(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110770255 B
(45)授权公告日 2025.07.01

(21)申请号 201880038526.5
(22)申请日 2018.04.11
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110770255 A
(43)申请公布日 2020.02.07
(30)优先权数据
62/484,217 2017.04.11 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.12.10
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/027195 2018.04.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/191438 EN 2018.10.18
(73)专利权人 因荷布瑞克斯生物科学公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 B·P·埃克尔曼 M·D·卡普兰 K·M·维利斯 Q·德福罗 J·C·蒂默
(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
专利代理师 陈扬扬 钱文宇
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
(56)对比文件
WO 2016055593 A1,2016.04.14
US 2014072581 A1,2014.03.13
审查员 王雨洁

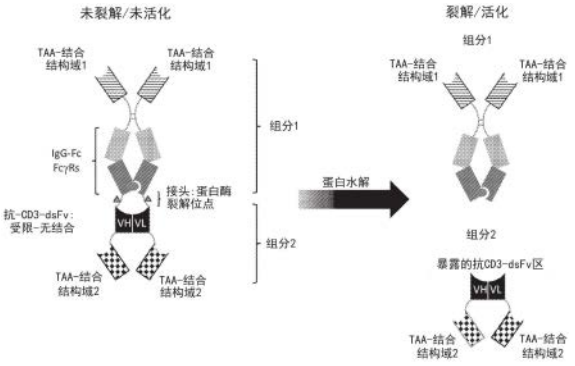
权利要求书4页 说明书104页
序列表99页 附图73页

(54)发明名称

具有受限CD3结合的多特异性多肽构建体及其使用方法

(57)摘要

本发明一般涉及具有受限CD3结合的多特异性多肽。在一些实施方式中,该多特异性多肽含有可裂解接头,其在裂解时产生双重效应物功能。还提供了制备此类多特异性多肽的方法和使用此类多特异性多肽于多种治疗性、诊断性和预防性适应症的方法。



CN 110770255 B

1.一种多特异性多肽构建体,该多特异性多肽构建体包含含有异二聚体免疫球蛋白Fc区的第一组分和包含CD3结合区的第二组分,其中:

所述第一组分和所述第二组分是由第一接头偶联,其中所述异二聚体Fc区位于所述CD3结合区的氨基末端;

所述CD3结合区是经二硫键稳定的抗CD3 Fv抗体片段(dsFv),其包含可变重链区(VH)和可变轻链区(VL),其中所述VH的氨基酸序列为SEQ ID NO: 44,并且所述VL的氨基酸序列为SEQ ID NO: 72,其中所述dsFv的VH连接至所述异二聚体免疫球蛋白Fc区的第一多肽,并且所述dsFv的VL连接至所述异二聚体免疫球蛋白Fc区的第二多肽;

所述异二聚体免疫球蛋白Fc区的第一多肽的氨基酸序列为SEQ ID NO:82并且所述异二聚体免疫球蛋白Fc区的第二多肽的氨基酸序列为SEQ ID NO:83;

所述第一组分包含一个或两个结合肿瘤相关抗原(TAA)的第一抗原结合结构域,其中所述第一抗原结合结构域是单一结构域抗体(sdAb),其中所述第一组分的每个抗原结合结构域由第二接头连接至所述Fc区的氨基末端,且

所述第二组分还包含一个或两个结合TAA的第二抗原结合结构域,其中所述第二抗原结合结构域是sdAb,其中所述第二组分的每个抗原结合结构域由第三接头连接至所述CD3结合区的羧基末端,所述第三接头是包含至少50%甘氨酸残基的长度为2-6个氨基酸的多肽。

2.如权利要求1所述的多特异性多肽构建体,其中所述CD3结合区结合CD3ε。

3.如权利要求1所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一组分包含第一抗原结合结构域且所述第二组分包含第二抗原结合结构域,其中此类抗原结合结构域中的每一种结合肿瘤相关抗原(TAA)。

4.如权利要求3所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一抗原结合结构域位于相对于所述多特异性多肽构建体的所述Fc区的氨基末端,且所述第二抗原结合结构域是位于相对于所述多特异性多肽构建体的所述CD3结合区的羧基末端。

5.如权利要求1所述的多特异性多肽构建体,其中所述异二聚体免疫球蛋白Fc区的所述第一多肽和所述异二聚体免疫球蛋白Fc区的所述第二多肽进一步包含非半胱氨酸残基修饰为半胱氨酸残基。

6.如权利要求1至5中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区包含含有至少一个修饰以增强FcRn结合的多肽。

7. 如权利要求1至5中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区包含含有至少一个氨基酸修饰的多肽,所述至少一个氨基酸修饰降低效应物功能和/或降低与选自Fcγ受体或C1q的效应物分子的结合。

8.如权利要求1至5中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述CD3结合区是单价的。

9.如权利要求1至5中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一接头是可裂解接头。

10.如权利要求9所述的多特异性多肽构建体,其中所述可裂解接头是多肽,其具有作为蛋白酶的底物的功能。

11.如权利要求10所述的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶是由免疫效应细胞、由

肿瘤或由肿瘤微环境中存在的细胞产生。

12.如权利要求10所述的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶是选自间质蛋白酶、基质金属蛋白酶(MMP)、颗粒酶B及其组合。

13. 如权利要求9所述的多特异性多肽构建体,其中所述可裂解接头包含通式P4 P3 P2 P1 ↓ P1'的氨基酸序列,其中P4是氨基酸I、L、Y、M、F、V或A;P3是氨基酸A、G、S、V、E、D、Q、N或Y;P2是氨基酸H、P、A、V、G、S或T;P1是氨基酸D或E;且P1'是氨基酸I、L、Y、M、F、V、T、S、G或A。

14. 如权利要求9所述的多特异性多肽构建体,其中所述可裂解接头包含通式P4 P3 P2 P1 ↓ P1'的氨基酸序列,其中P4是氨基酸I或L;P3是氨基酸E;P2是氨基酸P或A;P1是氨基酸D;且P1'是氨基酸I、V、T、S或G。

15. 如权利要求9所述的多特异性多肽构建体,其中所述可裂解接头包含氨基酸序列IEPDI (SEQ ID NO:136)、LEPDG (SEQ ID NO:152)、LEADT (SEQ ID NO:137)、IEPDG (SEQ ID NO:138)、IEPDV (SEQ ID NO:139)、IEPDS (SEQ ID NO:140)、IEPDT (SEQ ID NO:141)或LEADG (SEQ ID NO:153)。

16. 如权利要求9所述的多特异性多肽构建体,其中所述可裂解接头包含选自由SEQ ID NO:22、105-112、136-141、150-153组成的组的氨基酸序列。

17.如权利要求12所述的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶是间质蛋白酶。

18.如权利要求9所述的多特异性多肽构建体,其中:

所述可裂解接头包含序列RQARA或序列RQARV (SEQ ID NO: 156)。

19.如权利要求12所述的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶是MMP。

20. 如权利要求9所述的多特异性多肽构建体,其中所述可裂解接头包含通式P3 P2 P1 ↓ P1',其中P3是P、V或A;P2是Q或D;P1是A或N;且P1'是L、I或M。

21. 如权利要求9所述的多特异性多肽构建体,其中所述可裂解接头包含通式P3 P2 P1 ↓ P1',其中P3是P;P2是Q或D;P1是A或N;且P1'是L或I。

22. 如权利要求9所述的多特异性多肽构建体,其中所述可裂解接头包含选自由SEQ ID NO:22-24、105-113、117-118、136-144、148、150-158组成的组的氨基酸序列。

23.如权利要求1至5中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗原结合结构域与所述TAA产生单价、二价、三价或四价结合。

24. 如权利要求1至5中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗原结合结构域结合至选自以下的肿瘤相关抗原(TAA):1-92-LFA-3、5T4、α-4整联蛋白、α-V整联蛋白、α4β1整联蛋白、α4β7整联蛋白、AGR2、刘易斯-Y、艾普林J受体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5补体、C-242、CA9、CA19-9 (刘易斯a)、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132、IL-2RG、CD133、CD137、CD138、CD166、CD172A、CD248、CDH6、CEACAM5 、CEACAM6 (NCA-90)、CLAUDIN-3、CLAUDIN-4、cMet、胶原、Cripto、CSFR-1、CTLA-4、CTGF、CXCL10、CXCL13、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CYR61、DL44、DLK1、DLL3、DLL4、DPP-4、DSG1、EDA、EDB、EGFR、内皮素B受体(ETBR)、ENPP3、EpCAM、EPHA2、EPHB2、ERBB3、RSV的F蛋白、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、叶酸盐受体α (FRα)、GAL3ST1、G-CSF、G-CSFR、GD2、GITR、GLUT1、GLUT4、GM-

CSF、GM-CSFR、GP IIb受体、GP IIIa受体、Gp130、GPIIB、GPIIIA、GPNMB、GRP78、HER2、HER3、HER4、HGF、hGH、HVEM、玻尿酸酶、ICOS、IFNα、IFNβ、IFNγ、IgE、IgE受体(FceRI)、IGF、IGF1R、IL1B、IL1R、IL2、IL11、IL12、IL12p40、IL-12R、IL-12Rβ1、IL13、IL13R、IL15、IL17、IL18、IL21、IL23、IL23R、IL27、IL27R、IL29、IL-31R、IL31、IL31R、IL2R、IL4、IL4R、IL6、IL6R、胰岛素受体、锯齿状1、锯齿状2、KISS1-R、LAG-3、LIF-R、刘易斯X、LIGHT、LRP4、LRRC26、Ly6G6D、LyPD1、MCSP、间皮素、MRP4、MUC1、黏蛋白-16 (MUC16)、Na/K ATP酶、NGF、纳卡斯特罗因蛋白、Notch 1、Notch 2、Notch 3、Notch 4、NOV、OSM-R、OX-40、PAR2、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGFRα、PDGFRβ、PD-1、PD-L1、PD-L2、磷脂酰基-丝氨酸、P1GF、PSCA、PSMA、PSGR、RAAG12、RAGE、SLC44A4、磷酸神经鞘胺醇1、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TAPA1、TEM-8、TGFβ、TIGIT、TIM-3、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TMEM31、TNFα、TNFR、TNFRS12A、TRAIL-R1、TRAIL-R2、运铁蛋白、运铁蛋白受体、TRK-A、TRK-B、uPAR、VAP1、VCAM-1、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、VISTA、WISP-1、WISP-2和WISP-3。

25. 如权利要求1至5中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗原结合结构域结合至EGFRviii。

26.如权利要求1至5中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中多特异性多肽构建体至少包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合至相同TAA;或

所述多特异性多肽构建体至少包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合不同TAA。

27. 如权利要求1至5中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含所述第一抗原结合结构域与所述Fc区之间的第二接头以及所述CD3结合区与所述第二抗原结合结构域之间的第三接头,且其中所述多特异性多肽构建体自N-末端至C-末端具有如下结构配置:第一抗原结合结构域 - 第二接头- Fc区 -第一接头 -CD3结合区 -第三接头 - 第二抗原结合结构域。

28.一种多核苷酸,其编码如权利要求1至27中任一项所述多特异性多肽构建体。

29.一种载体,其包含如权利要求28所述的多核苷酸。

30.一种细胞,其包含一或多种如权利要求28所述的多核苷酸。

31.一种细胞,其包含如权利要求29所述的载体。

32.一种产生多特异性多肽构建体的方法,所述方法包括向细胞中引入一或多种如权利要求28所述的多核苷酸以及在产生所述多特异性多肽构建体条件下培养所述细胞。

33.一种产生多特异性多肽构建体的方法,所述方法包括向细胞中引入一或多种如权利要求29所述的载体以及在产生所述多特异性多肽构建体条件下培养所述细胞。

34.一种产生多特异性多肽构建体的方法,所述方法包括在适于如权利要求30或31所述的细胞产生所述多特异性多肽构建体的条件下培养所述细胞。

35.一种医药组合物,其包含如权利要求1至27中任一项所述的多特异性多肽构建体和医药上可接受的载剂。

36.如权利要求1至27中任一项所述的多特异性多肽构建体在制备用于治疗对象的癌症的药物中的用途。

37.如权利要求35所述的医药组合物在制备用于治疗对象的癌症的药物中的用途。

38.如权利要求36至37中任一项所述的用途,其中所述对象是人类。

具有受限CD3结合的多特异性多肽构建体及其使用方法

[0001] 本申请要求2017年4月11日提交的题为“具有受限CD3结合的多特异性多肽构建体及其使用方法”的美国临时申请号62/484,217的优先权,其全部内容通过引用纳入本文。

[0002] 序列表以引用方式纳入

[0003] 本发明是以电子格式与序列表一起提出申请。序列表以标题为744952000141SeqList.TXT的文件形式提供,其创建于2018年4月11日,其大小为174,179字节。序列表的电子格式中的信息以引用方式全文纳入。

技术领域

[0004] 本发明一般涉及具有受限CD3结合的多特异性多肽。在一些实施方式中,该多特异性多肽含有可裂解接头,其在裂解时产生双重效应物功能。还提供了多特异性制备此类多特异性多肽的方法和使用此类多特异性多肽于多种治疗性、诊断性和预防性适应症的方法。

现有技术

[0005] 会导致靶细胞耗尽的治疗性抗体通常依赖于经由与Fc-γ-受体(FcγR)和补体蛋白的相互作用介导的效应物功能。表达FcγR的效应细胞主要是先天免疫系统的那些。T细胞并非参与抗体介导的靶细胞耗尽的直接效应细胞。

[0006] CD3(分化簇3)T细胞辅受体是由四条不同多肽链(称为ε、γ、δ和ζ链)组成的多聚体蛋白。CD3复合物用作与T细胞受体(TCR)的抗原结合a/b链非共价缔合的T细胞受体的信号传导模块。

[0007] 由于CD3的直接接合导致T细胞活化,所以其是各种治疗和/或诊断性适应症的合意的靶标。因此,需要靶向CD3/TCR路径的抗体和治疗剂。

发明内容

[0008] 本发明提供显示受限CD3结合的多特异性多肽构建体。这是有因这是有因方面此类细胞因子细胞因子由此这是有因在一些实施方式中,多特异性多肽构建体由包含免疫球蛋白Fc区的第一组分和包含CD3结合区的第二组分组成,其中第一和第二组分由接头偶合或可操作连接,其中Fc区位于CD3结合区的N-末端;且第一和第二组分中的一种或二种包含结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域。在一些实施方式中,呈无活性状态的多特异性多肽构建体由第一组分和第二组分组成,其中第一和第二组分可操作连接,其中第一和第二组分中的每一种包含结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域,其中第一组分包含Fc区,其中第二组分包含CD3结合区,且其中第一和第二组分由可裂解接头偶合。在一些实施方式中,CD3结合区结合CD3(CD3ε)。

[0009] 在一些实施方式中,抗原结合结构域位于相对于多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和/或位于相对于CD3结合区的羧基末端。在一些实施方式中,第一组分包含第一抗原结合结构域且第二组分包含第二抗原结合结构域,其中抗原结合结构域中的每一种结合

肿瘤相关抗原(TAA)。在一些情况下,第一抗原结合结构域位于多特异性构建体的氨基末端且第二抗原结合结构域位于多特异性构建体的羧基末端。在一些实施方式中,第一抗原结合结构域位于相对于多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和/或位于相对于CD3结合区的羧基末端。

[0010] 本文提供多特异性多肽构建体,其中多特异性构建体自N-末端至C-末端依次包含:结合至肿瘤相关抗原(TAA)的第一抗原结合结构域;免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3(CD3ε)的CD3结合区;和结合肿瘤相关抗原(TAA)的第二抗原结合结构域。也提供多特异性多肽构建体,其中多特异性构建体自N-末端至C-末端依次包含:免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3(CD3ε)的CD3结合区;和结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域。提供多特异性多肽构建体,其中多特异性构建体自N-末端至C-末端依次包含:结合至肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域;免疫球蛋白Fc区;接头;和结合CD3(CD3ε)的CD3结合区。

[0011] 本发明提供至少结合CD3和第二抗原(例如肿瘤相关抗原(TAA))的多特异性多肽构建体。本文提供的多特异性多肽构建体至少包括第一组分,其包括结合连接至免疫球蛋白Fc区的抗原的抗原结合结构域的一或多个拷贝;第二组分,其包括至少一个结合CD3的结合结构域(本文中称作抗CD3结合结构域或CD3结合区,其在本文中可互换使用)的一或多个拷贝;及联接第一组分与第二组分的接头,例如可裂解接头。

[0012] Fc区位于CD3结合区的N-末端会降低或防止了CD3结合区结合CD3的能力。在一些实施方式中,在未裂解/无活性状态下,多特异性多肽构建体的第一组分(1号组分)及第二组分(2号组分)是经连接且不容许结合至CD3,除非抗原结合结构域结合至其同源抗原。这是有利的,因其防止CD3结合区与T细胞系统性结合且使其集中于抗原表达的位点。这是有益的,因其消除外周T细胞的主要结合槽,从而容许在抗原表达位点(例如肿瘤细胞或肿瘤微环境)更有利的分布及定位。在一些情况下,通过容纳联接1号组分与2号组分的可裂解接头可放大或增加CD3的结合和/或接合,其中当可裂解接头(例如)通过蛋白分解裂解时,使得由CD3结合区的结合会增加。

[0013] 在非活性、也即未裂解状态下,多特异性多肽构建体的1号组分及2号组分可操作连接CD3且不结合或以其他方式接合CD3,除非抗原结合结构域结合至其同源抗原。在一些实施方式中,未裂解的多特异性多肽构建体能与Fcγ R相互作用并介导先天免疫效应物功能,例如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)及抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。在一些实施方式中,未裂解的多特异性多肽构建体能与补体蛋白(即C1q)相互作用并介导补体依赖性细胞毒性。

[0014] 本公开内容的多特异性多肽构建体通常具有一个以上抗原结合结构域。在其中多特异性多肽构建体含有可裂解接头的所提供方面中,一旦联接第一及第二组分的接头由(例如)蛋白酶裂解,则每一组分维持至少一个抗原结合结构域。第一组分(即,1号组分)至少含有Fc区和抗原结合结构域。第二组分(即,2号组分)至少含有抗CD3结合结构域和抗原结合结构域。

[0015] 可裂解接头内(例如)通过蛋白分解的裂解物理分离1号组分与2号组分,此类组分各自具有治疗用途,但取决于不同效应细胞。1号组分含有至少一个抗原结合结构域和Fc区。在一些实施方式中,1号组分能引发先天免疫效应物功能,例如ADCC、细胞因子释放、脱粒化和/或吞噬作用。2号组分至少含有结构域CD3结合区及抗原结合结构域,前者能结合

CD3(在与1号组分分离时)。2号组分能在抗原表达细胞与T细胞之间形成免疫突触。此共接合介导抗原依赖性T细胞活化、细胞毒性、细胞因子释放、脱粒化和增殖。在裂解/活化状态下,2号组分不可操作连接至1号组分的Fc区且由此2号组分不能与FcRn相互作用,且若定位于无表达抗原的细胞的位点,则具有增强的血清清除率。这是有利的,因其限制活化抗CD3结合结构域的全身暴露且直接集中至表达抗原的组织(例如肿瘤细胞或肿瘤微环境)中。

[0016] 在一些实施方式中,多特异性多肽呈无活性状态,也即未裂解状态,且在多特异性多肽构建体与裂解状态相比呈未裂解状态时,CD3结合区与CD3的结合受到抑制或显著降低。在一些实施方式中,多特异性多肽呈活化状态,且第一和第二组分不可操作连接。在一些实施方式中,多特异性多肽呈活化状态,也即裂解状态,且第二组分结合CD3的ε链(CD3ε)和肿瘤相关抗原(TAA)。

[0017] 在一些方面中,抗原结合结构域,或独立地各抗原结合结构域选自抗体或抗原结合片段,天然同源结合伴侣,抗运载蛋白(Anticalin,经改造脂质运载蛋白),Darpin,Fynomer,Centyrin(经改造纤连蛋白III结构域),半胱氨酸-杵结构域,Affilin,Affibody或经改造CH3结构域。在一些实施方式中,天然同源结合伴侣包含TAA的天然同源结合伴侣的胞外结构域或其结合片段,或其显示出对TAA的结合活性的变体。

[0018] 在一些方面中,抗原结合结构域,或独立地各抗原结合结构域包含TAA的天然同源结合伴侣的胞外结构域或其结合片段,或其显示出对TAA的结合活性的变体。

[0019] 在一些实施方式中,第一组分包含抗原结合结构域的一个或多个拷贝。在一些实施方式中,第一组分包含至少两个抗原结合结构域,如两个抗原结合结构域。在一些实施方式中,第一组分的至少两个抗原结合结构域结合至相同TAA。在一些情况下,第一组分的至少两个抗原结合结构域结合相同TAA上的不同表位。在一些情况下,第一组分的至少两个抗原结合结构域结合相同TAA的相同表位。在一些实施方式中,第一组分的至少两个抗原结合结构域结合不同TAA。

[0020] 在一些实施方式中,第一组分的抗原结合结构域,其在一些情况下是第一抗原结合结构域,包括抗体或其抗原结合片段的一或多个拷贝。在一些实施方式中,第一组分的抗原结合结构域,如第一抗原结合结构域包括选自由以下组成的组的抗体或其抗原结合片段的一或多个拷贝:Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、scFv、scAb、dAb、单一结构域重链抗体和单一结构域轻链抗体。在一些实施方式中,第一抗原结合结构域包括一或多个单一结构域抗体(sdAb)片段(例如V_HH、V_{NAR}、经改造V_H或V_K结构域)的一或多个拷贝。V_HH可自骆驼科动物仅重链抗体生成。V_{NAR}可自软骨鱼类仅重链抗体生成。已执行各种方法自常用异二聚体V_H和V_K结构域生成单体sdAb,包括特异性种系家族的表面改造和选择。

[0021] 在一些实施方式中,第一组分的抗原结合结构域,如第一抗原结合结构域结合抗原,如肿瘤相关抗原(TAA)。在一些实施方式中,TAA是选自由以下组成的组:1-92-LFA-3、α-4整联蛋白、α-V整联蛋白、α4β1整联蛋白、α4β7整联蛋白、AGR2、抗刘易斯-Y(Anti-Lewis-Y)、艾普林J受体(Apelin J receptor)、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5补体、C-242、CA9、CA19-9(刘易斯a)、碳酸酐酶9、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132、(IL-2RG)、CD133、CD137、CD138、CD166、CD172A、CD248、CDH6、CEACAM5(CEA)、CEACAM6(NCA-90)、密连蛋

白-3、密连蛋白-4、cMet、胶原、Cripto、CSFR、CSFR-1、CTLA-4、CTGF、CXCL10、CXCL13、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CYR61、DL44、DLK 1、DLL3、DLL4、DPP-4、DSG1、EDA、EDB、EGFR、EGFRviii、内皮素B受体(ETBR)、ENPP3、EpCAM、EPHA2、EPHB2、ERBB3、RSV的F蛋白、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、叶酸盐受体α(FRα)、GAL3ST1、G-CSF、G-CSFR、GD2、GITR、GLUT1、GLUT4、GM-CSF、GM-CSFR、GP IIb/IIIa受体、Gp 130、GPIIB/IIIA、GPNMB、GRP78、HER2/neu、HER3、HER4、HGF、hGH、HVEM、玻尿酸酶、ICOS、IFNα、IFNβ、IFNγ、IgE、IgE受体(FceRI)、IGF、IGF1R、IL1B、IL1R、IL2、IL11、IL12、IL12p40、IL-12R、IL-12Rβ1、IL13、IL13R、IL15、IL17、IL18、IL21、IL23、IL23R、IL27/IL27R(wsx1)、IL29、IL-31R、IL31/IL31R、IL2R、IL4、IL4R、IL6、IL6R、胰岛素受体、锯齿状配体、锯齿状1、锯齿状2、KISS 1-R、LAG-3、LIF-R、刘易斯X、LIGHT、LRP4、LRRC26、Ly6G6D、LyPD1、MCSP、间皮素、MRP4、MUC1、黏蛋白-16(MUC16、CA-125)、Na/K ATP酶、NGF、纳卡斯特罗因蛋白(Nicastrin)、Notch受体、Notch 1、Notch 2、Notch 3、Notch 4、NOV、OSM-R、OX-40、PAR2、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGFRα、PDGFRβ、PD-1、PD-L1、PD-L2、磷脂酰基-丝氨酸、P1GF、PSCA、PSMA、PSGR、RAAG12、RAGE、SLC44A4、磷酸神经鞘胺醇1、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TAPA1、TEM-8、TGFβ、TIGIT、TIM-3、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TMEM31、TNFα、TNFR、TNFRS12A、TRAIL-R1、TRAIL-R2、运铁蛋白、运铁蛋白受体、TRK-A、TRK-B、uPAR、VAP1、VCAM-1、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、VISTA、WISP-1、WISP-2和WISP-3。

[0022] 在一些实施方式中,Fc区是同二聚体Fc区。在一些实施方式中,Fc区是异二聚体Fc区。

[0023] 在一些实施方式中,第一组分的免疫球蛋白Fc区是选自由以下组成的组的IgG同种型:IgG1同种型、IgG2同种型、IgG3同种型和IgG4亚类。在一些实施方式中,Fc区是人类IgG1、人类IgG2、人类IgG3或人类IgG4的Fc区,或是其免疫活性片段。在一些实施方式中,Fc区包含含有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列相同性的氨基酸序列的多肽。在一些情况下,Fc区包含含有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列相同性的氨基酸序列的多肽。在任何此类实施方式中的一些中,Fc区包含含有SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列相同性的氨基酸序列的多肽。在一些实施方式中,Fc区包含含有SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列相同性的氨基酸序列的多肽。

[0024] 在一些实施方式中,免疫球蛋白Fc区是包含选自由SEQ ID NO:1-6组成的组的氨基酸序列的多肽。在一些实施方式中,免疫球蛋白Fc区是包含与选自由SEQ ID NO:1-6组成的组的氨基酸序列具有至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的多肽。

[0025] 在一些实施方式中,免疫球蛋白Fc区是包含源自选自由SEQ ID NO:1-6组成的组的氨基酸序列的氨基酸序列的多肽。在一些实施方式中,免疫球蛋白Fc区是包含源自选自由SEQ ID NO:1-6组成的组的氨基酸序列的氨基酸序列的多肽,其包含一或多个修饰。在一些实施方式中,免疫球蛋白Fc区是包含源自选自由SEQ ID NO:1-6组成的组的氨基酸序列

的氨基酸序列的多肽,其包含一或多个修饰以防止糖基化,改变Fc受体相互作用,减少Fc受体结合,增强与CD32A的相互作用,减少补体蛋白C1q结合,延长半衰期,增强FcRn结合,改变抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),诱导异二聚化,防止二聚化,稳定CH3:CH3表面的同二聚化及其组合。

[0026] 在一些实施方式中,Fc是异二聚体Fc。在一些情况下,与同二聚体Fc区的多肽相比,可选地与SEQ ID NO:1中所示的Fc多肽或其免疫活性片段相比,异二聚体Fc区的一种或两种Fc多肽包含至少一个修饰以诱导异二聚化。在一些实施方式中,异二聚体Fc的Fc多肽中的每一种独立地包含至少一个氨基酸修饰。在一些情况下,异二聚体Fc的Fc多肽中的每一种包含杵臼结构(knob-into-hole)修饰或包含电荷突变以增加多肽的静电互补。在一些实施方式中,氨基酸修饰是杵臼结构修饰。

[0027] 在一些实施方式中,异二聚体Fc的第一Fc多肽包含选自Thr366Ser、Leu368Ala、Tyr407Val及其组合的修饰,且异二聚体Fc的第二Fc多肽包含修饰T366W。在一些情况下,第一和第二Fc多肽进一步包含非半胱氨酸残基至半胱氨酸残基的修饰,其中第一多肽的修饰是在位置Ser354和Y349中的一种,且第二Fc多肽的修饰是在位置Ser354和Y349中的另一种。

[0028] 在一些实施方式中,氨基酸修饰是电荷突变以增加多肽的静电互补。在一些实施方式中,第一和/或第二Fc多肽包含互补位置的修饰,其中修饰是用具有相反电荷的氨基酸置换另一多肽的互补氨基酸。在一些实施方式中,第一或第二多肽包含互补位置的修饰,其中修饰是用具有相反电荷的氨基酸置换另一多肽的互补氨基酸。在一些实施方式中,至少第一或第二Fc多肽各自包含互补位置的修饰,其中修饰是用具有相反电荷的氨基酸置换另一多肽的互补氨基酸。在一些实施方式中,第一和第二Fc多肽各自包含互补位置的修饰,其中修饰是用具有相反电荷的氨基酸置换另一多肽的互补氨基酸。

[0029] 在一些实施方式中,异二聚体Fc的第一或第二Fc多肽中的一种进一步包含残基Ile253的修饰。在一些情况下,修饰是Ile253Arg。在一些实施方式中,异二聚体Fc的第一或第二Fc多肽中的一种进一步包含残基His435的修饰。在一些情况下,修饰是His435Arg。在一些实施方式中,Fc区包含无Lys447的多肽。

[0030] 在一些实施方式中,Fc区内的修饰降低与Fc-受体-γ受体的结合,但对与新生Fc受体(FcRn)的结合具有最小影响。在一些实施方式中,突变或修饰的Fc多肽包括以下突变:使用Kabat编号系统,Met252Tyr和Met428Leu或Met252Tyr和Met428Val(M252Y、M428L或M252Y、M428V)。

[0031] 在一些实施方式中,Fc区包含多肽,其包含至少一个修饰以增强FcRn结合。在一些实施方式中,修饰在选自由以下组成的组的位置:Met252、Ser254、Thr256、Met428、Asn434及其组合。在一些情况下,修饰在选自由以下组成的组的位置:Met252Y、Ser254T、Thr256E、Met428L、Met428V、Asn434S及其组合。在一些特定实施方式中,修饰在位置Met252和位置Met428。在一些情况下,修饰是Met252Y和Met428L。在一些情况下,修饰是Met252Y和Met428V。

[0032] 在一些实施方式中,异二聚体Fc的第一多肽包含SEQ ID NO:82、86、94或96中的任一种中所示的氨基酸序列,且异二聚体Fc的第二多肽包含SEQ ID NO:83、87、90、92、98或100中的任一种中所示的氨基酸序列。

[0033] 在一些实施方式中,Fc区包含含有至少一个氨基酸修饰的多肽,该氨基酸修饰降低效应物功能和/或降低与选自Fcγ受体或C1q的效应物分子的结合。在一些实施例中,一或多个氨基酸修饰是Glu233、Leu234或Leu235中的一或多种的缺失。在一些方面中,异二聚体Fc的第一多肽包含SEQ ID NO:84、88、95或97中的任一种中所示的氨基酸序列,且异二聚体Fc的第二多肽包含SEQ ID NO:85、89、91、93、99或101中的任一种中所示的氨基酸序列。

[0034] 在一些实施方式中,Fc区包含含有至少一个修饰以增强FcγR结合的多肽。在一些情况下,修饰是Ser239或Ile332的修饰。在一些实施方式中,与未经修饰的Fc区相比,Fc区的糖基化经修饰以增强FcγR结合。在一些实施方式中,Fc区无岩藻糖含量或具有降低的岩藻糖含量。

[0035] 在一些实施方式中,CD3结合区是抗CD3抗体或抗原结合片段。在一些实施方式中,抗CD3抗体或抗原结合片段包含可变重链区(VH)和可变轻链区(VL)。在任何此类实施方式中的一些中,CD3结合区是单价的。

[0036] 在一些实施方式中,抗CD3抗体或抗原结合片段并非单链抗体,可选地并非单链可变片段(scFv)。在一些实施方式中,Fc是异二聚体Fc,且包含抗CD3抗体或抗原结合片段的VH和VL连接至异二聚体Fc的相反多肽。在一些实施方式中,除非抗原结合结构域中的至少一种结合至其TAA,否则CD3结合区不能或基本上不能结合或接合CD3。在一些方面中,除非抗原结合结构域中的至少二种结合至其TAA,否则CD3结合区不能或基本上不能结合或接合CD3。

[0037] 在一些实施方式中,多特异性多肽构建体含有接头,其为多肽接头。在一些实施方式中,接头是长度为最多25个氨基酸的多肽。在一些情况下,接头是或是约2至24个氨基酸、2至20个氨基酸、2至18个氨基酸、2至14个氨基酸、2至12个氨基酸、2至10个氨基酸、2至8个氨基酸、2至6个氨基酸、6至24个氨基酸、6至20个氨基酸、6至18个氨基酸、6至14个氨基酸、6至12个氨基酸、6至10个氨基酸、6至8个氨基酸、8至24个氨基酸、8至20个氨基酸、8至18个氨基酸、8至14个氨基酸、8至12个氨基酸、8至10个氨基酸、10至24个氨基酸、10至20个氨基酸、10至18个氨基酸、10至14个氨基酸、10至12个氨基酸、12至24个氨基酸、12至20个氨基酸、12至18个氨基酸、12至14个氨基酸、14至24个氨基酸、14至20个氨基酸、14至18个氨基酸、18至24个氨基酸、18至20个氨基酸或20至24个氨基酸的多肽。在一些实施方式中,接头是长度为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸的多肽。在一些情况下,接头是可裂解接头。

[0038] 在一些实施方式中,第一抗原结合结构域和免疫球蛋白Fc多肽经由氨基酸接头可操作连接。在一些实施方式中,此类组分内接头主要由氨基酸甘氨酸和丝氨酸组成,本文中表示为GS-接头。本发明融合蛋白的GS-接头具有不同长度,例如长度为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个氨基酸。

[0039] 在一些实施方式中,GS-接头包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:GGSGGS,也即$(GGS)_2$(SEQ ID NO:10);GGSGGSGGS,也即$(GGS)_3$(SEQ ID NO:11);GGSGGSGGSGGS,也即$(GGS)_4$(SEQ ID NO:12);和GGSGGSGGSGGSGGS,也即$(GGS)_5$(SEQ ID NO:13)。

[0040] 在一些实施方式中,第二组分也包括抗CD3结合结构域的一或多个拷贝。在一些实施方式中,抗CD3结合结构域包括抗体或其抗原结合片段的一或多个拷贝。在一些实施方式中,抗CD3结合结构域包括选自由以下组成的组的抗体或其抗原结合片段的一或多个拷贝:

Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、scFv、scAb、dAb、单一结构域重链抗体和单一结构域轻链抗体。在一些实施方式中,抗CD3结合结构域包括结合CD3ε的Fv抗体片段(本文中称作抗CD3ε Fv片段)。在一些实施方式中,抗CD3εFv抗体片段包括选自SEQ ID NO:32-81的群的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗CD3εFv抗体片段包括与选自由SEQ ID NO:32-81组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗CD3εFv抗体片段包括选自SEQ ID NO:32-62的群的氨基酸序列和选自由SEQ ID NO:63-81组成的组的氨基酸序列的组合。在一些实施方式中,抗CD3εFv抗体片段包括与选自由SEQ ID NO:32-62组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序列和与选自由SEQ ID NO:63-81组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序列的组合。

[0041] 在一些实施方式中,抗CD3εFv抗体片段是经二硫键稳定的抗CD3结合Fv片段(dsFv)。

[0042] 在一些实施方式中,第二组分包含抗原结合结构域的一个或多个拷贝。在一些实施方式中,第二组分包含至少两个抗原结合结构域,如两个抗原结合结构域。在一些实施方式中,第二组分的至少两个抗原结合结构域结合至相同TAA。在一些情况下,第二组分的至少两个抗原结合结构域结合相同TAA上的不同表位。在一些实施方式中,第二组分的至少两个抗原结合结构域结合不同TAA。

[0043] 在一些实施方式中,第一组分含有第一抗原结合结构域并且第二组分的抗原结合结构域是第二抗原结合结构域。在一些实施方式中,第二组分的第二抗原结合结构域与第一组分的第一抗原结合结构域结合相同抗原。在一些实施方式中,第二组分的第二抗原结合结构域结合与第一组分的第一抗原结合结构域相同的抗原上的不同表位。在一些实施方式中,第二组分的第二抗原结合结构域在与第一组分的第一抗原结合结构域相同的抗原上结合表位。

[0044] 在一些实施方式中,第二组分的抗原结合结构域,如第二抗原结合结构域包括抗体或其抗原结合片段的一或多个拷贝。在一些实施方式中,第二抗原结合结构域包括选自由以下组成的组的抗体或其抗原结合片段的一或多个拷贝:Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、scFv、scAb、dAb、单一结构域重链抗体和单一结构域轻链抗体。在一些实施方式中,第二抗原结合结构域包括一或多个单一结构域抗体(sdAb)片段(例如V_HH、V_{NAR}、经改造V_H或V_K结构域)的一或多个拷贝。V_HH可自骆驼科动物仅重链抗体生成。V_{NAR}可自软骨鱼类仅重链抗体生成。已执行各种方法自常用异二聚体V_H和V_K结构域生成单体sdAb,包括特异性种系家族的表面改造和选择。

[0045] 在一些实施方式中,第二组分的抗原结合结构域,如第二抗原结合结构域结合抗原,如肿瘤相关抗原(TAA)。在一些实施方式中,TAA是选自由以下组成的组:1-92-LFA-3、α-4整联蛋白、α-V整联蛋白、α4β1整联蛋白、α4β7整联蛋白、AGR2、抗刘易斯-Y、艾普林J受体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5补体、C-242、CA9、CA19-9(刘易斯a)、碳酸酐酶9、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132、(IL-2RG)、CD133、CD137、CD138、CD166、CD172A、

CD248、CDH6、CEACAM5(CEA)、CEACAM6(NCA-90)、密连蛋白-3、密连蛋白-4、cMet、胶原、Cripto、CSFR、CSFR-1、CTLA-4、CTGF、CXCL10、CXCL13、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CYR61、DL44、DLK1、DLL3、DLL4、DPP-4、DSG1、EDA、EDB、EGFR、EGFRviii、内皮素B受体(ETBR)、ENPP3、EpCAM、EPHA2、EPHB2、ERBB3、RSV的F蛋白、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、叶酸盐受体α(FRα)、GAL3ST1、G-CSF、G-CSFR、GD2、GITR、GLUT1、GLUT4、GM-CSF、GM-CSFR、GP IIb/IIIa受体、Gp130、GPIIB/IIIA、GPNMB、GRP78、HER2/neu、HER3、HER4、HGF、hGH、HVEM、玻尿酸酶、ICOS、IFNα、IFNβ、IFNγ、IgE、IgE受体(FceRI)、IGF、IGF1R、IL1B、IL1R、IL2、IL11、IL12、IL12p40、IL-12R、IL-12Rβ1、IL13、IL13R、IL15、IL17、IL18、IL21、IL23、IL23R、IL27/IL27R(wsx1)、IL29、IL-31R、IL31/IL31R、IL2R、IL4、IL4R、IL6、IL6R、胰岛素受体、锯齿状配体、锯齿状1、锯齿状2、KISS1-R、LAG-3、LIF-R、刘易斯X、LIGHT、LRP4、LRRC26、Ly6G6D、LyPD1、MCSP、间皮素、MRP4、MUC1、黏蛋白-16(MUC16、CA-125)、Na/K ATP酶、NGF、纳卡斯特罗因蛋白、Notch受体、Notch 1、Notch 2、Notch 3、Notch 4、NOV、OSM-R、OX-40、PAR2、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGFRα、PDGFRβ、PD-1、PD-L1、PD-L2、磷脂酰基-丝氨酸、P1GF、PSCA、PSMA、PSGR、RAAG12、RAGE、SLC44A4、磷酸神经鞘胺醇1、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TAPA1、TEM-8、TGFβ、TIGIT、TIM-3、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TMEM31、TNFα、TNFR、TNFRS12A、TRAIL-R1、TRAIL-R2、运铁蛋白、运铁蛋白受体、TRK-A、TRK-B、uPAR、VAP1、VCAM-1、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、VISTA、WISP-1、WISP-2和WISP-3。

[0046] 在一些实施方式中,第二抗原结合结构域和抗CD3结合结构域经由氨基酸接头可操作连接。在一些实施方式中,此类组分内接头主要由氨基酸甘氨酸和丝氨酸组成,本文中表示为GS-接头。本发明融合蛋白的GS-接头可具有不同长度,例如长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个氨基酸。

[0047] 在一些实施方式中,GS-接头包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:GGSGGS,也即$(GGS)_2$(SEQ ID NO:10);GGSGGSGGS,也即$(GGS)_3$(SEQ ID NO:11);GGSGGSGGSGGS,也即$(GGS)_4$(SEQ ID NO:12);和GGSGGSGGSGGSGGS,也即$(GGS)_5$(SEQ ID NO:13)。

[0048] 本文提供多特异性多肽构建体,该多特异性多肽构建体包含含有异二聚体Fc区的第一组分和包含包含可变重链区(VH)和可变轻链区(VL)的抗CD3抗体或抗原结合片段的第二组分,其中:构成抗CD3抗体或抗原结合片段的VH和VL连接至异二聚体Fc的相反多肽;第一和第二组分由可裂解接头偶合,其中异二聚体Fc区位于抗CD3抗体的N-末端;且第一和第二组分中的一种或二种包含结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域。

[0049] 在一些实施方式中,在多特异性多肽构建体与裂解状态相比呈未裂解状态时,CD3结合区与CD3的结合显著降低。在一些实施方式中,在裂解状态下,第一和第二组分未连接。

[0050] 在一些实施方式中,可裂解接头是多肽。在一些实施方式中,可裂解接头是作为蛋白酶的底物的多肽。在一些实施方式中,蛋白酶是由免疫效应细胞、由肿瘤或由肿瘤微环境中存在的细胞产生。在一些实施方式中,蛋白酶是由靠近表达CD3ε的细胞的肿瘤产生和/或是由与组织中表达CD3ε的细胞共定位的肿瘤产生,且其中在多特异性多肽构建体暴露于蛋白酶时,蛋白酶使多特异性多肽构建体中的可裂解接头裂解。在一些实施方式中,蛋白酶是由靠近表达一或多种肿瘤相关抗原(TAA)的细胞的肿瘤产生和/或是由与组织中表达靶TAA的细胞共定位的肿瘤产生,且其中在多特异性多肽构建体暴露于蛋白酶时,蛋白酶使多特

异性多肽构建体中的可裂解接头裂解。在一些实施方式中,蛋白酶是由免疫效应细胞产生。在一些实施方式中,蛋白酶是由靠近表达TAA的细胞的免疫效应细胞产生。在一些实施方式中,蛋白酶是由免疫效应细胞产生,且免疫效应细胞是活化T细胞、天然杀伤(NK)细胞或NKT细胞。在一些实施方式中,在多特异性多肽构建体暴露于蛋白酶时,蛋白酶使多特异性多肽构建体中的可裂解接头裂解。在一些实施方式中,蛋白酶是由靠近表达TAA的细胞的免疫效应细胞产生,且其中在多特异性多肽构建体暴露于蛋白酶时,蛋白酶使多特异性多肽构建体中的可裂解接头裂解。

[0051] 在一些实施方式中,可裂解接头是长度为最多50个氨基酸的多肽。在一些实施方式中,可裂解接头是长度为最多25个氨基酸的多肽。在一些实施方式中,可裂解接头是长度为最多15个氨基酸的多肽。

[0052] 在一些实施方式中,可裂解接头是选自本文所述蛋白酶的蛋白酶的底物。在一些实施方式中,可裂解接头是选自由以下组成的组的蛋白酶的底物:uPA、天冬酰胺内肽酶、间质蛋白酶(matriptase)(在本文中也称为MT-SP1或MTSP1)、ADAM17、BMP-1、TMPRSS3、TMPRSS4、MMP-9、MMP-12、MMP-13、MMP-14及其任何组合。在一些实施方式中,可裂解接头是选自由以下组成的组的蛋白酶的底物:uPA、天冬酰胺内肽酶和间质蛋白酶。在一些实施方式中,蛋白酶是选自间质蛋白酶、基质金属蛋白酶(MMP)、颗粒酶B及其组合。

[0053] 在一些实施方式中,蛋白酶是颗粒酶B。在一些实施方式中,可裂解接头包含通式P4 P3 P2 P1 ↓ P1’(SEQ ID NO:150)的氨基酸序列,其中P4是氨基酸I、L、Y、M、F、V或A;P3是氨基酸A、G、S、V、E、D、Q、N或Y;P2是氨基酸H、P、A、V、G、S或T;P1是氨基酸D或E;且P1’是氨基酸I、L、Y、M、F、V、T、S、G或A。在一些实施方式中,可裂解接头包含通式P4 P3 P2 P1 ↓ P1’(SEQ ID NO:151)的氨基酸序列,其中P4是氨基酸I或L;P3是氨基酸E;P2是氨基酸P或A;P1是氨基酸D;且P1’是氨基酸I、V、T、S或G。在一些实施方式中,可裂解接头包含氨基酸序列IEPDI(SEQ ID NO:136)、LEPDG(SEQ ID NO:152)、LEADT(SEQ ID NO:137)、IEPDG(SEQ ID NO:138)、IEPDV(SEQ ID NO:139)、IEPDS(SEQ ID NO:140)、IEPDT(SEQ ID NO:141)或LEADG(SEQ ID NO:153)。在一些情况下,可裂解接头包含选自由SEQ ID NO:22、105-112、136-141、148、150-153组成的组的氨基酸序列。

[0054] 在一些实施方式中,蛋白酶是间质蛋白酶。在一些情况下,可裂解接头包含序列P1QAR ↓(A/V)(SEQ ID NO:154),其中P1是任何氨基酸;或可裂解接头包含序列RQAR(A/V)(SEQ ID NO:155)。在一些实施方式中,可裂解接头包含序列RQARV(SEQ ID NO:156)。在一些情况下,可裂解接头包含选自由SEQ ID NO:23、154-156组成的组的氨基酸序列。

[0055] 在一些实施方式中,蛋白酶是MMP。在一些实施方式中,MMP是MMP-2。在一些实施方式中,可裂解接头包含通式P3 P2 P1 ↓ P1’(SEQ ID NO:157),其中P3是P、V或A;P2是Q或D;P1是A或N;且P1’是L、I或M。在一些情况下,可裂解接头包含通式P3 P2 P1 ↓ P1’(SEQ ID NO:158),其中P3是P;P2是Q或D;P1是A或N;且P1’是L或I。在一些实施方式中,可裂解接头包含序列PAGL(SEQ ID NO:24)。在一些实施方式中,可裂解接头是基质金属蛋白酶(MMP)的底物。

[0056] 在一些实施方式中,多特异性多肽构建体至少包含(i)第一多肽,其包含异二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头和抗CD3抗体或抗原结合片段的VH结构域;和(ii)第二多肽,其包含异二聚体Fc区的第二Fc多肽、接头和抗CD3抗体或抗原结合片段的VL结构域,其中第一和

第二多肽中的一种或二种包含至少一个结合至肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域。在一些情况下,第一或第二多肽中仅一种包含至少一个结合TAA的抗原结合结构域。

[0057] 在任何提供的实施方式的一些中,抗原结合结构域产生与TAA的单价、二价、三价、或四价结合。在一些实施方式中,一或多个结合TAA的抗原结合结构域独立地选自sdAb,scFv或Fab。在一些实施方式中,一或多个结合TAA的抗原结合结构域是TAA是单链分子,如含有VH和VL的单链抗体片段,例如sdAb或scFv。在一些实施方式中,抗原结合结构域中的至少一个是含有包含VH-CH1(Fd)的第一链和包含VL-CL的第二链的Fab。

[0058] 在一些实施方式中,至少一个抗原结合结构域位于相对于Fc区的氨基末端和/或位于相对于多特异性多肽构建体的第一或第二多肽中的一种的CD3结合区的羧基末端。在一些情况下,至少一个抗原结合结构域位于相对于多特异性构建体的Fc区的氨基末端,且第二抗原结合结构域位于相对于多特异性构建体的CD3结合区的羧基末端。

[0059] 在一些实施方式中,抗原结合结构域中的至少一种是Fab。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体包含:(i)第一多肽,其包含异二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头和抗CD3抗体或抗原结合片段的VH结构域;(ii)第二多肽,其包含异二聚体Fc区的第二Fc多肽、接头和抗CD3抗体或抗原结合片段的VL结构域,和(iii)第三多肽,其包含结合至肿瘤相关抗原的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL,其中第一和/或第二多肽进一步包含Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL中的另一种。在一些情况下,第一或第二多肽中仅一种包含Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL中的另一种。在一些实施方式中,第一或第二多肽二者均包含Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL中的另一种。在一些情况下,Fab抗体片段的VH-CH 1(Fd)或VL-CL中的另一种未于相对于Fc区的氨基末端和/或位于相对于多特异性多肽构建体的第一或第二多肽中的一种的CD3结合区的羧基末端。在一些实施方式中,Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL中的另一种位于相对于第一多肽或第二多肽的Fc区的氨基末端和位于相对于第一或第二多肽中的另一种的CD3结合区的羧基末端。

[0060] 在一些实施方式中,抗原结合结构域或独立地抗原结合结构域中的每一种结合至选自以下的肿瘤抗原:1-92-LFA-3、5T4、α-4整联蛋白、α-V整联蛋白、α4β1整联蛋白、α4β7整联蛋白、AGR2、抗刘易斯-Y、艾普林J受体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5补体、C-242、CA9、CA19-9(刘易斯a)、碳酸酐酶9、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132、(IL-2RG)、CD133、CD137、CD138、CD166、CD172A、CD248、CDH6、CEACAM5(CEA)、CEACAM6(NCA-90)、密连蛋白-3、密连蛋白-4、cMet、胶原、Cripto、CSFR、CSFR-1、CTLA-4、CTGF、CXCL10、CXCL13、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CYR61、DL44、DLK1、DLL3、DLL4、DPP-4、DSG1、EDA、EDB、EGFR、EGFRviii、内皮素B受体(ETBR)、ENPP3、EpCAM、EPHA2、EPHB2、ERBB3、RSV的F蛋白、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、叶酸盐受体α(FRα)、GAL3ST1、G-CSF、G-CSFR、GD2、GITR、GLUT1、GLUT4、GM-CSF、GM-CSFR、GP IIb/IIIa受体、Gp130、GPIIB/IIIA、GPNMB、GRP78、HER2/neu、HER3、HER4、HGF、hGH、HVEM、玻尿酸酶、ICOS、IFNα、IFNβ、IFNγ、IgE、IgE受体(FceRI)、IGF、IGF1R、IL1B、IL1R、IL2、IL11、IL12、IL12p40、IL-12R、IL-12Rβ1、IL13、IL13R、IL15、IL17、IL18、IL21、IL23、IL23R、IL27/IL27R(wsx1)、IL29、IL-31R、IL31/IL31R、IL2R、IL4、IL4R、IL6、IL6R、胰岛素受体、锯齿状配体、锯齿状1、锯齿状2、KISS1-R、LAG-3、LIF-R、刘易斯X、

LIGHT、LRP4、LRRC26、Lv6G6D、LyPD1、MCSP、间皮素、MRP4、MUC1、黏蛋白-16(MUC16、CA-125)、Na/K ATP酶、NGF、纳卡斯特罗因蛋白、Notch受体、Notch 1、Notch 2、Notch 3、Notch 4、NOV、OSM-R、OX-40、PAR2、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGFRα、PDGFRβ、PD-1、PD-L1、PD-L2、磷脂酰基-丝氨酸、P1GF、PSCA、PSMA、PSGR、RAAG12、RAGE、SLC44A4、磷酸神经鞘胺醇1、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TAPA1、TEM-8、TGFβ、TIGIT、TIM-3、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TMEM31、TNFα、TNFR、TNFRS12A、TRAIL-R1、TRAIL-R2、运铁蛋白、运铁蛋白受体、TRK-A、TRK-B、uPAR、VAP1、VCAM-1、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、VISTA、WISP-1、WISP-2和WISP-3。

[0061] 在一些实施方式中,多特异性抗原结合结构域至少包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合至相同TAA。在一些情况下,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合相同TAA上的不同表位。在一些情况下,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合相同TAA的相同表位。在一些实施方式中,多特异性抗原结合结构域至少包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合不同TAA。

[0062] 在一些实施方式中,多特异性多肽构建体包含第一抗原结合结构域与免疫球蛋白Fc多肽区(Fc区)之间的第一连接肽(LP1)。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体包含抗CD3结合结构域(CD3结合区)与第二抗原结合结构域之间的第二连接肽(LP2)。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体包含第一抗原结合结构域与免疫球蛋白Fc多肽区(Fc区)之间的第一连接肽(LP1)和抗CD3结合结构域(CD3结合区)与第二抗原结合结构域之间的第二连接肽(LP2)。

[0063] 在一些实施方式中,呈未裂解状态的多特异性多肽构建体自N-末端至C-末端具有如下结构配置:第一抗原结合结构域-LP1-免疫球蛋白Fc多肽接头区(Fc区)-接头(例如可裂解接头)-抗CD3结合结构域-LP2-第二抗原结合结构域。在一些实施方式中,呈未裂解状态的多特异性多肽构建体自N-末端至C-末端具有如下结构配置:第二抗原结合结构域-LP2-抗CD3结合结构域(CD3结合区)-接头(例如可裂解接头)-免疫球蛋白Fc多肽接头区-LP1-第一抗原结合结构域。在一些实施方式中,接头是可裂解接头。在一些实施方式中,两个连接肽彼此不相同。在一些情况下,LP1或LP2独立地是长度为约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方式中,LP1或LP2独立地包含是或包含如SEQ ID NO:10-13、119、135、147、149中所示的任何Gly-Ser接头的肽。

[0064] 在一些实施方式中,多特异性构建体是具有图1中所示的任意结构配置的构建体。在一些实施方式中,多特异性构建体是具有图2中所示的结构配置的双特异性构建体。在一些实施方式中,双特异性构建体自N-末端至C-末端具有如下结构配置。双特异性构建体的N-末端包括结合肿瘤相关抗原(TAA)的第一抗原结合结构域。第一结合结构域结合TAA靶标上的第一表位。调控Fc γR相互作用和/或FcRn相互作用的中心免疫球蛋白Fc多肽区与第一抗原结合结构域偶合。在一些实施方式中,中心免疫球蛋白Fc多肽区是异二聚体。免疫球蛋白Fc多肽区与可裂解接头偶合,该可裂解接头含有一或多个位于免疫球蛋白Fc多肽区的末端的C-末端位置的蛋白水解裂解位点。在一些实施方式中,一或多个蛋白水解裂解位点是间质蛋白酶、基质金属蛋白酶(MMP)或颗粒酶B的底物。可裂解接头附接至位于Fc的C-末端,并且在一些情况下第二组分远端的抗CD3结合序列。

[0065] 在一些实施方式中,抗CD3抗体或抗原结合片段是Fv抗体片段。在一些实施方式中,Fv抗体片段包含经二硫键稳定的抗CD3结合Fv片段(dsFv)。在一些实施方式中,抗CD3结合序列是经改造以在可变重链(VH)区与可变轻链(VL)区之间包括二硫键、由此产生经二硫键稳定的抗CD3结合Fv片段(dsFv)的Fv抗体片段。在一些实施方式中,包含抗CD3 Fv的VH和VL结构域可操作连接至异二聚体Fc区的相对成员。在此类实施方式中,抗CD3 Fv以单价形式结合CD3。在可裂解接头是完整的,也即呈未裂解或无活性状态时,抗CD3 dsFv不接合CD3。双特异性构建体的C-末端包括结合TAA的第二抗原结合结构域。在一些实施方式中,第二抗原结合结构域与位于第一组分内的第一抗原结合结构域结合相同TAA。在一些实施方式中,第二抗原结合结构域结合TAA上的第二表位,其中第二表位与TAA上的第一表位无竞争性。在一些实施方式中,第二抗原结合结构域结合与第一抗原结合结构域不同的TAA。

[0066] 在一些实施方式中,双特异性构建体的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一种包括抗体或其抗原结合片段的一或多个拷贝。在一些实施方式中,双特异性构建体的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一种包括选自由以下组成的组的抗体或其抗原结合片段的一或多个拷贝:Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、scFv、scAb、dAb、单一结构域重链抗体和单一结构域轻链抗体。在一些实施方式中,抗原结合结构域或独立地抗原结合结构域中的每一种系选自由以下组成的组的抗体或其抗原结合片段:Fab片段、F(ab′)2片段、Fv片段、scFv、scAb、dAb、单一结构域重链抗体和单一结构域轻链抗体。在一些实施方式中,双特异性构建体的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的每一种包括一或多个单一结构域抗体(sdAb)片段(例如V_HH、V_{NAR}、经改造V_H或V_K结构域)的一或多个拷贝。V_HH可自天然骆驼科动物仅重链抗体、产生仅重链抗体的遗传修饰的啮齿类动物或幼稚/合成骆驼科动物或人源化骆驼科动物单一结构域抗体文库生成。M_{NAR}可自软骨鱼类仅重链抗体生成。已执行各种方法自常用异二聚体V_H和V_K结构域生成单体sdAb,包括特异性种系家族的表面改造和选择。

[0067] 在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段是sdAb。在一些情况下,sdAb是人类或人源化sdAb。在一些方面中,sdAb是V_HH、V_{NAR}、经改造的VH结构域或经改造的VK结构域。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段是scFv。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段是Fab。

[0068] 在一些实施方式中,抗CD3抗体或抗原结合片段包含含有氨基酸序列TYAMN(SEQ ID NO:16)的VH CDR1;包含氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:17)的VH CD2;包含氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:18)的VH CDR3、包含氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:19)的VL CDR1;包含氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:20)的VL CDR2;和包含氨基酸序列ALWYSNLWV(SEQ ID NO:21)的VL CDR3。

[0069] 在一些实施方式中,抗CD3 dsFv包含:具有SEQ ID NO:14,44和32-62中的任一种的氨基酸序列或与SEQ ID NO:14,44和32-62中的任一种展现至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列相同性的序列的VH;和具有SEQ ID NO:15,72和63-81中的任一种的氨基酸序列或与SEQ ID NO:14,44和32-62中的任一种展现至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列相同性的序列的VL。在一些情况下,抗CD3 dsFv包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列和SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在一些情况下,抗CD3 dsFv包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列和SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

[0070] 在一些实施方式中,第一组分的免疫球蛋白Fc区是选自由以下组成的组的IgG同

种型:IgG1同种型、IgG2同种型、IgG3同种型和IgG4亚类。在一些实施方式中,免疫球蛋白Fc区是包含选自由SEQ ID NO:1-6组成的组的氨基酸序列的多肽。在一些实施方式中,免疫球蛋白Fc区是包含与选自由SEQ ID NO:1-6组成的组的氨基酸序列具有至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的多肽。

[0071] 在一些实施方式中,免疫球蛋白Fc区是包含源自选自由SEQ ID NO:1-6组成的组的氨基酸序列的氨基酸序列的多肽。在一些实施方式中,免疫球蛋白Fc区是包含源自选自由SEQ ID NO:1-6组成的组的氨基酸序列的氨基酸序列的多肽,其包含一或多个修饰。在一些实施方式中,免疫球蛋白Fc区是包含源自选自由SEQ ID NO:1-6组成的组的氨基酸序列的氨基酸序列的多肽,其包含一或多个修饰以防止糖基化,改变Fc受体相互作用,减少Fc受体结合,增强与CD32A的相互作用,减少补体蛋白C1q结合,延长半衰期,增强FcRn结合,改变抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),诱导异二聚化,防止二聚化,稳定CH3:CH3表面的同二聚化及其组合。在一些实施方式中,Fc区内的修饰降低与Fc-受体-γ受体的结合,同时对与新生Fc受体(FcRn)的结合具有最小影响。在一些实施方式中,突变或经修饰Fc多肽包括以下突变:使用Kabat编号系统,Met252Tyr和Met428Leu或Met252Tyr和Met428Val(M252Y、M428L或M252Y、M428V)。

[0072] 在一些实施方式中,第一抗原结合结构域和免疫球蛋白Fc多肽经由氨基酸接头可操作连接。在一些实施方式中,此类组分内接头主要由氨基酸甘氨酸和丝氨酸组成,本文中表示为GS-接头。本发明融合蛋白的GS-接头可具有不同长度,例如长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个氨基酸。

[0073] 在一些实施方式中,GS-接头包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:GGSGGS,也即$(GGS)_2$(SEQ ID NO:10);GGSGGSGGS,也即$(GGS)_3$(SEQ ID NO:11);GGS GGSGGSGGS,也即$(GGS)_4$(SEQ ID NO:12);和GGSGGSGGSGGSGGS,也即$(GGS)_5$(SEQ ID NO:13)。

[0074] 在一些实施方式中,抗CD3εdsFv抗体片段包括选自由SEQ IDNO:32-81组成的组的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗CD3εdsFv抗体片段包括与选自由SEQ ID NO:32-81组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗CD3εFv抗体片段包括选自SEQ ID NO:32-62的群的氨基酸序列和选自由SEQ ID NO:63-81组成的组的氨基酸序列的组合。在一些实施方式中,抗CD3εFv抗体片段包括与选自由SEQ ID NO:32-62组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序列和与选自由SEQ ID NO:63-81组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序列的组合。

[0075] 在一些实施方式中,第二抗原结合结构域和抗CD3结合结构域经由氨基酸接头可操作连接。在一些实施方式中,此类组分内接头主要由氨基酸甘氨酸和丝氨酸组成,本文中表示为GS-接头。本发明融合蛋白的GS-接头可具有不同长度,例如长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个氨基酸。

[0076] 在一些实施方式中,GS-接头包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:GGSGGS,也即$(GGS)_2$(SEQ ID NO:10);GGSGGSGGS,也即$(GGS)_3$(SEQ ID NO:11);GGSGGSGGSGGS,也即$(GGS)_4$(SEQ ID NO:12);和GGSGGSGGSGGSGGS,也即$(GGS)_5$(SEQ ID NO:13)。

[0077] 在一些实施方式中,可裂解接头是多肽。在一些实施方式中,可裂解接头是作为蛋白酶的底物的多肽。在一些实施方式中,蛋白酶是由靠近表达CD3ε的细胞的肿瘤产生和/或是由与组织中表达CD3ε的细胞共定位的肿瘤产生,且其中在多特异性多肽构建体暴露于蛋白酶时,蛋白酶使多特异性多肽构建体中的可裂解接头裂解。在一些实施方式中,蛋白酶是由靠近表达一或多种肿瘤相关抗原(TAA)的细胞的肿瘤产生和/或是由与组织中表达靶TAA的细胞共定位的肿瘤产生,且其中在多特异性多肽构建体暴露于蛋白酶时,蛋白酶使多特异性多肽构建体中的可裂解接头裂解。

[0078] 在一些实施方式中,可裂解接头是长度为最多50个氨基酸的多肽。在一些实施方式中,可裂解接头是长度为最多25个氨基酸的多肽。在一些实施方式中,可裂解接头是长度为最多15个氨基酸的多肽。在一些实施方式中,可裂解接头是选自本文所述蛋白酶的蛋白酶的底物。在一些实施方式中,可裂解接头是选自由以下组成的组的蛋白酶的底物:uPA、天冬酰胺内肽酶、间质蛋白酶(在本文中也称为MT-SP1或MTSP1)、ADAM17、BMP-1、TMPRSS3、TMPRSS4、MMP-9、MMP-12、MMP-13、MMP-14及其任何组合。在一些实施方式中,可裂解接头是选自由以下组成的组的蛋白酶的底物:uPA、天冬酰胺内肽酶和间质蛋白酶。在一些实施方式中,可裂解接头是基质金属蛋白酶(MMP)的底物。

[0079] 在一些实施方式中,多特异性构建体也包括偶联至多特异性构建体的试剂。在一些实施方式中,该试剂是治疗剂。在一些实施方式中,该试剂是可检测部分。在一些实施方式中,可检测部分是诊断剂。在一些实施方式中,该试剂经由接头偶联至多特异性构建体。在一些实施方式中,接头是可裂解接头。在一些实施方式中,接头是不可裂解接头。

[0080] 在一些实施方式中,本文所述抗多特异性构建体连同一或多种额外试剂或额外试剂的组合使用。合适额外试剂包括用于预期应用(例如癌症)的当前医药和/或手术疗法。举例而言,多特异性构建体可连同额外化学治疗剂或抗瘤剂使用。

[0081] 在一些实施方式中,将多特异性构建体和额外试剂配制成单一治疗性组合物,且同时给予多特异性构建体和额外试剂。在一些实施方式中,多特异性构建体和额外试剂彼此分开,例如,各自配制成单独治疗性组合物,且同时给予多特异性构建体和额外试剂,或在治疗方案期间的不同时间给予多特异性构建体和额外试剂。举例而言,在给予额外试剂之前给予多特异性构建体,在给予额外试剂之后给予多特异性构建体,或多特异性构建体和额外试剂以交替形式给予。如本文所述,多特异性构建体和额外试剂是以单一剂量或以多个剂量给予。

[0082] 在一些实施方式中,多特异性构建体天然含有一或多个二硫键。在一些实施方式中,多特异性构建体可经改造以包括一或多个二硫键。

[0083] 本公开也提供编码本文所述多特异性构建体的至少一部分的经分离核酸分子或多核苷酸和/或一或多个编码本文所述多特异性构建体的核酸分子,例如至少编码多特异性构建体的第一组分的至少一部分的第一核酸和编码多特异性构建体的第二组分的至少一部分的第二核酸,以和包括此类经分离核酸序列的载体。

[0084] 所提供实施方式是编码所提供多特异性多肽构建体中的任一种的多核苷酸。也提供编码所提供多特异性多肽构建体中的任一种的多肽链的多核苷酸。进一步提供多核苷酸,其包含编码所提供多特异性构建体中的任一种的第一多肽的第一核酸序列和编码多特异性构建体的第二多肽的第二核酸序列,其中第一和第二核酸序列是通过内部核糖体进入

位点(IRES)、或编码自我裂解肽或会造成核糖体跳跃的肽的核酸隔开。在一些情况下,第一核酸序列和第二核酸序列可操作连接至相同启动子。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体包含第三多肽链,且多核苷酸进一步包含编码多特异性构建体的第三多肽的第三核酸。在一些实施方式中,第三核酸由内部核糖体进入位点(IRES)、或编码自我裂解肽或会造成核糖体跳跃的肽的核酸与第一和/或第二多肽隔开,和/或第三核酸序列可操作连接至与第一和/或第二核酸序列相同的启动子。在一些实施方式中,编码自我裂解肽或引起核糖体跳跃的肽的核酸是选自T2A、P2A、E2A或F2A(SEQ ID NO:159-164,或由SEQ ID NO:165中所示的序列编码)。

[0085] 本文提供包含所提供多核苷酸中的任一种的载体。在一些实施方式中,载体是表达载体。在一些实施方式中,载体是病毒载体或真核载体,可选地其中真核载体是哺乳动物载体。

[0086] 提供包含所提供多核苷酸或载体中的任一种的细胞。在一些情况下,细胞是重组或分离的。在一些实施方式中,细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方式中,细胞是HEK293或CHO细胞。

[0087] 本公开提供通过在导致多特异性构建体表达的条件下培养细胞产生多特异性构建体的方法,其中细胞包含该(等)核酸分子。在一些实施方式中,细胞包含该载体。

[0088] 本文提供产生重特异性多肽构建体的方法,该方法包括将所提供多核苷酸或载体中的任一种引入细胞中和在导致多特异性构建体表达的条件下培养细胞以产生多特异性多肽构建体。也提供产生多特异性多肽构建体的方法,该方法包括在由细胞表达或产生多特异性多肽的条件下培养所提供细胞中的任一种。在一些情况下,细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方式中,细胞是HEK293或CHO细胞。在一些实施方式中,该方法进一步包括自细胞分离或纯化多特异性多肽构建体。在一些情况下,多特异性多肽构建体是异二聚体。

[0089] 本文提供通过所提供方法中的任一种产生的多特异性多肽构建体。

[0090] 本文提供刺激或诱导免疫反应的方法,该方法包含使靶细胞和T细胞与所提供多特异性多肽构建体中的任一种或医药组合物接触,该靶细胞表达由多特异性多肽构建体识别的肿瘤相关抗原。在一些实施方式中,靶细胞是表达肿瘤相关抗原(TAA)的肿瘤细胞。

[0091] 在一些实施方式中,多特异性多肽构建体包含用作蛋白酶的底物的可裂解接头,且在蛋白酶存在下增大诱导或刺激免疫反应。在一些情况下,蛋白酶是由免疫效应细胞、由肿瘤或由肿瘤微环境中存在的细胞产生。

[0092] 在一些实施方式中,蛋白酶是由免疫效应细胞产生,且免疫效应细胞是活化T细胞、天然杀伤(NK)细胞或NK T细胞。在一些情况下,免疫效应细胞靠近表达抗原的细胞。在一些实施方式中,蛋白酶是由靠近表达组织中的TAA的细胞的肿瘤产生和/或是由与组织中的TAA共定位的肿瘤产生,且其中在多特异性多肽构建体暴露于蛋白酶时,蛋白酶使多特异性多肽构建体中的可裂解接头裂解。在一些实施方式中,蛋白酶是选自间质蛋白酶、基质金属蛋白酶(MMP)、颗粒酶B及其组合。在一些情况下,蛋白酶是颗粒酶B。

[0093] 在一些实施方式中,接触是离体或体外实施。在一些实施方式中,接触是在对象体内实施。

[0094] 提供刺激或诱导对象的免疫反应的方法,该方法包括向有需要的对象给予治疗有效量的所提供多特异性偶联物或医药组合物中的任一种。在一些情况下,该方法增加细胞

介导的免疫性。在一些实施方式中,该方法增加T细胞活性。在一些实施方式中,该方法增加细胞溶解T细胞(CTL)活性。在一些实施方式中,增加针对肿瘤或癌症的免疫反应。在一些实施方式中,该方法治疗对象的疾病或病况。

[0095] 本发明也提供治疗、预防或以其他方式改善一或多种病理的症状、延迟其进展或缓和与此类病理相关的症状的方法,其是通过向期望该治疗或预防的对象给予本公开的多特异性多肽构建体来完成。本文提供治疗对象的疾病或病况的方法,该方法包含向有需要的对象给予治疗有效量的所提供多特异性偶联物或医药组合物中的任一种。在一些实施方式中,疾病或病况是肿瘤或癌症。

[0096] 在所提供方法中的任一种的一些实施方式中,对象(例如欲治疗的对象)是(例如)人类或其他哺乳动物。在所提供方法中的任一种的一些实施方式中,对象是人类。在一些实施方式中,对象是非人类哺乳动物,例如非人类灵长类动物、伴侣动物(例如猫、狗、马)、农场动物、役畜或动物园动物。在一些实施方式中,对象是啮齿类动物。

[0097] 此类方法和用途的实施方式中的任一种中所用的本公开的多特异性多肽构建体可在疾病的任何阶段给予。举例而言,该多特异性多肽构建体可给予患有任何阶段(自早期至转移)癌症的患者。术语对象和患者在本文中可互换使用。

[0098] 此类方法和用途的实施方式中的任一种中所用的本公开的多特异性多肽构建体可用于包含前导性疗法的治疗方案中。

[0099] 此类方法和用途的实施方式中的任一种中所用的本公开的多特异性多肽构建体可单独或与一或多种额外试剂组合给予,此类额外试剂包括小分子抑制剂、其他基于抗体的疗法、基于多肽或肽的疗法、基于核酸的疗法和/或其他生物制品。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体是一或多种额外试剂组合给予,此类额外试剂例如(通过非限制性实施方式)化学治疗剂,例如烷基化剂、抗代谢物、抗微管剂、拓朴异构酶抑制剂、细胞毒性抗生素和任何其他核酸破坏剂。在一些实施方式中,额外试剂是紫杉烷(taxane),例如紫杉醇(paclitaxel)(例如Abraxane®)。在一些实施方式中,额外试剂是抗代谢物,例如吉西他滨(gemcitabine)。在一些实施方式中,额外试剂是烷基化剂,例如基于铂的化学疗法,例如卡铂(carboplatin)或顺铂(cisplatin)。在一些实施方式中,额外试剂是靶向试剂,例如激酶抑制剂,例如索拉菲尼(sorafenib)或厄洛替尼(erlotinib)。在一些实施方式中,额外试剂是靶向试剂,例如另一抗体,例如单克隆抗体(例如贝伐珠单抗(bevacizumab))、双特异性抗体或多特异性抗体。在一些实施方式中,额外试剂是蛋白体抑制剂,例如硼替佐米(bortezomib)或卡非佐米(carfilzomib)。在一些实施方式中,额外试剂是免疫调节剂,例如来那度胺(lenolidominde)或IL-2。在一些实施方式中,额外试剂是辐射。在一些实施方式中,额外试剂是由本领域技术人员视为护理标准的试剂。在一些实施方式中,额外试剂是本领域技术人员熟知的化学治疗剂。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体和额外试剂配制于单一组合物中。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体和额外试剂以两种或更多种单独组合物形式给予。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体和额外试剂是同时给予。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体和额外试剂是依次给予。

[0100] 在一些实施方式中,额外试剂是化学治疗剂,例如选自由以下组成的组的化学治疗剂:多西他赛(docetaxel)、紫杉醇、埃布尔杉烷(abraxane)(即,白蛋白偶联的紫杉醇)、多柔比星(doxorubicin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、卡铂、顺铂、伊立替康(irinotecan)和

吉西他滨(gemcitabine)。

[0101] 在一些实施方式中,额外试剂是检查点抑制剂、激酶抑制剂、肿瘤微环境中试剂靶向抑制剂和/或T细胞或NK激动剂。在一些实施方式中,额外试剂是放射疗法,其是单独的与另一额外试剂(例如化学治疗剂或抗瘤剂)组合。在一些实施方式中,额外试剂是疫苗、致癌病毒和/或DC活化剂(例如通过非限制性实施方式类toll样受体(TLR)激动剂和/或α-CD40)。在一些实施方式中,额外试剂是经设计经由ADCC或经由与毒素直接结合(例如抗体药物偶联物(ADC))杀死肿瘤的肿瘤靶向抗体。

[0102] 在一些实施方式中,检查点抑制剂是选自由以下组成的组的靶标的抑制剂:CTLA-4、LAG-3、PD-1、PDL1、TIGIT、TIM-3、B7H3、B7H4和Vista。在一些实施方式中,激酶抑制剂是选自由以下组成的组:B-RAFi、MEKi和Btk抑制剂,例如依鲁替尼(ibrutinib)。在一些实施方式中,激酶抑制剂是克唑替尼(carfilzomib)。在一些实施方式中,肿瘤微环境抑制剂是选自由以下组成的组:IDO抑制剂、α-CSF1R抑制剂、α-CCR4抑制剂、TGF-β、骨髓源抑制细胞或T-调节细胞。在一些实施方式中,激动剂是选自由以下组成的组:OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、CD27和HVEM。在一些实施方式中,检查点抑制剂是结合选自CTLA-4、PD-1和/或PD-L1的靶标的抗体。在一些实施方式中,检查点抑制剂是抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体和/或其组合。在一些实施方式中,检查点抑制剂是抗CTLA4抗体,例如Yervoy™。在一些实施方式中,检查点抑制剂是抗PD-1抗体,例如Opdivo™和/或Keytruda™。

[0103] 在一些实施方式中,抑制剂是CTLA-4抑制剂。在一些实施方式中,抑制剂是LAG-3抑制剂。在一些实施方式中,抑制剂是PD-1抑制剂。在一些实施方式中,抑制剂是PDL1抑制剂。在一些实施方式中,抑制剂是TIGIT抑制剂。在一些实施方式中,抑制剂是TIM-3抑制剂。在一些实施方式中,抑制剂是B7H3抑制剂。在一些实施方式中,抑制剂是B7H4抑制剂。在一些实施方式中,抑制剂是Vista抑制剂。在一些实施方式中,抑制剂是B-RAFi抑制剂。在一些实施方式中,抑制剂是MEKi抑制剂。在一些实施方式中,抑制剂是Btk抑制剂。在一些实施方式中,抑制剂是依鲁替尼。在一些实施方式中,抑制剂是克唑替尼。在一些实施方式中,抑制剂是IDO抑制剂。在一些实施方式中,抑制剂是α-CSF1R抑制剂。在一些实施方式中,抑制剂是α-CCR4抑制剂。在一些实施方式中,抑制剂是TGF-β。在一些实施方式中,抑制剂是骨髓源抑制细胞。在一些实施方式中,抑制剂是T-调节细胞。

[0104] 在一些实施方式中,激动剂是OX40。在一些实施方式中,激动剂是GITR。在一些实施方式中,激动剂是CD137。在一些实施方式中,激动剂是CD28。在一些实施方式中,激动剂是ICOS。在一些实施方式中,激动剂是CD27。在一些实施方式中,激动剂是HVEM。

[0105] 在一些实施方式中,多特异性多肽构建体是在与一或多种额外试剂(例如化学治疗剂、抗炎剂和/或免疫抑制剂)组合治疗期间和/或之后给予。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体和额外试剂配制成单一治疗性组合物,且多特异性多肽构建体和额外试剂是同时给予。或者,多特异性多肽构建体和额外试剂彼此分开,例如,各自配制成单独治疗性组合物,且同时给予多特异性多肽构建体和额外试剂,或在治疗方案期间的不同时间给予多特异性多肽构建体和额外试剂。举例而言,在给予额外试剂之前给予多特异性多肽构建体,在给予额外试剂之后给予多特异性多肽构建体,或多特异性多肽构建体和额外试剂以交替形式给予。如本文所述,多特异性多肽构建体和额外试剂是以单一剂量或以多个剂量给予。

[0106] 在一些实施方式中,多特异性多肽构建体和额外试剂是同时给予。举例而言,多特异性多肽构建体和额外试剂可配制于单一组合物中或以两种或更多种组合物形式给予。在一些实施方式中,依次给予多特异性多肽构建体和额外试剂,或在治疗方案期间的不同时间给予多特异性多肽构建体和额外试剂。

[0107] 除了上述要素外,多特异性多肽构建体也可含有额外要素,例如多特异性多肽构建体的N-或C-末端的氨基酸序列。举例而言,多特异性多肽构建体可包括靶向部分以有利于递送至所关注细胞或组织。多特异性多肽构建体可偶联至诸如治疗剂、可检测部分或诊断剂等试剂。本文显示试剂的示例。

[0108] 多特异性多肽构建体也可包括本文所述偶联试剂、接头和其他组分中的任一种连同本公开的多特异性多肽构建体。

[0109] 本公开也涉及包含偶联至细胞毒性剂(例如毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段))或放射性同位素(即,放射性偶联物)的多特异性多肽构建体的免疫偶联物。适用于靶向(例如)T细胞源淋巴瘤中的患病T细胞的细胞毒性剂包括例如尾海兔素及其衍生物(例如澳瑞他汀E(auristatin E)、AFP、MMAD、MMAF、MMAE)。在一些实施方式中,试剂是尾海兔素。在一些实施方式中,试剂是澳瑞他汀或其衍生物。在一些实施方式中,试剂是类美登素(maytansinoid)或类美登素衍生物。在一些实施方式中,试剂是DM1或DM4。在一些实施方式中,试剂是倍癌霉素(duocarmycin)或其衍生物。在一些实施方式中,试剂是卡奇霉素(calicheamicin)或其衍生物。在一些实施方式中,试剂是吡咯并苯二氮杂革。

[0110] 在一些实施方式中,多特异性多肽构建体与细胞毒性剂之间的接头是可裂解的。在一些实施方式中,接头是不可裂解的。在一些实施方式中,存在两个或更多个接头。两个或更多个接头均相同,例如均可裂解或不可裂解,或两个或更多个接头不同,例如,至少一个可裂解且至少一个不可裂解。

[0111] 多特异性多肽构建体及其偶联物可用于治疗多种病症和/或疾病的方法中。疾病的非限制性示例包括:所有类型的癌症(乳癌、肺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、黑色素瘤、头颈癌和胰腺癌等)、类风湿性关节炎、克罗恩氏病(Crohn's disuse)、SLE、心血管损伤、缺血等。举例而言,适应症将包括白血病(包括T细胞急性淋巴母细胞性白血病(T-ALL))、淋巴母细胞性疾病(包括多发性骨髓瘤)和实体肿瘤(包括肺肿瘤、结肠直肠肿瘤、前列腺肿瘤、胰腺肿瘤和乳房肿瘤(包括三阴性乳癌))。举例而言,适应症包括骨疾病或癌症转移,其与原发性肿瘤来源无关;乳癌,包括(通过非限制性实施方式)ER/PR+乳癌、Her2+乳癌、三阴性乳癌;结肠直肠癌;子宫内膜癌;胃癌;神经胶母细胞瘤;头颈癌,例如食管癌;肺癌,例如通过非限制性实施方式,非小细胞肺癌;多发性骨髓瘤、卵巢癌;胰腺癌;前列腺癌;肉瘤,例如骨肉瘤;肾癌,例如通过非限制性实施方式,肾细胞癌;和/或皮肤癌,例如通过非限制性实施方式,鳞状细胞癌、基底细胞癌或黑色素瘤。在一些实施方式中,癌症是鳞状细胞癌。在一些实施方式中,癌症是皮肤鳞状细胞癌。在一些实施方式中,癌症是食管鳞状细胞癌。在一些实施方式中,癌症是头颈部鳞状细胞癌。在一些实施方式中,癌症是肺鳞状细胞癌。

[0112] 也提供包含本文提供的多特异性多肽构建体中的任一种和医药上可接受的载剂的医药组合物。在一些情况下,医药组合物是无菌的。本公开的医药组合物可包括本公开的多特异性多肽构建体和载剂。此类医药组合物可包括试剂盒(例如诊断试剂盒)中。

[0113] 本领域技术人员应了解,本公开的抗体具有多种用途。举例而言,本公开的蛋白质

用作多种病症的治疗剂。本公开的抗体也用作诊断试剂盒中的试剂或用作诊断工具,或此类抗体可用于竞争分析以生成治疗性试剂。

[0114] 附图简单说明

[0115] 图1是具有受限CD3结合的本发明多特异性多肽构建体的基本组分的示意图。抗原结合结构域位于氨基和/或羧基末端。Fc区(例如异二聚体Fc区)位于CD3结合区的N-末端。Fc紧靠CD3结合区的此定位阻碍CD3结合。

[0116] 图2是显示含有可裂解接头并具有双重效应物功能的本公开的多特异性分子的示例性结构的图解说明,其中可裂解接头的蛋白水解裂解引起多特异性多肽构建体活化,以产生各自具有生物活性的两个组分。

[0117] 图3是由两个多肽(即,链1和链2)组成的各种FRα-靶向受限CD3构建体的示意图。上图提供可裂解多特异性多肽构建体的示例性显示,该可裂解多特异性多肽构建体含有具有(例如)MTSP1、MMP和/或颗粒酶B中的一或多种的一或多个蛋白酶底物识别位点的可裂解接头。链1含有FRαsdAb(抗原结合结构域),其连接至异二聚体Fc“臼”、经由蛋白酶可裂解接头(cx1547:仅颗粒酶B,cx309:MTSP1、MMP和颗粒酶B)连接至抗CD3 VL结构域、连接至第二FRαsdAb。链2含有FRαsdAb,其连接至互补异二聚体Fc“杵”,经由与上述相同的蛋白酶接头连接至抗CD3 VH结构域、连接至第二FRαsdAb。图6的下图显示与上图类似的构型,只是接头是不可裂解接头(范围介于cx1356中的3个氨基酸至cx681中的18个氨基酸)。在共表达时,CD3结合结构域经由VL:VH分别缔合于臼和杵上而适当地组装。

[0118] 图4A-4C显示所生成用以比较接头限制所生成构建体中的CD3结合的效应的构建体。图4A显示在每一多肽链中含有相同可裂解接头以偶合异二聚体Fc的每一Fc多肽与CD3结合区的结构域的多特异性多肽构建体的实施方式(显示示例性构建体cx1762)。在图4A中所示的形式中,显示呈未分解状态的构建体。图4B中显示构建体的替代形式,其中仅采用单一可裂解接头将Fc区连接至CD3结合结构域,命名为半裂解(显示示例性构建体cx3238)。图4C显示代表图4A和4B中的构建体在完全裂解时的形式的结构(显示示例性构建体cx2190)。代表蛋白水解裂解产物的构建体可通过共表达所显示的各种链重组产生。FRα靶向的sdAb位于每一构建体的C末端位置。

[0119] 图5A-5E显示代表性EGFR靶向和EGFR/cMET双重靶向的受限CD3接合体。在图5A中,cx2513具有位于异二聚体的每一链的C-末端的EGFR靶向的sdAb且由此展现与EGFR的二价结合。在图5B中,cx3030具有位于异二聚体的每一链的N和C-末端的EGFR靶向的sdAb且由此展现与EGFR的四价结合。在图5C中,cx2973具有位于异二聚体的每一链的N-末端的cMET靶向的sdAb和位于C-末端的EGFR靶向的sdAb且由此展示与每一cMET和EGFR的二价结合。在图5D中,cx2979具有位于异二聚体的一条链的N-末端的cMET靶向的sdAb和位于C-末端的EGFR靶向的sdAb且由此展现与cMET的单价结合和与EGFR的二价结合。在图5E中,cx2977具有位于异二聚体的一条链或另一链的N-末端的cMET靶向的sdAb和位于C-末端的EGFR靶向的sdAb且由此展现与每一cMET和EGFR的单价结合。

[0120] 图6A和6B是用以组装示例性B7H3靶向的受限CD3接合体的组分链的示意图。此类代表性构建体中所利用的B7H3结合结构域包括sdAb、scFv或FAB。通常,含有sdAb和scFv的构建体由两条异二聚体链组成,而含有FAB的构建体包括同源轻链的第三链(VL-CL)。

[0121] 图7显示5T4靶向的受限CD3接合体。生成分子的核心以含有异二聚体Fc,之后是可

裂解接头和经二硫键稳定的抗CD3 Fv。将此类分子的TAA结合部分放置于异二聚体Fc链的N-或C-末端。在顶部列中,TAA结合单元是Fab,其由杵多肽的N-末端和臼多肽的C-末端上的Fd(VH-CH1)组成。在Fab是结合单元的情况下,使第三链(轻链-VL-CL)表达以与Fd缔合。在中间和底部列中,TAA结合单位是位于N-末端和C-末端的杵多肽上的单一结构域抗体。在中间列中,生成的构建体的TAA结合sdAb是相同的,而在底部列中,生成的构建体的TAA结合sdab是具有不同表位的不同序列。

[0122] 图8是代表性CD20靶向的受限CD3接合构建体cx3309的示意图,其中CD20结合结构域是源自CD20抗体GA101的scFv。

[0123] 图9是代表性DLL3靶向的受限CD3接合构建体cx3308的示意图,其中DLL3结合结构域是scFvs。此示例性构建体包括两条链,其各自具有连接至CD3结合结构域和DLL3结合scFv的一个组分的异二聚体Fc的互补组分。呈组装形式的构建体对于DLL3是二价的且具有位于Fc异二聚体的C-末端的CD3结合结构域。

[0124] 图10A是还原(R)和非还原(NR)条件的代表性FRα靶向受限CD3接合构建体cx1547的SDS-PAGE的影像。预期分子量为135kDa。图10B和图10C是来自cx1547的尺寸排除分析的层析图的图,证实其是具有137.9kDa的测定分子量的单一物质。图10C是图10B中显示的主峰附近的放大视图。

[0125] 图11A和11B是展现本公开的示例性多特异性多肽构建体(本文中称作cx309)以未裂解或以蛋白水解方式裂解状态结合人类T细胞的结合能力的一对图。间质蛋白酶和MMP-2分别用于使图11A和图11B中的cx309裂解。

[0126] 图12A-12D显示由代表性FRα靶向受限CD3接合构建体cx1356、cx681和cx1547的细胞结合。图12A和图12C显示与Ovcar5细胞(FRa阳性卵巢癌细胞系)结合。图12B和图12D显示未与T细胞结合。图12A和图12B展示标准化的细胞计数对每一构建体的100nM的荧光的直方图。各种细胞类型上的每一构建体的完全滴定示于图12C和图12D中。在图12A和图12B中,仅二级抗人类APC抗体对照显示于填充的黑色迹线中,而阳性对照抗CD3结合显示于开放迹线中,且cx1356、cx681和cx1547显示于灰色阴影迹线中。

[0127] 图13A-13B显示由代表性EFGR靶向受限CD3接合构建体cx3030的细胞结合。图13A显示与100nM的EGFR阳性细胞系Colo-205的结合。图13B展现与100nM的T细胞未结合。结合展示为标准化的细胞计数对荧光的直方图。仅二级抗人类APC抗体对照显示于填充的黑色迹线中,而阳性对照抗CD3结合显示于开放的迹线中,且cx3030显示于灰色阴影迹线中。

[0128] 图14A-14D显示由B7H3靶向受限CD3接合体与B7H3阳性A375结合(图14A和14B)和与T细胞上的CD3未结合(图14C和14D)。靶向B7H3和CD3的替代形式DART-Fc展示与T细胞上的B7H3和CD3的强烈结合。本文使用各种B7H3抗原结合结构域,包括cx3095sdAb、cx3313FAB和cx3314scFv。scFv和FAB含有DART-Fc形式中所用的相同的抗B7H3 VH和VL序列。图14A和14C显示100nM浓度的每一构建体的比较直方图。仅二级抗人类APC抗体对照显示于填充的黑色迹线中,且各种B7H3靶向的CD3接合构建体显示于白色非共享迹线中。图14B和14D分别显示由各种构建体与BH73和CD3的结合的滴定。

[0129] 图15A-15B显示由代表性5T4靶向受限CD3接合构建体cx3262和cx3315的细胞结合。图15A显示与400nM的5T4阳性细胞系Ovcar-5的结合。图15B展现与400nM的T细胞未结合。结合展示为标准化的细胞计数对荧光的直方图。仅二级抗人类APC抗体对照显示于填充

的黑色迹线中,而阳性对照抗CD3结合显示于开放的迹线中,且cx3262和cx3315显示于灰色阴影迹线中。

[0130] 图16A-16D显示由代表性CD20靶向受限CD3接合构建体cx3309的细胞结合。图16A和图16C显示与Ramos细胞(一种CD20阳性细胞系)的结合。图16B和图16D展现未与T细胞结合。图16A-16B展示标准化的细胞计数对每一构建体的100nM的荧光的直方图。各种细胞类型上的每一构建体的完全滴定示于图16C-16D中。仅二级抗人类APC抗体对照显示于填充的黑色迹线中,而阳性对照抗CD3结合显示于开放的迹线中,且cx3309显示于灰色阴影迹线中。

[0131] 图17是展现在存在或不存在表达FRα的细胞Ovcar5下裂解或未裂解的cx309活化CD3 NFAT报告基因Jurkat细胞系(普洛麦格公司(Promega),美国)的能力的图。

[0132] 图18显示由cx1547的抗原依赖性T细胞活化。将呈FRα阳性(T47D、IGROV1、NCI-H2342、Ovcar-5、Skov-3和A2780)或阴性(NCI-H460)的各种细胞系与Jurkat CD3 NFAT-GFP报告基因细胞系共孵育,并在6小时测量荧光。此展现受限CD3构建体以抗原方式活化T细胞的能力。

[0133] 图19A-19D显示若在Fc结构域与CD3结构域之间的接头内发生蛋白分解,则受限CD3接合体的T细胞活化能力增强。此处显示在FRα阳性Ovcar-5细胞(图19A)或FRα阴性CCRF-CEM细胞(图19B)存在下由20nM cx1762、cx3238或cx2190介导的T细胞活化的动力学。此处也显示在FRα阳性Ovcar-5细胞(图19C)或FRα阴性CCRF-CEM细胞(图19D)存在下由cx1762、cx3238或cx2190介导的T细胞活化的功效。使用Jurkat CD3 NFAT-GFP报告基因,使用Incucyte ZOOM成像仪在24小时内监测CD3信号传导。值得注意的是,T细胞活化依赖于靶细胞系上的抗原表达,且通过去除CD3结合VH:VL结构域的一侧或两侧上的CD3结合结构域的N-末端的Fc结构域而大大增强。

[0134] 图20A-20D是展现各种EGFR和EGFR/cMET靶向受限CD3接合体的抗原依赖性T细胞活化能力的图系列。值得注意的是,T细胞活化能力随增加的价态或额外的靶抗原结合特异性而增强。由抗原阳性A431细胞上的各种构建体介导的T细胞活化动力学显示于图20A中,或由抗原阴性CCRF-CEM细胞上的各种构建体介导的T细胞活化动力学显示于图20C中。由抗原阳性A431细胞上的各种构建体的T细胞活化功效显示于图20B中,或由抗原阴性CCRF-CEM细胞上的各种构建体的T细胞活化功效显示于图20D中。在此使用Jurkat CD3 NFAT-GFP报告基因细胞系。

[0135] 图21A-21B显示由代表性B7H3靶向受限CD3接合构建体cx3095和靶向B7H3和CD3的替代DART-Fc形式来介导靶抗原特异性T细胞活化的能力。使用Jurkat CD3 NFAT-GFP报告基因细胞评价在B7H3阳性细胞系A375(图21A)和B7H3阴性细胞系Raji(图21B)存在下的T细胞活化。

[0136] 图22A-22F显示由代表性B7H3靶向受限CD3接合构建体和靶向B7H3和CD3的替代DART-Fc形式来介导靶抗原特异性T细胞活化的能力。值得注意的是,受限CD3接合构建体利用B7H3靶向的sdAb、scFv或FAB。使用Jurkat CD3 NFAT-GFP报告基因细胞评价在B7H3阳性细胞系A375(图22A、22C、22E)和B7H3阴性细胞系CCRF(图22B、22D、22F)存在下的T细胞活化。显示由50nM(图22A和22B)或2nM(图22C或22D)的每一构建体介导的T细胞活化的动力学。也显示由抗原阳性(图22E)和阴性(图22F)细胞系上的每一构建体介导的T细胞活化的

功效。

[0137] 图23A-23B是显示5T4靶向受限CD3接合构建体的T细胞活化能力的图系列。此实施方式显示二价二表位TAA靶向如何在TAA阳性细胞(OVCAR5)上相对于二价单表位蛋白增加受限CD3接合体的活性。在TAA阴性细胞(CCRF)存在下,构建体均不诱导T细胞活化。

[0138] 图24是显示由代表性5T4靶向受限CD3接合构建体cx3315诱导抗原依赖性T细胞活化的能力的图。使用Jurkat CD3 NFAT-GFP报告基因细胞系监测在5T4阳性细胞系(OVCAR5)和5T4阴性细胞系(CCRF-CEM)存在下由cx3315的T细胞活化。

[0139] 图25显示由代表性CD20靶向受限CD3接合构建体cx3309诱导抗原依赖性T细胞活化的能力。使用Jurkat CD3 NFAT-GFP报告基因细胞系监测在CD20阳性细胞系Ramos和细胞CD20阴性细胞系CCRF-CEM存在下由cx3309的T细胞活化。

[0140] 图26是显示由代表性DLL3靶向受限CD3接合构建体cx3308诱导T细胞活化的能力的图。使用Jurkat CD3 NFAT-GFP报告基因细胞系监测在SHP-77细胞(其是DLL3阳性的)存在下由cx3309的T细胞活化。此展现scFv部分可用于以受限CD3形式靶向TAA,并在结合至同源TAA阳性细胞系时有效活化T细胞。

[0141] 图27A-27F显示接头长度对在FRα阳性细胞IGROV1(图27A、27C、27E)或FRα阴性NCI-H460(图27B、27D、27F)存在下活化T细胞的能力的影响。图27A-27B分别显示由抗原阳性和阴性细胞上的2nM各种构建体的T细胞活化的动力学。图27C-27D分别显示由抗原阳性和阴性细胞上的2nM各种构建体的T细胞活化能力的量值。图27E-27F分别显示抗原阳性和阴性细胞上具有不同接头长度各种构建体的T细胞活化能力的功效。使用Jurkat CD3 NFAT-GFP报告基因细胞系评价T细胞活化。当与靶细胞上的第二抗原结合时,受限CD3蛋白仅在T细胞上有效地接合和簇集CD3。

[0142] 图28A-28C显示由cx1547的抗原依赖性T细胞介导的细胞毒性。图28A展现cx1547不诱导T细胞介导的抗原阴性细胞系(NCI-H460)的细胞毒性。图28B展现cx1547诱导T细胞介导的抗原阳性细胞系(Ovcar5)的细胞毒性。图28C显示对于由3nM cx1547诱导的OVCAR5细胞的T细胞介导的细胞毒性的动力学。cx1547仅在抗原阳性细胞系中诱导T细胞介导的细胞毒性。在Incucyte ZOOM成像仪上使用差异标记的靶细胞的半胱天冬酶-3/7荧光探针底物监测细胞毒性。在此分析中以20:1和10:1评价效应细胞对靶细胞比率(E:T)。

[0143] 图29A-29F显示由代表性B7H3靶向受限CD3接合构建体和靶向B7H3和CD3的替代DART-Fc形式驱动的T细胞介导的细胞毒性的动力学。B7H3阳性A375细胞系上的CD3接合构建体的50nM至80pM的滴定范围示于图29A-29E中。图29F显示B7H3表达已敲低的A549细胞上50nM的每一构建体的测量。值得注意的是,所有构建体均展示B7H3依赖性T细胞介导的细胞毒性。

[0144] 图30显示抗原阳性(A375)和阴性(A549-B7H3敲低)细胞系上由2.5nM B7H3靶向受限CD3接合构建体和DART-Fc B7H3 x CD3形式诱导的T细胞介导的细胞毒性的量值。

[0145] 图31A-31F显示两种形式FRa靶向的CD3接合体诱导对FRα阳性Ovcar-5细胞(图31A-31E)和FRα阴性NCI-H60细胞(图31F)的介导的T细胞细胞毒性的比较功效。cx2190是可源自cx1762的颗粒酶B蛋白水解处理的代表性C-末端产物。值得注意的是,cx2190与cx1792相比展示优异功效,此展现由Fc与CD3结合结构域之间的接头区内的蛋白分解介导的CD3结合显著增强。20nM、32pM和6pM的FRa阳性细胞上T细胞介导的细胞毒性的动力学分别显示于

图31A、31B和31C中。图31D和图31E分别显示在24和40小时FRαCD3接合体的两种形式的功效。图F展现,在靶细胞上无FRα表达下,任何构建体未介导显著细胞毒性。

[0146] 图32显示由代表性5T4靶向受限CD3接合构建体cx3315介导的T细胞介导的细胞毒性。cx3315对5t4表达细胞系Ovcar-5、而不对5T4阴性细胞系CCRF-CEM诱导特异性T细胞毒性。此分析中使用20nM cx3315。

[0147] 图33是展现在裂解或未裂解cx309存在下T细胞和Ovcar5细胞共培养20hr后的T细胞活化的图。仅裂解的cx309能够经由CD3结合介导FRa依赖性T细胞活化。通过CD25%的CD4和CD8群体的流式细胞分析监测T细胞活化。

[0148] 图34A-34H显示以靶标依赖性方式由代表性B7H3靶向受限CD3接合构建体和靶向B7H3和CD3的替代DART-Fc形式活化CD4(图34A和34E)和CD8(图34C和34G)T细胞的能力。将T细胞与B7H3阳性细胞系A375(图34A、34C、34E、34G)或B7H3敲低A549细胞系(图34B、34D、34F、34H)一起孵育,并通过流式细胞术评价活化标记CD25和CD71。此类数据展现所用构建体的B7H3依赖性T细胞活化能力。

[0149] 图35显示B7H3靶向受限CD3接合构建体cx3095介导抗原依赖性INFγ产生的能力。使用INFγELISA量化细胞因子产生。使用A375作为B7H3阳性细胞系,而使用B7H3敲低A549细胞系作为阴性细胞系。

[0150] 图36A-36B显示代表性FRα靶向受限CD3接合构建体cx1547诱导来自人类PBMC的FRα依赖性IFNγ(图36A)和IL-2(图36B)的能力。使用FluoroSpot细胞因子捕获分析测量细胞因子产生。分别使用IGROV-1和NCI-H460作为FRα阳性和阴性细胞系。

[0151] 图37显示B7H3靶向受限CD3接合构建体cx3095介导抗原依赖性INFγ产生的能力。使用FluoroSpot分析监测细胞因子产生。分别使用A375和CCRF-CEM细胞系作为B7H3阳性和阴性细胞系。

[0152] 图38A-38D显示FRα靶向受限CD3构建体cx1547活化离解的原发性人类卵巢肿瘤样品中存在的T细胞和引发细胞毒性的能力。图38A显示解离的卵巢肿瘤样品中肿瘤细胞(EpCAM+)和浸润性淋巴球(CD45+)的相对盛行率的流程图。图38B显示在用常用FRα抗体或cx1547处理后6天孵育后黏附性肿瘤细胞的存活率(CellTiterGlo)。图38C显示在用FRa抗体或cx1547处理后6天孵育后的INFγ产生。图38D显示在未用抗体(左图)、用常用FRα抗体(中间图)或cx1547(右图)处理6天后剩余黏附性肿瘤细胞的代表性影像。

[0153] 实施方式

[0154] 本发明提供呈至少结合CD3和第二抗原的多特异性多肽构建体形式的受限T细胞接合融合蛋白。本文提供的多特异性多肽构建体至少包括第一组分,其包括结合可操作连接至免疫球蛋白Fc区的抗原的抗原结合结构域的一或多个拷贝;第二组分,其包括至少一个结合CD3的结合结构域(本文中称作抗CD3结合结构域或CD3结合区,其是在本文中可互换使用的术语)的一或多个拷贝;和联接第一组分与第二组分的接头,例如多肽接头。在一些实施方式中,抗原是肿瘤相关抗原(TAA)。在一些实施方式中,接头是可裂解接头。

[0155] 所提供多特异性多肽构建体包括其中含有Fc区的第一组分在含有CD3结合区的第二组分的N-末端的构型。在该实施方式中,第一和第二组分经由在Fc区端的C-末端的接头联接。在一些实施方式中,抗原结合结构域位于多特异性多肽构建体的氨基末端(N-末端)区上。在一些实施方式中,抗原结合结构域位于多特异性多肽构建体的羧基末端(C-末端)

区上。在一些实施方式中,抗原结合结构域位于多特异性多肽构建体的N-和C-末端区上。如本文提供的多特异性多肽构建体的各种构型示于图1中。

[0156] 所提供多特异性多肽构建体展现受限T细胞接合活性,因一旦抗原经由抗原结合结构域结合,此类构建体仅基本上结合至CD3。此示例于本文提供的实施方式和图中,其展现受限CD3接合蛋白有效结合TAA阳性细胞、同时极少结合至不结合T细胞的能力。此独特性质容许受限CD3接合蛋白分布至存在TAA的位点而不结合至外周T细胞。此形式与其他CD3接合多特异性构建体的不同的处在于不容许或消除组成型CD3结合,从而提供避免外周T细胞结合的显著益处并允许优先分布至如由抗原结合结构域识别的抗原的位点。举例而言,如实施方式中所示,受限CD3接合形式能够具有与DART-Fc形式(例如公开的PCT发明第WO2017/030926号)类似的功效,但与外周T细胞的结合显著减弱。此外,其他CD3接合构建体介导抗原依赖性T细胞活化,然而,本文提供的多特异性多肽构建体介导抗原依赖性T细胞结合和活化。

[0157] 在一些方面中,所提供多特异性多肽构建体的受限T细胞接合活性是由于Fc区定位于CD3结合区的N-末端。在一些实施方式中,该定位减少、减弱、阻抑和/或防止由CD3结合区的CD3结合。在不存在由抗原结合结构域的抗原结合下,本文提供的多特异性多肽构建体展现降低或消除的CD3结合和T细胞活化能力。在一些实施方式中,在存在由多特异性多肽构建体的抗原结合结构域介导的抗原结合事件下,由CD3结合区结合CD3的能力大大增强。在一些实施方式中,在存在由多特异性多肽构建体的抗原结合结构域介导的抗原结合事件下,活化T细胞的能力大大增强。多特异性多肽构建体内由抗原结合结构域的其同源抗原的接合导致随后T细胞接合并介导抗原依赖性T细胞活化,例如细胞毒性、细胞因子释放、脱粒化和增殖。在一些实施方式中,所提供多特异性多肽构建体可用于增加免疫反应,例如增强T细胞活性,包括细胞溶解(或细胞毒性)T细胞活性。在一些方面中,免疫反应的调节可治疗对象的疾病或病况。

[0158] 在一些实施方式中,一或多个抗原结合结构域结合肿瘤细胞或肿瘤微环境的细胞上的抗原。在一些方面中,所提供多特异性多肽构建体可用于增加针对肿瘤或癌症的免疫反应,例如T细胞活性,例如细胞毒性活性。在一些实施方式中,所提供多特异性多肽构建体可用于治疗对象的肿瘤或癌症。

[0159] 本公开的多特异性多肽构建体确保经由外周血中的CD3未结合T细胞,因此类构建体的CD3结合区因Fc区的存在受限或以其他方式被阻断和/或抑制。因此,本公开的多特异性多肽构建体提供多个优点。在一些方面中,此类构建体限制结合所有T细胞的槽效应。在一些方面中,此类构建体降低全身性毒性。

[0160] 在一些实施方式中,本公开的所提供多特异性多肽构建体容许受控生物分布至对象的期望位点,例如肿瘤相关抗原(TAA)表达的位点。TAA表达的位点包括(例如)肿瘤和周围肿瘤微环境。

[0161] 在一些实施方式中,本公开的多特异性多肽构建体展现对CD3和一或多种其他抗原的特异性。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体可含有一个以上能结合一或多种TAA的抗原结合结构域,例如2、3或4个抗原结合结构域,例如参见图1。在一些实施方式中,一或多个抗原结合结构域结合相同抗原。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体包括一个以上结合相同抗原的不同表位的抗原结合结构域。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体

包括一个以上结合一或多种不同抗原的抗原结合结构域。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体包括一个以上结合相同抗原上的不同表位的抗原结合结构域,以及包括结合至一或多种不同抗原的额外抗原结合结构域。在一些方面中,所提供多特异性多肽构建体是双特异性多肽构建体,使得其能够经由多特异性多肽构建体的抗原结合结构域的结合而结合至CD3和另一抗原(例如TAA)。在一些实施方式中,所提供多特异性多肽构建体是双特异性多肽构建体,其经由使用第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域提供一或多种TAA的四价接合。举例而言,在一些实施方式中,双特异性多肽构建包括第一抗原结合单一结构域抗体(sdAb)和第二抗原结合sdAb,如图1和2中所示。

[0162] 在一些实施方式中,本文提供的多特异性多肽构建体就结合CD3和随后活化T细胞的能力而言以两种状态存在:(1)在未由任何或全部抗原结合结构域进行任何结合时,发生"无活性"状态,也即未裂解状态,使得CD3结合受限且排除T细胞相互作用,和(2)在由任何或全部抗原结合结构域抗原结合时,发生"活性"状态,使得CD3结合区能够结合CD3并容许T细胞相互作用。

[0163] 在一些实施方式中,Fc区经由一或多个接头连接至CD3结合结构域。在一些实施方式中,Fc区经由一或多个不可裂解接头连接至CD3结合区。在一些实施方式中,Fc区经由可裂解接头或以其他方式不稳定的接头连接至CD3结合区。

[0164] 在一些实施方式中,Fc区和CD3结合区由可裂解接头连接,其中在一些方面中,在可裂解接头裂解后发生增强的CD3结合。在一些此类方面中,"活性"状态可经由若干机制包括经由联接CD3结合区与Fc区的接头的裂解进一步放大。在一些实施方式中,可裂解接头是含有蛋白酶的底物识别位点的接头。在一些实施方式中,其中Fc区和CD3结合区由可裂解接头连接,在接头内裂解后可发生增强的CD3结合。

[0165] 在一些方面中,本公开的多特异性多肽构建体容许在不存在蛋白分解下的治疗效能。

[0166] 在一些实施方式中,Fc区是同二聚体Fc区。在一些实施方式中,Fc区是异二聚体Fc区。在一些实施方式中,Fc区是单体Fc区。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体的Fc区能与Fcγ R相互作用并介导先天免疫效应物功能,例如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体的Fc区能与补体蛋白(即C1q)相互作用并介导补体依赖性细胞毒性。因此,在一些方面中,本公开的多特异性多肽构建体容许多重免疫效应物机制,包括先天免疫效应物和T细胞。

[0167] 在一些实施方式中,其中Fc区和CD3结合区由可裂解接头可操作连接,Fc区与CD3结合区之间的接头的裂解可将多特异性多肽构建体分成第一和第二组分。取决于多特异性多肽构建体的组成,第一和第二组分可具有不同功能性。在一些实施方式中,Fc区是展现一或多种效应物功能(例如ADCC、CDC或ADCP功能)的区。在此类示例中,本公开的多特异性多肽构建体可用于产生自放大系统。举例而言,多特异性构建体可如下使用:在Fc区的TAA靶向和CD16结合后由NK细胞介导的ADCC引起释放颗粒酶B,其能使多特异性多肽构建体的第一和第二组分之间的接头细胞外蛋白分解和裂解。

[0168] 在一些实施方式中,接头是可裂解接头。多特异性多肽构建体提供具有双重效应物功能的二合一治疗部分,其中多特异性多肽构建体的蛋白水解活化产生两种各自具有生物活性的组分。本公开的多特异性多肽构建体能提供仅Fc介导的效应物功能,例如ADCC(例

如由NK细胞释放颗粒酶B)、ADCP和/或CDC。

[0169] 预期受限CD3接合构建体适于与任何TAA结合结构域一起使用,从而通过避免与外周T细胞相互作用和介导强效TAA依赖性T细胞细胞毒性而容许在肿瘤或肿瘤微环境中更佳治疗暴露。在Fc与CD3结合结构域的组分之间纳入蛋白酶可裂解接头通过容许CD3结合结构域完全暴露使得能够放大T细胞活化能力。取决于所包括的特定接头,放大步骤可由肿瘤相关的蛋白酶或在抗原依赖性T细胞活化后释放的颗粒酶来介导。若包括肿瘤蛋白酶可裂解接头,则由肿瘤或肿瘤微环境介导放大。而若包括颗粒酶B可裂解接头,则放大可在抗原依赖性活化后由T细胞自介导。此外,在其中构建体中包括效应物启用的Fc的情况下,放大可由自NK细胞释放的颗粒酶介导,其是经由ADCC机制发生。

[0170] 在一些实施方式中,蛋白酶是在肿瘤微环境中产生和/或在T细胞活化时经由抗原结合结构域与TAA的结合由肿瘤微环境中CD3结合区与CD3的初始结合诱导的蛋白酶。在一些实施方式中,蛋白酶是颗粒酶B。在一些方面中,本公开的多特异性多肽构建体影响肿瘤微环境内的蛋白酶和/或颗粒酶B裂解Fc免疫球蛋白多肽下方位置的多特异性多肽构建体内的接头的能力,由此产生两种在一些情况下具有不同效应细胞接合的治疗活性蛋白质。在一些方面中,在可裂解接头裂解时,裂解的第一部分或组分保留Fc-效应物功能和经由第一抗原结合结构域的第一抗原(例如TAA)的二价靶向,且第二部分或组分保留T细胞接合的能力,因CD3结合区与Fc区的分离容许CD3结合。裂解的第二部分或组分在一些情况下也保留结合至TAA的能力,其可为经由第二抗原结合结构域的二价结合。

[0171] 在一些实施方式中,第二部分或组分含有与CD3呈单价的CD3结合区,使得除非存在TAA,否则将不活化T细胞。在一些方面中,若多价多肽构建体含有可裂解接头,则裂解的第二部分或组分容许TAA依赖性T细胞介导的细胞毒性。在一些情况下,裂解的第二部分或组分确保无FcRn相互作用。此外,裂解的第二部分或组分的大小将足够小,例如仅约50kDa,若出于任何原因裂解的第二部分或组分在裂解后分布至肿瘤位点外和/或若其在肿瘤位点外异常裂解,此将确保快速释放。

[0172] 在一些实施方式中,本公开的多特异性多肽构建体容许同时发生T细胞和NK细胞介导的细胞毒性。在一些情况下,该活性可在多特异性多肽构建体中发生,其中含有可靶向给定TAA上的不同和/或非竞争表位的第一抗原结合结构域(例如第一抗TAA抗原结合结构域)和第二抗原结合结构域(例如第二抗TAA抗原结合结构域)。

[0173] 在一些方面中,本公开的多特异性多肽构建体提供许多优于目前双特异性治疗剂的优点。本公开的多特异性多肽构建体比常用治疗性抗体小,例如150kDa对125kDa,此将容许更佳靶标(例如肿瘤)渗透。首先,整个多特异性多肽构建体的大小为未裂解的构建体提供长的半衰期,且在构建体裂解时,裂解的第二部分或组分将足够小以确保短的半衰期。在一些方面中,本公开的多特异性多肽构建体展现降低的全身性毒性或降低的肿瘤和/或肿瘤微环境外的任何区域的毒性,因在CD3接合发生之前,由CD3结合区的CD3结合取决于TAA接合。在一些情况下,对肿瘤环境的蛋白酶具有特异性的可裂解接头的纳入减少了由多特异性构建体的CD3结合,直至蛋白水解活化和TAA接合,由此放大CD3接合。

[0174] 本公开的多特异性多肽构建体经设计以确保使可裂解接头裂解的蛋白酶无需偏向肿瘤(例如无需仅在肿瘤位点和/或在肿瘤环境中不同表达)。相反,此类多特异性多肽构建体仅需要蛋白酶与TAA存在于相同位置。此类构建体的化合价将驱动生物分布和保留于

肿瘤和/或肿瘤微环境中。

[0175] 本文中引用的所有出版物和专利文献以引用方式纳入本文中,如同每一该出版物或文献具体地和单独地指示为以引用方式纳入本文中一般。出版物和专利文献的引用并不旨在承认任一种系相关现有技术,其也不欲构成对此类出版物和专利文献的内容或日期的任何承认。现已通过书面说明阐述了本发明,本领域技术人员将认识到,本发明可在各种实施方式中实践且以下说明和实施方式用于阐释目的,而不限制以下权利要求。

[0176] I.定义

[0177] 除非另外定义,否则与本发明相关使用的科学和技术术语应具有本领域技术人员通常理解的含义。术语“一个”实体或“一种”实体是指一或多个该实体。举例而言,化合物是指一或多种化合物。因此,术语“一个”、“一种”、“一或多个”和“至少一个”在可互换使用。此外,除非上下文另外需要,否则单数术语将包括复数且复数术语将包括单数。通常,与本文所述的细胞及组织培养、分子生物学以及蛋白质和寡核苷酸或或多核苷酸化学和杂交相关利用的命名和技术是业内熟知和常用的那些。标准技术用于重组DNA、寡核苷酸合成和组织培养和转化(例如电穿孔、脂转染)。酶促反应和纯化技术是根据制造商的说明书来实施,或如业内常规方法完成,或如本文所述实施。通常根据业内熟知的常用方法且如各种一般且更具体参考文献中所述实施上述技术和程序,此类参考文献贯穿本说明书引用且论述。参见(例如)Sambrook等人《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)(第2版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),冷泉港,纽约(1989))。与本文所述的分析化学、合成有机化学以和医学和医药化学相关利用的命名及其实验室程序和技术为是业内熟知且常用的那些。对化学合成、化学分析、医药制备、配制和递送和患者治疗使用标准技术。

[0178] 如根据本发明所利用,以下术语除非另有指示否则应理解为具有以下含义:

[0179] 如本文所用术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白(Ig)分子的抗原结合部分,也即,含有特异性结合抗原(与抗原免疫反应)的抗原结合位点的分子。“特异性结合”或“与……免疫反应”或“免疫特异性结合”意指抗体与期望抗原的一或多种抗原决定簇反应且不与其他多肽结合或以远更低的亲和性($K_d > 10^{-6}$)结合。抗体包括(但不限于)多克隆、单克隆、嵌合、完全人类、结构域抗体、单链、Fab、和$F(ab')_2$片段、Fv、scFv和Fab表达文库。

[0180] 已知基本抗体结构单元包含四聚体。每一四聚体由两个相同的多肽链对组成,每一对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。每一链的氨基末端部分包括约100个至110个或更多个主要负责抗原识别的氨基酸的可变区。每一链的羧基末端部分界定主要负责效应功能的恒定区。一般而言,自人类获得的抗体分子是指种类IgG、IgM、IgA、IgE和IgD中的任一种,其因分子中存在的重链的性质彼此不同。某些种类也具有亚类,例如IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4和其他。此外,在人类中,轻链可为κ链或λ链。

[0181] 如本文所用术语“单克隆抗体”(mAb)或“单克隆抗体组合物”是指仅含有一分子种类的抗体分子群体,该抗体分子由独特轻链基因产物和独特重链基因产物组成。具体而言,单克隆抗体的互补决定区(CDR)在群体的所有分子中均相同。MAb含有能够与抗原的特定表位免疫反应的抗原结合位点,其特征在于对抗原的独特结合亲和性。

[0182] 术语“抗原结合位点”或“结合部分”是指免疫球蛋白分子中参与抗原结合的部分。抗原结合位点是由重(“H”)和轻(“L”)链的N-末端可变(“V”)区的氨基酸残基形成。重链和

轻链的V区内的三个高度趋异伸展序列(称作“超变区”)插入称作“框架区”或“FR”的更保守侧翼伸展序列之间。因此,术语“FR”是指在免疫球蛋白中的超变区之间和附近天然发现的氨基酸序列。在抗体分子中,轻链的三个超变区和重链的三个超变区相对于彼此布置于三维空间中以形成抗原结合表面。抗原结合表面与结合抗原的三维表面互补,且重链和轻链中的每一种的三个超变区称为”互补决定区”或“CDR”。氨基酸在每一结构域中的分配是按照以下的定义:《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》(Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest)(国立卫生研究院,马里兰州贝塞斯达(1987和1991)),或Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987),Chothia等人,Nature 342:878-883(1989)。

[0183] 如本文所用术语“表位”包括由抗体、抗体片段或其他结合结构域靶向的抗原的任何特异性部分。术语“表位”包括特异性结合针对的任何蛋白区。术语“表位”包括能够特异性结合至免疫球蛋白或T细胞受体的任何蛋白决定簇。表位决定簇通常是由分子的化学活性表面分型(例如,氨基酸或糖侧链)组成,且通常具有特定三维结构特征以和特定电荷特征。举例而言,可针对多肽的N-末端、中心或C-末端肽产生抗体。另外,可针对多肽的线性或中断表位产生抗体。在解离常数是≤1μM,例如在一些实施方式中≤100nM且在一些实施方式中≤10nM时,据称抗体特异性结合抗原,且抗体不展示与紧密相关或不同的其他蛋白的结合。

[0184] 如本文所用术语“特异性结合”、“免疫结合”和“免疫结合性质”是指在免疫球蛋白分子与免疫球蛋白特异性针对的抗原之间发生的类型的非共价相互作用。免疫结合相互作用的强度或亲和性可相互作用的解离常数(K_d)表示,其中K_d越小代表亲和性越大。所选多肽的免疫结合性质可使用业内熟知的方法量化。一种该方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中那些速率取决于复合伴侣的浓度、相互作用的亲和性以和在两个方向上同样影响速率的几何参数。因此,可通过计算浓度和实际缔合和解离速率来测定“缔合速率常数”(K_{on})和“解离速率常数”(K_{off})。(参见Nature 361:186-87(1993))。K_{off}/K_{on}的比率能够取消与亲和性无关的所有参数,并且等于解离常数K_d。(通常参见Davies等人(1990)Annual Rev Biochem 59:439-473)。在如通过诸如放射性配体结合分析或本领域技术人员已知的类似分析等分析所测量的结合常数(K_d)是≤1μM、例如在一些实施方式中≤100nM、在一些实施方式中≤10nM且在一些实施方式中≤100pM至约1pM时,据称本发明抗体特异性结合至EGFR。

[0185] 如本文所用术语“分离的多核苷酸”应意指基因组、cDNA或合成起源或其一些组合的多核苷酸,其由于其起源,“分离的多核苷酸”(1)与多核苷酸的全部或一部分不相关,其中“分离的多核苷酸”是在自然界中发现,(2)可操作连接至多核苷酸,其中其在自然界中不连接至多核苷酸,或(3)作为较大序列的一部分不会在自然界发生。根据本公开的多核苷酸包括编码本文所示的重链免疫球蛋白分子的核酸分子和编码本文所示的轻链免疫球蛋白分子的核酸分子。

[0186] 本文中提及的术语“分离的蛋白质”意指cDNA、重组RNA或合成起源或其一些组合的蛋白质,其由于其起源或衍生的来源,“分离的蛋白质”(1)与自然界中发现的蛋白质不相关,(2)不含来自同一来源的其他蛋白质,例如不含鼠类蛋白质,(3)由来自不同物种的细胞表达,或(4)自然界中不出现。

[0187] 术语“多肽”在本文中用作通用术语来指天然蛋白质、多肽序列的片段或类似物。因此,天然蛋白质片段和类似物是多肽属的种类。根据本公开的多肽包含本文所示的重链免疫球蛋白分子和本文所示的轻链免疫球蛋白分子,以及由包含重链免疫球蛋白分子与轻链免疫球蛋白分子(例如κ轻链免疫球蛋白分子)的组合形式的抗体分子且反的也然,以及其片段和类似物。

[0188] 如用于物体的如本文所用术语“天然”是指自然界中可发现的物体的事实。举例而言,可自自然界中的来源分离且尚未在实验室中由人有意修饰或以其他方式修饰的生物体(包括病毒)中存在的多肽或多核苷酸序列是天然的。

[0189] 如本文所用术语“可操作连接”是指如此阐述的组分的位置处于允许其以其预期方式发挥功能的关系。“可操作连接”至编码序列的控制序列以使在与控制序列兼容的条件下实现编码序列的表达的方式接合。

[0190] 如本文所用术语“控制序列”是指实现与其接合的编码序列的表达和处理所必需的多核苷酸序列。此类控制序列的性质根据原核生物中的宿主生物体而不同,此类控制序列通常包括真核生物中的启动子、核糖体结合位点和转录终止序列,通常,此类控制序列包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”旨在至少包括其存在对于表达和加工是必不可少的所有组分,且也可包括其存在是有利的额外组分,例如,前导序列和融合伴侣序列。如本文中提及的术语“多核苷酸”意指至少10个碱基长度的核苷酸,核糖核苷酸或脱氧核苷酸,或任一类型的核苷酸的修饰形式。该术语包括单链和双链形式的DNA。

[0191] 本文中提及的术语寡核苷酸包括通过天然和非天然寡核苷酸链接连接在一起的天然和修饰的核苷酸。寡核苷酸通常包含200个或更少碱基长度的多核苷酸亚组。在一些实施方式中,寡核苷酸是10至60个碱基长,例如,在一些实施方式中,是12、13、14、15、16、17、18、19或20至40个碱基长。寡核苷酸通常是例如用于探针的单链,但寡核苷酸可为例如用于构建基因突变体的双链。本公开的寡核苷酸是正义或反义寡核苷酸。

[0192] 本文中提及的术语“天然核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。本文中提及的术语“修饰的核苷酸”包括具有修饰或取代的糖基团的核苷酸等。本文中提及的术语“寡核苷酸链接”包括寡核苷酸链接,例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺磷酸硫醇酯(phosphoroanilothioate)、苯胺磷酸酯(phoshoraniladate)、氨基磷酸酯(phosphoronmidate)等。参见(例如)LaPlanche等人,Nucl.Acids Res.14:9081(1986);Stec等人,J.Am.Chem.Soc.106:6077(1984),Stein等人,Nucl.Acids Res.16:3209(1988),Zon等人Anti Cancer Drug Design 6:539(1991);Zon等人《寡核苷酸和类似物:实践方法》Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach,,第87-108页(F.Eckstein编辑,牛津大学出版社(Oxford University Press),英格兰牛津(1991));Stec等人,美国专利第5,151,510号;Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543(1990)。若有需要,寡核苷酸可包括用于检测的标记。

[0193] 如本文所用,20个常规氨基酸及其缩写是遵循常用用法。参见《免疫学-合成》(Immunology-A Synthesis)(第2版,E.S.Golub和D.R.Gren编辑,Sinauer Associates,Sunderland7 Mass.(1991))。20个常规氨基酸、非天然氨基酸(例如α-,α-二取代的氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸和其他非常规氨基酸)的立体异构物(例如D-氨基酸)也可为适于本发明多肽的组分。非常规氨基酸的示例包括:4羟脯氨酸、γ-羧基谷氨酸盐、ε-N,N,N-三甲基

赖氨酸、ε-N-乙酰基赖氨酸、O-磷丝氨酸、N-乙酰基丝氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟赖氨酸、σ-N-甲基精氨酸和其他类似氨基酸和亚氨基酸(例如4-羟脯氨酸)。在本文使用的多肽符号中,根据标准用法和惯例,左手方向是氨基末端方向,且右手方向是羧基末端方向。

[0194] 类似地,除非另有说明,否则单链多核苷酸序列的左手末端是双链多核苷酸序列的左手方向的5′端,称为5′方向。新生RNA转录本的5′至3′添加方向称为转录方向;DNA链上具有与RNA相同序列且为RNA转录本的5′至5′端的序列区称为“上游序列”,DNA链上具有与RNA相同序列且为RNA转录本的3′至3′端的序列区称为“下游序列”。

[0195] 当应用于多肽时,术语“显著相同性”意指在例如通过程序GAP或BESTFIT使用默认空位权重最佳比对时,两个肽序列共有至少80序列相同性百分比、例如在一些实施方式中至少90序列相同性百分比、在一些实施方式中至少95序列相同性百分比和在一些实施方式中至少99序列相同性百分比。

[0196] 在一些实施方式中,不同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。

[0197] 如本文所论述,涵盖抗体或免疫球蛋白分子的氨基酸序列的微小变化,如由本发明所包括,前提是氨基酸序列的变化维持至少75%、例如在一些实施方式中至少80%、90%、95%且在一些实施方式中99%。具体而言,涵盖保守氨基酸置换。保守置换是在其侧链中相关的氨基酸家族内进行的那些。遗传编码的氨基酸通常分成以下家族:(1)酸性氨基酸是天冬氨酸盐、谷氨酸盐;(2)碱性氨基酸是赖氨酸、精氨酸、组氨酸;(3)非极性氨基酸是丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸;和(4)不带电极性氨基酸是甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、半胱氨酸、丝氨酸、氨酸、酪氨酸。亲水性氨基酸包括精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸盐、谷氨酸、谷氨酸盐、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸和苏氨酸。疏水性氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。氨基酸的其他家族包括(i)丝氨酸和苏氨酸,其是脂肪族-羟基家族;(ii)天冬酰胺和谷氨酸,其是含有酰胺的家族;(iii)丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸,其是脂肪族家族;和(iv)苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,其是芳香族家族。举例而言,可以合理地预期用异亮氨酸或缬氨酸分离置换亮氨酸、用谷氨酸盐置换天冬氨酸盐、用丝氨酸置换苏氨酸或用结构上相关的氨基酸类似地置换取代氨基酸不会对所得分子的结合或性质产生主要效应,尤其若取代不涉及框架位点内的氨基酸。通过分析多肽衍生物的比活性可容易地确定氨基酸变化是否产生功能性肽。本文中详细阐述分析。抗体或免疫球蛋白分子的片段或类似物可由本领域技术人员容易地制备。在一些实施方式中,片段或类似物的氨基-和羧基-末端出现在功能结构域的边界附近。结构和功能域可通过比较核苷酸和/或氨基酸序列数据与公开或专利序列数据库来鉴别。使用计算机化比较方法以鉴别在已知结构和/或功能的其他蛋白质中出现的序列基序或预测的蛋白质构型结构域。已知鉴别折叠成已知三维结构的蛋白质序列的方法。Bowie等人,Science 253:164(1991)。因此,上述实施方式表明,本领域技术人员可识别可用于定义根据本公开的结构和功能结构域的序列基序和结构构型。

[0198] 在一些实施方式中,氨基酸取代是如下的那些:(1)降低对蛋白分解的敏感性,(2)降低对氧化的敏感性,(3)改变结合亲和性以形成蛋白复合物,(4)改变结合亲和性,和(4)赋予或修改此类类似物的其他物理化学或功能性质。类似物可包括除天然肽序列外的序列

的各种突变蛋白质。举例而言,单一或多个氨基酸取代(例如,保守氨基酸取代)可在天然序列中(例如,在形成分子间接触的结构域外的多肽部分中)制得。保守氨基酸取代不应显著改变母序列的结构特征(例如置换氨基酸不应倾向于切断母序列中出现的螺旋或破坏表征母序列的其他类型的二级结构)。业内公认的多肽二级和三级结构的示例阐述于以下中:《蛋白质、结构和分子原理》(Proteins,Structures and Molecular Principles)(Creighton编辑,W.H.Freeman and Company,New York(1984));《蛋白质结构介绍》(Introduction to Protein Structure)(C.Branden和J.Tooze编辑,Garland Publishing,New York,N.Y.(1991));和Thornton等人,Nature 354:105(1991)。

[0199] 如本文所用术语“多肽片段”是指具有氨基末端和/或羧基末端缺失和/或一个或多个内部缺失的多肽,但其中其余氨基酸序列与自例如全长cDNA序列的推断天然序列中的相应位置相同。片段通常是至少5、6、8或10个氨基酸长,例如在一些实施方式中至少14个氨基酸长,在一些实施方式中至少20个氨基酸长,通常至少50个氨基酸长,且在一些实施方式中至少70个氨基酸长。如本文所用术语“类似物”是指包括至少25个氨基酸的区段的多肽,此类氨基酸与推断的氨基酸序列的一部分具有显著相同性且在合适结合条件下与EGFR特异性结合。通常,相对于天然序列,多肽类似物包含保守氨基酸取代(或添加或缺失)。类似物通常是至少20个氨基酸长,例如在一些实施方式中至少50个氨基酸长或更长,且通常可与全长天然多肽一样长。

[0200] 术语“药剂”在本文中用于表示自生物材料制得的化学化合物、化学化合物的混合物、生物大分子或提取物。

[0201] 如本文所用术语“标记”或“标记的”是指纳入可检测标记物,例如通过纳入经放射标记的氨基酸或附接至可通过经标记抗生物素蛋白(例如,含有荧光标记物或可通过光学或比色方法检测的酶活性的链霉抗生物素蛋白)检测的生物素基部分的多肽。在某些情况下,标记或标记物也可具有治疗性。标记多肽和糖蛋白的各种方法为业内已知且可使用。用于多肽的标记的示例包括(但不限于)以下:放射性同位素或放射性核种(例如,^{3}H、^{14}C、^{15}N、^{35}S、^{90}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{125}I、^{131}I)、荧光标记(例如,荧光团、玫瑰红(rhodamine)、镧是元素磷光体)、酶标记(例如,辣根过氧化物酶、p-半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光标记物、生物素基、由第二报告子识别的预定多肽表位(例如,亮氨酸拉链对序列、二级抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签)。在一些实施方式中,标记由各种长度之间隔臂附接以减少潜在的空间位阻。如本文所用术语“医药剂或药物”是指当适当地给予患者时能够诱导期望治疗效应的化学化合物或组合物。

[0202] 如本文所用的“基本上纯”意指目标物质是存在的主要物质(即,基于摩尔浓度,其比组合物中的任何其他个别物质更丰富),且基本上纯化的部分是其中目标物质包含占存在的所有大分子物质的至少约50%(基于摩尔浓度)的组合物。

[0203] 通常,基本上纯的组合物将占组合物中存在的所有大分子物质的约80%以上,例如在一些实施方式中约85%、90%、95%和99%以上。在一些实施方式中,将目标物质纯化至基本均质性(通过常用检测方法在组合物中不能检测到污染物质),其中组合物基本上由单一大分子物质组成。

[0204] 术语患者包括人类和家畜对象。

[0205] 本文中的其他化学术语根据业内习惯用法使用,如由《麦格劳-希尔化学术语词

典》(The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms)(Parker,S.编辑,McGraw-Hill,San Francisco(1985))所示例。

[0206] II.多特异性多肽构建体

[0207] 本文提供含有包含免疫球蛋白Fc区的第一组分和包含CD3结合区的第二组分的多特异性多肽构建体,其中第一和第二组分由接头偶合,其中Fc区位于CD3结合区的N-末端;且第一和第二组分中的一种或二种包含结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域。

[0208] 在一些实施方式中,多特异性多肽构建体自N-末端至C-末端依次含有:免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3(CD3ε)的CD3结合区;和结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体自N-末端至C-末端依次包含:结合至肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域;免疫球蛋白Fc区;接头;和结合CD3(CD3ε)的CD3结合区。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体至少含有结合TAA的第一抗原结合结构域和结合TAA的第二抗原结合结构域。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体自N-末端至C-末端依次包含:结合至肿瘤相关抗原(TAA)的第一抗原结合结构域;免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3(CD3ε)的CD3结合区;和结合肿瘤相关抗原(TAA)的第二抗原结合结构域。

[0209] 本公开的多特异性多肽构建体的每一组分更详细阐述于下文中。

[0210] 1.抗CD3结合结构域:

[0211] 本公开的多特异性多肽构建体包括抗CD3结合结构域的一或多个拷贝。本公开的抗CD3结合结构域经由T细胞上CD3ε的接合活化T细胞。本公开的抗CD3结合结构域激动、刺激、活化和/或以其他方式增大CD3介导的T细胞活化。CD3的生物活性包括例如经由CD3与T细胞受体(TCR)的抗原结合亚单位之间的相互作用的T细胞活化和其他信号传导。举例而言,本公开的抗CD3结合结构域经由T细胞上的CD3ε的接合通过调节、例如激动、刺激、活化或以其他方式增大CD3介导的T细胞活化完全或部分活化T细胞。

[0212] 在优选实施方式中,本公开的抗CD3结合结构域特异性结合CD3的ε链,也称为CD3ε。本公开的抗CD3ε结合结构域经由T细胞上的CD3ε的接合活化T细胞。本公开的抗CD3ε结合结构域包括单克隆抗体,例如哺乳动物单克隆抗体、灵长类动物单克隆抗体、完全人类单克隆抗体、以及人源化单克隆抗体及嵌合抗体,以及其抗原结合片段。在一些实施方式中,抗CD3ε结合结构域包括抗体或其抗原结合片段的一或多个拷贝。

[0213] 在一些实施方式中,抗CD3ε结合结构域包括选自由以下组成的组的抗体或其抗原结合片段的一或多个拷贝:Fab片段、F(ab′)$_2$片段、Fv片段、scFv、scAb、dAb、单一结构域重链抗体和单一结构域轻链抗体。在一些实施方式中,抗CD3结合结构域包括结合CD3ε的Fv抗体片段(本文中称作抗CD3εFv片段)。在一些实施方式中,抗CD3εFv抗体片段是经二硫键稳定的抗CD3结合Fv片段(dsFv)。在一些实施方式中,抗CD3结合结构域单价结合CD3。

[0214] 在一些实施方式中,其抗CD3ε结合结构域包含含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的可变重链(Hv)。在一些实施方式中,抗CD3ε结合结构域包含含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。在一些实施方式中,其抗CD3ε结合结构域包含含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的可变重链(Hv)和包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。在一些实施方式中,其抗CD3ε结合结构域包含含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的可变重链(Hv)。在一些实施方式中,抗CD3ε结合结构域包含含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。在一些实施方式中,其抗CD3ε结合结构域包含含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的可变重链

(Hv)和包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。在一些实施方式中,其抗CD3e结合结构域包含含有选自SEQ ID NO:32-81的群的氨基酸序列的重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合。在一些实施方式中,其抗CD3ε结合结构域包括选自SEQ ID NO:32-62的群的重链可变区氨基酸序列和包含选自SEQ ID NO:63-81的群的氨基酸序列的轻链可变区氨基酸序列的组合。

[0215] 在一些实施方式中,其抗CD3ε结合结构域包含含有与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序列的可变重链(Hv)。在一些实施方式中,抗CD3ε结合结构域包含含有与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。在一些实施方式中,其抗CD3ε结合结构域包含含有与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序列的可变重链(Hv)和包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。

[0216] 在一些实施方式中,其抗CD3ε结合结构域包含含有与SEQ ID NO:44的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序列的可变重链(Hv)。在一些实施方式中,抗CD3ε结合结构域包含含有与SEQ ID NO:72的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。在一些实施方式中,其抗CD3ε结合结构域包含含有与SEQ ID NO:44的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序列的可变重链(Hv)和包含与SEQ ID NO:72的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。

[0217] 在一些实施方式中,抗CD3εFv抗体片段包括选自SEQ ID NO:32-81的群的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗CD3εFv抗体片段包括与选自由SEQ ID NO:32-81组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗CD3εFv抗体片段包括选自SEQ ID NO:32-62的群的氨基酸序列和选自由SEQ ID NO:63-81组成的组的氨基酸序列的组合。在一些实施方式中,抗CD3εFv抗体片段包括与选自由SEQ ID NO:32-62组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序列和与选自由SEQ ID NO:63-81组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序列的组合。

[0218] 在一些实施方式中,抗CD3ε结合结构域包括VH CDR1序列、VH CDR2序列和VH CDR3序列的组合,其中VH CDR1序列、VH CDR2序列和VH CDR3序列中的至少一种选自至少包括氨基酸序列TYAMN(SEQ ID NO:16)的VH CDR1序列;至少包括氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:17)的VH CD2序列;和至少包括氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:18)的VH CDR3序列。

[0219] 在一些实施方式中,抗CD3ε结合结构域包括VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列的组合,其中VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列中的至少一种选自至少包括氨

基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:19)的VL CDR1序列;至少包括氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:20)的VL CDR2序列;和至少包括氨基酸序列ALWYSNLWV(SEQ ID NO:21)的VL CDR3序列。

[0220] 在一些实施方式中,抗CD3ε结合结构域包括至少包括氨基酸序列TYAMN(SEQ ID NO:16)的VH CDR1序列;至少包括氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:17)的VH CD2序列;至少包括氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:18)的VH CDR3序列、至少包括氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:19)的VL CDR1序列;至少包括氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:20)的VL CDR2序列;和至少包括氨基酸序列ALWYSNLWV(SEQ ID NO:21)的VL CDR3序列。

[0221] 在一些实施方式中,抗CD3ε结合结构域包括VH CDR1序列、VH CDR2序列和VH CDR3序列的组合,其中VH CDR1序列、VH CDR2序列和VH CDR3序列中的至少一种选自包括与氨基酸序列TYAMN(SEQ ID NO:16)具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的序列的VH CDR1序列;包括与氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:17)具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的序列的VH CD2序列;和包括与氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:18)具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的序列的VH CDR3序列。

[0222] 在一些实施方式中,抗CD3ε结合结构域包括VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列的组合,其中VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列中的至少一种选自包括与氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:19)具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的序列的VL CDR1序列;包括与氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:20)具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的序列的VL CDR2序列;和包括与氨基酸序列ALWYSNLWV(SEQ ID NO:21)具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的序列的VL CDR3序列。

[0223] 在一些实施方式中,抗CD3ε结合结构域包括与氨基酸序列TYAMN(SEQ ID NO:16)具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的VH CDR1序列;与氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:17)具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的VH CD2序列;与氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:18)具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的VH CDR3序列、与氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:19)具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的VL CDR1序列;与氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:20)具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的VL CDR2序列;和与氨基酸序列ALWYSNLWV(SEQ ID NO:21)具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的VL CDR3序列。

[0224] 在一些实施方式中,其抗CD3ε结合结构域是包括重链可变氨基酸序列和轻链可变氨基酸序列的组合的Fv片段。在一些实施方式中,其抗CD3ε结合结构域是Fv片段,其包含含有与选自由SEQ ID NO:32-81组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性的氨基酸序的重链可变氨基酸序列与轻链

可变氨基酸序列的组合。在一些实施方式中,其抗CD3ε结合结构域是Fv片段,其包含含有选自由SEQ ID NO:32-81组成的组的氨基酸序列的重链可变氨基酸序列与轻链可变氨基酸序列的组合。在一些实施方式中,其抗CD3ε结合结构域是Fv片段,其包括选自SEQ ID NO:32-62的群的重链可变氨基酸序列与选自由SEQ ID NO:63-81组成的组的氨基酸序列的组合。在一些实施方式中,其抗CD3ε结合结构域是Fv片段,其包括与选自由SEQ ID NO:32-62组成的组的氨基酸序列具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高相同性的重链可变氨基酸序列和与选自由SEQ ID NO:63-81组成的组的氨基酸序列具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高相同性的氨基酸序列的组合。

[0225] 2.免疫球蛋白Fc多肽:

[0226] 本公开的多特异性多肽构建体的第一组分包括免疫球蛋白Fc区。在一些实施方式中,免疫球蛋白Fc区是选自由IgG1同种型、IgG2同种型、IgG3同种型和IgG4亚类组成的组的IgG同种型。在一些实施方式中,Fc区是人类Fc。在一些实施方式中,免疫球蛋白Fc区是包含选自由SEQ ID NO:1-6组成的组的氨基酸序列的多肽。在一些实施方式中,免疫球蛋白Fc区含有为SEQ ID NO:1-6中的任一种的免疫活性片段的Fc链。在一些实施方式中,免疫球蛋白Fc区含有与SEQ ID NO:1-6中的任一种的氨基酸序列至少50％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％相同的Fc多肽链或其免疫活性片段。

[0227] 在一些实施方式中,多特异性多肽构建体是由各自含有Fc的多肽形成的二聚体。在一些具体实施方式中,相同或基本上相同的多肽将二聚化以产生同二聚体。在一些实施方式中,二聚体是其中多特异性多肽构建体的两条多肽相同的同二聚体。在其他情况下,Fc区是由Fc结构域形成,此类Fc结构域经突变或经修饰以促进异二聚化,其中不同多肽可二聚化以产生异二聚体。因此,在一些实施方式中,二聚体是其中多特异性多肽构建体的两条多肽链不同的异二聚体。已知用以促进异二聚化的示例性修饰,包括如下文所述的任一种。

[0228] 一般而言,除抗原结合能力(其是免疫球蛋白的主要功能)外,Fc区也负责效应物功能,例如补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC)。另外,Fc区中存在的FcRn序列通过通过偶合至体内FcRn受体延长体内半衰期起调控IgG含量的作用。在一些实施方式中,在使用所提供多特异性多肽构建体的Fc区,此类功能可改变,例如降低或增强。

[0229] 在一些实施方式中,所提供多特异性多肽构建体的Fc区展现一或多种效应物功能。在一些情况下,Fc区能提供Fc介导的效应物功能,例如ADCC(例如由NK细胞释放颗粒酶B)、ADCP和/或CDC。因此,在其中多特异性多肽构建体含有可裂解接头的一些实施方式中,接头的裂解可产生两种各自具有生物活性的组分:能够结合并接合T细胞上的CD3的CD3结合区,以及连接至可展现靶标特异性效应物功能的TAA-抗原结合结构域的Fc区。

[0230] 在一些实施方式中,Fc区包括经突变或经修饰以改变一或多种效应物功能的Fc多肽。已知突变成Fc多肽以改变(例如降低)效应物功能的各种实施方式,包括如下文所述的任一种。在一些实施方式中,除非参照特定SEQ ID NO阐述,否则在提及Fc区中的氨基酸取代时是由Kabat的EU编号(也称作Kabat编号)。EU编号是已知的且是根据最近更新的IMGT Scientific Chart(IMGT®,the international ImMunoGeneTics information

system®,http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html(创建日期:2001年5月17日,最后更新日期:2013年1月10日)和如以下中所报告的EU索引:Kabat,E.A.等人《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》(Sequences of Proteins of Immunological interest).第5版,US Department of Health and Human Services,NIH公开案第91-3242号(1991)。

[0231] 在一些实施方式中,含有展现降低的效应物功能的Fc区的所提供多特异性多肽构建体可为其中期望受限CD3结合但某些效应物功能(例如CDC和ADCC)是非必需或有害的应用的合意的候选者。可实施体外和/或体内细胞毒性分析来确认CDC和/或ADCC活性的降低/消耗。举例而言,可实施Fc受体(FcR)结合分析以确保多特异性多肽构建体和/或其裂解的组分无Fcγ R结合(因此可能无ADCC活性),但保留FcRn结合能力。用于介导ADCC的原代细胞(NK细胞)仅表达Fcγ RIII,而单核细胞表达Fcγ RI、Fcγ RII和Fcγ RIII。评估所关注分子的ADCC活性的体外分析的非限制性实施方式阐述于以下中:美国专利第5,500,362号(例如,参见Hellstrom,I.等人,Proc.Nat′l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I等人,Proc.Nat′l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);美国专利第5,821,337号(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))。或者,可采用非放射性分析方法(例如参见用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性分析(CellTechnology,Inc.Mountain View,Calif.)和CvtoTox 96®非放射性细胞毒性分析(Promega,Madison,Wis.))。可用于此类分析的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。或者或另外,可在体内(例如)在诸如Clynes等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中所显示者等动物模型中评价所关注分子的ADCC活性。也可实施C1q结合分析来确认多特异性多肽构建体和/或其裂解的组分不能结合C1q且因此无CDC活性。例如,参见WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为评价补体活化,可实施CDC分析(例如,参见Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood 101:1045-1052(2003);和Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。也可使用业内已知的方法来实施FcRn结合和体内清除率/半衰期测定(例如,参见Petkova,S.B.等人,Int′l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0232] 在一些实施方式中,免疫球蛋白Fc区或其免疫活性片段是IgG同种型。举例而言,融合蛋白的免疫球蛋白Fc区属人类IgG1同种型,其具有以下氨基酸序列:

[0233]
PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL
HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN
NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)。

[0234] 在一些实施方式中,免疫球蛋白Fc区或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人类IgG1多肽序列。

[0235] 在一些实施方式中,人类IgG1 Fc区经修饰以改变抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),例如,以下中所述的氨基酸修饰:Natsume等人,2008Cancer Res,68(10):3863-72;Idusogie等人,2001J Immunol,166(4):2571-5;Moore等人,2010mAbs,2(2):181-189;Lazar等人,2006 PNAS,103(11):4005-4010,Shields等人,2001 JBC,276(9):6591-6604;Stavenhagen等人,2007 Cancer Res,67(18):8882-8890;Stavenhagen等人,2008 Advan.Enzyme Regul.,48:152-164;Alegre等人,1992J Immunol,148:3461-3468;参阅Kaneko和Niwa,2011 Biodrugs,25(1):1-11,其全部内容以引用方式纳入本文中。

[0236] 在一些实施方式中,Fc区(例如人类IgG1 Fc区)经修饰以增强ADCC活性或CDC活性。增强ADCC的突变的实施方式包括Ser239和Ile332的修饰,例如Ser239Asp和Ile332Glu(S239D,I332E)。增强CDC的突变的示例包括Lys326和Glu333的修饰。在一些实施方式中,Fc区在使用Kabat编号系统的此类位置的一种或二种处经修饰,例如Lys326Ala和/或Glu333Ala(K326A和E333A)。

[0237] 在一些实施方式中,本发明的人类IgG1 Fc区融合蛋白无或具有减少的在N297附接至N-连接的聚糖链的岩藻糖。存在多种方式来防止岩藻糖基化,包括(但不限于)在FUT8缺陷型细胞系中产生;向哺乳动物细胞培养基中添加抑制剂,例如澳粟精胺(Castanospermine);和产生细胞系的代谢改造。在一些实施方式中,人类IgG1 Fc区在氨基酸Asn297(加框,Kabat编号)经修饰以防止融合蛋白的糖基化,例如Asn297Ala(N297A)或Asn297Asp(N297D)。

[0238] 在一些实施方式中,融合蛋白的Fc区在以下位置中的一或多种经改变以降低Fc受体结合:Leu 234(L234)、Leu235(L235)、Asp265(D265)、Asp270(D270)、Ser298(S298)、Asn297(N297)、Asn325(N325)或Ala327(A327)。举例而言,Leu 234Ala(L234A)、Leu235Ala(L235A)、Asp265Asn(D265N)、Asp270Asn(D270N)、Ser298Asn(S298N)、Asn297Ala(N297A)、Asn325Glu(N325E)或Ala327Ser(A327S)。在一些实施方式中,融合蛋白的Fc区在氨基酸Leu235(在上述SEQ ID NO:1中加框,Kabat编号)经修饰以改变Fc受体相互作用,例如Leu235Glu(L235E)或Leu235Ala(L235A)。在一些实施方式中,融合蛋白的Fc区在氨基酸Leu234(在上述SEQ ID NO:1中加框,Kabat编号)经修饰以改变Fc受体相互作用,例如Leu234Ala(L234A)。在一些实施方式中,融合蛋白的Fc区在氨基酸234和235经改变,例如Leu234Ala和Leu235Ala(L234A/L235A)或Leu234Val和Leu235Ala(L234V/L235A)。在较佳实施方式中,Fc区内的修饰降低与Fc-受体-γ受体的结合,同时对与新生Fc受体(FcRn)的结合具有最小影响。

[0239] 在一些实施方式中,人类IgG Fc区经修饰以增强FcRn结合。增强与FcRn的结合的Fc突变的实施方式是Met252Tyr,Ser254Thr,Thr256Glu(分别M252Y,S254T,T256E)(Kabat编号,Dall'Acqua等人,2006,J.Biol Chem Vol.281(33)23514-23524),Met428Leu和Asn434Ser(M428L,N434S)(Zalevsky等人,2010 Nature Biotech,第28(2)卷,157-159)(Kabat等人1991《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest)的EU索引)。在一些实施方式中,突变或修饰的Fc多肽包括以下突变:使用Kabat编号系统,Met252Tyr和Met428Leu或Met252Tyr和Met428Val(M252Y、M428L或M252Y、M428V)。

[0240] 在一些实施方式中,融合蛋白的Fc区在以下位置中的一或多种无氨基酸以降低Fc受体结合:Glu233(E233)、Leu234(L234)或Leu235(L235)。在此类实施方式中,这三个氨基酸的Fc缺失降低补体蛋白C1q结合。

[0241] PAPGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 2)

[0242] 在一些实施方式中,融合蛋白的Fc区在Gly236(在上述SEQ ID NO:1中加框)经改变以降低Fc受体结合。举例而言,其中自融合蛋白缺失Gly236。在一些实施方式中,人类IgG1Fc区在氨基酸Gly236经修饰以增强与CD32A的相互作用,例如Gly236Ala(G236A)。

[0243] 在一些实施方式中,人类IgG1 Fc区无Lys447(Kabat等人1991《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest)的EU索引)。

[0244] 在一些实施方式中,融合或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人类IgG2多肽序列。

[0245] 在一些实施方式中,融合蛋白的免疫球蛋白Fc区或免疫活性片段属人类IgG2同种型,其具有以下氨基酸序列:

[0246] PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 3)

[0247] 在一些实施方式中,融合或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人类IgG2多肽序列。

[0248] 在一些实施方式中,人类IgG2 Fc区在氨基酸Asn297(加框)经修饰以防止抗体的糖基化,例如Asn297Ala(N297A)或Asn297Asp(N297D)。在一些实施方式中,人类IgG2 Fc区无Lys447(Kabat等人1991《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest)的EU索引)。

[0249] 在一些实施方式中,融合蛋白的免疫球蛋白Fc区或免疫活性片段属人类IgG3同种型,其具有以下氨基酸序列:

[0250] PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFKWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST FRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESSGQPEN NYNTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNIFSCSVMH EALHNRFTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 4)

[0251] 在一些实施方式中,抗体或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人类IgG3多肽序列。

[0252] 在一些实施方式中,人类IgG3 Fc区在氨基酸Asn297(加框,Kabat编号)经修饰以防止抗体的糖基化,例如Asn297Ala(N297A)或Asn297Asp(N297D)。在一些实施方式中,人类IgG3 Fc区在氨基酸435经修饰以延长半衰期,例如Arg435His(R435H)。在一些实施方式中,人类IgG3 Fc区无Lys447(Kabat等人1991《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest)的EU索引)。

[0253] 在一些实施方式中,融合蛋白的免疫球蛋白Fc区或免疫活性片段属人类IgG4同种型,其具有以下氨基酸序列:

[0254] PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID NO: 5)

[0255] 在一些实施方式中,抗体或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人类IgG4多肽序列。

[0256] 在一些实施方式中,融合蛋白的免疫球蛋白Fc区或免疫活性片段属人类IgG4同种型,其具有以下氨基酸序列:

[0257] PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID NO: 6)

[0258] 在一些实施方式中,抗体或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

98％或99％相同的人类IgG4多肽序列。

[0259] 在其他实施方式中,人类IgG4 Fc区在氨基酸235经修饰以改变Fc受体相互作用,例如Leu235Glu(L235E)。在一些实施方式中,人类IgG4 Fc区在氨基酸Asn297(加框,Kabat编号)经修饰以防止抗体的糖基化,例如Asn297Ala(N297A)或Asn297Asp(N297D)。在一些实施方式中,人类IgG4 Fc区无Lys447(Kabat等人1991《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest)的EU索引)。

[0260] 在一些实施方式中,在CH3:CH3表面通过将Ser354变为Cys(S354C)和将Tyr349变为Cys(Y349C)(S354C/Y349C)引入两个二硫键修饰人类IgG Fc区以稳定同二聚化。

[0261] 在一些实施方式中,人类IgG Fc区经修饰以诱导异二聚化。已知用于促进互补Fc多肽的异二聚化的各种方法,例如参见Ridgway等人,Protein Eng.9:617-621(1996);Merchant等人,Nat.Biotechnol.16(7):677-81(1998);Moore等人(2011)MAbs,3:546-57;Von Kreudenstein等人MAbs,(2013)5:646-54;Gunasekaran等人(2010)J.Biol.Chem.,285:19637-46;Leaver-Fay等人(2016)Structure,24:641-51;Ha等人(2016)Frontiers in Immunology,7:1;Davis等人(2010)Protein Eng Des Sel,23:195-202;公开的国际PCT发明第WO 1998/050431号、第WO 2009/089004号、第WO2011143545号、第WO 2014/067011号、第WO 2012/058768号、第WO2018027025号;公开的美国专利发明第US20140363426号、第US20150307628号、第US20180016354号、第US20150239991号;和美国专利第US5731168号、第US7183076号、第US9701759号、第US9605084号和第US9650446号。用以促进Fc链的异二聚化的方法包括诱变Fc区,例如通过包括一组“杵臼结构”突变或包括突变以实现Fc的静电操纵以有利于不同多肽链间的吸引相互作用。举例而言,在一些实施方式中,异二聚体的Fc多肽包括突变以改变跨越Fc二聚体表面的电荷极性,使得静电匹配的Fc链的共表达支持有利的吸引相互作用,由此促进期望Fc异二聚体形成,而不利的排斥性电荷相互作用抑制不期望的Fc同二聚体形成(Guneskaran等人(2010)JBC,285:19637-19646)。当在细胞中共表达时,链间的缔合是可能的,但由于电荷排斥,此类链基本上不自我缔合。用于生成异二聚体Fc的其他策略包括混合人类IgG和IgA CH3结构域区段以产生互补CH3异二聚体,其称为SEED Fc。

[0262] 在一些实施方式中,为了促进异二聚化,Fc异二聚体的两种多肽均含有成对或互补的氨基酸修饰。Fc融合物的多肽的示例性成对氨基酸修饰阐述于表1中。

[0263]

表1：异二聚体Fc的成对氨基酸	
第一Fc多肽	第二Fc多肽
T366W	T366S/L368W/Y407V
T366W/S354C	T366S/L368A/Y407V/Y349C
S364H/F405A	Y349T/Y349F
T350V/L351Y/F405A/Y407V	T350V/T366L/K392L/T394W
K360D/D399M/Y407A	E345R/Q347R/T366V/K409V
K409D/K392D	D399K/E356K
K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
L360E/K409W/Y349C	Q347R/399V/F405T/S354C
K370E/K409W	E357N/D399V/F405T

[0264] 在一些实施方式中,修饰包括将突起(杵)引入第一Fc多肽中和将空腔(臼)引入第二Fc多肽中,使得突起可位于空腔中以促进第一和第二含Fc的多肽的复合。靶向置换和/或修饰以在多肽中产生突起或空腔的氨基酸通常是与第二多肽的表面中的一或多个氨基酸相互作用或接触的表面氨基酸。

[0265] 在一些实施方式中,经修饰以含有突起(臼)氨基酸的第一Fc多肽包括用具有至少一条侧链的氨基酸置换天然或原始氨基酸,该侧链自第一Fc多肽的表面突出且因此可定位在第二多肽的毗邻表面中的互补空腔(臼)中。最经常地,置换氨基酸是具有比原始氨基残基大的侧链体积者。本领域技术人员知道如何确定和/或评价氨基酸残基的性质,以鉴别作为理想置换氨基酸以产生突起的那些。在一些实施方式中,用于形成突起的置换残基是天然氨基酸残基且包括(例如)精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)。在一些实施方式中,鉴别用于置换的原始残基是具有小的侧链的氨基酸残基,例如丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或缬氨酸。

[0266] 在一些实施方式中,经修饰以含有空腔(臼)的第二Fc多肽是包括用具有至少一条侧链的氨基酸置换天然或原始氨基酸者,该侧链自第二多肽的表面凹陷且因此能够容纳来自第一多肽的表面的相应突起。最经常地,置换氨基酸是具有比原始氨基残基小的侧链体积者。本领域技术人员知道如何确定和/或评价氨基酸残基的性质,以鉴别用于形成空腔的理想置换氨基酸的那些。通常,用于形成空腔的置换残基是天然氨基酸残基且包括(例如)丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)。在一些实施方式中,鉴别用于置换的原始氨基酸是具有大的侧链的氨基酸,例如酪氨酸、精氨酸、苯丙氨酸或色氨酸。

[0267] 人类IgG1的CH3表面(例如)包括每一结构域上的16个残基,该结构域位于四条反向平行β3链上且距每一表面包埋1090 Å2(例如,参见Deisenhofer等人(1981)Biochemistry,20:2361-2370;Miller等人,(1990)J Mol.Biol.,216,965-973;Ridgway等人,(1996)Prot.Engin.,9:617-621;美国专利第5,731,168号)。用以产生突起或空腔的CH3结构域的修饰阐述于(例如)美国专利第5,731,168号;国际专利发明WO98/50431和WO 2005/063816号;和Ridgway等人,(1996)Prot.Engin.,9:617-621中。在一些实施方式中,用

以产生突起或空腔的CH3结构域的修饰通常靶向位于两条中央反向平行β链上的残基。目的是最小化产生的突起可通过伸入周围溶剂中容纳而非由伴侣CH3结构域中的互补空腔容纳的风险。

[0268] 举例而言,在一些实施方式中,异二聚体Fc包括CH3结构域内在Thr366处具有氨基酸修饰的多肽,当用较大氨基酸(例如Try(T366W))置换时,其优先与在位置Thr366、Leu368和Tyr407具有较小氨基酸的氨基酸修饰(例如分别Ser、Ala和Val(T366S/L368A/Y407V))的第二CH3结构域配对。可通过引入二硫键,例如通过在相对的CH3结构域上将Ser354变为Cys(S354C)并将Tyr349变为Cys(Y349C)进一步稳定经由CH3修饰的异二聚化(参阅Carter,2001Journal of Immunological Methods,248:7-15)。

[0269] 可通过任何合适方法,例如通过在蛋白质A或蛋白质G柱上亲和层析纯化所得多特异性多肽构建体。若编码不同多肽的两个核酸分子转化至细胞中,则会形成同二聚体和异二聚体。可调整表达的条件,以使异二聚体形成比同二聚体形成更有利。

[0270] 已知基于异二聚体对亲和性试剂的差别亲和性自同二聚体回收异二聚体的技术。在一些方面中,此类技术包括设计异二聚体,以使其中Fc多肽链中的一种不与亲和性试剂蛋白A结合。在一些情况下,多肽链中的一种可含有一或多个氨基酸取代以消除或降低Fc异二聚体的多肽中的一种中对蛋白质A试剂的亲和性,参见例如WO2017134440、WO2010151792、Jendeberg等人(Jendeberg等人,(1997)J.Immunol.Methods,201(1):25-34。在此类实施方式中的一些中,Fc区可在异二聚体的一个成员上的蛋白质-A结合位点经修饰,以便防止蛋白质-A结合且由此更有效地纯化异二聚体融合蛋白。此结合位点内的示例性修饰是Ile253,例如Ile253Arg(I253R)。在一些实施方式中,修饰可为H435R或H435R/Y436F。在一些实施方式中,Fc异二聚体的Fc多肽可含有修饰以使其能结合蛋白质A而非蛋白质G(pA+/pG-)。示例性pA+/pG-氨基酸修饰包括在位置428含有丝氨酸、在位置434含有丝氨酸和可选地在位置436含有组氨酸的Fc,参照人类IgG1或在人类IgG 2、3、或4的相应位置包含此类残基。在一些方面中,在位置428、434和可选地436的一个IgG Fc多肽中的此类氨基酸修饰减少或防止蛋白G的结合,从而增强蛋白的纯化。

[0271] 在一些实施方式中,赋予亲和性试剂差异亲和性的任何此类修饰可与上述任一或多种其他氨基酸修饰组合。举例而言,I253R修饰可与T366S/L368A/Y407V修饰或T366W修饰组合。T366S/L368A/Y407V修饰的Fc能形成同二聚体,因无二聚化表面的空间封闭,如同在T336W修饰的Fc的情况下。因此,在一些实施方式中,I253R修饰与T366S/L368A/Y407V修饰的Fc组合以不允许纯化任何可能形成的同二聚体Fc。可通过组合T366S/L368A/Y407V和H453R利用相似修饰。

[0272] 在一些实施方式中,异二聚体分子的Fc区另外可含有一或多个其他Fc突变,例如上文所述中的任一种。在一些实施方式中,异二聚体分子含有具有降低效应物功能的突变的Fc区。

[0273] 在一些实施方式中,异二聚体Fc的一个Fc多肽包含SEQ ID NO:82、86、94或96中的任一种中所示的氨基酸序列,且异二聚体Fc的另一Fc多肽含有SEQ ID NO:83、87、90、92、98或100中的任一种中所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,异二聚体Fc的一个Fc多肽包含SEQ ID NO:84、88、95或97中的任一种中所示的氨基酸序列且异二聚体Fc的另一Fc多肽包含SEQ ID NO:85、89、93、99或101中的任一种中所示的氨基酸序列。

[0274] 在一些实施方式中,人类IgG Fc区经修饰以防止二聚化。在此类实施方式中,本发明的融合蛋白是单体的。举例而言,在残基Thr366修饰成带电残基(例如Thr366Lys、Thr366Arg、Thr366Asp或Thr366Glu(分别T366K、T366R、T366D或T366E))会防止CH3-CH3二聚化。

[0275] 在一些实施方式中,融合蛋白的Fc区在以下位置中的一或多种经改变以降低Fc受体结合:Leu 234(L234)、Leu235(L235)、Asp265(D265)、Asp270(D270)、Ser298(S298)、Asn297(N297)、Asn325(N325)或Ala327(A327)。举例而言,Leu 234Ala(L234A)、Leu235Ala(L235A)、Asp265Asn(D265N)、Asp270Asn(D270N)、Ser298Asn(S298N)、Asn297Ala(N297A)、Asn325Glu(N325E)或Ala327Ser(A327S)。在优选实施方式中,Fc区内的修饰降低与Fc-受体-γ受体的结合,同时对与新生Fc受体(FcRn)的结合具有最小影响。

[0276] 在一些实施方式中,融合蛋白含有源自免疫球蛋白铰链区的多肽。铰链区可选自人类IgG亚类中的任一种。举例而言,融合蛋白可含有具有EPKSSDKTHTCPPC(SEQ ID NO:7)的序列的经修饰的IgG1铰链,其中在与轻链的C-末端半胱氨酸形成二硫化物的Cys220中,突变成丝氨酸,例如Cys220Ser(C220S)。在其他实施方式中,融合蛋白含有具有序列DKTHTCPPC(SEQ ID NO:8)的截短的铰链。

[0277] 在一些实施方式中,融合蛋白具有来自IgG4的修饰的铰链,其经修饰以防止或减少链改变,例如Ser228Pro(S228P),具有序列ESKYGPPCPPC(SEQ ID NO:9)。在一些实施方式中,融合蛋白含有接头多肽。在其他实施方式中,融合蛋白含有接头和铰链多肽。

[0278] 3.接头:

[0279] 所提供多特异性多肽构建体含有接头,其联接或偶合含有免疫球蛋白Fc区的第一组分和含有CD3结合区的第二组分。在一些实施方式中,接头位于Fc区的C-末端区的末端,使得Fc区在CD3结合区的N-末端。由于所提供多特异性多肽构建体是多聚体(例如二聚体),所以所提供构建体包括联接第一Fc多肽与第一多肽的CD3结合区的第一结构域(例如VH)以及第二Fc多肽与第二多肽的CD3结合区的第二结构域(例如VL)的接头。通常,多特异性多肽构建体的第一和第二多肽中存在的接头相同。因此,在一些实施方式中,CD3结合结构域的每一结构域经由接头(例如相同接头)连接至Fc(例如异二聚体Fc)的相反多肽。

[0280] 已知用于融合蛋白中的各种多肽接头(例如,参见Chen等人(2013)Adv.Drug.Deliv.65:1357-1369;和国际PCT公开案第WO2014/099997号、第WO2000/24884号;美国专利第5,258,498号;美国专利第5,525,491号;美国专利第5,525,491号、美国专利第6,132,992号)。

[0281] 在一些实施方式中,选择接头,使得当CD3结合区联接至多特异性多肽偶联物的Fc区时,CD3结合区受限,且在多特异性多肽构建体与细胞接触时,不能或基本上不能结合或接合细胞(例如T细胞)表面上的CD3。可采用各种分析来评价CD3由多特异性多肽构建体的结合或接合,包括用以评价T细胞结合、使用报告基因系统的NFAT活化、细胞溶解性T细胞活性、细胞因子产生和/或T细胞活化标记物的表达的分析。示例性分析示于所提供实施例中。通常,接头也是确保多肽构建体正确折叠者,不展现将与连接的多肽的活性或功能不一致的电荷或不与一或多个结构域中的氨基酸残基形成键或其他相互作用,其可阻碍或或改变连接多肽的活性。在一些实施方式中,接头是多肽接头。多肽接头可为挠性接头或刚性接头或二者的组合。在一些方面中,接头是短的、中等或长的接头。在一些实施方式中,接头是最

多40个氨基酸长。在一些实施方式中,接头是最多25个氨基酸长。在一些实施方式中,接头是至少或是至少约2个氨基酸长。在一些方面中,合适长度是(例如)至少一个且通常少于约40个氨基酸残基(例如2-25个氨基酸残基、5-20个氨基酸残基、5-15个氨基酸残基、8-12个氨基酸)长。在一些实施方式中,接头是约2至24个氨基酸、2至20个氨基酸、2至18个氨基酸、2至14个氨基酸、2至12个氨基酸、2至10个氨基酸、2至8个氨基酸、2至6个氨基酸、6至24个氨基酸、6至20个氨基酸、6至18个氨基酸、6至14个氨基酸、6至12个氨基酸、6至10个氨基酸、6至8个氨基酸、8至24个氨基酸、8至20个氨基酸、8至18个氨基酸、8至14个氨基酸、8至12个氨基酸、8至10个氨基酸、10至24个氨基酸、10至20个氨基酸、10至18个氨基酸、10至14个氨基酸、10至12个氨基酸、12至24个氨基酸、12至20个氨基酸、12至18个氨基酸、12至14个氨基酸、14至24个氨基酸、14至20个氨基酸、14至18个氨基酸、18至24个氨基酸、18至20个氨基酸或20至24个氨基酸。在一些实施方式中,接头是2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸长。

[0282] 在某些方面中,接头长度越长,则在多特异性多肽偶联物结合至其抗原(例如TAA)时的CD3结合越强。因此,在一些方面中,接头的长度大于12个氨基酸,例如长度大于13、14、15、16、17或18个氨基酸。在一些实施方式中,接头的长度是12至40个氨基酸、12至30个氨基酸、12至24个氨基酸、12至18个氨基酸、12至15个氨基酸、15至40个氨基酸、15至30个氨基酸、15至24个氨基酸、15至18个氨基酸、18至40个氨基酸、18至30个氨基酸、18至24个氨基酸、24至40个氨基酸、24至30个氨基酸或30至40个氨基酸。

[0283] 接头可为天然的、合成的或二者的组合。尤其合适的接头多肽主要包括选自甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)、丙氨酸(Ala)和苏氨酸(Thr)的氨基酸残基。举例而言,接头可含有至少75%(基于肽接头中存在的残基的总数计算)、例如至少80%、至少85%或至少90%选自Gly、Ser、Ala和Thr的氨基酸残基。接头也可仅由Gly、Ser、Ala和/或Thr残基组成。在一些实施方式中,接头含有1-25个甘氨酸残基、5-20个甘氨酸残基、5-15个甘氨酸残基或8-12个甘氨酸残基。在一些方面中,合适肽接头通常含有至少50%甘氨酸残基,例如至少75%甘氨酸残基。在一些实施方式中,肽接头仅包含甘氨酸残基。在一些实施方式中,肽接头仅包含甘氨酸和丝氨酸残基。

[0284] 在一些实施方式中,此类接头主要由氨基酸甘氨酸和丝氨酸构成,本文中表示为GS-接头。在一些实施方式中,接头含有(GGS)n,其中n是1至10,例如1至5,例如1至3,例如GGS(GGS)n(SEQ ID NO:171),其中n是0至10。在特定实施方式中,接头含有序列(GGGGS)n(SEQ ID NO:173),其中n是1至10或n是1至5,例如1至3。在其他实施方式中,接头含有(GGGGGS)n(SEQ ID NO:172),其中n是1至4,例如1至3。接头可包括上述中任一种的组合,例如可组合2、3、4或5个GS、GGS、GGGGS和/或GGGGGS接头的重复。在一些实施方式中,该接头是2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个氨基酸长。

[0285] 在一些实施方式中,接头是(以单字母氨基酸代码):GGS、GGGGS(SEQ ID NO:149)或GGGGGS(SEQ ID NO:135)。在一些实施方式中,GS-接头包含以下的氨基酸序列:GGSGGS,也即$(GGS)_2$(SEQ ID NO:10);GGSGGSGGS,也即$(GGS)_3$(SEQ ID NO:11);GGSGGSGGSGGS,也即$(GGS)_4$(SEQ ID NO:12);GGSGGSGGSGGSGGS,也即$(GGS)_5$(SEQ ID NO:13);GGGGGSGGGGGSGGGGGS,也即$(G5S)_3$(SEQ ID NO:119);GGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:147)和GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:170)。在一些实施方式中,接头是GGGG(SEQ ID NO:

103)。在任何上述实施方式中的一些中,丝氨酸可经丙氨酸(例如(Gly4Ala)或(Gly3Ala))置换。

[0286] 在一些实施方式中,接头包括具有氨基酸序列Gly_xXaa-Gly_y-Xaa-Gly_z(SEQ ID NO:174)的肽接头,其中各Xaa独立地选自丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、甲硫氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、色氨酸(Trp)、脯氨酸(Pro)、甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、半胱氨酸(Cys)、酪氨酸(Tyr)、天冬酰胺(Asn)、谷氨酸(Gln)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、组氨酸(His)、天冬氨酸盐(Asp)和谷氨酸盐(Glu),且其中x、y和z各自是1-5范围内的整数。在一些实施方式中,各Xaa独立地选自由Ser、Ala和Thr组成的组。在具体变化形式中,x、y和z中的每一种等于3(由此产生具有氨基酸序列Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly(SEQ ID NO:175)的肽接头,其中各Xaa是如上文所选择。

[0287] 在一些实施方式中,接头是基于(SSSSG)y(SEQ ID NO:185)基序的重复的富含丝氨酸的接头,其中y是至少1,但y可为2、3、4、5、6、7、8和9。

[0288] 在一些情况下,可期望向肽接头中提供一些刚性。此可通过在肽接头的氨基酸序列中包括脯氨酸残基来完成。因此,在一些实施方式中,接头包含肽接头的氨基酸序列中的至少一个脯氨酸残基。举例而言,肽接头可具有氨基酸序列,其中至少25%(例如至少50%或至少75%)的氨基酸残基是脯氨酸残基。在一个特定实施方式中,肽接头仅包含脯氨酸残基。

[0289] 在一些方面中,肽接头包含至少一个半胱氨酸残基,例如一个半胱氨酸残基。举例而言,在一些实施方式中,接头包含至少一个半胱氨酸残基和选自由Gly、Ser、Ala和Thr组成的组的氨基酸残基。在一些此类实施方式中,接头包含甘氨酸残基和半胱氨酸残基,例如仅甘氨酸残基和半胱氨酸残基。通常,每肽接头将包括仅一个半胱氨酸残基。包含半胱氨酸残基的具体接头的一个示例包括具有氨基酸序列Gly_m-Cys-Gly_n的肽接头,其中n和m各自是1-12、例如3-9、4-8或4-7的整数。在具体变化形式中,该肽接头具有氨基酸序列GGGGG-C-GGGGG(SEQ ID NO:177)。

[0290] 在一些实施方式中,融合蛋白的接头是结构化或受限接头。在特定实施方式中,结构化接头含有序列(AP)n或(EAAAK)n(SEQ ID NO:178),其中n是2至20,优选4至10,包括但不限于AS-(AP)n-GT(SEQ ID NO:179)或AS-(EAAAK)n-GT(SEQ ID NO:180),其中n是2至20,例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15。在其他实施方式中,接头包含序列(GGGGA)n(SEQ ID NO:181)、(PGGGS)n(SEQ ID NO:182)、(AGGGS)n(SEQ ID NO:183)或GGS-(EGKSSGSGSESKST)n-GGS(SEQ ID NO:184,其中n是2至20。在一些实施方式中,接头是SSSASASSA(SEQ ID NO:186)、GSPGSPG(SEQ ID NO:187)或ATTTGSSPGPT(SEQ ID NO:176)。在一些实施方式中,此类接头由于其结构可对蛋白水解降解更具抗性,由此在体内注射时提供优点。

[0291] 在一些实施方式中,接头并非可裂解接头,也称作不可裂解接头。在一些实施方式中,接头不可由蛋白酶裂解。在一些实施方式中,并非可裂解接头或不可由蛋白酶裂解的接头是通常对于体内递送或重组产生稳定者。在一些方面中,不可由蛋白酶裂解的接头包括不含至少一个肽键的那些,该肽键优选位于蛋白酶的可裂解肽序列或识别位点内。在特定实施方式中,不可裂解接头并非蛋白酶的靶底物,使得与含有相同蛋白酶的底物识别位点的接头相比,其并不由蛋白酶优先或特异性裂解。

[0292] 在一些实施方式中,接头是可裂解接头。在一些方面中,可裂解接头是包括作为蛋白酶的底物的序列的接头,由于存在至少一个可在生理条件下断裂的键。在一些情况下,可裂解接头在体内存在的特定条件下、例如在暴露于细胞外蛋白酶(包括细胞环境中体内存在的那些)后,易于裂解或对裂解敏感。在一些情况下,蛋白酶可存在于特定生理微环境、例如肿瘤微环境中,由此限制裂解可能发生的位点。

[0293] 与另一非靶底物相比,蛋白酶通常展现对特定靶底物的裂解的特异性或优先性。该特异性的程度可基于序列(例如接头)的裂解速率常数来测定,其是蛋白酶对其底物的优先性以及酶的效率的量度。用以测定在不同浓度的底物存在下裂解随时间增加的速率的任何方法均可用于计算特异性常数。举例而言,底物连接至荧光探针部分,其在由蛋白酶裂解时释放。通过测定不同蛋白酶浓度下的裂解速率,可测定特定蛋白酶对特定接头的裂解特异性常数(k_{cat}/K_m)。在一些实施方式中,可裂解接头是能以约至少$1\times10^4M^{-1}S^{-1}$、或至少$5\times10^4M^{-1}S$、至少$10\times10^4M^{-1}S$、至少$10\times10^5M^{-1}S$或更大的速率由蛋白酶特异性裂解的接头。

[0294] 可裂解接头

[0295] 在一些实施方式中,本公开的多特异性多肽构建体包括联接第一和第二组分的可裂解接头。在一些实施方式中,可裂解接头包括可用作蛋白酶、通常细胞外蛋白酶的底物的氨基酸序列。举例而言,可裂解接头可包含含有至少一个肽键的裂解序列,该肽键位于蛋白酶的可裂解肽序列内。合适蛋白酶包括(例如)基质金属蛋白酶(MMP)、半胱氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶和胞浆素活化剂,其在诸如类风湿性关节炎或癌症等疾病中以强化方式形成或活化,从而导致过度组织降解、发炎和转移。在特定实施方式中,蛋白酶是由肿瘤、活化免疫效应细胞(例如T细胞或NK细胞)或肿瘤微环境中的细胞产生的蛋白酶。在一些实施方式中,蛋白酶是颗粒酶B、间质蛋白酶或MMP(例如MMP-2)。

[0296] 可裂解接头可基于由靠近表达靶标的细胞的肿瘤产生和/或由与多特异性多肽构建体的期望靶标共定位于组织中的肿瘤产生的蛋白酶来进行选择。有文献报告了在许多癌症(例如实体肿瘤)中具有已知底物的蛋白酶的含量增加。参见(例如)La Rocca等人,(2004)British J.of Cancer 90(7):1414-1421。

[0297] 在一些实施方式中,联接多特异性多肽构建体的第一和第二组分的可裂解接头可由免疫效应细胞所产生的蛋白酶裂解,该免疫效应细胞由此类组分中的一种活化。举例而言,涵盖效应物启用或增强的IgG Fc区的多特异性多肽构建体在与靶抗原接合时能引发ADCC。对ADCC至关重要的是自效应细胞(即NK细胞和细胞毒性T细胞)释放颗粒酶B和穿孔蛋白。在释放时,颗粒酶B以穿孔蛋白依赖性方式进入靶细胞,其中其介导细胞凋亡。重要的是,颗粒酶B在效应细胞与靶细胞之间的细胞外突触内具有活性。在一些实施方式中,联接多特异性多肽构建体的第一和第二组分的可裂解接头可由颗粒酶B裂解。在由多特异性多肽构建体的组分之一介导的效应细胞活化期间,释放颗粒酶B。在一些实施方式中,颗粒酶B和其他蛋白酶可由免疫效应细胞(包括活化T细胞或NK细胞)产生。在一些实施方式中,在TAA由多特异性多肽构建体结合时,通过CD3接合的T细胞活化可释放此类蛋白酶,其随后可裂解特异性可裂解接头,由此增强或增加CD3结合分子接合CD3的活性。在一些实施方式中,裂解可放大或增加在未裂解状态下结合至TAA时由多特异性构建体达成的活性。

[0298] 示例性底物包括但不限于可由以下酶或蛋白酶中的一或多种裂解的底物:ADAMS、ADAMTS,例如ADAM8;ADAM9;ADAM10;ADAM12;ADAM15;ADAM17/TACE;ADAMDEC1;ADAMTS1;

ADAMTS4;ADAMTS5;天冬氨酸盐蛋白酶,例如BACE或肾素;天冬氨酸细胞自溶酶,例如细胞自溶酶D或细胞自溶酶E;半胱天冬酶,例如半胱天冬酶1、半胱天冬酶2、半胱天冬酶3、半胱天冬酶4、半胱天冬酶5、半胱天冬酶6、半胱天冬酶7、半胱天冬酶8、半胱天冬酶9、半胱天冬酶10或半胱天冬酶14;半胱氨酸细胞自溶酶,例如细胞自溶酶B、细胞自溶酶C、细胞自溶酶K、细胞自溶酶L、细胞自溶酶S、细胞自溶酶V/L2、细胞自溶酶X/Z/P;半胱氨酸蛋白酶,例如库紫蛋白酶;天冬酰胺内肽酶;Otubain-2;KLK,例如KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13或KLK14;金属蛋白酶,例如甲丙胺酯(Meprin);脑啡肽酶;PSMA;BMP-1;MMP,例如MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26或MMP27;丝氨酸蛋白酶,例如活化蛋白C、细胞自溶酶A、细胞自溶酶G、凝乳酶、凝血因子蛋白酶(例如FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa)、弹性蛋白酶、颗粒酶B、胍基苯甲酸酯酶、HtrA1、人类嗜中性球弹性蛋白酶、乳铁蛋白、Marapsin、NS3/4A、PACE4、胞浆素、PSA、tPA、凝血酶、纤溶酶、uPA;II型跨膜丝氨酸蛋白酶(TTSP),例如DESC1、DPP-4、FAP、Hepsin、间质蛋白酶-2、间质蛋白酶、TMPRSS2、TMPRSS3、或TMPRSS4;及其任何组合。

[0299] 在一些实施方式中,可裂解接头可由多种蛋白酶、例如2种或更多种蛋白酶、3种或更多种蛋白酶、4种或更多种蛋白酶等裂解。

[0300] 在一些实施方式中,可裂解接头选择使用特异性蛋白酶,例如已知由靠近表达靶标的细胞的肿瘤产生和/或由与多特异性多肽构建体的靶标共定位的肿瘤产生的蛋白酶。

[0301] 在一些实施方式中,可裂解接头含有特定蛋白酶的底物识别位点或裂解位点,其是由蛋白酶所裂解的蛋白酶的活性位点识别的序列。通常,例如,对于丝氨酸蛋白酶而言,裂解序列由底物中的P1-P4和P1′-P4′氨基酸构成,其中裂解发生在P1位置之后。通常,丝氨酸蛋白酶的裂解序列是6个残基长以匹配许多蛋白酶的扩大的底物特异性,但根据蛋白酶而定可更长或更短。通常,可裂解接头包括由蛋白酶识别的P1-P1′易裂键序列。在一些方面中,可裂解接头经改造以引入能够由特异性蛋白酶裂解的肽键,例如通过引入蛋白酶的底物识别位点序列或裂解序列。

[0302] 在一些实施方式中,可裂解接头包括两个或更多个底物序列的组合。在一些实施方式中,各底物序列由相同蛋白酶裂解。在一些实施方式中,底物序列中的至少二种由不同蛋白酶裂解。在一些实施方式中,可裂解接头包含作为颗粒酶B的底物的氨基酸。在一些实施方式中,颗粒酶B可裂解接头含有具有通式P4 P3 P2 P1 ↓ P1’(SEQ ID NO:150)的氨基酸序列,其中P4是氨基酸I、L、Y、M、F、V或A;P3是氨基酸A、G、S、V、E、D、Q、N或Y;P2是氨基酸H、P、A、V、G、S或T;P1是氨基酸D或E;且P1’是氨基酸I、L、Y、M、F、V、T、S、G或A。在一些实施方式中,颗粒酶B可裂解接头含有具有通式P4 P3 P2 P1 ↓ P1’(SEQ ID NO:151)的氨基酸序列,其中P4是氨基酸I或L;P3是氨基酸E;P2是氨基酸P或A;P1是氨基酸D;且P1’是氨基酸I、V、T、S或G。

[0303] 在一些实施方式中,颗粒酶B的底物包含氨基酸序列LEAD(SEQ ID NO:22)、LEPG(SEQ ID NO:142)或LEAE(SEQ ID NO:143)。在一些实施方式中,可裂解接头含有氨基酸序列IEPDI(SEQ ID NO:136)、LEPDG(SEQ ID NO:152)、LEADT(SEQ ID NO:137)、IEPDG(SEQ ID NO:138)、IEPDV(SEQ ID NO:139)、IEPDS(SEQ ID NO:140)、IEPDT(SEQ ID NO:141)、IEPDP(SEQ ID NO:144)、LEPDG(SEQ ID NO:152)或LEADG(SEQ ID NO:153)。

[0304] 在一些实施方式中,可裂解接头包含作为间质蛋白酶的底物的氨基酸。在一些实施方式中,可裂解接头包含序列P4QAR ↓(A/V)(SEQ ID NO:154),其中P4是任何氨基酸。在一些实施方式中,可裂解接头包含序列RQAR(A/V)(SEQ ID NO:155)。在一些实施方式中,间质蛋白酶的底物包含氨基酸序列RQAR(SEQ ID NO:23)。在一些实施方式中,可裂解接头包含氨基酸序列RQARV(SEQ ID NO:156)。

[0305] 在一些实施方式中,可裂解接头包含作为一或多种基质金属蛋白酶(MMP)的底物的氨基酸。在一些实施方式中,MMP是MMP-2。在一些实施方式中,可裂解接头含有通式P3 P2 P1 ↓ P1'(SEQ ID NO:157),其中P3是P、V或A;P2是Q或D;P1是A或N;且P1'是L、I或M。在一些实施方式中,可裂解接头含有通式P3 P2 P1 ↓ P1'(SEQ ID NO:158),其中P3是P;P2是Q或D;P1是A或N;且P1'是L或I。在一些实施方式中,MMP的底物包含氨基酸序列PAGL(SEQ ID NO:24)。

[0306] 在一些实施方式中,可裂解接头包含作为颗粒酶B的底物的氨基酸序列与作为间质蛋白酶的底物的氨基酸序列的组合。在一些实施方式中,可裂解接头包含氨基酸序列LEAD(SEQ ID NO:22)与氨基酸序列RQAR(SEQ ID NO:23)的组合。

[0307] 在一些实施方式中,可裂解接头包含作为颗粒酶B的底物的氨基酸序列与作为MMP的底物的氨基酸序列的组合。在一些实施方式中,可裂解接头包含氨基酸序列LEAD(SEQ ID NO:22)与氨基酸序列PAGL(SEQ ID NO:24)的组合。

[0308] 在一些实施方式中,可裂解接头包含作为间质蛋白酶的底物的氨基酸序列与作为MMP的底物的氨基酸序列的组合。在一些实施方式中,可裂解接头包含氨基酸序列RQAR(SEQ ID NO:23)与氨基酸序列PAGL(SEQ ID NO:24)的组合。

[0309] 在一些实施方式中,可裂解接头包含作为颗粒酶B的底物的氨基酸序列、作为间质蛋白酶的底物的氨基酸序列和作为MMP的底物的氨基酸序列的组合。在一些实施方式中,可裂解接头包含作为颗粒酶B的底物的氨基酸序列与作为MMP的底物的氨基酸序列的组合。在一些实施方式中,可裂解接头包含氨基酸序列LEAD(SEQ ID NO:22)、氨基酸序列RQAR(SEQ ID NO:23)和氨基酸序列PAGL(SEQ ID NO:24)的组合。

[0310] 可裂解接头可包括任何已知接头。可裂解接头的示例阐述于以下中:Be'liveau等人(2009)FEBS Journal,276;美国公开发明第US20160194399号;第US20150079088号;第US20170204139号;第US20160289324号;第US20160122425号;第US20150087810号;第US20170081397号;美国专利第US9644016号。

[0311] 在一些实施方式中,可裂解接头包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:TGLEADGSPAGLGRQARVG(SEQ ID NO:25);TGLEADGSRQARVGPAGLG(SEQ ID NO:26);TGSPAGLEADGSRQARVGS(SEQ ID NO:27);TGPAGLGLEADGSRQARVG(SEQ ID NO:28);TGRQARVGLEADGSPAGLG(SEQ ID NO:29);TGSRQARVGPAGLEADGS(SEQ ID NO:30);和TGPAGLGSRQARVGLEADGS(SEQ ID NO:31);GPAGLGLEPDGSRQARVG(SEQ ID NO:104);GGSGGGGIEPDIGGSGGS(SEQ ID NO:105);GGSGGGGLEADTGGSGGS(SEQ ID NO:106);GSIEPDIGS(SEQ ID NO:107);GSLEADTGS(SEQ ID NO:108);GGSGGGGIEPDGGGSGGS(SEQ ID NO:109);GGSGGGGIEPDVGGSGGS(SEQ ID NO:110);GGSGGGGIEPDSGGSGGS(SEQ ID NO:111);GGSGGGGIEPDTGGSGGS(SEQ ID NO:112);GGGSLEPDGSGS(SEQ ID NO:113);和GPAGLGLEADGSRQARVG(SEQ ID NO:114),GGEGGGGSGGSGGGS(SEQ ID NO:115);

GSSAGSEAGGSGQAGVGS(SEQ ID NO:116);GGSGGGGLEAEGSGGGGS(SEQ ID NO:117);GGSGGGGIEPDPGGSGGS(SEQ ID NO:118);TGGSGGGGIEPDIGGSGGS(SEQ ID NO:148)。

[0312] 4.抗原结合结构域:

[0313] 本发明的多特异性多肽构建体至少包括一个抗原结合结构域,如至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域。在一些方面中,抗原结合结构域,或独立地各抗原结合结构域选自抗体或抗原结合片段,天然同源结合伴侣,抗运载蛋白(Anticalin,经改造脂质运载蛋白),Darpin,Fynomer,Centyrin(经改造纤连蛋白III结构域),半胱氨酸-杵结构域,Affilin,Affibodv或经改造CH3结构域。在一些实施方式中,天然同源结合伴侣包含TAA的天然同源结合伴侣的胞外结构域或其结合片段,或其显示出对TAA的结合活性的变体。

[0314] 在一些实施方式中,抗原结合结构域,或独立地各抗原结合结构域,如第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域包括抗体或其抗原结合片段的一或多个拷贝。在一些实施方式中,抗原结合结构域,或独立地各抗原结合结构域,如第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域包括选自由以下组成的组的抗体或其抗原结合片段的一或多个拷贝:Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、scFv、scAb、dAb、单一结构域重链抗体和单一结构域轻链抗体。在一些实施方式中,抗原结合结构域,或独立地各抗原结合结构域,如第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域包括一或多个单一结构域抗体(sdAb)片段,例如V_HH、V_{NAR}、经改造的V_H或V_K结构域。V_HH可自天然骆驼科动物仅重链抗体、产生仅重链抗体的遗传修饰的啮齿类动物或幼稚/合成骆驼科动物或人源化骆驼科动物单一结构域抗体文库生成。V_{NAR}可自软骨鱼类仅重链抗体生成。已执行各种方法自常用异二聚体V_H和V_K结构域生成单体sdAb,包括特异性种系家族的表面改造和选择。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体的抗原结合结构域,或独立地各抗原结合结构域,如第一抗原结合结构域和/或第二抗原结合结构域含有组装成FAB或scFv的VH和VL序列。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体的抗原结合结构域,或独立地各抗原结合结构域,如第一抗原结合结构域和/或第二抗原结合结构域含有作为单一结构域抗体(sdAb)的结合结构域。

[0315] 在一些实施方式中,抗原结合结构域或独立地各抗原结合结构域是或包括TAA的天然同源结合伴侣的细胞外结构域或其结合片段,或其展现与TAA的结合活性的变体。

[0316] 在一些实施方式中,抗原结合结构域,或独立地各抗原结合结构域,如第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合相同抗原。在一些实施方式中,抗原结合结构域,或独立地各抗原结合结构域,如第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合不同抗原。在一些实施方式中,抗原结合结构域,或独立地各抗原结合结构域,如第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合相同肿瘤相关抗原(TAA)。在一些实施方式中,抗原结合结构域,或独立地各抗原结合结构域,如第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合不同TAA。在一些实施方式中,抗原结合结构域,或独立地各抗原结合结构域,如第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合相同TAA上的不同表位。在一些实施方式中,抗原结合结构域,或独立地各抗原结合结构域,如第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合相同TAA上的相同表位。

[0317] 在一些实施方式中,结合TAA的抗原结合结构域或独立地各抗原结合结构域与TAA产生单价、二价、三价或四价结合。

[0318] 在一些实施方式中,TAA是选自由以下组成的组:1-92-LFA-3、5T4、α-4整联蛋白、

α-V整联蛋白、α4β1整联蛋白、α4β7整联蛋白、AGR2、抗刘易斯-Y、艾普林J受体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5补体、C-242、CA9、CA19-9(刘易斯a)、碳酸酐酶9、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132、(IL-2RG)、CD133、CD137、CD138、CD166、CD172A、CD248、CDH6、CEACAM5(CEA)、CEACAM6(NCA-90)、密连蛋白-3、密连蛋白-4、cMet、胶原、Cripto、CSFR、CSFR-1、CTLA-4、CTGF、CXCL10、CXCL13、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CYR61、DL44、DLK1、DLL3、DLL4、DPP-4、DSG 1、EDA、EDB、EGFR、EGFRviii、内皮素B受体(ETBR)、ENPP3、EpCAM、EPHA2、EPHB2、ERBB3、RSV的F蛋白、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、叶酸盐受体α(FRα)、GAL3ST1、G-CSF、G-CSFR、GD2、GITR、GLUT1、GLUT4、GM-CSF、GM-CSFR、GP IIb/IIIa受体、Gp130、GPIIB/IIIA、GPNMB、GRP78、HER2/neu、HER3、HER4、HGF、hGH、HVEM、玻尿酸酶、ICOS、IFNα、IFNβ、IFNγ、IgE、IgE受体(FceRI)、IGF、IGF1R、IL1B、IL1R、IL2、IL11、IL12、IL12p40、IL-12R、IL-12Rβ1、IL13、IL13R、IL15、IL17、IL18、IL21、IL23、IL23R、IL27/IL27R(wsx1)、IL29、IL-31R、IL31/IL31R、IL2R、IL4、IL4R、IL6、IL6R、胰岛素受体、锯齿状配体、锯齿状1、锯齿状2、KISS1-R、LAG-3、LIF-R、刘易斯X、LIGHT、LRP4、LRRC26、Ly6G6D、LvPD1、MCSP、间皮素、MRP4、MUC1、黏蛋白-16(MUC16、CA-125)、Na/K ATP酶、NGF、纳卡斯特罗因蛋白、Notch受体、Notch 1、Notch 2、Notch 3、Notch 4、NOV、OSM-R、OX-40、PAR2、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGFRα、PDGFRβ、PD-1、PD-L1、PD-L2、磷脂酰基-丝氨酸、P1GF、PSCA、PSMA、PSGR、RAAG12、RAGE、SLC44A4、磷酸神经鞘胺醇1、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TAPA1、TEM-8、TGFB、TIGIT、TIM-3、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TMEM31、TNFα、TNFR、TNFRS12A、TRAIL-R1、TRAIL-R2、运铁蛋白、运铁蛋白受体、TRK-A、TRK-B、uPAR、VAP1、VCAM-1、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、VISTA、WISP-1、WISP-2和WISP-3。

[0319] 在一些实施方式中,至少一个抗原结合结构域,或独立地各抗原结合结构域结合肿瘤相关抗原(TAA)叶酸盐受体α(FRα)。举例而言,抗原结合结构域含有作为结合FRα的sdAb的结合结构域。示例性FRα-结合sdAb阐述于SEQ ID NO:120、121和122中。

[0320] 在一些实施方式中,至少一个抗原结合结构域,或独立地各抗原结合结构域结合肿瘤相关抗原(TAA)cMET。举例而言,抗原结合结构域含有作为结合cMET的sdAb的结合结构域。示例性cMET-结合sdAb阐述于SEQ ID NO:123(美国专利第9,346,884号)中。

[0321] 在一些实施方式中,至少一个抗原结合结构域,或独立地各抗原结合结构域结合肿瘤相关抗原(TAA)B7H3。举例而言,抗原结合结构域含有作为结合B7H3的scFv的结合结构域。示例性B7H3-结合scFv阐述于SEQ ID NO:124中。在一些实施方式中,抗原结合结构域是或含有包含VH-CH1(Fd)和LC的Fab抗体片段。示例性B7H3 Fd阐述于SEQ ID NO:127中且示例性B7H3 LC阐述于SEQ ID NO:128(PCT公开案第WO2017/030926号)中。

[0322] 在一些实施方式中,抗原结合结构域结合肿瘤相关抗原(TAA)CD20。举例而言,抗原结合结构域含有作为结合CD20的scFv的结合结构域。示例性CD20-结合scFv阐述于SEQ ID NO:125、189和190(美国公开案第US 2005/0123546号)中。

[0323] 在一些实施方式中,抗原结合结构域结合肿瘤相关抗原(TAA)DLL3。举例而言,抗原结合结构域含有作为结合DLL3的scFv的结合结构域。示例性DLL3-结合scFv阐述于SEQ ID NO:126和189(美国公开案第US 2017/0037130号)中。在一些实施方式中,抗原结合结构

域是或含有包含结合DLL3的Fd和LC的Fab抗体片段。示例性DLL3 Fd阐述于SEQ ID NO:133中且示例性DLL3 LC阐述于SEQ ID NO:134(美国专利第US 8,044,178号)中。

[0324] 在一些实施方式中,抗原结合结构域结合肿瘤相关抗原(TAA)5T4。示例性5T4 Fd阐述于SEQ ID NO:129中且示例性5T4 LC阐述于SEQ ID NO:130中。在一些实施方式中,抗体结合结构域包含如SEQ ID NO:167和168(美国专利第US 8,044,178号)中所示的VH-CH1(Fd)或VL-CL。

[0325] 在一些实施方式中,抗原结合结构域结合肿瘤相关抗原(TAA)gpNMB。在一些实施方式中,抗原结合结构域是或含有包含Fd和LC链的Fab片段。示例性gpNMB Fd阐述于SEQ ID NO:131中且示例性gpNMB LC阐述于SEQ ID NO:132中。

[0326] 在一些实施方式中,抗原结合结构域直接或经由接头间接连接至Fc区和/或CD3结合区。在一些实施方式中,链接是经由接头。在一些实施方式中,接头是连接肽(LP),其可包括如部分II.3中所示的任何挠性或刚性接头,但连接一或多个抗原结合结构域的肽通常并非可裂解接头。

[0327] 在一些实施方式中,多特异性多肽构建体包含第一抗原结合结构域与Fc区之间的第一连接肽(LP1)。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体包含CD3结合区与第二抗原结合结构域之间的第二连接肽(LP2)。在一些实施方式中,多特异性多肽构建体包含第一抗原结合结构域与Fc区之间的第一连接肽(LP1)以和CD3结合区与第二抗原结合结构域之间的第二连接肽(LP2)。在一些方面中,多特异性多肽构建体自N-末端至C-末端具有如下结构配置:第一抗原结合结构域-LP1-Fc区-接头-CD3结合区-LP2-第二抗原结合结构域。在一些实施方式中,两种连接肽彼此不同。

[0328] 在一些实施方式中,LP1或LP2独立地是约1至20个氨基酸长的肽。在一些实施方式中,LP1或LP2独立地是作为或包含如SEQ ID NO:10-13、119、135、147、149或GGS中所示的任何Gly-Ser接头的肽。

[0329] III.医药组合物

[0330] 本文提供所提供多特异性多肽构建体中的任一种的组合物。应了解,根据本公开的治疗性实体的给予应与合适载剂、赋形剂和纳入配制物中以提供改良的转移、递送、耐受等的其他试剂一起给予。多种适当配制物可参见所有医药化学家已知的配方:《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)(第15版,马克出版公司(Mack Publishing Company),宾西马尼亚州伊斯顿(1975)),特定而言其中的第87章,Blaug,Seymour。此类配制物包括例如粉末、糊剂、软膏剂、凝胶剂、蜡、油、脂质、含有脂质(阳离子或阴离子型)的囊泡(例如Lipofectin™)、DNA偶联物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳液、乳液卡波蜡(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有卡波蜡的半固体混合物。上述混合物中的任一种可适于根据本发明的治疗和疗法中,条件是配制物中的活性成分不会被配制物灭活且配制物与给予途径生理上相容且耐受。关于医药化学家熟知的配制物、赋形剂和载剂相关的额外信息,也参见Baldrick P.“药物赋形剂研发:临床前指导的需求(Pharmaceutical excipient development:the need for preclinical guidance).”Regul.Toxicol Pharmacol.32(2):210-8(2000),Wang W.“固体蛋白药物的冻干与开发(Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals).”Int.J.Pharm.203(1-2):1-60(2000),Charman WN“脂类、亲脂药物和口服药物递送——一

些新兴的概念(Lipids,lipophilic drugs,and oral drug delivery-some emerging concepts).”J Pharm Sci.89(8):967-78(2000),Powell等人“非肠道制剂的赋形剂概述(Compendium of excipients for parenteral formulations)”PDA J Pharm Sci Technol.52:238-311(1998)和其中的引用。

[0331] 在一些实施方式中,多特异性多肽构建体、偶联的多特异性多肽构建体及其组合物(本文中统称为治疗剂和衍生物、其片段、类似物和同系物)可纳入适于给予的医药组合物中。制备此类组合物所涉及的原理和考虑因素以及组分的选择指南提供于以下中:例如,《雷明顿药物科学:药学科学与实践》(Remington’s Pharmaceutical Sciences:The Science And Practice Of Pharmacy),第19版(Alfonso R.Gennaro等人编辑)马克出版公司,Easton,Pa.:1995;《药物吸收增强:概念、可能性、限制和趋势》(Drug Absorption Enhancement:Concepts,Possibilities,Limitations,And Trends,Harwood Academic Publishers),Langhorne,Pa.,1994;和《肽和蛋白质药物递送》(PeptideAnd Protein Drug Delivery)(Advances In Parenteral Sciences,第4卷),1991,M.Dekker,New York。

[0332] 此类组合物通常包含多特异性多肽构建体或其偶联物和医药上可接受的载剂。若多特异性多肽构建体包括抗体的片段,则可使用特异性结合至靶蛋白的抗体的最小片段。举例而言,基于抗体的可变区序列,可设计保留抗体结合靶蛋白序列的能力的肽分子。此类肽可以化学方式合成和/或通过重组DNA技术产生。(例如,参见Marasco等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:7889-7893(1993))。

[0333] 如本文所用术语“医药上可接受的载剂”旨在包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂和医药给予相容的类似试剂。合适载剂阐述于《雷明顿药学科学》(Remington’s Pharmaceutical Sciences)的最近版本中,该文献是业内的标准参考文本,其是以引用方式纳入本文中。此类载剂或稀释剂的合适实施方式包括(但不限于)水、盐水、林格氏溶液(ringer’s solution)、右旋糖溶液和5%人类血清白蛋白。也可使用脂质粒和非水性媒剂(例如不挥发油)。业内熟知用于医药活性物质的此类介质和试剂的使用。除任何与活性化合物不相容的常用介质或试剂外,也涵盖其于治疗组合物中的使用。

[0334] 用于体内给予的配制物必须无菌。此易于通过过滤通过无菌过滤膜达成。

[0335] 本公开的医药组合物经配制以与其预期给予途径兼容。给予途径的实施方式包括胃肠外(例如静脉内)、真皮内、皮下、经口(例如吸入)、经皮(即局部)、经黏膜和直肠给予。用于胃肠外、真皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可包括以下组分:无菌稀释剂,例如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗细菌剂,例如苄醇或对羟苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;缓冲液,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,和用于调节张力的试剂(例如氯化钠或右旋糖)。可利用酸或碱(例如盐酸或氢氧化钠)调节pH。胃肠外制剂可包封于由玻璃或塑料制得的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0336] 合适注射使用的医药组合物包括无菌水溶液(若水溶性)或分散液和用于临时制备无菌注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内给予,合适载剂包括生理盐水、抑菌水、克列莫佛(Cremophor)EL™(BASF,Parsippany,N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物均应为无菌且其流动性程度应使其具有易注射性。其在制造和储存条件下必须

稳定,且必须防止受到诸如细菌和真菌等微生物的污染作用。载剂可为溶剂或分散介质,其含有(例如)水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)和其合适混合物。可(例如)通过使用包衣(例如卵磷脂)、通过维持所需粒径(在分散液情况下)且通过使用表面活性剂来维持适当流动性。可通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来达成对微生物的作用的预防。在许多情况下,合适地将等渗剂(例如糖、多元醇(例如,甘露醇、山梨醇)或氯化钠)纳入组合物中。可通过向组合物中纳入延迟吸收剂(例如,单硬脂酸盐和明胶)实现可注射组合物的长效吸收。

[0337] 无菌可注射溶液可通过以下步骤来制备:将所需量的活性化合物纳入含有上文所列举成分中的一种或组合(视需要)的适当溶剂中,随后进行过滤灭菌。通常,通过将活性化合物纳入含有基本分散介质和来自上文所列举的那些的所需其他成分的无菌媒剂中来制备分散液。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其可产生由活性成分和任一期望额外成分(来自其先前经无菌过滤的溶液)构成的粉末。若组合物经冻干,使用此方法的灭菌可在冻干和重建之前或之后执行。胃肠外给予的组合物可以冻干形式或于溶液中储存。另外,通常将胃肠外组合物置入具有输液端口的容器中,例如具有可通过皮下注射针刺穿的塞子的静脉注射溶液袋或小瓶。

[0338] 在一些实施方式中,经由任何途径向对象给予医药组合物,该途径包括经口、经皮、通过吸入、静脉内、动脉内、肌内、直接施加至伤口位点、施加至手术位点、腹膜内、通过栓剂、皮下、真皮内、透皮、通过雾化、胸膜内、室内、关节内、眼内或脊椎内。

[0339] 经口组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载剂。其可包封于明胶胶囊中或压制至片剂中。出于经口治疗性给予的目的,活性化合物可与赋形剂一起纳入并以片剂、糖片剂或胶囊形式使用。经口组合物也可使用流体载剂制备以用作漱口剂,其中流体载剂中的化合物经口施加且漱口和吐出或吞咽。可包括医药上相容的结合剂和/或佐剂材料作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊、糖片剂等可含有以下成分或具有类似性质的化合物中的任一种:粘合剂,例如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,例如淀粉或乳糖;崩解剂,例如海藻酸、羧甲基淀粉(Primogel)或玉米淀粉;润滑剂,例如硬脂酸镁或完全氢化植物油(Sterotes);助流剂,例如胶状二氧化硅;甜味剂,例如蔗糖或糖精;或矫味剂,例如薄荷、柳酸甲酯或橙味调味剂。

[0340] 对于通过吸入的给予,多特异性多肽构建体以来自含有合适推进剂(例如气体,例如二氧化碳)的压力容器或分配器或雾化器的气溶胶喷雾形式递送。

[0341] 全身给予也可以通过经黏膜或经皮方式进行。对于经黏膜或经皮给予,在配制物中使用适合渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂在业内通常是已知的,且例如对于经黏膜给予,包括清洁剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。经黏膜给予可经由使用鼻喷雾或栓剂来完成。对于经皮给予,将活性化合物配制成如业内通常已知的软膏剂、药膏、凝胶或乳霜。

[0342] 化合物也可以栓剂(例如具有常用栓剂基质,例如可可脂和其他甘油酯)或保留灌肠剂的形式制备用于直肠递送。

[0343] 在一个实施方式中,用可保护化合物免于自体内快速消除的载剂制备治疗剂,例如持续/控制释放配制物,包括植入体和微囊封递送系统。可使用生物可降解的生物相容性聚合物,例如乙烯基乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。此类配制物的制备方法对于本领域技术人员是显而易见的。

[0344] 举例而言,治疗剂可装入分别通过(例如)凝聚技术或表面聚合制备的微胶囊(例如,羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中、胶质药物递送系统(例如,脂质粒、白蛋白微球体、微乳液、奈米颗粒和奈米胶囊)或粗滴乳液中。

[0345] 在一些实施方式中,医药组合物包含医药上可接受的赋形剂,例如填充剂、粘合剂、包衣、防腐剂、润滑剂、矫味剂、甜味剂、着色剂、溶剂、缓冲剂、螯合剂或稳定剂。医药上可接受的填充剂的示例包括纤维素、磷酸氢钙、碳酸钙、微晶纤维素、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、麦芽醇、预明胶化淀粉、玉米淀粉或马铃薯淀粉。医药上可接受的粘合剂的示例包括聚乙烯基吡咯啶酮、淀粉、乳糖、木糖醇、山梨醇、麦芽糖醇、明胶、蔗糖、聚乙二醇、甲基纤维素或纤维素。医药上可接受的包衣的示例包括羟丙基甲基纤维素(HPMC)、虫胶、玉米蛋白或明胶。医药上可接受的崩解剂的示例包括聚乙烯基吡咯啶酮、羧甲纤维素或淀粉羟乙酸钠。医药上可接受的润滑剂的示例包括聚乙二醇、硬脂酸镁或硬脂酸。医药上可接受的防腐剂的示例包括对羟苯甲酸甲酯、对羟苯甲酸乙酯、对羟苯甲酸丙酯、苯甲酸或山梨酸。医药上可接受的甜味剂的示例包括蔗糖、糖精、阿斯巴甜或山梨醇。医药上可接受的缓冲剂的示例包括碳酸盐、柠檬酸盐、葡萄糖酸盐、乙酸盐、磷酸盐或酒石酸盐。

[0346] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适示例包含含有抗体的固态疏水性聚合物的半渗透性基质,此类基质呈成形制品形式,例如膜或微胶囊。在一些实施方式中,医药组合物进一步包含用于控制或持续释放产物的试剂,例如可注射微球体、生物可溶蚀颗粒、聚合化合物(聚乳酸、聚乙醇酸)、珠粒或脂质粒。持续释放基质的示例包括聚酯、水凝胶(例如聚(甲基丙烯酸-2-羟乙基酯)或聚(乙烯基醇))、聚交酯(美国专利第3,773,919号)、L-谷氨酸与γL-谷氨酸乙基酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物(例如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸柳培林(leuprolide acetate)构成的可注射微球体))和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。尽管诸如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸等聚合物使得能够释放分子100天以上,但某些水凝胶释放蛋白质持续较短时间段。

[0347] 材料也可自阿尔扎公司(Alza Corporation)和诺瓦制药公司(Nova Pharmaceuticals,Inc.)商业获得。脂质粒悬浮液(包括利用针对病毒抗原的单克隆抗体靶向受感染细胞的脂质粒)也可用作医药上可接受的载剂。此类材料可根据本领域技术人员已知的方法,例如如美国专利第4,522,811号中所述来制备。

[0348] 尤其有利地将经口或胃肠外组合物配制成剂量单位形式以便于给予和剂量均匀性。如本文所用的剂量单位形式是指适于作为单位剂量供欲治疗对象使用的物理离散单元;各单元含有预定量的活性化合物,此预定量经计算与所需医药载剂一起产生期望治疗效应。本公开的剂量单位形式的规格取决于且直接依赖于下列因素:活性化合物的独特特性和欲达成的特定治疗效应,和复合此一活性化合物以治疗对象的技术中固有限制条件。

[0349] 进一步提供包含本文所述医药组合物(或制品)的试剂盒。此类医药组合物可与给予说明书一起装入容器、包装或分配器中。本文所述试剂盒也可包括自商业和使用者角度所期望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射器和具有实施本文所述任何方法的说明的包装插页。

[0350] 配制物也可含有所治疗特定适应症所需的一种以上多特异性多肽构建体,例如为彼此不会产生不利影响的具有互补活性的那些。在一些实施方式中,或另外,组合物可包含增强其功能的试剂,例如细胞毒性剂、细胞因子、化学治疗剂或生长抑制剂。此类分子适于

以对预期目的有效的量以组合形式存在。

[0351] 在一些实施方式中,医药组合物的剂量是单一剂量或重复剂量。在一些实施方式中,剂量是每天一次、每天两次、每天三次或每天四次或更多次给予对象。在一些实施方式中,在一周内给予约1个或更多个(例如约2个或更多个、约3个或更多个、约4个或更多个、约5个或更多个、约6个或更多个或约7个或更多个)剂量。在一些实施方式中,在数天、数周、数月或数年的过程中给予多个剂量。在一些实施方式中,疗程是约1个或更多个剂量(例如约2个或更多个剂量、约3个或更多个剂量、约4个或更多个剂量、约5个或更多个剂量、约7个或更多个剂量、约10个或更多个剂量、约15个或更多个剂量、约25个或更多个剂量、约40个或更多个剂量、约50个或更多个剂量或约100个或更多个剂量)。

[0352] 在一些实施方式中,向对象给予医药组合物。通常,根据对象的尺寸和条件、根据标准医药实践确定医药组合物的剂量和给予途径。举例而言,可最初在细胞培养分析中或在动物模型(例如小鼠、大鼠、兔、狗、猪或猴)中估计治疗有效剂量。动物模型也可用于测定适当浓度范围和给予途径。随后可使用此等信息来确定人类中的可用给予剂量和途径。将根据与需要治疗的对象相关的因素来确定精确剂量。调节剂量和给予以提供足够含量的活性化合物或维持期望效应。可考虑的因素包括疾病状态的严重程度、对象的一般健康状况、对象的年龄、体重和性别、给予时间和频率、药物组合、反应敏感性和对疗法的反应。医药领域技术人员通过监测患者的疾病的体征并相应地调节治疗可容易地确定特定患者的最佳剂量和治疗方案。

[0353] IV.使用方法和治疗性给予

[0354] 还给予使用多特异性多肽构建体的方法及其用途。这类方法和用途包括治疗性方法和用途,例如,涉及向患有疾病、病症或紊乱,如肿瘤或癌症的对象给予分子或包含其的组合物。在一些实施方式中,以有效量给予分子和/或组合物以有效治疗疾病或病症。用途包括多特异性多肽构建体在这类方法和治疗中的用途,和在制备医药以进行此类治疗性方法中的用途。在一些实施方式中,通过向患有或疑似患有疾病或病症的对象给予多特异性多肽构建体,或包含其的组合物来进行该方法。在一些实施方式中,该方法由此治疗对象的疾病或病症或紊乱。

[0355] 在一个实施方式中,本公开的多特异性多肽构建体可用作治疗剂。此类药剂通常将用于诊断、预后、监测、治疗、缓和和/或预防对象的疾病或病状。治疗方案是通过使用标准方法鉴别患有病症(或处于发展病症的风险下)的对象(例如人类患者或其他哺乳动物)来实施。向对象给予多特异性多肽构建体。将多特异性多肽构建体给予对象且通常会因其与靶标结合而具有效应。

[0356] 在一些实施方式中,本文提供通过给予治疗有效量的所提供多特异性偶联物或医药组合物中的任一种来调节对象的免疫反应的方法。在一些实施方式中,调节免疫反应的方法增加或增强对象的免疫反应。举例而言,增加或增强的反应可为细胞介导的免疫性的增加。在一些实施方式中,该方法增加T细胞活性,例如细胞溶解T细胞(CTL)活性。在一些实施方式中,调节(例如增加)的免疫反应是针对肿瘤或癌症。

[0357] 给予多特异性多肽构建体可经由Fcγ R通过多特异性多肽构建体的Fc-区的接合而活化先天免疫细胞。给予多特异性多肽构建体可激动、刺激、活化和/或增大先天免疫细胞效应物功能,包括ADCC、细胞因子释放、脱粒化和/或ADCP。一旦连接第一和第二组分的接

头由蛋白酶裂解,从而容许抗CD3结合部分结合T细胞上的CD3ε,则给予多特异性多肽构建体可活化T细胞。给予多特异性多肽构建体可激动、刺激、活化和/或增大CD3介导的T细胞活化、细胞毒性、细胞因子释放和/或增殖。

[0358] 在一些实施方式中,所提供的方法用于通过给予治疗有效量的所提供多特异性偶联物或医药组合物中的任一种来治疗对象的疾病或病况。在一些实施方式中,疾病或病况是肿瘤或癌症。通常,缓和或治疗疾病或病症涉和减轻一或多种与疾病或病症相关的症状或医学问题。举例而言,在癌症的情况下,治疗有效量的药物可完成以下中一种或组合:减少癌细胞的数目;减少肿瘤大小;抑制(即,减少至一定程度/或停止)癌细胞浸润至外周器官中;抑制肿瘤转移;抑制肿瘤生长至一定程度;和/或减轻与癌症相关的一或多种症状至一定程度。在一些实施方式中,本公开的组合物可用于预防对象(例如人类或其他哺乳动物,例如非人类灵长类动物、伴侣动物(例如猫、狗、马)、农场动物、工作动物或动物园动物)的疾病或病症的发作或复发。术语对象和患者在本文中可互换使用。

[0359] 一些实施方式中,医药组合物可用于抑制哺乳动物癌细胞(例如人类癌细胞)的生长。治疗癌症的方法可包括向患有癌症的对象给予有效量的本文所述医药组合物中的任一种。可给予有效量的医药组合物以抑制、阻止或逆转癌症的进展。可在体内或离体处理人类癌细胞。在人类患者的离体治疗中,在体外处理含有癌细胞的组织或流体,且然后将组织或流体重新导回患者中。在一些实施方式中,在一些实施方式中,癌症在人类患者体内通过向患者给予治疗性组合物来治疗癌症。

[0360] 疾病的非限制性实施方式包括:所有类型的癌症(乳癌、肺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、黑色素瘤、头颈癌和胰腺癌等)、类风湿性关节炎、克罗恩氏病(Crohn's disuse)、SLE、心血管损伤、缺血等。举例而言,适应症将包括白血病(包括T细胞急性淋巴母细胞性白血病(T-ALL))、淋巴母细胞性疾病(包括多发性骨髓瘤)和实体肿瘤(包括肺肿瘤、结肠直肠肿瘤、前列腺肿瘤、胰腺肿瘤和乳房肿瘤(包括三阴性乳癌))。举例而言,适应症包括骨疾病或癌症转移,其与原发性肿瘤来源无关;乳癌,包括(通过非限制性实施方式)ER/PR+乳癌、Her2+乳癌、三阴性乳癌;结肠直肠癌;子宫内膜癌;胃癌;神经胶母细胞瘤;头颈癌,例如食管癌;肺癌,例如通过非限制性实施方式,非小细胞肺癌;多发性骨髓瘤、卵巢癌;胰腺癌;前列腺癌;肉瘤,例如骨肉瘤;肾癌,例如通过非限制性实施方式,肾细胞癌;和/或皮肤癌,例如通过非限制性实施方式,鳞状细胞癌、基底细胞癌或黑色素瘤。在一些实施方式中,癌症是鳞状细胞癌。在一些实施方式中,癌症是皮肤鳞状细胞癌。在一些实施方式中,癌症是食管鳞状细胞癌。在一些实施方式中,癌症是头颈部鳞状细胞癌。在一些实施方式中,癌症是肺鳞状细胞癌。

[0361] 本公开的多特异性多肽构建体的治疗有效量通常涉及实现治疗目标所需的量。如上所述,此可为多特异性多肽构建体与其靶抗原之间的结合相互作用,在某些情况下,其激动、刺激、活化和/或增大FcγR介导的先天免疫细胞活化或CD3介导的T细胞活化。所需给予量将进一步取决于多特异性多肽构建体对其特异性抗原的结合亲和性,且也取决于所给予多特异性多肽构建体自其所给予的其他对象的自由体积耗尽的速率。多特异性多肽构建体的治疗有效剂量的常见范围可为(通过非限制性实施方式)约0.01μg/kg体重至约10mg/kg体重。在一些实施方式中,本公开的多特异性多肽构建体的治疗有效剂量可为(通过非限制性实施方式)约0.01mg/kg体重至约5-10mg/kg体重。常见的投药频率可在例如每日两次至

每周一次的范围内。

[0362] 治疗的有效性与用于诊断或治疗特定病症的任何已知方法联合确定。用于筛选具有期望特异性的多特异性多肽构建体的方法包括(但不限于)酶联免疫吸附分析(ELISA)和业内已知的其他免疫介导的技术。已知多种方式用于通过以下方式确定所提供多特异性多肽构建体的给予是否足够调节免疫活性:诱导、生成或开启介导或能介导保护性免疫反应的免疫细胞;改变免疫细胞的物理或功能性质;或此类效应的组合。免疫活性的调节的测量的示例包括(但不限于)检查免疫细胞群体的存在或不存在(使用流式细胞术、免疫组织化学、组织学、电子显微镜、聚合酶链式反应(PCR));测量免疫细胞的功能能力,包括因应信号增殖或分裂的能力或对其的抗性(例如,用抗CD3抗体、抗T细胞受体抗体、抗CD28抗体、钙离子载体、装载有肽或蛋白质抗原的PMA(佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯)抗原呈递细胞刺激后使用T-细胞增殖分析和基于3H-胸苷掺入的肽扫描分析;B细胞增殖分析);测量杀死或溶解其他细胞能力(例如细胞毒性T细胞分析);测量细胞因子、趋化介素、细胞表面分子、抗体和其他细胞产物(例如通过流式细胞术、酶联免疫吸附分析、Western印迹分析、蛋白质微数组分析、免疫沉分析);测量免疫细胞或免疫细胞内信号传导路径活化的生化标记(例如Western印迹和免疫沉淀分析酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸磷酸化、多肽裂解和形成或解离蛋白质复合物;蛋白数组分析;DNA转录、使用DNA数组或减法杂交分型);通过细胞凋亡、坏死或其他机制测量细胞死亡(例如膜联蛋白V染色、TUNEL分析、用以测量DNA梯的凝胶电泳、组织学;荧光探针半胱天冬酶分析、Western印迹分析半胱天冬酶底物;测量免疫细胞产生的基因、蛋白质和其他分子(例如Northern印迹分析、聚合酶链反应、DNA微数组、蛋白质微数组、二维凝胶电泳、Western印迹分析、酶联免疫吸附分析、流式细胞术);测量临床症状或结果,例如通过测量复发率或疾病严重程度,例如自体免疫、神经退化和涉及自我蛋白或自我多肽的其他疾病的改良(临床评分、需要使用额外疗法、功能状态、成像研究)。

[0363] 多特异性多肽构建体也可用于各种诊断和预防性配制物。在一个实施方式中,向处于发生上文所提及的病症中的一或多种的风险的患者给予多特异性多肽构建体。患者或器官对一或多种病症的倾向可使用基因型、血清学或生化标记来确定。

[0364] 在本发明的另一实施方式中,向经诊断具有与上文所提及的病症中的一或多种相关的临床适应症的人类对象给予多特异性多肽构建体。在诊断时,给予多特异性多肽构建体以减轻或逆转临床适应症的效应。

[0365] 组合疗法

[0366] 在一些实施方式中,给予多特异性多肽构建体、偶联的多特异性多肽构建体及其组合物(在本文中共同称为治疗剂)连同一或更多额外试剂或额外试剂的组合。合适额外试剂包括用于预期应用的目前医药和/或手术疗法。举例而言,治疗剂可连同额外化学治疗剂或抗肿瘤剂使用。举例而言,将治疗剂和额外试剂配制成单一治疗性组合物,且同时给予治疗剂和额外试剂。在一些实施方式中,治疗剂和额外试剂彼此分开,例如,各自配制成单独的治疗性组合物,且同时给予治疗剂和额外试剂,或治疗剂和额外试剂在治疗方案期间在不同时间给予。举例而言,治疗剂在给予额外试剂前给予,治疗剂在给予额外试剂后给予,或治疗剂和额外试剂以交替方式给予。如本文所述,治疗剂和额外试剂以单一剂量或多个剂量给予。在一些实施方式中,额外试剂偶合或以其他方式附接至治疗剂。根据预期应用的目的(即杀死、预防细胞增殖、激素疗法或基因疗法)选择合适额外试剂。此类试剂可包括

(但不限于,例如)医药剂、毒素、毒素的片段、烷基化剂、酶、抗生素、抗代谢物、抗增殖剂、激素、神经传递质、DNA、RNA、siRNA、寡核苷酸、反义RNA、适配体、诊断剂、不透射线染料、放射性同位素、荧光探针化合物、磁性标记、纳米颗粒、标记化合物、凝集素、改变细胞膜渗透性的化合物、光化学化合物、小分子、脂质粒、胶束、基因治疗载体、病毒载体等。最后,可使用试剂的组合或不同类别的试剂的组合。

[0367] 在一个实施方式中,多特异性多肽构建体是以组合疗法,也即与可用于治疗病理状况或病症(例如自体免疫病症和发炎性疾病)的其他试剂(例如治疗剂)组合给予。本上下文中的术语"组合"意指基本上同时、同时或依次给予此类试剂。若依次给予,则在第二化合物给予开始时,两种化合物的第一种仍然可在治疗位点以有效浓度检测到。

[0368] 举例而言,组合疗法可包括本公开的一或多种多特异性多肽构建体与一或多种额外治疗剂(例如一或多种细胞因子和生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎剂、代谢抑制剂、酶抑制剂和/或细胞毒性或细胞生长抑制剂,如下文更详细阐述)共配制和/或共给予。此外,本文所述的一或多种多特异性多肽构建体可与本文所述的两种或更多种治疗剂组合使用。此类组合疗法可有利地利用较低剂量的所给予治疗剂,由此避免与各种单一疗法相关的可能毒性或并发症。

[0369] 在其他实施方式中,本公开的一或多种多特异性多肽构建体与一或多种消炎药、免疫抑制剂或代谢或酶抑制剂共配制和/或共给予。可与本文所述抗体组合使用的药物或抑制剂的非限制性实施方式包括(但不限于)以下中的一或多种:非类固醇消炎药(NSAID),例如布洛芬(ibuprofen)、替尼达普(tenidap)、萘普生(naproxen)、美洛西卡(meloxicam)、吡罗昔康(piroxicam)、双氯芬酸(diclofenac)和吲哚美辛(indomethacin);磺胺塞拉金(sulfasalazine);皮质类固醇,例如普赖苏浓(prednisolone);细胞因子抑制性消炎药(CSAID);核苷酸生物合成的抑制剂,例如,嘌呤生物合成的抑制剂、叶酸盐拮抗剂(例如氨甲喋呤(methotrexate)(N-[4-[[(2,4-二氨基-6-蝶啶基)甲基]甲基氨基]苯甲酰基]-L-谷氨酸);和嘧啶生物合成的抑制剂,例如二氢乳清酸去氢酶(DHODH)抑制剂。与本公开的抗体组合使用的合适治疗剂包括NSAID、CSAID、(DHODH)抑制剂(例如来氟米特)和叶酸盐拮抗剂(例如氨甲喋呤)。

[0370] 额外抑制剂的示例包括以下中的一或多种:皮质类固醇(经口、吸入和局部注射);免疫抑制剂,例如环孢素(cyclosporin)、他克莫司(tacrolimus)(FK-506);和mTOR抑制剂,例如西罗莫司(sirolimus)(雷帕霉素(rapamycin)-RAPAMUNE™或雷帕霉素衍生物,例如可溶性雷帕霉素衍生物(例如酯雷帕霉素衍生物,例如CCI-779);干扰由促炎性细胞因子信号传导的试剂,例如TNFα或IL-1(例如IRAK、NIK、IKK、p38或MAP激酶抑制剂);COX2抑制剂,例如塞来昔布、罗非昔布及其变体;磷酸二酯酶抑制剂,例如R973401(磷酸二酯酶IV型抑制剂);磷脂酶抑制剂,例如胞质磷脂酶2的抑制剂(cPLA2)(例如三氟甲基酮类似物);血管内皮细胞生长因子或生长因子受体的抑制剂,例如VEGF抑制剂和/或VEGF-R抑制剂;和血管生成的抑制剂。适于与本公开抗体组合使用的治疗剂是免疫抑制剂,例如环孢素、他克莫司(FK-506);mTOR抑制剂,例如西罗莫司(雷帕霉素)或雷帕霉素衍生物,例如可溶性雷帕霉素衍生物(例如酯雷帕霉素衍生物,例如CCI-779);COX2抑制剂,例如塞来昔布及其变体;和磷脂酶抑制剂,例如胞质磷脂酶2(cPLA2)的抑制剂,例如三氟甲基酮类似物。可与多特异性多肽构建体组合的治疗剂的额外示例包括以下中的一或多种:6-巯嘌呤(6-MP);硫唑嘌呤柳

氮磺吡啶;美色拉嗪(mesalazine);奥色拉秦(olsalazine);氯喹/羟基氯喹(PLAQUENIL®);青霉胺;金硫代苹果酸盐(肌内和经口);硫唑嘌呤;秋水仙碱;β-2肾上腺受体激动剂(沙丁胺醇(salbutamol)、特布他林(terbutaline)、沙美特罗(salmeteral));黄嘌呤(茶碱、胺茶碱);色甘酸盐;奈多罗米(nedocromil);酮替芬(ketotifen);异丙托铵(ipratropium)和氧托品(oxitropium);吗替麦考酚酯(mycophenolate mofetil);腺苷激动剂;抗血栓剂;补体抑制剂;和肾上腺素性试剂。

[0371] V.示例性实施方式

[0372] 其中所提供实施方式是:

[0373] 1.一种多特异性多肽构建体,该多特异性多肽构建体包含含有免疫球蛋白Fc区的第一组分和包含CD3结合区的第二组分,其中:

[0374] 该第一组分和该第二组分由接头偶合,其中该Fc区位于该CD3结合区的N-末端;且

[0375] 该第一组分和该第二组分中的一种或二种包含结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域。

[0376] 2.如实施方式1的多特异性多肽构建体,其中该CD3结合区结合CD3(CD3ε)。

[0377] 3.如实施方式1或实施方式2的多特异性构建体,其中该抗原结合结构域位于相对于该多特异性多肽构建体的该Fc区的氨基末端和/或位于相对于该CD3结合区的羧基末端。

[0378] 4.如实施方式1至3中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该第一组分包含第一抗原结合结构域且该第二组分包含第二抗原结合结构域,其中此类抗原结合结构域中的每一种结合肿瘤相关抗原(TAA)。

[0379] 5.如实施方式4的多特异性多肽构建体,其中该第一抗原结合结构域位于相对于该多特异性构建体的该Fc区的氨基末端且该第二抗原结合结构域位于相对于该多特异性构建体的该CD3结合区的羧基末端。

[0380] 6.一种多特异性多肽构建体,其中该多特异性构建体自N-末端至C-末端依次包含:

[0381] 结合至肿瘤相关抗原(TAA)的第一抗原结合结构域;

[0382] 免疫球蛋白Fc区;

[0383] 接头;

[0384] 结合CD3(CD3ε)的CD3结合区;和

[0385] 结合肿瘤相关抗原(TAA)的第二抗原结合结构域。

[0386] 7.一种多特异性多肽构建体,其中该多特异性构建体自N-末端至C-末端依次包含:

[0387] 免疫球蛋白Fc区;

[0388] 接头;

[0389] 结合CD3(CD3ε)的CD3结合区;和

[0390] 结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域。

[0391] 8.一种多特异性多肽构建体,其中该多特异性构建体自N-末端至C-末端依次包含:

[0392] 结合至肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域;

[0393] 免疫球蛋白Fc区;

[0394] 接头;和

[0395] 结合CD3(CD3ε)的CD3结合区。

[0396] 9.如实施方式1至8中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该Fc区是同二聚体Fc区。

[0397] 10.如实施方式1至9中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该Fc区是人类IgG1、人类IgG2、人类IgG3或人类IgG4的Fc区,或是其免疫活性片段。

[0398] 11.如实施方式1至10中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该Fc区包含含有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列相同性的氨基酸序列的多肽。

[0399] 12.如实施方式1至10中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该Fc区包含含有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列相同性的氨基酸序列的多肽;

[0400] 该Fc区包含含有SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列相同性的氨基酸序列的多肽;或

[0401] 该Fc区包含含有SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列相同性的氨基酸序列的多肽。

[0402] 13.如实施方式1至6、9和12中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该Fc区是异二聚体Fc区。

[0403] 14.如实施方式13的多特异性多肽构建体,其中与同二聚体Fc区的多肽相比,可选地与SEQ ID NO:1中所示的该Fc多肽或其免疫活性片段相比,该异二聚体Fc区的一个或两个Fc多肽包含至少一个修饰以诱导异二聚化。

[0404] 15.如实施方式14的多特异性多肽构建体,其中该异二聚体Fc的此类Fc多肽中的每一种独立地包含至少一个氨基酸修饰。

[0405] 16.如实施方式15的多特异性多肽构建体,其中该异二聚体Fc的此类Fc多肽中的每一种包含杵臼结构修饰或包含电荷突变以增加此类多肽的静电互补。

[0406] 17.如实施方式16的多特异性多肽构建体,其中该氨基酸修饰是杵臼结构修饰。

[0407] 18.如实施方式13至17中任一实施方式的多特异性融合多肽,其中该异二聚体Fc的该第一Fc多肽包含选自Thr366Ser、Leu368Ala、Tyr407Val及其组合的修饰且该异二聚体Fc的该第二Fc多肽包含修饰T366W。

[0408] 19.如实施方式18的多特异性融合多肽,其中该第一Fc多肽和该第二Fc多肽进一步包含非半胱氨酸残基至半胱氨酸残基的修饰,其中该第一多肽的该修饰在位置Ser354和Y349中的一种且该第二Fc多肽的该修饰在位置Ser354和Y349中的另一种。

[0409] 20.如实施方式16的多特异性多肽构建体,其中该氨基酸修饰是电荷突变以增加此类多肽的静电互补。

[0410] 21.如实施方式13至16和20中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该第一Fc多肽和/或该第二Fc多肽或该第一Fc多肽和该第二Fc多肽中的每一种包含互补位置的修饰,其中该修饰是用具有与该另一多肽的互补氨基酸相反的电荷的氨基酸置换。

[0411] 22.如实施方式14至21中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该异二聚体Fc的该第一Fc多肽或该第二Fc多肽中的一种进一步包含残基Ile253的修饰。

[0412] 23.如实施方式22的多特异性多肽构建体,其中该修饰是Ile253Arg。

[0413] 24.如实施方式14至23中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该异二聚体Fc的该第一Fc多肽或该第二Fc多肽中的一种进一步包含残基His435的修饰。

[0414] 25.如实施方式24的多特异性多肽构建体,其中该修饰是His435Arg。

[0415] 26.如实施方式1至25中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该Fc区包含无Lys447的多肽。

[0416] 27.如实施方式1至26中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该Fc区包含含有至少一个修饰以增强FcRn结合的多肽。

[0417] 28.如实施方式27的多特异性融合多肽,其中该修饰是在选自由以下组成的组的位置:Met252、Ser254、Thr256、Met428、Asn434及其组合。

[0418] 29.如实施方式28的多特异性融合多肽,其中该修饰是在选自由以下组成的组的位置:Met252Y、Ser254T、Thr256E、Met428L、Met428V、Asn434S及其组合。

[0419] 30.如实施方式28的多特异性融合多肽,其中该修饰是在位置Met252和位置Met428。

[0420] 31.如实施方式30的多特异性融合多肽,其中该修饰是Met252Y和Met428L。

[0421] 32.如实施方式30的多特异性融合多肽,其中该修饰是Met252Y和Met428V。

[0422] 33.如实施方式13至32中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该异二聚体Fc的该第一多肽包含SEQ ID NO:82、86、94或96中的任一种中所示的氨基酸序列,且该异二聚体Fc的该第二多肽包含SEQ ID NO:83、87、90、92、98或100中的任一种中所示的氨基酸序列。

[0423] 34.如实施方式1至33中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该Fc区包含含有至少一个氨基酸修饰的多肽,该至少一个氨基酸修饰降低效应物功能和/或降低与选自Fcγ受体或C1q的效应物分子的结合。

[0424] 35.如实施方式34的多特异性多肽构建体,其中该一或多个氨基酸修饰是缺失Glu233、Leu234或Leu235中的一或多种。

[0425] 36.如实施方式13至32、34和35中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该异二聚体Fc的该第一多肽包含SEQ ID NO:84、88、95或97中的任一种中所示的氨基酸序列且该异二聚体Fc的该第二多肽包含SEQ ID NO:85、89、91、93、99或101中的任一种中所示的氨基酸序列。

[0426] 37.如实施方式1至32中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该Fc区包含含有至少一个修饰以增强FcγR结合的多肽。

[0427] 38.如实施方式37的多特异性多肽构建体,其中该修饰是Ser239或Ile332的修饰。

[0428] 39.如实施方式1至32和37中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中与未经修饰的Fc区相比,该Fc区的糖基化经修饰以增强FcγR结合。

[0429] 40.如实施方式39的多特异性多肽构建体,其中该Fc区无或具有减少的岩藻糖含量。

[0430] 41.如实施方式1至40中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该CD3结合区

是抗CD3抗体或抗原结合片段。

[0431] 42.如实施方式41的多特异性多肽构建体,其中该抗CD3抗体或抗原结合片段包含可变重链区(VH)和可变轻链区(VL)。

[0432] 43.如实施方式1至42中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该CD3结合区是单价的。

[0433] 44.如实施方式41至43中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该抗CD3抗体或抗原结合片段并非单链抗体,可选地并非单链可变片段(scFv)。

[0434] 45.如实施方式42或实施方式44的多特异性多肽构建体,其中该Fc是异二聚体Fc,且构成该抗CD3抗体或抗原结合片段的该VH和该VL连接至该异二聚体Fc的相反多肽。

[0435] 46.如实施方式1至45中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中除非该抗原结合结构域中的至少一种结合至其TAA,否则该CD3结合区不能或基本上不能结合或接合CD3。

[0436] 47.如实施方式1至46中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中除非该抗原结合结构域中的至少二种结合至其TAA,否则该CD3结合区不能或基本上不能结合或接合CD3。

[0437] 48.如实施方式1至47中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该接头是多肽接头。

[0438] 49.如实施方式48的多特异性多肽构建体,其中该接头是最多25个氨基酸长的多肽。

[0439] 50.如实施方式48或实施方式49的多特异性多肽构建体,其中该接头是或是约2至24个氨基酸、2至20个氨基酸、2至18个氨基酸、2至14个氨基酸、2至12个氨基酸、2至10个氨基酸、2至8个氨基酸、2至6个氨基酸、6至24个氨基酸、6至20个氨基酸、6至18个氨基酸、6至14个氨基酸、6至12个氨基酸、6至10个氨基酸、6至8个氨基酸、8至24个氨基酸、8至20个氨基酸、8至18个氨基酸、8至14个氨基酸、8至12个氨基酸、8至10个氨基酸、10至24个氨基酸、10至20个氨基酸、10至18个氨基酸、10至14个氨基酸、10至12个氨基酸、12至24个氨基酸、12至20个氨基酸、12至18个氨基酸、12至14个氨基酸、14至24个氨基酸、14至20个氨基酸、14至18个氨基酸、18至24个氨基酸、18至20个氨基酸或20至24个氨基酸的多肽。

[0440] 51.如实施方式48至50中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该接头是3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸长的多肽。

[0441] 52.如实施方式1至51中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该接头是可裂解接头。

[0442] 53.一种多特异性多肽构建体,该多特异性多肽构建体包含含有异二聚体Fc区的第一组分和包含含有可变重链区(VH)和可变轻链区(VL)的抗CD3抗体或抗原结合片段的第二组分,其中:

[0443] 构成该抗CD3抗体或抗原结合片段的该VH和该VL连接至该异二聚体Fc的相反多肽;

[0444] 该第一组分和该第二组分由可裂解接头偶合,其中该异二聚体Fc区位于该抗CD3抗体的N-末端;且

[0445] 该第一组分和该第二组分中的一种或二种包含结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域。

[0446] 54.如实施方式52或实施方式53的多特异性多肽构建体,其中当该多特异性多肽

构建体与裂解状态相比呈未裂解状态时,该CD3结合区与CD3的结合显著降低。

[0447] 55.如实施方式52至54中任一实施方式的多特异性多肽,其中在裂解状态下,该第一组分和该第二组分未连接。

[0448] 56.如实施方式52至55中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该可裂解接头是用作蛋白酶的底物的多肽。

[0449] 57.如实施方式56的多特异性多肽构建体,其中该蛋白酶是由免疫效应细胞、由肿瘤或由肿瘤微环境中存在的细胞产生。

[0450] 58.如实施方式57的多特异性多肽构建体,其中该蛋白酶是由免疫效应细胞产生,且该免疫效应细胞是活化的T细胞、天然杀伤(NK)细胞或NK T细胞。

[0451] 59.如实施方式56至58中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该蛋白酶是选自间质蛋白酶、基质金属蛋白酶(MMP)、颗粒酶B及其组合。

[0452] 60.如实施方式59的多特异性多肽构建体,其中该蛋白酶是颗粒酶B。

[0453] 61.如实施方式52至60中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该可裂解接头包含通式P4 P3 P2 P1 ↓ P1'(SEQ ID NO:150)的氨基酸序列,其中P4是氨基酸I、L、Y、M、F、V或A;P3是氨基酸A、G、S、V、E、D、Q、N或Y;P2是氨基酸H、P、A、V、G、S或T;P1是氨基酸D或E;且P1'是氨基酸I、L、Y、M、F、V、T、S、G或A。

[0454] 62.如实施方式52至61中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该可裂解接头包含通式P4 P3 P2 P1 ↓ P1'(SEQ ID NO:151)的氨基酸序列,其中P4是氨基酸I或L;P3是氨基酸E;P2是氨基酸P或A;P1是氨基酸D;且P1'是氨基酸I、V、T、S或G。

[0455] 63.如实施方式52至62中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该可裂解接头包含氨基酸序列IEPDI(SEQ ID NO:136)、LEPDG(SEQ ID NO:152)、LEADT(SEQ ID NO:137)、IEPDG(SEQ ID NO:138)、IEPDV(SEQ ID NO:139)、IEPDS(SEQ ID NO:140)、IEPDT(SEQ ID NO:141)或LEADG(SEQ ID NO:153)。

[0456] 64.如实施方式52至63中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该可裂解接头包含选自由SEQ ID NO:22、105-112、136-141、148、150-153组成的组的氨基酸序列。

[0457] 65.如实施方式59的多特异性多肽构建体,其中该蛋白酶是间质蛋白酶。

[0458] 66.如实施方式52至65中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中:

[0459] 该可裂解接头包含序列P1QAR ↓(A/V)(SEQ ID NO:154),其中P1是任何氨基酸;或

[0460] 该可裂解接头包含序列RQAR(A/V)(SEQ ID NO:155)。

[0461] 67.如实施方式52至66中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该可裂解接头包含序列RQARV(SEQ ID NO:156)。

[0462] 68.如实施方式52至67中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该可裂解接头包含选自由SEQ ID NO:23、154-156组成的组的氨基酸序列。

[0463] 69.如实施方式59的多特异性多肽构建体,其中该蛋白酶是MMP。

[0464] 70.如实施方式69的多特异性多肽构建体,其中该MMP是MMP-2。

[0465] 71.如实施方式52至70中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该可裂解接头包含通式P3 P2 P1 ↓ P1'(SEQ ID NO:157),其中P3是P、V或A;P2是Q或D;P 1是A或N;且P1'是L、I或M。

[0466] 72.如实施方式52至71中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该可裂解接

头包含通式P3 P2 P1 ↓ P1'(SEQ ID NO:158),其中P3是P;P2是Q或D;P1是A或N;且P1'是L或I。

[0467] 73.如实施方式52至72中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该可裂解接头包含序列PAGL(SEQ ID NO:24)。

[0468] 74.如实施方式52至73中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该可裂解接头包含选自由SEQ ID NO:22-31、104-114、117-118、136-144、148、150-158组成的组的氨基酸序列。

[0469] 75.如实施方式45至74中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该多特异性多肽构建体至少包含(i)第一多肽,其包含该异二聚体Fc区的该第一Fc多肽、该接头和该抗CD3抗体或抗原结合片段的该VH结构域;和(ii)第二多肽,其包含该异二聚体Fc区的该第二Fc多肽、该接头和该抗CD3抗体或抗原结合片段的该VL结构域,其中该第一多肽和该第二多肽中的一种或二种包含至少一个结合至肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域。

[0470] 76.如实施方式1至75中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中一或多个结合TAA的抗原结合结构域与该TAA产生单价、二价、三价或四价结合。

[0471] 77.如实施方式75的多特异性多肽构建体,其中该第一多肽或该第二多肽中仅一种包含该至少一个结合TAA的抗原结合结构域。

[0472] 78.如实施方式75或实施方式77的多特异性多肽构建体,其中该至少一个抗原结合结构域位于该多特异性多肽构建体的该第一多肽或该第二多肽中的一种的相对于该Fc区的氨基末端和/或位于相对于该CD3结合区的羧基末端。

[0473] 79.如实施方式75或实施方式77的多特异性多肽构建体,其中该至少一个抗原结合结构域位于相对于该多特异性构建体的该Fc区的氨基末端且该第二抗原结合结构域位于相对于该多特异性构建体的该CD3结合区的羧基末端。

[0474] 80.如实施方式1至79中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该抗原结合结构域或独立地此类抗原结合结构域中的每一种包含该TAA的天然同源结合伴侣或展现与该TAA的结合活性的其变体的细胞外结构域或其结合片段。

[0475] 81.如实施方式1至79中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该抗原结合结构域或独立地此类抗原结合结构域中的每一种系选自由以下组成的组的抗体或其抗原结合片段:Fab片段、F(ab')2片段、Fv片段、scFv、scAb、dAb、单一结构域重链抗体和单一结构域轻链抗体。

[0476] 82.如实施方式81的多特异性多肽构建体,其中该抗体或其抗原结合片段是Fv、scFv、Fab、单一结构域抗体(sdAb)、V_{NAR}或V_HH。

[0477] 83.如实施方式81或实施方式82的多特异性多肽构建体,其中该抗体或抗原结合片段是sdAb。

[0478] 84.如实施方式83的多特异性多肽构建体,其中该sdAb是人类或人源化sdAb。

[0479] 85.如实施方式83或实施方式84的多特异性多肽构建体,其中该sdAb是V_HH、V_{NAR}、经改造的VH结构域或经改造的VK结构域。

[0480] 86.如实施方式81或实施方式82的多特异性多肽构建体,其中该抗体或其抗原结合片段是scFv。

[0481] 87.如实施方式81或实施方式82的多特异性多肽构建体,其中该抗体或其抗原结

合片段是Fab。

[0482] 88.如实施方式87的多特异性多肽构建体,其中该多特异性多肽构建体包含:

[0483] (i)第一多肽,其包含该异二聚体Fc区的该第一Fc多肽、该接头和该抗CD3抗体或抗原结合片段的该VH结构域;

[0484] (ii)第二多肽,其包含该异二聚体Fc区的该第二Fc多肽、该接头和该抗CD3抗体或抗原结合片段的该VL结构域,和

[0485] (iii)第三多肽,其包含结合至肿瘤相关抗原的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL,其中该第一多肽和/或该第二多肽进一步包含该Fab抗体片段的该VH-CH1(Fd)或该VL-CL中的另一种。

[0486] 89.如实施方式88的多特异性多肽构建体,其中该第一多肽或该第二多肽中仅一种包含该Fab抗体片段的该VH-CH1(Fd)或该VL-CL中的另一种。

[0487] 90.如实施方式89的多特异性多肽构建体,其中该第一多肽或该第二多肽二种均包含该Fab抗体片段的该VH-CH1(Fd)或该VL-CL中的另一种。

[0488] 91.如实施方式89或实施方式90的多特异性多肽构建体,其中该Fab抗体片段的该VH-CH1(Fd)或该VL-CL中的另一种位于该多特异性多肽构建体的该第一多肽或该第二多肽中的一种的相对于该Fc区的氨基末端和/或位于相对于该CD3结合区的羧基末端。

[0489] 92.如实施方式89至91中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该Fab抗体片段的该VH-CH1(Fd)或该VL-CL中的另一种位于相对于该第一多肽或该第二多肽的该Fc区的氨基末端和位于相对于该第一多肽或该第二多肽中的另一种的该CD3结合区的羧基末端。

[0490] 93.如实施方式1至92中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该抗原结合结构域或独立地此类抗原结合结构域中的每一种结合至选自以下的肿瘤抗原:1-92-LFA-3、5T4、α-4整联蛋白、α-V整联蛋白、α4β1整联蛋白、α4β7整联蛋白、AGR2、抗刘易斯-Y、艾普林J受体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5补体、C-242、CA9、CA19-9(刘易斯a)、碳酸酐酶9、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132、(IL-2RG)、CD133、CD137、CD138、CD166、CD172A、CD248、CDH6、CEACAM5(CEA)、CEACAM6(NCA-90)、密连蛋白-3、密连蛋白-4、cMet、胶原、Cripto、CSFR、CSFR-1、CTLA-4、CTGF、CXCL10、CXCL13、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CYR61、DL44、DLK1、DLL3、DLL4、DPP-4、DSG1、EDA、EDB、EGFR、EGFRviii、内皮素B受体(ETBR)、ENPP3、EpCAM、EPHA2、EPHB2、ERBB3、RSV的F蛋白、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、叶酸盐受体α(FRα)、GAL3ST1、G-CSF、G-CSFR、GD2、GITR、GLUT1、GLUT4、GM-CSF、GM-CSFR、GP IIb/IIIa受体、Gp130、GPIIB/IIIA、GPNMB、GRP78、HER2/neu、HER3、HER4、HGF、hGH、HVEM、玻尿酸酶、ICOS、IFNα、IFNβ、IFNγ、IgE、IgE受体(FceRI)、IGF、IGF1R、IL1B、IL1R、IL2、IL11、IL12、IL12p40、IL-12R、IL-12Rβ1、IL13、IL13R、IL15、IL17、IL18、IL21、IL23、IL23R、IL27/IL27R(wsx1)、IL29、IL-31R、IL31/IL31R、IL2R、IL4、IL4R、IL6、IL6R、胰岛素受体、锯齿状配体、锯齿状1、锯齿状2、KISS1-R、LAG-3、LIF-R、刘易斯X、LIGHT、LRP4、LRRC26、Ly6G6D、LyPD1、MCSP、间皮素、MRP4、MUC1、黏蛋白-16(MUC16、CA-125)、Na/K ATP酶、NGF、纳卡斯特罗因蛋白、Notch受体、Notch 1、Notch 2、Notch 3、Notch 4、NOV、OSM-R、OX-40、PAR2、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGFRα、PDGFRβ、PD-1、PD-L1、PD-L2、磷脂酰基-丝氨酸、P1GF、

PSCA、PSMA、PSGR、RAAG12、RAGE、SLC44A4、磷酸神经鞘胺醇1、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TAPA1、TEM-8、TGFβ、TIGIT、TIM-3、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TMEM31、TNFα、TNFR、TNFRS12A、TRAIL-R1、TRAIL-R2、运铁蛋白、运铁蛋白受体、TRK-A、TRK-B、uPAR、VAP1、VCAM-1、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、VISTA、WISP-1、WISP-2和WISP-3。

[0491] 94.如实施方式1至93中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中多特异性抗原结合结构域至少包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,其中该第一抗原结合结构域和该第二抗原结合结构域结合至相同TAA。

[0492] 95.如实施方式94的多特异性多肽构建体,其中该第一抗原结合结构域和该第二抗原结合结构域结合相同TAA上的不同表位。

[0493] 96.如实施方式94的多特异性多肽构建体,其中该第一抗原结合结构域和该第二抗原结合结构域结合相同TAA上的相同表位。

[0494] 97.如实施方式1至96中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中多特异性抗原结合结构域至少包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,其中该第一抗原结合结构域就该第二抗原结合结构域结合不同TAA。

[0495] 98.如实施方式5至97中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该多特异性多肽构建体包含该第一抗原结合结构域与该Fc区之间的第一连接肽(LP1)。

[0496] 99.如实施方式5至98中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该多特异性多肽构建体包含该CD3结合区与该该第二抗原结合结构域之间的第二连接肽(LP2)。

[0497] 100.如实施方式5至99中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该多特异性多肽构建体包含该第一抗原结合结构域与该Fc区之间的第一连接肽(LP1)以及该CD3结合区与该第二抗原结合结构域之间的第二连接肽(LP2),且其中该多特异性多肽构建体自N-末端至C-末端具有如下结构配置:第一抗原结合结构域-LP1-Fc区-接头-CD3结合区-LP2-第二抗原结合结构域。

[0498] 101.如实施方式100的多特异性多肽构建体,其中该接头是可裂解接头。

[0499] 102.如实施方式100和实施方式101的多特异性多肽构建体,其中该两个连接肽彼此不同。

[0500] 103.如实施方式98至102中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中LP1或LP2独立地是约1至20个氨基酸长的肽。

[0501] 104.如实施方式103的多特异性多肽,其中LP1或LP2独立地包含是或包含如SEQ ID NO:10-13、119、135、147、149或GGS中所示的任何Gly-Ser接头的肽。

[0502] 105.如实施方式41至104中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该抗CD3抗体或抗原结合片段是Fv抗体片段。

[0503] 106.如实施方式105的多特异性多肽构建体,其中该Fv抗体片段包含经二硫键稳定的抗CD3结合Fv片段(dsFv)。

[0504] 107.如实施方式41至106中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该抗CD3抗体或抗原结合片段包含VH CDR1,其包含氨基酸序列TYAMN(SEQ ID NO:16);VH CD2,其包含氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:17);VH CDR3,其包含氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:18);VL CDR1,其包含氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID

NO:19);VL CDR2,其包含氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:20);和VL CDR3,其包含氨基酸序列ALWYSNLWV(SEQ ID NO:21)。

[0505] 108.如实施方式106或实施方式107的多特异性多肽构建体,其中该抗CD3 dsFv包含:

[0506] VH,其具有SEQ ID NO:14和32-62中的任一种的氨基酸序列或与SEQ ID NO:14和32-62中的任一种展现至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列相同性的序列;和

[0507] VL,其具有SEQ ID NO:15和63-81中的任一种的氨基酸序列或与SEQ ID NO:14和32-62中的任一种展现至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列相同性的序列。

[0508] 109.如实施方式106至108中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该抗CD3 dsFv包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列和SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0509] 110.如实施方式102至104中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该抗CD3 dsFv包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列和SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

[0510] 111.如实施方式1至109中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该多特异性多肽构建体偶联至试剂。

[0511] 112.如实施方式111的多特异性多肽构建体,其中该试剂是治疗剂、抗瘤剂、毒素或其片段、可检测部分或诊断剂。

[0512] 113.如实施方式112的多特异性多肽构建体,其中该试剂经由接头偶联至该多特异性多肽构建体。

[0513] 114.一种编码如实施方式1至113中任一实施方式的多特异性多肽构建体的多核苷酸。

[0514] 115.一种编码如实施方式1至113中任一实施方式的多特异性多肽构建体中的任一种的多肽链的多核苷酸。

[0515] 116.一种多核苷酸,其包含编码如实施方式1至115中任一实施方式的多特异性构建体的第一多肽的第一核酸序列和编码该多特异性构建体的第二多肽的第二核酸序列,其中该第一核酸序列和该第二核酸序列是通过内部核糖体进入位点(IRES)或编码自我裂解肽或会造成核糖体跳跃的肽的核酸分开。

[0516] 117.如实施方式116的多核苷酸,其中该第一核酸序列和该第二核酸序列可操作连接至相同启动子。

[0517] 118.如实施方式116或实施方式117的多核苷酸,其中该多特异性多肽构建体包含第三多肽链,且该多核苷酸进一步包含编码该多特异性构建体的该第三多肽的第三核酸。

[0518] 119.如实施方式118的多核苷酸,其中该第三核酸是通过内部核糖体进入位点(IRES)或编码自我裂解肽或会造成核糖体跳跃的肽的核酸与该第一核酸和/或该第二核酸分开,和/或该第三核酸序列与该第一核酸序列和/或该第二核酸序列可操作连接至相同启动子。

[0519] 120.如实施方式116至119中任一实施方式的多核苷酸,其中编码自我裂解肽或会造成核糖体跳跃的肽的该核酸是选自T2A、P2A、E2A或F2A。

[0520] 121.一种载体,其包含如实施方式114至120中任一实施方式的多核苷酸。

[0521] 122.如实施方式121的载体,其是表达载体。

[0522] 123.如实施方式121或122的载体,其是病毒载体或真核载体,可选地其中该真核载体是哺乳动物载体。

[0523] 124.一种细胞,其包含一或多种如实施方式114至120中任一实施方式的多核苷酸或一或多种如实施方式121至123中任一实施方式的载体。

[0524] 125.如实施方式124的细胞,其中该细胞是重组或分离的。

[0525] 126.如实施方式125的细胞,其中该细胞是哺乳动物细胞。

[0526] 127.如实施方式126的细胞,其中该细胞是HEK293或CHO细胞。

[0527] 128.一种产生多特异性多肽构建体的方法,该方法包括向细胞中引入一或多种如实施方式114至120中任一实施方式的多核苷酸或一或多种如实施方式121至123中任一实施方式的载体,以及在条件下培养此类细胞以产生该多特异性多肽构建体。

[0528] 129.一种产生多特异性多肽构建体的方法,该方法包括在由如实施方式124至127中任一实施方式的细胞产生该多特异性多肽的条件下培养该细胞。

[0529] 130.如实施方式128或129的细胞,其中该细胞是哺乳动物细胞。

[0530] 131.如实施方式130的细胞,其中该细胞是HEK293或CHO细胞。

[0531] 132.如实施方式128或实施方式129的方法,其进一步包括自该细胞分离或纯化该多特异性多肽构建体。

[0532] 133.如实施方式128至132中任一实施方式的方法,其中该多特异性多肽构建体是异二聚体。

[0533] 134.一种通过如实施方式128至133中任一实施方式的方法产生的多特异性多肽构建体。

[0534] 135.一种医药组合物,其包含如实施方式1至113或实施方式134中任一实施方式的多特异性多肽构建体和医药上可接受的载剂。

[0535] 136.如实施方式135的医药组合物,其是无菌的。

[0536] 137.一种刺激或诱导免疫反应的方法,该方法包括使靶细胞和T细胞与如实施方式1至113或实施方式134中任一实施方式的多特异性多肽构建体或如实施方式109或实施方式110的医药组合物接触,该靶细胞表达由该多特异性多肽构建体识别的肿瘤相关抗原。

[0537] 138.如实施方式137的方法,其中该靶细胞是表达该肿瘤相关抗原(TAA)的肿瘤细胞。

[0538] 139.如实施方式138或实施方式138的方法,其中该多特异性多肽构建体包含用作蛋白酶的底物的裂解接头且在该蛋白酶存在下对该免疫反应的该诱导或刺激增加。

[0539] 140.如实施方式139的方法,其中该蛋白酶是由免疫效应细胞、由肿瘤或由肿瘤微环境中存在的细胞产生。

[0540] 141.如实施方式139或实施方式140的方法,其中该蛋白酶是由免疫效应细胞产生,且该免疫效应细胞是活化的T细胞、天然杀伤(NK)细胞或NK T细胞。

[0541] 142.如实施方式141的方法,其中该免疫效应细胞靠近表达该抗原的细胞。

[0542] 143.如实施方式137至142中任一实施方式的方法,其中该蛋白酶是由靠近表达组织中的该TAA的细胞的肿瘤产生和/或是由与组织中的TAA共定位的肿瘤产生,且其中在该多特异性多肽构建体暴露于该蛋白酶时,该蛋白酶使该多特异性多肽构建体中的该可裂解

接头裂解。

[0543] 144.如实施方式137至143中任一实施方式的方法,其中该蛋白酶是选自间质蛋白酶、基质金属蛋白酶(MMP)、颗粒酶B及其组合。

[0544] 145.如实施方式144的方法,其中该蛋白酶是颗粒酶B。

[0545] 146.如实施方式137至145中任一实施方式的方法,其中该接触是离体或体外实施。

[0546] 147.如实施方式137至145中任一实施方式的方法,其中该接触是在对象体内实施。

[0547] 148.一种刺激或诱导对象的免疫反应的方法,该方法包括向有需要的对象给予治疗有效量的如实施方式1至113或实施方式134中任一实施方式的多特异性偶联物或如实施方式109或实施方式110的医药组合物。

[0548] 149.如实施方式137至147和148的方法,其增加细胞介导的免疫性。

[0549] 150.如实施方式137至147、148和149中任一实施方式的方法,其增加T细胞活性。

[0550] 151.如实施方式137至147、148至150中任一实施方式的方法,其增加细胞溶解T细胞(CTL)活性。

[0551] 152.如实施方式137至147、148至151中任一实施方式的方法,其中该免疫反应针对肿瘤或癌症增加。

[0552] 153.如实施方式137至147、148至152中任一实施方式的方法,其中该方法治疗对象的疾病或病况。

[0553] 154.一种治疗对象的疾病或病况的方法,该方法包含向有需要的对象给予治疗有效量的如实施方式1至113中任一实施方式的多特异性偶联物或如实施方式135或实施方式136的医药组合物。

[0554] 155.如实施方式153或实施方式154的方法,其中该疾病或病况是肿瘤或癌症。

[0555] 156.如实施方式147、148至155中任一实施方式的方法,其中该对象是人类。

[0556] 157.一种多特异性多肽构建体,其在无活性状态下包含第一组分和第二组分,其中该第一组分和该第二组分可操作连接,其中该第一组分和该第二组分中的每一种包含结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域,其中该第一组分包含Fc区,其中该第二组分包含CD3结合区,且其中该第一组分和该第二组分由可裂解接头偶合。

[0557] 158.如实施方式157的多特异性多肽,其中在无活性状态下,该CD3结合区与CD3的结合被抑制或显著减少。

[0558] 159.如实施方式157的多特异性多肽,其中在活化状态下,该第一组分和该第二组分不被可操作连接。

[0559] 160.如实施方式157的多特异性多肽,其中在活化状态下,该第二组分结合CD3的ε链(CD3ε)和肿瘤相关抗原(TAA)。

[0560] 161.一种多特异性多肽构建体,其在活化状态下结合CD3的ε链(CD3ε)和肿瘤相关抗原(TAA),该多特异性多肽构建体包含:

[0561] 结合该TAA上的第一表位的第一抗原结合结构域;

[0562] 结合至CD3ε的抗体或其抗原结合片段;

[0563] 免疫球蛋白Fc多肽区;

[0564] 结合该TAA上的第二表位的第二抗原结合结构域;和

[0565] 偶合至该免疫球蛋白Fc多肽区和该第二抗原结合结构域的可裂解接头,其中该可裂解接头是用作蛋白酶的底物的多肽。

[0566] 162.如实施方式161的多特异性多肽构建体,其中该蛋白酶是由免疫效应细胞产生。

[0567] 163.如实施方式162的多特异性多肽构建体,其中该免疫效应细胞靠近表达该TAA的细胞。

[0568] 164.如实施方式161至163中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中当该多特异性多肽构建体暴露于该蛋白酶时,该蛋白酶使该多特异性多肽构建体中的该可裂解接头裂解。

[0569] 165.如实施方式161的多特异性多肽构建体,其中该蛋白酶是由靠近表达组织中的该TAA的细胞的肿瘤产生和/或是由与组织中的TAA共定位的肿瘤产生,且其中在该多特异性多肽构建体暴露于该蛋白酶时,该蛋白酶使该多特异性多肽构建体中的该可裂解接头裂解。

[0570] 166.如实施方式161的多特异性多肽构建体,其中该可裂解接头是最多25个氨基酸长的多肽。

[0571] 167.如实施方式161的多特异性多肽构建体,其中该可裂解接头是间质蛋白酶、基质金属蛋白酶(MMP)、颗粒酶B及其组合的底物。

[0572] 168.如实施方式161的多特异性多肽构建体,其中该可裂解接头包含选自由SEQ ID NO:24-31组成的组的氨基酸序列。

[0573] 169.如实施方式161的多特异性多肽构建体,其中该第一抗原结合结构域和该第二抗原结合结构域中的每一种系选自由以下组成的组的抗体或其抗原结合片段:Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、scFv、scAb、dAb、单一结构域重链抗体和单一结构域轻链抗体。

[0574] 170.如实施方式169的多特异性融合多肽,其中该抗体或其抗原结合片段是Fv、scFv、Fab、单一结构域抗体(sdAb)、V_{NAR}或V_HH。

[0575] 171.如实施方式169的多特异性融合多肽,其中该抗体或抗原结合片段是sdAb。

[0576] 172.如实施方式171的多特异性融合多肽,其中该sdAb是人类或人源化sdAb。

[0577] 173.如实施方式171的多特异性融合多肽,其中该sdAb是V_HH、V_{NAR}、经改造的VH结构域或经改造的VK结构域。

[0578] 174.如实施方式161的多特异性融合多肽,其中该免疫球蛋白Fc区多肽包含选自由SEQ ID NO:1-2组成的组的氨基酸序列。

[0579] 175.如实施方式174的多特异性融合多肽,其中该免疫球蛋白Fc区多肽包含至少一个修饰以增强Fcγ R结合。

[0580] 176.如实施方式175的多特异性融合多肽,其中该修饰是Ser239或Ile332的修饰。

[0581] 177.如实施方式174的多特异性融合多肽,其中与未经修饰的Fc区相比,该免疫球蛋白Fc糖基化经修饰以增强Fcγ R结合。

[0582] 178.如实施方式177的多特异性融合多肽,其中该免疫球蛋白Fc糖基化无或具有减少的岩藻糖含量。

[0583] 179.如实施方式174的多特异性融合多肽,其中该免疫球蛋白Fc区多肽包含至少

一个修饰以诱导异二聚化。

[0584] 180.如实施方式179的多特异性融合多肽,其中该修饰是在选自由以下组成的组的位置:Thr366、Leu368和Tyr407及其组合。

[0585] 181.如实施方式180的多特异性融合多肽,其中该修饰是选自由以下组成的组:Thr366Ser、Leu368Ala、Tyr407Val及其组合。

[0586] 182.如实施方式181的多特异性融合多肽,其进一步包含在选自由Ser354、Y349及其组合组成的组的位置非半胱氨酸残基修饰为半胱氨酸残基。

[0587] 183.如实施方式181的多特异性融合多肽,其进一步包含残基Ile235的修饰。

[0588] 184.如实施方式183的多特异性融合多肽,其中该修饰是Ile235Arg。

[0589] 185.如实施方式174的多特异性融合多肽,其中该免疫球蛋白Fc区多肽包含残基Ile235的修饰。

[0590] 186.如实施方式185的多特异性融合多肽,其中该修饰是Ile235Arg。

[0591] 187.如实施方式174的多特异性融合多肽,其中该免疫球蛋白Fc区多肽包含至少一个修饰以增强FcRn结合。

[0592] 188.如实施方式187的多特异性融合多肽,其中该修饰是在选自由以下组成的组的位置:Met252、Ser254、Thr256、Met428、Asn434及其组合。

[0593] 189.如实施方式188的多特异性融合多肽,其中该修饰是在选自由以下组成的组的位置:Met252Y、Ser254T、Thr256E、Met428L、Met428V、Asn434S及其组合。

[0594] 190.如实施方式187的多特异性融合多肽,其中该修饰是在位置Met252和位置Met428。

[0595] 191.如实施方式190的多特异性融合多肽,其中该修饰是Met252Y和M428L。

[0596] 192.如实施方式190的多特异性融合多肽,其中该修饰是Met252Y和M428V。

[0597] 193.如实施方式161的多特异性多肽构建体,其中该多特异性多肽构建体包含该第一抗原结合结构域与该免疫球蛋白Fc多肽区之间的第一连接肽(LP1)。

[0598] 194.如实施方式161的多特异性多肽构建体,其中该多特异性多肽构建体包含该抗CD3结合结构域与该第二抗原结合结构域之间的第二连接肽(LP2)。

[0599] 195.如实施方式161的多特异性多肽构建体,其中该多特异性多肽构建体包含该第一抗原结合结构域与该免疫球蛋白Fc多肽区之间的第一连接肽(LP1)以及该抗CD3结合结构域与该第二抗原结合结构域之间的第二连接肽(LP2),且其中该多特异性多肽构建体在未裂解状态下自N-末端至C-末端具有如下结构配置:第一抗原结合结构域-LP1-免疫球蛋白Fc多肽接头区-可裂解接头-抗CD3结合结构域-LP2-第二抗原结合结构域。

[0600] 196.如实施方式195的多特异性多肽构建体,其中该两个连接肽彼此不同。

[0601] 197.如实施方式195的多特异性多肽构建体,其中LP1和LP2中的每一种系约1至20个氨基酸长的肽。

[0602] 198.如实施方式161的多特异性多肽构建体,其中结合至CD3ε的该抗体或其抗原结合片段是Fv抗体片段。

[0603] 199.如实施方式198的多特异性多肽构建体,其中该Fv抗体片段包含经二硫键稳定的抗CD3结合Fv片段(dsFv)。

[0604] 200.如实施方式199的多特异性多肽构建体,其中抗CD3 dsFv包含VH CDR1,其包

含氨基酸序列TYAMN(SEQ ID NO:16);VH CD2,其包含氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:17);VH CDR3,其包含氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:18);VL CDR1,其包含氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:19);VL CDR2,其包含氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:20);和VL CDR3,其包含氨基酸序列ALWYSNLWV(SEQ ID NO:21)。

[0605] 201.如实施方式198的多特异性多肽构建体,其中构成该抗CD3结合Fv的该VH和该VL连接至异二聚体Fc的相反侧。

[0606] 202.如实施方式200的多特异性多肽构建体,其中抗CD3 dsFv包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0607] 203.如实施方式200的多特异性多肽构建体,其中抗CD3 dsFv包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0608] 204.如实施方式200的多特异性多肽构建体,其中抗CD3 dsFv包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列和SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0609] 205.如实施方式204的多特异性多肽构建体,其中抗CD3 dsFv包含选自由SEQ ID NO:32-81组成的组的氨基酸序列。

[0610] 206.如实施方式204的多特异性多肽构建体,其中抗CD3 dsFv包含选自由SEQ ID NO:32-62组成的组的氨基酸序列与选自由SEQ ID NO:63-81组成的组的氨基酸序列的组合。

[0611] 207.如实施方式1至206中任一实施方式的多特异性多肽构建体,其中该多特异性多肽构建体偶联至试剂。

[0612] 208.如实施方式207的多特异性多肽构建体,其中该试剂是治疗剂、抗瘤剂、毒素或其片段、可检测部分或诊断剂。

[0613] 209.如实施方式207的多特异性多肽构建体,其中该试剂经由接头偶联至该多特异性多肽构建体。

[0614] 210.一种医药组合物,其包含如实施方式1至209中任一实施方式的多特异性多肽构建体和载剂。

[0615] 211.一种治疗或缓和对象中与病症相关的临床适应症的症状的方法,该方法包含向有需要的对象给予足以缓和与该病症相关的该临床适应症的该症状的量的如实施方式157至209中任一实施方式的多特异性多肽构建体或如实施方式210的医药组合物。

[0616] 212.如实施方式211的方法,其中该对象是人类。

[0617] 213.如实施方式211的方法,其中该病症是癌症。

实施例

[0618] 提出以下实施例仅用于阐释性目的且并不旨在限制本发明的领域。

[0619] 实施例1.产生受限CD3结合蛋白的方法

[0620] 实施例1阐述含有展现受限CD3结合的CD3结合区的多特异性多肽构建体的生成和表达。多特异性构建体是以各种构型生成,如图1、图2、图3、图4A-4C、图5A-5E、图6A-6B、图7、图8和图9中所示,以含有由接头(例如可裂解接头)偶合至该CD3结合区的免疫球蛋白的异二聚体Fc区,和一或多个结合肿瘤相关抗原(TAA)且相对于多特异性多肽构建体的Fc区氨基末端和/或相对于CD3结合区羧基末端定位的抗原结合结构域。生成具有不同TAA抗原

结合结构域和接头的示例性代表性构建体。

[0621] 生成至少编码异二聚体多特异性多肽构建体的第一多肽链和第二多肽链的多核苷酸并将其克隆至质粒中用于表达。第一多肽链通常自N-末端至C-末端依次包括Fc臼多肽(例如SEQ ID NO:83中所示);可裂解接头,例如含有一或多个蛋白酶的底物识别位点;和dsFv抗CD3抗体的可变轻(VL)结构域(例如SEQ ID NO:72中所示)。第二多肽链通常自N-末端至C-末端依次包括Fc杵多肽(例如SEQ ID NO:82中所示);与第一多肽链相同的可裂解接头;和dsFv抗CD3抗体的可变重结构域(例如SEQ ID NO:44中所示)。除非另有说明,否则在示例性构建体中使用含有颗粒酶B的底物识别位点的示例性可裂解接头GGSGGGGIEPDIGGSGGS(SEQ ID NO:105)。在含有FRα的示例性构建体cx1547中使用类似接头TGGSGGGGIEPDIGGSGGS(SEQ ID NO:148)。对于示例性构建体cx309,使用示例性可裂解接头GSPAGLEADGSRQARVGS(SEQ ID NO:166)。类似构建体可使用其他异二聚体Fc构型,包括其他杵臼结构构型,例如如所述的任一种;其他接头,包括其他可裂解接头,具体而言包括诸如颗粒酶B、间质蛋白酶和/或MMP等蛋白酶的底物识别位点的多肽接头;和其他CD3结合区,包括其他抗CD3抗体,包括dsFv或其他单价片段;或其他TAA抗原结合片段,例如scFv、sdAb或Fab形式来生成。

[0622] 在一些情况下,生成类似构建体,除了含有不可裂解接头。不可裂解接头包括介于3-18个氨基酸大小范围内的接头。示例性生成分子中所用的不可裂解接头的示例是GGS(例如包含于示例性构建体cx1356中)、GGSGGS(SEQ ID NO:10,包含于示例性构建体cx1357中)、GGSGGSGGS(SEQ ID NO:11,包含于示例性构建体cx1358中)、GGSGGSGGSGGS(SEQ ID NO:12,包含于示例性构建体cx1359中)、GGSGGSGGSGGSGGS(SEQ ID NO:13,包含于示例性构建体cx1360中)和GGGGGSGGGGGSGGGGGS(SEQ ID NO:119)或GGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:147;包含于示例性构建体cx681中)。

[0623] 多肽链中的一种或二种另外编码一或多个在Fc结构域的氨基末端和/或在CD3结合区的羧基末端呈各种构型的TAA抗原结合结构域。在TAA提供为单链片段(例如sdAb或scFv)时,TAA抗原结合结构域在Fc异二聚体(例如臼和/或杵)的一条或两条多肽链的N-末端由肽接头(例如PGGGG(SEQ ID NO:102))连接,和/或在CD3结合区的一个或两个结构域(例如VH和/或VL)的C-末端由肽接头(例如GGGG(SEQ ID NO:103))连接。可采用其他类似肽接头。当TAA在例如命名为cx3313或cx3315的示例性构建体中提供为Fab时,将编码Fab的轻链的额外多核苷酸克隆至质粒中。在此实施例中,编码的多肽包括一或多条多肽链,其中Fab的VH-CH1(Fd)在Fc异二聚体的一条或两条多肽链的N-末端连接,和/或在CD3结合区的一个或两个结构域的C-末端连接,类似于上文。第三多核苷酸编码Fab的VL-CL。所提供多特异性多肽构建体中可采用结合至TAA的任何抗原结合结构域。

[0624] 示例性生成的蛋白质含有结合以下肿瘤相关抗原中的一种的抗原结合结构域:叶酸盐受体α(FRa)、B7H3、EGFR、5T4、CD20和DLL3。生成的蛋白质是由组装为Fab或scFv的VH和VL序列组成或是生成以含有结合结构域作为单一结构域抗体(sdAb)。各种TAA结合结构域在本文中使用时包括sdAb、scFv和Fab,包括来自以下来源:如SEQ ID NO:123中所示的cMet sdAb(美国专利第US9,346,884号);如SEQ ID NO:127和128中所示的B7H3 Fab和scFv和如SEQ ID NO:124中所示的scFv(美国公开案第WO2017030926号);如SEQ ID NO:129、130、167和168中所示的5T4 scFv(美国专利第US8,044,178号);如SEQ ID NO:189中所示的DLL3

scFv(美国公开案第US2017/0037130号);如SEQ ID NO:125、189和190中所示的CD20GA101(美国公开案第US 2005/0123546号)。生成含有1、2、3或4个TAA抗原结合结构域以例如提供单价、二价、三价或四价结合的多特异性多肽构建体。在一些情况下,TAA抗原结合结构域相同。在一些情况下,TAA抗原结合结构域不同,使得生成的多特异性多肽构建体对至少两种不同TAA、或对于相同TAA的不同表位或相同TAA的相同表位展现特异性。举例而言,生成含有对EGFR和cMet(例如,参见图5C和命名为cx2973、cx2979和cx2977的示例性构建体)具有特异性的抗原结合结构域的示例性双重靶向多特异性多肽构建体。此外,生成含有对B7H3的相同表位或B7H3的两个不同表位(例如图6A和分别命名为cx2846和cx3094的示例性构建体)或5T4的相同表位(例如图7,示例性构建体cx3252)具有特异性的不同TAA抗原结合结构域的示例性多特异性多肽构建体。

[0625] 生成多核苷酸以编码命名为以下的示例性多特异性多肽构建体的多肽链:cx1547、cx309、cx1356、cx1357、cx1358、cx1359、cx1360、cx681和cx1762(各自靶向FRα);cx2513和cx3030(各自靶向EGFR);cx2973、cx2979、cx2977(各自靶向cMET和EGFR);cx3095、cx2846、cx3094、cx3314和cx3313(各自靶向B7H3);cx3315、cx3265和cx3262(各自靶向5T4);cx3309(靶向CD20);和cx3308(靶向DLL3),包括如图3、4A(上图)-4C、5A-5E、6A-6B、7、8和9中显示的构建体。生成构建体以含有可裂解或不可裂解接头。

[0626] 使用聚乙烯亚胺将编码异二聚体受限CD3结合蛋白的每一链的单独质粒以等摩尔比率瞬时转染至哺乳动物细胞(HEK293或CHO)中。3-7天后收集分泌至上清液中的重组蛋白,并通过蛋白A层析、之后通过制备型尺寸排阻层析(SEC)或流通疏水相互作用层析(HIC)纯化。由于突变被设计到位置I253R或H435R的异二聚体Fc的一条链(通常臼-Fc)使得其不结合蛋白A,选择性纯化异二聚体蛋白。使用SEC(具有Superdex-200树脂的AKTA)或FT-HIC(具有丁基/苯基琼脂糖凝胶的AKTA)上的第二层析步骤去除含有两个异二聚体Fc的不期望的交叉配对物质,其疏水性更大且是预期分子量的两倍。

[0627] 该方法倾向于产生异二聚体多特异性多肽构建体,其含有如所述异二聚体Fc和经二硫键稳定的抗CD3 Fv(具有如SEQ ID NO:44中所示的突变G44C的抗CD3 VH和具有如SEQ ID NO:72中所示的突变G100C的VL)的适当配对的物质。在4℃或增加的蛋白质浓度下延长孵育时,纯化的异二聚体受限CD3结合蛋白是稳定的且不累积交叉配对的物质。

[0628] 图10A显示还原(R)和非还原(NR)条件下FRα靶向受限CD3接合构建体cx1547(预期分子量135kDa)的SDS-PAGE的影像。图10B和10C显示cx1547的尺寸排阻分析的层析图,其展现观察到具有137.9kDa的测定分子量的单一物质。

[0629] 实施例2.通过流式细胞术的与癌细胞和原代T细胞的结合

[0630] 此实施例阐述评价示例性构建体与T细胞或癌细胞的结合的研究。此类研究是在仅含有彼此分离的T细胞或仅癌细胞的单一培养物中实施。

[0631] 1.裂解和未裂解状态下与原代T细胞的结合

[0632] 在蛋白水解裂解其可裂解接头GSPAGLEADGSRQARVGS(SEQ ID NO:27)后,评价本公开的示例性多特异性多肽构建体(本文中称作cx309)与原代T细胞表面上的CD3的结合,该接头含有间质蛋白酶、颗粒酶B和MMP-2的底物识别位点。cx309的肿瘤抗原结合结构域结合叶酸盐受体α(FRα),其在原代T细胞上不表达。

[0633] 原代T细胞是自分离自健康人类供体leukopak的PBMC负性富集。若说明,则在添加

至细胞前使cx309预裂解,其中通过SDS-PAGE确认裂解。具体而言,将cx309暴露于间质蛋白酶(图11A)或基质金属蛋白酶2(MMP-2)(图11B)(裂解)或未暴露于蛋白酶(未裂解)。将裂解或未裂解的cx309构建体滴定至细胞上或以单一饱和浓度添加。利用对人类Fc或人源化vhh具有特异性的荧光团偶联的二级抗体检测结合的cx309,且通过流式细胞术测量结合。与二级抗体一起孵育的细胞仅用作阴性对照。

[0634] 如图11A和11B中所示,在构建体由Fc与CD3结合结构域之间的接头内的质蛋白酶或MMP-2裂解之后,在开始结合分析之前,cx309结合至T细胞。利用未裂解构建体未观察到与T细胞结合,此显示cx309能够在裂解,也即活性状态下与T细胞结合,但在未裂解形式下展现不可检测的T细胞结合。

[0635] 2.与T细胞对抗原表达癌细胞的结合的比较

[0636] 评价在Fc与CD3结合结构域的组分之间具有各种接头的额外代表性FRα靶向受限CD3接合构建体与上述T细胞和与FRα表达细胞(Ovcar-5)的结合。对于此类研究,使用100nM每一构建体cx1356、cx681或cx1547。发现在Fc与CD3结合结构域的组分之间具有各种接头的额外代表性FRα靶向受限CD3接合构建体结合FRα表达细胞(Ovcar-5)(图12A和12C),但没有结合T细胞的能力(图12B和12D)。

[0637] 在类似研究中,发现基本上如实施例1中所述产生的代表性EGFR靶向受限CD3接合构建体cx3030结合EGFR表达细胞(Colo-205)(图13A),但没有结合T细胞的能力(图13B)。使用400nM每一构建体。此观察进一步展现,受限CD3接合构建体展示减弱的单独的T细胞结合。

[0638] 如图14A-14D中所示,针对代表性B7H3靶向受限CD3接合体cx3313、cx3314和cx3095观察到类似的结果。Cx3313和cx3314是如实施例1中基本上阐述产生,且是由如实施例1中所述的分别组装为Fab或scFv的相同B7H3 VH和VL序列组成。cx3095含有是单一结构域抗体的B7H3结合结构域。如图14A和14B中所示,发现代表性B7H3靶向受限CD3接合体结合表达B7H3的A375细胞。然而,如图14C和14D中所示,相同构建体不能单独地结合至T细胞。在此类研究中,比较代表性B7H3靶向受限CD3接合体cx3313、cx3314和cx3095的结合与靶向B7H3和CD3的双重亲和性重新靶向抗体(DART)-单体Fc形式(DART-Fc B7H3xCD3;参见例如WO2017030926A1)。DART-Fc B7H3xCD3含有如SEQ ID NO:169、145或146所示的B7H3序列。值得注意的是,观察到仅DART-Fc形式容许在不存在B7H3接合下T细胞结合(图14C和14D),而所有形式均展示与B7H3表达细胞结合(图14A和14B)。

[0639] 在又一研究中,针对基本上如实施例1中所述产生的代表性5T4靶向受限CD3接合构建体cx3262和cx3315观察到类似受限结合。cx3262的5T4结合结构域以单一结构域抗体形式生成,而cx3315的5T4结合结构域是利用如SEQ ID NO:167和168中所述衍生的scFv生成(参见美国专利第US8,044,178号)。发现两种代表性5T4靶向受限CD3接合构建体均结合5T4表达细胞(Ovcar-5)(图15A),但没有T细胞结合能力(图15B)。使用400nM每一构建体。此观察进一步展现,本文所述受限CD3接合构建体展示减弱的单独的T细胞结合。

[0640] 如图16A-16D中所示,发现代表性CD20靶向受限CD3接合构建体cx3490结合CD20表达细胞(Ramos),但没有T细胞结合能力。使用100nM cx3490构建体。cx3490的CD20结合结构域是源自如实施例1中所示的CD20抗体GA 101的VH和VL的scFv。

[0641] 实施例3.使用报告基因分析的CD3报告基因T细胞活化的评价

[0642] 此实施例阐述评价各种构建体活化与靶抗原表达细胞的共培养物中CD3 NFAT报告基因Jurkat细胞系的能力。此类分析用于展现,尽管经由CD3结合结构域的T细胞结合在分离的T细胞上受到限制或抑制(如实施例2中所示),但一旦本文提供的多特异性多肽结合至同源抗原,其即能接合T细胞并介导T细胞活化。

[0643] 1.荧光素酶报告基因分析

[0644] 将抗原靶向受限CD3接合构建体滴定至靶细胞与表达NFAT驱动的荧光素酶报告基因(普洛麦格公司,美国)的遗传工程Jurkat细胞的共培养物上。在此分析中,CD3的接合导致NFAT信号传导和细胞内荧光素酶的产生。将分析板于37℃下孵育约6小时且随后平衡至室温。向样品孔中添加Bio-Glo试剂且使用SpectraMax L微读板仪测量上清液的发光。

[0645] 如图17中所示,当在Fc与CD3结合结构域之间的接头处裂解时,代表性FRα靶向受限CD3接合构建体cx309展示显著增强的活化T细胞的能力。此处,在分析开始前用间质蛋白酶预裂解cx309。值得注意的是,仅在FRα阳性Ovcar-5细胞系存在下观察到T细胞活化。利用未裂解的cx309观察到一些T细胞活化。此结果与受限CD3接合构建体在结合至其抗原时展现CD3结合的能力一致,且蛋白水解裂解后CD3接合增加。

[0646] 2.GFP报告基因分析

[0647] 将抗原靶向受限CD3接合构建体滴定至靶细胞与表达NFAT驱动的绿色荧光蛋白(GFP)的改造的Jurkat细胞的共培养物上。CD3的接合导致NFAT信号传导和绿色荧光的产生。对于利用黏附性靶细胞的报告基因分析,接种靶细胞,使其在室温下沉降均匀分布,并于37℃下孵育几个小时以允许在添加报告基因细胞和抗原靶向受限CD3接合构建体之前黏附。使用IncuCyte ZOOM系统对分析板进行连续成像,并通过测量总绿色物体积分强度来确定CD3报告基因细胞活化。

[0648] 图18和19A-19D显示靶向叶酸盐受体(FRα)的构建体;图20A-20D显示靶向EGFR或EGFR和cMET的构建体;图21A-21B和22A-22F显示靶向B7H3的构建体;图23A-23B和24显示靶向5T4的构建体;图25显示靶向CD20的构建体;且图26显示靶向DLL3的构建体。如所有图中所示,所测试代表性构建体中的每一种能够在靶表达细胞存在下诱导抗原依赖性T细胞活化,如增加的GFP信号所示。图22A-F显示活化程度与实施例2中阐述的比较分子DART-Fc:B7H3xCD3类似或在一些情况下更大。

[0649] 值得注意的是,图19A-19D展现当去除受限CD3接合构建体的Fc部分从而容许不受限制的T细胞接合时,实现增强的dT细胞活化能力。若Fc与CD3结合结构域之间包括蛋白水解可裂解接头,则可经由蛋白分解去除此类受限CD3接合构建体的Fc。cx3238代表完全裂解的C-末端部分且经由共表达编码以下的两种质粒产生:1)连接至FRa结合sdAb的C-末端的抗CD3 VH和2)连接至FRα结合sdAb的C-末端的抗CD3 VL。此结果与Fc结构域的定位一致,限制CD3结合区结合CD3的能力。

[0650] 实施例4.接头长度对活性的评价

[0651] 使用实施例3中所述的Jurkat报告基因分析测试Fc与包含CD3结合区的组分结构域(VH和VL)之间各种长度的接头对T细胞活化能力的效应。此类分析中使用如实施例1中所述生成的含有如表E1中所列举的不同长度的基于GlySer的接头的FRα靶向受限CD3接合构建体。

[0652]

表E1：测试的接头长度	
SEQ ID NO	接头
-	gs3：GGS
10	gs6：GGSGGS

[0653]

11	gs9：GGSGGSGGS
12	gs12：GGSGGSGGSGGS
13	gs15：GGSGGSGGSGGSGGS
119	gs18：GGGGGSGGGGGSGGGGGS
147	gs18：GGSGGGGSGGGGSGGGGS

[0654] 如图27A-27F中所示,接头长度和T细胞活化能力呈正相关。显示T细胞活化能力与接头长度直接相关,从而指示较短的接头更大程度地限制CD3结合。重要的是,构建体的T细胞接合依赖于TAA结合,因此类构建体如实施例2中所示未展现单独的T细胞结合能力(例如,未结合靶TAA时的溶液形式)(图12A-12D)。总之,此类构建体展现受限或抑制的与CD3的结合,但能够以靶依赖性方式活化T细胞。

[0655] 实施例5.功能活性的评价

[0656] 此实施例阐述人类原代T细胞体外分析中所测试的受限CD3接合构建体的评价和表征。

[0657] 1.T细胞介导的细胞毒性

[0658] 用CytoID红荧光标记靶细胞。对于利用黏附性靶细胞的细胞毒性分析,接种靶细胞,使其在室温下沉降均匀分布,并于37℃下孵育几个小时以允许在添加其他分析组分之前黏附。原代T细胞自分离自健康人类供体leukopak的PBMC负向富集并以10:1-40:1 T细胞-对-靶细胞比率添加。添加绿色半胱天冬酶-3/7试剂,其荧光标记经历细胞凋亡的细胞的核DNA。将抗体滴定至共培养物上并使用IncuCyte ZOOM系统对分析板进行连续成像。基于测量总的红色/绿色重叠物体面积来确定靶细胞死亡。

[0659] 如图28A-28C中所示,FRα靶向受限CD3接合构建体cx1547诱导抗原阳性而非抗原阴性细胞系的强效T细胞介导的细胞毒性,此与强效地诱导抗原依赖性T细胞活化的能力一致。类似地,B7H3靶向受限CD3接合构建体诱导抗原阳性而非抗原阴性细胞系的强效T细胞介导的细胞毒性,如图29A-29F和30中所示。此类构建体展示与替代形式DART-Fc B7H3xCD3类似的效力。此类观察支持,与业内已知的其他CD3接合形式相比,本文提供的抗原靶向受限CD3形式未展现或展现降低的单独的T细胞结合,同时维持强效抗原依赖性T细胞细胞毒性诱导能力。

[0660] 如图31A-31F中所示,与未裂解的FRα靶向受限CD3接合构建体(命名为cx1762(参见图4A))相比,仅含有可操作连接至TAA结合结构域的CD3结合结构域的代表C-末端蛋白水解产物的构建体(命名为cx2190(参见图4C))展示增强的抗原依赖性T细胞毒性诱导能力。

[0661] 如图32中所示,代表性5T4靶向受限CD3接合构建体cx3315诱导对表达5t4的细胞系Ovcar-5而非对5T4阴性细胞系CCRF-CEM的特异性T细胞毒性。

[0662] 2.T细胞活化

[0663] 为评价T细胞活化,收集T细胞介导的细胞毒性分析的悬浮细胞并用活/死的染料和荧光团偶联的抗CD4、抗CD8、抗CD25和/或抗CD71抗体染色。使用SONY SA3800光谱分析仪分析细胞并通过测量CD25或CD71的表达程度或CD25或CD71阳性百分比确定CD4+或CD8+ T细胞活化。

[0664] 图33显示T细胞活化,如通过在T细胞与Ovcar5细胞的共培养物中将裂解的cx309和未裂解,也即无活性的cx309构建体孵育20小时所测量。如所示,仅裂解的cx309能够经由CD3结合介导FRα依赖性T细胞活化。通过CD25%的CD4和CD8群体的流式细胞分析监测T细胞活化。

[0665] 另外,也测试含有B7H3 TAA的构建体。如图34A-34H中所示,B7H3靶向受限CD3接合构建体也经由CD3结合介导B7H3依赖性T细胞活化。观察到由受限CD3接合构建体和DART-Fc形式的T细胞活化的类似效力,但由该两个形式的T细胞结合的差异显著(图14A-14D)。

[0666] 因此,结果展现,所测试的抗原-靶标受限CD3接合构建体诱导CD4和CD8 T细胞的强效抗原依赖性活化。

[0667] 3.T细胞细胞因子产生(ELISA)

[0668] 通过夹心式ELISA(白乐津公司(BioLegend),美国)分析来自T细胞介导的细胞毒性分析的上清液的IFNγ含量。遵循制造商的说明书并产生上清液样品的细胞因子浓度值插入的标准曲线。向吸光度值低于检测下限的样品分配等于最低标准浓度的一半的细胞因子浓度。图35显示,观察到代表性B7H3靶向受限CD3接合构建体以抗原依赖性方式引发T细胞产生IFNγ。

[0669] 4.T细胞细胞因子产生(FluoroSpot)

[0670] 于4℃下将FluoroSpot膜用IFNγ和IL-2捕获抗体涂布过夜。用PBS洗涤膜,并添加抗体滴定物、靶细胞和PBMC或自PBMC负向富集的T细胞。对于靶细胞:PBMC共培养,以1:20比率接种细胞。对于靶细胞:T细胞共培养,以1:10比率接种细胞。将分析板于37℃下孵育约24小时,并根据制造商(C.T.L.)说明书制备膜。使用CTL-ImmunoSpot S6通用分析仪对膜进行成像。在分析孔间使用均一暴露时间和强度设置测量细胞因子斑点计数。图36A-36B和37分别显示抗原靶向受限CD3接合构建体以FRα或B7H3依赖性方式引发自T细胞产生细胞因子的能力。

[0671] 5.解离的肿瘤细胞杀伤

[0672] 使用Zombie红和荧光团偶联的抗CD45和抗EpCAM抗体对卵巢癌解离的肿瘤细胞样品(Conversant)染色以通过流式细胞术鉴别肿瘤细胞(CD45-/EpCAM+)和肿瘤浸润免疫细胞(CD45+/EpCAM-)。将未染色的细胞接种于96孔组织培养板中,并以20nM和10ng/mL最终浓度添加代表性FRα-受限CD3接合构建体和重组人类IL-2。于37℃下培养6天后,收集上清液等分试样以通过夹心式ELISA(上述)分析IFNγ含量,并去除含有非黏附细胞的其余上清液。用PBS轻轻洗涤黏附细胞以去除残余的悬浮细胞和碎片,将培养基添加至细胞中,并使用IncuCyte ZOOM系统使分析孔成像以使肿瘤细胞铺满可视化。向样品孔中添加等体积的CellTiter-Glo存活率试剂,并使用SpectraMax L微读板仪测量发光。图38A-38D显示抗原靶向受限CD3接合构建体活化先前浸润肿瘤样品的T细胞和介导细胞毒性和肿瘤细胞消除的能力。

[0673] 其他实施方式

[0674] 尽管已结合本发明的详细说明阐述本发明,但前述说明旨在阐释而非限制本公开的范围,其是由所附权利要求的范围来界定。其他方面、优点和修改在以下权利要求的范围内。

[0675] 序列表

[0676]

SEQ ID NO	序列	说明
1	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	IgG1 Fc
2	PAPGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK	IgG2 Fc
3	PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL	IgG2 Fc

[0677]

SEQ ID NO	序列	说明
	TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	
4	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFKWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST FRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESSGQPEN NYNTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNIFSCSVMH EALHNRFTQK SLSLSPGK	IgG3 Fc
5	PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	IgG4 Fc
6	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	IgG4 Fc
7	EPKSSDKTHTCPPC	铰链

[0678]

SEQ ID NO	序列	说明
8	DKTHTCPPC	铰链
9	ESKYGPPCPPC	铰链
10	GGSGGS	(GGS)2
11	GGSGGSGGS	(GGS)3
12	GGSGGSGGSGGS	(GGS)4
13	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGS)5
14	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSA	抗CD3 Hv
15	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGS LIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVF GGGTKLTVL	抗CD3 Lv
16	TYAMN	抗CD3 VH CDR1
17	RIRSKYNNYATYYADSVKD	抗CD3 VH CDR2
18	HGNFGNSYVSWFAY	抗CD3 VH CDR3
19	RSSTGAVTTSNYAN	抗CD3 VL CDR1
20	GTNKRAP	抗CD3 VL CDR2
21	ALWYSNLWV	抗CD3 VL CDR3
22	LEAD	颗粒酶B底物
23	RQAR	颗粒酶B底物
24	PAGL	MMP底物
25	TGLEADGSPAGLGRQARVG	接头
26	TGLEADGSRQARVGPAGLG	接头
27	TGSPAGLEADGSRQARVGS	接头
28	TGPAGLGLEADGSRQARVG	接头

[0679]

SEQ ID NO	序列	说明
29	TGRQARVGLEADGSPAGLG	接头
30	TGSRQARVGPAGLEADGS	接头
31	TGPAGLGSRQARVGLEADGS	接头
32	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYA MNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH1
33	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH2
34	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH3
35	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH4
36	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH5
37	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYA MNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADS VKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH6

SEQ ID NO	序列	说明
38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYA MSWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADS VKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC VRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH7
39	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY CVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVS	抗CD3 VH8
40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTVTVSS	抗CD3 VH9
41	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSYFAYWGQGTTVTVSS	抗CD3 VH10
42	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH11
43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVKP	抗CD3 VH12
44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYY	抗CD3 VH13

[0680]

[0681]

SEQ ID NO	序列	说明
	CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVKP	
45	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGCGTLVTVKP	抗CD3 VH14
46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH15
47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADS VKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYC VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH16
48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYA MNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADS VKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYC VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH17
49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYA MNWVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH18
50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKCLEWVSRIRSKYNNYATYYADS VKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYC VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH19
51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYA MNWVRQAPGKCLEWVSRIRSKYNNYATYYADS	抗CD3 VH20

[0682]

SEQ ID NO	序列	说明
	VKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYC VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	
52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYA MNWVRQAPGKCLEWVGRIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH21
53	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH22
54	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH23
55	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH24
56	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH25
57	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYA MNWVRQAPGKCLEWVSRIRSKYNNYATYYADS VKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH26
58	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYA	抗CD3 VH27

[0683]

SEQ ID NO	序列	说明
	MSWVRQAPGKCLEWVGRIRSKYNNYATYYADS VKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC VRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	
59	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY CVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVS	抗CD3 VH28
60	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTVTVSS	抗CD3 VH29
61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSYFAYWGQGTTVTVSS	抗CD3 VH30
62	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH31
63	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGS LIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVF GGGTKLTVL	抗CD3 VL1
64	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSN YANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSG SLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHW VFGCGTKLEIK	抗CD3 VL2

[0684]

SEQ ID NO	序列	说明
65	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSG SLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	抗CD3 VL3
66	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGS LIGDKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVF GGGTKLTVL	抗CD3 VL4
67	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGS ILGNKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVF GGGTKLTVL	抗CD3 VL5
68	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGS ILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNLWV FGGGTKLTVL	抗CD3 VL6
69	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSN YANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSG SLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	抗CD3 VL7
70	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGN YPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSG SLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVL	抗CD3 VL8
71	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSN YANWVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFS GSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNH	抗CD3 VL9

[0685]

SEQ ID NO	序列	说明
	WVFGGGTKLEIK	
72	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSN YANWVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFS GSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNH WVFGCGTKLEIK	抗CD3 VL10
73	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSN YANWVQQKPGQCFRGLIGGTNKRAPGVPARFS GSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNH WVFGEGTKLEIK	抗CD3 VL11
74	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGS LIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVF GCGTKLTVL	抗CD3 VL12
75	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSN YANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSG SLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHW VFGGGTKLEIK	抗CD3 VL13
76	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSG SLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLW VFGCGTKLTVL	抗CD3 VL14
77	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGS LIGDKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVF GGGTKLTVL	抗CD3 VL15
78	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGS	抗CD3 VL16

[0686]

SEQ ID NO	序列	说明
	ILGNKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVF GCGTKLTVL	
79	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGS ILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNLWV FGCGTKLTVL	抗CD3 VL17
80	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSN YANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSG SLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGCGTKLTVL	抗CD3 VL18
81	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGN YPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSG SLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGCGTKLTVL	抗CD3 VL19
82	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPT	杵Fc
83	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ	臼Fc

[0687]

SEQ ID NO	序列	说明
	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPT	
84	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPT	杵Fc
85	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPT	臼Fc
86	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	杵Fc
87	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG	臼Fc

[0688]

SEQ ID NO	序列	说明
	QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
88	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	杵Fc
89	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	臼Fc
90	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPT	臼Fc
91	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR	臼Fc

[0689]

SEQ ID NO	序列	说明
	DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPT	
92	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPG	臼Fc
93	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPG	臼Fc
94	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVVHEALHNHYTQKSLSLSPT	杵Fc
95	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC	杵Fc

[0690]

SEQ ID NO	序列	说明
	KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVVHEALHNHYTQKSLSLSPT	
96	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVVHEALHNHYTQKSLSLSPG	杵Fc
97	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVVHEALHNHYTQKSLSLSPG	杵Fc
98	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVVHEALHNRYTQKSLSLSPT	臼Fc
99	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT	臼Fc

SEQ ID NO	序列	说明
	KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVVHEALHNRYTQKSLSLSPT	
100	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVVHEALHNRYTQKSLSLSPG	白Fc
101	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVVHEALHNRYTQKSLSLSPG	白Fc
102	PGGGG	肽接头
103	GGGG	肽接头
104	GPAGLGLEPDGSRQARVG	接头
105	GGSGGGGIEPDIGGSGGS	接头
106	GGSGGGGLEADTGGSGGS	接头
107	GSIEPDIGS	接头
108	GSLEADTGS	接头
109	GGSGGGGIEPDGGGSGGS	接头

[0691]

[0692]

SEQ ID NO	序列	说明
110	GGSGGGGIEPDVGGSGGS	接头
111	GGSGGGGIEPDSGGSGGS	接头
112	GGSGGGGIEPDTGGSGGS	接头
113	GGGSLEPDGSGS	接头
114	GPAGLGLEADGSRQARVG	接头
115	GGEGGGGSGGSGGGS	接头
116	GSSAGSEAGGSGQAGVGS	接头
117	GGSGGGGLEAEGSGGGGS	接头
118	GGSGGGGIEPDPGGSGGS	接头
119	GGGGGSGGGGGSGGGGGS	接头
120	QLQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDNYA IGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGSTYYADSVKG RFTISRNNAKGTVYLLMNSLKPEDTAVYYCATE LVPACTYSNGRGPLDGMDYWGKGTQVTVKP	FR α sdAb
121	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSIDAT AWYRQAPGKQRELVAIITSSGSTNYPESVKGRFT ISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNAITRY GGSTYDFWGQGTLVTVKP	FR α sdAb
122	EVQPGGSLRLSCAASETFGVVFTLGWYRQAPGK GREFVARVTGTDTVDYAESVKGRFTISSDFARN TVYLQMNSLRAEDTAVYYCNTGAYWGQGTLV TVKP	FR α sdAb
123	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFILDYYAI GWFRQAPGKEREGVLCIDASDDITYYADSVKGR FTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCATPI GLSSSCLLEYDYDYWGQGTLVTVKP	cMET sdAb
124	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFG	B7H3 scFv

[0693]

SEQ ID NO	序列	说明
	MHWVRQAPGKGLEWVAYISSDSSAIYYADTVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGR GRENIYYGSRLDYWGQGTTVTVSSSGGGGSGG GGSGGGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYN NYPFTFGQGTKLEIK	
125	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYS WINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKF KGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSGSGGGGSGGG GTGGGGSDIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKS LLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCA QNLELPYTFGGGTKVEIK	CD20 scFv
126	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYW SWIRQPPGKGLEWIGYVYYSGTTNYNPSLKSRV TISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASIAVT GFYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS EIVLTQSPGTLSLSPGERVTLSCRASQRVNNNYL AWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDRSPLTFGGG TKLEIK	DLL3 scFv
127	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFG MHWVRQAPGKGLEWVAYISSDSSAIYYADTVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGR GRENIYYGSRLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVF	B7H3 Fd

[0694]

SEQ ID NO	序列	说明
	PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
128	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVDTNVA WYQQKPGKAPKALIYSASYRYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPFTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	B7H3 LC
129	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYATYYADS VKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYY CVRQWDYDVRAMNYWGQGTSVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	5T4 Fd
130	DIVMTQSHIFMSTSVGDRVSITCKASQDVDTAV AWYQQKPGQSPKLLIYWASTRLTGVPDRFTGSG SGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGG GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	5T4 LC
131	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSFNY YWSWIRHHPGKGLEWIGYIYYSGSTYSNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLTLSSVTAADTAVYYCARG	gpNMB Fd

[0695]

SEQ ID NO	序列	说明
	YNWNYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
132	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVDNNLV WYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSG TEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPWTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	gpNMB LC
133	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYG MNWVKQAPGKGLKWMAWINTYTGEPTYADDF KGRFAFSLETSASTASLQIINLKNEDTATYFCARI GDSSPSDYWGQGTTLTVSSSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	DLL3 Fd
134	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVV WYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFAGSGY GTDFSFTISTVQAEDLAVYFCQQDYTSPWTFGG GTKLEIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	DLL3 LC
135	GGGGGS	肽接头
136	IEPDI	接头

[0696]

SEQ ID NO	序列	说明
137	LEADT	接头
138	IEPDG	接头
139	IEPDV	接头
140	IEPDS	接头
141	IEPDT	接头
142	LEPD	接头
143	LEAE	接头
144	IEPDP	接头
145	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSDSSAIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGRGRENIYYGSRLDYWGQGTTVTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE	B7-H3 x CD3双特异性DART-A双抗体的第二多肽链
146	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK	B7-H3 x CD3双特异性DART-A双抗体的第三多肽链
147	GGSGGGGSGGGGSGGGGS	接头
148	TGGSGGGGIEPDIGGSGGS	接头
149	GGGGS	接头

SEQ ID NO	序列	说明
150	X_1 X_2 X_3 X_4 X_5(P4 P3 P2 P1 ↓ P1’) X1= I、L、Y、M、F、V或A；(P4 = I、L、Y、M、F、V或A) X2 = A、G、S、V、E、D、Q、N或Y；(P3 = A、G、S、V、E、D、Q、N或Y) X3 = H、P、A、V、G、S或T；(P2 = H、P、A、V、G、S或T) X4 = D或E；(P1 = D或E) X5 = I、L、Y、M、F、V、T、S、G或A (P1’ = I、L、Y、M、F、V、T、S、G或A)	共有接头
151	X1 E X3 D X5 (P4 P3 P2 P1 ↓ P1’) X1 = I或L；(P4 = I或L) (P3 = E) X3 = P或A；(P2 = P或A) X5 = I、V、T、S或G (P1’ = I、V、T、S或G)	共有接头
152	LEPDG	接头
153	LEADG	接头
154	X_1QARX$_5$(P1QAR↓(A/V)) X1 = 任何氨基酸；(P1是任何氨基酸) X5 = A或V	共有接头
155	RQARX$_5$(RQAR(A/V)) X5 = A或V	共有接头
156	RQARV	接头
157	X1X2 X3 X4 (P3 P2 P1 ↓ P1’) X1 = P、V或A；(P3 = P、V或A) X2 = Q或D；(P2 = Q或D) X3 = A或N；(P1 = A或N)	共有接头

[0697]

SEQ ID NO	序列	说明
	X4 = L、I或M (P1' = L、I或M)	
158	PX2X3X4 (P3 P2 P1 ↓ P1') (P3 = P) X2 = Q或D; (P2 = Q或D) X3 = A或N; (P1是A或N) X4 = L或I (P1'是L或I)	共有接头
159	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
160	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
161	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
162	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
163	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
164	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A
[0698] 165	GGATCTGGAGCAACAAACTTCTCACTACTCAA ACAAGCAGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGA CCC	P2A DNA
166	GSPAGLEADGSRQARVGS	接头
167	MLLGLKWVFF VVFYQGVHCE VQLVESGGGL VQPKGSLKLS CAASGFTFNT YAMNWVRQAP GKGLEWVARI RSKSNNYATY YADSVKDRFT ISRDDSQSML YLQMNNLKTE DTAMYXCVRQ WDYDVRAMNY WGQGTSVTVS S	抗5T4 VH
168	METHSQVFVY MLLWLSGVEG DIVMTQSHIF MSTSVGDRVS ITCKASQDVD TAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRLTGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLADYFCQQ YSSYPYTFGG GTKLEIK	抗5T4 VL
169	DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD	B7-H3 x CD3双

[0699]

SEQ ID NO	序列	说明
	TNVAWYQQKP GKAPKALIYS ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISRD DSKNSLYLQM NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS GGCGGGEVAA LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK	特异性DART-A双抗体的第一多肽链
170	GGGGSGGGGSGGGGS	接头
171	GGS(GGS)n 其中n是0至10	接头
172	(GGGGGS)n 其中n是1至4	接头
173	(GGGGS)n 其中n是1至5	接头
174	Gly_xXaa-Gly_y-Xaa-Gly_z	接头

[0700]

SEQ ID NO	序列	说明
	Xaa独立地选自A、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、H、D或E x、y和z各自是介于1-5范围内的整数	
175	Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly Xaa独立地选自A、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、H、D或E	接头
176	ATTTGSSPGPT	接头
177	GGGGG-C-GGGGG	接头
178	(EAAAK)n n=2-20	接头
179	AS-(AP)n-GT n=2-20	接头
180	AS-(EAAAK)n-GT n=2-20	接头
181	(GGGGA)n n=2-20	接头
182	(PGGGS)n n=2-20	接头
183	(AGGGS)n n=2-20	接头
184	GGS-(EGKSSGSGSESKST)n-GGS n=2-20	接头
185	(SSSSG)n n=1-9	接头
186	SSSASASSA	接头
187	GSPGSPG	接头
188	QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS	DLL3 scFv

[0701]

SEQ ID NO	序列	说明
	SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY VYYSGTTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCASIAV TGFYFDYWGQ GTLVTVSSGG GGSGGGGSGG GGSEIVLTQS PGTLSLSPGE RVTLSCRASQ RVNNNYLAWY QQRPGQAPRL LIYGASSRAT GIPDRFSGSG SGTDFTLTIS RLEPEDFAVY YCQQYDRSPL TFGGGTKLEI K	
189	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQA PGQGLEWMGR IFPGDGDTDY NGKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARNV FDGYWLVYWG QGTLVTVSS	CD20 VH
190	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSLL HSNGITYLYW YLQKPGQSPQ LLIYQMSNLV SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCAQNLELP YTFGGGTKVE IKRTV	CD20 VL

[0001] 序列表

[0002] <110> 印希彼有限公司(INHIBRX LP)

[0003] B·P·埃克尔曼(ECKELMAN, Brendan P.)

[0004] M·D·卡普兰(KAPLAN, Michael D.)

[0005] K·M·维利斯(WILLIS, Katelyn M.)

[0006] Q·德福罗(DEVERAUX, Quinn)

[0007] J·C·蒂默(TIMMER, John C.)

[0008] <120> 具有受限CD3结合的多特异性多肽构建体及其使用方法

[0009] <130> 744952000140

[0010] <150> 62/484,217

[0011] <151> 2017-04-11

[0012] <140> 未分配

[0013] <141> 同时附上

[0014] <160> 190

[0015] <170> PatentIn version 3.5

[0016] <210> 1

[0017] <211> 218

[0018] <212> PRT

[0019] <213> 人工序列

[0020] <220>

[0021] <223> IgG1 Fc

[0022] <400> 1

[0023] Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

[0024] 1 5 10 15

[0025] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

[0026] 20 25 30

[0027] Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

[0028] 35 40 45

[0029] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

[0030] 50 55 60

[0031] Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

[0032] 65 70 75 80

[0033] His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

[0034] 85 90 95

[0035] Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

[0036] 100 105 110

[0037] Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

[0038] 115 120 125

[0039] Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[0040] 130 135 140
[0041] Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[0042] 145 150 155 160
[0043] Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[0044] 165 170 175
[0045] Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[0046] 180 185 190
[0047] Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[0048] 195 200 205
[0049] Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0050] 210 215
[0051] <210> 2
[0052] <211> 215
[0053] <212> PRT
[0054] <213> 人工序列
[0055] <220>
[0056] <223> IgG2 Fc
[0057] <400> 2
[0058] Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[0059] 1 5 10 15
[0060] Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[0061] 20 25 30
[0062] Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[0063] 35 40 45
[0064] Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
[0065] 50 55 60
[0066] Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[0067] 65 70 75 80
[0068] Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
[0069] 85 90 95
[0070] Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[0071] 100 105 110
[0072] Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
[0073] 115 120 125
[0074] Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[0075] 130 135 140
[0076] Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[0077] 145 150 155 160

[0078] Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[0079] 165 170 175
[0080] Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
[0081] 180 185 190
[0082] Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[0083] 195 200 205
[0084] Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0085] 210 215
[0086] <210> 3
[0087] <211> 217
[0088] <212> PRT
[0089] <213> 人工序列
[0090] <220>
[0091] <223> IgG2 Fc
[0092] <400> 3
[0093] Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
[0094] 1 5 10 15
[0095] Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
[0096] 20 25 30
[0097] Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
[0098] 35 40 45
[0099] Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
[0100] 50 55 60
[0101] Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
[0102] 65 70 75 80
[0103] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
[0104] 85 90 95
[0105] Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
[0106] 100 105 110
[0107] Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
[0108] 115 120 125
[0109] Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
[0110] 130 135 140
[0111] Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
[0112] 145 150 155 160
[0113] Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
[0114] 165 170 175
[0115] Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
[0116] 180 185 190

[0117] Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
[0118] 195 200 205
[0119] Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0120] 210 215
[0121] <210> 4
[0122] <211> 218
[0123] <212> PRT
[0124] <213> 人工序列
[0125] <220>
[0126] <223> IgG3 Fc
[0127] <400> 4
[0128] Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
[0129] 1 5 10 15
[0130] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
[0131] 20 25 30
[0132] Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp
[0133] 35 40 45
[0134] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
[0135] 50 55 60
[0136] Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
[0137] 65 70 75 80
[0138] His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
[0139] 85 90 95
[0140] Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
[0141] 100 105 110
[0142] Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
[0143] 115 120 125
[0144] Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[0145] 130 135 140
[0146] Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn
[0147] 145 150 155 160
[0148] Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[0149] 165 170 175
[0150] Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[0151] 180 185 190
[0152] Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr
[0153] 195 200 205
[0154] Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0155] 210 215

[0156] <210> 5

[0157] <211> 218

[0158] <212> PRT

[0159] <213> 人工序列

[0160] <220>

[0161] <223> IgG4 Fc

[0162] <400> 5

[0163] Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

[0164] 1 5 10 15

[0165] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

[0166] 20 25 30

[0167] Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp

[0168] 35 40 45

[0169] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

[0170] 50 55 60

[0171] Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

[0172] 65 70 75 80

[0173] His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

[0174] 85 90 95

[0175] Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

[0176] 100 105 110

[0177] Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu

[0178] 115 120 125

[0179] Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

[0180] 130 135 140

[0181] Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

[0182] 145 150 155 160

[0183] Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

[0184] 165 170 175

[0185] Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn

[0186] 180 185 190

[0187] Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

[0188] 195 200 205

[0189] Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

[0190] 210 215

[0191] <210> 6

[0192] <211> 218

[0193] <212> PRT

[0194] <213> 人工序列

[0195] <220>

[0196] <223> IgG4 Fc

[0197] <400> 6

[0198] Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

[0199] 1 5 10 15

[0200] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

[0201] 20 25 30

[0202] Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp

[0203] 35 40 45

[0204] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

[0205] 50 55 60

[0206] Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

[0207] 65 70 75 80

[0208] His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

[0209] 85 90 95

[0210] Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

[0211] 100 105 110

[0212] Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu

[0213] 115 120 125

[0214] Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

[0215] 130 135 140

[0216] Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

[0217] 145 150 155 160

[0218] Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

[0219] 165 170 175

[0220] Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn

[0221] 180 185 190

[0222] Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

[0223] 195 200 205

[0224] Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

[0225] 210 215

[0226] <210> 7

[0227] <211> 14

[0228] <212> PRT

[0229] <213> 人工序列

[0230] <220>

[0231] <223> 铰链

[0232] <400> 7

[0233] Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

[0234] 1 5 10

[0235] <210> 8

[0236] <211> 9

[0237] <212> PRT

[0238] <213> 人工序列

[0239] <220>

[0240] <223> 铰链

[0241] <400> 8

[0242] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

[0243] 1 5

[0244] <210> 9

[0245] <211> 11

[0246] <212> PRT

[0247] <213> 人工序列

[0248] <220>

[0249] <223> 铰链

[0250] <400> 9

[0251] Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys

[0252] 1 5 10

[0253] <210> 10

[0254] <211> 6

[0255] <212> PRT

[0256] <213> 人工序列

[0257] <220>

[0258] <223> (GGS)2

[0259] <400> 10

[0260] Gly Gly Ser Gly Gly Ser

[0261] 1 5

[0262] <210> 11

[0263] <211> 9

[0264] <212> PRT

[0265] <213> 人工序列

[0266] <220>

[0267] <223> (GGS)3

[0268] <400> 11

[0269] Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

[0270] 1 5

[0271] <210> 12

[0272] <211> 12

[0273] <212> PRT

[0274] <213> 人工序列

[0275] <220>

[0276] <223> (GGS)4

[0277] <400> 12

[0278] Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

[0279] 1 5 10

[0280] <210> 13

[0281] <211> 15

[0282] <212> PRT

[0283] <213> 人工序列

[0284] <220>

[0285] <223> (GGS)5

[0286] <400> 13

[0287] Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

[0288] 1 5 10 15

[0289] <210> 14

[0290] <211> 125

[0291] <212> PRT

[0292] <213> 人工序列

[0293] <220>

[0294] <223> 抗-CD3 Hv

[0295] <400> 14

[0296] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly

[0297] 1 5 10 15

[0298] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

[0299] 20 25 30

[0300] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0301] 35 40 45

[0302] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[0303] 50 55 60

[0304] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile

[0305] 65 70 75 80

[0306] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

[0307] 85 90 95

[0308] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

[0309] 100 105 110

[0310] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

[0311] 115 120 125

[0312] <210> 15

[0313] <211> 109

[0314] <212> PRT

[0315] <213> 人工序列

[0316] <220>

[0317] <223> 抗-CD3 Lv

[0318] <400> 15

[0319] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu

[0320] 1 5 10 15

[0321] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

[0322] 20 25 30

[0323] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly

[0324] 35 40 45

[0325] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

[0326] 50 55 60

[0327] Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

[0328] 65 70 75 80

[0329] Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

[0330] 85 90 95

[0331] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

[0332] 100 105

[0333] <210> 16

[0334] <211> 5

[0335] <212> PRT

[0336] <213> 人工序列

[0337] <220>

[0338] <223> 抗-CD3 VH CDR1

[0339] <400> 16

[0340] Thr Tyr Ala Met Asn

[0341] 1 5

[0342] <210> 17

[0343] <211> 19

[0344] <212> PRT

[0345] <213> 人工序列

[0346] <220>

[0347] <223> 抗-CD3 VH CDR2

[0348] <400> 17

[0349] Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

[0350] 1 5 10 15

[0351] Val Lys Asp

[0352] <210> 18

[0353] <211> 14

[0354] <212> PRT

[0355] <213> 人工序列

[0356] <220>

[0357] <223> 抗-CD3 VH CDR3

[0358] <400> 18

[0359] His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

[0360] 1 5 10

[0361] <210> 19

[0362] <211> 14

[0363] <212> PRT

[0364] <213> 人工序列

[0365] <220>

[0366] <223> 抗-CD3 VL CDR1

[0367] <400> 19

[0368] Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

[0369] 1 5 10

[0370] <210> 20

[0371] <211> 7

[0372] <212> PRT

[0373] <213> 人工序列

[0374] <220>

[0375] <223> 抗-CD3 VL CDR2

[0376] <400> 20

[0377] Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

[0378] 1 5

[0379] <210> 21

[0380] <211> 9

[0381] <212> PRT

[0382] <213> 人工序列

[0383] <220>

[0384] <223> 抗-CD3 VL CDR3

[0385] <400> 21

[0386] Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

[0387] 1 5

[0388] <210> 22

[0389] <211> 4

[0390] <212> PRT

[0391] <213> 人工序列

[0392] <220>

[0393] <223> 颗粒酶B底物

[0394] <400> 22

[0395] Leu Glu Ala Asp

[0396] 1

[0397] <210> 23

[0398] <211> 4

[0399] <212> PRT

[0400] <213> 人工序列

[0401] <220>

[0402] <223> 颗粒酶B底物

[0403] <400> 23

[0404] Arg Gln Ala Arg

[0405] 1

[0406] <210> 24

[0407] <211> 4

[0408] <212> PRT

[0409] <213> 人工序列

[0410] <220>

[0411] <223> MMP底物

[0412] <400> 24

[0413] Pro Ala Gly Leu

[0414] 1

[0415] <210> 25

[0416] <211> 19

[0417] <212> PRT

[0418] <213> 人工序列

[0419] <220>

[0420] <223> 接头

[0421] <400> 25

[0422] Thr Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Pro Ala Gly Leu Gly Arg Gln Ala

[0423] 1 5 10 15

[0424] Arg Val Gly

[0425] <210> 26

[0426] <211> 19

[0427] <212> PRT

[0428] <213> 人工序列

[0429] <220>

[0430] <223> 接头

[0431] <400> 26

[0432] Thr Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Arg Gln Ala Arg Val Gly Pro Ala

[0433] 1 5 10 15

[0434] Gly Leu Gly

[0435] <210> 27

[0436] <211> 19

[0437] <212> PRT

[0438] <213> 人工序列

[0439] <220>

[0440] <223> 接头

[0441] <400> 27

[0442] Thr Gly Ser Pro Ala Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Arg Gln Ala Arg

[0443] 1 5 10 15

[0444] Val Gly Ser

[0445] <210> 28

[0446] <211> 19

[0447] <212> PRT

[0448] <213> 人工序列

[0449] <220>

[0450] <223> 接头

[0451] <400> 28

[0452] Thr Gly Pro Ala Gly Leu Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Arg Gln Ala

[0453] 1 5 10 15

[0454] Arg Val Gly

[0455] <210> 29

[0456] <211> 19

[0457] <212> PRT

[0458] <213> 人工序列

[0459] <220>

[0460] <223> 接头

[0461] <400> 29

[0462] Thr Gly Arg Gln Ala Arg Val Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Pro Ala

[0463] 1 5 10 15

[0464] Gly Leu Gly

[0465] <210> 30

[0466] <211> 18

[0467] <212> PRT

[0468] <213> 人工序列

[0469] <220>

[0470] <223> 接头

[0471] <400> 30

[0472] Thr Gly Ser Arg Gln Ala Arg Val Gly Pro Ala Gly Leu Glu Ala Asp

[0473] 1 5 10 15

[0474] Gly Ser

[0475] <210> 31

[0476] <211> 20

[0477] <212> PRT

[0478] <213> 人工序列

[0479] <220>

[0480] <223> 接头

[0481] <400> 31

[0482] Thr Gly Pro Ala Gly Leu Gly Ser Arg Gln Ala Arg Val Gly Leu Glu

[0483] 1 5 10 15

[0484] Ala Asp Gly Ser

[0485] 20

[0486] <210> 32

[0487] <211> 125

[0488] <212> PRT

[0489] <213> 人工序列

[0490] <220>

[0491] <223> 抗-CD3 VH1

[0492] <400> 32

[0493] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0494] 1 5 10 15

[0495] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

[0496] 20 25 30

[0497] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0498] 35 40 45

[0499] Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[0500] 50 55 60

[0501] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser

[0502] 65 70 75 80

[0503] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

[0504] 85 90 95

[0505] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

[0506] 100 105 110

[0507] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0508] 115 120 125
[0509] <210> 33
[0510] <211> 125
[0511] <212> PRT
[0512] <213> 人工序列
[0513] <220>
[0514] <223> 抗-CD3 VH2
[0515] <400> 33
[0516] Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0517] 1 5 10 15
[0518] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
[0519] 20 25 30
[0520] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0521] 35 40 45
[0522] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[0523] 50 55 60
[0524] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
[0525] 65 70 75 80
[0526] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
[0527] 85 90 95
[0528] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[0529] 100 105 110
[0530] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0531] 115 120 125
[0532] <210> 34
[0533] <211> 125
[0534] <212> PRT
[0535] <213> 人工序列
[0536] <220>
[0537] <223> 抗-CD3 VH3
[0538] <400> 34
[0539] Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
[0540] 1 5 10 15
[0541] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
[0542] 20 25 30
[0543] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0544] 35 40 45
[0545] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[0546] 50 55 60

[0547] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile

[0548] 65 70 75 80

[0549] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

[0550] 85 90 95

[0551] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

[0552] 100 105 110

[0553] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0554] 115 120 125

[0555] <210> 35

[0556] <211> 125

[0557] <212> PRT

[0558] <213> 人工序列

[0559] <220>

[0560] <223> 抗-CD3 VH4

[0561] <400> 35

[0562] Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg

[0563] 1 5 10 15

[0564] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

[0565] 20 25 30

[0566] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0567] 35 40 45

[0568] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[0569] 50 55 60

[0570] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile

[0571] 65 70 75 80

[0572] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

[0573] 85 90 95

[0574] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

[0575] 100 105 110

[0576] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0577] 115 120 125

[0578] <210> 36

[0579] <211> 125

[0580] <212> PRT

[0581] <213> 人工序列

[0582] <220>

[0583] <223> 抗-CD3 VH5

[0584] <400> 36

[0585] Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
[0586] 1 5 10 15
[0587] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
[0588] 20 25 30
[0589] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0590] 35 40 45
[0591] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[0592] 50 55 60
[0593] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
[0594] 65 70 75 80
[0595] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
[0596] 85 90 95
[0597] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[0598] 100 105 110
[0599] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0600] 115 120 125
[0601] <210> 37
[0602] <211> 125
[0603] <212> PRT
[0604] <213> 人工序列
[0605] <220>
[0606] <223> 抗-CD3 VH6
[0607] <400> 37
[0608] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0609] 1 5 10 15
[0610] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
[0611] 20 25 30
[0612] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0613] 35 40 45
[0614] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[0615] 50 55 60
[0616] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
[0617] 65 70 75 80
[0618] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[0619] 85 90 95
[0620] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[0621] 100 105 110
[0622] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0623] 115 120 125

[0624] <210> 38

[0625] <211> 125

[0626] <212> PRT

[0627] <213> 人工序列

[0628] <220>

[0629] <223> 抗-CD3 VH7

[0630] <400> 38

[0631] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0632] 1 5 10 15

[0633] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

[0634] 20 25 30

[0635] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0636] 35 40 45

[0637] Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[0638] 50 55 60

[0639] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

[0640] 65 70 75 80

[0641] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

[0642] 85 90 95

[0643] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe

[0644] 100 105 110

[0645] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0646] 115 120 125

[0647] <210> 39

[0648] <211> 124

[0649] <212> PRT

[0650] <213> 人工序列

[0651] <220>

[0652] <223> 抗-CD3 VH8

[0653] <400> 39

[0654] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0655] 1 5 10 15

[0656] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr

[0657] 20 25 30

[0658] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0659] 35 40 45

[0660] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[0661] 50 55 60

[0662] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

[0663] 65 70 75 80
[0664] Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[0665] 85 90 95
[0666] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp
[0667] 100 105 110
[0668] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
[0669] 115 120
[0670] <210> 40
[0671] <211> 125
[0672] <212> PRT
[0673] <213> 人工序列
[0674] <220>
[0675] <223> 抗-CD3 VH9
[0676] <400> 40
[0677] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0678] 1 5 10 15
[0679] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
[0680] 20 25 30
[0681] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0682] 35 40 45
[0683] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[0684] 50 55 60
[0685] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
[0686] 65 70 75 80
[0687] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[0688] 85 90 95
[0689] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[0690] 100 105 110
[0691] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[0692] 115 120 125
[0693] <210> 41
[0694] <211> 125
[0695] <212> PRT
[0696] <213> 人工序列
[0697] <220>
[0698] <223> 抗-CD3 VH10
[0699] <400> 41
[0700] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0701] 1 5 10 15

[0702] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
[0703] 20 25 30
[0704] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0705] 35 40 45
[0706] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[0707] 50 55 60
[0708] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
[0709] 65 70 75 80
[0710] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[0711] 85 90 95
[0712] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Tyr Phe
[0713] 100 105 110
[0714] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[0715] 115 120 125
[0716] <210> 42
[0717] <211> 125
[0718] <212> PRT
[0719] <213> 人工序列
[0720] <220>
[0721] <223> 抗-CD3 VH11
[0722] <400> 42
[0723] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
[0724] 1 5 10 15
[0725] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
[0726] 20 25 30
[0727] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0728] 35 40 45
[0729] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[0730] 50 55 60
[0731] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
[0732] 65 70 75 80
[0733] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
[0734] 85 90 95
[0735] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[0736] 100 105 110
[0737] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0738] 115 120 125
[0739] <210> 43
[0740] <211> 125

[0741] <212> PRT

[0742] <213> 人工序列

[0743] <220>

[0744] <223> 抗-CD3 VH12

[0745] <400> 43

[0746] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0747] 1 5 10 15

[0748] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

[0749] 20 25 30

[0750] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0751] 35 40 45

[0752] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[0753] 50 55 60

[0754] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr

[0755] 65 70 75 80

[0756] Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

[0757] 85 90 95

[0758] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

[0759] 100 105 110

[0760] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro

[0761] 115 120 125

[0762] <210> 44

[0763] <211> 125

[0764] <212> PRT

[0765] <213> 人工序列

[0766] <220>

[0767] <223> 抗-CD3 VH13

[0768] <400> 44

[0769] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0770] 1 5 10 15

[0771] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

[0772] 20 25 30

[0773] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val

[0774] 35 40 45

[0775] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[0776] 50 55 60

[0777] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr

[0778] 65 70 75 80

[0779] Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

[0780] 85 90 95

[0781] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

[0782] 100 105 110

[0783] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro

[0784] 115 120 125

[0785] <210> 45

[0786] <211> 125

[0787] <212> PRT

[0788] <213> 人工序列

[0789] <220>

[0790] <223> 抗-CD3 VH14

[0791] <400> 45

[0792] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0793] 1 5 10 15

[0794] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

[0795] 20 25 30

[0796] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0797] 35 40 45

[0798] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[0799] 50 55 60

[0800] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr

[0801] 65 70 75 80

[0802] Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

[0803] 85 90 95

[0804] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

[0805] 100 105 110

[0806] Ala Tyr Trp Gly Cys Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro

[0807] 115 120 125

[0808] <210> 46

[0809] <211> 125

[0810] <212> PRT

[0811] <213> 人工序列

[0812] <220>

[0813] <223> 抗-CD3 VH15

[0814] <400> 46

[0815] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0816] 1 5 10 15

[0817] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

[0818] 20 25 30

[0819] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0820] 35 40 45
[0821] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[0822] 50 55 60
[0823] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr
[0824] 65 70 75 80
[0825] Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[0826] 85 90 95
[0827] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[0828] 100 105 110
[0829] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0830] 115 120 125
[0831] <210> 47
[0832] <211> 125
[0833] <212> PRT
[0834] <213> 人工序列
[0835] <220>
[0836] <223> 抗-CD3 VH16
[0837] <400> 47
[0838] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0839] 1 5 10 15
[0840] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
[0841] 20 25 30
[0842] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0843] 35 40 45
[0844] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[0845] 50 55 60
[0846] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr
[0847] 65 70 75 80
[0848] Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[0849] 85 90 95
[0850] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[0851] 100 105 110
[0852] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0853] 115 120 125
[0854] <210> 48
[0855] <211> 125
[0856] <212> PRT
[0857] <213> 人工序列

[0858] <220>

[0859] <223> 抗-CD3 VH17

[0860] <400> 48

[0861] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0862] 1 5 10 15

[0863] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

[0864] 20 25 30

[0865] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0866] 35 40 45

[0867] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[0868] 50 55 60

[0869] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr

[0870] 65 70 75 80

[0871] Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

[0872] 85 90 95

[0873] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

[0874] 100 105 110

[0875] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0876] 115 120 125

[0877] <210> 49

[0878] <211> 125

[0879] <212> PRT

[0880] <213> 人工序列

[0881] <220>

[0882] <223> 抗-CD3 VH18

[0883] <400> 49

[0884] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0885] 1 5 10 15

[0886] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

[0887] 20 25 30

[0888] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val

[0889] 35 40 45

[0890] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[0891] 50 55 60

[0892] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr

[0893] 65 70 75 80

[0894] Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

[0895] 85 90 95

[0896] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

[0897] 100 105 110

[0898] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0899] 115 120 125

[0900] <210> 50

[0901] <211> 125

[0902] <212> PRT

[0903] <213> 人工序列

[0904] <220>

[0905] <223> 抗-CD3 VH19

[0906] <400> 50

[0907] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0908] 1 5 10 15

[0909] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

[0910] 20 25 30

[0911] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val

[0912] 35 40 45

[0913] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[0914] 50 55 60

[0915] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr

[0916] 65 70 75 80

[0917] Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

[0918] 85 90 95

[0919] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

[0920] 100 105 110

[0921] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0922] 115 120 125

[0923] <210> 51

[0924] <211> 125

[0925] <212> PRT

[0926] <213> 人工序列

[0927] <220>

[0928] <223> 抗-CD3 VH20

[0929] <400> 51

[0930] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0931] 1 5 10 15

[0932] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

[0933] 20 25 30

[0934] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val

[0935] 35 40 45

[0936] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[0937] 50 55 60
[0938] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr
[0939] 65 70 75 80
[0940] Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[0941] 85 90 95
[0942] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[0943] 100 105 110
[0944] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0945] 115 120 125
[0946] <210> 52
[0947] <211> 125
[0948] <212> PRT
[0949] <213> 人工序列
[0950] <220>
[0951] <223> 抗-CD3 VH21
[0952] <400> 52
[0953] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0954] 1 5 10 15
[0955] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
[0956] 20 25 30
[0957] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
[0958] 35 40 45
[0959] Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[0960] 50 55 60
[0961] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
[0962] 65 70 75 80
[0963] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[0964] 85 90 95
[0965] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[0966] 100 105 110
[0967] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0968] 115 120 125
[0969] <210> 53
[0970] <211> 125
[0971] <212> PRT
[0972] <213> 人工序列
[0973] <220>
[0974] <223> 抗-CD3 VH22

[0975] <400> 53

[0976] Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0977] 1 5 10 15

[0978] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

[0979] 20 25 30

[0980] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val

[0981] 35 40 45

[0982] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[0983] 50 55 60

[0984] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser

[0985] 65 70 75 80

[0986] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

[0987] 85 90 95

[0988] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

[0989] 100 105 110

[0990] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0991] 115 120 125

[0992] <210> 54

[0993] <211> 125

[0994] <212> PRT

[0995] <213> 人工序列

[0996] <220>

[0997] <223> 抗-CD3 VH23

[0998] <400> 54

[0999] Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg

[1000] 1 5 10 15

[1001] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

[1002] 20 25 30

[1003] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val

[1004] 35 40 45

[1005] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[1006] 50 55 60

[1007] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile

[1008] 65 70 75 80

[1009] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

[1010] 85 90 95

[1011] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

[1012] 100 105 110

[1013] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[1014] 115 120 125

[1015] <210> 55

[1016] <211> 125

[1017] <212> PRT

[1018] <213> 人工序列

[1019] <220>

[1020] <223> 抗-CD3 VH24

[1021] <400> 55

[1022] Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg

[1023] 1 5 10 15

[1024] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

[1025] 20 25 30

[1026] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val

[1027] 35 40 45

[1028] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[1029] 50 55 60

[1030] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile

[1031] 65 70 75 80

[1032] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

[1033] 85 90 95

[1034] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

[1035] 100 105 110

[1036] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[1037] 115 120 125

[1038] <210> 56

[1039] <211> 125

[1040] <212> PRT

[1041] <213> 人工序列

[1042] <220>

[1043] <223> 抗-CD3 VH25

[1044] <400> 56

[1045] Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg

[1046] 1 5 10 15

[1047] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

[1048] 20 25 30

[1049] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val

[1050] 35 40 45

[1051] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[1052] 50 55 60

[1053] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
[1054] 65 70 75 80
[1055] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
[1056] 85 90 95
[1057] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[1058] 100 105 110
[1059] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1060] 115 120 125
[1061] <210> 57
[1062] <211> 125
[1063] <212> PRT
[1064] <213> 人工序列
[1065] <220>
[1066] <223> 抗-CD3 VH26
[1067] <400> 57
[1068] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1069] 1 5 10 15
[1070] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
[1071] 20 25 30
[1072] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
[1073] 35 40 45
[1074] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[1075] 50 55 60
[1076] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
[1077] 65 70 75 80
[1078] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[1079] 85 90 95
[1080] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[1081] 100 105 110
[1082] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1083] 115 120 125
[1084] <210> 58
[1085] <211> 125
[1086] <212> PRT
[1087] <213> 人工序列
[1088] <220>
[1089] <223> 抗-CD3 VH27
[1090] <400> 58
[1091] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[1092] 1 5 10 15
[1093] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
[1094] 20 25 30
[1095] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
[1096] 35 40 45
[1097] Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[1098] 50 55 60
[1099] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
[1100] 65 70 75 80
[1101] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[1102] 85 90 95
[1103] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[1104] 100 105 110
[1105] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1106] 115 120 125
[1107] <210> 59
[1108] <211> 124
[1109] <212> PRT
[1110] <213> 人工序列
[1111] <220>
[1112] <223> 抗-CD3 VH28
[1113] <400> 59
[1114] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1115] 1 5 10 15
[1116] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr
[1117] 20 25 30
[1118] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
[1119] 35 40 45
[1120] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[1121] 50 55 60
[1122] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
[1123] 65 70 75 80
[1124] Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[1125] 85 90 95
[1126] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp
[1127] 100 105 110
[1128] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
[1129] 115 120
[1130] <210> 60

[1131] <211> 125
[1132] <212> PRT
[1133] <213> 人工序列
[1134] <220>
[1135] <223> 抗-CD3 VH29
[1136] <400> 60
[1137] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1138] 1 5 10 15
[1139] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
[1140] 20 25 30
[1141] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
[1142] 35 40 45
[1143] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[1144] 50 55 60
[1145] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
[1146] 65 70 75 80
[1147] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[1148] 85 90 95
[1149] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[1150] 100 105 110
[1151] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[1152] 115 120 125
[1153] <210> 61
[1154] <211> 125
[1155] <212> PRT
[1156] <213> 人工序列
[1157] <220>
[1158] <223> 抗-CD3 VH30
[1159] <400> 61
[1160] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1161] 1 5 10 15
[1162] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
[1163] 20 25 30
[1164] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
[1165] 35 40 45
[1166] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[1167] 50 55 60
[1168] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
[1169] 65 70 75 80

[1170] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[1171] 85 90 95
[1172] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Tyr Phe
[1173] 100 105 110
[1174] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[1175] 115 120 125
[1176] <210> 62
[1177] <211> 125
[1178] <212> PRT
[1179] <213> 人工序列
[1180] <220>
[1181] <223> 抗-CD3 VH31
[1182] <400> 62
[1183] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
[1184] 1 5 10 15
[1185] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
[1186] 20 25 30
[1187] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
[1188] 35 40 45
[1189] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[1190] 50 55 60
[1191] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
[1192] 65 70 75 80
[1193] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
[1194] 85 90 95
[1195] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[1196] 100 105 110
[1197] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1198] 115 120 125
[1199] <210> 63
[1200] <211> 109
[1201] <212> PRT
[1202] <213> 人工序列
[1203] <220>
[1204] <223> 抗-CD3 VL1
[1205] <400> 63
[1206] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
[1207] 1 5 10 15
[1208] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

[1209] 20 25 30

[1210] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly

[1211] 35 40 45

[1212] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

[1213] 50 55 60

[1214] Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

[1215] 65 70 75 80

[1216] Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

[1217] 85 90 95

[1218] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

[1219] 100 105

[1220] <210> 64

[1221] <211> 109

[1222] <212> PRT

[1223] <213> 人工序列

[1224] <220>

[1225] <223> 抗-CD3 VL2

[1226] <400> 64

[1227] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

[1228] 1 5 10 15

[1229] Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

[1230] 20 25 30

[1231] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Gly

[1232] 35 40 45

[1233] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

[1234] 50 55 60

[1235] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala

[1236] 65 70 75 80

[1237] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

[1238] 85 90 95

[1239] His Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[1240] 100 105

[1241] <210> 65

[1242] <211> 109

[1243] <212> PRT

[1244] <213> 人工序列

[1245] <220>

[1246] <223> 抗-CD3 VL3

[1247] <400> 65

[1248] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[1249] 1 5 10 15
[1250] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[1251] 20 25 30
[1252] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
[1253] 35 40 45
[1254] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
[1255] 50 55 60
[1256] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
[1257] 65 70 75 80
[1258] Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[1259] 85 90 95
[1260] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[1261] 100 105
[1262] <210> 66
[1263] <211> 109
[1264] <212> PRT
[1265] <213> 人工序列
[1266] <220>
[1267] <223> 抗-CD3 VL4
[1268] <400> 66
[1269] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
[1270] 1 5 10 15
[1271] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[1272] 20 25 30
[1273] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
[1274] 35 40 45
[1275] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
[1276] 50 55 60
[1277] Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
[1278] 65 70 75 80
[1279] Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[1280] 85 90 95
[1281] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[1282] 100 105
[1283] <210> 67
[1284] <211> 109
[1285] <212> PRT
[1286] <213> 人工序列

[1287] <220>

[1288] <223> 抗-CD3 VL5

[1289] <400> 67

[1290] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly

[1291] 1 5 10 15

[1292] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

[1293] 20 25 30

[1294] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

[1295] 35 40 45

[1296] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

[1297] 50 55 60

[1298] Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

[1299] 65 70 75 80

[1300] Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

[1301] 85 90 95

[1302] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

[1303] 100 105

[1304] <210> 68

[1305] <211> 109

[1306] <212> PRT

[1307] <213> 人工序列

[1308] <220>

[1309] <223> 抗-CD3 VL6

[1310] <400> 68

[1311] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly

[1312] 1 5 10 15

[1313] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

[1314] 20 25 30

[1315] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

[1316] 35 40 45

[1317] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

[1318] 50 55 60

[1319] Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

[1320] 65 70 75 80

[1321] Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

[1322] 85 90 95

[1323] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

[1324] 100 105

[1325] <210> 69

[1326] <211> 109
[1327] <212> PRT
[1328] <213> 人工序列
[1329] <220>
[1330] <223> 抗-CD3 VL7
[1331] <400> 69
[1332] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[1333] 1 5 10 15
[1334] Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[1335] 20 25 30
[1336] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
[1337] 35 40 45
[1338] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
[1339] 50 55 60
[1340] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
[1341] 65 70 75 80
[1342] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[1343] 85 90 95
[1344] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[1345] 100 105
[1346] <210> 70
[1347] <211> 109
[1348] <212> PRT
[1349] <213> 人工序列
[1350] <220>
[1351] <223> 抗-CD3 VL8
[1352] <400> 70
[1353] Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[1354] 1 5 10 15
[1355] Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly
[1356] 20 25 30
[1357] Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
[1358] 35 40 45
[1359] Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
[1360] 50 55 60
[1361] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
[1362] 65 70 75 80
[1363] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn
[1364] 85 90 95

[1365] Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[1366] 100 105
[1367] <210> 71
[1368] <211> 109
[1369] <212> PRT
[1370] <213> 人工序列
[1371] <220>
[1372] <223> 抗-CD3 VL9
[1373] <400> 71
[1374] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[1375] 1 5 10 15
[1376] Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[1377] 20 25 30
[1378] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
[1379] 35 40 45
[1380] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
[1381] 50 55 60
[1382] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
[1383] 65 70 75 80
[1384] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[1385] 85 90 95
[1386] His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1387] 100 105
[1388] <210> 72
[1389] <211> 109
[1390] <212> PRT
[1391] <213> 人工序列
[1392] <220>
[1393] <223> 抗-CD3 VL10
[1394] <400> 72
[1395] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[1396] 1 5 10 15
[1397] Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[1398] 20 25 30
[1399] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
[1400] 35 40 45
[1401] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
[1402] 50 55 60
[1403] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala

[1404] 65 70 75 80
[1405] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[1406] 85 90 95
[1407] His Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1408] 100 105
[1409] <210> 73
[1410] <211> 109
[1411] <212> PRT
[1412] <213> 人工序列
[1413] <220>
[1414] <223> 抗-CD3 VL11
[1415] <400> 73
[1416] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[1417] 1 5 10 15
[1418] Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[1419] 20 25 30
[1420] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Cys Phe Arg Gly
[1421] 35 40 45
[1422] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
[1423] 50 55 60
[1424] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
[1425] 65 70 75 80
[1426] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[1427] 85 90 95
[1428] His Trp Val Phe Gly Glu Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1429] 100 105
[1430] <210> 74
[1431] <211> 109
[1432] <212> PRT
[1433] <213> 人工序列
[1434] <220>
[1435] <223> 抗-CD3 VL12
[1436] <400> 74
[1437] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
[1438] 1 5 10 15
[1439] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[1440] 20 25 30
[1441] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
[1442] 35 40 45

[1443] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
[1444] 50 55 60
[1445] Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
[1446] 65 70 75 80
[1447] Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[1448] 85 90 95
[1449] Leu Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[1450] 100 105
[1451] <210> 75
[1452] <211> 109
[1453] <212> PRT
[1454] <213> 人工序列
[1455] <220>
[1456] <223> 抗-CD3 VL13
[1457] <400> 75
[1458] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[1459] 1 5 10 15
[1460] Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[1461] 20 25 30
[1462] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Gly
[1463] 35 40 45
[1464] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
[1465] 50 55 60
[1466] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
[1467] 65 70 75 80
[1468] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[1469] 85 90 95
[1470] His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1471] 100 105
[1472] <210> 76
[1473] <211> 109
[1474] <212> PRT
[1475] <213> 人工序列
[1476] <220>
[1477] <223> 抗-CD3 VL14
[1478] <400> 76
[1479] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[1480] 1 5 10 15
[1481] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

[1482] 20 25 30
[1483] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
[1484] 35 40 45
[1485] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
[1486] 50 55 60
[1487] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
[1488] 65 70 75 80
[1489] Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[1490] 85 90 95
[1491] Leu Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[1492] 100 105
[1493] <210> 77
[1494] <211> 109
[1495] <212> PRT
[1496] <213> 人工序列
[1497] <220>
[1498] <223> 抗-CD3 VL15
[1499] <400> 77
[1500] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
[1501] 1 5 10 15
[1502] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[1503] 20 25 30
[1504] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
[1505] 35 40 45
[1506] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
[1507] 50 55 60
[1508] Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
[1509] 65 70 75 80
[1510] Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[1511] 85 90 95
[1512] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[1513] 100 105
[1514] <210> 78
[1515] <211> 109
[1516] <212> PRT
[1517] <213> 人工序列
[1518] <220>
[1519] <223> 抗-CD3 VL16
[1520] <400> 78

[1521] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
[1522] 1 5 10 15
[1523] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[1524] 20 25 30
[1525] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
[1526] 35 40 45
[1527] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
[1528] 50 55 60
[1529] Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
[1530] 65 70 75 80
[1531] Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[1532] 85 90 95
[1533] Leu Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[1534] 100 105
[1535] <210> 79
[1536] <211> 109
[1537] <212> PRT
[1538] <213> 人工序列
[1539] <220>
[1540] <223> 抗-CD3 VL17
[1541] <400> 79
[1542] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
[1543] 1 5 10 15
[1544] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[1545] 20 25 30
[1546] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
[1547] 35 40 45
[1548] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
[1549] 50 55 60
[1550] Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
[1551] 65 70 75 80
[1552] Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[1553] 85 90 95
[1554] Leu Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[1555] 100 105
[1556] <210> 80
[1557] <211> 109
[1558] <212> PRT
[1559] <213> 人工序列

[1560] <220>

[1561] <223> 抗-CD3 VL18

[1562] <400> 80

[1563] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

[1564] 1 5 10 15

[1565] Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

[1566] 20 25 30

[1567] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

[1568] 35 40 45

[1569] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe

[1570] 50 55 60

[1571] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala

[1572] 65 70 75 80

[1573] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

[1574] 85 90 95

[1575] Leu Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

[1576] 100 105

[1577] <210> 81

[1578] <211> 109

[1579] <212> PRT

[1580] <213> 人工序列

[1581] <220>

[1582] <223> 抗-CD3 VL19

[1583] <400> 81

[1584] Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

[1585] 1 5 10 15

[1586] Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly

[1587] 20 25 30

[1588] Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly

[1589] 35 40 45

[1590] Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe

[1591] 50 55 60

[1592] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val

[1593] 65 70 75 80

[1594] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn

[1595] 85 90 95

[1596] Arg Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

[1597] 100 105

[1598] <210> 82

[1599] <211> 226
[1600] <212> PRT
[1601] <213> 人工序列
[1602] <220>
[1603] <223> 杵Fc
[1604] <400> 82
[1605] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[1606] 1 5 10 15
[1607] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[1608] 20 25 30
[1609] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[1610] 35 40 45
[1611] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[1612] 50 55 60
[1613] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[1614] 65 70 75 80
[1615] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[1616] 85 90 95
[1617] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[1618] 100 105 110
[1619] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[1620] 115 120 125
[1621] Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
[1622] 130 135 140
[1623] Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[1624] 145 150 155 160
[1625] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[1626] 165 170 175
[1627] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
[1628] 180 185 190
[1629] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[1630] 195 200 205
[1631] His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[1632] 210 215 220
[1633] Pro Thr
[1634] 225
[1635] <210> 83
[1636] <211> 226
[1637] <212> PRT

[1638] <213> 人工序列

[1639] <220>

[1640] <223> 臼Fc

[1641] <400> 83

[1642] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

[1643] 1 5 10 15

[1644] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

[1645] 20 25 30

[1646] Arg Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

[1647] 35 40 45

[1648] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

[1649] 50 55 60

[1650] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

[1651] 65 70 75 80

[1652] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

[1653] 85 90 95

[1654] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

[1655] 100 105 110

[1656] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

[1657] 115 120 125

[1658] Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

[1659] 130 135 140

[1660] Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

[1661] 145 150 155 160

[1662] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

[1663] 165 170 175

[1664] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

[1665] 180 185 190

[1666] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

[1667] 195 200 205

[1668] His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

[1669] 210 215 220

[1670] Pro Thr

[1671] 225

[1672] <210> 84

[1673] <211> 223

[1674] <212> PRT

[1675] <213> 人工序列

[1676] <220>

[1677] <223> 杵Fc

[1678] <400> 84

[1679] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser

[1680] 1 5 10 15

[1681] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

[1682] 20 25 30

[1683] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

[1684] 35 40 45

[1685] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

[1686] 50 55 60

[1687] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

[1688] 65 70 75 80

[1689] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

[1690] 85 90 95

[1691] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

[1692] 100 105 110

[1693] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

[1694] 115 120 125

[1695] Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys

[1696] 130 135 140

[1697] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

[1698] 145 150 155 160

[1699] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

[1700] 165 170 175

[1701] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

[1702] 180 185 190

[1703] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

[1704] 195 200 205

[1705] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Thr

[1706] 210 215 220

[1707] <210> 85

[1708] <211> 223

[1709] <212> PRT

[1710] <213> 人工序列

[1711] <220>

[1712] <223> 臼Fc

[1713] <400> 85

[1714] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser

[1715] 1 5 10 15

[1716] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Arg Ser Arg
[1717] 20 25 30
[1718] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
[1719] 35 40 45
[1720] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[1721] 50 55 60
[1722] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[1723] 65 70 75 80
[1724] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[1725] 85 90 95
[1726] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[1727] 100 105 110
[1728] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
[1729] 115 120 125
[1730] Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
[1731] 130 135 140
[1732] Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[1733] 145 150 155 160
[1734] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[1735] 165 170 175
[1736] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
[1737] 180 185 190
[1738] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[1739] 195 200 205
[1740] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Thr
[1741] 210 215 220
[1742] <210> 86
[1743] <211> 226
[1744] <212> PRT
[1745] <213> 人工序列
[1746] <220>
[1747] <223> 杵Fc
[1748] <400> 86
[1749] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[1750] 1 5 10 15
[1751] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[1752] 20 25 30
[1753] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[1754] 35 40 45

[1755] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[1756] 50 55 60
[1757] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[1758] 65 70 75 80
[1759] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[1760] 85 90 95
[1761] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[1762] 100 105 110
[1763] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[1764] 115 120 125
[1765] Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
[1766] 130 135 140
[1767] Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[1768] 145 150 155 160
[1769] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[1770] 165 170 175
[1771] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
[1772] 180 185 190
[1773] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[1774] 195 200 205
[1775] His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[1776] 210 215 220
[1777] Pro Gly
[1778] 225
[1779] <210> 87
[1780] <211> 226
[1781] <212> PRT
[1782] <213> 人工序列
[1783] <220>
[1784] <223> 臼Fc
[1785] <400> 87
[1786] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[1787] 1 5 10 15
[1788] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[1789] 20 25 30
[1790] Arg Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[1791] 35 40 45
[1792] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[1793] 50 55 60

[1794] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[1795] 65 70 75 80
[1796] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[1797] 85 90 95
[1798] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[1799] 100 105 110
[1800] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[1801] 115 120 125
[1802] Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
[1803] 130 135 140
[1804] Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[1805] 145 150 155 160
[1806] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[1807] 165 170 175
[1808] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
[1809] 180 185 190
[1810] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[1811] 195 200 205
[1812] His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[1813] 210 215 220
[1814] Pro Gly
[1815] 225
[1816] <210> 88
[1817] <211> 223
[1818] <212> PRT
[1819] <213> 人工序列
[1820] <220>
[1821] <223> 杵Fc
[1822] <400> 88
[1823] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
[1824] 1 5 10 15
[1825] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[1826] 20 25 30
[1827] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
[1828] 35 40 45
[1829] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[1830] 50 55 60
[1831] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[1832] 65 70 75 80

[1833] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[1834] 85 90 95
[1835] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[1836] 100 105 110
[1837] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[1838] 115 120 125
[1839] Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
[1840] 130 135 140
[1841] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[1842] 145 150 155 160
[1843] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[1844] 165 170 175
[1845] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
[1846] 180 185 190
[1847] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[1848] 195 200 205
[1849] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[1850] 210 215 220
[1851] <210> 89
[1852] <211> 223
[1853] <212> PRT
[1854] <213> 人工序列
[1855] <220>
[1856] <223> 臼Fc
[1857] <400> 89
[1858] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
[1859] 1 5 10 15
[1860] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Arg Ser Arg
[1861] 20 25 30
[1862] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
[1863] 35 40 45
[1864] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[1865] 50 55 60
[1866] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[1867] 65 70 75 80
[1868] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[1869] 85 90 95
[1870] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[1871] 100 105 110

[1872] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
[1873] 115 120 125
[1874] Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
[1875] 130 135 140
[1876] Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[1877] 145 150 155 160
[1878] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[1879] 165 170 175
[1880] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
[1881] 180 185 190
[1882] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[1883] 195 200 205
[1884] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[1885] 210 215 220
[1886] <210> 90
[1887] <211> 226
[1888] <212> PRT
[1889] <213> 人工序列
[1890] <220>
[1891] <223> 臼Fc
[1892] <400> 90
[1893] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[1894] 1 5 10 15
[1895] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[1896] 20 25 30
[1897] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[1898] 35 40 45
[1899] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[1900] 50 55 60
[1901] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[1902] 65 70 75 80
[1903] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[1904] 85 90 95
[1905] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[1906] 100 105 110
[1907] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[1908] 115 120 125
[1909] Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
[1910] 130 135 140

[1911] Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[1912] 145 150 155 160
[1913] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[1914] 165 170 175
[1915] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
[1916] 180 185 190
[1917] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[1918] 195 200 205
[1919] His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[1920] 210 215 220
[1921] Pro Thr
[1922] 225
[1923] <210> 91
[1924] <211> 223
[1925] <212> PRT
[1926] <213> 人工序列
[1927] <220>
[1928] <223> 臼Fc
[1929] <400> 91
[1930] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
[1931] 1 5 10 15
[1932] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[1933] 20 25 30
[1934] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
[1935] 35 40 45
[1936] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[1937] 50 55 60
[1938] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[1939] 65 70 75 80
[1940] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[1941] 85 90 95
[1942] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[1943] 100 105 110
[1944] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
[1945] 115 120 125
[1946] Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
[1947] 130 135 140
[1948] Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[1949] 145 150 155 160

[1950] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[1951] 165 170 175
[1952] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
[1953] 180 185 190
[1954] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[1955] 195 200 205
[1956] Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Thr
[1957] 210 215 220
[1958] <210> 92
[1959] <211> 226
[1960] <212> PRT
[1961] <213> 人工序列
[1962] <220>
[1963] <223> 臼Fc
[1964] <400> 92
[1965] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[1966] 1 5 10 15
[1967] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[1968] 20 25 30
[1969] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[1970] 35 40 45
[1971] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[1972] 50 55 60
[1973] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[1974] 65 70 75 80
[1975] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[1976] 85 90 95
[1977] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[1978] 100 105 110
[1979] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[1980] 115 120 125
[1981] Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
[1982] 130 135 140
[1983] Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[1984] 145 150 155 160
[1985] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[1986] 165 170 175
[1987] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
[1988] 180 185 190

[1989] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[1990] 195 200 205
[1991] His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[1992] 210 215 220
[1993] Pro Gly
[1994] 225
[1995] <210> 93
[1996] <211> 223
[1997] <212> PRT
[1998] <213> 人工序列
[1999] <220>
[2000] <223> 臼Fc
[2001] <400> 93
[2002] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
[2003] 1 5 10 15
[2004] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[2005] 20 25 30
[2006] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
[2007] 35 40 45
[2008] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[2009] 50 55 60
[2010] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[2011] 65 70 75 80
[2012] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[2013] 85 90 95
[2014] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[2015] 100 105 110
[2016] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
[2017] 115 120 125
[2018] Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
[2019] 130 135 140
[2020] Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[2021] 145 150 155 160
[2022] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[2023] 165 170 175
[2024] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
[2025] 180 185 190
[2026] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[2027] 195 200 205

[2028] Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[2029] 210 215 220
[2030] <210> 94
[2031] <211> 226
[2032] <212> PRT
[2033] <213> 人工序列
[2034] <220>
[2035] <223> 杵Fc
[2036] <400> 94
[2037] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[2038] 1 5 10 15
[2039] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr
[2040] 20 25 30
[2041] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[2042] 35 40 45
[2043] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[2044] 50 55 60
[2045] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[2046] 65 70 75 80
[2047] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[2048] 85 90 95
[2049] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[2050] 100 105 110
[2051] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[2052] 115 120 125
[2053] Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
[2054] 130 135 140
[2055] Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[2056] 145 150 155 160
[2057] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[2058] 165 170 175
[2059] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
[2060] 180 185 190
[2061] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val
[2062] 195 200 205
[2063] His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[2064] 210 215 220
[2065] Pro Thr
[2066] 225

[2067] <210> 95

[2068] <211> 223

[2069] <212> PRT

[2070] <213> 人工序列

[2071] <220>

[2072] <223> 杵Fc

[2073] <400> 95

[2074] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser

[2075] 1 5 10 15

[2076] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Ser Arg

[2077] 20 25 30

[2078] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

[2079] 35 40 45

[2080] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

[2081] 50 55 60

[2082] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

[2083] 65 70 75 80

[2084] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

[2085] 85 90 95

[2086] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

[2087] 100 105 110

[2088] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

[2089] 115 120 125

[2090] Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys

[2091] 130 135 140

[2092] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

[2093] 145 150 155 160

[2094] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

[2095] 165 170 175

[2096] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

[2097] 180 185 190

[2098] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val His Glu Ala

[2099] 195 200 205

[2100] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Thr

[2101] 210 215 220

[2102] <210> 96

[2103] <211> 226

[2104] <212> PRT

[2105] <213> 人工序列

[2106] <220>

[2107] <223> 杵Fc

[2108] <400> 96

[2109] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

[2110] 1 5 10 15

[2111] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr

[2112] 20 25 30

[2113] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

[2114] 35 40 45

[2115] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

[2116] 50 55 60

[2117] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

[2118] 65 70 75 80

[2119] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

[2120] 85 90 95

[2121] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

[2122] 100 105 110

[2123] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

[2124] 115 120 125

[2125] Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

[2126] 130 135 140

[2127] Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

[2128] 145 150 155 160

[2129] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

[2130] 165 170 175

[2131] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

[2132] 180 185 190

[2133] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val

[2134] 195 200 205

[2135] His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

[2136] 210 215 220

[2137] Pro Gly

[2138] 225

[2139] <210> 97

[2140] <211> 223

[2141] <212> PRT

[2142] <213> 人工序列

[2143] <220>

[2144] <223> 杵Fc

[2145] <400> 97

[2146] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
[2147] 1 5 10 15

[2148] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Ser Arg
[2149] 20 25 30

[2150] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
[2151] 35 40 45

[2152] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[2153] 50 55 60

[2154] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[2155] 65 70 75 80

[2156] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[2157] 85 90 95

[2158] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[2159] 100 105 110

[2160] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[2161] 115 120 125

[2162] Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
[2163] 130 135 140

[2164] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[2165] 145 150 155 160

[2166] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[2167] 165 170 175

[2168] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
[2169] 180 185 190

[2170] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val His Glu Ala
[2171] 195 200 205

[2172] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[2173] 210 215 220

[2174] <210> 98

[2175] <211> 226

[2176] <212> PRT

[2177] <213> 人工序列

[2178] <220>

[2179] <223> 臼Fc

[2180] <400> 98

[2181] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[2182] 1 5 10 15

[2183] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr

[2184] 20 25 30
[2185] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[2186] 35 40 45
[2187] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[2188] 50 55 60
[2189] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[2190] 65 70 75 80
[2191] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[2192] 85 90 95
[2193] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[2194] 100 105 110
[2195] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[2196] 115 120 125
[2197] Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
[2198] 130 135 140
[2199] Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[2200] 145 150 155 160
[2201] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[2202] 165 170 175
[2203] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
[2204] 180 185 190
[2205] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val
[2206] 195 200 205
[2207] His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[2208] 210 215 220
[2209] Pro Thr
[2210] 225
[2211] <210> 99
[2212] <211> 223
[2213] <212> PRT
[2214] <213> 人工序列
[2215] <220>
[2216] <223> 臼Fc
[2217] <400> 99
[2218] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
[2219] 1 5 10 15
[2220] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Ser Arg
[2221] 20 25 30
[2222] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

[2223] 35 40 45
[2224] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[2225] 50 55 60
[2226] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[2227] 65 70 75 80
[2228] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[2229] 85 90 95
[2230] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[2231] 100 105 110
[2232] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
[2233] 115 120 125
[2234] Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
[2235] 130 135 140
[2236] Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[2237] 145 150 155 160
[2238] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[2239] 165 170 175
[2240] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
[2241] 180 185 190
[2242] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val His Glu Ala
[2243] 195 200 205
[2244] Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Thr
[2245] 210 215 220
[2246] <210> 100
[2247] <211> 226
[2248] <212> PRT
[2249] <213> 人工序列
[2250] <220>
[2251] <223> 臼Fc
[2252] <400> 100
[2253] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[2254] 1 5 10 15
[2255] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr
[2256] 20 25 30
[2257] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[2258] 35 40 45
[2259] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[2260] 50 55 60
[2261] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

[2262] 65 70 75 80
[2263] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[2264] 85 90 95
[2265] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[2266] 100 105 110
[2267] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[2268] 115 120 125
[2269] Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
[2270] 130 135 140
[2271] Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[2272] 145 150 155 160
[2273] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[2274] 165 170 175
[2275] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
[2276] 180 185 190
[2277] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val
[2278] 195 200 205
[2279] His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[2280] 210 215 220
[2281] Pro Gly
[2282] 225
[2283] <210> 101
[2284] <211> 223
[2285] <212> PRT
[2286] <213> 人工序列
[2287] <220>
[2288] <223> 臼Fc
[2289] <400> 101
[2290] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
[2291] 1 5 10 15
[2292] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Ser Arg
[2293] 20 25 30
[2294] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
[2295] 35 40 45
[2296] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[2297] 50 55 60
[2298] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[2299] 65 70 75 80
[2300] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

[2301] 85 90 95

[2302] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

[2303] 100 105 110

[2304] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu

[2305] 115 120 125

[2306] Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys

[2307] 130 135 140

[2308] Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

[2309] 145 150 155 160

[2310] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

[2311] 165 170 175

[2312] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

[2313] 180 185 190

[2314] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val His Glu Ala

[2315] 195 200 205

[2316] Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[2317] 210 215 220

[2318] <210> 102

[2319] <211> 5

[2320] <212> PRT

[2321] <213> 人工序列

[2322] <220>

[2323] <223> 肽接头

[2324] <400> 102

[2325] Pro Gly Gly Gly Gly

[2326] 1 5

[2327] <210> 103

[2328] <211> 4

[2329] <212> PRT

[2330] <213> 人工序列

[2331] <220>

[2332] <223> 肽接头

[2333] <400> 103

[2334] Gly Gly Gly Gly

[2335] 1

[2336] <210> 104

[2337] <211> 18

[2338] <212> PRT

[2339] <213> 人工序列

[2340] <220>
[2341] <223> 接头
[2342] <400> 104
[2343] Gly Pro Ala Gly Leu Gly Leu Glu Pro Asp Gly Ser Arg Gln Ala Arg
[2344] 1 5 10 15
[2345] Val Gly
[2346] <210> 105
[2347] <211> 18
[2348] <212> PRT
[2349] <213> 人工序列
[2350] <220>
[2351] <223> 接头
[2352] <400> 105
[2353] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Ile Gly Gly Ser Gly
[2354] 1 5 10 15
[2355] Gly Ser
[2356] <210> 106
[2357] <211> 18
[2358] <212> PRT
[2359] <213> 人工序列
[2360] <220>
[2361] <223> 接头
[2362] <400> 106
[2363] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Leu Glu Ala Asp Thr Gly Gly Ser Gly
[2364] 1 5 10 15
[2365] Gly Ser
[2366] <210> 107
[2367] <211> 9
[2368] <212> PRT
[2369] <213> 人工序列
[2370] <220>
[2371] <223> 接头
[2372] <400> 107
[2373] Gly Ser Ile Glu Pro Asp Ile Gly Ser
[2374] 1 5
[2375] <210> 108
[2376] <211> 9
[2377] <212> PRT
[2378] <213> 人工序列

[2379] <220>
[2380] <223> 接头
[2381] <400> 108
[2382] Gly Ser Leu Glu Ala Asp Thr Gly Ser
[2383] 1 5
[2384] <210> 109
[2385] <211> 18
[2386] <212> PRT
[2387] <213> 人工序列
[2388] <220>
[2389] <223> 接头
[2390] <400> 109
[2391] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Gly Gly Gly Ser Gly
[2392] 1 5 10 15
[2393] Gly Ser
[2394] <210> 110
[2395] <211> 18
[2396] <212> PRT
[2397] <213> 人工序列
[2398] <220>
[2399] <223> 接头
[2400] <400> 110
[2401] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Val Gly Gly Ser Gly
[2402] 1 5 10 15
[2403] Gly Ser
[2404] <210> 111
[2405] <211> 18
[2406] <212> PRT
[2407] <213> 人工序列
[2408] <220>
[2409] <223> 接头
[2410] <400> 111
[2411] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Ser Gly Gly Ser Gly
[2412] 1 5 10 15
[2413] Gly Ser
[2414] <210> 112
[2415] <211> 18
[2416] <212> PRT
[2417] <213> 人工序列

[2418] <220>
[2419] <223> 接头
[2420] <400> 112
[2421] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Thr Gly Gly Ser Gly
[2422] 1 5 10 15
[2423] Gly Ser
[2424] <210> 113
[2425] <211> 12
[2426] <212> PRT
[2427] <213> 人工序列
[2428] <220>
[2429] <223> 接头
[2430] <400> 113
[2431] Gly Gly Gly Ser Leu Glu Pro Asp Gly Ser Gly Ser
[2432] 1 5 10
[2433] <210> 114
[2434] <211> 18
[2435] <212> PRT
[2436] <213> 人工序列
[2437] <220>
[2438] <223> 接头
[2439] <400> 114
[2440] Gly Pro Ala Gly Leu Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Arg Gln Ala Arg
[2441] 1 5 10 15
[2442] Val Gly
[2443] <210> 115
[2444] <211> 15
[2445] <212> PRT
[2446] <213> 人工序列
[2447] <220>
[2448] <223> 接头
[2449] <400> 115
[2450] Gly Gly Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
[2451] 1 5 10 15
[2452] <210> 116
[2453] <211> 18
[2454] <212> PRT
[2455] <213> 人工序列
[2456] <220>

[2457] <223> 接头

[2458] <400> 116

[2459] Gly Ser Ser Ala Gly Ser Glu Ala Gly Gly Ser Gly Gln Ala Gly Val

[2460] 1 5 10 15

[2461] Gly Ser

[2462] <210> 117

[2463] <211> 18

[2464] <212> PRT

[2465] <213> 人工序列

[2466] <220>

[2467] <223> 接头

[2468] <400> 117

[2469] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Leu Glu Ala Glu Gly Ser Gly Gly Gly

[2470] 1 5 10 15

[2471] Gly Ser

[2472] <210> 118

[2473] <211> 18

[2474] <212> PRT

[2475] <213> 人工序列

[2476] <220>

[2477] <223> 接头

[2478] <400> 118

[2479] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Pro Gly Gly Ser Gly

[2480] 1 5 10 15

[2481] Gly Ser

[2482] <210> 119

[2483] <211> 18

[2484] <212> PRT

[2485] <213> 人工序列

[2486] <220>

[2487] <223> 接头

[2488] <400> 119

[2489] Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

[2490] 1 5 10 15

[2491] Gly Ser

[2492] <210> 120

[2493] <211> 129

[2494] <212> PRT

[2495] <213> 人工序列

[2496] <220>

[2497] <223> FRαsdAb

[2498] <400> 120

[2499] Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[2500] 1 5 10 15

[2501] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asn Tyr

[2502] 20 25 30

[2503] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

[2504] 35 40 45

[2505] Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[2506] 50 55 60

[2507] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Lys Gly Thr Val Tyr

[2508] 65 70 75 80

[2509] Leu Leu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[2510] 85 90 95

[2511] Ala Thr Glu Leu Val Pro Ala Cys Thr Tyr Ser Asn Gly Arg Gly Pro

[2512] 100 105 110

[2513] Leu Asp Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Lys

[2514] 115 120 125

[2515] Pro

[2516] <210> 121

[2517] <211> 119

[2518] <212> PRT

[2519] <213> 人工序列

[2520] <220>

[2521] <223> FRαsdAb

[2522] <400> 121

[2523] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly

[2524] 1 5 10 15

[2525] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asp

[2526] 20 25 30

[2527] Ala Thr Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

[2528] 35 40 45

[2529] Ala Ile Ile Thr Ser Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Pro Glu Ser Val Lys

[2530] 50 55 60

[2531] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu

[2532] 65 70 75 80

[2533] Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn

[2534] 85 90 95

[2535] Ala Ile Thr Arg Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Asp Phe Trp Gly Gln Gly
[2536] 100 105 110
[2537] Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
[2538] 115
[2539] <210> 122
[2540] <211> 101
[2541] <212> PRT
[2542] <213> 人工序列
[2543] <220>
[2544] <223> FRαsdAb
[2545] <400> 122
[2546] Glu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu
[2547] 1 5 10 15
[2548] Thr Phe Gly Val Val Phe Thr Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly
[2549] 20 25 30
[2550] Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Val Thr Gly Thr Asp Thr Val Asp
[2551] 35 40 45
[2552] Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Phe Ala
[2553] 50 55 60
[2554] Arg Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
[2555] 65 70 75 80
[2556] Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
[2557] 85 90 95
[2558] Val Thr Val Lys Pro
[2559] 100
[2560] <210> 123
[2561] <211> 125
[2562] <212> PRT
[2563] <213> 人工序列
[2564] <220>
[2565] <223> cMET sdAb
[2566] <400> 123
[2567] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[2568] 1 5 10 15
[2569] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Leu Asp Tyr Tyr
[2570] 20 25 30
[2571] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
[2572] 35 40 45
[2573] Leu Cys Ile Asp Ala Ser Asp Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[2574] 50 55 60

[2575] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr

[2576] 65 70 75 80

[2577] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys

[2578] 85 90 95

[2579] Ala Thr Pro Ile Gly Leu Ser Ser Ser Cys Leu Leu Glu Tyr Asp Tyr

[2580] 100 105 110

[2581] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro

[2582] 115 120 125

[2583] <210> 124

[2584] <211> 245

[2585] <212> PRT

[2586] <213> 人工序列

[2587] <220>

[2588] <223> B7H3 scFv

[2589] <400> 124

[2590] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[2591] 1 5 10 15

[2592] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

[2593] 20 25 30

[2594] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[2595] 35 40 45

[2596] Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

[2597] 50 55 60

[2598] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

[2599] 65 70 75 80

[2600] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[2601] 85 90 95

[2602] Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp

[2603] 100 105 110

[2604] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[2605] 115 120 125

[2606] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln

[2607] 130 135 140

[2608] Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr

[2609] 145 150 155 160

[2610] Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln

[2611] 165 170 175

[2612] Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg

[2613] 180 185 190
[2614] Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
[2615] 195 200 205
[2616] Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
[2617] 210 215 220
[2618] Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr
[2619] 225 230 235 240
[2620] Lys Leu Glu Ile Lys
[2621] 245
[2622] <210> 125
[2623] <211> 247
[2624] <212> PRT
[2625] <213> 人工序列
[2626] <220>
[2627] <223> CD20 scFv
[2628] <400> 125
[2629] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[2630] 1 5 10 15
[2631] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
[2632] 20 25 30
[2633] Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[2634] 35 40 45
[2635] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
[2636] 50 55 60
[2637] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[2638] 65 70 75 80
[2639] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2640] 85 90 95
[2641] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[2642] 100 105 110
[2643] Thr Leu Val Thr Val Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
[2644] 115 120 125
[2645] Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu
[2646] 130 135 140
[2647] Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser
[2648] 145 150 155 160
[2649] Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr
[2650] 165 170 175
[2651] Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser

[2652] 180 185 190
[2653] Asn Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
[2654] 195 200 205
[2655] Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
[2656] 210 215 220
[2657] Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
[2658] 225 230 235 240
[2659] Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[2660] 245
[2661] <210> 126
[2662] <211> 241
[2663] <212> PRT
[2664] <213> 人工序列
[2665] <220>
[2666] <223> DLL3 scFv
[2667] <400> 126
[2668] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
[2669] 1 5 10 15
[2670] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
[2671] 20 25 30
[2672] Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[2673] 35 40 45
[2674] Gly Tyr Val Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
[2675] 50 55 60
[2676] Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
[2677] 65 70 75 80
[2678] Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[2679] 85 90 95
[2680] Ser Ile Ala Val Thr Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[2681] 100 105 110
[2682] Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[2683] 115 120 125
[2684] Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
[2685] 130 135 140
[2686] Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
[2687] 145 150 155 160
[2688] Arg Val Asn Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
[2689] 165 170 175
[2690] Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile

[2691] 180 185 190
[2692] Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[2693] 195 200 205
[2694] Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
[2695] 210 215 220
[2696] Tyr Asp Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[2697] 225 230 235 240
[2698] Lys
[2699] <210> 127
[2700] <211> 225
[2701] <212> PRT
[2702] <213> 人工序列
[2703] <220>
[2704] <223> B7H3 Fd
[2705] <400> 127
[2706] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[2707] 1 5 10 15
[2708] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
[2709] 20 25 30
[2710] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2711] 35 40 45
[2712] Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
[2713] 50 55 60
[2714] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[2715] 65 70 75 80
[2716] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2717] 85 90 95
[2718] Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
[2719] 100 105 110
[2720] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[2721] 115 120 125
[2722] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
[2723] 130 135 140
[2724] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[2725] 145 150 155 160
[2726] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[2727] 165 170 175
[2728] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[2729] 180 185 190

[2730] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
[2731] 195 200 205
[2732] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
[2733] 210 215 220
[2734] Cys
[2735] 225
[2736] <210> 128
[2737] <211> 214
[2738] <212> PRT
[2739] <213> 人工序列
[2740] <220>
[2741] <223> B7H3 LC
[2742] <400> 128
[2743] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
[2744] 1 5 10 15
[2745] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
[2746] 20 25 30
[2747] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
[2748] 35 40 45
[2749] Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[2750] 50 55 60
[2751] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[2752] 65 70 75 80
[2753] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
[2754] 85 90 95
[2755] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[2756] 100 105 110
[2757] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[2758] 115 120 125
[2759] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[2760] 130 135 140
[2761] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[2762] 145 150 155 160
[2763] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[2764] 165 170 175
[2765] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[2766] 180 185 190
[2767] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[2768] 195 200 205

[2769] Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[2770] 210
[2771] <210> 129
[2772] <211> 225
[2773] <212> PRT
[2774] <213> 人工序列
[2775] <220>
[2776] <223> 5T4 Fd
[2777] <400> 129
[2778] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
[2779] 1 5 10 15
[2780] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
[2781] 20 25 30
[2782] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2783] 35 40 45
[2784] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[2785] 50 55 60
[2786] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
[2787] 65 70 75 80
[2788] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
[2789] 85 90 95
[2790] Tyr Cys Val Arg Gln Trp Asp Tyr Asp Val Arg Ala Met Asn Tyr Trp
[2791] 100 105 110
[2792] Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[2793] 115 120 125
[2794] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
[2795] 130 135 140
[2796] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[2797] 145 150 155 160
[2798] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[2799] 165 170 175
[2800] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[2801] 180 185 190
[2802] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
[2803] 195 200 205
[2804] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
[2805] 210 215 220
[2806] Cys
[2807] 225

[2808] <210> 130
[2809] <211> 214
[2810] <212> PRT
[2811] <213> 人工序列
[2812] <220>
[2813] <223> 5T4 LC
[2814] <400> 130
[2815] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Ile Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
[2816] 1 5 10 15
[2817] Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ala
[2818] 20 25 30
[2819] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
[2820] 35 40 45
[2821] Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Leu Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
[2822] 50 55 60
[2823] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
[2824] 65 70 75 80
[2825] Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
[2826] 85 90 95
[2827] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[2828] 100 105 110
[2829] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[2830] 115 120 125
[2831] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[2832] 130 135 140
[2833] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[2834] 145 150 155 160
[2835] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[2836] 165 170 175
[2837] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[2838] 180 185 190
[2839] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[2840] 195 200 205
[2841] Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[2842] 210
[2843] <210> 131
[2844] <211> 222
[2845] <212> PRT
[2846] <213> 人工序列

[2847] <220>

[2848] <223> gpNMB Fd

[2849] <400> 131

[2850] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

[2851] 1 5 10 15

[2852] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Phe

[2853] 20 25 30

[2854] Asn Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu

[2855] 35 40 45

[2856] Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Asn Pro Ser

[2857] 50 55 60

[2858] Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

[2859] 65 70 75 80

[2860] Ser Leu Thr Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

[2861] 85 90 95

[2862] Cys Ala Arg Gly Tyr Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

[2863] 100 105 110

[2864] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

[2865] 115 120 125

[2866] Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

[2867] 130 135 140

[2868] Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

[2869] 145 150 155 160

[2870] Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

[2871] 165 170 175

[2872] Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

[2873] 180 185 190

[2874] Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

[2875] 195 200 205

[2876] Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

[2877] 210 215 220

[2878] <210> 132

[2879] <211> 215

[2880] <212> PRT

[2881] <213> 人工序列

[2882] <220>

[2883] <223> gpNMB LC

[2884] <400> 132

[2885] Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

[2886] 1 5 10 15
[2887] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asn Asn
[2888] 20 25 30
[2889] Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
[2890] 35 40 45
[2891] Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
[2892] 50 55 60
[2893] Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
[2894] 65 70 75 80
[2895] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro
[2896] 85 90 95
[2897] Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
[2898] 100 105 110
[2899] Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
[2900] 115 120 125
[2901] Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
[2902] 130 135 140
[2903] Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
[2904] 145 150 155 160
[2905] Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
[2906] 165 170 175
[2907] Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
[2908] 180 185 190
[2909] Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
[2910] 195 200 205
[2911] Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[2912] 210 215
[2913] <210> 133
[2914] <211> 223
[2915] <212> PRT
[2916] <213> 人工序列
[2917] <220>
[2918] <223> DLL3 Fd
[2919] <400> 133
[2920] Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
[2921] 1 5 10 15
[2922] Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
[2923] 20 25 30
[2924] Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

[2925] 35 40 45
[2926] Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
[2927] 50 55 60
[2928] Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Ser
[2929] 65 70 75 80
[2930] Leu Gln Ile Ile Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
[2931] 85 90 95
[2932] Ala Arg Ile Gly Asp Ser Ser Pro Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[2933] 100 105 110
[2934] Thr Leu Thr Val Ser Ser Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
[2935] 115 120 125
[2936] Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
[2937] 130 135 140
[2938] Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
[2939] 145 150 155 160
[2940] Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
[2941] 165 170 175
[2942] Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
[2943] 180 185 190
[2944] Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
[2945] 195 200 205
[2946] Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
[2947] 210 215 220
[2948] <210> 134
[2949] <211> 214
[2950] <212> PRT
[2951] <213> 人工序列
[2952] <220>
[2953] <223> DLL3 LC
[2954] <400> 134
[2955] Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
[2956] 1 5 10 15
[2957] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
[2958] 20 25 30
[2959] Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
[2960] 35 40 45
[2961] Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ala Gly
[2962] 50 55 60
[2963] Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Ser Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala

[2964] 65 70 75 80
[2965] Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Trp
[2966] 85 90 95
[2967] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala
[2968] 100 105 110
[2969] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[2970] 115 120 125
[2971] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[2972] 130 135 140
[2973] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[2974] 145 150 155 160
[2975] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[2976] 165 170 175
[2977] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[2978] 180 185 190
[2979] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[2980] 195 200 205
[2981] Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[2982] 210
[2983] <210> 135
[2984] <211> 6
[2985] <212> PRT
[2986] <213> 人工序列
[2987] <220>
[2988] <223> 接头
[2989] <400> 135
[2990] Gly Gly Gly Gly Gly Ser
[2991] 1 5
[2992] <210> 136
[2993] <211> 5
[2994] <212> PRT
[2995] <213> 人工序列
[2996] <220>
[2997] <223> 接头
[2998] <400> 136
[2999] Ile Glu Pro Asp Ile
[3000] 1 5
[3001] <210> 137
[3002] <211> 5

[3003] <212> PRT
[3004] <213> 人工序列
[3005] <220>
[3006] <223> 接头
[3007] <400> 137
[3008] Leu Glu Ala Asp Thr
[3009] 1 5
[3010] <210> 138
[3011] <211> 5
[3012] <212> PRT
[3013] <213> 人工序列
[3014] <220>
[3015] <223> 接头
[3016] <400> 138
[3017] Ile Glu Pro Asp Gly
[3018] 1 5
[3019] <210> 139
[3020] <211> 5
[3021] <212> PRT
[3022] <213> 人工序列
[3023] <220>
[3024] <223> 接头
[3025] <400> 139
[3026] Ile Glu Pro Asp Val
[3027] 1 5
[3028] <210> 140
[3029] <211> 5
[3030] <212> PRT
[3031] <213> 人工序列
[3032] <220>
[3033] <223> 接头
[3034] <400> 140
[3035] Ile Glu Pro Asp Ser
[3036] 1 5
[3037] <210> 141
[3038] <211> 5
[3039] <212> PRT
[3040] <213> 人工序列
[3041] <220>

[3042] <223> 接头
[3043] <400> 141
[3044] Ile Glu Pro Asp Thr
[3045] 1 5
[3046] <210> 142
[3047] <211> 4
[3048] <212> PRT
[3049] <213> 人工序列
[3050] <220>
[3051] <223> 接头
[3052] <400> 142
[3053] Leu Glu Pro Asp
[3054] 1
[3055] <210> 143
[3056] <211> 4
[3057] <212> PRT
[3058] <213> 人工序列
[3059] <220>
[3060] <223> 接头
[3061] <400> 143
[3062] Leu Glu Ala Glu
[3063] 1
[3064] <210> 144
[3065] <211> 5
[3066] <212> PRT
[3067] <213> 人工序列
[3068] <220>
[3069] <223> 接头
[3070] <400> 144
[3071] Ile Glu Pro Asp Pro
[3072] 1 5
[3073] <210> 145
[3074] <211> 274
[3075] <212> PRT
[3076] <213> 人工序列
[3077] <220>
[3078] <223> B7-H3 x CD3双特异性DART-A双抗体的第二多肽链
[3079] <400> 145
[3080] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

[3081] 1 5 10 15
[3082] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[3083] 20 25 30
[3084] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
[3085] 35 40 45
[3086] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
[3087] 50 55 60
[3088] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
[3089] 65 70 75 80
[3090] Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[3091] 85 90 95
[3092] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
[3093] 100 105 110
[3094] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
[3095] 115 120 125
[3096] Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
[3097] 130 135 140
[3098] Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
[3099] 145 150 155 160
[3100] Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile
[3101] 165 170 175
[3102] Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
[3103] 180 185 190
[3104] Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp
[3105] 195 200 205
[3106] Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly
[3107] 210 215 220
[3108] Ser Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[3109] 225 230 235 240
[3110] Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala
[3111] 245 250 255
[3112] Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
[3113] 260 265 270
[3114] Lys Glu
[3115] <210> 146
[3116] <211> 227
[3117] <212> PRT
[3118] <213> 人工序列
[3119] <220>

[3120] <223> B7-H3 x CD3双特异性DART-A双抗体的第三多肽链

[3121] <400> 146

[3122] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

[3123] 1 5 10 15

[3124] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

[3125] 20 25 30

[3126] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

[3127] 35 40 45

[3128] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

[3129] 50 55 60

[3130] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

[3131] 65 70 75 80

[3132] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

[3133] 85 90 95

[3134] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

[3135] 100 105 110

[3136] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

[3137] 115 120 125

[3138] Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

[3139] 130 135 140

[3140] Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

[3141] 145 150 155 160

[3142] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

[3143] 165 170 175

[3144] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

[3145] 180 185 190

[3146] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

[3147] 195 200 205

[3148] His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

[3149] 210 215 220

[3150] Pro Gly Lys

[3151] 225

[3152] <210> 147

[3153] <211> 18

[3154] <212> PRT

[3155] <213> 人工序列

[3156] <220>

[3157] <223> 接头

[3158] <400> 147

[3159] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
[3160] 1 5 10 15
[3161] Gly Ser
[3162] <210> 148
[3163] <211> 19
[3164] <212> PRT
[3165] <213> 人工序列
[3166] <220>
[3167] <223> 接头
[3168] <400> 148
[3169] Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Ile Gly Gly Ser
[3170] 1 5 10 15
[3171] Gly Gly Ser
[3172] <210> 149
[3173] <211> 5
[3174] <212> PRT
[3175] <213> 人工序列
[3176] <220>
[3177] <223> 接头
[3178] <400> 149
[3179] Gly Gly Gly Gly Ser
[3180] 1 5
[3181] <210> 150
[3182] <211> 5
[3183] <212> PRT
[3184] <213> 人工序列
[3185] <220>
[3186] <223> 共有接头
[3187] <220>
[3188] <221> 变体
[3189] <222> (1)..(1)
[3190] <223> X1= I, L, Y, M, F, V,或A
[3191] <220>
[3192] <221> 变体
[3193] <222> (2)..(2)
[3194] <223> X2 = A, G, S, V, E, D, Q, N,或Y
[3195] <220>
[3196] <221> 变体
[3197] <222> (3)..(3)

[3198] <223> X3 = H, P, A, V, G, S,或T

[3199] <220>

[3200] <221> 变体

[3201] <222> (4)..(4)

[3202] <223> X4 = D或E

[3203] <220>

[3204] <221> 变体

[3205] <222> (5)..(5)

[3206] <223> X5 = I, L, Y, M, F, V, T, S, G或A

[3207] <400> 150

[3208] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

[3209] 1 5

[3210] <210> 151

[3211] <211> 5

[3212] <212> PRT

[3213] <213> 人工序列

[3214] <220>

[3215] <223> 共有接头

[3216] <220>

[3217] <221> 变体

[3218] <222> (1)..(1)

[3219] <223> X1 = I或L

[3220] <220>

[3221] <221> 变体

[3222] <222> (3)..(3)

[3223] <223> X3 = P或A

[3224] <220>

[3225] <221> 变体

[3226] <222> (5)..(5)

[3227] <223> X5 = I, V, T, S,或G

[3228] <400> 151

[3229] Xaa Glu Xaa Asp Xaa

[3230] 1 5

[3231] <210> 152

[3232] <211> 5

[3233] <212> PRT

[3234] <213> 人工序列

[3235] <220>

[3236] <223> 接头

[3237] <400> 152
[3238] Leu Glu Pro Asp Gly
[3239] 1 5
[3240] <210> 153
[3241] <211> 5
[3242] <212> PRT
[3243] <213> 人工序列
[3244] <220>
[3245] <223> 接头
[3246] <400> 153
[3247] Leu Glu Ala Asp Gly
[3248] 1 5
[3249] <210> 154
[3250] <211> 5
[3251] <212> PRT
[3252] <213> 人工序列
[3253] <220>
[3254] <223> 共有接头
[3255] <220>
[3256] <221> 变体
[3257] <222> (1)..(1)
[3258] <223> X1 = 任何氨基酸
[3259] <220>
[3260] <221> 变体
[3261] <222> (5)..(5)
[3262] <223> X5 = A或V
[3263] <400> 154
[3264] Xaa Gln Ala Arg Xaa
[3265] 1 5
[3266] <210> 155
[3267] <211> 5
[3268] <212> PRT
[3269] <213> 人工序列
[3270] <220>
[3271] <223> 共有接头
[3272] <220>
[3273] <221> 变体
[3274] <222> (5)..(5)
[3275] <223> X5 = A或V

[3276] <400> 155
[3277] Arg Gln Ala Arg Xaa
[3278] 1 5
[3279] <210> 156
[3280] <211> 5
[3281] <212> PRT
[3282] <213> 人工序列
[3283] <220>
[3284] <223> 接头
[3285] <400> 156
[3286] Arg Gln Ala Arg Val
[3287] 1 5
[3288] <210> 157
[3289] <211> 4
[3290] <212> PRT
[3291] <213> 人工序列
[3292] <220>
[3293] <223> 共有接头
[3294] <220>
[3295] <221> 变体
[3296] <222> (1)..(1)
[3297] <223> X1 = P, V或A
[3298] <220>
[3299] <221> 变体
[3300] <222> (2)..(2)
[3301] <223> X2 = Q或D
[3302] <220>
[3303] <221> 变体
[3304] <222> (3)..(3)
[3305] <223> X3 = A或N
[3306] <220>
[3307] <221> 变体
[3308] <222> (4)..(4)
[3309] <223> X4 = L, I或M
[3310] <400> 157
[3311] Xaa Xaa Xaa Xaa
[3312] 1
[3313] <210> 158
[3314] <211> 4

[3315] <212> PRT
[3316] <213> 人工序列
[3317] <220>
[3318] <223> 共有接头
[3319] <220>
[3320] <221> 变体
[3321] <222> (2)..(2)
[3322] <223> X2 = Q或D
[3323] <220>
[3324] <221> 变体
[3325] <222> (3)..(3)
[3326] <223> X3 = A或N
[3327] <220>
[3328] <221> 变体
[3329] <222> (4)..(4)
[3330] <223> X4 = L或I
[3331] <400> 158
[3332] Pro Xaa Xaa Xaa
[3333] 1
[3334] <210> 159
[3335] <211> 22
[3336] <212> PRT
[3337] <213> 人工序列
[3338] <220>
[3339] <223> P2A
[3340] <400> 159
[3341] Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
[3342] 1 5 10 15
[3343] Glu Glu Asn Pro Gly Pro
[3344] 20
[3345] <210> 160
[3346] <211> 19
[3347] <212> PRT
[3348] <213> 人工序列
[3349] <220>
[3350] <223> P2A
[3351] <400> 160
[3352] Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn
[3353] 1 5 10 15

[3354] Pro Gly Pro
[3355] <210> 161
[3356] <211> 20
[3357] <212> PRT
[3358] <213> 人工序列
[3359] <220>
[3360] <223> E2A
[3361] <400> 161
[3362] Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
[3363] 1 5 10 15
[3364] Asn Pro Gly Pro
[3365] 20
[3366] <210> 162
[3367] <211> 22
[3368] <212> PRT
[3369] <213> 人工序列
[3370] <220>
[3371] <223> F2A
[3372] <400> 162
[3373] Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val
[3374] 1 5 10 15
[3375] Glu Ser Asn Pro Gly Pro
[3376] 20
[3377] <210> 163
[3378] <211> 18
[3379] <212> PRT
[3380] <213> 人工序列
[3381] <220>
[3382] <223> T2A
[3383] <400> 163
[3384] Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
[3385] 1 5 10 15
[3386] Gly Pro
[3387] <210> 164
[3388] <211> 24
[3389] <212> PRT
[3390] <213> 人工序列
[3391] <220>
[3392] <223> T2A

[3393] <400> 164
[3394] Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp
[3395] 1 5 10 15
[3396] Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg
[3397] 20
[3398] <210> 165
[3399] <211> 66
[3400] <212> DNA
[3401] <213> 人工序列
[3402] <220>
[3403] <223> P2A
[3404] <400> 165
[3405] ggatctggag caacaaactt ctcactactc aaacaagcag gtgacgtgga ggagaatccc 60
[3406] ggaccc 66
[3407] <210> 166
[3408] <211> 18
[3409] <212> PRT
[3410] <213> 人工序列
[3411] <220>
[3412] <223> 接头
[3413] <400> 166
[3414] Gly Ser Pro Ala Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Arg Gln Ala Arg Val
[3415] 1 5 10 15
[3416] Gly Ser
[3417] <210> 167
[3418] <211> 122
[3419] <212> PRT
[3420] <213> 小家鼠(Mus musculus)
[3421] <220>
[3422] <221> MISC_FEATURE
[3423] <223> 抗-5T4 VH
[3424] <220>
[3425] <221> misc_feature
[3426] <222> (97)..(97)
[3427] <223> Xaa可以是任何天然氨基酸
[3428] <400> 167
[3429] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
[3430] 1 5 10 15
[3431] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

[3432] 20 25 30
[3433] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[3434] 35 40 45
[3435] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[3436] 50 55 60
[3437] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
[3438] 65 70 75 80
[3439] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
[3440] 85 90 95
[3441] Xaa Cys Val Arg Gln Trp Asp Tyr Asp Val Arg Ala Met Asn Tyr Trp
[3442] 100 105 110
[3443] Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[3444] 115 120
[3445] <210> 168
[3446] <211> 107
[3447] <212> PRT
[3448] <213> 小家鼠(Mus musculus)
[3449] <220>
[3450] <221> MISC_FEATURE
[3451] <223> 抗-5T4 VL
[3452] <400> 168
[3453] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Ile Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
[3454] 1 5 10 15
[3455] Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ala
[3456] 20 25 30
[3457] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
[3458] 35 40 45
[3459] Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Leu Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
[3460] 50 55 60
[3461] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
[3462] 65 70 75 80
[3463] Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
[3464] 85 90 95
[3465] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[3466] 100 105
[3467] <210> 169
[3468] <211> 504
[3469] <212> PRT
[3470] <213> 人工序列

[3471] <220>

[3472] <223> B7-H3 x CD3双特异性DART-A双抗体的第一多肽链

[3473] <400> 169

[3474] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

[3475] 1 5 10 15

[3476] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn

[3477] 20 25 30

[3478] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile

[3479] 35 40 45

[3480] Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[3481] 50 55 60

[3482] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[3483] 65 70 75 80

[3484] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe

[3485] 85 90 95

[3486] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly

[3487] 100 105 110

[3488] Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

[3489] 115 120 125

[3490] Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

[3491] 130 135 140

[3492] Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

[3493] 145 150 155 160

[3494] Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr

[3495] 165 170 175

[3496] Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser

[3497] 180 185 190

[3498] Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr

[3499] 195 200 205

[3500] Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val

[3501] 210 215 220

[3502] Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[3503] 225 230 235 240

[3504] Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala

[3505] 245 250 255

[3506] Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu

[3507] 260 265 270

[3508] Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

[3509] 275 280 285

[3510] Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
[3511] 290 295 300
[3512] Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
[3513] 305 310 315 320
[3514] Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
[3515] 325 330 335
[3516] Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
[3517] 340 345 350
[3518] Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
[3519] 355 360 365
[3520] Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
[3521] 370 375 380
[3522] Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
[3523] 385 390 395 400
[3524] Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
[3525] 405 410 415
[3526] Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
[3527] 420 425 430
[3528] Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
[3529] 435 440 445
[3530] Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
[3531] 450 455 460
[3532] Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
[3533] 465 470 475 480
[3534] Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
[3535] 485 490 495
[3536] Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[3537] 500
[3538] <210> 170
[3539] <211> 15
[3540] <212> PRT
[3541] <213> 人工序列
[3542] <220>
[3543] <223> 接头
[3544] <400> 170
[3545] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[3546] 1 5 10 15
[3547] <210> 171
[3548] <211> 6

[3549] <212> PRT
[3550] <213> 人工序列
[3551] <220>
[3552] <223> 接头
[3553] <220>
[3554] <221> 重复
[3555] <222> (4)..(6)
[3556] <223> 重复0至10次
[3557] <400> 171
[3558] Gly Gly Ser Gly Gly Ser
[3559] 1 5
[3560] <210> 172
[3561] <211> 6
[3562] <212> PRT
[3563] <213> 人工序列
[3564] <220>
[3565] <223> 接头
[3566] <220>
[3567] <221> 重复
[3568] <222> (1)..(6)
[3569] <223> 重复1至4次
[3570] <400> 172
[3571] Gly Gly Gly Gly Gly Ser
[3572] 1 5
[3573] <210> 173
[3574] <211> 5
[3575] <212> PRT
[3576] <213> 人工序列
[3577] <220>
[3578] <223> 接头
[3579] <220>
[3580] <221> 重复
[3581] <222> (1)..(5)
[3582] <223> 重复1至5次
[3583] <400> 173
[3584] Gly Gly Gly Gly Ser
[3585] 1 5
[3586] <210> 174
[3587] <211> 5

[3588] <212> PRT
[3589] <213> 人工序列
[3590] <220>
[3591] <223> 接头
[3592] <220>
[3593] <221> 重复
[3594] <222> (1)..(1)
[3595] <223> 重复1至5次
[3596] <220>
[3597] <221> 变体
[3598] <222> (2)..(2)
[3599] <223> X2= A, V, L, I, M, F, W, P, G, S, T, C, Y, N, Q, K, R, H, D,或E
[3600] <220>
[3601] <221> 重复
[3602] <222> (3)..(3)
[3603] <223> 重复1至5次
[3604] <220>
[3605] <221> 变体
[3606] <222> (4)..(4)
[3607] <223> X4 = A, V, L, I, M, F, W, P, G, S, T, C, Y, N, Q, K, R, H, D,或E
[3608] <220>
[3609] <221> 重复
[3610] <222> (5)..(5)
[3611] <223> 重复1至5次
[3612] <400> 174
[3613] Gly Xaa Gly Xaa Gly
[3614] 1 5
[3615] <210> 175
[3616] <211> 11
[3617] <212> PRT
[3618] <213> 人工序列
[3619] <220>
[3620] <223> 接头
[3621] <220>
[3622] <221> 变体
[3623] <222> (4)..(4)
[3624] <223> X4 = A, V, L, I, M, F, W, P, G, S, T, C, Y, N, Q, K, R, H, D,或E

[3625] <220>

[3626] <221> 变体

[3627] <222> (8)..(8)

[3628] <223> X8 = A, V, L, I, M, F, W, P, G, S, T, C, Y, N, Q, K, R, H, D,或E

[3629] <400> 175

[3630] Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Gly

[3631] 1 5 10

[3632] <210> 176

[3633] <211> 11

[3634] <212> PRT

[3635] <213> 人工序列

[3636] <220>

[3637] <223> 接头

[3638] <400> 176

[3639] Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr

[3640] 1 5 10

[3641] <210> 177

[3642] <211> 11

[3643] <212> PRT

[3644] <213> 人工序列

[3645] <220>

[3646] <223> 接头

[3647] <400> 177

[3648] Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Gly

[3649] 1 5 10

[3650] <210> 178

[3651] <211> 5

[3652] <212> PRT

[3653] <213> 人工序列

[3654] <220>

[3655] <223> 接头

[3656] <220>

[3657] <221> 重复

[3658] <222> (1)..(5)

[3659] <223> 重复2至20次

[3660] <400> 178

[3661] Glu Ala Ala Ala Lys

[3662] 1 5

[3663] <210> 179
[3664] <211> 6
[3665] <212> PRT
[3666] <213> 人工序列
[3667] <220>
[3668] <223> 接头
[3669] <220>
[3670] <221> 重复
[3671] <222> (3)..(4)
[3672] <223> 重复2至20次
[3673] <400> 179
[3674] Ala Ser Ala Pro Gly Thr
[3675] 1 5
[3676] <210> 180
[3677] <211> 9
[3678] <212> PRT
[3679] <213> 人工序列
[3680] <220>
[3681] <223> 接头
[3682] <220>
[3683] <221> 重复
[3684] <222> (3)..(7)
[3685] <223> 重复2至20次
[3686] <400> 180
[3687] Ala Ser Glu Ala Ala Ala Lys Gly Thr
[3688] 1 5
[3689] <210> 181
[3690] <211> 5
[3691] <212> PRT
[3692] <213> 人工序列
[3693] <220>
[3694] <223> 接头
[3695] <220>
[3696] <221> 重复
[3697] <222> (1)..(5)
[3698] <223> 重复2至20次
[3699] <400> 181
[3700] Gly Gly Gly Gly Ala
[3701] 1 5

[3702] <210> 182
[3703] <211> 5
[3704] <212> PRT
[3705] <213> 人工序列
[3706] <220>
[3707] <223> 接头
[3708] <220>
[3709] <221> 重复
[3710] <222> (1)..(5)
[3711] <223> 重复2至20次
[3712] <400> 182
[3713] Pro Gly Gly Gly Ser
[3714] 1 5
[3715] <210> 183
[3716] <211> 5
[3717] <212> PRT
[3718] <213> 人工序列
[3719] <220>
[3720] <223> 接头
[3721] <220>
[3722] <221> 重复
[3723] <222> (1)..(5)
[3724] <223> 重复2至20次
[3725] <400> 183
[3726] Ala Gly Gly Gly Ser
[3727] 1 5
[3728] <210> 184
[3729] <211> 20
[3730] <212> PRT
[3731] <213> 人工序列
[3732] <220>
[3733] <223> 接头
[3734] <220>
[3735] <221> 重复
[3736] <222> (4)..(17)
[3737] <223> 重复2至20次
[3738] <400> 184
[3739] Gly Gly Ser Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser
[3740] 1 5 10 15

[3741] Thr Gly Gly Ser
[3742] 20
[3743] <210> 185
[3744] <211> 5
[3745] <212> PRT
[3746] <213> 人工序列
[3747] <220>
[3748] <223> 接头
[3749] <220>
[3750] <221> 重复
[3751] <222> (1)..(5)
[3752] <223> 重复1至9次
[3753] <400> 185
[3754] Ser Ser Ser Ser Gly
[3755] 1 5
[3756] <210> 186
[3757] <211> 9
[3758] <212> PRT
[3759] <213> 人工序列
[3760] <220>
[3761] <223> 接头
[3762] <400> 186
[3763] Ser Ser Ser Ala Ser Ala Ser Ser Ala
[3764] 1 5
[3765] <210> 187
[3766] <211> 7
[3767] <212> PRT
[3768] <213> 人工序列
[3769] <220>
[3770] <223> 接头
[3771] <400> 187
[3772] Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly
[3773] 1 5
[3774] <210> 188
[3775] <211> 241
[3776] <212> PRT
[3777] <213> 人工序列
[3778] <220>
[3779] <223> DLL3 scFv

[3780] <400> 188

[3781] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
[3782] 1 5 10 15

[3783] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
[3784] 20 25 30

[3785] Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[3786] 35 40 45

[3787] Gly Tyr Val Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
[3788] 50 55 60

[3789] Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
[3790] 65 70 75 80

[3791] Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[3792] 85 90 95

[3793] Ser Ile Ala Val Thr Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[3794] 100 105 110

[3795] Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[3796] 115 120 125

[3797] Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
[3798] 130 135 140

[3799] Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
[3800] 145 150 155 160

[3801] Arg Val Asn Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
[3802] 165 170 175

[3803] Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
[3804] 180 185 190

[3805] Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[3806] 195 200 205

[3807] Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
[3808] 210 215 220

[3809] Tyr Asp Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[3810] 225 230 235 240

[3811] Lys

[3812] <210> 189

[3813] <211> 119

[3814] <212> PRT

[3815] <213> 人工序列

[3816] <220>

[3817] <223> CD20 VH

[3818] <400> 189

[3819] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[3820] 1 5 10 15
[3821] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
[3822] 20 25 30
[3823] Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[3824] 35 40 45
[3825] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
[3826] 50 55 60
[3827] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[3828] 65 70 75 80
[3829] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3830] 85 90 95
[3831] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[3832] 100 105 110
[3833] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[3834] 115
[3835] <210> 190
[3836] <211> 115
[3837] <212> PRT
[3838] <213> 人工序列
[3839] <220>
[3840] <223> CD20 VL
[3841] <400> 190
[3842] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
[3843] 1 5 10 15
[3844] Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
[3845] 20 25 30
[3846] Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[3847] 35 40 45
[3848] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
[3849] 50 55 60
[3850] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[3851] 65 70 75 80
[3852] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
[3853] 85 90 95
[3854] Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[3855] 100 105 110
[3856] Arg Thr Val
[3857] 115

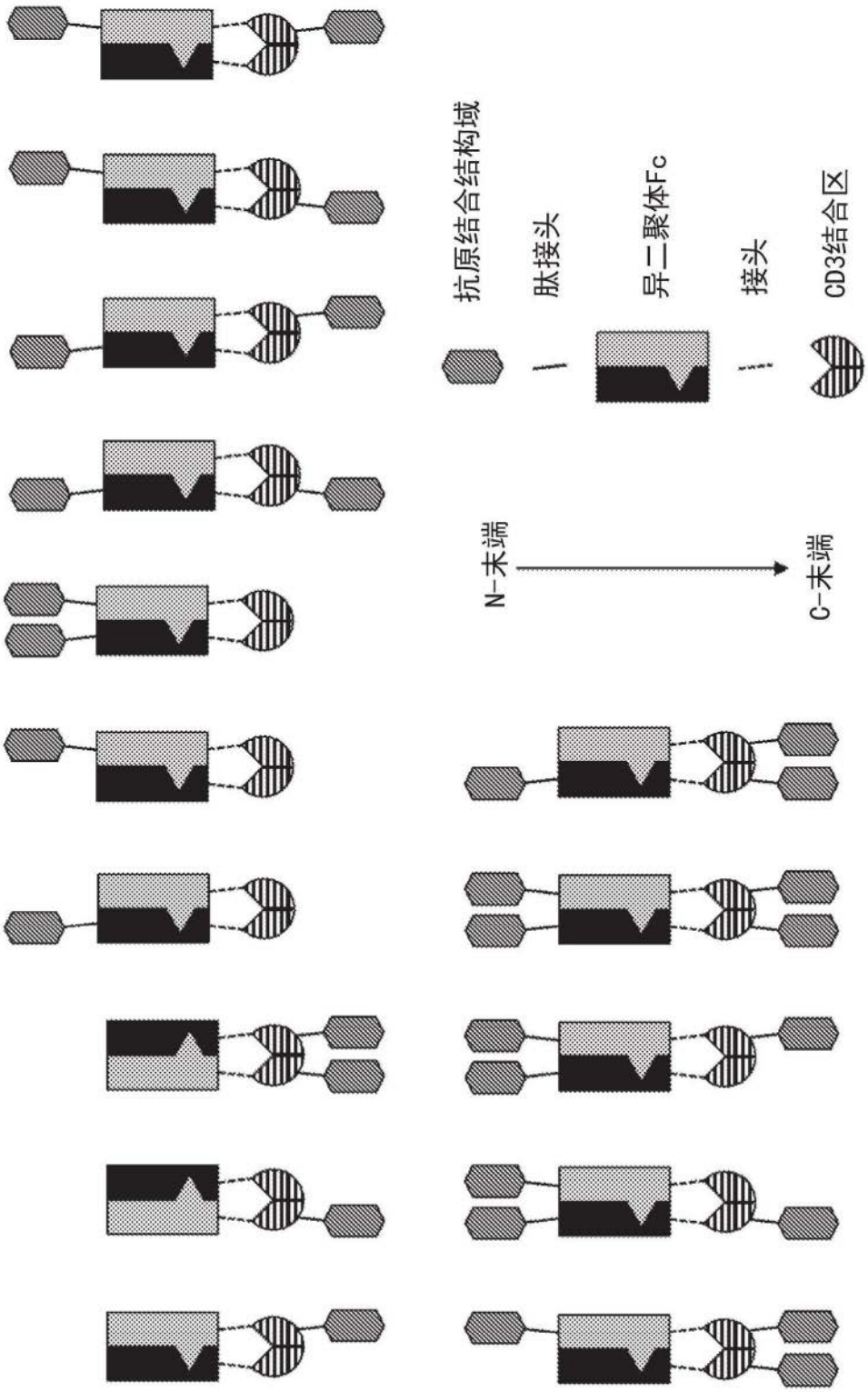


图1

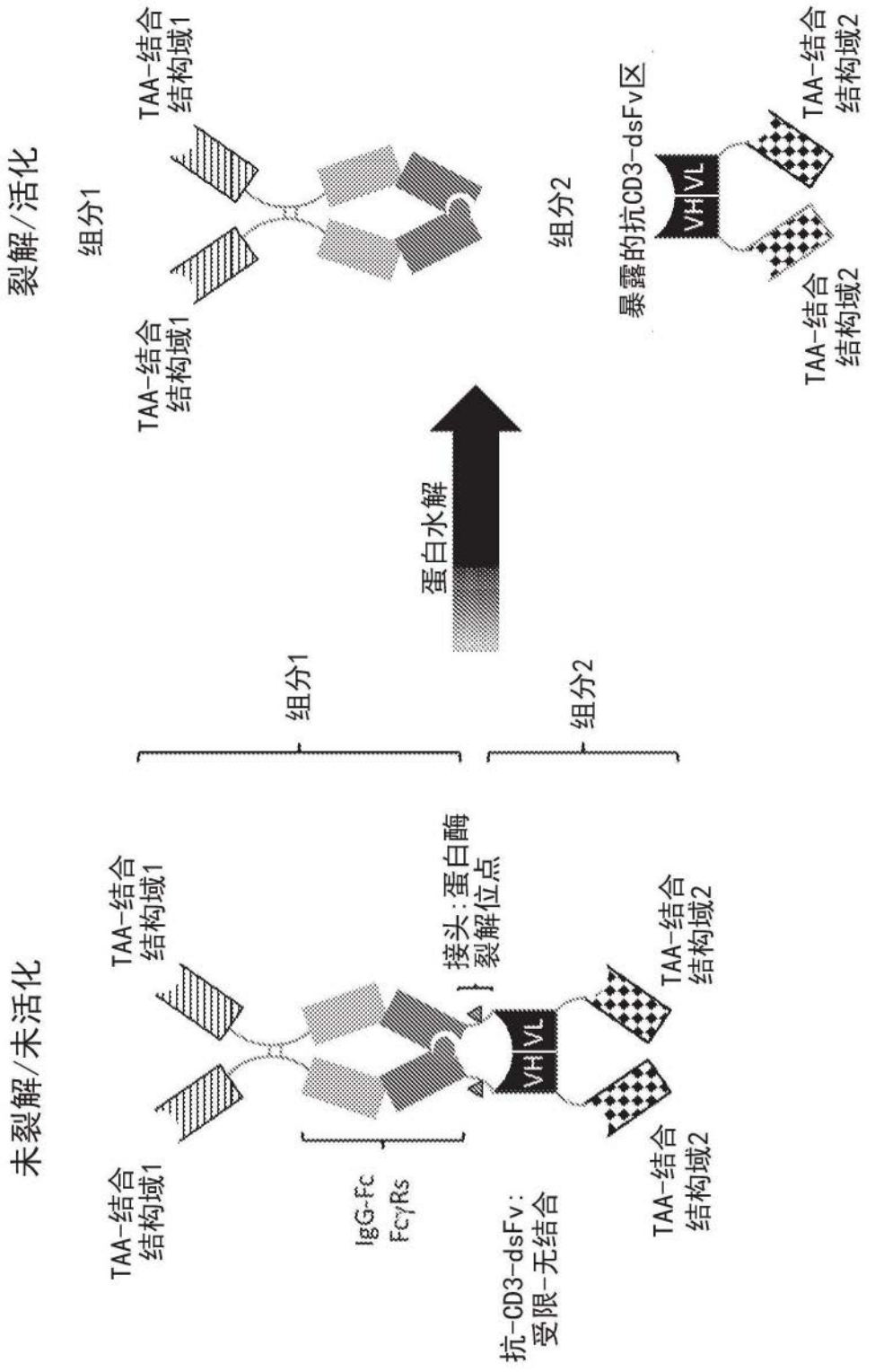

未裂解/未活化
TAA-结合结构域1
TAA-结合结构域1
IgG-Fc
FcγRs
接头:蛋白酶裂解位点
VH
VL
抗-CD3-dsFv:受限-无结合
TAA-结合结构域2
TAA-结合结构域2
组分1
组分2
蛋白水解
裂解/活化
组分1
TAA-结合结构域1
TAA-结合结构域1
组分2
暴露的抗CD3-dsFv区
VH
VL
TAA-结合结构域2
TAA-结合结构域2

图2

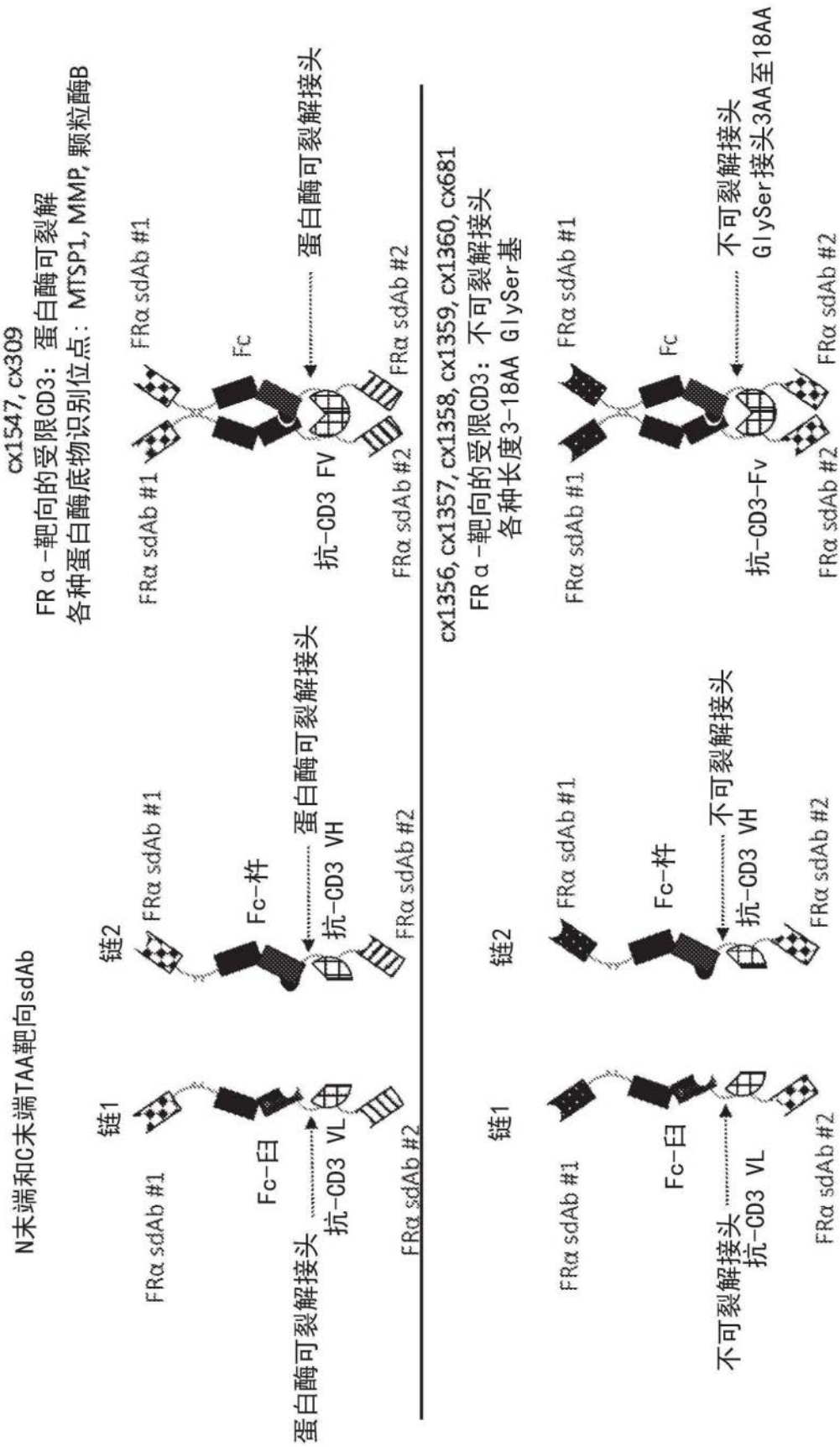
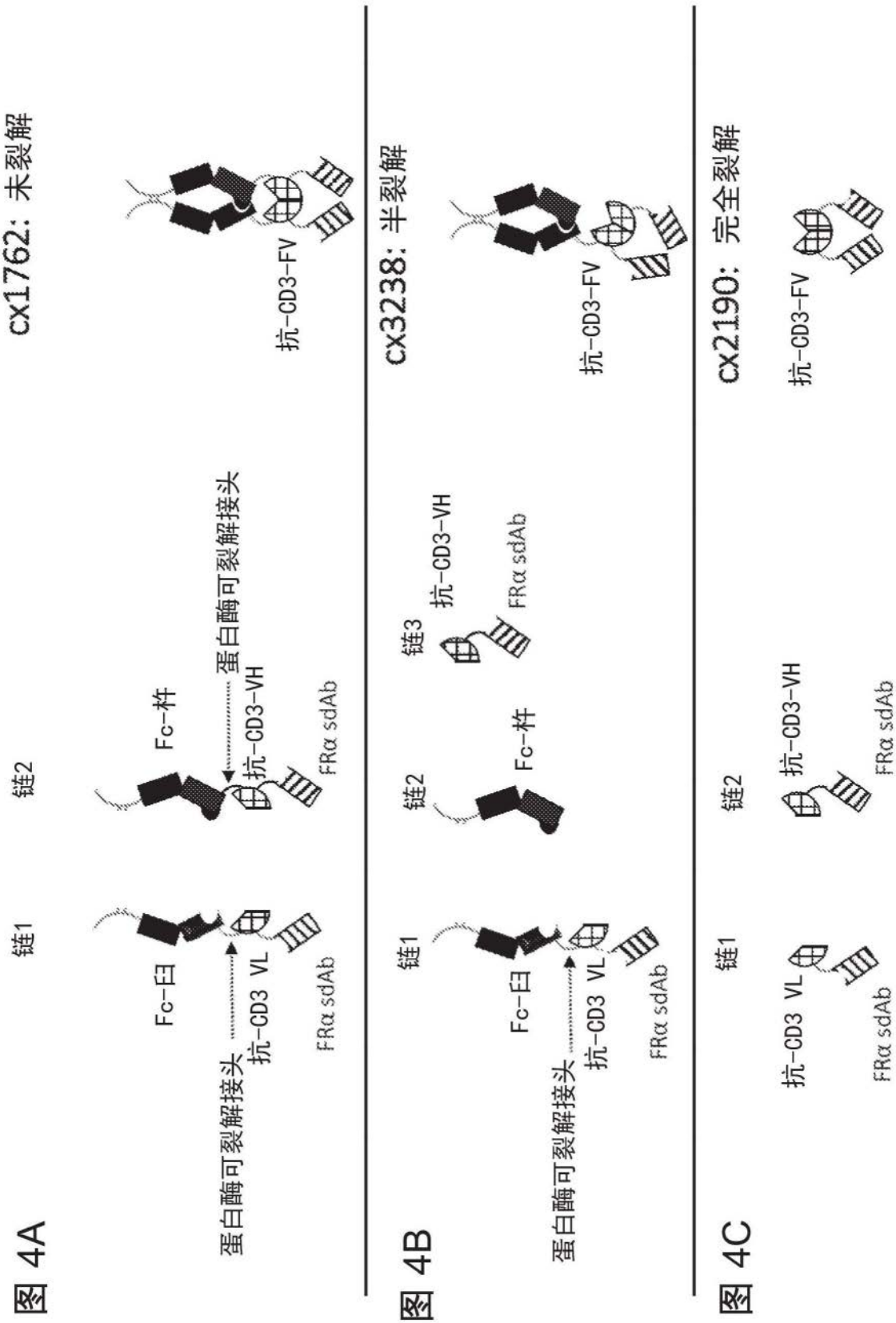

N末端和C末端TAA靶向sdAb
cx1547, cx309
FR α -靶向的受限CD3： 蛋白酶可裂解
各种蛋白酶底物识别位点： MTSP1, MMP, 颗粒酶B
链1
链2
FRα sdAb #1
FRα sdAb #2
Fc-臼
Fc-杵
Fc
蛋白酶可裂解接头
不可裂解接头
抗-CD3 VL
抗-CD3 VH
抗-CD3 FV
抗-CD3-Fv
cx1356, cx1357, cx1358, cx1359, cx1360, cx681
FR α -靶向的受限CD3： 不可裂解接头
各种长度3-18AA GlySer基
GlySer接头3AA至18AA

图3


图 4A
cx1762：未裂解
链1
链2
Fc-臼
Fc-杵
蛋白酶可裂解接头
抗-CD3 VL
抗-CD3-VH
FRα sdAb
抗-CD3-FV
图 4B
cx3238：半裂解
链1
链2
链3
Fc-臼
Fc-杵
蛋白酶可裂解接头
抗-CD3 VL
抗-CD3-VH
FRα sdAb
抗-CD3-FV
图 4C
cx2190：完全裂解
链1
链2
抗-CD3 VL
抗-CD3-VH
FRα sdAb
抗-CD3-FV

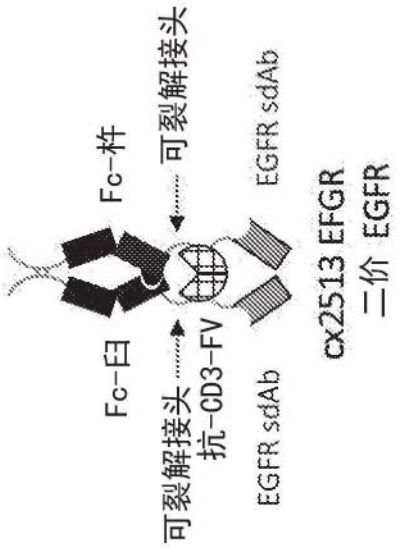

Fc-杵
可裂解接头
EGFR sdAb
Fc-臼
可裂解接头
抗-CD3-FV
EGFR sdAb
cx2513 EFGR
二价 EGFR

图5A

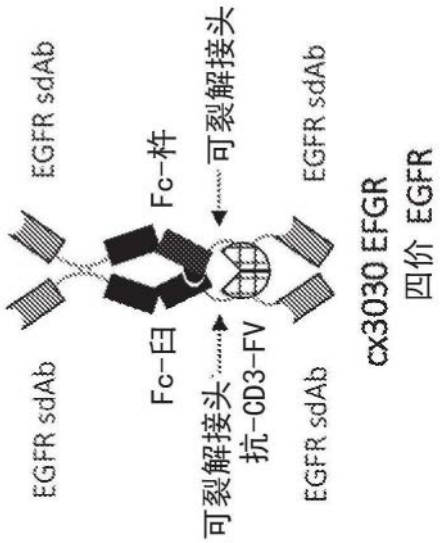

EGFR sdAb
Fc-杵
可裂解接头
EGFR sdAb
EGFR sdAb
Fc-臼
可裂解接头
抗-CD3-FV
EGFR sdAb
cx3030 EFGR
四价 EGFR

图5B

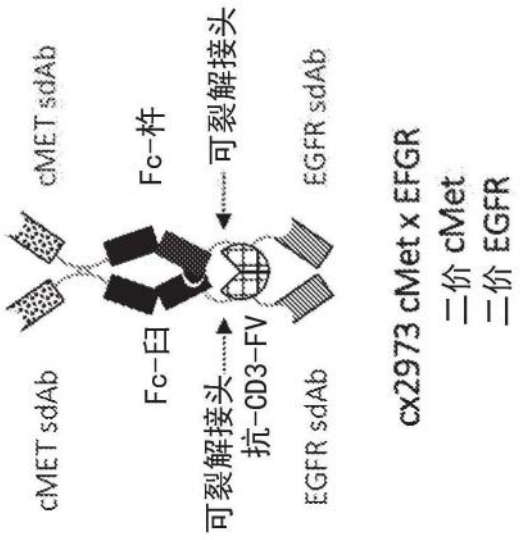

cMET sdAb
Fc-杵
可裂解接头
EGFR sdAb
cMET sdAb
Fc-臼
可裂解接头
抗-CD3-FV
EGFR sdAb
cx2973 cMet x EFGR
二价 cMet
二价 EGFR

图5C

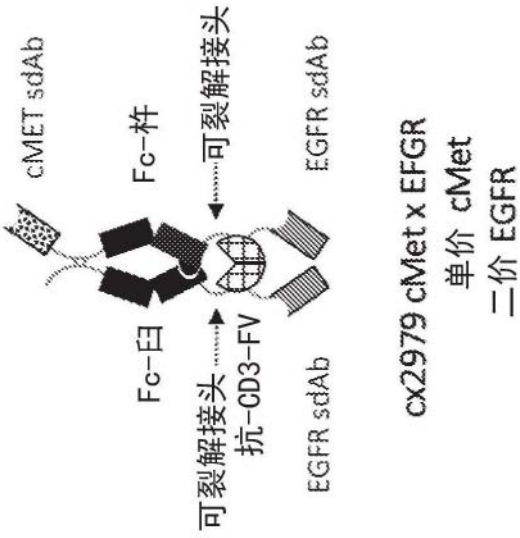

cMET sdAb
Fc-杵
可裂解接头
EGFR sdAb
Fc-臼
可裂解接头
抗-CD3-FV
EGFR sdAb
cx2979 cMet x EFGR
单价 cMet
二价 EGFR

图5D

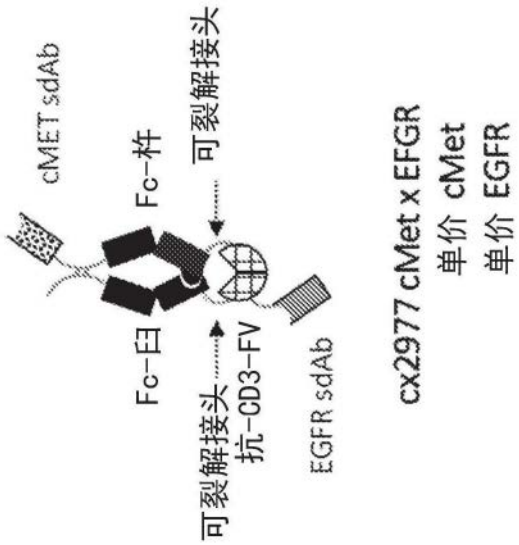

cMET sdAb
Fc-杵
可裂解接头
Fc-臼
可裂解接头
抗-CD3-FV
EGFR sdAb
cx2977 cMet x EFGR
单价 cMet
单价 EGFR

图5E

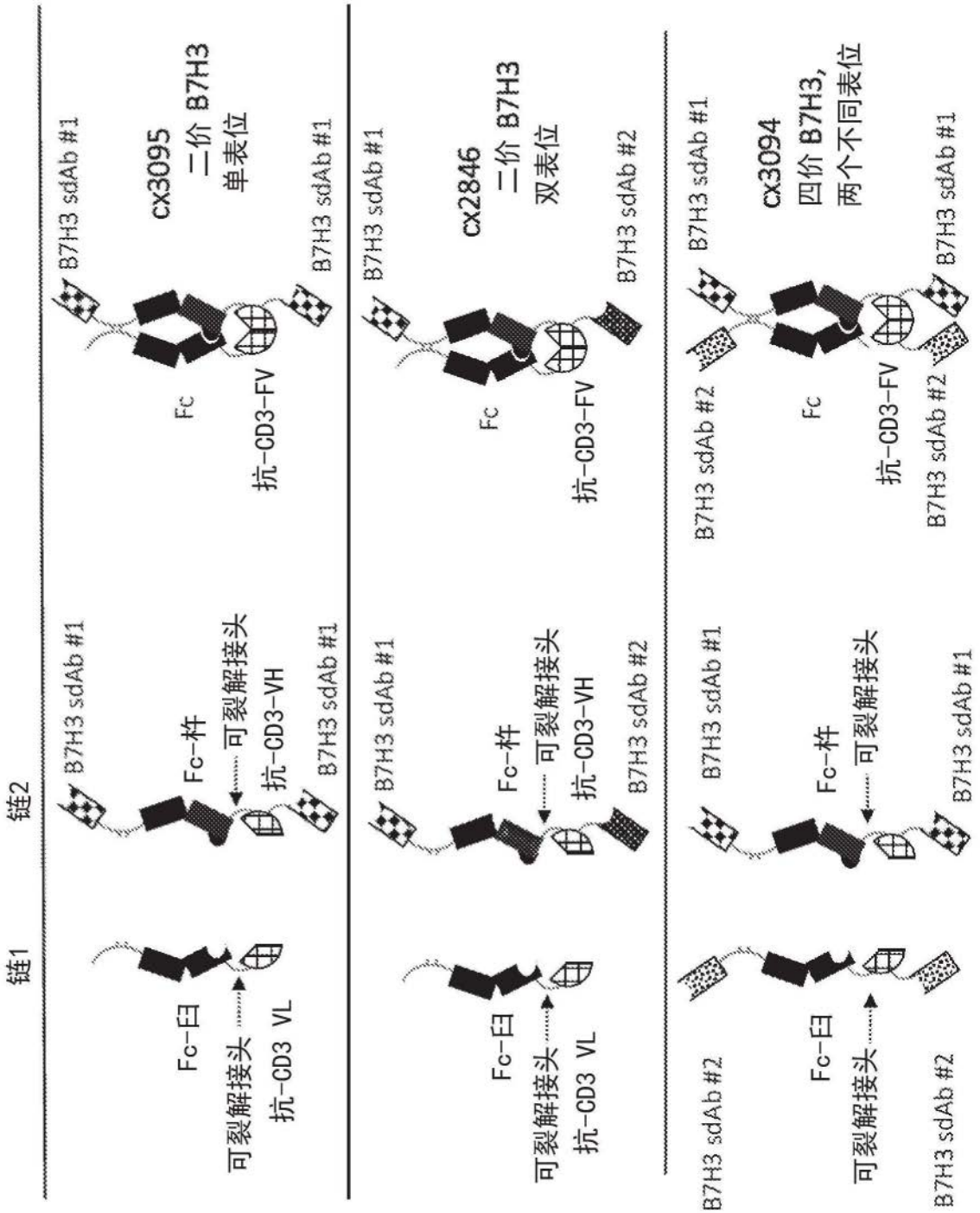

链1
链2
Fc-臼
可裂解接头
抗-CD3 VL
B7H3 sdAb #1
Fc-杵
可裂解接头
抗-CD3-VH
B7H3 sdAb #1
cx3095
二价 B7H3
单表位
Fc
抗-CD3-FV
B7H3 sdAb #1
Fc-臼
可裂解接头
抗-CD3 VL
B7H3 sdAb #1
Fc-杵
可裂解接头
抗-CD3-VH
B7H3 sdAb #2
cx2846
二价 B7H3
双表位
Fc
抗-CD3-FV
B7H3 sdAb #2
B7H3 sdAb #2
Fc-臼
可裂解接头
B7H3 sdAb #1
Fc-杵
可裂解接头
抗-CD3-VH
B7H3 sdAb #1
cx3094
四价 B7H3,
两个不同表位
Fc
抗-CD3-FV
B7H3 sdAb #2
B7H3 sdAb #1

图6A

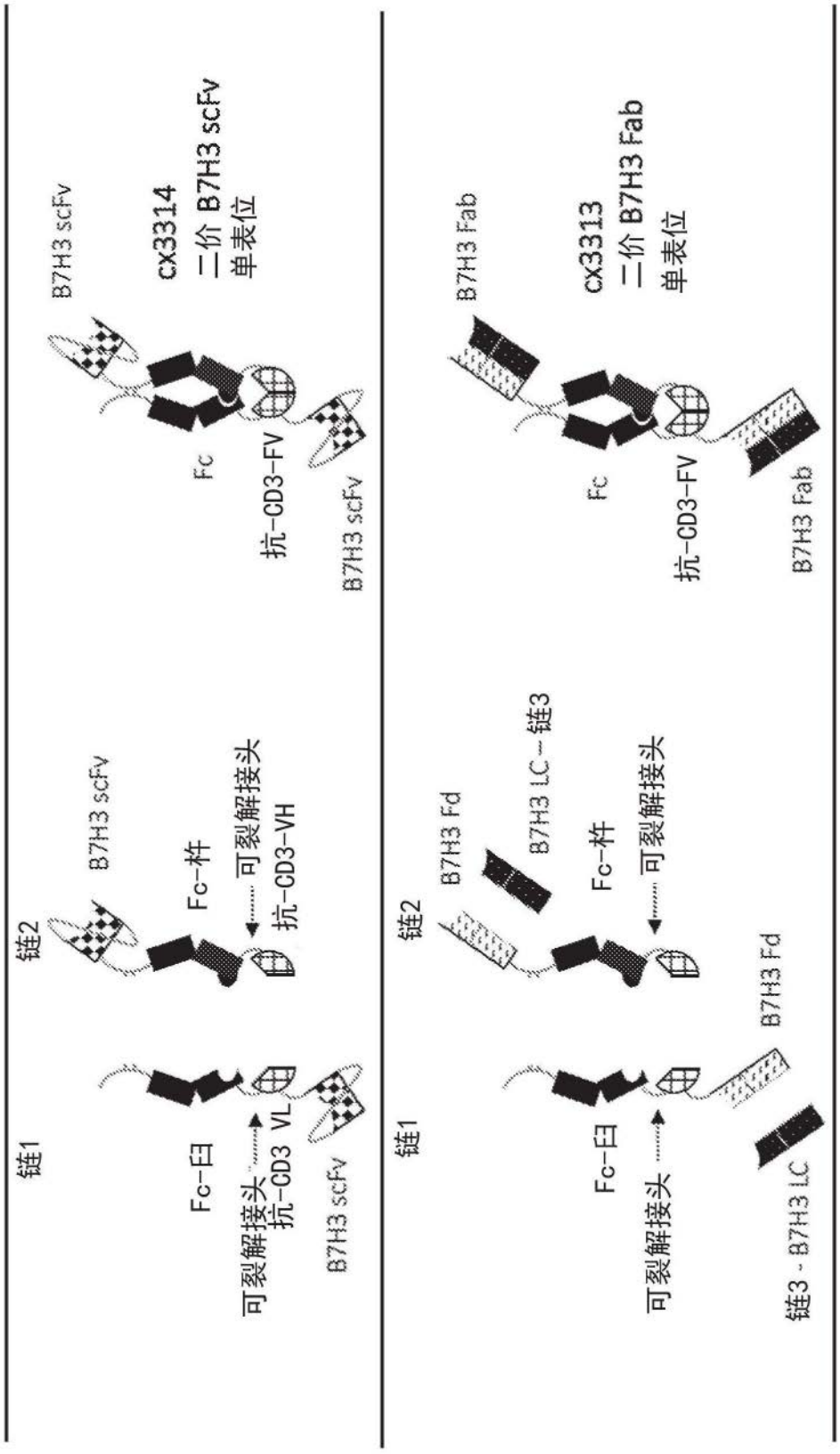

链1
链2
B7H3 scFv
Fc-杵
可裂解接头
抗-CD3-VH
Fc-臼
可裂解接头
抗-CD3 VL
B7H3 scFv
cx3314
二价 B7H3 scFv
单表位
Fc
抗-CD3-FV
B7H3 scFv
链1
链2
B7H3 Fd
B7H3 LC－链3
Fc-杵
可裂解接头
Fc-臼
可裂解接头
B7H3 Fd
链3 - B7H3 LC
B7H3 Fab
cx3313
二价 B7H3 Fab
单表位
Fc
抗-CD3-FV
B7H3 Fab

图6B

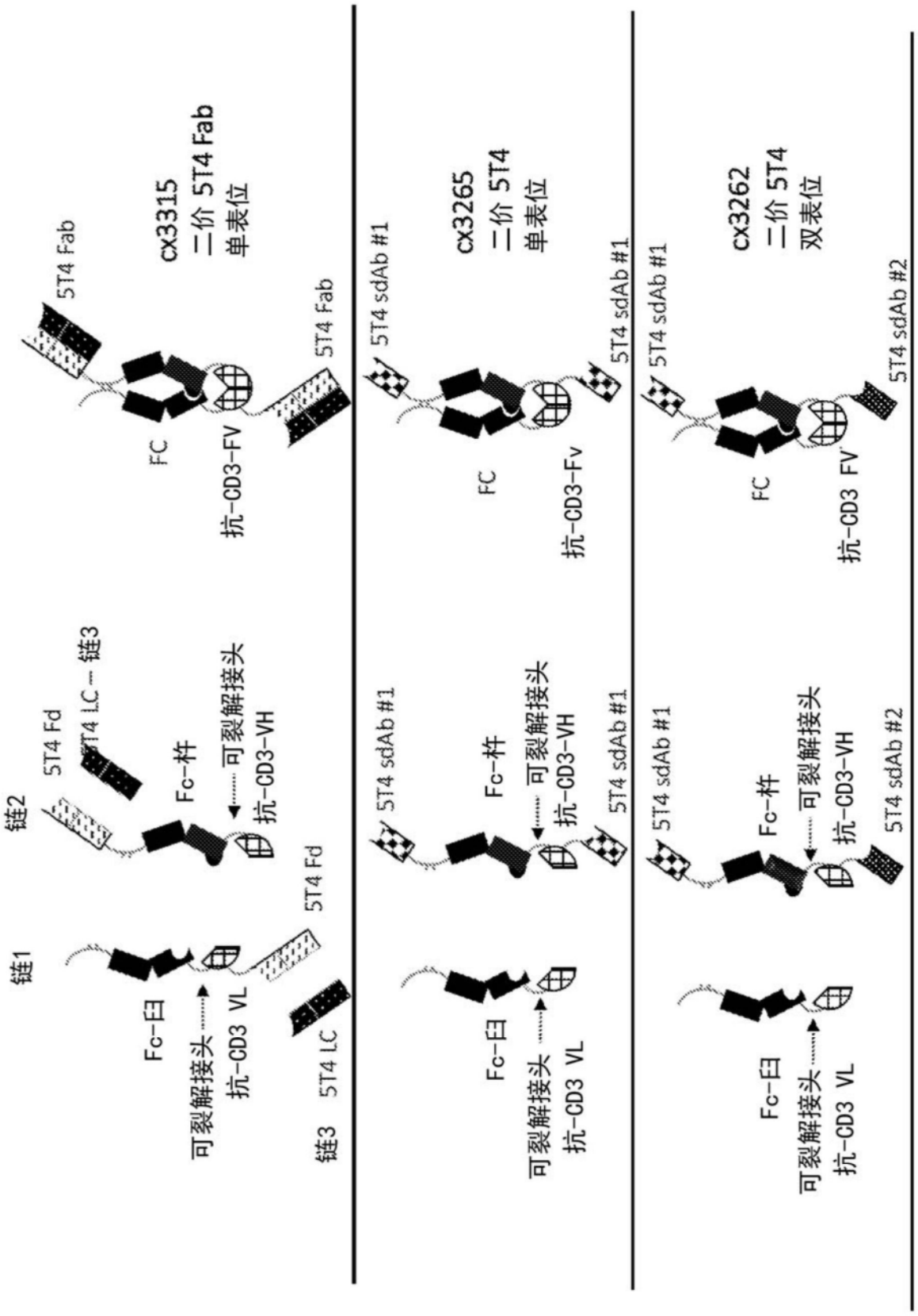

链1
Fc-臼
可裂解接头
抗-CD3 VL
链3 5T4 LC
链2
5T4 Fd
5T4 LC — 链3
Fc-杵
可裂解接头
抗-CD3-VH
5T4 Fd
5T4 Fab
FC
抗-CD3-FV
cx3315
二价 5T4 Fab
单表位
5T4 Fab
5T4 sdAb #1
Fc-臼
可裂解接头
抗-CD3 VL
5T4 sdAb #1
Fc-杵
可裂解接头
抗-CD3-VH
5T4 sdAb #1
FC
抗-CD3-Fv
cx3265
二价 5T4
单表位
5T4 sdAb #1
5T4 sdAb #1
Fc-臼
可裂解接头
抗-CD3 VL
5T4 sdAb #1
Fc-杵
可裂解接头
抗-CD3-VH
5T4 sdAb #2
FC
抗-CD3 FV
cx3262
二价 5T4
双表位
5T4 sdAb #2

图7

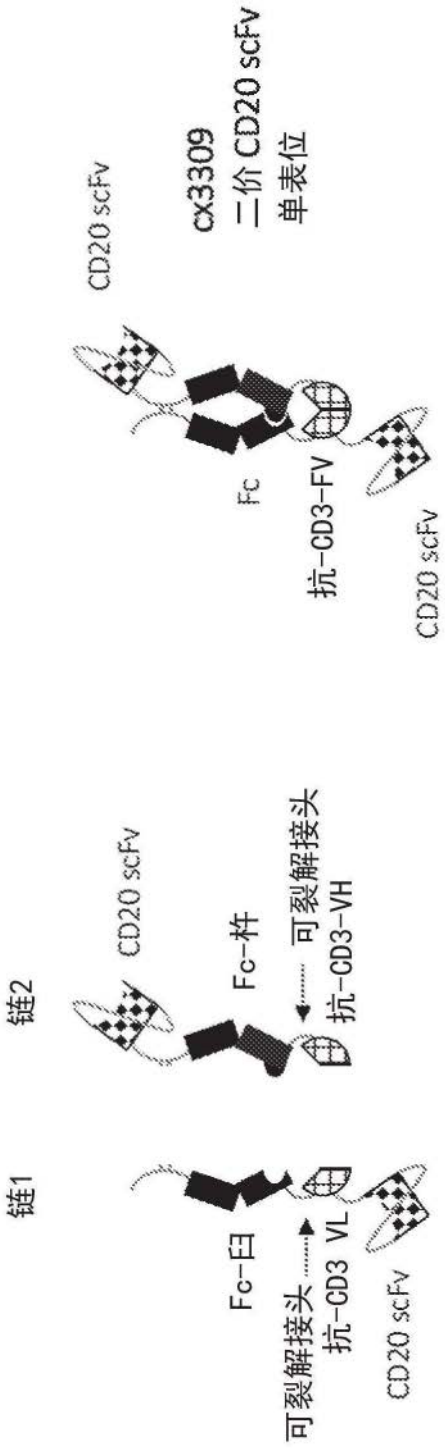

CD20 scFv
cx3309
二价 CD20 scFv
单表位
Fc
抗-CD3-FV
CD20 scFv
链2
CD20 scFv
Fc-杵
可裂解接头
抗-CD3-VH
链1
Fc-臼
可裂解接头
抗-CD3 VL
CD20 scFv

图8

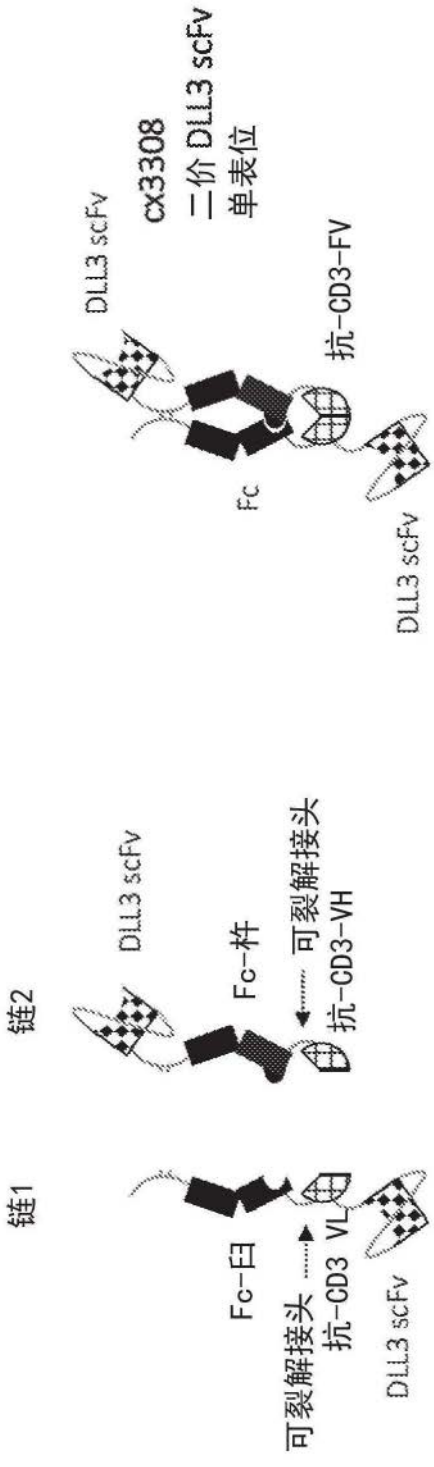

cx3308
二价 DLL3 scFv
单表位
DLL3 scFv
抗-CD3-FV
Fc
DLL3 scFv
链2
DLL3 scFv
Fc-杵
可裂解接头
抗-CD3-VH
链1
Fc-臼
可裂解接头
抗-CD3 VL
DLL3 scFv

图9

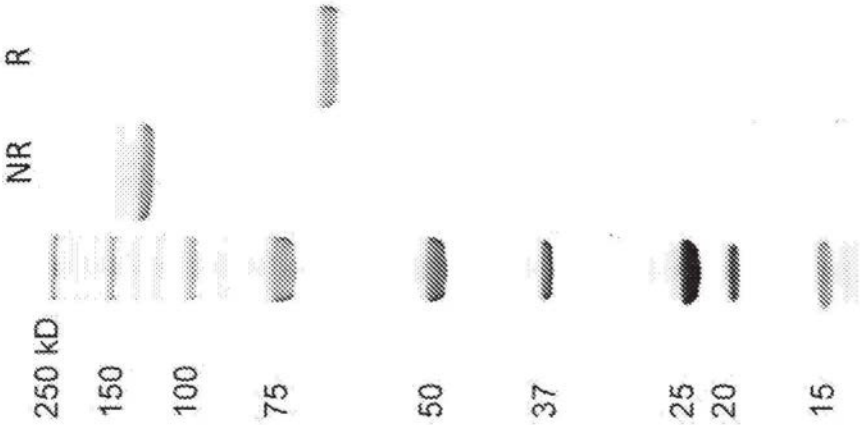
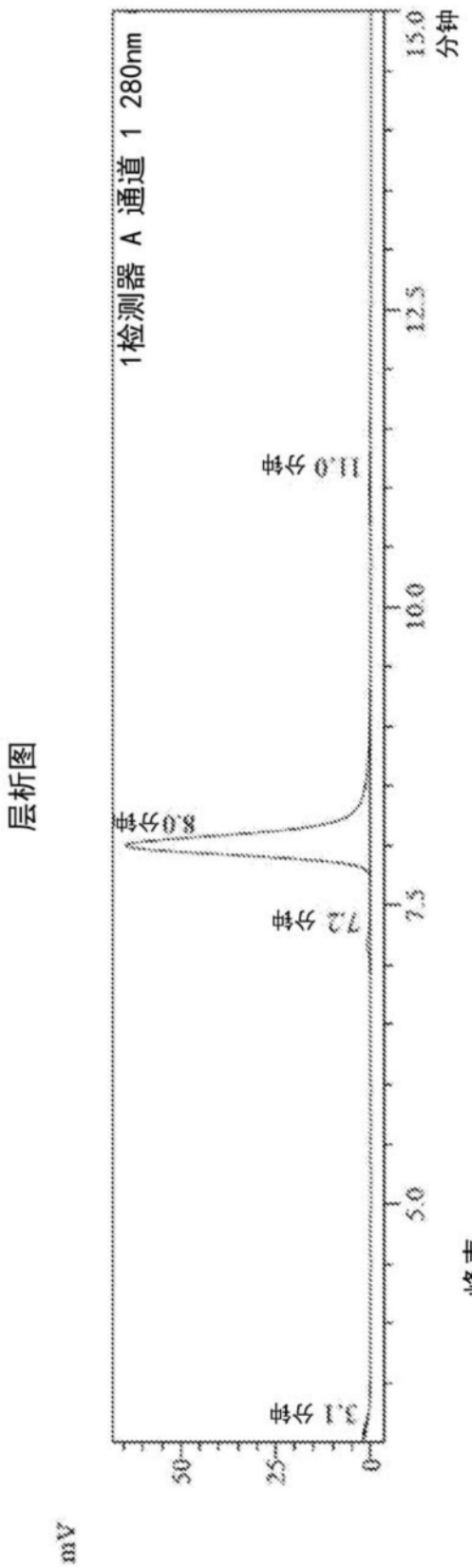


图10A



峰表

检测器 A 通道 1 280nm

停留时间	面积	面积%
3.059 分钟	3065	0.346
7.174 分钟	9190	1.039
8.001 分钟	866802	97.960
10.993 分钟	5799	0.655
	884855	100.000

图10B

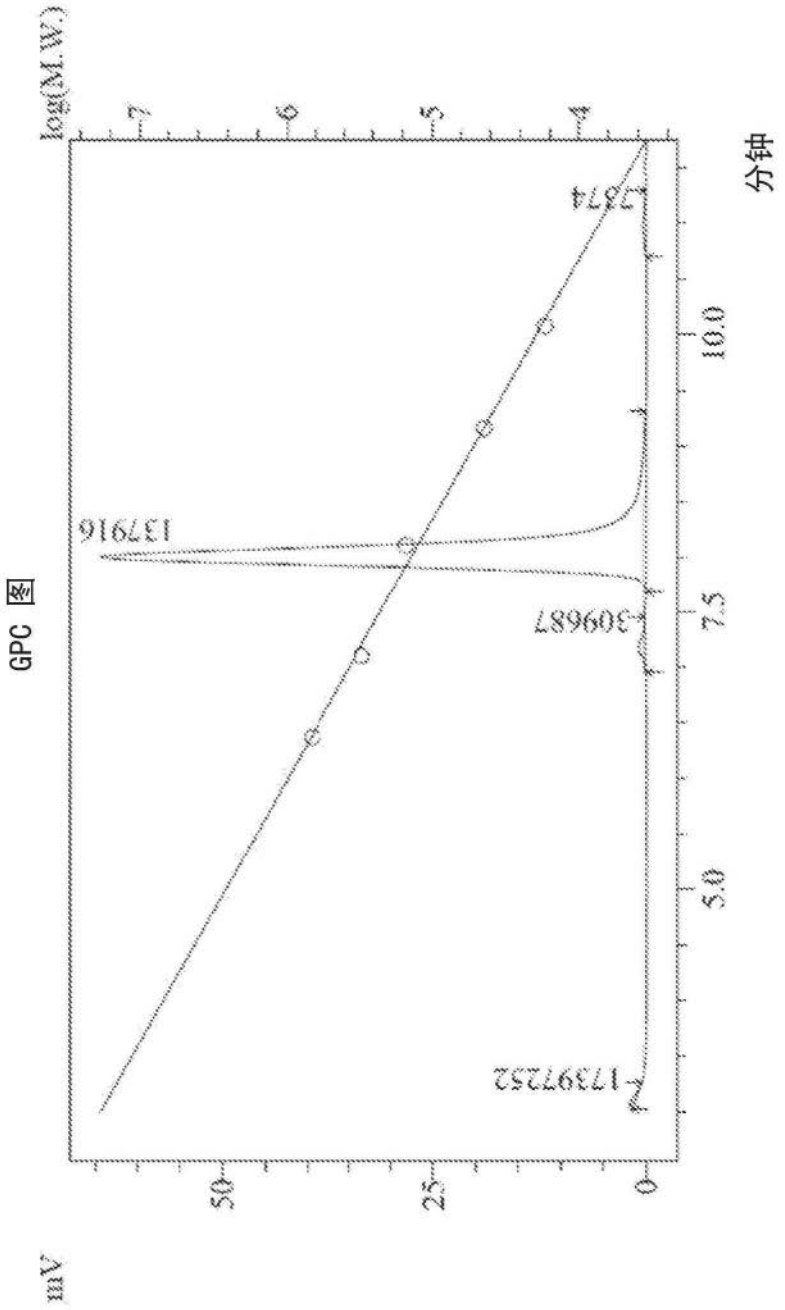

log(M.W.)
7
6
5
4
分钟
23874
10.0
1379216
309687
7.5
5.0
1739725
GPC 图
50
25
0
mV

图10C

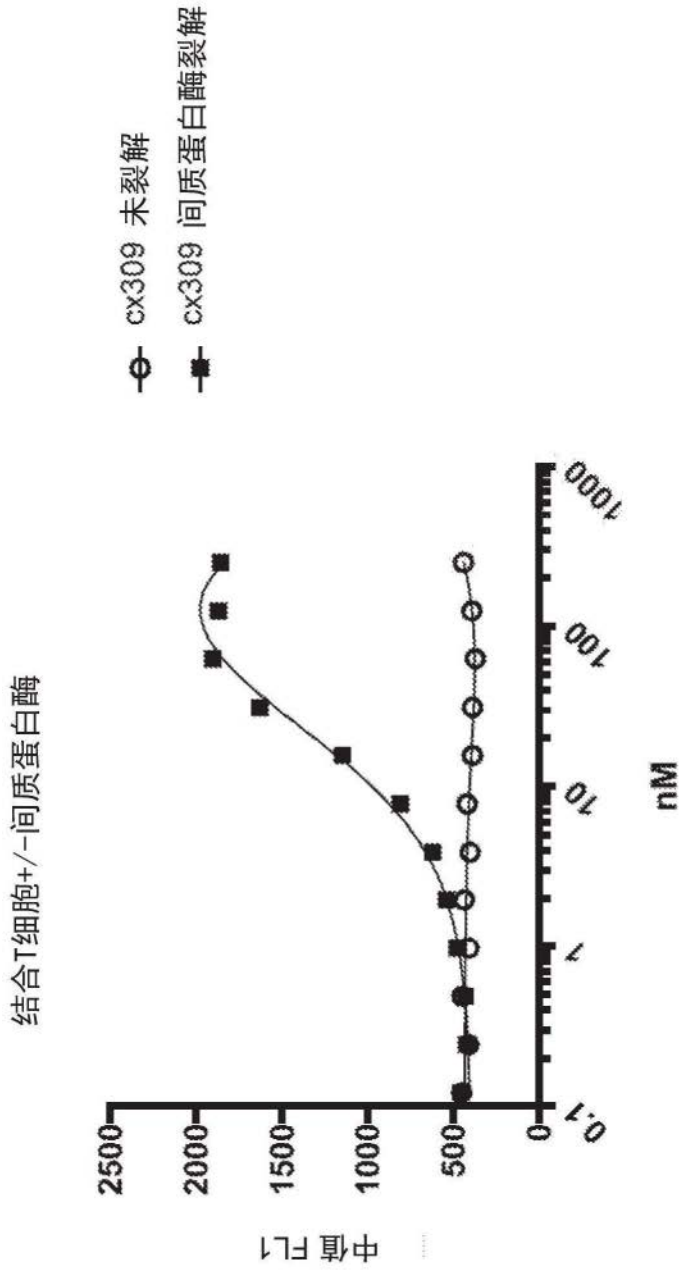

cx309 未裂解
cx309 间质蛋白酶裂解
结合T细胞+/-间质蛋白酶
中值 FL1
2500
2000
1500
1000
500
0
0.1
1
10
100
1000
nM

图11A

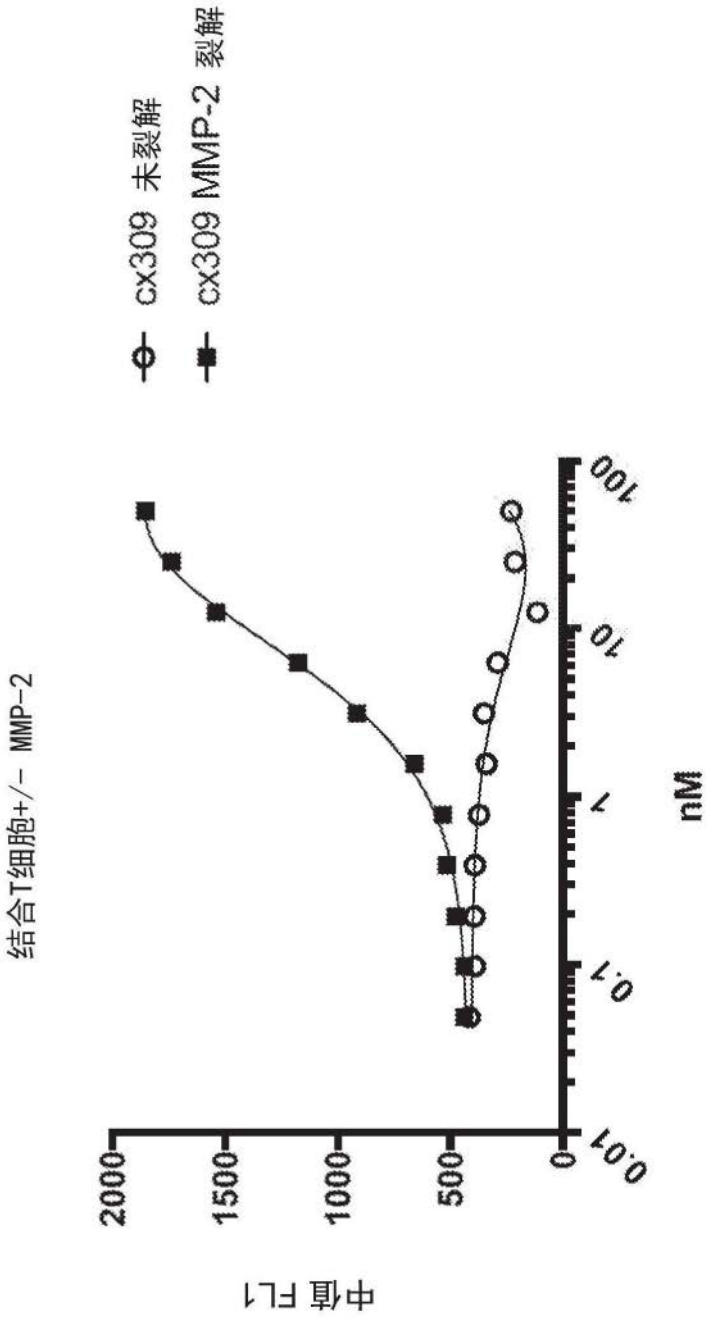

cx309 未裂解
cx309 MMP-2 裂解
结合T细胞+/- MMP-2
中值 FL1
2000
1500
1000
500
0
0.07
0.7
7
10
100
nM

图11B

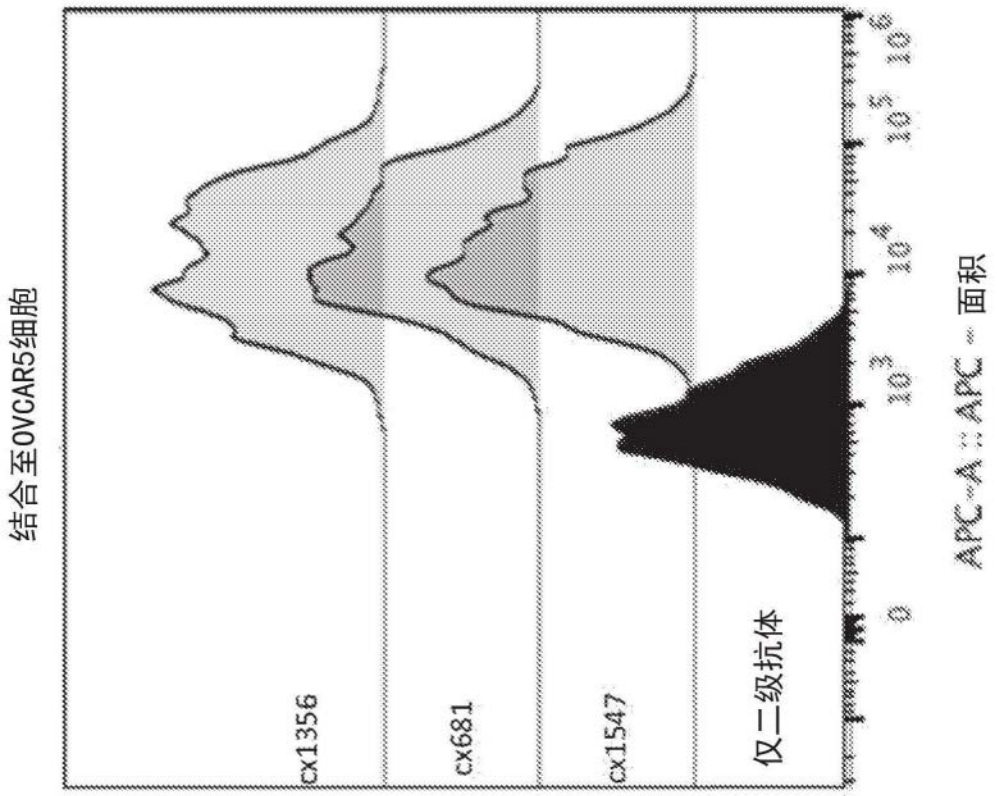

结合至OVCAR5细胞
cx1356
cx681
cx1547
仅二级抗体
0
10^3
10^4
10^5
10^6
APC-A :: APC - 面积

图12A

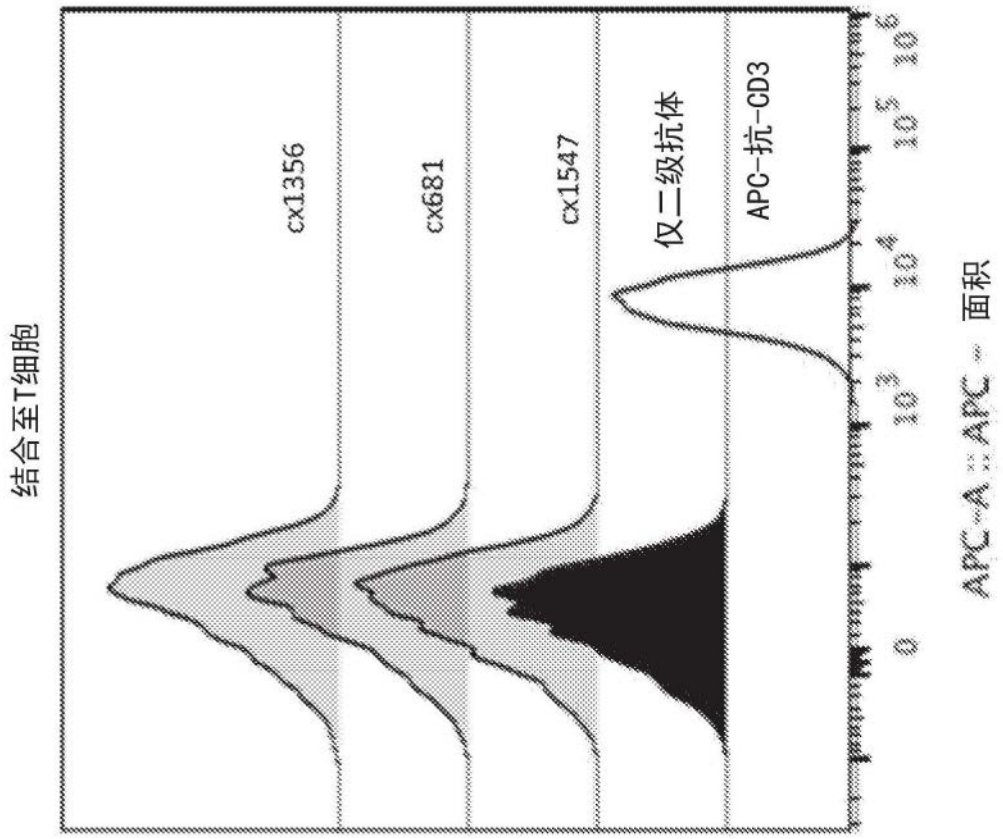

结合至T细胞
cx1356
cx681
cx1547
仅二级抗体
APC-抗-CD3
0
10^3
10^4
10^5
10^6
APC-A :: APC - 面积

图12B

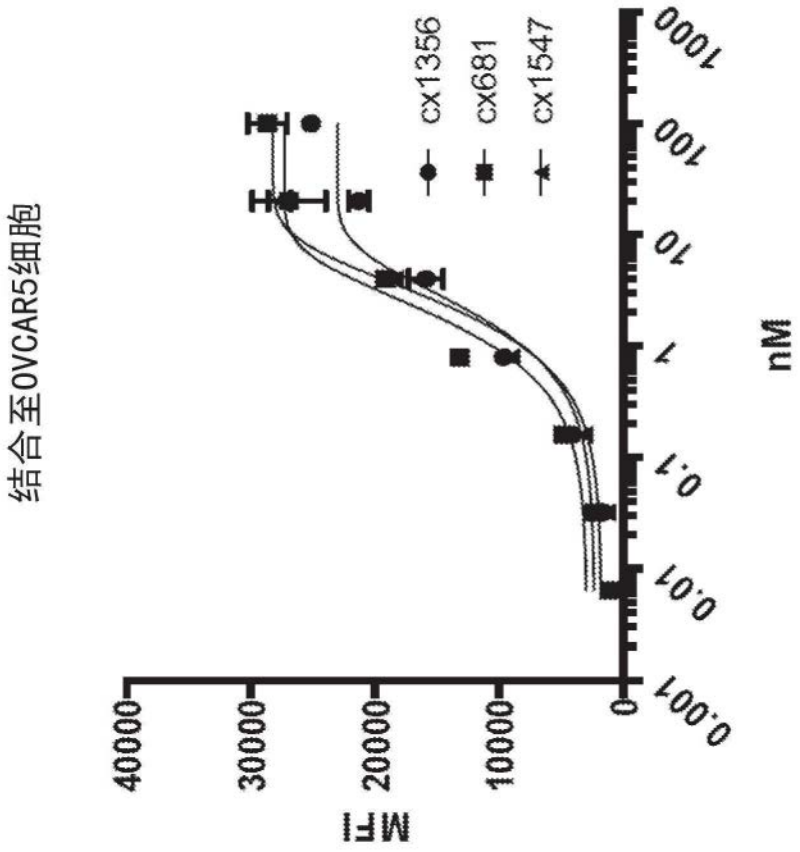

结合至OVCAR5细胞
cx1356
cx681
cx1547
MFI
40000
30000
20000
10000
0
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
nM

图12C

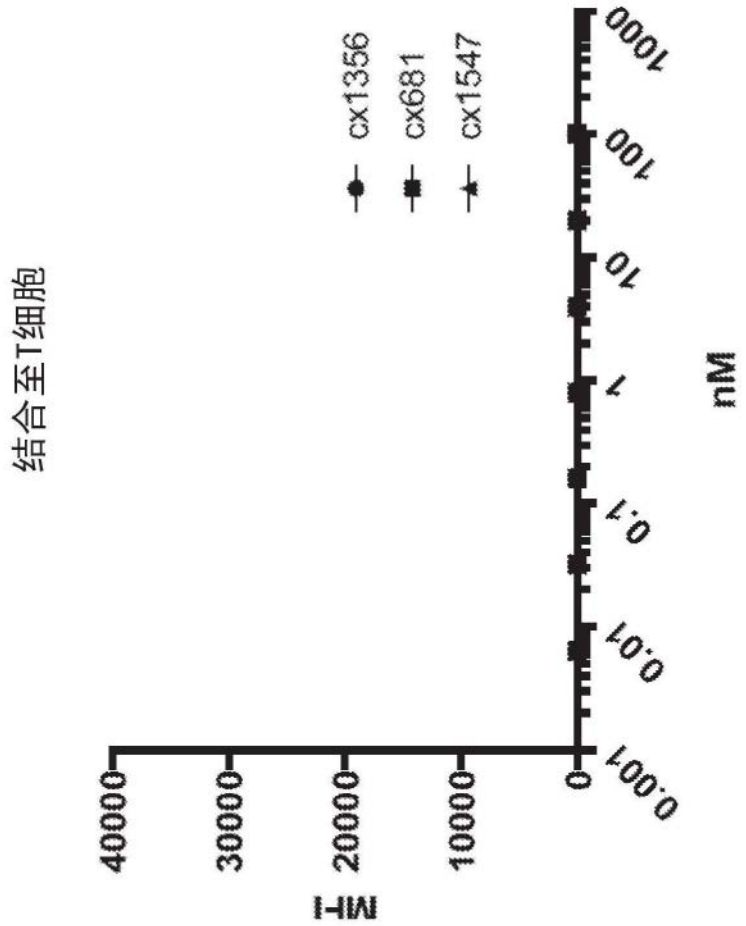

结合至T细胞
cx1356
cx681
cx1547
MFI
40000
30000
20000
10000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM

图12D

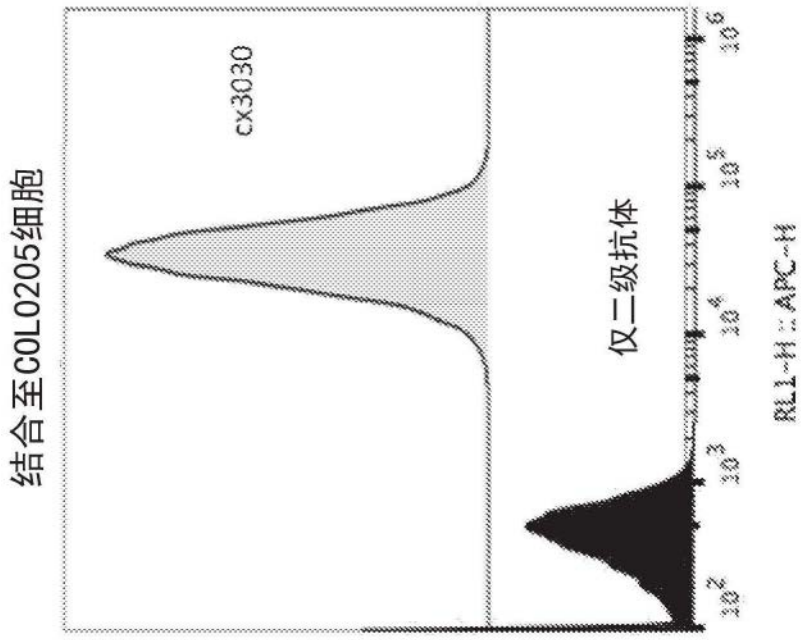

结合至COLO205细胞
cx3030
仅二级抗体
RL1-H :: APC-H

图13A

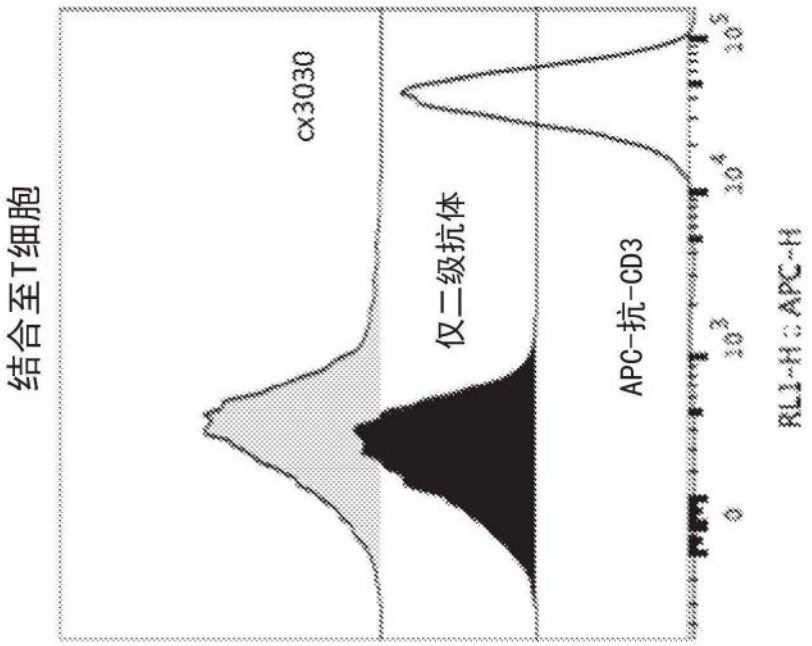

结合至T细胞
cx3030
仅二级抗体
APC-抗-CD3
RL1-H :: APC-H
0
10^3
10^4
10^5

图13B

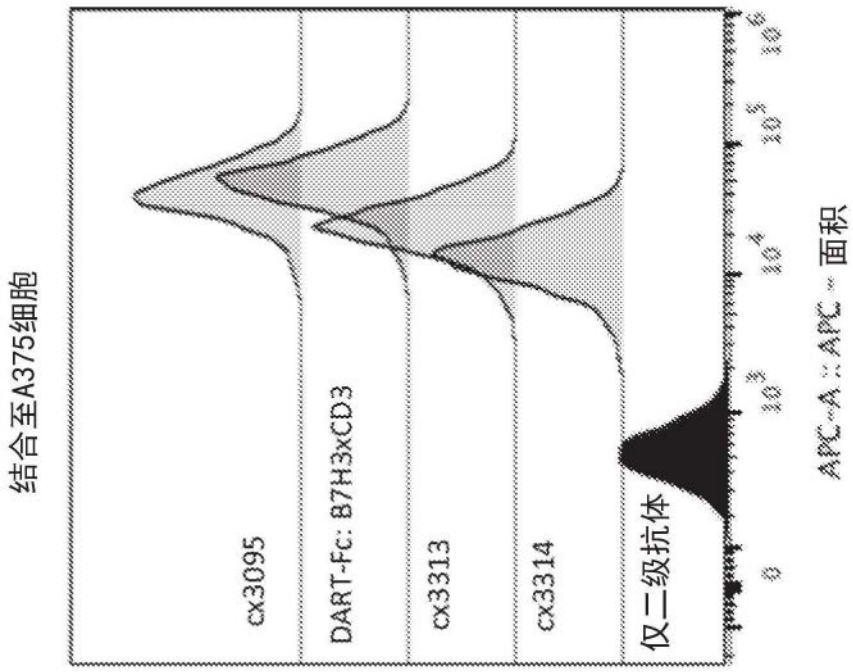

结合至A375细胞
cx3095
DART-Fc: B7H3xCD3
cx3313
cx3314
仅二级抗体
APC-A :: APC - 面积
0
10^3
10^4
10^5
10^6

图14A

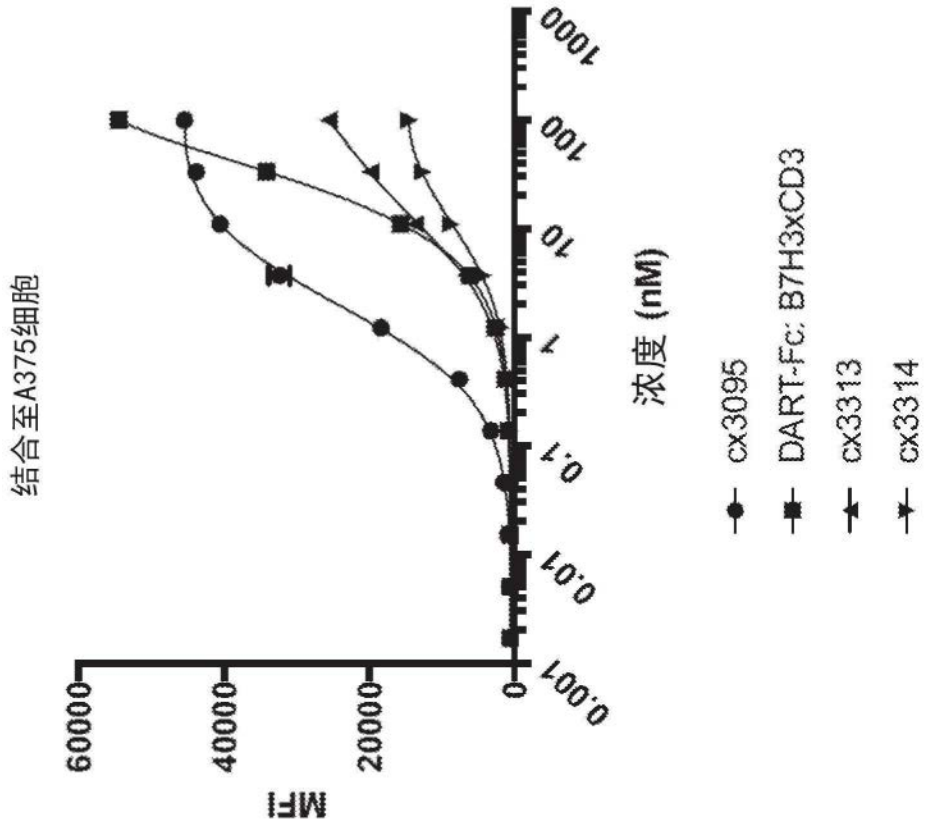

结合至A375细胞
MFI
60000
40000
20000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度 (nM)
cx3095
DART-Fc: B7H3xCD3
cx3313
cx3314

图14B

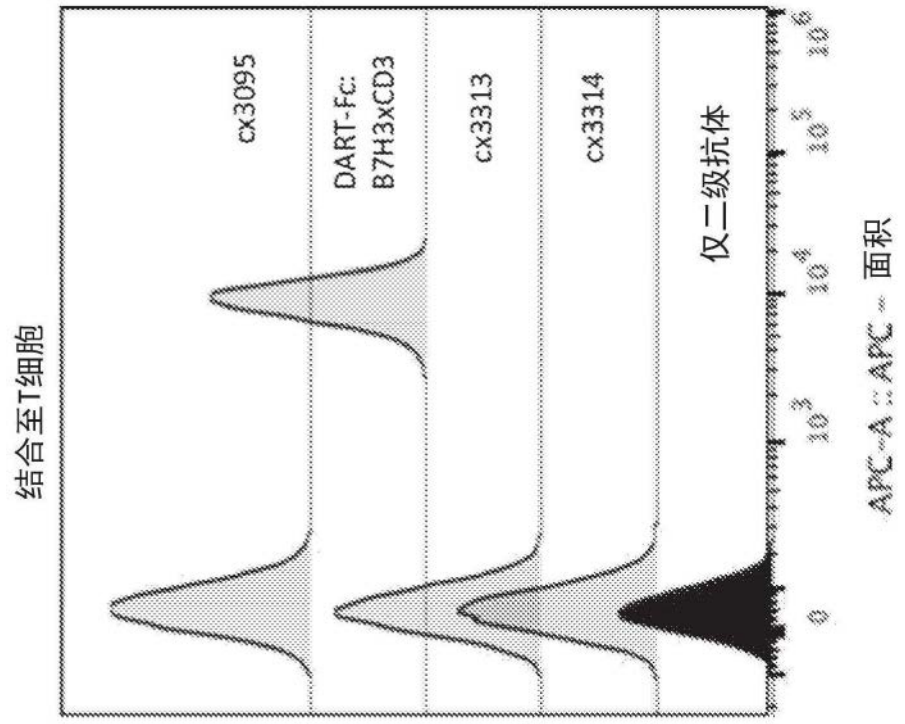

结合至T细胞
cx3095
DART-Fc:
B7H3xCD3
cx3313
cx3314
仅二级抗体
APC-A :: APC - 面积
0
10^3
10^4
10^5
10^6

图14C

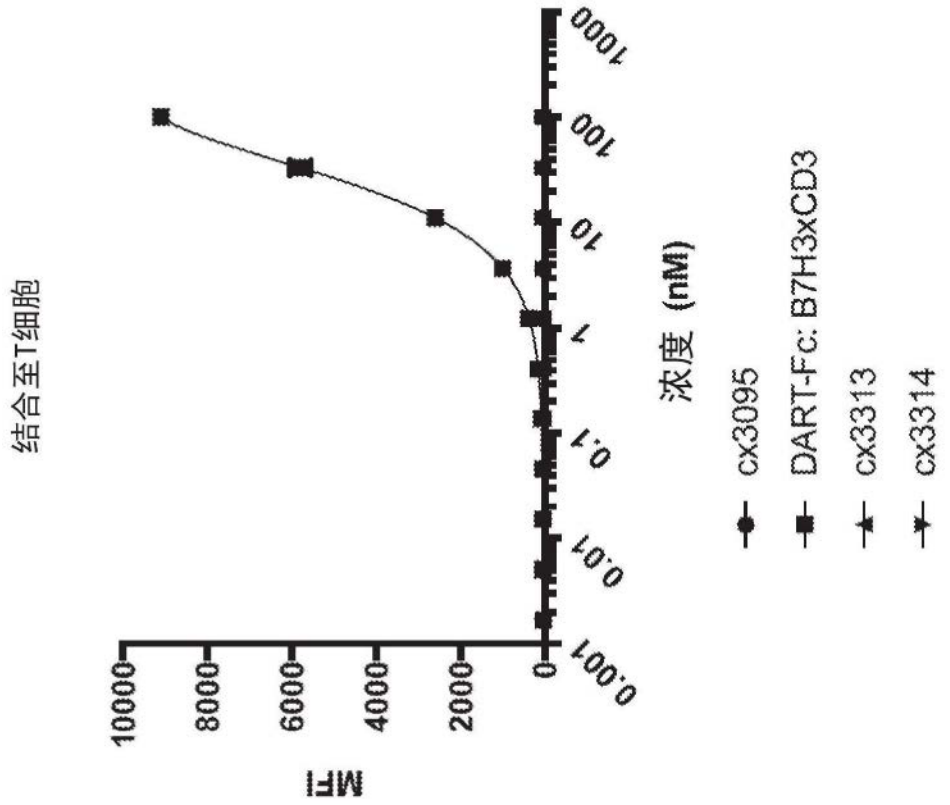

结合至T细胞
MFI
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度 (nM)
cx3095
DART-Fc: B7H3xCD3
cx3313
cx3314

图14D

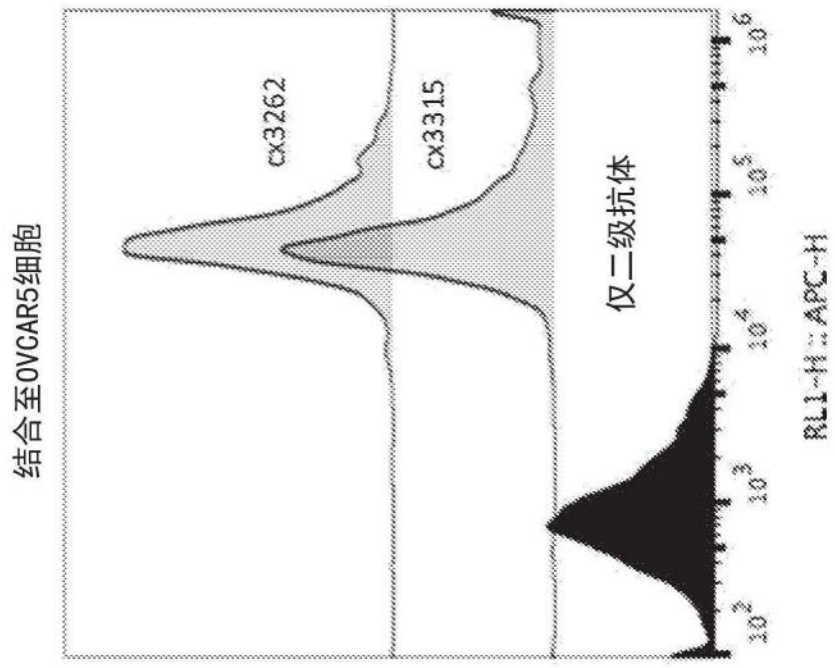

结合至OVCAR5细胞
cx3262
cx3315
仅二级抗体
RL1-H :: APC-H
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6

图15A

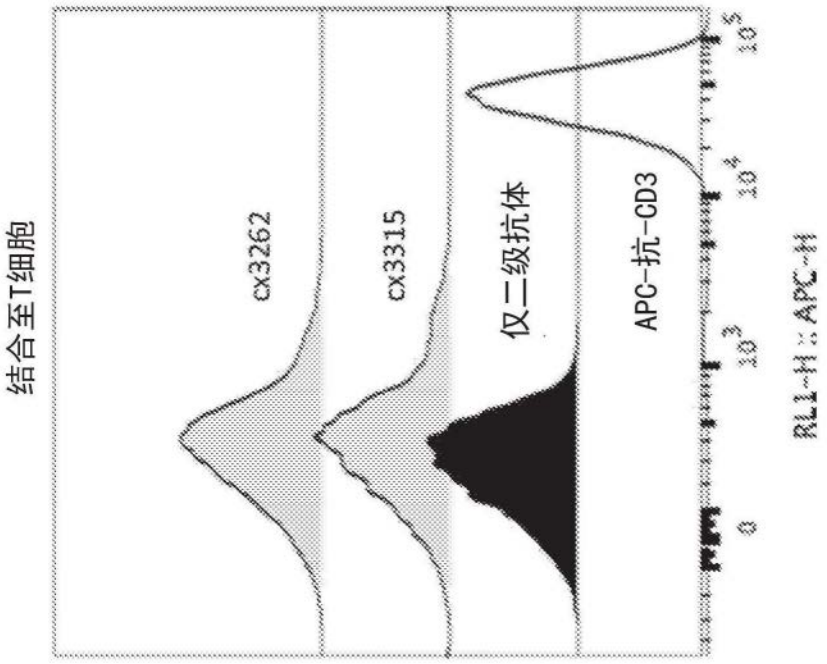

结合至T细胞
cx3262
cx3315
仅二级抗体
APC-抗-CD3
RL1-H :: APC-H
0
10^3
10^4
10^5

图15B

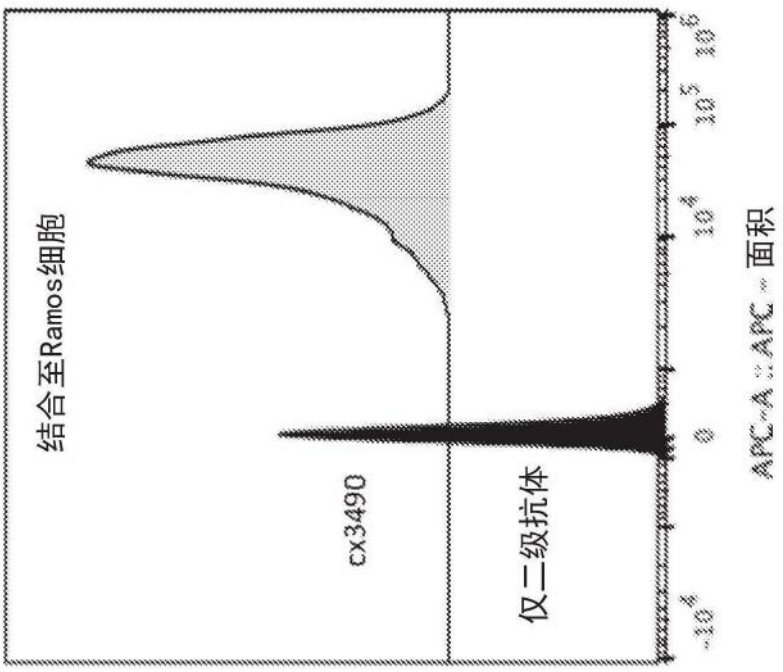

结合至Ramos细胞
cx3490
仅二级抗体
APC-A :: APC - 面积
-10^4
0
10^4
10^5
10^6

图16A

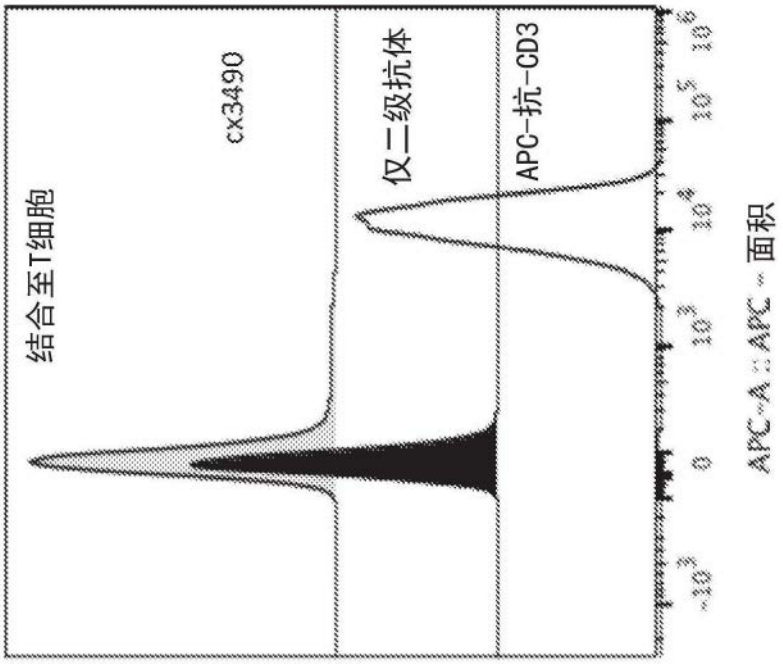

结合至T细胞
cx3490
仅二级抗体
APC-抗-CD3
APC-A :: APC - 面积

图16B

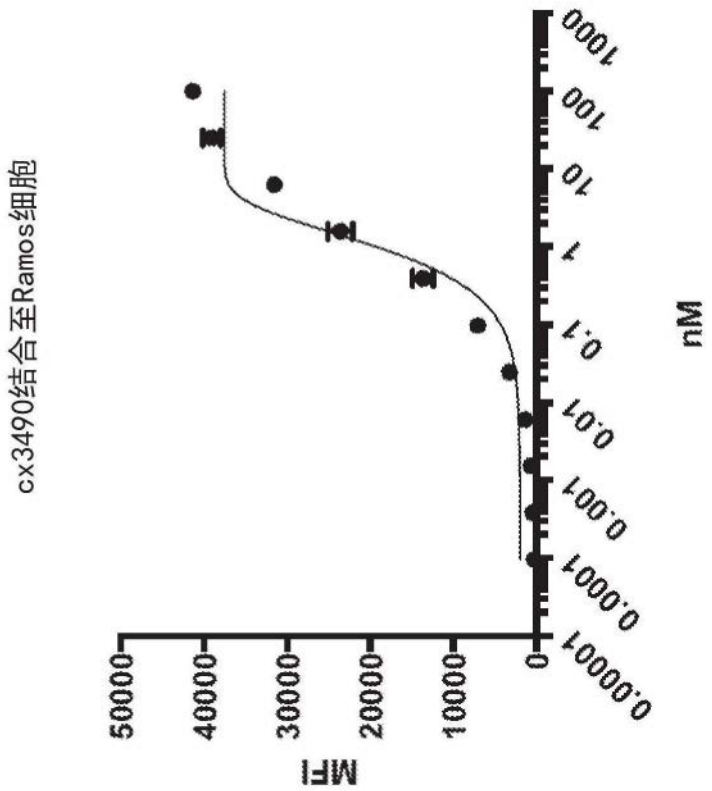

cx3490结合至Ramos细胞
MFI
nM

图16C

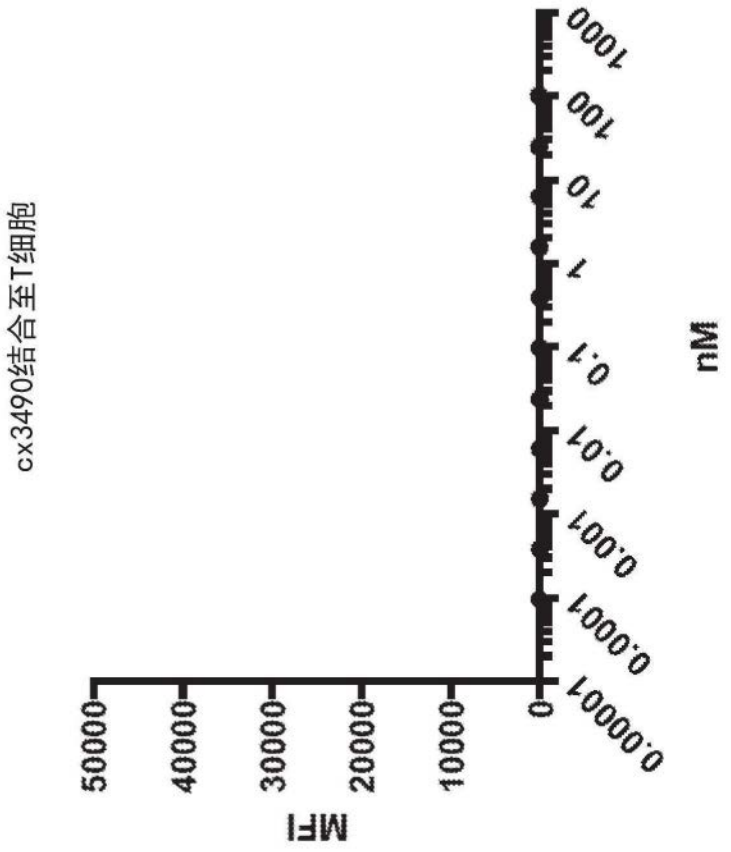

cx3490结合至T细胞
MFI
50000
40000
30000
20000
10000
0
nM
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001

图16D

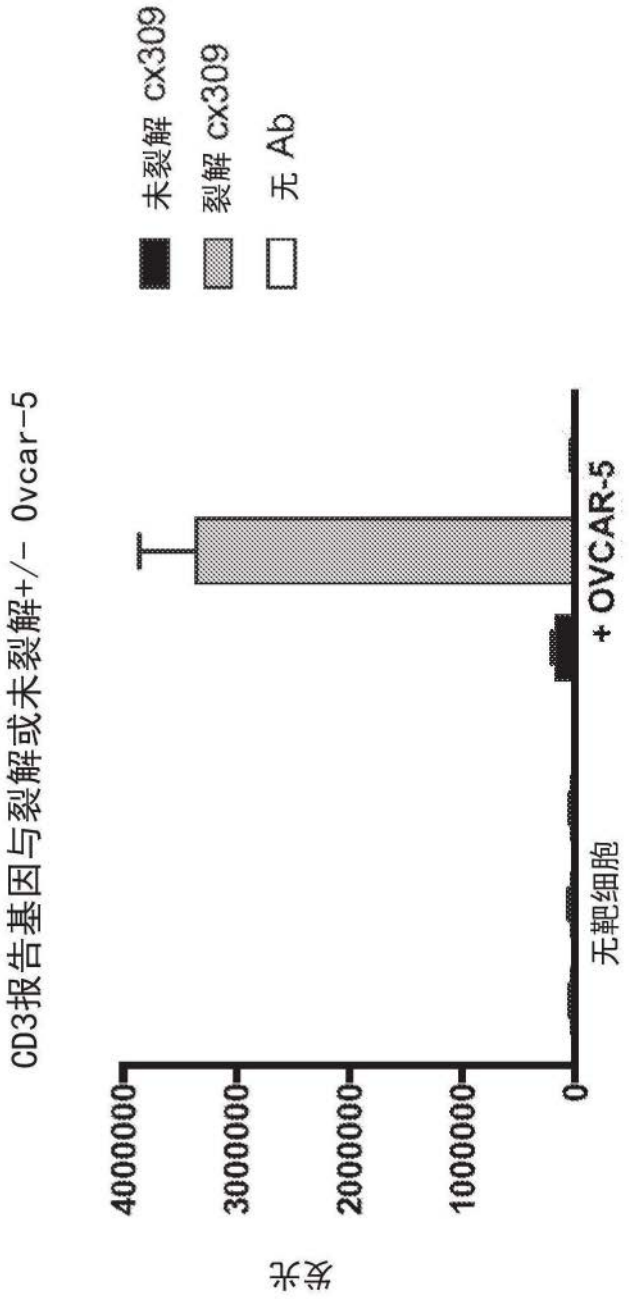

未裂解 cx309
裂解 cx309
无 Ab
CD3报告基因与裂解或未裂解+/- Ovcar-5
4000000
3000000
2000000
1000000
0
发光
无靶细胞
+ OVCAR-5

图17

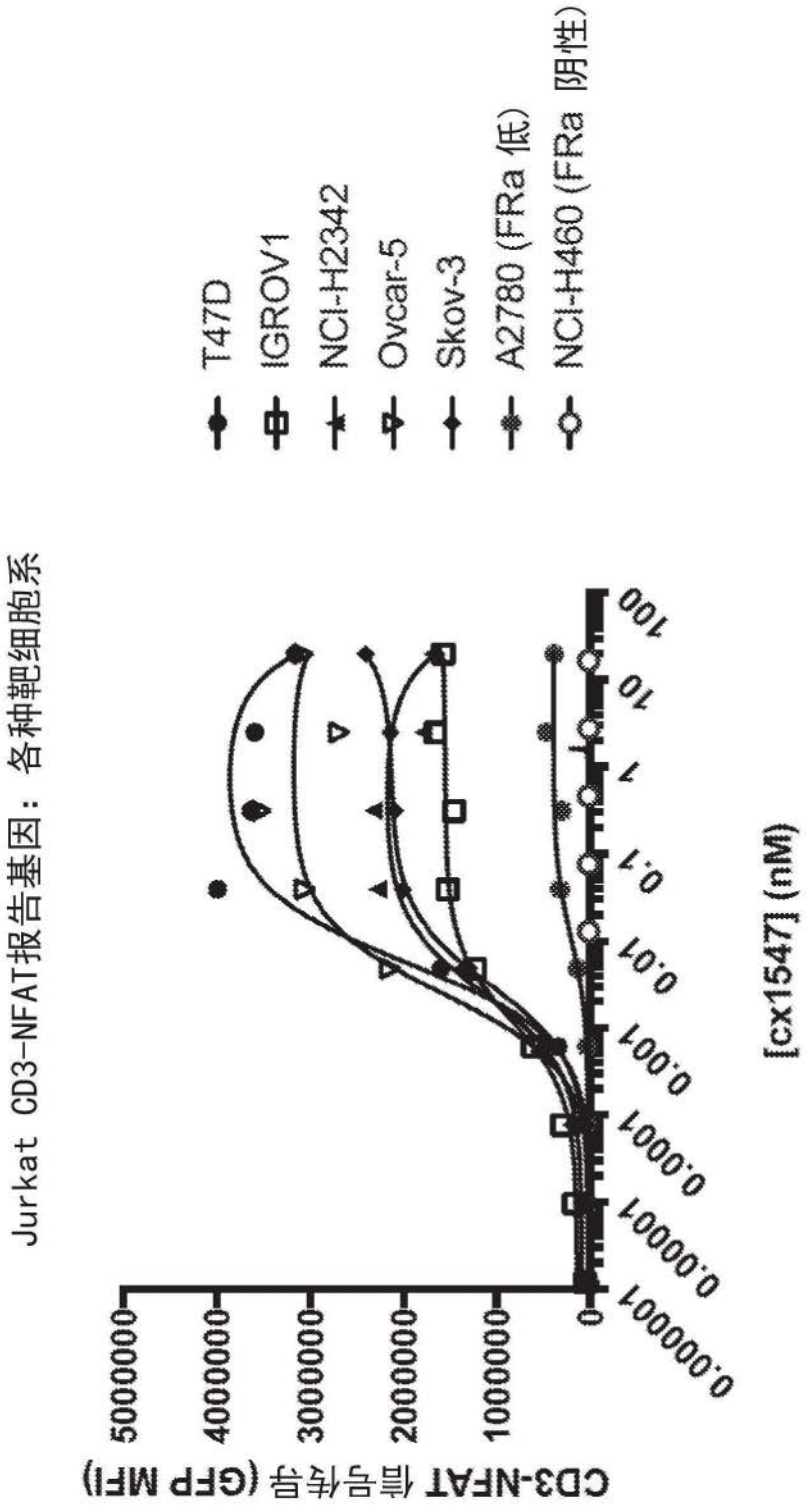
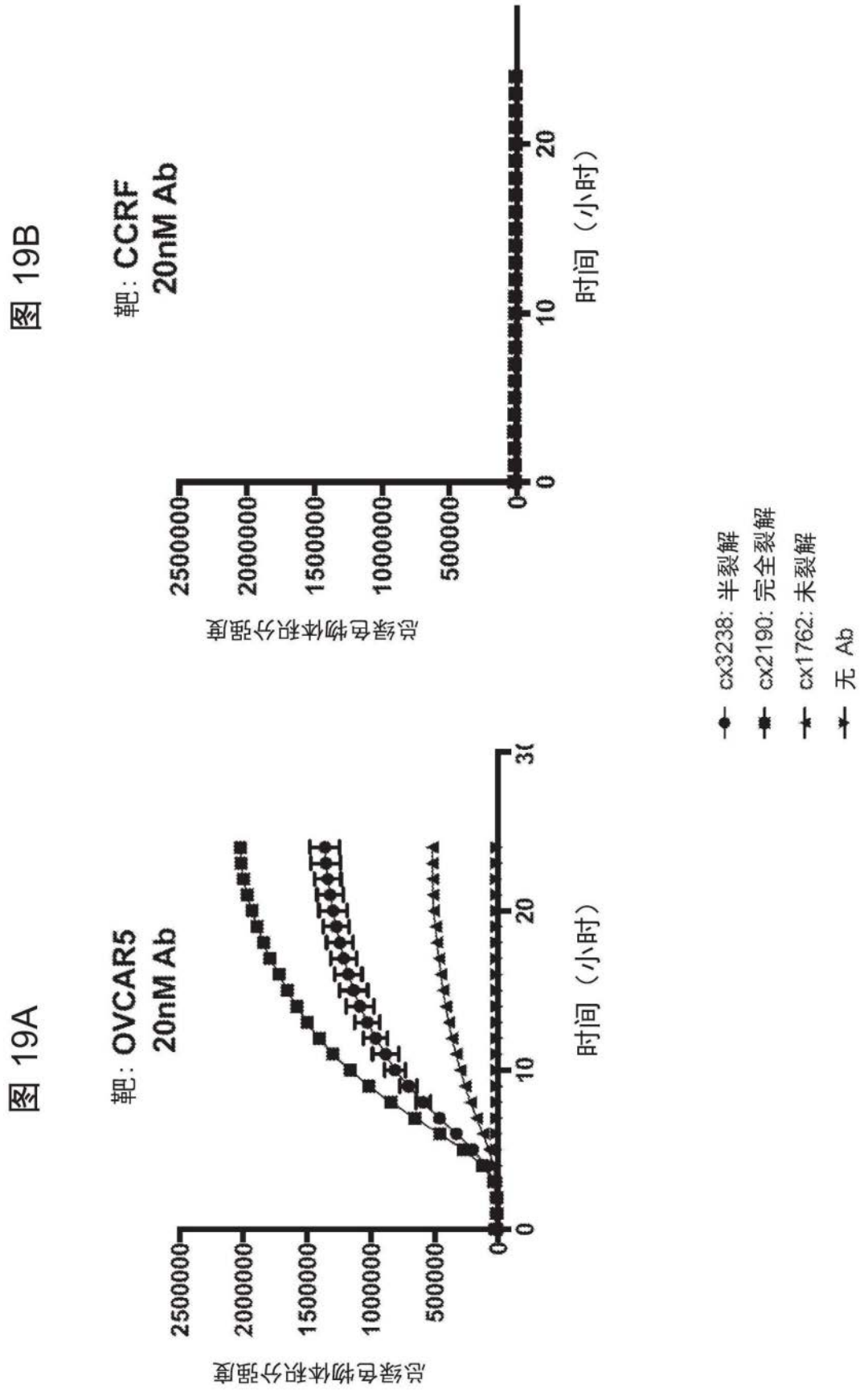
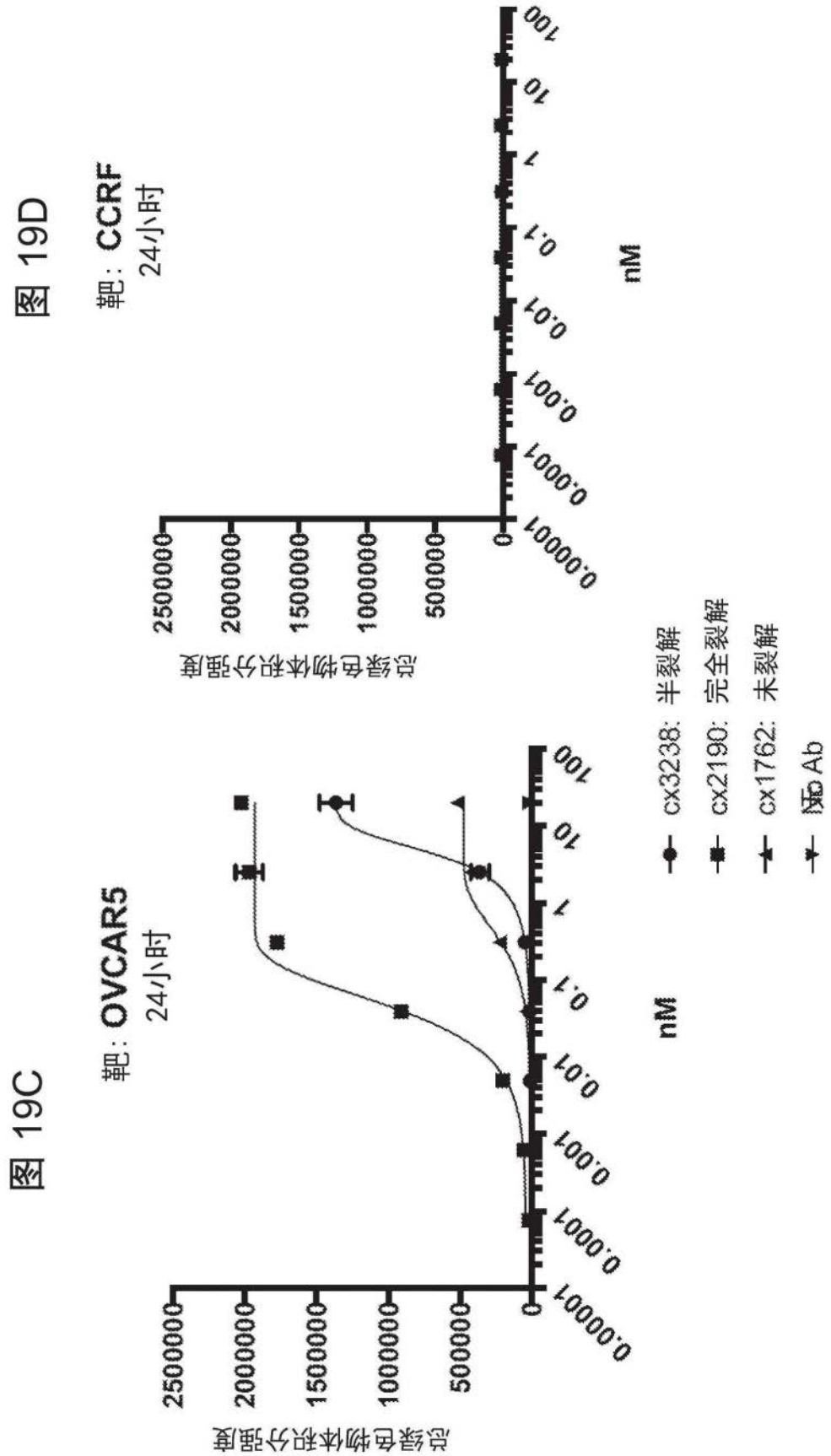
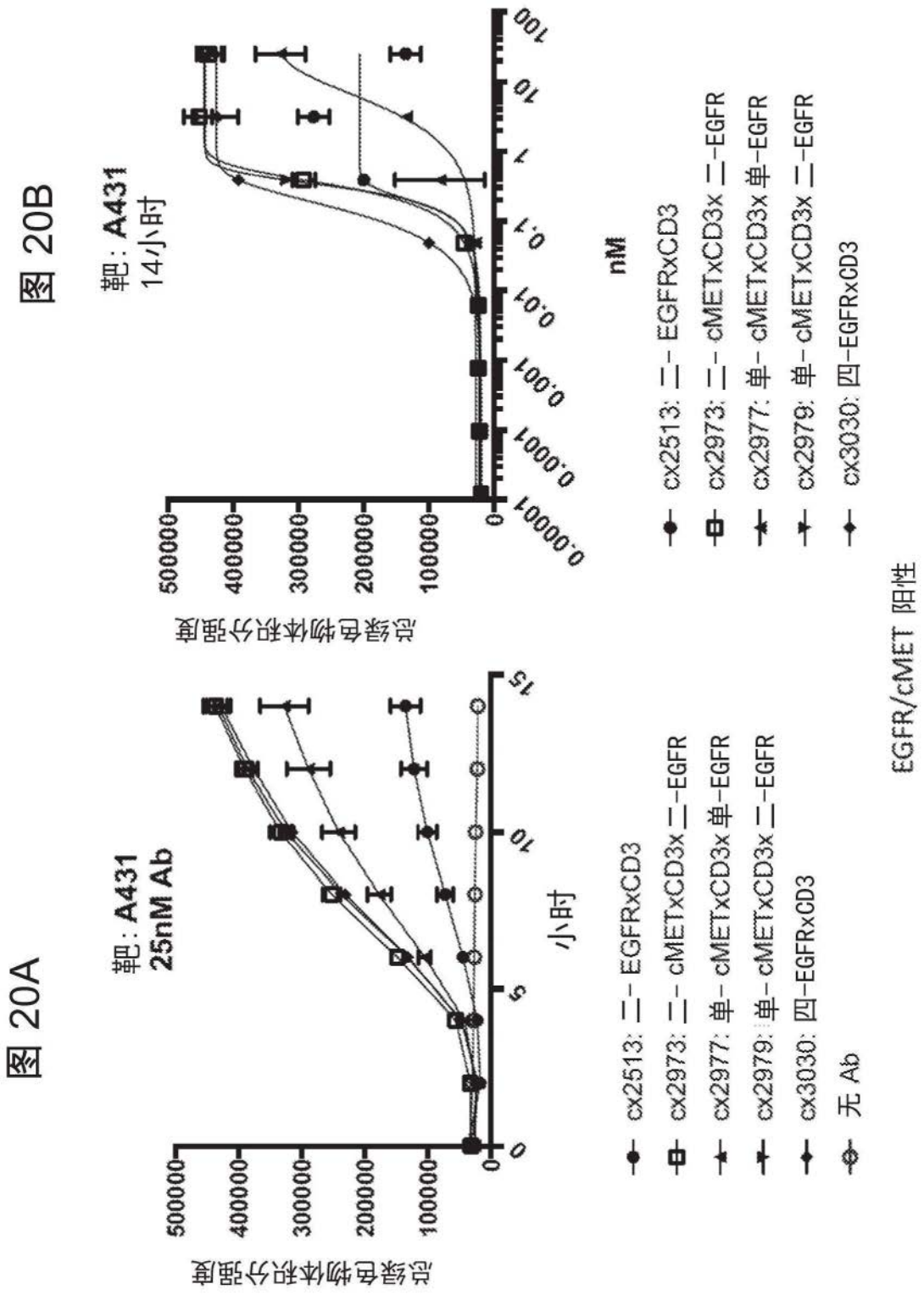
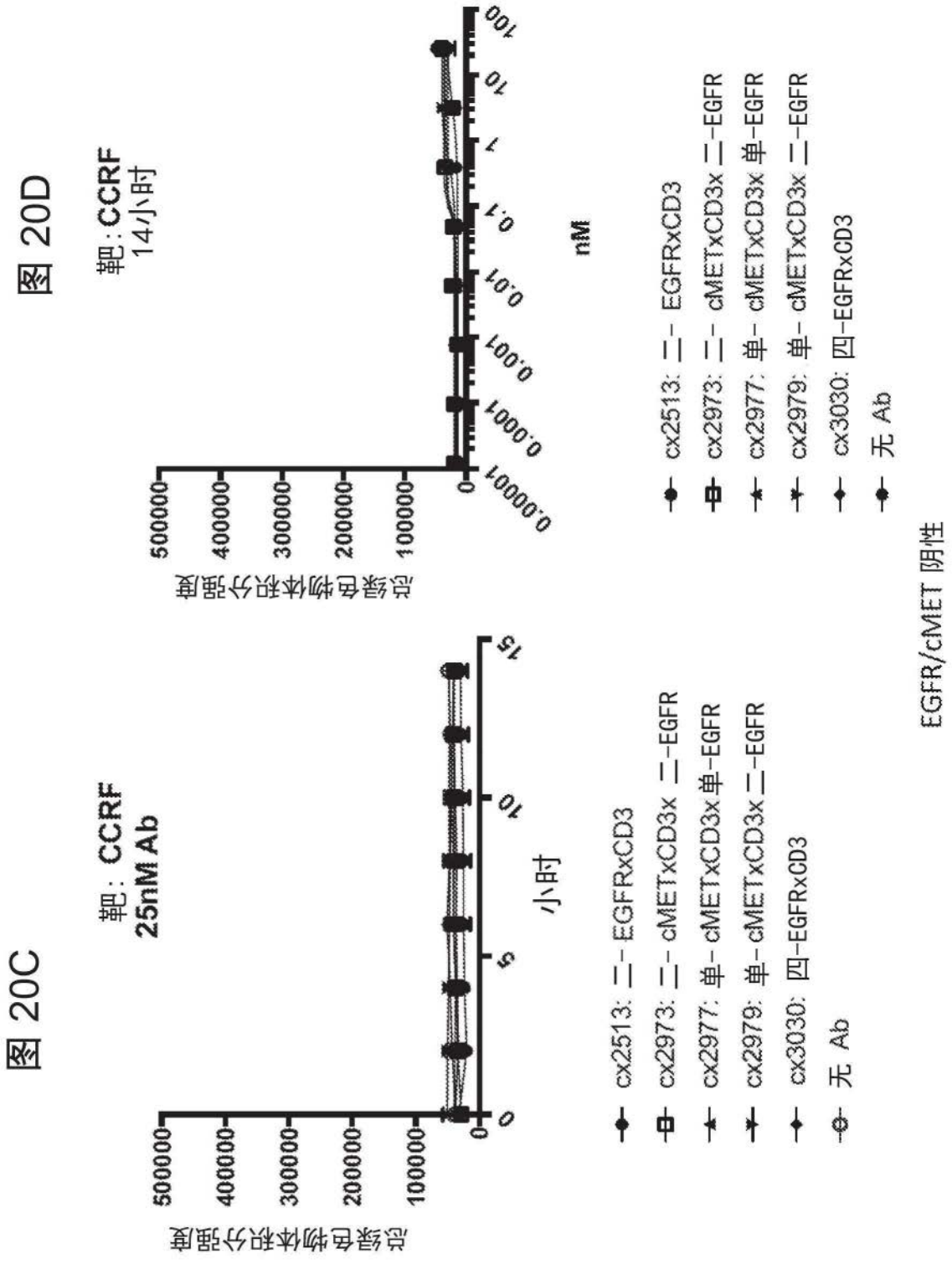

Jurkat CD3-NFAT报告基因：各种靶细胞系
CD3-NFAT 信号传导 (GFP MFI)
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
0.000001
[cx1547] (nM)
T47D
IGROV1
NCI-H2342
Ovcar-5
Skov-3
A2780 (FRa 低)
NCI-H460 (FRa 阴性)

图18


图 19A
靶: OVCAR5
20nM Ab
总绿色物体积分强度
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
0
10
20
时间（小时）
图 19B
靶: CCRF
20nM Ab
总绿色物体积分强度
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
0
10
20
时间（小时）
cx3238: 半裂解
cx2190: 完全裂解
cx1762: 未裂解
无 Ab


图 19C
靶: OVCAR5
24小时
总绿色物体积分强度
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
nM
cx3238: 半裂解
cx2190: 完全裂解
cx1762: 未裂解
hIgG Ab
图 19D
靶: CCRF
24小时
总绿色物体积分强度
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
nM


图 20A
靶: A431
25nM Ab
总绿色物体积分强度
小时
0
5
10
15
100000
200000
300000
400000
500000
cx2513: 二- EGFRxCD3
cx2973: 二- cMETxCD3x 二-EGFR
cx2977: 单- cMETxCD3x 单-EGFR
cx2979: 单- cMETxCD3x 二-EGFR
cx3030: 四-EGFRxCD3
无 Ab
图 20B
靶: A431
14小时
总绿色物体积分强度
nM
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
cx2513: 二- EGFRxCD3
cx2973: 二- cMETxCD3x 二-EGFR
cx2977: 单- cMETxCD3x 单-EGFR
cx2979: 单- cMETxCD3x 二-EGFR
cx3030: 四-EGFRxCD3
EGFR/cMET 阳性


图 20C
靶: CCRF
25nM Ab
总绿色物体积分强度
小时
图 20D
靶:CCRF
14小时
总绿色物体积分强度
nM
cx2513: 二- EGFRxCD3
cx2973: 二- cMETxCD3x 二-EGFR
cx2977: 单- cMETxCD3x 单-EGFR
cx2979: 单- cMETxCD3x 二-EGFR
cx3030: 四-EGFRxCD3
无 Ab
EGFR/cMET 阴性

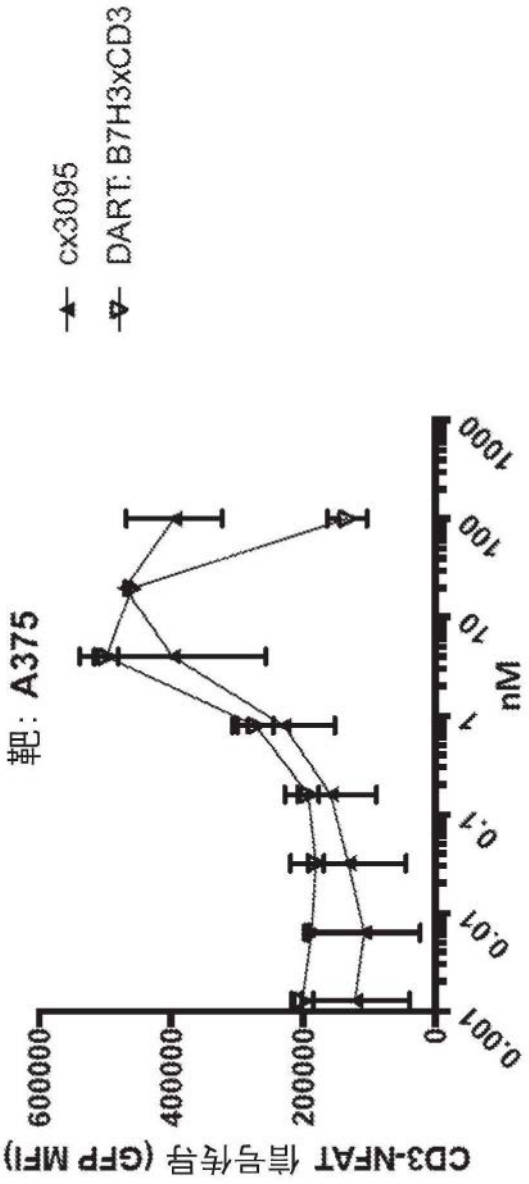

cx3095
DART: B7H3xCD3
靶: A375
CD3-NFAT 信号传导 (GFP MFI)
600000
400000
200000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM

图21A

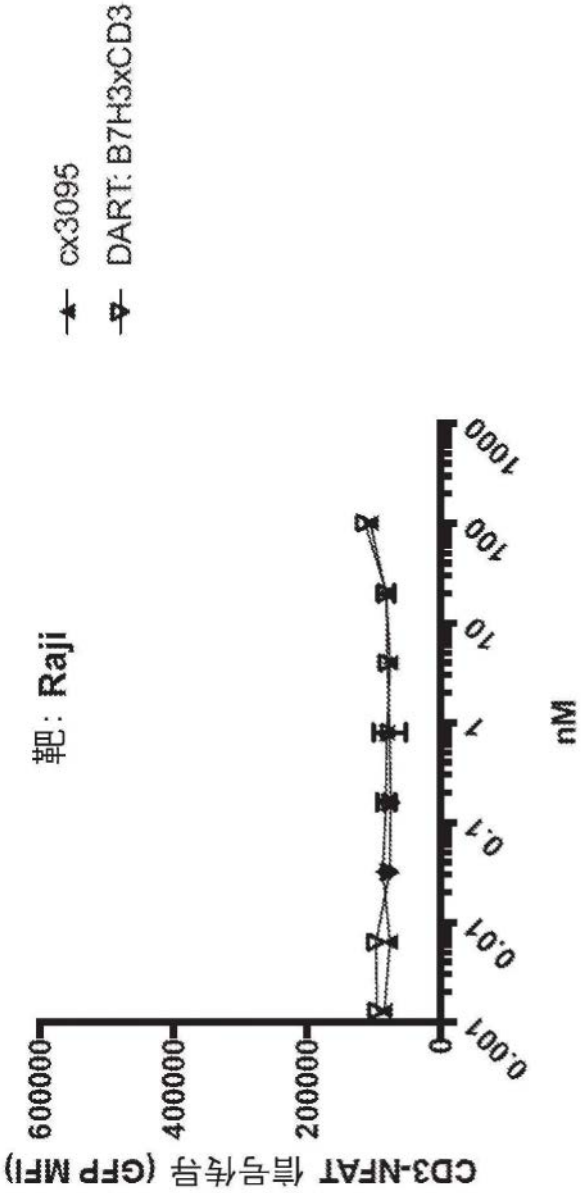

cx3095
DART: B7H3xCD3
靶: Raji
CD3-NFAT 信号传导 (GFP MFI)
600000
400000
200000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM

图21B

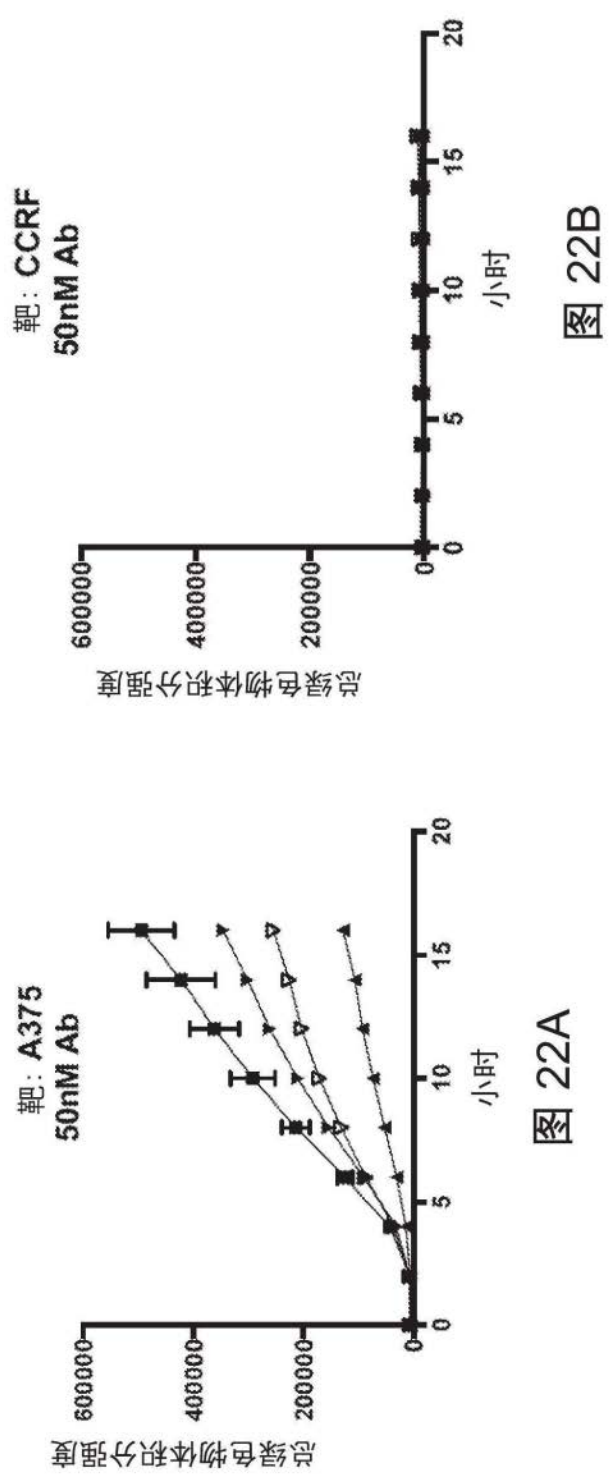


图 22A

图 22B

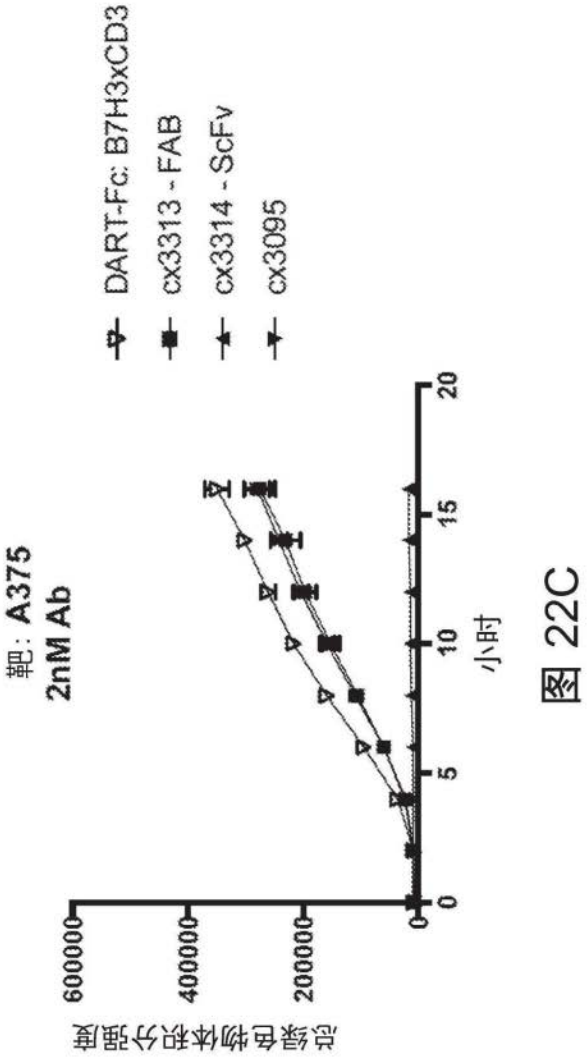


图 22C

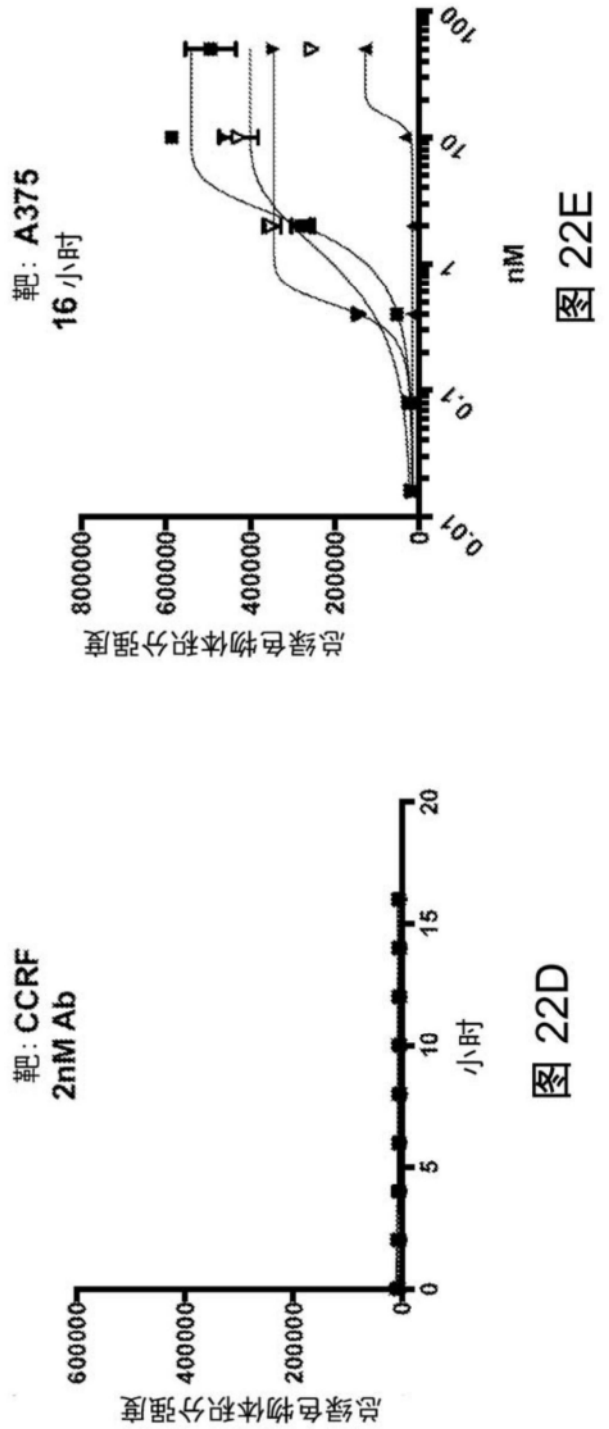


图 22D

图 22E

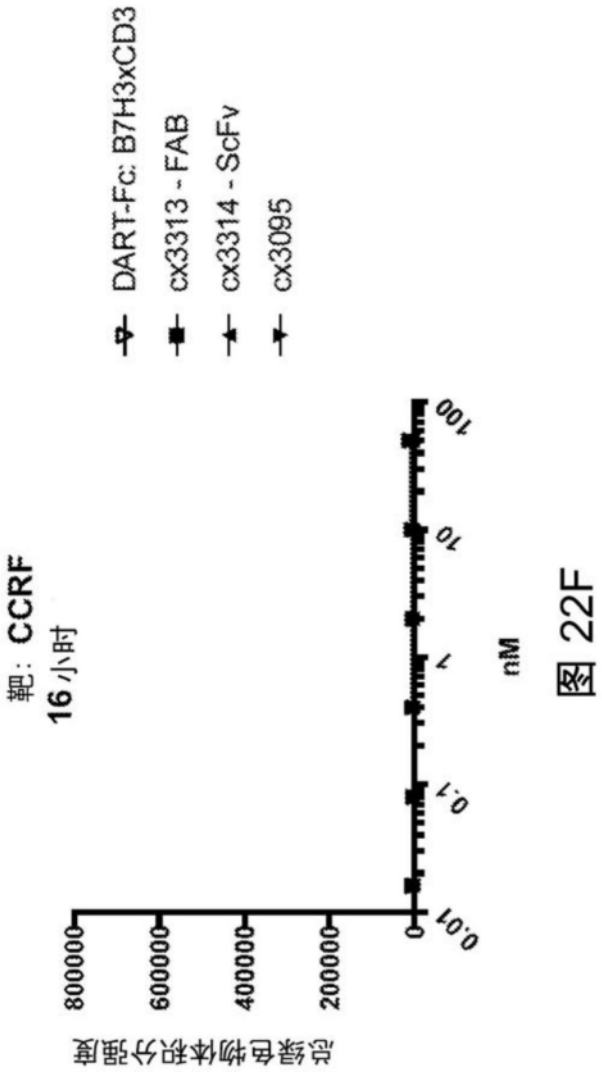


图 22F

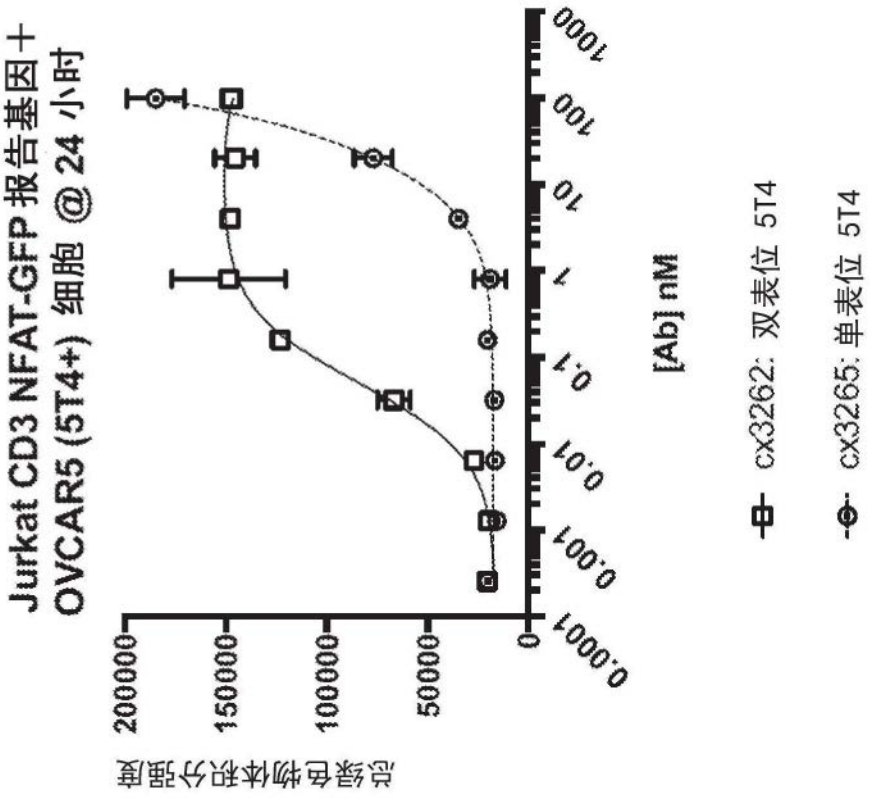

Jurkat CD3 NFAT-GFP 报告基因＋
OVCAR5 (5T4+) 细胞 @ 24 小时
总绿色物体积分强度
200000
150000
100000
50000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[Ab] nM
cx3262: 双表位 5T4
cx3265: 单表位 5T4

图23A

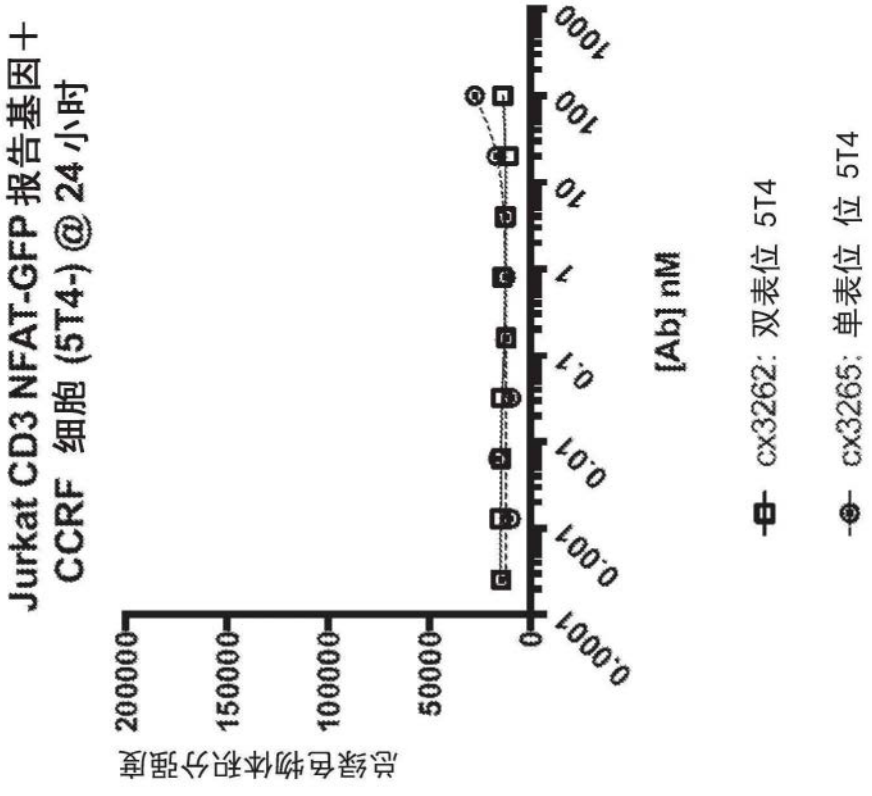

Jurkat CD3 NFAT-GFP 报告基因＋
CCRF 细胞 (5T4-) @ 24 小时
总绿色物体积分强度
200000
150000
100000
50000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[Ab] nM
cx3262: 双表位 5T4
cx3265: 单表位 位 5T4

图23B

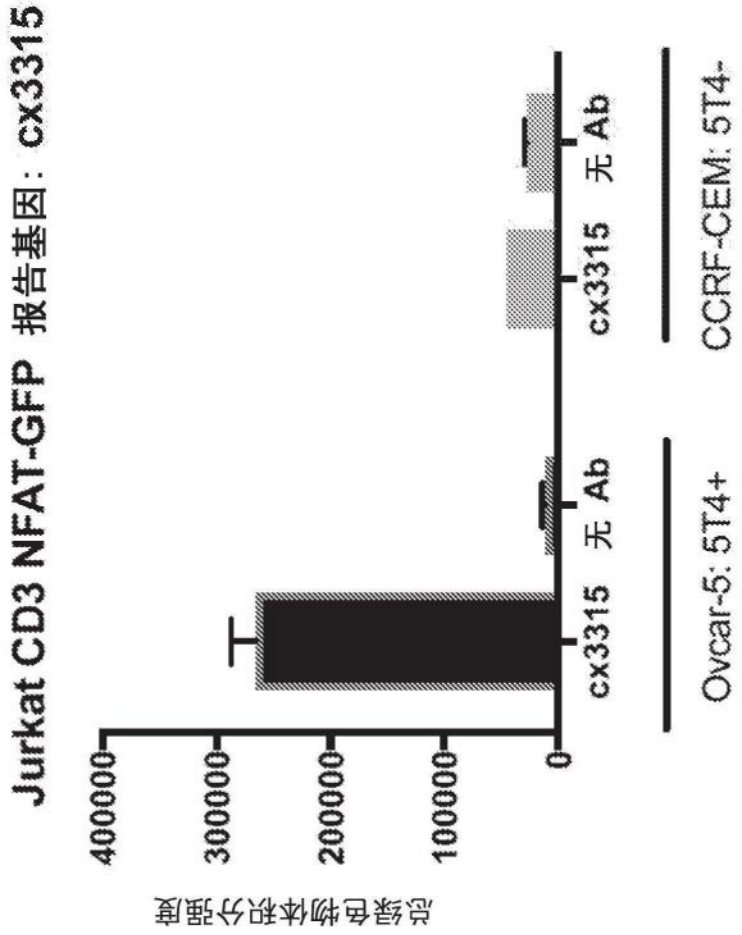

Jurkat CD3 NFAT-GFP 报告基因：cx3315
总绿色物体积分强度
400000
300000
200000
100000
0
cx3315
无 Ab
cx3315
无 Ab
Ovcar-5: 5T4+
CCRF-CEM: 5T4-

图24

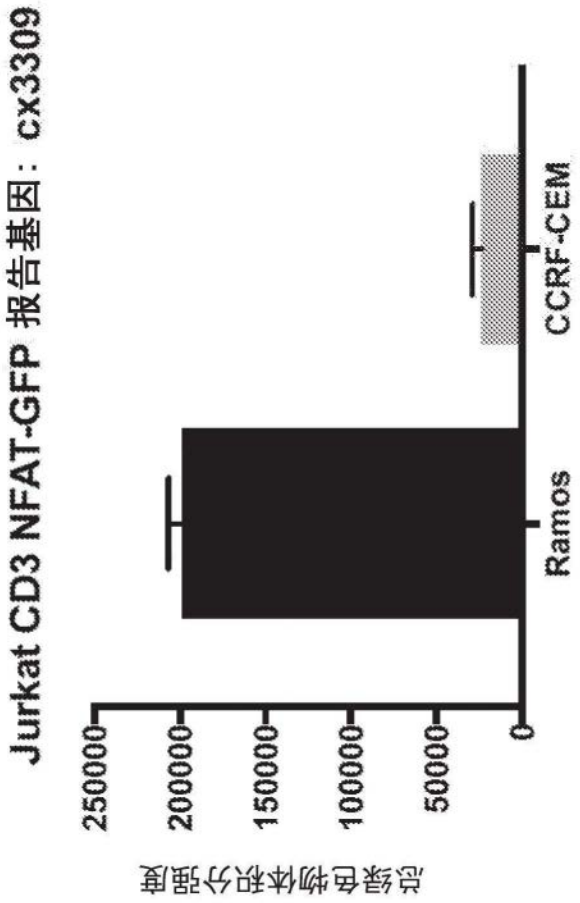

Jurkat CD3 NFAT-GFP 报告基因：cx3309
总绿色物体积分强度
250000
200000
150000
100000
50000
0
Ramos
CCRF-CEM

图25

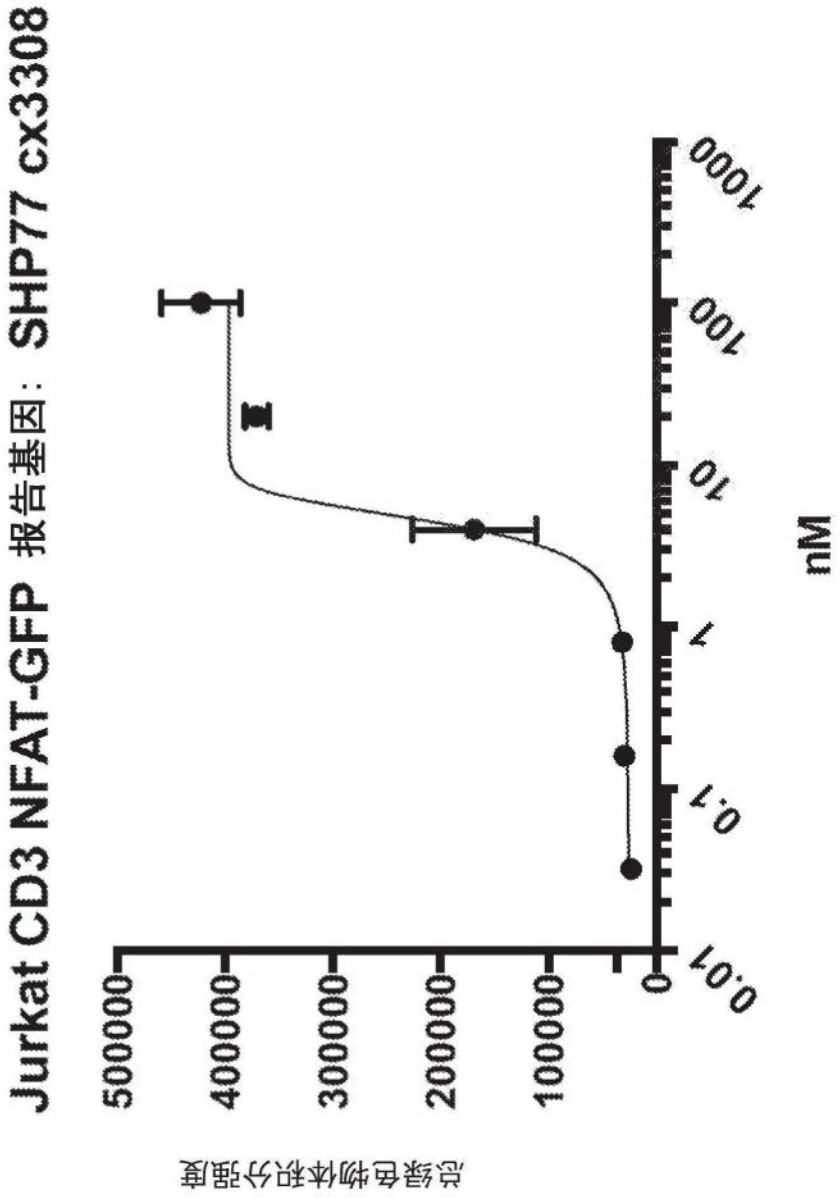

Jurkat CD3 NFAT-GFP 报告基因: SHP77 cx3308
总绿色物体积分强度
500000
400000
300000
200000
100000
0
0.07
0.1
1
10
100
1000
nM

图26

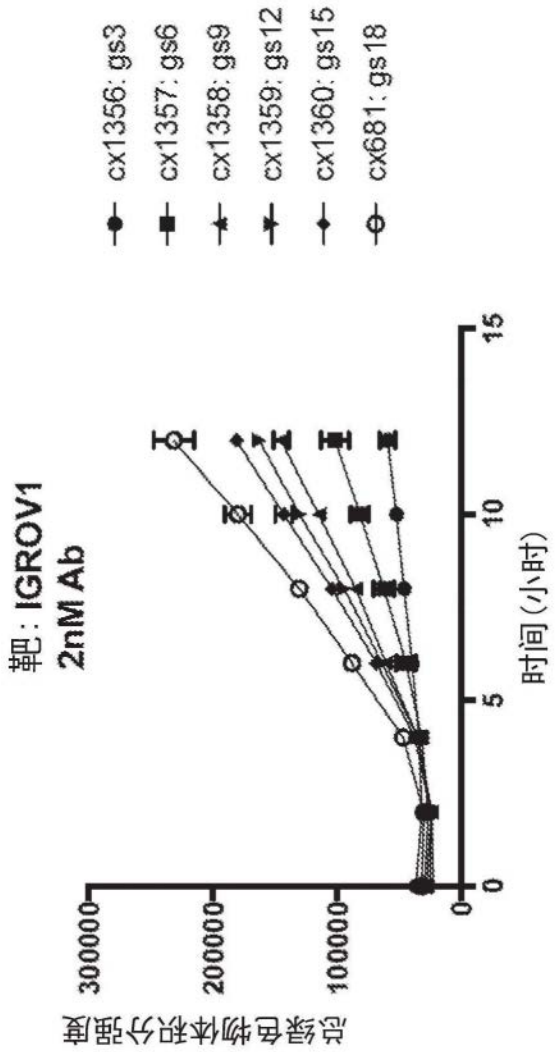

cx1356:gs3
cx1357:gs6
cx1358:gs9
cx1359:gs12
cx1360:gs15
cx681:gs18
靶:IGROV1
2nM Ab
总绿色物体积分强度
300000
200000
100000
0
0
5
10
15
时间(小时)

图27A

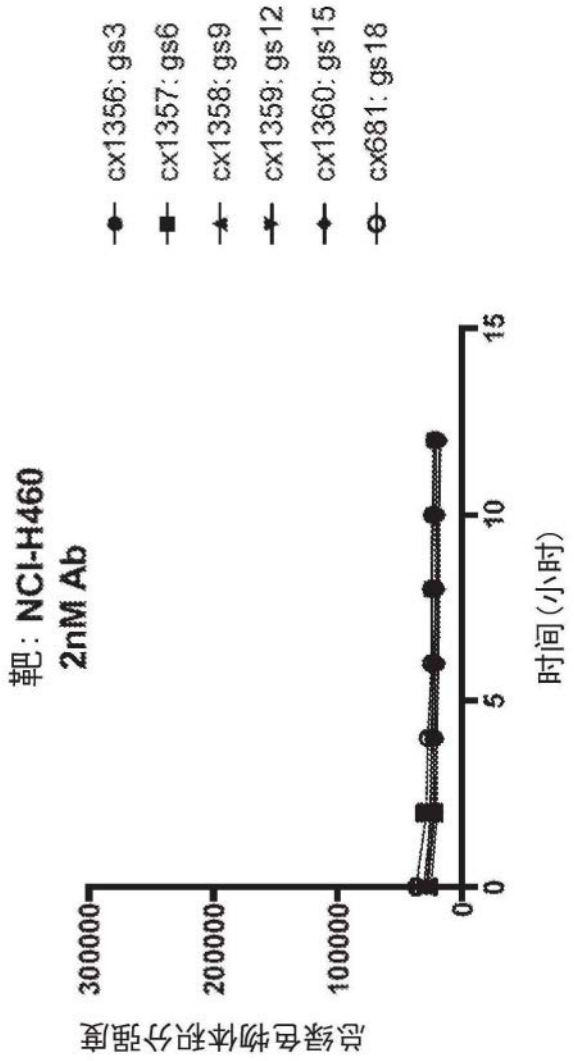

cx1356: gs3
cx1357: gs6
cx1358: gs9
cx1359: gs12
cx1360: gs15
cx681: gs18
靶: NCI-H460
2nM Ab
总绿色物体积分强度
300000
200000
100000
0
0
5
10
15
时间(小时)

图27B

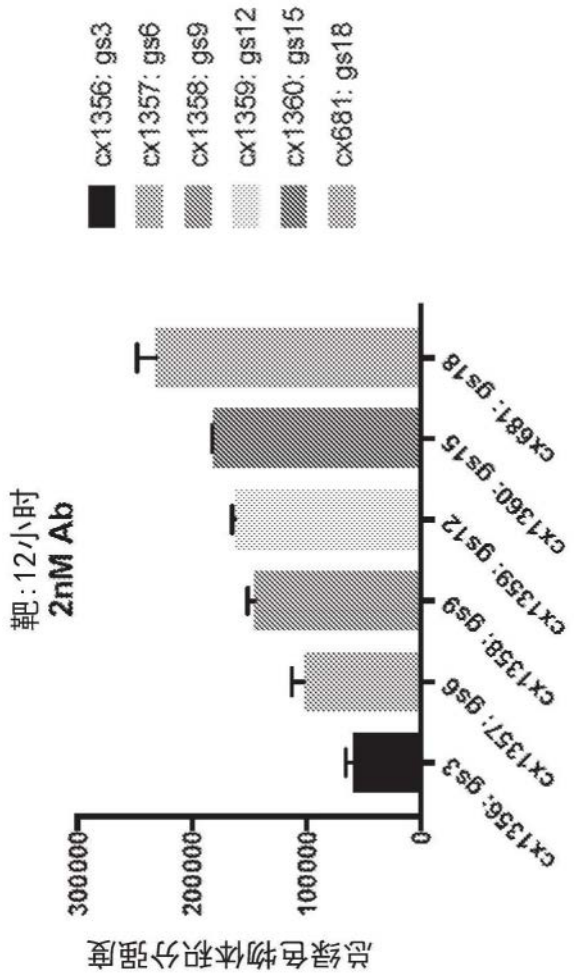

cx1356: gs3
cx1357: gs6
cx1358: gs9
cx1359: gs12
cx1360: gs15
cx681: gs18
靶:12小时
2nM Ab
总绿色物体积分强度
300000
200000
100000
0
cx1356: gs3
cx1357: gs6
cx1358: gs9
cx1359: gs12
cx1360: gs15
cx681: gs18

图27C

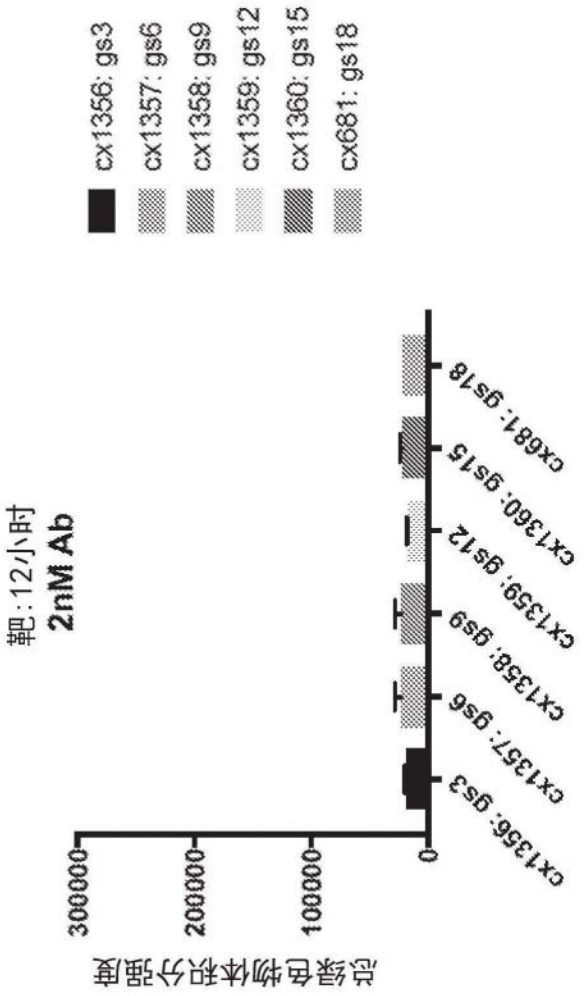

cx1356: gs3
cx1357: gs6
cx1358: gs9
cx1359: gs12
cx1360: gs15
cx681: gs18
靶:12小时
2nM Ab
总绿色物体积分强度
300000
200000
100000
0
cx1356: gs3
cx1357: gs6
cx1358: gs9
cx1359: gs12
cx1360: gs15
cx681: gs18

图27D

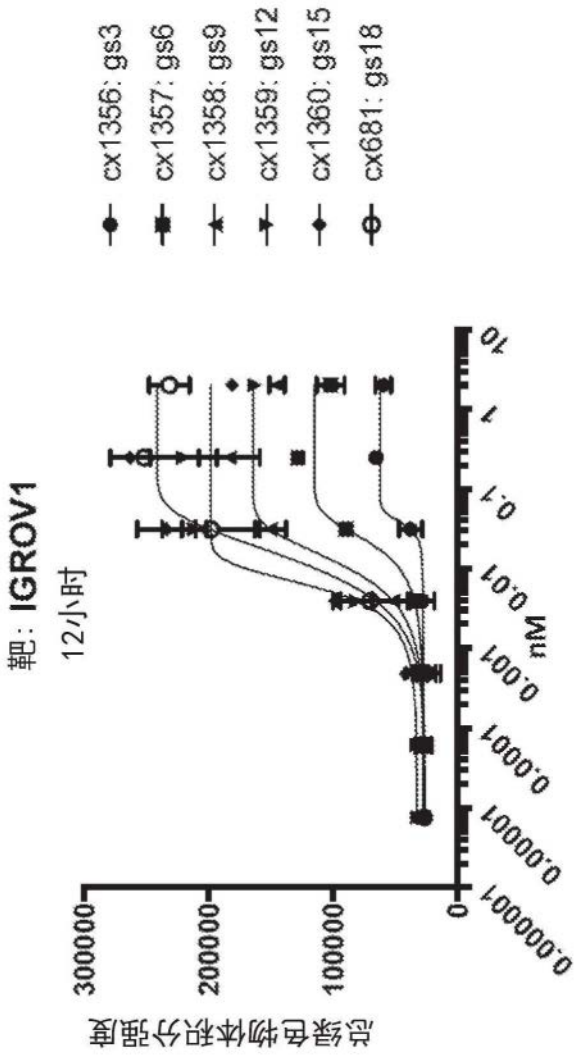

cx1356: gs3
cx1357: gs6
cx1358: gs9
cx1359: gs12
cx1360: gs15
cx681: gs18
靶: IGROV1
12小时
总绿色物体积分强度
300000
200000
100000
0
0.000001
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM

图27E

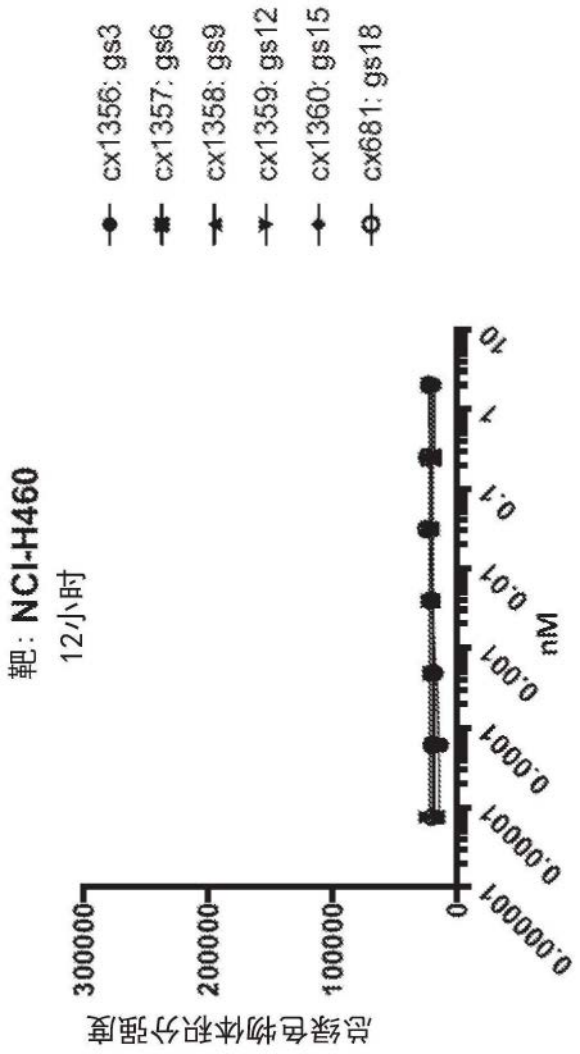

cx1356: gs3
cx1357: gs6
cx1358: gs9
cx1359: gs12
cx1360: gs15
cx681: gs18
靶: NCI-H460
12小时
总绿色物体积分强度
300000
200000
100000
0
0.000001
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM

图27F

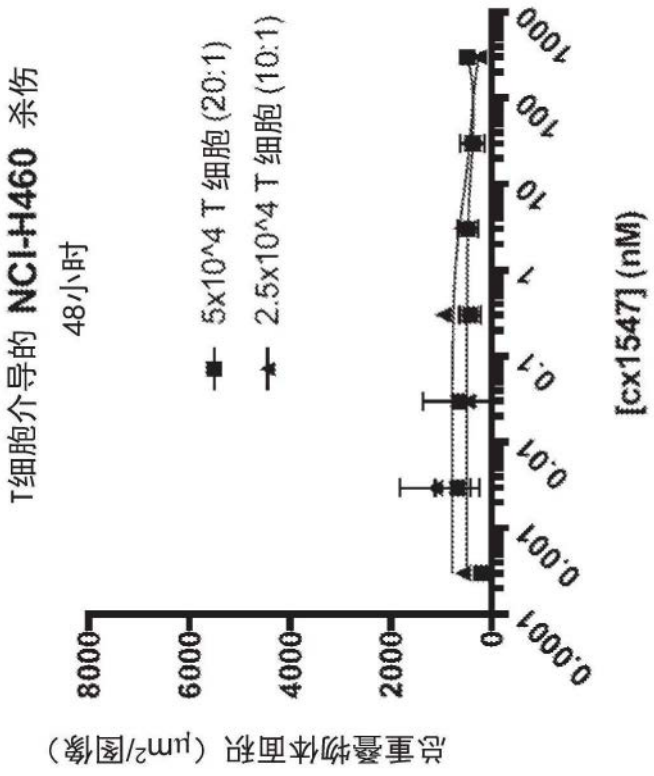

T细胞介导的 NCI-H460 杀伤
48小时
5x10^4 T 细胞 (20:1)
2.5x10^4 T 细胞 (10:1)
总重叠物体面积 (μm²/图像)
8000
6000
4000
2000
0
[cx1547] (nM)
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001

图28A

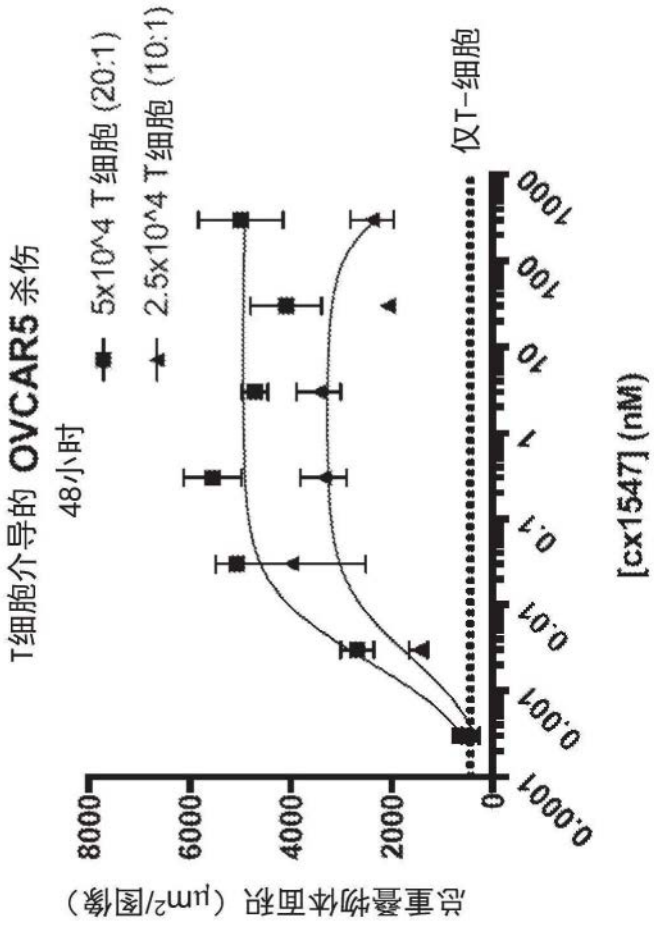

T细胞介导的 OVCAR5 杀伤
48小时
5x10^4 T细胞 (20:1)
2.5x10^4 T细胞 (10:1)
仅T-细胞
总重叠物体面积 (μm²/图像)
8000
6000
4000
2000
0
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
[cx1547] (nM)

图28B

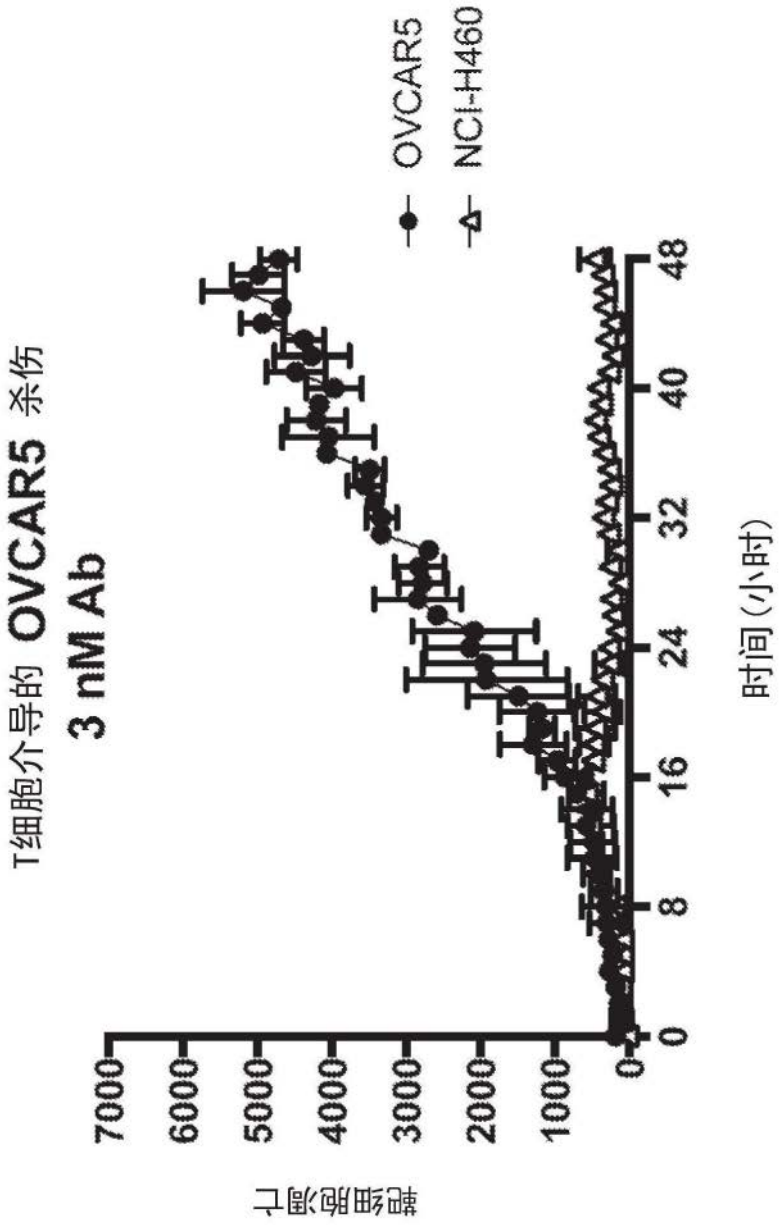

T细胞介导的 OVCAR5 杀伤
3 nM Ab
OVCAR5
NCI-H460
靶细胞凋亡
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
8
16
24
32
40
48
时间(小时)

图28C

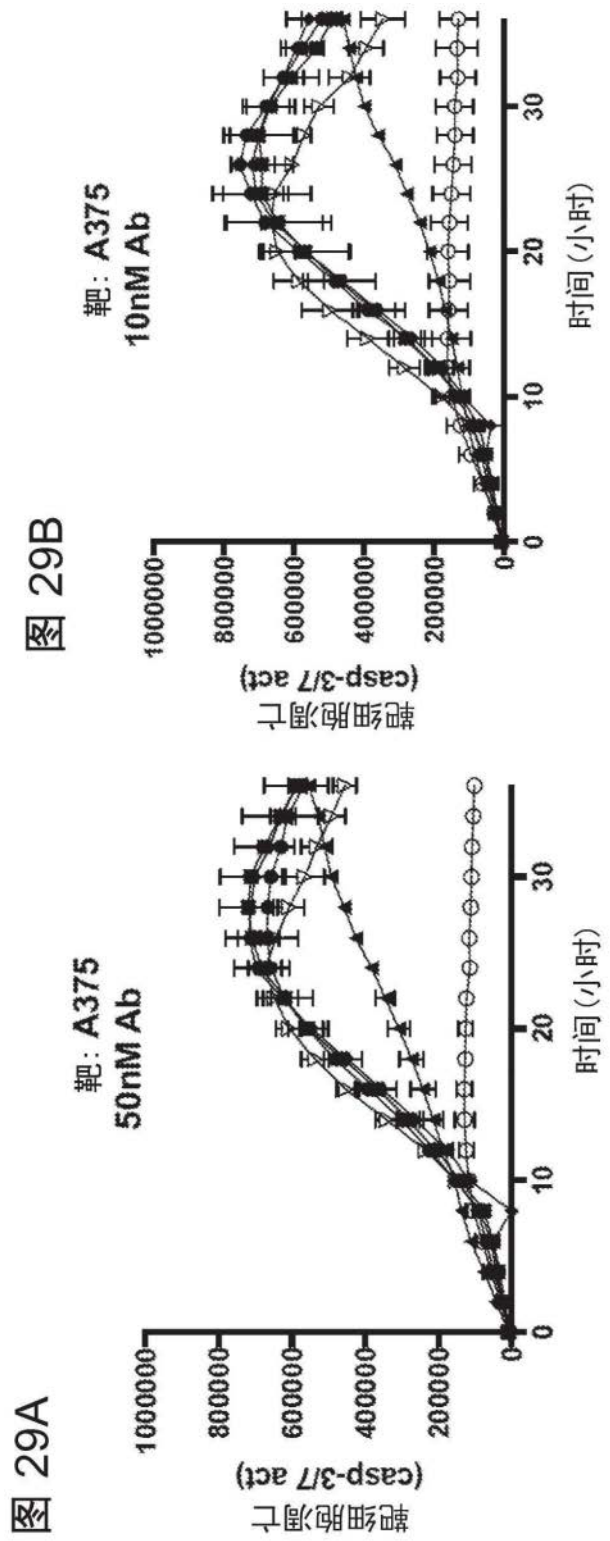


图 29A

图 29B

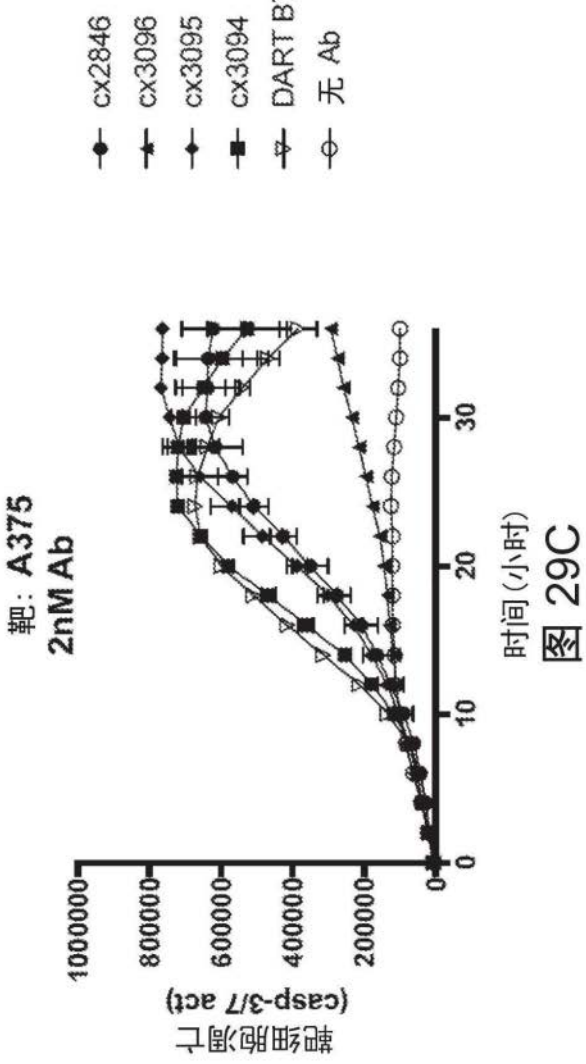


图 29C

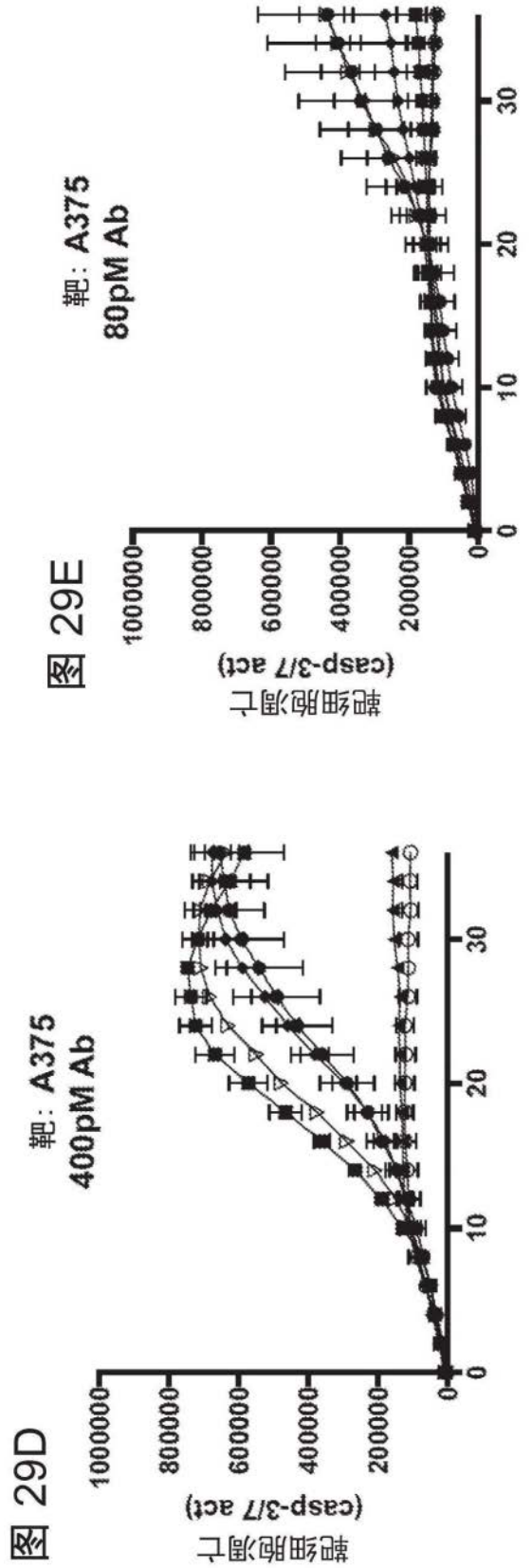


图 29D

图 29E

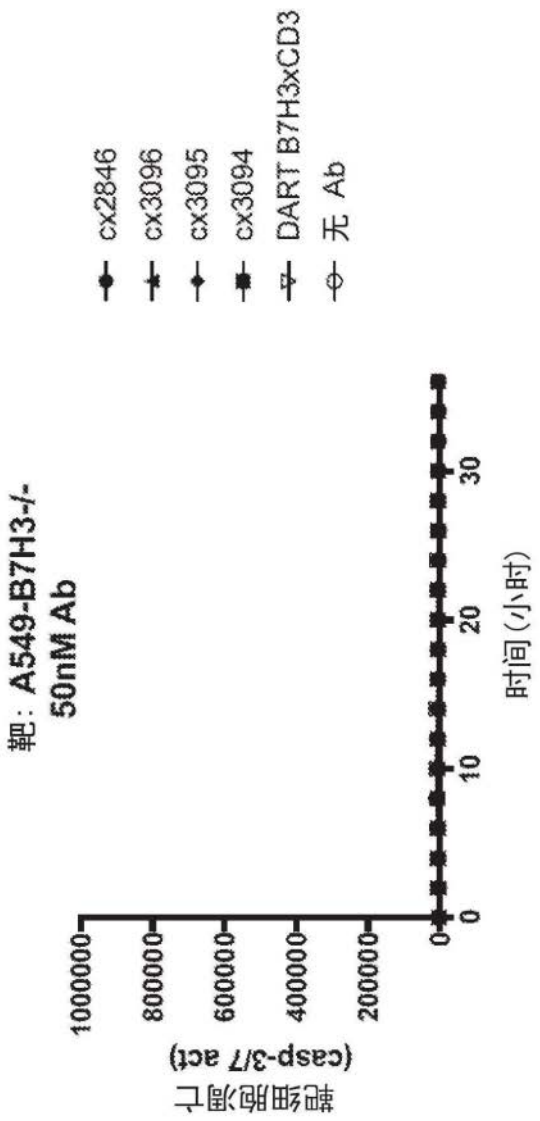


图 29F

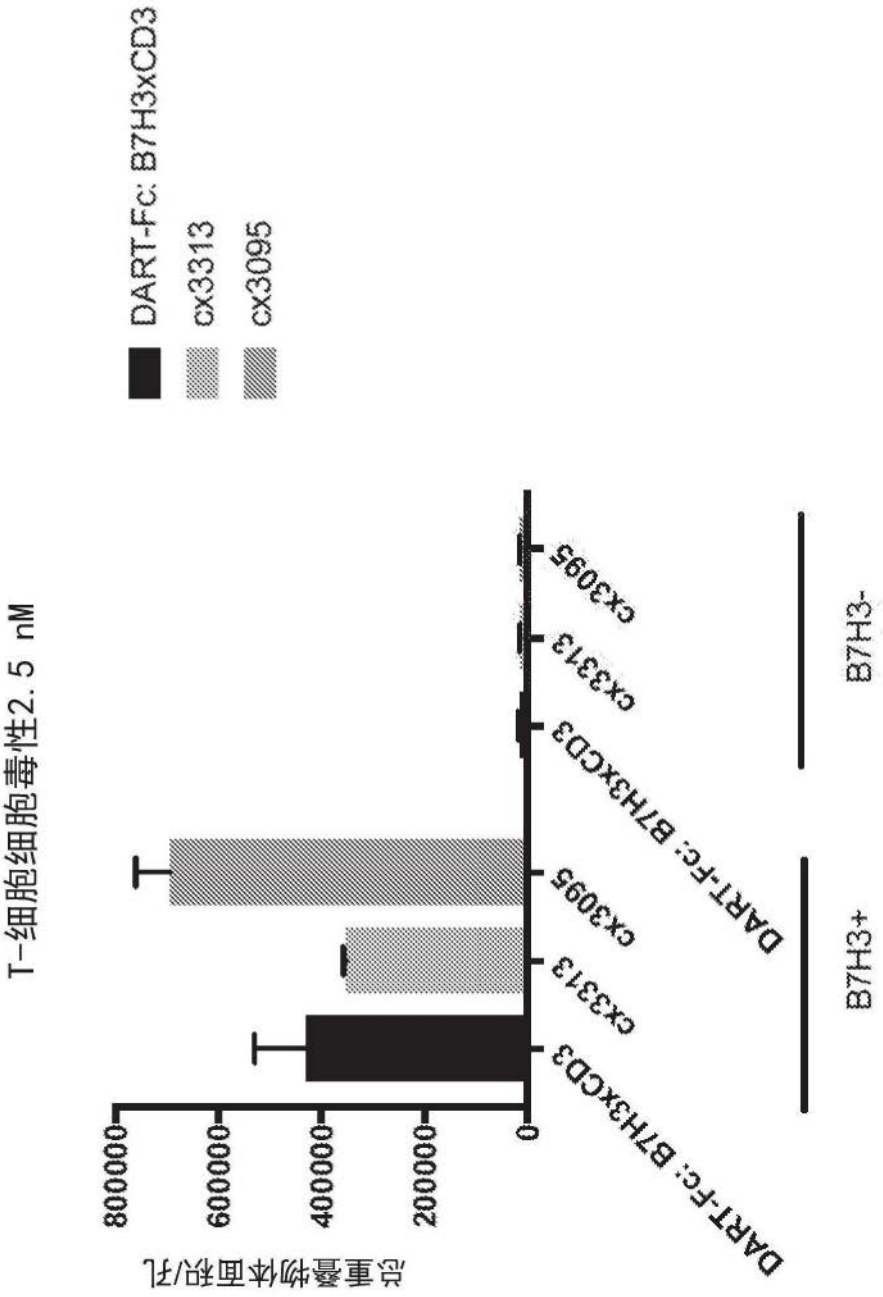

DART-Fc: B7H3xCD3
cx3313
cx3095
T-细胞细胞毒性2.5 nM
总重叠物体面积/孔
800000
600000
400000
200000
0
DART-Fc: B7H3xCD3
cx3313
cx3095
DART-Fc: B7H3xCD3
cx3313
cx3095
B7H3+
B7H3-

图30

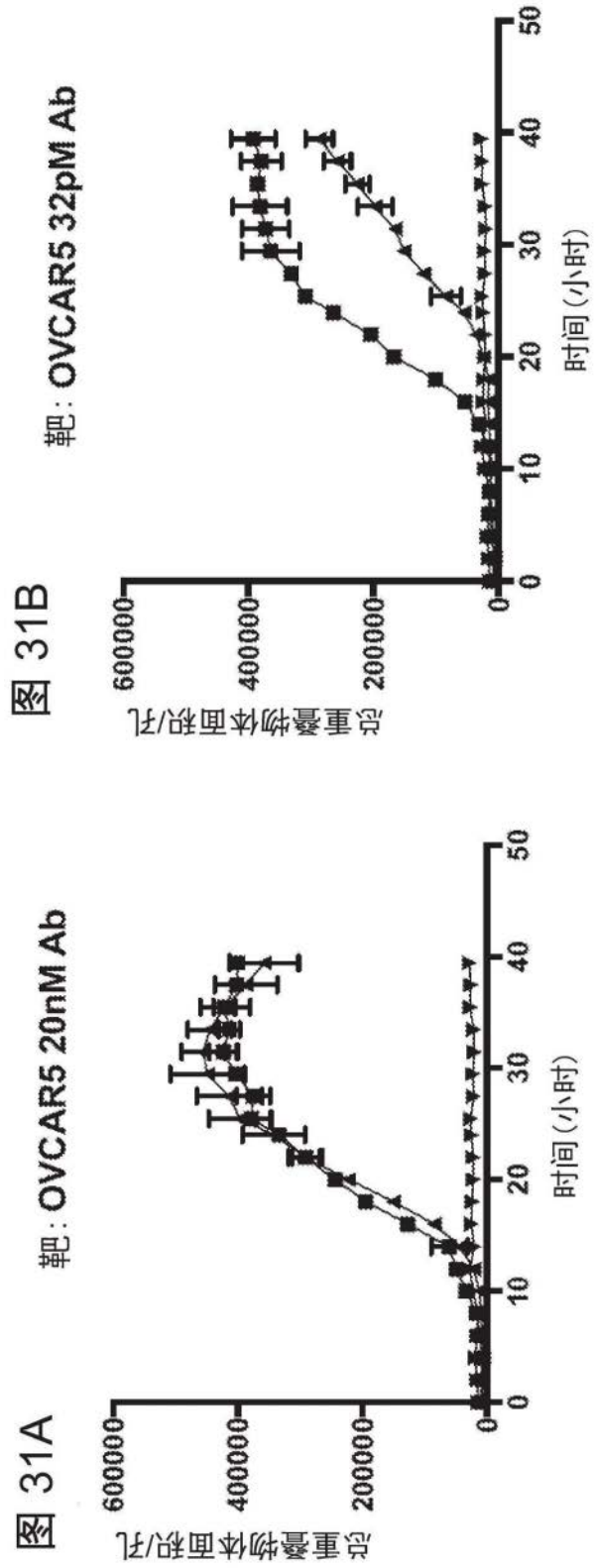


图 31A

图 31B

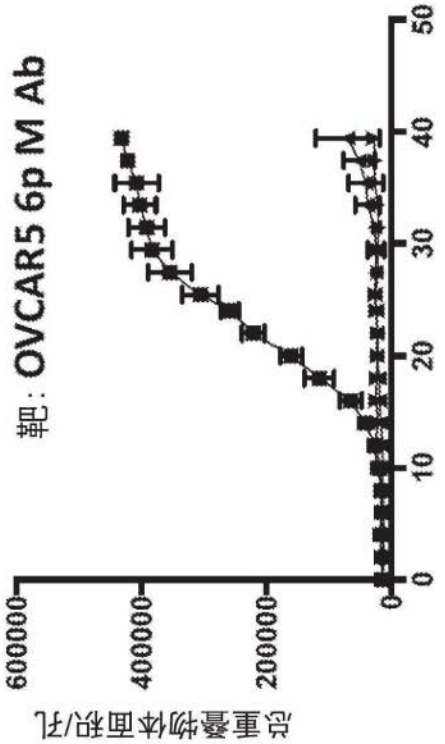


图 31C

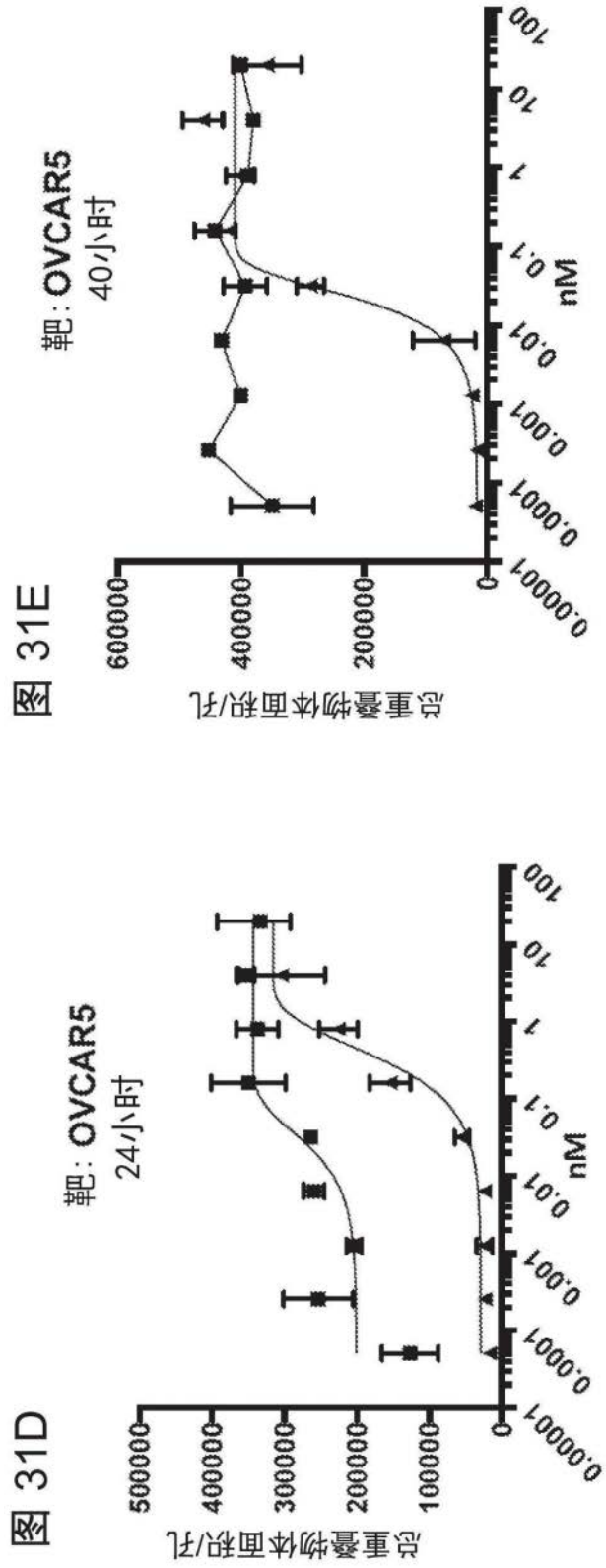


图 31D

图 31E

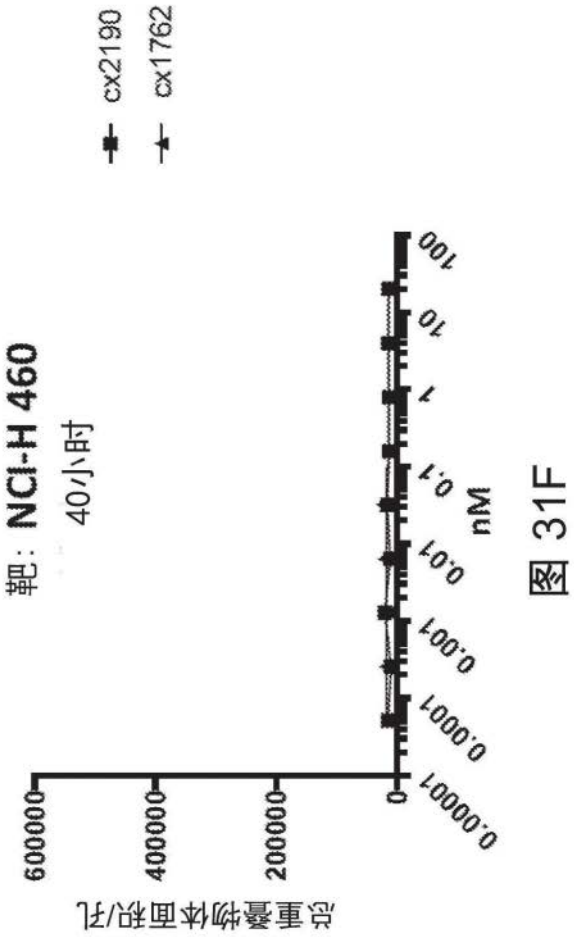


图 31F

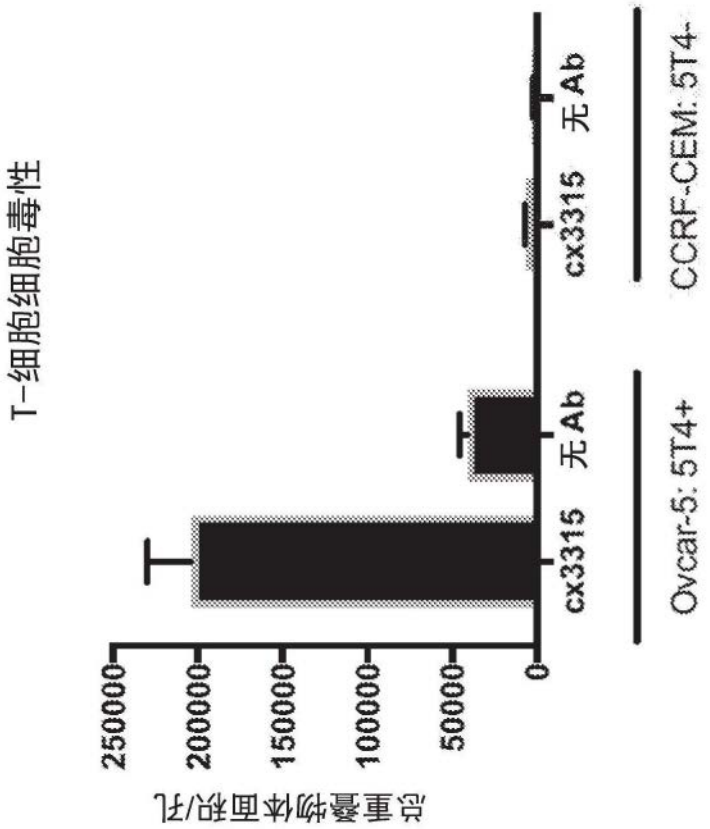

T-细胞细胞毒性
总重叠物体面积/孔
250000
200000
150000
100000
50000
0
cx3315
无Ab
cx3315
无Ab
Ovcar-5: 5T4+
CCRF-CEM: 5T4-

图32

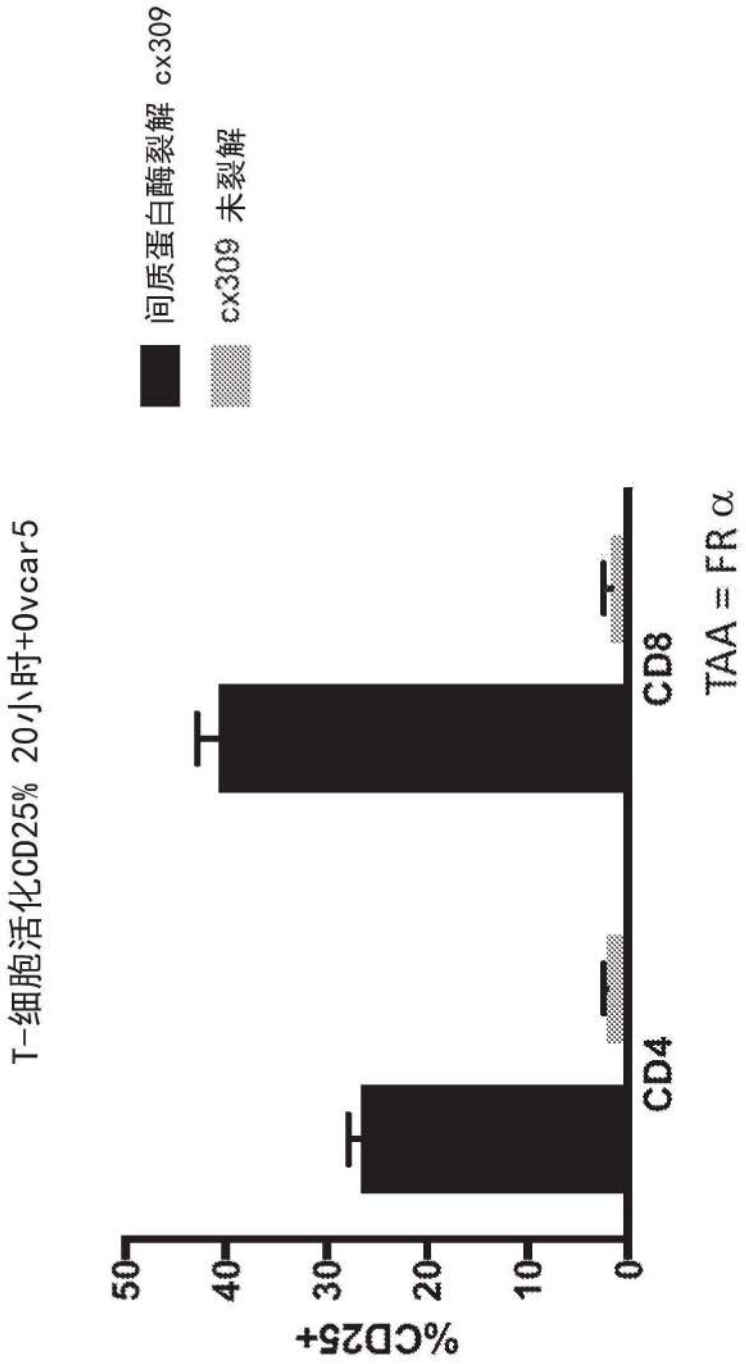

间质蛋白酶裂解 cx309
cx309 未裂解
T-细胞活化CD25% 20小时+Ovcar5
%CD25+
50
40
30
20
10
0
CD4
CD8
TAA = FR α

图33

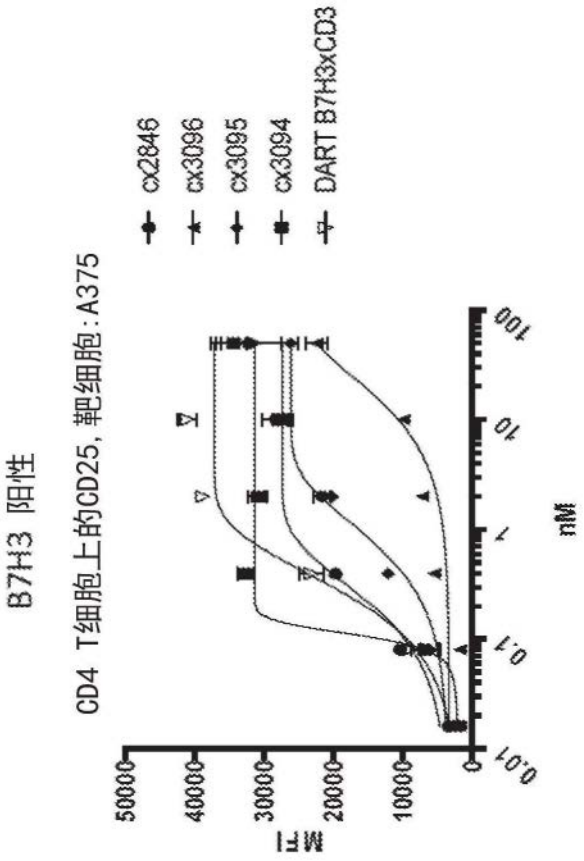

B7H3 阳性
CD4 T细胞上的CD25,靶细胞:A375
MFI
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
nM
cx2846
cx3096
cx3095
cx3094
DART B7H3xCD3

图34A

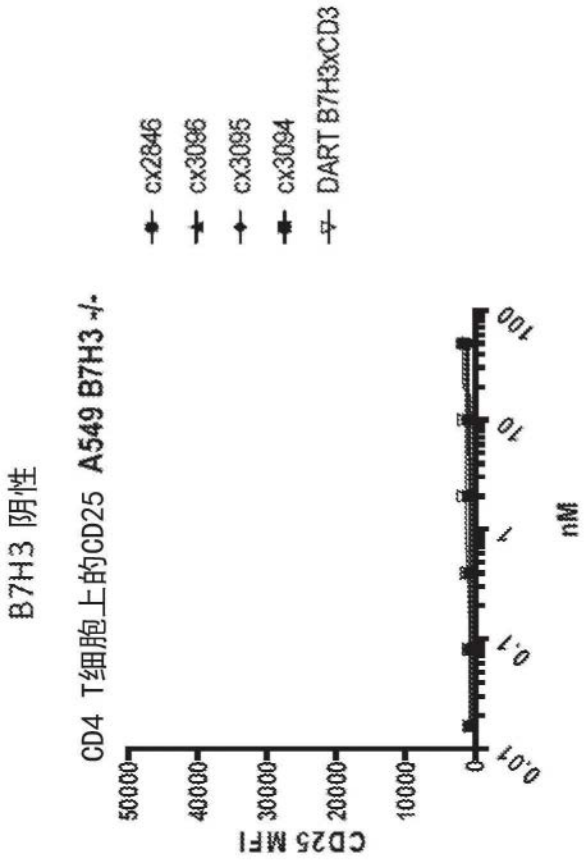

cx2846
cx3096
cx3095
cx3094
DART B7H3xCD3
B7H3 阴性
CD4 T细胞上的CD25 A549 B7H3 +/-
CD25 MFI
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
nM

图34B

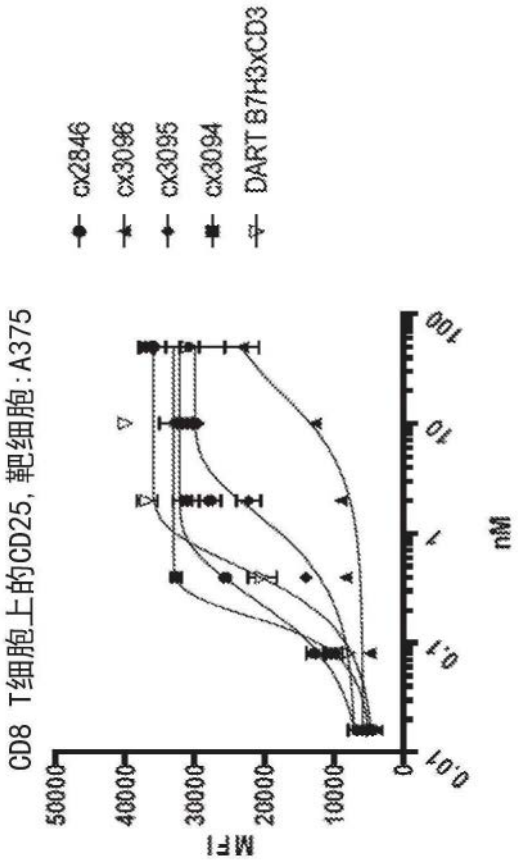

cx2846
cx3096
cx3095
cx3094
DART B7H3xCD3
CD8 T细胞上的CD25, 靶细胞:A375
MFI
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
nM

图34C

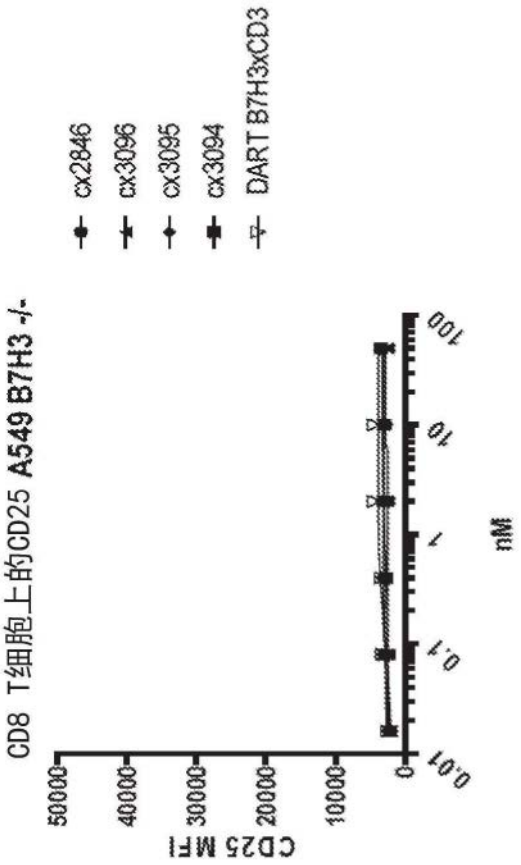

cx2846
cx3096
cx3095
cx3094
DART B7H3xCD3
CD8 T细胞上的CD25 A549 B7H3 -/-
CD25 MFI
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
nM

图34D

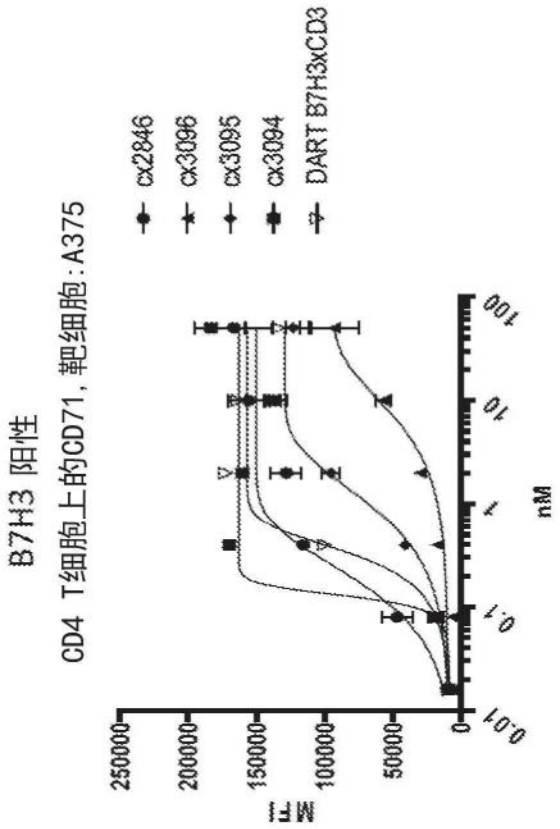

B7H3 阳性
CD4 T细胞上的CD71，靶细胞：A375
cx2846
cx3096
cx3095
cx3094
DART B7H3xCD3
MFI
250000
200000
150000
100000
50000
0
0.01
0.1
1
10
100
nM

图34E

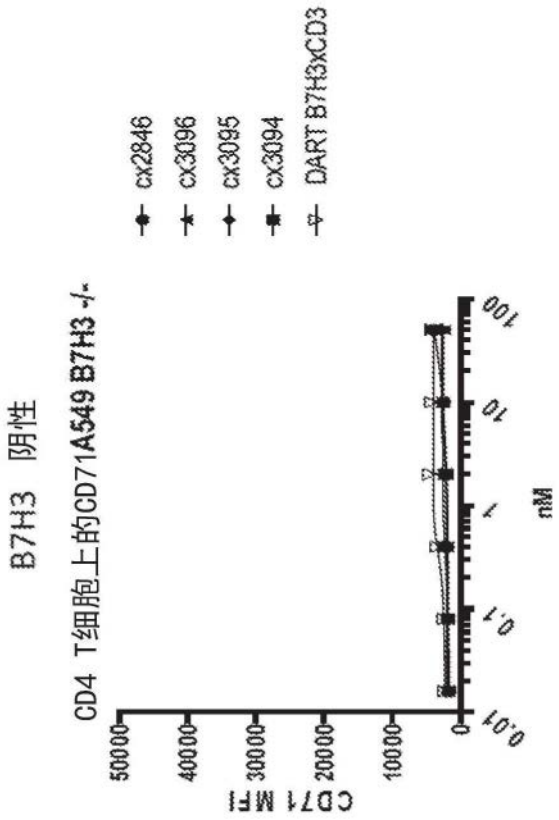

cx2846
cx3096
cx3095
cx3094
DART B7H3xCD3
B7H3 阴性
CD4 T细胞上的CD71A549 B7H3 -/-
CD71 MFI
50000
40000
30000
20000
10000
0
100
10
1
0.1
0.01
nM

图34F

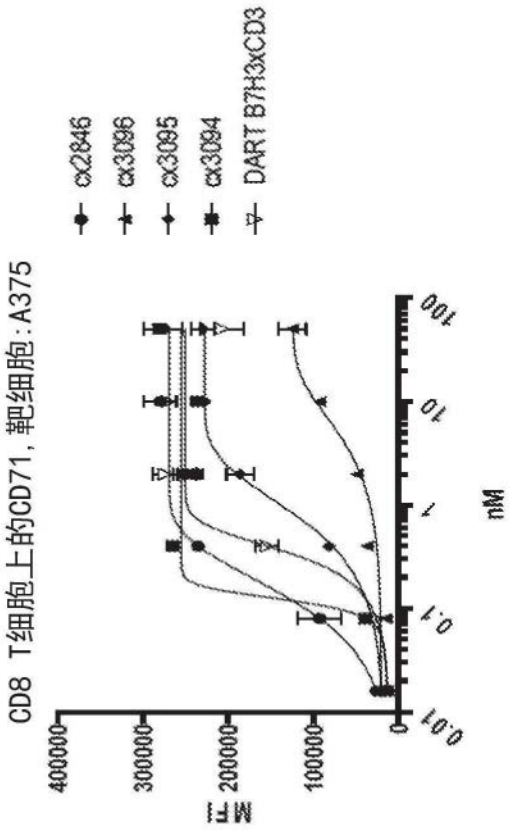

cx2846
cx3096
cx3095
cx3094
DART B7H3xCD3
CD8 T细胞上的CD71，靶细胞:A375
EC
400000
300000
200000
100000
0
0.01
0.1
1
10
100
nM

图34G

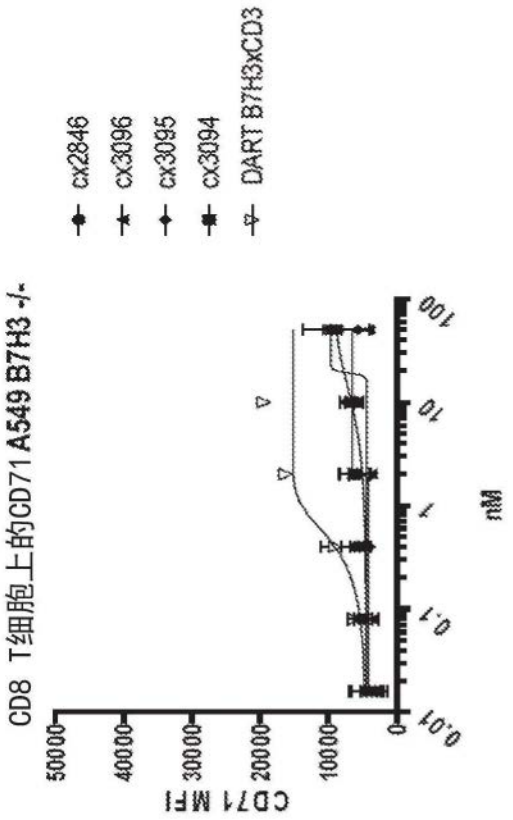

cx2846
cx3096
cx3095
cx3094
DART B7H3xCD3
CD8 T细胞上的CD71 A549 B7H3 -/-
CD71 MFI
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
nM

图34H

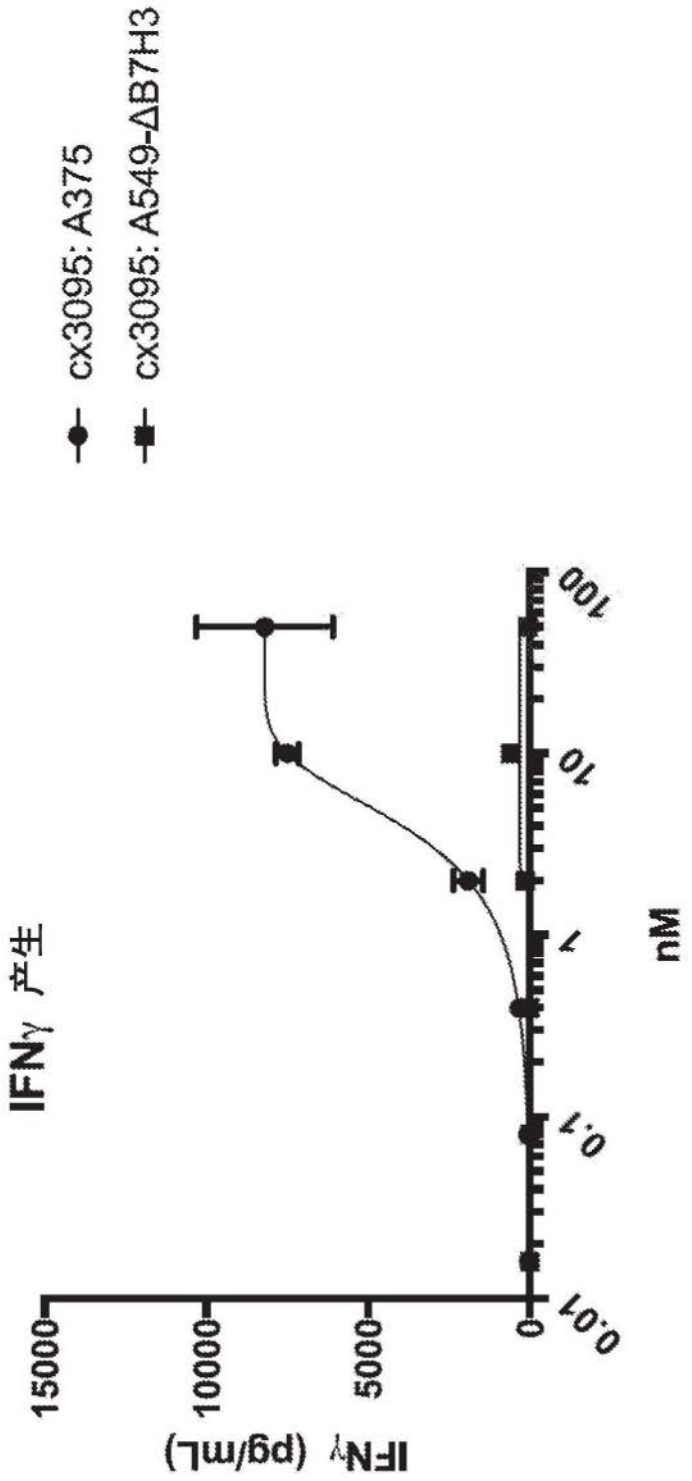

cx3095: A375
cx3095: A549-ΔB7H3
IFNγ 产生
IFNγ (pg/mL)
15000
10000
5000
0
0.07
0.7
7
70
700
nM

图35

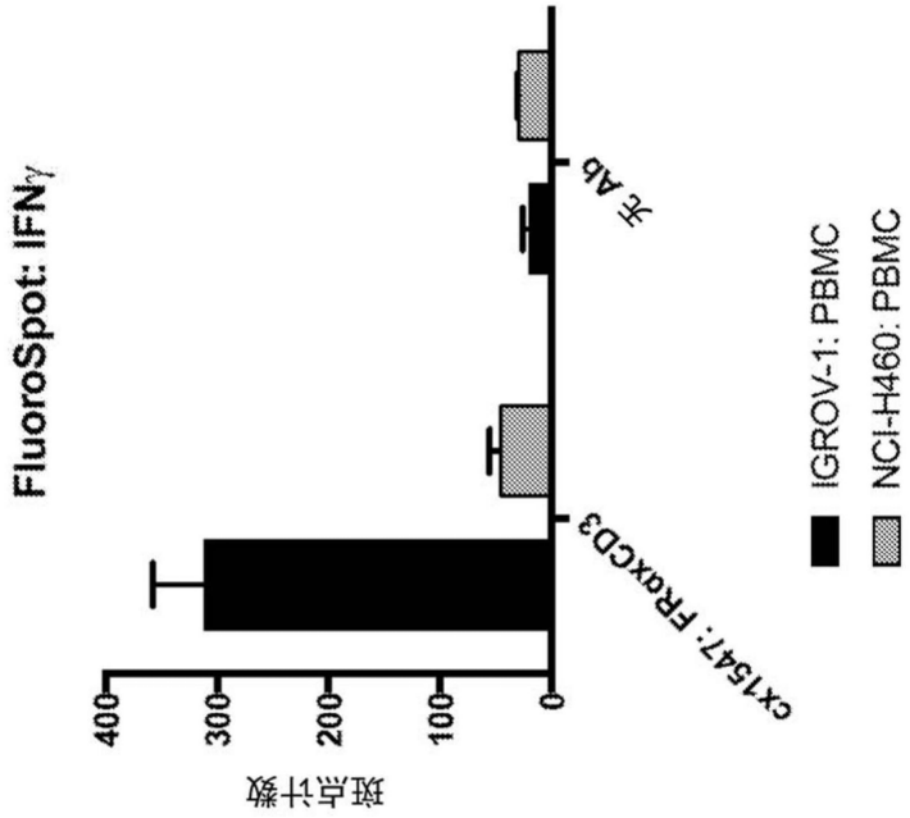

FluoroSpot: IFNγ
斑点计数
400
300
200
100
0
cx154T: FRaxCD3
无 Ab
IGROV-1: PBMC
NCI-H460: PBMC

图36A

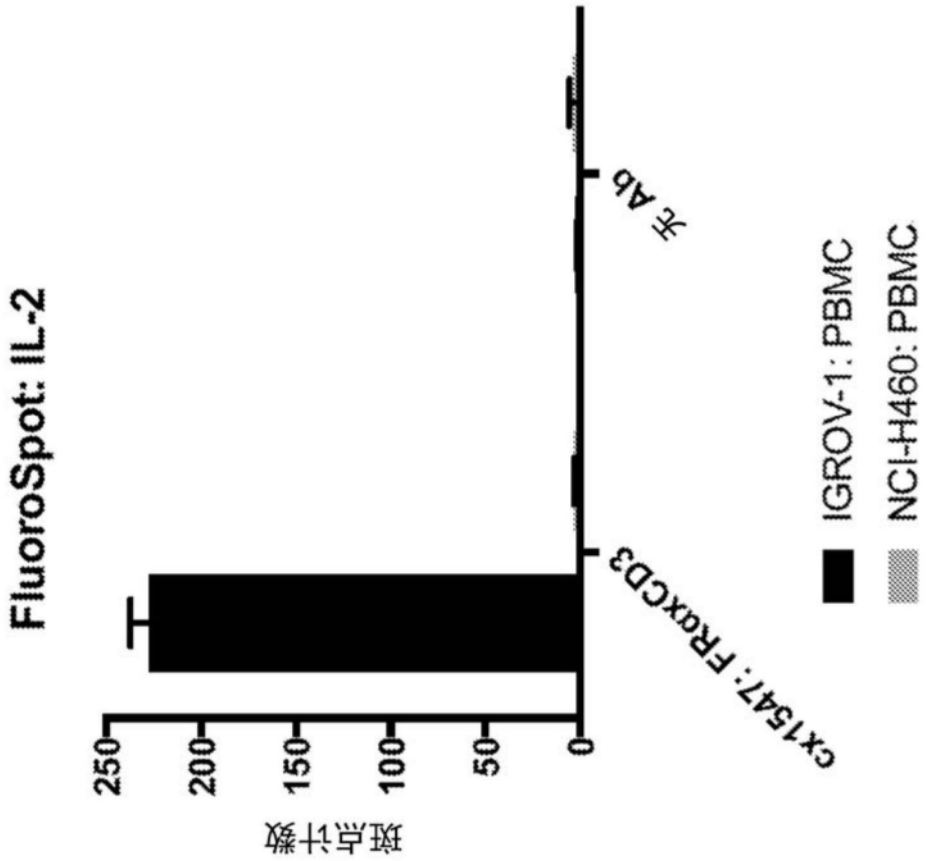

FluoroSpot: IL-2
斑点计数
250
200
150
100
50
0
CX154T: FRαxCD3
无 Ab
IGROV-1: PBMC
NCI-H460: PBMC

图36B

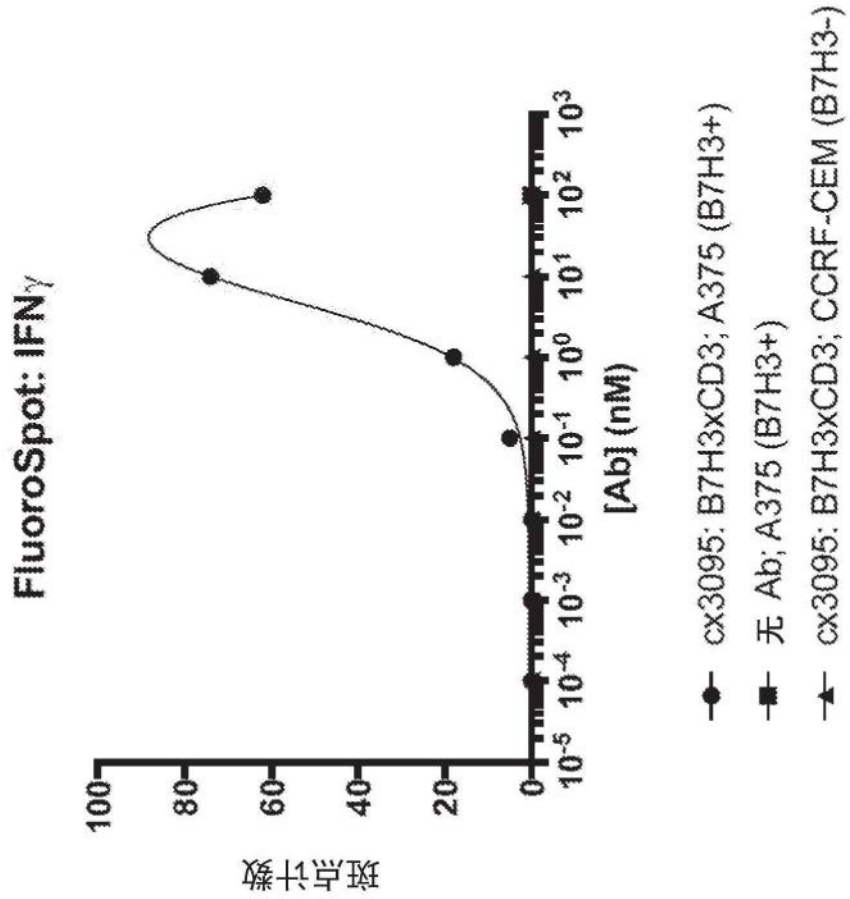

FluoroSpot: IFNγ
斑点计数
100
80
60
40
20
0
[Ab] (nM)
10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100 101 102 103
cx3095: B7H3xCD3; A375 (B7H3+)
无 Ab; A375 (B7H3+)
cx3095: B7H3xCD3; CCRF-CEM (B7H3-)
无 Ab; CCRF-CEM

图37

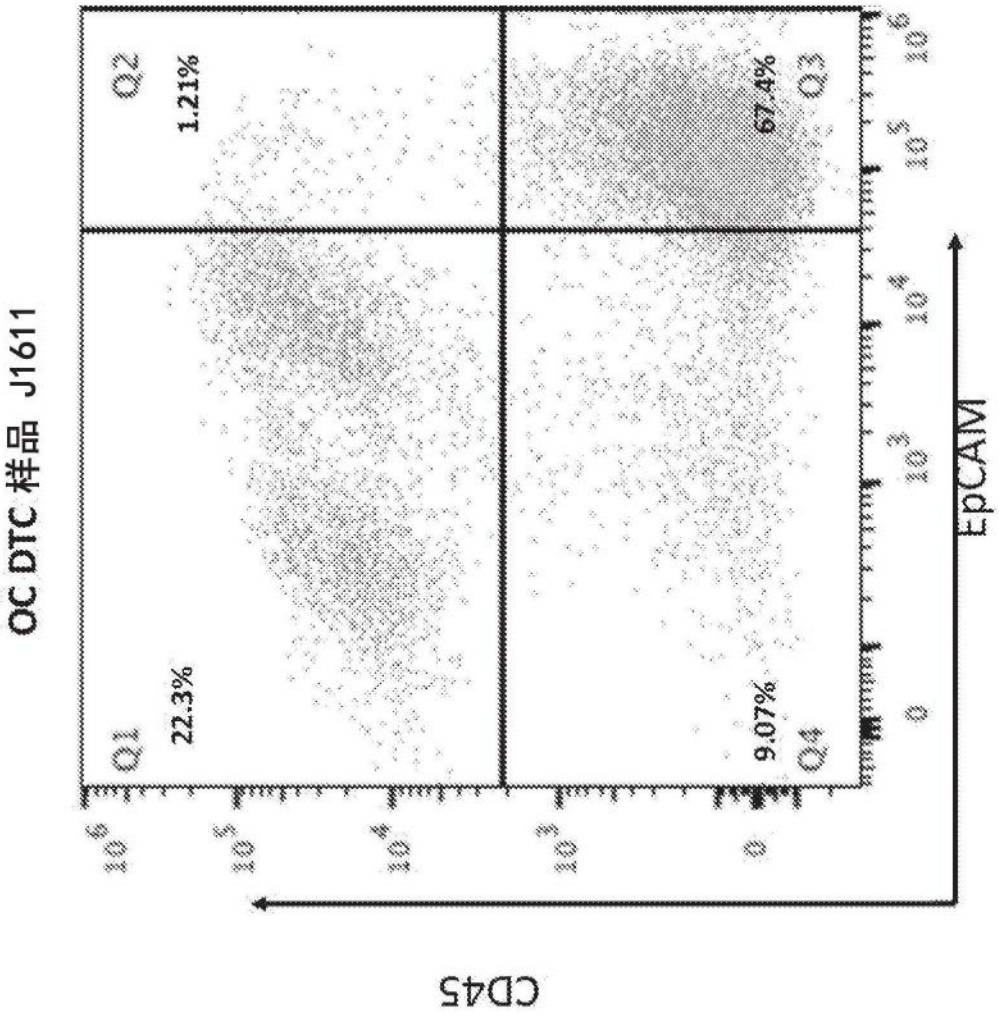

OC DTC 样品 J1611
Q2
1.21%
Q3
67.4%
Q1
22.3%
Q4
9.07%
EpCAM
CD45
10^6
10^5
10^4
10^3
0

图38A

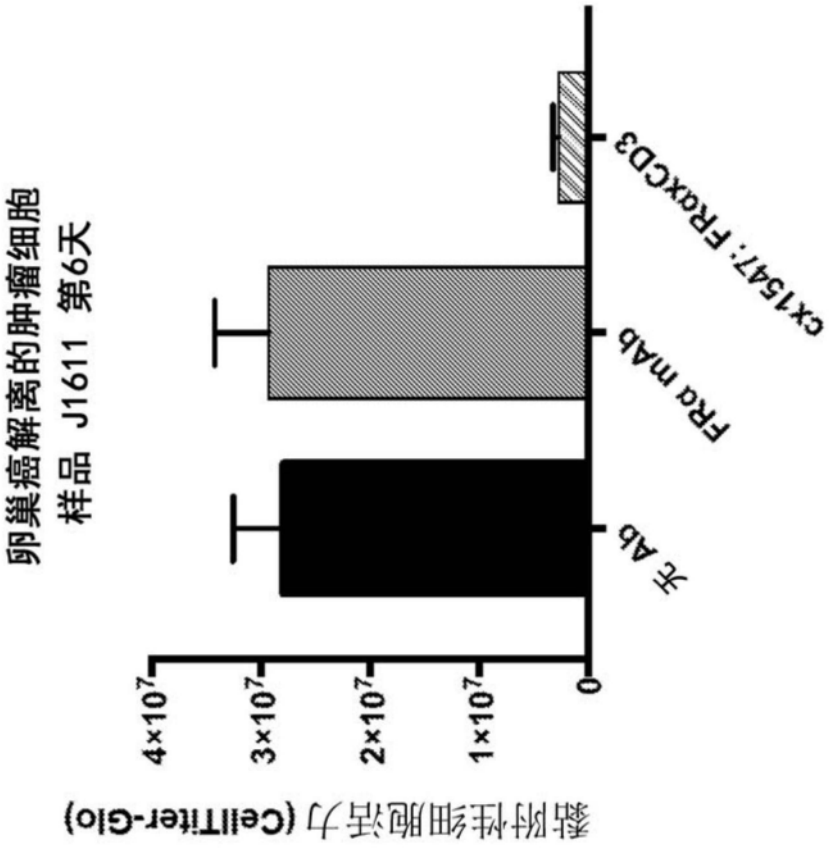

卵巢癌解离的肿瘤细胞
样品 J1611 第6天
黏附性细胞活力 (CellTiter-Glo)
4×10^7
3×10^7
2×10^7
1×10^7
0
无 Ab
FRa mAb
cx1547: FRaxCD3

图38B

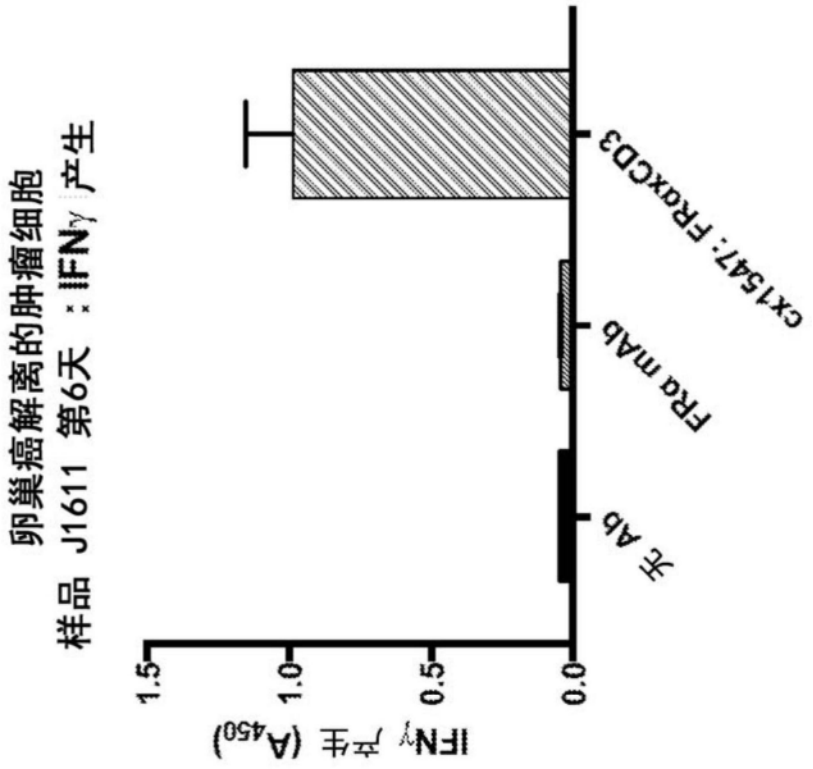

卵巢癌解离的肿瘤细胞
样品 J1611 第6天 : IFNγ 产生
IFNγ 产生 (A450)
1.5
1.0
0.5
0.0
无 Ab
FRα mAb
cx1547: FRαxCD3

图38C

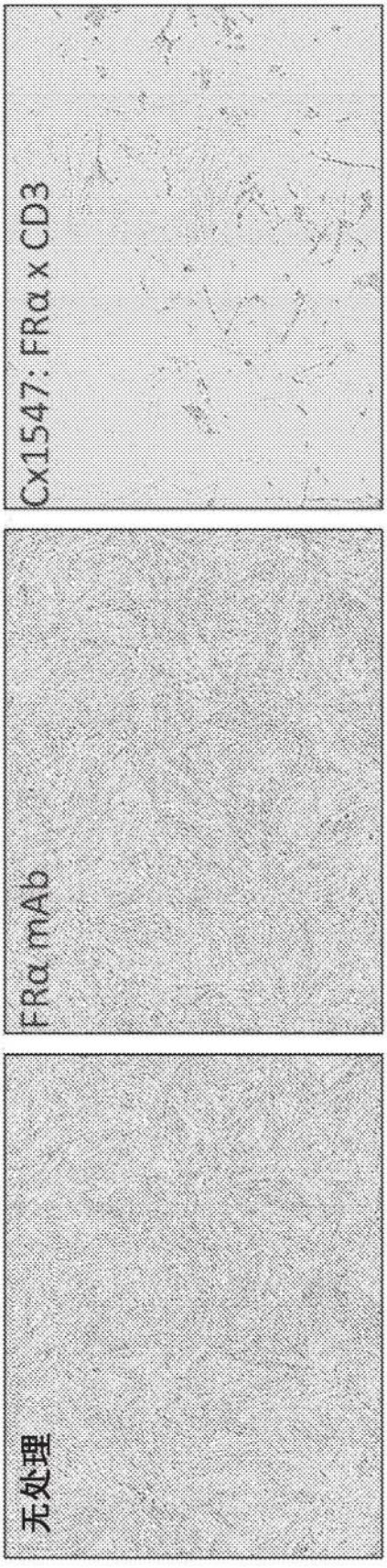

无处理
FRα mAb
Cx1547: FRα x CD3
在洗去淋巴细胞（悬浮细胞）后通过CellTiter Glo试剂评价肿瘤细胞的存活率（剩余黏附性细胞）

图38D