(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119219778 A
(43)申请公布日 2024.12.31

(21)申请号 202411292391.9

(22)申请日 2016.05.13

(30)优先权数据
62/160,794 2015.05.13 US

(62)分案原申请数据
201680040586.1 2016.05.13

(71)申请人 埃博灵克斯股份有限公司
地址 比利时

(72)发明人 安内利斯·罗布鲁克
迪亚娜·范霍里克 若昂·维埃拉

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 关旭颖 贺卫国

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)

权利要求书3页 说明书129页 附图18页

(54)发明名称

基于CD3反应性的T细胞募集多肽

(57)摘要

提供与T细胞上的CD3结合的T细胞募集多肽。所述多肽能够用于治疗癌症的方法。

CN 119219778 A

1.包含第一免疫球蛋白单可变结构域(ISV)和第二免疫球蛋白单可变结构域的多肽,其中

-所述第一ISV对T细胞上存在的分化簇3(CD3)具有高亲和力/与T细胞上存在的分化簇3(CD3)结合;

-所述第二ISV对靶细胞上的第一抗原具有高亲和力/与靶细胞上的第一抗原结合;

其中所述第一抗原不同于所述CD3;

其中所述靶细胞不同于所述T细胞;并且

其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

(i)CDR1选自由以下组成的组:

(a)SEQ ID NOs:91-93;和

(b)与SEQ ID NO:91的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

(ii)CDR2选自由以下组成的组:

(c)SEQ ID NOs:114-117;和

(d)与SEQ ID NO:114的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

(iii)CDR3选自由以下组成的组:

(e)SEQ ID NOs:131-133;和

(f)与SEQ ID NO:131的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

2.根据权利要求1所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1由SEQ ID NO:91表示,CDR2由SEQ ID NO:114表示,且CDR3由SEQ ID NO:131表示。

3.根据权利要求1或2所述的多肽,其中靶细胞上的所述第一抗原是肿瘤抗原,优选肿瘤相关抗原(TAA)。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的多肽,其进一步包含第三ISV,所述第三ISV对靶细胞上的第二抗原具有高亲和力和/或与靶细胞上的第二抗原结合,其中所述第二抗原不同于所述第一抗原。

5.根据权利要求4所述的多肽,其中靶细胞上的所述第二抗原是肿瘤抗原,优选肿瘤相关抗原(TAA)。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的多肽,其进一步包含血清蛋白结合部分。

7.根据权利要求6所述的多肽,其中所述血清蛋白结合部分是结合血清白蛋白的ISV。

8.一种特异性结合CD3并且包括以下或基本上由以下组成的多肽:4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3),其中:

(i)CDR1选自由以下组成的组:

(a)SEQ ID NOs:91-93;和

(b)与SEQ ID NO:91的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

(ii)CDR2选自由以下组成的组:

(c)SEQ ID NOs:114-117;和

(d)与SEQ ID NO:114的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

(iii)CDR3选自由以下组成的组:

(e)SEQ ID NOs:131-133;和

(f)与SEQ ID NO:131的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

9.根据权利要求8所述的多肽,其中CDR1选自由以下组成的组:

(a)SEQ ID NO:91;和

(b)与SEQ ID NO:91具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

-在位置6处R已经变为N或T;

-在位置7处N已经变为H;和/或

-在位置8处M已经变为T。

10.根据权利要求8或9中任一项所述的多肽,其中CDR2选自由以下组成的组:

(a)SEQ ID NO:114;和

(b)与SEQ ID NO:114具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

-在位置1处R已经变为Q;

-在位置3处T已经变为S;和/或

-在位置7处D已经变为A或K。

11.根据权利要求8至10中任一项所述的多肽,其中CDR3选自由以下组成的组:

(a)SEQ ID NO:131;和

(b)与SEQ ID NO:131具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

-在位置2处S已经变为R;和/或

-在位置6处S已经变为V。

12.根据权利要求8至11中任一项所述的多肽,其中CDR1由SEQ ID NO:91表示,CDR2由SEQ ID NO:114表示,且CDR3由SEQ ID NO:131表示。

13.根据权利要求8至12中任一项所述的多肽,其是纳米抗体、V_{HH}、人源化的V_{HH}或骆驼源化的V_H。

14.根据权利要求8至13中任一项所述的多肽,其进一步包含血清蛋白结合部分。

15.根据权利要求14所述的多肽,其中所述血清蛋白结合部分是结合血清白蛋白的ISV。

16.编码如权利要求1至15中任一项定义的多肽的核酸或核酸序列,或包含所述核酸或核酸序列的载体。

17.一种宿主细胞,所述宿主细胞用如权利要求16中定义的核酸或核酸序列或用如权利要求16中定义的载体转化或转染。

18.一种用于生产根据权利要求1至15中任一项所述的多肽的方法,所述方法包括在允许表达如权利要求1至15中任一项定义的多肽的条件下培养如权利要求17中定义的宿主细胞和从培养物中回收生产的多肽。

19.一种药物组合物,其包含根据权利要求1至15中任一项所述的多肽或根据权利要求18的方法生产的多肽。

20.根据权利要求1至15中任一项所述的多肽或根据权利要求18的方法生产的多肽,其用于治疗有需要的个体。

21.根据权利要求1至15中任一项所述的多肽或根据权利要求18的方法生产的多肽,其使用于预防、治疗或改善选自由增殖性疾病、炎性疾病、传染性疾病和自身免疫性疾病组成的组的疾病。

22.根据权利要求21使用的多肽,其中所述增殖性疾病是癌症。

23.根据权利要求22使用的多肽,其中所述癌症选自由以下组成的组:癌,神经胶质瘤,间皮瘤,黑素瘤,淋巴瘤,白血病,腺癌:乳腺癌,卵巢癌,宫颈癌,成胶质细胞瘤,多发性骨髓瘤(包括意义不明的单克隆丙种球蛋白病,无症状和有症状的骨髓瘤),前列腺癌和伯基特淋巴瘤,头颈癌,结肠癌,结直肠癌,非小细胞肺癌,小细胞肺癌,食道癌,胃癌,胰腺癌,肝胆管癌,胆囊癌,小肠癌,直肠癌,肾癌,膀胱癌,前列腺癌,阴茎癌,尿道癌,睾丸癌,阴道癌,子宫癌,甲状腺癌,副甲状腺癌,肾上腺癌,胰腺内分泌癌,类癌癌症,骨癌,皮肤癌,视网膜母细胞瘤,霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,卡波济肉瘤,多中心卡斯尔曼病或AIDS相关的原发性渗出性淋巴瘤,神经外胚层肿瘤,横纹肌肉瘤;以及上述癌症的任一种的任何转移,以及非癌症适应症如鼻息肉病。

基于CD3反应性的T细胞募集多肽

[0001] 本申请是申请日为2016年5月13日、发明名称为“基于CD3反应性的T细胞募集多肽”的中国专利申请No.201680040586.1的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明提供多特异性T细胞募集多肽,所述多肽结合T细胞上的CD3和靶细胞上的至少一个抗原。本发明也涉及在这些多特异性多肽中使用的单价T细胞募集多肽。本发明还提供治疗方法和提供它们的试剂盒。

背景技术

[0003] 癌症在全世界造成了巨大的人员伤亡。现在,它是世界上的主要死因,其次是心脏病和中风。癌症是世界范围内发病率和死亡率的主要原因之一,在2012年约有1400万新病例和820万癌症相关死亡。预计未来20年新病例的数量将上升约70％(来源:WHO癌症)。在2008年,世界范围内癌症的过早死亡和残疾导致的总体经济影响大约为9000亿美元,占全球国内生产总值的1.5％。

[0004] 可用于实体瘤的治疗方案典型地包括手术切除、化疗和放疗的组合。在40年的临床经验中,几乎没有取得任何进展,特别是在癌症的晚期阶段。

[0005] 急切期待对抗癌症的新疗法。

[0006] 抗体疗法现在是对抗疾病并且尤其是癌症的医生的医疗设备的重要部分。单克隆抗体已经被确立为几年来一系列疾病的关键治疗方法。所有同时期批准的抗体疗法都依赖于单特异性单克隆抗体(mAb)。直到今天,mAb的大多数靶标需要激动或拮抗的方法。虽然靶向细胞表面抗原本身能够通过诱导细胞凋亡来介导抗肿瘤活性,但是大多数针对血液恶性肿瘤的基于mAb的活性依赖于Fc介导的效应子功能,诸如补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

[0007] 免疫疗法已经成为癌症研究的快速发展领域。免疫疗法正在将身体的免疫监视系统并且特别是T细胞导向癌细胞。

[0008] 细胞毒性T细胞(CTL)是这样的T淋巴细胞,其杀死癌细胞、被感染的细胞(特别是被病毒感染的细胞)或以其它方式受损的细胞。T淋巴细胞(或T细胞)在细胞表面表达T细胞受体或TCR分子以及CD3受体。αβTCR-CD3复合物(或“TCR复合物”)由六种不同的I型单跨越(single-spanning)跨膜蛋白组成:形成负责配体识别的TCR异源二聚体的TCRα和TCRβ链,以及非共价缔合的CD3γ、CD3δ、CD3ε和ζ链(它们具有在受体活化时被磷酸化的胞质序列基序并且募集大量信号传导组分)(Call等人2004,Molecular Immunology 40:1295-1305)。

[0009] T细胞受体的α链和β链均由恒定结构域和可变结构域组成。生理学上,T细胞受体的αβ链识别载有肽的MHC复合物,并且在与CD3链接合时偶联。这些CD3链随后将接合信号转导到细胞内环境。

[0010] 考虑到天然存在的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)介导细胞溶解的潜力,已经探索了各种策略来募集CTL以介导肿瘤细胞杀伤。由于T淋巴细胞缺少Fc受体的表达,所以它们不是

通过抗肿瘤单克隆的Fc尾来募集到肿瘤位点。作为备选方案,患者的T细胞采用对确定的肿瘤抗原具有已知的特异性的第二TCR进行修饰。这种过继性细胞转移本质上是高度个性化的和劳动密集型的。然而,T细胞疗法的主要问题仍然是已知在癌症患者中发生的大量免疫逃逸机制(Nagorsen等人2012,Pharmacology&Therapeutics 136:334-342)。

[0011] 较新的发展已经尝试通过经由基于重组抗体的“双特异性抗体”技术以多克隆方式接合患者的所有细胞毒性T细胞来组合免疫疗法与抗体疗法的优点,而不是引发依赖于癌细胞表达MHC分子以及特异性肽抗原的存在、产生、转运和展示的特异性T细胞应答。

[0012] 双特异性抗体已经被工程改造,其在一个臂(靶标结合臂)上具有肿瘤识别部分,而该分子的另一个臂对T细胞抗原(效应子结合臂)(主要是CD3)具有特异性。通过将两个臂同时结合到它们各自的靶抗原上,T淋巴细胞被导向肿瘤细胞并在肿瘤细胞处活化,在那里它们能够发挥其细胞溶解功能。

[0013] 使用双特异性抗体来活化针对肿瘤细胞的T细胞的概念在二十多年前就有描述,但是制造问题和临床失败使该领域陷入停滞。开发了较小格式的双特异性抗体,其比常规抗体更容易穿透组织和肿瘤。另外,较小的格式更善于创建细胞毒性突触(其杀死靶细胞)。据认为较小格式的双特异性抗体比常规抗体更容易制造,并且免疫原性较低。然而,由5个氨基酸肽接头连接的两个单链可变片段(scFv)组成的较小的双特异性BiTE分子表现出缺乏稳定性(scFv倾向于聚集),低表达滴度和差的溶解度。此外,识别CD3链的博纳吐单抗(Blinatumomab)(一种BiTE分子)的首次临床试验由于以下而过早地停止:在一方面是神经系统不良事件,细胞因子释放综合征和感染,且在另一方面是缺少生物活性的客观临床反应或强烈迹象。除了效力,BiTE必须不断地被注入--可能是由于缺少Fc结构域--这不会有助于患者的依从性(compliance)。对于DART(由MacroGenics开发的双亲和力重靶向分子),其中来自一个抗体(Ab)的重可变结构域与另一个Ab的轻可变结构域连接,也存在同样的问题。MacroGenics目前试图通过将Fc结构域融合到其下一代DART上来解决这个问题,这使得分子不仅变得更大,而且还导致制造问题和其它Fc功能的输入。Fc的较大格式将具有更好的PK,但是重新引入了脱靶活性的风险。(Garber 2014,Nature reviews 13:799-801)。

[0014] 仍然需要替代的双特异性格式。

发明概述

[0016] 本发明通过提供多特异性多肽解决了该问题,所述多特异性多肽包含第一免疫球蛋白单可变结构域(ISV)和至少一个另外的免疫球蛋白单可变结构域,其中所述第一ISV对CD3具有高亲和力/与CD3结合;所述至少一个另外的ISV对靶细胞上存在的抗原具有高亲和力/与靶细胞上存在的抗原结合。在特别的方面,第一ISV的结合将活化T细胞针对靶细胞的固有细胞毒性潜力(独立于MHC1之外)。

[0017] 因此,在第一方面,本发明提供多肽,其包含第一和第二免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其中

[0018] -所述第一ISV对T细胞上存在的分化簇3(CD3)具有高亲和力/与T细胞上存在的分化簇3(CD3)结合;

[0019] -所述第二ISV对靶细胞上的第一抗原具有高亲和力/与靶细胞上的第一抗原结合;

[0020] 其中所述第一抗原不同于所述CD3;并且

[0021] 其中所述靶细胞不同于所述T细胞。

[0022] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述多肽将T细胞导向靶细胞。

[0023] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述多肽诱导T细胞活化。

[0024] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述T细胞活化独立于MHC识别。

[0025] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述T细胞活化依赖于将与靶细胞上的所述第一抗原结合的所述多肽呈递至T细胞。

[0026] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述T细胞活化引起所述T细胞的一种或多种细胞应答,其中所述细胞应答选自由以下组成的组:增殖,分化,细胞因子分泌,细胞毒性效应分子释放,细胞毒性活性,表达活化标志物和重定向的靶细胞溶解。

[0027] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述T细胞活化引起抑制所述靶细胞的活性达多于约10%,诸如20%、30%或40%或甚至多于50%,诸如多于60%,诸如70%、80%或甚至多于90%,诸如100%。

[0028] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV结合TCR复合物的CD3γ(SEQ ID NO:292)、CD3δ(SEQ ID NO:291)和/或CD3ε(SEQ ID NO:293),或其多态(polymorphic)变体或同种型(isoform)。

[0029] 备选地,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV结合TCR复合物的CD3γ(SEQ ID NO:379)、CD3δ(SEQ ID NO:291)和/或CD3ε(SEQ ID NO:380),或其多态变体或同种型。

[0030] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述多肽和/或第一ISV关于结合所述CD3具有选自由以下组成的组的结合速率常数(Kon):至少约$10^2M^{-1}s^{-1}$、至少约$10^3M^{-1}s^{-1}$、至少约$10^4M^{-1}s^{-1}$、至少约$10^5M^{-1}s^{-1}$、至少约$10^6M^{-1}s^{-1}$、$10^7M^{-1}s^{-1}$、至少约$10^8M^{-1}s^{-1}$、至少约$10^9M^{-1}s^{-1}$和至少约$10^{10}M^{-1}s^{-1}$,优选如通过表面等离子共振所测量的。

[0031] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述多肽和/或第一ISV对结合所述CD3具有选自由以下组成的组的解离速率常数(Koff):至多约$10^{-3}s^{-1}$、至多约$10^{-4}s^{-1}$、至多约$10^{-5}s^{-1}$、至多约$10^{-6}s^{-1}$、至多约$10^{-7}s^{-1}$、至多约$10^{-8}s^{-1}$、至多约$10^{-9}s^{-1}$和至多约$10^{-10}s^{-1}$,优选如通过表面等离子共振所测量的。

[0032] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV以这样的EC50值与所述CD3结合:在100nM至1pM之间的EC50值,诸如100nM以下的平均EC50值,甚至更优选90nM以下的平均EC50值,诸如小于80、70、60、50、40、30、20、10、5nM或甚至更小,诸如小于4、3、2、1nM或甚至更小,诸如小于500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、5pM或甚至更小,诸如小于4pM,优选如通过流式细胞术所测量的。

[0033] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV以这样的平均KD值与所述CD3结合:在100nM至10pM之间的平均KD值,诸如90nM以下的平均KD值,甚至更优选80nM以下的平均KD值,诸如小于70、60、50、40、30、20、10、5nM或甚至更小,诸如小于4、3、2、1nM,诸如小于500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20pM或甚至更小,诸如小于10pM。优选地,KD通过SPR确定,例如如通过Proteon所确定的。

[0034] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0035] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0036] (a)SEQ ID NOs:81-100;和

[0037] (b)与SEQ ID NO:81的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0038] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0039] (c)SEQ ID NOs:101-122;和

[0040] (d)与SEQ ID NO:101的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0041] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0042] (e)SEQ ID NOs:123-143;和

[0043] (f)与SEQ ID NO:123的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0044] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0045] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0046] (a)SEQ ID NOs:81-100;或(b)与SEQ ID NO:81的氨基酸序列或与SEQ ID NOs:81-100中任一者具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0047] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0048] (c)SEQ ID NOs:101-122;或(d)与SEQ ID NO:101的氨基酸序列或与SEQ ID NOs:101-122中任一者具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0049] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0050] (e)SEQ ID NOs:123-143;或(f)与SEQ ID NO:123的氨基酸序列或与SEQ ID NOs:123-143中任一者具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0051] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1选自由以下组成的组:

[0052] (a)SEQ ID NO:81;和

[0053] (b)与SEQ ID NO:81具有1或2个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0054] -在位置1处G已经变为R;

[0055] -在位置3处T已经变为A;

[0056] -在位置4处Y已经变为F;

[0057] -在位置8处S已经变为G;和/或

[0058] -在位置10处G已经变为A。

[0059] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR2选自由以下组成的组:

[0060] (a)SEQ ID NO:101;和

[0061] (b)与SEQ ID NO:101具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0062] -在位置3处V已经变为T或A;

[0063] -在位置5处S已经变为T;

[0064] -在位置6处G已经变为D或E;和/或

[0065] -在位置9处T已经变为S、A或P。

[0066] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR3选自由以下组成的组:

[0067] (a)SEQ ID NO:123;和

[0068] (b)与SEQ ID NO:123具有1或2个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0069] -在位置2处I已经变为T;

[0070] -在位置9处I已经变为V;和/或

[0071] -在位置10处A已经变为P。

[0072] 优选地,与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR的多肽的结合相比,包含具有所述3、2或1个氨基酸差异的一个或多个CDR的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0073] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0074] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0075] (a)SEQ ID NO:81;和

[0076] (b)与SEQ ID NO:81具有1或2个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0077] -在位置1处G已经变为R;

[0078] -在位置3处T已经变为A;

[0079] -在位置4处Y已经变为F;

[0080] -在位置8处S已经变为G;和/或

[0081] -在位置10处G已经变为A,

[0082] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0083] 并且其中

[0084] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0085] (a)SEQ ID NO:101;和

[0086] (b)与SEQ ID NO:101具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0087] -在位置3处V已经变为T或A;

[0088] -在位置5处S已经变为T;

[0089] -在位置6处G已经变为D或E;和/或

[0090] -在位置9处T已经变为S、A或P,

[0091] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0092] 并且其中

[0093] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0094] (a)SEQ ID NO:123;和

[0095] (b)与SEQ ID NO:123具有1或2个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0096] -在位置2处I已经变为T;

[0097] -在位置9处I已经变为V;和/或

[0098] -在位置10处A已经变为P,

[0099] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0100] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0101] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0102] (a)SEQ ID NOs:81-87;和

[0103] (b)与SEQ ID NO:81的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0104] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0105] (c)SEQ ID NOs:101-109;和

[0106] (d)与SEQ ID NO:101的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0107] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0108] (e)SEQ ID NOs:123-127;和

[0109] (f)与SEQ ID NO:123的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0110] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0111] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0112] (a)SEQ ID NOs:81-87;和

[0113] (b)与SEQ ID NO:81的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通

过表面等离子共振所测量的;和/或

[0114] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0115] (c)SEQ ID NOs:101-109;和

[0116] (d)与SEQ ID NO:101的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0117] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0118] (e)SEQ ID NOs:123-127;和

[0119] (f)与SEQ ID NO:123的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0120] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1由SEQ ID NO:81表示,CDR2由SEQ ID NO:101表示,且CDR3由SEQ ID NO:123表示。

[0121] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV选自由SEQ ID NOs:1-50组成的组。

[0122] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV通过具有SEQ ID NOs:1-50的至少一种多肽交叉阻断与CD3的结合。

[0123] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV通过具有SEQ ID NOs:1-50的至少一种多肽被交叉阻断与CD3的结合。

[0124] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1是SEQ ID NO:88。

[0125] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR2是SEQ ID NO:110。

[0126] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR3是SEQ ID NO:128。

[0127] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0128] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0129] (a)SEQ ID NO:88;和

[0130] (b)与SEQ ID NO:88的氨基酸序列具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0131] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0132] (c)SEQ ID NO:110;和

[0133] (d)与SEQ ID NO:110的氨基酸序列具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0134] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0135] (e)SEQ ID NO:128;和

[0136] (f)与SEQ ID NO:128的氨基酸序列具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0137] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0138] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0139] (a)SEQ ID NOs:88;和

[0140] (b)与SEQ ID NO:88的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0141] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0142] (c)SEQ ID NOs:110;和

[0143] (d)与SEQ ID NO:110的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0144] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0145] (e)SEQ ID NOs:128;和

[0146] (f)与SEQ ID NO:128的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0147] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1由SEQ ID NO:88表示,CDR2由SEQ ID NO:110表示,且CDR3由SEQ ID NO:128表示。

[0148] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV是SEQ ID NOs:51。

[0149] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV通过具有SEQ ID NOs:51的多肽交叉阻断与CD3的结合。

[0150] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV通过具有SEQ ID NOs:51的多肽被交叉阻断与CD3的结合。

[0151] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1是SEQ ID NO:90。

[0152] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR2选自由以下

组成的组：

[0153] (a)SEQ ID NO:112;和

[0154] (b)与SEQ ID NO:112具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0155] -在位置2处V已经变为A。

[0156] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR3是SEQ ID NO:130。

[0157] 优选地,与包含不具有1个氨基酸差异的CDR的多肽的结合相比,包含具有1个氨基酸差异的一个或多个CDR的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0158] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0159] (i)CDR1是SEQ ID NO:90;和

[0160] 并且其中

[0161] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0162] (a)SEQ ID NO:112;和

[0163] (b)与SEQ ID NO:112具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0164] -在位置2处V已经变为A,

[0165] 条件是与包含不具有1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0166] 并且其中

[0167] (iii)CDR3是SEQ ID NO:130。

[0168] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0169] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0170] (a)SEQ ID NO:90;和

[0171] (b)与SEQ ID NO:90的氨基酸序列具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0172] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0173] (c)SEQ ID NOs:112-113;和

[0174] (d)与SEQ ID NO:112的氨基酸序列具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0175] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0176] (e)SEQ ID NO:130;和

[0177] (f)与SEQ ID NO:130的氨基酸序列具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0178] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0179] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0180] (a)SEQ ID NOs:90;和

[0181] (b)与SEQ ID NO:90的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0182] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0183] (c)SEQ ID NOs:112-113;和

[0184] (d)与SEQ ID NO:112的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0185] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0186] (e)SEQ ID NOs:130;和

[0187] (f)与SEQ ID NO:130的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0188] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1由SEQ ID NO:90表示,CDR2由SEQ ID NO:112表示,且CDR3由SEQ ID NO:130表示。

[0189] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV选自由SEQ ID NOs:53-56组成的组。

[0190] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV通过具有SEQ ID NOs:53-56的至少一种多肽交叉阻断与CD3的结合。

[0191] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV通过具有SEQ ID NOs:53-56的至少一种多肽被交叉阻断与CD3的结合。

[0192] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1是SEQ ID NO:89。

[0193] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR2是SEQ ID NO:111。

[0194] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR3是SEQ ID NO:129。

[0195] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0196] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0197] (a)SEQ ID NO:89;和

[0198] (b)与SEQ ID NO:89的氨基酸序列具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0199] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0200] (c)SEQ ID NO:111;和

[0201] (d)与SEQ ID NO:111的氨基酸序列具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0202] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0203] (e)SEQ ID NO:129;和

[0204] (f)与SEQ ID NO:129的氨基酸序列具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0205] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0206] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0207] (a)SEQ ID NOs:89;和

[0208] (b)与SEQ ID NO:89的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0209] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0210] (c)SEQ ID NOs:111;和

[0211] (d)与SEQ ID NO:111的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0212] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0213] (e)SEQ ID NOs:129;和

[0214] (f)与SEQ ID NO:129的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0215] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1由SEQ ID NO:89表示,CDR2由SEQ ID NO:111表示,且CDR3由SEQ ID NO:129表示。

[0216] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV是SEQ ID NOs:52。

[0217] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV通过具有SEQ ID NOs:52的多肽交叉阻断与CD3的结合。

[0218] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV通过具有SEQ ID NOs:52的多肽被交叉阻断与CD3的结合。

[0219] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框

架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1选自由以下组成的组:

[0220] (a)SEQ ID NO:91;和

[0221] (b)与SEQ ID NO:91具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0222] -在位置6处R已经变为N或T;

[0223] -在位置7处N已经变为H;和/或

[0224] -在位置8处M已经变为T。

[0225] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR2选自由以下组成的组:

[0226] (a)SEQ ID NO:114;和

[0227] (b)与SEQ ID NO:114具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0228] -在位置1处R已经变为Q;

[0229] -在位置3处T已经变为S;和/或

[0230] -在位置7处D已经变为A或K。

[0231] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR3选自由以下组成的组:

[0232] (a)SEQ ID NO:131;和

[0233] (b)与SEQ ID NO:131具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0234] -在位置2处S已经变为R;和/或

[0235] -在位置6处S已经变为V。

[0236] 优选地,与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR的多肽的结合相比,包含具有所述3、2或1个氨基酸差异的一个或多个CDR的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0237] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0238] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0239] (a)SEQ ID NO:91;和

[0240] (b)与SEQ ID NO:91具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0241] -在位置6处R已经变为N或T;

[0242] -在位置7处N已经变为H;和/或

[0243] -在位置8处M已经变为T,

[0244] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0245] 并且其中

[0246] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0247] (a)SEQ ID NO:114;和

[0248] (b)与SEQ ID NO:114具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0249] -在位置1处R已经变为Q;

[0250] -在位置3处T已经变为S;和/或

[0251] -在位置7处D已经变为A或K,

[0252] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0253] 并且其中

[0254] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0255] (a)SEQ ID NO:131;和

[0256] (b)与SEQ ID NO:131具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0257] -在位置2处S已经变为R;和/或

[0258] -在位置6处S已经变为V,

[0259] 条件是与包含不具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0260] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0261] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0262] (a)SEQ ID NOs:91-93;和

[0263] (b)与SEQ ID NO:91的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0264] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0265] (c)SEQ ID NOs:114-117;和

[0266] (d)与SEQ ID NO:114的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0267] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0268] (e)SEQ ID NOs:131-133;和

[0269] (f)与SEQ ID NO:131的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0270] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0271] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0272] (a)SEQ ID NOs:91-93;和

[0273] (b)与SEQ ID NO:91的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0274] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0275] (c)SEQ ID NOs:114-117;和

[0276] (d)与SEQ ID NO:114的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0277] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0278] (e)SEQ ID NOs:131-133;和

[0279] (f)与SEQ ID NO:131的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0280] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1由SEQ ID NO:91表示,CDR2由SEQ ID NO:114表示,且CDR3由SEQ ID NO:131表示。

[0281] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV选自由SEQ ID NOs:57-65组成的组。

[0282] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV通过具有SEQ ID NOs:57-65的至少一种多肽交叉阻断与CD3的结合。

[0283] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV通过具有SEQ ID NOs:57-65的至少一种多肽被交叉阻断与CD3的结合。

[0284] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1选自由以下组成的组:

[0285] (a)SEQ ID NO:94;和

[0286] (b)与SEQ ID NO:94具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0287] -在位置3处S已经变为T、A或G;

[0288] -在位置5处N已经变为S;

[0289] -在位置6处M已经变为T或A;和/或

[0290] -在位置9处L已经变为M。

[0291] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR2选自由以下组成的组:

[0292] (a)SEQ ID NO:118;和

[0293] (b)与SEQ ID NO:118具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0294] -在位置2处H已经变为V;

[0295] -在位置5处S已经变为H或A;

[0296] -在位置8处N已经变为S;和/或

[0297] -在位置10处Y已经变为F。

[0298] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR3选自由以下

组成的组:

[0299] (a)SEQ ID NO:134;和

[0300] (b)与SEQ ID NO:134具有1、2、3、4或5个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0301] -在位置6处A已经变为S或D;

[0302] -在位置7处F已经变为Y或A;

[0303] -在位置8处R已经变为H;

[0304] -在位置9处S已经变为A;

[0305] -在位置11处G已经变为D、T、N、S、K或R;和/或

[0306] -在位置14处V已经变为I。

[0307] 优选地,与包含不具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的CDR的多肽的结合相比,包含具有所述5、4、3、2或1个氨基酸差异的一个或多个CDR的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0308] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中

[0309] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0310] (a)SEQ ID NO:94;和

[0311] (b)与SEQ ID NO:94具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0312] -在位置3处S已经变为T、A或G;

[0313] -在位置5处N已经变为S;

[0314] -在位置6处M已经变为T或A;和/或

[0315] -在位置9处L已经变为M,

[0316] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0317] 并且其中

[0318] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0319] (a)SEQ ID NO:118;和

[0320] (b)与SEQ ID NO:118具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0321] -在位置2处H已经变为V;

[0322] -在位置5处S已经变为H或A;

[0323] -在位置8处N已经变为S;和/或

[0324] -在位置10处Y已经变为F,

[0325] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0326] 并且其中

[0327] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0328] (a)SEQ ID NO:134;和

[0329] (b)与SEQ ID NO:134具有1、2、3、4或5个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0330] -在位置6处A已经变为S或D;

[0331] -在位置7处F已经变为Y或A;

[0332] -在位置8处R已经变为H;

[0333] -在位置9处S已经变为A;

[0334] -在位置11处G已经变为D、T、N、S、K或R;和/或

[0335] -在位置14处V已经变为I,

[0336] 条件是与包含不具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述5、4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0337] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0338] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0339] (a)SEQ ID NOs:94-100;和

[0340] (b)与SEQ ID NO:94的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0341] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0342] (c)SEQ ID NOs:118-122;和

[0343] (d)与SEQ ID NO:118的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0344] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0345] (e)SEQ ID NOs:134-143;和

[0346] (f)与SEQ ID NO:134的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0347] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0348] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0349] (a)SEQ ID NOs:94-100;和

[0350] (b)与SEQ ID NO:94的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0351] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0352] (c)SEQ ID NOs:118-122;和

[0353] (d)与SEQ ID NO:118的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0354] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0355] (e)SEQ ID NOs:134-143;和

[0356] (f)与SEQ ID NO:134的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条

件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0357] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1由SEQ ID NO:94表示,CDR2由SEQ ID NO:118表示,且CDR3由SEQ ID NO:134表示。

[0358] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV选自由SEQ ID NOs:66-80组成的组。

[0359] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV通过具有SEQ ID NOs:66-80的至少一种多肽交叉阻断与CD3的结合。

[0360] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV通过具有SEQ ID NOs:66-80的至少一种多肽被交叉阻断与CD3的结合。

[0361] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中靶细胞上的所述第一抗原是肿瘤抗原,优选肿瘤相关抗原(TAA)。

[0362] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其进一步包含第三ISV,所述第三ISV对靶细胞上的第二抗原具有高亲和力和/或与靶细胞上的第二抗原结合,其中所述第二抗原不同于所述第一抗原。

[0363] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中靶细胞上的所述第二抗原是肿瘤抗原,优选肿瘤相关抗原(TAA)。

[0364] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一抗原和所述第二抗原存在于相同的靶细胞上。

[0365] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一抗原和所述第二抗原存在于不同的靶细胞上。

[0366] 在优选的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述TAA独立地选自由以下组成的组:黑素瘤相关的硫酸软骨素蛋白聚糖(Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan,MCSP),表皮生长因子受体(EGFR),成纤维细胞活化蛋白(Fibroblast Activation Protein,FAP),MART-1,癌胚抗原(CEA),gp100,MAGE-1,HER-2,Lewis^{Y}抗原,CD123,CD44,CLL-1,CD96,CD47,CD32,CXCR4,Tim-3,CD25,TAG-72,Ep-CAM,PSMA,PSA,GD2,GD3,CD4,CD5,CD19,CD20,CD22,CD33,CD36,CD45,CD52,CD147,生长因子受体,包括ErbB3和ErbB4,细胞因子受体,包括白细胞介素-2受体γ链(CD132抗原),白细胞介素-10受体α链(IL-10R-A),白细胞介素-10受体β链(IL-10R-B),白细胞介素-12受体β-1链(IL-12R-β1),白细胞介素-12受体β-2链(IL-12受体β-2),白细胞介素-13受体α-1链(IL-13R-α-1)(CD213a1抗原),白细胞介素-13受体α-2链(白细胞介素-13结合蛋白),白细胞介素-17受体(IL-17受体),白细胞介素-17B受体(IL-17B受体),白细胞介素21受体前体(IL-21R),I型白细胞介素-1受体(IL-1R-1)(CD121a),II型白细胞介素-1受体(IL-1R-β)(CDw121b),白细胞介素-1受体拮抗蛋白(IL-1ra),白细胞介素-2受体α链(CD25抗原),白细胞介素-2受体β链(CD122抗原),白细胞介素-3受体α链(IL-3R-α)(CD123抗原),CD30,IL23R,IGF-1R,IL5R,IgE,CD248(内皮唾液酸蛋白(endosialin)),CD44v6,gpA33,Ron,Trop2,PSCA,密蛋白(claudin)6,密蛋白18.2,CLEC12A,CD38,ephA2,c-Met,CD56,MUC16,EGFRvIII,AGS-16,

CD27L,柄蛋白(Nectin)-4,SLITRK6,间皮素,叶酸受体,组织因子,axl,磷脂酰肌醇聚糖(glypican)-3,CA9,Cripto,CD138,CD37,MUC1,CD70,胃泌素释放肽受体,PAP,CEACAM5,CEACAM6,CXCR7,N-钙粘蛋白(cadherin),FXYD2γa,CD21,CD133,Na/K-ATP酶,mIgM(膜结合IgM),mIgA(膜结合IgA),Mer,Tyro2,CD120,CD95,CA 195,DR5,DR6,DcR3和CAIX,包括相关的多态变体和同种型。

[0367] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述TAA是CD20(UniProt 11836),HER2(Uniprot P04626),其多态变体或同种型。

[0368] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一抗原和所述第二抗原选自由以下组成的组:

[0369] -EGFR作为第一抗原且CEA作为第二抗原;

[0370] -CD19作为第一抗原且CD20作为第二抗原;

[0371] -CD19作为第一抗原且CD22作为第二抗原;

[0372] -CD123作为第一抗原且Tim-3作为第二抗原;和

[0373] -CD132作为第一抗原且CD69作为第二抗原。

[0374] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其进一步包含血清蛋白结合部分。

[0375] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述血清蛋白结合部分与血清白蛋白结合。

[0376] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述血清蛋白结合部分是结合血清白蛋白的ISV。

[0377] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述结合血清白蛋白的ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1是SFGMS(SEQ ID NO:373),CDR2是SISGSGSDTLYADSVKG(SEQ ID NO:374)且CDR3是GGSLSR(SEQ ID NO:375),CDR根据Kabat定义确定;和/或其中CDR1是GFTFSSFGMS(SEQ ID NO:376)或GFTFRSFGMS(SEQ ID NO:377),CDR2是SISGSGSDTL(SEQ ID NO:378)且CDR3是GGSLSR(SEQ ID NO:375),CDR根据Kontermann 2010确定。

[0378] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述结合血清白蛋白的ISV选自Alb8、Alb23、Alb129、Alb132、Alb11、Alb11(S112K)-A、Alb82、Alb82-A、Alb82-AA、Alb82-AAA、Alb82-G、Alb82-GG和Alb82-GGG(SEQ ID NOs:348至360)。

[0379] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述ISV直接地彼此连接或通过接头连接。

[0380] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV和/或所述第二ISV和/或可能的所述第三ISV和/或可能的所述结合血清白蛋白的ISV通过接头连接。

[0381] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述接头选自由5GS、7GS、9GS、10GS、15GS、18GS、20GS、25GS、30GS和35GS(SEQ ID NOs:362至372)的接头组成的组。

[0382] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述血清蛋白结合部分是基于非抗体的多肽。

[0383] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其进一步包含PEG。

[0384] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述ISV是Nanobody®、V_{HH}、人源化的V_{HH}或骆驼源化的V_H。

[0385] 在另外的方面,本发明提供多肽,其中所述第一ISV选自由SEQ ID NOs:1至80组成的组。

[0386] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV选自由SEQ ID NOs:1至80组成的组,并且其中所述第二ISV选自由SEQ ID NOs:297至304组成的组。

[0387] 在另外的方面,本发明提供选自由以下组成的组的多肽:SEQ ID NOs:249-250、252-253、255-256、258-260、263、265-283、286-289、306-307、309-310、312-313、315-317、320、322-340和343-346。

[0388] 在另外的方面,本发明提供这样的多肽,所述多肽特异性结合CD3并且包括以下或基本上由以下组成:4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3),其中:

[0389] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0390] (a)SEQ ID NOs:81-100;或

[0391] (b)与SEQ ID NOs:81-100中任一者的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0392] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0393] (c)SEQ ID NOs:101-122;或

[0394] (d)与SEQ ID NOs:101-122中任一者的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0395] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0396] (e)SEQ ID NOs:123-143;或

[0397] (f)与SEQ ID NOs:123-143中任一者的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0398] 本发明还提供如本文所述的多肽,其中:

[0399] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0400] (a)SEQ ID NOs:81-87;和

[0401] (b)与SEQ ID NO:81的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0402] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0403] (c)SEQ ID NOs:101-109;和

[0404] (d)与SEQ ID NO:101的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2

或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0405] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0406] (e)SEQ ID NOs:123-127;和

[0407] (f)与SEQ ID NO:123的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0408] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中CDR1选自由以下组成的组:

[0409] (a)SEQ ID NO:81;和

[0410] (b)与SEQ ID NO:81具有1或2个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0411] -在位置1处G已经变为R;

[0412] -在位置3处T已经变为A;

[0413] -在位置4处Y已经变为F;

[0414] -在位置8处S已经变为G;和/或

[0415] -在位置10处G已经变为A。

[0416] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中CDR2选自由以下组成的组:

[0417] (a)SEQ ID NO:101;和

[0418] (b)与SEQ ID NO:101具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0419] -在位置3处V已经变为T或A;

[0420] -在位置5处S已经变为T;

[0421] -在位置6处G已经变为D或E;和/或

[0422] -在位置9处T已经变为S、A或P。

[0423] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中CDR3选自由以下组成的组:

[0424] (a)SEQ ID NO:123;和

[0425] (b)与SEQ ID NO:123具有1或2个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0426] -在位置2处I已经变为T;

[0427] -在位置9处I已经变为V;和/或

[0428] -在位置10处A已经变为P。

[0429] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR1由SEQ ID NO:81表示,CDR2由SEQ ID NO:101表示,且CDR3由SEQ ID NO:123表示。

[0430] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:

[0431] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0432] (a)SEQ ID NOs:88;和

[0433] (b)与SEQ ID NO:88的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0434] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0435] (c)SEQ ID NOs:110;和

[0436] (d)与SEQ ID NO:110的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0437] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0438] (e)SEQ ID NOs:128;和

[0439] (f)与SEQ ID NO:128的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0440] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR1是SEQ ID NO:88。

[0441] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR2是SEQ ID NO:110。

[0442] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR3是SEQ ID NO:128。

[0443] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR1由SEQ ID NO:88表示,CDR2由SEQ ID NO:110表示,且CDR3由SEQ ID NO:128表示。

[0444] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:

[0445] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0446] (a)SEQ ID NO:90;和

[0447] (b)与SEQ ID NO:90的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0448] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0449] (c)SEQ ID NOs:112-113;和

[0450] (d)与SEQ ID NO:112的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0451] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0452] (e)SEQ ID NO:130;和

[0453] (f)与SEQ ID NO:130的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0454] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR1是SEQ ID NO:90。

[0455] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR2选自由以下组成的组:

[0456] (a)SEQ ID NO:112;和

[0457] (b)与SEQ ID NO:112具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0458] -在位置2处V已经变为A。

[0459] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR3是SEQ ID NO:130。

[0460] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR1由SEQ ID NO:90表示,CDR2由SEQ ID NO:112表示,且CDR3由SEQ ID NO:130表示。

[0461] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:

[0462] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0463] (a)SEQ ID NOs:89;和

[0464] (b)与SEQ ID NO:89的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0465] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0466] (c)SEQ ID NOs:111;和

[0467] (d)与SEQ ID NO:111的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0468] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0469] (e)SEQ ID NOs:129;和

[0470] (f)与SEQ ID NO:129的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0471] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR1是SEQ ID NO:89。

[0472] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR2是SEQ ID NO:111。

[0473] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR3是SEQ ID NO:129。

[0474] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR1由SEQ ID NO:89表示,CDR2由SEQ ID NO:111表示,且CDR3由SEQ ID NO:129表示。

[0475] 本发明还提供如本文所述的多肽,其中:

[0476] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0477] (a)SEQ ID NOs:91-93;和

[0478] (b)与SEQ ID NO:91的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0479] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0480] (c)SEQ ID NOs:114-117;和

[0481] (d)与SEQ ID NO:114的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2

或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0482] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0483] (e)SEQ ID NOs:131-133;和

[0484] (f)与SEQ ID NO:131的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0485] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中CDR1选自由以下组成的组:

[0486] (a)SEQ ID NO:91;和

[0487] (b)与SEQ ID NO:91具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0488] -在位置6处R已经变为N或T;

[0489] -在位置7处N已经变为H;和/或

[0490] -在位置8处M已经变为T。

[0491] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中CDR2选自由以下组成的组:

[0492] (a)SEQ ID NO:114;和

[0493] (b)与SEQ ID NO:114具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0494] -在位置1处R已经变为Q;

[0495] -在位置3处T已经变为S;和/或

[0496] -在位置7处D已经变为A或K。

[0497] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中CDR3选自由以下组成的组:

[0498] (a)SEQ ID NO:131;和

[0499] (b)与SEQ ID NO:131具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0500] -在位置2处S已经变为R;和/或

[0501] -在位置6处S已经变为V。

[0502] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR1由SEQ ID NO:91表示,CDR2由SEQ ID NO:114表示,且CDR3由SEQ ID NO:131表示。

[0503] 本发明还提供如本文所述的多肽,其中:

[0504] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0505] (a)SEQ ID NOs:94-100;和

[0506] (b)与SEQ ID NO:94的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0507] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0508] (c)SEQ ID NOs:118-122;和

[0509] (d)与SEQ ID NO:118的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通

过表面等离子共振所测量的;和/或

[0510] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0511] (e)SEQ ID NOs:134-143;和

[0512] (f)与SEQ ID NO:134的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0513] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中CDR1选自由以下组成的组:

[0514] (a)SEQ ID NO:94;和

[0515] (b)与SEQ ID NO:94具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0516] -在位置3处S已经变为T、A或G;

[0517] -在位置5处N已经变为S;

[0518] -在位置6处M已经变为T或A;和/或

[0519] -在位置9处L已经变为M。

[0520] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中CDR2选自由以下组成的组:

[0521] (a)SEQ ID NO:118;和

[0522] (b)与SEQ ID NO:118具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0523] -在位置2处H已经变为V;

[0524] -在位置5处S已经变为H或A;

[0525] -在位置8处N已经变为S;和/或

[0526] -在位置10处Y已经变为F。

[0527] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中CDR3选自由以下组成的组:

[0528] (a)SEQ ID NO:134;和

[0529] (b)与SEQ ID NO:134具有1、2、3、4或5个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0530] -在位置6处A已经变为S或D;

[0531] -在位置7处F已经变为Y或A;

[0532] -在位置8处R已经变为H;

[0533] -在位置9处S已经变为A;

[0534] -在位置11处G已经变为D、T、N、S、K或R;和/或

[0535] -在位置14处V已经变为I。

[0536] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR1由SEQ ID NO:94表示,CDR2由SEQ ID NO:118表示,且CDR3由SEQ ID NO:134表示。

[0537] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其是纳米抗体、V_{HH}、人源化的V_{HH}或骆驼源化的V_H。

[0538] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其进一步包含血清蛋白结合部分。

[0539] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述血清蛋白结合部分与血清白蛋白结合。

[0540] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述血清蛋白结合部分是结合血清白蛋白的ISV。

[0541] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中结合血清白蛋白的所述ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1是SFGMS(SEQ ID NO:373),CDR2是SISGSGSDTLYADSVKG(SEQ ID NO:374)且CDR3是GGSLSR(SEQ ID NO:375),CDR如根据Kabat定义确定;和/或其中CDR1是GFTFSSFGMS(SEQ ID NO:376)或GFTFRSFGMS(SEQ ID NO:377),CDR2是SISGSGSDTL(SEQ ID NO:378)且CDR3是GGSLSR(SEQ ID NO:375),CDR如根据Kontermann 2010确定。

[0542] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中结合血清白蛋白的所述ISV选自Alb8、Alb23、Alb129、Alb132、Alb11、Alb11(S112K)-A、Alb82、Alb82-A、Alb82-AA、Alb82-AAA、Alb82-G、Alb82-GG和Alb82-GGG(SEQ ID NOs:348至360)。

[0543] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述ISV直接连接或通过接头连接。

[0544] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述接头选自由5GS、7GS、9GS、10GS、15GS、18GS、20GS、25GS、30GS和35GS(SEQ ID NOs:362至372)的接头组成的组。

[0545] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其进一步包含PEG部分。

[0546] 在另外的方面,本发明提供编码如本文定义的多肽的核酸或核酸序列。

[0547] 在另外的方面,本发明提供包含如本文定义的核酸或核酸序列的载体。

[0548] 在另外的方面,本发明提供宿主细胞,所述宿主细胞用如本文定义的核酸或核酸序列或用如本文定义的载体转化或转染。

[0549] 在另外的方面,本发明提供生产如本文定义的多肽的方法,所述方法包括在允许表达如本文定义的多肽的条件下培养如本文定义的宿主细胞和从培养物中回收生产的多肽。

[0550] 在另外的方面,本发明提供药物组合物,所述药物组合物包含如本文所述的多肽,或根据如本文所述的方法生产的多肽。

[0551] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,或如本文所述的生产的多肽,其使用于治疗有需要的受试者。

[0552] 在另外的方面,本发明提供将预防性或治疗性多肽递送至体内特定位置、组织或细胞类型的方法,所述方法包括将如本文所述的多肽或如本文所述的生产的多肽施用至受试者的步骤。

[0553] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,或如本文所述的生产的多肽,其用于预防、治疗或改善选自由增殖性疾病、炎性疾病、传染性疾病和自身免疫性疾病组成的组的疾病。

[0554] 在另外的方面,本发明提供预防、治疗或改善选自由增殖性疾病、炎性疾病、传染性疾病和自身免疫性疾病组成的组的疾病的方法,其包括将如本文所述的多肽或如本文所述的生产的多肽施用至有需要的受试者的步骤。

[0555] 在另外的方面,本发明提供用于预防、治疗或改善如本文所述的疾病的多肽或方法,其中所述增殖性疾病是癌症。

[0556] 在另外的方面,本发明提供用于预防、治疗或改善如本文所述的疾病的多肽或方法,其中所述癌症(cancer)选自由以下组成的组:癌(carcinomas),神经胶质瘤,间皮瘤,黑素瘤,淋巴瘤,白血病,腺癌:乳腺癌,卵巢癌,宫颈癌,成胶质细胞瘤,多发性骨髓瘤(包括意

义不明的单克隆丙种球蛋白病,无症状和有症状的骨髓瘤),前列腺癌和伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma),头颈癌,结肠癌,结直肠癌,非小细胞肺癌,小细胞肺癌,食道癌,胃癌,胰腺癌,肝胆管癌,胆囊癌,小肠癌,直肠癌,肾癌,膀胱癌,前列腺癌,阴茎癌,尿道癌,睾丸癌,阴道癌,子宫癌,甲状腺癌,副甲状腺癌,肾上腺癌,胰腺内分泌癌,类癌癌症,骨癌,皮肤癌,视网膜母细胞瘤,霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,卡波济肉瘤(Kaposi's sarcoma),多中心卡斯尔曼病(multicentric Castleman's disease)或AIDS相关的原发性渗出性淋巴瘤,神经外胚层肿瘤,横纹肌肉瘤;以及上述癌症的任一种的任何转移,以及非癌症适应症如鼻息肉病。

[0557] 在另外的方面,本发明提供用于预防、治疗或改善如本文所述的疾病的多肽或方法,其中所述治疗是组合治疗。

[0558] 在另外的方面,本发明提供试剂盒,所述试剂盒包含如本文定义的多肽、如本文定义的核酸或核酸序列、如本文定义的载体或如本文定义的宿主细胞。

附图说明

[0559] 图1:人TCR/CD3和人CD3转染的细胞系的QC,使用100nM的抗-人TCRα/β抗体(克隆BW242/412)(黑色)和100nM抗-人CD3抗体(克隆OKT-3)(灰色)。绘制每个细胞系的MCF值(平均通道荧光)。

[0560] 图2A和2B:单价CD3纳米抗体与CHO-K1细胞上表达的人TCR/CD3的剂量依赖性结合(图2A)和与纯化的原代人T细胞的剂量依赖性结合(图2B)。针对纳米抗体的浓度绘制MCF值(平均通道荧光)。

[0561] 图3:单价CD3纳米抗体与HEK293H人TCR(2IAL)/CD3(实心圆)、HEK293H人CD3(十字)和与HEK293H亲本细胞系(空心圆)的剂量依赖性结合。针对纳米抗体的浓度绘制MCF值(平均通道荧光)。

[0562] 图4A和4B:珠偶联(bead coupled)的单价CD3纳米抗体的T细胞活化数据(图4A)。以溶液形式呈现的单价CD3纳米抗体的T细胞活化数据(图4B)。通过监测CD69在原代人T细胞上的上调对活化进行测量。绘制每个纳米抗体的MCF值(平均通道荧光)。

[0563] 图5A-5C:CD20xCD3(实线)和CD3xCD20(虚线)双特异性纳米抗体的稀释物系列与CHO-K1细胞上表达的人TCR/CD3(图5A),原代人T细胞(图5B)和Ramos细胞(图5C)的结合。针对纳米抗体的浓度绘制MCF值(平均通道荧光)。

[0564] 图6A和6B:在基于流式细胞术的人T细胞介导的Ramos(图6A)和Raji(图6B)B细胞杀伤测定中,CD20xCD3(实线)和CD3xCD20(虚线)双特异性纳米抗体的剂量依赖性杀伤效应。针对纳米抗体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0565] 图7:在人CD20 Ramos(空心符号)和Raji(实心符号)细胞上抗-CD20纳米抗体的剂量依赖性结合。针对纳米抗体的浓度绘制MCF值(平均通道荧光)。

[0566] 图8:在基于xCELLigence的人T细胞介导的CHO-K1人CD20杀伤测定中,CD20xCD3(实线)和CD3xCD20(虚线)双特异性纳米抗体的剂量依赖性杀伤效应。针对纳米抗体的浓度绘制CI。

[0567] 图9:在使用CHO-K1人CD20细胞(黑色条)和使用CHO-K1亲本细胞系(灰色条)以阐明TAA依赖性杀伤的基于xCELLigence的杀伤测定中,1μM的CD20xCD3和不相关的构建体的

杀伤效应。针对纳米抗体的浓度绘制细胞指数(CI)。

[0568] 图10:在使用Ramos的基于流式细胞术的杀伤测定中,具有9GS接头(空心圆-虚线)和35GS接头(实心正方形-虚线)的CD20xCD3纳米抗体以及具有35GS接头(实心菱形-实线)的CD3xCD20纳米抗体的剂量依赖性杀伤效应。针对纳米抗体的浓度绘制%细胞死亡(TORPRO阳性细胞)。

[0569] 图11:在使用不同的效应子(E)与靶标(T)的比率(E:T比率10:1-实心圆,E:T比率5:1-空心正方形,E:T比率2:1-实心三角形,和E:T比率1:1-空心菱形)的基于流式细胞术的人T细胞介导的Ramos B细胞杀伤测定中,T017000062的剂量依赖性杀伤。针对纳米抗体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0570] 图12:使用CHO-K1人CD20靶细胞的xCELLigence中的纯化的原代人T细胞介导的杀伤测定中,CD20/CD3的时间依赖性细胞溶解活性。针对构建体的浓度绘制%特异性溶解。不同曲线代表在加入T细胞后的分析时间。

[0571] 图13A-13C:HLE构建体的系列稀释物与CHO-K1细胞上表达的人TCR/CD3(图13A),原代人T细胞(图13B)和Ramos细胞(图13C)的结合。针对纳米抗体的浓度绘制MCF值(平均通道荧光)。

[0572] 图14A-14D:在基于流式细胞术的人T细胞介导的Ramos B细胞杀伤测定中,CD20xCD3双特异性纳米抗体(实线-菱形)相比于CD20xCD3xALB11构建体(实线-实心三角形)的剂量依赖性杀伤(图14A,图14C)和在缺少(实线-实心三角形)或存在(虚线-空心三角形)30μM HSA的情况下CD20xCD3xALB11构建体的剂量依赖性杀伤效应(图14B,图14D)。针对纳米抗体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0573] 图15:在流式细胞术中100nM单价抗-HER2纳米抗体(5F07)与SK-BR-3、MCF-7和MDA-MB-468细胞系的结合以比较HER2表达水平。绘制每个细胞系的MCF值(平均通道荧光)。

[0574] 图16:在基于xCELLigence的人T细胞介导的细胞杀伤测定中,双特异性CD3xHER2纳米抗体(虚线)和双特异性HER2xCD3(实线)的剂量依赖性杀伤效应。使用18小时处对数据进行分析。针对纳米抗体的浓度绘制细胞指数(CI)。

[0575] 图17:在基于流式细胞术的杀伤测定中,在用双特异性CD20xCD3纳米抗体孵育人CD20阳性CHO-K1细胞后,经由人T细胞的剂量依赖性INF-γ产生。在72小时温育后对数据进行分析。针对纳米抗体的浓度绘制405nm处的OD。

[0576] 图18:研究设计PBMC B细胞消耗模型。在第3天(D3)将PBMC腹膜内注射至动物。从D3至D7,将小鼠用T017000084(CD3/CD20)IV Q1Dx5或T017000088IV Q1Dx5(不相关的纳米抗体)处理。

[0577] 图19:绝对PBMC衍生的B细胞以对数量级计数。绘制各个动物结果。针对不同处理组显示B-细胞的数量。

[0578] 图20:研究设计Ramos模型。在D1将Ramos细胞静脉内注射至小鼠。在D3将PBMC腹膜内注射至动物。从D3至D7,将小鼠用T017000084(CD3/CD20)IV Q1Dx5或T017000088IV Q1Dx5(不相关的纳米抗体)处理。

[0579] 图21:绝对Ramos B细胞以对数量级计数。绘制各个动物结果。在图表上方的空心圆表明基于来自混合效应ANOVA分析的F检验,其活性剂量在统计学上显著不同于不相关的NB(T017000088)。所有效应在5%的显著性水平上是统计学上显著的。

[0580] 图22:绝对PBMC衍生的B细胞以对数量级计数。绘制各个动物结果。在图表上方的空心圆表明基于来自混合效应ANOVA分析的F检验,其活性剂量在统计学上显著不同于不相关的NB(T017000088)。所有效应在5%的显著性水平上是统计学上显著的。

[0581] 图23A和23B:在流式细胞术中确定EGFR(图23A;Santa Cruz,sc-120PE)或CEACAM5(图23B;Sino Biological,11077-MM02-P)在HER14、Hela、LoVo和LS174-T细胞系上的表达水平。绘制每个细胞系的MCF值(平均通道荧光)。

发明详述

[0583] 本发明人认识到将T细胞和肿瘤细胞结合在一起以诱导免疫应答的格式应该符合各种各样的且常常相反的要求。格式应该广泛适用。具体而言,格式应该优选地用于广泛范围的患者,并且优选也针对广泛范围的肿瘤使用。格式应该优选地是安全的,并且仅靶向预期的细胞。此外,格式应该优选地是足够小的以容易穿透组织和肿瘤,而在另一方面,格式应该是对患者友好的。例如,格式应该具有延长的半衰期,使得在施用后所述格式不会立即通过肾清除去除。然而,延长半衰期应该优选地不引入脱靶活性和副作用或限制穿透到组织和肿瘤中。此外,认识到肿瘤细胞通常通过治疗内靶向抗原的下调而产生逃避机制。因此,在另外的优选形式中,格式应该同时靶向多种抗原。

[0584] 本发明实现了这些要求中的至少一个。

[0585] 具体而言,预测免疫球蛋白单可变结构域(ISV)原则上将是理想的候选物,因为它们足够小以容易穿透(肿瘤)组织并且能够与其它ISV组合为结构单元。其次,针对CD3、特别是CD3ε的ISV应该具有广泛的适用性。

[0586] 鉴定了相关ISV的六个簇,其具有意想不到的范围的有利特征。首先,ISV意想不到地是广泛适用的,即,CD3 ISV能够以高亲和力结合来自不同供体的T细胞。在多特异性多肽中经格式化,CD3 ISV使得不同肿瘤相关抗原的肿瘤细胞杀死成为可能。因此,CD3 ISV能够针对众多癌症使用。另外,当与白蛋白结合时,包含CD3 ISV的多特异性多肽保持活性。这有助于良好的PK性质和患者依从性,同时使副作用最小化。仅当与T细胞和靶细胞二者结合时本发明的多肽才显示效应,这表明其安全性。

[0587] 本发明人认为同时靶向多种抗原降低了产生肿瘤逃逸变体的可能性,所以T细胞接合策略的治疗活性得以改善。提供多特异性多肽,其包含与针对不同靶抗原和/或特定抗原上的不同表位(双互补位的)的免疫球蛋白单可变结构域组合的CD3 ISV。

[0588] 免疫球蛋白序列,诸如由此衍生的抗体和抗原结合片段(例如,免疫球蛋白单可变结构域或ISV),用于在研究和治疗应用中特异性靶向它们各自的抗原。免疫球蛋白单可变结构域(诸如例如VHH或纳米抗体)的产生可以涉及实验动物(诸如美洲驼)的免疫,从免疫组织构建噬菌体文库,选择展示结合抗原的免疫球蛋白单可变结构域的噬菌体以及针对所需特异性筛选所述结构域及其工程改造的构建体(WO 94/04678)。备选地,类似的免疫球蛋白单可变结构域(诸如例如dAb)能够通过直接从天然或合成文库选择展示结合抗原的免疫球蛋白单可变结构域的噬菌体并随后针对所需特异性筛选所述结构域和其工程改造的构建体来产生(Ward等人,Nature,1989,341:544-6;Holt等人,Trends Biotechnol.,2003,21(11):484-490;以及例如WO 06/030220,WO 06/003388和Domantis Ltd.的其它公开专利申请)。不幸的是,与其它策略相比,使用单克隆和/或重度工程改造的抗体也带来高制造成本

并可能导致次优的(suboptimal)肿瘤穿透。

[0589] 本发明提供了与T细胞受体复合物的CD3特异性结合的多特异性多肽,其具有意想不到的范围的有利特征。首先,多肽易于制造。此外,ISV意想不到地是广泛适用的,即,CD3 ISV能够以高亲和力结合来自不同供体的T细胞。在多特异性多肽中经格式化,CD3 ISV使得不同肿瘤相关抗原的肿瘤细胞杀死成为可能。与此相反,当多肽不与T细胞和靶细胞结合时,则没有观察到杀伤,这强调了本发明的多肽的安全性。因此,CD3 ISV能够针对众多癌症使用。此外,CD3 ISV能够被认为是安全的。另外,当与白蛋白结合时,包含CD3 ISV的多特异性多肽保持活性。这将有助于良好的PK性质和患者依从性,同时使副作用最小化。

[0590] 因此,本发明涉及包含第一和第二免疫球蛋白单可变结构域(ISV)的多肽,其中第一ISV对CD3具有高亲和力/与CD3结合,并且第二ISV对细胞(靶细胞)、优选肿瘤细胞上的抗原具有高亲和力/与所述抗原结合。抗原优选地对所述靶细胞(诸如例如肿瘤相关抗原(TAA))具有特异性。本发明的多特异性多肽将T细胞导向细胞(例如肿瘤细胞)并诱导T细胞活化,以便允许所述T细胞抑制或杀死所述靶细胞(例如所述肿瘤细胞)。

[0591] 定义:

[0592] a)除非另有说明或定义,使用的所有术语具有其在本领域中通常的含义,其对于本领域技术人员来说是清楚的。例如参考WO 08/020079

[0593] 第46页段a)中提及的标准手册。

[0594] b)术语“免疫球蛋白单可变结构域”,可与“单可变结构域”和“ISV”互换使用,表示其中抗原结合位点存在于单个免疫球蛋白结构域并由单个免疫球蛋白结构域形成的分子。这将免疫球蛋白单可变结构域与“常规”免疫球蛋白或其片段(诸如Fab,scFv等)分开,其中两个免疫球蛋白结构域、特别是两个可变结构域相互作用以形成抗原结合位点。典型地,在常规免疫球蛋白中,重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)相互作用以形成抗原结合位点。在这种情况下,VH和VL二者的互补决定区(CDR)将有助于抗原结合位点,即总共6个CDR将参与抗原结合位点的形成。与此不同,免疫球蛋白单可变结构域的结合位点由单个VH或VL结构域形成。因此,免疫球蛋白单可变结构域的抗原结合位点由不超过三个CDR形成。

[0595] 术语“免疫球蛋白单可变结构域”、“单可变结构域”和“ISV”因此不包括常规免疫球蛋白或其片段,所述常规免疫球蛋白或其片段要求至少两个可变结构域的相互作用用来形成抗原结合位点。然而,这些术语确实包括常规免疫球蛋白的片段,其中抗原结合位点由单个可变结构域形成。

[0596] 术语“免疫球蛋白单可变结构域”或“ISV”包括(但不限于)分别地抗原结合结构域或片段,诸如V_{HH}结构域或V_H或V_L结构域。术语抗原结合分子或抗原结合蛋白可以交换使用,并且还包括术语纳米抗体。免疫球蛋白单可变结构域可以是轻链可变结构域序列(例如V_L-序列),或重链可变结构域序列(例如V_H-序列);更特别地,它们可以是衍生自常规四链抗体的重链可变结构域序列或衍生自重链抗体的重链可变结构域序列。相应地,免疫球蛋白单可变结构域可以是结构域抗体,或者适合用作结构域抗体的免疫球蛋白序列,单结构域抗体,或者适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白序列,“dAbs”或者适合用作dAbs的免疫球蛋白序列,或者纳米抗体,包括但不限于V_{HH}序列、人源化的VHH序列或骆驼源化的VH序列。本发明包括不同来源的免疫球蛋白序列,包括小鼠、大鼠、兔、驴、人和骆驼科动物的免疫球蛋白序列。免疫球蛋白单可变结构域包括完全是人的、人源化的,其它序列优化的或嵌合的免疫

球蛋白序列。免疫球蛋白单可变结构域和免疫球蛋白单可变结构域的结构可视为-但不限于-由四个构架区或

[0597] “FR’s”组成,其在本领域中以及在本文中分别称为“构架区1”或

[0598] “FR1”;“构架区2”或“FR2”;“构架区3”或“FR3”;“构架区4”或“FR4”;

[0599] 构架区被三个互补决定区或“CDR’s”间隔开,所述三个互补决定区或

[0600] “CDR’s”在本领域中分别称为“互补决定区1”或“CDR1”;“互补决定区2”或“CDR2”;“互补决定区3”或“CDR3”。应当注意术语纳米抗体(Nanobody或Nanobodies)是Ablynx N.V.的注册商标,因此也分别被称为纳米抗体®(Nanobody®或Nanobodies®)。

[0601] c)除非另有说明,术语“免疫球蛋白序列”、“序列”、“核苷酸序列”和“核酸”如WO 08/020079第46页段b)中所述。

[0602] d)除非另有说明,所有没有特别详细描述的方法、步骤、技术和操作可以以本身已知的方式进行或已经这样进行,这对于本领域技术人员来说是清楚的。例如再次参考本文提及的标准手册和一般背景技术以及其中所引用的其它参考文献;以及例如下述综述Presta 2006(Adv.

[0603] Drug Deliv.Rev.58(5-6):640-656),Levin和Weiss 2006(Mol.Biosyst.

[0604] 2(1):49-57),Irving等人2005(J.Immunol.Methods 248(1-2):31-45),Schmitz等人2000(Placenta 21增刊A:S106-112,Gonzales等人2005

[0605] (Tumour Biol.26(1):31-43),其中描述了蛋白质工程技术,例如亲和力成熟及其它提高蛋白质如免疫球蛋白的特异性及其它所需性质的技术。

[0606] e)氨基酸残基用标准的三字母或单字母氨基酸代码表示。参考发明名称为“Immunoglobulin single variabledomains directed against IL-6R andpolypeptides comprising the same for the treatment of diseases anddisorders associated with Il-6mediated signalling”的Ablynx N.V.的国际申请WO 08/020079第48页表A-2。

[0607] f)为比较两个以上核苷酸序列的目的,第一核苷酸序列和第二核苷酸序列之间的“序列同一性”的百分比可以如WO 08/020079(通过引用的方式将其合并入本文中)第49页段e)所述进行计算或确定,例如用[第一核苷酸序列中与第二核苷酸序列中相应位置的核苷酸相同的核苷酸的数目]除以[第一核苷酸序列中核苷酸的总数目]并乘以[100%],其中

[0608] 第二核苷酸序列中每个核苷酸的缺失、插入、取代或添加-与第一核苷酸序列相比-视为是单核苷酸(位置)的差异;或者使用适合的计算机算法或技术,也如WO 08/020079(通过引用的方式合并入本文中)

[0609] 第49页段e)所述。

[0610] g)为了比较两个以上免疫球蛋白单可变结构域或其它氨基酸序列例如本发明的多肽等的目的,第一氨基酸序列和第二氨基酸序列之间的“序列同一性”(本文中也称为“氨基酸同一性”)的百分比可以如WO

[0611] 08/020079(通过引用的方式合并入本文中)第49和50页的段f)所述进行计算或确定,例如用[第一氨基酸序列中与第二氨基酸序列中相应位置的氨基酸残基相同的氨基酸残基的数目]除以[第一氨基酸序列中氨基酸残基的总数目]并乘以[100%],其中第二氨基酸序列中每个氨基酸残基的缺失、插入、取代或添加-与第一氨基酸序列相比-视为是单个氨基酸残基(位置)的差异,即本文所定义的“氨基酸差异”;或者使用适合的计算机算法或

技术,也如WO 08/020079(通过引用的方式将其合并入本文中)第49和50页段f)所述。

[0612] 而且,在确定两个免疫球蛋白单可变结构域之间的序列同一性程度时,本领域技术人员可以考虑所谓的"保守"氨基酸取代,如WO

[0613] 08/020079第50页所述。

[0614] 还可以基于由Schulz等人1978(Principles of Protein Structure,Springer-Verlag)提出的不同物种的同源蛋白之间的氨基酸变异频度分析,由Chou和Fasman 1975(Biochemistry 13:211)和1978(Adv.

[0615] Enzymol.47:45-149)提出的结构形成潜能分析,和由Eisenberg等人1984(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:140-144)、Kyte&Doolittle 1981(JMolec.Biol.157:105-132)和Goldman等人1986(Ann.Rev.Biophys.

[0616] Chem.15:321-353)提出的蛋白质疏水模式分析对本文所述的多肽应用任何氨基酸取代,通过引用的方式将它们的全文合并入本文。本文说明书和上述引用的一般背景技术中给出纳米抗体的一级、二级和三级结构的信息。而且,为此目的,例如在Desmyter等人1996(NatureStructural Biology,3:803),Spinelli等人1996(Natural StructuralBiology 3:752-757)和Decanniere等人1999(Structure,7:361)中给出了美洲驼的V_{HH}结构域的晶体结构。可以在上述引用的现有技术中找到关于在常规V_H结构域中在这些位置上形成V_H/V_L界面和可能的骆驼源化取代的一些氨基酸残基的进一步的信息。

[0617] h)如果免疫球蛋白单可变结构域和核酸序列在其全长上具有100%的序列同一性(如文本所定义的),那么将它们称为"完全相同"。

[0618] i)当比较两个免疫球蛋白单可变结构域时,术语"氨基酸差异"指与第二序列相比,第一序列的某个位置上单个氨基酸残基的插入、缺失或取代;应当理解两个免疫球蛋白单可变结构域可以包含一个、两个或更多个这种氨基酸差异。

[0619] j)当核苷酸序列或氨基酸序列被称为分别"包含"另一个核苷酸序列或氨基酸序列,或者被称为"基本上由"另一个核苷酸或氨基酸序列"组成"时,其具有WO 08/020079第51-52页段i)所给出的含义。

[0620] k)术语"以基本上分离的形式"具有WO 08/020079第52和53页段j)所给出的含义。

[0621] l)术语"域"和"结合结构域"具有WO 08/020079第53页段k)所给出的含义。

[0622] m)术语"抗原决定簇"和"表位"在本文中可互换使用,具有WO 08/020079

[0623] 第53页段l)所给出的含义。

[0624] n)如WO 08/020079第53页段m)中进一步描述的,能与特定的抗原决定簇、表位、抗原或蛋白(或者它的至少一部分、片段或表位)(特异性)结合,与其具有亲和力和/或对其具有特异性的氨基酸序列(例如本发明的抗体、多肽,或通常的抗原结合蛋白或多肽或其片段)被称为"针对"或"指向"所述的抗原决定簇、表位、抗原或蛋白。

[0625] o)术语"特异性"指特定的抗原结合分子或抗原结合蛋白(诸如本发明的ISV、纳米抗体或多肽)能结合的不同类型的抗原或抗原决定簇的数目。可以基于亲和力和/或抗体亲抗原性确定抗原结合蛋白的特异性。亲和力(由抗原与抗原-结合蛋白解离的平衡常数(K_D或KD)表示),是抗原决定簇(即靶标),和抗原-结合蛋白(即ISV或纳米抗体)上的抗原-结合位点之间的结合强度的测量值:K_D值越小,抗原决定簇和抗原-结合分子之间的结合强度越强(备选地,亲和力还可以表达为亲和力常数(K_A),其是$1/K_D$)。如对于技术人员明确的(例如

基于本文中进一步公开的),亲和力可以以本身已知的方式确定,取决于研究的特定抗原。

[0626] 亲合力是多肽的亲和力,即配体能够经由两个(以上)药效团(ISV)结合,其中多个相互作用协同增强"表观"亲和力。亲合力是本发明的多肽和相关抗原之间的结合强度的测量值。本发明的多肽能够经由其两个(以上)结构单元,如ISV或纳米抗体,结合于至少两个靶标,其中

[0627] 多个相互作用,例如第一结构单元,ISV或纳米抗体结合第一靶标并且第二结构单元,ISV,或纳米抗体结合第二靶标,协同增强"表观"

[0628] 亲和力。亲合力与抗原决定簇和抗原-结合分子上的其抗原结合位点之间的亲和力以及抗原-结合分子上存在的相关结合位点的数量相关。例如,并且不受限制,含有两个以上结构单元,如针对细胞上不同靶标的ISV或纳米抗体的多肽可以(并且通常将)以比包含在本发明中的多肽中的单个单体或单个结构单元,如,例如,单价ISV或纳米抗体高的亲合力结合。

[0629] 任何大于10^{-4}摩尔/升的K_D值(或任何低于10^4M^{-1}的K_A值)升/摩尔通常认为是非特异结合。

[0630] 本发明的多肽包含第一和第二结构单元,例如第一和第二ISV,或第一和第二纳米抗体。优选为分别确定各个结构单元,例如ISV或纳米抗体的亲和力。换句话说,对于单价结构单元,ISV或纳米抗体,独立于由于其他结构单元,ISV或纳米抗体(其可能存在或可能不存在)导致的亲合力效应来确定亲和力。对于单价结构单元,ISV或纳米抗体的亲和力可以对单价结构单元,ISV或纳米抗体本身确定,即当所述单价结构单元,ISV或纳米抗体不包含在本发明的多肽中时。在备选方案中或此外,在不存在其他靶标时,单价结构单元,ISV或纳米抗体的亲和力可以对一个靶标确定。

[0631] 抗原-结合蛋白对抗原或抗原决定簇的结合可以以本身已知的任何合适方法确定,包括例如,Scatchard分析和/或竞争结合测定,如放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定(EIA)和夹心竞争测定,和本领域中的本身已知的其不同变化形式;以及本文中提及的其他技术。

[0632] 解离常数可以是实际或表面解离常数,如对于技术人员将是明显的。用于确定解离常数的方法对于技术人员将是明显的,并且例如包括本文中提及的技术。在此方面,还将明显的是,其可能不能测量大于10^{-4}摩尔/升或10^{-3}摩尔/升(例如,10^{-2}摩尔/升)的解离常数。任选地,如还将对于技术人员明显的,(实际或表观)解离常数可以基于(实际或表观)结合常数(K_A),通过关系[$K_D=1/K_A$]的方式计算。

[0633] 亲和力表示分子相互作用的强度或稳定性。亲和力通常由K_D或解离常数给出,其具有摩尔/升(或M)的单位。亲和力还可以表达为结合常数,K_A,其等于$1/K_D$并且具有(摩尔/升)$^{-1}$(或M^{-1})的单位。在本说明书中,两个分子(如本发明的氨基酸序列、纳米抗体或多肽和其预期靶标)之间的相互作用的稳定性将主要根据它们的相互作用的K_D值表达;技术人员将明确,鉴于关系$K_A=1/K_D$,通过其K_D值指定分子相互作用的强度还可以用于计算相应K_A值。K_D-值也在热力学意义上表征分子相互作用的强度,因为通过公知关系$DG=RT.\ln(K_D)$(等价地$DG=-RT.\ln(K_A)$)它与结合的自由能(DG)相关,其中R等于气体常数,T等于绝对温度并且ln表示自然对数。

[0634] 被认为有意义的(例如特异的)的对于生物学相互作用的K_D通常在10^{-10}M(0.1nM)

至10^{-5}M(10000nM)的范围内。相互作用越强,其K_D越低。

[0635] K_D也可以表达为复合体的解离速率常数(表示为k_{off})与其结合速率(表示为k_{on})的比率(所以$K_D=k_{off}/k_{on}$和$K_A=k_{on}/k_{off}$)。解离速率k_{off}具有单位s^{-1}(其中s是秒的SI单位记号)。结合速率k_{on}具有单位$M^{-1}s^{-1}$。结合速率可以在$10^2M^{-1}s^{-1}$至约$10^7M^{-1}s^{-1}$之间变化,接近对于生物分子相互作用的扩散限制的结合速率常数。通过关系$t_{1/2}=\ln(2)/k_{off}$,解离速率与给定分子相互作用的半衰期有关。解离速率可以在$10^{-6}s^{-1}$(接近具有多日的$t_{1/2}$的不可逆复合体)至$1s^{-1}$($t_{1/2}=0.69s$)之间变化。

[0636] 两个分子之间的分子相互作用的亲和力可以经由本身已知的不同技术测量,如公知的表面等离子共振(SPR)生物传感器技术(参见例如Ober等人2001,Intern.Immunology,13:1551-1559)。如本文使用的术语“表面等离子共振”,是指允许通过检测生物传感器矩阵内的蛋白浓度的改变分析实时生物特异相互作用的光学现象,在传感器矩阵中,一种分子被固定在生物传感器芯片上,并且另一种分子在流动条件下经过固定的分子,得到k_{on},k_{off}测量值和由此得到K_D(或K_A)值。这可以例如使用公知的BIAcore(R)系统(BIAcore International AB,GE Healthcare公司,Uppsala,Sweden和Piscataway,NJ)进行。对于进一步描述,参见Jonsson等人1993(Ann.Biol.Clin.51:19-26),Jonsson等人1991(Biotechniques 11:620-627),Johnsson等人1995(J.Mol.Recognit.8:125-131)和Johnnson等人1991(Anal.Biochem.198:268-277)。

[0637] 备选地,亲和力能够在动力学排阻分析(KinExA)(参见例如Drake等人2004,Anal.Biochem.,328:35-43)中,使用KinExA®平台(Sapidyne Instruments Inc,Boise,USA)测量。术语“KinExA”,如本文中所用,是指测量未修饰的分子的真正平衡结合亲和力和动力学的基于溶液的方法。抗体/抗原复合物的平衡溶液经过具有预涂有抗原(或抗体)的小球的柱,这允许游离抗体(或抗原)结合涂覆的分子。检测由此捕获的抗体(或抗原)通过荧光标记的蛋白结合所述抗体(或抗原)完成。

[0638] 如果测量过程例如由与一种分子的生物传感器上包被层相关的假象某种程度上影响隐含的分子的固有结合亲和力,技术人员还将明确的是,测量的K_D可以对应于表观K_D。此外,如果一种分子含有多于一个用于其他分子的识别位点,可以测量表观K_D。在此情况下,测量的亲和力不受两个分子的相互作用的亲合力影响。

[0639] 可以用于评价亲和力的另一方法是Friguet等人1985(J.Immunol.

[0640] Methods,77:305-19)的2-步骤ELISA(酶联免疫吸附测定)步骤。该方法建立溶液相结合平衡测量并且避免与在支持物如塑料上的分子中的一种的吸附相关的假象。

[0641] 然而,K_D的精确测量可能是极为劳力密集的并且因此,经常确定表观K_D值以评价两种分子的结合强度。应该注意,只要以连续的方式进行所有测量(例如保持测定条件不变),表观K_D测量可以用作真正K_D的近似值,并且因此在本文件中,K_D和表观K_D应该被以相等的重要性或相关性处理。

[0642] 最后,应该注意,在很多情况下,有经验的科学家可以判断其方便用于确定相对于一些参考分子的结合亲和力。例如,为了评价分子A和B之间的结合强度,可以例如使用参考分子C,其已知结合B并且适当地用荧光团或发色团基团或其他化学部分,如用于容易在ELISA或FACS(荧光激活的细胞分选)或其他形式(用于荧光检测的荧光团,用于光吸收检测的发色团,用于链霉亲和素介导的ELISA检测的生物素)中检测的生物素标记。通常,将参考

分子C保持固定的浓度并且对于给定浓度或量的B改变A的浓度。作为结果,获得对应于A的浓度的IC_{50}值,在该值,在不存在A的情况下对于C测量的信号减半。假如$K_{D\ ref}$(参考分子的K_D)以及参考分子的总浓度c_{ref}是已知的,则对于相互作用A-B的表观K_D可以从下式获得:$K_D = IC_{50}/(1+c_{ref}/K_{D\ ref})$。注意如果cref<<$K_{D\ ref}$,则$K_D \approx IC_{50}$。假如对于比较的结合物的$IC_{50}$的测量以连续的方式进行(例如保持$c_{ref}$固定),则分子相互作用的强度或稳定性可以通过$IC_{50}$评价,并且在本文中将该测量判断为等于$K_D$或表观$K_D$。

[0643] p)本发明的氨基酸序列、化合物或多肽的半衰期通常可以如WO

[0644] 08/020079第57页段o)所描述的以及本文所提及的那样定义,指例如由于氨基酸序列或化合物的降解和/或天然机制造成的序列或化合物的清除或隔离,所述序列、化合物或多肽在体内的血清浓度减少50%所花费的时间。本发明的氨基酸序列、化合物或多肽的体内半衰期可以用其本身已知的任何方式确定,例如通过药代动力学分析确定。适合的技术对本领域技术人员来说是清楚的,通常可以是如WO 08/020079第57页段o)所描述的。如WO 08/020079第57页段o)中还提及的,半衰期可以用参数例如t1/2-α,t1/2-β和曲线下面积(AUC)表示。例如可以参考下面的实验部分,以及标准手册,例如Kenneth等人1996(Chemical Stability of Pharmaceuticals:A Handbook for Pharmacists)和Peters等人1996(Pharmacokinete analysis:A Practical Approach)。还可以参考Gibaldi&Perron 1982(Pharmacokinetics,Dekker M,2nd修订版)。术语“半衰期的增加”或“增加的半衰期”如WO 08/020079第57页段o)所定义的,特别指t1/2-β的增加,伴随或不伴随着t1/2-α和/或AUC或二者的增加。

[0645] q)关于靶标或抗原,术语靶标或抗原上的“相互作用位点”指靶标或抗原上的位点、表位、抗原决定簇、部分、结构域或氨基酸残基序列段(stretch),其是靶标或抗原的与配体、受体或其它结合配偶体的结合位点、催化位点、切割位点、变构相互作用位点、多聚化(例如同聚化或异二聚化)中涉及的位点;或者靶标或抗原的生物学作用或机制中涉及的靶标或抗原上的任何其它位点、表位、抗原决定簇、部分、结构域或氨基酸残基序列段(stretch)。更通常地,“相互作用位点”可以是本发明的氨基酸序列或多肽能够结合并使得靶标或抗原(和/或涉及所述靶标或抗原的任何途径、相互作用、信号传导、生物学机制或生物学效应)被调节的所述靶标或抗原上的任何位点、表位、抗原决定簇、部分、结构域或氨基酸残基序列段(stretch)。

[0646] r)当其与第一抗原以(所述氨基酸序列或多肽与第二靶标或多肽结合的亲和力)至少10倍、如至少100倍、和优选至少1000倍和至多可达10.000倍或更高的亲和力/抗体亲抗原性(如上所述的,适合地表达为K_D值,K_A值,K_{off}速率和/或K_{on}速率)结合,则将免疫球蛋白单可变结构域或多肽称为相对于第二靶标或抗原而言对第一靶标或抗原是

[0647] “特异的”。例如,第一抗原可以与靶标或抗原以比所述氨基酸序列或多肽与第二靶标或抗原结合的K_D小至少10倍,例如小至少100倍,

[0648] 其优选小至少1000倍,例如10.000倍以下的K_D值结合。优选地,当与第二靶标或抗原相比,免疫球蛋白单可变结构域或多肽对第一靶标或抗原是“特异的”时,它针对(如本文所定义的)所述的第一靶标或抗原,而不针对所述第二靶标或抗原。

[0649] s)术语“交叉阻断(cross-block)”、“被交叉阻断(cross-blocked)”和“交叉阻断的(cross-blocking)”在本文中可互换使用,指免疫球蛋白单可变结构域或多肽干扰天然

配体与其一种或多种受体结合的能力。本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽能够干扰另一种化合物如天然配体与其靶标结合的程度,并且因此无论其是否可被称为根据本发明的交叉阻断,可以使用竞争性结合检测测定。一种特别适合的定量交叉阻断检测使用基于FACS-或基于ELISA的方法或Alphascreen,测量标记的(例如带His标记的或生物素化的)根据本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽及其它结合试剂之间就它们与靶标的结合而言的竞争。实验部分一般性地描述了用于测定结合分子是否交叉阻断或者能交叉阻断本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽的适合的基于FACS-、基于ELISA-或基于Alphascreen置换的检测。应当认识到所述检测可用于本文所描述的任何免疫球蛋白单可变结构域或其它结合试剂。因此,通常,根据本发明的交叉阻断氨基酸序列或其它结合剂是例如与上述交叉阻断检测中的靶标结合的,以使得在检测过程中以及在存在本发明的第二氨基酸序列或其它结合剂的条件下,所记录的根据本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽被0.01mM或更少量的待测的可能的交叉阻断试剂(交叉阻断试剂可以是另一种常规单克隆抗体例如IgG,经典单价抗体片段(Fab,scFv)和改造的变体(例如双抗体、三抗体、微抗体、VHHs、dAbs、VHs、VLs))的置换为最大理论置换(例如被需要被交叉阻断的非标记的(例如未标记的)免疫球蛋白单可变结构域或多肽置换)的60％-100％之间(例如在基于ELISA/Alphascreen的竞争检测中)或者80％-100％之间(例如在基于FACS的竞争检测中)。

[0650] t)如果所述VHH1型免疫球蛋白单可变结构域或1型VHH序列具有85％同一性(使用VHH1共有序列作为查询序列并且将具有标准设置(即,blosom62得分矩阵)的blast算法)用于VHH1共有序列(QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKE

[0651] REGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPE

[0652] DTAVYYCAA)(SEQ ID NO:361)并且在位置50强制地具有半胱氨酸(即,C50)(使用Kabat编号),则表明氨基酸序列如例如根据本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽是“VHH1型免疫球蛋白单可变结构域”或“1型VHH序列”。

[0653] u)如果氨基酸序列例如根据本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽对两个不同抗原或抗原决定簇(例如来自两个不同哺乳动物物种的血清白蛋白,例如人血清白蛋白和猕猴血清白蛋白)是特异的,那么将其称为对这些不同的抗原或抗原决定簇是“交叉反应的”。

[0654] v)如WO 08/020079(通过引用合并入本文)第58和59页段q)所进一步描述的,根据Kabat等人给出的V_H结构域的通用编号(“Sequence ofproteins of immunological interest”,US Public Health Services,NIHBethesda,MD,公布号91)对免疫球蛋白单可变结构域的氨基酸残基进行编号,如Riechmann和Muyldermans,2000(J.Immunol.Methods

[0655] 240(1-2):185-195;参见例如该出版物的图2)中应用于骆驼科动物的

[0656] V_{HH}结构域的那样。应该注意的是-正如本领域中对于V_H结构域和

[0657] VHH结构域所熟知的一样-每个CDR中的氨基酸残基的总数可以变化,并且可以不对应于由Kabat编号所指出的氨基酸残基的总数(即,根据Kabat编号的一个或多个位置在实际序列中可以不被占据,或者

[0658] 实际序列可以含有比Kabat编号所允许的数量更多的氨基酸残基)。这意味着,通常,根据Kabat的编号可以对应于或不对应于实际序列中的氨基酸残基的实际编号。VH结构域和VHH结构域中的氨基酸残基的总数将通常在110至120的范围内,通常在112至115之间。

然而,应该注意的是更小且更长的序列也可以适于本文所述的目的。

[0659] CDR区的确定也可以根据不同的方法进行。在根据Kabat的CDR确定中,免疫球蛋白单可变结构域的FR1包含1-30位的氨基酸残基,免疫球蛋白单可变结构域的CDR1包含31-35位的氨基酸残基,免疫球蛋白单可变结构域的FR2包含36-49位的氨基酸,免疫球蛋白单可变结构域的CDR2包含50-65位的氨基酸残基,免疫球蛋白单可变结构域的FR3包含66-94位的氨基酸残基,免疫球蛋白单可变结构域的CDR3包含95-102位的氨基酸残基,免疫球蛋白单可变结构域的FR4包含103-113位的氨基酸残基。

[0660] 在本申请中,除非另有说明,CDR序列根据Kontermann和Dübel(Eds.

[0661] 2010,Antibody Engineering,vol 2,Springer Verlag Heidelberg Berlin,Martin,第3章,pp.33-51)确定。根据该方法,FR1包含位置1-25处的氨基酸残基,CDR1包含位置26-35处的氨基酸残基,FR2包含位置36-49处的氨基酸残基,CDR2包含位置50-58处的氨基酸残基,FR3包含位置59-94处的氨基酸残基,CDR3包含位置95-102处的氨基酸残基,并且FR4包含位置103-113处的氨基酸残基。

[0662] w)所给出的附图、序列表和实验部分/实施例仅仅是进一步举例说明本发明,不应理解或解释为以任何方式限制本发明和/或所附权利要求的范围,除非本文另外明确指出。

[0663] x)半数最大抑制浓度(IC50)是化合物在抑制生物或生化功能方面的效应,例如药理学效应的测量。该定量测量表示半数抑制给定生物学过程(或过程的组分,即酶、细胞、细胞受体、趋化作用、退行性变化、转移、侵入等)需要多少ISV或纳米抗体(抑制剂)。换句话说,其是物质的半数最大(50%)抑制浓度(IC)(50% IC,或IC50)。药物的IC50可以通过构建剂量响应曲线和检查不同浓度的拮抗剂如本发明的ISV或纳米抗体对逆转激动活性的影响来确定。可以通过确定抑制半数的激动剂的最大生物学响应所需的浓度对给定拮抗剂如本发明的ISV或纳米抗体计算IC50值。

[0664] 术语半数最大有效浓度(EC50)是指在指定的暴露时间之后,诱导基线和最大值之间的半数的响应的化合物浓度。在本文中其用作多肽的、ISV的或纳米抗体的效力的测量值。分级的剂量响应曲线的EC50表示观察到其最大效应的50%的情况下化合物的浓度。浓度优选以摩尔单位表达。

[0665] 在生物系统中,配体浓度的小的改变通常导致响应符合S形曲线函数的快速改变。随配体浓度增加而响应增加开始变缓处的拐点是EC50。这可以通过对最佳拟合线求导来从数学上确定。在多数情况下,依赖于图表来评估是方便的。在实施例部分提供EC50的情况下,设计实验以尽可能精确地反映KD。换句话说,EC50值因此可以被认为是KD值。术语“平均KD”涉及与至少1个,但优选多于1个,如至少2个实验中获得的平均KD值。术语“平均”是指数学术语“平均”(数据的总和除以数据中的项数)。

[0666] 还涉及IC50,其是化合物的抑制(50%抑制)的测量值。对于竞争结合测定和功能性拮抗剂测定,IC50是剂量响应曲线的最常见概要测量。

[0667] 对于激动剂/刺激剂测定,最常见的概要测量是EC50。

[0668] y)必须注意的是,如本文中所用,除非另有明确指明,单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包括复数指代。因此,例如,提及“试剂”

[0669] 包括一种或多种所述不同试剂,并且提及“所述方法”包括提及等价步骤和本领域技术人员已知的能够修饰或置换本文所述方法的方法。

[0670] 除非另有说明,在一系列元素之前的术语“至少”被理解为是指在系列中的每个元素。本领域技术人员将认识到,或者能够仅使用常规实验确定,本文所述发明的具体实施方案的许多等价物。所述等价物旨在涵盖于本发明中。

[0671] 无论在本文中何处使用,术语“和/或”包括“和”、“或”和“由所述术语连接的元素的全部或任何其它组合”的含义。

[0672] 术语“约”或“大约”,如本文中所用,意指在给定值或范围的20%之内,

[0673] 优选15%之内,更优选10%之内,并且最优选5%之内。

[0674] 在整个本说明书和随后的权利要求书中,除非上下文另有要求,词语

[0675] “包含(comprise)”以及变型(诸如“comprises”和“comprising”)将被理解为暗指包含所表明的整数或步骤或者多个整数或多个步骤的组,但是不排除任何其它整数或步骤或者整数或步骤的组。当在本文中使用时,术语“包含”能够用术语“含有”或“包括”替换,或者有时当在本文中使用时能够用术语“具有”替换。

[0676] 本发明涉及包含至少第一免疫球蛋白单可变结构域(ISV)和至少一个另外的免疫球蛋白单可变结构域的多肽,其中所述至少第一ISV对分化簇3(CD3)具有高亲和力/与分化簇3(CD3)结合,并且所述至少一个另外的ISV对靶细胞上的抗原具有高亲和力/与靶细胞上的抗原结合。

[0677] 典型地,本发明的多特异性多肽将靶细胞上的高亲和力抗原识别与T细胞活化相组合,这导致独立于T细胞的天然特异性的活化。与靶细胞上的细胞表面分子(诸如肿瘤抗原)和与T细胞共同受体CD3二者结合的结合分子的作用模式是公知的。使T细胞紧邻于靶细胞,即接合所述T细胞,导致所述T细胞杀死所述靶细胞。在本发明中,该方法在对抗增殖性疾病、炎性疾病、传染性疾病和自身免疫性疾病中利用。通常,T细胞配备有包含孔道形成蛋白(称为成孔素)和细胞死亡诱导蛋白酶(称为粒酶)的致死组合的颗粒。优选地,这些蛋白质经由细胞溶解突触被递送到靶细胞,所述细胞溶解突触当T细胞紧邻于打算杀死的靶细胞时形成。正常地,T细胞和靶细胞之间的紧邻通过T细胞使用其匹配的T细胞受体与MHC/肽复合物结合而实现。本发明的多肽在缺少T细胞受体/MHC相互作用的情况下使T细胞如此紧邻于靶细胞。

[0678] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽将T细胞导向靶细胞。

[0679] 通过一个臂(第一ISV),多特异性多肽对CD3(T细胞上的T细胞受体信号转导复合物的蛋白质组分)具有高亲和力/与CD3结合。通过另一个臂(第二ISV和/或第三ISV等),多特异性多肽识别靶细胞上的抗原,对靶细胞上的抗原具有高亲和力/与靶细胞上的抗原结合。优选地,仅当多特异性多肽被呈递至T细胞上时,在靶细胞的表面上才能看到T细胞活化。对于活化的靶细胞上的抗原依赖性导致有利的安全属性。在一个实施方案中,多特异性多肽短暂地链接T细胞和靶细胞。优选地,多特异性多肽能够将静息的多克隆T细胞(诸如$CD4^+$和/或$CD8^+$T细胞)诱导至活化,用于靶细胞的高效重定向溶解。优选地,在第一靶细胞溶解后,所述T细胞被导向下一个靶细胞。

[0680] 包含或基本上由两种以上免疫球蛋白单可变结构域(如至少两种本发明的免疫球蛋白单可变结构域)组成的蛋白和多肽将在本文中称为“多价”蛋白或多肽或称为“多价构建体”。从本文中进一步的描述,这样的多价构建体的一些非限制实例将变得明确。本发明的多肽是“多价的”,即包含两个以上结构单元或ISV,其中至少第一结构单元、ISV或纳米抗

体和第二结构单元、ISV或纳米抗体不同,并且针对不同靶标,如抗原或抗原决定簇。含有至少两个结构单元、ISVs或纳米抗体(其中至少一个结构单元、ISV或纳米抗体针对第一抗原的本发明的多肽(即,针对第一靶标,如例如CD3)并且至少一个结构单元、ISV或纳米抗体针对第二抗原(即,针对不同于第一靶标的第二靶标,如例如TAA,例如CD20或HER2)),还将被称为本发明的"多特异性"多肽,并且该多肽中存在的结构单元、ISV或纳米抗体在本文中还将被称为是"多价格式"或"多特异性格式"。因此,例如,本发明的"双特异性"肽是包含至少一个针对第一靶标(例如CD3)的结构单元、ISV或纳米抗体和至少一个针对第二靶标(即,针对不同于所述第一靶标的第二靶标,如例如TAA,例如CD20或HER2)的其它结构单元、ISV或纳米抗体的多肽,而本发明的"三特异性"多肽是包含至少一个针对第一靶标(例如,CD3)的结构单元、ISV或纳米抗体,针对不同于所述第一靶标的第二靶标(例如TAA,如CD20或HER2)的第二结构单元、ISV或纳米抗体和至少一个针对第三抗原(即,不同于第一和第二靶标二者,诸如另一个TAA),如,例如,血清白蛋白等的其它结构单元、ISV或纳米抗体的多肽;等。如将从说明书明确的,在本发明的多特异性多肽可以包含至少针对第一靶标的第一结构单元、ISV或纳米抗体,针对第二靶标的第二结构单元、ISV或纳米抗体和任意数量的针对一个以上可以分别与第一和/或第二靶标相同或不同的靶标的结构单元、ISVs或纳米抗体的意义上,本发明不限于双特异性多肽。结构单元、ISVs或纳米抗体可以任选地经由接头序列连接。

[0681] 术语双特异性多肽、双特异性格式、双特异性构建体、双特异性纳米抗体构建体、双特异性和双特异性抗体在本文中可替换地使用。

[0682] 如通过上述和本文的进一步描述变得清楚的那样,本发明的免疫球蛋白单可变结构域可以用做"结构单元"以形成本发明的多肽,例如通过适当地将它们与其它基团、残基、结构部分或结合单元组合,以形成本文所述的化合物或构建体(例如但不限于本文所描述的本发明的双/三/四/多价的和双/三/四多特异性的多肽),其在一个分子内组合了一种或多种所希望的特性或生物学功能。

[0683] 将理解的是(如还在实施例部分所证明的),结合CD3的ISV和结合靶细胞上的抗原的ISV在本发明的多肽中能够以任何顺序放置。更特别地,在一个实施方案中,结合CD3的ISV置于N-末端,并且结合靶细胞上的抗原的ISV置于C-末端。在另一个实施方案中,结合靶细胞上的抗原的ISV置于N-末端,并且结合CD3的ISV置于C-末端。

[0684] 在优选的方面,本发明的多肽包含至少第一免疫球蛋白单可变结构域(ISV)、至少第二免疫球蛋白单可变结构域和至少第三免疫球蛋白单可变结构域,其中所述至少第一ISV对CD3具有高亲和力/与CD3结合;所述至少第二ISV对靶细胞上的第一抗原具有高亲和力/与靶细胞上的第一抗原结合,并且所述至少第三ISV对靶细胞上的第二抗原具有高亲和力/与靶细胞上的第二抗原结合,其中所述第二抗原不同于所述第一抗原。所述第一抗原和所述第二抗原能够在相同的靶细胞上或者在不同的靶细胞上。

[0685] 将理解的是(如还在实施例部分所证明的),结合CD3的ISV和结合靶细胞上的第一抗原和第二抗原的ISV在本发明的多肽中能够以任何顺序放置。更特别地,在一个实施方案中,结合CD3的ISV置于N-末端,结合靶细胞上的第一抗原的ISV置于中心,并且结合靶细胞上的第二抗原的ISV置于C-末端。在另一个实施方案中,结合CD3的ISV置于N-末端,结合靶细胞上的第二抗原的ISV置于中心,并且结合靶细胞上的第一抗原的ISV置于C-末端。在另

一个实施方案中,结合靶细胞上的第一抗原的ISV置于N-末端,结合靶细胞上的第二抗原的ISV置于中心,并且结合CD3的ISV置于C-末端。在另一个实施方案中,结合靶细胞上的第一抗原的ISV置于N-末端,结合CD3的ISV置于中心,并且结合靶细胞上的第二抗原的ISV置于C-末端。在另一个实施方案中,结合靶细胞上的第二抗原的ISV置于N-末端,结合CD3的ISV置于中心,并且结合靶细胞上的第一抗原的ISV置于C-末端。在另一个实施方案中,结合靶细胞上的第二抗原的ISV置于N-末端,结合靶细胞上的第一抗原的ISV置于中心,并且结合CD3的ISV置于C-末端。

[0686] 本发明还涉及化合物或构建体,并且特别是这样的蛋白质或多肽,其包含或基本上由被本发明的一种或多种ISV或多肽组成,并且任选地还包含一种或多种其它基团、残基、部分或结合单元。本领域技术人员将从本文的进一步公开内容中清楚知悉,所述其它基团、残基、部分、结合单元或氨基酸序列可以提供或可以不提供另外的功能性到本发明的多肽(和/或到所述多肽存在的化合物或构建体),并且可以改变或可以不改变本发明的多肽的性质。

[0687] 本发明的化合物、构建体或多肽通常可以通过下述方法制备:其包含至少一个将一个或多个本发明的免疫球蛋白单可变结构域与一个或多个另外的基团、残基、结构部分或结合单元任选地通过一个或多个适合的接头适当地连接的步骤,以提供本发明的化合物、构建体或多肽。本发明的多肽还可以通过下述方法制备:其通常包括提供编码本发明的多肽的核酸,以适当的方式表达所述核酸,回收表达的本发明的多肽的步骤。这种方法可以以本身已知的方式实施,其对于本领域技术人员来说是清楚的,例如基于在本文进一步描述的方法和技术。

[0688] 由本发明的氨基酸序列开始,设计/选择和/或制备本发明的化合物、构建体或多肽的工艺在本文中也被称为本发明的所述氨基酸序列的“格式化”;作为本发明的化合物、构建体或多肽的一部分的本发明的氨基酸被称为“格式化的”或“格式形式的”本发明的所述化合物、构建体或多肽。本发明的氨基酸序列格式化方式的实例以及这种格式的实例在本文公开的基础上对本领域技术人员来说是清楚的;这种格式化的免疫球蛋白单可变结构域或多肽形成本发明的另一个方面。

[0689] 例如,这种另外的基团、残基、结构部分或结合单元可以是一个或多个另外的免疫球蛋白单可变结构域,这样所述化合物或构建体是(融合)蛋白或(融合)多肽。在优选的但是非限制性的方面,所述一个或多个其它基团、残基、结构部分或结合单元是免疫球蛋白序列。更优选地,所述一个或多个其它基团、残基、结构部分或结合单元选自由结构域抗体、适合用作结构域抗体的免疫球蛋白单可变结构域、单结构域抗体、适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白单可变结构域(ISV)、“dAb”’s、适合用作dAb的免疫球蛋白单可变结构域、或纳米抗体组成的组。或者,这种基团、残基、结构部分或结合单元可以例如是化学基团、残基、结构部分,其本身可以具有或不具有生物学和/或药理学活性。例如但不受其限制地,这种基团可以与一个或多个本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽连接以提供本发明的ISV或多肽的“衍生物”,如本文进一步描述的。

[0690] 包含一个或多个本文描述的衍生物或基本上由其组成,并且任选地进一步包含一个或多个任选地通过一个或多个接头连接的其它基团、残基、结构部分或结合单元的化合物或构建体也在本发明的范围内。优选地,所述一个或多个其它基团、残基、结构部分或结

合单元是免疫球蛋白单可变结构域。在上述的化合物或构建体中,本发明的一个或多个免疫球蛋白单可变结构域和一个或多个基团、残基、结构部分或结合单元可以直接彼此连接和/或通过一个或多个适合的接头或间隔子连接。例如,当一个或多个基团、残基、结构部分或结合单元是免疫球蛋白单可变结构域时,接头也可以是免疫球蛋白单可变结构域,以使获得的化合物或构建体是融合(蛋白)或融合(多肽)。

[0691] 在一些实施方案中,多肽包含如本文公开的至少两个以上免疫球蛋白单可变结构域。在一些实施方案中,多肽基本上由如本文公开的两个以上免疫球蛋白单可变结构域组成。“基本上由”两个以上免疫球蛋白单可变结构域“组成”的多肽是除了如本文公开的两个以上免疫球蛋白单可变结构域之外不具有另外的免疫球蛋白单可变结构域的多肽。例如,基本上由两个免疫球蛋白单可变结构域组成的多肽不包括任何另外的免疫球蛋白单可变结构域。然而,应当理解的是基本上由两个以上免疫球蛋白单可变结构域组成的多肽可以包括另外的功能性,诸如标记、毒素、一个或多个接头、结合序列等。这些另外的功能性包括基于氨基酸的基团和基于非氨基酸的基团二者。在一些实施方案中,多肽由如本文公开的一个或多个免疫球蛋白单可变结构域组成。应该理解的是,术语“多肽构建体”和“多肽”在本文中可替换地使用(除非上下文另有明确说明)。

[0692] 在一些实施方案中,多肽包括包含如本文公开的免疫球蛋白单可变结构域的多价或多特异性构建体。在一些实施方案中,多肽包含如本文公开的一种或多种基于抗体的支架和/或基于非抗体的支架。在一些实施方案中,多肽包含血清结合蛋白部分。在一些实施方案中,血清结合蛋白部分是免疫球蛋白单可变结构域。在一些实施方案中,免疫球蛋白单可变结构域是Nanobody®。

[0693] 将理解的是,结构单元(诸如例如第一结构单元、第二结构单元、第三结构单元等)在多肽上的顺序(取向)可以根据本领域技术人员的需要选择,以及根据可取决于这些结构单元在多肽中的位置的相对亲和力选择。多肽是否包含接头是设计选择的问题。然而,与其他取向相比,一些取向(有或没有接头)可以提供优选的结合特征。例如,第一和第二结构单元在本发明的多肽中的顺序可以是(从N-末端到C-末端):(i)第一结构单元(例如第一ISV,诸如第一纳米抗体)-[接头]-第二结构单元(例如第二ISV,诸如第二纳米抗体);或(ii)第二结构单元(例如第二ISV,诸如第二纳米抗体)-[接头]-第一结构单元(例如第一ISV,诸如第一纳米抗体);(其中接头是任选的)。所有取向都包括在本发明中。含有提供所需(结合)特性的结构单元取向的多肽可以容易地通过常规筛选鉴定,例如如实验部分举例说明的。

[0694] 本发明的多肽的第一免疫球蛋白单可变结构域(ISV)对效应细胞(优选所述效应细胞的TCR复合物,并且甚至更优选CD3)具有高亲和力/与效应细胞(优选所述效应细胞的TCR复合物,并且甚至更优选CD3)结合。

[0695] 效应细胞是包含TCR复合物的细胞,优选免疫细胞,诸如T辅助细胞、单核细胞、巨噬细胞或树突细胞,优选$CD4^+$T辅助细胞(也称为CD4细胞、T辅助细胞或T4细胞),更优选细胞毒性T细胞(也称为T_C细胞、CTL或$CD8^+$T细胞)、天然杀伤T细胞(NKT细胞)或天然杀伤细胞(NK细胞)。在一些实施方案中,细胞是在体内存在的。在一些实施方案中,细胞是在体外存在的。本发明的效应细胞尤其涉及哺乳动物细胞,优选涉及灵长类细胞,并且甚至更优选涉及人细胞。

[0696] 如本文中所用,术语“TCR复合物”或“αβTCR-CD3复合物”是指在T细胞的表面上呈

现的T细胞受体复合物(参见Kuhns等人2006,Immunity24:133-139)。TCR复合物由六种不同的I型单跨越跨膜蛋白组成:形成负责配体识别的TCR异源二聚体的TCRα和TCRβ链,以及非共价缔合的CD3γ、CD3δ、CD3ε和ζ链(它们具有在受体活化时被磷酸化的胞质序列基序并且募集大量信号传导组分)。T细胞受体的α链和β链均由恒定结构域和可变结构域组成。人CD3和人TCRα/β构建体结构域的序列在表A-10中提供(SEQ ID NOs:291-296;参见UniProtKB:CD3δ:P04234,CD3γ:P09693,CD3ε:P07766,CD3ζ:P20963,TCRα:P01848和TCRβ:P01850)。

[0697] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV结合TCR复合物的CD3γ(SEQ ID NO:292)、CD3δ(SEQ ID NO:291)和/或CD3ε(SEQ ID NO:293),或其多态变体或同种型。

[0698] 备选地,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述第一ISV结合TCR复合物的CD3γ(SEQ ID NO:379)、CD3δ(SEQ ID NO:291)和/或CD3ε(SEQ ID NO:380),或其多态变体或同种型。

[0699] 同种型是能够通过单个生物事件或通过生物事件的组合从相同的基因产生的备选蛋白质序列,所述生物事件诸如选择性启动子使用、选择性剪切、选择性起始和核糖体移码,全部如本领域中已知的。

[0700] 如本文中所用,“T细胞活化”是指T细胞(例如细胞毒性T细胞)的一种或多种细胞应答,诸如选自:增殖,分化,细胞因子分泌,细胞毒性效应分子释放,细胞毒性活性,表达活化标志物和重定向的靶细胞溶解。本发明的多肽能够诱导T细胞活化。如本文所述的,测量T细胞活化的合适的测定在本领域中是已知的,例如如在WO 99/54440或Schlereth等人2005(Cancer Immunol.Immunother.20:1-12)中描述的,或如实施例或下文中例证的。

[0701] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽诱导T细胞活化。优选地,本发明的多肽仅当所述第二ISV和/或另外的ISV结合靶细胞上的抗原时才诱导T细胞活化。

[0702] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述T细胞活化依赖于将与靶细胞上的所述第一抗原结合的所述多肽呈递至T细胞。

[0703] 经由本发明多肽的T细胞活化能够通过以下进行监测:CD69、CD25和多种细胞粘附分子,细胞因子(例如IFN-γ、TNF-α、IL-6、IL-2、IL-4和IL-10)的重新表达和/或释放,粒酶和穿孔素表达的上调,和/或细胞增殖,质膜出泡(membrane blebbing),胱天蛋白酶原3和/或7的活化,核DNA的片段化和/或胱天蛋白酶底物聚(ADP核糖)聚合酶的裂解。优选地,经由多特异性多肽的靶细胞的重定向溶解独立于T细胞受体特异性,I类MHC和/或β2微球蛋白的存在,和/或任何共刺激性刺激物的存在。

[0704] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述T细胞活化独立于MHC识别。

[0705] 本发明的多肽显示了在体外通过先前未刺激的外周多克隆$CD8^+$-和$CD4^+$-阳性T细胞的重定向溶解。经由通过本发明的多肽募集T细胞的靶细胞的重定向溶解涉及细胞溶解突触形成以及穿孔素和粒酶的递送。经由T细胞的细胞溶解已经在例如Atkinson和Bleackley 1995(Crit.Rev.Immunol 15(3-4):359-384)中描述。优选地,接合的T细胞能够进行连续靶细胞溶解,并且不受到免疫逃逸机制(其干扰肽抗原加工和呈递,或克隆的T细胞分化)影响(参见例如WO 2007/042261)。在体外,重定向溶解在低皮摩尔浓度下可见,这

表明极低数量的本发明多肽需要与靶细胞结合用来触发T细胞。如实施例中证明的,效应子与靶标的低比率可以表明连续靶细胞溶解。因此,本发明涉及有效力的多肽。优选地,本发明的多肽介导靶细胞(例如癌细胞)的杀伤,诸如刺激T细胞以形成孔道和递送细胞毒性T细胞颗粒的促凋亡组分。

[0706] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述T细胞活化引起所述T细胞的一种或多种细胞应答,其中所述细胞应答选自由以下组成的组:增殖,分化,细胞因子分泌,细胞毒性效应分子释放,细胞毒性活性,表达活化标志物和重定向的靶细胞溶解。

[0707] 如本文中使用的,术语"效力"是药剂,如多肽、ISV或纳米抗体,其生物学活性的测量。药剂的效力可以通过本领域中已知的任何合适的方法,如例如实验部分中所述的方法确定。基于细胞培养的效力测定常常是用于确定生物学活性的优选形式,因为它们测量药剂诱导的生理学响应,并且可以在相对短的时期产生结果。基于产物的作用机制,可以使用基于各种类型的细胞的测定,包括但不限于增殖测定、细胞毒性测定、细胞杀伤测定、报告基因测定、细胞表面受体结合测定和测量对功能上关键的蛋白或其他信号分子(如磷酸化蛋白、酶、细胞因子、cAMP等)的诱导/抑制的测定、Ramos B细胞消耗模型、T细胞介导的肿瘤细胞杀伤测定(例如如实施例部分所示),全部是本领域中已知的。来自基于细胞的效力测定的结果可以表达为"相对效力",如通过将本发明的多特异性多肽与对于相应参考单价ISV(例如仅包含一种ISV或一种纳米抗体,任选地进一步包含不相关纳米抗体的多肽(参见实验部分))获得的响应相比较来确定的。

[0708] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述T细胞活化引起所述靶细胞活性的抑制,诸如延迟或最小化所述靶细胞的传播、抑制或延迟所述靶细胞的生长和/或增殖和/或杀死所述靶细胞(例如,引起病症和/或症状的消退)达多于约10%,诸如20%、30%或40%或甚至多于50%,诸如多于60%,诸如70%、80%或甚至多于90%,诸如100%。

[0709] 本发明的第一结构单元、ISV、纳米抗体或VHH对其靶标(即CD3)具有高亲和力。本发明的第一结构单元、ISV或纳米抗体可以例如针对所述第一靶标的抗原决定簇、表位、部分、结构域、亚单位或构象(在可用的情况下)。针对它对其靶标自身的高亲和力优选选择第一结构单元,例如第一ISV、纳米抗体或VHH,不考虑任何亲合力效应的影响。

[0710] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV以这样的平均KD值与CD3结合:在100nM至10pM之间的平均KD值,诸如90nM以下的平均KD值,甚至更优选80nM以下的平均KD值,诸如小于70、60、50、40、30、20、10、5nM或甚至更小,诸如小于4、3、2、1nM,诸如小于500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20pM或甚至更小,诸如小于10pM。优选地,KD通过Kinexa或SPR确定,例如如通过Proteon所确定的。例如,所述KD如实施例部分中所示的确定。

[0711] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV当以单价测量时具有高亲和力。优选地,所述平均KD通过表面等离子共振(SPR)在重组蛋白上测量。

[0712] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽对所述CD3(或对结合所述CD3)具有选自由以下组成的组的解离常数(K_D):至多约10^{-5}M、至多约10^{-6}M、至多约10^{-7}M、至多约10^{-8}M、至多约10^{-9}M、至多约10^{-10}M、至多约10^{-11}M和至多约10^{-12}M,优选如通过表面等离子共振所测量的。

[0713] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV以这样的EC50值与所述CD3结合:在100nM至1pM之间的EC50值,诸如100nM以下的平均EC50值,甚至更优选90nM以下的平均EC50值,诸如小于80、70、60、50、40、30、20、10、5nM或甚至更小,诸如小于4、3、2、1nM或甚至更小,诸如小于500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、5pM或甚至更小,诸如小于4pM。

[0714] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述平均KD通过FACS、Biacore、ELISA,在单价第一ISV(诸如纳米抗体)或包含单价第一ISV(诸如纳米抗体)的多肽上确定,例如所述EC50是如实施例部分中所示确定的。

[0715] 在实施例中已经表明,KD与EC50良好关联。

[0716] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽对所述CD3(或对结合所述CD3)具有选自由以下组成的组的结合速率常数(Kon):至少约$10^2M^{-1}s^{-1}$、至少约$10^3M^{-1}s^{-1}$、至少约$10^4M^{-1}s^{-1}$、至少约$10^5M^{-1}s^{-1}$、至少约$10^6M^{-1}s^{-1}$、$10^7M^1s^{-1}$、至少约$10^8M^{-1}s^{-1}$、至少约$10^9M^{-1}s^{-1}$和至少约$10^{10}M^{-1}s^{-1}$,优选如通过表面等离子共振所测量的或如实施例部分中所进行的。

[0717] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽对所述CD3(或对结合所述CD3)具有选自由以下组成的组的解离速率常数(Koff):至多约$10^{-3}s^{-1}$、至多约$10^{-4}s^{-1}$、至多约$10^{-5}s^{-1}$、至多约$10^{-6}s^{-1}$、至多约$10^{-7}s^{-1}$、至多约$10^{-8}s^{-1}$、至多约$10^{-9}s^{-1}$和至多约$10^{-10}s^{-1}$,优选如通过表面等离子共振所测量的或如实施例部分中所进行的。

[0718] 可以考虑本文所述的结合分子、ISV或多肽的氨基酸序列修饰。例如,改善抗体或ISV的结合亲和力和/或其它生物学特性可能是所需的。结合分子、ISV或多肽的氨基酸序列变体通过将适当的核苷酸变化引入到所述结合分子、ISV或多肽的核酸或通过肽合成来制备。

[0719] 所述修饰包括,例如,从结合分子、ISV或多肽的氨基酸序列内的残基缺失,和/或向结合分子、ISV或多肽的氨基酸序列内的残基插入,和/或结合分子、ISV或多肽的氨基酸序列内的残基置换。可以产生缺失、插入和置换的任意组合以实现最终构建体,条件是所述最终构建体拥有所需特征。氨基酸变化也可以改变结合分子的翻译后加工,诸如改变糖基化位点的数量或位置。优选地,在CDR中可以取代1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸,而在框架区(FR)中可以取代1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或25个氨基酸。取代优选地是如本文所述的保守取代。另外地或备选地,在每个CDR中可以插入或缺失1、2、3、4、5或6个氨基酸(当然,这取决于它们的长度),而在每个FR中可以插入或缺失1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或25个氨基酸。

[0720] 一种用于鉴定作为诱变的优选位置的结合分子、ISV或多肽的某些残基或区域的有用方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham和Wells 1989(Science 244:1081-1085)所描述的。因此,将结合分子内的残基或一组靶残基(例如,带电荷残基诸如Arg、Asp、His、Lys和Glu)鉴定并且用中性或带负电荷的氨基酸(最优选是丙氨酸或多丙氨酸)替换以影响氨基酸与表位的相互作用。然后,对取代显示功能敏感性的那些氨基酸位置通过在取代的位点处或者对于取代的位点引入另外的或其它变体而完善。因此,虽然引入氨基酸序列变体的位点是预先确定的,但是突变本身的性质不需要预先确定。例如,为了分析给定位点处的突变的性能,丙氨酸扫描或随机诱变在目标密码子或区域进行,并且表达的结合分子变

体对所需活性进行筛选。

[0721] 优选地,氨基酸序列插入包括氨基端融合和/或羧基端融合,长度范围从1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个残基到含有一百以上个残基的多肽。

[0722] 另一类型的变体是氨基酸取代变体。这些变体优选地具有被不同残基替换的结合分子、ISV或多肽中的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基。对于取代诱变最感兴趣的位点包括CDR,特别是高变区,但也考虑FR改变。例如,如果CDR序列包括6个氨基酸,则设想这些氨基酸中的一个、两个或三个被取代。类似地,如果CDR序列包括15个氨基酸,则设想这些氨基酸中的一个、两个、三个、四个、五个或六个被取代。

[0723] 通常,如果氨基酸在一个或多个或所有CDR中被取代,则优选的是随后获得的“取代的”序列与“原始”CDR序列至少60%、更优选65%、甚至更优选70%、特别优选75%、更特别优选80%或甚至多于90%相同。这意味着CDR的长度依赖于其与“取代的”序列相同的程度。例如,具有5个氨基酸的CDR优选地与其取代的序列80%相同,以便具有至少一个取代的氨基酸。因此,结合分子的CDR可以具有与它们取代的序列的不同程度的同一性,例如,CDR1可以具有80%,而CDR3可以具有90%。

[0724] 优选的取代(或置换)是保守取代。然而,可以设想任何取代(包括非保守取代或来自如下表B-1中列出的“示例性取代”的一者或多者),只要多肽保持其通过第一ISV与存在于T细胞上的CD3结合的能力和通过第二ISV与靶细胞上的第一抗原结合的能力和/或其CDR具有与随后取代的序列的同一性(与“原始”CDR序列至少60%、更优选65%、甚至更优选70%、特别优选75%、更特别优选80%相同)。

[0725] 保守取代在如下表B-1中显示。

[0726] 表8-1:氨基酸取代

[0727]

来源	示例性取代	优选的取代
Ala(A)	val,leu,ile	val
Arg(R)	lys,gln,asn	lys
Asn(N)	gln,his,asp,lys,arg	gln
Asp(D)	glu,asn	glu
Cys(C)	ser,ala	ser
Gln(Q)	asn,glu	asn
Glu(E)	asp,gln	asp
Gly(G)	ala	ala
His(H)	asn,gln,lys,arg	arg
lle(I)	leu,val,met,ala,phe	leu
Leu(L)	norleucine,ile,val,met,ala	ile
Lys(K)	arg,gln,asn	arg
Met(M)	leu,phe,ile	leu
Phe(F)	leu,val,ile,ala,tyr	tyr
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	Ser

Trp(W)	tyr,phe	tyr
Tyr(Y)	trp,phe,th r,ser	phe
Val(V)	ile,leu,met,phe,ala	leu

[0728] 序列分析还显示了在CDR中仅存在有限数目的序列改变(参见实施例4.2和表A-1至A-6)。

[0729] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0730] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0731] (a)SEQ ID NOs:81-100;和

[0732] (b)与SEQ ID NO:81的氨基酸序列或与SEQ ID NOs:81-100中任一者具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0733] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0734] (c)SEQ ID NOs:101-122;和

[0735] (d)与SEQ ID NO:101的氨基酸序列或与SEQ ID NOs:101-122中任一者具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0736] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0737] (e)SEQ ID NOs:123-143;和

[0738] (f)与SEQ ID NO:123的氨基酸序列或与SEQ ID NOs:123-143中任一者具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0739] 另外的优选CDR序列在表A-8中描述。

[0740] 通常,表A-8列出的CDR的组合(即,表A-4同一行中提及的那些)是优选的。因此,通常优选的是,当ISV中的CDR是表A-8中提及的CDR序列或合适地选自由与表A-8列出的CDR序列具有4、3、2或仅1个氨基酸差异的CDR序列组成的组时,其它CDR中的至少一个并且优选二者合适地选自属于表A-8中相同组合的CDR序列(即,表A-8中同一行提及的)或者合适地选自由与属于所述相同组合的CDR序列具有4、3、2或仅1个氨基酸的CDR序列组成的组。

[0741] 所得结合物的序列分析进一步导致鉴定6个不同的簇。提供了相应的比对(参见表A-1、表A-2、表A-3、表A-4、表A-5和表A-6)。成簇是基于CDR2和CDR3中的序列相似性和差异。A簇是最突出的,包括50个克隆(SEQ ID NO:s 1-50),B簇和D簇由仅1个克隆表示(分别为SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52),C簇包括4个克隆(SEQ ID NO:s 53-56),E簇包括9个克隆(SEQ ID NO:s 57-65)并且F簇包括15个克隆(SEQ ID NO:s 66-80)。基于氨基酸序列的结构相似性和差异的成簇被转换成实施例所揭示的功能相似性和差异。基于结合CD3的高亲和力(实施例3&4)和人T细胞活化(实施例4.2)分离所有簇的代表物。通常,A簇代表物展示了最好的EC50值。尽管C簇代表物具有比B簇代表物略差的EC50值,但是C簇代表物在基于流式细胞术的T细胞介导的Ramos杀伤测定中具有较低的IC50值(参见实施例10)。

[0742] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1选自由以下组成的组:

[0743] (a)SEQ ID NO:81;和

[0744] (b)与SEQ ID NO:81具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0745] -在位置1处G已经变为R;

[0746] -在位置3处T已经变为A;

[0747] -在位置4处Y已经变为F;

[0748] -在位置8处S已经变为G;和/或

[0749] -在位置10处G已经变为A。

[0750] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR2选自由以下组成的组:

[0751] (a)SEQ ID NO:101;和

[0752] (b)与SEQ ID NO:101具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0753] -在位置3处V已经变为T或A;

[0754] -在位置5处S已经变为T;

[0755] -在位置6处G已经变为D或E;和/或

[0756] -在位置9处T已经变为S、A或P。

[0757] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR3选自由以下组成的组:

[0758] (a)SEQ ID NO:123;和

[0759] (b)与SEQ ID NO:123具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0760] -在位置2处I已经变为T;

[0761] -在位置9处I已经变为V;和/或

[0762] -在位置10处A已经变为P。

[0763] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0764] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0765] (a)SEQ ID NOs:81-87;和

[0766] (b)与SEQ ID NO:81的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0767] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0768] (c)SEQ ID NOs:101-109;和

[0769] (d)与SEQ ID NO:101的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0770] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0771] (e)SEQ ID NOs:123-127;和

[0772] (f)与SEQ ID NO:123的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0773] 在一个实施方案,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1由SEQ ID NO:81表示,CDR2由SEQ ID NO:101表示,且CDR3由SEQ ID NO:123表示。

[0774] 属于B簇的纳米抗体由1个克隆表示。

[0775] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0776] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0777] (a)SEQ ID NO:88;和

[0778] (b)与SEQ ID NO:88的氨基酸序列具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0779] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0780] (c)SEQ ID NO:110;和

[0781] (d)与SEQ ID NO:110的氨基酸序列具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0782] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0783] (e)SEQ ID NO:128;和

[0784] (f)与SEQ ID NO:128的氨基酸序列具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0785] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1由SEQ ID NO:88表示,CDR2由SEQ ID NO:110表示,且CDR3由SEQ ID NO:128表示。

[0786] C簇的纳米抗体在CDR中显示十分有限的序列可变性。

[0787] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR2选自由以下组成的组:

[0788] (a)SEQ ID NO:112;和

[0789] (b)与SEQ ID NO:112具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0790] -在位置2处V已经变为A。

[0791] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0792] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0793] (a)SEQ ID NO:90;和

[0794] (b)与SEQ ID NO:90的氨基酸序列具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0795] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0796] (c)SEQ ID NOs:112-113;和

[0797] (d)与SEQ ID NO:112的氨基酸序列具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0798] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0799] (e)SEQ ID NO:130;和

[0800] (f)与SEQ ID NO:130的氨基酸序列具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0801] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1由SEQ ID NO:90表示,CDR2由SEQ ID NO:112表示,且CDR3由SEQ ID NO:130表示。

[0802] 属于D簇的纳米抗体由1个克隆表示。

[0803] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0804] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0805] (a)SEQ ID NO:89;和

[0806] (b)与SEQ ID NO:89的氨基酸序列具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0807] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0808] (c)SEQ ID NO:111;和

[0809] (d)与SEQ ID NO:111的氨基酸序列具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0810] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0811] (e)SEQ ID NO:129;和

[0812] (f)与SEQ ID NO:129的氨基酸序列具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0813] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1由SEQ ID NO:89表示,CDR2由SEQ ID NO:111表示,且CDR3由SEQ ID NO:129表示。

[0814] E簇包括9个克隆。

[0815] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1选自由以下组成的组:

[0816] (a)SEQ ID NO:91;和

[0817] (b)与SEQ ID NO:91具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0818] -在位置6处R已经变为N或T;

[0819] -在位置7处N已经变为H;和/或

[0820] -在位置8处M已经变为T。

[0821] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR2选自由以下组成的组:

[0822] (a)SEQ ID NO:114;和

[0823] (b)与SEQ ID NO:114具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0824] -在位置1处R已经变为Q;

[0825] -在位置3处T已经变为S;和/或

[0826] -在位置7处D已经变为A或K。

[0827] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR3选自由以下组成的组:

[0828] (a)SEQ ID NO:131;和

[0829] (b)与SEQ ID NO:131具有1或2个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0830] -在位置2处S已经变为R;和/或

[0831] -在位置6处S已经变为V。

[0832] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0833] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0834] (a)SEQ ID NOs:91-93;和

[0835] (b)与SEQ ID NO:91的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/

或

[0836] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0837] (c)SEQ ID NOs:114-117;和

[0838] (d)与SEQ ID NO:114的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0839] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0840] (e)SEQ ID NOs:131-133;和

[0841] (f)与SEQ ID NO:131的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0842] 在一个实施方案,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1由SEQ ID NO:91表示,CDR2由SEQ ID NO:114表示,且CDR3由SEQ ID NO:131表示。

[0843] 属于F簇的纳米抗体由15个克隆表示。

[0844] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1选自由以下组成的组:

[0845] (a)SEQ ID NO:94;和

[0846] (b)与SEQ ID NO:94具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0847] -在位置3处S已经变为T、A或G;

[0848] -在位置5处N已经变为S;

[0849] -在位置6处M已经变为T或A;和/或

[0850] -在位置9处L已经变为M。

[0851] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR2选自由以下组成的组:

[0852] (a)SEQ ID NO:118;和

[0853] (b)与SEQ ID NO:118具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0854] -在位置2处H已经变为V;

[0855] -在位置5处S已经变为H或A;

[0856] -在位置8处N已经变为S;和/或

[0857] -在位置10处Y已经变为F。

[0858] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR3选自由以下组成的组:

[0859] (a)SEQ ID NO:134;和

[0860] (b)与SEQ ID NO:134具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0861] -在位置6处A已经变为S或D;

[0862] -在位置7处F已经变为Y或A;

[0863] -在位置8处R已经变为H;

[0864] -在位置9处S已经变为A;

[0865] -在位置11处G已经变为D、T、N、S、K或R;和/或

[0866] -在位置14处V已经变为I。

[0867] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4

个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0868] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0869] (a)SEQ ID NOs:94-100;和

[0870] (b)与SEQ ID NO:94的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0871] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0872] (c)SEQ ID NOs:118-122;和

[0873] (d)与SEQ ID NO:118的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0874] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0875] (e)SEQ ID NOs:134-143;和

[0876] (f)与SEQ ID NO:134的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0877] 在一个实施方案,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1由SEQ ID NO:94表示,CDR2由SEQ ID NO:118表示,且CDR3由SEQ ID NO:134表示。

[0878] 本发明的多肽的第二免疫球蛋白单可变结构域(ISV)对靶细胞(优选癌细胞)上的抗原具有高亲和力/与靶细胞(优选癌细胞)上的抗原结合。“靶细胞”在本文中是指在其表面存在特定抗原的细胞。在优选的方面,“靶细胞”是癌细胞。

[0879] 膜(也称为质膜或磷脂双层)围绕细胞的胞质,其是细胞的外边界,即膜是细胞的表面。该膜用于将细胞与外界环境分离和保护细胞并且大多由磷脂双层制成。该膜中嵌入的是多种蛋白分子,如通道、泵和细胞受体。因为膜是流体,所以蛋白分子可以在膜内移动。如本文中使用的,术语“靶细胞上的抗原”表示在细胞的表面上展现的分子。在大多数情况下,该分子将位于细胞的质膜中或细胞的质膜上,从而该分子的至少一部分保持可从细胞外以三级形式接近。位于质膜中的细胞表面分子的非限制性实例是在其三级构象中包含亲水性和疏水性区域的跨膜蛋白。在此,至少一个疏水区允许细胞表面分子被包埋或插入到细胞的疏水质膜,而亲水区在质膜的任一侧分别延伸到细胞质和细胞外空间。

[0880] 所述抗原能够是细胞上的任何靶标,例如,肿瘤抗原。在优选的实施方案中,所述抗原对所述靶细胞(例如癌细胞)具有特异性,诸如所述癌细胞上的肿瘤相关抗原(TAA)。

[0881] 如本文中使用的,术语“肿瘤抗原”可以理解为在肿瘤细胞上呈现的那些抗原。这些抗原能够在细胞表面上呈现细胞外部分,其通常与分子的跨膜和细胞质部分相组合。这些抗原有时能够仅由肿瘤细胞呈递且从未由正常或健康细胞呈递。肿瘤抗原能够专有地表达在肿瘤细胞上,或者可以代表与正常细胞相比的肿瘤特异性突变。在这种情况下,它们被称为肿瘤特异性抗原。但是,通常并非这种情况。更常见的是由肿瘤细胞和正常细胞呈递的抗原,并且它们被称为“肿瘤相关抗原(TAA)”。与正常细胞相比,这些肿瘤相关抗原能够在肿瘤细胞上过表达,或者由于肿瘤组织结构较不紧凑,所以与正常细胞相比更易于获得肿瘤细胞中的抗体结合。TAA优选是在特定肿瘤的细胞上表达但是优选在正常细胞中不表达的抗原。通常,TAA是仅在生物体发育的特定点(诸如在胎儿发育期间)在细胞中正常表达并且在目前的发育点在生物体中不适当地表达的抗原,或者是在现在表达抗原的器官的正常组织或细胞中不表达的抗原。

[0882] 在一个实施方案中,靶细胞上的所述第一抗原是肿瘤抗原,优选肿瘤相关抗原(TAA)。

[0883] 在一个实施方案中,靶细胞上的所述第二抗原是肿瘤抗原,优选肿瘤相关抗原(TAA)。

[0884] 在一个实施方案中,所述抗原在癌细胞上比在正常细胞上更多地存在。靶细胞上的所述抗原优选是肿瘤相关抗原(TAA)。优选的TAA包括MART-1,癌胚抗原("CEA"),gp100,MAGE-1,HER-2,CD20,$Lewis^Y$抗原,黑素瘤相关的硫酸软骨素蛋白聚糖(MCSP),表皮生长因子受体(EGFR),成纤维细胞活化蛋白(FAP),CD19和CD33。

[0885] 与正常造血干细胞相比优先在AML LSC上表达并且因此优选作为TAA的细胞表面抗原包括CD123,CD44,CLL-1,CD96,CD47,CD32,CXCR4,Tim-3和CD25。

[0886] 适于作为靶细胞上的抗原用来与本发明多肽内的第二ISV结合的其它肿瘤相关抗原包括:TAG-72,Ep-CAM,PSMA,PSA,糖脂如GD2和GD3。

[0887] 本发明的TAA还包括造血分化抗原,即通常与簇分化(CD)分组相关的糖蛋白,如CD4、CD5、CD19、CD20、CD22、CD33、CD36、CD45、CD52、CD69和CD147;生长因子受体,包括HER2、ErbB3和ErbB4;细胞因子受体,包括白细胞介素-2受体γ链(CD132抗原),白细胞介素-10受体α链(IL-10R-A),白细胞介素-10受体β链(IL-10R-B),白细胞介素-12受体β-1链(IL-12R-β1),白细胞介素-12受体β-2链(IL-12受体β-2),白细胞介素-13受体α-1链(IL-13R-α-1)(CD213a1抗原),白细胞介素-13受体α-2链(白细胞介素-13结合蛋白),白细胞介素-17受体(IL-17受体),白细胞介素-17B受体(IL-17B受体),白细胞介素21受体前体(IL-21R),I型白细胞介素-1受体(IL-1R-1)(CD121a),II型白细胞介素-1受体(IL-1R-β)(CDw121b),白细胞介素-1受体拮抗蛋白(IL-1ra),白细胞介素-2受体α链(CD25抗原),白细胞介素-2受体β链(CD122抗原),白细胞介素-3受体α链(IL-3R-α)(CD123抗原);以及其它如CD30,IL23R,IGF-1R,IL5R,IgE,CD248(内皮唾液酸蛋白),CD44v6,gpA33,Ron,Trop2,PSCA,密蛋白6,密蛋白18.2,CLEC12A,CD38,ephA2,c-Met,CD56,MUC16,EGFRvIII,AGS-16,CD27L,柄蛋白-4,SLITRK6,间皮素,叶酸受体,组织因子,axl,磷脂酰肌醇聚糖-3,CA9,Cripto,CD138,CD37,MUC1,CD70,胃泌素释放肽受体,PAP,CEACAM5,CEACAM6,CXCR7,N-钙粘蛋白,FXYD2γa,CD21,CD133,Na/K-ATP酶,mIgM(膜结合IgM),mIgA(膜结合IgA),Mer,Tyro2,CD120,CD95,CA 195,DR5,DR6,DcR3和CAIX。

[0888] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述TAA选自由以下组成的组:黑素瘤相关的硫酸软骨素蛋白聚糖(MCSP),表皮生长因子受体(EGFR),成纤维细胞活化蛋白(FAP),MART-1,癌胚抗原("CEA"),gp100,MAGE-1,HER-2,$Lewis^Y$抗原,CD123,CD44,CLL-1,CD96,CD47,CD32,CXCR4,Tim-3,CD25,TAG-72,Ep-CAM,PSMA,PSA,GD2,GD3,CD4,CD5,CD19,CD20,CD22,CD33,CD36,CD45,CD52,CD147;生长因子受体,包括ErbB3和ErbB4;细胞因子受体,包括白细胞介素-2受体γ链(CD132抗原),白细胞介素-10受体α链(IL-10R-A),白细胞介素-10受体β链(IL-10R-B),白细胞介素-12受体β-1链(IL-12R-β1),白细胞介素-12受体β-2链(IL-12受体β-2),白细胞介素-13受体α-1链(IL-13R-α-1)(CD213a1抗原),白细胞介素-13受体α-2链(白细胞介素-13结合蛋白),白细胞介素-17受体(IL-17受体),白细胞介素-17B受体(IL-17B受体),白细胞介素21受体前体(IL-21R),I型白细胞介素-1受体(IL-1R-1)(CD121a),II型白细胞介素-1受体(IL-1R-β)(CDw121b),白细胞介素-1受体拮抗蛋白(IL-

1ra),白细胞介素-2受体α链(CD25抗原),白细胞介素-2受体β链(CD122抗原),白细胞介素-3受体α链(IL-3R-α)(CD123抗原),CD30,IL23R,IGF-1R,IL5R,IgE,CD248(内皮唾液酸蛋白),CD44v6,gpA33,Ron,Trop2,PSCA,密蛋白6,密蛋白18.2,CLEC12A,CD38,ephA2,c-Met,CD56,MUC16,EGFRvIII,AGS-16,CD27L,柄蛋白-4,SLITRK6,间皮素,叶酸受体,组织因子,axl,磷脂酰肌醇聚糖-3,CA9,Cripto,CD138,CD37,MUC1,CD70,胃泌素释放肽受体,PAP,CEACAM5,CEACAM6,CXCR7,N-钙粘蛋白,FXYD2γa,CD21,CD133,Na/K-ATP酶,mIgM(膜结合IgM),mIgA(膜结合IgA),Mer,Tyro2,CD120,CD95,CA 195,DR5,DR6,DcR3和CAIX,以及相关的多态变体和同种型,优选地所述TAA是CD20(UniProt 11836),HER2(Uniprot P04626),其多态变体和/或同种型。

[0889] 本发明的第二结构单元、ISV、纳米抗体或VHH对其抗原具有高亲和力。本发明的第二结构单元、ISV或纳米抗体可以例如针对靶细胞上的所述抗原的抗原决定簇、表位、部分、结构域、亚单位或构象(在适用的情况下)。

[0890] 本发明的靶细胞尤其涉及哺乳动物细胞,并且优选涉及灵长类细胞,并且甚至更优选涉及人细胞。靶细胞优选是过度增殖细胞,诸如例如癌细胞。

[0891] 本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第二ISV或另外的ISV以这样的平均KD值与靶细胞上的抗原结合:在100nM至10pM之间的平均KD值,诸如90nM以下的平均KD值,甚至更优选80nM以下的平均KD值,诸如小于70、60、50、40、30、20、10、5nM或甚至更小,诸如小于4、3、2、1nM,诸如小于500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20pM或甚至更小,诸如小于10pM。优选地,KD通过KinExA或SPR确定,例如如通过Proteon所确定的。

[0892] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第二ISV或另外的ISV当以单价测量时对其抗原具有高亲和力。

[0893] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述平均KD通过表面等离子共振(SPR)和/或KinExA或Proteon,例如在重组蛋白上测量,诸如实施例部分中描述的。

[0894] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述第二ISV或另外的ISV以这样的EC50值与靶细胞上的抗原结合:在100nM至1pM之间的EC50值,诸如100nM以下的平均EC50值,甚至更优选90nM以下的平均EC50值,诸如小于80、70、60、50、40、30、20、10、5nM或甚至更小,诸如小于4、3、2、1nM或甚至更小,诸如小于500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、5pM或甚至更小,诸如小于4pM。

[0895] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述平均EC50通过FACS或ELISA,在单价第二ISV(诸如纳米抗体)或包含单价第二ISV(诸如纳米抗体)的多肽上确定。

[0896] 在实施例中已经表明,KD与EC50良好关联。

[0897] 同时靶向多种抗原能够降低产生肿瘤逃逸变体的可能性,所以T细胞接合策略的治疗活性得以改善。本发明提供多特异性多肽,其包括与针对(靶细胞上的)不同(靶)抗原的免疫球蛋白单可变结构域组合的CD3 ISV(参见实施例19)。如下提供第一和第二抗原的优选组合(将理解的是结合所述抗原的ISV能够在本发明的多肽中以任何顺序放置):

[0898]

第一抗原	第二抗原
EGFR(OMIM:131550)	CD20(OMIM:112210)
EGFR(OMIM:131550)	CEA(OMIM:114890)
EGFR(OMIM:131550)	HER2(OMIM:164870)

HER2(OMIM:164870)	CD20(OMIM:112210)
HER2(OMIM:164870)	CEA(OMIM:114890)
CD20(OMIM:112210)	CEA(OMIM:114890)

[0899] 类似地,同时靶向靶细胞上的蛋白质或抗原的多种表位、抗原决定簇、部分、结构域、亚单位或构象能够降低产生肿瘤逃逸变体的可能性,所以T细胞接合策略的治疗活性得以改善(参见实施例20)。本发明提供这样的多肽,其包含与针对靶细胞上的抗原的不同表位、抗原决定簇、部分、结构域、亚单位或构象的免疫球蛋白单可变结构域组合的抗-CD3 ISV(也称为双互补位的构建体)。如下提供第一和第二TAA ISV的优选组合(将理解的是结合所述抗原的ISV能够在本发明的多肽中以任何顺序放置):

[0900]

TAA1 ISV	名称	SEQ ID NO:	TAA2 ISV	名称	SEQ ID NO:
EGFR-1	7D12	302	EGFR-2	9G08	299
HER2-1	5F07	297	HER2-2	47D05	298

[0901]

CEA-1	CEA#1	300	CEA-2	CEA#5	301

[0902] 本发明的多肽和组合物能够用于预防和/或治疗本发明的疾病和病症(本文也为“本发明的疾病和病症”),其包括,但不限于癌症。术语“癌症”是指哺乳动物中典型特征为异常调控的细胞增殖或存活的病理状况。癌症的实例包括,但不限于,癌,神经胶质瘤,间皮瘤,黑素瘤,淋巴瘤,白血病,腺癌:乳腺癌,卵巢癌,宫颈癌,成胶质细胞瘤,多发性骨髓瘤(包括意义不明的单克隆丙种球蛋白病,无症状和有症状的骨髓瘤),前列腺癌和伯基特淋巴瘤,头颈癌,结肠癌,结直肠癌,非小细胞肺癌,小细胞肺癌,食道癌,胃癌,胰腺癌,肝胆管癌,胆囊癌,小肠癌,直肠癌,肾癌,膀胱癌,前列腺癌,阴茎癌,尿道癌,睾丸癌,阴道癌,子宫癌,甲状腺癌,副甲状腺癌,肾上腺癌,胰腺内分泌癌,类癌癌症,骨癌,皮肤癌,视网膜母细胞瘤,霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,卡波济肉瘤,多中心卡斯尔曼病或AIDS相关的原发性渗出性淋巴瘤,神经外胚层肿瘤,横纹肌肉瘤(对于其它癌症参见例如Cancer, Principles and practice(DeVita等人编辑1997));以及上述癌症的任一种的任何转移,以及非癌症适应症如鼻息肉病;以及本文所述的其它病症和疾病。

[0903] 对于免疫球蛋白单可变结构域的一般描述,对以下进一步描述,以及对本文引用的现有技术进行参考。然而在这点上,应该注意,本描述和现有技术主要描述所谓的“V_H3型”的免疫球蛋白单可变结构域(即,与V_H3型的人生殖系序列如DP-47、DP-51或DP-29具有高度序列同源性的免疫球蛋白单可变结构域),其形成本发明的优选方面。然而,应该注意,本发明在其最广泛的意义上覆盖任何类型的免疫球蛋白单可变结构域并且例如还涵盖属于所谓“V_H4型”的免疫球蛋白单可变结构域(即,与V_H4型的人生殖系序列如DP-78具有高度序列同源性的免疫球蛋白单可变结构域),如例如WO 07/118670中所述的。

[0904] 通常,免疫球蛋白单可变结构域(尤其是V_{HH}序列和序列优化的免疫球蛋白单可变结构域)可以尤其特征为在一个以上的框架区序列(如例如表B-2中描述的)中存在以上“特征残基”(如本文所述)。

[0905] 表B-2:VHHs中的特征残基

[0906]

位置	人 V_H3	特征残基
11	L, V; 主要是 L	L, S, V, M, W, F, T, Q, E, A, R, G, K, Y, N, P, I; 优选 L
37	V, I, F; 通常是 V	$F^{(1)}$, Y, V, L, A, H, S, I, W, C, N, G, D, T, P, 优选 $F^{(1)}$或 Y
$44^{(8)}$	G	$E^{(3)}$, $Q^{(3)}$, $G^{(2)}$, D, A, K, R, L, P, S, V, H, T, N, W, M, I; 优选 $G^{(2)}$, $E^{(3)}$或 $Q^{(3)}$;最优选 $G^{(2)}$或 $Q^{(3)}$。
$45^{(8)}$	L	$L^{(2)}$, $R^{(3)}$, P, H, F, G, Q, S, E, T, Y, C, I, D, V; 优选 $L^{(2)}$或 $R^{(3)}$
$47^{(8)}$	W, Y	$F^{(1)}$, $L^{(1)}$或 $W^{(2)}$G, I, S, A, V, M, R, Y, E, P, T, C, H, K, Q, N, D; 优选 $W^{(2)}$, $L^{(1)}$或 $F^{(1)}$
83	R 或 K; 通常是 R	R, $K^{(5)}$, T, $E^{(5)}$, Q, N, S, I, V, G, M, L, A, D, Y, H; 优选 K 或 R; 最优选 K
84	A, T, D; 主要是 A	$P^{(5)}$, S, H, L, A, V, I, T, F, D, R, Y, N, Q, G, E; 优选 P
103	W	$W^{(4)}$, $R^{(6)}$, G, S, K, A, M, Y, L, F, T, N, V, Q, $P^{(6)}$, E, C; 优选 W
104	G	G, A, S, T, D, P, N, E, C, L; 优选 G
108	L, M 或 T; 主要是 L	Q, $L^{(7)}$, R, P, E, K, S, T, M, A, H; 优选 Q 或 $L^{(7)}$

注意：

(1) 特别地，但不仅限于，与位置 43-46 的 KERE 或 KQRE 组合。

(2) 通常在 44-47 位为 GLEW。

(3) 通常在 43-46 位为 KERE 或 KQRE，例如在 43-47 位为 KEREL, KEREF, KQREL, KQREF, KEREG, KQREW 或 KQREG。或者，序列例如 TERE (例如 TEREL), TQRE (例如 TQREL), KECE (例如 KECEL 或 KECER), KQCE (例如 KQCEL), RERE (例如 REREG), RQRE (例如 RQREL, RQREF 或 RQREW), QERE (例如 QEREG), QQRE, (例如 QQREW,

[0907] QQREL 或 QQREF), KGRE (例如 KGREG), KDRE (例如 KDREV)也是可能的。一些其它的可能的，但是次优选的序列包括例如 DECKL 和 NVCEL。

(4) 在 44-47 位为 GLEW 以及在 43-46 位为 KERE 或 KQRE。

(5) 通常在天然存在的 V_{HH} 结构域的 83-84 位为 KP 或 EP。

(6) 特别地，但不仅限于与位置 44-47 的 GLEW 组合。

(7) 附加条件为在还包含 103 位的 W 的(非人源化的)V_{HH} 结构域中，当位置 44-47 为 GLEW 时，位置 108 总是 Q。

(8) GLEW 组还包含位置 44-47 的 GLEW-样序列，例如 GVEW, EPEW, GLER, DQEW, DLEW, GIEW, ELEW, GPEW, EWLP, GPER, GLER 和 ELEW。

[0908] 本发明的免疫球蛋白还可以含有C-末端延伸(X)n(其中n为1至10,优选1至5,诸如1、2、3、4或5(并且优选1或2,诸如1);并且各X是(优选天然存在的)氨基酸残基,该氨基酸残基独立地选自且优选独立地选自由丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)或异亮氨酸(I)组成的组),其涉及WO 12/175741和WO 15/060643。

[0909] 除此之外和/或另外地,本发明的免疫球蛋白可以在位置11、89、110和/或112处具有某些优选的氨基酸残基,如在WO 15/060643中进一步详细描述的(其作为参考并入本文)。

[0910] 而且,这样的免疫球蛋白单可变结构域可以以任何适当的方式来自于任何适当的来源,例如可以是天然存在的V_{HH}序列(即来自于适合的骆驼科动物种属,例如美洲驼)或者合成的或半合成的VHs或VLs(例如来自于人)。这种免疫球蛋白单可变结构域可以包括通过例如亲和力成熟(例如由合成的、随机的或天然存在的免疫球蛋白序列开始)、CDR移植、镶饰、组合来源于不同免疫球蛋白序列的片段、使用重叠引物进行PCR装配、以及本领域技术人员熟知的改造的免疫球蛋白序列的类似技术改变的“人源化的”或者其它“序列优化的”VHHs,“骆驼源化的”免疫球蛋白序列(特别是骆驼源化的重链可变结构域序列,即骆驼源化的VHs),以及人VHs,人VLs,骆驼科动物的VHHs;或者前述任一种的任何适当的组合,如本文进一步描述的。如本文中所述,特别优选的本发明的免疫球蛋白单可变结构域的类型包含具有与天然存在的V_{HH}结构域的氨基酸序列对应,但被“人源化(humanized)”的氨基酸序列的免疫球蛋白单可变结构域,所述人源化即通过用在来自人类(例如上文指出的)的常规4-链抗体的V_H结构域中的相应一个或多个位置处出现的氨基酸残基中的一个或多个替代所述天然存在的V_{HH}序列(并且尤其是在框架序列中)的氨基酸序列中的一个以上氨基酸残基。这可以以技术人员将明确的本身已知的方式进行,例如基于本文中进一步的描述和本文引用的人源化方面的现有技术。再次,应该注意,本发明的这样的人源化的免疫球蛋白单可变结构域可以以本身已知的任何合适的方式获得并且因此不严格限于使用包含天然存在的V_{HH}结构域的多肽作为起始材料获得的多肽。

[0911] 另一特别优选的本发明的免疫球蛋白单可变结构域的类型包含具有对应于天然

存在的V_H结构域的氨基酸序列,但被“骆驼化(camelized)”的氨基酸序列的免疫球蛋白单可变结构域,所述骆驼化即通过用重链抗体的V_{HH}结构域中的一个或多个相应位置处存在的氨基酸残基中的一个或多个替代来自常规4-链抗体的天然存在的V_H结构域的氨基酸序列中的一个以上氨基酸残基。这可以以技术人员将明确的本身已知的方式,例如基于本文中所述进行。这样的“骆驼化”置换优选插入在V_H-V_L界面处形成和/或存在的氨基酸位置处,和/或在所谓的骆驼科特征处,如本文中定义的(还参见例如WO 94/04678以及Davies和Riechmann 1994(FEBS letters 339:285-290)和1996(Protein Engineering 9:531-537))。优选地,用作用于产生或设计骆驼化免疫球蛋白单可变结构域的起始材料或起始点的V_H序列优选为来自哺乳动物的V_H序列,更优选为人类的V_H序列,如V_H3序列。然而,应该注意的是,本发明的这样的骆驼化的免疫球蛋白单可变结构域可以以任何本身已知的合适的方式获得,并且因此不严格限于使用包含天然存在的V_H结构域的多肽作为起始材料获得的多肽。

[0912] 例如,又如本文中进一步描述的,“人源化”和“骆驼化”二者可以通过提供分别编码天然存在的V_{HH}结构域或V_H结构域的核苷酸序列进行,并随后以本身已知的方式,以这样的方式改变所述核苷酸序列中的一个以上密码子:新核苷酸序列分别编码本发明的“人源化”或“骆驼化”免疫球蛋白单可变结构域。该核酸可以随后以本身已知的方式表达,从而提供本发明所需的免疫球蛋白单可变结构域。备选地,分别基于天然存在的V_{HH}结构域或V_H结构域的氨基酸序列,可以分别设计本发明所需的人源化或骆驼化的免疫球蛋白单可变结构域的氨基酸序列,并随后使用本身已知的肽合成技术从头合成。此外,分别基于天然存在的V_{HH}结构域或V_H结构域的氨基酸序列或核苷酸序列,可以分别设计编码所需的本发明的人源化或骆驼化的免疫球蛋白单可变结构域的核苷酸序列,并随后使用本身已知的用于核酸合成的技术从头合成,这之后,因此获得的核酸可以以本身已知的方式表达,从而提供本发明所需的免疫球蛋白单可变结构域。

[0913] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述ISV是纳米抗体、V_{HH}、人源化的V_{HH}或骆驼源化的V_H。

[0914] 通常,包含或基本上由单个结构单元、单个免疫球蛋白单可变结构域或单个纳米抗体组成的蛋白或多肽在本文中将分别称为“单价”蛋白或多肽,称为“单价构建体”,称为“单价结构单元”,称为“单价免疫球蛋白单可变结构域”,或称为“单价纳米抗体”。

[0915] 在这方面,本发明还涉及组成本发明的多肽的单价结构单元。

[0916] 因此,本发明涉及这样的ISV或多肽,所述ISV或多肽特异性结合CD3的恒定结构域并且包括以下或基本上由以下组成:4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3),其中:

[0917] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0918] (a)SEQ ID NOs:81-100;或

[0919] (b)与SEQ ID NOs:81-100中任一者的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0920] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0921] (c)SEQ ID NOs:101-122;或

[0922] (d)与SEQ ID NOs:101-122中任一者的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0923] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0924] (e)SEQ ID NOs:123-143;或

[0925] (f)与SEQ ID NOs:123-143中任一者的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0926] 如上讨论的,基于CDR2和CDR3中的结构相似性和差异,分离属于不同簇的ISV。

[0927] 属于A簇的免疫球蛋白单可变结构域由根据以下的多肽表示,其中:

[0928] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0929] (a)SEQ ID NOs:81-87;和

[0930] (b)与SEQ ID NO:81的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0931] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0932] (c)SEQ ID NOs:101-109;和

[0933] (d)与SEQ ID NO:101的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0934] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0935] (e)SEQ ID NOs:123-127;和

[0936] (f)与SEQ ID NO:123的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0937] 在另一个方面,在属于A簇的多肽中,CDR1选自由以下组成的组:

[0938] (a)SEQ ID NO:81;和

[0939] (b)与SEQ ID NO:81具有1或2个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0940] -在位置1处G已经变为R;

[0941] -在位置3处T已经变为A;

[0942] -在位置4处Y已经变为F;

[0943] -在位置8处S已经变为G;和/或

[0944] -在位置10处G已经变为A。

[0945] 在另一个方面,在属于A簇的多肽中,CDR2选自由以下组成的组:

[0946] (a)SEQ ID NO:101;和

[0947] (b)与SEQ ID NO:101具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0948] -在位置3处V已经变为T或A;

[0949] -在位置5处S已经变为T;

[0950] -在位置6处G已经变为D或E;和/或

[0951] -在位置9处T已经变为S、A或P。

[0952] 在另一个方面,在属于A簇的多肽中,CDR3选自由以下组成的组:

[0953] (a)SEQ ID NO:123;和

[0954] (b)与SEQ ID NO:123具有1或2个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0955] -在位置2处I已经变为T;

[0956] -在位置9处I已经变为V;和/或

[0957] -在位置10处A已经变为P。

[0958] 因此,本发明涉及这样的ISV或多肽,所述ISV或多肽特异性结合CD3并且包括以下或基本上由以下组成:4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3),其中:

[0959] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0960] (a)SEQ ID NO:81;和

[0961] (b)与SEQ ID NO:81具有1或2个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0962] -在位置1处G已经变为R;

[0963] -在位置3处T已经变为A;

[0964] -在位置4处Y已经变为F;

[0965] -在位置8处S已经变为G;和/或

[0966] -在位置10处G已经变为A,

[0967] 并且其中

[0968] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0969] (a)SEQ ID NO:101;和

[0970] (b)与SEQ ID NO:101具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0971] -在位置3处V已经变为T或A;

[0972] -在位置5处S已经变为T;

[0973] -在位置6处G已经变为D或E;和/或

[0974] -在位置9处T已经变为S、A或P,

[0975] 并且其中

[0976] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0977] (a)SEQ ID NO:123;和

[0978] (b)与SEQ ID NO:123具有1或2个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0979] -在位置2处I已经变为T;

[0980] -在位置9处I已经变为V;和/或

[0981] -在位置10处A已经变为P。

[0982] 在另一个方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR1由SEQ ID NO:81表示,CDR2由SEQ ID NO:101表示,且CDR3由SEQ ID NO:123表示。优选地,多肽选自SEQ ID NOs:1至50中的任一者。

[0983] 属于B簇的免疫球蛋白单可变结构域由根据以下的多肽表示,其中:

[0984] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0985] (a)SEQ ID NOs:88;和

[0986] (b)与SEQ ID NO:88的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0987] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[0988] (c)SEQ ID NOs:110;和

[0989] (d)与SEQ ID NO:110的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[0990] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[0991] (e)SEQ ID NOs:128;和

[0992] (f)与SEQ ID NO:128的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0993] 在另一个方面,在属于B簇的多肽中,CDR1是SEQ ID NO:88。

[0994] 在另一个方面,在属于B簇的多肽中,CDR2是SEQ ID NO:110。

[0995] 在另一个方面,在属于B簇的多肽中,CDR3是SEQ ID NO:128。

[0996] 在另一个方面,本发明涉及这样的多肽,其中:CDR1由SEQ ID NO:88表示,CDR2由SEQ ID NO:110表示,且CDR3由SEQ ID NO:128表示。优选地,多肽是SEQ ID NOs:51。

[0997] 属于C簇的免疫球蛋白单可变结构域由根据以下的多肽表示,其中:

[0998] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[0999] (a)SEQ ID NO:90;和

[1000] (b)与SEQ ID NO:90的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[1001] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[1002] (c)SEQ ID NOs:112-113;和

[1003] (d)与SEQ ID NO:112的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通

过表面等离子共振所测量的;和/或

[1004] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[1005] (e)SEQ ID NO:130;和

[1006] (f)与SEQ ID NO:130的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[1007] 在另一个方面,在属于C簇的多肽中,CDR1是SEQ ID NO:90。

[1008] 在另一个方面,在属于C簇的多肽中,CDR2选自由以下组成的组:

[1009] (a)SEQ ID NO:112;和

[1010] (b)与SEQ ID NO:112具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1011] -在位置2处V已经变为A。

[1012] 在另一个方面,在属于C簇的多肽中,CDR3是SEQ ID NO:130。

[1013] 因此,本发明涉及这样的ISV或多肽,所述ISV或多肽特异性结合CD3并且包括以下或基本上由以下组成:4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3),其中:

[1014] (i)CDR1是SEQ ID NO:90;和

[1015] 并且其中

[1016] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[1017] (a)SEQ ID NO:112;和

[1018] (b)与SEQ ID NO:112具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1019] -在位置2处V已经变为A,

[1020] 并且其中

[1021] (iii)CDR3是SEQ ID NO:130。

[1022] 在另一个方面,本发明涉及这样的多肽,其中:CDR1由SEQ ID NO:90表示,CDR2由SEQ ID NO:112表示,且CDR3由SEQ ID NO:130表示。优选地,多肽选自SEQ ID NOs:53-56中的任一者。

[1023] 属于D簇的免疫球蛋白单可变结构域由根据以下的多肽表示,其中:

[1024] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[1025] (a)SEQ ID NOs:89;和

[1026] (b)与SEQ ID NO:89的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[1027] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[1028] (c)SEQ ID NOs:111;和

[1029] (d)与SEQ ID NO:111的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通

过表面等离子共振所测量的;和/或

[1030] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[1031] (e)SEQ ID NOs:129;和

[1032] (f)与SEQ ID NO:129的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[1033] 在另一个方面,在属于D簇的多肽中,CDR1是SEQ ID NO:89。

[1034] 在另一个方面,在属于D簇的多肽中,CDR2是SEQ ID NO:111。

[1035] 在另一个方面,在属于D簇的多肽中,CDR3是SEQ ID NO:129。

[1036] 在另一个方面,本发明涉及这样的多肽,其中:CDR1由SEQ ID NO:89表示,CDR2由SEQ ID NO:111表示,且CDR3由SEQ ID NO:129表示。优选地,多肽是SEQ ID NOs:52。

[1037] 属于E簇的免疫球蛋白单可变结构域由根据以下的多肽表示,其中:

[1038] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[1039] (a)SEQ ID NOs:91-93;和

[1040] (b)与SEQ ID NO:91的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[1041] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[1042] (c)SEQ ID NOs:114-117;和

[1043] (d)与SEQ ID NO:114的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[1044] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[1045] (e)SEQ ID NOs:131-133;和

[1046] (f)与SEQ ID NO:131的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[1047] 在另一个方面,在属于E簇的多肽中,CDR1选自由以下组成的组:

[1048] (a)SEQ ID NO:91;和

[1049] (b)与SEQ ID NO:91具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1050] -在位置6处R已经变为N或T;

[1051] -在位置7处N已经变为H;和/或

[1052] -在位置8处M已经变为T。

[1053] 在另一个方面,在属于E簇的多肽中,CDR2选自由以下组成的组:

[1054] (a)SEQ ID NO:114;和

[1055] (b)与SEQ ID NO:114具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1056] -在位置1处R已经变为Q;

[1057] -在位置3处T已经变为S;和/或

[1058] -在位置7处D已经变为A或K。

[1059] 在另一个方面,在属于E簇的多肽中,CDR3选自由以下组成的组:

[1060] (a)SEQ ID NO:131;和

[1061] (b)与SEQ ID NO:131具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1062] -在位置2处S已经变为R;和/或

[1063] -在位置6处S已经变为V。

[1064] 因此,本发明涉及这样的ISV或多肽,所述ISV或多肽特异性结合CD3并且包括以下或基本上由以下组成:4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3),其中:

[1065] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[1066] (a)SEQ ID NO:91;和

[1067] (b)与SEQ ID NO:91具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1068] -在位置6处R已经变为N或T;

[1069] -在位置7处N已经变为H;和/或

[1070] -在位置8处M已经变为T,

[1071] 并且其中

[1072] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[1073] (a)SEQ ID NO:114;和

[1074] (b)与SEQ ID NO:114具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1075] -在位置1处R已经变为Q;

[1076] -在位置3处T已经变为S;和/或

[1077] -在位置7处D已经变为A或K,

[1078] 并且其中

[1079] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[1080] (a)SEQ ID NO:131;和

[1081] (b)与SEQ ID NO:131具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1082] -在位置2处S已经变为R;和/或

[1083] -在位置6处S已经变为V。

[1084] 在另一个方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR1由SEQ ID NO:91表示,CDR2由SEQ ID NO:114表示,且CDR3由SEQ ID NO:131表示。优选地,多肽选自SEQ ID NOs:57-65中的任一者。

[1085] 属于F簇的免疫球蛋白单可变结构域由根据以下的多肽表示,其中:

[1086] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[1087] (a)SEQ ID NOs:94-100;和

[1088] (b)与SEQ ID NO:94的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2

或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[1089] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[1090] (c)SEQ ID NOs:118-122;和

[1091] (d)与SEQ ID NO:118的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;和/或

[1092] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[1093] (e)SEQ ID NOs:134-143;和

[1094] (f)与SEQ ID NO:134的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同或者更高的亲和力与CD3结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[1095] 在另一个方面,在属于F簇的多肽中,CDR1选自由以下组成的组:

[1096] (a)SEQ ID NO:94;和

[1097] (b)与SEQ ID NO:94具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1098] -在位置3处S已经变为T、A或G;

[1099] -在位置5处N已经变为S;

[1100] -在位置6处M已经变为T或A;和/或

[1101] -在位置9处L已经变为M。

[1102] 在另一个方面,在属于F簇的多肽中,CDR2选自由以下组成的组:

[1103] (a)SEQ ID NO:118;和

[1104] (b)与SEQ ID NO:118具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1105] -在位置2处H已经变为V;

[1106] -在位置5处S已经变为H或A;

[1107] -在位置8处N已经变为S;和/或

[1108] -在位置10处Y已经变为F。

[1109] 在另一个方面,在属于F簇的多肽中,CDR3选自由以下组成的组:

[1110] (a)SEQ ID NO:134;和

[1111] (b)与SEQ ID NO:134具有1、2、3、4或5个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1112] -在位置6处A已经变为S或D;

[1113] -在位置7处F已经变为Y或A;

[1114] -在位置8处R已经变为H;

[1115] -在位置9处S已经变为A;

[1116] -在位置11处G已经变为D、T、N、S、K或R;和/或

[1117] -在位置14处V已经变为I。

[1118] 因此,本发明涉及这样的ISV或多肽,所述ISV或多肽特异性结合CD3并且包括以下或基本上由以下组成:4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至

CDR3),其中:

[1119] (i)CDR1选自由以下组成的组:

[1120] (a)SEQ ID NO:94;和

[1121] (b)与SEQ ID NO:94具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1122] -在位置3处S已经变为T、A或G;

[1123] -在位置5处N已经变为S;

[1124] -在位置6处M已经变为T或A;和/或

[1125] -在位置9处L已经变为M,

[1126] 并且其中

[1127] (ii)CDR2选自由以下组成的组:

[1128] (a)SEQ ID NO:118;和

[1129] (b)与SEQ ID NO:118具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1130] -在位置2处H已经变为V;

[1131] -在位置5处S已经变为H或A;

[1132] -在位置8处N已经变为S;和/或

[1133] -在位置10处Y已经变为F,

[1134] 并且其中

[1135] (iii)CDR3选自由以下组成的组:

[1136] (a)SEQ ID NO:134;和

[1137] (b)与SEQ ID NO:134具有1、2、3、4或5个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1138] -在位置6处A已经变为S或D;

[1139] -在位置7处F已经变为Y或A;

[1140] -在位置8处R已经变为H;

[1141] -在位置9处S已经变为A;

[1142] -在位置11处G已经变为D、T、N、S、K或R;和/或

[1143] -在位置14处V已经变为I。

[1144] 在另一个方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中:CDR1由SEQ ID NO:94表示,CDR2由SEQ ID NO:118表示,且CDR3由SEQ ID NO:134表示。优选地,多肽选自SEQ ID NOs:66-80中的任一者。

[1145] 在另外的方面,本发明涉及这样的多肽,所述多肽通过属于A、B、C、D、E或F簇的ISV或多肽中的至少一者交叉阻断与CD3的结合。

[1146] 因此,本发明涉及这样的多肽,所述多肽通过具有SEQ ID NOs:1-50的ISV或多肽中的至少一者交叉阻断与CD3的结合。

[1147] 因此,本发明涉及这样的多肽,所述多肽通过具有SEQ ID NO:51的ISV或多肽交叉阻断与CD3的结合。

[1148] 因此,本发明涉及这样的多肽,所述多肽通过具有SEQ ID NOs:53-56的ISV或多肽中的至少一者交叉阻断与CD3的结合。

[1149] 因此,本发明涉及这样的多肽,所述多肽通过具有SEQ ID NO:52的ISV或多肽交叉阻断与CD3的结合。

[1150] 因此,本发明涉及这样的多肽,所述多肽通过具有SEQ ID NOs:57-65的ISV或多肽中的至少一者交叉阻断与CD3的结合。

[1151] 因此,本发明涉及这样的多肽,所述多肽通过具有SEQ ID NOs:66-80的ISV或多肽中的至少一者交叉阻断与CD3的结合。

[1152] 在另外的方面,本发明涉及这样的多肽,所述多肽通过属于A、B、C、D、E或F簇的ISV或多肽中的至少一者被交叉阻断与CD3的结合。

[1153] 因此,本发明涉及这样的多肽,所述多肽通过属于SEQ ID NOs:1-50的ISV或多肽中的至少一者被交叉阻断与CD3的结合。

[1154] 因此,本发明涉及这样的多肽,所述多肽通过具有SEQ ID NO:51的ISV或多肽被交叉阻断与CD3的结合。

[1155] 因此,本发明涉及这样的多肽,所述多肽通过属于SEQ ID NOs:53-56的ISV或多肽中的至少一者被交叉阻断与CD3的结合。

[1156] 因此,本发明涉及这样的多肽,所述多肽通过具有SEQ ID NO:52的ISV或多肽被交叉阻断与CD3的结合。

[1157] 因此,本发明涉及这样的多肽,所述多肽通过属于SEQ ID NOs:57-65的ISV或多肽中的至少一者被交叉阻断与CD3的结合。

[1158] 因此,本发明涉及这样的多肽,所述多肽通过属于SEQ ID NOs:66-80的ISV或多肽中的至少一者被交叉阻断与CD3的结合。

[1159] 本发明还涉及化合物或构建体,并且特别是这样的蛋白质或多肽,其包含或基本上由被本发明的一种或多种ISV或多肽组成,并且任选地还包含一种或多种其它基团、残基、部分或结合单元。本领域技术人员将从本文的进一步公开内容中清楚知悉,所述其它基团、残基、部分、结合单元或氨基酸序列可以提供或可以不提供另外的功能性到本发明的多肽(和/或到所述多肽存在的化合物或构建体),并且可以改变或可以不改变本发明的多肽的性质。

[1160] 在本发明的一个特定的但非限制性的方面中,其将在本文中进一步描述,本发明的ISV和多肽与作为其来源的免疫球蛋白单可变结构域或多肽相比可以在血清中具有增加的半衰期(如本文进一步描述的)。例如,本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽可以与一个或多个延长半衰期的基团或结构部分(例如PEG)连接(以化学方式或其它方式),以提供具有增加的半衰期的本发明的ISV或多肽的衍生物。

[1161] 在本发明的一个特定方面,本发明的化合物或构建体或本发明的多肽与本发明的相应ISV或多肽相比可以具有增加的半衰期。这种化合物、构建体和多肽的一些优选的但是非限制性的实例在本文进一步公开的基础上对本领域技术人员来说将会变得清楚,例如包括已经进行化学修饰以增加其半衰期(例如通过聚乙二醇化)的本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽;包含至少一个用于结合血清蛋白(例如血清白蛋白)的额外的结合位点的本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽;或者包含至少一个与增加本发明ISV或多肽的半衰期的结构部分(特别是至少一个氨基酸序列)连接的本发明的ISV或多肽的本发明的构建体或多肽。包含这种延长半衰期的结构部分或免疫球蛋白单可变结构域的本发明的ISV或多肽的实例在本文进一步公开的基础上对本领域技术人员来说将会变得清楚;例如包括但不限于其中本发明的一个或多个免疫球蛋白单可变结构域或多肽适当地与一个或多个

血清蛋白或其片段(例如(人)血清白蛋白或其适合的片段)或与一个或多个能结合血清蛋白的结合单元(例如能结合血清蛋白例如血清白蛋白(例如人血清白蛋白)、血清免疫球蛋白例如IgG、或转铁蛋白的结构域抗体、适合用作结构域抗体的免疫球蛋白单可变结构域、单结构域抗体、适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白单可变结构域、“dAb”’s、适合用作dAb的免疫球蛋白单可变结构域、或纳米抗体;参考本文的进一步描述和所提及的参考文献)连接的多肽;其中本发明的ISV或多肽与Fc部分(例如人Fc)或其适合的部分或片段连接的ISV或多肽;或其中本发明的一个或多个免疫球蛋白单可变结构域或多肽适当地与一个或多个能结合血清蛋白的小蛋白或肽(例如但不限于WO 91/01743、WO 01/45746、WO 02/076489、WO 08/068280、WO 09/127691和WO 11/095545中描述的蛋白和肽)连接的多肽。

[1162] 通常,具有增加的半衰期的本发明的化合物、构建体或多肽的半衰期优选是本发明的相应ISV或多肽本身的半衰期的至少1.5倍,其优选至少2倍,例如至少5倍,例如至少10倍或大于20倍。例如,具有增加的半衰期的本发明的化合物、构建体或多肽例如在人中可以具有比本发明的相应ISV或多肽本身增加大于1小时,其优选大于2小时,更优选大于6小时,例如大于12小时,或者甚至大于24、48或72小时的半衰期。

[1163] 在本发明的优选的但是非限制性的方面,本发明的这种化合物、构建体或多肽例如在人中具有比本发明的相应ISV或多肽本身增加大于1小时,其优选大于2小时,更优选大于6小时,例如大于12小时,或者甚至大于24、48或72小时的血清半衰期。

[1164] 在本发明的另一个优选的但是非限制性的方面,本发明的这种化合物、构建体或多肽表现出在人中至少约12小时,其优选至少24小时,更优选至少48小时,更优选至少72小时或更长的血清半衰期。例如,本发明的化合物、构建体或多肽可以具有至少5天(例如约5-10天),其优选至少9天(例如约9-14天),更优选至少约10天(例如约10-15天),或者至少约11天(例如约11-16天),更优选至少约12天(例如约12-18天或更长),或者大于14天(例如约14-19天)的半衰期。

[1165] 在本发明中证实了在构建物中包含靶向白蛋白的结合单位本身对获得的效力或功效不具有重要影响。尽管在HSA存在下观察到功效/效力的轻微损失,但是半衰期延长的CD3多特异性多肽在肿瘤细胞杀伤中仍然是有效的。已经证实,基于白蛋白的药物递送对于实现改善的癌症疗法是有用的,这很大程度上归因于其通过增强的渗透性和滞留效应被动靶向肿瘤以及肿瘤细胞对作为能量和氨基酸来源的白蛋白的需求增加。然而,白蛋白不仅缺少克服细胞膜屏障的活性机制,而且缺少穿透肿瘤组织的能力(Qianqian Guo等人Polym.Chem.,2013,4,4584-4587)。

[1166] 在本发明的特别优选但非限制性方面,本发明提供这样的本发明的多肽:包含第一和第二免疫球蛋白单可变结构域(ISV);并且进一步包含一种以上(优选为一种)如本文所述的结合血清白蛋白的免疫球蛋白单可变结构域,例如称为Alb8、Alb23、Alb129、Alb132、Alb11、Alb11(S112K)-A、Alb82、Alb82-A、Alb82-AA、Alb82-AAA、Alb82-G、Alb82-GG、Alb82-GGG的结合血清白蛋白的免疫球蛋白单可变结构域(表B-3)。

[1167] 表B-3:用于本发明的ISV和多肽的HLE中的免疫球蛋白单可变结构域

[1168]

Alb8	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQA PGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYL QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQA PGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb129	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQ APGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLY LQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb132	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQ APGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb11	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQA PGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYL QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb11 (S112K)-A	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQA PGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYL QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVKVSSA
Alb82	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQ APGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLY LQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb82-A	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQ APGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLY LQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb82-AA	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQ APGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLY LQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSAA

[1169]

Alb82-AAA	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQ APGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLY LQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSAAA
Alb82-G	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQ APGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLY LQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSG
Alb82-GG	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQ APGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLY LQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGG
Alb82-GGG	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQ APGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLY LQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGG

[1170] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,进一步包含血清蛋白结合部分。

[1171] 本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述血清蛋白结合部分与血清白蛋白结合。

[1172] 本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述血清蛋白结合部分是结合血清白蛋白的免疫球蛋白单可变结构域。

[1173] 本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述结合血清白蛋白的ISV基本上由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1是SFGMS(SEQ

ID NO:373),CDR2是SISGSGSDTLYADSVKG(SEQ ID NO:374),并且其中CDR3是GGSLSR(SEQ ID NO:375),CDR根据Kabat定义确定;和/或其中CDR1是GFTFSSFGMS(SEQ ID NO:376)或GFTFRSFGMS(SEQ ID NO:377),CDR2是SISGSGSDTL(SEQ ID NO:378)且CDR3是GGSLSR(SEQ ID NO:375),CDR根据Kontermann 2010确定。

[1174] 本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述结合血清白蛋白的ISV包括Alb8、Alb23、Alb129、Alb132、Alb11、Alb11(S112K)-A、Alb82、Alb82-A、Alb82-AA、Alb82-AAA、Alb82-G、Alb82-GG、Alb82-GGG(表B-3)。

[1175] 在本发明的多肽中,两个以上结构单元、ISV或纳米抗体和任选地一个以上多肽、一个以上其他基团、药物、药剂、残基、部分或结合单元可以直接彼此连接(如例如WO 99/23221中所述)和/或可以通过一个以上合适的间隔区或接头,或其任意组合彼此连接。

[1176] 用于多价和多特异性多肽的合适的间隔区或接头将对于技术人员是明确的,并且可以通常是本领域中用于连接氨基酸序列的任何接头或间隔区。优选地,所述接头或间隔区适于用于构建预期用于药用的蛋白或多肽。

[1177] 一些特别优选的间隔区包括本领域中用于连接抗体片段或抗体结构域的间隔区和接头。这些包括上文引用的一般背景中提及的接头,以及例如本领域中用于构建双抗体(diabodies)或ScFv片段的接头(然而,就这一点,应该注意,在双抗体和ScFv片段中,使用的接头序列应该具有允许相关V_H和V_L结构域靠拢以形成完整的抗原-结合位点的长度、柔性程度和其他性质,对用于本发明的多肽的接头的长度或柔性没有特定限制,因为各个ISV或纳米抗体本身形成完整的抗原-结合位点)。

[1178] 例如,接头可以是合适的氨基酸序列,并且尤其是1至50个之间,其优选为1至30个之间,如1至10个之间的氨基酸残基的氨基酸序列。这样的氨基酸序列的一些优选的实例包括gly-ser接头,例如类型$(gly_xser_y)_z$的,如(例如$(gly_4ser)_3$或$(gly_3ser_2)_3$,如WO 99/42077中所述的,和本文提及的在申请中由Ablynx描述的GS30、GS15、GS9和GS7接头(参见例如WO 06/040153和WO 06/122825),以及铰链状区域,如天然存在的重链抗体或类似序列的铰链区(如WO 94/04678中所述)。优选的接头在表B-4中描述。

[1179] 表B-4:接头

[1180]

5GS	GGGGS
7GS	SGGSGGS
9GS	GGGGSGGGS
10GS	GGGGSGGGGS
15GS	GGGGSGGGGSGGGGS
18GS	GGGGSGGGGSGGGGGGGS
20GS	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
25GS	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
30GS	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
35GS	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
多聚A	AAA

[1181] 一些其他特别优选的接头是多聚丙氨酸(如AAA),以及接头GS30(WO 06/122825中的SEQ ID NO:85)和GS9(WO 06/122825中的SEQ ID NO:84)。

[1182] 其他合适的接头通常包含有机化合物或聚合物,尤其是适于在用于药用的蛋白中使用的那些。例如,聚(乙二醇)部分已经被用于连接抗体结构域,参见例如WO 04/081026。

[1183] 包括在本发明的范围内的是,使用的一个或多个接头(尽管不是至关重要,因为其通常用于在ScFv片段中使用的接头)的长度、柔性程度和/或其他性质可以对本发明的最终多肽的性质具有一些影响,包括但不限于对CD3、或对于一种以上的其他抗原的亲和力、特异性或亲合力。基于本文公开的内容,任选地在一些有限的常规实验后,技术人员将能够确定用于本发明的特定多肽的一个或多个最佳接头。

[1184] 例如,在包含针对第一和第二靶标的结构单元、ISV或纳米抗体的本发明的多价多肽中,接头的长度和柔性优选为这样:其允许存在于多肽中的本发明各个结构单元、ISV或纳米抗体结合于其同源靶标,例如各个靶标上的抗原决定簇。再次,基于本文公开的内容,任选地在一些有限的常规实验后,技术人员将能够确定用于本发明的特定多肽的一个或多个最佳接头。

[1185] 还在本发明的范围内的是,使用的一个或多个接头赋予本发明的多肽一种以上其他有利性质或功能性,和/或提供一个以上用于形成衍生物和/或用于连接功能基团(例如如本文所述用于本发明的ISV、纳米抗体或多肽的衍生物)的位点。例如,含有一个以上带电氨基酸残基的接头可以提供改善的亲水性质,而形成或含有小的表位或标签的接头可以用于检测、鉴定和/或纯化的目的。再次,基于本文中的公开内容,任选地在一些有限的常规实验后,技术人员将能够确定用于本发明的特定多肽的最佳接头。

[1186] 最后,当两个以上接头用于本发明的多肽时,这些接头可以相同或不同。再次,基于本文中的公开内容,任选地在一些有限的常规实验后,技术人员将能够确定用于本发明的特定多肽的最佳接头。

[1187] 通常,为了容易表达和生产,本发明的多肽将是线性多肽。然而,在其最广泛的意义上,本发明不限于此。例如,当本发明的多肽包含三个以上结构单元、ISV或纳米抗体时,可能通过使用具有三个以上“臂”的接头连接它们,每个“臂”连接于结构单元、ISV或纳米抗体,从而提供“星形”构建体。尽管通常不优选,还可能使用环形构建体。

[1188] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV和所述第二ISV以及可能的所述第三ISV和/或所述结合血清白蛋白的ISV直接地彼此连接或经由接头连接。

[1189] 本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述接头选自由5GS、7GS、9GS、10GS、15GS、18GS、20GS、25GS、30GS和35GS的接头组成的组。

[1190] 本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述血清蛋白结合部分是基于非抗体的多肽(例如PEG)。

[1191] 本发明还涉及用于制备本文所述的ISV、多肽和构建体的方法。本发明的ISV、多肽和构建体能够以本身已知的方式制备,如本领域技术人员从本文的进一步描述中将清楚的那样。例如,本发明的ISV、多肽和构建体能够以本身已知的用于制备抗体并且特别是用于制备抗体片段(包括但不限于(单)结构域抗体和ScFv片段)的任何方式制备。制备多肽和构建体的一些优选但非限制性的方法包括本文所述的方法和技术。

[1192] 生产本发明的ISV、多肽或蛋白质构建体的方法可以包括以下步骤:

[1193] -在合适的宿主细胞或宿主生物体(在本文中也称为“本发明的宿主”)中或在编码本发明的所述IVS、多肽或蛋白质构建体的核酸的另一种合适的表达系统中进行表达,

[1194] 任选地,随后是:

[1195] -分离和/或纯化由此获得的本发明的ISV、多肽或蛋白质构建体。

[1196] 特别地,所述方法可以包括以下步骤:

[1197] -在使得本发明的所述宿主表达和/或产生至少一种本发明的ISV、多肽或蛋白质构建体的条件下培养和/或维持本发明的宿主;

[1198] 任选地,随后是:

[1199] -分离和/或纯化由此获得的本发明的ISV、多肽或蛋白质构建体。

[1200] 因此,本发明还涉及编码本发明的ISV、多肽或蛋白质构建体的核酸或核苷酸序列(也称为"本发明的核酸"或"本发明的核苷酸序列")。本发明的核酸可以是单链或双链DNA或RNA的形式,并且优选是双链DNA的形式。例如,本发明的核苷酸序列可以是基因组DNA、cDNA或合成DNA(诸如具有已经专门适用于在预期的宿主细胞或宿主生物体中表达的密码子使用的DNA)。

[1201] 根据本发明的一个实施方案,本发明的核酸是基本上分离的形式,如本文所定义的。本发明的核酸还可以是载体的形式、存在于载体中和/或是载体的一部分,诸如例如质粒、粘粒或YAC,其也可以是基本上分离的形式。

[1202] 基于本文给出的关于本发明的多肽或蛋白质构建体的信息,本发明的核酸可以以本身已知的方式制备或获得,和/或可以从合适的天然来源分离。而且,如本领域技术人员将清楚的,为了制备本发明的核酸,数个核苷酸序列(诸如编码本发明的免疫球蛋白单可变结构域的至少一个核苷酸序列)和例如编码一个或多个接头的核酸还可以以适当的方式连接在一起。

[1203] 用于产生本发明的核酸的技术对于本领域技术人员将是清楚的,并且可以例如包括但不限于自动化DNA合成;定点诱变;组合两个或更多个天然存在的和/或合成的序列(或其两个或更多个部分),引入导致表达截短的表达产物的突变;引入一个或多个限制性位点(例如以产生使用合适的限制酶可以容易地酶切和/或连接的盒和/或区域),和/或使用一个或多个"错配"引物通过PCR反应引入突变。这些和其它技术对于技术人员将是清楚的,并且还可以参考标准手册,诸如本文中提及的Sambrook等人和Ausubel等人,以及如下实施例。

[1204] 如本领域技术人员将清楚的,本发明的核酸还可以是遗传构建体的形式、存在于遗传构建体中和/或是遗传构建体的一部分。所述遗传构建体通常包含本发明的至少一种核酸,其任选地连接至本身已知的遗传构建体的一个或多个元件,诸如例如一个或多个合适的调控元件(诸如合适的启动子、增强子、终止子等)和本文涉及的遗传构建体的其它元件。包含本发明的至少一种核酸的所述遗传构建体也将在本文中称为"本发明的遗传构建体"。

[1205] 本发明的遗传构建体可以是DNA或RNA,并且优选是双链DNA。本发明的遗传构建体还可以是适于转化预期的宿主细胞或宿主生物体的形式,适于整合到预期的宿主细胞的基因组DNA中的形式,或适于预期的宿主生物体中的独立复制、维持和/或遗传的形式。例如,本发明的遗传构建体可以是载体的形式,诸如例如质粒、粘粒、YAC、病毒载体或转座子。特别地,载体可以是表达载体,即能够提供体外和/或体内表达(例如在合适的宿主细胞、宿主生物体和/或表达系统中)的载体。

[1206] 在优选但非限制性的实施方案中,本发明的遗传构建体包含

[1207] a)本发明的至少一种核酸;可操作地连接至

[1208] b)一个或多个调控元件,诸如启动子和任选地合适的终止子;

[1209] 以及还任选地

[1210] c)本身已知的遗传构建体的一个或多个其它元件;

[1211] 其中术语"调控元件"、"启动子"、"终止子"和"可操作地连接"具有其在本领域中的通常含义(如本文进一步所述):并且其中存在于遗传构建体中的所述"其它元件"可以是例如可以促进或增加转化或整合(的效率)的3'-或5'-UTR序列、前导序列、选择标记、表达标记/报告基因、和/或元件。所述基因构建体的这些和其它合适的元件对技术人员将是清楚的,并且可以例如取决于所使用的构建体的类型;预期的宿主细胞或宿主生物体;感兴趣的本发明的核苷酸序列的表达方式(例如通过组成型、瞬时或诱导表达):和/或要使用的转化技术。例如,本身已知用于抗体和抗体片段(包括但不限于(单)结构域抗体和ScFv片段)的表达和生产的调控序列、启动子和终止子可以以基本类似的方式使用。

[1212] 优选地,在本发明的遗传构建体中,本发明的所述至少一种核酸和所述调节元件,以及任选地所述一个或多个其它元件彼此"可操作地连接",通常意指它们通过这样彼此具有功能关系。例如,如果所述启动子能够启动或以其它方式控制/调节编码序列的转录和/或表达(其中所述编码序列应该被理解为"在"所述启动子的"控制下"),则认为启动子与编码序列"可操作地连接"。通常,当两个核苷酸序列可操作地连接时,它们将处于相同的取向并且通常也处于相同的阅读框中。它们通常也将是基本上连续的,尽管这也可能不是必需的。

[1213] 本发明的核酸和/或本发明的遗传构建体可以用于转化宿主细胞或宿主生物体,即用于表达和/或产生本发明的多肽或蛋白质构建体。宿主优选是非人类宿主。合适的宿主或宿主细胞对本领域技术人员将是清楚的,并且可以是例如任何合适的真菌、原核或真核细胞或细胞系或任何合适的真菌、原核或真核生物体,例如:

[1214] -细菌菌株,包括但不限于革兰氏阴性菌株,诸如大肠杆菌(Escherichia coli)的菌株;变形杆菌属(Proteus)的菌株,例如奇异变形杆菌(Proteus mirabilis);假单胞菌属(Pseudomonas)的菌株,例如荧光假单胞菌(Pseudomonas fluorescens);和革兰氏阳性菌株,诸如芽胞杆菌属(Bacillus)的菌株,例如枯草芽孢杆菌(Bacillussubtilis)或短芽孢杆菌(Bacillus brevis);链霉菌属(Streptomyces)的菌株,例如变青链霉菌(Streptomyces lividans);葡萄球菌属(Staphylococcus)的菌株,例如肉葡萄球菌(Staphylococcuscarnosus);和乳球菌属(Lactococcus)的菌株,例如乳酸乳球菌(Lactococcus lactis);

[1215] -真菌细胞,包括但不限于来自木霉属(Trichoderma)种属的细胞,

[1216] 例如来自里氏木霉(Trichoderma reesei);来自链孢霉属(Neurospora)种属的细胞,例如来自粗糙链孢霉(Neurospora crassa);来自粪壳属(Sordaria)种属的细胞,例如来自大孢粪壳(Sordariamacrospora);来自曲霉属(Aspergillus)种属的细胞,例如来自黑曲霉(Aspergillus niger)或来自酱油曲霉(Aspergillus sojae);或来自其它丝状真菌;

[1217] -酵母细胞,包括但不限于来自酵母属(Saccharomyces)种属的细胞,

[1218] 例如酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae);来自裂殖酵母属

(Schizosaccharomyces)种属的细胞,例如粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe);来自毕赤酵母属(Pichia)种属的细胞,例如毕赤酵母(Pichia pastoris)或甲醇毕赤酵母(Pichiamethanolica);来自汉逊酵母属(Hansenula)种属的细胞,例如多形汉逊酵母(Hansenula polymorpha);来自克鲁维酵母属(Kluyveromyces)种属的细胞,例如乳酸克鲁维酵母(Kluyveromyceslactis);来自Arxula种属的细胞,例如Arxula adeninivorans;来自耶氏酵母属(Yarrowia)种属的细胞,例如解脂耶氏酵母(Yarrowialipolytica);

[1219] -两栖动物细胞或细胞系,诸如爪蟾卵母细胞(Xenopus oocytes);

[1220] -来源于昆虫的细胞或细胞系,诸如来源于鳞翅目的细胞/细胞系,

[1221] 包括但不限于夜蛾属(Spodoptera)SF9和Sf21细胞或来源于果蝇属(Drosophila)的细胞/细胞系,诸如Schneider和Kc细胞;

[1222] -植物或植物细胞,例如在烟草植物中;和/或

[1223] -哺乳动物细胞或细胞系,例如来源于人的细胞或细胞系,来自哺乳动物的细胞或细胞系,包括但不限于CHO-细胞,BHK-细胞(例如BHK-21细胞)和人细胞或细胞系诸如HeLa、COS(例如COS-7)

[1224] 和PER.C6细胞;

[1225] 以及本身已知用于抗体和抗体片段(包括但不限于(单)结构域抗体和ScFv片段)的表达和产生的所有其它宿主或宿主细胞,这对技术人员将是清楚的。还可以参考本文中上述引用的一般背景领域,以及例如WO 94/29457;WO 96/34103;WO 99/42077;Frenken等人1998(Res.Immunol.149:589-99);Riechmann和Muyldermans 1999(J.Immunol.Met.231:25-38);van der Linden 2000(J.Biotechnol.80:261-70);Joosten等人2003(Microb.Cell Fact.2:1);Joosten等人2005(Appl.Microbiol.Biotechnol.66:384-92);和本文引用的其它文献。

[1226] 对于在细胞中表达ISV、多肽或构建体,它们也可以作为所谓的“胞内抗体”表达,如例如WO 94/02610,WO 95/22618和US 7004940;WO 03/014960;Cattaneo和Biocca 1997(Intracellular Antibodies:Development and Applications.Landes and Springer-Verlag)和Kontermann 2004(Methods34:163-170)中描述的。

[1227] 根据本发明的一个优选但非限制性的实施方案,本发明的ISV、多肽或蛋白质构建体在细菌细胞、特别是适于大规模药物生产的细菌细胞(诸如上述提及的菌株的细胞)中生产。

[1228] 根据本发明的另一个优选但非限制性的实施方案,本发明的ISV、多肽或蛋白质构建体在酵母细胞、特别是适于大规模药物生产的酵母细胞(诸如上述提及的种属的细胞)中生产。

[1229] 根据本发明的又一个优选但非限制性的实施方案,本发明的ISV、多肽或构建体在哺乳动物细胞中生产,特别是在人细胞中或在人细胞系的细胞中生产,更特别是在适用于大规模药物生产的人细胞或人细胞系的细胞(诸如上文提及的细胞系)中生产。

[1230] 用于转化本发明的宿主或宿主细胞的合适技术对于技术人员将是清楚的,并且可以取决于预期的宿主细胞/宿主生物体和要使用的遗传构建体。再次参考如上提及的手册和专利申请。

[1231] 转化后,可以进行用于检测和选择已经用本发明的核苷酸序列/遗传构建体成功

转化的那些宿主细胞或宿主生物体的步骤。这例如可以是基于存在于本发明的遗传构建体中的选择性标记的选择步骤,或涉及例如使用特定抗体检测本发明的多肽的步骤。

[1232] 转化的宿主细胞(其可以是稳定的细胞系的形式)或宿主生物体(其可以是稳定的突变系或菌株的形式)形成本发明的另外的方面。

[1233] 优选地,这些宿主细胞或宿主生物体使得它们表达或者(至少)能够表达(例如在合适的条件下)本发明的ISV、多肽或蛋白质构建体(并且在宿主生物的情况下:在其至少一个细胞、部分、组织或器官中)。本发明还包括本发明的宿主细胞或宿主生物体的下一代,后代和/或子代,例如通过细胞分裂或通过有性或无性繁殖获得。

[1234] 因此,在另一个方面,本发明涉及表达(或在合适的情况下能够表达)本发明的ISV、多肽或蛋白质构建体的宿主或宿主细胞;和/或含有编码本发明的ISV、多肽或蛋白质构建体的核酸的宿主或宿主细胞。这种宿主或宿主细胞的一些优选但非限制性的实例可以如WO 04/041867、WO 04/041865或WO 09/068627中通常描述的。例如,本发明的ISV、多肽和蛋白质构建体可以有利地在酵母菌株诸如毕赤酵母的菌株中表达、产生或制造。还参考WO 04/25591、WO 10/125187、WO 11/003622和WO 12/056000,其还描述了免疫球蛋白单可变结构域和包含其的多肽在毕赤酵母和其它宿主/宿主细胞中的表达/产生。

[1235] 为了产生/获得本发明的ISV、多肽或蛋白质构建体的表达,转化的宿主细胞或转化的宿主生物体通常可以在使得本发明的(所需)ISV、多肽或蛋白质构建体表达/产生的条件下保持、维持和/或培养。合适的条件对于技术人员将是清楚的,并且通常将取决于所使用的宿主细胞/宿主生物体,以及控制本发明的(相关)核苷酸序列的表达的调控元件。再次参考在关于本发明遗传构建体的段落中如上提及的手册和专利申请。

[1236] 通常,合适的条件可以包括使用合适的培养基,存在合适的食物来源和/或合适的营养素,使用合适的温度,并且任选地存在合适的诱导因子或化合物(例如当本发明的核苷酸序列处于诱导性启动子的控制下时);全部这些可以由技术人员选择。同样地,在这样的条件下,本发明的ISV、多肽或蛋白质构建体可以以组成型方式表达,以瞬时方式表达,或者仅当适当诱导时表达。

[1237] 本领域技术人员还将清楚的是,本发明的ISV、多肽或蛋白质构建体可以(首先)以未成熟形式产生(如上所述),然后可以对其进行翻译后修饰,这取决于所使用的宿主细胞/宿主生物体。而且,本发明的ISV、多肽或蛋白质构建体可以是糖基化的,这也取决于所使用的宿主细胞/宿主生物体。

[1238] 然后可以使用本身已知的蛋白质分离和/或纯化技术,诸如(制备)色谱和/或电泳技术、示差沉淀技术、亲和技术(例如,使用与本发明的多肽或构建体融合的特异性可裂解氨基酸序列)和/或制备免疫技术(即,使用针对待分离的氨基酸序列的抗体),从宿主细胞/宿主生物体和/或从其中培养所述宿主细胞或宿主生物体的培养基分离本发明的ISV、多肽或蛋白质构建体。

[1239] 本发明的构建体通常可以通过下述方法制备:其包含至少一个将本发明的ISV或多肽与一个或多个另外的基团、残基、结构部分或结合单元任选地通过一个或多个适合的接头适当地连接的步骤,以提供本发明的构建体。然后可以进一步修饰本发明的ISV、多肽和构建体,并且特别是通过对形成本发明的多肽或构建体的一个或多个氨基酸残基进行化学和/或生物学(例如酶促)修饰以获得本发明的多肽或构建体的衍生物。

[1240] 本发明还涉及包含本发明的ISV、多肽、化合物或构建体的药物组合物。

[1241] 在上述方法中,本发明的氨基酸序列、ISV、纳米抗体、多肽、化合物或构建体和/或包含其的组合物可以以任何适当的方式施用,这取决于要用的特定的药物制剂或组合物。因此,例如,本发明的氨基酸序列、ISV、纳米抗体、多肽、化合物或构建体和/或包含其的组合物可以经口、腹膜内(例如,静脉内、皮下、肌内或通过避开胃肠道的任何其它施用途径)、鼻内、经皮、局部、通过栓剂、通过吸入方式施用,这也取决于要用的特定的药物制剂或组合物。临床医生将能够选择适当的施用途径和用于所述施用的适当的药物制剂或组合物,这取决于要预防或治疗的疾病或病症以及临床医生公知的其它因素。

[1242] 如本文所用,术语“治疗剂”是指能够用于治疗和/或处理过度增殖细胞病症(例如癌症)或其一种或多种症状的任何药剂。在某些实施方案中,术语“治疗剂”是指本发明的多特异性多肽。优选地,治疗剂是已知可用于或已经用于或目前正在用于治疗、预防和/或处理过度增殖细胞病症(例如癌症)或其一种或多种症状的药剂。

[1243] 如本文所用,在癌症背景下的“治疗有效量”是指在治疗和/或处理癌症中提供治疗益处的单独治疗量或与其它疗法组合的治疗量。在一个方面,治疗有效量是指足以破坏、改变、控制或去除原发性、区域性或转移性癌症组织的治疗量。在另一个方面,治疗有效量是指足以减轻癌症症状的治疗量。在另一个方面,治疗有效量是指足以延迟或最小化癌症扩散的治疗量。在具体的实施方案中,疗法的治疗有效量是足以抑制癌细胞的生长或增殖、杀死现有的癌细胞(例如引起癌症消退)和/或预防癌症细胞扩散到其它组织或区域(例如,防止转移)的治疗量。在另一个具体的实施方案中,疗法的治疗有效量是足以抑制肿瘤生长达至少5%,优选至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少100%(如通过本领域已知的标准方法测量的)的治疗量。与一定量的本发明的多特异性多肽结合使用时,该术语可以涵盖改善总体疗法的量,降低或避免不需要的效应的量,或增强与另一种疗法的治疗功效或协同作用的量。在一个实施方案中,疗法的治疗有效量在本领域已知的或本文中描述的测定中相对于对照(例如阴性对照如磷酸盐缓冲盐水)降低或避免不需要的效应,或增强与另一种疗法的治疗功效或协同作用达至少5%,优选至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少100%。

[1244] 如本文所用,在非癌症的过度增殖细胞病症背景下的“治疗有效量”是指在治疗和/或处理所述病症中提供治疗益处的单独治疗量或与其它疗法组合的治疗量。在一个方面,治疗有效量是指足以破坏、改变、控制或去除受非癌症的过度增殖细胞病症影响的细胞的治疗量。在另一个方面,治疗有效量是指足以减轻非癌症的过度增殖细胞病症的症状的治疗量。在另一个方面,治疗有效量是指足以延迟或最小化非癌症的过度增殖细胞病症的扩散的治疗量。在具体的实施方案中,疗法的治疗有效量是足以抑制非癌症的过度增殖细胞病症的生长或增殖、杀死现有的非癌症的过度增殖细胞(例如引起病症消退)的治疗量。在另一个具体的实施方案中,疗法的治疗有效量是足以抑制非癌症的过度增殖细胞的生长达至少5%,优选至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少

85％、至少90％、至少95％或至少100％(如通过本领域已知的标准方法测量的)的治疗量。与一定量的本发明的多特异性多肽结合使用时,该术语可以涵盖改善总体疗法的量,降低或避免不需要的效应的量,或增强与另一种疗法的治疗功效或协同作用的量。在一个实施方案中,疗法的治疗有效量在本领域已知的测定中相对于对照(例如阴性对照如磷酸盐缓冲盐水)降低或避免不需要的效应,或增强与另一种疗法的治疗功效或协同作用达至少5％,优选至少10％、至少15％、至少20％、至少25％、至少30％、至少35％、至少40％、至少45％、至少50％、至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％或至少100％。

[1245] 如本文所用,术语“疗法”是指能够用于治疗、预防和/或处理过度增殖细胞病症(例如癌症)的任何方案、方法和/或药剂。在某些实施方案中,术语“疗法”是指用于治疗、预防和/或处理过度增殖细胞病症(例如癌症)或本领域技术人员(诸如医务人员)已知的其一种或多种症状的生物疗法、支持疗法和/或其它疗法。

[1246] 如本文所用,在对受试者施用疗法的背景下,术语“治疗(“treat”、“treatment”和“treating”)”是指由施用一种或多种疗法(包括但不限于施用一种或多种预防剂或治疗剂)导致的与过度增殖细胞病症(例如癌症)有关的病症的进展、严重度和/或持续时间的降低或改善,和/或其一种或多种症状的改善。在具体的实施方案中,在对受试者施用疗法的背景下,术语“治疗”是指降低或改善过度增殖细胞病症(例如癌症)的进展、严重度和/或持续时间,是指相对于对照(例如阴性对照如磷酸盐缓冲盐水)减少癌细胞达至少5％,优选至少10％、至少15％、至少20％、至少25％、至少30％、至少35％、至少40％、至少45％、至少50％、至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％或至少100％。在其它实施方案中,在对受试者施用疗法的背景下,术语“治疗”是指降低或改善过度增殖细胞病症(例如癌症)的进展、严重度和/或持续时间,是指癌症细胞数量没有变化、住院时间减少、死亡率降低或患有癌症的受试者的存活时间增加。

[1247] 本发明的氨基酸序列、ISV、纳米抗体、多肽、化合物和/或构建体和/或包含其的组合物按照治疗方案进行施用,所述治疗方案适于预防和/或治疗要被预防或治疗的过度增殖细胞病症(例如癌症)。临床医生将通常能够确定适宜的治疗方案,取决于以下因素,诸如要被治疗的过度增殖细胞病症(例如癌症)的阶段,要被治疗的过度增殖细胞病症(例如癌症)的严重度和/或其症状的严重度,要用的本发明的特定的氨基酸序列、ISV、纳米抗体、多肽、化合物和/或构建体,要用的特定的施用途径和药物制剂或组合物,患者的年龄、性别、体重、饮食、综合病况,以及临床医生公知的类似因素。

[1248] 一般地,所述治疗方案将包括以一种或多种药学上有效量或剂量施用本发明的一种或多种氨基酸序列、ISV、纳米抗体、多肽、化合物和/或构建体,或一种或多种包含其的组合物。仍基于上述因素,临床医生可以确定施用的具体量或剂量。

[1249] 通常,为了预防和/或治疗本文提及的过度增殖细胞病症(例如癌症),并且取决于要治疗的过度增殖细胞病症(例如癌症)的类型和疾病阶段、要用的本发明的特定的氨基酸序列、ISV、纳米抗体、多肽、化合物或构建体的效力、使用的特定施用途径和特定药物制剂或组合物,本发明的氨基酸序列、ISV、纳米抗体、多肽、化合物或构建体将一般以每天每kg体重1克至0.01毫克的量施用,优选每天每kg体重0.1克至0.01毫克,诸如每天每kg体重约0.1、1、10、100或1000毫克,例如每kg受试者体重0.1mg至25mg;或者作为单一的每日剂量或

在一天内作为多次分剂量连续地(例如通过输注)施用。临床医生将通常能够确定合适的每日剂量,这取决于本文提及的因素。还应该清楚,在特定的情况下,临床医师可以选择偏离这些量,例如基于上文引用的因素以及他的专业判断。一般地,考虑到亲和力/亲合力、功效、生物分布、半衰期以及技术人员公知的类似因素的不同,关于施用量的一些指导可以从通过基本上相同的途径通常施用的相当的针对相同施用靶标的常规抗体或抗体片段的量而获得。

[1250] 通常,在上述方法中,将使用单一的本发明的氨基酸序列、ISV、纳米抗体、多肽、化合物或构建体。然而,使用组合的两种或更多种本发明的氨基酸序列、ISV、纳米抗体、多肽化合物和/或构建体在本发明的范围之内。

[1251] 本发明的ISV、纳米抗体、氨基酸序列、多肽、化合物和/或构建体还可以与一种或多种其它药物活性化合物或成分组合使用,即作为组合治疗方案,其可以或者可以不引起协同效应。并且,基于上文引用的因素及其专业判断,临床医生将能够选择所述的其它化合物或成分,以及合适的组合治疗方案。

[1252] 特别地,本发明的氨基酸序列、ISV、纳米抗体、多肽、化合物和/或构建体可以与其它药物活性化合物或成分组合使用,所述其它药物活性化合物或成分是或者能够用于预防和/或治疗本文引用的过度增殖细胞病症(例如癌症)、疾病和/或病症,其结果可以或者可以不获得协同效应。所述化合物和成分的实例,以及施用它们的途径、方法和药物制剂或组合物是临床医生所清楚的。

[1253] 当两种或更多种物质或成分用作组合治疗方案的一部分时,它们可以通过相同的施用途径或者通过不同的施用途径在基本上相同的时间或在不同时间(例如,基本上同时地、连续地或者按照备选方案)施用。当所述物质或成分通过相同的施用途径同时施用时,它们可以作为不同的药物制剂或组合物或者作为组合的药物制剂或组合物的一部分进行施用,这是技术人员所清楚的。

[1254] 在一个方面,本发明提供了用于施用免疫球蛋白单可变结构域和包含一个或多个免疫球蛋白单可变结构域的多肽构建体、多肽、化合物和/或构建体的方法。在一些实施方案中,免疫球蛋白单可变结构域、多肽、化合物和/或构建体作为药物组合物施用。除了免疫球蛋白单可变结构域和其多肽构建体之外,药物组合物包括药学上可接受的载体。

[1255] 如详细描述的,本发明的药物组合物可以被特别地配制以以固体或液体形式施用,所述固体或液体形式包括适于以下的那些:口服施用,例如灌剂(drench)(水性或非水性溶液或混悬液)、片剂(例如靶向口腔、舌下和系统性吸收的那些)、大丸剂(bolus)、散剂(powder)、颗粒剂(granule)、用于施用至舌头的糊剂(paste);肠胃外施用,例如作为例如无菌溶液或混悬液或缓释制剂通过皮下、肌内、静脉内或硬膜外注射的肠胃外施用;局部施用,例如作为施用于皮肤、肺或口腔的霜剂(cream)、软膏剂(ointment)或控释贴剂(patch)或喷雾剂(spray);阴道内或直肠内,例如作为阴道栓剂(pessary)、霜剂或泡沫剂;舌下;经眼睛(ocularly);经皮;或经鼻、肺和到其它粘膜表面。

[1256] 本文使用的短语“药学上可接受的”是指这样的那些化合物、材料、组合物和/或剂型:在合理的医学判断范围内,其适合用于接触人类和动物的组织,且没有过度的毒性、刺激、变应性应答或其它问题或并发症,与合理的收益/风险比相称。

[1257] 本文使用的短语“药学上可接受的载体”是指参与从一个器官或身体的一部分向

另一个器官或身体的另一部分运送或运输主题化合物的药学上可接受的材料、组合物或载体,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包封材料。每种载体必须是“可接受的”,其含义是,与制剂的其它成分相容,且对患者无害。可以充当药学上可接受的载体的物质的一些实例包括:糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;粉状黄蓍胶(tragacanth);麦芽;明胶;滑石;赋形剂,诸如可可脂和栓剂蜡;油类,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,诸如丙二醇;多元醇,诸如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原的水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;pH缓冲溶液;聚酯、聚碳酸酯和/或聚酐;和用于药物制剂中的其它无毒的相容物质。

[1258] 本发明的制剂包括适于口服、经鼻、局部(包括口腔和舌下)、直肠、阴道和/或肠胃外施用的那些。制剂可以方便地以单位剂型存在,并且可以通过制药领域中公知的任何方法制备。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分(例如,免疫球蛋白单可变结构域或其多肽构建体)的量将根据要治疗的宿主和特定的施用方式而变化。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将通常是产生治疗效果的化合物的量。通常,该量将在约1%至约99%的活性成分的范围内,优选约5%至约70%,最优选约10%至约30%。

[1259] 在某些实施方案中,制剂包含赋形剂,其选自由环糊精、脂质体、胶束形成剂(例如胆汁酸)和聚合载体(例如聚酯和聚酐)组成的组。在某些实施方案中,前述制剂提供经口地生物可利用的免疫球蛋白单可变结构域或多肽构建体。

[1260] 制备这些制剂或组合物的方法包括将免疫球蛋白单可变结构域或多肽构建体与载体以及任选地一种或多种辅助成分结合的步骤。一般地,通过将免疫球蛋白单可变结构域或多肽构建体均匀且紧密地与液体载体或细碎的固体载体或二者结合,并且然后使产物成形(如果需要)来制备制剂。

[1261] 适于口服施用的制剂可以是以下形式:胶囊、扁囊剂(cachet)、丸剂(pill)、片剂、锭剂(lozenge)(使用调味基质,通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、散剂、颗粒剂,或者作为呈水性或非水性液体的溶液或混悬液,或者作为水包油或油包水液体乳剂,或者作为酏剂(elixir)或糖浆(syrup),或者作为软锭剂(pastille)(使用惰性基质,诸如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)和/或者作为漱口水等,各自含有预定量的免疫球蛋白单可变结构域或多肽构建体作为活性成分。免疫球蛋白单可变结构域或多肽构建体发明也可以作为大丸剂、药糖剂(electuary)或糊剂施用。

[1262] 在用于口服施用的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸(dragee)、散剂、颗粒剂等)中,活性成分与一种或多种药学上可接受的载体混合,诸如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或以下中的任一者:填充剂或增充剂(extender),诸如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;粘合剂,诸如例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;保湿剂(humectant),诸如甘油;崩解剂,诸如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;溶液缓凝剂,诸如石蜡;吸收促进剂,诸如季铵化合物;湿润剂,诸如例如鲸蜡醇、甘油单硬脂酸酯和非离子表面活性剂;吸附剂,诸如高岭土和膨润土;润滑剂,诸如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠及其混合物;和着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,药物组合物还可以包含缓冲剂。类似类型的固体组合物也可以用作

在使用诸如乳糖(lactose)或牛奶糖(milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等赋形剂的软壳和硬壳明胶胶囊中的填充剂。

[1263] 片剂可以任选地与一种或多种辅助成分通过压制或模制来制备。压制片剂可以使用粘合剂(例如明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如羟基乙酸淀粉钠或交联的羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂来制备。模制片剂可以在合适的机器中制备,其中粉状化合物的混合物用惰性液体稀释剂润湿。

[1264] 片剂和药物组合物的其它固体剂型(诸如糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒剂)可以任选地用包衣和外壳(诸如药物配制领域公知的肠溶衣和其它包衣)刻痕或制备。它们也可以经配制以便提供其中活性成分的缓慢或控制释放,例如使用以提供所需释放曲线的不同比例的羟丙基甲基纤维素,其它聚合物基质,脂质体和/或微球体。它们可以经配制以用于快速释放,例如冷冻干燥。它们可以通过例如通过保留细菌的过滤器过滤来灭菌,后者通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌,所述灭菌剂可以在使用前即刻溶解在无菌水或一些其它无菌可注射介质中。这些组合物还可以任选地含有遮盖剂(opacifying agent),并且可以是这样的组合物:它们仅在或优选在胃肠道的某个部分释放活性成分,任选地以延迟的方式。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物质和蜡。活性成分也可以是微囊形式,如果合适的话,具有一种或多种上述赋形剂。

[1265] 用于口服施用的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、混悬液、糖浆和酏剂。除了活性成分之外,液体剂型可以含有本领域常用的惰性稀释剂(诸如例如水或其它溶剂),增溶剂和乳化剂,诸如乙醇,异丙醇,碳酸乙酯,乙酸乙酯,苯甲醇,苯甲酸苄酯,丙二醇,1,3-丁二醇,油类(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油),甘油,四氢呋喃醇,聚乙二醇和山梨聚糖的脂肪酸酯,以及它们的混合物。

[1266] 除了惰性稀释剂之外,口服组合物还可以包括佐剂(诸如湿润剂),乳化剂和悬浮剂,甜味剂,调味剂,着色剂,加香剂和防腐剂。

[1267] 除了活性化合物以外,混悬液可以含有悬浮剂,例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和脱水山梨醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍胶,及其混合物。

[1268] 用于直肠或阴道施用的药物组合物的制剂可以作为栓剂呈现,其可以通过将免疫球蛋白单可变结构域或多肽构建体与一种或多种合适的非刺激性赋形剂或载体混合来制备,所述赋形剂或载体包括例如可可脂,聚乙二醇,栓剂蜡或水杨酸酯,并且其在室温下是固体,但是在体温下是液体,并且因此将在直肠或阴道腔中融化并释放活性化合物。

[1269] 适于阴道施用的制剂还包括含有本领域已知的合适载体的阴道栓剂、棉塞、霜剂、凝胶、糊剂、泡沫剂或喷雾制剂。

[1270] 用于局部或经皮施用免疫球蛋白单可变结构域或多肽构建体的剂型包括散剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、霜剂、洗剂(lotion)、凝胶、溶液、贴剂和吸入剂。活性化合物可以在无菌条件下与药学上可接受的载体以及可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[1271] 软膏剂、糊剂、霜剂和凝胶可以含有赋形剂,诸如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅氧烷、膨润土、硅酸、滑石和氧化锌,或其混合物。

[1272] 散剂和喷雾剂可以含有赋形剂,诸如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末,或这些物质的混合物。喷雾剂可以额外地含有常规推进剂,诸如氯氟烃和挥发性未取代的烃(诸如丁烷和丙烷)。

[1273] 经皮贴剂具有提供将免疫球蛋白单可变结构域或多肽构建体控制递送至身体的附加优点。将化合物溶解或分散在适当的介质中可以制得所述剂型。吸收促进剂也可以用于增加化合物通过皮肤的通量。提供速率控制膜或将化合物分散在聚合物基质或凝胶中可以控制所述通量的速率。

[1274] 眼科制剂,眼软膏、散剂、溶液等也被认为是在本发明的范围内。

[1275] 适于肠胃外施用的药物组合物包含一种或多种免疫球蛋白单可变结构域或多肽构建体,其与一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散液、混悬液或乳液或者可以在使用前重构为无菌可注射溶液或分散液的灭菌散剂组合,它们可以含有糖、醇、抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质或悬浮剂或增稠剂。

[1276] 可以用于药物组合物中的合适的水性和非水性载体的实例包括水,乙醇,多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等),及其合适的混合物,植物油(诸如橄榄油)和可注射的有机酯(诸如油酸乙酯)。例如,通过使用包衣材料(诸如卵磷脂)、通过在分散液的情况下保持所需的粒度以及通过使用表面活性剂可以保持适当的流动性。

[1277] 这些组合物还可以含有佐剂,诸如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如尼泊金(paraben)、氯丁醇、苯酚山梨酸等,可以确保阻止微生物对主题化合物的作用。将等渗剂(诸如糖、氯化钠等)包含在组合物中也是所期望的。另外,可通过包含延迟吸收的药剂(诸如单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射药物形式的延长的吸收。

[1278] 在一些情况下,为了延长药物的效应,期望减缓从皮下或肌内注射的药物吸收。这可以通过使用具有差的水溶性的结晶或无定形材料的液体混悬液来完成。然后,药物的吸收速率取决于其溶解速率,这又可以取决于晶体大小和结晶形式。或者,肠胃外施用的药物形式的延迟吸收通过将药物溶解或悬浮于油性载体中来完成。

[1279] 通过在生物可降解的聚合物(诸如聚乳酸-聚乙交酯)中形成主题化合物的微囊基质来制得可注射的储存形式。取决于药物与聚合物的比例以及施用的特定聚合物的性质,可以控制药物释放的速率。其它生物可降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚-(酸酐)。还通过将药物包裹在与身体组织相容的脂质体或微乳剂中来制备储存可注射制剂。

[1280] 本说明书中说明和讨论的实施方案仅意在教导本领域技术人员本发明人已知的最佳方式以实现和使用本发明。如本领域技术人员根据上述教导理解的,在不偏离本发明的情况下,本发明的上述实施方案的改进和变化形式是可能的。因此要理解,在权利要求和其对等物的范围内,本发明可以除了如具体描述的之外实践。

[1281] 现在,本发明将通过如下非限制性优选方面、实施例和附图被进一步描述。

[1282] 本申请中引用的所有参考文献(包括文献参考文献、公开的专利、公开的专利申请和共同待定的专利申请),尤其是对于上文参考的教导,在此明确通过引用结合。

实施例

[1283] 实施例1TCRαβ/CD3细胞系

[1284] 产生瞬时和稳定的CHO-K1(ATCC:CCL-61)、HEK293H(Life technologies 11631-017)、Llana(来自美洲驼脐带细胞的成纤维细胞)细胞系,其重组过表达完整人T细胞受体复合物的全部6个链。为此,将TCRalpha(α)链和TCRbeta(β)链的编码序列克隆到来源于

pcDNA3.1的载体中,位于CMV启动子的下游,并将2A样病毒肽序列插入到两个链之间以在多蛋白的翻译期间诱导核糖体跳过(ribosomal skipping)。在相同的载体中,将CD3复合物的ε、δ、γ和ζ链的编码序列克隆到另外的CMV启动子的下游,也使用相应链之间的2A样病毒肽序列。另外,使用单一基因载体,如上所述产生具有重组过表达人CD3的4个链的稳定HEK293H克隆。

[1285] 人CD3和人TCRα/β恒定结构域的序列从UniProtKB获取(CD3δ:P04234,CD3γ:P09693,CD3ε:P07766,CD3ζ:P20963,TCRα:P01848和TCRβ:P01850)。人TCRα/β可变结构域的序列从晶体结构获取。(PDB编码:2IAN、2XN9和3TOE)。

[1286] 使用功能性小鼠IgG2b抗-人TCRα/β抗体、克隆BW242/412(Miltenyi130-098-219)以及功能性小鼠IgG2a抗-CD3 PE标记的抗体、克隆OKT-3(eBioscience 12-0037)来确认人T细胞受体复合物的细胞表面表达。

[1287] (图1)

[1288] 实施例2具有TCR/CD3的美洲驼的免疫,仅重链的抗体片段库的克隆和噬菌体的制备

[1289] 2.1免疫

[1290] 经伦理委员会批准后(比利时根特大学兽医学院-EC2004/044en EC2005/053),用通过Ficol密度离心从单一血沉棕黄层(buffy coat)分离的人外周血淋巴细胞(PBMC)或用通过使用生物素缀合的抗体的磁性细胞分离从PBMC富集的小鼠或人T细胞和NK细胞对美洲驼(llama glama)进行免疫。这些免疫策略都没有导致特异性免疫应答。

[1291] 在伦理委员会批准后(CRIA,LA1400575,比利时-EC2012#1),用pVAX1-人TCR(2IAN)/CD3(实施例1中所述)质粒载体(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)和用pVAX1-人TCR(2XN9)/CD3(实施例1中所述)质粒载体(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)根据标准方案对3只额外的美洲驼进行免疫。两只美洲驼另外接受1次原代人T细胞的皮下注射。使用RosetteSep(StemCell Technologies,#15061),从健康志愿者(根特血库),从血沉棕黄层血液中收集人T细胞,随后根据生产商的说明书在Ficoll-PaqueTM PLUS(GE Healthcare#17-1440-03)上富集并储存在液氮中。融化后,将细胞洗涤,并重新悬浮于来自Gibco的D-PBS中,并在注射前保持在冰上。

[1292] 2.2仅重链的抗体片段库的克隆和噬菌体的制备。

[1293] 每只动物在注射一种免疫抗原后收集血样。从这些血样中,根据制造商的说明书(Amersham Biosciences,Piscataway,NJ,USA)使用Ficoll-Hypaque制备PBMC。对于每只免疫的美洲驼,通过汇集从源自免疫方案的某个子集(即,在一种免疫抗原之后)的样品中分离的总RNA来构建文库。

[1294] 简言之,通过特定的限制性位点将PCR扩增的VHH库克隆到经设计用于促进VHH文库的噬菌体展示的载体中。载体来源于pUC119。与VHH编码序列同框,载体编码C-末端3xFLAG和His6标签。根据标准方案(参见例如WO 04/041865,WO 04/041863,WO 04/062551,WO 05/044858和其它现有技术和本文引用的Ablynx N.V.递交的申请)制备噬菌体。

[1295] 实施例3通过噬菌体展示选择TCR/CD3特异性VHH

[1296] 在应用多重选择条件时,从所有美洲驼获得并克隆为噬菌体文库的VHH库用于不同的选择策略。变量包括:i)人TCRα/β/CD3的呈递形式(在不同的细胞背景上或在纯化的原

代T细胞上(如实施例2.1中所述分离)),ii)抗原浓度,iii)选择轮次的数量。简言之,将细胞与噬菌体文库温育2小时,然后充分洗涤;用胰蛋白酶(1mg/mL)洗脱结合的噬菌体15分钟。当胰蛋白酶用于噬菌体洗脱时,通过应用0.8mM蛋白酶抑制剂ABSF立即中和蛋白酶活性。作为对照,平行进行亲本细胞系的选择或无抗原的选择。

[1297] 使用噬菌体输出(outputs)感染大肠杆菌以分析单个VHH克隆。根据标准方案(参见例如WO 03/035694,WO 04/041865,WO 04/041863,WO 04/062551和其它现有技术和本文引用的Ablynx N.V.递交的申请)制备周质提取物。

[1298] 实施例4筛选

[1299] 4.1在流式细胞术测定中筛选结合TCR/CD3的纳米抗体

[1300] 使用人TCR/CD3转染的CHO-K1或HEK293H细胞和相应的CHO-K1或HEK293H参考细胞系,在混合细胞系设置中对周质提取物筛选表达TCR/CD3结合的细胞。为此,一大批参考细胞系用8μM PKH26标记并冷冻。将5x10^4个PKH标记的参考细胞与5x10^4个靶细胞混合,并与周质提取物在4℃温育30分钟,并洗涤3次。接下来,将细胞与1μg/ml单克隆ANTI-FLAG®M2抗体(Sigma-Aldrich,cat#F1804)在4℃温育30分钟,再次洗涤,并与山羊抗-小鼠APC标记的抗体(Jackson Immunoresearch115-135-164,1:100)在4℃温育30分钟。将样品洗涤,重新悬浮于FACS缓冲液(来自Gibco的D-PBS,具有来自Sigma的10%FBS和来自Merck的0.05%叠氮化钠)中,然后在BD FACSArray上进行分析。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在该门类中,在收获期间计数20,000个细胞。基于PKH26-SSC分布,选择PKH标记的亲本群体和人类TCR/CD3未标记的靶标群体。对于这2个群体,计算平均APC值。

[1301] 4.2在人T细胞活化测定中筛选结合TCR/CD3的纳米抗体

[1302] 经过多次尝试,结果显示,根据标准方案(即包被到96孔板上)通过抗体或纳米抗体活化纯化的人T细胞是不够灵敏的(数据未显示)。

[1303] 为了评估活性,基于珠偶联的T细胞活化开发了不同的测定法。简言之,用小鼠抗-flag IgG抗体(Sigma F1804)(15μg/1E7珠)包被山羊抗-小鼠IgG动态珠(dynabead)(Life technologies#11033)。在4℃温育2小时后,将珠洗涤并与80μl周质提取物在4℃温育20分钟,同时震荡。在将珠复合物与可溶性小鼠抗-CD28抗体(Pelicluster CD28-Sanquin#M1650)一起添加至纯化的原代人T细胞(如实施例2.1中所述分离)之前,洗掉非偶联的纳米抗体。作为对照条件,使用未刺激的人T细胞。简言之,将与小鼠抗-flag IgG偶联的山羊抗-小鼠IgG动态珠在含有不相关的纳米抗体的80μl周质提取物中温育。在洗涤步骤期间去除未偶联的纳米抗体之后,将不相关的纳米抗体-珠复合物加入到纯化的初始人T细胞中。

[1304] 在37°和5%CO_2温育24小时后,通过使用单克隆小鼠抗-人CD69PE(BD#557050)在流式细胞术中测量CD69表达水平来测定人T细胞的活化状态。

[1305] 将在流式细胞术结合筛选和T细胞活化测定中评分为阳性的纳米抗体进行测序。

[1306] 序列分析导致鉴定了6个不同的簇。提供了相应的比对(表A-1、表A-2、表A-3、表A-4、表A-5、表A-6)。成簇是基于CDR2和CDR3中的序列相似性和差异。A簇是最突出的,包括50个克隆(SEQ ID NO:s 1-50),B簇和D簇各自由仅1个克隆表示(分别为SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52),C簇包括4个克隆((SEQ ID NO:s 53-56),E簇包括9个克隆(SEQ ID NO:s 57-65)并且F簇包括15个克隆(SEQ ID NO:s 66-80)。

[1307] 对于不同的簇确定CDR的序列可变性。对于A簇,使用克隆117G03的CDR的氨基酸序列用作参考,将所有其它A簇克隆的CDR与其进行比较。相对于117G03的序列可变性在下表中描述。

[1308]

117G03										
Kabat 编号	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
绝对编号	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10
117G03 序列	G	R	T	Y	R	G	Y	S	M	G
变体	R		A	F				G		A

[1309] *在位置1是R的情况下,那么位置10也是A。

[1310]

117G03										
Kabat 编号	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58
绝对编号	1	2	3*	4	5	6	7	8	9	10
117G03 序列	A	I	V	W	S	G	G	N	T	Y
变体			T		T	D			S	
变体			A			E			A	
变体									P	

[1311] *在位置3是T的情况下,那么位置6也是E。

[1312]

117G03															
Kabat 编号	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	101	102
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
117G03 序列	K	I	R	P	Y	I	F	K	I	A	G	Q	Y	D	Y
变体		T							V	P					

[1313] 对于B簇,克隆60E11的CDR的氨基酸序列在下表中描述。

60E11										
Kabat 编号	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
60E11 序列	G	D	I	Y	K	S	F	D	M	G

[1314]

60E11													
Kabat 编号	50	51	52	52a	52b	52c	52d	53	54	55	56	57	58
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
60E11 序列	V	I	G	S	R	G	N	N	R	G	R	T	N

[1315]

60E11								
Kabat 编号	95	96	97	98	99	95	101	102
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8
60E11 序列	A	P	L	V	A	G	R	P

[1316] 对于C簇,使用克隆33G03的CDR的氨基酸序列用作参考,将所有其它C簇克隆的CDR与其进行比较。相对于33G03的序列可变性在下表中描述。

33G03										
Kabat 编号	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
33G03 序列	G	R	T	F	S	T	N	P	M	G

[1317]

33G03										
Kabat 编号	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
33G03 序列 变体	A	V A	R	W	A	D	G	N	T	F

33G03															
Kabat 编号	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	101	102
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
33G03 序列	G	R	P	W	S	A	Y	H	S	P	A	E	Y	V	H

[1318] 对于D簇,克隆11A10的CDR的氨基酸序列在下表中描述。

11A10										
Kabat 编号	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11A10 序列	G	R	T	F	S	S	Y	A	M	A

[1319]

11A10										
Kabat 编号	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11A10 序列	S	I	S	W	S	G	E	N	T	N

11A10																								
Kabat 编号	95	96	97	98	99	100	100 a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l			101	102		
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20				
11A10 序列	K	I	A	K	T	Y	P	D	N	W	Y	W	T	K	S	N	N	Y	N	Y				

[1320] 对于E簇,使用克隆52G04的CDR的氨基酸序列用作参考,将所有其它E簇克隆的CDR与其进行比较。相对于52G04的序列可变性在下表中描述。

[1321]

52G04										
Kabat 编号	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
52G04 序列	G	I	R	I	S	R	N	M	M	G
变体						N	H	T		
变体						T				

[1322]

52G04									
Kabat 编号	50	51	52	53	54	55	56	57	58
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
52G04 序列	R	I	T	P	G	G	D	T	Y
变体	Q		S				A		
变体							K		

52G04						
Kabat 编号	95	96	97	98	101	102
绝对编号	1	2	3	4	5	6
52G04 序列	Y	S	T	L	G	S
变体		R				V

[1323] 对于F簇,使用克隆50A11的CDR的氨基酸序列用作参考,将所有其它F簇克隆的CDR与其进行比较。相对于50A11的序列可变性在下表中描述。

[1324]

50A11										
Kabat 编号	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
50A11 序列	G	R	S	F	N	M	N	P	L	G
变体			T		S	T			M	
变体			A			A				
变体			G							

50A11										
Kabat 编号	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
50A11 序列	A	H	R	W	S	D	G	N	T	Y
变体		V			H			S		F
变体					A					

[1325]

50A11															
Kabat 编号	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	101	102
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
50A11 序列	G	R	P	W	S	A	F	R	S	P	G	E	Y	V	Y
变体						S	Y	H	A		D			I	
变体						D	A				T				
变体											N				
变体											S				
变体											K				
变体											R				

[1326] 基于序列的成簇转变为功能性差异(参见下文)。

[1327] 4.3单价纳米抗体的纯化

[1328] 由于表征实施例4.2中鉴定的全部克隆是不可行的,所以选择代表性的纳米抗体并在大肠杆菌TG1中表达为三联FLAG,His6-标记的蛋白。通过加入1mM IPTG诱导表达并且让其在37℃继续4小时。在离心细胞培养物后,通过冻融沉淀制备周质提取物。将这些提取物用作起始材料并且通过IMAC和尺寸排阻层析(SEC)纯化纳米抗体。

[1329] 将纳米抗体纯化至95%纯度,如通过SDS-PAGE评价的(数据未显示)。

[1330] 实施例5CD3纳米抗体与CHO-K1细胞上表达的人TCR/CD3的结合和CD3纳米抗体与纯化的原代人T细胞的结合。

[1331] 纯化的单价CD3纳米抗体与表达于CHO-K1细胞上的人TCR(2XN9)/CD3的结合和与纯化的原代人T细胞的结合在如实施例4.1中所述的流式细胞术中进行评价。将开始于1μM的CD3纳米抗体117G03(A簇)、60E11(B簇)、33G03(C簇)、11A10(D簇)、52G04(E簇)和50A11(F簇)的稀释物系列应用于细胞。

[1332] 结果在图2中显示。

[1333] 纳米抗体明显结合于CHO-K1细胞上表达的人TCR/CD3。A簇代表物显示最好的亲和力,其次是B、C、F、D和E簇代表物。纳米抗体与纯化的原代人T细胞结合,尽管与CHO-K1人TCR(2XN9)/CD3细胞相比效力稍低。A簇的代表物显示出对人原代T细胞的最佳亲和力,与CHO-K1(2XN9)/CD3上的数据一致。从剂量反应曲线获得的EC_{50}值在表1中呈现。

[1334] 表1:抗-CD3单价纳米抗体对CHO-K1人TCR(2XN9)/CD3细胞和对纯化的原代T细胞的EC50(M),如流式细胞术中所确定。

[1335]

		CHO-K1TCR(2XN9)/CD3			原代人 T 细胞		
簇	样品 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
A	T0170117G03	1.8E-09	1.4E-09	2.3E-09	2.2E-08	1.8E-08	2.8E-08
B	T0170060E11	1.4E-08	1.3E-08	1.6E-08	3.4E-08	1.6E-08	7.0E-08
C	T0170033G03	>1E-07	/	/	>1E-07	/	/
D	T0170011A10	>1E-07	/	/	>1E-07	/	/
E	T0170052G04	不结合			>1E-07	/	/
F	T0170050A11	1.5E-08	3.5E-09	6.3E-08	5.6E-08	3.4E-08	9.2E-08

[1336] 实施例6结合表位的确定

[1337] 在如实施例5所述的流式细胞术中评价与表达于HEK293H细胞上的TCR(2IAN)/CD3的结合并将其与HEK293H人CD3细胞的结合进行比较。将开始于1μM的CD3纳米抗体的稀释物系列应用于细胞。包括作为TCR/CD3阴性细胞系的亲本HEK293H细胞系。

[1338] 结果在图3中显示。

[1339] 对于所有纳米抗体均观察到与人CD3转染的HEK293H的结合。另外,一些Nb显示与转染人TCR/CD3的HEK293H的结合。未观察到与HEK293H亲本细胞系的结合。从剂量反应曲线获得的EC_{50}值在表2中描述。

[1340] 表2:抗-CD3单价纳米抗体对表达于HEK293H上的人TCR(2IAN)/CD3或人CD3的EC50(M),如流式细胞术中所确定。

[1341]

		HEK293H CD3				HEK293H TCR(2IAN)/CD3			
簇	样品 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	1μM/顶部的 MCF	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	1μM/顶部的 MCF
A	T0170117G03	NT	/	/	/	NT	/	/	/
A	T0170075G11	8.4E-08	3.8E-08	1.8E-07	47652	2.0E-08	1.7E-08	2.4E-08	89865
B	T0170060E11	6.1E-09	5.2E-09	7.0E-09	115329	不适合	/	/	13708
C	T0170033G03	2.9E-08	1.1E-08	7.5E-08	68578	不适合	/	/	6694
D	T0170011A10	>1E-07	/	/	3303	>1E-07	/	/	15882
E	T0170052G04	>1E-07	/	/	2852	>1E-07	/	/	4952
F	T0170050A11	1.5E-09	9.8E-10	2.4E-09	106019	不适合	/	/	7457

[1342] 实施例7纯化的CD3反应性纳米抗体的原代人T细胞活化能力

[1343] 在人T细胞活化测定中评价纯化的单价CD3纳米抗体的功能性。用小鼠抗-flag IgG抗体(Sigma F1804)(15μg/1E7珠)包被山羊抗-小鼠IgG动态珠(Life technologies# 11033)。在4℃温育2小时后,将珠洗涤并与固定(1μg)浓度的纯化的flag标签纳米抗体在4℃温育20分钟,同时震荡。在将珠复合物与可溶性小鼠抗-CD28抗体(Pelicluster CD28-Sanquin#M1650)一起添加至来自不同健康供体的纯化的原代人T细胞(如实施例2.1中所述分离)之前,洗掉未偶联的纳米抗体。

[1344] 另外,在不先前捕获到珠上的情况下和在抗-CD28抗体的存在下,通过将纳米抗体与从不同健康供体分离的纯化的原代人T细胞温育来评价纳米抗体结合单价CD3的效应。

[1345] 在如实施例4.2所述,在37℃和5%CO2温育24小时后,通过使用单克隆小鼠抗-人CD69PE(BD#557050)在流式细胞术中测量CD69表达来监测纯化的原代人T细胞的活化状态。

[1346] 总之,CD3纳米抗体在捕获到抗-小鼠IgG动态珠上之后显示出明显的CD69上调(图4A)。当在溶液中应用时,CD3反应性纳米抗体均不能活化纯化的原代人T细胞,如增加的CD69表达所测量的(图4B)。

[1347] 实施例8双特异性CD3多肽与细胞上表达的人T细胞受体复合物的结合

[1348] 为了证明通过纳米抗体将接合的T细胞重定向至肿瘤细胞是可能的,选择CD20抗原作为示例性肿瘤靶标。

[1349] 将不同的CD3结构单元(即纳米抗体)与人CD20靶向纳米抗体一起格式化成双特异性构建体(参见表3)。效应子和肿瘤纳米抗体通过35GS接头进行基因连接,并且随后根据标准方案(双特异性多肽)在毕赤酵母中表达。

[1350] 通过用不相关的抗卵溶菌酶(cablys)纳米抗体代替效应子或肿瘤纳米抗体来产

生不相关的构建体(表3)。

[1351] 表3:样品ID和双特异性构建体的描述

[1352]

	靶标 Nb x 效应子 Nb		效应子 Nb x 靶标 Nb	
簇	克隆 ID	描述	克隆 ID	描述
C	T017000016	20CD019C07-35GS-T0170033G03-FLAG3-HIS6	T017000021	T0170033G03-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6
C	T017000059	20CD019C07-35GS-T0170033G03-FLAG3-HIS6	T017000045	T0170033G03-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6
D	T017000017	20CD019C07-35GS-T0170011A10-FLAG3-HIS6	T017000022	T0170011A10-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6
/	T017000006	20CD019C07-5GS-cAbLys3-FLAG3-HIS6		
/	T017000018	20CD019C07-35GS-cAbLys3-FLAG3-HIS6	T017000023	cAbLys3(D1E)-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6
C			T017000024	T0170033G03-35GS-cAbLys3-FLAG3-HIS6
D			T017000027	T0170011A10-35GS-cAbLys3-FLAG3-HIS6
D	T017000061	20CD019C07-35GS-T0170011A10-FLAG3-HIS6	T017000047	T0170011A10-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6
F	T017000057	20CD019C07-35GS-T0170050A11-FLAG3-HIS6	T017000043	T0170050A11-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6
E	T017000056	20CD019C07-35GS-T0170052G04-FLAG3-HIS6	T017000048	T0170052G04-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6
A	T017000066	20CD019C07-35GS-T0170061D09-FLAG3-HIS6	T017000072	T0170061D09-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6
A	T017000071	20CD019C07-35GS-T0170061F07-FLAG3-HIS6	T017000034	T0170061F07-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6
A	T017000052	20CD019C07-35GS-T0170061F04-FLAG3-HIS6	T017000039	T0170061F04-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6
A	T017000062	20CD019C07-35GS-T0170117G03-FLAG3-HIS6	T017000036	T0170117G03-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6
B	T017000053	20CD019C07-35GS-T0170060E11-FLAG3-HIS6	T017000040	T0170060E11-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6

[1353] 在如实施例5所述的流式细胞术中评价双特异性构建体与表达于CHO-K1细胞上的人TCR/CD3、纯化的原代人T细胞和人CD20阳性Ramos细胞(ATCC:CRL-1596)的结合,并且在图5中呈现。

[1354] 从剂量反应曲线获得的EC_{50}值在表4中描述。

[1355] 表4:抗-CD3单价纳米抗体对CHO-K1人TCR(2XN9)/CD3细胞、原代人T细胞和Ramos细胞的EC50(M),如流式细胞术中所确定。

[1356]

		CHO-K1 huTCR(2XN9)/CD3			hu T 细胞			Ramos		
簇	样品 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
A	T017000062	1.5E-07	1.1E-07	2.1E-07	8.9E-08	7.2E-08	1.1E-07	1.9E-09	1.8E-09	2.1E-09
A	T017000036	7.6E-09	5.9E-09	9.6E-09	3.5E-08	2.8E-08	4.4E-08	2.1E-08	1.9E-08	2.3E-08
B	T017000053	1.5E-07	1.3E-07	1.7E-07	>1E-07	/	/	1.8E-09	1.6E-09	2.0E-09
B	T017000040	1.6E-07	1.5E-07	1.8E-07	>1E-07	/	/	3.2E-08	2.9E-08	3.7E-08
C	T017000016	>1E-07	/	/	>1E-07	/	/	1.5E-09	1.4E-09	1.6E-09
C	T017000021	>1E-07	/	/	5.4E-08	4.0E-08	7.3E-08	4.7E-09	4.4E-09	5.0E-09

[1357] 数据表明CD3xCD20双特异性纳米抗体(虚线)与它们的单价对应物相比具有相似的结合,但是CD20XCD3双特异性纳米抗体(实线)与它们的单价对应物相比对CHO-K1人TCR(2XN9)/CD3细胞和对原代人T细胞的结合降低。在人CD20 Ramos细胞上,在C末端具有CD20的双特异性CD3纳米抗体显示出降低的结合。

[1358] 实施例9在基于流式细胞术的杀伤测定中双特异性CD20XCD3多肽的功能性表征

[1359] 为了评估双特异性多肽是否能够杀死肿瘤细胞,使用分离的人T细胞作为效应细胞进行细胞毒性测定。

[1360] 如实施例2.1所述分离人T细胞。用抗-CD3(eBioscience#12-0037-73);抗-CD8(BD Bioscience#345775);抗-CD4(BD Bioscience#345771);抗-CD45RO(BD Bioscience#555493);抗-CD45RA(BD Bioscience#550855)和抗-CD19(BD Bioscience#555413),抗-CD25(BD Pharmigen#557138),抗-CD69(BD Pharmigen#557050)荧光标记的抗体在流式细胞术测定中对纯化的人T细胞的质量和纯度进行检查。表达人CD20的Ramos细胞和表达人CD20的Raji细胞(ECACC:85011429),如上所述用PKH-26膜染料标记,用作靶细胞。将$2.5x10^5$个效应子和$2.5x10^4$个靶细胞以10:1的效应子对靶标的比率在96孔V底平板中共同温育。为了测量浓度依赖性细胞溶解,将双特异性多肽的系列稀释物(表3)加入到样品中并在37℃在5% CO_2气氛中温育18小时。温育后,通过离心沉淀细胞并用FACS缓冲液洗涤。随后,将细胞重新悬浮于补充有5nM TOPRO3(Molecular Probes cat#T3605)的FACS缓冲液中

以区分活细胞和死细胞。使用FACS Array流式细胞仪(BD Biosciences)分析细胞。对于每个样品,获得80μl的总样品体积。将门控设定为PKH26阳性细胞上,并在该群体内确定TOPRO3阳性细胞。

[1361] CD3双特异性多肽显示Ramos细胞的剂量依赖性杀伤(图6A)。T017000045(C簇,T0170033G03-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6)在Ramos细胞(图6A)和Raji细胞(图6B)二者上显示剂量依赖性杀伤,证实了观察到的细胞毒性作用不限于单一肿瘤细胞系。对于这两种细胞系确定肿瘤抗原CD20的表达水平(图7)。

[1362] 从剂量反应曲线获得的IC_{50}值和%溶解在表5中描述(%溶解=500nM纳米抗体处的%死细胞减去无纳米抗体对照的%死细胞)。

[1363] 表5:在基于流式细胞术的纯化的原代人T细胞介导的Ramos杀伤测定中(使用10:1的效应子比靶标比率)双特异性构建体的平均IC50(M)。

[1364]

簇	单价Nb ID	构建体ID (CD20xCD3)	n	IC50 (M)	%溶解	%溶解 (stdev)	构建体ID (CD3xCD20)	n	IC50 (M)	%溶解	%溶解 (stdev)
A	T0170117G03	T017000062	6	3.9E-09	22	7	T017000036	3	5.5E-09	26	6
B	T0170060E11	T017000053	2	7.0E-09	22	3	T017000040	3	6.8E-09	29	5
C	T0170033G03	T017000016	2	9.2E-09	4	2	T017000045	1	/	0	
D	T0170011A10	T017000061	2	2.9E-08	13	0	T017000047	0			
E	T0170052G04	T017000056	2	1.5E-08	4	6	T017000048	0			
F	T0170050A11	T017000057	2	1.4E-09	3	4	T017000043	0			

[1365] 这些结果证明了CD3双特异性多肽能够诱导肿瘤靶标阳性细胞系的T细胞介导的杀伤。当靶向纳米抗体或效应纳米抗体被不相关的纳米抗体替换时,无法观察到对Ramos细胞的存活的影响。双特异性多肽中各个结构单元之间的取向没有明显偏好。

[1366] 实施例10在基于xCELLigence的杀伤测定中双特异性CD20XCD3多肽的功能性表征

[1367] 还使用基于实时电阻抗的技术,在人效应T细胞的存在下测试CD3多特异性多肽(表3)对人CD20转染的贴壁靶细胞的细胞毒性。在此,测量由细胞粘附到电极表面诱导的阻抗波动。T细胞是非粘附的,并且因此不影响阻抗测量。

[1368] 简言之,将xCELLigence站置于5% CO_2下的37℃培养箱中。将50μl的测定培养基加入到E-pate 96(ACEA Biosciences;cat#05 232 368 001)的每个孔中,并在xCELLigence系统上进行空白读数以测量不存在细胞时的背景阻抗。随后,将人CD20转染的CHO-K1或CHO-K1亲本细胞($1x10^4$)接种到E-平板96上,并加入50μl的纳米抗体的系列稀释物。在室温30分钟后,每孔加入50μl的人T细胞($3x10^5$)以具有30:1的效应子比靶标比率。将板放置在xCELLigence站中,并在3天内每15分钟测量一次阻抗。在测定开始之后44小时对数据进行分析。

[1369] IC_{50}值在表6中描述。

[1370] 多特异性多肽显示肿瘤抗原依赖性杀伤,它们诱导对人CD20转染的CHO-K1细胞(图8)的剂量依赖性人T细胞介导的杀伤,但是构建体不能诱导对CHO-K1亲本细胞的T细胞介导的杀伤(图9)。

[1371] 表6:在基于xCELLigence的人T细胞介导的CHO-K1 CD20杀伤测定中(使用30:1的效应子比靶标比率,在接种之后44小时进行分析)多特异性构建体的平均IC50(M)。

[1372]

簇	单价 Nb ID	样品 ID (CD20xCD3)	n	IC50 (M)	样品 ID (CD3xCD20)	n	IC50 (M)
A	T0170117G03	T017000062	5	7.88E-10	T017000036	2	1.04E-09
B	T0170060E11	T017000053	2	2.81E-10	T017000040	2	4.89E-10
C	T0170033G03	T017000016	3	6.81E-12	T017000021	2	1.52E-10

[1373] 这些结果证实了在实施例9的基于流式细胞术的杀伤测定法中获得的结果。另外，只有当存在肿瘤靶抗原时才观察到T细胞介导的杀伤，这表明双特异性多肽决定性地依赖于其用于诱导细胞毒性的靶标。

[1374] 实施例11双特异性多肽的接头长度评价

[1375] 为了评价用于CD20/CD3双特异性多肽中的接头长度对细胞毒性能力的影响，将效应子和肿瘤纳米抗体与5GS、9GS或35GS接头进行基因连接，并且随后根据标准方案在毕赤酵母中表达(参见表7)。

[1376] 表7:样品ID和双特异性构建体的描述以评价接头长度的影响

[1377]

	靶标 Nb x 效应子 Nb		效应子 Nb x 靶标 Nb	
簇	克隆 ID	描述	克隆 ID	描述
C	T017000004	20CD019C07-5GS-T0170033G03-FLAG3-HIS6		
D	T017000005	20CD019C07-5GS-T0170011A10-FLAG3-HIS6		
C	T017000010	20CD019C07-9GS-T0170033G03-FLAG3-HIS6	T017000020	T0170033G03-9GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6
D	T017000011	20CD019C07-9GS-T0170011A10-FLAG3-HIS6	T017000026	T0170011A10-9GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6
C	T017000016	20CD019C07-35GS-T0170033G03-FLAG3-HIS6	T017000021	T0170033G03-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6
D	T017000017	20CD019C07-35GS-T0170011A10-FLAG3-HIS6	T017000022	T0170011A10-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6
/	T017000006	20CD019C07-5GS-cAbLys3-FLAG3-HIS6		
/	T017000012	20CD019C07-9GS-cAbLys3-FLAG3-HIS6		
/	T017000018	20CD019C07-35GS-cAbLys3-FLAG3-HIS6	T017000023	cAbLys3(D1E)-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6
C			T017000024	T0170033G03-35GS-cAbLys3-FLAG3-HIS6
D			T017000027	T0170011A10-35GS-cAbLys3-FLAG3-HIS6

[1378] 如实施例9中所述，使用基于实时电阻抗的技术，评价用于CD20/CD3双特异性多肽的接头长度对人原代效应T细胞诱导的对于贴壁CHO-K1人CD20靶标的细胞毒性的影响。

[1379] 结果在图10中总结。

[1380] 所有双特异性多肽，即所有接头长度，均表现出特异性细胞杀伤。对于这些双特异性多肽，不同接头9GS接头和35GS接头之间观察到很小的效力差异。

[1381] 实施例12CD3双特异性多肽的效应子与靶标比率的评价

[1382] 为了评价不同的效应物对靶标(E:T)比率对纳米抗体的杀伤特性的影响，如实施例2所述，将CD20xCD3双特异性多肽与$2.5x10^4$个PKH标记的Ramos细胞在分别存在$2.5x10^5$个(E:T＝10:1)、$1.25x10^5$个(E:T＝5:1)、$5x10^4$个(E:T＝2:1)、$2.5x10^4$个(E:T＝1:1)人T细胞的情况下进行温育。

[1383] 示例性结果在图11中显示。IC_{50}值在表8中描述。

[1384] 表8:在基于流式细胞术的T细胞介导的Ramos杀伤测定中(使用不同的效应子比靶标比率)双特异性构建体的IC50(M)。

[1385]

簇	单价 Nb ID	样品 ID (CD20xCD3)	E:T	n	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI	%溶解
A	T0170117G03	T017000062	10	1	7.3E-09	5.2E-09	1.0E-08	15
A	T0170117G03	T017000062	5	1	8.7E-09	5.3E-09	1.4E-08	10
A	T0170117G03	T017000062	2	1	7.1E-09	3.1E-09	1.6E-08	6
A	T0170117G03	T017000062	1	1	2.5E-08	1.9E-09	3.3E-07	2

[1386] 在18小时的温育时间之后，双特异性构建体以不同的E:T比率(甚至以1:1的比率)

诱导人CD20靶细胞的杀伤,效力几乎没有差异。尽管E:T比率对%溶解存在影响,但是这也能够与温育时间有关(参见下文)。

[1387] 实施例13在xCELLigence中的纯化原代人T细胞介导的测定中CD20/CD3双特异性构建体的时间依赖性细胞溶解活性

[1388] 为了评价温育时间对CD20XCD3双特异性构建体的杀伤特性的影响,在xCELLigence中计算不同时间点的靶细胞的特异性溶解。简言之,将xCELLigence站置于5% CO_2下的37℃培养箱中。将50μl的测定培养基加入到E-pate 96(ACEA Biosciences;cat#05 232 368 001)的每个孔中,并在xCELLigence系统上进行空白读数以测量不存在细胞时的背景阻抗。随后,将人CD20转染的CHO-K1或CHO-K1亲本细胞($1x10^4$)接种到E-平板96上。20小时后,分别加入纯化的原代人T细胞(如上所述)和100nM或1.5nm的双特异性构建体。细胞指数(CI)在5天内每15分钟测量一次。使用标准化CI(标准化细胞指数-NCI通过将特定时间点的细胞指数值除以添加纯化的原代人类T细胞时的时间点的细胞指数值来计算)计算相对于缺少构建体的条件下,在具有构建体的条件下的不同时间点的特异性裂解。(%特异性溶解=$((NCI_{无构建体}-NCI_{具有构建体})/NCI_{无构建体}))x100$。

[1389] 结果在图12中描述。

[1390] 在加入人原代T细胞和多特异性构建体之后一小时,已经能够观察到细胞指数的增加,其在更长的温育时间后进一步明显增加。最大效应明显取决于温育时间,但是所获得的IC50值不随温育时间的增加而改变。不相关的构建体并未显示人CD20 CHO-K1细胞的任何杀伤。

[1391] 实施例14半衰期延长的探索

[1392] 假设通过白蛋白结合的HLE可能适于符合各种要求,包括(i)该部分的半衰期延长(HLE);和(ii)多特异性的功效。优选地,HLE功能将不会损害肿瘤和组织的穿透。

[1393] Alb11(与人血清白蛋白(HSA)结合的纳米抗体)与多特异性CD20xCD3多肽连接以增加格式化分子的体内半衰期(WO 06/122787)。基于N末端的CD20肿瘤靶向结构单元、中间的CD3募集结构单元和C末端的白蛋白靶向纳米抗体使用35GS接头产生多种格式,并如上所述进行表达。所探索格式的概述在表9中显示。

[1394] 表9:样品ID和HLE构建体的描述

[1395]

簇	样品ID	描述
A	T017000094	20CD019C07-35GS-T0170117G03-35GS-ALB11-FLAG3-HIS6
B	T017000096	20CD019C07-35GS-T0170060E11-35GS-ALB11-FLAG3-HIS6

[1396] 由于HSA与Alb11纳米抗体的结合可能对HLE构建体的亲和力或效力产生影响,因此针对CD3过表达的CHO-K1和原代人T细胞的结合对半衰期延长的纳米抗体进行表征。另外,在存在和不存在HSA的情况下评价功能性T细胞依赖性Ramos B细胞杀伤测定中的效力(在如下14.1和14.2中描述)。

[1397] 14.1人血清白蛋白对结合特性的影响

[1398] 类似于实施例5中所述的实验,在流式细胞术测定中评价半衰期延长的抗-CD3多特异性构建体与CHO-K1人TCR(2XN9)/CD3细胞、原代人T细胞和Ramos细胞的结合。

[1399] 结果在图13中提供。在该测定中获得的EC_{50}值在表10中列出。

[1400] 表10:具有这样的EC50值的表格:基于细胞的与CHO-K1人TCR(2XN9)/CD3、原代人T

细胞和Ramos细胞的结合的EC50值,如流式细胞术中所确定。

[1401]

		CHO-K1-K1 huTCR (2XN9)/CD3			huT 细胞			Ramos		
簇	样品 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
A	T017000094	>1E-07	/	/	>1E-07	/	/	1.9E-09	1.7E-09	2.1E-09
B	T017000096	1.6E-07	1.4E-07	1.8E-07	3.2E-08	2.0E-08	5.3E-08	1.7E-09	1.5E-09	1.9E-09

[1402] CD20-35GS-CD3 HLE构建体与非HLE构建体的比较显示在所有测试的三种细胞系上都具有类似的结合。所呈现的数据显示Alb11结构单元的偶联不影响结合特性。

[1403] 14.2在人T细胞介导的B细胞杀伤测定中人血清白蛋白对效力的影响

[1404] 在存在和不存在30μM HSA的情况下,如实施例10中所述在人T细胞介导的Ramos杀伤测定中评价半衰期延长的抗-CD3纳米抗体的功能性(表9),并与非HLE双特异性构建体的功能性进行比较。

[1405] 结果在图14中描述。在该测定中获得的IC_{50}值在表11中列出。

[1406] 表11:具有这样的IC50和%溶解的表格:在T细胞依赖性B细胞(Ramos)杀伤测定中CD20xCD3纳米抗体的IC50和%溶解,以评价HLE的效应。

[1407]

簇	样品ID	EC50 (M)	95%LCI	95%UCI	%溶解
A	T017000062	6.4E-10	3.5E-10	1.2E-09	15
A	T017000094	3.2E-09	1.7E-09	6.1E-09	14
A	T017000094	2.0E-09	1.2E-09	3.3E-09	14
A	T017000094+HSA	2.0E-08	7.0E-09	5.5E-08	7
B	T017000053	1.8E-09	8.9E-10	3.8E-09	12
B	T017000096	3.8E-09	2.1E-09	7.0E-09	15
B	T017000096	2.6E-09	1.5E-09	4.7E-09	16
B	T017000096+HSA	4.8E-09	1.1E-09	2.0E-08	6

[1408] 结果表明,在构建物中包含靶向白蛋白的Nb本身对获得的效力或功效不具有重要影响。尽管在HSA存在下观察到功效/效力的轻微损失,但是半衰期延长的CD3双特异性多肽在肿瘤细胞杀伤中仍然是有效的。

[1409] 实施例15在基于xCELLigence的人T细胞介导的HER2阳性肿瘤杀伤测定中多特异性多肽的功能性表征

[1410] 为了评价CD3结构单元在将T细胞导向肿瘤细胞中的普遍适用性,将CD3结构单元与不同的TAA组合(在这种情况下是与HER2结合的纳米抗体)。

[1411] 抗-CD3结构单元在两个取向上与针对HER2实体瘤抗原的纳米抗体组合(表12),并且在实施例10中所述的基于xCELLigence的人T细胞介导的HER2阳性肿瘤杀伤测定中使用两种HER2表达细胞系进行表征:SK-BR-3(ATCC:HTB-30)、MCF-7(ATCC:HTB-22)和HER2阴性参考细胞系,作为靶细胞群的MDA-MB-468(ATCC HTB-132)。在使用单价抗-HER2纳米抗体HER2005F07在如实施例9中所述使用100nM的抗-HER2纳米抗体的流式细胞术中证实人HER2表达水平,并在图15中显示。

[1412] 表12:样品ID和HER2/CD3构建体的描述

[1413]

簇	样品ID	描述
A	T017000101	HER2005F07(Q108L)-35GS-T0170117G03-FLAG3-HIS6
A	T017000100	T0170117G03-35GS-HER2005F07(Q108L)-FLAG3-HIS6

[1414] 简言之,将SKBR3($4x10^4$个细胞/孔)、MDA-MB-468($4x10^4$个细胞/孔)或MCF-7($2x10^4$个细胞/孔)接种于96孔E-平板中并与人原代T细胞的$6x10^5$个细胞和$3x10^5$个细胞(效应子靶标比率为15:1)在存在或不存在多特异性构建体的情况下温育,并进行一段时间。在实验开始之后18小时后对数据进行分析并在图16中显示。

[1415] 在该测定中获得的IC_{50}值在表13中列出。

[1416] 表13:概述HER2/CD3构建体在T细胞介导的HER2-阳性肿瘤杀伤测定中的IC50

[1417]

基于 xCELLigence 的细胞毒性(18h 读出) - SKBR3 (E/T=15:1)											
簇	单价 Nb ID	构建体 ID (HER2xCD3)	n	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI	构建体 ID (CD3xHER20)	n	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI
A	T0170117G03	T017000101	1	2.6E-11	2.2E-11	3.1E-11	T017000100	1	9.5E-12	8.1E-12	1.1E-11
基于 xCELLigence 的细胞毒性(18h 读出) - MCF-7 (E/T=15:1)											
簇	单价 Nb ID	构建体 ID (HER2xCD3)	n	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI	构建体 ID (CD3xHER20)	n	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI
A	T0170117G03	T017000101	1	1.1E-10	7.3E-11	1.8E-10	T017000100	1	6.9E-11	4.5E-11	1.0E-10
基于 xCELLigence 的细胞毒性(18h 读出) - MDA-MB-468(E/T=15:1)											
簇	单价 Nb ID	构建体 ID (HER2xCD3)	n	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI	构建体 ID (CD3xHER2)	n	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI
A	T0170117G03	T017000101	1	/	/	/	T017000100	1	/	/	/

[1418] 数据表明,通过经由CD3纳米抗体将人原代T细胞导向肿瘤细胞来特异性杀伤HER2阳性肿瘤细胞系。因此,CD3结构单元广泛地适用于将CTL导向肿瘤。尽管SKBR3和MCF-7细胞上的肿瘤抗原密度存在巨大差异,但是二者都通过加入多特异性纳米抗体构建体而被有效地杀伤。

[1419] 实施例16在xCELLigence杀伤测定中CD20/CD3多肽对通过人T细胞的IFN-γ释放的影响

[1420] 在人T细胞介导的CHO_K1人CD20杀伤测定中(基于如实施例10中所述的xCELLigence)对CD20xCD3多肽评价它们诱导细胞因子分泌的能力。通过ELISA进行测量细胞因子IFN-γ的释放。简言之,将CHO-K1人CD20细胞接种于96E平板并且在20小时后,将具有或不具有双特异性CD20XCD3/不相关的构建体的纯化的人原代T细胞加入到如实施例13所述的E平板中。在将人原代T细胞/构建体加入到E-平板之后72小时,测量通过人原代T细胞的IFN-γ产生。用抗-人IFN-γ抗体(BD Bioscence#551221)包被Maxisorp 96孔ELISA平板(Nunc)。过夜温育后,将平板洗涤并在室温下用PBS+2% BSA封闭1小时。接着,将平板与100μl的上清(2倍稀释的)和1μg/ml的生物素化抗-人IFN-γ抗体(BD Bioscience,#554550)温育2小时30分钟,同时震荡,再次洗涤,并与链霉亲和素-HRP(Dakocytomation#P0397)进行温育。30分钟后,加入TMB One溶液(Promega#G7431)。用2M H2SO4终止反应,并且通过使用Tecan sunrise 4测量405nm处的OD来确定IFN-γ的纳米抗体剂量依赖性产生。

[1421] 结果在图17中显示。在该测定中获得的EC_{50}值在表14中列出。

[1422] 表14:在人T细胞介导的基于xCELLigence的杀伤测定中经由人T细胞的CD20/CD3依赖性IFN-γ分泌的EC50(M)。

[1423]

单价 Nb ID	构建体 ID (CD20xCD3)	n	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T0170117G03	T017000062	1	6.2E-10	5.3E-10	7.5E-10
T0170060E11	T017000053	1	9.1E-10	7.2E-10	1.1E-09

[1424] 双特异性CD20/CD3多肽显示IFN-γ的剂量依赖性产生。与不相关的构建体温育或在不具有双特异性构建体的条件下温育不诱导任何IFN-γ产生。

[1425] 实施例17PBMC B细胞消耗模型中的体内概念验证

[1426] 在该B细胞消耗模型中,人PBMC被腹膜内注射到NOG小鼠。评价PBMC群中存在的多肽介导的T细胞募集对来源于PBMC的B细胞的杀伤,这反映了多特异性多肽通过将T细胞(经由CD3)直接连接至靶标B细胞(经由CD20)来活化T细胞(导致靶细胞杀伤)的潜力。

[1427] 评价在PBMC NOG小鼠模型中CD3/CD20多特异性多肽(TO17000084,CD20xCD3结合,A簇)对B细胞消耗的体内效力并将其与不相关的多肽TO17000088进行比较。研究证明了在脾脏中对来源于PBMC的B细胞耗竭的明确效果。

[1428] 详言之,在小鼠中评价B细胞消耗,在第0天(D0)用γ源(1.44Gy,60Co)对小鼠进行全身照射并将小鼠随机分为每组12只动物的组后,在第3天(D3)向小鼠腹膜内注射500μL的PBS中的$3x10^7$个PBMC。在D3在PBMC注射之后一小时开始治疗,并且重复连续5天,总计直到第7天(D7)(图18)。对结合CD3/CD20的NB的一个剂量水平进行测试(24mg/kg)。

[1429] 在第18天(D18),将小鼠处死并收集脾脏用于FACS分析(mCD45,hCD45,hCD19,hCD20)以分析和定量来源于PBMC的人B细胞的存在(hCD19+hCD20+hCD45+mCD45-)。

[1430] 来源于PBMC的B细胞消耗的结果在图19中呈现。在脾脏中,在测试的剂量水平下,在经TO17000084治疗的组中B计数明显不同于不相关的多肽治疗的组。估计剂量处于最大效应。

[1431] 总之,这些结果证明了结合CD3/CD20的多特异性多肽明显能够减少在该模型中脾脏中来源于PBMC的B细胞。这证实了多肽诱导的T细胞活化,其通过将T细胞交联至靶B细胞并杀伤后者。

[1432] 实施例18:Ramos B细胞消耗模型中的体内概念验证

[1433] 在该B细胞消耗模型中,Ramos细胞(伯基特淋巴瘤细胞系)和人PBMC分别被静脉内和腹膜内注射到NOG小鼠。评价PBMC群中存在的多肽介导的T细胞募集对Ramos B细胞和来源于PBMC的B细胞的杀伤,这反映了多特异性多肽通过将T细胞(经由CD3)直接连接至靶标B细胞(经由CD20)来活化T细胞(导致靶细胞杀伤)的潜力。

[1434] 评价在Ramos NOG小鼠模型中多特异性多肽TO17000084(CD20xCD3结合)对B细胞消耗的体内效力并将其与不相关的双特异性多肽TO17000088(不相关的纳米抗体+CD3结合纳米抗体)进行比较。研究证明了在骨髓和脾脏中对Ramos B细胞消耗的统计学显著效应和在脾脏中对来源于PBMC的B细胞消耗的统计学显著效应。

[1435] 详言之,在小鼠中评价B细胞消耗,在第一天(D1)向小鼠静脉内注射200μL的Roswell Park Memorial Institute(RPMI)培养基1640中的10^6个Ramos细胞。在用γ源(1.44Gy,60Co)对小鼠进行全身照射之后24小时进行该注射(D0)。在将小鼠随机分为每组12只动物的组后,在D3注射(即,肿瘤细胞注射之后两天)10^7个PBMC(500μL,在PBS中)。在D3在PBMC注射之后一小时开始治疗,并且重复连续5天,总计直到D7(图20)。对结合CD3/CD20的多肽的一个剂量水平进行测试(24mg/kg)。

[1436] 在D20或在D21,将小鼠处死并收集脾脏和骨髓(股骨)用于FACS分析(mCD45,hCD45,hCD19,hCD20,hCD10)以分析和定量Ramos B细胞的存在(hCD19+hCD20+hCD45+mCD45-hCD10+)和来源于PBMC的B细胞的存在(hCD19+hCD20+hCD45+mCD45-hCD10-)。

[1437] Ramos B细胞消耗的结果在图21中呈现。用不相关的双特异性多肽治疗的小鼠被认为是用于分析的对照组。已经通过来自混合效应ANOVA分析的F检验进行统计分析。对于骨髓和脾脏,在测试的剂量水平下,在经T017000084治疗的组中B细胞计数统计学上显著不同于不相关的多肽治疗的组。在脾脏中,剂量接近或估计处于最大效应。

[1438] 来源于PBMC的B细胞消耗的结果在图22中呈现。在骨髓和脾脏二者中,在测试的剂量水平下,对于T017000084比上不相关的多肽观察到人B细胞数量上的统计学显著差异。估计剂量处于最大效应。

[1439] 总之,这些结果证明了CD3/CD20双特异性多肽能够显著减少在该模型中脾脏和骨髓中的Ramos B细胞和来源于PBMC的B细胞。这证实了纳米抗体诱导的T细胞活化,其通过将T细胞交联至靶B细胞并杀伤后者。

[1440] 实施例19用多特异性T细胞接合多肽靶向肿瘤细胞

[1441] 通过同时靶向多种肿瘤相关抗原能够改善T细胞接合策略的治疗活性。通常,肿瘤细胞在治疗内通过靶向抗原的下调而产生逃避机制。同时靶向多种抗原可能降低产生肿瘤逃逸变体的可能性。各个肿瘤靶向纳米抗体的个体亲和力可以是变化的,从而实现与单一标志物的优选结合或同时结合两种肿瘤标志物。存在于不同细胞群上的抗原能够被组合,或者甚至将可溶性蛋白与肿瘤相关抗原组合进行靶向。

[1442] 由于纳米抗体平台理想地适于将不同特异性组合成多特异性格式,所以本发明的CD3纳米抗体组合成阐明这些构思的格式,即在多特异性多肽中具有不同的肿瘤抗原结合纳米抗体。

[1443] 对于双重肿瘤抗原靶向构思,在与CD3反应性纳米抗体组合的情况下,将对第一肿瘤抗原(TA1,例如CEA)具有反应性的纳米抗体与具有不同于TA1的不同特异性(TA2,例如EGFR)的第二纳米抗体连接。结构单元的具体顺序在格式内以及在不同结构单元之间应用的接头长度内变化。表15中描绘了测试的TA1和TA2的组合。

[1444] 表15:在多特异性多肽中CD3、TA1、TA2和Alb结合结构单元的组合。

[1445]

T细胞ISV	TA1 ISV	TA2 ISV	ALB-ISV
CD3	CEA	Irr	+
CD3	CEA	Irr	-
CD3	CEA	EGFR	+
CD3	CEA	EGFR	-
CD3	Irr	EGFR	+
CD3	Irr	EGFR	-

[1446] 为了测试半衰期延长,白蛋白结合纳米抗体也包括在表15中所示的多肽中。

[1447] 为了证明特异性杀伤作用,使用混合细胞培养测定系统,其中将TA1单阳性肿瘤细胞(例如MC38-huCEA或MKN45)和TA2单阳性肿瘤细胞(例如Hela或Her14)共同温育。在不同的细胞系中确定各个肿瘤抗原的表达水平,并在图23中呈现。在加入本发明的多肽、原代人T细胞和白蛋白(如果需要)时,基于细胞计数的读出,监测T细胞介导的细胞毒性。与含有一种或多种不相关的纳米抗体的双阴性细胞或格式进行比较。

[1448] 为了验证特异性杀伤作用,将双阳性肿瘤(对于TA1和TA2,例如LS174T或LoVo)细胞的诱导杀伤与单阳性肿瘤细胞的诱导杀伤进行比较。为此,如上所述使用T细胞介导的细

胞毒性测定,其中单一类型的肿瘤细胞对于两种标记均呈阳性(参见实施例17)。

[1449] 实施例20用多特异性T细胞接合多肽靶向肿瘤细胞

[1450] 如上所述,通过同时靶向多种肿瘤相关抗原能够改善T细胞接合策略的治疗活性。肿瘤细胞在治疗内不仅通过靶向抗原的下调而且通过引入(点-)突变来产生逃避机制。在此情况下,同时靶向抗原上的多个位点也可能降低产生肿瘤逃逸变体的可能性。此外,靶向单个抗原上的多个位点能够增加结合的亲和力(亲合力效应)。

[1451] 由于纳米抗体平台理想地适于将不同特异性组合成多价格式,所以将本发明的抗-CD3纳米抗体组合成阐明这些构思的格式,即在多特异性多肽中具有不同的结合肿瘤抗原的纳米抗体。

[1452] 对于多价肿瘤抗原靶向构思,连接对于抗原具有反应性的两种纳米抗体(分别是TA1和TA2),随后连接CD3反应性纳米抗体。结构单元的具体顺序在格式内以及在不同结构单元之间应用的接头长度内变化。表16中描绘了测试的TA1和TA2的组合。

[1453] 表16:在多特异性多肽中CD3、TA1、TA2和Alb结合结构单元的组合。

[1454]

T细胞ISV	TA1 ISV	TA2 ISV	ALB-ISV
CD3	EGFR-1(7D12)	EGFR-2(9G08)	+
CD3	EGFR-1(7D12)	EGFR-2(9G08)	-
CD3	Her2-1(5F07)	Her2-2(47D05)	+
CD3	Her2-1(5F07)	Her2-2(47D05)	-

[1455] 为了测试半衰期延长,Alb纳米抗体也包括在表16中所示的多肽中。

[1456] 评价这些多价格式的效力和功效,并将其在体外肿瘤细胞杀伤测定中与各个双特异性格式进行比较,所述测定类似于实施例10中描述的测定但是使用相关细胞系(例如Hela,Her14,Ls174T,SKBR3,MCF7)。另外,效应子-靶标比率是变化的,以便估计多价/多特异性多肽是否在具有较低的效应子靶标比率时具有较高的效力。

[1457]

表格

表 A-1：CD3 A 簇结合物的序列比对

```
T0170PMP117G03 : EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGKEREFVAA1VWSGGNTYYEDSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP061F04 : ..........A....S..........D.......F..........S....L.....N.....T.L..........
T0170PMP081D02 : ..........A....S..........D.......F..........SV...L.....N.....T.L..........
T0170PMP120D07 : ..........A....S..........D.......F..........S....L.....N.E...T.L..........
T0170PMP118D11 : ..........A....S..........D.......F..........S....L.....N.E.G.T.L..........
T0170PMP062A11 : ..........A....S..........D.......F..........S....LS.H.N.....T.V..........
T0170PMP118A08 : ...P......A....S..........D.......F..........S....LS.H.N.....T.V..........
T0170PMP122C07 : ..........A....S..........D.......F..........S....LS.H.AN.....T.V..........
T0170PMP062D09 : .....S....N....S..........D..S....F..........S....I.....N.....T.V..........
T0170PMP062G08 : ..........N....S....G.....T..E..A....F..........L.....N.....T.L..........
T0170PMP126E04 : ..........N....S..........T..E..A....F..........L.....N.....T.L..........
T0170PMP116E01 : ..........N....S..........T..E..A....F.R........L.....N.....T.L..........
T0170PMP117E03 : .....N.R.....A....S..........T..E..A....F..........L.....N.....T.L..........
T0170PMP062B10 : .....S....A....S..........T..E..A....F..........L.....N.....T.L..........
T0170PMP118E11 : ..........N....S..........T..E..A....F..........L.....N.....T.L.....T.....
T0170PMP075A10 : .....D....A....S..........T..E..A....F..........L.....N.....T.L..........
T0170PMP062C06 : ..........N....S..........T..E..A....F..........L.....N.....T.L..........
T0170PMP112G06 : ..........A....S..........T..E..A....F..........L.....N.R...T.L..........
T0170PMP061A09 : .....L....T....N..........A....P..........T..E..P....F..........L..R..R.E...T.L..........
T0170PMP061B06 : ..........T....N..........A....P..........T..E..P....F..........L..R..R.E...T.L..........
T0170PMP111C01 : ..........T....N..........A....P..........T..E..P....FA.........L..R..R.E...T.L..........
T0170PMP061D06 : ..........T....N..A.....A....P..........T..E..P....F..........L..R..R.E...T.L..........
T0170PMP061E09 : ..........T....N..........A....P..........T..E..P....F..........L..R..R.E...T.L.....V....
T0170PMP078A07 : .....N.R.....A....P..........T..E..P....F..........L..R..R.E...T.L..........
```

[1458]

```
T0170PMP061A04 : .....T.....V.....A...P.....T..E.....F.....L.....G.....T.L.....P.....L.....
T0170PMP115A03 : .....T.....V.....A...P.....T..E.....F.....L.....T.L.....P.....L.....
T0170PMP061F09 : ...P.....T.....V.....A...P.....T..E.....F.....L.....T.L.....P.....L.....
T0170PMP112D04 : .....T.....V.....A...P.....G.....T..E.....F.....L.....T.L.....P.....L.....
T0170PMP114E06 : .....T.....V.P.....A...P.....T..E.....F.....L.....T.L.....P.....L.....
T0170PMP113G04 : .....T.....V.....A...P.....T..E.....F.....L...A.....T.L.....P.....L.....
T0170PMP061D09 : .....L.T.....V.....A...P.....T..E.....F.....L.....T.L.....P.....
T0170PMP062G05 : .....T.....V.....A...P.....T..E.....F.....S.L.....T.L.....P.....
T0170PMP114C05 : .....T.....V.....A...P.....T..E.....L.....L.....T.L.....P.....
T0170PMP117G05 : .....T.....V.....A...P.....T..E.....F.....L.....T.L.....VP.....
T0170PMP061F07 : .....F....A...P.....T..E.....F.....L.....T.L.....L.....
T0170PMP061C09 : .....R.....D.....
T0170PMP124E06 : .....A.....R.....D.....L.....
T0170PMP111B02 : .....R..R.....D.....P.....
T0170PMP062E08 : .....D.....A.....V.....TD.....IT.....L.....
T0170PMP062G03 : .....F.....D.....A.....V.....TD.....IT.....L.....
T0170PMP062G10 : .....D.....A.....V.....A.TD.....IT.....L.....
T0170PMP078E10 : .....D.....A.....V.....TD.....VT.....L.....
T0170PMP115E06 : .....R.....D.....A.....V.....TD.....IT.....L.....
T0170PMP122B02 : .....D.....A.....V.....TD..A.....IT.....L.....
T0170PMP061D07 : .....D.....A.....RV.....TD.....IT.....
T0170PMP126D09 : .....-.....D.....A.....V.....TD.....IT.....
T0170PMP126B03 : .....D.....V.....TD.....T.....L.....
T0170PMP126B02 : K.....D.....V.....TD.....T.....L.....
T0170PMP075G11 : .....D.....V.....TD.....IT.....H.....
T0170PMP080E07 : .....L.....A.....V.....TD.....IT.....
```

[1459]

表 A-2：CD3 B 簇结合物的序列比对

T0170PMP060E11 : EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIYKSFDMGWYRQAPGKQRDLVAVIGSRGNNRGRTNYADSVKGRFTISRDGTGNTVYLLMNKLRPEDTAIYYCNTAPLVAGRPWGRGTLVTVSS

表 A-3：CD3 C 簇结合物的序列比对

T0170PMP033G03 : EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRWADGNTFYADSVKGRFTISRDNAKKTVYLQMNSLKSEDTATYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTQVTVSS

T0170PMP044A09 : .....L.....S.....S.....

T0170PMP043E10 : .....L.....S.....S...A.....

T0170PMP044B10 : .....L.....S.....S.....R.....L.....

表 A-4：CD3 D 簇结合物的序列比对

T0170PMP011A10 : EVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWSGENTNYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNVYWGQGTQVTVSS

表 A-5：CD3 E 簇结合物的序列比对

T0170PMP052G04 : EVQLVESGGGAVQPGGSLRLSCAASGIRISRNMMGWFRQAPGKQRDLVARITPGGDTYYVDSVKGRFSISKDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNSYSTLGSWGQGTQVTVSS

T0170PMP062B02 : .....V.....RT..RE.NM...S..A.....DS.....D.....

T0170PMP114D01 : .....V.....RT..RE.NM...S..A.....DS.....D.....L.....

T0170PMP080F02 : .....V.....RT..RG.NM...S..A.....DS.....D.....

T0170PMP122A11 : .....S..M...S.....R.....I.....L.....

T0170PMP113E06 : .....V.....NH.....E...M...S.....V.....N..L.....R.....

T0170PMP061E10 : .....V.....THT.....E...EM..Q.S...K...I.....T.....F.R..D...D.....V.....L.....

T0170PMP061D03 : .....V.....THT.....E...EM..Q.S...K...I.....T.....F.R..D...D.....V.....

T0170PMP113E03 : .....V.....THT.....E...EM..Q.S...K...I.....T.....F.R..D...DG.....V.....

[1460]

表 A-6：CD3 F 簇结合物的序列比对

```
T0170PMP050A11 : EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFNMNPLGWFRQSPGKEREFVAAHRWSDGNTYYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAAGRPWSAFRSPGEYYYWGQGTQVTVSS
T0170PMP044A06 : ..............................T.ST..M.........N.....................A.........A.........K.....................SY...D.....
T0170PMP044D11 : ..............................A..T..M.....FA.....................A.....................A.....................SY...D.....
T0170PMP043E08 : ..............................A.S...M.........R.....................A.....................S.....................SY...T.....L.....
T0170PMP043E06 : .............A.....................ST..M.....F.R.....................A.....................H.....................AH..N.....
T0170PMP043E07 : ..............................SA..M.....F.......S.....................A.....................H.....................AH..N.....
T0170PMP039D06 : ..............................G.ST..M.....................................A.....................H.....................DY.A.S..I.....
T0170PMP044F10 : .............R.....................G.ST..M.....................................A.....................H.....................D..A.S..I.S.P.....
T0170PMP044B11 : ..............................A..T..M.....................L..V..H..S...T.....................................YH..N.....L.....
T0170PMP044C08 : ..............................A..T..M.....................L..V..H..S...T.....................C.....................YH..N.....
T0170PMP043B03 : .....F.......................A.ST..M.....................G.V.....S..SA.....VF.....................YH..K.....L.....
T0170PMP039E06 : ..............D.............A.ST..M.....................S.FVA.....................S.....A.....YH..R.I...R.....
T0170PMP049A04 : ..............D.............A.ST..M.....................S.FVA.....................S.....A.....YH..R.I...R.L.....
T0170PMP043F09 : ..............A.............A.ST..M.....Q....L..V..A.....T.....A.....K.....L.N.....A.....YHA.K..I.....L.....
T0170PMP044C11 : ..............A.............A.ST..M.....Q....L..V..A.....T.....A.....K.....L.N.....A.....YHA.K..I.....
```

[1461]

表 A-7：单价抗-CD3 抗体的氨基酸序列("ID"是指本文所用的 SEQ ID NO)

名称	ID	氨基酸序列
T0170PMP117G03	1	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGKEREFVAAIVWSGGNTYYEDS VKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP061F04	2	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMAWFRQSPGKEREFVAAIVWSDGNTYYEDFV KGRFTISRDSAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP081D02	3	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMAWFRQSPGKEREFVAAIVWSDGNTYYEDFV KGRFTISRDSVKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP120D07	4	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMAWFRQAPGKEREFVAAIVWSDGNTYYEDFV KGRFTISRDSAKNTLYLQMTNLEPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP118D11	5	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMAWFRQAPGKEREFVAAIVWSDGNTYYEDFV KGRFTISRDSAKNTLYLQMTNLEPGDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP062A11	6	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMAWFRQAPGKEREFVAAIVWSDGNTYYEDFV KGRFTISRDSAKNTLSLHMTNLKPEDTAVYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP118A08	7	EVQPVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMAWFRQAPGKEREFVAAIVWSDGNTYYEDF VKGRFTISRDSAKNTLSLHMTNLKPEDTAVYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP122C07	8	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMAWFRQAPGKEREFVAAIVWSDGNTYYEDFV KGRFTISRDSAKNTLSLHMANLKPEDTAVYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP062D09	9	EVQLVESGGGPVQSGGSLRLSCANSGRTYRGYSMGWFRQAPGKEREFVAAIVWSDGNSYYEDFV KGRFTISRDSAKNIMYLQMTNLKPEDTAVYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP062G08	10	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCANSGRTYRGYSMAWFRQSPGKERGFVAAITWSEGNAYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP126E04	11	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCANSGRTYRGYSMAWFRQSPGKEREFVAAITWSEGNAYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP116E01	12	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCANSGRTYRGYSMAWFRQSPGKEREFVAAITWSEGNAYYEDFV RGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP117E03	13	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCANSRRTYRGYSMAWFRQSPGKEREFVAAITWSEGNAYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS

[1462]

名称	ID	氨基酸序列
T0170PMP062B10	14	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCASSGRTYRGYSMAWFRQSPGKEREFVAAITWSEGNAYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP118E11	15	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCANSGRTYRGYSMAWFRQSPGKEREFVAAITWSEGNAYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAAKTRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP075A10	16	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCADSGRTYRGYSMAWFRQSPGKEREFVAAITWSEGNAYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP062C06	17	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCANSGRTYRGYGMAWFRQSPGKEREFVAAITWSEGNAYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP112G06	18	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCANSGRTYRGYSMAWFRQSPGKEREFVAAITWSEGNAYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLRPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP061A09	19	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCANSGRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNPYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLRMTRLEPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP061B06	20	EVQLVESGGGPVQAGGSLTLSCANSGRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNPYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLRMTRLEPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP111C01	21	EVQLVESGGGPVQAGGSLTLSCANSGRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNPYYEDFA KGRFTISRDNAKNTLYLRMTRLEPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP061D06	22	EVQLVESGGGPVQAGGSLTLSCANSGRAYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNPYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLRMTRLEPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP061E09	23	EVQLVESGGGPVQAGGSLTLSCANSGRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNPYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLRMTRLEPEDTALYYCAAKIRPYIFKVAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP078A07	24	EVQLVESGGGPVQAGGSLTLSCANSRRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNPYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLRMTRLEPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP061A04	25	EVQLVESGGGPVQTGGSLRLSCVASGRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNTYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLQMTGLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIPGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP115A03	26	EVQLVESGGGPVQTGGSLRLSCVASGRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNTYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIPGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP061F09	27	EVQPVESGGGPVQTGGSLRLSCVASGRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNTYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIPGQYDYWGQGTLVTVSS

[1463]

名称	ID	氨基酸序列
T0170PMP112D04	28	EVQLVESGGGPVQTGGSLRLSCVASGRTYRGYSMAWFRQPPGKERGFVAAITWSEGNTYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIPGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP114E06	29	EVQLVESGGGPVQTGGSLRLSCVAPGRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNTYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIPGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP113G04	30	EVQLVESGGGPVQTGGSLRLSCVASGRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNTYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLQMASLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIPGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP061D09	31	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCVASGRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNTYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIPGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP062G05	32	EVQLVESGGGPVQTGGSLRLSCVASGRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNTYYEDFV KGRFTISRDNAKSTLYLQMTSLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIPGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP114C05	33	EVQLVESGGGPVQTGGSLRLSCVASGRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNTYYEDLV KGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIPGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP117G05	34	EVQLVESGGGPVQTGGSLRLSCVASGRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNTYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKVPGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP061F07	35	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTFRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNTYYEDFV KGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP061C09	36	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGREREFVAAIVWSDGNTYYEDS VKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP124E06	37	EVQLVESGGGPAQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGREREFVAAIVWSDGNTYYEDSV KGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP111B02	38	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRRAPGREREFVAAIVWSDGNTYYEDPV KGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP062E08	39	EVQLVESGGGPVQAGDSLRLSCAASGRAYRGYSMGWFRQVPGKEREFVAAIVWTDGNTYYEDS VKGRFTISRDITKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP062G03	40	EVQLVEFGGGPVQAGDSLRLSCAASGRAYRGYSMGWFRQVPGKEREFVAAIVWTDGNTYYEDS VKGRFTISRDITKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP062G10	41	EVQLVESGGGPVQAGDSLRLSCAASGRAYRGYSMGWFRQVPGKEREFVAAIAWTDGNTYYEDS VKGRFTISRDITKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS

[1464]

名称	ID	氨基酸序列
T0170PMP078E10	42	EVQLVESGGGPVQAGDSLRLSCAASGRAYRGYSMGWFRQVPGKEREFVAAIVWTDGNTYYEDS VKGRFTISRDVTKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP115E06	43	EVQLVESRGGPVQAGDSLRLSCAASGRAYRGYSMGWFRQVPGKEREFVAAIVWTDGNTYYEDS VKGRFTISRDITKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP122B02	44	EVQLVESGGGPVQAGDSLRLSCAASGRAYRGYSMGWFRQVPGKEREFVAAIVWTDGNAYYEDS VKGRFTISRDITKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP061D07	45	EVQLVESGGGPVQAGDSLRLSCAASGRAYRGYSMGWFRRVPGKEREFVAAIVWTDGNTYYEDS VKGRFTISRDITKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP126D09	46	EVQLVSGGGPVQAGDSLRLSCAASGRAYRGYSMGWFRQVPGKEREFVAAIVWTDGNTYYEDSV KGRFTISRDITKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP126B03	47	EVQLVESGGGPVQAGDSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQVPGKEREFVAAIVWTDGNTYYEDS VKGRFTISRDNTKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP126B02	48	KVQLVESGGGPVQAGDSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQVPGKEREFVAAIVWTDGNTYYEDS VKGRFTISRDNTKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
T0170PMP075G11	49	EVQLVESGGGPVQAGDSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQVPGKEREFVAAIVWTDGNTYYEDS VKGRFTISRDITKNTMYLHMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP080E07	50	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAYRGYSMGWFRQVPGKEREFVAAIVWTDGNTYYEDS VKGRFTISRDITKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTQVTVSS
T0170PMP060E11	51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIYKSFDMGWYRQAPGKQRDLVAVIGSRGNNRGRTNYA DSVKGRFTISRDGTGNTVYLLMNKLRPEDTAIYYCNTAPLVAGRPWGRGTLVTVSS
T0170PMP011A10	52	EVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWSGENTNYRNSVK GRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQGTQVTV SS
T0170PMP033G03	53	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRWADGNTFYADSV KGRFTISRDNAKKTVYLQMNSLKSEDTATYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTQVTVSS
T0170PMP044A09	54	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQSPGKERSLIAAVRWADGNTFYADSVK GRFTISRDNAKKTVYLQMNSLKSEDTATYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTQVTVSS
T0170PMP043E10	55	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQSPGKERSLIAAARWADGNTFYADSV KGRFTISRDNAKKTVYLQMNSLKSEDTATYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTQVTVSS

[1465]

名称	ID	氨基酸序列
T0170PMP044B10	56	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQSPGKERSLIAAVRWADGNTFYADSVK GRFTISRDNAKKTVYLQMNSLRSEDTATYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTLVTVSS
T0170PMP052G04	57	EVQLVESGGGAVQPGGSLRLSCAASGIRISRNMMGWFRQAPGKQRDLVARITPGGDTYYVDSVK GRFSISKDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNSYSTLGSWGQGTQVTVSS
T0170PMP062B02	58	EVQLVESGGGAVQPGGSLRLSCVASGIRISRNMMGWFRRTPGRERNMVARISPGGATYYVDSVKG RFSISKDDSKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCNSYSTLGSWGQGTQVTVSS
T0170PMP114D01	59	EVQLVESGGGAVQPGGSLRLSCVASGIRISRNMMGWFRRTPGRERNMVARISPGGATYYVDSVKG RFSISKDDSKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCNSYSTLGSWGQGTLVTVSS
T0170PMP080F02	60	EVQLVESGGGAVQPGGSLRLSCVASGIRISRNMMGWFRRTPGRGRNMVARISPGGATYYVDSVKG RFSISKDDSKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCNSYSTLGSWGQGTQVTVSS
T0170PMP122A11	61	EVQLVESGGGAVQPGGSLRLSCAASGIRISRNMMGWFRQAPGKSRDMVARISPGGDTYYVDSVK GRFSISKDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAIYYCNSYSTLGSWGQGTLVTVSS
T0170PMP113E06	62	EVQLVESGGGAVQPGGSLRLSCVASGIRISNHMMGWFRQAPGEQRDMVARISPGGDTYVVDSVK GRFSISKDNAKNTVYLQMNNLKLEDTAVYYCNSYRTLGSWGQGTQVTVSS
T0170PMP061E10	63	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIRISTHTMGWFRQAPEKQREMVAQISPGGGKTYYIDSVKG RFTISKDNAKNTVFLRMNDLKPDDTAVYYCNSYSTLGVWGQGTLVTVSS
T0170PMP061D03	64	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIRISTHTMGWFRQAPEKQREMVAQISPGGGKTYYIDSVKG RFTISKDNAKNTVFLRMNDLKPDDTAVYYCNSYSTLGVWGQGTQVTVSS
T0170PMP113E03	65	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIRISTHTMGWFRQAPEKQREMVAQISPGGGKTYYIDSVKG RFTISKDNAKNTVFLRMNDLKPDGTAVYYCNSYSTLGVWGQGTQVTVSS
T0170PMP050A11	66	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFNMNPLGWFRQSPGKEREFVAAHRWSDGNTYYVDS VKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAAGRPWSAFRSPGEYVYWGQGTQVTVSS
T0170PMP044A06	67	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQSPGNEREFVAAHRWSDGNTYYADSV KGRFAISRDNAKKTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAAGRPWSSYRSPDEYVYWGQGTQVTVSS
T0170PMP044D11	68	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFNTNPMGWFRQFAGKEREFVAAHRWSDGNTYYVDS VKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAAGRPWSSYRSPDEYVYWGQGTQVTVSS
T0170PMP043E08	69	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFSMNPMGWFRQSPGREREFVAAHRWSDGNTYYVDS VKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLKSEDTAVYYCAAGRPWSSYRSPTEYVYWGQGTLVTVSS

[1466]

名称	ID	氨基酸序列
T0170PMP043E06	70	EVQLVESGGGAVQAGGSLRLSCAASGRSFSTNPMGWFRQFPRKEREFVAAHRWSDGNTYYADSV KGRFTISRDNAKHTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAAGRPWSAAHSPNEYVYWGQGTQVTVSS
T0170PMP043E07	71	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFSANPMGWFRQFPGKERESVAAHRWSDGNTYYADSV KGRFTISRDNAKHTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAAGRPWSAAHSPNEYVYWGQGTQVTVSS
T0170PMP039D06	72	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRGFSTNPMGWFRQSPGKEREFVAAHRWSDGNTYYVDS VKGRFAISRDNAKNTVHLQMNSLKSEDTAVYYCAAGRPWSDYRAPSEYIYWGQGTQVTVSS
T0170PMP044F10	73	EVQLVESGGGLVRAGGSLRLSCAASGRGFSTNPMGWFRQSPGKEREFVAAHRWSDGNTYYVDSV KGRFAISRDNAKNTVHLQMNSLKSEDTAVYYCAAGRPWSDFRAPSEYIYSGPGTQVTVSS
T0170PMP044B11	74	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFNTNPMGWFRQSPGKEREFLAAVRWHDGSTYYTDSV KGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAAGRPWSAYHSPNEYVYYWGQGTLVTVSS
T0170PMP044C08	75	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFNTNPMGWFRQSPGKEREFLAAVRWHDGSTYYTDSV KGRFTISRDNAKNTVCLQMNSLKSEDTAVYYCAAGRPWSAYHSPNEYVYYWGQGTQVTVSS
T0170PMP043B03	76	EVQLVEFGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFSTNPMGWFRQSPGKEREFVGAVRWSDGSTYSADSV KGRFTVFRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAAGRPWSAYHSPKEYVYYWGQGTLVTVSS
T0170PMP039E06	77	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRAFSTNPMGWFRQSPGKEREFVAAHRWSDGSTFVADSV KGRFTISRDNAKNTVSLQMNSLKSADTAVYYCAAGRPWSAYHSPREYIYWGRGTQVTVSS
T0170PMP049A04	78	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRAFSTNPMGWFRQSPGKEREFVAAHRWSDGSTFVADSV KGRFTISRDNAKNTVSLQMNSLKSADTAVYYCAAGRPWSAYHSPREYIYWGRGTLVTVSS
T0170PMP043F09	79	EVQLVESGGGLVQAGASLRLSCAASGRAFSTNPMGWFRQSPGQEREFLAAVRWADGNTYYTDSV KGRATISRDNAKKTVYLQLNNLKSEDAAVYYCAAGRPWSAYHAPKEYIYWGQGTLVTVSS
T0170PMP044C11	80	EVQLVESGGGLVQAGASLRLSCAASGRAFSTNPMGWFRQSPGQEREFLAAVRWADGNTYYTDSV KGRATISRDNAKKTVYLQLNNLKSEDAAVYYCAAGRPWSAYHAPKEYIYWGQGTQVTVSS

[1467]

表A-8：CDR 和框架加上式I 中提供的优选组合(即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4)的序列。

"ID"是指给定的SEQ ID NO。第一栏是指完整ISV 的SEQ ID NO，即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR1、CDR2 和CDR3 根据 Kontermann, 2010 确定。

ID	名称	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
1	T0170PMP117G03	144	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAAS	81	GRTYRGYSMG	174	WFRQAPGKEREFVA	101	AIVWSGGNTY	200	YEDSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
2	T0170PMP061F04	144	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAAS	82	GRTYRGYSMA	175	WFRQSPGKEREFVA	102	AIVWSDGNTY	201	YEDFVKGRFTISRDSAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
3	T0170PMP081D02	144	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAAS	82	GRTYRGYSMA	175	WFRQSPGKEREFVA	102	AIVWSDGNTY	202	YEDFVKGRFTISRDSVKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
4	T0170PMP120D07	144	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAAS	82	GRTYRGYSMA	174	WFRQAPGKEREFVA	102	AIVWSDGNTY	203	YEDFVKGRFTISRDSAKNTLYLQMTNLEPEDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
5	T0170PMP118D11	144	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAAS	82	GRTYRGYSMA	174	WFRQAPGKEREFVA	102	AIVWSDGNTY	204	YEDFVKGRFTISRDSAKNTLYLQMTNLEPGDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
6	T0170PMP062A11	144	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAAS	82	GRTYRGYSMA	174	WFRQAPGKEREFVA	102	AIVWSDGNTY	205	YEDFVKGRFTISRDSAKNTLSLHMTNLKPEDTAVYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
7	T0170PMP118A08	145	EVQPVESGGGPVQAGGSLRLSCAAS	82	GRTYRGYSMA	174	WFRQAPGKEREFVA	102	AIVWSDGNTY	205	YEDFVKGRFTISRDSAKNTLSLHMTNLKPEDTAVYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
8	T0170PMP122C07	144	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAAS	82	GRTYRGYSMA	174	WFRQAPGKEREFVA	102	AIVWSDGNTY	206	YEDFVKGRFTISRDSAKNTLSLHMANLKPEDTAVYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
9	T0170PMP062D09	146	EVQLVESGGGPVQSGGSLRLSCANS	81	GRTYRGYSMG	174	WFRQAPGKEREFVA	103	AIVWSDGNSY	207	YEDFVKGRFTISRDSAKNIMYLQMTNLKPEDTAVYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS

[1468]

ID	名称	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
10	T0170PMP062G08	147	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCANS	82	GRTYRGYSMA	176	WFRQSPGKERGFVA	104	AITWSEGNAY	208	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
11	T0170PMP126E04	147	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCANS	82	GRTYRGYSMA	175	WFRQSPGKEREFVA	104	AITWSEGNAY	208	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
12	T0170PMP116E01	147	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCANS	82	GRTYRGYSMA	175	WFRQSPGKEREFVA	104	AITWSEGNAY	209	YEDFVRGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
13	T0170PMP117E03	147	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCANS	83	RRTYRGYSMA	175	WFRQSPGKEREFVA	104	AITWSEGNAY	208	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
14	T0170PMP062B10	148	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCASS	82	GRTYRGYSMA	175	WFRQSPGKEREFVA	104	AITWSEGNAY	208	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
15	T0170PMP118E11	147	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCANS	82	GRTYRGYSMA	175	WFRQSPGKEREFVA	104	AITWSEGNAY	208	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAA	124	KTRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
16	T0170PMP075A10	149	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCADS	82	GRTYRGYSMA	175	WFRQSPGKEREFVA	104	AITWSEGNAY	208	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
17	T0170PMP062C06	147	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCANS	84	GRTYRGYGMA	175	WFRQSPGKEREFVA	104	AITWSEGNAY	208	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
18	T0170PMP112G06	147	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCANS	82	GRTYRGYSMA	175	WFRQSPGKEREFVA	104	AITWSEGNAY	210	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTNLRPEDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
19	T0170PMP061A09	150	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCANS	82	GRTYRGYSMA	177	WFRQPPGKEREFVA	105	AITWSEGNPY	211	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLRMTRLEPEDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
20	T0170PMP061B06	151	EVQLVESGGGPVQAGGSLTLSCANS	82	GRTYRGYSMA	177	WFRQPPGKEREFVA	105	AITWSEGNPY	211	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLRMTRLEPEDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS

[1469]

ID	名称	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
21	T0170PMP111C01	151	EVQLVESGGGPVQAGGSLTLSCANS	82	GRTYRGYSMA	177	WFRQPPGKEREFVA	105	AITWSEGNPY	212	YEDFAKGRFTISRDNAKNTLYLRMTRLEPEDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
22	T0170PMP061D06	151	EVQLVESGGGPVQAGGSLTLSCANS	85	GRAYRGYSMA	177	WFRQPPGKEREFVA	105	AITWSEGNPY	211	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLRMTRLEPEDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
23	T0170PMP061E09	151	EVQLVESGGGPVQAGGSLTLSCANS	82	GRTYRGYSMA	177	WFRQPPGKEREFVA	105	AITWSEGNPY	211	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLRMTRLEPEDTALYYCAA	125	KIRPYIFKVAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
24	T0170PMP078A07	151	EVQLVESGGGPVQAGGSLTLSCANS	83	RRTYRGYSMA	177	WFRQPPGKEREFVA	105	AITWSEGNPY	211	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLRMTRLEPEDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
25	T0170PMP061A04	152	EVQLVESGGGPVQTGGSLRLSCVAS	82	GRTYRGYSMA	177	WFRQPPGKEREFVA	106	AITWSEGNTY	213	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTGLKPEDTALYYCAA	126	KIRPYIFKIPGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
26	T0170PMP115A03	152	EVQLVESGGGPVQTGGSLRLSCVAS	82	GRTYRGYSMA	177	WFRQPPGKEREFVA	106	AITWSEGNTY	214	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAA	126	KIRPYIFKIPGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
27	T0170PMP061F09	153	EVQPVESGGGPVQTGGSLRLSCVAS	82	GRTYRGYSMA	177	WFRQPPGKEREFVA	106	AITWSEGNTY	214	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAA	126	KIRPYIFKIPGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
28	T0170PMP112D04	152	EVQLVESGGGPVQTGGSLRLSCVAS	82	GRTYRGYSMA	178	WFRQPPGKERGFVA	106	AITWSEGNTY	214	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAA	126	KIRPYIFKIPGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
29	T0170PMP114E06	154	EVQLVESGGGPVQTGGSLRLSCVAP	82	GRTYRGYSMA	177	WFRQPPGKEREFVA	106	AITWSEGNTY	214	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAA	126	KIRPYIFKIPGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
30	T0170PMP113G04	152	EVQLVESGGGPVQTGGSLRLSCVAS	82	GRTYRGYSMA	177	WFRQPPGKEREFVA	106	AITWSEGNTY	215	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMASLKPEDTALYYCAA	126	KIRPYIFKIPGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
31	T0170PMP061D09	155	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCVAS	82	GRTYRGYSMA	177	WFRQPPGKEREFVA	106	AITWSEGNTY	214	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAA	126	KIRPYIFKIPGQYDY	243	WGQGTQVTVSS

[1470]

ID	名称	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
32	T0170PMP062G05	152	EVQLVESGGGPVQTGGSLRLSCVAS	82	GRTYRGYSMA	177	WFRQPPGKEREFVA	106	AITWSEGNTY	216	YEDFVKGRFTISRDNAKSTLYLQMTSLKPEDTALYYCAA	126	KIRPYIFKIPGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
33	T0170PMP114C05	152	EVQLVESGGGPVQTGGSLRLSCVAS	82	GRTYRGYSMA	177	WFRQPPGKEREFVA	106	AITWSEGNTY	217	YEDLVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAA	126	KIRPYIFKIPGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
34	T0170PMP117G05	152	EVQLVESGGGPVQTGGSLRLSCVAS	82	GRTYRGYSMA	177	WFRQPPGKEREFVA	106	AITWSEGNTY	214	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAA	127	KIRPYIFKVPGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
35	T0170PMP061F07	144	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCASAS	86	GRTFRGYSMA	177	WFRQPPGKEREFVA	106	AITWSEGNTY	214	YEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
36	T0170PMP061C09	144	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCASAS	81	GRTYRGYSMG	179	WFRQAPGRERGFVA	102	AIVWSDGNTY	200	YEDSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
37	T0170PMP124E06	156	EVQLVESGGGPAQAGGSLRLSCASAS	81	GRTYRGYSMG	179	WFRQAPGRERGFVA	102	AIVWSDGNTY	200	YEDSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
38	T0170PMP111B02	144	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCASAS	81	GRTYRGYSMG	180	WFRRAPGREREFVA	102	AIVWSDGNTY	218	YEDPVKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
39	T0170PMP062E08	157	EVQLVESGGGPVQAGDSLRLSCAAS	87	GRAYRGYSMG	181	WFRQVPGKEREFVA	107	AIVWTDGNTY	219	YEDSVKGRFTISRDITKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
40	T0170PMP062G03	158	EVQLVEFGGGPVQAGDSLRLSCAAS	87	GRAYRGYSMG	181	WFRQVPGKEREFVA	107	AIVWTDGNTY	219	YEDSVKGRFTISRDITKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
41	T0170PMP062G10	157	EVQLVESGGGPVQAGDSLRLSCAAS	87	GRAYRGYSMG	181	WFRQVPGKEREFVA	108	AIAWTDGNTY	219	YEDSVKGRFTISRDITKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
42	T0170PMP078E10	157	EVQLVESGGGPVQAGDSLRLSCAAS	87	GRAYRGYSMG	181	WFRQVPGKEREFVA	107	AIVWTDGNTY	220	YEDSVKGRFTISRDVTKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS

[1471]

ID	名称	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
43	T0170PMP115E06	159	EVQLVESRGGPVQAGDSLRLSCAAS	87	GRAYRGYSMG	181	WFRQVPGKEREFVA	107	AIVWTDGNTY	219	YEDSVKGRFTISRDITKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
44	T0170PMP122B02	157	EVQLVESGGGPVQAGDSLRLSCAAS	87	GRAYRGYSMG	181	WFRQVPGKEREFVA	109	AIVWTDGNAY	219	YEDSVKGRFTISRDITKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
45	T0170PMP061D07	157	EVQLVESGGGPVQAGDSLRLSCAAS	87	GRAYRGYSMG	182	WFRRVPGKEREFVA	107	AIVWTDGNTY	219	YEDSVKGRFTISRDITKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
46	T0170PMP126D09	160	EVQLVSGGGPVQAGDSLRLSCAAS	87	GRAYRGYSMG	181	WFRQVPGKEREFVA	107	AIVWTDGNTY	219	YEDSVKGRFTISRDITKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
47	T0170PMP126B03	157	EVQLVESGGGPVQAGDSLRLSCAAS	81	GRTYRGYSMG	181	WFRQVPGKEREFVA	107	AIVWTDGNTY	221	YEDSVKGRFTISRDNTKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
48	T0170PMP126B02	161	KVQLVESGGGPVQAGDSLRLSCAAS	81	GRTYRGYSMG	181	WFRQVPGKEREFVA	107	AIVWTDGNTY	221	YEDSVKGRFTISRDNTKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	244	WGQGTLVTVSS
49	T0170PMP075G11	157	EVQLVESGGGPVQAGDSLRLSCAAS	81	GRTYRGYSMG	181	WFRQVPGKEREFVA	107	AIVWTDGNTY	222	YEDSVKGRFTISRDITKNTMYLHMTSLKPEDSATYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
50	T0170PMP080E07	162	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS	87	GRAYRGYSMG	181	WFRQVPGKEREFVA	107	AIVWTDGNTY	219	YEDSVKGRFTISRDITKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAA	123	KIRPYIFKIAGQYDY	243	WGQGTQVTVSS
51	T0170PMP060E11	163	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	88	GDIYKSFDMG	183	WYRQAPGKQRDLVA	110	VIGSRGNNRGRTN	223	YADSVKGRFTISRDGTGNTVYLLMNKLRPEDTAIYYCNT	128	APLVAGRP	245	WGRGTLVTVSS
52	T0170PMP011A10	164	EVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAAS	89	GRTFSSYAMA	177	WFRQPPGKEREFVA	111	SISWSGENTN	224	YRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA	129	KIAKTYPDNWYWTKSNNYNY	243	WGQGTQVTVSS
53	T0170PMP033G03	165	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAAS	90	GRTFSTNPMG	184	WFRQVPGKERELIA	112	AVRWADGNTF	225	YADSVKGRFTISRDNAKKTVYLQMNSLKSEDTATYYCAA	130	GRPWSAYHSPAEYVH	243	WGQGTQVTVSS
54	T0170PMP	162	EVQLVESGGGLV	90	GRTFST	185	WFRQSPGK	112	AVRWA	225	YADSVKGRFTISRDNAK	130	GRPWSAYHSP	243	WGQGT

[1472]

ID	名称	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
	044A09		QAGGSLRLSCA AS		NPMG		ERSLIA		DGNTF		KTVYLQMNSLKSEDTAT YYCAA		AEYVH		QVTVSS
55	T0170PMP 043E10	162	EVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCA AS	90	GRTFST NPMG	185	WFRQSPGK ERSLIA	113	AARWA DGNTF	225	YADSVKGRFTISRDNAK KTVYLQMNSLKSEDTAT YYCAA	130	GRPWSAYHSP AEYVH	243	WGQGT QVTVSS
56	T0170PMP 044B10	162	EVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCA AS	90	GRTFST NPMG	185	WFRQSPGK ERSLIA	112	AVRWA DGNTF	226	YADSVKGRFTISRDNAK KTVYLQMNSLRSEDTAT YYCAA	130	GRPWSAYHSP AEYVH	244	WGQGT LVTVSS
57	T0170PMP 052G04	166	EVQLVESGGGAV QPGGSLRLSCAA S	91	GIRISRN MMG	186	WFRQAPG KQRDLVA	114	RITPGG DTY	227	YVDSVKGRFSISKDNAK NTVYLQMNSLKPEDTAV YYCNS	131	YSTLGS	243	WGQGT QVTVSS
58	T0170PMP 062B02	167	EVQLVESGGGAV QPGGSLRLSCVA S	91	GIRISRN MMG	187	WFRRTPGR ERNMVA	115	RISPGG ATY	228	YVDSVKGRFSISKDDSK NTVYLQMDSLKPEDTAV YYCNS	131	YSTLGS	243	WGQGT QVTVSS
59	T0170PMP 114D01	167	EVQLVESGGGAV QPGGSLRLSCVA S	91	GIRISRN MMG	187	WFRRTPGR ERNMVA	115	RISPGG ATY	228	YVDSVKGRFSISKDDSK NTVYLQMDSLKPEDTAV YYCNS	131	YSTLGS	244	WGQGT LVTVSS
60	T0170PMP 080F02	167	EVQLVESGGGAV QPGGSLRLSCVA S	91	GIRISRN MMG	188	WFRRTPGR GRNMVA	115	RISPGG ATY	228	YVDSVKGRFSISKDDSK NTVYLQMDSLKPEDTAV YYCNS	131	YSTLGS	243	WGQGT QVTVSS
61	T0170PMP 122A11	166	EVQLVESGGGAV QPGGSLRLSCAA S	91	GIRISRN MMG	189	WFRQAPG KSRDMVA	116	RISPGG DTY	229	YVDSVKGRFSISKDNAK NTVYLQMNSLRPEDTAI YYCNS	131	YSTLGS	244	WGQGT LVTVSS
62	T0170PMP 113E06	167	EVQLVESGGGAV QPGGSLRLSCVA S	92	GIRISNH MMG	190	WFRQAPGE QRDMVA	116	RISPGG DTY	230	VVDSVKGRFSISKDNAK NTVYLQMNNLKLEDTA VYYCNS	132	YRTLGS	243	WGQGT QVTVSS
63	T0170PMP 061E10	168	EVQLVESGGGV VQPGGSLRLSCA AS	93	GIRISTH TMG	191	WFRQAPEK QREMVA	117	QISPGG KTY	231	YIDSVKGRFTISKDNAK NTVFLRMNDLKPDDTAV YYCNS	133	YSTLGV	244	WGQGT LVTVSS
64	T0170PMP 061D03	168	EVQLVESGGGV VQPGGSLRLSCA AS	93	GIRISTH TMG	191	WFRQAPEK QREMVA	117	QISPGG KTY	231	YIDSVKGRFTISKDNAK NTVFLRMNDLKPDDTAV YYCNS	133	YSTLGV	243	WGQGT QVTVSS
65	T0170PMP 113E03	168	EVQLVESGGGV VQPGGSLRLSCA	93	GIRISTH TMG	191	WFRQAPEK QREMVA	117	QISPGG KTY	232	YIDSVKGRFTISKDNAK NTVFLRMNDLKPDGTAV	133	YSTLGV	243	WGQGT QVTVSS

[1473]

ID	名称	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
			AS								YYCNS				
66	T0170PMP050A11	162	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS	94	GRSFNMNPLG	175	WFRQSPGKEREFVA	118	AHRWSDGNTY	233	YVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAA	134	GRPWSAFRSPGEYVY	243	WGQGTQVTVSS
67	T0170PMP044A06	162	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS	90	GRTFSTNPMG	192	WFRQSPGNEREFVA	118	AHRWSDGNTY	234	YADSVKGRFAISRDNAKKTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAA	135	GRPWSSYRSPDEYVY	243	WGQGTQVTVSS
68	T0170PMP044D11	162	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS	95	GRAFNTNPMG	193	WFRQFAGKEREFVA	118	AHRWSDGNTY	233	YVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAA	135	GRPWSSYRSPDEYVY	243	WGQGTQVTVSS
69	T0170PMP043E08	162	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS	96	GRAFSMNPMG	194	WFRQSPGREREFVA	118	AHRWSDGNTY	235	YVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLKSEDTAVYYCAA	136	GRPWSSYRSPTEYVY	244	WGQGTQLVTVSS
70	T0170PMP043E06	169	EVQLVESGGGAVQAGGSLRLSCAAS	97	GRSFSTNPMG	195	WFRQFPRKEREFVA	118	AHRWSDGNTY	236	YADSVKGRFTISRDNAKHTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAA	137	GRPWSAAHSPNEYVY	243	WGQGTQVTVSS
71	T0170PMP043E07	162	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS	98	GRSFSANPMG	196	WFRQFPGKERESVA	118	AHRWSDGNTY	236	YADSVKGRFTISRDNAKHTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAA	137	GRPWSAAHSPNEYVY	243	WGQGTQVTVSS
72	T0170PMP039D06	162	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS	99	GRGFSTNPMG	175	WFRQSPGKEREFVA	118	AHRWSDGNTY	237	YVDSVKGRFAISRDNAKNTVHLQMNSLKSEDTAVYYCAA	138	GRPWSDYRAPSEYIY	243	WGQGTQVTVSS
73	T0170PMP044F10	170	EVQLVESGGGLVQRAGGSLRLSCAAS	99	GRGFSTNPMG	175	WFRQSPGKEREFVA	118	AHRWSDGNTY	237	YVDSVKGRFAISRDNAKNTVHLQMNSLKSEDTAVYYCAA	139	GRPWSDFRAPSEYIY	246	SGPGTQVTVSS
74	T0170PMP044B11	162	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS	95	GRAFNTNPMG	197	WFRQSPGKEREFLA	119	AVRWHDGSTY	238	YTDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAA	140	GRPWSAYHSPNEYVY	244	WGQGTQLVTVSS
75	T0170PMP044C08	162	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS	95	GRAFNTNPMG	197	WFRQSPGKEREFLA	119	AVRWHDGSTY	239	YTDSVKGRFTISRDNAKNTVCLQMNSLKSEDTAVYYCAA	140	GRPWSAYHSPNEYVY	243	WGQGTQVTVSS
76	T0170PMP043B03	171	EVQLVEFGGGLVQAGGSLRLSCAAS	100	GRAFSTNPMG	198	WFRQSPGKEREFVG	120	AVRWSDGSTY	240	SADSVKGRFTVFRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAA	141	GRPWSAYHSPKEYVY	244	WGQGTQLVTVSS

[1474]

ID	名称	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
77	T0170PMP039E06	172	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAAS	100	GRAFSTNPMG	175	WFRQSPGKEREFVA	121	AHRWSDGSTF	241	VADSVKGRFTISRDNAKNTVSLQMNSLKSADTAVYYCAA	142	GRPWSAYHSPREYIY	247	WGRGTQVTVSS
78	T0170PMP049A04	172	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAAS	100	GRAFSTNPMG	175	WFRQSPGKEREFVA	121	AHRWSDGSTF	241	VADSVKGRFTISRDNAKNTVSLQMNSLKSADTAVYYCAA	142	GRPWSAYHSPREYIY	245	WGRGTLVTVSS
79	T0170PMP043F09	173	EVQLVESGGGLVQAGASLRLSCAAS	100	GRAFSTNPMG	199	WFRQSPGQEREFLA	122	AVRWADGNTY	242	YTDSVKGRATISRDNAKKTVYLQLNNLKSEDAAVYYCAA	143	GRPWSAYHAPKEYIY	244	WGQGTLVTVSS
80	T0170PMP044C11	173	EVQLVESGGGLVQAGASLRLSCAAS	100	GRAFSTNPMG	199	WFRQSPGQEREFLA	122	AVRWADGNTY	242	YTDSVKGRATISRDNAKKTVYLQLNNLKSEDAAVYYCAA	143	GRPWSAYHAPKEYIY	243	WGQGTQVTVSS

表A-9：多特异性多肽(具有和不具有标签)的序列。"ID"是指本文所用的SEQ ID NO。

ID	名称	描述	氨基酸序列
248	T017000001	T0170011A10-35GS-T0170011A10FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWSGENTNYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWSGENTNYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQGTLVTVSSGAADYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
249	T017000004	20CD019C07-5GS-T0170033G03-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRWADGNTFYADSVKGRFTISRDNAKKTVYLQMNSLKSEDTATYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTLVTVSSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
250	T017000005	20CD019C07-5GS-T0170011A10-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWSGENTNYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQGTLVTVSSGAADYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH

[1475]

ID	名称	描述	氨基酸序列
251	T017000006	20CD019C07-5GS-cAbLys3-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSDVQLQASGGGSVQ AGGSLRLSCAASGYTIGPYCMGWFRQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLLM NSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYYECGHGLSTGGYGYDSWGQGTQVTVSSGAADYKDHDIDY KDDDDKGAAHHHHHH
252	T017000010	20CD019C07-9GS-T0170033G03-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG SVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRWADGNTFYADSVKGRFTISRDNAKKTVY LQMNSLKSEDTATYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTLVTVSSGAADYKDHDGDYKDHDIDY KGAAHHHHHH
253	T017000011	20CD019C07-9GS-T0170011A10-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG LVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWSGENTNYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYL QMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQGTLVTVSSGAADYKDHDGDYKDHDIDY KDDDDKGAAHHHHHH
254	T017000012	20CD019C07-9GS-cAbLys3-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDVQLQASGG GSVQAGGSLRLRLSCAASGYTIGPYCMGWFRQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTV YLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYYECGHGLSTGGYGYDSWGQGTQVTVSSGAADYKDHDGDYKDH DIDYKDDDDKGAAHHHHHH
255	T017000016	20CD019C07-35GS-T0170033G03-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRW ADGNTFYADSVKGRFTISRDNAKKTVYLQMNSLKSEDTATYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTLVTV SSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
256	T017000017	20CD019C07-35GS-T0170011A10-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWS GENTNYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQG TLVTVSSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH

[1476]

ID	名称	描述	氨基酸序列
257	T017000018	20CD019C07-35GS-cAbLys3-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLQASGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPYCMGWFRQAPGKEREGVAAIN MGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYYECGHGLSTGGYGYDS WGQGTQVTVSSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
258	T017000020	T0170033G03-9GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRWADGNTFYADSVKGRFTIS RDNAKKTVYLQMNSLKSEDTAIYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAV YLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK GAAHHHHHH
259	T017000021	T0170033G03-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRWADGNTFYADSVKGRFTIS RDNAKKTVYLQMNSLKSEDTAIYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAE VRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVS SGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
260	T017000022	T0170011A10-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWSGENTNYRNSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKE REFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQG TLVTVSSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
261	T017000023	cAbLys3(D1E)-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6	EVQLQASGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPYCMGWFRQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTI SQDNAKNTVYLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYYECGHGLSTGGYGYDSWGQGTQVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQA PGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDY WGQGTLVTVSSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
262	T017000024	T0170033G03-35GS-cAbLys3-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRWADGNTFYADSVKGRFTIS RDNAKKTVYLQMNSLKSEDTAIYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLQASGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPYCMGWFRQAPGKEREGV AAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYYECGHGLSTGGYG YDSWGQGTQVTVSSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH

[1477]

ID	名称	描述	氨基酸序列
263	T0170000026	T0170011A10-9GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWSGENTNYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGAADYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
264	T0170000027	T0170011A10-35GS-cAbLys3-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWSGENTNYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLQASGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPYCMGWFRQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYYECGHGLSTGGYGYDSWGQGTQVTVSSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
265	T0170000034	T0170061F07-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTFRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNTYYEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLQASGGGSVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGAADYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
266	T0170000036	T0170117G03-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGKEREFVAAIVWSGGNTYYEDSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGAADYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
267	T0170000039	T0170061F04-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMAWFRQSPGKEREFVAAIVWSDGNTYYEDFVKGRFTISRDSAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGAADYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
268	T0170000040	T0170060E11-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIYKSFDMGWYRQAPGKQRDLVAVIGSRGNNRGRTNYADSVKGRFTISRDGTGNTVYLLMNKLRPEDTAIYYCNTAPLVAGRPWGRGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGAADYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH

[1478]

ID	名称	描述	氨基酸序列
269	T0170000043	T0170050A11-35GS-20CD019C07-FLAG 3-HIS6	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFNMNPLGWFRQSPGKEREFVAAHRWSDGNTYYVDSVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAAGRPWSAFRSPGEYVYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVA EVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVT VSSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
270	T0170000045	T0170033G03-35GS-20CD019C07-FLAG 3-HIS6	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRWADGNTFYADSVKGRFTIS RDNAKKTVYLQMNSLKSEDTATYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAE VRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVS SGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
271	T0170000047	T0170011A10-35GS-20CD019C07-FLAG 3-HIS6	EVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWSGENTNYRNSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKE REFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQG TLVTVSSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
272	T0170000048	T0170052G04-35GS-20CD019C07-FLAG 3-HIS6	EVQLVESGGGAVQPGGSLRLSCAASGIRISRNMMGWFRQAPGKQRDLVARITPGGDTYYVDSVKGRFSISK DNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNSYSTLGSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYS NSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGAADYKDH DGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
273	T0170000052	20CD019C07-35GS-T0170061F04-FLAG 3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMAWFRQSPGKEREFVAAIV WSDGNTYYEDFVKGRFTISRDSAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTV SSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
274	T0170000053	20CD019C07-35GS-T0170060E11-FLAG 3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIYKSFDMGWYRQAPGKQRDLVAVIGS RGNNRGRTNYADSVKGRFTISRDGTGNTVYLLMNKLRPEDTAIYYCNTAPLVAGRPWGRGTLVTVSSGAA DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH

[1479]

ID	名称	描述	氨基酸序列
275	T017000056	20CD019C07-35GS-T0170052G04-FLAG 3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGAVQPGGSLRLSCAASGIRISRNNMGWFRQAPGKQRDLVARITP GGDTYYVDSVKGRFSISKDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNSYSTLGSWGQGTLVTVSSGAADYKDH DGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
276	T017000057	20CD019C07-35GS-T0170050A11-FLAG 3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFNMNPLGWFRQSPGKEREFVAAHR WSDGNTYYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAAGRPWSAFRSPGEYVYWGQGTLV TVSSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
277	T017000059	20CD019C07-35GS-T0170033G03-FLAG 3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRW ADGNTFYADSVKGRFTISRDNAKKTVYLQMNSLKSEDTATYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTLVTV SSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
278	T017000061	20CD019C07-35GS-T0170011A10-FLAG 3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWS GENTNYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQG TLVTVSSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
279	T017000062	20CD019C07-35GS-T0170117G03-FLAG 3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGKEREFVAAIV WSGGNTYYEDSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTV SSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
280	T017000066	20CD019C07-35GS-T0170061D09-FLAG 3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCVASGRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITW SEGNTYYEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIPGQYDYWGQGTLVTVSS GAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH

[1480]

ID	名称	描述	氨基酸序列
281	T0170000071	20CD019C07-35GS-T0170061F07-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTFRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITW SEGNTYYEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS GAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
282	T0170000072	T0170061D09-35GS-20CD019C07-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCVASGRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNTYYEDFVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIPGQYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVR WGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSG AADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
283	T0170000084	20CD019C07(E1D)-35GS-T0170117G03-A	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGKEREFVAAIV WSGGNTYYEDSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTV SSA
284	T0170000090	RSV007B02-35GS-T0170061F04-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSDGSTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMAWFRQSPGKEREF VAAIVWSDGNTYYEDFVKGRFTISRDSAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQG TLVTVSSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
285	T0170000091	RSV007B02-35GS-T0170117G03-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSDGSTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGKEREF VAAIVWSGGNTYYEDSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQG TLVTVSSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
286	T0170000094	20CD019C07-35GS-T0170117G03-35GS-ALB11-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGKEREFVAAIV WSGGNTYYEDSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSR SSQGTLVTVSSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH

[1481]

ID	名称	描述	氨基酸序列
287	T017000096	20CD019C07-35GS-T0170060E11-35GS-ALB11-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIYKSFDMGWYRQAPGKQRDLVAVIGS RGNNRGRTNYADSVKGRFTISRDGTGNTVYLLMNKLRPEDTAIYYCNTAPLVAGRPWGRGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWV RQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSSGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
288	T017000100	T0170117G03-35GS-HER2005F07(Q108L)-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGKEREFVAAIVWSGGNTYYEDSVKGRFTI SRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITFSINTMGWYRQAPGKQRELVAL ISSIGDTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKRFRTAAQGTDYWGQGTLVTVSSGA ADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
289	T017000101	HER2005F07(Q108L)-35GS-T0170117G03-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITFSINTMGWYRQAPGKQRELVALISSIGDTYYADSVKGRFTISRD NAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKRFRTAAQGTDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGKEREFVAAIVWSGG NTYYEDSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSSGA ADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
290	T017000088	RSV007B02(E1D)-35GS-T0170055A02-A	DVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSDGSTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDVHKINILGWYRQAPAKEREM VAHITIGDATDYADSAKGRFTISRDEAKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAYSRIYPYNYWGQGTLVTVSSA
305	T017000001	T0170011A10	EVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWSGENTNYRNSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKE REFVASISWSGENTNYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSN NYNYWGQGTLVTVSS
306	T017000004	20CD019C07-5GS-T0170033G03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSEVQLVESGGGSVQA GGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRWADGNTFYADSVKGRFTISRDNAKKTVYLQMN SLKSEDTATYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTLVTVSS
307	T017000005	20CD019C07-5GS-T0170011A10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQG GGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWSGENTNYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNS LKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQGTLVTVSS

[1482]

ID	名称	描述	氨基酸序列
308	T0170000006	20CD019C07-5GS-cAbLys3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSDVQLQASGGGSVQ AGGSLRLSCAASGYTIGPYCMGWFRQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLLM NSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYYECGHGLSTGGYGYDSWGQGTQVTVSS
309	T0170000010	20CD019C07-9GS-T0170033G03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG SVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRWADGNTFYADSVKGRFTISRDNAKKTVY LQMNSLKSEDTATYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTLVTVSS
310	T0170000011	20CD019C07-9GS-T0170011A10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG LVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWSGENTNYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYL QMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQGTLVTVSS
311	T0170000012	20CD019C07-9GS-cAbLys3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDVQLQASGG GSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPYCMGWFRQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTV YLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYYECGHGLSTGGYGYDSWGQGTQVTVSS
312	T0170000016	20CD019C07-35GS-T0170033G03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRW ADGNTFYADSVKGRFTISRDNAKKTVYLQMNSLKSEDTATYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTLVTV SS
313	T0170000017	20CD019C07-35GS-T0170011A10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWS GENTNYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQG TLVTVSS
314	T0170000018	20CD019C07-35GS-cAbLys3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLQASGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPYCMGWFRQAPGKEREGVAAIN MGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYYECGHGLSTGGYGYDS WGQGTQVTVSS

[1483]

ID	名称	描述	氨基酸序列
315	T0170000020	T0170033G03-9GS-20CD019C07	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRWADGNTFYADSVKGRFTISRDNAKKTVYLQMNSLKSEDTAIYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSS
316	T0170000021	T0170033G03-35GS-20CD019C07	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRWADGNTFYADSVKGRFTISRDNAKKTVYLQMNSLKSEDTAIYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSS
317	T0170000022	T0170011A10-35GS-20CD019C07	EVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWSGENTNYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSS
318	T0170000023	cAbLys3(D1E)-35GS-20CD019C07	EVQLQASGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPYCMGWFRQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYYECGHGLSTGGYGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSSYTMGWFRQPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSS
319	T0170000024	T0170033G03-35GS-cAbLys3	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRWADGNTFYADSVKGRFTISRDNAKKTVYLQMNSLKSEDTAIYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLQASGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPYCMGWFRQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYYECGHGLSTGGYGYDSWGQGTQVTVSS
320	T0170000026	T0170011A10-9GS-20CD019C07	EVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWSGENTNYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSS
321	T0170000027	T0170011A10-35GS-cAbLys3	EVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWSGENTNYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLQASGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPYCMGWFRQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYYECGHGLSTGGYGYDSWGQGTQVTVSS

[1484]

ID	名称	描述	氨基酸序列
322	T0170000034	T0170061F07-35GS-20CD019C07	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTFRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNTYYEDFVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVR WGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSS
323	T0170000036	T0170117G03-35GS-20CD019C07	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGKEREFVAAIVWSGGNTYYEDSVKGRFTI SRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAE VRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVS S
324	T0170000039	T0170061F04-35GS-20CD019C07	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMAWFRQSPGKEREFVAAIVWSDGNTYYEDFVKGRFTI SRDSAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEV RWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSS
325	T0170000040	T0170060E11-35GS-20CD019C07	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIYKSFDMGWYRQAPGKQRDLVAVIGSRGNNRGRTNYADSVKGR FTISRDGTGNTVYLLMNKLRPEDTAIYYCNTAPLVAGRPWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWG GVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSS
326	T0170000043	T0170050A11-35GS-20CD019C07	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFNMNPLGWFRQSPGKEREFVAAHRWSDGNTYYVDSVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAAGRPWSAFRSPGEYVYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVA EVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVT VSS
327	T0170000045	T0170033G03-35GS-20CD019C07	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRWADGNTFYADSVKGRFTIS RDNAKKTVYLQMNSLKSEDTATYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAE VRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVS S
328	T0170000047	T0170011A10-35GS-20CD019C07	EVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWSGENTNYRNSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKE REFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQG TLVTVSS

[1485]

ID	名称	描述	氨基酸序列
329	T0170000048	T0170052G04-35GS-20CD019C07	EVQLVESGGGAVQPGGSLRLSCAASGIRISRNMMGWFRQAPGKQRDLVARITPGGDTYYVDSVKGRFSISK DNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNSYSTLGSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYS NSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSS
330	T0170000052	20CD019C07-35GS-T0170061F04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMAWFRQSPGKEREFVAAIV WSDGNTYYEDFVKGRFTISRDSAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTV SS
331	T0170000053	20CD019C07-35GS-T0170060E11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIYKSFDMGWYRQAPGKQRDLVAVIGS RGNNRGRTNYADSVKGRFTISRDGTGNTVYLLMNKLRPEDTAIYYCNTAPLVAGRPWGRGTLVTVSS
332	T0170000056	20CD019C07-35GS-T0170052G04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGAVQPGGSLRLSCAASGIRISRNMMGWFRQAPGKQRDLVARITP GGDTYYVDSVKGRFSISKDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNSYSTLGSWGQGTLVTVSS
333	T0170000057	20CD019C07-35GS-T0170050A11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFNMNPLGWFRQSPGKEREFVAAHR WSDGNTYYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAAGRPWSAFRSPGEYVYWGQGTLV TVSS
334	T0170000059	20CD019C07-35GS-T0170033G03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTFSTNPMGWFRQVPGKERELIAAVRW ADGNTFYADSVKGRFTISRDNAKKTVYLQMNSLKSEDTATYYCAAGRPWSAYHSPAEYVHWGQGTLVTV SS
335	T0170000061	20CD019C07-35GS-T0170011A10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQGGGSLSLSCAASGRTFSSYAMAWFRQPPGKEREFVASISWS GENTNYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKIAKTYPDNWYWTKSNNYNYWGQG TLVTVSS

[1486]

ID	名称	描述	氨基酸序列
336	T0170000062	20CD019C07-35GS-T0170117G03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGKEREFVAAIV WSGGNTYYEDSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTV SS
337	T0170000066	20CD019C07-35GS-T0170061D09	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCVASGRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITW SEGNTYYEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIPGQYDYWGQGTLVTVSS
338	T0170000071	20CD019C07-35GS-T0170061F07	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTFRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITW SEGNTYYEDFVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
339	T0170000072	T0170061D09-35GS-20CD019C07	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCVASGRTYRGYSMAWFRQPPGKEREFVAAITWSEGNTYYEDFVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIPGQYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVR WGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSS
340	T0170000084	20CD019C07(E1D)-35GS-T0170117G03	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGKEREFVAAIV WSGGNTYYEDSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTV SS
341	T0170000090	RSV007B02-35GS-T0170061F04	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSDGSTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMAWFRQSPGKEREF VAAIVWSDGNTYYEDFVKGRFTISRDSAKNTLYLQMTNLKPEDTALYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQG TLVTVSS
342	T0170000091	RSV007B02-35GS-T0170117G03	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSDGSTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGKEREF VAAIVWSGGNTYYEDSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQG TLVTVSS

[1487]

ID	名称	描述	氨基酸序列
343	T0170000094	20CD019C07-35GS-T0170117G03-35GS-ALB11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGKEREFVAAIV WSGGNTYYEDSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSR SSQGTLVTVSS
344	T0170000096	20CD019C07-35GS-T0170060E11-35GS-ALB11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISE DSVKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIYKSFDMGWYRQAPGKQRDLVAVIGS RGNNRGRTNYADSVKGRFTISRDGTGNTVYLLMNKLRPEDTAIYYCNTAPLVAGRPWGRGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWV RQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
345	T0170000100	T0170117G03-35GS-HER2005F07(Q108L)	EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGKEREFVAAIVWSGGNTYYEDSVKGRFTI SRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITFSINTMGWYRQAPGKQRELVAL ISSIGDTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKRFRTAAQGTDYWGQGTLVTVSS
346	T0170000101	HER2005F07(Q108L)-35GS-T0170117G03	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITFSINTMGWYRQAPGKQRELVALISSIGDTYYADSVKGRFTISRD NAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKRFRTAAQGTDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGKEREFVAAIVWSGG NTYYEDSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTLVTVSS
347	T0170000088	RSV007B02(E1D)-35GS-T0170055A02	DVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSDGSTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDVHKINILGWYRQAPAKEREM VAHITIGDATDYADSAKGRFTISRDEAKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAYSRIYPYNYWGQGTLVTVSS

表A-10：TCR复合物的组分的序列。“ID”是指本文所用的SEQ ID NO。

ID	名称	氨基酸序列
291	HUMAN CD3 DELTA (P04234)	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDI YKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLR DRDDAQYSHLGGNWARNK

[1488]

ID	名称	氨基酸序列
292	HUMAN CD3 GAMMA (P09693)	MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNL GSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVRQSRASDKQTLLPNDQ LYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRNAATISGFLFRN
293	HUMAN CD3 EPSILON (P07766)	MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKN IGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFNCMEMDVMSVATI VIVDICITGGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPYLYLRARVCE
294	HUMAN CD3 ZETA (P20963)	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR
295	HUMAN TCR ALPHA CONSTANT DOMAIN (P01848)	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACA NAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
296	HUMAN TCR BETA CONSTANT DOMAIN (P01850)	EDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCL SSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEI LLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
379	HUMAN CD3 GAMMA (P09693)	MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNL GSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVRQSRASD KQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN
380	HUMAN CD3 EPSILON (P07766)	MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKN IGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYY WSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI
381	HUMAN TCR ALPHA VARIABLE DOMAIN DERIVED FROM 2IAN	IQVEQSPPDLILQEGANSTLRCNFSDSVNNLQWFHQNPWGQLINLFYIPSGTKQNGRLSATTVATERYSLLYISSSQT TDSGVYFCAALIQGAQKLVFGQGTRLTIN
382	HUMAN TCR BETA VARIABLE DOMAIN DERIVED FROM 2IAN	NAGVTQTPKFRILKIGQSMTLQCTQDMNHNYMYWYRQDPGMGLKLIYYSVGAGITDKGEVPNGYNVSRSTTED FPLRLELAAPSQTSVYFCASTYHGTGYFGEGSWLTVV
383	HUMAN TCR ALPHA VARIABLE DOMAIN DERIVED FROM 2XN9	QLLEQSPQFLSIQEGENLTVYCNSSSVFSSLQWYRQEPGEGPVLLVTVVTGGEVKKLKRLTFQFGDARKDSSLHIT AAQPGDTGLYLCAGAGSQGNLIFGKGTKLSVK
384	HUMAN TCR BETA VARIABLE DOMAIN DERIVED FROM 2XN9	DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESF PLTVTSAQKNPTAFYLCASSSRSSYEQYFGPGTRLTVT

[1489]

ID	名称	氨基酸序列
385	HUMAN TCR ALPHA VARIABLE DOMAIN DERIVED FROM 3TOE	GDAKTTQPNSMESNEEEPVHLPCNHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIHGLTSNVNNRMASLAIAEDRKSSTLIL HRATLRDAAVYYCTVYGGATNKLIFGTGTLLAVQ
386	HUMAN TCR BETA VARIABLE DOMAIN DERIVED FROM 3TOE	VVSQHPSWVIAKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTLS TLTVTSAHPEDSSFYICSARGGSYNSPLHFGNGTRLTVT

表A-11：TAA 结构单元的序列。“ID”是指本文所用的SEQ ID NO。

ID	名称	氨基酸序列
297	HER2005F07 (Q108L)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITFSINTMGWYRQAPGKQRELVALISSIGDTYYADSVKGRFTISRDNAKNTV YLQMNSLKPEDTAVYYCKRFRTAAQGTDYWGQGTLVTVSS
298	HER2047D05 (L108Q)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFGFNDMAWYRQAPGKQRELVALISRVGVTSSADSVKGRFTISRVNAKDT VYLQMNSLKPEDTAVYYCYMDQRLDGSTLAYWGQGTQVTVSS
299	EGFR009G08	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNAKN TMYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTQVTVSS
300	NbCEA5 (CEA#1)	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSYWMGWFRQAPGKEREGVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDTA KNTVYLQMNSLRPDDTADYYCAASGVLGGLHEDWFNYWGQGTLVTVSS
301	T023200005 (CEA#5)	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSYWMGWFRQAPGQEREAVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRPDDTADYYCAASGVLGGLHEDWFNYWGQGTLVTVSS
302	7D12 (EGFR#1)	EVQLVESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAK NTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLVTVSS
303	T023200033 (EGFR#33)	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGSTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAK NTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSTWYGTLYEYDYWGQGTLVTVSS
304	20CD019C07	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGGTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAEVRWGGVTTYSNSLKDRFSISEDSVKNA VYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRQMYMTVVPDYWGQGTLVTVSS
387	cAblys3	DVQLQASGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPYCMGWFRQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAK NTVYLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYYECGHGLSTGGYGYDSWGQGTQVTVSS
388	RSV007B02	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKN TVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTQVTVSS

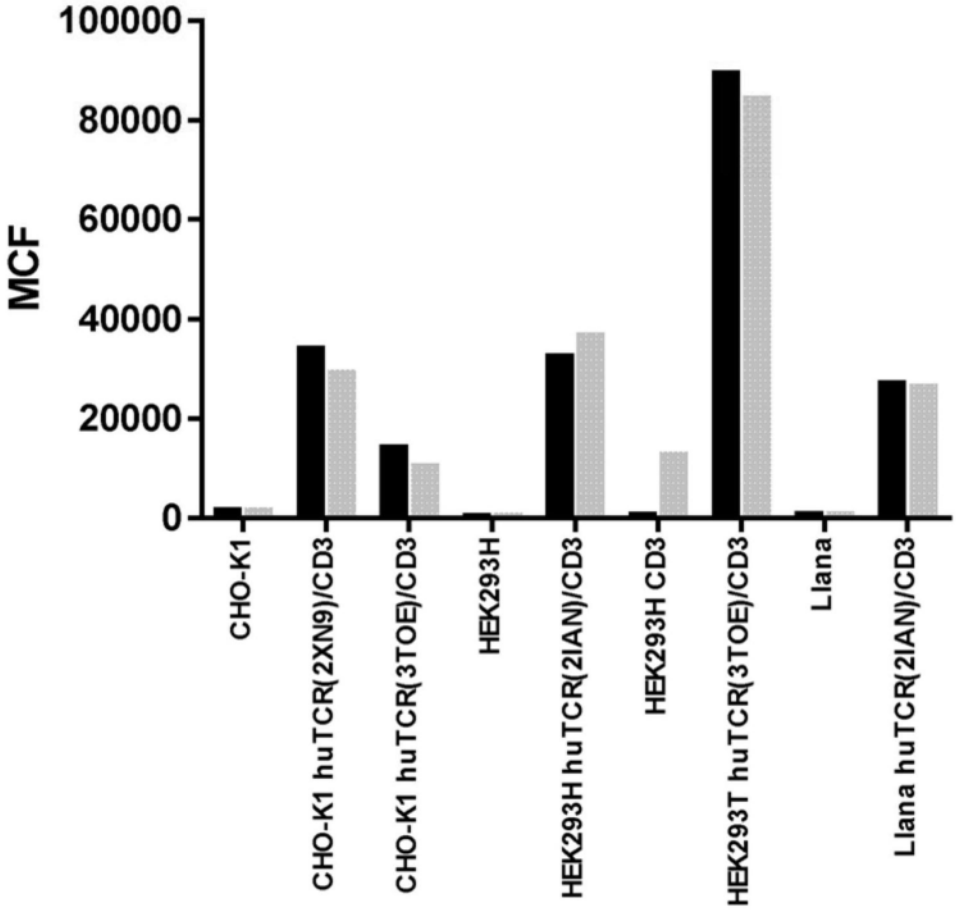

100000
80000
60000
40000
20000
0
MCF
CHO-K1
CHO-K1 huTCR(2XN9)/CD3
CHO-K1 huTCR(3TOE)/CD3
HEK293H
HEK293H huTCR(2IAN)/CD3
HEK293H CD3
HEK293T huTCR(3TOE)/CD3
Llana
Llana huTCR(2IAN)/CD3

图1

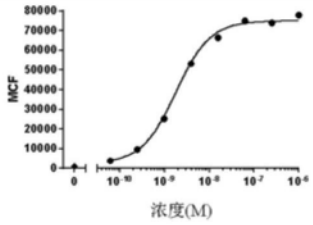
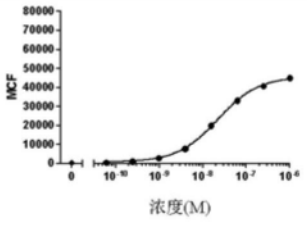
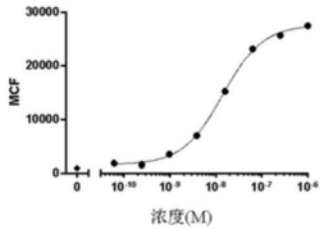
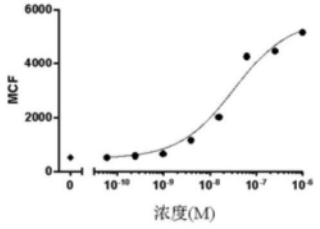
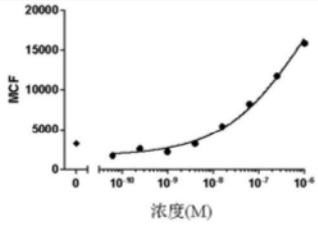
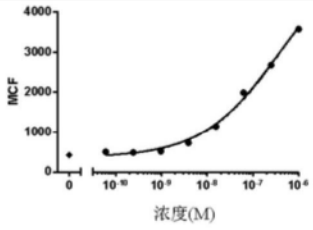
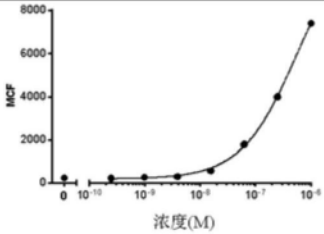
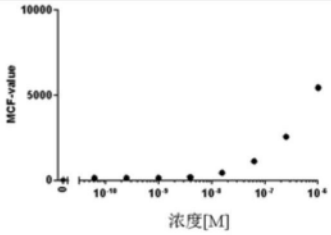
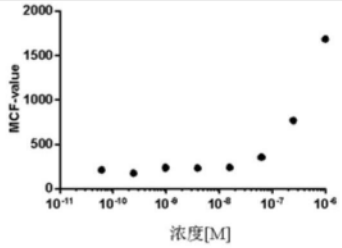
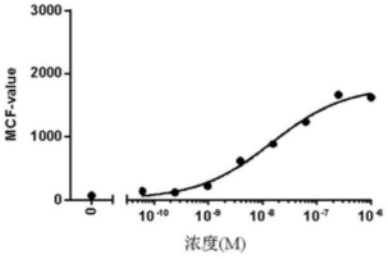
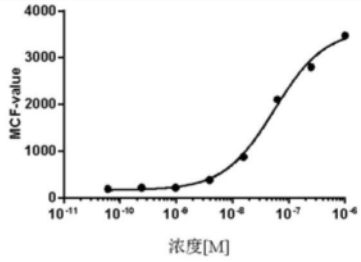
簇	样品 ID	A CHO-K1 hu TCR(2XN9)/CD3	B hu T 细胞
A	T0170117G03		
B	T0170060E11		
C	T0170033G03		
D	T0170011A10		
E	T0170052G04		
F	T0170050A11		

图2

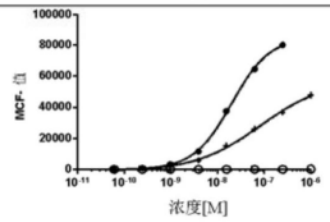
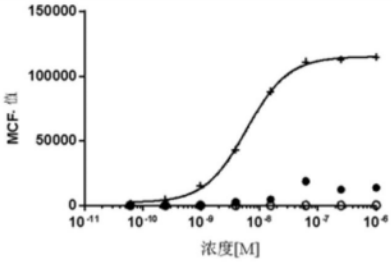
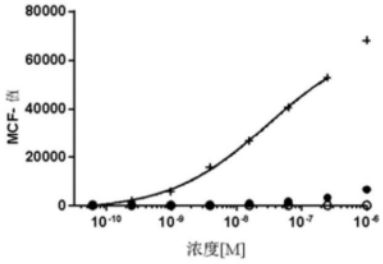
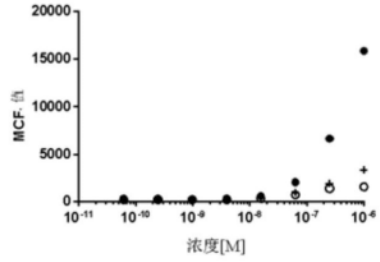
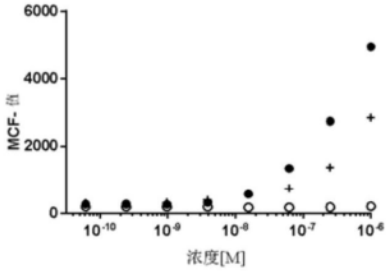
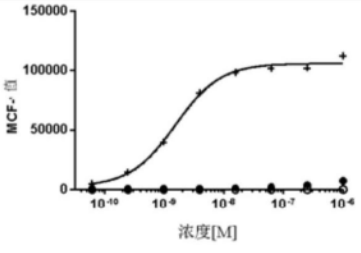
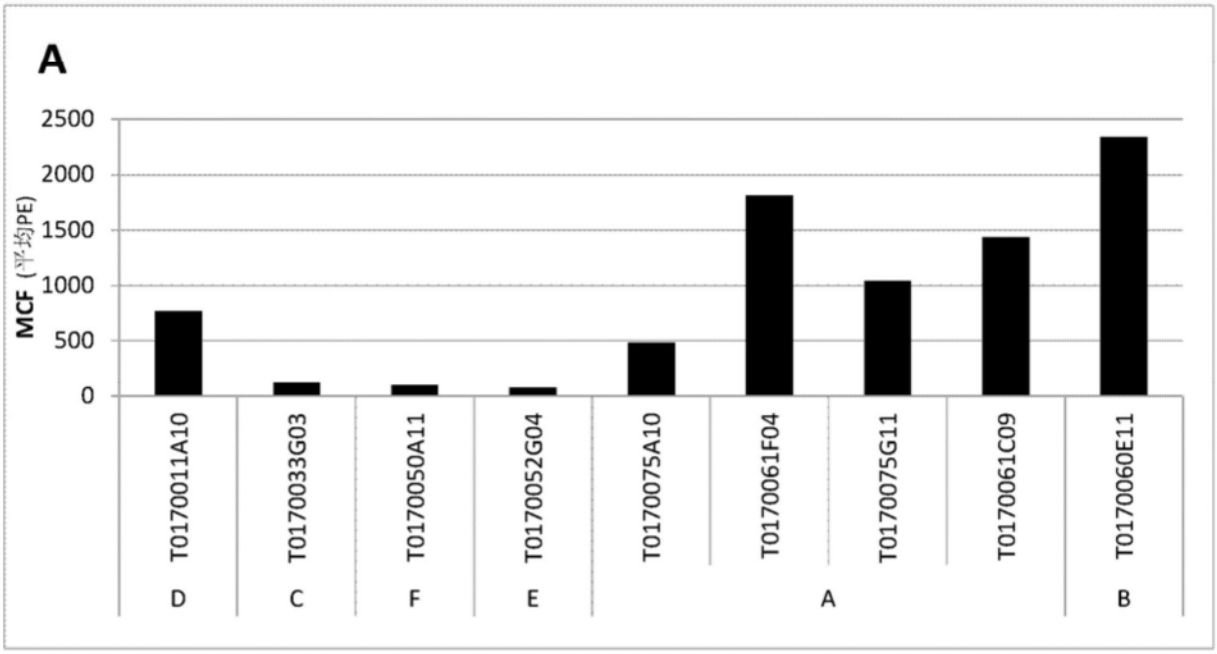
簇	样品 ID	与 HEK293H 人 TCR(2IAN)/CD3 (实心圆)、HEK293H 人 CD3 (十字)和与 HEK293H 参考细胞系(空心圆)的结合
A	T0170075G11	
B	T0170060E11	
C	T0170033G03	
D	T0170011A10	
E	T0170052G04	
F	T0170050A11	

图3


A
MCF (平均PE)
2500
2000
1500
1000
500
0
T0170011A10
T0170033G03
T0170050A11
T0170052G04
T0170075A10
T0170061F04
T0170075G11
T0170061C09
T0170060E11
D
C
F
E
A
B

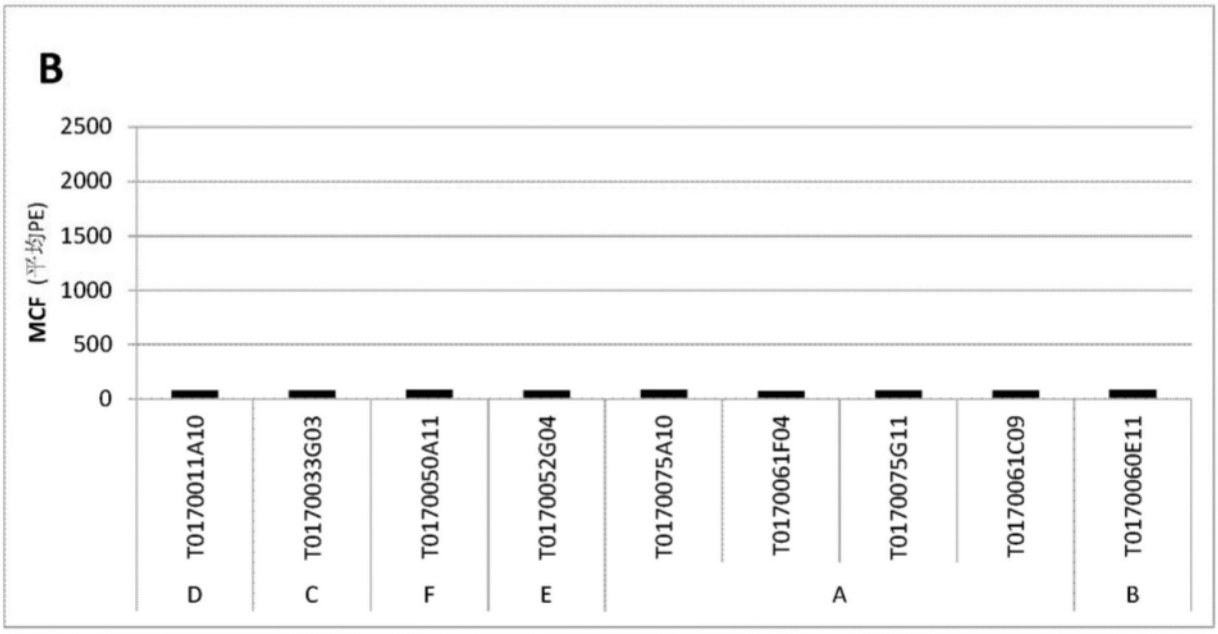

B
MCF (平均PE)
2500
2000
1500
1000
500
0
T0170011A10
T0170033G03
T0170050A11
T0170052G04
T0170075A10
T0170061F04
T0170075G11
T0170061C09
T0170060E11
D
C
F
E
A
B

图4

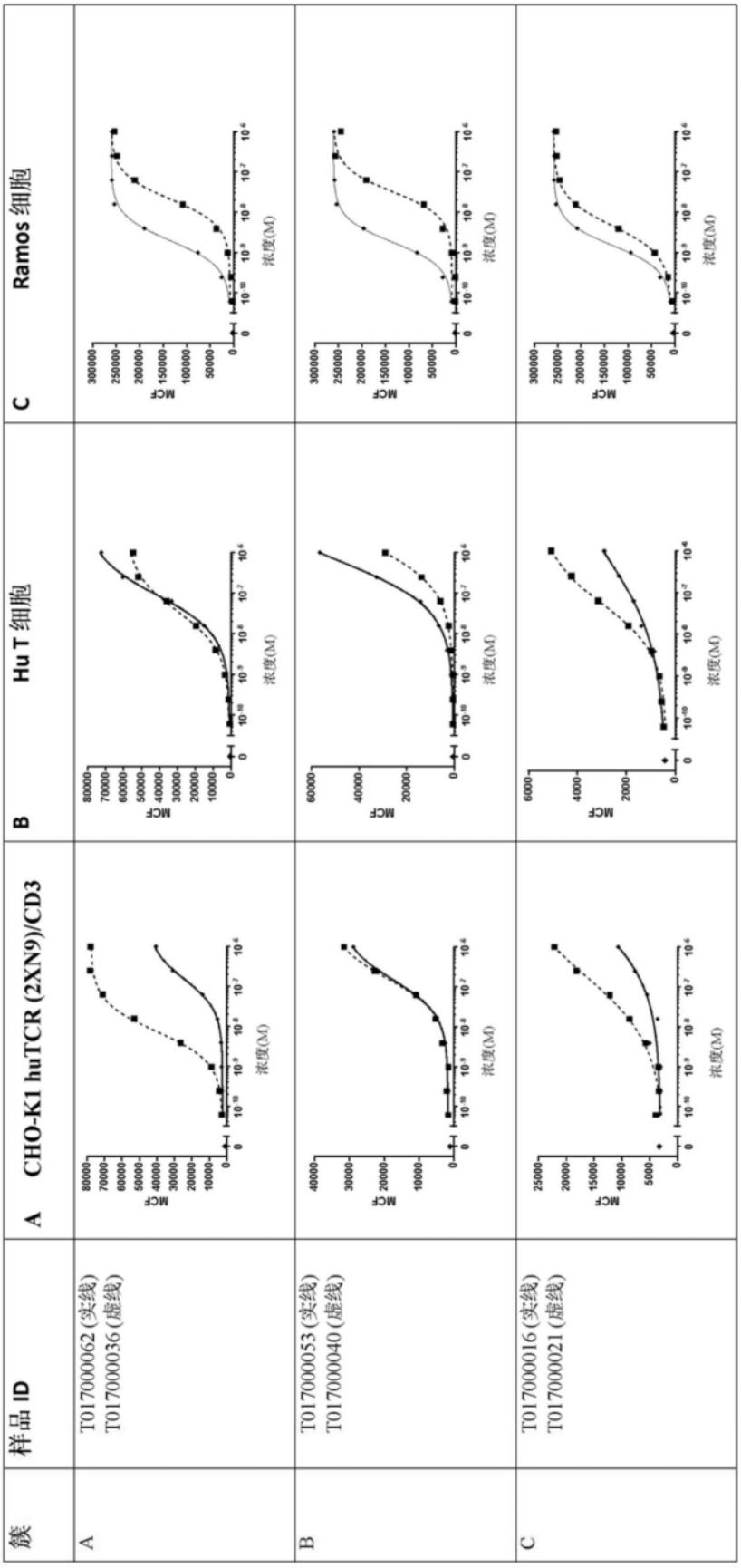

簇
样品 ID
A CHO-K1 huTCR (2XN9)/CD3
B Hu T 细胞
C Ramos 细胞
A
T017000062 (实线)
T017000036 (虚线)
B
T017000053 (实线)
T017000040 (虚线)
C
T017000016 (实线)
T017000021 (虚线)
MCF
浓度(M)

图5

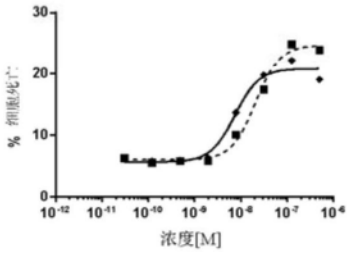
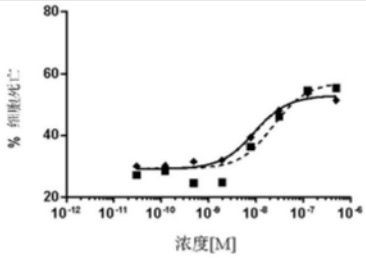
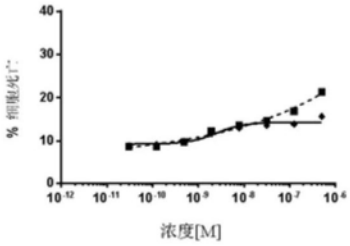
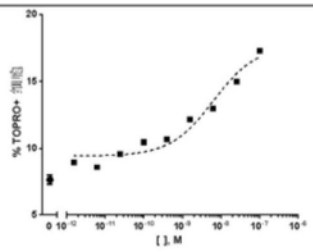
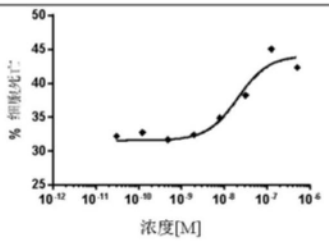
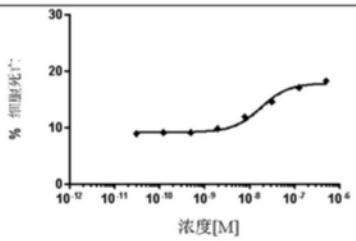
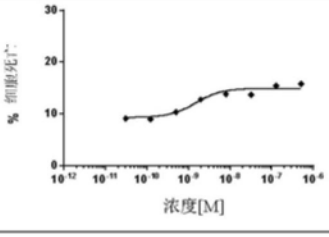
簇	样品 ID	A Ramos	B Raji
A	T017000062 (实线) T017000036 (虚线)		
B	T017000053 (实线) T017000040 (虚线)		
C	T017000016 (实线) T017000045 (虚线)		
D	T017000061 (实线)		
E	T017000056 (实线)		
F	T017000057 (实线)		

图6

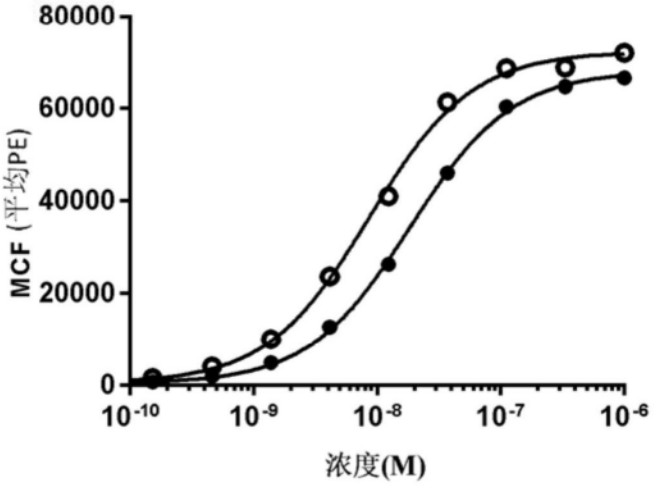


图7

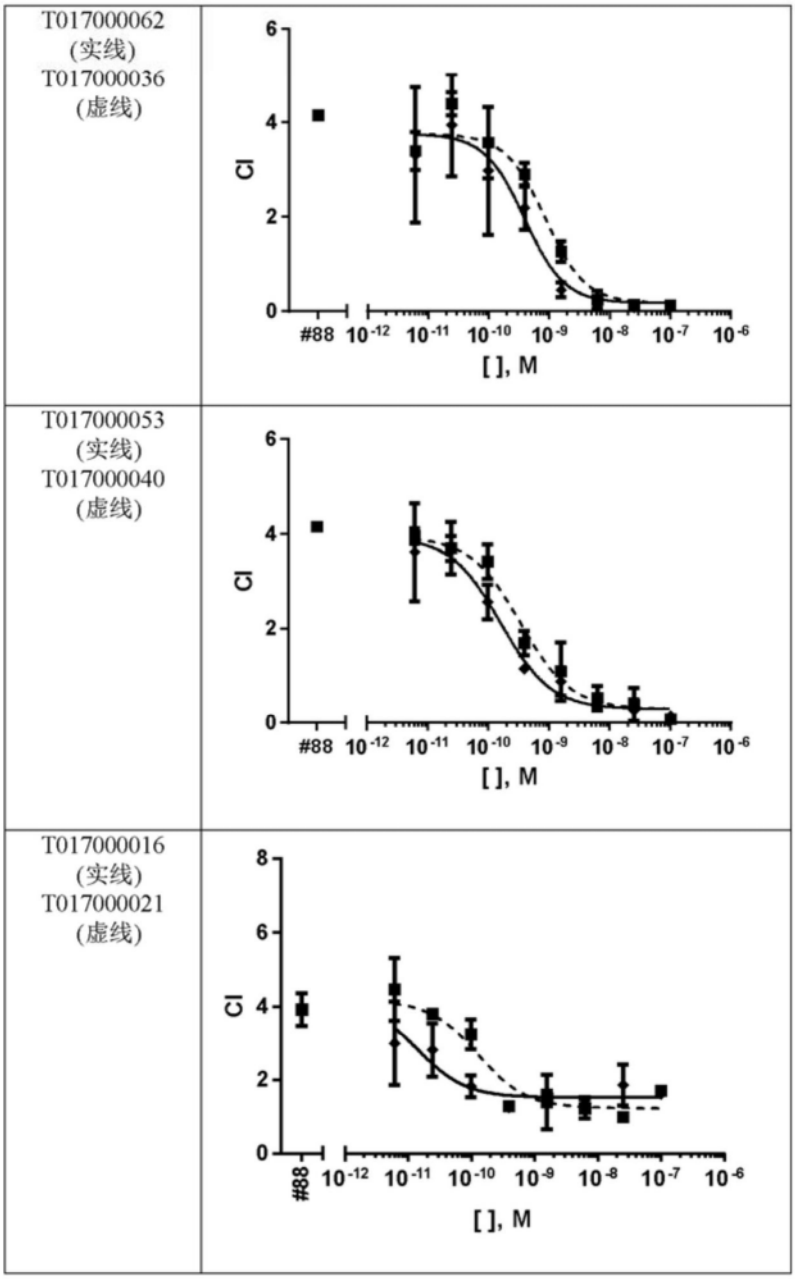

T017000062
(实线)
T017000036
(虚线)
CI
[ ], M
T017000053
(实线)
T017000040
(虚线)
CI
[ ], M
T017000016
(实线)
T017000021
(虚线)
CI
[ ], M

图8

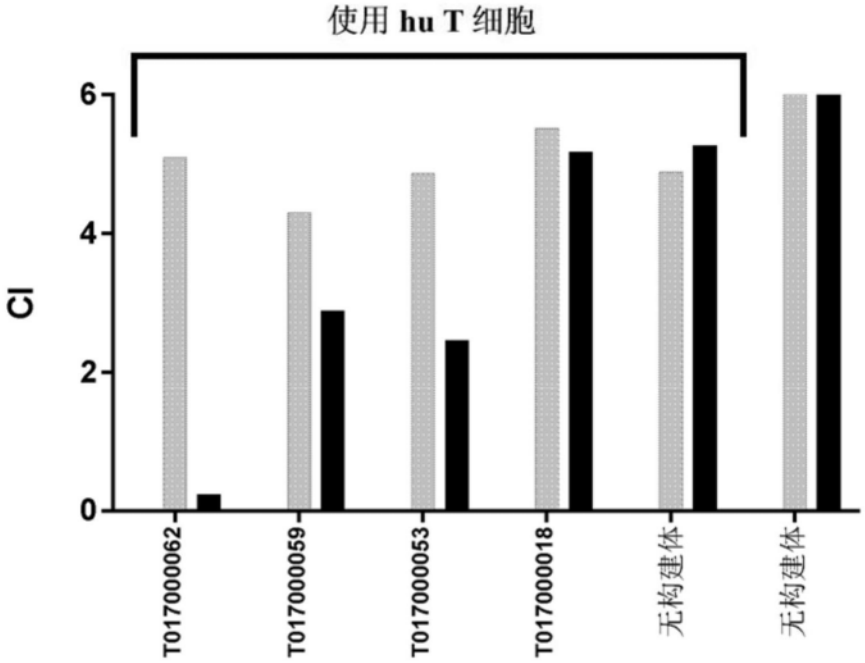

使用 hu T 细胞
CI
6
4
2
0
T017000062
T017000059
T017000053
T017000018
无构建体
无构建体

图9

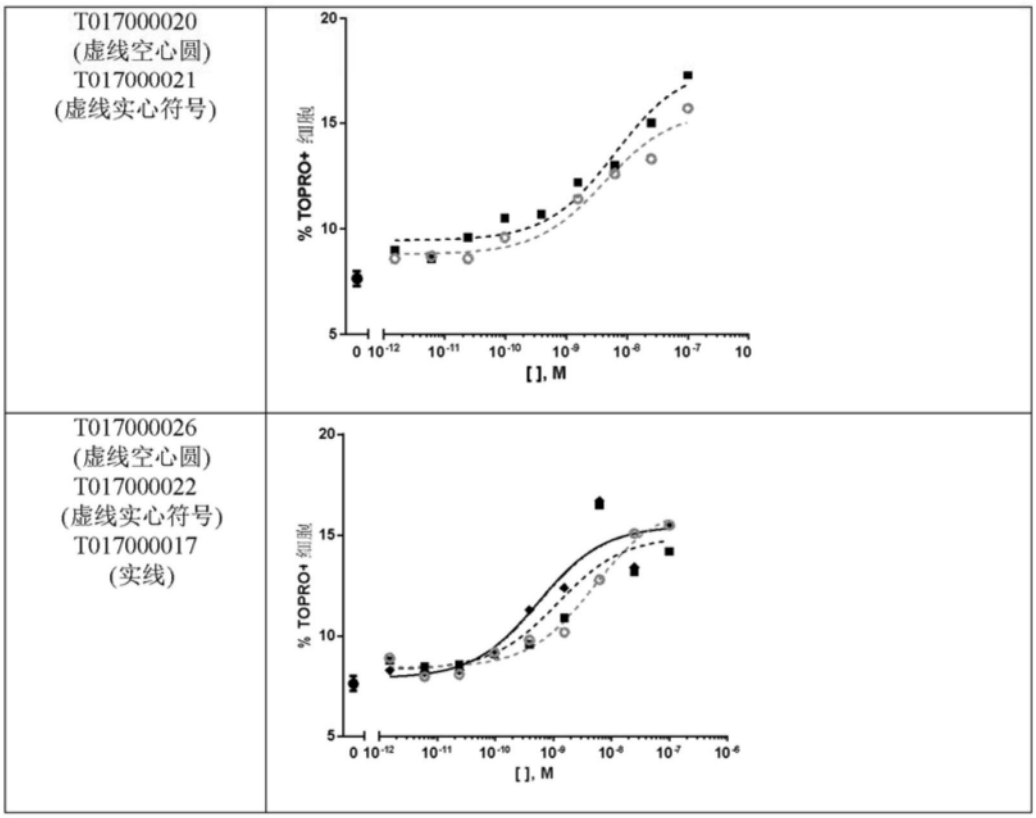

T017000020
(虚线空心圆)
T017000021
(虚线实心符号)
% TOPRO+ 细胞
[], M
T017000026
(虚线空心圆)
T017000022
(虚线实心符号)
T017000017
(实线)
% TOPRO+ 细胞
[], M

图10

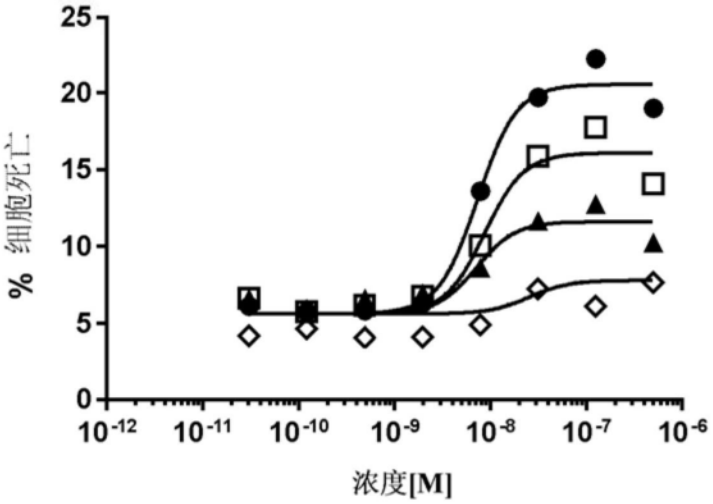

% 细胞死亡
25
20
15
10
5
0
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
浓度[M]

图11

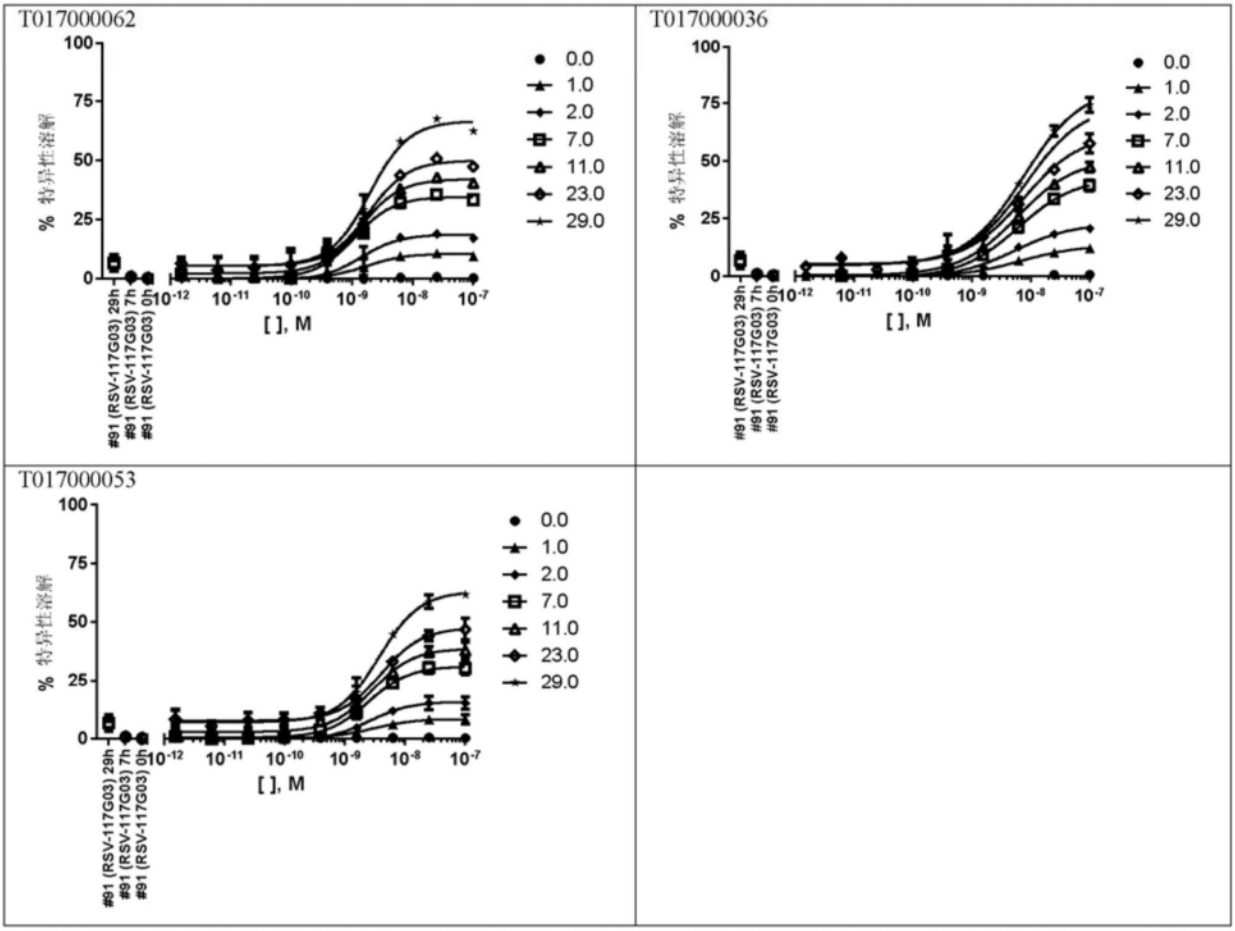

T017000062
T017000036
T017000053
% 特异性溶解
100
75
50
25
0
0.0
1.0
2.0
7.0
11.0
23.0
29.0
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
[ ], M
#91 (RSV-117G03) 29h
#91 (RSV-117G03) 7h
#91 (RSV-117G03) 0h

图12

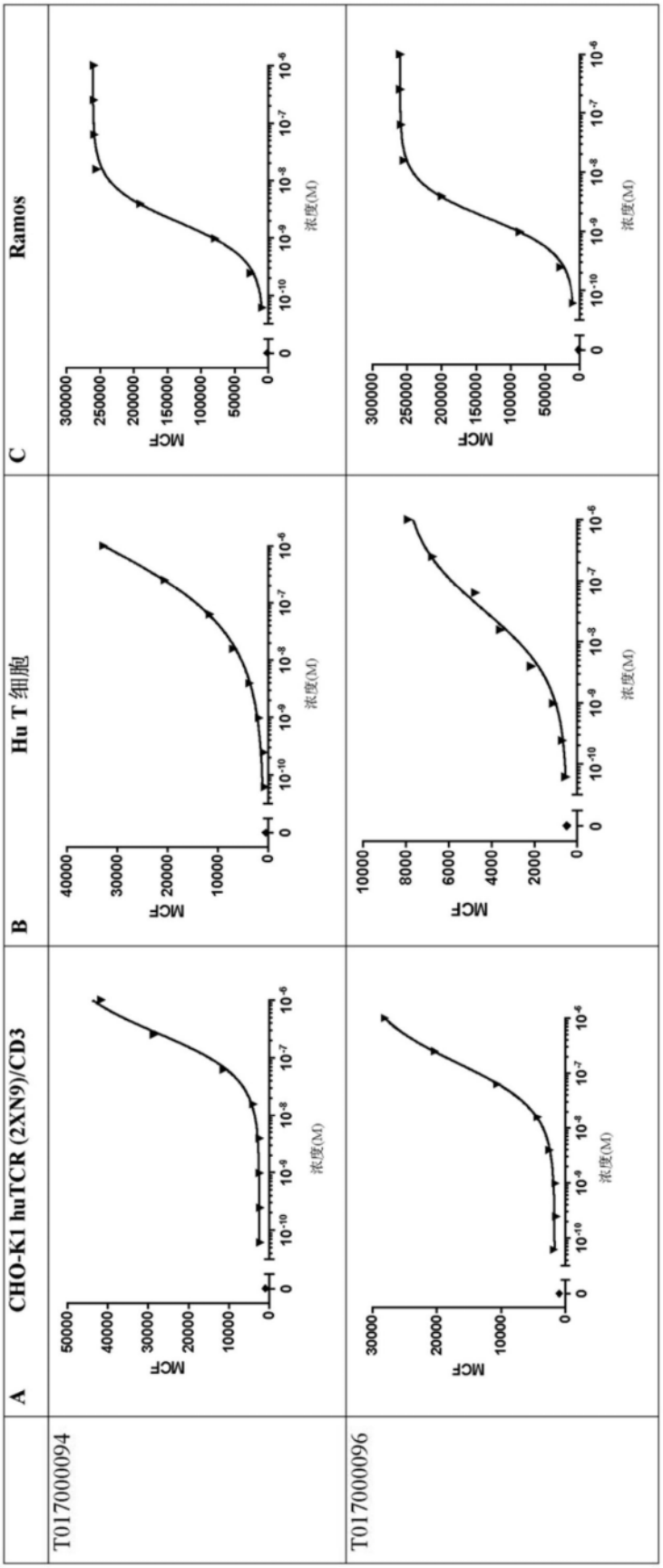

A
CHO-K1 huTCR (2XN9)/CD3
B
Hu T 细胞
C
Ramos
T017000094
T017000096
MCF
浓度(M)

图13

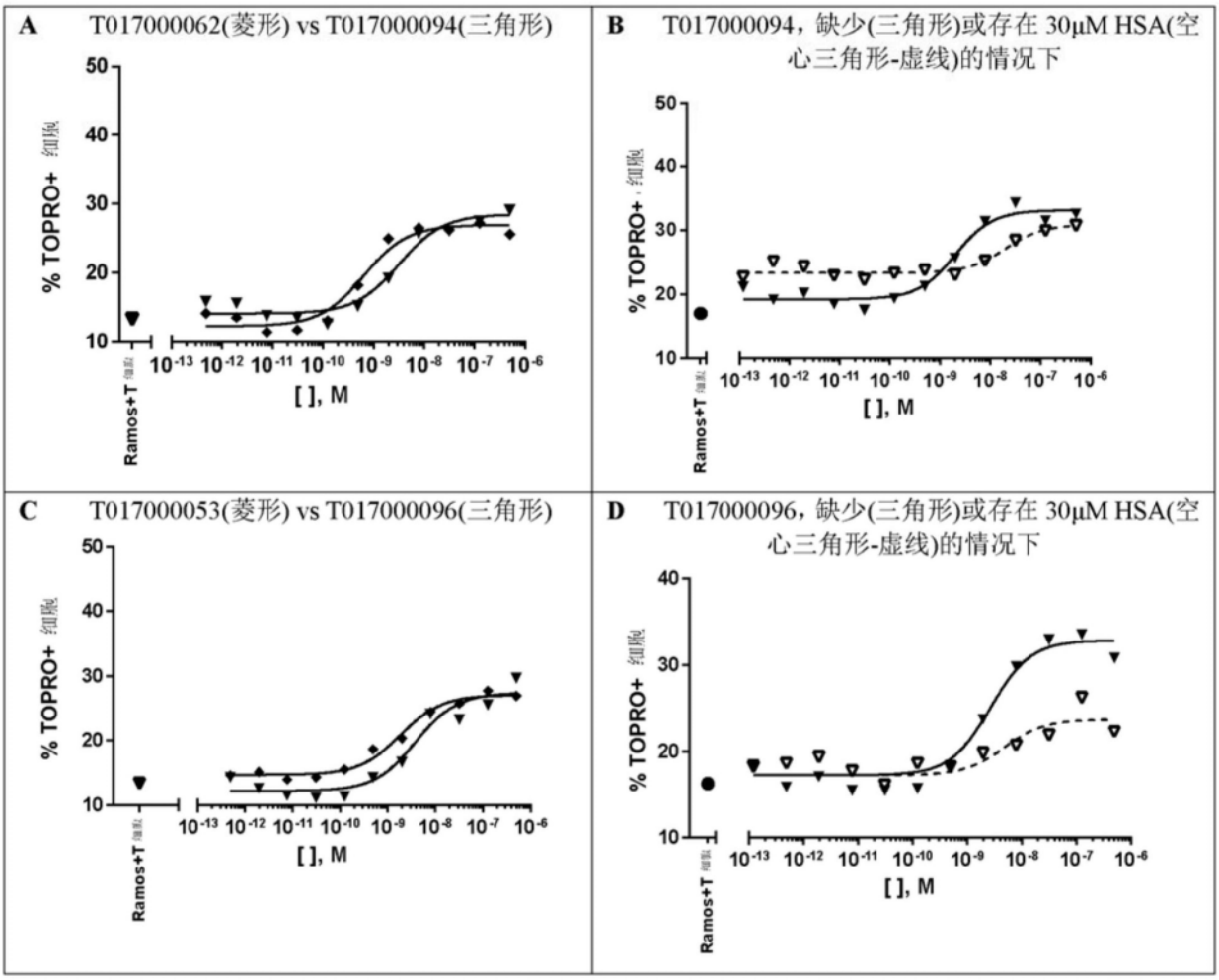

A
T017000062(菱形) vs T017000094(三角形)
% TOPRO+ 细胞
Ramos+T 细胞
[ ], M
B
T017000094，缺少(三角形)或存在 30μM HSA(空心三角形-虚线)的情况下
C
T017000053(菱形) vs T017000096(三角形)
D
T017000096，缺少(三角形)或存在 30μM HSA(空心三角形-虚线)的情况下

图14

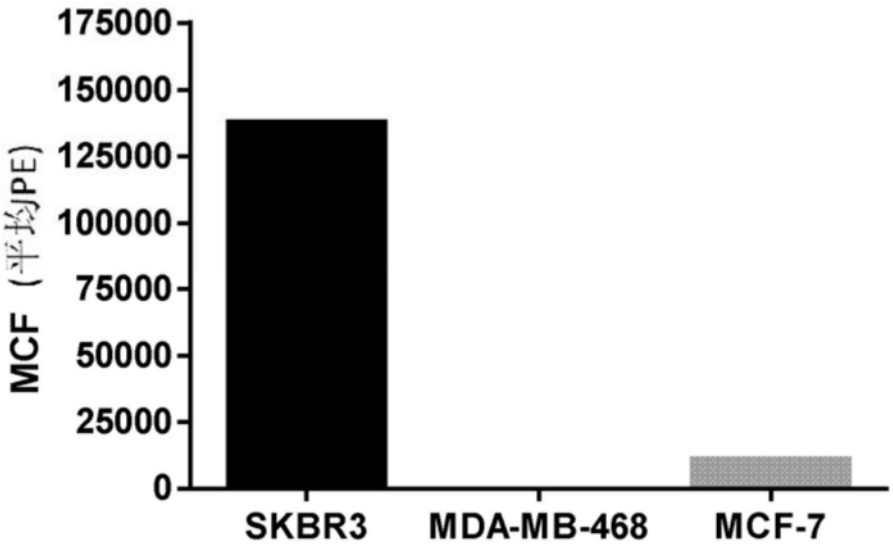

MCF (平均PE)
175000
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
SKBR3
MDA-MB-468
MCF-7

图15

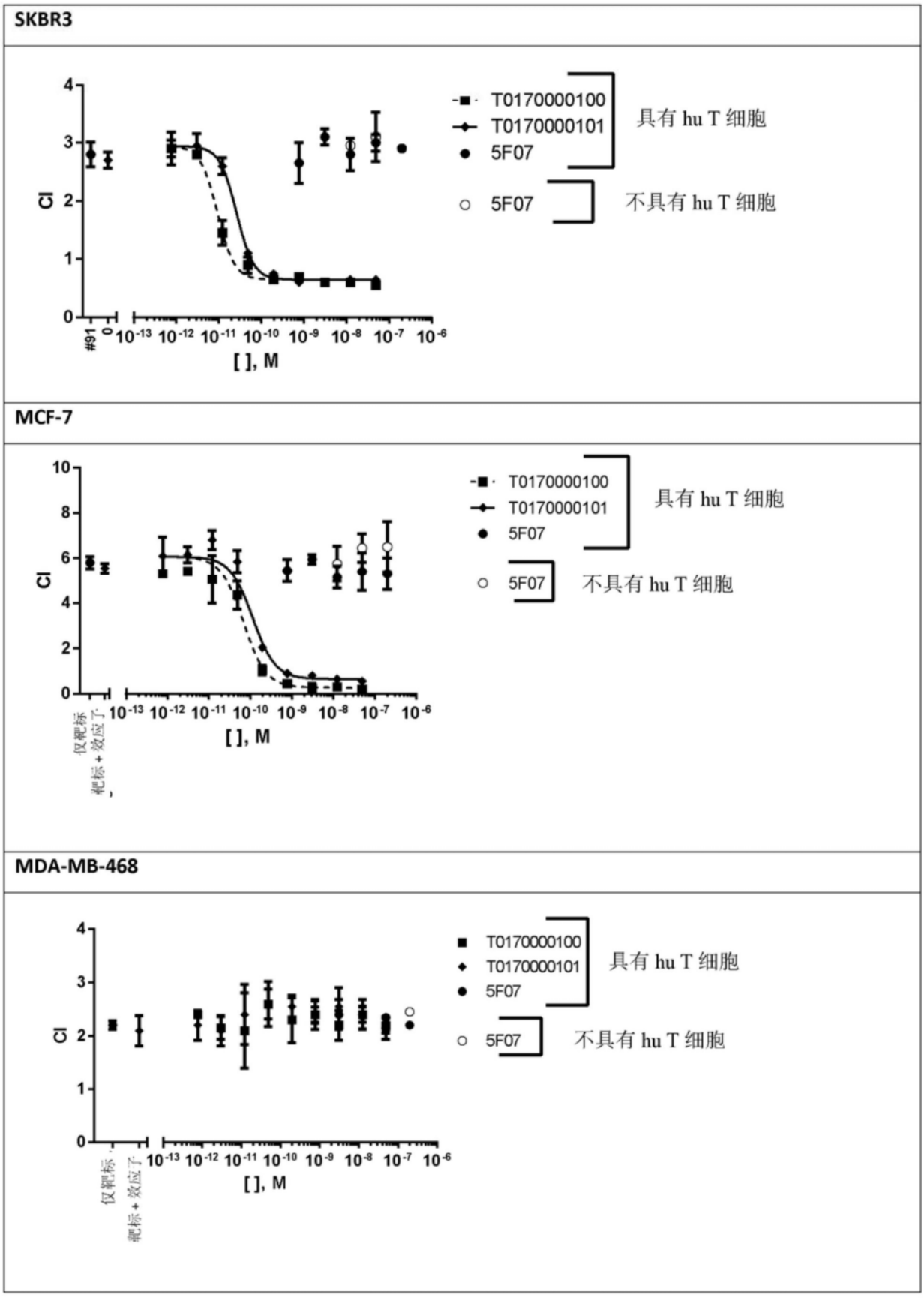

SKBR3
CI
[ ], M
#91
T0170000100
T0170000101
5F07
具有 hu T 细胞
5F07
不具有 hu T 细胞
MCF-7
CI
[ ], M
仅靶标
靶标 + 效应子
T0170000100
T0170000101
5F07
具有 hu T 细胞
5F07
不具有 hu T 细胞
MDA-MB-468
CI
[ ], M
仅靶标
靶标 + 效应子
T0170000100
T0170000101
5F07
具有 hu T 细胞
5F07
不具有 hu T 细胞

图16

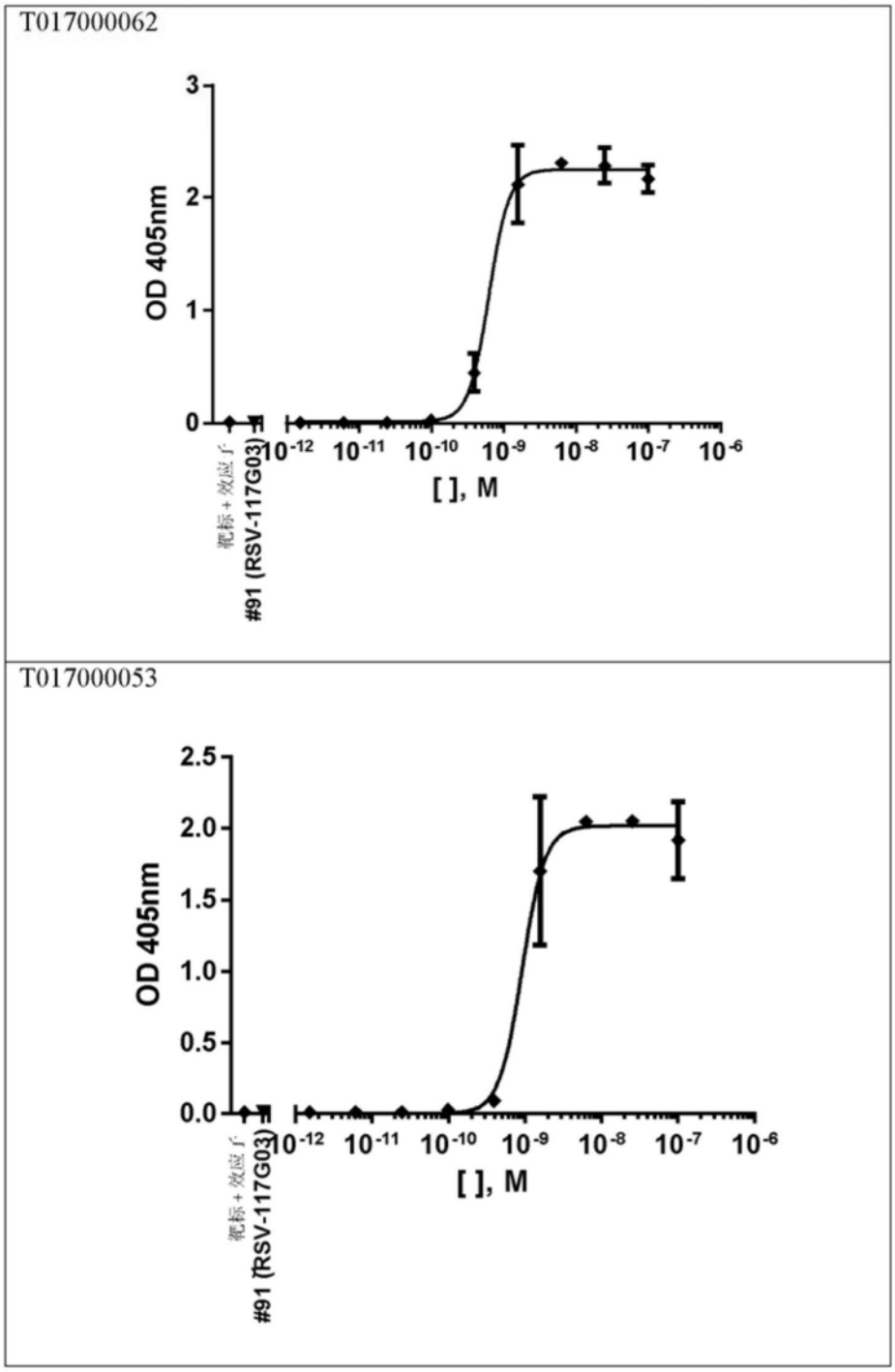

T017000062
OD 405nm
3
2
1
0
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[ ], M
靶标 + 效应子
#91 (RSV-117G03)
T017000053
OD 405nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[ ], M
靶标 + 效应子
#91 (RSV-117G03)

图17


治疗 i.v.
D0
D3
D18
照射
IP
hPBMCs
3x10E7
脾脏收集
用于 B 细胞定量(FACS)

图18

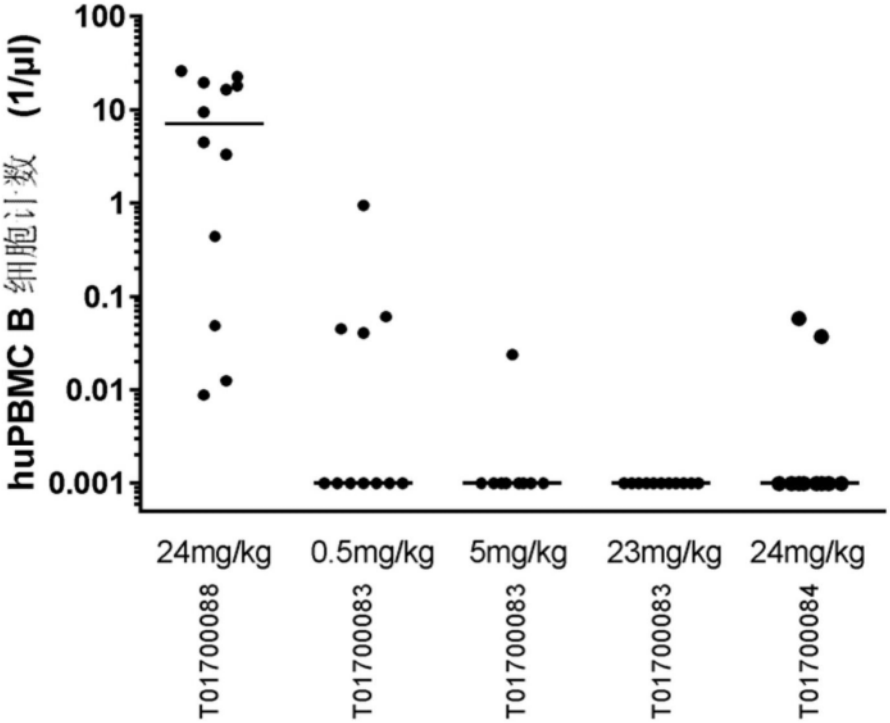

huPBMC B 细胞计数 (1/μl)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
24mg/kg
0.5mg/kg
5mg/kg
23mg/kg
24mg/kg
T01700088
T01700083
T01700083
T01700083
T01700084

图19

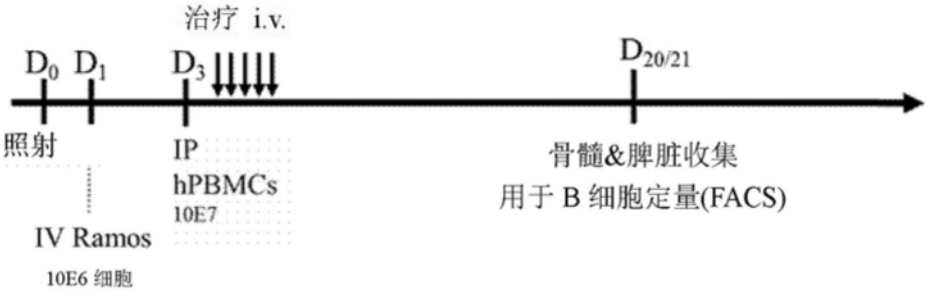
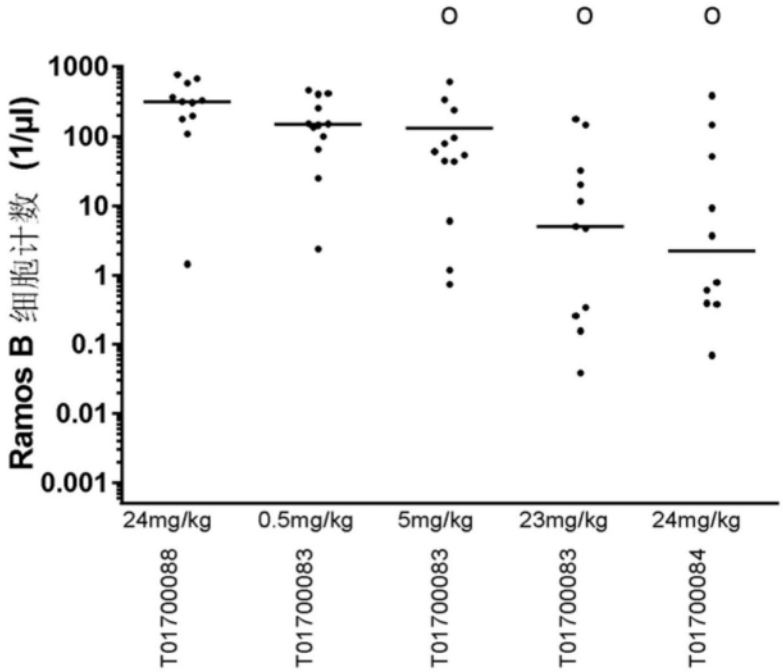

治疗 i.v.
D0
D1
D3
D20/21
照射
IP
hPBMCs
10E7
IV Ramos
10E6 细胞
骨髓&脾脏收集
用于 B 细胞定量(FACS)

图20

骨髓


Ramos B 细胞计数 (1/μl)
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
24mg/kg
0.5mg/kg
5mg/kg
23mg/kg
24mg/kg
T01700088
T01700083
T01700083
T01700083
T01700084

脾脏

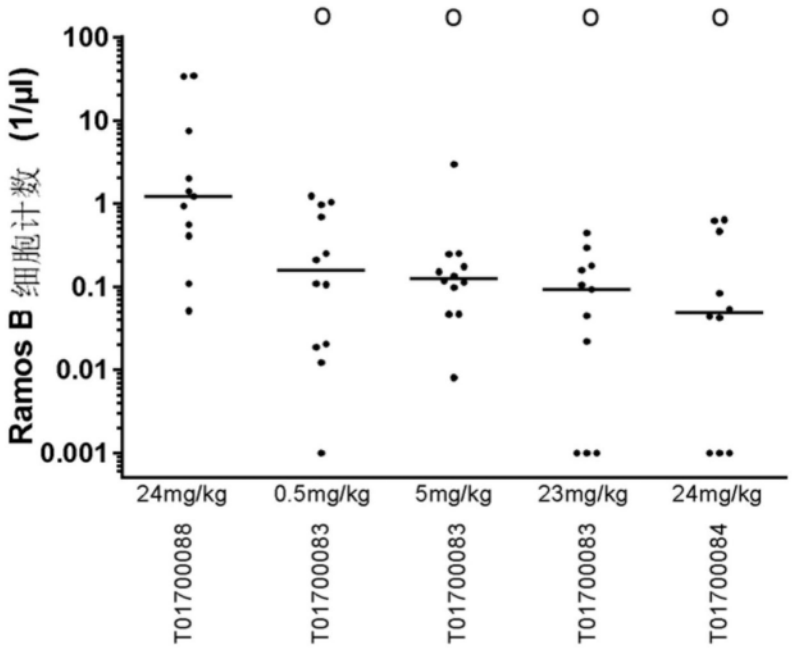
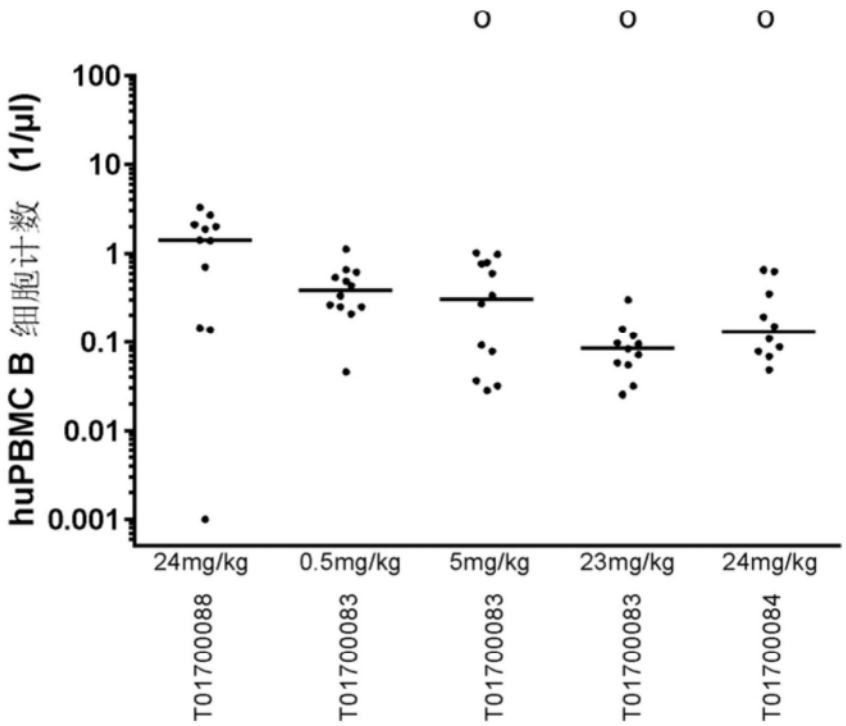

Ramos B 细胞计数 (1/μl)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
24mg/kg
0.5mg/kg
5mg/kg
23mg/kg
24mg/kg
T01700088
T01700083
T01700083
T01700083
T01700084

图21

骨髓


huPBMC B 细胞计数 (1/μl)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
24mg/kg
0.5mg/kg
5mg/kg
23mg/kg
24mg/kg
T01700088
T01700083
T01700083
T01700083
T01700084

脾脏

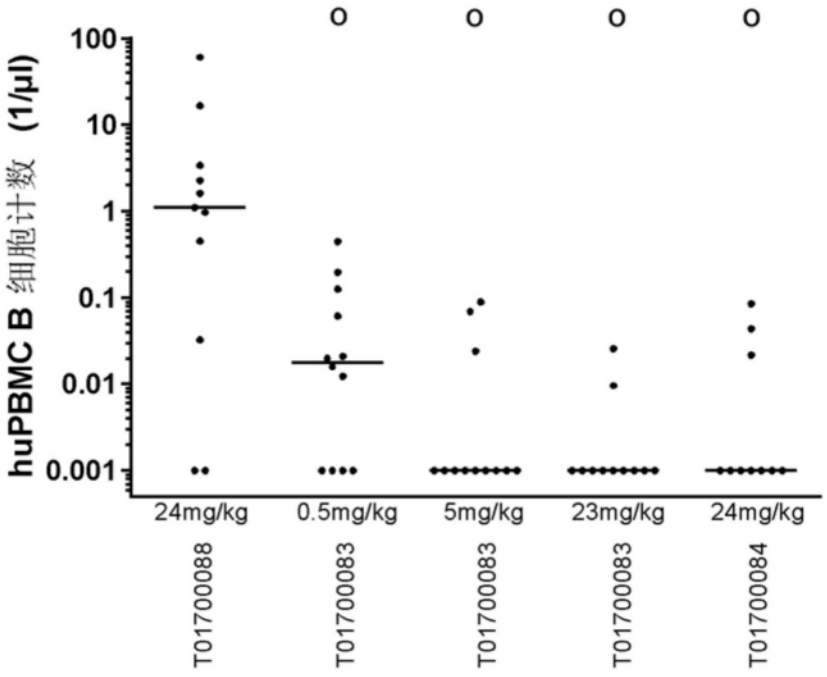
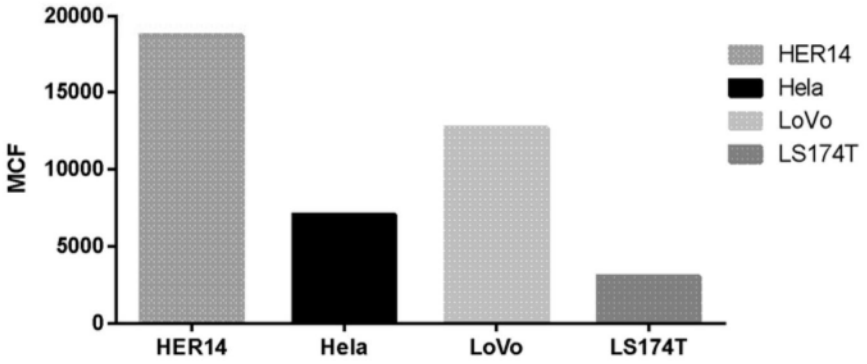

huPBMC B 细胞计数 (1/μl)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
24mg/kg
0.5mg/kg
5mg/kg
23mg/kg
24mg/kg
T01700088
T01700083
T01700083
T01700083
T01700084

图22

A


20000
15000
10000
5000
0
MCF
HER14
Hela
LoVo
LS174T
HER14
Hela
LoVo
LS174T

B

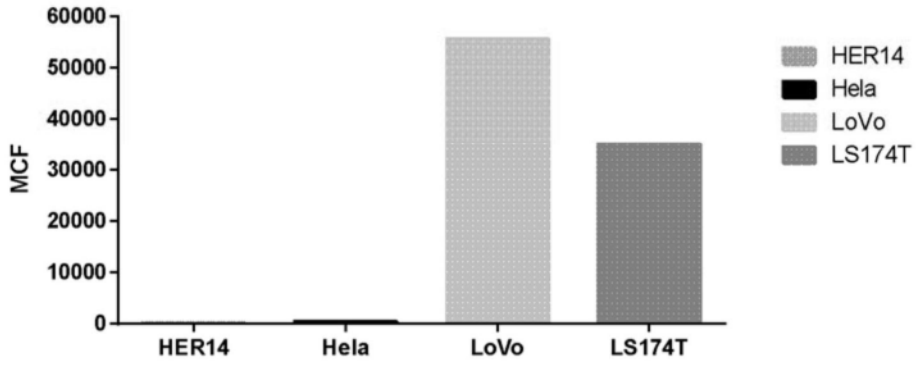

60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
MCF
HER14
Hela
LoVo
LS174T
HER14
Hela
LoVo
LS174T

图23