域包含突變Y349C、T366S、L368A及Y407V(臼-cys突變；臼-cys側)(根據Kabat之EU索引編號)。

【0037】 在一個實施例中，多特異性抗體包含三個抗原結合位點，其中

a)第一抗原結合位點由第一環形融合多肽之第一抗體重鏈可變域(VH₁)及第一抗體輕鏈可變域(VL₁)對(VH₁/VL₁-對)形成，其中

- VH₁係第一重鏈Fab片段(VH₁-CH1)之一部分，且VL₁係第一輕鏈Fab片段(VL₁-CL)之一部分，

- VH₁-CH1經由第一肽連接子結合至第一可變域-連接子-抗體恆定域3融合多肽(V₃-L-CH3)之N端或C端，且VL₁-CL經由第二肽連接子結合至第一V₃-L-CH3之各別其他末端，

- VH₁-CH1及VL₁-CL彼此締合且形成VH₁/VL₁-對，

b)第二抗原結合位點由第二環形融合多肽之第二抗體重鏈可變域(VH₂)及第二抗體輕鏈可變域(VL₂)對(VH₂/VL₂-對)形成，其中

- VH₂係第二重鏈Fab片段(VH₂-CH1)之一部分，且VL₂係第二輕鏈Fab片段(VL₂-CL)之一部分，

- VH₂-CH1經由第三肽連接子結合至第二可變域-連接子-抗體恆定域3融合多肽(V₃-L-CH3)之N端或C端，且VL₂-CL經由第四肽連接子結

合至第二V₃-L-CH3之各別其他末端，

- VH₂-CH1及VL₂-CL彼此締合且形成VH₂/VL₂-對，

c)第三抗原結合位點由第一V₃-L-CH3及第二V₃-L-CH3形成，其中

- 第一V₃-L-CH3係可變重鏈域-連接子-抗體恆定域3融合多肽(VH₃-L-CH3)或可變輕鏈域-連接子-抗體恆定域3融合多肽(VL₃-L-CH3)，

- 若第一V₃-L-CH3係可變輕鏈域-連接子-抗體恆定域3融合多肽，則第二V₃-CH3係可變重鏈域-連接子-抗體恆定域3融合多肽，或反之亦然，

- VH₃-L-CH3及VL₃-L-CH3彼此締合形成VH₃/VL₃-對，

其中兩個抗體恆定域3 (CH3)藉由以下而改變以促進雜二聚：在CH3中之一者中引入突變T366W及視情況存在之突變S354C及在各別其他CH3引入突變T366S、L368A及Y407V及視情況存在之突變Y349C (根據Kabat之EU索引編號)，

其中多特異性抗體不含抗體恆定域2 (CH2)及鉸鏈區。

【0038】 在一個實施例中，第三結合域之第一及/或第二部分中之連接子不存在(亦即第三結合域之第一部分係可變重鏈域-抗體恆定域3融合多肽且第三結合域之第二部分係可變輕鏈域-抗體恆定域3融合多肽，或反之亦然)。

【0039】 在一個實施例中，第一及第二結合位點特異性結合至相同或不同標靶，且第三結合位點特異性結合至不同於第一及第二結合位點之標靶的標靶。

【0040】 如本文所報導之一個態樣係包含如本文所報導之多特異性抗體及細胞毒性劑的免疫結合物。

【0041】如本文所報導之一個態樣係包含如本文所報導之多特異性抗體及醫藥學上可接受之載劑的醫藥調配物。

【0042】如本文所報導之一個態樣係如本文所報導之多特異性抗體，其用作藥劑。

【0043】如本文所報導之一個態樣係如本文所報導之多特異性抗體之用途，其係用於製造藥劑。

【圖式簡單說明】

【0044】

圖1 如本文所報導之環形融合多肽之通用結構之圖解。

圖2 如本文所報導之二環形融合多肽之通用結構之圖解。

圖3 在IgG型之正常抗體及如本文所報導之例示性二環形融合多肽的結合位點之間的取向及空間距離。

圖4 不同康特斯體形式之UV消光層析圖(280 nm)。

圖5 藉由質譜分析對如本文所報導之環形融合多肽進行產物品質分析。

圖6+7 「向VH內」取向(接近Fc區)及「向VH外」取向(更遠離Fc區)之VH域之相對位置及取向之圖解。

圖8 用於產生如本文所報導之雙特異性二環形融合多肽的具有各別取向之抗cMET環形融合多肽之例示性鏈。

圖9 包含兩個環形融合多肽及第三VH/VL-對之根據本發明之多特異性抗體；上圖：草圖，下圖：三維模型。

圖10 LeY/生物素三Fab康特斯體之KappaSelect純化培養上清液之SEC層析圖(上半部分)及SDS-page (下半部分)。

圖11 三Fab-康特斯體LeY/生物素之m/z光譜。

圖12 對LeY/生物素-三Fab-康特斯體之FACS分析。

圖13 雙特異性抗LeY/CD3三Fab康特斯體之圖解。

圖14 抗LeY/CD3三Fab康特斯體之考馬斯(Coomassie)染色之SDS PAGE凝膠分析；kDa =千道爾頓(分子量標記)；nr =非還原性；r =還原性。

圖15 雙特異性抗LeY/CD3三Fab康特斯體及用於與MCF7細胞一起培育之雙特異性三Fab之圖解。

圖16 抗LeY三Fab(陽性對照)，ii)抗LeY/X三Fab (X不存在於MCF7上；陰性對照)，iii)根據本發明之抗LeY/CD3三Fab康特斯體的MCF7細胞之劑量依賴性細胞殺死。

【實施方式】

【0045】

I. 定義

杵臼二聚模塊及其在抗體工程改造中之用途描述於Carter P.；Ridgway J.B.B.；Presta L.G.: Immunotechnology，第2卷，第1期，1996年2月，第73-73(1)頁中。

【0046】 關於人類免疫球蛋白輕鏈及重鏈之核苷酸序列之一般資訊提供於Kabat, E.A.等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，美國公共衛生署(Public Health Service), 美國國家衛生研究院(National Institutes of Health), Bethesda, MD (1991)中。

【0047】 如本文所用，重鏈及輕鏈之所有恆定區及恆定域中的胺基酸位置均根據Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological

Interest，第5版，美國公共衛生署，美國國家衛生研究院，Bethesda, MD (1991)中所述之Kabat編號系統編號且在本文中稱為「根據Kabat編號」。

特定言之， κ 及 λ 同型之輕鏈恆定域CL使用Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，美國公共衛生署，美國國家衛生研究院，Bethesda, MD (1991)之Kabat編號系統(參見第647-660頁)且恆定重鏈域(CH1、鉸鏈、CH2及CH3，在此情況下，藉由參考「根據Kabat EU索引編號」來進一步闡明)使用Kabat EU索引編號系統(參見第661-723頁)。

【0048】適用於實現本發明之方法及技術描述於例如Ausubel, F.M. (編), Current Protocols in Molecular Biology，第I至III卷 (1997)；Glover, N.D.及Hames, B.D.編, DNA Cloning: A Practical Approach，第I至II卷 (1985), Oxford University Press；Freshney, R.I. (編), Animal Cell Culture - a practical approach, IRL Press Limited (1986)；Watson, J.D.等人，Recombinant DNA，第二版，CHSL Press (1992)；Winnacker, E.L., From Genes to Clones；N.Y., VCH Publishers (1987)；Celis, J.編, Cell Biology，第二版，Academic Press (1998)；Freshney, R.I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique，第二版，Alan R. Liss, Inc., N.Y. (1987)中。

【0049】使用重組DNA技術能夠產生核酸衍生物。此類衍生物可例如在個別或若干核苷酸位置藉由取代、改變、交換、缺失或插入而修飾。修飾或衍生化可例如藉助於定點突變誘發來實施。此類修飾可容易地藉由熟習此項技術者實施(參見例如Sambrook, J.等人，Molecular Cloning: A laboratory manual (1999) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New

York, USA ; Hames, B.D.及Higgins, S.G., Nucleic acid hybridization - a practical approach (1985) IRL Press, Oxford, England)。

【0050】 必須注意，除非上下文另有明確規定，否則如本文及隨附申請專利範圍中所用，單數形式「一(a)」、「一(an)」及「該(the)」包括複數個提及物。因此，舉例而言，提及「一細胞」包括複數個此類細胞及熟習此項技術者已知之其等效物等。術語「一(a)」(或「一(an)」)、「一或多個/種」及「至少一個/種」在本文中亦可互換使用。亦應注意，術語「包含」、「包括」及「具有」可互換使用。

【0051】 術語「約」指示其後數值之 $\pm 20\%$ 範圍。在一個實施例中，術語約指示其後數值之 $\pm 10\%$ 範圍。在一個實施例中，術語約指示其後數值之 $\pm 5\%$ 範圍。

【0052】 「親和力」係指分子(例如抗體)之單個結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間的非共價相互作用之總和之強度。除非另外指明，否則如本文所用，「結合親和力」係指反映結合對(例如抗體與抗原)成員之間1:1相互作用之固有結合親和力。分子X對其搭配物Y之親和力一般可由解離常數(kd)表示。可藉由此項技術中已知之常用方法(包括本文所述之該等方法)來量測親和力。

【0053】 術語「抗體依賴性細胞毒性(ADCC)」係藉由Fc受體結合介導之功能且係指抗體Fc區在效應細胞存在下介導之標靶細胞溶解。在一個實施例中，藉由在效應細胞(諸如新近分離之PBMC (周邊血液單核細胞)或自白血球層純化之效應細胞(如單核球或NK (自然殺手)細胞))存在下，用如本文所報導之包含Fc區之多環形融合多肽處理表現標靶之紅血球系細胞(例如表現重組標靶之K562細胞)的製劑來量測ADCC。標靶細胞用

Cr-51標記且隨後與多環形融合多肽一起培育。將經標記細胞與效應細胞一起培育且分析上清液中釋放之Cr-51。對照包括在有效應細胞下但無多環形融合多肽下培育靶標內皮細胞。藉由量測與Fc γ 受體表現細胞，諸如以重組方式表現Fc γ RI及 / 或Fc γ RIIA之細胞或NK細胞(基本上表現Fc γ RIIIA)之結合來研究多環形融合多肽誘導介導ADCC之初始步驟之能力。在一個較佳實施例中，測量對於NK細胞上Fc γ R之結合。

【0054】 術語「結合至」指示結合位點與其標靶之結合，諸如包含抗體重鏈可變域及抗體輕鏈可變域(VH/VL-對)之抗體結合位點與各別抗原之結合。此結合可使用例如BIAcore®分析(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)測定。

【0055】 舉例而言，在BIAcore®分析之一個可能實施例中，抗原結合至表面且藉由表面電漿子共振(SPR)量測抗體結合位點的結合。結合親和力係藉由術語ka (締合常數：用於締合以形成複合物之速率常數)、kd (解離常數；用於解離複合物之速率常數)及KD (kd/ka)定義。或者，SPR感應圖譜中之結合信號可在共振信號高度及解離特性方面，直接與參考物之反應信號加以比較。

【0056】 術語「二Fab」表示包含兩對V₁-C₁/V₂-C₂之分子，其中V指示抗體可變域且C指示抗體恆定域，其彼此結合。舉例而言，該等對可為VH₁-CH1/VL₁-CL及VH₂-CH3₁/VL₂-CH3₂。同樣，術語「三Fab」指示包含三對V₁-C₁/V₂-C₂之分子，其中V指示抗體可變域且C指示抗體恆定域，其彼此結合。舉例而言，該等對可為VH₁-CH1/VL₁-CL、VH₂-CH1/VL₂-CL及VH₃-CH3₁/VL₃-CH3₂。

【0057】 術語「CH1域」指示抗體重鏈多肽之一部分，其自EU位置

118大致延伸至EU位置215 (EU編號系統)。在一個實施例中，CH1域包含
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS
WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS NTKVDKKV (SEQ ID NO: 01)之胺基酸序列。

【0058】術語「CH2域」指示抗體重鏈多肽之一部分，其自EU位置
231大致延伸至EU位置340 (根據Kabat之EU編號系統)。在一個實施例
中，CH2域包含APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT
CVWDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQUESTYRW
SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAK (SEQ ID NO:
02)之胺基酸序列。CH2域之獨特之處在於其不與另一域緊密配對。相反
地，兩個N連接分支鏈碳水化合物鏈插入完整天然Fc區之兩個CH2域之
間。已推測碳水化合物可為結構域-結構域配對提供替代物且有助於CH2
域穩定化。Burton, Mol. Immunol. 22 (1985) 161-206。

【0059】術語「CH3域」指示抗體重鏈多肽之一部分，其自EU位置
341大致延伸至EU位置446。在一個實施例中，CH3域包含
GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSP (SEQ ID NO: 03)之胺基酸序
列。

【0060】如本文所用，術語「細胞毒性劑」係指抑制或防止細胞功
能及/或導致細胞死亡或破壞之物質。細胞毒性劑包括(但不限於)放射性同
位素(例如At-211、I-131、I-125、Y-90、Re-186、Re-188、Sm-153、
Bi-212、P-32、Pb-212及Lu之放射性同位素)；化學治療劑或藥物(例如甲

胺喋呤(methotrexate)、阿德力黴素(adriamycin)、長春花生物鹼(vinca alkaloids) (長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、依託泊苷(etoposide))、小紅莓(doxorubicin)、美法侖(melphalan)、絲裂黴素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道諾黴素(daunorubicin)或其他插入劑)；生長抑制劑；酶及其片段，諸如溶核酶；抗生素；毒素，諸如小分子毒素或細菌、真菌、植物或動物來源之酶促活性毒素，包括其片段及/或變異體；以及以下所揭示之各種抗腫瘤或抗癌劑。

【0061】 術語「補體依賴性細胞毒性(CDC)」係指如本文所報導之抗體Fc區在補體存在下誘導細胞溶解。在一個實施例中，藉由用如本文所報導之多環形融合多肽在補體存在下處理表現標靶之人類內皮細胞來量測CDC。在一個實施例中，細胞經鈣黃綠素標記。若多環形融合多肽誘導20%或更多之濃度為30 µg/ml之標靶細胞溶解，則發現CDC。可在ELISA中量測與補體因子C1q之結合。在此類分析中，ELISA盤原則上塗佈有一定濃度範圍之多環形融合多肽，向該多環形融合多肽中添加純化之人類C1q或人類血清。藉由針對C1q之抗體，隨後藉由過氧化酶標記之結合物偵測C1q結合。結合(最大結合Bmax)之偵測係以405 nm光學密度(OD405)、針對過氧化酶受質ABTS® (2,2'-次偶氮基-二-[3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸酯])量測。

【0062】 「效應功能」係指可歸因於抗體之Fc區的該等生物活性，其因衍生其之抗體類別而異。抗體效應功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體)之減量下調；及B細胞活化。

【0063】可藉由抗體Fc區與Fc受體(FcR)(其為造血細胞上之特殊化細胞表面受體)之相互作用介導Fc受體結合依賴性效應功能。Fc受體屬於免疫球蛋白超家族，且已顯示介導以下作用：藉由免疫複合物之吞噬來移除經抗體塗佈之病原體，與經由抗體依賴性細胞毒性(ADCC)而使紅血球及呈現Fc區的各種其他細胞標靶(例如腫瘤細胞)溶解(參見例如Van de Winkel, J.G.及Anderson, C.L., *J. Leukoc. Biol.* 49 (1991) 511-524)。FcR係根據其對免疫球蛋白同型之特異性定義：針對IgG型Fc區之Fc受體稱為FcγR。Fc受體結合描述於例如Ravetch, J.V.及Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492；Capel, P.J.等人，*Immunomethods* 4 (1994) 25-34；de Haas, M.等人，*J. Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341；Gessner, J.E.等人，*Ann. Hematol.* 76 (1998) 231-248。

【0064】受體與IgG型抗體Fc區之交聯(FcγR)觸發多種效應功能，包括吞噬、抗體依賴性細胞毒性及炎性介體釋放，以及免疫複合物清除及抗體產生調控。在人類中，已表徵三種類別之FcγR，其係：

- FcγRI (CD64)以高親和力結合單體IgG且在巨噬細胞、單核球、嗜中性球及嗜酸性球上表現。在Fc區IgG內至少在胺基酸殘基E233-G236、P238、D265、N297、A327及P329 (根據Kabat之EU索引編號)中之一者修飾減小與FcγRI之結合。位置233-236處之IgG2殘基(經取代至IgG1及IgG4)減少與FcγR之結合 10^3 倍，且消除人單核球與抗體敏化紅血球之響應(Armour, K.L.等人，*Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2613-2624)。

- FcγRII (CD32)以中至低親和力結合複合的IgG且得以廣泛表現。此受體可分為兩種子類型：FcγRIIA及FcγRIIB。在許多涉及殺死作用之細胞(例如巨噬細胞、單核球、嗜中性球)上發現FcγRIIA，且其似乎能夠

活化殺死過程。FcγRIIB似乎在抑製程序中起一定作用，且發現於B細胞、巨噬細胞上及肥大細胞及嗜酸性球上。在B細胞上，其似乎起到遏制進一步產生免疫球蛋白及同型轉換至例如IgE類別之功能。在巨噬細胞上，FcγRIIB用以抑制如經由FcγRIIA介導之吞噬作用。在嗜酸性球及肥大細胞上，B形式可經由IgE結合至其各別受體而有助於抑制此等細胞之活化。發現對於FcγRIIA結合減小，例如對於包含至少在胺基酸殘基E233-G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、R292及K414中之一者處具有突變之IgG Fc區的抗體(根據Kabat之EU索引編號)。

- FcγRIII (CD16)以中至低親和力結合IgG，且以兩種類型存在。FcγRIIIA見於NK細胞、巨噬細胞、嗜酸性球及一些單核球及T細胞上，且介導ADCC。FcγRIIIB高度表現於嗜中性球上。發現對於FcγRIIIA結合減小，例如對於包含至少在胺基酸殘基E233-G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、S239、E269、E293、Y296、V303、A327、K338及D376中之一者處具有突變之IgG Fc區的抗體(根據Kabat之EU索引編號)。

【0065】 人類IgG1上結合位點對於Fc受體之定位、上文所提及之突變位點及量測與FcγRI及FcγRIIA之結合之方法描述於Shields, R.L.等人，J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604中。

【0066】 例如醫藥調配物之藥劑的「有效量」係指在所需劑量及時段下有效實現所需治療性或預防性結果之量。

【0067】 術語「抗原決定基」係指標靶與結合位點之間特異性結合所需之既定標靶之部分。抗原決定基可為連續的，亦即由存在於標靶中之

鄰近結構要素形成，或非連續的，亦即由處於標靶之一級序列中，諸如極接近諸如體液之天然環境中標靶所採用之三維結構的標靶蛋白質之胺基酸序列中之不同位置之結構要素形成。

【0068】如本文所用，術語「Fc受體」係指特徵為存在與該受體相關聯之細胞質ITAM序列之活化受體(參見例如Ravetch, J.V.及Bolland, S., *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 275-290)。此類受體係FcγRI、FcγRIIA及FcγRIIIA。術語「無FcγR結合」指示在10 μg/ml之抗體濃度下，如本文所報導之抗體與NK細胞之結合係如WO 2006/029879中所報導之抗OX40L抗體LC.001所之實驗結合值之10%或更小。

【0069】當IgG4展示減小之FcR結合時，其他IgG子類之抗體展示強烈結合。然而，Pro238、Asp265、Asp270、Asn297 (缺失Fc碳水化合物)、Pro329、Leu234、Leu235、Gly236、Gly237、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434及His435為殘基，其提供(若改變亦提供)減小FcR結合(Shields, R.L.等人，*J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604；Lund, J.等人，*FASEB J.* 9 (1995) 115-119；Morgan, A.等人，*Immunology* 86 (1995) 319-324；及EP 0 307 434)。

【0070】術語「鉸鏈區」指示抗體重鏈多肽之一部分，其使CH1域與CH2域在野生型抗體重鏈中連接，例如約位置216至約位置230 (根據Kabat之EU編號系統)，或約位置226至約位置230 (根據Kabat之EU編號系統)。其他IgG子類之鉸鏈區可藉由與IgG1子類序列之鉸鏈區半胱胺酸殘基比對來確定。

【0071】鉸鏈區通常係由具有一致胺基酸序列之兩個多肽組成之二聚分子。鉸鏈區一般包含約25個胺基酸殘基且係可撓性的，從而使締合之

標靶結合位點獨立移動。可將鉸鏈區細分為三個結構域：上部、中部及下部鉸鏈結構域(參見例如Roux等人，J. Immunol. 161 (1998) 4083)。

【0072】 術語「全長抗體」、「完整抗體」及「完全抗體」在本文中可互換使用，其係指具有與天然抗體結構大體上類似之結構的抗體。

【0073】 術語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及「宿主細胞培養物」可互換使用且係指已引入外源核酸之細胞，包括此類細胞之子代。宿主細胞包括「轉型體」及「轉型細胞」，其包括初級轉型細胞及來源於其之子代(不考慮繼代次數)。子代之核酸含量與母細胞可能不完全相同，但可能含有突變。本文包括針對原始轉型細胞篩選或選擇具有相同功能或生物活性之突變型子代。

【0074】 「免疫結合物」係與一或多種分子(包括(但不限於)細胞毒性劑)結合之如本文所報導之多特異性抗體。

【0075】 「個體」或「受試者」係哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)馴養動物(例如牛、羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如人類及非人類靈長類，諸如猴)、兔及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)。在某些實施例中，個體或受試者係人類。

【0076】 「分離之」抗體係已與其天然環境之組分分離之抗體。在一些實施例中，將抗體純化至純度大於95%或99%，如藉由例如電泳(例如SDS-PAGE、等電聚焦(IEF)、毛細管電泳)或層析(例如尺寸排阻層析或離子交換或逆相HPLC)所測定。關於評定抗體純度之方法之綜述，參見例如Flatman, S.等人，J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87。

【0077】 「分離之」核酸係指已與其天然環境之組分分離之核酸分子。分離之核酸包括通常含有核酸分子之細胞中所含之核酸分子，但該核

酸分子存在於染色體外或存在於不同於其天然染色體位置之染色體位置。

【0078】術語「重鏈」指示天然IgG抗體之較長多肽鏈，其包含(在N端至C端方向上)重鏈可變域(VH)、抗體恆定域1 (CH1)、鉸鏈區、抗體恆定域2 (CH2)及抗體恆定域3 (CH3)。抗體或Fc區之「類別」係指重鏈或其片段所具有之恆定域或恆定區之類型。存在五種主要類別：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且此等類別中之若干者可進一步分成子類(同型)，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。對應於不同類別免疫球蛋白之重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。

【0079】術語「輕鏈」指示天然IgG抗體之較短多肽鏈，其包含(在N端至C端方向上)輕鏈可變域(VL)及輕鏈恆定域(CL)。抗體之輕鏈根據其恆定域之胺基酸序列(參見人類 κ 輕鏈恆定域之SEQ ID NO:04及人類 λ 輕鏈恆定域之SEQ ID NO:05)可歸屬於稱為 κ 及 λ 之兩個類型中之一者。

【0080】如本文所用，術語「單株抗體」係指獲自實質上同種的抗體群體之抗體，亦即組成該群體之個別抗體除可能的變異型抗體(例如含有天然產生之突變或在單株抗體製劑產生期間出現)以外均相同及/或結合同一抗原決定基，此類變異體一般少量存在。相比於通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑，單株抗體製劑中之各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。因此，修飾語「單株」指示抗體之特徵係自實質上同種的抗體群體獲得，且不應視為需要藉由任何特定方法產生該抗體。舉例而言，根據本發明使用之單株抗體可藉由多種技術製得，包括(但不限於)融合瘤方法、重組DNA方法、噬菌體呈現方法及利用含有所有或部分人類免疫球蛋白基因座之轉殖基因動物的方法、本文所述之製造單株抗體之此類方法及其他例示性方法。

【0081】術語「裸多特異性抗體」係指不與部分(例如細胞毒性部分)或放射性標記結合之多特異性抗體。裸多特異性抗體可存在於醫藥調配物中。

【0082】「天然抗體」係指具有不同結構之天然產生之免疫球蛋白分子。舉例而言，天然IgG抗體係約150,000道爾頓之雜四聚體糖蛋白，其由二硫鍵鍵結之兩條相同輕鏈及兩條相同重鏈構成。由N端至C端，各重鏈具有可變區(VH) (亦稱為可變重域或重鏈可變域)，隨後為三個恆定域(CH1、CH2及CH3)，其中鉸鏈區位於第一恆定域與第二恆定域之間。類似地，由N端至C端，各輕鏈具有可變區(VL)，亦稱為可變輕鏈域或輕鏈可變域，隨後為恆定輕鏈(CL)域。抗體之輕鏈可根據其恆定域之胺基酸序列歸屬於兩種類型中之一者，稱為 κ 及 λ 。

【0083】術語「藥品說明書」用於指通常包括於治療性產品之商業包裝中之說明書，其含有關於與使用此類治療性產品有關之適應症、用法、劑量、投藥、組合療法、禁忌症及/或警告之信息。

【0084】術語「互補位」係指標靶與結合位點之間特異性結合所需之既定抗體分子之部分。互補位可為連續的，亦即由存在於結合位點中之鄰近胺基酸殘基形成，或非連續的，亦即由處於胺基酸殘基之一級序列中，諸如極接近結合位點所採用之三維結構的胺基酸殘基之CDR之胺基酸序列中之不同位置之胺基酸殘基形成。

【0085】術語「肽連接子」指示天然及/或合成來源之連接子。肽連接子由胺基酸直鏈組成，其中20種天然產生之胺基酸係藉由肽鍵連接之單體構築嵌段。該鏈之長度係1至50個胺基酸殘基，較佳在1與28個胺基酸殘基之間，尤其較佳在3與25個胺基酸殘基之間。肽連接子可含有重複胺

基酸序列或天然產生之多肽序列。肽連接子用以確保環形融合多肽之結構域可藉由使結構域恰當地摺疊且適當地呈現來表現其生物活性。肽連接子較佳係「合成肽連接子」，其指定富含甘胺酸、麩醯胺酸及/或絲胺酸殘基。此等殘基排列成例如至多五個胺基酸之小重複單元，諸如GGGS (SEQ ID NO: 06)、GGGGS (SEQ ID NO: 07)、QQQG (SEQ ID NO: 08)、QQQQG (SEQ ID NO: 09)、SSSG (SEQ ID NO: 10)或SSSSG (SEQ ID NO: 11)。可將此小重複單位重複兩至五次以形成多聚體單元，諸如(GGGS)2 (SEQ ID NO: 12)、(GGGS)3 (SEQ ID NO: 13)、(GGGS)4 (SEQ ID NO: 14)、(GGGS)5 (SEQ ID NO: 15)、(GGGGS)2 (SEQ ID NO: 16)、(GGGGS)3 (SEQ ID NO: 17)、(GGGGS)4 (SEQ ID NO: 18)、(GGGGS)4GG (SEQ ID NO: 19)、GG(GGGGS)3 (SEQ ID NO: 20)及(GGGGS)6 (SEQ ID NO: 21)。在多聚體單元之胺基端及/或羧基端，可添加至多六個天然產生之額外任意胺基酸。其他合成肽連接子由單個胺基酸構成，其重複10至20次之間且可在胺基端及/或羧基端包含至多六個天然產生之額外任意胺基酸，諸如連接子GSSSSSSSSSSSSSSSSSG (SEQ ID NO: 22)中之絲胺酸。所有肽連接子可由核酸分子編碼且因此可重組表現。由於連接子本身係肽，因此抗基因融合肽經由肽鍵連接至連接子，該肽鍵在兩個胺基酸之間形成。

【0086】 術語「醫藥調配物」係指呈准許其中所含活性成分之生物活性有效之形式且不含有對該調配物將投與之受試者具有不可接受之毒性的額外組分的製劑。

【0087】 「醫藥學上可接受之載劑」係指醫藥調配物中除活性成分外之對受試者無毒的成分。醫藥學上可接受之載劑包括(但不限於)緩衝

劑、賦形劑、穩定劑或防腐劑。

【0088】如本文所用，「治療(treatment)」(及其語法變化形式，諸如「治療(treat)」或「治療(treating)」)係指臨床介入以試圖改變所治療個體之自然病程，且可為實現預防或在臨床病理學病程中進行。所需治療作用包括(但不限於)預防疾病發生或復發，緩解症狀，減輕疾病之任何直接或間接病理性結果，預所需治療效應包括(但不限於)預防疾病出現或復發、緩解症狀、減輕疾病之任何直接或間接病理性後果、預防癌轉移、降低疾病進展速率、改善(amelioration)或緩和疾病病況及緩解或改良(improved)預後。在一些實施例中，本發明之抗體用於延遲疾病發生或減慢疾病進展。

【0089】術語「可變區」或「可變域」係指抗體重鏈或輕鏈中參與抗體與抗原之結合的結構域。天然抗體之重鏈及輕鏈可變域(分別係VH及VL)一般具有類似結構，其中各結構域包含四個保守性構架區(FR)及三個高變區(HVR)(參見例如Kindt, T.J.等人，Kuby Immunology，第6版，W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007)，第91頁)。單個VH或VL域可足以賦予抗原結合特異性。此外，結合特定抗原之抗體可使用來自結合該抗原之抗體的VH或VL域分別篩選互補VL或VH域之文庫來分離(參見例如Portolano, S.等人，J. Immunol. 150 (1993) 880-887；Clackson, T.等人，Nature 352 (1991) 624-628)。

【0090】如本文所用，術語「載體」係指一種核酸分子，其能夠傳送其所連接之另一核酸。該術語包括呈自我複製核酸結構之載體以及併入至已引入其之宿主細胞之基因組中的載體。某些載體能夠導引可操作地連接其之核酸的表現。此類載體在本文中稱為「表現載體」。

【0091】 本發明在下文中使用具有不同結構及特異性之多肽例示。僅呈現此等多肽以例示本發明。尚未將此舉視為限制。真實範疇闡述於申請專利範圍中。

【0092】

II. 如本文所報導之多特異性抗體

本文報導一種包含兩個環形融合多肽之多特異性抗體，該等環形融合多肽各包含VH/VL-對及藉此之第一及第二結合位點，由此第三VH/VL-對及藉此之第三結合位點由該兩個環形融合多肽之締合形成。

【0093】 本發明係至少部分基於以下結果：輕鏈可變域與(全長)重鏈C端之融合或重鏈可變域與全長輕鏈之融合致使形成包含相同多肽之各別VH及VL域(VH/VL-對)之功能結合位點，亦即單個多肽鏈內之可變輕鏈域及可變重鏈域對藉由鏈內環化形成官能性VH/VL-對及藉此之功能結合位點。在此環形多肽中，N端部分包含結合域之第一部分，且C端部分包含結合域之第二部分。結合域之第一部分及結合域之第二部分(彼此締合)形成完整或官能性結合位點。藉此將多肽環化。

【0094】 本發明係至少部分基於以下結果：可提供包含兩個環形融合多肽之多特異性抗體，其中環形融合多肽各包含由VH/VL-對形成之官能性結合位點，另一結合位點由兩個環形融合多肽之締合形成。

【0095】 本發明係至少部分基於以下結果：藉由改變肽連接子之長度，使個別抗體可變域連接至第三結合域之一部分之融合多肽之各別N端及C端及雜二聚結構域，可調節由所得多特異性抗體中之環形融合多肽形成之兩個結合位點之幾何佈置/距離。

【0096】 本發明係至少部分基於以下結果：二聚融合多肽，亦即二

環形融合多肽之結合幾何佈置可視第一/第三肽連接子及第二/第四肽連接子之長度(亦即連接子長度比率)而改變。藉此，可將兩個Fab類結合臂之幾何佈置相對於彼此固定。

【0097】 本文揭示一種包含三個抗原結合位點之多特異性抗體，其中

a)第一抗原結合位點由第一環形融合多肽形成，該第一環形融合多肽包含第一結合域之第一部分、第一結合域之第二部分及第三結合域之第一部分，其中

- 第一結合域之第一部分直接或經由第一肽連接子與第三結合域之第一部分之N端融合，
- 第一結合域之第二部分直接或經由第二肽連接子與第三結合域之第一部分之C端融合，
- 第一結合域之第一部分係重鏈Fab片段(VH₁-CH1)或輕鏈Fab片段(VL₁-CL)，其中若第一結合域之第一部分係重鏈Fab片段，則第一結合域之第二部分係輕鏈Fab片段，或反之亦然，
- 第一結合域之第一部分及第一結合域之第二部分彼此締合且形成第一抗原結合位點，

b)第二抗原結合位點由第二環形融合多肽形成，該第二環形融合多肽包含第二結合域之第一部分、第二結合域之第二部分及第三結合域之第二部分，其中

- 第二結合域之第一部分直接或經由第三肽連接子與第三結合域之第二部分之N端融合，
- 第二結合域之第二部分直接或經由第四肽連接子與第三結合域之

第二部分之C端融合，

- 第二結合域之第一部分係重鏈Fab片段(VH_2-CH1)或輕鏈Fab片段(VL_2-CL)，其中若第二結合域之第一部分係重鏈Fab片段，則第二結合域之第二部分係輕鏈Fab片段，或反之亦然，

- 第二結合域之第一部分及第二結合域之第二部分彼此締合且形成第二抗原結合位點，

c)第三抗原結合位點由第三結合域之第一部分及第三結合域之第二部分形成，其中

- 第三結合域之第一部分係可變重鏈-CH3域融合多肽(VH_3-CH3)或可變輕鏈-CH3域融合多肽(VL_3-CH3)，

- 若第一環形融合多肽中之第二結合域之第一部分係可變輕鏈-CH3域融合多肽，則第三結合域之第二部分係可變重鏈-CH3域融合多肽，或反之亦然，

- 第三結合域之第一部分及第三結合域之第二部分彼此締合且形成第三抗原結合位點，

其中兩個恆定重鏈域3 (CH3)藉由以下而改變以促進雜二聚：

i) 在CH3域中之一者中藉由至少一個原始胺基酸殘基經側鏈體積大於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基取代產生隆凸，及在CH3域中之另一者中藉由至少一個原始胺基酸殘基經側鏈體積小於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基取代產生空腔，以使得在CH3域中之一者中產生之隆凸可定位於CH3域中之另一者中產生之空腔中，或

CH3域中之一者中之至少一個原始胺基酸殘基經帶正電胺基酸取代，及CH3域中之另一者中之至少一個原始胺基酸殘基經帶負電胺基酸取

代，或

ii) 在各CH3域中引入至少一個半胱胺酸殘基，以使得在CH3域之間形成二硫鍵，或

iii) i)與ii)之修改，

其中多特異性抗體不含恆定重鏈域2 (CH2)及鉸鏈區。

【0098】 在一個實施例中，多特異性抗體包含三個抗原結合位點，其中

a)第一抗原結合位點由第一環形融合多肽之第一抗體重鏈可變域(VH₁)及第一抗體輕鏈可變域(VL₁)對(VH₁/VL₁-對)形成，其中

- VH₁係第一重鏈Fab片段(VH₁-CH1)之一部分，且VL₁係第一輕鏈Fab片段(VL₁-CL)之一部分，

- VH₁-CH1經由第一肽連接子結合至第一可變域-連接子-抗體恆定域3融合多肽(V₃-L-CH3)之N端或C端，且VL₁-CL經由第二肽連接子結合至第一V₃-CH3之各別其他末端，

- VH₁-CH1及VL₁-CL彼此締合且形成VH₁/VL₁-對，

b)第二抗原結合位點由第二環形融合多肽之第二抗體重鏈可變域(VH₂)及第二抗體輕鏈可變域(VL₂)對(VH₂/VL₂-對)形成，其中

- VH₂係第二重鏈Fab片段(VH₂-CH1)之一部分，且VL₂係第二輕鏈Fab片段(VL₂-CL)之一部分，

- VH₂-CH1經由第三肽連接子結合至第二可變域-連接子-抗體恆定域3融合多肽(V₃-L-CH3)之N端或C端，且VL₂-CL經由第四肽連接子結合至第二V₃-CH3之各別其他末端，

- VH₂-CH1及VL₂-CL彼此締合且形成VH₂/VL₂-對，

c)第三抗原結合位點由第一V₃-L-CH3及第二V₃-L-CH3形成，其中

- 第一V₃-L-CH3係可變重鏈域-連接子-抗體恆定域3融合多肽(VH₃-L-CH3)或可變輕鏈域-連接子-抗體恆定域3融合多肽(VL₃-L-CH3)，
- 若第一V₃-L-CH3係可變輕鏈域-連接子-抗體恆定域3融合多肽，則第二V₃-L-CH3係可變重鏈域-連接子-抗體恆定域3融合多肽，或反之亦然，
- VH₃-L-CH3及VL₃-L-CH3彼此締合形成VH₃/VL₃-對，

其中兩個抗體恆定域3 (CH3)藉由以下而改變以促進雜二聚：在CH3中之一者中引入突變T366W及視情況存在之突變S354C及在各別其他CH3引入突變T366S、L368A及Y407V及視情況存在之突變Y349C (根據Kabat之EU索引編號)，

其中多特異性抗體不含抗體恆定域2 (CH2)及鉸鏈區。

【0099】 第一及/或第二結合域之第一部分及其各別第二部分可彼此非共價或共價締合。若共價締合，則其藉由除肽鍵外之鍵，諸如藉由二硫鍵實現。

【0100】 如本文所報導之多特異性抗體中所含有之環形融合多肽各係單鏈多肽。分離之環形融合多肽之通用結構示於圖1中。

【0101】 如本文所報導之多特異性抗體係基於包含第一環形融合多肽及第二環形融合多肽之二聚環形融合多肽，亦即其係二環形融合多肽，其中第一及第二環形融合多肽相同或不同。

【0102】 如本文所報導之多特異性抗體之環形融合多肽除各別結合域之N端及C端融合部分之外包含有包含第三結合位點之一部分的核心區以及雜二聚結構域。在此情況下，核心區之結構特性提供二聚官能性。第

一環形融合多肽之雜二聚結構域可藉由至少一個非肽鍵，在一個實施例中藉由至少一個二硫鍵與第二環形融合多肽之雜二聚結構域結合。

【0103】 在本文中，鹼性二環形融合多肽亦稱為康特斯體。二環形融合多肽/康特斯體之通用結構示於圖2中。

【0104】 與正常IgG抗體相比，康特斯體僅使用一個鏈而非重鏈及輕鏈，以提供結合位點(VH/VL-對)。基於如本文所報導之多特異性抗體的康特斯體之特殊處在於第三結合位點(VH/VL-對)係由兩個環形融合多肽之二聚形成，且結合域之此第三結合位點/部分位於重鏈Fab片段與輕鏈Fab片段之間。

【0105】 下文中使用無第三結合位點之二聚環形融合多肽以展示形成如本文所報導之多特異性抗體之基礎的二環形融合多肽之特定特性。除Fab片段之外，亦可使用分離之可變域作為結合位點之部分。

【0106】 在此實例中，在重鏈Fab片段與輕鏈Fab片段之間具有「鉸鏈-CH₂-CH₃」結構域作為二聚結構域之單鏈融合多肽經由其Fc-區二聚，其中兩個Fab係經固定在其彼此取向。相反，在正常IgG型抗體中，兩個Fab更具可撓性且取向大大不同。

【0107】 在康特斯體中兩個結合位點相對於彼此之幾何佈置可藉由所用連接子之長度來調節。IgG型正常抗體及形成如本文所報導之多特異性抗體之基礎的二環形融合多肽之結合位點之間的取向及空間距離示於圖3中。

【0108】 IgG型習知抗體之結合位點之間的空間距離係約80 Å (埃)或更大。如本文所報導之二環形融合多肽之結合位點之間的空間距離視形成二環形融合多肽之個別環形融合多肽中之肽連接子之長度及長度比率而

定可在約20 Å至約50 Å之間。肽連接子視預期幾何佈置而選擇。在一個實施例中，第一至第四肽連接子彼此獨立地選自由SEQ ID NO: 06至SEQ ID NO: 22組成之肽連接子群。

【0109】

II.1. 由二環形融合多肽形成之比較單特異性二價抗體

單特異性二環形融合多肽包含兩個環形融合多肽，其中環形融合多肽各特異性結合至同一標靶上之同一抗原決定基，亦即包含同一結合位點。

【0110】 例示性單特異性二環形融合多肽係抗Her2康特斯體(包含SEQ ID NO: 23之環形融合多肽)。其藉由用含有編碼環形融合多肽之核苷酸序列之載體轉染HEK293細胞產生。

【0111】 已發現習知蛋白質A親和力層析法適合於萃取培養上清液之含有Fc區之部分。或者，可使用經由GSG肽連接子連接之六組胺酸C端標籤(SEQ ID NO: 24)以達到純化目的。

【0112】 在第二純化步驟中使用製備型尺寸排阻層析以分離環形融合多肽與產物相關之雜質，主要為環形融合多肽之高級結構(層析圖中亦見小部分聚集體，亦如IgG型抗體一般)(參見例如圖4)。此類構築體之典型產量係平均10毫克/公升。抗Her2康特斯體已分數批表現(0.5公升至2公升搖瓶規模)。產物品質已藉由質譜分析進行分析(參見圖5)。在高於95%之純度等級下確定產物身分。

【0113】 已在兩種不同設定中使用表面電漿子共振(SPR，例如BIAcore)測定抗Her2康特斯體之結合，以與IgG型之習知抗Her2抗體相比評定分子之親和力及親合力。

【0114】 在第一設定(下表中之1；對於親和力)中，各別抗Her2康特斯體由與SPR晶片表面結合之抗人類Fc區抗體捕獲。將Her2細胞外域(ECD)用作分析物。在第二設定(下表中之2；對於親合力)中，將抗Her2抗體帕妥珠單抗(以Perjeta®出售)固定於晶片表面上且藉此捕捉Her2之ECD。將各別康特斯體用作分析物。IgG型參比抗體曲妥珠單抗之親合力，使用一系列濃度之分析物來量測二價抗Her2康特斯體。作為參比，在兩種設定中，已使用抗Her2抗體曲妥珠單抗(以Herceptin®出售)。

設定	分子	k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	$t(1/2)$ [min]	K_D [M]	比率 R_{max} 實驗 值/理論值
1	曲妥珠單抗	6.8E+05	5.2E-04	22.2	7.7E-10	114
1	康特斯體	2.1E+05	1.9E-03	6.1	9.1E-09	41
2	曲妥珠單抗	1.03E+06	6.36E-05	181.7	6.2E-11	101.5
2	康特斯體	1.11E+06	6.59E-05	175.4	5.9E-11	102.3

【0115】 與IgG型之習知抗體相比，康特斯體更緊湊。

【0116】 抗Her2康特斯體已在增殖分析中進行測試。類似地，對於以化學方式使用交聯曲妥珠單抗Fab之Scheer等人(Scheer等人，PLoS One 7 (2012) e51817)，抗Her2康特斯體將受體募集於細胞表面上且促進活化信號。曲妥珠單抗，一種用於位於受體莖域上之Her2抗原決定基之黏合劑，使受體遠離彼此，且因此拮抗增殖。曲妥珠單抗及二環形抗Her2康特斯體分別係抗增生及促增生的。

【0117】 已測定抗Her2康特斯體結合FcRn受體之能力。與曲妥珠單抗(一種IgG型IgG1子類之抗體)相比，抗Her2康特斯體與人類FcRn受體之結合出人意料地高，亦即二環形康特斯體高達大約10倍。相對於食蟹獼猴，FcRn曲妥珠單抗及康特斯體表現類似，與曲妥珠單抗相比二聚康特

斯體更親和達4.5倍。

【0118】 使用色胺酸自體螢光，康特斯體之第一熱變性溫度 T_m 係大致63℃。使用靜態光散射，測定康特斯體之聚集開始溫度係大致66℃。使用動態光散射，測定康特斯體之聚集開始溫度係大致66℃。在所有實驗中，調配物係1 mg/mL於20 mM His/His*HCl、140 mM NaCl中之康特斯體。

【0119】 藉由質譜分析可確定不形成混合Fab。

【0120】 二環形單特異性康特斯體之其他實例係抗cMET康特斯體 (SEQ ID NO: 25之環形融合多肽)及具有不同可變域之抗CD20康特斯體 ((1)SEQ ID NO: 26之環形融合多肽；(2)SEQ ID NO: 27之環形融合多肽)。在下表中，給出此等康特斯體之表現率、產量及品質。

	抗cMET康特斯體	抗CD20康特斯體(1)	抗CD20康特斯體(2)
表現體積[ml]	250	500	500
濃度[mg/ml]	0.60	1.06	1.0
量(mg)	0.78	3.1	5.7
單體%(分析型SEC)	100.00	97.9	98.4
主峰%(CE-SDS)	96.30	99.3	99.6
產量[mg/l]	3.12	6.2	11.4

【0121】 所有康特斯體已短暫表現於HEK-293細胞中，其中產量在2至15 mg/L範圍內。一般而言，產物在蛋白A管柱之後高於85%，且藉由SEC管柱層析自副產物純化，達至純度高於96%。

【0122】

II.2. 由二環形融合多肽形成之比較雙特異性二價抗體

雙特異性多環形融合多肽包含兩個環形融合多肽，其中環形融合多

肽各特異性結合至不同標靶及/或同一標靶上之不同抗原決定基，亦即包含具有特異性特異性之至少兩個結合位點。

【0123】 不受此理論束縛，假定單鏈多肽中之結合位點之對應結構域之自組合普遍發生鏈間締合，亦即換言之，在表現單個環形融合多肽之後，結合位點之個別非官能性結構域締合且形成官能性結合位點。舉例而言，若官能性結合位點係Fab，則Fab部分，亦即重鏈片段(VH-CH1)及輕鏈片段(VL-CL)形成組成性結合勝任Fab部分，且此第一組合環形融合多肽之孤立半抗體與另一環形融合多肽連續締合，以形成二環形融合多肽(包含兩個單個環形融合多肽之二聚體之康特斯體)。為獲得多特異性多環形融合多肽，必須促進分離之環形融合多肽之雜二聚。一個例示性雜二聚促進要素係根據杵臼技術之突變。

【0124】 可改良肽連接子之長度以改變所得雙特異性康特斯體之兩個結合位點之幾何佈置/距離；對於單特異性康特斯體亦如此。

【0125】 可藉由改變結合位點彼此之相對位置而改良結合位點之幾何佈置/距離。

【0126】 舉例而言，在Fab作為結合位點之情況下，重鏈Fab片段及輕鏈Fab片段之結構域之序列可反轉，亦即例如分別地重鏈Fab片段可具有結構域序列VH-CH1或CH1-VH (由N端至C端)，且同樣地，輕鏈Fab片段可具有結構域序列VL-CL或CL-VL (由N端至C端)或混合。假設在第三結合位點之一部分之中心融合多肽及核心結構域之前及之後，亦即在第三結合位點之一部分之融合多肽及抗體恆定域3之前及之後存在連接子，相對於核心結構域限制Fab片段取向。因此，VH域之相對位置係接近Fc區，此處稱為「向VH內」，或遠離Fc區，此處稱為「向VH外」(參見圖6

及7)。

【0127】 亦可使用CrossMab技術，亦即一個組中之結構域交換來改良總成特性。此舉可進一步在交換或非交換組中與電荷變異體組合。用於產生雙特異性二環線融合多肽之具有各別取向之抗cMET環形融合多肽之例示性鏈示於圖8中(向VH外、向VH內，且此等不同鏈組合之各別表現率、產量及品質在下表中給出。

	向VH外- 杵/向VH 外-臼	向VH內- 杵/向VH 外-臼	向VH外- 杵/向VH 外-臼-CH- CL-互換	向VH內-杵/ 向VH外-臼- CH-CL-互 換	向VH外- 杵/向VH 內-臼-VH- VL-互換	向VH內- 杵/向VH 外-臼-VH- VL-互換
表現體積 [ml]	250	250	250	250	250	250
濃度[mg/ml]	1.80	0.60	0.48	1.17	0.36	0.65
量 [mg]	2.88	0.60	0.81	1.17	0.43	0.65
單 體(分 析 型 SEC)[%]	98.10	93.80	97.34	97.90	98.74	98.88
主 峰(CE- SDS)[%]	96.80	98.80	95.73	100.00	100.00	100.00
產量 [mg/l]	11.52	2.40	3.24	4.68	1.72	2.60

- 向VH外-杵 = SEQ ID NO: 28,
- 向VH內-杵 = SEQ ID NO: 29,
- 向VH外-臼 = SEQ ID NO: 30,
- 向VH外-臼-CH-CL-互換 = SEQ ID NO: 31,
- 向VH內-臼-VH-VL-互換 = SEQ ID NO: 32。

【0128】 亦可使用製造且採納習知雙特異性抗體之通常適用的技術以製造雙特異性二環形融合多肽。

【0129】 舉例而言，用於製造多特異性抗體之技術包括(但不限於)

重組共表現具有不同特異性之兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(參見Milstein, C.及Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540), WO 93/08829, 及Traunecker, A.等人, EMBO J. 10 (1991) 3655-3659), 及「杵臼(knob-in-hole)」工程改造(參見例如US 5,731,168)。多特異性抗體亦可藉由以下製得：工程改造用於製造抗體Fc-雜二聚體分子之靜電操控效應(WO 2009/089004)；使兩個或更多個抗體或片段交聯(參見例如US 4,676,980, 及Brennan, M.等人, Science 229 (1985) 81-83)；使用白胺酸拉鏈以產生雙特異性抗體(參見例如Kostelny, S.A.等人, J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553)；使用用於製造雙特異性抗體片段之「雙功能抗體」技術(參見例如Holliger, P.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448)；及使用單鏈Fv (sFv)二聚體(參見例如Gruber, M等人, J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374)；及製備三特異性抗體，如例如Tutt, A.等人, J. Immunol. 147 (1991) 60-69中所描述)。

【0130】一般而言，各次均需要幾何約束以固定兩個結合位點之取向，可使用康特斯體。

【0131】

II.3 由根據本發明之二環形融合多肽形成之二及三特異性三價抗體

根據本發明之例示性多特異性抗體之設計及組合物示於圖9中。包含三個結合位點之此類抗體可命名為三Fab-康特斯體。

【0132】自圖9下半部分，可見結合位點在三Fab-康特斯體中以相反位置排列。因此，三Fab-康特斯體係具有規定及有限可撓性之緊密分子。其具有極特殊且規定的幾何佈置。在結合至其抗原時，其類似於具有磁極之磁體連接兩個抗原(呈現該等抗原之細胞)。

【0133】 例示性三Fab-康特斯體係抗LeY/生物素抗體。其包含兩個環形融合多肽，其中第一者具有如下結構域之序列：

抗LeY 抗體VH-CH1-肽連接子1-抗生物素抗體VL-連接子-具有杵突變之CH3-肽連接子2-抗LeY 抗體VL-CL (κ)

【0134】 各別胺基酸序列以SEQ ID NO: 34列舉。

【0135】 第二環形融合多肽具有如下結構域之序列：

抗LeY抗體VH-CH1-肽連接子1-抗生物素抗體VL-連接子-具有臼突變之CH3-肽連接子2-抗LeY 抗體VL-CL (κ)

【0136】 各別胺基酸序列以SEQ ID NO: 35列舉。

【0137】 類似於實例中所述之方法，將分子表現且純化。

【0138】 圖10展示KappaSelect純化培養上清液之SEC及SDS-page。

【0139】 藉由MS確定分子之身分，如圖11中以下表中之數據所示：

	預期質量[Da]	測定質量[Da]
整個分子	148582	148586
鏈A	73635	73635
鏈B	74980	74980

【0140】 分子之官能性藉由FACS分析確定，從而表明LeY-Bio三Fab-康特斯體之雙特異性。三Fab-康特斯體經由其抗LeY結合特異性結合至細胞表面。藉由經由其抗生物素結合位點捕捉螢光生物素-Cy5結合物，在FACS分析中可偵測結合細胞之三Fab-康特斯體，亦即細胞締合之Cy5信號指示兩個結合位點(亦即位於個別環形融合多肽中結合位點以及

由兩個環形融合多肽之二聚作用形成之結合位點)之同步官能性。FACS數據示於圖12中。

【0141】 本文揭示一種多特異性抗體，其包含三個抗原結合位點且由兩個環形融合多肽組成，其中

a)第一環形融合多肽包含第一結合域之第一部分、第一結合域之第二部分及第三結合域之第一部分，其中

- 第一結合域之第一部分直接或經由第一肽連接子與第三結合域之第一部分之N端融合，

- 第一結合域之第二部分直接或經由第二肽連接子與第三結合域之第一部分之C端融合，

- 第一結合域之第一部分係重鏈Fab片段(VH₁-CH1)或輕鏈Fab片段(VL₁-CL)，其中若第一結合域之第一部分係重鏈Fab片段，則第一結合域之第二部分係輕鏈Fab片段，或反之亦然，

- 第一結合域之第一部分及第一結合域之第二部分彼此締合且一起形成第一抗原結合位點，

b)第二環形融合多肽包含第二結合域之第一部分、第二結合域之第二部分及第三結合域之第二部分，其中

- 第二結合域之第一部分直接或經由第三肽連接子與第三結合域之第二部分之N端融合，

- 第二結合域之第二部分直接或經由第四肽連接子與第三結合域之第二部分之C端融合，

- 第二結合域之第一部分係重鏈Fab片段(VH₂-CH1)或輕鏈Fab片段(VL₂-CL)，其中若第二結合域之第一部分係重鏈Fab片段，則第二結合域

之第二部分係輕鏈Fab片段，或反之亦然，

- 第二結合域之第一部分及第二結合域之第二部分彼此締合且一起形成第二抗原結合位點，

c)第三結合域之第一部分及第三結合域之第二部分一起形成第三抗原結合位點，其中

- 第三結合域之第一部分係可變重鏈-CH3域融合多肽(VH₃-CH3)或可變輕鏈-CH3域融合多肽(VL₃-CH3)，

- 若第一環形融合多肽中之第二結合域之第一部分係可變輕鏈-CH3域融合多肽，則第三結合域之第二部分係可變重鏈-CH3域融合多肽，或反之亦然，

- 第三結合域之第一部分及第三結合域之第二部分彼此締合且形成第三抗原結合位點，

其中兩個恆定重鏈域3 (CH3)藉由以下而改變以促進雜二聚：

i) 在CH3域中之一者中藉由至少一個原始胺基酸殘基經側鏈體積大於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基取代產生隆凸，及在CH3域中之另一者中藉由至少一個原始胺基酸殘基經側鏈體積小於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基取代產生空腔，以使得在CH3域中之一者中產生之隆凸可定位於CH3域中之另一者中產生之空腔中，或

CH3域中之一者中之至少一個原始胺基酸殘基經帶正電胺基酸取代，及CH3域中之另一者中之至少一個原始胺基酸殘基經帶負電胺基酸取代，或

ii) 在各CH3域中引入至少一個半胱胺酸殘基，以使得在CH3域之間形成二硫鍵，或

iii) i)與ii)之修改，

其中多特異性抗體不含恆定重鏈域2 (CH2)及鉸鏈區。

【0142】 在所有態樣之一個實施例中，第一及第二環形融合多肽各包含恰好一個在第三抗原結合域之一部分之N端的結合域之部分、及恰好一個但不同的在第三結合域之一部分之C端的結合域之部分。

【0143】 在所有態樣之一個實施例中，第一環形融合多肽中之第一結合域之第一部分及第一結合域之第二部分彼此共價締合，及/或第二環形融合多肽中之第二結合域之第一部分及第二結合域之第二部分彼此共價締合。在一個實施例中，共價締合藉由除肽鍵外之鍵實現。在一個較佳實施例中，共價締合藉由二硫鍵實現。

【0144】 在所有態樣之一個實施例中，

i) 第一或第二結合位點之第一部分之CH1域之C端與第三結合域之一部分之N端結合，且第一或第二結合位點之第二部分之VL域之N端與第三結合域之C端結合，或

ii) 第一或第二結合位點之第一部分之VH域之C端與第三結合域之一部分之N端結合，且第一或第二結合位點之第二部分之CL域之N端與第三結合域之C端結合。

【0145】 在所有態樣之一個實施例中，第三抗原結合位點藉由彼此獨立地在以下位置下引入半胱胺酸殘基以在VH與VL域之間形成二硫鍵(根據Kabat編號)而二硫鍵穩定：

- VH之位置44處及VL之位置100處，
- VH之位置105處及VL之位置43處，或
- VH之位置101處及VL之位置100處。

【0146】 在所有態樣之一個實施例中，第一或第二結合域之第一部分係抗體重鏈Fab片段(VH+CH1)，且第一或第二結合域之第二部分係抗體輕鏈Fab片段(VL+CL)，或反之亦然。

【0147】 在所有態樣之一個實施例中，多特異性抗體融合多肽發揮效應功能。在一個實施例中，效應功能係ADCC或/及CDC。

【0148】 在所有態樣之一個實施例中，第一結合域之第一部分經由SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 17之第一肽連接子與第三結合域之一部分之N端融合，且第一結合域之第二部分經由SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 17之第二肽連接子與第三結合域之一部分之C端融合，其中第一及第二肽連接子彼此獨立地進行選擇。

【0149】 在所有態樣之一個實施例中，第二結合域之第一部分經由SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 17之第一肽連接子與第三結合域之一部分之N端融合，且第二結合域之第二部分經由SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 17之第二肽連接子與第三結合域之一部分之C端融合，其中第一及第二肽連接子彼此獨立地進行選擇。

【0150】 在所有態樣之一個實施例中，各(環形)(單鏈)融合多肽在N端至C端方向上在第三結合域之一部分之前(亦即第三結合域之一部分之N端)包含恰好一個抗體可變域，且在第三結合域之一部分之後(亦即第三結構域之一部分之C端)包含恰好一個抗體可變域。

【0151】 在所有態樣之一個實施例中，標靶係細胞表面抗原或細胞表面受體之可溶性配體。

【0152】 在所有態樣之一個實施例中，結合域係Fab、DAF或雙特異性Fab。

【0153】 在所有態樣之一個實施例中，第一及/或第二結合域係(習知)Fab，其中結合域之第一部分包含抗體重鏈可變域(VH)及至少(或完整)第一抗體重鏈恆定域(CH1)之N端片段，且結合域之各別其他部分包含抗體輕鏈可變域(VL)及至少(或完整)抗體輕鏈恆定域(CL)之N端片段，或反之亦然。在一個實施例中，結合域之第一部分在N端至C端方向上包含VH-CH1，且結合域之第二部分在N端至C端方向上包含VL-CL，或反之亦然。

【0154】 在所有態樣之一個實施例中，側鏈體積大於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基選自R、F、Y及W。

【0155】 在所有態樣之一個實施例中，側鏈體積小於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基選自A、S、T及V。

【0156】 在所有態樣之一個實施例中，側鏈體積大於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基選自R、F、Y及W，且側鏈體積小於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基選自A、S、T及V。

【0157】 在所有態樣之一個實施例中，第三結合位點之CH3域包含T366W突變(杵突變；杵側)，且第三結合位點之另一CH3域包含突變T366S、L368A及Y407V(臼突變；臼側)(根據Kabat之EU索引編號)。

【0158】 在所有態樣之一個實施例中，第三結合位點之CH3域包含T366W突變(杵突變；杵側)，且第三結合位點之另一CH3域包含突變T366S、L368A及Y407V(臼突變；臼側)(根據Kabat之EU索引編號)。

【0159】 在所有態樣之一個實施例中，第三結合位點之CH3域包含S354C及T366W突變(杵-cys突變；杵-cys側)，且第三結合位點之另一CH3域包含突變Y349C、T366S、L368A及Y407V(臼-cys突變；臼-cys側)。

側)(根據Kabat之EU索引編號)。

【0160】 如本文所報導之一個態樣係包含三個抗原結合位點之多特異性抗體，其中

a)第一抗原結合位點由第一環形融合多肽之第一抗體重鏈可變域(VH₁)及第一抗體輕鏈可變域(VL₁)對(VH₁/VL₁-對)形成，其中

- VH₁係第一重鏈Fab片段(VH₁-CH1)之一部分，且VL₁係第一輕鏈Fab片段(VL₁-CL)之一部分，

- VH₁-CH1經由第一肽連接子結合至第一可變域-抗體恆定域3融合多肽(V₃-CH3)之N端或C端，且VL₁-CL經由第二肽連接子結合至第一V₃-CH3之各別其他末端，

- VH₁-CH1及VL₁-CL彼此締合且形成VH₁/VL₁-對，

b)第二抗原結合位點由第二環形融合多肽之第二抗體重鏈可變域(VH₂)及第二抗體輕鏈可變域(VL₂)對(VH₂/VL₂-對)形成，其中

- VH₂係第二重鏈Fab片段(VH₂-CH1)之一部分，且VL₂係第二輕鏈Fab片段(VL₂-CL)之一部分，

- VH₂-CH1經由第三肽連接子結合至第二可變域-抗體恆定域3融合多肽(V₃-CH3)之N端或C端，且VL₂-CL經由第四肽連接子結合至第二V₃-CH3之各別其他末端，

- VH₂-CH1及VL₂-CL彼此締合且形成VH₂/VL₂-對，

c)第三抗原結合位點由第一V₃-CH3及第二V₃-CH3形成，其中

- 第一V₃-CH3係可變重鏈-抗體恆定域3融合多肽(VH₃-CH3)或可變輕鏈-抗體恆定域3融合多肽(VL₃-CH3)，

- 若第一V₃-CH3係可變輕鏈-抗體恆定域3融合多肽，則第二V₃-

CH3係可變重鏈-抗體恆定域3融合多肽，或反之亦然，

- VH₃-CH3及VL₃-CH3彼此締合形成VH₃/VL₃-對，

其中兩個抗體恆定域3 (CH3)藉由以下而改變以促進雜二聚：在CH3中之一者中引入突變T366W及視情況存在之突變S354C及在各別其他CH3引入突變T366S、L368A及Y407V及視情況存在之突變Y349C (根據Kabat之EU索引編號)，

其中多特異性抗體不含抗體恆定域2 (CH2)及鉸鏈區。

【0161】 在一個實施例中，第三結合域之第一及/或第二部分中之連接子不存在(亦即第三結合域之第一部分係可變重鏈域-抗體恆定域3融合多肽且第三結合域之第二部分係可變輕鏈域-抗體恆定域3融合多肽，或反之亦然)。

【0162】 在一個實施例中，連接子L係肽連接子。在一個實施例中連接子L具有SEQ ID NO: 33之胺基酸序列。

【0163】 所有其他上文未提及之所列舉實施例亦屬於此態樣。

【0164】 如本文所報導之一個態樣係包含(至少)三個抗原結合VH/VL-對之多特異性抗體，

其中多特異性抗體包含/由以下組成：

a)第一環形融合多肽，其在N端至C端方向上包含

i)第一可變重鏈域(VH₁)，

ii)抗體重鏈恆定域1(CH1)，

iii)第一肽連接子，

iv)第二可變重鏈域(VH₂)，

v)第一CH3域(CH3₁)，

vi)第二肽連接子，

vii)第一可變輕鏈域(VL₁)，及

viii)抗體輕鏈恆定域(CL)，

其中根據i)及vii)鑑定之結構域彼此締合且係特異性結合至第一抗原之第一VH/VL-對，

且

b)第二環形融合多肽，其在N端至C端方向上包含

i)第三可變重鏈域(VH₃)，

ii)抗體重鏈恆定域1(CH1)，

iii)第三肽連接子，

iv)第二可變輕鏈域(VL₂)，

v)第二CH3域(CH₃₂)，

vi)第四肽連接子，

vii)第三可變輕鏈域(VL₃)，及

viii)抗體輕鏈恆定域(CL)，

其中根據i)及vii)鑑定之結構域彼此締合且係特異性結合至第二抗原之第二VH/VL-對，

其中CH3域藉由以下而改變以促進雜二聚：在第一CH3域中藉由至少一個原始胺基酸殘基經側鏈體積大於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基取代產生隆凸，及在第二CH3域中藉由至少一個原始胺基酸殘基經側鏈體積小於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基取代產生空腔，以使得在CH3域中之一者中產生之隆凸可定位於CH3域中之另一者中產生之空腔中，

其中根據a) v)及b) v)鑑定之結構域藉由二硫鍵彼此結合(以形成第一

環形融合多肽及第二融合多肽之二聚體)，

及

其中根據a) iv)及b) iv)鑑定之結構域彼此與締合且係特異性結合至第三抗原之第三VH/VL-對。

【0165】 在一個實施例中，第一抗原及第二抗原係相同抗原且第三抗原係不同於其之抗原。

【0166】 所有其他上文未提及之所列舉實施例亦屬於此態樣。

【0167】 在所有態樣之一個實施例中，第一及第二結合位點特異性結合至相同(第一)抗原且第三結合位點特異性結合至不同(第二)抗原。

【0168】 在所有態樣之一個實施例中，第一結合位點特異性結合至第一抗原，第二結合位點特異性結合至第二抗原，且第三結合位點特異性結合至第三抗原，其中第一、第二及第三抗原係不同抗原。

【0169】

III. 結合位點

III.1. 抗體片段源性結合位點

在某些實施例中，如本文所報導之多特異性抗體中之結合位點各由抗體重鏈可變域(VH)及抗體輕鏈可變域(VL)構成。

【0170】 在某些實施例中，多特異性抗體之結合位點中之一或兩者係抗體片段。抗體片段包括(但不限於)Fab、Fab'、Fab'-SH及Fv片段。關於某些抗體片段之綜述，參見Hudson, P.J.等人，Nat. Med. 9 (2003) 129-134。關於scFv片段之綜述，參見例如Plueckthun, A., In; The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，第113卷，Rosenburg及Moore (編)，Springer-Verlag, New York (1994)，第269-315頁；亦參見WO

93/16185；US 5,571,894及US 5,587,458。關於包含救助受體結合抗原決定基殘基且活體內半衰期增加之Fab片段之論述，參見US 5,869,046。

【0171】 抗體片段亦可為「雙作用Fab」或「DAF」(參見例如US 2008/0069820)。

【0172】 抗體片段可藉由各種技術製得，包括(但不限於)完整抗體之蛋白水解消化以及如本文所述之藉由重組宿主細胞(例如大腸桿菌或噬菌體)產生。

【0173】 若結合位點係Fab，則Fab可為習知Fab、DAF或雙特異性Fab。

【0174】 在習知Fab之情況下，結合域之一個部分包含抗體重鏈可變域(VH)及至少(或完整)第一抗體重鏈恆定域(CH1)之N端片段，且結合域之各別其他部分包含抗體輕鏈可變域(VL)及至少(或完整)抗體輕鏈恆定域(CL)之N端片段。此等結構域之次序可為任何次序，只要其締合及(官能性)結合位點之形成係可能的(亦即未防止其結合及(官能性)結合位點之形成)即可。

【0175】 在一個實施例中，結合域之一個部分在N端至C端方向上包含VH-CH1，且結合域之另一部分在N端至C端方向上包含VL-CL。

【0176】 在雙特異性Fab之情況下，結構域之一個部分包含抗體重鏈可變域(VH)及至少(或完整)第一抗體重鏈恆定結構域(CH1)之N端片段，且各別其他結合域包含抗體輕鏈可變域(VL)及至少(或完整)抗體輕鏈恆定域(CL)之N端片段，其中在本文中，該結合域在重鏈可變域(VH)及輕鏈可變域(VL)之互補對中包含兩個不重疊互補位，其中第一互補位包含來自VL域之CDR1及CDR3以及VH域之CDR2的殘基，且第二互補位包含

來自VH域之CDR1及CDR3以及VL域之CDR2的殘基。

【0177】 在一個實施例中，第一互補位包含來自VL域之CDR1及CDR3以及VH域之CDR2的殘基，且第二互補位包含來自VH域之CDR1及CDR3以及VL域之CDR2的殘基。

【0178】 在一個實施例中，結合位點之重鏈可變域係基於人類VH3家族重鏈序列，且結合位點之輕鏈可變域係基於人類V κ 1家族輕鏈序列。

【0179】 在一個實施例中，結合位點之重鏈可變域係基於人類VH3家族重鏈序列，且結合位點之輕鏈可變域係基於人類V λ 1家族輕鏈序列。

【0180】

III.2. 嵌合及人類化抗體源性結合位點

在某些實施例中，多特異性抗體中之結合位點中之一者或兩者或三者係源自例如人類化抗體之嵌合抗體之嵌合結構域。

【0181】 「構架」或「FR」係指除高變區(HVR)殘基外之可變域殘基。可變域之FR一般由四個FR域組成：FR1、FR2、FR3及FR4。因此，在VH (或VL)中HVR及FR序列一般出現於以下序列中：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0182】 如本文所用，術語「高變區」或「HVR」係指包含排序高變的胺基酸殘基延伸(「互補決定區」或「CDR」)及/或形成結構經規定之環(「高變環」)及/或含有抗原接觸殘基(「抗原觸點」)之抗體可變域中之每中之各者。一般而言，抗體包含六個HVR；三個在VH (H1、H2、H3)中，且三個在VL (L1、L2、L3)中。

【0183】 HVR包括

(a)出現於胺基酸殘基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)及96-101 (H3)處之高變環(Chothia, C.及Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917)；

(b)出現於胺基酸殘基24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2)及95-102 (H3)處之CDR (Kabat, E.A.等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版 美國公共衛生署, 美國國家衛生研究院, Bethesda, MD (1991), NIH出版號91-3242.)；

(c)出現於胺基酸殘基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2)及93-101 (H3)處之抗原接觸點(MacCallum等人 J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))；及

(d)(a)、(b)及/或(c)之組合，包括胺基酸殘基46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3)及94-102 (H3)。

【0184】 除非另外指明，否則在本文中，根據Kabat等人，同上對可變域中之HVR殘基及其他殘基(例如FR殘基)進行編號。

【0185】 在某些實施例中，嵌合抗體為人源化抗體。通常，對非人類抗體進行人類化以降低對人類之免疫原性，同時保留親本非人類抗體之特異性及親和力。一般而言，人類化抗體包含一或多種可變域，其中HVR，例如CDR(或其部分)係源自非人類抗體，且FR (或其部分)係源自人類抗體序列。在一些實施例中，人類化抗體中之一些FR殘基經來自非人類抗體(例如HVR殘基所來源之抗體)之對應殘基取代以例如恢復或改良抗體特異性或親和力。

【0186】 「人類化」抗體係指包含來自非人類HVR之胺基酸殘基及

來自人類FR之胺基酸殘基的抗體。在某些實施例中，人類化抗體將包含至少一個及通常兩個可變域之基本上全部，其中全部或基本上全部HVR(例如CDR)與非人類抗體之HVR相對應，且全部或基本上全部FR與人類抗體之FR相對應。人類化抗體視情況可包含來源於人類抗體之抗體恆定區的至少一部分。抗體(例如非人類抗體)之「人類化形式」係指已經歷人類化之抗體。

【0187】 人類化抗體及其製造方法綜述於例如Almagro, J.C.及Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633中，且另外描述於例如Riechmann, I.等人，*Nature* 332 (1988) 323-329；Queen, C.等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033；US 5,821,337、US 7,527,791、US 6,982,321及US 7,087,409；Kashmiri, S.V.等人，*Methods* 36 (2005) 25-34 (描述特異性決定區(SDR)移植)；Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498 (描述「表面再塑」)；Dall'Acqua, W.F.等人，*Methods* 36 (2005) 43-60 (描述「FR改組」)；及Osbourn, J.等人，*Methods* 36 (2005) 61-68及Klimka, A.等人，*Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260 (描述FR改組之「引導選擇」方法)。

【0188】 可用於人類化之人類構架區包括(但不限於)：使用「最佳擬合」方法選擇之構架區(參見例如Sims, M.J. 等人，*J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308)；來源於具有輕鏈或重鏈可變區之特定子群之人類抗體共同序列的構架區(參見例如Carter, P.等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289；及Presta, L.G.等人，*J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632)；人類成熟(體細胞突變)構架區或人類生殖系構架區(參見例如Almagro, J.C.及Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-

1633)；及來源於篩選FR庫之構架區(參見例如Baca, M.等人，J. Biol. Chem. 272 (1997) 10678-10684及Rosok, M.J.等人，J. Biol. Chem. 271 (1996) 22611-22618)。

【0189】

III.3. 人類抗體源性結合位點

在某些實施例中，如本文所報導之多特異性抗體中之一個或兩個或三個結合位點由抗體重鏈可變域(VH)及抗體輕鏈可變域(VL)構成。在某些實施例中，可變域來自人類抗體。

【0190】 可使用此項技術中已知之各種技術來產生人類抗體。人類抗體一般描述於van Dijk, M.A.及van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374及Lonberg, N., Curr. Opin. Immunol. 20 (2008) 450-459中。

【0191】 人類抗體可藉由將免疫原投與已經修飾以響應於抗原攻毒而產生完整人類抗體或具有人類可變區之完整抗體的轉殖基因動物來製備。此類動物通常含有人類免疫球蛋白基因座之全部或一部分，其置換內源性免疫球蛋白基因座，或存在於染色體外或隨機整合至動物染色體中。在此類轉殖基因小鼠中，內源性免疫球蛋白基因座一般已失活。關於自轉殖基因動物獲得人類抗體之方法的綜述，參見Lonberg, N., Nat. Biotech. 23 (2005) 1117-1125。亦參見例如描述XENOMOUSE™技術之US 6,075,181及US 6,150,584；描述HUMAB®技術之US 5,770,429；描述K-M MOUSE®技術之US 7,041,870；描述VELOCIMOUSE®技術之US 2007/0061900；描述免疫重築小鼠之WO 2007/131676)。來自由此類動物產生之完整抗體之人類可變區可進一步修飾。

【0192】 人類抗體亦可藉由基於融合瘤之方法製備。已描述用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類融合骨髓瘤細胞株(參見例如 Kozbor, D., J. Immunol. 133 (1984) 3001-3005 ; Brodeur, B.R.等人 , Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), 第51-63頁 ; 及Boerner, P.等人 , J. Immunol. 147 (1991) 86-95))。經由人類B細胞融合瘤技術產生之人類抗體亦描述於Li, J.等人 , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 3557-3562中。額外方法包括描述於例如US 7,189,826 (描述自融合瘤細胞株產生單株人類IgM抗體)及Ni, J., Xiandai Mianyixue 26 (2006) 265-268 (描述人類-人類融合瘤)中之彼等方法。人類融合瘤技術(三源融合瘤技術)亦描述於Vollmers, H.P.及Brandlein, S., Histology and Histopathology 20 (2005) 927-937及Vollmers, H.P.及Brandlein, S., Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27 (2005) 185-191中。

【0193】 人類抗體亦可藉由分離選自人類源性噬菌體呈現文庫之Fv純系可變域序列產生。此類可變域序列接著可與所需人類恆定域組合。下文描述用於自抗體文庫選擇人類抗體之技術。

【0194】

III.4. 文庫源性抗體結合位點

在某些實施例中，如本文所報導之多特異性抗體中之一個或兩個或三個結合位點由抗體重鏈可變域(VH)及抗體輕鏈可變域(VL)構成。在某些實施例中，可變域可藉由篩選組合性文庫中之具有一或多種所需活性之抗體而分離。

【0195】 舉例而言，此項技術中已知多種方法用於產生噬菌體呈現

庫及針對具有所需結合特徵之抗體篩選此類文庫。此類方法綜述於例如 Hoogenboom, H.R.等人, *Methods in Molecular Biology* 178 (2001) 1-37中, 且進一步描述於例如 McCafferty, J.等人, *Nature* 348 (1990) 552-554; Clackson, T.等人, *Nature* 352 (1991) 624-628; Marks, J.D.等人, *J. Mol. Biol.* 222 (1992) 581-597; Marks, J.D.及 Bradbury, A., *Methods in Molecular Biology* 248 (2003) 161-175; Sidhu, S.S.等人, *J. Mol. Biol.* 338 (2004) 299-310; Lee, C.V.等人, *J. Mol. Biol.* 340 (2004) 1073-1093; Fellouse, F.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 12467-12472; 及 Lee, C.V.等人, *J. Immunol. Methods* 284 (2004) 119-132中。

【0196】 在某些噬菌體呈現方法中, VH及VL基因之譜系藉由聚合酶鏈式反應(PCR)單獨選殖且在噬菌體庫中隨機重組, 其可接著如 Winter, G.等人, *Ann. Rev. Immunol.* 12 (1994) 433-455中所述篩選抗原結合噬菌體。噬菌體通常以單鏈Fv (scFv)片段或Fab片段形式呈現抗體片段。來自經免疫來源之文庫提供與免疫原之高親和力結合位點而無需構築融合瘤。或者, 可將天然譜系純系化(例如自人類)以提供抗各種非自體抗原以及自體抗原之抗體之單一來源而無需任何免疫接種, 如 Griffiths, A.D.等人, *EMBO J.* 12 (1993) 725-734所述。最後, 亦可以合成方式如下製備天然文庫: 自幹細胞選殖未重排V基因區段, 且使用含有隨機序列之PCR引子編碼CDR3高度可變區及實現活體外重排, 如 Hoogenboom, H.R.及 Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388所描述。描述人類抗體噬菌體庫之專利公開案包括例如: US 5,750,373及US 2005/0079574、US 2005/0119455、US 2005/0266000、US 2007/0117126、US

2007/0160598、US 2007/0237764、US 2007/0292936及US
2009/0002360。

【0197】自人類抗體文庫分離之抗體或抗體片段在本文中視為人類
抗體或人類抗體片段。

【0198】

IV. 雜-多(二)聚結構域

為確保兩個環形融合多肽正確締合以形成如本文所報導之多特異性
抗體，可使用不同技術。其中之一者係所謂的「杵臼」工程改造(參見例
如US 5,731,168)。多環形融合多肽亦可藉由以下製得：工程改造用於製
造抗體Fc-雜二聚體分子之靜電操控效應(WO 2009/089004)；使兩個或更
多個環形融合多肽交聯(參見例如US 4,676,980，及Brennan, M.等人，
Science 229 (1985) 81-83)；使用白胺酸拉鏈以產生二環形融合多肽(參見
例如Kostelny, S.A.等人，J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553)。

【0199】「CH3域」包含Fc區中CH2域C端之殘基鏈段(亦即IgG之
由約位置341之胺基酸殘基至約位置447之胺基酸殘基)。在根據本發明之
抗體內，一個各別CH3域排列於第三結合位點之VH₃及VL₃域之C端。在
本文中，「CH3域」係變異型CH3域，其中天然CH3域之胺基酸序列經歷
至少一個不同胺基酸取代(亦即CH3域之胺基酸序列之修飾)以促進多特異
性抗體內兩個CH3域面向彼此發生二聚。

【0200】用於CH3修飾以支持雜二聚之若干方法已描述於例如WO
96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO
2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、
WO 2011/143545、WO 2012/058768、WO 2013/157954、WO

2013/096291中，其以引用的方式包括於本文中。

【0201】通常，在此項技術中已知之雜二聚方法中，一個重鏈之CH3域與另一重鏈之CH3域以互補方式進行工程改造，以使得包含一個經工程改造之CH3域的重鏈可不再與相同結構之另一重鏈均二聚。藉此，迫使包含一個經工程改造之CH3域的重鏈與包含以互補方式工程改造之CH3域的另一個重鏈雜二聚。

【0202】一種此項技術中已知之雜二聚方法係所謂的「杵臼」技術，其以若干實例詳細描述於例如WO 96/027011, Ridgway, J.B.等人，Protein Eng. 9 (1996) 617-621；Merchant, A.M.等人，Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681；及WO 98/050431中，其以引用的方式包括於本文中。在「臼杵」技術中，在抗體之三級結構中兩個CH3域之間形成之界面內，各CH3域上之特定胺基酸經工程改造以分別在CH3域中之一者中產生隆凸(「杵」)及在CH3域中之另一者中產生空腔(「臼」)。在多特異性抗體之三級結構中，一個CH3域中之引入之隆凸可定位於另一CH3域中之引入之空腔中。

【0203】在多特異性抗體之一個實施例中，CH3域根據杵臼技術而改變。根據此實施例之多特異性抗體在本文中亦稱為「CH3(KiH)-工程改造之多特異性抗體」(其中縮寫「KiH」表示「杵臼技術」)。因此，根據此實施例，在CH3(KiH)-工程改造之多特異性抗體內，CH3域藉由以下而改變以促進雜二聚：在CH3域中之一者中藉由至少一個原始胺基酸殘基經側鏈體積大於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基取代產生隆凸；及在CH3域中之另一者中藉由至少一個原始胺基酸殘基經側鏈體積小於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基取代產生空腔，以使得在CH3域中之一者中產生之隆凸可定

位於CH3域中之另一者中產生之空腔中。

【0204】換言之，此實施例係關於根據本發明之CH3(KiH)-工程改造之多特異性抗體，其包含有包含抗體恆定域3之第一多肽及包含抗體恆定域3之第二多肽，其中在抗體之三級結構中，第一多肽之CH3域及第二多肽之CH3域形成位於各別CH3域之間的界面，其中第一多肽之CH3域及第二多肽之CH3域之各別胺基酸序列各自包含位於抗體之三級結構中之該界面內之一組胺基酸，

- 其中，在位於一個多肽之CH3域中之界面中的該組胺基酸中，至少一個胺基酸殘基經側鏈體積大於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基取代，藉此在界面內產生隆凸，其中隆凸位於一個多肽之CH3域中，且其中隆凸可定位於位於界面內之另一多肽之CH3域中的空腔中；及

- 其中，在位於另一多肽之CH3域中之界面中的該組胺基酸中，至少一個胺基酸殘基經側鏈體積小於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基取代，藉此在界面內產生空腔，其中空腔位於另一多肽之CH3域中，且其中位於一個多肽之CH3域中之界面內之隆凸可定位於空腔中。

【0205】在根據本發明之該CH3(KiH)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，側鏈體積大於原始胺基酸殘基之該胺基酸殘基選自R、F、Y及W。

【0206】在根據本發明之該CH3(KiH)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，側鏈體積小於原始胺基酸殘基之該胺基酸殘基選自A、S、T及V。

【0207】在根據本發明之該CH3(KiH)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，側鏈體積大於原始胺基酸殘基之該胺基酸殘基選自R、

F、Y及W；且側鏈體積小於原始胺基酸殘基之該胺基酸殘基選自A、S、T及V。

【0208】在根據本發明之該CH3(KiH)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，CH3域中之一者包含T366W突變，且各別另一CH3域包含T366S、L368A及Y407V突變(根據Kabat之EU索引編號)。

【0209】在根據本發明之該CH3(KiH)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，CH3域中之一者包含T366W及G407Y突變，且各別另一CH3域包含T366S、L368A及Y407V突變(根據Kabat之EU索引編號)。

【0210】在根據本發明之該CH3(KiH)-工程改造之多特異性抗體之另一實施例中，CH3域中之一者包含T366W、R409D及K370E突變，且各別另一CH3域包含T366S、L368A、Y407V、D399K及E357K突變(根據Kabat之EU索引編號)。

【0211】或者或與根據如上文所定義之杵臼技術之修飾組合，根據本發明之多特異性抗體之CH3域根據此項技術中已知之其他雜二聚方法而改變以促進雜二聚，較佳WO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012/058768、WO 2013/157954及WO 2013/096291中所描述之方法。

【0212】在多特異性抗體之另一實施例中，或者或與根據杵臼技術之修飾組合，CH3域藉由在CH3/CH3域界面中在特定胺基酸位置引入具有相反電荷之帶電荷胺基酸改變(例如如EP 1870459中所述)。根據此實施例之多特異性抗體在本文中亦稱為「CH3(+/-)工程改造之多特異性抗體」(其中縮寫「+/-」表示引入各別CH3域中之帶相反電荷胺基酸)。因此，根

據此實施例，在CH3(+/-)工程改造之多特異性抗體內，CH3域藉由以下而改變以促進雜二聚：CH3域中之一者中之至少一個原始胺基酸殘基經帶正電胺基酸取代；及CH3域中之另一者中之至少一個原始胺基酸殘基經帶負電胺基酸取代。

【0213】 換言之，此實施例係關於一種根據本發明之CH3(+/-)工程改造之多特異性抗體，其包含第一多肽及第二多肽，其中在抗體之三級結構中，第一多肽之CH3域及第二多肽之CH3域形成位於各別抗體CH3域之間的界面，其中第一多肽之CH3域及第二多肽之CH3域之各別胺基酸序列各包含位於抗體之三級結構中之該界面內之一組胺基酸，其中在位於一個多肽之CH3域中之界面中的該組胺基酸中，第一胺基酸經帶正電胺基酸取代，且在位於另一多肽之CH3域中之界面中的該組胺基酸中，第二胺基酸經帶負電胺基酸取代。

【0214】 在根據本發明之該CH3(KiH)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，帶正電胺基酸選自K、R及H；且帶負電胺基酸選自E或D。

【0215】 在根據本發明之該CH3(KiH)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，帶正電胺基酸選自K及R；且帶負電胺基酸選自E或D。

【0216】 在根據本發明之該CH3(+/-)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，帶正電胺基酸為K，且帶負電胺基酸為E。

【0217】 在根據本發明之該CH3(+/-)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，在CH3域中之一者中，位置409 (根據Kabat之EU索引編號)處之胺基酸R經D取代，且位置370 (根據Kabat之EU索引編號)處之胺基酸K經E取代；且在各別另一CH3域中，位置399 (根據Kabat之EU索引編號)

處之胺基酸D經K取代且位置357 (根據Kabat之EU索引編號)處之胺基酸E經K取代。

【0218】 在多特異性抗體之另一實施例中，使CH3域二硫鍵穩定。根據此實施例之多特異性抗體在本文中亦稱為「CH3(S-S)-工程改造之多特異性抗體」(其中縮寫「S-S」表示二硫鍵穩定)。因此，根據此實施例，在「CH3(S-S)-工程改造之多特異性抗體內，CH3域藉由在各CH3域中引入至少一個半胱胺酸殘基以使得在CH3域之間形成二硫鍵而改變以促進雜二聚。

【0219】 換言之，此實施例係關於一種根據本發明之CH3(S-S)-工程改造之多特異性抗體，其包含第一多肽及第二多肽，其中在抗體之三級結構中，第一多肽之CH3域及第二多肽之CH3域形成位於各別抗體CH3域之間的界面，其中第一多肽之CH3域及第二多肽之CH3域之各別胺基酸序列各包含位於抗體之三級結構中之該界面內之一組胺基酸，在位於一個多肽之CH3域中之界面中的該組胺基酸中，第一胺基酸經半胱胺酸取代；且在位於另一多肽之CH3域中之界面中的該組胺基酸中，第二胺基酸經半胱胺酸取代，其中第二胺基酸面向界面內之第一胺基酸，以使得一個多肽之CH3域與另一多肽之CH3域之間的二硫橋鍵可經由引入之半胱胺酸殘基形成。

【0220】 在CH3(S-S)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，CH3域藉由CH3域中之一者中之E356C或S354C突變及另一CH3域中之Y349C突變而二硫鍵穩定(根據Kabat之EU索引編號)。在CH3(S-S)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，CH3域藉由CH3域中之一者中之S354C突變及另一CH3域中之Y349C突變而二硫鍵穩定(根據Kabat之EU

索引編號)。

【0221】 在多特異性抗體之另一較佳實施例中，CH3域根據杵臼技術而二硫鍵穩定且改變。根據此實施例之多特異性抗體在本文中亦稱為「CH3(KSS)-工程改造之多特異性抗體」(其中縮寫「K」表示杵臼技術且「SS」表示二硫鍵穩定)。因此，根據此實施例，在CH3(KSS)-工程改造之多特異性抗體內，CH3域藉由以下而改變以促進雜二聚：在CH3域中之一者中藉由至少一個原始胺基酸殘基經側鏈體積大於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基取代產生隆凸；及在CH3域中之另一者中藉由至少一個原始胺基酸殘基經側鏈體積小於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基取代產生空腔，以使得在CH3域中之一者中產生之隆凸可定位於CH3域中之另一者中產生之空腔中；且在各CH3域中額外引入至少一個半胱胺酸殘基，以使得在CH3域之間形成二硫鍵。

【0222】 換言之，此實施例係關於一種根據本發明之CH3(KSS)-工程改造之多特異性抗體，其包含第一多肽及第二多肽，其中在抗體之三級結構中，第一多肽之CH3域及第二多肽之CH3域形成位於各別抗體CH3域之間的界面，其中第一多肽之CH3域及第二多肽之CH3域之各別胺基酸序列各包含位於抗體之三級結構中之該界面內之一組胺基酸，

- 其中，在位於一個多肽之CH3域中之界面中的該組胺基酸中，至少一個胺基酸殘基經側鏈體積大於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基取代，藉此在界面內產生隆凸，其中隆凸位於一個多肽之CH3域中，且其中隆凸可定位於位於界面內之另一多肽之CH3域中的空腔中；及

- 其中，在位於另一多肽之CH3域中之界面中的該組胺基酸中，至少一個胺基酸殘基經側鏈體積小於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基取代，藉

此在界面內產生空腔，其中空腔位於另一多肽之CH₃域中，且其中位於一個多肽之CH₃域中之界面內之隆凸可定位於空腔中；且其中

- 在位於一個多肽之CH₃域中之界面中的該組胺氨基酸中，第一胺基酸經半胱胺酸取代；且在位於另一多肽之CH₃域中之界面中的該組胺氨基酸中，第二胺基酸經半胱胺酸取代，其中第二胺基酸面向界面內之第一胺基酸；以使得一個多肽之CH₃域與另一多肽之CH₃域之間的二硫橋鍵可經由引入之半胱胺酸殘基形成。

【0223】 在根據本發明之該CH₃(KSS)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，在「杵」鏈之CH₃域中引入E356C或S354C突變，且在「臼」鏈之CH₃域中引入Y349C突變。

【0224】 在根據本發明之該CH₃(KSS)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，側鏈體積大於之原始胺基酸殘基之該胺基酸殘基選自R、F、Y及W。

【0225】 在根據本發明之該CH₃(KSS)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，側鏈體積小於原始胺基酸殘基之該胺基酸殘基選自A、S、T及V。

【0226】 在根據本發明之該CH₃(KSS)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，側鏈體積大於原始胺基酸殘基之該胺基酸殘基選自R、F、Y及W；且側鏈體積小於原始胺基酸殘基之該胺基酸殘基選自A、S、T及V。

【0227】 在根據本發明之該CH₃(KSS)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，側鏈體積大於原始胺基酸殘基之該胺基酸殘基選自R、F、Y及W；且側鏈體積小於原始胺基酸殘基之該胺基酸殘基選自A、S、

T及V，且CH3域藉由CH3域中之一者中之E356C或S354C突變(在一個實施例中係S354C突變)及另一CH3域中之Y349C突變而二硫鍵穩定(根據Kabat之EU索引編號)。

【0228】 在根據本發明之該CH3(KSS)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，一個多肽(包含「杵」之多肽)之CH3域包含T366W突變，且另一多肽(包含「臼」之多肽)之CH3域包含T366S、L368A及Y407V突變(根據Kabat之EU索引編號)，且CH3域藉由CH3域中之一者中之E356C或S354C突變(在一個實施例中係S354C突變)及另一CH3域中之Y349C突變而二硫鍵穩定(根據Kabat之EU索引編號)。

【0229】 在根據本發明之該CH3(KSS)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，一個多肽(包含「杵」之多肽)之CH3域包含T366W及G407Y突變，且另一多肽(包含「臼」之多肽)之CH3域包含T366S、L368A及Y407V突變(根據Kabat之EU索引編號)，且CH3域藉由CH3域中之一者中之E356C或S354C突變(在一個實施例中係S354C突變)及另一CH3域中之Y349C突變而二硫鍵穩定(根據Kabat之EU索引編號)。

【0230】 在根據本發明之該CH3(KSS)-工程改造之多特異性抗體之另一實施例中，一個多肽(包含「杵」之多肽)之CH3域包含T366W、R409D及K370E突變，且另一多肽(包含「臼」之多肽)之CH3域包含T366S、L368A、Y407V、D399K及E357K突變(根據Kabat之EU索引編號)，且CH3域藉由CH3域中之一者中之E356C或S354C突變(在一個實施例中係S354C突變)及另一CH3域中之Y349C突變而二硫鍵穩定(根據Kabat之EU索引編號)。

【0231】 在多特異性抗體之另一較佳實施例中，CH3域藉由在

CH3/CH3域-界面中之特定胺基酸位置引入具有相反電荷之帶電荷胺基酸而二硫鍵穩定且改變。根據此實施例之多特異性抗體在本文中亦稱為「CH3(+/-/SS)-工程改造之多特異性抗體」(其中縮寫「+/-」表示具有相反電荷之胺基酸且「SS」表示二硫鍵穩定)。因此，根據此實施例，在CH3((+/-/SS)-工程改造之多特異性抗體內，CH3域藉由以下而改變以促進雜二聚：CH3域中之一者中之至少一個原始胺基酸殘基經帶正電荷胺基酸取代；且CH3域中之另一者中之至少一個原始胺基酸殘基經帶負電荷胺基酸取代；且在各CH3域中額外引入至少一個半胱胺酸殘基，以使得在CH3域之間形成二硫鍵。

【0232】換言之，此實施例係關於一種根據本發明之CH3(+/-/SS)-工程改造之多特異性抗體，其包含第一多肽及第二多肽，其中在抗體之三級結構中，第一多肽之CH3域及第二多肽之CH3域形成位於各別抗體CH3域之間的界面，其中第一多肽之CH3域及第二多肽之CH3域之各別胺基酸序列各包含位於抗體之三級結構中之該界面內之一組胺基酸，

- 其中，在位於一個多肽之CH3域中之界面中的該組胺基酸中，第一胺基酸經帶正電荷胺基酸取代；且

- 其中，在位於另一多肽之CH3域中之界面中的該組胺基酸中，第二胺基酸經帶負電荷胺基酸取代；且其中

- 在位於一個多肽之CH3域中之界面中的該組胺基酸中，第一胺基酸經半胱胺酸取代；且在位於另一多肽之CH3域中之界面中的該組胺基酸中，第二胺基酸經半胱胺酸取代，其中第二胺基酸面向界面內之第一胺基酸；以使得一個多肽之CH3域與另一多肽之CH3域之間的二硫橋鍵可經由引入之半胱胺酸殘基形成。

【0233】 在本發明之一個實施例中，使多特異性抗體之第三結合位點二硫鍵穩定。因此， VH_3 及 VL_3 域藉由在 VH_3 域中引入至少一個半胱胺酸殘基且在 VL_3 域中引入一個半胱胺酸殘基以使得在 VH_3 與 VL_3 域之間形成二硫鍵而改變。在本發明之一個實施例中，多特異性抗體之第三結合位點藉由在以下位置引入半胱胺酸殘基以在 VH_3 與 VL_3 域之間形成二硫鍵而二硫鍵穩定(根據Kabat編號)：

- VH_3 之位置44處及 VL_3 之位置100處；
- VH_3 之位置105處及 VL_3 之位置43處；或
- VH_3 之位置101處及 VL_3 之位置100處。

【0234】 在一個較佳實施例中，第三結合位點藉由在 VH_3 域中在位置44處及在 VL_3 域中在位置100處引入半胱胺酸殘基而二硫鍵穩定。

【0235】 在本發明之一個較佳實施例中，使多特異性抗體之第三結合位點二硫鍵穩定且使 $CH3$ 域二硫鍵穩定。

【0236】 不受此理論束縛，至少兩個由根據本發明之多特異性抗體之改變的多肽之不同結構域中之此修飾形成之二硫鍵替換野生型IgG鉸鏈二硫鍵相互作用，且藉此支持雜二聚，同時使抗原近接第三結合位點。

【0237】 在本發明之一個實施例中，多特異性抗體之第一及/或第二結合位點亦藉由彼此獨立地在以下位置引入半胱胺酸殘基以在 VH 與 VL 域之間形成二硫鍵而二硫鍵穩定(根據Kabat編號)：

- VH 之位置44處及 VL 之位置100處；
- VH 之位置105處及 VL 之位置43處或
- VH 之位置101處及 VL 之位置100處。

【0238】 在一個實施例中，根據本發明之 $CH3(S-S)$ -工程改造之多

特異性抗體之第三結合位點藉由在以下位置引入半胱胺酸殘基以在VH₃與VL₃域之間形成二硫鍵而二硫鍵穩定(根據Kabat編號)：

- VH₃之位置44處及VL₃之位置100處；
- VH₃之位置105處及VL₃之位置43處；或
- VH₃之位置101處及VL₃之位置100處。

【0239】 在本發明之一個較佳實施例中，根據本發明之CH3(S-S)-工程改造之多特異性抗體之第三結合位點藉由在VH₃域中在位置44處及在VL₃域中在位置100處引入半胱胺酸殘基而二硫鍵穩定。

【0240】 在本發明之另一較佳實施例中，根據本發明之CH3(S-S)-工程改造之多特異性抗體之第三結合位點藉由在VH₃域中在位置44處及在VL₃域中在位置100處引入半胱胺酸殘基而二硫鍵穩定；且CH3域藉由CH3域中之一者中之E356C或S354C突變及另一CH3域中之Y349C突變而二硫鍵穩定(根據Kabat之EU索引編號)。

【0241】 在本發明之另一較佳實施例中，雜二聚藉由CH3域內之杵臼修飾支持，且另外，分別使多特異性抗體之第三結合位點及CH3域二硫鍵穩定。在根據此實施例之多特異性抗體中，杵臼修飾之重鏈之雜二聚進一步藉由人工鏈間二硫鍵支持，該二硫鍵(與已知杵臼方法相反)不位於CH3域內，但處於不同結構域中(亦即在VH₃與VL₃域之間)。在根據此實施例之抗體內，第三結合模組(包含VH₃-CH3及VL₃-CH3多肽)之雜二聚藉由四種不同相互作用促進：(i) VH₃與VL₃之間的天然相互作用、(ii) VH₃/VL₃界面中之二硫鍵穩定、(iii) CH3/CH3界面中之二硫鍵穩定；及(iv) CH3/CH3界面中之杵臼修飾。由此，促進雜二聚體之形成而非均二聚體形成，且改良抗體之穩定性。

【0242】 在一個實施例中，根據本發明之CH3(KSS)-工程改造之多特異性抗體之第三結合位點藉由在以下位置引入半胱胺酸殘基以在VH₃與VL₃域之間形成二硫鍵而二硫鍵穩定(根據Kabat編號)：

- VH₃之位置44處及VL₃之位置100處；
- VH₃之位置105處及VL₃之位置43處；或
- VH₃之位置101處及VL₃之位置100處。

【0243】 在本發明之一個較佳實施例中，根據本發明之CH3(KSS)-工程改造之多特異性抗體之第三結合位點藉由在VH₃域中在位置44處及在VL₃域中在位置100處引入半胱胺酸殘基而二硫鍵穩定。

【0244】 在本發明之另一較佳實施例中，根據本發明之CH3(KSS)-工程改造之多特異性抗體之第三結合位點藉由在VH₃域在位置44處中及在VL₃域中在位置100處引入半胱胺酸殘基而二硫鍵穩定；且側鏈體積大於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基選自R、F、Y及W；且側鏈體積小於原始胺基酸殘基之胺基酸殘基選自A、S、T及V，且CH3域藉由CH3域中之一者中之E356C或S354C突變(在一個實施例中係S354C突變)及另一CH3域中之Y349C突變而二硫鍵穩定(根據Kabat之EU索引編號)。

【0245】 在本發明之另一較佳實施例中，根據本發明之CH3(KSS)-工程改造之多特異性抗體之第三結合位點藉由在VH₃域中在位置44處及在VL₃域中在位置100處引入半胱胺酸殘基而二硫鍵穩定；且一個多肽(包含「杵」之多肽)之CH3域包含T366W突變，且另一多肽(包含「臼」之多肽)之CH3域包含T366S、L368A及Y407V突變(根據Kabat之EU索引編號)，且CH3域藉由CH3域中之一者中之E356C或S354C突變(在一個實施例中係S354C突變)及另一CH3域中之Y349C突變而二硫鍵穩定(根據

Kabat之EU索引編號)。

【0246】 在本發明之另一較佳實施例中，根據本發明之CH3(KSS)-工程改造之多特異性抗體之第三結合位點藉由在VH₃域中在位置44處及在VL₃域中在位置100處引入半胱胺酸殘基而二硫鍵穩定；且一個多肽(包含「杵」之多肽)之CH3域包含T366W及G407Y突變，且另一多肽(包含「臼」之多肽)之CH3域包含T366S、L368A及Y407V突變(根據Kabat之EU索引編號)，且CH3域藉由CH3域中之一者中之E356C或S354C突變(在一個實施例中係S354C突變)及另一CH3域中之Y349C突變而二硫鍵穩定(根據Kabat之EU索引編號)。

【0247】 在本發明之另一較佳實施例中，根據本發明之CH3(KSS)-工程改造之多特異性抗體之第三結合位點藉由在VH₃域中在位置44處及在VL₃域中在位置100處引入半胱胺酸殘基而二硫鍵穩定；且一個多肽(包含「杵」之多肽)之CH3域包含T366W、R409D及K370E突變，且另一多肽(包含「臼」之多肽)之CH3域包含T366S、L368A、Y407V、D399K及E357K突變(根據Kabat之EU索引編號)，且CH3域藉由CH3域中之一者中之E356C或S354C突變(在一個實施例中係S354C突變)及另一CH3域中之Y349C突變而二硫鍵穩定(根據Kabat之EU索引編號)。

【0248】 在本發明之另一較佳實施例中，雜二聚藉由在CH3/CH3域界面中在特定胺基酸位置引入具有相反電荷將帶電荷胺基酸支持，且另外，分別使多特異性抗體之第三結合位點及CH3結構域二硫鍵穩定。在根據此實施例之多特異性抗體中，經修飾多肽之雜二聚進一步藉由人工鏈間二硫鍵支持，該二硫鍵不位於CH3域內，但處於不同結構域中(亦即在VH₃與VL₃域之間)。在一個實施例中，根據本發明之CH3(+/-/SS)-工程改

造之多特異性抗體之第三結合位點藉由在以下位置引入半胱胺酸殘基以在VH₃與VL₃域之間形成二硫鍵而二硫鍵穩定(根據Kabat編號)：

- VH₃之位置44處及VL₃之位置100處；
- VH₃之位置105處及VL₃之位置43處；或
- VH₃之位置101處及VL₃之位置100處。

【0249】 在本發明之一個較佳實施例中，根據本發明之CH3(+/-/SS)-工程改造之多特異性抗體之第三結合位點藉由在VH₃域中在位置44處及在VL₃域中在位置100處引入半胱胺酸殘基而二硫鍵穩定。

【0250】 用於修飾多特異性抗體之重鏈之CH3域(除「杵臼」技術之外)以便加強雜二聚之其他技術在此項技術中已知。本文涵蓋此等技術，尤其WO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012/058768、WO 2013/157954及WO 2013/096291中所述之技術，作為與根據本發明之多特異性抗體組合的「杵臼技術」之替代方案。包括用以支持雜二聚之此等修飾中之一者的多特異性抗體在本文中進一步稱為「CH3-工程改造之」多特異性抗體。

【0251】 根據EP 1870459中所述之方法，CH3域之雜二聚係基於在第一與第二重鏈之間的CH3/CH3域-界面中之特定胺基酸位置引入具有相反電荷之帶電荷胺基酸，(在本文中進一步稱為「CH3(+/-)-工程改造之多特異性抗體」)。

【0252】 在根據本發明之多特異性抗體之一個實施例中，使用WO 2013/157953中所描述之方法來支持多特異性抗體之第一多肽及第二多肽之雜二聚。在根據本發明之該CH3-工程改造之多特異性抗體之一個實施

例中，在一個多肽之CH3域中，位置366處之胺基酸T (根據Kabat之EU索引編號)經K取代；且在另一多肽之CH3域中，位置351處之胺基酸L (根據Kabat之EU索引編號)經D取代。在根據本發明之該CH3-工程改造之多特異性抗體之另一實施例中，在一個多肽之CH3域中，位置366處之胺基酸T (根據Kabat之EU索引編號)經K取代，且位置351處之胺基酸L (根據Kabat之EU索引編號)經K取代；且在另一多肽之CH3域中，位置351處之胺基酸L (根據Kabat之EU索引編號)經D取代。

【0253】 在根據本發明之該CH3-工程改造之多特異性抗體之另一實施例中，在一個多肽之CH3域中，位置366處之胺基酸T (根據Kabat之EU索引編號)經K取代，且位置351處之胺基酸L (根據Kabat之EU索引編號)經K取代；且在另一多肽之CH3域中，位置351處之胺基酸L (根據Kabat之EU索引編號)經D取代。另外，以下取代中之至少一者包含於另一多肽之CH3域中：位置349處之胺基酸Y (根據Kabat之EU索引編號)經E取代，位置349處之胺基酸Y (根據Kabat之EU索引編號)經D取代且位置368處之胺基酸L (根據Kabat之EU索引編號)經E。在一個實施例中，位置368處之胺基酸L (根據Kabat之EU索引編號)經E取代。

【0254】 在根據本發明之多特異性抗體之一個實施例中，使用WO 2012/058768中所描述之方法來支持多特異性抗體之第一多肽及第二多肽之雜二聚。在根據本發明之該CH3-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，在一個多肽之CH3域中，位置351處之胺基酸L (根據Kabat之EU索引編號)經Y取代且位置407處之胺基酸Y (根據Kabat之EU索引編號)經A取代；且在另一多肽之CH3域中，位置366處之胺基酸T (根據Kabat之EU索引編號)經A取代且位置409處之胺基酸K (根據Kabat之EU索引編號)經F

取代。在另一實施例中，除前述取代以外，在另一多肽之CH3域中，位置411 (原先係T)、399 (原先係D)、400 (原先係S)、405 (原先係F)、390 (原先係N)及392 (原先係K)處之胺基酸中之至少一者經取代。較佳取代係：

- 位置411處之胺基酸T (根據Kabat之EU索引編號)經選自N、R、Q、K、D、E及W之胺基酸取代；
- 位置399處之胺基酸D (根據Kabat之EU索引編號)經選自R、W、Y及K之胺基酸取代；
- 位置400處之胺基酸S (根據Kabat之EU索引編號)經選自E、D、R及K之胺基酸取代；
- 位置405處之胺基酸F (根據Kabat之EU索引編號)經選自I、M、T、S、V及W之胺基酸取代；
- 位置390處之胺基酸N (根據Kabat之EU索引編號)經選自R、K及D之胺基酸取代；且
- 位置392處之胺基酸K (根據Kabat之EU索引編號)經選自V、M、R、L、F及E之胺基酸取代。

【0255】 在根據本發明之該CH3-工程改造之多特異性抗體(根據WO 2012/058768工程改造)之另一實施例中，在一個多肽之CH3域中，位置351處之胺基酸L (根據Kabat之EU索引編號)經Y取代，且位置407處之胺基酸Y (根據Kabat之EU索引編號)經A取代；且在另一多肽之CH3域中，位置366處之胺基酸T (根據Kabat之EU索引編號)經V取代且，位置409處之胺基酸K (根據Kabat之EU索引編號)經F取代。在根據本發明之該CH3-工程改造之多特異性抗體之另一實施例中，在一個多肽之CH3域中，位置

407處之胺基酸Y (根據Kabat之EU索引編號)經A取代；且在另一多肽之CH3域中，位置366處之胺基酸T (根據Kabat之EU索引編號)經A取代，且位置409處之胺基酸K (根據Kabat之EU索引編號)經F取代。在該上文最後所述之實施例中，在該另一多肽之CH3域中，位置392處之胺基酸K (根據Kabat之EU索引編號)經E取代，位置411處之胺基酸T (根據Kabat之EU索引編號)經E取代，位置399處之胺基酸D (根據Kabat之EU索引編號)經R取代且位置400處之胺基酸S (根據Kabat之EU索引編號)經R取代。

【0256】 在根據本發明之多特異性抗體之一個實施例中，使用WO 2011/143545中所描述之方法來支持多特異性抗體之第一多肽及第二多肽之雜二聚。在根據本發明之該CH3-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，在位置368及/或409引入兩種多肽之CH3域中之胺基酸修飾。

【0257】 在根據本發明之多特異性抗體之一個實施例中，使用WO 2011/090762中所描述之方法來支持多特異性抗體之第一多肽及第二多肽之雜二聚。WO 2011/090762係關於根據「杵臼」技術之胺基酸修飾。在根據本發明之該CH3(KiH)-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，在一個多肽之CH3域中，位置366處之胺基酸T (根據Kabat之EU索引編號)經W取代；且在另一多肽之CH3域中，位置407處之胺基酸Y (根據Kabat之EU索引編號)經A取代。在根據本發明之該CH3(KiH)-工程改造之多特異性抗體之另一實施例中，在一個多肽之CH3域中，位置366處之胺基酸T (根據Kabat之EU索引編號)經Y取代；且在另一多肽之CH3域中，位置407處之胺基酸Y (根據Kabat之EU索引編號)經T取代。

【0258】 在根據本發明之多特異性抗體(其為IgG2同型)之一個實施例中，使用WO 2011/090762中所描述之方法來支持多特異性抗體之第一

多肽及第二多肽之雜二聚。

【0259】 在根據本發明之多特異性抗體之一個實施例中，使用WO 2009/089004中所描述之方法來支持多特異性抗體之第一多肽及第二多肽之雜二聚。在根據本發明之該CH3-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，在一個多肽之CH3域中，位置392處之胺基酸K或N（根據Kabat之EU索引編號）經帶負電胺基酸（在一個較佳實施例中經E或D，在一個較佳實施例中經D）取代；且在另一多肽之CH3域中，位置399處之胺基酸D、位置356處之胺基酸E或D或位置357處之胺基酸E（根據Kabat之EU索引編號）經帶正電胺基酸（在一個較佳實施例中經K或R，在一個較佳實施例中經K，在一個較佳實施例中，位置399或356處之胺基酸經K取代）取代。在另一實施例中，除前述取代以外，在一個多肽之CH3域中，位置409處之胺基酸K或R（根據Kabat之EU索引編號）經帶負電胺基酸（在一個較佳實施例中經E或D，在一個較佳實施例中經D）取代。在甚至另一實施例中，另外或替代前述取代，在一個多肽之CH3域中，位置439處之胺基酸K及/或位置370處之胺基酸K（根據Kabat之EU索引編號）彼此獨立地經帶負電胺基酸（在一個較佳實施例中經E或D，在一個較佳實施例中經D）取代。

【0260】 在根據本發明之多特異性抗體之一個實施例中，使用WO 2007/147901中所描述之方法來支持多特異性抗體之第一多肽及第二多肽之雜二聚。在根據本發明之該CH3-工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，在一個多肽之CH3域中，位置253處之胺基酸K（根據Kabat之EU索引編號）經E取代，位置282處之胺基酸D（根據Kabat之EU索引編號）經K取代且位置322處之胺基酸K（根據Kabat之EU索引編號）經D取代；且在另一多肽之CH3域中，位置239處之胺基酸D（根據Kabat之EU索引編號）經K取

代，位置240處之胺基酸E (根據Kabat之EU索引編號)經K取代且位置292處之胺基酸K (根據Kabat之EU索引編號)經D取代。

【0261】 在根據本發明之多特異性抗體之一個實施例中，使用WO 2007/110205中所描述之方法來支持多特異性抗體之第一多肽及第二多肽之雜二聚。

【0262】 另外或替代藉由以上鑑定之雜二聚策略工程改造CH3域，引入額外鏈間二硫橋鍵使雜二聚體穩定(Atwell, S.等人，J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35；Merchant, A.M.等人，Nature Biotech. 16 (1998) 677-681)。此舉在本文中亦稱為「CH3域之二硫鍵穩定」。

【0263】

V. 重組方法及組合物

根據本發明之多特異性抗體可使用例如如US 4,816,567中所述之重組方法及組合物產生。在一個實施例中，提供一或多種編碼本文所述之多特異性抗體之分離之核酸。此類核酸可編碼包含一個環形融合多肽之胺基酸序列，且視情況亦編碼包含第二環形融合多肽(例如二環形融合多肽之第一環形融合多肽及第二環形融合多肽)之胺基酸序列。在另一實施例中，提供一或多種包含此類核酸之載體(例如表現載體)。在另一實施例中，提供一種包含此類核酸之宿主細胞。在一個此類實施例中，在根據本發明之多特異性抗體之情況下，宿主細胞包含以下(例如用以下轉型)：第一載體，其包含編碼包含第一環形融合多肽之胺基酸序列之核酸，及第二載體，其包含編碼包含第二環形融合多肽之胺基酸序列之核酸，或包含此等兩個核酸之單個載體。在一個實施例中，宿主細胞係真核細胞，例如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或淋巴細胞(例如Y0、NS0、Sp2/0細胞)。在一個

實施例中，提供一種製造根據本發明之多特異性抗體之方法，其中該方法包含在適用於表現多特異性抗體之條件下培養如上文所提供之包含編碼多特異性抗體之核酸之宿主細胞，及視情況自宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收多特異性抗體。

【0264】 對於重組產生根據本發明之多特異性抗體，將例如如上文所述之編碼環形融合多肽之核酸分離且插入至一或多種載體中以便在宿主細胞中進一步選殖及/或表現。此類核酸可容易使用習知程序產生。

【0265】 適用於選殖或表現編碼多特異性抗體之載體的宿主細胞包括本文所述之原核或真核細胞。舉例而言，根據本發明之多特異性抗體可在細菌中尤其在不需糖基化及Fc效應功能時產生。關於在細菌中表現抗體片段及多肽，參見例如US 5,648,237、US 5,789,199及US 5,840,523 (亦參見Charlton, K.A., 於: *Methods in Molecular Biology*, 第248卷, Lo, B.K.C. (編), Humana Press, Totowa, NJ (2003), 第245-254頁, 描述在大腸桿菌中表現抗體片段)。在表現之後，可以可溶性溶離份自細菌細胞糊狀物分離多特異性抗體且其可進一步純化。

【0266】 除原核生物以外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物係適用於編碼環形融合多肽之載體之選殖或表現宿主，包括糖基化路徑已「人類化」之真菌及酵母菌株，從而產生具有部分或全部人類糖基化模式之根據本發明之多特異性抗體(參見Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414; Li, H.等人, *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215)。

【0267】 適用於表現根據本發明之糖基化多特異性抗體之宿主細胞亦源自多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別出許多可與昆蟲細胞結合使用，尤其用於轉染

草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞之桿狀病毒株。

【0268】植物細胞培養物亦可用作宿主(參見例如US 5,959,177、US 6,040,498、US 6,420,548、US 7,125,978及US 6,417,429 (描述在轉殖基因植物中生產抗體之PLANTIBODIES™技術))。

【0269】脊椎動物細胞亦可用作宿主。舉例而言，適於在懸浮液中生長之哺乳動物細胞株可為適用的。適用的哺乳動物宿主細胞株之其他實例係經SV40 (COS-7)轉型之猴腎CV1細胞株；人類胚胎腎細胞株(如例如在Graham, F.L.等人，J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74中所述之293或293細胞)；幼倉鼠腎細胞(BHK)；小鼠塞特利氏細胞(mouse sertoli cell) (如例如在Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252中所述之TM4細胞)；猴腎細胞(CV1)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76)；人類子宮頸癌細胞(HELA)；犬腎細胞(MDCK)；水牛鼠肝細胞(buffalo rat liver cell) (BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝細胞(Hep G2)；小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562)；如例如在Mather, J.P.等人，Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68中所述之TRI細胞；MRC 5細胞；及FS4細胞。其他適用的哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，其包括DHFR⁻ CHO細胞(Urlaub, G.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220)；及骨髓瘤細胞株，諸如Y0、NS0及Sp2/0。關於適用於抗體產生之某些哺乳動物宿主細胞株之綜述，參見例如Yazaki, P.及Wu, A.M., Methods in Molecular Biology，第248卷, Lo, B.K.C. (編), Humana Press, Totowa, NJ (2004)，第255-268頁。

【0270】

VI. 分析

根據本發明之多特異性抗體可藉由此項技術中已知用於測定多肽與其標靶之結合的各種分析針對其物理/化學特性及/或生物活性進行鑑定、篩選或表徵。

【0271】

VII. 免疫結合物

本發明亦提供免疫結合物，其包含與一或多種諸如化學治療劑或藥物、生長抑制劑、毒素(例如蛋白質毒素、細菌性、真菌性、植物或動物來源之酶促活性毒素或其片段)或放射性同位素之細胞毒性劑結合之根據本發明之多特異性抗體。

【0272】 在一個實施例中，免疫結合物係根據本發明之多特異性抗體-藥物結合物，其中根據本發明之多特異性抗體與一或多種藥物結合，該等藥物包括(但不限於)類美登素(maytansinoid) (參見US 5,208,020、US 5,416,064及EP 0 425 235 B1)；奧瑞他汀(auristatin)，諸如單甲基奧瑞他汀藥物藥物DE及DF (MMAE及MMAF) (參見US 5,635,483、US 5,780,588及US 7,498,298)；海兔毒素(dolastatin)；卡奇黴素(calicheamicin)或其衍生物(參見US 5,712,374、US 5,714,586、US 5,739,116、US 5,767,285、US 5,770,701、US 5,770,710、US 5,773,001及US 5,877,296；Hinman, L.M.等人，Cancer Res. 53 (1993) 3336-3342；及Lode, H.N.等人，Cancer Res. 58 (1998) 2925-2928)；蒽環黴素(anthracycline)，諸如道諾黴素(daunomycin)或小紅莓(doxorubicin) (參見Kratz, F.等人，Curr. Med. Chem. 13 (2006) 477-523；Jeffrey, S.C.等人，Bioorg. Med. Chem. Lett. 16 (2006) 358-362；Torgov, M.Y.等人，Bioconjug. Chem. 16 (2005) 717-721；Nagy, A.等

人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 829-834；Dubowchik, G.M. 等人，Bioorg. & Med. Chem. Letters 12 (2002) 1529-1532；King, H.D. 等人，J. Med. Chem. 45 (2002) 4336-4343；及US 6,630,579)；甲胺喋呤(methotrexate)；長春地辛(vindesine)；紫杉烷(taxane)，諸如多烯紫杉醇(docetaxel)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、拉洛他賽(larotaxel)、替司他賽(tesetaxel)及奧他賽(ortataxel)；單端孢黴烯族毒素(trichothecene)；及 CC1065。

【0273】在另一實施例中，免疫結合物包含與酶促活性毒素或其片段結合之根據本發明之多特異性抗體，該酶促活性毒素或其片段包括(但不限於)白喉A鏈(diphtheria A chain)、白喉毒素(diphtheria toxin)之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A鏈(ricin A chain)、相思子毒素A鏈(abrin A chain)、莫迪素A鏈(modeccin A chain)、 α -帚麴菌素(alpha-sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、康乃馨(dianthin)蛋白、洋商陸(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制劑、麻瘋樹毒蛋白(curcin)、巴豆毒素(crotonin)、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制劑、白樹素(gelonin)、有絲分裂素(mitogellin)、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素(phenomycin)、伊諾黴素(enomycin)及黴菌毒素。

【0274】在另一實施例中，免疫結合物包含與放射性原子結合之根據本發明之多特異性抗體以形成放射性結合物。多種放射性同位素可用於產生放射性結合物。實例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及Lu之放射性同位素。當放射性結合物用於偵測時，其可包含用於閃爍攝影研究之放射性原子，例如 $\text{TC}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} ；或用

於核磁共振(NMR)成像(亦稱為磁共振成像，MRI)之自旋標記物，又諸如碘-123、碘-131、銥-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、釷、錳或鐵。

【0275】 可使用多種雙官能蛋白質偶合劑製造根據本發明之多特異性抗體及細胞毒性劑之結合物，該等雙官能蛋白質偶合劑係諸如N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、丁二醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta, E.S.等人，*Science* 238 (1987) 1098-1104中所述來製備。經碳14標記之1-異硫氰基苯甲基-3-甲基二伸乙三胺五乙酸(MX-DTPA)係使放射性核苷酸與環形融合多肽結合之例示性螯合劑(參見WO94/11026)。連接子可為有助於細胞毒性藥物在細胞中釋放之「可裂解連接子」。舉例而言，可使用酸不穩定連接子、肽酶敏感連接子、光不穩定連接子、二甲基連接子或含二硫鍵連接子(Chari, R.V.等人，*Cancer Res.* 52 (1992) 127-131；US 5,208,020)。

【0276】 本文之免疫結合物或ADC明確涵蓋(但不限於)用交聯試劑製備之此類結合物，該等交聯試劑包括(但本文之免疫結合物明確涵蓋(但不限於)用包括(但不限於)以下之交聯試劑製備之此類結合物：BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-

KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC及磺基-SMPB及SVSB (丁二醯亞胺基-(4-乙烯基磺)苯甲酸酯)，該等交聯試劑可購得(例如來自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。

【0277】

VIII. 用於診斷及偵測之方法及組合物

在某些實施例中，根據本發明之多特異性抗體中之任一者適用於偵測其標靶在生物樣品中之存在。如本文中所用，術語「偵測」涵蓋定量或定性偵測。在某些實施例中，生物樣品包含血液、血清、血漿、細胞或組織。

【0278】 在一個實施例中，提供一種用於診斷或偵測之方法的根據本發明之多特異性抗體。在另一態樣中，提供一種偵測根據本發明之多特異性抗體之標靶在生物樣品中之存在的方法。在某些實施例中，該方法包含使生物樣品與如根據本發明之多特異性抗體在允許多特異性抗體結合至其標靶之條件下接觸，且偵測在多特異性抗體與其標靶之間是否形成複合物。此類方法可為活體外或活體內方法。在一個實施例中，根據本發明之多特異性抗體用於選擇用於用該多特異性抗體治療之受試者。

【0279】 在某些實施例中，提供標記之根據本發明之多特異性抗體。標記包括(但不限於)直接偵測之標記或部分(諸如螢光、發色、電子緻密、化學發光及放射性標記)，以及例如經由酶反應或分子相互作用間接偵測之部分(諸如酶或配體)。例示性標記包括(但不限於)放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 及 ^{131}I ；螢光團，諸如稀土螯合物或螢光素及其衍生物；若丹明及其衍生物；丹醯基；傘酮；螢光素酶，例如螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶(US 4,737,456)；螢光素；2,3-二氫酞嗪二酮；辣根過氧

化酶(HRP)；鹼性磷酸酶； β -半乳糖苷酶；葡糖澱粉酶；溶菌酶；醣氧化酶，例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸去氫酶；雜環氧化酶，諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶，其與使用過氧化氫氧化染料前驅體之酶(諸如HRP、乳過氧化酶或微過氧化酶)偶合；生物素/抗生物素蛋白；自旋標記；噬菌體標記；穩定自由基及其類似標記。

【0280】

IX. 醫藥調配物

根據本發明之多特異性抗體之醫藥調配物藉由使具有所需純度之此類多特異性抗體與一或多種視情況選用之醫藥學上可接受之載劑混合(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A. (編) (1980))以凍乾調配物或水溶液形式製備。醫藥學上可接受之載劑在所用劑量及濃度下一般對接受者無毒，且包括(但不限於)：緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如氯化十八烷基二甲基苄基銨；氯化六羥季銨；苯紮氯銨；苄索氯銨；苯酚、丁醇或苯甲醇；對羥苯甲酸烷基酯，諸如甲基或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(低於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚(乙烯吡咯啉酮)；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖類，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子界面活性劑，諸如聚乙二醇(PEG)。本文中之例示性醫藥學上可接受之載劑進一步包括間質性藥物分散劑，諸如可溶性中性活性

玻尿酸酶糖蛋白(sHASEGP)，例如人類可溶性PH-20玻尿酸酶糖蛋白，諸如rhuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)。某些例示性sHASEGP (包括rhuPH20)及使用方法描述於US 2005/0260186及US 2006/0104968中。在一個態樣中，sHASEGP與一或多種額外葡萄糖胺聚糖酶(諸如軟骨素酶)組合。

【0281】 例示性凍乾抗體調配物描述於US 6,267,958中。抗體調配物水溶液包括US 6,171,586及WO2006/044908中所述之彼等抗體調配物水溶液，WO2006/044908中所述之調配物包括組胺酸-乙酸鹽緩衝劑。

【0282】 本文之調配物亦可含有多於一種為所治療之特定適應症所必需之活性成分，較佳為具有不會對彼此產生不利影響之補充性活性的活性成分。此類活性成分宜以有效達成預期目的之量的組合存在。

【0283】 可例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合將活性成分可包覆於所製備之微膠囊中，例如分別在膠狀藥物遞送系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米囊劑)中或於巨乳液中之羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊。此類技術揭示於Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版，Osol, A. (編) (1980)中。

【0284】 可製備持續釋放製劑。持續釋放型製劑之適合實例包括含有環形融合多肽之固體疏水性聚合物之半滲透基質，該等基質呈成形物品形式，例如膜或微膠囊。

【0285】 用於活體內投與之調配物一般係無菌的。無菌性可容易地藉由例如經由無菌過濾膜過濾來實現。

【0286】

X. 治療方法及組合物

根據本發明之多特異性抗體中之任一者可用於治療方法中。

【0287】 在一個態樣中，提供一種用作藥劑之根據本發明之多特異性抗體。在其他態樣中，提供一種用於治療疾病之根據本發明之多特異性抗體。在某些實施例中，提供一種用於治療方法之根據本發明之多特異性抗體。在某些實施例中，本發明提供一種用於治療具有疾病之個體之方法中的多特異性抗體，該方法包含向該個體投與有效量之根據本發明之多特異性抗體。在一個此類實施例中，該方法進一步包含向個體投與有效量之至少一種額外治療劑。根據以上實施例中之任一者的「個體」較佳係人類。

【0288】 在另一態樣中，本發明提供根據本發明之多特異性抗體之用途，其係用於製造或製備藥劑。在一個實施例中，藥劑用於治療疾病。在另一實施例中，藥劑用於治療疾病之方法中，該方法包含向具有該疾病之個體投與有效量之藥劑。在一個此類實施例中，該方法進一步包含向個體投與有效量之至少一種額外治療劑。根據任一以上實施例之「個體」可為人類。

【0289】 在另一態樣中，本發明提供一種用於治療疾病之方法。在一個實施例中，該方法包含向具有此類疾病之個體投與有效量之根據本發明之多特異性抗體。在一個此類實施例中，該方法進一步包含向個體投與有效量之至少一種額外治療劑。根據任一以上實施例之「個體」可為人類。

【0290】 在另一態樣中，本發明提供包含根據本發明之多特異性抗體中之任一者的醫藥調配物，其例如用於上述治療方法中之任一者中。在一個實施例中，醫藥調配物包含根據本發明之多特異性抗體中之任一者及

醫藥學上可接受之載劑。在另一實施例中，醫藥調配物包含根據本發明之多特異性抗體中之任一者及至少一種額外治療劑。

【0291】 根據本發明之多特異性抗體可單獨或與其他藥劑組合用於療法中。舉例而言，根據本發明之多特異性抗體可與至少一種額外治療劑共同投與。

【0292】 此類上述組合療法涵蓋組合投與(其中兩種或更多種治療劑包括於相同或個別調配物中)及個別投與，在此情況下，投與根據本發明之多特異性抗體可在投與額外一或多種治療劑之前、同時及/或之後進行。在一個實施例中，多特異性抗體之投與及額外治療劑之投與彼此在約一個月內；或在約一週、兩週或三週內；或在約一天、兩天、三天、四天、五天或六天內進行。適合的根據本發明之多特異性抗體亦可與輻射療法組合使用。

【0293】 根據本發明之多特異性抗體(及任何額外治療劑)可藉由任何適合的方式，包括非經腸、肺內及鼻內且必要時針對局部治療，病灶內投與來投與。非經腸輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投與。部分視投與之短期或長期性而定，可藉由任何適合的途徑(例如藉由注射，諸如靜脈內或皮下注射)給藥。本文中涵蓋各種給藥時程，包括(但不限於)單次投與或經各個時間點多次投與、快速投與及脈衝式輸注。

【0294】 根據本發明之多特異性抗體以符合良好醫學實務之方式調配、給藥及投與。在此情形中考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床病狀、病症起因、藥劑遞送部位、投與方法、投與時程及醫學從業者已知之其他因素。多特異性抗體並非必須，而是視情況與一或多種當前用於預防或治療所討論之病症之藥劑一起調

配。此類其他藥劑之有效量視調配物中存在之多特異性抗體之量、病症或治療之類型及如上文所述之其他因素而定。此等藥劑一般以相同劑量且用如本文所述之投與途徑使用，或以本文所述之劑量之約1%至99%使用，或以任何劑量且憑經驗/臨床上確定為適當之任何途徑使用。

【0295】 為預防或治療疾病，根據本發明之多特異性抗體(當單獨或與一或多種其他額外治療劑組合使用時)之適當劑量將視待治療之疾病類型、多特異性抗體之類型、疾病之嚴重程度及病程、多特異性抗體係出於預防性或治療性目的投與、先前療法、患者之臨床病史及對多特異性抗體之反應及主治醫師之判斷而定。一次性或歷經一系列治療向患者適當地投與多特異性抗體。視疾病之類型及嚴重程度而定，約1 $\mu\text{g/kg}$ 至15 mg/kg (例如0.5 mg/kg - 10 mg/kg)之多特異性抗體可為例如藉由一或多次個別投與或藉由連續輸注向患者投與之初始候選劑量。視上文所提及之因子而定，一種典型日劑量可在約1 $\mu\text{g/kg}$ 至100 mg/kg 或更高之範圍內。對於歷經數日或更長時間之重複投藥，視病狀而定，治療一般將持續直至疾病症狀之所需抑制發生為止。多特異性抗體之一種例示性劑量將在約0.05 mg/kg 至約10 mg/kg 之範圍內。因此，可向患者投與約0.5 mg/kg 、2.0 mg/kg 、4.0 mg/kg 或10 mg/kg (或其任何組合)之一或多種劑量。此類劑量可間歇投與，例如每週或每三週(例如以使得患者接收約兩至約二十，或例如約六次劑量之多特異性抗體)。可投與初始較高起始劑量，之後可投與一或多次較低劑量。然而，其他給藥方案可為適用的。此療法之進程易於藉由習知技術及分析來監測。

【0296】 應瞭解以上調配物或治療方法中之任一者可替代或除了根據本發明之多特異性抗體使用本發明之免疫結合物來實現。

【0297】

XI. 製品

在本發明之另一態樣中，提供一種含有適用於治療、預防及/或診斷病症之製品。製品包含容器及容器上或容器隨附之標籤或藥品說明書。適合的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、靜脈內溶液袋等。容器可由多種材料(諸如玻璃或塑膠)形成。容器容納組合物本身或組合物與有效治療、預防及/或診斷病狀之另一組合物之組合，且可具有無菌接取口(例如容器可為具有可由皮下注射針刺穿之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。組合物中之至少一種活性劑係根據本發明之多特異性抗體。標籤或藥品說明書指示組合物用於治療所選病狀。此外，製品可包含(a)具有其中所含之組合物之第一容器，其中該組合物包含根據本發明之多特異性抗體；及(b)具有其中所含之之組合物之第二容器，其中該組合物包含另一細胞毒性或以其他方式之治療劑。本發明之此實施例中之製品可進一步包含指示組合物可用於治療特定病狀之藥品說明書。或者或另外，製品可進一步包含第二(或第三)容器，其包含醫藥學上可接受之緩衝劑，諸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。其可進一步包括就商業及使用者觀點而言所需之其他物質，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

【0298】 本文中所引用之所有文獻(科學文獻、書籍或專利)皆以引用的方式併入。

【0299】 提供以下實例及圖示以幫助理解本發明，其真實範疇闡述於隨附申請專利範圍中。應理解，可在不偏離本發明精神之情況下對所闡述之程序進行修正。

【0300】**XII. 實例**

以下為本發明之方法及組合物之實例。應理解，考慮到上文提供之一般說明，可實施各種其他實施例。

【0301】**材料及方法****重組DNA技術**

使用標準方法操作DNA，如Sambrook, J.等人，Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所描述。根據製造商之說明使用分子生物試劑。

【0302】**基因及寡核苷酸合成**

藉由在Geneart GmbH (Regensburg, Germany)化學合成來製備所需基因區段。將合成基因片段選殖至大腸桿菌質體中以用於繁殖/擴增。藉由DNA定序檢驗次選殖基因片段之DNA序列。或者，藉由黏接化學合成之寡核苷酸或經由PCR組裝短合成DNA片段。藉由metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Germany)製備各別寡核苷酸。

【0303】**試劑**

若未另外規定，則如根據製造商之方案所提供使用所有市售化學品、抗體及套組。

【0304】

實例1

構建用於環形融合多肽之表現質體

對於如本文所報導之環形融合多肽之表現，使用包含以下功能要素之轉錄單元：

- 來自包括內含子A之人類巨細胞病毒(P-CMV)之即刻早期強化子及啟動子，
- 人類重鏈免疫球蛋白5'未轉譯區(5'UTR)，
- 鼠類免疫球蛋白重鏈信號序列，
- 編碼各別環形融合多肽之核酸，及
- 牛生長激素聚腺苷酸化序列(BGH pA)。

【0305】 除包括待表現之所需基因之表現單元/卡匣以外，基本/標準哺乳動物表現質體含有

- 允許在大腸桿菌中複製此質體之來自載體pUC18之複製起點，及
- β -內醯胺酶基因，其賦予大腸桿菌以安比西林(ampicillin)抗性。

【0306】

實例2

環形融合多肽之表現

在經懸浮液調適之HEK293F (FreeStyle 293-F細胞；Invitrogen)細胞中用轉染試劑293-free (Novagen)短暫表現環形融合多肽。

【0307】 細胞在解凍之後已在125 ml搖瓶中藉由稀釋至少四次(體積30 ml)來繼代(在37°C、7% CO₂、85%濕度、135 rpm下培育/震盪)。

【0308】 將細胞擴增至250 ml體積下 3×10^5 個細胞/毫升。三天後，細胞已分裂且以250 ml體積下 7×10^5 個細胞/毫升之密度新接種於1公升搖

瓶中。24小時後，將以大約 $1.4-2.0 \times 10^6$ 個細胞/毫升之細胞密度進行轉染。

【0309】在轉染之前，用經預加熱(水浴；37°C)之Opti-MEM (Gibco)將250 µg質體-DNA稀釋至10 ml之最終體積。將溶液輕輕混合且在室溫下培育不超過5 min。接著將333.3 µl 293-free轉染劑添加至DNA-OptiMEM溶液。此後將溶液輕輕混合且在室溫下培育15-20分鐘。混合物之總體積與250 ml HEK-細胞-培養物體積一起添加至1 L搖瓶中。

【0310】在37°C、7% CO₂、85%濕度、135 rpm下培育/震盪6或7天。

【0311】藉由在2,000 rpm、4°C下之第一離心步驟10分鐘來收集上清液。接著將上清液轉移至新離心燒瓶中以便在4,000 rpm、4°C下進行第二離心持續20分鐘。此後，經由0.22 µm瓶頂過濾器過濾無細胞上清液且儲存於冷凍器(-20°C)中。

【0312】

實例3

環形融合多肽之純化

將含有抗體之培養上清液過濾且藉由兩個層析步驟純化。使用經PBS (1 mM KH₂PO₄、10 mM Na₂HPO₄、137 mM NaCl、2.7 mM KCl) (pH 7.4)平衡之HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare)藉由親和層析來捕捉抗體。藉由用平衡緩衝劑洗滌來移除未結合蛋白質，且用50 mM檸檬酸鹽緩衝劑(pH 2.8)回收抗體，且在溶離之後立即用1 M Tris鹼(pH 9.0)中和至pH 6.0。經Superdex 200™ (GE Healthcare)之尺寸排阻層析用作第二純化步驟。在20 mM組胺酸緩衝劑、0.14 M NaCl (pH 6.0)中進行尺

寸排阻層析。用配備有Biomax-SK膜 (Millipore, Billerica, MA) 之 Ultrafree-CL離心過濾器單元濃縮含有抗體之溶液且儲存於-80°C下。

【0313】

實例4

抗Her2環形融合多肽之結合

表面電漿子共振Her2受體結合

晶片表面：CM5-晶片

T：37°C及25°C，分別用於分析設定1及2

運作緩衝劑：PBS + 0.05% (v/v) Tween 20

稀釋緩衝劑：運作緩衝劑 + 0.1 % BSA

分析物：c(HER2 ECD) = 0.41-900 nM，用於分析設定1；

c(二聚抗Her2康特斯體) = 3.7-300 nM，

c(曲妥珠單抗) = 3.7-300 nM，用於分析設定2

配體：用於分析設定1之經由抗人類Fc區抗體結合之二聚抗Her2康特斯體、曲妥珠單抗；用於分析設定2之經由帕妥珠單抗結合之Her2-ECD。

【0314】反應單位與分子量成正比。分析物結合之理論最大值係根據Her2 ECD之已知結合程度。100% = 1分子二聚抗Her2康特斯體或曲妥珠單抗分別結合至2分子HER2 ECD。

【0315】

實例5

ADCC分析-ACEA

BT-474細胞用阿庫酶(Accutase)「穩定」，在培養基中計數且使達至 2×10^5 個細胞/毫升之細胞密度。將50 μ l培養基用移液管移取至96孔盤之

各孔中，經ACEA量測本底效應，且最終添加50 μ l細胞懸浮液/孔(=10,000個細胞/孔)。將盤置放於ACEA中且在15分鐘之後量測細胞指數。接著藉由用移液管移取而移除培養基，用AIM-V培養基進行洗滌步驟，至添加50 μ l三種不同濃度之抗體。對自然殺手細胞計數且置放於AIM-V中至 6×10^5 之細胞密度。將50 μ l (30,000個細胞/孔 ad E/T 3:1添加於ACEA中，且每5分鐘量測細胞指數。在24小時之後，停止實驗且計算2及4小時後之ADCC。

【0316】

實例6

質譜分析

自Roche Diagnostics GmbH獲得PNGase F (14.3 U/ μ l；磷酸鈉、EDTA及甘油於溶液中)。自凍乾物新鮮重構在IgG抗體之鉸鏈區中特異性裂解之蛋白酶，之後消化。

【0317】

PNGase F之酶促去糖基化

用10 mM磷酸鈉緩衝劑(pH 7.1)將50 μ g康特斯體稀釋至0.6 mg/ml之最終濃度，且在37°C下用1 μ l PNGase F去糖基化16小時。

【0318】

酶促裂解

用200 mM Tris緩衝劑(pH 8.0)將去糖基化樣品稀釋至0.5 mg/ml之最終濃度，且隨後在37°C下用IgG特異性蛋白酶消化1小時。

【0319】

ESI-QTOF質譜分析

藉由HPLC經葡聚糖凝膠G25管柱(Kronlab, 5×250 mm, TAC05/250G0-SR)使用40%乙腈以及2%甲酸(v/v)將樣品去鹽。經配備有TriVersa NanoMate來源(Advion)之maXis 4G UHR-QTOF MS系統(Bruker Daltonik)經由ESI-QTOF MS測定總質量。用碘化鈉進行校準(Waters ToF G2-樣品套組2部分：700008892-1)。對於消化康特斯體，在1000-4000 m/z (ISCID：30 eV)下實現數據獲取。原始質譜進行評估且轉化為個別相對莫耳質量。為使結果可視化，使用專有軟體產生去卷積質譜。

【0320】

實例7

三Fab-康特斯體之純化

將含有抗體之培養上清液過濾且藉由兩個層析步驟純化。由於缺乏官能性Fc區(因分子缺乏CH₂域)，因此藉由標準蛋白質L (KappaSelect)親和力層析法純化三Fab-康特斯體。使用經PBS (1 mM KH₂PO₄、10 mM Na₂HPO₄、137 mM NaCl、2.7 mM KCl)(pH 7.4)平衡之KappaSelect (GE Healthcare)藉由親和力層析法捕捉抗體。藉由用平衡緩衝劑洗滌來移除未結合蛋白質，且用50 mM檸檬酸鹽緩衝劑(pH 2.8)回收抗體，且在溶離之後立即用1 M Tris鹼(pH 9.0)中和至pH 6.0。經Superdex 200™ (GE Healthcare)之尺寸排阻層析用作第二純化步驟。在20 mM組胺酸緩衝劑、0.14 M NaCl (pH 6.0)中進行尺寸排阻層析。用配備有Biomax-SK膜(Millipore, Billerica, MA)之Ultrafree-CL離心過濾器單元濃縮含有抗體之溶液且儲存於-80℃下。

【0321】

實例8

對三Fab-康特斯體之FACS分析

應用FACS分析以評定產生之三Fab-康特斯體之結合官能性。因此，使表現LeY-抗原之MCF7細胞在藉由生物素-Cy5結合物(陰性對照II)洗滌細胞之後暴露於生物素-Cy5結合物(陰性對照)(一種作為陰性對照之非結合三Fab-康特斯體)，或暴露於隨後添加有生物素-Cy5之三Fab-康特斯體，且評定細胞之螢光。圖12展示結果。

【0322】

實例9

三Fab康特斯體有效介導T細胞誘發之腫瘤細胞殺死

為評定三Fab康特斯體形式在T細胞誘發之腫瘤細胞殺死中之適用性，使用作為第三結合實體中之抗CD3結合實體(圖13)。VH及VL序列係如US 2015/0166661 A1中所述之CD3-黏合劑之例示性序列。在本文中任何抗CD3 Fv均可經取代。已簡單選擇此物質作為實例。此抗LeY/CD3三Fab康特斯體包SEQ ID NO: 36及SEQ ID NO: 37之多肽。

【0323】 抗LeY/CD3三Fab康特斯體之表現及純化(如以上事例中所概述執行)以每公升表現體積8 mg之產量實現。在考馬斯染色之SDS PAGE分析中，存在預期分子量之透明帶(圖14)。

【0324】 將LeY陽性MCF7細胞接種於96孔盤中且培育隔夜，之後暴露於不同濃度之i)作為陽性對照之抗LeY三Fab；ii)作為陰性對照之抗LeY/X三Fab，其中X不存在於MCF7細胞上；及iii)抗LeY/CD3三Fab康特斯體(參見圖15)。為評定T細胞介導之殺死，以5:1比率添加來自健康供體之全血的PBMC (經由Ficoll® Paque Plus純化根據製造商之說明書(GE

Healthcare)分離。此後使培養物保持於37℃及5% CO₂下48小時，之後評定腫瘤細胞溶解之程度(應用LDH釋放分析根據製造商之說明書(細胞毒性偵測套組(LDH)，Roche)。確定甚至在低皮莫耳範圍下之三Fab康特斯體誘導劑量依賴性殺死。與陽性對照抗LeY/CD3三Fab (約120 pM)相比，三Fab康特斯體展示明顯更低的IC₅₀值(約2.4 pM)(圖16)。

不同LeY/CD3三Fab康特斯體之表現量：

鏈1	鏈2	表現量
VH/CH1-DKTH(GGGGS)2-VL/CH3(杵-cys)-(GGGGS)2-VL/CL	VH/CH1-DKTH(GGGGS)2-VH/CH3(臼-cys)-(GGGGS)2-VL/CL	小於1 mg/L
VH/CH1-DKTH(GGGGS)2-VH/CL(杵-cys)-(GGGGS)2-VL/CL	VH/CH1-DKTH(GGGGS)2-VL/CH3(臼-cys)-(GGGGS)2-VL/CL	小於1 mg/L
VH/CH1-DKTHGGGGS-VH/CH3(杵-cys)-(GGGGS)2-VL/CL	VH/CH1-DKTHGGGGS-VL/CH3(臼-cys)-(GGGGS)2-VL/CL	小於1 mg/L
VH/CH1-DKTHGGGGS-VH/CH3(杵-cys)-(GGGGS)2-VL/CL	VL/CL-DKTHGGGGS-VL/CH3(臼-cys)-(GGGGS)2-VH/CH1	約 8 mg/L

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司(F. HOFFMANN-LA ROCHE AG)

<120> 三Fab-康特斯體(Contorsbody)

<130> P34509-WO

<140> TW 107138674

<141> 2018-10-31

<150> EP17199608.5

<151> 2017-11-01

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 98

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

35 40 45

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

Glu Ser Thr Tyr Arg Trp Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
65 70 75 80

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
85 90 95

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105

<210> 3
<211> 105
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

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

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
100 105

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 105
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 6

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 8

Gln Gln Gln Ser

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 9

Gln Gln Gln Gln Ser
1 5

<210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 10

Ser Ser Ser Gly
1

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 11
Ser Ser Ser Ser Gly
1 5

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 12
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 13
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 14
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 15
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 16

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 16

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

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 17

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

<210> 18
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 18

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

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 19
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 19

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20

<210> 20
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 20
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser

<210> 21
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 21
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 22
Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
1 5 10 15

Gly

<210> 23
<211> 693
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗Her2環形融合多肽

<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

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

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

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly
210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
225 230 235 240

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
245 250 255

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
260 265 270

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
275 280 285

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
290 295 300

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
305 310 315 320

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
325 330 335

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
340 345 350

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
355 360 365

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
370 375 380

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
385 390 395 400

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
405 410 415

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
420 425 430

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
435 440 445

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly
450 455 460

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
465 470 475 480

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
485 490 495

Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
500 505 510

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val
515 520 525

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
530 535 540

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
545 550 555 560

His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

	565		570		575
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp	580		585		590
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn	595		600		605
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu	610		615		620
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp	625		630		635
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr	645		650		655
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser	660		665		670
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Ser Gly His	675		680		685
His His His His His	690				
<210>	24				
<211>	6				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	His-標籤				
<400>	24				
His His His His His His	1		5		
<210>	25				
<211>	692				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	抗cMet環形融合多肽				
<400>	25				
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	1		5		10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr	20		25		30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
450 455 460

Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
465 470 475 480

Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
485 490 495

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly Leu
500 505 510

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Leu Pro
515 520 525

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
530 535 540

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
545 550 555 560

Tyr Cys Ala Pro Ser Tyr Tyr Tyr Gly Gly Lys His Val Ala Leu Phe
565 570 575

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
580 585 590

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
595 600 605

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
610 615 620

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
625 630 635 640

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
645 650 655

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
660 665 670

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
675 680 685

Pro Lys Ser Cys
690

<210> 26
<211> 693
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD20環形融合多肽(1)

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

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

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
225 230 235 240

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
305 310 315 320

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
405 410 415

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly
450 455 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala
465 470 475 480

Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala
485 490 495

Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser
500 505 510

Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
515 520 525

Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
530 535 540

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
545 550 555 560

Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
565 570 575

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
580 585 590

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
595 600 605

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
610 615 620

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

625	630	635	640
Ser Thr Tyr Ser	Leu Ser Ser Thr Leu	Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr	
	645	650	655
Glu Lys His Lys	Val Tyr Ala Cys	Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser	
	660	665	670
Ser Pro Val Thr	Lys Ser Phe Asn Arg	Gly Glu Cys Gly Ser Gly His	
	675	680	685
His His His His His			
690			
<210>	27		
<211>	697		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	抗CD20環形融合多肽(2)		
<400>	27		
Gln Val Gln Leu	Val Gln Ser Gly Ala	Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
1	5	10	15
Ser Val Lys Val	Ser Cys Lys Ala	Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser	
	20	25	30
Trp Ile Asn Trp	Val Arg Gln Ala	Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
	35	40	45
Gly Arg Ile Phe	Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe		
	50	55	60
Lys Gly Arg Val	Thr Ile Thr Ala Asp Lys	Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser	Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
Ala Arg Asn Val	Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly		
	100	105	110
Thr Leu Val Thr	Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
	115	120	125
Pro Leu Ala Pro	Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
	130	135	140
Gly Cys Leu Val	Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155	160

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly
210 215 220

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
405 410 415

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445

 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460

 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
 465 470 475 480

 Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys
 485 490 495

 Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln
 500 505 510

 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu
 515 520 525

 Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 530 535 540

 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr
 545 550 555 560

 Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 565 570 575

 Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 580 585 590

 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 595 600 605

 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 610 615 620

 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 625 630 635 640

 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 645 650 655

 Lys Ala Asp Tyr Gln Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 660 665 670

 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 675 680 685

Gly Ser Gly His His His His His His
690 695

<210> 28
<211> 689
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗cMet環形融合多肽向VH外-杵

<400> 28

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Leu Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Pro Ser Tyr Tyr Tyr Gly Gly Lys His Val Ala Leu Phe Ala Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys

第 20 頁(序列表)

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
485 490 495

Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
500 505 510

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr
515 520 525

Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
530 535 540

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
545 550 555 560

Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly
565 570 575

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
580 585 590

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
595 600 605

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
610 615 620

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
625 630 635 640

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
645 650 655

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
660 665 670

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
675 680 685

Cys

<210> 29
<211> 692
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗cMet環形融合多肽向VH內-杵

<400> 29

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

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val	35	40	45
Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	210	215	220
Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	225	230	235
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	245	250	255
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	260	265	270

Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	
	275						280					285				
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	
290						295					300					
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	
305					310					315					320	
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	
				325					330					335		
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	
			340					345					350			
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	
		355					360					365				
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	
	370					375					380					
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	
385					390					395					400	
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	
				405					410					415		
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	
			420					425					430			
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	
		435					440					445				
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
	450					455					460					
Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	
465					470					475					480	
Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	
			485						490					495		
Ser	Asp	Tyr	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
			500					505					510			
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr	Leu	Pro	
		515					520					525				
Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	
	530					535					540					

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
545 550 555 560

Tyr Cys Ala Pro Ser Tyr Tyr Tyr Gly Gly Lys His Val Ala Leu Phe
565 570 575

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
580 585 590

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
595 600 605

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
610 615 620

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
625 630 635 640

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
645 650 655

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
660 665 670

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
675 680 685

Pro Lys Ser Cys
690

<210> 30
<211> 685
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗cMet環形融合多肽向VH外-F1

<400> 30

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

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

Phe Ile Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Trp	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val
			100					105					110		
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
		115					120					125			
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
	130					135					140				
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
145					150					155					160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				165					170					175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
			180					185					190		
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
		195					200					205			
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
	210					215					220				
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys
225					230					235					240
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
				245					250					255	
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
			260					265					270		
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys
		275					280					285			
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
	290					295					300				
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
305					310					315					320
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
				325					330					335	

Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
			340					345					350		
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
		355					360					365			
Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys
	370					375					380				
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
385					390					395				400	
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
				405					410					415	
Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
			420					425					430		
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
		435					440					445			
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly
	450					455					460				
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala
465					470					475					480
Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala
				485					490					495	
Ser	Ser	Ser	Val	Ser	His	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
			500					505					510		
Ala	Pro	Arg	Leu	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val
		515					520					525			
Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
	530					535					540				
Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	His	Gln
545					550					555					560
Arg	Thr	Asn	Tyr	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile
				565					570					575	
Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp
			580					585					590		
Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn
		595					600					605			

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
610 615 620

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
625 630 635 640

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Ser Leu Ser Lys Ala Asp
645 650 655

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
660 665 670

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
675 680 685

<210> 31
<211> 686
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗cMet環形融合多肽向VH外-白-CH-CL-交叉

<400> 31

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

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

Phe Ile Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Asp Tyr Asn Tyr Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ser Ala Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
115 120 125

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

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
145 150 155 160

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
165 170 175

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
180 185 190

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
195 200 205

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly
210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys
225 230 235 240

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
275 280 285

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
340 345 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
355 360 365

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
370 375 380

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455 460

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr
465 470 475 480

Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
485 490 495

Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser His Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln
500 505 510

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu
515 520 525

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
530 535 540

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
545 550 555 560

Phe Cys His Gln Arg Thr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
565 570 575

Lys Leu Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
580 585 590

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
595 600 605

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
610 615 620

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
625 630 635 640

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
645 650 655

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
660 665 670

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

675	680	685
<210> 32		
<211> 683		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 抗cMet環形融合多肽向VH外-F1-VH-VL-交叉		
<400> 32		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1 5 10 15		
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser His Leu		
20 25 30		
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Trp Ile Tyr		
35 40 45		
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser		
50 55 60		
Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu		
65 70 75 80		
Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys His Gln Arg Thr Asn Tyr Pro Trp Thr		
85 90 95		
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
100 105 110		
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly		
115 120 125		
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		
130 135 140		
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		
145 150 155 160		
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
165 170 175		
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn		
180 185 190		
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro		
195 200 205		
Lys Ser Cys Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp		
210 215 220		

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
450 455 460

Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile
465 470 475 480

Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr Phe Ile Asn Trp

485 490 495

Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Tyr
500 505 510

Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Phe Tyr Asp Gln Ser Phe Gln Gly Gln Val
515 520 525

Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser
530 535 540

Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asp
545 550 555 560

Tyr Asn Tyr Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
565 570 575

Ser Ala Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
580 585 590

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
595 600 605

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
610 615 620

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
625 630 635 640

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
645 650 655

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
660 665 670

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
675 680

<210> 33
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 33

Lys Ala Lys
1

<210> 34
<211> 681

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LeY-生物素-杆

<400> 34
Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Asn Asp Asp Ser Ser Ala Ala Tyr Ser Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Leu Ala Trp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
225 230 235 240

Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	
				245					250					255		
Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gly	Asn	Ile	His	Asn	Tyr	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	
			260					265					270			
Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Lys	Thr	
		275					280					285				
Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	
	290					295					300					
Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	
305					310					315					320	
Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Trp	Ser	Ser	Ile	Tyr	Thr	Phe	Gly	Cys	Gly	
				325					330					335		
Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
		340						345					350			
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
		355					360					365				
Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
	370					375					380					
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
385					390				395						400	
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	
				405					410					415		
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	
			420					425					430			
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	
		435				440						445				
Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Val	
	450					455					460					
Leu	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Gln	
465					470					475					480	
Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ile	Ile	Val	His	Ser	Asn	Gly	
				485					490					495		
Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	
			500					505					510			

Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg
515 520 525

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg
530 535 540

Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His
545 550 555 560

Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
565 570 575

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
580 585 590

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
595 600 605

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
610 615 620

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
625 630 635 640

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
645 650 655

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
660 665 670

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
675 680

<210> 35
<211> 694
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LeY-生物素-衍

<400> 35

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

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

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Asn Asp Asp Ser Ser Ala Ala Tyr Ser Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Leu Ala Trp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val
225 230 235 240

Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser
245 250 255

Cys Lys Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys Asp Thr Phe Phe Gln Trp Val
260 265 270

Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro
275 280 285

Ala Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr
290 295 300

Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser
305 310 315 320

Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asp Thr
325 330 335

Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
340 345 350

Val Ser Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
355 360 365

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
370 375 380

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455 460

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Leu Met Thr
465 470 475 480

Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile
485 490 495

Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ile Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
500 505 510

Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
515 520 525

Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
530 535 540

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
545 550 555 560

Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe
565 570 575

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
225 230 235 240

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
245 250 255

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
260 265 270

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn
275 280 285

Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp
290 295 300

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
305 310 315 320

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Tyr
325 330 335

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln
340 345 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu
355 360 365

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

370	375	380
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn 385 390 395 400		
Tyr Lys Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu 405 410 415		
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val 420 425 430		
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln 435 440 445		
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly 450 455 460		
Gly Gly Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val 465 470 475 480		
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ile Ile 485 490 495		
Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro 500 505 510		
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser 515 520 525		
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr 530 535 540		
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys 545 550 555 560		
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu 565 570 575		
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro 580 585 590		
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu 595 600 605		
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn 610 615 620		
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser 625 630 635 640		

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
645 650 655

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
660 665 670

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
675 680 685

<210> 37
<211> 679
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LeY-CD3-白鏈

<400> 37

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ile Ile Val His Ser
20 25 30

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

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180						185						190					
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser		
		195					200					205					
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Gly		
	210					215					220						
Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala		
225					230					235					240		
Val	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser		
				245					250					255			
Leu	Leu	Asn	Ser	Arg	Thr	Arg	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln		
			260					265					270				
Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg		
		275					280					285					
Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp		
	290					295					300						
Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr		
305					310					315					320		
Tyr	Cys	Thr	Gln	Ser	Phe	Ile	Leu	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys		
				325					330					335			
Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro		
			340					345					350				
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala		
		355					360					365					
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn		
	370					375					380						
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser		
385					390					395					400		
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg		
				405					410					415			
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu		
			420					425					430				
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly		
		435					440					445					

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Lys Leu Val Glu Ser
450 455 460

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala
465 470 475 480

Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln
485 490 495

Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Asn Asp Asp
500 505 510

Ser Ser Ala Ala Tyr Ser Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
515 520 525

Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys
530 535 540

Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Ala Trp Gly
545 550 555 560

Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
565 570 575

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
580 585 590

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
595 600 605

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
610 615 620

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
625 630 635 640

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
645 650 655

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
660 665 670

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
675

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DKTHGGGGS -連接子

<400> 38

Asp Lys Thr His Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種多特異性抗體，其包含三個抗原結合位點且由兩個環形融合多肽組成，其中

a)第一環形融合多肽包含第一結合域之第一部分、第一結合域之第二部分及第三結合域之第一部分，其中

- 該第一結合域之該第一部分經由第一肽連接子與該第三結合域之該第一部分之N端融合，
- 該第一結合域之該第二部分經由第二肽連接子與該第三結合域之該第一部分之C端融合，
- 該第一結合域之該第一部分係重鏈Fab片段(VH1-CH1)或輕鏈Fab片段(VL1-CL1)，其中若該第一結合域之該第一部分係重鏈Fab片段，則該第一結合域之該第二部分係輕鏈Fab片段，或反之亦然，且
- 該第一結合域之該第一部分及該第一結合域之該第二部分彼此締合且一起形成第一抗原結合位點，

b)第二環形融合多肽包含第二結合域之第一部分、第二結合域之第二部分及該第三結合域之第二部分，其中

- 該第二結合域之該第一部分經由第三肽連接子與該第三結合域之該第二部分之N端融合，
- 該第二結合域之該第二部分經由第四肽連接子與該第三結合域之該第二部分之C端融合，
- 該第二結合域之該第一部分係重鏈Fab片段(VH2-CH1)或輕鏈

Fab片段(VL2-CL1)，其中若該第二結合域之該第一部分係重鏈Fab片段，則該第二結合域之該第二部分係輕鏈Fab片段，或反之亦然，

- 該第二結合域之該第一部分及該第二結合域之該第二部分彼此締合且一起形成第二抗原結合位點，

c)該第三結合域之該第一部分及該第三結合域之該第二部分一起形成第三抗原結合位點，其中

- 該第三結合域之該第一部分係可變重鏈-CH3域融合多肽(VH3-CH3)或可變輕鏈-CH3域融合多肽(VL3-CH3)，
- 若該第二結合域之該第一部分係可變輕鏈-CH3域融合多肽，則該第三結合域之該第二部分為可變重鏈-CH3域融合多肽，或反之亦然，
- 該第三結合域之該第一部分及該第三結合域之該第二部分彼此締合且形成該第三抗原結合位點，

其中一個恆定重鏈域3 (CH3)包含T366W突變，且另一個CH3域包含T336S、L368A及Y407V突變，其根據Kabat之EU索引編號，

其中該多特異性抗體不含恆定重鏈域2 (CH2)及鉸鏈區。

【請求項2】

如請求項1之多特異性抗體，其中該第一及/或該第二及/或該第三抗原結合位點彼此獨立地在以下位置引入半胱胺酸殘基以在該等VH與VL域之間形成二硫鍵而二硫鍵穩定(根據Kabat編號)：

VH之位置44處及VL之位置100處，

VH之位置105處及VL之位置43處，或

VH之位置101處及VL之位置100處。

【請求項3】

如請求項1至2中任一項之多特異性抗體，其中該第一、第二、第三及第四肽連接子係至少5個胺基酸之肽。

【請求項4】

如請求項1至2中任一項之多特異性抗體，其中該第一及第三肽連接子具有SEQ ID NO: 38之胺基酸序列；且該第二及第四肽連接子具有SEQ ID NO: 16之胺基酸序列。

【請求項5】

如請求項1至2中任一項之多特異性抗體，其中該VH3域之C端直接連接至該等CH3域中之一者之N端，且該VL3域之C端直接連接至該等CH3域中之另一者之N端。

【請求項6】

如請求項1至2中任一項之多特異性抗體，其中該抗體係三價抗體。

【請求項7】

如請求項1至2中任一項之多特異性抗體，其中該抗體係雙特異性抗體(該第一結合位點結合至第一抗原，該第二結合位點結合至第二抗原且該第三結合位點結合至第三抗原，其中該第一、該第二及該第三抗原中之兩者係相同抗原且另一者係不同抗原)；或三特異性抗體(該第一結合位點結合至第一抗原，該第二結合位點結合至第二抗原且該第三結合位點結合至第三抗原，其中該第一、該第二及該第三抗原係不同抗原)。

【請求項8】

如請求項1至2中任一項之多特異性抗體，其中該第一結合域之該第

一部分及該第一結合域之該第二部分藉由二硫鍵彼此共價締合，及/或其中該第二結合域之該第一部分及該第二結合域之該第二部分藉由二硫鍵彼此共價締合。

【請求項9】

如請求項1至2中任一項之多特異性抗體，其中該第三結合位點特異性結合至人類CD3。

【請求項10】

一種用於製備如請求項1至9中任一項之多特異性抗體之方法，其包含以下步驟

用表現載體轉型宿主細胞，該表現載體包含編碼該多特異性抗體之核酸，

在允許該多特異性抗體合成之條件下培養該宿主細胞，及

自該宿主細胞培養物回收該多特異性抗體。

【請求項11】

一種核酸之集合，其編碼如請求項1至9中任一項之多特異性抗體之多肽。

【請求項12】

一種表現載體，其包含如請求項11之核酸之集合。

【請求項13】

一種表現載體之集合，其各自包含如請求項11之核酸之集合中之一種核酸。

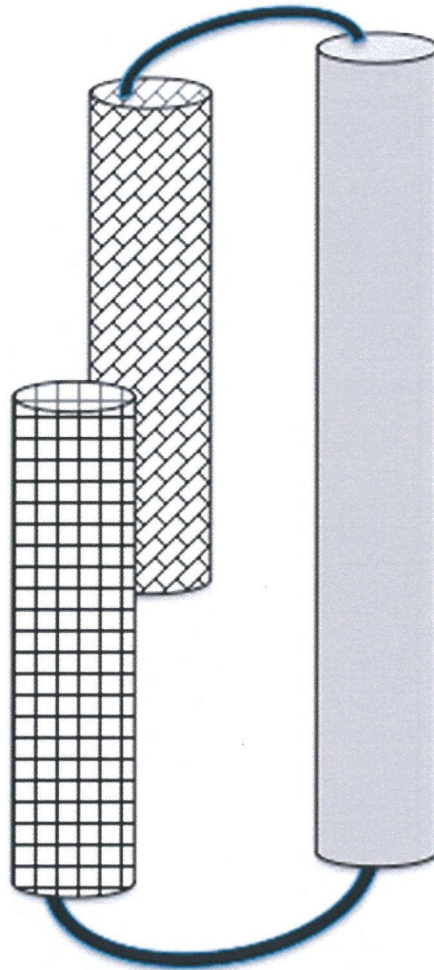
【請求項14】

一種宿主細胞，其包含如請求項11之核酸之集合。

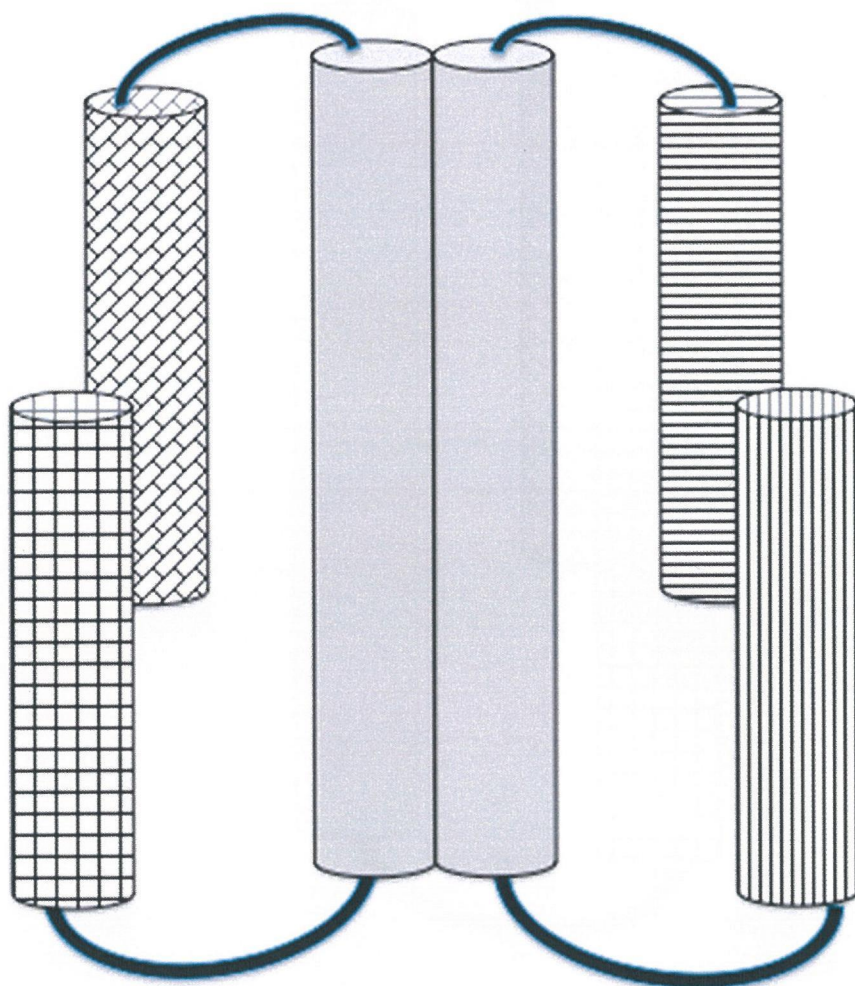
【請求項15】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至9中任一項之多特異性抗體與至少一種醫藥學上可接受之載劑的組合。

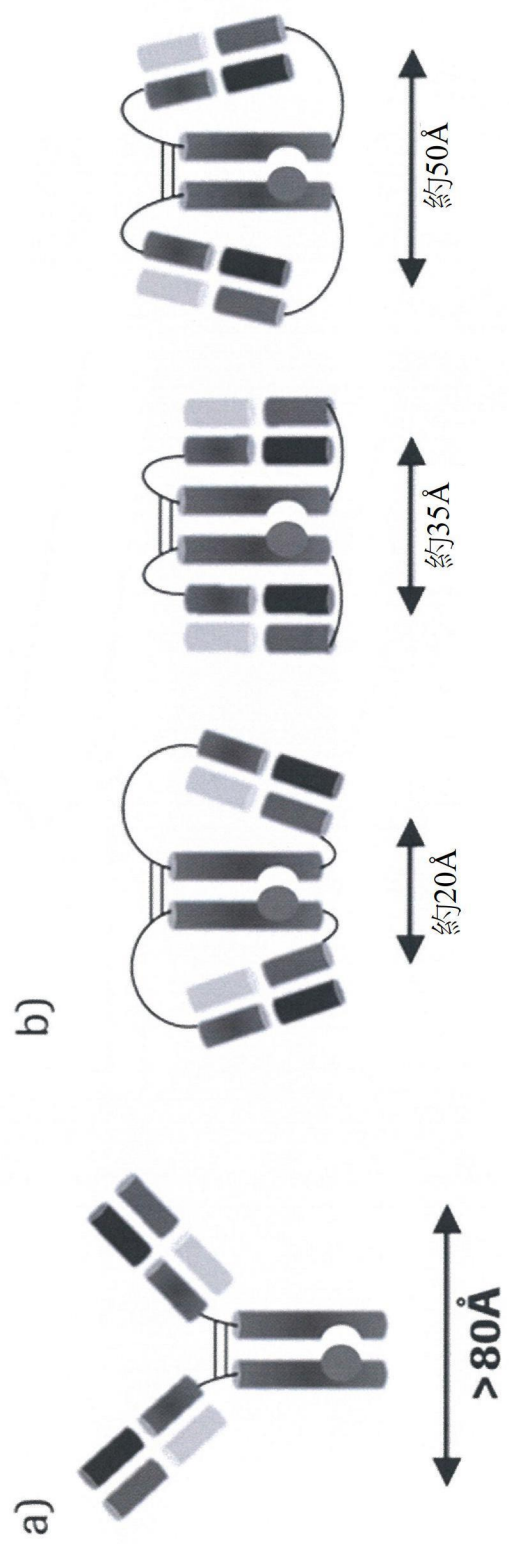
【發明圖式】



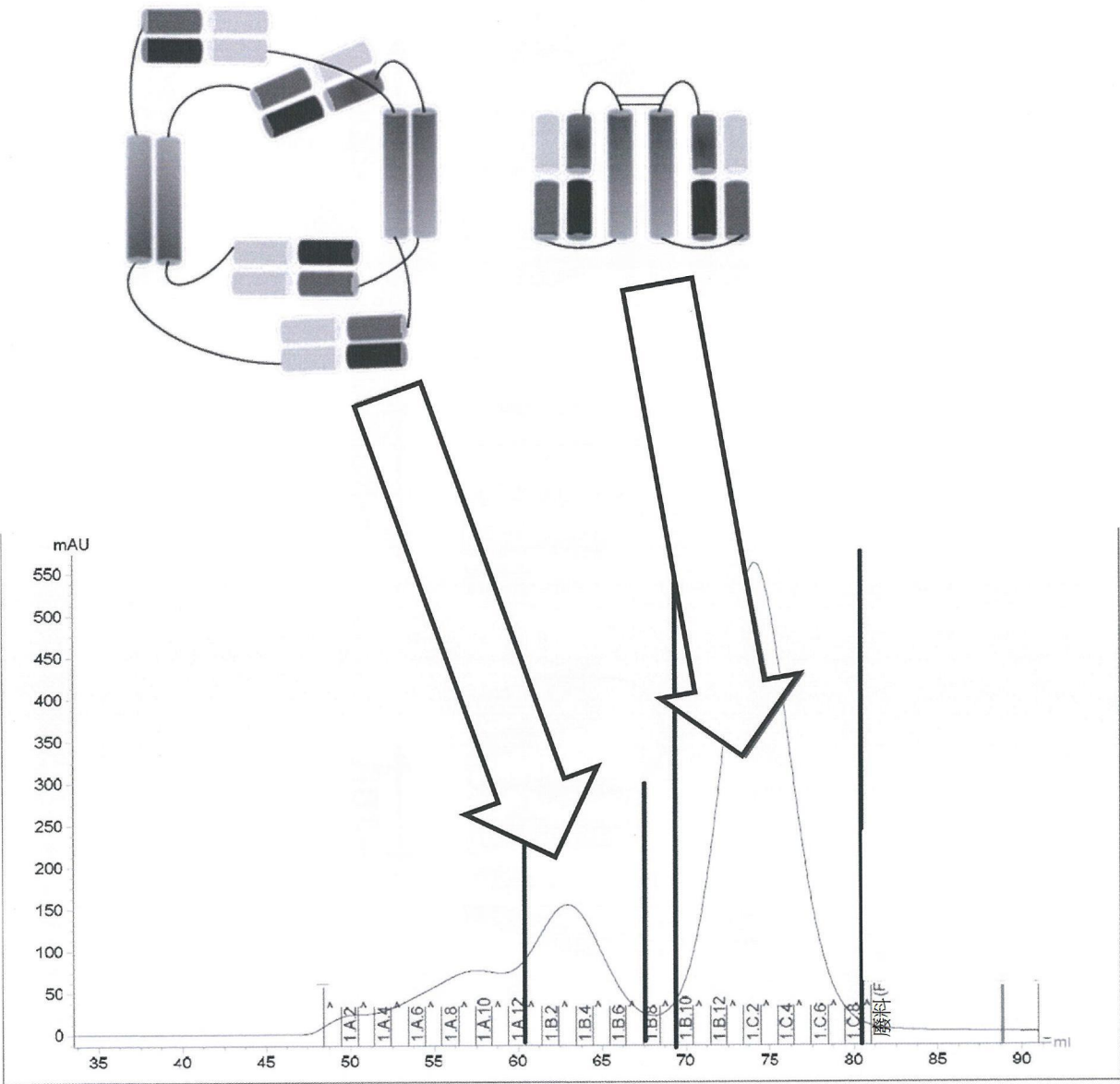
【圖1】



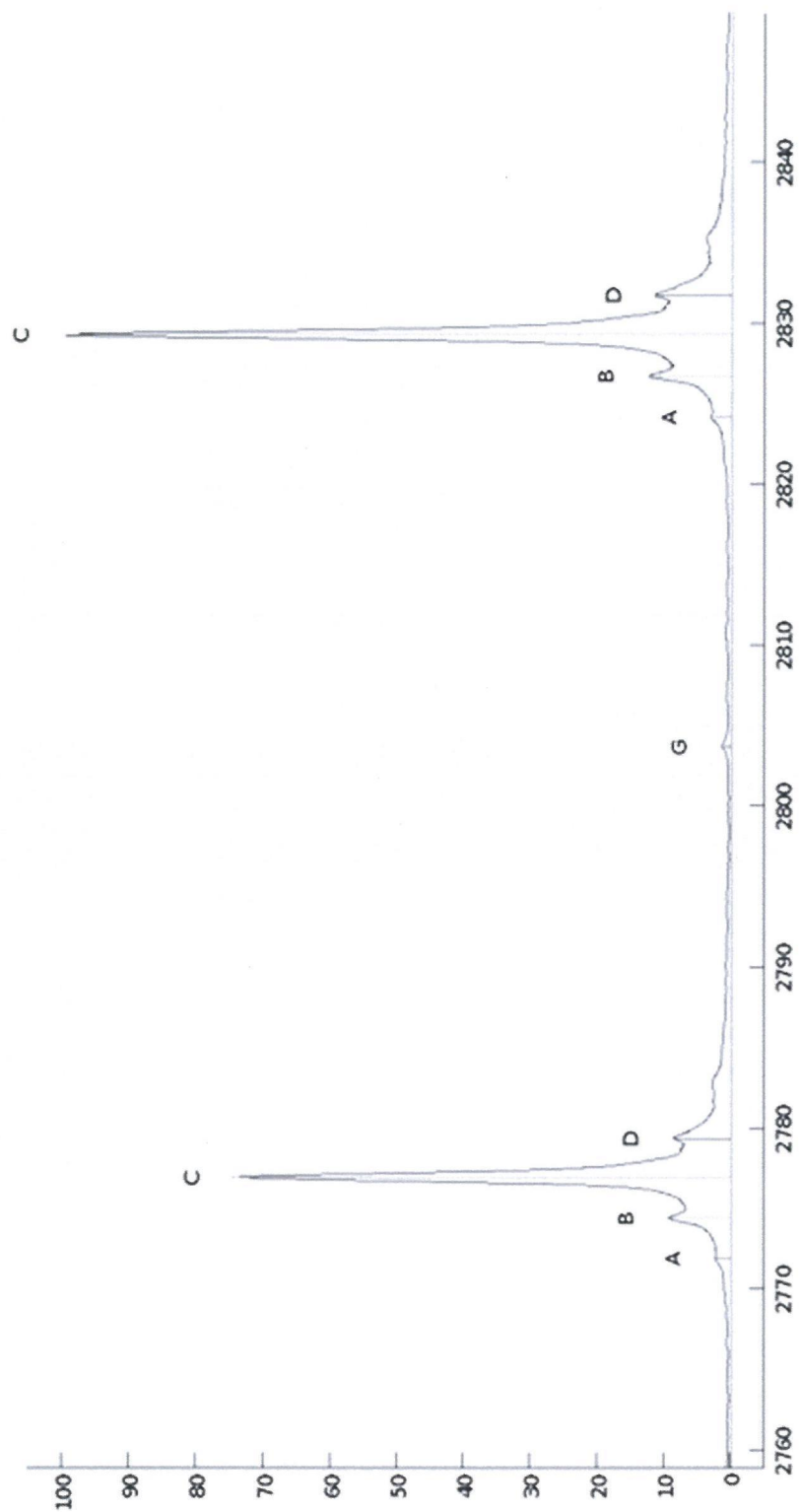
【圖2】



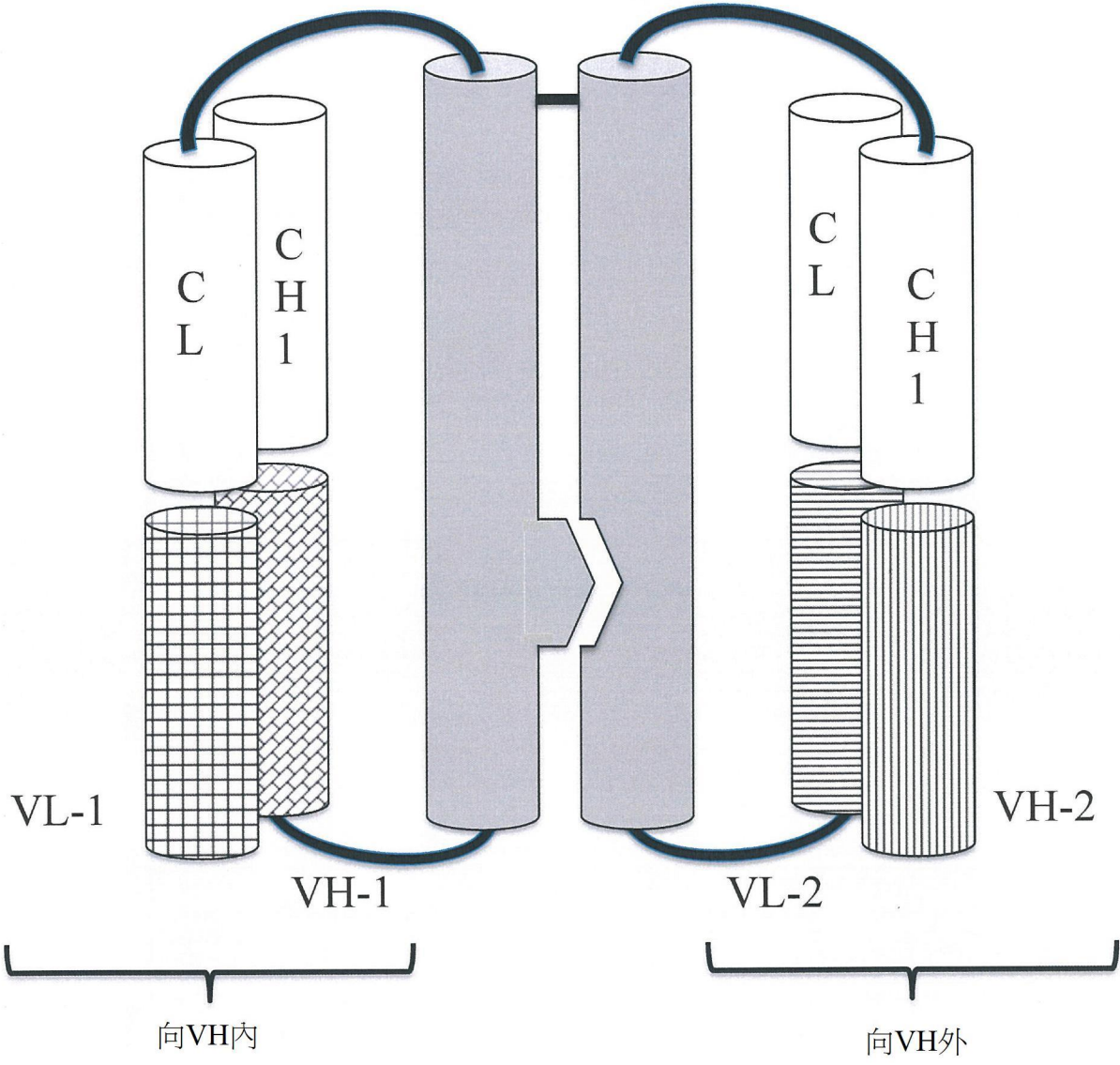
【圖3】



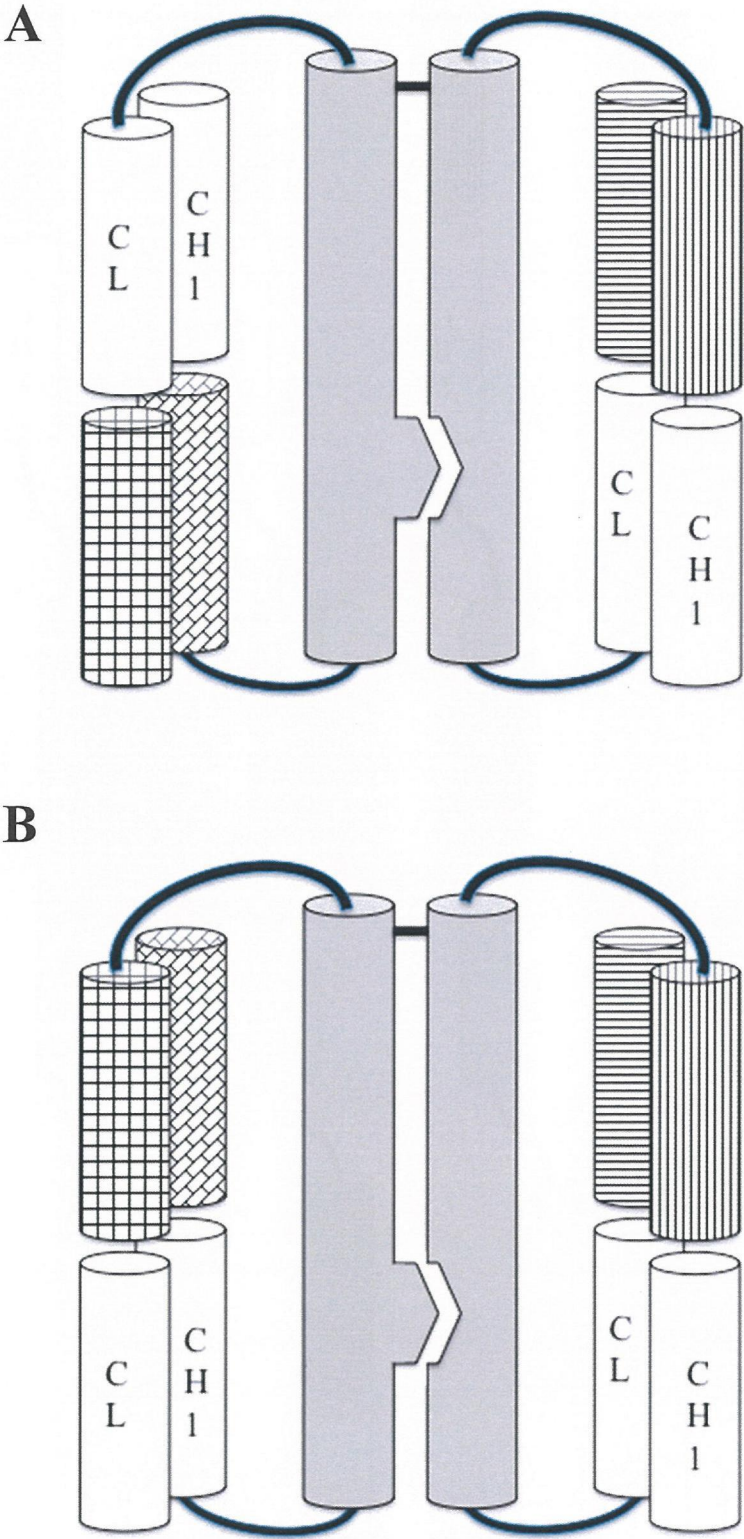
【圖4】



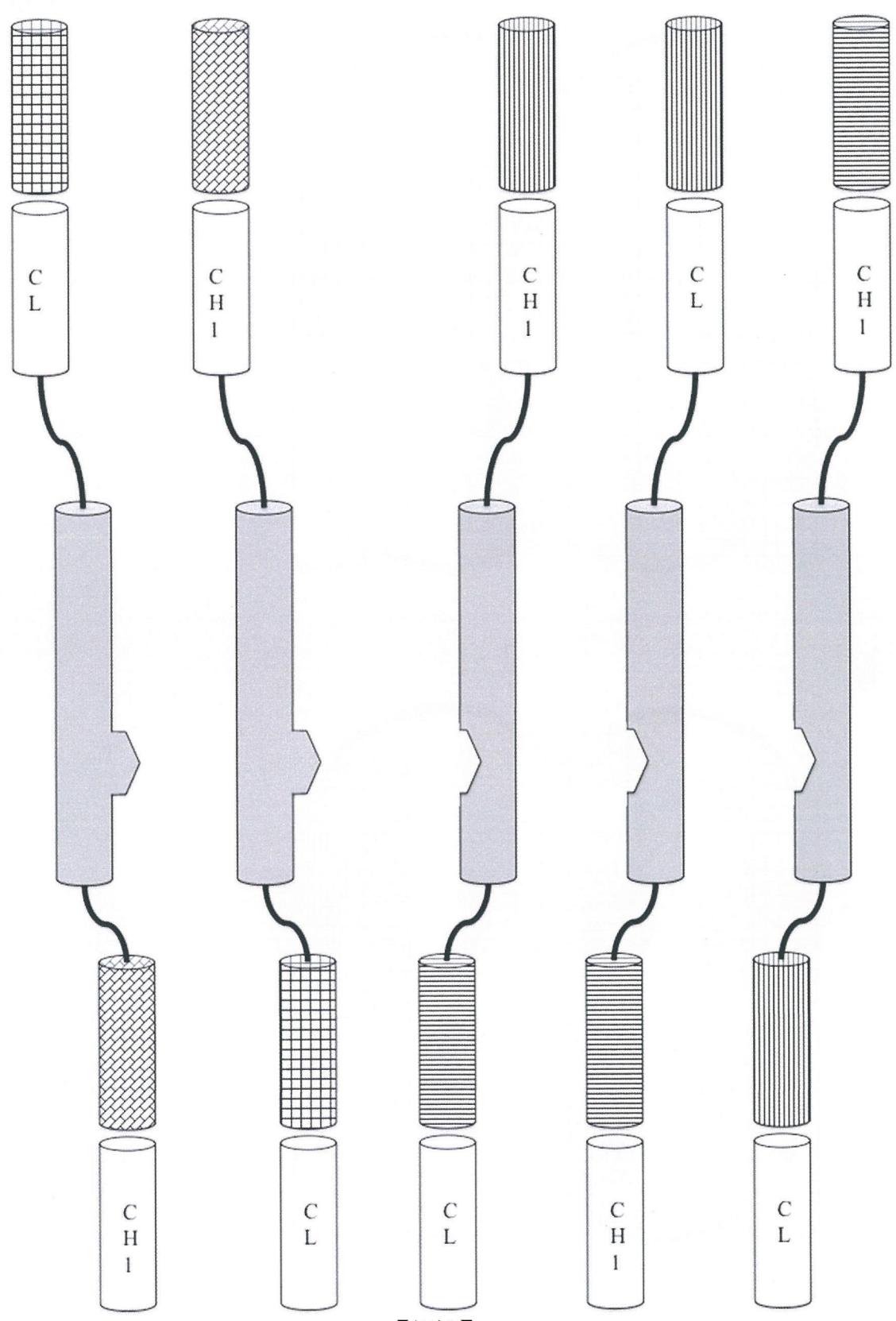
【圖5】



【圖6】

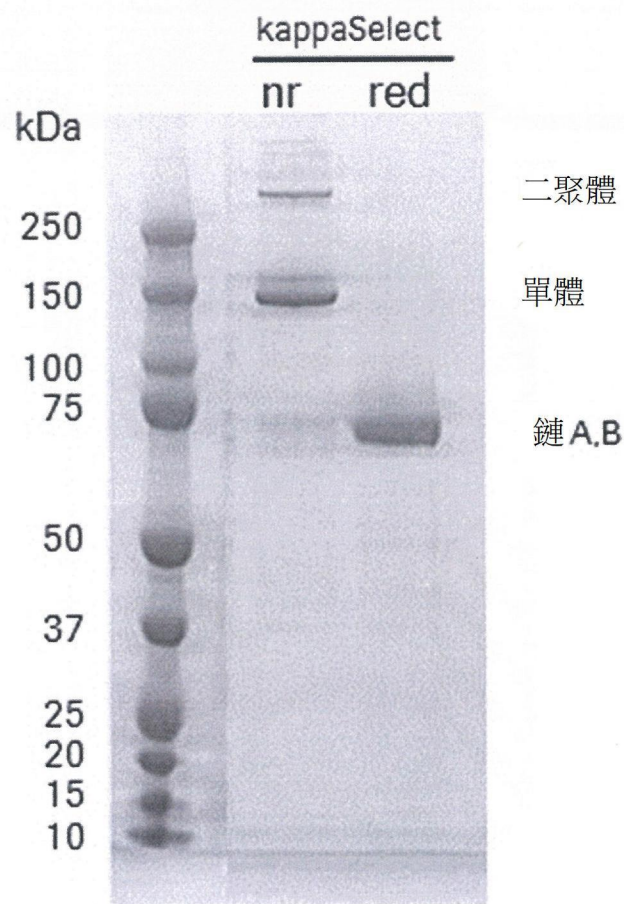
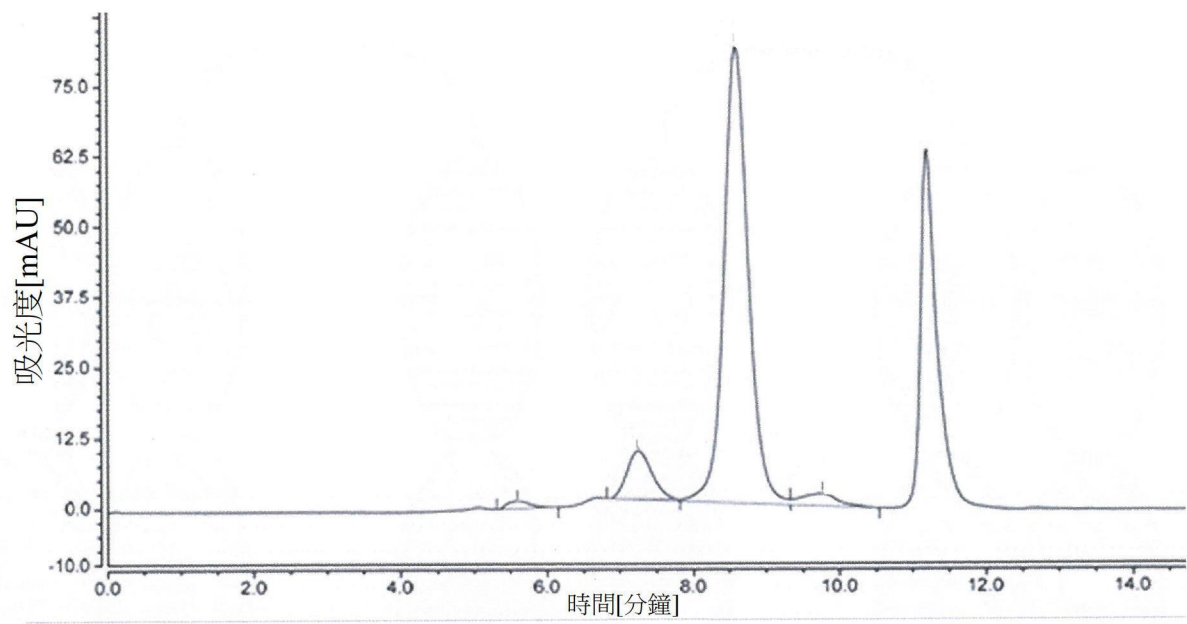


【圖7】

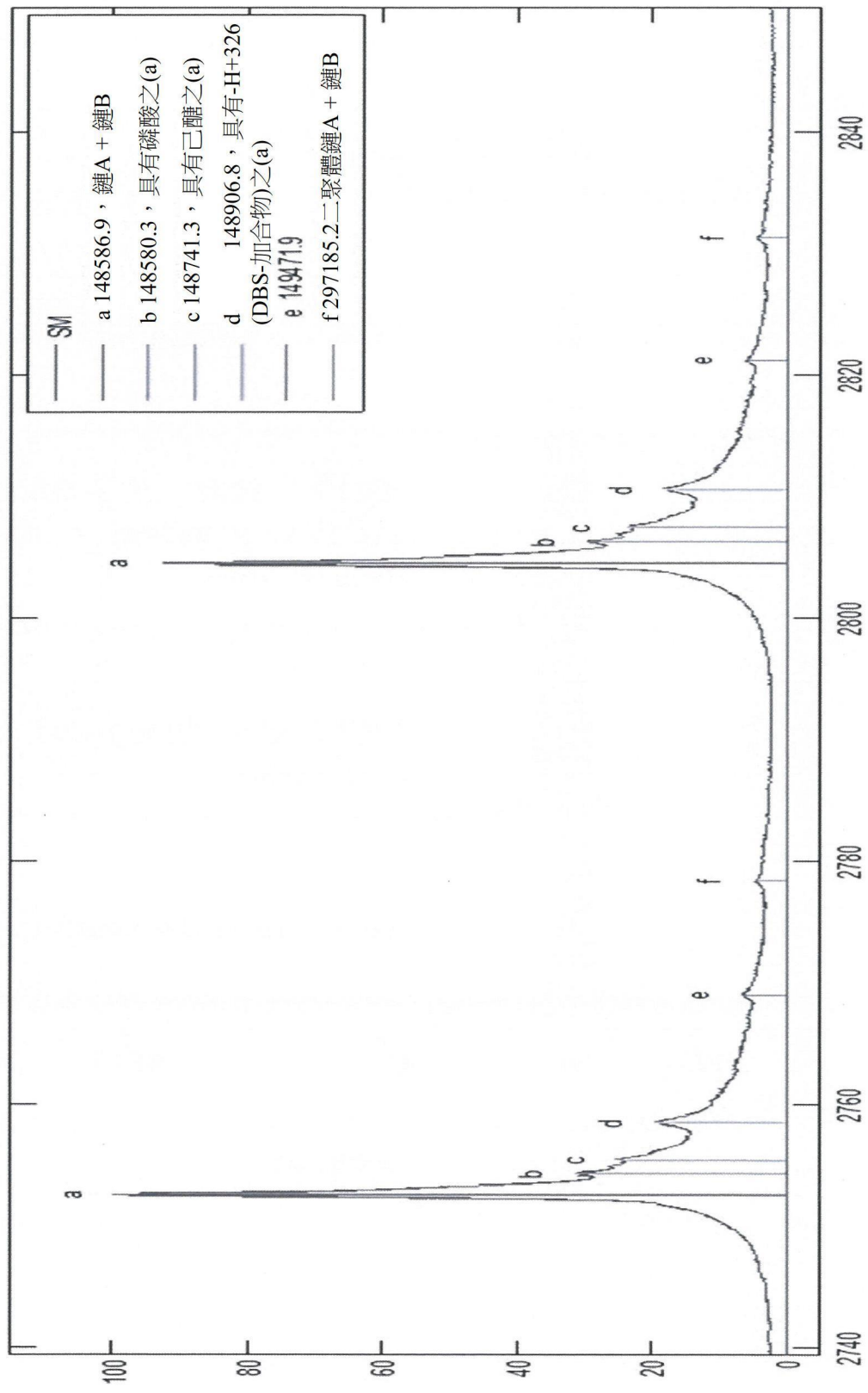


【圖8】

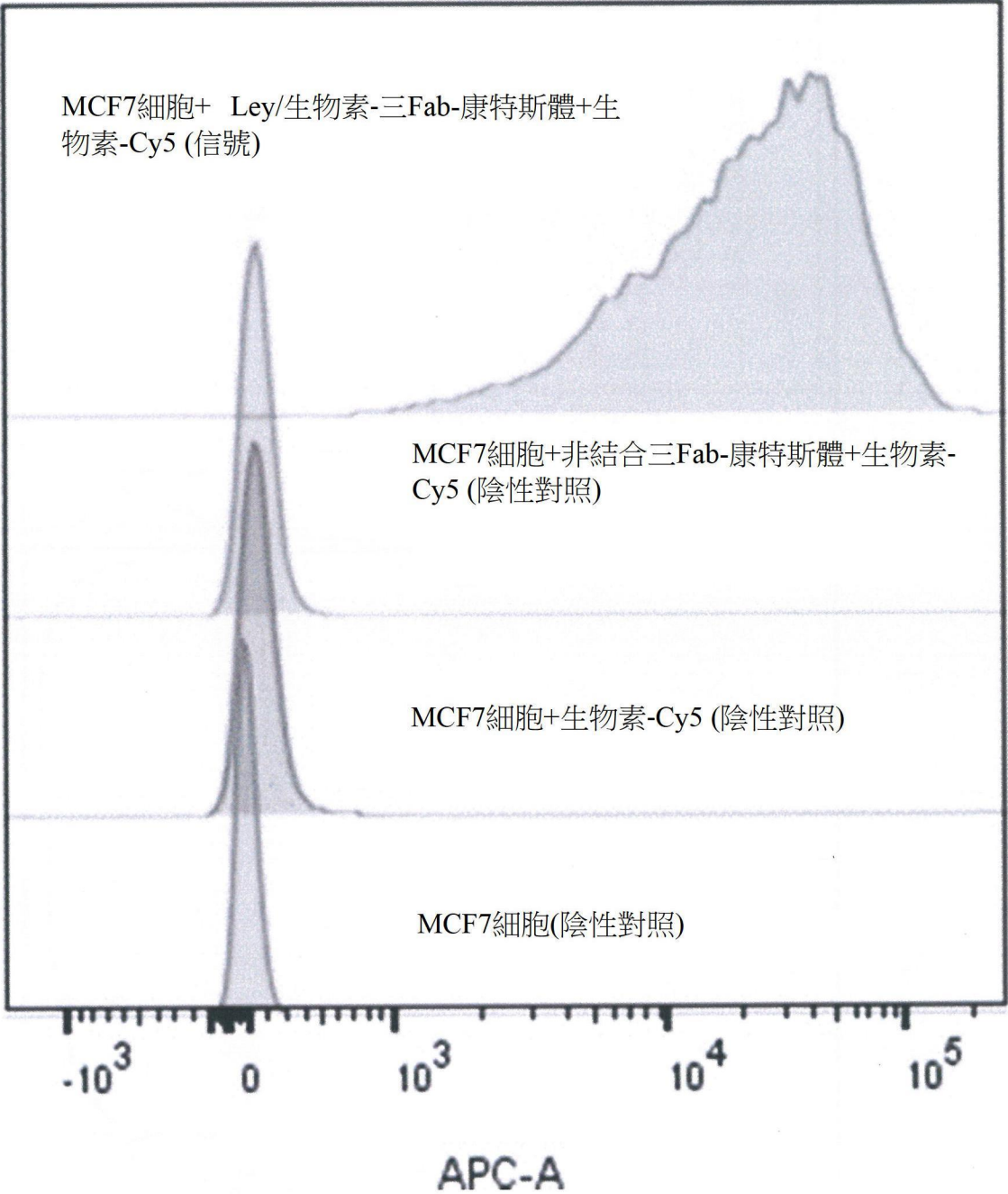
【圖9】



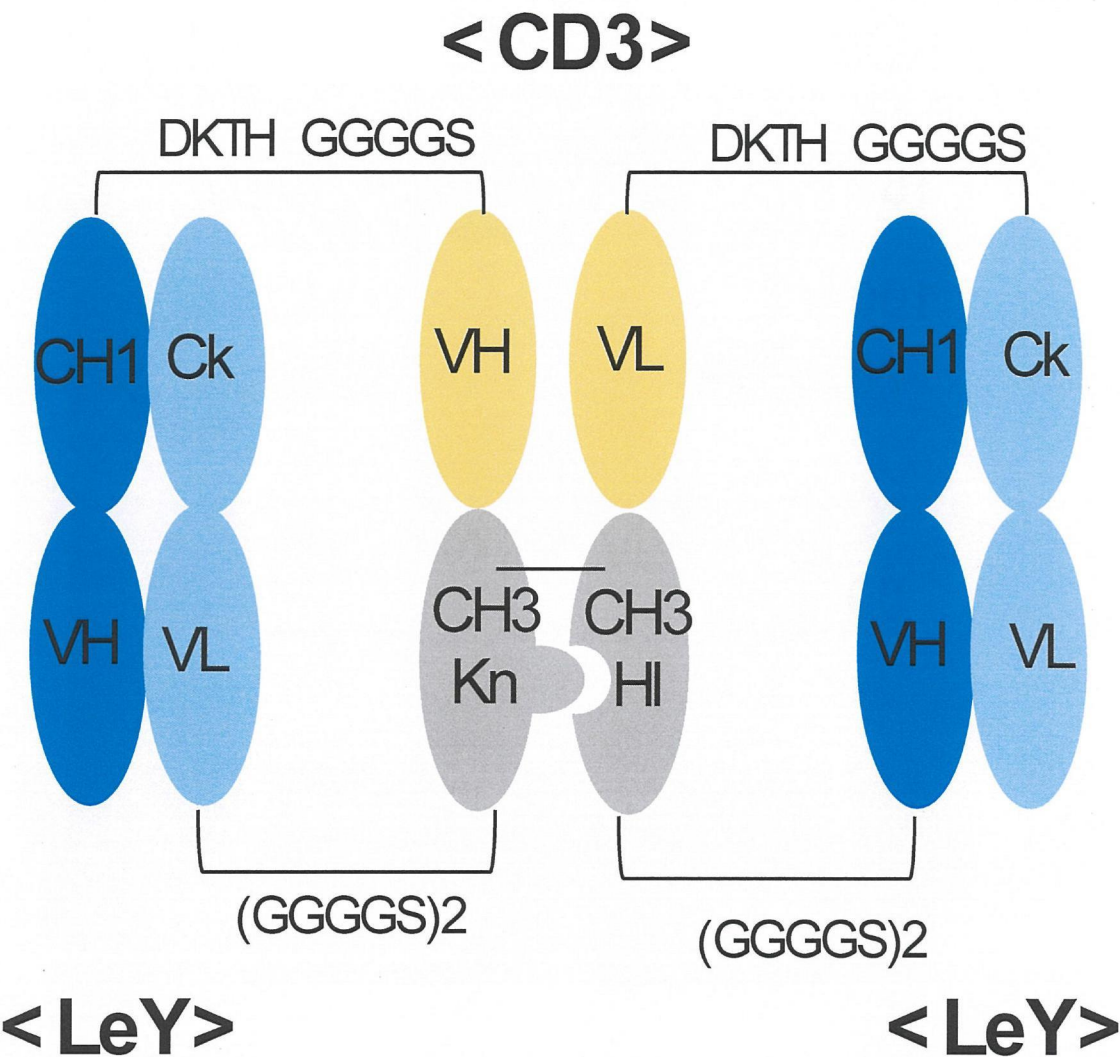
【圖10】



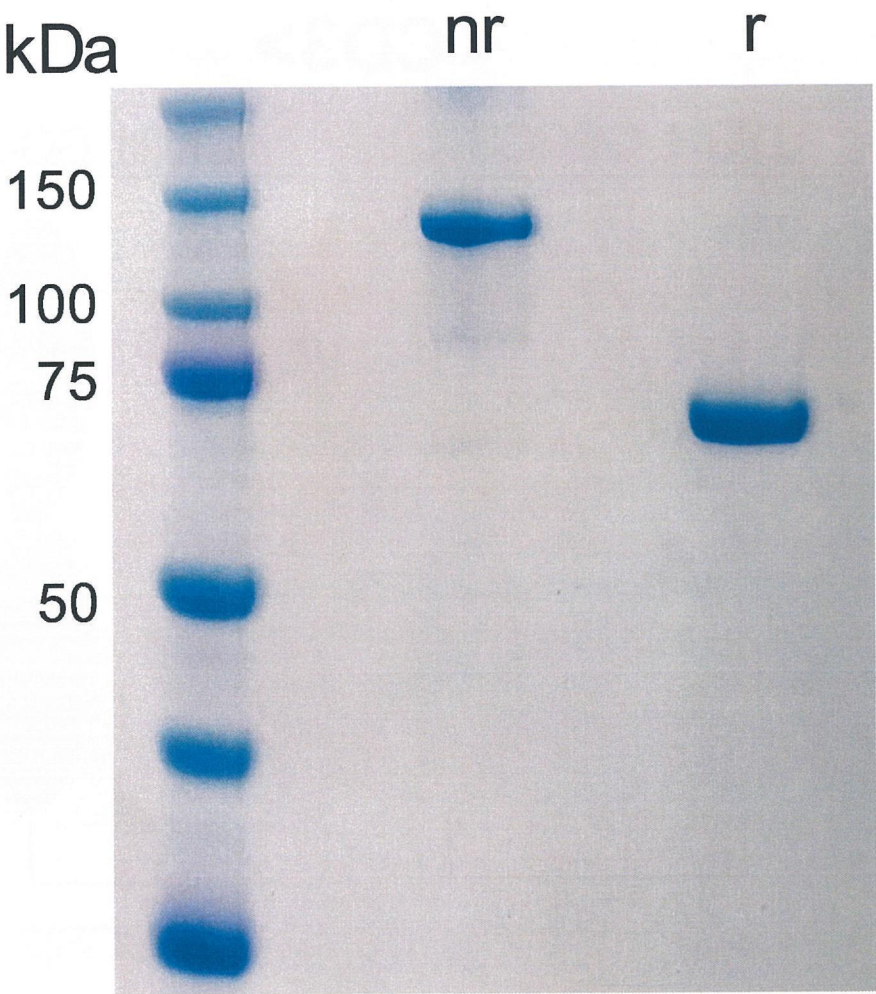
【圖11】



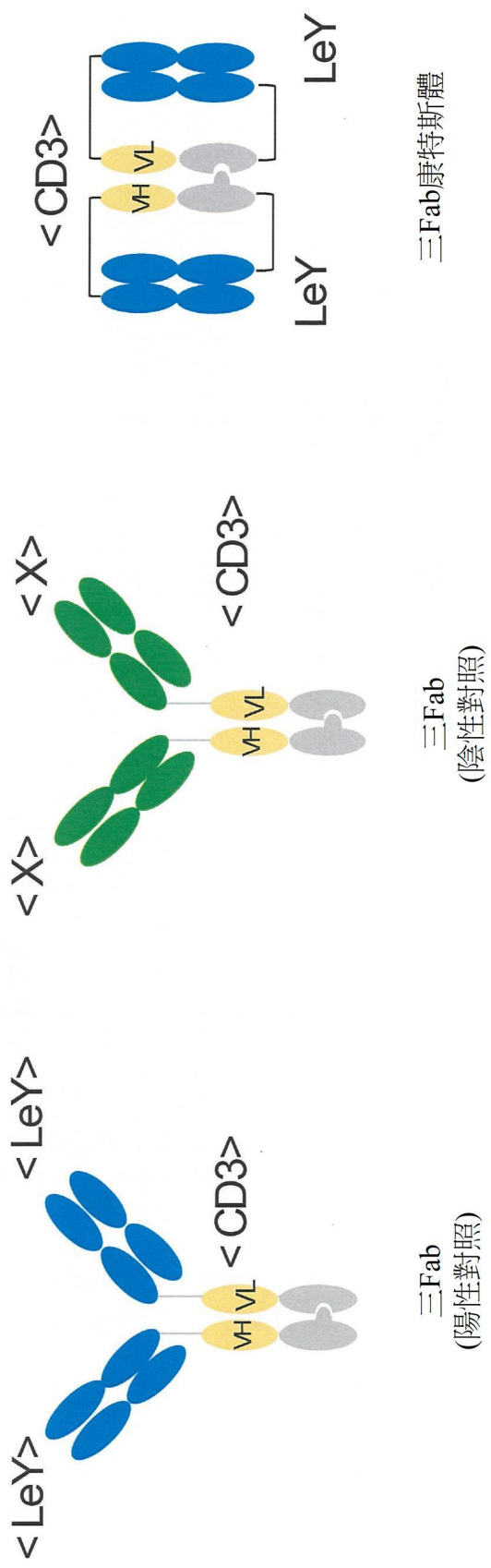
【圖12】



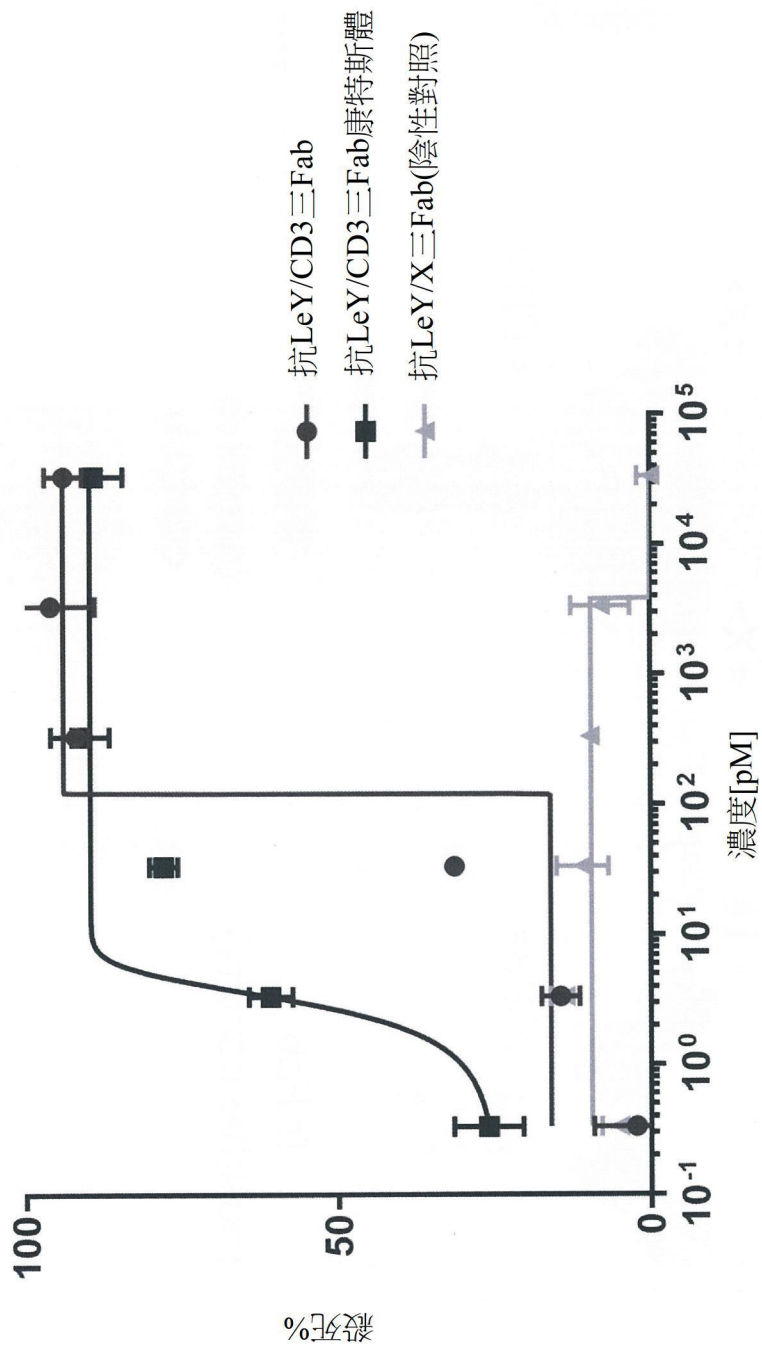
【圖13】



【圖14】



【圖15】



【圖16】