(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113518647 A
(43)申请公布日 2021.10.19

(21)申请号 201980080771.7

(22)申请日 2019.10.09

(30)优先权数据
62/744,631 2018.10.11 US
62/877,824 2019.07.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.06.04

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/055454 2019.10.09

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/076992 EN 2020.04.16

(71)申请人 印希比股份有限公司
地址 美国加利福利亚州

(72)发明人 J·C·蒂莫尔 M·D·卡普兰
K·M·威利斯 R·A·潘迪特
A·N·萨纳布里亚 S·A·巴恩斯
M·E·哈尔 B·P·埃克曼
R·H·杰克逊

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴

(51)Int.Cl.
A61P 35/00(2006.01)
A61K 47/68(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)
C07K 14/725(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)

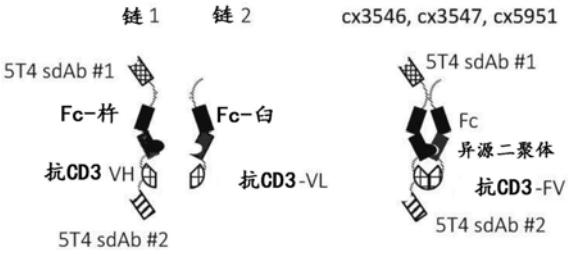
权利要求书18页 说明书200页
序列表218页 附图53页

(54)发明名称

5T4单域抗体及其治疗性组合物

(57)摘要

本发明提供特异性结合5T4的结合多肽。更具体言之,本文提供结合5T4的融合蛋白,其包括多价和/或多特异性构建体和嵌合抗原受体。也提供含有所述多肽的医药组合物;编码所述多肽的核酸分子以及其载体和细胞;以及所提供的5T4结合多肽用于治疗诸如癌症的疾病和病状的使用方法和用途。



CN 113518647 A

1.一种5T4结合多肽构建体,其包含特异性结合5T4的至少一个仅重链的可变域(5T4 VHH域)和结合至除5T4外的靶点的一或多个额外结合域。

2.如权利要求1的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含互补决定区1(CDR1),其包含选自由SEQ ID NO:86至87和288至292、296和297组成的组的氨基酸序列;互补决定区2(CDR2),其包含选自由SEQ ID NO:88至99、298和299组成的组的氨基酸序列;和互补决定区3(CDR3),其包含选自由SEQ ID NO:100至102、300、301和303组成的组的氨基酸序列。

3.一种5T4结合多肽构建体,其包含至少一个仅有重链的可变域(5T4VHH域),其包含互补决定区1(CDR1),其包含选自由SEQ ID NO:86至87和288至292、296和297组成的组的氨基酸序列;互补决定区2(CDR2),其包含选自由SEQ ID NO:88至99、298和299组成的组的氨基酸序列;和互补决定区3(CDR3),其包含选自由SEQ ID NO:100至102、300、301和303组成的组的氨基酸序列。

4.如权利要求1至3中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述5T4为人类5T4。

5.如权利要求1至4中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域为人源化的。

6.如权利要求1、2、4和5中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述一或多个额外结合域结合至免疫细胞上的活化受体。

7.如权利要求6的5T4结合多肽构建体,其中所述免疫细胞为T细胞。

8.如权利要求6或7的5T4结合多肽构建体,其中所述活化受体为CD3(CD3ε)。

9.如权利要求8的5T4结合多肽构建体,其对5T4和CD3具有双特异性。

10.如权利要求6的5T4结合多肽构建体,其中所述免疫细胞为自然杀伤(NK)细胞。

11.如权利要求6或10的5T4结合多肽构建体,其中所述活化受体为CD16(CD16a)。

12.如权利要求11的5T4结合多肽构建体,其对5T4和CD16a具有双特异性。

13.如权利要求1、2、4和5中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述一或多个额外结合域结合至细胞因子受体。

14.如权利要求1、2和4至13中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述一或多个额外结合域包含抗体或其抗原结合片段。

15.如权利要求1、2和4至14中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述一或多个额外结合域为单价的。

16.如权利要求14或15的5T4结合多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段为Fv、经二硫键稳定的Fv(dsFv)、scFv、Fab、单域抗体(sdAb)。

17.如权利要求13的5T4结合多肽构建体,其中所述一或多个额外结合域为细胞因子或能够结合至所述细胞因子受体的其经截短的片段或变体。

18.如权利要求17的5T4结合多肽构建体,其中所述细胞因子为干扰素或其经截短的片段或变体。

19.如权利要求18的5T4结合多肽构建体,其中所述干扰素为第I型干扰素或第II型干扰素;为第I型干扰素的经截短的片段或变体;或第II型干扰素的经截短的片段或变体。

20.如权利要求19的5T4结合多肽构建体,其中:

所述第I型干扰素为IFN-α或IFN-β或其经截短的片段或变体;或

所述第II型干扰素为IFN-γ或其经截短的片段或变体。

21.如权利要求1至20中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述多肽构建体包含免疫球蛋白Fc区。

22.如权利要求1、2和4至21中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述多肽包含连接所述至少一个5T4 VHH域和所述一或多个额外结合域的免疫球蛋白Fc区。

23.如权利要求1至22中任一项的5T4结合多肽构建体，其为二聚体。

24.如权利要求21至23中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述Fc区为同源二聚体Fc区。

25.如权利要求21至24中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述Fc区包含SEQ ID NO:8、10、11、12或13中的任一者中所示的氨基酸序列；或展现出与SEQ ID NO:8、10、11、12或13中的任一者有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列。

26.如权利要求21至25中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述Fc区为人类IgG1。

27.如权利要求26的5T4结合多肽构建体，其中所述Fc区包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列；或展现出与SEQ ID NO:8有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列。

28.如权利要求21至23中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述Fc区为异源二聚体Fc区。

29.如权利要求21至28中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述Fc区展现效应功能。

30.如权利要求21至29中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述Fc区包含包括一或多种氨基酸修饰的多肽，所述修饰降低效应功能和/或减少与选自Fcγ受体或C1q的效应分子的结合。

31.如权利要求30的5T4结合多肽构建体，其中所述一或多种氨基酸修饰为Glu233、Leu234或Leu235中的一或多者缺失。

32.如权利要求30或31的5T4结合多肽构建体，其中所述Fc区包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列；或展现出与SEQ ID NO:9有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列。

33.如权利要求1至32中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:245至253、255至287、294、295、302和360中的任一者中所示的序列；或展现出与SEQ ID NO:245至253、255至287、294、295、302和360中的任一者有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

34.如权利要求1至33中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域结合至人类5T4中的抗原决定基，但并未展现交叉反应性结合至小鼠5T4。

35.如权利要求1至34中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域结合至SEQ ID NO:382的氨基酸60与112之间的氨基酸残基。

36.如权利要求1至35中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域结合至SEQ ID NO:382的氨基酸173与224之间的氨基酸残基。

37.如权利要求1至36中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域包

含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:245;(ii)SEQ ID NO:245的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:245有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

38.如权利要求1至37中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:288和289组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:88中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:100中所示的氨基酸序列。

39.如权利要求1至38中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:288、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:289、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

40.如权利要求1至39中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:246至253或360中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:246至253或360有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

41.如权利要求1至40的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4VHH域包含SEQ ID NO:246至253或360中的任一者中所示的氨基酸序列。

42.如权利要求1至36中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:255;(ii)SEQ ID NO:255的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:255有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

43.如权利要求1至36和42中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:86、290至292组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:89至94组成的组的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:101中所示的氨基酸序列。

44.如权利要求1至36、42和43中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:290、90和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、91和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、92和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、93和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:291、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:292、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:86、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

45.如权利要求1至36和42至44中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:256至275有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

46.如权利要求1至36和43至45的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列。

47.如权利要求1至36中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:276;(ii)SEQ ID NO:276的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:276有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、

95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

48.如权利要求1至33和47中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域包含CDR1，其包含选自由SEQ ID NO:86和87组成的组的氨基酸序列；CDR2，其包含选自由SEQ ID NO:95至99组成的组的氨基酸序列；和CDR3，其包含SEQ ID NO:102中所示的氨基酸序列。

49.如权利要求1至36、47和48中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:87、95和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:87、96和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:87、97和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:87、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:87、99和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；或SEQ ID NO:86、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

50.如权利要求1至36和47至49中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:277至287中的任一者中所示的氨基酸序列；或展现出与SEQ ID NO:277至287有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

51.如权利要求1至36和47至50的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:277至287中的任一者中所示的氨基酸序列。

52.如权利要求1至36中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:294；(ii)SEQ ID NO:294的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:294有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

53.如权利要求1至36和52中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域包含CDR1，其包含SEQ ID NO:296中所示的氨基酸序列；CDR2，其包含SEQ ID NO:298中所示的氨基酸序列；和CDR3，其包含SEQ ID NO:300中所示的氨基酸序列。

54.如权利要求1至36和52中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域包含CDR3，其包含选自由SEQ ID NO:300、301和303组成的组的氨基酸序列。

55.如权利要求1至36和52中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域包含：

CDR1，其包含选自由SEQ ID NO:288、296和297组成的组的氨基酸序列；和/或

CDR2，其包含选自由SEQ ID NO:88、298和299组成的组的氨基酸序列。

56.如权利要求1至36中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:295；(ii)SEQ ID NO:295的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:295有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

57.如权利要求1至36和56中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域包含CDR1，其包含SEQ ID NO:297中所示的氨基酸序列；CDR2，其包含SEQ ID NO:299中所示的氨基酸序列；和CDR3，其包含SEQ ID NO:301中所示的氨基酸序列。

58.如权利要求1至36中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:302；(ii)SEQ ID NO:302的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:302有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、

95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

59.如权利要求1至36和56中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域包含CDR1，其包含SEQ ID NO:288中所示的氨基酸序列；CDR2，其包含SEQ ID NO:88中所示的氨基酸序列；和CDR3，其包含SEQ ID NO:303中所示的氨基酸序列。

60.如权利要求1至36中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:294、295或302；(ii)SEQ ID NO:294、295或302的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:294、295或302有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

61.如权利要求1至36和60中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:296、298和300中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:297、299和301中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；或SEQ ID NO:288、88和303中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

62.如权利要求1至36、60和61中任一项的5T4结合多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域为SEQ ID NO:245、249、255、270、276、294、295或302中所示。

63.一种多特异性多肽构建体，其包含：(a)第一组分，所述第一组分包含包括第一Fc多肽和第二Fc多肽的异源二聚体Fc区；和(b)第二组分，所述第二组分包含包括可变重链区(VH)和可变轻链区(VL)的抗CD3抗体或抗原结合片段，其中：

构成所述抗CD3抗体或抗原结合片段的所述VH和VL连接于所述异源二聚体Fc的相对多肽；

所述第一组分和第二组分通过接头偶合，其中所述异源二聚体Fc区定位于所述抗CD3抗体的N端；和

所述第一组分和第二组分中的一或两者包含至少一个仅重链的可变域(5T4 VHH域)。

64.如权利要求63的多特异性多肽构建体，其中所述多特异性多肽构建体至少包含(i)第一多肽，其包含所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、所述接头和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域；和(ii)第二多肽，其包含所述异源二聚体Fc区的第二Fc多肽；所述接头，视情况与所述第一多肽中所存在的所述接头相同的接头；和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域中的另一者，

其中所述第一多肽和第二多肽中的一或两者包含所述至少一个5T4VHH域。

65.如权利要求63或64的多特异性多肽构建体，其中与同源二聚体Fc区的多肽相比，视情况与SEQ ID NO:8中所示的所述Fc多肽或其免疫活性片段相比，所述异源二聚体Fc区的所述第一Fc多肽和第二Fc多肽中的一或两者包含至少一种修饰以诱导异源二聚化。

66.如权利要求65的多特异性多肽构建体，其中所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽和第二Fc多肽中的每一者独立地包含至少一种氨基酸修饰。

67.如权利要求65或66的多特异性多肽构建体，其中所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽和第二Fc多肽中的每一者包含杵-臼修饰或包含电荷突变以增加所述多肽的静电互补性。

68.如权利要求65至67的多特异性多肽构建体，其中所述氨基酸修饰为杵-臼修饰。

69.如权利要求63至68中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述异源二聚体Fc区的

第一Fc多肽包含选自以下中的修饰:Thr366Ser、Leu368Ala、Tyr407Val及其组合,且所述异源二聚体Fc区的第二Fc多肽包含修饰Thr366Trp。

70.如权利要求69的多特异性多肽构建体,其中所述第一Fc多肽和第二Fc多肽进一步包含将非半胱氨酸残基修饰成半胱氨酸残基,其中所述第一Fc多肽的修饰在位置Ser354和Tyr349中的一者处,且该第二Fc多肽的修饰在位置Ser354和Tyr349中的另一者处。

71.如权利要求65至67中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述氨基酸修饰为电荷突变以增加所述多肽的静电互补性。

72.如权利要求63至67和71中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述第一Fc多肽和/或第二Fc多肽或所述第一Fc多肽和第二Fc多肽中的每一者在互补位置处包含氨基酸修饰,其中所述修饰为用具有与所述另一多肽的互补氨基酸相反的电荷的氨基酸置换。

73.如权利要求63至72中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽或第二Fc多肽中的一者在残基Ile253处进一步包含修饰。

74.如权利要求73的多特异性多肽构建体,其中所述修饰为Ile253Arg。

75.如权利要求63至74中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽或第二Fc多肽中的一者在残基His435处进一步包含修饰。

76.如权利要求75的多特异性多肽构建体,其中所述修饰为His435Arg。

77.如权利要求63至76中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区包含缺乏Lys447的多肽。

78.如权利要求63至77中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区包含多肽,其包含至少一种修饰以增强FcRn结合。

79.如权利要求78的多特异性多肽构建体,其中所述至少一种修饰在选自由以下组成的组的位置处:Met252、Ser254、Thr256、Met428、Asn434及其组合。

80.如权利要求78或79的多特异性多肽构建体,其中所述至少一种修饰为选自由以下组成的组:Met252Y、Ser254T、Thr256E、Met428L、Met428V、Asn434S及其组合。

81.如权利要求78至80中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一种修饰在位置Met252处和位置Met428处。

82.如权利要求78至81中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一种修饰为Met252Y和Met428L。

83.如权利要求78至81中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一种修饰为Met252Y和Met428V。

84.如权利要求63至83中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽包含SEQ ID NO:103、107、115、117、328或334中的任一者中所示的氨基酸序列,且所述异源二聚体Fc区的第二Fc多肽包含SEQ ID NO:104、108、111、113、119、121、329、332或336中的任一者中所示的氨基酸序列。

85.如权利要求21至84中任一项的多肽构建体,其中所述Fc区包含包括至少一种氨基酸修饰的多肽,所述修饰降低效应功能和/或减少与选自Fcγ受体和C1q的效应分子的结合。

86.如权利要求85的多特异性多肽构建体,其中所述至少一种氨基酸修饰为Glu233、Leu234和Leu235中的一或多者缺失。

87.如权利要求63至86中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽包含SEQ ID NO:105、109、116、118、330或335中的任一者中所示的氨基酸序列，且所述异源二聚体Fc区的第二Fc多肽包含SEQ ID NO:106、110、112、114、120、122、331、333或337中的任一者中所示的氨基酸序列。

88.如权利要求63至87中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述抗CD3抗体或抗原结合片段为单价的。

89.如权利要求63至88中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述抗CD3抗体或抗原结合片段不为单链抗体，视情况不为单链可变片段(scFv)。

90.如权利要求63至89中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述抗CD3抗体或抗原结合片段为Fv抗体片段。

91.如权利要求90的多特异性多肽构建体，其中所述Fv抗体片段包含经二硫键稳定的抗CD3结合Fv片段(dsFv)。

92.如63至91的多特异性多肽构建体，其中所述抗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:29)；VH CDR2，其包含氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:30)；VH CDR3，其包含氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:31)；VL CDR1，其包含氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:32)；VL CDR2，其包含氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:33)；和VL CDR3，其包含氨基酸序列ALWYSNLWV(SEQ ID NO:34)。

93.如权利要求63至92中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述抗CD3抗体或抗原结合片段包含：

VH，其具有SEQ ID NO:27、35至65、341、343和358中的任一者的氨基酸序列；或展现出与SEQ ID NO:27、35至65、341、343和358中的任一者有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合CD3的序列；和

VL，其具有SEQ ID NO:28、66至84、293、340和342中的任一者的氨基酸序列；或展现出与SEQ ID NO:28、66至84、293、340和342和293中的任一者有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合CD3的序列。

94.如权利要求63至93中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述抗CD3抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列SEQ ID NO:47和氨基酸序列SEQ ID NO:75。

95.如权利要求63至93中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述抗CD3抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列SEQ ID NO:47和氨基酸序列SEQ ID NO:293。

96.如权利要求63至92中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区定位于氨基端和/或相对于所述多特异性构建体的CD3结合区定位于羧基端。

97.如权利要求63至96中任一项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特异性结合5T4的第一5T4 VHH域和特异性结合5T4的第二5T4 VHH域。

98.如权利要求97的多特异性多肽构建体，其中所述第一5T4 VHH域或第二5T4 VHH域相对于所述多特异性构建体的Fc区定位于氨基端，且所述第一5T4 VHH域或第二5T4 VHH域中的另一者相对于所述多特异性构建体的CD3结合区定位于羧基端。

99.如权利要求97或98的多特异性多肽构建体，其中

所述第一组分按N端至C端的次序包含结合5T4的第一5T4 VHH域;所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽;所述接头;所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域;和结合5T4的第二5T4 VHH域;和

所述第二组分按N端至C端的次序包含所述异源二聚体Fc区的第二Fc多肽;所述接头,视情况与所述第一组分中所存在的接头相同的接头;和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域中的另一者。

100.如权利要求97至99中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域相同。

101.如权利要求97至99中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域不同。

102.如权利要求101的多特异性多肽构建体,其中所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域结合5T4的不同或非重叠抗原决定基和/或不竞争结合至5T4。

103.如权利要求102的多特异性多肽构建体,其中:

所述第一5T4 VHH域包含SEQ ID NO:245至253、295、302和360的任一者中所示的氨基酸序列、其人源化变体;或展现出与SEQ ID NO:245至253、295、302和360有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列;和

所述第二5T4 VHH域包含SEQ ID NO:255至287、294、302中的任一者中所示的氨基酸序列、其人源化变体;或展现出与SEQ ID NO:255至287、294、302有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

104.如权利要求102的多特异性多肽构建体,其中:

所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域为选自SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:294;SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:276;SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:255;SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:295;SEQ ID NO:295和SEQ ID NO:294;SEQ ID NO:249和SEQ ID NO:270;SEQ ID NO:302和SEQ ID NO:302;或SEQ ID NO:360和SEQ ID NO:287。

105.如权利要求63至104中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:245至253、255至287、294、295、302和360中的任一者中所示的VHH域序列;或展现出与SEQ ID NO:245至253、255至287、294、295、302和360中的任一者有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

106.如权利要求63至105中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域结合至人类5T4中的抗原决定基,但并未展现交叉反应性结合至小鼠5T4。

107.如权利要求63至106中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域结合至SEQ ID NO:382的氨基酸60与112之间的氨基酸残基。

108.如权利要求63至107中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域结合至SEQ ID NO:382的氨基酸173与224之间的氨基酸残基。

109.如权利要求63至108中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列:(i)

SEQ ID NO:245;(ii)SEQ ID NO:245的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:245有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

110.如权利要求63至109中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:86至87和288至292、296和297组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:88至99、298和299组成的组的氨基酸序列;和CDR3,其包含选自由SEQ ID NO:100至102、300、301和303组成的组的氨基酸序列。

111.如权利要求63至110中任一项的多特异性构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:288、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:289、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、89和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、90和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、91和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、92和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、93和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:291、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:292、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:86、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、95和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、96和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、97和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、99和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:86、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:296、298和300中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:297、299和301中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:288、88和303中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

112.如权利要求63至111中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:246至253和360中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:246至253和360有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

113.如权利要求63至112中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:246至253和360中的任一者中所示的氨基酸序列。

114.如权利要求63至108中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:255;(ii)SEQ ID NO:255的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:255有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

115.如权利要求63至108和114中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:86、290至292组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:89至

94组成的组的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:101中所示的氨基酸序列。

116.如权利要求63至108、114和115中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:290、89和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、90和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、91和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、92和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、93和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:291、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:292、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:86、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

117.如权利要求63至108和114至116中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:256至275有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

118.如权利要求63至108和114至117的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列。

119.如权利要求63至108中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:276;(ii)SEQ ID NO:276的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:276有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

120.如权利要求63至108和119中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:86和87组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:95至99组成的组的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:102中所示的氨基酸序列。

121.如权利要求63至108、119和120中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:87、95和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、96和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、97和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、99和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:86、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

122.如权利要求63至108和119至121中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:277至287中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:277至287有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

123.如权利要求63至108和119至122的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:277至287

中的任一者中所示的氨基酸序列。

124.如权利要求63至108中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:294;(ii)SEQ ID NO:294的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:294有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

125.如权利要求63至108和124中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含CDR1,其包含SEQ ID NO:296中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:298中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:300中所示的氨基酸序列。

126.如权利要求63至106中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:295;(ii)SEQ ID NO:295的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:295有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

127.如权利要求63至106和126中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含CDR1,其包含SEQ ID NO:297中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:299中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:301中所示的氨基酸序列。

128.如权利要求63至106中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:302;(ii)SEQ ID NO:302的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:302有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

129.如权利要求63至106和126中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含CDR1,其包含SEQ ID NO:288中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:88中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:303中所示的氨基酸序列。

130.如权利要求63至106中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:294、295或302;(ii)SEQ ID NO:294、295或302的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:294、295或302有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

131.如权利要求63至106和130中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:296、298和300中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:297、299和301中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:288、88和303中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

132.如权利要求63至106、130和131中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地示于SEQ ID NO:

245、249、255、270、276、294、295、302或360中。

133.如权利要求63至132中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述第一组分和第二组分中的一或两者包含结合共刺激受体的至少一个共刺激受体结合区(CRBR)。

134.如权利要求133的多特异性多肽构建体，其中所述至少一个共刺激受体结合区(CRBR)相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区定位于氨基端和/或相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区定位于羧基端。

135.如权利要求133或134的多特异性多肽构建体，其中所述多特异性多肽构建体仅包含一个共刺激受体结合区(CRBR)。

136.如权利要求133至135中任一项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两个共刺激受体结合区(CRBR)，其视情况相同或不同。

137.如权利要求133至136中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述至少一个共刺激受体结合区(CRBR)为或包含所述共刺激受体的原生同源结合搭配物的胞外域或其结合片段，或展现对所述共刺激受体的结合活性的其变体。

138.如权利要求133至136中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述至少一个共刺激受体结合区(CRBR)为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、单域重链抗体和单域轻链抗体。

139.如权利要求138的多特异性多肽构建体，其中所述抗体或其抗原结合片段为Fv、scFv、Fab或单域抗体(sdAb)。

140.如权利要求138或139的多特异性多肽构建体，其中所述抗体或抗原结合片段为sdAb。

141.如权利要求140的多特异性多肽构建体，其中所述sdAb为人类或人源化sdAb。

142.如权利要求133至141中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述至少一个共刺激受体结合区(CRBR)结合选自以下中的共刺激受体：41BB(CD137)、OX40(CD134)、CD27、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)、CD28、ICOS、CD40、B细胞活化因子受体(BAFF-R)、B细胞成熟抗原(BCMA)、跨膜活化因子和CAML相互作用因子(TACI)和NKG2D。

143.如权利要求133至142中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述至少一个共刺激受体结合区(CRBR)结合选自以下中的共刺激受体：41BB(CD137)、OX40(CD134)和糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)。

144.如权利要求133至143中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述至少一个共刺激受体结合区(CRBR)包含SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列；或与SEQ ID NO:210中所示的序列有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合4-1BB的序列。

145.如权利要求63至144中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述第一组分和第二组分中的一或两者包含结合抑制性受体的至少一个抑制性受体结合区(IRBR)。

146.如权利要求145的多特异性多肽构建体，其中所述至少一个抑制性受体结合区(IRBR)相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区定位于氨基端和/或相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区定位于羧基端。

147.如权利要求145或146的多特异性多肽构建体，其中所述多特异性多肽构建体仅包含一个抑制性受体结合区(IRBR)。

148.如权利要求145至147中任一项的多特异性多肽构建体,其中:

所述第一组分按N端至C端的次序包含结合5T4的第一5T4 VHH域;所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽;所述接头;所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域;和结合5T4的第二5T4 VHH域;和

所述第二组分包含所述IRBR且按N端至C端的次序包含所述异源二聚体Fc区的第二Fc多肽;所述接头,视情况与所述第一组分中所存在的接头相同的接头;和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域中的另一者,其中所述IRBR相对于所述第二组分的Fc区定位于氨基端和/或相对于所述第二组分的抗CD3抗体或抗原结合片段定位于羧基端。

149.如权利要求145至148中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个IRBR为或包含所述抑制性受体的原生同源结合搭配物的胞外域或其结合片段,或展现对所述抑制性受体的结合活性的其变体。

150.如权利要求139至142中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个IRBR为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、单域重链抗体和单域轻链抗体。

151.如权利要求150的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段为Fv、scFv、Fab、单域抗体(sdAb)。

152.如权利要求150或151的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或抗原结合片段为sdAb。

153.如权利要求152的多特异性多肽构建体,其中所述sdAb为人类或人源化sdAb。

154.如权利要求145至153中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个IRBR结合选自以下中的抑制性受体:PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA和TIM3。

155.如权利要求145至154中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个IRBR结合PD-1。

156.如权利要求145至155中任一项的多特异性多肽构建体,其中:

所述第一组分按N端至C端的次序包含结合5T4的第一5T4 VHH域;所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽;所述接头;所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域;和结合5T4的第二5T4 VHH域;和

所述第二多肽按N端至C端的次序包含所述IRBR或所述CRBR中的一者;所述异源二聚体Fc区的第二Fc多肽;所述接头,视情况与所述第一组分中所存在的接头相同的接头;所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域中的另一者;和所述CRBR或IRBR中的另一者。

157.如权利要求63至156中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述接头为肽或多肽接头,视情况地,其中所述接头长度为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸。

158.如权利要求63至157中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述接头为不可裂解接头。

159.如权利要求158的多特异性多肽构建体,其中所述不可裂解接头为或包含GG。

160.如权利要求158的多特异性多肽构建体,其中所述不可裂解接头包含GS、GGS、GGGGS(SEQ ID NO:125)、GGGGGS(SEQ ID NO:126)或其组合。

161.如权利要求63至158中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述接头为或包含序

列GGGGGSGGGGGSGGGGGS(SEQ ID NO:127)。

162.如权利要求63至157中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述接头为可裂解接头。

163.如权利要求162的多特异性多肽构建体,其中所述可裂解接头为充当蛋白酶的基质的多肽。

164.如权利要求163的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶为由免疫效应细胞、肿瘤细胞或肿瘤微环境中所存在的细胞产生。

165.如权利要求163或164的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶为由免疫效应细胞产生,且所述免疫效应细胞为活化T细胞、自然杀伤(NK)细胞或NK T细胞。

166.如权利要求163至165中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶为选自以下当中:间质蛋白酶、基质金属蛋白酶(MMP)、颗粒酶B及其组合。

167.如权利要求166的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶为颗粒酶B。

168.如权利要求163至167中任一项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GGSGGGGIEPDIGGSGGS(SEQ ID NO:171)。

169.一种结合5T4的分离单域抗体(sdAb),其包含互补决定区1(CDR1),其包含选自由SEQ ID NO:86至87和288至292、296和297组成的组的氨基酸序列;互补决定区2(CDR2),其包含选自由SEQ ID NO:88至99、298和299组成的组的氨基酸序列;和互补决定区3(CDR3),其包含选自由SEQ ID NO:100至102、300、301和303组成的组的氨基酸序列。

170.如权利要求169的分离单域抗体(sdAb),其中所述至少一个5T4VHH域结合至人类5T4中的抗原决定基,但并未展现交叉反应性结合至小鼠5T4。

171.如权利要求169或170的分离单域抗体(sdAb),其中所述至少一个5T4 VHH域结合至SEQ ID NO:382的氨基酸60与112之间的氨基酸残基。

172.如权利要求169至171中任一项的分离单域抗体(sdAb),其中所述至少一个5T4 VHH域结合至SEQ ID NO:382的氨基酸173与224之间的氨基酸残基。

173.如权利要求169的分离单域抗体,其包含SEQ ID NO:245至253、255至287、294、295、302和360中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:245至253、255至287、294、295、302和360中的任一者有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

174.如权利要求169至173中任一项的分离单域抗体,其中所述单域抗体包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:245;(ii)SEQ ID NO:245的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:245有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

175.如权利要求169至174中任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:288和289组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:88中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:100中所示的氨基酸序列。

176.如权利要求169至175中任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含SEQ ID NO:288、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:289、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

177.如权利要求169至176中任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含SEQ ID NO:

246至253和360中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:246至253和360有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

178.如权利要求169至177中任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含SEQ ID NO:246至253和360中的任一者中所示的氨基酸序列。

179.如权利要求169至173中任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:255;(ii)SEQ ID NO:255的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:255有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

180.如权利要求169至173和179中任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含CDR1,其包含SEQ ID NO:86、290至292中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:89至94组成的组的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:101中所示的氨基酸序列。

181.如权利要求169至173、179和180中任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含SEQ ID NO:290、89和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、90和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、91和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、92和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、93和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:291、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:292、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:86、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

182.如权利要求169至173和179至181中任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:256至275有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

183.如权利要求169至173和179至182中任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列。

184.如权利要求169至173中任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:276;(ii)SEQ ID NO:276的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:276有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

185.如权利要求169至173或184中任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:86和87组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:95至99组成的组的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:102中所示的氨基酸序列。

186.如权利要求169至173、184和185中任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含SEQ ID NO:87、95和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、96和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、97和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、99和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:86、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

187.如权利要求169至173和184至186中任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含SEQ ID NO:277至287中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:277至287有

至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

188.如权利要求169至173和184至187中任一项的分离单域抗体，其中所述sdAb包含SEQ ID NO:277至287中的任一者中所示的氨基酸序列。

189.如权利要求169至173中任一项的分离单域抗体，其中所述sdAb包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:294；(ii)SEQ ID NO:294的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:294有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

190.如权利要求169至173或189的分离单域抗体，其中所述sdAb包含CDR1，其包含SEQ ID NO:296中所示的氨基酸序列；CDR2，其包含SEQ ID NO:298中所示的氨基酸序列；和CDR3，其包含SEQ ID NO:300中所示的氨基酸序列。

191.如权利要求169至173或189的分离单域抗体，其中所述sdAb包含CDR3，其包含选自由SEQ ID NO:300、301和303组成的组的氨基酸序列。

192.如权利要求169至173或189的分离单域抗体，其中所述sdAb包含：

CDR1，其包含选自由SEQ ID NO:288、296和297组成的组的氨基酸序列；和/或

CDR2，其包含选自由SEQ ID NO:88、298和299组成的组的氨基酸序列。

193.如权利要求169至173中任一项的分离单域抗体，其中所述sdAb包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:295；(ii)SEQ ID NO:295的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:295有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

194.如权利要求169至173和193中任一项的分离单域抗体，其中所述sdAb包含CDR1，其包含SEQ ID NO:297中所示的氨基酸序列；CDR2，其包含SEQ ID NO:299中所示的氨基酸序列；和CDR3，其包含SEQ ID NO:301中所示的氨基酸序列。

195.如权利要求169至173中任一项的分离单域抗体，其中所述sdAb包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:302；(ii)SEQ ID NO:302的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:302有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

196.如权利要求169至173和193中任一项的分离单域抗体，其中所述sdAb包含CDR1，其包含SEQ ID NO:288中所示的氨基酸序列；CDR2，其包含SEQ ID NO:88中所示的氨基酸序列；和CDR3，其包含SEQ ID NO:303中所示的氨基酸序列。

197.如权利要求169至173中任一项的分离单域抗体，其中所述sdAb包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:294、295或302；(ii)SEQ ID NO:294、295或302的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:294、295或302有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

198.如权利要求169至173和197中任一项的分离单域抗体，其中所述sdAb包含SEQ ID NO:296、298和300中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:297、299和301中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；或SEQ ID NO:288、88和303中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

199.一种聚核苷酸，其编码如权利要求1至62中任一项的5T4结合多肽构建体。

200.一种聚核苷酸，其编码如权利要求63至168中任一项的多特异性多肽构建体。

201.一种聚核苷酸,其包含第一核酸序列,其编码如权利要求63至168中任一项的多特异性构建体的第一多肽;和第二核酸序列,其编码所述多特异性构建体的第二多肽,其中所述第一核酸序列和第二核酸序列为通过内部核糖体进入位点(IRES)或编码自裂解肽或引起核糖体跳跃的肽的核酸分离。

202.如权利要求201的聚核苷酸,其中所述第一核酸序列和第二核酸序列可操作地连接于相同启动子。

203.如权利要求201或202的聚核苷酸,其中编码自裂解肽或引起核糖体跳跃的肽的所述核酸为选自T2A、P2A、E2A或F2A。

204.一种聚核苷酸,其编码如权利要求169至198中任一项的单域抗体。

205.一种载体,其包含如权利要求199至204中任一项的聚核苷酸。

206.如权利要求205的载体,其为表达载体。

207.如权利要求205或206的载体,其为病毒载体或真核载体,视情况其中所述真核载体为哺乳动物载体。

208.一种细胞,其包含一或多种如权利要求199至204中任一项的聚核苷酸或一或多种如权利要求205至207中任一项的载体。

209.如权利要求208的细胞,其中所述细胞为重组或分离的。

210.如权利要求209的细胞,其中所述细胞为哺乳动物细胞。

211.一种制造多肽的方法,所述方法包含将一或多种如权利要求199至204中任一项的聚核苷酸或一或多种如权利要求205至207中任一项的载体引入细胞中,且在产生所述多特异性多肽构建体的条件下培养所述细胞。

212.如权利要求211的方法,其进一步包含自所述细胞分离或纯化所述多肽。

213.一种多肽,其为由如权利要求211或212的方法产生。

214.一种经工程改造的免疫细胞,其包含嵌合抗原受体,其包含:

包含如权利要求169至198中任一项的单域抗体的胞外域;

跨膜域;和

胞内信号传导域。

215.如权利要求214的经工程改造的免疫细胞,其中所述细胞为淋巴细胞。

216.如权利要求214或215的经工程改造的免疫细胞,其中所述细胞为T细胞或自然杀伤(NK)细胞。

217.如权利要求214至216中任一项的经工程改造的免疫细胞,其中所述胞内信号传导域包含基于免疫受体酪氨酸的活化模体(ITAM)信号传导域。

218.如权利要求214至217中任一项的经工程改造的免疫细胞,其中所述胞内信号传导域为或包含CD3ζ信号传导域,视情况人类CD3ζ信号传导域。

219.如权利要求214至218的经工程改造的免疫细胞,其中所述胞内信号传导域进一步包含共刺激分子的信号传导域。

220.如权利要求219的经工程改造的免疫细胞,其中所述共刺激分子为CD28、ICOS、41BB或OX40,视情况人类CD28、人类ICOS、人类41BB或人类OX40。

221.一种医药组合物,其包含如权利要求1至62中任一项的5T4结合多肽构建体、如权利要求63至168中任一项的多特异性多肽构建体、如权利要求169至198中任一项的单域抗

体或如权利要求214至220中任一项的经工程化改造的免疫细胞。

222.如权利要求221的医药组合物,其包含医药学上可接受的载剂。

223.如权利要求221或222的医药组合物,其为无菌的。

224.一种刺激或诱导受试者的免疫反应的方法,所述方法包含向有需要的受试者给予如权利要求1至62中任一项的5T4结合多肽构建体、如权利要求63至168中任一项的多特异性多肽构建体、如权利要求169至198中任一项的单域抗体或如权利要求214至220中任一项的经工程改造的免疫细胞或如权利要求221至223的医药组合物。

225.如权利要求224的方法,其中针对肿瘤或癌症,视情况表达5T4的肿瘤或癌症增强所述免疫反应。

226.如权利要求224或225的方法,其中所述方法治疗所述受试者的疾病或病状。

227.一种治疗受试者的疾病或病状的方法,所述方法包含向有需要的受试者给予治疗有效量的如权利要求1至59中任一项的5T4结合多肽构建体、如权利要求60至161中任一项的多特异性多肽构建体、如权利要求162至188中任一项的单域抗体或如权利要求214至220中任一项的经工程化改造的免疫细胞或如权利要求221至223的医药组合物。

228.如权利要求226或227的方法,其中所述疾病或病状为肿瘤或癌症。

229.如权利要求224至228中任一项的方法,其中所述受试者为人类。

5T4单域抗体及其治疗性组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年10月11日提交的题目为“5T4单域抗体及其治疗性组合物(5T4 SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AND THERAPEUTIC COMPOSITIONS THEREOF)”的美国临时申请62/744,631和2019年7月23日提交的题目为“5T4单域抗体及其治疗性组合物(5T4 SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AND THERAPEUTIC COMPOSITIONS THEREOF)”的美国临时申请62/877,824的优先权,将其各自的内容出于所有目的通过引用以其整体而并入。

[0003] 通过引用并入序列表

[0004] 本申请是与电子格式的序列表一起提交的。序列表作为2019年10月8日创建的标题为744952000540SeqList.TXT的文件而提供,其大小为368千字节。将在电子格式的序列表中的信息通过引用以其整体而并入。

技术领域

[0005] 本公开内容总体上提供了特异性结合5T4的结合蛋白。更具体地,本公开内容涉和至少结合5T4的融合蛋白,包括多价和/或多特异性构建体和嵌合抗原受体。本公开内容也提供编码所述多肽的核苷酸及其载体和细胞,以及本文提供的5T4结合多肽用于治疗疾病和病症(如癌症)的使用方法和用途。

背景技术

[0006] 5T4,亦称为滋养层糖蛋白(TPBG),为表达于多种肿瘤细胞的表面上的跨膜糖蛋白,且其表达已与多种癌症不良预后相关。人类中多种癌症上5T4的表达结合其在正常成人组织中的罕见表达,使得5T4成为理想的治疗靶点。需要靶向5T4的经改良的治疗性分子和药剂。本文提供满足此类需要的实施例。

发明内容

[0007] 本文提供一种5T4结合多肽构建体,其包含特异性结合5T4的至少一个仅重链的可变域(5T4 VHH域)和结合至除5T4外的靶点的一或多个额外结合域。在一些实施例中,至少一个5T4 VHH域包含互补决定区1(CDR1),其包含选自由SEQ ID NO:86至87和288至292、296和297组成的组的氨基酸序列;互补决定区2(CDR2),其包含选自由SEQ ID NO:88至99、298和299组成的组的氨基酸序列;及互补决定区3(CDR3),其包含选自由SEQ ID NO:100至102、300、301和303组成的组的氨基酸序列。

[0008] 本文提供一种5T4结合构建体,其包含至少一个仅有重链的可变域(5T4 VHH域),其包含互补决定区1(CDR1),其包含选自由SEQ ID NO:86至87和288至292、296和297组成的组的氨基酸序列;互补决定区2(CDR2),其包含选自由SEQ ID NO:88至99、298和299组成的组的氨基酸序列;以及互补决定区3(CDR3),其包含选自由SEQ ID NO:100至102、300、301和303组成的组的氨基酸序列。

[0009] 在任何所提供的实施例中的一些中,5T4为人类5T4。在一些实施例中,至少一个

5T4 VHH域为人源化的。在一些实施例中,5T4具有SEQ ID NO:244或其缺少信号序列的成熟形式中所示的序列。

[0010] 在任何所提供的实施例中的一些中,一或多个额外结合域结合至免疫细胞上的活化受体。在任何所提供的实施例中的一些中,免疫细胞为T细胞。在任何所提供的实施例中的一些中,活化受体为CD3(CD3ε)。在一些实施例中,5T4结合多肽构建体对5T4和CD3具有双特异性。在一些实施例中,免疫细胞为自然杀伤(NK)细胞。

[0011] 在任何所提供的实施例中的一些中,活化受体为CD16(CD16a)。在一些实施例中,5T4结合多肽构建体对5T4和CD16a具有双特异性。

[0012] 在任何所提供的实施例中的一些中,一或多个额外结合域结合至细胞因子受体。

[0013] 在任何所提供的实施例中的一些中,一或多个额外结合域包含抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,一或多个额外结合域为单价的。在一些实施例中,该抗体或其抗原结合片段为Fv、经二硫键稳定的Fv(dsFv)、scFv、Fab、单域抗体(sdAb)、VNAR或VHH。在一些实施例中,单域抗体(sdAb)为VNAR或VHH。在一些实施例中,单域抗体(sdAb)为骆驼VHH。在一些实施例中,单域抗体(sdAb)为骆驼VHH的人源化形式。

[0014] 在任何所提供的实施例中的一些中,一或多个额外结合域为细胞因子或能够结合至细胞因子受体的其经截短的片段或变体。在一些方面中,细胞因子为干扰素或干扰素的经截短的片段或变体。在一些实施例中,干扰素为第I型干扰素或第II型干扰素;为第I型干扰素的经截短的片段或变体;或第II型干扰素的经截短的片段或变体。在一些实施例中,第I型干扰素为IFN-α或IFN-β或其经截短的片段或变体;或第II型干扰素为IFN-γ或其经截短的片段或变体。

[0015] 在任何所提供的实施例中的一些中,多肽包含免疫球蛋白Fc区。在任何所提供的实施例中的一些中,多肽包含连接至少一个单域抗体和一或多个额外结合域的免疫球蛋白Fc区。在任何所提供的实施例中的一些中,5T4结合多肽构建体为二聚体。在任何所提供的实施例中的一些中,Fc区为同源二聚体Fc区。在任何所提供的实施例中的一些中,Fc区包含SEQ ID NO:8、10、11、12或13中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:8、10、11、12或13中的任一者有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,Fc区为人类IgG1。在任何所提供的实施例中的一些中,Fc区包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:8有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,Fc区为异源二聚体Fc区。

[0016] 在一些实施例中,Fc区展现效应功能。在任何所提供的实施例中的一些中,Fc区包含包括一或多种氨基酸修饰的多肽,该修饰降低效应功能和/或减少与选自Fcγ受体或C1q的效应分子的结合。在一些实施例中,一或多种氨基酸修饰为Glu233、Leu234或Leu235中的一或多者缺失。在一些情况下,Fc区包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:9有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的氨基酸序列。

[0017] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:245至287、294、295、302、360中的任一者中所示的VHH域序列;或展现出与SEQ ID NO:245至287、

294、295、302、360中的任一者有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0018] 在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个5T4 VHH域结合至人类5T4中的抗原决定基，但并未展现交叉反应性结合至小鼠5T4。

[0019] 在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个5T4 VHH域结合至SEQ ID NO:382的氨基酸60与112之间的氨基酸残基。

[0020] 在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个5T4 VHH域结合至SEQ ID NO:382的氨基酸173与224之间的氨基酸残基。

[0021] 在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:245；(ii)SEQ ID NO:245的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:245有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个5T4 VHH域包含CDR1，其包含选自由SEQ ID NO:288和289组成的组的氨基酸序列；CDR2，其包含SEQ ID NO:88中所示的氨基酸序列；和CDR3，其包含SEQ ID NO:100中所示的氨基酸序列。在一些实施例中，至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:288、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；或SEQ ID NO:289、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0022] 在任何所提供的实施例中的一些中，5T4 VHH域包含SEQ ID NO:245中所示的VHH域序列。在任何所提供的实施例中的一些中，5T4 VHH域包含SEQ ID NO:249中所示的VHH域序列。在任何所提供的实施例中的一些中，5T4 VHH域包含SEQ ID NO:254中所示的VHH域序列。在任何所提供的实施例中的一些中，5T4 VHH域包含SEQ ID NO:255中所示的VHH域序列。在任何所提供的实施例中的一些中，5T4 VHH域包含SEQ ID NO:270中所示的VHH域序列。在任何所提供的实施例中的一些中，5T4 VHH域包含SEQ ID NO:276中所示的VHH域序列。在任何所提供的实施例中的一些中，5T4 VHH域包含SEQ ID NO:287中所示的VHH域序列。在任何所提供的实施例中的一些中，5T4 VHH域包含SEQ ID NO:294中所示的VHH域序列。在任何所提供的实施例中的一些中，5T4 VHH域包含SEQ ID NO:302中所示的VHH域序列。在任何所提供的实施例中的一些中，5T4 VHH域包含SEQ ID NO:360中所示的VHH域序列。

[0023] 在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:246至254或360中的任一者中所示的氨基酸序列；或展现出与SEQ ID NO:246至254或360有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:246至254或360中的任一者中所示的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:255；(ii)SEQ ID NO:255的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:255有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个5T4 VHH域包含CDR1，其包含选自由SEQ ID NO:86、290至292组成的组的氨基酸序列；CDR2，其包含选自由SEQ ID NO:89至94组成的组的氨基酸序列；和CDR3，其包含SEQ ID NO:101中所示的氨基酸序列。在一些实施例中，至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:290、90和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；

SEQ ID NO:290、91和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、92和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、93和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:291、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:292、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:86、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3,至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:256至275有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:276;(ii)SEQ ID NO:276的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:276有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:86和87组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:95至99组成的组的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:102中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:87、95和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、96和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、97和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、99和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:86、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0024] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:277至287中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:277至287有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:277至287中的任一者中所示的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:294;(ii)SEQ ID NO:294的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:294有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域包含CDR1,其包含SEQ ID NO:296中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:298中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:300中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,至少一个5T4 VHH域包含CDR3,其包含选自由SEQ ID NO:300、301和303组成的组的氨基酸序列。

[0025] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:288、296和297组成的组的氨基酸序列;和/或CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:88、298和299组成的组的氨基酸序列。

[0026] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:295;(ii)SEQ ID NO:295的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:295有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域包含CDR1,其包含SEQ ID NO:297中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:

299中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:301中所示的氨基酸序列。

[0027] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:302;(ii)SEQ ID NO:302的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:302有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域包含CDR1,其包含SEQ ID NO:288中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:88中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:303中所示的氨基酸序列。

[0028] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:294、295或302;(ii)SEQ ID NO:294、295或302的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:294、295或302有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:296、298和300中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:297、299和301中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:288、88和303中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0029] 在任何所提供的实施例中的一些中,5T4 VHH域结合至位于SEQ ID NO:411中所示的5T4胞外域的氨基酸残基60与112之间的抗原决定基。在任何所提供的实施例中的一些中,5T4 VHH域结合至位于SEQ ID NO:412中所示的5T4胞外域的氨基酸残基173与224之间的抗原决定基。

[0030] 在一些实施例中,5T4 VHH不与小鼠5T4抗原交叉反应。在一些实施例中,包含SEQ ID NO:245中所示的氨基酸序列的5T4 VHH或其人源化变体不与小鼠5T4抗原交叉反应。在一些实施例中,包含SEQ ID NO:255中所示的氨基酸序列的5T4 VHH或其人源化变体不与小鼠5T4抗原交叉反应。在一些实施例中,包含SEQ ID NO:276中所示的氨基酸序列的5T4 VHH或其人源化变体不与小鼠5T4抗原交叉反应。

[0031] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域为SEQ ID NO:245、249、255、270、276、294、295或302中所示。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域示于SEQ ID NO:254或360中。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域示于SEQ ID NO:360中。

[0032] 在任何所提供的实施例中的一些中,5T4 VHH域可在其N和/或C端处包含额外氨基酸,诸如用于连接于另一氨基酸序列,诸如另一多肽。在任何所提供的实施例中的一些中,5T4 VHH域可包含可挠性接头,诸如甘氨酸接头或主要由氨基酸甘氨酸和丝氨酸构成的接头,其在本文中表示为GS-接头。本发明的所述接头可具有各种长度,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。在一些实施例中,接头包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:GGSGGS,亦即$(GGS)_2$(SEQ ID NO:1);GGSGGSGGS,亦即$(GGS)_3$(SEQ ID NO:2);GGSGGSGGSGGS,亦即$(GGS)_4$(SEQ ID NO:3);和GGSGGSGGSGGSGGS,亦即$(GGS)_5$(SEQ ID NO:4);Gly-Gly(GG)、GGG、GGGG(SEQ ID NO:5);GGGGG(SEQ ID NO:6);和GGGGGG(SEQ ID NO:7)。在一些实施例中,接头为(GGGGS)n,其中n为1至5(SEQ ID NO:123);(GGGGGS)n,其中n为1至4(SEQ ID NO:124);GGGGS(SEQ ID NO:125);GGGGGS(SEQ ID NO:126);GGGGGSGGGGGSGGGGGS(SEQ ID NO:127);GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:128);GGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:129);或PGGGG(SEQ ID NO:327)。在一些实施例中,接头

为GG接头。在一些实施例中,5T4结合多肽包括GS-接头和甘氨酸接头的组合。在一些实施例中,5T4 VHH域可在其C端处包含额外接头,诸如用于连接于另一氨基酸序列,诸如另一多肽。在任何所提供的实施例中的一些中,5T4 VHH域可在其N端处包含接头,诸如用于连接于另一氨基酸序列,诸如另一多肽。

[0033] 本文提供一种多特异性多肽构建体,其包含:第一组分,该第一组分包含包括第一Fc多肽和第二Fc多肽的异源二聚体Fc区;和第二组分,该第二组分包含包括可变重链区(VH)和可变轻链区(VL)的抗CD3抗体或抗原结合片段,其中构成抗CD3抗体或抗原结合片段的VH和VL连接于异源二聚体Fc的相对多肽;第一组分和第二组分通过接头偶合,其中异源二聚体Fc区定位于抗CD3抗体的N端;且第一组分和第二组分中的一或两者包含至少一个抗原结合域,其包含特异性结合5T4的仅有重链的可变域(5T4 VHH域)。在一些实施例中,多特异性多肽构建体至少包含第一多肽,其包含异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头和抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域;和第二多肽,其包含异源二聚体Fc区的第二Fc多肽;接头,视情况与第一多肽中所存在的接头相同的接头;和抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域中的另一者,其中第一多肽和第二多肽中的一或两者包含至少一个5T4 VHH域。

[0034] 在任何所提供的实施例中的一些中,与同源二聚体Fc区的多肽相比,视情况与SEQ ID NO:8中所示的Fc多肽或其免疫活性片段相比,异源二聚体Fc区的第一Fc多肽和第二Fc多肽中的一或两者包含至少一种修饰以诱导异源二聚化。在一些实施例中,异源二聚体Fc的第一Fc多肽和第二Fc多肽中的每一者独立地包含至少一种氨基酸修饰。在一些实施例中,异源二聚体Fc的第一Fc多肽和第二Fc多肽中的每一者包含杵-臼修饰或包含电荷突变以增加多肽的静电互补性。在一些实施例中,氨基酸修饰为杵-臼修饰。

[0035] 在任何所提供的实施例中的一些中,异源二聚体Fc的第一Fc多肽包含选自以下中的修饰:Thr366Ser、Leu368Ala、Tyr407Val及其组合,且异源二聚体Fc的第二Fc多肽包含修饰Thr366Trp。在任何所提供的实施例中的一些中,第一Fc多肽和第二Fc多肽进一步包含将非半胱氨酸残基修饰成半胱氨酸残基,其中第一多肽的修饰在位置Ser354和Tyr349中的一者处,且第二Fc多肽的修饰在位置Ser354和Tyr349中的另一者处。在任何所提供的实施例中的一些中,抗CD3抗体或抗原结合片段的VL域连接于异源二聚体Fc的第一Fc多肽,且抗CD3抗体或抗原结合片段的VH域连接于异源二聚体Fc的第二Fc多肽。

[0036] 在任何所提供的实施例中的一些中,氨基酸修饰为电荷突变以增加多肽的静电互补性。在任何所提供的实施例中的一些中,第一Fc多肽和/或第二Fc多肽或第一Fc多肽和第二Fc多肽中的每一者在互补位置处包含修饰,其中所述修饰为用具有与另一多肽的互补氨基酸相反的电荷的氨基酸置换。

[0037] 在任何所提供的实施例中的一些中,异源二聚体Fc的第一Fc多肽或第二Fc多肽中的一者在残基Ile253处进一步包含修饰。在一些实施例中,该修饰为Ile253Arg。在任何所提供的实施例中的一些中,异源二聚体Fc的第一Fc多肽或第二Fc多肽中的一者在残基His435处进一步包含修饰。在一些实施例中,该修饰为His435Arg。在任何所提供的实施例中的一些中,Fc区包含缺乏Lys447的多肽。

[0038] 在任何所提供的实施例中的一些中,Fc区包含多肽,其包含至少一种修饰以增强FcRn结合。在一些实施例中,该修饰在选自由以下组成的组的位置处:Met252、Ser254、Thr256、Met428、Asn434及其组合。在一些情况下,该修饰在选自由以下组成的组的位置处:

Met252Y、Ser254T、Thr256E、Met428L、Met428V、Asn434S及其组合。在一些实施例中，该修饰在位置Met252处和位置Met428处。在一些实施例中，该修饰为Met252Y和Met428L。在一些情况下，该修饰为Met252Y和Met428V。

[0039] 在任何所提供的实施例中的一些中，异源二聚体Fc的第一多肽包含SEQ ID NO:103、107、115或117中的任一者中所示的氨基酸序列，且异源二聚体Fc的第二多肽包含SEQ ID NO:104、108、111、113、119或121中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0040] 在一些实施例中，异源二聚体Fc区的第一Fc多肽包含SEQ ID NO:103、107、115、117、328或334中的任一者中所示的氨基酸序列，且异源二聚体Fc区的第二Fc多肽包含SEQ ID NO:104、108、111、113、119、121、329、332或336中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0041] 在任何所提供的实施例中的一些中，Fc区包含包括至少一种氨基酸修饰的多肽，该修饰降低效应功能和/或减少与选自Fcγ受体或C1q的效应分子的结合。在一些实施例中，一或多种氨基酸修饰为Glu233、Leu234或Leu235中的一或多者缺失。

[0042] 在任何所提供的实施例中的一些中，异源二聚体Fc的第一多肽包含SEQ ID NO:105、109、116或118中的任一者中所示的氨基酸序列，且异源二聚体Fc的第二多肽包含SEQ ID NO:106、110、112、114、120或122中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0043] 在任何所提供的实施例中的一些中，异源二聚体Fc区的第一Fc多肽包含SEQ ID NO:105、109、116、118、330或335中的任一者中所示的氨基酸序列，且异源二聚体Fc区的第二Fc多肽包含SEQ ID NO:106、110、112、114、120、122、331、333或337中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0044] 在任何所提供的实施例中的一些中，抗CD3抗体或抗原结合片段为单价的。在任何所提供的实施例中的一些中，抗CD3抗体或抗原结合片段不为单链抗体，视情况不为单链可变片段(scFv)。在任何所提供的实施例中的一些中，抗CD3抗体或抗原结合片段为Fv抗体片段。在一些实施例中，Fv抗体片段包含经二硫键稳定的抗CD3结合Fv片段(dsFv)。

[0045] 在任何所提供的实施例中的一些中，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:29)；VH CDR2，其包含氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:30)；VH CDR3，其包含氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:31)；VL CDR1，其包含氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:32)；VL CDR2，其包含氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:33)；和VL CDR3，其包含氨基酸序列ALWYSNLWV(SEQ ID NO:34)。在任何所提供的实施例中的一些中，抗CD3抗体或抗原结合片段包含VH，其具有SEQ ID NO:27、35至65、341、343和358中的任一者的氨基酸序列；或展现出与SEQ ID NO:27、35至65、341、343和358中的任一者有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合CD3的序列；和VL，其具有SEQ ID NO:28、66至84、293、340和342中的任一者的氨基酸序列；或展现出与SEQ ID NO:28、66至84、293、340和342中的任一者有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合CD3的序列。在任何所提供的实施例中的一些中，抗CD3抗体或抗原结合片段包含VH，其具有SEQ ID NO:27、35至65、341、343、358、388、389、392、393中的任一者的氨基酸序列；或展现出与SEQ ID NO:27、35至65、341、343、358、388、389、392、393中的任一者有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合CD3的序列；和VL，其具有SEQ ID NO:28、66至84、293、340、342、390、391、394、395中的任一者的氨基酸序列；或展现出与SEQ ID NO:28、66至

84、293、340、342、390、391、394、395中的任一者有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合CD3的序列。以上VH和VL序列中的任一者可在本文所提供的构建体中的抗CD3抗体或抗原结合片段中以任何组合形式进行组合。

[0046] 在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个抗原结合域结合至人类5T4中的抗原决定基，但并未展现交叉反应性结合至小鼠5T4。

[0047] 在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个抗原结合域结合至SEQ ID NO:382的氨基酸60与112之间的氨基酸残基。

[0048] 在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个抗原结合域结合至SEQ ID NO:382的氨基酸173与224之间的氨基酸残基。

[0049] 在任何所提供的实施例中的一些中，抗CD3抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列SEQ ID NO:47和氨基酸序列SEQ ID NO:75。在一些实施例中，抗CD3抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列SEQ ID NO:47和氨基酸序列SEQ ID NO:293。在一些实施例中，抗CD3抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列SEQ ID NO:341和氨基酸序列SEQ ID NO:342。

[0050] 在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个5T4单域抗体相对于多特异性多肽构建体的Fc区定位于氨基端和/或相对于多特异性多肽构建体的CD3结合区定位于羧基端。在任何所提供的实施例中的一些中，多特异性多肽构建体包含特异性结合5T4的第一5T4 VHH域和特异性结合5T4的第二5T4 VHH域。在任何所提供的实施例中的一些中，第一5T4 VHH域或第二5T4 VHH域相对于多特异性构建体的Fc区定位于氨基端，且第一5T4 VHH域或第二5T4 VHH域中的另一者相对于多特异性构建体的CD3结合区定位于羧基端。

[0051] 在任何所提供的实施例中的一些中，第一多肽按N端至C端的次序包含结合5T4的第一5T4 VHH域；包含异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头、抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域的第一多肽；和结合5T4的第二5T4 VHH域；且第二多肽按N端至C端的次序包含异源二聚体Fc区的第二Fc多肽；接头，视情况与第一多肽中所存在的接头相同的接头；和抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域中的另一者。

[0052] 在任何所提供的实施例中的一些中，第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域相同。在任何所提供的实施例中的一些中，第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域不同。在任何所提供的实施例中的一些中，第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域结合5T4的不同或非重迭抗原决定基和/或不竞争结合至5T4。在任何所提供的实施例中的一些中，5T4 VHH域结合至位于5T4胞外域的氨基酸残基60与112之间的抗原决定基，所述氨基酸残基对应于SEQ ID NO:382中所示的残基。在任何所提供的实施例中的一些中，5T4 VHH域结合至位于5T4胞外域的氨基酸残基173与224之间的抗原决定基，所述氨基酸残基对应于SEQ ID NO:382中所示的残基。

[0053] 在任何所提供的实施例中的一些中，第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域结合至5T4胞外域的相同或重迭抗原决定基。在任何所提供的实施例中的一些中，第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域均结合位于5T4胞外域的氨基酸残基60与112之间的抗原决定基，所述氨基酸残基对应于SEQ ID NO:382中所示的残基。在任何所提供的实施例中的一些中，第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域均结合位于5T4胞外域的氨基酸残基173与224之间的抗原决定基，所述氨基酸残基对应于SEQ ID NO:382中所示的残基。

[0054] 在任何所提供的实施例中的一些中，第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域结合至5T4胞外域的不同抗原决定基。在任何所提供的实施例中的一些中，第一5T4 VHH域结合位于

5T4胞外域的氨基酸残基60与112之间的抗原决定基，所述氨基酸残基对应于SEQ ID NO:382中所示的残基，且第二5T4 VHH域结合位于5T4胞外域的氨基酸残基173与224之间的抗原决定基，所述氨基酸残基对应于SEQ ID NO:382中所示的残基。

[0055] 在任何所提供的实施例中的一些中，第一VHH域或sdAb包含SEQ ID NO:245至254、295、302中的任一者中所示的氨基酸序列、其人源化变体；或展现出与SEQ ID NO:245至254、295、302中的任一者有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列；且第二VHH域或sdAb包含SEQ ID NO:255至287、294中的任一者中所示的氨基酸序列、其人源化变体；或展现出与SEQ ID NO:255至287、294中的任一者有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0056] 在任何所提供的实施例中的一些中，第一VHH域或sdAb包含SEQ ID NO:245至254、295、302、360中的任一者中所示的氨基酸序列、其人源化变体；或展现出与SEQ ID NO:245至254、295、302、360中的任一者有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列；且第二VHH域或sdAb包含SEQ ID NO:255至287、294中的任一者所示的氨基酸序列、其人源化变体；或展现出与SEQ ID NO:255至287、294中的任一者有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0057] 在任何所提供的实施例中的一些中，第一抗体和第二抗体(5T4 VHH域)为分别选自SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:294。在任何所提供的实施例中的一些中，第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域为分别选自SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:276。在任何所提供的实施例中的一些中，第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域为分别选自SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:255。在任何所提供的实施例中的一些中，第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域为分别选自SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:294。在任何所提供的实施例中的一些中，第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域为分别选自SEQ ID NO:295和SEQ ID NO:294。在任何所提供的实施例中的一些中，第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域为分别选自SEQ ID NO:249和SEQ ID NO:270。在任何所提供的实施例中的一些中，第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域为分别选自SEQ ID NO:254和SEQ ID NO:287。在任何所提供的实施例中的一些中，第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域为分别选自SEQ ID NO:302和SEQ ID NO:302。在任何所提供的实施例中的一些中，第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域为分别选自SEQ ID NO:360和SEQ ID NO:287。在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:245至287、294、295、302或360中的任一者中所示的VHH域序列；或展现出与SEQ ID NO:245至287、294、295、302或360中的任一者有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0058] 在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:360中所示的VHH域序列；或展现出与SEQ ID NO:360有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0059] 在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:245；(ii)SEQ ID NO:

245的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:245有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:86至87和288至292、296和297组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:88至99、298和299组成的组的氨基酸序列;和CDR3,其包含选自由SEQ ID NO:100至102、300、301和303组成的组的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:288、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:289、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、90和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、91和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、92和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、93和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:291、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:292、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:86、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、95和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、96和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、97和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、99和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:86、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:296、298和300中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:297、299和301中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:288、88和303中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0060] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:246至254中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:246至254有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:246至254中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0061] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:360中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:360有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:360中所示的氨基酸序列。

[0062] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:255;(ii)SEQ ID NO:255的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:255有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:86、290至292组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:89至94组成的组的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ

ID NO:101中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:290、90和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、91和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、92和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、93和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:291、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:292、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:86、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0063] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:256至275有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:276;(ii)SEQ ID NO:276的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:276有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一和第二sdAb中的每一者独立地包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:86和87组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:95至99组成的组的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:102中所示的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:87、95和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、96和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、97和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、99和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:86、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0064] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:277至287中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:277至287有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:277至287中的任一者中所示的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:294;(ii)SEQ ID NO:294的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:294有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含CDR1,其包含SEQ ID NO:296中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:298中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:300中所示的氨基酸序列。

[0065] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二

5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:295;(ii)SEQ ID NO:295的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:295有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含CDR1,其包含SEQ ID NO:297中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:299中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:301中所示的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:302;(ii)SEQ ID NO:302的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:302有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含CDR1,其包含SEQ ID NO:288中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:88中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:303中所示的氨基酸序列。

[0066] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一sdAb和第二sdAb中的每一者独立地包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:294、295或302;(ii)SEQ ID NO:294、295或302的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:294、295或302有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0067] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:296、298和300中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:297、299和301中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:288、88和303中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0068] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地示于SEQ ID NO:245、249、255、270、276、294、295或302中。

[0069] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个5T4 VHH域或第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地示于SEQ ID NO:245、249、254、255、270、276、287、294、295、302或360中。

[0070] 在任何所提供的实施例中的一些中,第一组分和第二组分中的一或两者包含结合共刺激受体的至少一个共刺激受体结合区(CRBR)。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个共刺激受体结合区(CRBR)相对于多特异性多肽构建体的Fc区定位于氨基端和/或相对于多特异性多肽构建体的CD3结合区定位于羧基端。在一些实施例中,多特异性多肽构建体仅包含一个共刺激受体结合区(CRBR)。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个共刺激受体结合区(CRBR)相对于多特异性多肽构建体的Fc区定位于氨基端。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个共刺激受体结合区(CRBR)相对于多特异性多肽构建体的CD3结合区定位于羧基端。

[0071] 在任何所提供的实施例中的一些中,第一多肽按N端至C端的次序包含结合5T4的第一5T4 VHH域;包含异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头、抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域的第一多肽;和结合5T4的第二5T4 VHH域;且第二多肽包含CRBR且按N端至C端的次序包含异源二聚体Fc区的第二Fc多肽;接头,视情况与第一多肽中所存在的接头相同的接

头;抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域中的另一者,其中CRBR相对于第二多肽的Fc区定位于氨基端或相对于第二多肽的抗CD3抗体或抗原结合片段定位于羧基端。

[0072] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个共刺激受体结合区(CRBR)为或包含共刺激受体的原生同源结合搭配物的胞外域或其结合片段,或展现对共刺激受体的结合活性的其变体。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个共刺激受体结合区(CRBR)为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、单域重链抗体和单域轻链抗体。在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段为Fv、scFv、Fab、单域抗体(sdAb)、VNAR或VHH。在一些情况下,抗体或抗原结合片段为sdAb。在一些实施例中,sdAb为人类或人源化sdAb。在一些实施例中,sdAb为VNAR或VHH。

[0073] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个共刺激受体结合区(CRBR)结合选自以下中的共刺激受体:41BB(CD137)、OX40(CD134)、CD27、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)、CD28、ICOS、CD40、B细胞活化因子受体(BAFF-R)、B细胞成熟抗原(BCMA)、跨膜活化因子和CAML相互作用因子(TACI)和NKG2D。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个共刺激受体结合区(CRBR)结合选自以下中的共刺激受体:41BB(CD137)、OX40(CD134)和糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个共刺激受体结合区(CRBR)包含SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列;或与SEQ ID NO:210中所示的序列有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合4-1BB的序列。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个共刺激受体结合区(CRBR)包含SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列且结合4-1BB。

[0074] 在任何所提供的实施例中的一些中,第一组分和第二组分中的一或两者包含结合抑制性受体的至少一个抑制性受体结合区(IRBR)。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个抑制性受体结合区(IRBR)相对于多特异性多肽构建体的Fc区定位于氨基端和/或相对于多特异性多肽构建体的CD3结合区定位于羧基端。在任何所提供的实施例中的一些中,多特异性多肽构建体仅包含一个抑制性受体结合区(IRBR)。

[0075] 在任何所提供的实施例中的一些中,第一多肽按N端至C端的次序包含结合5T4的第一5T4 VHH域;包含异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头、抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域的第一多肽;和结合5T4的第二5T4 VHH域;且第二多肽包含IRBR且按N端至C端的次序包含异源二聚体Fc区的第二Fc多肽;接头,视情况与第一多肽中所存在的接头相同的接头;抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域中的另一者,其中IRBR相对于第二多肽的Fc区定位于氨基端或相对于第二多肽的抗CD3抗体或抗原结合片段定位于羧基端。

[0076] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个IRBR为或包含抑制性受体的原生同源结合搭配物的胞外域或其结合片段,或展现对抑制性受体的结合活性的其变体。在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个IRBR为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、单域重链抗体和单域轻链抗体。在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段为Fv、scFv、Fab、单域抗体(sdAb)、VNAR或VHH。在一些情况下,抗体或抗原结合片段为sdAb。在一些实施例中,sdAb为人类或人源化sdAb。

[0077] 在任何所提供的实施例中的一些中,至少一个IRBR结合选自以下中的抑制性受体:PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA和TIM3。在一些实施例中,至少一个IRBR结合PD-1。

[0078] 在任何所提供的实施例中的一些中,第一多肽按N端至C端的次序包含结合5T4的

第一5T4 VHH域;包含异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头、抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域的第一多肽;和结合5T4的第二5T4 VHH域;且第二多肽按N端至C端的次序包含IRBR或CRBR中的一者;异源二聚体Fc区的第二Fc多肽;接头,视情况与第一多肽中所存在的接头相同的接头;抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域中的另一者;和CRBR或IRBR中的另一者。

[0079] 在任何所提供的实施例中的一些中,接头为肽或多肽接头,视情况地,其中接头长度为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸。在任何所提供的实施例中的一些中,接头为不可裂解接头。在任何所提供的实施例中的一些中,不可裂解接头为或包含GG。在任何所提供的实施例中的一些中,不可裂解接头包含GS、GGS、GGGGS(SEQ ID NO:125)、GGGGGS(SEQ ID NO:126)及其组合。在任何所提供的实施例中的一些中,接头为或包含序列GGGGGSGGGGGSGGGGGS(SEQ ID NO:127)。在任何所提供的实施例中的一些中,接头为可裂解接头。在任何所提供的实施例中的一些中,可裂解接头为充当蛋白酶的基质的多肽。

[0080] 在任何所提供的实施例中的一些中,蛋白酶为由免疫效应细胞、肿瘤或肿瘤微环境中所存在的细胞产生。在任何所提供的实施例中的一些中,蛋白酶为由免疫效应细胞产生,且免疫效应细胞为活化T细胞、自然杀伤(NK)细胞或NK T细胞。在一些实施例中,蛋白酶为选自以下当中: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,蛋白酶为颗粒酶B。

[0081] 在任何所提供的实施例中的一些中,可裂解接头包含氨基酸序列GGSGGGGIEPDIGGSGGS(SEQ ID NO:171)。

[0082] 本文提供一种结合5T4的分离单域抗体,其包含互补决定区1(CDR1),其包含选自由SEQ ID NO:86至87和288至292、296和297组成的组的氨基酸序列;互补决定区2(CDR2),其包含选自由SEQ ID NO:88至99、298和299组成的组的氨基酸序列;和互补决定区3(CDR3),其包含选自由SEQ ID NO:100至102、300、301和303组成的组的氨基酸序列。在一些实施例中,分离单域抗体包含SEQ ID NO:245至287、294、295、302中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:245至287、294、295、302中的任一者有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0083] 在任何所提供的实施例中的一些中,分离单域抗体结合至人类5T4中的抗原决定基,但并未展现交叉反应性结合至小鼠5T4。

[0084] 在任何所提供的实施例中的一些中,分离单域抗体结合至SEQ ID NO:382的氨基酸60与112之间的氨基酸残基。

[0085] 在任何所提供的实施例中的一些中,分离单域抗体结合至SEQ ID NO:382的氨基酸173与224之间的氨基酸残基。

[0086] 本文提供一种结合5T4的分离单域抗体,其包含互补决定区1(CDR1),其包含选自由SEQ ID NO:86至87和288至292、296和297组成的组的氨基酸序列;互补决定区2(CDR2),其包含选自由SEQ ID NO:88至99、298和299组成的组的氨基酸序列;和互补决定区3(CDR3),其包含选自由SEQ ID NO:100至102、300、301和303组成的组的氨基酸序列。在一些实施例中,分离单域抗体包含SEQ ID NO:245至287、294、295、302、360中的任一者中所示的

氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:245至287、294、295、302、360中的任一者有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0087] 在任何所提供的实施例中的一些中,单域抗体包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:245;(ii)SEQ ID NO:245的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:245有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,sdAb包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:288和289组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:88中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:100中所示的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,sdAb包含SEQ ID NO:288、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:289、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在任何所提供的实施例中的一些中,sdAb包含SEQ ID NO:246至254中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:246至254有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,sdAb包含SEQ ID NO:246至254中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0088] 在任何所提供的实施例中的一些中,单域抗体包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:245;(ii)SEQ ID NO:245的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:245有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,sdAb包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:288和289组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:88中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:100中所示的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,sdAb包含SEQ ID NO:288、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:289、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在任何所提供的实施例中的一些中,sdAb包含SEQ ID NO:246至254或360中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:246至254有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,sdAb包含SEQ ID NO:246至254或360中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0089] 在任何所提供的实施例中的一些中,sdAb包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:255;(ii)SEQ ID NO:255的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:255有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,sdAb包含CDR1,其包含SEQ ID NO:86、290至292中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:89至94组成的组的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:101中所示的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中,sdAb包含SEQ ID NO:290、90和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、91和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、92和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、93和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:291、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:292、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:86、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0090] 在任何所提供的实施例中的一些中，sdAb包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列；或展现出与SEQ ID NO:256至275有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中，sdAb包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中，sdAb包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:276；(ii)SEQ ID NO:276的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:276有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中，sdAb包含CDR1，其包含选自由SEQ ID NO:86和87组成的组的氨基酸序列；CDR2，其包含选自由SEQ ID NO:95至99组成的组的氨基酸序列；和CDR3，其包含SEQ ID NO:102中所示的氨基酸序列。在一些实施例中，sdAb包含SEQ ID NO:87、95和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:87、96和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:87、97和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:87、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:87、99和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；或SEQ ID NO:86、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0091] 在任何所提供的实施例中的一些中，sdAb包含SEQ ID NO:277至287中的任一者中所示的氨基酸序列；或展现出与SEQ ID NO:277至287有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:277至287中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0092] 在任何所提供的实施例中的一些中，sdAb包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:294；(ii)SEQ ID NO:294的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:294有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中，sdAb包含CDR1，其包含SEQ ID NO:296中所示的氨基酸序列；CDR2，其包含SEQ ID NO:298中所示的氨基酸序列；和CDR3，其包含SEQ ID NO:300中所示的氨基酸序列。

[0093] 在任何所提供的实施例中的一些中，sdAb包含CDR3，其包含选自由SEQ ID NO:300、301和303组成的组的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中，sdAb包含CDR1，其包含选自由SEQ ID NO:288、296和297组成的组的氨基酸序列；和/或CDR2，其包含选自由SEQ ID NO:88、298和299组成的组的氨基酸序列。

[0094] 在任何所提供的实施例中的一些中，sdAb包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:295；(ii)SEQ ID NO:295的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:295有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中，sdAb包含CDR1，其包含SEQ ID NO:297中所示的氨基酸序列；CDR2，其包含SEQ ID NO:299中所示的氨基酸序列；和CDR3，其包含SEQ ID NO:301中所示的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中，sdAb包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:302；(ii)SEQ ID NO:302的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:302有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的

实施例中的一些中，sdAb包含CDR1，其包含SEQ ID NO:288中所示的氨基酸序列；CDR2，其包含SEQ ID NO:88中所示的氨基酸序列；和CDR3，其包含SEQ ID NO:303中所示的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中，sdAb包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:294、295或302；(ii)SEQ ID NO:294、295或302的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:294、295或302有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。在任何所提供的实施例中的一些中，至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:296、298和300中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:297、299和301中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；或SEQ ID NO:288、88和303中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0095] 本文提供编码本文中所提供的任何5T4结合多肽的一或多种聚核苷酸。

[0096] 本文提供编码本文中所提供的多特异性多肽构建体中的任一者的一或多种聚核苷酸。

[0097] 本文提供一种聚核苷酸，其包含第一核酸序列，其编码本文中所提供的多特异性构建体中的任一者的第一多肽；和第二核酸序列，其编码多特异性构建体的第二多肽，其中第一核酸序列和第二核酸序列为通过内部核糖体进入位点(IRES)或编码自裂解肽或引起核糖体跳跃的肽的核酸分离。在一些实施例中，第一核酸序列和第二核酸序列可操作地连接于相同启动子。

[0098] 在任何所提供的实施例中的一些中，编码自裂解肽或引起核糖体跳跃的肽的核酸为选自T2A、P2A、E2A或F2A。

[0099] 本文提供一种编码所提供的单域抗体中的任一者的聚核苷酸。

[0100] 本文提供一种包含所提供的聚核苷酸中的任一者的载体。在任何所提供的实施例中的一些中，载体为表达载体。在任何所提供的实施例中的一些中，载体为病毒载体或真核载体，视情况其中所述真核载体为哺乳动物载体。

[0101] 本文提供一种包含一或多种所提供的聚核苷酸中的任一者或一或多种所提供的载体中的任一者的细胞。在一些实施例中，细胞为重组或分离的。在一些实施例中，细胞为哺乳动物细胞。

[0102] 本文提供一种制造多肽的方法，该方法包含将一或多种所提供的聚核苷酸中的任一者或一或多种所提供的载体中的任一者引入细胞中，且在产生多特异性多肽构建体的条件下培养细胞。在任何所提供的实施例中的一些中，该方法进一步包含自细胞分离或纯化多肽。

[0103] 本文提供一种由所提供的方法中的任一者产生的多肽。

[0104] 本文提供一种经工程改造的免疫细胞，其包含嵌合抗原受体，其包含：包含所提供的单域抗体中的任一者的胞外域；跨膜域；和胞内信号传导域。在一些实施例中，细胞为淋巴细胞。在任何所提供的实施例中的一些中，细胞为T细胞或自然杀伤(NK)细胞。在任何所提供的实施例中的一些中，胞内信号传导域包含基于免疫受体酪氨酸的活化模体(ITAM)信号传导域。在任何所提供的实施例中的一些中，胞内信号传导域为或包含CD3ζ信号传导域，视情况人类CD3ζ信号传导域。在任何所提供的实施例中的一些中，胞内信号传导域进一步包含共刺激分子的信号传导域。在任何所提供的实施例中的一些中，共刺激分子为CD28、ICOS、41BB或OX40，视情况人类CD28、人类ICOS、人类41BB或人类OX40。

[0105] 本文提供一种医药组合物，其包含所提供的5T4结合多肽、多特异性多肽构建体、单域抗体或经工程改造的免疫细胞中的任一者。在任何所提供的实施例中的一些中，医药组合物包括医药学上可接受的载剂。在一些实施例中，医药组合物为无菌的。

[0106] 本文提供一种刺激或诱导受试者的免疫反应的方法，该方法包含向对其有需要的受试者给予所提供的5T4结合多肽、多特异性多肽构建体、单域抗体或经工程改造的免疫细胞中的任一者或医药组合物。在一些实施例中，针对肿瘤或癌症，视情况表达5T4的肿瘤或癌症增强免疫反应。在一些实施例中，该方法治疗受试者的疾病或病状。

[0107] 本文提供一种治疗受试者的疾病或病状的方法，该方法包含向对其有需要的受试者给予治疗有效量的所提供的5T4结合多肽、多特异性多肽构建体、单域抗体或经工程改造的免疫细胞中的任一者或医药组合物。在任何所提供的实施例中的一些中，该疾病或病状为肿瘤或癌症。在任何所提供的实施例中的一些中，该受试者为人类。

[0108] 附图简单说明

[0109] 图1A至图1B描绘靶向5T4的多种单域抗体结合细胞表面5T4的能力。通过对内源性表达5T4的HEK-293freestyle细胞进行流动式细胞测量术来评估结合。

[0110] 图2A至图2F描绘靶向5T4的sdAb及其人源化变体结合T47D细胞上的细胞表面5T4的能力。通过对5T4阳性细胞株T47D进行流动式细胞测量术来评估结合。图2A至图2C展示T47D上12E9及其人源化变体的结合。图2D至图2E展示T47D上14B5及其人源化变体的结合。图2F展示T47D上16G10及其人源化变体的结合。在此，5T4 sdAb可操作地连接于人类Fc。

[0111] 图3A至图3E描绘无(图3A、图3C、图3E)和具有41BB结合域(图3B、图3D)的代表性靶向5T4的限制性CD3接合分子。cx3546和cx3547具有位于异源二聚体的一条链的N端处的相同的靶向5T4的sdAb(12E9)和位于异源二聚体的一条链的C端处的不同的靶向5T4的sdAb(分别14B5或16G10)。cx3499和cx3497分别与cx3546和cx3547一致，但具有位于异源二聚体的相反链的C端处的靶向41BB的sdAb。cx3546、cx3547、cx3499和cx3497各在Fc区与CD3结合区之间含有可裂解接头。cx5185与cx5951相同，但前者包括位于CD3结合区的C端处的靶向4-1BB的sdAb；两者均在Fc区与CD3结合区之间含有不可裂解接头，且含有位于Fc异源二聚体的N端和C端处的靶向5T4的sdAb的人源化型式、hz12E9v9和hz16G10v11。这些代表性靶向5T4的限制性CD3接合分子显示与5T4的二价结合，且在含具有41BB结合域的构建体中，显示与41BB的单价结合。

[0112] 图4A至图4M描绘多种靶向5T4的限制性CD3接合构建体与5T4阳性Ovcar-5细胞株的结合(左上)和与初级人类T细胞的结合的缺乏(右上)。下图展示滴定量的靶向5T4的限制性CD3接合构建体以比较与Ovcar-5和初级人类T细胞的结合。通过流动式细胞测量术使用抗人类IgG APC二级抗体来评估结合。直方图显示在200nM各构建体下经校正的细胞计数对比荧光。

[0113] 图5A至图5F描绘靶向5T4的限制性CD3接合构建体引发5T4依赖性T细胞活化的能力。Jurkat CD3 NFAT-GFP报告分子细胞株用于监测T细胞活化。Ovcar-5细胞(图5A、图5C、图5E)用作抗原阳性细胞且CCRF-CEM细胞(图5B、图5D、图5F)用作抗原阴性细胞。

[0114] 图6A和图6B描绘靶向5T4的限制性CD3接合构建体介导5T4阳性细胞株Ovcar-5上抗原特异性T细胞细胞毒性的能力(图6A)及针对5T4阴性细胞株CCRF-CEM的细胞毒性的缺乏(图6B)。

[0115] 图7A至图7D描绘如通过流动式细胞测量术分析活化标记物CD25所评估，靶向5T4的限制性CD3接合构建体介导CD4 T细胞(图7A至图7B)和CD8 T细胞(图7C至图7D)上抗原特异性T细胞活化的能力。5T4阳性细胞株Ovcar-5或5T4阴性细胞株CCRF-CEM用于评估由示例性的靶向5T4的限制性CD3接合构建体介导的细胞活化。

[0116] 图8A至图8D描绘如通过流动式细胞测量术分析活化标记物CD69所评估，靶向5T4的限制性CD3接合构建体介导CD4 T细胞(图8A至图8B)和CD8 T细胞(图8C至图8D)上抗原特异性T细胞活化的能力。5T4阳性细胞株Ovcar-5或5T4阴性细胞株CCRF-CEM用于评估由示例性的靶向5T4的限制性CD3接合构建体介导的细胞活化。

[0117] 图9A至图9D描绘如通过流动式细胞测量术分析活化标记物CD71所评估，靶向5T4的限制性CD3接合构建体介导CD4 T细胞(图9A至图9B)和CD8 T细胞(图9C至图9D)上抗原特异性T细胞活化的能力。5T4阳性细胞株Ovcar-5或5T4阴性细胞株CCRF-CEM用于评估由示例性的靶向5T4的限制性CD3接合构建体介导的细胞活化。

[0118] 图10A至图10C展示靶向5T4的限制性CD3接合构建体以抗原依赖性方式引发IFNγ(图10A和图10B)或TNFα(图10C)自T细胞产生的能力。使用ELISA法(图10A)或FluoroSpot分析(图10B和图10C)监测细胞因子产生。

[0119] 图11A展示如通过流动式细胞测量术通过CD107a表达所评估，格式化为sdAb-Fc的5T4 sdAb 12E9和4D3介导NK细胞活化的能力。图11B至图11D描绘CD16报告分子活化分析的结果，该分析为ADCC活性的替代物，其使用经NFAT驱动的荧光素酶报导基因工程改造以稳定表达CD16a的Jurkat报告分子细胞株。图11B描绘在5T4+细胞存在或不存在下且用50nM所指示的sdAb-Fc或hzsdAb-Fc处理的荧光素酶报告分子的相对发光单位(RLU)。图11C和图11D描绘在5T4+细胞存在(图11C)或不存在(图11D)下且用滴定量的所指示的hzsdAb-Fc处理的荧光素酶报告分子的RLU。

[0120] 图12A至图12D描绘代表性靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx3497(具有41BB结合域)和cx3547(无41BB结合域)的细胞结合。图12A和图12B展示与Ovcar-5细胞(一种5T4阳性黑色素瘤细胞株)的结合。图12C和图12D描绘与T细胞的结合且展示借由测试构建体与分离的T细胞的结合的缺乏。图12A和图12C显示在200nM各构建体下经校正的细胞计数对比荧光的直方图。图12B和图12D中展示各构建体在多种细胞类型上的整个滴定。如图12A和图12C中所示，仅仅二级抗人类APC抗体的对照以实心黑色迹线展示，而阳性对照抗CD3结合以空心迹线展示，且cx3547和cx3497以灰色阴影迹线展示。

[0121] 图13A和图13B描绘针对5T4阳性细胞株Ovcar-5(图13A)和5T4阴性细胞株CCRF-CEM(图13B)，由代表性靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx3497(具有41BB结合域)和cx3547(无41BB结合域)介导的T细胞细胞毒性的动力学。总重迭面积代表双重阳性:经荧光标记的靶点细胞中的裂解胱天蛋白酶-3/7基质。在抗原阴性细胞株上观测到的初始细胞毒性可能由靶点细胞与T细胞之间的MHC-错配介导。特别值得注意的是，含具有41BB结合域的cx3497能够诱发细胞毒性且动力学与TCR信号传导后的41BB上调相一致。

[0122] 图14展示在5T4阳性Ovcar-5细胞和5T4阴性CCRF-CEM细胞存在下用具有41BB结合域的代表性靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx3499和cx3497以及无41BB结合域的代表性靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx3546和cx3547处理的T细胞的IFNγ产生的比较。通过ELISA监测细胞因子产生。cx3546和cx3499含有相同的靶向5T4的sdAb，且cx3547和cx3497

含有相同的靶向5T4在sdAb。因此，这些组的构建体之间的唯一差异为添加41BB结合域。并有41BB结合域的靶向5T4的限制性CD3接合构建体显示增强的以抗原依赖性方式诱发IFNγ自T细胞产生的能力。

[0123] 图15A和图15B描绘由具有41BB结合域的示例性的靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx5185和无41BB结合域的示例性的靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx5951驱动的T细胞介导的细胞毒性的效能。图15A中展示5T4阳性Ovcar5细胞株上200nM至3.1pM的滴定范围的CD3接合构建体且图15B中展示5T4阴性CCRF-CEM上200nM至3.1pM的滴定范围的CD3接合构建体。

[0124] 图16A和图16B描绘在与具有41BB结合域的代表性靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx5185和无41BB结合域的代表性靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx5951一起在5T4阳性细胞A375、Ovcar-5和SHP-77存在下培育后，如通过CD4(图16A)和CD8(图16B)细胞上的CD25表达所评估的T细胞活化。借由流动式细胞测量术监测细胞表面的CD25来评估T细胞活化。

[0125] 图17展示在5T4阳性细胞株A375、SHP-77和Ovcar5存在下用滴定量的具有41BB结合域的代表性靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx5185和无41BB结合域的代表性靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx5951处理的T细胞的IFNγ产生的比较。

[0126] 图18描绘在5T4阳性细胞株A375、Ovcar-5和SHP-77存在下与具有41BB结合域的代表性靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx5185和无41BB结合域的代表性靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx5951一起培育后CD4 T细胞上的T细胞增殖。经由稀释CellTrace™染料监测T细胞增殖。结果描绘如通过稀释CellTrace™紫染料所监测的增殖性细胞百分比。

[0127] 图19描绘在5T4阳性细胞株A375、Ovcar-5和SHP-77存在下与具有41BB结合域的代表性靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx5185和无41BB结合域的代表性靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx5951一起培育后CD8 T细胞上的T细胞增殖。经由稀释CellTrace™染料监测T细胞增殖。结果描绘如通过稀释CellTrace™紫染料所监测的增殖性细胞百分比。

[0128] 图20描绘在5T4阳性细胞A375、Ovcar-5和SHP-77存在下与具有41BB结合域的代表性靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx5185和无41BB结合域的代表性靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx5951一起培育后CD4 T细胞中的粒线体功能的评估。线粒体功能通过流动式细胞测量术，使用MitoTracker绿(一种在活性粒线体中积聚的线粒体选择性荧光探针)来评估。

[0129] 图21描绘在5T4阳性细胞A375、Ovcar-5和SHP-77存在下与具有41BB结合域的代表性靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx5185和无41BB结合域的代表性靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx5951一起培育后CD8 T细胞中的粒线体功能的评估。粒线体功能通过流动式细胞测量术，使用MitoTracker绿(一种在活性粒线体中积聚的粒线体选择性荧光探针)来评估。

[0130] 图22展示具有41BB结合域的靶向5T4的限制性CD3接合构建体cx5185介导41BB信号传导的能力，而非缺乏41BB结合域的相同构建体cx5951。使用Jurkat 41BB NFkB-荧光素酶报告分子细胞及盘结合的重组5T4作为抗原来源来监测41BB信号传导。

[0131] 图23A至图23B描绘具有共刺激受体结合区(CRBR)的示例性靶向TAA的限制性CD3接合分子。所述构建体具有位于异源二聚体的一条链的N端和C端处的靶向抗原的sdAb，Fc杵，且具有位于异源二聚体的相反链的C端处的共刺激受体结合区(CRBR)，Fc臼，但具有相

对于彼此,位于相对侧上的CD3结合Fv的VH和VL。

[0132] 图24描绘图23A至图23B中所述的示例性构建体的T细胞报告分子分析的结果。图24A和图24B描绘当TAA阳性细胞株A375或TAA阴性细胞株CCRF-CEM分别与Jurkat CD3 NFAT-GFP报告分子细胞共培养时GFP报告分子的平均荧光强度(MFI)。图24C和图24D描绘当TAA阳性细胞株A375或TAA阴性细胞株CCRF-CEM分别与Jurkat CD3 NFAT-荧光素酶报告分子细胞共培养时荧光素酶报告分子的相对发光单位(RLU)。

[0133] 图25为用于抗原决定基定位的多种混杂小鼠/人类5T4构建体的示意图。移植人类5T4细胞外域(ECD)的区域,代替小鼠5T4全长构建体的对应区域。所述sdAb能够结合人类5T4,但不结合小鼠5T4。sdAb与混杂小鼠/人类5T4的结合表明sdAb所结合的抗原决定基在移植区域中。

[0134] 图26A描绘12E9v9与多种混杂小鼠/人类5T4构建体的结合,此证明由此sdAb识别的抗原决定基可能存在于氨基酸残基60与112(SEQ ID NO:411)之间。图26B描绘16G10v11与多种混杂小鼠/人类5T4构建体的结合,此证明由此sdAb识别的抗原决定基可能存在于氨基酸残基173与224(SEQ ID NO:412)之间。图26C描绘14B5v17与多种混杂小鼠/人类5T4构建体的结合,此证明由此sdAb识别的抗原决定基可能存在于氨基酸残基173与224(SEQ ID NO:412)之间。Hu和Mu分别表示全长人类和小鼠5T4细胞外域构建体。

[0135] 图27A至图27B描绘靶向5T4的限制性CD3接合构建体引发5T4依赖性T细胞活化的能力。Jurkat CD3 NFAT-GFP报告分子细胞株用于监测T细胞活化。SKOV-3(图27A)细胞用作抗原阳性细胞且CCRF-CEM(图27B)用作抗原阴性细胞。

[0136] 详述的说明

[0137] 本文提供特异性结合至5T4的多肽,下文中亦称为5T4结合多肽。在一些实施例中,所提供的结合多肽包含至少一个结合5T4的VHH域。在一些实施例中,本文提供的5T4结合多肽包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个各自个别地结合5T4的VHH域。在一些实施例中,本文提供的5T4结合多肽包含一个、两个、三个或四个结合5T4的VHH域。在一些实施例中,5T4结合多肽为单特异性的。在一些实施例中,5T4结合多肽为多特异性的。举例而言,所提供的5T4结合多肽包括可包含至少一个结合5T4的VHH域和结合一或多种除5T4外的靶点蛋白的一或多个额外结合域、诸如一或多个额外VHH域的多肽。

[0138] 在一些实施例中,5T4结合多肽包含至少一个结合5T4的VHH域和Fc域。在一些实施例中,本文提供的5T4结合多肽包含一个、两个、三个或四个结合5T4的VHH域和Fc域。在一些实施例中,Fc域介导5T4结合多肽在生理条件下的二聚以便形成使5T4结合位点的数量加倍的二聚体。举例而言,包含三个结合5T4的VHH域和Fc区的5T4结合多肽为三价的单体形式,但在生理条件下,Fc区可介导二聚,使得5T4结合多肽在所述条件下以六价二聚体形式存在。

[0139] 5T4癌胚抗原(亦称为滋养层糖蛋白、TPBG;5T4癌胚滋养层糖蛋白;以及Wnt活化的抑制因子1、WAIF1)为由来自合胞体滋养细胞层微绒毛膜糖蛋白免疫接种的小鼠的脾细胞的杂交瘤产生的鼠类单克隆抗体鉴别的一种72kDa糖蛋白。5T4在各种肿瘤细胞和肿瘤血管的表面上表达,包括(但不限于)肾细胞癌、头颈部鳞状细胞癌、结肠直肠癌、卵巢癌和胃癌。5T4 cDNA转导至细胞株中增强细胞运动性且减少细胞-细胞接触,此表明其可能在机制上与恶性表型有关(Carsberg等人,1996,Int J Cancer.68 1:84-92)。另外,5T4表达上调为

胚胎干(ES)细胞早期分化中多能性丧失的标记物,且形成上皮间质转化(在胚胎发育和上皮肿瘤的转移扩散期间具有重要意义的过程)的构成组分(Southgate等人,2010,PLoS One.5(4):e9982)。5T4表达在正常组织中非常有限,但在经转型细胞株中以及在恶性肿瘤中其整个发展过程中为普遍的(Hole及Stern,1988,Br.J.Cancer,57,239-246;Southall等人,1990,Br.J.Cancer,61,89-95.;Jones等人,1990,Br.J.Cancer,61,96-100.;Starzynska等人1992,Br.J.Cancer 66:867-869)。另外,在结肠直肠癌(Starzynska等人,1992,Br.J.Cancer 66:867-869)、胃癌(Starzynska等人,1998,Eur J Gastroenterol Hepatol.10(6):479-84)、卵巢癌(Wrigley等人,1995,Int J Gynecol Cancer 5(4):269-274)、头颈部鳞状细胞癌(Kerk等人,2017,Clin Cancer Res.23(10):2516-2527.)和急性淋巴母细胞白血病(McGinn等人,2017,Haematologica,102:1075-1084)中肿瘤组织上高水平的5T4表达与晚期肿瘤阶段和不良存活率相关。

[0140] 人类5T4的一示例性序列如下阐述:

[0141] MPGGCSRGPAAGDGRLRLARLALVLLGWVSSSSPTSSASSFSSSAPFLAS

[0142] AVSAQPPLPDQCPALCECSEAARTVKCVNRNLTEVPTDLPAYVRNLFLTG

[0143] NQLAVLPAGAFARRPPLAELAALNLSGSRLDEVRAGAFEHLPSLRQLDLS

[0144] HNPLADLSPFAFSGSNASVSAPSPLVELILNHIVPPEDERQNRSFEGMVV

[0145] AALLAGRALQGLRRLELASNHFLYLPRDVLAQLPSLRHLDLSNNSLVSLT

[0146] YVSFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNGTLAELQGLPHIRVFLDNNPWVCDC

[0147] HMADMVTWLKETEVVQGKDRLTCAYPEKMRNRVLLELNSADLDCDPILPP

[0148] SLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLVLYLNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEGYH

[0149] YRYEINADPRLTNLSSNSDV(SEQ ID NO:244,信号序列加下划线)

[0150] 在一些实施例中,所提供的5T4结合多肽结合至人类5T4的细胞外域,诸如结合至SEQ ID NO:382中所示的氨基酸序列内的区域或抗原决定基。在一些方面中,所提供的5T4结合多肽结合至SEQ ID NO:382中所示的人类5T4的细胞外域中的相邻氨基酸序列。在一些实施例中,抗原决定基为线性抗原决定基。

[0151] 在一些实施例中,提供至少含有第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域序列的5T4结合多肽,其中两者均结合至SEQ ID NO:382中所示的氨基酸序列内的区域或抗原决定基。在一些方面中,第一5T4 VHH域序列和第二5T4 VHH域序列各结合至SEQ ID NO:382中所示的人类5T4的细胞外域中的相邻氨基酸序列。在一些实施例中,抗原决定基为线性抗原决定基。在一些实施例中,第一5T4 VHH域序列和第二5T4 VHH域序列结合至5T4细胞外域中的相同或重迭抗原决定基。在一些实施例中,第一5T4 VHH域序列和第二5T4 VHH域序列结合至5T4细胞外域中的不同抗原决定基。在一些实施例中,第一5T4VHH域结合至位于人类5T4细胞外域的氨基酸60-112(包括氨基酸60和112)内的表位(由SEQ ID NO:411给出),且第二5T4 VHH域结合至位于人类5T4细胞外域的氨基酸173-224(包括氨基酸173和224)内的表位(由SEQ ID NO:412给出)。在一些实施例中,第一5T4 VHH域包含SEQ ID NO:245中所示的氨基酸序列或其人源化变体,且第二5T4 VHH域包含SEQ ID NO:276中所示的氨基酸序列或其人源化变体。在一些实施例中,第一5T4 VHH域包含SEQ ID NO:360中所示的氨基酸序列且第二5T4 VHH域包含SEQ ID NO:287中所示的氨基酸序列。

[0152] 在一些实施例中,5T4 VHH不与小鼠5T4抗原交叉反应。在一些实施例中,包含SEQ

ID NO:245中所示的氨基酸序列的5T4 VHH或其人源化变体不与小鼠5T4抗原交叉反应。在一些实施例中,包含SEQ ID NO:255中所示的氨基酸序列的5T4 VHH或其人源化变体不与小鼠5T4抗原交叉反应。在一些实施例中,包含SEQ ID NO:276中所示的氨基酸序列的5T4 VHH或其人源化变体不与小鼠5T4抗原交叉反应。

[0153] 在一些实施例中,提供至少含有第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域的多特异性多肽构建体。在一些实施例中,提供含有包含SEQ ID NO:360中所示的氨基酸序列的第一5T4 VHH域和包含SEQ ID NO:360中所示的氨基酸序列的第二5T4 VHH域的多特异性多肽构建体。在一些实施例中,提供含有包含SEQ ID NO:287中所示的氨基酸序列的第一5T4 VHH域和包含SEQ ID NO:287中所示的氨基酸序列的第二5T4 VHH域的多特异性多肽构建体。在一些实施例中,提供至少含有包含SEQ ID NO:360中所示的氨基酸序列的第一5T4 VHH域或其人源化变体和包含SEQ ID NO:287中所示的氨基酸序列的第二5T4 VHH域或其人源化变体的多特异性多肽构建体。

[0154] 在一些情况下,所提供的5T4结合多肽直接阻断或抑制5T4的活性,在一些方面中,其可用作治疗剂以抑制或减少肿瘤细胞生长或存活。

[0155] 提供多种5T4多肽结合形式。在一些实施例中,5T4结合多肽包括5T4VHH-Fc多肽。在一些实施例中,Fc为展现免疫效应活性的Fc,该免疫效应活性诸如一或多种效应功能,诸如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0156] 在一些实施例中,所提供的5T4结合多肽可用于刺激受试者的免疫反应,在一些方面中,其治疗受试者的疾病或病症,诸如癌症。在一些方面中,本文提供的5T4结合多肽,诸如5T4-Fc,可结合至表达5T4的肿瘤细胞且诱发针对表达5T4的肿瘤细胞的主动免疫反应。在一些情况下,主动免疫反应可引起癌细胞死亡(例如抗体结合至癌细胞诱发细胞凋亡式细胞死亡),或抑制癌细胞的生长(例如阻断细胞周期进展)。在其他情况下,本文提供的5T4结合多肽,诸如5T4 VHH-Fc,可结合至癌细胞且抗体依赖性细胞毒性(ADCC)可消除该5T4结合多肽所结合的癌细胞。在一些情况下,所提供的5T4 VHH结合多肽亦可活化细胞与体液免疫反应,且募集更多自然杀伤细胞或增加进一步活化个体免疫为统以破坏癌细胞的细胞因子(例如IL-2、IFN-γ、IL-12、TNF-α、TNF-β等)的产生。在另一实施例中,5T4结合多肽,诸如5T4 VHH-Fc,可结合至癌细胞,且巨噬细胞或其他吞噬细胞可诸如经由CDC或ADCP过程调理癌细胞。

[0157] 在其他方面中,本文亦提供展现多特异性结合的VHH结合多肽。在一些情况下,结合多肽包括对5T4和诸如CD3的T细胞抗原展现双重亲和力的多肽。在一些方面中,此类双重亲和力分子能够在结合肿瘤表达的5T4时接合或活化肿瘤部位处的T细胞。详言之,本文提供的此类分子尤其为展现限制性CD3结合的分子。本文亦提供表达含有5T4结合多肽的嵌合抗原受体的经工程改造的细胞,诸如经工程改造的T细胞。

[0158] 本申请案中所提及的所有公开案,包括专利文件、科学论文和数据库,出于所有目的均以全文引用的方式并入本文中,其引用的程度如同各个别公开案以引用的方式个别地并入一般。若本文所阐述的定义与以引用方式并入本文中的专利、申请案、公开申请案及其他公开案中所阐述的定义相反或在其他方面不一致,则以本文所阐述的定义为准,而非以以引用方式并入本文中的定义为准。

[0159] 本文所述或所提及的技术和程序通常很好理解且普遍使用常规常规方法由本领域技术人员采用，诸如以下文献中所述的广泛利用的方法：Sambrook等人，Molecular Cloning:A Laboratory Manual第3版(2001)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F.M.Ausubel等人编辑,(2003))；系列METHODS IN ENZYMOLOGY(Academic Press,Inc.):PCR 2:A PRACTICAL APPROACH(M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor编辑(1995))；Harlow和Lane编辑(1988)ANTIBODIES,A LABORATORY MANUAL,and ANIMAL CELL CULTURE(R.I.Freshney编辑(1987))；Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编辑,1984)；Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编辑,1998)Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney)编辑,1987)；Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell编辑,1993-8)J.Wiley and Sons;Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑)；Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos编辑,1987)；PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人编辑,1994)；Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人编辑,1991)；Short Protocols in Molecular Biology(Wiley and Sons,1999)；Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997)；Antibodies(P.Finch,1997)；Antibodies:APractical Approach(D.Catty.编辑,IRL Press,1988-1989)；Monoclonal Antibodies:A Practical Approach(P.Shepherd和C.Dean编辑,Oxford University Press,2000)；Using Antibodies:A Laboratory Manual(E.Harlow和D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999)；The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra编辑,Harwood Academic Publishers,1995)；以及Cancer:Principles and Practice of Oncology(V.T.DeVita等人编辑,J.B.Lippincott Company,1993)；及其最新型式。

[0160] 本文所使用的章节标题仅出于组织的目的且不应理解为限制所描述的主题。

[0161] I.定义

[0162] 除非另外定义，否则结合本发明使用的科学与技术术语将具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外，除非上下文另有需要或另外明确地指出，否则单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。对于各种来源或参考文献之间有关定义的任何矛盾，以本文所提供的定义为准。

[0163] 应了解，本文所述的本发明实施例包括“由”实施例“组成”和/或“基本上由”实施例“组成”。除非另外指出，否则如本文所用，单数形式“一(a/an)”和“该”包括复数个指示物。术语“或”在本文中的使用不意图暗示替代方案为互相排斥的。

[0164] 在本申请案中，除非明确地叙述或本领域技术人员所了解，否则“或”的使用意谓“和/或”。在多项从属权利要求的情况下，“或”的使用重新提及超过一个前述独立权利要求或从属权利要求。

[0165] 如本文所用，术语“约”指本领域技术人员易于知晓的各别值的常见误差范围。本文中提及“约”某一值或参数包括(且描述)针对该值或参数本身的实施例。举例而言，涉及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0166] 术语“核酸分子”、“核酸”和“多核苷酸”可互换使用，且指核苷酸聚合物。此类核苷酸聚合物可含有天然和/或非天然核苷酸且包括(但不限于)DNA、RNA和PNA。“核酸序列”指包含于核酸分子或多核苷酸中的核苷酸线性序列。

[0167] 如本文所用的术语“经分离的多核苷酸”应意谓基因组、cDNA或合成来源或其某一组合的多核苷酸，借助于其来源，该分离的多核苷酸(1)不与自然界中发现的多核苷酸的全部或一部分相关联，(2)可操作地连接于在自然界中其未连接的多核苷酸，或(3)在自然界中不作为较大序列的部分存在。

[0168] 术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用且指氨基酸残基的聚合物，且不限于最小长度。氨基酸残基的此类聚合物可含有天然或非天然氨基酸残基且包括但不限于氨基酸残基的肽、寡肽、二聚体、三聚体和多聚体。全长蛋白与其片段皆涵盖于该定义中。该术语亦包括多肽的表达后修饰，例如糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化和类似修饰。此外，出于本发明的目的，“多肽”指一种蛋白质，其包括对天然序列的修饰，诸如缺失、添加和取代(实际上通常为保守的)，只要该蛋白质保持所需活性即可。这些修饰可为有意的，如经由定点突变诱发;或可为偶然的，诸如经由产生蛋白质的宿主的突变或因PCR扩增所致的误差。

[0169] 本文所提及的术语“经分离的蛋白质”意谓如下目标蛋白质，其(1)不含至少一些通常在自然界中发现与其在一起的其他蛋白质，(2)基本上不含来自相同来源，例如来自相同物种的其他蛋白质，(3)由来自不同物种的细胞表达，(4)已与在自然界中其相关联的至少约50％多核苷酸、脂质、碳水化合物或其他材料分离，(5)不与在自然界中“分离的蛋白质”相关联的蛋白质部分相关联(通过共价或非共价相互作用)，(6)可操作地与在自然界中其不相关联的多肽相关联(通过共价或非共价相互作用)，或(7)在自然界中不存在。此类经分离的蛋白质可由基因组DNA、cDNA、mRNA或其他RNA编码，可为合成来源，或其任何组合。在某些实施例中，经分离的蛋白质实质上为纯的或实质上不含在其天然环境中发现的将干扰其使用(治疗、诊断、预防、研究或其他)的蛋白质或多肽或其他污染物。

[0170] 如本文所用，“实质上纯”意谓对象物种为存在的主要物种(亦即以莫尔计，其比组合物中的任何其他个别物种更丰富)，且实质上纯化的部分为其中对象物种占存在的所有大分子物种的至少约50％(以莫尔计)的组合物。一般而言，实质上纯组合物将包含超过组合物中存在的所有大分子物种的约80％，例如在一些实施例中，超过约85％、90％、95％和99％。在一些实施例中，对象物种纯化至基本同质性(无法通过常规侦测方法在组合物中侦测到污染物种)，其中组合物基本上由单一大分子物种组成。

[0171] 如本文所用的术语“可操作地连接”指进行如此描述的组分的位置处于准许其以其预期方式起作用的关系中。“可操作地连接”至编码序列的控制序列为以使编码序列的表达在与控制序列兼容的条件下达成的方式接合。

[0172] 术语“特异性结合”于抗原或抗原决定基为本领域中充分了解的术语，且用于测定该特异性结合的方法亦为本领域中熟知。若分子与特定细胞或物质的反应或缔合比其与替代性细胞或物质更频繁、更快速，持续时间更长和/或亲和力更大，则称其呈现“特异性结合”或“优选结合”。若单域抗体(sdAb)或含VHH多肽与靶点的结合比其与其他物质的结合亲和力、亲合力更大、更容易和/或持续时间更长，则其“特异性结合”或“优先结合”于靶点。举例而言，特异性或优先结合至5T4抗原决定基的sdAb或含VHH多肽为与此抗原决定基的结合比其与其他5T4抗原决定基或除5T4外抗原决定基的结合亲和力、亲合力更大、更容易和/或

持续时间更长的sdAb或含VHH多肽。通过阅读此定义，亦应理解；例如特异性或优先结合至第一靶点的sdAb或含VHH多肽可能或可能不特异性或优先结合至第二靶点。由此，“特异性结合”或“优先结合”未必需要(尽管其可包括)独占式结合。一般而言，但不一定，提及结合意谓优先结合。“特异性”指结合蛋白选择性地结合抗原的能力。

[0173] 如本文所用的术语“抗原决定基”指抗原结合分子(例如sdAb或含VHH多肽)在靶点分子(例如抗原，诸如蛋白质、核酸、碳水化合物或脂质)上结合的位点。抗原决定基常常包括一组表面具有化学活性的分子，诸如氨基酸、多肽或糖侧链，且具有特定三维结构特征以及荷质比特征。抗原决定基可由靶点分子的相邻和/或并接非相邻残基(例如氨基酸、核苷酸、糖、脂质部分)形成。由相邻残基(例如氨基酸、核苷酸、糖、脂质部分)形成的抗原决定基通常在暴露于变性溶剂时得以保留，而通过三级折迭形成的抗原决定基通常在用变性溶剂处理时丢失。抗原决定基可包括(但不限于)至少3个、至少5个或8-10个残基(例如氨基酸或核苷酸)。在一些实施例中，抗原决定基的长度小于20个残基(例如氨基酸或核苷酸)、小于15个残基或小于12个残基。若两个抗体对某个抗原展现竞争性结合，则其可能结合该抗原内的同一个抗原决定基。在一些实施例中，可通过距抗原结合分子上的CDR残基的某一最小距离鉴别抗原决定基。在一些实施例中，抗原决定基可通过以上距离来鉴别，且进一步局限于与抗原结合分子的残基与抗原残基之间的键(例如氢键)相关的那些残基。抗原决定基亦可通过各种扫描来鉴别，例如丙氨酸或精氨酸扫描可指示出抗原结合分子可进行相互作用的一或多个残基。除非明确表示，否则作为抗原决定基的一组残基不排除其他残基作为特定抗原结合分子的抗原决定基的一部分。实际上，该组的存在表示最小的一系列抗原决定基(或一组物种)。因此，在一些实施例中，鉴别为抗原决定基的一组残基表示该抗原的最小相关抗原决定基，而非抗原上的抗原决定基的排他性残基清单。

[0174] “非线性抗原决定基”或“构形抗原决定基”包含在对抗原决定基具有特异性的抗原结合分子所结合的抗原蛋白质内的非相邻多肽、氨基酸和/或糖。在一些实施例中，至少一个残基将与抗原决定基的其他所指出的残基不相邻；然而，一或多个残基亦可与其他残基相邻。

[0175] “线性抗原决定基”包含在对抗原决定基具有特异性的抗原结合分子所结合的抗原蛋白质内的相邻多肽、氨基酸和/或糖。应注意，在一些实施例中，并非线性抗原决定基内的每一个残基均需要与抗原结合分子直接结合(或与键相关)。在一些实施例中，线性抗原决定基可来自用实际上由线性抗原决定基序列组成的肽进行免疫接种，或来自与蛋白质的剩余部分相对分离的蛋白质结构部分(以使得抗原结合分子可至少主要地，仅与该序列部分相互作用)。

[0176] 术语“抗体”和“抗原结合分子”就最广义而言可互换使用，且涵盖包含抗体样抗原结合域的各种多肽，包括(但不限于)常规常规抗体(通常包含至少一个重链和至少一个轻链)、单域抗体(sdAb，其仅包含一个通常类似于重链的链)、含VHH多肽(包含至少一个仅重链的抗体可变域或VHH的多肽)和前述任一者的片段，只要其展现所需抗原结合活性即可。在一些实施例中，抗体包含二聚结构域。这些二聚结构域包括(但不限于)重链恒定域(包含CH1、铰链、CH2和CH3，其中CH1通常与轻链恒定域CL配对，而铰链调节二聚作用)和Fc域(包含铰链、CH2和CH3，其中铰链调节二聚作用)。

[0177] 术语抗体亦包括(但不限于)嵌合抗体、人源化抗体和各种物种的抗体，诸如骆驼

(包括美洲)、鲨鱼、小鼠、人类、食蟹猕猴等。

[0178] 术语“可变区”或“可变域”指抗体重链或轻链中参与抗体与抗原的结合的结构域。原生抗体的重链和轻链(分别为V_H和V_L)的可变域通常具有类似结构,其中各结构域包含四个保守性构架区(FR)和三个CDR。(参见例如Kindt等人Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007)。单一V_H或V_L域可足够赋予抗原结合特异性,例如单域抗体,诸如VHH。此外,可使用来自结合抗原的抗体的V_H或V_L域分离结合特定抗原的抗体以分别筛选互补V_L或V_H域的库。参见例如Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0179] “抗体片段”或“抗原结合片段”指除常规或完整抗体外包含常规或完整抗体的至少含有结合抗原的可变区的部分的分子。抗体片段的实施例包括(但不限于)Fv、单链Fv(sdFv)、Fab、Fab’、Fab’-SH、$F(ab')_2$;双抗体;线性抗体;仅仅包含V_H区(VHH)的单域抗体。

[0180] 如本文所用,提及结合分子时“单价”指结合分子具有单个对目标抗原具有特异性的抗原识别位点。单价结合分子的实施例包括例如单价抗体片段、具有抗体样结合特性的蛋白质结合分子或MHC分子。单价抗体片段的实施例包括(但不限于)Fab片段、Fv片段和单链Fv片段(scFv)。

[0181] 术语“单域抗体”、“sdAb”、“VHH”在本文中可互换地使用以指具有单个单体结构域抗原结合/识别结构域的抗体。此类抗体包括骆驼抗体或鲨鱼抗体。在一些实施例中,VHH包含三个CDR和四个构架区,称为FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。在一些实施例中,VHH可在N端或C端截短,以使得其仅仅包含部分FR1和/或FR4,或缺乏那些构架区中的一或两者,只要VHH实质上维持抗原结合和特异性即可。

[0182] 术语“含VHH多肽”指包含至少一个VHH结构域的多肽。在一些实施例中,VHH多肽包含两个、三个或四个或更多个VHH域,其中各VHH域可相同或不同。在一些实施例中,含VHH多肽包含Fc域。在一些此类实施例中,VHH多肽可形成二聚体。含VHH多肽的非限制性结构包括VHH_1-Fc、VHH_1-VHH_2-Fc和VHH_1-VHH_2-VHH_3-Fc,其中VHH_1、VHH_2和VHH_3可相同或不同。在这些结构的一些实施例中,一个VHH可经接头连接至另一VHH,或一个VHH可经接头连接至Fc。在一些此类实施例中,接头包含1-20个氨基酸,优选为1-20个主要包含甘氨酸且视情况包含丝氨酸的氨基酸。在一些实施例中,当含VHH多肽包含Fc时,其形成二聚体。因此,若结构VHH_1-VHH_2-Fc形成二聚体,则认为其为四价的(亦即,二聚体具有四个VHH域)。类似地,若结构VHH_1-VHH_2-VHH_3-Fc形成二聚体,则认为其为六价的(亦即,二聚体具有六个VHH域)。

[0183] 如本文所用,5T4结合多肽为特异性结合5T4的多肽或蛋白质。通常,本文中5T4结合多肽为含有至少一个结合5T4的VHH域的含VHH多肽。5T4结合多肽包括偶联物,包括融合蛋白。5T4结合多肽包括融合蛋白,包括含有Fc域的融合蛋白。在一些实施例中,5T4结合多肽含有两个、三个或四个或更多个各特异性结合至5T4的VHH域,其中各VHH域可相同或不同。在一些实施例中,5T4结合多肽为多价的。在一些实施例中,5T4结合多肽为多特异性的。在一些情况下,5T4结合多肽可含有一或多个结合至除5T4外的一或多种其他或额外抗原的额外结构域。

[0184] 术语“单克隆抗体”指实质上同质的抗体群体的抗体(包括sdAb或含VHH多肽),亦即,构成此群体的个别抗体除可能少量存在的可能天然存在的突变以外均相同。单克隆抗体针对单一抗原位点具有高度特异性。另外,与通常包括针对不同决定子(抗原决定基)的

不同抗体的多克隆抗体制剂形成对比，各单克隆抗体为针对抗原上的单一决定子。因此，单克隆抗体的样品可结合至抗原上的同一抗原决定基。修饰语“单克隆”指示抗体的特征为自实质上同质的抗体群体获得，且不应理解为需要通过任何特定方法来产生该抗体。举例而言，单克隆抗体可通过Kohler和Milstein,1975,Nature 256:495首次描述的融合瘤方法制造，或可通过诸如美国专利第4,816,567号中所述的重组DNA方法制造。举例而言，单克隆抗体亦可自使用McCafferty等人，1990,Nature 348:552-554中所描述的技术生成的噬菌体文库中分离。

[0185] 术语“CDR”表示互补决定区，如由本领域技术人员用至少一种鉴别方式所定义。所给定CDR或FR的确切氨基酸序列边界可容易使用多种熟知方案中的任一者确定，包括以下文献中所述的方案:Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,第5版Public Health Service”,National Institutes of Health,Bethesda,MD(“Kabat”编号方案);Al-Lazikani等人,(1997)JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案);MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996),“Antibody-antigen interactions:Contact analysis and binding site topography”,J.Mol.Biol.262,732-745.”(“接触”编号方案);Lefranc MP等人,“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains”,Dev Comp Immunol,2003年1月;27(1):55-77(“IMGT”编号方案);Honegger A和Plückthun A,“Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool”,J Mol Biol,2001年6月8日;309(3):657-70,(“Aho”编号方案);以及Martin等人,“Modeling antibody hypervariable loops:a combined algorithm”,PNAS,1989,86(23):9268-9272,(“AbM”编号方案)。

[0186] 所给定CDR或FR的边界可根据鉴别所用的方案而变化。举例而言，Kabat方案为基于结构比对，而Chothia方案为基于结构信息。Kabat与Chothia两种方案的编号均基于最常用抗体区域序列长度，其中在一些抗体中出现由插入字母(例如“30a”)表示的插入和缺失。两种方案使得某些插入和缺失(“插入缺失”)位于不同位置，产生不同编号。接触方案为基于对复杂晶体结构的分析，且在多个方面与Chothia编号方案类似。AbM方案为介于Kabat与Chothia定义之间的折衷，其基于由Oxford Molecular的AbM抗体模型化软件使用的方案。

[0187] 在一些实施例中，CDR可根据Chothia编号方案、Kabat编号方案、Kabat与Chothia的组合、AbM定义和/或接触定义中的任一者来定义。VHH包含三个CDR，称为CDR1、CDR2和CDR3。下表1列出分别如通过Kabat、Chothia、AbM和接触方案所鉴别的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3的例示性位置边界。对于CDR-H1，残基编号使用Kabat和Chothia两种编号方案来列出。FR位于CDR之间，例如FR-H1位于CDR-H1之前，FR-H2位于CDR-H1与CDR-H2之间，FR-H3位于CDR-H2与CDR-H3之间等等。应注意，因为所示Kabat编号方案使得插入位于H35A和H35B处，所以视环长度而定，Chothia CDR-H1环的末端在使用所示Kabat编号规约进行编号时在H32与H34之间变化。

[0188]

表1. 根据各种编号方案得到的CDR边界

CDR	Kabat	Chothia	AbM	接触
CDR-H1 (Kabat编号[1])	H31--H35B	H26--H32..34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Chothia编号[2])	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

[0189] 1-Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD

[0190] 2-Al-Lazikani等人,(1997)JMB 273,927-948

[0191] 因此,除非另外说明,否则既定抗体或其区域(诸如其可变区)的“CDR”或“互补决定区”或个别指定的CDR(例如CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)应理解为涵盖如通过任一前述方案所定义的互补决定区(或具体互补决定区)。举例而言,在陈述特定CDR(例如CDR-H3)含有既定VHH氨基酸序列中相应CDR的氨基酸序列的情况下,应了解此类CDR具有VHH内如通过任一前述方案所定义的相应CDR(例如CDR-H3)的序列。在一些实施例中,指定具体CDR序列。使用多种编号方案来描述所提供的抗体的示例性CDR序列(参见例如表1),但应了解,所提供的抗体可包括如根据其他上述编号方案中的任一者或熟练技术人员已知的其他编号方案描述的CDR。

[0192] 如本文所用,“偶联物”、“结合”或其语法变化形式为指两种或更多种化合物通过本领域中已知的任何接合或连接方法接合或连接在一起,导致形成另一化合物。其亦可指通过将两种或更多种化合物接合或连接在一起所产生的化合物。举例而言,直接或间接地连接至一或多种化学部分或多肽的VHH域为例示性偶联物。此类偶联物包括融合蛋白,通过化学偶联物产生的偶联物和通过任何其他方法产生的偶联物。

[0193] 免疫球蛋白Fc融合物(“Fc-融合物”),诸如VHH-Fc,为包含一或多个VHH域可操作地连接于免疫球蛋白的Fc区的分子。免疫球蛋白Fc区可间接或直接连接至一或多个VHH域。各种接头为本领域中已知的且可视情况用于连接Fc与融合搭配物以产生Fc-融合物。在一些此类实施例中,接头包含1-20个氨基酸,优选为1-20个主要包含甘氨酸且视情况包含丝氨酸的氨基酸。相同物种的Fc-融合物可二聚形成Fc-融合同源二聚体,或使用不相同物种以形成Fc-融合异源二聚体。在一些实施例中,Fc为哺乳动物Fc,诸如人类Fc。

[0194] 如本文所用,术语“重链恒定区”指包含至少三个重链恒定域C_H1、铰链、C_H2和C_H3的区域。当然,除非另外指出,否则所述结构域内不改变功能的缺失和变化涵盖在术语“重链恒定区”的范围内。非限制性示例性重链恒定区包括γ、δ和α。非限制性示例性重链恒定区亦包括ε和μ。各重链恒定区对应于抗体同型。举例而言,包含γ恒定区的抗体为IgG抗体,包含δ恒定区的抗体为IgD抗体且包含α恒定区的抗体为IgA抗体。另外,包含μ恒定区的抗体为IgM抗体,且包含ε恒定区的抗体为IgE抗体。某些同型可进一步细分为子类。举例而言,IgG

抗体包括(但不限于)IgG1(包含γ_1恒定区)、IgG2(包含γ_2恒定区)、IgG3(包含γ_3恒定区)和IgG4(包含γ_4恒定区)抗体;IgA抗体包括(但不限于)IgA1(包含α_1恒定区)和IgA2(包含α_2恒定区)抗体;且IgM抗体包括(但不限于)IgM1和IgM2。

[0195] 如本文所用,“Fc区”指包含CH2和CH3的重链恒定区的部分。在一些实施例中,Fc区包含铰链、CH2和CH3。在各种实施例中,当Fc区包含铰链时铰链介导两个含Fc的多肽之间的二聚。Fc区可为本文所论述的任何抗体重链恒定区同型。在一些实施例中,Fc区为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0196] “功能Fc片段”具有原生序列Fc区的“效应功能”。示例性“效应功能”包括Fc受体结合;Clq结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调;以及B细胞活化等。所述效应功能一般需要Fc区与结合域(例如抗体可变域)组合且可使用各种分析评估。

[0197] “原生序列Fc区”包含与在自然界中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。原生序列人类Fc区包括原生序列人类IgG1 Fc区(非A和A异型);原生序列人类IgG2 Fc区;原生序列人类IgG3 Fc区;和原生序列人类IgG4 Fc区以及其天然存在的变体。

[0198] “变体Fc区”包含与原生序列Fc区的氨基酸序列相差至少一个氨基酸修饰的氨基酸序列。在一些实施例中,“变异Fc区”包含与原生序列Fc区的氨基酸序列相差至少一个氨基酸修饰,但保留原生序列Fc区的至少一种效应功能的氨基酸序列。在一些实施例中,变体Fc区相比于原生序列Fc区或相比于亲本多肽的Fc区具有至少一个氨基酸取代,例如在原生序列Fc区中或在亲本多肽的Fc区中约一个至约十个氨基酸取代,且优选约一个至约五个氨基酸取代。在一些实施例中,本文中的变体Fc区与原生序列Fc区和/或与亲本多肽的Fc区具有至少约80%序列一致性、至少约90%序列一致性、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%序列一致性。

[0199] 一般而言,免疫球蛋白重链或其部分,诸如Fc区中残基的编号为Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)中EU索引的编号。“如Kabat中的EU索引”指人类IgG1 EU抗体的残基编号。

[0200] “Fc受体”或“FcR”描述与抗体的Fc区结合的受体。在一些实施例中,Fcγ R为原生人类FcR。在一些实施例中,FcR为结合IgG抗体的FcR(γ 受体)且包括Fcγ RI、Fcγ RII和Fcγ RIII子类的受体,包括那些受体的等位基因变体和交替剪接形式。Fcγ RII受体包括Fcγ RIIA (“活化受体”)和Fcγ RIIB(“抑制受体”),两者具有相似的氨基酸序列,不同的处主要在于其细胞质域。活化受体Fcγ RIIA在其细胞质域中含有基于免疫受体酪氨酸的活化模体(ITAM)。抑制受体Fcγ RIIB在其细胞质域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制模体(ITIM)。(参见例如Daeron,Annu.Rev.Immunol.15:203-234(1997))。FcR评述于例如Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol 9:457-92(1991);Capel等人,Immunomethods 4:25-34(1994);和de Haas等人,J.Lab.Clin.Med.126:330-41(1995)。其他FcR,包括将来鉴别的FcR,涵盖于本文术语“FcR”中。举例而言,术语“Fc受体”或“FcR”亦包括新生儿受体FcRn,其负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))且调节免疫球蛋白的稳态。与FcRn的结合的测量方法为已知的(参见例如Ghetie和Ward,Immunol.Today 18(12):592-598(1997);Ghetie等人,Nature Biotechnology,15

(7):637-640(1997);Hinton等人,J.Biol.Chem.279(8):6213-6216(2004);WO 2004/92219(Hinton等人)。

[0201] 如本文所论述,如本文所用的“接受体人类构架”为包含源自人类免疫球蛋白构架或人类共同构架的重链可变域(V_H)构架的氨基酸序列的构架。源自人类免疫球蛋白构架或人类共同构架的接受体人类构架可包含与其相同的氨基酸序列,或其可含有氨基酸序列改变。在一些实施例中,在诸如VHH的单一抗原结合域中的所有人类构架中,氨基酸改变的数量少于10、或少于9、或少于8、或少于7、或少于6、或少于5、或少于4、或少于3。

[0202] 如本文所用,“嵌合抗原受体”或“CAR”指一种经工程改造的受体,其经由抗原结合域将抗原特异性引入至其进行工程改造的细胞(例如T细胞,诸如原始T细胞、中枢记忆T细胞、效应记忆T细胞或其组合),因此将抗原结合域的抗原结合特性与T细胞的T细胞活性(例如溶解能力和自我更新)组合。CAR通常包括细胞外抗原结合域(胞外域)、跨膜域和胞内信号传导域。胞内信号传导域一般含有至少一个例如源自CD3ζ的ITAM信号传导域和视情况选用的至少一个例如源自CD28或4-1BB的共刺激信号传导域。在本文提供的CAR中,VHH域形成抗原结合域且当在细胞中表达时位于细胞外侧。

[0203] “亲和力”指分子(例如抗体或含VHH多肽)的单一结合位点与其结合搭配物(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。分子X对其搭配物Y的亲和力或表观亲和力一般可分别由解离常数(K_D)或$K_{D-表观}$来表示。亲和力可通过本领域中已知的常用方法(诸如ELISA K_D、KinExA、流动式细胞测量术和/或表面电浆子共振装置),包括本文所述的那些方法来量测。这些方法包括(但不限于)涉及BIAcore®、Octet®或流动式细胞测量术的方法。

[0204] 如本文所用的术语“K_D”指抗原结合分子/抗原相互作用的平衡解离常数。当本文中使用术语“K_D”时,其包括K_D和$K_{D-表观}$。

[0205] 在一些实施例中,通过流动式细胞测量术,使用表达抗原的细胞株且将在每种抗体浓度下测量的平均荧光拟合至非线性单位点等式(Prism Software graphpad)中来测量抗原结合分子的K_D。在一些此类实施例中,K_D为$K_{D-表观}$。

[0206] 术语“生物活性”指分子的任一种或多种生物特性(无论是在活体内发现为天然存在的抑或通过重组手段提供或实现的)。生物特性包括(但不限于)结合配位体、诱发或增加细胞增殖(诸如T细胞增殖)和诱发或增加细胞因子的表达。

[0207] “亲和力成熟”含VHH多肽指相较于不具有在一或多个CDR中的一或多个改变的亲本含VHH多肽,具有此类改变的含VHH多肽,此类改变改良含VHH多肽对抗原的亲和力。

[0208] 如本文所用的“人源化VHH”指其中一或多个构架区已实质上经人类构架区置换的VHH。在一些情况下,人类免疫球蛋白的某些构架区(FR)残基经对应非人类残基置换。此外,人源化VHH可包含在原始VHH或人类构架序列中均未发现,但包括在内以进一步改进和优化VHH或含VHH多肽的效能的残基。在一些实施例中,人源化的含VHH多肽包含人类Fc区。应了解,人源化序列可通过其一级序列鉴别且未必表示该抗体产生的过程。

[0209] 如本文所用的术语“实质上相似”或“实质上相同”表示两个或更多个数值之间的相似度足够高,使得在通过该值量度的生物特征的背景下,本领域技术人员将认为该两个或更多个值之间的差异具有极小或无生物和/或统计显著性。在一些实施例中,两个或更多个实质上相似值相差不超过约以下任一个:5%、10%、15%、20%、25%或50%。

[0210] 多肽“变体”意谓在比对序列且必要时引入间隙以达到最大序列一致性百分比之后，且不考虑任何保守取代为序列一致性的一部分，与原生序列多肽具有至少约80％氨基酸序列一致性的生物活性多肽。所述变体包括例如在多肽的N端或C端添加或缺失一或多个氨基酸残基的多肽。在一些实施例中，变体将具有至少约80％氨基酸序列一致性。在一些实施例中，变体将具有至少约90％氨基酸序列一致性。在一些实施例中，变体与原生序列多肽将具有至少约95％氨基酸序列一致性。

[0211] 如本文所用的关于肽、多肽或抗体序列的“氨基酸序列一致性百分比(％)”和“同源性”定义为在比对序列且必要时引入间隙以达到最大序列一致性百分比之后，且不考虑任何保守取代为序列一致性的一部分，候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基一致的氨基酸残基的百分比。出于确定氨基酸序列一致性百分比的目的的比对可以本领域内的各种方式实现，例如使用公开可获得的计算机软件，诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGNTM(DNASTAR)软件。本领域技术人员可决定用于测量比对的适当参数，包括用于达成所比较序列的全长内的最大比对所需的任何算法。

[0212] 氨基酸取代可包括(但不限于)将多肽中的一个氨基酸替换为另一个氨基酸。示例性取代展示于表2中。氨基酸取代可引入所关注抗体和针对所需活性筛选出的产物中，该活性例如抗原结合的保留/改良、免疫原性降低、或ADCC或CDC的改善。

[0213]

表2

原始残	示例性取代

[0214]

基	
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp、Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正白氨酸
Leu (L)	正白氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正白氨酸

[0215] 氨基酸可根据共有侧链特性进行分组:

[0216] (1)疏水性:正白氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0217] (2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0218] (3)酸性:Asp、Glu;

[0219] (4)碱性:His、Lys、Arg;

[0220] (5)影响链取向的残基:Gly、Pro;

[0221] (6)芳族:Trp、Tyr、Phe。

[0222] 非保守取代将需要这些类别中的一者的成员换成另一个类别。

[0223] 术语“载体”用于描述可经工程改造以含有经克隆的多核苷酸的多核苷酸或可在宿主细胞中繁殖的的多核苷酸。载体可包括以下组件中的一或多个:复制起点、一或多个调控所关注多肽的表达的调控序列(诸如启动子和/或强化子)和/或一或多个可选择标记物基因(诸如抗生素抗性基因和可用于比色分析中的基因,例如β-半乳糖)。术语“表达载体”指用于在宿主细胞中表达所关注多肽的载体。

[0224] “宿主细胞”指可为或已为载体或经分离多核苷酸的接受体的细胞。宿主细胞可为原核细胞或真核细胞。示例性真核细胞包括哺乳动物细胞,诸如灵长类动物或非灵长类动物细胞;真菌细胞,诸如酵母;植物细胞;以及昆虫细胞。非限制性示例性哺乳动物细胞包括(但不限于)NSO细胞、PER.C6®细胞(Crucell)以及293和CHO细胞,以及其衍生物,诸如293-6E、CHO-DG44、CHO-K1、CHO-S和CHO-DS细胞。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代,且后代可能由于自然、偶然或故意突变而不一定与原始母细胞完全一致(在形态或基因组DNA互补方面)。宿主细胞包括在活体内经本文提供的多核苷酸转染的细胞。

[0225] 如本文所用,术语“经分离”指分子已与自然界中通常发现与其一起或产生的至少一些组分分离。举例而言,当多肽与产生多肽的细胞的至少一些组分分离时,该多肽称为“经分离”。在多肽在表达后由细胞分泌的情况下,使含有该多肽的清液层与产生其的细胞在实体上分离视为“分离”多肽。类似地,当多核苷酸不为在自然界中其中通常发现该多核苷酸的较大多核苷酸(诸如在DNA多核苷酸的情况下基因组DNA或线粒体DNA)的一部分或与产生该多核苷酸的细胞的至少一些组分分离(例如在RNA多核苷酸的情况下)时,多核苷酸称为“经分离”。因此,宿主细胞内部的载体中所含的DNA多核苷酸可称为“经分离”。

[0226] 术语“个体(individual)”与“受试者(subject)”在本文中可互换使用,指动物;例如哺乳动物。术语患者包括人类和兽医学受试者。在一些实施例中,提供治疗哺乳动物的方法,所述哺乳动物包括(但不限于)人类、啮齿动物、猿猴、猫科动物、犬科动物、马科动物、牛科动物、猪科动物、绵羊、山羊、哺乳类实验动物、哺乳类农畜、哺乳类运动动物和哺乳类宠物。受试者可为雄性或雌性且可为任何适龄受试者,包括婴儿、幼年、青年、成年和老年受试者。在一些实施例中,“个体或受试者(individual或subject)”指需要治疗疾病或病症的个体或受试者。在一些实施例中,接受治疗的受试者可为患者,指出以下事实:该受试者已鉴别为患有与该治疗有关联的病症,或有极大的风险患上该病症。在特定实施例中,受试者为人类,诸如人类患者。

[0227] 如本文所用,“疾病”或“病症”指需要和/或期望治疗的病状。

[0228] 除非另外指出,否则术语“肿瘤细胞”、“癌细胞”、“癌症”、“肿瘤”和/或“赘瘤”在本文中可互换使用,且指展现不可控的生长和/或细胞存活异常增加和/或抑制细胞凋亡,干扰身体器官和系统的正常功能的细胞。此定义中包括良性和恶性癌症、息肉、增生以及潜伏性肿瘤或微小转移灶。

[0229] 术语“癌症”和“肿瘤”涵盖实体癌症和血液/淋巴癌,且亦涵盖恶性、潜在恶性和良性生长,诸如异常增生。此定义中亦包括具有免疫系统无法阻止(例如免疫逃避和免疫逃脱机制)的异常增殖的细胞(例如病毒感染细胞)。示例性癌症包括(但不限于):基底细胞癌、胆道癌;膀胱癌;骨癌;大脑和中枢神经系统癌症;乳癌;腹膜癌;子宫颈癌;绒毛膜癌;结肠和直肠癌;结缔组织癌;消化系统癌症;子宫内膜癌;食道癌;眼癌;头颈癌;胃癌(包括胃肠

癌)；神经胶母细胞瘤；肝癌；肝瘤；上皮细胞内赘瘤；肾脏癌或肾癌；喉癌；白血病；肝癌；肺癌(例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌)；黑色素瘤；骨髓瘤；神经母细胞瘤；口腔癌(唇癌、舌癌、口癌和咽癌)；卵巢癌；胰脏癌；前列腺癌；视网膜母细胞瘤；横纹肌肉瘤；直肠癌；呼吸系统癌症；唾液腺癌；肉瘤；皮肤癌；鳞状细胞癌；胃癌；睾丸癌；甲状腺癌；子宫或子宫内膜癌；泌尿系统癌症；外阴癌；淋巴瘤，包括霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)和非霍奇金氏淋巴瘤，以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)；小淋巴球性(SL)NHL；中级/滤泡性NHL；中级弥漫性NHL；高级免疫母细胞NHL；高级淋巴母细胞NHL；高级小无核裂细胞NHL；肿块性病变NHL；套细胞淋巴瘤；AIDS相关淋巴瘤；以及瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia)；慢性淋巴球性白血病(CLL)；急性淋巴母细胞白血病(ALL)；毛细胞白血病；慢性骨髓母细胞白血病；以及其他癌瘤和肉瘤；和移植后淋巴增生性病症(PTLD)，以及与母斑病、水肿(诸如与脑瘤相关)和梅格斯氏症状(Meigs'syndrome)相关的异常血管增生。

[0230] 如本文所用的术语“非肿瘤细胞”指正常细胞或组织。示例性非肿瘤细胞包括(但不限于)：T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、树突状细胞、单核细胞、巨噬细胞、上皮细胞、纤维母细胞、肝细胞、间质性肾细胞、纤维母细胞样滑膜细胞、骨母细胞以及位于乳房、骨骼肌、胰脏、胃、卵巢、小肠、胎盘、子宫、睾丸、肾脏、肺、心脏、大脑、肝、前列腺、结肠、淋巴器官、骨和骨来源间叶干细胞中的细胞。如本文所用的术语“位于周边的细胞或组织”指并非位于肿瘤细胞附近和/或肿瘤微环境内部的非肿瘤细胞。

[0231] 如本文所用的术语“肿瘤微环境内的细胞或组织”指围绕和/或喂饲肿瘤细胞的细胞、分子、细胞外基质和/或血管。肿瘤微环境内的示例性细胞或组织包括(但不限于)：肿瘤血管结构；浸润肿瘤的淋巴球；纤维母细胞网状细胞；内皮祖细胞(EPC)；癌症相关纤维母细胞；外膜细胞；其他基质细胞；细胞外基质的组分(ECM)；树突状细胞；抗原呈递细胞；T细胞；调节性T细胞(Treg细胞)；巨噬细胞；嗜中性白血球；骨髓衍生的抑制细胞(MDSC)和位于肿瘤附近的其他免疫细胞。如下文中所述，本领域中熟知用于鉴别肿瘤细胞和/或位于肿瘤微环境内的细胞/组织的方法。

[0232] 在一些实施例中，“增加”或“减少”分别指统计学上显著的增加或减少。如本领域技术人员将显而易见，“调节”亦可包括与相同条件但不存在测试剂的情形相比，实现靶点或抗原对其配位体、结合搭配物、用于缔合成同源多聚体或异源多聚体形式的搭配物或基质的亲和力、亲合力、特异性和/或选择性的变化(可为增加或减少)；实现靶点或抗原对存在该靶点或抗原的介质或周围环境中的一或多种条件(诸如pH、离子强度、辅因子的存在等)的敏感性的变化(可为增加或减少)；和/或细胞增殖或细胞因子产生。视所涉及的靶点而定，此可通过任何合适方式和/或使用本身已知或本文所述的任何合适分析来确定。

[0233] 如本文所用，“免疫反应”意谓涵盖足以抑制或阻止疾病发作或缓解疾病症状(例如癌症或癌转移)的细胞和/或体液免疫反应。“免疫反应”可包含先天性和适应性免疫系统两者的态样。

[0234] 如本文所用，术语疾病、病症或病状的“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”或“疗法(therapy)”为一种获得有益或所期望的临床结果的方法。如本文所用的“治疗”涵盖针对包括人类的哺乳动物的疾病的治疗剂的任何给予或施用。出于本发明的目的，有益或所期望的临床结果包括但不限于以下的任一种或多种：减轻一或多种症状、减弱疾病程度、

预防或延迟疾病扩散(例如转移,例如转移至肺或淋巴结)、预防或延迟疾病复发、延迟或减缓疾病进展、改善疾病病况、抑制疾病或疾病进展、抑制或减缓疾病或其进展、阻滞其发展和缓解(无论部分抑或完全)。“治疗”亦涵盖减轻增生性疾病的病理后果。本文所提供的方法涵盖这些治疗方面中的任一种或多种。按照以上内容,术语治疗不需要百分之一百移除病症的所有态样。

[0235] 如在癌症情况下,在本文所用的术语癌症的“治疗”或“抑制(inhibit)”、“抑制(inhibiting)”或“抑制(inhibition)”指以下中的至少一者:肿瘤生长速率的统计显著降低;肿瘤生长中止;或如通过诸如(但不限于)实体肿瘤反应评估标准(RECIST)的指标所测量,肿瘤的尺寸、质量、代谢活性或体积减小;或无进展存活期(PFS)或总存活期(OS)的统计显著增加。

[0236] “改善”意谓与未给予治疗剂相比,一或多种症状得以减轻或好转。“改善”亦包括症状的持续时间缩短或减少。

[0237] 疾病或病症的“预防(Preventing)”、“预防(prophylaxis)”或“预防(prevention)”指单独或与另一化合物组合给予医药组合物,以预防疾病或病症或者疾病或病症的一些或全部症状的出现或发作,或降低疾病或病症发作的可能性。

[0238] 术语“抑制(inhibition)”或“抑制(inhibit)”指任何表型特征的减少或停止,或该特征的发生率、程度或可能性降低或停止。“降低”或“抑制”为使活性、功能和/或量相较于参考物减少、降低或停滞。在一些实施例中,“降低”或“抑制”意谓能够引起总体减少10%或更大。在一些实施例中,“降低”或“抑制”意谓能够引起总体减小50%或更大。在一些实施例中,“降低”或“抑制”意谓能够引起总体减少75%、85%、90%、95%或更大。在一些实施例中,一段时间内上文所述量相对于同一段时间内的对照而言受到抑制或减少。

[0239] 如本文所用,“延迟疾病发展”意谓推迟、阻碍、减缓、阻滞、稳定、遏制和/或延迟疾病(诸如癌症)的发展。此延迟可具有不同时间长度,视所治疗的疾病和/或个体的病史而定。如本领域技术人员显而易见,充分或显著延迟可实际上涵盖预防,因为该个体不发展该疾病。举例而言,可延迟晚期癌症,诸如癌转移发展。

[0240] 如本文所用,“预防”包括在某一疾病在可能易患该疾病但尚未诊断患有该疾病的受试者中的出现或复发方面提供预防作用。除非另外规定,否则术语“降低”、“抑制”或“预防”不表示或不需要一直完全预防,而仅在所量测的时间段内。

[0241] 术语“抗癌剂”在本文中以最广含义使用,指用于治疗一或多种癌症的药剂。示例类别的这些药剂包括(但不限于)化学治疗剂、抗癌生物制剂(诸如细胞因子、受体细胞外域-Fc融合物和抗体)、放射线疗法、CAR-T疗法、治疗性寡核苷酸(诸如反义寡核苷酸和siRNA)和溶瘤病毒。

[0242] 术语“生物样品”意谓一定量的来自活物或先前活物的物质。所述物质包括(但不限于)血液(例如全血)、血浆、血清、尿液、羊水、滑液、内皮细胞、白血球、单核细胞、其他细胞、器官、组织、骨髓、淋巴结和脾脏。

[0243] 术语“对照”或“参考”指已知不含分析物的组合物(“阴性对照”)或已知含有分析物的组合物(“阳性对照”)。阳性对照可包含已知浓度的分析物。

[0244] 术语“有效量”或“治疗有效量”指如例如通过改善或消除症状和/或疾病病因,含有活性成分(例如sdAb或含VHH多肽)的组合物在单独(亦即,呈单一疗法形式)或与其他治

疗剂组合给予患者时使疾病进展在统计学上显著减少的量和/或浓度。有效量可为减轻、减少或缓解至少一种与疾病或病症相关的症状或生物反应或效应、预防疾病或病症进展或改善患者的生理功能的量。含有活性剂的组合物的治疗有效量可根据诸如疾病病况、个体的年龄、性别和体重和活性剂在个体中引发所需反应的能力而变化。治疗有效量亦为治疗有益作用超过活性剂的任何毒性或有害作用的量。治疗有效量可以一或多次投药递送。治疗有效量指可有效在所必需的剂量和时间下达成所要治疗和/或预防结果的量。

[0245] 如本文所用,组合物指两种或更多种产物、物质或化合物(包括细胞)的任何混合物。其可为溶液、悬浮液、液体、粉末、膏剂、水溶液、非水溶液或其任何组合。

[0246] 术语“医药调配物”和“医药组合物”指所呈形式允许活性成分的生物活性有效,且不含对调配物将给予的受试者具有不可接受毒性的其他组分的制剂。因此,其为适合于医药学上用于哺乳动物受试者,常常人类的组合物。医药组合物通常包含有效量的活性剂(例如sdAb或含VHH多肽)和载剂、赋形剂或稀释剂。载剂、赋形剂或稀释剂通常分别为医药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂。此类调配物可为无菌的。

[0247] “医药学上可接受的载剂”指本领域中常规的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、囊封材料、调配助剂或载剂,其与治疗剂一起使用,一起构成向受试者给予的“医药组合物”。医药学上可接受的载剂在所用剂量和浓度下对接受者无毒且与调配物的其他成分兼容。医药学上可接受的载剂适于所用的调配物。

[0248] 与一或多种其他治疗剂“组合”给予包括同时(并行)投药和按任何次序依次投药。

[0249] 术语“并行”在本文中用以指给予两种或更多种治疗剂,其中至少部分给予在时间上重叠,或其中一种治疗剂的给予落在相对于给予另一种治疗剂的相对短的时间段内,或其中两种药剂的治疗作用重叠至少一段时间。

[0250] 术语“依次”在本文中用以指时间上不重迭地给予两种或更多种治疗剂,或其中所述等药剂的治疗作用不重迭。

[0251] 如本文所用,“结合”指除一种治疗模式以外,亦给予另一种治疗模式。因此,“结合”指在向个体给予一种治疗模式之前、期间或之后给予另一种治疗模式。

[0252] 术语“药品说明书”用以指通常包括于治疗性产品的商业包装中的说明,其含有关于与使用此类治疗性产品有关的适应症、用法、剂量、给予、组合疗法、禁忌和/或警告的信息。

[0253] “制品”为包含至少一种试剂的任何制造品(例如包装或容器)或试剂盒,该至少一种试剂例如为用于治疗疾病或病症(例如癌症)的药物,或用于特异性侦测本文所述的生物标记物的探针。在一些实施例中,制造品或试剂盒为以单元形式推销、分销或出售以用于执行本文所述方法。

[0254] 术语“标记”和“可侦测标记”意谓例如附着至抗体或抗原以使得特异性结合对的成员之间的反应(例如,结合)可侦测的部分。特异性结合对的标记成员称为“可侦测地标记”。因此,术语“经标记的结合蛋白”指并入有标记以便鉴别结合蛋白的蛋白质。在一些实施例中,标记为可产生可通过目视或仪器手段侦测的信号的可侦测标记物,例如并入经放射性标记的氨基酸或附接至具有可通过标记抗生物素蛋白(例如含有可通过光学或比色方法侦测的荧光标记物或酶活性的抗生蛋白链菌素)侦测的生物素基部分的多肽。用于多肽的标记的实施例包括(但不限于)以下各者:放射性同位素或放射性核素(例如^{3}H、^{14}C、^{35}S、

^{90}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{125}I、^{131}I、^{177}Lu、^{166}Ho或^{153}Sm)；色素原、荧光标记(例如FITC、若丹明(rhodamine)、镧为磷光体(lanthanide phosphor))、酶标记(例如辣根过氧化酶、荧光素酶、碱性磷酸酶)；化学发光标记物；生物素基；由二级报告分子识别的预定多肽抗原决定基(例如亮氨酸拉链对序列、二级抗体的结合位点、金属结合域、抗原决定基标签)；和磁化剂，诸如钆螯合物。常用于免疫分析的标记的代表性实施例包括产生光的部分，例如吖锭化合物，和产生荧光的部分，例如荧光素。就此而言，部分自身可能未可侦测地标记，但可在与又一部分反应之后变得可侦测。

[0255] II.结合5T4的VHH域

[0256] 本文提供5T4结合多肽，其为含有至少一个特异性结合至5T4的VHH域的含VHH多肽。在一些实施例中，VHH域结合人类5T4。在任何所提供的实施例中的一些中，VHH域结合具有SEQ ID NO:244中所示的序列或缺乏信号序列的其成熟形式的5T4。

[0257] 在一些实施例中，含VHH多肽并有本文提供的VHH域的多个复本。在此类实施例中，含VHH多肽可并有相同VHH域的多个复本。在一些实施例中，含VHH多肽可并有虽不同但识别5T4上相同抗原决定基的VHH域的多个复本。

[0258] 在一些实施例中，5T4 VHH不与小鼠5T4抗原交叉反应。在一些实施例中，包含SEQ ID NO:245中所示的氨基酸序列的5T4 VHH或其人源化变体不与小鼠5T4抗原交叉反应。在一些实施例中，包含SEQ ID NO:255中所示的氨基酸序列的5T4 VHH或其人源化变体不与小鼠5T4抗原交叉反应。在一些实施例中，包含SEQ ID NO:276中所示的氨基酸序列的5T4 VHH或其人源化变体不与小鼠5T4抗原交叉反应。在一些实施例中，所提供的5T4 VHH域结合至位于与SEQ ID NO:382中所示的氨基酸残基对应的5T4胞外域的氨基酸残基60与112之间的抗原决定基。在一些实施例中，具有SEQ ID NO:360(12E9v9)中所示的氨基酸序列的5T4 VHH域结合至位于与SEQ ID NO:382中所示的氨基酸残基对应的5T4胞外域的氨基酸残基60与112之间的抗原决定基。

[0259] 在一些实施例中，5T4 VHH域结合至位于与SEQ ID NO:382中所示的氨基酸残基对应的5T4胞外域的氨基酸残基173与224之间的抗原决定基。在一些实施例中，具有SEQ ID NO:272或287(16G10v11或14B5v17)中所示的氨基酸序列的5T4 VHH域结合至位于与SEQ ID NO:382中所示的氨基酸残基对应的5T4胞外域的氨基酸残基60与112之间的抗原决定基。

[0260] 含VHH多肽可格式化呈多种形式，包括如以下部分III中所述的任一形式。

[0261] 单域抗体为互补决定区为单域多肽的一部分的抗体。实施例包括(但不限于)重链抗体、天然缺乏轻链的抗体、来源于常规4-链抗体的单域抗体、经工程改造的抗体和除来源于抗体的骨架以外的单域骨架。单域抗体可来源于任何物种，包括但不限于小鼠、人类、骆驼、美洲驼、羊驼、小羊驼、原驼、鲨鱼、山羊、兔和/或牛。在一些实施例中，如本文所用的单域抗体为天然存在的单域抗体，称为缺乏轻链的重链抗体。为求清楚，此来源于天然缺乏轻链的重链分子的可变域在本文中称为VHH，以与四链免疫球蛋白的常规VH区分。此类VHH分子可来源于骆驼科物种，例如骆驼、美洲驼、单峰驼、羊驼、小羊驼和原驼中产生的抗体。除骆驼科的外的其他物种可产生天然缺乏轻链的重链抗体；此类VHH属于本发明的范畴内。

[0262] VHH域为抗体片段，其为能够选择性地结合至特定抗原的单个单体可变抗体结构域。在仅仅12-15kDa的分子量下，VHH域(亦称为单域抗体)比由两个蛋白重链和两个轻链构成的常见抗体(150-160kDa)小得多，且甚至比Fab片段(约50kDa，一个轻链和重链一半)和

单链可变片段(约25kDa,两个可变域,一个来自轻链和一个来自重链)小。

[0263] 用于筛选对5T4具有所需特异性的VHH域,包括VHH结合多肽的方法包括(但不限于)酶联免疫吸附分析(ELISA)、酶分析、流动式细胞测量术和本领域中已知的其他免疫介导技术。

[0264] 本文提供的所提供VHH域尤其为5T4 VHH(源自美洲驼)和人源化序列,诸如下文描述的任一者。

[0265] 在一些实施例中,结合5T4的VHH域可人源化。人源化抗体(诸如含VHH多肽)适用作治疗性分子,此系因为人源化抗体减少或消除对非人类抗体的人类免疫反应,人类免疫反应可引起对抗体治疗剂的免疫反应且减小治疗剂的效力。一般而言,人源化抗体包含一或多个可变域,其中CDR(或其一部分)来源于非人类抗体,且FR(或其一部分)来源于人类抗体序列。人源化抗体视情况亦包含人类恒定区的至少一部分。在一些实施例中,人源化抗体中的一些FR残基经来自非人类抗体(例如CDR残基源自的抗体)的相应残基取代,从而例如恢复或改良抗体特异性或亲和力。

[0266] 人源化抗体及其制造方法综述于例如Almagro和Fransson,(2008)Front.Biosci.13:1619-1633,且进一步描述于例如Riechmann等人,(1988)Nature332:323-329;Queen等人,(1989)Proc.Natl Acad.Sci USA 86:10029-10033;美国专利第5,821,337号、第7,527,791号、第6,982,321号和第7,087,409;Kashmiri等人,(2005)Methods 36:25-34;Padlan,(1991)Mol.Immunol.28:489-498(描述“表面重塑”);Dall'Acqua等人,(2005)Methods 36:43-60(描述“FR改组”);以及Osbourn等人,(2005)Methods 36:61-68和Klimka等人,(2000)Br.J.Cancer,83:252-260(描述FR改组的“引导选择”方法)。

[0267] 可用于人源化的人类构架区包括(但不限于):使用“最佳拟合”方法选择的构架区(参见例如Sims等人(1993)J.Immunol.151:2296);来源于具有重链可变区特定亚群的人类抗体的共同序列的构架区(参见例如Carter等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285;和Presta等人(1993)J.Immunol,151:2623);人类成熟(体细胞突变)构架区或人类生殖为构架区(参见例如Almagro和Fransson,(2008)Front.Biosci.13:1619-1633);和来源于筛选FR文库的构架区(参见例如Baca等人,(1997)J.Biol.Chem.272:10678-10684和Rosok等人,(1996)J.Biol.Chem.271:22611-22618)。通常由人类FR区置换VHH的FR区来制备人源化VHH。在一些实施例中,置换人类FR的某些FR残基来改良人源化VHH的一或多种特性。具有此类置换残基的VHH域在本文中仍称为“人源化”。

[0268] 本文提供一种结合5T4的VHH域,其中所述VHH域包含选自SEQ ID NO:245-287、294、295、302或360中的任一者的VHH氨基酸序列或与选自SEQ ID NO:245-287、294、295、302或360中的任一者的VHH区氨基酸具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的氨基酸序列中所含的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中,本文提供的5T4VHH域含有SEQ ID NO:288-292、86-87、296、297中的任一者中所示的CDR1、SEQ ID NO:88-99、298、299中的任一者中所示的CDR2和SEQ ID NO:100-102、300、301、303中的任一者中所示的CDR3。所提供的5T4 VHH域尤其具有SEQ ID NO:245-287、294、295、302或360中的任一者中所示的氨基酸序列,或与选自SEQ ID NO:245-287、294、295、302或360中的任一者的VHH区氨基酸具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的氨基酸序列。在一些实施例中,5T4 VHH域具有SEQ ID NO:245-287、294、

295、302或360中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0269] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:245中所示的VHH域或与SEQ ID NO:245中所示选择的VHH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列中所含的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，5T4 VHH域具有SEQ ID NO:245中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:245中所示选择的氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列。在一些实施例中，5T4 VHH域为SEQ ID NO:245中所示的氨基酸序列的人源化变体。

[0270] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:288或289中所示的CDR1、SEQ ID NO:88中所示的CDR2和SEQ ID NO:100中所示的CDR3。

[0271] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:288、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:289、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0272] 在一些方面中，结合5T4的VHH域包含选自SEQ ID NO:246-254中的任一者的VHH氨基酸序列或与选自SEQ ID NO:246-254中的任一者的V_HH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列中所含的CDR1、CDR2和CDR3。

[0273] 在一些方面中，结合5T4的VHH域包含选自SEQ ID NO:246-254和360中的任一者的VHH氨基酸序列或与选自SEQ ID NO:246-254和360中的任一者的V_HH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列中所含的CDR1、CDR2和CDR3。

[0274] 在一些情况下，所提供的5T4 VHH域为具有SEQ ID NO:246-254和360中的任一者中所示的氨基酸序列或与选自SEQ ID NO:246-254中的任一者的VHH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列的人源化变体。在一些实施例中，5T4人源化VHH域具有SEQ ID NO:246-254中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0275] 在一些情况下，所提供的5T4 VHH域为具有SEQ ID NO:246-254和360中的任一者中所示的氨基酸序列或与选自SEQ ID NO:246-254和360中的任一者的VHH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列的人源化变体。在一些实施例中，5T4人源化VHH域具有SEQ ID NO:246-254和360中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0276] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:255中所示的VHH域或与SEQ ID NO:255中所示选择的VHH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列中所含的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，5T4 VHH域具有SEQ ID NO:255中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:255中所示选择的氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列。在一些实施例中，5T4 VHH域为SEQ ID NO:255中所示的氨基酸序列的人源化变体。

[0277] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:86、290-292中的任一者

中所示的CDR1、SEQ ID NO:89-94中的任一者中所示的CDR2和SEQ ID NO:101中所示的CDR3。

[0278] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:290、89和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:290、90和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:290、91和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:290、92和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:290、93和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:290、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:291、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:292、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:86、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0279] 在一些方面中，结合5T4的VHH域包含选自SEQ ID NO:256-275中的任一者的VHH氨基酸序列或与选自SEQ ID NO:256-275中的任一者的VHH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列中所含的CDR1、CDR2和CDR3。

[0280] 在一些情况下，所提供的5T4 VHH域为具有SEQ ID NO:256-275中的任一者中所示的氨基酸序列或与选自SEQ ID NO:256-275中的任一者的VHH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列的人源化变体。在一些实施例中，5T4人源化VHH域具有SEQ ID NO:256-275中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0281] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:276中所示的VHH域或与SEQ ID NO:276中所示选择的VHH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列中所含的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，5T4 VHH域具有SEQ ID NO:276中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:276中所示选择的氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列。在一些实施例中，5T4 VHH域为SEQ ID NO:276中所示的氨基酸序列的人源化变体。

[0282] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:86或87中的任一者中所示的CDR1、SEQ ID NO:95-99中所示的CDR2和SEQ ID NO:102中所示的CDR3。

[0283] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:87、95、102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:87、96、102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:87、97、102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:87、98、102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:87、99、102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:86、98、102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0284] 在一些方面中，结合5T4的VHH域包含选自SEQ ID NO:277-287中的任一者的VHH氨

基酸序列或与选自SEQ ID NO:277-287中的任一者的VHH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列中所含的CDR1、CDR2和CDR3。

[0285] 在一些情况下，所提供的5T4 VHH域为具有SEQ ID NO:277-287中的任一者中所示的氨基酸序列或与选自SEQ ID NO:277-287中的任一者的V_HH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列的人源化变体。在一些实施例中，5T4人源化VHH域具有SEQ ID NO:277-287中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0286] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:294中所示的VHH域或与SEQ ID NO:294中所示选择的VHH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列中所含的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，5T4 VHH域具有SEQ ID NO:294中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:294中所示选择的氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列。在一些实施例中，5T4 VHH域为SEQ ID NO:294中所示的氨基酸序列的人源化变体。

[0287] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:296中所示的CDR1、SEQ ID NO:298中所示的CDR2和SEQ ID NO:.300中所示的CDR3。

[0288] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:296、298、300中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0289] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:295中所示的VHH域或与SEQ ID NO:295中所示选择的VHH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列中所含的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，5T4 VHH域具有SEQ ID NO:295中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:295中所示选择的氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列。在一些实施例中，5T4 VHH域为SEQ ID NO:295中所示的氨基酸序列的人源化变体。

[0290] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:297中所示的CDR1、SEQ ID NO:299中所示的CDR2和SEQ ID NO:.301中所示的CDR3。

[0291] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:297、299、301中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0292] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:302中所示的VHH域或与SEQ ID NO:302中所示选择的VHH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列中所含的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，5T4 VHH域具有SEQ ID NO:302中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:302中所示选择的氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的氨基酸序列。在一些实施例中，5T4 VHH域为SEQ ID NO:302中所示的氨基酸序列的人源化变体。

[0293] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:288中所示的CDR1、SEQ ID NO:88中所示的CDR2和SEQ ID NO:.303中所示的CDR3。

[0294] 在一些实施例中，本文提供的5T4 VHH域含有SEQ ID NO:288、88、303中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0295] III.含有5T4结合多肽的融合蛋白和偶联物

[0296] 本文提供含有5T4结合多肽的融合蛋白和偶联物，所述5T4结合多肽含有至少一个特异性结合5T4的VHH域直接或间接地连接至一或多个额外结构域或部分。在一些实施例中，本发明的融合蛋白或偶联物由单一多肽构成。在其他实施例中，本发明的融合蛋白或偶联物由超过一种多肽构成。在一些实施例中，本发明的5T4结合多肽并有至少一个特异性结合5T4的VHH域。在一些方面中，5T4结合多肽为多价的。在一些实施例中，5T4结合多肽包括特异性结合5T4的VHH域的两个或更多个复本，例如特异性结合5T4的VHH域的三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、或六个或更多个复本。在某些方面中，5T4结合多肽为多特异性的。例如在一些情况下，一或多个额外域可为结合至一或多种其他抗原或蛋白质的一或多个额外结合域。

[0297] 在一些实施例中，本发明的5T4结合多肽包括两个或更多个经由氨基酸接头可操作地连接的多肽序列。在一些实施例中，这些接头主要由氨基酸甘氨酸和丝氨酸组成，在本文中表示为GS-接头。本发明的融合蛋白的GS-接头可具有各种长度，例如长度为5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个氨基酸。在一些实施例中，GS-接头包含选自由以下组成的组的氨基酸序列：GGSGGS，亦即$(GGS)_2$(SEQ ID NO:1)；GGSGGSGGS，亦即$(GGS)_3$(SEQ ID NO:2)；GGSGGSGGSGGS，亦即$(GGS)_4$(SEQ ID NO:3)；和GGSGGSGGSGGSGGS，亦即$(GGS)_5$(SEQ ID NO:4)。在一些实施例中，接头为包含甘氨酸残基的可挠性接头，诸如(借助于非限制性实施例)GG、GGG、GGGG(SEQ ID NO:5)、GGGGG(SEQ ID NO:6)和GGGGGG(SEQ ID NO:7)。在一些实施例中，接头为(GGGGS)n，其中n为1至5(SEQ ID NO:123)；(GGGGGS)n，其中n为1至4(SEQ ID NO:124)；GGGGS(SEQ ID NO:125)；GGGGGS(SEQ ID NO:126)；GGGGGSGGGGGSGGGGGS(SEQ ID NO:127)；GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:128)；GGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:129)；或PGGGG(SEQ ID NO:327)。在一些实施例中，5T4结合多肽包括GS-接头和甘氨酸接头的组合。

[0298] A.Fc融合物

[0299] 本文提供一种5T4结合多肽，其为含有至少一个本文提供的结合5T4的VHH域和Fc域的融合蛋白。在一些实施例中，本文提供的5T4结合多肽包含一个、两个、三个或四个结合5T4的VHH域和Fc域。

[0300] 在一些实施例中，在一些方面中，融合蛋白中免疫球蛋白Fc区的并入可由两种多肽构成，该两种多肽一起形成二聚体。在一些实施例中，Fc域介导5T4结合多肽在生理条件(诸如当自细胞表达时)下的二聚以便形成使5T4结合位点的数量加倍的二聚体。举例而言，包含三个结合5T4的VHH域和Fc区的5T4结合多肽为三价的单体形式，但Fc区可介导二聚，使得5T4结合多肽在所述条件下以六价二聚体形式存在。在一些实施例中，5T4 VHH域与IgG Fc区融合且在这些实施例中，融合蛋白为每分子具有两个5T4 VHH域的二价分子。在一些实施例中，两个5T4结合域(2×)与IgG Fc区融合且在这些实施例中，融合蛋白为每分子具有四个5T4 VHH域的四价分子。在一些实施例中，三个5T4结合域(3×)与IgG Fc区融合且在这些实施例中，融合蛋白为每分子具有六个5T4 VHH域的六价分子。

[0301] 在一些实施例中，多价5T4结合多肽为二价的。在一些实施例中，本发明的二价5T4

结合多肽包括具有以下结构的5T4结合多肽的两个复本:(5T4VHH)-接头-Fc。在一些实施例中,多价5T4结合多肽为四价的。在一些实施例中,本发明的四价5T4结合多肽包括具有以下结构的5T4多肽的两个复本:(5T4 VHH)-接头-(5T4 VHH)-接头-Fc。在一些实施例中,多价5T4结合多肽为六价的。在一些实施例中,本发明的六价5T4结合多肽包括具有以下结构的5T4结合多肽的两个复本:(5T4 VHH)-接头-(5T4 VHH)-接头-(5T4 VHH)-接头-Fc。

[0302] 在一些情况下,Fc区的CH3域可用作同源二聚域,以使得所得到的融合蛋白为由两个一致多肽形成。在其他情况下,Fc区的CH3二聚体交界区可突变以便能够实现异源二聚化。举例而言,异源二聚域可并入至融合蛋白中,以使得构建体为不对称的融合蛋白。

[0303] 在任一所提供实施例中,5T4 VHH域可为如上所述的任一种VHH域。在一些实施例中,5T4 VHH域为结合5T4的人源化VHH域。

[0304] 在各种实施例中,5T4结合多肽中包括的Fc域为人类Fc域或来源于人类Fc域。在一些实施例中,融合蛋白含有免疫球蛋白Fc区。在一些实施例中,免疫球蛋白Fc区为选自由IgG1同型、IgG2同型、IgG3同型和IgG4子类组成的组的IgG同型。

[0305] 在一些实施例中,免疫球蛋白Fc区或其免疫活性片段为IgG同型。举例而言,融合蛋白的免疫球蛋白Fc区为人类IgG1同型,其具有以下氨基酸序列:

[0306] 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: 8)

[0307] 在一些实施例中,免疫球蛋白Fc区或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:8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%一致的人类IgG1多肽序列。

[0308] 在一些实施例中,在本发明的融合蛋白包括Fc多肽的情况下,Fc多肽发生突变或修饰。在一些情况下,突变包括一或多个使Fc多肽的效应功能减少的氨基酸取代。已知改变、诸如减少效应功能的Fc多肽突变的各种实施例,包括如下所述的任一种。在一些实施例中,除非提及特定SEQ ID NO时描述,否则对Fc区中的氨基酸取代的提及为通过Kabat的EU编号(亦称为Kabat编号)。EU编号为已知的且根据最新的IMGT Scientific Chart(IMGT®,the international ImMunoGeneTics informationsystem®,http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html(建立:2001年5月17日,最新更新:2013年1月10日)和如Kabat,E.A.等人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)中报导的EU索引。

[0309] 在一些实施例中,展现减少的效应功能的Fc区可为需要结合5T4或CD3但某些效应功能(诸如CDC和ADCC)为不必要或有害的应用的理想候选物。可进行活体外和/或活体内细胞毒性分析以证实CDC和/或ADCC活性的降低/消除。举例而言,可进行Fc受体(FcR)结合分析以确保多特异性多肽构建体和/或其裂解组分缺乏FcγR结合(因此可能缺乏ADCC活性),但保留FcRn结合能力。用于介导ADCC的初级细胞NK细胞仅表达FcγRIII,而单核细胞表达

FcγRI、FcγRII和FcγRIII。评估所关注分子的ADCC活性的活体外分析的非限制性实施例描述于以下中:美国专利第5,500,362号(参见例如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(参见例如用于流动式细胞测量术的ACTI™非放射性细胞毒性分析(CellTechnology,Inc.Mountain View,Calif.);和CytoTox 96™非放射性细胞毒性分析(Promega,Madison,Wis.))。适用于此类分析的效应细胞包括周边血液单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。或者或另外,可例如在动物模型中活体内评估所关注的分子的ADCC活性,诸如Clynes等人Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中所揭示。亦可进行C1q结合分析以证实多特异性多肽构建体或其裂解组分无法结合C1q,因此缺乏CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为评估补体活化,可进行CDC分析(参见例如Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood 101:1045-1052(2003);和Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。亦可使用本领域中已知的方法测定FcRn结合和活体内清除率/半衰期(参见例如Petkova,S.B.等人,Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0310] 在一些实施例中,人类IgG 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,2006PNAS,103(11):4005-4010;Shields等人,2001JBC,276(9):6591-6604;Stavenhagen等人,2007Cancer Res,67(18):8882-8890;Stavenhagen等人,2008Advan.Enzyme Regul.,48:152-164;Alegre等人,1992J Immunol,148:3461-3468;Kaneko和Niwa,2011Biodrugs,25(1):1-11中评述。

[0311] 增强ADCC的突变的实施例包括在Ser239和Ile332处的修饰,例如Ser239Asp和Ile332Glu(S239D、I332E)。增强CDC的突变的实施例包括在Lys326和Glu333处的修饰。在一些实施例中,Fc区在这些位置中的一或两处经修饰,例如使用Kabat编号系统的Lys326Ala和/或Glu333Ala(K326A和E333A)。

[0312] 在一些实施例中,融合蛋白的Fc区在以下位置中的一或多处改变以减少Fc受体结合:Leu 234(L234)、Leu235(L235)、Asp265(D265)、Asp270(D270)、Ser298(S298)、Asn297(N297)、Asn325(N325)、Ala327(A327)或Pro329(P329)。例如,Leu 234Ala(L234A)、Leu235Ala(L235A)、Leu235Glu(L235E)、Asp265Asn(D265N)、Asp265Ala(D265A)、Asp270Asn(D270N)、Ser298Asn(S298N)、Asn297Ala(N297A)、Pro329Ala(P329A)或Pro239Gly(P329G)、Asn325Glu(N325E)或Ala327Ser(A327S)。在优选实施例中,Fc区内的修饰减少与Fc受体-γ受体的结合,同时对与新生儿Fc受体(FcRn)的结合影响最小。

[0313] 在一些实施例中,人类IgG1 Fc区在氨基酸Asn297(Kabat编号)处经修饰以防止融合蛋白糖基化,例如Asn297Ala(N297A)或Asn297Asp(N297D)。在一些实施例中,融合蛋白的Fc区在氨基酸Leu235(Kabat编号)处经修饰以改变Fc受体相互作用,例如Leu235Glu(L235E)或Leu235Ala(L235A)。在一些实施例中,融合蛋白的Fc区在氨基酸Leu234(Kabat编号)处经修饰以改变Fc受体相互作用,例如Leu234Ala(L234A)。在一些实施例中,融合蛋白

的Fc区在氨基酸Leu234(Kabat编号)处经修饰以改变Fc受体相互作用,例如Leu235Glu(L235E)。在一些实施例中,融合蛋白的Fc区在氨基酸234与235处发生改变,例如Leu234Ala和Leu235Ala(L234A/L235A)或Leu234Val和Leu235Ala(L234V/L235A)。在一些实施例中,融合蛋白的Fc区在氨基酸234、235和297处发生改变,例如Leu234Ala、Leu235Ala、Asn297Ala(L234A/L235A/N297A)。在一些实施例中,融合蛋白的Fc区在氨基酸234、235和329处发生改变,例如Leu234Ala、Leu235Ala、Pro239Ala(L234A/L235A/P329A)。在一些实施例中,融合蛋白的Fc区在氨基酸Asp265(Kabat编号)处经修饰以改变Fc受体相互作用,例如Asp265Ala(D265A)。在一些实施例中,融合蛋白的Fc区在氨基酸Pro329(Kabat编号)处经修饰以改变Fc受体相互作用,例如Pro329Ala(P329A)或Pro329Gly(P329G)。在一些实施例中,融合蛋白的Fc区在氨基酸265与329处发生改变,例如Asp265Ala和Pro329Ala(D265A/P329A)或Asp265Ala和Pro329Gly(D265A/P329G)。在一些实施例中,融合蛋白的Fc区在氨基酸234、235和265处发生改变,例如Leu234Ala、Leu235Ala、Asp265Ala(L234A/L235A/D265A)。在一些实施例中,融合蛋白的Fc区在氨基酸234、235和329处发生改变,例如Leu234Ala、Leu235Ala、Pro329Gly(L234A/L235A/P329G)。在一些实施例中,融合蛋白的Fc区在氨基酸234、235、265和329处发生改变,例如Leu234Ala、Leu235Ala、Asp265Ala、Pro329Gly(L234A/L235A/D265A/P329G)。在一些实施例中,融合蛋白的Fc区在Gly235处发生改变以减少Fc受体结合。举例而言,其中Gly235自融合蛋白缺失。在一些实施例中,人类IgG1 Fc区在氨基酸Gly236处经修饰以增强与CD32A的相互作用,例如Gly236Ala(G236A)。在一些实施例中,人类IgG1 Fc区缺乏Lys447(Kabat等人1991Sequences of Proteins of Immunological Interest的EU索引)。

[0314] 在一些实施例中,融合蛋白的Fc区缺乏以下位置中的一或多处的氨基酸以减少Fc受体结合:Glu233(E233)、Leu234(L234)或Leu235(L235)。在一些实施例中,融合蛋白的Fc区缺乏以下位置中的一或多处的氨基酸:Glu233(E233)、Leu234(L234)或Leu235(L235),且在Asp265(D265)、Asn297(N297)或Pro329(P329)中的一或多处经修饰以减少Fc受体结合。举例而言,5T4结合多肽中包括的Fc区来源于人类Fc域,且在对应于IgG1的较低铰链中包含三个氨基酸缺失E233、L234和L235。在一些方面中,此类Fc多肽不啮合Fc γ Rs且因此称为“效应沉默”或“无效应”。举例而言,Fc缺失此三个氨基酸将减少补体蛋白C1q结合。在一些实施例中,具有Fc缺失此三个氨基酸的Fc区的多肽保留与FcRn的结合,因此具有延长的半衰期和胞转作用,此与FcRn介导的再循环相关联。此类经修饰Fc区称为“Fc xELL”或“Fc缺失”且具有以下氨基酸序列:

[0315] 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: 9)

[0316] 在一些实施例中,免疫球蛋白Fc区或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:9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%一致的人类IgG1多肽序列。

[0317] 在一些实施例中，人类IgG Fc区经修饰以增强FcRn结合。增强与FcRn的结合的Fc突变的实施例为Met252Tyr、Ser254Thr、Thr256Glu(分别为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2010Nature Biotech,第28卷(2)157-159)或Met252Ile、Thr256Asp、Met428Leu(分别为M252I、T256D、M428L)(Kabat等人1991Sequences of Proteins of Immunological Interest的EU索引)。

[0318] 在一些实施例中，5T4结合多肽中包括的Fc域来源于人类Fc域且包含突变M252Y和M428V，本文中称为"Fc-YV"。在一些实施例中，经突变或修饰的Fc多肽包括以下突变:使用Kabat编号系统，M252Y和M428L。在一些实施例中，所述突变在核内体的酸性pH下(接近6.5)增强与FcRn的结合，而在中性pH(约7.2)下失去可侦测的结合，从而增强FcRn介导的再循环且半衰期延长。

[0319] 在一些实施例中，5T4结合多肽中包括的Fc域来源于人类Fc域且包含诱发异源二聚化的突变。在一些实施例中，此类突变包括称为"杵"和"臼"突变的突变。举例而言，在CH3域内Thr366处进行氨基酸修饰，其在经更大氨基酸，例如Try(T366W)置换时能够优先与在位置Thr366、Leu368和Tyr407处氨基酸经修饰为较小氨基酸，例如分别为Ser、Ala和Val(T366S/L368A/Y407V)的第二CH3域配对。在一些实施例中，"杵"Fc域包含突变T366W。在一些实施例中，"臼"Fc域包含突变T366S、L368A和Y407V。可通过引入二硫键，例如通过将相对CH3域上的Ser354变为Cys(S354C)和Y349变为Cys(Y349C)进一步稳定经由CH3修饰的异源二聚(综述于Carter,2001Journal of Immunological Methods,248:7-15中)。在一些实施例中，用于异源二聚化的Fc域包含其他突变，诸如异源二聚体Fc对的第一成员上的突变S354C，其与异源二聚体Fc对的第二成员上的相应突变Y349C形成不对称双硫键。在一些实施例中，异源二聚体Fc对的一个成员包含修饰H435R或H435K以避免蛋白A结合，同时保持FcRn结合。在一些实施例中，异源二聚体Fc对的一个成员包含修饰H435R或H435K，而异源二聚体Fc对的第二成员在H435处不经修饰。在各种实施例中，臼Fc域包含修饰H435R或H435K(在一些情况下当修饰为H435R时称为"臼-R")，而杵Fc域不包含。在一些情况下，相对于可能存在的同源二聚臼Fc域，臼-R突变改良异源二聚体的纯化。

[0320] 在一些实施例中，人类IgG Fc区经修饰以防止二聚。在这些实施例中，本发明的融合蛋白为单体。例如残基Thr366修饰为带电残基，例如Thr366Lys、Thr366Arg、Thr366Asp或Thr366Glu(分别为T366K、T366R、T366D或T366E)防止CH3-CH3二聚。

[0321] 在一些实施例中，融合蛋白的免疫球蛋白Fc区或免疫活性片段为人类IgG2同型，其具有以下氨基酸序列:

[0322] 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: 10)

[0323] 在一些实施例中，融合物或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:10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％一致的人类IgG2多肽序列。

[0324] 在一些实施例中，人类IgG2 Fc区在氨基酸Asn297处经修饰，例如防止抗体糖基化，例如Asn297Ala(N297A)或Asn297Asp(N297D)。在一些实施例中，人类IgG2 Fc区缺乏Lys447(Kabat等人1991Sequences of Proteins of Immunological Interest的EU索引)。

[0325] 在一些实施例中，融合蛋白的免疫球蛋白Fc区或免疫活性片段为人类IgG3同型，其具有以下氨基酸序列：

[0326] 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: 11)

[0327] 在一些实施例中，抗体或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:11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％一致的人类IgG3多肽序列。

[0328] 在一些实施例中，人类IgG3 Fc区在氨基酸Asn297(Kabat编号)处经修饰，以防止抗体糖基化，例如Asn297Ala(N297A)或Asn297Asp(N297D)。在一些实施例中，人类IgG3 Fc区在氨基酸435处经修饰以延长半衰期，例如Arg435His(R435H)。在一些实施例中，人类IgG3 Fc区缺乏Lys447(Kabat等人1991Sequences of Proteins of Immunological Interest的EU索引)。

[0329] 在一些实施例中，融合蛋白的免疫球蛋白Fc区或免疫活性片段为人类IgG4同型，其具有以下氨基酸序列：

[0330] 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: 12)

[0331] 在一些实施例中，抗体或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:12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％一致的人类IgG4多肽序列。

[0332] 在一些实施例中，融合蛋白的免疫球蛋白Fc区或免疫活性片段为人类IgG4同型，其具有以下氨基酸序列：

[0333] 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: 13)

[0334] 在一些实施例中，抗体或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:13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％一致的人类IgG4多肽序列。

[0335] 在一些实施例中，人类IgG4 Fc区在氨基酸235处经修饰以改变Fc受体相互作用，例如Leu235Glu(L235E)。在一些实施例中，人类IgG4 Fc区在氨基酸Asn297(Kabat编号)处经修饰，以防止抗体糖基化，例如Asn297Ala(N297A)或Asn297Asp(N297D)。在一些实施例中，人类IgG4 Fc区缺乏Lys447(Kabat等人1991Sequences of Proteins of Immunological Interest的EU索引)。

[0336] 在一些实施例中，融合蛋白含有来源于免疫球蛋白铰链区的多肽。铰链区可选自任一人类IgG子类。举例而言，融合蛋白可含有具有序列EPKSSDKTHTCPPC(SEQ ID NO:14)的经修饰IgG1铰链，其中在与轻链的C端半胱氨酸形成二硫键的Cys220中，突变成丝氨酸，例如Cys220Ser(C220S)。在其他实施例中，融合蛋白含有具有序列DKTHTCPPC(SEQ ID NO:15)的截短铰链。

[0337] 在一些实施例中，融合蛋白具有来自IgG4的经修饰铰链，其经修饰以防止或减少链交换，例如Ser228Pro(S228P)，具有序列ESKYGPPCPPC(SEQ ID NO:16)。在一些实施例中，融合蛋白含有连接多肽。在其他实施例中，融合蛋白含有接头和铰链多肽。

[0338] 在一些实施例中，Fc区在N297处缺乏或具有减少的附接至N连接聚糖链的岩藻糖。存在大量防止岩藻糖基化的方式，包括(但不限于)在缺乏FUT8的细胞株中产生；添加抑制剂至哺乳动物细胞培养基，例如栗树精胺；以及生产细胞株的代谢工程改造。

[0339] 在一些实施例中，Fc区经工程改造以消除在人类中发现的预先存在的抗体的识别。在一些实施例中，本发明的含VHH多肽通过位置Leu11的突变，例如Leu11Glu(L11E)或Leu11Lys(L11K)进行修饰。在其他实施例中，本发明的单域抗体通过羧基端区域中的改变进行修饰，例如末端序列具有序列GQGTLVTVKPGG(SEQ ID NO:17)或GQGTLVTVEPGG(SEQ ID NO:18)或其修饰。在一些实施例中，本发明的含VHH多肽通过位置11的突变和通过羧基端区域中的改变进行修饰。

[0340] 在一些实施例中，本发明的融合蛋白的一或多种多肽经由氨基酸接头可操作地连接。在一些实施例中，这些接头主要由氨基酸甘氨酸和丝氨酸组成，在本文中表示为GS-接头。在一些实施例中，这些接头主要由氨基酸甘氨酸组成，在本文中表示为甘氨酸接头。本发明的融合蛋白的GS-接头或甘氨酸接头可具有各种长度，例如长度为5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个氨基酸。

[0341] 在一些实施例中，GS-接头包含选自由以下组成的组的氨基酸序列：GGSGGS，亦即$(GGS)_2$(SEQ ID NO:1)；GGSGGSGGS，亦即$(GGS)_3$(SEQ ID NO:2)；GGSGGSGGSGGS，亦即$(GGS)_4$(SEQ ID NO:3)；和GGSGGSGGSGGSGGS，亦即$(GGS)_5$(SEQ ID NO:4)。在一些实施例中，接头为可挠性接头，其为包含甘氨酸残基的甘氨酸接头，诸如(借助于非限制性实施例)GG、GGG、GGGG(SEQ ID NO:5)、GGGGG(SEQ ID NO:6)和GGGGGG(SEQ ID NO:7)。在一些实施例中，接头为(GGGGS)n，其中n为1至5(SEQ ID NO:123)；(GGGGGS)n，其中n为1至4(SEQ ID NO:124)；GGGGS(SEQ ID NO:125)；GGGGGS(SEQ ID NO:126)；GGGGGSGGGGGSGGGGGS(SEQ ID NO:127)；GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:128)；GGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:129)；或PGGGG(SEQ ID NO:327)。在一些实施例中，融合蛋白可包括GS-接头与甘氨酸接头的组合。

[0342] B.共轭物

[0343] 本文提供含有至少一个本文提供的特异性结合5T4的VHH域和一或多个其他部分的偶联物。其他部分可为治疗剂，诸如细胞毒性剂，或可为侦测剂。在一些实施例中，部分可

为靶向部分、小分子药物(小于500道尔顿摩尔质量的非多肽药物)、毒素、细胞生长抑制剂、细胞毒性剂、免疫抑制剂、适合于诊断目的的放射性试剂、用于治疗目的的放射性金属离子、前药活化酶、增加生物半衰期的试剂或诊断剂或可侦测试剂。

[0344] 在一些实施例中,偶联物为含有一或多个本文提供的5T4 VHH域结合至治疗剂的抗体药物偶联物(ADC,亦称为免疫偶联物),其具有细胞毒性,抑制细胞生长,或者提供一些治疗益处。在一些实施例中,细胞毒性剂为化学治疗剂、药物、生长抑制剂、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(亦即,放射性偶联物)。在一些实施例中,本发明提供的抗体药物偶联物允许药物部分靶向递送至肿瘤。在一些情况下,此可引起肿瘤细胞的靶向杀死。

[0345] 在一些实施例中,提供一种结合5T4的偶联物,其包含至少一个本文提供的5T4 VHH域与治疗剂结合。在一些实施例中,治疗剂包括例如道诺霉素(daunomycin)、阿霉素(doxorubicin)、甲氨喋呤(methotrexate)和长春地辛(vindesine)(Rowland等人,Cancer Immunol.Immunother.21:183-187,1986)。在一些实施例中,治疗剂具有细胞内活性。在一些实施例中,结合5T4的偶联物经内化且治疗剂为阻断细胞的蛋白质合成,引起细胞死亡的细胞毒素。在一些实施例中,治疗剂为包含具有核糖体不活化活性的多肽的细胞毒素,包括例如白树毒蛋白、三角梅核糖体失活蛋白(bouganin)、肥皂草毒蛋白(saporin)、蓖麻毒素、蓖麻毒素A链、异株泻根毒蛋白(bryodin)、白喉毒素、局限曲菌素(restrictocin)、绿脓杆菌外毒素A及其变体。在一些实施例中,在治疗剂为包含具有核糖体不活化活性的多肽的细胞毒素的情况下,结合5T4的偶联物必须在结合至靶细胞后内化以使该蛋白质对细胞具细胞毒性。

[0346] 在一些实施例中,提供一种结合5T4的偶联物,其包含至少一个本文提供的5T4 VHH域与毒素结合。在一些实施例中,毒素包括例如细菌毒素(诸如白喉毒素)、植物毒素(诸如蓖麻毒素)、小分子毒素(诸如格尔德霉素(geldanamycin))(Mandler等人,J.Nat.Cancer Inst.92(19):1573-1581(2000);Mandler等人,Bioorganic&Med.Chem.Letters 10:1025-1028(2000);Mandler等人,Bioconjugate Chem.13:786-791(2002))、类美登素(maytansinoid)(EP 1391213;Liu等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:8618-8623(1996))和加利车霉素(calicheamicin)(Lode等人,Cancer Res.58:2928(1998);Hinman等人,Cancer Res.53:3336-3342(1993))。毒素可通过包括微管蛋白结合、DNA结合或拓朴异构酶抑制的机制发挥其细胞毒性和细胞生长抑制作用。

[0347] 在一些实施例中,提供一种结合5T4的偶联物,其包含至少一个本文提供的5T4 VHH域与标记结合,该标记可间接或直接产生可侦测信号。这些结合5T4的偶联物可用于研究或诊断应用,诸如用于活体内侦测癌症。标记优选能够直接或间接产生可侦测信号。举例而言,标记可为射线不透的或放射性同位素,如3H、14C、32P、35S、123I、125I、131I;荧光(荧光团)或化学发光(发色团)化合物,诸如荧光异硫氰酸盐、若丹明或荧光素;酶,诸如碱性磷酸酶、β-半乳糖或辣根过氧化酶;显影剂;或金属离子。在一些实施例中,标记为用于闪烁摄影研究的放射性原子,例如99Tc或123I,或用于核磁共振(NMR)成像(亦称为磁共振成像,MRI)的自旋标记,诸如锆-89、碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。锆-89可与多种金属螯合剂错合且结合至抗体,例如用于PET成像(WO 2011/056983)。

[0348] 结合5T4的偶联物可使用本领域中已知的任何方法制备。参见例如WO 2009/

067800、WO 2011/133886和美国专利申请公开案第2014322129号，其以全文引用的方式并入本文中。

[0349] 在一些实施例中，附接可为共价或非共价的，例如经由生物素-抗生蛋白链菌素非共价相互作用。在一些实施例中，1个、2个、3个、4个、5个或更多个可相同或不同的部分与5T4 VHH域结合、连接或融合，以形成结合5T4的偶联物。在一些实施例中，此类部分使用本领域中已知和下文描述的多种分子生物学或化学结合和连接方法附接至VHH域。在一些实施例中，接头，诸如肽接头、可裂解接头、不可裂解接头或帮助结合反应的接头，可用于将效应部分连接或结合至变异型多肽或免疫调节蛋白。

[0350] 在一些实施例中，5T4 VHH域经由接头(L)结合至一或多个部分，例如每个VHH约1至约20个药物部分。在一些实施例中，结合5T4的偶联物包含以下组分：(VHH域)、$(L)_q$和$(部分)_m$，其中VHH域为如所描述能够特异性结合5T4的所述VHH域中的任一者；L为用于连接蛋白质或多肽至部分的接头；m为至少1；q为0或更多；且所得结合5T4的偶联物结合至5T4。在特定实施例中，m为1至4且q为0至8。

[0351] 接头可由一或多个接头组分组成。为共价附接抗体与药物部分，接头通常具有两个反应性官能基，亦即在反应意义上二价。已知适用于附接两个或更多个功能性或生物活性部分，诸如肽、核酸、药物、毒素、抗体、半抗原和报告分子基团的二价接头试剂，且已描述得到偶联物的方法(Hermanson,G.T.(1996)Bioconjugate Techniques;Academic Press:New York,第234-242页)。

[0352] 示例性接头组分包括6-顺丁烯二酰亚胺基己酰基(“MC”)、顺丁烯二酰亚胺基丙酰基(“MP”)、缬氨酸-瓜氨酸(“val-cit”)、丙氨酸-苯丙氨酸(“ala-phe”)、对氨基苯甲氧基羰基(“PAB”)、N-丁二酰亚胺基4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯(“SPP”)、N-丁二酰亚胺基4-(N-顺丁烯二酰亚胺基甲基)环己烷-1甲酸酯(“SMCC”)和N-丁二酰亚胺基(4-碘-乙酰基)胺基苯甲酸酯(“SIAB”)。

[0353] 在一些实施例中，接头可包含氨基酸残基。例示性氨基酸接头组分包括二肽、三肽、四肽或五肽。示例性二肽包括：缬氨酸-瓜氨酸(vc或val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(af或ala-phe)。示例性三肽包括：甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(gly-val-cit)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(gly-gly-gly)。包含氨基酸接头组分的氨基酸残基包括天然存在的残基以及次要氨基酸和非天然存在的氨基酸类似物，诸如瓜氨酸。氨基酸接头组分可在其选择性方面经设计和优化，以通过特定酶，例如肿瘤相关蛋白酶、组织蛋白酶B、C和D、胞浆素蛋白酶进行酶促裂解。

[0354] VHH域与细胞毒性剂的偶联物可使用多种双官能蛋白质偶合剂制得，诸如N-丁二酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亚胺基硫杂环戊烷(IT)、酰亚胺酯的双官能衍生物(诸如己二酰亚胺酸二甲酯HCl)、活性酯(诸如二丁二酰亚胺基基质)、醛(诸如戊二醛)、双叠氮基化合物(诸如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

[0355] 抗体药物偶联物可通过本领域技术人员已知的多种方法、诸如有机化学反应、条件和试剂制备。在一个实施例中，方法包括：(1)使VHH域的亲核性基团与二价接头试剂反应，以经由共价键形成VHH-L，接着与药物部分D反应；以及(2)药物部分的亲核性基团与二

价接头试剂反应,以经由共价键形成D-L,接着与VHH域的亲核性基团反应。

[0356] 包括VHH域的抗体上的亲核性基团包括(但不限于):(i)N端氨基;(ii)侧链氨基,例如赖氨酸;(iii)侧链硫醇基,例如半胱氨酸;和(iv)其中抗体经糖基化的糖羟基或胺基。胺、硫醇和羟基为亲核性的且能够与接头部分和接头试剂上的亲电性基团反应形成共价键,所述亲电性基团包括:(i)活性酯,诸如NHS酯、HOBt酯、卤基甲酸酯和酸卤化物;(ii)烷基和苯甲基卤化物,诸如卤乙酰胺;和(iii)醛、酮、羧基和顺丁烯二酰亚胺基。可经由赖氨酸与2-亚胺基硫杂环戊烷(特氏试剂(Traut's reagent))的反应将额外亲核性基团引入至抗体中,使得胺转化成硫醇。反应性硫醇基可通过引入一个、两个、三个、四个或更多个半胱氨酸残基而引入至抗体(或其片段)中(例如,制备包含一或多个非天然半胱氨酸氨基酸残基的突变抗体)。

[0357] 诸如抗体药物偶联物的偶联物亦可通过对抗体、诸如VHH域进行修饰以引入亲电性部分而产生,所述亲电性部分可与接头试剂或药物上的亲核性取代基反应。糖基化抗体的糖可经例如过碘酸盐氧化试剂氧化,形成醛基或酮基,其可与接头试剂或药物部分的胺基反应。所得亚胺希夫碱(Schiff base)基团可形成稳定键,或可例如通过硼氢化物试剂还原,以形成稳定的胺键。在一个实施例中,糖基化抗体的碳水化合物部分与半乳糖氧化酶或偏过碘酸钠反应可在蛋白质中产生羰基(醛和酮),其可与药物上的适当基团反应(Hermanson,Bioconjugate Techniques)。在另一实施例中,含有N端丝氨酸或苏氨酸残基的蛋白质可与偏过碘酸钠反应,产生醛代替第一氨基酸。此类醛可与药物部分或接头亲核试剂反应。

[0358] 同样,药物部分上的亲核性基团包括(但不限于):能够与接头部分和接头试剂上的亲电性基团反应形成共价键的胺、硫醇、羟基、酰肼、肟、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸酯和芳基酰肼基团,所述亲电性基团包括:(i)活性酯,诸如NHS酯、HOBi酯、卤基甲酸酯和酸卤化物;(ii)烷基和苯甲基卤化物,诸如卤代酰胺;(iii)醛、酮、羧基和顺丁烯二酰亚胺基。

[0359] 或者,可例如通过重组技术或肽合成制得含有VHH域和细胞毒性剂的融合蛋白。DNA的长度可包含编码偶联物的两个部分的各别区域,所述区域彼此相邻或由编码不破坏偶联物的所要性质的连接肽的区域隔开。

[0360] C.多特异性格式

[0361] 本文提供多特异性5T4结合多肽,其含有至少一个结合5T4的VHH域和一或多个额外结合域。通常一或多个额外结构域结合至除5T4外的第二抗原或蛋白质。在一些实施例中,一或多个额外域为对第二抗原或蛋白质具有特异性的抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,额外域为VHH域。

[0362] 在一些实施例中,多特异性5T4结合多肽包含至少一个结合5T4的VHH域和至少一个结合第二抗原或蛋白质的额外结合域。在一些实施例中,此第二抗原为肿瘤相关抗原(TAA)或肿瘤微环境相关抗原(TMEAA)。在一些实施例中,此第二抗原为免疫调节抗原,其中所述抗原与增强或抑制免疫细胞中的信号传导路径相关。在一些实施例中,此第二抗原为肿瘤相关抗原(TAA)或肿瘤微环境相关抗原(TMEAA)。在一些实施例中,此第二抗原为免疫调节抗原,其中所述抗原与增强或抑制免疫细胞中的信号传导路径相关。

[0363] 在一些情况下,多特异性5T4结合多肽可进一步含有Fc域,诸如上述任一者。在一些实施例中,本文提供的多特异性5T4结合多肽包含至少一个结合5T4的VHH域、至少一个结

合第二抗原或蛋白质的额外结合域和Fc域。在一些实施例中,Fc域介导多特异性5T4结合多肽在生理条件下的二聚以便形成使5T4和额外抗原或蛋白质的结合位点的数量加倍的二聚体。

[0364] 下文描述非限制性示例性多特异性5T4结合多肽。

[0365] 1.双特异性T细胞接合分子

[0366] 在一些实施例中,5T4结合多肽为一种双特异性构建体,其为或包含至少一个本文提供的5T4 VHH域和至少一个能够结合至T细胞上表达的表面分子的额外结合分子。在一些实施例中,表面分子为T细胞活化组分,诸如T细胞受体复合物的组分。在特定方面中,表面分子为在T细胞上表达且能够在与抗原结合分子相互作用时诱发T细胞活化的活化T细胞抗原。例如在一些方面中,抗原结合分子与活化T细胞抗原的相互作用可通过触发T细胞受体复合物的信号级联来诱发T细胞活化。已知适于测量T细胞活化的分析,且包括任何测量或评估增生、分化、细胞因子分泌、细胞毒活性和/或一或多种活化标记物表达的分析。在一些实施例中,此类5T4结合多肽与其两个靶点,在靶细胞上表达的5T4和在T细胞上表达的T细胞分子,例如活化T细胞抗原的同时或几乎同时结合可引起靶细胞与T细胞之间暂时相互作用,借此引起T细胞活化,例如细胞毒活性,且随后使靶细胞溶解。

[0367] 在一些实施例中,诸如活化T细胞抗原的T表面分子为CD3或为CD2。具体而言,所提供的双特异性5T4结合多肽能够特异性结合在人类T细胞上表达的活化T细胞抗原,诸如人类CD3或人类CD3。在特定方面中,特异性针对活化T细胞抗原(例如CD3或CD2)的额外域为抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,5T4结合多肽可为双特异性抗体T细胞接合分子,其含有至少一个特异性结合至5T4的5T4 VHH域和额外结合分子,该额外结合分子为对T细胞的活化组分(例如T细胞表面分子,例如CD3或CD2)具有特异性的抗体或抗原结合片段。

[0368] 双特异性抗体T细胞接合分子尤其为双特异性T细胞接合分子(BiTE),其含有通过可挠性接头融合的串联scFv分子(参见例如Nagorsen和Bauerle,Exp Cell Res 317,1255-1260(2011)、经由例如可挠性接头彼此融合的串联scFv分子且进一步含有由能够稳定缔合的第一和第二次单元构成的Fc域(WO2013026837);双功能抗体及其衍生物,包括串联双功能抗体(Holliger等人,Prot Eng 9,299-305(1996);Kipriyanov等人,J Mol Biol 293,41-66(1999));双重亲和力再靶向(DART)分子,其可包括具有C端二硫桥键的双功能抗体形式;或特瑞单抗(triomab),其包括完全杂交小鼠/大鼠IgG分子(Seimetz等人,Cancer Treat Rev 36,458-467(2010))。可使用本文提供的5T4VHH结构域中的任一者产生任一以上分子的类似形式。

[0369] 在一些实施例中,特异性针对活化T细胞抗原的额外结合域为选自Fab片段、F(ab')$_2$片段、Fv片段、scFv、经二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、scAb、dAb、单域重链抗体(VHH)或单域轻链抗体的抗原结合片段。在一些实施例中,额外结合域就结合活化T细胞抗原(诸如CD2或CD3)而言为单价的。

[0370] 在一些实施例中,额外结合域能够结合至CD3或CD3复合物。CD3复合物为成熟T淋巴细胞中彼此和与T细胞受体非共价缔合的至少五个膜结合多肽的复合物。CD3复合物包括γ、δ、ε、ζ和η链(亦称为亚基)。在一些实施例中,额外结合分子为能够特异性结合至CD3或CD3复合物的抗体或抗原结合片段,亦称为CD3结合域。在一些实施例中,能够结合CD3或CD3复合物的CD3结合域包括抗CD3 Fab片段、抗CD3 F(ab')$_2$片段、抗CD3 Fv片段、抗CD3scFv、

抗CD3 dsFv、抗CD3 scAb、抗CD3 dAb、抗CD3单域重链抗体(VHH)和抗CD3单域轻链抗体的一或多个复本。在一些实施例中,抗CD3结合域就结合CD3而言为单价的。

[0371] 在一些情况下,CD3结合域识别CD3ε链。在一些实施例中,抗CD3ε结合域包括抗CD3εFab片段、抗CD3εF(ab')$_2$片段、抗CD3εFv片段、抗CD3εscFv、抗CD3εdsFv、抗CD3εscAb、抗CD3εdAb、抗CD3ε单域重链抗体(VHH)和抗CD3ε单域轻链抗体的一或多个复本。在一些实施例中,抗CD3ε结合域就结合CD3ε而言为单价的。

[0372] 示例性的针对CD3或CD3复合物的单克隆抗体包括(但不限于)OKT3、SP34、UCHT1或64.1或其抗原结合片段(参见例如June,等人,J.Immunol.136:3945-3952(1986);Yang,等人,J.Immunol.137:1097-1100(1986);和Hayward,等人,Immunol.64:87-92(1988))。在一些方面中,例如通过固定或定位于细胞或系栓的抗CD3抗体使CD3丛集在T细胞上引起T细胞活化,类似于T细胞受体的啮合,但与其克隆为典型特异性无关。在一个实施例中,CD3结合域单价且特异性结合CD3抗原,且来源于OKT3(ORTHOCLONE-OKT3™(莫罗莫那(muromonab)-CD3);人源化OKT3(美国专利第7,635,475号和公开的国际申请案第WO2005040220号);SP34(Pessano等人The EMBO Journal.4:337-344,1985);SP34的人源化变体(WO2015001085);Teplizumab™(MGA031,Eli Lilly);US2011/0275787中所述的抗CD3结合分子;UCHT1(Pollard等人1987J Histochem Cytochem.35(11):1329-38;WO2000041474);NI0401(WO2007/033230);维西珠单抗(visilizumab)(美国专利第5,834,597号);BC-3(Anasetti等人,Transplantation54:844(1992);H2C(描述于PCT公开案第WO2008/119567号中);V9(描述于Rodrigues等人,Int J Cancer增刊7,45-50(1992)和美国专利第6,054,297号中))。其他抗CD3抗体亦可用于本文提供的构建体中,包括以下中所述的任一种:国际公开PCT申请案第WO199404679号、第WO2008119567号、第WO2015095392号、第WO2016204966号、第WO2019133761号;公开专利申请案第US20170369563号、第US20180194842号、第US20180355038号;美国专利第7,728,114号、第7,381,803号、第7,994,289号。

[0373] 在一些实施例中,CD3结合域含有SEQ ID NO:19中所示的可变重链(VH)和/或SEQ ID NO:20中所示的可变轻链,或与这些序列具有至少60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%一致性的VH和/或VL序列,且特异性结合CD3。在一些实施例中,CD3结合域含有SEQ ID NO:19中所示的可变重链(VH)的CDRH1、CDRH2和CDRH3和SEQ ID NO:20中所示的可变轻链的CDRL1、CDRL2和CDRL3。在一些情况下,CD3结合区包含SEQ ID NO:19中所示的VH序列的人源化型式和SEQ ID NO:20中所示的VL序列的人源化型式。在一些实施例中,CD3结合区可含有SEQ ID NO 21、22、23中的任一者中所示的人源化OKT3来源VH域序列和/或SEQ ID NO 24、25、26中的任一者中所示的VL域序列,或与这些序列具有至少60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%一致性的VH和/或VL序列,且特异性结合CD3。在一些实施例中,CD3结合域为Fab、scFv、Fv或dsFv,其含有以上VH和VL序列的任何组合,尤其SEQ ID NO:21、22、23中的任一者中所示的VH序列与SEQ ID NO:24、25、26中的任一者中所示的VL序列的任何组合。在一些实施例中,抗CD3ε结合域包括至少包括氨基酸序列TYAMN(SEQ ID NO:29)的VH CDR1序列;至少包括氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:30)的VH CDR2序列;至少包括氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:31)的VH CDR3序列;至少包括氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:32)的VL CDR1序列;至少包括氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:33)的VL CDR2序列;和至少包括氨基酸序列ALWYSNLWV(SEQ ID NO:34)的VL CDR3序列。

在一些实施例中,CD3结合域为Fab、scFv、Fv或dsFv,其含有至少包括氨基酸序列TYAMN(SEQ ID NO:29)的VH CDR1序列;至少包括氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:30)的VH CDR2序列;至少包括氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:31)的VH CDR3序列;至少包括氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:32)的VL CDR1序列;至少包括氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:33)的VL CDR2序列;和至少包括氨基酸序列ALWYSNLWV(SEQ ID NO:34)的VL CDR3序列。

[0374] 在一些实施例中,CD3结合域含有SEQ ID NO:27中所示的可变重链(VH)和/或SEQ ID NO:28中所示的可变轻链,或与这些序列具有至少60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%一致性的VH和/或VL序列,且特异性结合至CD3。在一些实施例中,CD3结合域含有SEQ ID NO:27中所示的可变重链(VH)的CDRH1、CDRH2和CDRH3和SEQ ID NO:28中所示的可变轻链的CDRL1、CDRL2和CDRL3。在一些实施例中,CD3结合域含有SEQ ID NO:29、30和31中分别所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3和SEQ ID NO:32、33和34中分别所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3可变轻链。在一些情况下,CD3结合区包含SEQ ID NO:27中所示的VH序列的人源化型式和SEQ ID NO:28中所示的VL序列的人源化型式。在一些实施例中,CD3结合区可含有SEQ ID NO 27、35-65、341、343或358中的任一者中所示的人源化VH域序列和/或SEQ ID NO:28、66-84、293、340或342中的任一者中所示的VL域序列,或与这些序列具有至少60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%一致性的VH和/或VL序列,且特异性结合至CD3。在一些实施例中,CD3结合区可含有SEQ ID NO 27、35-65、341、343、358、388、389、392、393中的任一者中所示的人源化VH域序列和/或SEQ ID NO:28、66-84、293、340、342、390、391、394、395中的任一者中所示的VL域序列,或与这些序列具有至少60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%一致性的VH和/或VL序列,且特异性结合至CD3。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的可变重链(VH)和包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的可变轻链(VL)。

[0375] 在一些实施例中,CD3结合域为Fab、scFv、Fv或dsFv,其含有以上VH和VL序列的任何组合,尤其SEQ ID NO:27、35-65、341、343或358中的任一者中所示的VH序列与SEQ ID NO:28、66-84、293、340或342中的任一者中所示的VL序列的任何组合。在一些实施例中,抗CD3结合域为Fab、scFv、Fv或dsFv,其含有包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的可变重链(VH)和包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的可变轻链(VL)。

[0376] 在一些实施例中,CD3结合域含有SEQ ID NO:388、389、392或393中的任一者中所示的可变重链(VH)。在一些实施例中,CD3结合域含有SEQ ID NO:390、391、394或395中的任一者中所示的可变轻链(VL)。

[0377] 所提供的双特异性构建体可格式化成含有至少一个5T4 VHH域和至少一个特异性针对活化T细胞抗原的额外域(诸如CD3结合域)的大量形式中的任一种。

[0378] 在一个实施例中,双特异性构建体为双特异性单域抗体连接Fab(S-Fab),其含有直接或间接地连接至特异性针对T细胞活化抗原(例如CD3)的Fab抗原结合片段(诸如抗CD3 Fab)的至少一个所述5T4 VHH域。针对T细胞活化抗原的Fab,例如抗CD3 Fab,可含有所述VH和VL序列中的任一者。在一些实施例中,5T4 VHH域连接至抗CD3 Fab的VH或VL链的C端。在一些实施例中,S-Fab可进一步加以修饰,诸如通过与聚乙二醇(PEG)、N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA)共聚物、蛋白质(诸如白蛋白)、聚麸胺酸结合或血浆半衰期延长(Pan等人,

(2018)International Jounral of Nanomedicine,2018:3189-3201)。

[0379] 在另一个实施例中,双特异性构建体为scFv-单域抗体,其中构建体含有直接或间接地连接至scFv的至少一个所述5T4 VHH,该scFv含有特异性针对T细胞活化抗原(例如CD3)的抗原结合域的VH和VL。针对T细胞活化抗原的scFv,例如抗CD3 scFv,可含有所述VH和VL序列中的任一者。在一些实施例中,VHH域和scFv通过接头,诸如肽接头连接。在一些实施例中,肽接头可为如本文所述的肽接头。在一些实施例中,VHH域和scFv各自连接至Fc区,诸如Fc区的N端,视情况经由铰链区或接头(例如肽接头)连接。Fc区可为本文所述的任一者,诸如人类Fc区或其变体,例如人类IgG1 Fc区或其变体。在特定实施例中,Fc区为由变体型Fc域(例如变体型人类IgG1域)形成,所述Fc域发生突变或经修饰以促进异源二聚化,其中不同多肽可二聚而产生异源二聚体。

[0380] 在另一实施例中,CD3结合域为单域抗体,诸如特异性结合至CD3的VHH域。单域抗体(包括结合至CD3的VHH域)已为人所知,参见例如公开的美国专利申请案第US20160280795号。在一些实施例中,CD3结合域为SEQ ID NO:85中所示的抗CD3 VHH;或展现出与SEQ ID NO:85至少60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%一致性的序列,且特异性结合至CD3。在此类方面中,本文提供的双特异性构建体可包括至少一个5T4 VHH域和至少一个CD3 VHH域。为将构建体格式化,在一些情况下,各VHH域连接至Fc区,诸如Fc区的N端,视情况经由铰链区或接头(例如肽接头)连接。Fc区可为本文所述的任一者,诸如人类Fc区或其变体,例如人类IgG1 Fc区或其变体。在特定实施例中,Fc区为由变体型Fc域(例如变体型人类IgG1域)形成,所述Fc域发生突变或经修饰以促进异源二聚化,其中不同多肽可二聚而产生异源二聚体。

[0381] 在上述实施例中,为促进异源二聚而对Fc区进行的例示性修饰已为人所知,包括如下文所述的任一者,例如表3。在一些实施例中,异源二聚体Fc中的一种Fc多肽包含SEQ ID NO:328(例如SEQ ID NO:103或107)、334(例如SEQ ID NO:115或117)中的任一者中所述的氨基酸序列,且异源二聚体Fc中的另一种Fc多肽含有SEQ ID NO:329(例如SEQ ID NO:104或108)、332(例如SEQ ID NO:111或113)、336(例如SEQ ID NO:119或121)中的任一者中所述的氨基酸序列。在一些实施例中,异源二聚体Fc中的一种Fc多肽包含SEQ ID NO:330(例如SEQ ID NO:105或109)、335(例如SEQ ID NO:116或118)中的任一者中所述的氨基酸序列,且异源二聚体Fc中的另一种Fc多肽包含SEQ ID NO:331(例如SEQ ID NO:106或110)、333(例如SEQ ID NO:112或114)、337(SEQ ID NO:120或122)中的任一者中所述的氨基酸序列。

[0382] 2.限制性CD3多特异性构建体

[0383] 在一些实施例中,5T4结合多肽为一种多特异性多肽构建体,其为限制性T细胞接合融合蛋白。在特定方面中,本文提供的限制性多特异性构建体结合诸如CD3的活化T细胞抗原和5T4。本文提供的限制性多特异性多肽构建体至少包括:包括免疫球蛋白Fc区的第一组分;包括至少结合CD3的结合域的一或多个复本的第二组分(在本文中称为抗CD3结合域或CD3结合域,所述为在本文中可互换使用的术语);和接合第一组分与第二组分的接头,诸如多肽接头。在所提供的多特异性多肽构建体中,第一和第二组分中的一或两者含有至少一个5T4 VHH域,该5T4 VHH域在结合至抗原时进行啮合,致使限制性CD3结合区实质上能够结合CD3。图3A至图3E描绘限制性多特异性构建体的示例性形式。

[0384] 在一些实施例中,就结合CD3和随后活化T细胞的能力而言,本文提供的限制性多特异性多肽构建体呈两种状态存在:(1)当任一或所有抗原结合域均不结合至5T4,使得CD3结合受限且避免或减少T细胞相互作用时,出现“非活性”状态;和(2)在任一或所有抗原结合域结合抗原,使得CD3结合区能够结合CD3且允许T细胞相互作用时,出现“活性”状态。

[0385] 在一些实施例中,Fc区经由接头连接于CD3结合域。在一些实施例中,Fc区经由不可裂解接头连接于CD3结合区。在一些实施例中,Fc区经由可裂解接头或其他方面不稳定的接头连接于CD3结合区。在一些实施例中,可裂解接头为可在蛋白酶存在下特异性裂解的接头。在一些方面中,在可裂解接头裂解后CD3结合得到增强。在一些此类方面中,“活性”状态可经由若干机制进一步扩增,所述机制包括经由使接合CD3结合区与Fc区的接头裂解。在一些实施例中,可裂解接头为含有蛋白酶基质识别位点的接头。在一些实施例中,在Fc区和CD3结合区通过可裂解接头连接的情况下,在接头内裂解可增强CD3结合。

[0386] 此外,在Fc区和CD3结合区通过可裂解接头可操作地连接的方面中,Fc区与CD3结合区之间的接头裂解可将限制性多特异性多肽构建体分成第一组分和第二组分。视限制性多特异性多肽构建体的组成而定,第一组分和第二组分可具有不同功能。在一些实施例中,Fc区为展现一或多种效应功能,诸如ADCC、CDC或ADCP功能的区域。在这些实施例中,本发明的限制性多特异性多肽构建体可用于产生自扩增系统。举例而言,在一些方面中,在Fc与CD3结合域的组分之间并入蛋白酶可裂解接头通过使CD3结合域完全暴露而能够扩增T细胞活化能力。视所包括的特定接头而定,扩增步骤可由肿瘤相关蛋白酶或通过抗原依赖性T细胞活化后释放的颗粒酶介导。若包括肿瘤蛋白酶可裂解接头,则扩增通过肿瘤或肿瘤微环境介导。而若包括颗粒酶B可裂解接头,则扩增可在抗原依赖性活化后通过T细胞自我介导。此外,在构建体中包括能够实现效应的Fc的情况下,扩增可通过自经由ADCC机制出现的NK细胞释放的颗粒酶介导。

[0387] 所提供的限制性多特异性多肽构建体包括一种构型,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端。在此类实施例中,第一组分和第二组分经由在Fc区的末端C端的接头接合。在一些实施例中,至少一个5T4VHH域位于多特异性多肽构建体的氨基端(N端)区域上。在一些实施例中,至少一个5T4 VHH域位于多特异性多肽构建体的羧基端(C端)区域上。在一些实施例中,限制性多特异性多肽构建体含有至少两个位于多特异性多肽构建体的N端和C端区域上的5T4 VHH结构域。

[0388] 在一些实施例中,限制性多特异性多肽构建体为二聚体,其中二聚为由两个多肽链之间的共价或非共价相互作用形成。在一些实施例中,两个多肽链通过例如链间二硫键共价键结于彼此。在一些实施例中,Fc区介导经由链间二硫键的二聚。在特定实施例中,限制性多特异性多肽构建体含有异源二聚体Fc区,其中在一些情况下,多特异性多肽构建体的多肽链为不同(异源二聚体)的。在异源二聚体多特异性多肽构建体的特定实施例中,CD3结合区为含有VH和VL链的双链多肽,诸如含有VH和VL的Fv抗体片段。在一些实施例中,Fv抗体片段包括经二硫键稳定的抗CD3结合Fv片段(dsFv)。

[0389] 在特定实施例中,Fv为经二硫键稳定的Fv片段(dsFv),其中V_H-V_L异源二聚体通过链间二硫键稳定化。在一些实施例中,链间二硫键通过使VH和/或VL链的构架位置中的位置发生突变而进行工程改造。在一些实施例中,VH链含有突变G44C且VL链含有突变G100C,各依据kabat编号。在一些实施例中,依据Kabat编号,经二硫键稳定的抗CD3 Fv包含在位置

105处突变为Cys的抗CD3 VH和在位置43处突变为Cys的抗CD3 VL。

[0390] 在一些实施例中,限制性多特异性多肽构建体为由两种多肽形成或包括两种多肽,包括第一多肽,该第一多肽包含异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头(例如可裂解或不可裂解接头)、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv)的VH域;和第二多肽,该第二多肽包含异源二聚体Fc区的第二Fc多肽、接头(例如可裂解或不可裂解接头)、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv)的VL域。在一些实施例中,第一多肽含有一或两个结合至5T4的VHH域。在一些实施例中,第二多肽含有一或两个结合至5T4的VHH域。在一些实施例中,限制性多特异性多肽构建体含有至少两个5T4 VHH域。在一些情况下,至少一个5T4VHH域位于Fc多肽N端,且至少一个5T4 VHH域位于CD3结合区的链的C端。

[0391] 在一些实施例中,第一多肽或第二多肽或第一多肽与第二多肽两者进一步包括结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。在一些实施例中,第一和/或第二多肽的CRBR可位于Fc多肽N端和/或CD3结合区的链的C端。

[0392] 在一些实施例中,限制性多特异性多肽构建体含有至少两个结合5T4的VHH域和至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。在一些实施例中,限制性多特异性多肽构建体含有:(1)第一多肽,该第一多肽按N端至C端次序包含:第一5T4 VHH域、异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头(例如可裂解或不可裂解接头)、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv或dsFv)的链(例如VH或VL)和第二5T4 VHH域;以及(2)第二多肽,该第二多肽按N端至C端次序包含:异源二聚体Fc区的第二Fc多肽、相同接头(例如相同可裂解接头)、抗CD3抗体或抗原结合片段的另一链(VH或VL的另一链)和结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。

[0393] 在一些实施例中,第一多肽或第二多肽或第一多肽与第二多肽两者进一步包括结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)。在一些实施例中,第一多肽和/或第二多肽的IRBR可位于Fc多肽N端和/或CD3结合区的链的C端。

[0394] 在一些实施例中,限制性多特异性多肽构建体含有至少两个结合5T4的VHH域和至少一个结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)。在一些实施例中,限制性多特异性多肽构建体含有:(1)第一多肽,该第一多肽按N端至C端次序包含:第一5T4 VHH域、异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头(例如可裂解或不可裂解接头)、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv或dsFv)的链(例如VH或VL)和第二5T4 VHH域;以及(2)第二多肽,该第二多肽按N端至C端次序包含:异源二聚体Fc区的第二Fc多肽、相同接头(例如相同可裂解或不可裂解接头)、抗CD3抗体或抗原结合片段的另一链(VH或VL的另一链)和结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)。

[0395] 在一些实施例中,第一多肽或第二多肽中的至少一者进一步包括结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR),且第一多肽或第二多肽中的至少一者进一步包括结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)。在一些实施例中,第一和/或第二多肽的CRBR可位于Fc多肽N端和/或CD3结合区的链的C端。在一些实施例中,第一多肽和/或第二多肽的IRBR可位于Fc多肽N端和/或CD3结合区的链的C端。

[0396] 在一些实施例中,限制性多特异性多肽构建体含有至少两个结合5T4的VHH域、结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)和结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)。在一些实施例中,限制性多特异性多肽构建体含有:(1)第一多肽,该第一多肽按N端至C端

次序包含:第一5T4 VHH域、异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头(例如可裂解接头)、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv或dsFv)的链(例如VH或VL)和第二5T4 VHH域;以及(2)第二多肽,该第二多肽按N端至C端次序包含:IRBR或CRBR中的一者、异源二聚体Fc区的第二Fc多肽、相同接头(例如相同可裂解接头)、抗CD3抗体或抗原结合片段的另一链(VH或VL的另一链)和IRBR或CRBR中的另一者。

[0397] 在下文更详细地描述本发明的多特异性多肽构建体的各组分。

[0398] a.5T4 VHH抗原结合域

[0399] 本发明的限制性多特异性多肽构建体包括至少一个来自本文提供的任一者的5T4 VHH域。在一些实施例中,5T4 VHH域包含SEQ ID NO:245-287、294-295、302中的任一者中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,5T4 VHH域包含SEQ ID NO:245-287、294-295、302、360中的任一者中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,5T4 VHH域包含SEQ ID NO:360中所示的氨基酸序列。

[0400] 在特定实施例中,限制性多特异性多肽构建体含有至少两个5T4域。在一些情况下,至少一个5T4 VHH域相对于异源二聚体Fc的Fc多肽位于氨基端,且至少一个5T4 VHH域相对于CD3结合区的VH或VL链位于羧基端。

[0401] 在含有至少两个或含有两个5T4 VHH域的限制性多特异性多肽构建体的方面中,各5T4 VHH域可结合至5T4上相同或重叠的抗原决定基。

[0402] 在含有至少两个或含有两个5T4 VHH域的限制性多特异性多肽构建体的方面中,各5T4 VHH域可结合至5T4上不同或非重叠的抗原决定基。在一些实施例中,第一5T4 sdAb和第二5T4 sdAb结合5T4的不同或非重叠的抗原决定基和/或不竞争结合至5T4。

[0403] 在一些实施例中,5T4 VHH不与小鼠5T4抗原交叉反应。在一些实施例中,包含SEQ ID NO:245中所示的氨基酸序列的5T4 VHH或其人源化变体不与小鼠5T4抗原交叉反应。在一些实施例中,包含SEQ ID NO:255中所示的氨基酸序列的5T4 VHH或其人源化变体不与小鼠5T4抗原交叉反应。在一些实施例中,包含SEQ ID NO:276中所示的氨基酸序列的5T4 VHH或其人源化变体不与小鼠5T4抗原交叉反应。

[0404] 在一些实施例中,第一sdAb包含SEQ ID NO:245-254、295、302、360中的任一者所示的氨基酸序列、其人源化变体;或展现出与SEQ ID NO:245-254、295、302、360中的任一者有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列;且第二sdAb包含SEQ ID NO:255-287、294、302中的任一者所示的氨基酸序列、其人源化变体;或展现出与SEQ ID NO:255-287、294中的任一者有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0405] 在一些实施例中,第一sdAb(第一5T4 VHH域)包含SEQ ID NO:245中所示的氨基酸序列或SEQ ID NO:246-254、295或302中的任一者中所示的人源化变体;且第二sdAb(第二5T4 VHH域)包含SEQ ID NO:255中所示的氨基酸序列或SEQ ID NO:256-275、SEQ ID NO:276中的任一者中所示的人源化变体或SEQ ID NO:277-287、294或302中的任一者中所示的人源化变体。

[0406] 在一些实施例中,第一sdAb(第一5T4 VHH域)包含SEQ ID NO:245中所示的氨基酸序列或SEQ ID NO:246-254、295、302或360中的任一者中所示的人源化变体;且第二sdAb

(第二5T4 VHH域)包含SEQ ID NO:255中所示的氨基酸序列或SEQ ID NO:256-275、SEQ ID NO:276中的任一者中所示的人源化变体或SEQ ID NO:277-287、294或302中的任一者中所示的人源化变体。

[0407] 在一些实施例中,第一sdAb(第一5T4 VHH域)和第二sdAb(第二5T4VHH域)具有SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:294中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,第一sdAb(第一5T4 VHH域)和第二sdAb(第二5T4 VHH域)具有SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:276中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,第一sdAb(第一5T4 VHH域)和第二sdAb(第二5T4 VHH域)具有SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:255中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,第一sdAb(第一5T4 VHH域)和第二sdAb(第二5T4 VHH域)具有SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:295中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,第一sdAb(第一5T4 VHH域)和第二sdAb(第二5T4 VHH域)具有SEQ ID NO:295和SEQ ID NO:294中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,第一sdAb(第一5T4 VHH域)和第二sdAb(第二5T4 VHH域)具有SEQ ID NO:249和SEQ ID NO:270中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,第一sdAb(第一5T4 VHH域)和第二sdAb(第二5T4 VHH域)具有SEQ ID NO:254和SEQ ID NO:287中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,第一sdAb(第一5T4 VHH域)和第二sdAb(第二5T4 VHH域)具有SEQ ID NO:302和SEQ ID NO:302中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,第一sdAb(第一5T4 VHH域)和第二sdAb(第二5T4 VHH域)具有SEQ ID NO:360和SEQ ID NO:287中所示的氨基酸序列。

[0408] 在一些实施例中,限制性多特异性多肽构建体含有至少一个5T4 VHH结构域,诸如本文提供的任一者,和特异性针对另一肿瘤相关抗原(TAA)的至少一种其他抗原结合域。在一些实施例中,至少一种其他抗原结合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复本:Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、scFv、scAb、dAb、单域重链抗体和单域轻链抗体。在特定实施例中,其他TAA抗原结合域为单链抗体。在一些实施例中,单链为scFv、scAb、单域重链抗体或单域轻链抗体。例如在一些情况下,其他TAA抗原结合域包括一或多个单域抗体(sdAb)片段,例如V_HH、V_{NAR}、经工程改造的V_H或V_K结构域。V_HH可由天然骆驼科单独重链抗体产生,由产生单独重链抗体的经基因修饰的啮齿动物产生,由或初始/合成骆驼科或人源化骆驼科单域抗体文库产生。V_{NAR}可由软骨鱼单独重链抗体产生。已执行各种方法以利用常规异源二聚体V_H和V_K域产生单体sdAb,包括特定生殖为家族的界面工程改造和选择。

[0409] 在一些实施例中,其他TAA为选自由以下组成的组:1-92-LFA-3、α-4整合素、α-V整合素、α4β1整合素、α4β7整合素、AGR2、抗Lewis-Y、Apelin J受体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5补体、C-242、CA9、CA19-9、(Lewis 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)、CLAUDIN-3、CLAUDIN-4、cMet、胶原蛋白、畸胎瘤衍化生长因子(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 F蛋白、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、叶酸受体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、锯齿状配位体、锯齿状1、锯齿状2、KISS1-R、LAG-3、LIF-R、Lewis X、LIGHT、LRP4、LRRC26、Ly6G6D、LyPD1、MCSP、间皮素、MRP4、MUC1、黏蛋白-16(MUC16、CA-125)、Na/K ATPase、NGF、呆蛋白、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、神经鞘氨醇1磷酸酯、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、转铁蛋白、转铁蛋白受体、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。

[0410] 在一些实施例中,诸如5T4 VHH域的抗原结合域直接或间接地经由接头连接至Fc区和/或CD3结合区。在一些实施例中,连接为经由接头。在一些实施例中,接头为连接肽(LP),其可包括所述任何可挠性或刚性接头。在一些实施例中,接头为选自由以下组成的组:GGSGGS,亦即$(GGS)_2$(SEQ ID NO:1);GGSGGSGGS,亦即$(GGS)_3$(SEQ ID NO:2);GGSGGSGGSGGS,亦即$(GGS)_4$(SEQ ID NO:3);和GGSGGSGGSGGSGGS,亦即$(GGS)_5$(SEQ ID NO:4)。在一些实施例中,接头为包含甘氨酸残基的可挠性接头,诸如借助于非限制性实施例GG、GGG、GGGG(SEQ ID NO:5)、GGGGG(SEQ ID NO:6)和GGGGGG(SEQ ID NO:7)。在一些实施例中,接头为(GGGGS)n,其中n为1至5(SEQ ID NO:123);(GGGGGS)n,其中n为1至4(SEQ ID NO:124);GGGGS(SEQ ID NO:125);GGGGGS(SEQ ID NO:126);GGGGGSGGGGGSGGGGGS(SEQ ID NO:127);GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:128);GGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:129);或PGGGG(SEQ ID NO:327)。在一些实施例中,接头包括GS接头与甘氨酸接头的组合。

[0411] b.Fc区

[0412] 限制性多特异性多肽构建体包括免疫球蛋白Fc区。一般而言,限制性多特异性多肽构建体为由各含有Fc的多肽所形成的二聚体。Fc多肽可为如上文所述的任何多肽。在特定实施例中,Fc区为由Fc域形成,所述Fc域发生突变或经修饰以促进异源二聚化,其中不同多肽可二聚而产生异源二聚体。因此,在一些实施例中,二聚体为异源二聚体,其中多特异性多肽构建体的两个多肽链不同。

[0413] 用于促进互补Fc多肽异源二聚化的多种方法已为人所知,参见例如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申请案第WO 1998/050431号、第WO2009/089004号、第WO2011143545号、第WO 2014/067011号、第WO2012/058768号、第WO2018027025号;公开的美国专利申请案第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。促进Fc链异源二聚化的方法包括Fc区诱

变，诸如通过纳入一组“杵-臼”突变或纳入对Fc实现有利于不同多肽链间的吸引性相互作用的静电操纵的突变。举例而言，在一些实施例中，异源二聚体中的Fc多肽包括改变整个Fc二聚体界面的电荷极性的突变，使得静电匹配的Fc链的共表达支持有利的吸引性相互作用，借此促进所要的Fc异源二聚体形成，而不利的排斥电荷相互作用抑制非所需的Fc同源二聚体形成(Guneskaran等人(2010)JBC,285:19637-19646)。当在细胞中共表达时，链之间可能会结合，但链因电荷排斥力而基本上不会发生自身结合。用于产生异二聚体Fc的其他策略包括将人类IgG与IgA CH3域链段混合以产生互补的CH3异源二聚体，称为SEED Fc。

[0414] 异源二聚方法和变体亦包括已公开的国际PCT申请案WO2014/145806中所述的方法和变体，包括“杵与臼”突变(亦称为“偏斜”变体)、与“静电操纵”或“电荷对”有关的突变和pI变体。异源二聚变体亦包括如美国公开申请案第US2012/0149876号或第US2018/011883号中所述的任何变体。

[0415] 在一些实施例中，为促进异源二聚化，Fc异源二聚体的两种多肽均含有成对或互补的氨基酸修饰。Fc融合体中的多肽的例示性成对氨基酸修饰阐述于表3中。

[0416]

表3：异源二聚体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

[0417] 在一些实施例中，修饰包括将隆凸(杵)引入第一Fc多肽中和将空腔(臼)引入第二Fc多肽中，使得隆凸可定位于空腔中以促进第一与第二含Fc多肽复合。作为置换和/或修饰的目标以在多肽中产生隆凸或空腔的氨基酸典型地为界面氨基酸，所述界面氨基酸与第二多肽的界面中的一或多个氨基酸相互作用或接触。

[0418] 在一些实施例中，经修饰以含有隆凸(杵)氨基酸的第一Fc多肽包括原生或原始氨基酸置换为具有至少一个侧链的氨基酸，该至少一个侧链自第一Fc多肽的界面突起且因此可定位于相邻的第二多肽界面的补偿性空腔(臼)中。置换氨基酸最常为侧链体积大于原始氨基酸残基的氨基酸。本领域技术人员知晓如何测定和/或评估氨基酸残基的特性以鉴别出作为产生隆凸的理想置换氨基酸的那些氨基酸。在一些实施例中，用于形成隆凸的置换残基为天然存在的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)。在一些实施例中，鉴别用于置换的原始残基为具有小侧链的氨基酸残基，诸如丙氨酸、

天冬酰氨、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或缬氨酸。

[0419] 在一些实施例中，经修饰以含有空腔(臼)的第二Fc多肽为包括原生或原始氨基酸置换为具有至少一条侧链的氨基酸的Fc多肽，该至少一个侧链自第二多肽界面凹入且从而能够容纳来自第一多肽界面的相应隆凸。置换氨基酸最常为侧链体积小于原始氨基酸残基的氨基酸。本领域技术人员知晓如何测定和/或评估氨基酸残基的特性以鉴别出作为用于形成空腔的理想置换残基的那些残基。一般而言，用于形成空腔的置换残基为天然存在的氨基酸且包括例如丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)。在一些实施例中，经鉴别用于置换的原始氨基酸为具有大侧链的氨基酸，诸如酪氨酸、精氨酸、苯丙氨酸或色氨酸。

[0420] 人类IgG1的CH3界面例如涉及位于四个反向平行β股的各域上的十六个残基，各域的各表面隐藏着1090Å2(参见例如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)。修饰CH3域以产生隆凸或空腔描述于例如美国专利第5,731,168号;国际专利申请案WO98/50431和WO 2005/063816;和Ridgway等人，(1996)Prot.Engin.,9:617-621中。在一些实施例中，修饰CH3域以产生隆凸或空腔典型地以位于两个中心反向平行β股上的残基为目标。目的为将所产生的隆凸通过伸入周围溶剂中而可容纳而非被搭配物CH3域中的补偿性空腔容纳的风险降至最低。

[0421] 举例而言，在一些实施例中，异源二聚体Fc包括具有位于Thr366的CH3域内的氨基酸修饰的多肽，该氨基酸修饰当置换为较大体积的氨基酸(例如Try(T366W))时，能够优先与第二CH3域成对，该第二CH3域分别在位置Thr366、Leu368和Tyr407具有体积较小氨基酸(例如Ser、Ala和Val)的氨基酸修饰(T366S/L368A/Y407V)。经由CH3修饰达成的异源二聚可进一步通过引入二硫键稳定化，例如通过将对置CH3域上的Ser354改变成Cys(S354C)和Tyr349改变成Cys(Y349C)(回顾于Carter,2001Journal of Immunological Methods,248:7-15)。

[0422] 在特定实施例中，多特异性多肽构建体含有能够介导Fc异源二聚化的第一与第二Fc，含有具有突变T366W和S354C的第一Fc多肽和具有突变T366S、L368A、Y407V和Y349C的第二Fc多肽。在一些实施例中，第一Fc多肽为选自包含SEQ ID NO:328或334中所示的序列的Fc多肽且第二Fc多肽为选自包含SEQ ID NO:329、332或336中所示的序列的Fc多肽。在一些实施例中，第一Fc多肽为或包含SEQ ID NO:103、107、115或117中的任一者中所示的氨基酸序列，且第二Fc多肽为或包含SEQ ID NO:104、108、111、113、119或121中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0423] 在一些实施例中，Fc多肽展现得到Fc介导性效应功能的特征。在特定实施例中，第一Fc多肽为或包含SEQ ID NO:328中所示的序列且第二Fc多肽为或包含SEQ ID NO:329或332。在一些实施例中，第一Fc多肽为或包含SEQ ID NO:103中所示的序列且第二Fc多肽为或包含SEQ ID NO:104或111中所示的序列。在一些实施例中，第一Fc多肽为或包含SEQ ID NO:107中所示的序列且第二Fc多肽为或包含SEQ ID NO:108或113中所示的序列。第一与第二Fc多肽可在构建体的任一多肽链上格式化。

[0424] 在一些实施例中，第一与第二Fc多肽中的一或两者可进一步包括一或多个氨基酸突变以进一步减少一或多种Fc效应功能，诸如减少Fc受体结合。减少Fc效应功能的例示性

突变包括如所述的任何突变。在一些实施例中，修饰可为一或多个位置Glu233(E233)、Leu234(L234)或Leu235(L235)的缺失，诸如氨基酸Glu233(E233)、Leu234(L234)和Leu235(L235)的缺失。在一些实施例中，第一Fc多肽为选自包含SEQ ID NO:330或335中所示的序列的Fc多肽且第二Fc多肽为选自包含SEQ ID NO:331、333或337中所示的序列的Fc多肽。在一些实施例中，第一Fc多肽为或包含SEQ ID NO:105、109、116或118中的任一者中所示的氨基酸序列，且第二Fc多肽为或包含SEQ ID NO:106、110、112、114、120或122中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0425] 在特定实施例中，第一Fc多肽为或包含SEQ ID NO:330中所示的序列且第二Fc多肽为或包含SEQ ID NO:331或333。在一些实施例中，第一Fc多肽为或包含SEQ ID NO:105中所示的序列且第二Fc多肽为或包含SEQ ID NO:106或112中所示的序列。在一些实施例中，第一Fc多肽为或包含SEQ ID NO:109中所示的序列且第二Fc多肽为或包含SEQ ID NO:110或114中所示的序列。第一与第二Fc多肽可在构建体的任一多肽链上格式化。

[0426] 在一些实施例中，第一Fc多肽或第二Fc多肽进一步包括突变M252Y和/或M428V。在特定实施例中，第一Fc多肽为或包含SEQ ID NO:334中所示的序列且第二Fc多肽为或包含SEQ ID NO:336中所示的序列。在一些实施例中，第一Fc多肽为或包含SEQ ID NO:115中所示的序列且第二Fc多肽为或包含SEQ ID NO:119中所示的序列。在一些实施例中，第一Fc多肽为或包含SEQ ID NO:117中所示的序列且第二Fc多肽为或包含SEQ ID NO:121中所示的序列。在其他实施例中，第一Fc多肽为或包含SEQ ID NO:335中所示的序列且第二Fc多肽为或包含SEQ ID NO:337中所示的序列。在一些实施例中，第一Fc多肽为或包含SEQ ID NO:116中所示的序列且第二Fc多肽为或包含SEQ ID NO:120中所示的序列。在一些实施例中，第一Fc多肽为或包含SEQ ID NO:118中所示的序列且第二Fc多肽为或包含SEQ ID NO:122中所示的序列。第一与第二Fc多肽可在构建体的任一多肽链上格式化。

[0427] 可有助于促成异源二聚体的其他变体实施例为第一Fc多肽与第二Fc多肽的空间变体(例如偏斜变体)的任何组合或对，其选自：S364K/E357Q和L368D/K370S；L368D/K370S和S364K；L368E/K370S和S364K；T411T/E360E/Q362E和D401K；L368D/K370S和S364K/E357L、K370S和S364K/E357Q和T366S/L368A/Y407V和T366W或366S/L368A/Y407V/Y349C和T366W/S354C)，其中每一对代表第一Fc多肽和第二Fc多肽中的突变。在特定实施例中，所提供的构建体含有具有突变对L368D/K370S和S364K和E357Q的第一与第二Fc多肽。

[0428] 可用于产生异源二聚体的另一种机制有时称为“静电操纵”，如Gunasekaran等人，J.Biol.Chem.285(25):19637(2010)中所述。此在本文中有时称为“电荷对”。在此实施例中，利用静电偏向形成异源二聚化。如本领域技术人员将了解，这些机制亦可对pI且从而对纯化具有影响，且因此在一些情况下亦可视为pI变体。然而，由于这些变体系为迫使发生异源二聚而产生且不作为纯化工具使用，因此其归类为“空间变体”。在一个实施例中，第一Fc多肽可含有突变D221E/P228E/L368E且第二Fc多肽可含有突变D221R/P228R/K409R。在另一实施例中，第一Fc多肽可含有突变C220E/P228E/368E且第二Fc多肽可含有突变C220R/E224R/P228R/K409R。

[0429] 在一些实施例中，pI变体可促进异源二聚化。在一些方面中，pI变体可包括增大蛋白质pI(碱性变化)的那些变体。在其他方面中，pI变体可包括减小蛋白质pI(酸性变化)的那些变体。在一些情况下，可以达成这些变体的所有组合，包括其中一种Fc多肽可为野生型

的组合，或显示的pI与野生型无显著差异的变体，且另一种Fc多肽可具较强碱性或较强酸性。或者，可以改变各Fc多肽，一者改变成较强碱性且一者改变成较强酸性。在一些实施例中，至少一种Fc多肽为含有突变Q295E/N384D/Q418E/N421D的负pI变体Fc。

[0430] 在一些实施例中，空间异源二聚变体(例如杵与臼)与pI或电荷对变体可以组合使用。

[0431] 在特定实施例中，所提供的构建体含有：(a)包含偏斜变体S364K/E357Q的第一Fc多肽；和b)含有偏斜变体L368D/K370S和pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D的第二Fc多肽。在一些实施例中，第一与第二多肽中的一或两者可含有减少Fc效应子活性的其他突变，诸如例示性突变E233P/L234V/L235A/G236del/S267K。能够介导Fc异源二聚化的此类第一Fc多肽和第二Fc多肽的实施例包含SEQ ID NO:338和339中所示的序列。第一与第二Fc多肽可在构建体的任一多肽链上格式化。

[0432] 所得限制性多特异性多肽构建体可以通过任何适合方法纯化，诸如通过蛋白质A或蛋白质G管柱亲和层析。在编码不同多肽的两种核酸分子于细胞中转型的情况下，将形成同源二聚体与异源二聚体。可以调整用于表达的条件，以便有利于异源二聚体形成而非同源二聚体形成。

[0433] 基于异源二聚体对亲和试剂的差别亲和力自同源二聚体回收异源二聚体的技术已为人所知。在一些方面中，此类技术包括设计异源二聚体，以使得Fc多肽链之一不结合至亲和试剂蛋白质A。在一些情况下，多肽链之一可含有一或多个氨基酸取代以消除或减少Fc异源二聚体中的多肽之一对蛋白质A试剂的亲和力，参见例如WO2017134440、WO2010151792、Jendeberg等人(Jendeberg等人，(1997)J.Immunol.Methods,201(1):25-34。在一些这些实施例中，Fc区可在异源二聚体之一成员的蛋白质A结合位点上经修饰，以便阻止蛋白质A结合且借此能够更高效地纯化异源二聚融合蛋白。此结合位点内的例示性修饰为Ile253，例如Ile253Arg(I253R)。在一些实施例中，修饰可为H435R或H435R/Y436F。在一些实施例中，Fc异源二聚体中的Fc多肽可含有修饰，使得其能够结合蛋白质A，而非蛋白质G(pA+/pG-)。例示性pA+/pG氨基酸修饰包括参照人类IgG1，Fc在位置428含有丝氨酸，在位置434含有丝氨酸且在位置436视情况含有组氨酸，或在人类IgG 2、3或4中的相应位置包含这些残基。在一些方面中，一种IgG Fc多肽在位置428、434和视情况存在的436的此类氨基酸修饰减少或阻止蛋白质G结合，从而增强蛋白质纯化。

[0434] 在一些实施例中，赋予亲和试剂差别亲和力的任一此类修饰可与上述任一种或多种其他氨基酸修饰组合。举例而言，I253R修饰可与T366S/L368A/Y407V修饰组合或与T366W修饰组合。T366S/L368A/Y407V修饰的Fc因二聚合界面不存在空间位阻而能够形成同源二聚体，在T336W修饰的Fc的情况下，二聚合界面存在空间位阻。因此，在一些实施例中，将I253R修饰与T366S/L368A/Y407V修饰的Fc组合，使可能已形成的任何同源二聚体Fc无法纯化。通过将T366S/L368A/Y407V和H453R组合可以使用类似修饰。

[0435] 在一些实施例中，异源二聚体分子的Fc区可另外含有一或多个其他Fc突变，诸如上文所述的任何突变。在一些实施例中，异源二聚体分子含有具有减少效应功能的突变的Fc区。在一些实施例中，Fc区经改变以减少Fc介导性效应功能，诸如经由减少的Fc受体结合，例如结合至FcγR的结合，但通常不是FcRn结合。

[0436] 在一些实施例中，Fc区在以下一或多个位置发生突变以减少Fc受体结合：Glu233

(E233)、Leu234(L234)或Leu235(L235)。一或多个突变可包括E233P、L234V和/或L235A。

[0437] 在特定实施例中,减少Fc效应功能(例如经由减少Fc受体结合至FcγR)的Fc区的突变包括选自以下的突变:G236R/L328R、E233P/L234V/L235A/G236del/S239K、E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G、E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G、E233P/L234V/L235A/G236del、D265A/P329A、D265A/P329G、D265A/N297A、L234V/L235A/D265A、L234V/L235A/N297A、L234V/L235A/P329A,或L234V/L235A/P329G。在一些实施例中,异源二聚体Fc中的一种Fc多肽包含SEQ ID NO:328(例如SEQ ID NO:103或107)、334(例如SEQ ID NO:115或117)中的任一者中所示的氨基酸序列,且异源二聚体Fc中的另一种Fc多肽含有SEQ ID NO:329(例如SEQ ID NO:104或108)、332(例如SEQ ID NO:111或113)、336(例如SEQ ID NO:119或121)中的任一者中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,异源二聚体Fc中的一种Fc多肽包含SEQ ID NO:330(例如SEQ ID NO:105或109)、335(例如SEQ ID NO:116或118)中的任一者中所示的氨基酸序列,且异源二聚体Fc中的另一种Fc多肽包含SEQ ID NO:331(例如SEQ ID NO:106或110)、333(例如SEQ ID NO:112或114)、337(SEQ ID NO:120或122)中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0438] 在一些实施例中,所提供的多特异性多肽构建体的Fc区展现一或多种效应功能。在一些情况下,Fc区能够提供Fc介导性效应功能,诸如ADCC(例如NK细胞释放颗粒酶B)、ADCP和/或CDC。一般而言,Fc区负责效应功能,诸如补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC),此外负责抗原结合能力,其为免疫球蛋白的主要功能。另外,存在于Fc区中的FcRn序列通过与活体内FcRn受体结合而增加活体内半衰期来起到调控血清中的IgG含量的作用。在多特异性多肽构建体含有可裂解接头的一些实施例中,接头裂解可以产生两种各自具有生物活性的组分:能够与T细胞上的CD3结合且接合的CD3结合区,在一些方面中,其亦可含有用于向T细胞诱导共刺激信号的CRBR和/或用于向T细胞诱导抑制信号的IRBR;和与5T4 VHH域连接的Fc区,其可以展现靶点特异性效应功能。在本文所提供的特定实施例中,多特异性多肽构建体含有不可裂解接头且在一些方面中,可以不展现独立的Fc介导性效应功能。

[0439] 在一些实施例中,Fc区包括发生突变或经修饰以改变一或多种效应功能的Fc多肽。因此,在一些情况下,可以使用所提供的限制性多特异性多肽构建体改变(诸如减少或增强)Fc的效应功能,诸如ADCC、ADCP和/或CDC中的一或多者。减少效应功能的例示性突变包括如上文所述的任一者。

[0440] 在一些实施例中,可以利用G1 m1或G1 m3异型制备IgG1 Fc多肽或其变体,诸如下文所述的任一者。在一些实施例中,Fc区可含有人类G1 m1异型的氨基酸,诸如在位置356和358含有Asp(D)和Leu(L)的残基,例如SEQ ID NO:8中所述。在一些情况下,Fc多肽可含有氨基酸取代E356D和M358L以重构异型G1 m1的残基。在其他实施例中,Fc区可含有人类G1 m3异型的氨基酸,诸如依据EU编号的位置356和358的残基Glu(E)和Met(M),例如SEQ ID NO:338和339中所述。在一些情况下,Fc多肽可含有氨基酸取代D356E和L358M以重构异型G1 m3的残基。

[0441] c.CD3结合域

[0442] 限制性多特异性多肽构建体包括抗CD3结合域的一或多个复本。本发明的抗CD3结合域经由与T细胞上的CD3或CD3复合物成员接合来活化T细胞。在优选实施例中,本发明的

抗CD3结合域特异性结合CD3的ε链，亦称为CD3ε。本发明的抗CD3ε结合域经由与T细胞上的CD3ε接合来活化T细胞。本发明的抗CD3结合域促效、刺激、活化和/或以其他方式增强CD3介导性T细胞活化。CD3的生物活性包括例如T细胞活化和经由CD3与T细胞受体(TCR)的抗原结合亚单元之间的相互作用达成的其他信号传导。举例而言，本发明的抗CD3结合域经由与T细胞上的CD3ε接合、通过部分地或完全地调节(例如促效、刺激、活化或以其他方式增强)CD3介导性T细胞活化来完全或部分地活化T细胞。

[0443] CD3结合域可为如上文所述的任一者。在特定实施例中，CD3结合域为结合CD3ε的Fv抗体片段(在本文中称为抗CD3εFv片段)。在一些实施例中，抗CD3εFv抗体片段为经二硫键稳定的抗CD3结合Fv片段(dsFv)。在一些实施例中，抗CD3结合域就结合CD3而言为单价的。

[0444] 在一些实施例中，CD3结合区为含有可变重链(Hv，亦称为VH)和可变轻链(Lv，亦称为VL)的Fv抗体片段，诸如所述的任一者。在此类实施例的方面中，免疫球蛋白Fc区为含有两种不同Fc多肽的异源二聚体Fc区，其能够实现Fc异源二聚体中的两种多肽之间的异源二聚体结合，诸如所述任一者。在此类实施例中，CD3结合区的可变重链(VH)与可变轻链(VL)依异源二聚体Fc的相对链连接。

[0445] 在一些实施例中，CD3结合区为SP34的Fv或dsFv(Pessano等人，The EMBO Journal.4:337-344,1985)或SP34的人源化变体(WO2015001085)。

[0446] 在一些实施例中，其抗CD3ε结合域为Fv，诸如dsFv片段，其包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合。在一些实施例中，CD3结合域为Fv或dsFv片段，其含有至少包括氨基酸序列TYAMN(SEQ ID NO:29)的VH CDR1序列；至少包括氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:30)的VH CDR2序列；至少包括氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:31)的VH CDR3序列；至少包括氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:32)的VL CDR1序列；至少包括氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:33)的VL CDR2序列；和至少包括氨基酸序列ALWYSNLWV(SEQ ID NO:34)的VL CDR3序列。

[0447] 在一些实施例中，抗CD3ε结合域包括与氨基酸序列TYAMN(SEQ ID NO:29)至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的VH CDR1序列；与氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:30)至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的VH CDR2序列；与氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:31)至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的VH CDR3序列；与氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:32)至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的VL CDR1序列；与氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:33)至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的VL CDR2序列；和与氨基酸序列ALWYSNLWV(SEQ ID NO:34)至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的VL CDR3序列。

[0448] 在一些实施例中，抗CD3ε结合域包括：至少包括氨基酸序列GFTFNTYAMN(SEQ ID NO:350)的VH CDR1序列；至少包括氨基酸序列RIRSKYNNYATY(SEQ ID NO:351)的VH CDR2序列；至少包括氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:31)的VH CDR3序列；至少包括氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:32)的VL CDR1序列)；至少包括氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:33)的VL CDR2序列；和至少包括氨基酸序列ALWYSNLWV(SEQ ID NO:34)的VL CDR3序

列。

[0449] 在一些实施例中,抗CD3ε结合域包括与氨基酸序列GFTFNTYAMN(SEQ ID NO:350)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的VH CDR1序列;与氨基酸序列RIRSKYNNYATY(SEQ ID NO:351)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的VH CDR2序列;与氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:31)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的VH CDR3序列、与氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:32)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的VL CDR1序列;与氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:33)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的VL CDR2序列;和与氨基酸序列ALWYSNLWV(SEQ ID NO:34)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的VL CDR3序列。

[0450] 在一些实施例中,抗CD3ε结合域包括:至少包括氨基酸序列GFTFNTYAMN(SEQ ID NO:350)的VH CDR1序列;至少包括氨基酸序列RIRSKYNNYATY(SEQ ID NO:351)的VH CDR2序列;至少包括氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:31)的VH CDR3序列;至少包括氨基酸序列GSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:357)的VL CDR1序列;至少包括氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:33)的VL CDR2序列;和至少包括氨基酸序列ALWYSNHWV(SEQ ID NO:353)的VL CDR3序列。

[0451] 在一些实施例中,抗CD3ε结合域包括与氨基酸序列GFTFNTYAMN(SEQ ID NO:350)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的VH CDR1序列;与氨基酸序列RIRSKYNNYATY(SEQ ID NO:351)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的VH CDR2序列;与氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:31)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的VH CDR3序列;与氨基酸序列GSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:357)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的VL CDR1序列;与氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:33)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的VL CDR2序列;和与氨基酸序列ALWYSNHWV(SEQ ID NO:353)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的VL CDR3序列。

[0452] 在一些实施例中,抗CD3ε结合域包括:至少包括氨基酸序列GFTFSTYAMN(SEQ ID NO:355)的VH CDR1序列;至少包括氨基酸序列RIRSKYNNYATY(SEQ ID NO:356)的VH CDR2序列;至少包括氨基酸序列HGNFGDSYVSWFAY(SEQ ID NO:352)的VH CDR3序列;至少包括氨基酸序列GSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:357)的VL CDR1序列;至少包括氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:33)的VL CDR2;和至少包括氨基酸序列ALWYSNHWV(SEQ ID NO:353)的VL CDR3序列。

[0453] 在一些实施例中,抗CD3ε结合域包括与氨基酸序列GFTFSTYAMN(SEQ ID NO:355)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的VH CDR1序列;与氨基酸序列RIRSKYNNYATY(SEQ ID NO:356)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的VH CDR2序列;与氨基酸序列HGNFGDSYVSWFAY(SEQ ID NO:352)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的VH CDR3序列;与氨基酸序列GSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:357)至少90%、91%、92%、93%、

94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的VL CDR1序列;与氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:33)至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的VL CDR2序列;和与氨基酸序列ALWYSNHWV(SEQ ID NO:353)至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的VL CDR3序列。

[0454] 在一些实施例中,抗CD3ε结合域包括至少包括氨基酸VLWYSNRWV(SEQ ID NO:354)的CDR3。在一些实施例中,抗CD3ε结合域包括与氨基酸VLWYSNRWV(SEQ ID NO:354)至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的CDR3。

[0455] 在一些实施例中,抗CD3ε结合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复本:Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、scFv、scAb、dAb、单域重链抗体和单域轻链抗体。在一些实施例中,抗CD3结合域包括结合CD3ε的Fv抗体片段(在本文中称为抗CD3εFv片段)。在一些实施例中,抗CD3εFv抗体片段为经二硫键稳定的抗CD3结合Fv片段(dsFv)。在一些实施例中,抗CD3结合域就结合CD3而言为单价的。

[0456] 在一些实施例中,CD3结合区不为单链抗体。举例而言,在一些方面中,CD3结合区不为单链可变片段(scFv)。

[0457] 在一些实施例中,CD3结合区为含有可变重链(Hv,亦称为VH)和可变轻链(Lv,亦称为VL)的Fv抗体片段,诸如所述的任一者。在此类实施例的方面中,免疫球蛋白Fc区为含有两种不同Fc多肽的异源二聚体Fc区,其能够达成Fc异源二聚体中的两种多肽的异源二聚体结合,诸如章节III.C.2.b中所述的任一者。在此类实施例中,CD3结合区的可变重链(VH)与可变轻链(VL)依异源二聚体Fc的相对链连接。

[0458] 在一些实施例中,其抗CD3ε结合域为包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合的Fv片段。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域为包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合的Fv片段,该重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列包含与选自由SEQ ID NO:27-28、35-84、293、340-343和358组成的组的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的氨基酸序列。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域为包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合的Fv片段,该重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列包含选自由SEQ ID NO:27-28、35-84、293、340-343和358组成的组的氨基酸序列。

[0459] 在一些实施例中,其抗CD3ε结合域为包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合的Fv片段,该重链可变区氨基酸序列选自SEQ ID NO:27、35-65、341、343和358的组且该轻链可变区氨基酸序列选自由SEQ ID NO:28、66-84、293、340和342组成的组。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域为包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合的Fv片段,该重链可变区氨基酸序列与选自由SEQ ID NO:27、35-65、341、343和358组成的组的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致,该轻链可变区氨基酸序列与选自由SEQ ID NO:28、66-84、293、340和342组成的组的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致。

[0460] 在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合,该重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列包含选自SEQ ID NO:27-28、35-84、293、340-343和358的组的氨基酸序列。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合,该重链可变区氨基酸序列选自

SEQ ID NO:27、35-65、341、343和358的组，且轻链可变区氨基酸序列包含选自SEQ ID NO:28、66-84、293、340和342的组的氨基酸序列。在一些实施例中，抗CD3εFv抗体片段包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合，该重链可变区氨基酸序列选自SEQ ID NO:27、35-65、341、343和358的组，且该轻链可变区氨基酸序列选自由SEQ ID NO:28、66-84、293、340、342组成的组。在一些实施例中，抗CD3εFv抗体片段包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合，该重链可变区氨基酸序列选自以下的组：SEQ ID NO:27、35-65、341、343、358、388、389、392、393，该轻链可变区氨基酸序列选自由以下组成的组：SEQ ID NO:28、66-84、293、340、342、390、391、394、395。

[0461] 在一些实施例中，其抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的可变重链(VH)。在一些实施例中，抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的可变轻链(VL)。在一些实施例中，其抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的可变重链(VH)和氨基酸序列与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的可变轻链(VL)。在一些实施例中，其抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的可变重链(VH)。在一些实施例中，抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在一些实施例中，其抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的可变重链(VH)和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的可变轻链(VL)。

[0462] 在一些实施例中，其抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:341的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的可变重链(VH)。在一些实施例中，抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:342的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的可变轻链(VL)。在一些实施例中，其抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:341的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的可变重链(VH)和氨基酸序列与SEQ ID NO:342的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的可变轻链(VL)。在一些实施例中，其抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:341的氨基酸序列的可变重链(VH)。在一些实施例中，抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:342的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在一些实施例中，其抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:341的氨基酸序列的可变重链(VH)和包含SEQ ID NO:342的氨基酸序列的可变轻链(VL)。

[0463] 在特定实施例中，Fv为经二硫键稳定的Fv片段(dsFv)，其中V_H-V_L异源二聚体通过链间二硫键稳定化。在一些实施例中，链间二硫键为通过使VH和/或VL链的构架位置中的位置发生突变而经工程改造。在一些实施例中，依据Kabat编号，经二硫键稳定的抗CD3 Fv包含44突变为Cys的抗CD3 VH和依据Kabat编号的100突变为Cys的抗CD3 VL。举例而言，在一些实施例中，VH链含有突变G44C且VL链含有突变G100C，各依据kabat编号。在一些实施例中，依据Kabat编号，经二硫键稳定的抗CD3 Fv包含位置105突变为Cys的抗CD3 VH和位置43突变为Cys的抗CD3 VL。

[0464] 在一些实施例中，其抗CD3ε结合域为Fv，诸如dsFv片段，其包括选自SEQ ID NO:

35-65的组的重链可变区氨基酸序列和选自由SEQ ID NO:66-84、293组成的组的轻链可变区氨基酸序列。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域为Fv,诸如dsFv片段,其包括与选自由SEQ ID NO:35-65组成的组的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的重链可变区氨基酸序列和与选自由SEQ ID NO:66-84、293氨基酸序列组成的组的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的氨基酸序列。在一些实施例中,抗CD3结合域为Fv或dsFv,其含有包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的可变重链(VH)和包含SEQ ID NO:293的氨基酸序列的可变轻链(VL)。

[0465] 在一些实施例中,其抗CD3ε结合域为包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合的Fv片段。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域为包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合的Fv片段,该重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列包含与选自由SEQ ID NO:27-28、35-84、293、340-343和358组成的组的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的氨基酸序列。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域为包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合的Fv片段,该重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列包含选自由SEQ ID NO:27-28、35-84、293、340-343和358组成的组的氨基酸序列。

[0466] 在一些实施例中,其抗CD3ε结合域为包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合的Fv片段,该重链可变区氨基酸序列选自SEQ ID NO:27、35-65、341、343和358的组且该轻链可变区氨基酸序列选自由SEQ ID NO:28、66-84、293、340和342组成的组。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域为包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合的Fv片段,该重链可变区氨基酸序列与选自由SEQ ID NO:27、35-65、341、343和358组成的组的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致,该轻链可变区氨基酸序列与选自由SEQ ID NO:28、66-84、293、340和342组成的组的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致。

[0467] 在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合,该重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列包含选自以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:27-28、35-84、293、340-343和358。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合,该重链可变区氨基酸序列选自以下的组:SEQ ID NO:27、35-65、341、343和358,该轻链可变区氨基酸序列包含选自SEQ ID NO:28、66-84、293、340和342的组的氨基酸序列。在一些实施例中,抗CD3εFv抗体片段包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合,该重链可变区氨基酸序列选自以下的组:SEQ ID NO:27、35-65、341、343和358,该轻链可变区氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:28、66-84、293、340、342。

[0468] 在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的可变重链(VH)。在一些实施例中,抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的可变轻链(VL)。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的可变重链(VH)和氨基酸序列与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

98％、99％或更多一致的可变轻链(VL)。在一些实施例中，其抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的可变重链(VH)。在一些实施例中，抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在一些实施例中，其抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的可变重链(VH)和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的可变轻链(VL)。

[0469] 在一些实施例中，其抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:341的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的可变重链(VH)。在一些实施例中，抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:342的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的可变轻链(VL)。在一些实施例中，其抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:341的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的可变重链(VH)和氨基酸序列与SEQ ID NO:342的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的可变轻链(VL)。在一些实施例中，其抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:341的氨基酸序列的可变重链(VH)。在一些实施例中，抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:342的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在一些实施例中，其抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:341的氨基酸序列的可变重链(VH)和包含SEQ ID NO:342的氨基酸序列的可变轻链(VL)。

[0470] 在特定实施例中，Fv为经二硫键稳定的Fv片段(dsFv)，其中V_H-V_L异源二聚体通过链间二硫键稳定化。在一些实施例中，链间二硫键为通过使VH和/或VL链的构架位置中的位置发生突变而经工程改造。在一些实施例中，依据Kabat编号，经二硫键稳定的抗CD3 Fv包含44突变为Cys的抗CD3 VH和100突变为Cys的抗CD3 VL。举例而言，在一些实施例中，VH链含有突变G44C且VL链含有突变G100C，各依据kabat编号。在一些实施例中，依据Kabat编号，经二硫键稳定的抗CD3 Fv包含位置105突变为Cys的抗CD3 VH和位置43突变为Cys的抗CD3 VL。

[0471] 在一些实施例中，其抗CD3ε结合域包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合，该重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列包含与选自由SEQ ID NO:67、75、77、79、81-84、293和340组成的组的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致的氨基酸序列。在一些实施例中，其抗CD3ε结合域包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合，该重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列包含选自以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:47、52-65、67、75、77、79、81-84、293、340、343和358。在一些实施例中，抗CD3εFv抗体片段包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合，该重链可变区氨基酸序列与选自由SEQ ID NO:47和52-65、343和358组成的组的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致，该轻链可变区氨基酸序列与选自由SEQ ID NO:67、75、77、79、81-84、293和340组成的组的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多一致。在一些实施例中，抗CD3εFv抗体片段包括重链可变区氨基酸序列与轻链可变区氨基酸序列的组合，该重链可变区氨基酸序列选自SEQ ID NO:47、52-65、343和358的组，该轻链可变区氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:67、75、77、79、81-84、293和340。在任何此类实施例中的一些中，抗CD3 Fv为dsFv，其具有含有突变G44C的VH链和含有突变G100C的VL链，各依据kabat编号。

[0472] 在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:47的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的可变重链(VH)。在一些实施例中,抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:75的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的可变轻链(VL)。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:47的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的可变重链(VH)和氨基酸序列与SEQ ID NO:75的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的可变轻链(VL)。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的可变重链(VH)。在一些实施例中,抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的可变重链(VH)和包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在任何此类实施例中的一些中,抗CD3 Fv为dsFv,其具有含有突变G44C的VH链和含有突变G100C的VL链,各依据kabat编号。

[0473] 在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:343的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的可变重链(VH)。在一些实施例中,抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:340的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的可变轻链(VL)。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:343的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的可变重链(VH)和氨基酸序列与SEQ ID NO:340的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的可变轻链(VL)。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:343的氨基酸序列的可变重链(VH)。在一些实施例中,抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:340的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:343的氨基酸序列的可变重链(VH)和包含SEQ ID NO:340的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在任何此类实施例中的一些中,抗CD3 Fv为dsFv,其具有含有突变G44C的VH链和含有突变G100C的VL链,各依据kabat编号。

[0474] 在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:358的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的可变重链(VH)。在一些实施例中,抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:340的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的可变轻链(VL)。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括氨基酸序列与SEQ ID NO:358的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的可变重链(VH)和氨基酸序列与SEQ ID NO:340的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的可变轻链(VL)。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:358的氨基酸序列的可变重链(VH)。在一些实施例中,抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:340的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在一些实施例中,其抗CD3ε结合域包括包含SEQ ID NO:358的氨基酸序列的可变重链(VH)和包含SEQ ID NO:340的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在任何此类实施例中的一些中,抗CD3 Fv为dsFv,其具有含有突变G44C的VH链和含有突变G100C的VL链,各依据kabat编号。

[0475] d.接头

[0476] 限制性多特异性多肽构建体含有接头，该接头使含有免疫球蛋白Fc区的第一组分与含有CD3结合区的第二组分连接或偶合。在一些实施例中，接头定位于Fc区的C端区域的末端，使得Fc区位于CD3结合区的N端。应了解，由于所提供的限制性多特异性多肽构建体为多聚体，诸如含有第一与第二多肽的二聚体，所述多肽一起形成第一与第二组分，因此所提供的构建体包括使Fc部分与第一多肽的CD3结合区接合的接头和使Fc部分与第二多肽的CD3结合区接合的接头。在一些实施例中，第一多肽包括异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头，和CD3结合区的第一域(例如VH)，且第二多肽包括异源二聚体Fc区的第二Fc多肽、接头和CD3结合区的第二域(例如VL)。典型地，存在于限制性多特异性多肽构建体的第一与第二多肽中的接头相同。因此，在一些实施例中，CD3结合域的各域经由接头(诸如相同接头)连接至Fc(诸如异源二聚体Fc)的相对多肽。

[0477] 用于融合蛋白中的各种多肽接头已为人所知(参见例如Chen等人(2013) Adv.Drug.Deliv.65:1357-1369;和国际PCT公开案第WO 2014/099997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)。

[0478] 在一些实施例中，选择接头，使得当CD3结合区连接至多特异性多肽偶联物的Fc区时，CD3结合区受到限制且在多特异性多肽构建体与细胞接触后，不能或基本上不能与细胞(例如T细胞)表面上的CD3结合或接合。可以利用各种分析评估多特异性多肽构建体对CD3的结合或接合，包括评估以下的分析:T细胞结合、使用报告分子为统的NFAT活化、溶胞性T细胞活性、细胞因子产生和/或T细胞活化标记的表达。例示性分析展示于所提供的实施例中。典型地，接头亦为确保多肽构建体正确折叠的接头，其不展现与所连接多肽的活性或功能不一致的电荷，或与阻碍或改变所连接多肽的活性的一或多个域中的氨基酸残基形成键或其他相互作用。在一些实施例中，接头为多肽接头。多肽接头可为可挠性接头或刚性接头或两者的组合。在一些方面中，接头为短、中或长接头。在一些实施例中，接头具有至多40个氨基酸的长度。在一些实施例中，接头具有至多25个氨基酸的长度。在一些实施例中，接头具有至少或至少约2个氨基酸的长度。在一些方面中，适合长度为例如至少一个且典型地少于约40个氨基酸残基的长度，诸如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。在一些实施例中，接头为或为约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。在一些实施例中，接头具有2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸的长度。

[0479] 在某些方面中，接头长度愈长，则当多特异性多肽偶联物结合至其抗原(例如TAA)时，CD3结合愈大。因此，在一些方面中，接头具有大于12个氨基酸的长度，诸如大于13、14、15、16、17或18个氨基酸的长度。在一些实施例中，接头的长度为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。

[0480] 接头可为天然存在的接头、合成的接头或两者的组合。特别适合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％(基于存在于肽接头中的残基的总数计算)(诸如至少80％、至少85％或至少90％)的选自Gly、Ser、Ala和Thr的氨基酸残基。接头亦可由仅Gly、Ser、Ala和/或Thr残基组成。在一些实施例中，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，适合的肽接头典型地含有至少50％甘氨酸残基，诸如至少75％甘氨酸残基。在一些实施例中，肽接头仅包含甘氨酸残基。在一些实施例中，肽接头仅包含甘氨酸和丝氨酸残基。

[0481] 在一些实施例中，这些接头主要由氨基酸甘氨酸和丝氨酸组成，在本文中表示为GS-接头。在一些实施例中，接头含有(GGS)n，其中n为1至10，诸如1至5，例如1至3，诸如GGS(GGS)n(SEQ ID NO:363)，其中n为0至10。在特定实施例中，接头含有序列(GGGGS)n(SEQ ID NO:123)，其中n为1至10或n为1至5，诸如1至3。在其他实施例中，接头含有(GGGGGS)n(SEQ ID NO:124)，其中n为1至4，诸如1至3。接头可包括上述任一者的组合，诸如2、3、4或5个GS、GGS、GGGGS和/或GGGGGS接头的重复可以组合。在一些实施例中，此类接头具有2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个氨基酸的长度。

[0482] 在一些实施例中，接头为(依单字母氨基酸代码)：GGS、GGGGS(SEQ ID NO:125)、GGGGGS(SEQ ID NO:126)，或GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:346)。在一些实施例中，GS-接头包含氨基酸序列GGSGGS，亦即$(GGS)_2$(SEQ ID NO:1)；GGSGGSGGS，亦即$(GGS)_3$(SEQ ID NO:2)；GGSGGSGGSGGS，亦即$(GGS)_4$(SEQ ID NO:3)；GGSGGSGGSGGSGGS，亦即$(GGS)_5$(SEQ ID NO:4)；GGGGGSGGGGGSGGGGGS，亦即$(G5S)_3$(SEQ ID NO:127)；GGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:129)和GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:128)。在一些实施例中，接头为GGGG(SEQ ID NO:5)。在一些上述实施例中的任一例中，丝氨酸可经丙氨酸置换(例如(Gly4Ala)或(Gly3Ala))。在一些实施例中，接头为GGGGG(SEQ ID NO:6)。在一些实施例中，接头为PGGGG(SEQ ID NO:327)。

[0483] 在一些实施例中，接头包括具有氨基酸序列Gly_xXaa-Gly_y-Xaa-Gly_z(SEQ ID NO:130)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)、天冬酰氨(Asn)、谷氨酰胺(Gln)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、组氨酸(His)、天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu)，且其中x、y和z各为1-5范围内的整数。在一些实施例中，各Xaa独立地选自由Ser、Ala和Thr组成的组。在一个特定变化形式中，x、y和z中的每一者等于3(借此产生具有氨基酸序列Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly(SEQ ID NO:131)的肽接头，其中各Xaa如上所述选择。

[0484] 在一些实施例中，接头为基于(SSSSG)n(SEQ ID NO:132)模体的重复的富丝氨酸接头，其中n为至少1，然而y可为2、3、4、5、6、7、8和9。

[0485] 在一些情况下，可能需要向肽接头提供一些刚性。此可通过在肽接头的氨基酸序列中包括脯氨酸残基来实现。因此，在一些实施例中，接头在肽接头的氨基酸序列中包含至

少一个脯氨酸残基。举例而言，肽接头可以具有氨基酸序列，其中至少25％(例如至少50％或至少75％)的氨基酸残基为脯氨酸残基。在一个特定实施例中，肽接头仅包含脯氨酸残基。

[0486] 在一些方面中，肽接头包含至少一个半胱氨酸残基，诸如一个半胱氨酸残基。举例而言，在一些实施例中，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。在一些此类实施例中，接头包含甘氨酸残基和半胱氨酸残基，诸如仅包含甘氨酸残基和半胱氨酸残基。典型地，每个肽接头包括仅一个半胱氨酸残基。包含半胱氨酸残基的特定接头的一个实施例包括具有氨基酸序列Gly_m-Cys-Gly_n的肽接头，其中n和m各为整数1-12，例如3-9、4-8或4-7。在一个特定变化形式中，此类肽接头具有氨基酸序列GGGGG-C-GGGGG(SEQ ID NO:133)。

[0487] 在一些实施例中，融合蛋白中的接头为结构化或限制性接头。在特定实施例中，结构化接头含有序列(AP)n或(EAAAK)n(SEQ ID NO:134)，其中n为2至20，优选4至10，包括(但不限于)AS-(AP)n-GT(SEQ ID NO:135)或AS-(EAAAK)n-GT(SEQ ID NO:136)，其中n为2至20，诸如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15。在其他实施例中，接头包含序列(GGGGA)n(SEQ ID NO:137)、(PGGGS)n(SEQ ID NO:138)、(AGGGS)n(SEQ ID NO:139)或GGS-(EGKSSGSGSESKST)n-GGS(SEQ ID NO:140，其中n为2至20)、(ADAAP)n(SEQ ID NO:396，其中n为2至20)、(ADAAP)n-G(SEQ ID NO:397，其中n为2至20)、(GEPQG)n(SEQ ID NO:398，其中n为2至20)、(GEPQG)n-G(SEQ ID NO:399，其中n为2至20)、(AGGEP)n(SEQ ID NO:400，其中n为2至20)、(AGGEP)n-G(SEQ ID NO:401，其中n为2至20)、(AGSEP)n(SEQ ID NO:402，其中n为2至20)、(AGSEP)n-G(SEQ ID NO:403，其中为2至20)、(GGGEQ)n(SEQ ID NO:404，其中n为2至20)，或(GGGEQ)n-G(SEQ ID NO:405，其中n为2至20)。在一些实施例中，接头为SSSASASSA(SEQ ID NO:141)、GSPGSPG(SEQ ID NO:142)、ATTTGSSPGPT(SEQ ID NO:143)、ADAAPADAAPG(SEQ ID NO:406)、GEPQGGEPQGG(SEQ ID NO:407)、AGGEPAGGEPG(SEQ ID NO:408)、AGSEPAGSEPG(SEQ ID NO:409)，或GGGEQGGGEQG(SEQ ID NO:410)。在一些实施例中，此类接头借助于其结构可对蛋白水解降解更具抗性，借此在活体内注射时提供优势。在一些实施例中，此类接头带负电荷且可更适于抑制CD3结合域结合至CD3。

[0488] 在一些实施例中，接头不为可裂解接头，亦称为不可裂解接头。在一些实施例中，蛋白酶不能使接头裂解。在一些实施例中，不为可裂解接头或不可被蛋白酶裂解的接头为对于活体内递送或重组产生而言通常稳定的接头。在一些方面中，不可被蛋白酶裂解的接头包括不含有至少一个肽键的那些接头，所述肽键优选位于可裂解肽序列内或蛋白酶识别位点处。在特定实施例中，不可裂解接头不为蛋白酶的目标基质，使得其相较于含有相同蛋白酶的基质识别位点的接头优先或特异性地被蛋白酶裂解。

[0489] 在一些实施例中，接头不含有特定蛋白酶的基质识别位点或裂解位点，该位点为蛋白酶的活性位点所识别、被蛋白酶裂解的序列。典型地，例如，对于丝氨酸蛋白酶而言，裂解序列为由基质中的P1-P4和P1'-P4'氨基酸构成，其中裂解发生于P1位置之后。典型地，丝氨酸蛋白酶的裂解序列为长度与多种蛋白酶的扩展基质特异性匹配的六个残基，但视蛋白酶而定可为较长或较短的。典型地，接头不包括被蛋白酶识别的P1-P1'易裂键序列。在一些方面中，不可裂解接头或不含有被蛋白酶特异性识别裂解的基质识别位点的接头为蛋白酶对其的裂解作用实质性小于蛋白酶的目标基质裂解作用的接头。

[0490] 在一些实施例中,接头为可裂解接头。在一些方面中,可裂解接头为进一步包括作为蛋白酶基质的序列(因存在至少一个可在生理条件下断裂的键)的接头,诸如上述任一者。在一些情况下,可裂解接头容易在活体内存在的特定条件下发生裂解或对此裂解敏感,诸如在暴露于细胞外蛋白酶(包括活体内存在于细胞环境中的那些蛋白酶)之后。在一些情况下,蛋白酶可以存在于特定生理学微环境(诸如肿瘤微环境)中,借此限制裂解可能发生的位点。

[0491] 蛋白酶典型地展现特定目标基质相较于另一种非目标基质的裂解特异性或偏好。此类特异性程度可基于序列(例如接头)的裂解速率常数测定,该速率常数为蛋白酶针对其基质的偏好和酶效率的量度。测定在多种浓度的基质存在下裂解随时间增加的速率的任何方法可以用于计算特异性常数。举例而言,基质连接至荧光部分,该荧光部分在蛋白酶裂解后释放。通过测定不同蛋白酶浓度下的裂解速率,可测定特定蛋白酶针对特定接头的特异性裂解常数(k_{cat}/K_m)。在一些实施例中,可裂解接头为能够被蛋白酶以至少约$1\times10^4M^{-1}S^{-1}$或至少$5\times10^4M^{-1}S$、至少$10\times10^4M^{-1}S$、至少$10\times10^5M^{-1}S$或更大的速率特异性裂解的接头。

[0492] 在一些实施例中,本发明的限制性多特异性多肽构建体包括连接第一和第二组分的可裂解接头。在一些实施例中,可裂解接头包括可以充当蛋白酶(通常为细胞外蛋白酶)的基质的氨基酸序列。举例而言,可裂解接头可包括含有至少一个肽键的裂解序列,该至少一个肽键优选位于蛋白酶的可裂解肽序列内。适合蛋白酶包括例如基质金属蛋白酶(MMP)、半胱氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶和纤维蛋白溶酶活化因子,其在诸如类风湿性关节炎或癌症的疾病中以增强的方式形成或活化,引起过度组织降解、发炎和转移。在特定实施例中,蛋白酶为肿瘤、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。在一些实施例中,蛋白酶为颗粒酶B、间质蛋白酶或MMP,诸如MMP-2。

[0493] 可以基于与表达靶点的细胞邻近的肿瘤所产生的蛋白酶和/或与多特异性多肽构建体的所需靶点共定域于组织中的肿瘤所产生的蛋白酶来选择可裂解接头。文献中已报导在多种癌症(例如实体肿瘤)中具有已知基质的蛋白酶水平增加。参见例如La Rocca等人,(2004)British J.of Cancer 90(7):1414-1421。

[0494] 在一些实施例中,连接限制性多特异性多肽构建体的第一与第二组分的可裂解接头被蛋白酶裂解,该蛋白酶为由被所述组分之一活化的免疫效应细胞产生。举例而言,涵盖效应子致能或增强型IgG Fc区的多特异性多肽构建体能够在与靶点抗原接合时诱发ADCC。ADCC的关键之处为效应细胞(亦即NK细胞和细胞毒性T细胞)释放颗粒酶B和穿孔蛋白。释放后,颗粒酶B以其介导细胞凋亡的穿孔蛋白依赖性方式进入靶细胞。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。在一些实施例中,连接多特异性多肽构建体的第一与第二组分的可裂解接头通过颗粒酶B裂解。颗粒酶B在多特异性多肽构建体组分之一介导的效应细胞活化期间释放。在一些实施例中,颗粒酶B及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。在一些实施例中,多特异性多肽构建体结合TAA后,T细胞通过CD3接合活化可释放此类蛋白酶,此类蛋白酶接着可使特定可裂解接头裂解,借此增强或增加CD3结合分子接合CD3的活性。在一些实施例中,裂解可以扩增或增强多特异性构建体在以未裂解状态结合至TAA时所达成的活性。

[0495] 例示性基质包括(但不限于)可被以下酶或蛋白酶中的一或多者裂解的基质:ADAMS、ADAMTS,例如ADAM8;ADAM9;ADAM10;ADAM12;ADAM15;ADAM17/TACE;ADAMDEC1;

ADAMTS1;ADAMTS4;ADAMTS5;天冬氨酸蛋白酶,例如BACE或肾素;天冬氨酸组织蛋白酶,例如组织蛋白酶D或组织蛋白酶E;凋亡蛋白酶,例如凋亡蛋白酶1、凋亡蛋白酶2、凋亡蛋白酶3、凋亡蛋白酶4、凋亡蛋白酶5、凋亡蛋白酶6、凋亡蛋白酶7、凋亡蛋白酶8、凋亡蛋白酶9、凋亡蛋白酶10或凋亡蛋白酶14;半胱氨酸组织蛋白酶,例如组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶S、组织蛋白酶V/L2、组织蛋白酶X/Z/P;半胱氨酸蛋白酶,例如克鲁兹蛋白酶(Cruzipain);豆荚蛋白(Legumain);卵巢肿瘤去泛素化酶-2(Otubain-2);KLKs,例如KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13或KLK14;金属蛋白酶,例如穿膜肽酶(Meprin);脑啡肽酶(Neprilysin);PSMA;BMP-1;MMPs,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、组织蛋白酶A、组织蛋白酶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、胍基苯甲酸蛋白酶、HtrA1、人类嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、乳铁蛋白、通道活化蛋白酶(Marapsin)、NS3/4A、PACE4、纤维蛋白溶酶、PSA、tPA、凝血酶、类胰蛋白酶、uPA;第II型跨膜丝氨酸蛋白酶(TTSPs),例如DESC1、DPP-4、FAP、II型跨膜丝氨酸蛋白酶(Hepsin)、间质蛋白酶-2、间质蛋白酶、TMPRSS2、TMPRSS3或TMPRSS4;及其任何组合。

[0496] 在一些实施例中,可裂解接头通过多种蛋白酶裂解,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。

[0497] 在一些实施例中,选择可裂解接头用于特定蛋白酶,例如已知由与表达靶点的细胞邻近的肿瘤产生的蛋白酶和/或由与多特异性多肽构建体的靶点共定域的肿瘤产生的蛋白酶。

[0498] 在一些实施例中,可裂解接头含有基质识别位点或特定蛋白酶裂解位点,其为蛋白酶活性位点所识别、通过蛋白酶裂解的序列。典型地,例如,对于丝氨酸蛋白酶而言,裂解序列为由基质中的P1-P4和P1'-P4'氨基酸构成,其中裂解发生于P1位置之后。典型地,丝氨酸蛋白酶的裂解序列为长度与多种蛋白酶的扩展基质特异性匹配的六个残基,但视蛋白酶而定可为较长或较短的。典型地,可裂解接头包括被蛋白酶识别的P1-P1'易裂键序列。在一些方面中,可裂解接头经工程改造以引入能够被特定蛋白酶裂解的肽键,例如通过引入基质识别位点序列或蛋白酶裂解序列。

[0499] 在一些实施例中,可裂解接头包括两种或更多种基质序列的组合。在一些实施例中,各基质序列通过相同蛋白酶裂解。在一些实施例中,至少两种基质序列通过不同蛋白酶裂解。在一些实施例中,可裂解接头包含作为颗粒酶B基质的氨基酸。在一些实施例中,颗粒酶B可裂解接头含有具有通式P4 P3P2 P1↓P1'的氨基酸序列(SEQ ID NO:144),其中P4为氨基酸I、L、Y、M、F、V或A;P3为氨基酸A、G、S、V、E、D、Q、N或Y;P2为氨基酸H、P、A、V、G、S或T;P1为氨基酸D或E;且P1'为氨基酸I、L、Y、M、F、V、T、S、G或A。在一些实施例中,颗粒酶B可裂解接头含有具有通式P4 P3 P2P1↓P1'的氨基酸序列(SEQ ID NO:145),其中P4为氨基酸I或L;P3为氨基酸E;P2为氨基酸P或A;P1为氨基酸D;且P1'为氨基酸I、V、T、S或G。

[0500] 在一些实施例中,颗粒酶B基质包含氨基酸序列LEAD(SEQ ID NO:146)、LEPD(SEQ ID NO:147)或LEAE(SEQ ID NO:148)。在一些实施例中,可裂解接头含有氨基酸序列,可裂解接头包含氨基酸序列IEPDI(SEQ ID NO:149)、LEPDG(SEQ ID NO:150)、LEADT(SEQ ID NO:151)、IEPDG(SEQ ID NO:152)、IEPDV(SEQ ID NO:153)、IEPDS(SEQ ID NO:154)、IEPDT

(SEQ ID NO:155)、IEPDP(SEQ ID NO:361)、IEPDG(SEQ ID NO:152)或LEADG(例如SEQ ID NO:144)。

[0501] 在一些实施例中,可裂解接头包含作为间质蛋白酶基质的氨基酸。在一些实施例中,可裂解接头包含序列P1QAR↓(A/V)(SEQ ID NO:156),其中P1为任何氨基酸。在一些实施例中,可裂解接头包含序列RQAR(A/V)(SEQ ID NO:157)。在一些实施例中,间质蛋白酶基质包含氨基酸序列RQAR(SEQ ID NO:158)。在一些实施例中,可裂解接头包含氨基酸序列RQARV(SEQ ID NO:159)。

[0502] 在一些实施例中,可裂解接头包含作为一或多种基质金属蛋白酶(MMPs)的基质的氨基酸。在一些实施例中,MMP为MMP-2。在一些实施例中,可裂解接头含有通式P3 P2 P1↓P1'(SEQ ID NO:160),其中P3为P、V或A;P2为Q或D;P1为A或N;且P1'为L、I或M。在一些实施例中,可裂解接头含有通式P3 P2 P1↓P1'(SEQ ID NO:161),其中P3为P;P2为Q或D;P1为A或N;且P1'为L或I。在一些实施例中,MMP基质包含氨基酸序列PAGL(SEQ ID NO:162)。

[0503] 在一些实施例中,可裂解接头包含作为颗粒酶B基质的氨基酸序列与作为间质蛋白酶基质的氨基酸序列的组合。在一些实施例中,可裂解接头包含氨基酸序列LEAD(SEQ ID NO:146)与氨基酸序列RQAR(SEQ ID NO:158)的组合。

[0504] 在一些实施例中,可裂解接头包含作为颗粒酶B基质的氨基酸序列与作为MMP基质的氨基酸序列的组合。在一些实施例中,可裂解接头包含氨基酸序列LEAD(SEQ ID NO:146)与氨基酸序列PAGL(SEQ ID NO:162)的组合。

[0505] 在一些实施例中,可裂解接头包含作为间质蛋白酶基质的氨基酸序列与作为MMP基质的氨基酸序列的组合。在一些实施例中,可裂解接头包含氨基酸序列RQAR(SEQ ID NO:158)与氨基酸序列PAGL(SEQ ID NO:162)的组合。

[0506] 在一些实施例中,可裂解接头包含作为颗粒酶B基质的氨基酸序列、作为间质蛋白酶基质的氨基酸序列与作为MMP基质的氨基酸序列的组合。在一些实施例中,可裂解接头包含作为颗粒酶B基质的氨基酸序列与作为MMP基质的氨基酸序列的组合。在一些实施例中,可裂解接头包含氨基酸序列LEAD(SEQ ID NO:146)、氨基酸序列RQAR(SEQ ID NO:158)与氨基酸序列PAGL(SEQ ID NO:162)的组合。

[0507] 可裂解接头可包括任何已知接头。可裂解接头的实施例描述于Be'liveau等人(2009)FEBS Journal,276;美国公开申请案第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。

[0508] 在一些实施例中,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:163);TGLEADGSRQARVGPAGLG(SEQ ID NO:164);TGSPAGLEADGSRQARVGS(SEQ ID NO:162);TGPAGLGLEADGSRQARVG(SEQ ID NO:166);TGRQARVGLEADGSPAGLG(SEQ ID NO:167);TGSRQARVGPAGLEADGS(SEQ ID NO:168);和TGPAGLGSRQARVGLEADGS(SEQ ID NO:169);GPAGLGLEPDGSRQARVG(SEQ ID NO:170);GGSGGGGIEPDIGGSGGS(SEQ ID NO:171);GGSGGGGLEADTGGSGGS(SEQ ID NO:172);GSIEPDIGS(SEQ ID NO:173);GSLEADTGS(SEQ ID NO:174);GGSGGGGIEPDGGGSGGS(SEQ ID NO:175);GGSGGGGIEPDVGGSGGS(SEQ ID NO:176);GGSGGGGIEPDSGGSGGS(SEQ ID NO:177);GGSGGGGIEPDTGGSGGS(SEQ ID NO:178);GGGSLEPDGSGS(SEQ ID NO:179);和

GPAGLGLEADGSRQARVG(SEQ ID NO:180)、GGEGGGGSGGSGGGS(SEQ ID NO:181)；GSSAGSEAGGSGQAGVGS(SEQ ID NO:182)；GGSGGGGLEAEGSGGGGS(SEQ ID NO:183)；GGSGGGGIEPDPGGSGGS(SEQ ID NO:184)；TGGSGGGGIEPDIGGSGGS(SEQ ID NO:185)。

[0509] e.共刺激结合域

[0510] 本发明的多特异性多肽构建体包括结合共刺激受体的一或多个共刺激受体结合区(CRBR)。在一些实施例中，所提供多特异性多肽构建体的一或多个CRBR结合T细胞上所表达的共刺激受体。在一些实施例中，共刺激受体在活化T细胞的表面上受到上调、诱导或表达。在一些方面中，CRBR结合共刺激受体且刺激共刺激受体。在一些实施例中，共刺激受体对多特异性多肽CRBR的促效性结合诱导T细胞的下游信号传导，以在CD3接合之后强化或增强T细胞活化或功能。在一些实施例中，CRBR或CRBRs中的每一者独立地为抗体或抗原结合片段、共刺激受体的天然同源结合搭配物、抗运载蛋白(经工程改造的脂质运载蛋白)、锚蛋白重复蛋白(Darpin)、菲诺体(Fynomer)、生替林(Centyrin)(经工程改造的纤维结合蛋白III域)、胱氨酸结点域、阿菲林(Affilin)、亲和抗体(Affibody)或经工程改造的CH3域。

[0511] 在一些实施例中，CRBR或CRBRs(诸如第一CRBR和第二CRBR)中的每一者独立地包括抗体或其抗原结合片段的一或多个复本。在一些实施例中，CRBR或CRBRs(诸如第一抗原结合域和第二CRBR)中的每一者独立地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复本：Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、scFv、scAb、dAb、单域重链抗体和单域轻链抗体。

[0512] 在一些实施例中，CRBR或CRBRs(诸如第一CRBR和第二CRBR)中的每一者独立地为单链抗体。在一些实施例中，单链为scFv、scAb、单域重链抗体或单域轻链抗体。

[0513] 在一些实施例中，CRBR或CRBRs(诸如第一CRBR和第二CRBR)中的每一者独立地包括一或多个单域抗体(sdAb)片段，例如V_HH、V_{NAR}、经工程改造的V_H或V_K域。V_HH可由天然骆驼科单独重链抗体产生，由产生单独重链抗体的经基因修饰的啮齿动物产生，或初始/合成骆驼科或人源化骆驼科单域抗体文库产生。V_{NAR}可由软骨鱼单独重链抗体产生。已执行各种方法以利用常规的异源二聚体V_H和V_K域产生单体sdAb，包括界面工程改造和选择特定生殖系家族。

[0514] 在一些实施例中，多特异性多肽构建体的CRBR或CRBRs(诸如第一CRBR和/或第二CRBR)中的每一者独立地含有结合共刺激受体的至少一个sdAb或scFv。在一些实施例中，结合共刺激受体的至少一个scFv或sdAb定位于相对于Fc区的氨基端和/或相对于多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基端。在一些实施例中，多特异性多肽构建体仅含有一个结合至共刺激受体、可定位于相对于Fc区的氨基端和/或相对于CD3结合区的羧基端的scFv或sdAb。在一些实施例中，多特异性多肽构建体含有结合至共刺激受体、定位于相对于Fc区的氨基端和/或相对于CD3结合区的羧基端的两个scFv或sdAb。

[0515] 在一些实施例中，多特异性多肽构建体为由两种多肽形成或包括两种多肽，包括第一多肽，该第一多肽包含异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv)的VH域，和结合至共刺激受体的scFv或sdAb；和第二多肽，该第二多肽包含异源二聚体Fc区的第二Fc多肽、接头、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv)的VL域和视情况存在的结合至共刺激受体的另一相同或不同scFv或sdAb。结合共刺激受体的scFv或sdAb可定位于相对于异源二聚体Fc的Fc多肽的氨基端和/或相对于CD3结合区的VH或VL链的羧基端。多

特异性多肽构建体的第一和/或第二多肽中的至少一者亦包括结合TAA或其链的抗原结合域，如章节II.4中所述。在一些实施例中，结合TAA的抗原结合域为scFv或sdAb且作为多特异性多肽构建体的第一和/或第二多肽的一部分包括在内。在一些实施例中，结合TAA的抗原结合域为Fab，且多特异性多肽构建体另外由第三多肽形成，其中至少第一与第二多肽包括结合TAA的Fab链(例如Fab的VH-CH1或VL-CL)且第三多肽含有结合TAA的Fab的另一链(例如Fab的另一VH-CH1或VL-CL)。

[0516] 在一些实施例中，CRBR或CRBRs(诸如第一CRBR和/或第二CRBR)中的每一者独立地含有超过一个链。在一些实施例中，多特异性多肽构建体的CRBR或CRBRs(诸如第一CRBR和/或第二CRBR)中的每一者独立地含有组装为FAB的VH和VL序列。

[0517] 在一些实施例中，多特异性多肽构建体的抗原结合域或各抗原结合域(诸如第一抗原结合域和/或第二抗原结合域)独立地含有结合共刺激受体的Fab抗体的VH-CH1(Fd)和VL-CL。在一些实施例中，含有VH-CH1(Fd)和VL-CL的Fab抗体定位于相对于Fc区的氨基端和/或相对于多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基端。在一些实施例中，多特异性多肽构建体仅含有一个结合至共刺激受体、含有VH-CH1(Fd)或VL-CL的Fab抗体，该Fab抗体可定位于相对于Fc区的氨基端和/或相对于CD3结合区的羧基端。在一些实施例中，多特异性多肽构建体含有结合至共刺激受体、各含有VH-CH1(Fd)和VL-CL的两个Fab抗体片段，其中一者定位于相对于Fc区的氨基端且另一者定位于相对于CD3结合区的羧基端。

[0518] 在一些实施例中，多特异性多肽构建体为由三种或更多种多肽形成或包括三种或更多种多肽，包括第一多肽，该第一多肽包含异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头和结合至共刺激受体的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL；第二多肽，该第二多肽包含异源二聚体Fc区的第二Fc多肽、接头和视情况存在的结合至共刺激受体的Fab抗体片段的相同VH-CH1(Fd)或VL-CL；和第三多肽，该第三多肽包含结合至共刺激受体的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL中的另一者。多特异性多肽构建体的第一、第二和/或第三多肽亦可包括5T4 VHH域，诸如所述任一者。

[0519] 在一些实施例中，CRBR或CRBRs中的每一者独立地为或包括共刺激受体的天然(原生)同源结合搭配物(例如天然配位体)，或对共刺激受体展现结合活性的其变体。

[0520] 在一些实施例中，所提供多特异性多肽构建体的一或多个CRBR结合T细胞上所表达的共刺激受体。在一些实施例中，超过一个CRBR结合至共刺激受体且CRBRs(诸如第一CRBR和第二CRBR)中的每一者结合相同共刺激受体。在一些实施例中，CRBRs(诸如第一CRBR和CRBRs)中的每一者结合不同共刺激受体。在一些实施例中，CRBRs(诸如第一CRBR和第二CRBR)中的每一者结合相同共刺激受体上的不同抗原决定基。在一些实施例中，CRBRs(诸如第一抗原-CRBR和CRBR)中的每一者结合相同共刺激受体上的相同抗原决定基。

[0521] 在一些实施例中，CRBR或结合共刺激受体的CRBRs中的每一者独立地对共刺激受体产生单价、二价、三价或四价结合。

[0522] 在一些实施例中，抗原结合域对TAA产生单价、二价、三价或四价结合。在一些实施例中，对TAA的二价结合包含结合相同抗原的相同抗原决定基(例如单抗原决定基)的两个抗原结合域。在一些实施例中，对TAA的二价结合包含结合相同抗原的不同抗原决定基(例如双抗原决定基)的两个抗原结合域。在一些实施例中，对TAA的单价结合包含结合抗原的一个抗原决定基(例如单抗原决定基)的一个抗原结合域。

[0523] 在一些实施例中，共刺激受体表达于T细胞上，诸如获自受试者的初始T细胞。在一些实施例中，共刺激受体表达于人类T细胞上，诸如获自人类受试者的初始人类T细胞。

[0524] 在一些实施例中，共刺激受体为肿瘤坏死因子(TNF)受体家族成员。在一些实施例中，共刺激受体为免疫球蛋白超家族(IgSF)成员。在一些实施例中，共刺激受体为B7受体家族成员。

[0525] 在一些实施例中，共刺激受体选自由以下组成的组：41BB(CD137)、OX40(CD134)、CD27、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)、CD28、ICOS、CD40、B细胞活化因子受体(BAFF-R)、B细胞成熟抗原(BCMA)、跨膜活化因子和CAML相互作用因子(TACI)，和NKG2D。在一些实施例中，共刺激受体为选自41BB、OX40、GITR、ICOS或CD28。在一些实施例中，共刺激受体为选自41BB、OX40或GITR。

[0526] 在一些实施例中，共刺激受体为41BB。在一些实施例中，共刺激受体为OX40。在一些实施例中，共刺激受体为GITR。在一些实施例中，共刺激受体为ICOS。在一些实施例中，共刺激受体为CD28。

[0527] 在一些实施例中，多特异性多肽的CRBR为或包含针对共刺激受体的促效性结合分子。CRBR可以结合至共刺激受体且起始、诱导或刺激与受体天然配位体所起始、诱导或刺激相似或相同的反应或活性。在一些方面中，CRBR对共刺激受体的结合诱导或刺激的下游信号为受体天然配位体所起始、诱导或刺激的信号的大于5％、大于10％、大于20％、大于30％、大于40％、大于50％、大于60％、大于70％、大于80％、大于90％或大于100％。

[0528] 在一些实施例中，一或多个CRBR为结合至共刺激受体41BB(CD137)、OX40(CD134)、CD27、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)、CD28、ICOS、CD40、B细胞活化因子受体(BAFF-R)、B细胞成熟抗原(BCMA)的抗体或其片段。在一些实施例中，一或多个CRBR为结合至共刺激受体41BB、OX40、GITR、ICOS或CD28的抗体或其片段。在一些实施例中，一或多个CRBR为结合至共刺激受体41BB、OX40或GITR的抗体或其片段。用于结合41BB、OX40和GITR的例示性多肽分别描述于PCT公开案第WO2017123650号、第WO2017123673号和第WO2017015623号中。在一些实施例中，一或多个CRBR为结合共刺激受体的单域抗体(sdAb)，诸如PCT公开案第WO2017123650号、第WO2017123673号和第WO2017015623号所述的那些物。

[0529] 在一些实施例中，共刺激受体结合区(CRBR)结合或包含41BB(CD137)、OX40(CD134)、CD27、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)、CD28、ICOS、CD40、B细胞活化因子受体(BAFF-R)、B细胞成熟抗原(BCMA)、跨膜活化因子和CAML相互作用因子(TACI)、NKG2D的天然同源结合搭配物。在一些实施例中，天然同源结合搭配物为选自41BB配位体(41BBL)、OX40L(CD252)、CD70、GITR配位体/TNFSF18、CD80(B7-1)、CD86(B7-2)、ICOS配位体(ICOSL)、CD154(CD40L)、B细胞活化因子(BAFF)、A增殖诱导配位体(APRIL)、NKG2D配位体，或其功能片段。

[0530] 在一些实施例中，共刺激受体结合区(CRBR)为结合41BB的抗体或抗原结合片段。在特定实施例中，结合4-1BB的CRBR为单域抗体。在一些实施例中，sdAb含有CDR1 GFSFSINAMG(SEQ ID NO:347中所示)、CDR2AIESGRNTV(SEQ ID NO:348中所示)和CDR3 LKGNRVVSPSVAY(SEQ ID NO:349中所示)。靶向41BB的sdAb的实施例描述于PCT公开案第WO2017123650号中。

[0531] CRBRs的例示性序列阐述于表4中。

[0532] 在一些实施例中，至少一个CRBR或各CRBR独立地结合共刺激受体41BB。在一些实施例中，CRBR为或含有特异性针对或结合41BB的抗体或抗原结合片段，诸如含有VH和VL的sdAb或片段(例如scFv)。在一些实施例中，至少一个CRBR或各CRBR独立地为41BB的天然配位体或为其功能结合片段。在一些实施例中，结合41BB的CRBR为含有胞外域的41BB配位体(41BBL)的功能片段或其截短部分，诸如对应于UniProt第P41273号的氨基酸50-254，例如SEQ ID NO:186中所示，或SEQ ID NO:202-209中的任一者中所示的截短部分或其片段。例示性结合41BB的CRBRs阐述于SEQ ID NO:186-210和359中的任一者中。在一些实施例中，至少一个CRBR或各CRBR独立地为SEQ ID NO:193-201中的任一者中所示的抗运载蛋白。在一些实施例中，sdAb(诸如VHH)含有分别具有SEQ ID NO:347、348和349中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3。结合41BB的CRBR(诸如sdAb)可包括SEQ ID NO:210中所示的序列。结合41BB的CRBR(诸如sdAb)可包括SEQ ID NO:359中所示的序列。在一些实施例中，4-1BB结合域含有具有VH和VL的抗原结合抗体片段，诸如其中VH与VL被接头分隔的单链片段，例如scFv。在一些实施例中，结合41BB的CRBR含有SEQ ID NO:187、189和191中的任一者中所示的VH，和SEQ ID NO:188、190或192中的任一者中所示的VL。所提供多特异性多肽构建体中的CRBRs或各CRBR独立地可与前述SEQ ID Nos中的任一者具有至少85％、85％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合41BB。

[0533] 在一些实施例中，至少一个CRBR或各CRBR独立地结合共刺激受体OX40。在一些实施例中，CRBR为或含有特异性针对或结合OX40的抗体或抗原结合片段，诸如含有VH和VL的sdAb或片段(例如scFv)。在一些实施例中，至少一个CRBR或各CRBR独立地为OX40的天然配位体或为其功能结合片段。此类结合OX40的例示性CRBRs阐述于SEQ ID NO:211-220中的任一者中。在一些实施例中，结合OX40的CRBR含有SEQ ID NO:216和218中的任一者中所示的VH，和SEQ ID NO:217和219中的任一者中所示的VL。所提供多特异性多肽构建体中的CRBRs或各CRBR独立地可与前述SEQ ID Nos中的任一者具有至少85％、85％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合OX40。

[0534] 在一些实施例中，至少一个CRBR或各CRBR独立地结合共刺激受体GITR。在一些实施例中，CRBR为或含有特异性针对或结合GITR的抗体或抗原结合片段，诸如含有VH和VL的sdAb或片段(例如scFv)。在一些实施例中，至少一个CRBR或各CRBR独立地为GITR的天然配位体或为其功能结合片段。此类结合GITR的例示性CRBRs阐述于SEQ ID NO:221-230中的任一者中。在一些实施例中，结合GITR的CRBR含有SEQ ID NO:222、224、226和228中的任一者中所示的VH和SEQ ID NO:223、225、227和229中的任一者中所示的VL。所提供多特异性多肽构建体中的CRBRs或各CRBR独立地可与前述SEQ ID Nos中的任一者具有至少85％、85％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合GITR。

[0535] 在一些实施例中，至少一个CRBR或各CRBR独立地结合共刺激受体CD27。在一些实施例中，CRBR为或含有特异性针对或结合CD27的抗体或抗原结合片段，诸如含有VH和VL的sdAb或片段(例如scFv)。在一些实施例中，至少一个CRBR或各CRBR独立地为CD27的天然配位体或为其功能结合片段。此类结合CD27的例示性CRBRs阐述于SEQ ID NO:231中的任一者中。在一些实施例中，结合CD27的CRBR含有SEQ ID NO:232中所示的VH和SEQ ID NO:233中所示的VL。所提供多特异性多肽构建体中的CRBRs或各CRBR独立地可与前述SEQ ID Nos中

的任一者具有至少85％、85％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合CD27。

[0536] 在一些实施例中，至少一个CRBR或各CRBR独立地结合共刺激受体ICOS。在一些实施例中，CRBR为或含有特异性针对或结合ICOS的抗体或抗原结合片段，诸如含有VH和VL的sdAb或片段(例如scFv)。在一些实施例中，至少一个CRBR或各CRBR独立地为ICOS的天然配位体或为其功能结合片段。结合ICOS的例示性CRBR序列阐述于SEQ ID NO:234中。

[0537] 在一些实施例中，至少一个CRBR或各CRBR独立地结合共刺激受体CD28。在一些实施例中，CRBR为或含有特异性针对或结合CD28的抗体或抗原结合片段，诸如含有VH和VL的sdAb或片段(例如scFv)。在一些实施例中，至少一个CRBR或各CRBR独立地为CD28的天然配位体或为其功能结合片段。结合CD28的例示性CRBR序列阐述于SEQ ID NO:235中。

[0538]

表4：例示性CRBR序列

CRBR	形式	参考文献	SEQ ID NO
结合41BB的CRBR序列			
41BBL	天然配位体	UniProt登记编号P41273	186
PF-05082566	VH	US 2012/0237498 (SEQ ID NO: 43)	187
	VL	US 2012/0237498 (SEQ ID NO: 45)	188
BMS663513	VH	WO 2005/035584 (SEQ ID NO: 9)	189
	VL	WO 2005/035584 (SEQ ID NO: 6)	190
MSB7	VH	US 2017/0226215 (SEQ ID NO:	191

[0539]

		138)	
	VL	US 2017/0226215 (SEQ ID NO: 28)	192
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 12)	193
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 13)	194
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 14)	195
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 15)	196
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 16)	197
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 17)	198
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 18)	199
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 SEQ ID NO: 19)	200
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 20)	201
人类41BBL的71-254	41BB配位体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 3)	202
人类41BBL的85-254	41BB配位体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 4)	203
人类41BBL的80-254	41BB配位体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 5)	204
人类41BBL的52-254	41BB配位体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 6)	205
人类41BBL的	41BB配位体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO:	206

[0540]

71-248		7)	
人类41BBL的85-248	41BB配位体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 8)	207
人类41BBL的80-248	41BB配位体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 9)	208
人类41BBL的52-248	41BB配位体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 10)	209
41BB sdAb	sdAb	US 2017/0198050	210
41BB sdAb	sdAb		359
结合OX40的CRBR序列			
OX40配位体	天然配位体	UniProt登记编号P23510	211
OX40配位体	天然配位体	US 7,959,925 (SEQ ID NO: 2)	212
人类OX40L: 51-183	天然配位体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 11)	213
人类Ox40L: 51-183 N90D	天然配位体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 12)	214
人类OX40L: 52-183	天然配位体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 13)	215
1A07	VH	US 2015/0307617 (SEQ ID NO: 56)	216
	VL	US 2015/0307617 (SEQ ID NO: 59)	217
1949	VH	WO 2016/179517 (SEQ ID NO: 16)	218
	VL	WO 2016/179517	219
1D10v1	sdAb	US 9,006,399	220
结合GITR的CRBR序列			
GITR配位体	天然配位体	UniProt编号Q9UNG2	221
36E5	VH	US 2014/0348841 (SEQ ID NO: 104)	222

[0541]

	VL	US 2014/0348841 (SEQ ID NO: 105)	223
TRX-518	VH	US 2013/0183321 (SEQ ID NO: 54)	224
	VL	US 2013/0183321 (SEQ ID NO: 44)	225
5H7v2	VH	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 282)	226
	VL	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 134)	227
41G5v2	VH	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 312)	228
	VL	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 124)	229
C06v3	sdAb	US 2017/0022284 (SEQ ID NO: 59)	230
结合CD27的CRBR序列			
CD70-ECD	天然配位体	UniProt编号P32970	231
1F5	VH	US 2011/0274685	232
	VL	US 2011/0274685	233
结合CD28的CRBR序列			
CD28 sdAb	sdAb		235
结合ICOS的CRBR序列			
ICOS sdAb	sdAb		234

[0542] 在一些实施例中，一或多个CRBR直接地或间接地经由接头连接至Fc区和/或CD3结合区。在一些实施例中，连接为经由接头达成。在一些实施例中，接头为连接肽(LP)，其可包括如本文所述的任何可挠性或刚性接头，但连接CRBR或区域的肽通常不为可裂解接头。

[0543] 在一些实施例中，多特异性多肽构建体包含CRBR与Fc区之间的连接肽(LP)。在一些实施例中，多特异性多肽构建体包含CD3结合区与CRBR之间的连接肽(LP)。

[0544] f.抑制性受体结合区(IRBR)

[0545] 本发明的多特异性多肽构建体包括结合抑制性受体的一或多个抑制受体结合区(IRBR)。在一些实施例中，所提供多特异性多肽构建体中的一或多个IRBR结合T细胞上所表达的抑制性受体。在一些实施例中，抑制性受体在活化T细胞的表面上受到上调、诱导或表达。在一些方面中，IRBR阻断抑制性受体与其配位体之间的相互作用，借此减少、抑制或降低IRBR所结合的细胞(例如T细胞)中的抑制信号。在一些实施例中，IRBR或IRBRs中的每一

者独立地为抗体或抗原结合片段、共刺激受体的天然同源结合搭配物、抗运载蛋白(经工程改造的脂质运载蛋白)、锚蛋白重复蛋白、菲诺体、生替林(经工程改造的纤连蛋白III域)、胱氨酸结点域、阿菲林、亲和抗体或经工程改造的CH3域。

[0546] 在一些实施例中,IRBR或IRBRs(诸如第一IRBR和第二IRBR)中的每一者独立地包括抗体或其抗原结合片段的一或多个复本。在一些实施例中,IRBR或IRBRs(诸如第一IRBR和第二IRBR)中的每一者独立地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复本:Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、scFv、scAb、dAb、单域重链抗体,和单域轻链抗体。

[0547] 在一些实施例中,IRBR或IRBRs(诸如第一IRBR和第二IRBR)中的每一者独立地为单链抗体。在一些实施例中,单链为scFv、scAb、单域重链抗体或单域轻链抗体。

[0548] 在一些实施例中,IRBR或IRBRs(诸如第一IRBR和第二IRBR)中的每一者独立地包括一或多个单域抗体(sdAb)片段,例如V_HH、V_{NAR}、经工程改造的V_H或V_K域。V_HH可由天然骆驼科单独重链抗体产生,由产生单独重链抗体的经基因修饰的啮齿动物产生,或初始/合成骆驼科或人源化骆驼科单域抗体文库产生。V_{NAR}可由软骨鱼单独重链抗体产生。已执行各种方法以利用常规的异源二聚体V_H和V_K域产生单体sdAb,包括界面工程改造和选择特定生殖系家族。

[0549] 在一些实施例中,多特异性多肽构建体中的IRBR或IRBRs(诸如第一IRBR和/或第二IRBR)中的每一者独立地含有至少一个结合抑制性受体的sdAb或scFv。在一些实施例中,至少一个结合抑制性受体的scFv或sdAb定位于相对于Fc区的氨基端和/或相对于多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基端。在一些实施例中,多特异性多肽构建体仅含有一个结合至抑制性受体的scFv或sdAb,其可定位于相对于Fc区的氨基端和/或相对于CD3结合区的羧基端。在一些实施例中,多特异性多肽构建体含有结合至抑制性受体、定位于相对于Fc区的氨基端和/或相对于CD3结合区的羧基端的两个scFv或sdAb。

[0550] 在一些实施例中,多特异性多肽构建体由两种多肽形成或包括两种多肽,包括第一多肽,该第一多肽包含异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv)的VH域,和结合至抑制性受体的scFv或sdAb;和第二多肽,该第二多肽包含异源二聚体Fc区的第二Fc多肽、接头、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv)的VL域,和视情况存在的结合至抑制性受体的另一相同或不同scFv或sdAb。结合抑制性受体的scFv或sdAb可定位于相对于异源二聚体Fc的Fc多肽的氨基端和/或相对于CD3结合区的VH或VL链的羧基端。多特异性多肽构建体的第一和/或第二多肽中的至少一者亦包括结合TAA或其链的抗原结合域,如章节II.4中所述。在一些实施例中,结合TAA的抗原结合域为scFv或sdAb且作为多特异性多肽构建体的第一和/或第二多肽的一部分包括在内。在一些实施例中,结合TAA的抗原结合域为Fab,且多特异性多肽构建体另外由第三多肽形成,其中至少第一与第二多肽包括结合TAA的Fab链(例如Fab的VH-CH1或VL-CL)且第三多肽含有结合TAA的Fab的另一链(例如Fab的另一VH-CH1或VL-CL)。

[0551] 在一些实施例中,多特异性多肽构建体由两种多肽形成或包括两种多肽,包括第一多肽,该第一多肽依序包含:特异性针对TAA的第一抗原结合域、异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv)的VH域,和特异性针对TAA的第二抗原结合域;以及第二多肽,该第二多肽含有IRBR且依序包含:异源二聚体Fc区的第二Fc多肽、接

头、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv)的VL域,其中IRBR定位于Fc区的氨基端和/或CD3结合区的C端。在一些实施例中,IRBR定位于第二多肽上的CD3结合区的羧基端。在一些实施例中,IRBR定位于第二多肽上的Fc区的氨基端。在一些实施例中,IRBR定位于Fc区的氨基端和CD3结合区的C端。在一些实施例中,特异性针对TAA的第一与第二抗原结合域相同。在一些实施例中,特异性针对TAA的第一与第二抗原结合域不同。在一些实施例中,第一抗原结合域和第二抗原结合域结合不同TAA。在一些实施例中,第一抗原结合域和第二抗原结合域结合相同TAA的不同或不重叠抗原决定基且/或竞争结合至相同TAA。

[0552] 在一些实施例中,IRBR或IRBRs(诸如第一IRBR和/或第二IRBR)中的每一者独立地含有超过一个链。在一些实施例中,多特异性多肽构建体中的IRBR或IRBRs(诸如第一IRBR和/或第二IRBR)中的每一者独立地含有组装为FAB的VH和VL序列。

[0553] 在一些实施例中,多特异性多肽构建体中的抗原结合域或抗原结合域(诸如第一抗原结合域和/或第二抗原结合域)中的每一者独立地含有结合抑制性受体的Fab抗体的VH-CH1(Fd)和VL-CL。在一些实施例中,含有VH-CH1(Fd)和VL-CL的Fab抗体定位于相对于Fc区的氨基端和/或相对于多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基端。在一些实施例中,多特异性多肽构建体仅含有一个结合至抑制性受体、含有VH-CH1(Fd)或VL-CL的Fab抗体,该Fab抗体可定位于相对于Fc区的氨基端和/或相对于CD3结合区的羧基端。在一些实施例中,多特异性多肽构建体含有结合至抑制性受体、各含有VH-CH1(Fd)和VL-CL的两个Fab抗体片段,其中一者定位于相对于Fc区的氨基端且另一者定位于相对于CD3结合区的羧基端。

[0554] 在一些实施例中,多特异性多肽构建体为由三种或更多种多肽形成或包括三种或更多种多肽,包括第一多肽,该第一多肽包含异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头,和结合至抑制性受体的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL;第二多肽,该第二多肽包含异源二聚体Fc区的第二Fc多肽、接头和视情况存在的结合至抑制性受体的Fab抗体片段的相同VH-CH1(Fd)或VL-CL;和第三多肽,该第三多肽包含结合至抑制性受体的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL中的另一者。多特异性多肽构建体中的第一、第二和/或第三多肽亦可包括结合TAA的抗原结合域或其链,如章节II.4中所述。在一些实施例中,结合TAA的抗原结合域为scFv或sdAb且作为多特异性多肽构建体的第一和/或第二多肽的一部分包括在内。在一些实施例中,结合TAA的抗原结合域为Fab,且多特异性多肽构建体另外由第四多肽形成,其中至少第一与第二多肽包括结合TAA的Fab的链(例如Fab的VH-CH1或VL-CL)且第四多肽含有结合TAA的Fab的另一链(例如Fab的另一VH-CH1或VL-CL)。

[0555] 在一些实施例中,IRBR或IRBRs中的每一者独立地为或包括抑制性受体的天然(原生)同源结合搭配物(例如天然配位体),或对抑制性受体展现结合活性的其变体。

[0556] 在一些实施例中,所提供多特异性多肽构建体中的一或多个IRBR结合T细胞上所表达的抑制性受体。在一些实施例中,存在超过一个结合至抑制性受体的IRBR且IRBRs(诸如第一IRBR和第二IRBR)中的每一者结合相同共刺激受体。在一些实施例中,IRBRs(诸如第一IRBR和第二IRBR)中的每一者结合不同抑制性受体。在一些实施例中,IRBRs(诸如第一IRBR和第二IRBR)中的每一者结合相同抑制性受体上的不同抗原决定基。在一些实施例中,IRBRs(诸如第一IRBR和第二IRBR)中的每一者结合相同抑制性受体上的相同抗原决定基。

[0557] 在一些实施例中,结合抑制性受体的IRBR或IRBRs中的每一者独立地对抑制性受体产生单价、二价、三价或四价结合。

[0558] 在一些实施例中，抑制性受体表达于T细胞上，诸如受试者的初始T细胞上。在一些实施例中，抑制性受体表达于人类T细胞上，诸如人类受试者的初始人类T细胞。

[0559] 在一些实施例中，抑制性受体为肿瘤坏死因子(TNF)受体家族成员。在一些实施例中，抑制性受体为免疫球蛋白超家族(IgSF)成员。

[0560] 在一些实施例中，抑制性受体为程序化细胞死亡蛋白1(PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)、具有Ig和ITIM域的T细胞免疫受体(TIGIT)、T细胞活化的免疫球蛋白抑制因子V域(VISTA)、含有T细胞免疫球蛋白和黏蛋白域的分子-3(TIM3)，或淋巴细胞活化基因3(LAG3)。在一些实施例中，一或多个IRBR为结合至抑制性受体PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、TIM3或LAG3的抗体或其片段。在特定实施例中，抗体或抗原结合片段为人源化的或为人类抗体或抗原结合片段。

[0561] 在一些实施例中，抑制性受体结合区(IRBR)结合或包含PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA或TIM3的天然同源结合搭配物。在一些实施例中，天然同源结合搭配物为选自PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、CD155、CD112或VSIG-3/IGSF11，或其功能片段。

[0562] 在一些实施例中，IRBR含有抗体片段，诸如scFv，该抗体片段含有结合抑制性受体(诸如PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA或TIM3)的抗体的可变轻链(VL)和可变重链(VH)。在一些实施例中，IRBR含有特异性结合抑制性受体(诸如PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA或TIM3)的单域抗体或VHH域，参见例如PCT公开案第WO2018068695号或第WO2018068201号中所述。

[0563] 在一些实施例中，抑制性受体为PD-1。在一些实施例中，一或多个IRBR为结合至PD-1的抗体片段。

[0564] 在一些实施例中，IRBR为或含有结合PD-1的VHH域，该VHH域包含VHH氨基酸序列中所含的CDR1、CDR2和CDR3，该VHH氨基酸序列选自SEQ ID NO:304-320、326或364-381中的任一者，或与选自SEQ ID NO:304-320、326或364-381中的任一者的VHH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合PD-1的氨基酸序列。

[0565] 在一些实施例中，IRBR为或含有VHH域，该VHH域含有SEQ ID NO:326中所示的VHH域中所含的CDR1、CDR2、CDR3，或与SEQ ID NO:326中所示的选定VHH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合PD-1的氨基酸序列。在一些实施例中，IRBR为或含有VHH域，该VHH域具有SEQ ID NO:326中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:326中所示的选定氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合PD-1的氨基酸序列。在一些实施例中，IRBR为或含有VHH域，该VHH域为SEQ ID NO:326中所示的氨基酸序列的人源化变体。在一些实施例中，结合PD-1的IRBR具有VHH域，该VHH域包含SEQ ID NO:321、322或323中的任一者中所示的CDR1、SEQ ID NO:324中所示的CDR2和SEQ ID NO:325中所示的CDR3。

[0566] 在一些实施例中，结合PD-1的IRBR具有VHH域，该VHH域含有SEQ ID NO:322、324和325中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，结合PD-1的IRBR具有VHH域，该VHH域含有SEQ ID NO:321、324和325中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，结合PD-1的IRBR具有VHH域，该VHH域含有SEQ ID NO:323、324和325中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0567] 在一些方面中，IRBR为或含有VHH域，该VHH域含有VHH氨基酸序列中所含的CDR1、CDR2和CDR3，该VHH氨基酸序列选自SEQ ID NO:304-320中的任一者或与选自SEQ ID NO:

304-320中的任一者的V_HH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合PD-1的氨基酸序列。

[0568] 在一些情况下，IRBR含有作为人源化变体的VHH域，其具有SEQ ID NO:304-320中的任一者中所示的氨基酸序列或与选自SEQ ID NO:304-320中的任一者的VHH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合PD-1的氨基酸序列。在一些实施例中，IRBR为或含有VHH域序列，其为具有SEQ ID NO:304-320中的任一者中所示的氨基酸序列的人源化VHH域。

[0569] 在一些实施例中，IRBR为或含有VHH域，该VHH域含有SEQ ID NO:364中所示的VHH域中所含的CDR1、CDR2、CDR3，或与SEQ ID NO:364中所示的选定VHH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合PD-1氨基酸序列。在一些实施例中，IRBR为或含有VHH域，该VHH域具有SEQ ID NO:364中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:364中所示的选定氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合PD-1的氨基酸序列。在一些实施例中，IRBR为或含有VHH域，该VHH域为SEQ ID NO:364中所示的氨基酸序列的人源化变体。

[0570] 在一些实施例中，结合PD-1的IRBR具有VHH域，该VHH域包含SEQ ID NO:321、322或323中的任一者中所示的CDR1、SEQ ID NO:324中所示的CDR2和SEQ ID NO:325中所示的CDR3。

[0571] 在一些实施例中，结合PD-1的IRBR具有VHH域，该VHH域含有SEQ ID NO:322、324和325中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，结合PD-1的IRBR具有VHH域，该VHH域含有SEQ ID NO:321、324和325中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中，结合PD-1的IRBR具有VHH域，该VHH域含有SEQ ID NO:323、324和325中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0572] 在一些方面中，IRBR为或含有VHH域，该VHH域含有VHH氨基酸序列中所含的CDR1、CDR2和CDR3，该VHH氨基酸序列选自SEQ ID NO:365-381中的任一者，或与选自SEQ ID NO:365-381中的任一者的V_HH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合PD-1的氨基酸序列。

[0573] 在一些情况下，IRBR含有作为人源化变体的VHH域，其具有SEQ ID NO:365-381中的任一者中所示的氨基酸序列或与选自SEQ ID NO:365-381中的任一者的VHH区氨基酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合PD-1的氨基酸序列。在一些实施例中，IRBR为或含有VHH域序列，其为具有SEQ ID NO:365-381中的任一者中所示的氨基酸序列的人源化VHH域。

[0574] 在一些实施例中，一或多个IRBR直接地或间接地经由接头连接至Fc区和/或CD3结合区。在一些实施例中，连接为经由接头达成。在一些实施例中，接头为连接肽(LP)，其可包括如诸如章节II.3所述的任何可挠性或刚性接头，但连接IRBR或区域的肽通常不为可裂解接头。

[0575] 在一些实施例中，多特异性多肽构建体包含IRBR与Fc区之间的连接肽(LP)。在一些实施例中，多特异性多肽构建体包含CD3结合区与IRBR之间的连接肽(LP)。

[0576] 在一些实施例中，多特异性多肽构建体包含超过一个IRBR。在一些实施例中，多特异性多肽构建体包含第一IRBR与Fc区之间的第一连接肽(LP1)。在一些实施例中，多特异性多肽构建体包含CD3结合区与第二IRBR之间的第二连接肽(LP2)。在一些实施例中，多特异

性多肽构建体包含第一IRBR与Fc区之间的第一连接肽(LP1)和CD3结合区与第二IRBR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端至C端具有如下结构排列:IRBR和/或抗原结合域-LP1-Fc区-接头-CD3结合区-LP2-IRBR和/或抗原结合域。在一些实施例中,两种连接肽彼此不相同。

[0577] 在一些实施例中,LP(例如LP1或LP2)独立地为具有约1至20个氨基酸长度的肽。在一些实施例中,LP1或LP2独立地为肽,该肽为或包含SEQ ID NO:1-4、125-127、129中所示的任何Gly-Ser接头或GGS。

[0578] 在一些实施例中,多特异性多肽构建体含有CRBR与IRBR。在一些实施例中,CRBR或IRBR之一定位于相对于Fc区的氨基端且CRBR或IRBR中的另一者定位于相对于多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基端。在一些实施例中,CRBR和IRBR存在于异源二聚体多特异性多肽构建体的不同多肽上,其中至少一种多肽亦含有至少一个特异性针对TAA的抗原结合域。在一些实施例中,CRBR和IRBR存在于异源二聚体多特异性多肽构建体的同一多肽(第一多肽)上且特异性针对TAA的至少一个抗原结合域位于异源二聚体多特异性多肽构建体的另一(或第二)多肽上。

[0579] 在一些实施例中,多特异性多肽构建体为由两种多肽形成或包括两种多肽。在一些方面中,第一多肽依序包含:特异性针对TAA的第一抗原结合域、异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv)的VH域,和特异性针对TAA的第二抗原结合域;且第二多肽依序包含:IRBR或CRBR之一、异源二聚体Fc区的第二Fc多肽、接头、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv)的VL域,和IRBR或CRBR中的另一者。在一些实施例中,IRBR定位于第二多肽的CD3结合区的羧基端且CRBR定位于第二多肽的Fc区的氨基端。在一些实施例中,IRBR定位于第二多肽的Fc区的氨基端且CRBR定位于第二多肽的CD3结合区的羧基端。在一些实施例中,特异性针对TAA的第一与第二抗原结合域相同。在一些实施例中,特异性针对TAA的第一与第二抗原结合域不同。在一些实施例中,第一抗原结合域和第二抗原结合域结合不同TAA。在一些实施例中,第一抗原结合域和第二抗原结合域结合相同TAA的不同或不重叠抗原决定基且/或竞争结合至相同TAA。

[0580] 3.NK募集

[0581] 在一些实施例中,5T4结合多肽为双特异性构建体,其为或包含本文所提供的至少一个5T4 VHH域和至少一种其他结合分子,该其他结合分子能够结合至自然杀伤(NK)细胞和/或募集NK细胞上所表达的表面分子。在特定方面中,多特异性构建体对5T4和NK细胞表面分子具有双特异性。在一些实施例中,表面分子为CD16(FcγRIII)。特定言之,所提供的双特异性5T4结合多肽能够特异性结合人类NK细胞上所表达的NK活化受体,诸如人类CD16a。

[0582] CD16(对已知涉及抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的一些IgG的Fc部分的低亲和力受体)为经充分表征的膜受体,其负责触发NK细胞对靶点细胞的溶解(Mandelboim等人,1999,PNAS 96:5640-5644)。一般而言,大部分(约90%)人类NK细胞以低密度(CD56dim)表达CD56且以高水平表达FcγRIII(CD16)(Cooper等人,2001,Trends免疫学.22:633-640)。人类FcγRIII以两种同种型存在:CD16a(FcγRIIIA)和CD16b(FcγRIIIB),其与其细胞外免疫球蛋白结合区共有96%序列一致性(van de Winkel和Capel,1993,Immunol.Today 14(5):215-221)。在特定实施例中,其他结合分子能够特异性结合CD16a。

[0583] CD16a作为跨膜受体表达于巨噬细胞、肥大细胞和NK细胞上。在NK细胞上,CD16a的α链与含有FcεRIγ链和/或T细胞受体(TCR)/CD3ζ链的基于免疫受体酪氨酸的活化模体(ITAM)结合以介导信号传导(Wirthmueller等人,1992,J.Exp.Med.175:1381-1390)。已在NK细胞中观测到CD16a与γ和ζ链的同源二聚体和异源二聚体的不同组合的相互作用,表明能够经由不同信号传导路径、经由CD16a复合物的变化形式介导NK细胞中的信号传导(Anderson等人,1990,PNAS 87(6):2274-2278;Ackerly等人,1992,Int.J.Cancer增刊7:11-14)。表达FcγR的效应细胞已展示与经由ADCC摧毁肿瘤细胞有关。举例而言,CD16a与诸如能够特异性结合CD16a的促效结合分子的接合可以引起表达CD16a的NK细胞活化,借此诱发生物反应,特定而言,信号传导反应。在一些情况下,结合分子能够借助于其对此类细胞的结合、以类似于抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的方式触发细胞杀死。

[0584] 在特定实施例中,5T4结合多肽包括可以特异性结合至5T4和CD16a的双特异性分子,其可以使NK细胞靶向携带此类抗原的细胞,使得携带抗原的细胞可以经由NK细胞介导的细胞杀死加以根除。举例而言,特异性结合肿瘤细胞上所表达的5T4的结合分子可以使NK细胞靶向肿瘤细胞。在一些情况下,结合分子结合至CD16a而引起的NK细胞活化可使得肿瘤细胞被杀死。

[0585] 在一些实施例中,特异性针对活化NK细胞受体(诸如CD16a)的其他结合域为选自以下的抗原结合片段:Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、scFv、经二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、scAb、dAb、单域重链抗体(VHH),或单域轻链抗体。在一些实施例中,其他结合域就结合活化T NK细胞受体(诸如CD16a)而言为单价的。

[0586] 在一些情况下,识别CD3结合域的其他结合域识别CD16a。在一些实施例中,抗CD16a结合域包括抗CD16a Fab片段、抗CD16a $F(ab')_2$片段、抗CD16a Fv片段、抗CD16a scFv、抗CD16a dsFv、抗CD16a scAb、抗CD16a dAb、抗CD16a单域重链抗体(VHH)和抗CD16a单域轻链抗体的一或多个复本。在一些实施例中,抗CD16a结合域就结合CD16a而言为单价的。在一些实施例中,BH73结合多肽为结合BH73且促效CD16a活性的双特异性构建体。

[0587] 特异性针对CD16a的抗体及其抗原结合片段已为人所知且包括例如NM3E2(McCall等人(1999)Mol.Immunol.,36:433-045。其他抗CD16a抗体亦可以用于本文所提供的构建体中,包括已公开的美国专利申请案第US10160280795号;美国专利第9,701,750号;Behar等人(2008)Protein Eng Des Sel.21:1-10;Arndt等人,(1999)Blood 94:2562-2568中所述的任一者。在特定实施例中,抗CD16a为抗CD16a scFv。在一些实施例中,抗CD16a为TandAb分子中所包括的抗CD16a抗体(参见例如Reush等人(2014)Mabs,6:727-738)。在一些方面中,抗CD16a为抗CD16a或抗原结合片段,诸如scFv,如美国专利第9,035,026号所述。

[0588] 所提供的双特异性构建体可格式化呈多种形式中的任一者,其含有至少一个5T4 VHH域和特异性针对活化NK细胞受体的至少一种其他域,诸如CD16a结合域。

[0589] 在一个实施例中,双特异性构建体为双特异性单域抗体连接Fab(S-Fab),其含有直接地或间接地连接至特异性针对NK细胞活化受体(例如CD16a)的Fab抗原结合片段(诸如抗CD16a Fab)的至少一个所述5T4 VHH域。在一些实施例中,5T4 VHH域连接至抗C16a Fab的VH或VL链的C端。在一些实施例中,S-Fab可进一步加以修饰,诸如通过与聚乙二醇(PEG)、N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA)共聚物、蛋白质(诸如白蛋白)、聚麸胺酸结合或血浆半衰期延长(Pan等人,(2018)International Jounral of Nanomedicine,2018:3189-

3201)。

[0590] 在另一个实施例中,双特异性构建体为scFv-单域抗体,其中构建体含有直接地或间接地连接至scFv的至少一个所述5T4 VHH,该scFv含有特异性针对NK细胞活化受体(例如CD16a)的抗原结合域的VH和VL。针对NK细胞活化受体的scFv(例如抗CD16a scFv)可含有所述VH和VL序列中的任一者。在一些实施例中,VHH域和scFv通过接头(诸如肽接头)连接。在一些实施例中,肽接头可为如本文所述的肽接头。在一些实施例中,VHH域和scFv各自连接至Fc区,诸如Fc区的N端,视情况经由铰链区或接头(例如肽接头)连接。Fc区可为本文所述的任一者,诸如人类Fc区或其变体,例如人类IgG1 Fc区或其变体。在特定实施例中,Fc区为由变体型Fc域(例如变体型人类IgG1域)形成,所述Fc域发生突变或经修饰以促进异源二聚化,其中不同多肽可二聚而产生异源二聚体。

[0591] 在另一实施例中,特异性针对NK细胞活化受体(例如CD16a)的抗原结合域为单域抗体,诸如特异性结合至CD16a的VHH域。单域抗体(包括结合至CD16a的VHH域)已为人所知,参见例如已公开的美国专利申请案第US20160280795号。在此方面中,本文提供的双特异性构建体可包括至少一个5T4 VHH域和至少一个CD16a VHH域。为将构建体格式化,在一些情况下,各VHH域连接至Fc区,诸如Fc区的N端,视情况经由铰链区或接头(例如肽接头)连接。Fc区可为本文所述的任一者,诸如人类Fc区或其变体,例如人类IgG1 Fc区或其变体。在特定实施例中,Fc区为由变体型Fc域(例如变体型人类IgG1域)形成,所述Fc域发生突变或经修饰以促进异源二聚化,其中不同多肽可二聚而产生异源二聚体。

[0592] 在上述实施例中,为了促进异源二聚而对Fc区进行的例示性修饰已为人所知,包括如下文所述的任一者,例如表3。在一些实施例中,异源二聚体Fc中的一种Fc多肽包含SEQ ID NO:328(例如SEQ ID NO:103或107)、334(例如SEQ ID NO:115或117)中的任一者中所示的氨基酸序列,且异源二聚体Fc中的另一种Fc多肽含有SEQ ID NO:329(例如SEQ ID NO:104或108)、332(例如SEQ ID NO:111或113)、336(例如SEQ ID NO:119或121)中的任一者中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,异源二聚体Fc中的一种Fc多肽包含SEQ ID NO:330(例如SEQ ID NO:105或109)、335(例如SEQ ID NO:116或118)中的任一者中所示的氨基酸序列,且异源二聚体Fc中的另一种Fc多肽包含SEQ ID NO:331(例如SEQ ID NO:106或110)、333(例如SEQ ID NO:112或114)、337(SEQ ID NO:120或122)中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0593] 4.细胞因子融合体和/或细胞因子受体靶点

[0594] 在一些实施例中,5T4结合多肽为多特异性多肽构建体,其为细胞因子-抗体融合蛋白(亦称为5T4 VHH-细胞因子融合体)。在一些方面中,本文所提供的至少一个5T4 VHH域直接地或间接地连接至至少一种细胞因子,诸如干扰素。在特定实施例中,细胞因子为能够展现抗增殖活性、细胞凋亡活性和/或抗病毒活性的干扰素。在一些实施例中,本文所提供的5T4 VHH-细胞因子融合体中的干扰素能够结合至由IFNAR1和/或2构成的受体。可使用多种分析中的任一者评估此类融合蛋白结合IFNAR1和/或2、减少或降低癌细胞的生长速率和/或增殖速率、减小肿瘤尺寸、消除肿瘤或诱导癌细胞死亡(例如经由细胞凋亡)的作用。此类分析包括使用已知表达5T4的各种癌细胞株进行的活体外分析或使用动物肿瘤模型进行的活体内分析。

[0595] 在一些实施例中,干扰素为第I型干扰素,诸如人类第I型干扰素或其变体。在一些

方面中，人类第I型干扰素为变体，其为截短的人类第I型干扰素或人类突变型第I型干扰素。在一些实施例中，第I型干扰素或其变体为野生型人类IFN-α(IFN-α;α2和天然较高亲和力变体，诸如α14)、干扰素β(IFN-β)以及其突变体和/或截短形式。在一些实施例中，干扰素为第II型干扰素，诸如人类第II型干扰素或其变体。在一些方面中，人类第II型干扰素为变体，其为截短的人类第II型干扰素或人类突变型第II型干扰素。在一些实施例中，第II型干扰素或其变体为野生型人类干扰素γ(IFN-γ)以及其突变体和/或截短形式。在一些实施例中，所提供的细胞因子-抗体融合蛋白可用于抑制表达或过度表达5T4的靶细胞(例如癌细胞)的生长和/或增殖。

[0596] 在一些实施例中，5T4 VHH-细胞因子融合蛋白的形式类似于如以下文献中所述的任一者：国际PCT公开申请案第WO2014194100号、美国专利第9,803,021号；Valedkarimi等人(2017)Biomed Pharmacother.,95:731-742;或Young等人(2014)Semin Oncol.,41:623-636。

[0597] 在特定实施例中，干扰素(例如第I型干扰素，诸如人类第I型干扰素(例如IFN-α、IFN-β或IFN-γ))为具有原生或野生型干扰素的内源结合亲和力和/或活性的干扰素，该内源结合亲和力和/或活性优选处于原生野生型干扰素(其分离形式)的至少60％或至少或至少约80％的水平，诸如至少90％、95％、98％、99％、100％或大于原生野生型干扰素(其分离形式)的水平。

[0598] 干扰素和干扰素突变体为一组熟知且经充分表征的细胞因子(参见例如WO 2002/095067;WO 2002/079249;WO 2002/101048;WO 2002/095067;WO 2002/083733;WO 2002/086156;WO 2002/083733;WO 2003/000896;WO 2002/101048;WO 2002/079249;WO 2003/000896;WO 2004/022593;WO2004/022747;WO 2003/023032;WO 2004/022593以及Kim等人(2003)Cancer Lett.189(2):183-188;Hussain等人(2000)J.Interferon Cytokine Res.20(9):763-768;Hussain等人(1998)J.Interferon Cytokine Res.18(7):469-477;Nyman等人(1988)Biochem.J.329(Pt 2):295-302;Golovleva等人(1997)J.Interferon Cytokine Res.17(10):637-645;Hussain等人(1997)J.Interferon Cytokine Res.17(9):559-566;Golovleva等人(1997)Hum.Hered.47(4):185-188;Kita等人(1991)J.Interferon Cytokine Res.17(3):135-140;Golovleva等人(1996)Am.J.Hum.Genet.59(3):570-578;Hussain等人(1996)J.Interferon Cytokine Res.16(7):523-529;Linge等人(1995)Biochim Biophys Acta。此类的任一者可以用于所提供的细胞因子-抗体融合蛋白。

[0599] 在一些实施例中，干扰素为人类第I型干扰素。人类干扰素基因/蛋白质家族的等位基因已为人所知，参见例如Pestka(10983)Arch Biochem Biophys.,221:1-37;Diaz等人(1994)Genomics,22:540-52;Pestka(1986)Meth.Enzymol,199:3-4;和Krause等人(2000)J.Biol.Chem.,275:22995-3004。

[0600] 在一些实施例中，干扰素为全长IFN-α(例如人类IFN-α)、全长IFN-β(例如人类IFN-β)或全长IFN-γ(例如人类IFN-γ)。在一些实施例中，干扰素为具有生物活性的截短IFN-α(例如人类IFN-α)、具有生物活性的截短IFN-β(例如人类IFN-β)或具有生物活性的截短IFN-γ(例如人类IFN-γ)。在一些实施例中，具有生物活性的截短干扰素含有在N端和/或C端截短的野生型或原生干扰素的连续氨基酸序列，且包含长度为原生或野生型干扰素长度的至少或至少约50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％或更多。可以使用

多种标准分析中的任一者评估干扰素生物活性。举例而言，可通过测量针对特定测试病毒的抗病毒活性来分析IFN-α活性。用于分析IFN-α活性的试剂盒可市购(参见例如Neutekbio,Ireland的ILITE™alphabeta试剂盒)。在一些方面中，IFN-α为IFN-a2a(例如Acc.第CAA23805号)、IFN-a-c(Acc.第P01566号)、IFN-a-d(Acc.第AAB59403号)；IFNa-5(Acc.第CAA26702号)；IFNa-6(Acc.第AA26704号)；IFNa-4(Acc.第NP_066546号)；IFNa-4b(Acc.第CAA26701号)；IFNa-I(Acc.第AAA52725号)；IFNa-J(Acc.第CAA23792号)；IFNa-H(Acc.第CAA23794号)；IFNa-F(Acc.第AAA52718号)；IFNa-7(Acc.第CAA26903号)，或为其生物学活性片段。在一些方面中，IFN-β为Acc.第AAC41702号中所示的IFN-β或为其生物学活性片段。在一些方面中，IFN-γ为Acc.第P01579号中所示的IFN-γ或为其生物学活性片段。

[0601] 在一些实施例中，预期所提供的5T4 VHH-细胞因子融合体含有变体型或突变型干扰素α2(IFNa2)。某些突变体包括位置57的His和/或位置58的E和/或位置61的Q的突变。在某些实施例中，突变体包括突变H57Y和/或E58N和/或Q61S。在某些实施例中，突变体包括突变的IFNa2，其具有突变H57Y、E58N和Q61S(YNS)(参见例如Kalie等人(2007)J.Biol.Chem.,282:11602-11611)。在其他实施例中，突变体包括位置57的His和/或位置58的E和/或位置61的Q向A(丙氨酸)的突变。在某些实施例中，突变体包括突变的IFNa2，其具有突变H57A、E58A和Q61A(HEQ)(参见例如Jaitin等人(2006)Mo/.Cellular Biol,26(5):1888-1897)。在某些实施例中，突变型干扰素包含位置57的His向A、Y或M的突变，和/或位置58的E向A或N或D或L的突变，和/或位置61的Q向A或S或L或D的突变。在某些实施例中，突变体包括干扰素α8(IFN-a8)突变体，诸如氨基酸置换对应于以下的变体：R145置换为V、I或L和/或A146置换为N或S和/或M149置换为Y，例如R145V/A146N/M149Y)、R145I、/A146S/M149Y或R145L/A146S/M149Y(参见例如Yamamoto等人，.(2009)J.Interferon&cytokine Res,29:161-170。

[0602] 在一些实施例中，所提供的5T4 VHH-细胞因子融合体含有突变型或变体型IFN-β，其在氨基酸17含有取代天然存在的半胱氨酸的丝氨酸(参见例如Hawkins等人(1985)Cancer Res.,45,5914-5920)。

[0603] 在一些实施例中，所提供的5T4 VHH-细胞因子融合体含有截短的干扰素。在一个实施例中，截短的干扰素包括缺失至多为前15个氨基端氨基酸残基和/或缺失至多为最后10-13个羧基端氨基酸残基的人类IFN-α，其已展示保持原生或野生型人类IFN-α的活性(参见例如Ackerman(1984)Proc.Natl.Acad.Sci,USA,81:1045-1047)。在一些实施例中，截短的人类IFN-α有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13个羧基端氨基酸残基缺失和/或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基端氨基酸残基缺失。

[0604] 在一些实施例中，所提供的5T4 VHH-细胞因子融合体含有截短的干扰素，诸如已公开的美国专利申请案第US2009/0025106号中所述。在一些实施例中，所提供的5T4 VHH-细胞因子融合体含有截短的IFN-γ，该截短的IFN-γ含有N端和/或C端缺失，诸如Lundell等人(1991)Protein Neg.,4:335-341;Pan等人(1987)Eur.J.Biochem.,166:145-149所述。

[0605] 在一些实施例中，干扰素(例如人类干扰素)为突变型干扰素，该突变型干扰素相较于未修饰(典型地为野生型)的蛋白质对蛋白分解具有抗性，参见例如美国专利第7,998,469号；美国专利第8,052,964号；美国专利第4,832,959号；美国专利第6,120,762号；WO1992/008737;和EP219781。

[0606] 在所提供的5T4 VHH-细胞因子融合蛋白的方面中，抗体与细胞因子(例如干扰素)

直接连接或经由接头(诸如肽接头)间接连接。可以连接至VHH域的N端或C端,只要该连接不干扰抗体对5T4的结合。可以使用本文所述的任何接头,例如肽接头。在一些实施例中,接头为包含选自由以下组成的组的氨基酸序列的GS接头:GGSGGS,亦即$(GGS)_2$(SEQ ID NO:1);GGSGGSGGS,亦即$(GGS)_3$(SEQ ID NO:2);GGSGGSGGSGGS,亦即$(GGS)_4$(SEQ ID NO:3);和GGSGGSGGSGGSGGS,亦即$(GGS)_5$(SEQ ID NO:4)。在一些实施例中,接头为(GGGGS)n,其中n为1至5(SEQ ID NO:123);(GGGGGS)n,其中n为1至4(SEQ ID NO:124);GGGGS(SEQ ID NO:125);GGGGGS(SEQ ID NO:126);GGGGGSGGGGGSGGGGGS(SEQ ID NO:127);GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:128);GGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:129)。在一些实施例中,接头为包含甘氨酸残基的可挠性接头,作为非限制性实施例,诸如GG、GGG、GGGG(SEQ ID NO:5)、GGGGG(SEQ ID NO:6)、GGGGGG(SEQ ID NO:7)和PGGGG(SEQ ID NO:327)。在一些实施例中,融合蛋白可包括GS接头与甘氨酸接头的组合。

[0607] D.嵌合受体和经工程改造的细胞

[0608] 本文提供具有胞外域的嵌合抗原受体(CAR),该胞外域包含本文所提供的一或多个5T4 VHH域,诸如本文所提供的任一5T4 VHH域序列。本文提供的CAR构建体包括胞外域,该胞外域含有一或多个5T4 VHH、跨膜域和胞内信号传导区。形成CAR的抗原结合单元的一或多个5T4 VHH域以足够亲和力“结合”或“能够结合”(亦即靶向)5T4,使得CAR适用于疗法中靶向表达5T4的细胞或组织。

[0609] CAR为合成受体,其典型地含有与单一融合分子中的一或多个信号传导域结合且表达于细胞(诸如T细胞)表面上的细胞外靶向/结合部分。因此,CAR将抗原特异性与T细胞活化特性组合于单一融合分子中。第一代CAR典型地包括CD3ζ或Fc 1受体γ链的细胞质区作为其信号传导域。已在对卵巢癌、肾癌、淋巴瘤和神经母细胞瘤患者的I期临床研究中测试第一代CAR,其在所述患者中已诱发适度反应(评述于Sadelain等人,Curr Opin Immunol,21(2):215-223,2009中)。第二代CAR含有共刺激分子的信号传导域(诸如CD28和CD3ζ),其提供双重信号传导来引导组合的活化与共刺激信号。第三代CAR更为复杂,其具有三个或更多个信号传导域(评述于Sadelain等人,Cancer Discovery(3)388-398,2013和Dotti等人,Immuno.Rev,257(1),1-36,2014)。

[0610] 在一些实施例中,所提供的CAR含有至少一个抗原结合域,该抗原结合域包含靶向或能够特异性结合5T4的5T4 VHH域。在一些实施例中,CAR含有靶向一或多种抗原的至少两个抗原结合域(其中至少一者包含5T4 VHH域)。在一个实施例中,CAR的抗原结合域包含特异性针对5T4的两个或至少两个5T4 VHH域,从而提供二价结合分子。在一个实施例中,抗原结合域包含特异性针对5T4、但结合至该抗原上的不同抗原决定基的两个或至少两个5T4VHH域。在此类情况下,抗原结合域包含结合至5T4的第一抗原决定基的第一5T4 VHH域和结合至5T4的第二抗原决定基的第二VHH域。抗原决定基可为重叠抗原决定基。因此,在一些实施例中,抗原结合域为双互补位抗原结合域且CAR为双互补位CAR。在又另一个实施例中,抗原结合域包含特异性针对5T4且结合至5T4上的相同抗原决定基的两个5T4 VHH域。

[0611] 本文提供的CAR的跨膜域为一种结构域,其典型地穿越质膜或能够穿越或跨越质膜且直接地或间接地(例如经由间隔子,诸如免疫球蛋白铰链序列)连接至细胞外抗原结合域和含有细胞内信号传导域的内质网部分。在一个实施例中,CAR的跨膜域为跨膜蛋白(例如第I型跨膜蛋白)的跨膜区、人工疏水性序列或其组合。在一个实施例中,跨膜域包含CD3ζ

域或CD28跨膜域。其他跨膜域对于本领域技术人员而言将为显而易见的，且可结合本文提供的CAR的实施例使用。

[0612] 本文提供的CAR的细胞内信号传导区含有一或多个细胞内信号传导域，在CAR的抗原结合域接合后，诸如在结合抗原后，所述细胞内信号传导域将信号传递至T细胞。在一些实施例中，细胞内区域含有细胞内信号传导域，该细胞内信号传导域为或含有ITAM信号传导域。例示性细胞内信号传导域包括例如衍生自以下的信号传导域：T细胞受体复合物的ζ链或其任一同源物(例如η链、FcsRIy和β链、MB 1(Iga)链、B29(Ig)链等)、人类CD3ζ链、CD3多肽(Δ、δ和ε)、syk家族酪氨酸激酶(Syk、ZAP 70等)、src家族酪氨酸激酶(Lck、Fyn、Lyn等)和涉及T细胞转导的其他分子，诸如CD2、CD5、OX40和CD28。在特定实施例中，细胞内信号传导区含有衍生自人类CD3ξ链的细胞内信号传导域。

[0613] 在一些实施例中，胞内域包含CD3-ζ信号传导域。在一些实施例中，CD3-ζ信号传导域包含SEQ ID NO:236中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:236展现至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％或更大序列一致性且保持T细胞信号传导活性的氨基酸序列。

[0614] 在一些实施例中，CAR的细胞内信号传导区可以进一步含有衍生自共刺激分子的细胞内信号传导域。在此类实施例中，在抗原特异性接合后，此类信号传导域可以增强CAR-T细胞活性，诸如经由增强记忆细胞的增殖、存活和/或发育来增强CAR-T细胞活性，例如相较于仅含有含ITAM的信号传导域(例如CD3ξ)的CAR。在一些实施例中，共刺激域为功能信号传导域，其获自选自以下的蛋白质：CD28、CD137(4-IBB)、CD134(OX40)、DapIO、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD1 la/CD18)、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40或其组合。在特定实施例中，共刺激信号传导域衍生自或获自人类蛋白质。在一些方面中，共刺激信号传导域衍生自或获自人类CD28或人类CD137(4-IBB)。

[0615] 在一些实施例中，共刺激信号传导域衍生自CD28或4-1BB且包含SEQ ID NO:237-240中的任一者中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:237-240展现至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％或更多序列一致性且保持T细胞共刺激信号传导活性的氨基酸序列。

[0616] 在特定实施例中，CAR进一步包含连接细胞外抗原结合域与跨膜域的铰链或间隔区。此铰链或间隔区可用于达成所得CAR的不同长度和可挠性。可使用的铰链或间隔区的实施例包括(但不限于)抗体的Fc片段或其片段或衍生物、抗体的铰链区或其片段或衍生物、抗体的C_H2区、抗体的C_H3区、人工间隔序列(例如肽序列)或其组合。其他铰链或间隔区对于本领域技术人员而言将为显而易见的且可使用。在一实施例中，铰链为lgG4铰链或CD8A铰链。

[0617] 在一些实施例中，间隔子和跨膜域为衍生自CD8的铰链和跨膜域，诸如具有SEQ ID NO:241-243中所示的例示性序列或与SEQ ID NO:241-243展现至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多序列一致性的氨基酸序列。

[0618] 本文亦提供一种分离的核酸构建体，其包含至少一种编码如本文所提供的CAR的核酸。在一些方面中，构建体为用于在细胞中表达CAR的表达载体。表达载体可为病毒载体。病毒载体技术在本领域中已熟知且描述于例如Sambrook等人(Molecular Cloning:A

Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,2013)。已开发出用于将基因转移至哺乳动物细胞中的多种基于病毒的系统。举例而言,使用逆转录病毒,诸如腺病毒载体。在一个实施例中,使用慢病毒载体。

[0619] 在另一方面中,亦提供包含一或多种如上所述的核酸构建体的经分离细胞或细胞群。亦提供一种已经基因修饰以表达本文所提供的CAR的经分离细胞或细胞群。因此,本文提供经基因工程改造的细胞,其包含本文所提供的CAR,诸如稳定表达本文所提供的CAR。在一个实施例中,细胞为选自由以下组成的组:T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴球(CTL)、调节性T细胞、造血干细胞和/或多能胚胎/诱导干细胞。在一些情况下,细胞为T细胞,诸如CD4和/或CD8 T细胞。在一些实施例中,细胞为受试者自体细胞。举例而言,在一些实施例中,可自患者分离出T细胞(亦称为初始T细胞),以便用CAR核酸构建体进行工程改造,例如转染或转导。

[0620] 在一个例示性实施例中,初始T细胞可以离体纯化(CD4细胞或CD8细胞或两者)且用TCR/CD28促效剂(诸如抗CD3/抗CD28涂布的珠粒)刺激。2或3天活化过程后,编码CAR的重组表达载体可经由标准慢病毒或逆转录病毒转导方案或质体电穿孔策略稳定引入初始T细胞中。可以监测细胞的CAR表达,例如通过流动式细胞测量术、使用抗抗原决定基标签或与原生亲本分子交叉反应的抗体来监测。表达CAR的T细胞可视应用而定,经由用抗抗原决定基标签抗体分选来富集或针对高或低表达而富集。

[0621] 可以通过多种方式分析CAR工程化T细胞的适当功能。在一些情况下,可以利用活体外细胞毒性、增殖或细胞因子分析(例如IFN-γ表达)来评估经工程改造的T细胞的功能。例示性标准终点为肿瘤株系的溶解百分比、经工程改造的T细胞的增殖,或培养上清液中的IFN-γ蛋白质表达。在一些情况下,可以评估在刺激CAR(例如经由抗原)后刺激T细胞活化的能力,诸如通过监测活化标记物(诸如CD69、CD44或CD62L)的表达、增殖和/或细胞因子产生来评估。

[0622] 本文亦提供用于预防和/或治疗受试者的疾病或病状(诸如癌症)的方法,包括向受试者给予包含本文提供的CAR的经工程改造的细胞。一般而言,受试者的疾病或病状需要以医药学活性量的细胞和/或本发明医药组合物治疗。

[0623] IV.多肽表达和产生

[0624] 提供包含聚核苷酸的核酸分子,所述聚核苷酸编码所提供的sdAb和5T4结合多肽中的任一者。在一些实施例中,所提供的核酸序列且特定言之DNA序列编码如本文所提供的融合蛋白。在任一前述实施例中,核酸分子亦可编码引导5T4结合多肽分泌的前导序列,该前导序列典型地以其不存在于所分泌的多肽中的方式裂解。前导序列可为原生重链(或VHH)前导序列,或可为另一种异源前导序列。

[0625] 核酸分子可使用本领域中常规的重组DNA技术构建。在一些实施例中,核酸分子为适于在所选宿主细胞中表达的表达载体。

[0626] 提供包含核酸的载体,所述核酸编码本文所述的5T4结合多肽。此类载体包括(但不限于)DNA载体、噬菌体载体、病毒载体、逆转录病毒载体等。在一些实施例中,选择使多肽在所需细胞类型(诸如CHO或CHO衍生细胞)中或在NSO细胞中的表达优化的载体。例示性此类载体描述于例如Running Deer等人,Biotechnol.Prog.20:880-889(2004)。

[0627] 特定言的,使用编码所需5T4结合多肽(诸如融合蛋白)的DNA载体可以有助于制备

本文所述的5T4结合多肽的方法和获得显著数量。可以将DNA序列插入适当表达载体中，亦即含有转录和翻译所插入的蛋白编码序列必要的组件的载体。可以利用多种宿主-载体系统表达蛋白编码序列。这些系统包括感染病毒(例如痘疮病毒、腺病毒等)的哺乳动物细胞系统；感染病毒(例如杆状病毒)的昆虫细胞系统；含有酵母载体的微生物，诸如酵母，或经细菌噬菌体DNA、质体DNA或黏质体DNA转型的细菌。视所用宿主-载体系统而定，可使用多种适合的转录和翻译组件中的任一者。

[0628] 本发明亦提供通过在引起多肽表达的条件下培养细胞来产生5T4结合多肽的方法，其中细胞包含编码本文所述的5T4结合多肽的经分离的核酸分子，和/或包括这些经分离的核酸序列的载体。

[0629] 在一些实施例中，5T4结合多肽可表达于原核细胞中，诸如细菌细胞；或表达于真核细胞中，诸如真菌细胞(诸如酵母)、植物细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。此类表达可例如根据本领域中已知的程序来进行。可用于表达多肽的例示性真核细胞包括(但不限于)COS细胞，包括COS 7细胞；293细胞，包括293-6E细胞；CHO细胞，包括CHO-S、DG44.Lec13 CHO细胞，和FUT8CHO细胞；PER.C6®细胞(Crucell)；和NSO细胞。在一些实施例中，5T4结合多肽可表达于酵母中。参见例如美国公开案第US 2006/0270045 A1号。在一些实施例中，特定的真核宿主细胞为基于其对多肽产生所需翻译后修饰的能力来选择。举例而言，在一些实施例中，CHO细胞产生多肽，所述多肽的唾液酸化程度高于293细胞中所产生的相同多肽。

[0630] 向所需宿主细胞中引入一或多种核酸(诸如载体)可通过任何方法来实现，包括(但不限于)磷酸钙转染、DEAE-聚葡萄糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染等。非限制性例示性方法描述于例如Sambrook等人，Molecular Cloning，A Laboratory Manual，第3版，Cold Spring Harbor Press(2001)中。核酸可根据任何适合方法短暂或稳定转染于所要宿主细胞中。

[0631] 亦提供包含本文所述的任何核酸或载体的宿主细胞。在一些实施例中，提供表达本文所述的5T4结合多肽的宿主细胞。可通过任何适合方法来纯化宿主细胞中表达的5T4结合多肽。此类方法包括(但不限于)使用亲和基质或疏水性相互作用层析。适合的亲和性配位体包括ROR1 ECD和结合Fc区的药剂。举例而言，蛋白质A、蛋白质G、蛋白质A/G或抗体亲和管柱可用于结合Fc区和纯化包含Fc区的5T4结合多肽。疏水相互作用层析，例如丁基或苯基管柱，亦可适用于纯化一些多肽，诸如抗体。离子交换层析(例如阴离子交换层析和/或阳离子交换层析)亦适用于纯化一些多肽，诸如抗体。混合模式层析(例如逆相/阴离子交换、逆相/阳离子交换、亲水相互作用/阴离子交换、亲水相互作用/阳离子交换等)亦可适用于纯化一些多肽，诸如抗体。本领域中已知多种用于纯化多肽的方法。

[0632] 在一些实施例中，在无细胞系统中产生5T4结合多肽。非限制性例示性无细胞系统描述于例如Sitaraman等人，Methods Mol.Biol.498:229-44(2009)；Spirin，Trends Biotechnol.22:538-45(2004)；Endo等人，Biotechnol.Adv.21:695-713(2003)。

[0633] 在一些实施例中，提供通过上述方法制备的5T4结合多肽。在一些实施例中，在宿主细胞中制备5T4结合多肽。在一些实施例中，在无细胞系统中制备5T4结合多肽。在一些实施例中，5T4结合多肽经纯化。在一些实施例中，提供包含5T4结合多肽的细胞培养基。

[0634] 在一些实施例中，提供包含通过上述方法制备的抗体的组合物。在一些实施例中，组合物包含宿主细胞中所制备的5T4结合多肽。在一些实施例中，组合物包含无细胞系统中

所制备的5T4结合多肽。在一些实施例中，组合物包含经纯化的5T4结合多肽。

[0635] V.医药组合物和制剂

[0636] 本文提供含有本文所提供的任一种5T4结合多肽或表达其的工程化细胞的医药组合物。在一些实施例中，适于投药的医药组合物中可以并入5T4结合多肽，诸如本发明的融合蛋白(在本文中亦称为“活性化合物”)及其衍生物、片段、类似物和同源物。在一些实施例中，适于投药的医药组合物中可以并入表达嵌合受体(诸如嵌合抗原受体)的工程化细胞，该嵌合受体含有本文提供的5T4结合多肽。

[0637] 此类组合物典型地含有医药学上可接受的载剂。如本文所用，术语“医药学上可接受的载剂”意欲包括与医药给予兼容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等张性和吸收延迟剂，及其类似物。适合载剂描述于该领域中的标准参考教科书Remington’s Pharmaceutical Sciences最新版，其以引用的方式并入本文中。此类载剂或稀释剂的适合实施例包括(但不限于)水、生理盐水、林格氏溶液(ringer’s solutions)、右旋糖溶液和5％人类血清白蛋白。亦可使用脂质体和非水性媒剂，诸如不挥发性油。此类介质和药剂用于医药活性物质的用途在本领域中已熟知。除非任何常规介质或药剂与活性成分不兼容，否则预期在组合物中使用其。组合物中亦可并入补充活性化合物。

[0638] 本发明的医药组合物经调配与其预定投药途径兼容。投药途径的实施例包括非经肠，例如静脉内、皮内、皮下、瘤内、经口(例如吸入)、经皮(亦即，外用)、经黏膜和直肠投药。用于非经肠、皮内或皮下施用的溶液或悬浮液可包括以下组分：无菌稀释剂，诸如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、丙三醇、丙二醇或其他合成溶剂；抗细菌剂，诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂，诸如乙二胺四乙酸(EDTA)；缓冲剂，诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐；和张力调节剂，诸如氯化钠或右旋糖。可用酸或碱(诸如盐酸或氢氧化钠)调节pH。非经肠制剂可封装于由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0639] 适于可注射使用的医药组合物包括无菌水溶液(具水溶性)或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内投药而言，适合载剂包括生理盐水、抑菌水、CREMOPHOR EL™(BASF,Parsippany,N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下，该组合物必须为无菌的且就易注射而言应为液体。其在制造和储存条件下必须稳定，且必须保藏以防诸如细菌和真菌的微生物的污染作用。载剂可为溶剂或分散介质，其含有例如水、乙醇、多元醇(诸如丙三醇、丙二醇和液体聚乙二醇及其类似物)及其适合混合物。可维持适当流动性，例如通过使用诸如卵磷脂的包衣、在分散液的情况下通过维持所需颗粒大小和通过使用表面活性剂来维持。防止微生物作用可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂达成，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞及其类似物。在许多情况下，组合物中优选将包括等张剂，例如糖、多元醇(诸如甘露糖醇、山梨糖醇)、氯化钠。可通过在组合物中包括延迟吸收剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来达成可注射组合物的吸收延长。

[0640] 无菌可注射溶液可通过将所需量的活性化合物与以上所列成分的一或组合(需要时)并入适当溶剂中、随后过滤灭菌来制备。一般而言，分散液为通过将活性化合物并入含有基本分散介质和选自以上所列者的所需其他成分的无菌媒介剂中来制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下，制备方法为真空干燥和冷冻干燥，其利用预先无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何其他所需成分的粉末。

[0641] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载剂。其可围封于明胶胶囊中或压缩成片剂。出于经口治疗投药的目的，活性化合物可与赋形剂一起并入且以片剂、糖衣锭或胶囊的形式使用。亦可使用适用作漱口剂的流体载剂制备口服组合物，其中流体载剂中的化合物经口施用且漱口且吐掉或吞服。可包括医药学兼容性黏合剂和/或佐剂物质作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊、糖衣锭及其类似物可含有以下成分或具有类似性质的化合物中的任一者：黏合剂，诸如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶；赋形剂，诸如淀粉或乳糖；崩解剂，诸如褐藻酸、淀粉羟基乙酸钠(Primogel)或玉米淀粉；润滑剂，诸如硬脂酸镁或斯特罗特斯(Sterotes)；助滑剂，诸如胶状二氧化硅；甜味剂，诸如蔗糖或糖精；或调味剂，诸如胡椒薄荷、水杨酸甲酯或橙调味剂。

[0642] 对于通过吸入投药而言，化合物可以气溶胶喷雾形式自含有适合推进剂(例如气体，诸如二氧化碳)的加压容器或分配器或雾化器递送。

[0643] 全身性投药亦可通过经黏膜或经皮方式。对于经黏膜或经皮投药而言，在调配物中使用适于渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂在本领域中通常已知，且对于经黏膜给予而言，包括例如洗涤剂、胆盐和梭链孢酸衍生物。经黏膜投药可经由使用鼻喷雾剂或栓剂而完成。对于经皮投药而言，将活性化合物调配成软膏、油膏、凝胶或乳膏，如本领域中通常所知。

[0644] 化合物亦可以栓剂(例如使用常规栓剂基质，诸如可可脂及其他甘油酯)或保留灌肠剂形式制备用于直肠递送。

[0645] 在一个实施例中，用防止化合物自体内快速消除的载剂制备活性化合物，诸如控释型调配物，包括植入物和微囊封递送系统。可使用可生物降解的生物兼容性聚合物，诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类调配物的方法为本领域技术人员显而易见的。材料在商业上亦可获自Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals,Inc.。亦可使用脂质体悬浮液作为医药学上可接受的载剂。这些物可根据本领域技术人员已知的方法制备，例如如美国专利第4,522,811号中所述。

[0646] 就易投药和剂量均一性而言，将口服或非经肠组合物调配成单位剂型尤其有利。如本文所用，单位剂型指作为单位剂量适用于待治疗受试者的实体不连续单元；各单元均含有经计算可产生所需治疗效果的预定量的活性化合物与所需医药载剂。本发明的单位剂型的规格取决于且直接依赖于活性化合物的独特特征和欲达成的特定治疗作用，和用于治疗个体的此类活性化合物的混配技术中的固有限制。

[0647] 医药组合物可连同投药说明书一起包括于试剂盒、容器、包装或分配器中。这些医药组合物可与使用说明书一起包括于诊断试剂盒中。

[0648] 医药组合物为以有效治疗或预防特定适应症的量给予。治疗有效量典型地依赖于所治疗受试者的体重、其体能或健康状况、所治疗病状的广泛程度或所治疗受试者的年龄。在一些实施例中，医药组合物可以每剂量每公斤体重约50μg至每公斤体重约50mg范围内的量给予。在一些实施例中，医药组合物可以每剂量每公斤体重约100μg至每公斤体重约50mg范围内的量给予。在一些实施例中，医药组合物可以每剂量每公斤体重约100μg至每公斤体重约20mg范围内的量给予。在一些实施例中，医药组合物可以每剂量每公斤体重约0.5mg至每公斤体重约20mg范围内的量给予。

[0649] 在一些实施例中，医药组合物可以每剂量约10mg至约1,000mg范围内的量给予。在一些实施例中，医药组合物可以每剂量约20mg至约500mg范围内的量给予。在一些实施例

中,医药组合物可以每剂量约20mg至约300mg范围内的量给予。在一些实施例中,医药组合物可以每剂量约20mg至约200mg范围内的量给予。

[0650] 医药组合物可按需要给予受试者。在一些实施例中,有效剂量的医药组合物给予受试者一或多次。在各种实施例中,一月一次、小于一月一次(诸如每两个月一次、每三个月一次或每六个月一次)向受试者给予有效剂量的医药组合物。在其他实施例中,大于一月一次给予有效剂量的医药组合物,诸如每两周一次、每周一次、每周两次、每周三次、每天一次或每天多次。有效剂量的医药组合物给予受试者至少一次。在一些实施例中,有效剂量的医药组合物可给予多次,包括至少一个月、至少六个月或至少一年的时段。在一些实施例中,医药组合物依需要给予受试者以缓解病状的一或多种症状。

[0651] VI.治疗方法和用途

[0652] 本文所述的5T4结合多肽或表达其的工程化细胞适用于多种治疗、诊断和预防适应症。举例而言,5T4结合多肽或工程化细胞适用于治疗受试者的多种疾病和病症。此类方法和用途包括治疗方法和用途,例如涉及向患有疾病、病状或病症(诸如肿瘤或癌症)的受试者给予分子或工程化细胞或含有其的组合物。在一些实施例中,分子或工程化细胞以实现疾病或病症有效治疗的有效量给予。用途包括含有5T4结合多肽的分子或工程化细胞用于此类方法和治疗的用途和用于制备药剂以便执行此类治疗方法的用途。在一些实施例中,所述方法为通过向患有或怀疑患有疾病或病状的受试者给予5T4结合多肽或工程化细胞或包含其的组合物来进行。在一些实施例中,所述方法借此治疗受试者的疾病或病状或病症。

[0653] 在一个实施例中,本发明的5T4结合多肽或工程化细胞可以用作治疗剂。此类药剂通常用于诊断、预后、监测、治疗、缓解和/或预防受试者的疾病或病变。治疗方案为通过使用标准方法鉴别受试者(例如人类患者或罹患病症(或处于产生病症的风险中)的其他哺乳动物)来进行。在一些情况下,选择已知、怀疑或已鉴别出患有表达5T4的肿瘤的受试者。向受试者给予5T4结合多肽或工程化细胞。5T4结合多肽或工程化细胞给予受试者且通常因其与靶点结合而发挥作用。

[0654] 在一些实施例中,所提供的5T4多肽多特异性多肽构建体或工程化细胞当给予受试者时能够调节(例如增强)免疫反应,诸如根据CD3的接合和/或细胞中的CD3信号。在一些实施例中,本文提供一种调节受试者的免疫反应的方法,其通过给予治疗有效量的所提供多特异性构建体或工程化细胞或其医药组合物。在一些实施例中,调节免疫反应的方法增加或增强受试者的免疫反应。举例而言,增加或增强的反应可为细胞介导的免疫力的增加。在一些实施例中,该方法增加T细胞活性,诸如溶胞性T细胞(CTL)活性。在一些实施例中,经调节(例如增加)的免疫反应为针对肿瘤或癌症。

[0655] 在一些实施例中,5T4结合多肽(诸如5T4-Fc融合蛋白或含有Fc区的多特异性构建体)的给予可以经由FcγRs的接合(经由多特异性多肽构建体的Fc区接合)活化先天免疫细胞。此类多特异性多肽构建体的给予可以促效、刺激、活化和/或增强先天免疫细胞效应功能,包括ADCC、细胞因子释放、去颗粒和/或ADCP。在限制性多特异性多肽构建体的情况下,此类多特异性多肽构建体的给予在连接第一与第二组分的接头被蛋白酶裂解之后且/或结合靶细胞(例如肿瘤细胞)上的5T4之后,可以活化T细胞,借此允许抗CD3结合部分结合T细胞上的CD3ε。在一些情况下,多特异性多肽构建体的给予可以促效、刺激、活化且/或增强

CD3介导的T细胞活化、细胞毒性、细胞因子释放和/或增殖。

[0656] 在一些实施例中，所提供的方法通过给予治疗有效量的所提供5T4结合多肽或工程化细胞或其医药组合物中的任一者而用于治疗受试者的疾病或病状。在一些实施例中，疾病或病状为肿瘤或癌症。一般而言，疾病或病症的缓解或治疗涉及与疾病或病症相关的一或多种症状或医学问题的减轻。举例而言，在癌症的情况下，治疗有效量的药物可实现以下一者或组合：减少癌细胞数目；减小肿瘤尺寸；抑制(亦即在一定程度上减少和/或阻止)癌细胞浸润至周边器官中；抑制肿瘤转移；在一定程度上抑制肿瘤生长；和/或在一定程度上缓解与癌症相关的一或多种症状。在一些实施例中，本发明的组合物可以用于预防受试者(例如人类或其他哺乳动物，诸如非人类灵长类动物、伴侣动物(例如猫、犬、马)、家畜、研究动物或动物园动物)的疾病或病症的发作或复发。术语受试者和患者在本文中可互换使用。

[0657] 在一些实施例中，5T4结合多肽或工程化细胞或其医药组合物可用于抑制哺乳动物癌细胞(诸如人类癌细胞)生长。一种治疗癌症的方法可包括向患有癌症的受试者给予有效量的本文所述的医药组合物中的任一者。可给予有效量的医药组合物以抑制、中断或逆转癌症进展。人类癌细胞可以活体内或离体治疗。在人类患者的离体治疗时，在身体外部处理含有癌细胞的组织或体液，且接着将该组织或体液再引回至患者体内。在一些实施例中，通过向患者给予治疗组合物至活体内治疗人类患者的癌症。

[0658] 疾病的非限制实施例包括：所有类型的癌症(乳房、肺、结肠直肠、前列腺、黑色素瘤、头颈部、胰脏等)、类风湿性关节炎、克罗恩氏病、SLE、心血管损伤、局部缺血等。举例而言，适应症包括白血病，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、结肠直肠、前列腺、胰脏和乳房，包括三阴性乳腺癌)。举例而言，适应症包括骨骼疾病或癌症转移(不论原发肿瘤起源)；乳腺癌，作为非限制性实施例包括ER/PR+乳腺癌、Her2+乳腺癌、三阴性乳腺癌；结肠直肠癌；子宫内膜癌；胃癌；神经胶母细胞瘤；头颈癌，诸如食道癌；肺癌，作为非限制性实施例诸如非小细胞肺癌；多发性骨髓瘤卵巢癌；胰脏癌；前列腺癌；肉瘤，诸如骨肉瘤；肾癌，作为非限制性实施例诸如肾细胞癌；和/或皮肤癌，作为非限制性实施例诸如鳞状细胞癌、基底细胞癌或黑色素瘤。在一些实施例中，癌症为鳞状细胞癌。在一些实施例中，癌症为皮肤鳞状细胞癌。在一些实施例中，癌症为食道鳞状细胞癌。在一些实施例中，癌症为头颈部鳞状细胞癌。在一些实施例中，癌症为肺鳞状细胞癌。

[0659] 在一些实施例中，5T4结合多肽或工程化细胞或其医药组合物适用于治疗、减缓症状、改善和/或延迟癌症或其他赘生性病状的进展。在一些实施例中，癌症为膀胱癌、乳腺癌、子宫/子宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、食道癌、胃肠癌、胰脏癌、结肠直肠癌、结肠癌、肾癌、头颈癌、肺癌、胃癌、生殖细胞癌、骨癌、肝癌、甲状腺癌、皮肤癌、中枢神经系统的赘瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤和病毒相关癌症。在某些实施例中，癌症为转移性癌症、难治性癌症或复发性癌症。

[0660] 在一些实施例中，本发明的5T4结合多肽(诸如融合蛋白或多特异性多肽构建体)的治疗有效量通常指为达成治疗目标而需要的量。典型地，待给予的本发明的组合物的精确量可由医师考虑患者(受试者)的年龄、体重、肿瘤尺寸、感染或转移程度和病状的个别差异来决定。

[0661] 在一些实施例中，作为非限制性实施例，治疗有效剂量可为每公斤体重约0.01μg至每公斤体重约10mg。在一些实施例中，作为非限制性实施例，治疗有效剂量可为每公斤体重约0.01mg至每公斤体重约5-10mg。常用给药频率可在例如每天两次至一周一次的范围内。

[0662] 在一些实施例中，给予治疗量的本发明工程化细胞组合物。通常可以规定，包含如本文所述的工程化细胞(例如T细胞)的医药组合物可以每公斤体重10^4至10^9个细胞(诸如每公斤体重10^5至10^6个细胞(包括那些范围内的所有整数值))的剂量给予。工程化细胞组合物(诸如T细胞组合物)亦可以这些剂量给予多次。细胞可通过使用免疫疗法中通常已知的输注技术给予(参见例如Rosenberg等人,New Eng.J.of Med.319:1676,1988)。医学领域技术人员可通过监测患者的疾病病征且相应地调整疗法而容易确定特定患者的最佳剂量和治疗方案。

[0663] 治疗有效性为结合用于诊断或治疗特定病症的任何已知方法测定。用于筛选具有所需特异性的5T4结合多肽或含有其的工程化细胞的方法包括(但不限于)酶联免疫吸附分析(ELISA)和本领域中已知的其他免疫介导技术。已知多种方式用于确定所提供的5T4结合多肽或工程化细胞的给予是否充分地调节免疫活性，此调节为通过消除、隔离或不活化介导或能够介导非所需免疫反应的免疫细胞；诱导、产生或开启介导或能够介导保护性免疫反应的免疫细胞；改变免疫细胞的生理或功能特性；或这些效应的组合。免疫活性调节的测量实施例包括(但不限于)检查免疫细胞群的存在或不存在(利用流动式细胞测量术、免疫组织化学、组织学、电子显微法、聚合酶链反应(PCR))；测量免疫细胞的功能能力，包括响应于信号增殖或分裂的能力或抗性(诸如利用T细胞增殖分析和肽扫描分析，其基于抗CD3抗体、抗T细胞受体抗体、抗CD28抗体、钙离子载体、PMA(佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯)、负载有肽或蛋白质抗原的抗原呈递细胞刺激之后的3H-胸苷并入；B细胞增殖分析)；测量杀死或溶解其他细胞的能力(诸如细胞毒性T细胞分析)；测量细胞因子、趋化因子、细胞表面分子、抗体和细胞的其他产物(例如通过流动式细胞测量术、酶联免疫吸附分析、蛋白免疫印迹分析、蛋白质微阵列分析、免疫沉淀分析)；测量免疫细胞活化的生物化学标记或免疫细胞内的信号传导路径(例如对酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸磷酸化、多肽裂解和蛋白质复合物形成或解离进行的蛋白免疫印迹和免疫沉淀分析；蛋白质阵列分析；利用DNA阵列或差减杂交达成的DNA转录特征)；测量通过细胞凋亡、坏死或其他机制达成的细胞死亡(例如膜联蛋白V染色、TUNEL分析、测量DNA梯度变化的凝胶电泳、组织学；荧光凋亡蛋白酶分析、凋亡蛋白酶基质的蛋白免疫印迹分析)；测量免疫细胞所产生的基因、蛋白质及其他分子(例如Northern印迹杂交分析、聚合酶链反应、DNA微阵列、蛋白质微阵列、2维凝胶电泳、蛋白免疫印迹分析、酶联免疫吸附分析、流动式细胞测量术)；和测量临床症状或结果，诸如涉及自身蛋白质或自身多肽的自身免疫、神经退化及其他疾病的改善(临床分数、对使用其他疗法的需求、功能状态、成像研究)，例如通过量测复发速率或疾病严重程度。

[0664] 所提供的5T4结合多肽亦适用于多种诊断和预防调配物。在一个实施例中，将5T4结合多肽给予处于产生一或多种前述病症的风险中的患者。患者或器官对所述病症中的一或多者的倾向性可使用基因型、血清学或生物化学标记物测定。

[0665] 在本发明的另一个实施例中，将5T4结合多肽或工程化细胞给予诊断患有临床适应症与一或多种前述病症的人类个体。诊断后，给予此类治疗剂以缓和或逆转临床适应症

的影响。

[0666] 组合疗法

[0667] 本发明的5T4结合多肽或工程化细胞可以单独或与其他治疗模式(诸如其他抗癌剂)组合给予。其可在其他治疗模式之前、实质上同时或之后(亦即,同时或依序)来提供。在一些实施例中,本文所述的治疗方法可以进一步包括给予:辐射疗法、化学疗法、疫苗接种、靶向肿瘤疗法CAR-T疗法、溶瘤病毒疗法、癌症免疫疗法、细胞因子疗法、手术切除、染色体修饰、部分切除术、冷冻疗法、针对肿瘤靶点的反义药剂、针对肿瘤靶点的siRNA药剂、针对肿瘤靶点的微RNA药剂或抗癌/肿瘤药剂,或生物制剂,诸如抗体、细胞因子或受体胞外域-Fc融合体。

[0668] 在一些实施例中,本文提供的5T4结合多肽与一或多种化学治疗剂、CAR-T(嵌合抗原受体T细胞)疗法、溶瘤病毒疗法、细胞因子疗法和/或靶向其他检查点分子的药剂(诸如VISTA、gpNMB、B7H4、HHLA2、CD73、CTLA4、TIGIT等)同时给与。

[0669] 在一些实施例中,本发明的5T4结合多肽或工程化细胞与其他抗肿瘤剂组合使用,诸如抗HER-2抗体、抗CD20抗体、表皮生长因子受体(EGFR)拮抗剂(例如酪氨酸激酶抑制剂)、HER1/EGFR抑制剂(例如埃罗替尼(erlotinib)(TARCEVA®)、血小板源生长因子抑制剂(例如GLEEVEC®(甲磺酸伊马替尼(Imatinib Mesylate)))、COX-2抑制剂(例如塞内昔布(celecoxib))、干扰素、CTLA4抑制剂(例如抗CTLA抗体伊匹单抗(ipilimumab)(YERVOY®))、PD-1抑制剂(例如抗PD1抗体BMS-936558)、PDL1抑制剂(例如抗PDL1抗体MPDL3280A)、PDL2抑制剂(例如抗PDL2抗体)、细胞因子、结合至以下靶点中的一或多者的拮抗剂(例如中和抗体):ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR-β、BlyS、APRIL、BCMA、PD-1、PDL1、PDL2、CTLA4或VEGF受体、TRAIL/Apo2,及其他生物活性和有机化学药剂等。

[0670] 在一些实施例中,本文提供的5T4结合多肽或工程化细胞与PD-1/PD-L1疗法同时给与。PD-1/PD-L1疗法的实施例包括纳武单抗(nivolumab)(BMS);皮立珠单抗(pidilizumab)(CureTech,CT-011)、派立珠单抗(pembrolizumab)(Merck);德瓦鲁单抗(durvalumab)(Medimmune/AstraZeneca);阿特珠单抗(atezolizumab)(Genentech/Roche);艾维路单抗(avelumab)(Pfizer);AMP-224(Amplimmune);BMS-936559;AMP-514(Amplimmune);MDX-1105(Merck);TSR-042(Tesaro/AnaptysBio,ANB-011);STI-A1010(Sorrento Therapeutics);STI-A1110(Sorrento Therapeutics);以及针对程序化死亡-1(PD-1)或程序化死亡配位体1(PD-L1)的其他药剂。

[0671] 在一些实施例中,本发明的5T4结合多肽或工程化细胞可与化学治疗剂组合使用。化学治疗剂的实施例包括(但不限于)烷基化剂,诸如噻替派(thiotepa)和CYTOXAN®环磷酰胺;磺酸烷酯,诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶,诸如苯唑多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)和尤利多巴(uredopa);伸乙亚胺和甲基三聚氰胺,包括六甲蜜胺(altretamine)、三伸乙基蜜胺、三伸乙基磷酰胺、三伸乙基硫代磷酰胺和三甲密胺;多聚乙酰(acetogenins)(具体言之,布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone));喜树碱(包括合成类似物拓朴替康(topotecan));苔藓抑素(bryostatin);海洋抑素(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来

新(bizelesin)合成类似物);念珠藻素(cryptophycin)(特定言之,念珠藻素1和念珠藻素8);海兔毒素(dolastatin);倍癌霉素(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);艾榴塞洛素(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);沙考地汀(sarcodictyin);海绵抑素(spongistatin);氮芥,诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、二氯甲二乙胺(mechlorethamine)、二氯甲二乙胺氧化物盐酸盐、美法仑(melphalan)、新恩比兴(novembichin)、芬司特瑞(phenesterine)、泼尼氮芥(prednimustine)、曲洛磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥;亚硝基脲,诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimnustine);抗生素,诸如烯二炔抗生素(例如卡奇霉素(calicheamicin),具体言之,卡奇霉素γ1I和卡奇霉素ωI1(参见例如Agnew,Chem Intl.Ed.Engl.,33:183-186(1994));达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;双膦酸盐,诸如氯屈膦酸盐(clodronate);埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新抑癌蛋白发色团和相关色蛋白烯二炔抗生素发色团)、阿克拉霉素(aclacinomysin)、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(authramycin)、偶氮丝胺酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C、卡拉比辛(carabicin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycini)、放线菌素D、道诺霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-侧氧基-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN®阿霉素(doxorubicin)(包括吗啉基-阿霉素、氰基吗啉基-阿霉素、2-吡咯啉基-阿霉素和脱氧阿霉素)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、埃达霉素(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycin)(诸如丝裂霉素C)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泼非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、奎那霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链脲霉素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他汀(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物,诸如甲胺喋呤(methotrexate)和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,诸如迪诺特宁(denopterin)、甲胺喋呤、蝶罗呤(pteropterin)、曲美沙特(trimetrexate);嘌呤类似物,诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,诸如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、脱氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine);雄激素,诸如卡普睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone);抗肾上腺药物,诸如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,诸如亚叶酸;乙酰葡醛酯(aceglatone);醛磷酰胺醣苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶(eniluracil);安吖啶(amsacrine);贝斯布西(bestrabucil);比生群(bisantrene);埃达曲克(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);地美可辛(demecolcine);地吖醌(diaziquone);艾弗利散(elfornithine);依利醋铵(elliptinium acetate);埃博霉素(epothilone);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;磨菇多糖(lentinan);氯尼达

明(lonidainine);类美登素(maytansinoid),诸如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin);丙脒腙(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidamol);硝拉维林(nitracrine);喷司他汀(pentostatin);凡那明(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼(procarbazine);PSK®多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,OR);雷佐生(razoxane);根瘤菌素(rhizoxin);西佐喃(sizofiran);螺旋锗(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2″-三氯三乙胺;单端孢霉烯(具体言之,T-2毒素、黏液霉素A(verracurin A)、杆孢菌素A(roridin A)和胺癸叮(anguidine));乌拉坦(urethan);长春地辛(vindesine);达喀尔巴嗪(dacarbazine);甘露醇氮芥(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);甲托辛(gacytosine);阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺;噻替派(thiotepa);类紫杉醇,例如TAXOL®紫杉醇(Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)、ABRAXANE®不含十六醇聚氧乙烯醚(Cremophor)、经白蛋白工程改造的紫杉醇纳米粒子调配物(American Pharmaceutical Partners,Schaumberg,Illinois),和TAXOTERE®多西他赛(doxetaxel)(Rhône-Poulenc Rorer,Antony,France);苯丁酸氮芥;GEMZAR®吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲胺喋呤;铂类似物,诸如顺铂(cisplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)和卡铂(carboplatin);长春碱(vinblastine);铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌(mitoxantrone);长春新碱(vincristine);NAVELBINE®长春瑞宾(vinorelbine);诺凡特龙(novantrone);替尼泊苷(teniposide);依达曲沙(edatrexate);柔红霉素(daunomycin);氨基喋呤(aminopterin);希罗达(xeloda);伊班膦酸盐(ibandronate);伊立替康(irinotecan)(开普拓(Camptosar),CPT-11)(包括伊立替康联合5-FU和甲酰四氢叶酸的治疗方案);拓朴异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟胺酸(DMFO);类视黄醇,诸如视黄酸;卡培他滨(capecitabine);康柏斯达汀(combretastatin);甲酰四氢叶酸(LV);奥沙利铂(oxaliplatin),包括奥沙利铂治疗方案(FOLFOX);减少细胞增殖的PKC-α、Raf、H-Ras、EGFR抑制剂(例如埃罗替尼(erlotinib)(TARCEVA®))和VEGF-A;和上述任一者的医药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0672] 其他非限制性例示性化学治疗剂包括用于调控或抑制激素对癌症的作用的抗激素剂,诸如抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂(SERM),包括例如他莫昔芬(tamoxifen)(包括NOLVADEX®他莫昔芬)、拉洛昔芬(raloxifene)、曲洛昔芬(droloxifene)、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮(onapristone)和FARESTON®托瑞米芬(toremifene);抑制芳香酶的芳香酶抑制剂,其调控肾上腺中的雌激素产生,诸如4(5)-咪唑、氨鲁米特(aminoglutethimide)、MEGASE®乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)、AROMASIN®依西美坦(exemestane)、福美斯坦(formestanie)、法屈唑(fadrozole)、RIVISOR®伏罗唑(vorozole)、FEMARA®来曲唑(letrozole)和ARIMIDEX®阿那曲唑(anastrozole);

和抗雄激素,诸如氟他胺(flutamide)、尼鲁胺(nilutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、亮丙立德(leuprolide)和戈舍瑞林(goserelin);以及曲沙他滨(troxacitabine)(1,3-二氧杂环戊烷核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸,特定言之,抑制涉及异常细胞增殖的信号传导路径中的基因表达的那些物,诸如PKC-α、Ralf和H-Ras;核糖核酸酶,诸如VEGF表达抑制剂(例如ANGIOZYME®核糖核酸酶)和HER2表达抑制剂;疫苗,诸如基因疗法疫苗,例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和VAXID®疫苗;PROLEUKIN®(阿地白介素(aldesleukin))rIL-2;LURTOTECAN®拓朴异构酶1抑制剂;ABARELIX® GnRH促效剂;和上述任一者的医药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0673] 在一些实施例中,5T4结合多肽与其他药剂调配成单一治疗组合物,且5T4结合多肽与其他药剂同时给予。或者,5T4结合多肽或工程化细胞与另一种药剂彼此分开,例如各自调配成单独的治疗组合物,且5T4结合多肽或工程化细胞与另一种药剂同时给予,或5T4结合多肽或工程化细胞与另一种药剂在治疗方案期间的不同时间给予。举例而言,5T4结合多肽或工程化细胞为在另一种药剂给予之前给予,5T4结合多肽或工程化细胞为在另一种药剂给予之后给予,或5T4结合多肽或工程化细胞与另一种药剂为以交替方式给予。5T4结合多肽与另一种药剂可以单次剂量或以多次剂量给予。

[0674] 在一些实施例中,5T4结合多肽或工程化细胞与其他药剂同时给予。举例而言,5T4结合多肽与其他药剂可以调配成单一组合物或以两种或更多种单独组合物给予。在一些实施例中,5T4结合多肽或工程化细胞与其他药剂依序给予,或5T4结合多肽或工程化细胞与其他药剂在治疗方案期间的不同时间给予。

[0675] VII.例示性实施例

[0676] 所提供的实施例为:

[0677] 1.一种5T4结合多肽构建体,其包含特异性结合5T4的至少一个仅重链的可变域(5T4 VHH域)和结合至除5T4外的靶点的一或多个额外结合域。

[0678] 2.如实施例1的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含互补决定区1(CDR1),其包含选自由SEQ ID NO:86至87和288至292、296和297组成的组的氨基酸序列;互补决定区2(CDR2),其包含选自由SEQ ID NO:88至99、298和299组成的组的氨基酸序列;和互补决定区3(CDR3),其包含选自由SEQ ID NO:100至102、300、301和303组成的组的氨基酸序列。

[0679] 3.一种5T4结合多肽构建体,其包含至少一个仅有重链的可变域(5T4VHH域),其包含互补决定区1(CDR1),其包含选自由SEQ ID NO:86至87和288至292、296和297组成的组的氨基酸序列;互补决定区2(CDR2),其包含选自由SEQ ID NO:88至99、298和299组成的组的氨基酸序列;和互补决定区3(CDR3),其包含选自由SEQ ID NO:100至102、300、301和303组成的组的氨基酸序列。

[0680] 4.如实施例1至3中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述5T4为人类5T4。

[0681] 5.如实施例1至4中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域为人源化的。

[0682] 6.如实施例1、2、4至5中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述一或多个额外结合域结合至免疫细胞上的活化受体。

[0683] 7.如实施例6的5T4结合多肽构建体,其中所述免疫细胞为T细胞。

[0684] 8.如实施例6或实施例7的5T4结合多肽构建体,其中所述活化受体为CD3(CD3ε)。

[0685] 9.如实施例8的5T4结合多肽构建体,其对5T4和CD3具有双特异性。

[0686] 10.如实施例6的5T4结合多肽构建体,其中所述免疫细胞为自然杀伤(NK)细胞。

[0687] 11.如实施例6或实施例10的5T4结合多肽构建体,其中所述活化受体为CD16(CD16a)。

[0688] 12.如实施例11的5T4结合多肽构建体,其对5T4和CD16a具有双特异性。

[0689] 13.如实施例1、2、4至5中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述一或多个额外结合域结合至细胞因子受体。

[0690] 14.如实施例1、2和4至13中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述一或多个额外结合域包含抗体或其抗原结合片段。

[0691] 15.如实施例1、2和4至14中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述一或多个额外结合域为单价的。

[0692] 16.如实施例14或实施例15的5T4结合多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段为Fv、经二硫键稳定的Fv(dsFv)、scFv、Fab、单域抗体(sdAb)。

[0693] 17.如实施例13的5T4结合多肽构建体,其中所述一或多个额外结合域为细胞因子或能够结合至所述细胞因子受体的其经截短的片段或变体。

[0694] 18.如实施例17的5T4结合多肽构建体,其中所述细胞因子为干扰素或其经截短的片段或变体。

[0695] 19.如实施例18的5T4结合多肽构建体,其中所述干扰素为第I型干扰素或第II型干扰素;为第I型干扰素的经截短的片段或变体;或第II型干扰素的经截短的片段或变体。

[0696] 20.如实施例19的5T4结合多肽构建体,其中:

[0697] 所述第I型干扰素为IFN-α或IFN-β或其经截短的片段或变体;或

[0698] 所述第II型干扰素为IFN-γ或其经截短的片段或变体。

[0699] 21.如实施例1至20中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述多肽构建体包含免疫球蛋白Fc区。

[0700] 22.如实施例1、2和4至21中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述多肽包含连接所述至少一个5T4 VHH域和所述一或多个额外结合域的免疫球蛋白Fc区。

[0701] 23.如实施例1至22中任一项的5T4结合多肽构建体,其为二聚体。

[0702] 24.如实施例21至23中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述Fc区为同源二聚体Fc区。

[0703] 25.如实施例21至24中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述Fc区包含SEQ ID NO:8、10、11、12或13中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:8、10、11、12或13中的任一者有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的氨基酸序列。

[0704] 26.如实施例21至25中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述Fc区为人类IgG1。

[0705] 27.如实施例26的5T4结合多肽构建体,其中所述Fc区包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:8有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的氨基酸序列。

[0706] 28.如实施例21至23中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述Fc区为异源二聚体Fc区。

[0707] 29.如实施例21至28中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述Fc区展现效应功能。

[0708] 30.如实施例21至29中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述Fc区包含包括一或多种氨基酸修饰的多肽,所述修饰降低效应功能和/或减少与选自Fcγ受体或C1q的效应分子的结合。

[0709] 31.如实施例30的5T4结合多肽构建体,其中所述一或多种氨基酸修饰为Glu233、Leu234或Leu235中的一或多者缺失。

[0710] 32.如实施例30或实施例31的5T4结合多肽构建体,其中所述Fc区包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:9有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的氨基酸序列。

[0711] 33.如实施例1至32中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:245至253、255至287、294、295、302和360中的任一者中所示的序列;或展现出与SEQ ID NO:245至253、255至287、294、295、302和360中的任一者有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0712] 34.如实施例1至33中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域结合至人类5T4中的抗原决定基,但并未展现交叉反应性结合至小鼠5T4。

[0713] 35.如实施例1至34中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域结合至SEQ ID NO:382的氨基酸60与112之间的氨基酸残基。

[0714] 36.如实施例1至35中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域结合至SEQ ID NO:382的氨基酸173与224之间的氨基酸残基。

[0715] 37.如实施例1至36中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:245;(ii)SEQ ID NO:245的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:245有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0716] 38.如实施例1至37中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:288和289组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:88中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:100中所示的氨基酸序列。

[0717] 39.如实施例1至38中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:288、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:289、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0718] 40.如实施例1至39中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:246至253或360中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:246至253或360有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0719] 41.如实施例1至40的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:246至253或360中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0720] 42.如实施例1至36中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:255;(ii)SEQ ID NO:255的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:255有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0721] 43.如实施例1至36和42中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:86、290至292组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:89至94组成的组的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:101中所示的氨基酸序列。

[0722] 44.如实施例1至36、42和43中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:290、90和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、91和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、92和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、93和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:291、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:292、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:86、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0723] 45.如实施例1至36和42至44中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:256至275有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0724] 46.如实施例1至36和43至45的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0725] 47.如实施例1至36中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:276;(ii)SEQ ID NO:276的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:276有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0726] 48.如实施例1至33和47中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:86和87组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:95至99组成的组的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:102中所示的氨基酸序列。

[0727] 49.如实施例1至36、47和48中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:87、95和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、96和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、97和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、99和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:86、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0728] 50.如实施例1至36和47至49中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:277至287中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:277至287有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0729] 51.如实施例1至36和47至50的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域

包含SEQ ID NO:277至287中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0730] 52.如实施例1至36中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:294;(ii)SEQ ID NO:294的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:294有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0731] 53.如实施例1至36和52中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含CDR1,其包含SEQ ID NO:296中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:298中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:300中所示的氨基酸序列。

[0732] 54.如实施例1至36和52中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含CDR3,其包含选自由SEQ ID NO:300、301和303组成的组的氨基酸序列。

[0733] 55.如实施例1至36和52中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含:

[0734] CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:288、296和297组成的组的氨基酸序列;和/或

[0735] CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:88、298和299组成的组的氨基酸序列。

[0736] 56.如实施例1至36中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:295;(ii)SEQ ID NO:295的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:295有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0737] 57.如实施例1至36和56中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含CDR1,其包含SEQ ID NO:297中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:299中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:301中所示的氨基酸序列。

[0738] 58.如实施例1至36中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:302;(ii)SEQ ID NO:302的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:302有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0739] 59.如实施例1至36和56中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含CDR1,其包含SEQ ID NO:288中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:88中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:303中所示的氨基酸序列。

[0740] 60.如实施例1至36中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:294、295或302;(ii)SEQ ID NO:294、295或302的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:294、295或302有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0741] 61.如实施例1至36和60中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域包含SEQ ID NO:296、298和300中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:297、299和301中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:288、88和303中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0742] 62.如实施例1至36、60和61中任一项的5T4结合多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域为如SEQ ID NO:245、249、255、270、276、294、295或302中所示。

[0743] 63.一种多特异性多肽构建体,其包含:(a)第一组分,所述第一组分包含包括第一Fc多肽和第二Fc多肽的异源二聚体Fc区;和(b)第二组分,所述第二组分包含包括可变重链区(VH)和可变轻链区(VL)的抗CD3抗体或抗原结合片段,其中:

[0744] 构成所述抗CD3抗体或抗原结合片段的所述VH和VL连接于所述异源二聚体Fc的相对多肽;

[0745] 所述第一组分和第二组分通过接头偶合,其中所述异源二聚体Fc区定位于所述抗CD3抗体的N端;和

[0746] 所述第一组分和第二组分中的一或两者包含至少一个仅重链的可变域(5T4 VHH域)。

[0747] 64.如实施例63的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体至少包含(i)第一多肽,其包含所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽、所述接头和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域;和(ii)第二多肽,其包含所述异源二聚体Fc区的第二Fc多肽;所述接头,视情况与所述第一多肽中所存在的所述接头相同的接头;和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域中的另一者,

[0748] 其中所述第一多肽和第二多肽中的一或两者包含所述至少一个5T4VHH域。

[0749] 65.如实施例63或实施例64的多特异性多肽构建体,其中与同源二聚体Fc区的多肽相比,视情况与SEQ ID NO:8中所示的所述Fc多肽或其免疫活性片段相比,所述异源二聚体Fc区的所述第一Fc多肽和第二Fc多肽中的一或两者包含至少一种修饰以诱导异源二聚化。

[0750] 66.如实施例65的多特异性多肽构建体,其中所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽和第二Fc多肽中的每一者独立地包含至少一种氨基酸修饰。

[0751] 67.如实施例65或66的多特异性多肽构建体,其中所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽和第二Fc多肽中的每一者包含杵-臼修饰或包含电荷突变以增加所述多肽的静电互补性。

[0752] 68.如实施例65至67的多特异性多肽构建体,其中所述氨基酸修饰为杵-臼修饰。

[0753] 69.如实施例63至68中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽包含选自以下中的修饰:Thr366Ser、Leu368Ala、Tyr407Val及其组合,且所述异源二聚体Fc区的第二Fc多肽包含修饰Thr366Trp。

[0754] 70.如实施例69的多特异性多肽,其中所述第一Fc多肽和第二Fc多肽进一步包含将非半胱氨酸残基修饰成半胱氨酸残基,其中所述第一Fc多肽的修饰在位置Ser354和Tyr349中的一者处,且所述第二Fc多肽的修饰在位置Ser354和Tyr349中的另一者处。

[0755] 71.如实施例65至67中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述氨基酸修饰为电荷突变以增加所述多肽的静电互补性。

[0756] 72.如实施例63至67和71中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述第一Fc多肽和/或所述第二Fc多肽或所述第一Fc多肽和第二Fc多肽中的每一者在互补位置处包含氨基酸修饰,其中所述修饰为用具有与所述另一多肽的互补氨基酸相反的电荷的氨基酸置换。

[0757] 73.如实施例63至72中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽或第二Fc多肽中的一者在残基Ile253处进一步包含修饰。

[0758] 74.如实施例73的多特异性多肽构建体,其中所述修饰为Ile253Arg。

[0759] 75.如实施例63至74中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽或第二Fc多肽中的一者在残基His435处进一步包含修饰。

[0760] 76.如实施例75的多特异性多肽构建体,其中所述修饰为His435Arg。

[0761] 77.如实施例63至76中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区包含缺乏Lys447的多肽。

[0762] 78.如实施例63至77中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区包含多肽,其包含至少一种修饰以增强FcRn结合。

[0763] 79.如实施例78的多特异性多肽构建体,其中所述至少一种修饰在选自由以下组成的组的位置处:Met252、Ser254、Thr256、Met428、Asn434及其组合。

[0764] 80.如实施例78或实施例79的多特异性多肽构建体,其中所述至少一种修饰为选自由以下组成的组:Met252Y、Ser254T、Thr256E、Met428L、Met428V、Asn434S及其组合。

[0765] 81.如实施例78至80中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一种修饰在位置Met252处和位置Met428处。

[0766] 82.如实施例78至81中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一种修饰为Met252Y和Met428L。

[0767] 83.如实施例78至81中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一种修饰为Met252Y和Met428V。

[0768] 84.如实施例63至83中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽包含SEQ ID NO:103、107、115、117、328或334中的任一者中所示的氨基酸序列,且所述异源二聚体Fc区的第二Fc多肽包含SEQ ID NO:104、108、111、113、119、121、329、332或336中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0769] 85.如实施例21至84任一项的多肽构建体,其中所述Fc区包含包括至少一种氨基酸修饰的多肽,所述修饰降低效应功能和/或减少与选自Fcγ受体和C1q的效应分子的结合。

[0770] 86.如实施例85的多特异性多肽构建体,其中所述至少一种氨基酸修饰为Glu233、Leu234和Leu235中的一或多者缺失。

[0771] 87.如实施例63至86中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽包含SEQ ID NO:105、109、116、118、330或335中的任一者中所示的氨基酸序列,且所述异源二聚体Fc区的第二Fc多肽包含SEQ ID NO:106、110、112、114、120、122、331、333或337中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0772] 88.如实施例63至87任一项的多特异性多肽构建体,其中所述抗CD3抗体或抗原结合片段为单价的。

[0773] 89.如实施例63至88中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述抗CD3抗体或抗原结合片段不为单链抗体,视情况不为单链可变片段(scFv)。

[0774] 90.如实施例63至89中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述抗CD3抗体或抗原结合片段为Fv抗体片段。

[0775] 91.如实施例90的多特异性多肽构建体,其中所述Fv抗体片段包含经二硫键稳定的抗CD3结合Fv片段(dsFv)。

[0776] 92.如63至91的多特异性多肽构建体,其中所述抗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:29);VH CDR2,其包含氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:30);VH CDR3,其包含氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:31);VL CDR1,其包含氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:32);VL CDR2,其包含氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:33);和VL CDR3,其包含氨基酸序列ALWYSNLWV(SEQ ID NO:34)。

[0777] 93.如实施例63至92中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述抗CD3抗体或抗原结合片段包含:

[0778] VH,其具有SEQ ID NO:27、35至65、341、343和358中的任一者的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:27、35至65、341、343和358中的任一者有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合CD3的序列;和

[0779] VL,其具有SEQ ID NO:28、66至84、293、340和342中的任一者的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:28、66至84、293、340、342和293中的任一者有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合CD3的序列。

[0780] 94.如实施例63至93中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述抗CD3抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列SEQ ID NO:47和氨基酸序列SEQ ID NO:75。

[0781] 95.如实施例63至93中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述抗CD3抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列SEQ ID NO:47和氨基酸序列SEQ ID NO:293。

[0782] 96.如实施例63至92任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区定位于氨基端和/或相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区定位于羧基端。

[0783] 97.如实施例63至96中任一项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特异性结合5T4的第一5T4 VHH域和特异性结合5T4的第二5T4 VHH域。

[0784] 98.如实施例97的多特异性多肽构建体,其中所述第一5T4 VHH域或第二5T4 VHH域相对于所述多特异性构建体的Fc区定位于氨基端,且所述第一5T4 VHH域或第二5T4 VHH域中的另一者相对于所述多特异性构建体的CD3结合区定位于羧基端。

[0785] 99.如实施例97或实施例98的多特异性多肽构建体,其中

[0786] 该第一组分按N端至C端的次序包含结合5T4的第一5T4 VHH域;所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽;所述接头;所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域;和结合5T4的第二5T4 VHH域;和

[0787] 所述第二组分按N端至C端的次序包含所述异源二聚体Fc区的第二Fc多肽;所述接头,视情况与所述第一组分中所存在的接头相同的接头;和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域中的另一者。

[0788] 100.如实施例97至99中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域相同。

[0789] 101.如实施例97至99中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域不同。

[0790] 102.如实施例101的多特异性多肽构建体,其中所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域结合5T4的不同或非重叠抗原决定基和/或不竞争结合至5T4。

[0791] 103.如实施例102的多特异性多肽构建体,其中:

[0792] 所述第一5T4 VHH域包含SEQ ID NO:245至253、295、302和360中的任一者中所示的氨基酸序列、其人源化变体;或展现出与SEQ ID NO:245至253、295、302和360有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列;和

[0793] 所述第二5T4 VHH域包含SEQ ID NO:255至287、294、302中的任一者中所示的氨基酸序列、其人源化变体;或展现出与SEQ ID NO:255至287、294、302有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0794] 104.如实施例102的多特异性多肽构建体,其中:

[0795] 所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域为选自SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:294;SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:276;SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:255;SEQ ID NO:245和SEQ ID NO:295;SEQ ID NO:295和SEQ ID NO:294;SEQ ID NO:249和SEQ ID NO:270;SEQ ID NO:302和SEQ ID NO:302;或SEQ ID NO:360和SEQ ID NO:287。

[0796] 105.如实施例63至104中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:245至253、255至287、294、295、302和360中的任一者中所示的VHH域序列;或展现出与SEQ ID NO:245至253、255至287、294、295、302和360中的任一者有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0797] 106.如实施例63至105中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域结合至人类5T4中的抗原决定基,但并未展现交叉反应性结合至小鼠5T4。

[0798] 107.如实施例63至106中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域结合至SEQ ID NO:382的氨基酸60与112之间的氨基酸残基。

[0799] 108.如实施例63至107中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域结合至SEQ ID NO:382的氨基酸173与224之间的氨基酸残基。

[0800] 109.如实施例63至108中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:245;(ii)SEQ ID NO:245的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:245有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0801] 110.如实施例63至109中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:86至87和288至292、296和297组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:88至99、298和299组成的组的氨基酸序列;和CDR3,其包含选自由SEQ ID NO:100至102、300、301和303组成的组的氨基酸序列。

[0802] 111.如实施例63至110任一项的多特异性构建体,其中所述至少一个5T4VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:288、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:289、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、89和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、90和101中分别所示

的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、91和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、92和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、93和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:291、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:292、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:86、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、95和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、96和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、97和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:87、99和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:86、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:296、298和300中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:297、299和301中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:288、88和303中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0803] 112.如实施例63至111中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:246至253和360中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:246至253和360有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0804] 113.如实施例63至112中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:246至253和360中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0805] 114.如实施例63至108中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:255;(ii)SEQ ID NO:255的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:255有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0806] 115.如实施例63至108和114中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:86、290至292组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:89至94组成的组的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:101中所示的氨基酸序列。

[0807] 116.如实施例63至108、114和115中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:290、89和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、90和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、91和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、92和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、93和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:290、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:291、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:292、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:86、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0808] 117.如实施例63至108和114至116中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:256至275有至少

85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0809] 118.如实施例63至108和114至117的多特异性多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0810] 119.如实施例63至108中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:276；(ii)SEQ ID NO:276的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:276有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0811] 120.如实施例63至108和119任一项的多特异性多肽，其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含CDR1，其包含选自由SEQ ID NO:86和87组成的组的氨基酸序列；CDR2，其包含选自由SEQ ID NO:95至99组成的组的氨基酸序列；和CDR3，其包含SEQ ID NO:102中所示的氨基酸序列。

[0812] 121.如实施例63至108、119和120中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:87、95和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:87、96和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:87、97和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:87、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:87、99和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；或SEQ ID NO:86、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0813] 122.如实施例63至108和119至121中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:277至287中的任一者中所示的氨基酸序列；或展现出与SEQ ID NO:277至287有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0814] 123.如实施例63至108和119至122的多特异性多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:277至287中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0815] 124.如实施例63至108中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:294；(ii)SEQ ID NO:294的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:294有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0816] 125.如实施例63至108和124中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含CDR1，其包含SEQ ID NO:296中所示的氨基酸序列；CDR2，其包含SEQ ID NO:298中所示的氨基酸序列；和CDR3，其包含SEQ ID NO:300中所示的氨基酸序列。

[0817] 126.如实施例63至106中任一项的多特异性多肽构建体，其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列：

(i)SEQ ID NO:295;(ii)SEQ ID NO:295的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:295有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0818] 127.如实施例63至106和126中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含CDR1,其包含SEQ ID NO:297中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:299中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:301中所示的氨基酸序列。

[0819] 128.如实施例63至106中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:302;(ii)SEQ ID NO:302的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:302有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0820] 129.如实施例63至106和126中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含CDR1,其包含SEQ ID NO:288中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:88中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:303中所示的氨基酸序列。

[0821] 130.如实施例63至106中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:294、295或302;(ii)SEQ ID NO:294、295或302的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:294、295或302有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0822] 131.如实施例63至106和130中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地包含SEQ ID NO:296、298和300中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:297、299和301中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:288、88和303中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0823] 132.如实施例63至106、130和131中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个5T4 VHH域或所述第一5T4 VHH域和第二5T4 VHH域中的每一者独立地示于SEQ ID NO:245、249、255、270、276、294、295、302或360中。

[0824] 133.如实施例63至132中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述第一组分和第二组分中的一或两者包含结合共刺激受体的至少一个共刺激受体结合区(CRBR)。

[0825] 134.如实施例133的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个共刺激受体结合区(CRBR)相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区定位于氨基端和/或相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区定位于羧基端。

[0826] 135.如实施例133或实施例134的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体仅包含一个共刺激受体结合区(CRBR)。

[0827] 136.如实施例133至135中任一项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两个共刺激受体结合区(CRBR),其视情况相同或不同。

[0828] 137.如实施例133至136中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个共刺激受体结合区(CRBR)为或包含所述共刺激受体的原生同源结合搭配物的胞外域或其结合

片段,或展现对所述共刺激受体的结合活性的其变体。

[0829] 138.如实施例133至136中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个共刺激受体结合区(CRBR)为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、单域重链抗体和单域轻链抗体。

[0830] 139.如实施例138的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段为Fv、scFv、Fab或单域抗体(sdAb)。

[0831] 140.如实施例138或实施例139的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或抗原结合片段为sdAb。

[0832] 141.如实施例140的多特异性多肽构建体,其中所述sdAb为人类或人源化sdAb。

[0833] 142.如实施例133至141中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个共刺激受体结合区(CRBR)结合选自以下中的共刺激受体:41BB(CD137)、OX40(CD134)、CD27、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)、CD28、ICOS、CD40、B细胞活化因子受体(BAFF-R)、B细胞成熟抗原(BCMA)、跨膜活化因子和CAML相互作用因子(TACI)和NKG2D。

[0834] 143.如实施例133至142中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个共刺激受体结合区(CRBR)结合选自以下中的共刺激受体:41BB(CD137)、OX40(CD134)和糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)。

[0835] 144.如实施例133至143中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个共刺激受体结合区(CRBR)包含SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列;或与SEQ ID NO:210中所示的序列有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的序列。

[0836] 145.如实施例63至144中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述第一组分和第二组分中的一或两者包含结合抑制性受体的至少一个抑制性受体结合区(IRBR)。

[0837] 146.如实施例145的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个抑制性受体结合区(IRBR)相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区定位于氨基端和/或相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区定位于羧基端。

[0838] 147.如实施例145或实施例146的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体仅包含一个抑制性受体结合区(IRBR)。

[0839] 148.如实施例145-147中任一项的多特异性多肽构建体,其中:

[0840] 所述第一组分按N端至C端的次序包含结合5T4的第一5T4 VHH域;所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽;所述接头;所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域;和结合5T4的第二5T4 VHH域;和

[0841] 所述第二组分包含所述IRBR且按N端至C端的次序包含所述异源二聚体Fc区的第二Fc多肽;所述接头,视情况与所述第一组分中所存在的接头相同的接头;和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域中的另一者,其中所述IRBR相对于所述第二组分的Fc区定位于氨基端和/或相对于所述第二组分的抗CD3抗体或抗原结合片段定位于羧基端。

[0842] 149.如实施例145至148中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个IRBR为或包含所述抑制性受体的原生同源结合搭配物的胞外域或其结合片段,或展现对所述抑制性受体的结合活性的其变体。

[0843] 150.如实施例139至142中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个IRBR

为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、单域重链抗体和单域轻链抗体。

[0844] 151.如实施例150的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段为Fv、scFv、Fab、单域抗体(sdAb)。

[0845] 152.如实施例150或实施例151的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或抗原结合片段为sdAb。

[0846] 153.如实施例152的多特异性多肽构建体,其中所述sdAb为人类或人源化sdAb。

[0847] 153.如实施例145至153中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个IRBR结合选自以下中的抑制性受体:PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA和TIM3。

[0848] 155.如实施例145至154中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个IRBR结合PD-1。

[0849] 156.如实施例145至155中任一项的多特异性多肽构建体,其中:

[0850] 所述第一组分按N端至C端的次序包含结合5T4的第一5T4 VHH域;所述异源二聚体Fc区的第一Fc多肽;所述接头;所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域;和结合5T4的第二5T4 VHH域;和

[0851] 该第二多肽按N端至C端的次序包含所述IRBR或所述CRBR中的一者;所述异源二聚体Fc区的第二Fc多肽;所述接头,视情况与该第一组分中所存在的接头相同的接头;所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL域中的另一者;和所述CRBR或IRBR中的另一者。

[0852] 157.如实施例63至156中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述接头为肽或多肽接头,视情况地,其中所述接头长度为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸。

[0853] 158.如实施例63至157中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述接头为不可裂解接头。

[0854] 159.如实施例158的多特异性多肽构建体,其中所述不可裂解接头为或包含GG。

[0855] 160.如实施例158的多特异性多肽构建体,其中所述不可裂解接头包含GS、GGS、GGGGS(SEQ ID NO:125)、GGGGGS(SEQ ID NO:126)或其组合。

[0856] 161.如实施例63至158中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述接头为或包含序列GGGGGSGGGGGSGGGGGS(SEQ ID NO:127)。

[0857] 162.如实施例63至157中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述接头为可裂解接头。

[0858] 163.如实施例162的多特异性多肽构建体,其中所述可裂解接头为充当蛋白酶的基质的多肽。

[0859] 164.如实施例163的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶为由免疫效应细胞、肿瘤细胞或肿瘤微环境中所存在的细胞产生。

[0860] 165.如实施例163或实施例164的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶为由免疫效应细胞产生,且所述免疫效应细胞为活化T细胞、自然杀伤(NK)细胞或NK T细胞。

[0861] 166.如实施例163至165中任一项的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶为选自以下当中:间质蛋白酶、基质金属蛋白酶(MMP)、颗粒酶B及其组合。

[0862] 167.如实施例166的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶为颗粒酶B。

[0863] 168.如实施例163至167中任一项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GGSGGGGIEPDIGGSGGS(SEQ ID NO:171)。

[0864] 169.一种结合5T4的分离单域抗体(sdAb),其包含互补决定区1(CDR1),其包含选自由SEQ ID NO:86至87和288至292、296和297组成的组的氨基酸序列;互补决定区2(CDR2),其包含选自由SEQ ID NO:88至99、298和299组成的组的氨基酸序列;和互补决定区3(CDR3),其包含选自由SEQ ID NO:100至102、300、301和303组成的组的氨基酸序列。

[0865] 170.如实施例169的分离单域抗体(sdAb),其中所述至少一个5T4 VHH域结合至人类5T4中的抗原决定基,但并未展现交叉反应性结合至小鼠5T4。

[0866] 171.如实施例169或170的分离单域抗体(sdAb),其中所述至少一个5T4VHH域结合至SEQ ID NO:382的氨基酸60与112之间的氨基酸残基。

[0867] 172.如实施例169至171中任一项的分离单域抗体(sdAb),其中所述至少一个5T4 VHH域结合至SEQ ID NO:382的氨基酸173与224之间的氨基酸残基。

[0868] 173.如实施例169的分离单域抗体,其包含SEQ ID NO:245至253、255至287、294、295、302和360中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:245至253、255至287、294、295、302和360中的任一者有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0869] 174.如实施例169至173任一项的分离单域抗体,其中所述单域抗体包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:245;(ii)SEQ ID NO:245的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:245有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0870] 175.如实施例169至174任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:288和289组成的组的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:88中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:100中所示的氨基酸序列。

[0871] 176.如实施例169至175任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含SEQ ID NO:288、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:289、88和100中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0872] 177.如实施例169至176任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含SEQ ID NO:246至253和360中的任一者中所示的氨基酸序列;或展现出与SEQ ID NO:246至253和360有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0873] 178.如实施例169至177任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含SEQ ID NO:246至253和360中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0874] 179.如实施例169至173任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:255;(ii)SEQ ID NO:255的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:255有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0875] 180.如实施例169至173和179任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含CDR1,其包含SEQ ID NO:86、290至292中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:89至94组成的组的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:101中所示的氨基酸序列。

[0876] 181.如实施例169至173、179和180任一项的分离单域抗体，其中所述sdAb包含SEQ ID NO:290、89和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:290、90和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:290、91和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:290、92和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:290、93和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:290、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:291、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:292、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；或SEQ ID NO:86、94和101中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0877] 182.如实施例169至173和179至181任一项的分离单域抗体，其中所述sdAb包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列；或展现出与SEQ ID NO:256至275有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0878] 183.如实施例169至173和179至182任一项的分离单域抗体，其中所述sdAb包含SEQ ID NO:256至275中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0879] 184.如实施例169至173任一项的分离单域抗体，其中所述sdAb包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:276；(ii)SEQ ID NO:276的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:276有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0880] 185.如实施例169至173或实施例184任一项的分离单域抗体，其中所述sdAb包含CDR1，其包含选自由SEQ ID NO:86和87组成的组的氨基酸序列；CDR2，其包含选自由SEQ ID NO:95至99组成的组的氨基酸序列；和CDR3，其包含SEQ ID NO:102中所示的氨基酸序列。

[0881] 186.如实施例169至173、184和185任一项的分离单域抗体，其中所述sdAb包含SEQ ID NO:87、95和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:87、96和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:87、97和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:87、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；SEQ ID NO:87、99和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3；或SEQ ID NO:86、98和102中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0882] 187.如实施例169至173和184-186任一项的分离单域抗体，其中所述sdAb包含SEQ ID NO:277至287中的任一者中所示的氨基酸序列；或展现出与SEQ ID NO:277至287有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0883] 188.如实施例169至173和184至187任一项的分离单域抗体，其中所述sdAb包含SEQ ID NO:277至287中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0884] 189.如实施例169至173任一项的分离单域抗体，其中所述sdAb包含以下中所示的序列：(i)SEQ ID NO:294；(ii)SEQ ID NO:294的人源化变体；或(iii)展现出与SEQ ID NO:294有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0885] 190.如实施例169至173或189的分离单域抗体，其中所述sdAb包含CDR1，其包含SEQ ID NO:296中所示的氨基酸序列；CDR2，其包含SEQ ID NO:298中所示的氨基酸序列；和CDR3，其包含SEQ ID NO:300中所示的氨基酸序列。

[0886] 191.如实施例169至173或189的分离单域抗体，其中所述sdAb包含CDR3，其包含选

自由SEQ ID NO:300、301和303组成的组的氨基酸序列。

[0887] 192.如实施例169至173或189的分离单域抗体,其中所述sdAb包含:

[0888] CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:288、296和297组成的组的氨基酸序列;和/或

[0889] CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:88、298和299组成的组的氨基酸序列。

[0890] 193.如实施例169至173任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:295;(ii)SEQ ID NO:295的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:295有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0891] 194.如实施例169至173和193任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含CDR1,其包含SEQ ID NO:297中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:299中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:301中所示的氨基酸序列。

[0892] 195.如实施例169至173任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:302;(ii)SEQ ID NO:302的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:302有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0893] 196.如实施例169至173和193任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含CDR1,其包含SEQ ID NO:288中所示的氨基酸序列;CDR2,其包含SEQ ID NO:88中所示的氨基酸序列;和CDR3,其包含SEQ ID NO:303中所示的氨基酸序列。

[0894] 197.如实施例169至173任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含以下中所示的序列:(i)SEQ ID NO:294、295或302;(ii)SEQ ID NO:294、295或302的人源化变体;或(iii)展现出与SEQ ID NO:294、295或302有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性且结合5T4的氨基酸序列。

[0895] 198.如实施例169至173和197任一项的分离单域抗体,其中所述sdAb包含SEQ ID NO:296、298和300中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;SEQ ID NO:297、299和301中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;或SEQ ID NO:288、88和303中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0896] 199.一种聚核苷酸,其编码如实施例1至62中任一项的5T4结合多肽构建体。

[0897] 200.一种聚核苷酸,其编码如实施例63至168中任一项的多特异性多肽构建体。

[0898] 201.一种聚核苷酸,其包含第一核酸序列,其编码如实施例63至168中任一项的多特异性构建体的第一多肽;和第二核酸序列,其编码所述多特异性构建体的第二多肽,其中所述第一核酸序列和第二核酸序列为通过内部核糖体进入位点(IRES)或编码自裂解肽或引起核糖体跳跃的肽的核酸分离。

[0899] 202.如实施例201的聚核苷酸,其中所述第一核酸序列和第二核酸序列可操作地连接于相同启动子。

[0900] 203.如实施例201或202的聚核苷酸,其中编码自裂解肽或引起核糖体跳跃的肽的所述核酸为选自T2A、P2A、E2A或F2A。

[0901] 204.一种聚核苷酸,其编码如实施例169至198中任一项的单域抗体。

[0902] 205.一种载体,其包含如实施例199至204中任一项的聚核苷酸。

[0903] 206.如实施例205的载体,其为表达载体。

[0904] 207.如实施例205或实施例206的载体,其为病毒载体或真核载体,视情况其中所

述真核载体为哺乳动物载体。

[0905] 208.一种细胞,其包含一或多种如实施例199至204中任一项的聚核苷酸或一或多种如实施例205至207中任一项的载体。

[0906] 209.如实施例208的细胞,其中所述细胞为重组或分离的。

[0907] 210.如实施例209的细胞,其中所述细胞为哺乳动物细胞。

[0908] 211.一种制造多肽的方法,所述方法包含将一或多种如实施例199至204中任一项的聚核苷酸或一或多种如实施例205至207中任一项的载体引入细胞中,且在产生所述多特异性多肽构建体的条件下培养所述细胞。

[0909] 212.如实施例211的方法,其进一步包含自所述细胞分离或纯化所述多肽。

[0910] 213.一种多肽,其为由如实施例211或实施例212的方法产生。

[0911] 214.一种经工程改造的免疫细胞,其包含嵌合抗原受体,其包含:

[0912] 包含如实施例169至198中任一项的单域抗体的胞外域;

[0913] 跨膜域;和

[0914] 胞内信号传导域。

[0915] 215.如实施例214的经工程改造的免疫细胞,其中所述细胞为淋巴细胞。

[0916] 216.如实施例214或实施例215的经工程改造的免疫细胞,其中所述细胞为T细胞或自然杀伤(NK)细胞。

[0917] 217.如实施例214至216任一项的经工程改造的免疫细胞,其中所述胞内信号传导域包含基于免疫受体酪氨酸的活化模体(ITAM)信号传导域。

[0918] 218.如实施例214至217任一项的经工程改造的免疫细胞,其中所述胞内信号传导域为或包含CD3ζ信号传导域,视情况人类CD3ζ信号传导域。

[0919] 219.如实施例214至218的经工程改造的免疫细胞,其中所述胞内信号传导域进一步包含共刺激分子的信号传导域。

[0920] 220.如实施例219的经工程改造的免疫细胞,其中所述共刺激分子为CD28、ICOS、41BB或OX40,视情况人类CD28、人类ICOS、人类41BB或人类OX40。

[0921] 221.一种医药组合物,其包含如实施例1至62中任一项的5T4结合多肽构建体、如实施例63至168中任一项的多特异性多肽构建体、如实施例169至198中任一项的单域抗体或如实施例214至220中任一项的经工程改造的免疫细胞。

[0922] 222.如实施例221的医药组合物,其包含医药学上可接受的载剂。

[0923] 223.如实施例221或实施例222的医药组合物,其为无菌的。

[0924] 224.一种刺激或诱导受试者的免疫反应的方法,所述方法包含向有需要的受试者给予如实施例1至62中任一项的5T4结合多肽构建体、如实施例63至168中任一项的多特异性多肽构建体、如实施例169至198中任一项的单域抗体或如实施例214至220中任一项的经工程改造的免疫细胞或如实施例221至223的医药组合物。

[0925] 225.如实施例224的方法,其中针对肿瘤或癌症,视情况表达5T4的肿瘤或癌症增强所述免疫反应。

[0926] 226.如实施例224或实施例225的方法,其中所述方法治疗所述受试者的疾病或病状。

[0927] 227.一种治疗受试者的疾病或病状的方法,所述方法包含向有需要的受试者给予

治疗有效量的如实施例1至59中任一项的5T4结合多肽构建体、如实施例60至161中任一项的多特异性多肽构建体、如实施例162至188中任一项的单域抗体或如实施例214至220中任一项的经工程改造的免疫细胞或如实施例221至223的医药组合物。

[0928] 228.如实施例226或实施例227的方法，其中所述疾病或病状为肿瘤或癌症。

[0929] 229.如实施例224至228中任一项的方法，其中所述受试者为人类。

[0930] VIII.实施例

[0931] 以下实施例仅为说明的目的而包括在内且不意欲限制本发明的范畴。

[0932] 实施例1:5T4 sdAb的产生

[0933] 经由美洲驼和羊驼的免疫接种产生靶向人类5T4的单域抗体。用SEQ ID NO:362中所示且如下的人类5T4胞外域(ECD;人类5T4的氨基酸32至355，例如，UniProt编号Q13641)的重组形式免疫接种美洲驼和羊驼：

[0934] SSPTSSASSFSSSAPFLASAVSAQPPLPDQCPALCECSEAARTVKCVNRNLTEVPTDLPAYVRN
LFLTGNQLAVLPAGAFARRPPLAELAALNLSGSRLDEVRAGAFEHLPSLRQLDLSHNPLADLS
PFAFSGSNASVSAPSPLVELILNHIVPPEDERQNRSFEGMVVAALLAGRALQGLRRLELASNH
FLYLPRDVLAQLPSLRHLDLSNNSLVSLTYVSFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNGTLAELQGL
PHIRVFLDNNPWVCDCHMADMVTWLKETEVVQGKDRLTCAYPEKMRNRVLLELNSADLD
CDPILPPSLQTS

[0935] 产生特异性抗5T4抗体效价之后，自来自经免疫接种的动物的500mL血液分离骆马/羊驼外周血液单核细胞(PBMC)，且使用Qiagen RNeasy Maxi Kit分离总mRNA，且之后使用Thermo Superscript IV逆转录酶和oligo-dT底料(oligo-dT priming)转化为第一股cDNA。经由PCR使用cDNA作为模板特异性地扩增单域抗体(sdAb;亦称作VHH)序列，且克隆至酵母表面展现载体中作为sdAb-Fc-AGA2融合蛋白。Fc为人类IgG1 Fc(SEQ ID NO:8中所示)。

[0936] 经由磁珠分离使用5T4 ECD的重组形式富集展示这些sdAb的酵母库，之后进行荧光活化细胞分选(FACS)。将分选酵母涂铺出，且在96孔板中挑选分离菌落，且使其在培养基中生长，其将表达自表面展示的sdAb-Fc转换成在培养基中分泌。将来自96孔酵母分泌培养物的上清液施加至Ovcar-5(5T4阳性)或CCRF-CEM细胞(5T4阴性)，加以洗涤，用经荧光团标记的抗人类Fc二级抗体处理，且由96孔流动式细胞测量术加以分析。

[0937] 将针对5T4阳性细胞和非针对5T4阴性细胞的结合子选殖于哺乳动物表达载体中作为sdAb-Fc，通过使用聚乙烯亚胺在HEK293 freestyle细胞(293F细胞)或CHO细胞中进行短暂性转染来表达。在3至7天之后收集分泌于上清液中的重组蛋白，且通过蛋白A层析来纯化。

[0938] 例示性经鉴别的sdAb阐述于表E1A中。在一些情况下，sdAb可包括用于连接于另一多肽，诸如Fc，或另一sdAb的可挠性接头(例如GG)。

[0939] **表E1A：5T4 sdAb**

[0940]

纯系名称	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
L12E9	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	245
L14B5	ERPFGTYAMG	290	AVSRNGGASQ	89	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	255
L16G10	GRPFSSSAMG	87	AVSRNGGSSY	95	RSAAYSRSSETYTEKHDYTY	102	276
7E1	GRTRSLRTMA	296	AISWRSDSTY	298	GGGWLATTPDEYTY	300	294
14F4	GVTWNSYTMA	297	AIRWTVDTTY	299	GRKWPKADDY	301	295
4D3	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQTWGTKFTDYSD	303	302

[0941] 实施例2:利用流动式细胞测量术的sdAb与表达5T4的细胞的结合

[0942] 在表达5T4的细胞上评定针对经纯化的sdAb-Fc的特异性和相对亲和力。5T4-sdAb-Fc融合蛋白的结合为使用表达5T4的细胞通过流动式细胞测量术来评定。将滴定系列的融合蛋白与表达5T4的细胞株(大约2.5×10^4至5×10^4个细胞/孔)在4摄氏度下在96孔板中的FACS缓冲液(PBS 1%BSA,0.1%NaN_3pH 7.4)中一起培育30分钟。在FACS缓冲液中进行三次洗涤步骤之后,添加经APC结合的抗人类Fcγ特异性二级抗体(Jackson ImmunoResearch)且在4摄氏度下培育30分钟。在FACS缓冲液中再进行三次洗涤步骤之后,经由流动式细胞测量术(IQue Intellicyte)侦测结合抗体。

[0943] 图1A至图1B阐述例示性5T4 sdAb,亦即4D3(SEQ ID NO:302)、12E9(SEQ ID NO:245)、7E1(SEQ ID NO:294)、14B5(SEQ ID NO:255)、16G10(SEQ ID NO:276)、14F4(SEQ ID NO:295)的结果。

[0944] 使用例示性所产生的sdAb进行结合至5T4的抗原决定基框并分析,以测试成对地用于阻断另一抗体结合至抗原的抗原决定基的抗体。结果阐述于表E1B中:

[0945]

表E1B：抗原决定基框并	
12E9	BIN1
7E1	BIN2
14B5	BIN2
16G10	BIN2
4D3	BIN1
14F4	BIN1

[0946] 实施例3:源于骆驼的5T4 sdAb的人源化

[0947] 使用人类VH3-23生殖系作为支架来对例示性的源于骆驼的5T4 sdAb,12E9、14B5和16G10进行人源化。促成溶解性、特异性、稳定性和/或亲和力的骆驼残基保持未经修饰。此外,所有人源化变体均含有Leu11Glu(L11E)的修饰和Ser112Lys(S112K)和Ser113Pro(S113P)的羧基端修饰,因为已知这些修饰会防止或减少识别涉及sdAb的预先存在的ADA(如US20160207981中所述)。

[0948] 表E2阐述例示性5T4 sdAb人源化变体。

[0949]

表E2：5T4 sdAb人源化变体							
纯系名称	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
L12E9人源化变体							
hz12E9v1	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	246
hz12E9v2	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	247
hz12E9v3	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	248
hz12E9v4	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	249
hz12E9v5	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	250
hz12E9v6	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	251
hz12E9v7	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	252
hz12E9v8	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	253

[0950]

表E2：5T4 sdAb人源化变体							
纯系名称	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
hz12E9v9	GRPFSSKTMA	289	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	254 360
L14B5人源化变体							
hz14B5v1	ERPFGTYAMG	290	AVSRNGGASQ	89	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	256
hz14B5v2	ERPFGTYAMG	290	AVSRNGGASQ	89	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	257
hz14B5v3	ERPFGTYAMG	290	AVSRNGGASQ	89	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	258
hz14B5v4	ERPFGTYAMG	290	AVSRNGGASQ	89	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	259
hz14B5v5	ERPFGTYAMG	290	AVSRNAGASQ	90	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	260
hz14B5v6	ERPFGTYAMG	290	AVSRNTGASQ	91	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	261
hz14B5v7	ERPFGTYAMG	290	AVSRQGGASQ	92	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	262

[0951]

表E2：5T4 sdAb人源化变体

纯系名称	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
hz14B5v8	ERPFGTYAMG	290	AVSRGGGASQ	93	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	263
hz14B5v9	ERPFGTYAMG	290	AVSRNGGASQ	89	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	264
hz14B5v10	ERPFGTYAMG	290	AVSRNGGASQ	89	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	265
hz14B5v11	ERPFGTYAMG	290	AVSRNAGASQ	90	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	266
hz14B5v12	ERPFGTYAMG	290	AVSRNAGASQ	90	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	267
hz14B5v13	ERPFGTYAMG	290	AVSRNAGASQ	90	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	268
hz14B5v14	ERPFGTYAMG	290	AVSRNAGASQ	90	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	269
hz14B5v15	ERPFGTYAMG	290	AVSRNAGASY	94	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	270

[0952]

表E2：5T4 sdAb人源化变体							
纯系名称	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
hz14B5v16	ERPFGTYAMG	290	AVSRNAGASQ	90	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	271
hz14B5v17	ERPFGTYAMG	290	AVSRNAGASY	94	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	272
hz14B5v18	ERPFSSYAMG	291	AVSRNAGASY	94	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	273
hz14B5v19	GRPFGTYAMG	292	AVSRNAGASY	94	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	274
hz14B5v20	GRPFSSYAMG	86	AVSRNAGASY	94	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	275
L16G10人源化变体							
hz16G10v1	GRPFSSSAMG	87	AVSRNGGSSY	95	RSAAYSRSSETYTEKHDYTY	102	277
hz16G10v2	GRPFSSSAMG	87	AVSRNGGSSY	95	RSAAYSRSSETYTEKHDYTY	102	278
hz16G10v3	GRPFSSSAMG	87	AVSRNGGSSY	95	RSAAYSRSSETYTEKHDYTY	102	279

[0953]

表E2：5T4 sdAb人源化变体

纯系名称	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
hz16G10v4	GRPFSSSAMG	87	AVSRQGGSSY	96	RSAAYSRSSETYTEKHDYTY	102	280
hz16G10v5	GRPFSSSAMG	87	AVSRGGGSSY	97	RSAAYSRSSETYTEKHDYTY	102	281
hz16G10v6	GRPFSSSAMG	87	AVSRNAGSSY	98	RSAAYSRSSETYTEKHDYTY	102	282
hz16G10v7	GRPFSSSAMG	87	AVSRNTGSSY	99	RSAAYSRSSETYTEKHDYTY	102	283
hz16G10v8	GRPFSSSAMG	87	AVSRNGGSSY	95	RSAAYSRSSETYTEKHDYTY	102	284
hz16G10v9	GRPFSSSAMG	87	AVSRNGGSSY	95	RSAAYSRSSETYTEKHDYTY	102	285
hz16G10v10	GRPFSSSAMG	87	AVSRNAGSSY	98	RSAAYSRSSETYTEKHDYTY	102	286
hz16G10v11	GRPFSSYAMG	86	AVSRNAGSSY	98	RSAAYSRSSETYTEKHDYTY	102	287

[0954] 测试5T4 sdAb的人源化变体结合表达5T4的细胞的能力，实质上如实施例2中所述，且将结合与亲本sdAb进行比较。在这些研究中使用表达5T4的T47D细胞。结果显示于图2A至图2F中，其证实人源化变体的结合。在一些情况下，与亲本sdAb相比，结合有所增加。

[0955] 实施例4：制造靶向5T4的限制性CD3结合蛋白的方法

[0956] 生成含有以下的多特异性多肽构建体：展现限制性CD3结合的经二硫键稳定的抗CD3 Fv结合区、异源二聚体Fc域和上文所述的相对于Fc区定位于氨基端和/或相对于CD3结合区定位于羧基端的一或多个5T4 sdAb。产生呈各种构型的多特异性构建体，如图3A至图3E中所示。在一些情况下，限制性CD3接合构建体含有至少一个共刺激受体结合区(CRBR)，

其相对于Fc区定位于氨基端和/或相对于CD3结合区定位于羧基端。

[0957] 在例示性构建体中,产生至少编码异源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聚核苷酸,且克隆于质体中以供表达。第一多肽链按N端至C端的次序通常包括Fc臼多肽(例如SEQ ID NO:112,或在一些情况下,SEQ ID NO:114中所示);可裂解或不可裂解接头,诸如含有一或多个蛋白酶的基质识别位点的接头;和dsFv抗CD3抗体的可变轻链(VL)域(例如SEQ ID NO:75中所示)。第二多肽链按N端至C端的次序通常包括Fc杵多肽(例如SEQ ID NO:105,或在一些情况下,SEQ ID NO:109中所示);与第一多肽链相同的可裂解接头或相同的不可裂解接头;和dsFv抗CD3抗体的可变重链域(例如SEQ ID NO:47中所示)。构建体产生有例示性不可裂解接头,GGGGGSGGGGGSGGGGGS(SEQ ID NO:127)或例示性可裂解接头,GGSGGGGIEPDIGGSGGS(SEQ ID NO:171),其含有颗粒酶B的基质识别位点。多肽链中的一或两者额外编码在Fc域的氨基端和/或CD3结合区的羧基端的一或多种5T4 sdAb,和/或在Fc域的氨基端和/或CD3结合区的羧基端的共刺激受体结合域,其呈各种构型。

[0958] 使用聚乙烯亚胺以等摩尔比将编码异源二聚体限制性CD3结合蛋白的各链的独立质粒短暂性转染于哺乳动物细胞(HEK293或CHO)中。3至7天之后收集分泌于上清液中的重组蛋白,且通过蛋白A层析来纯化,随后以进行制备型尺寸排阻层析(SEC)或流通式疏水相互作用层析(HIC)。由于在位置I253R或H435R处的异源二聚体Fc的一个链中设计有突变(通常臼-Fc),以使得该链不结合蛋白A的缘故,选择性地纯化异源二聚体蛋白。SEC(AKTA,伴随Superdex-200树脂)或FT-HIC(AKTA,伴随丁基/苯基琼脂糖凝胶)上进行的第二层析步骤用于移除非所期望的交叉配对的物种,其含有更具疏水性且呈预期分子量两倍的两种异源二聚体Fc。

[0959] 该方法适于产生异源二聚体多特异性多肽构建体,其含有经恰当配对的异源二聚体Fc物种和如所述的经二硫键稳定的抗CD3 Fv(例如如SEQ ID NO:47中所示的具有突变G44C的抗CD3 VH和如SEQ ID NO:293中所示的具有突变G100C的VL)。经纯化的异源二聚体限制性CD3结合蛋白为稳定的且在4℃下长期培育后并未积聚交叉配对的物种或增加的蛋白浓度。

[0960] 表E3阐述例示性的所产生的限制性多特异性构建体。cx3315的5T4结合域为限制性CD3接合构建体中定位在N和C端的FAB。

[0961]

表E3：5T4 VHH限制性多特异性构建体

构建体编号	链	氨基端sdAb(靶点)(SEQ ID NO)	Fc	接头	CD3结合域	羧基端sdAb(靶点)(SEQ ID NO)
cx3253	1	12E9 (5T4) (245)	hFc-杵	IEPDI	Con1 VH	7E1 (5T4) (294)
	2	-	hFc-白	IEPDI	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)
cx3497	1	12E9 (5T4) (245)	hFc-杵	IEPDI	Con1 VH	16G10 (5T4) (276)
	2	-	hFc-白	IEPDI	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)
cx3499	1	12E9 (5T4) (245)	hFc-杵	IEPDI	Con1 VH	14B5 (5T4) (255)
	2	-	hFc-白	IEPDI	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)
cx4224	1	14F4 (5T4) (295)	hFc-杵	IEPDI	Con1 VH	7E1 (5T4) (294)
	2	-	hFc-白	IEPDI	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)
cx3262	1	12E9 (5T4) (245)	hFc-杵	IEPDI	Con1 VH	7E1 (5T4) (294)
	2	-	hFc-白	IEPDI	Con1 VL	-
cx4910	1	hz12E9v4 (5T4)	xELL-杵	(G5S)3	Con1 VH	hz14B5v15 (5T4)

[0962]

		(249)				(270)
	2	-	xELL-白	(G5S)3	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)
cx4912	1	hz14B5v15 (5T4) (270)	xELL-杵	(G5S)3	Con1 VH	hz12E9v4 (5T4) (249)
	2	-	xELL-白	(G5S)3	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)
cx4911	1	hz12E9v4 (5T4) (249)	xELL-杵	(G5S)3	Con1 VH	hz14B5v15 (5T4) (270)
	2	-	xELL-白	(G5S)3	Con1 VL	-
cx4913	1	hz14B5v15 (5T4) (270)	xELL-杵	(G5S)3	Con1 VH	hz12E9v4 (5T4) (249)
	2	-	xELL-白	(G5S)3	Con1 VL	-
cx3546	1	12E9 (5T4) (245)	hFc-杵	IEPDI	Con1 VH	14B5 (5T4) (255)
	2	-	hFc-白	IEPDI	Con1 VL	-
cx3547	1	12E9 (5T4) (245)	hFc-杵	IEPDI	Con1 VH	16G10 (5T4) (276)
	2	-	hFc-白	IEPDI	Con1 VL	-
cx3264	1	4D3 (5T4) (302)	hFc-杵	IEPDI	Con1 VH	4D3 (5T4) (302)
	2	-	hFc-白	IEPDI	Con2 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)
cx3265	1	4D3 (5T4)	hFc-杵	IEPDI	Con1 VH	4D3 (5T4)

[0963]

		(302)				(302)
	2	-	hFc-白	IEPDI	Con1 VL	-
cx5185	1	hz12E9v9 (5T4) (360)	xELL-杵	(G5S)3	Con1 VH	hz16G10v11(5T4) (287)
	2	-	xELL-白	(G5S)3	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)
cx7859	1	hz12E9v9 (5T4) (360)	xELL-杵	(G5S)3	Con1 VH	hz12E9v9 (5T4) (360)
	2	-	xELL-白	(G5S)3	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)
cx7860	1	hz16G10v11(5T4) (287)	xELL-杵	(G5S)3	Con1 VH	hz16G10v11(5T4) (287)
	2	-	xELL-白	(G5S)3	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)

[0964] 实施例5:比较与分离初级T细胞对表达5T4的癌细胞的结合

[0965] 通过流动式细胞测量术评定表E3中所阐述的例示性的靶向5T4的限制性CD3接合构建体与初级T细胞和表达5T4的细胞(Ovcar-5)的表面上的CD3的结合。T细胞为自与健康人类供体leukopak分离的PBMC阴性富集的初级T细胞。用对人类Fc具有特异性的经荧光团结合的二级抗体(抗人类IgG APC二级抗体)侦测经结合的构建体,且通过流动式细胞测量术测量结合。与二级抗体一起培育的细胞仅充当阴性对照。与二级抗体一起培育的细胞仅充当阴性对照。

[0966] 根据显示标准化细胞计数对各构建体在200nM时的荧光反应的流动式细胞测量术直方图的结果显示于图4A(cx3253)、图4B(cx3264)、图4C(cx3497)、图4D(cx3499)、图4E(cx3547)、图4F(cx3546)、图4G(cx4224)、图4H(cx4913)、图4I(cx3265)、图4J(cx4912)、图4K(cx3262)、图4L(cx4911)和图4M(cx4910)中。如所示,发现代表性的靶向5T4的限制性CD3接合体结合表达5T4的Ovcar-5细胞(每一图式中的左上图和下图)。然而,如每一图式中的右上图和下图中所示,相同构建体未能结合至分离的T细胞。

[0967] 表E4汇总了这些研究中如由流动式细胞测量术测定的例示性分子对5T4或CD3的亲和力。

[0968] 表E4:构建体结合亲和力

[0969]

构建体编号	亲和力5T4	亲和力CD3
cx3253	0.120 nM	>200 nM
cx3497	0.646 nM	>200 nM
cx3499	0.653 nM	>200 nM
cx4224	0.871 nM	>200 nM
cx3262	0.116 nM	>200 nM
cx4910	0.575 nM	>200 nM
cx4912	0.119 nM	>200 nM
cx4911	0.259 nM	>200 nM
cx4913	0.348 nM	>200 nM
cx3546	0.436 nM	>200 nM
cx3547	0.419 nM	>200 nM
cx3264	0.145 nM	>200 nM
cx3265	0.156 nM	>200 nM

[0970] 实施例6:使用报告分子分析评定5T4依赖性CD3报告分子T细胞活化

[0971] 此实施例描述评定不同代表性的靶向5T4的限制性CD3接合构建体活化与表达5T4的Ovcar-5细胞或5T4阴性细胞株、CCFR-CEM共培养的CD3 NFAT报告分子Jurkat细胞株(CD3 NFAT reporter Jurkat cell line)的能力。在报告分子分析中,Jurkat细胞中CD3的接合引起NFAT信号传导且产生绿色荧光。这些分析用于证明尽管经由CD3结合域的T细胞结合在分离T细胞上受到限制或抑制(如实施例5中所示),但在本文所提供的靶向5T4的限制性CD3接合构建体结合至同源抗原后,其能够接合T细胞且介导T细胞活化。

[0972] 将靶向抗原的限制性CD3接合构建体滴定于表达5T4的靶细胞、Ovcar-5和表达经NFAT驱动的绿色荧光蛋白(GFP)的经工程改造的Jurkat细胞的共培养物上。对于利用黏着靶细胞的报告分子分析,接种靶细胞,使其在室温下静置以均匀分布,且在37℃下培育数小时以在添加报告分子细胞和靶向抗原的限制性CD3接合构建体前准许黏着。使用IncuCyte ZOOM为统对分析板进行连续成像,且通过测量总绿色对象累积强度(total green object integrated intensity)测定CD3报告分子细胞活化。如所示,所评定的靶向5T4的限制性CD3接合构建体在含有5T4阳性细胞的培养物中诱导报告分子活性(图5A、图5C和图5E),但当用5T4阴性细胞株(CCRF-CEM)培养T细胞时,未观测到可测量的报告分子活性(图5B、图5D和图5F)。

[0973] 实施例7:功能活性的评定

[0974] 此实施例描述在人类初级T细胞活体外分析中评定和表征例示性的所产生的靶向

5T4的限制性CD3接合构建体。

[0975] A.T细胞介导的细胞毒性

[0976] 用CytoID红荧光标记靶细胞。对于利用黏着靶细胞Ovcar-5或CCRF-CEM的细胞毒性分析，接种靶细胞，使其在室温下静置以均匀分布，且在37℃下培育数小时以准许在添加其他分析组分之前黏着。自与健康人类供体leukopak分离的PBMC阴性富集初级T细胞，且以10:1至40:1的T细胞:靶细胞比率添加所述细胞。添加绿色细胞凋亡蛋白酶-3/7试剂，其荧光标记经历细胞凋亡的细胞的细胞核DNA。将抗体滴定于共培养物上，且使用IncuCyte ZOOM为统对分析板进行连续成像。通过量测总红色/绿色重叠对象面积来判定靶细胞死亡。

[0977] 如图6A中所示，所评定的靶向5T4的限制性CD3接合构建体诱发5T4阳性(Ovcar-5)细胞株的强效的T细胞介导的细胞毒性。如图6B中所示，针对5T4阴性细胞株(CCRF-CEM)未观测到可测量的T细胞细胞毒性，其与强效地诱导抗原依赖性T细胞活化的能力相一致。这些观测结果支持，与其他CD3接合形式相比，本文中所提供的靶向抗原的限制性CD3形式缺乏或展现减少的分离的T细胞结合，同时维持诱发强效的5T4依赖性T细胞细胞毒性的能力。

[0978] B.T细胞活化

[0979] 为了评定T细胞活化，自T细胞介导的细胞毒性分析收集悬浮细胞，且用活/死亡细胞染色剂(live/dead stain)和经荧光团结合的抗CD4、抗CD8、抗CD25、抗CD69和/或抗CD71抗体染色。使用SONY SA3800光谱分析仪分析细胞，且通过测量CD25、CD69或CD71的表达量或CD25、CD69或CD71阳性的百分比判定CD4+或CD8+T细胞活化。

[0980] 图7A至图7B和图7C至图7D描绘在例示性构建体存在下，培养T细胞与5T4阳性(Ovcar-5)或5T4阴性(CCRF-CEM)细胞株后，CD25分别在CD4 T细胞和CD8 T细胞上的表达结果。图8A至图8B和图8C至图8D描绘在例示性构建体存在下，培养T细胞与5T4阳性(Ovcar-5)或5T4阴性(CCRF-CEM)细胞株后，CD69分别在CD4 T细胞和CD8 T细胞上的表达结果。图9A至图9B和图9C至图9D描绘在例示性构建体存在下，培养T细胞与5T4阳性(Ovcar-5)或5T4阴性(CCRF-CEM)细胞株后，CD71分别在CD4 T细胞和CD8 T细胞上的表达结果。所述结果显示，例示性的所评定的靶向5T4的限制性CD3接合构建体经由CD3结合介导剂量依赖性5T4依赖性T细胞活化，如由CD4+和CD8+T细胞中的CD25、CD69和CD71的表达增加证明。

[0981] 因此，所述结果证明，本发明的靶向5T4的限制性CD3接合构建体诱导强效的CD4和CD8 T细胞的抗原依赖性活化。

[0982] C.T细胞细胞因子产量(ELISA)

[0983] 通过三明治ELISA(BioLegend,USA)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，且产生标准曲线，自该曲线内插得到上清液样本的细胞因子浓度值。具有低于侦测下限的吸亮度值的样本被指配等于最低标准浓度的二分的一的细胞因子浓度。如图10A中所示，利用T细胞与5T4阳性(Ovcar-5)，例示性的所评定的靶向5T4的限制性CD3接合构建体引发产生IFNγ，且伴随5T4阴性细胞株(CCRF-CEM)未观测到可量测的IFNγ产量。

[0984] D.T细胞细胞因子产量(FluoroSpot)

[0985] 在4℃下用IFNγ和TNFα捕捉抗体涂布FluoroSpot膜隔夜。用PBS洗涤膜，且进行抗体滴定，添加靶细胞和PBMC或自PBMC阴性富集的纯化T细胞。以1:10靶细胞:效应细胞比率接种细胞。在37℃下培育分析盘约24小时，且根据制造商(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。在各分析孔中使用统一曝光时间和强度设定来量测细胞因子斑点计数。图10B(IFNγ)和图10C(TNFα)描绘例示性的靶向5T4的限制性CD3接合构建体以5T4依赖性方式引起自PBMC或T细胞产生细胞因子。

[0986] 实施例8:NK细胞活化的评定

[0987] A.初级NK细胞的活化

[0988] 为了评定在5T4阳性细胞存在下,sdAb-IgG1-Fc活化NK细胞的能力,在37摄氏度下用抗体滴定处理A549细胞(2.5×10^3个细胞/孔)和PBMC(1.55×10^6个细胞/孔;2.5×10^4个NK细胞/孔)的共培养物4小时。用FITC-抗CD56和APC-抗CD107a染色细胞。通过用流动式细胞测量术测量CD56+细胞上的CD107a量来判定NK活化。如图11A中所示,格式化为sdAb-Fc的12E9和4D3能够引起靶点依赖性NK细胞活化。

[0989] B.ADCC报告分子活化

[0990] 为了评定例示性靶向5T4的sdAb的Fc效应功能,使用经NFAT驱动的荧光素酶报告基因工程改造以稳定表达CD16a的Jurkat报告分子细胞株。在存在或不存在表达5T4的细胞(T47D;大约3×10^4个细胞/孔)下接种Jurkat报告分子细胞(大约6×10^4个细胞/孔)。将50纳摩尔的抗体添加至细胞中,且在37摄氏度下培育分析盘持续六小时,最终分析体积为75微升。使分析盘平衡至室温,将75微升Bio-Glo添加至样本孔中,且在室温下培育分析盘10分钟。将100微升等分试样转移至白色96孔板,且使用Clariostar酶标仪来测量荧光。图11B描绘12E9-Fc、4F7-Fc、4F11-Fc、hz12E9v9-Fc和hz16G10v11-Fc以抗原依赖性方式活化CD16报告分子细胞的能力。图11C和图11D描绘cx7884(hz12E9v9-Fc)和cx7885(hz16G10v11-Fc)以抗原和剂量依赖性方式活化CD16报告分子细胞的能力。

[0991] 实施例9:靶向5T4的CD3接合构建体的比较

[0992] A.与癌细胞和初级T细胞的结合

[0993] 此实施例描述评定例示性构建体与T细胞或癌细胞的结合的研究。在彼此分离的仅含有T细胞或仅含有癌细胞的单一培养物中进行这些研究。

[0994] 评定本发明的例示性CD3接合构建体与初级T细胞的表面上的CD3和与表达5T4的Ovcar5细胞的结合。自与健康人类供体leukopak分离的PBMC阴性富集初级T细胞。用经荧光团结合的二级抗体侦测经结合的构建体,且通过流动式细胞测量术测量结合。与二级抗体一起培育的细胞仅充当阴性对照。

[0995] 评定例示性的靶向5T4的限制性CD3接合构建体。如表E3中所示,cx3497并入有41BB结合域作为共刺激受体结合区(CRBR),而cx3547并未并入有CRBR。例示性cx3497构建体含有靶向41BB共刺激受体的sdAb(其含有SEQ ID NO:347、348和349中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;例如,SEQ ID NO:210中所示)作为CRBR。并入单域抗体作为两个构建体的5T4结合域以及cx3497的41BB结合域。如图12A和图12B中所示,两个构建体均展示结合至表达5T4的细胞,Ovcar-5。然而,该等构建体无法结合分离的T细胞(图12C和图12D)。

[0996] B.T细胞介导的细胞毒性

[0997] 此实施例描述在人类初级T细胞活体外分析中评定和表征所测试的限制性CD3接合构建体。

[0998] 用CytoID红荧光标记靶细胞。对于黏着靶细胞,接种靶细胞,使其在室温下静置以均匀分布,且在37℃下培育数小时以准许在添加其他分析组分之前黏着。自健康人类供体

leukopak分离的PBMC阴性富集初级T细胞，且以10:1至40:1T细胞:靶点细胞比率添加所述细胞。添加绿色半胱氨酸蛋白水解酶-3/7试剂，其荧光标记经历细胞凋亡的细胞的细胞核DNA。将抗体滴定于共培养物上，且使用IncuCyte ZOOM为统对分析板进行连续成像。通过测量总红色/绿色重叠对象面积(如图13A和图13B中所示)来判定靶细胞死亡。此处，用CytoID红将靶细胞标记为红色，同时用绿色荧光卡半胱氨酸蛋白水解酶-3/7基质监测细胞凋亡，因此细胞凋亡靶细胞为双标记有红色和绿色。

[0999] 在例示性分析中，所测试多特异性构建体包括具有41BB结合共刺激受体结合区的靶向5T4的限制性CD3构建体(cx3497)。作为对照，也测试相应的不具有共刺激受体结合区的靶向5T4的限制性CD3构建体(cx3547)。靶细胞为5T4阳性Ovcar5细胞或5T4阴性CCRF细胞。如图13A和图13B中所示，代表性的靶向5T4的限制性CD3接合构建体，cx3547缺乏介导抗原特异性细胞毒性的能力，而添加41BB结合域诱发对表达5T4的细胞株，Ovcar-5，而非对5T4阴性细胞株，CCRF-CEM的特异性T细胞细胞毒性。值得注意的是，在大约40小时以前并未观测到由cx3497介导的T细胞介导的细胞毒性，其与TCR信号传导后的41BB上调的动力学相一致。

[1000] 这些结果显示，相对于缺乏41BB结合域的构建体，添加靶向共刺激受体的共刺激受体结合区，诸如41BB，增强了T细胞介导的细胞毒性的效能。与其他CD3接合形式相比，这些观测结果支持本文中所提供的具有额外共刺激能力的靶向抗原的限制性CD3形式展示介导的细胞毒性的增强效能，同时不会实质上结合不存在抗原接合的T细胞。

[1001] C.T细胞细胞因子产量(ELISA)

[1002] 通过三明治ELISA(BioLegend，USA)分析上文所述的来自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，且产生标准曲线，自该曲线内插得到上清液样本的细胞因子浓度值。具有低于侦测下限的吸光度值的样本被指配等于最低标准浓度的二分之一的细胞因子浓度。

[1003] 图14显示，观测到当41BB结合域并入构建体(cx3499和cx3497对cx3546和cx3547)中时，代表性的靶向5T4的限制性CD3接合构建体以抗原依赖性方式引起T细胞产生增加的IFNγ。

[1004] 实施例10:含有具有或不具有共刺激结合区的靶向5T4的抗原结合域的CD3限制性多特异性构建体的产生和评定

[1005] 产生额外多特异性构建体，其含有通过接头(例如不可裂解接头)偶合至CD3结合区的免疫球蛋白的异源二聚体Fc区，和相对于多特异性多肽构建体的Fc区定位于氨基端和相对于多特异性多肽构建体的CD3结合区定位于羧基端的结合5T4肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合域。产生具有或不具有靶向sdAb的4-1BB作为CRBR的构建体且在不同分析中比较T细胞活性。

[1006] A.构建体的设计和产生

[1007] 产生具有如图3A至图3E中所描绘的形式的例示性多特异性构建体。产生至少编码异源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聚核苷酸，且克隆至质粒中以供表达。第一多肽链按N端至C端的次序通常包括第一Fc多肽(例如Fc臼多肽)；不可裂解接头；和抗CD3抗体的可变轻链(VL)域。第二多肽链按N端至C端的次序通常包括第二Fc多肽(例如Fc杵多肽)；与第一多肽链相同的不可裂解接头；和抗CD3抗体的可变重链(VH)域。抗

CD3抗体包括经二硫键稳定的(dsFv)抗体(具有突变G44C的抗CD3 VH和具有突变G100C的VL)，如表E5中所述。多肽链中的一者额外编码两个5T4抗原结合域，一个在Fc域的氨基端且一个在CD3结合区的羧基端。产生不具有CRBR的例示性构建体cx5951，而构建体cx5185含有作为相对于CD3结合区定位于羧基端的CRBR的4-1BB抗原结合域(例如sdAb)，例如，sdAb(含有SEQ ID NO:347、348和349中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3，例如，SEQ ID NO:210中所示)。

[1008] 具有靶向5T4的sdAb域的例示性限制性CD3结合构建体的组分给定在下表E5中。实质上如实施例4中所述表达和纯化的构建体。

[1009]

表E5：5T4 VHH限制性多特异性构建体

构建体	链	氨基端sdAb(靶点)	Fc	接头	CD3结合域	羧基端sdAb(靶点)	经二硫键稳定
cx5951	1	5T4 sdAb hz12E9v09 (360)	xELL-杵 (105)	GGGGGSGGGGGSGGGGGS (127)	VH13 (47)	5T4 sdAb hz16G10v11 (287)	是
	2	无	hxELL-白 (106)	GGGGGSGGGGGSGGGGGS (127)	VL10 (75)	无	
cx5185	1	5T4 sdAb hz12E9v09 (360)	xELL-杵 (105)	GGGGGSGGGGGSGGGGGS (127)	VH13 (47)	5T4 sdAb hz16G10v11 (287)	是
	2	无	xELL-白 (112)	GGGGGSGGGGGSGGGGGS (127)	VL10 (75)	4-1BB sdAb RH3v5-1 (210)	

[1010] B.T细胞活性

[1011] 比较不同分析中上文所述的构建体接合CD3的活性。

[1012] 1.细胞毒活性

[1013] 在具有41BB结合共刺激受体结合区(cx5185)或不具有CRBR(cx5951)的例示性靶向5T4的构建体存在下评定对靶细胞的细胞毒活性。对于细胞毒性分析，将表达5T4的Ovcar-5细胞或不表达5T4的CCRF-CEM对照细胞用作靶细胞且进行接种，使其在室温下静置以均匀分布，且在37摄氏度下培育数小时以准许在添加其他分析组分之前黏着。自健康人类供体leukopak分离的PBMC阴性富集初级T细胞，且以10:1至40:1T细胞:靶细胞比率添加

所述细胞。此处，用CytoID红将靶细胞标记为红色，同时用绿色荧光半胱氨酸蛋白水解酶-3/7基质监测细胞凋亡；因此细胞凋亡靶细胞为双标记有红色和绿色的靶细胞。使用IncuCyte ZOOM系统对分析板进行连续成像。通过测量总红色/绿色重叠对象面积来判定靶细胞死亡。

[1014] 如图15A中所示，在48小时之后，与缺少41BB结合共刺激受体结合区的相同构建体，cx5951相比，伴随具有41BB结合共刺激受体结合区的靶向5T4的限制性CD3接合构建体，cx5185观测到对表达5T4的靶细胞的T细胞介导的靶细胞细胞毒性的效能方面的显著差异。未观测到针对非靶细胞的细胞毒活性(图15B)。

[1015] 与其他CD3接合形式相比，这些观测结果支持本文中所提供的具有额外共刺激能力的抗原依赖性限制性CD3形式展示介导的细胞毒性的增强效能。

[1016] 2.T细胞活化

[1017] 为了评定由例示性的靶向5T4的限制性CD3接合构建体介导的T细胞活化，在T细胞与表达5T4的靶细胞(A375细胞、Ovcar-5细胞或SHP-77细胞)的共培养物中培育cx5185和cx5951。为了评定T细胞活化，收集细胞且用活/死亡细胞染色和经荧光团结合的抗CD4、抗CD8和/或抗CD25抗体染色。使用SONY SA3800光谱分析仪分析细胞，且通过测量CD25的表达量判定CD4+或CD8+T细胞活化。通过CD4和CD8群上的CD25表达评定T细胞活化。如通过CD25的表达所测量，T细胞活化在已在例示性构建体存在下与表达5T4的靶细胞一起培育的CD4(图16A)和CD8(图16B)T细胞中显而易见。如图16A至图16B中所示，与缺少41BB结合域的相似构建体，cx5951相比，并入有41BB结合域的靶向5T4的限制性CD3接合构建体(cx5185)展示对CD4和CD8 T细胞两者的增强的活化能力。

[1018] 3.T细胞细胞因子产量(ELISA)

[1019] 使用不同的表达5T4的细胞株(A375、SHP-77和Ovcar5)评定将41BB结合域并入例示性的靶向5T4的限制性CD3接合构建体中对T细胞介导的IFNγ产量的影响。在共培养T细胞和表达5T4的靶细胞之后，通过三明治ELISA(BioLegend，USA)分析上清液的IFNγ含量。遵循制造商的说明书，且产生标准曲线，自该曲线内插得到上清液样本的细胞因子浓度值。具有低于侦测下限的吸亮度值的样本被指配等于最低标准浓度的二分的一的细胞因子浓度。如图17中所示，与缺少41BB结合域的相似构建体，cx5951相比，并入有41BB结合域的靶向5T4的限制性CD3接合构建体，cx5185展示增加的IFNγ产量。

[1020] 4.T细胞增殖

[1021] 通过利用流动式细胞测量术测量经标记的CD4+或CD8+T细胞中的CellTrace™ Violet染料(Thermo Fisher Scientific)的稀释来评定T细胞增殖。自PBMC阴性富集T细胞且根据制造商的方案用CellTrace™ Violet加以标记。将靶向5T4的限制性CD3接合构建体滴定于经标记的T细胞和表达5T4的细胞A375、Ovcar-5和SHP-77的共培养物上，且在37℃下培育分析板持续五天。用存活力染料碘化丙啶以及经荧光团结合的抗CD4和抗CD8抗体染色细胞，且使用SONY SA3800光谱分析仪加以分析。通过对适当活T细胞亚群进行门控且测量CellTrace™ Violet强度低于来自未处理的共培养物的T细胞的CellTrace™ Violet强度的细胞的百分比来测定增殖的CD4+或CD8+T细胞百分比。

[1022] 与缺少41BB结合域的相似构建体，cx5951相比，并入有41BB结合域的靶向5T4的限制性CD3接合构建体，cx5185增强了CD4(图18)和CD8(图19)T细胞的增殖。

[1023] 5.T细胞线粒体评定

[1024] 已表明41BB信号传导会促进线粒体功能。可使用线粒体选择性荧光探针MitoTracker绿(Thermo Fisher Scientific)来监测线粒体功能,该探针会在活性粒线体中积聚。为了评定T细胞的线粒体功能,在例示性的靶向5T4的限制性CD3接合构建体存在下,将T细胞与表达5T4的细胞株A375、Ovcar-5和SHP-77共培养五天。以100nM的最终细胞染色浓度添加MitoTracker绿以及存活力染料碘化丙啶和经荧光团结合的抗CD4和抗CD8抗体,且使用SONY SA3800光谱分析仪分析细胞。通过对适当活T细胞亚群进行门控来测定CD4+或CD8+T细胞的中值MitoTracker绿荧光强度。与缺少41BB结合域的相似构建体,cx5951相比,并入有41BB结合域的靶向5T4的限制性CD3接合构建体,cx5185增强了CD4(图20)和CD8(图21)T细胞的线粒体功能。

[1025] 6.T细胞报告分子分析

[1026] 亦评定含有靶向5T4的sdAb的限制性CD3接合构建体介导41BB共刺激信号传导路径的特异性激动作用的能力。使用Jurkat 41BB NFκB-荧光素酶报告分子细胞株来测试不具有共刺激受体结合域(cx5951)或具有41BB结合域(cx5185)的例示性的靶向5T4的限制性CD3接合构建体。经重组培养板结合的5T4用作抗原来源。如图22中所示,发现并入有41BB结合域的cx5185诱导经靶向的共刺激受体的特异性激动作用。

[1027] C.概述

[1028] 总之,这些结果证明,在存在和不存在CRBR下,含有靶向5T4的sdAb域的CD3接合构建体能够抗原依赖性活化T细胞。值得注意的是,相较于不具有41BB结合域的靶向5T4的限制性CD3接合构建体,并入有41BB结合域的靶向5T4的限制性CD3接合构建体展示优于其的抗原依赖性和活性。

[1029] 实施例11:含有靶向抗原域的CD3限制性多特异性构建体中的CD3结合区的定向的比较

[1030] A.构建体的设计和产生

[1031] 如图23A至图23B中所示产生多特异性多肽构建体,其含有通过接头(例如不可裂解接头)偶合至CD3结合区的免疫球蛋白的异源二聚体Fc区;相对于CD3结合区定位于羧基端的作为CRBR的抗原结合域(例如sdAb);和相对于多特异性多肽构建体的Fc区定位于氨基端和相对于多特异性多肽构建体的CD3结合区定位于羧基端的结合肿瘤相关抗原(TAA)的双抗原结合域。

[1032] 产生至少编码异源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聚核苷酸,且选殖于质体中以供表达。第一多肽链按N端至C端的次序通常包括第一Fc多肽(例如Fc臼多肽);不可裂解接头;抗CD3抗体的可变轻链(VL;图23B)或可变重链(VH;图23A)域;和作为CRBR的抗原结合域(例如sdAb)。第二多肽链按N端至C端的次序通常包括第一抗原结合域(例如sdAb#1)、第二Fc多肽(例如Fc杵多肽);与第一多肽链相同的接头;抗CD3抗体的可变重链(VH)或可变轻链(VL)域中的另一者;和第二抗原结合域(例如sdAb#2)。抗CD3抗体包括经二硫键稳定的(dsFv)抗体(具有突变G44C的抗CD3 VH和具有突变G100C的VL)。

[1033] 值得注意的是,如图23A至图23B中所示,CD3 Fv的抗CD3 VH和抗CD3VL的定向相对于异源二聚体Fc区的Fc杵或Fc臼以不同方式定位。如图23A中所示,产生如下构建体,其中异源二聚体构建体的第一多肽具有定位在Fc杵C端的CD3 Fv的VL和在N和C端极远处的抗原

结合域,且异源二聚体构建体的第二多肽具有定位在Fc臼C端的CD3 Fv的VH和在C端极远处的CRBR sdAb。相比之下,图23B描绘了如下例示性构建体,其中异源二聚体构建体的第一多肽具有定位在Fc杵C端的CD3 Fv的VH和在N和C端极远处的抗原结合域,且异源二聚体构建体的第二多肽具有定位在Fc臼C端的CD3 Fv的VL和在C端极远处的CRBR sdAb。一些所产生的例示性构建体含有靶向41BB共刺激受体的sdAb(其含有SEQ ID NO:347、348和349中分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;例如,SEQ ID NO:210中所示)作为CRBR。

[1034] 实质上如实施例4中所述表达和纯化构建体。

[1035] B.T细胞报告分子活性

[1036] 为了比较CD3接合,在抗原依赖性CD3报告分子分析中通过评定例示性构建体活化与表达靶抗原的细胞共培养的CD3 NFAT Jurkat报告分子细胞株的能力来测试所述构建体。通过监测Jurkat报告分子细胞中的绿色荧光或荧光素酶报告分子信号来评定活化。

[1037] 将靶向限制性CD3接合构建体的抗原滴定于表达靶抗原的A375细胞或非表达靶抗原的对照CCRF-CEM细胞与表达经NFAT驱动的绿色荧光蛋白(GFP)的经工程改造的Jurkat细胞的共培养物上。CD3的接合引起NFAT信号传导且产生绿色荧光。对于利用黏着靶细胞的报告分子分析,接种靶细胞,使其在室温下静置以均匀分布,且在37摄氏度下培育数小时以准许在添加报告分子细胞和靶向抗原的限制性CD3接合构建体之前黏着。使用IncuCyte ZOOM系统对分析盘进行连续成像,且通过测量总绿色对象累积强度测定CD3报告分子细胞活化。

[1038] 如图24A中所示,当在表达抗原的靶细胞存在下,在报告分子T细胞共培养物中培育时,例示性的靶向抗原的限制性CD3接合构建体展现介导靶抗原特异性T细胞活化的能力。然而,在与非表达靶抗原的细胞的共培养物中并未观测到报告分子活性(图24B)。值得注意的是,与具有杵-VL;臼-VH形式的构建体相比,具有杵-VH;臼-VL形式的构建体展示增强的T细胞活化。

[1039] 在相似分析中,将相同的靶向限制性CD3接合构建体的抗原滴定于表达靶抗原的A375细胞或非表达靶抗原的对照CCRF-CEM细胞与表达经NFAT驱动的荧光素酶的经工程改造的Jurkat细胞的共培养物上。如图24C中所示,当在表达抗原的靶细胞存在下,在报告分子T细胞共培养物中培育时,例示性的靶向抗原的限制性CD3接合构建体展现介导靶抗原特异性T细胞活化的能力。同样,在与非表达靶抗原的细胞的共培养物中并未观测到报告分子活性(图24D)。如同GFP报告分子分析,与具有杵-VL;臼-VH形式的构建体相比,具有杵-VH;臼-VL形式的构建体展示增强的T细胞活化。

[1040] 这些结果与当CD3 Fv的组分经定向以使得VH和VL分别定位在Fc杵和Fc臼区的C端时观测到增强的CD3接合和活性的观测结果一致。

[1041] 实施例12:5T4 sdAb抗原决定基测定

[1042] A.抗原决定基测定

[1043] 靶向5T4的sdAb,12E9(SEQ ID NO:245)、16G10(SEQ ID NO:276)和14B5(SEQ ID NO:255)及其人源化变体不与小鼠5T4抗原交叉反应。为了测定这些sdAb所识别的抗原决定基的位置,产生不同小鼠:人类嵌合5T4构建体,其中鼠类5T4的胞外域的各部分置换成人类5T4的各部分。通过在编码与胞内Citrine标签融合的完整5T4编码区(胞外域、跨膜域、胞内域)的哺乳动物表达质粒中将编码人类5T4的特定区域的核酸序列嫁接至小鼠5T4的同源区中来产生构建体。所测试的构建体包括完全人类构建体(“Hu”;SEQ ID NO:382)、完全鼠类

构建体(“Mu”;SEQ ID NO:383)、嵌合hmc5T4.1(SEQ ID NO:384);嵌合hmc5T4.2(SEQ ID NO:385)、嵌合hmc5T4.3(SEQ ID NO:386)和嵌合hmc5T4.4(SEQ ID NO:387)(图25)。伴随这些构建体短暂性转染CHO细胞以实现细胞表面表达,且通过流动式细胞测量术监测结合。如图26A至图26C中所示,12E9v9(SEQ ID NO:360)识别存在于氨基酸残基60与112(SEQ ID NO:411)之间的抗原决定基,而16G10v11(SEQ ID NO:287)和14B5v17(SEQ ID NO:272)均识别存在于氨基酸残基173与224之间(SEQ ID NO:412)的抗原决定基。

[1044] B.与表达5T4的细胞的结合

[1045] 评定例示性的所产生的靶向5T4的限制性CD3接合构建体在与表达5T4的SKOV3细胞或5T4阴性CCFR-CEM细胞的共培养物中活化CD3 NFAT Jurkat报告分子细胞株的能力。所测试的全部三个构建体均含有两个靶向5T4的sdAb。构建体中有一者(cx5185)含有结合不同抗原决定基的两个靶向5T4的sdAb(hz12E9v9和hz16G10v11),而另外两个构建体(cx7859和cx7860)各含有针对同一抗原决定基的两个靶向5T4的sdAb(分别为hz12E9v9或hz16G10v11)。

[1046] 在报告分子分析中,Jurkat细胞中CD3的接合引起NFAT信号传导且产生绿色荧光。将靶向限制性CD3接合构建体的抗原滴定于表达5T4的SKOV 3靶细胞和表达经NFAT驱动的绿色荧光蛋白(GFP)的经工程改造的Jurkat细胞的共培养物上。接种靶细胞,使其在室温下静置以均匀分布,且在37℃下培育数小时以准许在添加报告分子细胞和靶向抗原的限制性CD3接合构建体之前黏着。如实施例6中所述测定CD3报告分子细胞活化。

[1047] 如所示,所评定的靶向5T4的限制性CD3接合构建体在含有5T4阳性细胞的培养物中诱导报告分子活性(图27A),但当与5T4阴性细胞(CCRF-CEM)培养T细胞时,未观测到可测量的报告分子活性(图27B)。如图27A中所示,相较于对于5T4亦呈二价,但仅结合两个抗原决定基中的一者的构建体(cx7859和cx7860),含有结合不同抗原决定基的两个靶向5T4的sdAb的构建体(cx5185)诱导报告分子细胞发生更大程度地活化。

[1048] 本发明不意欲限制在具体公开的实施例的范畴中,这些实施例被提供用于例如说明本发明的各种方面。对所描述的组合物和方法的各种修改将由本文中的描述和教导而变得显而易见。此类变化形式可在不背离本发明的真正范畴和精神的情况下加以实践且预期属于本发明的范畴内。

[1049] 序列

[1050]

#	序列	注释
1	GGSGGS	(GGS)2接头
2	GGSGGSGGS	(GGS)3接头
3	GGSGGSGGSGGS	(GGS)4接头
4	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGS)5接头
5	GGGG	甘氨酸接头
6	GGGGG	甘氨酸接头
7	GGGGGG	甘氨酸接头
8	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	人类IgG1 Fc
9	PAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	Fc xELL

[1051]

#	序列	注释
10	PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	人类IgG2 Fc
11	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFKWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST FRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESSGQPEN NYNTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNIFSCSVMH EALHNRFTQK SLSLSPGK	人类IgG3 Fc
12	PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	人类IgG4 Fc

[1052]

#	序列	注释
13	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	人类IgG4 Fc
14	EPKSSDKTHTCPPC	经修饰的IgG1铰链
15	DKTHTCPPC	经截短的IgG1铰链
16	ESKYGPPCPPC	经修饰的IgG4铰链
17	GQGTLVTVKPGG	羧基端序列
18	GQGTLVTVEPGG	羧基端序列
19	VQLVQSGGG VVQPGRSLRL SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGKGLEWIGYINPSRGYTNY NQKVKDRFTI SRDNSKNTAF LQMDSLRPED TGVYFCARYYDDHYCLDYWG QGTPVTVSS	OKT3 VH
20	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASSSVS YMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSR FSGSGSGTDY TFTISSLQPE DIATYYCQQW SSNPFTFGQGTKLQIT	OKT3 VL
21	QVQLVQSGGG VVQPGRSLRL SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGKGLEWIGYINPSRGYTNY NQKVKDRFTI SRDNSKNTAF LQMDSLRPED TGVYFCARYYDDHYSLDYWG QGTPVTVSS	OKT3 人源化 VH

[1053]

#	序列	注释
22	DVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGQGLEWIGYINPSRGYTNY ADSVKGRFTI TTDKSTSTAY MELSSLRSED TATYYCARYYDDHYCLDYWG QGTTVTVSS	OKT3 人源化 VH
23	QVQLVQSGAE LKKPGASVKV SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGQCLEWMGYINPSRGYTNY NQKFKDKATL TADKSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARYYDDHYSLDYWG QGTLVTVSS	OKT3 人源化 VH
24	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDTSKLASGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSGTKLEIN	OKT3 人源化 VL
25	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSVS YMNWYQQKPG KAPKRWIYDTSKVASGVPAR FSGSGSGTDY SLTINSLEAE DAATYYCQQW SSNPLTFGGGTKVEIK	OKT3 人源化 VL
26	DIQLTQSPSI LSASVGDRVT ITCRASSSVS YMNWYQQKPG KAPKRWIYDTSKVASGVPYR FSGSGSGTEY TLTISSMQPE DFATYYCQQW SSNPLTFGCGTKVEIKRT	OKT3 人源化 VL
27	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGN FGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSA	抗CD3 Hv
28	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYAN WVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGD KAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKL TVL	抗CD3 Lv
29	TYAMN	抗 CD3 VH CDR1

[1054]

#	序列	注释
30	RIRSKYNNYATYYADSVKD	抗 CD3 VH CDR2
31	HGNFGNSYVSWFAY	抗 CD3 VH CDR3
32	RSSTGAVTTSNYAN	抗 CD3 VL CDR1
33	GTNKRAP	抗 CD3 VL CDR2
34	ALWYSNLWV	抗 CD3 VL CDR3
35	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGN FGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH1
36	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH2
37	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGN FGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH3
38	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGN FGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH4
39	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGN FGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH5

[1055]

#	序列	注释
40	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKG RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGN FGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH6
41	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMS WVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKG RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGN FGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH7
42	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAM NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRH GNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVS	抗CD3 VH8
43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKG RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGN FGNSYVSWFAYWGQGTTVTVSS	抗CD3 VH9
44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKG RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGN FGNSYVSYFAYWGQGTTVTVSS	抗CD3 VH10
45	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGN FGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH11
46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKG RFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGN FGNSYVSWFAYWGQGTLVTVKP	抗CD3 VH12

[1056]

#	序列	注释
47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGR FTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNF GNSYVSWFAYWGQGTLVTVKP	抗CD3 VH13
48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKG RFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGN FGNSYVSWFAYWGCGTLVTVKP	抗CD3 VH14
49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKG RFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGN FGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH15
50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKG RFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGN FGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH16
51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKG RFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGN FGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH17
52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGR FTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNF GNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH18
53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKCLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGR FTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNF GNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH19

[1057]

#	序列	注释
54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRQAPGKCLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGR FTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNF GNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH20
55	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRQAPGKCLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGN FGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH21
56	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGN FGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH22
57	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNF GNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH23
58	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNF GNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH24
59	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNF GNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH25
60	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRQAPGKCLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNF GNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH26

[1058]

#	序列	注释
61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMS WVRQAPGKCLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKG RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGN FGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH27
62	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAM NWVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRH GNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVS	抗CD3 VH28
63	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNF GNSYVSWFAYWGQGTTVTVSS	抗CD3 VH29
64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNF GNSYVSYFAYWGQGTTVTVSS	抗CD3 VH30
65	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNF GNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH31
66	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYAN WVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGD KAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKL TVL	抗CD3 VL1
67	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG GKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGCGT KLEIK	抗CD3 VL2

[1059]

#	序列	注释
68	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLG GKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGG TKLTVL	抗CD3 VL3
69	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN WVQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGD KAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKL TVL	抗CD3 VL4
70	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN WVQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGN KAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKL TVL	抗CD3 VL5
71	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN WVQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGN KAALTITGAQADDESDYYCALWYSNLWVFGGGTK LTVL	抗CD3 VL6
72	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTK LTVL	抗CD3 VL7
73	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYP NWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVL	抗CD3 VL8
74	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG GKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGG TKLEIK	抗CD3 VL9

[1060]

#	序列	注释
75	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG GKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGCGT KLEIK	抗CD3 VL10
76	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGQCFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG GKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGEGT KLEIK	抗CD3 VL11
77	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYAN WVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGD KAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGCGTKL TVL	抗CD3 VL12
78	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG GKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGG TKLEIK	抗CD3 VL13
79	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLG GKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGCGT KLTVL	抗CD3 VL14
80	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN WVQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGD KAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKL TVL	抗CD3 VL15
81	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN WVQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGN KAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGCGTKL TVL	抗CD3 VL16

[1061]

#	序列	注释
82	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN WVQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGN KAALTITGAQADDESDYYCALWYSNLWVFGCGTK LTVL	抗CD3 VL17
83	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGCGTK LTVL	抗CD3 VL18
84	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYP NWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGCG TKLTVL	抗CD3 VL19
85	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYHM GWFRQAPGKERELVAAISGSGGSTYYTDSVKGRFT ISRNNAKNTMSLQMSNLKPEDTGVYYCTTPTEKG SSIDYWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDY	抗CD3 VHH
86	GRPFSSYAMG	5T4 CDR-H1
87	GRPFSSSAMG	5T4 CDR-H1
88	AVRWIGGATR	5T4 CDR-H2
89	AVSRNGGASQ	5T4 CDR-H2
90	AVSRNAGASQ	5T4 CDR-H2
91	AVSRNTGASQ	5T4 CDR-H2
92	AVSRQGGASQ	5T4 CDR-H2
93	AVSRGGGASQ	5T4 CDR-H2
94	AVSRNAGASY	5T4 CDR-H2
95	AVSRNGGSSY	5T4 CDR-H2
96	AVSRQGGSSY	5T4 CDR-H2
97	AVSRGGGSSY	5T4 CDR-H2
98	AVSRNAGSSY	5T4 CDR-H2

[1062]

#	序列	注释
99	AVSRNTGSSY	5T4 CDR-H2
100	GQAWGTKFTDYSD	5T4 CDR-H3
101	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	5T4 CDR-H3
102	RSAAYSRSSETYTEKHDYTY	5T4 CDR-H3
103	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPT	杵Fc
104	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPT	臼Fc
105	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPT	杵Fc

[1063]

#	序列	注释
106	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPT	白Fc
107	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	杵Fc
108	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	白Fc
109	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	杵Fc

[1064]

#	序列	注释
110	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	白Fc
111	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNRYTQKSLSLSPT	白Fc
112	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNRYTQKSLSLSPT	白Fc
113	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNRYTQKSLSLSPG	白Fc

[1065]

#	序列	注释
114	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNRYTQKSLSLSPG	白Fc
115	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHE ALHNHYTQKSLSLSPT	杵Fc
116	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNHYTQKSLSLSPT	杵Fc
117	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHE ALHNHYTQKSLSLSPG	杵Fc

[1066]

#	序列	注释
118	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNHYTQKSLSLSPG	杵Fc
119	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHE ALHNRYTQKSLSLSPT	臼Fc
120	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPT	臼Fc
121	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHE ALHNRYTQKSLSLSPG	臼Fc

[1067]

#	序列	注释
122	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPG	白Fc
123	(GGGGS)n，其中n为1至5	接头
124	(GGGGGS)n，其中n为1至4	接头
125	GGGGS	接头
126	GGGGGS	接头
127	GGGGGSGGGGGSGGGGGS	接头
128	GGGGSGGGGSGGGGS	接头
129	GGSGGGGSGGGGSGGGGS	接头
130	GlyxXaa-Glyy-Xaa-Glyz Xaa为独立地选自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为在1至5范围内的各整数	接头
131	Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly Xaa为独立地选自A、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、H、D或E	接头
132	(SSSSG)n n=1-9	接头
133	GGGGG-C-GGGGG	接头
134	(EAAAK)n n=2-20	接头
135	AS-(AP)n-GT n=2-20	接头

[1068]

#	序列	注释
136	AS-(EAAAK)n-GT n=2-20	接头
137	(GGGGA)n n=2-20	接头
138	(PGGGS)n n=2-20	接头
139	(AGGGS)n n=2-20	接头
140	GGS-(EGKSSGSGSESKST)n-GGS n=2-20	接头
141	SSSASASSA	接头
142	GSPGSPG	接头
143	ATTTGSSPGPT	接头
144	X1 X2 X3 X4 X5 (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)	共同接头
145	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)	共同接头
146	LEAD	颗粒酶B基质
147	LEPD	接头

[1069]

#	序列	注释
148	LEAE	接头
149	IEPDI	接头
150	LEPDG	接头
151	LEADT	接头
152	IEPDG	接头
153	IEPDV	接头
154	IEPDS	接头
155	IEPDT	接头
156	X1QARX5 (P1QAR↓(A/V)) X1 =任何氨基酸；(P1为任何氨基酸) X5 = A或V	共同接头
157	RQARX5 (RQAR(A/V)) X5 = A或V	接头
158	RQAR	间质蛋白酶基质
159	RQARV	接头
160	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) X4 = L、I或M (P1' = L、I或M)	共同接头
161	PX2X3X4 (P3 P2 P1 ↓ P1') (P3 = P) X2 = Q或D；(P2 = Q或D) X3 = A或N；(P1为A或N) X4 = L或I (P1'为L或I)	共同接头
162	PAGL	MMP基质
163	TGLEADGSPAGLGRQARVG	接头
164	TGLEADGSRQARVGPAGLG	接头

[1070]

#	序列	注释
165	TGSPAGLEADGSRQARVGS	接头
166	TGPAGLGLEADGSRQARVG	接头
167	TGRQARVGLEADGSPAGLG	接头
168	TGSRQARVGPAGLEADGS	接头
169	TGPAGLGSRQARVGLEADGS	接头
170	GPAGLGLEPDGSRQARVG	接头
171	GGSGGGGIEPDIGGSGGS	接头
172	GGSGGGGLEADTGGSGGS	接头
173	GSIEPDIGS	接头
174	GSLEADTGS	接头
175	GGSGGGGIEPDGGGSGGS	接头
176	GGSGGGGIEPDVGGSGGS	接头
177	GGSGGGGIEPDSGGSGGS	接头
178	GGSGGGGIEPDTGGSGGS	接头
179	GGGSLEPDGSGS	接头
180	GPAGLGLEADGSRQARVG	接头
181	GGEGGGGSGGSGGGS	接头
182	GSSAGSEAGGSGQAGVGS	接头
183	GGSGGGGLEAEGSGGGGS	接头
184	GGSGGGGIEPDPGGSGGS	接头
185	TGGSGGGGIEPDIGGSGGS	接头
186	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGL LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGV SLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVV AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPA SSEANSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE	41BBL

[1071]

#	序列	注释
187	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWIS WVRQMPGKGLEWMGKIYPGDSYTNYSPSFQGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGIF DYWGQGTLVTVSS	41BB VH
188	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWY QQKPGQSPVLVIYQDKNRPSGIPERFSGSNSGNTAT LTISGTQAMDEADYYCATYTGFGSLAVFGGGTKLT VL	41BB VL
189	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYW SWIRQSPEKGLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGPGNY DWYFDLWGRGTLVTVSS	41BB VH
190	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGTKVEI K	41BB VL
191	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSGYY MHWVRQAPGQGLEWMGWVNPMSGGTNYAQKF QGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE GMAMRLELDKWGQGTLVTVSS	41BB VH
192	SYELTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWY QQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTAT LTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSVVFGGGTQLTVL	41BB VL
193	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVV GQAGNIKLREDKDPNKMMATIYELKEDKSYNVTG VTFDDKKCTYAISTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPGHT SSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFVFQNREEFYITLYG RTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCID G	41BB 抗运载蛋白

[1072]

#	序列	注释
194	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVV GQAGNIRLREDKDPIKMMATIYELKEDKSYDVTM VKFDDKKCMYDIWTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPGH TSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFVFQNREEFYITLY GRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCI DG	41BB 抗运载蛋白
195	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVV GQAGNIRLREDKDPNKMMATIYELKEDKSYDVTA VAFDDKKCTYDIWTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPGH TSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFVFQNREEFYITLY GRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCI DG	41BB 抗运载蛋白
196	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVV GQAGNIKLREDKDPNKMMATIYELKEDKSYDVTA VAFDDKKCTYDIWTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPGH TSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFVFQNREEFYITLY GRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCI DG	41BB 抗运载蛋白
197	QDSTSDLIPA PPLSKVPLQQ NFQDNQFHGK WYVVGQAGNI KLREDSKMMA TIYELKEDKS YDVTGVSFDD KKCTYAIMTF VPGSQPGEFT LGKIKSFPGH TSSLVRVVST NYNQHAMVFF KFVFQNREEF YITLYGRTKE LTSELKENFI RFSKSLGLPE NHIVFPVPID QCIDG	41BB 抗运载蛋白
198	QDSTSDLIPA PPLSKVPLQQ NFQDNQFHGK WYVVGQAGNI KLREDKDPVK MMATIYELKE DKSYDVTGVT FDDKKCRYDI STFVPGSQPG EFTFGKIKSF PGHTSSLVRV VSTNYNQHAM VFFKFVFQNR EEFYITLYGR TKELTSELKE NFIRFSKSLG LPENHIVFPV PIDQCIDG	41BB 抗运载蛋白

[1073]

#	序列	注释
199	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVV GQAGNIRLREDKDPHKMMATIYELKEDKSYDVTG VTFDDKKCTYAISTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPGHT SSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFVFQNREEFYITLYG RTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCID G	41BB 抗运载蛋白
200	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVV GQAGNIKLREDKDPNKMMATIYELKEDKSYDVTG VTFDDKKCTYAISTLVPGSQPGEFTFGKIKSFPGHT SSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFVFQNREEFYITLYG RTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCID G	41BB 抗运载蛋白
201	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVV GQAGNIRLREDKDPSKMMATIYELKEDKSYDVTA VTFDDKKCNYAISTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPGHT SSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFVFQNREEFYITLYG RTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCID G	41BB 抗运载蛋白
202	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDG PLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAG VYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGLPSPRSE	人类41BBL的71至254
203	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGV SLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVV AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPA SSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE	人类41BBL的85至254

[1074]

#	序列	注释
204	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYYVFFQL ELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRS E	人类41BBL的80至254
205	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLD LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE	人类4-lBBL的52至254
206	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDG PLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAG VYYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGL	人类41BBL的71至248
207	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGV SLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYYVFFQLELRRVV AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPA SSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	人类41BBL的85至248
208	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYYVFFQL ELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	人类41BBL的80至248

[1075]

#	序列	注释
209	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLD LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	人类41BBL的52至248
210	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSINAMG WYRQAPGKRREFVAAIESGRNTVYAESVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGLLKGNRV VSPSVAYWGQGTLVTVKP	41BB sdAb
211	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIM KVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVNISLHYQKD EEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTD NTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL	OX40配位体
212	QVSHRYPRFQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEFCVL	OX40配位体
213	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIM KVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVNISLHYQKD EEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTD NTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL	OX40配位体
214	QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL	OX40配位体

[1076]

#	序列	注释
215	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMK VQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVNISLHYQKDE EPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDN TSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL	OX40配位体
216	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYM SWVRQAPGQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRER VTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCVLAPRWY FSVWGQGTLVTVSS	OX40 VH
217	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPPTFGQGTKVEI KRT	OX40 VL
218	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSAMH WVRQASGKGLEWVGRIRSKANSYATAYAASVKGR FTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTSGIYDS SGYDYWGQGTLVTVSS	OX40 VH
219	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYN YLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGGG TKVEIK	OX40 VL
220	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAFMY WVRQAPGKGLEWVSSISNRGLKTAYAESVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCSRDVDGDF RGQGTLVTVKP	OX40 sdAb
221	QLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVS DWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLY KNKDMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTIDLIFN SEHQVLKNNTYWGIILLANPQFIS	GITR配位体

[1077]

#	序列	注释
222	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVASISSGGTTYYPDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGGYYDS MDYWGQGTLVTVSS	GITR VH
223	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASESVDNYGVSF MNWYQQKPGQAPRLLIYAASNQGSGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTKEVTWTFGQGT KVEIK	GITR VL
224	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGV GWIRQPPGKALEWLAHIWWDDDKYYQPSLKSRLT ISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARTRRYFP FAYWGQGTLVTVSS	GITR VH
225	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVGTNVAW YQQKPGQAPRLLIYSASYRYSGIPARFSGSGSGTEF TLTISSLQSEDFAVYYCQQYNTDPLTFGGGTKVEIK	GITR VL
226	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGGYFW SWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGTTYYNPSLKSRVTISI DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDLFYYDTSG PRGFDPWGQGTLVTVSS	GITR VH
227	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQTVSSNYLAW YQQKPGQAPRLLIYGSSTRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQYDSSPWTFGQGTKVEIK	GITR VL
228	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVIWYPGSNKYYAESVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGEL GRYYYYGMDVWGQGTTVTVSS	GITR VH
229	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTVTCRASQGIRNDLGW YQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEF TLTISSLQPEDFATYYCLQHNNYPWTFGQGTKVDI K	GITR VL

[1078]

#	序列	注释
230	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVFSIDAMG WYRQAPGKQRELVAVLSGISSAKYAASAPGRFTISR DNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYADVSTGWG RDAHGYWGQGTLVTV	GITR sdAb
231	MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLV VCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQ DPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIY MVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPASRSIS LLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLP SRNTDETFFGVQWVRP	UniProt 编号 P32970，CD70-ECD 残基39至193 (下划线)
232	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDM HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGN WGFFDYWGQGTLVTVSS	CD70 VH
233	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAW YQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPRTFGQGTKVEIK	CD70 VL
234	QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINGMG WYRQAPGKERELVAGLTSGGSVTNYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCRAEIFTRTG ENYYGMDYWGKGTQVTVKP	ICOS sdAb
235	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAM GWFRQAPGKEREFVAAINYRRDAADYAESVKGRF TISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAG WASSRRDDYNYWGQGTLVTVKP	CD28 sdAb
236	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	CD3ζ 信号传导域

[1079]

#	序列	注释
237	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCEL	源自4-1BB的共刺激域
238	SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDF AAYRS	源自CD28的共刺激域
239	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPR DFAAYRS	源自CD28的共刺激域2
240	FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA PPRDFAAYRS	源自CD28的共刺激域3
241	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAV HTRGLDFASDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	源自CD8的铰链和跨膜域
242	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT	源自CD8的铰链和跨膜域
243	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT	CD8铰链和跨膜域
244	MPGGCSRGPAAGDGRLRLARLALVLLGWVSSSSP TSSASSFSSSAPFLASAVSAQPPLPDQCPALCECSEA ARTVKCVNRNLTEVPTDLPAYVRNLFLTGNQLAVL PAGAFARRPPLAELAALNLSGSRLDEVRAGAFEHL PSLRQLDLSHNPLADLSPFAFSGSNASVSAPSPLVE LILNHIVPPEDERQNRSFEGMVVAALLAGRALQGL RRLELASNHFLYLPRDVLAQLPSLRHLDLSNNSLVS LTYVSFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNGTLAELQG LPHIRVFLDNNPWVCDCHMADMVTWLKETEVVQ GKDRLTCAYPEKMRNRVLLELNSADLDCDPILPPS LQTSYVFLGIVLALIGAIFLLVLYLNRKGIKKWMH NIRDACRDHMEGYHYRYEINADPRLTNLSSNSDV	5T4
245	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASRRPFSSKTM AWFRQTPGKEREFVAAVRWIGGATRYTDSVKGRFS ISKDNAINTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAAGQAWG TKFTDYSDWGQGTQVTVKP	L12E9

[1080]

#	序列	注释
246	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMA WFRQAPGKGREFVAAVRWIGGATRYAESVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAAGQAWG TKFTDYSDWGQGTLVTVKP	hz12E9v1
247	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMA WFRQAPGKEREFVAAVRWIGGATRYAESVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAAGQAWG TKFTDYSDWGQGTLVTVKP	hz12E9v2
248	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMA WFRQAPGKEREFVAAVRWIGGATRYAESVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAGQAWG TKFTDYSDWGQGTLVTVKP	hz12E9v3
249	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMA WFRQAPGKEREFVAAVRWIGGATRYTESVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAGQAWG TKFTDYSDWGQGTLVTVKP	hz12E9v4
250	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMA WFRQAPGKEREFVAAVRWIGGATRYTESVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAAGQAWG TKFTDYSDWGQGTLVTVKP	hz12E9v5
251	EVQLVESGGGEVQAGGSLRLSCAASRRPFSSKTMA WFRQTPGKEREFVAAVRWIGGATRYAESVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAGQAWG TKFTDYSDWGQGTLVTVKP	hz12E9v6
252	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMA WFRQAPGKEREFVAAVRWIGGATRYTDSVKGRFSI SKDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAGQAWG TKFTDYSDWGQGTLVTVKP	hz12E9v7

[1081]

#	序列	注释
253	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMA WFRQAPGKEREFVAAVRWIGGATRYAESVKGRFTI SRDNAINTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAAGQAWGT KFTDYSDWGQGTLVTVKP	hz12E9v8
254	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSKTMA WFRQAPGKEREFVAAVRWIGGATRYTESVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAGQAWG TKFTDYSDWGQGTLVTVKPGG	hz12E9v9
255	QVQLVQSGGGLVQAGDSLTLSCAVSERPFGTYAMG WFRQAPGRERDLVAAVSRNGGASQYGDSVKGRFS ISRDNIKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAARSAAYS RSSEVYTGKDEYYYWGQGTQVTVKP	L14B5
256	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFGTYAMG WFRQAPGKGRDLVSAVSRNGGASQYAESVKGRFT ISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v1
257	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFGTYAMG WFRQAPGKERDLVAAVSRNGGASQYAESVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v2
258	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFGTYAMG WFRQAPGKERDLVAAVSRNGGASQYAESVKGRFTI SRDNAKNTMYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v3
259	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFGTYAMG WFRQAPGKERDLVAAVSRNGGASQYAESVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v4

[1082]

#	序列	注释
260	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFGTYAMG WFRQAPGKERDLVAAVSRNAGASQYAESVKGRFTI SRDNAKNTMYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v5
261	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFGTYAMG WFRQAPGKERDLVAAVSRNTGASQYAESVKGRFTI SRDNAKNTMYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v6
262	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFGTYAMG WFRQAPGKERDLVAAVSRQGGASQYAESVKGRFTI SRDNAKNTMYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v7
263	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFGTYAMG WFRQAPGKERDLVAAVSRGGGASQYAESVKGRFTI SRDNAKNTMYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v8
264	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFGTYAMG WFRQAPGKERDLVAAVSRNGGASQYGDSVKGRFT ISRDNAKNTMYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAY SRSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v9
265	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFGTYAMG WFRQAPGKERDLVAAVSRNGGASQYGESVKGRFT ISRDNAKNTMYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAY SRSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v10
266	EVQLVESGGGEVQAGDSLTLSCAVSERPFGTYAMG WFRQAPGRERDLVAAVSRNAGASQYAESVKGRFTI SRDNAKNTMYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v11

[1083]

#	序列	注释
267	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFGTYAMG WFRQAPGKERDLVAAVSRNAGASQYGESVKGRFSI SRDNIKNTMYLQMSSLKPEDTAVYYCAARSAAYS RSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v12
268	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFGTYAMG WFRQAPGKERETVAAVSRNAGASQYAESVKGRFTI SRDNAKNTMYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v13
269	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFGTYAMG WFRQAPGKEREFVAAVSRNAGASQYAESVKGRFTI SRDNAKNTMYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v14
270	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFGTYAMG WFRQAPGKERDLVAAVSRNAGASYYAESVKGRFTI SRDNAKNTMYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v15
271	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFGTYAMG WFRQAPGKERDLVAAVSRNAGASQYGEFVKGRFT ISRDNAKNTMYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAY SRSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v16
272	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFGTYAMG WFRQAPGKERDLVAAVSRNAGASYYAESVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v17
273	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFSSYAMG WFRQAPGKERDLVAAVSRNAGASYYAESVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v18

[1084]

#	序列	注释
274	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFGTYAM GWFRQAPGKERDLVAAVSRNAGASYYAESVKGRF TISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAA YSRSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v19
275	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSYAMG WFRQAPGKERDLVAAVSRNAGASYYAESVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSEVYTGKDEYYYWGQGTLVTVKP	hz14B5v20
276	QVQLLQSGGGLVQAGGSLILSCAVSGRPFSSSAMG WFRQAPGKERETVAAVSRNGGSSYYADFVKGRFTI SRDNDKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARSAAYS RSSETYTEKHDYTYWGQGTQVTVKP	L16G10
277	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMG WFRQAPGKGRETVSAVSRNGGSSYYAESVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSETYTEKHDYTYWGQGTLVTVKP	hz16G10v1
278	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMG WFRQAPGKERETVAAVSRNGGSSYYAESVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSETYTEKHDYTYWGQGTLVTVKP	hz16G10v2
279	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMG WFRQAPGKERETVAAVSRNGGSSYYAESVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSETYTEKHDYTYWGQGTLVTVKP	hz16G10v3
280	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMG WFRQAPGKERETVAAVSRQGGSSYYAESVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSETYTEKHDYTYWGQGTLVTVKP	hz16G10v4

[1085]

#	序列	注释
281	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMG WFRQAPGKERETVAAVSRGGGSSYYAESVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSETYTEKHDYTYWGQGTLVTVKP	hz16G10v5
282	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMG WFRQAPGKERETVAAVSRNAGSSYYAESVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSETYTEKHDYTYWGQGTLVTVKP	hz16G10v6
283	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMG WFRQAPGKERETVAAVSRNTGSSYYAESVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSETYTEKHDYTYWGQGTLVTVKP	hz16G10v7
284	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMG WFRQAPGKERETVAAVSRNGGSSYYADFVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSETYTEKHDYTYWGQGTLVTVKP	hz16G10v8
285	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMG WFRQAPGKERETVAAVSRNGGSSYYAESVKGRFTI SRDNDKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSETYTEKHDYTYWGQGTLVTVKP	hz16G10v9
286	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMG WFRQAPGKERETVAAVSRNAGSSYYADFVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSETYTEKHDYTYWGQGTLVTVKP	hz16G10v10
287	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSYAMG WFRQAPGKERETVAAVSRNAGSSYYAESVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYS RSSETYTEKHDYTYWGQGTLVTVKP	hz16G10v11
288	RRPFSSKTMA	5T4CDR-H1
289	GRPFSSKTMA	5T4 CDR-H1

[1086]

#	序列	注释
290	ERPFGTYAMG	5T4 CDR-H1
291	ERPFSSYAMG	5T4 CDR-H1
292	GRPFGTYAMG	5T4 CDR-H1
293	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG GKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGCGT KLTVL	抗 CD3 VL (CON)
294	QVQLVQSGGGLVQAGASLRLSCVASGRTRSLRTMA WFRQAPGKERIFVAAISWRSDSTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTAYLQMNTLKPEDTAVYYCAAGGGWLA TTPDEYTYWGQGTLVTVKP	7E1
295	QVQLQESGGGLMQAGDSLRLSCVVSGVTWNSYT MAWFRQAPGKEREFVAAIRWTVDTTYYADFVKGR FTISRDYAKKTMYLQMNNLKPEDAAVYYCAVGRK WPKADDYWGQGTLVTVKP	14F4
296	GRTRSLRTMA	5T4 CDR-H1
297	GVTWNSYTMA	5T4 CDR-H1
298	AISWRSDSTY	5T4 CDR-H2
299	AIRWTVDTTY	5T4 CDR-H2
300	GGGWLATTPDEYTY	5T4 CDR-H3
301	GRKWPKADDY	5T4 CDR-H3
302	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASRRPFSSKTM AWFRQTPGKEREFVAAVRWIGGATRYTDSVKGRFS ISKDNAINTVYLQTNSLKSEDTAVYYCAAGQTWG TKFTDYSDWGQGTLVTVKP	4D3
303	GQTWGTKFTDYSD	5T4 CDR-H3

[1087]

#	序列	注释
304	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTM GWYRQAPGKGRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v1
305	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTM GWYRQAPGKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v2
306	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTM GWYRQAPGKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v3
307	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTM GWYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v4
308	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTM GWYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTIS RENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v5
309	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTM GWYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v6
310	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMG WYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTS WGQGTLVTVKPGG	hz18H10v7

[1088]

#	序列	注释
311	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTM GWYRQAPGKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v8
312	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTM GWYRQAPGKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v9
313	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTM GWYRQAPGKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTIS RENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v10
314	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTM GWYRQAPGKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTIS RENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v11
315	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTM GWYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTIS RENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v12
316	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTM GWYRQAPGKQRELVALIGNYVTHYAESVKGRFTIS RENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v13
317	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTM GWYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v14

[1089]

#	序列	注释
318	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMG WYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISR DNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTS WGQGTLVTVKPGG	hz18H10v15
319	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMG WYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISR ENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTS WGQGTLVTVKPGG	hz18H10v16
320	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMG WYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTS WGQGTLVTVKPGG	hz18H10v17
321	GSMTGANTMG	CDR1
322	GSVTGANTMG	CDR1
323	GSITGANTMG	CDR1
324	LIGNYVTH	CDR2
325	YTDNLGTS	CDR3
326	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGSMTGANTM GWYRQAPGKQRDLVALIGNYHYADSVKGRFTISR ENAKNTVILQMNSLNPEDTAVYYCYLYTDNLGTS WGQGTLVTVKPGG	18H10
327	PGGGG	接头
328	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSP	杵Fc

[1090]

#	序列	注释
329	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSP	白Fc
330	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSP	杵Fc
331	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSP	白Fc
332	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNRYTQKSLSLSP	白Fc

[1091]

#	序列	注释
333	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNRYTQKSLSLSP	白Fc
334	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHE ALHNHYTQKSLSLSP	杵Fc
335	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNHYTQKSLSLSP	杵Fc
336	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHE ALHNRYTQKSLSLSP	白Fc

[1092]

#	序列	注释
337	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSP	白Fc
338	DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc-Het-1
339	DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTK NQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc-Het-2
340	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG GKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGCGT KLTVL	抗CD3 VL21
341	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKG RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGN FGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH32

[1093]

#	序列	注释
342	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG GKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGG TKLTVL	抗CD3 VL20
343	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADTVKG RFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGN FGDSYVSWFAYWGQGTLVTV	抗CD3 VH34
344	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSP	IgG1杵
345	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSP	IgG1杵
346	GGGGSGGGGSGGGGS	接头
347	GFSFSINAMG	41BB CDR1
348	AIESGRNTV	41BB CDR2
349	LKGNRVVSPSVAY	41BB CDR3
350	GFTFNTYAMN	抗 CD3 VH CDR1
351	RIRSKYNNYATY	抗 CD3 VH CDR2

[1094]

#	序列	注释
352	HGNFGDSYVSWFAY	抗 CD3 VH CDR3
353	ALWYSNHWV	抗 CD3 VL CDR3
354	VLWYSNRWV	抗 CD3 VL CDR3
355	GFTFSTYAMN	抗 CD3 VH CDR1
356	RIRSKYNNYATY	抗 CD3 VH CDR2
357	GSSTGAVTTSNYAN	抗 CD3 VL CDR1
358	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRQAPGKCLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKG RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGN FGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH33
359	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSINAMG WYRQAPGKRREFVAAIESGRNTVYAESVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGLLKGNRV VSPSVAYWGQGTLVTVKP	41BB sdAb
360	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSKTMA WFRQAPGKEREFVAAVRWIGGATRYTESVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAGQAWG TKFTDYSDWGQGTLVTVKP	hz12E9v09
361	IEPDP	接头

[1095]

#	序列	注释
362	SSPTSSASSFSSSAPFLASAVSAQPPLPDQCPALCEC SEAARTVKCVNRNLTEVPTDLPAYVRNLFLTGNQL AVLPAGAFARRPPLAELAALNLSGSRLDEVRAGAF EHLPSLRQLDLSHNPLADLSPFAFSGSNASVSAPSP LVELILNHIVPPEDERQNRSFEGMVVAALLAGRAL QGLRRLELASNHFLYLPRDVLAQLPSLRHLDLSNN SLVSLTYVSFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNGTLA ELQGLPHIRVFLDNNPWVCDCHMADMVTWLKET EVVQGKDRLTCAYPEKMRNRVLLELNSADLDCDPI LPPSLQTS	人类5T4的5T4 ECD，氨基酸 32 至 355 (UniProt 编号 Q13641)
363	GGS(GGS)n，其中n=0至10	接头
364	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGSMTGANTM GWYRQAPGKQRDLVALIGNYHYADSVKGRFTISR ENAKNTVILQMNSLNPEDTAVYYCYLYTDNLGTS WGQGTLVTVKP	18H10
365	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTM GWYRQAPGKGRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKP	hz18H10v1
366	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTM GWYRQAPGKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKP	hz18H10v2
367	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTM GWYRQAPGKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKP	hz18H10v3

[1096]

#	序列	注释
368	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTM GWYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKP	hz18H10v4
369	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTM GWYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTIS RENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKP	hz18H10v5
370	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTM GWYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKP	hz18H10v6
371	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMG WYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTS WGQGTLVTVKP	hz18H10v7
372	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTM GWYRQAPGKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKP	hz18H10v8
373	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTM GWYRQAPGKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKP	hz18H10v9
374	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTM GWYRQAPGKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTIS RENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKP	hz18H10v10

[1097]

#	序列	注释
375	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTM GWYRQAPGKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTIS RENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKP	hz18H10v11
376	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTM GWYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTIS RENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKP	hz18H10v12
377	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTM GWYRQAPGKQRELVALIGNYVTHYAESVKGRFTIS RENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKP	hz18H10v13
378	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTM GWYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGT SWGQGTLVTVKP	hz18H10v14
379	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMG WYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISR DNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTS WGQGTLVTVKP	hz18H10v15
380	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMG WYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISR ENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTS WGQGTLVTVKP	hz18H10v16
381	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMG WYRQAPGKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTS WGQGTLVTVKP	hz18H10v17

[1098]

#	序列	注释
382	SSPTSSASSFSSSAPFLASAVSAQPPLPDQCPALCEC SEAARTVKCVNRNLTEVPTDLPAYVRNLFLTGNQL AVLPAGAFARRPPLAELAALNLSGSRLDEVRAGAF EHLPSLRQLDLSHNPLADLSPFAFSGSNASVSAPSP LVELILNHIVPPEDERQNRSFEGMVVAALLAGRAL QGLRRLELASNHFLYLPRDVLAQLPSLRHLDLSNN SLVSLTYVSFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNGTLA ELQGLPHIRVFLDNNPWVCDCHMADMVTWLKET EVVQGKDRLTCAYPEKMRNRVLLELNSADLDCDPI LPPSLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLVLYLNRKGIKKW MHNIRDACRDHMEGYHYRYEINADPRLTNLSSNS DV	人类5T4构建体
383	SAPSSSVPSSSTSPAAFLASGSAQPPPAERCPAACEC SEAARTVKCVNRNLLEVPADLPPYVRNLFLTGNQ MTVLPAGAFARQPPLADLEALNLSGNHLKEVCAG AFEHLPGLRRLDLSHNPLTNLSAFAFAGSNASVSAP SPLEELILNHIVPPEDQRQNGSFEGMVAFEGMVAA ALRSGLALRGLTRLELASNHFLFLPRDLLAQLPSLR YLDLRNNSLVSLTYASFRNLTHLESLHLEDNALKV LHNSTLAEWHGLAHVKVFLDNNPWVCDCYMAD MVAWLKETEVVPDKARLTCAFPEKMRNRGLLDLN SSDLDCDAVLPQSLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLVLY LNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINAD PRLTNLSSNSDV	鼠类5T4构建体

#	序列	注释
384	SSPTSSASSFSSSAPFLASAVSAQPPLPDQCPALCEC SEAARTVKCVNRNLTEVPTDLPAYVRNLFLTGNQL AVLPAGAFARRPPLAELAALNLSGSRLDEVRAGAF EHLPSLRQLDLSHNPLADLSPFAFSGSNASVSAPSP LVELILNHIVPPEDERQNRSFEGMVVAALLSGLALR GLTRLELASNHFLFLPRDLLAQLPSLRYLDLRNNSL VSLTYASFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNSTLAEW HGLAHVKVFLDNNPWVCDCYMADMVAWLKETE VVPDKARLTCAFPEKMRNRGLLDLNSSDLDCDAV LPQSLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLVLYLNRKGIKK WMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINADPRLTNLSSN SDV	hmc5T4.1（加下划线的人类残基）
385	SAPSSSVPSSSTSPAAFLASGSAQPPPAERCPAACEC SEAARTVKCVN RNLLEVPADLPPYVRNLFLTGNQMTVLPAGAFARQ PPLADLEALNLS GNHLKEVCAGAFEHLPSLRQLDLSHNPLADLSPFA FSGSNASVSAPSP LVELILNHIVPPEDERQNRSFEGMVVAALLAGRAL QGLRRLELASNHFLYLPRDVLAQLPSLRHLDLSNN SLVSLTYVSFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNSTLAE WHGLAHVKVFLDNNPWVCDCYMADMVAWLKET EVVPDKARLTCAFPEKMRNRGLLDLNSSDLDCDA VLPQSLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLVLYLNRKGIKK WMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINADPRLTNLSSN SDV	hmc5T4.2（加下划线的人类残基）

[1099]

[1100]

#	序列	注释
386	SSPTSSASSFSSSAPFLASAVSAQPPLPDQCPALCEC SEAARTVKCVNRNLTEVPTDLPAYVRNLFLTGNQ MTVLPAGAFARQPPLADLEALNLSGNHLKEVCAG AFEHLPGLRRLDLSHNPLTNLSAFAFAGSNASVSAP SPLEELILNHIVPPEDQRQNGSFEGMVAFEGMVAA ALRSGLALRGLTRLELASNHFLFLPRDLLAQLPSLR YLDLRNNSLVSLTYASFRNLTHLESLHLEDNALKV LHNSTLAEWHGLAHVKVFLDNNPWVCDCYMAD MVAWLKETEVVPDKARLTCAFPEKMRNRGLLDLN SSDLDCDAVLPQSLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLVLY LNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINAD PRLTNLSSNSDV	hmc5T4.3（加下划线的人类残基）
387	SAPSSSVPSSSTSPAAFLASGSAQPPPAERCPAACEC SEAARTVKCVNRNLLEVPADLPPYVRNLFLTGNQ MTVLPAGAFARQPPLADLEALNLSGNHLKEVCAG AFEHLPGLRRLDLSHNPLTNLSAFAFAGSNASVSAP SPLEELILNHIVPPEDQRQNGSFEGMVAFEGMVAA ALRSGLALRGLTRLELASNHFLFLPRDLLAQLPSLR YLDLRNNSLVSLTYASFRNLTHLESLHLEDNALKV LHNSTLAEWHGLAHVKVFLDNNPWVCDCYMAD MVTWLKETEVVQGKDRLTCAYPEKMRNRVLLEL NSADLDCDPILPPSLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLVL YLNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINA DPRLTNLSSNSDV	hmc5T4.4（加下划线的人类残基）
388	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMH WVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDSRGYG DYRLGGAYWGQGTLVTVSS	抗 CD3 VH 312557

[1101]

#	序列	注释
389	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMH WVRQAPGKCLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDSRGYG DYRLGGAYWGQGTLVTVSS	抗 CD3 VH 312557 G44C
390	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWY QQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFT LTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQGTKVEIK	抗 CD3 VL 312557
391	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWY QQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFT LTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGCGTKVEIK	抗 CD3 VL 312557 Q100C
392	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGFTFDDYSMH WVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSKDYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKYGSG YGKFYHYGLDVWGQGTTVTVSS	CD3-VH-G
393	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGFTFDDYSMH WVRQAPGKCLEWVSGISWNSGSKDYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKYGSG YGKFYHYGLDVWGQGTTVTVSS	CD3-VH-G
394	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK	V_{K1}-39Jκ5
395	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGCGTRLEIK	V_{K1}-39Jκ5 Q100C
396	(ADAAP)n n=2-20	接头
397	(ADAAP)n-G n=2-20	接头
398	(GEPQG)n n=2-20	接头

[1102]

#	序列	注释
399	(GEPQG)n-G n=2-20	接头
400	(AGGEP)n n=2-20	接头
401	(AGGEP)n-G n=2-20	接头
402	(AGSEP)n n=2-20	接头
403	(AGSEP)n-G n=2-20	接头
404	(GGGEQ)n n=2-20	接头
405	(GGGEQ)n-G n=2-20	接头
406	ADAAPADAAPG	接头
407	GEPQGGEPQGG	接头
408	AGGEPAGGEPG	接头
409	AGSEPAGSEPG	接头
410	GGGEQGGGEQG	接头
411	AYVRNLFLTGNQLAVLPAGAFARRPPLAELAALNL SGSRLDEVRAGAFEHLPS	人类5T4 ECD的氨基酸60至112
412	LAGRALQGLRRLELASNHFLYLPRDVLAQLPSLRH LDLSNNSLVSLTYVSFR	人类5T4 ECD的氨基酸173至224

SEQUENCE LISTING
<110> 印希比股份有限公司
<120> 5T4单域抗体及其治疗性组合物
<130> 74495-20005.40
<140> PCT/US2019/055454
<141> 2019-10-09
<150> US 62/744,631
<151> 2018-10-11
<150> US 62/877,824
<151> 2019-07-23
<160> 412
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0
<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (GGS)2接头
<400> 1
Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5
<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (GGS)3接头
<400> 2
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5
<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (GGS)4接头
<400> 3
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> (GGS)5接头

<400> 4

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 甘氨酸接头

<400> 5

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 甘氨酸接头

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 甘氨酸接头

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 8

<211> 218

<212> PRT
<213> 智人
<220>
<223> 人类IgG1 Fc
<400> 8

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1 5 10 15
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
20 25 30
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
35 40 45
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
50 55 60
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
65 70 75 80
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
85 90 95
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
100 105 110
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
115 120 125
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130 135 140
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
145 150 155 160
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
165 170 175
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
180 185 190
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
195 200 205
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 9
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Fc xELL

<400> 9

Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
1 5 10 15
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
20 25 30
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
35 40 45
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
50 55 60
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
65 70 75 80
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
85 90 95
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
100 105 110
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
115 120 125
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
130 135 140
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
145 150 155 160
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
165 170 175
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
180 185 190
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
195 200 205
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 10
<211> 217
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<223> 人类IgG2 Fc
<400> 10

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

20 25 30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 11
<211> 218
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<223> 人类IgG3 Fc
<400> 11
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1 5 10 15
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
20 25 30
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp
35 40 45
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

50 55 60

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
65 70 75 80

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
85 90 95

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
100 105 110

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
115 120 125

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130 135 140

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn
145 150 155 160

Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
165 170 175

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
180 185 190

Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr
195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 12

<211> 218

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 人类IgG4 Fc

<400> 12

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
35 40 45

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

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
65 70 75 80

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

85 90 95
Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
100 105 110
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
115 120 125
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130 135 140
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
145 150 155 160
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
165 170 175
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
180 185 190
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
195 200 205
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215

<210> 13
<211> 218
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<223> 人类IgG4 Fc
<400> 13
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1 5 10 15
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
20 25 30
Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
35 40 45
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
50 55 60
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
65 70 75 80
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
85 90 95
Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
100 105 110
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu

115 120 125
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130 135 140
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
145 150 155 160
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
165 170 175
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
180 185 190
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
195 200 205
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215

<210> 14
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 经修饰的IgG1铰链
<400> 14
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
1 5 10

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 经截短的IgG1铰链
<400> 15
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
1 5

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 经修饰的IgG4铰链
<400> 16
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys

1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 羧基端序列

<400> 17

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 羧基端序列

<400> 18

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Glu Pro Gly Gly
1 5 10

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OKT3 VH

<400> 19

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OKT3 VL
<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80
Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
100 105

<210> 21
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OKT3人源化VH
<400> 21

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val
50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OKT3人源化VH
<400> 22

Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 23
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OKT3人源化VH
<400> 23

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

1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OKT3人源化VL
<400> 24

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
100 105

<210> 25
<211> 106
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> OKT3人源化VL
<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 26
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OKT3人源化VL
<400> 26

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 27
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 Hv
<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120 125

<210> 28
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 Lv
<400> 28

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105
<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH CDR1
<400> 29
Thr Tyr Ala Met Asn
1 5
<210> 30
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH CDR2
<400> 30
Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15
Val Lys Asp
<210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH CDR3
<400> 31
His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10
<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL CDR1

<400> 32
Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10
<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL CDR2
<400> 33
Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5
<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL CDR3
<400> 34
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5
<210> 35
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH1
<400> 35
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 36
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH2
<400> 36
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 37
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH3
<400> 37
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 38
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH4
<400> 38

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 39
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD3 VH5
<400> 39

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 40
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH6
<400> 40

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 41
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH7
<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 42
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH8
<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 43
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH9
<400> 43

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 44
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH10

<400> 44

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Tyr Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 45

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH11

<400> 45

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 46
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH12
<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120 125

<210> 47
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH13
<400> 47

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120 125

<210> 48
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH14
<400> 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Cys Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120 125

<210> 49
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH15
<400> 49

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 50
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH16
<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 51

<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH17
<400> 51

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 52
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH18
<400> 52

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 53
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH19
<400> 53

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 54
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH20
<400> 54

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 55
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH21
<400> 55
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 56
<211> 125
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH22
<400> 56

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 57
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH23
<400> 57

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 58
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH24
<400> 58

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 59
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH25
<400> 59

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

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

<210> 60
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH26
<400> 60

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

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

<210> 61
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 抗CD3 VH27

<400> 61

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 62

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH28

<400> 62

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 63
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH29
<400> 63

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 64
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH30
<400> 64

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Tyr Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 65
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH31
<400> 65
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 66
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL1
<400> 66

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 67
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL2
<400> 67

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
65 70 75 80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
His Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 68
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD3 VL3
<400> 68

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 69
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL4
<400> 69

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 70

<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL5
<400> 70

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 71
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL6
<400> 71

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 72
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL7
<400> 72

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 73
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL8
<400> 73

Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly
20 25 30
Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val

65 70 75 80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 74
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL9
<400> 74
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
65 70 75 80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 75
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL10
<400> 75
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
65 70 75 80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
His Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 76
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL11
<400> 76
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Cys Phe Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
65 70 75 80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
His Trp Val Phe Gly Glu Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 77
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL12
<400> 77
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 78
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL13
<400> 78
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
65 70 75 80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 79
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL14
<400> 79

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 80
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL15
<400> 80
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 81
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD3 VL16
<400> 81

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 82
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL17
<400> 82

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 83

<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL18
<400> 83

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 84
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL19
<400> 84

Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly
20 25 30
Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
65 70 75 80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Arg Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 85
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VHH
<400> 85

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
His Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Lys Asn Thr Met Ser
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Thr Pro Thr Glu Lys Gly Ser Ser Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Arg Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp
115 120 125
Tyr

<210> 86
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H1
<400> 86

Gly Arg Pro Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly
1 5 10

<210> 87
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 5T4 CDR-H1
<400> 87
Gly Arg Pro Phe Ser Ser Ser Ala Met Gly
1 5 10
<210> 88
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H2
<400> 88
Ala Val Arg Trp Ile Gly Gly Ala Thr Arg
1 5 10
<210> 89
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H2
<400> 89
Ala Val Ser Arg Asn Gly Gly Ala Ser Gln
1 5 10
<210> 90
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H2
<400> 90
Ala Val Ser Arg Asn Thr Gly Ala Ser Gln
1 5 10
<210> 91
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H2
<400> 91

Ala Val Ser Arg Asn Thr Gly Ala Ser Gln
1 5 10

<210> 92
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H2
<400> 92
Ala Val Ser Arg Gln Gly Gly Ala Ser Gln
1 5 10

<210> 93
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H2
<400> 93
Ala Val Ser Arg Gly Gly Gly Ala Ser Gln
1 5 10

<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H2
<400> 94
Ala Val Ser Arg Asn Ala Gly Ala Ser Tyr
1 5 10

<210> 95
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H2
<400> 95
Ala Val Ser Arg Asn Gly Gly Ser Ser Tyr
1 5 10

<210> 96

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H2
<400> 96
Ala Val Ser Arg Gln Gly Gly Ser Ser Tyr
1 5 10
<210> 97
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H2
<400> 97
Ala Val Ser Arg Gly Gly Gly Ser Ser Tyr
1 5 10
<210> 98
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H2
<400> 98
Ala Val Ser Arg Asn Ala Gly Ser Ser Tyr
1 5 10
<210> 99
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H2
<400> 99
Ala Val Ser Arg Asn Thr Gly Ser Ser Tyr
1 5 10
<210> 100
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 5T4 CDR-H3
<400> 100
Gly Gln Ala Trp Gly Thr Lys Phe Thr Asp Tyr Ser Asp
1 5 10
<210> 101
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H3
<400> 101
Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly Lys Asp
1 5 10 15
Glu Tyr Tyr Tyr
20
<210> 102
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H3
<400> 102
Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Thr Tyr Thr Glu Lys His
1 5 10 15
Asp Tyr Thr Tyr
20
<210> 103
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 杵Fc
<400> 103
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Thr
225

<210> 104
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 臼Fc
<400> 104

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Arg Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Thr
225

<210> 105
<211> 223
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 杵Fc
<400> 105

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
20 25 30

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
35 40 45

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

65 70 75 80
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
100 105 110
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
115 120 125
Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
130 135 140
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
195 200 205
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Thr
210 215 220

<210> 106
<211> 223
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 臼Fc
<400> 106
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Arg Ser Arg
20 25 30
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
35 40 45
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

100 105 110
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
115 120 125
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
130 135 140
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
195 200 205
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Thr
210 215 220

<210> 107
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 杵Fc
<400> 107
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140
Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Gly
225

<210> 108
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 臼Fc
<400> 108
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30
Arg Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Gly
225

<210> 109
<211> 223
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 杵Fc
<400> 109
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Arg Ser Arg
20 25 30
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
35 40 45
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
100 105 110
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
115 120 125
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
130 135 140
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

165 170 175
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
195 200 205
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220

<210> 110
<211> 223
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 臼Fc
<400> 110

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Arg Ser Arg
20 25 30
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
35 40 45
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
100 105 110
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
115 120 125
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
130 135 140
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

195 200 205

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220

<210> 111
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 臼Fc
<400> 111

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Thr

225

<210> 112

<211> 223

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 臼Fc

<400> 112

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
20 25 30
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
35 40 45
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
100 105 110
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
115 120 125
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
130 135 140
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
195 200 205
Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Thr
210 215 220

<210> 113

<211> 226

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 臼Fc
<400> 113

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Gly
225

<210> 114
<211> 223
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 臼Fc

<400> 114

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
20 25 30
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
35 40 45
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
100 105 110
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
115 120 125
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
130 135 140
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
195 200 205
Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220

<210> 115

<211> 226

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 杵Fc

<400> 115

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Thr
225

<210> 116
<211> 223
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 杵Fc
<400> 116

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Ser Arg
20 25 30

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
35 40 45
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
100 105 110
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
115 120 125
Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
130 135 140
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val His Glu Ala
195 200 205
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Thr
210 215 220

<210> 117
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 杵Fc
<400> 117

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Gly
225

<210> 118
<211> 223
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 杵Fc
<400> 118

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Ser Arg
20 25 30
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
35 40 45
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
100 105 110
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
115 120 125
Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
130 135 140
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val His Glu Ala
195 200 205
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220

<210> 119
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 臼Fc
<400> 119

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Thr
225

<210> 120
<211> 223
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 臼Fc
<400> 120

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Ser Arg
20 25 30
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
35 40 45
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
100 105 110
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
115 120 125

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
130 135 140
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val His Glu Ala
195 200 205
Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Thr
210 215 220

<210> 121
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 臼Fc
<400> 121

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Gly
225

<210> 122
<211> 223
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 臼Fc
<400> 122
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Ser Arg
20 25 30
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
35 40 45
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
100 105 110
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
115 120 125
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
130 135 140
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val His Glu Ala
195 200 205
Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220

<210> 123
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1)...(5)
<223> 重复1至5次
<400> 123
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 124
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1)...(6)
<223> 重复1至4次
<400> 124
Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 125
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 125

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 126
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 126
Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 127
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 127
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Gly Ser
<210> 128
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 128
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 129
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 129
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser
<210> 130
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 变体
<222> 2
<223> Xaa为独立地选自A、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、H、D或E
<220>
<221> 变体
<222> 4
<223> Xaa为独立地选自A、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、H、D或E
<220>
<221> 重复
<222> 1
<223> 重复1至5次
<220>
<221> REPEAT
<222> 3
<223> 重复1至5次
<220>
<221> REPEAT
<222> 5
<223> 重复1至5次
<400> 130
Gly Xaa Gly Xaa Gly
1 5
<210> 131
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 变体
<222> 4

<223> Xaa为独立地选自A、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、H、D或E
<220>
<221> 变体
<222> 8
<223> Xaa为独立地选自A、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、H、D或E
<400> 131
Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Gly
1 5 10
<210> 132
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1)...(5)
<223> 重复1至9次
<400> 132
Ser Ser Ser Ser Gly
1 5
<210> 133
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 133
Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10
<210> 134
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1)...(5)

<223> 重复2至20次
<400> 134
Glu Ala Ala Ala Lys
1 5
<210> 135
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (3)...(4)
<223> Repeated 2至20次
<400> 135
Ala Ser Ala Pro Gly Thr
1 5
<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (3)...(7)
<223> 重复2至20次
<400> 136
Ala Ser Glu Ala Ala Ala Lys Gly Thr
1 5
<210> 137
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1)...(5)

<223> 重复2至20次
<400> 137
Gly Gly Gly Gly Ala
1 5
<210> 138
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1)...(5)
<223> 重复2至20次
<400> 138
Pro Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 139
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1)...(5)
<223> 重复2至20次
<400> 139
Ala Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 140
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (4)...(17)

<223> 重复2至20次
<400> 140
Gly Gly Ser Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser
1 5 10 15
Thr Gly Gly Ser
20
<210> 141
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 141
Ser Ser Ser Ala Ser Ala Ser Ser Ala
1 5
<210> 142
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 142
Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly
1 5
<210> 143
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 143
Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr
1 5 10
<210> 144
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 共同接头

<220>
<221> 变体
<222> 1
<223> Xaa为I、L、Y、M、F、V或A
<220>
<221> 变体
<222> 2
<223> Xaa为A、G、S、V、E、D、Q、N或Y
<220>
<221> 变体
<222> 3
<223> Xaa为H、P、A、V、G、S或T
<220>
<221> 变体
<222> 4
<223> Xaa为D或E
<220>
<221> 变体
<222> 5
<223> Xaa为I、L、Y、M、F、V、T、S、G或A
<400> 144
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5
<210> 145
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 共同接头
<220>
<221> 变体
<222> 1
<223> Xaa为I或L
<220>
<221> 变体
<222> 3
<223> Xaa为P或A
<220>
<221> 变体

<222> 5
<223> Xaa为I、V、T、S或G
<400> 145
Xaa Glu Xaa Asp Xaa
1 5
<210> 146
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 颗粒酶B基质
<400> 146
Leu Glu Ala Asp
1
<210> 147
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 147
Leu Glu Pro Asp
1
<210> 148
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 148
Leu Glu Ala Glu
1
<210> 149
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 149

Ile Glu Pro Asp Ile
1 5
<210> 150
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 150
Leu Glu Pro Asp Gly
1 5
<210> 151
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 151
Leu Glu Ala Asp Thr
1 5
<210> 152
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 152
Ile Glu Pro Asp Gly
1 5
<210> 153
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 153
Ile Glu Pro Asp Val
1 5
<210> 154

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 154
Ile Glu Pro Asp Ser
1 5
<210> 155
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 155
Ile Glu Pro Asp Thr
1 5
<210> 156
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 共同接头
<220>
<221> 变体
<222> 1
<223> Xaa为任何氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 5
<223> Xaa为A或V
<400> 156
Xaa Gln Ala Arg Xaa
1 5
<210> 157
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 接头
<220>
<221> 变体
<222> 5
<223> Xaa is A or V
<400> 157
Arg Gln Ala Arg Xaa
1 5
<210> 158
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 间质蛋白酶基质
<400> 158
Arg Gln Ala Arg
1
<210> 159
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 159
Arg Gln Ala Arg Val
1 5
<210> 160
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 共同接头
<220>
<221> 变体
<222> 1
<223> Xaa为 P、V或A
<220>
<221> 变体
<222> 2

<223> Xaa为Q或D
<220>
<221> 变体
<222> 3
<223> Xaa为A或N
<220>
<221> 变体
<222> 4
<223> Xaa为L、I或M
<400> 160
Xaa Xaa Xaa Xaa
1
<210> 161
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 共同接头
<220>
<221> 变体
<222> 2
<223> Xaa为Q或D
<220>
<221> 变体
<222> 3
<223> Xaa为A或N
<220>
<221> 变体
<222> 4
<223> Xaa为L或I
<400> 161
Pro Xaa Xaa Xaa
1
<210> 162
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> MMP基质

<400> 162
Pro Ala Gly Leu
1
<210> 163
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 163
Thr Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Pro Ala Gly Leu Gly Arg Gln Ala
1 5 10 15
Arg Val Gly
<210> 164
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 164
Thr Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Arg Gln Ala Arg Val Gly Pro Ala
1 5 10 15
Gly Leu Gly
<210> 165
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 165
Thr Gly Ser Pro Ala Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Arg Gln Ala Arg
1 5 10 15
Val Gly Ser
<210> 166
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头

<400> 166
Thr Gly Pro Ala Gly Leu Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Arg Gln Ala
1 5 10 15
Arg Val Gly
<210> 167
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 167
Thr Gly Arg Gln Ala Arg Val Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Pro Ala
1 5 10 15
Gly Leu Gly
<210> 168
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 168
Thr Gly Ser Arg Gln Ala Arg Val Gly Pro Ala Gly Leu Glu Ala Asp
1 5 10 15
Gly Ser
<210> 169
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 169
Thr Gly Pro Ala Gly Leu Gly Ser Arg Gln Ala Arg Val Gly Leu Glu
1 5 10 15
Ala Asp Gly Ser
20
<210> 170
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头
<400> 170
Gly Pro Ala Gly Leu Gly Leu Glu Pro Asp Gly Ser Arg Gln Ala Arg
1 5 10 15
Val Gly
<210> 171
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 171
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Ile Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser
<210> 172
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 172
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Leu Glu Ala Asp Thr Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser
<210> 173
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 173
Gly Ser Ile Glu Pro Asp Ile Gly Ser
1 5
<210> 174
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头
<400> 174
Gly Ser Leu Glu Ala Asp Thr Gly Ser
1 5
<210> 175
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 175
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser
<210> 176
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 176
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Val Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser
<210> 177
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 177
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser
<210> 178
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头
<400> 178
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Thr Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser
<210> 179
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 179
Gly Gly Gly Ser Leu Glu Pro Asp Gly Ser Gly Ser
1 5 10
<210> 180
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 180
Gly Pro Ala Gly Leu Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Arg Gln Ala Arg
1 5 10 15
Val Gly
<210> 181
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 181
Gly Gly Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 182
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 接头
<400> 182
Gly Ser Ser Ala Gly Ser Glu Ala Gly Gly Ser Gly Gln Ala Gly Val
1 5 10 15
Gly Ser
<210> 183
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 183
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Leu Glu Ala Glu Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15
Gly Ser
<210> 184
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 184
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Pro Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser
<210> 185
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 185
Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Ile Gly Gly Ser
1 5 10 15
Gly Gly Ser
<210> 186
<211> 204
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 41BBL
<400> 186

Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala
1 5 10 15
Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro
20 25 30
Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala
35 40 45
Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro
50 55 60
Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp
65 70 75 80
Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe
85 90 95
Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val
100 105 110
Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala
115 120 125
Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Asn
130 135 140
Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln
145 150 155 160
Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp
165 170 175
Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro
180 185 190
Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
195 200

<210> 187
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB VH
<400> 187

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr

20 25 30
Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 188
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB VL
<400> 188
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
85 90 95
Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 189
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 41BB VH
<400> 189
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110
Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 190
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB VL
<400> 190
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95
Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 191
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB VH
<400> 191

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Val Asn Pro Met Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Met Ala Met Arg Leu Glu Leu Asp Lys Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 192
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB VL
<400> 192

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Val Val
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
100 105
<210> 193
<211> 178
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB抗运载蛋白
<400> 193
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30
Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Lys Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45
Asn Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60
Asn Val Thr Gly Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Ala Ile
65 70 75 80
Ser Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
85 90 95
Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125
Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175
Asp Gly
<210> 194
<211> 178
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 41BB抗运载蛋白
<400> 194
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30
Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45
Ile Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60
Asp Val Thr Met Val Lys Phe Asp Asp Lys Lys Cys Met Tyr Asp Ile
65 70 75 80
Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
85 90 95
Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125
Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175
Asp Gly
<210> 195
<211> 178
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB抗运载蛋白
<400> 195
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30
Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Asn Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60
Asp Val Thr Ala Val Ala Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Asp Ile
65 70 75 80
Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
85 90 95
Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125
Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175
Asp Gly

<210> 196
<211> 178
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB抗运载蛋白
<400> 196

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30
Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Lys Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45
Asn Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60
Asp Val Thr Ala Val Ala Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Asp Ile
65 70 75 80
Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
85 90 95
Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln

115 120 125
Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175
Asp Gly
<210> 197
<211> 175
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB抗运载蛋白
<400> 197
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30
Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Lys Leu Arg Glu Asp Ser Lys Met
35 40 45
Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr
50 55 60
Gly Val Ser Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Ala Ile Met Thr Phe
65 70 75 80
Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys Ile Lys Ser
85 90 95
Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr
100 105 110
Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln Asn Arg Glu
115 120 125
Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu
130 135 140
Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu
145 150 155 160
Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
165 170 175
<210> 198
<211> 178

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB抗运载蛋白
<400> 198

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30
Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Lys Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45
Val Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60
Asp Val Thr Gly Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Arg Tyr Asp Ile
65 70 75 80
Ser Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Phe Gly Lys
85 90 95
Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125
Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175
Asp Gly

<210> 199
<211> 178
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB抗运载蛋白
<400> 199

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45
His Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60
Asp Val Thr Gly Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Ala Ile
65 70 75 80
Ser Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
85 90 95
Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125
Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175
Asp Gly

<210> 200
<211> 178
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB抗运载蛋白
<400> 200

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30
Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Lys Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45
Asn Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60
Asp Val Thr Gly Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Ala Ile
65 70 75 80
Ser Thr Leu Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Phe Gly Lys
85 90 95
Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125
Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175
Asp Gly

<210> 201
<211> 178
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB抗运载蛋白
<400> 201
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30
Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45
Ser Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60
Asp Val Thr Ala Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Asn Tyr Ala Ile
65 70 75 80
Ser Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
85 90 95
Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125
Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 202

<211> 184

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 人类41BBL的71至254

<400> 202

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15
Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30
Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45
Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60
Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80
Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95
Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110
Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125
Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140
His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160
Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175
Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
180

<210> 203

<211> 170

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 人类41BBL的85至254

<400> 203

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
1 5 10 15
Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
20 25 30
Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
35 40 45
Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
50 55 60
Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
65 70 75 80
Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
85 90 95
Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
100 105 110
Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
115 120 125
Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
130 135 140
Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
145 150 155 160
Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
165 170

<210> 204
<211> 175
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<223> 人类41BBL的80至254
<400> 204

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
1 5 10 15
Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
20 25 30
Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
35 40 45
Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val
50 55 60
Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
65 70 75 80

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
85 90 95
Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
100 105 110
Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
115 120 125
Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
130 135 140
His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
145 150 155 160
Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
165 170 175

<210> 205
<211> 203
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<223> 人类4-1BBL的52至254
<400> 205

Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser
1 5 10 15
Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly
20 25 30
Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn
35 40 45
Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
50 55 60
Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys
65 70 75 80
Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu
85 90 95
Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu
100 105 110
Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu
115 120 125
Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser
130 135 140
Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg
145 150 155 160

Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln
165 170 175
Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu
180 185 190
Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
195 200

<210> 206
<211> 178
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<223> 人类41BBL的71至248
<400> 206
Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15
Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30
Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45
Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60
Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80
Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95
Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110
Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125
Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140
His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160
Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175
Gly Leu

<210> 207
<211> 164
<212> PRT

<213> 智人
<220>
<223> 人类41BBL的85至248
<400> 207

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
1 5 10 15
Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
20 25 30
Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
35 40 45
Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
50 55 60
Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
65 70 75 80
Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
85 90 95
Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
100 105 110
Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
115 120 125
Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
130 135 140
Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
145 150 155 160
Pro Ala Gly Leu

<210> 208
<211> 169
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<223> 人类41BBL的80至248
<400> 208

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
1 5 10 15
Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
20 25 30
Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
35 40 45
Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val

50 55 60

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
65 70 75 80

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
85 90 95

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
100 105 110

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
115 120 125

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
130 135 140

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
145 150 155 160

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
165

<210> 209
<211> 197
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<223> 人类41BBL的52至248
<400> 209

Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser
1 5 10 15

Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly
20 25 30

Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn
35 40 45

Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
50 55 60

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

Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu
85 90 95

Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu
100 105 110

Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu
115 120 125

Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser

130 135 140

Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg
145 150 155 160
Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln
165 170 175
Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu
180 185 190
Ile Pro Ala Gly Leu
195

<210> 210
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB sdAb
<400> 210

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ile Asn
20 25 30
Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Ile Glu Ser Gly Arg Asn Thr Val Tyr Ala Glu Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly
85 90 95
Leu Leu Lys Gly Asn Arg Val Val Ser Pro Ser Val Ala Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120

<210> 211
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40配位体
<400> 211

Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
1 5 10 15
Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu
20 25 30
Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp
35 40 45
Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn
50 55 60
Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys
65 70 75 80
Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys
85 90 95
Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp
100 105 110
Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly
115 120 125
Glu Phe Cys Val Leu
130

<210> 212
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40配位体
<400> 212

Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Phe Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
1 5 10 15
Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu
20 25 30
Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp
35 40 45
Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn
50 55 60
Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys
65 70 75 80
Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys
85 90 95
Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp
100 105 110

Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly
115 120 125
Glu Phe Cys Val Leu
130
<210> 213
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40配位体
<400> 213
Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
1 5 10 15
Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu
20 25 30
Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp
35 40 45
Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn
50 55 60
Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys
65 70 75 80
Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys
85 90 95
Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp
100 105 110
Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly
115 120 125
Glu Phe Cys Val Leu
130
<210> 214
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40配位体
<400> 214
Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
1 5 10 15
Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu

20 25 30
Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp
35 40 45
Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn
50 55 60
Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys
65 70 75 80
Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys
85 90 95
Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp
100 105 110
Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly
115 120 125
Glu Phe Cys Val Leu
130

<210> 215
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40配位体
<400> 215
Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr
1 5 10 15
Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp
20 25 30
Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly
35 40 45
Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile
50 55 60
Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys
65 70 75 80
Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp
85 90 95
Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe
100 105 110
His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu
115 120 125
Phe Cys Val Leu

130

<210> 216
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40 VH
<400> 216

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asp Met Tyr Pro Asp Asn Gly Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 217
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40 VL
<400> 217

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 218
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40 VH
<400> 218

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 219
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40 VL
<400> 219

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95
Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 220
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40 sdAb
<400> 220
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
20 25 30
Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly Leu Lys Thr Ala Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ser Arg Asp Val Asp Gly Asp Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro
115

<210> 221
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> GITR配位体
<400> 221

Gln Leu Glu Thr Ala Lys Glu Pro Cys Met Ala Lys Phe Gly Pro Leu
1 5 10 15
Pro Ser Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser Glu Pro Pro Cys Val Asn Lys
20 25 30
Val Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu Gln Asn Gly Leu Tyr Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn Tyr Asn Asp Val Ala Pro Phe
50 55 60
Glu Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp Met Ile Gln Thr Leu Thr Asn
65 70 75 80
Lys Ser Lys Ile Gln Asn Val Gly Gly Thr Tyr Glu Leu His Val Gly
85 90 95
Asp Thr Ile Asp Leu Ile Phe Asn Ser Glu His Gln Val Leu Lys Asn
100 105 110
Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Leu Ala Asn Pro Gln Phe Ile Ser
115 120 125

<210> 222
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> GITR VH
<400> 222

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Val Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 223
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> GITR VL
<400> 223

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30
Gly Val Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Ile Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Lys
85 90 95
Glu Val Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 224
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> GITR VH
<400> 224

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Gln Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val

65 70 75 80
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 225
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> GITR VL
<400> 225
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Asp Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 226
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> GITR VH
<400> 226
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Asp Leu Phe Tyr Tyr Asp Thr Ser Gly Pro Arg Gly Phe
100 105 110
Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 227
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> GITR VL
<400> 227

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Val Ser Ser Asn
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ser Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Ser Pro
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 228
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> GITR VH

<400> 228

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Pro Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Gly Glu Leu Gly Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 229

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR VL

<400> 229

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Asn Tyr Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 230

<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> GITR sdAb
<400> 230

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Phe Ser Ile Asp
20 25 30
Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Val Leu Ser Gly Ile Ser Ser Ala Lys Tyr Ala Ala Ser Ala Pro
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr
85 90 95
Ala Asp Val Ser Thr Gly Trp Gly Arg Asp Ala His Gly Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115

<210> 231
<211> 193
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<223> UniProt编号P32970, CD70-ECD
<400> 231

Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly
1 5 10 15
Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile
20 25 30
Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu
35 40 45
Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His
50 55 60
Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala
65 70 75 80

Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu
85 90 95
Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu
100 105 110
Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu
115 120 125
Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg
130 135 140
Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro
145 150 155 160
Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu
165 170 175
Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg
180 185 190
Pro

<210> 232
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CD70 VH
<400> 232

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Ser Gly Asn Trp Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 233

<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CD70 VL
<400> 233

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 234
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ICOS sdAb
<400> 234

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn
20 25 30
Gly Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Gly Leu Thr Ser Gly Gly Ser Val Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ala Glu Ile Phe Thr Arg Thr Gly Glu Asn Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Lys Pro
115 120

<210> 235
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CD28 sdAb
<400> 235

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Met Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Ile Asn Tyr Arg Arg Asp Ala Ala Asp Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Gly Phe Thr Tyr Ala Gly Trp Ala Ser Ser Arg Arg Asp Asp Tyr Asn
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120

<210> 236
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CD3ζ信号传导域
<400> 236

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 237
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 源自4-1BB的共刺激域
<400> 237

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 238
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 源自CD28的共刺激域
<400> 238

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
20 25 30

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 239
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 源自CD28的共刺激域2
<400> 239

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 240
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 源自CD28的共刺激域3
<400> 240

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
1 5 10 15
Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
20 25 30
Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 241
<211> 71
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 源自CD8的铰链和跨膜域
<400> 241

Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15
Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser Arg Pro Ala
20 25 30
Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Ser Asp Ile
35 40 45
Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
50 55 60
Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
65 70

<210> 242
<211> 69
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 源自CD8的铰链和跨膜域
<400> 242

```
Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
1               5                  10                  15
Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
            20                  25                  30
Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
        35                  40                  45
Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
    50                  55                  60
Ser Leu Val Ile Thr
65
```

<210> 243
<211> 68
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CD8铰链和跨膜域
<400> 243

```
Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
1               5                  10                  15
Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
            20                  25                  30
Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile
        35                  40                  45
Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
    50                  55                  60
Leu Val Ile Thr
65
```

<210> 244
<211> 420
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 5T4

<400> 244

Met Pro Gly Gly Cys Ser Arg Gly Pro Ala Ala Gly Asp Gly Arg Leu
1 5 10 15
Arg Leu Ala Arg Leu Ala Leu Val Leu Leu Gly Trp Val Ser Ser Ser
20 25 30
Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ser Ser Phe Ser Ser Ser Ala Pro Phe Leu
35 40 45
Ala Ser Ala Val Ser Ala Gln Pro Pro Leu Pro Asp Gln Cys Pro Ala
50 55 60
Leu Cys Glu Cys Ser Glu Ala Ala Arg Thr Val Lys Cys Val Asn Arg
65 70 75 80
Asn Leu Thr Glu Val Pro Thr Asp Leu Pro Ala Tyr Val Arg Asn Leu
85 90 95
Phe Leu Thr Gly Asn Gln Leu Ala Val Leu Pro Ala Gly Ala Phe Ala
100 105 110
Arg Arg Pro Pro Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Asn Leu Ser Gly Ser
115 120 125
Arg Leu Asp Glu Val Arg Ala Gly Ala Phe Glu His Leu Pro Ser Leu
130 135 140
Arg Gln Leu Asp Leu Ser His Asn Pro Leu Ala Asp Leu Ser Pro Phe
145 150 155 160
Ala Phe Ser Gly Ser Asn Ala Ser Val Ser Ala Pro Ser Pro Leu Val
165 170 175
Glu Leu Ile Leu Asn His Ile Val Pro Pro Glu Asp Glu Arg Gln Asn
180 185 190
Arg Ser Phe Glu Gly Met Val Val Ala Ala Leu Leu Ala Gly Arg Ala
195 200 205
Leu Gln Gly Leu Arg Arg Leu Glu Leu Ala Ser Asn His Phe Leu Tyr
210 215 220
Leu Pro Arg Asp Val Leu Ala Gln Leu Pro Ser Leu Arg His Leu Asp
225 230 235 240
Leu Ser Asn Asn Ser Leu Val Ser Leu Thr Tyr Val Ser Phe Arg Asn
245 250 255
Leu Thr His Leu Glu Ser Leu His Leu Glu Asp Asn Ala Leu Lys Val
260 265 270
Leu His Asn Gly Thr Leu Ala Glu Leu Gln Gly Leu Pro His Ile Arg
275 280 285
Val Phe Leu Asp Asn Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys His Met Ala Asp

290 295 300

Met Val Thr Trp Leu Lys Glu Thr Glu Val Val Gln Gly Lys Asp Arg
305 310 315 320

Leu Thr Cys Ala Tyr Pro Glu Lys Met Arg Asn Arg Val Leu Leu Glu
325 330 335

Leu Asn Ser Ala Asp Leu Asp Cys Asp Pro Ile Leu Pro Pro Ser Leu
340 345 350

Gln Thr Ser Tyr Val Phe Leu Gly Ile Val Leu Ala Leu Ile Gly Ala
355 360 365

Ile Phe Leu Leu Val Leu Tyr Leu Asn Arg Lys Gly Ile Lys Lys Trp
370 375 380

Met His Asn Ile Arg Asp Ala Cys Arg Asp His Met Glu Gly Tyr His
385 390 395 400

Tyr Arg Tyr Glu Ile Asn Ala Asp Pro Arg Leu Thr Asn Leu Ser Ser
405 410 415

Asn Ser Asp Val
420

<210> 245
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> L12E9
<400> 245

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Arg Pro Phe Ser Ser Lys
20 25 30

Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Gly Gln Ala Trp Gly Thr Lys Phe Thr Asp Tyr Ser Asp Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Lys Pro

115 120

<210> 246
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz12E9v1
<400> 246

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Arg Pro Phe Ser Ser Lys
20 25 30
Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Val Arg Trp Ile Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Gly Gln Ala Trp Gly Thr Lys Phe Thr Asp Tyr Ser Asp Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120

<210> 247
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz12E9v2
<400> 247

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Arg Pro Phe Ser Ser Lys
20 25 30
Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Val Arg Trp Ile Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Gly Gln Ala Trp Gly Thr Lys Phe Thr Asp Tyr Ser Asp Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120

<210> 248
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz12E9v3
<400> 248

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Arg Pro Phe Ser Ser Lys
20 25 30
Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Val Arg Trp Ile Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Gly Gln Ala Trp Gly Thr Lys Phe Thr Asp Tyr Ser Asp Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120

<210> 249
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz12E9v4
<400> 249

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Arg Pro Phe Ser Ser Lys
20 25 30
Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Val Arg Trp Ile Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Thr Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Gly Gln Ala Trp Gly Thr Lys Phe Thr Asp Tyr Ser Asp Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120

<210> 250
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz12E9v5
<400> 250

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Arg Pro Phe Ser Ser Lys
20 25 30
Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Val Arg Trp Ile Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Thr Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Gly Gln Ala Trp Gly Thr Lys Phe Thr Asp Tyr Ser Asp Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120

<210> 251

<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz12E9v6
<400> 251

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Arg Pro Phe Ser Ser Lys
20 25 30
Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Val Arg Trp Ile Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Gly Gln Ala Trp Gly Thr Lys Phe Thr Asp Tyr Ser Asp Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120

<210> 252
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz12E9v7
<400> 252

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Arg Pro Phe Ser Ser Lys
20 25 30
Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Val Arg Trp Ile Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Gly Gln Ala Trp Gly Thr Lys Phe Thr Asp Tyr Ser Asp Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120

<210> 253
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz12E9v8
<400> 253

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Arg Pro Phe Ser Ser Lys
20 25 30
Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Val Arg Trp Ile Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Ile Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Gly Gln Ala Trp Gly Thr Lys Phe Thr Asp Tyr Ser Asp Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120

<210> 254
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz12E9v9
<400> 254

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

20 25 30
Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Val Arg Trp Ile Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Thr Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Gly Gln Ala Trp Gly Thr Lys Phe Thr Asp Tyr Ser Asp Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro Gly Gly
115 120

<210> 255
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> L14B5
<400> 255
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15
Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Val Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Gly Gly Ala Ser Gln Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ile Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro
<210> 256
<211> 129

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v1
<400> 256

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ser Ala Val Ser Arg Asn Gly Gly Ala Ser Gln Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 257
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v2
<400> 257

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Gly Gly Ala Ser Gln Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 258
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v3
<400> 258
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Gly Gly Ala Ser Gln Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 259
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v4
<400> 259
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Gly Gly Ala Ser Gln Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 260
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v5
<400> 260

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Ala Gly Ala Ser Gln Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125

Pro
<210> 261
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v6
<400> 261
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Thr Gly Ala Ser Gln Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro
<210> 262
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v7
<400> 262
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Gln Gly Gly Ala Ser Gln Tyr Ala Glu Ser Val

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 263
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v8
<400> 263
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Gly Gly Gly Ala Ser Gln Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 264
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> hz14B5v9
<400> 264
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Gly Gly Ala Ser Gln Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro
<210> 265
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v10
<400> 265
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Gly Gly Ala Ser Gln Tyr Gly Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly

100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro
<210> 266
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v11
<400> 266
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15
Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Val Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Ala Gly Ala Ser Gln Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro
<210> 267
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v12
<400> 267
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Ala Gly Ala Ser Gln Tyr Gly Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ile Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 268
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v13
<400> 268

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Thr Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Ala Gly Ala Ser Gln Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 269
<211> 129

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v14
<400> 269

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Ala Gly Ala Ser Gln Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 270
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v15
<400> 270

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Ala Gly Ala Ser Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 271
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v16
<400> 271
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Ala Gly Ala Ser Gln Tyr Gly Glu Phe Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 272
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v17
<400> 272
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Ala Gly Ala Ser Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 273
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v18
<400> 273

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Pro Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Ala Gly Ala Ser Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125

Pro
<210> 274
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v19
<400> 274
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Gly Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Ala Gly Ala Ser Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro
<210> 275
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz14B5v20
<400> 275
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Ala Gly Ala Ser Tyr Tyr Ala Glu Ser Val

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr Thr Gly
100 105 110
Lys Asp Glu Tyr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 276
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> L16G10
<400> 276
Gln Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Ile Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Arg Pro Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Thr Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Asp Phe Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Thr Tyr Thr Glu
100 105 110
Lys His Asp Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 277
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> hz16G10v1
<400> 277
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Thr Val
35 40 45
Ser Ala Val Ser Arg Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Thr Tyr Thr Glu
100 105 110
Lys His Asp Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro
<210> 278
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz16G10v2
<400> 278
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Thr Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Thr Tyr Thr Glu

100 105 110
Lys His Asp Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro
<210> 279
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz16G10v3
<400> 279
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Thr Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Thr Tyr Thr Glu
100 105 110
Lys His Asp Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro
<210> 280
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz16G10v4
<400> 280
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Thr Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Gln Gly Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Thr Tyr Thr Glu
100 105 110
Lys His Asp Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 281
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz16G10v5
<400> 281

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Thr Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Thr Tyr Thr Glu
100 105 110
Lys His Asp Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 282
<211> 129

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz16G10v6
<400> 282

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Thr Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Ala Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Thr Tyr Thr Glu
100 105 110
Lys His Asp Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 283
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz16G10v7
<400> 283

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Thr Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Thr Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Thr Tyr Thr Glu
100 105 110
Lys His Asp Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 284
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz16G10v8
<400> 284
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Thr Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Asp Phe Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Thr Tyr Thr Glu
100 105 110
Lys His Asp Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 285
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz16G10v9
<400> 285
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Thr Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Thr Tyr Thr Glu
100 105 110
Lys His Asp Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro

<210> 286
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz16G10v10
<400> 286

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Thr Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Ala Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Asp Phe Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Thr Tyr Thr Glu
100 105 110
Lys His Asp Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125

Pro
<210> 287
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz16G10v11
<400> 287
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Thr Val
35 40 45
Ala Ala Val Ser Arg Asn Ala Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Ser Ala Ala Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Thr Tyr Thr Glu
100 105 110
Lys His Asp Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
115 120 125
Pro
<210> 288
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4CDR-H1
<400> 288
Arg Arg Pro Phe Ser Ser Lys Thr Met Ala
1 5 10
<210> 289
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 5T4 CDR-H1
<400> 289
Gly Arg Pro Phe Ser Ser Lys Thr Met Ala
1 5 10
<210> 290
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H1
<400> 290
Glu Arg Pro Phe Gly Thr Tyr Ala Met Gly
1 5 10
<210> 291
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H1
<400> 291
Glu Arg Pro Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly
1 5 10
<210> 292
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H1
<400> 292
Gly Arg Pro Phe Gly Thr Tyr Ala Met Gly
1 5 10
<210> 293
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL
<400> 293
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
65 70 75 80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
His Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 294
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 7E1
<400> 294
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Ala
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Arg Ser Leu Arg
20 25 30
Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Ile Phe Val
35 40 45
Ala Ala Ile Ser Trp Arg Ser Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Thr Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Gly Gly Gly Trp Leu Ala Thr Thr Pro Asp Glu Tyr Thr Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120

<210> 295
<211> 119
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 14F4
<400> 295

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Met Gln Ala Gly Asp
1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Val Thr Trp Asn Ser Tyr
            20                  25                  30
Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45
Ala Ala Ile Arg Trp Thr Val Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Phe Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Ala Lys Lys Thr Met Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Val Gly Arg Lys Trp Pro Lys Ala Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110
Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
        115
```

<210> 296
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H1
<400> 296

```
Gly Arg Thr Arg Ser Leu Arg Thr Met Ala
1               5                  10
```

<210> 297
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H1
<400> 297

```
Gly Val Thr Trp Asn Ser Tyr Thr Met Ala
1               5                  10
```

<210> 298

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H2
<400> 298
Ala Ile Ser Trp Arg Ser Asp Ser Thr Tyr
1 5 10
<210> 299
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H2
<400> 299
Ala Ile Arg Trp Thr Val Asp Thr Thr Tyr
1 5 10
<210> 300
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H3
<400> 300
Gly Gly Gly Trp Leu Ala Thr Thr Pro Asp Glu Tyr Thr Tyr
1 5 10
<210> 301
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H3
<400> 301
Gly Arg Lys Trp Pro Lys Ala Asp Asp Tyr
1 5 10
<210> 302
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4D3
<400> 302

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Arg Pro Phe Ser Ser Lys
20 25 30
Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Val Arg Trp Ile Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ala Ile Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Thr Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Gly Gln Thr Trp Gly Thr Lys Phe Thr Asp Tyr Ser Asp Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120

<210> 303
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 5T4 CDR-H3
<400> 303

Gly Gln Thr Trp Gly Thr Lys Phe Thr Asp Tyr Ser Asp
1 5 10

<210> 304
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v1
<400> 304

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Met Thr Gly Ala Asn
20 25 30

Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ser Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro Gly Gly
115

<210> 305
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v2
<400> 305

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Met Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ser Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro Gly Gly
115

<210> 306
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hz18H10v3
<400> 306

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Met Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ser Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro Gly Gly
115

<210> 307
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v4
<400> 307

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Met Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Lys Pro Gly Gly
115

<210> 308
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v5
<400> 308

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Met Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro Gly Gly
115

<210> 309
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v6
<400> 309

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro Gly Gly
115

<210> 310
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v7
<400> 310
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro Gly Gly
115

<210> 311
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v8

<400> 311

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ser Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro Gly Gly
115

<210> 312

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hz18H10v9

<400> 312

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ser Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro Gly Gly

115

<210> 313
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v10
<400> 313

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Met Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ser Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro Gly Gly
115

<210> 314
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v11
<400> 314

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ser Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro Gly Gly
115

<210> 315
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v12
<400> 315
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro Gly Gly
115

<210> 316
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v13
<400> 316
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Met Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro Gly Gly
115

<210> 317
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v14
<400> 317

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro Gly Gly
115

<210> 318

<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v15
<400> 318

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro Gly Gly
115

<210> 319
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v16
<400> 319

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80

Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro Gly Gly
115

<210> 320
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v17
<400> 320

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro Gly Gly
115

<210> 321
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 321

Gly Ser Met Thr Gly Ala Asn Thr Met Gly
1 5 10

<210> 322

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 322
Gly Ser Val Thr Gly Ala Asn Thr Met Gly
1 5 10
<210> 323
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 323
Gly Ser Ile Thr Gly Ala Asn Thr Met Gly
1 5 10
<210> 324
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
<400> 324
Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His
1 5
<210> 325
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 325
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser
1 5
<210> 326
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18H10
<400> 326
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Met Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
50 55 60
Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Ile Leu Gln Met Asn
65 70 75 80
Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu Tyr Thr
85 90 95
Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
100 105 110
Pro Gly Gly
115
<210> 327
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 327
Pro Gly Gly Gly Gly
1 5
<210> 328
<211> 225
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 杵Fc
<400> 328
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro
225

<210> 329
<211> 225
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 臼Fc
<400> 329

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30
Arg Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro
225

<210> 330
<211> 222
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 杵Fc
<400> 330

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
20 25 30
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
35 40 45
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
100 105 110
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
115 120 125
Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
130 135 140
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
195 200 205
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
210 215 220

<210> 331
<211> 222
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 臼Fc
<400> 331

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Arg Ser Arg
20 25 30
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
35 40 45
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
100 105 110
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
115 120 125
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
130 135 140
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
195 200 205
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
210 215 220

<210> 332
<211> 225
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 臼Fc
<400> 332

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro
225

<210> 333
<211> 222
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 臼Fc
<400> 333
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
20 25 30
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
35 40 45
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
100 105 110
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
115 120 125
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
130 135 140

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
195 200 205
Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
210 215 220

<210> 334
<211> 225
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 杵Fc
<400> 334

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro
225

<210> 335
<211> 222
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 杵Fc
<400> 335

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Ser Arg
20 25 30
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
35 40 45
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
100 105 110
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
115 120 125
Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
130 135 140
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val His Glu Ala
195 200 205
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
210 215 220

<210> 336
<211> 225
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 臼Fc
<400> 336

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro
225
<210> 337
<211> 222
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 臼Fc
<400> 337

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Gly	Gly	Pro	Ser
1				5				10					15		
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Arg
			20					25				30			
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
		35					40					45			
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
	50					55					60				
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
65					70					75					80
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
				85					90					95	
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
			100					105					110		
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu
		115					120					125			
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys
	130					135					140				
Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
145					150					155					160
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
				165					170					175	
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
			180					185					190		
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Ala
		195					200					205			
Leu	His	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro		
	210					215					220				

<210> 338
<211> 226

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Fc-Het-1
<400> 338

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
1 5 10 15
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
20 25 30
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Lys His Glu
35 40 45
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
50 55 60
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Glu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
65 70 75 80
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
85 90 95
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
100 105 110
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
115 120 125
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
130 135 140
Thr Cys Asp Val Ser Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
145 150 155 160
Glu Ser Asp Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
165 170 175
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
180 185 190
Lys Ser Arg Trp Glu Gln Gly Asp Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
195 200 205
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
210 215 220
Gly Lys
225

<210> 339
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc-Het-2
<400> 339

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
1 5 10 15
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
20 25 30
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Lys His Glu
35 40 45
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
50 55 60
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
65 70 75 80
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
85 90 95
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
100 105 110
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
115 120 125
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Gln Met Thr Lys Asn Gln Val Lys Leu
130 135 140
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
145 150 155 160
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
165 170 175
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
180 185 190
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
195 200 205
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
210 215 220
Gly Lys
225

<210> 340
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL21

<400> 340

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
65 70 75 80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
His Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 341

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH32

<400> 341

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 342

<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL20
<400> 342

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
65 70 75 80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 343
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH34
<400> 343

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115 120

<210> 344
<211> 225
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> IgG1杵
<400> 344

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro
225
<210> 345
<211> 225
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> IgG1杵
<400> 345
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30
Arg Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro
225

<210> 346
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 346
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 347
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB CDR1
<400> 347
Gly Phe Ser Phe Ser Ile Asn Ala Met Gly
1 5 10
<210> 348
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB CDR2
<400> 348
Ala Ile Glu Ser Gly Arg Asn Thr Val
1 5
<210> 349
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB CDR3
<400> 349
Leu Lys Gly Asn Arg Val Val Ser Pro Ser Val Ala Tyr
1 5 10
<210> 350
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH CDR1
<400> 350
Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn
1 5 10
<210> 351
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH CDR2
<400> 351
Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
1 5 10
<210> 352
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH CDR3
<400> 352
His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10
<210> 353
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL CDR3
<400> 353
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val
1 5
<210> 354
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL CDR3

<400> 354
Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val
1 5
<210> 355
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH CDR1
<400> 355
Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn
1 5 10
<210> 356
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH CDR2
<400> 356
Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
1 5 10
<210> 357
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL CDR1
<400> 357
Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10
<210> 358
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH33
<400> 358
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 359
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 41BB sdAb
<400> 359

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ile Asn
20 25 30
Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Ile Glu Ser Gly Arg Asn Thr Val Tyr Ala Glu Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly
85 90 95
Leu Leu Lys Gly Asn Arg Val Val Ser Pro Ser Val Ala Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120

<210> 360
<211> 122

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz12E9v09
<400> 360

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Ser Lys
20 25 30
Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Val Arg Trp Ile Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Thr Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Gly Gln Ala Trp Gly Thr Lys Phe Thr Asp Tyr Ser Asp Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120

<210> 361
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 361

Ile Glu Pro Asp Pro
1 5

<210> 362
<211> 324
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<223> 5T4 ECD,人类5T4的氨基酸32至355 (UniProt编号 Q13641)
<400> 362

Ser Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ser Ser Phe Ser Ser Ser Ala Pro Phe
1 5 10 15

Leu Ala Ser Ala Val Ser Ala Gln Pro Pro Leu Pro Asp Gln Cys Pro
20 25 30
Ala Leu Cys Glu Cys Ser Glu Ala Ala Arg Thr Val Lys Cys Val Asn
35 40 45
Arg Asn Leu Thr Glu Val Pro Thr Asp Leu Pro Ala Tyr Val Arg Asn
50 55 60
Leu Phe Leu Thr Gly Asn Gln Leu Ala Val Leu Pro Ala Gly Ala Phe
65 70 75 80
Ala Arg Arg Pro Pro Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Asn Leu Ser Gly
85 90 95
Ser Arg Leu Asp Glu Val Arg Ala Gly Ala Phe Glu His Leu Pro Ser
100 105 110
Leu Arg Gln Leu Asp Leu Ser His Asn Pro Leu Ala Asp Leu Ser Pro
115 120 125
Phe Ala Phe Ser Gly Ser Asn Ala Ser Val Ser Ala Pro Ser Pro Leu
130 135 140
Val Glu Leu Ile Leu Asn His Ile Val Pro Pro Glu Asp Glu Arg Gln
145 150 155 160
Asn Arg Ser Phe Glu Gly Met Val Val Ala Ala Leu Leu Ala Gly Arg
165 170 175
Ala Leu Gln Gly Leu Arg Arg Leu Glu Leu Ala Ser Asn His Phe Leu
180 185 190
Tyr Leu Pro Arg Asp Val Leu Ala Gln Leu Pro Ser Leu Arg His Leu
195 200 205
Asp Leu Ser Asn Asn Ser Leu Val Ser Leu Thr Tyr Val Ser Phe Arg
210 215 220
Asn Leu Thr His Leu Glu Ser Leu His Leu Glu Asp Asn Ala Leu Lys
225 230 235 240
Val Leu His Asn Gly Thr Leu Ala Glu Leu Gln Gly Leu Pro His Ile
245 250 255
Arg Val Phe Leu Asp Asn Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys His Met Ala
260 265 270
Asp Met Val Thr Trp Leu Lys Glu Thr Glu Val Val Gln Gly Lys Asp
275 280 285
Arg Leu Thr Cys Ala Tyr Pro Glu Lys Met Arg Asn Arg Val Leu Leu
290 295 300
Glu Leu Asn Ser Ala Asp Leu Asp Cys Asp Pro Ile Leu Pro Pro Ser
305 310 315 320
Leu Gln Thr Ser

<210> 363
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (4)...(6)
<223> 重复0至10次
<400> 363
Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5
<210> 364
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 18H10
<400> 364
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Met Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
50 55 60
Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Ile Leu Gln Met Asn
65 70 75 80
Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu Tyr Thr
85 90 95
Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys
100 105 110
Pro
<210> 365
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hz18H10v1
<400> 365

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Met Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ser Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro
115

<210> 366
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v2
<400> 366

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Met Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ser Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Lys Pro
115

<210> 367
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v3
<400> 367

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Met Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ser Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro
115

<210> 368
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v4
<400> 368

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Met Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro
115

<210> 369
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v5
<400> 369
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Met Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro
115

<210> 370
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v6

<400> 370

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro
115

<210> 371

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hz18H10v7

<400> 371

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro

115

<210> 372
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v8
<400> 372

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ser Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro
115

<210> 373
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v9
<400> 373

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ser Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro
115

<210> 374
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v10
<400> 374

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Met Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ser Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro
115

<210> 375
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v11
<400> 375

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ser Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro
115

<210> 376
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v12
<400> 376

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro
115

<210> 377

<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v13
<400> 377

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Met Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro
115

<210> 378
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v14
<400> 378

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80

Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro
115

<210> 379
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v15
<400> 379

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro
115

<210> 380
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v16
<400> 380

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Thr Gly Ala Asn

20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro
115

<210> 381
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hz18H10v17
<400> 381
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Thr Gly Ala Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Gly Asn Tyr Val Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Leu
85 90 95
Tyr Thr Asp Asn Leu Gly Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Pro
115

<210> 382
<211> 389
<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 人类5T4构建体

<400> 382

Ser Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ser Ser Phe Ser Ser Ser Ala Pro Phe
1 5 10 15
Leu Ala Ser Ala Val Ser Ala Gln Pro Pro Leu Pro Asp Gln Cys Pro
20 25 30
Ala Leu Cys Glu Cys Ser Glu Ala Ala Arg Thr Val Lys Cys Val Asn
35 40 45
Arg Asn Leu Thr Glu Val Pro Thr Asp Leu Pro Ala Tyr Val Arg Asn
50 55 60
Leu Phe Leu Thr Gly Asn Gln Leu Ala Val Leu Pro Ala Gly Ala Phe
65 70 75 80
Ala Arg Arg Pro Pro Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Asn Leu Ser Gly
85 90 95
Ser Arg Leu Asp Glu Val Arg Ala Gly Ala Phe Glu His Leu Pro Ser
100 105 110
Leu Arg Gln Leu Asp Leu Ser His Asn Pro Leu Ala Asp Leu Ser Pro
115 120 125
Phe Ala Phe Ser Gly Ser Asn Ala Ser Val Ser Ala Pro Ser Pro Leu
130 135 140
Val Glu Leu Ile Leu Asn His Ile Val Pro Pro Glu Asp Glu Arg Gln
145 150 155 160
Asn Arg Ser Phe Glu Gly Met Val Val Ala Ala Leu Leu Ala Gly Arg
165 170 175
Ala Leu Gln Gly Leu Arg Arg Leu Glu Leu Ala Ser Asn His Phe Leu
180 185 190
Tyr Leu Pro Arg Asp Val Leu Ala Gln Leu Pro Ser Leu Arg His Leu
195 200 205
Asp Leu Ser Asn Asn Ser Leu Val Ser Leu Thr Tyr Val Ser Phe Arg
210 215 220
Asn Leu Thr His Leu Glu Ser Leu His Leu Glu Asp Asn Ala Leu Lys
225 230 235 240
Val Leu His Asn Gly Thr Leu Ala Glu Leu Gln Gly Leu Pro His Ile
245 250 255
Arg Val Phe Leu Asp Asn Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys His Met Ala
260 265 270
Asp Met Val Thr Trp Leu Lys Glu Thr Glu Val Val Gln Gly Lys Asp

275 280 285

Arg Leu Thr Cys Ala Tyr Pro Glu Lys Met Arg Asn Arg Val Leu Leu
290 295 300

Glu Leu Asn Ser Ala Asp Leu Asp Cys Asp Pro Ile Leu Pro Pro Ser
305 310 315 320

Leu Gln Thr Ser Tyr Val Phe Leu Gly Ile Val Leu Ala Leu Ile Gly
325 330 335

Ala Ile Phe Leu Leu Val Leu Tyr Leu Asn Arg Lys Gly Ile Lys Lys
340 345 350

Trp Met His Asn Ile Arg Asp Ala Cys Arg Asp His Met Glu Gly Tyr
355 360 365

His Tyr Arg Tyr Glu Ile Asn Ala Asp Pro Arg Leu Thr Asn Leu Ser
370 375 380

Ser Asn Ser Asp Val
385

<210> 383
<211> 395
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<220>
<223> 鼠类5T4构建体
<400> 383

Ser Ala Pro Ser Ser Ser Val Pro Ser Ser Ser Thr Ser Pro Ala Ala
1 5 10 15

Phe Leu Ala Ser Gly Ser Ala Gln Pro Pro Pro Ala Glu Arg Cys Pro
20 25 30

Ala Ala Cys Glu Cys Ser Glu Ala Ala Arg Thr Val Lys Cys Val Asn
35 40 45

Arg Asn Leu Leu Glu Val Pro Ala Asp Leu Pro Pro Tyr Val Arg Asn
50 55 60

Leu Phe Leu Thr Gly Asn Gln Met Thr Val Leu Pro Ala Gly Ala Phe
65 70 75 80

Ala Arg Gln Pro Pro Leu Ala Asp Leu Glu Ala Leu Asn Leu Ser Gly
85 90 95

Asn His Leu Lys Glu Val Cys Ala Gly Ala Phe Glu His Leu Pro Gly
100 105 110

Leu Arg Arg Leu Asp Leu Ser His Asn Pro Leu Thr Asn Leu Ser Ala
115 120 125

Phe Ala Phe Ala Gly Ser Asn Ala Ser Val Ser Ala Pro Ser Pro Leu

130 135 140

Glu Glu Leu Ile Leu Asn His Ile Val Pro Pro Glu Asp Gln Arg Gln
145 150 155 160
Asn Gly Ser Phe Glu Gly Met Val Ala Phe Glu Gly Met Val Ala Ala
165 170 175
Ala Leu Arg Ser Gly Leu Ala Leu Arg Gly Leu Thr Arg Leu Glu Leu
180 185 190
Ala Ser Asn His Phe Leu Phe Leu Pro Arg Asp Leu Leu Ala Gln Leu
195 200 205
Pro Ser Leu Arg Tyr Leu Asp Leu Arg Asn Asn Ser Leu Val Ser Leu
210 215 220
Thr Tyr Ala Ser Phe Arg Asn Leu Thr His Leu Glu Ser Leu His Leu
225 230 235 240
Glu Asp Asn Ala Leu Lys Val Leu His Asn Ser Thr Leu Ala Glu Trp
245 250 255
His Gly Leu Ala His Val Lys Val Phe Leu Asp Asn Asn Pro Trp Val
260 265 270
Cys Asp Cys Tyr Met Ala Asp Met Val Ala Trp Leu Lys Glu Thr Glu
275 280 285
Val Val Pro Asp Lys Ala Arg Leu Thr Cys Ala Phe Pro Glu Lys Met
290 295 300
Arg Asn Arg Gly Leu Leu Asp Leu Asn Ser Ser Asp Leu Asp Cys Asp
305 310 315 320
Ala Val Leu Pro Gln Ser Leu Gln Thr Ser Tyr Val Phe Leu Gly Ile
325 330 335
Val Leu Ala Leu Ile Gly Ala Ile Phe Leu Leu Val Leu Tyr Leu Asn
340 345 350
Arg Lys Gly Ile Lys Lys Trp Met His Asn Ile Arg Asp Ala Cys Arg
355 360 365
Asp His Met Glu Gly Tyr His Tyr Arg Tyr Glu Ile Asn Ala Asp Pro
370 375 380
Arg Leu Thr Asn Leu Ser Ser Asn Ser Asp Val
385 390 395

<210> 384
<211> 389
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hmc5T4.1

<400> 384

Ser Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ser Ser Phe Ser Ser Ser Ala Pro Phe
1 5 10 15
Leu Ala Ser Ala Val Ser Ala Gln Pro Pro Leu Pro Asp Gln Cys Pro
20 25 30
Ala Leu Cys Glu Cys Ser Glu Ala Ala Arg Thr Val Lys Cys Val Asn
35 40 45
Arg Asn Leu Thr Glu Val Pro Thr Asp Leu Pro Ala Tyr Val Arg Asn
50 55 60
Leu Phe Leu Thr Gly Asn Gln Leu Ala Val Leu Pro Ala Gly Ala Phe
65 70 75 80
Ala Arg Arg Pro Pro Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Asn Leu Ser Gly
85 90 95
Ser Arg Leu Asp Glu Val Arg Ala Gly Ala Phe Glu His Leu Pro Ser
100 105 110
Leu Arg Gln Leu Asp Leu Ser His Asn Pro Leu Ala Asp Leu Ser Pro
115 120 125
Phe Ala Phe Ser Gly Ser Asn Ala Ser Val Ser Ala Pro Ser Pro Leu
130 135 140
Val Glu Leu Ile Leu Asn His Ile Val Pro Pro Glu Asp Glu Arg Gln
145 150 155 160
Asn Arg Ser Phe Glu Gly Met Val Val Ala Ala Leu Leu Ser Gly Leu
165 170 175
Ala Leu Arg Gly Leu Thr Arg Leu Glu Leu Ala Ser Asn His Phe Leu
180 185 190
Phe Leu Pro Arg Asp Leu Leu Ala Gln Leu Pro Ser Leu Arg Tyr Leu
195 200 205
Asp Leu Arg Asn Asn Ser Leu Val Ser Leu Thr Tyr Ala Ser Phe Arg
210 215 220
Asn Leu Thr His Leu Glu Ser Leu His Leu Glu Asp Asn Ala Leu Lys
225 230 235 240
Val Leu His Asn Ser Thr Leu Ala Glu Trp His Gly Leu Ala His Val
245 250 255
Lys Val Phe Leu Asp Asn Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys Tyr Met Ala
260 265 270
Asp Met Val Ala Trp Leu Lys Glu Thr Glu Val Val Pro Asp Lys Ala
275 280 285
Arg Leu Thr Cys Ala Phe Pro Glu Lys Met Arg Asn Arg Gly Leu Leu
290 295 300

Asp Leu Asn Ser Ser Asp Leu Asp Cys Asp Ala Val Leu Pro Gln Ser
305 310 315 320
Leu Gln Thr Ser Tyr Val Phe Leu Gly Ile Val Leu Ala Leu Ile Gly
325 330 335
Ala Ile Phe Leu Leu Val Leu Tyr Leu Asn Arg Lys Gly Ile Lys Lys
340 345 350
Trp Met His Asn Ile Arg Asp Ala Cys Arg Asp His Met Glu Gly Tyr
355 360 365
His Tyr Arg Tyr Glu Ile Asn Ala Asp Pro Arg Leu Thr Asn Leu Ser
370 375 380
Ser Asn Ser Asp Val
385

<210> 385
<211> 389
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hmc5T4.2
<400> 385

Ser Ala Pro Ser Ser Ser Val Pro Ser Ser Ser Thr Ser Pro Ala Ala
1 5 10 15
Phe Leu Ala Ser Gly Ser Ala Gln Pro Pro Pro Ala Glu Arg Cys Pro
20 25 30
Ala Ala Cys Glu Cys Ser Glu Ala Ala Arg Thr Val Lys Cys Val Asn
35 40 45
Arg Asn Leu Leu Glu Val Pro Ala Asp Leu Pro Pro Tyr Val Arg Asn
50 55 60
Leu Phe Leu Thr Gly Asn Gln Met Thr Val Leu Pro Ala Gly Ala Phe
65 70 75 80
Ala Arg Gln Pro Pro Leu Ala Asp Leu Glu Ala Leu Asn Leu Ser Gly
85 90 95
Asn His Leu Lys Glu Val Cys Ala Gly Ala Phe Glu His Leu Pro Ser
100 105 110
Leu Arg Gln Leu Asp Leu Ser His Asn Pro Leu Ala Asp Leu Ser Pro
115 120 125
Phe Ala Phe Ser Gly Ser Asn Ala Ser Val Ser Ala Pro Ser Pro Leu
130 135 140
Val Glu Leu Ile Leu Asn His Ile Val Pro Pro Glu Asp Glu Arg Gln
145 150 155 160

Asn Arg Ser Phe Glu Gly Met Val Val Ala Ala Leu Leu Ala Gly Arg
165 170 175
Ala Leu Gln Gly Leu Arg Arg Leu Glu Leu Ala Ser Asn His Phe Leu
180 185 190
Tyr Leu Pro Arg Asp Val Leu Ala Gln Leu Pro Ser Leu Arg His Leu
195 200 205
Asp Leu Ser Asn Asn Ser Leu Val Ser Leu Thr Tyr Val Ser Phe Arg
210 215 220
Asn Leu Thr His Leu Glu Ser Leu His Leu Glu Asp Asn Ala Leu Lys
225 230 235 240
Val Leu His Asn Ser Thr Leu Ala Glu Trp His Gly Leu Ala His Val
245 250 255
Lys Val Phe Leu Asp Asn Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys Tyr Met Ala
260 265 270
Asp Met Val Ala Trp Leu Lys Glu Thr Glu Val Val Pro Asp Lys Ala
275 280 285
Arg Leu Thr Cys Ala Phe Pro Glu Lys Met Arg Asn Arg Gly Leu Leu
290 295 300
Asp Leu Asn Ser Ser Asp Leu Asp Cys Asp Ala Val Leu Pro Gln Ser
305 310 315 320
Leu Gln Thr Ser Tyr Val Phe Leu Gly Ile Val Leu Ala Leu Ile Gly
325 330 335
Ala Ile Phe Leu Leu Val Leu Tyr Leu Asn Arg Lys Gly Ile Lys Lys
340 345 350
Trp Met His Asn Ile Arg Asp Ala Cys Arg Asp His Met Glu Gly Tyr
355 360 365
His Tyr Arg Tyr Glu Ile Asn Ala Asp Pro Arg Leu Thr Asn Leu Ser
370 375 380
Ser Asn Ser Asp Val
385

<210> 386
<211> 395
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hmc5T4.3
<400> 386

Ser Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ser Ser Phe Ser Ser Ser Ala Pro Phe
1 5 10 15

Leu Ala Ser Ala Val Ser Ala Gln Pro Pro Leu Pro Asp Gln Cys Pro
20 25 30
Ala Leu Cys Glu Cys Ser Glu Ala Ala Arg Thr Val Lys Cys Val Asn
35 40 45
Arg Asn Leu Thr Glu Val Pro Thr Asp Leu Pro Ala Tyr Val Arg Asn
50 55 60
Leu Phe Leu Thr Gly Asn Gln Met Thr Val Leu Pro Ala Gly Ala Phe
65 70 75 80
Ala Arg Gln Pro Pro Leu Ala Asp Leu Glu Ala Leu Asn Leu Ser Gly
85 90 95
Asn His Leu Lys Glu Val Cys Ala Gly Ala Phe Glu His Leu Pro Gly
100 105 110
Leu Arg Arg Leu Asp Leu Ser His Asn Pro Leu Thr Asn Leu Ser Ala
115 120 125
Phe Ala Phe Ala Gly Ser Asn Ala Ser Val Ser Ala Pro Ser Pro Leu
130 135 140
Glu Glu Leu Ile Leu Asn His Ile Val Pro Pro Glu Asp Gln Arg Gln
145 150 155 160
Asn Gly Ser Phe Glu Gly Met Val Ala Phe Glu Gly Met Val Ala Ala
165 170 175
Ala Leu Arg Ser Gly Leu Ala Leu Arg Gly Leu Thr Arg Leu Glu Leu
180 185 190
Ala Ser Asn His Phe Leu Phe Leu Pro Arg Asp Leu Leu Ala Gln Leu
195 200 205
Pro Ser Leu Arg Tyr Leu Asp Leu Arg Asn Asn Ser Leu Val Ser Leu
210 215 220
Thr Tyr Ala Ser Phe Arg Asn Leu Thr His Leu Glu Ser Leu His Leu
225 230 235 240
Glu Asp Asn Ala Leu Lys Val Leu His Asn Ser Thr Leu Ala Glu Trp
245 250 255
His Gly Leu Ala His Val Lys Val Phe Leu Asp Asn Asn Pro Trp Val
260 265 270
Cys Asp Cys Tyr Met Ala Asp Met Val Ala Trp Leu Lys Glu Thr Glu
275 280 285
Val Val Pro Asp Lys Ala Arg Leu Thr Cys Ala Phe Pro Glu Lys Met
290 295 300
Arg Asn Arg Gly Leu Leu Asp Leu Asn Ser Ser Asp Leu Asp Cys Asp
305 310 315 320
Ala Val Leu Pro Gln Ser Leu Gln Thr Ser Tyr Val Phe Leu Gly Ile

325 330 335
Val Leu Ala Leu Ile Gly Ala Ile Phe Leu Leu Val Leu Tyr Leu Asn
340 345 350
Arg Lys Gly Ile Lys Lys Trp Met His Asn Ile Arg Asp Ala Cys Arg
355 360 365
Asp His Met Glu Gly Tyr His Tyr Arg Tyr Glu Ile Asn Ala Asp Pro
370 375 380
Arg Leu Thr Asn Leu Ser Ser Asn Ser Asp Val
385 390 395

<210> 387
<211> 395
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hmc5T4.4
<400> 387

Ser Ala Pro Ser Ser Ser Val Pro Ser Ser Ser Thr Ser Pro Ala Ala
1 5 10 15
Phe Leu Ala Ser Gly Ser Ala Gln Pro Pro Pro Ala Glu Arg Cys Pro
20 25 30
Ala Ala Cys Glu Cys Ser Glu Ala Ala Arg Thr Val Lys Cys Val Asn
35 40 45
Arg Asn Leu Leu Glu Val Pro Ala Asp Leu Pro Pro Tyr Val Arg Asn
50 55 60
Leu Phe Leu Thr Gly Asn Gln Met Thr Val Leu Pro Ala Gly Ala Phe
65 70 75 80
Ala Arg Gln Pro Pro Leu Ala Asp Leu Glu Ala Leu Asn Leu Ser Gly
85 90 95
Asn His Leu Lys Glu Val Cys Ala Gly Ala Phe Glu His Leu Pro Gly
100 105 110
Leu Arg Arg Leu Asp Leu Ser His Asn Pro Leu Thr Asn Leu Ser Ala
115 120 125
Phe Ala Phe Ala Gly Ser Asn Ala Ser Val Ser Ala Pro Ser Pro Leu
130 135 140
Glu Glu Leu Ile Leu Asn His Ile Val Pro Pro Glu Asp Gln Arg Gln
145 150 155 160
Asn Gly Ser Phe Glu Gly Met Val Ala Phe Glu Gly Met Val Ala Ala
165 170 175
Ala Leu Arg Ser Gly Leu Ala Leu Arg Gly Leu Thr Arg Leu Glu Leu

180 185 190

Ala Ser Asn His Phe Leu Phe Leu Pro Arg Asp Leu Leu Ala Gln Leu

195 200 205

Pro Ser Leu Arg Tyr Leu Asp Leu Arg Asn Asn Ser Leu Val Ser Leu

210 215 220

Thr Tyr Ala Ser Phe Arg Asn Leu Thr His Leu Glu Ser Leu His Leu

225 230 235 240

Glu Asp Asn Ala Leu Lys Val Leu His Asn Ser Thr Leu Ala Glu Trp

245 250 255

His Gly Leu Ala His Val Lys Val Phe Leu Asp Asn Asn Pro Trp Val

260 265 270

Cys Asp Cys Tyr Met Ala Asp Met Val Thr Trp Leu Lys Glu Thr Glu

275 280 285

Val Val Gln Gly Lys Asp Arg Leu Thr Cys Ala Tyr Pro Glu Lys Met

290 295 300

Arg Asn Arg Val Leu Leu Glu Leu Asn Ser Ala Asp Leu Asp Cys Asp

305 310 315 320

Pro Ile Leu Pro Pro Ser Leu Gln Thr Ser Tyr Val Phe Leu Gly Ile

325 330 335

Val Leu Ala Leu Ile Gly Ala Ile Phe Leu Leu Val Leu Tyr Leu Asn

340 345 350

Arg Lys Gly Ile Lys Lys Trp Met His Asn Ile Arg Asp Ala Cys Arg

355 360 365

Asp His Met Glu Gly Tyr His Tyr Arg Tyr Glu Ile Asn Ala Asp Pro

370 375 380

Arg Leu Thr Asn Leu Ser Ser Asn Ser Asp Val

385 390 395

<210> 388

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH 312557

<400> 388

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 389
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VH 312557 G44C
<400> 389

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 390
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 抗CD3 VL 312557
<400> 390
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 391
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VL 312557 Q100C
<400> 391
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 392
<211> 124

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CD3-VH-G
<400> 392

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Leu Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 393
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CD3-VH-G
<400> 393

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Leu Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 394
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VK1-39Jκ5
<400> 394
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 395
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VK1-39Jκ5 Q100C
<400> 395
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Cys Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 396
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1)...(5)
<223> 重复2至20次
<400> 396
Ala Asp Ala Ala Pro
1 5

<210> 397
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1)...(5)
<223> 重复2至20次
<400> 397
Ala Asp Ala Ala Pro Gly
1 5

<210> 398
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1)...(5)
<223> 重复2至20次
<400> 398
Gly Glu Pro Gln Gly
1 5
<210> 399
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1)...(5)
<223> 重复2至20次
<400> 399
Gly Glu Pro Gln Gly Gly
1 5
<210> 400
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1)...(5)
<223> 重复2至20次
<400> 400
Ala Gly Gly Glu Pro
1 5
<210> 401
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1)...(5)
<223> 重复2至20次
<400> 401
Ala Gly Gly Glu Pro Gly
1 5
<210> 402
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1)...(5)
<223> 重复2至20次
<400> 402
Ala Gly Ser Glu Pro
1 5
<210> 403
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1)...(5)
<223> 重复2至20次
<400> 403
Ala Gly Ser Glu Pro Gly
1 5
<210> 404
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1)...(5)
<223> 重复2至20次
<400> 404
Gly Gly Gly Glu Gln
1 5
<210> 405
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1)...(5)
<223> 重复2至20次
<400> 405
Gly Gly Gly Glu Gln Gly
1 5
<210> 406
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 406
Ala Asp Ala Ala Pro Ala Asp Ala Ala Pro Gly
1 5 10
<210> 407
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 407
Gly Glu Pro Gln Gly Gly Glu Pro Gln Gly Gly
1 5 10

<210> 408
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 408
Ala Gly Gly Glu Pro Ala Gly Gly Glu Pro Gly
1 5 10
<210> 409
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 409
Ala Gly Ser Glu Pro Ala Gly Ser Glu Pro Gly
1 5 10
<210> 410
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 410
Gly Gly Gly Glu Gln Gly Gly Gly Glu Gln Gly
1 5 10
<210> 411
<211> 53
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<223> 人类5T4 ECD的氨基酸60至112
<400> 411
Ala Tyr Val Arg Asn Leu Phe Leu Thr Gly Asn Gln Leu Ala Val Leu
1 5 10 15
Pro Ala Gly Ala Phe Ala Arg Arg Pro Pro Leu Ala Glu Leu Ala Ala
20 25 30
Leu Asn Leu Ser Gly Ser Arg Leu Asp Glu Val Arg Ala Gly Ala Phe

35 40 45

Glu His Leu Pro Ser
50

<210> 412
<211> 52
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<223> 人类5T4 ECD的氨基酸173至224
<400> 412

Leu Ala Gly Arg Ala Leu Gln Gly Leu Arg Arg Leu Glu Leu Ala Ser
1 5 10 15
Asn His Phe Leu Tyr Leu Pro Arg Asp Val Leu Ala Gln Leu Pro Ser
20 25 30
Leu Arg His Leu Asp Leu Ser Asn Asn Ser Leu Val Ser Leu Thr Tyr
35 40 45
Val Ser Phe Arg
50

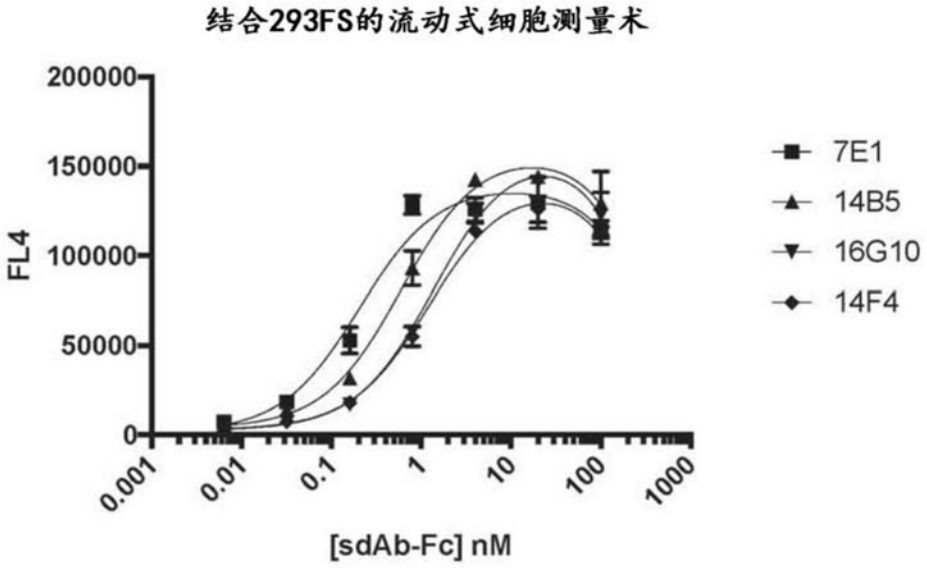

结合293FS的流动式细胞测量术
200000
150000
100000
50000
0
FL4
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[sdAb-Fc] nM
7E1
14B5
16G10
14F4

FIG.1A

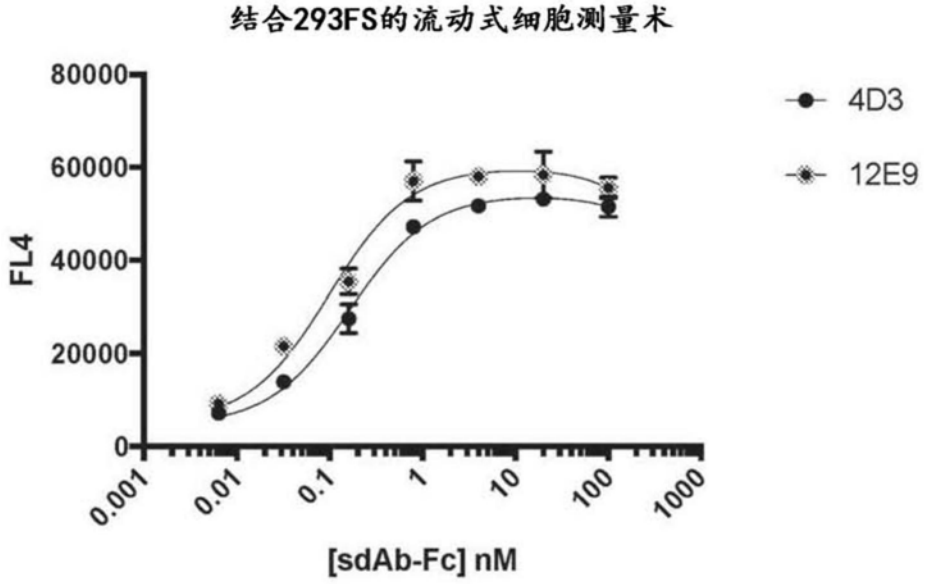

结合293FS的流动式细胞测量术
80000
60000
40000
20000
0
FL4
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[sdAb-Fc] nM
4D3
12E9

FIG.1B

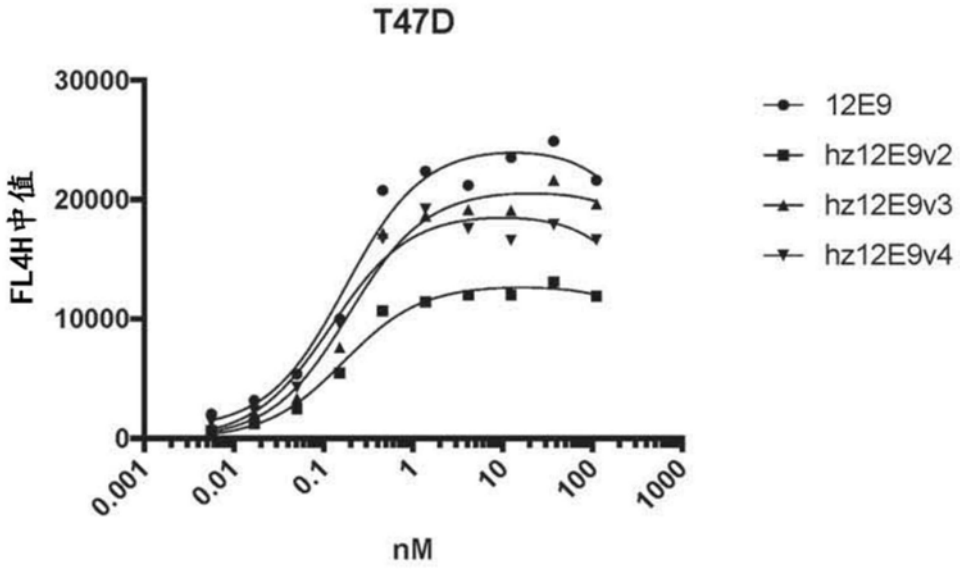

T47D
30000
20000
10000
0
FL4H中值
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM
12E9
hz12E9v2
hz12E9v3
hz12E9v4

FIG.2A

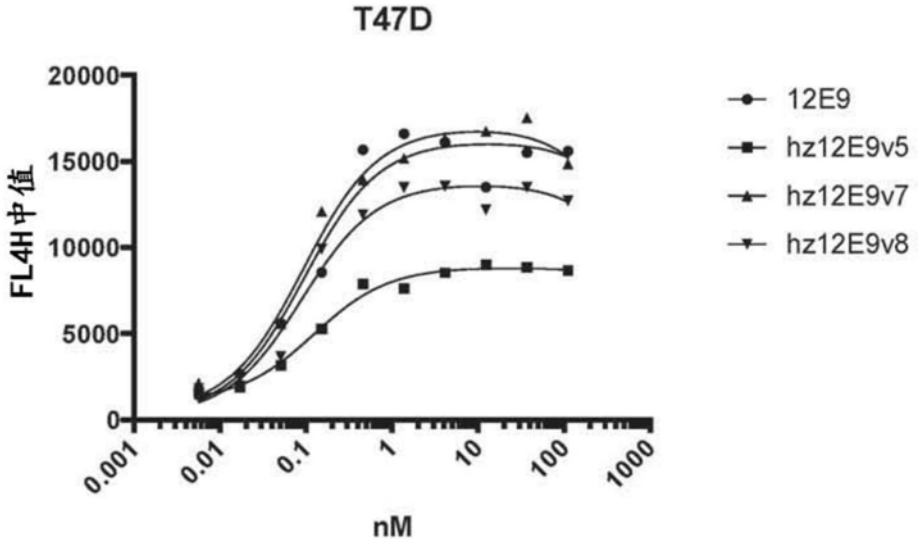

T47D
20000
15000
10000
5000
0
FL4H中值
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM
12E9
hz12E9v5
hz12E9v7
hz12E9v8

FIG.2B

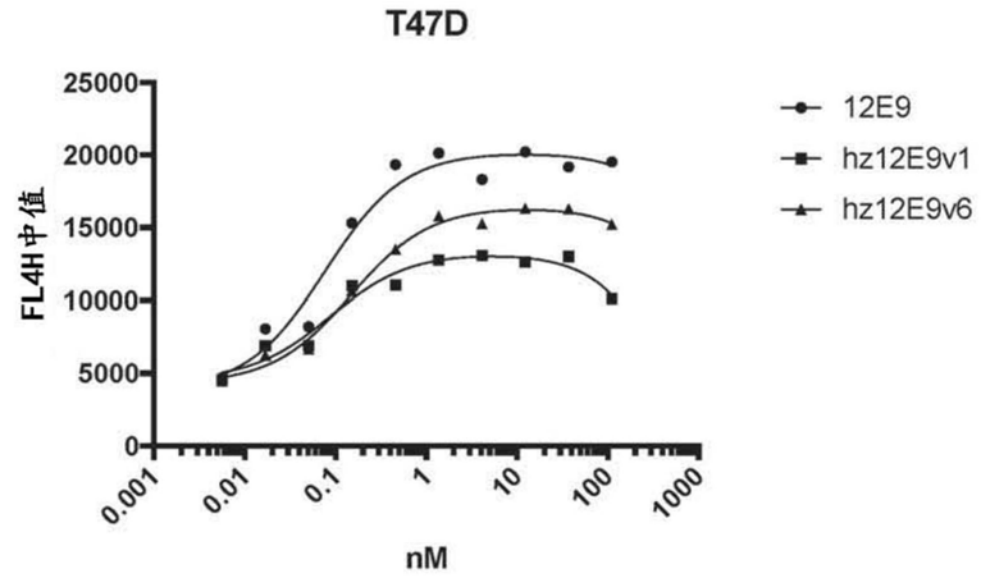

T47D
FL4H中值
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM
12E9
hz12E9v1
hz12E9v6

FIG.2C

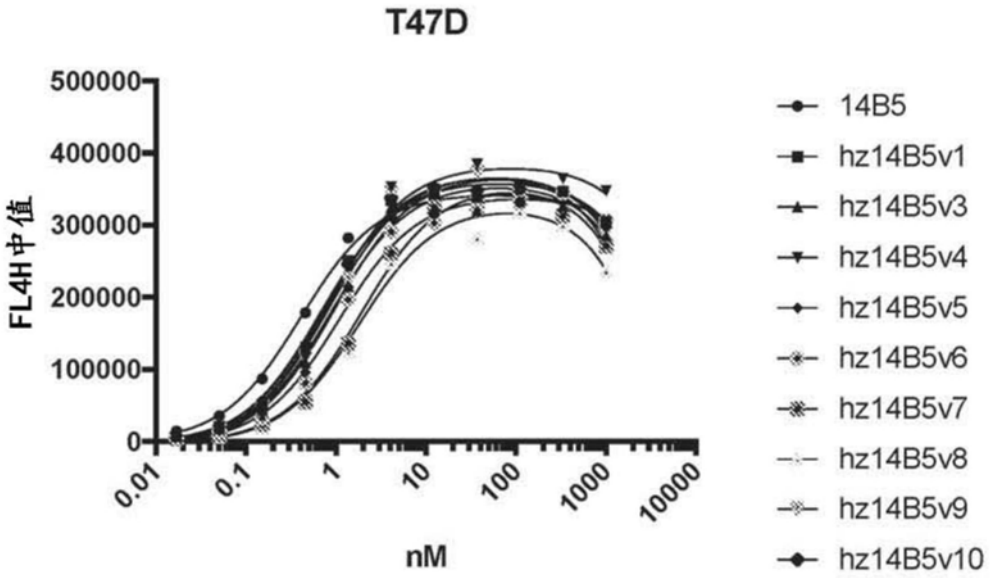

T47D
FL4H中值
500000
400000
300000
200000
100000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
nM
14B5
hz14B5v1
hz14B5v3
hz14B5v4
hz14B5v5
hz14B5v6
hz14B5v7
hz14B5v8
hz14B5v9
hz14B5v10

FIG.2D

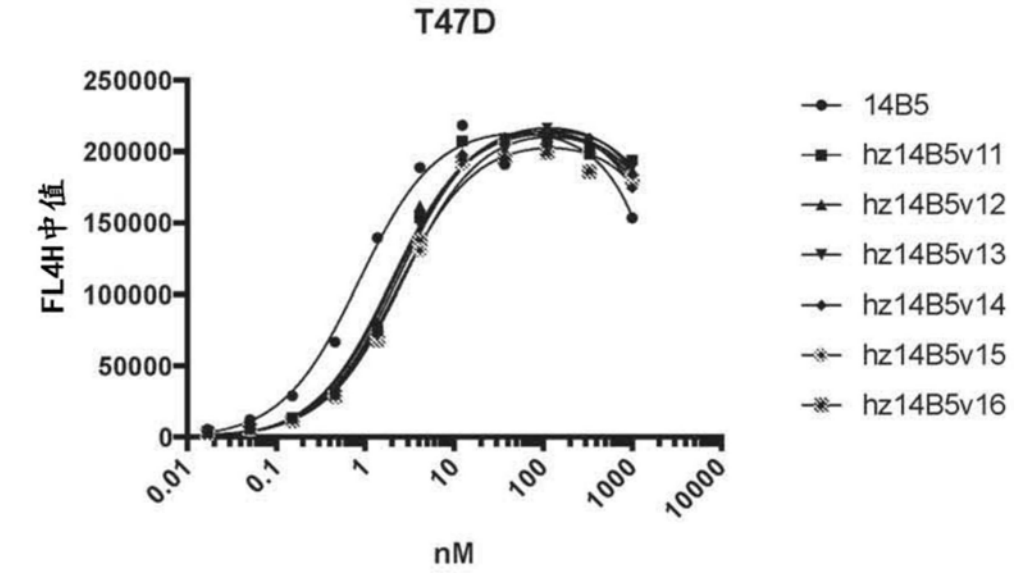

T47D
FL4H中值
250000
200000
150000
100000
50000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
nM
14B5
hz14B5v11
hz14B5v12
hz14B5v13
hz14B5v14
hz14B5v15
hz14B5v16

FIG.2E

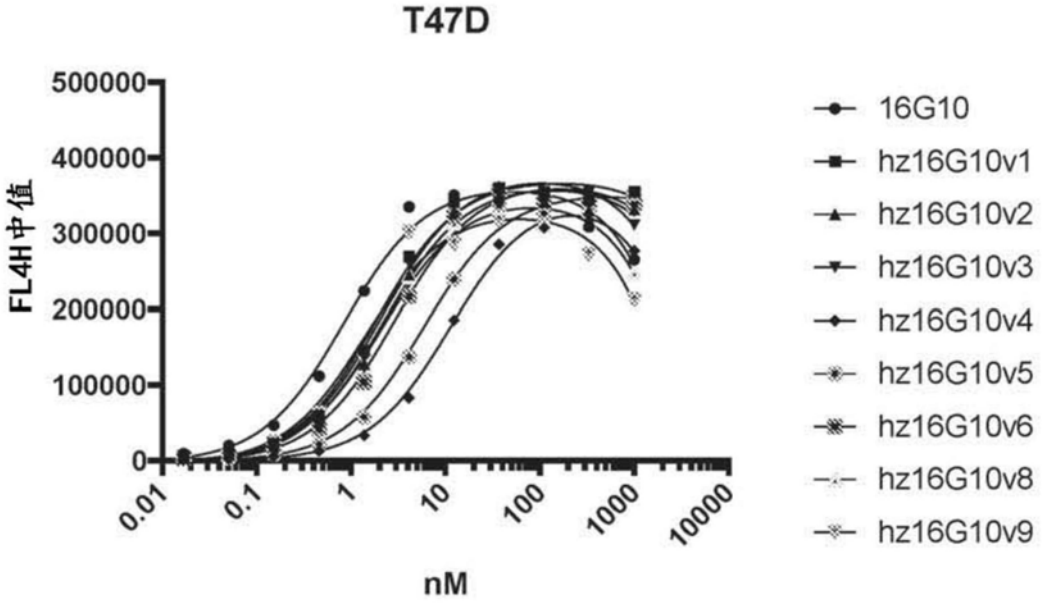

T47D
FL4H中值
500000
400000
300000
200000
100000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
nM
16G10
hz16G10v1
hz16G10v2
hz16G10v3
hz16G10v4
hz16G10v5
hz16G10v6
hz16G10v8
hz16G10v9

FIG.2F

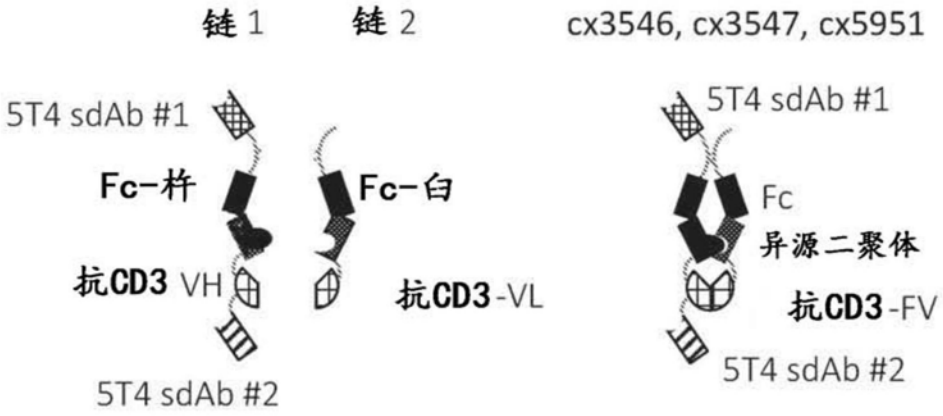

链 1
链 2
cx3546, cx3547, cx5951
5T4 sdAb #1
Fc-杵
抗CD3 VH
5T4 sdAb #2
Fc-白
抗CD3-VL
5T4 sdAb #1
Fc
异源二聚体
抗CD3-FV
5T4 sdAb #2

FIG.3A

链 1
链 2
cx3499, cx3497, cx5185
5T4 sdAb #1
Fc-杵
抗CD3 VH
5T4 sdAb #2
Fc-白
抗CD3-VL
41BB sdAb
5T4 sdAb #1
Fc
异源二聚体
抗CD3-FV
5T4 sdAb #2
41BB sdAb

FIG.3B

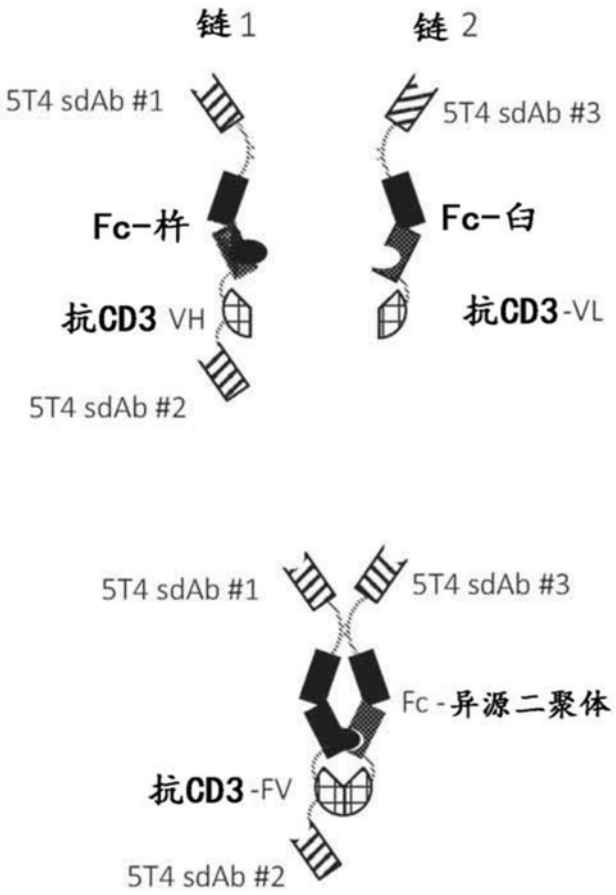

链 1
链 2
5T4 sdAb #1
5T4 sdAb #3
Fc-杵
Fc-臼
抗CD3 VH
抗CD3-VL
5T4 sdAb #2
5T4 sdAb #1
5T4 sdAb #3
Fc-异源二聚体
抗CD3-FV
5T4 sdAb #2

FIG.3C

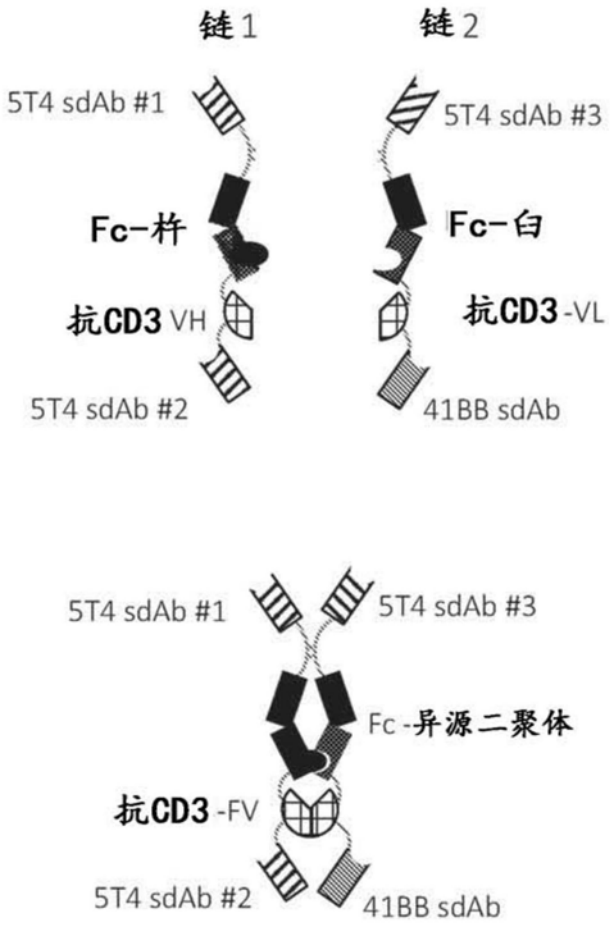

链1
链2
5T4 sdAb #1
5T4 sdAb #3
Fc-杵
Fc-臼
抗CD3 VH
抗CD3 -VL
5T4 sdAb #2
41BB sdAb
5T4 sdAb #1
5T4 sdAb #3
Fc -异源二聚体
抗CD3 -FV
5T4 sdAb #2
41BB sdAb

FIG.3D

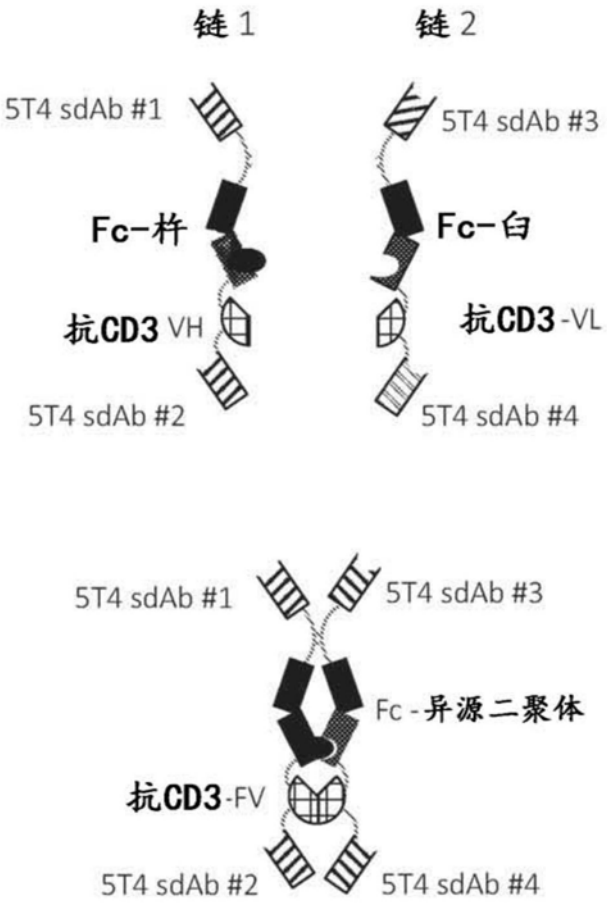

链 1
链 2
5T4 sdAb #1
5T4 sdAb #3
Fc-杵
Fc-白
抗CD3 VH
抗CD3-VL
5T4 sdAb #2
5T4 sdAb #4
5T4 sdAb #1
5T4 sdAb #3
Fc -异源二聚体
抗CD3-FV
5T4 sdAb #2
5T4 sdAb #4

FIG.3E

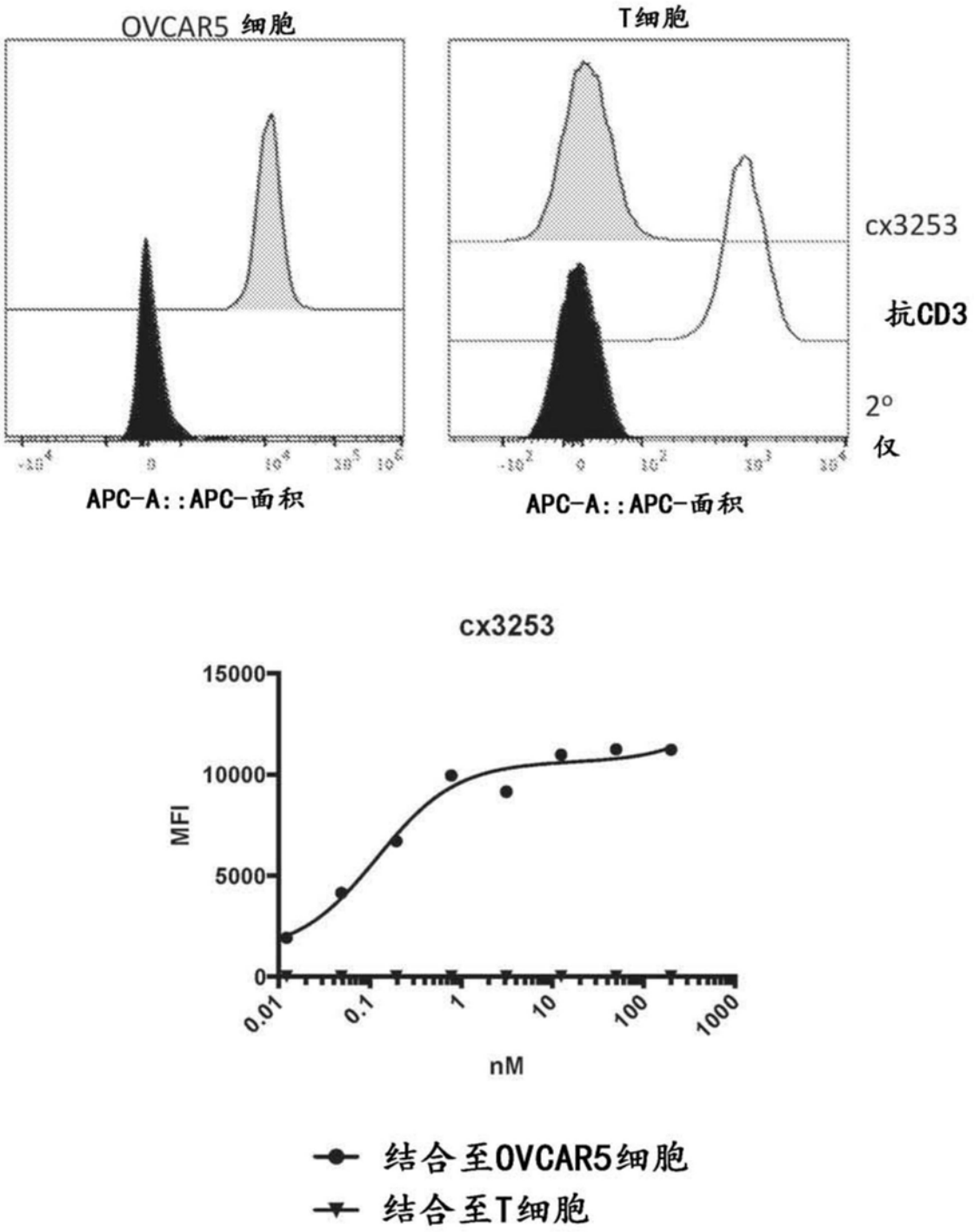

OVCAR5 细胞
T细胞
cx3253
抗CD3
2°仅
APC-A::APC-面积
APC-A::APC-面积
cx3253
MFI
15000
10000
5000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM
结合至OVCAR5细胞
结合至T细胞

FIG.4A

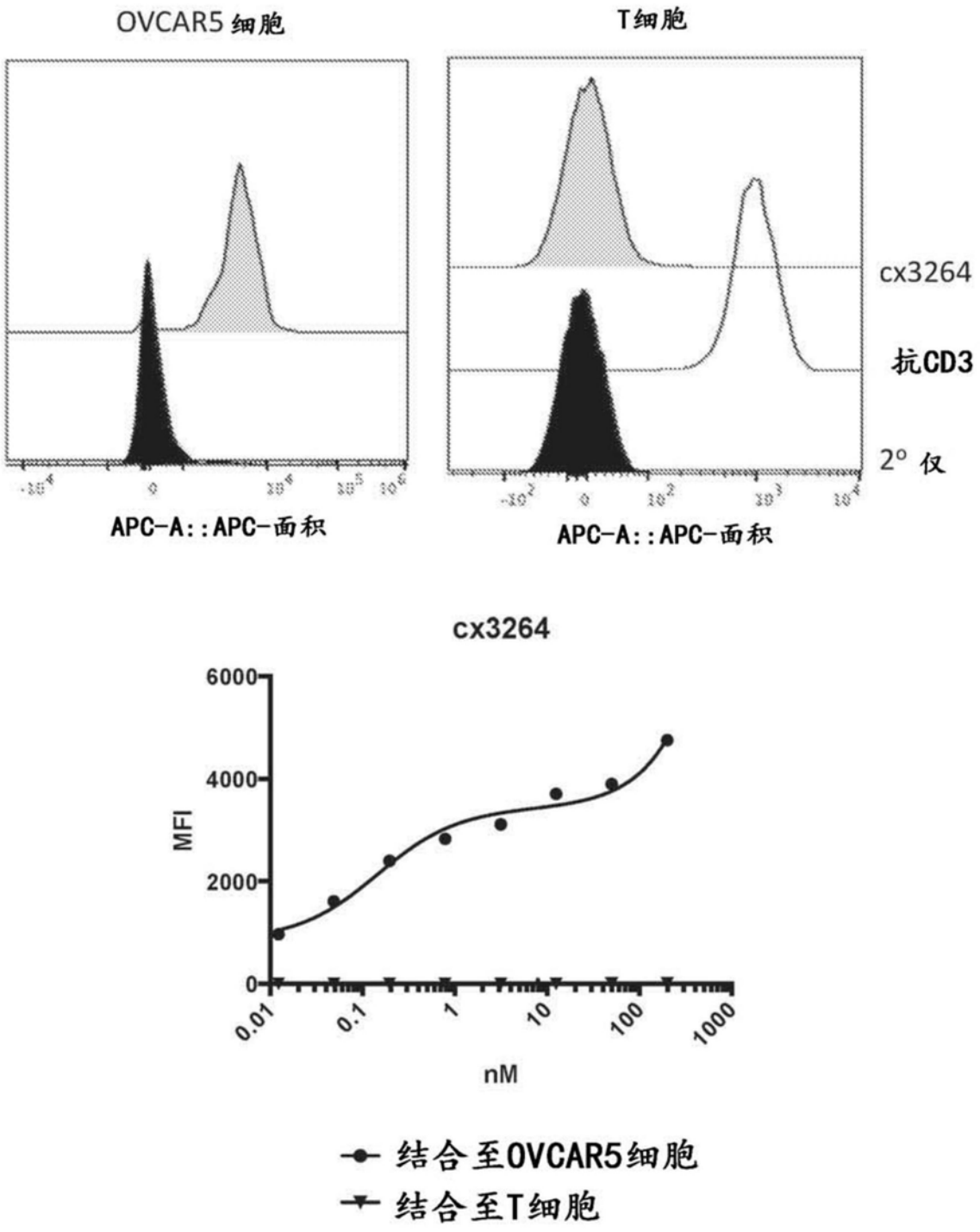

OVCAR5 细胞
T细胞
cx3264
抗CD3
2° 仅
APC-A::APC-面积
APC-A::APC-面积
cx3264
6000
4000
2000
0
MFI
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM
结合至OVCAR5细胞
结合至T细胞

FIG.4B

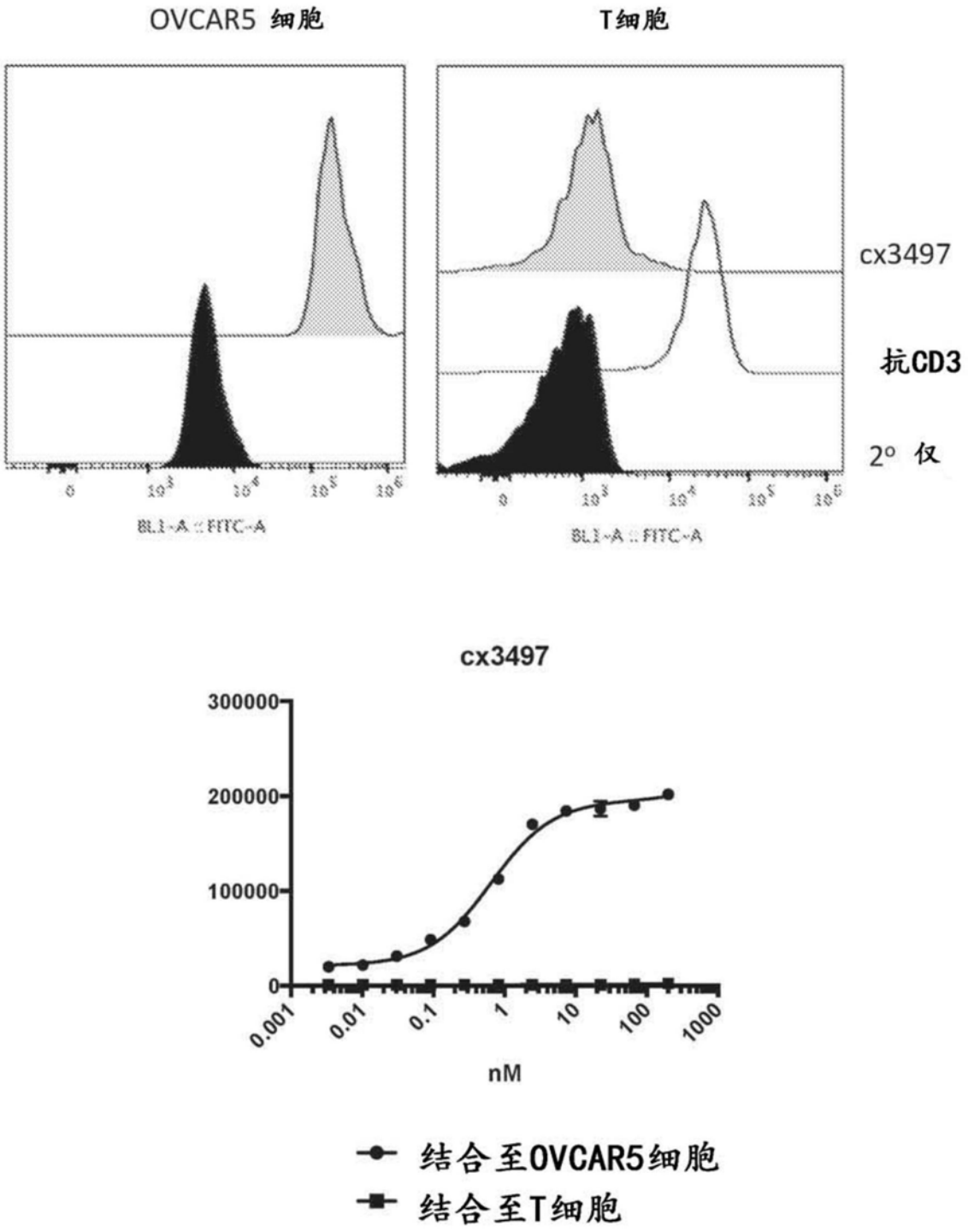

OVCAR5 细胞
T细胞
cx3497
抗CD3
2° 仅
BL1-A :: FITC-A
BL1-A :: FITC-A
cx3497
300000
200000
100000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM
结合至OVCAR5细胞
结合至T细胞

FIG.4C

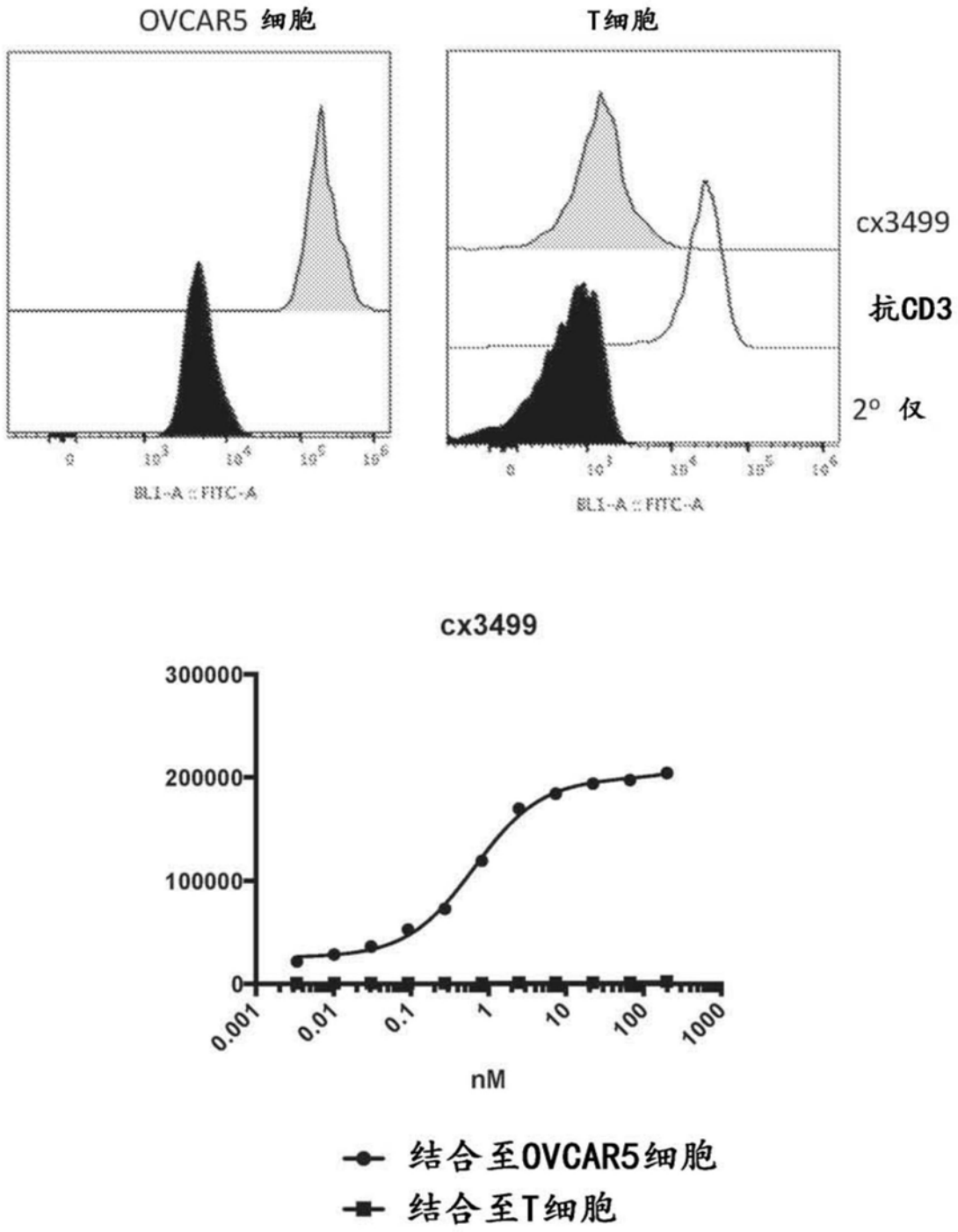

OVCAR5 细胞
T细胞
cx3499
抗CD3
2° 仅
BL1-A :: FITC-A
BL1-A :: FITC-A
cx3499
300000
200000
100000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM
结合至OVCAR5细胞
结合至T细胞

FIG.4D

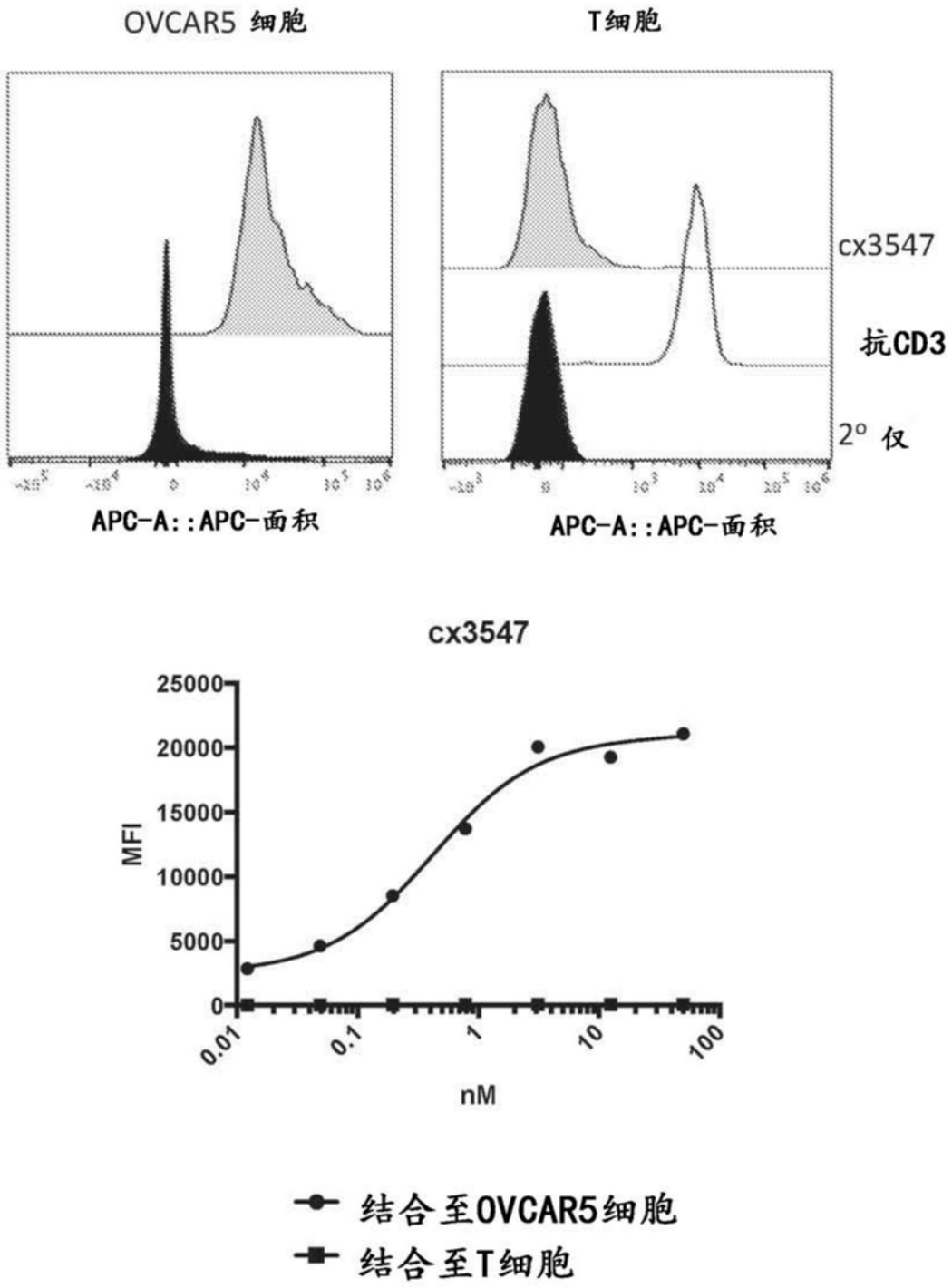

OVCAR5 细胞
T细胞
cx3547
抗CD3
2° 仅
APC-A::APC-面积
APC-A::APC-面积
cx3547
MFI
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.01
0.1
1
10
100
nM
结合至OVCAR5细胞
结合至T细胞

FIG.4E

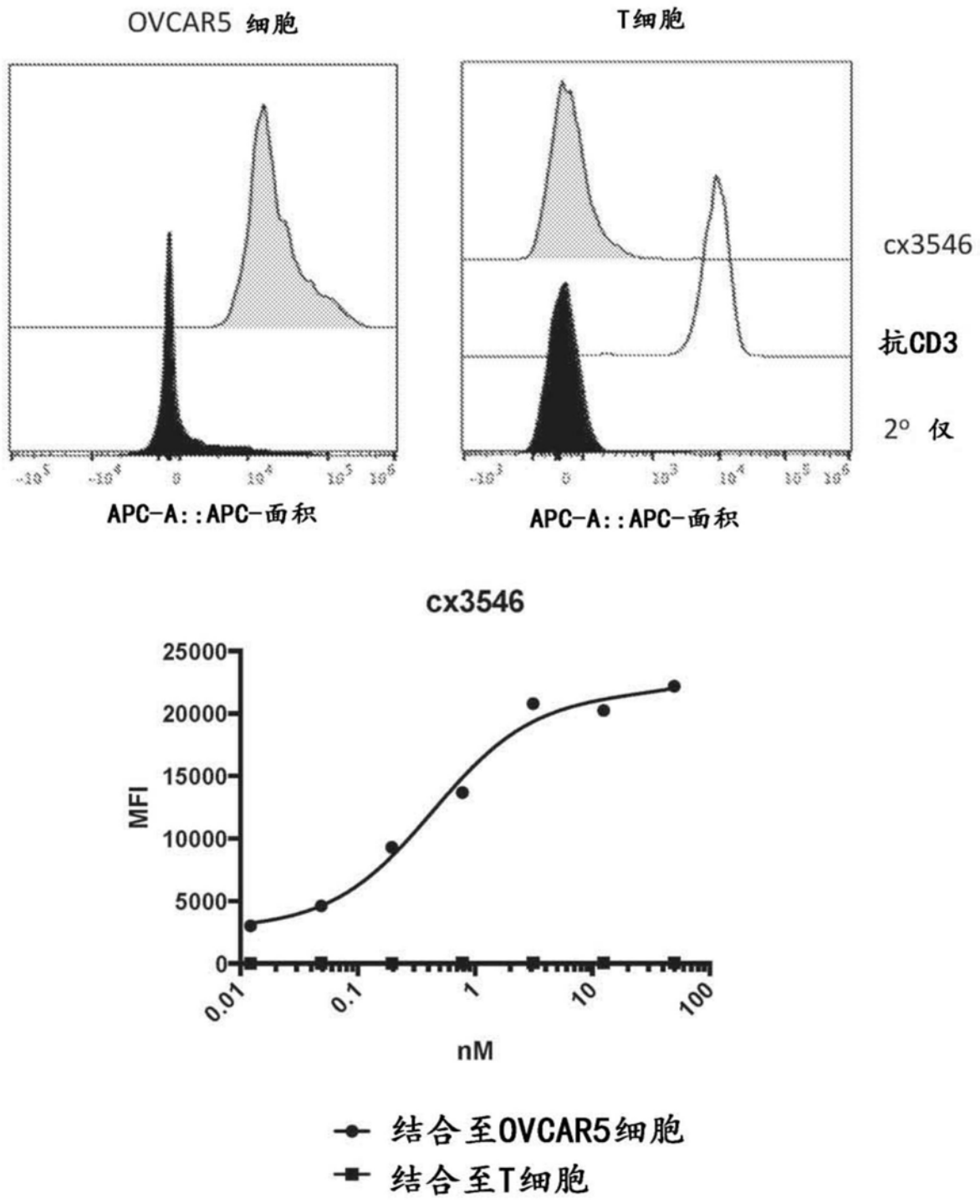

OVCAR5 细胞
T细胞
cx3546
抗CD3
2° 仅
APC-A::APC-面积
APC-A::APC-面积
cx3546
MFI
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.01
0.1
1
10
100
nM
结合至OVCAR5细胞
结合至T细胞

FIG.4F

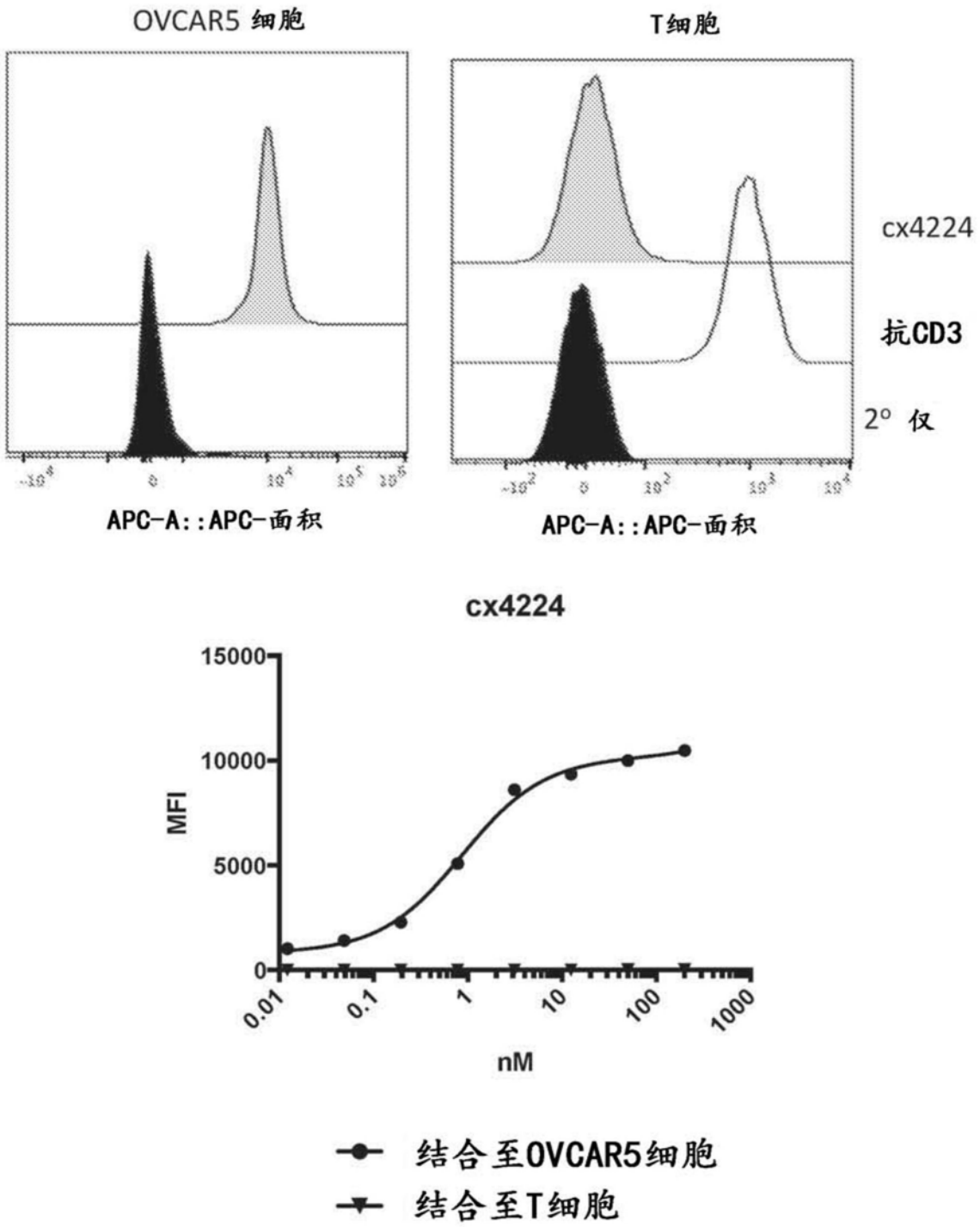

OVCAR5 细胞
T细胞
cx4224
抗CD3
2° 仅
APC-A::APC-面积
APC-A::APC-面积
cx4224
15000
10000
5000
0
MFI
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM
结合至OVCAR5细胞
结合至T细胞

FIG.4G

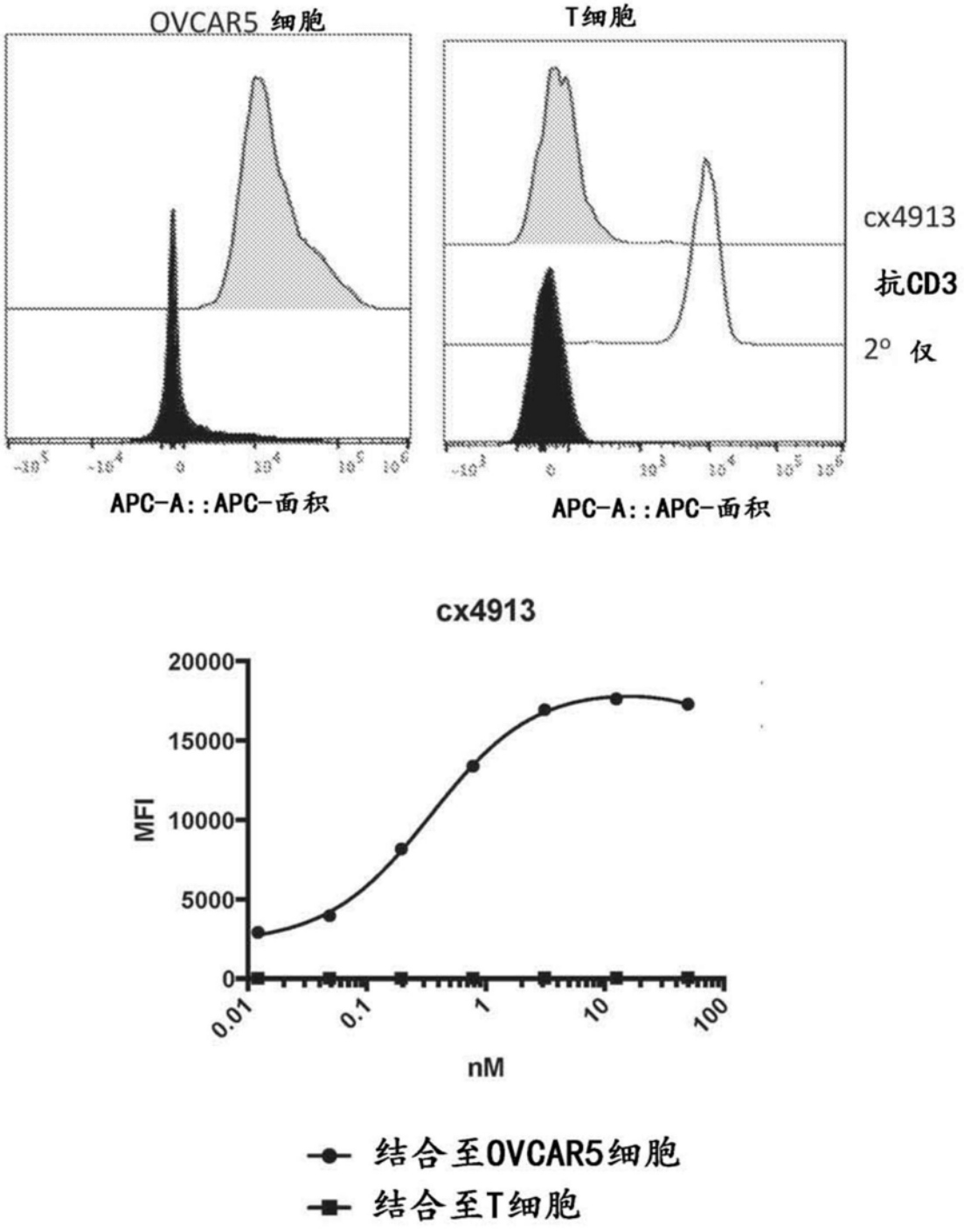

OVCAR5 细胞
T细胞
cx4913
抗CD3
2° 仅
APC-A::APC-面积
APC-A::APC-面积
cx4913
MFI
20000
15000
10000
5000
0
0.01
0.1
1
10
100
nM
结合至OVCAR5细胞
结合至T细胞

FIG.4H

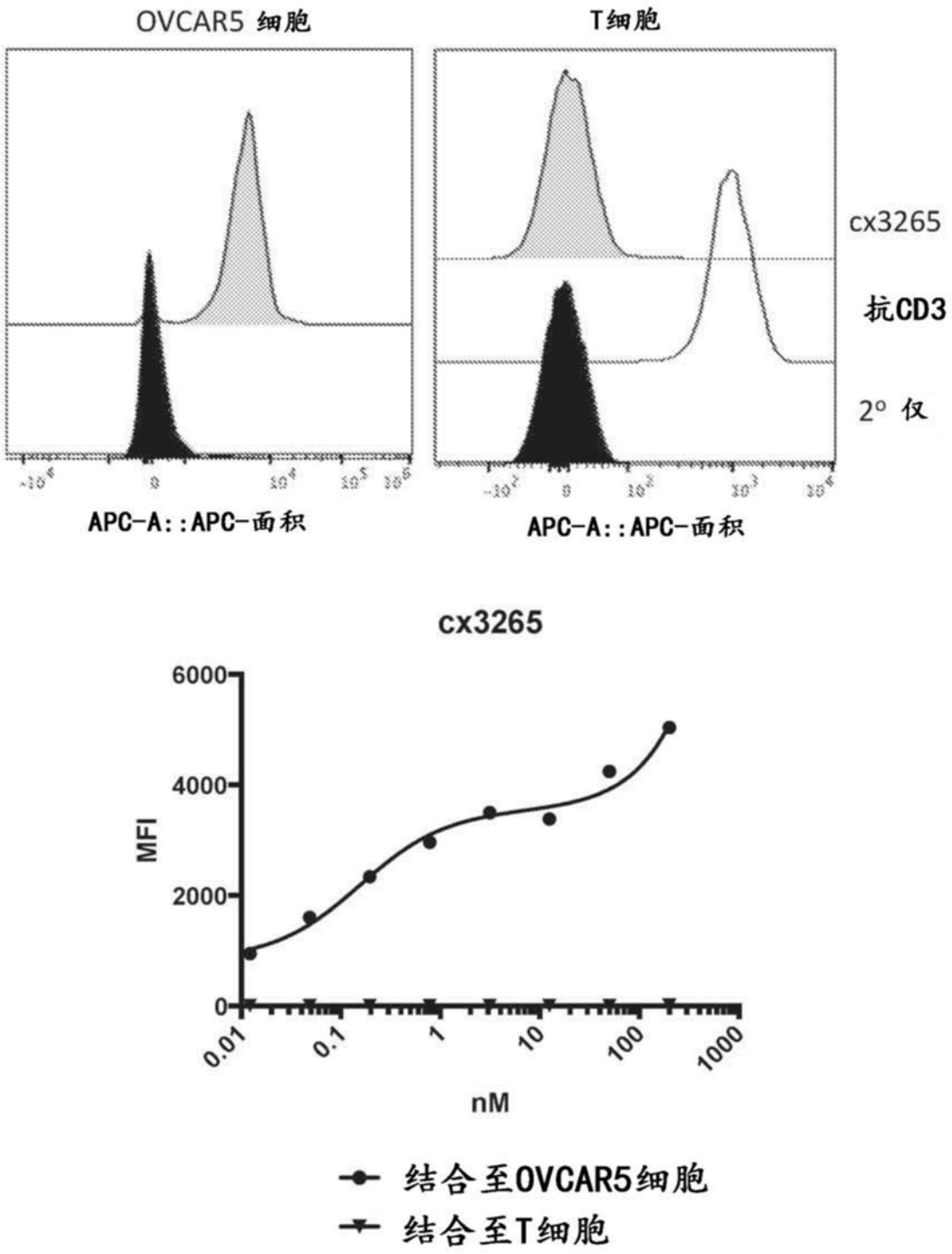

OVCAR5 细胞
T细胞
cx3265
抗CD3
2° 仅
APC-A::APC-面积
APC-A::APC-面积
cx3265
MFI
6000
4000
2000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM
结合至OVCAR5细胞
结合至T细胞

FIG.4I

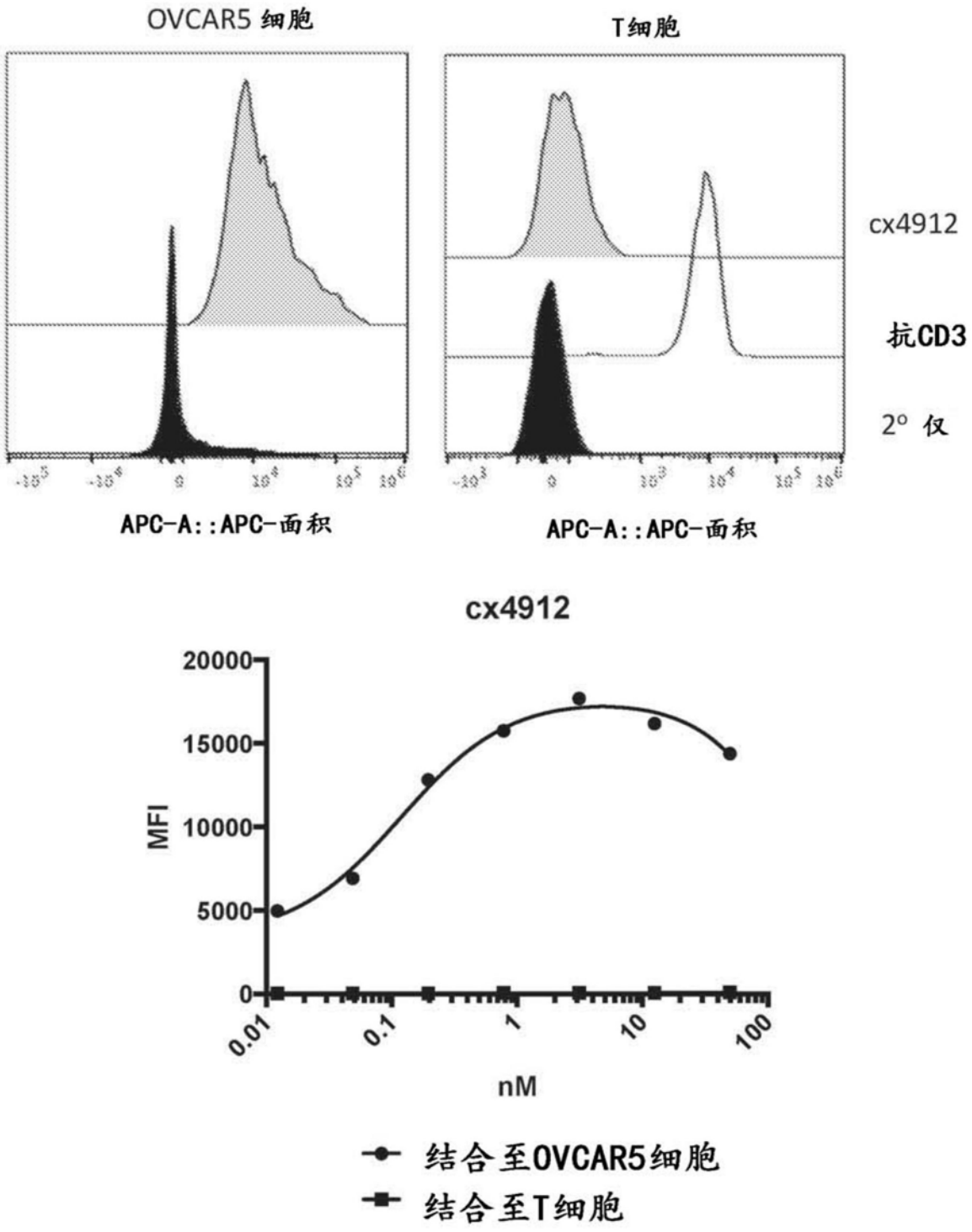

OVCAR5 细胞
T细胞
cx4912
抗CD3
2° 仅
APC-A::APC-面积
APC-A::APC-面积
cx4912
MFI
20000
15000
10000
5000
0
0.01
0.1
1
10
100
nM
结合至OVCAR5细胞
结合至T细胞

FIG.4J

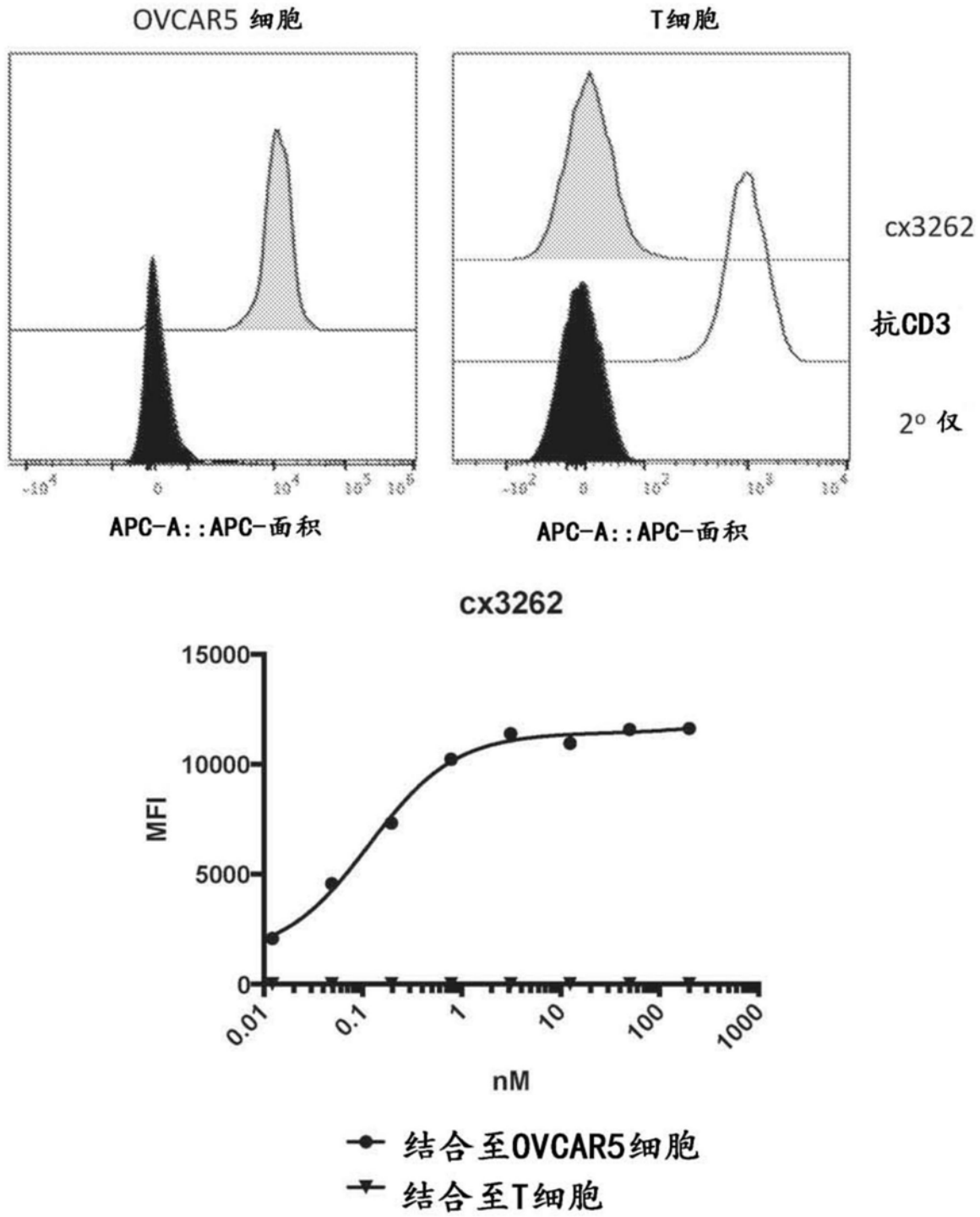

OVCAR5 细胞
T细胞
cx3262
抗CD3
2° 仅
APC-A::APC-面积
APC-A::APC-面积
cx3262
15000
10000
5000
0
MFI
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM
结合至OVCAR5细胞
结合至T细胞

FIG.4K

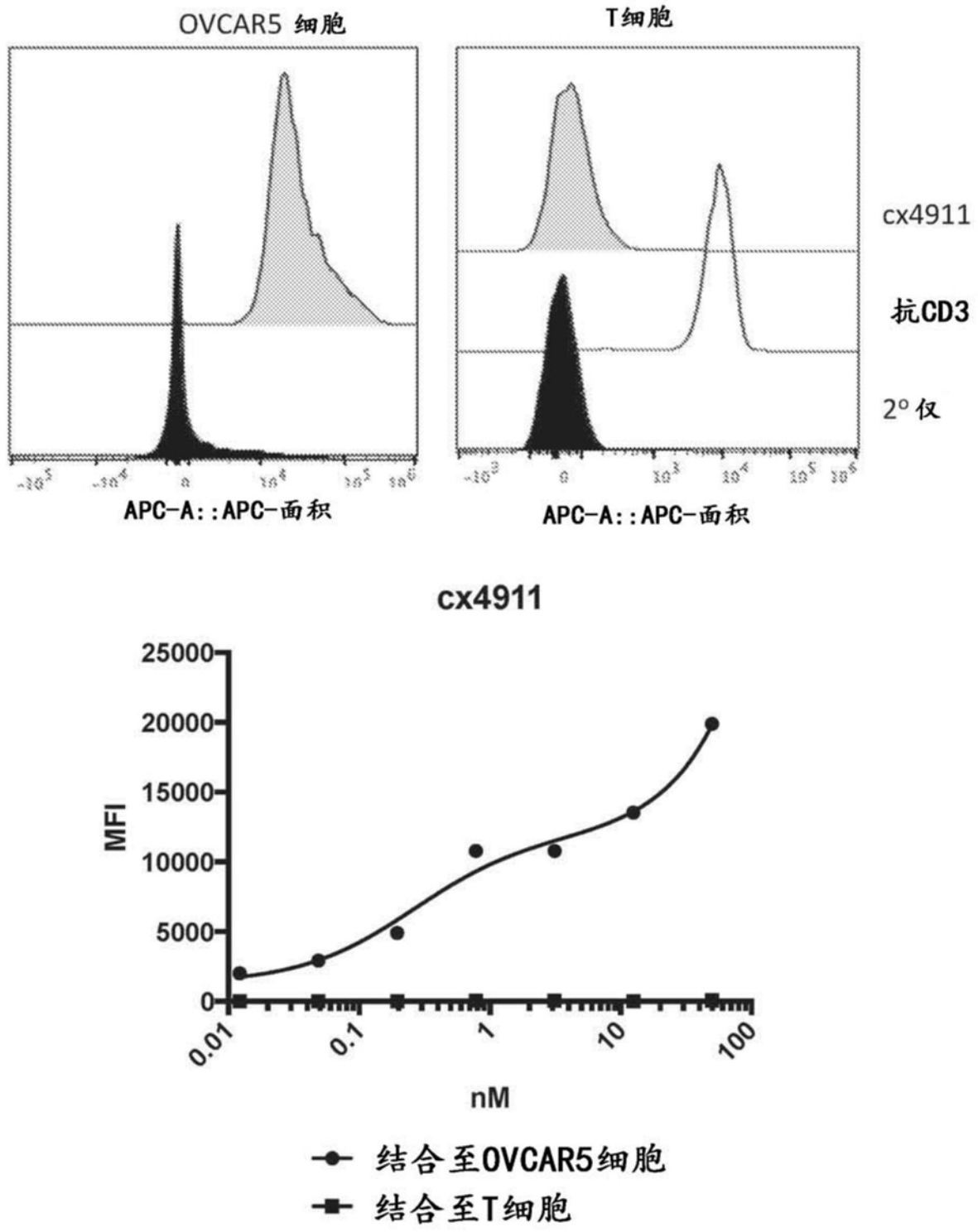

OVCAR5 细胞
T细胞
cx4911
抗CD3
2°仅
APC-A::APC-面积
APC-A::APC-面积
cx4911
MFI
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.01
0.1
1
10
100
nM
结合至OVCAR5细胞
结合至T细胞

FIG.4L

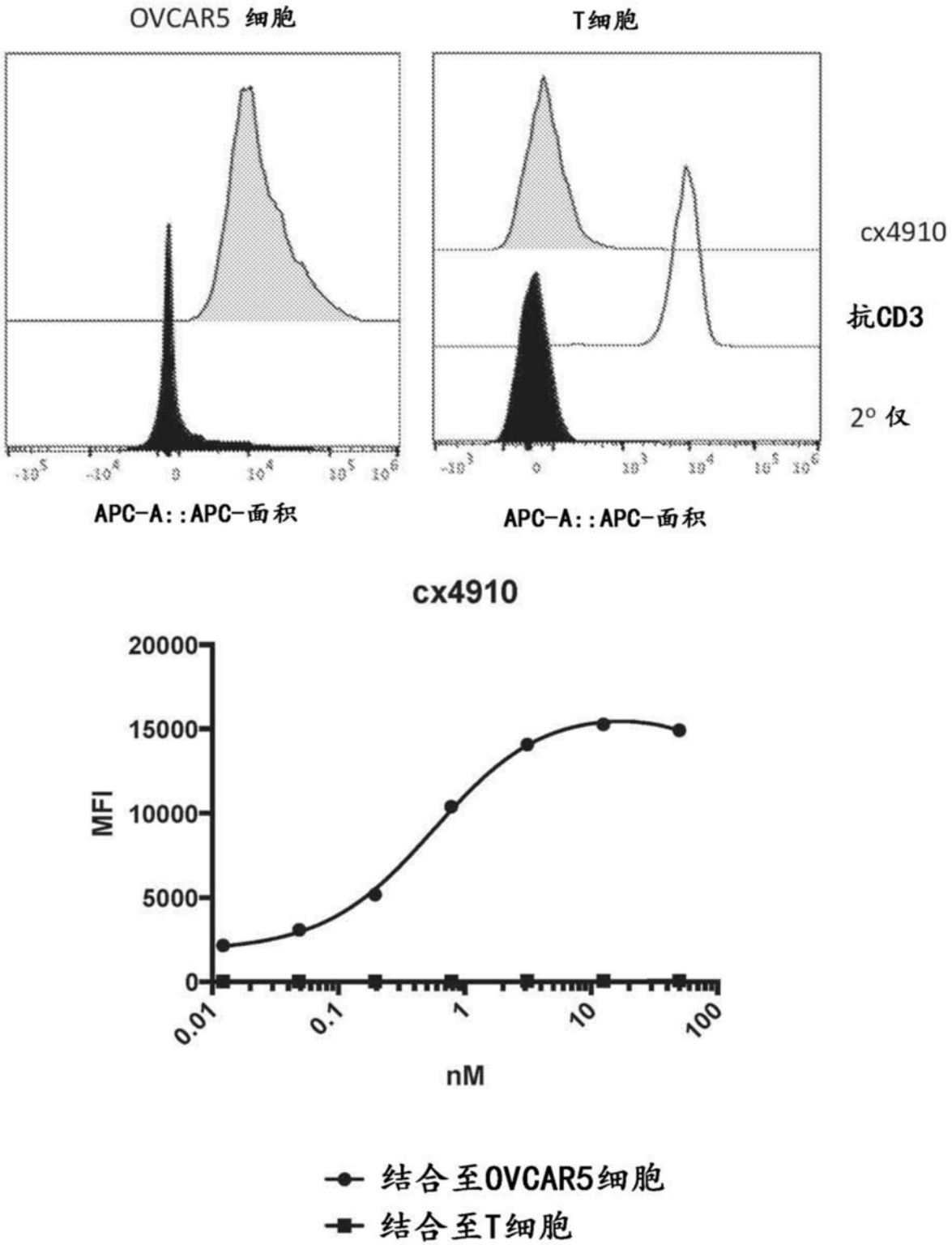

OVCAR5 细胞
T细胞
cx4910
抗CD3
2° 仅
APC-A::APC-面积
APC-A::APC-面积
cx4910
MFI
20000
15000
10000
5000
0
0.01
0.1
1
10
100
nM
结合至OVCAR5细胞
结合至T细胞

FIG.4M

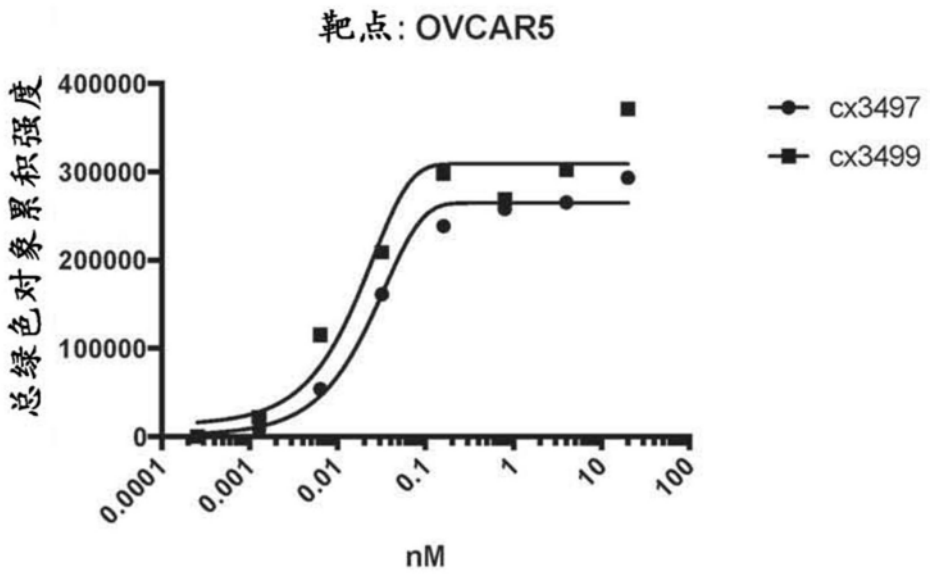

靶点: OVCAR5
总绿色对象累积强度
400000
300000
200000
100000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
nM
cx3497
cx3499

FIG.5A

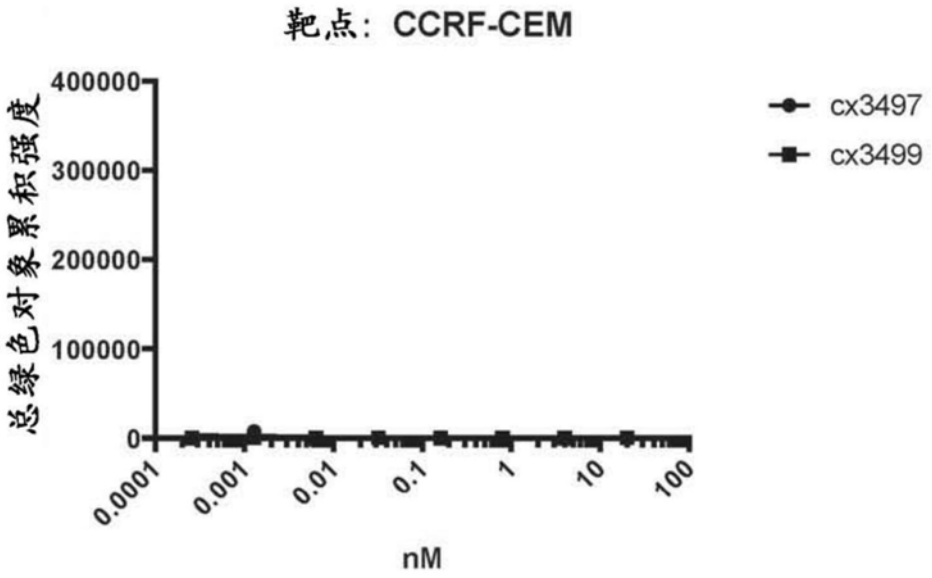

靶点: CCRF-CEM
总绿色对象累积强度
400000
300000
200000
100000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
nM
cx3497
cx3499

FIG.5B

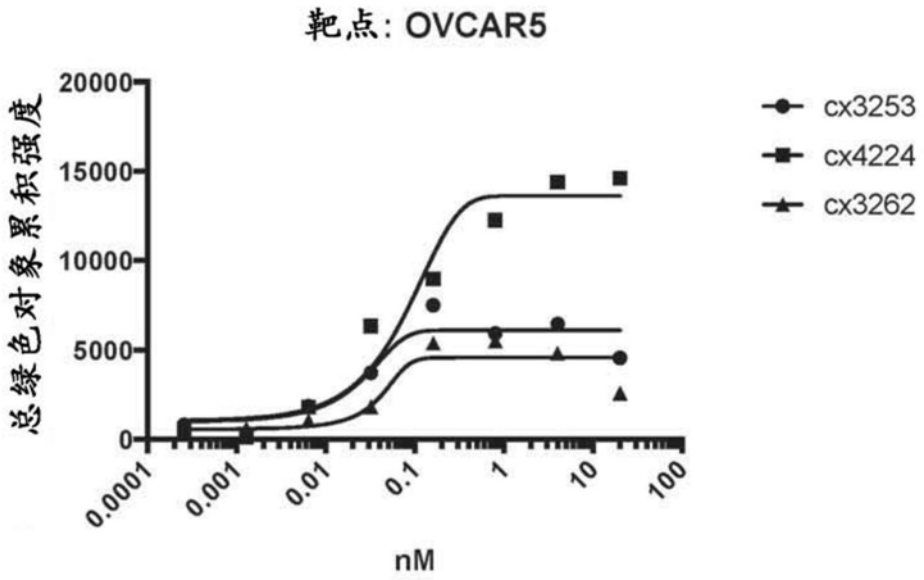

靶点: OVCAR5
总绿色对象累积强度
20000
15000
10000
5000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
nM
cx3253
cx4224
cx3262

FIG.5C

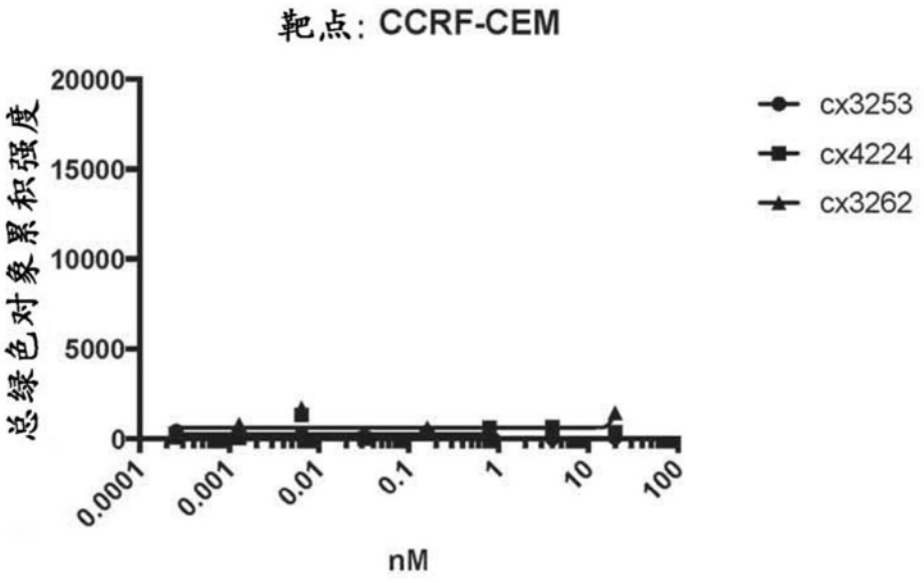

靶点: CCRF-CEM
总绿色对象累积强度
20000
15000
10000
5000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
nM
cx3253
cx4224
cx3262

FIG.5D

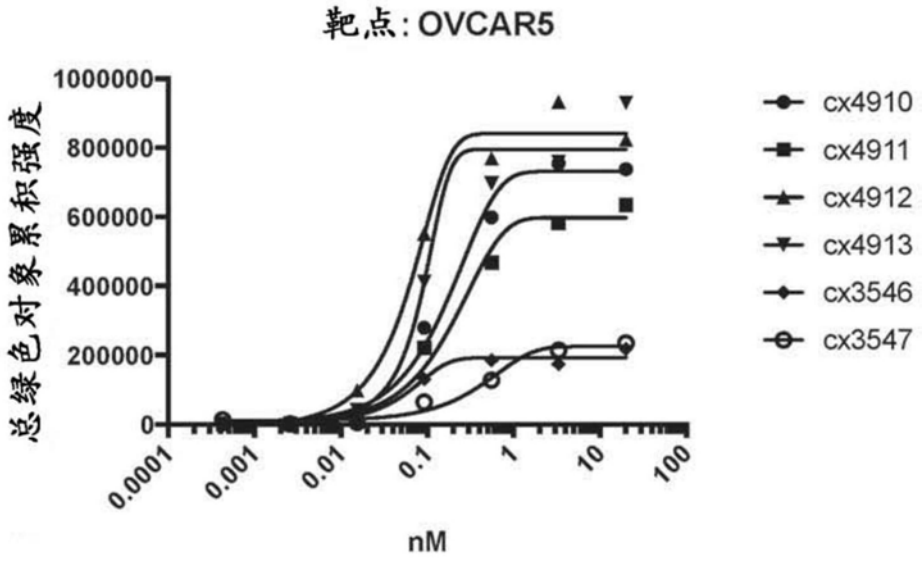

靶点: OVCAR5
总绿色对象累积强度
1000000
800000
600000
400000
200000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
nM
cx4910
cx4911
cx4912
cx4913
cx3546
cx3547

FIG.5E

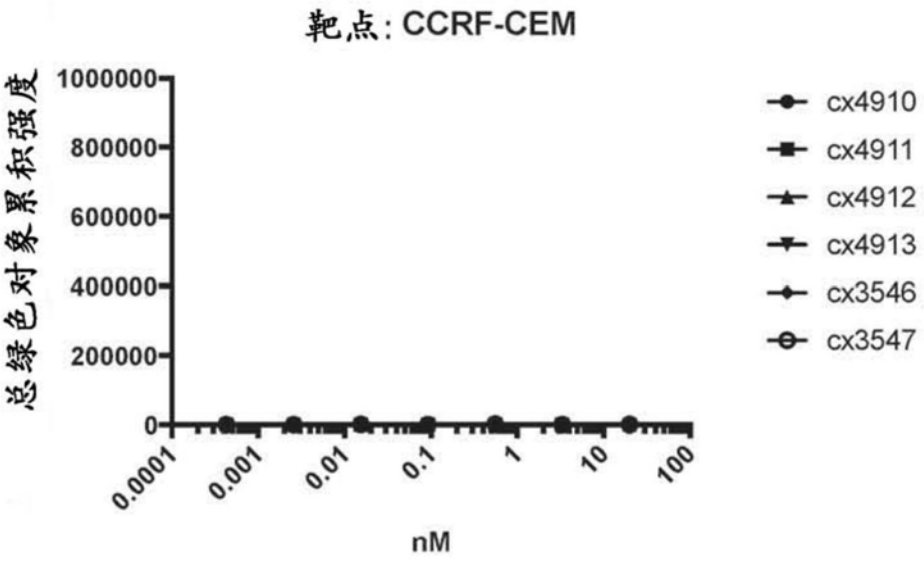

靶点: CCRF-CEM
总绿色对象累积强度
1000000
800000
600000
400000
200000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
nM
cx4910
cx4911
cx4912
cx4913
cx3546
cx3547

FIG.5F

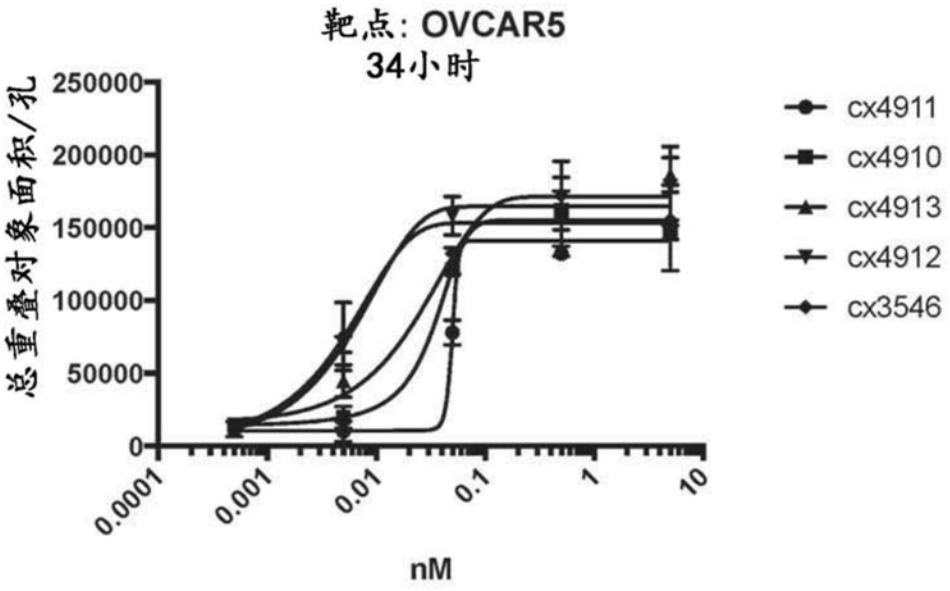

靶点: OVCAR5
34小时
总重叠对象面积/孔
250000
200000
150000
100000
50000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
cx4911
cx4910
cx4913
cx4912
cx3546

FIG.6A

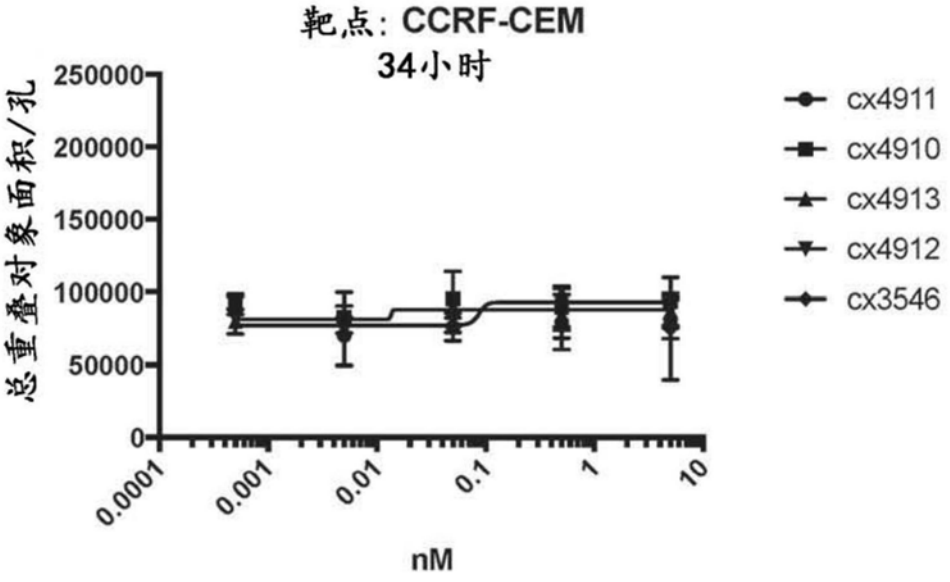

靶点: CCRF-CEM
34小时
总重叠对象面积/孔
250000
200000
150000
100000
50000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
cx4911
cx4910
cx4913
cx4912
cx3546

FIG.6B

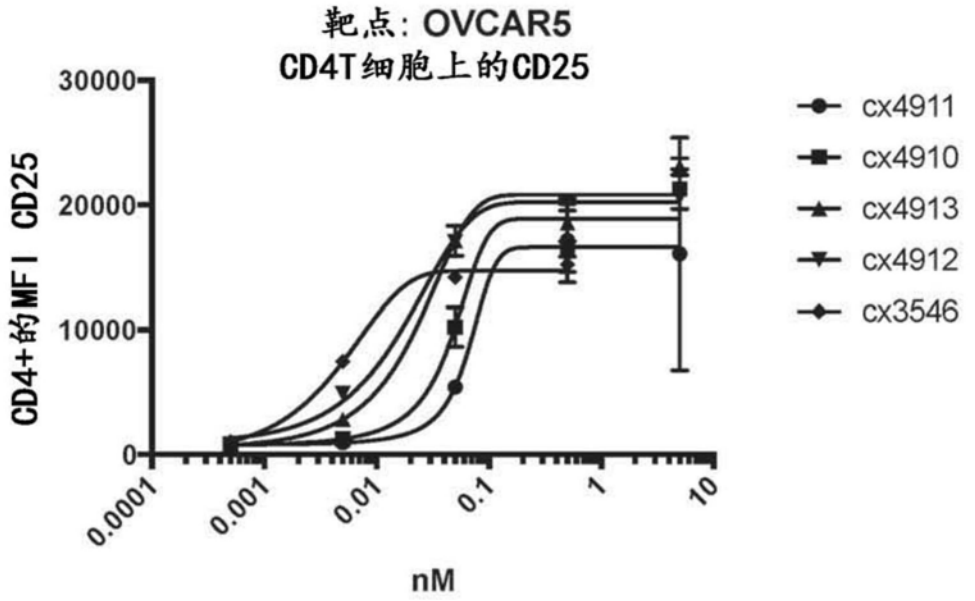

靶点: OVCAR5
CD4T细胞上的CD25
CD4+的MFI CD25
30000
20000
10000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
cx4911
cx4910
cx4913
cx4912
cx3546

FIG.7A

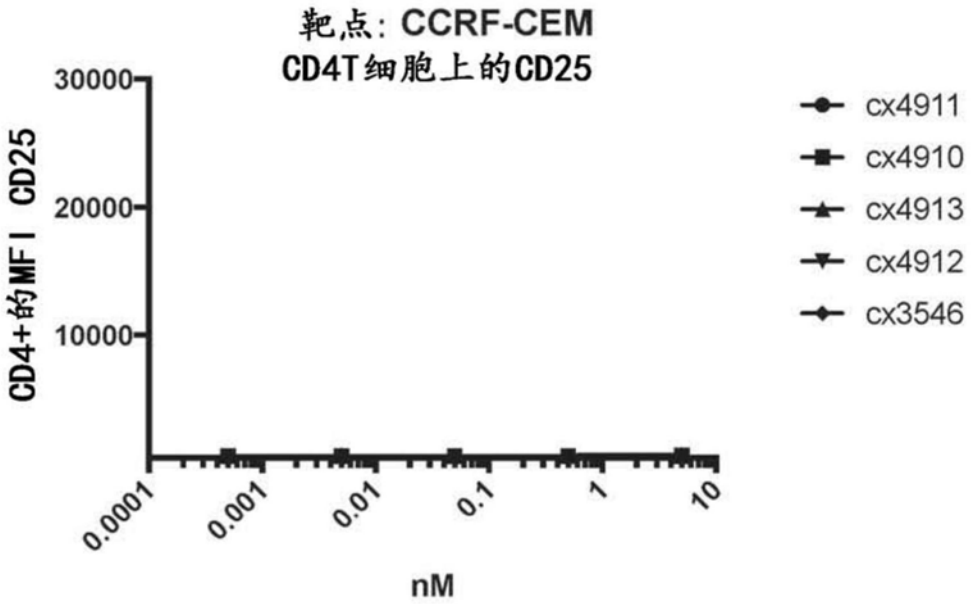

靶点: CCRF-CEM
CD4T细胞上的CD25
CD4+的MFI CD25
30000
20000
10000
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
cx4911
cx4910
cx4913
cx4912
cx3546

FIG.7B

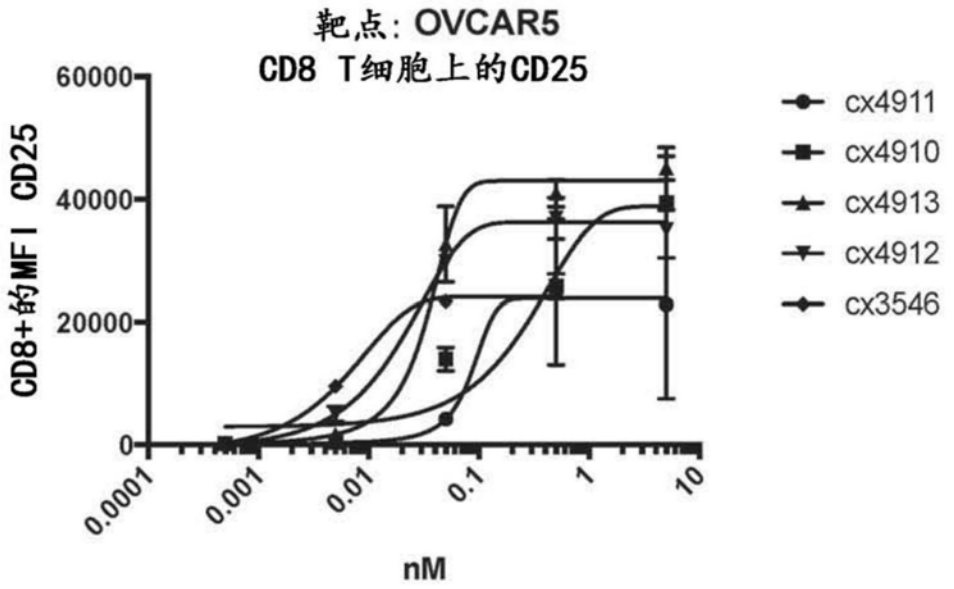

靶点: OVCAR5
CD8 T细胞上的CD25
CD8+的MFI CD25
60000
40000
20000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
cx4911
cx4910
cx4913
cx4912
cx3546

FIG.7C

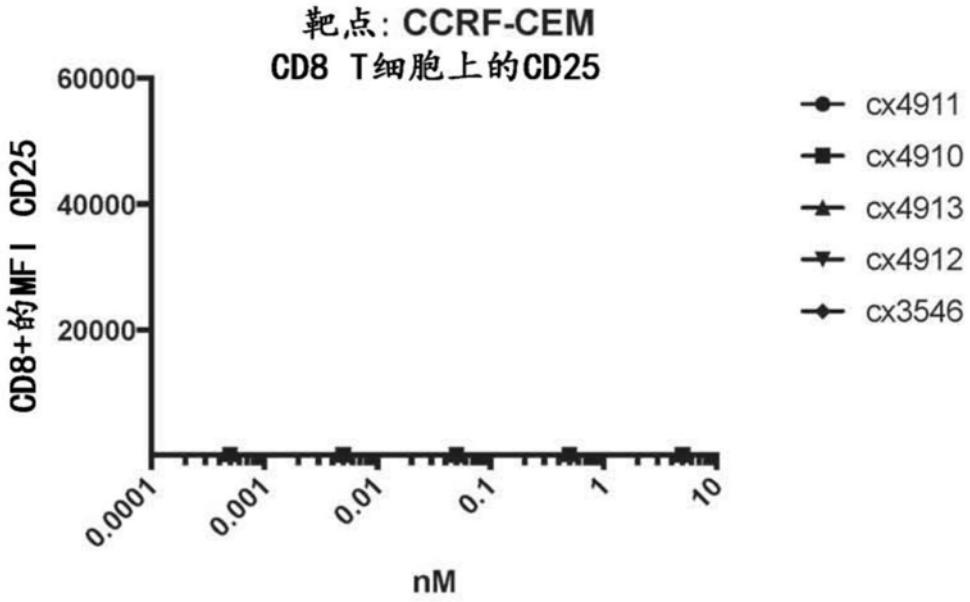

靶点: CCRF-CEM
CD8 T细胞上的CD25
CD8+的MFI CD25
60000
40000
20000
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
cx4911
cx4910
cx4913
cx4912
cx3546

FIG.7D

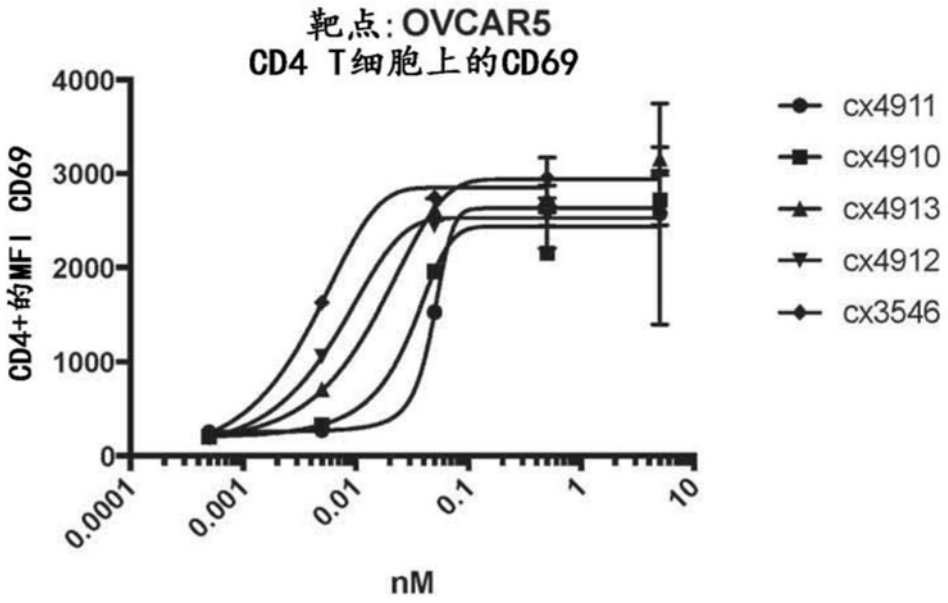

靶点:OVCAR5
CD4 T细胞上的CD69
CD4+的MFI CD69
4000
3000
2000
1000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
cx4911
cx4910
cx4913
cx4912
cx3546

FIG.8A

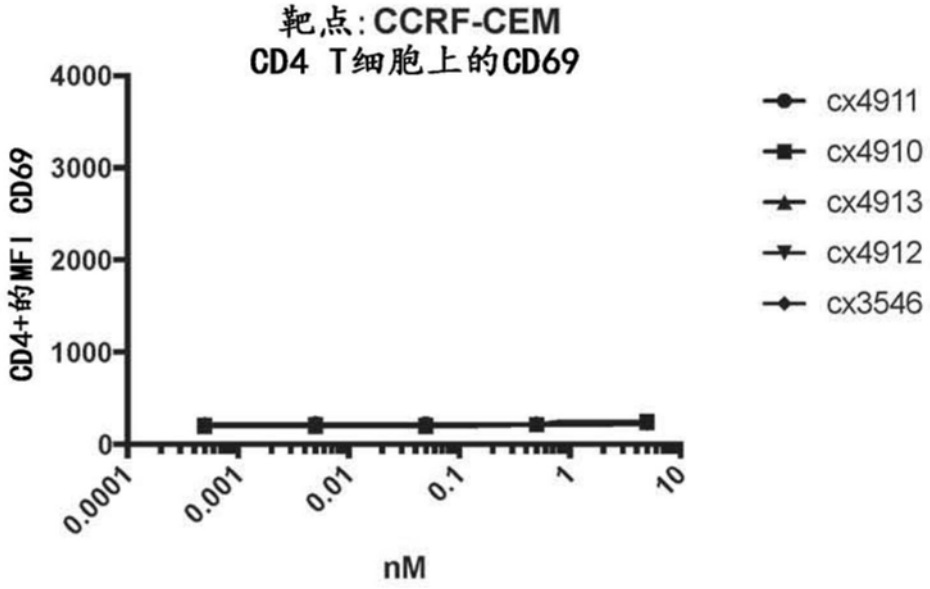

靶点:CCRF-CEM
CD4 T细胞上的CD69
CD4+的MFI CD69
4000
3000
2000
1000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
cx4911
cx4910
cx4913
cx4912
cx3546

FIG.8B

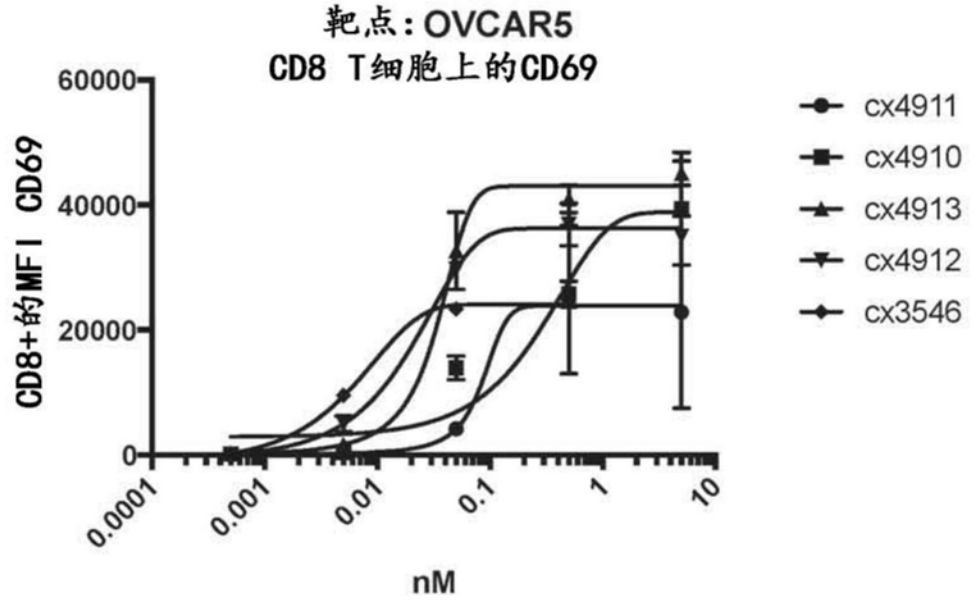

靶点：OVCAR5
CD8 T细胞上的CD69
CD8+的MFI CD69
60000
40000
20000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
cx4911
cx4910
cx4913
cx4912
cx3546

FIG.8C

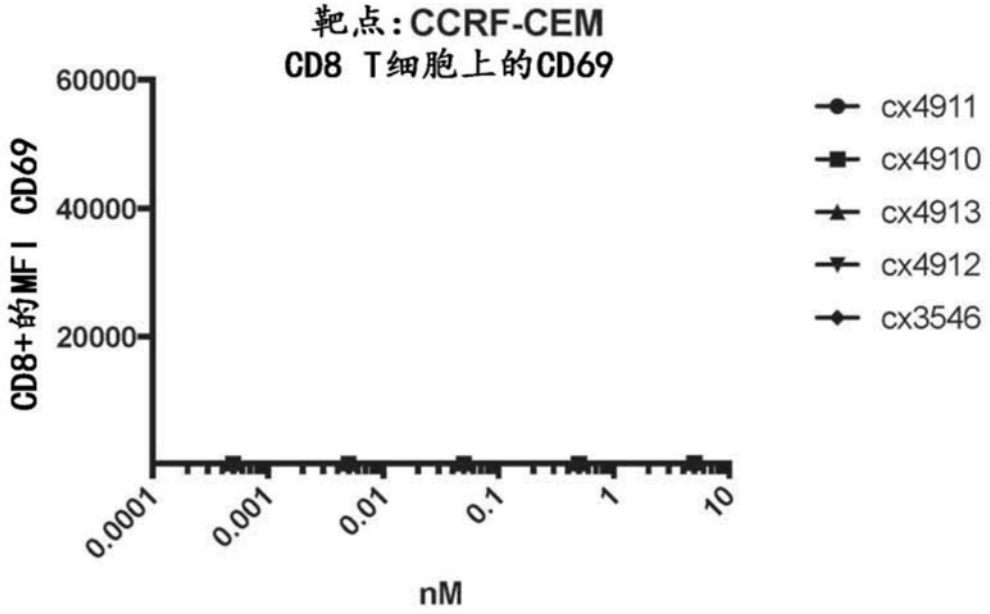

靶点：CCRF-CEM
CD8 T细胞上的CD69
CD8+的MFI CD69
60000
40000
20000
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
cx4911
cx4910
cx4913
cx4912
cx3546

FIG.8D

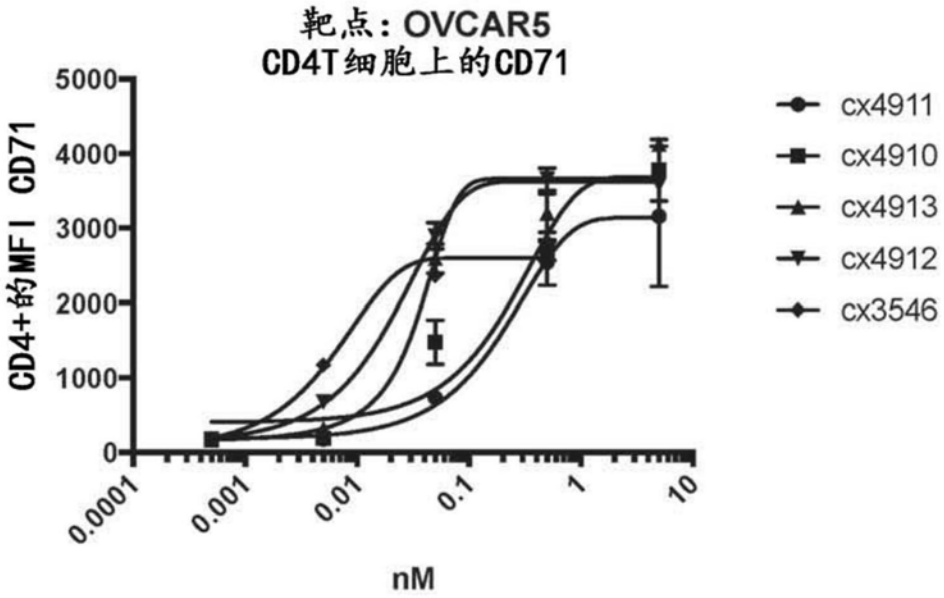

靶点：OVCAR5
CD4T细胞上的CD71
CD4+的MFI CD71
5000
4000
3000
2000
1000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
cx4911
cx4910
cx4913
cx4912
cx3546

FIG.9A

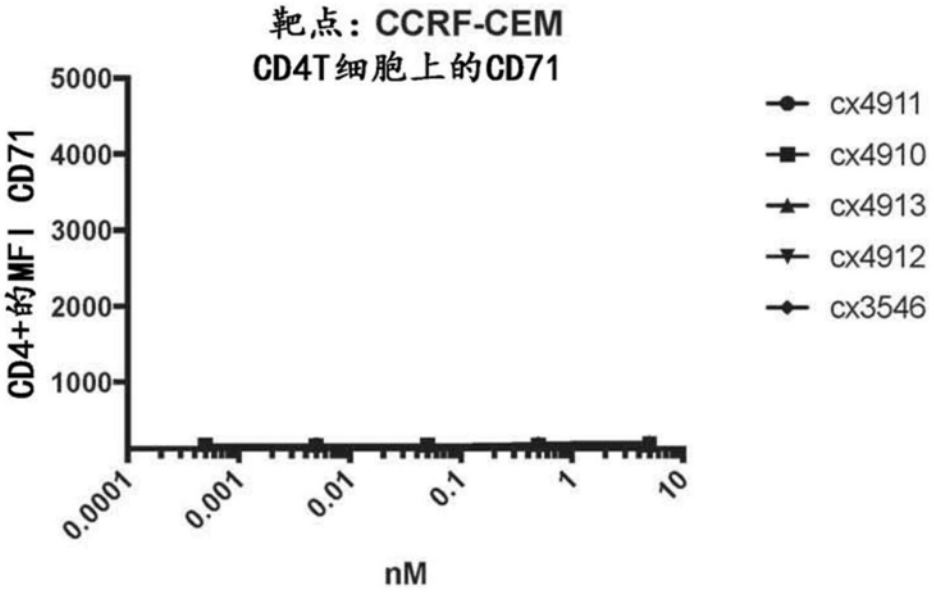

靶点：CCRF-CEM
CD4T细胞上的CD71
CD4+的MFI CD71
5000
4000
3000
2000
1000
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
cx4911
cx4910
cx4913
cx4912
cx3546

FIG.9B

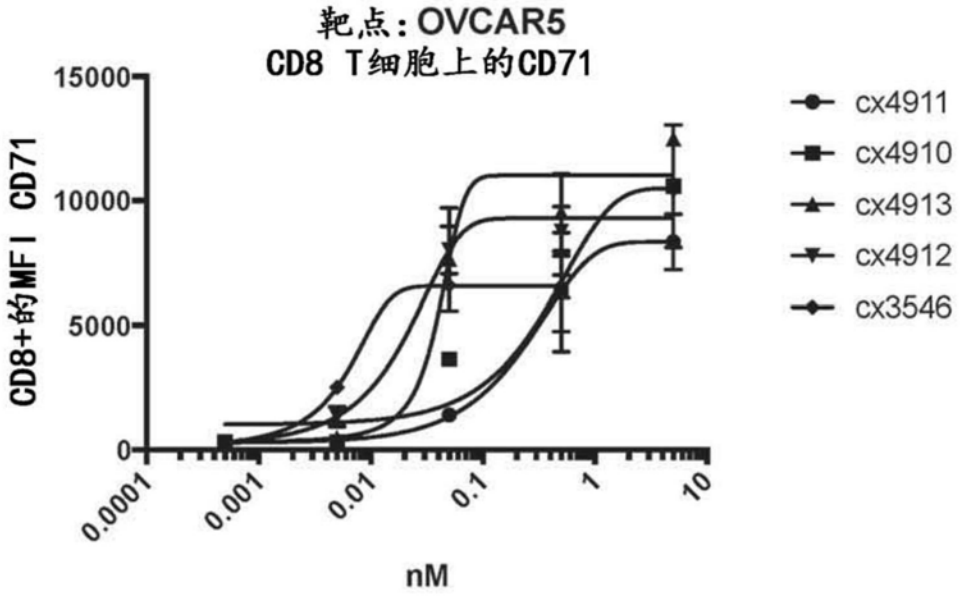

靶点：OVCAR5
CD8 T细胞上的CD71
CD8+的MFI CD71
15000
10000
5000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
cx4911
cx4910
cx4913
cx4912
cx3546

FIG.9C

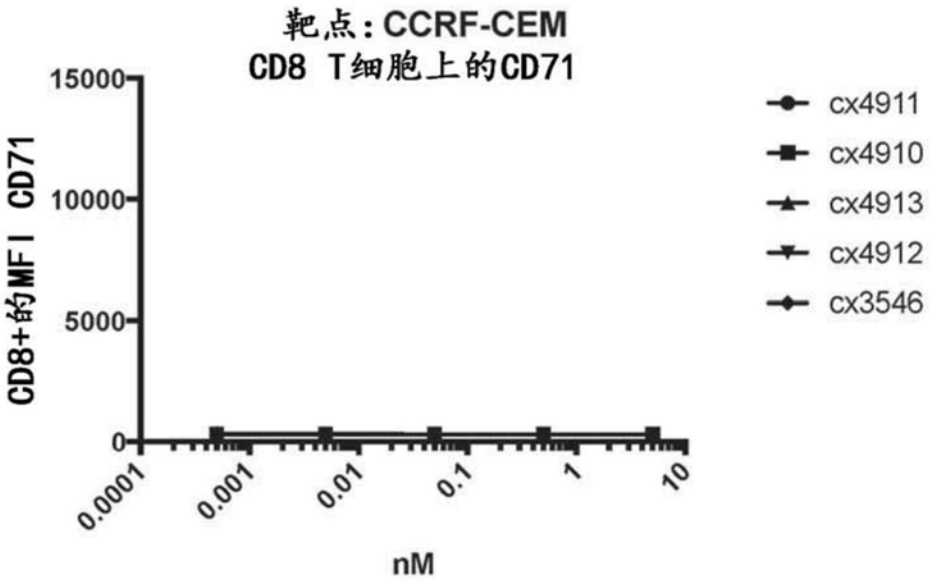

靶点：CCRF-CEM
CD8 T细胞上的CD71
CD8+的MFI CD71
15000
10000
5000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
cx4911
cx4910
cx4913
cx4912
cx3546

FIG.9D

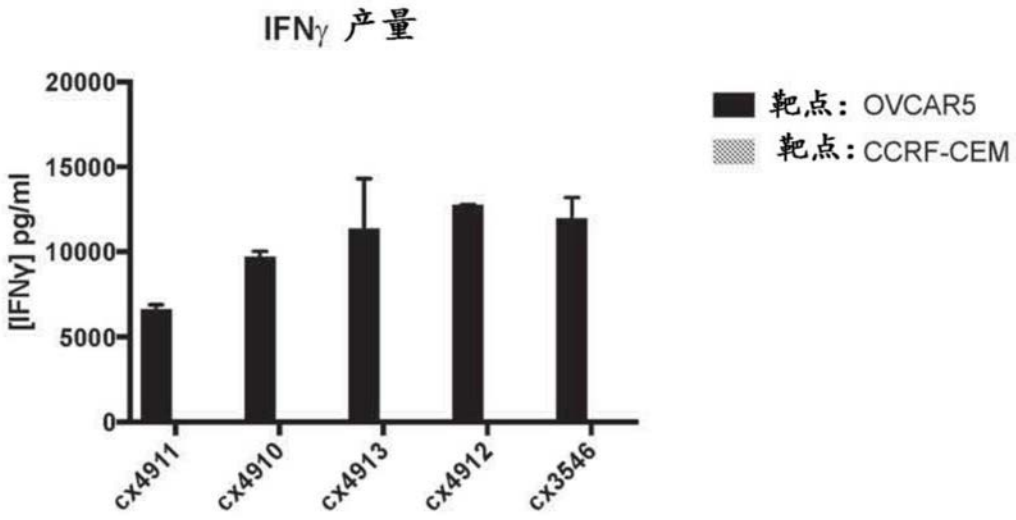


FIG.10A

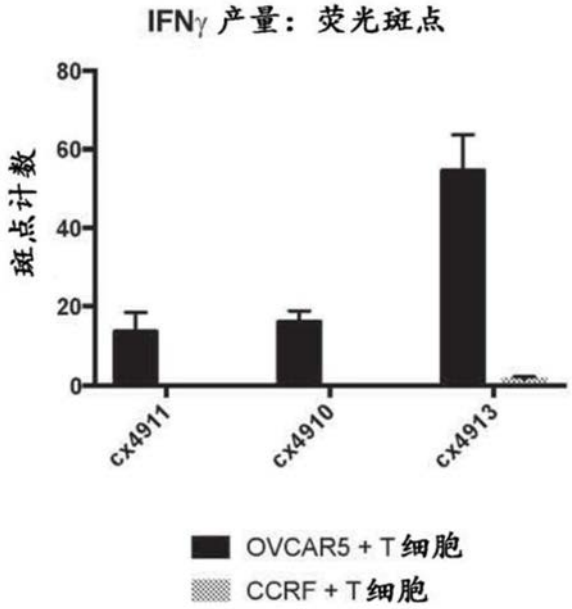


FIG.10B

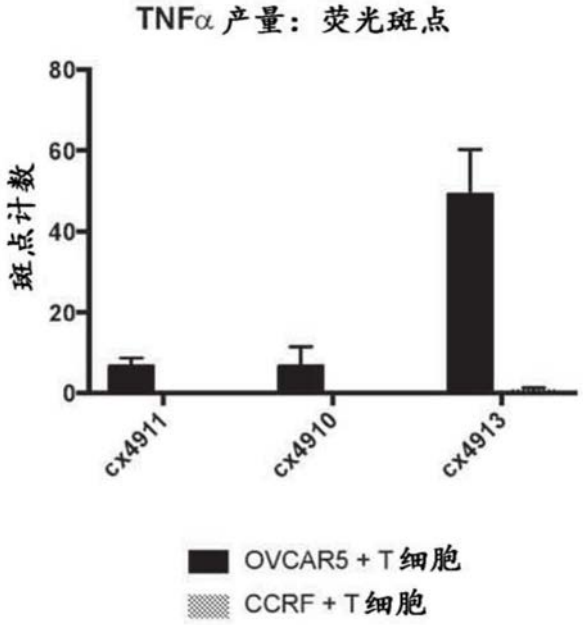


FIG.10C

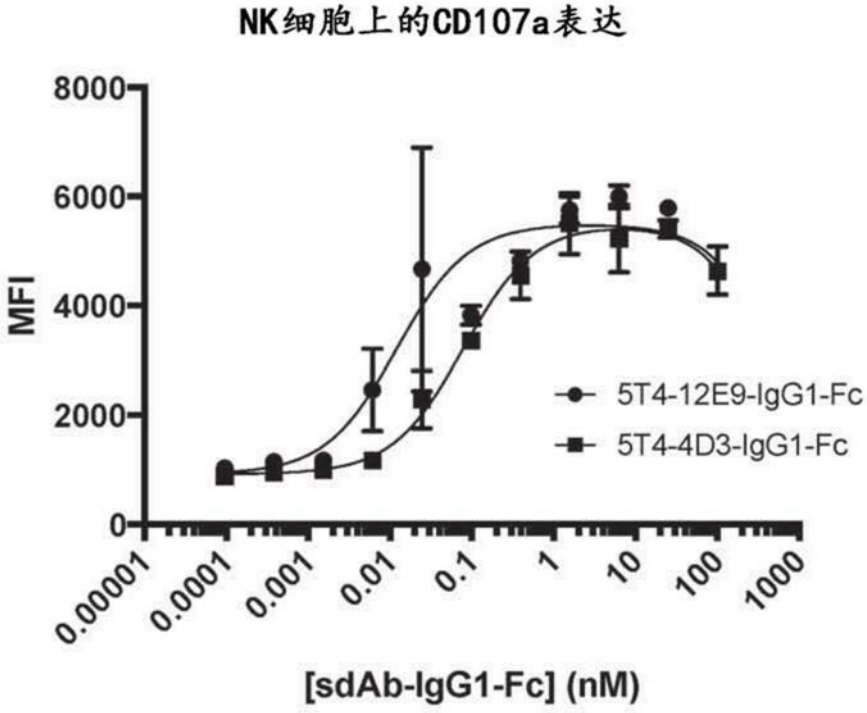


FIG.11A

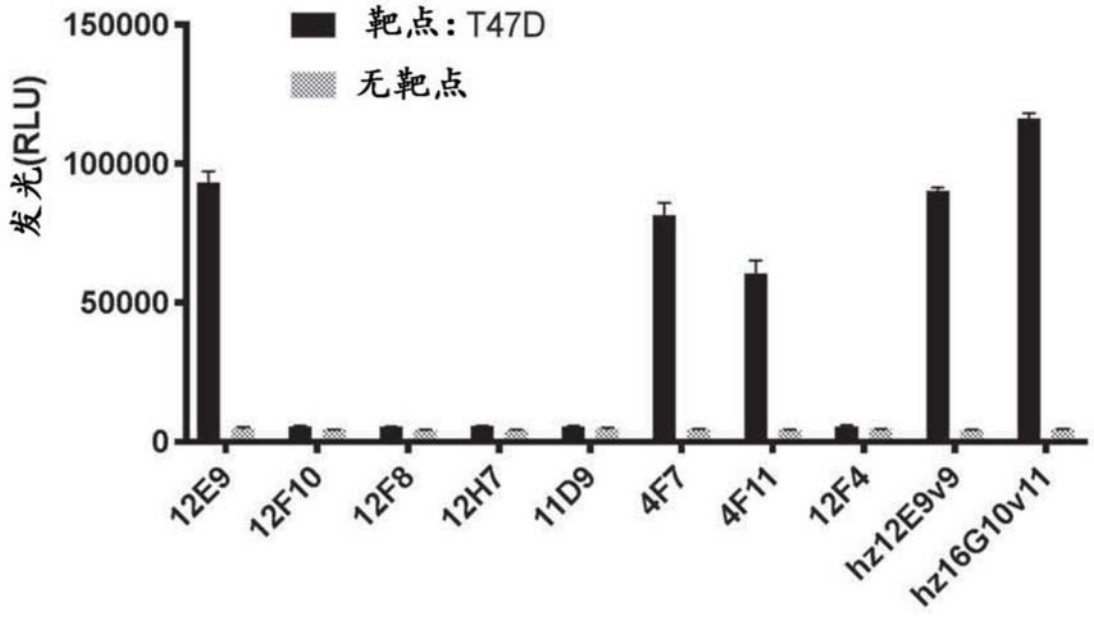


FIG.11B

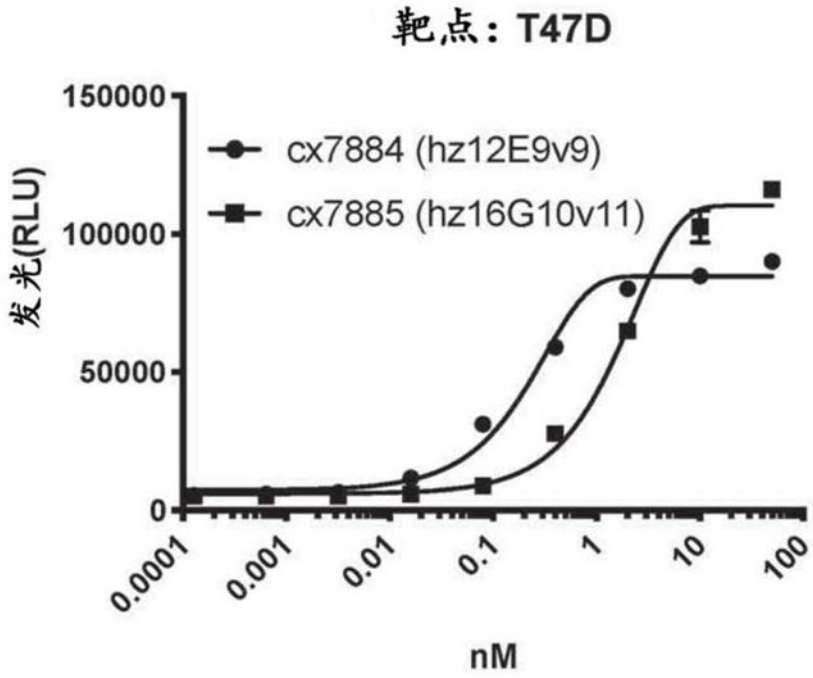


FIG.11C

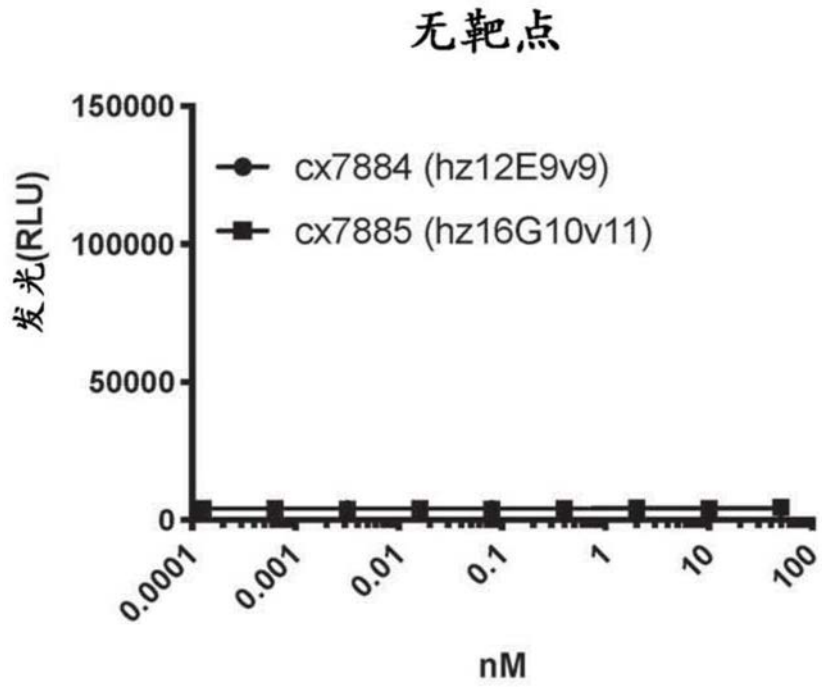


FIG.11D

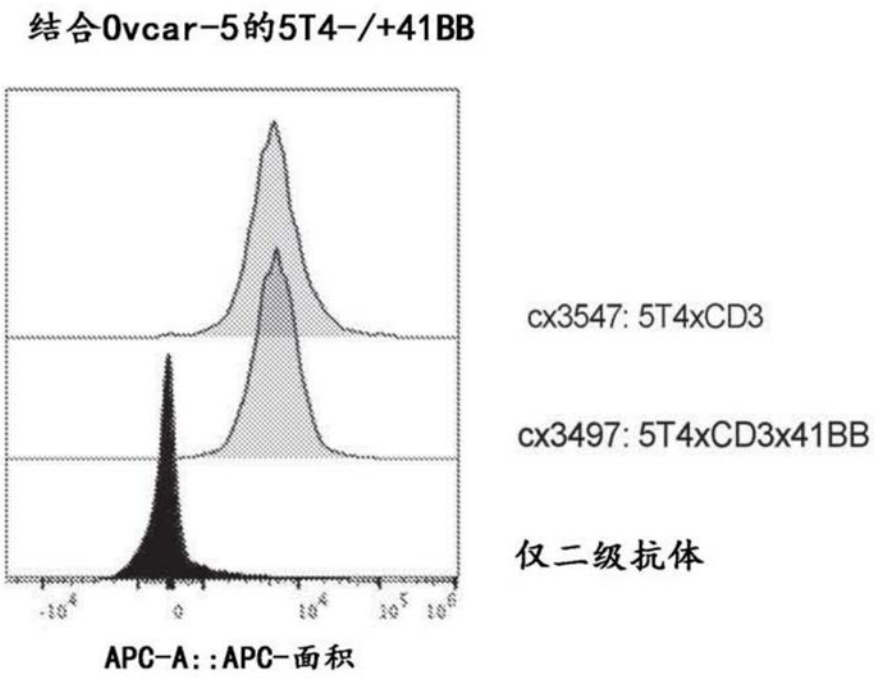


FIG.12A

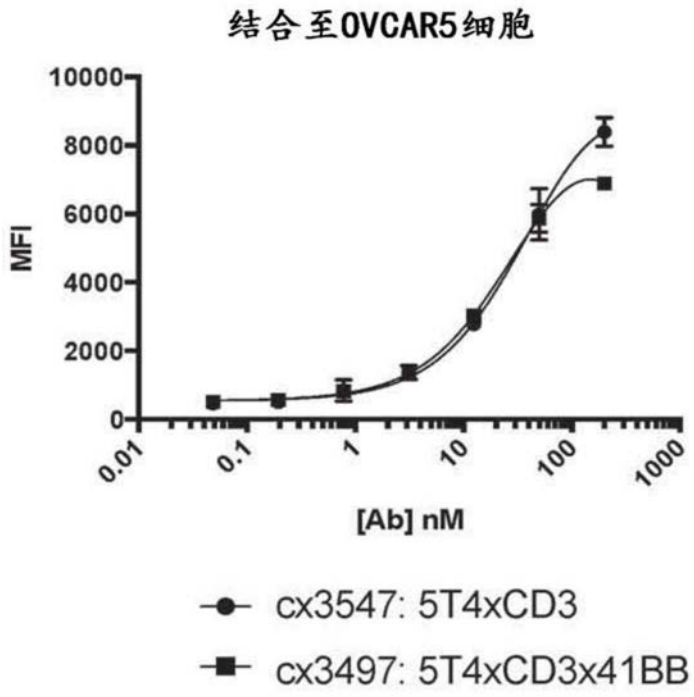


FIG.12B

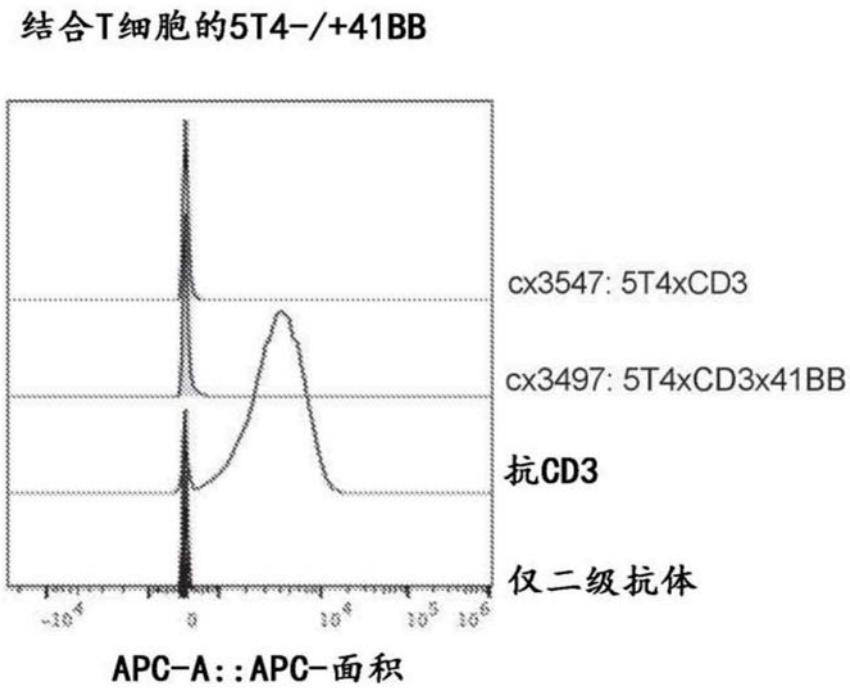


FIG.12C

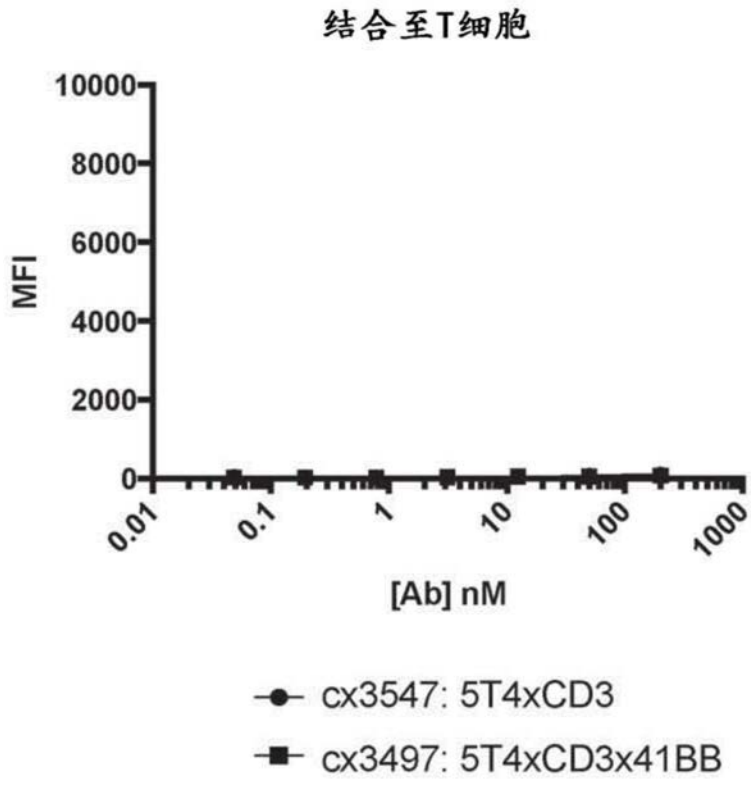


FIG.12D

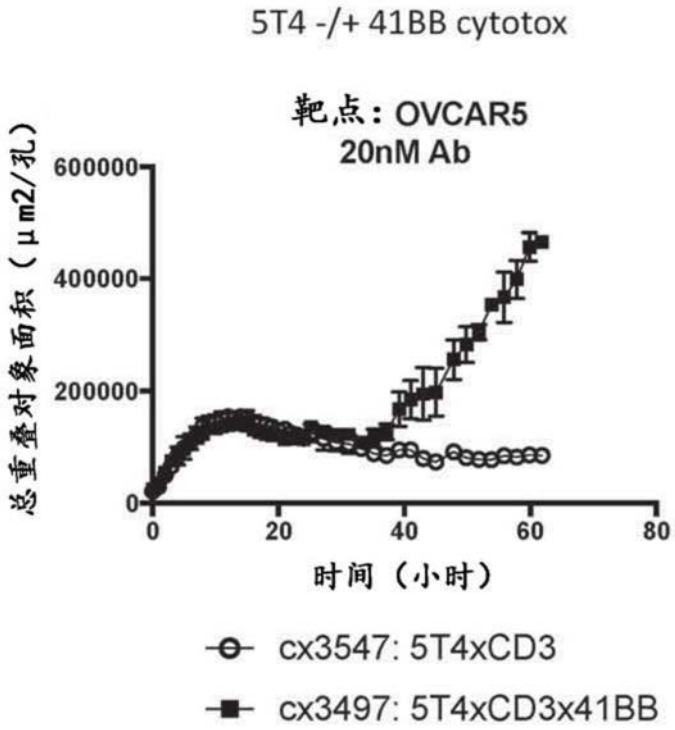


FIG.13A

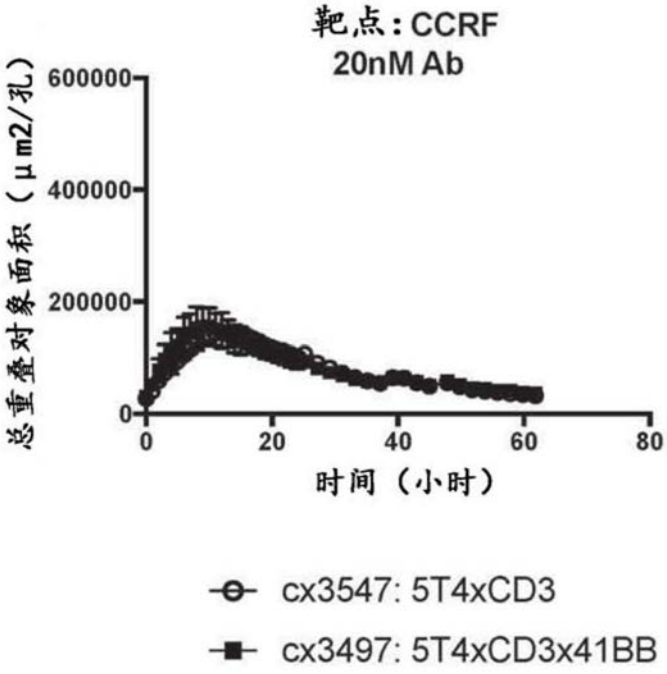


FIG.13B

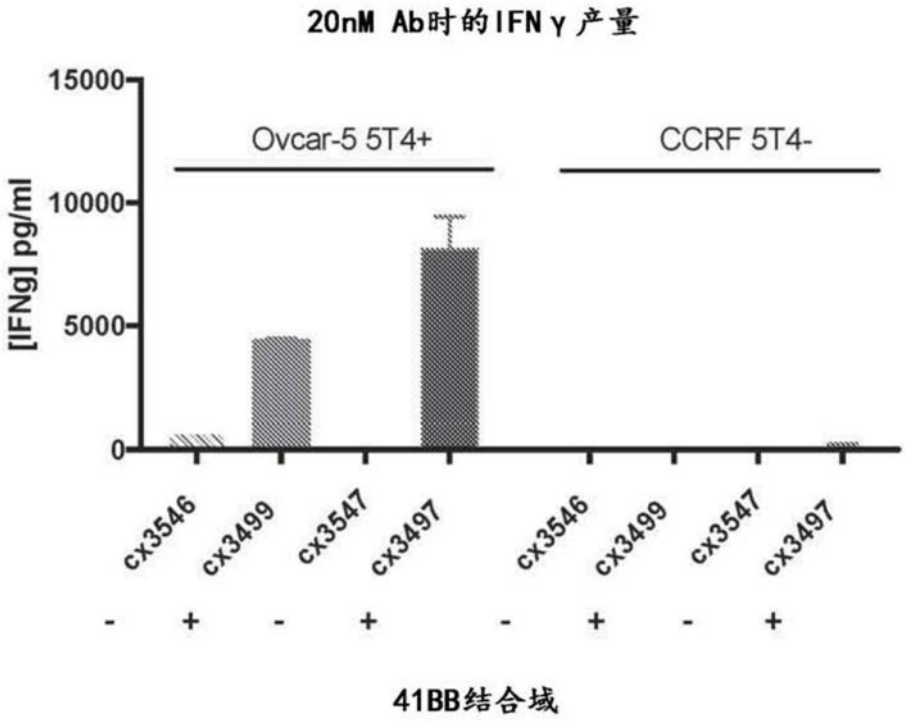


FIG.14

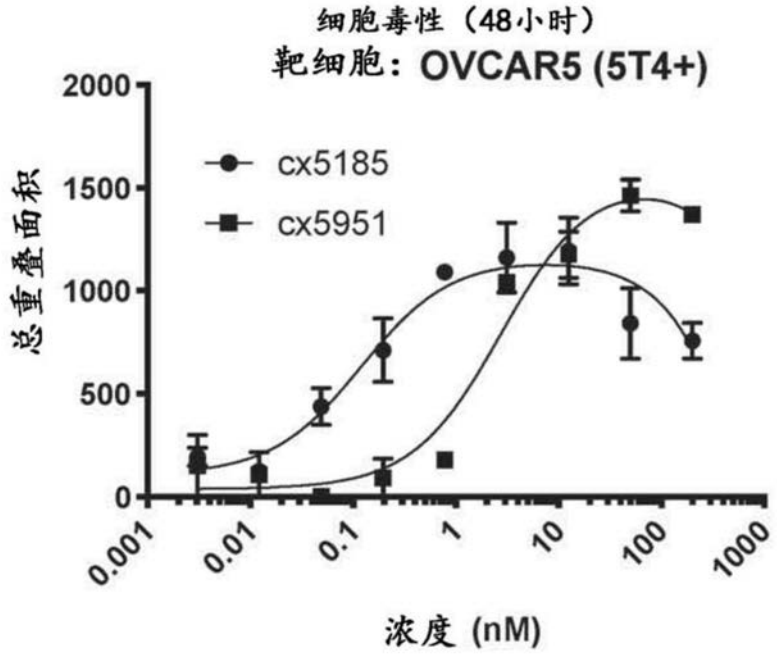


FIG.15A

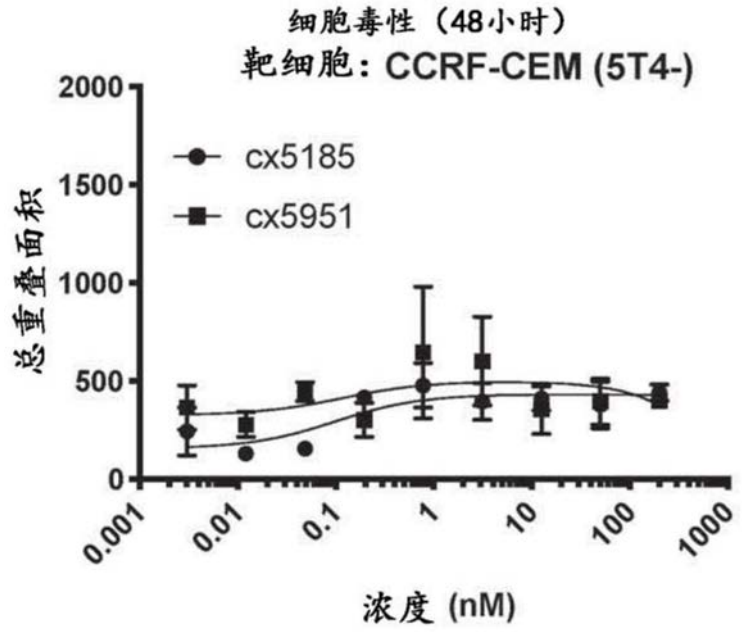


FIG.15B

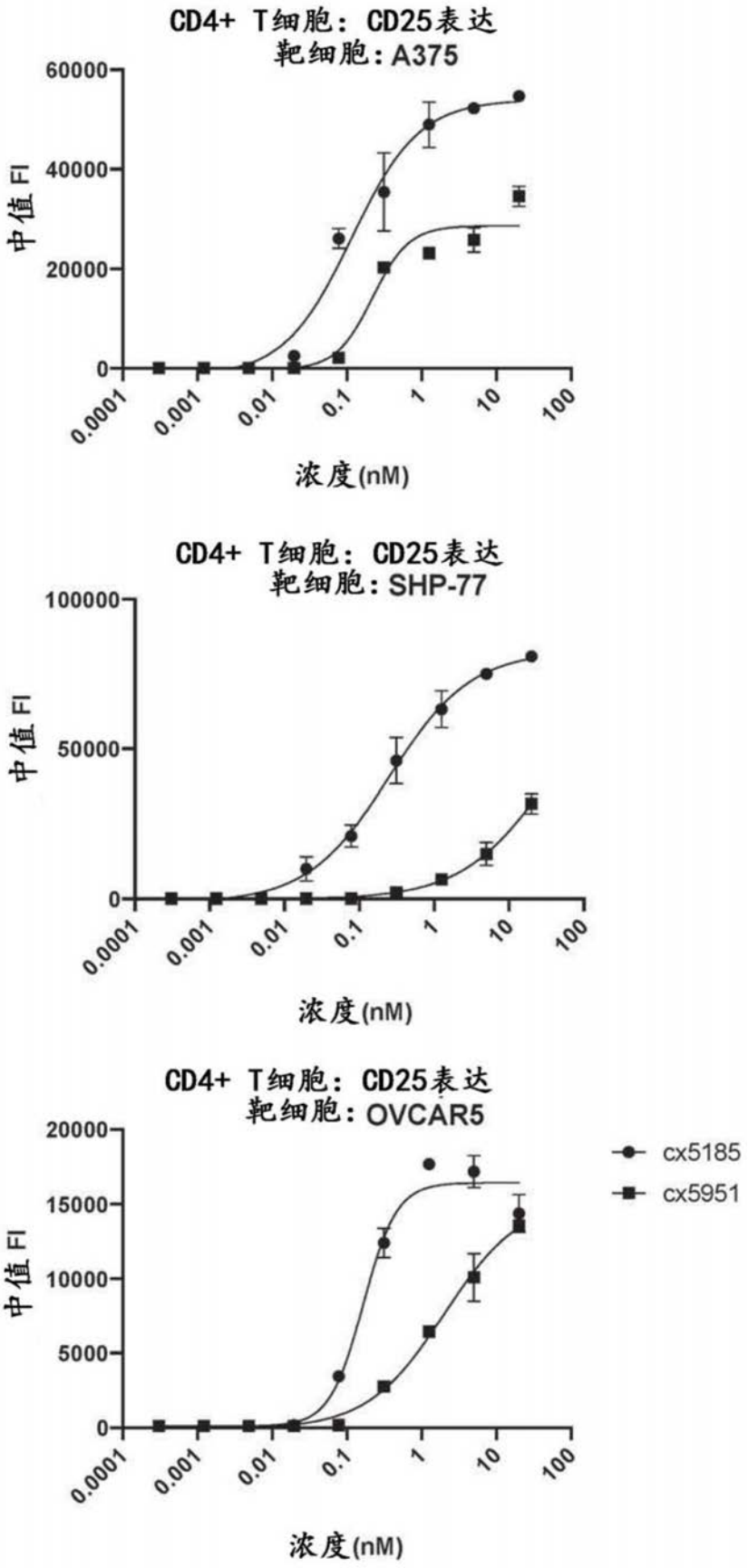

CD4+ T细胞：CD25表达
靶细胞：A375
中值 FI
60000
40000
20000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度(nM)
CD4+ T细胞：CD25表达
靶细胞：SHP-77
中值 FI
100000
50000
0
浓度(nM)
CD4+ T细胞：CD25表达
靶细胞：OVCAR5
中值 FI
20000
15000
10000
5000
0
浓度(nM)
cx5185
cx5951

FIG.16A

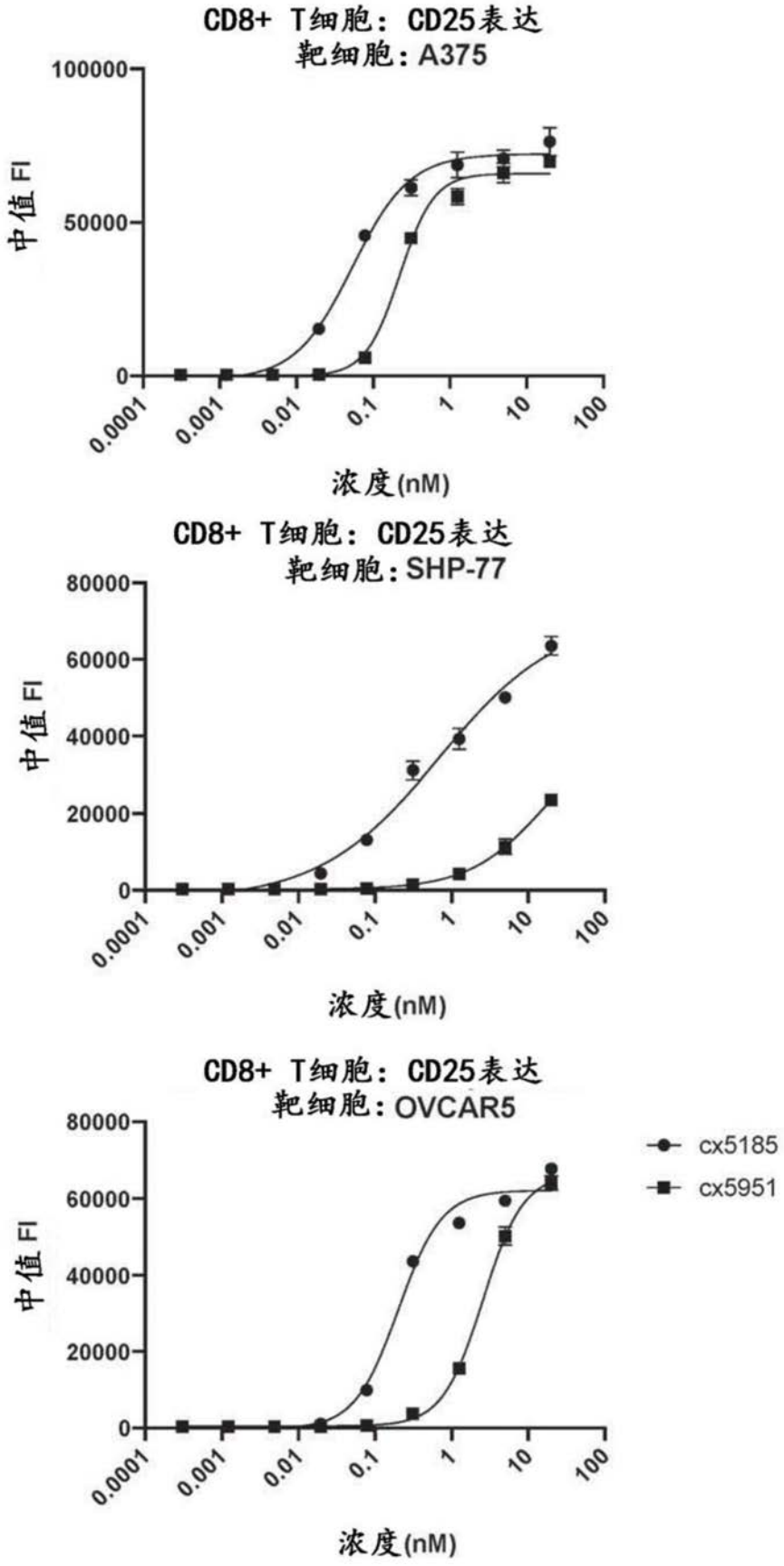

CD8+ T细胞：CD25表达
靶细胞：A375
中值 FI
100000
50000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度(nM)
CD8+ T细胞：CD25表达
靶细胞：SHP-77
中值 FI
80000
60000
40000
20000
0
浓度(nM)
CD8+ T细胞：CD25表达
靶细胞：OVCAR5
中值 FI
浓度(nM)
cx5185
cx5951

FIG.16B

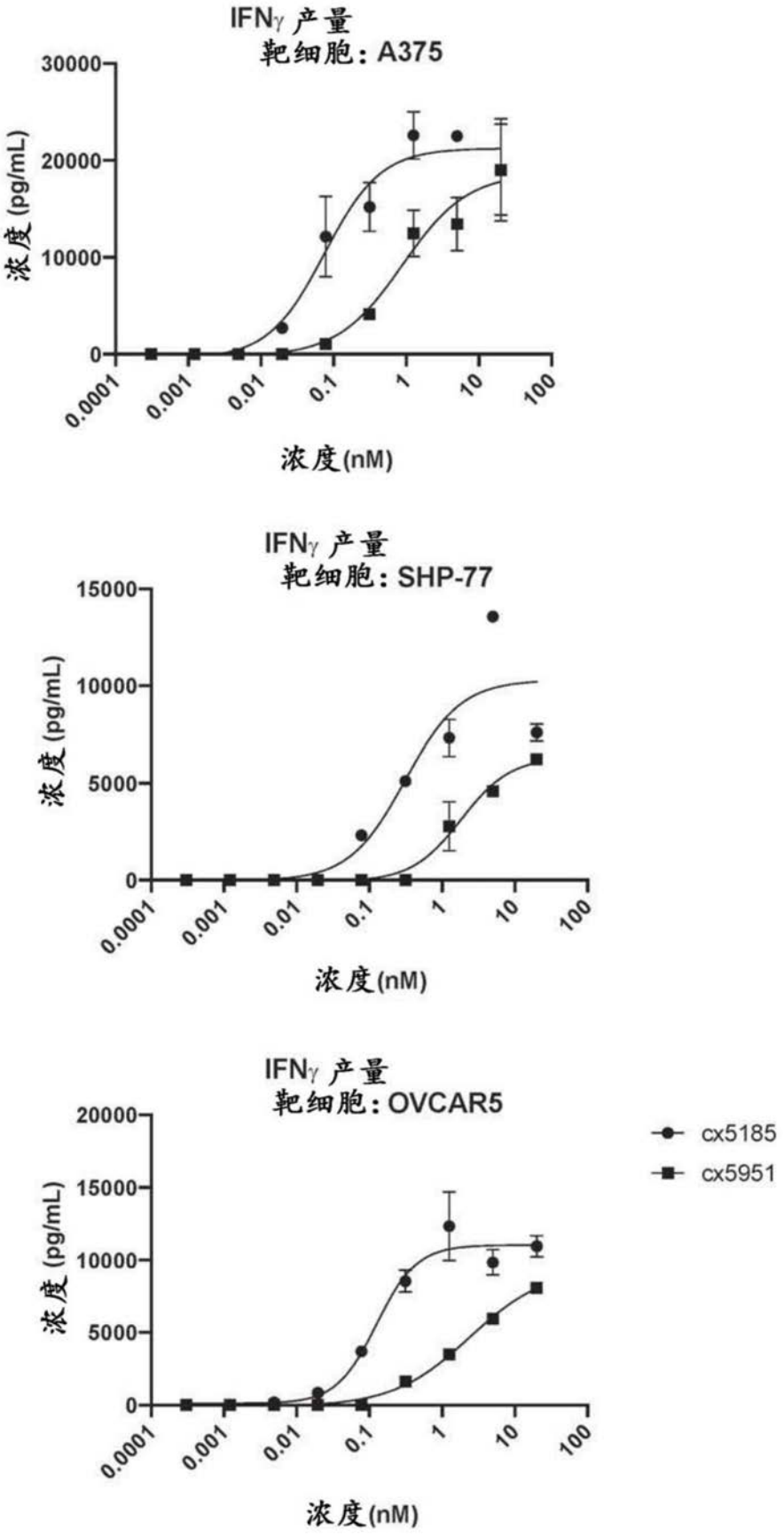

IFNγ 产量
靶细胞：A375
浓度 (pg/mL)
30000
20000
10000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度(nM)
IFNγ 产量
靶细胞：SHP-77
浓度 (pg/mL)
15000
10000
5000
0
浓度(nM)
IFNγ 产量
靶细胞：OVCAR5
浓度 (pg/mL)
20000
15000
10000
5000
0
浓度(nM)
cx5185
cx5951

FIG.17

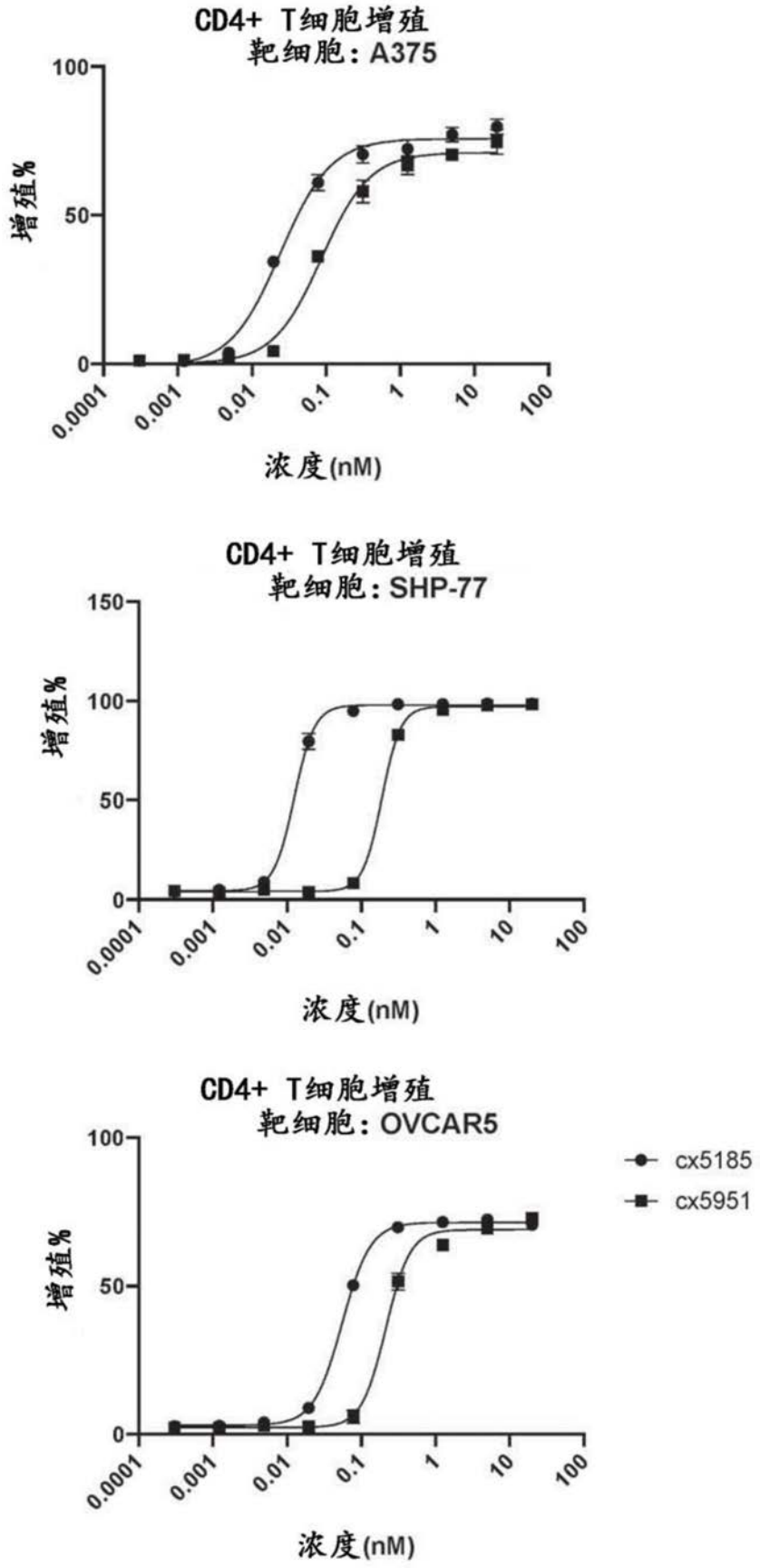

CD4+ T细胞增殖
靶细胞：A375
增殖%
100
50
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度(nM)
CD4+ T细胞增殖
靶细胞：SHP-77
增殖%
150
100
50
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度(nM)
CD4+ T细胞增殖
靶细胞：OVCAR5
增殖%
100
50
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度(nM)
cx5185
cx5951

FIG.18

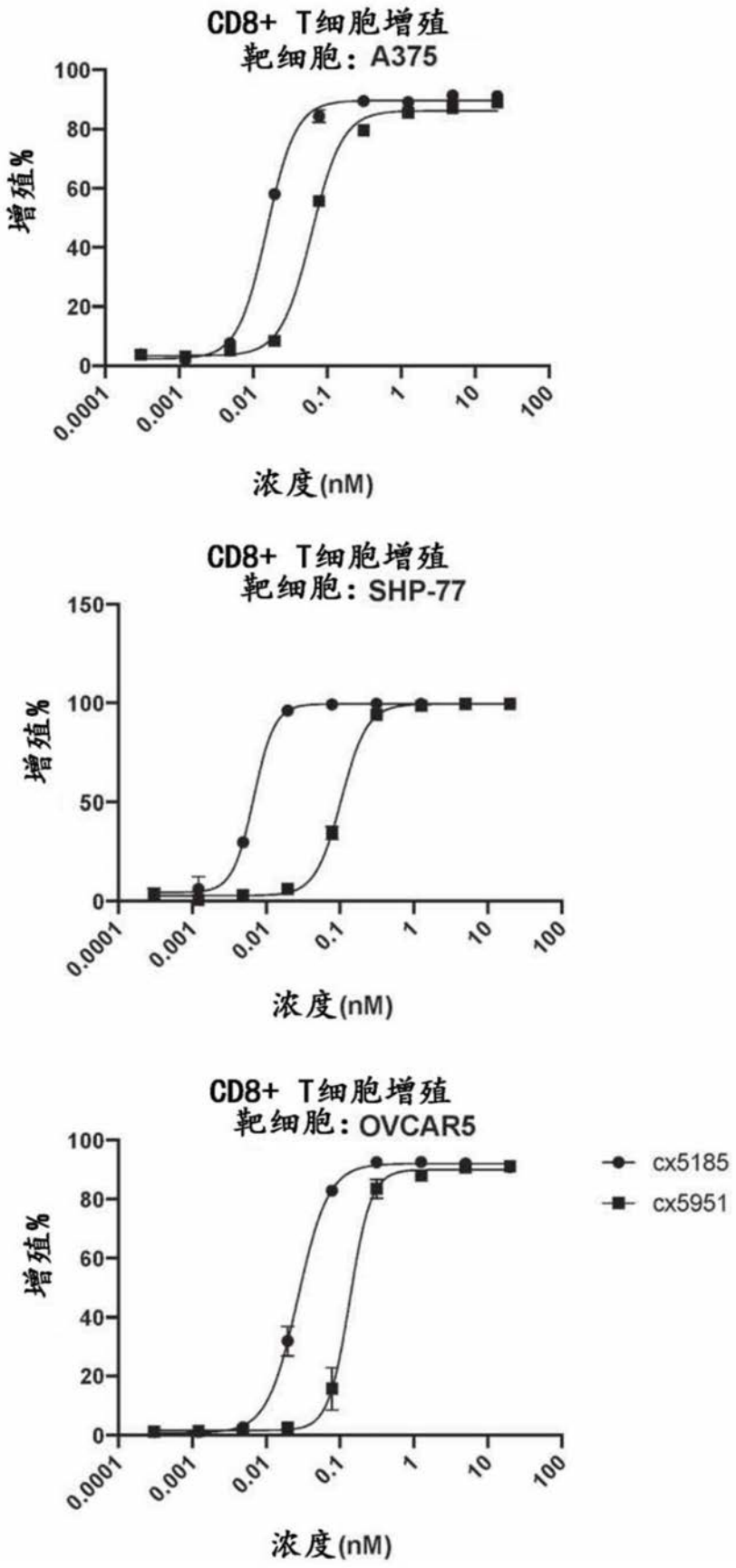

CD8+ T细胞增殖
靶细胞：A375
增殖%
浓度(nM)
CD8+ T细胞增殖
靶细胞：SHP-77
增殖%
浓度(nM)
CD8+ T细胞增殖
靶细胞：OVCAR5
增殖%
浓度(nM)
cx5185
cx5951

FIG.19

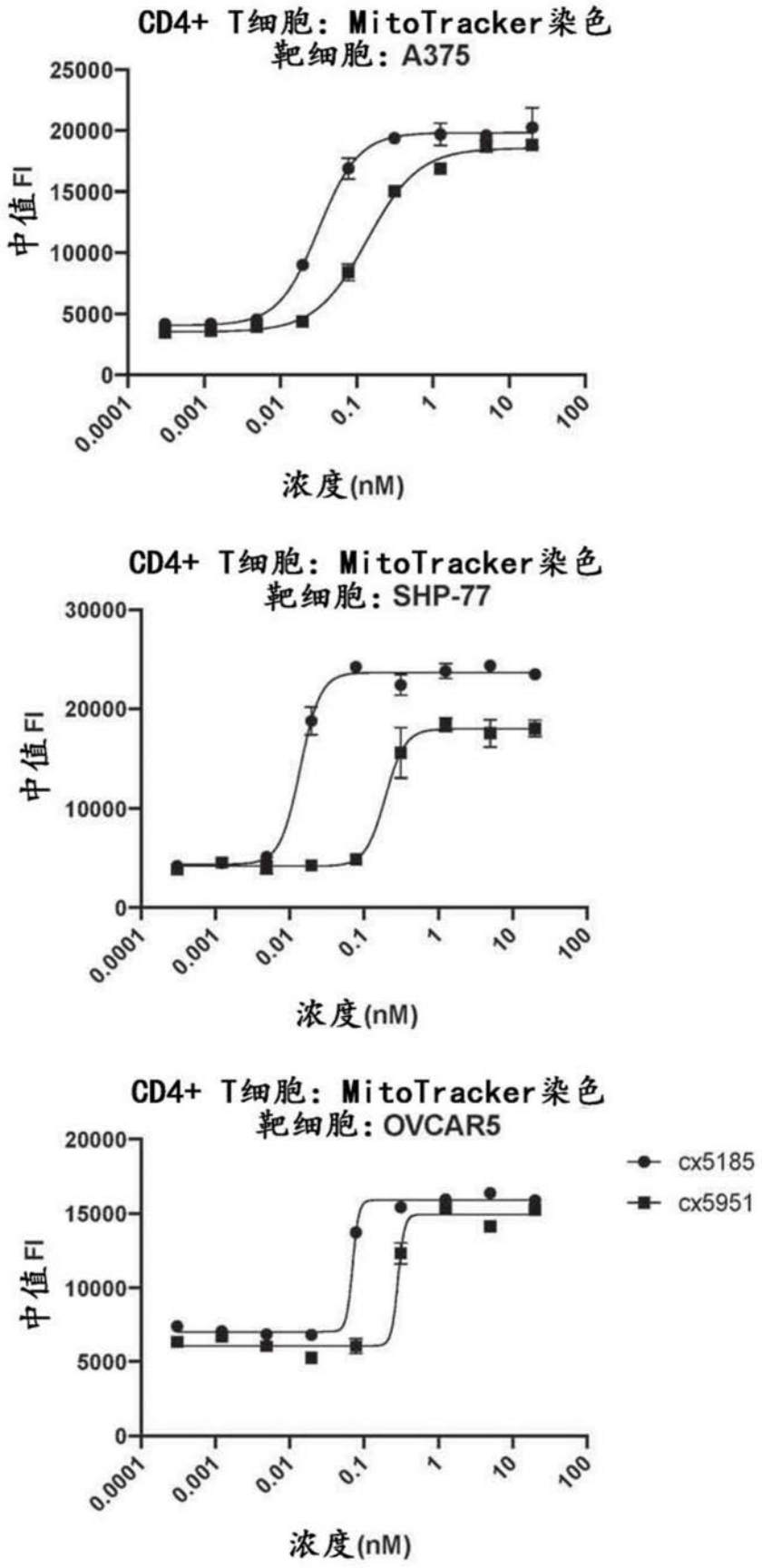

CD4+ T细胞：MitoTracker染色
靶细胞：A375
中值FI
浓度(nM)
CD4+ T细胞：MitoTracker染色
靶细胞：SHP-77
中值FI
浓度(nM)
CD4+ T细胞：MitoTracker染色
靶细胞：OVCAR5
cx5185
cx5951
中值FI
浓度(nM)

FIG.20

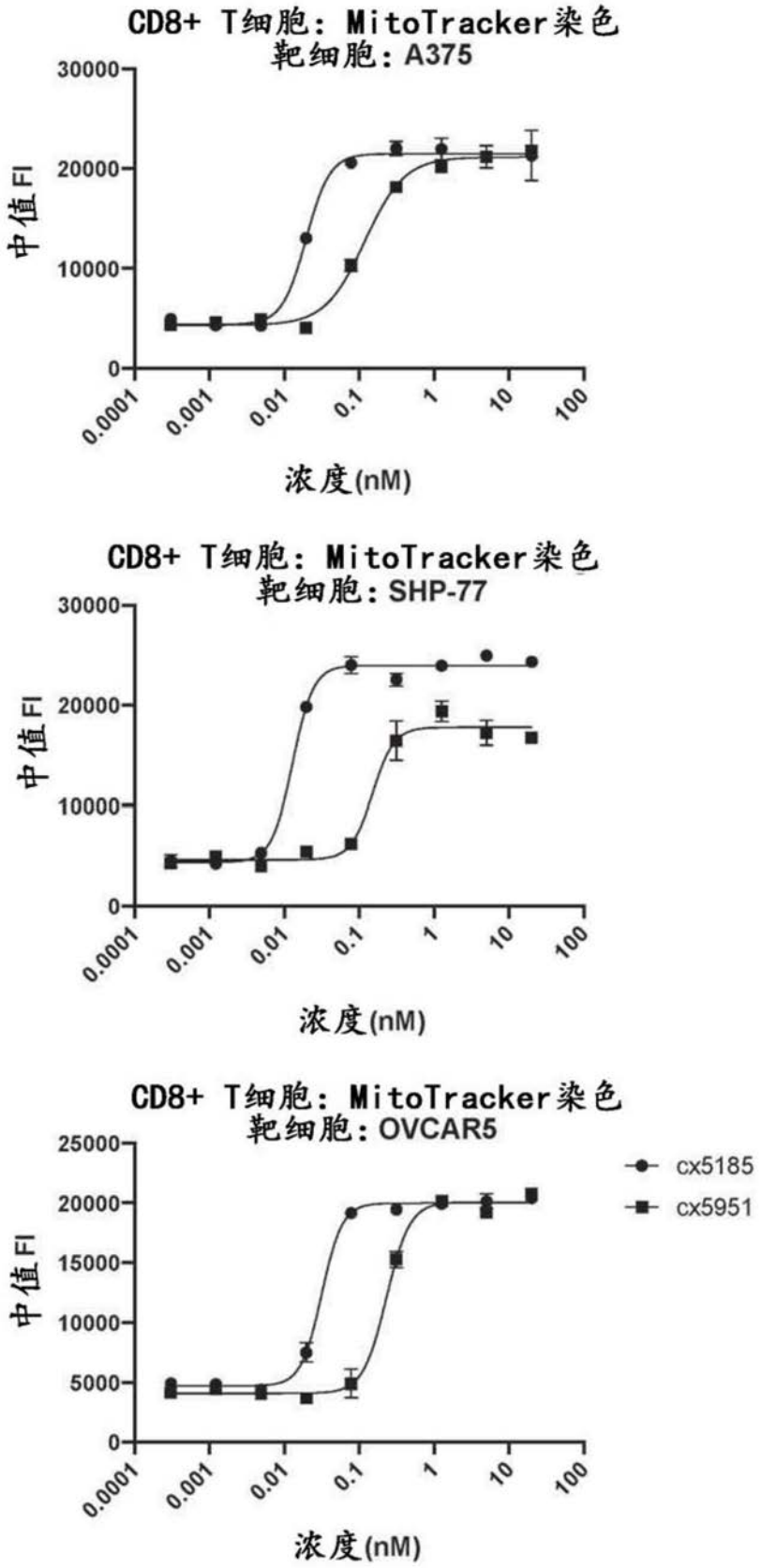

CD8+ T细胞：MitoTracker染色
靶细胞：A375
中值FI
30000
20000
10000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度(nM)
CD8+ T细胞：MitoTracker染色
靶细胞：SHP-77
中值FI
30000
20000
10000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度(nM)
CD8+ T细胞：MitoTracker染色
靶细胞：OVCAR5
中值FI
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度(nM)
cx5185
cx5951

FIG.21

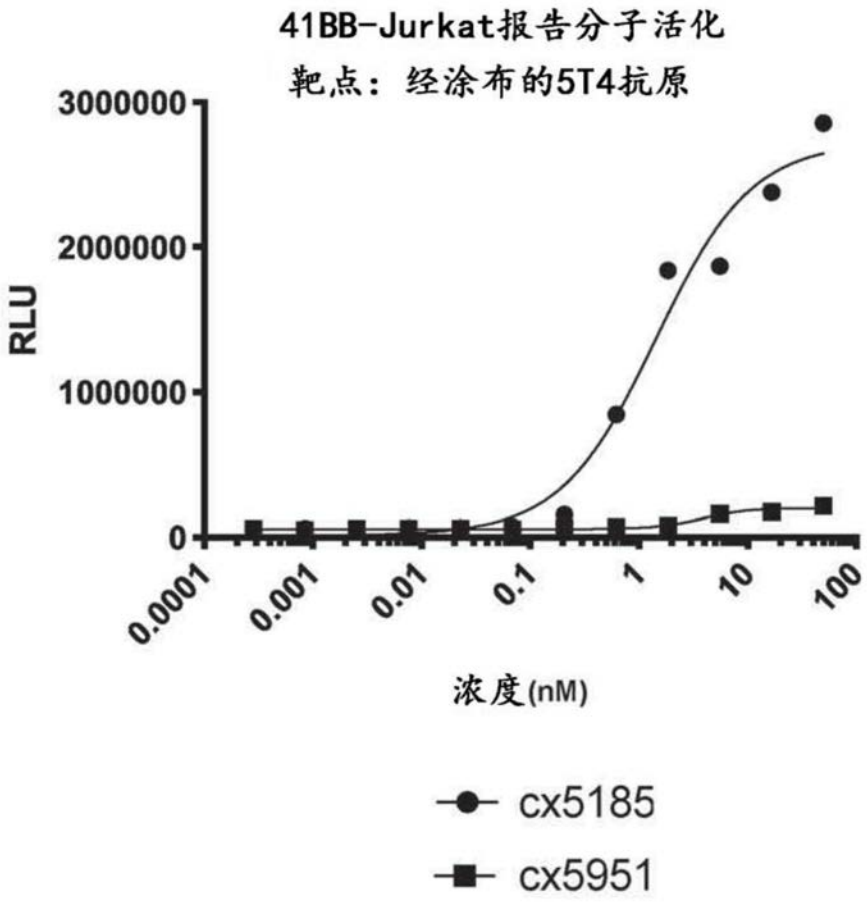


FIG.22

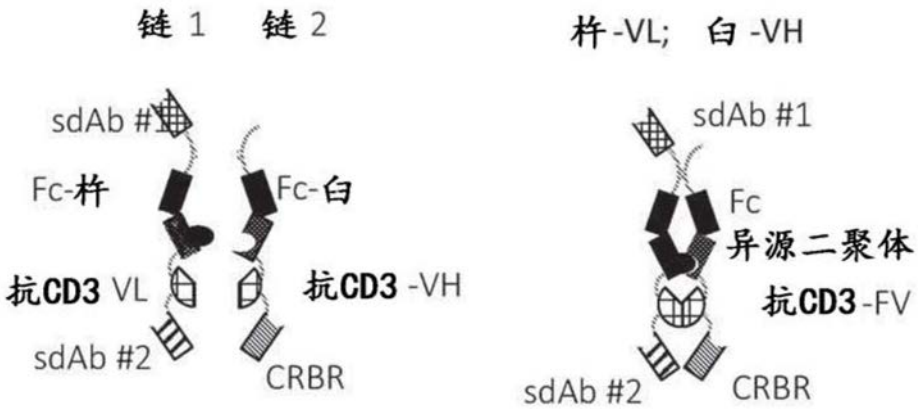


FIG.23A

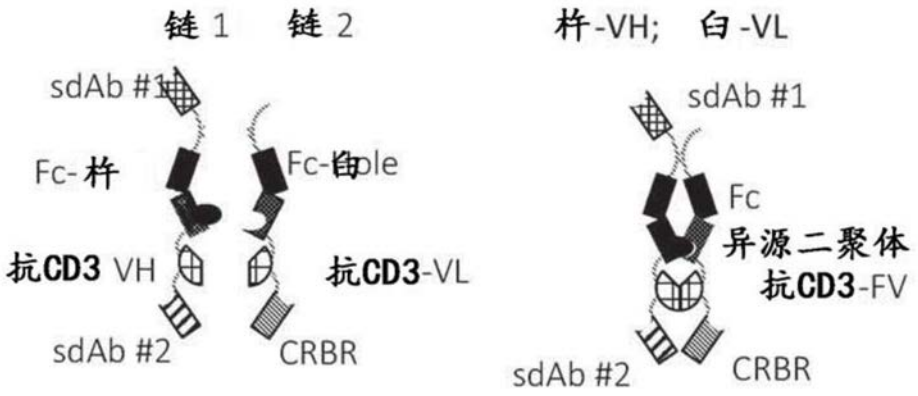

链 1
链 2
杵-VH;
白-VL
sdAb #1
Fc-杵
Fc-白
抗CD3 VH
抗CD3-VL
sdAb #2
CRBR
sdAb #1
Fc
异源二聚体
抗CD3-FV
sdAb #2
CRBR

FIG.23B

FIG. 24A

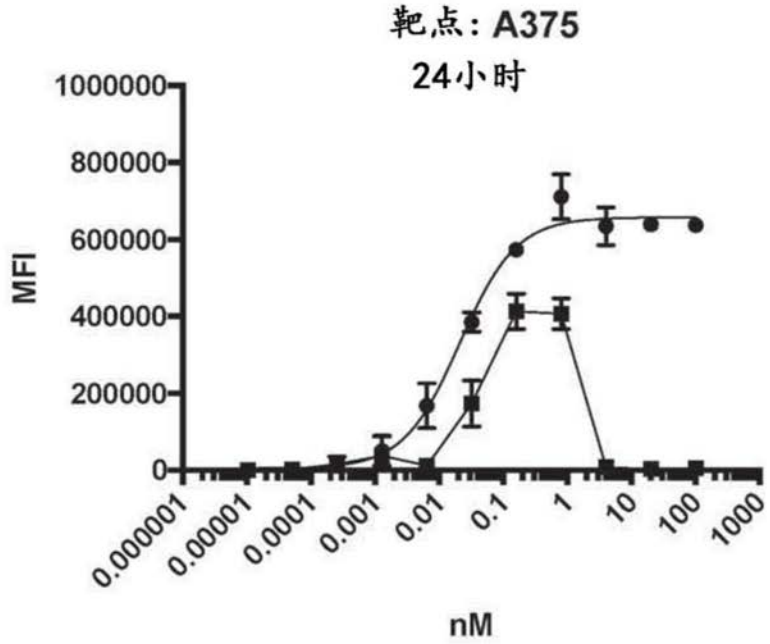


FIG. 24B

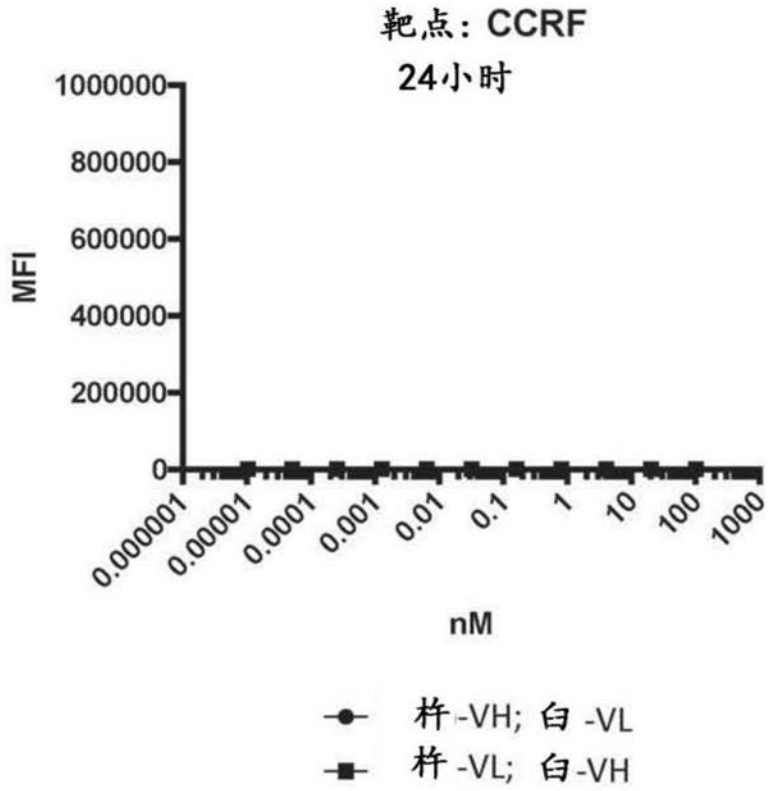


FIG. 24C

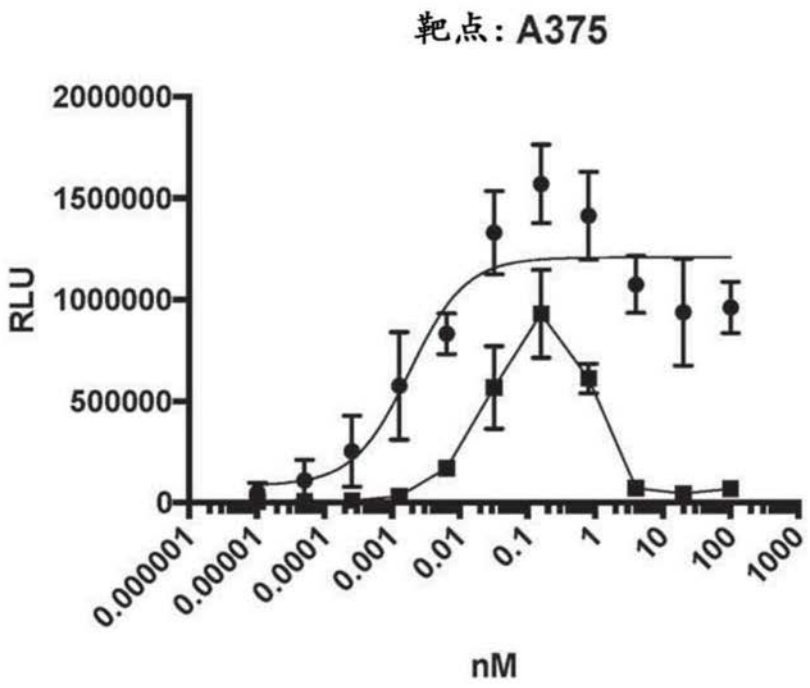
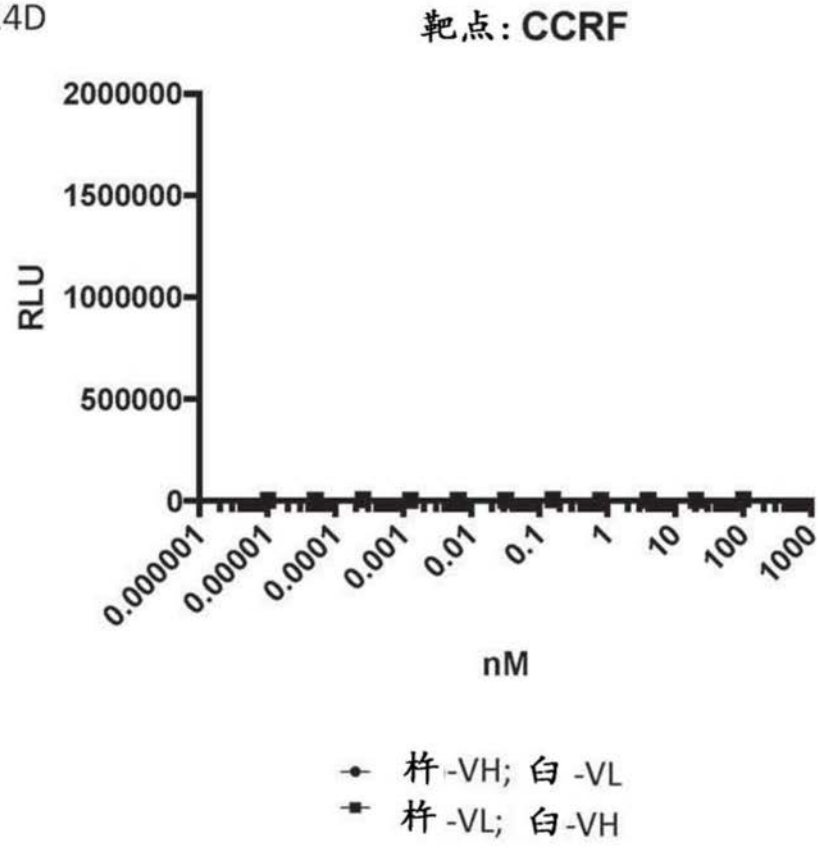


FIG. 24D



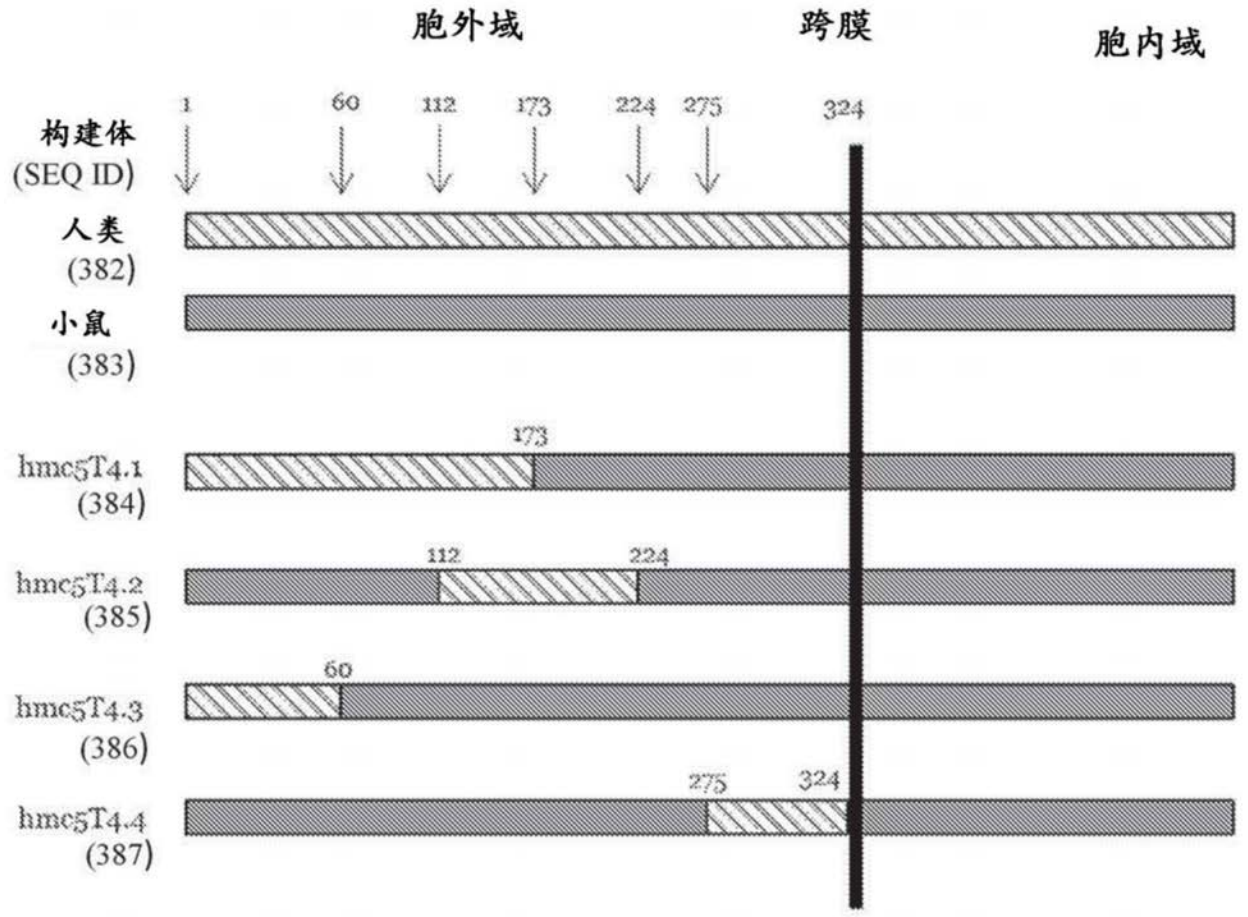


FIG.25

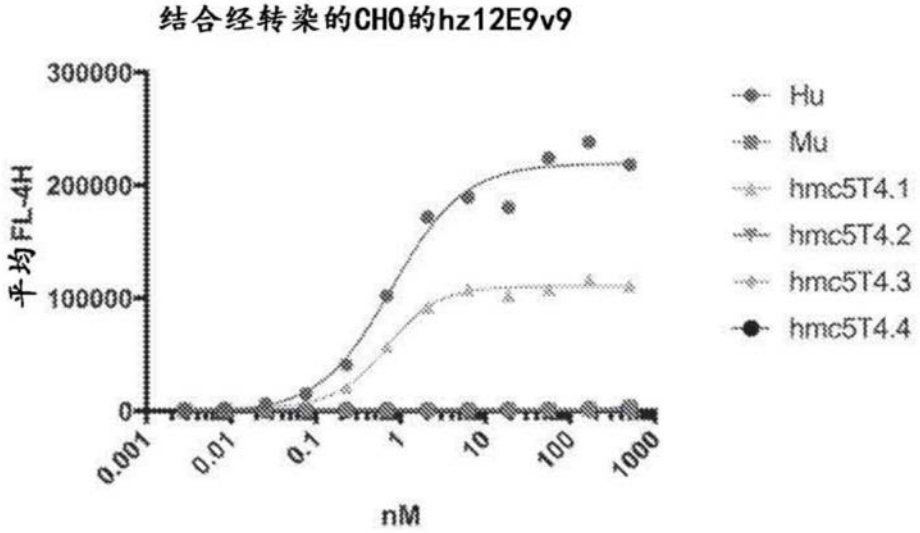


FIG.26A

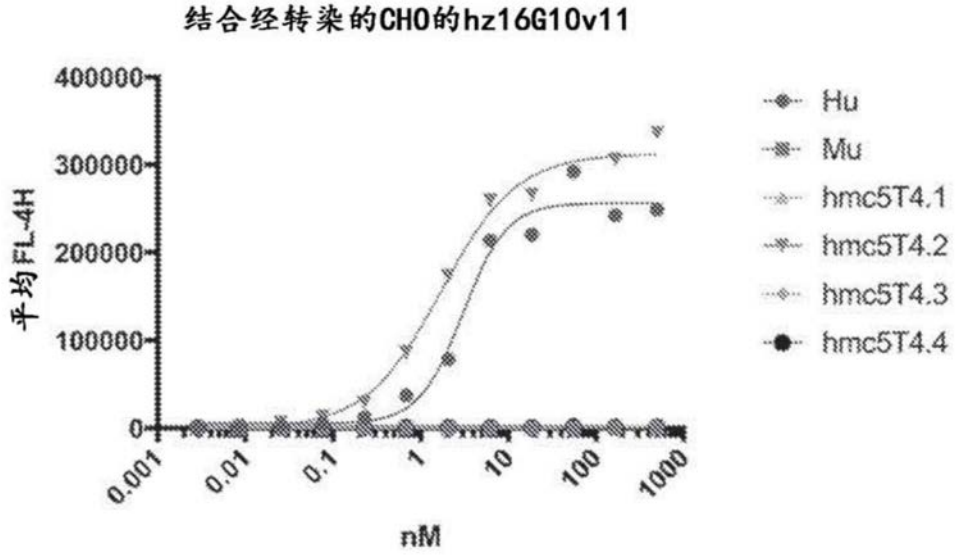


FIG.26B

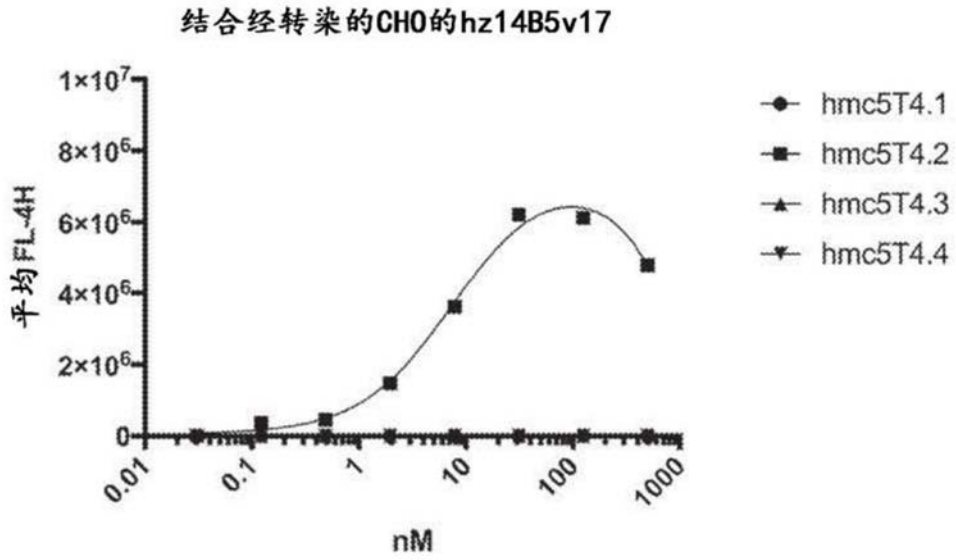


FIG.26C

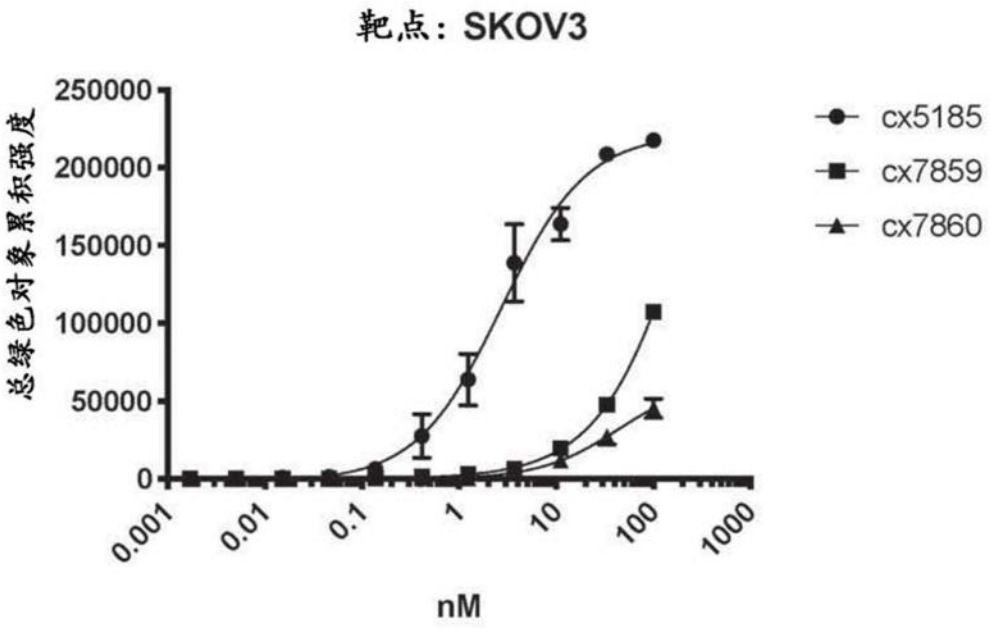


FIG.27A

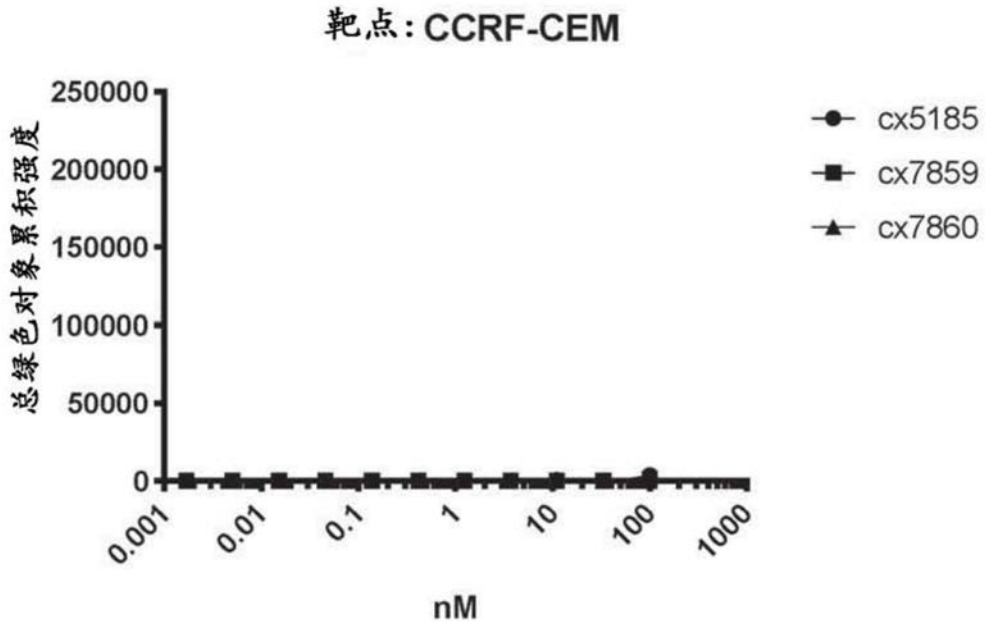


FIG.27B