202302631

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202302631 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：111119065 (22)申請日： 中華民國 106 (2017) 年 03 月 08 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/18 (2006.01)* *C07K16/28 (2006.01)*
*C07K16/30 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
*A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2016/03/08 美國 62/305,092

(71)申請人：日商武田藥品工業股份有限公司 (日本) TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED (JP)
日本

(72)發明人：博伊爾勒 派翠克 BAEUERLE, PATRICK (DE)；杜布瑞基 羅伯特 DUBRIDGE, ROBERT B. (US)；韋舍 霍爾格 WESCHE, HOLGER (DE)；伊伏寧 盧克 EVNIN, LUKE (US)；蓋諾 吉恩瑪麗 GUENOT, JEANMARIE (US)；潘卡爾 阿南德 PANCHAL, ANAND (IN)；維諾格拉多 瑪雅 VINOGRADOVA, MAIA (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：56 共 260 頁

(54)名稱

可誘導性結合蛋白和使用方法

(57)摘要

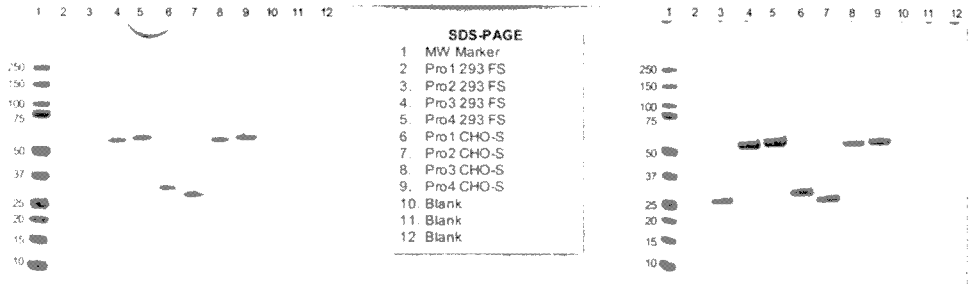
本發明提供經條件性活化之多肽構建體，該多肽構建體包含與 CD3 結合之經蛋白酶活化的結構域、至少一個半衰期延長結構域及二或更多個與一或多個靶抗原結合之結構域。亦提供該多肽構建體之醫藥組成物及用於製備該多肽構建體之核酸、重組表現載體和宿主細胞。亦揭示使用該揭示之多肽構建體以預防及/或治療疾病、病症和失調之方法。

Provided herein are conditionally activated polypeptide constructs comprising a protease-activated domain binding to CD3, at least one half-life extension domain, and two or more domains binding to one or more target antigens. Also provided are pharmaceutical compositions thereof, as well as nucleic acids, recombinant expression vectors and host cells for making such polypeptide constructs. Also disclosed are methods of using the disclosed polypeptide constructs in the prevention, and/or treatment diseases, conditions and disorders.

指定代表圖：

TW 202302631 A

第 1A 圖




第 1B 圖

| 批號 | 樣品描述 | 消光係數 | 濃度 (mg/mL) | 體積 (mL) | 總計 (mg) | 收穫體積 (mL) | 反算之力價 (mg/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BP-016-016-1 | Pro1 293 FS | 2.28 | 0.00 | 5 | 0.00 | 24.4 | 00.0 |
| BP-016-016-2 | Pro2 293 FS | 2.09 | 0.33 | 5 | 1.67 | 23. | 72.4 |
| BP-016-016-3 | Pro3 293 FS | 2.21 | 0.39 | 5 | 1.93 | 23.9 | 80.8 |
| BP-016-016-4 | Pro4 293 FS | 2.23 | 0.42 | 5 | 2.12 | 22.7 | 93.4 |
| BP-016-016-5 | Pro1 CHO-S | 2.28 | 0.32 | 5 | 1.62 | 21. | 77.3 |
| BP-016-016-6 | Pro2 CHO-S | 2.09 | 0.39 | 5 | 1.93 | 20.8 | 92.9 |
| BP-016-016-7 | Pro3 CHO-S | 2.21 | 0.31 | 5 | 1.55 | 20.8 | 74.4 |
| BP-016-016-8 | Pro4 CHO-S | 2.23 | 0.39 | 5 | 1.97 | 20.6 | 95.6 |

202302631

# 【發明摘要】

【中文發明名稱】

可誘導性結合蛋白和使用方法

【英文發明名稱】

INDUCIBLE BINDING PROTEINS AND METHODS OF USE

【中文】

本發明提供經條件性活化之多肽構建體，該多肽構建體包含與 CD3 結合之經蛋白酶活化的結構域、至少一個半衰期延長結構域及二或更多個與一或多個靶抗原結合之結構域。亦提供該多肽構建體之醫藥組成物及用於製備該多肽構建體之核酸、重組表現載體和宿主細胞。亦揭示使用該揭示之多肽構建體以預防及/或治療疾病、病症和失調之方法。

【英文】

Provided herein are conditionally activated polypeptide constructs comprising a protease-activated domain binding to CD3, at least one half-life extension domain, and two or more domains binding to one or more target antigens. Also provided are pharmaceutical compositions thereof, as well as nucleic acids, recombinant expression vectors and host cells for making such polypeptide constructs. Also disclosed are methods of using the disclosed polypeptide constructs in the prevention, and/or treatment diseases, conditions and disorders.

【指定代表圖】第 1A 和 1B 圖
【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

# 【發明說明書】

【中文發明名稱】

可誘導性結合蛋白和使用方法

【英文發明名稱】

INDUCIBLE BINDING PROTEINS AND METHODS OF USE

【技術領域】

[0001] 本發明關於可誘導性結合蛋白和使用方法。

【先前技術】

[0002] 在各種臨床設置中，選擇性破壞個別細胞或特定之細胞類型通常是合乎需要的。例如，癌症治療的主要目標為特異性破壞腫瘤細胞，同時留下儘可能完整且未受損之健康細胞和組織。一種該等方法係藉由誘導針對該腫瘤之免疫反應來使免疫效應子細胞(諸如天然殺手(NK)細胞或細胞毒性 T 淋巴細胞(CTL))攻擊和破壞腫瘤細胞。

[0003] 完整單株抗體(MAb)(其提供對腫瘤相關抗原優異的結合特異性及親和力)之使用已成功應用在癌症治療及診斷領域中。然而，完整 MAb 之大尺寸、其不良生物分佈及在血液池中之長持久性限制其臨床應用。例如，完整抗體在腫瘤區域內可能顯現出特異性累積。在生物分佈研究中，當精確調查該腫瘤時會注意到抗體分佈不均勻，在外周區域中具有原始積聚。由於腫瘤壞死，不均勻

之抗原分佈和增加之間質組織壓力，使用完整抗體構建體不可能到達腫瘤之中心部分。相反地，較小之抗體片段顯示出快速的腫瘤定位、更深入地滲透入腫瘤，還有相對快速地從血液中除去。

[0004] 在臨床應用方面，源自親本 MAb 之小結合結構域的單鏈片段(scFv)能提供較完整 MAb 更好之生物分佈，並且可更有效地靶向腫瘤細胞。單鏈片段可有效地從細菌經工程處理取得，然而，與其親本 mAb((C(c)，D)相比較，由於缺乏二價化合物經歷之強結合性，大部分經工程處理之 scFv 具有單價結構並顯示出在腫瘤之累積減少(例如在腫瘤細胞上之停留短暫)且特異性降低。

[0005] 不管 scFv 之有利性質，某些特性阻礙其在癌症化療中全面運用在臨床上。特別值得注意的是由於這些試劑靶向患病和健康組織二者共有的細胞表面受體，因而在患病與健康組織之間具有交叉反應性。具有提升之治療指數的 scFv 將在這些藥劑之臨床用途中提供顯著進展。本發明提供該等改善之 scFv 及彼等之製造和使用方法。本發明之改善的 scFv 藉由形成二聚體化合物而具有出人意外之克服單一單位所顯現之缺乏結合力的利益。

【發明內容】

[0006] 於各種實施態樣中，本發明提供由二部分組成之多肽。參考**第 53 圖**。於示例性實施態樣中，該多肽的二個區係藉由其大小在單鏈至較大之多肽結構域(其可

包括具有一或多個裂解位點之一或多個可裂解之連接子(CL)以允許該二個區在裂解時分離)之範圍內的 scFv 區域連接子(RL)連接。該多肽的二個區各自含有一或多個疾病靶向結構域(例如靶抗原結合結構域，其可為任何格式之單鏈結合結構域，包括 scFv、sdAb、細胞受體結構域、外源凝集素(lectin)及類似物)，該一或多個疾病靶向結構域係經由至少一個非可裂解之連接子($NCL^1$ 及 $NCL^2$)連接至靶向 T 細胞活化蛋白(αCD3、αCD16、αTCRα、αTCRβ、αCD28 及類似物)的經去活化之 scFv。該靶向 T 細胞活化結構域之 scFv 的 $V_H$ 或 $V_L$ 節段被去活化且各 scFv 之該二個節段係使用易於在患病組織中裂解之可裂解的連接子(CL1 和 CL2)連接。

[0007] 本文所描述之抗原結合多肽構建體提供數種超越傳統單株抗體及其他較小之雙特異性分子的治療優點。特別值得注意的是本發明之多肽構建體的條件性活化。該構建體基本上保持能夠結合其所欲之靶抗原，然而，該 CD3 信號傳導活性係取決於被編程在多肽本身之結構中的獨特多肽降解步驟。因此，與類似之抗體和抗體片段對非病變之正常組織的特異活性相比較，本發明之示例性多肽對非病變之正常組織的特異活性明顯降低。該多肽在其期望之作用位點“啟動”，但在其進展至此位點之期間保持“沉默”的能力為特異性結合多肽治療劑之領域中的顯著進步，此令製造容易設計且可表現出成為藥物之格式的強力、特殊治療劑是有希望的。

[0008] 一般而言，重組多肽藥物之有效性常受限於該多肽本身之固有、快速的藥代動力學，導致該多肽被快速清除。本發明之示例性抗原結合多肽所提供之額外益處為延長藥代動力學排除半衰期，因為其具有半衰期延長結構域(例如特異性結合 HSA 之結合結構域)。在此態樣中，本發明之示例性抗原結合多肽具有延長之血清停留半衰期。於一些實施態樣中，此基序之示例性多肽構建體之半衰期為約二、三、約五、約七、約十、約十二或約十四天。這有利地對比於其他結合蛋白，諸如 BiTE 或 DART 分子(其具有相對短得多之排除半衰期)。例如，該 BiTE CD19 x CD3 雙特異性 scFv-scFv 融合分子由於其排除半衰期短因此需要連續靜脈輸注(iv) 來遞送藥物。本發明之示例性抗原結合多肽之較長的固有半衰期可補救此缺點，從而允許增加治療潛力(諸如低劑量之醫藥調配劑)、減少週期性投予及/或併入本發明化合物之新穎醫藥組成物。

[0009] 本發明之示例性抗原結合多肽亦具有用於增強組織滲透和分佈及降低首渡腎清除率(first pass renal clearance)的最佳尺寸。由於腎一般係過濾出低於約 50kDa 之分子，在設計蛋白質治療劑時降低清除率之努力都集中在透過蛋白質融合、糖基化或加入聚乙二醇聚合物(即，PEG)來增加分子大小。然而，雖然增加蛋白質治療劑之大小可防止腎清除，但是較大的尺寸亦阻止該分子滲透入靶組織中。本文所描述之示例性抗原結合多肽藉由與白蛋白結合來避免腎清除，此方法將防止快速腎清除，同時亦具

有允許組織滲透和分佈，及最佳效力之小尺寸。於各種實施態樣中，該半衰期延長結構域被置於分子中之藉由可裂解之連接子而與治療活性組分分開的位置處。因此，例如，當到達期望之靶的(在此，試劑裂解該連接子，例如蛋白酶、酯酶、還原性或氧化性微環境)時，該半衰期延長結構域從治療活性組分裂解，減少該治療組分之尺寸並促進其滲透入組織中，或由細胞攝取。於其他實施態樣中，該半衰期延長結構域將被置於該抗原結合結構域與活性抗 CD3 結構域之間。

[0010] 因此，於一示例性實施態樣中，本發明提供針對 CD3 抗原之單鏈 scFv 多肽。該 scFv 多肽包含透過可裂解之 scFv 連接子連接的第一 scFv 結構域及第二 scFv 結構域。該第一 scFv 結構域包含透過第一可裂解之 scFv 連接子部分接合之第一 $V_H^1$ 結構域和第一 $V_L^1$ 結構域。該 $V_L$ 或 $V_H$ 中一者為如本文中所定義之無活性(即，$VL^1i$、$VH^1i$)。該第一 $V_H$ 結構域與該第一 $V_L$ 結構域交互作用以形成第一 scFv，然而，由於該無活性同源物，該 scFv 不會特異性結合 CD3。該第一 scFv 連接子部分(例如 CL1)包含介於該第一 $V_H^1$ 結構域與第一 $V_L^1$ 結構域之間的第一蛋白酶裂解位點。當蛋白酶在該蛋白酶裂解位點裂解該第一 scFv 連接子時，該無活性 $V_Hi$ 或無活性 $V_Li$ 結構域與其 $V_L$ 或 $V_H$ 結合夥伴分開，然後它們再與其活性同源物配對，允許經正確配對之抗 CD3 結構域形成並與該 CD3 抗原結合。該靶抗原結合結構域經由連接子連接該 $V_H/V_L$ 對

之活性同源物。

[0011] 於一示例性實施態樣中，該第一 scFv 結構域係透過可選擇地包含第二裂解位點(例如蛋白酶裂解位點)之第一連接子部分與第二 scFv 結構域接合。該第二 scFv 結構域之結構很像該第一結構域且包含經由第二 scFv 連接子部分接合之第二 $V_H$ 結構域和第二 $V_L$ 結構域。該第二 scFv 連接子部分可選擇地包含介於該第二 $V_H$ 結構域與第二 $V_L$ 結構域之間的第三蛋白酶裂解位點。該第二 $V_H$ 結構域與該第二 $V_L$ 結構域交互作用以形成第二 $V_H/V_L$ 對。如同上述之第一 $V_H/V_L$ 對，該第二 $V_H$ 結構域和該第二 $V_L$ 結構域中一者無活性，致使該第二 scFv 結構域不會特異性結合該 CD3 抗原，該介於第一與第二 scFv 結合結構域之間的複合物亦不會。該第二 scFv 結構域係透過第二結構域連接子與第二靶抗原結合結構域接合。此第二結構域連接子接合選自該第一 $V_H$ 結構域和該第一 $V_L$ 結構域之成員與第二靶抗原結合結構域。該靶抗原結合結構域係經由連接子連接該 $V_H/V_L$ 對之活性同源物。

[0012] 本發明之多肽構建體係在可裂解之連接子處被裂解並形成活性 CD3 結合結構域，此活性 CD3 結合結構域在展現 CD3 抗原之細胞的存在下與 CD3 抗原結合。類似地，該靶抗原結合結構域與靶抗原結合。

[0013] 於示例性實施態樣中，本發明提供具有單一 scFv 結構域之針對 CD3 抗原的單鏈 scFv 多肽。該 scFv 多肽包含第一 scFv 結構域，該第一 scFv 結構域包含第一

$V_H$結構域和第一 $V_L$結構域，該第一 VH 結構域和該第一 $V_L$結構域係透過第一 scFv 連接子部分接合。該第一 scFv 連接子部分包含介於該第一 $V_H$結構域與該第一 $V_L$結構域之間的第一裂解位點，例如蛋白酶裂解位點。該第一 $V_H$結構域與該第一 $V_L$ 結構域交互作用以形成第一 $V_H/V_L$對，其中該第一 $V_H$結構域和該第一 $V_L$結構域中一者無活性。因此，該第一 scFv 結構域不能特異性結合該 CD3 抗原。該第一 scFv 多肽透過第一結構域連接子部分與第一靶抗原結合結構域接合。該第一結構域連接子接合選自第一 $V_H$結構域和第一 $V_L$結構域之成員與第一靶抗原結合結構域。該第一靶抗原結合結構域未連接至無活性之 $V_L$ 或無活性之 $V_H$。

[0014] 於示例性之實施態樣中，本發明提供一對上述之單一結構域 scFv 構建體。該構建體對係透過其成對之 CD3 結合結構域協同結合 CD3 抗原。該構建體對之個別 scFv 分子與成對之 CD3 位點的 CD3 抗原的結合作用可藉由該構建體對之各成員的靶抗原結構域與其同源抗原結合而被加速、增強及/或驅動。

[0015] 於一些實施態樣中，提供包含單一多肽鏈之抗原結合多肽，該單一多肽鏈包含二或更多個可逆地無活性之 CD3 結合結構域、二或更多個靶抗原結合結構域、可選擇之一或多個半衰期延長結構域及一或多個蛋白酶裂解結構域；其中，當該蛋白酶裂解結構域被蛋白酶裂解時，該 CD3 結合結構域變得活躍並與 CD3 結合。於一示

例性實施態樣中，在蛋白酶裂解位點被裂解之後，該 CD3 結合結構域變得活躍並能與 CD3 結合。於各種實施態樣中，該 CD3 結合結構域在該蛋白酶裂解位點裂解後變得活躍，並藉由靶抗原結合結構域與靶抗原結合。於一些實施態樣中，與 CD3 結合會活化細胞，該 T 細胞再破壞患病(例如癌性)細胞。

[0016] 於一示例性實施態樣中，本發明之多肽構建體包括 scFv，該 scFv 包含選擇性地結合 CD3 之結合結構域。該 CD3 結合結構域包括能夠選擇性地結合 CD3 之 $V_H$ 或 $V_L$。此 $V_H$ 或 $V_L$ 係分別與 $V_L$ 或 $V_H$ 配對。

[0017] 本文中藉由參考條件性 CD3 結合多肽來說明本發明之多肽，該條件性 CD3 結合多肽包含 scFv，該 scFv 合併 CD3 結合結構域和蛋白酶裂解位點，當被蛋白酶裂解時，該蛋白酶裂解位點之無活性 $V_L$ 或 $V_H$ 分別與其成對之活性 $V_H$ 或 $V_L$ 分開，活化該 CD3 結合結構域並允許其(彼等)與 CD3 結合。代表性 scFv 包含經由多肽連接子連接之 $V_H$ 結構域和 $V_L$ 結構域，該多肽連接子包含蛋白酶裂解位點。該 CD3 結合結構域為可逆地無活性，因此，其基本上無法與 CD3 結合，直到該蛋白酶裂解位點被蛋白酶裂解。能夠裂解該蛋白酶裂解位點之代表性蛋白酶為由癌細胞表現或侷限在該腫瘤微環境中之蛋白酶。於一示例性實施態樣中，本發明之多肽進一步包含至少一個靶抗原結合位點。代表性靶抗原為在癌細胞表面上發現之抗原，例如 EGFR。

[0018] 於一些實施態樣中，該蛋白酶裂解結構域係在靶抗原結合結構域與靶抗原結合之前被裂解。於一些實施態樣中，該蛋白酶裂解結構域係在靶抗原結合結構域與靶抗原結合之後被裂解。於一些實施態樣中，該多肽包括二或更多個靶抗原結合結構域。該二或更多個抗原結合結構域具有相同或不同之多肽序列。於各種實施態樣中，該二或更多個抗原結合結構域具有相同或不同之多肽序列且結合相同之靶抗原。於一示例性實施態樣中，該二或多個抗原結合結構域之多肽序列不同且該二或多個結構域結合相同之靶抗原或不同之靶抗原。於一些實施態樣中，該二或更多個靶抗原結合結構域各自結合在相同細胞上之具有不同序列或結構的靶抗原。於一示例性實施態樣中，該二或更多個靶抗原結合結構域各自結合在各二或更多個細胞上之具有不同序列的抗原。於各種實施態樣中，該二或更多個抗原結合結構域各自結合在各二或更多個細胞上之具有相同序列或不同序列的抗原。

[0019] 本文描述條件性結合抗原之結合多肽、彼之醫藥組成物和用於製造該等抗原結合多肽之核酸、重組表現載體和宿主細胞，及使用本發明之抗原結合多肽來治療疾病、失調或病症的方法。

[0020] 本發明之其他目的、實施態樣和優點可從下文之詳細描述中顯明。

【圖式簡單說明】

[0021] 本發明之新穎特性具體闡述於所附之申請專利範圍中。藉由參考下文中闡述說明性實施態樣(其中採用本發明之原理)之詳細描述將可更充分地理解本發明之特性和優點，附圖如下：

[0022] **第 1A 圖**顯示經瞬時表現之 Prodent 1 至 4 的 SDS-PAGE 變化形廓。

[0023] **第 1B 圖**顯示透析後反算之 Pro1-4 表現水準。

[0024] **第 2A 圖**顯示經純化之蛋白質的分析性尺寸排阻色層分析法。

[0025] **第 2B 圖**顯示經純化之蛋白質的分析性尺寸排阻色層分析法。

[0026] **第 2C 圖**顯示經純化之蛋白質的分析性尺寸排阻色層分析法。

[0027] **第 2D 圖**顯示經純化之蛋白質的分析性尺寸排阻色層分析法。

[0028] **第 3 圖**顯示 Pro5：Prodent 平台 2。

[0029] **第 4 圖**顯示 Pro6 和 Pro7：雙功能夥伴。**第 4 圖**證實將 EK 裂解位點插入抗 CD3scFv 中之 $V_H$ 或 $V_L$ 的 CDR2 中會終止 CD3 結合及活性。

[0030] **第 5 圖**顯示 Pro8：陽性對照。**第 5 圖**證實在 scFv 連接子中插入 EK 位點不會干擾 scFv 折疊及 CD3 結合。

[0031] **第 6 圖**顯示 Prodent 5 至 8-在 Expi293 中之瞬

時表現。

[0032] **第 7 圖**為證明經純化之 Prodent 5 至 8 在 SEC 上顯示出單體變化形廓之數據。**第 7A 圖**顯示 Pro5-G8：(I2ci)×2：D12:: His6。

[0033] **第 7 圖**為證明經純化之 Prodent 5 至 8 在 SEC 上顯示出單體變化形廓之數據。**第 7B 圖**顯示 Pro6-G8(sdAb)：I2Ci:: His6。

[0034] **第 7 圖**顯示經純化之 Prodent 5 至 8 在 SEC 上顯示出單體變化形廓。**第 7C 圖**顯示 Pro7-I2Ci：D12(sdAb):: His6。

[0035] **第 7 圖**為證明經純化之 Prodent 5 至 8 在 SEC 上顯示出單體變化形廓之數據。**第 7D 圖**顯示 Pro8-G8(sdAb)：I2Cflag:: His6。

[0036] **第 8 圖**顯示在 SDS-PAGE 上之經 Ni-excel 純化的平台 2 蛋白。

[0037] **第 9 圖**顯示四種類型之結合/活性分析。

[0038] **第 10A 圖**顯示平台 2 Prodent 與 hEGFR 結合。**第 10A 圖**顯示 Prodent 與 EGFR 結合-ELISA(rhEGFR-Fc，抗 His-HRP 檢測)。

[0039] **第 10B 圖**顯示平台 2 Prodent 與 hEGFR 結合。**第 10B 圖**顯示 Prodent 與 EGFR 結合-FACS OVCAR8 抗 His FITC 檢測。

[0040] **第 11A 圖**顯示無活性之平台 2 Prodent 不與 CD3 結合。**第 11A 圖**顯示 Prodent 與 CD3 結合-ELISA

(cyCD3-Flag-Fc，抗 His-HRP 檢測)。

[0041] **第 11B 圖**顯示無活性之平台 2 Prodent 不與 CD3 結合。**第 11A 圖**顯示 Prodent 與 CD3 結合-使用 FACS jurkat 抗 His-FITC 檢測來測定。

[0042] **第 12 圖**顯示 Pro6 和 Pro7：藉由蛋白酶裂解活化 CD3 結合作用。

[0043] **第 13 圖**顯示藉由重組腸激酶裂解 Prodent。

[0044] **第 14A 圖**顯示用於測試在 EK 裂解後，Prodent 與 CD3 結合作用之 ELISA 分析格式(夾心 ELISA)。

[0045] **第 14B 圖**顯示在 EK 裂解後，Pro6 不與 CD3 結合(夾心 ELISA)。**第 14B 圖**顯示 Pro6 與 rEGFR:: huFC 結合，以生物素-CDCD3:: Flag:: huFC，SAV-HRP 檢測。

[0046] **第 14C 圖**顯示在 EK 裂解後，Pro7 不與 CD3 結合(夾心 ELISA)。**第 14C 圖**顯示 Pro7 與 rEGFR:: huFC 結合，以生物素-cyCD3:: Flag:: huFC，SAV-HRP 檢測。

[0047] **第 14D 圖**顯示在 EK 裂解後，Pro6+Pro7 協同與 CD3 結合(夾心 ELISA)。**第 14D 圖**顯示 Pro6+Pro7 與 rEGFR:: huFC 結合，以生物素- cyCD3:: Flag:: huFC，SAV-HRP 檢測。

[0048] **第 14E 圖**顯示在 EK 裂解後，Pro6+Pro7 協同與 CD3 結合(夾心 ELISA)。

[0049] **第 15A 圖**顯示 FACS 分析格式，其測試在 EK 裂解後，與 EGFR 表現細胞之表面上的 CD3 結合(夾心

FACS)。

[0050] **第 15B 圖**顯示在 EK 裂解後，Pro6 不與 CD3 結合(夾心 FACS)。**第 15B 圖**顯示 EK 分解與 OVCAR-8 結合之 Pro6，以 A488-cyCD3:: Flag:: hFC 檢測。

[0051] **第 15C 圖**顯示在 EK 裂解後，Pro7 不與 CD3 結合(夾心 FACS)。**第 15C 圖**顯示 EK 分解與 OVCAR-8 結合之 Pro7，以 A488-cyCD3:: Flag:: hFC 檢測。

[0052] **第 15D 圖**顯示在 EK 裂解後，Pro6+Pro7 協同與 CD3 結合(夾心 FACS)。**第 15D 圖**顯示 EK 分解與 OVCAR-8 結合之 Pro6+Pro7，以 A488-cyCD3:: Flag:: huFC 檢測。

[0053] **第 15E 圖**顯示在 EK 裂解後，Pro6+Pro7 協同與 CD3 結合(夾心 FACS)。

[0054] **第 16 圖**顯示在藉由 EK 進行蛋白水解裂解後，Pro5 與 CD3 之結合作用被活化。**第 16 圖**顯示 EK 分解與 OVCAR-8 結合之 Pro5，以 A488-cyCD3:: Flag:: huFC 檢測。

[0055] **第 17 圖**顯示 Pro8：對照分子。**第 17 圖**證實在 scFv 連接子中插入 EK 位點不會干擾 scFv 折疊及 CD3 結合作用。

[0056] **第 18A 圖**顯示 Pro8：對照分子。**第 18A 圖**證實在 scFv 連接子中插入 EK 位點不會干擾 scFv 折疊和 CD3 結合作用。**第 18A 圖**顯示 Pro8 與 rhEGFR:: hFC 結合，以生物素-cyCD3:: Flag:: huFC，SAV-HRP 檢測。

[0057] **第 18B 圖**顯示 Pro8：對照分子。**第 18B 圖**證實在 scFv 連接子中插入 EK 位點不會干擾 scFv 折疊和 CD3 結合作用。**第 18B 圖**顯示 EK 分解與 OVCAR-8 結合之 Pro8，以 A488-cyCD3:: flag:: hFC 檢測。

[0058] **第 18C 圖**顯示 Pro8：陽性對照分子。

[0059] **第 19 圖**顯示 EK 裂解與 Pro6+Pro7 協同活化 T 細胞殺死 EGFR +靶細胞，但與 Pro8 協同減少殺死 EGFR +靶細胞。**第 19A 圖**顯示 Pro6 之結果。

[0060] **第 19 圖**顯示 EK 裂解與 Pro6+Pro7 協同活化 T 細胞殺死 EGFR +靶細胞，但與 Pro8 協同減少殺死 EGFR +靶細胞。**第 19B 圖**顯示 Pro7 之結果。

[0061] **第 19 圖**顯示 EK 裂解與 Pro6+Pro7 協同活化 T 細胞殺死 EGFR +靶細胞，但與 Pro8 協同減少殺死 EGFR +靶細胞。**第 19C 圖**顯示 Pro6+Pro7 之結果。

[0062] **第 19 圖**顯示 EK 裂解與 Pro6+Pro7 協同活化 T 細胞殺死 EGFR +靶細胞，但與 Pro8 協同減少殺死 EGFR +靶細胞。**第 19D 圖**顯示 Pro8 之結果。

[0063] **第 20A 圖**顯示 Pro25。

[0064] **第 20B 圖**顯示 Pro26。

[0065] **第 20C 圖**顯示 Pro27。

[0066] **第 21 圖**顯示活性 CD3 結合結構域之產生係取決於二個臂結合靶的。GFP 不表現在 OvCar8 細胞表面。**第 21A 圖**顯示 Pro6+Pro7 與 rhEGFR 結合，以 b-cyCD3:: Flag:: hFC，SAV-HRP 檢測。

[0067] **第 21 圖**顯示活性 CD3 結合結構域之產生係取決於二個臂結合靶的。GFP 不表現在 OvCar8 細胞表面。**第 21B 圖**顯示 Pro6+Pro9 與 rhEGFR 結合，以 b-cyCD4::Flag:: hFC，SAV-HRP 檢測。

[0068] **第 21 圖**顯示活性 CD3 結合結構域之產生係取決於二個臂結合靶的。GFP 不表現在 OvCar8 細胞表面。**第 21C 圖**顯示 Pro6+Pro26 與 rhEGFR 結合，以 b-cyCD3::Flag:: hFC，SAV-HRP 檢測。

[0069] **第 21 圖**顯示活性 CD3 結合結構域之產生係取決於二個臂結合靶的。GFP 不表現在 OvCar8 細胞表面。**第 21D 圖**顯示 Pro6+Pro27 與 rhEGFR 結合，以 b-cyCD3::Flag:: hFC，SAV-HRP 檢測。

[0070] **第 21 圖**顯示活性 CD3 結合結構域之產生係取決於二個臂結合靶的。GFP 不表現在 OvCar8 細胞表面。**第 21E 圖**顯示 Pro7+Pro25 與 rhEGFR 結合，以 b-cyCD3::Flag:: hFC，SAV-HRP 檢測。

[0071] **第 21 圖**顯示活性 CD3 結合結構域之產生係取決於二個臂結合靶的。GFP 不表現在 OvCar8 細胞表面。**第 21F 圖**顯示 Pro9+Pro25 與 rhEGFR 結合，以 b-cyCD3::Flag:: huFC，SAV-HRP 檢測。

[0072] **第 22 圖**顯示具有間質蛋白酶(matriptase)(M)裂解位點之 Pro8 和在親本 Pro8 裂解後，經裂解之 Pro8 與癌細胞交互作用的產物。**第 22 圖**證明該 αCD3scFv 連接子可經修飾以併入不同長度和蛋白酶特異性。

[0073] **第 23A 圖**顯示在 EK 裂解之前和之後，來自 Pro8 與 rhEGFR:: hFC 結合之夾心 ELISA 的數據，其係以生物素-cyCD3E:: Flag:: huFC，SAV-HRP 檢測。

[0074] **第 23B 圖**顯示在間質蛋白酶裂解之前和之後，來自 Pro8 MS(14aa 連接子)與 rhEGFR:: hFC 結合之夾心 ELISA 的數據，其係以生物素-cyCD3E:: Flag:: huFC，SAV-HRP 檢測。

[0075] **第 23C 圖**顯示在 ST14 裂解之前和之後，來自 Pro8 ML(24aa 連接子) 與 rhEGFR:: hFC 結合之夾心 ELISA 的數據，其係以生物素-cyCD3E:: Flag:: huFC，SAV-HRP 檢測。

[0076] **第 24A 圖**為藉由 EK 裂解之前和之後，來自 Pro8 與 OVCAR8 結合之 FACS 數據，其係以 AF488-cyCD3:: Flag:: hFC 檢測。

[0077] **第 24B 圖**為藉由 ST14 裂解之前和之後，來自 Pro8 MS(14aa 連接子)與 OVCAR8 結合之 FACS 數據，其係以 AF488-cyCD3:: Flag:: hFC 檢測。

[0078] **第 24C 圖**為藉由 ST14 裂解之前和之後，來自 Pro8 ML(24aa 連接子)與 OVCAR8 結合之 FACS 數據，其係以 AF488-cyCD3:: Flag:: hFC 檢測。

[0079] **第 25 圖**顯示另外之代表性 Prodent 示意圖。**第 25 圖**顯示具充分活性之 αCD3 scFvs I2C(Pro8，Pro11)和 OKT3(Pro15)。

[0080] **第 26 圖**顯示代表性之不完全 αCD3 Prodent 組

合，缺乏活性 CD3 結合位點。

[0081] **第 27A 圖**顯示 Pro6+Pro10 與 rhEGFR 結合，以生物素-cyCD3:: Flag:: FC，SAV-HRP 檢測。

[0082] **第 27B 圖**顯示 Pro6+Pro14 與 rhEGFR 結合，以生物素-cyCD3:: Flag:: FC，SAV-HRP 檢測。

[0083] **第 27C 圖**顯示 Pro7+Pro9 與 rhEGFR 結合，以生物素-cyCD3:: Flag:: FC，SAV-HRP 檢測。

[0084] **第 27D 圖**顯示 Pro7+Pro12 與 rhEGFR 結合，以生物素-cyCD3:: Flag:: FC，SAV-HRP 檢測。

[0085] **第 27E 圖**顯示 Pro9+Pro12 與 rhEGFR 結合，以生物素-cyCD3:: Flag:: FC，SAV-HRP 檢測。

[0086] **第 27F 圖**顯示 Pro10+Pro14 與 rhEGFR 結合，以生物素-cyCD3:: Flag:: FC，SAV-HRP 檢測。

[0087] **第 28 圖**顯示在 N 端至 C 端靶向結構域位置中具有變化之代表性 Pro 結構和 Pro 結構域取向對 CD3 結合之影響。

[0088] **第 29 圖**顯示 C 端相對於 N 端靶的結合結構域具有類似活性。**第 29A 圖**顯示來自 Pro6+Pro9 與 OVCAR8 結合之 FACS 數據。

[0089] **第 29 圖**顯示 C 端相對於 N 端靶的結合結構域具有類似活性。**第 29B 圖**顯示 EK 分解 Pro6+Pro7 與 OVCAR-8 之結合，以 A488-cyCD3:: Flag:: huFC 檢測。

[0090] **第 30 圖**顯示用於探測單特異性結構域相對於雙靶向結構域之效果的代表性 Pro 結構。

[0091] **第 31 圖.**以必須結合單獨之靶分子的 sdAb 進行雙重靶向是可行的。**第 31A 圖**顯示 Pro9+Pro14 與 OVCAR8 結合之 FACS 數據，以 AF488-cyCD3 檢測。

[0092] **第 31 圖.**以必須結合單獨之靶分子的 sdAb 進行雙重靶向是可行的。**第 31B 圖**顯示 EK 分解 Pro6+Pro7 與 OVCAR-8 之結合，以 AF488-cyCD3:: Flag:: huFC 檢測。

[0093] **第 32A 圖**顯示具有互補性 αCD3 結構域之代表性 Prodent 組合。

[0094] **第 32B 圖**顯示具有互補性 αCD3 結構域之代表性 Prodent 組合，即 Pro6+Pro9(單-順式+雙重-反式分子靶向)。

[0095] **第 32C 圖**顯示具有互補性 αCD3 結構域之代表性 Prodent 組合，即 Pro9+Pro14(雙重分子-僅反式靶向)。

[0096] **第 33A 圖**顯示 Pro6+Pro7 與 OVCAR8 結合之 FACS 數據，以 AF488-cyCD3 檢測。

[0097] **第 33B 圖**顯示 Pro9+Pro10 與 OVCAR8 結合之 FACS 數據，以 AF488-cyCD3 檢測。

[0098] **第 33C 圖**顯示 Pro12+Pro14 與 OVCAR8 結合之 FACS 數據，以 AF488-cyCD3 檢測。

[0099] **第 33D 圖**顯示 Pro7+Pro10 與 OVCAR8 結合之 FACS 數據，以 AF488-cyCD3 檢測。

[0100] **第 33E 圖**顯示 Pro6+Pro9 與 OVCAR8 結合之

FACS 數據，以 AF488-cyCD3 檢測。

[0101] **第 34A 圖**顯示來自 Pro6+Pro12 與 OVCAR8 結合之夾心 FACS(僅有反式結合)的數據，以 AF488-cyCD3 檢測。

[0102] **第 34B 圖**顯示來自 Pro7+Pro14 與 OVCAR8 結合之夾心 FACS(僅有反式結合)的數據，以 AF488-cyCD3 檢測。

[0103] **第 34C 圖**顯示來自 Pro9+Pro14 與 OVCAR8 結合之夾心 FACS(僅有反式結合)的數據，以 AF488-cyCD3 檢測。

[0104] **第 34D 圖**顯示來自 Pro10+Pro12 與 OVCAR8 結合之夾心 FACS(僅有反式結合)的數據，以 AF488-cyCD3 檢測。

[0105] **第 35A 圖**顯示 TDCC：順式+反式與僅有反式之活性相似。**第 35A 圖**顯示 TDCC，OVCAR8 LucB 與經裂解和未經裂解之 Prodent 順式結合。(Pro6+Pro7、Pro6+Pro9、Pro7+Pro10)。

[0106] **第 35B 圖**顯示 TDCC：順式+反式與僅有反式之活性相似。**第 35B 圖**顯示 TDCC，OVCAR8 LucB 與經裂解和未經裂解之 Prodent 反式結合(Pro9+Pro14；Pro6+Pro18)。

[0107] **第 36 圖**顯示 TDCC-陽性對照 Prodent 在 EK 裂解後失去活性：以經裂解和未經裂解之 Prodents 8、11、15 殺死 OVCAR8 LucB 細胞的 TDCC 數據。

[0108] **第 37 圖**顯示 EK-His6 在 OVCAR8-lux 細胞單峰中之穩定表現的染色為在未經轉染之細胞上的 EK 表現，而延長之曲線為以 EK 表現載體穩定轉染之細胞上之 EK 表現的染色。

[0109] **第 38 圖**顯示表現 EK 之 OVCAR8 細胞株(高、中和低度表現)。

[0110] **第 39 圖**顯示由表現 EK 之 OVCAR8 細胞以劑量依賴方式活化 Prodent。**第 39A 圖**顯示使用經標記之 cyCD3ε 檢測未經裂解之 Pro6+Pro9 與表現 EK 之 OVCAR-8 細胞株之結合。

[0111] **第 39 圖**顯示由表現 EK 之 OVCAR8 細胞以劑量依賴方式活化 Prodent。**第 39B 圖**顯示使用經螢光標記之 cyCD3ε 檢測未經裂解之 Pro6+Pro9 與表現 EK 之 OVCAR-8 細胞株結合之 FACS 數據。

[0112] **第 40A 圖**顯示藉由具有和不具有 EK 之 Pro6+Pro9 殺死 OVCAR8 細胞之 TDCC 數據。

[0113] **第 40B 圖**顯示具有和不具有 EK 之 Pro6+Pro9 殺死 EK 表現 OVCAR8 細胞株之 TDCC 數據。

[0114] **第 41A 圖**顯示用於鑑定 αCD3 $V_H$ 和 $V_L$ 中之去活化 CDR 變化的結構模型：αCD3e scFv 之同源性建模顯示使用 5fxc.pdb 之同源性模型 Swiss-Model；scFv-SM3，69%同一性 GMQE 0.77 QMEAN-1.11。

[0115] **第 41B 圖**顯示用於鑑定 αCD3 $V_H$ 和 $V_L$ 中之去活化 CDR 變化的結構模型：αCD3e scFv 之同源建模顯

示與 1xiw.pdb，人 CD3-e/d 二聚體 scFv 比對之同源性模型。

[0116] **第 42A 圖**顯示用於 CD3e 結合($V_H$ 結構域)之代表性序列和用於突變以形成與最接近之人種系序列對準之無活性變體的區。

[0117] **第 42B 圖**顯示在本發明之示例性 Prodent 中用於無活性變體 CD3e 結合($V_H$結構域)的代表性序列。

[0118] **第 43 圖**顯示用於 CD3e 結合($V_L$ 結構域)和用於突變以形成無活性變體之區，及用於形成與最接近之人種系序列對準之無活性變體之示例性胺基酸位點的代表性序列。

[0119] **第 44A 圖**顯示在用於結合之 octet 分析中所使用之示例性 Prodent。

[0120] **第 44B 圖**顯示所選定之 Prodent 的結合活性-octet 分析。

[0121] **第 45A 圖**顯示 Pro23-血清裂解成兩半，證明 Pro23 對藉由 EK 和凝血酶進行之裂解敏感。

[0122] **第 45B 圖**顯示 Pro24-腫瘤裂解成兩半，顯示 EK 活性蛋白酶裂解位點。

[0123] **第 46 圖**顯示來自 SDS PAGE 之數據，其顯示藉由 EK(2)、藉由 EK 和凝血酶(3)及僅有凝血酶(4)造成之 Pro23(1)裂解；藉由 EK(6)造成之 Pro24(5)裂解。

[0124] **第 47A 圖**顯示藉由經裂解和未經裂解之 Pro23 殺死 OVCAR8 之 TDCC 數據。

[0125] **第 47B 圖**顯示藉由經裂解和未經裂解之 Pro24 殺死 OVCAR8 之 TDCC 數據。

[0126] **第 48 圖**提供用於本發明之多肽構建體之代表性 scFv 和結構域連接子之序列及這些連接子裂解之數據。**第 48A 圖**顯示藉由 1nM MMP9、Dabcyl-Edans 受質之 MMP9 肽受質的裂解。**第 48B 圖**顯示小鼠血清中 MMP9 受質之裂解。**第 48C 圖**顯示人血清中 MMP9 受質之裂解。**第 48D 圖**顯示獼猴血清中之 MMP9 受質的裂解。

[0127] **第 49 圖**為用於本發明之多肽構建體中的代表性連接子之各種示例性多肽序列的列表。**第 49A 圖**顯示藉由 Meprin 1a 3nM 所進行之肽受質之裂解)。**第 49B 圖**顯示藉由 Meprin 1b 3nM 所進行之肽受質之裂解)。**第 49C 圖**顯示藉由 Meprin 1a 3nM 所進行之肽受質之裂解)。**第 49D 圖**顯示人血清中之肽受質的裂解。**第 49E 圖**顯示小鼠血清中之肽受質之裂解。**第 49F 圖**顯示獼猴血清中之肽受質之裂解。

[0128] **第 50 圖**為用於本發明之多肽構建體中之代表性連接子的各種示例性多肽序列的列表。**第 50A 圖**顯示藉由間質蛋白酶 ST14 所進行之肽受質之裂解。**第 50B 圖**顯示小鼠血清中之肽受質之裂解。**第 50C 圖**顯示人血清中之肽受質之裂解。**第 50D 圖**顯示獼猴血清中之肽受質之裂解。

[0129] **第 51 圖**顯示用於本發明之多肽構建體中之被血液蛋白酶裂解的示例性連接子序列。**第 51A 圖**顯示被凝血酶裂解之示例性肽受質。**第 51B 圖**顯示被弗林蛋白酶

(furin)裂解之肽受質。**第 51C 圖**顯示被嗜中性粒細胞彈性蛋白酶裂解之肽受質。

[0130] **第 52 圖**顯示用於本發明之多肽構建體中之被血清裂解的示例性連接子序列。**第 52A 圖**顯示人血清中之肽受質之裂解。**第 52B 圖**顯示小鼠血清中之肽受質之裂解。**第 52C 圖**顯示獼猴血清中之肽受質之裂解。

[0131] **第 53 圖**顯示本發明之示例性多肽構建體之組成部分的佈置彈性。

[0132] **第 53A 圖**顯示第一樣式，從 N 至 C 端讀取，其中第一靶抗原結合結構域(α-T1)係透過結構域連接子與第一 CD3 $V_L$ 結合結構域結合，該第一 CD3 $V_L$ 結合結構域反過來透過可裂解之結構域連接子(CL1)與第一無活性 CD3 $V_H$i 結合結構域結合。CL1 亦與第一半衰期延長結構域(HED)結合，該第一半衰期延長結構域透過結構域連接子與第二靶抗原結合結構域(α-T2)結合，該 α-T2 本身與第二 CD3 $V_H$ 結合結構域結合。該第二 CD3 $V_H$ 結合結構域係透過可裂解之結構域連接子(CL2)與無活性之第二 CD3 $V_L$ 結合結構域($V_L$i)結合，該無活性之第二 CD3 $V_L$ 結合結構域亦與第二半衰期延長結構域結合。該多肽之 C-端可選擇地包括具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個胺基酸之阻斷基團，例如 His6。

[0133] **第 53B 圖**顯示第二樣式，從 N 至 C 端讀取，其中第二靶抗原結合結構域(α-T2)與第一 CD3 $V_L$ 結合結構域結合，該第一 CD3 $V_L$ 結合結構域結合反過來透過可

裂解之結構域連接子(CL1)與第一無活性 CD3 $V_H$i 結合結構域結合。CD3 $V_H$i 亦與第一半衰期延長結構域結合，該第一半衰期延長結構域透過結構域連接子與第一靶抗原結合結構域(α-T1)結合，該第一靶抗原結合結構域本身與第二 CD3 $V_H$ 結合結構域結合。該第二 CD3 $V_H$ 結合結構域透過可裂解之連接子(CL2)與無活性之第二 CD3 $V_L$ 結合結構域($V_L$i)結合，該第二 CD3 $V_L$ 結合結構域亦與第二半衰期延長結構域結合。該多肽之 C-端可選擇地包括具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個胺基酸之阻斷基團，例如 His6。

[0134] **第 53C 圖**顯示第三樣式，從 N 至 C 端讀取，其中第一靶抗原結合結構域(α-T1)與第一 CD3 $V_H$ 結合結構域結合，該第一 CD3 $V_H$ 結合結構域反過來透過可裂解之結構域連接子(CL1)與第一無活性 CD3 $V_L$i 結合結構域結合。CD3 $V_L$i 亦與第一半衰期延長結構域結合，該第一半衰期延長結構域透過結構域連接子與第二靶抗原結合結構域(α-T2)結合，該第二靶抗原結合結構域本身與第二 CD3 $V_L$ 結合結構域結合。該第二 CD3 $V_L$ 結合結構域透過可裂解之連接子(CL2)與無活性之第二 CD3 $V_H$ 結合結構域($V_H$i)結合，該無活性之第二 CD3 $V_H$ 結合結構域亦與第二半衰期延長結構域結合。該多肽之 C-端可選擇地包括具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個胺基酸之阻斷基團，例如 His6。

[0135] **第 53D 圖**顯示第四樣式，從 N 至 C 端讀取，

其中第二靶抗原結合結構域(α-T2)與第一 CD3 $V_H$ 結合結構域結合，該第一 CD3 $V_H$ 結合結構域反過來透過可裂解之結構域連接子(CL1)與第一無活性 CD3 $V_L$i 結合結構域結合。CD3 $V_L$i 亦與第一半衰期延長結構域結合，該第一半衰期延長結構域透過結構域連接子與第一靶抗原結合(α-T1)，該 α-T1 本身與第二 CD3 $V_L$ 結合結構域結合。該第二 CD3 $V_H$ 結合結構域透過可裂解之連接子(CL2)與無活性之第二 CD3 $V_H$ 結合結構域($V_H$i)結合，該無活性之第二 CD3 $V_H$ 結合結構域亦與第二半衰期延長結構域結合。該多肽之 C-端可選擇地包括具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個胺基酸之阻斷基團，例如 His6。

[0136] **第 53E 圖**顯示第五樣式，從 N 至 C 端讀取，其中第一半衰期延長結構域連接無活性之第一 CD3 $V_H$ 結合結構域($V_H$i)，且該無活性之第一 CD3 $V_H$ 結合結構域透過第一可裂解之連接子(CL1)與第一 CD3 $V_L$ 結合結構域結合，該第一 CD3 $V_L$ 結合結構域連接第一靶抗原結合結構域(α-T1)。該第一靶抗原結合結構域係透過結構域連接子連接第二半衰期延長結構域，於第二半衰期延長結構域係與第二 CD3 $V_L$ 結合結構域($V_L$i)結合，該第二 CD3 $V_L$ 結合結構域($V_L$i)無活性且透過第二可裂解之結構域連接子(CL2)與第二 CD3 $V_H$ 結構域結合，該第二 CD3 $V_H$ 結構域本身與第二靶抗原結合結構域(α-T2)結合。該多肽之 C-端可選擇地包括具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個胺基酸之阻斷基團，例如 His6。

[0137] **第 53F 圖**顯示本發明之多肽構建體之示例性樣式，從 N 至 C 端讀取，其中第一半衰期延長結構域連接無活性之第一 CD3 $V_H$ 結合結構域($V_H$i)，該無活性之第一 CD3 $V_H$ 結合結構域透過第一可裂解之連接子(CL1)與第一 CD3 $V_L$ 結合結構域結合，該第一 CD3 $V_L$ 結合結構域連接第二靶抗原結合結構域(α-T2)。該第二靶抗原結合結構域透過結構域連接子連接第二半衰期延長結構域，該第二半衰期延長結構域連接無活性之第二 CD3 $V_L$ 結合結構域($V_L$i)，該無活性之第二 CD3 $V_L$ 結合結構域透過第二可裂解之結構域連接子(CL2)與第二 CD3 $V_H$ 結構域結合，該第二 CD3 $V_H$ 結構域本身與第一靶抗原結合結構域(α-T1)結合。該多肽之 C-端可選擇地包括具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個胺基酸之阻斷基團，例如 His6。

[0138] **第 53G 圖**顯示本發明之多肽構建體之第七示例性樣式，從 N 至 C 端讀取，其中第一半衰期延長結構域連接無活性之第一 CD3 $V_L$ 結合結構域($V_L$i)，該無活性之第一 CD3 $V_L$ 結合結構域透過第一可裂解之連接子(CL1)連接第一 CD3 $V_H$ 結合結構域，該第一 CD3 $V_H$ 結合結構域連接第一靶抗原結合結構域(α-T1)。該第一靶抗原結合結構域透過結構域連接子連接第二半衰期延長結構域，該第二半衰期延長結構域連接無活性之 CD3 $V_H$ 結合結構域($V_H$i)，且該無活性之 CD3 $V_H$ 結合結構域透過第二可裂解之連接子(CL2)與第二 CD3 $V_L$ 結合結構域結合，該第二 CD3 $V_L$ 結構域本身與第二靶抗原結合結構域(α-T2)結合。

該多肽之 C-端可選擇地包括具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個胺基酸之阻斷基團，例如 His6。

[0139] **第 53H 圖**顯示本發明之多肽構建體之第八示例性樣式，從 N 至 C 端讀取，其中第一半衰期延長結構域連接無活性之第一 CD3 $V_L$ 結合結構域($V_L$i)，該無活性之第一 CD3 $V_L$ 結合結構域透過第一可裂解之連接子(CL1)連接第一 CD3 $V_H$ 結合結構域，該第一 CD3 $V_H$ 結合結構域連接第二靶抗原結合結構域(α-T2)。該第二靶抗原結合結構域透過結構域連接子連接第二半衰期延長結構域，該第二半衰期延長結構域與無活性之第二 CD3 $V_H$ 結合結構域($V_H$i)結合，且該無活性之第二 CD3 $V_H$ 結合結構域透過第二可裂解之連接子(CL2)與第二 CD3 $V_L$ 結構域結合，該第二 CD3 $V_L$ 結構域本身與第一靶抗原結合結構域(α-T1)結合。該多肽之 C-端可選擇地包括具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個胺基酸之阻斷基團，例如 His6。

[0140] **第 53I 圖**顯示本發明之多肽軛合物之另一示例性樣式，從 N 至 C 端讀取，其中第一靶抗原結合結構域(α-T1)連接第一 CD3 $V_L$ 結構域，該第一 CD3 $V_L$ 結構域透過第一可裂解之連接子(CL1)連接無活性之第一 CD3 $V_H$ 結構域($V_H$i)，且該無活性之第一 CD3 $V_H$ 結構域與第一半衰期延長結構域結合，該第一半衰期延長結構域透過結構域連接子連接第二半衰期延長結構域。該第二半衰期延長結構域連接無活性之第二 CD3 $V_L$ 結構域($V_L$i)，且該無活性之第二 CD3 $V_L$ 結構域透過第二可裂解之連接子(CL2)連

接第二 CD3 $V_H$ 結構域，該第二 CD3 $V_H$ 結構域連接第二靶抗原結合結構域(α-T2)。該多肽之 C-端可選擇地包括具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個胺基酸之阻斷基團，例如 His6。

[0141] **第 53J 圖**顯示本發明之多肽靶合物的另一示例性樣式，從 N 至 C 端讀取，其中第二靶抗原結合結構域(α-T2)連接第一 CD3 $V_L$ 結構域，該第一 CD3 $V_L$ 結構域透過第一可裂解之連接子(CL1)連接無活性之第一 CD3 $V_H$ 結構域($V_H$i)，該無活性之第一 CD3 $V_H$ 結構域與第一半衰期延長結構域結合，該第一半衰期延長結構域透過結構域連接子連接第二半衰期延長結構域。該第二半衰期延長結構域連接 scFv 和無活性之第二 CD3 $V_L$ 結構域($V_L$i)，且該無活性之第二 CD3 $V_L$ 結構域透過第二可裂解之連接子(CL2)連接第二 CD3 $V_H$ 結構域，該第二 CD3 $V_H$ 結構域連接第一靶抗原結合結構域(α-T1)。該多肽之 C-端可選擇地包括具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個胺基酸之阻斷基團，例如 His6。

[0142] **第 53K 圖**顯示本發明之多肽靶合物的另一示例性樣式，從 N 至 C 端讀取，其中第一靶抗原結合結構域(α-T1)連接第一 CD3 $V_H$ 結構域，該第一 CD3 $V_H$ 結構域透過第一可裂解之連接子(CL1)連接無活性之第一 CD3 $V_L$ 結構域($V_L$i)，該無活性之第一 CD3 $V_L$ 結構域與第一半衰期延長結構域結合，該第一半衰期延長結構域透過結構域連接子連接第二半衰期延長結構域。該第二半衰期延長結

構域連接無活性之第二 CD3 $V_H$ 結構域($V_H$i)，該無活性之第二 CD3 $V_H$ 結構域透過第二可裂解之連接子(CL2)連接第二 CD3 $V_L$ 結構域，該第二 CD3 $V_L$ 結構域連接第二靶抗原結合結構域(α-T2)。該多肽之 C-端可選擇地包括具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個胺基酸之阻斷基團，例如 His6。

[0143] **第 53L 圖**顯示本發明之多肽軛合物的另一示例性樣式，從 N 至 C 端讀取，其中第二靶抗原結合結構域(α-T2)連接第一 CD3 $V_H$ 結構域，該第一 CD3 $V_H$ 結構域透過第一可裂解之連接子(CL1)連接無活性之第一 CD3 $V_L$ 結構域($V_L$i)，該無活性之第一 CD3 $V_L$ 結構域與第一半衰期延長結構域結合，該第一半衰期延長結構域透過結構域連接子連接第二半衰期延長結構域。該第二半衰期延長結構域連接無活性之第二 CD3 $V_H$ 結構域($V_H$i)，且該無活性之第二 CD3 $V_H$ 結構域透過第二可裂解之連接子(CL2)連接第二 CD3 $V_L$ 結構域，該第二 CD3 $V_L$ 結構域連接第一靶抗原結合結構域(α-T1)。該多肽之 C-端可選擇地包括具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個胺基酸之阻斷基團，例如 His6。

[0144] **第 53M 圖**顯示本發明之多肽軛合物的另一示例性樣式，從 N 至 C 端讀取，其中第一半衰期延長結構域連接無活性之第一 CD3 $V_H$ 結構域($V_H$i)，該無活性之第一 CD3 $V_H$ 結構域透過第一可裂解之連接子(CL1)連接第一 CD3 $V_L$ 結構域。該 CD3 $V_L$ 結構域連接第一靶抗原結合結

構域(α-T1)，該第一靶抗原結合結構域經由結構域連接子連接第二靶抗原結合結構域(α-T2)，該第二靶抗原結合結構域(α-T2)連接第二 CD3 $V_H$ 結構域，該第二 CD3 $V_H$ 結構域透過第二可裂解之結構域連接子(CL2)連接無活性之第二 CD3 $V_L$ 結構域($V_L$i)且該第二 CD3 $V_L$ 結構域連接第二半衰期延長結構域。該多肽之 C-端可選擇地包括具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個胺基酸之阻斷基團，例如 His6。

[0145] **第 53N 圖**顯示本發明之多肽靶合物的另一示例性樣式，從 N 至 C 端讀取，其中第一半衰期延長結構域連接無活性之第一 CD3 $V_H$ 結構域($V_H$i)，該第一 CD3 $V_H$ 結構域透過第一可裂解之連接子(CL1)連接第一 CD3 $V_L$ 結構域。該 CD3 $V_L$ 結構域連接第二靶抗原結合結構域(α-T2)，該第二靶抗原結合結構域經由結構域連接子連接第一靶抗原結合結構域(α-T1)，該第一靶抗原結合結構域(α-T1)連接第二 CD3 $V_H$ 結構域，該等第二 CD3 $V_H$ 結構域透過第二可裂解之結構域連接子(CL2)連接無活性之第二 CD3 $V_L$ 結構域($V_L$i)，且該無活性之第二 CD3 $V_L$ 結構域連接第二半衰期延長結構域。該多肽之 C-端可選擇地包括具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個胺基酸之阻斷基團，例如 His6。

[0146] **第 53O 圖**顯示本發明之多肽靶合物的另一示例性樣式，從 N 至 C 端讀取，其中第一半衰期延長結構域連接無活性之第一 CD3 $V_L$ 結構域($V_L$i)，該第一 CD3

$V_L$ 結構域透過第一可裂解之連接子(CL1)連接第一 CD3 $V_H$結構域。該 CD3 $V_H$結構域連接第一靶抗原結合結構域(α-T1)，該第一靶抗原結合結構域經由結構域連接子連接第二靶抗原結合結構域(α-T2)，該第二靶抗原結合結構域連接第二 CD3 $V_L$ 結構域，該第二 CD3 $V_L$ 結構域連接無活性之第二 CD3 $V_H$結構域($V_H$i)，且該無活性之第二 CD3 $V_H$ 結構域連接第二半衰期延長結構域。該多肽之 C-端可選擇地包括具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個胺基酸之阻斷基團，例如 His6。

[0147] **第 53P 圖**顯示本發明之多肽軛合物的另一示例性樣式，從 N 至 C 端讀取，其中第一半衰期延長結構域連接無活性之第一 CD3 $V_L$ 結構域($V_L$i)，該第一 CD3 $V_L$ 結構域透過第一可裂解之連接子(CL1)連接第一 CD3 $V_H$結構域。該第一 CD3 $V_H$結構域連接第二靶抗原結合結構域(α-T2)，該第二靶抗原結合結構域經由結構域連接子連接第一靶抗原結合結構域(α-T1)，該第一靶抗原結合結構域(α-T1)連接第二 CD3 $V_L$結構域，該第二 CD3 $V_L$結構域經由第二可裂解之連接子(CL2)連接無活性之第二 CD3 $V_H$ 結構域($V_H$i)且該無活性之第二 CD3 $V_H$ 結構域與第二半衰期延長結構域結合。該多肽之 C-端可選擇地包括具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個胺基酸之阻斷基團，例如 His6。

[0148] **第 54 圖**提供用於本發明之示例性多肽構建體的代表性核酸和多肽序列。用於本發明之示例性多肽在

C-端被阻斷，因此，顯示出具有 $His_x$ C 端標籤之序列可與這些標籤、這些標籤之較短或更長的版本一起使用或沒有標籤。

[0149] **第 55 圖**提供本發明之各種多肽構建體的 SEQ ID NO 和這些構建體之縮寫命名的用語索引。

[0150] **第 56 圖**提供用於本發明之實施態樣中之連接子的示例性連接子序列。

【實施方式】

**發明之詳細描述**

**引言**

[0151] 本文描述可有條件地活化之抗原結合多肽。本發明之示例性多肽包括至少一個靶抗原結合結構域、至少一個針對 CD3 之 scFv (該 scFv 具有至少一個 $V_H/V_L$ 對，其中 $V_H$ 和 $V_L$ 至少一者在特異性結合 CD3 方面無活性)、與該多肽構建體組分共價結合之各種 scFv 和結構域連接子、在一或多個結構域及/或 scFv 連接子內之可裂解的位點，及可選擇地一或多個半衰期延長結構域。一種示例性之可裂解位點可被位於或集中在腫瘤微環境中之血清酶(例如酯酶)或降解酶(例如蛋白酶)裂解，該腫瘤為該多肽構建體所針對之腫瘤。一種示例性之降解酶為該腫瘤所表現或在該腫瘤微環境內之蛋白酶。當該構建體之連接子中至少一個可裂解之位點裂解時，該 scFv 對之無活性成員從構建體移除，而該 scFv 對之活性成員與其活性同源

物交互作用(例如 $V_H^1/V_Li^1$ 變成 $V_H^1$；$V_Hi^2/V_L^2$ 變為 $V_L^2$，而 $V_H^1$ 和 $V_L^2$ 交互作用形成特異性結合 CD3 之功能性 scFv。該構建體亦透過靶抗原結合結構域特異性結合經選定之靶抗原。於一示例性實施態樣中，$V_H^1$ 和 $V_L^2$ 藉由 scFv 連接子保持接合，該 scFv 連接子進一步將該靶抗原結合結構域與 $V_H^1$ 和 $V_L^2$ 連接在一起。本發明之某些多肽構建體亦包括一或多個半衰期延長結構域，該一或多個半衰期延長結構域在該多肽被投予有需要該多肽之個體後增加該多肽之半衰期。一種示例性半衰期延長結構域為針對循環血漿蛋白(例如 hHSA)之抗體或抗體片段。該半衰期延長結構域可包括在多肽序列內，在其與該構建體之其餘部分之間具有一或多個可裂解之連接子，致使該半衰期延長結構域一旦實現其目的(例如將該構建體遞送至腫瘤、或在體內完成所期望之循環半衰期)後可自該構建體裂解。附圖提供本發明之多肽構建體的許多示例性基序之結構。

[0152] 具有一個以上之 $V_H/V_L$ 對之發明的多肽構建體係以單一實體(scFv)之形式存在。於各種實施態樣中，本發明之化合物包括單一 $V_H/V_L$ 對。於這些實施態樣中，該多肽構建體對通常係成對使用，其中該成對的一個成員包括 $V_H/V_Li$ 及另一 $V_Hi/V_L$，致使得當該成對之無活性成員裂解時，該 $V_H/V_L$ 能夠配對並與 CD3 結合。

[0153] 於本發明之多肽構建體的示例性實施態樣中，該疾病細胞靶向結構域係藉由非可裂解之連接子

(NCL1 和 NCL2)連接該活性抗 T 細胞結合節段。該活性和無活性抗 T 細胞 scFv 段係藉由對該疾病組織微環境敏感之可裂解連接子(CL1 和 CL2)連接。該二個半分子或蛋白質區係藉由另一可降解之連接子(RL)連接。**第 53 圖**。

[0154] 於各種實施例中，初始構建體係由二個多肽區所組成，該二個多肽區可在注射入體內後藉由在區域連接子(RL)處裂解來分開。該疾病靶的結合結構域提前活化並能結合其靶的，藉此富集在該患病細胞之表面上的無活性蛋白質。然後，該可裂解之連接子可在該疾病組織微環境中被裂解，而該活性 T 細胞結合段(其藉由該靶向結構域及非可裂解之連接子與患病細胞結合)可再重新組合以在該患病細胞之表面上，但不在溶液中創建活性 T 細胞結合 scFv。此用來創建活性 T 細胞結合 scFv 之重組作用使 T 細胞與患病細胞結合並殺死它。該 1 至 2 個半衰期延長結構域在分子到達患病細胞之前延長分子之循環半衰期，並與無活性之抗 T 細胞結構域($V_Li$ 或 $V_Hi$)一起移除來限制該經裂解/活化之分子若離開患病組織時的半衰期。若該區域連接子係在腫瘤中裂解，則一個半衰期延長結構域是理想的，若該區域連接子係在血液中裂解，則在完整分子中有二個半衰期延長結構域是理想的以確保該二個半分子/蛋白區域具有足夠之半衰期來累積在患病細胞上。包含可被腫瘤相關之酶和血液相關之酶裂解的連接子之多肽構建體係在本發明之範圍內。

[0155] 本發明亦提供該多肽構建體之醫藥組成物，

以及用於製造該等構建體之核酸、重組表現載體和宿主細胞。本發明亦提供使用所揭示之多肽來預防及/或治療疾病、病症和失調之方法。

**定義**

[0156] 為了使本發明可被更全面地理解，下文中闡述幾個定義。該等定義意在涵蓋文法同等項。

[0157] 如本文所使用之“胺基酸”及“胺基酸同一性”意指該 20 種天然存在之胺基酸或可存在於特定、經界定之位置處的任何非天然類似物的其中一者。本文中，“蛋白質”意指至少二個經共價連接之胺基酸，其包括蛋白質、多肽、寡肽和肽。該蛋白質可由天然存在之胺基酸和肽鍵或合成之擬肽結構，即“類似物”(諸如類肽)構成(參見 Simon et al., PNAS USA 89(20)：9367(1992))，尤其是當 LC 肽類係欲投予患者時。因此，本文所使用之“胺基酸”或“肽殘基”意指天然存在及合成之胺基酸二者。例如高苯丙胺酸、瓜胺酸和正白胺酸為考慮用於本發明目的之胺基酸。“胺基酸”亦包括亞胺酸殘基，諸如脯胺酸和羥脯胺酸。側鏈可為(R)或(S)構型。於較佳之實施態樣中，該胺基酸為(S)或 L-構型。若使用非天然存在之側鏈，則可使用非胺基酸取代基，以，例如防止或延遲在體內降解。

[0158] 本文中之“ 胺基酸修飾”意指多肽序列中之胺基酸取代、插入及/或缺失，或對經化學連接至蛋白質之部分的改變。例如，修飾可為連接蛋白質之經改變的碳水

化合物或 PEG 結構。本文中“胺基酸修飾”係指多肽序列中之胺基酸取代、插入及/或缺失。為了清楚起見，除非另有說明，該胺基酸修飾總是針對由 DNA 編碼之胺基酸，例如該 DNA 及 RNA 中具有密碼子之 20 種胺基酸。本文中較佳之胺基酸修飾為取代。

[0159] 本文中，“胺基酸取代”或“取代”意指以不同胺基酸替換親本多肽序列中之特定位置處的胺基酸。尤其是，於一些實施態樣中，該取代係替換成非為該特定位置處之天然存在的胺基酸(非為該生物體內或任何生物體內之天然存在的胺基酸)。例如取代 E272Y 係指一種變體多肽(在此情況中為 Fc 變體)，其中在位置 272 之麩胺酸被酪胺酸替換。為了清楚起見，已經工程處理以改變核酸編碼序列，但未改變起始胺基酸(例如將 CGG(編碼精胺酸)交換成 CGA(仍編碼精胺酸)以增加宿主生物體表現水準)之蛋白質並非“胺基酸取代”；亦即，儘管創建新基因來編碼該相同蛋白質，若該蛋白質在起始之特定位置上具有相同胺基酸，則其並非胺基酸取代。

[0160] 本文所使用之“ 胺基酸插入”或“插入”意指在親本多肽序列之特定位置添加胺基酸序列。例如-233E 或 233E 表示在位置 233 之後和位置 234 之前插入麩胺酸。此外，-233ADE 或 A233ADE 表示在 233 位置之後和 234 位置之前插入 AlaAspGlu。

[0161] 如本文所使用之“ 胺基酸缺失”或“缺失”意指從親本多肽序列之特定位置處除去胺基酸序列。例如

E233-或 E233#、E233()或 E233del 表示缺失在位置 233 處之麩胺酸。此外，EDA233-或 EDA233#表示缺失在位置 233 處開始之 GluAspAla 序列。

[0162] 如本文所使用之“多肽”意指至少二個經共價連接之胺基酸，其包括蛋白質、多肽、寡肽和肽。該肽基團可包含天然存在之胺基酸和肽鍵或合成之擬肽結構，即“類似物”，諸如類肽(參見 Simon et al., PNAS USA 89(20)：9367(1992)，其全文以引用方式併入本文)。該胺基酸可為天然存在或合成的(例如非由 DNA 編碼之胺基酸)；如本技藝之人士所理解者。例如高苯丙胺酸、瓜胺酸、鳥胺酸和正白胺酸為考慮用於本發明目的之合成胺基酸，且 D-和 L-(R 或 S) 二種構型之胺基酸均可使用。本發明之變體可包含修飾，該修飾包括使用合成之胺基酸，該胺基酸係利用，例如由 Schultz 和同事研發之技術，包括，但不限於由 Cropp & Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12):625-30、Anderson et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101 (2):7566-71、Zhang et al., 2003, 303(5656):371-3 及 Chin et al., 2003, Science 301(5635):964-7 所描述之方法，其全文以引用方式併入本文。此外，多肽可包括具有一或多個側鏈或端、糖基化、PEG 化、致環交換、環化、連接其他分子之連接子、與蛋白或蛋白結構域融合及添加肽標籤或標記的合成衍生物。

[0163] 本發明之多肽特異性結合 CD3 及如本文概述之靶細胞受體。本文之“特異性結合”係指該多肽之結合常

數係在至少 $10^{-4}$ 至 $10^{-6}$ $M^{-1}$ 之範圍內，較佳之範圍為 $10^{-7}$ 至-$10^{-9}$ $M^{-1}$。

[0164] 具體包括在“多肽”之定義內的為無糖基化之多肽。本文所使用之“無糖基化之多肽”意指缺乏連接在 Fc 區之位置 297 處之碳水化合物的多肽，其中編號係根據如 Kabat 中之 EU 系統。該無糖基化之多肽可為去糖基化之多肽，亦即其中該 Fc 碳水化合物已被除去(例如以化學或酶催化方式)之抗體或抗體片段。或者，該無糖基化之多肽可為表現時無 Fc 碳水化合物之非糖基化或未糖基化之抗體或其片段，例如經由將編碼該糖基化格式之一或多個殘基突變或在不會使碳水化合物與蛋白質連接之生物體，例如細菌中表現。

[0165] 本文所使用之“親本多肽”或“前體多肽”(包括 Fc 親本或前體)係指隨後被修飾以產生變體之多肽。該親本多肽可為天然存在之多肽或天然存在之多肽的變體或經工程處理的版本。親本多肽可指該多肽本身、包含該親本多肽之組成物或編碼該親本多肽之胺基酸序列。因此，本文所使用之“親本 Fc 多肽”意指未經修飾之 Fc 多肽，該 Fc 多肽係經修飾以產生變體，且藉由本文所使用之“親本抗體”意指經修飾以產生變體抗體之未經修飾的抗體。

[0166] 本文所使用之“位置”意指在蛋白質序列中之位置。位置可依序編號或根據已設立之格式(例如用於抗體編號之 EU 索引)編號。

[0167] 本文所使用之“靶抗原”意指被指定抗體之可

變區特異性結合之分子。靶抗原可為蛋白質、碳水化合物、脂質或其他化學化合物。本文中描述一系列之合適的示例性靶抗原。

[0168] 本文所使用之“靶細胞”意指表現靶抗原之細胞。

[0169] 本文中“抗體”一詞意指由一或多個基本上由全部或部分經識別之免疫球蛋白基因編碼之多肽所組成的蛋白質。該經識別之免疫球蛋白基因(例如在人類中)，包括 kappa(κ)、lambda(λ)及重鏈基因座，其共同包含無數可變區基因及恆定區基因 mu(μ)、delta(δ)、gamma (γ)、sigma(ε)和 alpha(α) (其分別編碼 IgM、IgD、IgG、IgE 和 IgA 同種異型)。本文中之抗體意圖包括全長抗體和抗體片段，並可指來自任何生物體之天然抗體、經工程處理之抗體或經重組產生之抗體以供用於如下文中進一步定義之實驗、治療或其他目的。因此，“抗體”包括多株和單株抗體(mAb)。製備和純化單株和多株抗體之方法為本技藝所已知且描述於，例如 Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)中。如本文中所概述者，“抗體”具體包括本文所描述之 Fc 變體，“全長”抗體包括本文所描述之 Fc 變體片段及與如本文所描述之其他蛋白融合之 Fc 變體融合物。

[0170] 術語“抗體”包括如本技藝中已知之抗體片段，諸如 Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fcs 或抗體之其他抗原結合

子序列，諸如單鏈抗體(例如 scFv)、嵌合型抗體，等，無論是藉由修飾完整抗體製造者或使用重組 DNA 技術重新合成者。術語“抗體”進一步包含多株抗體和單株抗體，其可為激動劑或拮抗劑抗體。

[0171] 具體包括在“抗體”之定義內的有含有 Fc 變體部分之全長抗體。本文中，“全長抗體”意指構成抗體之天然生物形式的結構，包括可變區及恆定區。例如，在大多數哺乳動物(包括人類和小鼠)中，IgG 類之全長抗體為四聚體且係由二對完全相同之免疫球蛋白鏈對所組成，該免疫球蛋白鏈對具有二條免疫球蛋白鏈，每對具有一條輕鏈和一條重鏈，各輕鏈包含免疫球蛋白結構域 $V_L$ 和 $C_L$，而各重鏈包含免疫球蛋白結構域 $V_H$、Cγ1、Cγ2 及 Cγ3。於一些哺乳動物中(例如在駱駝和美洲駝中)，IgG 抗體可僅由二條重鏈所組成，各重鏈包含一連接 Fc 區之可變結構域。本文所使用之“IgG”意指屬於基本上由經識別之免疫球蛋白 γ 基因所編碼之抗體類別的多肽。在人類中，此類別包含 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4。在小鼠中，此類別包含 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3。

[0172] 於一較佳之實施態樣中，本發明之抗體為人化抗體。使用目前之單株抗體技術，個人可製造針對幾乎任何可鑑別之靶抗原的人化抗體 [Stein, Trends Biotechnol. 15:88-90 (1997)]。人化形式之非人類(例如鼠)抗體為免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或其含有源自非人免疫球蛋白之最小序列的片段(諸如 Fv、Fc、Fab、Fab'、

F(ab')2 或抗體之其他抗原結合子序列)之嵌合型分子。人化抗體包括人免疫球蛋白(受者抗體)，其中形成該受者之互補決定區(CDR)的殘基被來自具有所需之特異性、親和性和能力之非人物種(諸如小鼠、大鼠或兔)的 CDR (供者抗體)之殘基替換。在一些情況下，該人免疫球蛋白之 Fv 框架殘基被對應之非人殘基替換。人化抗體亦包含既無法在受者抗體中，亦無法在引入之 CDR 或框架序列中發現的殘基。一般而言，該人化抗體將包含基本上全部(至少一個，且通常為二個)之可變結構域，其中該 CDR 區全部或基本上全部對應於非人免疫球蛋白之 CDR 區且全部或基本上全部之 FR 區為人免疫球蛋白共有序列之 FR 區。該人化抗體理想上亦將包含之免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分，通常為人免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分[Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)；Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)；及 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]。

[0173] 用於將非人抗體人化之方法為本技藝所周知。一般而言，人化抗體具有一或多個從非人來源引入之胺基酸殘基。這些非人胺基酸殘基通常被稱為輸入殘基，其通常取自輸入之可變結構域。人化可基本上依照 Winter 及其同事之方法執行[Jones et al.,同上；Riechmann et al., 同上；及 Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)]，該方法係經由以嚙齒類 CDR 或 CDR 序列取代人抗體之對應序列執行。本技藝中亦知其他人化之小鼠單株

抗體的實例，例如與人蛋白 C 結合之抗體[O'Connor et al., Protein Eng. 11:321-8 (1998)]、與介白素 2 受體結合之抗體[Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 86:10029-33 (1989)]及與人表皮生長因子受體 2 結合之抗體[Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285-9 (1992)]。因此，該等人化抗體為嵌合型抗體(美國專利第 4,816,567 號)，其中基本上少於完整之人可變結構域已被來自非人物種之對應序列取代。在實行時，人化抗體通常為其中一些 CDR 殘基及可能地，一些 FR 殘基被來自嚙齒動物抗體中之類似位點的殘基所取代的人抗體。

[0174] 於一較佳之實施態樣中，本發明之多肽係基於人序列且因此人序列被用來作為“基礎”序列，針對該“基礎”序列，比較其他序列，諸如大鼠、小鼠和猴子序列。為了建立與一級序列或結構之同源性，將前體或親本抗體或 scFv 之胺基酸序列直接與對應之人序列相比較。在比對序列後，使用本文所描述之一或多種同源性比對程式(例如使用保守性殘基比對物種)，允許必要之插入和刪除以保持對準(即，避免透過任意刪除和插入而排除保守性殘基)，界定等同於人類多肽之一級序列中的特定胺基酸之殘基。較佳地，對準之保守性殘基應保留 100%該等殘基。然而，大於 75%或少至 50%之對準的保守性殘基亦足以定義同等殘基(本文中有時稱為“對應殘基”)。

[0175] 本文所使用之“殘基” 意指在蛋白質中的位置及其相關之胺基酸身份。例如，天門冬醯胺 297(亦稱為

Asn297 或 N297)為在人抗體 IgG1 中之位置 297 處的殘基。

[0176] 相等殘基亦可藉由測定 scFv 片段之三級結構層級(其三級結構已藉由 X 射線晶體學測定)的同源性來定義。相等殘基之定義為該親本或前體序列之特定胺基酸殘基的二或更多個主鏈原子的原子坐標(N 對 N，CA 對 CA、C 對 C 及 O 對 O)在對準之後係在 0.13 nm 之內，且較佳為 0.1nm 的殘基。對準係在最佳模型已定向和定位以使該 scFv 變體片段之非氫蛋白質原子的原子坐標產生最大重疊後達成。

[0177] 本文所使用之“Fv”或“Fv 片段”或“Fv 區”意指包含單一抗體之 $V_L$ 和 $V_H$ 結構域的多肽。如本技藝之技術人士將理解者，這些通常係由二條鏈所構成，或可組合(通常以如本文所討論之連接子)以形成 scFv。

[0178] 本文中，“單鏈 Fv”或“scFv”意指共價連接可變輕鏈($V_L$)結構域之可變重鏈($V_H$)結構域，其一般係使用如本文所討論之 scFv 連接子來形成 scFv 或 scFv 結構域。scFv 結構域可為 N 端至 C 端之任一取向($V_H$-連接子-$V_L$ 或 $V_L$-連接子-$V_H$)。

[0179] 如本文所使用之“可變區”意指包含一或多個 Ig 結構域之免疫球蛋白的區，該一或多個 Ig 結構域基本上係由分別構成該 κ、λ 及重鏈和輕鏈免疫球蛋白基因座的 Vκ、Vλ、$V_L$ 及/或 $V_H$ 基因其中任一者編碼。

[0180] 如本文所使用之“無活性 $V_H$”和“無活性 $V_L$”係

指 scFv 之組分，當其分別與彼等之同源 $V_L$ 或 $V_H$ 夥伴配對時會形成 $V_H/V_L$ 對，此 $V_H/V_L$ 對不會特異性結合當該“活性”$V_H$ 或“活性”$V_L$ 抗原係與並非“無活性”之 $V_L$ 或 $V_H$ 類似物結合時所將結合之抗原。示例性之“無活性 $V_H$”和“無活性 $V_L$”結構域係經由使野生型 $V_H$ 或 $V_L$ 序列突變來形成。示例性之突變係在 $V_H$ 或 $V_L$ 之 CDR1、CDR2 或 CDR3 內。一種示例性突變包括在 CDR2 內放置結構域連接子，從而形成“無活性 $V_H$”或“無活性 $V_L$”結構域。相反地，“活性 $V_H$”或“活性 $V_L$”為當與其“活性”同源夥伴(即，分別為 $V_L$ 或 $V_H$)配對時能夠與其靶抗原特異性結合者。

[0181] 相反地，如本文所使用之術語“活性”係指能夠特異性結合 CD3 之 CD3 結合結構域。該術語用在二種背景下：(a)當指 scFv 結合對之單一成員(即，$V_H$ 或 $V_L$)時，其為能夠與其同源夥伴配對並與 CD3 特異性結合之序列的成員；及(b) 能與 CD3 特異性結合之序列的同源物對(即，$V_H$ 和 $V_L$)。一種示例性“活性” $V_H$、$V_L$ 或 $V_H/V_L$ 對為野生型或親本序列。

[0182] “CD-*x*”係指分化(CD)蛋白簇。於示例性之實施態樣中，CD-*x* 係選自那些當個體被投予本發明之多肽構建體時參與募集或活化個體之 T 細胞的 CD 蛋白。於一示例性之實施態樣中，CD-*x* 為 CD3。

[0183] 當與本發明有關時，術語“結合結構域”表徵(特異性)結合/交互作用/識別靶分子(抗原)上之指定的靶抗原決定部位或指定之靶位點(例如：分別為 EGFR 和 CD3)

的結構域。該靶抗原結合結構域(識別 EGFR)之結構和功能，且較佳地，還有該 CD3 結合結構域(識別 CD3)之結構及/或功能係基於抗體(例如全長或完整之免疫球蛋白分子)之結構及/或功能。根據本發明，該靶抗原結合結構域之特徵在於存有三個輕鏈 CDR(即，該 $V_L$ 區之 CDR1、CDR2 和 CDR3)及/或三個重鏈 CDR(即，該 $V_H$ 區之 CDR1、CDR2 和 CDR3)。較佳地，該 CD3 結合結構域亦至少包含可允許靶的結合之抗體之最小結構要求。更佳地，該 CD3 結合結構域包含至少三個輕鏈 CDR(即，該 $V_L$ 區之 CDR1、CDR2 和 CDR3)及/或三個重鏈 CDR(即，該 $V_H$ 區之 CDR1、CDR2 和 CDR3)。在示例性實施態樣中，設想該靶抗原及/或 CD3 結合結構域係藉由噬菌體展示或集合庫篩選法產生或取得。

[0184] 如本文所使用之“Fc”、“Fc 區”、“Fc 多肽”意指如本文所定義之包括含有抗體之恆定區，排除第一恆定區免疫球蛋白結構域之多肽的抗體。因此，Fc 係指 IgA、IgD 和 IgG 之最後二個恆定區免疫球蛋白結構域及 IgE 和 IgM 之最後三個恆定區免疫球蛋白結構域及這些結構域 N 端之彈性鉸鏈。在 IgA 和 IgM 方面，Fc 可包括 J 鏈。在 IgG 方面，Fc 包含免疫球蛋白結構域 Cγ2 和 Cγ3，及介於 Cγ1 與 Cγ2 之間的鉸鏈。雖然 Fc 區之邊界可能有不同，該人 IgG 重鏈 Fc 區通常被界定為在其羧基端包含殘基 C226 或 P230，其中該編號係根據如 Kabat 中之 EU 索引。Fc 可指獨立之該區，或在抗體、抗體片段或 Fc 融合

物之背景下的該區。Fc 可為包含 Fc 之抗體、Fc 融合物或蛋白質或蛋白質結構域。特佳者為 Fc 變體，其為 Fc 之非天然存在之變體。

[0185] 如本文所使用之“IgG”意指屬於該基本上由經識別之免疫球蛋白 γ 基因所編碼之抗體類別的多肽。在人類，此類別包含 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。在小鼠，此類別包含 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3。本文中，“免疫球蛋白(Ig)”意指由一或或多個基本上由免疫球蛋白基因編碼之多肽所組成的蛋白質。免疫球蛋白包括，但不限於抗體。免疫球蛋白可具有許多結構形式，包括，但不限於全長抗體、抗體片段及個別免疫球蛋白結構域。本文中，“免疫球蛋白(Ig)結構域”意指以如蛋白質結構技藝之技術人士所確定之獨特結構實體存在的免疫球蛋白區域。Ig 結構域通常具有特徵性夾心折疊拓撲學。在 IgG 類別之抗體中的已知 Ig 結構域為 $V_H$、Cγ1、Cγ2、Cγ3、$V_L$ 和 $C_L$。

[0186] 本文中，“野生型或 WT” 意指在自然界中發現之胺基酸序列或核苷酸序列，包括等位基因變異。WT 蛋白具有未曾經故意修飾之胺基酸序列或核苷酸序列。

[0187] 本文所使用之“變體多肽”意指憑藉至少一個胺基酸修飾而與親本多肽序列不同的多肽序列。修飾可包括取代、缺失及添加。變體多肽可指多肽本身、包含該多肽之組成物或編碼該多肽之胺基酸序列。較佳地，與親本多肽相比較，該變體多肽具有至少一個胺基酸修飾，例如約 1 至約 10 個胺基酸修飾，較佳為約 1 至約 5 個胺基酸

修飾。較佳地，本文之變體多肽序列將與親本多肽序列具有至少約 80%之同源性，最佳為具有至少約 90%之同源性，更佳為具有至少約 95%之同源性。因此，本文所使用之“Fc 變體”意指憑藉至少一個胺基酸修飾而與親本 Fc 序列不同的 Fc 序列。類似地，示例性之“無活性 $V_L$ 結構域”或“無活性 $V_H$ 結構域”為親本 $V_L$ 或 $V_H$ 多肽之變體。

[0188] 於一些實施態樣中，本發明之多肽構建體為“經分離的”或“基本上純的”多肽構建體。當用於描述本文所揭示之多肽構建體時，“經分離的”或“基本上純的”意指已經過鑑定，自其製造環境之組分分離及/或回收之多肽構建體。較佳地，該多肽構建體不與或基本不與所有其他來自其製造環境之組分聯結。其製造環境之污染組分(諸如從經重組轉染細胞產生者)為通常會干擾該多肽之診斷或治療用途的物質，並可能包括酶、激素及其他蛋白質性或非蛋白質性溶質。在該製造培養基中之理想的多肽構建體可構成該培養基中之全部多肽至少約 5%、至少約 25%或至少約 50%(按重量計)。

[0189] 本發明之示例性經分離的多肽構建體實質上或基本上不含用於製造該物質之組分。在本發明之肽軛合物方面，術語“經分離的” 意指物質實質上或基本上不含該通常在用於製備該肽軛合物之混合物中伴隨該物質的組分。“經分離的”和“純的”可互換使用。通常，本發明之經分離的多肽構建體所具有之純度水準較佳為以範圍形式表示。該多肽構建體之純度範圍的下限為約 60%、約 70%或

約 80%，且純度範圍之上限為約 70%、約 80%、約 90%或超過約 90%。

[0190] 當該多肽構建體之純度大於約 90%，其純度亦較佳為以範圍形式表示。該純度範圍之下限為約 90%、約 92%、約 94%、約 96%或約 98%。純度範圍之上限為約 92%、約 94%、約 96%、約 98%或約 100%。

[0191] 純度係藉由本技藝公認之分析方法來測定(例如在銀染色之凝膠、聚丙烯醯胺凝膠電泳、HPLC 或類似裝置上之譜帶強度)。

[0192] 根據本發明，結合結構域為一或多個多肽之形式。該等多肽可包括蛋白質性部分和非蛋白質性部分(例如化學連接子或化學交聯劑，諸如戊二醛)。多肽(包括彼等之片段，較佳為生物活性片段及肽，通常具有 30 個以上之胺基酸)包含二或多個經由共價肽鍵彼此耦聯(導致胺基酸鏈)之胺基酸。

[0193] 結合結構域與抗原決定部位或包含該抗原決定部位之區域之間的交互作用暗示結合結構域對在特定蛋白質或抗原上之抗原決定部位/包含該抗原決定部位之區域(例如，分別為 EGFR 和 CD3)顯示出可感知之親和力且，一般而言，不會表現出與 EGFR 或 CD3 以外之蛋白質或抗原有顯著之反應性。“可感知之親和力”包括以約 $10^{-6}$ M(KD)或更強之親和力結合。較佳地，當該結合親和力為約 $10^{-12}$ 至 $10^{-8}$ M、$10^{-12}$ 至 $10^{-9}$ M、$10^{-12}$ 至 $10^{-10}$ M、$10^{-11}$ 至 $10^{-8}$ M，較佳地，約 $10^{-11}$ 至 $10^{-8}$ M 時，該結

合被認為是特異性結合。結合結構域是否與靶的特異性反應或結合可很容易地藉由，尤其是，將該結合結構域與靶蛋白或抗原之反應與該結合結構域與非 EGFR 或 CD3 之蛋白質或抗原之反應相比較來測試。較佳地，本發明之結合結構域實質上不會或基本上不會特異性結合非 EGFR 或 CD3 之蛋白質或抗原(即，該第一結合結構域不會特異性結合非 EGFR 之蛋白質，且該第二結合結構域不會特異性結合非 CD3 之蛋白質)。

[0194] 咸信，特異性結合係由該結合結構域和抗原之胺基酸序列中的特定基序驅動。因此，結合之達成為彼等之一級、二級及/或三級結構之結果以及該結構之二級修飾的結果。該抗原交互作用位點與其特異性抗原之特異性交互作用可導致該位點與抗原之單純結合。再者，該抗原交互作用位點與其特異性抗原之特異性交互作用可能另外或額外導致信號起始，例如由於引起該抗原之構象改變、該抗原之寡聚化，等。

[0195] 術語“實質上不特異性結合”、“基本上不特異性結合”或“不能特異性結合”可互換使用且意指本發明之結合結構域不會與非 EGFR 或 CD3 之蛋白質或抗原結合，即，顯示出與非 EGFR 或 CD3 之蛋白質或抗原不具有超過 30%，較佳為不超過 20%，更佳為不超過 10%，特佳為不超過 9%、8%、7%、6%或 5%之反應性(其中與 EGFR 或 CD3 抗原之結合分別設為 100%)。這些術語亦用於關於 $V_H/V_L^1$ 或 $V_L/V_H^1$ 對之抗原結合性質。

[0196] 本文所使用之術語“雙特異性”係指“至少為雙特異性”之本發明的多肽構建體(“Pro”或“Prodent”)，即，其包含至少一個第一結合結構域(例如靶抗原，例如EGFR)和第二結合結構域(例如 CD3，例如 CD3)，其中該第一結合結構域與一抗原或靶的結合，而該第二結合結構域與另一抗原或靶的結合。因此，根據本發明之多肽構建體包含對至少二種不同抗原或靶的之特異性。術語，本發明之“雙特異性多肽構建體”亦包含多特異性多肽構建體，諸如三特異性多肽構建體，後者包括三個結合結構域或具有超過三種(例如四、五、...)特異性之構建體。

[0197] 鑑於根據本發明之多肽構建體為(至少)雙特異性的，它們不會自然發生且它們與天然存在之產物明顯不同。因此，“雙特異性”多肽構建體為具有至少二個具有不同特異性之不同結合位點的人工雜合多肽。雙特異性多肽構建體可藉由多種方法產生。參見，例如 Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990)。

[0198] 本發明之多肽構建體的至少二個結合結構域及可變結構域可能或可能不包含肽連接子(間隔子肽)。根據本發明，術語 “肽連接子”包含胺基酸序列，藉由此胺基酸序列，本發明之抗體構建體的一個(可變及/或結合)結構域與另一(可變及/或結合)結構域之胺基酸序列可彼此連接。該等肽連接子之必要技術特性為其不包含任何聚合活性。合適之肽連接子有描述於美國專利案第 4,751,180 和 4,935,233 號或 WO 88/09344 中者。該肽連接子亦可用於

連接其他結構域或模塊或區(諸如半衰期延長結構域)與本發明之抗體構建體。

[0199] 於那些其中使用連接子之實施態樣中，該連接子較佳為具有足夠之長度和序列。以確保每個靶抗原和CD3 結合結構域可彼此獨立地保持彼等之差別結合特異性。在本發明之抗體構建體中用於連接至少二個結合結構域(或二個可變結構域)之肽連接子較佳為包含最佳數目之胺基酸殘基(例如 12 個胺基酸殘基或更少)者。因此，使用具有 12、11、10、9、8、7，6 或 5 個胺基酸殘基之肽連接子。具有少於 5 個胺基酸之預想的肽連接子包含 4、3、2 或 1 個胺基酸，其中富含 Gly 之連接子為較佳者。在該“肽連接子”之背景下，特佳之“單一”胺基酸為 Gly。因此，該肽連接子可由單一胺基酸 Gly 組成。肽連接子之另一較佳實施態樣的特徵為胺基酸序列 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser，即，$Gly_4Ser$(SEQ ID NO：1)或其聚合物，即$(Gly_4Ser)_x$，其中 x 為整數 1 或更大(例如 2 或 3)。該肽連接子之特性(其不包含促進二級結構)為本技藝所已知且描述於，例如 Dall'Acqua et al. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273)、Cheadle et al. (Mol ImmunoL (1992) 29, 21-30)及 Raag and Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80)中。亦使用不會進一步促進任何二級結構之肽連接子。該結構域彼此連接可藉由，例如實施例中描述之遺傳工程提供。用於製備融合且經可操作地連接之雙特異性單鏈構建體並使彼等在哺乳動物細胞或細菌中表現之方法為本技藝所熟知(例

如，WO 99/54440 或 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001)。

[0200] 本發明之示例性實施態樣包含至少一個 scFv 結構域，雖然不是天然存在，其通常包括藉由 scFv 連接子連接在一起之重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域。如本文中所概述者，雖然該 scFv 結構域從 N-至 C 端之取向通常為 $V_H$-scFv 連接子-$V_L$，此取向在任何 scFv 結構域(或那些使用來自 Fab 之 $V_H$ 和 $V_L$ 序列所構建者)中均可反轉成 $V_L$-scFv 連接子-$V_H$，根據格式可在一端或二端具有可選擇之連接子。一般而言，$V_L$ 或 $V_H$ 中一者"無活性"。

[0201] 如本文所示，有許多合適之 scFv 連接子可使用，包括藉由重組技術產生之傳統肽鍵。該連接子肽可主要包括下列胺基酸殘基：Gly、Ser、Ala 或 Thr。該連接子肽應具有適當之長度以連接二個分子，該連接方式為可令該二個分子呈現出相對於彼此具有正確構象，致使其保留所需活性。於一實施態樣中，該連接子之長度為約 1 至 50 個胺基酸，較佳之長度為約 1 至 30 個胺基酸長。於一實施態樣中，可使用長度為 1 至 20 個胺基酸之連接子，於一些實施態樣中，可使用長度為約 5 至約 10 個胺基酸之連接子。有用之連接子包括甘胺酸-絲胺酸聚合物，包括，例如(GS)n、(GSGGS)n、(GGGGS)n 和(GGGS)n(其中 n 為至少一(且一般為 3 至 4)之整數)、甘胺酸-丙胺酸聚合物、丙胺酸-絲胺酸聚合物和其他彈性連接子。或者，多

種非蛋白質性聚合物(包括，但不限於聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇與聚丙二醇的共聚物)可用來作為連接子，即，可作為連接子。

[0202] 其他連接子序列可包括 CL/CH1 結構域之任何長度的任何序列，但不包括 CL/CH1 結構域之所有殘基；例如該 CL/CH1 結構域的前 5 至 12 個胺基酸殘基。連接子可源自免疫球蛋白輕鏈，例如 Cκ 或 Cλ。連接子可源自任何同種型之免疫球蛋白重鏈，包括，例如 Cγ1、Cγ2、Cγ3、Cγ4、Cα1、Cα2、Cδ、Cε及 Cμ。連接子序列亦可源自其他蛋白質，諸如 Ig 樣蛋白(例如 TCR、FcR、KIR)、源自鉸鏈區之序列及來自其他蛋白質之其他天然序列。

[0203] 於一些實施態樣中，該連接子為用於將任何二個如本文概述之結構域連接在一起之“結構域連接子”。雖然可使用任何合適之連接子，許多實施態樣利用甘胺酸-絲胺酸聚合物(包括例如(GS)n、(GSGGS)n、(GGGGS)n和(GGGS)n，其中 n 為至少 1 之整數(一般為 3 至 4 至 5))及具有足夠長度和彈性以允許該二個結構域重組連接時令每個結構域保留其生物學功能的任何肽序列。在一些情況中，注意如下文中概述之“鏈型(strandedness)”，如於 scFv 連接子之一些實施態樣中，可使用帶電荷之結構域連接子。示例性結構域連接子為不可裂解之連接子，該不可裂解之連接子在其中該多肽構建體在體內半衰期期間係在，例如生理學相關之 pH 和溫度下使用的條件下，基本上未

被裂解。結構域連接子可在其框架之範圍內包括一或多個可裂解之部分。

[0204] 於一些實施態樣中，該 scFv 連接子或結構域為帶電之 scFv 連接子或結構域連接子。

[0205] 本文中，“計算篩選法”意指任何用於設計一或多個本發明之多肽構建體的方法，包括在構建體之組分(例如 $V_H$、$V_L$)中的突變，其中該方法利用電腦評估可能之胺基酸側鏈取代彼此間及/或與該蛋白質之其餘部分交互作用之能量。如本技藝之技術人士將理解者，能量之評估(稱為能量計算)係指計算一或多個胺基酸修飾之積分的一些方法。該方法可能涉及物理或化學能項目或可能涉及基於知識、統計、序列能項目，等。本文中，組成運算篩選法之計算稱為“運算式篩選計算”。

## 實施態樣

### 多肽構建體

[0206] 根據較佳之實施態樣及如所附之實施例中的記載，本發明之示例性多肽構建體為“雙特異性單鏈多肽構建體”，更佳為“單鏈 Fv”(scFv)，該 scFv 包括至少一個靶抗原結合結構域及可選擇地進一步連接至少一個半衰期延長結構域。雖然該 Fv 片段的二個結構域 $V_L$ 和 $V_H$ 係由分別的基因編碼，其可使用重組方法藉由合成連接子(如前文之描述)接合，該合成連接子使該二個結構域 $V_L$ 和 $V_H$ 能夠被製成單一蛋白鏈，在該單一蛋白鏈中，$V_L$ 和 $V_H$

區配對以形成無活性之 $V_L/V_H$ 對；參見，例如 Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883。這些多肽片段係使用本技藝之技術人士已知的常規技術取得，且該片段係以評估完整或全長抗體之相同方式來評估其功能。因此，單鏈可變片段(scFv)為免疫球蛋白之重鏈($V_H$)可變區和輕鏈($V_L$)可變區的融合蛋白，其通常係藉由具有約 10 至約 25 個胺基酸(較佳為約 15 至 20 個胺基酸)之短連接子肽連接。該連接子通常富含甘胺酸以具有彈性，以及富含絲胺酸或蘇胺酸以具有溶解度，且可連接 $V_H$ 之 N-端與 $V_L$ 之 C 端，或者反過來。未被變成"無活性"之多肽部分基本上保留該原始免疫球蛋白之特異性，儘管該恆定區被除去並引入連接子。

[0207] 因此，於一示例性之實施態樣中，本發明提供針對 CD3 抗原之單鏈 scFv 多肽。該 scFv 多肽包含第一 scFv 結構域，該第一 scFv 結構域包含第一 $V_H$ 結構域和第一 $V_L$ 結構域，該第一 VH 結構域和該第一 VL 結構域透過第一連接子部分(例如 scFv 連接子)接合。該第一連接子部分可選擇地包含介於該第一 $V_H$ 結構域與該第一 $V_L$ 結構域之間的第一蛋白酶裂解位點。該第一 $V_H$ 結構域與該第一 $V_L$ 結構域交互作用以形成第一 $V_H/V_L$ 對。為了提供能有條件地結合其 CD3 靶的之多肽，該第一 $V_H$ 結構域和該第一 $V_L$ 結構域中一者為如本文所定義之術語般的無活性(即，$V_H$ i 或 $V_L$i)。因此，示例性之第一 scFv 結構域不會特異性結合 CD3 抗原。當蛋白酶在該蛋白酶裂解位點裂

解該第一 scFv 連接子時，該無活性 $V_H$ 或無活性 $V_L$ 結構域與其活性 $V_L$ 或活性 $V_H$ 結合夥伴分離，然後該活性 $V_L$ 或活性 $V_H$ 結合夥伴可與其活性同源物配對，從而允許形成經適當配對之抗 CD3 結構域並與 CD3 抗原結合。於示例性實施態樣中，該二種活性同源物係在相同的多肽鏈上。於各種實施態樣中，該二種活性同源物係在分開之多肽鏈上，它們被放在一起並在細胞表面上交互作用以形成特異性結合 CD3 之活性 CD3 結合結構域。

[0208] 該第一 scFv 多肽透過可選擇地包含第二蛋白酶裂解位點之第一結構域連接子部分與第二 scFv 結構域接合。該第二 scFv 結構域包含第二 $V_H$ 結構域和第二 $V_L$ 結構域，該第二 $V_H$ 結構域和第二 $V_L$ 結構域經由該第二 scFv 與該第二 $V_L$ 結構域之間的第三蛋白酶裂解位點接合。該第二 $V_H$ 結構域與該第二 $V_L$ 結構域交互作用以形成第二 $V_H/V_L$ 對。如同上述之第一 $V_H/V_L$ 對，該第二 $V_H$ 結構域和該第二 $V_L$ 結構域中一者無活性，致使該第二 scFv 結構域不會特異性結合該 CD3 抗原。該第一 scFv 結構域透過第二結構域連接子與第一靶抗原結合結構域接合。該第二結構域連接子接合選自該第一 $V_H$ 結構域和該第一 $V_L$ 結構域之成員與該第一靶抗原結合結構域。該第二 scFv 結構域透過第三結構域連接子與第二靶抗原結合結構域接合。該第三結構域連接子接合選自該第二 $V_H$ 結構域和該第二 $V_L$ 結構域之成員與該第二靶抗原結合結構域。

[0209] 於一示例性之實施態樣中，本發明提供針對

CD3 抗原之單鏈 scFv 多肽。該 scFv 多肽包含第一 scFv 結構域，該第一 scFv 結構域包含第一 $V_H$ 結構域和第一 $V_L$ 結構域，該第一 $V_H$ 結構域和該第一 $V_L$ 結構域透過第一 scFv 連接子部分接合。該第一 scFv 連接子部分包含介於該第一 $V_H$ 結構域與該第一 $V_L$ 結構域之間的第一蛋白酶裂解位點。如上文所闡述者，該第一 $V_H$ 結構域與該第一 $V_L$ 結構域交互作用以形成第一 $V_H/V_L$ 對，其中該第一 $V_H$ 結構域和該第一 $V_L$ 結構域中一者為無活性之第一 $V_H$ 結構域或無活性之第一 $V_L$ 結構域。因此，該第一 scFv 結構域不會特異性結合該 CD3 抗原。該第一 scFv 多肽透過可選擇地包含第二蛋白酶裂解位點之第一結構域連接子部分與第二 scFv 結構域接合，該第二 scFv 結構域包含第二 $V_H$ 結構域和第二 $V_L$ 結構域，該第二 $V_H$ 結構域和第二 $V_L$ 結構域經由第二 scFv 連接子部分接合，該第二 scFv 連接子部分包含介於該第二 $V_H$ 結構域與該第二 $V_L$ 結構域之間的第三蛋白酶裂解位點。該第二 $V_H$ 結構域與該第二 $V_L$ 結構域交互作用以形成第二 $V_H/V_L$ 對。如上述，該第二 $V_H$ 結構域和該第二 $V_L$ 結構域中一者為無活性之第二 $V_H$ 結構域或無活性之 $V_L$ 結構域且該第二 scFv 結構域不會特異性結合該 CD3 抗原。

[0210] 此多肽之第一 scFv 結構域透過第二結構域連接子與第一靶抗原結合結構域接合，該第二結構域連接子接合選自該第一 $V_H$ 結構域和該第一 $V_L$ 結構域之成員與該第一靶抗原結合結構域。該第二 scFv 結構域透過第三結

構域連接子與第二靶抗原結合結構域接合。該第三結構域連接子接合選自該第二 $V_H$ 結構域和該第二 $V_L$ 結構域之成員與該第二靶抗原結合結構域。當單鏈 scFv 與能夠裂解該第一 scFv 連接子部分之第一蛋白酶裂解位點的第一蛋白酶接觸時，該無活性之第一 $V_H$ 結構域或該無活性之第一 $V_L$ 結構域與該單鏈 scFv 多肽分離。類似地，當該多肽與能夠裂解該第二 scFv 連接子部分之第二蛋白酶裂解位點的第二蛋白酶接觸時，該無活性之第二 $V_H$ 結構域或該無活性之第二 $V_L$ 結構域與該單鏈 scFv 多肽分離。該無活性之結構域從該多肽之活性結構域裂解以形成能夠特異性結合該 CD3 抗原之活性單鏈 scFv。

[0211] 於一示例性之實施態樣中，本發明提供針對 CD3 抗原之單鏈 scFv 多肽。該 scFv 多肽包含第一 scFv 結構域，該第一 scFv 結構域包含第一 $V_H$ 結構域和第一 $V_L$ 結構域，該第一 VH 結構域和該第一 VL 結構域透過第一 scFv 連接子部分接合。該第一連接子部分包含介於該第一 $V_H$ 結構域與該第一 $V_L$ 結構域之間的第一蛋白酶裂解位點。該第一 $V_H$ 結構域與該第一 $V_L$ 結構域交互作用以形成第一 $V_H/V_L$ 對，其中該第一 $V_H$ 結構域和該第一 $V_L$ 結構域中一者無活性。因此，該第一 scFv 結構域不會特異性結合該 CD3 抗原。該第一 scFv 多肽透過可選擇地包含第二蛋白酶裂解位點之第一結構域連接子部分與第一靶抗原結合結構域接合。該第一結構域連接子接合選自該第一 $V_H$ 結構域和該第一 $V_L$ 結構域之成員與該第一靶抗原結合

結構域。

[0212] 於一示例性之實施態樣中，提供該等如上述之 scFv 構建體對。該構建體對透過彼等之配對的 CD3 結合結構域協同結合 CD3 抗原。該構建體對之個別 scFv 分子之配對的 CD3 位點與 CD3 抗原之結合係藉由該構建體對之各成員的靶抗原結合結構域與其同源抗原結合來促進、增強及/或驅動。

[0213] 該多肽構建體能與一或多個靶抗原和 CD3，及可選擇地半衰期延長結構域(諸如 HSA 結合結構域)特異性結合。與 CD3 結合僅可能在一旦被蛋白酶活化及與靶抗原結合時。應理解的是，於一些實施態樣中，蛋白酶裂解該蛋白酶裂解結構域係在靶抗原結合結構域與靶抗原結合之前發生。亦應理解的是，於一些實施態樣中，蛋白酶裂解該蛋白酶裂解結構域係在靶抗原結合結構域與靶抗原結合之後發生。

[0214] 於一些實施態樣中，該 scFv 多肽進一步包含二或更多個蛋白酶裂解結構域。於一些實施態樣中，一或多個 CD3 結合結構域包含源自特異於人 CD3 之單鏈可變片段(scFv)的多肽。於一示例性之實施態樣中，該 CD3 結合結構域包括 $V_L$ 和 $V_H$ 部分，該 $V_L$ 和 $V_H$ 部分藉由其中具有一個蛋白酶裂解結構域之連接子連接。在此 CD3 結合結構域中，藉由已知技術使 $V_L$ 或 $V_H$ 無活性(即，基本上不能特異性結合 CD3)，該技術為，例如在 $V_L$ 或 $V_H$ 中之一或多個位點製造突變、刪除 CDR，等。該經突變之 $V_L$

或 $V_H$ 能夠被配對並分別與對應之 $V_H$ 或 $V_L$ 配對，該對應之 $V_H$ 或 $V_L$ 當未與突變序列配對(或與其適當之同源序列配對)時，實質上能夠選擇性地與 CD3 結合。該無活性之 $V_L$ 或 $V_H$ 與對應之 CD3 結合 $V_H$ 或 $V_L$ 配對時使得該對應之 CD3 結合 $V_H$ 或 $V_L$ 無活性，直到該夥伴經由蛋白酶裂解連接子中之蛋白酶裂解結構域而使結合夥伴分開。當蛋白酶裂解結構域裂解時，該活性 CD3 結合物種與其無活性夥伴為“未經配對”，從而允許該 CD3 結合結構域實質上特異性結合 CD3。於各種實施態樣中，由於 CD3 結合 $V_L$ 或 $V_H$ 中之一或多個胺基酸突變而使得該無活性之結合夥伴無活性，該突變實質上破壞了該結合夥伴以特異方式結合 CD3，但保留該經突變之物種與 CD3 結合結構域配對之能力，憑藉此可實質上將 CD3 結合結構域之 CD3 結合特性去活化，直到藉由蛋白酶裂解該蛋白酶裂解結構域以使該結合夥伴分開。

[0215] 如下列實施例中所示，本發明者已發現本發明之多肽構建體的活性和效力顯示出幾乎不依賴各種結構域之取向。因此，從 N 端讀至 C 端，$V_L$ 可為 $V_Hi$ 之上游，反之亦然。此外，$V_Li$ 可為 $V_H$ 之上游，或者反之亦然。該半衰期延長結構域可與該無活性 CD3 結合結構域中一者接合或與靶抗原結合結構域接合。於一示例性實施態樣中，該半衰期延長結構域係與多肽構建體的組分接合，其在該 scFv 連接子裂解時與該活性多肽分離。因此，例如，該半衰期延長結構域與 $V_Li$ 或 $V_Hi$ 接合。

[0216] 於一些實施態樣中，一或多個半衰期延長結構域包含與人血清白蛋白結合之結合結構域。於一些實施態樣中，一或多個半衰期延長結構域包含 scFv、可變重鏈結構域($V_H$)、輕鏈可變域($V_L$)、奈米體、肽、配體或小分子。於一些實施態樣中，一或多個半衰期延長結構域包含 scFv。於一些實施態樣中，一或多個半衰期延長結構域包含 Fc 結構域。於一些實施態樣中，該半衰期延長結構域在蛋白酶裂解前係位於多肽之 N 端。於一些實施態樣中，該半衰期延長結構域在蛋白酶裂解前係位於多肽之 C 端。於一些實施態樣中，該半衰期延長結構域在蛋白酶裂解前不在多肽之 C 端或 N 端。

[0217] 該半衰期延長結構域允許該多肽構建體之大小被調整成基本上為任何期望之大小以取得適當之藥代動力學參數。因此，於一些實施態樣中，本文所描述之多肽構建體之大小為約 50kD 的至約 80 kD、約 50kD 至約 75 kD、約 50kD 至約 70 kD 或約 50kD 的至約 65 kD。因此，該抗原結合多肽之大小優於 IgG 抗體，該 IgG 抗體之大小為約 150 kD，而該 BiTE 和 DART 雙抗體分子之大小為約 55kD 但並非經半衰期延長的，因此會快速地透過腎臟清除。本文所描述之抗原結合多肽的另一特性為彼等具有單一多肽之設計，其結構域具有彈性連接。這允許該多肽構建體可容易地產生和製造，因其可由單一 cDNA 分子編碼以輕易地被併入載體中。再者，由於本文所描述之抗原結合多肽為單體型單多肽鏈，沒有鏈配對問題或需要二

聚體化。不同於其他報告之分子(諸如雙特異性 BiTE 蛋白質)，本文所描述之抗原結合多肽被預期聚集之趨勢降低。

[0218] 雙特異性單鏈分子為本技藝所已知且描述於 WO99/54440、Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970、Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025、Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197、Loffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103、Bruhl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426、Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56 中。用於製造單鏈抗體之技術可經過修改(參見，尤其是，美國專利案第 4,946,778 號)以適用於產生特異性識別經選定之靶的之單鏈多肽構建體。

[0219] 具有較高效價之多肽(二價抗體之類似物)亦在本發明之範圍內。例如，與二個 CD3 結合之多肽構建體(例如在 T 細胞受體中之 3 個分子或二個 CD3 次單位)係包含在本發明內。類似地，本發明之多肽構建體可包括二或更多個靶抗原結合結構域。因此，本發明之構建體可可包括二或更多個完全相同或二或更多個不同的抗 EGFR 結合結構域。該等分子可被認為類似於二價(bivalent)(亦稱為二價(divalent))或雙特異性單鏈可變片段(具有格式$(scFv)_2$之雙-scFv 或二-scFv)。該等構建體可藉由連接二個 scFv 分子(例如使用如前述之連接子)來進行工程處理。若這二個 scFv 分子具有相同的結合特異性，該所產生之$(scFv)_2$分子通常被稱為“二價”(即，其具有用於相同之靶的抗原

決定部位的二個效價)。若該 2 個 scFv 分子具有不同的結合特異性，該所產生之$(scFv)_2$分子通常被稱為雙特異性。該連接可藉由產生具有二個 $V_H$ 區及二個 $V_L$ 區的單一肽鏈，產生串聯 scFv 來完成(參見，例如 Kufer P. et al., (2004) Trends in Biotechnology 22(5):238-244)。

[0220] 本文描述之抗原結合 scFv 多肽係經設計以藉由招募細胞毒性 T 細胞而允許特異性靶向表現靶抗原之細胞。該 CD3 結合結構域保持無活性，直到藉由蛋白酶裂解位於 $V_H$ 和 $V_L$i 之間或 $V_H$i 和 $V_L$ 之間的蛋白酶裂解位點才被活化，其中"i"表示藉由 $V_H$ 或 $V_L$ 之親本多肽序列發生突變而被去活化之次單位。與雙特異性 T 細胞銜接器治療劑相比較，這改善了特異性，該雙特異性 T 細胞銜接器治療劑與 CD3 和靶抗原(靶細胞，諸如腫瘤或癌症細胞可能或可能不表現該靶抗原)結合。相反地，藉由特異性活化在靶細胞之微環境(其中該靶抗原和蛋白酶高度表現)中的 CD3 結合，該多肽構建體可將細胞毒性 T 細胞與以高度特異性方式表現靶抗原之細胞交聯，從而指導該 T 細胞之細胞毒性潛能朝向該靶細胞。本文所描述之多肽構建體經由蛋白酶活化之結合作用來銜接細胞毒性 T 細胞與表面表現之 CD3，這形成 T 細胞受體複合體之一部分。同時將數個多肽構建體與 CD3 及與表現在特定細胞表面上之靶抗原結合會引起 T 細胞活化並介導該表現特定之靶抗原的細胞隨後裂解。因此，預期多肽構建體顯示出強、特異性且有效之靶細胞滅殺。

[0221] 於一些實施態樣中，本文所描述之多肽構建體刺激由細胞毒性 T 細胞滅殺靶細胞以排除在富含蛋白酶之微環境中之致病細胞(例如腫瘤細胞、病經毒或細菌感染之細胞、自體反應性 T 細胞，等)。於一些該等實施態樣中，細胞被選擇性地排除，從而降低毒性副作用之可能。於其他實施態樣中，可使用相同之多肽來增進排除用於治療效果之內源性細胞，諸如在自體免疫性疾病中之 B 或 T 淋巴細胞，或用於幹細胞移植之造血幹細胞(HSC)。已知與患病細胞或組織相關之蛋白酶包括，但不限於絲胺酸蛋白酶、半胱胺酸蛋白酶、天門冬胺酸蛋白酶、蘇胺酸蛋白酶、麩胺酸蛋白酶、金屬蛋白酶、天門冬醯胺肽裂合酶(lyase)、血清蛋白酶、組織蛋白酶(cathepsin)、組織蛋白酶 B、組織蛋白酶 C、組織蛋白酶 D、組織蛋白酶 E、組織蛋白酶 K、組織蛋白酶 L、激肽釋放酶(kallikrein)、hK1、hK10、hK15、纖溶酶(plasmin)、膠原蛋白酶、第 IV 型膠原蛋白酶、溶基質蛋白酶(stromelysin)、第 Xa 因子、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)樣蛋白酶、胰蛋白酶樣蛋白酶、彈性蛋白酶(elastase)樣蛋白酶、枯草桿菌蛋白酶樣蛋白酶、奇異果蛋白酶(actinidain)、鳳梨蛋白酶(bromelain)、鈣蛋白酶(calpain)、凋亡蛋白酶(caspase)、凋亡蛋白酶 3、Mir 1-CP、木瓜蛋白酶(papain)、HIV-1 蛋白酶、HSV 蛋白酶、CMV 蛋白酶、凝乳酶(chymosin)、腎素(renin)、胃蛋白酶(pepsin)、間質蛋白酶、天門冬醯胺內肽酶(legumain)、天門冬胺酸蛋白酶(plasmepsin)、豬籠

草蛋白酶(nepenthesin)、金屬外肽酶(metalloexopeptidase)、金屬內肽酶(metalloendopeptidase)、基質金屬蛋白酶(MMP)、MMP1、MMP2、MMP3、MMP8、MMP9、MMP13、MMP11、MMP14、尿激酶纖溶酶原活化劑(uPA)、腸激酶(enterokinase)、前列腺特異性抗原(PSA、hK3)、介白素-1β 轉化酶、凝血酶、FAP(FAP-α)、二肽基肽酶、甲基多巴(meprin)、粒酶及二肽基肽酶 IV(DPPIV/CD26)。

[0222] 本文所描述之抗原結合多肽進一步提供超越已經識別之單株抗抗體及其他較小之雙特異性分子的治療優點。雙特異性分子係經設計成經由與致病細胞相關之細胞特異性標記來與靶細胞結合。在某些情況下，當健康細胞或組織表現出與致病細胞相同之標記物時可能會有毒性。本發明之抗原結合多肽構建體的一種優點為與 CD3 之結合係依賴由該靶細胞(諸如腫瘤細胞)表現之蛋白酶的活化作用以及該抗原結合結構域與一或多個靶抗原(例如腫瘤抗原)結合。該多肽構建體包含無活性 CD3 結合結構域，該無活性 CD3 結合結構域包含被一或多個蛋白酶裂解位點分開的 $V_H$ 和 $V_L$i 或 $V_H$i 和 $V_L$。在靶細胞之富含蛋白酶的環境中，該蛋白酶裂解位點被裂解，使 $V_H$ 和 $V_L$i 或 $V_H$i 和 $V_L$ 分離並允許 $V_H$ 和 $V_L$ 或 $V_H$ 和 $V_L$ 交互作用以形成活性 CD3 結合結構域，然後在一或多個靶抗原被結合時使該構建體與 CD3 結合。當無蛋白酶裂解存在時，該 CD3 結合結構域無活性且無法與 CD3 結合。

[0223] 亦提供由單獨分子在蛋白酶裂解後配對形成

活性抗 CD3 scFv 之多肽構建體。因此，為該配對之第一成員的多肽構建體包括 $V_H/V_Li$ 或 $V_Hi/V_L$ 結構域，$V_Li$ 或 $V_Hi$ 被蛋白酶從該配對之第一成員裂解。該對應之 $V_Li$ 或 $V_Hi$ 被從該配對之第二成員裂解，允許經由將該在 CD3 靶的上之二個分開的分子配對來形成 $V_L/V_H$ 結構域。於一態樣中，這些“半-Pro”分子係作為用於工程處理該“全-Pro”分子的工具，其係藉由允許該形成配對之二個分子容易變化及將從這些實驗獲得之信息轉譯成設計並製備對應之“全-Pro”多肽構建體來作用。於各種實施態樣中，該“半-Pro”分子必須同時結合 CD3 靶的和靶抗原二者以形成功能性抗 CD3 $V_L/V_H$ 對。

[0224] 因此，本文亦提供其中該蛋白質包含單一多肽鏈之多肽構建體，該單一多肽鏈包含蛋白酶裂解結構域(P)，此蛋白酶裂解結構域(P)將鏈分開成第一和第二 CD3 結合區；其中該第一區包含抗 CD3 $V_H$ 結合結構域($CV_H$)及靶抗原結合結構域($T_1$)，而該第二區包含抗 CD3 $V_L$ 結合結構域($CV_L$)及靶抗原結合結構域($T_2$)；其中該蛋白質在第一或第二區中可選擇地包含半衰期延長結構域(H)，且其中當藉由蛋白酶裂解 P 及由 $T_1$ 和 $T_2$ 結合靶抗原來活化時，該第一和第二區相聯結以形成結合 CD3 之完整抗 CD3 $V_L/V_H$ 結構域。

[0225] 於某些態樣中，本文亦提供其中該蛋白質包含單一多肽鏈之多肽構建體，該單一多肽鏈包含蛋白酶裂解結構域(P)，此蛋白酶裂解結構域(P)將鏈分開成第一和

第二區；其中該第一區包含抗 CD3 $V_L$ 結合結構域($CV_L$)及靶抗原結合結構域($T_1$)，而該第二區包含抗 CD3 $V_H$ 結合結構域($CV_H$)及靶抗原結合結構域($T_2$)；其中該蛋白質在第一或第二區中可選擇地包含半衰期延長結構域(H)，且其中當藉由蛋白酶裂解 P 及由 $T_1$ 和 $T_2$ 結合靶抗原來活化時，該第一和第二區相聯結以形成結合 CD3 之完整抗 CD3 $V_L/V_H$ 結構域。

[0226] 於某些態樣中，本文亦提供其中該蛋白質包含單一多肽鏈之多肽構建體，該單一多肽鏈包含第一和第二區；其中該第一區包含抗 CD3 $V_H$ 結合結構域($CV_H$)、與 $CV_H$ 聯結之無活性抗 CD3 $V_L$ 結合結構域($CV_L$i)及靶抗原結合結構域($T_1$)；其中該第二區包含抗 CD3 $V_L$ 結合結構域($CV_L$)；與 $CV_L$ 聯結之無活性抗 CD3 $V_H$ 結合結構域($CV_H$i)及靶抗原結合結構域($T_2$)；其中該蛋白質在第一及/或第二區中可選擇地包含半衰期延長結構域(H)，且其中 $CV_L$i 和 $CV_H$i 各自包含至少一個蛋白酶裂解結構域；其中當藉由蛋白酶裂解該蛋白酶裂解結構域及由 $T_1$ 和 $T_2$ 結合靶抗原來活化時，該第一和第二區相聯結以形成結合 CD3 之完整抗 CD3 $V_L/V_H$ 結構域。

[0227] 於某些態樣中，本文亦提供其中該蛋白質包含單一多肽鏈之多肽構建體，該單一多肽鏈包含第一和第二區；其中該第一區包含抗 CD3 $V_L$ 結合結構域($CV_L$)、與 $CV_L$ 聯結之無活性抗 CD3 $V_H$ 結合結構域($CV_H$i)及靶抗原結合結構域($T_1$)；其中該第二區包含抗 CD3 $V_H$ 結合結構

域($CV_H$)；與 $CV_L$ 聯結之無活性抗 CD3 $V_L$ 結合結構域($CV_Li$)及靶抗原結合結構域($T_2$)；其中該蛋白質在第一及/或第二區中可選擇地包含半衰期延長結構域(H)，且其中 $CV_Li$ 和 $CV_Hi$ 各自包含至少一個蛋白酶裂解結構域；其中當藉由蛋白酶裂解該蛋白酶裂解結構域及由 $T_1$ 和 $T_2$ 結合靶抗原來活化時，該第一和第二區相聯結以形成結合 CD3 之完整抗 CD3 $V_L/V_H$ 結構域。

[0228] 於一態樣中，該為預活化形式之抗原結合蛋白包含單一多肽鏈，該單一多肽鏈包含第一結構域和第二區，該第一結構域包含至少一抗 CD3 結合結構域且該第二區包含至少一個抗靶的結合結構域。該第一區和第二區係藉由多肽連接子分開，該多肽連接子在其序列中可選擇地包括一或多個可裂解部分，例如至少一個蛋白酶裂解結構域(P)。於一示例性實施態樣中，該第一區包含抗 CD3 $V_H$ 結合結構域($CV_H$)和靶抗原結合結構域($T_1$)。於一實施態樣中，該第二區包含抗 CD3 $V_L$ 結合結構域($CV_L$)和靶抗原結合結構域($T_2$)。於一實施態樣中，該抗原結合結構域在第一區中可選擇地包含半衰期延長結構域(H)。於一實施態樣中，該抗原結合結構域在第二區中可選擇地包含半衰期延長結構域(H)。一旦藉由蛋白酶裂解該蛋白酶裂解結構域並由靶抗原結合結構域 $T_1$ 和 $T_2$ 結合該靶抗原來活化時，該抗 CD3 結合結構域 $CV_H$ 和 $CV_L$ 被活化以結合 T 細胞上之 CD3。在抗原結合蛋白中之結構域被預期在各區內係以任何順序排列，並在該預活化之多肽中心具有一蛋

白酶裂解結構域(P)。此外，在該預活化之多肽內的各區可為任何順序。因此(僅用來舉例)，可預期的是，該多肽構建體之示例性結構域順序包括，但不限於：

a) $CV_H$-$T^1$-P-$T^2$-$CV_L$、

b) $T^1$-$CV_H$-P-$T^2$-$CV_L$、

c) $CV_H$-$T^1$-P-$CV_L$-$T^2$、

d) $T^1$-$CV_H$-P-$CV_L$-$T^2$、

e) H-$CV_H$-$T^1$-P-$T^2$-$CV_L$、

f) $CV_H$-H-$T^1$-P-$T^2$-$CV_L$、

g) $CV_H$-$T^1$-H-P-$T^2$-$CV_L$、

h) $CV_H$-$T^1$-P-H-$T^2$-$CV_L$、

i) $CV_H$-$T^1$-P-$T^2$-H-$CV_L$、

j) $CV_H$-$T^1$-P-$T^2$-$CV_L$-H、

k) H-$T^1$-$CV_H$-P-$T^2$-$CV_L$、

l) $T^1$-H-$CV_H$-P-$T^2$-$CV_L$、

m) $T^1$-$CV_H$-H-P-$T^2$-$CV_L$、

n) $T^1$-$CV_H$-P-H-$T^2$-$CV_L$、

o) $T^1$-$CV_H$-P-$T^2$-H-$CV_L$、

p) $T^1$-$CV_H$-P-$T^2$-$CV_L$-H、

q) H-$CV_H$-$T^1$-P-$CV_L$-$T^2$、

r) $CV_H$-H-$T^1$-P-$CV_L$-$T^2$、

s) $CV_H$-$T^1$-H-P-$CV_L$-$T^2$、

t) $CV_H$-$T^1$-P-H-$CV_L$-$T^2$、

u) $CV_H$-$T^1$-P-$CV_L$-H-$T^2$、

v) $CV_H$-$T^1$-P -$CV_L$-$T^2$-H、

w) H-$T^1$-$CV_H$-P-$CV_L$-$T^2$、

x) $T^1$-H-$CV_H$-P-$CV_L$-$T^2$、

y) $T^1$-$CV_H$-H-P-$CV_L$-$T^2$、

z) $T^1$-$CV_H$-P-H-$CV_L$-$T^2$、

aa) $T^1$-$CV_H$-P-$CV_L$-H-$T^2$，及

bb) $T^1$-$CV_H$-P-$CV_L$-$T^2$-H。

[0229] 如本技藝之技術熟習人士所理解的，在上述 a 至 bb 各項中，$CV_H$ 和 $CV_L$ 中一者無活性，即，$CV_H$i 或 $CV_L$i。在上述 a-bb 各項中之個別組分的順序與“半-Pro”分子和“全-Pro”分子相關。在“全-Pro”分子方面，“T”和其他部分之數目可依需要而改變以形成有用之本發明的多肽構建體。一般而言，較佳地，H 與 $CV_L$ 或 $CV_H$ 之無活性版本結合。如**第 53 圖**所例示，本發明之多肽構建體的組分可在一個順序範圍內連接且其間以具有各種特性之連接子隔開。

[0230] 於各種實施態樣中，本發明提供為前藥之多肽構建體(或指導該等多肽表現之核酸載體)。因此，提供一種前藥組成物，其包含：i) 編碼 CD3 結合結構域之第一多肽序列，該 CD3 結合結構域包含含有第一 $V_H$ 結構域和第一 $V_L$ 結構域之第一 scFv 結構域，該第一 $V_H$ 結構域和該第一 $V_L$ 結構域係透過包含第一蛋白酶裂解位點之第一 scFv 連接子部分接合，致使該第一 scFv 結構域不會特異性結合 CD3；ii) 編碼腫瘤抗原結合結構域之第二多肽

序列，該腫瘤抗原結合結構域包含含有第二 $V_H$ 結構域和第二 $V_L$ 結構域之第二 scFv 結構域，該第二 $V_H$ 結構域和第二 $V_L$ 結構域係透過包含第二蛋白酶裂解位點之第二 scFv 連接子部分接合，致使該第二 scFv 結構域不會特異性結合腫瘤抗原；及 iii) 可選擇地至少一個半衰期延長結構域。

[0231] 於一示例性之實施態樣中，在該前藥組成物中，該第一多肽序列和第二多肽序列係藉由可選擇地包含蛋白酶裂解位點之第一結構域連接子部分可操作地連接。

[0232] 於各種實施態樣中，提供一種前藥組合物，其包含：i) 第一多肽序列，其包含 a) 包含第一 scFv 結構域之第一 CD3 結合結構域，該第一 scFv 結構域包含第一 $V_H$ 結構域和第一 $V_L$ 結構域，該第一 $V_H$ 結構域和該第一 $V_L$ 結構域係透過包含第一蛋白酶裂解位點之第一 scFv 連接子部分接合，其中該第一 scFv 結構域不會特異性結合 CD3；和 b)第一腫瘤抗原結合結構域；ii) 第二多肽序列，其包含 a)包含第二 scFv 結構域之第二 CD3 結合結構域，該第二 scFv 結構域包含第二 $V_H$ 結構域和第二 $V_L$ 結構域，該第二 $V_H$ 結構域和第二 $V_L$ 結構域係透過包含第二蛋白酶裂解位點之第二 scFv 連接子部分接合，其中該第二 scFv 結構域不會特異性結合 CD3；和 b)第二腫瘤抗原結合結構域；及 iii) 可選擇地至少一個半衰期延長結構域。於一示例性實施態樣中，該第一 $V_H$ 結構域和第二 $V_L$ 結構域特異性結合 CD3 及/或該第二 $V_H$ 結構域和第一 $V_L$

結構域特異性結合 CD3。

[0233] 在該前藥組成物中，該第一腫瘤抗原結合結構域及該第二腫瘤抗原結合結構域與相同之腫瘤抗原結合。於各種實施態樣中，該第一腫瘤抗原結合結構域及該第二腫瘤抗原結合結構域與不同之腫瘤抗原蛋白結合。於各種實施態樣中，該第一腫瘤抗原結合結構域與呈現在第一腫瘤細胞上之第一腫瘤抗原結合，且該第二腫瘤抗原結合結構域與呈現在該第一腫瘤細胞上之第二腫瘤抗原結合。

***CD3 結合結構域***

[0234] T 細胞反應之特異性係藉由 T 細胞受體複合物識別抗原來介導(在主要組織相容性複合物，MHC 之背景下顯示)。作為 T 細胞受體複合物之一部分，CD3 為蛋白質複合物，其包括存在於該細胞表面上之 CD3γ(gamma)鏈、CD3δ(delta)鏈及二個 CD3ε(epsilon)鏈。CD3 與 T 細胞受體(TCR)之 α (alpha)和 β (beta)鏈以及 CD3ζ (zeta)全部聯結在一起以包含 T 細胞受體複合物。CD3 在 T 細胞上群集成簇(諸如藉由固定之抗 CD 3 抗體)而導致類似於 T 細胞受體接合之 T 細胞活化，但與其選殖株典型特異性無關。於一些實施態樣中，抗 CD3 抗體與 CD3 之結合係藉由蛋白酶裂解結構域調節，該蛋白酶裂解結構域限制 CD3 抗體與 CD3 僅在具有提高之蛋白酶水準的患病細胞或組織之微環境(例如在腫瘤微環境中)中結合。

[0235] 於一態樣中，本文所描述之多肽構建體包含當被蛋白酶活化時會特異性結合 CD3 之結構域。於一態樣中，本文所描述之多肽構建體包含二或更多個當被蛋白酶活化時會特異性結合人 CD3 之結構域。於一些態樣中，本文所描述之多肽構建體包含二或更多個當被蛋白酶活化時會特異性結合 CD3γ 之結構域。於一些實施態樣中，本文所描述之多肽構建體包含二或更多個當被蛋白酶活化時會特異性結合 CD3δ 之結構域。於一些實施態樣中，本文所描述之多肽構建體包含二或更多個當被蛋白酶活化時會特異性結合 CD3ε 之結構域。

[0236] 於一些實施態樣中，該蛋白酶裂解位點係位於抗 CD3 $V_H$ 和 $V_L$ 結構域之間並使該 CD3 $V_H$ 和 $V_L$ 結構域避免折疊及與 T 細胞上之 CD3 結合。一旦該蛋白酶裂解位點被存在於該靶細胞之蛋白酶裂解，該抗 CD3 $V_H$ 和 $V_L$ 結構域能夠折疊並與 T 細胞上之 CD3 結合。於一替代之實施態樣中，該蛋白酶裂解位點被設計在與該抗 CD3 $V_H$ 和 $V_L$ 結構域結合之非 CD3 結合 $V_L$ 和 $V_H$ 結構域中。藉由存在於靶細胞之蛋白酶來裂解該蛋白酶裂解位點可移除非 CD3 結合 $V_L$ 和 $V_H$ 結構域並允許抗 CD3 $V_H$ 和 $V_L$ 折疊及與 T 細胞上之 CD3 結合。

[0237] 本文所描述之抗原結合蛋白包含當被蛋白酶活化時會與 CD3 特異性結合之結構域。於一實施態樣中，該特異性結合 CD3 之結構域包含被至少一個蛋白酶裂解位點分開的 $V_H$ 結構域和 $V_L$ 結構域。當該蛋白酶裂解

位點被裂解時，該 $V_H$ 結構域和 $V_L$ 結構域能夠折疊，從而與 CD3 結合。於一些實施態樣中，該蛋白酶裂解位點係在環區中。於一些實施態樣中，該蛋白酶裂解位點係在 $V_H$ 及/或 $V_L$ 結構域內，該蛋白酶裂解位點被裂解後露出 $V_H$ 及/或 $V_L$ 結構域，允許它們折疊，從而與 CD3 結合。

[0238] 於進一步之實施態樣中，本文所描述之多肽構建體包含二或更多個當被蛋白酶活化時會特異性結合 T 細胞受體(TCR)之結構域。在某些情況下，本文所描述之多肽構建體包含二或更多個當被蛋白酶活化時會特異性結合 TCR 之鏈的結構域。在某些情況下，本文所描述之多肽構建體包含二或更多個當被蛋白酶活化時會特異性結合 TCR 之 β 鏈的結構域。

[0239] 於某些實施態樣中，本文所描述之多肽構建體之 CD3 結合結構域不僅表現出對人 CD3 之強 CD3 結合親和力，亦顯示出與各別食蟹猴 CD3 蛋白具優良之交叉反應性。在一些情況下，該多肽構建體之 CD3 結合結構域與來自食蟹猴之 CD3 交叉反應。在某些情況下，人：食蟹猴對 CD3 之 $K_D$ 比係在 5 和 0.2 之間。

[0240] 於一些實施態樣中，該抗原結合蛋白之 CD3 結合結構域可為任何與 CD3 結合之結構域，包括，但不限於來自單株抗體、多株抗體、重組抗體、人抗體、人化抗體之結構域。在一些情況下，該 CD3 結合結構域係源自該最終將使用該抗原結合蛋白的相同物種是有利的。例如，為了用於人體，該抗原結合蛋白之 CD3 結合結構域

包含來自抗體或抗體片段之抗原結合結構域的人或人化殘基是有利的。

[0241] 因此，於一態樣中，該抗原結合結構域包含人化抗體、或人抗體、或抗體片段、或鼠抗體、或抗體片段。於一實施態樣中，該人化或人抗 CD3 結合結構域包含一或多個(例如全部三個)本文所描述之人化或人抗 CD3 結合結構域的輕鏈互補決定區 1(LC CDR1)、輕鏈互補決定區 2(LC CDR2)、輕鏈互補決定區 3(LC CDR3)，及/或一或多個(例如全部三個)本文所描述之人化或人抗 CD3 結合結構域的重鏈互補決定區 1(HC CDR1)、重鏈互補決定區 2(HC CDR2)及重鏈互補決定區 3(HC CDR3)，例如包含一或多個(例如全部三個) LC CDR 及一或多個(例如全部三個) HC CDR。

[0242] 於一些實施態樣中，該人化或人抗 CD3 結合結構域包含特異於 CD3 之人化或人輕鏈可變區，其中該特異於 CD3 之輕鏈可變區包含在人輕鏈框架區中的人或非人輕鏈 CDR。在某些情況下，該輕鏈框架區為 λ (lambda)輕鏈框架。在其他情況下，該輕鏈構架區為 κ (kappa)輕鏈框架。

[0243] 於一些實施態樣中，一或多個 CD3 結合結構域係特異於 CD3ε。於一些實施態樣中，一或多個 CD3 結合結構域係特異於 CD3δ。於一些實施態樣中，一或多個 CD3 結合結構域係特異於 CD3γ。

[0244] 於一些實施態樣中，一或多個 CD3 結合結構

域為人化的或全部為人的。於一些實施態樣中，一或多個經活化之 CD3 結合結構域與 CD3 表現細胞上之 CD3 結合之 KD 為 1000nM 或更小。於一些實施態樣中，一或多個經活化之 CD3 結合結構域與 CD3 表現細胞上之 CD3 結合之 KD 為 100nM 或更小。於一些實施態樣中，一或多個經活化之 CD3 結合結構域與 CD3 表現細胞上之 CD3 結合的 KD 為 10nM 或更小。於一些實施態樣中，一或多個 CD3 結合結構域與食蟹猴 CD3 具有交叉反應性。於一些實施態樣中，一或多個 CD3 結合結構域包含本文所提供之胺基酸序列。

[0245] 於一些實施態樣中，該人化或人抗 CD3 結合結構域包含特異於 CD3 之人化或人重鏈可變區，其中該特異於 CD3 之重鏈可變區包含在人重鏈框架區中之人或非人重鏈 CDR。

[0246] 在某些情況下，該重鏈及/或輕鏈之互補決定區係源自已知之抗 CD3 抗體，諸如，例如莫羅單抗-CD3 (muromonab-CD3)(OKT3)、奧昔珠單抗 (otelixizumab) (TRX4)、替利珠單抗 (teplizumab)(MGA031)、維西珠單抗 (visilizumab)(Nuvion)、SP34 或 I2C、TR-66 或 X35-3、VIT3、BMA030 (BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1 及 WT-31。

[0247] 於一實施態樣中，該抗 CD3 結合結構域為單鏈可變片段(scFv)，該單鏈可變片段(scFv)包含本文提供之胺基酸序列的輕鏈和重鏈。於一實施態樣中，該抗 CD3 結合結構域包含：輕鏈可變區，其包含對本文所提供之輕鏈可變區的胺基酸序列製造至少 1、2 或 3 個修飾(例如取代)，但不超過 30、20 或 10 個修飾(例如取代)所產生的胺基酸序列，或者該輕鏈可變區包含之序列與本文所提供之胺基酸序列具有 95 至 99%之同一性；及/或重鏈可變區，其包含對本文所提供之重鏈可變區的胺基酸序列製造至少 1、2 或 3 個修飾(例如取代)，但不超過 30、20 或 10 個修飾(例如取代)所產生的胺基酸序列，或者該重鏈可變區包含之序列與本文所提供之胺基酸序列具有 95 至 99%之同一性。於一實施態樣中，該人化或人抗 CD3 結合結構域為 scFv，且包含本文所描述之胺基酸序列的輕鏈可變區係經由 scFv 連接子連接包含本文所描述之胺基酸序列的重鏈可變區。該 scFv 之輕鏈可變區和重鏈可變區可為，例如任何下列取向：輕鏈可變區域-scFV 連接子-重鏈可變區或重鏈可變區域-scFV 連接子-輕鏈可變區。

[0248] 於一些實施態樣中，抗原結合蛋白之 CD3 結合結構域對 CD3 表現細胞上之 CD3 的親和力之 $K_D$ 為 1000 nM 或更低、100nM 或更低、50 nM 或更低、20 nM 或更低、10 nM 或更低、5 nM 或更低、1 nM 或更低、或 0.5 nM 或更低。於一些實施態樣中，抗原結合蛋白之 CD3 結合結構域對 CD3ε、γ 或 δ 之親和力之 $K_D$ 為 1000

nM 或更低、100nM 或更低、50 nM 或更低、20 nM 或更低、10 nM 或更低、5 nM 或更低、1 nM 或更低、或 0.5 nM 或更低。於進一步之實施態樣中，抗原結合蛋白之 CD3 結合結構域對 CD3 之親和力低，即，$K_D$ 為約 100nM 或更高。

[0249] 對 CD3 之結合親和力可，例如藉由該抗原結合蛋白本身或其 CD3 結合結構域與塗層在分析板上之 CD3；展現在微生物細胞表面上之 CD3；溶液中之 CD3；等結合之能力來測定。本發明之抗原結合蛋白本身或其 CD3 結合結構域與 CD3 結合之活性可藉由將該配體(例如 CD3)或抗原結合蛋白本身或其 CD3 結合結構域固定在小珠、受質、細胞，等來測定。作用劑可加入適當之緩衝液中並將結合夥伴在指定之溫度下培育一段時間。在洗滌以除去未結合之物質後，該經結合之蛋白可隨著，例如 SDS、具有高 pH 之緩衝液，等釋出並藉由，例如表面等離子體共振儀(SPR)分析。

***連接子***

[0250] 該二個結構域係藉由可選擇地可裂解之連接子接合。示例性裂解位點為蛋白酶裂解位點。裂解該域間連接子之示例性蛋白酶包括在血漿中所發現者(例如凝血酶)及過度表現在腫瘤微環境中者。

[0251] 在本文所描述之抗原結合多肽中，該結構域係藉由結構域連接子(例如 $L^1$、$L^2$、$L^3$ 和 $L^4$)連接，其中

$L^1$ 連接該多肽構建體之第一和第二結構域，$L^2$ 連接該多肽構建體之第二和第三結構域，$L^3$ 連接該多肽構建體之第三和第四結構域且 $L^4$ 連接該經蛋白酶活化之多肽構建體的第四和第五結構域。連接子(例如 $L^1$、$L^2$、$L^3$ 和 $L^4$)具有優化之長度及/或胺基酸組成。於一些實施態樣中，連接子(例如 $L^1$、$L^2$、$L^3$ 和 $L^4$)並不相同。於某些實施態樣中，內部連接子 $L^1$、$L^2$、$L^3$ 及/或 $L^4$ 是“短”的，即，由 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 個胺基酸殘基所組成。因此，在某些情況下，該內部連接子係由約 12 個或更少的胺基酸殘基所組成。在 0 個胺基酸殘基之情況下，該結構域連接子為肽鍵。於某些實施態樣中，結構域連接子 $L^1$、$L^2$、$L^3$ 及/或 $L^4$ 是“長”的，即，由 15、20 或 25 個胺基酸殘基所組成。於一些實施態樣中，這些結構域連接子係由約 3 至約 15 個(例如 8、9 或 10 個)連續胺基酸殘基所組成。關於結構域連接子之胺基酸組成，選擇具有能賦予該多肽構建體彈性，不會干擾該結合結構域及可選擇地抵抗蛋白酶裂解之性質的肽類。例如，甘胺酸和絲胺酸殘基通常提供對蛋白酶裂解之抗性。適合用於連接本發明之多肽中的結構域的內部連接子之實例包括，但不限於$(GS)_n$、$(GGS)_n$、$(GGGS)_n$、$(GGSG)_n$、$(GGSGG)_n$或$(GGGGS)_n$，其中 n 為 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。於一實施態樣中，內部連接子 $L^1$、$L^2$ 及/或 $L^3$ 為$(GGGGS)_4$或$(GGGGS)_3$。

[0252] 在一些情況下，與 CD3 結合之 scFv 係根據已

知方法製備。例如，scFv 分子可經由使用彈性多肽連接子將 $V_H$ 和 $V_L$ 區連接在一起來製造。該 scFv 分子包含具有經優化之長度及/或胺基酸組成的 scFv 連接子(例如 Ser-Gly 連接子)。因此，於一些實施態樣中，該 scFV 連接子之長度係使 $V_H$ 或 $V_L$ 結構域可與其他可變結構域分子間式聯結以形成 CD3 結合位點。於某些實施態樣中，該等 scFv 連接子是“短”的，即，由 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 個胺基酸殘基所組成。因此，在某些情況下，該 scFv 連接子係由約 12 個或更少的胺基酸殘基所組成。在 0 個胺基酸殘基之情況下，該 scFv 連接子為肽鍵。於一些實施態樣中，這些 scFv 連接子係由約 3 至約 15 個(例如 8、9 或 10 個)連續胺基酸殘基所組成。關於該 scFv 連接子之胺基酸組成，選擇能賦予彈性，不會干擾該可變結構域及允許鏈間折疊以使二個可變結構域連接在一起形成功能性 CD3 結合位點之肽類。例如，包含甘胺酸和絲胺酸殘基之 scFv 連接子通常提供蛋白酶抗性。於一些實施態樣中，scFv 中之連接子包含甘胺酸和絲胺酸殘基。該 scFv 連接子之胺基酸序列可，例如藉由噬菌體展示法來優化以改善 CD3 結合及 scFv 之產量。適合用於連接 scFv 中之可變輕鏈結構域和可變重鏈結構域之肽 scFv 連接子的實例包括，但不限於$(GS)_n$、$(GGS)_n$、$(GGGS)_n$、$(GGSG)_n$、$(GGSGG)_n$ 或$(GGGGS)_n$，其中 n 為 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。於一實施態樣中，該 scFv 連接子可為$(GGGGS)_4$ 或$(GGGGS)_3$。連接子長度中之

變化可維持或增強活性，在活性研究中產生較佳之效力。

[0253] 其他示例性結構域和 scFv 連接子闡明於**第 56 圖**中。

***蛋白酶裂解結構域***

[0254] 本文所描述之抗原結合多肽包含至少一個蛋白酶裂解位點，該蛋白酶裂解位點包含被至少一種蛋白酶裂解之胺基酸序列。在一些情況下，本文所描述之抗原結合蛋白包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或更多個彼至少一種蛋白酶裂解之蛋白酶裂解位點。在一些情況下，該包含可被蛋白酶識別之胺基酸序列的蛋白酶裂解位點為 MMP9 裂解位點，此 MMP9 裂解位點包含具有胺基酸序列 LEATA 之多肽。

[0255] 蛋白酶裂解結構域為具有以序列特異性方式被識別及裂解之序列的多肽。在一些情況下，本文所考量之抗原結合蛋白包含以序列特異性方式被基質金屬蛋白酶(MMP) (例如 MMP9)識別之蛋白酶裂解結構域。在一些情況下，該被 MMP9 識別之蛋白酶裂解結構域包含具有胺基酸序列 PR(S/T)(L/I)(S/T)之多肽。在一些情況下，該被 MMP9 識別之蛋白酶裂解結構域包含具有胺基酸序列 LEATA 之多肽。在一些情況下，該蛋白酶裂解結構域係以序列特異性方式被 MMP11 識別。在一些情況下，該被 MMP11 識別之蛋白酶裂解結構域包含具有胺基酸序列

GGAANLVRGG 之多肽。在一些情況下，該蛋白酶裂解結構域被表 1 中所揭示之蛋白酶識別。在一些情況下，該被表 1 中所揭示之蛋白酶識別之蛋白酶裂解結構域所包含之多肽具有選自表 1 中所揭示之序列的胺基酸序列。

[0256] 在一些情況下，蛋白酶為以序列特異性方式裂解蛋白質之蛋白質。蛋白酶包括，但不限於絲胺酸蛋白酶、半胱胺酸蛋白酶、天門冬胺酸蛋白酶、蘇胺酸蛋白酶、麩胺酸蛋白酶、金屬蛋白酶、天門冬醯胺肽裂解酶、血清蛋白酶、組織蛋白酶、組織蛋白酶 B、組織蛋白酶 C、組織蛋白酶 D、組織蛋白酶 E、組織蛋白酶 K、組織蛋白酶 L、激肽釋放酶、hK1、hK10、hK15、纖溶酶、膠原蛋白酶、第 IV 型膠原蛋白酶、溶基質蛋白酶、第 Xa 因子、胰凝乳蛋白酶樣蛋白酶、胰蛋白酶樣蛋白酶、彈性蛋白酶樣蛋白酶、枯草桿菌蛋白酶類蛋白酶、奇異果蛋白酶、鳳梨蛋白酶、鈣蛋白酶、凋亡蛋白酶、凋亡蛋白酶 3、Mir 1-CP、木瓜蛋白酶、HIV-1 蛋白酶、HSV 蛋白酶、CMV 蛋白酶、凝乳酶、腎素、胃蛋白酶、蛋白裂解酶、天門冬醯胺內肽、天門冬胺酸蛋白酶、豬籠草蛋白酶、金屬外肽酶、金屬內肽酶、基質金屬蛋白酶(MMP)、MMP1、MMP2、MMP3、MMP8、MMP9、MMP11、MMP13、MMP14、尿激酶纖溶酶原活化劑(uPA)、腸激酶、前列腺特異性抗原(PSA、hK3)、介白素-1β 轉化酶、凝血酶、FAP(FAP-α)、二肽基肽酶及二肽基肽酶 IV(DPPIV/CD26)。

表 1： 示例性蛋白酶及蛋白酶裂解結構域序列

| 蛋白酶 | 裂解結構域序列 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| MMP7 | KRALGLPG | 2 |
| MMP7 | $(DE)_8$RPLALWRS$(DR)_8$ | 3 |
| MMP9 | PR(S/T)(L/I)(S/T) | 4 |
| MMP9 | LEATA | 5 |
| MMP11 | GGAANLVRGG | 6 |
| MMP14 | SGRIGFLRTA | 7 |
| MMP | PLGLAG | 8 |
| MMP | PLGLAX | 9 |
| MMP | PLGC(me)AG | 10 |
| MMP | ESPAYYTA | 11 |
| MMP | RLQLKL | 12 |
| MMP | RLQLKAC | 13 |
| MMP2, MMP9, MMP14 | EP(Cit)G(Hof)YL | 14 |
| 尿激酶纖溶酶原活化劑 (uPA) | SGRSA | 15 |
| 尿激酶纖溶酶原活化劑 (uPA) | DAFK | 16 |
| 尿激酶纖溶酶原活化劑 (uPA) | GGGRR | 17 |
| 溶酶體酶 | GFLG | 18 |
| 溶酶體酶 | ALAL | 19 |
| 溶酶體酶 | FK | 20 |
| 組織蛋白酶 B | NLL | 21 |
| 組織蛋白酶 D | PIC(Et)FF | 22 |
| 組織蛋白酶 K | GGPRGLPG | 23 |
| 前列腺特異性抗原 | HSSKLQ | 24 |
| 前列腺特異性抗原 | HSSKLQL | 25 |
| 前列腺特異性抗原 | HSSKLQEDA | 26 |
| 單純疱疹病毒蛋白酶 | LVLASSSFGY | 27 |
| HIV 蛋白酶 | GVSQNYPIVG | 28 |

| | | |
|---|---|---|
| CMV 蛋白酶 | GVVQASCRLA | 29 |
| 凝血酶 | F(Pip)RS | 30 |
| 凝血酶 | DPRSFL | 31 |
| 凝血酶 | PPRSFL | 32 |
| 凋亡蛋白酶-3 | DEVD | 33 |
| 凋亡蛋白酶-3 | DEVDP | 34 |
| 凋亡蛋白酶-3 | KGSGDVEG | 35 |
| 介白素 1β 轉化酶 | GWEHDG | 36 |
| 腸激酶 | EDDDDKA | 37 |
| FAP | KQEQNPGST | 38 |
| 激肽釋放酶 2 | GKAFRR | 39 |
| 纖溶酶 | DAFK | 40 |
| 纖溶酶 | DVLK | 41 |
| 纖溶酶 | DAFK | 42 |
| TOP | ALLLALL | 43 |

[0257] 已知蛋白酶係由某些患病細胞和組織(例如腫瘤或癌細胞)分泌，創建富含蛋白酶或蛋白酶豐裕之微環境。在一些情況下，個體之血液中富含蛋白酶。在一些情況下，腫瘤周圍的細胞分泌蛋白酶入腫瘤微環境。腫瘤周圍之分泌蛋白酶的細胞包括，但不限於腫瘤基質細胞、成肌纖維細胞、血細胞、肥大細胞、B 細胞、NK 細胞、調節性 T 細胞、巨噬細胞、細胞毒性 T 淋巴細胞、樹突細胞、間質幹細胞、多形核細胞及其他細胞。在一些情況下，蛋白酶存在於個體之血液中，例如在微生物肽類中發現之靶向胺基酸序列的蛋白酶。此特性允許被靶向之治療劑(諸如抗原結合蛋白)具有額外之特異性，因為 T 細胞將不會與抗原結合蛋白結合，除了在富含蛋白酶之經靶向的

細胞或組織微環境中。

[0258] 於示例性之實施態樣中，該多肽構建體包括一或多個蛋白酶裂解位點，例如上述表 1 中所闡明之位點。於各種實施態樣中，這些位點係在 scFv 中且位於一或多個 $V_L$i 或 $V_H$i 及一或多個 $V_H$ 或 $V_L$ 之間，從而在該位點被相關蛋白酶裂解時，$V_L$i 與 $V_H$ 分離及/或 $V_H$i 與 $V_L$ 分開。如本技藝之技術熟習人士所理解的，該蛋白酶裂解位點可包含介於該 $V_L$ 與 $V_H$ 結構域之間的整個連接多肽 scFv 連接子序列，或者，該裂解位點之一或二端可鄰接額外之胺基酸或肽序列。

[0259] 於一些實施態樣中，該蛋白酶裂解結構域係在半衰期延長結構域或 CD3 結合結構域中。於一些實施態樣中，該蛋白酶裂解結構域不在半衰期延長結構域或 CD3 結合結構域中。

***半衰期延長結構域***

[0260] 本文所考量的為延長抗原結合結構域之半衰期的結構域。該等結構域據預計包括，但不限於 HSA 結合結構域、Fc 結構域、小分子及本技藝中已知之其他半衰期延長結構域。

[0261] 人血清白蛋白(HSA)(分子量～67kDa)為血漿中最豐富之蛋白質，其存在量為約 50mg/ml(600μM)且在人體中之半衰期為約 20 天。HSA 係用於維持血漿 pH，有助於膠體血壓，作為許多代謝物和脂肪酸之載體並作為血

漿中之主要藥物轉運蛋白。

[0262] 與白蛋白非共價結合可延長短期蛋白質之排除半衰期。例如當經由靜脈內途徑投予小鼠和兔子白蛋白結合結構域與 Fab 片段之重組融合物時，與投予單獨之 Fab 片段相比較可導致分別為 25 倍和 58 倍之體內清除且半衰期分別延長 26 倍和 37 倍。於另一實例中，以脂肪酸將胰島素醯化以促進與白蛋白聯結時，當經由皮下途徑注射投予兔或豬時可觀察到拖延效果。總之，這些研究證明結合白蛋白和長期作用之間的關聯。

[0263] 於一態樣中，本文所描述之抗原結合蛋白包含半衰期延長結構域，例如特異性結合 HSA 之結構域。於一些實施態樣中，抗原結合蛋白之 HSA 結合結構域可為結合 HSA 之任何結構域，包括，但不限於來自單株抗體、多株抗體、重組抗體、人抗體、人化抗體之結構域。於一些實施態樣中，該 HSA 結合結構域為單鏈可變片段(scFv)、單結構域抗體，諸如源自駱駝科動物之特異於 HSA 之奈米抗體、肽、配體或小分子的重鏈可變結構域(VH)、輕鏈可變結構域(VL)及可變結構域(VHH)。於某些實施態樣中，該 HSA 結合結構域為單結構域抗體。於其他實施態樣中，該 HSA 結合結構域為肽。於進一步之實施態樣中，該 HSA 結合結構域為小分子。預計該抗原結合蛋白之 HSA 結合結構域相當小且不超過 25 kD、不超過 20 kD、不超過 15 kD，或於一些實施態樣中，不超過 10 kD。在某些情況下，若該 HSA 結合結構域為肽或小分

子，則其為 5kD 或更小。

[0264] 該抗原結合蛋白之半衰期延長結構域提供該抗原結合蛋白本身經改變之藥效學和藥代動力學。如上述，該半衰期延長結構域延長排除半衰期。該半衰期延長結構域亦改變藥效學性質，包括改變該抗原結合蛋白之組織分佈、滲透及擴散。於一些實施態樣中，相較於無半衰期延長結合結構域之蛋白質，該半衰期延長結構域提供改善之組織(包括腫瘤)靶向、組織滲透、組織分佈、在組織內之擴散及增進之效力。於一實施態樣中，治療方法有效且有效率地利用減量之抗原結合蛋白，導致副作用減少，諸如非腫瘤細胞之細胞毒性降低。

[0265] 此外，該半衰期延長結構域(例如 HSA 結合結構域)之特徵包括 HSA 結合結構域對 HSA 之結合親和力。該 HSA 結合結構域之親和力可經選擇，從而靶向特定多肽構建體中之特定排除半衰期。因此，於一些實施態樣中，該 HSA 結合結構域具有高結合親和力。於其他實施態樣中，該 HSA 結合結構域具有中等結合親和力。再於其他實施態樣中，該 HSA 結合結構域具有低或臨界結合親和力。示例性結合親和力包括 $K_D$ 濃度在 10nM 或更小(高親和力)、$K_D$ 濃度介於 10 nM 至 100 nM(中等親和力)及 $K_D$ 濃度大於 100nM(低親和力)。如上述，與 HSA 之結合親和力係藉由已知方法，諸如表面等離子體共振(SPR)測定。

*靶的抗原結合結構域*

[0266] 除了所描述之 CD3 和半衰期延長結構域外，本文所描述之多肽構建體亦包含至少一個、或至少 2 個或更多個與一或多個靶的抗原結合或與單一靶抗原上之一或多個區結合的結構域。預計本發明之多肽構建體係在，例如個體之疾病特異性微環境或血液中之蛋白酶裂解結構域被裂解，且各靶抗原結合結構域將與靶細胞上之靶抗原結合，從而活化該 CD3 結合結構域與 T 細胞結合。至少一個靶抗原涉及疾病、病症或病況及/或與疾病、病症或病況相關聯。示例性靶抗原包括那些與增殖性疾病、腫瘤疾病、發炎疾病、免疫疾病、自體免疫疾病、感染性疾病、病毒性疾病、過敏反應、寄生蟲反應、移植物抗宿主疾病或宿主抗移植物疾病相關者。於一些實施態樣中，靶抗原為表現在腫瘤細胞上之腫瘤抗原。或者，於一些實施態樣中，靶抗原與病原體相關，諸如病毒或細菌。至少一種靶抗原亦可以針對健康組織。

[0267] 於一些實施態樣中，靶抗原為細胞表面分子，諸如蛋白質、脂質或多醣。於一些實施態樣中，靶抗原係在腫瘤細胞、經病毒感染之細胞、經細菌感染之細胞、受損之紅血球、動脈斑塊細胞或纖維化組織細胞上。本文預計當結合一個以上之靶抗原時，二個無活性之 CD3 結合結構域共同定位並在該靶細胞之表面上形成活性 CD3 結合結構域。於一些實施態樣中，該抗原結合蛋白包含一個以上之靶抗原結合結構域以活化在該抗原結合蛋白中之

無活性 CD3 結合結構域。於一些實施態樣中，該抗原結合蛋白包含一個以上之靶抗原結合結構域以增強與靶細胞結合之強度。於一些實施態樣中，該抗原結合蛋白包含一個以上之靶抗原結合結構域以增強與靶細胞結合之力量。於一些實施態樣中，一個以上之抗原結合結構包含相同之抗原結合結構域。於一些實施態樣中，一個以上之抗原結合結構包含不同的抗原結合結構域。例如，已知將雙重表現在患病細胞或組織(例如腫瘤或癌症細胞)中的二個不同的抗原結合結構域可增強抗原結合蛋白與靶的結合或對靶的之選擇性。

[0268] 本文所考量之多肽構建體包括至少一個抗原結合結構域，其中該抗原結合結構域與至少一個靶抗原結合。在一些情況下，靶抗原表現在患病細胞或組織(例如腫瘤或癌細胞)之表面上。靶抗原包括，但不限於 EpCAM、EGFR、HER-2、HER-3、c-Met、FoIR 及 CEA。本文所揭示之多肽構建體亦包括包含二個抗原結合結構域之蛋白質，該二個抗原結合結構域與二個已知表現在患病細胞或組織上之不同靶抗原結合。示例性抗原結合結構域對包括，但不限於 EGFR/CEA、EpCAM/CEA 及 HER-2/HER-3。

[0269] 本文所描述之多肽構建體的設計允許該針對一或多個靶抗原之結合結構域有靈活性使得該針對靶抗原之結合結構域可為任何類型之結合結構域，包括，但不限於來自單株抗體、多株抗體、重組抗體、人抗體、人化抗

體之結構域。於一些實施態樣中，該針對靶抗原之結合結構域為單鏈可變片段(scFv)、單結構域抗體，諸如源自駱駝科動物之奈米抗體的重鏈可變結構域($V_H$)、輕鏈可變結構域($V_L$)及可變結構域(VHH)。於其他實施態樣中，該針對靶抗原之結合結構域為非 Ig 結合結構域，即，抗體模擬物，諸如抗運載蛋白(anticalin)、人泛素(affilin)、親和體分子、affimer、阿非廷(affitin)、α 體(alphabody)、avimer、DARPin、fynomer、Kunitz 結構域肽及單抗體。於進一步之實施態樣中，該針對一或多個靶抗原之結合結構域為與一或多個靶抗原結合或聯結之配體或肽。

[0270] 於一些實施態樣中，該靶細胞抗原結合結構域獨立包含 scFv、$V_H$結構域、$V_L$結構域、非 Ig 結構域或特異性結合靶抗原之配體。於一些實施態樣中，該靶抗原結合結構域特異性結合細胞表面分子。於一些實施態樣中，該靶抗原結合結構域特異性結合腫瘤抗原。於一些實施態樣中，該靶抗原結合結構域特異性且獨立地結合選自下列至少一者之抗原：EpCAM、EGFR、HER-2、HER-3、cMet、CEA 及 FoIR。於一些實施態樣中，該靶抗原結合結構域特異性且獨立地結合二種不同抗原，其中該抗原至少一者係選自 EpCAM、EGFR、HER-2、HER-3、cMet、CEA 及 FoIR 其中之一。於一些實施態樣中，該蛋白質在蛋白酶裂解結構域裂解之前少於約 100kDa。於一些實施態樣中，該蛋白質在蛋白酶裂解結構域裂解之後為約 25 至約 75 kDa。於一些實施態樣中，該蛋白質在蛋白酶裂解

之前的大小高於首過清除之腎閾值。於一些實施態樣中，該蛋白質在蛋白酶裂解之前的排除半衰期為至少約 50 小時。於一些實施態樣中，該蛋白質在蛋白酶裂解之前的排除半衰期為至少約 100 小時。於一些實施態樣中，與針對相同靶抗原之 IgG 相比較，該蛋白質具有增加之組織滲透。於一些實施態樣中，與針對相同靶抗原之 IgG 相比較，該蛋白質具有增加之組織分佈。

***多肽構建體藥代動力學***

[0271] 本文所描述之多肽構建體具有某些本技藝之技術人士所識別之優點。例如，本文所描述之多肽構建體具有優於傳統抗體治療劑之改善的藥代動力學。本文之多肽構建體的藥代動力學改善係至少歸因於該半衰期延長結構域及 CD3 結合結構域。如本文所揭示之半衰期延長結構域包括各種多肽，這些多肽包括，但不限於與 HSA 結合之 Fc 結構域及多肽。本文之 CD3 結合結構域具有獨特之性質，其產生優異之藥代動力學。本文之 CD3 結合結構域不與 CD3 結合，直到其藉由至少一個蛋白酶裂解結構域被裂解且該抗原結合結構域與靶抗原結合而使該 CD3 結合結構域被活化。因此，本文之抗原結合蛋白的藥代動力學增強係至少部分歸因於透過個人之循環中的 CD3 結合作用來減少或排除由靶的介導之藥物沈積。改善之藥物動力學包含較淺之 α 相及 β 相中之較高度暴露至少一者。因此，相較於傳統之抗體治療劑，本文所描述之抗原結合

蛋白具有較大之治療窗，暴露時之峰/谷差異較小。

***多肽構建體修飾***

[0272] 本文所描述之多肽構建體包含衍生物或類似物，其中(i)胺基酸被並非由遺傳密碼編碼之胺基酸殘基所取代，(ii)該成熟多肽與另一化合物(例如如聚乙二醇)融合，或(iii) 額外之胺基酸與蛋白質融合，諸如領導或分泌序列或用於純化蛋白質之序列。

[0273] 典型之修飾包括，但不限於乙醯化、醯化、ADP-核糖基化、醯胺化、共價連接黃素、共價連接血紅素部分、共價連接核苷酸或核苷酸衍生物、共價連接脂質或脂質衍生物、共價連接磷脂醯肌醇、交聯、環化、形成二硫鍵、去甲基化、形成共價交聯、形成胱胺酸、形成焦麩胺酸、甲醯化、γ 羧基化、糖基化、形成 GPI 錨、羥基化、碘化、甲基化、肉荳蔻醯化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、異戊二烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、由轉運 RNA 介導之在蛋白質中添加胺基酸，諸如精胺醯化及泛素化。

[0274] 修飾係在本文所描述之多肽構建體中之任何位置進行，包括肽骨架、胺基酸側鏈及胺基或羧基端。可用於修飾多肽構建體之某些常見的肽修飾包括糖基化、脂質連接、硫酸化、麩胺酸殘基之 γ-羧基化、羥基化、藉由共價修飾阻斷多肽中之胺基或羧基團或該二者，及 ADP 核糖基化。

**編碼抗原結合蛋白之多核苷酸**

[0275] 於一些實施態樣中亦提供編碼本文所描述之抗原結合蛋白的多核苷酸分子。於一些實施態樣中，該多核苷酸分子係以 DNA 構建體之形式提供。於其他實施態樣中，該多核苷酸分子係以信使 RNA 轉錄子之形式提供。

[0276] 該多核苷酸分子係藉由已知方法構建，諸如藉由組合編碼該三個結合結構域之基因構建，該三個結合結構域係藉由肽連接子分開，或者，於其他實施態樣中係藉由肽鍵直接連接成單一遺傳構建體，該構建體係可操作地連接合適之啟動子及可選擇地合適之轉錄終止子，並使該構建體表現在細菌或其他合適之表現系統中，諸如，例如 CHO 細胞。於其中該靶的結合結構域為小分子之實施態樣中，該多核苷酸含有編碼與 CD3 和 HSA 結合之結構域的基因。於其中該半衰期延長結構域為小分子之實施態樣中，該多核苷酸含有編碼與 CD3 和靶抗原結合之結構域的基因。根據所採用之載體系統和宿主，可使用任何數目之合適的轉錄和轉譯元件，包括組成型和誘導型啟動子。該啟動子係經選擇致使其驅動該多核苷酸表現在對應之宿主細胞中。

[0277] 於一些實施態樣中，該多核苷酸係插入載體中(較佳為表現載體)，其代表示另外之實施態樣。該重組載體可根據已知方法構建。特別令人感興趣之載體包括質

粒、噬菌粒、噬菌體衍生物、病毒(例如逆轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、皰疹病毒、慢病毒，等)和黏粒。

[0278] 多種表現載體/宿主系統可用於包含並表現該編碼所描述之多肽構建體之多肽的多核苷酸。表現載體之實例有用於在大腸桿菌中表現之 pSKK (Le Gall et al., J Immunol Methods. (2004) 285(1):111-27)，或用於在哺乳動物細胞中表現之 pcDNA5 (Invitrogen)。

[0279] 因此，於一些實施態樣中，如本文所描述之多肽構建體係經由將編碼如上述之蛋白質的載體引入宿主細胞，並在能表現該蛋白結構域之條件下培養該宿主細胞來製造，該多肽構建體可被分離出及，可選擇地進一步純化。

**醫藥組成物**

[0280] 於一些實施態樣中亦提供醫藥組成物，其包含本文所描述之抗原結合蛋白、包含編碼該多肽構建體之多肽的多核苷酸之載體或藉由此載體轉形之宿主細胞及至少一種醫藥上可接受之載體。術語“醫藥上可接受之載體”包括，但不限於不會干擾該成分之生物活性的有效性且對經投予該載體之患者沒有毒性之任何載體。合適之藥學載體之實例為本技藝所熟知，包括磷酸鹽緩衝之鹽溶液、水、乳劑(諸如油/水乳液)、各種類型之潤濕劑、無菌溶液，等。該等載體可藉由習知方法配製且可以合適之劑量投予個體。較佳地，該組成物為無菌的。這些組成物亦可

含有佐劑，諸如防腐劑、乳化劑和分散劑。預防微生物之作用可藉由包含各種抗菌劑和抗真菌劑來確保。

[0281] 於該醫藥組成物之一些實施態樣中，本文所描述之抗原結合蛋白係包封在奈米顆粒中。於一些實施態樣中，該奈米粒為富勒烯、液晶、脂質體、量子點(quantum dot)、超順磁性奈米粒、樹枝狀聚合物(dendrimer)或奈米棒。於該醫藥組成物之其他實施態樣中，該抗原結合蛋白係連接脂質體。在一些情況下，該抗原結合蛋白係軛合至脂質體之表面上。在一些情況下，該抗原結合蛋白係包封在脂質體之殼體內。在一些情況下，該脂質體為陽離子脂質體。

[0282] 本文所描述之多肽構建體係考慮作為藥物。投予可藉由不同方式生效，例如經由靜脈內、腹膜內、皮下、肌肉內、局部或皮內投予進行。於一些實施態樣中，該投予途徑係取決於該治療之種類及包含在該醫藥組成物中之化合物的種類。該劑量方案將由主治醫師及其他臨床因素決定。用於任一患者之劑量係取決於許多因素，包括患者之尺寸、體表面積、年齡、性別、欲投予之特定化合物、投予之時間和途徑、治療種類、整體健康狀況及其他同時投予之藥物。“有效劑量”係指足以影響該疾病之過程和嚴重性，導致該等病態減輕或緩解之活性成分的量並可使用已知之方法測定。

## 治療方法

[0283] 於一些實施態樣中，本文亦提供用於刺激有此需要之個體的免疫系統之方法和用途，其包含投予本文所描述之抗原結合蛋白。在一些情況下，投予本文所描述之抗原結合蛋白可誘導及/或維持針對表現靶抗原之細胞的細胞毒性，其中該表現靶抗原之細胞係在具有增加之蛋白酶活性水準的微環境中。在一些情況下，該表現靶抗原之細胞為癌症或腫瘤細胞、經病毒感染之細胞、經細菌感染之細胞、自身反應性 T 細胞或 B 細胞、受損之紅血球、動脈斑塊或纖維組織。在一些情況下，該個體之血液富含蛋白酶。

[0284] 本文亦提供用於治療與靶抗原相關之疾病、失調或病症的方法及用途，其包含投予有此需要之個體本文所描述之抗原結合蛋白。與靶抗原相關之疾病、失調或病症包括，但不限於病毒感染、細菌感染、自體免疫病、移植排斥、動脈粥樣硬化或纖維化。於其他實施態樣中，該與靶抗原相關之疾病、失調或病症為增殖性疾病、腫瘤疾病、炎性疾病、免疫疾病、自體免疫疾病、感染性疾病、病毒疾病、過敏性反應、寄生蟲反應、移植物抗宿主疾病或宿主抗移植物疾病。於一實施態樣中，該與靶抗原相關之疾病、失調或病症為癌症。在一種情況下，該癌症為血液癌症。在另一種情況下，該癌症為實體腫瘤癌症。

[0285] 於一些實施態樣中，如本文所使用之“治療(treatment 或 treating 或 treated)”係指治療性處理，其中該目標係減緩(減輕)不受歡迎之生理病症、失調或疾病，

或取得有益或期望之臨床效果。在本文所描述之目的方面，有益或期望之臨床結果包括，但不限於減輕症狀；減少該病症、失調或疾病之程度；穩定(即，不惡化)該病症、失調或疾病之狀態；延遲該病症、失調或疾病發作或減緩進展；改善該病症、失調或疾病狀態；及緩解(無論是部分還是全部)，無論是可檢測的或不可檢測的，或增進或改善該病症、失調或疾病。治療包括引起臨床上顯著之反應而無過度之副作用水準。治療亦包括當與若未接受治療之預期存活相比較時生存期延長。於其他實施態樣中，“治療(treatment 或 treating 或 treated)”係指預防性措施，其中該目標係延遲，諸如，例如易罹患疾病之個人(例如攜帶疾病，諸如乳癌之遺傳標記的個體)的不受歡迎之生理病症、失調或疾病發作或減輕嚴重性。

[0286] 本發明之方法中，治療係用來提供相對於疾病或病症之正面治療反應。藉由“正面治療反應”係指疾病或病症改善，及/或與該疾病或病症相關之症狀改善。例如正面治療反應將指疾病之一或多種下列改善：(1)腫瘤細胞之數目減少；(2)腫瘤細胞死亡增加；(3)腫瘤細胞存活受抑制；(5) 腫瘤生長受抑制(即，減緩到一定程度，較佳地停止生長)；(6) 患者之存活率增加；及(7) 一或多種與該疾病或病症相關之症狀有些緩解。

[0287] 任一指定之疾病或病症的正面治療反應可藉由特異於該疾病或病症之標準化反應標準來測定。腫瘤反應可使用篩選技術對腫瘤形態中之變化(即，整體腫瘤負

荷、腫瘤大小，等)進行評估，該篩選技術有，諸如磁共振成像(MRI)掃描、x-放射顯影成像、電腦斷層(CT)掃描、骨掃描成像、內視鏡檢查及腫瘤活組織切片採樣(包括骨髓穿刺(BMA) 及計算循環中之腫瘤細胞)。

[0288] 除了這些正面治療反應外，接受治療之個體可能經歷與該疾病相關之症狀改善的有益效果。

[0289] 根據本發明之治療包括“治療有效量”之使用的藥物。“治療有效量”係指取得期望之治療結果所必要之有效劑量和時間。

[0290] 治療有效量可根據，諸如個體之疾病狀態、年齡、性別和體重，及藥物在個體中引出期望之反應的能力等因素而變化。治療有效量亦為其中治療之有益效果勝過該抗體或抗體部分之任何毒性或有害作用的量。

[0291] 用於腫瘤治療之“ 治療有效量”亦可藉由其穩定該疾病進展之能力來測量。化合物抑制癌症之能力可在預測在人腫瘤中之效力的動物模型系統中評估。

[0292] 或者，此組成物之性質可藉由本技藝之技術熟習人士已知之體外分析檢查該化合物抑制細胞生長或誘導凋亡之能力來評估。治療有效量之治療化合物可縮小腫瘤大小，或改善個體之症狀。本技藝之一般技術人士將能夠基於諸如個體大小、個體症狀之嚴重性和選定投予之特定組成物或途徑這類因素來測定該等量。

[0293] 劑量方案係經調整以提供最佳之期望反應(例如治療反應)。例如，可投予單次推注、可隨著時間投予

數個分割劑量，或者該劑量可依治療情況之緊急程度指示按比例減少或增加。腸胃道外組成物可配製成劑量單位形式以易於投予並使劑量均勻。本文所使用之劑量單位形式係指適合作為用於欲治療之個體之單一劑量的物理上離散單位；各單位含有經計算以與所需要之藥物載體聯合產生期望之治療效果的預定量之活性化合物。

[0294] 用於本發明之劑量單位形式之規格係由下列(a)及(b)規定且直接取決於此二項：(a) 該活性化合物之獨特特徵和欲達到之特定治療效果，及(b)調配該等用於治療個體之敏感性的活性化合物的技藝中之固有限制。

[0295] 該用於本發明所使用之雙特異性抗體的有效劑量和劑量方案取決於欲治療之疾病或病症，並且可由本技藝之技術熟習人士測定。

[0296] 用於本發明之雙特異性抗體的治療有效量之示例性，非限制性範圍為約 0.1 至 100mg/kg。

[0297] 於本文所描述之方法的一些實施態樣中，該多肽構建體係與用於治療特定疾病、失調或病症之藥劑聯合投予。該藥劑包括，但不限於涉及抗體、小分子(例如化療劑)、激素(類固醇、肽，等)之治療、放射治療(γ 射線，X 射線及/或定向投遞放射性同位素、微波、紫外線照射，等)、基因治療(例如反義、逆轉錄病毒治療，等)及其他免疫治療。於一些實施態樣中，該多肽構建體係與抗腹瀉劑、止吐劑、止痛劑、類鴉片及/或非膽固醇類抗炎劑聯合投予。於一些實施態樣中，該多肽構建體係在手

術之前、期間或之後投予。

[0298] 所有引用之參考文獻之全部內容以引用方式明確併入本文。

## 材料和方法

[0299] **編碼該多肽構建體之 DNA 表現構建體之選殖：**使用具有蛋白酶裂解位點結構域之抗 CD3 scFv 來構建抗原結合蛋白與抗 CD3 scFv 結構域和半衰期延長結構域(例如 HSA 結合肽或 VH 結構域)之組合，該結構域之組織如**第 53 圖**所示。為了在 CHO 細胞中表現抗原結合蛋白，將所有蛋白質結構域之編碼序列選殖入哺乳動物表現載體系統中。簡單地說，分別合成並分殖編碼該 CD3 結合結構域、半衰期延長結構域和 CD3 結合結構域連同肽連接子 $L^1$ 和 $L^2$ 的基因序列。然後將所產生之構建體依靶的結合結構域-$L^1$-VH CD3 結合結構域-$L^2$-蛋白酶裂解結構域-$L^3$-VLi CD3 結合結構域 $L^4$-靶的結合結構域-$L^5$-VLCD3 結合結構域-$L^6$-蛋白酶裂解結構域-$L^7$-VHi CD3 結合結構域-$L^8$-半衰期延長結構域之順序連接在一起以產生最終之構建體。所有表現構建體係經設計以含有分別用於 N 端信號肽和 C 端六-或十組胺酸(6x-或 10x-his)-標籤之編碼序列，以促進蛋白質分泌和純化。

[0300] **多肽構建體在經穩定轉染之 CHO 細胞中的表現：**使用 CHO 細胞表現系統(Flp-In®，Life Technologies 公司)，CHO-K1 中國倉鼠卵巢細胞之衍生物(ATCC，

CCL-61) (Kao and Puck, Proc. Natl. Acad Sci USA 1968; 60(4): 1275-81)。根據由 Life Technologies 提供之標準細胞培養方案繼代培養貼壁細胞。

[0301] 為了適應在懸浮液中生長，將細胞從組織培養瓶中分離並置於不含血清之培養基中。將經懸浮適應之細胞冷凍保存在帶有 10%DMSO 之培養基中。

[0302] 藉由轉染經懸浮適應之細胞來產生穩定表現分泌之多肽構建體的重組 CHO 細胞株。在以抗生素潮黴素 B 選擇期間，每週測量二次存活細胞之密度，將細胞離心並以 $0.1x10^6$ 存活細胞/mL 之最大密度再懸浮於新鮮之選擇培養基中。在選擇後 2 至 3 週回收穩定表現多肽構建體之細胞池並在此時點將細胞轉移至搖動培養瓶中之標準培養基中。經由執行蛋白質凝膠電泳或流式細胞術來證實重組之分泌蛋白質之表現。將穩定之細胞池冷凍保存在含有 DMSO 之培養基中。

[0303] 在經穩定轉染之 CHO 細胞株的 10 天分批餵料之培養物中，藉由分泌入該細胞培養之上清液中來製造多肽構建體。培養 10 天後，典型之培養存活率> 75%時收穫細胞培養上清液。每隔一天從生產培養物收集樣品，並評估細胞密度和存活力。在收穫當天，在進一步使用前藉由離心及真空過濾使細胞培養上清液澄清。

[0304] 藉由 SDS-PAGE 分析細胞培養上清液中之蛋白質表現力價和產品完整性。

[0305] **多肽構建體之純化：**以二步驟程序從 CHO 細

胞培養上清液純化多肽構建體。在第一步驟中將該構建體進行親和性色層分析，接著在第二步驟中在 Superdex 200 上進行製備型尺寸排阻色層分析(SEC)。將樣品進行緩衝液交換並藉由超濾濃縮至典型濃度> 1 mg/mL。在還原和非還原條件下，藉由 SDS-PAGE 評估最終樣品之純度和均勻性(通常>90%)，隨後分別使用抗 HSA 或抗獨特型抗體且藉由分析型 SEC 進行免疫點墨來評估樣品。將純化之蛋白質的等份儲存在-80℃下直到使用時。

[0306] **顯示 CD3 結合之夾心 ELISA**：以在 PBS 中之 1μg/ mL 恒河猴 EGFR:: hFC 將 96 孔 EIA 盤塗層並在 4℃下培育過夜。然後，以含有 0.05% Tween-20 之 PBS 將盤洗滌三次並在室溫下以 SuperBlock(PBS)阻斷 1 小時。另外洗滌三次後，在適當之孔中添加連續稀釋之 Prodent，並在室溫下培育 1 小時。再次洗滌盤，添加與生物素軛合之食蟹猴 CD3E:: hFC，使最終濃度為 1μg/mL 並在室溫下培育 1 小時。再將盤洗滌三次後，添加與 HRP 軛合的鏈親和素，濃度為 0.1μg/mL，並培育 30 分鐘。最後，再次洗滌盤並使用 SurModics 單組分 TMB 受質發展 5 分鐘。以 SurModics 650 終止溶液停止該反應，並在 650nm 處讀取該盤之結果。

[0307] **顯示 CD3 結合之夾心 FACS**：以在 PBS 中之 20nM EDTA 將生長至約 80%匯合之 OvCAR8 細胞分離出。然後，以含有 10%FBS 之 PBS 阻斷細胞並將其以 $2\times10^5$ 個細胞/孔接種到 96 孔圓底細胞培養盤中。在冰上

進行所有進一步之步驟。將盤在 800×g 離心 5 分鐘以使細胞沉澱成小丸。丟棄上清液並將細胞重新懸於經連續稀釋之 Prodent 中。將 Prodent 在冰上培育 1 小時後，以含有 1% FBS 之 PBS 洗滌細胞三次。然後，加入濃度為 0.5μg/$1\times10^6$ 個細胞之經 AF488 標記的食蟹猴 CD3E::hFC，將其在冰上、黑暗中培育 30 分鐘。將細胞再次洗滌三次，再懸浮於 150μL 之含有 1%FBS 和 0.5μg/mL 碘化丙啶之 PBS 中並在流式細胞儀上進行分析。

[0308] **TDCC 分析：**令經螢光素酶轉導之 OvCAR8 細胞生長至約 80%匯合，以 TrypLE express 分離之。將細胞離心並再懸浮於培養基中使成為 $1\times10^6$/mL。將經純化之人 Pan T 細胞解凍、離心並再懸浮於培養基中。最後，將 OvCAR8 細胞和 T 細胞之共同培養物加入 384 孔細胞培養盤中。然後，將連續稀釋之 Prodent 加至該共同培養物中並培育 48 小時。最後，將等體積之 SteadyGlo 螢光素酶分析試劑加入該盤中並培育 20 分鐘。讀取盤之數值並記錄總發光。

[0309] **用於 EK 裂解之 SDS-PAGE：**將 Prodent 之緩衝液交換成含有 2mM $CaCl_2$ 之 HBS 並以二種濃度之重組腸激酶(NEB，P8070L)裂解。在室溫下進行裂解反應 2 小時並以過量之苯甲脒瓊脂糖終止該反應。將裂解產物在 4 至 20% Tris-甘胺酸凝膠上泳行，並以考馬斯 G-250 染色。

[0310] **用於未純化之蛋白質的 SDS-PAGE：**為了測定表現水準，藉由 SDS-PAGE 評估來自經瞬時轉染之 Expi293 細胞的條件培養基。在還原和非還原之條件下將 10μL 來自各轉染之上清液在 10-20% Tris-甘胺酸凝膠上泳行。以考馬斯 G-250 將凝膠染色，並在適當之分子量處觀察預期之條帶。

[0311] **用於純化之蛋白質的 SDS-PAGE：**純化後，在非還原條件下將 2μg 之各 Prodent 在 10-20% Tris-甘胺酸凝膠上泳行以評估純度和穩定性。以考馬斯 G-250 將凝膠染色，並在適當之分子量處觀察預期之條帶。

[0312] **間接 ELISA- Prodent 與 EGFR 或 CD3 結合：**以 1μg/mL 在 PBS 中之捕捉抗原－恒河猴 EGFR::hFC 或食蟹猴 CD3E::Flag::hFC 將 96 孔盤塗層，並在 4℃培育過夜。然後以含有 0.05%Tween-20 之 PBS 將盤洗滌三次並在室溫下以 SuperBlock(PBS) 阻斷 1 小時。額外洗滌三次後，在適當的孔中添加經連續稀釋之 Prodent，並在室溫下培育 1 小時。再次洗滌盤，加入濃度為 1μg/mL 之與 HRP 軛合之抗-6x His Tag 抗體並在室溫下培育 1 小時。最後，再次洗滌盤，並以 Surmodics 單組分 TMB 受質發展 5 分鐘。以 Surmodics650 終止溶液停止該反應，並在 650nm 處讀取該盤之結果。

[0313] **FACS-Prodent 與 OvCAR8 或 Jurkat 結合：**使用 FACS 評估未裂解之 Prodent，以確認 OvCAR8 細胞上之 EGFR 結合及 Jurkat 上之 CD3 結合。以含有 10%FBS

之 PBS 阻斷細胞並以 $2\times10^5$ 個細胞/孔將其接種到 96 孔圓底細胞培養盤中。在冰上進行所有進一步之步驟。將盤在 800×g 離心 5 分鐘以使細胞沉澱成小丸。丟棄上清液並將細胞重新懸於經連續稀釋之 Prodent 中。將 Prodent 在冰上培育 1 小時後，以含有 1%FBS 之 PBS 洗滌該細胞三次。將細胞重新懸浮於濃度為 0.5μg/mL 之經 FITC 標記之抗 6×His Tag 抗體中並培育 30 分鐘。將細胞再次洗滌三次，再懸浮於 150μL 之含有 1%FBS 和 0.5μg/mL 碘化丙啶之 PBS 中並在流式細胞儀上進行分析。

[0314] **FACS & MSD-藉由經 EK 轉染之細胞裂解 Prodents**：藉由 FACS 和 MSD 評估藉由經 EK 轉染之 OvCAR8 選殖株裂解 Prodent。令細胞生長至約 80%匯合並以在 PBS 中之 20nM EDTA 分離出細胞。在 MSD 方面，在 37℃下，將 $2\times10^4$ 個細胞固定在 96 孔 Sector MSD 盤之各孔中 2 小時。然後，在室溫下以含有 10%FBS 之 PBS 阻斷該孔 1 小時。以分析緩衝液(含有 1%FBS 之 PBS)將盤洗滌三次。加入經連續稀釋之未經裂解的 Prodent 並在室溫下培育 1 小時。再將盤洗滌三次，加入經 Sulfo-Tag 標記之食蟹猴 CD3E::Flag::hFC，使最終濃度為 1μg/mL 並在室溫下培育 1 小時。再額外洗滌該盤三次。加入不含表面活性劑之 Read Buffer T 並立即測量總發光。

[0315] 在 FACS 方面，以含有 10%FBS 之 PBS 阻斷細胞並將其以 $2\times10^5$ 個細胞/孔接種到 96 孔圓底細胞培養

盤中。在冰上進行所有進一步之步驟。將盤在 800×g 離心 5 分鐘以使細胞沉澱成小丸。丟棄上清液並將細胞重新懸於經連續稀釋之未經裂解的 Prodent 中。將 Prodent 在冰上培育 1 小時後，以含有 1%FBS 之 PBS 洗滌細胞三次。然後，加入濃度為 0.5μg/ $1\times10^6$ 個細胞之經 AF488 標記的食蟹猴 CD3E:: hFC 並在冰上及黑暗中培育 30 分鐘。將細胞再洗滌三次，再懸浮於 150μL 之含有 1%FBS 和 0.5μg/mL 碘化丙啶之 PBS 中並在流式細胞儀上進行分析。

[0316] **FACS- 表現 EK 之 OvCAR8 細胞的生成**：將以帶有細胞外 6xHis 標籤之編碼腸激酶的載體轉染之細胞在選擇下生長。挑出選殖株並藉由 FACS 分析以測定 EK 表現之相對水準。使細胞生長至約 80%匯合，以在 PBS 中之 20nM EDTA 分離細胞並以含有 10%FBS 之 PBS 阻斷之。在冰上進行所有進一步之步驟。以濃度為 0.5μg/ mL 之經 FITC 標記之小鼠 IgG1 抗-6x His Tag 抗體為每一選殖株染色，一式二分。使用經 FITC 標記之小鼠 IgG1 同種型對照組作為陰性染色。亦以該二種抗體將未經轉染之 OvCAR8 細胞染色作為陰性對照組。在冰上培育 1 小時後，將細胞洗滌三次並將其再懸浮於 150μL 含有 1% FBS 和 0.5μg/ml 碘化丙啶之 PBS 沖。在流式細胞儀上分析並根據 EK 表現進行分級。

[0317] **經由 Octet 分析選定之 Prodent 的結合親和力**：用於測量親和力的 Octet 分析配置：抗人 IgG 捕獲

(AHC)生物傳感器---> huEGFR.huFc 或 hCD3e.flag.hFc---> Prodent.6his。Octet 分析步驟：基線 60 秒，加載 120 秒，基線 2 60 秒，聯結 180 秒，解離 300 秒。在 AHC 傳感器尖端上加載 100nM 之 huEGFR.huFc 或 hCD3e.flag.hFc 蛋白。Prodent 濃度為 100nM。緩衝液：在 PBS 緩衝液中之 0.25% 酪蛋白，這是用於傳感器水合、稀釋樣品及所有基線和離解步驟。溫度為 30℃。搖動器速度為 1000rpm。陽性對照組為來自 BD Pharmingen 目錄編號 555996 之抗 huEGFR 單株抗體及來自 BD Pharmingen 目錄編號 551916 之抗 hCD3e 單株抗體。陰性對照組：小鼠 IgG2b、IgG1 及 Enbrel。使用 OctetRED96 儀器來產生數據。

[0318] 蛋白 A 定量分析配置：蛋白質 A 生物傳感器---> Prodent.Octet 分析步驟：將蛋白 A 傳感器浸入樣品中 120 秒，再生 3 次並將所有樣品重複進行此步驟。緩衝液：在 PBS 緩衝液或表現基質中之 0.25%酪蛋白，傳感器水合及樣品稀釋使用相同之緩衝液。溫度為 30℃。搖動器速度為 400rpm。純化之 Prodent 的標準曲線範圍 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56、0.78μg/mL。

[0319] **間質蛋白酶裂解反應：**在蛋白水解反應方面，將為 26 kDa 蛋白質之人間質蛋白酶 ST14(R&D，目錄 # 3946-SE)之重組催化結構域加入 69 μM Pro8MS 及 81μM Pro8MS 樣品中，使最終濃度為 0.3μM。使反應在室溫下進行 24 小時並以過量之苄脒瓊脂糖終止反應。藉由

SDS PAGE(10-20%Tris/甘胺酸凝膠，Invitrogen 公司，非還原條件)分析樣品。裂解顯示出完成超過 95%。將未經處理之 Pro8MS 和 Pro8ML 樣品保持在室溫下與經處理之樣品相同的時間。該反應係在含有 25mM 檸檬酸鈉、75mM L-精胺酸、75 mM 氯化鈉、4%蔗糖緩衝液(pH 7.0)之緩衝液中發生。

[0320] **Prodent SEC 變化形廓：**在 HPLC 系統(Ailient Technologies 1290 Infinity Ⅱ)上使用 Yarra 3um SEC-2000 柱(Phenomenex)進行分析型尺寸排阻色層分析法。在 AKTA 純色層分析系統(GE)上，使用 HiLoad 26/600 Superdex 200 柱(GE)，在 31.25 mM 檸檬酸鈉、94 mM L-精胺酸、94 mM NaCl(pH7.0)緩衝液中進行製備型尺寸排阻色層分析。

[0321] **蛋白酶活性分析：**使用經螢光團對標記之肽(FRET 肽)作為受質來測量市售之重組或純化的蛋白酶及人、小鼠和食蟹猴血清之蛋白水解活性。分別在 320 和 420nm 之激發/發射波長下測量經 Abz-Dnp 標記之肽的螢光。分別在 340 和 490nm 之激發/發射波長下測量經 Dabcyl-EDANS 標記之肽的螢光。將來自 DMSO 中之 20mM 貯存物的肽加入含有蛋白酶特異性緩衝液或血清的反應孔中，使最終濃度為 3 至 120μM。所添加之蛋白酶的濃度為 1 至 10nM。使用 96 孔盤式分析儀記錄在線性螢光靈敏度範圍內之螢光。

**實施例 1：初始 PRO 平台之製備及表徵**

[0322] 本研究之目的為發展 “條件式活性”T 細胞銜接子，其中 T 細胞活化和細胞毒性係在腫瘤微環境中被增強。策略：在專有之 αX/αCD3 分子中插入腫瘤-特異性蛋白酶裂解位點，致使裂解及腫瘤結合導致活性分子。αX 為用於 1 個，或較佳地，2 個腫瘤抗原之結合結構域。該分子設計係利用位於無活性抗 CD3 scFv 對之 scFv 連接子中的蛋白酶裂解位點，該無活性抗 CD3 scFv 含有互補性活性抗 CD3 結構域($V_H$ 和 $V_L$)，原則上，在該二個抗腫瘤結合結構域與腫瘤細胞之表面結合後，該二個經連接之功能性抗 CD3 scFv 結合結構域可聯結以產生活性 CD3 結合結構域並起始由 T 細胞介導之腫瘤細胞滅殺。

平台 1 (未經配對之 αCD3 scFv)

**Pro1**-αEGFR G8 sdAb-I2C $V_H$-His10

**Pro2**-I2C $V_L$–EGFR D12 sdAb-His10

**Pro3**-αEGFR G8 sdAb-I2C scFv($V_H$-$(GS)_3$-$V_L$)-αEGFR D12 sdAb-His10

**Pro4**-αEGFR G8 sdAb-I2C $V_H$-Flag*-I2C $V_L$-αEGFR D12 sdAb-His10

(短 scFv 連接子防止 aCD3 $V_H$ 和 $V_L$ 配對)

Flag*為用於蛋白酶-腸激酶(EK)之 8 個胺基酸裂解位點

[0323] 依下述製備平台 1 之構建體。將編碼 Prodent 1 至 4 之基因選殖入哺乳動物表現載體中並產生質粒 DNA。在搖瓶中之 25 毫升生長基中之 HEK293 和 CHO 細

胞株中瞬時表現蛋白質。使用 Ni-excel 樹脂純化各個經聚 - His 標記之蛋白質。結果顯示於**第 1A 圖**和**第 1B 圖**中。

*scFv CD3 結合結構域之產生*

[0324] 該人 CD3ε 鏈標準序列為 UniProt 登錄編號 P07766。該人 CD3γ 鏈標準序列為 UniProt 登錄編號 P09693。該人 CD3δ 鏈標準序列為 UniProt 登錄編號 P043234。針對 CD3ε、CD3γ 或 CD3δ 之抗體係經由已知之技術(諸如親和力成熟)產生。其中鼠抗 CD3 抗體係作為起始物質，人化之鼠抗 CD3 抗體是臨床設置所需要的，其中該小鼠特異性殘基可在接受本文所描述之抗原結合蛋白治療的個體中誘導人抗小鼠抗原(HAMA)反應。人化係藉由從小鼠抗 CD3 抗體移植 CDR 區到適當之人種系受體框架上來完成，並可選擇地包括其他對 CDR 及/或框架區之修飾。如本文所提供者，抗體和抗體片段殘基編號係依照 Kabat(Kabat E. A. et al, 1991; Chothia et al, 1987)。

[0325] 因此，使用人類或人化之抗 CD3 抗體來產生用於多肽構建體之 CD3 結合結構域的 scFv 序列。取得編碼人或人化 $V_L$ 和 $V_H$ 結構域之 DNA 序列並將用於構建體之密碼子可選擇地優化以在來自智人之細胞中表現。在 $V_H$ 與 $V_L$ 之間包含蛋白酶裂解位點。在該 scFv 中，$V_H$ 和 $V_L$ 之出現順序有變化(即，$V_L$-$V_H$ 或 $V_H$-$V_L$ 取向)，該“G4S”或“$G_4S$”次單位的三個複本$(G_4S)_3$ 連接該可變結構域以創建 scFv 結構域。抗 CD3 scFv 質粒構建體可具有可選

擇之 Flag、His 或其他親和性標籤並經電穿孔入 HEK293 或其他合適之人或哺乳動物細胞株中，表現和純化蛋白質。驗證分析包括藉由 FACS 之結合分析、使用 Proteon 之動力學分析及 CD3 或靶的表現細胞之染色。

[0326] 將表現之多肽進行尺寸排阻色層分析，結果發現形成聚集體，也許是雙抗體。**第 2 圖。**

[0327] 上述實驗提供下列結果和結論。除了 Pro1 外，在 HEK293 細胞中觀察到該 4 個經多聚-His 標記的 Prodent 蛋白的各自表現。因此，這些多肽能夠被表現。使用 Ni-excel 樹脂從表現基質純化該多肽。然後將樣品對 PBS 透析，藉由 A280 測定多肽濃度並反算表現水準。當在 SDS-PAGE 凝膠上泳行時，每一經純化之經多聚-His 標記的蛋白質具有預期之分子量。在經透析之 Ni-excel 洗提樣品上執行分析性 SEC，然而 Pro1 和 Pro2 顯示出強烈之聚集傾向。在 ELISA 分析中，具有受限之 αCD3 scFv 連接子之 PRO4 與 CD3ε 蛋白之結合相等於與 Pro3 陽性對照蛋白，所以連接子限制並未創造條件式活性之 T-細胞銜接子。

**實施例 2：第二代 Pro 平台之製備和表徵**

[0328] 設計第二代 PRO 平台多肽以藉由改變此 $V_L$ 或 $V_H$ 結構域的多肽序列來具有成為無活性(即，基本上無 CD3 結合)之 $V_L$ 或 $V_H$ 結構域。示例性第二代 Pro 多肽列於下文中。

平台 2 (去活化之 αCD3 scFv)

**Pro5**-αEGFR G8 sdAb-I2C $V_H$-Flag-I2C$V_L$i-Flag-I2C$V_H$i-Flag-I2C$V_L$-αEGFR D12 sdAb-His6

**Pro6**-αEGFR G8 sdAb-I2C $V_H$-Flag-I2 C$V_L$i-His6

**Pro7**-I2C$V_H$i-Flag-I2C$V_L$-αEGFR D12 sdAb-His6

**Pro8**-αEGFR G8 sdAb-I2C $V_H$-Flag-I2C$V_L$-His6

[0329] Pro5 之結構顯示於**第 3 圖**中。在 Pro5 方面，預期未經裂解之多肽將與 EGFR 良好結合，不與 CD3 結合且在 T 細胞依賴性細胞毒性(TDCC)分析中將無活性。裂解後，預期該活性抗 CD3 scFv 的二半將經由與 EGFR 結合而被束縛在癌細胞。該二個活性 scFv 結構域將交互作用以形成活性 CD3 結合 scFv，該構建體在 TDCC 分析中證明具有活性。

[0330] **第 4 圖**中顯示該雙官能夥伴，Pro6 和 Pro7 之結構。本文所描述之實驗證明在抗 CD3 scFv 中之 $V_H$ 或 $V_L$ 的 CDR2 中插入典型蛋白酶裂解位點(EK 裂解位點)可廢除 CD3 結合及活性。預計，該未經裂解之分子將與 EGFR 結合，將不會與 CD3 結合且在 TDCC 分析中不具有活性。裂解後，Pro6 和 Pro7 將產生活性分子，因完整 $V_H$ 和 $V_L$ 二者均透過 EGFR 被束縛在癌細胞。

[0331] 為了產生具有無活性 $V_H$ 之抗 CD3e scFv，製造下列突變：在 Pro21 中(N30S、K31G、Y32S、A49G、Y55A、N57S、Y61A、D64A、N97K、N100K、S110A、Y111F)；在 Pro29 中(Y32S、Y61A、D64A、S110A、

Y111F)；在 Pro30 中(Y32S、Y61A、S110T、Y111F)；在 Pro31 中(N30S、K31G、Y55A、N57S、Y61E、D64A、F104A、Y108A)；在 Pro32 中(N30S、K31G、Y32H、Y55A、N57S、N103A、F104N)。突變被安置在 VH 之 CDR 區中：在 CDR1 中- N30S、K31G、Y32S、Y32H；在 CDR2 中-A49G、Y55A、N57S、Y61A、D64A、Y55A、N57S、Y61E；在 CDR3 中-N97K、N100K、N103A、F104N、F104A、Y108A、S110A、S110T、Y111F。突變 N30S、K31G、Y32S、Y32H、A49G、Y55A、N57S、Y61A、D64A、Y55A、N57S、Y61E 係基於該殘基在人種系序列中出現及當彼等在複合物中與 CD3 結合時在界面上之可能位置來選擇。在 CDR3 區中之突變 N103A、F104N、F104A、Y108A 被挑選出位於 CDR3 之暴露的表面部分，遠離可能之 VH-VL 界面並在可能與 CD3e 交互作用之界面上。突變 S110A、S110T、Y111F 被挑選出來以輕微破壞該可能之 $V_H$-$V_L$ 界面的穩定，以使該區稍微更改結構。

[0332] 當表現時，Pro29 至 32 產生穩定蛋白質，當藉由 DSF 測量時 Tm 為 53-55°C。Pro21 未充分表現。

[0333] 為了產生具有無活性 $V_L$ 之抗 CD3e scFv，在 Pro20 中製造下列突變(N32H、K54S、F55N、L56K、A57H、P58S、G59W、W94G、N96R)。將突變置於 VL 之 CDR 區中：在 CDR1 中-N32H；在 CDR2 中-K54S、F55N、L56K、A57H、P58S、G59W；在 CDR3 中-W94G、

N96R。突變 N32H、K54S、F55N、L56K、A57H、P58S、G59W 是係基於該殘基在人種系序列中出現及彼等在複合物中不利地影響與 CD3 結合之界面上的可能位置來選擇。在 CDR3 區中之突變 W94G、N96R 被挑選出位於 CDR3 之暴露的表面部分，遠離可能之 $V_H$-$V_L$ 界面。

[0334] 當表現時，Pro20 產生穩定之蛋白質。

[0335] Pro8 為陽性對照組。使用 Pro8 來確認在 scFv 連接子中插入典型之蛋白酶裂解位點(EK 裂解位點)不會干擾 scFv 折疊及 CD3 結合。**第 5 圖.** 未經裂解之 Pro8 分子應與 EGFR 結合、與 CD3 結合且在 TDCC 分析中具有活性。裂解後，Pro8 應該失去與 CD3 之結合，因為該經由與 EGFR 結合而被束縛在細胞表面之經裂解分子的每一半失去協同影響而導致 $V_H$ 與 $V_L$ 分開。

[0336] 對多肽進行四種類型之結合/活性分析。示例性分析顯示於**第 9 圖**中。

[0337] 利用典型蛋白酶腸激酶將該位在介於活性和無活性 $V_H$ 及 $V_L$ 結構域之間的蛋白酶裂解位點處之本發明構建體裂解。

**結果**

[0338] **第 6 圖**顯示本發明之未經純化的多肽及各種對照組之 SDS-PAGE。如由 PAGE 所示者，該多肽被充分表現。Pro5 至 8 之尺寸排阻色層分析顯示沒有聚集，確認這些 Pro 結構趨向形成單體物種。**第 7 圖.** 藉由 Ni-excel

色層分析法純化該多肽且各多肽基本上在 SDS-PAGE 上提供單一頻帶。**第 8 圖**中之表格顯示蛋白質表現及純化之結果。

[0339] EGFR-ELISA 分析證明平台 2 之多肽能與 ELISA 分析中之 EGFR(**第 10A 圖**)及細胞上之 EGFR(**第 10B 圖**)結合。如藉由 CD3-ELISA 及 CD3-FACS 所確認者，平台 2 之無活性(即，未經裂解的)多肽不與 Jurkat 細胞上之 CD3 結合。**第 11A 圖**和**第 11B 圖**。

[0340] Pro6 和 Pro7 顯示出藉由蛋白酶裂解被活化，將 Pro6 之無活性 $V_L$i 和 Pro7 之無活性 $V_H$i 與彼等在構建體中之對應的 $V_H$ 和 $V_L$ 夥伴分開。該未經裂解之分子與 EGFR 結合，不與 CD3 結合且在 TDCC 分析中無活性。裂解後，該 Pro6 和 Pro7 之混合物產生活性抗 CD3 結構域，因完整 $V_H$ 和 $V_L$ 二者均經由與 EGFR 結合而被束縛在該癌細胞上。**第 12 圖**。

[0341] 藉由 SDS-PAGE，**第 13 圖**證實腸激酶(EK)顯示出裂解 Pro5 至 8。藉由 ELISA，Pro6 和 Pro7 顯示出在 EK 裂解後以協同方式與 CD3 結合。**第 14 圖**、**第 14B 圖及第 14C 圖**顯示出 Pro6 和 Pro7 分別與 CD3 有最低限度之結合。當先後加入分析時，Pro6 和 Pro7 在 EK 裂解後形成活性 CD3 結合結構域時以協同方式與 CD3 結合。(**第 14D 圖**)。該場景以示意方式顯示於**第 14E 圖中**。藉由夾心 FACS，Pro6 和 Pro7 亦顯示出在 EK 裂解後以協同方式與 CD3 結合。因此，**第 15B 圖**和**第 15C 圖**顯示出個別

Pro 構建體不與 CD3 結合，然而，當它們組合在一起並在表現 EGFR 之 OvCar8 細胞的表面上形成活性 CD3 結合結構域時，其能夠以協同方式與 CD3 結合(**第 15D 圖**)。

[0342] 全長構建體 Pro5 與 CD3 之結合係在該構建體被 EK 蛋白水解式裂解後被活化。**第 16 圖**。

[0343] Pro8 為具有單一靶的結合結構域(抗 EGFR)之陽性對照組模型。因此，當此構建體在蛋白酶裂解位點被裂解時，其失去與 CD3 結合之能力，因為沒有形成活性 CD3 結合結構域：該未被束縛在靶的結合結構域之 $V_L$ 部分不會以足夠有效在 $V_H$ 和 $V_L$ 之間產生協同性交互作用之方式與細胞結合。在裂解之前，Pro8 透過單獨之 EGFR 結合結構域與 EGFR 結合、透過活性 CD3 結合結構域與 CD3 結合，因此在 TDCC 分析中具有活性。裂解後，由於 scFv 組分之間的交互作用弱，該經裂解之構建體失去與 CD3 結合之能力。**第 17 圖**. 此結果顯示於**第 18A 圖和第 18B 圖**。

[0344] Pro6、Pro7 和 Pro8 之 TDCC 分析顯示於**第 19 圖(A 至 D)**中。**第 19A 圖**和**第 19B 圖**中顯示對單獨之 Pro6 和 Pro7 進行之 TDCC 分析的結果。在 EK 裂解後，基本上沒有由這些單一構建體誘導之由 T 細胞介導的細胞毒性。在顯著之對比中，當 Pro6 和 Pro7 組合在一起並裂解(如**第 19C 圖**所示)時導致顯著之 T 細胞細胞毒性。相反地，當 Pro8 被 EK 裂解時，該細胞毒性減低(**第 19D 圖**)。

**實施例 3：對多元靶的結合結構域之結合依賴性的評估**

[0345] 設計實驗以評估一個以上之靶的結合結構域對該構建體與 CD3 結合之能力的重要性。設計不具有 EGFR 靶的結合結構域之 Pro25 至 27，這些結構域被綠色螢光蛋白(GFP)結合結構域所替代。**第 20 圖.** 使用抗 GFP 結合結構域之部分動機為 GFP 不表現在 OvCar8 細胞之表面上。將該含有抗 GFP Pro 構建體與 Pro6 和 Pro7 組合並以 EK 進行蛋白酶裂解。如**第 21C 圖**(Pro6+Pro26)、**第 21D 圖**(Pro6+Pro27)、**第 21E 圖**(Pro7+Pro25)和**第 21F 圖**(Pro9+Pro25)中所示，這些構建體在 EK 裂解後基本上不與 CD3 結合。因此，各 Pro 組分有必要包括至少一個靶的結合結構域以供該經裂解之構建體結合並形成活性 CD3 結合結構域。

**實施例 4：替代之蛋白酶和裂解位點的評估**

[0346] 為了確認上文討論之現象並非僅依賴 EK 及其共有裂解位點，設計具有用於替代之蛋白酶(包括間質蛋白酶)的蛋白酶裂解位點之 Pro 構建體。Pro8 MS 和 Pro8 ML 分別包括 14 個胺基酸間質蛋白酶敏感連接子及 24 個胺基酸間質蛋白酶敏感連接子。該連接子係在構建體之 $V_H$ 和 $V_L$ 結構域之間。利用前述實施例中所闡述之方法，Pro8、Pro8 MS 和 Pro8 ML 在以相關之連接子特異性蛋白酶裂解前及後均具有相等結合特性。因此，在裂解之前，各構建體扭結合 EGFR、結合 CD3 且在 TDCC 分析中為活

性的。在裂解後，由於 scFv 交互作用弱，CD3 結合活性及 TDCC 分析中之活性喪失。該實驗之結果闡述於**第 23 圖**中，其顯示出夾心 ELISA 分析之結果，**第 24 圖**顯示出 FACS 分析之結果。

[0347] 如上文所討論之結果證明本發明之構建體充分表現在真核平台。在 α-CD3 scFv($V_H$ 或 $V_L$)之 CDR(例如 CDR2)中插入示例性蛋白酶(例如 EK)之裂解位點(Flag)可有效地將 α-CD3 scFv 去活化。蛋白酶裂解位點之裂解導致形成功能性 CD3 結合位點。於示例性 Pro 對(Pro6 和 Pro7)中，CD3 結合位點僅在當 Pro6 和 Pro7 非常接近時形成。這些結果係使用經靶抗原塗層之 ELISA 盤及表現靶抗原之癌細胞(基於 ELISA、FACS 和 TDCC 數據)取得。

**實施例 5：Pro 取向對結合之相關性的調查**

[0348] 利用額外之 Pro 基序調查 Pro 之取向(從結構域 N 端至 C 端的順序)是否與 Pro 發生結合作用之能力密切相關(**第 25 圖**)。在該圖中，Pro10 為 Pro6 之反轉類似物，而 Pro9 為 Pro7 之反轉類似物 7。Pro8、Pro11 和 Pro15 (OKT3 為完全活性之 α-CD3 scFv。第 25 圖之表格顯示 Pro6、Pro7、Pro9、Pro10、Pro12 和 Pro14 之組合(其為不完整的)結合 EGFR，但不結合 CD3。該不完整之 CD3 對不與 CD3 結合係藉由夾心 ELISA 證明(**第 26 圖**)。

[0349] 當 Pro6 和 Pro9 組合在一起並發生蛋白酶裂解時，它們形成功能性 CD3 結合結構域(**第 27 圖**)。

Pro6+Pro9 顯示出與 Pro6+Pro7 相比較，具有相等之結合特性(**第 28、29 圖**)。

[0350] 亦調查單特異性相對於雙靶向結構域在 Pro 構建體之結合及活性方面的相關性。將 Pro9 和 Pro14 (各具有相同之 EGFR 結合結構域) 組合並裂解(**第 30 圖**)。**第 31A 圖**顯示出非經裂解和經 EK 裂解之 Pro9 +Pro14 的 FACS 數據，而**第 31B 圖**顯示出 Pro6+Pro7 之類似數據。

[0351] 亦製備和測試其中各 Pro 具有不同 EGFR 結合結構域的 Pro 構造體對。**第 32A 圖**提供之表列出具有 EGFR 和 CD3 結合結構域之 Pro 對。亦製備並裂解的第一組 Pro 對，其中該對之各成員顯示出不同之 EGFR 結合結構域。此對之成員被假定經歷透過不同結合結構域與相同的 EGFR 分子結合("順式"結合)及透過不同結合結構域與不同的 EGFR 分子結合("反式"結合)(**第 32B 圖**)。組裝第二組 Pro 構建體，在該對之各成員上顯示出相同之 EGFR 結合結構域。在該種情況下，該對之成員必須與不同的 EGFR 分子結合("反式"結合)，因為在 EGFR 位點上之靶結合位點係被該對的一個成員之 EGFR 結合結構域佔據。**第 32C 圖**。在這些對上進行之夾心 ELISA 證明 Pro 6+Pro7 (**第 33A 圖**)、Pro9+Pro10(**第 33B 圖**)、Pro 12+Pro14 (**第 33C 圖**)、Pro7+Pro10(**第 33D 圖**)及 Pro 6+Pro9 (**第 33E 圖**)之順式+反式結合。相反地，Pro6+ Pro12 (**第 34A 圖**)、Pro7+Pro14(**第 34B 圖**)、Pro9+Pro14 (**第 34C 圖**)和 Pro10+Pro12(**第 34D 圖**)被證明僅反式結

合。有趣的是，Pro 對之順式+反式結合及僅具有反式結合者在裂解後之活性相似。TDCC 分析之結果顯示於**第 35 圖中**。**第 35A 圖**(順式+反式)、**第 35B 圖**(僅有反式)。如**第 36 圖**所示，陽性對照 Pro 構建體在 EK 裂解後失去活性，可能是因為若無該對之各個具有功能性 EGFR 結合位點之成員來使該 CD3 結合結構域的二個組分靠近時，該 Pro 構建體無法形成功能性 CD3 結合位點。

**實施例 6：藉由蛋白酶表現細胞裂解**

[0352] 在此實施例中，將表現 EK 之載體轉染入螢光素酶+OVCAR8 細胞並選出穩定表現該蛋白質之選殖株。選擇 100 個選殖株並藉由 FACS 確認為陽性(α-His6-FITC)。保存對應於高、中、低表現細胞之細胞樣品。使用夾心 FACS、夾心 MSD 和 TDCC 將這些細胞樣品針對所選定之本發明之多肽構建體進行測試。

[0353] **第 37 圖**證明 EK- His6 在 OvCar8-lux 細胞中穩定表現。鑑別高、中、低表現株落。**第 38 圖**將本發明之未經活化的 Pro 構建體與細胞接觸，該細胞顯示出對 Pro 構建體發揮劑量依賴性活化作用(**第 39 圖**)。從 MSD(**第 39A 圖**)和 FACS(**第 39B 圖**)得到之結果相當。EK 表現之 FACS 分等為 Pro 裂解之預測。

[0354] 使用 EK 過表現 OvCAR8 細胞之 TDCC 顯示出在未經裂解之 Pro 構建體的存在下活化 T 細胞之細胞毒性。**第 40 圖**。野生型 OvCAR8 細胞(其未過度表現 EK)

使用該未經裂解之蛋白質沒有明顯活化該 Pro 構建體並產生之由 T 細胞介導之最小細胞毒性(**第 40A 圖**)。相反地，該過度表現 EK 之 OvCAR8 細胞使用該未經裂解之蛋白質顯示出由 T 細胞介導之細胞毒性(**第 40B 圖**)。

**實施例 7：去活化之 α-CD3 $V_H$ 及 $V_L$**

[0355] **第 41 圖**顯示 α-CD3 scFv 之同源性模型。該親本 $V_H$ 多肽序列及其最同源種系序列之大致比對顯示於**第 42A 圖中**。經設計以將此示例性變體朝向與 CD3 結合去活化的示例性變體闡述於**第 42B 圖中**。類似地，**第 43 圖**闡述該 CD3 之親本 VL 多肽之序列及其與最同源種系序列之大致比對，並提供經設計以使其相關於其與 CD3 結合而使多肽去活化的示例性變體序列。

[0356] **第 44 圖**提供本發明某些多肽 Pro 構建體之示意圖，包括 EGFR 結合結構域、$V_H$ 及 $V_L$ 結構域(其中一者無活性，即，$V_L$i，$V_H$i)、半衰期延長結構域(α-HAS)及介於 $V_L$i 和 $V_H$i 結構域之間的蛋白酶裂解 Flag 位點標誌。**第 44B 圖**之表闡述這些示例性 Pro 物種之結合活性。Pro22 為陽性對照組，其既不具有無活性 $V_H$ 亦不具有無活性 $V_L$。此 Pro 在活化之前同時結合 EGFR 和 CD3。如表中所闡述者，其他 Pro 物種無一在蛋白酶活化前與 CD3 結合。

[0357] **第 45 圖.** 顯示出 Pro23(**第 45A 圖**)和 Pro24(**第 45B 圖**)之示意圖，其各包括一個以上之 Flag EK 裂解

位點。Pro23 亦包括凝血酶裂解位點，使其易於在血漿中裂解。Pro23 之各“臂”包括被蛋白酶可裂解 Flag 位點開之活性和無活性 CD3 結合結構域。各個“臂”亦包括半衰期延長結構域，例如 α-HSA。由於從 Pro24 可明顯得知，該凝血酶可裂解位點可被另一可裂解位點(例如 EK 可裂解位點)來替代。**第 46 圖**提供 Pro23 和 Pro24 蛋白酶裂解之 SDS-PAGE 數據。Pro23 和 Pro24 之活性數據提供在**第 47 圖中**。**第 47A 圖**顯示出被 EK 裂解活化，但不會被凝血酶活化之 Pro23 的 TDCC 活性，證實該活性 CD3 結合結構域與其無活性夥伴的分離為多肽與 CD 3 結合之條件。類似地，Pro24 被 EK 裂解活化(**第 47B 圖**)。

**實施例 8：使用非 EK 之蛋白酶裂解來活化**

[0358] 為了證實以 Pro 多肽觀察到之裂解/結合現象並不僅限於 EK 裂解，設計並測試具有非 EK 蛋白酶裂解位點之另外 Pro 物種。將該測試化合物經工程處理以包括螢光能量轉移對，這將在該多肽在蛋白酶裂解位點裂解時產生信號。**第 48** 至 **52 圖**顯示本次研究之數據。已知蛋白酶 MMP9 在腫瘤細胞中過度表現。將肽經工程處理以包括 MMP9 裂解位點。肽 GPSGPAGLKGAPG 和 GPPGPAGMKGLPG 在血清中穩定，其可被重組 MMP9 裂解，但不會被重組間質蛋白酶 ST14、TACE(ADAM17)純化之組織蛋白酶 B 和 D 裂解(**第 48 圖**)。

[0359] 亦設計和測試包括用於蛋白酶 Meprin 之裂解

位點的另外的肽。**第 49 圖**。肽 GYVADAPK 和 KKLADEPE 在血清中穩定且可被重組 Mep1A 和 Mep1B 裂解，不會被重組 MMP9、TACE(ADAM17)、組織蛋白酶 B 裂解。肽 GGSRPAHLRDSGK 在人血清中穩定，而在小鼠和食蟹猴血清中較不穩定，可被重組裂解 Mep1A 裂解，被重組 MMP9 部分裂解，但不會被 ADAM17、組織蛋白酶 B、間質蛋白酶 ST14 裂解。

[0360] 亦設計和測試對間質蛋白酶裂解敏感之肽。如**第 50 圖**所示，該肽無任何一種在血清中是穩定的。肽類 SFTQARVVGG 和 LSGRSDNH 可波重組間質蛋白酶 ST14 裂解，但不會被 MMP9、TACE(ADAM17)、組織蛋白酶 B 裂解。

[0361] 設計並測試對被血液蛋白酶(凝血酶、嗜中性彈性蛋白酶和弗林蛋白酶)裂解敏感之多肽(**第 51 圖**)。凝血酶(從人血漿中純化)可非常有效地裂解凝血酶-1 肽受質(具有低 $K_m$ 及高 $V_{max}$)。重組中性白細胞彈性蛋白酶可非常有效地裂解彈性蛋白酶 1 肽受質。**第 52 圖**顯示出血液蛋白酶肽受質在血清中裂解之數據。凝血酶-1、凝血酶-2 和弗林酶-2 肽受質之裂解在人血清中最有效。由於血清中無攜帶該活性蛋白酶之嗜中性粒細胞存在，未觀察到嗜中性彈性蛋白酶受質之裂解。

[0362] 雖然本發明之示例性實施態樣已經顯示和描述於本文中，本技藝之技術熟習人士將清楚明白所提供之這些實施態樣僅用於舉例。本技藝之技術熟習人士可在不

偏離本發明下製作許多變化、改變和替代。應理解的是，本文所描述之本發明的實施態樣的各種替代方案可用於實施本發明。下列申請專利範圍意圖限定本發明之範圍並藉此涵蓋在這些申請專利範圍及其等效項之範圍內的方法和結構。

# 【發明申請專利範圍】

【請求項1】一對多肽，其包含：

a) 第一多肽，該第一多肽自N至C端之順序包含：

i) 第一單鏈抗原結合結構域，該第一單鏈抗原結合結構域與癌細胞上之第一靶抗原特異性結合；

ii) 第一scFv結構域，該第一scFv結構域包含：

1) 第一VL結構域；和

2) 第一VH結構域，其中：

該第一VL結構域與該第一VH結構域交互作用以形成第一VL/VH對，該第一VL/VH對不會特異性結合CD3抗原；

第一蛋白酶可裂解之連接子連接該第一VL結構域之C端與該第一VH結構域之N端；且

第一多肽連接子連接該第一單鏈抗原結合結構域之C端與該第一scFv結構域之N端；及

iii) 第一多肽半衰期延長結構域，該第一多肽半衰期延長結構域連接該第一scFv結構域之C端；和

b) 第二多肽，該第二多肽自N至C端之順序包含：

i) 第二單鏈抗原結合結構域，該第二單鏈抗原結合結構域與癌細胞上之第二靶抗原特異性結合；

ii) 第二scFv結構域，該第二scFv結構域包含：

1) 第二VH結構域；和

2) 第二VL結構域，其中：

該第二VH結構域與該第二VL結構域交

互作用以形成第二VL/VH對，該第二VL/VH對不會特異性結合該CD3抗原；

第二蛋白酶可裂解之連接子連接該第二VH結構域之C端與該第二VL結構域之N端；且

第二多肽連接子連接該第二單鏈抗原結合結構域之C端與該第二scFv結構域之N端；及

iii) 第二多肽半衰期延長結構域，該第二多肽半衰期延長結構域連接該第二scFv結構域之C端；

其中藉由該第一蛋白酶可裂解之連接子和該第二蛋白酶可裂解之連接子經裂解，自該第一多肽之第一VL結構域與自該第二多肽之第二VH結構域交互作用以形成第三VL/VH對，該第三VL/VH對特異性結合該CD3抗原。

【請求項2】如請求項1之一對多肽，其中該第一或該第二多肽半衰期延長結構域包含單一結構域抗原結合結構域(sdABD)，該sdABD與人血清白蛋白(HSA)結合。

【請求項3】如請求項2之一對多肽，其中與HSA結合之該sdABD具有序列EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 76之胺基酸397至511)。

【請求項4】如請求項1至3中任一項之一對多肽，其中該第一或該第二多肽半衰期延長結構域具有序列EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYL

QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO: 76之胺基酸397至517)。

【請求項5】如請求項1至4中任一項之一對多肽，其中該第一靶抗原和該第二靶抗原係選自下述之群組：EpCAM、EGFR及FOLR1。

【請求項6】如請求項1至5中任一項之一對多肽，其中該第一及/或該第二蛋白酶可裂解之連接子係由選自下述群組之人蛋白酶裂解：基質金屬蛋白酶2 (MMP2)、MMP9、甲基多巴(meprin)、蛋白裂解酶、凝血酶、尿激酶纖溶酶原活化劑(uPA)及組織蛋白酶。

【請求項7】如請求項1至6中任一項之一對多肽，其中該第一和該第二多肽各別包含額外之單鏈抗原結合結構域。

【請求項8】如請求項1至7中任一項之一對多肽，其中該第一和該第二單鏈抗原結合結構域係相同。

【請求項9】如請求項1至7中任一項之一對多肽，其中該第一和該第二單鏈抗原結合結構域係不同。

【請求項10】如請求項1至9中任一項之一對多肽，其中該第二VH結構域包含序列EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 44之胺基酸137至261)且該第一VL結構域包含序列QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQA

PRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 46之胺基酸1至109)。

【請求項11】如請求項1至9中任一項之一對多肽，其中該第二VH結構域包含序列EVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYA TYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC VRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 76之胺基酸137至261)且該第一VL結構域包含序列QTVVTQE PSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY YCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 82之胺基酸134至241)。

【請求項12】如請求項1至11中任一項之一對多肽，其中該第一單鏈抗原結合結構域包含SEQ ID NO: 76之胺基酸1至127的序列或SEQ ID NO: 82之胺基酸1至124的序列。

【請求項13】如請求項1至12中任一項之一對多肽，其中該第二單鏈抗原結合結構域包含SEQ ID NO: 76之胺基酸1至127的序列或SEQ ID NO: 82之胺基酸1至124的序列。

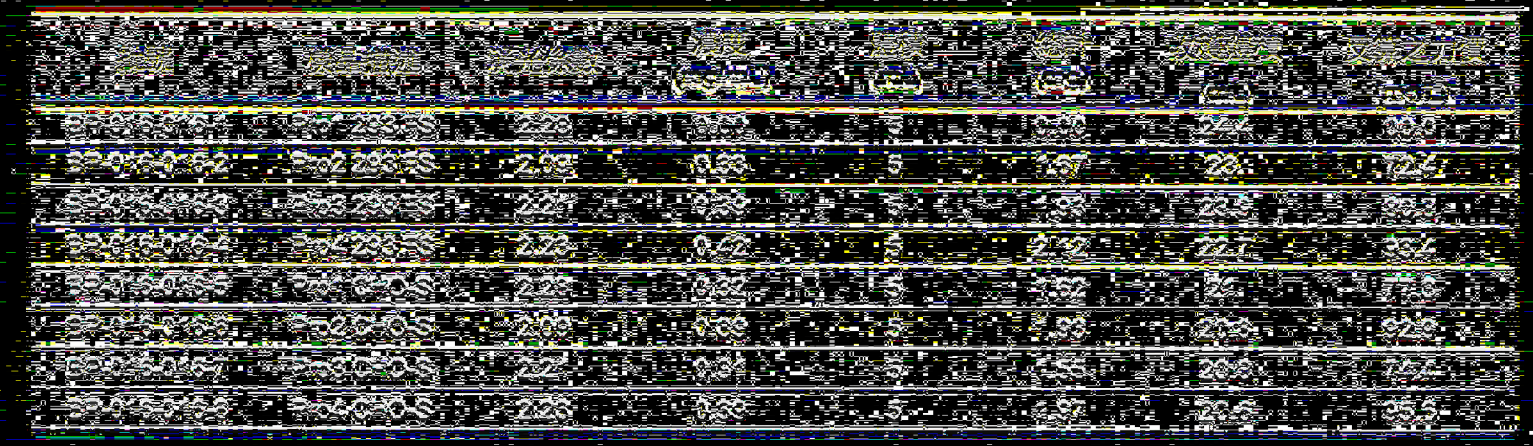
【請求項14】如請求項1至13中任一項之一對多肽，其中該第二VL結構域包含序列QTVVTQEPSLTVSPGGTVT LTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGDYKDDDD

KGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 76之胺基酸278至387)。

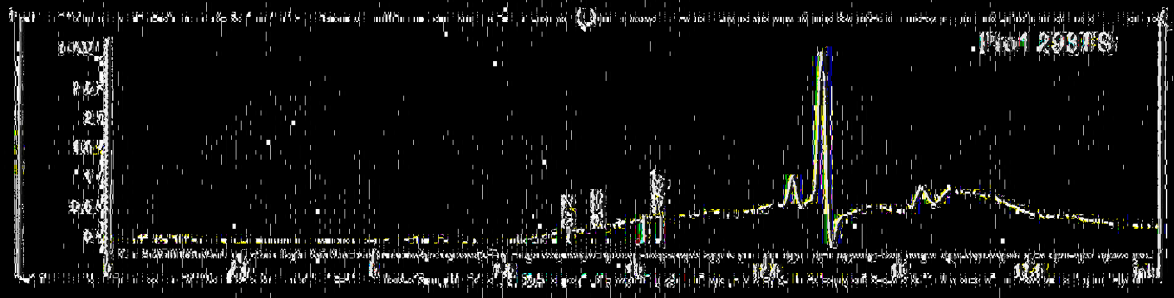
【請求項15】如請求項1至14中任一項之一對多肽，其中該第一VH結構域包含序列EVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDY KDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 82之胺基酸259至384)。

【発明の名称】

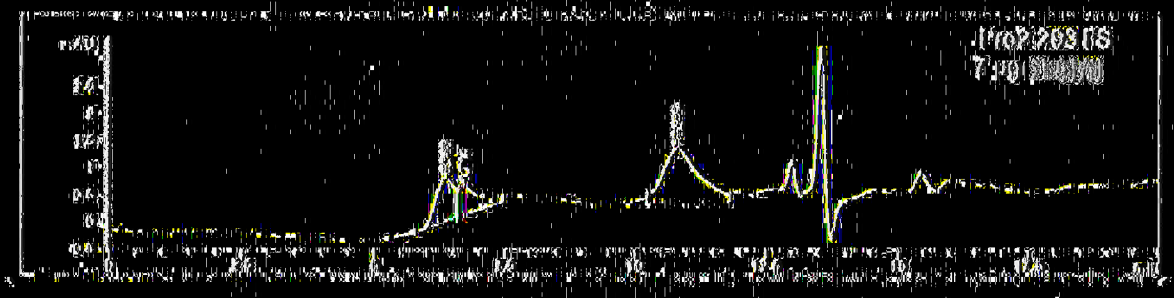
# 第13章



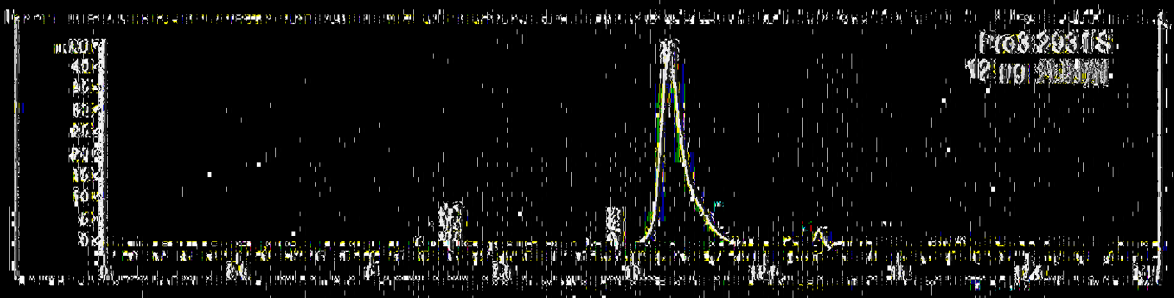
第 2A 圖



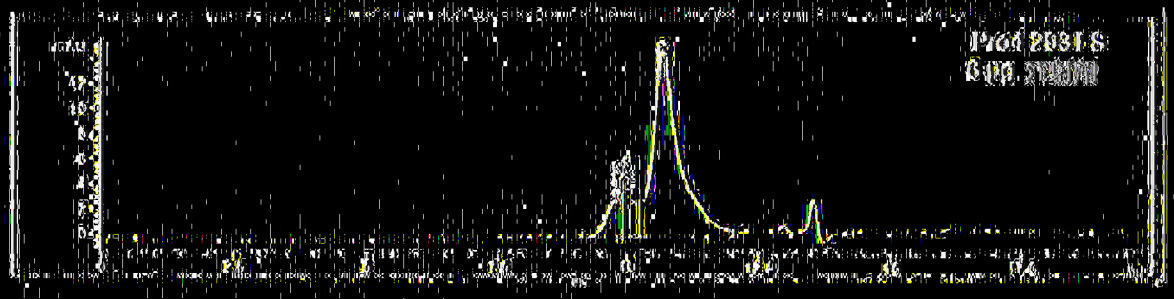

第 2B 圖



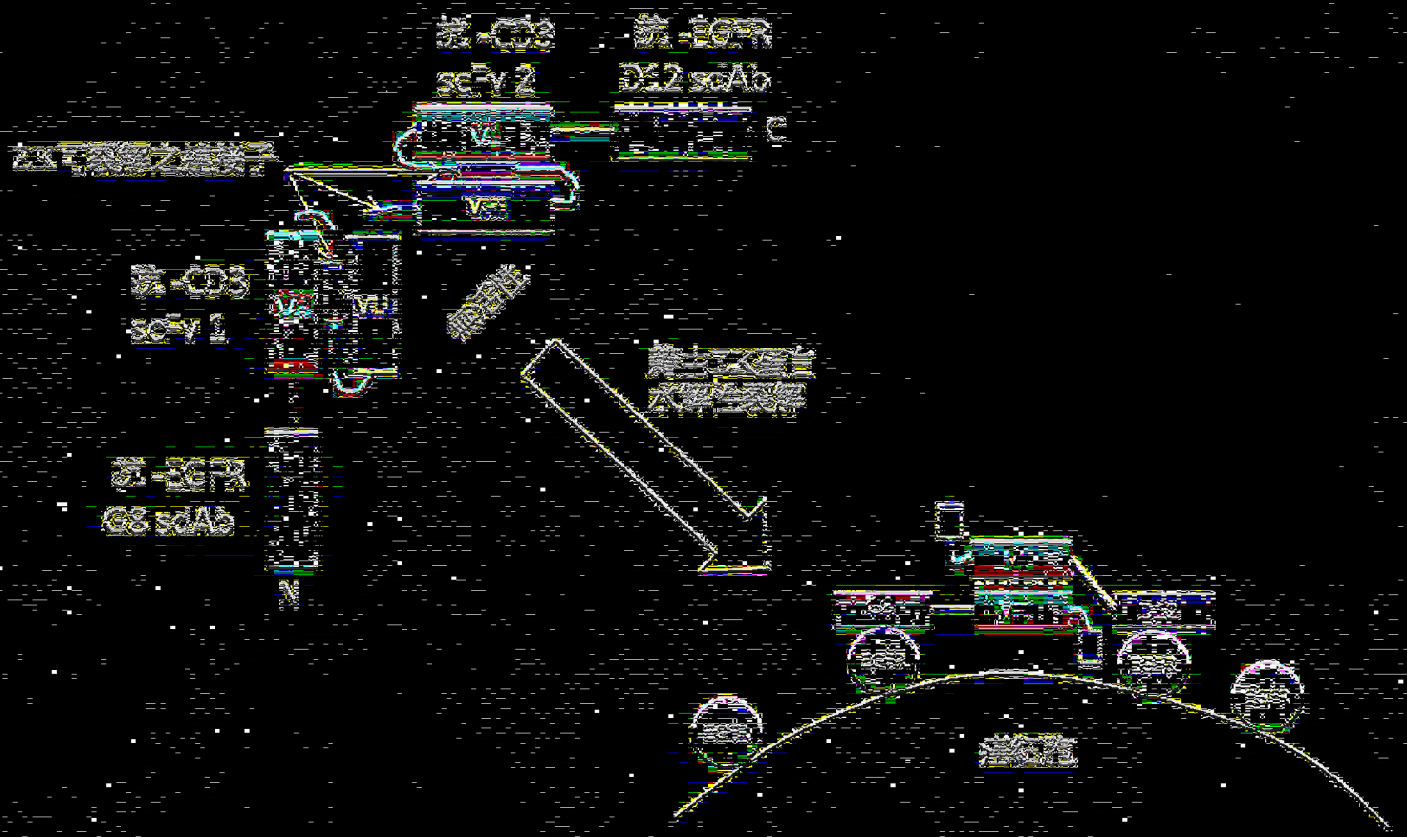

第 2C 圖



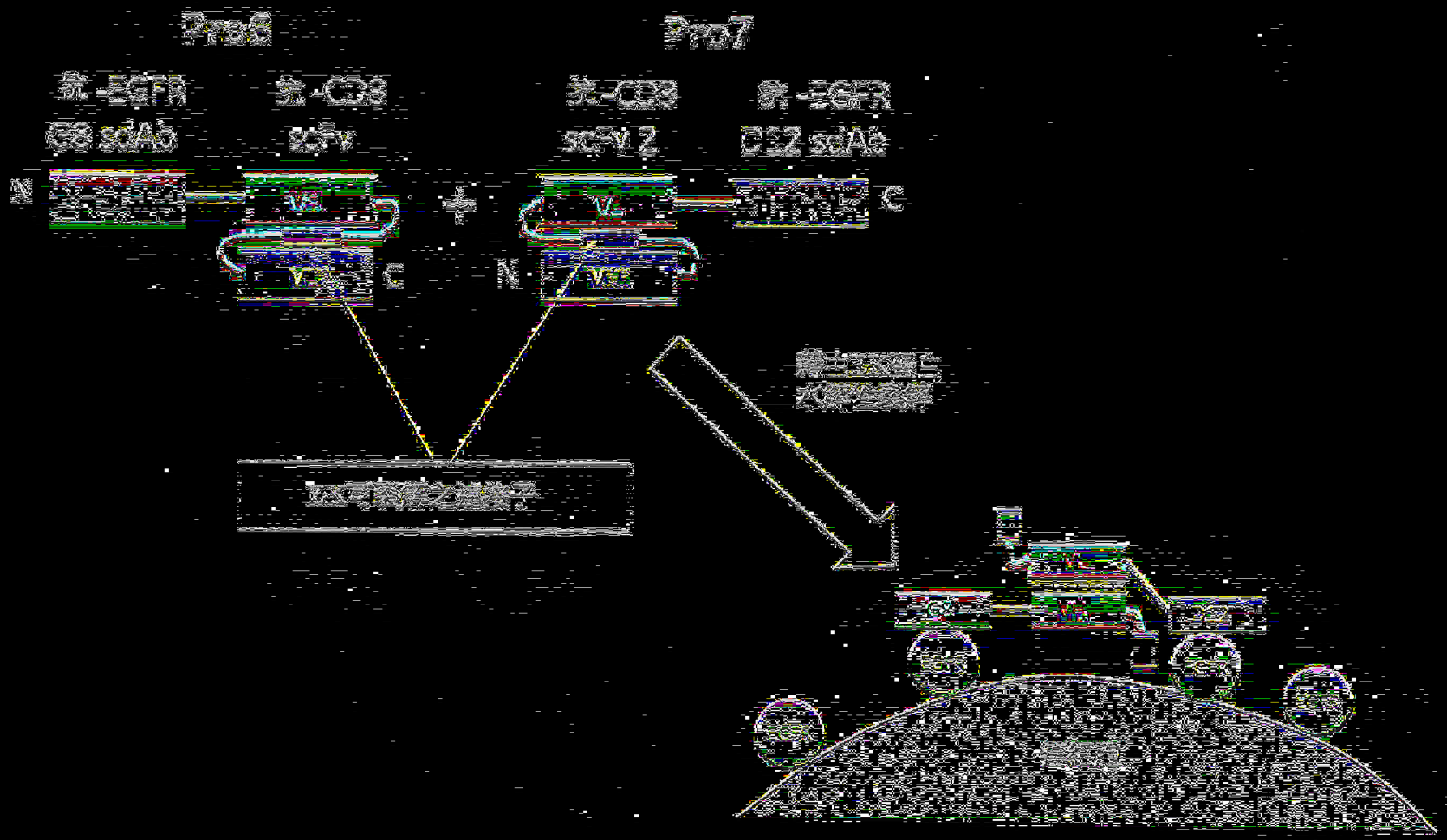

第 2D 圖



第 3 图



# 第4章

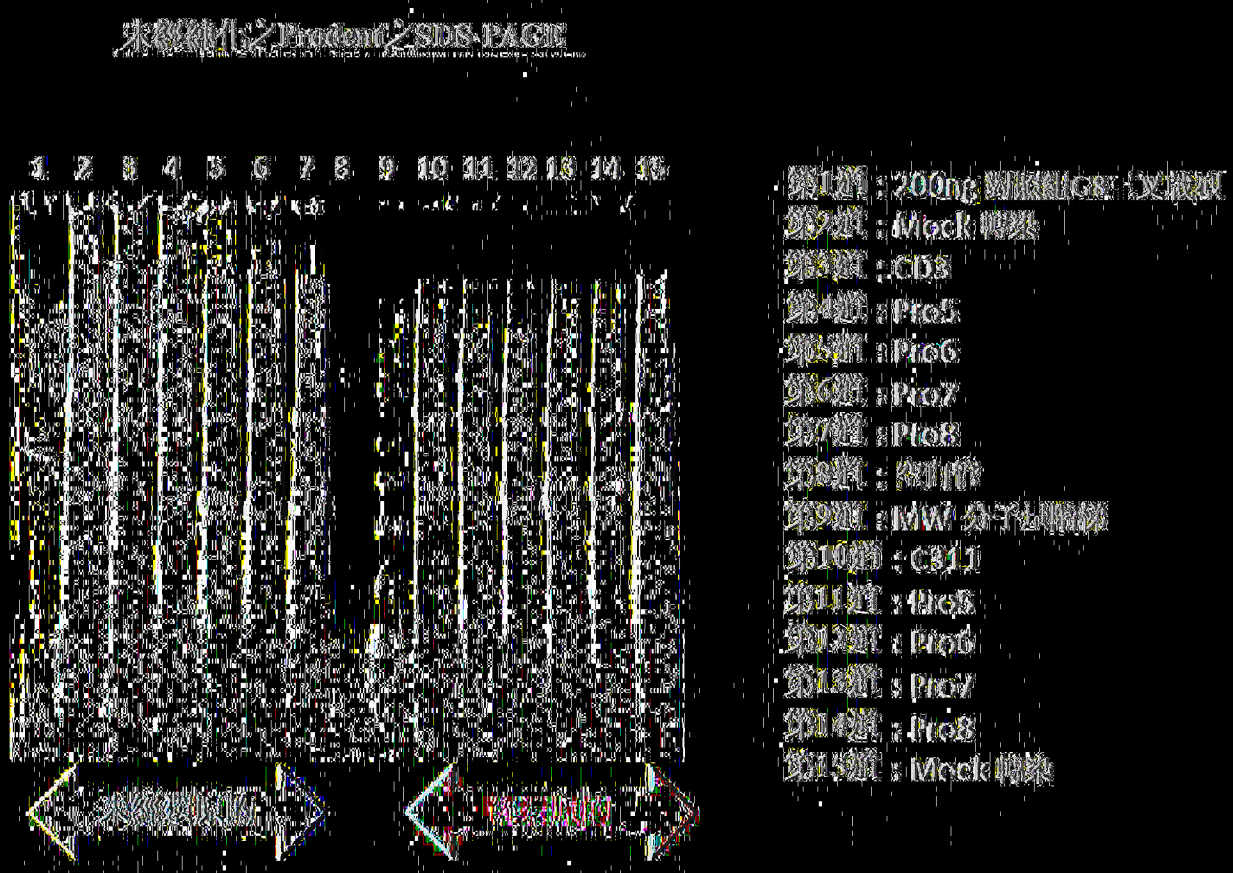


202302631

# 第5章



# 第6圖



Prodont SDS-PAGE
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
第1道 : 200ng
第2道 : Mock
第3道 : CD3
第4道 : Pro5
第5道 : Pro6
第6道 : Pro7
第7道 : Pro8
第8道 : 紅 MW
第9道 : MW 分子量標準
第10道 : C311
第11道 : Pro5
第12道 : Pro6
第13道 : Pro7
第14道 : Pro8
第15道 : Mock

第 7A 图

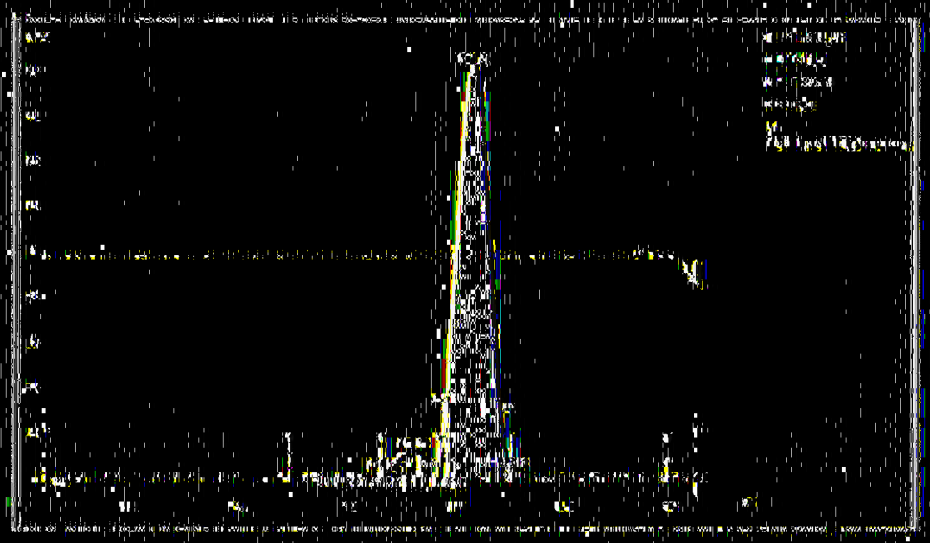


Fig.5

第 7B 图

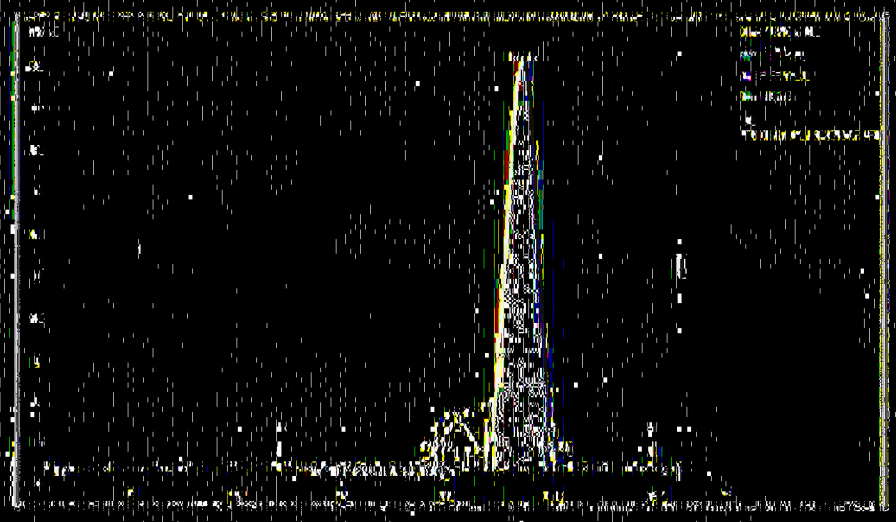
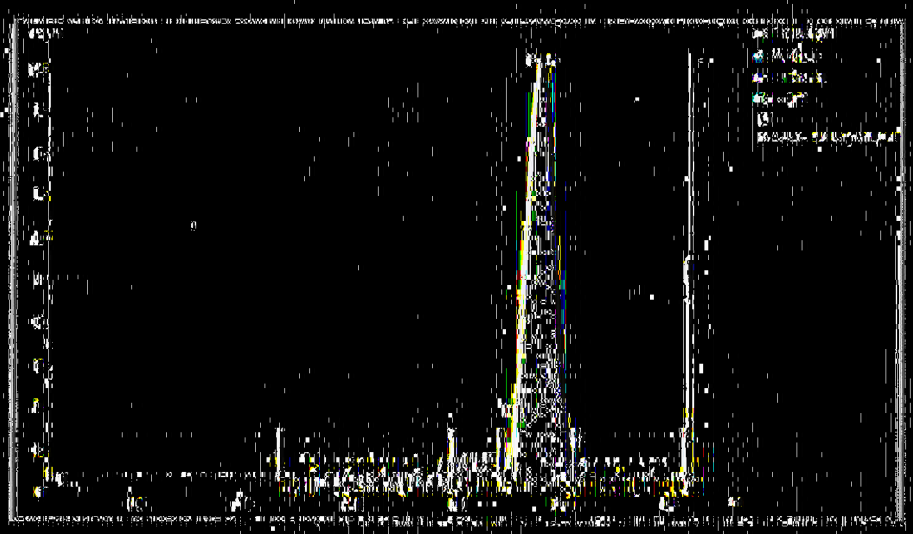


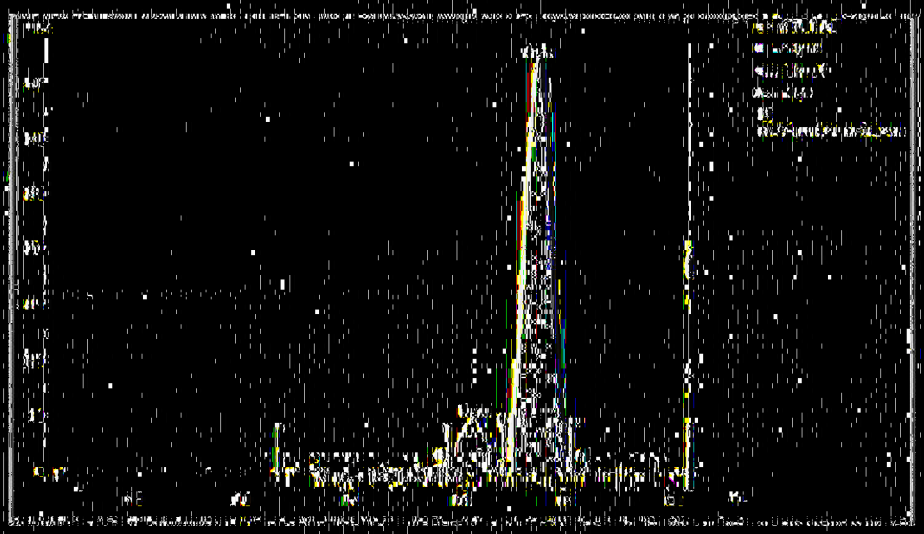
Fig.6

# 第 7C 圖



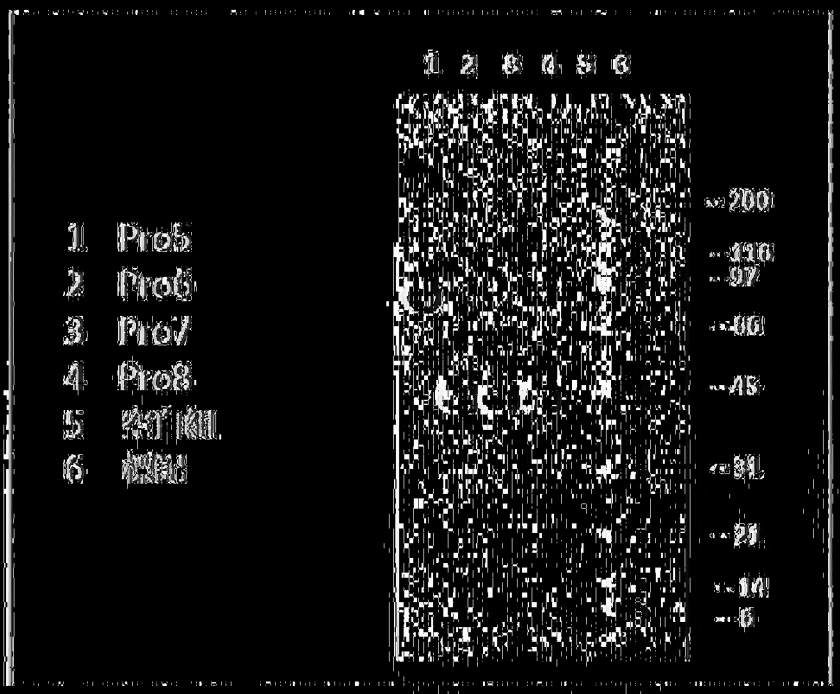
Pro 7
(2Cb)D12(sdAb)-His6

# 第 7D 圖



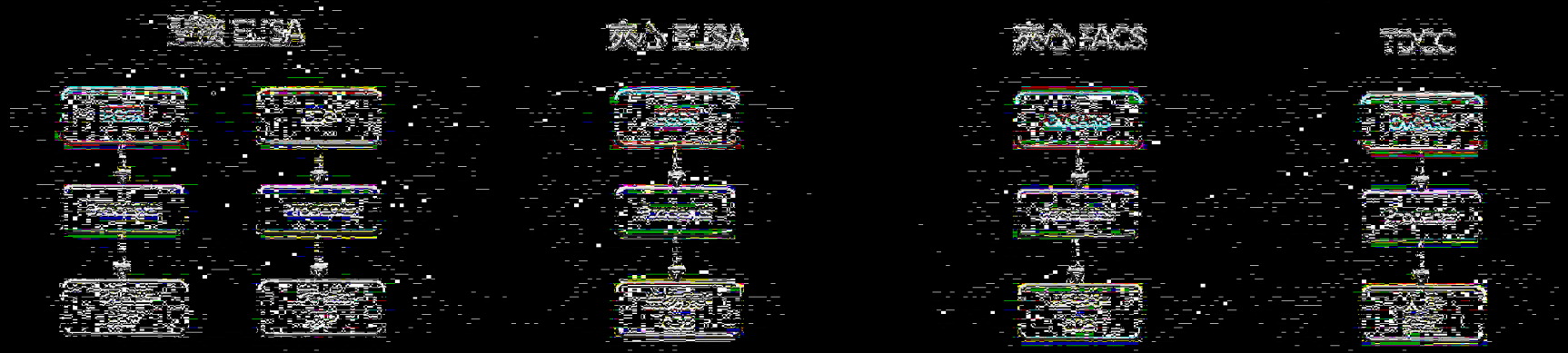
Pro 8
G8(sdAb)-12Cflag-His6

# 第 8 圖

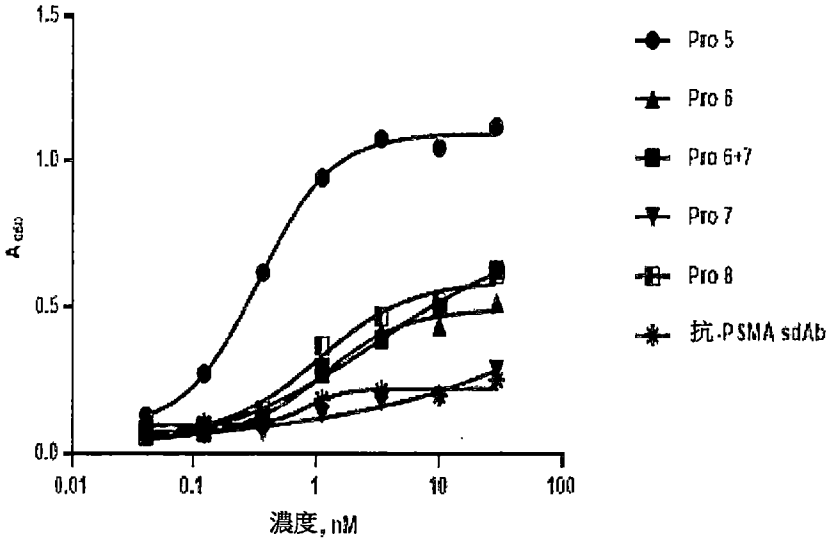



| 名稱 | MW | lot mg/ml | lot mg | lot mlg | lot [illegible] mg/ml | [illegible] | [illegible] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Product 5 GS(sdAb)H2O(x2)D12(sdAb)-HIS6 | 83382 | 0.475 | 14.7 | 31 | 1.3 | 5 | DS |
| Product 6 GS(sdAb)H2O(x)HIS6 | 42471 | 0.205 | 6.4 | 31 | 3.0 | 5 | DS |
| Product 7 H2O(D12(sdAb)-HIS6 | 41686 | 0.983 | 30.5 | 31 | 33.1 | 5 | DS |
| Product 8 GS(sdAb)H2O(lag)HIS6 | 42791 | 0.348 | 10.8 | 31 | 13.5 | 5 | DS |

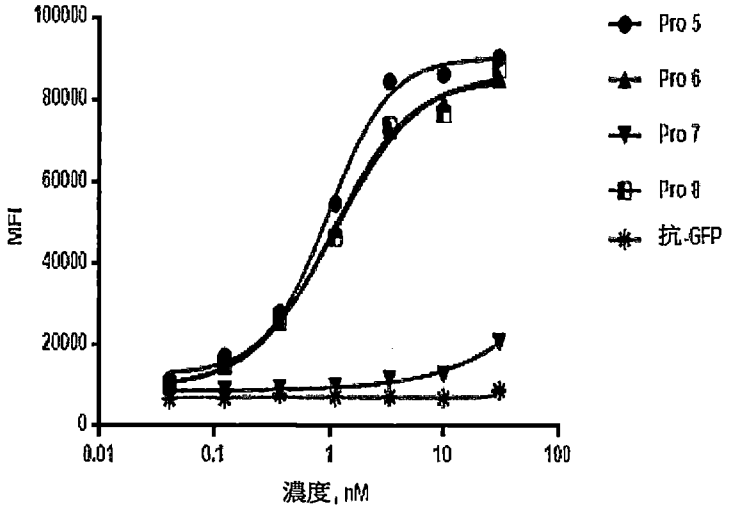
# 第9图



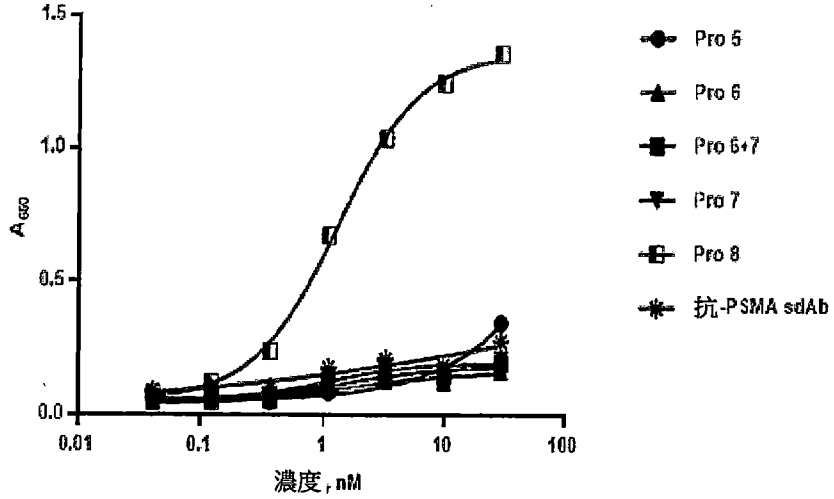
第 10A 圖


1.5
1.0
0.5
0.0
$A_{450}$
0.01
0.1
1
10
100
濃度, nM
Pro 5
Pro 6
Pro 6+7
Pro 7
Pro 8
抗-PSMA sdAb

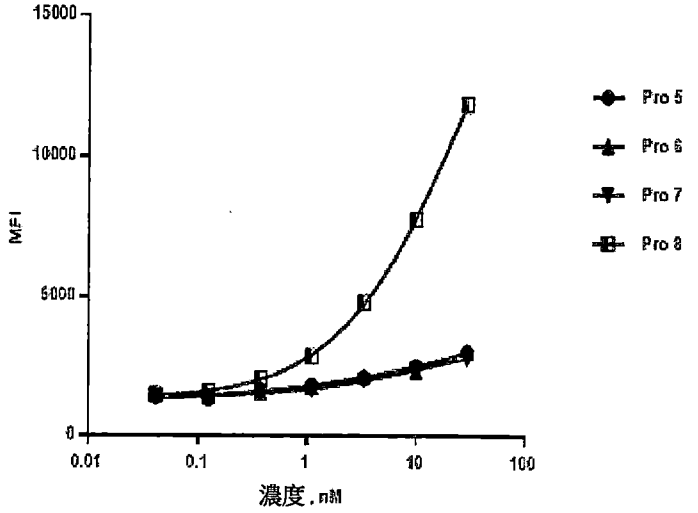
第 10B 圖


100000
80000
60000
40000
20000
0
MFI
0.01
0.1
1
10
100
濃度, nM
Pro 5
Pro 6
Pro 7
Pro 8
抗-GFP

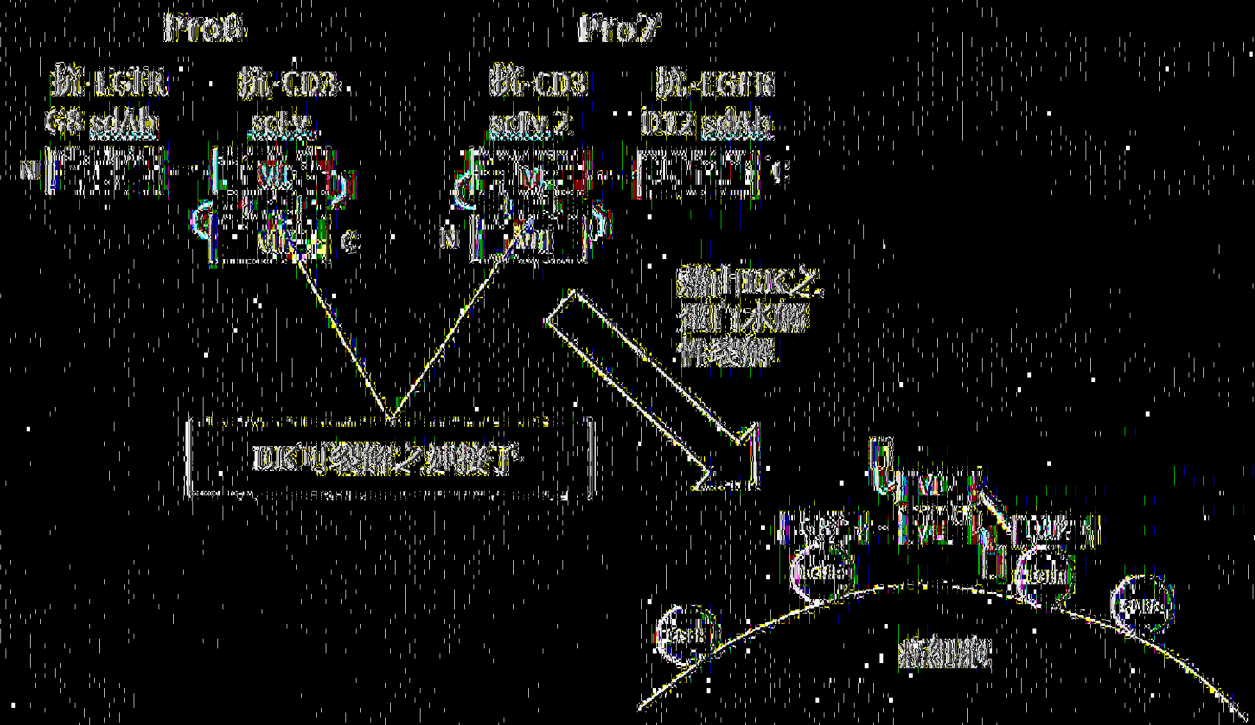
第 11A 圖


1.5
1.0
0.5
0.0
$A_{650}$
0.01
0.1
1
10
100
濃度, nM
Pro 5
Pro 6
Pro 6+7
Pro 7
Pro 8
抗-PSMA sdAb

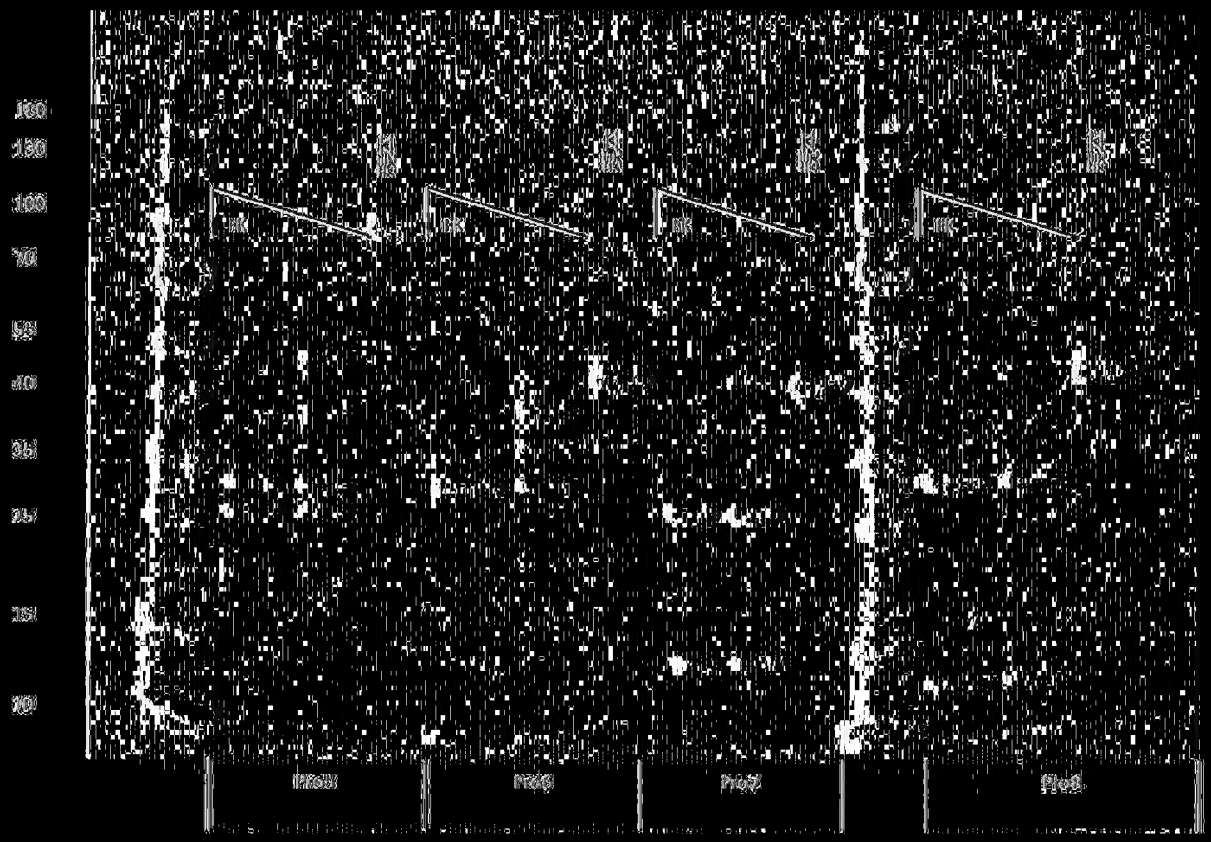
第 11B 圖


15000
10000
5000
0
MFI
0.01
0.1
1
10
100
濃度, nM
Pro 5
Pro 6
Pro 7
Pro 8

# 第 12 圖



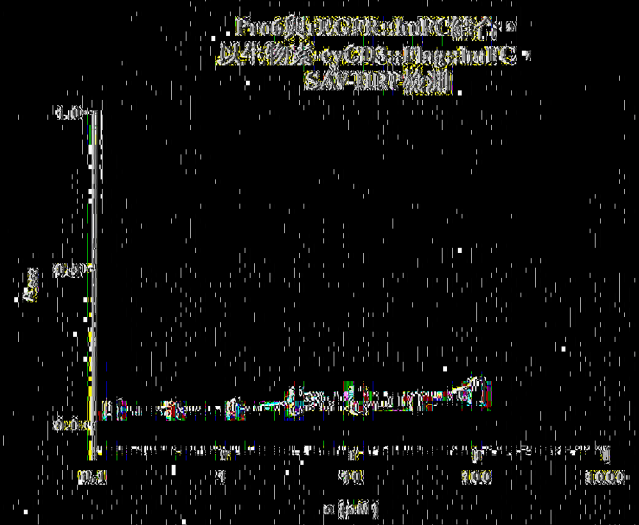
# 第 13 图



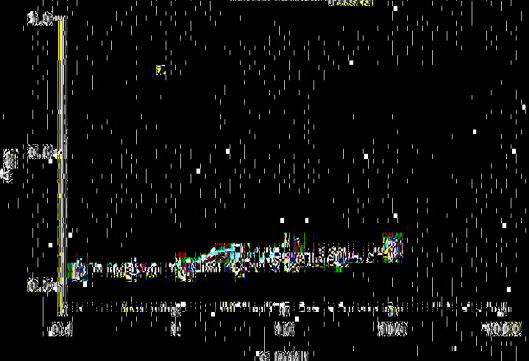
第 14A 圖



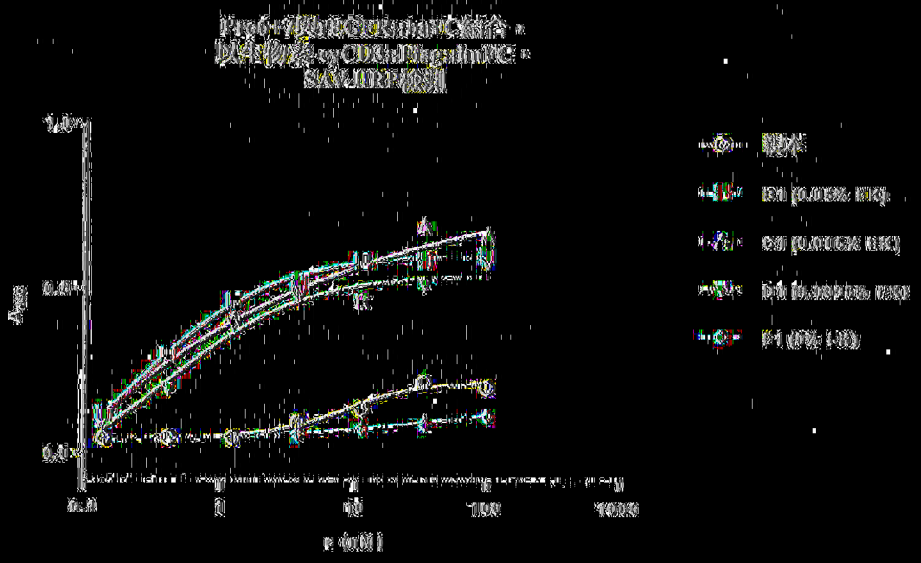

第 14B 圖



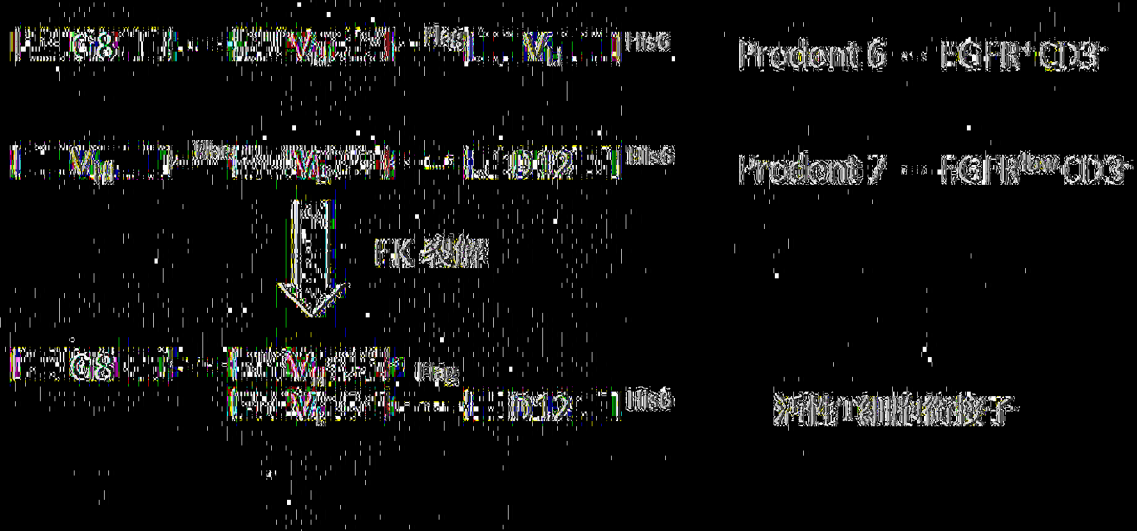
第 14C 圖



第 14D 圖

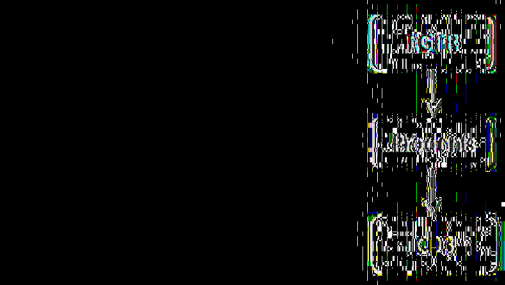


第 14E 圖

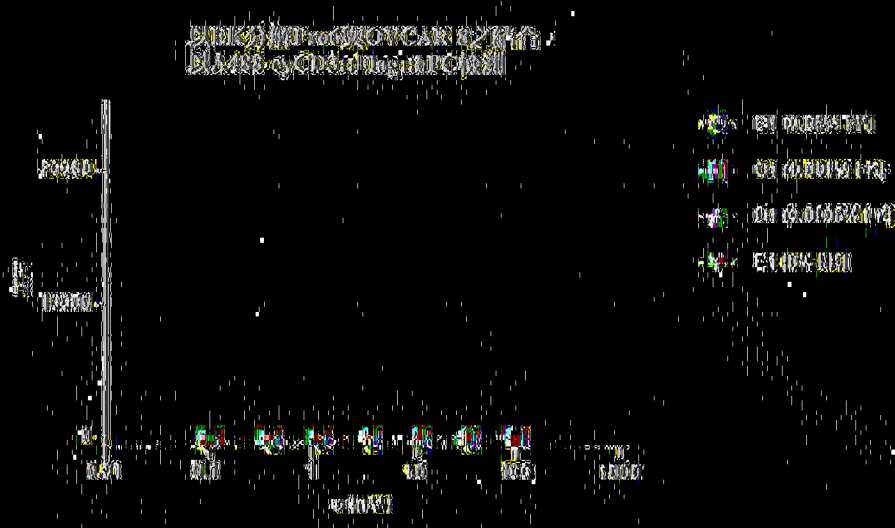


202302631

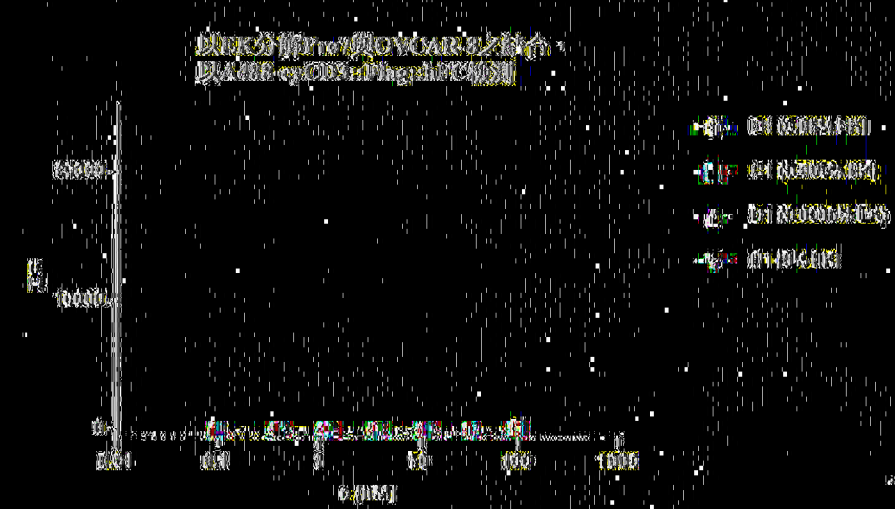
# 第 15A 圖



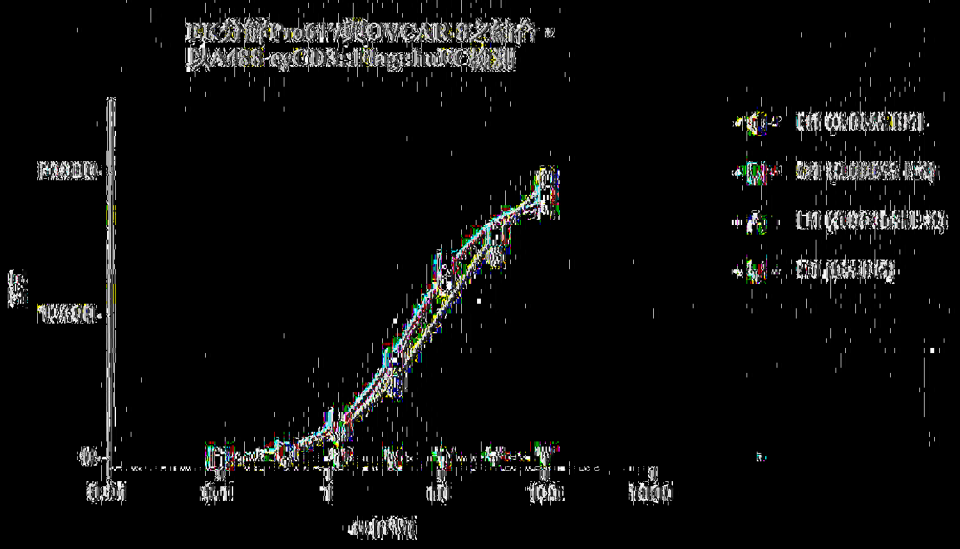
# 第 15B 圖



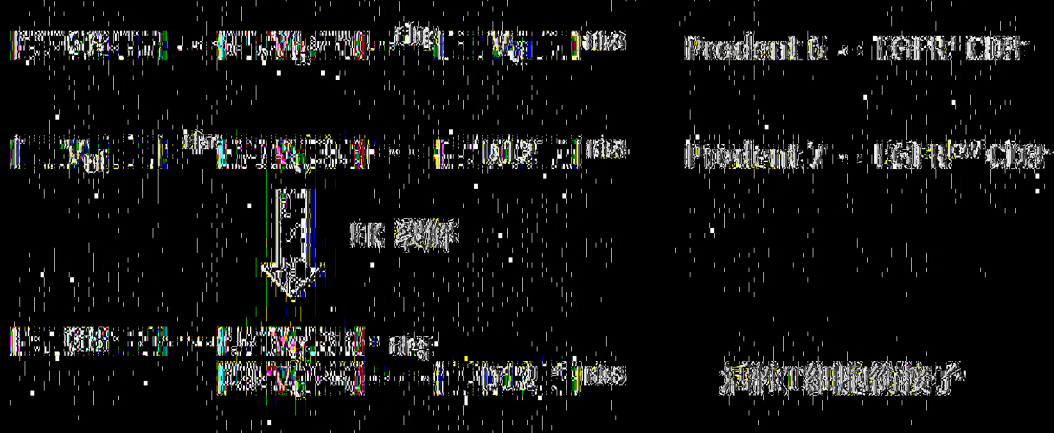
# 第 15C 圖



第 15D 圖

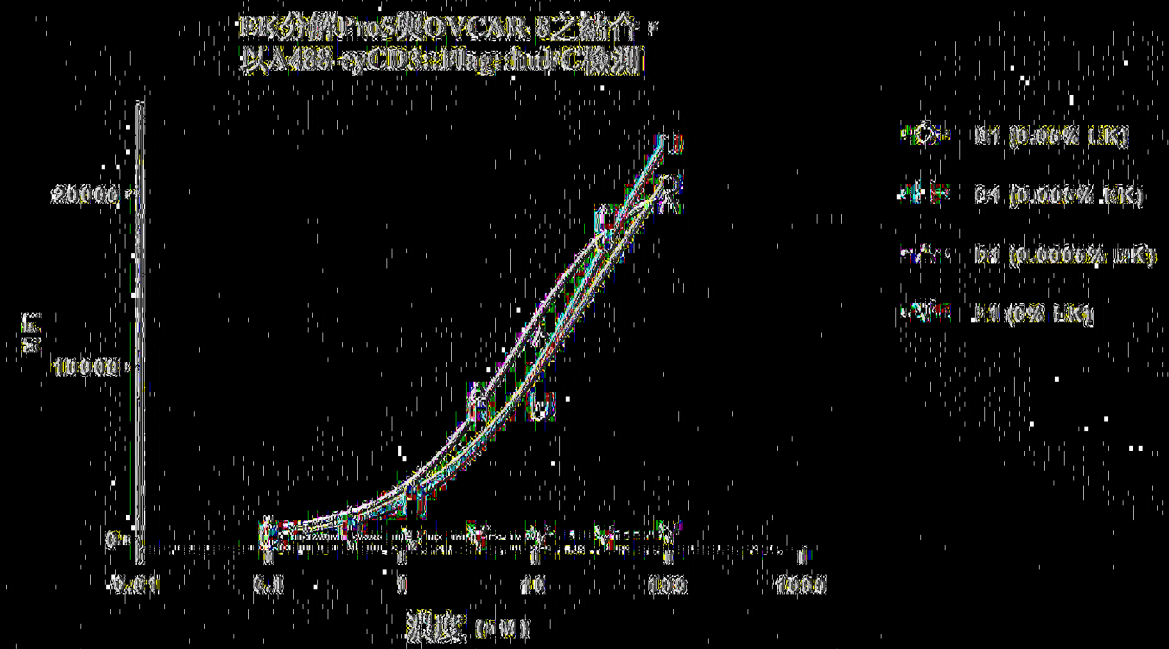


第 15E 圖



202302631

# 第16圖

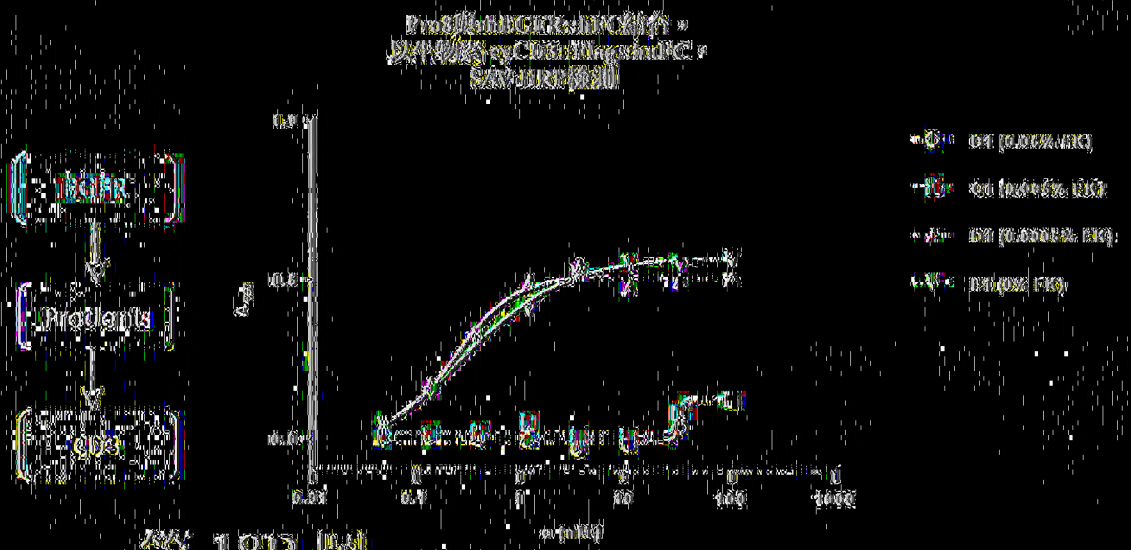


202302631

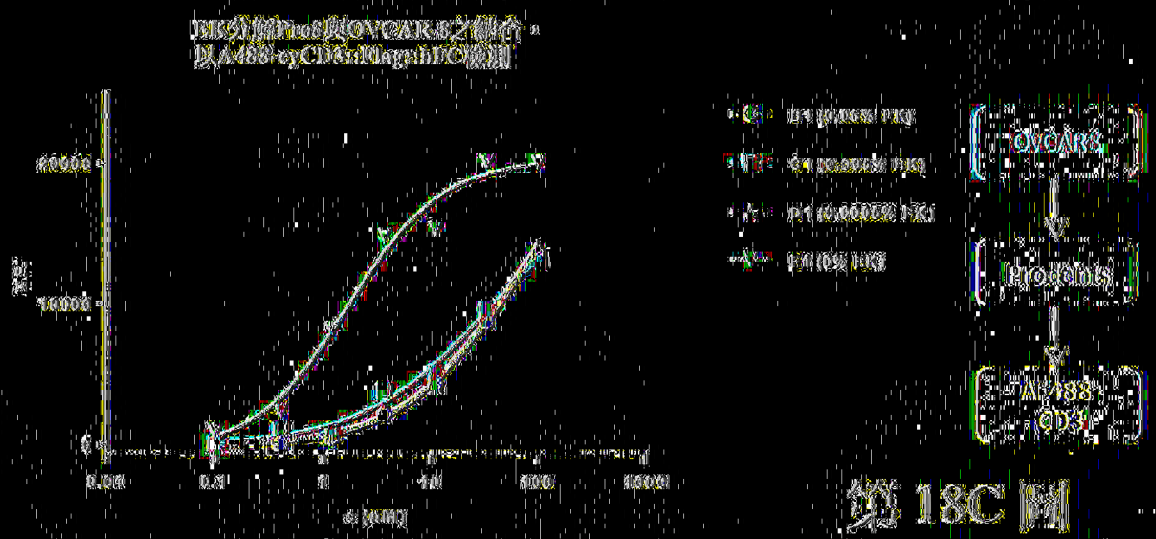
第 17 図



第 18A 圖

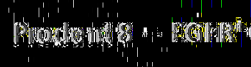



第 18B 圖

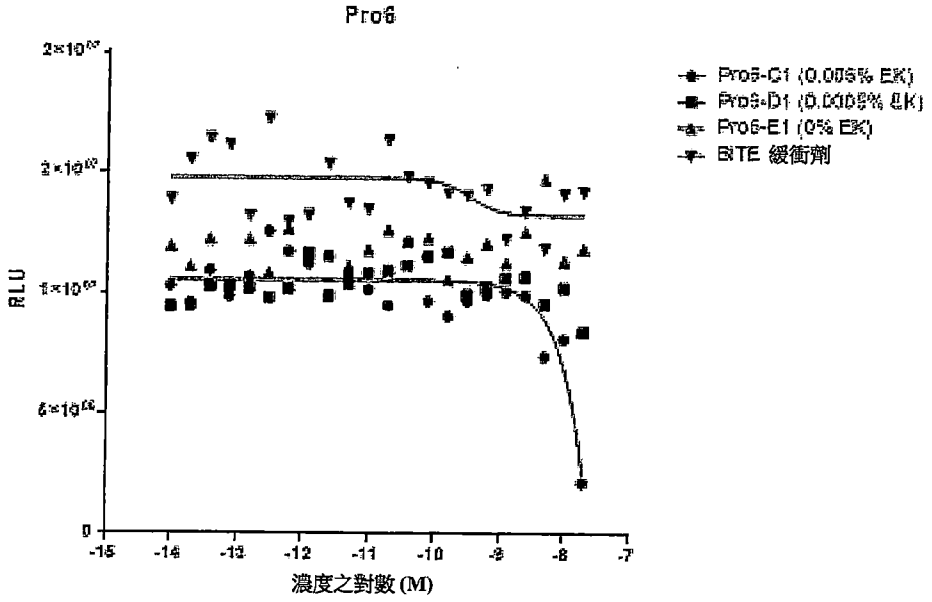



第 18C 圖

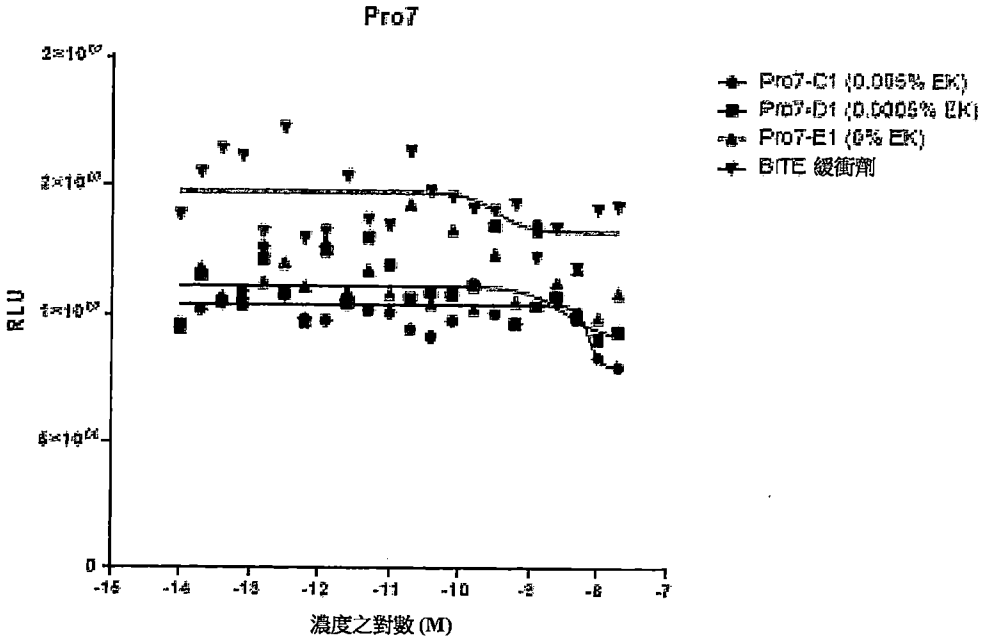


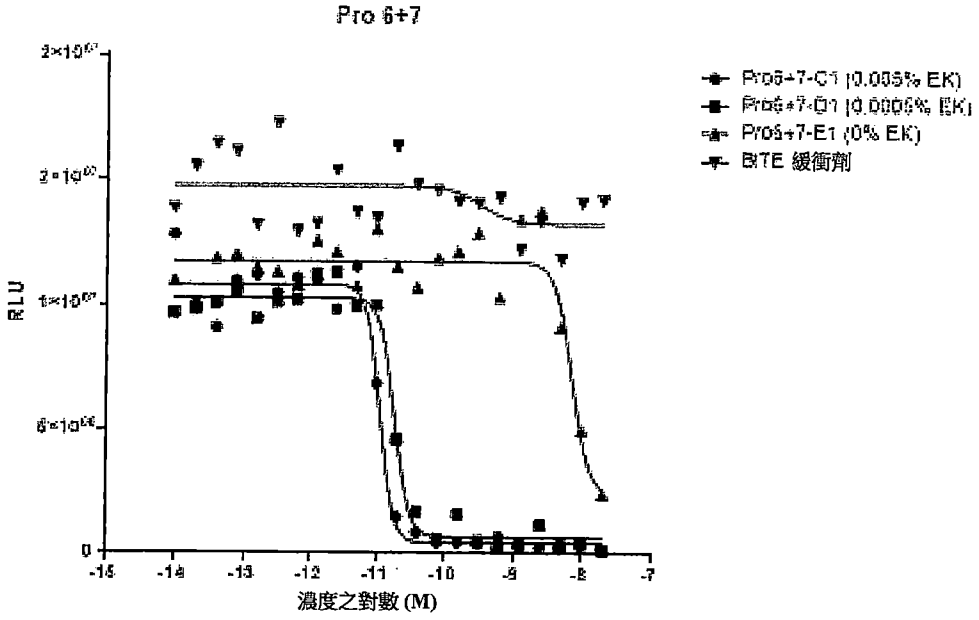
第 19A 圖


Pro6
RLU
濃度之對數 (M)
Pro6-C1 (0.005% EK)
Pro6-D1 (0.0005% EK)
Pro6-E1 (0% EK)
BiTE 緩衝劑

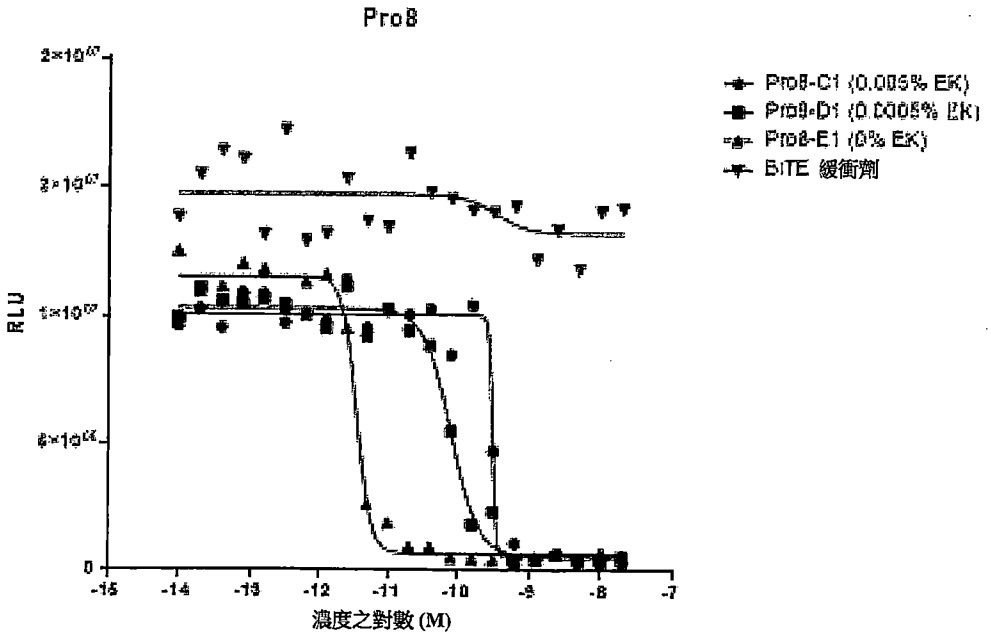
第 19B 圖


Pro7
RLU
濃度之對數 (M)
Pro7-C1 (0.005% EK)
Pro7-D1 (0.0005% EK)
Pro7-E1 (0% EK)
BiTE 緩衝劑

第 19C 圖


Pro 6+7
RLU
濃度之對數 (M)
Pro6+7-C1 (0.005% EK)
Pro6+7-D1 (0.0005% EK)
Pro6+7-E1 (0% EK)
BiTE 緩衝劑

第 19D 圖


Pro8
RLU
濃度之對數 (M)
Pro8-C1 (0.005% EK)
Pro8-D1 (0.0005% EK)
Pro8-E1 (0% EK)
BiTE 緩衝劑

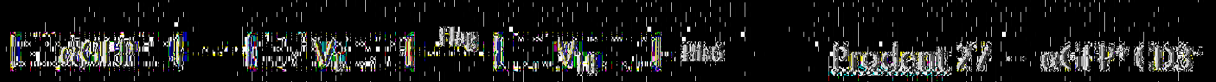
第 20A 圖



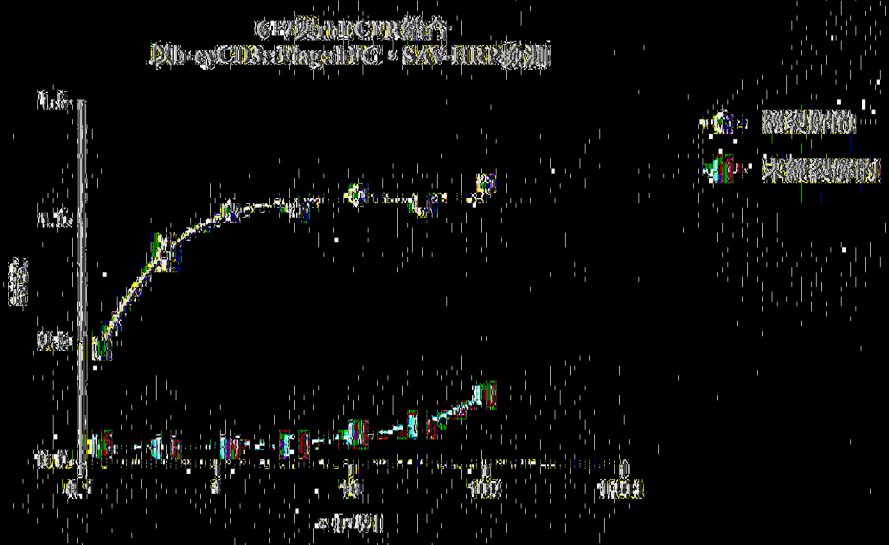

第 20B 圖



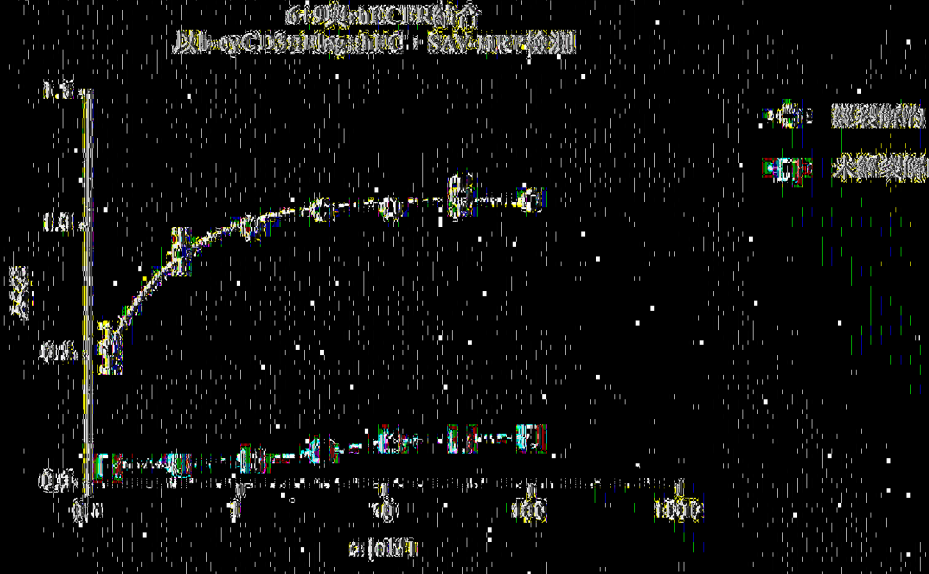

第 20C 圖



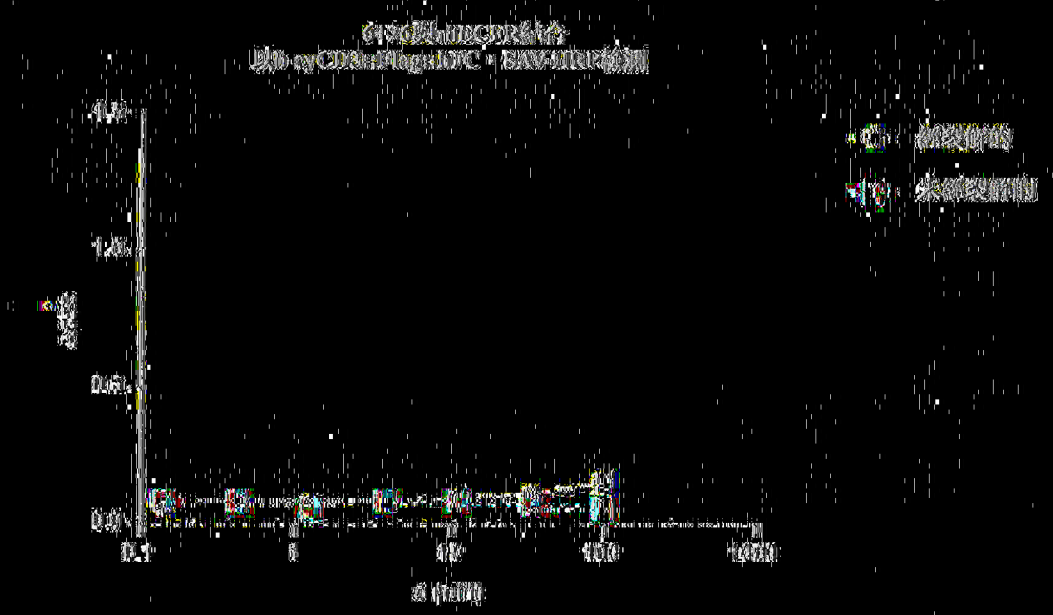
第 21A 圖



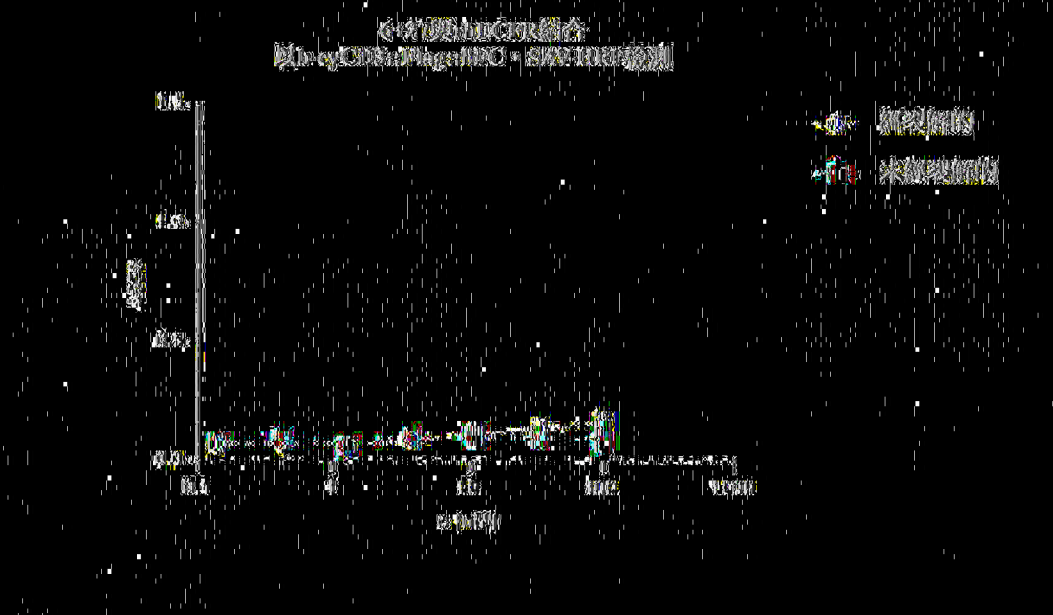
第 21B 圖



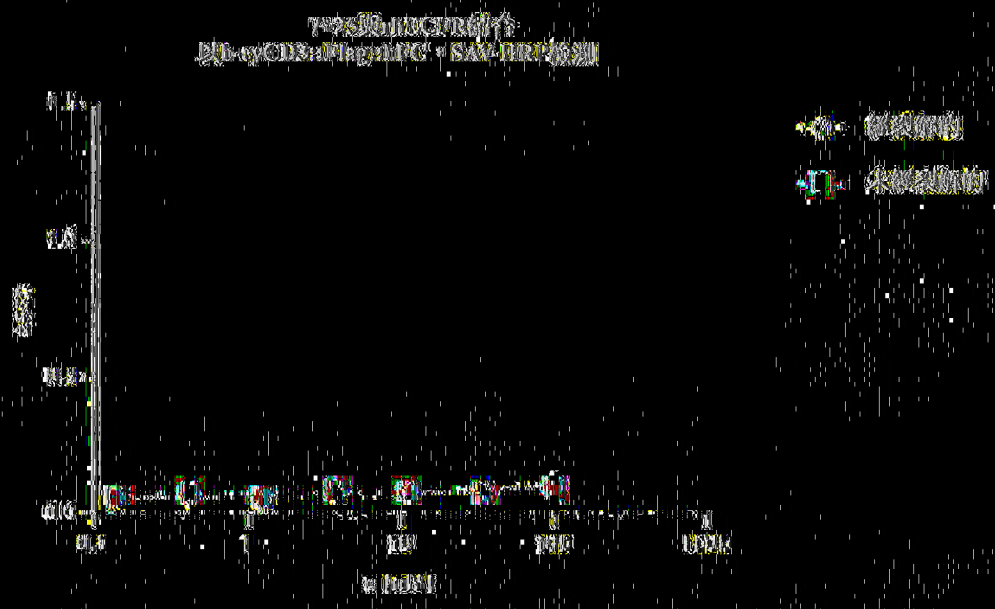
第21C图



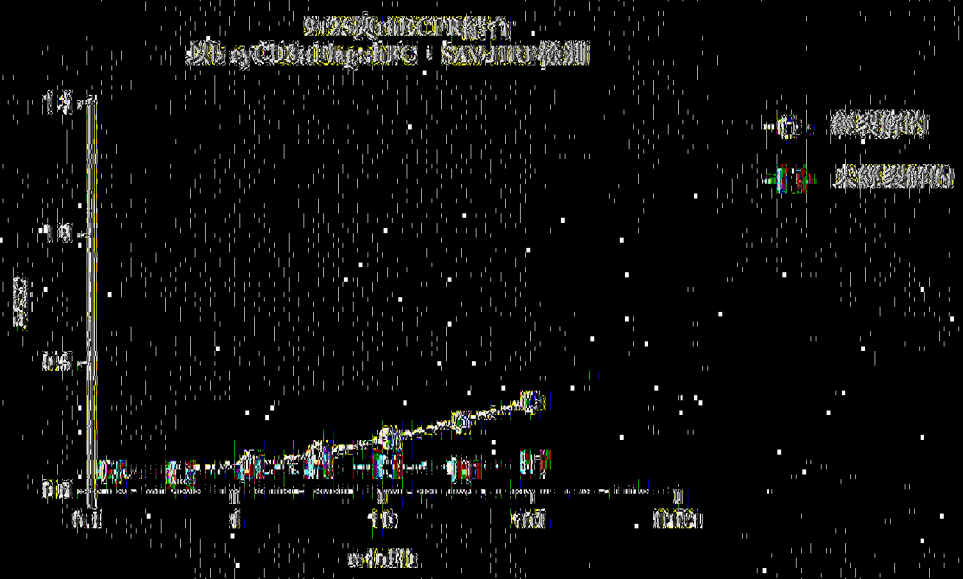
第21D图



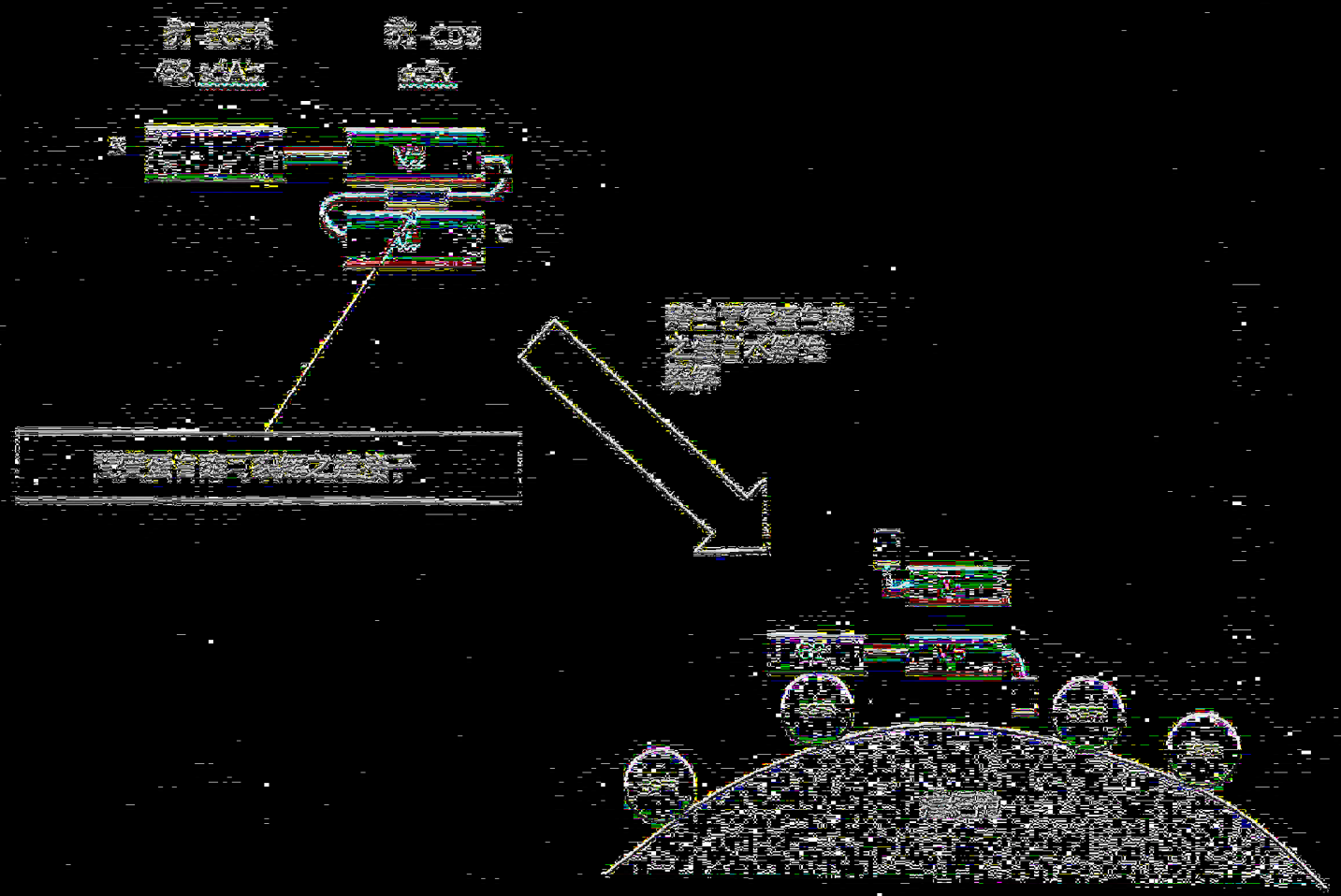
# 第21E圖



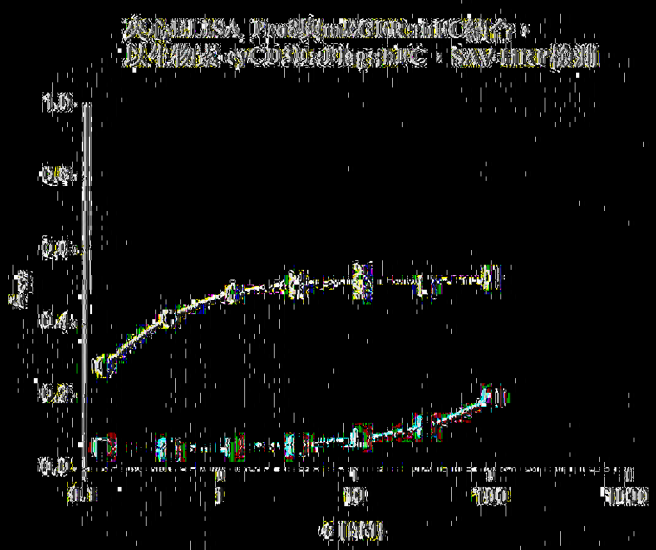
# 第21F圖



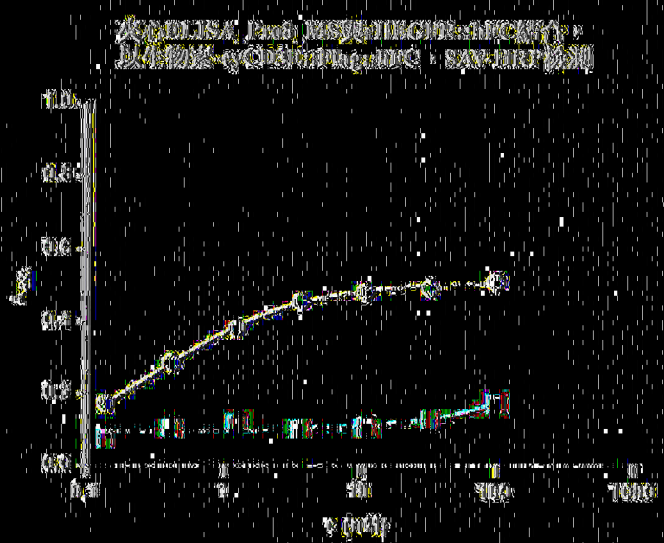
第22圖



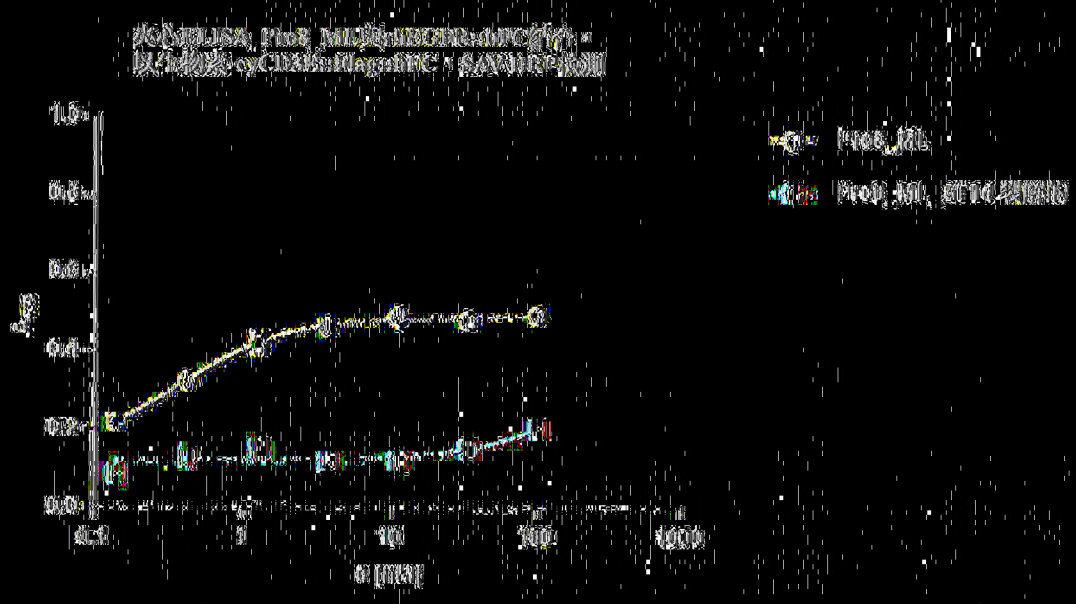
第 23A 图



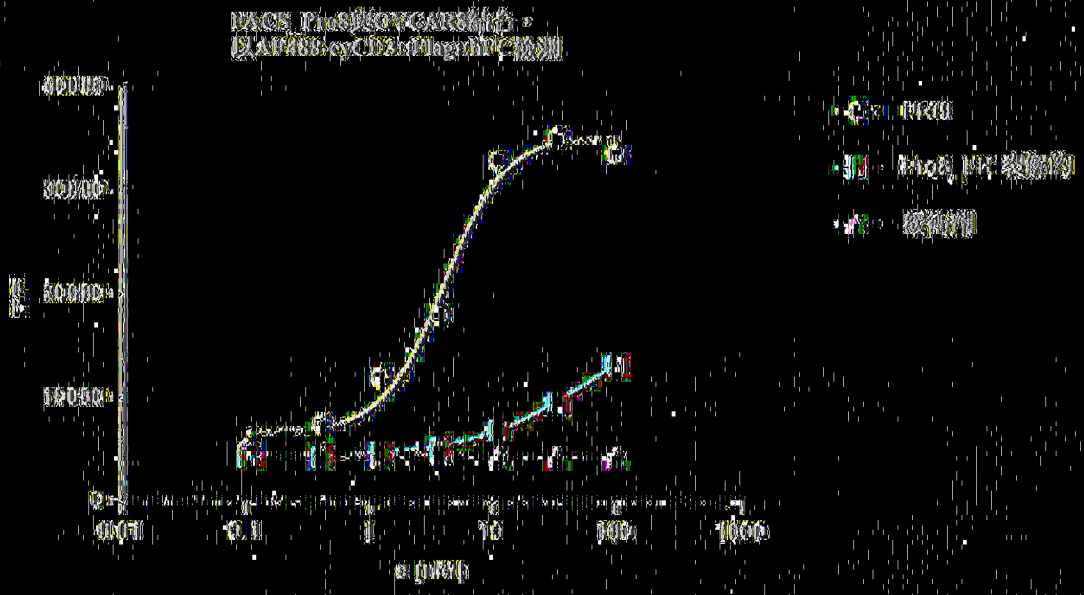
第 23B 图



# 第 23C 图



第 24A 圖


40000
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000

第 24B 圖

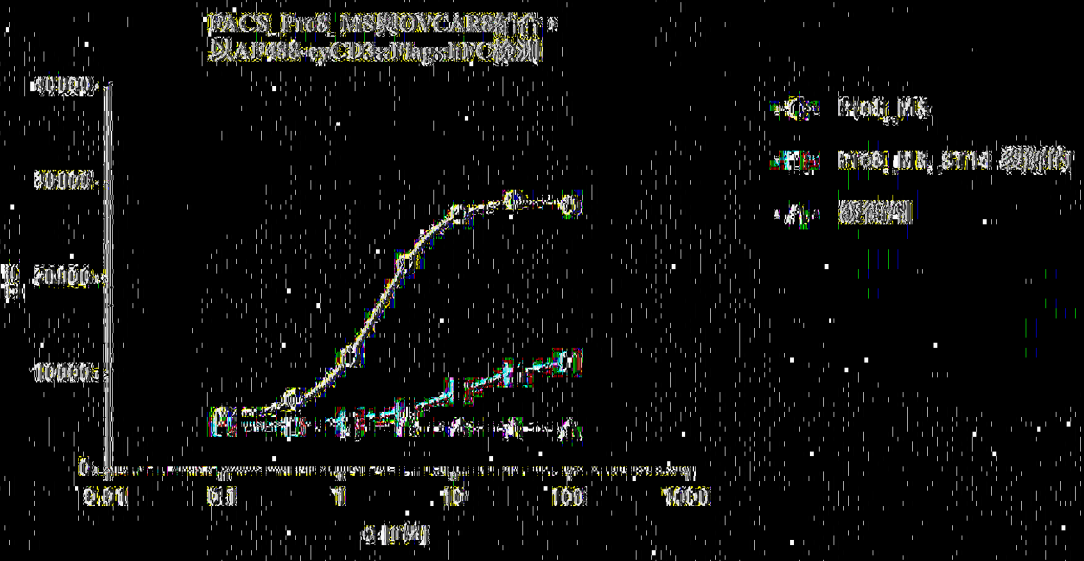
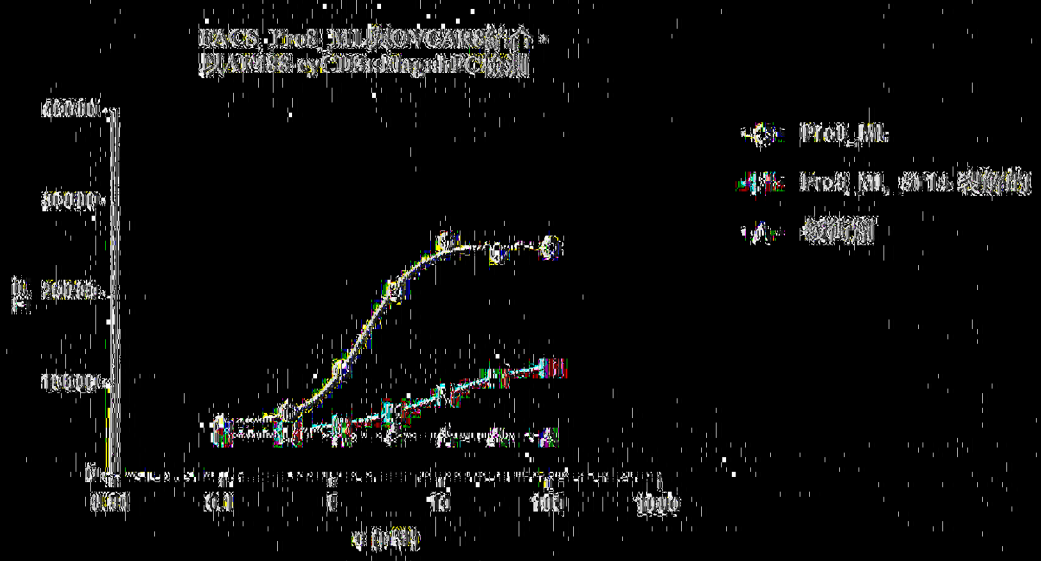
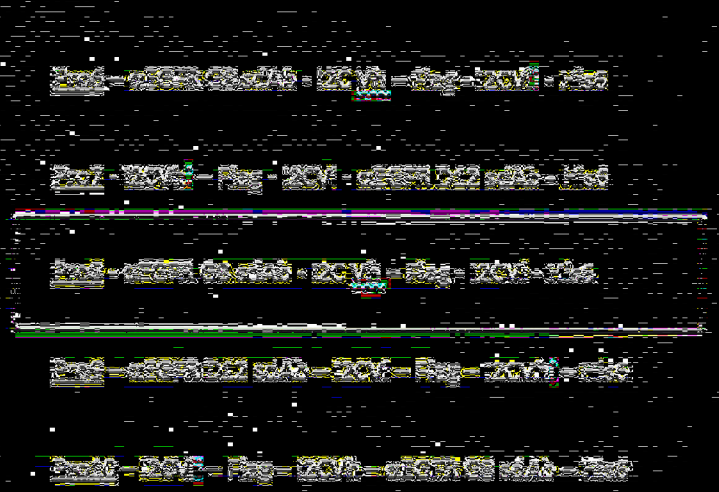
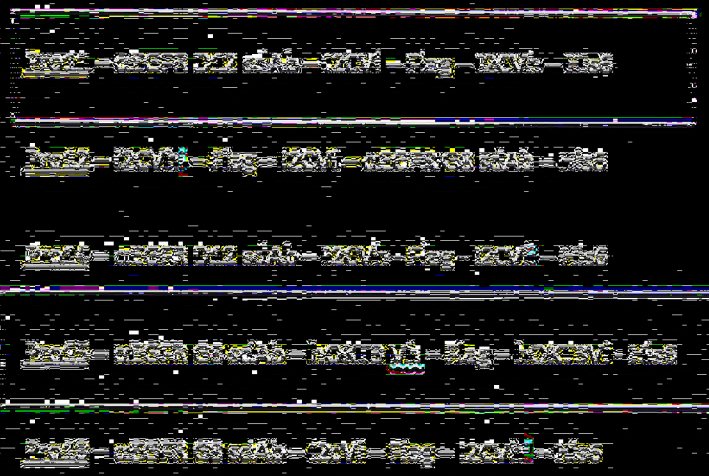

40000
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000

図 24C

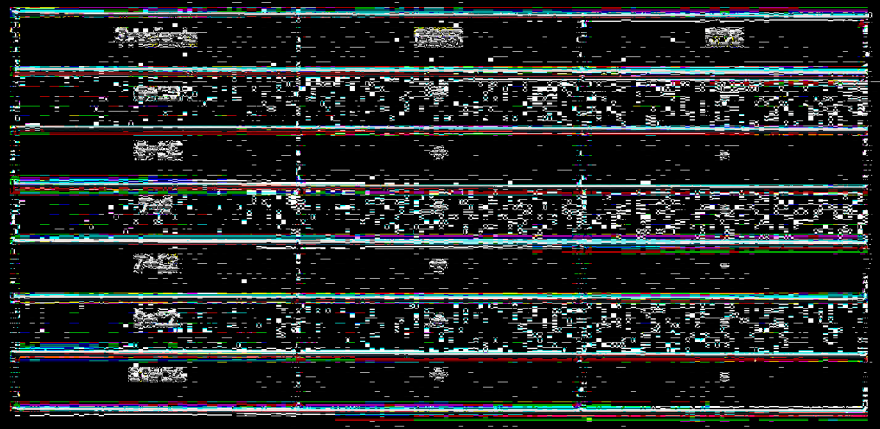


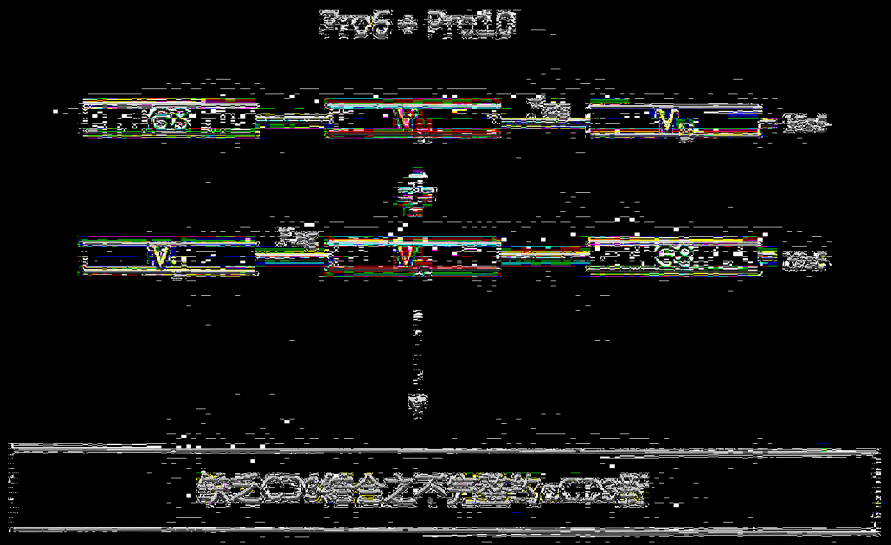
# 第 25 章



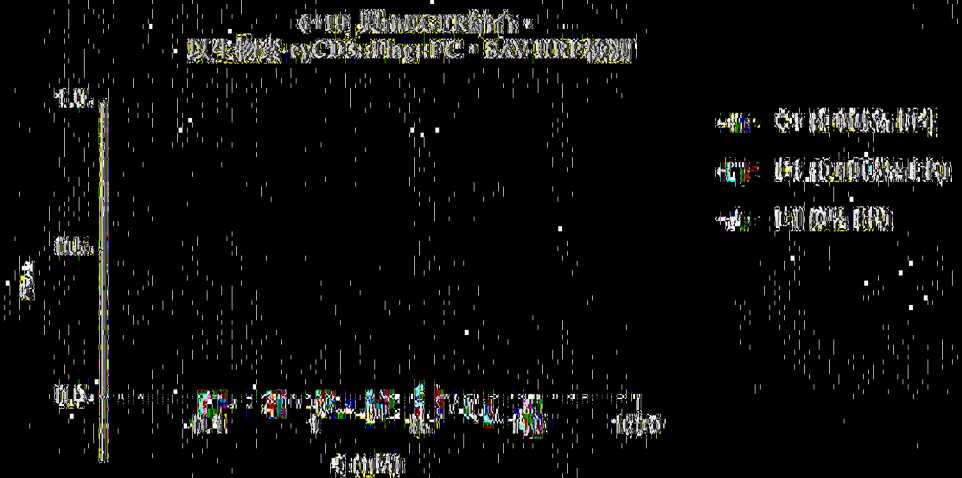


第 26 圖

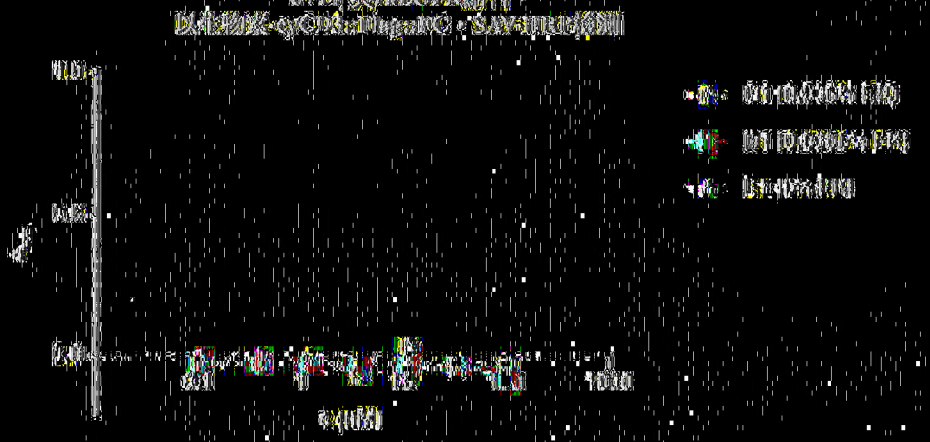




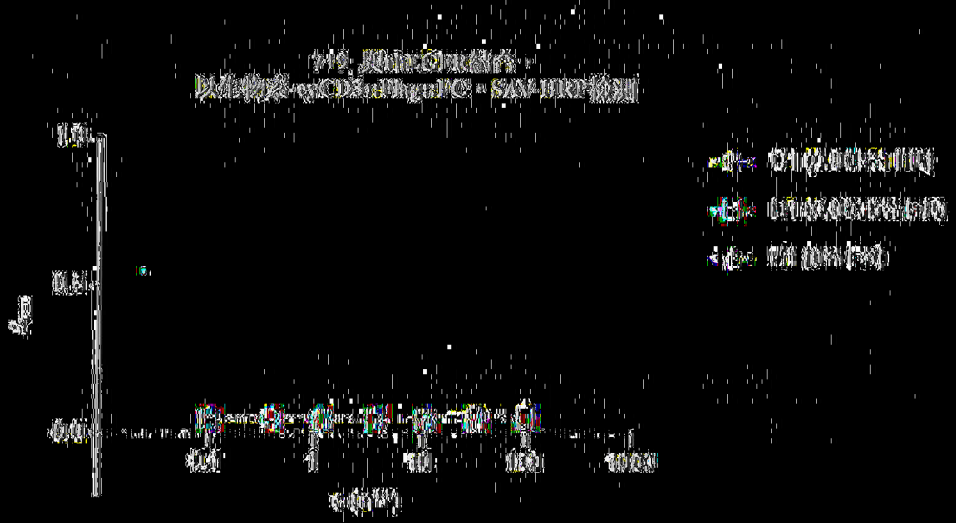
第 27A 圖



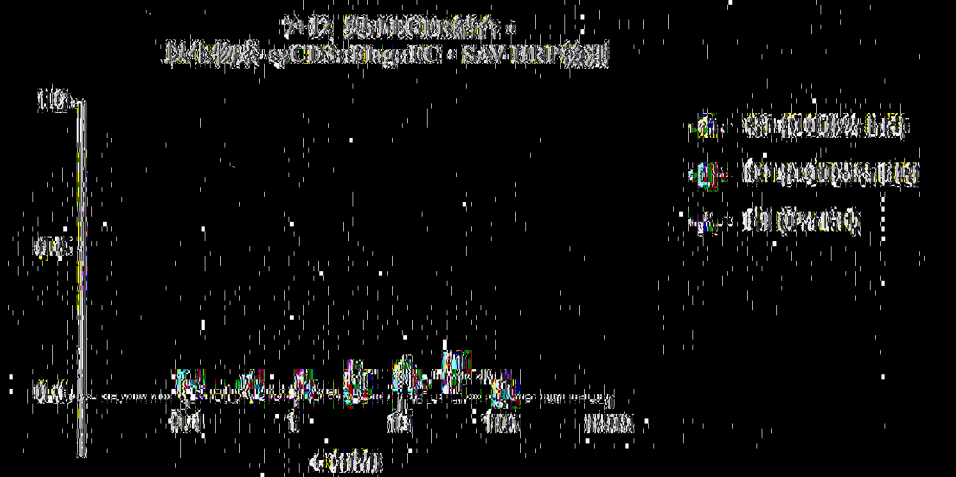
第 27B 圖



第 2/C 圖

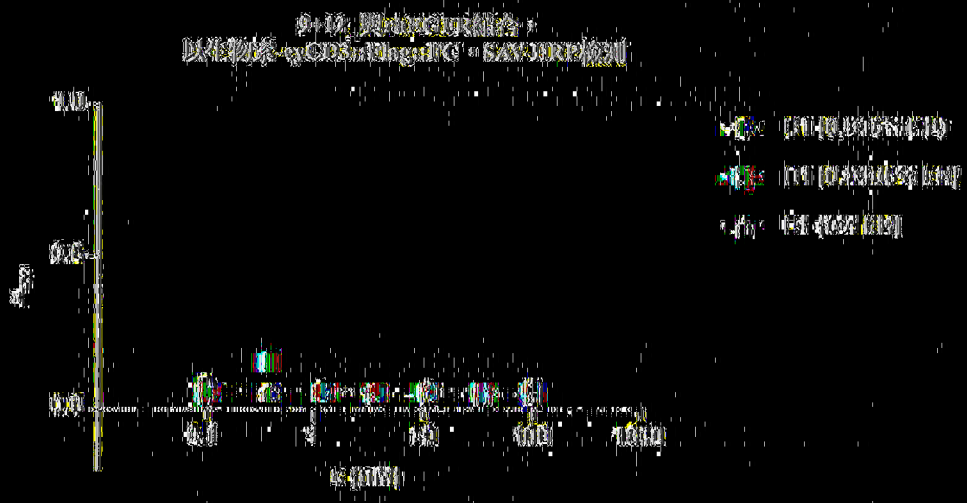


第 2/D 圖

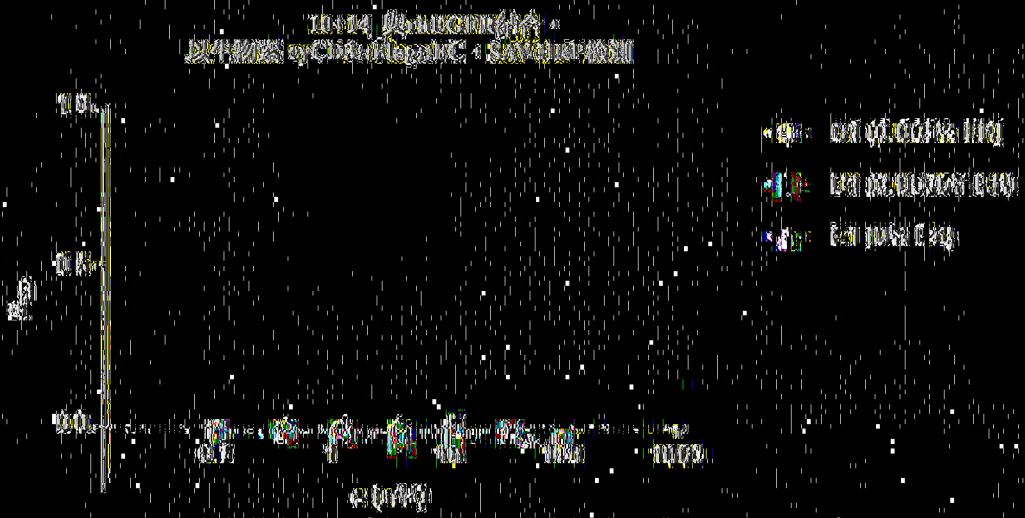


202302631

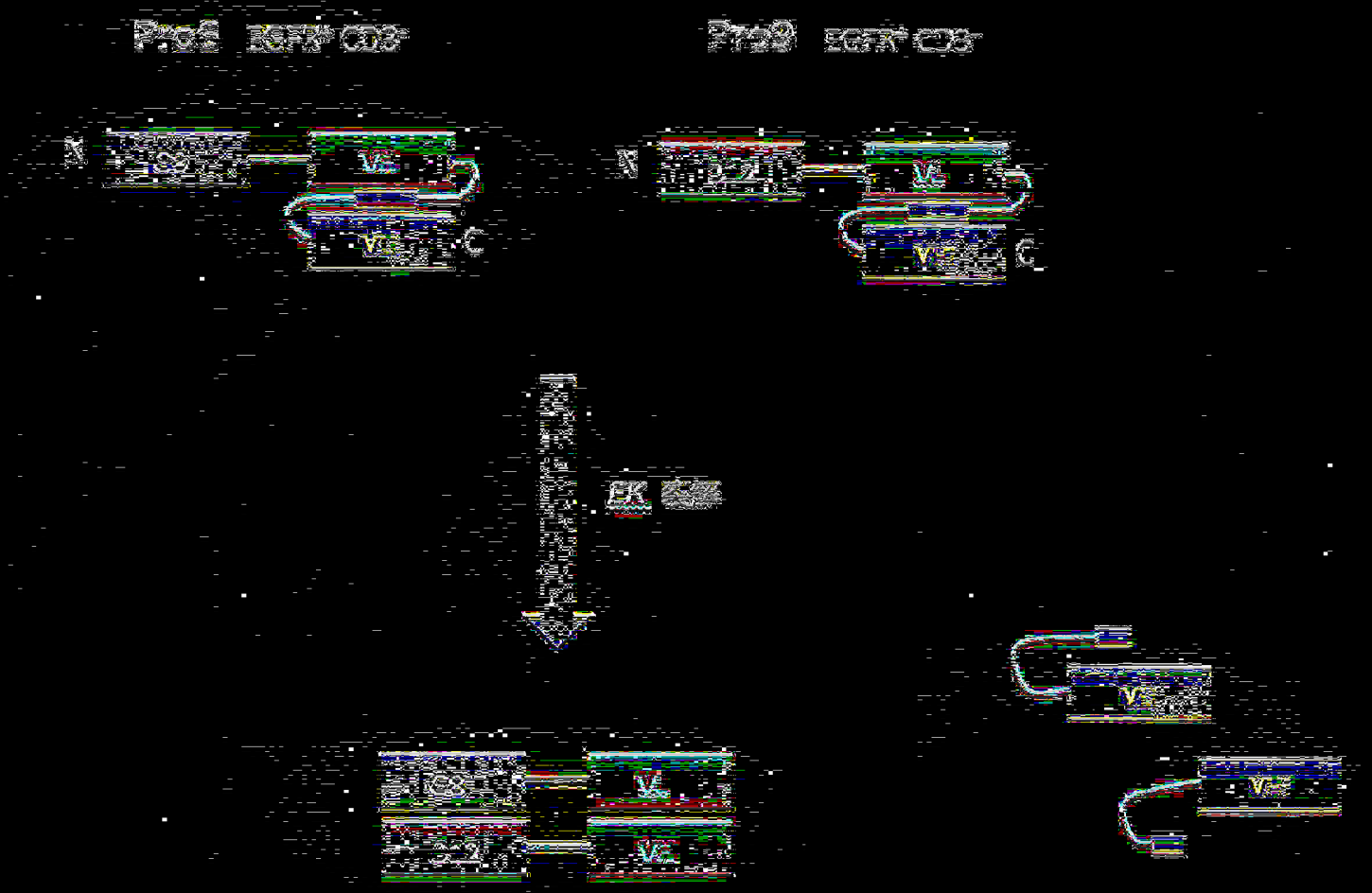
# 第 27R 圖



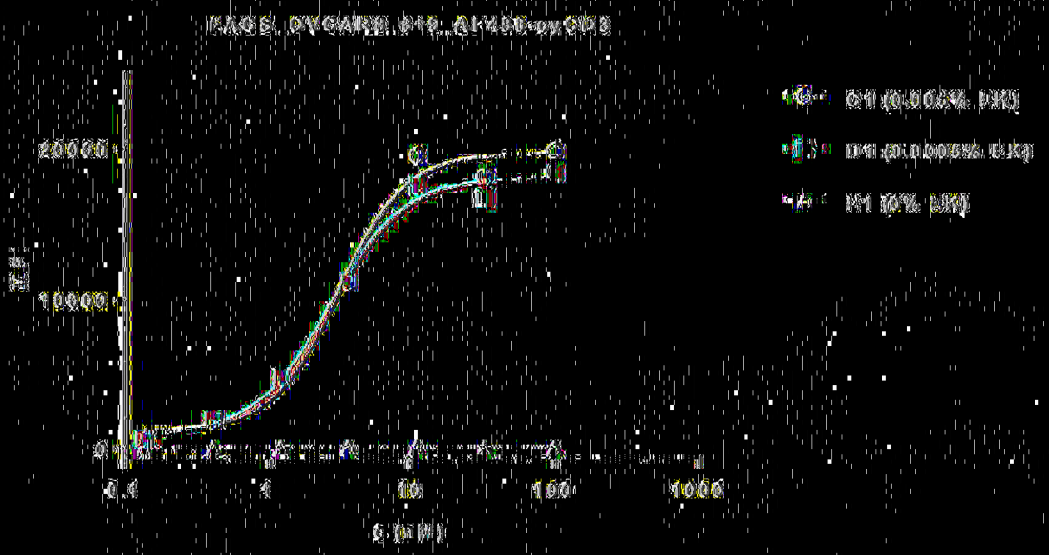

# 第 27F 圖



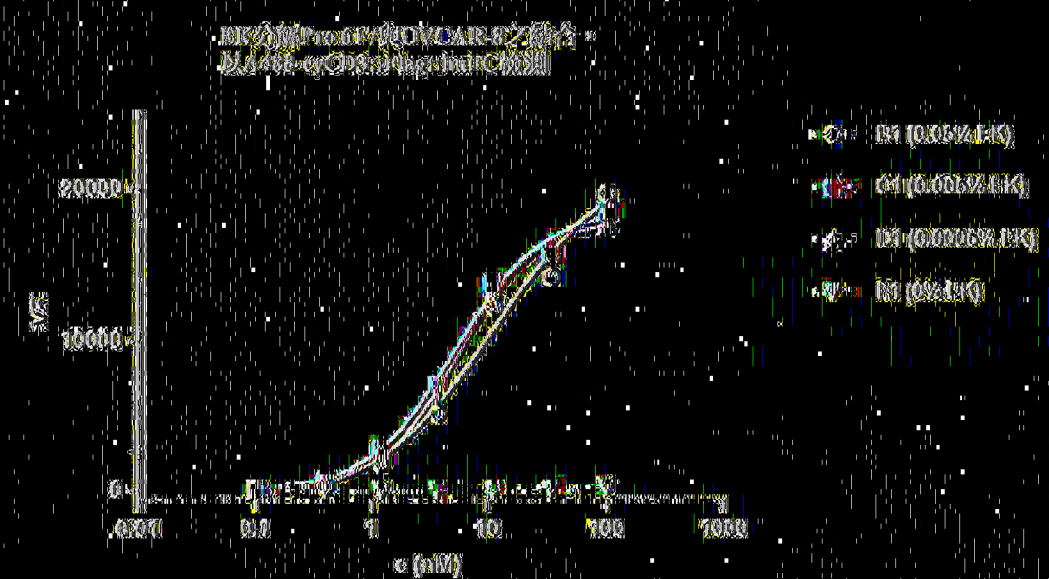
# 第 28 圖

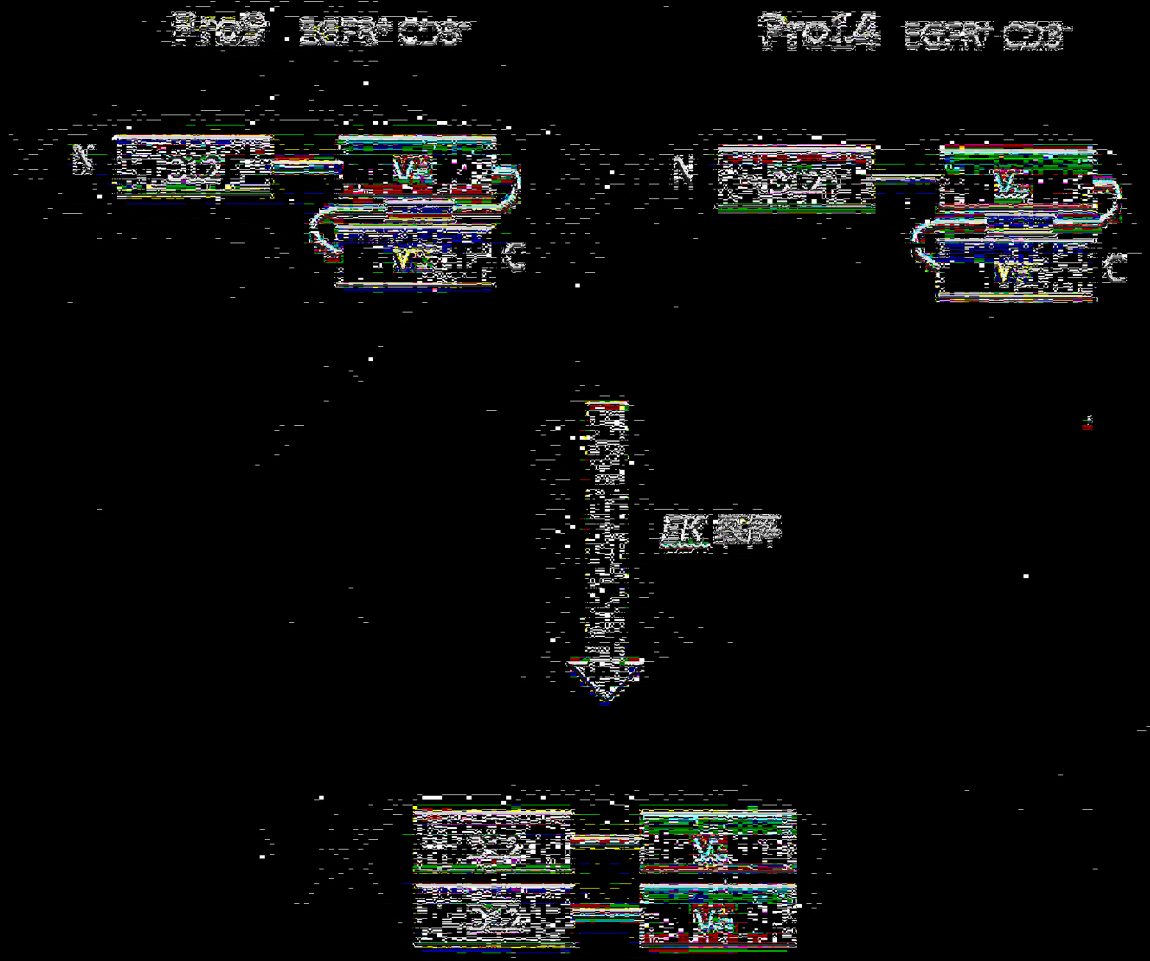


# 第 29A 圖


20000
10000
0
0.4
1
10
100
1000
C (nM)

# 第 29B 圖


20000
10000
0
.0001
0.01
1
10
100
1000
C (nM)




20230631

図 31A

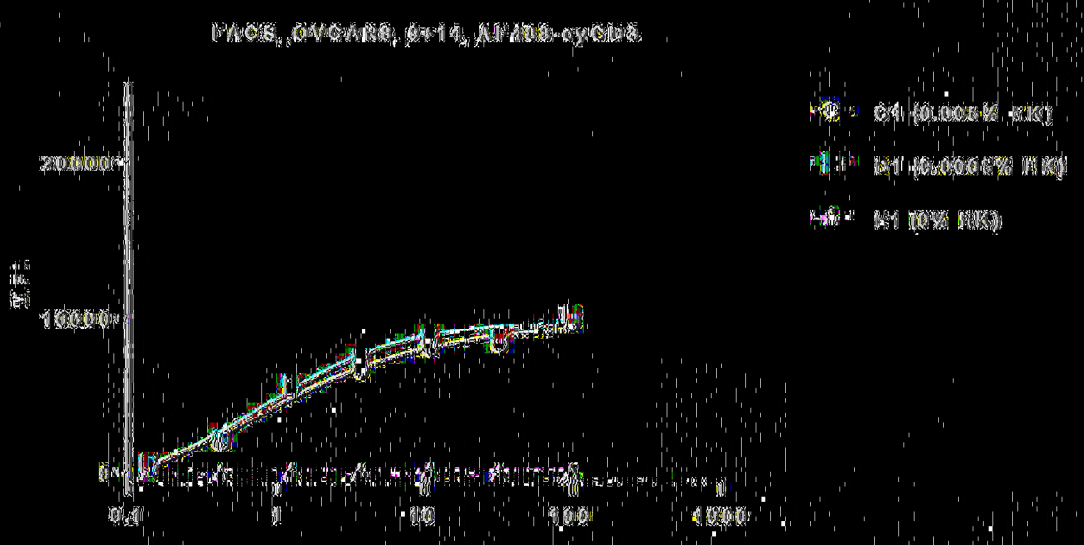
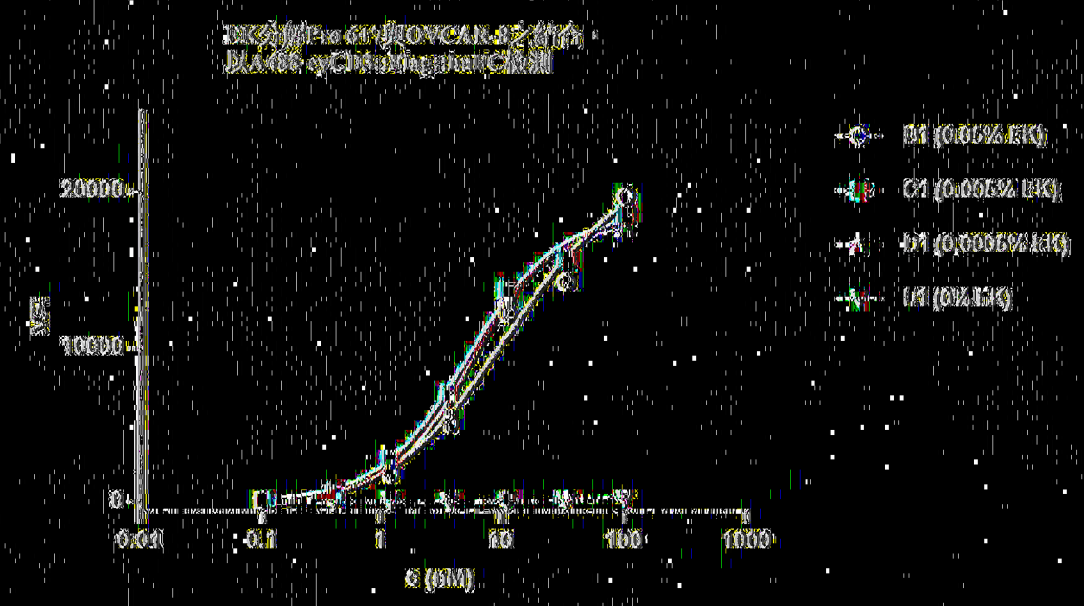

200000
150000
0.01
0.1
1
10
100
1000

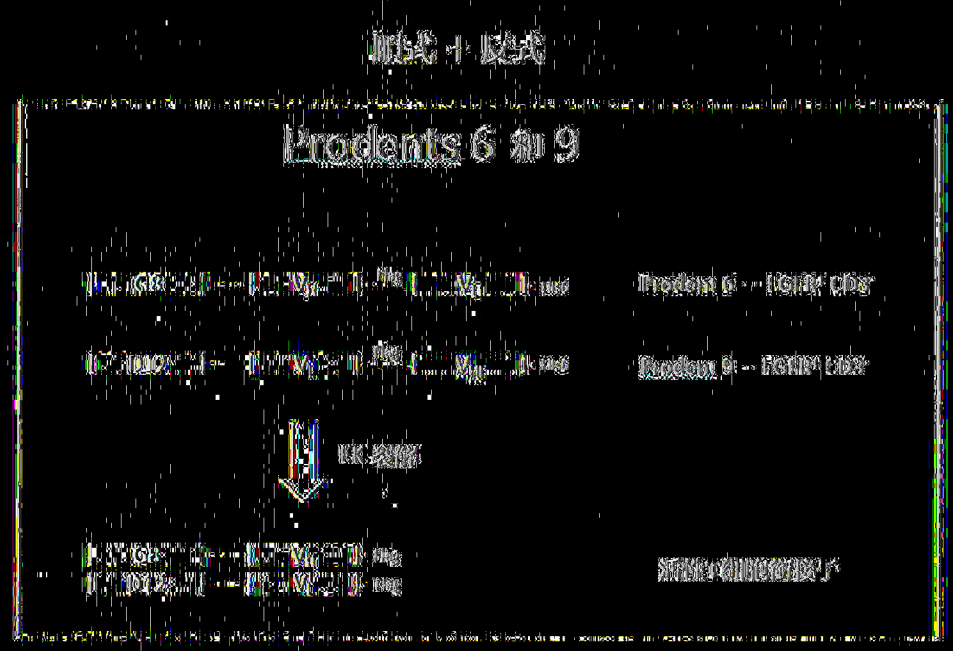
図 31B


20000
10000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000

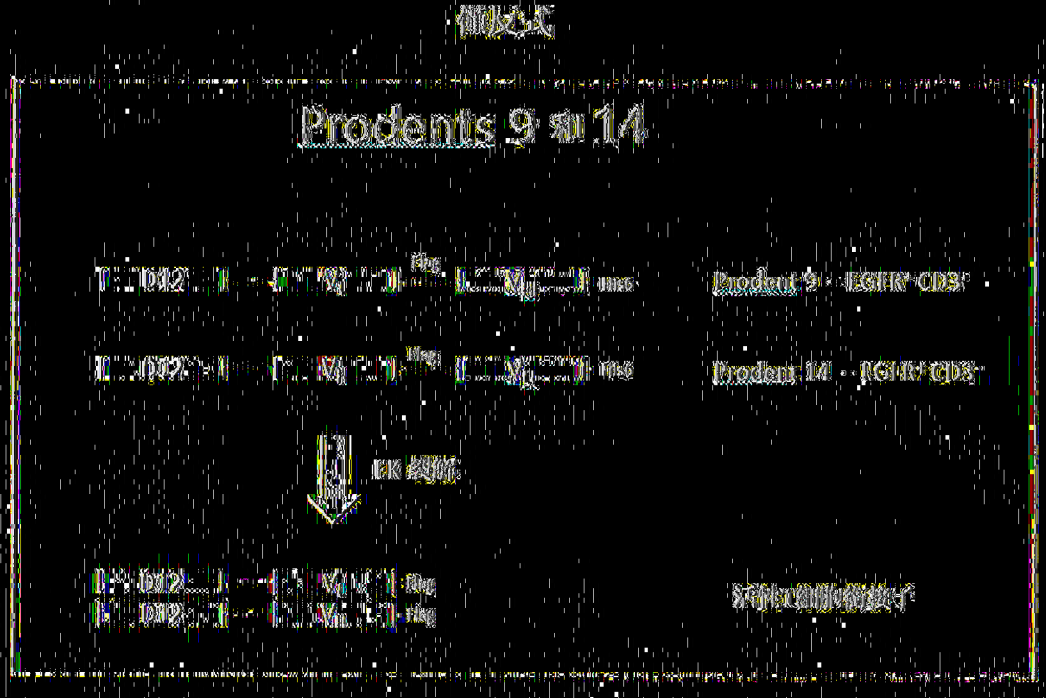
# 第 32A 圖

| Prodents | FGFR | CDS | 順式及反式 |
|---|---|---|---|
| 6*9 | + | + | 順式及反式 |
| 7*10 | + | + | 順式及反式 |
| 8*11 | + | + | 順式及反式 |
| 9*12 | + | + | 順式及反式 |
| 10*13 | + | + | 順式及反式 |
| 11*14 | + | + | 順式及反式 |

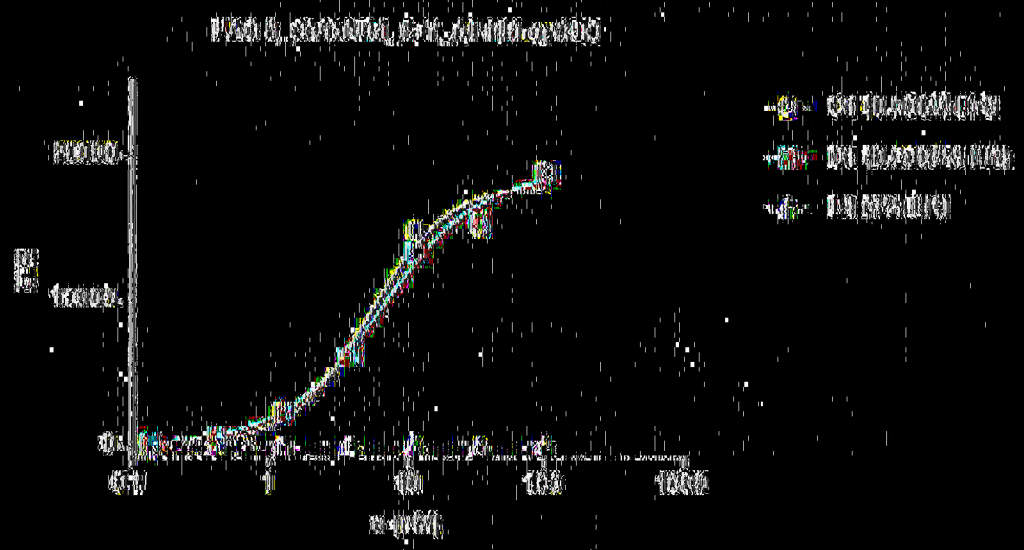
# 第 32B 圖



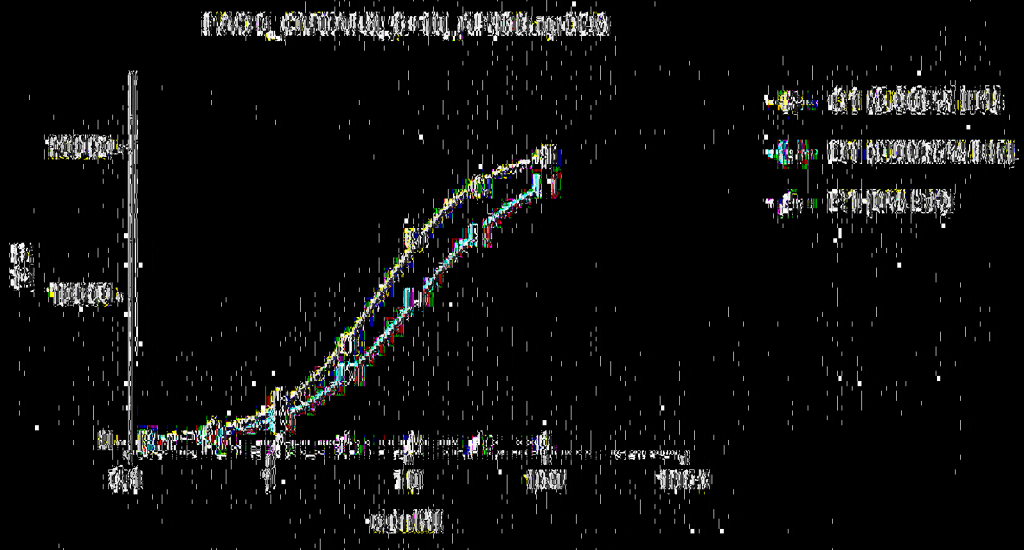
# 第 32C 回



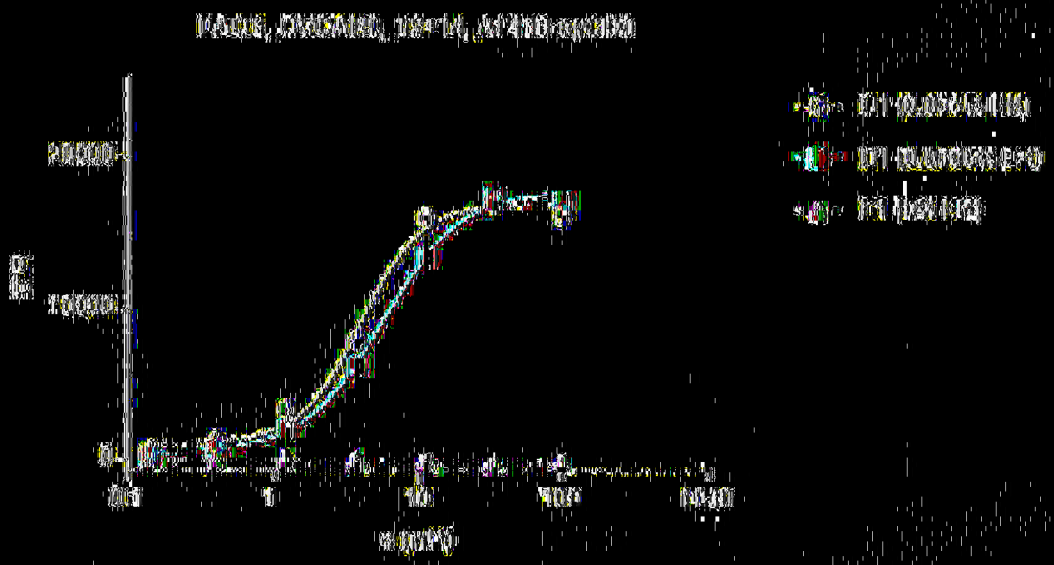
第 33A 圖



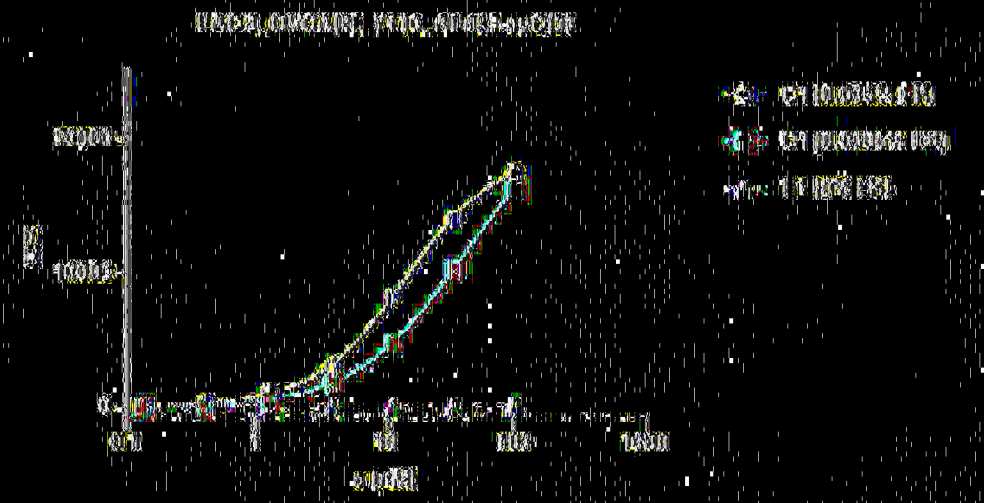
第 33B 圖



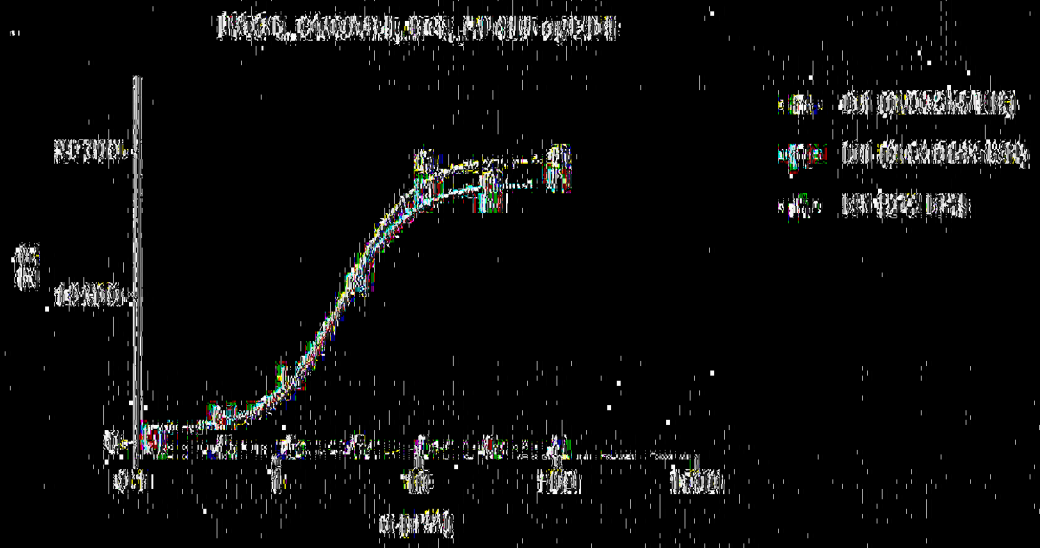
第 33C 圖



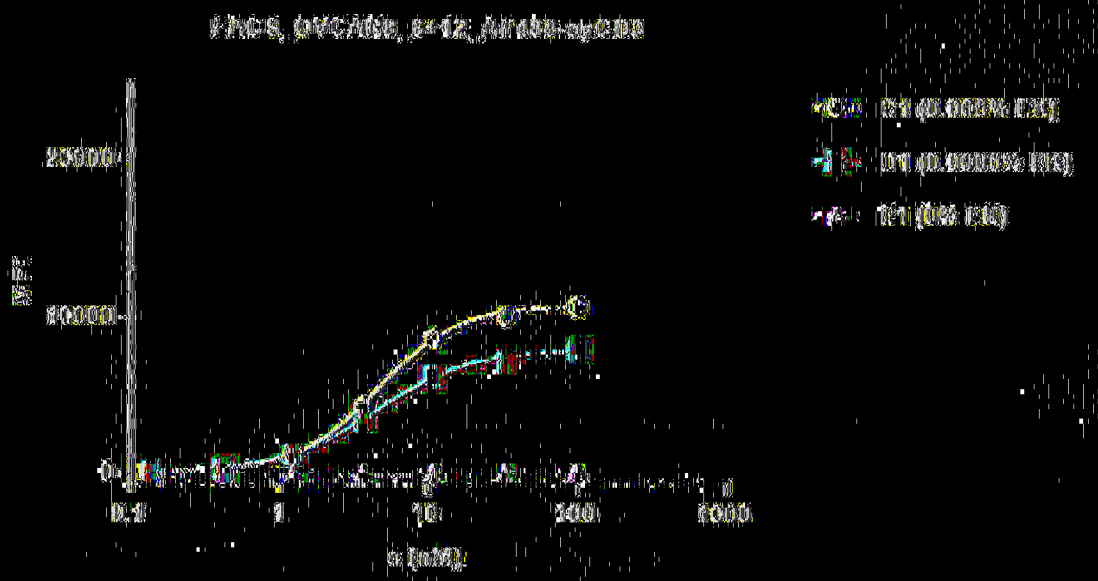
第 33D 圖



第 331 图



# 第 34A 圖


20000
10000
0
0.1
1
10
100
1000
m [nM]

# 第 34B 圖

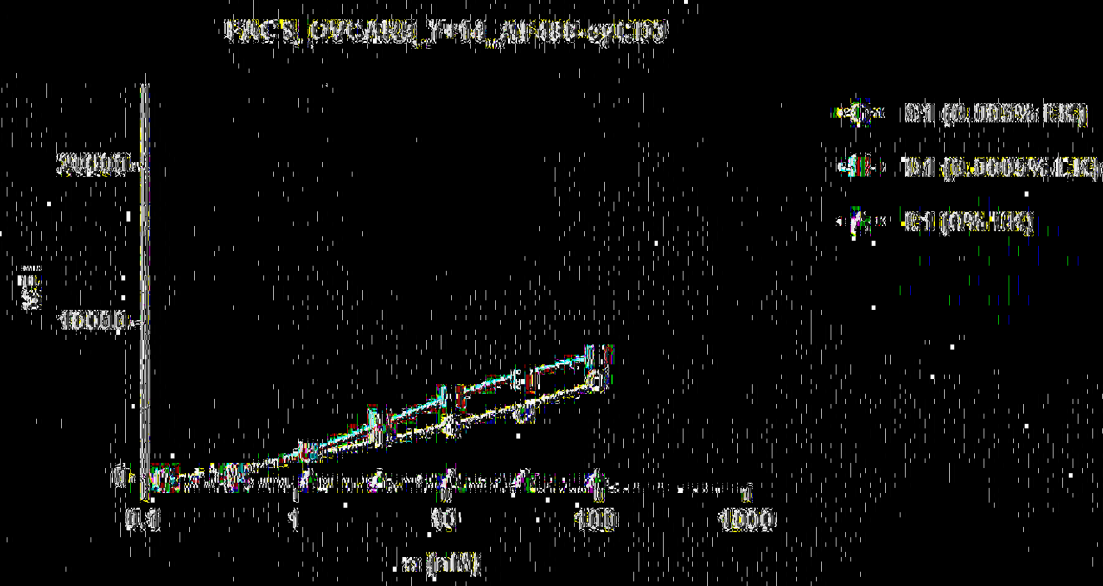
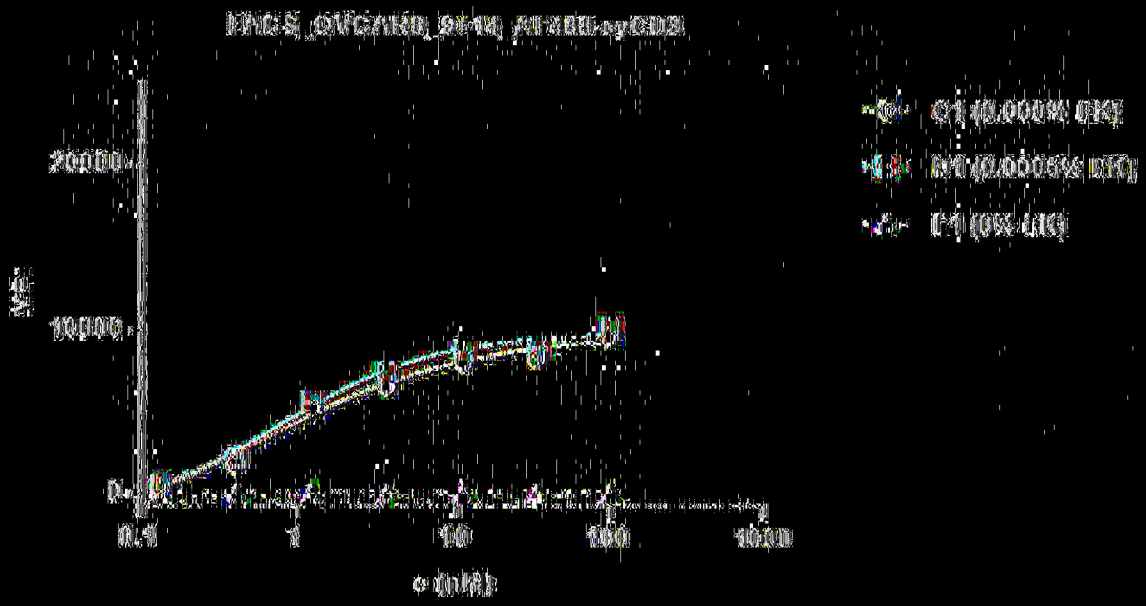
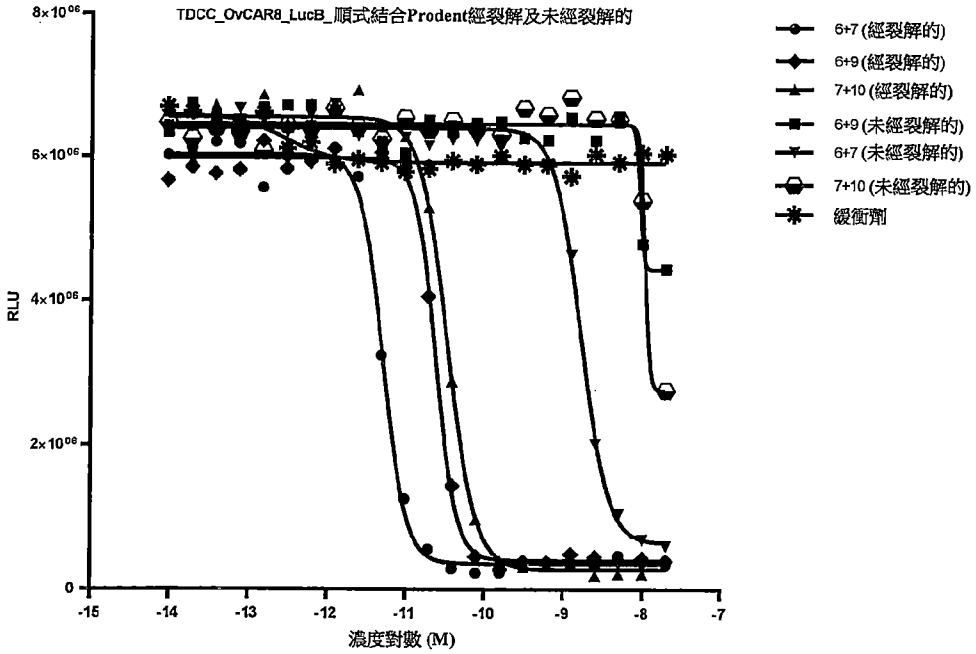

20000
10000
0
0.1
1
10
100
1000
m [nM]

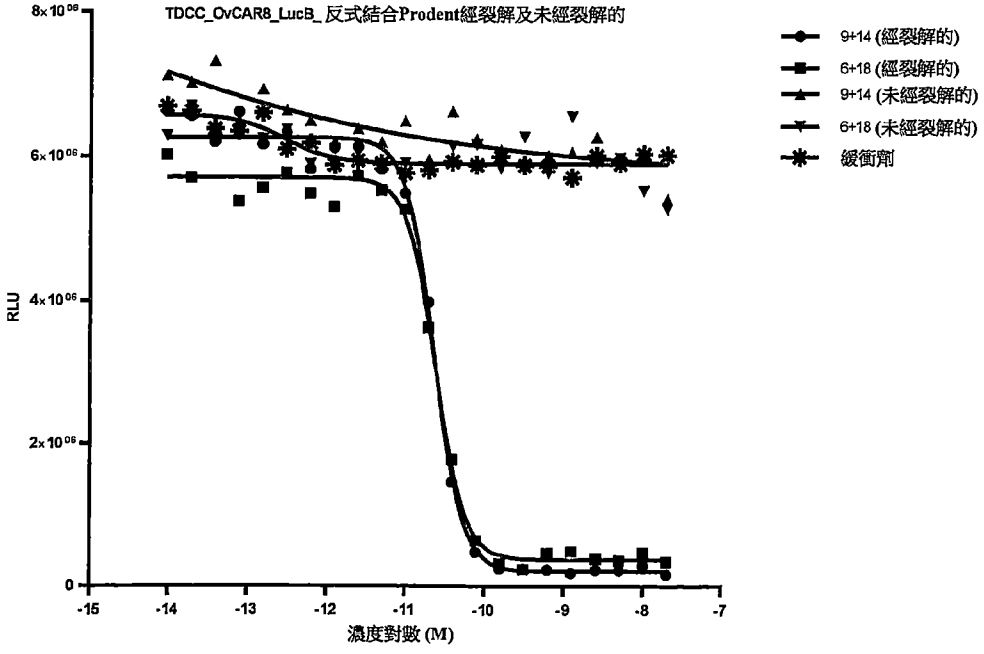
図 34C


200000
100000
0
0.1
1
10
100
1000
0.01
0.001
0.0001
0.00001
0.000001
0.0000001
0.00000001
0.000000001
0.0000000001
0.00000000001
0.000000000001
0.0000000000001
0.00000000000001
0.000000000000001
0.0000000000000001
0.00000000000000001
0.000000000000000001
0.0000000000000000001
0.00000000000000000001
0.000000000000000000001
0.0000000000000000000001
0.00000000000000000000001
0.000000000000000000000001
0.0000000000000000000000001
0.00000000000000000000000001
0.000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000

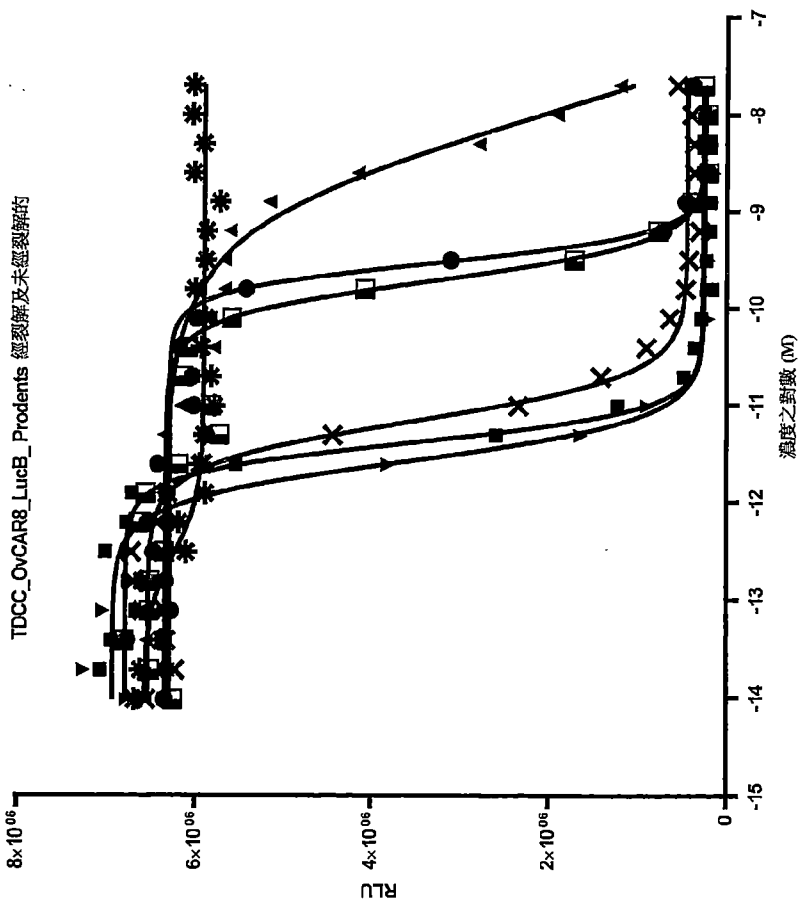
第 35A 圖


TDCC_OvCAR8_LucB_順式結合Prodent經裂解及未經裂解的
RLU
濃度對數 (M)
6+7 (經裂解的)
6+9 (經裂解的)
7+10 (經裂解的)
6+9 (未經裂解的)
6+7 (未經裂解的)
7+10 (未經裂解的)
緩衝劑

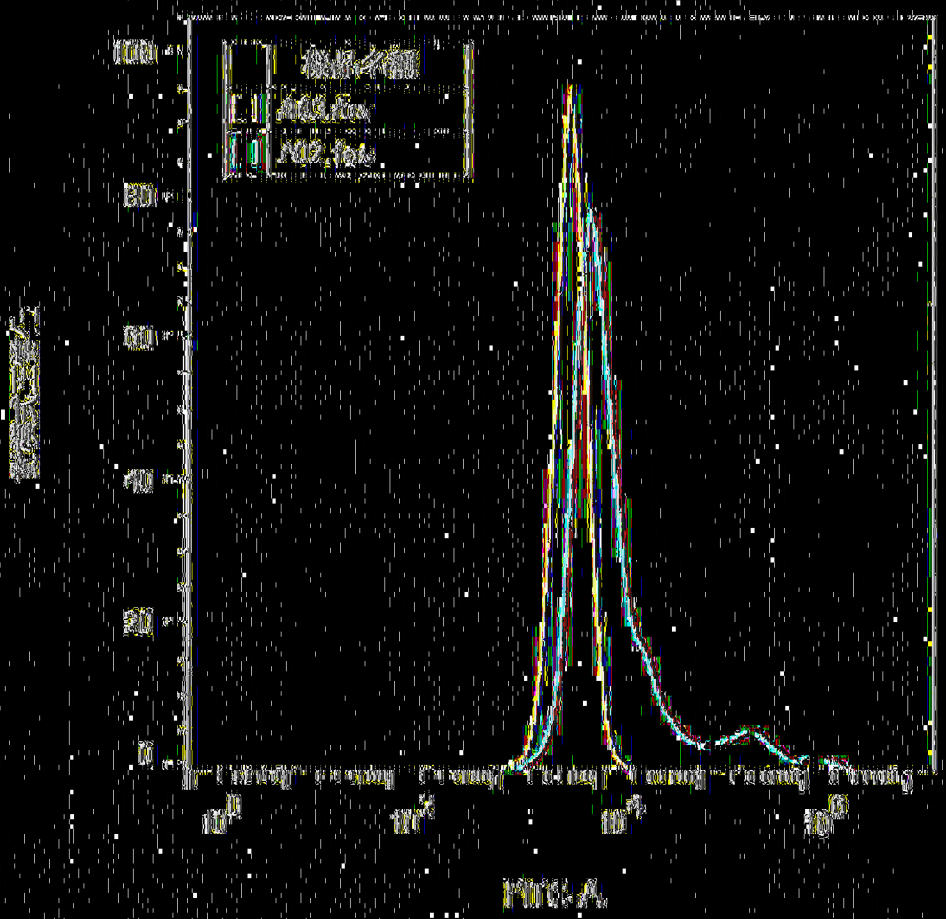
第 35B 圖


TDCC_OvCAR8_LucB_反式結合Prodent經裂解及未經裂解的
RLU
濃度對數 (M)
9+14 (經裂解的)
6+18 (經裂解的)
9+14 (未經裂解的)
6+18 (未經裂解的)
緩衝劑

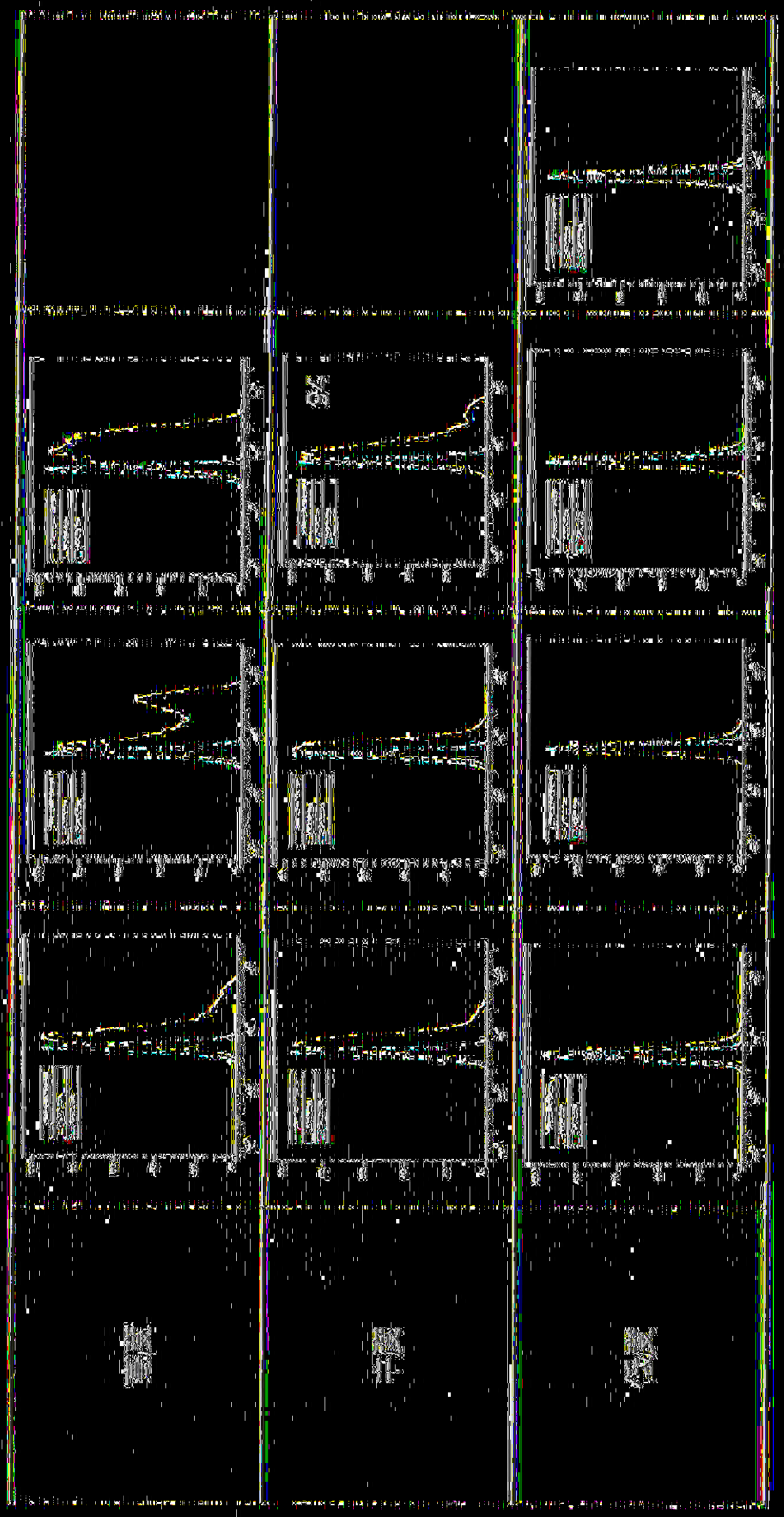
第 36 圖


TDCC_OvCAR8_LucB_Prodents 經裂解及未經裂解的
8 (經裂解的)
11 (經裂解的)
15 (經裂解的)
8 (未經裂解的)
11 (未經裂解的)
15 (未經裂解的)
緩衝劑
RLU
8x10^06
6x10^06
4x10^06
2x10^06
0
-7
-8
-9
-10
-11
-12
-13
-14
-15
濃度之對數 (M)

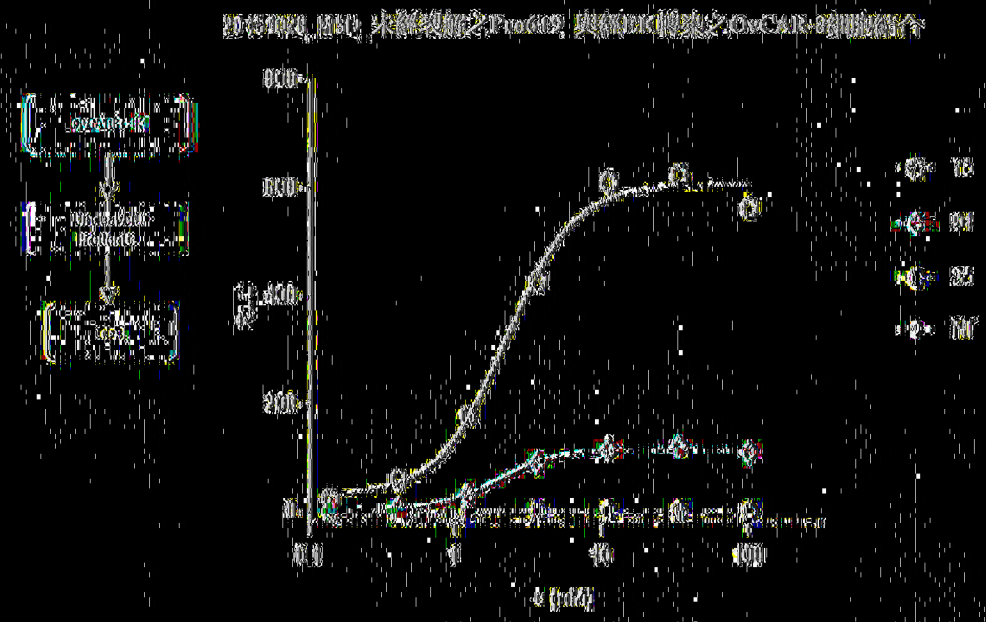
第 37 頁



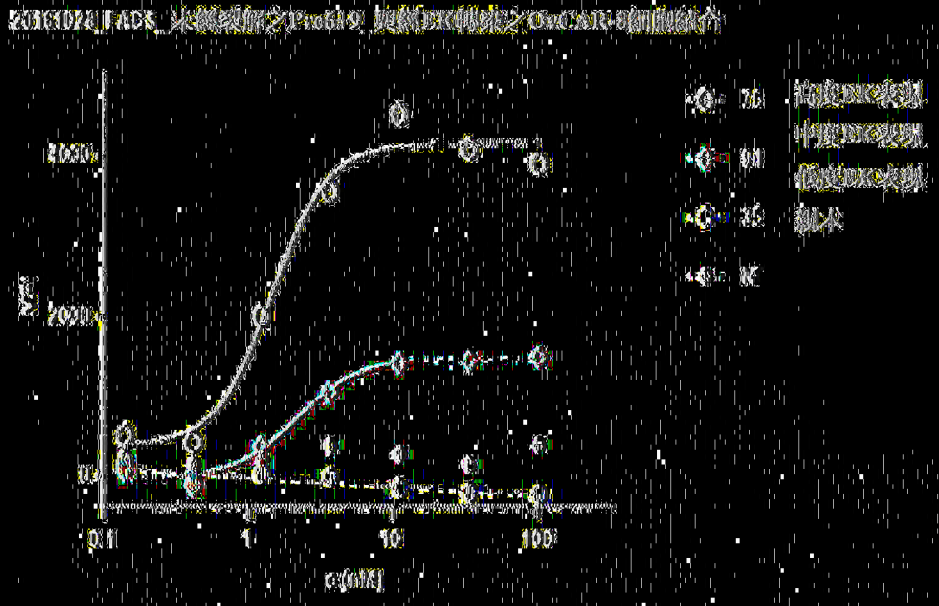
202302631



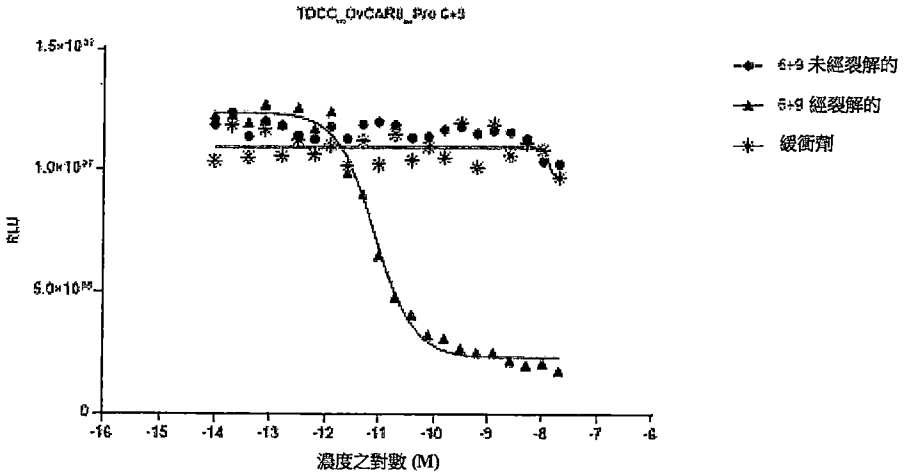
第 39A 圖



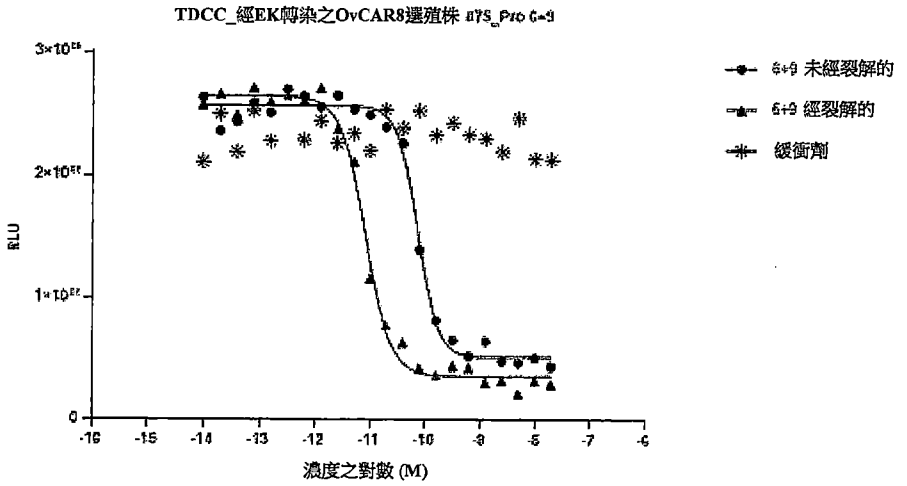
第 39B 圖



第 40A 圖


TDCC_OvCAR8_Pro 6+9
RLU
濃度之對數 (M)
6+9 未經裂解的
6+9 經裂解的
緩衝劑

第 40B 圖


TDCC_經EK轉染之OvCAR8選殖株 #75_Pro 6+9
RLU
濃度之對數 (M)
6+9 未經裂解的
6+9 經裂解的
緩衝劑

第 41A 圖




第 41B 圖



# 第42A圖

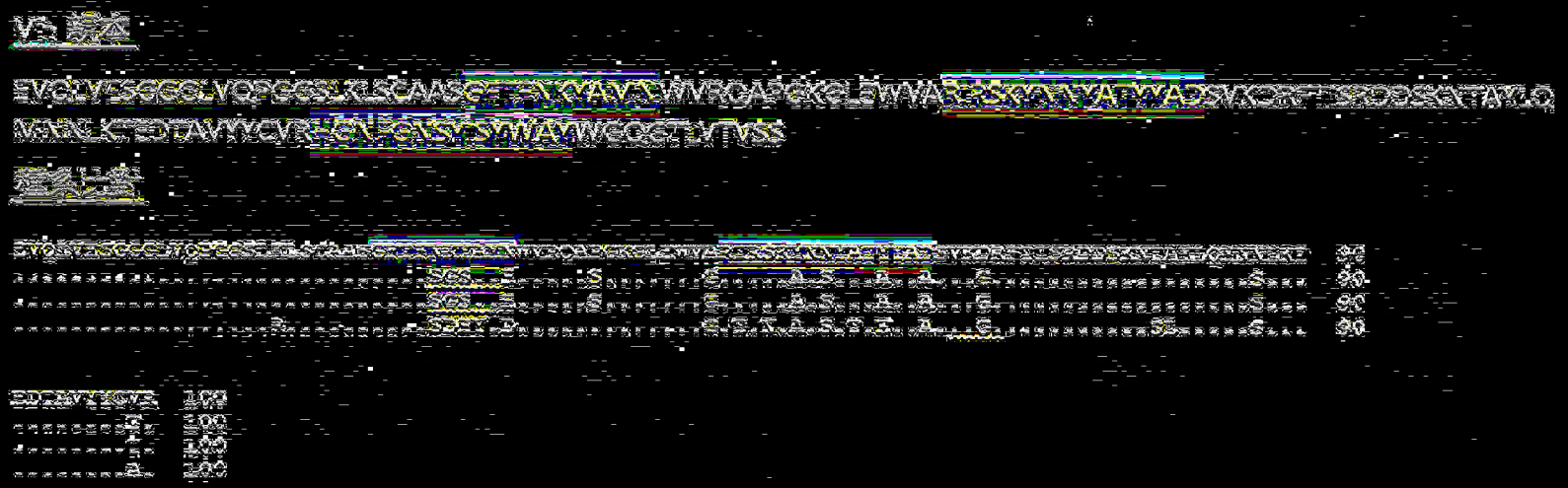
VS 解析

[illegible]

[illegible]

| | | |
|---|---|---|
| [illegible] | [illegible] | 90 |
| [illegible] | [illegible] | 90 |
| [illegible] | [illegible] | 90 |
| [illegible] | [illegible] | 90 |

| | |
|---|---|
| [illegible] | 100 |
| [illegible] | 100 |
| [illegible] | 100 |
| [illegible] | 100 |



# 第423章

Pro28

[illegible]

未充分表明

Pro29 (Y32S, Y62A, D64A, S110A, Y[illegible])



[illegible]

表现出：無活性

Pro30 (Y32S, Y62A, S110A, Y[illegible])



[illegible]

表现出：無活性



Pro32 (N30S, K32G, Y53A, N57S, Y62S, D64A, P104A, Y108A)



[illegible]

表现出：無活性

Pro32 (N30S, K32G, Y32H, Y53A, N57S, N109A, P104Y)



[illegible]

表现出：無活性

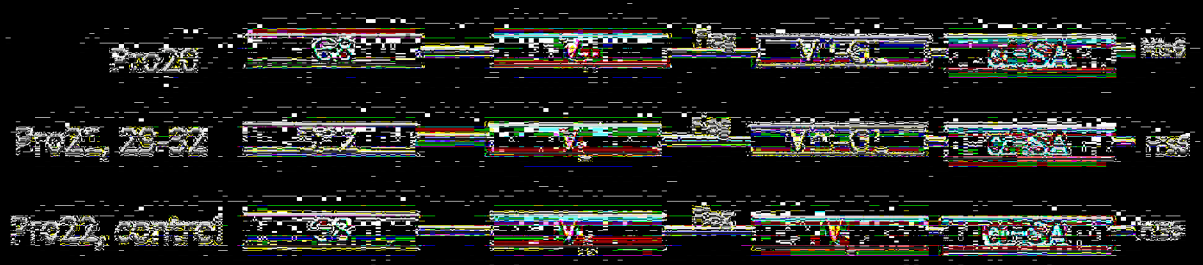
202302631

# 第43章



202302631

# 第44A圖



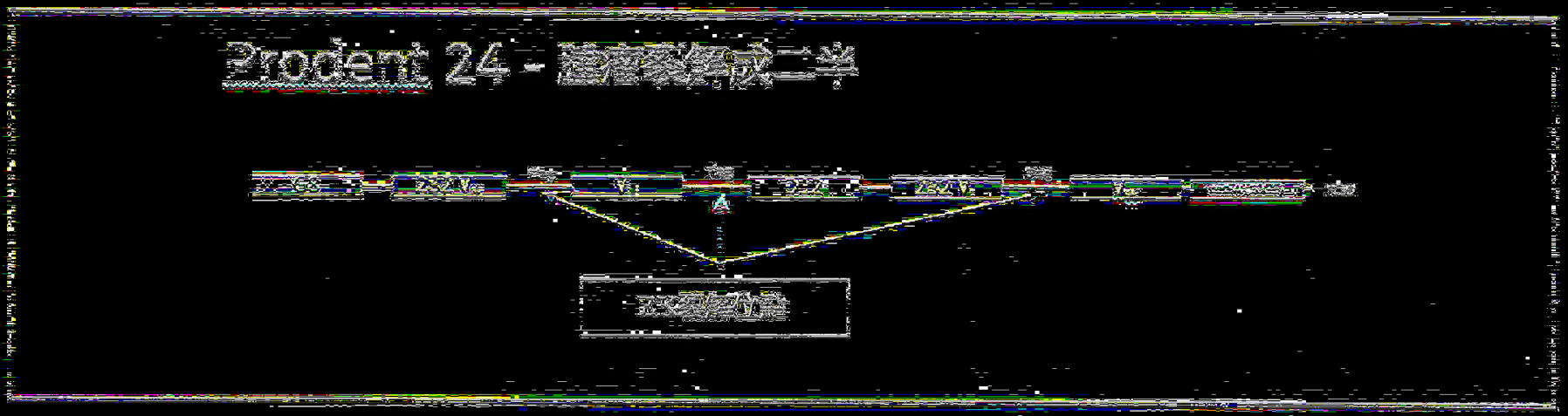

# 第44B圖

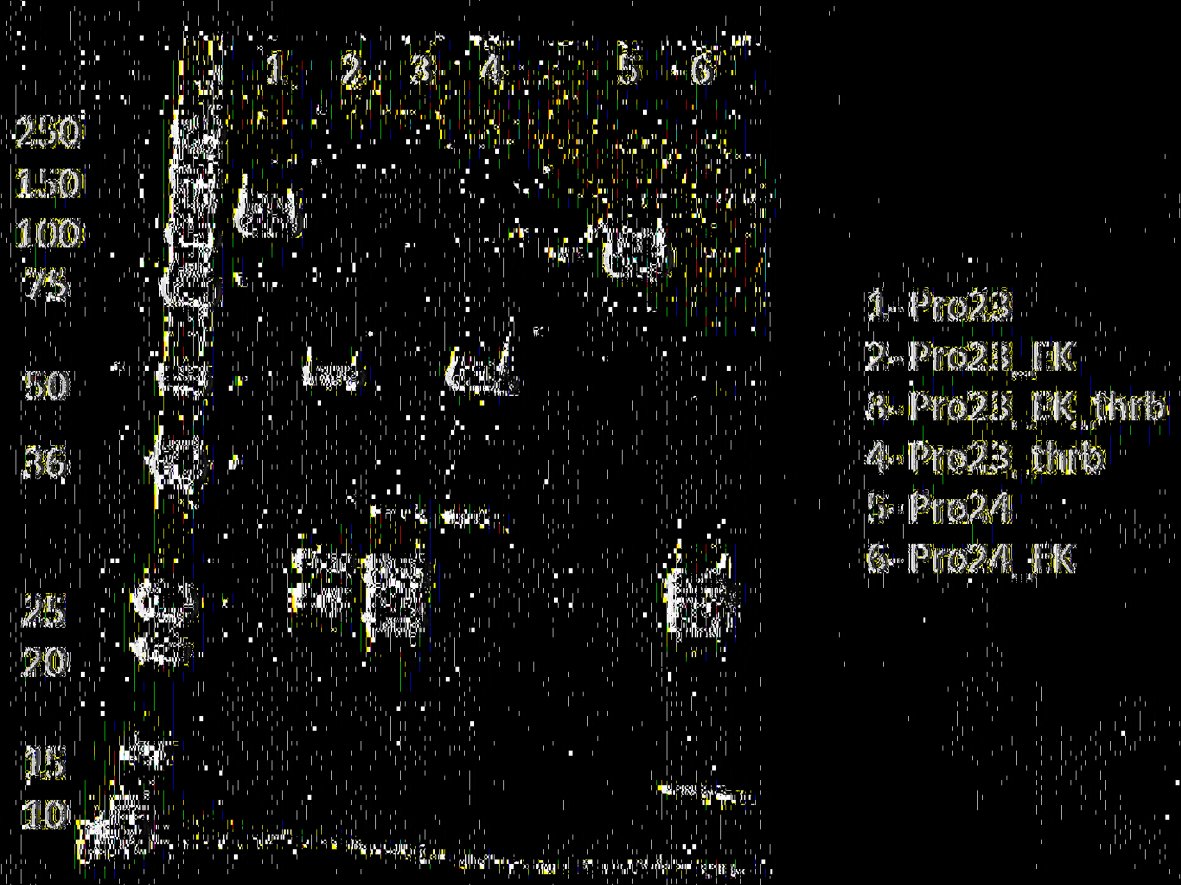
| Product 4kB | hSCF/Ub-Fc | hCD3e-Fag-hFc | Pt-gcH3-hFc (Cl) 1 mV | Pt-hCD3e-Fag-hFc (Cl) 1 mV | [illegible] mV |
|---|---|---|---|---|---|
| Pro19 (αCD3 Vc3) | + | - | [illegible] | 0 | 3.25 |
| Pro20 (VrG1) | + | - | [illegible] | 0 | 1.88 |
| Pro21 (VrG1.3) | +/- | - | [illegible] | 0 | 0.23 |
| Pro22 (WT αCD3) | + | + | [illegible] | [illegible] | 3.09 |
| Pro29 (VrG1.2) | + | - | [illegible] | 0 | 4.08 |
| Pro30 (VrG1.3) | + | - | [illegible] | 0 | 6.88 |
| Pro31 (VrG1.4) | + | - | [illegible] | 0 | 6.12 |
| Pro32 (VrG1.5) | + | - | [illegible] | 0 | 2.91 |

第 45A 圖

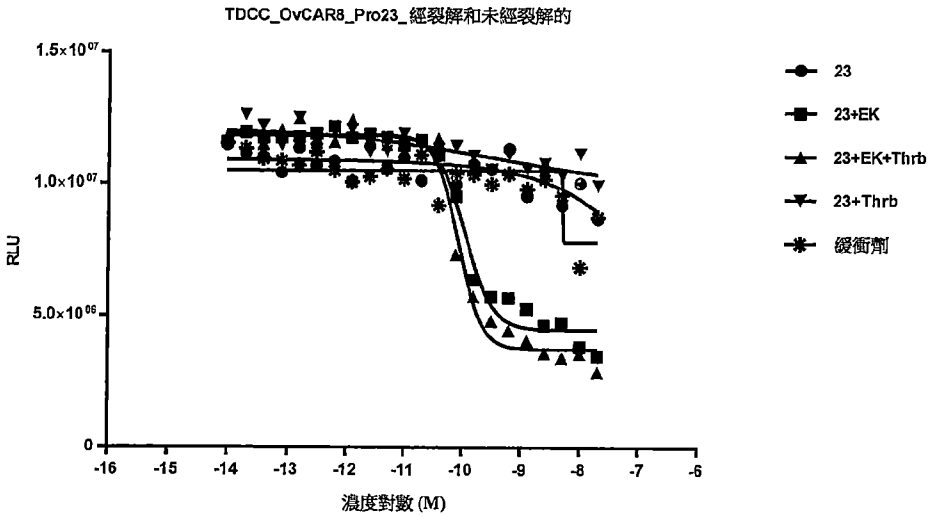



第 45B 圖

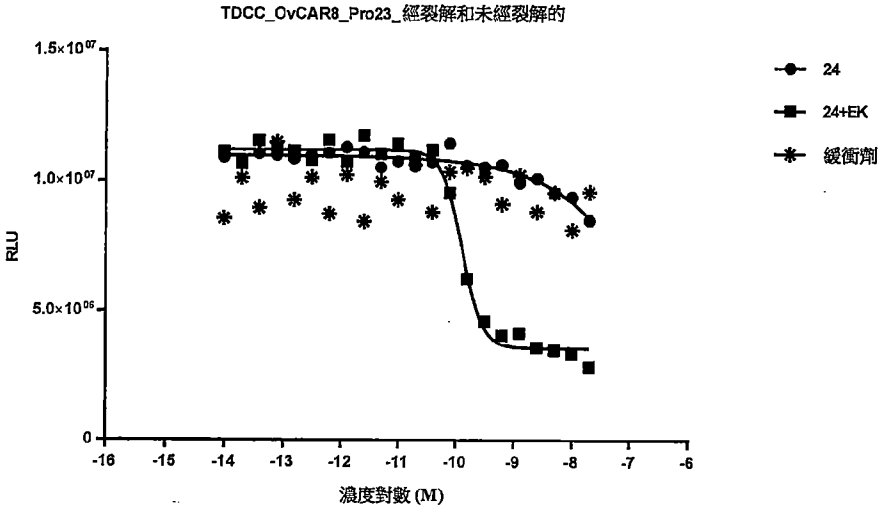



1
2
3
4
5
6
250
150
100
75
50
36
25
20
15
10
1- Pro23
2- Pro23_FK
3- Pro23_FK_thrb
4- Pro23_thrb
5- Pro24
6- Pro24_FK

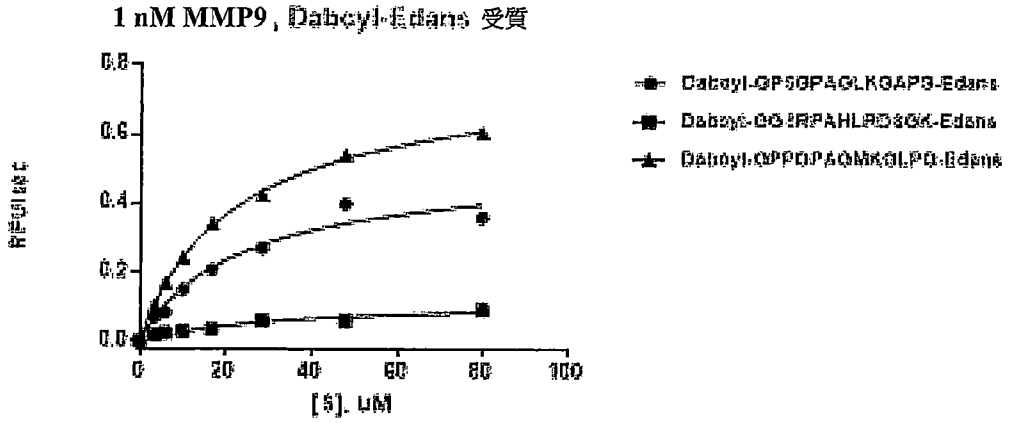
第 47A 圖


TDCC_OvCAR8_Pro23_經裂解和未經裂解的
1.5x10^07
1.0x10^07
5.0x10^06
0
RLU
-16
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
濃度對數 (M)
23
23+EK
23+EK+Thrb
23+Thrb
緩衝劑

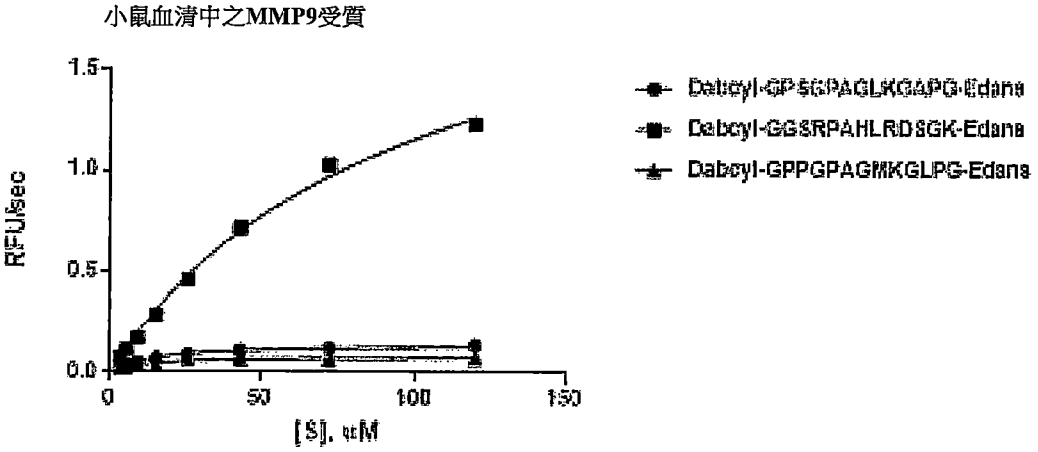
第 47B 圖


TDCC_OvCAR8_Pro23_經裂解和未經裂解的
1.5x10^07
1.0x10^07
5.0x10^06
0
RLU
-16
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
濃度對數 (M)
24
24+EK
緩衝劑

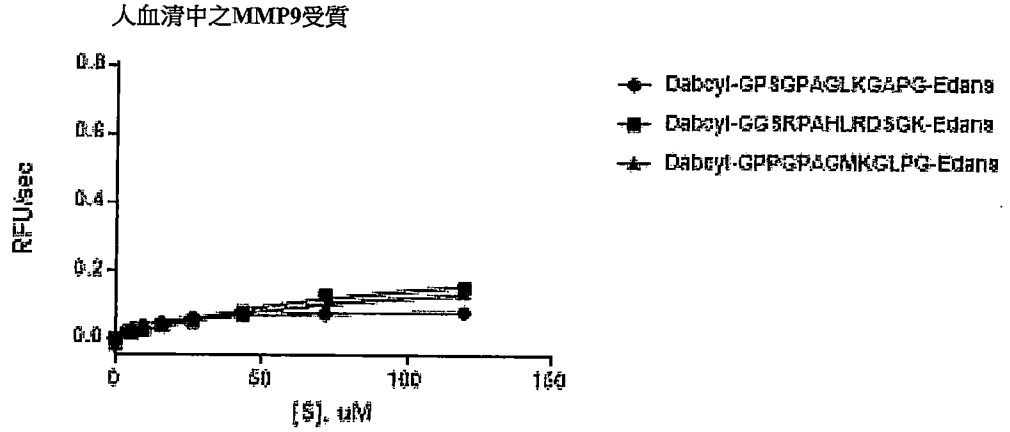
第 48A 圖


1 nM MMP9 , Dabcyl-Edans 受質
RFU/sec
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
0
20
40
60
80
100
[S], uM
Dabcyl-GPSGPAGLKGAPG-Edans
Dabcyl-GGSRPAHLRDSGK-Edans
Dabcyl-GPPGPAGMKGLPG-Edans

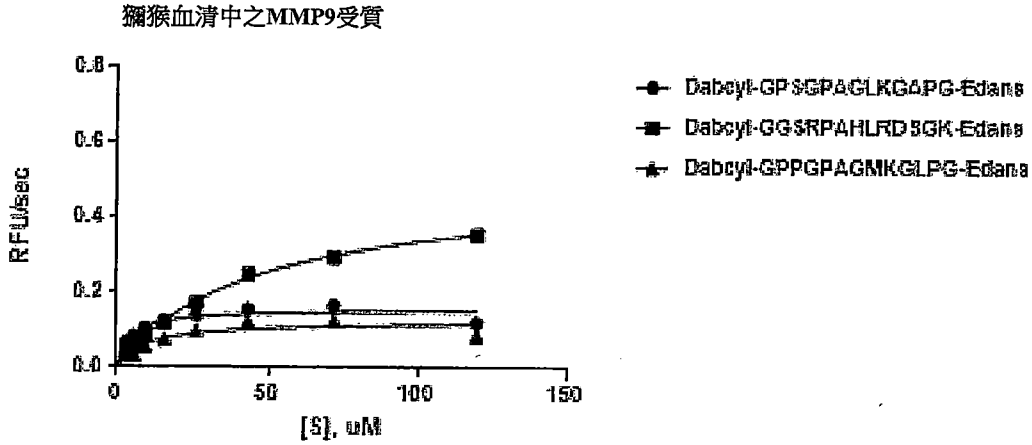
第 48B 圖


小鼠血清中之MMP9受質
RFU/sec
0.0
0.5
1.0
1.5
0
50
100
150
[S], uM
Dabcyl-GPSGPAGLKGAPG-Edans
Dabcyl-GGSRPAHLRDSGK-Edans
Dabcyl-GPPGPAGMKGLPG-Edans

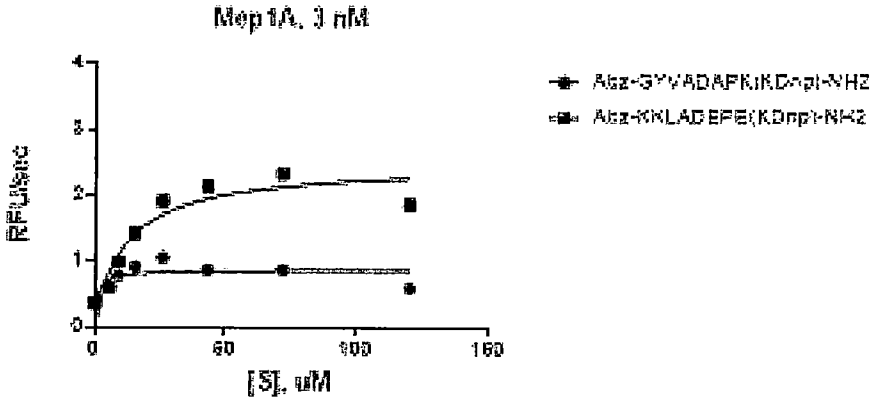
第 48C 圖


人血清中之MMP9受質
RFU/sec
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
0
50
100
150
[S], uM
Dabcyl-GPSGPAGLKGAPG-Edans
Dabcyl-GGSRPAHLRDSGK-Edans
Dabcyl-GPPGPAGMKGLPG-Edans

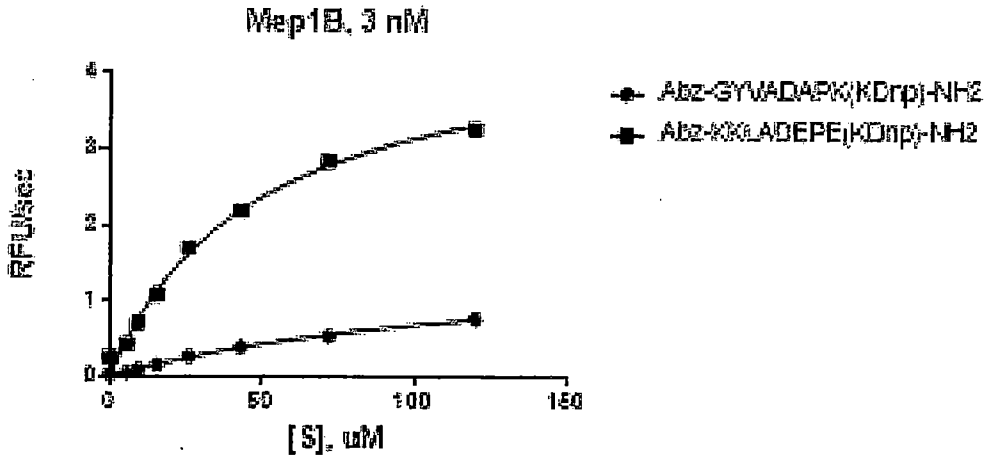
第 48D 圖


獼猴血清中之MMP9受質
RFU/sec
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
0
50
100
150
[S], uM
Dabcyl-GPSGPAGLKGAPG-Edans
Dabcyl-GGSRPAHLRDSGK-Edans
Dabcyl-GPPGPAGMKGLPG-Edans

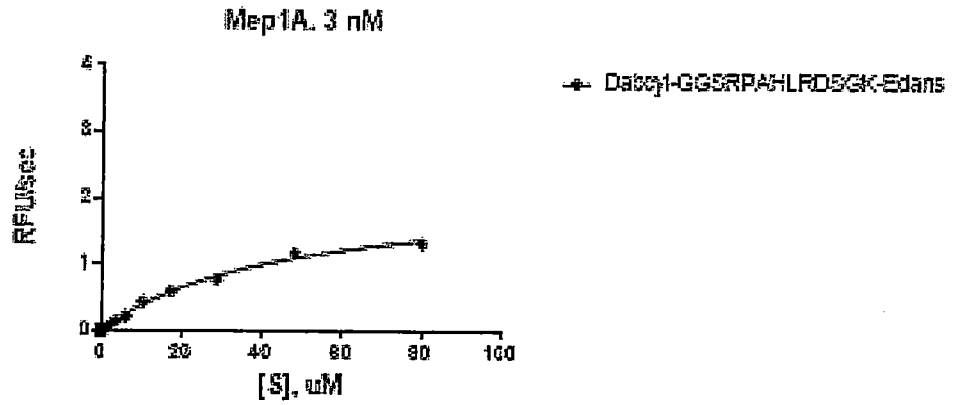
第 49A 圖


Mep1A, 3 nM
RFU/sec
[S], uM
0
60
120
160
Abz-GYVADAPK(KDnp)-NH2
Abz-KKLADEPE(KDnp)-NH2

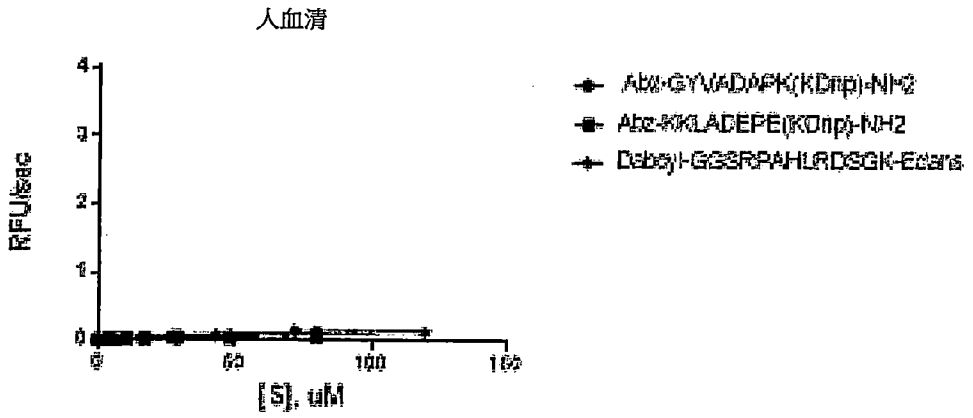
第 49B 圖


Mep1B, 3 nM
RFU/sec
[S], uM
0
50
100
150
Abz-GYVADAPK(KDnp)-NH2
Abz-KKLADEPE(KDnp)-NH2

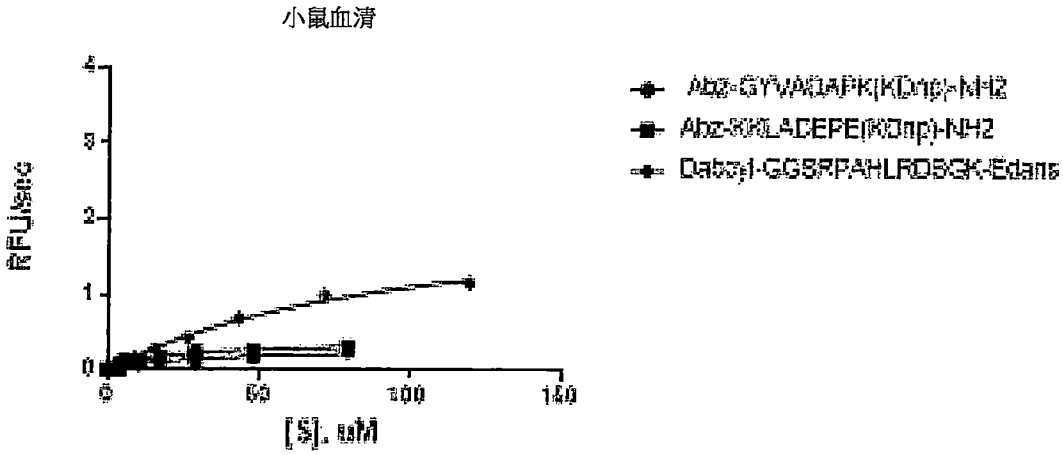
第 49C 圖


Mep1A, 3 nM
RFU/sec
[S], uM
Dabcyl-GGSRPAHLRDSGK-Edans

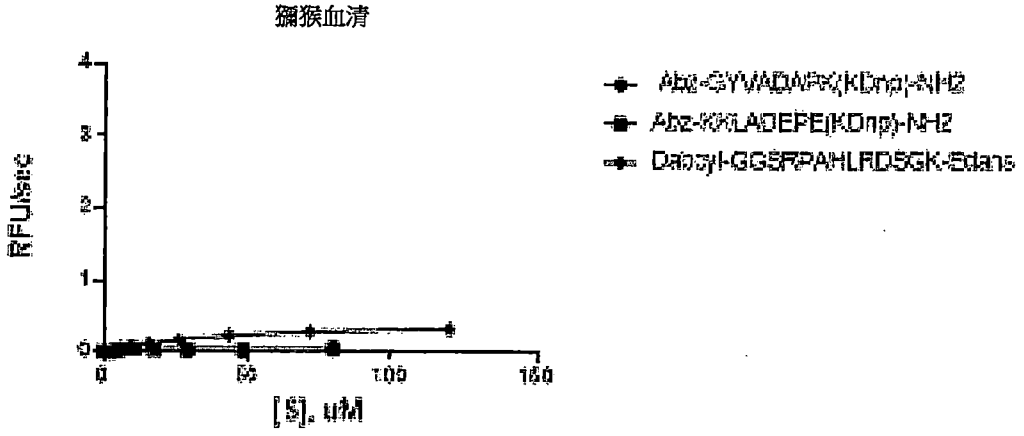
第 49D 圖


人血清
RFU/sec
[S], uM
Abz-GYVADAPK(KDnp)-NH2
Abz-KKLADEPE(KDnp)-NH2
Dabcyl-GGSRPAHLRDSGK-Edans

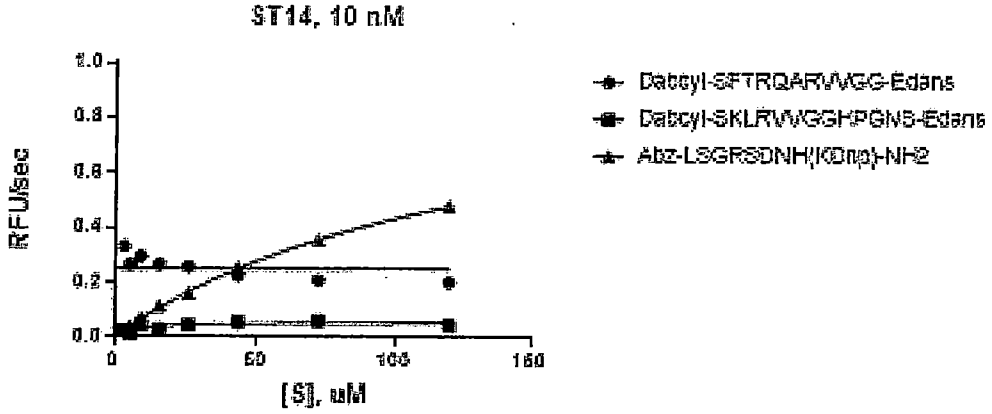
第 49E 圖


小鼠血清
RFU/sec
[S], uM
Abz-GYVADAPK(KDnp)-NH2
Abz-KKLADEPE(KDnp)-NH2
Dabcyl-GGSRPAHLRDSGK-Edans

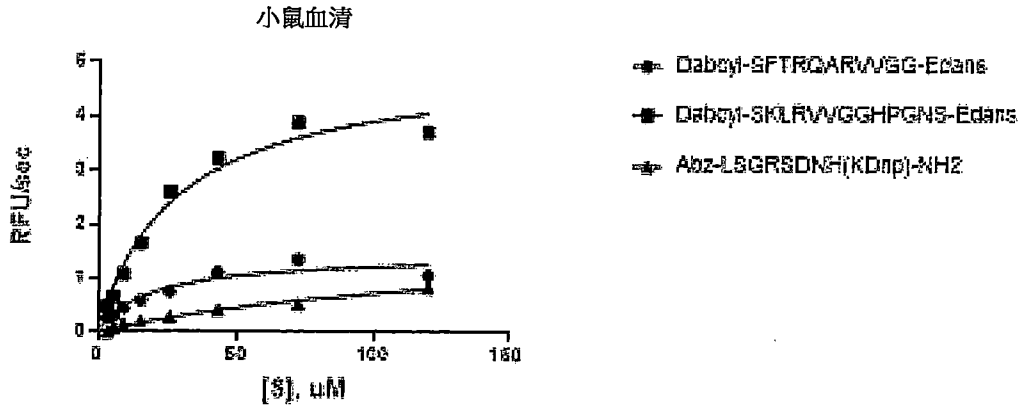
第 49F 圖


獼猴血清
RFU/sec
[S], uM
Abz-GYVADAPK(KDnp)-NH2
Abz-KKLADEPE(KDnp)-NH2
Dabcyl-GGSRPAHLRDSGK-Edans

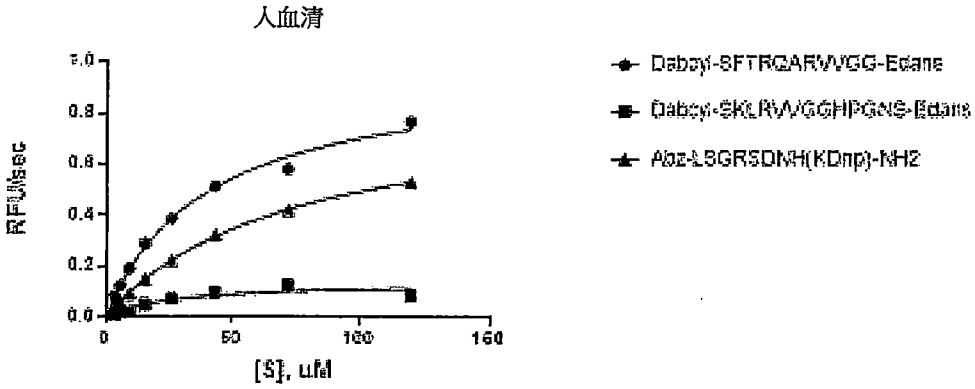
第 50A 圖


ST14, 10 nM
RFU/sec
[S], uM
Dabcyl-SFTRQARVVGG-Edans
Dabcyl-SKLRVVGGHPGNS-Edans
Abz-LSGRSDNH(KDnp)-NH2

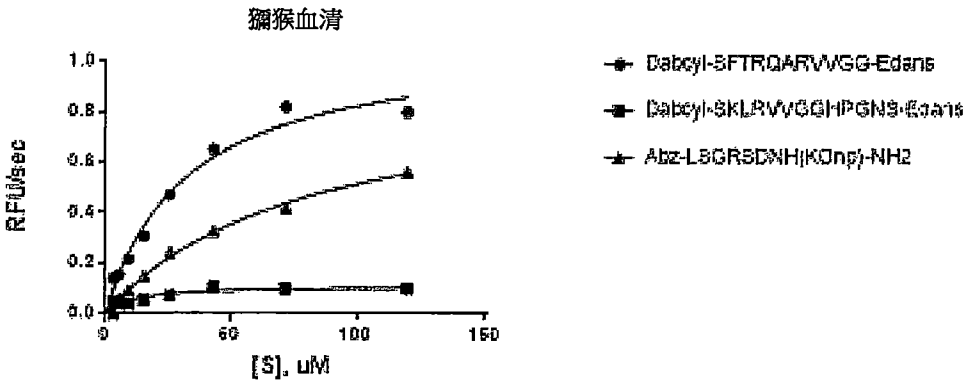
第 50B 圖


小鼠血清
RFU/sec
[S], uM
Dabcyl-SFTRQARVVGG-Edans
Dabcyl-SKLRVVGGHPGNS-Edans
Abz-LSGRSDNH(KDnp)-NH2

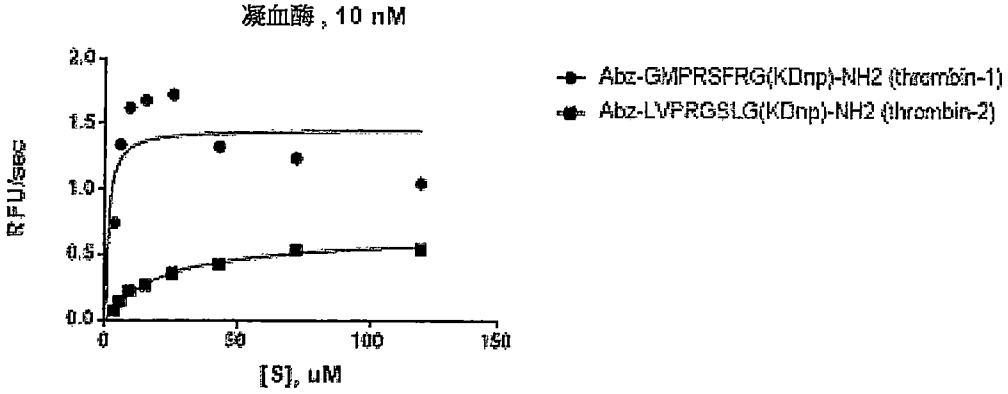
第 50C 圖


人血清
RFU/sec
[S], uM
Dabcyl-SFTRQARVVGG-Edans
Dabcyl-SKLRVVGGHPGNS-Edans
Abz-LSGRSDNH(KDnp)-NH2

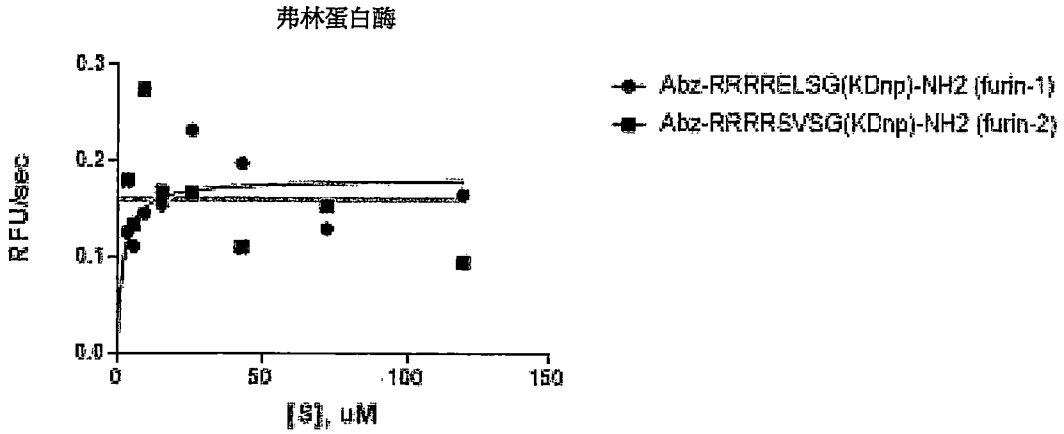
第 50D 圖


獼猴血清
RFU/sec
[S], uM
Dabcyl-SFTRQARVVGG-Edans
Dabcyl-SKLRVVGGHPGNS-Edans
Abz-LSGRSDNH(KDnp)-NH2

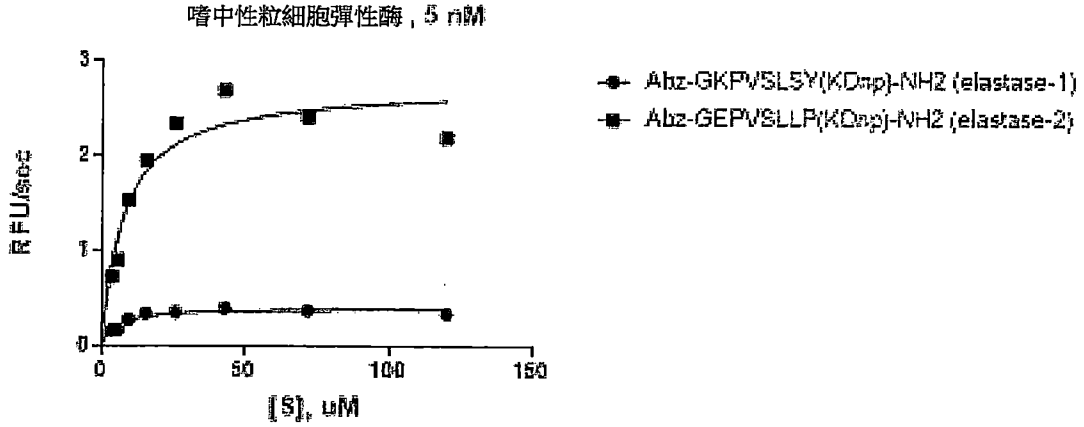
第 51A 圖


凝血酶 , 10 nM
RFU/sec
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
50
100
150
[S], uM
Abz-GMPRSFRG(KDnp)-NH2 (thrombin-1)
Abz-LVPRGSLG(KDnp)-NH2 (thrombin-2)

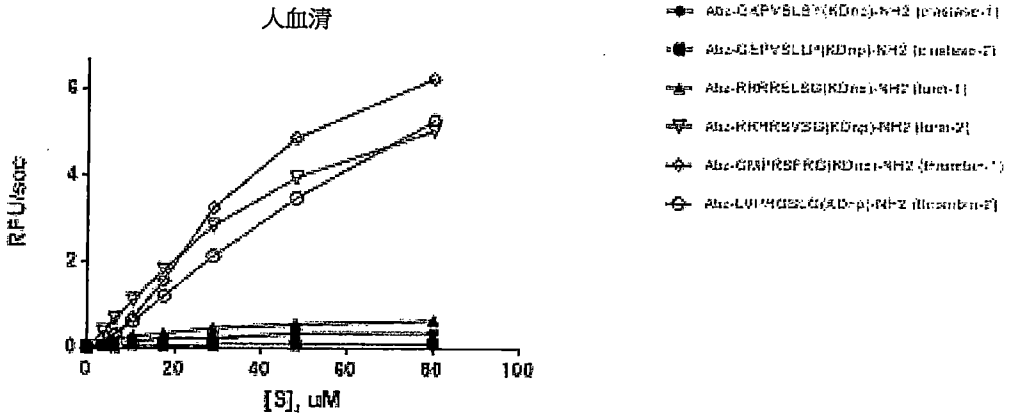
第 51B 圖


弗林蛋白酶
RFU/sec
0.3
0.2
0.1
0.0
0
50
100
150
[S], uM
Abz-RRRRELSG(KDnp)-NH2 (furin-1)
Abz-RRRRSVSG(KDnp)-NH2 (furin-2)

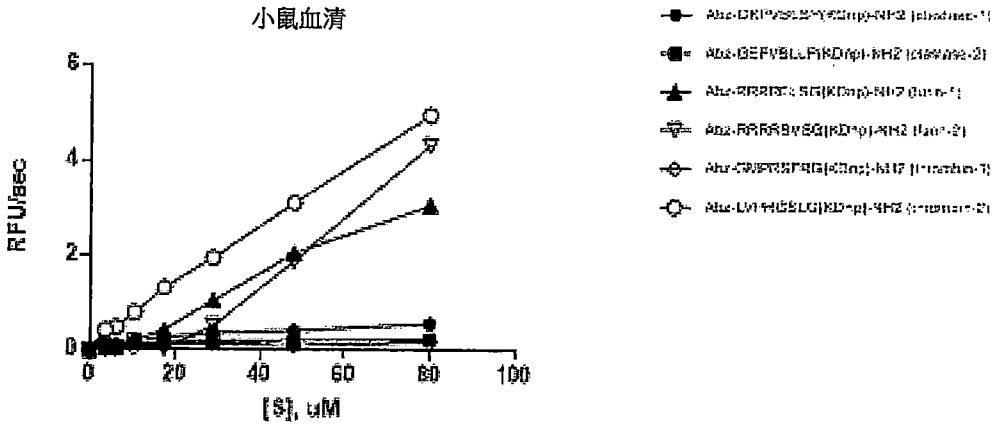
# 第 51C 圖


嗜中性粒細胞彈性酶，5 nM
RFU/sec
0
1
2
3
0
50
100
150
[S], uM
Abz-GKPVSLSY(KDnp)-NH2 (elastase-1)
Abz-GEPVSLLP(KDnp)-NH2 (elastase-2)

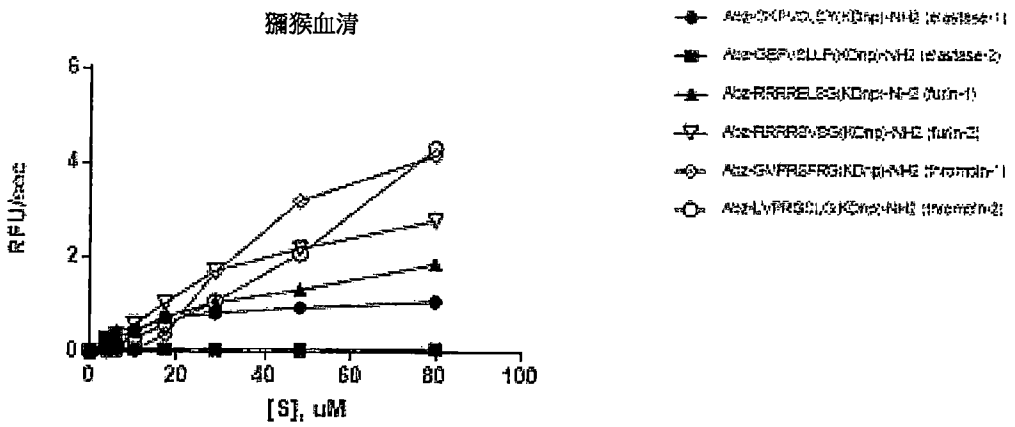
第 52A 圖


人血清
RFU/sec
[S], uM
0
2
4
6
0
20
40
60
80
100

第 52B 圖

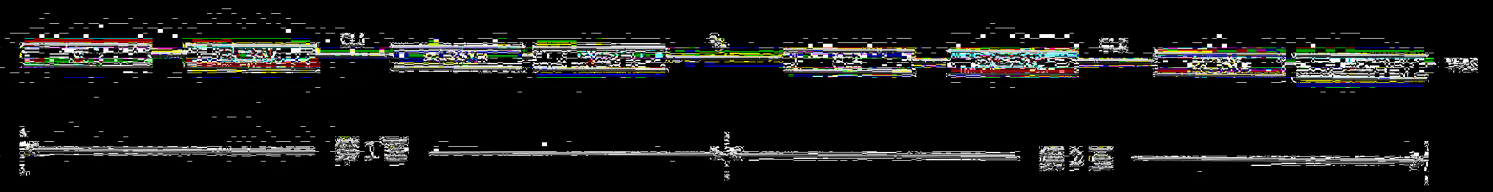

小鼠血清
RFU/sec
[S], uM
0
2
4
6
0
20
40
60
80
100

# 第 52C 圖

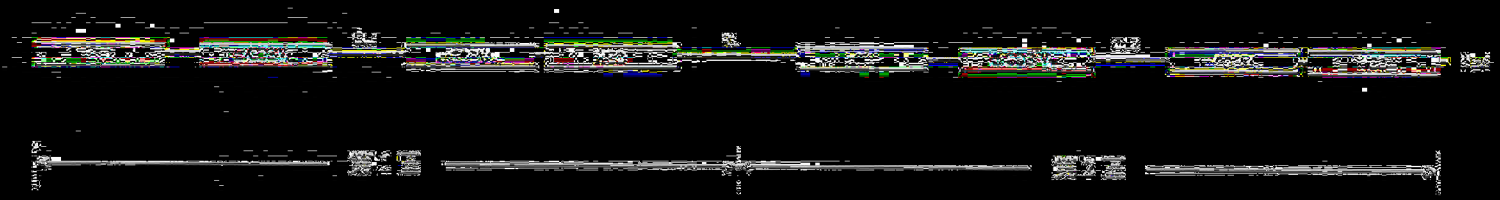


202302631

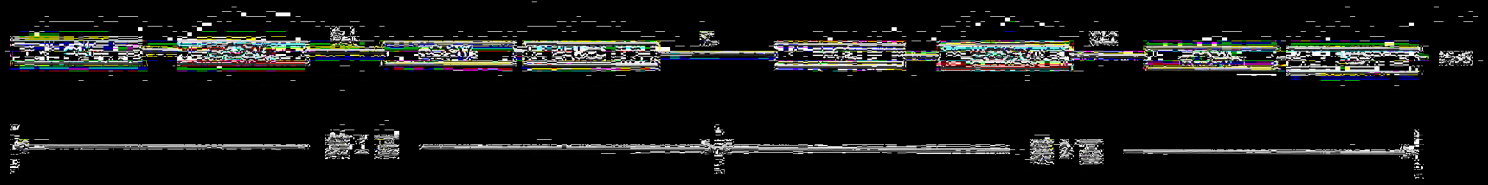
第 53A 圖

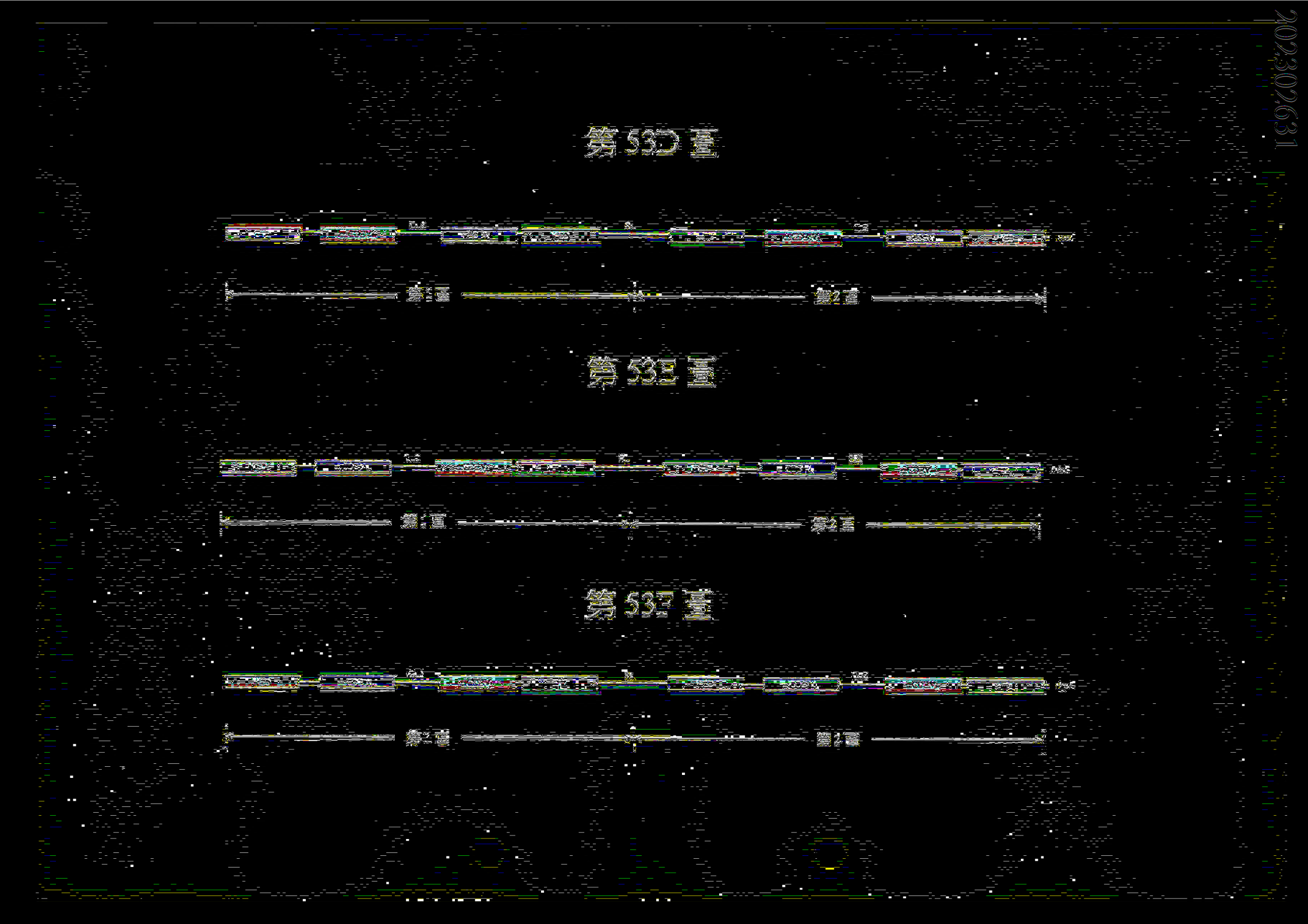


第 53B 圖



第 53C 圖

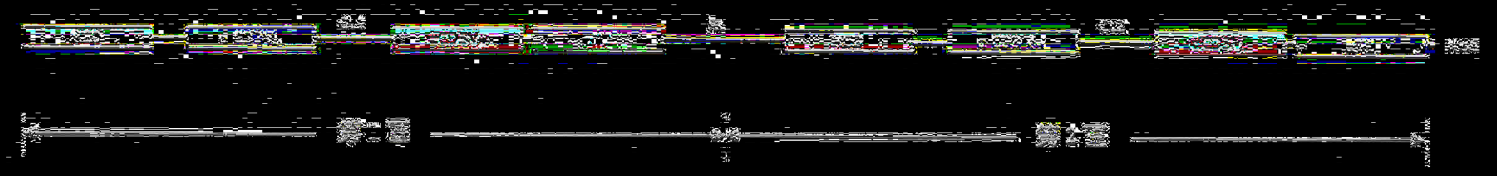



第53D圖
第53E圖
第53F圖

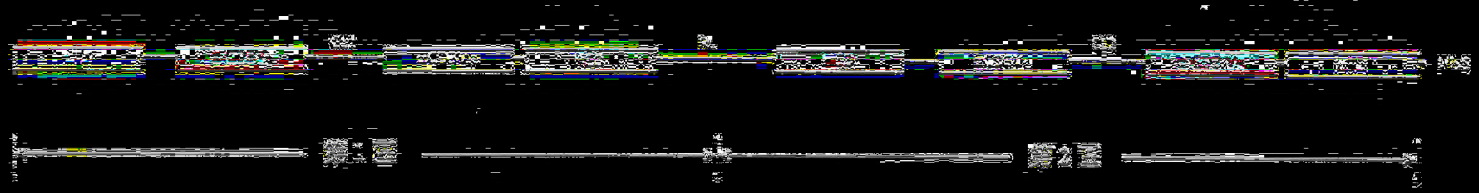
第53G圖




第53H圖

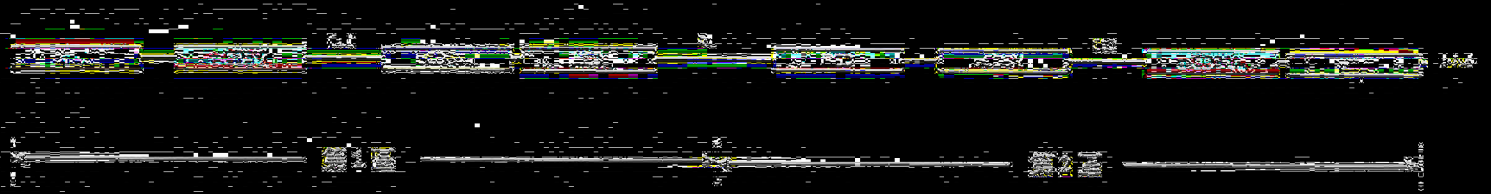



第53I圖

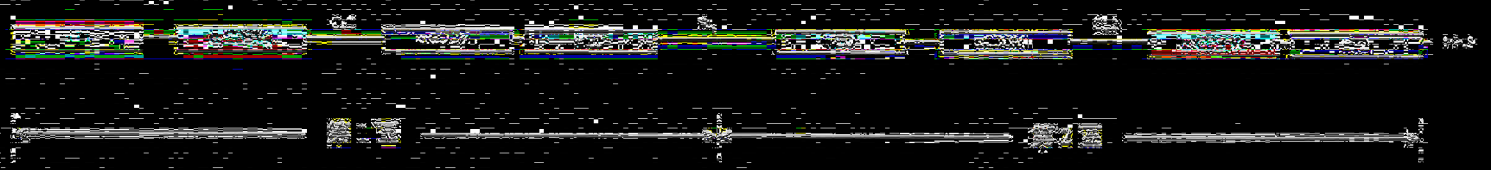


202302631

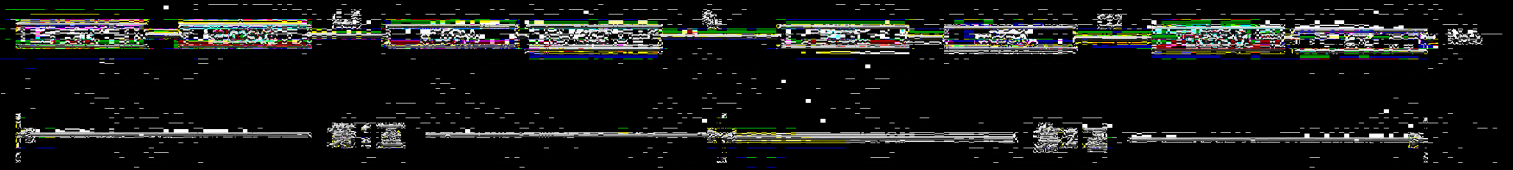
第53J圖



第53K圖

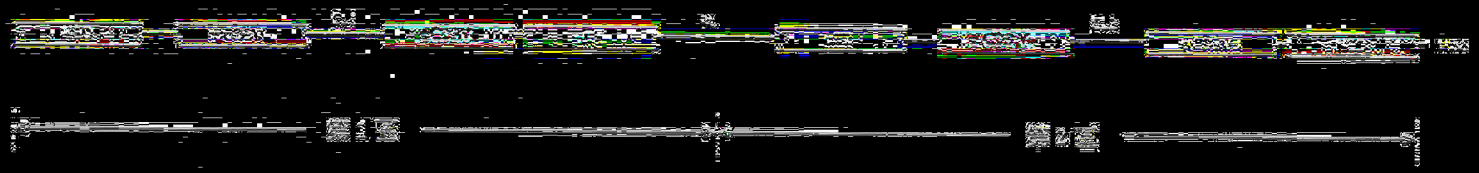


第53L圖



20230631

第53M图

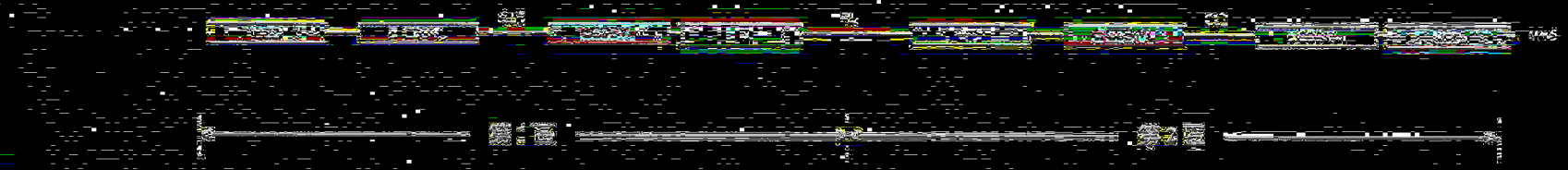


第53N图



第53O图





202302631

# 第 54A 圖

## Prodents 1 - 38

**Pro1 - aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh – His10**

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSL
KPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMN
WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTL
VTVSSHHHHHHHHHH SEQ ID NO: 44

GAAGTCCAACTGGTGGAATCGGGCGGTGGACTCGTGCAGGCCGGAGGTTCCCTGCGCCTTTCCTGTGCGGCTTCGGGAAGAACCT
TCTCCTCGTATGCCATGGGATGGTTCCGCCAAGCCCCTGGAAAAGAGCGGGAATTCGTCGTGGCGATCAATTGGAGCTCCGGTTC
GACTTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATTAGCCGGGACAATGCTAAGAACACCATGTATCTGCAGATGAACTC
ACTGAAACCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCGCTGGGTACCAGATCAATTCCGGAAACTACAACTTCAAGGACTACGA
GTACGACTACTGGGGTCAGGGCACCCAGGTCACCGTGTCCAGCGGAGGAGGTGGAAGCGGAGGCGGTTCCGAAGTGCAGCTCGT
CGAGTCCGGGGGGTGGACTGGTCCAACCGGGCGGATCACTGAAGCTGAGCTGCGCAGCCTCCGGATTCACCTTCAACAAGTACGC
CATGAACTGGGTCAGACAGGCACCCGGGAAGGGACTGGAATGGGTGGCCCGGATCAGGTCCAAGTACAACAACTACGCCACCT
ACTACGCGGACAGCGTGAAGGATAGGTTCACCATCTCCCGGGACGACAGCAAGAACACTGCCTACCTCCAAATGAACAACCTCA
AGACCGAAGATACTGCGGTGTATTACTGCGTGCGCCACGGGAACTTCGGAAACAGCTACATCAGCTACTGGGCCTACTGGGGCC
AGGGCACTCTGGTGACCGTGTCATCCCACCATCACCACCACCATCATCACCATCAC SEQ ID NO: 45

# 第 54B 圖

**<u>Pro2</u> – aCD3 Vl – aEGFR D12 sdAb – His10**
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY
YCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSQVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGD
STGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSHHHHHHHHHH
SEQ ID NO: 46

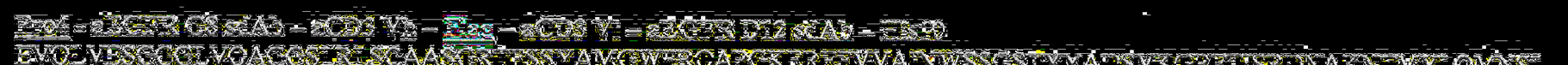
CAGACCGTGGTGACCCAGGAACCCTCACTGACCGTGTCCCCAGGAGGAACCGTGACCCTTACCTGTGGCTCCTCGACCGGTGCCG
TGACGTCCGGGAACTACCCCAACTGGGTCCAGCAAAAGCCGGGACAAGCCCCTCGGGGACTGATCGGGGGGACTAAGTTCCTGG
CCCCTGGCACTCCTGCCCGCTTCAGCGGCAGCCTCCTGGGAGGAAAAGCGGCCCTGACACTCTCGGGGGTGCAGCCTGAAGATG
AGGCCGAATACTACTGCGTGCTGTGGTACTCCAATCGCTGGGTGTTTGGAGGGGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGAGGAGGAG
GAAGCGGCGGAGGTTCCCAGGTCAAGCTGGAGGAATCGGGTGGAGGCTCAGTGCAGACAGGAGGTAGCCTCCGGCTCACTTGCG
CCGCTTCCGGAAGGACTTCCCGGAGCTACGGGATGGGCTGGTTTCGGCAAGCCCCCGGAAAGGAGAGAGAATTCGTGTCCGGAA
TTAGCTGGAGGGGCGACTCAACTGGATACGCGGACTCCGTCAAGGGCAGATTCACTATCTCTCGGGACAACGCCAAGAACACCG
TGGACTTGCAAATGAATTCCCTGAAGCCGGAGGACACTGCCATCTACTACTGTGCTGCGGCAGCAGGATCTGCCTGGTACGGCAC
CCTTTATGAATACGATTACTGGGGACAGGGAACCCAGGTCACGGTGTCGTCCCACCATCACCACCACCATCATCACCATCAC
SEQ ID NO: 47

# 第 54C 圖

**<u>Pro3</u> - aEGFR G8 sdAb – aCD3 scFv – aEGFR D12 sdAb – His10**

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSL
KPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMN
WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTL
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSL
LGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSQVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMG
WFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVT
VSSHHHHHHHHHH SEQ ID NO: 48

GAAGTCCAACTGGTGGAATCGGGCGGTGGACTCGTGCAGGCCGGAGGTTCCCTGCGCCTTTCCTGTGCGGCTTCGGGAAGAACCT
TCTCCTCGTATGCCATGGGATGGTTCCGCCAAGCCCCTGGAAAAGAGCGGGAATTCGTCGTGGCGATCAATTGGAGCTCCGGTTC
GACTTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATTAGCCGGGACAATGCTAAGAACACCATGTATCTGCAGATGAACTC
ACTGAAACCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCGCTGGGTACCAGATCAATTCCGGAAACTACAACTTCAAGGACTACGA
GTACGACTACTGGGGTCAGGGCACCCAGGTCACCGTGTCCAGCGGAGGAGGTGGAAGCGGAGGCGGTTCCGAAGTGCAGCTCGT
CGAGTCCGGGGGGTGGACTGGTCCAACCGGGCGGATCACTGAAGCTGAGCTGCGCAGCCTCCGGATTCACCTTCAACAAGTACGC
CATGAACTGGGTCAGACAGGCACCCGGGAAGGGACTGGAATGGGTGGCCCGGATCAGGTCCAAGTACAACAACTACGCCACCT
ACTACGCGGACAGCGTGAAGGATAGGTTCACCATCTCCCGGGACGACAGCAAGAACACTGCCTACCTCCAAATGAACAACCTCA
AGACCGAAGATACTGCGGTGTATTACTGCGTGCGCCACGGGAACTTCGGAAACAGCTACATCAGCTACTGGGCCTACTGGGGCC
AGGGCACTCTGGTGACCGTGAGCTCAGGAGGAGGCGGCTCCGGAGGCGGAGGCTCAGGGGGAGGAGGTTCGCAGACCGTGGTG
ACCCAGGAACCCTCACTGACCGTGTCCCCAGGAGGAACCGTGACCCTTACCTGTGGCTCCTCGACCGGTGCCGTGACGTCCGGGA
ACTACCCCAACTGGGTCCAGCAAAAGCCGGGACAAGCCCCTCGGGGACTGATCGGGGGGACTAAGTTCCTGGCCCCTGGCACTC
CTGCCCGCTTCAGCGGCAGCCTCCTGGGAGGAAAAGCGGCCCTGACACTCTCGGGGGTGCAGCCTGAAGATGAGGCCGAATACT
ACTGCGTGCTGTGGTACTCCAATCGCTGGGTGTTTGGAGGGGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGAGGAGGAGGAAGCGGCGGAG
GTTCCCAGGTCAAGCTGGAGGAATCGGGTGGAGGCTCAGTGCAGACAGGAGGTAGCCTCCGGCTCACTTGCGCCGCTTCCGGAA
GGACTTCCCGGAGCTACGGGATGGGCTGGTTTCGGCAAGCCCCCGGAAAGGAGAGAGAATTCGTGTCCGGAATTAGCTGGAGGG
GCGACTCAACTGGATACGCGGACTCCGTCAAGGGCAGATTCACTATCTCTCGGGACAACGCCAAGAACACCGTGGACTTGCAAA
TGAATTCCCTGAAGCCGGAGGACACTGCCATCTACTACTGTGCTGCGGCAGCAGGATCTGCCTGGTACGGCACCCTTTATGAATA
CGATTACTGGGGACAGGGAACCCAGGTCACGGTGTCGTCCCACCATCACCACCACCATCATCACCATCAC SEQ ID NO: 49



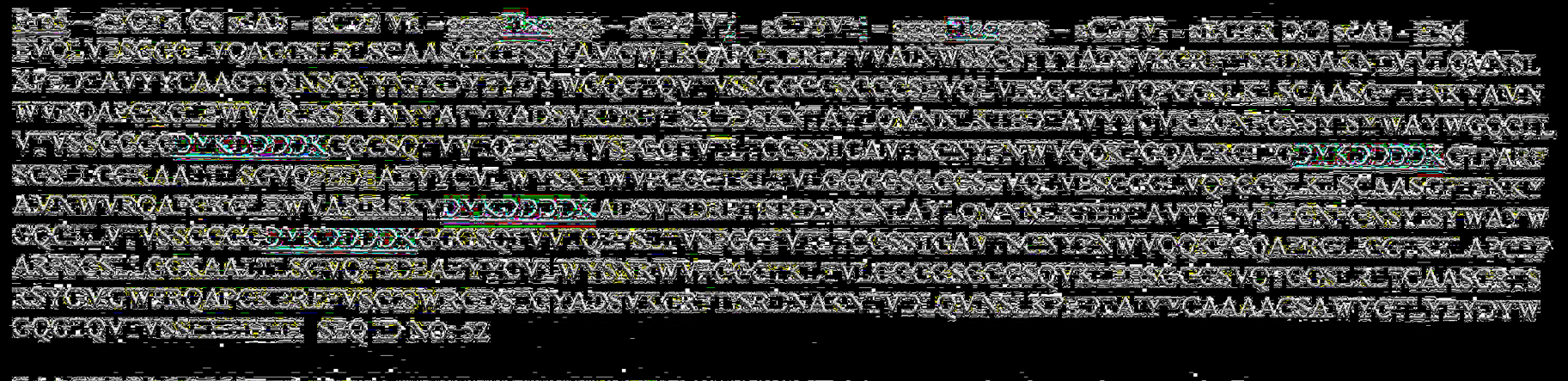
SEQ ID NO: 50



SEQ ID NO: 51

2023/02631

# 第542章



SEQ ID NO:52



# 第 54F 圖

CAGCTATTGGGCCTATTGGGGACAGGGCACTCTCGTAACGGTTTCATCCGGGGGAGGAGGAGACTACAAGGACGATGACGATAA
GGGCGGAGGCTCTCAGACGGTCGTAACTCAGGAGCCATCTCTCACTGTTAGCCCGGGCGGAACTGTTACTCTCACCTGTGGGAGC
AGTACTGGGGCGGTTACTTCCGGCAACTACCCTAACTGGGTTCAACAGAAGCCAGGTCAGGCACCAAGAGGTCTGATAGGCGGA
ACTAAATTCCTCGCCCCTGGTACCCCTGCACGATTCAGCGGATCCCTTTTGGGCGGCAAAGCGGCTCTTACACTTTCTGGAGTCCA
ACCGGAAGATGAGGCGGAATACTATTGTGTACTTTGGTATAGTAATCGCTGGGTATTCGGCGGCGGCACCAAACTCACTGTCCTT
GGAGGAGGAGGAAGCGGCGGAGGTTCCCAGGTCAAGCTGGAGGAATCGGGTGGAGGCTCAGTGCAGACAGGAGGTAGCCTCCG
GCTCACTTGCGCCGCTTCCGGAAGGACTTCCCGGAGCTACGGGATGGGCTGGTTTCGGCAAGCCCCCGGAAAGGAGAGAGAATT
CGTGTCCGGAATTAGCTGGAGGGGCGACTCAACTGGATACGCGGACTCCGTCAAGGGCAGATTCACTATCTCTCGGGACAACGC
CAAGAACACCGTGGACTTGCAAATGAATTCCCTGAAGCCGGAGGACACTGCCATCTACTACTGTGCTGCGGCAGCAGGATCTGC
CTGGTACGGCACCCTTTATGAATACGATTACTGGGGACAGGGAACCCAGGTCACGGTCTCGAGTCACCACCACCATCACCAC
SEQ ID NO: 53

# 第54C圖

[illegible]



SEQ ID NO:54



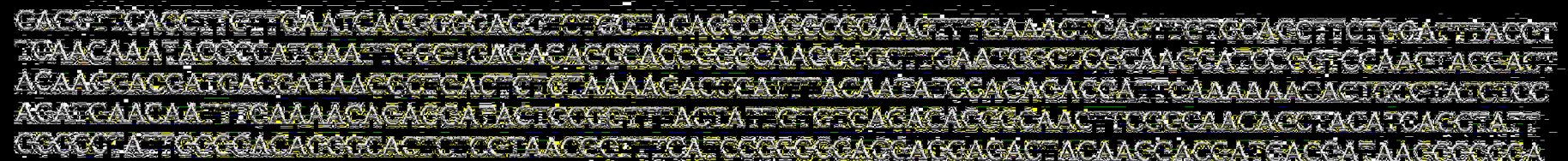
[illegible]

SEQ ID NO:55



# 第54頁

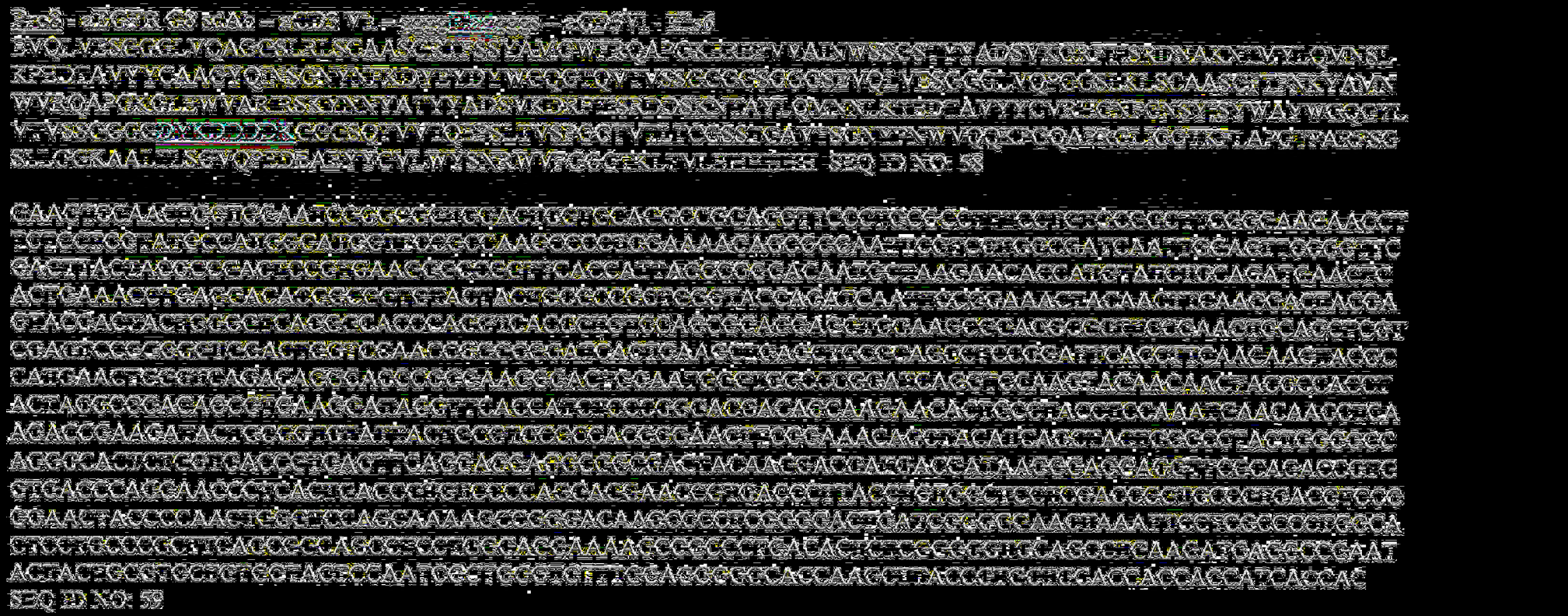
[illegible]



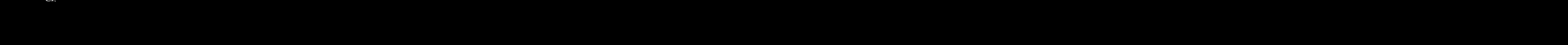
SEQ ID NO: 56

[illegible]

SEQ ID NO: 57



# 第541頁



[illegible]

SEQ ID NO: 58

[illegible]

SEQ ID NO: 59



# 第54章

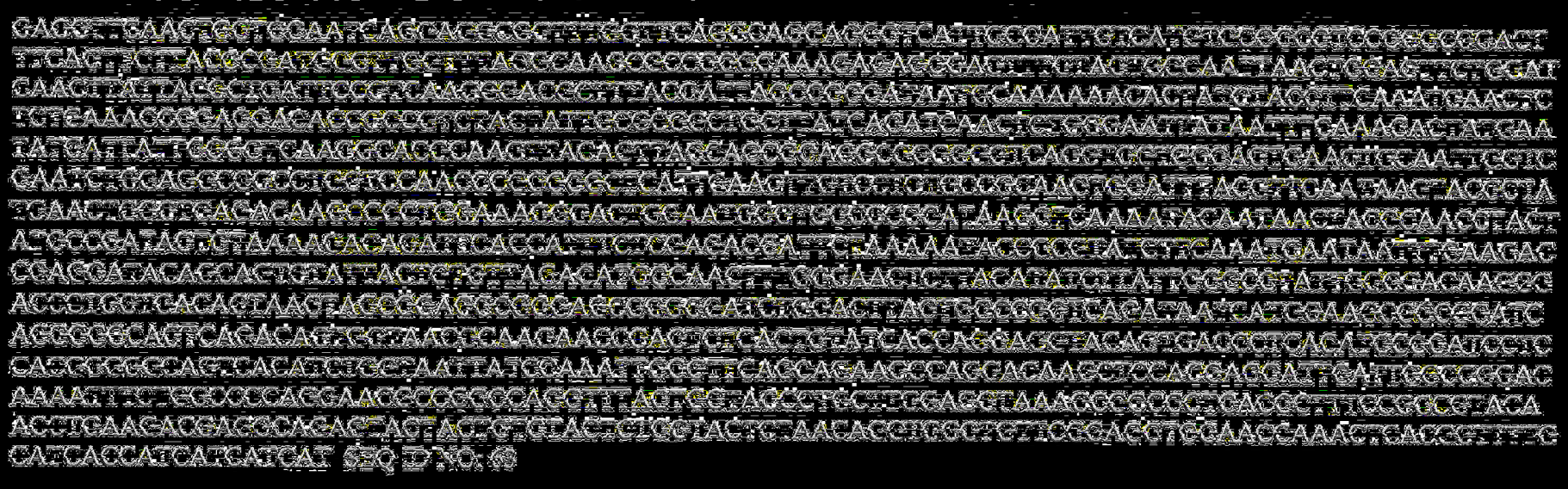


[illegible] SEQ ID NO: 60

[illegible] SEQ ID NO: 61



# 第54章 重



[illegible] SEQ ID NO: 62

[illegible] SEQ ID NO: 63

202302631



# 第54頁

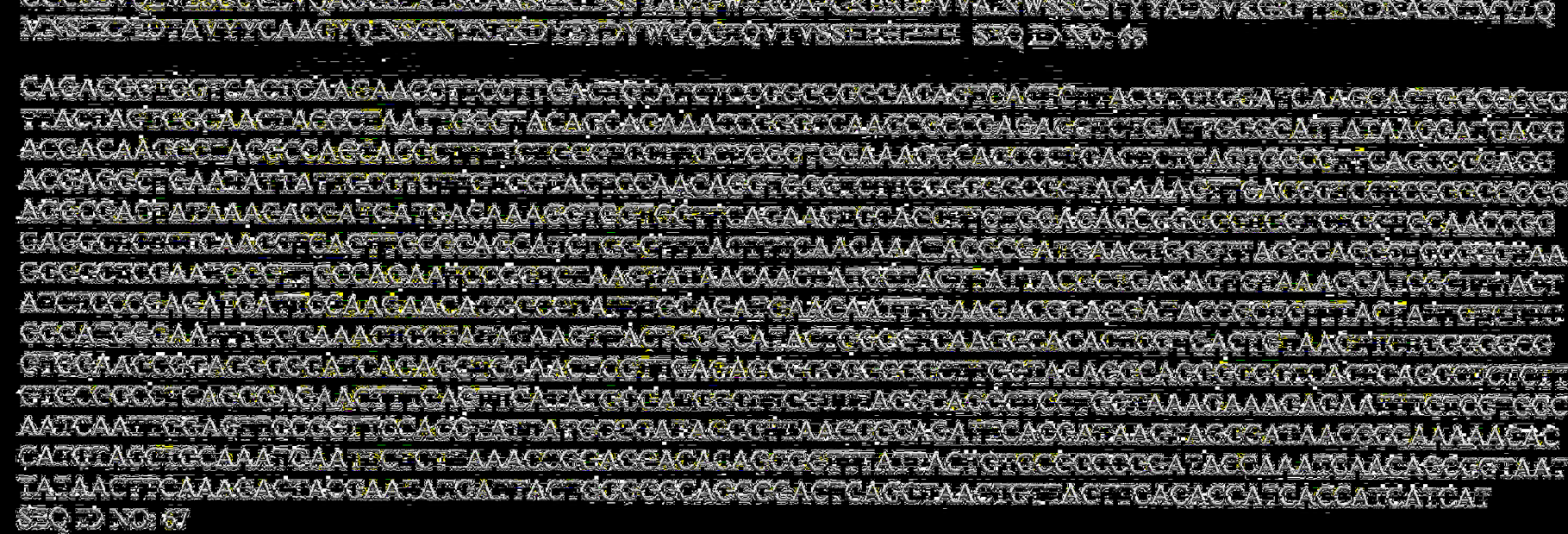


[illegible] SEQ ID NO:64

[illegible] SEQ ID NO:65



SEQ ID NO: 65



SEQ ID NO: 67

202302631

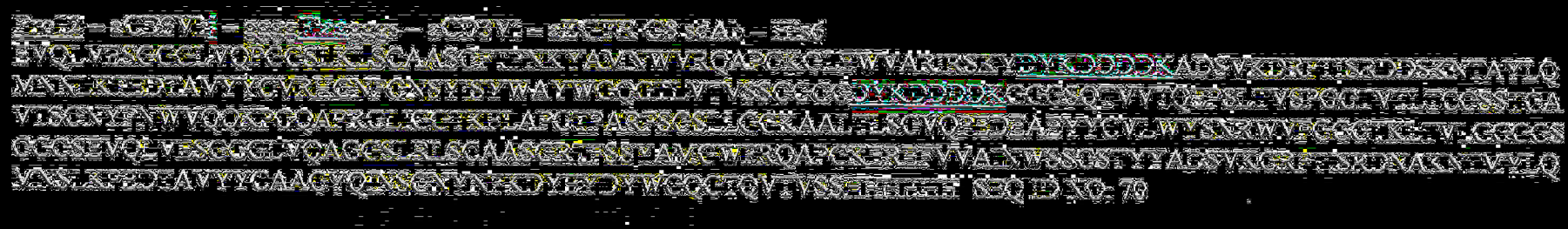


# 第54N圖



[illegible] SEQ ID NO: 68

[illegible] SEQ ID NO: 69



# 第540頁

[illegible]



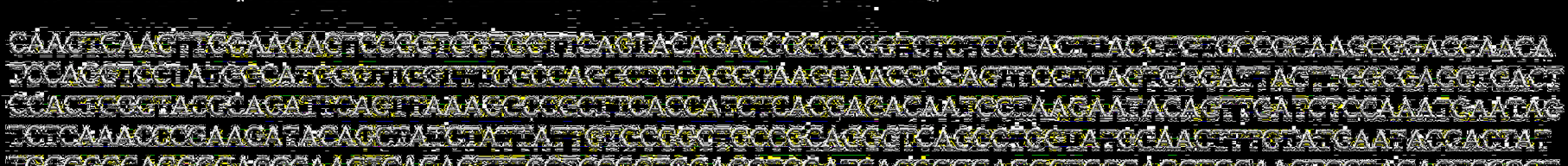
SEQ ID NO: 79

[illegible]

SEQ ID NO: 7[illegible]

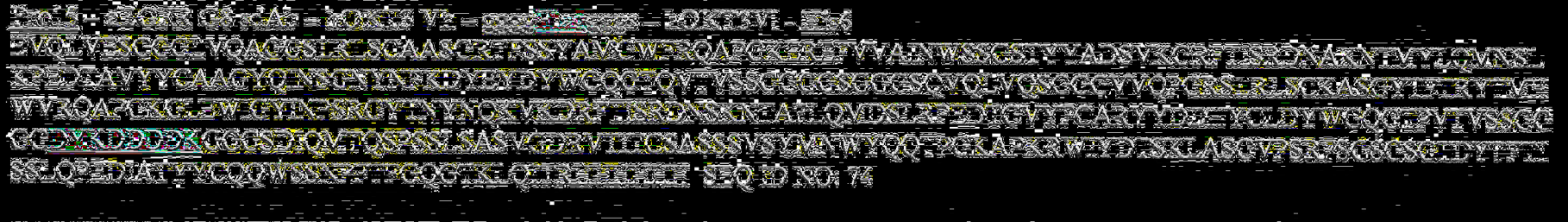


SEQ ID NO: 72



SEQ ID NO: 73

2023.06.31



# 第54Q頁

[illegible]

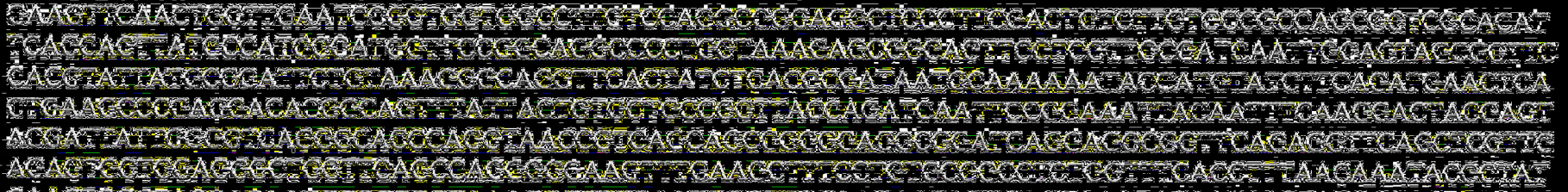


[illegible] SEQ ID NO: 74

[illegible] SEQ ID NO: 75



# 第54R圖



[illegible]
SEQ ID NO: 76

[illegible]
SEQ ID NO: 77



# 第548頁



[illegible]
SEQ ID NO: 78

[illegible]
SEQ ID NO: 79



# 第54T圖



[illegible]

[illegible] SEQ ID NO: 80

[illegible]

SEQ ID NO: 81



SEQ ID NO: 82



SEQ ID NO: 83

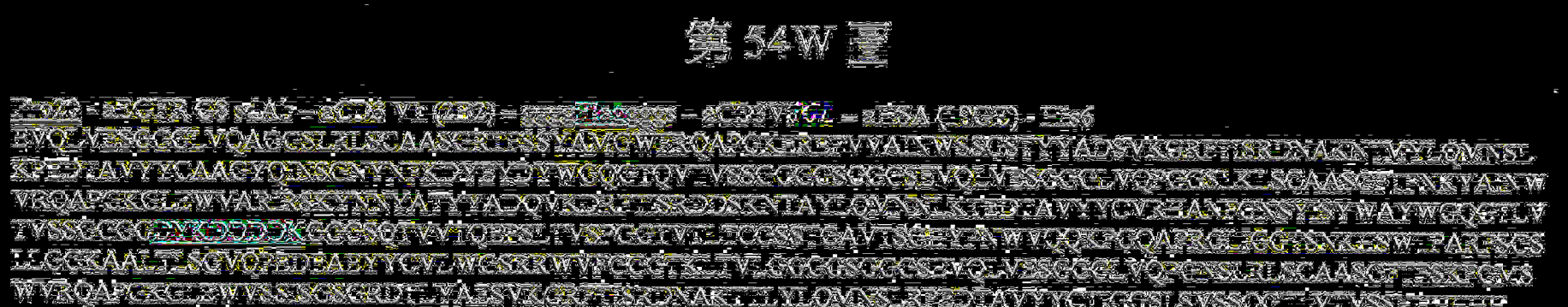
202302631



SEQ ID NO: 84

SEQ ID NO: 85

2023026631



# 第54W 圖

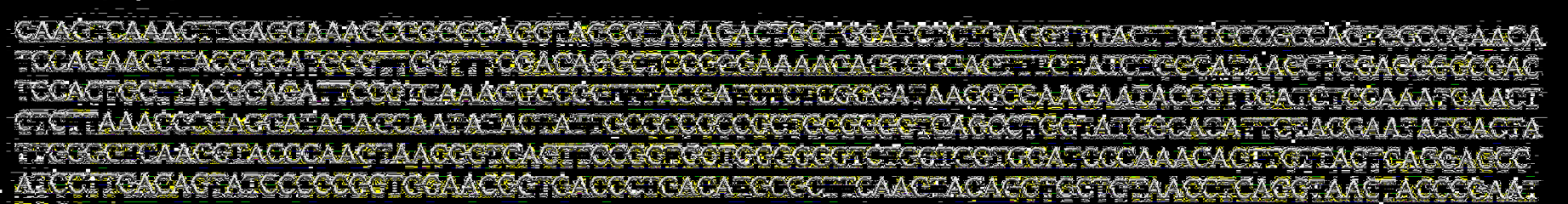


[illegible]
SEQ ID NO:86

[illegible]
SEQ ID NO:87



SEQ ID NO: 88



SEQ ID NO: 89

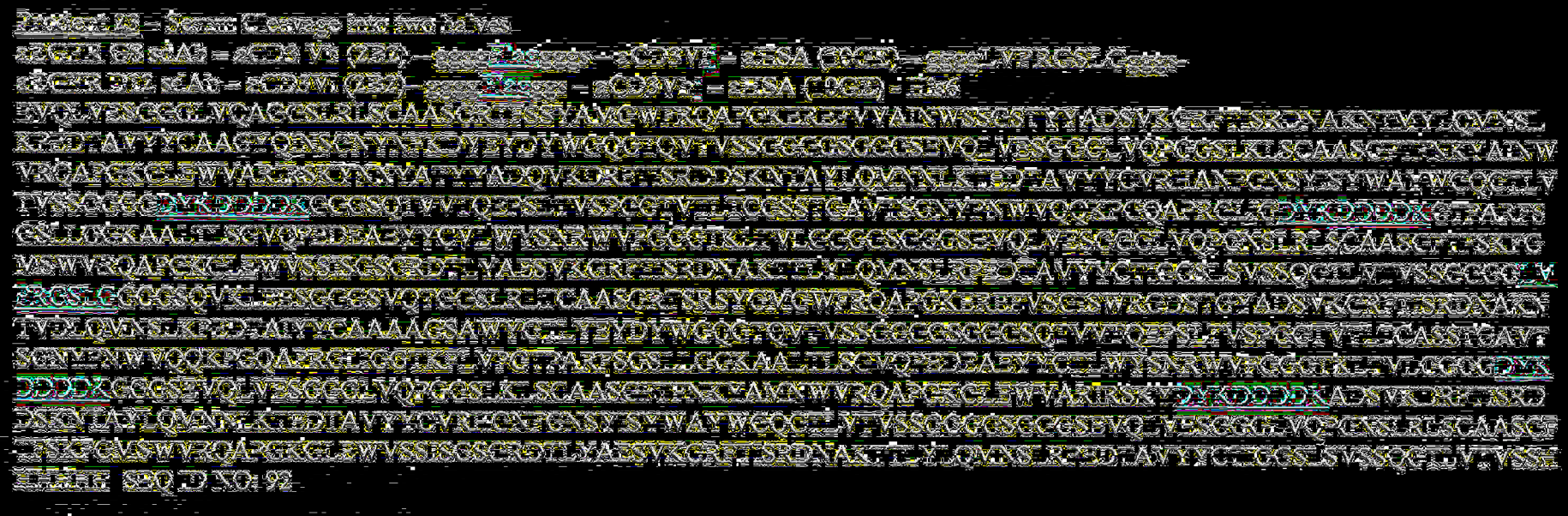
2023026631 13.07.2023



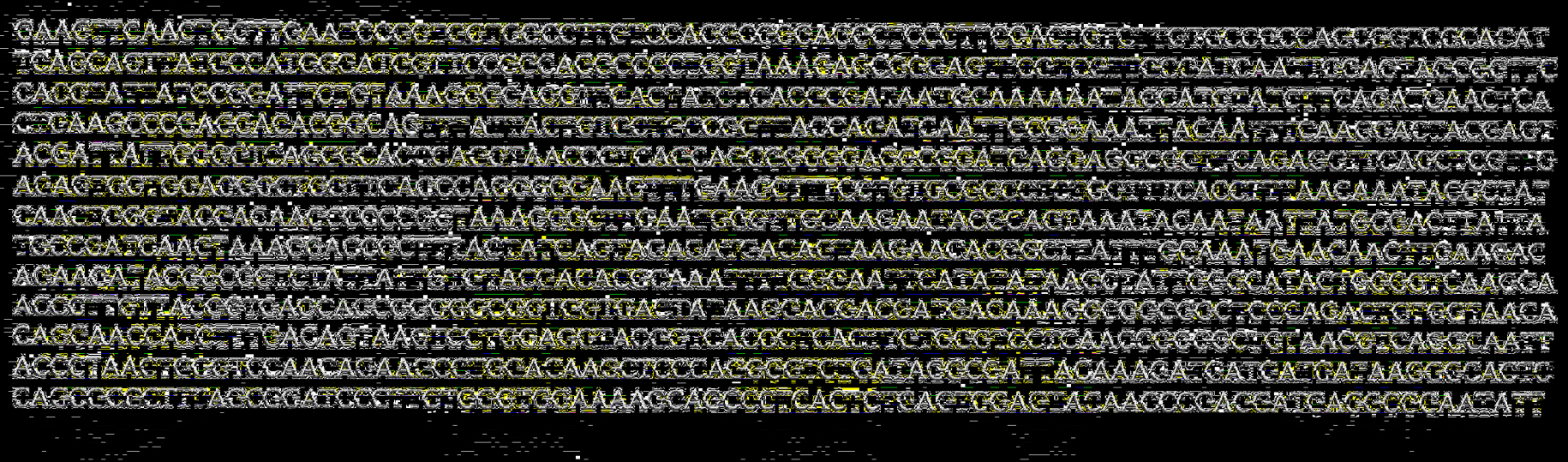
SEQ ID NO: 99

SEQ ID NO: 9.

2023026631



SEQ ID NO: 92



2023.08.31

# 第 54AA 圖

ATTGCGTGCTCTGGTATTCAAACCGCTGGGTCTTCGGTGGCGGTACGAAACTTACTGTACTGGGGGGAGGCGGCTCAGGCGGCGG
ATCAGAAGTGCAGCTTGTTGAATCTGGCGGAGGTCTGGTCCAGCCAGGTAACAGCTTGAGACTGTCCTGTGCTGCTAGCGGCTTT
ACCTTCTCTAAATTCGGTATGAGTTGGGTTCGGCAAGCCCCTGGAAAGGGTTTGGAATGGGTATCAAGCATTAGTGGTTCTGGGC
GAGATACACTCTATGCCGAATCAGTGAAGGGCCGCTTTACCATTAGTAGGGATAACGCTAAAACTACTCTGTATCTGCAAATGAA
TAGTCTGAGACCAGAAGATACTGCCGTTTACTACTGCACAATAGGGGGATCTCTGAGCGTTTCATCTCAAGGTACACTTGTGACT
GTTAGCAGTGGTGGCGGAGGACTTGTACCTCGAGGTAGCTTGGGTGGAGGGGGATCCCAAGTCAAACTTGAGGAAAGCGGGGG
AGGTAGCGTACAGACTGGTGGATCTCTGAGGTTGACTTGCGCCGCCAGTGGCCGAACATCCAGAAGTTACGGGATGGGTTGGTTT
CGACAGGCTCCGGGAAAAGAGCGGGAGTTTGTATCTGGCATAAGCTGGAGGGGCGACTCCACTGGTTACGCAGATTCCGTCAAA
GGGCGGTTTACGATCTCTCGGGATAACGCGAAGAATACCGTTGATCTCCAAATGAACTCTCTTAAACCCGAGGATACAGCAATAT
ACTATTGCGCCGCCGCTGCGGGGTCAGCCTGGTATGGCACATTGTACGAATATGACTATTGGGGTCAAGGTACCCAAGTAACGGT
CAGTTCCGGTGGTGGGGGGTCTGGTGGTGGATCCCAAACAGTTGTTACTCAGGAGCCATCCTTGACAGTATCCCCCGGTGGAACG
GTGACCCTGACATGCGCTTCAAGTACAGGTGCTGTAACCTCAGGTAACTACCCGAATTGGGTGCAGCAAAAACCTGGACAAGCA
CCCCGGGGTCTTATCGGGGGGACGAAGTTCTTGGTACCGGGTACCCCTGCGCGCTTCAGCGGAAGTCTTCTGGGTGGAAAAGCCG
CCTTGACCTTGTCAGGCGTTCAGCCCGAAGATGAGGCCGAATATTATTGCACGCTGTGGTATTCTAACCGGTGGGTCTTCGGAGG
AGGGACGAAACTTACTGTACTTGGAGGCGGCGGTGACTACAAGGACGACGATGACAAAGGCGGCGGCAGCGAGGTCCAGTTGG
TAGAATCCGGAGGTGGATTGGTTCAACCGGGAGGAAGCCTTAAGCTTTCATGCGCCGCATCCGGATTCACCTTCAATAAGTACGC
AATGAATTGGGTTAGACAGGCACCAGGTAAAGGGTTGGAATGGGTGGCACGCATTAGGTCTAAATACGATTACAAGGACGACGA
CGACAAAGCTGACAGCGTAAAAGACCGATTTACGATAAGCCGGGATGATTCTAAGAACACTGCTTATTTGCAGATGAATAATTT
GAAGACCGAGGATACTGCTGTCTATTATTGCGTCCGCCACGGTAATTTTGGTAACTCTTACATTAGCTATTGGGCGTATTGGGGG
CAGGGCACTCTGGTCACCGTCTCATCTGGCGGAGGGGGCAGTGGCGGCGGGTCAGAGGTTCAACTTGTCGAGTCTGGAGGCGGT
CTCGTACAACCGGGGAATAGTCTCCGACTCTCTTGCGCTGCGTCCGGGTTCACGTTCTCAAAGTTTGGGATGTCTTGGGTTAGGCA
AGCCCCAGGTAAGGGACTCGAATGGGTCAGCAGCATCTCAGGCTCCGGCAGAGACACGTTGTATGCCGAAAGTGTCAAAGGGAG
GTTCACAATCTCTCGGGACAATGCAAAAACCACCTTGTATCTCCAAATGAACTCACTCCGGCCTGAGGACACAGCAGTTTACTAC
TGTACGATAGGAGGGTCCCTTAGCGTATCTTCTCAGGGAACTTTGGTAACGGTCAGCTCCCACCACCATCATCATCAC
SEQ ID NO: 93

# 第54AB圖

[illegible]

[illegible] SEQ ID NO: 94





[illegible]

# 第 54AC 圖

TATCTGGCATAAGCTGGAGGGGCGACTCCACTGGTTACGCAGATTCCGTCAAAGGGCGGTTTACGATCTCTCGGGATAACGCGA
AGAATACCGTTGATCTCCAAATGAACTCTCTTAAACCCGAGGATACAGCAATATACTATTGCGCCGCCGCTGCGGGGTCAGCCTG
GTATGGCACATTGTACGAATATGACTATTGGGGTCAAGGTACCCAAGTAACGGTCAGTTCCGGTGGTGGGGGGTCTGGTGGTGG
ATCCCAAACAGTTGTTACTCAGGAGCCATCCTTGACAGTATCCCCCGGTGGAACGGTGACCCTGACATGCGCTTCAAGTACAGGT
GCTGTAACCTCAGGTAACTACCCGAATTGGGTGCAGCAAAAACCTGGACAAGCACCCCGGGGTCTTATCGGGGGGACGAAGTTC
TTGGTACCGGGTACCCCTGCGCGCTTCAGCGGAAGTCTTCTGGGTGGAAAAGCCGCCTTGACCTTGTCAGGCGTTCAGCCCGAAG
ATGAGGCCGAATATTATTGCACGCTGTGGTATTCTAACCGGTGGGTCTTCGGAGGAGGGACGAAACTTACTGTACTTGGAGGCGG
CGGTGACTACAAGGACGACGATGACAAAGGCGGCGGCAGCGAGGTCCAGTTGGTAGAATCCGGAGGTGGATTGGTTCAACCGG
GAGGAAGCCTTAAGCTTTCATGCGCCGCATCCGGATTCACCTTCAATAAGTACGCAATGAATTGGGTTAGACAGGCACCAGGTA
AAGGGTTGGAATGGGTGGCACGCATTAGGTCTAAATACGATTACAAGGACGACGACGACAAAGCTGACAGCGTAAAAGACCGA
TTTACGATAAGCCGGGATGATTCTAAGAACACTGCTTATTTGCAGATGAATAATTTGAAGACCGAGGATACTGCTGTCTATTATT
GCGTCCGCCACGGTAATTTTGGTAACTCTTACATTAGCTATTGGGCGTATTGGGGGCAGGGCACTCTGGTCACCGTCTCATCTGGC
GGAGGGGGCAGTGGCGGCGGGTCAGAGGTTCAACTTGTCGAGTCTGGAGGCGGTCTCGTACAACCGGGGAATAGTCTCCGACTC
TCTTGCGCTGCGTCCGGGTTCACGTTCTCAAAGTTTGGGATGTCTTGGGTTAGGCAAGCCCCAGGTAAGGGACTCGAATGGGTCA
GCAGCATCTCAGGCTCCGGCAGAGACACGTTGTATGCCGAAAGTGTCAAAGGGAGGTTCACAATCTCTCGGGACAATGCAAAAA
CCACCTTGTATCTCCAAATGAACTCACTCCGGCCTGAGGACACAGCAGTTTACTACTGTACGATAGGAGGGTCCCTTAGCGTATC
TTCTCAGGGAACTTTGGTAACGGTCAGCTCCCACCACCATCATCATCAC SEQ ID NO: 95

# 第54AD圖



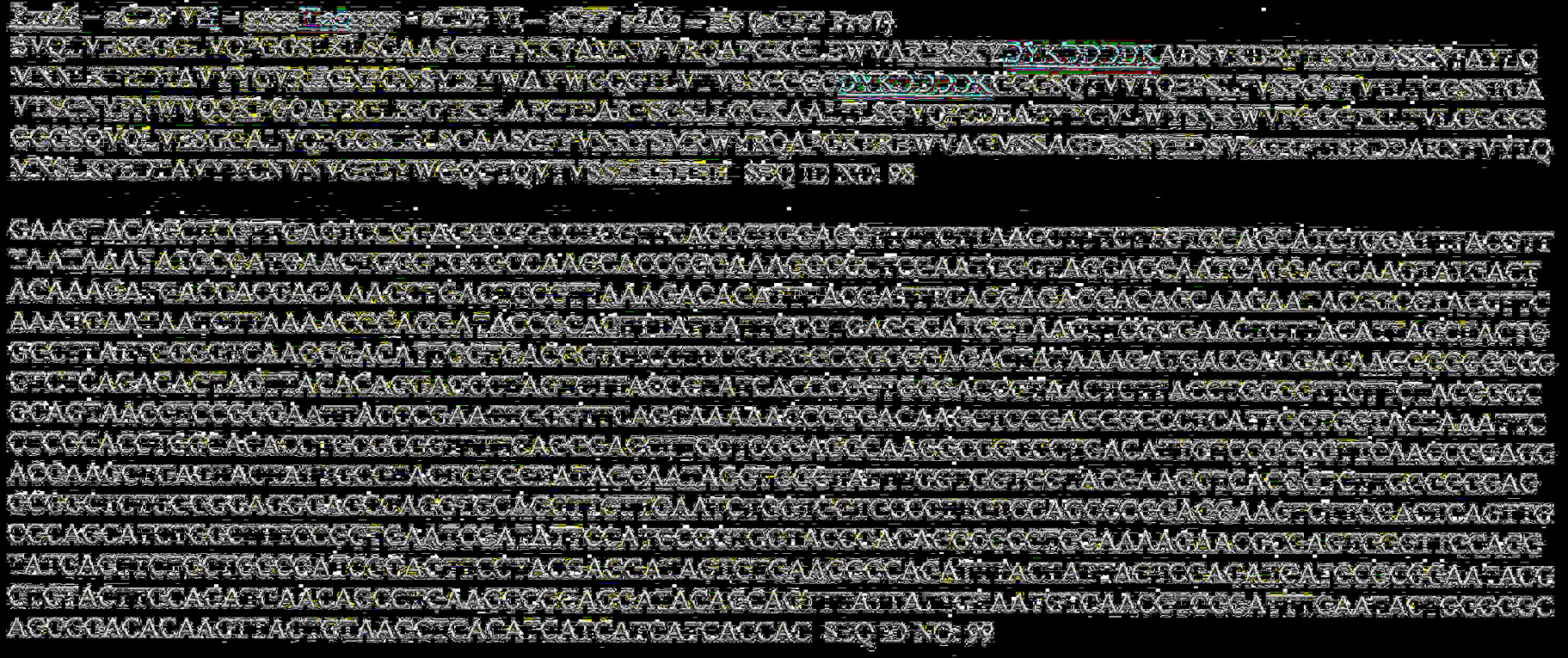
[illegible]



[illegible] SEQ ID NO: 96

[illegible] SEQ ID NO: 97

# 第54AE圖



[illegible] SEQ ID NO: 98

[illegible] SEQ ID NO: 99

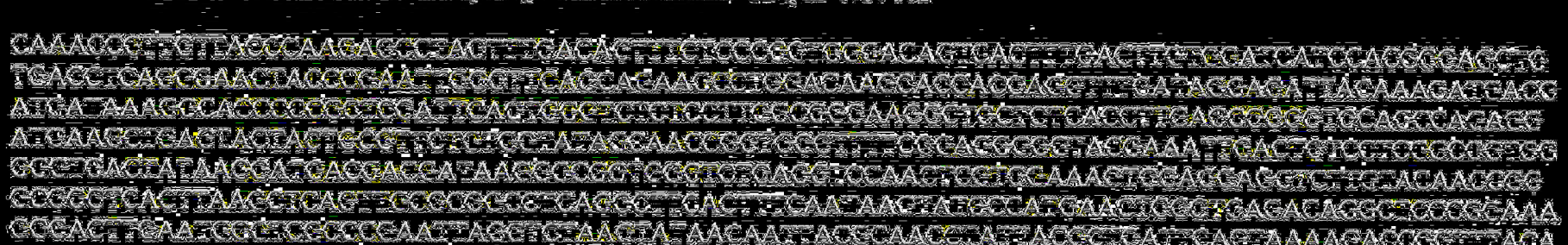
[illegible]

AVYYCVRSGNCLNSYSYWAFWCQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SEQ ID NO: 100

GACGTACAACGCGTCCATCAGCGCGCGCACTTCAACCCTCCTCCTCCTTCCTTCTCCCCCCCCAAACCCAAGT
CAACCGCTACCTCTATCCCTCGCACAGCCACCCCCCCCAAGCAGCCCGAATCCTTCCTCCAACTCCCAGCG
GAAGCAGTATCAAGACACCTACAGCCTCACCATCAGCAGCACTGACCCCGAAACACCCTTACTCCAAGCAA
CTTCAAGCCACACCACTACTCCCTTACTACTCAAGCAAAGCAGCACTTCAAATACTCCCCACAAGGCACCTCAACAGCG
CCCCCACACCCCTATACCACCAACCAACTCCCCCCCCTCCACACCACCCCCTTTCCCCCCCCAAAGC
ACCCCTACTCTCCCCCCTTCAGCCTCACCATCAAGCCCACTACTACCCCACTCCTCCCCCCCCCCCCT
CCCCCCAAAACTACTTCTCCCCCCCCCCCC



SEQ ID NO: 92

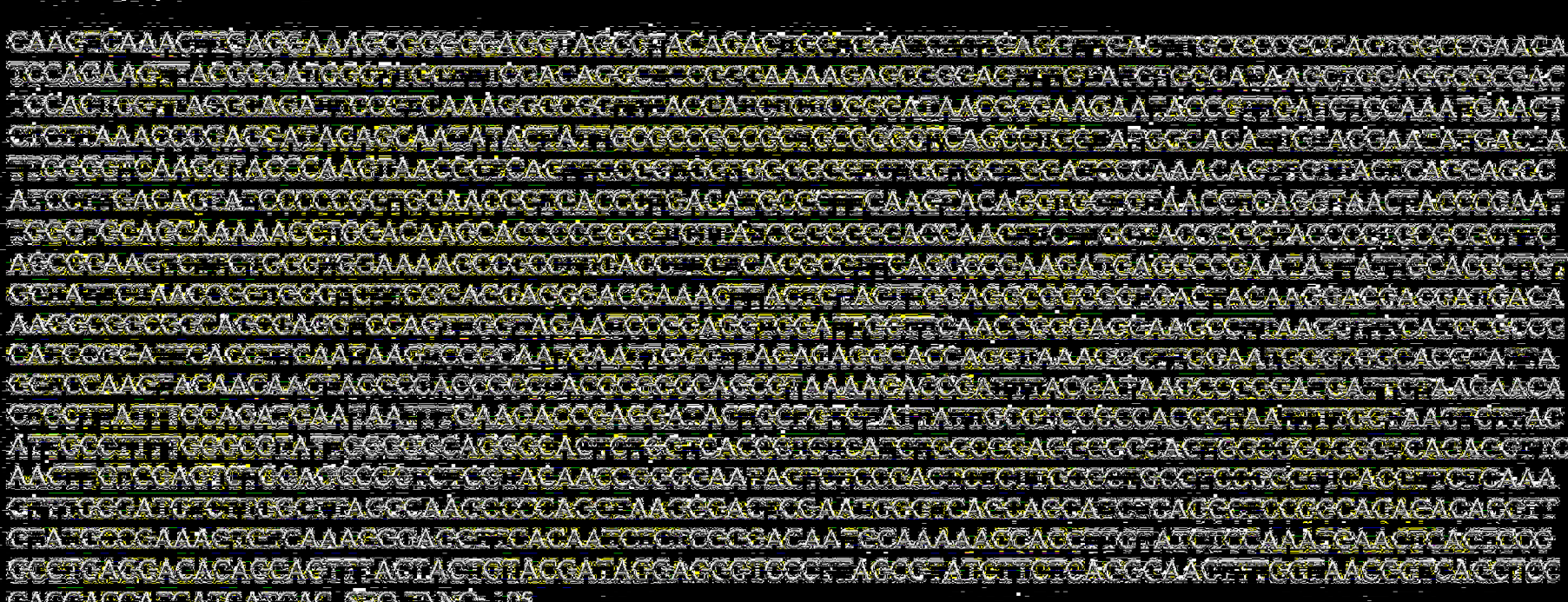


SEQ ID NO: 195

202302631



# 第54AE 圖



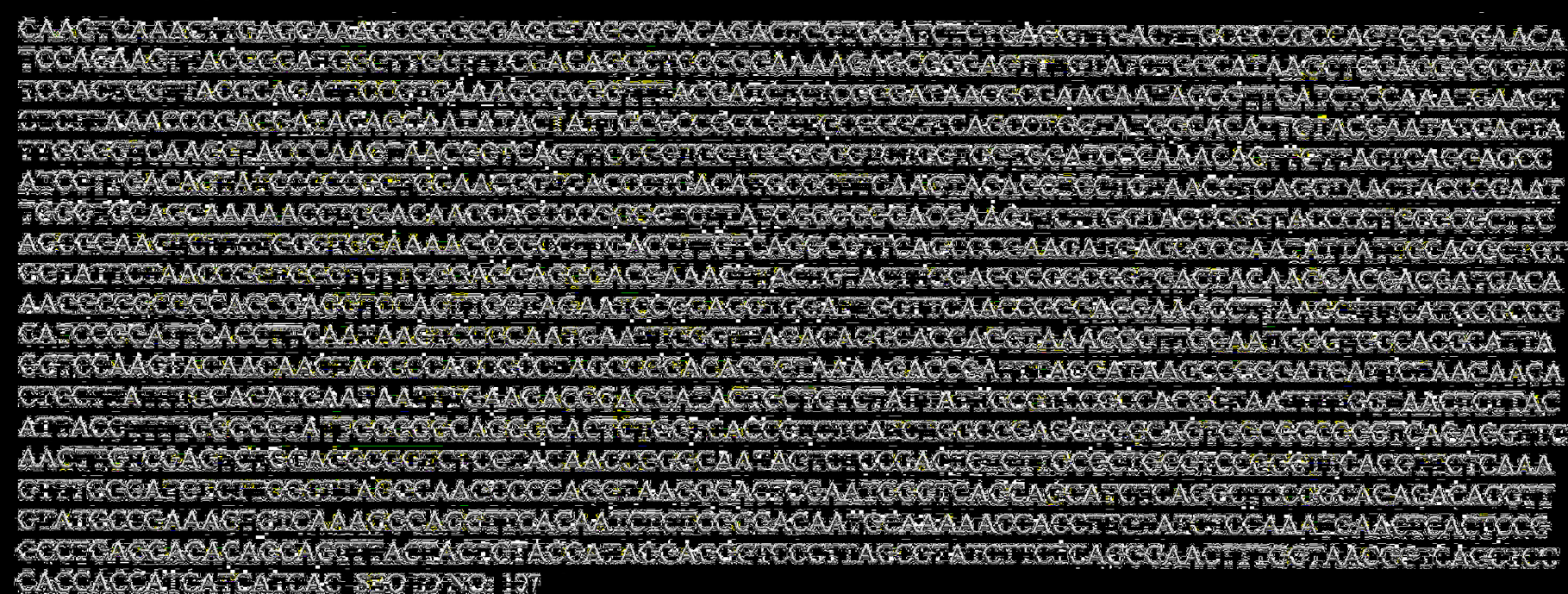
[illegible]
SEQ ID NO: 104

[illegible]
SEQ ID NO: 105

# 第54AI圖



[illegible]
SEQ ID NO: 106

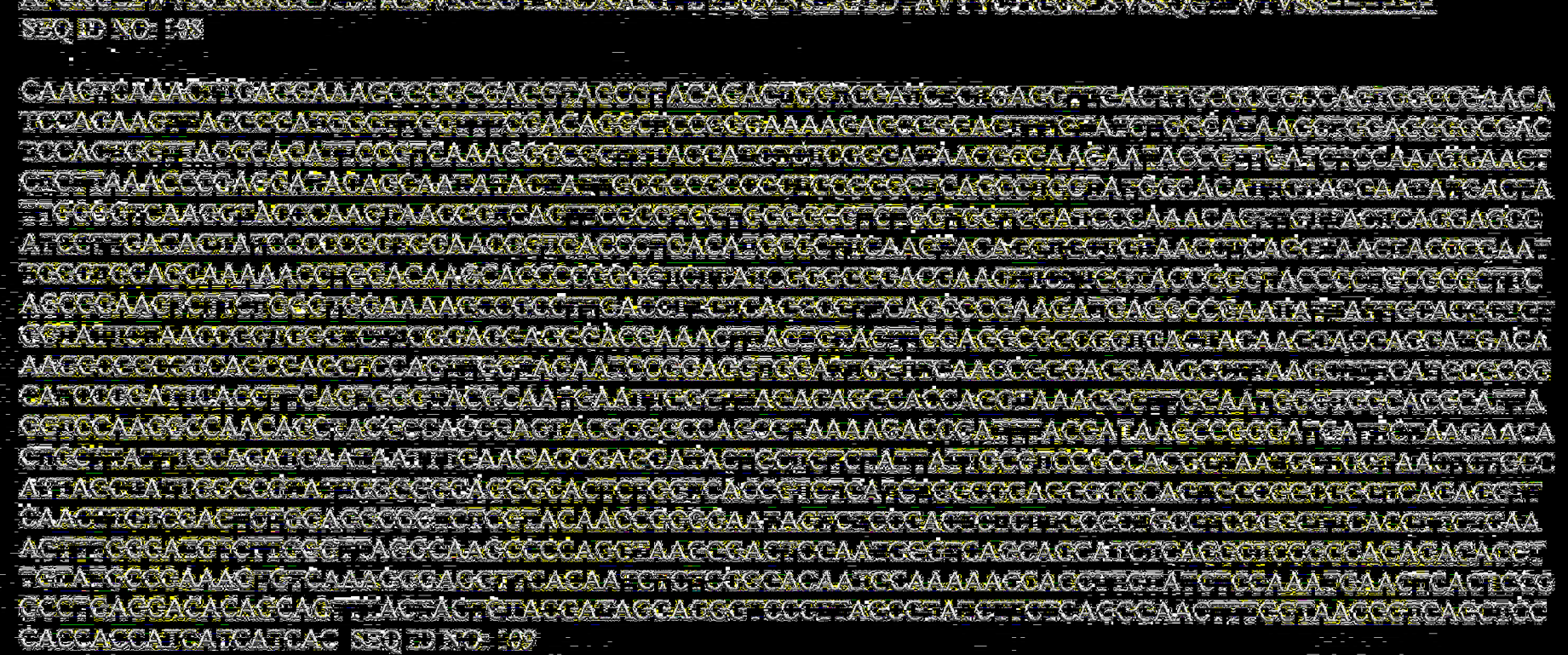


[illegible]
SEQ ID NO: 107

# 第54A1重



[illegible]
SEQ ID NO: 108

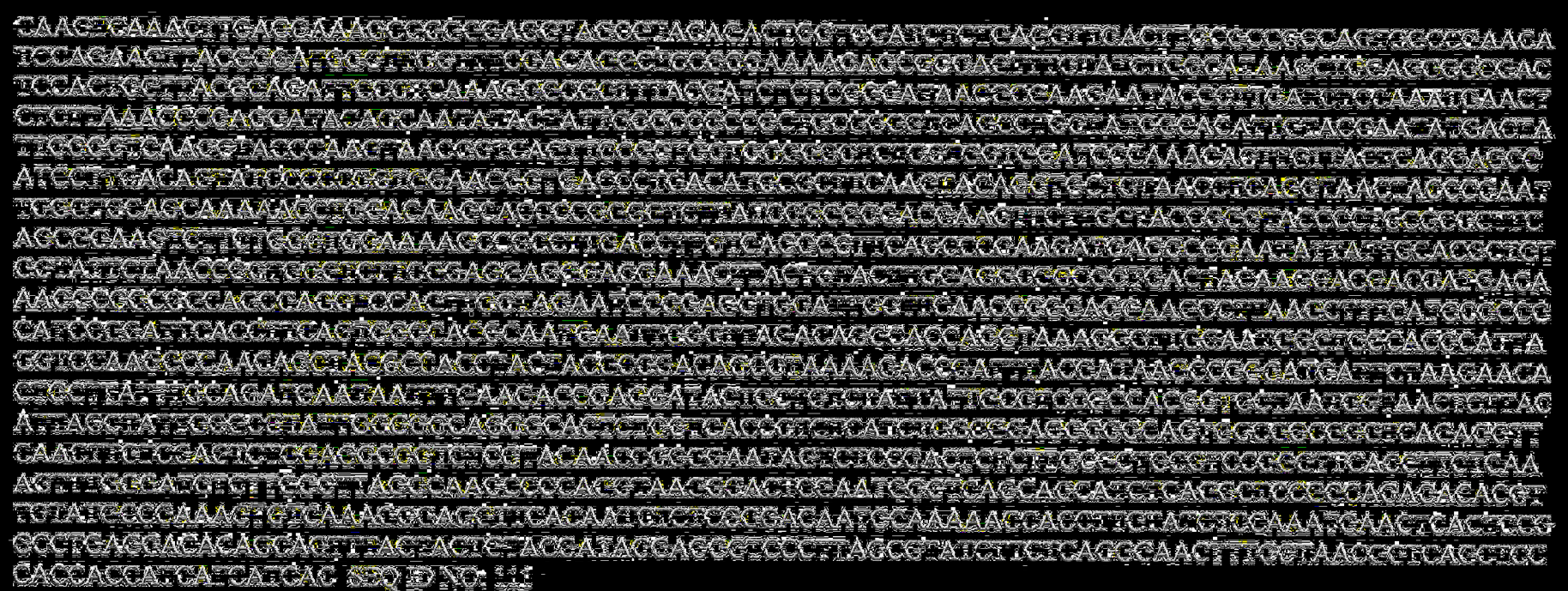


[illegible]
SEQ ID NO: 109

# 第 54AK 章



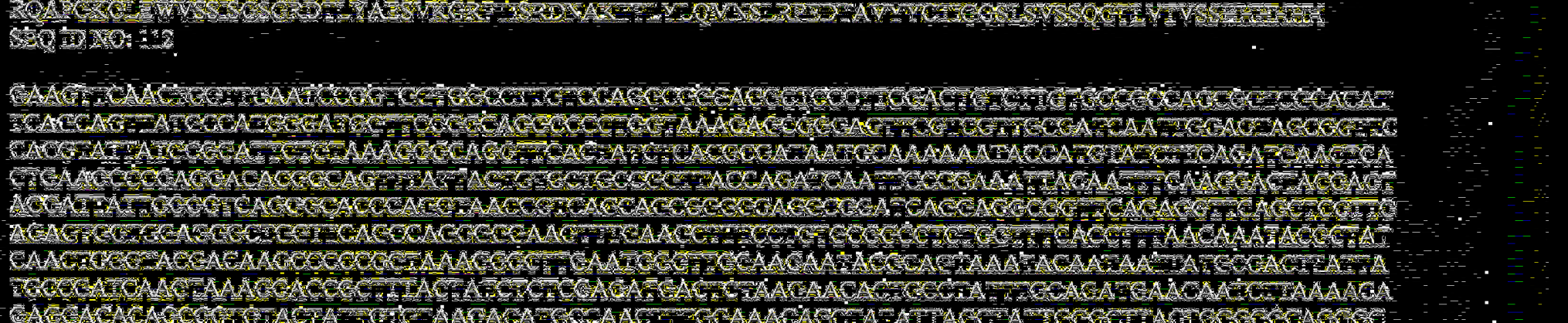
SEQ ID NO: 110



SEQ ID NO: 111



SEQ ID NO: 112



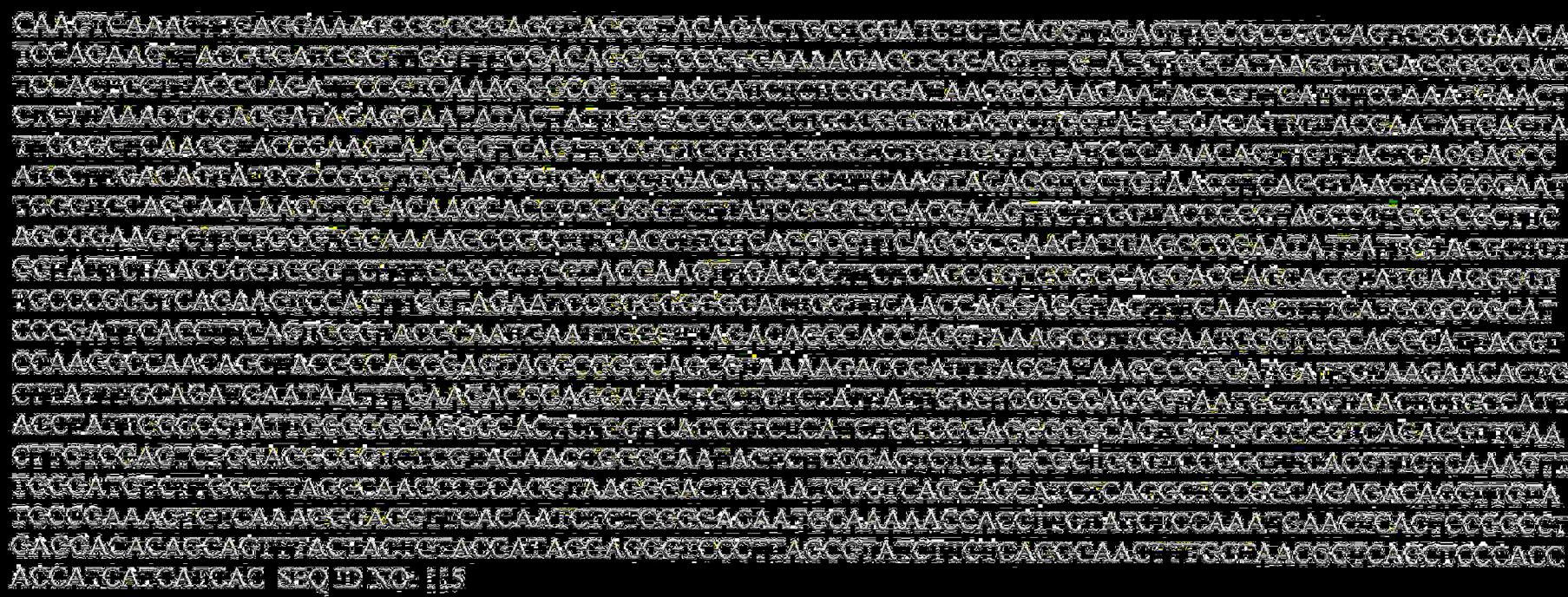
SEQ ID NO: 113

2023026631 13 Apr 2023



# 第54AM圖

[illegible]
SEQ ID NO: 114



[illegible]
ACCATCATCATCAC SEQ ID NO: 115

# 第54AN頁

[illegible] - [illegible] - [illegible] - SGGGKKLADEPGGGS - [illegible] - [illegible] - [illegible]

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVADWSSGGTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSL

KPEDTAVYYCAAGYQDSGAYYYRQYEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA

VRQAPGKGLEWVAVISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLGYCSSISCAVFDYWGQGTLV

TVSSGGGGKLADEPGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWFQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSL

LGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYS

MQWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTKGGSLSVSSQGTLVTVSSGGGGH

SEQ ID NO: 116

GAAGTCAATCTGGTTGAAGCGGCGGTGGCGGCCTTGTTCAGCCGGGAGGCTCCCTTCGCTTGTCTTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCAT

TCAGCAGTTACGCCATGTCGTGGGTTCGCCAGGCTCCGGGCAAAGGACTCGAGTGGGTTGCCGGCATCAATTGGAACGGTGGCAGCACC

CACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCACGCGACAACGCCAAAAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGC

GCCGAAGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGGCTACCAGGACTCCGGCGCCTACTACTACCGCTACGAGTACGACTACTGGGGC

ACCGGCACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGAAGTTCAGCTGGTT

GAGTCTGGTGGAGGCCTGGTTCAGCCTGGTGGTTCCCTGCGTCTGTCTTGTGCTGCTTCTGGTTTCACCTTCTCCTCCTACGCTATG

CACTGGGTTCGTCAGGCTCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGGTTTCTGCTATCTCCGGTTCCGGTGGTTCCACCTACTACGCTGACTCC

GTTAAAGGTCGTTTCACCATCTCCCGTGACAACTCCAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGTGCTGAAGACACCGCT

GTTTACTACTGCACCAAAGGTGGTTCCCTGTCCGTTTCCTCCCAGGGTACCCTGGTTACCGTTTCCTCCGGTGGTGGTGGTCACTAA

SEQ ID NO: 117

13,730,631

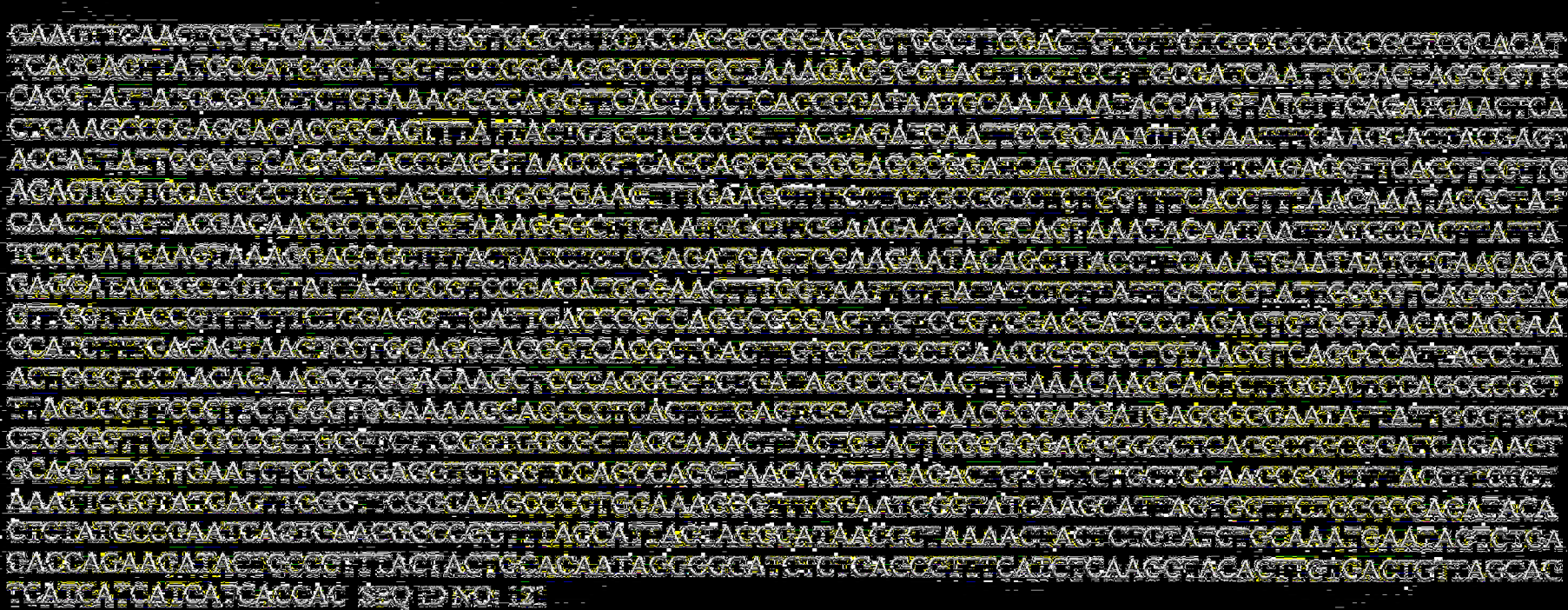
# 第54AO圖

[illegible]
SEQ ID NO: 118

[illegible]
SEQ ID NO: 119



SEQ ID NO: 72



SEQ ID NO: 73

2023026631

# 第 54AQ 言



SEQ ID NO: 122



ACCATCATCATCAC SEQ ID NO: 123



# 第54AR圖

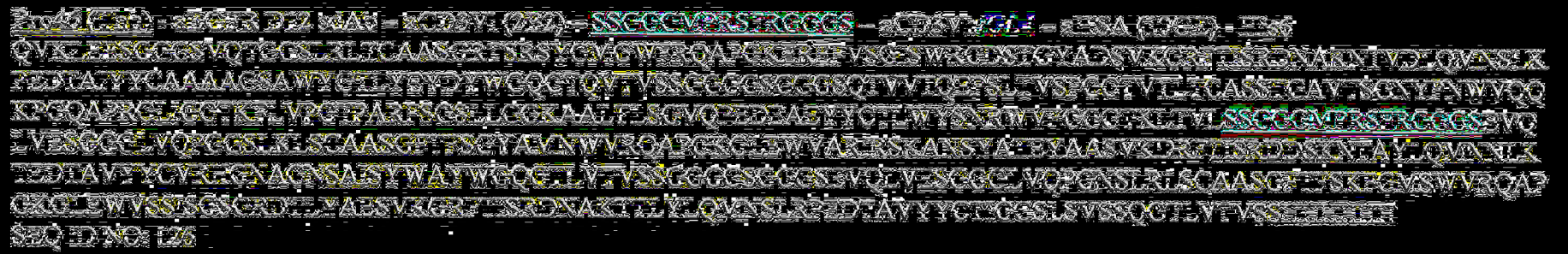
[illegible]
SEQ ID NO: 124



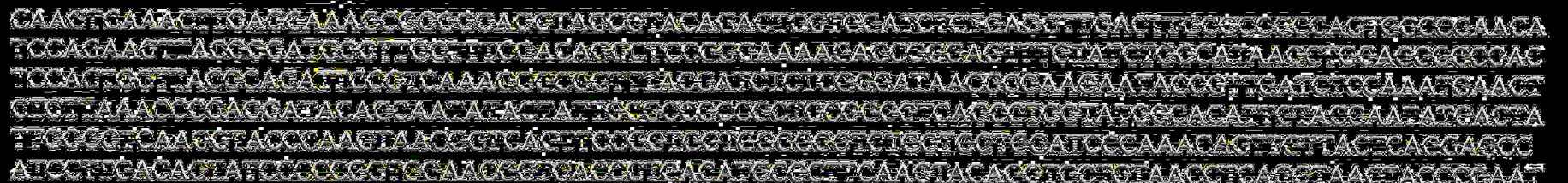
[illegible]
SEQ ID NO: 125

# 第54A8圖

[illegible]



SEQ ID NO: 126



[illegible]

SEQ ID NO: 127

# 第 55A 圖

| | |
|---|---|
| SEQ ID NO. 44 | Pro1 - aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh – His10 |
| | |
| SEQ ID NO. 46 | Pro2 – aCD3 Vl – aEGFR D12 sdAb – His10 |
| | |
| SEQ ID NO. 48 | Pro3 - aEGFR G8 sdAb – aCD3 scFv – aEGFR D12 sdAb – His10 |
| | |
| SEQ ID NO. 50 | Pro4 - aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh – Flag – aCD3 Vl – aEGFR D12 sdAb – His10 |
| | |
| SEQ ID NO. 52 | Pro5 – aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh – ggggFlaggggs – aCD3 Vli – aCD3Vhi – ggggFlaggggs – aCD3Vl - aEGFR D12 sdAb - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 54 | Pro6 – aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh – ggggFlaggggs – aCD3Vli - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 56 | Pro7 – aCD3Vhi – ggggFlaggggs – aCD3Vl - aEGFR D12 sdAb - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 58 | Pro8 - aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh – ggggFlaggggs – aCD3Vl - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 60 | Pro8 MS - aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh – GGGLSGR/SDNHGGS – aCD3Vl - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 62 | Pro8 ML - aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh – GGGSGGSGLSGR/SDNHGSGGSGGS – aCD3Vl - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 64 | Pro9 – aEGFR D12 sdAb – aCD3Vl – ggggFlagggs – aCD3Vhi – His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 66 | Pro10 – aCD3Vli – ggggFlaggggs – aCD3Vh – aEGFR G8 sdAb – His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 68 | Pro11 – aEGFR D12 sdAb – aCD3Vl – ggggFlaggggs – aCD3Vh – His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 70 | Pro12 – aCD3Vhi – ggggFlaggggs – aCD3Vl – aEGFR G8 sdAb – His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 72 | Pro14 – aEGFR D12 sdAb – aCD3Vh - ggggFlaggggs – aCD3Vli – His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 74 | Pro15 – aEGFR G8 sdAb – hOKT3 Vh – ggggFlaggggs – hOKT3Vl - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 76 | Pro16 – aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – ggggFlaggggs – aCD3Vli – aHSA (10GE) - His6 |
| | |

# 第 55B 圖

| | |
|---|---|
| SEQ ID NO. 78 | Pro17 – aHSA (10GE) – aCD3Vhi – ggggFlaggggs – aCD3Vl (2B2) - aEGFR D12 sdAb - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 80 | Pro18 – aEGFR G8 sdAb – aCD3Vl – ggggFlagggs – aCD3Vhi – His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 82 | Pro19 – aEGFR D12 sdAb – aCD3Vl (2B2) – ggggFlagggs – aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 84 | Pro19 CD3+ - aEGFR D12 sdAb – aCD3Vl (2B2) – ggggFlaggggs – aCD3Vh – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 86 | Pro20 - aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – ggggFlaggggs – aCD3VliGL – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 88 | Pro21 - aEGFR D12 sdAb – aCD3Vl (2B2) – ggggFlagggs – aCD3VhiGL1 – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 90 | Pro22 - aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – ggggFlaggggs – aCD3Vl (2B2) – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 92 | Prodent 23 – 血清裂解成二半<br>aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – ggggFlaggggs – aCD3Vli – aHSA (10GE) – ggggLVPRGSLGgggs-<br>aEGFR D12 sdAb – aCD3Vl (2B2)– ggggFlagggs – aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 94 | Prodent 24 – 腫瘤裂解成二半<br>aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – ggggFlaggggs – aCD3Vli – ggggFlaggggs-<br>aEGFR D12 sdAb – aCD3Vl (2B2)– ggggFlagggs – aCD3Vhi – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 96 | Pro25 – aGFP sdAb – aCD3 Vh – ggggFlaggggs - aCD3 Vli – H6 (aGFP Pro6) |
| | |
| SEQ ID NO. 98 | Pro26 – aCD3 Vhi – ggggFlaggggs - aCD3 Vl – aGFP sdAb – H6 (aGFP Pro7) |
| | |
| SEQ ID NO. 100 | Pro27 – aGFP sdAb – aCD3 Vl – ggggFlaggggs - aCD3 Vhi – H6 (aGFP Pro9) |
| | |
| SEQ ID NO. 102 | Pro28 – aCD3 Vli – ggggFlaggggs - aCD3 Vh – aGFP sdAb – H6 (aGFP Pro10) |
| | |

# 第 55C 圖

| | |
|---|---|
| SEQ ID NO. 104 | Pro29 - aEGFR D12 sdAb – aCD3Vl (2B2) – ggggFlaggggs – aCD3VhiGL2 – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 106 | Pro30 - aEGFR D12 sdAb – aCD3Vl (2B2) – ggggFlaggggs – aCD3VhiGL3 – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 108 | Pro31 - aEGFR D12 sdAb – aCD3Vl (2B2) – ggggFlaggggs – aCD3VhiGL4 – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 110 | Pro32 - aEGFR D12 sdAb – aCD3Vl (2B2) – ggggFlaggggs – aCD3VhiGL5 – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 112 | Pro39 (MMP9) - aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – SGGPGPAGMKGLPGS – aCD3VliGL – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 114 | Pro40 (MMP9) - aEGFR D12 sdAb – aCD3Vl (2B2) – SGGPGPAGMKGLPGS – aCD3VhiGL4 – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 116 | Pro41 (Mep) - aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – SGGGKKLADEPEGGS – aCD3VliGL – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 118 | Pro42 (Mep) - aEGFR D12 sdAb – aCD3Vl (2B2) – SGGGKKLADEPEGGS – aCD3VhiGL4 – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 120 | Pro43 (ST14#2) - aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – GGSFTRQARVVGGGS – aCD3VliGL – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 122 | Pro44 (ST14#2) - aEGFR D12 sdAb – aCD3Vl (2B2) – GGSFTRQARVVGGGS – aCD3VhiGL4 – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 124 | Pro45 (Thb) - aEGFR G8 sdAb – aCD3 Vh (2B2) – SSGGGMPRSFRGGGS – aCD3VliGL – aHSA (10GE) - His6 |
| | |
| SEQ ID NO. 126 | Pro46 (Thb) - aEGFR D12 sdAb – aCD3Vl (2B2) – SSGGGMPRSFRGGGS – aCD3VhiGL4 – aHSA (10GE) - His6 |

# 第 56A 圖

帶正電荷 scFv 連接子

| 名稱 | 序列 | 長度 | 電荷 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|---|---|
| Gly-Ser 15 | GGGGSGGGGSGGGGS | 15 | 0 | 44 |
| Whitlow linker | GSTSGSGKPGSGEGSTKG | 18 | +1 | 45 |
| 6paxA_1 (+A) | IRPRAIGGSKPRVA | 14 | +4 | 46 |
| +B | GKGGSGKGGSGKGGS | 15 | +3 | 47 |
| +C | GGKGSGGKGSGGKGS | 15 | +3 | 48 |
| +D | GGGKSGGGKSGGGKS | 15 | +3 | 49 |
| +E | GKGKSGKGKSGKGKS | 15 | +6 | 50 |
| +F | GGGKSGGKGSGKGGS | 15 | +3 | 51 |
| +G | GKPGSGKPGSGKPGS | 15 | +3 | 52 |
| +H | GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS | 20 | +4 | 53 |
| +I | GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS | 20 | +8 | 54 |

帶負電荷 scFv 連接子

| 名稱 | 序列 | 長度 | 電荷 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|---|---|
| Gly-Ser 15 | GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS | 20 | 0 | 55 |
| 3hsc_2 (-A) | STAGDTHLGGEDFD | 14 | -4 | 56 |
| -B | GEGGSGEGGSGEGGS | 15 | -3 | 57 |
| -C | GGEGSGGEGSGGEGS | 15 | -3 | 58 |
| -D | GGGESGGGESGGGES | 15 | -3 | 59 |
| -E | GEGESGEGESGEGES | 15 | -6 | 60 |
| -F | GGGESGGEGSGEGGS | 15 | -3 | 61 |
| -G | GEGESGEGESGEGESGEGES | 20 | -8 | 62 |

# 第 56B 圖

**scFv 連接子**

| | |
|---|---|
| GGGGSGGGGSGGGGS | (SEQ ID NO:63) |
| GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS | (SEQ ID NO:64) |
| GSTSGSGKPGSGEGSTKG | (SEQ ID NO:65) |
| PRGASKSGSASQTGSAPGS | (SEQ ID NO:66) |
| GTAAAGAGAAGGAAAGAAG | (SEQ ID NO:67) |
| GTSGSSGSGSGGSGSGGGG | (SEQ ID NO:68) |
| GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS | (SEQ ID NO:69) |