



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112789294 A

(43) 申请公布日 2021.05.11

(21) 申请号 201980061774.6

K·M·威利斯 Q·德弗罗

(22) 申请日 2019.07.23

K·S·琼斯 R·A·潘迪特

J·C·蒂默

(30) 优先权数据

62/702,888 2018.07.24 US

62/744,641 2018.10.11 US

62/832,268 2019.04.10 US

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.19

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/043115 2019.07.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/023553 EN 2020.01.30

(71) 申请人 印希比股份有限公司

地址 美国加利福利亚州

权利要求书19页 说明书156页

序列表176页 附图55页

(72) 发明人 B·P·埃克尔曼 M·D·卡普兰

(54) 发明名称

含有受限CD3结合结构域和受体结合区的多特异性多肽构建体及其使用方法

(57) 摘要

本发明总体上涉及至少结合CD3、第二抗原和T细胞受体如共刺激受体或抑制性受体的多特异性多肽,其中所述多特异性多肽构建体能够接合CD3。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体结合共刺激受体并提供共刺激结合活性。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体结合抑制性受体并阻断抑制活性。在一些方面,所述多特异性多肽具有受限的CD3结合,并且仅在与所述第二抗原如肿瘤相关抗原结合后才结合或接合CD3。在一些实施方案中,所述多特异性多肽含有可切割接头,所述可切割接头当被切割时导致双重效应子功能。还提供了制备这些多特异性多肽和在多种治疗性、诊断性和预防性适应症中使用这些多特异性多肽的方法。

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

所述第一组分和所述第二组分通过接头偶联,其中所述Fc区位于所述CD3结合区的N末端;

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域;并且

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。

2. 一种多特异性多肽构建体,所述多特异性多肽构建体包含含有免疫球蛋白Fc区的第一组分和含有CD3结合区的第二组分,其中:

所述第一组分和所述第二组分通过接头偶联,其中所述Fc区位于所述CD3结合区的N末端;

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域;并且

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)。

3. 一种多特异性多肽构建体,所述多特异性多肽构建体包含含有免疫球蛋白Fc区的第一组分和含有CD3结合区的第二组分,其中:

所述第一组分和所述第二组分通过接头偶联,其中所述Fc区位于所述CD3结合区的N末端;

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域;

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR);并且

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述CD3结合区结合CD3(CD3 ϵ)。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个抗原结合结构域位于相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一组分包含第一抗原结合结构域,并且所述第二组分包含第二抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域中的每一个结合肿瘤相关抗原(TAA)。

7. 根据权利要求6所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一抗原结合结构域位于相对于所述多特异性构建体的Fc区的氨基末端,并且所述第二抗原结合结构域位于相对于所述多特异性构建体的CD3结合区的羧基末端。

8. 根据权利要求1和3-7中任一项所述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)位于相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和/或位于相

对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。

9. 根据权利要求1和3-8中任一项所述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)位于相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。

10. 根据权利要求2-7中任一项所述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)位于相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。

11. 根据权利要求2-7和10中任一项所述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)位于相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一组分包含第一抗原结合结构域,并且所述第二组分包含第二抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域中的每一个结合肿瘤相关抗原(TAA)。

13. 根据权利要求12所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一抗原结合结构域位于相对于所述多特异性构建体的Fc区的氨基末端,并且所述第二抗原结合结构域位于相对于所述多特异性构建体的CD3结合区的羧基末端。

14. 根据权利要求12或权利要求13所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一组分或所述第二组分还包含所述共刺激受体结合区(CRBR)。

15. 根据权利要求12或权利要求13所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一组分或所述第二组分还包含所述抑制性受体结合区(IRBR)。

16. 一种多特异性多肽构建体,其中所述多特异性构建体从N末端到C末端按顺序包含:
结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)和/或结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域;

免疫球蛋白Fc区;

接头;

结合CD3(CD3 ϵ)的CD3结合区;以及

结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)和/或与肿瘤相关抗原(TAA)结合的抗原结合结构域;

其中所述多特异性多肽构建体包含至少一个CRBR和至少一个抗原结合结构域。

17. 根据权利要求16所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体仅包含一个共刺激受体结合区(CRBR)。

18. 一种多特异性多肽构建体,其中所述多特异性构建体从N末端到C末端按顺序包含:
结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)和/或结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域;

免疫球蛋白Fc区;

接头;

结合CD3(CD3 ϵ)的CD3结合区;以及

结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)和/或与肿瘤相关抗原(TAA)结合的抗原结合结构域;

其中所述多特异性多肽构建体包含至少一个IRBR和至少一个抗原结合结构域。

19. 根据权利要求18所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体仅包

含一个抑制性受体结合区 (IRBR)。

20. 一种多特异性多肽构建体,其中所述多特异性构建体从N末端到C末端按顺序包含:
结合抑制性受体的抑制性受体结合区 (IRBR) 或结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR) 中的一种和/或结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域;

免疫球蛋白Fc区;

接头;

结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区;以及

所述IRBR或所述CRBR中的另一种和/或与肿瘤相关抗原 (TAA) 结合的抗原结合结构域;

其中所述多特异性多肽构建体包含至少一个IRBR、至少一个CRBR和至少一个抗原结合结构域。

21. 根据权利要求16-20中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含两个与TAA结合的抗原结合结构域。

22. 根据权利要求21所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗原结合结构域与相同的肿瘤相关抗原 (TAA) 结合。

23. 根据权利要求21或权利要求22所述的多特异性多肽构建体,其中一个抗原结合结构域位于相对于所述Fc区的氨基末端,并且一个抗原结合结构域位于相对于所述CD3结合区的羧基末端。

24. 一种多特异性多肽构建体,其中所述多特异性构建体从N末端到C末端按顺序包含:

免疫球蛋白Fc区;

接头;

结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区;以及

结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域和结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR)。

25. 一种多特异性多肽构建体,其中所述多特异性构建体从N末端到C末端按顺序包含:

结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域和结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR);

免疫球蛋白Fc区;

接头;以及

结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区。

26. 一种多特异性多肽构建体,其中所述多特异性构建体从N末端到C末端按顺序包含:

免疫球蛋白Fc区;

接头;

结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区;以及

结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域和结合抑制性受体的抑制性受体结合区 (IRBR)。

27. 一种多特异性多肽构建体,其中所述多特异性构建体从N末端到C末端按顺序包含:

结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域和结合抑制性受体的抑制性受体结合区 (IRBR);

免疫球蛋白Fc区;

接头;以及

结合CD3 (CD3 ϵ)的CD3结合区。

28. 根据权利要求1-27中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区是同二聚体Fc区。

29. 根据权利要求1-28中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区是人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4的Fc区,或者是其免疫活性片段。

30. 根据权利要求1-29中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区包含含有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列的多肽。

31. 根据权利要求1-29中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区包含含有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列的多肽;

所述Fc区包含含有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列的多肽;或者

所述Fc区包含含有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列的多肽。

32. 根据权利要求1-23、29-31中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区是异二聚体Fc区。

33. 根据权利要求32所述的多特异性多肽构建体,其中与同二聚体Fc区的多肽相比,任选地与SEQ ID NO:1所示的Fc多肽或其免疫活性片段相比,所述异二聚体Fc区的一种或两种Fc多肽包含至少一个修饰以诱导异二聚化。

34. 根据权利要求33所述的多特异性多肽构建体,其中所述异二聚体Fc的Fc多肽中的每一种独立地包含至少一个氨基酸修饰。

35. 根据权利要求34所述的多特异性多肽构建体,其中所述异二聚体Fc的Fc多肽中的每一种包含杵臼结构修饰或包含电荷突变以增加所述多肽的静电互补性。

36. 根据权利要求35所述的多特异性多肽构建体,其中所述氨基酸修饰是杵臼结构修饰。

37. 根据权利要求32-36中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述CD3结合区包含可变重链区(VH)和可变轻链区(VL),并且所述VL在所述异二聚体Fc区的第一Fc多肽的C末端且所述VH在所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽的C末端,其中所述第一Fc多肽包含臼突变且所述第二Fc多肽包含杵突变。

38. 根据权利要求32-37中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述异二聚体Fc的第一Fc多肽包含选自Thr366Ser、Leu368Ala、Tyr407Val及其组合的修饰,并且所述异二聚体Fc的第二Fc多肽包含修饰Thr366Trp。

39. 根据权利要求38所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽还包含非半胱氨酸残基至半胱氨酸残基的修饰,其中所述第一多肽的修饰是在位置Ser354和Tyr349中的一个处,并且所述第二Fc多肽的修饰是在位置Ser354和Tyr349中的另一个处。

40. 根据权利要求35所述的多特异性多肽构建体,其中所述氨基酸修饰是电荷突变以

增加所述多肽的静电互补性。

41. 根据权利要求32-35和40中任一项所述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多肽或者所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的每一种包含互补位置的修饰,其中所述修饰是用具有与另一多肽的互补氨基酸相反电荷的氨基酸替代。

42. 根据权利要求33-41中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述异二聚体Fc的第一Fc多肽或第二Fc多肽中的一种还包含在残基Ile253处的修饰。

43. 根据权利要求42所述的多特异性多肽构建体,其中所述修饰是Ile253Arg。

44. 根据权利要求33-43中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述异二聚体Fc的第一Fc多肽或第二Fc多肽中的一种还包含在残基His435处的修饰。

45. 根据权利要求44所述的多特异性多肽构建体,其中所述修饰是His435Arg。

46. 根据权利要求1-45中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区包含缺乏Lys447的多肽。

47. 根据权利要求1-46中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区包含含有至少一个修饰以增强FcRn结合的多肽。

48. 根据权利要求47所述的多特异性多肽构建体,其中所述修饰是在选自以下的位置处:Met252、Ser254、Thr256、Met428、Asn434及其组合。

49. 根据权利要求48所述的多特异性多肽构建体,其中所述修饰是在选自以下的位置处:Met252Y、Ser254T、Thr256E、Met428L、Met428V、Asn434S及其组合。

50. 根据权利要求48所述的多特异性多肽构建体,其中所述修饰是在位置Met252处和位置Met428处。

51. 根据权利要求50所述的多特异性多肽构建体,其中所述修饰是Met252Y和Met428L。

52. 根据权利要求50所述的多特异性多肽构建体,其中所述修饰是Met252Y和Met428V。

53. 根据权利要求32-52中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述异二聚体Fc的第一多肽包含SEQ ID NO:82、86、94或96中任一个所示的氨基酸序列,并且所述异二聚体Fc的第二多肽包含SEQ ID NO:83、87、90、92、98或100中任一个所示的氨基酸序列。

54. 根据权利要求32-53中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述异二聚体Fc的第一多肽包含SEQ ID NO:291、293、297或298中任一个所示的氨基酸序列,并且所述异二聚体Fc的第二多肽包含SEQ ID NO:292、294、295、296、299或300中任一个所示的氨基酸序列。

55. 根据权利要求1-54中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区包含含有至少一个氨基酸修饰的多肽,所述至少一个氨基酸修饰降低效应子功能和/或降低与选自Fc γ 受体或C1q的效应分子的结合。

56. 根据权利要求55所述的多特异性多肽构建体,其中所述一个或多个氨基酸修饰是Glu233、Leu234或Leu235中的一个或多个的缺失。

57. 根据权利要求32-56中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述异二聚体Fc的第一多肽包含SEQ ID NO:84、88、95或97中任一个所示的氨基酸序列,并且所述异二聚体Fc的第二多肽包含SEQ ID NO:85、89、91、93、99或101中任一个所示的氨基酸序列。

58. 根据权利要求32-56中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述异二聚体Fc的第一多肽包含SEQ ID NO:291、293、297或298中任一个所示的氨基酸序列,并且所述异二聚体Fc的第二多肽包含SEQ ID NO:292、294、295、296、299或300中任一个所示的氨基酸序列。

59. 根据权利要求1-54中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区包含含有至少一个修饰以增强Fc γ R结合的多肽。

60. 根据权利要求59所述的多特异性多肽构建体,其中所述修饰是在Ser239或Ile332处的修饰。

61. 根据权利要求1-54和59中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中与未经修饰的Fc区相比,所述Fc区的糖基化被修饰以增强Fc γ R结合。

62. 根据权利要求61所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区缺乏岩藻糖含量或具有降低的岩藻糖含量。

63. 根据权利要求1-62中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述CD3结合区是抗CD3抗体或抗原结合片段。

64. 根据权利要求63所述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可变重链区(VH)和可变轻链区(VL)。

65. 根据权利要求64所述的多特异性构建体,其中所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VL与所述异二聚体Fc的第一Fc多肽连接,所述第一Fc多肽包含选自Thr366Ser、Leu368Ala、Tyr407Val及其组合的修饰,并且其中所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH与所述异二聚体Fc的第二Fc多肽连接,所述第二Fc多肽包含修饰Thr366Trp。

66. 根据权利要求1-65中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述CD3结合区是单价的。

67. 根据权利要求1-66中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述CD3结合区是包含可变重链区(VH)和可变轻链区(VL)的可变片段(Fv)。

68. 根据权利要求63-66中任一项所述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是单链抗体,任选地不是单链可变片段(scFv)。

69. 根据权利要求64-68中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc是异二聚体Fc,并且构成所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH和VL连接至所述异二聚体Fc的相对多肽。

70. 根据权利要求1-69中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述CD3结合区不能或基本上不能结合或接合CD3,除非所述抗原结合结构域中的至少一个与其TAA结合。

71. 根据权利要求1-70中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述CD3结合区不能或基本上不能结合或接合CD3,除非所述抗原结合结构域中的至少两个与其TAA结合。

72. 根据权利要求1-71中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是多肽接头。

73. 根据权利要求72所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是长度为最多25个氨基酸的多肽。

74. 根据权利要求72或权利要求73所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是从或从约2至24个氨基酸、2至20个氨基酸、2至18个氨基酸、2至14个氨基酸、2至12个氨基酸、2至10个氨基酸、2至8个氨基酸、2至6个氨基酸、6至24个氨基酸、6至20个氨基酸、6至18个氨基酸、6至14个氨基酸、6至12个氨基酸、6至10个氨基酸、6至8个氨基酸、8至24个氨基酸、8至20个氨基酸、8至18个氨基酸、8至14个氨基酸、8至12个氨基酸、8至10个氨基酸、10至24个氨基酸、10至20个氨基酸、10至18个氨基酸、10至14个氨基酸、10至12个氨基酸、12至24个氨基酸、12至20个氨基酸、12至18个氨基酸、12至14个氨基酸、14至24个氨基酸、14至20个氨基

酸、14至18个氨基酸、18至24个氨基酸、18至20个氨基酸或20至24个氨基酸的多肽。

75. 根据权利要求72-74中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是长度为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸的多肽。

76. 根据权利要求72-75中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是长度为3至18个氨基酸的多肽。

77. 根据权利要求72-75中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是长度为12至18个氨基酸的多肽。

78. 根据权利要求72-75中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是长度为15至18个氨基酸的多肽。

79. 根据权利要求1-78中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是不可切割接头。

80. 根据权利要求79所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头不含有由蛋白酶特异性识别以切割的底物识别位点。

81. 根据权利要求79或权利要求80所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含GS、GGS、GGGS (SEQ ID NO:149)、GGGGGS (SEQ ID NO:135) 及其组合。

82. 根据权利要求79-81中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含(GGS)_n,其中n是1至10。

83. 根据权利要求79-82中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含(GGGGS)_n (SEQ ID NO:173),其中n是1至10。

84. 根据权利要求79-83中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含(GGGGGS)_n (SEQ ID NO:172),其中n是1至4。

85. 根据权利要求79-84中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含GGS。

86. 根据权利要求79-84中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含GGGGS (SEQ ID NO:149)。

87. 根据权利要求79-84中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含GGGGGS (SEQ ID NO:135)。

88. 根据权利要求79-84中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含(GGS)₂ (SEQ ID NO:10)。

89. 根据权利要求79-84中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含GGSGGSGGS (SEQ ID NO:11)。

90. 根据权利要求79-84中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含GGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:12)。

91. 根据权利要求79-84中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含GGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:13)。

92. 根据权利要求79-84中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:119)。

93. 根据权利要求79-84中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含GGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:147)。

94. 根据权利要求79-84中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含和GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:170)。

95. 根据权利要求1-78中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是可切割接头。

96. 一种多特异性多肽构建体,所述多特异性多肽构建体包含含有异二聚体Fc区的第一组分和含有抗CD3抗体或抗原结合片段的第二组分,所述抗CD3抗体或抗原结合片段包含可变重链区(VH)和可变轻链区(VL),其中:

构成所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH和VL连接至所述异二聚体Fc的相对多肽;

所述第一组分和所述第二组分通过可切割接头偶联,其中所述异二聚体Fc区位于所述抗CD3抗体的N末端;

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域;并且

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。

97. 根据权利要求96所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种还包含至少一个结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)。

98. 一种多特异性多肽构建体,所述多特异性多肽构建体包含含有异二聚体Fc区的第一组分和含有抗CD3抗体或抗原结合片段的第二组分,所述抗CD3抗体或抗原结合片段包含可变重链区(VH)和可变轻链区(VL),其中:

构成所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH和VL连接至所述异二聚体Fc的相对多肽;

所述第一组分和所述第二组分通过可切割接头偶联,其中所述异二聚体Fc区位于所述抗CD3抗体的N末端;

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域;并且

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)。

99. 根据权利要求98所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种还包含至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。

100. 根据权利要求96-99中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中与切割状态相比,当所述多特异性多肽构建体处于未切割状态时,所述CD3结合区与CD3的结合大幅降低。

101. 根据权利要求96-100中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中在切割状态下,所述第一组分和所述第二组分不连接。

102. 根据权利要求96-101中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头是起蛋白酶底物作用的多肽。

103. 根据权利要求102所述的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶由免疫效应细胞、由肿瘤或由存在于肿瘤微环境中的细胞产生。

104. 根据权利要求103所述的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶由免疫效应细胞产生,并且所述免疫效应细胞是激活的T细胞、自然杀伤(NK)细胞或NK T细胞。

105. 根据权利要求102-104中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶选

自间质蛋白酶、基质金属蛋白酶(MMP)、颗粒酶B及其组合。

106. 根据权利要求105所述的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶是颗粒酶B。

107. 根据权利要求96-106中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头包含通式P4 P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:150)的氨基酸序列,其中P4是氨基酸I、L、Y、M、F、V或A;P3是氨基酸A、G、S、V、E、D、Q、N或Y;P2是氨基酸H、P、A、V、G、S或T;P1是氨基酸D或E;并且P1'是氨基酸I、L、Y、M、F、V、T、S、G或A。

108. 根据权利要求96-107中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头包含通式P4 P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:151)的氨基酸序列,其中P4是氨基酸I或L;P3是氨基酸E;P2是氨基酸P或A;P1是氨基酸D;并且P1'是氨基酸I、V、T、S或G。

109. 根据权利要求96-108中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头包含氨基酸序列IEPDI (SEQ ID NO:136)、LEPDG (SEQ ID NO:152)、LEADT (SEQ ID NO:137)、IEPDG (SEQ ID NO:138)、IEPDV (SEQ ID NO:139)、IEPDS (SEQ ID NO:140)、IEPDT (SEQ ID NO:141)或LEADG (SEQ ID NO:153)。

110. 根据权利要求96-109中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头包含选自SEQ ID NO:22、105-112、136-141、148、150-153的氨基酸序列。

111. 根据权利要求96-110中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头包含SEQ ID NO:105所示的氨基酸序列。

112. 根据权利要求111所述的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶是间质蛋白酶。

113. 根据权利要求96-112中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中:

所述可切割接头包含序列P1QAR↓(A/V) (SEQ ID NO:154),其中P1是任何氨基酸;或者所述可切割接头包含序列RQAR(A/V) (SEQ ID NO:155)。

114. 根据权利要求96-113中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头包含序列RQARV (SEQ ID NO:156)。

115. 根据权利要求96-114中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头包含选自SEQ ID NO:23、154-156的氨基酸序列。

116. 根据权利要求105所述的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶是MMP。

117. 根据权利要求116所述的多特异性多肽构建体,其中所述MMP是MMP-2。

118. 根据权利要求96-117中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头包含通式P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:157),其中P3是P、V或A;P2是Q或D;P1是A或N;并且P1'是L、I或M。

119. 根据权利要求96-118中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头包含通式P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:158),其中P3是P;P2是Q或D;P1是A或N;并且P1'是L或I。

120. 根据权利要求96-119中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头包含序列PAGL (SEQ ID NO:24)。

121. 根据权利要求96-120中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头包含选自SEQ ID NO:22-31、104-114、117-118、136-144、148、150-158的氨基酸序列。

122. 根据权利要求69-121中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体至少包含(i)第一多肽,其包含所述异二聚体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结构域;以及(ii)第二多肽,其包含所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头任选地与存在于所述第一多肽中相同的接头和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL结构域中的另一个,

其中所述第一多肽和所述第二多肽中的一种或两种包含至少一个与肿瘤相关抗原(TAA)结合的抗原结合结构域,并且所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR),

其中所述多特异性多肽构建体包含至少一个CRBR和至少一个抗原结合结构域。

123. 根据权利要求1-122中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中一个或多个结合TAA的抗原结合结构域导致与所述TAA的单价、二价、三价或四价结合。

124. 根据权利要求122或权利要求123所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一多肽或所述第二多肽中仅一种包含所述至少一个结合TAA的抗原结合结构域。

125. 根据权利要求122-124中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个抗原结合结构域位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多肽或第二多肽中的一种的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多肽或第二多肽中的一种的CD3结合区的羧基末端。

126. 根据权利要求122-124中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个抗原结合结构域位于相对于所述多特异性构建体的Fc区的氨基末端,并且所述第二抗原结合结构域位于相对于所述多特异性构建体的CD3结合区的羧基末端。

127. 根据权利要求122-126中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一多肽或所述第二多肽中仅一种包含所述至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。

128. 根据权利要求122-127中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述共刺激受体结合区(CRBR)位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多肽或第二多肽中的一种的Fc区的氨基末端或位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多肽或第二多肽中的一种的CD3结合区的羧基末端。

129. 根据权利要求122-128中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中:

所述第一多肽按N末端到C末端的顺序包含:结合肿瘤相关抗原(TAA)的第一抗原结合结构域、所述异二聚体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VL或VH以及结合肿瘤相关抗原(TAA)的第二抗原结合结构域;并且

所述第二多肽按N末端到C末端的顺序包含:所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头任选地与存在于所述第一多肽中相同的接头、所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL中的另一个以及结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。

130. 根据权利要求122-129中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述异二聚体Fc区包含Fc₁多肽和Fc₂多肽,其中所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VL位于所述Fc₁的C末端,并且所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH位于所述Fc₂的C末端。

131. 根据权利要求1-130中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个包含所述TAA的天然同源结合配偶体的细胞外结构域或其结合片段,或其展现出与所述TAA的结合活性的变体。

132. 根据权利要求1-131中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个是选自以下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、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。

133. 根据权利要求1-132中任一项所述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)是或包含所述共刺激受体的天然同源结合配偶体的细胞外结构域或其结合片段,或其展现出与所述共刺激受体的结合活性的变体。

134. 根据权利要求1-132中任一项所述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)是选自以下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、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。

135. 根据权利要求132或权利要求134所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段是Fv、scFv、Fab或单结构域抗体(sdAb)。

136. 根据权利要求132、权利要求134或权利要求122所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或抗原结合片段是sdAb。

137. 根据权利要求1-136中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域是单链抗体片段。

138. 根据权利要求137所述的多特异性多肽构建体,其中所述单链抗体片段是单结构域抗体或者是单链可变片段(scFv)。

139. 根据权利要求136-138中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述sdAb是人sdAb或人源化sdAb。

140. 根据权利要求136-139中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述sdAb是VHH、VNAR、工程化VH结构域或工程化VK结构域。

141. 根据权利要求132、权利要求134或权利要求135所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段是scFv。

142. 根据权利要求132、权利要求134或权利要求135所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段是Fab。

143. 根据权利要求1-132和134-142中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含:

(i) 第一多肽,其包含所述异二聚体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结构域;

(ii) 第二多肽,其包含所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VL结构域;

(iii) 第三多肽,其包含与肿瘤相关抗原结合的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL;

(iv) 第四多肽,其包含与共刺激受体结合的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL,

其中所述第一多肽和/或所述第二多肽还包含(1)与所述肿瘤相关抗原结合的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL中的另一个和(2)与所述共刺激受体结合的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL中的另一个。

144. 根据权利要求1-132和134-142中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含:

(i) 第一多肽,其包含所述异二聚体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结构域;

(ii) 第二多肽,其包含所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VL结构域;以及

(iii) 第三多肽,其包含与共刺激受体结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL,

其中所述第一多肽和/或所述第二多肽还包含与所述共刺激受体结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个,并且

所述第一多肽和/或所述第二多肽还包含至少一个结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域。

145. 根据权利要求1-132和134-142中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含:

(i) 第一多肽,其包含所述异二聚体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结构域;

(ii) 第二多肽,其包含所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VL结构域;以及

(iii) 第三多肽,其包含与肿瘤相关抗原结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL;

其中所述第一多肽和/或所述第二多肽还包含与所述肿瘤相关抗原结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个,并且

所述第一多肽和/或所述第二多肽还包含至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR)。

146. 根据权利要求144或权利要求145所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一多肽或所述第二多肽中仅一种包含所述Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个。

147. 根据权利要求144或权利要求145所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一多肽或所述第二多肽两者均包含所述Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个。

148. 根据权利要求146或权利要求147所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多肽或第二多肽中的一种的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多肽或第二多肽中的一种的CD3结合区的羧基末端。

149. 根据权利要求146-148中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个位于相对于所述第一多肽或所述第二多肽的Fc区的氨基末端和位于相对于所述第一多肽或所述第二多肽中的另一种的CD3结合区的羧基末端。

150. 根据权利要求1-149中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个与选自以下的肿瘤抗原结合:1-92-LFA-3、5T4、 α -4整合素、 α -V整合素、 α 4 β 1整合素、 α 4 β 7整合素、AGR2、抗路易斯-Y、爱帕琳肽J受体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5补体、C-242、CA9、CA19-9 (路易斯a)、碳酸酐酶9、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132 (IL-2RG)、CD133、CD137、CD138、CD166、CD172A、CD248、CDH6、CEACAM5 (CEA)、CEACAM6 (NCA-90)、密封蛋白-3、密封蛋白-4、cMet、胶原蛋白、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、EPA2、EPHB2、ERBB3、RSV的F蛋白、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、叶酸受体 α (FR α)、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、透明质酸酶、ICOS、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IgE、IgE受体 (FceRI)、IGF、IGF1R、IL1B、IL1R、IL2、IL11、IL12、IL12p40、IL-12R、IL-12R β 1、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、Jagged配体、Jagged 1、Jagged 2、KISS1-R、LAG-3、LIF-R、路易斯X、LIGHT、LRP4、LRRC26、Ly6G6D、LyPD1、MCSP、间皮素、MRP4、MUC1、粘蛋白-16 (MUC16、CA-125)、Na/K ATP酶、NGF、朊蛋白、Notch受体Notch 1、Notch 2、Notch 3、Notch 4、NOV、OSM-R、OX-40、PAR2、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGFR α 、PDGFR β 、PD-1、PD-L1、PD-L2、磷脂酰丝氨酸、P1GF、PSCA、PSMA、PSGR、RAAG12、RAGE、SLC44A4、鞘氨醇1磷酸酯、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TAPA1、TEM-8、TGF β 、TIGIT、TIM-3、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TMEM31、TNF α 、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。

151. 根据权利要求1-150中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗原结合结构域至少包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域与相同的TAA结合。

152. 根据权利要求151所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合相同TAA的不同表位。

153. 根据权利要求151所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合相同TAA的相同表位。

154. 根据权利要求1-153中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗原结合结构域至少包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合不同的TAA。

155. 根据权利要求1、3-17、20-25、28-97和99-154中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述共刺激受体结合区 (CRBR) 至少包含第一CRBR和第二CRBR,其中所述第一CRBR和所述第二CRBR与相同的共刺激受体结合。

156. 根据权利要求155所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一共刺激受体结合区 (CRBR) 和所述第二CRBR结合相同共刺激受体的不同表位。

157. 根据权利要求155所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一共刺激受体结合区 (CRBR) 和所述第二CRBR结合相同共刺激受体的相同表位。

158. 根据权利要求1、3-17、20-25、28-97和99-157中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述共刺激受体结合区 (CRBR) 至少包含第一CRBR和第二CRBR。

159. 根据权利要求155-158中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一CRBR和所述第二CRBR结合不同的共刺激受体。

160. 根据权利要求1、3-17、20-25、28-97和99-159中任一项所述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细胞激活因子受体 (BAFF-R)、B细胞成熟抗原 (BCMA)、跨膜激活剂及CAML相互作用因子

(TACI)和NKG2D。

161. 根据权利要求1、3-17、20-25、28-97和99-160中任一项所述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)。

162. 根据权利要求1、3-17、20-25、28-97和99-161中任一项所述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)与41BB(CD137)结合。

163. 根据权利要求1、3-17、20-25、28-97和99-162中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述至少一种共刺激受体包含SEQ ID NO:215所示的氨基酸序列,或者包含与SEQ ID NO:215所示的氨基酸序列具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

164. 根据权利要求1、3-17、20-25、28-97和99-163中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述至少一种共刺激受体包含SEQ ID NO:321所示的氨基酸序列。

165. 根据权利要求2-15、18-23、26-95、97-121、123-164中任一项所述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)是或包含所述共刺激受体的天然同源结合配偶体的细胞外结构域或其结合片段,或其展现出与所述共刺激受体的结合活性的变体。

166. 根据权利要求2-15、18-23、26-95、97-121、123-164中任一项所述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)是选自以下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、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。

167. 根据权利要求166所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段是Fv、scFv、Fab或单结构域抗体(sdAb)。

168. 根据权利要求166或权利要求122所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或抗原结合片段是sdAb。

169. 根据权利要求168所述的多特异性多肽构建体,其中所述sdAb是人sdAb或人源化sdAb。

170. 根据权利要求168或权利要求169所述的多特异性多肽构建体,其中所述sdAb是VHH、VNAR、工程化VH结构域或工程化VK结构域。

171. 根据权利要求166或权利要求167所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段是scFv。

172. 根据权利要求166或权利要求167所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段是Fab。

173. 根据权利要求2-15、18-23、26-95、97-121、123-172中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抑制性受体结合区(IRBR)至少包含第一IRBR和第二IRBR,其中所述第一IRBR和所述第二IRBR与相同的抑制性受体结合。

174. 根据权利要求173所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一抑制性受体结合区(IRBR)和所述第二IRBR结合相同抑制性受体的不同表位。

175. 根据权利要求173所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一抑制性受体结合区(IRBR)和所述第二IRBR结合相同抑制性受体的相同表位。

176. 根据权利要求2-15、18-23、26-95、97-121、123-175中任一项所述的多特异性多肽

构建体,其中所述抑制性受体结合区(IRBR)至少包含第一IRBR和第二IRBR。

177.根据权利要求173-176中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一IRBR和所述第二IRBR结合不同的抑制性受体。

178.根据权利要求2-15、18-23、26-95、97-121、123-177中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个受体结合区(IRBR)结合选自以下的抑制性受体:PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA或TIM3。

179.根据权利要求2-15、18-23、26-95、97-121、123-178中任一项所述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)结合PD-1。

180.根据权利要求1-179中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含在所述第一抗原结合结构域与所述Fc区之间的第一连接肽(LP1)。

181.根据权利要求1-180中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含在所述CD3结合区与所述第二抗原结合结构域之间的第二连接肽(LP2)。

182.根据权利要求1-180中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含在所述第一共刺激受体结合区(CRBR)与所述Fc区之间的第一连接肽(LP1)。

183.根据权利要求1-182中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含在所述CD3结合区与所述第二共刺激受体结合区(CRBR)之间的第二连接肽(LP2)。

184.根据权利要求1-183中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含在所述抗原结合结构域或共刺激受体结合区与所述Fc区之间的第一连接肽(LP1)以及在所述CD3结合区与所述抗原结合结构域或CRBR之间的第二连接肽(LP2),并且其中所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端具有如下结构排列:第一抗原结合结构域或CRBR-LP1-Fc区-接头-CD3结合区-LP2-第二抗原结合结构域或CRBR。

185.根据权利要求184所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是可切割接头。

186.根据权利要求184所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是不可切割接头。

187.根据权利要求184-186中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述两种连接肽彼此不相同。

188.根据权利要求180-187中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中LP1或LP2独立地是长度为约1至20个氨基酸的肽。

189.根据权利要求188所述的多特异性多肽构建体,其中LP1或LP2独立地包含为或包含如SEQ ID NO:10-13、119、135、147、149或GGS所示的任何Gly-Ser接头的肽。

190.根据权利要求1-189中任一项所述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是Fv抗体片段。

191.根据权利要求190所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fv抗体片段包括二硫化物稳定的抗CD3结合Fv片段(dsFv)。

192.根据权利要求1-191中任一项所述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含有氨基酸序列TYAMN(SEQ ID NO:16)的VH CDR1;含有氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ IDNO:17)的VH CD2;含有氨基酸序列HGNGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:18)的VH CDR3;含有氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:19)的VL CDR1;含有氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:20)的VL CDR2;以及含有氨基酸序列ALWYSNLWV(SEQ ID NO:

21)的VL CDR3。

193.根据权利要求160或权利要求161所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗CD3 dsFv包含:

具有SEQ ID NO:14、32-62、287、290和311中任一个的氨基酸序列或与SEQ ID NO:14、32-62、287、290和311中的任一个展现出至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列的VH;以及

具有SEQ ID NO:15、63-81、241、288和289中任一个的氨基酸序列或与SEQ ID NO:15、63-81、241、288和289中的任一个展现出至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列的VL。

194.根据权利要求190-193中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗CD3 dsFv包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列和SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

195.根据权利要求190-194中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗CD3 dsFv包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列和SEQ ID NO:72的氨基酸序列;所述抗CD3 dsFv包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列和SEQ IDNO:241的氨基酸序列;所述抗CD3 dsFv包含SEQ ID NO:287的氨基酸序列和SEQ ID NO:288的氨基酸序列;或者所述抗CD3 dsFv包含SEQ IDNO:311的氨基酸序列和SEQ ID NO:289的氨基酸序列。

196.根据权利要求1-195中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体缀合至药剂。

197.根据权利要求196所述的多特异性多肽构建体,其中所述药剂是治疗剂、抗肿瘤剂、毒素或其片段、可检测部分或诊断剂。

198.根据权利要求197所述的多特异性多肽构建体,其中所述药剂经由接头缀合至所述多特异性多肽构建体。

199.一种或多种多核苷酸,其编码根据权利要求1-198中任一项所述的多特异性多肽构建体。

200.一种多核苷酸,其编码根据权利要求1-198中任一项所述的任何多特异性多肽构建体的多肽链。

201.一种多核苷酸,其包含编码根据权利要求1-198中任一项所述的多特异性构建体的第一多肽的第一核酸序列和编码所述多特异性构建体的第二多肽的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列被内部核糖体进入位点(IRES)或者编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的核酸分开。

202.根据权利要求201所述的多核苷酸,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列可操作地连接至相同的启动子。

203.根据权利要求201或权利要求202所述的多核苷酸,其中所述多特异性多肽构建体包含第三多肽链,并且所述多核苷酸还包含编码所述多特异性构建体的第三多肽的第三核酸。

204.根据权利要求203所述的多核苷酸,其中所述第三核酸与所述第一多肽和/或所述第二多肽被内部核糖体进入位点(IRES)或者编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的核酸分开,和/或所述第三核酸序列可操作地连接至与所述第一核酸序列和/或所述第二核酸序列情况下相同的启动子。

205. 根据权利要求201-204中任一项所述的多核苷酸,其中编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的所述核酸选自T2A、P2A、E2A或F2A。

206. 一种载体,其包含根据权利要求199-205中任一项所述的多核苷酸。

207. 根据权利要求206所述的载体,所述载体是表达载体。

208. 根据权利要求206或权利要求207所述的载体,所述载体是病毒载体或真核载体,任选地其中所述真核载体是哺乳动物载体。

209. 一种细胞,其包含根据权利要求199-205中任一项所述的一种或多种多核苷酸或根据权利要求206-208中任一项所述的一种或多种载体。

210. 根据权利要求209所述的细胞,其中所述细胞是重组的或分离的。

211. 根据权利要求210所述的细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

212. 根据权利要求211所述的细胞,其中所述细胞是HEK293或CHO细胞。

213. 一种产生多特异性多肽构建体的方法,所述方法包括向细胞中引入根据权利要求199-205中任一项所述的一种或多种多核苷酸或根据权利要求206-208中任一项所述的一种或多种载体,以及在产生所述多特异性多肽构建体的条件下培养所述细胞。

214. 一种产生多特异性多肽构建体的方法,所述方法包括在由根据权利要求209-213中任一项所述的细胞产生所述多特异性多肽的条件下培养所述细胞。

215. 根据权利要求213或权利要求214所述的细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

216. 根据权利要求215所述的细胞,其中所述细胞是HEK293或CHO细胞。

217. 根据权利要求213或权利要求214所述的方法,其还包括从所述细胞中分离或纯化所述多特异性多肽构建体。

218. 根据权利要求213-217中任一项所述的方法,其中所述多特异性多肽构建体是异二聚体。

219. 一种多特异性多肽构建体,其通过根据权利要求213-218中任一项所述的方法产生。

220. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1-198或权利要求219中任一项所述的多特异性多肽构建体和药学上可接受的载体。

221. 根据权利要求220所述的药物组合物,所述药物组合物是无菌的。

222. 一种刺激或诱导免疫应答的方法,所述方法包括使靶细胞和T细胞与根据权利要求1-198或权利要求219中任一项所述的多特异性多肽构建体或根据权利要求220或权利要求221所述的药物组合物接触,所述靶细胞表达由所述多特异性多肽构建体识别的肿瘤相关抗原。

223. 根据权利要求222所述的方法,其中所述靶细胞是表达所述肿瘤相关抗原(TAA)的肿瘤细胞。

224. 根据权利要求222或权利要求223所述的方法,其中所述多特异性多肽构建体包含起蛋白酶底物作用的切割接头,并且诱导或刺激所述免疫应答在所述蛋白酶的存在下增加。

225. 根据权利要求224所述的方法,其中所述蛋白酶由免疫效应细胞、由肿瘤或由存在于肿瘤微环境中的细胞产生。

226. 根据权利要求224或权利要求225所述的方法,其中所述蛋白酶由免疫效应细胞产

生,并且所述免疫效应细胞是激活的T细胞、自然杀伤(NK)细胞或NK T细胞。

227. 根据权利要求226所述的方法,其中所述免疫效应细胞靠近表达所述抗原的细胞。

228. 根据权利要求222-227中任一项所述的方法,其中所述蛋白酶由组织中靠近表达所述TAA的细胞的肿瘤产生和/或由组织中与所述TAA共定位的肿瘤产生,并且其中当所述多特异性多肽构建体暴露于所述蛋白酶时,所述蛋白酶切割所述多特异性多肽构建体中的可切割接头。

229. 根据权利要求222-228中任一项所述的方法,其中所述蛋白酶选自间质蛋白酶、基质金属蛋白酶(MMP)、颗粒酶B及其组合。

230. 根据权利要求229所述的方法,其中所述蛋白酶是颗粒酶B。

231. 根据权利要求222-230中任一项所述的方法,其中所述接触是离体或体外进行的。

232. 根据权利要求222-231中任一项所述的方法,其中所述接触是在受试者体内进行的。

233. 一种在受试者中刺激或诱导免疫应答的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据权利要求1-198或权利要求219中任一项所述的多特异性缀合物或根据权利要求220或权利要求221所述的药物组合物。

234. 根据权利要求222-233中任一项所述的方法,其增加细胞介导的免疫性。

235. 根据权利要求222-234中任一项所述的方法,其增加T细胞活性。

236. 根据权利要求222-235中任一项所述的方法,其增加细胞溶解性T细胞(CTL)活性。

237. 根据权利要求222-236中任一项所述的方法,其中所述免疫应答是针对肿瘤或癌症增加的。

238. 根据权利要求222-236中任一项所述的方法,其中所述方法治疗所述受试者的疾病或病症。

239. 一种治疗受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据权利要求1-198中任一项所述的多特异性多肽构建体或根据权利要求220或权利要求221所述的药物组合物。

240. 根据权利要求238或权利要求239所述的方法,其中所述疾病或病症是肿瘤或癌症。

241. 根据权利要求238-240中任一项所述的方法,其中所述疾病或病症表达所述肿瘤相关抗原(TAA)。

242. 根据权利要求222-241中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

243. 根据权利要求1-198中任一项所述的多特异性多肽构建体或根据权利要求220或权利要求221所述的药物组合物,用于治疗受试者的疾病或病症。

244. 根据权利要求1-198中任一项所述的多特异性多肽构建体或根据权利要求220或权利要求221所述的药物组合物在制造用于治疗受试者的疾病或病症的药物中的用途。

245. 根据权利要求243所述的用于所述用途的多特异性多肽构建体或药物组合物或根据权利要求244所述的用途,其中所述疾病或病症是肿瘤或癌症。

246. 根据权利要求243或权利要求245所述的用于所述用途的多特异性多肽构建体或药物组合物或根据权利要求244或权利要求245所述的用途,其中所述疾病或病症表达所述肿瘤相关抗原(TAA)。

247. 根据权利要求243、权利要求245或权利要求246所述的用于所述用途的多特异性多肽构建体或药物组合物或根据权利要求244、权利要求245或权利要求246所述的用途,其中所述受试者是人。

含有受限CD3结合结构域和受体结合区的多特异性多肽构建体及其使用方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2018年7月24日提交的标题为“含有受限CD3结合结构域和共刺激受体结合区的多特异性多肽构建体及其使用方法 (MULTISPECIFIC POLYPEPTIDE CONSTRUCTS CONTAINING A CONSTRAINED CD3 BINDING DOMAIN AND A CO-STIMULATORY RECEPTOR BINDING REGION AND METHODS OF USING THE SAME)”的美国临时申请62/702,888、2018年10月11日提交的标题为“含有受限CD3结合结构域和共刺激受体结合区的多特异性多肽构建体及其使用方法 (MULTISPECIFIC POLYPEPTIDE CONSTRUCTS CONTAINING A CONSTRAINED CD3 BINDING DOMAIN AND A CO-STIMULATORY RECEPTOR BINDING REGION AND METHODS OF USING THE SAME)”的美国临时申请62/744,641和2019年4月10日提交的标题为“含有受限CD3结合结构域和受体结合区的多特异性多肽构建体及其使用方法 (MULTISPECIFIC POLYPEPTIDE CONSTRUCTS CONTAINING A CONSTRAINED CD3 BINDING DOMAIN AND A RECEPTOR BINDING REGION AND METHODS OF USING THE SAME)”的美国临时申请62/832,268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。

通过引用并入序列列表

[0002] 本申请是与电子格式的序列列表一起提交的。序列列表作为2019年7月23日创建的标题为744952000840SeqList.TXT的文件而提供,其大小为311千字节。将在电子格式的序列列表中的信息通过引用以其整体而并入。

技术领域

[0003] 本发明总体上涉及至少结合CD3、第二抗原和T细胞受体如共刺激受体或抑制性受体的多特异性多肽,其中所述多特异性多肽构建体能够接合CD3。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体结合共刺激受体并提供共刺激结合活性。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体结合抑制性受体并阻断抑制活性。在一些方面,所述多特异性多肽具有受限的CD3结合,并且仅在与所述第二抗原如肿瘤相关抗原结合后才结合或接合CD3。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有可切割接头,所述可切割接头当被切割时导致双重效应子功能。还提供了制备这些多特异性多肽和在多种治疗性、诊断性和预防性适应症中使用这些多特异性多肽的方法。

背景技术

[0004] 导致靶细胞耗尽的治疗性抗体通常依赖于经由与Fc- γ 受体(Fc γ R)和补体蛋白相互作用介导的效应子功能。表达Fc γ R的效应细胞主要是先天免疫系统的那些。T细胞不是参与抗体介导的靶细胞耗尽的直接效应细胞。

[0005] CD3(分化簇3)T细胞共受体是一种多聚体蛋白,其由四条不同的多肽链(称为 ϵ 、 γ 、 δ 和 ζ 链)构成。CD3复合物充当T细胞受体的与T细胞受体(TCR)的抗原结合a/b链非共价缔合的信号传导模块。

[0006] 由于CD3的直接接合导致T细胞激活,因此它是多种治疗性和/或诊断性适应症的理想靶标。因此,需要靶向CD3/TCR途径的抗体和治疗剂。

发明内容

[0007] 本文提供了多特异性多肽构建体,其含有包含免疫球蛋白Fc区的第一组分和包含CD3结合区的第二组分,其中所述第一组分和所述第二组分通过接头偶联,其中所述Fc区位于所述CD3结合区的N末端;所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种含有至少一个结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域;并且所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。在一些实施方案中,所述CD3结合区结合CD3(CD3 ϵ)。在一些方面,所述多特异性多肽构建体含有至少或约或两个结合TAA和CRBR的抗原结合结构域。本文描述了示例性构建体。

[0008] 本文还提供了多特异性多肽构建体,其含有包含免疫球蛋白Fc区的第一组分和包含CD3结合区的第二组分,其中所述第一组分和所述第二组分通过接头偶联,其中所述Fc区位于所述CD3结合区的N末端;所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种含有至少一个结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域;并且所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)。在一些实施方案中,所述CD3结合区结合CD3(CD3 ϵ)。在一些方面,所述多特异性多肽构建体含有至少或约或两个结合TAA和IRBR的抗原结合结构域。本文描述了示例性构建体。

[0009] 本文还提供了多特异性多肽构建体,其含有包含免疫球蛋白Fc区的第一组分和包含CD3结合区的第二组分,其中所述第一组分和所述第二组分通过接头偶联,其中所述Fc区位于所述CD3结合区的N末端;所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种含有至少一个结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域;所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR);并且所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。在一些实施方案中,所述CD3结合区结合CD3(CD3 ϵ)。在一些方面,所述多特异性多肽构建体含有至少或约或两个结合TAA、CRBR和IRBR的抗原结合结构域。本文描述了示例性构建体。

[0010] 在一些实施方案中,所述至少一个抗原结合结构域位于相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述至少一个共刺激受体结合区(CRBR)位于相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。

[0011] 在一些实施方案中,所述第一组分包含第一抗原结合结构域,并且所述第二组分包含第二抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域中的每一个结合肿瘤相关抗原(TAA)。在一些实施方案中,所述第一抗原结合结构域位于相对于所述多特异性构建体的Fc区的氨基末端,并且所述第二抗原结合结构域位于相对于所述多特异性构建体的CD3结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述第一组分或所述第二组分还含有所述共刺激受体结合区(CRBR)。

[0012] 本文提供了多特异性多肽构建体,其从N末端到C末端按顺序含有:结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)和/或结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域;免疫球蛋

白Fc区；接头；结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区；以及结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR) 和/或与肿瘤相关抗原 (TAA) 结合的抗原结合结构域；其中所述多特异性多肽构建体包含至少一个CRBR和至少一个抗原结合结构域。在一些实施方案中，所述多特异性多肽构建体仅含有一个共刺激受体结合区 (CRBR)。在一些实施方案中，所述多特异性多肽构建体含有两个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中，所述抗原结合结构域与相同的肿瘤相关抗原 (TAA) 结合。在一些实施方案中，一个抗原结合结构域位于相对于所述Fc区的氨基末端，并且一个抗原结合结构域位于相对于所述CD3结合区的羧基末端。

[0013] 本文提供了多特异性多肽构建体，其从N末端到C末端按顺序含有：免疫球蛋白Fc区；接头；结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区；以及结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域和结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR)。本文提供了多特异性多肽构建体，其中所述多特异性构建体从N末端到C末端按顺序包含：结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域和结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR)；免疫球蛋白Fc区；接头；以及结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区。

[0014] 在任何此类实施方案中的一些中，所述Fc区是同二聚体Fc区。在一些例子中，所述Fc区是人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4的Fc区，或者是其免疫活性片段。在一些情况下，所述Fc区包含含有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中，所述Fc区包含含有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列的多肽；所述Fc区包含含有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列的多肽；或者所述Fc区包含含有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列的多肽。

[0015] 在一些实施方案中，所述Fc区是异二聚体Fc区。在一些实施方案中，与同二聚体Fc区的多肽相比，任选地与SEQ ID NO:1所示的Fc多肽或其免疫活性片段相比，所述异二聚体Fc区的一种或两种Fc多肽包含至少一个修饰以诱导异二聚化。在一些实施方案中，所述异二聚体Fc的Fc多肽中的每一种独立地含有至少一个氨基酸修饰。在一些实施方案中，所述异二聚体Fc的Fc多肽中的每一种包含杵臼结构 (knob-into-hole) 修饰或包含电荷突变以增加所述多肽的静电互补性。在一些情况下，所述氨基酸修饰是杵臼结构修饰。

[0016] 在一些实施方案中，所述异二聚体Fc的第一Fc多肽包含选自Thr366Ser、Leu368Ala、Tyr407Val及其组合的修饰，并且所述异二聚体Fc的第二Fc多肽包含修饰Thr366Trp。在一些实施方案中，所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽还包含非半胱氨酸残基甚至半胱氨酸残基的修饰，其中所述第一多肽的修饰是在位置Ser354和Tyr349中的一个处，并且所述第二Fc多肽的修饰是在位置Ser354和Tyr349中的另一个处。在一些实施方案中，所述氨基酸修饰是电荷突变以增加所述多肽的静电互补性。

[0017] 在一些实施方案中，所述第一Fc多肽和/或所述第二Fc多肽或者所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的每一种包含互补位置的修饰，其中所述修饰是用具有与另一多肽的互补氨基酸相反电荷的氨基酸替代。在一些实施方案中，所述异二聚体Fc的第一Fc多肽或第二Fc多肽中的一种还包含在残基Ile253处的修饰。在一些情况下，所述修饰是

Ile253Arg。在一些情形中,所述异二聚体Fc的第一Fc多肽或第二Fc多肽中的一种还包含在残基His435处的修饰。在一些例子中,所述修饰是His435Arg。在一些实施方案中,所述Fc区包含缺乏Lys447的多肽。

[0018] 在一些实施方案中,所述Fc区包含含有至少一个修饰以增强FcRn结合的多肽。在一些例子中,所述修饰是在选自以下的位置处:Met252、Ser254、Thr256、Met428、Asn434及其组合。在一些实施方案中,所述修饰是在选自以下的位置处:Met252Y、Ser254T、Thr256E、Met428L、Met428V、Asn434S及其组合。在一些实施方案中,所述修饰是在位置Met252处和位置Met428处。在一些实施方案中,所述修饰是Met252Y和Met428L。在一些实施方案中,所述修饰是Met252Y和Met428V。

[0019] 在一些实施方案中,所述异二聚体Fc的第一多肽包含SEQ ID NO:82、86、94或96中任一个所示的氨基酸序列,并且所述异二聚体Fc的第二多肽包含SEQ ID NO:83、87、90、92、98或100中任一个所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述Fc区包含含有至少一个氨基酸修饰的多肽,所述至少一个氨基酸修饰降低效应子功能和/或降低与选自Fc γ 受体或C1q的效应分子的结合。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸修饰是Glu233、Leu234或Leu235中的一个或多个的缺失。在一些实施方案中,所述异二聚体Fc的第一多肽包含SEQ ID NO:84、88、95或97中任一个所示的氨基酸序列,并且所述异二聚体Fc的第二多肽包含SEQ ID NO:85、89、91、93、99或101中任一个所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述Fc区包含含有至少一个修饰以增强Fc γ R结合的多肽。在一些实施方案中,所述修饰是在Ser239或Ile332处的修饰。在一些实施方案中,与未经修饰的Fc区相比,所述Fc区的糖基化被修饰以增强Fc γ R结合。在一些实施方案中,所述Fc区缺乏岩藻糖含量或具有降低的岩藻糖含量。

[0020] 在任何此类实施方案中的一些中,所述CD3结合区是抗CD3抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗CD3抗体或抗原结合片段包含可变重链区(VH)和可变轻链区(VL)。在一些实施方案中,所述CD3结合区是单价的。在一些实施方案中,所述CD3结合区是包含可变重链区(VH)和可变轻链区(VL)的可变片段(Fv)。在一些实施方案中,所述抗CD3抗体或抗原结合片段不是单链抗体,任选地不是单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,所述Fc是异二聚体Fc,并且构成所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH和VL连接至所述异二聚体Fc的相对多肽。

[0021] 在一些实施方案中,所述CD3结合区不能或基本上不能结合或接合CD3,除非所述抗原结合结构域中的至少一个与其TAA结合。在一些实施方案中,所述CD3结合区不能或基本上不能结合或接合CD3,除非所述抗原结合结构域中的至少两个与其TAA结合。

[0022] 在一些实施方案中,所述接头是多肽接头。在一些例子中,所述接头是长度为最多25个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,所述接头是从或从约2至24个氨基酸、2至20个氨基酸、2至18个氨基酸、2至14个氨基酸、2至12个氨基酸、2至10个氨基酸、2至8个氨基酸、2至6个氨基酸、6至24个氨基酸、6至20个氨基酸、6至18个氨基酸、6至14个氨基酸、6至12个氨基酸、6至10个氨基酸、6至8个氨基酸、8至24个氨基酸、8至20个氨基酸、8至18个氨基酸、8至14个氨基酸、8至12个氨基酸、8至10个氨基酸、10至24个氨基酸、10至20个氨基酸、10至18个氨基酸、10至14个氨基酸、10至12个氨基酸、12至24个氨基酸、12至20个氨基酸、12至18个氨基酸、12至14个氨基酸、14至24个氨基酸、14至20个氨基酸、14至18个氨基酸、18至24个氨基

酸、18至20个氨基酸或20至24个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,所述接头是长度为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸的多肽。在一些情形中,所述接头是长度为3至18个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,所述接头是长度为12至18个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,所述接头是长度为15至18个氨基酸的多肽。

[0023] 在一些实施方案中,所述接头是不可切割接头。在一些实施方案中,所述不可切割接头不含有由蛋白酶特异性识别以切割的底物识别位点。在一些实施方案中,所述不可切割接头包含GS、GGS、GGGS (SEQ ID NO:149)、GGGG (SEQ ID NO:135)及其组合。在一些实施方案中,所述不可切割接头包含(GGS)_n,其中n是1至10。在一些实施方案中,所述不可切割接头包含(GGGG)_n (SEQ ID NO:173),其中n是1至10。在一些实施方案中,所述不可切割接头包含(GGGGG)_n (SEQ ID NO:172),其中n是1至4。在一些情形中,所述不可切割接头包含GGS。在一些实施方案中,所述不可切割接头包含GGGS (SEQ ID NO:149)。在一些实施方案中,所述不可切割接头包含GGGG (SEQ ID NO:135)。在一些实施方案中,所述不可切割接头包含(GGS)₂ (SEQ ID NO:10)。在一些实施方案中,所述不可切割接头包含GGSGGSGGS (SEQ ID NO:11)。在一些实施方案中,所述不可切割接头包含GGSGGSGSGGS (SEQ ID NO:12)。在一些情况下,所述不可切割接头包含GGSGGSGSGSGGS (SEQ ID NO:13)。在一些实施方案中,所述不可切割接头包含GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:119)。在一些实施方案中,所述不可切割接头包含GGSGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:147)。在一些实施方案中,所述不可切割接头包含GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:170)。

[0024] 在一些实施方案中,所述接头是可切割接头。

[0025] 本文提供了多特异性多肽构建体,其含有包含异二聚体Fc区的第一组分以及包含含有可变重链区(VH)和可变轻链区(VL)的抗CD3抗体或抗原结合片段的第二组分,其中构成所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH和VL连接至所述异二聚体Fc的相对多肽;所述第一组分和所述第二组分通过可切割接头偶联,其中所述异二聚体Fc区位于所述抗CD3抗体的N末端;所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域;并且所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。在一些实施方案中,与切割状态相比,当所述多特异性多肽构建体处于未切割状态时,所述CD3结合区与CD3的结合大幅降低。在一些实施方案中,在切割状态下,所述第一组分和所述第二组分不连接。

[0026] 在一些实施方案中,所述可切割接头是起蛋白酶底物作用的多肽。在一些实施方案中,所述蛋白酶由免疫效应细胞、由肿瘤或由存在于肿瘤微环境中的细胞产生。在一些实施方案中,所述蛋白酶由免疫效应细胞产生,并且所述免疫效应细胞是激活的T细胞、自然杀伤(NK)细胞或NK T细胞。在一些实施方案中,所述蛋白酶选自间质蛋白酶(matriptase)、基质金属蛋白酶(MMP)、颗粒酶B及其组合。在一些情形中,所述蛋白酶是颗粒酶B。

[0027] 在一些实施方案中,所述可切割接头包含通式P₄ P₃ P₂ P₁↓P₁' (SEQ ID NO:150)的氨基酸序列,其中P₄是氨基酸I、L、Y、M、F、V或A;P₃是氨基酸A、G、S、V、E、D、Q、N或Y;P₂是氨基酸H、P、A、V、G、S或T;P₁是氨基酸D或E;并且P₁'是氨基酸I、L、Y、M、F、V、T、S、G或A。在一些实施方案中,所述可切割接头包含通式P₄ P₃ P₂ P₁↓P₁' (SEQ ID NO:151)的氨基酸序列,其中P₄是氨基酸I或L;P₃是氨基酸E;P₂是氨基酸P或A;P₁是氨基酸D;并且P₁'是氨基酸I、V、T、S或G。在一些实施方案中,所述可切割接头包含氨基酸序列IEPDI (SEQ ID NO:136)、

LEPDG (SEQ ID NO:152)、LEADT (SEQ ID NO:137)、IEPDG (SEQ ID NO:138)、IEPDV (SEQ ID NO:139)、IEPDS (SEQ ID NO:140)、IEPDT (SEQ ID NO:141) 或 LEADG (SEQ ID NO:153)。在一些实施方案中,所述可切割接头包含选自 SEQ ID NO:22、105-112、136-141、148、150-153 的氨基酸序列。在一些例子中,所述可切割接头包含 SEQ ID NO:105 所示的氨基酸序列。

[0028] 在一些实施方案中,所述蛋白酶是间质蛋白酶。在一些实施方案中,所述可切割接头包含序列 P1QAR↓ (A/V) (SEQ ID NO:154), 其中 P1 是任何氨基酸; 或者所述可切割接头包含序列 RQAR (A/V) (SEQ ID NO:155)。在一些例子中,所述可切割接头包含序列 RQARV (SEQ ID NO:156)。在一些实施方案中,所述可切割接头包含选自 SEQ ID NO:23、154-156 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述蛋白酶是 MMP。在一些实施方案中,所述 MMP 是 MMP-2。在一些例子中,所述可切割接头含有通式 P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:157), 其中 P3 是 P、V 或 A; P2 是 Q 或 D; P1 是 A 或 N; 并且 P1' 是 L、I 或 M。在一些实施方案中,所述可切割接头含有通式 P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:158), 其中 P3 是 P; P2 是 Q 或 D; P1 是 A 或 N; 并且 P1' 是 L 或 I。在一些情形中,所述可切割接头包含序列 PAGL (SEQ ID NO:24)。在一些实施方案中,所述可切割接头包含选自 SEQ ID NO:22-31、104-114、117-118、136-144、148、150-158 的氨基酸序列。

[0029] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体至少包含第一多肽,其包含所述异二聚体 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 结构域; 以及第二多肽,其包含所述异二聚体 Fc 区的第二 Fc 多肽、所述接头任选地与存在于所述第一多肽中相同的接头和所述抗 CD3 抗体或抗原结合片段的 VH 或 VL 结构域中的另一个,其中所述第一多肽和所述第二多肽中的一种或两种包含至少一个与肿瘤相关抗原 (TAA) 结合的抗原结合结构域,并且所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR), 其中所述多特异性多肽构建体含有至少一个 CRBR 和至少一个抗原结合结构域。

[0030] 在一些实施方案中,所述第一多肽或所述第二多肽中仅一种包含所述至少一个结合 TAA 的抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述至少一个抗原结合结构域位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多肽或第二多肽中的一种的 Fc 区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多肽或第二多肽中的一种的 CD3 结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述至少一个抗原结合结构域位于相对于所述多特异性构建体的 Fc 区的氨基末端,并且所述第二抗原结合结构域位于相对于所述多特异性构建体的 CD3 结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述第一多肽或所述第二多肽中仅一种包含所述至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR)。在一些实施方案中,所述共刺激受体结合区 (CRBR) 位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多肽或第二多肽中的一种的 Fc 区的氨基末端或位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多肽或第二多肽中的一种的 CD3 结合区的羧基末端。

[0031] 在一些实施方案中,所述第一多肽按 N 末端到 C 末端的顺序含有: 结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的第一抗原结合结构域、所述异二聚体 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 VL 或 VH 和结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的第二抗原结合结构域; 并且所述第二多肽按 N 末端到 C 末端的顺序含有: 所述异二聚体 Fc 区的第二 Fc 多肽、所述接头任选地与存在于所述第一多肽中相同的接头、所述抗 CD3 抗体或抗原结合片段的 VH 或 VL 中的另一个和结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR)。

[0032] 在一些实施方案中,所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个含有所述TAA的天然同源结合配偶体的细胞外结构域或其结合片段,或其展现出与所述TAA的结合活性的变体。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个是选自以下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、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。

[0033] 在一些实施方案中,所述至少一个共刺激受体结合区(CRBR)是或含有所述共刺激受体的天然同源结合配偶体的细胞外结构域或其结合片段,或其展现出与所述共刺激受体的结合活性的变体。在一些实施方案中,所述至少一个共刺激受体结合区(CRBR)是选自以下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、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是Fv、scFv、Fab、单结构域抗体(sdAb)、VNAR或VHH。在一些例子中,所述抗体或抗原结合片段是sdAb。在一些实施方案中,所述sdAb是人sdAb或人源化sdAb。在一些实施方案中,所述sdAb是VHH、VNAR、工程化VH结构域或工程化VK结构域。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是scFv。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是Fab。

[0034] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有第一多肽,其含有所述异二聚体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结构域;第二多肽,其含有所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VL结构域;第三多肽,其含有与肿瘤相关抗原结合的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL;第四多肽,其含有与共刺激受体结合的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL,其中所述第一多肽和/或所述第二多肽还含有(1)与所述肿瘤相关抗原结合的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL中的另一个和(2)与所述共刺激受体结合的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL中的另一个。

[0035] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有第一多肽,其含有所述异二聚体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结构域;第二多肽,其含有所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VL结构域;以及第三多肽,其含有与共刺激受体结合的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL,其中所述第一多肽和/或所述第二多肽还含有与所述共刺激受体结合的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL中的另一个,并且所述第一多肽和/或所述第二多肽还含有至少一个结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域。

[0036] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有第一多肽,其含有所述异二聚体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结构域;第二多肽,其含有所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VL结构域;以及第三多肽,其含有与肿瘤相关抗原结合的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL,其中所述第一多肽和/或所述第二多肽还含有与所述肿瘤相关抗原结合的Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL中的另一个,并且所述第一多肽和/或所述第二多肽还含有至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。

[0037] 在一些实施方案中,所述第一多肽或所述第二多肽中仅一种含有所述Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL中的另一个。在一些实施方案中,所述第一多肽或所述第二多肽两者均含有所述Fab抗体片段的VH-CH1(Fd)或VL-CL中的另一个。在一些实施方案中,所述Fab

抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多肽或第二多肽中的一种的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多肽或第二多肽中的一种的CD3结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个位于相对于所述第一多肽或所述第二多肽的Fc区的氨基末端和位于相对于所述第一多肽或所述第二多肽中的另一种的CD3结合区的羧基末端。

[0038] 在任何此类实施方案中的一些中,所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个与选自以下的肿瘤抗原结合:1-92-LFA-3、5T4、 α -4整合素、 α -V整合素、 α 4 β 1整合素、 α 4 β 7整合素、AGR2、抗路易斯-Y、爱帕琳肽J受体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5补体、C-242、CA9、CA19-9 (路易斯a)、碳酸酐酶9、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132 (IL-2RG)、CD133、CD137、CD138、CD166、CD172A、CD248、CDH6、CEACAM5 (CEA)、CEACAM6 (NCA-90)、密封蛋白-3、密封蛋白-4、cMet、胶原蛋白、Cripto、CSFR、CSFR-1、CTLA-4、CTGF、CXCL10、CXCL13、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CYR61、DL44、DLK1、DLL3、DLL4、DPP-4、DSG1、EDA、EDB、EGFR、EGFRviii、内皮素B受体 (ETBR)、ENPP3、EpCAM、EPHA2、EPHB2、ERBB3、RSV的F蛋白、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、叶酸受体 α (FR α)、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、透明质酸酶、ICOS、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IgE、IgE受体 (FceRI)、IGF、IGF1R、IL1B、IL1R、IL2、IL11、IL12、IL12p40、IL-12R β 1、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、Jagged配体、Jagged 1、Jagged 2、KISS1-R、LAG-3、LIF-R、路易斯X、LIGHT、LRP4、LRRC26、Ly6G6D、LyPD1、MCSP、间皮素、MRP4、MUC1、粘蛋白-16 (MUC16、CA-125)、Na/K ATP酶、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、PDGFR α 、PDGFR β 、PD-1、PD-L1、PD-L2、磷脂酰丝氨酸、P1GF、PSCA、PSMA、PSGR、RAAG12、RAGE、SLC44A4、鞘氨醇1磷酸酯、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TAPA1、TEM-8、TGF β 、TIGIT、TIM-3、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TMEM31、TNF α 、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。

[0039] 在一些实施方案中,所述抗原结合结构域至少含有第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域与相同的TAA结合。在一些实施方案中,所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合相同TAA的不同表位。在一些实施方案中,所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合相同TAA的相同表位。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域至少含有第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合不同的TAA。

[0040] 在一些实施方案中,所述共刺激受体结合区 (CRBR) 至少含有第一CRBR和第二CRBR,其中所述第一CRBR和所述第二CRBR与相同的共刺激受体结合。在一些实施方案中,所述第一共刺激受体结合区 (CRBR) 和所述第二CRBR结合相同共刺激受体的不同表位。在一些

实施方案中,所述第一共刺激受体结合区(CRBR)和所述第二CRBR结合相同共刺激受体的相同表位。在一些实施方案中,所述共刺激受体结合区(CRBR)至少含有第一CRBR和第二CRBR。在一些实施方案中,所述第一CRBR和所述第二CRBR结合不同的共刺激受体。

[0041] 在一些实施方案中,所述至少一个共刺激受体结合区(CRBR)结合选自以下的共刺激受体:41BB(CD137)、OX40(CD134)、CD27、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)、CD28、ICOS、CD40、B细胞激活因子受体(BAFF-R)、B细胞成熟抗原(BCMA)、跨膜激活剂及CAML相互作用因子(TACI)和NKG2D。在一些实施方案中,所述至少一个共刺激受体结合区(CRBR)结合选自以下的共刺激受体:41BB(CD137)、OX40(CD134)和糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)。

[0042] 在任何所提供的实施方案中的一些中,所述至少一个抑制性受体结合区(IRBR)是选自以下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、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是Fv、scFv、Fab、单结构域抗体(sdAb)、VNAR或VHH。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是sdAb。在一些实施方案中,所述sdAb是人sdAb或人源化sdAb。在一些实施方案中,所述sdAb是VHH、VNAR、工程化VH结构域或工程化VK结构域。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是scFv。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是Fab。在涉及含有至少一个抑制性受体结合结构域的构建体的任何本文所提供的实施方案中的一些中,所述抑制性受体选自如在T细胞、例如人T细胞上表达的PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA或TIM3。在一些实施方案中,所述T细胞是激活的T细胞。在任何所提供的实施方案中的一些中,所述至少一个抑制性受体结合区(IRBR)结合PD-1。

[0043] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有在所述第一抗原结合结构域与所述Fc区之间的第一连接肽(LP1)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有在所述CD3结合区与所述第二抗原结合结构域之间的第二连接肽(LP2)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有在所述第一共刺激受体结合区(CRBR)与所述Fc区之间的第一连接肽(LP1)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有在所述CD3结合区与所述第二共刺激受体结合区(CRBR)之间的第二连接肽(LP2)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有在所述抗原结合结构域或共刺激受体结合区与所述Fc区之间的第一连接肽(LP1)以及在所述CD3结合区与所述抗原结合结构域或CRBR之间的第二连接肽(LP2),并且其中所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端具有如下结构排列:第一抗原结合结构域或CRBR-LP1-Fc区-接头-CD3结合区-LP2-第二抗原结合结构域或CRBR。

[0044] 在一些实施方案中,所述接头是可切割接头。在一些实施方案中,所述两种连接肽彼此不相同。在一些实施方案中,LP1或LP2独立地是长度为约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,LP1或LP2独立地含有为或包含如SEQ ID NO:10-13、119、135、147、149或GG所示的任何Gly-Ser接头的肽。

[0045] 在一些实施方案中,所述抗CD3抗体或抗原结合片段是Fv抗体片段。在一些实施方案中,所述Fv抗体片段包括二硫化物稳定的抗CD3结合Fv片段(dsFv)。在一些实施方案中,所述抗CD3抗体或抗原结合片段包含含有氨基酸序列TYAMN(SEQ ID NO:16)的VH CDR1;含有氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD(SEQ ID NO:17)的VH CD2;含有氨基酸序列HGNFGNSYVSWFAY(SEQ ID NO:18)的VH CDR3;含有氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:

19)的VL CDR1;含有氨基酸序列GTNKRAP (SEQ ID NO:20)的VL CDR2;以及含有氨基酸序列ALWYSLWV (SEQ ID NO:21)的VL CDR3。

[0046] 在一些例子中,所述抗CD3 Fv包含具有SEQ ID NO:14和32-62中任一个的氨基酸序列或与SEQ ID NO:14和32-62中的任一个展现出至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列的VH;以及具有SEQ ID NO:15和63-81中任一个的氨基酸序列或与SEQ ID NO:15和63-81中的任一个展现出至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列的VL。

[0047] 在一些实施方案中,所述抗CD3抗体或抗原结合片段是Fv。在一些实施方案中,所述抗CD3 Fv包含:具有SEQ ID NO:14、32-43、45-47、48和287中任一个的氨基酸序列或与SEQ ID NO:14、32-43、45-47、48和287中的任一个展现出至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列的VH;以及具有SEQ ID NO:15、63、65-71、73、75、77和288中任一个的氨基酸序列或与SEQ ID NO:15、63、65-71、73、75、77和288中的任一个展现出至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列的VL。在一些情况下,所述抗CD3Fv包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列和SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在其他情况下,所述抗CD3 Fv包含SEQ ID NO:287的氨基酸序列和SEQ ID NO:288的氨基酸序列。

[0048] 在一些实施方案中,所述CD3结合结构域的VH和VL链区各自独立地包含至少一个氨基酸修饰。在一些实施方案中,所述CD3结合结构域的VH和VL链区的所述至少一个氨基酸修饰增加了所述CD3结合结构域的稳定性的。在一些实施方案中,所述CD3结合结构域的VH和VL链区的所述至少一个氨基酸修饰增加了所述CD3结合结构域结合CD3的能力。在一些实施方案中,所述CD3结合结构域的VH和VL链区的所述至少一个氨基酸修饰通过在所述VH链区与所述VL链区之间形成二硫键而增加了所述CD3结合结构域的稳定性的。

[0049] 在一些实施方案中,所述CD3结合区具有在VH区与VL区之间的二硫化物稳定的连接。在一些实施方案中,所述抗CD3抗体或抗原结合片段是二硫化物稳定的Fv (dsFv)。在一些实施方案中,根据Kabat编号,所述二硫化物稳定的抗CD3 Fv包含具有至Cys的突变44的抗CD3 VH和具有至Cys的突变100的抗CD3 VL。在一些实施方案中,根据Kabat编号,所述二硫化物稳定的抗CD3 Fv包含具有突变G44C的抗CD3 VH和具有突变G100C的抗CD3 VL。在一些实施方案中,根据Kabat编号,所述二硫化物稳定的抗CD3Fv包含具有至Cys的在位置105处的突变的抗CD3 VH和具有至Cys的在位置43处的突变的抗CD3 VL。在一些实施方案中,所述抗CD3 dsFv包含:具有SEQ ID NO:44、49-62、290和311中任一个的氨基酸序列或与SEQ ID NO:44,49-62、290和311中的任一个展现出至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列的VH;以及具有SEQ ID NO:64、72、74、76、78-81、241和289中任一个的氨基酸序列或与SEQ ID NO:64、72、74、76、78-81、241和289中的任一个展现出至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列的VL。在一些实施方案中,所述抗CD3 dsFv包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列和SEQ ID NO:72的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD3 dsFv包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列和SEQ ID NO:241的氨基酸序列。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:290的氨基酸序列的可变重链 (VH) 和含有SEQ ID NO:289的氨基酸序列的可变轻链 (VL)。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:311的氨基酸序列的可

变重链 (VH) 和含有 SEQ ID NO:289 的氨基酸序列的可变轻链 (VL)。

[0050] 在任何此类实施方案中的一些中,所述多特异性多肽构建体缀合至药剂。在一些实施方案中,所述药剂是治疗剂、抗癌剂、毒素或其片段、可检测部分或诊断剂。在一些实施方案中,所述药剂经由接头缀合至所述多特异性多肽构建体。

[0051] 本文提供了一种或多种多核苷酸,其编码任何所提供的多特异性多肽构建体。本文提供了多核苷酸,其编码任何所提供的多特异性多肽构建体的任何所提供的多肽链。本文提供了多核苷酸,其含有编码任何所提供的多特异性构建体的第一多肽的第一核酸序列和编码所述多特异性构建体的任何所提供的第二多肽的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列被内部核糖体进入位点 (IRES) 或者编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的序列分开。在一些实施方案中,所述第一核酸序列和所述第二核酸序列可操作地连接至相同的启动子。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有第三多肽链,并且所述多核苷酸还含有编码所述多特异性构建体的第三多肽的第三核酸。在一些实施方案中,所述第三核酸与所述第一多肽和/或所述第二多肽被内部核糖体进入位点 (IRES) 或者编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的核酸分开,和/或所述第三核酸序列可操作地连接至与所述第一核酸序列和/或所述第二核酸序列情况下相同的启动子。在一些实施方案中,编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的所述核酸选自 T2A、P2A、E2A 或 F2A。

[0052] 本文提供了载体,其含有任何所提供的多核苷酸。在一些实施方案中,所述载体是表达载体。在一些实施方案中,所述载体是病毒载体或真核载体,任选地其中所述真核载体是哺乳动物载体。

[0053] 本文提供了细胞,其含有多核苷酸或任何所提供的多核苷酸、载体或任何所提供的载体。在一些实施方案中,所述细胞是重组的或分离的。在一些实施方案中,所述细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,所述细胞是 HEK293 或 CHO 细胞。

[0054] 本文提供了产生多特异性多肽构建体的方法,其包括向细胞中引入多核苷酸或任何所提供的多核苷酸或者载体或任何所提供的载体,以及在产生所述多特异性多肽构建体的条件下培养所述细胞。

[0055] 本文提供了产生多特异性多肽构建体的方法,其包括在由任何所提供的细胞产生所述多特异性多肽的条件下培养所述细胞。在一些实施方案中,所述细胞是哺乳动物细胞。在一些例子中,所述细胞是 HEK293 或 CHO 细胞。在一些实施方案中,所述方法还包括从所述细胞中分离或纯化所述多特异性多肽构建体。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体是异二聚体。

[0056] 本文提供了通过任何所提供的方法产生的多特异性多肽构建体。

[0057] 本文提供了药物组合物,其含有任何所提供的多特异性多肽构建体和药学上可接受的载体。在一些实施方案中,所述药物组合物是无菌的。

[0058] 本文提供了刺激或诱导免疫应答的方法,所述方法包括使靶细胞和 T 细胞与任何所提供的多特异性多肽构建体或药物组合物接触,所述靶细胞表达由所述多特异性多肽构建体识别的肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,所述靶细胞是表达所述肿瘤相关抗原 (TAA) 的肿瘤细胞。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体包含起蛋白酶底物作用的切割接头,并且诱导或刺激所述免疫应答在所述蛋白酶的存在下增加。在一些实施方案中,所述蛋白酶由免疫效应细胞、由肿瘤或由存在于肿瘤微环境中的细胞产生。在一些实施方案中,

所述蛋白酶由免疫效应细胞产生,并且所述免疫效应细胞是激活的T细胞、自然杀伤(NK)细胞或NK T细胞。在一些实施方案中,所述免疫效应细胞靠近表达所述抗原的细胞。在一些实施方案中,所述蛋白酶由组织中靠近表达所述TAA的细胞的肿瘤产生和/或由组织中与所述TAA共定位的肿瘤产生,并且其中当所述多特异性多肽构建体暴露于所述蛋白酶时,所述蛋白酶切割所述多特异性多肽构建体中的可切割接头。

[0059] 在一些实施方案中,所述蛋白酶选自间质蛋白酶、基质金属蛋白酶(MMP)、颗粒酶B及其组合。在一些实施方案中,所述蛋白酶是颗粒酶B。在一些实施方案中,所述接触是离体或体外进行的。在一些实施方案中,所述接触是在受试者体内进行的。

[0060] 本文提供了在受试者中刺激或诱导免疫应答的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的任何所提供的多特异性缀合物或药物组合物。在一些实施方案中,所述方法增加细胞介导的免疫性。在一些实施方案中,所述方法增加T细胞活性。在一些实施方案中,所述方法增加细胞溶解性T细胞(CTL)活性。在一些实施方案中,所述免疫应答是针对肿瘤或癌症增加的。在一些实施方案中,所述方法治疗所述受试者的疾病或病症。

[0061] 本文提供了治疗受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的任何所提供的多特异性缀合物或任何所提供的药物组合物。在一些实施方案中,所述疾病或病症是肿瘤或癌症。在一些实施方案中,所述受试者是人。

[0062] 本领域技术人员将了解,本公开文本的抗体具有多种用途。例如,本公开文本的蛋白质用作多种障碍的治疗剂。本公开文本的抗体还用作诊断试剂盒中的试剂或用作诊断工具,或者这些抗体可以用于竞争测定中以产生治疗性试剂。

附图说明

[0063] 图1是具有受限的CD3结合的本公开文本的多特异性多肽构建体的基本组分的示意图。一个或多个抗原结合结构域位于氨基和/或羧基末端。Fc区(如异二聚体Fc区)位于CD3结合区的N末端。Fc靠近CD3结合区的这种定位阻碍了CD3结合。一个或多个共刺激受体结合区(CRBR)位于氨基和/或羧基末端。如果多特异性分子具有一个或两个抗原结合结构域,则所描绘的示例性多特异性构建体还可以含有第二CRBR。

[0064] 图2A-2F描绘了具有或没有CRBR的各种代表性的B7H3靶向性受限CD3接合物。图2A描绘了没有4-1BB结合结构域作为CRBR的代表性的B7H3靶向性受限CD3接合物(指定为cx3095或cx3834)。与cx3095相比,cx3834具有相反的杵和白构型,使得图2A描绘的cx3834的第一多肽链含有Fc白多肽,并且所描绘的第二多肽具有Fc杵多肽。具有41BB结合结构域作为CRBR的代表性的B7H3靶向性受限CD3接合物描绘于图2B中(指定为cx3091),cx3091具有位于异二聚体的相对链的C末端的靶向41BB的sdAb,从而显示出与41BB的单价结合。代表性构建体cx3095、cx3834和cx3091中的每一种具有位于异二聚体的一条链的N末端和C末端的靶向B7H3的sdAb,从而显示出与B7H3的二价结合。图2C-2F描绘了具有位于异二聚体的一条链的N末端和C末端的靶向B7H3的sdAb和位于异二聚体的相对链的C末端的CRBR(例如OX40、GITR、ICOS或CD28 sdAb)的代表性的B7H3靶向性受限CD3接合物。

[0065] 图3描绘了没有(顶部)和具有41BB结合结构域(底部)的代表性的5T4靶向性受限CD3接合物。cx3546和cx3547具有相同的位于异二聚体的一条链的N末端的靶向5T4的sdAb(12E9)以及不同的位于异二聚体的一条链的C末端的靶向5T4的sdAb(分别为14B5或

16G10)。cx3499和cx3497分别与cx3546和cx3547相同,但是具有位于Fc异二聚体的相对链的C末端的靶向41BB的sdAb。cx3546、cx3547、cx3499和cx3497中的每一种含有在Fc区与CD3结合区之间的可切割接头。cx5185和cx5951是相同的,但是前者包含位于CD3结合区的C末端的靶向4-1BB的sdAb;两者均含有在Fc区与CD3结合区之间的不可切割接头,并且含有位于Fc异二聚体的N末端和C末端的靶向5T4的sdAb的人源化版本hz12E9v9和hz16G10v11。这些代表性的5T4靶向性受限CD3接合物显示出与5T4的二价结合,并且在含有41BB结合结构域的构建体中,显示出与41BB的单价结合。

[0066] 图4A-4D描绘了与DART-Fc形式B7H3xCD3相比,代表性的靶向B7H3的受限CD3接合物构建体cx3091(具有41BB结合结构域)和cx3095(没有41BB结合结构域)的细胞结合。图4A和图4B示出了每种评估的构建体与A375细胞(B7H3阳性黑色素瘤细胞系)的结合。图4C和图4D描绘了与T细胞的结合,并且展示出了仅被DART-Fc形式B7H3xCD3结合,但是缺乏含有41BB结合结构域(cx3091)或缺乏41BB结合结构域(cx3095)的受限CD3接合物与T细胞的结合。图4A和图4C显示每种构建体在200nM处的归一化细胞计数与荧光的直方图。在各种细胞类型上每种构建体的完全滴定示于图4B和图4D中。在图4A和图4C中,仅二级抗人APC抗体对照示于填充的黑色迹线中;而在图4A和图4C中,阳性对照抗CD3结合示于空迹线中,并且cx3091、cx3095和DART-Fc B7H3xCD3示于灰色阴影迹线中。

[0067] 图5A-5D描绘了代表性的靶向5T4的受限CD3接合物构建体cx3497(具有41BB结合结构域)和cx3547(没有41BB结合结构域)的细胞结合。图5A和图5B示出了与Ovcar-5细胞(5T4阳性黑色素瘤细胞系)的结合。图5C和图5D描绘了与T细胞的结合,并且示出了所测试的构建体与分离的T细胞的结合的缺乏。图5A和图5C显示每种构建体在200nM处的归一化细胞计数与荧光的直方图。在各种细胞类型上每种构建体的完全滴定示于图5B和图5D中。在图5A和图5C中,仅二级抗人APC抗体对照示于填充的黑色迹线中;而在图5A和图5C中,阳性对照抗CD3结合示于空迹线中,并且cx3497和cx3547示于灰色阴影迹线中。

[0068] 图6A-6C描绘了代表性的B7H3靶向性受限CD3接合物构建体介导共刺激受体(41BB或OX40)的靶抗原特异性激发的能力。在图6A中,与缺乏41BB结合结构域的类型构建体cx3095相比,针对Jurkat 41BB NF κ B-萤光素酶报告细胞评估含有41BB结合结构域的代表性的B7H3靶向性受限CD3接合物构建体cx3091,以评估在B7H3阳性细胞系A375和同源A375 B7H3敲除细胞系(A375 Δ B7H3)的存在下的41BB激动。值得注意的是,cx3091具有有效且稳健的41BB激动作用。cx3095诱导了少量的NF κ B信号传导,可能是由TCR/CD3信号传导介导的,独立于41BB信号传导。在图6B和6C中,在与A375靶抗原表达细胞的共培养物中,针对OX40报告Jurkat细胞系(图6B)或41BB报告Jurkat细胞系(图6C)评估含有41BB结合结构域(cx3091)、含有OX40结合结构域(cx3723)或不含有CRBD(cx3834)的代表性的B7H3靶向性受限CD3接合物构建体。

[0069] 图7A-7B描绘了代表性的B7H3靶向性受限CD3接合物构建体cx3095和cx3091以及靶向B7H3和CD3的替代DART-Fc形式介导靶抗原特异性T细胞激活的能力。使用Jurkat CD3 NFAT-GFP报告细胞来评估在B7H3阳性细胞系A375(图7A)和A375 B7H3敲除细胞系A375 Δ B7H3(图7B)的存在下的T细胞激活。值得注意的是,含有41BB的构建体cx3091显示出增强的NFAT信号传导,可能是由于TCR/CD3信号传导后Jurkat细胞活力增加和/或消耗减少。

[0070] 图8A-8D描绘了与靶向B7H3和CD3的替代DART-Fc形式相比,由具有41BB结合结构

域(cx3091)和没有41BB结合结构域(cx3095)的代表性的B7H3靶向性受限CD3接合构建体驱动的T细胞介导的细胞毒性的效力。在B7H3阳性A375细胞系上CD3接合构建体的50nM至80pM的滴定范围示于图8A和8C中,并且在B7H3敲除A549细胞系上CD3接合构建体的50nM至80pM的滴定范围示于图8B和8D中。图8A和图8B示出了T细胞介导的细胞毒性,如通过对应细胞系中经标记的靶细胞之间由半胱天冬酶激活引起的总细胞凋亡(对半胱天冬酶-3/7底物呈阳性的细胞)所确定的。图8C和8D描绘了由T细胞介导的细胞毒性导致的靶细胞耗尽。

[0071] 图9A-9E是一系列图,其描绘了由掺入各种共刺激受体结合区的B7H3靶向性受限CD3接合构建体诱导的针对A375细胞的靶标依赖性T细胞介导的细胞毒性的效力。在本文中使用了没有掺入共刺激受体结合结构域(cx3834)、掺入OX40结合结构域(图9A cx3723)、掺入41BB结合结构域(图9B cx3091)、掺入GITR结合结构域(图9C cx3724)、掺入ICOS结合结构域(图9D cx3721)或掺入CD28结合结构域(图9E cx3726)的示例性的靶向B7H3的受限CD3接合构建体。细胞毒性是通过用以表示靶细胞凋亡的总重叠面积示出的,如通过对经标记的靶细胞(A375)和半胱天冬酶-3/7底物的双阳性荧光进行定量所测量的。

[0072] 图10A和10B描绘了由代表性的靶向5T4的受限CD3接合构建体cx3497(具有41BB结合结构域)和cx3547(没有41BB结合结构域)介导的针对5T4阳性细胞系Ovcar-5(图10A)和5T4阴性细胞系CCRF-CEM(图10B)的T细胞细胞毒性的动力学。总重叠面积表示双阳性:经荧光标记的靶细胞中的经切割的半胱天冬酶-3/7底物。在抗原阴性细胞系上观察到的最初细胞毒性可能是由靶细胞与T细胞之间的MHC错配介导的。值得注意的是,只有含有41BB结合结构域的cx3497能够诱导细胞毒性,并且动力学与TCR信号传导后41BB上调的动力学一致。

[0073] 图11A-11D描绘了与靶向B7H3和CD3的替代DART-Fc形式相比,由具有41BB结合结构域(cx3091)和没有41BB结合结构域(cx3095)的代表性的B7H3靶向性受限CD3接合构建体驱动的T细胞激活的效力。在B7H3阳性A375细胞系上CD3接合构建体的50nM至80pM的滴定范围示于图11A和11C中,并且在B7H3敲除A549细胞系上CD3接合构建体的50nM至80pM的滴定范围示于图11B和11D中。图11A和图11B示出了CD4 T细胞激活,而图11C和11D示出了CD8 T细胞激活。通过流式细胞术测量如通过CD71上调所证实的T细胞激活。

[0074] 图12A和12B示出了在B7H3阳性靶细胞A375(图12A)和B7H3阴性靶细胞CCRF-CEM(图12B)的存在下用具有41BB结合结构域(cx3091)和没有41BB结合结构域(cx3095)的代表性的B7H3靶向性受限CD3接合构建体处理的T细胞的IFN γ 产生的比较。通过荧光斑点测定来监测细胞因子产生。

[0075] 图13示出了在5T4阳性Ovcar-5细胞和5T4阴性CCRF-CEM细胞的存在下用具有41BB结合结构域(cx3499和cx3497)和没有41BB结合结构域(cx3546和cx3547)的代表性的5T4靶向性受限CD3接合构建体处理的T细胞的IFN γ 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,并且3547和3497含有相同的靶向5T4的sdAb。因此,这些组构建体之间的唯一差异是41BB结合结构域的添加。掺入41BB结合结构域的5T4靶向性受限CD3接合构建体显示出增强的以抗原依赖性方式诱导T细胞产生IFN γ 的能力。

[0076] 图14A和14B展示出了掺入共刺激受体结合结构域的受限CD3接合构建体介导对应共刺激信号传导途径的特异性激动的能力。在本文中使用了Jurkat OX40(图14A)或Jurkat 41BB(图14B)NF κ B-萤光素酶报告细胞。在本文中使用了没有掺入共刺激受体结合结构域(cx3834)、掺入OX40结合结构域(cx3723)或掺入41BB结合结构域(cx3091)的示例性的靶向

B7H3的受限CD3接合构建体。发现分别掺入OX40或41BB结合结构域的cx3723和cx3091诱导所靶向的共刺激受体的特异性激动。在所有构建体(包括不含有共刺激受体结合区的构建体)的情况下都观察到一些诱导的NF κ B信号传导,表明在此系统中靶标依赖性CD3信号传导介导了NF κ B信号传导。使用了B7H3阳性细胞系A375。

[0077] 图15A-15C描绘了18H10及其人源化变体hz18H10v7与表达人PD-1(图15A)、食蟹猴PD-1(图15B)或小鼠PD-1(图15C)的FreeStyle 293细胞的结合。还评估并示出了与未经转染的(293)细胞的结合。

[0078] 图16是描绘18H10及其人源化变体hz18H10v7与激活的人T细胞的结合的图。通过流式细胞术量化测试物与激活的T细胞的结合。

[0079] 图17是描绘18H10及其人源化变体hz18H10v7在Jurkat报告萤光素酶测定系统中阻断PD1/PDL1介导的T细胞受体(TCR)信号传导阻遏的能力的图。

[0080] 图18A-18B描绘了一系列表示含有抗PD1结合结构域的各种TAA靶向性受限CD3接合构建体的示意图。本公开文本的TAA靶向性受限CD3接合构建体的基本组分具有受限的CD3结合。一个或多个抗原结合结构域位于氨基和/或羧基末端。Fc区(如异二聚体Fc区)位于CD3结合区的N末端。Fc靠近CD3结合区的这种定位阻碍了CD3结合。在示例性实施方案中,抗PD1结合结构域位于异二聚体Fc的N末端,并且可以含有抗CD3结合结构域的C末端的41BB共刺激结合结构域。

[0081] 图19A是由两条多肽即链1和链2构成的各种靶向B7H3的受限CD3构建体的示意图。链1含有经由不可切割接头连接至在G100C处修饰的抗CD3 VL结构域的异二聚体Fc“白”(顶部);连接至异二聚体Fc“白”的靶向B7H3的sdAb,所述异二聚体Fc“白”经由不可切割接头连接至抗CD3 VL结构域(中间);或连接至异二聚体Fc“白”的靶向B7H3的sdAb,所述异二聚体Fc“白”经由不可切割接头连接至在G100C处修饰的抗CD3 VL结构域(底部)。链2含有连接至互补异二聚体Fc“杵”的B7H3靶向性sdAb,所述互补异二聚体Fc“杵”经由如上的接头连接至在G44C处修饰的抗CD3 VH结构域,所述抗CD3 VH结构域连接至第二B7H3 sdAb(顶部);连接至互补异二聚体Fc“杵”的B7H3靶向性sdAb,所述互补异二聚体Fc“杵”经由如上的接头连接至抗CD3 VH结构域(中间);或连接至互补异二聚体Fc“杵”的B7H3靶向性sdAb,所述互补异二聚体Fc“杵”经由如上的接头连接至被G44C修饰的抗CD3 VH结构域(底部)。当共表达时,CD3结合结构域经由分别在白和杵上的VL:VH的缔合而正确地组装。在指示的情况下,VH:VL相互作用是通过VH结构域中的修饰残基G44C与VL结构域中的G100C之间的工程化二硫键稳定化的。

[0082] 图19B是由两条多肽即链1和链2构成的各种靶向B7H3的受限CD3构建体的示意图。链1含有经由不可切割接头连接至在G100C处修饰的抗CD3 VL结构域的异二聚体Fc“白”,所述抗CD3 VL结构域连接至靶向共刺激受体的sdAb。链2含有连接至互补异二聚体Fc“杵”的B7H3靶向性sdAb,所述互补异二聚体Fc“杵”经由如上的接头连接至在G44C处修饰的抗CD3 VH结构域,所述抗CD3 VH结构域连接至第二B7H3靶向性sdAb(顶部);经由如上的接头连接至在G44C处修饰的抗CD3 VH结构域的异源二聚体Fc“杵”,所述抗CD3 VH结构域连接至B7H3靶向性sdAb(中间);或连接至互补异二聚体Fc“杵”的B7H3靶向性sdAb,所述互补异二聚体Fc“杵”经由如上的接头连接至被G44C修饰的抗CD3 VH结构域(底部)。当共表达时,CD3结合结构域经由分别在白和杵上的VL:VH的缔合而正确地组装。VH:VL相互作用是通过VH结构域

中的修饰残基G44C与VL结构域中的G100C之间的工程化二硫键稳定化的。所得的构建体以二价(顶部)或单价(中间和底部)方式接合B7H3。本文的所有构建体都表达含有靶向共刺激受体的sdAb。

[0083] 图19C是由三种多肽即链1、链2和链3构成的各种靶向B7H3的受限CD3构建体的示意图,其中B7H3靶向结构域是FAB。链1含有靶向BH73的VH;经由铰链连接至异二聚体Fc的第一成员(Fc-Het-1)的IgG恒定重链1(CH1),所述异二聚体Fc的第一成员经由如上的接头连接至缺乏(顶部)或含有(底部)G100C修饰的抗CD3 VL结构域。链2含有靶向BH73的VH;经由铰链连接至异二聚体Fc的第二成员(Fc-Het-2)的IgG恒定重链1(CH1),所述异二聚体Fc的第二成员经由如上的接头连接至缺乏(顶部)或含有(底部)G44C修饰的抗CD3 VH结构域。链3含有连接至人Ig恒定轻(CL)区的互补的靶向B7H3的VL结构域。当共表达时,CD3结合结构域经由互补异二聚体Fc区上的VL:VH的缔合而正确地组装。在指示的情况下,VH:VL相互作用是通过VH结构域中的修饰残基G44C与VL结构域中的G100C之间的工程化二硫键稳定化的。

[0084] 图20是由两条多肽即链1和链2构成的三种靶向DLL3的受限CD3构建体的示意图。链1含有经由不可切割接头连接至在G100C处修饰的抗CD3 VL结构域的异二聚体Fc“臼”,所述抗CD3 VL结构域连接至靶向共刺激受体的sdAb。链2含有连接至互补异二聚体Fc“杵”的DLL3靶向性sdAb,所述互补异二聚体Fc“杵”经由如上的接头连接至在G44C处修饰的抗CD3 VH结构域,所述抗CD3 VH结构域连接至第二DLL3靶向性sdAb(顶部);经由如上的接头连接至在G44C处修饰的抗CD3 VH结构域的异源二聚体Fc“杵”,所述抗CD3 VH结构域连接至DLL3靶向性sdAb(中间);或连接至互补异二聚体Fc“杵”的DLL3靶向性sdAb,所述互补异二聚体Fc“杵”经由如上的接头连接至被G44C修饰的抗CD3 VH结构域(底部)。

[0085] 图21A和21B描绘了代表性的靶向B7H3的受限CD3接合构建体的细胞结合。cx5187和cx5823各自含有两个B7H3结合结构域,而复杂的cx5873和cx5965各自含有一个B7H3结合结构域。图21A示出了与B7H3阳性A375细胞的结合。图21B示出了与B7H3阴性CCRF-CEM细胞和分离的T细胞的结合的缺乏。

[0086] 图21C和图21D描绘了代表性的靶向B7H3的受限CD3接合构建体以靶标依赖性方式激动CD3的能力。图21C显示,与对B7H3为单价的构建体(cx5873和cx5965)相比,用对B7H3为二价且为双表位的分子(cx5187)接合B7H3阳性A375细胞诱导更有效的CD3信号传导。图21D示出了在B7H3阴性CCRF-CEM细胞的存在下T细胞的激活的缺乏。使用Jurkat CD3 NFAT-GFP报告细胞系来评估CD3激动。

[0087] 图22A和22B描绘了代表性的靶向B7H3的受限CD3接合构建体以靶标依赖性方式诱导T细胞介导的细胞毒性的能力。图22A显示,与对B7H3为单价的构建体(cx5873和cx5965)相比,用对B7H3为二价且为双表位的构建体(cx5187)靶向B7H3阳性A375细胞诱导更有效的T细胞介导的细胞毒性。图22B描绘了针对B7H3阴性CCRF-CEM细胞缺乏T细胞介导的细胞毒性。

[0088] 图23A-D描绘了在B7H3阳性A375细胞的存在下代表性的靶向B7H3的受限CD3接合分子激活T细胞的能力,但是在B7H3阴性CCRF-CEM细胞的存在下并没有所述能力。图23A和23B分别显示,与对B7H3为单价的构建体(cx5873和cx5965)相比,用对B7H3为二价且为双表位的构建体(cx5187)靶向B7H3阳性A375细胞诱导更有效的在CD4⁺和CD8⁺ T细胞上的CD25

表达。图23C和23D分别示出了在B7H3阴性CCRF-CEM细胞的存在下CD4⁺和CD8⁺ T细胞上CD25表达的缺乏。

[0089] 图24A和24B证明单价的和二价的靶向DLL3的受限CD3接合构建体与表达DLL3的细胞系SHP-77结合(图24A),但是不与分离的T细胞结合(图24B)。通过流式细胞术评估结合。

[0090] 图24C描绘了在DLL3阳性SHP-77细胞的存在下代表性的靶向DLL3的受限CD3接合构建体激动CD3信号传导的能力。与对DLL3为单价的构建体(cx5800和cx5801)相比,用对DLL3为二价且为双表位的构建体(cx5352)接合DLL3阳性细胞诱导更有效的T细胞激活。使用Jurkat CD3 NFAT-萤光素酶报告细胞系来评估CD3信号传导。

[0091] 图25A和25B描绘了由具有41BB结合结构域(cx5185)和没有41BB结合结构域(cx5951)的示例性的5T4靶向性受限CD3接合构建体驱动的T细胞介导的细胞毒性的效力。在5T4阳性Ovcar5细胞系上CD3接合构建体的200nM至3.1pM的滴定范围示于图25A中,并且在5T4阴性CCRF-CEM细胞系上CD3接合构建体的200nM至3.1pM的滴定范围示于图25B中。

[0092] 图26A-F描绘了在各种5T4阳性细胞A375(图26A和26D)、Ovcar-5(图26B和26E)、SHP-77(图26C和26F)的存在下的T细胞激活,如通过在与具有41BB结合结构域(cx5185)和没有41BB结合结构域(cx5951)的代表性的5T4靶向性受限CD3接合构建体一起孵育后在CD4(图26A-C)和CD8(图26D-F)细胞上的CD25表达所评估的。通过流式细胞术监测CD25的细胞表面表达来评估T细胞激活。

[0093] 图27A-C示出了在5T4阳性细胞系A375(图27A)、SHP-77(图27B)和Ovcar5(图27C)的存在下用具有41BB结合结构域(cx5185)和没有41BB结合结构域(cx5951)的代表性的5T4靶向性受限CD3接合构建体的滴定液处理的T细胞的IFN γ 产生的比较。

[0094] 图28A-F描绘了在各种5T4阳性细胞系A375(图28A和28D)、Ovcar-5(图28B和28E)、SHP-77(图28C和28F)的存在下在与具有41BB结合结构域(cx5185)和没有41BB结合结构域(cx5951)的代表性的5T4靶向性受限CD3接合构建体一起孵育后在CD4(图28A-C)和CD8(图28D-F) T细胞上的T细胞增殖。经由CellTrace™染料的稀释来监测T细胞增殖。结果描绘了增殖细胞的百分比,如通过CellTrace™ Violet染料的稀释所监测的。

[0095] 图29A-F描绘了在各种5T4阳性细胞A375(图29A和29D)、Ovcar-5(图29B和29E)、SHP-77(图29C和29F)的存在下在与具有41BB结合结构域(cx5185)和没有41BB结合结构域(cx5951)的代表性的5T4靶向性受限CD3接合构建体一起孵育后在CD4(图29A-C)和CD8(图29D-F) T细胞中的线粒体功能的评估。使用MitoTracker Green(一种积累在活性线粒体中的线粒体选择性荧光探针)通过流式细胞术来评估线粒体功能。

[0096] 图30示出了具有41BB结合结构域的5T4靶向性受限CD3接合构建体cx5185介导41BB信号传导的能力,但是缺乏41BB结合结构域的同构构建体cx5951并没有所述能力。使用Jurkat 41BB NFkB-萤光素酶报告细胞和重组板结合的5T4作为抗原来源来监测41BB信号传导。

[0097] 图31A描绘了具有4-1BB结合结构域作为CRBR的各种代表性的B7H3靶向性受限CD3接合物。cx5841和cx5187具有位于异二聚体的一条链的N末端和C末端的靶向B7H3的sdAb、Fc杆,并且具有位于异二聚体的相对链的C末端的靶向41BB的sdAb、Fc杆,但是具有相对于彼此位于相对链上的CD3结合Fv的VH和VL。

[0098] 图31B-E描绘了图31A中所述的示例性构建体的T细胞报告物测定的结果。图31B和

图31C描绘了当B7H3阳性细胞系A375或B7H3阴性细胞系CCRF-CEM分别与Jurkat CD3 NFAT-GFP报告细胞共培养时GFP报告物的平均荧光强度(MFI)。图31D和图31E描绘了当B7H3阳性细胞系A375或B7H3阴性细胞系CCRF-CEM分别与Jurkat CD3 NFAT-萤光素酶报告细胞共培养时萤光素酶报告物的相对发光单位(RLU)。

[0099] 图32描绘了没有41BB结合结构域(cx5499)(图32A)和具有41BB结合结构域(cx5352)(图32B)的代表性的DLL3靶向性受限CD3接合物。cx5499和cx5352具有位于异二聚体的一条链的N末端和异二聚体的同一链的C末端的靶向DLL3的sdAb。cx5352和cx5499彼此相同,不同的是cx5352具有位于异二聚体的相对链的C末端的靶向41BB的sdAb,而cx5499并没有。这些代表性的DLL3靶向性受限CD3接合物显示出与DLL3的二价结合,并且在含有41BB结合结构域的构建体中,显示出与41BB的单价结合。

[0100] 图33示出了具有41BB结合结构域的DLL3靶向性受限CD3接合构建体cx5352介导41BB信号传导的能力,但是缺乏41BB结合结构域的同构建体cx5499并没有所述能力。使用与亲本HEK-293细胞或瞬时表达DLL3截短版本的HEK-293共培养的Jurkat 41BB NFkB-萤光素酶报告细胞来监测DLL3依赖性41BB信号传导,并且活性作为相对萤光素酶单位(RLU)示出。

[0101] 图34A-B描绘了由具有41BB结合结构域的示例性的DLL3靶向性受限CD3接合构建体cx5352驱动的针对DLL3阳性细胞系SHP-77(图34A)或DLL3阴性细胞系HEK-293FS(图34B)的T细胞介导的细胞毒性的效力。在此测定中将三种不同的T细胞供体用作效应细胞的来源。

[0102] 图35A-C示出了由具有41BB结合结构域(cx5352)和没有41BB结合结构域(cx5499)的示例性的DLL3靶向性受限CD3接合构建体驱动的T细胞介导的细胞毒性的效力的差异。在本文中比较了如下各种效应细胞(T细胞)与靶细胞(SHP-77)比率(效应细胞:靶细胞比率):10:1(图35A)、5:1(图35B)或1.25:1(图35C)。将人PBMC用作T细胞的来源。

[0103] 图36示出了在DLL3阳性细胞系SHP-77的存在下用具有41BB结合结构域(cx5352)和没有41BB结合结构域(cx5499)的代表性的DLL3靶向性受限CD3接合构建体的滴定液处理的T细胞的IFN γ 产生的比较。

具体实施方式

[0104] 本公开文本提供了呈至少结合CD3、第二抗原和共刺激受体的多特异性多肽构建体形式的受限T细胞接合融合蛋白。本公开文本还提供了呈至少结合CD3、第二抗原和抑制性受体的多特异性多肽构建体形式的受限T细胞接合融合蛋白。本公开文本还提供了呈至少结合CD3、第二抗原、共刺激受体和抑制性受体的多特异性多肽构建体形式的T细胞接合融合蛋白。

[0105] 在一些实施方案中,本文提供的多特异性多肽构建体至少包含第一组分,其包含免疫球蛋白Fc区;第二组分,其包含至少一个结合CD3的结合结构域(在本文中称为抗CD3结合结构域或CD3结合区,它们是在本文中可互换使用的术语)的一个或多个拷贝;以及连接所述第一组分与所述第二组分的接头,如多肽接头。在所提供的多特异性多肽构建体中,所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种含有至少一个抗原结合结构域,当在与抗原结合后接合时,所述抗原结合结构域使所述受限CD3结合区基本上能够结合CD3。在一些实施

方案中,所述抗原是肿瘤相关抗原(TAA)。另外,在一些方面,所述多特异性多肽构建体的第一组分和第二组分中的一种或两种还包含至少一个与共刺激受体结合的共刺激受体结合区(CRBR)。在其他方面,所述多特异性多肽构建体的第一组分和第二组分中的一种或两种还包含至少一个与抑制性受体结合的抑制性受体结合区(IRBR)。在所提供的本公开文本的特定方面,所述多特异性多肽构建体的第一组分和第二组分中的一种含有CRBR,并且所述第一组分和所述第二组分中的另一种含有IRBR。在一些实施方案中,所述接头是不可切割接头。在一些实施方案中,所述接头是可切割接头。

[0106] 在一些实施方案中,所提供的多特异性多肽构建体包含这样的构型,其中含有所述Fc区的第一组分在含有所述CD3结合区的第二组分的N末端。在这样的实施方案中,所述第一组分和所述第二组分经由在所述Fc区端的C末端的接头连接。在一些实施方案中,所述一个或多个抗原结合结构域和/或所述一个或多个CRBR位于所述多特异性多肽构建体的氨基末端(N末端)区上。在一些实施方案中,所述一个或多个抗原结合结构域和/或所述一个或多个CRBR位于所述多特异性多肽构建体的羧基末端(C末端)区上。在一些实施方案中,所述一个或多个抗原结合结构域和/或所述一个或多个CRBR位于所述多特异性多肽构建体的N末端区和C末端区两者上。如本文提供的多特异性多肽构建体的各种构型示于图1中。

[0107] 在一些实施方案中,所提供的多特异性多肽构建体包含这样的构型,其中含有所述Fc区的第一组分在含有所述CD3结合区的第二组分的N末端。在这样的实施方案中,所述第一组分和所述第二组分经由在所述Fc区端的C末端的接头连接。在一些实施方案中,所述一个或多个抗原结合结构域和/或所述一个或多个IRBR位于所述多特异性多肽构建体的氨基末端(N末端)区上。在一些实施方案中,所述一个或多个抗原结合结构域和/或所述一个或多个IRBR位于所述多特异性多肽构建体的羧基末端(C末端)区上。在一些实施方案中,所述一个或多个抗原结合结构域和/或所述一个或多个IRBR位于所述多特异性多肽构建体的N末端区和C末端区两者上。如本文提供的多特异性多肽构建体的各种构型示于图18A中。

[0108] 在一些实施方案中,所提供的多特异性多肽构建体包含这样的构型,其中含有所述Fc区的第一组分在含有所述CD3结合区的第二组分的N末端。在这样的实施方案中,所述第一组分和所述第二组分经由在所述Fc区端的C末端的接头连接。在一些实施方案中,所述一个或多个抗原结合结构域和/或所述一个或多个CRBR位于所述多特异性多肽构建体的氨基末端(N末端)区上,并且所述一个或多个抗原结合结构域和/或所述一个或多个IRBR位于所述多特异性多肽构建体的羧基末端(C末端)区上。在一些实施方案中,所述一个或多个抗原结合结构域和/或所述一个或多个IRBR位于所述多特异性多肽构建体的氨基末端(N末端)区上,并且所述一个或多个抗原结合结构域和/或所述一个或多个CRBR位于所述多特异性多肽构建体的羧基末端(C末端)区上。如本文提供的多特异性多肽构建体的各种构型示于图18B中。

[0109] 所提供的多特异性多肽构建体展现出受限的T细胞接合活性,因为一旦抗原经由抗原结合结构域结合,此类构建体仅基本上与CD3结合。这示例于本文提供的实施例和图中,所述实施例和图展示出了受限CD3接合蛋白有效地结合TAA阳性细胞同时几乎不结合T细胞的能力。此独特特性允许受限CD3接合蛋白分布至存在TAA的部位,而不与外周T细胞结合。此形式与其他CD3接合多特异性构建体的不同之处在于不允许或消除组成型CD3结合,从而通过避免外周T细胞结合并允许优先分布至存在如由抗原结合结构域识别的抗原的一

个或多个部位来提供显著益处。例如,如实施例所示,受限CD3接合形式使得与DART-Fc形式(例如公开的PCT申请号WO 2017/030926)可以具有相似的效力;然而,与外周T细胞的结合显著减弱。此外,其他CD3接合构建体介导抗原依赖性T细胞激活;然而,本文提供的多特异性多肽构建体介导抗原依赖性T细胞结合和激活两者。

[0110] 在一些方面,所提供的多特异性多肽构建体的受限T细胞接合活性归因于Fc区在CD3结合区的N末端的定位。在一些实施方案中,这种定位降低、减弱、阻抑和/或防止由CD3结合区进行的CD3结合。在不存在由抗原结合结构域进行的抗原结合的情况下,本文提供的多特异性多肽构建体展示出降低或消除的CD3结合和T细胞激活能力。在一些实施方案中,在由所述多特异性多肽构建体的一个或多个抗原结合结构域介导的抗原结合事件的存在下,由CD3结合区结合CD3的能力大大增强。在一些实施方案中,在由所述多特异性多肽构建体的一个或多个抗原结合结构域介导的抗原结合事件的存在下,激活T细胞的能力大大增强。由所述多特异性多肽构建体内的一个或多个抗原结合结构域对其同源抗原的接合导致随后的T细胞接合并介导抗原依赖性T细胞激活,如细胞毒性、细胞因子释放、脱粒和增殖。在一些实施方案中,所提供的多特异性多肽构建体可以用于增加免疫应答,如增强T细胞活性,包括细胞溶解性(或细胞毒性)T细胞活性。在一些方面,免疫应答的调节可以治疗受试者的疾病或病症。

[0111] 在一些实施方案中,本公开文本的多特异性多肽构建体展现出对CD3、一种或多种其他抗原和一种或多种共刺激受体的特异性。在一些实施方案中,本公开文本的多特异性多肽构建体展现出对CD3、一种或多种其他抗原和一种或多种抑制性受体的特异性。在一些实施方案中,本公开文本的多特异性多肽构建体展现出对CD3、一种或多种其他抗原、一种或多种共刺激受体和一种或多种抑制性受体的特异性。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体可以含有一个或多个抗原结合结构域,如1、2或3个抗原结合结构域,能够结合一种或多种TAA,如2或3个抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体可以含有一个或多个能够结合一种或多种共刺激受体(如2或3种共刺激受体)的共刺激受体结合区,如1、2或3个CRBR。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体可以含有一个或多个能够结合一种或多种抑制性受体(如2或3种抑制性受体)的抑制性受体结合区(IRBR),如1、2或3个IRBR。示例性构建体的形式示于图1-3和图18A-B中。

[0112] 在一些实施方案中,所述一个或多个CRBR结合T细胞表面表达的共刺激受体。CRBR可以靶向的共刺激受体的非限制性例子包括例如41BB、OX40、CD27、GITR、CD28、ICOS、CD40L、BAFFR、BCMA、TACI或NKG2d。在一些实施方案中,所述一个或多个CRBR是或包含与所述共刺激受体结合的结合结构域(例如sdAb、scFv或Fab)。如本文所示,CRBR在所提供的多特异性多肽构建体中的存在存在CD3结合区共接合CD3后增加或加强T细胞活性。

[0113] 在一些情况下,所述一个或多个CRBR结合并非在T细胞上组成型表达的共刺激受体。在一些实施方案中,所述一个或多个CRBR结合在T细胞激活后上调、诱导或表达的共刺激受体。在一些实施方案中,所述CRBR结合作为肿瘤坏死因子(TNF)受体家族成员的共刺激受体,如在T细胞激活后上调、诱导或表达的TNFRSF成员。在一些实施方案中,所述CRBR结合作为B7家族成员的共刺激受体,如在T细胞激活后上调、诱导或表达的B7家族成员。在激活的T细胞中表达上调或诱导表面表达的此类共刺激受体包括例如41BB、OX40和GITR。在一些方面,所提供的多特异性多肽构建体的CD3结合区在CD3结合区与CD3结合后诱导或增强T细

胞激活,这进而导致此类共刺激受体的表达增加或上调。在此类例子中,CRBR与共刺激受体(例如41BB、OX40或GITR)的结合仅在所述多特异性多肽构建体的CD3结合区接合CD3后才增加或变得可行,从而调节所提供的多特异性构建体对靶细胞的共刺激活性。在一些情况下,这解决了其他T细胞接合物的问题,因为它避免了由于与外周T细胞(如静息T细胞或非期望细胞)上表达的CD3和/或共刺激受体结合而引起的抗原“下沉(sink)”效应,这原本可能加速全身清除。在一些实施方案中,与能够和外周细胞结合的其他T细胞接合物(如双特异性T细胞接合物,例如DART-Fc)相比,所提供的多特异性多肽构建体展现出增加的半衰期和/或改善的药代动力学或药效学特性,如更好的肿瘤暴露。

[0114] 在一些实施方案中,所述一个或多个IRBR结合T细胞表面表达的抑制性受体。在一些方面,所述抑制性受体是在激活的T细胞上表达上调或增加的抑制性受体。IRBR可以靶向的抑制性受体的非限制性例子包括例如PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、TIM3或LAG3。在一些实施方案中,所述一个或多个IRBR是或包含与所述抑制性受体结合的结合结构域(例如sdAb、scFv或Fab)。

[0115] 在一些实施方案中,所述一个或多个IRBR结合抑制性受体并阻断或抑制与其配体的相互作用,从而阻断T细胞的抑制活性。在一些实施方案中,所述IRBR是与PD-1结合的PD-1结合多肽。在一些情况下,所提供的PD-1结合多肽直接阻断或抑制PD-L1/L2与PD-1之间的相互作用。在一些方面,在多特异性多肽构建体上包含IRBR抑制或降低抑制性受体与其配体(例如PD-L1和/或PD-L2与PD-1)之间的相互作用,从而调节免疫应答。虽然抑制信号的传输可能导致免疫细胞应答的下调(以及由此导致的整体免疫应答的下调),但阻断免疫细胞中的抑制信号导致免疫细胞应答的上调(以及由此导致的免疫应答的上调)。在一些情况下,通过增强免疫应答进行调节可以用于治疗免疫应答受阻遏的某些疾病或病症,如癌症。通常,在CD3结合区与T细胞上的CD3结合和/或抗原结合结构域与TAA结合后,阻断抑制性相互作用的能力发生在免疫突触处和/或肿瘤微环境中。在特定实施方案中,所提供的多特异性多肽构建体降低、抑制或阻遏由细胞(如T细胞)中的抑制性受体介导的抑制信号。

[0116] 在一些实施方案中,所述一个或多个抗原结合结构域结合肿瘤细胞或肿瘤微环境的细胞上的抗原。在一些方面,所提供的多特异性多肽构建体可以用于增加针对肿瘤或癌症的免疫应答,如T细胞活性,例如细胞毒性活性。在一些实施方案中,所提供的多特异性多肽构建体可以用于治疗受试者的肿瘤或癌症。

[0117] 在一些实施方案中,所述一个或多个抗原结合结构域结合相同的抗原。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体包含结合相同抗原上的不同表位的多于一个抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体包含结合一种或多种不同抗原的多于一个抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体包含结合相同抗原上的不同表位的多于一个抗原结合结构域,以及包含与一种或多种不同抗原结合的另外的抗原结合结构域。在一些例子中,所提供的多特异性多肽构建体提供对一种或多种TAA的多价接合,如通过至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域。例如,在一些实施方案中,所述多肽构建体至少包含第一抗原结合单结构域抗体(sdAb)和第二抗原结合sdAb。在一些方面,所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合相同的抗原。

[0118] 此外,在一些方面,本公开文本的多特异性多肽构建体确保将不存在或存在降低的经由外周血中的CD3对T细胞的结合,因为这些构建体的CD3结合区因Fc区的存在受限或

以其他方式被阻断和/或抑制。因此,本公开文本的多特异性多肽构建体提供了许多优点。在一些方面,这些构建体限制了由结合所有T细胞引起的下沉效应。在一些方面,这些构建体降低了全身性毒性。

[0119] 在一些实施方案中,本公开文本的所提供的多特异性多肽构建体允许受控地生物分布至受试者的所需部位,例如像肿瘤相关抗原(TAA)表达的部位。TAA表达的部位包括例如肿瘤和周围的肿瘤微环境。

[0120] 在一些实施方案中,就结合CD3并随后激活T细胞的能力而言,本文提供的多特异性多肽构建体以两种状态存在:(1)当未由所述一个或多个抗原结合结构域中的任一个或全部进行结合时,发生“无活性”状态,使得CD3结合受限且T细胞相互作用排除或降低,和(2)在由所述一个或多个抗原结合结构域中的任一个或全部进行抗原结合时,发生“活性”状态,使得CD3结合区能够结合CD3并允许T细胞相互作用。

[0121] 在一些实施方案中,所述Fc区经由一个或多个接头连接至所述CD3结合结构域。在一些实施方案中,所述Fc区经由一个或多个不可切割接头连接至所述CD3结合区。在一些实施方案中,所述Fc区经由可切割接头或者一个或多个在其他方面不稳定的接头连接至所述CD3结合区。

[0122] 在一些方面,本公开文本的多特异性多肽构建体允许在不存在切割的情况下(如在不存在蛋白水解的情况下)具有治疗功效。在一些实施方案中,所述接头是不可切割接头。

[0123] 在一些实施方案中,所述Fc区和所述CD3结合区通过可切割接头(如在蛋白酶的存在下可以特异性切割的接头)连接。在一些方面,在所述可切割接头的切割后发生增强的CD3结合。在一些此类方面,“活性”状态可以经由几种机制进一步放大,包括经由连接CD3结合区和Fc区的接头的切割。在一些实施方案中,所述可切割接头是含有蛋白酶的底物识别位点的接头。在一些实施方案中,其中所述Fc区和所述CD3结合区通过可切割接头连接,在所述一个或多个接头内切割后可以发生增强的CD3结合。

[0124] 在一些实施方案中,所述Fc区是同二聚体Fc区。在一些实施方案中,所述Fc区是异二聚体Fc区。在一些实施方案中,所述Fc区是单体Fc区。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的Fc区能够与Fc γ R相互作用并介导先天免疫效应子功能,例如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的Fc区能够与补体蛋白即C1q相互作用,并介导补体依赖性细胞毒性。因此,在一些方面,本公开文本的多特异性多肽构建体允许多重免疫效应子机制,包括先天免疫效应子和T细胞。

[0125] 在一些实施方案中,所述接头是可切割接头。在一些实施方案中,其中所述Fc区和所述CD3结合区通过可切割接头可操作地连接,所述Fc区与所述CD3结合区之间的一个或多个接头的切割可以将所述多特异性多肽构建体分离成第一组分和第二组分。根据所述多特异性多肽构建体的组成,所述第一组分和所述第二组分可以具有不同的功能。在一些实施方案中,所述Fc区是展现出一种或多种效应子功能(如ADCC、CDC或ADCP功能)的区域。在此类例子中,本公开文本的多特异性多肽构建体可以用于产生自放大系统。例如,所述多特异性构建体可以如下使用:在Fc区的TAA靶向和CD16结合后由NK细胞介导的ADCC导致释放颗粒酶B,其能够细胞外蛋白水解和切割所述多特异性多肽构建体的第一组分与第二组分之

间的接头。

[0126] 在一些方面,所述多特异性多肽构建体提供具有双重效应子功能的二合一治疗性部分,其中所述多特异性多肽构建体的蛋白水解激活(如经由所述可切割接头)产生各自具有生物活性的两种组分。本公开文本的多特异性多肽构建体能够提供Fc介导的效应子功能,例如像ADCC(例如,由NK细胞释放颗粒酶B)、ADCP和/或CDC。

[0127] 设想受限CD3接合构建体适合与任何TAA结合结构域一起使用,从而通过避免与外周T细胞的相互作用并介导有效的TAA依赖性T细胞细胞毒性而允许在肿瘤或肿瘤微环境中更佳的治疗性暴露。在一些方面,在所述Fc与所述CD3结合结构域的组分之间掺入蛋白酶可切割接头通过允许CD3结合结构域的完全暴露使得T细胞激活能力可以放大。根据所包含的特定接头,放大步骤可以由肿瘤相关蛋白酶或由抗原依赖性T细胞激活后释放的颗粒酶介导。如果包含肿瘤蛋白酶可切割接头,则放大由肿瘤或肿瘤微环境介导。然而,如果包含颗粒酶B可切割接头,则放大可以由T细胞在抗原依赖性激活后自介导。此外,在所述构建体包含效应子使能Fc的情况下,放大可以由通过ADCC机制发生的从NK细胞中释放的颗粒酶介导。

[0128] 在一些实施方案中,所述可切割接头被蛋白酶切割,所述蛋白酶在肿瘤微环境中产生和/或在T细胞激活后由T细胞产生或分泌,如可以经由一个或多个抗原结合结构域与TAA的结合通过CD3结合区与肿瘤微环境中的CD3的初始结合而诱导。在一些实施方案中,所述蛋白酶是颗粒酶B。在一些方面,本公开文本的多特异性多肽构建体利用肿瘤微环境内的蛋白酶和/或颗粒酶B在Fc免疫球蛋白多肽下方的位置处切割所述多特异性多肽构建体内的接头的的能力,从而产生具有(在一些情况下)不同的效应细胞接合的两种治疗活性蛋白。在一些方面,在所述可切割接头的切割后,经切割的第一部分或组分保留Fc效应子功能和第一抗原(例如像TAA)经由第一抗原结合结构域的二价靶向,并且第二部分或组分保留T细胞接合的能力,因为CD3结合区与Fc区的分离允许CD3结合。在一些情况下,经切割的第二部分或组分还保留与TAA结合的能力,其可以是经由第二抗原结合结构域的二价结合。

[0129] 本公开文本的多特异性多肽构建体被设计为确保切割所述可切割接头的蛋白酶不需要是肿瘤偏向性的(例如,不需要仅在肿瘤部位处和/或肿瘤环境中差异性表达)。相反,这些多特异性多肽构建体仅要求所述蛋白酶与所述TAA存在于相同的位置。这些构建体的价态将驱动肿瘤和/或肿瘤微环境内的生物分布和保留。

[0130] 在一些实施方案中,所述第二部分或组分含有对CD3为单价的CD3结合区,使得除非存在TAA,否则将不会激活T细胞。在一些方面,其中所述多价多肽构建体含有可切割接头,经切割的第二部分或组分允许TAA依赖性T细胞介导的细胞毒性。在一些情况下,经切割的第二部分或组分确保将不会有FcRn相互作用。此外,经切割的第二部分或组分的大小将足够小,例如仅为约50kDa,这将确保快速清除,如果在切割后由于任何原因经切割的第二部分或组分分布在肿瘤部位之外的话和/或如果它在肿瘤部位之外被异常切割的话。

[0131] 在一些实施方案中,本公开文本的多特异性多肽构建体允许T细胞和NK细胞介导的细胞毒性同时发生。在一些情况下,这种活性可以在多特异性多肽构建体中发生,所述多特异性多肽构建体含有可以靶向给定TAA上的不同和/或非竞争性表位的第一抗原结合结构域(例如,第一抗TAA抗原结合结构域)和第二抗原结合结构域(例如,第二抗TAA抗原结合域)。

[0132] 在一些方面,本公开文本的多特异性多肽构建体提供了优于当前双特异性治疗剂的许多优点。本公开文本的多特异性多肽构建体小于常规治疗性抗体(例如,150kDa相比于125kDa),这将允许更佳的靶标(例如肿瘤)渗透。首先,整个多特异性多肽构建体的大小为未经切割的构建体提供了长的半衰期,并且在所述构建体的切割后,经切割的第二部分或组分将足够小以确保短的半衰期。在一些方面,本公开文本的多特异性多肽构建体展现出降低的全身性毒性或肿瘤和/或肿瘤微环境之外的任何区域的毒性,因为由CD3结合区进行的CD3结合取决于在发生CD3接合之前的TAA接合。在一些情况下,包含对肿瘤环境的蛋白酶具有特异性的可切割接头降低所述多特异性构建体进行的CD3结合,直到蛋白水解激活和TAA接合,从而放大或增强CD3接合。此外,CRBR在所提供的多特异性多肽构建体中的另外存在提供了抗原依赖性特异性共刺激信号传导,以进一步增加或增强所需部位或位置(如具有肿瘤和/或肿瘤微环境)处的T细胞活性。同样,在所提供的多特异性多肽构建体中包含IRBR也可以通过去除或阻断检查点抑制信号来增强T细胞活性。

[0133] 本文引用的所有出版物和专利文件都通过引用并入本文,如同每个这种出版物或文件均被明确地且单独地被指明通过引用并入本文一样。出版物和专利文件的引用并非旨在承认任一种是相关现有技术,其也不欲构成对此类出版物和专利文件的内容或日期的任何承认。现在已经通过书面描述阐述了本发明,本领域技术人员将认识到,本发明可以在各种实施方案中实践并且前述说明和以下实施例用于说明目的,而不限后权利要求。

I. 定义

[0134] 除非另外定义,否则结合本公开文本使用的科学和技术术语应具有由本领域普通技术人员通常所理解的含义。术语“一个/一种(a)”实体或“一个/一种(an)”实体是指一个/一种或多个/多种该实体。例如,一种化合物是指一种或多种化合物。因此,术语“一个/一种(a、an)”、“一个/一种或多个/多种(one or more)”以及“至少一个/一种(at least one)”可以互换使用。此外,除非上下文另外要求,否则单数术语应包括复数,并且复数术语应包括单数。通常,与本文所述的细胞和组织培养、分子生物学以及蛋白质和寡核苷酸或多核苷酸化学和杂交结合使用的命名法及其技术是本领域熟知且常用的那些。对于重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如,电穿孔、脂质转染),使用标准技术。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书或如本领域通常实现或如本文所述来进行。前述技术和程序总体上根据本领域熟知的常规方法并且如本说明书全篇所引用和讨论的各个通用和更具体参考文献中所述来进行。参见例如,Sambrook等人Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989))。与本文所述的分析化学、合成有机化学以及医学化学和药物化学结合使用的命名法及其实验室程序和技术是本领域熟知且常用的那些。对于化学合成,化学分析,药物制备、配制和递送以及患者的治疗,使用标准技术。

[0135] 除非另外说明,否则如根据本公开文本所用,以下术语应理解为具有以下含义:

[0136] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白(Ig)分子的抗原结合部分或片段,即含有特异性结合抗原(与抗原免疫反应)的抗原结合位点的分子。术语抗体不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,而且包括其片段,如dAb、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(scFv)或单结构域抗体(sdAb)。通常,“抗原结合片段”含有免疫球蛋白重链和/或轻链的与目的抗原的至少一个表位结合的至少一个CDR。就这一点而言,抗原结合片段可以包含来

自结合抗原的抗体的可变重链 (VH) 和可变轻链 (VL) 序列的1、2、3、4、5个或所有6个CDR, 如对于含有VH和VL的抗体通常包含六个CDR (对于重链和轻链中的每一条为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”), 或对于含有单可变结构域的抗体包含三个CDR。抗原结合片段包括单结构域抗体, 如仅含有VH或仅含有VL的那些, 包括例如 V_{H1} 、 V_{NAR} 、工程化 V_H 或 V_L 结构域。

[0137] 已知基本的抗体结构单元包含四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链构成, 每一对具有一条“轻” (约25kDa) 链和一条“重”链 (约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括主要负责抗原识别的约100个至110个或更多个氨基酸的可变区。每条链的羧基末端部分限定主要负责效应子功能的恒定区。通常, 自人获得的抗体分子涉及种类IgG、IgM、IgA、IgE和IgD中的任一种, 其因分子中存在的重链的性质彼此不同。某些类别也具有亚类, 如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄等。此外, 在人中, 轻链可以是 κ 链或 λ 链。

[0138] 如本文所用, 术语“单克隆抗体” (mAb) 或“单克隆抗体组合物”是指含有抗体分子的仅一种分子种类的抗体分子群体, 所述抗体分子的仅一种分子种类由独特的轻链基因产物和独特的重链基因产物组成。特别地, 单克隆抗体的互补决定区 (CDR) 在群体的所有分子中是相同的。mAb含有能够与抗原的特定表位免疫反应的抗原结合位点, 其特征在于对抗原的独特结合亲和力。

[0139] 如本文所用, 术语“表位”包括由抗体、抗体片段或其他结合结构域靶向的抗原的任何特定部分。术语“表位”包括特异性结合所针对的任何蛋白质区。术语“表位”包括参与与结合分子 (如抗体或抗原结合片段) 特异性结合的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团 (如氨基酸或糖侧链) 组成, 并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如, 可以产生针对多肽的N末端、中心或C末端肽的抗体。另外, 可以产生针对多肽的线性或不连续表位的抗体。

[0140] 如本文所用, 术语“特异性结合 (specific binding或specifically binds)”是指结合分子 (如抗体或抗原结合片段) 优先结合蛋白质和/或大分子的复杂混合物中的抗原的能力。如果与结合分子和替代细胞或靶抗原反应或相关联的情况相比, 所述结合分子与特定细胞或靶抗原更频繁更快速地以更长的持续时间和/或以更大的亲和力反应或相关联, 则所述结合分子被视为展现出“特异性结合”或“优先结合”。如果与结合分子和其他物质结合的情况相比, 所述结合分子以更大的亲和力、亲合力更容易地和/或以更长的持续时间与靶标结合, 则所述结合分子特异性结合或优先结合靶标。在一些方面, 特异性结合可以指代在免疫球蛋白分子与免疫球蛋白对其具有特异性的抗原之间发生的类型的非共价相互作用。应理解, 特异性结合或优先结合并不一定需要 (尽管可以包括) 专一结合。可以使用各种已知方法来量化或评估结合。结合相互作用的强度或亲和力可以表示为相互作用的解离常数 (K_d), 其中较小的 K_d 表示较大的亲和力。一种这样的方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率, 其中那些速率取决于复合物配偶体的浓度、相互作用的亲和力以及同样影响两个方向上的速率的几何参数。因此, “缔合速率常数” (K_{on}) 和“解离速率常数” (K_{off}) 两者均可以通过计算浓度和实际的缔合和解离速率来确定。(参见Nature 361:186-87 (1993))。 K_{off}/K_{on} 的比率使得可以取消所有与亲和力无关的参数, 并且等于解离常数 K_d 。(总体上参见Davies等人 (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473)。如通过诸如放射性配体结合测定或本领域技术人员已知的类似测定等测定所测量的, 当结合常数 (K_d) 为 $\leq 1\mu\text{M}$ 时, 例如在一些实施方案中为 $\leq 100\text{nM}$, 在一些实施方案中为 $\leq 10\text{nM}$, 并且在一些实施方案

中为 $\leq 100\text{pM}$ 至约 1pM ,结合分子(如抗体或抗原结合片段)被视为特异性结合。

[0141] 术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用并且是指通过肽键连接的两个或更多个氨基酸的分子链。所述术语包括多肽的表达后修饰,例如糖基化、乙酰化、磷酸化等。所述术语还包括这样的分子,其中可以合成或使用已知蛋白质工程化技术重组表达的一种或多种氨基酸类似物或非经典或非天然氨基酸。另外,可以衍生化蛋白质。蛋白质可以是单一多肽链或通过例如链间二硫键相互共价键合的至少两条多肽链的多聚体(二聚体)。因此,单体、二聚体和更高级多聚体多肽在所定义术语的范围内。多聚体多肽可以是同多聚体的(相同多肽链)或异多聚体的(非相同多肽链)。

[0142] 本文所提及的术语“分离的蛋白质”意指主题蛋白质(1)不含通常会在自然界中和其一起发现的至少一些其他蛋白质,(2)本质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)已经与至少约50%的多核苷酸、脂质、碳水化合物或在自然界中和其相关联的其他材料分离,(5)与在自然界中和“分离的蛋白质”相关联的蛋白质部分不相关联(通过共价或非共价相互作用),(6)与在自然界中和其不相关联的多肽可操作地相关联(通过共价或非共价相互作用),或(7)在自然界中不存在。这样的分离的蛋白质可以由基因组DNA、cDNA、mRNA或其他RNA编码,或者可以是合成起源的,或其任何组合。在某些实施方案中,分离的蛋白质基本上不含在其天然环境中发现的会干扰其用途(治疗性、诊断性、预防性、研究或其他方式)的蛋白质或多肽或其他污染物。

[0143] 如本文提及的术语“多核苷酸”意指长度为至少10个碱基的核苷酸,其是核糖核苷酸或脱氧核苷酸,或者是任一类型核苷酸的修饰形式。所述术语包括单链和双链形式的DNA。根据本公开文本的多核苷酸包括编码本文所示多特异性多肽构建体的多肽的核酸分子。

[0144] 如本文所用的术语“分离的多核苷酸”应意指基因组、cDNA或合成起源或其某种组合的多核苷酸,根据其起源,所述“分离的多核苷酸”(1)不与在自然界中发现其所在的多核苷酸的全部或部分相关联,(2)可操作地连接至在自然界中其并不连接的多核苷酸,或(3)在自然界中不作为更大序列的一部分存在。

[0145] 如本文所用的术语“可操作地连接”是指如此描述的组分的位置处于允许它们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以使得在与控制序列相容的条件下实现编码序列表达的方式连接。

[0146] 当应用于多肽时,术语“基本同一性”意指两个肽序列当如通过GAP或BESTFIT程序使用默认空位权重最佳比对时,享有至少80%序列同一性,例如在一些实施方案中为至少90%序列同一性,在一些实施方案中为至少95%序列同一性,并且在一些实施方案中为至少99%序列同一性。特别地,设想了保守氨基酸替代。保守替代是在其侧链中相关的氨基酸家族内发生的那些。遗传编码的氨基酸通常分为以下家族:(1)酸性氨基酸是天冬氨酸、谷氨酸;(2)碱性氨基酸是赖氨酸、精氨酸、组氨酸;(3)非极性氨基酸是丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸,以及(4)不带电荷的极性氨基酸是甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。亲水性氨基酸包括精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸和苏氨酸。疏水性氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。其他氨基酸家族包括(i)丝氨酸和苏氨酸,其是脂肪族羟基家族;(ii)天冬酰胺和谷氨

酰胺,其是含有酰胺的家族;(iii)丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸,其是脂肪族家族;以及(iv)苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,其是芳香族家族。例如,可以合理地预期孤立地用异亮氨酸或缬氨酸替代亮氨酸、用谷氨酸替代天冬氨酸、用丝氨酸替代苏氨酸或用结构上相关的氨基酸类似地替代氨基酸不会对所得分子的结合或特性具有重大影响,尤其是在替代不涉及框架位点内的氨基酸时。氨基酸改变是否产生功能性肽可以通过测定多肽衍生物的比活性而容易地确定。本文详细描述了测定。

[0147] 术语“药剂”在本文中用于表示化学化合物、化学化合物的混合物、生物大分子或由生物材料制成的提取物。

[0148] 如本文所用,术语“标记”或“标记的”是指掺入可检测标记物,例如通过掺入放射性标记的氨基酸或衔接至具有生物素基部分的多肽,所述生物素基部分可以通过加标记的抗生物素蛋白(例如,含有可通过光学或量热方法检测的荧光标记物或酶活性的链霉抗生物素蛋白)检测。在某些情况下,标记或标记物也可以是治疗性的。标记多肽和糖蛋白的各种方法在本领域是已知的并且可以被使用。多肽的标记的例子包括但不限于以下:放射性同位素或放射性核素(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、荧光标记(例如,荧光团、罗丹明、镧系元素磷光体)、酶标记(例如,辣根过氧化物酶、p-半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光、生物素基团、由二级报告物识别的预定的多肽表位(例如,亮氨酸拉链对序列、二抗的结合位点、金属结合结构域、表位标签)。在一些实施方案中,标记通过各种长度的间隔区臂衔接以减少潜在的空间位阻。

[0149] 如本文所用的术语“肿瘤相关抗原”或“TAA”是指主要存在于哺乳动物受试者的肿瘤细胞上但通常在哺乳动物受试者的正常细胞上未发现的反结构。肿瘤特异性抗原不必是肿瘤细胞所独有的,但是具有肿瘤相关抗原的特定哺乳动物细胞的百分比足够高或肿瘤表面上肿瘤相关抗原的水平足够高,使得其可以被抗肿瘤治疗剂如所提供的多特异性多肽构建体靶向,并且向哺乳动物提供针对肿瘤效应的预防或治疗。在一些实施方案中,在来自具有肿瘤的哺乳动物的细胞的随机统计样品中,显示出TAA的细胞的至少50%是癌性的。在其他实施方案中,显示出TAA的细胞的至少60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%是癌性的。

[0150] 如本文所用,组合物是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。它可以是溶液、悬浮液、液体、粉末、糊剂、水性的、非水性的或其任何组合。

[0151] 术语“药物组合物”是指适用于哺乳动物受试者(通常为人)中的医药用途的组合物。药物组合物通常包含有效量的活性剂(例如,多特异性多肽构建体)和载体、赋形剂或稀释剂。载体、赋形剂或稀释剂通常分别是药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

[0152] 如本文所用的术语疾病或障碍的“治疗(treating、treatment)”或“疗法”意指通过施用单独的或与如本文所述另一种化合物组合的本公开文本的药物组合物来减慢、停止或逆转疾病或障碍的进展,如通过临床或诊断症状的减少、中止或消除所证实的。“治疗(treating、treatment)”或“疗法”还意指急性或慢性疾病或障碍中症状的严重程度降低或复发率降低。如本文在癌症的背景下所用,术语癌症的“治疗”或“抑制(inhibit、inhibiting或inhibition)”是指以下各项中的至少一种:肿瘤生长速率的统计学上显著的降低;肿瘤停止生长;或肿瘤的大小、质量、代谢活动或体积的减少,如通过标准准则(如但不限于实体瘤反应评价标准(RECIST))所测量的;或无进展存活期(PFS)或总存活期(OS)的

统计学上显著的增加。疾病或障碍的“预防 (preventing、prophylaxis或prevention)”是指施用单独的或与另一种化合物组合的药物组合物,以防止疾病或障碍或者疾病或障碍的一些或所有症状出现或发作,或减少疾病或障碍发作的可能性。

[0153] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指组合物当单独(即,作为单一疗法)或与另外的治疗剂组合施用至患者时,对疾病进展(如例如通过改善或消除疾病症状和/或病因)产生统计学上显著的降低的量和/或浓度。有效量可以是缓解、减轻或缓和与疾病或障碍相关的至少一种症状或生物反应或效应,防止疾病或障碍的进展,或改善患者的身体功能的量。

[0154] 如本文所用,“基本上纯的”意指目标种类是存在的主要种类(即,基于摩尔,其比组合物中的任何其他单独种类更丰富),并且基本上纯化的级分是这样的组合物,其中目标种类占存在的所有大分子种类的至少约50%(基于摩尔)。通常,基本上纯的组合物将占组合物中存在的所有大分子种类的多于约80%,例如在一些实施方案中多于约85%、90%、95%和99%。在一些实施方案中,将目标种类纯化至本质上同质(通过常规检测方法不能检测到组合物中的污染种类),其中组合物本质上由单一大分子种类组成。

[0155] 如本文所用,“受试者”是哺乳动物,如人或其他动物,并且通常是人。受试者(例如患者)包括需要治疗以治疗疾病或障碍的那些。术语患者包括人和兽医学受试者。受试者可以是雄性或雌性,并且可以是任何合适的年龄,包括婴儿、幼年、青少年、成人和老年受试者。

[0156] 本文中的其他化学术语是根据本领域的常规用法使用的,如麦格劳-希尔化学术语词典(The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms) (Parker, S. 编辑, McGraw-Hill, 旧金山(1985)) 所示例的。

[0157] 如本文所用的术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知晓的对应值的通常误差范围。本文对“约”某一值或参数的提及包括(并描述)针对该值或参数本身的实施方案。例如,提及“约X”的描述包括“X”的描述。

II. 多特异性多肽构建体

[0158] 本文提供了多特异性多肽构建体,其含有包含免疫球蛋白Fc区的第一组分和包含CD3结合区的第二组分,其中所述第一组分和所述第二组分通过接头偶联,所述Fc区位于所述CD3结合区的N末端;并且所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含(1)结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域和(2)结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。本文还提供了多特异性多肽构建体,其含有包含免疫球蛋白Fc区的第一组分和包含CD3结合区的第二组分,其中所述第一组分和所述第二组分通过接头偶联,所述Fc区位于所述CD3结合区的N末端;并且所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含(1)结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域和(2)结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有至少一个结合TAA的抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体至少含有结合TAA的第一抗原结合结构域和结合TAA的第二抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有至少一个结合共刺激受体的CRBR和/或至少一个结合抑制性受体的IRBR。本文提供的多特异性构建体的示例性形式示于图1-3以及图18A和18B中。

[0159] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端按顺序含有:免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3(CD3 ϵ)的CD3结合区;以及至少两个结合结构域,其中一个

合TAA的抗原结合结构域,并且另一个是结合共刺激受体的CRBR。

[0160] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端按顺序含有:至少两个结合结构域,其中一个是与肿瘤相关抗原(TAA)结合的抗原结合结构域,并且另一个是结合共刺激受体的CRBR;免疫球蛋白Fc区;接头;以及结合CD3(CD3 ϵ)的CD3结合区。

[0161] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端按顺序含有:免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3(CD3 ϵ)的CD3结合区;以及至少两个结合结构域,其中一个结合TAA的抗原结合结构域,并且另一个是结合抑制性受体的IRBR。

[0162] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端按顺序含有:免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3(CD3 ϵ)的CD3结合区;以及至少两个结合结构域,其中一个结合TAA的抗原结合结构域,并且另一个是结合抑制性受体的IRBR。

[0163] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端按顺序含有:至少两个结合结构域,其中一个是与肿瘤相关抗原(TAA)结合的抗原结合结构域,并且另一个是结合抑制性受体的IRBR;免疫球蛋白Fc区;接头;以及结合CD3(CD3 ϵ)的CD3结合区。

[0164] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端按顺序含有:与肿瘤相关抗原(TAA)结合的至少一个抗原结合结构域或结合共刺激受体的CRBR;免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3(CD3 ϵ)的CD3结合区;以及与TAA结合的所述至少一个抗原结合结构域或结合共刺激受体的所述CRBR中的另一种。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的N末端部分或C末端部分含有一个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的N末端部分或C末端部分含有两个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域中的每一个是相同的。在一些实施方案中,至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域与不同的TAA结合或者与相同TAA的不同表位结合。

[0165] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端按顺序含有:与肿瘤相关抗原(TAA)结合的至少一个抗原结合结构域或结合抑制性受体的IRBR;免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3(CD3 ϵ)的CD3结合区;以及与TAA结合的所述至少一个抗原结合结构域或结合抑制性受体的所述IRBR中的另一种。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的N末端部分或C末端部分含有一个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的N末端部分或C末端部分含有两个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域中的每一个是相同的。在一些实施方案中,至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域与不同的TAA结合或者与相同TAA的不同表位结合。

[0166] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端按顺序含有:结合共刺激受体的CRBR;免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3(CD3 ϵ)的CD3结合区;以及至少一个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的C末端部分含有一个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的C末端部分含有两个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域中的每一个是相同的。在一些实施方案中,至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域与不同的TAA结合或者与相同TAA的不同表位结合。

[0167] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端按顺序含有:结合

抑制性受体的IRBR;免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区;以及至少一个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的C末端部分含有一个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的C末端部分含有两个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域中的每一个是相同的。在一些实施方案中,至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域与不同的TAA结合或者与相同TAA的不同表位结合。

[0168] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端按顺序含有:至少一个与TAA结合的抗原结合结构域;免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区;以及结合共刺激受体的CRBR。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的N末端部分含有一个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的N末端部分含有两个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域中的每一个是相同的。在一些实施方案中,至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域与不同的TAA结合或者与相同TAA的不同表位结合。

[0169] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端按顺序含有:至少一个与TAA结合的抗原结合结构域;免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区;以及结合抑制性受体的IRBR。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的N末端部分含有一个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的N末端部分含有两个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域中的每一个是相同的。在一些实施方案中,至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域与不同的TAA结合或者与相同TAA的不同表位结合。

[0170] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端按顺序含有:至少一个与TAA结合的抗原结合结构域;免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区;以及至少两个结合结构域,其中一个是结合TAA的抗原结合结构域,并且另一个是结合共刺激受体的CRBR。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的C末端部分含有两个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域中的每一个是相同的。在一些实施方案中,至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域与不同的TAA结合或者与相同TAA的不同表位结合。

[0171] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端按顺序含有:至少一个与TAA结合的抗原结合结构域;免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区;以及至少两个结合结构域,其中一个是结合TAA的抗原结合结构域,并且另一个是结合抑制性受体的IRBR。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的C末端部分含有两个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域中的每一个是相同的。在一些实施方案中,至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域与不同的TAA结合或者与相同TAA的不同表位结合。

[0172] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端按顺序含有:至少两个结合结构域,其中一个是与肿瘤相关抗原 (TAA) 结合的抗原结合结构域,并且另一个是结合共刺激受体的CRBR;免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区;以及至少一个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的N末端部分含有两个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域

中的每一个是相同的。在一些实施方案中,至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域与不同的TAA结合或者与相同TAA的不同表位结合。

[0173] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端按顺序含有:至少两个结合结构域,其中一个是与肿瘤相关抗原(TAA)结合的抗原结合结构域,并且另一个是结合抑制性受体的IRBR;免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3(CD3 ϵ)的CD3结合区;以及至少一个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的N末端部分含有两个与TAA结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域中的每一个是相同的。在一些实施方案中,至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域与不同的TAA结合或者与相同TAA的不同表位结合。

[0174] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端按顺序含有:至少两个结合结构域,其中一个是与肿瘤相关抗原(TAA)结合的抗原结合结构域,并且另一个是结合共刺激受体的CRBR;免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3(CD3 ϵ)的CD3结合区;以及至少两个结合结构域,其中一个是与TAA结合的抗原结合结构域,并且另一个是结合抑制性受体的IRBR。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域中的每一个是相同的。在一些实施方案中,至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域与不同的TAA结合或者与相同TAA的不同表位结合。

[0175] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端按顺序含有:至少两个结合结构域,其中一个是与肿瘤相关抗原(TAA)结合的抗原结合结构域,并且另一个是结合抑制性受体的IRBR;免疫球蛋白Fc区;接头;结合CD3(CD3 ϵ)的CD3结合区;以及至少两个结合结构域,其中一个是与TAA结合的抗原结合结构域,并且另一个是结合共刺激受体的CRBR。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域中的每一个是相同的。在一些实施方案中,至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域与不同的TAA结合或者与相同TAA的不同表位结合。

[0176] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体是二聚体,其中二聚化是通过两条多肽链之间的共价或非共价相互作用形成。在一些实施方案中,这两条多肽链通过例如链间二硫键彼此共价键合。在一些实施方案中,所述Fc区经由链间二硫键介导二聚化。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有同二聚体Fc区,其中在一些情况下,所述多特异性多肽构建体的两条多肽链是相同的(同二聚体)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有异二聚体Fc区,其中在一些情况下,所述多特异性多肽构建体的多肽链是不同的(异二聚体)。在异二聚体多特异性多肽构建体的特定例子中,所述CD3结合区是含有VH和VL链的双链多肽,如是含有VH和VL的Fv抗体片段。在一些实施方案中,所述Fv抗体片段包括二硫化物稳定的抗CD3结合Fv片段(dsFv)。

[0177] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体由两种多肽形成或包含两种多肽,所述两种多肽不含第一多肽,其包含异二聚体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结构域;以及第二多肽,其包含所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头、所述抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv)的VL结构域。在一些实施方案中,所述第一多肽含有一个或两个与TAA结合的抗原结合结构域或其链。在一些实施方案中,所述第二多肽含有一个或两个与TAA结合的抗原结合结构域或其链。在一些实施方案中,与TAA结合的每个抗原结合结构域定位于所述Fc多肽的N末端和/或所述CD3结合区链的C末端。在一些

实施方案中,所述第一多肽或所述第二多肽或者所述第一多肽和所述第二多肽两者还包含CRBR,使得所述多特异性多肽构建体含有至少一个CRBR。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有两个CRBR。在一些实施方案中,所述第一多肽和/或所述第二多肽的CRBR可以定位于所述Fc多肽的N末端和/或所述CD3结合区链的C末端。在一些实施方案中,所述第一多肽或所述第二多肽或者所述第一多肽和所述第二多肽两者还包含IRBR,使得所述多特异性多肽构建体含有至少一个IRBR。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有两个IRBR。在一些实施方案中,所述第一多肽和/或所述第二多肽的IRBR可以定位于所述Fc多肽的N末端和/或所述CD3结合区链的C末端。在一些实施方案中,所述第一多肽或所述第二多肽或者所述第一多肽和所述第二多肽两者还包含CRBR,并且所述第一多肽或所述第二多肽或者所述第一多肽和所述第二多肽两者还包含IRBR,使得所述多特异性多肽构建体含有至少一个CRBR和至少一个IRBR。

[0178] 在本文中(包括在图1-3和18A-B中)描述了含有至少两条多肽链的各种示例性多特异性多肽构建体。设想了多特异性多肽构建体的任何此类构型。

[0179] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有至少两个结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域和至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有(1)第一多肽,其按N末端到C末端的顺序包含:结合肿瘤相关抗原(TAA)的第一抗原结合结构域、异二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头(例如可切割接头)、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv或dsFv)的链(例如VH或VL)和结合肿瘤相关抗原(TAA)的第二抗原结合结构域;以及第二多肽,其按N末端到C末端的顺序包含:以及(2)第二多肽,其按N末端到C末端的顺序包含:所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、相同的接头(例如相同的可切割接头)、所述抗CD3抗体或抗原结合片段的另一条链(VH或VL中的另一个)和结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有(1)第一多肽,其按N末端到C末端的顺序包含:结合肿瘤相关抗原(TAA)的第一抗原结合结构域、异二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头(例如可切割接头)、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv或dsFv)的链(例如VH或VL)和结合肿瘤相关抗原(TAA)的第二抗原结合结构域;以及第二多肽,其按N末端到C末端的顺序包含:以及(2)第二多肽,其按N末端到C末端的顺序包含:结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)、所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、相同的接头(例如相同的可切割接头)和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的另一条链(VH或VL中的另一个)。

[0180] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有至少两个结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域和至少一个结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有(1)第一多肽,其按N末端到C末端的顺序包含:结合肿瘤相关抗原(TAA)的第一抗原结合结构域、异二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头(例如可切割接头)、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv或dsFv)的链(例如VH或VL)和结合肿瘤相关抗原(TAA)的第二抗原结合结构域;以及第二多肽,其按N末端到C末端的顺序包含:以及(2)第二多肽,其按N末端到C末端的顺序包含:所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、相同的接头(例如相同的可切割接头)、所述抗CD3抗体或抗原结合片段的另一条链(VH或VL中的另一个)和结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有(1)第一多肽,其按N末端到C末端的顺序包含:结合肿瘤相关抗原(TAA)的第一

抗原结合结构域、异二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头(例如可切割接头)、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv或dsFv)的链(例如VH或VL)和结合肿瘤相关抗原(TAA)的第二抗原结合结构域;以及第二多肽,其按N末端到C末端的顺序包含:以及(2)结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR),第二多肽,其按N末端到C末端的顺序包含:所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、相同的接头(例如相同的可切割接头)和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的另一条链(VH或VL中的另一个)。

[0181] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有至少两个结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域、至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)和至少一个结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有(1)第一多肽,其按N末端到C末端的顺序包含:结合肿瘤相关抗原(TAA)的第一抗原结合结构域、异二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头(例如可切割接头)、抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv或dsFv)的链(例如VH或VL)和结合肿瘤相关抗原(TAA)的第二抗原结合结构域;以及(2)第二多肽,其按N末端到C末端的顺序包含:CRBR或IRBR中的一种、所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、相同的接头(例如相同的可切割接头)、所述抗CD3抗体或抗原结合片段的另一条链(VH或VL中的另一个)和所述CRBR或IRBR中的另一种。

[0182] 下文更详细地描述了本公开文本的多特异性多肽构建体的每种组分。

1. 抗CD3结合结构域

[0183] 本公开文本的多特异性多肽构建体包含抗CD3结合结构域的一个或多个拷贝。本公开文本的抗CD3结合结构域经由接合T细胞上的CD3 ϵ 来激活T细胞。本公开文本的抗CD3结合结构域激动、刺激、激活和/或以其他方式增大CD3介导的T细胞激活。CD3的生物活性包括例如通过CD3与T细胞受体(TCR)的抗原结合亚基之间的相互作用进行的T细胞激活和其他信号传导。例如,本公开文本的抗CD3结合结构域经由接合T细胞上的CD3 ϵ ,通过部分或完全调节(例如,激动、刺激、激活或以其他方式增大)CD3介导的T细胞激活来完全或部分激活T细胞。

[0184] 在优选的实施方案中,本公开文本的抗CD3结合结构域特异性结合CD3的 ϵ 链(也称为CD3 ϵ)。本公开文本的抗CD3 ϵ 结合结构域经由接合T细胞上的CD3 ϵ 来激活T细胞。本公开文本的抗CD3 ϵ 结合结构域包括单克隆抗体,例如像哺乳动物单克隆抗体、灵长类单克隆抗体、全人单克隆抗体以及人源化单克隆抗体和嵌合抗体及其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含抗体或其抗原结合片段的一个或多个拷贝。

[0185] 在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含选自以下的抗体或其抗原结合片段的一个或多个拷贝:Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域包括结合CD3 ϵ 的Fv抗体片段(在本文中称为抗CD3 ϵ Fv片段)。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ Fv抗体片段是二硫化物稳定的抗CD3结合Fv片段(dsFv)。在一些实施方案中,所述抗CD3结合结构域对于结合CD3为单价的。

[0186] 在一些实施方案中,所述CD3结合区不是单链抗体。例如,在一些方面,所述CD3结合区不是单链可变片段(scFv)。

[0187] 在一些实施方案中,所述CD3结合区是含有可变重链(Hv,也称为VH)和可变轻链(Lv,也称为VL)的Fv抗体片段,如所述的任一种。在此类实施方案的方面中,所述免疫球蛋白

白Fc区是异二聚体Fc区,其含有能够在Fc异二聚体的两条多肽之间进行异二聚体缔合的两种不同的Fc多肽,如第II.2节中所述的任一种。在此类实施方案中,所述CD3结合区的可变重链(Hv)和可变轻链(Lv)连接在异二聚体Fc的相对链上。

[0188] 在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含VH CDR1序列、VH CDR2序列和VH CDR3序列的组合,其中所述VH CDR1序列、所述VH CDR2序列和所述VH CDR3序列中的至少一个选自至少包含氨基酸序列TYAMN (SEQ ID NO:16)的VH CDR1序列;至少包含氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO:17)的VH CD2序列;以及至少包含氨基酸序列HG NFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:18)的VH CDR3序列。

[0189] 在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列的组合,其中所述VL CDR1序列、所述VL CDR2序列和所述VL CDR3序列中的至少一个选自至少包含氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:19)的VL CDR1序列;至少包含氨基酸序列GTNKRAP (SEQ ID NO:20)的VL CDR2序列;以及至少包含氨基酸序列ALWYNSLWV (SEQ ID NO:21)的VL CDR3序列。

[0190] 在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含至少包含氨基酸序列TYAMN (SEQ ID NO:16)的VH CDR1序列;至少包含氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO:17)的VH CD2序列;至少包含氨基酸序列HG NFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:18)的VH CDR3序列;至少包含氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:19)的VL CDR1序列;至少包含氨基酸序列GTNKRAP (SEQ ID NO:20)的VL CDR2序列;以及至少包含氨基酸序列ALWYNSLWV (SEQ ID NO:21)的VL CDR3序列。

[0191] 在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含VH CDR1序列、VH CDR2序列和VH CDR3序列的组合,其中所述VH CDR1序列、所述VH CDR2序列和所述VH CDR3序列中的至少一个选自包含与氨基酸序列TYAMN (SEQ ID NO:16)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列的VH CDR1序列;包含与氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO:17)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列的VH CD2序列;以及包含与氨基酸序列HG NFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:18)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列的VH CDR3序列。

[0192] 在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列的组合,其中所述VL CDR1序列、所述VL CDR2序列和所述VL CDR3序列中的至少一个选自包含与氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:19)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列的VL CDR1序列;包含与氨基酸序列GTNKRAP (SEQ ID NO:20)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列的VL CDR2序列;以及包含与氨基酸序列ALWYNSLWV (SEQ ID NO:21)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列的VL CDR3序列。

[0193] 在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含至少包含氨基酸序列GFTFNTYAMN (SEQ ID NO:312)的VH CDR1序列;至少包含氨基酸序列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO:318)的VH CDR2序列;至少包含氨基酸序列HG NFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:18)的VH CDR3序列;至少包含氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:19)的VL CDR1序列;至少包含氨基酸序列

GTNKRAP (SEQ ID NO:20) 的VL CDR2序列;以及至少包含氨基酸序列ALWYNSLWV (SEQ ID NO:21) 的VL CDR3序列。

[0194] 在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含与氨基酸序列TYAMN (SEQ ID NO:16) 至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的VH CDR1序列;与氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO:17) 至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的VH CD2序列;与氨基酸序列HGNGFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:18) 至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的VH CDR3序列;与氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:19) 至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的VL CDR1序列;与氨基酸序列GTNKRAP (SEQ ID NO:20) 至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的VL CDR2序列;以及与氨基酸序列ALWYNSLWV (SEQ ID NO:21) 至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的VL CDR3序列。

[0195] 在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含至少包含氨基酸序列GFTFNTYAMN (SEQ ID NO:312) 的VH CDR1序列;至少包含氨基酸序列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO:318) 的VH CDR2序列;至少包含氨基酸序列HGNGFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:18) 的VH CDR3序列;至少包含氨基酸序列GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:319) 的VL CDR1序列;至少包含氨基酸序列GTNKRAP (SEQ ID NO:320) 的VL CDR2序列;以及至少包含氨基酸序列ALWYNSHWV (SEQ ID NO:315) 的VL CDR3序列。

[0196] 在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含与氨基酸序列GFTFNTYAMN (SEQ ID NO:312) 至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的VH CDR1序列;与氨基酸序列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO:313) 至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的VH CDR2序列;与氨基酸序列HGNGFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:18) 至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的VH CDR3序列;与氨基酸序列GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:319) 至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的VL CDR1序列;与氨基酸序列GTNKRAP (SEQ ID NO:320) 至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的VL CDR2序列;以及与氨基酸序列ALWYNSHWV (SEQ ID NO:315) 至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的VL CDR3序列。

[0197] 在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域是Fv片段,所述Fv片段包含重链可变氨基酸序列和轻链可变氨基酸序列的组合。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域是Fv片段,所述Fv片段包含重链可变氨基酸序列和轻链可变氨基酸序列的组合,所述重链可变氨基酸序列和轻链可变氨基酸序列包含与选自SEQ ID NO:32-81和241的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域是Fv片段,所述Fv片段包含重链可变氨基酸序列和轻链可变氨基酸序列的组合,所述重链可变氨基酸序列和轻链可变氨基酸序列包含选自SEQ ID NO:32-81和241的氨基酸序列。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域是Fv片段,所述Fv片段包含选自SEQ ID NO:32-62的重链可变氨基酸序列和选自SEQ ID NO:63-81和241的轻链可变氨基酸序列的组合。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域是Fv片段,所述Fv片段包含与选自SEQ ID NO:32-62的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96%、97%、98%、99%或更多相同的重链可变氨基酸序列和与选自SEQ ID NO:63-81和241氨基酸序列的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的轻链可变氨基酸序列的组合。

[0198] 在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列的组合,所述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:32-81和241的氨基酸序列。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含选自SEQ ID NO:32-62的重链可变区氨基酸序列和含有选自SEQ ID NO:63-81和241的氨基酸序列的轻链可变区氨基酸序列的组合。

[0199] 在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ Fv抗体片段包含选自SEQ ID NO:14、15、32-81、241、287-291和311的重链可变氨基酸序列和轻链可变氨基酸序列的组合。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ Fv抗体片段包含与选自SEQ ID NO:14、15、32-81、241、287-291和311的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的重链可变氨基酸序列和轻链可变氨基酸序列的组合。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ Fv抗体片段包含选自SEQ ID NO:14、32-62、和287、290和311的可变重链氨基酸序列和选自SEQ ID NO:15、63-81、241、288和289的可变轻链氨基酸序列的组合。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ Fv抗体片段包含与选自SEQ ID NO:14、32-62、287、290和311的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的可变重链氨基酸序列和与选自SEQ ID NO:15、63-81、241、288和289的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的可变轻链氨基酸序列的组合。

[0200] 在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域是Fv片段,所述Fv片段包含重链可变氨基酸序列和轻链可变氨基酸序列的组合。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ Fv抗体片段包含与选自SEQ ID NO:14、32-43、45-47、48和287的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的可变重链氨基酸序列和与选自SEQ ID NO:15、63、65-71、73、75、77和288的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的可变轻链氨基酸序列的组合。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ Fv抗体片段包含选自SEQ ID NO:14、32-43、45-47、48和287的可变重链氨基酸序列和选自SEQ ID NO:15、63、65-71、73、75、77和288的可变轻链氨基酸序列的组合。

[0201] 在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变重链(Hv)。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变重链(Hv)和含有与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的可变重链(Hv)。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的可变重链(Hv)和含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。

[0202] 在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:287的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变重链(VH)。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:288的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:287的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变重链(VH)和含有与SEQ ID NO:288的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:287的氨基酸序列的可变重链(VH)。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:288的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:287的氨基酸序列的可变重链(VH)和含有SEQ ID NO:288的氨基酸序列的可变轻链(VL)。

[0203] 在特定实施方案中,所述Fv是二硫化物稳定的Fv片段(dsFv),其中V_H-V_L异二聚体是通过链间二硫键稳定化的。在一些实施方案中,通过VH和/或VL链的框架位置中的位置突变来工程化链间二硫键。在一些实施方案中,VH链含有用Cys进行的在位置44处的突变,并且VL链含有用Cys进行的在位置100处的突变,各自根据Kabat编号。例如,在一些实施方案中,VH链含有突变G44C,并且VL链含有突变G100C,各自根据kabat编号。在一些实施方案中,根据Kabat编号,所述二硫化物稳定的抗CD3 Fv包含具有至Cys的在位置105处的突变的抗CD3 VH和具有至Cys的在位置43处的突变的抗CD3 VL。

[0204] 在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ Fv抗体片段包含与选自SEQ ID NO:44和49-62、290和311的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的可变重链氨基酸序列和与选自SEQ ID NO:64、72、74、76、78-81、241和289的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的可变轻链氨基酸序列的组合。在任何此类实施方案中的一些中,所述抗CD3 Fv是dsFv,其具有含有突变G44C的VH链和含有突变G100C的VL链,各自根据kabat编号。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ Fv抗体片段包含选自SEQ ID NO:44和49-62、290和311的可变重链氨基酸序列和选自SEQ ID NO:64、72、74、76、78-81、241和289的可变轻链氨基酸序列的组合。

[0205] 在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:44的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变重链(Hv)。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:72的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:44的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变重链(Hv)和含有与SEQ ID NO:72的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。在任何此类实施方案中的一些中,所述抗CD3 Fv是dsFv,其具有含有突变G44C的VH链和含有突变G100C的VL链,各自根据kabat编号。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的可变重链(Hv)。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构

域包含含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的可变重链(Hv)和含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。

[0206] 在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:44的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变重链(Hv)。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:241的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:44的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变重链(Hv)和含有与SEQ ID NO:241的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。在任何此类实施方案中的一些中,所述抗CD3 Fv是dsFv,其具有含有突变G44C的VH链和含有突变G100C的VL链,各自根据kabat编号。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的可变重链(Hv)。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:241的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的可变重链(Hv)和含有SEQ ID NO:241的氨基酸序列的可变轻链(Lv)。

[0207] 在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:290的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变重链(VH)。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:289的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:290的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变重链(VH)和含有与SEQ ID NO:289的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在任何此类实施方案中的一些中,所述抗CD3 Fv是dsFv,其具有含有突变G44C的VH链和含有突变G100C的VL链,各自根据kabat编号。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:290的氨基酸序列的可变重链(VH)。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:289的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:290的氨基酸序列的可变重链(VH)和含有SEQ ID NO:289的氨基酸序列的可变轻链(VL)。

[0208] 在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:311的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变重链(VH)。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:289的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有与SEQ ID NO:311的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变重链(VH)和含有与SEQ ID NO:289的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在任何此类实施方案中的一些中,所述抗CD3 Fv是dsFv,其具有含有突变G44C的VH链和含

有突变G100C的VL链,各自根据kabat编号。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:311的氨基酸序列的可变重链(VH)。在一些实施方案中,所述抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:289的氨基酸序列的可变轻链(VL)。在一些实施方案中,其抗CD3 ϵ 结合结构域包含含有SEQ ID NO:311的氨基酸序列的可变重链(VH)和含有SEQ ID NO:289的氨基酸序列的可变轻链(VL)。

2. 免疫球蛋白Fc多肽

[0209] 本公开文本的多特异性多肽构建体包含免疫球蛋白Fc区。在一些实施方案中,所述免疫球蛋白Fc区是选自以下的IgG同种型:IgG1同种型、IgG2同种型、IgG3同种型和IgG4亚类。在一些实施方案中,所述Fc区是人Fc。在一些实施方案中,所述免疫球蛋白Fc区是包含选自SEQ ID NO:1-6的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,所述免疫球蛋白Fc区含有作为SEQ ID No:1-6中任一个的免疫活性片段的Fc链。在一些实施方案中,所述免疫球蛋白Fc区含有与SEQ ID NO:1-6中任一个的氨基酸序列至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的Fc多肽链或其免疫活性片段。

[0210] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体是由各自含有Fc的多肽形成的二聚体。在一些具体的实施方案中,相同或基本上相同的多肽将被二聚化以产生同二聚体。在一些实施方案中,所述二聚体是其中所述多特异性多肽构建体的两种多肽相同的同二聚体。在其他情况下,所述Fc区由Fc结构域形成,所述Fc结构域被突变或修饰以促进异二聚化,其中不同的多肽可以被二聚化以产生异二聚体。因此,在一些实施方案中,所述二聚体是其中所述多特异性多肽构建体的两条多肽链不同的异二聚体。促进异二聚化的示例性修饰是已知的,包括如下文所述的任一种。

[0211] 通常,除了作为免疫球蛋白的主要功能的抗原结合能力之外,所述Fc区还负责效应子功能,如补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。另外,所述Fc区中存在的FcRn序列通过与体内FcRn受体缀合增加体内半衰期而起到调节血清中IgG水平的作用。在一些实施方案中,可以在Fc中改变(如降低或增强)此类功能以与所提供的多特异性多肽构建体一起使用。

[0212] 在一些实施方案中,所提供的多特异性多肽构建体的Fc区展现出一种或多种效应子功能。在一些情况下,所述Fc区能够提供Fc介导的效应子功能,例如像ADCC(例如,由NK细胞释放颗粒酶B)、ADCP和/或CDC。在其中所述多特异性多肽构建体含有可切割接头的一些实施方案中,所述接头的切割可以产生两种各自具有生物活性的组分:能够结合并接合T细胞上的CD3的CD3结合区,其在一些方面还可以含有用于诱导T细胞上的共刺激信号的CRBR;以及可以展现出靶标特异性效应子功能的连接至TAA抗原结合结构域的Fc区。在本文提供的特定实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有不可切割接头,并且在一些方面可能不展现出独立的Fc介导的效应子功能。

[0213] 在一些实施方案中,所述Fc区包括被突变或修饰以改变一种或多种效应子功能的Fc多肽。Fc多肽突变(以改变(如降低)效应子功能)的各种例子是已知的,包括如下文所述的任一种。在一些实施方案中,除非参考特定的SEQ ID NO进行描述,否则对Fc区中的氨基酸取代的提及是根据Kabat的EU编号(也称为Kabat编号)。EU编号是已知的,并且按照最新更新 (IMGT $\text{\textcircled{R}}$),国际ImMunoGeneTics information system $\text{\textcircled{R}}$,

http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html (创建:2001年5月17日,最后更新: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公开号91-3242(1991)中报告的EU索引。

[0214] 在一些实施方案中,所提供的含有展现出降低的效应子功能的Fc区的多特异性多肽构建体对于其中需要受限的CD3结合但某些效应子功能(如CDC和ADCC)是不必要或有害的应用而言可能是理想候选物。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性的降低/耗尽。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保所述多特异性多肽构建体和/或其切割组分缺乏Fc γ R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。介导ADCC的原代细胞NK细胞仅表达Fc γ R111,而单核细胞表达Fc γ R1、Fc γ R2和Fc γ R3。用于评估目的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性例子描述于美国专利号5,500,362(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);美国专利号5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))中。可替代地,可以采用非放射性测定方法(参见例如,用于流式细胞术的ACT1™非放射性细胞毒性测定(CellTechnology,Inc.,加利福尼亚州山景城);和CytoTox 96™非放射性细胞毒性测定(Promega,威斯康辛州麦迪逊))。用于此类测定的有效效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外地,可以在体内(例如在动物模型中,如Clynes等人Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中公开的动物模型中)评估目的分子的ADCC活性。还可以进行C1q结合测定以证实所述多特异性多肽构建体或其切割组分不能结合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。为了评估补体激活,可以进行CDC测定(参见例如,Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood 101:1045-1052(2003);和Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。还可以使用本领域已知的方法进行FcRn结合和体内清除/半衰期测定(参见例如,Petkova,S.B.等人,Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0215] 在一些实施方案中,所述免疫球蛋白Fc区或其免疫活性片段是IgG同型。例如,所述融合蛋白的免疫球蛋白Fc区是人IgG1同种型的,具有氨基酸序列:

```

PAPE[LL]GPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
DGVEVHNAKT KPREEQY[NS]T YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
EALHNYHTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)

```

[0216] 在一些实施方案中,所述免疫球蛋白Fc区或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人IgG1多肽序列。

[0217] 在一些实施方案中,可以将IgG1 Fc多肽或其变体(如下文所述的任一种)制备为G1 m1或G1 m3同种异型。在一些实施方案中,所述Fc区可以含有人G1 m1同种异型的氨基

酸,如在位置356和358处含有Asp(D)和Leu(L)的残基,例如如SEQ ID NO:1所示。在一些情况下,Fc多肽可以含有氨基酸取代E356D和M358L以重构同种异型G1 m1的残基。在其他实施方案中,所述Fc区可以含有人G1 m3同种异型的氨基酸,如根据EU编号在位置356和358处的残基Glu(E)和Met(M),例如如SEQ ID NO:194和195所示。在一些情况下,Fc多肽可以含有氨基酸取代D356E和L358M以重构同种异型G1 m3的残基。

[0218] 在一些实施方案中,所述人IgG1 Fc区被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中所述的; Kaneko和Niwa,2011Biodrugs,25(1):1-11中综述的氨基酸修饰,将其各自的内容通过引用以其整体特此并入。

[0219] 在一些实施方案中,所述Fc区(如人IgG1 Fc区)被修饰以增强ADCC活性或CDC活性。增强ADCC的突变的例子包括在Ser239和Ile332处的修饰,例如Ser239Asp和Ile332Glu(S239D、I332E)。增强CDC的突变的例子包括在Lys326和Glu333处的修饰。在一些实施方案中,在使用Kabat编号系统的这些位置中的一个或两个处修饰所述Fc区,例如Lys326Ala和/或Glu333Ala(K326A和E333A)。

[0220] 在一些实施方案中,所述Fc区被改变以提供降低的Fc介导的效应子功能,如经由降低的Fc受体结合,例如与Fc γ R结合,但是总体上没有FcRn结合。在一些实施方案中,本公开文本的人IgG1 Fc区融合蛋白缺乏或具有减少的在N297处附接至N连接的聚糖链的岩藻糖。存在多种方式来防止岩藻糖基化,包括但不限于在FUT8缺陷型细胞系中产生;向哺乳动物细胞培养基中添加抑制剂,例如栗精胺(Castanospermine);以及对生产细胞系进行代谢工程。在一些实施方案中,人IgG1 Fc区在氨基酸Asn297(加框,Kabat编号)处被修饰以防止所述融合蛋白的糖基化,例如Asn297Ala(N297A)或Asn297Asp(N297D)。

[0221] 在一些实施方案中,在以下位置中的一个或多个处改变所述融合蛋白的Fc区以降低Fc受体结合:Leu 234(L234)、Leu235(L235)、Asp265(D265)、Asp270(D270)、Ser298(S298)、Asn297(N297)、Asn325(N325)或Ala327(A327)。例如,Leu 234Ala(L234A)、Leu235Ala(L235A)、Asp265Asn(D265N)、Asp270Asn(D270N)、Ser298Asn(S298N)、Asn297Ala(N297A)、Asn325Glu(N325E)或Ala327Ser(A327S)。在一些实施方案中,所述融合蛋白的Fc区在氨基酸Leu235(在上文SEQ ID NO:1中加框,Kabat编号)处被修饰以改变Fc受体相互作用,例如Leu235Glu(L235E)或Leu235Ala(L235A)。在一些实施方案中,所述融合蛋白的Fc区在氨基酸Leu234(在上文SEQ ID NO:1中加框,Kabat编号)处被修饰以改变Fc受体相互作用,例如Leu234Ala(L234A)。在一些实施方案中,所述融合蛋白的Fc区在氨基酸234和235两者处被改变,例如Leu234Ala和Leu235Ala(L234A/L235A)或Leu234Val和Leu235Ala(L234V/L235A)。在优选的实施方案中,所述Fc区内的修饰降低了与Fc受体- γ 受体的结合,同时对与新生儿Fc受体(FcRn)的结合具有最小影响。

[0222] 在一些实施方案中,人IgG Fc区被修饰以增强FcRn结合。增强与FcRn的结合的Fc突变的例子是Met252Tyr、Ser254Thr、Thr256Glu(分别为M252Y、S254T、T256E)(Kabat编号,

Dall'Acqua等人2006, *J. Biol. Chem.*第281卷(33) 23514-23524), Met428Leu和Asn434Ser (M428L、N434S) (Zalevsky等人2010 *Nature Biotech.*, 第28卷(2) 157-159) (Kabat等人1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*的EU索引)。在一些实施方案中,经突变或经修饰的Fc多肽包含以下突变:使用Kabat编号系统, Met252Tyr和Met428Leu或Met252Tyr和Met428Val (M252Y、M428L或M252Y、M428V)。

[0223] 在一些实施方案中,所述融合蛋白的Fc区在以下位置中的一个或多个处缺乏氨基酸以降低Fc受体结合:Glu233 (E233)、Leu234 (L234) 或Leu235 (L235)。在这些实施方案中,这三个氨基酸的Fc缺失降低了补体蛋白C1q结合。

[0224] PAPGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO:2)

[0225] 在一些实施方案中,所述Fc区在以下位置中的一个或多个中被突变以降低Fc受体结合:Glu233 (E233)、Leu234 (L234) 或Leu235 (L235)。所述一个或多个突变可以包括E233P、L234V和/或L235A。

[0226] 在一些实施方案中,所述融合蛋白的Fc区在Gly236(在上文SEQ ID NO:1中加框)处被改变以降低Fc受体结合。例如,其中从所述融合蛋白中缺失Gly236。在一些实施方案中,人IgG1 Fc区在氨基酸Gly236处被修饰以增强与CD32A的相互作用,例如Gly236Ala (G236A)。

[0227] 在特定实施方案中,用于降低Fc效应子功能(例如经由降低Fc受体与Fc γ R的结合)的Fc区的突变包括来自以下中的任一种的突变:G236R/L328R、E233P/L234V/L235A/G236del/S239K、E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G、E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G或E233P/L234V/L235A/G236del。

[0228] 在一些实施方案中,人IgG1 Fc区缺乏Lys447 (Kabat等人1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*的EU索引)。

[0229] 在一些实施方案中,所述融合物或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人IgG2多肽序列。

[0230] 在一些实施方案中,所述融合蛋白的免疫球蛋白Fc区或免疫活性片段是人IgG2同种型的,具有氨基酸序列:

PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA
PIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE
WESNGQPENNYKTTTPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEAL
ALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO:3)

[0231] 在一些实施方案中,所述融合物或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人IgG2多肽序列。

[0232] 在一些实施方案中,人IgG2 Fc区在氨基酸Asn297(加框)处被修饰以防止所述抗体的糖基化,例如Asn297Ala(N297A)或Asn297Asp(N297D)。在一些实施方案中,人IgG2 Fc区缺乏Lys447(Kabat等人1991Sequences of Proteins of Immunological Interest的EU索引)。

[0233] 在一些实施方案中,所述融合蛋白的免疫球蛋白Fc区或免疫活性片段是人IgG3同种型的,具有氨基酸序列:

PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFKWYV
 DGVEVHNAKT KPREEQY \square NST FRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
 EWESSGQPEN NYNTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNIFSCSVMH
 EALHN \square RFTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 4)

[0234] 在一些实施方案中,所述抗体或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人IgG3多肽序列。

[0235] 在一些实施方案中,人IgG3 Fc区在氨基酸Asn297(加框,Kabat编号)处被修饰以防止所述抗体的糖基化,例如Asn297Ala(N297A)或Asn297Asp(N297D)。在一些实施方案中,人IgG3 Fc区在氨基酸435处被修饰以延长半衰期,例如Arg435His(R435H)。在一些实施方案中,人IgG3 Fc区缺乏Lys447(Kabat等人1991Sequences of Proteins of Immunological Interest的EU索引)。

[0236] 在一些实施方案中,所述融合蛋白的免疫球蛋白Fc区或免疫活性片段是人IgG4同种型的,具有氨基酸序列:

PAPE \square FLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV
 DGVEVHNAKT KPREEQF \square NST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP
 SSIIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
 EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH
 EALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID NO: 5)

[0237] 在一些实施方案中,所述抗体或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人IgG4多肽序列。

[0238] 在一些实施方案中,所述融合蛋白的免疫球蛋白Fc区或免疫活性片段是人IgG4同种型的,具有氨基酸序列:

PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV
 DGVEVHNAKT KPREEQF \square NST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP
 SSIIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
 EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH
 EALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID NO: 6)

[0239] 在一些实施方案中,所述抗体或其免疫活性片段包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序

列至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的人IgG4多肽序列。

[0240] 在其他实施方案中,人IgG4 Fc区在氨基酸235处被修饰以改变Fc受体相互作用,例如Leu235Glu(L235E)。在一些实施方案中,人IgG4 Fc区在氨基酸Asn297(加框,Kabat编号)处被修饰以防止所述抗体的糖基化,例如Asn297Ala(N297A)或Asn297Asp(N297D)。在一些实施方案中,人IgG4 Fc区缺乏Lys447(Kabat等人1991Sequences of Proteins of Immunological Interest的EU索引)。

[0241] 在一些实施方案中,在CH3:CH3界面处通过将Ser354变为Cys(S354C)并将Tyr349变为Cys(Y349C)(S354C/Y349C)引入两个二硫键来修饰人IgG Fc区以稳定同二聚化。

[0242] 在本文提供的多特异性多肽构建体的特定实施方案中,人IgG Fc区被修饰以诱导异二聚化。已知各种用于促进互补Fc多肽的异二聚化的方法,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申请号W0 1998/050431、W0 2009/089004、W0 2011143545 W0 2014/067011、W0 2012/058768、W0 2018027025;公开的美国专利申请号US 20140363426、US 20150307628、US 20180016354、US 20150239991;以及美国专利号US5731168、US 7183076、US 9701759、US 9605084和US 9650446。促进Fc链异二聚化的方法包括诱变Fc区,如通过包含一组“杵臼结构”突变或包含突变以实现Fc的静电操纵以有利于不同多肽链之间的吸引相互作用。例如,在一些实施方案中,异二聚体的Fc多肽包含突变以改变跨Fc二聚体界面的电荷极性,使得静电匹配的Fc链的共表达支持有利的吸引相互作用,从而促进所需的Fc异二聚体形成,而不利的排斥电荷相互作用阻遏不需要的Fc同二聚体形成(Guneskaran等人(2010)JBC,285:19637-19646)。当在细胞中共表达时,链之间的缔合是可能的,但是由于电荷排斥,链基本上不自缔合。用于产生异二聚体Fc的其他策略包括混合人IgG和IgA CH3结构域区段以产生互补CH3异二聚体,其称为SEED Fc。

[0243] 异二聚化的方法和变体还包括公开的国际PCT申请W0 2014/145806中所述的那些,包括“杵臼”突变(也称为“偏斜(skew)”变体)、与“静电操纵”或“电荷对”有关的突变以及pI变体。异二聚体变体还包括美国公开的申请号US 2012/0149876或US 2018/011883中所述的任一种。

[0244] 在一些实施方案中,为了促进异二聚化,所述Fc异二聚体的两条多肽均含有成对的或互补的氨基酸修饰。Fc融合物的多肽的示例性的成对氨基酸修饰示出于表1中。

表1: 异二聚体Fc的成对氨基酸	
第一Fc多肽	第二Fc多肽

T366W	T366S/L368W/Y407V
T366W/S354C	T366S/L368A/Y407V/Y349C
S364H/F405A	Y349T/Y349F
T350V/L351Y/F405A/Y407V	T350V/T366L/K392L/T394W
K360D/D399M/Y407A	E345R/Q347R/T366V/K409V
K409D/K392D	D399K/E356K
K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
L360E/K409W/Y349C	Q347R/399V/F405T/S354C
K370E/K409W	E357N/D399V/F405T

[0245] 在一些实施方案中,修饰包括将突起(杆)引入第一Fc多肽中并将腔(臼)引入第二Fc多肽中,使得突起可位于腔中以促进第一含Fc的多肽和第二含Fc的多肽的复合。被靶向用于替代和/或修饰以在多肽中产生突起或腔的氨基酸通常是与第二多肽的界面中的一个或多个氨基酸相互作用或接触的界面氨基酸。

[0246] 在一些实施方案中,被修饰以含有突起(杆)氨基酸的第一Fc多肽包含用具有至少一个侧链的氨基酸替代天然或原始氨基酸,所述至少一个侧链从第一Fc多肽的界面突出,因此可位于第二多肽的相邻界面中的补偿腔(臼)中。最常见的是,替代氨基酸是具有比原始氨基酸残基更大的侧链体积的氨基酸。本领域技术人员了解如何确定和/或评估氨基酸残基的特性以鉴定产生突起的理想替代氨基酸。在一些实施方案中,用于形成突起的替代残基是天然存在的氨基酸残基,并且包括例如精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)。在一些例子中,经鉴定用于替代的原始残基是具有小侧链的氨基酸残基,例如像丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或缬氨酸。

[0247] 在一些实施方案中,被修饰以含有腔(臼)的第二Fc多肽是包含用具有至少一个侧链的氨基酸替代天然或原始氨基酸的多肽,所述至少一个侧链从第二多肽的界面凹进,因此能够从第一多肽的界面容纳相应的突起。最常见的是,替代氨基酸是具有比原始氨基酸残基更小的侧链体积的氨基酸。本领域技术人员了解如何确定和/或评估氨基酸残基的特性以鉴定对于形成腔而言理想的替代残基。通常,用于形成腔的替代残基是天然存在的氨基酸,并且包括例如丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)。在一些例子中,经鉴定用于替代的原始氨基酸是具有大侧链的氨基酸,例如像酪氨酸、精氨酸、苯丙氨酸或色氨酸。

[0248] 例如,人IgG1的CH3界面在每个结构域上包含十六个残基,所述结构域位于四条反平行的β链上且距每个表面包埋1090²(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;美国专利号5,731,168)。用于产生突起或腔的CH3结构域修饰描述于例如美国专利号5,731,168;国际专利申请W0 98/50431和W0 2005/063816;以及Ridgway等人,(1996) *Prot. Engin.*, 9:617-621中。在一些例子中,用于产生突起或腔的CH3结构域修饰通常针对位于两条中心反平行β链上的残基。目的是最小化以下风险,即产生的

突起可以通过突出到周围溶剂中而被容纳而不是由配偶体CH3结构域中的补偿腔容纳。

[0249] 例如,在一些实施方案中,所述异二聚体Fc包含CH3结构域内在Thr366处具有氨基酸修饰的多肽,当用较大体积氨基酸(例如,Try (T366W))替代时,所述多肽能够优先与在位置Thr366、Leu368和Tyr407处具有较小体积氨基酸的氨基酸修饰(例如,分别为Ser、Ala和Val (T366S/L368A/Y407V))的第二CH3结构域配对。可以通过引入二硫键,例如通过在相对的CH3结构域上将Ser354变为Cys (S354C)并将Tyr349变为Cys (Y349C)进一步稳定经由CH3修饰进行的异二聚化(综述于Carter,2001Journal of Immunological Methods,248:7-15中)。

[0250] 在特定实施方案中,多特异性多肽构建体含有能够介导Fc异二聚化的第一Fc和第二Fc,所述第一Fc和所述第二Fc包含含有突变T366W和S354C的第一Fc多肽和含有突变T366S、L368A、Y407V和Y349C的第二Fc多肽。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽选自包含SEQ ID NO:291或297所示的序列的Fc多肽,并且所述第二Fc多肽选自包含SEQ ID NO:292、295或299所示的序列的Fc多肽。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽是或包含SEQ ID NO:82、86、94或96中任一个所示的氨基酸序列,并且所述第二Fc多肽是或包含SEQ ID NO:83、87、90、92、98或100中任一个所示的氨基酸序列。

[0251] 在一些实施方案中,所述Fc多肽展现出提供Fc介导的效应子功能的特征。在特定例子中,所述第一Fc多肽是或包含SEQ ID NO:291所示的序列,并且所述第二Fc多肽是或包含SEQ ID NO:292或295。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽是或包含SEQ ID NO:82所示的序列,并且所述第二Fc多肽是或包含SEQ ID NO:83或90所示的序列。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽是或包含SEQ ID NO:86所示的序列,并且所述第二Fc多肽是或包含SEQ ID NO:87或92所示的序列。所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽可以格式化在所述构建体的任一多肽链上。

[0252] 在一些实施方案中,所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的一种或两种还可以包含一个或多个氨基酸突变,以进一步降低一种或多种Fc效应子功能,如降低的Fc受体结合。降低Fc效应子功能的示例性突变包括所述的任一种。在一些实施方案中,修饰可以是一个或多个位置Glu233 (E233)、Leu234 (L234)或Leu235 (L235)的缺失,如氨基酸Glu233 (E233)、Leu234 (L234)和Leu235 (L235)的缺失。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽选自包含SEQ ID NO:293或298所示的序列的Fc多肽,并且所述第二Fc多肽选自包含SEQ ID NO:294、296或300所示的序列的Fc多肽。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽是或包含SEQ ID NO:84、88、95或97中任一个所示的氨基酸序列,并且所述第二Fc多肽是或包含SEQ ID NO:85、89、91、93、99或101中任一个所示的氨基酸序列。

[0253] 在特定例子中,所述第一Fc多肽是或包含SEQ ID NO:293所示的序列,并且所述第二Fc多肽是或包含SEQ ID NO:294或296。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽是或包含SEQ ID NO:84所示的序列,并且所述第二Fc多肽是或包含SEQ ID NO:85或91所示的序列。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽是或包含SEQ ID NO:88所示的序列,并且所述第二Fc多肽是或包含SEQ ID NO:89或93所示的序列。所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽可以格式化在所述构建体的任一多肽链上。

[0254] 在一些实施方案中,所述第一Fc多肽或所述第二Fc多肽还包含突变M252Y和/或M428V。在特定例子中,所述第一Fc多肽是或包含SEQ ID NO:297所示的序列,并且所述第二

Fc多肽是或包含SEQ ID NO:299所示的序列。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽是或包含SEQ ID NO:94所示的序列,并且所述第二Fc多肽是或包含SEQ ID NO:98所示的序列。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽是或包含SEQ ID NO:96所示的序列,并且所述第二Fc多肽是或包含SEQ ID NO:100所示的序列。在其他例子中,所述第一Fc多肽是或包含SEQ ID NO:298所示的序列,并且所述第二Fc多肽是或包含SEQ ID NO:300所示的序列。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽是或包含SEQ ID NO:95所示的序列,并且所述第二Fc多肽是或包含SEQ ID NO:99所示的序列。在一些实施方案中,所述第一Fc多肽是或包含SEQ ID NO:97所示的序列,并且所述第二Fc多肽是或包含SEQ ID NO:101所示的序列。所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽可以格式化在所述构建体的任一多肽链上。

[0255] 可以有利于促成异二聚体的变体的另外的例子是来自以下中的第一Fc多肽和第二Fc多肽的任何组合或任何对的空间变体(例如偏斜变体):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;以及T366S/L368A/Y407V和T366W或366S/L368A/Y407V/Y349C和T366W/S354C),其中每对代表第一Fc多肽和第二Fc多肽中的突变。在特定实施方案中,所提供的构建体包含含有突变对L368D/K370S以及S364K和E357Q的第一Fc多肽以及第二Fc多肽。

[0256] 可以用于产生异二聚体的另外的机制有时称为“静电操纵”,如Gunasekaran等人,J.Biol.Chem.285(25):19637(2010)中所述。这在本文中有时称为“电荷对”。在此实施方案中,使用静电使形成偏斜向异二聚化。如本领域技术人员将了解的,这些也可能对pI具有影响,因此对纯化具有影响,因此在一些情况下也可以认为是pI变体。然而,由于这些被产生用以迫使异二聚化并且不用作纯化工具,因此将它们归类为“空间变体”。在一个实施方案中,第一Fc多肽可以含有突变D221E/P228E/L368E,并且第二Fc多肽可以含有突变D221R/P228R/K409R。在另一个实施方案中,第一Fc多肽可以含有突变C220E/P228E/368E,并且第二Fc多肽可以含有突变C220R/E224R/P228R/K409R。

[0257] 在一些实施方案中,异二聚化可以通过pI变体促进。在一些方面,pI变体可以包括增加蛋白质的pI(碱性变化)的那些。在其他方面,pI变体可以包括降低蛋白质的pI(酸性变化)的那些。在一些情况下,可以进行这些变体的所有组合,包括这样的组合,其中一种Fc多肽可以是野生型或者不显示出与野生型显著不同的pI的变体,而另一种Fc多肽可以是更具碱性或更具酸性的。可替代地,可以改变每种Fc多肽,一种改变为更具碱性的并且一种改变为更具酸性的。在一些实施方案中,至少一种Fc多肽是含有突变Q295E/N384D/Q418E/N421D的负pI变体Fc。

[0258] 在一些实施方案中,可以使用空间异二聚化变体(例如杵和白)和pI或电荷对变体的组合。

[0259] 在特定实施方案中,所提供的构建体含有(a)包含偏斜变体S364K/E357Q的第一Fc多肽;以及b)包含偏斜变体L368D/K370S和pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D的第二Fc多肽。在一些实施方案中,所述第一多肽和所述第二多肽中的一种或两种可以含有进一步的突变以降低Fc效应子活性,如示例性突变E233P/L234V/L235A/G236del/S267K。能够介导Fc异二聚化的这种第一Fc多肽和第二Fc多肽的例子包含SEQ ID NO:285和286所示的序列。所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽可以格式化在所述构建体的任一多肽链上。

[0260] 所得的多特异性多肽构建体可以通过任何合适的方法(例如像通过蛋白A或蛋白G柱上的亲和色谱)纯化。在将编码不同多肽的两种核酸分子转化到细胞中的情况下,将形成同二聚体和异二聚体。可以调节表达条件,使得异二聚体形成比同二聚体形成更有利。

[0261] 基于异二聚体对亲和试剂的不同亲和力从同二聚体中回收异二聚体的技术是已知的。在一些方面,此类技术包括设计异二聚体为使得Fc多肽链中的一条不与亲和试剂蛋白A结合。在一些情况下,多肽链中的一条可以含有一个或多个氨基酸取代以消除或降低Fc异二聚体的多肽中的一种对蛋白A试剂的亲和力,参见例如W0 2017134440、W0 2010151792、Jendeber等人(Jendeberg等人,(1997) J. Immunol. Methods, 201 (1) :25-34)。在这些实施方案中的一些中,所述Fc区可以在异二聚体的一个成员上的蛋白A结合位点处被修饰,以防止蛋白A结合,从而能够更有效地纯化异二聚体融合蛋白。在此结合位点内的示例性修饰是I1e253,例如I1e253Arg (I253R)。在一些实施方案中,修饰可以是H435R或H435R/Y436F。在一些实施方案中,Fc异二聚体的Fc多肽可以含有修饰,使得其能够结合蛋白A但是不结合蛋白G (pA+/pG-)。示例性的pA+/pG-氨基酸修饰包括在位置428处含有丝氨酸、在位置434处含有丝氨酸和任选地在位置436处含有组氨酸的Fc,参照人IgG1或在人IgG 2、3或4的相应位置处包含这些残基。在一些方面,一种IgG Fc多肽中在位置428、434和任选的436处的此类氨基酸修饰降低或防止蛋白G的结合,从而增强蛋白质的纯化。

[0262] 在一些实施方案中,赋予对亲和试剂的差异亲和力的任何此类修饰可以与上文所述的任何一个或多个其他氨基酸修饰组合。例如,I253R修饰可以与T366S/L368A/Y407V修饰或与T366W修饰组合。T366S/L368A/Y407V修饰的Fc能够形成同二聚体,因为不存在如同在T336W修饰的Fc的情况下二聚化界面的空间闭塞。因此,在一些实施方案中,将I253R修饰与T366S/L368A/Y407V修饰的Fc组合,从而不允许纯化可能已经形成的任何同二聚体Fc。可以通过组合T366S/L368A/Y407V和H453R来采用类似的修饰。

[0263] 在一些实施方案中,所述异二聚体分子的Fc区另外可以含有一个或多个其他Fc突变,如上文所述的任一种。在一些实施方案中,所述异二聚体分子含有具有降低效应子功能的突变的Fc区。

[0264] 在一些实施方案中,异二聚体Fc的一种Fc多肽包含SEQ ID NO:291(例如SEQ ID NO:82或86)或297(例如SEQ ID NO:94或96)中任一个所示的氨基酸序列,并且所述异二聚体Fc的另一种Fc多肽含有SEQ ID NO:201(例如SEQ ID NO:83或87)、295(例如SEQ ID NO:90或92)或299(例如SEQ ID NO:98或100)中任一个所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,异二聚体Fc的一种Fc多肽包含SEQ ID NO:293(例如SEQ ID NO:84或88)或298(例如SEQ ID NO:95或97)中任一个所示的氨基酸序列,并且所述异二聚体Fc的另一种Fc多肽包含SEQ ID NO:294(例如SEQ ID NO:85或89)、296(例如SEQ ID NO:91或93)或300(例如SEQ ID NO:99或101)中任一个所示的氨基酸序列。

[0265] 在一些实施方案中,人IgG Fc区被修饰以防止二聚化。在这些实施方案中,本公开文本的融合蛋白是单体的。例如,在残基Thr366处修饰为带电荷残基,例如Thr366Lys、Thr366Arg、Thr366Asp或Thr366Glu(分别为T366K、T366R、T366D或T366E)会防止CH3-CH3二聚化。

[0266] 在一些实施方案中,在以下位置中的一个或多个处改变所述融合蛋白的Fc区以降低Fc受体结合:Leu 234 (L234)、Leu235 (L235)、Asp265 (D265)、Asp270 (D270)、Ser298

(S298)、Asn297 (N297)、Asn325 (N325) 或Ala327 (A327)。例如,Leu 234Ala (L234A)、Leu235Ala (L235A)、Asp265Asn (D265N)、Asp270Asn (D270N)、Ser298Asn (S298N)、Asn297Ala (N297A)、Asn325Glu (N325E) 或Ala327Ser (A327S)。在优选的实施方案中,所述Fc区内的修饰降低了与Fc受体- γ 受体的结合,同时对与新生儿Fc受体 (FcRn) 的结合具有最小影响。

[0267] 在一些实施方案中,所述融合蛋白含有源自免疫球蛋白铰链区的多肽。铰链区可以选自人IgG亚类中的任一种。例如,所述融合蛋白可以含有具有EPKSSDKTHTCPPC (SEQ ID NO:7) 的序列的经修饰的IgG1铰链,其中与轻链的C末端半胱氨酸形成二硫化物的Cys220被突变为丝氨酸,例如Cys220Ser (C220S)。在其他实施方案中,所述融合蛋白含有具有序列DKTHTCPPC (SEQ ID NO:8) 的截短铰链。

[0268] 在一些实施方案中,所述融合蛋白具有来自IgG4的具有序列ESKYGPPCPPC (SEQ ID NO:9) 的经修饰的铰链,其被修饰以防止或减少链交换,例如Ser228Pro (S228P)。在一些实施方案中,所述融合蛋白含有接头多肽。在其他实施方案中,所述融合蛋白含有接头和铰链多肽。

3. 接头

[0269] 所提供的多特异性多肽构建体含有接头,所述接头连接或偶联含有所述免疫球蛋白Fc区的第一组分和含有所述CD3结合区的第二组分。在一些实施方案中,所述接头位于所述Fc区的C末端区的末端,使得所述Fc区在所述CD3结合区的N末端。因为所提供的多特异性多肽构建体是多聚体,如含有共同形成所述第一组分和所述第二组分的第一多肽和第二多肽的二聚体,所提供的构建体包含连接所述第一多肽的Fc部分和CD3结合区的接头和连接所述第二多肽的Fc部分和CD3结合区的接头。在一些实施方案中,所述第一多肽包含异二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头和CD3结合区的第一结构域(例如VH),并且所述第二多肽包含所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、接头和所述CD3结合区的第二结构域(例如VL)。通常,存在于所述多特异性多肽构建体的第一多肽和第二多肽中的接头是相同的。因此,在一些实施方案中,所述CD3结合结构域的每个结构域经由接头(如相同接头)连接至所述Fc(如异二聚体Fc)的相对多肽。

[0270] 用于融合蛋白的各种多肽接头是已知的(参见例如Chen等人(2013) Adv. Drug. Deliv. 65:1357-1369;以及国际PCT公开号WO 2014/099 997、WO 2000/24884;美国专利号5,258,498;美国专利号5,525,491;美国专利号5,525,491;美国专利号6,132,992)。

[0271] 在一些实施方案中,选择所述接头以使得当所述CD3结合区与所述多特异性多肽缀合物的Fc区连接时,所述CD3结合区受限,并且在所述多特异性多肽构建体与细胞接触时,不能或基本上不能结合或接合所述细胞(例如T细胞)表面上的CD3。可以采用各种测定来评估所述多特异性多肽构建体对CD3的结合或接合,所述各种测定包括用于评估T细胞结合、使用报告物系统的NFAT激活、细胞溶解性T细胞活性、细胞因子产生和/或T细胞激活标记物的表达的测定。在所提供的实施例中示出了示例性测定。通常,所述接头也是确保所述多肽构建体正确折叠的接头,不展现出与所连接多肽的活性或功能不一致的电荷,或不与一个或多个结构域中的氨基酸残基形成将阻碍或改变所连接多肽的活性的键或其他相互作用。在一些实施方案中,所述接头是多肽接头。所述多肽接头可以是柔性接头或刚性接头或两者的组合。

[0272] 在一些方面,所述接头是短的、中等或长的接头。在一些实施方案中,所述接头的长度为至多40个氨基酸。在一些实施方案中,所述接头的长度为至多25个氨基酸。在一些实施方案中,所述接头的长度为至少或至少约2个氨基酸。在一些方面,合适的长度是例如至少一个且通常少于约40个氨基酸残基的长度,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。在一些实施方案中,所述接头是从或从约2至24个氨基酸、2至20个氨基酸、2至18个氨基酸、2至14个氨基酸、2至12个氨基酸、2至10个氨基酸、2至8个氨基酸、2至6个氨基酸、6至24个氨基酸、6至20个氨基酸、6至18个氨基酸、6至14个氨基酸、6至12个氨基酸、6至10个氨基酸、6至8个氨基酸、8至24个氨基酸、8至20个氨基酸、8至18个氨基酸、8至14个氨基酸、8至12个氨基酸、8至10个氨基酸、10至24个氨基酸、10至20个氨基酸、10至18个氨基酸、10至14个氨基酸、10至12个氨基酸、12至24个氨基酸、12至20个氨基酸、12至18个氨基酸、12至14个氨基酸、14至24个氨基酸、14至20个氨基酸、14至18个氨基酸、18至24个氨基酸、18至20个氨基酸或20至24个氨基酸。在一些实施方案中,所述接头的长度为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸。

[0273] 在某些方面,所述接头长度越长,则当所述多特异性多肽缀合物与其抗原(例如TAA)结合时的CD3结合越强。因此,在一些方面,所述接头的长度大于12个氨基酸,如长度大于13、14、15、16、17或18个氨基酸。在一些实施方案中,所述接头的长度为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。

[0274] 所述接头可以是天然存在的、合成的或两者的组合。特别合适的接头多肽主要包含选自甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)、丙氨酸(Ala)和苏氨酸(Thr)的氨基酸残基。例如,所述接头可以含有至少75%(基于肽接头中存在的残基的总数计算),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。所述接头也可以仅由Gly、Ser、Ala和/或Thr残基组成。在一些实施方案中,所述接头含有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,合适的肽接头通常含有至少50%甘氨酸残基,如至少75%甘氨酸残基。在一些实施方案中,肽接头仅包含甘氨酸残基。在一些实施方案中,肽接头仅包含甘氨酸和丝氨酸残基。

[0275] 在一些实施方案中,这些接头主要由氨基酸甘氨酸和丝氨酸构成,在本文中表现为GS接头。在一些实施方案中,所述接头含有(GGS)_n,其中n是1至10,如1至5,例如1至3,如GGS(GGS)_n(SEQ ID NO:171),其中n是0至10。在特定实施方案中,所述接头含有序列(GGGGS)_n(SEQ ID NO:173),其中n是1至10或n是1至5,如1至3。在另外的实施方案中,所述接头含有(GGGGS)_n(SEQ ID NO:172),其中n是1至4,如1至3。所述接头可以包含上述中任一种的组合,如可以组合2、3、4或5个GS、GGS、GGGS和/或GGGS接头的重复。在一些实施方案中,这种接头的长度为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个氨基酸。

[0276] 在一些实施方案中,所述接头是(以单字母的氨基酸代码表示):GGS、GGGS(SEQ ID NO:149)或GGGS(SEQ ID NO:135)。在一些实施方案中,所述GS接头包含以下的氨基酸序列:GGSGGS,即(GGS)₂(SEQ ID NO:10);GGSGSGGS,即(GGS)₃(SEQ ID NO:11);GGSGSGSGGS,即(GGS)₄(SEQ ID NO:12);GGSGSGSGSGGS,即(GGS)₅(SEQ ID NO:13);GGSGSGSGSGSGGS,即(G5S)₃(SEQ ID NO:119);GGSGSGSGSGSGSGGS(SEQ ID NO:147)

和GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:170)。在一些实施方案中,所述接头是GGGG (SEQ ID NO:103)。在一些实施方案中,所述接头是GGGGG (SEQ ID NO:250)。在任何以上例子中的一些中,丝氨酸可以被丙氨酸替代(例如,(Gly4Ala)或(Gly3Ala))。

[0277] 在一些实施方案中,所述接头包括具有氨基酸序列 $\text{Gly}_x\text{-Xaa-Gly}_y\text{-Xaa-Gly}_z$ (SEQ ID NO:174)的肽接头,其中每个Xaa独立地选自丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、甲硫氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、色氨酸(Trp)、脯氨酸(Pro)、甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、半胱氨酸(Cys)、酪氨酸(Tyr)、天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、组氨酸(His)、天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu),并且其中x、y和z各自为范围从1-5的整数。在一些实施方案中,每个Xaa独立地选自Ser、Ala和Thr。在具体的变型中,x、y和z中的每一个等于3(从而产生具有氨基酸序列Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:175)的肽接头,其中每个Xaa如上所述选择。

[0278] 在一些实施方案中,所述接头是基于(SSSSG) $_n$ (SEQ ID NO:185)基序的重复的富含丝氨酸的接头,其中n是至少1,但是n可以是2、3、4、5、6、7、8和9。

[0279] 在一些情况下,可能希望向所述肽接头中提供一些刚性。这可以通过在所述肽接头的氨基酸序列中包含脯氨酸残基来完成。因此,在一些实施方案中,接头在所述肽接头的氨基酸序列中包含至少一个脯氨酸残基。例如,肽接头可以具有这样的氨基酸序列,其中至少25%(例如,至少50%或至少75%)的氨基酸残基是脯氨酸残基。在一个特定实施方案中,所述肽接头仅包含脯氨酸残基。

[0280] 在一些方面,肽接头包含至少一个半胱氨酸残基,如一个半胱氨酸残基。例如,在一些实施方案中,接头包含至少一个半胱氨酸残基和选自Gly、Ser、Ala和Thr的氨基酸残基。在一些此类实施方案中,接头包含甘氨酸残基和半胱氨酸残基,如仅甘氨酸残基和半胱氨酸残基。通常,每个肽接头将仅包含一个半胱氨酸残基。包含半胱氨酸残基的具体接头的例子包括具有氨基酸序列 $\text{Gly}_m\text{-Cys-Gly}_n$ 的肽接头,其中n和m各自是1-12,例如3-9、4-8或4-7的整数。在具体的变型中,这种肽接头具有氨基酸序列GGGGG-C-GGGGG (SEQ ID NO:177)。

[0281] 在一些实施方案中,所述融合蛋白的接头是结构化或受限接头。在特定实施方案中,所述结构化接头含有序列(AP) $_n$ 或(EAAAK) $_n$ (SEQ ID NO:178),其中n是2至20,优选4至10,包括但不限于AS-(AP) $_n$ -GT (SEQ ID NO:179)或AS-(EAAAK) $_n$ -GT (SEQ ID NO:180),其中n是2至20,如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15。在其他实施方案中,所述接头包含序列(GGGGA) $_n$ (SEQ ID NO:181)、(PGGGG) $_n$ (SEQ ID NO:182)、(AGGGG) $_n$ (SEQ ID NO:183)或GGG-(EGKSSGSGSESKST) $_n$ -GGG (SEQ ID NO:184),其中n是2至20。在一些实施方案中,所述接头是SSSASASSA (SEQ ID NO:186)、GSPGSPG (SEQ ID NO:187)或ATTTGSSPGPT (SEQ ID NO:176)。在一些实施方案中,此类接头由于其结构可以对蛋白水解降解更具抗性,从而在体内注射时具有优点。

[0282] 在一些实施方案中,所述接头不是可切割接头,也称为不可切割接头。在一些实施方案中,所述接头是不可被蛋白酶切割的。在一些实施方案中,并非可切割接头或不可被蛋白酶切割的接头是通常对于体内递送或重组生产稳定的接头。在一些方面,不可被蛋白酶切割的接头包括不含有优选位于蛋白酶的可切割肽序列或识别位点内的至少一个肽键的那些。在特定实施方案中,不可切割接头不是蛋白酶的靶底物,使得与含有相同蛋白酶的底

物识别位点的接头相比,其并不被蛋白酶优先或特异性切割。

[0283] 在一些实施方案中,所述接头不含有特定蛋白酶的底物识别位点或切割位点,所述底物识别位点或切割位点是被蛋白酶切割、由蛋白酶的活性位点识别的序列。通常,例如,对于丝氨酸蛋白酶,切割序列由底物中的P1-P4和P1'-P4'氨基酸组成,其中切割发生在P1位置之后。通常,丝氨酸蛋白酶的切割序列的长度为六个残基,以匹配许多蛋白酶的扩大的底物特异性,但是根据蛋白酶而定可以更长或更短。通常,所述接头不包含由蛋白酶识别的P1-P1'易裂键序列。在一些方面,不可切割接头或不含有由蛋白酶特异性识别以切割的底物识别位点的接头是其由蛋白酶的切割明显小于蛋白酶对靶底物的切割的接头。

[0284] 在一些实施方案中,所述接头是可切割接头。在一些方面,可切割接头是还包含作为蛋白酶底物的序列的接头,如上文所述的任一种,所述序列因为至少一个键的存在而可以在生理条件下断裂。在一些情况下,可切割接头在体内存在的特定条件下易被切割或对切割敏感,如在暴露于细胞外蛋白酶(包括存在于体内细胞环境中的那些)之后。在一些情况下,所述蛋白酶可能存在于特定的生理微环境(如肿瘤微环境)中,从而限制可能发生切割的部位。

[0285] 通常,与另一种非靶底物相比,蛋白酶对特定靶底物的切割展现出特异性或优先性。这种特异性程度可以基于序列(例如接头)的切割速率常数确定,所述切割速率常数是蛋白酶对其底物的优先性和酶效率的度量。用于确定在各种浓度的底物的存在下切割随时间增加的速率的任何方法都可以用于计算特异性常数。例如,将底物连接至荧光部分,所述荧光部分在被蛋白酶切割后被释放。通过确定在不同蛋白酶浓度下的切割速率,可以确定针对特定蛋白酶对特定接头的切割特异性常数(k_{cat}/K_m)。在一些实施方案中,可切割接头是能够被蛋白酶以约至少 $1 \times 10^4 M^{-1} S^{-1}$ 、或至少 $5 \times 10^4 M^{-1} S^{-1}$ 、至少 $10 \times 10^4 M^{-1} S^{-1}$ 、至少 $10 \times 10^5 M^{-1} S^{-1}$ 或更大的速率特异性切割的接头。

[0286] 在一些实施方案中,本公开文本的多特异性多肽构建体包含连接所述第一组分和所述第二组分的可切割接头。在一些实施方案中,所述可切割接头包含可以充当蛋白酶(通常是细胞外蛋白酶)的底物的氨基酸序列。例如,所述可切割接头可以包含含有优选地位于蛋白酶的可切割肽序列内的至少一个肽键的切割序列。合适的蛋白酶包括例如基质金属蛋白酶(MMP)、半胱氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶和纤溶酶激活剂,它们在诸如类风湿性关节炎或癌症等疾病中以强化的方式形成或激活,从而导致过度的组织降解、炎症和转移。在特定实施方案中,所述蛋白酶是由肿瘤、激活的免疫效应细胞(例如T细胞或NK细胞)或肿瘤微环境中的细胞产生的蛋白酶。在一些实施方案中,所述蛋白酶是颗粒酶B、间质蛋白酶或MMP(如MMP-2)。

[0287] 所述可切割接头可以基于蛋白酶来选择,所述蛋白酶由靠近表达靶标的细胞的肿瘤产生和/或由在组织中与所述多特异性多肽构建体的期望靶标共定位的肿瘤产生。在文献中有报道在许多癌症(例如,实体瘤)中具有已知底物的蛋白酶的水平增加。参见例如,La Rocca等人,(2004) *British J. of Cancer* 90(7):1414-1421。

[0288] 在一些实施方案中,连接所述第一组分多特异性多肽构建体和所述第二组分多特异性多肽构建体的可切割接头被由所述组分中的一种激活的免疫效应细胞产生的蛋白酶切割。例如,包含效应子使能或增强IgG Fc区的多特异性多肽构建体当与靶抗原接合时能够引发ADCC。ADCC的核心是颗粒酶B和穿孔素从效应细胞(即NK细胞和细胞毒性T细胞)中

的释放。在释放后,颗粒酶B以穿孔素依赖性方式进入靶细胞,在其中它介导凋亡。重要的是,颗粒酶B在效应细胞与靶细胞之间的细胞外突触内具有活性。在一些实施方案中,连接所述第一组分多特异性多肽构建体和所述第二组分多特异性多肽构建体的可切割接头被颗粒酶B切割。颗粒酶B在由所述多特异性多肽构建体的组分中的一种介导的效应细胞激活期间被释放。在一些实施方案中,颗粒酶B和其他蛋白酶可以由免疫效应细胞(包括激活的T细胞或NK细胞)产生。在一些实施方案中,在多特异性多肽构建体结合TAA后通过CD3接合来激活T细胞可以释放此类蛋白酶,其然后可以切割特异性可切割接头,从而加强或增加CD3结合分子的活性以接合CD3。在一些实施方案中,切割可以放大或增加所述多特异性构建体在未切割状态下与TAA结合时所实现的活性。

[0289] 示例性底物包括但不限于可被以下一种或多种酶或蛋白酶切割的底物: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;半胱天冬酶,例如半胱天冬酶1、半胱天冬酶2、半胱天冬酶3、半胱天冬酶4、半胱天冬酶5、半胱天冬酶6、半胱天冬酶7、半胱天冬酶8、半胱天冬酶9、半胱天冬酶10或半胱天冬酶14;半胱氨酸组织蛋白酶,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);豆荚蛋白酶(Legumain);Otubain-2;KLK,例如KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13或KLK14;金属蛋白酶,例如穿膜肽酶;脑啡肽酶;PSMA;BMP-1;MMP,例如MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26或MMP27;丝氨酸蛋白酶,例如激活蛋白C、组织蛋白酶A、组织蛋白酶G、糜酶、凝血因子蛋白酶(例如FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa)、弹性蛋白酶、颗粒酶B、胍基苯甲酸酯酶(Guanidinobenzoatase)、HtrA1、人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、乳铁蛋白、Marapsin、NS3/4A、PACE4、纤溶酶、PSA、tPA、凝血酶、类胰蛋白酶、uPA;II型跨膜丝氨酸蛋白酶(TTSP),例如DESC1、DPP-4、FAP、肝素、间质蛋白酶-2、间质蛋白酶、TMPRSS2、TMPRSS3或TMPRSS4;及其任何组合。

[0290] 在一些实施方案中,所述可切割接头被多种蛋白酶(例如,2种或更多种蛋白酶、3种或更多种蛋白酶、4种或更多种蛋白酶等等)切割。

[0291] 在一些实施方案中,选择所述可切割接头与特定蛋白酶一起使用,所述蛋白酶是例如已知由靠近表达靶标的细胞的肿瘤产生和/或由与所述多特异性多肽构建体的靶标共定位的肿瘤产生的蛋白酶。

[0292] 在一些实施方案中,所述可切割接头含有特定蛋白酶的底物识别位点或切割位点,所述底物识别位点或切割位点是被蛋白酶切割、由蛋白酶的活性位点识别的序列。通常,例如,对于丝氨酸蛋白酶,切割序列由底物中的P1-P4和P1'-P4'氨基酸组成,其中切割发生在P1位置之后。通常,丝氨酸蛋白酶的切割序列的长度为六个残基,以匹配许多蛋白酶的扩大的底物特异性,但是根据蛋白酶而定可以更长或更短。通常,所述可切割接头包含由蛋白酶识别的P1-P1'易裂键序列。在一些方面,所述可切割接头被工程化以引入能够被特定蛋白酶切割的肽键,例如通过引入蛋白酶的底物识别位点序列或切割序列。

[0293] 在一些实施方案中,所述可切割接头包含两个或更多个底物序列的组合。在一些实施方案中,每个底物序列被相同的蛋白酶切割。在一些实施方案中,至少两个底物序列被

不同的蛋白酶切割。在一些实施方案中,所述可切割接头包含作为颗粒酶B底物的氨基酸。在一些实施方案中,颗粒酶B可切割接头含有具有通式P4 P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:150)的氨基酸序列,其中P4是氨基酸I、L、Y、M、F、V或A;P3是氨基酸A、G、S、V、E、D、Q、N或Y;P2是氨基酸H、P、A、V、G、S或T;P1是氨基酸D或E;并且P1'是氨基酸I、L、Y、M、F、V、T、S、G或A。在一些实施方案中,颗粒酶B可切割接头含有具有通式P4 P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:151)的氨基酸序列,其中P4是氨基酸I或L;P3是氨基酸E;P2是氨基酸P或A;P1是氨基酸D;并且P1'是氨基酸I、V、T、S或G。

[0294] 在一些实施方案中,所述颗粒酶B底物包含氨基酸序列LEAD (SEQ ID NO:22)、LEPG (SEQ ID NO:142)或LEAE (SEQ ID NO:143)。在一些实施方案中,所述可切割接头含有氨基酸序列所述可切割接头包含氨基酸序列IEPDI (SEQ ID NO:136)、LEPDG (SEQ ID NO:152)、LEADT (SEQ ID NO:137)、IEPDG (SEQ ID NO:138)、IEPDV (SEQ ID NO:139)、IEPDS (SEQ ID NO:140)、IEPDT (SEQ ID NO:141)、IEPDP (SEQ ID NO:144)、LEPDG (SEQ ID NO:152)或LEADG (SEQ ID NO:153)。

[0295] 在一些实施方案中,所述可切割接头包含作为间质蛋白酶底物的氨基酸。在一些实施方案中,所述可切割接头包含序列P4QAR↓(A/V) (SEQ ID NO:154),其中P4是任何氨基酸。在一些实施方案中,所述可切割接头包含序列RQAR (A/V) (SEQ ID NO:155)。在一些实施方案中,所述间质蛋白酶底物包含氨基酸序列RQAR (SEQ ID NO:23)。在一些实施方案中,所述可切割接头包含氨基酸序列RQARV (SEQ ID NO:156)。

[0296] 在一些实施方案中,所述可切割接头包含作为一种或多种基质金属蛋白酶(MMP)底物的氨基酸。在一些实施方案中,所述MMP是MMP-2。在一些实施方案中,所述可切割接头含有通式P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:157),其中P3是P、V或A;P2是Q或D;P1是A或N;并且P1'是L、I或M。在一些实施方案中,所述可切割接头含有通式P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:158),其中P3是P;P2是Q或D;P1是A或N;并且P1'是L或I。在一些实施方案中,所述MMP底物包含氨基酸序列PAGL (SEQ ID NO:24)。

[0297] 在一些实施方案中,所述可切割接头包含作为颗粒酶B底物的氨基酸序列和作为间质蛋白酶底物的氨基酸序列的组合。在一些实施方案中,所述可切割接头包含氨基酸序列LEAD (SEQ ID NO:22)和氨基酸序列RQAR (SEQ ID NO:23)的组合。

[0298] 在一些实施方案中,所述可切割接头包含作为颗粒酶B底物的氨基酸序列和作为MMP底物的氨基酸序列的组合。在一些实施方案中,所述可切割接头包含氨基酸序列LEAD (SEQ ID NO:22)和氨基酸序列PAGL (SEQ ID NO:24)的组合。

[0299] 在一些实施方案中,所述可切割接头包含作为间质蛋白酶底物的氨基酸序列和作为MMP底物的氨基酸序列的组合。在一些实施方案中,所述可切割接头包含氨基酸序列RQAR (SEQ ID NO:23)和氨基酸序列PAGL (SEQ ID NO:24)的组合。

[0300] 在一些实施方案中,所述可切割接头包含作为颗粒酶B底物的氨基酸序列、作为间质蛋白酶底物的氨基酸序列和作为MMP底物的氨基酸序列的组合。在一些实施方案中,所述可切割接头包含作为颗粒酶B底物的氨基酸序列和作为MMP底物的氨基酸序列的组合。在一些实施方案中,所述可切割接头包含氨基酸序列LEAD (SEQ ID NO:22)、氨基酸序列RQAR (SEQ ID NO:23)和氨基酸序列PAGL (SEQ ID NO:24)的组合。

[0301] 所述可切割接头可以包括任何已知的接头。可切割接头的例子描述于Be' liveau

等人(2009)FEBS Journal, 276;美国公开的申请号US 20160194399;US 20150079088;US 20170204139;US 20160289324;US 20160122425;US 20150087810;US 20170081397;美国专利号US 9644016中。

[0302] 在一些实施方案中,所述可切割接头包含选自以下的氨基酸序列: TGLEADGSPAGLGRQARVG (SEQ ID NO:25); TGLEADGSRQARVGPAGLG (SEQ ID NO:26); TGSPAGLEADGSRQARVGS (SEQ ID NO:27); TGPAGLGLLEADGSRQARVG (SEQ ID NO:28); TGRQARVGLLEADGSPAGLG (SEQ ID NO:29); TGSRQARVGPAGLEADGS (SEQ ID NO:30); 和 TGPAGLGSRQARVGLLEADGS (SEQ ID NO:31); GPAGLGLLEPDGSRQARVG (SEQ ID NO:104); GGS GGGGIEPDIGSGGS (SEQ ID NO:105); GGS GGGGLEADTGGSGGS (SEQ ID NO:106); GSIEPDIGS (SEQ ID NO:107); GSLEADTGS (SEQ ID NO:108); GGS GGGGIEPDIGSGGS (SEQ ID NO:109); GGS GGGGIEPDVGGSGGS (SEQ ID NO:110); GGS GGGGIEPDSGGSGGS (SEQ ID NO:111); GGS GGGGIEPDTGGSGGS (SEQ ID NO:112); GGS SLEPDGSGS (SEQ ID NO:113); 和 GPAGLGLLEADGSRQARVG (SEQ ID NO:114); GGE GGGSGSGSGGS (SEQ ID NO:115); GSSAGSEAGSGQAGVGS (SEQ ID NO:116); GGS GGGGLEAEGSGSGGS (SEQ ID NO:117); GGS GGGGIEPDIGSGGS (SEQ ID NO:118); TGS GGGGIEPDIGSGGS (SEQ ID NO:148)。

4. 抗原结合结构域

[0303] 本公开文本的多特异性多肽构建体包含至少一个抗原结合结构域,如至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域。在一些方面,所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个选自抗体或抗原结合片段、天然(natural或native)同源结合配偶体、抗运载蛋白(Anticalin)(工程化脂质运载蛋白)、Darpin、Fynomer、Centyrin(工程化纤连蛋白III结构域)、半胱氨酸-杆结构域、阿菲林(Affilin)、亲和体(Affibody)或工程化CH3结构域。在一些实施方案中,所述天然同源结合配偶体包含所述TAA的天然同源结合配偶体的细胞外结构域或其结合片段,或其展现出与所述TAA的结合活性的变体。

[0304] 在一些实施方案中,所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个(如所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域)包含抗体或其抗原结合片段的一个或多个拷贝。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个(如所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域)包含选自以下的抗体或其抗原结合片段的一个或多个拷贝: Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个(如所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域)是单链抗体。在一些例子中,所述单链是scFv、scAb、单结构域重链抗体或单结构域轻链抗体。

[0305] 在一些实施方案中,所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个(如所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域)是单链抗体。在一些例子中,所述单链是scFv、scAb、单结构域重链抗体或单结构域轻链抗体。

[0306] 在一些实施方案中,所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个(如所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域)包含一个或多个单结构域抗体(sdAb)片段(例如V_H、V_{NAR}、工程化V_H或V_K结构域)。V_H可以从天然骆驼科动物仅重链抗体、产生仅重链抗体的经基因修饰的啮齿动物或幼稚/合成的骆驼科动物或人源化骆驼科

动物单结构域抗体库产生。 V_{NAR} 可以由软骨鱼仅重链抗体产生。已经实施了各种方法以从常规异二聚体 V_{H} 和 V_{K} 结构域产生单体sdAb,所述方法包括特异性种系家族的界面工程化和选择。

[0307] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的抗原结合结构域或者独立地抗原结合结构域中的每一个(如所述第一抗原结合结构域和/或所述第二抗原结合结构域)含有至少一个结合TAA的sdAb或scFv。在一些实施方案中,所述至少一个结合TAA的scFv或sdAb位于相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体仅含有一个与TAA结合的scFv或sdAb,所述scFv或sdAb可以位于相对于所述Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述CD3结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有两个与TAA结合的scFv或sdAb,所述scFv或sdAb位于相对于所述Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述CD3结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有三个scFv或sdAb,其中两个位于相对于所述Fc区的氨基末端或位于相对于所述CD3结合区的羧基末端,并且第三个位于所述多特异性多肽构建体的另一端。

[0308] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体由两种多肽形成或包含两种多肽,所述两种多肽包含第一多肽,其包含异二聚体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结构域和与肿瘤相关抗原结合的scFv或sdAb;以及第二多肽,其包含所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头、所述抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv)的VL结构域和任选的与肿瘤相关抗原结合的相同或不同的scFv或sdAb。与TAA结合的scFv或sdAb可以位于相对于所述异二聚体Fc的Fc多肽的氨基末端和/或位于相对于所述CD3结合区的VH或VL链的羧基末端。所述多特异性多肽构建体的第一多肽和/或第二多肽中的至少一种还包含结合共刺激受体的CRBR或其链,如第II.5节所述。在一些实施方案中,结合共刺激受体的CRBR是scFv或sdAb,并且作为所述多特异性多肽构建体的第一多肽和/或第二多肽的一部分被包含。在一些实施方案中,结合共刺激受体的CRBR是Fab,并且所述多特异性多肽构建体另外由第三多肽形成,其中至少所述第一多肽和所述第二多肽包含结合共刺激受体的Fab的链(例如Fab的VH-CH1或VL-CL),并且第三多肽含有结合所述共刺激受体的Fab的另一条链(例如Fab的VH-CH1或VL-CL中的另一个)。

[0309] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的抗原结合结构域或者独立地抗原结合结构域中的每一个(如所述第一抗原结合结构域和/或所述第二抗原结合结构域)含有作为单结构域抗体(sdAb)的结合结构域。

[0310] 在一些实施方案中,所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个(如所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域)含有多于一条链。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的抗原结合结构域或者独立地抗原结合结构域中的每一个(如所述第一抗原结合结构域和/或所述第二抗原结合结构域)含有组装为FAB的VH和VL序列。

[0311] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的抗原结合结构域或者独立地抗原结合结构域中的每一个(如所述第一抗原结合结构域和/或所述第二抗原结合结构域)含有结合TAA的Fab抗体的VH-CH1(Fd)和VL-CL。在一些实施方案中,含有VH-CH1(Fd)和VL-CL的Fab抗体位于相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多

特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体仅含有一个与TAA结合的含有VH-CH1 (Fd) 和VL-CL的Fab抗体,所述Fab抗体可以位于相对于所述Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述CD3结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有两个与TAA结合的各自含有VH-CH1 (Fd) 和VL-CL的Fab抗体片段,其中一个位于相对于所述Fc区的氨基末端,并且另一个位于相对于所述CD3结合区的羧基末端。

[0312] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体由三种或更多种多肽形成或包含三种或更多种多肽,所述三种或更多种多肽包含第一多肽,其包含异二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头和与肿瘤相关抗原结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL;第二多肽,其包含所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头和任选的与肿瘤相关抗原结合的Fab抗体片段的相同的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL;以及第三多肽,其包含与所述TAA结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个。所述多特异性多肽构建体的第一多肽、第二多肽和/或第三多肽还可以包含结合共刺激受体的CRBR或其链(例如Fab的VH-CH1或VL-CL),如第II.5节所述。在一些实施方案中,结合共刺激受体的CRBR是scFv或sdAb,并且作为所述多特异性多肽构建体的第一多肽和/或第二多肽的一部分被包含。在一些实施方案中,结合共刺激受体的CRBR是Fab,并且所述多特异性多肽构建体另外由第四多肽形成,其中至少第一多肽和第二多肽包含结合所述共刺激受体的Fab的链(例如Fab的VH-CH1或VL-CL),并且第四多肽含有结合所述共刺激受体的Fab的另一条链(例如Fab的VH-CH1或VL-CL中的另一个)。

[0313] 在一些实施方案中,所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个是或包含所述TAA的天然(natural或native)同源结合配偶体的细胞外结构域或其结合片段,或其展现出与所述TAA的结合活性的变体。

[0314] 在一些实施方案中,所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个(如所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域)结合相同的抗原。在一些实施方案中,存在多于一个结合TAA的抗原结合结构域,并且所述抗原结合结构域中的每一个(如所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域)结合不同的抗原。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域中的每一个(如所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域)结合相同的肿瘤相关抗原(TAA)。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域中的每一个(如所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域)结合不同的TAA。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域中的每一个(如所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域)结合相同TAA上的不同表位。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域中的每一个(如所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域)结合相同TAA上的相同表位。

[0315] 在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域或者独立地抗原结合结构域中的每一个导致与所述TAA的单价、二价、三价或四价结合。在一些实施方案中,与所述TAA的二价结合包含两个结合相同抗原的相同表位的抗原结合结构域(例如单表位的)。在一些实施方案中,与所述TAA的二价结合包含两个结合相同抗原的不同表位的抗原结合结构域(例如双表位的)。在一些实施方案中,与所述TAA的单价结合包含一个结合抗原的一个表位的抗原结合结构域(例如单表位的)。

[0316] 在一些实施方案中,所述TAA选自1-92-LFA-3、5T4、 α -4整合素、 α -V整合素、 α 4 β 1整

合素、 $\alpha 4\beta 7$ 整合素、AGR2、抗路易斯-Y、爱帕琳肽J受体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5补体、C-242、CA9、CA19-9(路易斯a)、碳酸酐酶9、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132(IL-2RG)、CD133、CD137、CD138、CD166、CD172A、CD248、CDH6、CEACAM5(CEA)、CEACAM6(NCA-90)、密封蛋白-3、密封蛋白-4、cMet、胶原蛋白、Cripto、CSFR、CSFR-1、CTLA-4、CTGF、CXCL10、CXCL13、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CYR61、DL44、DLK1、DLL3、DLL4、DPP-4、DSG1、EDA、EDB、EGFR、EGFRviii、内皮素B受体(ETBR)、ENPP3、EpCAM、EPHA2、EPHB2、ERBB3、RSV的F蛋白、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、叶酸受体 α (FR α)、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、透明质酸酶、ICOS、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IgE、IgE受体(Fc ϵ RI)、IGF、IGF1R、IL1B、IL1R、IL2、IL11、IL12、IL12p40、IL-12R、IL-12R β 1、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、Jagged配体、Jagged 1、Jagged 2、KISS1-R、LAG-3、LIF-R、路易斯X、LIGHT、LRP4、LRRC26、Ly6G6D、LyPD1、MCSP、间皮素、MRP4、MUC1、粘蛋白-16(MUC16、CA-125)、Na/K ATP酶、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、PDGFR α 、PDGFR β 、PD-1、PD-L1、PD-L2、磷脂酰丝氨酸、P1GF、PSCA、PSMA、PSGR、RAAG12、RAGE、SLC44A4、鞘氨醇1磷酸酯、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TAPA1、TEM-8、TGF β 、TIGIT、TIM-3、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TMEM31、TNF α 、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。

[0317] 在一些实施方案中，至少一个抗原结合结构域或者独立地每个抗原结合结构域结合肿瘤相关抗原(TAA)叶酸受体 α (FR α)。例如，所述抗原结合结构域含有作为结合FR α 的sdAb的结合结构域。示例性FR α 结合sdAb示出于SEQ ID NO:120、121和122中。所提供的多特异性多肽构建体中的抗原结合结构域或者独立地每个抗原结合结构域可以与任何前述SEQ ID No具有至少85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性并结合FR α 。

[0318] 在一些实施方案中，至少一个抗原结合结构域或者独立地每个抗原结合结构域结合肿瘤相关抗原(TAA)cMET。例如，所述抗原结合结构域含有作为结合cMET的sdAb的结合结构域。示例性cMET结合sdAb示出于SEQ ID NO:123中(美国专利号9,346,884)。所提供的多特异性多肽构建体中的抗原结合结构域或者独立地每个抗原结合结构域可以与前述SEQ ID No具有至少85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性并结合cMET。

[0319] 在一些实施方案中，至少一个抗原结合结构域或者独立地每个抗原结合结构域结合肿瘤相关抗原(TAA)B7H3。例如，所述抗原结合结构域含有作为结合B7H3的scFv的结合结构域。示例性B7H3结合scFv示出于SEQ ID NO:124中。在一些实施方案中，所述抗原结合结构域是sdAb，如VHH。示例性B7H3结合sdAb示出于SEQ ID NO:301-305中的任一个中。在一些实施方案中，所述抗原结合结构域是或含有包含VH-CH1(Fd)和LC的Fab抗体片段。示例性

B7H3 Fd示出于SEQ ID NO:127中,并且示例性B7H3LC示出于SEQ ID NO:128中(PCT公开号W02017/030926)。所提供的多特异性多肽构建体中的抗原结合结构域或者独立地每个抗原结合结构域可以与任何前述SEQ ID No具有至少85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性并结合B7H3。

[0320] 在一些实施方案中,至少一个抗原结合结构域或者独立地每个抗原结合结构域结合肿瘤相关抗原(TAA)CD20。在一些实施方案中,这种抗原结合结构域含有SEQ ID NO:189所示的VH和SEQ ID NO:190所示的VL或与SEQ ID NO:189或SEQ ID NO:190展现出至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、98%或99%序列同一性的序列。例如,所述抗原结合结构域含有作为结合CD20的scFv的结合结构域。示例性CD20结合scFv示出于SEQ ID NO:125中(美国公开号US 2005/0123546)。所提供的多特异性多肽构建体中的抗原结合结构域或者独立地每个抗原结合结构域可以与任何前述SEQ ID No具有至少85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性并结合CD20。

[0321] 在一些实施方案中,至少一个抗原结合结构域或者独立地每个抗原结合结构域结合肿瘤相关抗原(TAA)DLL3。例如,所述抗原结合结构域含有作为结合DLL3的scFv的结合结构域。示例性DLL3结合scFv示出于SEQ ID NO:126和188中(美国公开号US 2017/0037130)。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域是sdAb,如VHH。示例性DLL3结合sdAb示出于SEQ ID NO:306或SEQ ID NO:307中的任一个中。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域是或含有结合DLL3的包含Fd和LC的Fab抗体片段。示例性DLL3 Fd示出于SEQ ID NO:133中,并且示例性DLL3 LC示出于SEQ ID NO:134中(美国专利号US 8,044,178)。所提供的多特异性多肽构建体中的抗原结合结构域或者独立地每个抗原结合结构域可以与任何前述SEQ ID No具有至少85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性并结合DLL3。

[0322] 在一些实施方案中,至少一个抗原结合结构域或者独立地每个抗原结合结构域结合肿瘤相关抗原(TAA)5T4。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域是sdAb,如VHH。示例性5T4结合sdAb示出于SEQ ID NO:322或SEQ ID NO:323中的任一个中。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域是或含有结合5T4的包含Fd和LC的Fab抗体片段。示例性5T4 Fd示出于SEQ ID NO:129中,并且示例性5T4 LC示出于SEQ ID NO:130中。在一些实施方案中,所述抗体结合结构域包含如SEQ ID NO:167和168所示的VH-CH1(Fd)或VL-CL(美国专利号US 8,044,178)。所提供的多特异性多肽构建体中的抗原结合结构域或者独立地每个抗原结合结构域可以与任何前述SEQ ID No具有至少85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性并结合5T4。

[0323] 在一些实施方案中,至少一个抗原结合结构域或者独立地每个抗原结合结构域结合肿瘤相关抗原(TAA)gpNMB。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域是或含有包含Fd和LC链的Fab片段。示例性gpNMB Fd示出于SEQ ID NO:131中,并且示例性gpNMB LC示出于SEQ ID NO:132中。所提供的多特异性多肽构建体中的抗原结合结构域或者独立地每个抗原结合结构域可以与任何前述SEQ ID No具有至少85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性并结合gpNMB。

[0324] 在一些实施方案中,所述抗原结合结构域直接或经由接头间接连接至所述Fc区和/或所述CD3结合区。在一些实施方案中,连接是经由接头。在一些实施方案中,所述接头

是连接肽 (LP), 其可以包括如第II.3节所述的任何柔性或刚性接头, 但是通常连接所述一个或多个抗原结合结构域的肽不是可切割接头。

[0325] 在一些实施方案中, 所述多特异性多肽构建体包含在所述第一抗原结合结构域与所述Fc区之间的第一连接肽 (LP1)。在一些实施方案中, 所述多特异性多肽构建体包含在所述CD3结合区与所述第二抗原结合结构域之间的第二连接肽 (LP2)。在一些实施方案中, 所述多特异性多肽构建体包含在所述第一抗原结合结构域与所述Fc区之间的第一连接肽 (LP1) 和在所述CD3结合区与所述第二抗原结合结构域之间的第二连接肽 (LP2)。在一些方面, 所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端具有如下结构排列: 第一抗原结合结构域-LP1-Fc区-接头-CD3结合区-LP2-第二抗原结合结构域。在一些实施方案中, 所述两种连接肽彼此不相同。

[0326] 在一些实施方案中, LP1或LP2独立地是长度为约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方案中, LP1或LP2独立地是为或包含如SEQ ID NO:10-13、119、135、147、149或GGS所示的任何Gly-Ser接头的肽。

5. 共刺激受体结合区 (CRBR)

[0327] 本公开文本的多特异性多肽构建体包含一个或多个结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR)。在一些实施方案中, 所提供的多特异性多肽构建体的一个或多个CRBR结合T细胞上表达的共刺激受体。在一些实施方案中, 所述共刺激受体在激活的T细胞表面上上调、诱导或表达。在一些方面, 所述CRBR结合共刺激受体并刺激所述共刺激受体。在一些实施方案中, 所述共刺激受体与所述多特异性多肽的CRBR的激动结合在T细胞中诱导下游信号传导, 以加强或增强CD3接合后的T细胞激活或功能。在一些实施方案中, 所述CRBR或者独立地所述CRBR中的每一个是抗体或抗原结合片段、所述共刺激受体的天然同源结合配偶体、抗运载蛋白 (工程化脂质运载蛋白)、Darpin、Fynomer、Centyrin (工程化纤连蛋白III结构域)、半胱氨酸-杵结构域、阿菲林、亲和体或工程化CH3结构域。

[0328] 在一些实施方案中, 所述CRBR或者独立地所述CRBR中的每一个 (如所述第一CRBR和所述第二CRBR) 包含抗体或其抗原结合片段的一个或多个拷贝。在一些实施方案中, 所述CRBR或者独立地所述CRBR中的每一个 (如所述第一CRBR和所述第二CRBR) 包含选自以下的抗体或其抗原结合片段的一个或多个拷贝: Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。

[0329] 在一些实施方案中, 所述CRBR或者独立地所述CRBR中的每一个 (如所述第一CRBR和所述第二CRBR) 是单链抗体。在一些例子中, 所述单链是scFv、scAb、单结构域重链抗体或单结构域轻链抗体。

[0330] 在一些实施方案中, 所述CRBR或者独立地所述CRBR中的每一个 (如所述第一CRBR和所述第二CRBR) 包含一个或多个单结构域抗体 (sdAb) 片段 (例如V_HH、V_{NAR}、工程化V_H或V_K结构域)。V_HH可以从天然骆驼科动物仅重链抗体、产生仅重链抗体的经基因修饰的啮齿动物或幼稚/合成的骆驼科动物或人源化骆驼科动物单结构域抗体库产生。V_{NAR}可以由软骨鱼仅重链抗体产生。已经实施了各种方法以从常规异二聚体V_H和V_K结构域产生单体sdAb, 所述方法包括特异性种系家族的界面工程化和选择。

[0331] 在一些实施方案中, 所述多特异性多肽构建体的CRBR或者独立地CRBR中的每一个 (如所述第一CRBR和/或所述第二CRBR) 含有至少一个结合共刺激受体的sdAb或scFv。在一

些实施方案中,所述至少一个结合共刺激受体的scFv或sdAb位于相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体仅含有一个与共刺激受体结合的scFv或sdAb,所述scFv或sdAb可以位于相对于所述Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述CD3结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有两个与共刺激受体结合的scFv或sdAb,所述scFv或sdAb位于相对于所述Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述CD3结合区的羧基末端。

[0332] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体由两种多肽形成或包含两种多肽,所述两种多肽包含第一多肽,其包含异二聚体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结构域和与共刺激受体结合的scFv或sdAb;以及第二多肽,其包含所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头、所述抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv)的VL结构域和任选的与共刺激受体结合的另一个相同或不同的scFv或sdAb。与所述共刺激受体结合的scFv或sdAb可以位于相对于所述异二聚体Fc的Fc多肽的氨基末端和/或位于相对于所述CD3结合区的VH或VL链的羧基末端。所述多特异性多肽构建体的第一多肽和/或第二多肽中的至少一种还包含结合TAA的抗原结合结构域或其链,如第II.4节所述。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域是scFv或sdAb,并且作为所述多特异性多肽构建体的第一多肽和/或第二多肽的一部分被包含。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域是Fab,并且所述多特异性多肽构建体另外由第三多肽形成,其中至少所述第一多肽和所述第二多肽包含结合TAA的Fab的链(例如Fab的VH-CH1或VL-CL),并且所述第三多肽含有结合TAA的Fab的另一条链(例如Fab的VH-CH1或VL-CL中的另一个)。

[0333] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体由两种多肽形成或包含两种多肽,所述两种多肽包含第一多肽,其按顺序包含:对TAA具有特异性的第一抗原结合结构域、异二聚体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结构域和对TAA具有特异性的第二抗原结合结构域;以及第二多肽,其含有所述CRBR并且按顺序包含:所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头、所述抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv)的VL结构域,其中所述CRBR位于所述Fc区的氨基末端和/或位于所述CD3结合区的C末端。在一些实施方案中,所述CRBR位于在所述CD3结合区的羧基末端的第二多肽上。在一些实施方案中,所述CRBR位于在所述Fc区的氨基末端的第二多肽上。在一些实施方案中,所述CRBR位于所述Fc区的氨基末端且位于所述CD3结合区的C末端。在一些实施方案中,对TAA具有特异性的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域是相同的。在一些实施方案中,对TAA具有特异性的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域是不同的。在一些实施方案中,所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合不同的TAA。在一些实施方案中,所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合相同TAA的不同或不重叠的表位和/或竞争结合相同的TAA。

[0334] 在一些实施方案中,所述CRBR或者独立地所述CRBR中的每一个(如所述第一CRBR和所述第二CRBR)多于一条链。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的CRBR或者独立地CRBR中的每一个(如所述第一CRBR和/或所述第二CRBR)含有组装为FAB的VH和VL序列。

[0335] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的CRBR或者独立地CRBR中的每一个(如所述第一CRBR和/或所述第二CRBR)含有结合共刺激受体的Fab抗体的VH-CH1(Fd)和VL-

CL。在一些实施方案中,含有VH-CH1 (Fd) 和VL-CL的Fab抗体位于相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体仅含有一个与共刺激受体结合的含有VH-CH1 (Fd) 或VL-CL的Fab抗体,所述Fab抗体可以位于相对于所述Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述CD3结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有两个与共刺激受体结合的各自含有VH-CH1 (Fd) 和VL-CL的Fab抗体片段,其中一个位于相对于所述Fc区的氨基末端,并且另一个位于相对于所述CD3结合区的羧基末端。

[0336] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体由三种或更多种多肽形成或包含三种或更多种多肽,所述三种或更多种多肽包含第一多肽,其包含异二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头和与共刺激受体结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL;第二多肽,其包含所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头和任选的与共刺激受体结合的Fab抗体片段的相同的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL;以及第三多肽,其包含与所述共刺激受体结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个。所述多特异性多肽构建体的第一多肽、第二多肽和/或第三多肽还可以包含结合TAA的抗原结合结构域或其链,如第II.4节所述。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域是scFv或sdAb,并且作为所述多特异性多肽构建体的第一多肽和/或第二多肽的一部分被包含。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域是Fab,并且所述多特异性多肽构建体另外由第四多肽形成,其中至少第一多肽和第二多肽包含结合TAA的Fab的链(例如Fab的VH-CH1或VL-CL),并且所述第四多肽含有结合TAA的Fab的另一条链(例如Fab的VH-CH1或VL-CL中的另一个)。

[0337] 在一些实施方案中,所述CRBR或者独立地所述CRBR中的每一个是或包含所述共刺激受体的天然(natural/native)同源结合配偶体(例如天然配体),或其展现出与所述共刺激受体的结合活性的变体。

[0338] 在一些实施方案中,所提供的多特异性多肽构建体的一个或多个CRBR结合T细胞上表达的共刺激受体。在一些实施方案中,存在多于一个与共刺激受体结合的CRBR,并且所述CRBR中的每一个(如所述第一CRBR和所述第二CRBR)结合相同的共刺激受体。在一些实施方案中,所述CRBR中的每一个(如所述第一CRBR和所述CRBR)结合不同的共刺激受体。在一些实施方案中,所述CRBR中的每一个(如所述第一CRBR和所述第二CRBR)结合相同共刺激受体上的不同表位。在一些实施方案中,所述CRBR中的每一个(如所述CRBR和所述CRBR)结合相同共刺激受体上的相同表位。

[0339] 在一些实施方案中,结合共刺激受体的CRBR或者独立地CRBR中的每一个导致与所述共刺激受体的单价、二价、三价或四价结合。

[0340] 在一些实施方案中,所述共刺激受体在T细胞(如受试者的原代T细胞)上表达。在一些实施方案中,所述共刺激受体在人T细胞(如人类受试者的原代人T细胞)上表达。

[0341] 在一些实施方案中,所述共刺激受体是肿瘤坏死因子(TNF)受体家族的成员。在一些实施方案中,所述共刺激受体是免疫球蛋白超家族(IgSF)的成员。在一些实施方案中,所述共刺激受体是B7受体家族的成员。

[0342] 在一些实施方案中,所述共刺激受体是41BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD27、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)、CD28、ICOS、CD40、B细胞激活因子受体(BAFF-R)、B细胞成熟抗原(BCMA)、跨膜激活剂及CAML相互作用因子(TACI)和NKG2D。在一些实施方案中,所述

共刺激受体选自41BB、OX40、GITR、ICOS或CD28。在一些实施方案中,所述共刺激受体选自41BB、OX40或GITR。

[0343] 在一些实施方案中,所述共刺激受体是41BB。在一些实施方案中,所述共刺激受体是OX40。在一些实施方案中,所述共刺激受体是GITR。在一些实施方案中,所述共刺激受体是ICOS。在一些实施方案中,所述共刺激受体是CD28。

[0344] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽的CRBR是或包含所述共刺激受体的激动结合分子。所述CRBR可以与所述共刺激受体结合并启动、诱导或刺激与由所述受体的天然配体所启动、诱导或刺激的反应或活性相似或相同的反应或活性。在一些方面,所述CRBR与所述共刺激受体的结合诱导或刺激是由所述受体的天然配体所启动、诱导或刺激的信号的多于5%、多于10%、多于20%、多于30%、多于40%、多于50%、多于60%、多于70%、多于80%、多于90%或多于100%的下游信号。

[0345] 在一些实施方案中,所述一个或多个CRBR是与共刺激受体41BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD27、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白 (GITR)、CD28、ICOS、CD40、B细胞激活因子受体 (BAFF-R)、B细胞成熟抗原 (BCMA) 结合的抗体或其片段。在一些实施方案中,所述一个或多个CRBR是与共刺激受体41BB、OX40、GITR、ICOS或CD28结合的抗体或其片段。在一些实施方案中,所述一个或多个CRBR是与共刺激受体41BB、OX40或GITR结合的抗体或其片段。在特定实施方案中,所述共刺激结合区是单链片段,如单结构域抗体或scFv。用于结合41BB、OX40和GITR的示例性多肽分别描述于PCT公开号WO 2017123650、WO 2017123673和WO 2017015623中。在一些实施方案中,所述一个或多个CRBR是结合所述共刺激受体的单结构域抗体(sdAb),如在PCT公开号WO 2017123650、WO 2017123673和WO 2017015623中所述的那些。

[0346] 在一些例子中,所述共刺激受体结合区(CRBR)结合或包含以下的天然同源结合配偶体:41BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD27、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白 (GITR)、CD28、ICOS、CD40、B细胞激活因子受体 (BAFF-R)、B细胞成熟抗原 (BCMA)、跨膜激活剂及CAML相互作用因子 (TACI)、NKG2D。在一些实施方案中,所述天然同源结合配偶体选自41BB配体(41BBL)、OX40L (CD252)、CD70、GITR配体/TNFSF18、CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)、ICOS配体(ICOSL)、CD154 (CD40L)、B细胞激活因子 (BAFF)、增殖诱导配体 (APRIL)、NKG2D配体或其功能性片段。

[0347] 在一些实施方案中,所述共刺激受体结合区(CRBR)是结合41BB的抗体或抗原结合片段。在特定例子中,结合4-1BB的CRBR是单结构域抗体。在一些实施方案中,所述sdAb含有CDR1 GFSFSINAMG (示出于SEQ ID NO:308中)、CDR2 AIESGRNTV (示出于SEQ ID NO:309中)和CDR3 LKGNRVVSPSVAY (示出于SEQ ID NO:310中)。靶向41BB的sdAb的例子描述于PCT公开号WO 2017123650中。

[0348] CRBR的示例性序列示出于表2中。

[0349] 在一些实施方案中,至少一个CRBR或者独立地每个CRBR结合共刺激受体41BB。在一些例子中,所述CRBR是或含有对41BB具有特异性或结合41BB的抗体或抗原结合片段,如sdAb或含有VH和VL的片段(例如scFv)。在一些实施方案中,至少一个CRBR或者独立地每个CRBR是41BB的天然配体或者是其功能性结合片段。在一些实施方案中,至少一个CRBR或者独立地每个CRBR是抗运载蛋白。示例性41BB结合CRBR示出于SEQ ID NO:191-215和321中的

任一个中。在一些实施方案中,4-1BB结合CRBR是41BB配体(41BBL)的含有细胞外结构域的功能性片段或其截短部分,如对应于UniProt编号P41273的氨基酸50-254,例如如SEQ ID NO:191所示,或者SEQ ID NO:207-214中任一个所示的其截短部分或片段。在一些实施方案中,4-1BB结合CRBR是SEQ ID NO:198-206中任一个所示的抗运载蛋白。在一些实施方案中,所述4-1BB结合CRBR是sdAb,如VHH。在一些实施方案中,sdAb(如VHH)含有分别具有SEQ ID No:308、309和310中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3。41BB结合CRBR(如sdAb)可以包含SEQ ID NO:215所示的序列。41BB结合CRBR(如sdAb)可以包含SEQ ID NO:321所示的序列。在一些实施方案中,所述4-1BB结合结构域含有包含VH和VL的抗原结合抗体片段,如其中VH和VL被接头分开的单链片段(例如scFv)。在一些实施方案中,所述41BB结合CRBR含有SEQ ID NO:192、194和196中任一个所示的VH和SEQ ID NO:193、195或197中任一个所示的VL。所提供的多特异性多肽构建体中的CRBR或者独立地每个CRBR可以与任何前述SEQ ID No具有至少85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性,并且结合41BB。

[0350] 在一些实施方案中,至少一个CRBR或者独立地每个CRBR结合共刺激受体OX40。在一些例子中,所述CRBR是或含有对OX40具有特异性或结合OX40的抗体或抗原结合片段,如sdAb或含有VH和VL的片段(例如scFv)。在一些实施方案中,至少一个CRBR或者独立地每个CRBR是OX40的天然配体或者是其功能性结合片段。示例性的此类OX40结合CRBR示出于SEQ ID NO:216-225中的任一个中。在一些实施方案中,所述OX40结合CRBR含有SEQ ID NO:221和223中任一个所示的VH以及SEQ ID NO:222和224中任一个所示的VL。所提供的多特异性多肽构建体中的CRBR或者独立地每个CRBR可以与任何前述SEQ ID No具有至少85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性,并且结合OX40。

[0351] 在一些实施方案中,至少一个CRBR或者独立地每个CRBR结合共刺激受体GITR。在一些例子中,所述CRBR是或含有对GITR具有特异性或结合GITR的抗体或抗原结合片段,如sdAb或含有VH和VL的片段(例如scFv)。在一些实施方案中,至少一个CRBR或者独立地每个CRBR是GITR的天然配体或者是其功能性结合片段。示例性的此类GITR结合CRBR示出于SEQ ID NO:226-235中的任一个中。在一些实施方案中,所述GITR结合CRBR含有SEQ ID NO:227、229、233中任一个所示的VH以及SEQ ID NO:228、230和234中任一个所示的VL。所提供的多特异性多肽构建体中的CRBR或者独立地每个CRBR可以与任何前述SEQ ID No具有至少85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性,并且结合GITR。

[0352] 在一些实施方案中,至少一个CRBR或者独立地每个CRBR结合共刺激受体CD27。在一些例子中,所述CRBR是或含有对CD27具有特异性或结合CD27的抗体或抗原结合片段,如sdAb或含有VH和VL的片段(例如scFv)。在一些实施方案中,至少一个CRBR或者独立地每个CRBR是CD27的天然配体或者是其功能性结合片段。示例性的此类CD27结合CRBR示出于SEQ ID NO:236-238中的任一个中。在一些实施方案中,所述CD27结合CRBR含有SEQ ID NO:237所示的VH和SEQ ID NO:238所示的VL。所提供的多特异性多肽构建体中的CRBR或者独立地每个CRBR可以与任何前述SEQ ID No具有至少85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性,并且结合CD27。

[0353] 在一些实施方案中,至少一个CRBR或者独立地每个CRBR结合共刺激受体ICOS。在一些例子中,所述CRBR是或含有对ICOS具有特异性或结合ICOS的抗体或抗原结合片段,如sdAb或含有VH和VL的片段(例如scFv)。在一些实施方案中,至少一个CRBR或者独立地每个CRBR是ICOS的天然配体或者是其功能性结合片段。示例性ICOS结合CRBR序列示出于SEQ ID NO:239中。

[0354] 在一些实施方案中,至少一个CRBR或者独立地每个CRBR结合共刺激受体CD28。在一些例子中,所述CRBR是或含有对CD28具有特异性或结合CD28的抗体或抗原结合片段,如sdAb或含有VH和VL的片段(例如scFv)。在一些实施方案中,至少一个CRBR或者独立地每个CRBR是CD28的天然配体或者是其功能性结合片段。示例性CD28结合CRBR序列示出于SEQ ID NO:240中。

表2: 示例性CRBR序列			
CRBR	形式	参考	SEQ ID NO
41BB结合CRBR序列			

41BBL	天然配体	UniProt登录号P41273	191
PF-05082566	VH	US 2012/0237498 (SEQ ID NO: 43)	192
	VL	US 2012/0237498 (SEQ ID NO: 45)	193
BMS663513	VH	WO 2005/035584 (SEQ ID NO: 9)	194
	VL	WO 2005/035584 (SEQ ID NO: 6)	195
MSB7	VH	US 2017/0226215 (SEQ ID NO: 138)	196
	VL	US 2017/0226215 (SEQ ID NO: 28)	197
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 12)	198
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 13)	199
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 14)	200
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 15)	201
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 16)	202
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 17)	203
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 18)	204
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 SEQ ID NO: 19)	205
41BB抗运载蛋白	抗运载蛋白	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 20)	206
人41BBL的71-254	41BB配体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 3)	207
人41BBL的85-254	41BB配体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 4)	208
人41BBL的80-254	41BB配体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 5)	209

人41BBL的52-254	41BB配体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 6)	210
人41BBL的71-248	41BB配体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 7)	211
人41BBL的85-248	41BB配体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 8)	212
人41BBL的80-248	41BB配体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 9)	213
人41BBL的52-248	41BB配体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 10)	214
41BB sdAb	sdAb	US 2017/0198050	215
41BB sdAb	sdAb		321
OX40结合CRBR序列			
OX40配体	天然配体	UniProt登录号P23510	216
OX40配体	天然配体	US 7,959,925 (SEQ ID NO: 2)	217
人OX40L: 51-183	天然配体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 11)	218
人Ox40L: 51-183 N90D	天然配体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 12)	219
人OX40L: 52-183	天然配体	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 13)	220
1A07	VH	US 2015/0307617 (SEQ ID NO: 56)	221
	VL	US 2015/0307617 (SEQ ID NO: 59)	222
1949	VH	WO 2016/179517 (SEQ ID NO: 16)	223
	VL	WO 2016/179517	224
1D10v1	sdAb	US 9,006,399	225
GITR结合CRBR序列			
GITR配体	天然配体	UniProt编号Q9UNG2	226
36E5	VH	US 2014/0348841 (SEQ ID NO: 104)	227
	VL	US 2014/0348841 (SEQ ID NO: 105)	228

TRX-518	VH	US 2013/0183321 (SEQ ID NO: 54)	229
	VL	US 2013/0183321 (SEQ ID NO: 44)	230
5H7v2	VH	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 282)	231
	VL	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 134)	232
41G5v2	VH	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 312)	233
	VL	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 124)	234
C06v3	sdAb	US 2017/0022284 (SEQ ID NO: 59)	235
CD27结合CRBR序列			
CD70-ECD	天然配体	UniProt编号P32970; ECD示出为残基39-193	236
1F5	VH	US 2011/0274685	237
	VL	US 2011/0274685	238
CD28结合CRBR序列			
CD28 sdAb	sdAb		239
ICOS结合CRBR序列			
ICOS sdAb	sdAb		240

[0355] 在一些实施方案中,所述一个或多个CRBR直接或经由接头间接连接至所述Fc区和/或所述CD3结合区。在一些实施方案中,连接是经由接头。在一些实施方案中,所述接头是连接肽(LP),其可以包括如第II.3节所述的任何柔性或刚性接头,但是通常连接所述CRBR或区域的肽不是可切割接头。

[0356] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体包含在所述CRBR与所述Fc区之间的连接肽(LP)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体包含在所述CD3结合区与所述CRBR之间的连接肽(LP)。

[0357] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体包含多于一个CRBR。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体包含在所述第一CRBR与所述Fc区之间的第一连接肽(LP1)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体包含在所述CD3结合区与所述第二CRBR之间的第二连接肽(LP2)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体包含在所述第一CRBR与

所述Fc区之间的第一连接肽(LP1)和在所述CD3结合区与所述第二CRBR之间的第二连接肽(LP2)。在一些方面,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端具有如下结构排列:CRBR和/或抗原结合结构域-LP1-Fc区-接头-CD3结合区-LP2-CRBR和/或抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述两种连接肽彼此不相同。

[0358] 在一些实施方案中,所述LP(例如,LP1或LP2)独立地是长度为约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,LP1或LP2独立地是为或包含如SEQ ID NO:10-13、119、135、147、149或GG5所示的任何Gly-Ser接头的肽。

6. 抑制性受体结合区(IRBR)

[0359] 本公开文本的多特异性多肽构建体包含一个或多个结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)。在一些实施方案中,所提供的多特异性多肽构建体的一个或多个IRBR结合T细胞上表达的抑制性受体。在一些实施方案中,所述抑制性受体在激活的T细胞表面上上调、诱导或表达。在一些方面,所述IRBR阻断所述抑制性受体与其配体之间的相互作用,从而减少、阻遏或降低所述IRBR所结合的细胞(例如T细胞)中的抑制信号。在一些实施方案中,所述IRBR或者独立地所述IRBR中的每一个是抗体或抗原结合片段、所述共刺激受体的天然同源结合配偶体、抗运载蛋白(工程化脂质运载蛋白)、Darpin、Fynomer、Centyrin(工程化纤连蛋白III结构域)、半胱氨酸-杵结构域、阿菲林、亲和体或工程化CH3结构域。

[0360] 在一些实施方案中,所述IRBR或者独立地所述IRBR中的每一个(如所述第一IRBR和所述第二IRBR)包含抗体或其抗原结合片段的一个或多个拷贝。在一些实施方案中,所述IRBR或者独立地所述IRBR中的每一个(如所述第一IRBR和所述第二IRBR)包含选自以下的抗体或其抗原结合片段的一个或多个拷贝:Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。

[0361] 在一些实施方案中,所述IRBR或者独立地所述IRBR中的每一个(如所述第一IRBR和所述第二IRBR)是单链抗体。在一些例子中,所述单链是scFv、scAb、单结构域重链抗体或单结构域轻链抗体。

[0362] 在一些实施方案中,所述IRBR或者独立地所述IRBR中的每一个(如所述第一IRBR和所述第二IRBR)包含一个或多个单结构域抗体(sdAb)片段(例如V_HH、V_{NAR}、工程化V_H或V_K结构域)。V_HH可以从天然骆驼科动物仅重链抗体、产生仅重链抗体的经基因修饰的啮齿动物或幼稚/合成的骆驼科动物或人源化骆驼科动物单结构域抗体库产生。V_{NAR}可以由软骨鱼仅重链抗体产生。已经实施了各种方法以从常规异二聚体V_H和V_K结构域产生单体sdAb,所述方法包括特异性种系家族的界面工程化和选择。

[0363] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的IRBR或者独立地IRBR中的每一个(如所述第一IRBR和/或所述第二IRBR)含有至少一个结合抑制性受体的sdAb或scFv。在一些实施方案中,所述至少一个结合抑制性受体的scFv或sdAb位于相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体仅含有一个与抑制性受体结合的scFv或sdAb,所述scFv或sdAb可以位于相对于所述Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述CD3结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有两个与抑制性受体结合的scFv或sdAb,所述scFv或sdAb位于相对于所述Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述CD3结合区的羧基末端。

[0364] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体由两种多肽形成或包含两种多肽,所述两种多肽包含第一多肽,其包含异二聚体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结构域和与抑制性受体结合的scFv或sdAb;以及第二多肽,其包含所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头、所述抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv)的VL结构域和任选的与抑制性受体结合的另一个相同或不同的scFv或sdAb。与所述抑制性受体结合的scFv或sdAb可以位于相对于所述异二聚体Fc的Fc多肽的氨基末端和/或位于相对于所述CD3结合区的VH或VL链的羧基末端。所述多特异性多肽构建体的第一多肽和/或第二多肽中的至少一种还包含结合TAA的抗原结合结构域或其链,如第II.4节所述。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域是scFv或sdAb,并且作为所述多特异性多肽构建体的第一多肽和/或第二多肽的一部分被包含。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域是Fab,并且所述多特异性多肽构建体另外由第三多肽形成,其中至少所述第一多肽和所述第二多肽包含结合TAA的Fab的链(例如Fab的VH-CH1或VL-CL),并且所述第三多肽含有结合TAA的Fab的另一条链(例如Fab的VH-CH1或VL-CL中的另一个)。

[0365] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体由两种多肽形成或包含两种多肽,所述两种多肽包含第一多肽,其按顺序包含:对TAA具有特异性的第一抗原结合结构域、异二聚体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结构域和对TAA具有特异性的第二抗原结合结构域;以及第二多肽,其含有所述IRBR并且按顺序包含:所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头、所述抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv)的VL结构域,其中所述IRBR位于所述Fc区的氨基末端和/或位于所述CD3结合区的C末端。在一些实施方案中,所述IRBR位于在所述CD3结合区的羧基末端的第二多肽上。在一些实施方案中,所述IRBR位于在所述Fc区的氨基末端的第二多肽上。在一些实施方案中,所述IRBR位于所述Fc区的氨基末端且位于所述CD3结合区的C末端。在一些实施方案中,对TAA具有特异性的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域是相同的。在一些实施方案中,对TAA具有特异性的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域是不同的。在一些实施方案中,所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合不同的TAA。在一些实施方案中,所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合相同TAA的不同或不重叠的表位和/或竞争结合相同的TAA。

[0366] 在一些实施方案中,所述IRBR或者独立地所述IRBR中的每一个(如所述第一IRBR和所述第二IRBR)多于一条链。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的IRBR或者独立地IRBR中的每一个(如所述第一IRBR和/或所述第二IRBR)含有组装为FAB的VH和VL序列。

[0367] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体的抗原结合结构域或者独立地抗原结合结构域中的每一个(如所述第一抗原结合结构域和/或所述第二抗原结合结构域)含有结合抑制性受体的Fab抗体的VH-CH1(Fd)和VL-CL。在一些实施方案中,含有VH-CH1(Fd)和VL-CL的Fab抗体位于相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体仅含有一个与抑制性受体结合的含有VH-CH1(Fd)或VL-CL的Fab抗体,所述Fab抗体可以位于相对于所述Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述CD3结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有两个与抑制性受体结合的各自含有VH-CH1(Fd)和VL-CL的Fab抗体片段,其中一个位于相对于所述Fc区的氨基末端,并且另一个位于相对

于所述CD3结合区的羧基末端。

[0368] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体由三种或更多种多肽形成或包含三种或更多种多肽,所述三种或更多种多肽包含第一多肽,其包含异二聚体Fc区的第一Fc多肽、接头和与抑制性受体结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL;第二多肽,其包含所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头和任选的与抑制性受体结合的Fab抗体片段的相同的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL;以及第三多肽,其包含与所述抑制性受体结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个。所述多特异性多肽构建体的第一多肽、第二多肽和/或第三多肽还可以包含结合TAA的抗原结合结构域或其链,如第II.4节所述。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域是scFv或sdAb,并且作为所述多特异性多肽构建体的第一多肽和/或第二多肽的一部分被包含。在一些实施方案中,结合TAA的抗原结合结构域是Fab,并且所述多特异性多肽构建体另外由第四多肽形成,其中至少第一多肽和第二多肽包含结合TAA的Fab的链(例如Fab的VH-CH1或VL-CL),并且所述第四多肽含有结合TAA的Fab的另一条链(例如Fab的VH-CH1或VL-CL中的另一个)。

[0369] 在一些实施方案中,所述IRBR或者独立地所述IRBR中的每一个是或包含所述抑制性受体的天然(natural/native)同源结合配偶体(例如天然配体),或其展现出与所述抑制性受体的结合活性的变体。

[0370] 在一些实施方案中,所提供的多特异性多肽构建体的一个或多个IRBR结合T细胞上表达的抑制性受体。在一些实施方案中,存在多于一个与抑制性受体结合的IRBR,并且所述IRBR中的每一个(如所述第一IRBR和所述第二IRBR)结合相同的共刺激受体。在一些实施方案中,所述IRBR中的每一个(如所述第一IRBR和所述第二IRBR)结合不同的抑制性受体。在一些实施方案中,所述IRBR中的每一个(如所述第一IRBR和所述第二IRBR)结合相同抑制性受体上的不同表位。在一些实施方案中,所述IRBR中的每一个(如所述第一IRBR和所述第二IRBR)结合相同抑制性受体上的相同表位。

[0371] 在一些实施方案中,结合抑制性受体的IRBR或者独立地IRBR中的每一个导致与所述抑制性受体的单价、二价、三价或四价结合。

[0372] 在一些实施方案中,所述抑制性受体在T细胞(如受试者的原代T细胞)上表达。在一些实施方案中,所述抑制性受体在人T细胞(如人类受试者的原代人T细胞)上表达。

[0373] 在一些实施方案中,所述抑制性受体是肿瘤坏死因子(TNF)受体家族的成员。在一些实施方案中,所述抑制性受体是免疫球蛋白超家族(IgSF)的成员。

[0374] 在一些实施方案中,所述抑制性受体是程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)、具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)、T细胞激活抑制物免疫球蛋白可变区结构域(VISTA)、T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域蛋白-3(TIM3)或淋巴细胞激活基因3(LAG3)。在一些实施方案中,所述一个或多个IRBR是与抑制性受体PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、TIM3或LAG3结合的抗体或其片段。在特定实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是人源化的或者是人的。

[0375] 在一些例子中,所述共刺激受体结合区(CRBR)结合或包含以下的天然同源结合配偶体:PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA或TIM3。在一些实施方案中,所述天然同源结合配偶体选自PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、CD155、CD112或VSIG-3/IGSF11或其功能性片段。

[0376] 在一些例子中,所述IRBR含有抗体片段(如scFv),其含有结合抑制性受体(如PD-

1、CTLA-4、TIGIT、VISTA或TIM3)的抗体的可变轻(VL)链和可变重(VH)链。在一些例子中,所述IRBR含有特异性结合抑制性受体(如PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA或TIM3)的单结构域抗体或VHH结构域,参见例如PCT公开号WO 2018068695或WO 2018068201中所述。

[0377] 在一些实施方案中,所述抑制性受体是PD-1。在一些实施方案中,所述一个或多个IRBR是与PD-1结合的抗体片段。

[0378] 在一些实施方案中,所述IRBR是或含有结合PD-1的VHH结构域,其含有包含在选自SEQ ID NO:243或251-256中任一个的VHH氨基酸序列或与选自SEQ ID NO:243或251-256中任一个的VHH区氨基酸具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列中的CDR1、CDR2和CDR3,并且结合PD-1。

[0379] 在一些实施方案中,所述IRBR是或含有VHH结构域,其含有包含在SEQ ID NO:243所示的VHH结构域或与SEQ ID NO:243所示的VHH区氨基酸具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列中的CDR1、CDR2、CDR3,并且结合PD-1。在一些实施方案中,所述IRBR是或含有VHH结构域,其具有SEQ ID NO:243所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:243所示的氨基酸具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列,并且结合PD-1。在一些实施方案中,IRBR是或含有VHH结构域,其是SEQ ID NO:243所示的氨基酸序列的人源化变体。

[0380] 在一些实施方案中,结合PD-1的IRBR具有VHH结构域,其包含SEQ ID NO:268、272或273中任一个所示的CDR1、SEQ ID NO:278所示的CDR2和SEQ ID NO:283所示的CDR3。

[0381] 在一些实施方案中,结合PD-1的IRBR具有VHH结构域,其含有SEQ ID NO:272、278和283分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,结合PD-1的IRBR具有VHH结构域,其含有SEQ ID NO:268、278和283分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,结合PD-1的IRBR具有VHH结构域,其含有SEQ ID NO:273、278和283分别所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0382] 在一些方面,所述IRBR是或含有VHH结构域,其含有包含在选自SEQ ID NO:251-267中任一个的VHH氨基酸序列或与选自SEQ ID NO:251-267中任一个的V_H区氨基酸具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列中的CDR1、CDR2和CDR3,并且结合PD-1。

[0383] 在一些情况下,所述IRBR含有作为人源化变体的VHH结构域,所述人源化变体具有SEQ ID NO:251-267中任一个所示的氨基酸序列或与选自SEQ ID NO:251-267中的任一个的VHH区氨基酸具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列,并且结合PD-1。在一些实施方案中,所述IRBR是或含有VHH结构域序列,其是具有SEQ ID NO:251-267中任一个所示的氨基酸序列的人源化VHH结构域。

[0384] 在一些实施方案中,所述一个或多个IRBR直接或经由接头间接连接至所述Fc区和/或所述CD3结合区。在一些实施方案中,连接是经由接头。在一些实施方案中,所述接头是连接肽(LP),其可以包括如在如第II.3节所述的任何柔性或刚性接头,但是通常连接所述IRBR或区域的肽不是可切割接头。

[0385] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体包含在所述IRBR与所述Fc区之间的连接肽(LP)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体包含在所述CD3结合区与所述IRBR之间的连接肽(LP)。

[0386] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体包含多于一个IRBR。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体包含在所述第一IRBR与所述Fc区之间的第一连接肽(LP1)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体包含在所述CD3结合区与所述第二IRBR之间的第二连接肽(LP2)。在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体包含在所述第一IRBR与所述Fc区之间的第一连接肽(LP1)和在所述CD3结合区与所述第二CRBR之间的第二连接肽(LP2)。在一些方面,所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端具有如下结构排列:IRBR和/或抗原结合结构域-LP1-Fc区-接头-CD3结合区-LP2-IRBR和/或抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述两种连接肽彼此不相同。

[0387] 在一些实施方案中,所述LP(例如,LP1或LP2)独立地是长度为约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,LP1或LP2独立地是为或包含如SEQ ID NO:10-13、119、135、147、149或GGS所示的任何Gly-Ser接头的肽。

[0388] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体含有CRBR和IRBR两者。在一些实施方案中,所述CRBR或所述IRBR中的一种位于相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端,并且所述CRBR或所述IRBR中的另一种位于相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。在一些实施方案中,所述CRBR和所述IRBR存在于异二聚体多特异性多肽构建体的不同多肽上,其中所述多肽中的至少一种还含有至少一个对TAA具有特异性的抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述CRBR和所述IRBR存在于异二聚体多特异性多肽构建体的同一多肽(第一多肽)上,并且对TAA具有特异性的所述至少一个抗原结合结构域存在于所述异二聚体多特异性多肽构建体的另一(或第二)多肽上。

[0389] 在一些实施方案中,所述多特异性多肽构建体由两种多肽形成或包含两种多肽。在一些方面,所述第一多肽按顺序包含:对TAA具有特异性的第一抗原结合结构域、异二聚体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结构域和对TAA具有特异性的第二抗原结合结构域;并且第二多肽按顺序包含:所述IRBR或所述CRBR中的一种、所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头、所述抗CD3抗体或抗原结合片段(例如Fv)的VL结构域和所述IRBR或所述CRBR中的另一种。在一些实施方案中,所述IRBR位于在所述CD3结合区的羧基末端的第二多肽上,并且所述CRBR位于在所述Fc区的氨基末端的第二多肽上。在一些实施方案中,所述IRBR位于在所述Fc区的氨基末端的第二多肽上,并且所述CRBR位于在所述CD3结合区的羧基末端的第二多肽上。在一些实施方案中,对TAA具有特异性的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域是相同的。在一些实施方案中,对TAA具有特异性的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域是不同的。在一些实施方案中,所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合不同的TAA。在一些实施方案中,所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合相同TAA的不同或不重叠的表位和/或竞争结合相同的TAA。

[0390] 含有IRBR的多特异性多肽构建体的示例性形式示出于图18A和18B中。

III. 药物组合物

[0391] 本文提供了任何所提供的多特异性多肽构建体的组合物。应了解,根据本公开文本的治疗实体的施用将与掺入配制品中以提供改善的转移、递送、耐受性等的合适的载体、赋形剂和其他药剂一起施用。在所有药物化学家都已知的配方中可以找到许多适当的配制品:Remington's Pharmaceutical Sciences(第15版,Mack Publishing Company,宾夕法

尼亚州伊斯顿(1975)),特别是其中Blaug, Seymour的第87章。这些配制品包括例如粉末、糊剂、软膏、凝胶、蜡、油、脂质、含有脂质(阳离子或阴离子)的囊泡(如LipofectinTM)、DNA缀合物、无水吸收膏、水包油和油包水乳液、乳液卡波蜡(carbowax)(具有不同分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有卡波蜡的半固体混合物。任何前述混合物都可以适于根据本公开文本的治疗和疗法,前提条件是所述配制品中的活性成分不因配制而失活且所述配制品与施用途在生理上相容且可耐受。关于药物化学家熟知的与配制品、赋形剂和载体有关的另外的信息,还参见Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2): 210-8 (2000); Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2): 1-60 (2000); Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery - some emerging concepts." J Pharm Sci. 89(8): 967-78 (2000); Powell等人 "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52: 238-311 (1998) 以及其中的引用。

[0392] 在一些实施方案中,可以将所述多特异性多肽构建体、缀合的多特异性多肽构建体及其组合物(在本文中统称为一种或多种治疗剂及其衍生物、片段、类似物和同源物)掺入适于施用的药物组合物中。制备此类组合物所涉及的原理和考虑因素以及组分选择的指南提供于例如Remington's Pharmaceutical Sciences: The Science And Practice Of Pharmacy第19版(Alfonso R. Gennaro等人编辑) Mack Pub. Co., 宾夕法尼亚州伊斯顿: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, 宾夕法尼亚州兰霍恩, 1994; 和Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, 第4卷), 1991, M. Dekker, 纽约中。

[0393] 此类组合物通常包含所述多特异性多肽构建体或其缀合物和药学上可接受的载体。当多特异性多肽构建体包含抗体的片段时,可以使用与靶蛋白特异性结合的抗体的最小片段。例如,基于抗体的可变区序列,可以设计保留抗体结合靶蛋白序列的能力的肽分子。此类肽可以化学合成和/或通过重组DNA技术产生。(参见例如, Marasco等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993))。

[0394] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”旨在包括与药物施用相容的任何和全部溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。合适的载体描述于本领域中的标准参考文本Remington's Pharmaceutical Sciences的最新版本中,将其通过引用并入本文。此类载体或稀释剂的合适例子包括但不限于水、盐水、林格氏溶液(ringer's solution)、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性媒介物,如固定油。此类介质和药剂用于药物活性物质的用途在本领域是熟知的。除非任何常规介质或药剂与活性化合物不相容,否则设想了其在所述组合物中的用途。

[0395] 用于体内施用的配制品必须是无菌的。这可以通过无菌过滤膜过滤容易地实现。

[0396] 配制本公开文本的药物组合物以与其预期的施用途相容。施用途的例子包括肠胃外,例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如,吸入)、透皮(即,局部)、透粘膜和直肠施用。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可以包含以下组分: 无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂; 抗菌剂,如苯甲醇或对羟基

苯甲酸甲酯；抗氧化剂，如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂，如乙二胺四乙酸(EDTA)；缓冲液，如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐；以及用于调节张力的药剂，如氯化钠或右旋糖。可以用酸或碱(如盐酸或氢氧化钠)调节pH。可以将肠胃外制剂封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0397] 适于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(水溶性的)或分散液，以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内施用，合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF, 新泽西州帕西帕尼)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下，所述组合物必须是无菌的并且应当是易于注射的程度的流体。其在制造和储存条件下必须稳定并且必须抵抗微生物(如细菌和真菌)的污染作用而保存。所述载体可以是溶剂或分散介质，所述溶剂或分散介质含有例如水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。可以例如通过以下方式维持适当流动性：通过使用诸如卵磷脂等包衣，在分散液情况下通过维持所需粒径，以及通过使用表面活性剂。防止微生物的作用可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如，对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现。在许多情况下，合适的是在所述组合物中包含等渗剂，例如糖、多元醇(如甘露糖醇、山梨糖醇)、氯化钠。可以通过在所述组合物中包含延迟吸收的药剂(例如，单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的延长吸收。

[0398] 无菌可注射溶液可以通过以下方式制备：将活性化合物以所需量掺入视需要具有上文所列举成分中的一种或组合的适当溶剂中，之后过滤灭菌。通常，通过将活性化合物掺入无菌媒介物中来制备分散液，所述无菌媒介物含有碱性分散介质和来自上文所列举的那些的所需其他成分。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，所述真空干燥和冷冻干燥由先前无菌过滤的溶液产生活性成分和任何另外的所需成分的粉末。在冻干所述组合物的情况下，可以在冻干和重构之前或之后使用此方法进行灭菌。用于肠胃外施用的组合物可以以冻干形式或溶液形式储存。另外，通常将肠胃外组合物置于具有无菌入口的容器中，所述容器是例如具有可由皮下注射针刺穿的塞子的静脉输液袋或小瓶。

[0399] 在一些实施方案中，通过任何途径向受试者施用所述药物组合物，包括口服、透皮、通过吸入、静脉内、动脉内、肌内、直接应用于伤口部位、应用于外科手术部位、腹膜内、通过栓剂、皮下、皮内、经皮、通过雾化、胸膜内、心室内、关节内、眼内或脊柱内。

[0400] 口服组合物通常包含惰性稀释剂或可食用的载体。可以将它们封装于明胶胶囊中或压成片剂。出于口服治疗性施用的目的，可以将活性化合物与赋形剂一起掺入，并且以片剂、锭剂或胶囊的形式使用。口服组合物也可以使用流体载体来制备以用作漱口剂，其中所述流体载体中的化合物经口应用并漱口，并且被吐出或被吞下。可以包含药学上相容的结合剂和/或佐剂材料作为所述组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可以含有以下成分或具有类似性质的化合物中的任一种：粘合剂，如微晶纤维素、黄芪胶或明胶；赋形剂，如淀粉或乳糖；崩解剂，如海藻酸、Primogel或玉米淀粉；润滑剂，如硬脂酸镁或Sterotes；助流剂，如胶体二氧化硅；甜味剂，如蔗糖或糖精；或调味剂，如薄荷、水杨酸甲酯或橙味剂。

[0401] 对于通过吸入施用，从加压容器或分配器(其含有合适的推进剂，例如气体(如二氧化碳))或者喷雾器以气溶胶喷雾剂形式递送所述多特异性多肽构建体。

[0402] 全身性施用也可以通过经粘膜或透皮方式进行。对于经粘膜或透皮施用，在所述

配制品中使用适于待渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂在本领域通常是已知的,并且例如就经粘膜施用而言,包括洗涤剂、胆盐和梭链孢酸衍生物。经粘膜施用可以通过使用鼻喷雾剂或栓剂来完成。对于经皮施用,将活性化合物配制成如本领域通常已知的软膏、药膏、凝胶或乳膏。

[0403] 也可以将化合物制备为呈栓剂(例如,与常规栓剂基质如可可脂和其他甘油酯一起)或保留灌肠剂的形式以供直肠递送。

[0404] 在一个实施方案中,所述治疗剂是用保护化合物免于从身体迅速消除的载体制备的,如持续/控制释放配制品,包括植入物和微囊化递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。此类配制品的制备方法对本领域技术人员而言将是清楚的。

[0405] 例如,所述治疗剂可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合反应制备的微胶囊(例如,分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊以及聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中,包埋在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)中,或者包埋在粗乳液中。

[0406] 在一些实施方案中,所述药物组合物包含药学上可接受的赋形剂,例如填充剂、粘合剂、包衣、防腐剂、润滑剂、调味剂、甜味剂、着色剂、溶剂、缓冲剂、螯合剂或稳定剂。药学上可接受的填充剂的例子包括纤维素、磷酸氢钙、碳酸钙、微晶纤维素、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露糖醇、山梨糖醇、麦芽酚、预胶化淀粉、玉米淀粉或马铃薯淀粉。药学上可接受的粘合剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、淀粉、乳糖、木糖醇、山梨糖醇、麦芽糖醇、明胶、蔗糖、聚乙二醇、甲基纤维素或纤维素。药学上可接受的包衣的例子包括羟丙基甲基纤维素(HPMC)、虫胶、玉米蛋白玉米醇溶蛋白或明胶。药学上可接受的崩解剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素或羟基乙酸淀粉钠。药学上可接受的润滑剂的例子包括聚乙二醇、硬脂酸镁或硬脂酸。药学上可接受的防腐剂的例子包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸或山梨酸。药学上可接受的甜味剂的例子包括蔗糖、糖精、阿斯巴甜或山梨糖醇。药学上可接受的缓冲剂的例子包括碳酸盐、柠檬酸盐、葡糖酸盐、乙酸盐、磷酸盐或酒石酸盐。

[0407] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,所述基质呈成型制品(例如,薄膜或微胶囊)的形式。在一些实施方案中,所述药物组合物还包含用于控制或持续释放产物的药剂,如可注射的微球、生物可侵蚀的颗粒、聚合化合物(聚乳酸、聚乙醇酸)、珠粒或脂质体。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙基乙酸酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物(如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球)) and 聚D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙基乙酸酯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够释放分子超过100天,但某些水凝胶释放蛋白质持续较短时间段。

[0408] 所述材料也可以从Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals, Inc.商购获得。脂质体悬浮液(包括用针对病毒抗原的单克隆抗体靶向感染细胞的脂质体)也可以用作药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法(例如,如美国专利号4,522,811中所述)来制备。

[0409] 尤其有利的是以剂量单位形式配制口服或肠胃外组合物,以便于施用和剂量的均匀。如本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位含有经计算与所需的药物载体联合产生所需治疗效果的预定量的活性化合物。本公开文本的剂量单位形式的规格取决于且直接依赖于活性化合物的独特特征和所要实现的特定治疗效果以及在复合这种活性化合物用于治疗个体的领域中固有的限制。

[0410] 进一步提供了包含本文所述的药物组合物(或制品)的试剂盒。所述药物组合物可以与施用说明书一起包含在容器、包装或分配器中。本文所述的试剂盒还可以包含商业和用户角度所需的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射器以及具有针对执行本文所述任何方法的说明书的包装插页。

[0411] 所述配制品还可以含有所治疗的特定适应症所必需的多于一种多特异性多肽构建体,例如具有互补活性且彼此没有不利影响的那些。在一些实施方案中,或另外,所述组合物可以包含增强其功能的药剂,例如像细胞毒性剂、细胞因子、化学治疗剂或生长抑制剂。此类分子适合地以对预期目的有效的量组合存在。

[0412] 在一些实施方案中,所述药物组合物的剂量是单剂量或重复剂量。在一些实施方案中,向受试者给予所述剂量为每天一次、每天两次、每天三次或者每天四次或更多次。在一些实施方案中,在一周内给予约1或更多(如约2或更多、约3或更多、约4或更多、约5或更多、约6或更多或者约7或更多)个剂量。在一些实施方案中,在数天、数周、数月或数年的过程中给予多个剂量。在一些实施方案中,治疗过程是约1或更多个剂量(如约2或更多个剂量、约3或更多个剂量、约4或更多个剂量、约5或更多个剂量、约7或更多个剂量、约10或更多个剂量、约15或更多个剂量、约25或更多个剂量、约40或更多个剂量、约50或更多个剂量或者约100或更多个剂量)。

[0413] 在一些实施方案中,向受试者施用所述药物组合物。通常,根据标准药学实践,根据受试者的体型和状况确定所述药物组合物的剂量和施用途径。例如,最初可以在细胞培养测定中或在动物模型(如小鼠、大鼠、兔、狗、猪或猴)中估算治疗有效剂量。动物模型还可以用于确定适当的浓度范围和施用途径。此类信息然后可以用于确定在人的可用剂量和施用途径。确切剂量将根据与需要治疗的受试者相关的因素来确定。调整剂量和施用以提供足够水平的活性化合物或以维持所需效果。可以考虑的因素包括疾病状态的严重程度、受试者的一般健康状况、受试者的年龄、体重和性别、施用的时间和频率、一种或多种药物组合、反应敏感性以及对疗法的反应。医学领域技术人员可以通过监测患者的疾病体征并相应地调整治疗容易地确定用于特定患者的最佳剂量和治疗方案。

IV. 使用方法和治疗性施用

[0414] 还提供了使用所述多特异性多肽构建体的方法及其用途。此类方法和用途包括治疗性方法和用途,例如涉及向患有疾病、病症或障碍(如肿瘤或癌症)的受试者施用所述分子或含有所述分子的组合物。在一些实施方案中,以实现所述疾病或障碍的治疗的有效量施用所述分子和/或所述组合物。用途包括所述多特异性多肽构建体在此类方法和治疗中以及在制备药物以实施此类治疗性方法中的用途。在一些实施方案中,通过向患有或怀疑患有所述疾病或病症的受试者施用所述多特异性多肽构建体或包含所述多特异性多肽构建体的组合物来进行所述方法。在一些实施方案中,所述方法由此治疗所述受试者的疾病或病症或障碍。

[0415] 在一个实施方案中,本公开文本的多特异性多肽构建体可以用作治疗剂。此类药剂通常将用于诊断、预后、监测、治疗、缓和和/或预防受试者的疾病或病状。通过使用标准方法鉴定患有(或有风险患)障碍的受试者(例如,人类患者或其他哺乳动物)来进行治疗方案。向所述受试者施用多特异性多肽构建体。向所述受试者施用多特异性多肽构建体,并且通常会由于其与一种或多种靶标的结合而具有作用。

[0416] 在一些实施方案中,本文提供了通过施用治疗有效量的任何所提供的多特异性缀合物或药物组合物来调节受试者的免疫应答的方法。在一些实施方案中,调节免疫应答的方法增加或增强受试者的免疫应答。例如,增加或增强的应答可以是细胞介导的免疫性的增加。在一些例子中,所述方法增加T细胞活性,如细胞溶解性T细胞(CTL)活性。在一些实施方案中,调节的(例如,增加的)免疫应答是针对肿瘤或癌症的。

[0417] 所述多特异性多肽构建体的施用可以经由通过所述多特异性多肽构建体的Fc区对Fc γ R的接合来激活先天免疫细胞。所述多特异性多肽构建体的施用可以激动、刺激、激活和/或增大先天免疫细胞效应子功能,包括ADCC、细胞因子释放、脱粒和/或ADCP。一旦连接所述第一组分和所述第二组分的一个或多个接头被蛋白酶切割,从而允许抗CD3结合部分结合T细胞上的CD3 ϵ ,则所述多特异性多肽构建体的施用可以激活T细胞。所述多特异性多肽构建体的施用可以激动、刺激、激活和/或增大CD3介导的T细胞激活、细胞毒性、细胞因子释放和/或增殖。

[0418] 在一些实施方案中,所提供的方法用于通过施用治疗有效量的任何所提供的多特异性缀合物或药物组合物来治疗受试者的疾病或病症。在一些实施方案中,所述疾病或病症是肿瘤或癌症。通常,缓和或治疗疾病或障碍涉及减轻与所述疾病或障碍相关的一种或多种症状或医学问题。例如,在癌症的情况下,所述药物的治疗有效量可以实现以下中的一种或组合:减少癌细胞的数量;减少肿瘤大小;抑制(即,在一定程度上减少和/或停止)癌细胞向外周器官中的浸润;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种或多种症状。在一些实施方案中,本公开文本的组合物可以用于预防受试者(例如,人或其他哺乳动物,如非人灵长类动物、伴侣动物(例如,猫、狗、马)、农场动物、工作动物或动物园动物)的疾病或障碍的发作或复发。术语受试者和患者在本文中可互换使用。

[0419] 在一些实施方案中,所述药物组合物可以用于抑制哺乳动物癌细胞(如人癌细胞)的生长。治疗癌症的方法可以包括向患有癌症的受试者施用有效量的本文所述的任何药物组合物。可以施用有效量的药物组合物以抑制、中止或逆转癌症的进展。可以在体内或离体治疗人癌细胞。在人类患者的离体治疗中,含有癌细胞的组织或流体是在体外治疗的,然后将所述组织或流体再引回所述患者体内。在一些实施方案中,通过向患者施用所述治疗性组合物来体内治疗所述人类患者的癌症。

[0420] 疾病的非限制性例子包括:所有类型的癌症(乳腺癌、肺癌、结直肠癌、前列腺癌、黑色素瘤、头颈癌、胰腺癌等)、类风湿性关节炎、克罗恩病、SLE、心血管损伤、缺血等。例如,适应症将包括白血病(包括T细胞急性淋巴母细胞性白血病(T-ALL))、淋巴母细胞疾病(包括多发性骨髓瘤)和实体瘤(包括肺癌、结直肠癌、前列腺癌、胰腺癌和乳腺癌(包括三阴性乳腺癌))。例如,适应症包括骨病或癌症转移,不管原发性肿瘤起源;乳腺癌,作为非限制性例子,包括ER/PR+乳腺癌、Her2+乳腺癌、三阴性乳腺癌;结直肠癌;子宫内膜癌;胃癌;胶质

母细胞瘤；头颈癌，如食道癌；肺癌，作为非限制性例子，如非小细胞肺癌；多发性骨髓瘤卵巢癌；胰腺癌；前列腺癌；肉瘤，如骨肉瘤；肾癌，作为非限制性例子，如肾细胞癌；和/或皮肤癌，作为非限制性例子，如鳞状细胞癌、基底细胞癌或黑色素瘤。在一些实施方案中，所述癌症是鳞状细胞癌。在一些实施方案中，所述癌症是皮肤鳞状细胞癌。在一些实施方案中，所述癌症是食管鳞状细胞癌。在一些实施方案中，所述癌症是头颈鳞状细胞癌。在一些实施方案中，所述癌症是肺鳞状细胞癌。

[0421] 本公开文本的多特异性多肽构建体的治疗有效量通常涉及实现治疗目的所需的量。如上所述，这可能是所述多特异性多肽构建体与其一种或多种靶抗原之间的结合相互作用，在某些情况下，其激动、刺激、激活和/或增大Fc γ R介导的先天免疫细胞激活或CD3介导的T细胞激活。所需的施用量将此外取决于所述多特异性多肽构建体对其一种或多种特异性抗原的结合亲和力，并且还将取决于所施用的多特异性多肽构建体从其所施用的其他受试者的自由体积耗尽的速率。作为非限制性例子，多特异性多肽构建体的治疗有效剂量的常见范围可以是约0.01 μ g/kg体重至约10mg/kg体重。在一些实施方案中，作为非限制性例子，本公开文本的多特异性多肽构建体的治疗有效剂量可以是约0.01mg/kg体重至约5-10mg/kg体重。常见的给药频率可以例如在每日两次至每周一次的范围内。

[0422] 结合任何已知的用于诊断或治疗特定障碍的方法来确定治疗的有效性。筛选具有所需特异性的多特异性多肽构建体的方法包括但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)和本领域内已知的其他免疫介导的技术。已知多种手段用于确定施用所提供的多特异性多肽构建体是否通过以下方式充分调节免疫活性：消除、隔离或灭活介导或能够介导不希望的免疫应答的免疫细胞；诱导、产生或开启介导或能够介导保护性免疫应答的免疫细胞；改变免疫细胞的物理或功能特性；或这些效应的组合。免疫活性调节的测量的例子包括但不限于检查免疫细胞群的存在或不存在(使用流式细胞术、免疫组织化学、组织学、电子显微术、聚合酶链式反应(PCR))；测量免疫细胞的功能能力，包括响应于信号进行增殖或分裂的能力或抵抗响应于信号的增殖或分裂(如用抗CD3抗体、抗T细胞受体抗体、抗CD28抗体、钙离子载体、载有肽或蛋白质抗原的PMA(佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯)抗原呈递细胞刺激后，使用基于³H-胸苷掺入的T细胞增殖测定和肽扫描分析；B细胞增殖测定)；测量杀死或裂解其他细胞的能力(如细胞毒性T细胞测定)；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，通过流式细胞术、酶联免疫吸附测定、蛋白质印迹分析、蛋白质微阵列分析、免疫沉淀分析)；测量免疫细胞或免疫细胞内信号传导途径的激活的生化标记物(例如，蛋白质印迹和免疫沉淀分析酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸磷酸化、多肽切割以及蛋白质复合物的形成或解离；蛋白质阵列分析；DNA转录、使用DNA阵列或消减杂交的分析)；通过凋亡、坏死或其他机制测量细胞死亡(例如，膜联蛋白V染色、TUNEL测定、用于测量DNA梯度的凝胶电泳、组织学；荧光半胱天冬酶测定、半胱天冬酶底物的蛋白质印迹分析)；测量由免疫细胞产生的基因、蛋白质和其他分子(例如，RNA印迹分析、聚合酶链式反应、DNA微阵列、蛋白质微阵列、2维凝胶电泳、蛋白质印迹分析、酶联免疫吸附测定、流式细胞术)；以及测量临床症状或结果，如自身免疫性疾病、神经退行性疾病和其他涉及自身蛋白质或自身多肽的疾病的改善(临床评分、使用其他疗法的要求、功能状态、影像学研究)，例如通过测量复发率或疾病严重程度。

[0423] 所述多特异性多肽构建体也可用于多种诊断性和预防性配制品中。在一个实施方

案中,向有患前述障碍中的一种或多种的风险的患者施用多特异性多肽构建体。可以使用基因型、血清学或生化标记物确定患者或器官对一种或多种障碍的易患性。

[0424] 在本公开文本的另一个实施方案中,向被诊断为患有与前述障碍中的一种或多种相关的临床适应症的人类个体施用多特异性多肽构建体。在诊断后,施用多特异性多肽构建体以减轻或逆转所述临床适应症的影响。

组合疗法

[0425] 在一些实施方案中,将所述多特异性多肽构建体、缀合的多特异性多肽构建体及其组合物(在本文中统称为一种或多种治疗剂)与一种或多种另外的药剂或另外的药剂的组合联合施用。合适的另外的药剂包括用于预期应用的当前药物和/或手术疗法。例如,所述一种或多种治疗剂可以与另外的化学治疗剂或抗癌剂联合使用。例如,将所述一种或多种治疗剂和另外的药剂配制成单一治疗性组合物,并且同时施用所述一种或多种治疗剂和另外的药剂。在一些实施方案中,所述一种或多种治疗剂和另外的药剂彼此分开,例如各自配制成单独的治疗性组合物,并且同时施用所述一种或多种治疗剂和所述另外的药剂,或者在治疗方案期间的不同时间施用所述一种或多种治疗剂和所述另外的药剂。例如,在施用所述另外的药剂之前施用所述一种或多种治疗剂,在施用所述另外的药剂之后施用所述一种或多种治疗剂,或者以交替的方式施用所述一种或多种治疗剂和所述另外的药剂。如本文所述,将所述一种或多种治疗剂和所述另外的药剂以单剂量或多剂量施用。在一些实施方案中,所述另外的药剂被偶联或以其他方式附接至所述一种或多种治疗剂。根据预期应用的目的(即,杀伤、防止细胞增殖、激素疗法或基因疗法)选择合适的另外的药剂。此类药剂可以包括但不限于例如药用剂、毒素、毒素片段、烷化剂、酶、抗生素、抗代谢物、抗增殖剂、激素、神经递质、DNA、RNA、siRNA、寡核苷酸、反义RNA、适配体、诊断剂、不透射线的染料、放射性同位素、荧光化合物、磁性标记、纳米颗粒、标记化合物、凝集素、改变细胞膜通透性的化合物、光化学化合物、小分子、脂质体、胶束、基因疗法载体、病毒载体等。最后,可以使用药剂的组合或不同种类的药剂的组合。

[0426] 在一个实施方案中,将所述多特异性多肽构建体以组合疗法施用,即与可用于治疗病理病症或障碍(如自身免疫性障碍和炎症性疾病)的其他药剂(例如,治疗剂)组合施用。在本上下文中,术语“组合”意指基本上同步地(同时或顺序地)给予药剂。如果顺序给予,则在开始施用第二化合物时,两种化合物中的第一种仍然可在治疗部位被以有效浓度检测到。

[0427] 例如,所述组合疗法可以包括与一种或多种另外的治疗剂(例如,一种或多种细胞因子和生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎剂、代谢抑制剂、酶抑制剂和/或细胞毒性剂或细胞抑制剂,如下文更详细描述)共同配制和/或共同施用的一种或多种本公开文本的多特异性多肽构建体。此外,本文所述的一种或多种多特异性多肽构建体可以与本文所述的治疗剂中的两种或更多种组合使用。此类组合疗法可以有利地利用较低剂量的所施用的治疗剂,从而避免了与各种单一疗法相关的可能的毒性或并发症。

[0428] 在其他实施方案中,可以将本公开文本的一种或多种多特异性多肽构建体与一种或多种抗炎药、免疫抑制剂或代谢抑制剂或酶抑制剂共同配制和/或共同施用。可以与本文所述的抗体组合使用的药物或抑制剂的非限制性例子包括但不限于以下中的一种或多种:一种或多种非甾体抗炎药(NSAID),例如布洛芬、替尼达普、萘普生、美洛昔康、吡罗昔康、双

氯芬酸和吲哚美辛；柳氮磺胺吡啶；皮质类固醇，如泼尼松龙；一种或多种细胞因子抑制性抗炎药 (CSAID)；核苷酸生物合成的抑制剂，例如嘌呤生物合成的抑制剂、叶酸拮抗剂 (例如，甲氨蝶呤 (N-[4-[[(2,4-二氨基-6-蝶啶基) 甲基] 甲基氨基] 苯甲酰基]-L-谷氨酸))；以及嘧啶生物合成的抑制剂，例如二氢乳清酸脱氢酶 (DHODH) 抑制剂。与本公开文本的抗体组合使用的合适治疗剂包括NSAID、CSAID、(DHODH) 抑制剂 (例如，来氟米特) 和叶酸拮抗剂 (例如，甲氨蝶呤)。

[0429] 另外的抑制剂的例子包括以下中的一种或多种：皮质类固醇 (口服、吸入和局部注射)；免疫抑制剂，例如环孢菌素、他克莫司 (FK-506)；和mTOR抑制剂，例如西罗莫司 (雷帕霉素-RAPAMUNE™或雷帕霉素衍生物，例如可溶性雷帕霉素衍生物 (例如，酯雷帕霉素衍生物，例如CCI-779)；通过促炎性细胞因子 (如TNF α 或IL-1) 干扰信号传导的药剂 (例如IRAK、NIK、IKK、p38或MAP激酶抑制剂)；COX2抑制剂，例如塞来昔布、罗非昔布及其变体；磷酸二酯酶抑制剂，例如R973401 (IV型磷酸二酯酶抑制剂)；磷脂酶抑制剂，例如胞质磷脂酶2 (cPLA2) 的抑制剂 (例如，三氟甲基酮类似物)；血管内皮细胞生长因子或生长因子受体的抑制剂，例如VEGF抑制剂和/或VEGF-R抑制剂；以及血管生成抑制剂。与本公开文本的抗体组合使用的合适治疗剂是免疫抑制剂，例如环孢菌素、他克莫司 (FK-506)；mTOR抑制剂，例如西罗莫司 (雷帕霉素) 或雷帕霉素衍生物，例如可溶性雷帕霉素衍生物 (例如，酯雷帕霉素衍生物，例如CCI-779)；COX2抑制剂，例如塞来昔布及其变体；以及磷脂酶抑制剂，例如胞质磷脂酶2 (cPLA2) 的抑制剂，例如三氟甲基酮类似物。可以与多特异性多肽构建体组合的治疗剂的另外的例子包括以下中的一种或多种：6-巯基嘌呤 (6-MP)；硫唑嘌呤柳氮磺胺吡啶；美沙拉嗪；奥沙拉嗪；氯喹/羟氯喹 (PLAQUENIL®)；青霉胺；金硫苹果酸盐 (肌内和口服)；硫唑嘌呤；秋水仙碱； β -2肾上腺素受体激动剂 (沙丁胺醇、特布他林、沙美特罗)；黄嘌呤 (茶碱、氨茶碱)；色甘酸盐；奈多罗米；酮替芬；异丙托溴铵和氧托品；霉酚酸酯；腺苷激动剂；抗血栓剂；补体抑制剂；以及肾上腺素能剂。

V. 示例性实施方案

[0430] 所提供的实施方案包括：

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

所述第一组分和所述第二组分通过接头偶联，其中所述Fc区位于所述CD3结合区的N末端；

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域；并且

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR)。

2. 一种多特异性多肽构建体，所述多特异性多肽构建体包含含有免疫球蛋白Fc区的第一组分和含有CD3结合区的第二组分，其中：

所述第一组分和所述第二组分通过接头偶联，其中所述Fc区位于所述CD3结合区的N末端；

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域；并且

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合抑制性受体的抑制性受体结合区 (IRBR)。

3. 一种多特异性多肽构建体, 所述多特异性多肽构建体包含含有免疫球蛋白Fc区的第一组分和含有CD3结合区的第二组分, 其中:

所述第一组分和所述第二组分通过接头偶联, 其中所述Fc区位于所述CD3结合区的N末端;

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域;

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR); 并且

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合抑制性受体的抑制性受体结合区 (IRBR)。

4. 根据实施方案1-3中任一项所述的多特异性多肽构建体, 其中所述CD3结合区结合CD3 (CD3 ϵ)。

5. 根据实施方案1-4中任一项所述的多特异性多肽构建体, 其中所述至少一个抗原结合结构域位于相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。

6. 根据实施方案1和3-5中任一项所述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) 位于相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。

7. 根据实施方案2-5中任一项所述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) 位于相对于所述多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。

8. 根据实施方案1-7中任一项所述的多特异性多肽构建体, 其中所述第一组分包含第一抗原结合结构域, 并且所述第二组分包含第二抗原结合结构域, 其中所述抗原结合结构域中的每一个结合肿瘤相关抗原 (TAA)。

9. 根据实施方案8所述的多特异性多肽构建体, 其中所述第一抗原结合结构域位于相对于所述多特异性构建体的Fc区的氨基末端, 并且所述第二抗原结合结构域位于相对于所述多特异性构建体的CD3结合区的羧基末端。

10. 根据实施方案8或实施方案9所述的多特异性多肽构建体, 其中所述第一组分或所述第二组分还包含所述共刺激受体结合区 (CRBR)。

11. 根据实施方案8或实施方案9所述的多特异性多肽构建体, 其中所述第一组分或所述第二组分还包含所述抑制性受体结合区 (IRBR)。

12. 一种多特异性多肽构建体, 其中所述多特异性构建体从N末端到C末端按顺序包含:

结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR) 和/或结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域;

免疫球蛋白Fc区;

接头;

结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区;以及
结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR) 和/或与肿瘤相关抗原 (TAA) 结合的
抗原结合结构域;

其中所述多特异性多肽构建体包含至少一个CRBR和至少一个抗原结合结构域。

13. 根据实施方案12所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体
仅包含一个共刺激受体结合区 (CRBR)。

14. 一种多特异性多肽构建体,其中所述多特异性构建体从N末端到C末端按顺序
包含:

结合抑制性受体的抑制性受体结合区 (IRBR) 和/或结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗
原结合结构域;

免疫球蛋白Fc区;

接头;

结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区;以及

结合抑制性受体的抑制性受体结合区 (IRBR) 和/或与肿瘤相关抗原 (TAA) 结合的
抗原结合结构域;

其中所述多特异性多肽构建体包含至少一个IRBR和至少一个抗原结合结构域。

15. 根据实施方案14所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体
仅包含一个抑制性受体结合区 (IRBR)。

16. 一种多特异性多肽构建体,其中所述多特异性构建体从N末端到C末端按顺序
包含:

结合抑制性受体的抑制性受体结合区 (IRBR) 或结合共刺激受体的共刺激受体结
合区 (CRBR) 中的一种和/或结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域;

免疫球蛋白Fc区;

接头;

结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区;以及

所述IRBR或所述CRBR中的另一种和/或与肿瘤相关抗原 (TAA) 结合的抗原结合结
构域;

其中所述多特异性多肽构建体包含至少一个IRBR、至少一个CRBR和至少一个抗原
结合结构域。

17. 根据实施方案12-16中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性
多肽构建体包含两个与TAA结合的抗原结合结构域。

18. 根据实施方案17所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗原结合结构域与相
同的肿瘤相关抗原 (TAA) 结合。

19. 根据实施方案17或实施方案18所述的多特异性多肽构建体,其中一个抗原结
合结构域位于相对于所述Fc区的氨基末端,并且一个抗原结合结构域位于相对于所述CD3
结合区的羧基末端。

20. 一种多特异性多肽构建体,其中所述多特异性构建体从N末端到C末端按顺序
包含:

免疫球蛋白Fc区;

接头；
结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区；以及
结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域和结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR)。

21. 一种多特异性多肽构建体，其中所述多特异性构建体从N末端到C末端按顺序包含：

结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域和结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR)；

免疫球蛋白Fc区；

接头；以及

结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区。

22. 一种多特异性多肽构建体，其中所述多特异性构建体从N末端到C末端按顺序包含：

免疫球蛋白Fc区；

接头；

结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区；以及

结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域和结合抑制性受体的抑制性受体结合区 (IRBR)。

23. 一种多特异性多肽构建体，其中所述多特异性构建体从N末端到C末端按顺序包含：

结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域和结合抑制性受体的抑制性受体结合区 (IRBR)；

免疫球蛋白Fc区；

接头；以及

结合CD3 (CD3 ϵ) 的CD3结合区。

24. 根据实施方案1-23中任一项所述的多特异性多肽构建体，其中所述Fc区是同二聚体Fc区。

25. 根据实施方案1-24中任一项所述的多特异性多肽构建体，其中所述Fc区是人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4的Fc区，或者是其免疫活性片段。

26. 根据实施方案1-25中任一项所述的多特异性多肽构建体，其中所述Fc区包含含有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列的多肽。

27. 根据实施方案1-25中任一项所述的多特异性多肽构建体，其中所述Fc区包含含有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列的多肽；

所述Fc区包含含有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列的多肽；或者

所述Fc区包含含有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5具有至少

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列的多肽。

28. 根据实施方案1-19、25-27中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区是异二聚体Fc区。

29. 根据实施方案28所述的多特异性多肽构建体,其中与同二聚体Fc区的多肽相比,任选地与SEQ ID NO:1所示的Fc多肽或其免疫活性片段相比,所述异二聚体Fc区的一种或两种Fc多肽包含至少一个修饰以诱导异二聚化。

30. 根据实施方案29所述的多特异性多肽构建体,其中所述异二聚体Fc的Fc多肽中的每一种独立地包含至少一个氨基酸修饰。

31. 根据实施方案30所述的多特异性多肽构建体,其中所述异二聚体Fc的Fc多肽中的每一种包含杆臼结构修饰或包含电荷突变以增加所述多肽的静电互补性。

32. 根据实施方案31所述的多特异性多肽构建体,其中所述氨基酸修饰是杆臼结构修饰。

33. 根据实施方案28-32中任一项所述的多特异性多肽,其中所述异二聚体Fc的第一Fc多肽包含选自Thr366Ser、Leu368Ala、Tyr407Val及其组合的修饰,并且所述异二聚体Fc的第二Fc多肽包含修饰Thr366Trp。

34. 根据实施方案33所述的多特异性多肽,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽还包含非半胱氨酸残基至半胱氨酸残基的修饰,其中所述第一多肽的修饰是在位置Ser354和Tyr349中的一个处,并且所述第二Fc多肽的修饰是在位置Ser354和Tyr349中的另一个处。

35. 根据实施方案31所述的多特异性多肽构建体,其中所述氨基酸修饰是电荷突变以增加所述多肽的静电互补性。

36. 根据实施方案28-31和35中任一项所述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多肽或者所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽中的每一种包含互补位置的修饰,其中所述修饰是用具有与另一多肽的互补氨基酸相反电荷的氨基酸替代。

37. 根据实施方案29-36中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述异二聚体Fc的第一Fc多肽或第二Fc多肽中的一种还包含在残基Ile253处的修饰。

38. 根据实施方案37所述的多特异性多肽构建体,其中所述修饰是Ile253Arg。

39. 根据实施方案29-38中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述异二聚体Fc的第一Fc多肽或第二Fc多肽中的一种还包含在残基His435处的修饰。

40. 根据实施方案39所述的多特异性多肽构建体,其中所述修饰是His435Arg。

41. 根据实施方案1-40中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区包含缺乏Lys447的多肽。

42. 根据实施方案1-41中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区包含含有至少一个修饰以增强FcRn结合的多肽。

43. 根据实施方案42所述的多特异性多肽构建体,其中所述修饰是在选自以下的位置处:Met252、Ser254、Thr256、Met428、Asn434及其组合。

44. 根据实施方案43所述的多特异性多肽构建体,其中所述修饰是在选自以下的位置处:Met252Y、Ser254T、Thr256E、Met428L、Met428V、Asn434S及其组合。

45. 根据实施方案43所述的多特异性多肽构建体,其中所述修饰是在位置Met252处和位置Met428处。

46. 根据实施方案45所述的多特异性多肽构建体,其中所述修饰是Met252Y和Met428L。

47. 根据实施方案45所述的多特异性多肽构建体,其中所述修饰是Met252Y和Met428V。

48. 根据实施方案28-47中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述异二聚体Fc的第一多肽包含SEQ ID NO:82、86、94或96中任一个所示的氨基酸序列,并且所述异二聚体Fc的第二多肽包含SEQ ID NO:83、87、90、92、98或100中任一个所示的氨基酸序列。

49. 根据实施方案1-48中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区包含含有至少一个氨基酸修饰的多肽,所述至少一个氨基酸修饰降低效应子功能和/或降低与选自Fc γ 受体或C1q的效应分子的结合。

50. 根据实施方案49所述的多特异性多肽构建体,其中所述一个或多个氨基酸修饰是Glu233、Leu234或Leu235中的一个或多个的缺失。

51. 根据实施方案28-48、49和50中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述异二聚体Fc的第一多肽包含SEQ ID NO:84、88、95或97中任一个所示的氨基酸序列,并且所述异二聚体Fc的第二多肽包含SEQ ID NO:85、89、91、93、99或101中任一个所示的氨基酸序列。

52. 根据实施方案1-48中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区包含含有至少一个修饰以增强Fc γ R结合的多肽。

53. 根据实施方案52所述的多特异性多肽构建体,其中所述修饰是在Ser239或Ile332处的修饰。

54. 根据实施方案1-48和52中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中与未经修饰的Fc区相比,所述Fc区的糖基化被修饰以增强Fc γ R结合。

55. 根据实施方案54所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc区缺乏岩藻糖含量或具有降低的岩藻糖含量。

56. 根据实施方案1-55中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述CD3结合区是抗CD3抗体或抗原结合片段。

57. 根据实施方案56所述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可变重链区(VH)和可变轻链区(VL)。

58. 根据实施方案1-57中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述CD3结合区是单价的。

59. 根据实施方案1-58中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述CD3结合区是包含可变重链区(VH)和可变轻链区(VL)的可变片段(Fv)。

60. 根据实施方案56-58中任一项所述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是单链抗体,任选地不是单链可变片段(scFv)。

61. 根据实施方案57-60中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fc是异二聚体Fc,并且构成所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH和VL连接至所述异二聚体Fc的相对多肽。

62. 根据实施方案1-61中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述CD3结合区不能或基本上不能结合或接合CD3,除非所述抗原结合结构域中的至少一个与其TAA结合。

63. 根据实施方案1-62中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述CD3结合区不能或基本上不能结合或接合CD3,除非所述抗原结合结构域中的至少两个与其TAA结合。

64. 根据实施方案1-63中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是多肽接头。

65. 根据实施方案64所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是长度为最多25个氨基酸的多肽。

66. 根据实施方案64或实施方案65所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是从或从约2至24个氨基酸、2至20个氨基酸、2至18个氨基酸、2至14个氨基酸、2至12个氨基酸、2至10个氨基酸、2至8个氨基酸、2至6个氨基酸、6至24个氨基酸、6至20个氨基酸、6至18个氨基酸、6至14个氨基酸、6至12个氨基酸、6至10个氨基酸、6至8个氨基酸、8至24个氨基酸、8至20个氨基酸、8至18个氨基酸、8至14个氨基酸、8至12个氨基酸、8至10个氨基酸、10至24个氨基酸、10至20个氨基酸、10至18个氨基酸、10至14个氨基酸、10至12个氨基酸、12至24个氨基酸、12至20个氨基酸、12至18个氨基酸、12至14个氨基酸、14至24个氨基酸、14至20个氨基酸、14至18个氨基酸、18至24个氨基酸、18至20个氨基酸或20至24个氨基酸的多肽。

67. 根据实施方案64-66中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是长度为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸的多肽。

68. 根据实施方案64-67中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是长度为3至18个氨基酸的多肽。

69. 根据实施方案64-67中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是长度为12至18个氨基酸的多肽。

70. 根据实施方案64-67中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是长度为15至18个氨基酸的多肽。

71. 根据实施方案1-70中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是不可切割接头。

72. 根据实施方案71所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头不含有由蛋白酶特异性识别以切割的底物识别位点。

73. 根据实施方案71或实施方案72所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含GS、GGS、GGGS (SEQ ID NO:149)、GGGG (SEQ ID NO:135) 及其组合。

74. 根据实施方案71-73中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含(GGS)_n,其中n是1至10。

75. 根据实施方案71-74中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含(GGGG)_n (SEQ ID NO:173),其中n是1至10。

76. 根据实施方案71-75中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含(GGGGG)_n (SEQ ID NO:172),其中n是1至4。

77. 根据实施方案71-76中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含GGS。

78. 根据实施方案71-76中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割

接头包含GGGGG (SEQ ID NO:149)。

79. 根据实施方案71-76中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含GGGGG (SEQ ID NO:135)。

80. 根据实施方案71-76中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含(GGS)₂ (SEQ ID NO:10)。

81. 根据实施方案71-76中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含GGSGGSGGS (SEQ ID NO:11)。

82. 根据实施方案71-76中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含GGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:12)。

83. 根据实施方案71-76中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含GGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:13)。

84. 根据实施方案71-76中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含GGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:119)。

85. 根据实施方案71-76中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含GGSGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:147)。

86. 根据实施方案71-76中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述不可切割接头包含和GGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:170)。

87. 根据实施方案1-70中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是可切割接头。

88. 一种多特异性多肽构建体,所述多特异性多肽构建体包含含有异二聚体Fc区的第一组分和含有抗CD3抗体或抗原结合片段的第二组分,所述抗CD3抗体或抗原结合片段包含可变重链区(VH)和可变轻链区(VL),其中:

构成所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH和VL连接至所述异二聚体Fc的相对多肽;

所述第一组分和所述第二组分通过可切割接头偶联,其中所述异二聚体Fc区位于所述抗CD3抗体的N末端;

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域;并且

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。

89. 根据实施方案88所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种还包含至少一个结合抑制性受体的抑制性受体结合区(IRBR)。

90. 一种多特异性多肽构建体,所述多特异性多肽构建体包含含有异二聚体Fc区的第一组分和含有抗CD3抗体或抗原结合片段的第二组分,所述抗CD3抗体或抗原结合片段包含可变重链区(VH)和可变轻链区(VL),其中:

构成所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH和VL连接至所述异二聚体Fc的相对多肽;

所述第一组分和所述第二组分通过可切割接头偶联,其中所述异二聚体Fc区位于所述抗CD3抗体的N末端;

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合结构域; 并且

所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合抑制性受体的抑制性受体结合区 (IRBR)。

91. 根据实施方案90所述的多特异性多肽构建体, 其中所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种还包含至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR)。

92. 根据实施方案88-91中任一项所述的多特异性多肽构建体, 其中与切割状态相比, 当所述多特异性多肽构建体处于未切割状态时, 所述CD3结合区与CD3的结合大幅降低。

93. 根据实施方案88-92中任一项所述的多特异性多肽, 其中在切割状态下, 所述第一组分和所述第二组分不连接。

94. 根据实施方案88-93中任一项所述的多特异性多肽构建体, 其中所述可切割接头是起蛋白酶底物作用的多肽。

95. 根据实施方案94所述的多特异性多肽构建体, 其中所述蛋白酶由免疫效应细胞、由肿瘤或由存在于肿瘤微环境中的细胞产生。

96. 根据实施方案95所述的多特异性多肽构建体, 其中所述蛋白酶由免疫效应细胞产生, 并且所述免疫效应细胞是激活的T细胞、自然杀伤 (NK) 细胞或NK T细胞。

97. 根据实施方案94-96中任一项所述的多特异性多肽构建体, 其中所述蛋白酶选自间质蛋白酶、基质金属蛋白酶 (MMP)、颗粒酶B及其组合。

98. 根据实施方案97所述的多特异性多肽构建体, 其中所述蛋白酶是颗粒酶B。

99. 根据实施方案88-98中任一项所述的多特异性多肽构建体, 其中所述可切割接头包含通式 $P_4 P_3 P_2 P_1 \downarrow P_1'$ (SEQ ID NO:150) 的氨基酸序列, 其中 P_4 是氨基酸I、L、Y、M、F、V或A; P_3 是氨基酸A、G、S、V、E、D、Q、N或Y; P_2 是氨基酸H、P、A、V、G、S或T; P_1 是氨基酸D或E; 并且 P_1' 是氨基酸I、L、Y、M、F、V、T、S、G或A。

100. 根据实施方案88-99中任一项所述的多特异性多肽构建体, 其中所述可切割接头包含通式 $P_4 P_3 P_2 P_1 \downarrow P_1'$ (SEQ ID NO:151) 的氨基酸序列, 其中 P_4 是氨基酸I或L; P_3 是氨基酸E; P_2 是氨基酸P或A; P_1 是氨基酸D; 并且 P_1' 是氨基酸I、V、T、S或G。

101. 根据实施方案88-100中任一项所述的多特异性多肽构建体, 其中所述可切割接头包含氨基酸序列IEPDI (SEQ ID NO:136)、LEPDG (SEQ ID NO:152)、LEADT (SEQ ID NO:137)、IEPDG (SEQ ID NO:138)、IEPDV (SEQ ID NO:139)、IEPDS (SEQ ID NO:140)、IEPDT (SEQ ID NO:141) 或LEADG (SEQ ID NO:153)。

102. 根据实施方案88-101中任一项所述的多特异性多肽构建体, 其中所述可切割接头包含选自SEQ ID NO:22、105-112、136-141、148、150-153的氨基酸序列。

103. 根据实施方案88-102中任一项所述的多特异性多肽构建体, 其中所述可切割接头包含SEQ ID NO:105所示的氨基酸序列。

104. 根据实施方案103所述的多特异性多肽构建体, 其中所述蛋白酶是间质蛋白酶。

105. 根据实施方案88-105中任一项所述的多特异性多肽构建体, 其中:
所述可切割接头包含序列 $P_1QAR \downarrow (A/V)$ (SEQ ID NO:154), 其中 P_1 是任何氨基酸;
或者

所述可切割接头包含序列RQAR (A/V) (SEQ ID NO:155)。

106. 根据实施方案88-105中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头包含序列RQARV (SEQ ID NO:156)。

107. 根据实施方案88-106中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头包含选自SEQ ID NO:23、154-156的氨基酸序列。

108. 根据实施方案97所述的多特异性多肽构建体,其中所述蛋白酶是MMP。

109. 根据实施方案108所述的多特异性多肽构建体,其中所述MMP是MMP-2。

110. 根据实施方案88-109中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头包含通式 $P_3 P_2 P_1 \downarrow P_1'$ (SEQ ID NO:157),其中 P_3 是P、V或A; P_2 是Q或D; P_1 是A或N;并且 P_1' 是L、I或M。

111. 根据实施方案88-110中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头包含通式 $P_3 P_2 P_1 \downarrow P_1'$ (SEQ ID NO:158),其中 P_3 是P; P_2 是Q或D; P_1 是A或N;并且 P_1' 是L或I。

112. 根据实施方案88-111中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头包含序列PAGL (SEQ ID NO:24)。

113. 根据实施方案88-112中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述可切割接头包含选自SEQ ID NO:22-31、104-114、117-118、136-144、148、150-158的氨基酸序列。

114. 根据实施方案61-113中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体至少包含 (i) 第一多肽,其包含所述异二聚体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结构域;以及 (ii) 第二多肽,其包含所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头任选地与存在于所述第一多肽中相同的接头和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL结构域中的另一个,

其中所述第一多肽和所述第二多肽中的一种或两种包含至少一个与肿瘤相关抗原 (TAA) 结合的抗原结合结构域,并且所述第一组分和所述第二组分中的一种或两种包含至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区 (CRBR),

其中所述多特异性多肽构建体包含至少一个CRBR和至少一个抗原结合结构域。

115. 根据实施方案1-114中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中一个或多个结合TAA的抗原结合结构域导致与所述TAA的单价、二价、三价或四价结合。

116. 根据实施方案114或实施方案115所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一多肽或所述第二多肽中仅一种包含所述至少一个结合TAA的抗原结合结构域。

117. 根据实施方案114-116中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个抗原结合结构域位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多肽或第二多肽中的一种的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多肽或第二多肽中的一种的CD3结合区的羧基末端。

118. 根据实施方案114-116中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个抗原结合结构域位于相对于所述多特异性构建体的Fc区的氨基末端,并且所述第二抗原结合结构域位于相对于所述多特异性构建体的CD3结合区的羧基末端。

119. 根据实施方案114-118中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一多肽或所述第二多肽中仅一种包含所述至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区

(CRBR)。

120. 根据实施方案114-119中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述共刺激受体结合区(CRBR)位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多肽或第二多肽中的一种的Fc区的氨基末端或位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多肽或第二多肽中的一种的CD3结合区的羧基末端。

121. 根据实施方案1114-120中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中:

所述第一多肽按N末端到C末端的顺序包含:结合肿瘤相关抗原(TAA)的第一抗原结合结构域、所述异二聚体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VL或VH以及结合肿瘤相关抗原(TAA)的第二抗原结合结构域;并且

所述第二多肽按N末端到C末端的顺序包含:所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头任选地与存在于所述第一多肽中相同的接头、所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VH或VL中的另一个以及结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。

122. 根据实施方案1-121中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个包含所述TAA的天然同源结合配偶体的细胞外结构域或其结合片段,或其展现出与所述TAA的结合活性的变体。

123. 根据实施方案1-121中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个是选自以下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、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。

124. 根据实施方案1-123中任一项所述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)是或包含所述共刺激受体的天然同源结合配偶体的细胞外结构域或其结合片段,或其展现出与所述共刺激受体的结合活性的变体。

125. 根据实施方案1-123中任一项所述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)是选自以下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、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。

126. 根据实施方案123或实施方案125所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段是Fv、scFv、Fab、单结构域抗体(sdAb)、VNAR或VHH。

127. 根据实施方案123、实施方案125或实施方案114所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或抗原结合片段是sdAb。

128. 根据实施方案127所述的多特异性多肽构建体,其中所述sdAb是人sdAb或人源化sdAb。

129. 根据实施方案127或实施方案128所述的多特异性多肽构建体,其中所述sdAb是VHH、VNAR、工程化VH结构域或工程化VK结构域。

130. 根据实施方案123、实施方案125或实施方案126所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段是scFv。

131. 根据实施方案123、实施方案125或实施方案126所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段是Fab。

132. 根据实施方案1-123和125-131中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含:

(i) 第一多肽,其包含所述异二聚体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结构域;

(ii) 第二多肽,其包含所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VL结构域;

(iii) 第三多肽,其包含与肿瘤相关抗原结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL;

(iv) 第四多肽,其包含与共刺激受体结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL,其中所述第一多肽和/或所述第二多肽还包含(1)与所述肿瘤相关抗原结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个和(2)与所述共刺激受体结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个。

133. 根据实施方案1-123和125-131中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含:

(i) 第一多肽,其包含所述异二聚体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结构域;

(ii) 第二多肽,其包含所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VL结构域;以及

(iii) 第三多肽,其包含与共刺激受体结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL,其中所述第一多肽和/或所述第二多肽还包含与所述共刺激受体结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个,并且

所述第一多肽和/或所述第二多肽还包含至少一个结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域。

134. 根据实施方案1-123和1125-131中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含:

(i) 第一多肽,其包含所述异二聚体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结构域;

(ii) 第二多肽,其包含所述异二聚体Fc区的第二Fc多肽、所述接头和所述抗CD3抗体或抗原结合片段的VL结构域;以及

(iii) 第三多肽,其包含与肿瘤相关抗原结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL;

其中所述第一多肽和/或所述第二多肽还包含与所述肿瘤相关抗原结合的Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个,并且

所述第一多肽和/或所述第二多肽还包含至少一个结合共刺激受体的共刺激受体结合区(CRBR)。

135. 根据实施方案133或实施方案134所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一多肽或所述第二多肽中仅一种包含所述Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个。

136. 根据实施方案133或实施方案134所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一多肽或所述第二多肽两者均包含所述Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个。

137. 根据实施方案135或实施方案136所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多

肽或第二多肽中的一种的Fc区的氨基末端和/或位于相对于所述多特异性多肽构建体的第一多肽或第二多肽中的一种的CD3结合区的羧基末端。

138. 根据实施方案135-137中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fab抗体片段的VH-CH1 (Fd) 或VL-CL中的另一个位于相对于所述第一多肽或所述第二多肽的Fc区的氨基末端和位于相对于所述第一多肽或所述第二多肽中的另一种的CD3结合区的羧基末端。

139. 根据实施方案1-138中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗原结合结构域或者独立地所述抗原结合结构域中的每一个与选自以下的肿瘤抗原结合:1-92-LFA-3、5T4、 α -4整合素、 α -V整合素、 α 4 β 1整合素、 α 4 β 7整合素、AGR2、抗路易斯-Y、爱帕琳肽J受体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5补体、C-242、CA9、CA19-9(路易斯a)、碳酸酐酶9、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132(IL-2RG)、CD133、CD137、CD138、CD166、CD172A、CD248、CDH6、CEACAM5(CEA)、CEACAM6(NCA-90)、密封蛋白-3、密封蛋白-4、cMet、胶原蛋白、Cripto、CSFR、CSFR-1、CTLA-4、CTGF、CXCL10、CXCL13、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CYR61、DL44、DLK1、DLL3、DLL4、DPP-4、DSG1、EDA、EDB、EGFR、EGFRviii、内皮素B受体(ETBR)、ENPP3、EpCAM、EPHA2、EPHB2、ERBB3、RSV的F蛋白、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、叶酸受体 α (FR α)、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、透明质酸酶、ICOS、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IgE、IgE受体(Fc ϵ RI)、IGF、IGF1R、IL1 β 、IL1R、IL2、IL11、IL12、IL12p40、IL-12R、IL-12RB1、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、Jagged配体、Jagged 1、Jagged2、KISS1-R、LAG-3、LIF-R、路易斯X、LIGHT、LRP4、LRRC26、Ly6G6D、LyPD1、MCSP、间皮素、MRP4、MUC1、粘蛋白-16(MUC16、CA-125)、Na/K ATP酶、NGF、朊蛋白、Notch受体Notch 1、Notch 2、Notch 3、Notch 4、NOV、OSM-R、OX-40、PAR2、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGFR α 、PDGFR β 、PD-1、PD-L1、PD-L2、磷脂酰丝氨酸、P1GF、PSCA、PSMA、PSGR、RAAG12、RAGE、SLC44A4、鞘氨醇1磷酸酯、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TAPA1、TEM-8、TGF β 、TIGIT、TIM-3、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TMEM31、TNF α 、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。

140. 根据实施方案1-139中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗原结合结构域至少包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域与相同的TAA结合。

141. 根据实施方案140所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合相同TAA的不同表位。

142. 根据实施方案140所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合相同TAA的相同表位。

143. 根据实施方案1-142中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗原结合结构域至少包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,其中所述第一抗原结合结

构域和所述第二抗原结合结构域结合不同的TAA。

144. 根据实施方案1-143中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述共刺激受体结合区(CRBR)至少包含第一CRBR和第二CRBR,其中所述第一CRBR和所述第二CRBR与相同的共刺激受体结合。

145. 根据实施方案144所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一共刺激受体结合区(CRBR)和所述第二CRBR结合相同共刺激受体的不同表位。

146. 根据实施方案144所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一共刺激受体结合区(CRBR)和所述第二CRBR结合相同共刺激受体的相同表位。

147. 根据实施方案1-146中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述共刺激受体结合区(CRBR)至少包含第一CRBR和第二CRBR。

148. 根据实施方案1-147中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一CRBR和所述第二CRBR结合不同的共刺激受体。

149. 根据实施方案1-148中任一项所述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细胞激活因子受体(BAFF-R)、B细胞成熟抗原(BCMA)、跨膜激活剂及CAML相互作用因子(TACI)和NKG2D。

150. 根据实施方案1-149中任一项所述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)。

151. 根据实施方案1-150中任一项所述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)是或包含所述共刺激受体的天然同源结合配偶体的细胞外结构域或其结合片段,或其展现出与所述共刺激受体的结合活性的变体。

152. 根据实施方案1-150中任一项所述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)是选自以下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、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。

153. 根据实施方案152所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段是Fv、scFv、Fab、单结构域抗体(sdAb)、VNAR或VHH。

154. 根据实施方案152或实施方案114所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段是sdAb。

155. 根据实施方案154所述的多特异性多肽构建体,其中所述sdAb是人sdAb或人源化sdAb。

156. 根据实施方案154或实施方案155所述的多特异性多肽构建体,其中所述sdAb是VHH、VNAR、工程化VH结构域或工程化VK结构域。

157. 根据实施方案152或实施方案153所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段是scFv。

158. 根据实施方案152或实施方案153所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段是Fab。

159. 根据实施方案1-158中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抑制性受体结合区(IRBR)至少包含第一IRBR和第二IRBR,其中所述第一IRBR和所述第二IRBR与相

同的抑制性受体结合。

160. 根据实施方案159所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一抑制性受体结合区(IRBR)和所述第二CRBR结合相同抑制性受体的不同表位。

161. 根据实施方案159所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一抑制性受体结合区(IRBR)和所述第二IRBR结合相同抑制性受体的相同表位。

162. 根据实施方案1-161中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抑制性受体结合区(IRBR)至少包含第一IRBR和第二IRBR。

163. 根据实施方案1-162中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述第一IRBR和所述第二IRBR结合不同的抑制性受体。

164. 根据实施方案1-163中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述至少一个受体结合区(IRBR)结合选自以下的抑制性受体:PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA或TIM3。

165. 根据实施方案1-164中任一项所述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)结合PD-1。

166. 根据实施方案1-165中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含在所述第一抗原结合结构域与所述Fc区之间的第一连接肽(LP1)。

167. 根据实施方案1-166中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含在所述CD3结合区与所述第二抗原结合结构域之间的第二连接肽(LP2)。

168. 根据实施方案1-166中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含在所述第一共刺激受体结合区(CRBR)与所述Fc区之间的第一连接肽(LP1)。

169. 根据实施方案1-168中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含在所述CD3结合区与所述第二共刺激受体结合区(CRBR)之间的第二连接肽(LP2)。

170. 根据实施方案1-169中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体包含在所述抗原结合结构域或共刺激受体结合区与所述Fc区之间的第一连接肽(LP1)以及在所述CD3结合区与所述抗原结合结构域或CRBR之间的第二连接肽(LP2),并且其中所述多特异性多肽构建体从N末端到C末端具有如下结构排列:第一抗原结合结构域或CRBR-LP1-Fc区-接头-CD3结合区-LP2-第二抗原结合结构域或CRBR。

171. 根据实施方案170所述的多特异性多肽构建体,其中所述接头是可切割接头。

172. 根据实施方案170和实施方案171所述的多特异性多肽构建体,其中所述两种连接肽彼此不相同。

173. 根据实施方案166-172中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中LP1或LP2独立地是长度为约1至20个氨基酸的肽。

174. 根据实施方案173所述的多特异性多肽,其中LP1或LP2独立地包含为或包含如SEQ ID NO:10-13、119、135、147、149或GGS所示的任何Gly-Ser接头的肽。

175. 根据实施方案1-174中任一项所述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是Fv抗体片段。

176. 根据实施方案175所述的多特异性多肽构建体,其中所述Fv抗体片段包括二硫化物稳定的抗CD3结合Fv片段(dsFv)。

177. 根据实施方案1-176中任一项所述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含有氨基酸序列TYAMN (SEQ ID NO:16)的VH CDR1;含有氨基酸序列RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO:17)的VH CD2;含有氨基酸序列HGNFNGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:18)的VH CDR3;含有氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:19)的VL CDR1;含有氨基酸序列GTNKRAP (SEQ ID NO:20)的VL CDR2;以及含有氨基酸序列ALWYSNLWV (SEQ ID NO:21)的VL CDR3。

178. 根据实施方案149或实施方案150所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗CD3 dsFv包含:

具有SEQ ID NO:14和32-62中任一个的氨基酸序列或与SEQ ID NO:14和32-62中的任一个展现出至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列的VH;以及

具有SEQ ID NO:15和63-81中任一个的氨基酸序列或与SEQ ID NO:15、63-81和241中的任一个展现出至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列的VL。

179. 根据实施方案175-178中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗CD3 dsFv包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列和SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

180. 根据实施方案175-179中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述抗CD3 dsFv包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列和SEQ ID NO:72的氨基酸序列,或者所述抗CD3 dsFv包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列和SEQ ID NO:241的氨基酸序列。

181. 根据实施方案1-181中任一项所述的多特异性多肽构建体,其中所述多特异性多肽构建体缀合至药剂。

182. 根据实施方案181所述的多特异性多肽构建体,其中所述药剂是治疗剂、抗癌剂、毒素或其片段、可检测部分或诊断剂。

183. 根据实施方案182所述的多特异性多肽构建体,其中所述药剂经由接头缀合至所述多特异性多肽构建体。

184. 一种或多种多核苷酸,其编码根据实施方案1-183中任一项所述的多特异性多肽构建体。

185. 一种多核苷酸,其编码根据实施方案1-183中任一项所述的任何多特异性多肽构建体的多肽链。

186. 一种多核苷酸,其包含编码根据实施方案1-183中任一项所述的多特异性构建体的第一多肽的第一核酸序列和编码所述多特异性构建体的第二多肽的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列被内部核糖体进入位点(IRES)或者编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的核酸分开。

187. 根据实施方案186所述的多核苷酸,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列可操作地连接至相同的启动子。

188. 根据实施方案186或实施方案187所述的多核苷酸,其中所述多特异性多肽构建体包含第三多肽链,并且所述多核苷酸还包含编码所述多特异性构建体的第三多肽的第三核酸。

189. 根据实施方案188所述的多核苷酸,其中所述第三核酸与所述第一多肽和/或

所述第二多肽被内部核糖体进入位点 (IRES) 或者编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的核酸分开, 和/或所述第三核酸序列可操作地连接至与所述第一核酸序列和/或所述第二核酸序列情况下相同的启动子。

190. 根据实施方案186-189中任一项所述的多核苷酸, 其中编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的所述核酸选自T2A、P2A、E2A或F2A。

191. 一种载体, 其包含根据实施方案184-190中任一项所述的多核苷酸。

192. 根据实施方案191所述的载体, 所述载体是表达载体。

193. 根据实施方案191或实施方案192所述的载体, 所述载体是病毒载体或真核载体, 任选地其中所述真核载体是哺乳动物载体。

194. 一种细胞, 其包含根据实施方案184-190中任一项所述的一种或多种多核苷酸或根据实施方案191-193中任一项所述的一种或多种载体。

195. 根据实施方案194所述的细胞, 其中所述细胞是重组的或分离的。

196. 根据实施方案195所述的细胞, 其中所述细胞是哺乳动物细胞。

197. 根据实施方案196所述的细胞, 其中所述细胞是HEK293或CHO细胞。

198. 一种产生多特异性多肽构建体的方法, 所述方法包括向细胞中引入根据实施方案184-190中任一项所述的一种或多种多核苷酸或根据实施方案191-193中任一项所述的一种或多种载体, 以及在产生所述多特异性多肽构建体的条件下培养所述细胞。

199. 一种产生多特异性多肽构建体的方法, 所述方法包括在由根据实施方案194-198中任一项所述的细胞产生所述多特异性多肽的条件下培养所述细胞。

200. 根据实施方案198或实施方案199所述的细胞, 其中所述细胞是哺乳动物细胞。

201. 根据实施方案200所述的细胞, 其中所述细胞是HEK293或CHO细胞。

202. 根据实施方案198或实施方案199所述的方法, 其还包括从所述细胞中分离或纯化所述多特异性多肽构建体。

203. 根据实施方案198-202中任一项所述的方法, 其中所述多特异性多肽构建体是异二聚体。

204. 一种多特异性多肽构建体, 其通过根据实施方案198-203中任一项所述的方法产生。

205. 一种药物组合物, 其包含根据实施方案1-183或实施方案204中任一项所述的多特异性多肽构建体和药学上可接受的载体。

206. 根据实施方案205所述的药物组合物, 所述药物组合物是无菌的。

207. 一种刺激或诱导免疫应答的方法, 所述方法包括使靶细胞和T细胞与根据实施方案1-183或实施方案204中任一项所述的多特异性多肽构建体或根据实施方案205或实施方案206所述的药物组合物接触, 所述靶细胞表达由所述多特异性多肽构建体识别的肿瘤相关抗原。

208. 根据实施方案207所述的方法, 其中所述靶细胞是表达所述肿瘤相关抗原 (TAA) 的肿瘤细胞。

209. 根据实施方案207或实施方案208所述的方法, 其中所述多特异性多肽构建体包含起蛋白酶底物作用的切割接头, 并且诱导或刺激所述免疫应答在所述蛋白酶的存在下

增加。

210. 根据实施方案209所述的方法,其中所述蛋白酶由免疫效应细胞、由肿瘤或由存在于肿瘤微环境中的细胞产生。

211. 根据实施方案209或实施方案210所述的方法,其中所述蛋白酶由免疫效应细胞产生,并且所述免疫效应细胞是激活的T细胞、自然杀伤(NK)细胞或NK T细胞。

212. 根据实施方案211所述的方法,其中所述免疫效应细胞靠近表达所述抗原的细胞。

213. 根据实施方案207-212中任一项所述的方法,其中所述蛋白酶由组织中靠近表达所述TAA的细胞的肿瘤产生和/或由组织中与所述TAA共定位的肿瘤产生,并且其中当所述多特异性多肽构建体暴露于所述蛋白酶时,所述蛋白酶切割所述多特异性多肽构建体中的可切割接头。

214. 根据实施方案207-213中任一项所述的方法,其中所述蛋白酶选自间质蛋白酶、基质金属蛋白酶(MMP)、颗粒酶B及其组合。

215. 根据实施方案214所述的方法,其中所述蛋白酶是颗粒酶B。

216. 根据实施方案207-215中任一项所述的方法,其中所述接触是离体或体外进行的。

217. 根据实施方案207-216中任一项所述的方法,其中所述接触是在受试者体内进行的。

218. 一种在受试者中刺激或诱导免疫应答的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据实施方案1-183或实施方案204中任一项所述的多特异性缀合物或根据实施方案205或实施方案206所述的药物组合物。

219. 根据实施方案207-218中任一项所述的方法,其增加细胞介导的免疫性。

220. 根据实施方案207-219中任一项所述的方法,其增加T细胞活性。

221. 根据实施方案207-220中任一项所述的方法,其增加细胞溶解性T细胞(CTL)活性。

222. 根据实施方案207-221中任一项所述的方法,其中所述免疫应答是针对肿瘤或癌症增加的。

223. 根据实施方案207-222中任一项所述的方法,其中所述方法治疗所述受试者的疾病或病症。

224. 一种治疗受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据实施方案1-183中任一项所述的多特异性缀合物或根据实施方案205或实施方案206所述的药物组合物。

225. 根据实施方案223或实施方案224所述的方法,其中所述疾病或病症是肿瘤或癌症。

226. 根据实施方案207-225中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

VI. 实施例

[0431] 以下实施例被包括在内仅用于说明目的,并不旨在限制本发明的范围。

实施例1:含有受限CD3结合区和共刺激受体结合结构域的多特异性多肽构建体的产生

[0432] 实施例1描述了多特异性多肽构建体的产生和表达,所述多特异性多肽构建体含有展现出受限的CD3结合的CD3结合区、结合共刺激受体的结合结构域和一个或多个结合细胞表面抗原(如肿瘤相关抗原(TAA))的抗原结合结构域。如图1所示并且在图2A-2F和图3进一步例示,以各种构型产生了多特异性构建体,以含有通过接头(例如可切割接头或不可切割接头)与CD3结合区偶联的免疫球蛋白的异二聚体Fc区;一个或多个结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域,其位于相对于Fc区的氨基末端和/或位于相对于CD3结合区的羧基末端;以及至少一个共刺激受体结合区(CRBR),其位于相对于Fc区的氨基末端和/或位于相对于CD3结合区的羧基末端。

[0433] 产生了具有不同TAA抗原结合结构域、共刺激受体结合区和接头的示例性的代表性构建体。可以产生类似的构建体,使用其他异二聚体Fc构型,包括其他杵臼结构构型,如所述的任一种;其他接头,包括不可切割接头或其他可切割接头,特别是包含蛋白酶(如颗粒酶B、间质蛋白酶和/或MMP)的底物识别位点的多肽接头;其他CD3结合区,包括其他抗CD3抗体,包括dsFv或其他单价片段;其他TAA抗原结合片段,如scFv、sdAb或Fab形式;或其他共刺激受体结合区,如scFv、sdAb或Fab形式。

[0434] 在示例性构建体中,产生了至少编码异二聚体多特异性多肽构建体的第一多肽链和第二多肽链的多核苷酸,并且将其克隆到质粒中进行表达。第一多肽链从N末端到C末端按顺序通常包含Fc白多肽(例如示出于SEQ ID NO:83或292中);可切割接头,如含有蛋白酶的一个或多个底物识别位点的接头;和dsFv抗CD3抗体的可变轻链(VL)结构域(例如示出于SEQ ID NO:72中)。第二多肽链从N末端到C末端按顺序通常包含Fc杵多肽(例如示出于SEQ ID NO:82或291中);与第一多肽链情况下相同的可切割接头;和dsFv抗CD3抗体的可变重链结构域(例如示出于SEQ ID NO:44中)。将含有颗粒酶B的底物识别位点的示例性可切割接头GGSGGGGIEPDIGSGGS(SEQ ID NO:105)用于示例性构建体中。

[0435] 多肽链中的一条或两条另外以各种构型编码在Fc结构域的氨基末端和/或在CD3结合区的羧基末端的一个或多个TAA抗原结合结构域以及在Fc结构域的氨基末端和/或在CD3结合区的羧基末端的共刺激受体结合结构域。所产生的示例性蛋白质掺入了作为单结构域抗体(sdAb)的TAA和共刺激受体结合结构域。

[0436] 在示例性构建体中,TAA抗原结合结构域(例如sdAb)通过肽接头(例如PGGGG(SEQ ID NO:102))在Fc异二聚体的一条或两条多肽链(例如白和/或杵)的N末端连接和/或通过肽接头(例如GGGG(SEQ ID NO:103))在CD3结合区的一个或两个结构域(例如VH和/或VL)的C末端连接。可以采用其他类似的肽接头。可以在所提供的多特异性多肽构建体中采用与TAA结合的任何抗原结合结构域。所产生的示例性蛋白质包含结合以下肿瘤相关抗原中的一种的抗原结合结构域:B7H3和5T4。在一些情况下,TAA抗原结合结构域是相同的。在一些情况下,TAA抗原结合结构域是不同的,使得所产生的多特异性多肽构建体展现出对至少两种不同TAA的特异性,展现出对相同TAA的不同表位或相同TAA的相同表位的特异性。

[0437] 在示例性构建体中,共刺激结合区(例如sdAb)通过肽接头(例如GGGG(SEQ ID NO:103))在Fc异二聚体的多肽链(例如白和/或杵)的C末端连接。通常,共刺激结合区(例如sdAb)在相对于CD3结合区的羧基末端。可以采用其他类似的肽接头。可以在所提供的多特异性多肽构建体中采用与共刺激受体结合的任何共刺激结合区。所产生的示例性蛋白质含有结合以下共刺激受体中的一种的共刺激结合区:41BB、OX40、GITR、ICOS、CD28或CD27。

[0438] 产生了示例性多特异性多肽构建体,其含有两个对B7H3的相同表位具有特异性的TAA抗原结合结构域,并且进一步含有靶向41BB的另外的共刺激受体结合区(cx3091)、靶向OX40的另外的共刺激受体结合区(cx3723)、靶向GITR的另外的共刺激受体结合区(cx3724)、靶向ICOS的另外的共刺激受体结合区(cx3721)或靶向CD28的另外的共刺激受体结合区(cx3726)(图2A-2F)。为了比较,产生了多特异性多肽构建体,其含有两个对B7H3的相同表位具有特异性的TAA抗原结合结构域,而没有CRBR(cx3095或3834)(图2A)。与cx3095相比,cx3834具有相反的杵和白构型,使得图2A描绘的cx3834的第一多肽链含有Fc白多肽,并且所描绘的第二多肽具有Fc杵多肽。

[0439] 产生了示例性多特异性多肽构建体,其含有对5T4具有特异性TAA抗原结合结构域与靶向4-1BB的另外的CRBR。所产生的一些示例性构建体含有靶向4-1BB共刺激受体的sdAb(包含分别示出于SEQ ID No:308、309和310中的CDR1、CDR2和CDR3;例如示出于SEQ ID NO:215中)。所产生的构建体包括(cx3497和cx3499),各自具有靶向5T4的不同抗原结合结构域。还产生了没有CRBR的针对cx3497和cx3499的对照构建体,分别指定为cx3547和cx3546。(图3)

[0440] 示例性多特异性多肽构建体中使用的CRBR示出于表E1中。

表E1: 示例性多特异性多肽构建体中的CRBR		
所产生的示例性分子	CRBR	SEQ ID NO
cx3091、cx3497、 cx3499	41BB sdAb RH3v5-1	215
cx3723	OX40 sdAb 1D10v1	225
cx3724	GITR sdAb C06v3	235
cx3721	ICOS sdAb	239
cx3726	CD28 sdAb	240

[0441] 产生了多核苷酸以编码指定为cx3095、cx3834、cx3723、cx3724、cx3721、cx3726和cx3091(各自靶向B7H3);cx3546、cx3547、cx3497和cx3499(各自靶向5T4)的示例性多特异性多肽构建体的多肽链。产生了构建体以含有可切割或不可切割接头。

[0442] 使用聚乙烯亚胺将编码异二聚体受限CD3结合蛋白的每一条链的单独质粒以等摩尔比率瞬时转染到哺乳动物细胞(HEK293或CHO)中。3-7天后收集分泌到上清液中的重组蛋白,并且通过蛋白A色谱、之后通过制备型尺寸排阻色谱(SEC)或流通疏水相互作用色谱(HIC)纯化。由于突变被设计到异二聚体Fc的一条链(在位置I253R或H435R处)(通常是白-Fc)使得其结合蛋白A,因此选择性纯化了异二聚体蛋白。使用通过SEC(采用Superdex-200树脂的AKTA)或FT-HIC(采用丁基/苯基琼脂糖凝胶的AKTA)进行的第二色谱步骤去除含有两个异二聚体Fc的不期望的交叉配对种类,所述交叉配对种类疏水性更高且是预期分子量的两倍。

[0443] 所述方法有利于产生异二聚体多特异性多肽构建体,其含有正确配对的种类的异二聚体Fc和所述的二硫化物稳定的抗CD3 Fv(如SEQ ID NO:44所示的具有突变G44C的抗

CD3 VH和如SEQ ID NO:72所示的具有突变G100C的VL)。在4℃或增加的蛋白质浓度下延长孵育时,经纯化的异二聚体受限CD3结合蛋白是稳定的且不积累交叉配对种类。

实施例2:通过流式细胞术测得与癌细胞和原代T细胞的结合

[0444] 此实施例描述了评估示例性构建体与T细胞或癌细胞的结合的研究。这些研究是在含有彼此分离的仅T细胞或仅癌细胞的单一培养物中进行的。

[0445] 评估了本公开文本的示例性多特异性多肽构建体(在本文中称为cx3091和cx3095(分别具有和没有共刺激受体结合区))与原代T细胞表面上的CD3和与表达B7H3的细胞(A375)的结合。如实施例1所述,cx3091和cx3095含有作为单结构域抗体的B7H3结合结构域。另外,cx3091含有作为单结构域抗体的41BB结合结构域。所测试的构建体的肿瘤抗原结合结构域结合不在原代T细胞上表达的B7H3。为了比较的目的,使用掺入了如SEQ ID NO:169、145或146所示的多肽序列的类似方法产生了DART-Fc形式。从分离自健康人类供体leukopak的PBMC中负性富集了原代T细胞。用对任一人具有特异性的荧光团缀合的二抗检测结合的构建体,并且通过流式细胞术测量结合。仅用二抗孵育的细胞充当阴性对照。

[0446] 对于研究,使用每种构建体cx3091、cx3095或B7H3xCD3DART-Fc的48pM至200nM的滴定液。发现代表性的靶向B7H3的受限CD3接合构建体结合表达B7H3的细胞(A375)(图4A和4B),但是缺乏结合T细胞的能力(图4C和4D)。值得注意的是,观察到只有DART-Fc形式才允许在不存在B7H3接合的情况下结合T细胞。重要的是,观察到41BB结合结构域的添加不介导T细胞结合,这与41BB表达需要T细胞激活一致。

[0447] 在进一步的研究中,观察到基本上如实施例1所述产生的代表性的靶向5T4的受限CD3接合构建体的类似的受限结合;cx3497掺入了另外的41BB结合结构域,而cx3547未掺入共刺激受体结合区。掺入了单结构域抗体作为两种构建体的5T4结合结构域以及cx3497的41BB结合结构域。如图5A和5B所示,两种构建体均显示出与表达5T4的细胞Ovcar-5的结合。然而,所述构建体不能结合分离的T细胞(图5C和5D)。

实施例3:使用报告物测定评估共刺激受体信号传导

[0448] 此实施例描述了各种构建体在与靶抗原表达细胞的共培养物中激活41BB或OX40报告Jurkat细胞系的能力的评估。将靶向抗原的受限CD3接合构建体滴定到靶细胞和表达细胞表面41BB或OX40和NFκB驱动的荧光素酶的工程化Jurkat细胞的共培养物上。41BB或OX40的接合导致NFκB信号传导和荧光素酶产生。对于利用贴壁靶细胞的报告物测定,接种靶细胞,允许其在室温下沉降以便均匀分布,并且在37℃下孵育若干小时以允许在添加报告细胞和靶向抗原的受限CD3接合构建体之前贴壁。在将报告细胞、靶细胞(抗原阳性或阴性细胞)和受限CD3接合构建体共孵育6小时后,添加BioGlo试剂(Promega),并且在SpectraMaxL上测量发光。

[0449] 在此示例性测定中,所测试的多特异性构建体包含B7H3靶向性受限CD3与41BB结合共刺激受体结合区(cx3091)或OX40结合区(cx3723)。作为对照,也测试了相应的没有共刺激受体结合区的B7H3靶向性受限CD3构建体(cx3095或cx3834)。靶细胞是表达B7H3的A375细胞(A375)或针对B7H3被敲减(缺失)的A375(A375(Δ)B7H3)。

[0450] 如图6A所示,显示含有41BB结合结构域的示例性的B7H3靶向性受限CD3接合构建体(cx3091)介导靶抗原特异性41BB激动,如与在不含共刺激结合区的相应构建体(cx3095)的存在下孵育的共培养物相比报告信号的增加所指示的。类似地,在与不表达B7H3靶抗原

的靶细胞共培养的T细胞中没有观察到41BB激动,这与具有共刺激结合区的B7H3靶向性受限CD3构建体展现出仅以靶抗原依赖性方式介导T细胞共刺激信号传导的能力的观察结果一致。

[0451] 如图6B和6C所示,观察到含有OX40结合结构域的B7H3靶向性受限CD3接合构建体(cx3723)的类似的结果。值得注意的是,含有OX40结合结构域的B7H3靶向性受限CD3接合构建体并未将表达41BB的报告细胞中的NF κ B信号传导增强(图6C),同时含有41BB结合结构域的B7H3靶向性受限CD3接合构建体并未将表达OX40的报告细胞中的NF κ B信号传导增强(图6B)高于缺乏共刺激结合结构域的B7H3靶向性受限CD3接合构建体观察到的水平。

[0452] 这些结果展示出了掺入共刺激受体结合区的抗原靶向性受限CD3接合构建体介导抗原依赖性特异性共刺激信号传导的另外的功能特性。

实施例4:使用报告物测定评估CD3报告T细胞激活

[0453] 此实施例描述了各种构建体在与靶抗原表达细胞的共培养物中激活CD3 NFAT报告Jurkat细胞系的能力的评估。将靶向抗原的受限CD3接合构建体滴定到靶细胞(表达B7H3或针对B7H3被敲减,B7H3 $-/-$)和表达NFAT驱动的绿色荧光蛋白(GFP)的工程化Jurkat细胞的共培养物上。CD3的接合导致NFAT信号传导和绿色荧光产生。对于利用贴壁靶细胞的报告物测定,接种靶细胞,允许其在室温下沉降以便均匀分布,并且在37 $^{\circ}$ C下孵育若干小时以允许在添加报告细胞和靶向抗原的受限CD3接合构建体之前贴壁。使用IncuCyte ZOOM系统对测定板进行连续成像,并且通过测量总绿色对象积分强度来确定CD3报告细胞激活。

[0454] 在此示例性测定中,所测试的多特异性构建体包含B7H3靶向性受限CD3与41BB结合共刺激受体结合区(cx3091)。作为对照,也测试了相应的没有共刺激受体结合区的B7H3靶向性受限CD3(cx3095)。靶细胞是表达B7H3的A375细胞(A375)。

[0455] 如图7A所示,当在表达B7H3的靶细胞的存在下在报告T细胞共培养物中孵育时,示例性的B7H3靶向性受限CD3接合构建体展现出介导靶抗原特异性T细胞激活的能力。然而,在不包含B7H3靶细胞的共培养物中没有观察到报告物活性(图7B)。类似地,在表达抗原的A375细胞而非B7H3阴性细胞的存在下,也观察到示例性DART-Fc(其也与B7H3结合)的T细胞激活,如通过报告物活性所测量的。值得注意的是,与不含有CRBR的构建体相比,含有41BB的构建体cx3091显示出增强的NFAT信号传导,这可能是由于TCR/CD3信号传导后Jurkat细胞活力增加和/或消耗减少。

[0456] 这些结果证明,虽然经由CD3结合结构域的T细胞结合在分离的T细胞上受到限制或抑制(如实施例2所示),但一旦本文提供的多特异性多肽与同源抗原结合,它们就能够接合T细胞结合并介导T细胞激活。

实施例5:对功能活性的评估

[0457] 此实施例描述了在人原代T细胞体外测定中对所测试的受限CD3接合构建体的评估和表征。

1. T细胞介导的细胞毒性

[0458] 用CytoID红荧光标记靶细胞。对于利用贴壁靶细胞的细胞毒性测定,接种靶细胞,允许其在室温下沉降以便均匀分布,并且在37 $^{\circ}$ C下孵育若干小时以允许在添加其他测定组分之前贴壁。从分离自健康人类供体leukopak的PBMC中负性富集了原代T细胞,并且以10:1-40:1T细胞比靶细胞的比率添加。添加绿色半胱天冬酶-3/7试剂,其荧光标记了经历凋亡

的细胞的核DNA。将抗体滴定到共培养物上,并且使用IncuCyte ZOOM系统对测定板进行连续成像。通过测量总红色/绿色重叠对象面积来确定靶细胞死亡(如图8A、8B、9A-9E、10A、10B所示)。在本文中用CytoID红将靶细胞标记为红色,同时用绿色荧光半胱天冬酶-3/7底物监测凋亡,因此凋亡靶细胞是红色和绿色双重标记的那些。通过测量在测定结束时剩余的总红色对象来确定靶细胞耗尽,如图8C和8D所示。

[0459] 在图8A-8D所示的示例性测定中,测试了包含B7H3靶向性受限CD3与41BB结合共刺激受体结合区的多特异性构建体(cx3091)。作为对照,也测试了相应的没有共刺激受体结合区的B7H3靶向性受限CD3(cx3095)或也与B7H3结合的DART-Fc。靶细胞是表达B7H3的A375或针对B7H3被敲减的A549细胞。示例性的B7H3靶向性受限CD3接合构建体cx3095诱导了抗原阳性细胞系的有效T细胞介导的细胞毒性(图8A和8C),但是没有诱导抗原阴性细胞系的有效T细胞介导的细胞毒性(图8B和8D),这与有效诱导抗原依赖性T细胞激活的能力一致。不含有共刺激结合区的对照构建体cx3095和DART-Fc也展现出细胞毒活性,但是水平低于cx3091观察到的水平,特别是在所测试的最低浓度下。cx3095显示出与替代形式DART-Fc B7H3xCD3(其也缺乏41BB结合结构域)相似的效力。

[0460] 在类似的测定中,通过掺入了结合其他共刺激受体的共刺激结合区的其他B7H3靶向性受限多特异性多肽构建体观察到类似的结果。与缺乏共刺激受体结合区的类似构建体(cx3834)相比,掺入了靶向OX40(cx3723;图9A)、41BB(cx3091;图9B)、GITR(cx3724;图9C)、ICOS(cx3721;图9D)或CD28(cx3726;图9E)的共刺激受体结合区的多特异性多肽构建体各自都允许优越的B7H3阳性细胞A375的T细胞介导的细胞毒性。

[0461] 用具有41BB结合共刺激受体结合区的5T4靶向性受限CD3构建体(cx3497)进行了类似的测定。作为对照,也测试了相应的没有共刺激受体结合区的5T4靶向性受限CD3(cx3547)。靶细胞是表达5T4的Ovcar-5细胞或基本上不表达5T4的CCRF-CEM细胞。如图10A-10B所示,代表性的5T4靶向性受限CD3接合构建体cx3547缺乏介导抗原特异性细胞毒性的能力,而41BB结合结构域的添加诱导了针对表达5T4的细胞系Ovcar-5的特异性T细胞细胞毒性,但是没有诱导针对5T4阴性细胞系CCRF-CEM的特异性T细胞细胞毒性。值得注意的是,由cx3497介导的T细胞介导的细胞毒性直到大约40小时才观察到,这与TCR信号传导后41BB上调的动力学一致。

[0462] 这些结果显示,靶向共刺激受体(如41BB)的共刺激受体结合区的添加比缺乏共刺激受体结合区的构建体增强了T细胞介导的细胞毒性的效力。这些观察结果支持与其他CD3接合形式相比,本文提供的具有另外的共刺激受体结合能力的抗原靶向性受限CD3形式展现出改善的活性,包括显示出增强的介导细胞毒性的效力而在不存在抗原接合的情况下基本上不结合T细胞的能力。

2. T细胞激活

[0463] 为了评估T细胞激活,收集来自上述T细胞介导的细胞毒性测定的悬浮细胞,并且将其用live/dead染色剂和荧光团缀合的抗CD4、抗CD8、抗CD25和/或抗CD71抗体染色。使用SONY SA3800光谱分析仪分析了细胞,并且通过测量CD25或CD71的表达水平来确定CD4+或CD8+ T细胞激活。通过对CD4和CD8群体上CD71的表达水平进行流式细胞术分析来监测T细胞激活。

[0464] 为了评估T细胞激活,将cx3091、cx3095或DART-Fc B7H3xCD3在T细胞和靶细胞

(B7H3阳性A375细胞或其中B7H3已经被敲除的A549细胞)的共培养物中孵育20小时。通过对CD4和CD8群体上CD71的表达水平进行流式细胞术分析来监测T细胞激活。在已经在所有测试的构建体的存在下与表达B7H3的靶细胞一起孵育的CD4(图11A)和CD8 T细胞(图11C)中T细胞激活(如通过CD71的诱导所测量的)是明显的。然而,如所示,掺入41BB结合结构域的B7H3靶向性受限CD3接合构建体cx3091在观察到的T细胞激活程度方面优于缺乏41BB结合结构域类似构建体cx3095和DART-Fc两者。如图11B和图11D所示,在不存在B7H3抗原的情况下,在测定中分别没有在CD4+或CD8+ T细胞中观察到T细胞激活,如通过CD71表达所测量的。

3. T细胞细胞因子产生

[0465] 为了评估细胞因子产生,在4°C下用IFN γ 捕获抗体包被FluoroSpot膜过夜。用PBS洗涤膜,并且添加抗体滴定液、靶细胞和从PBMC中负性富集的T细胞。以1:10的比率接种靶细胞:T细胞共培养细胞。将测定板在37°C下孵育约24h,并且根据制造商的说明书制备膜。使用CTL-ImmunoSpot S6通用分析仪对膜进行成像。使用测定孔之间的均匀暴露时间和强度设置来测量细胞因子斑点计数。

[0466] 在示例性测定中,所测试的多特异性构建体包含B7H3靶向性受限CD3与41BB结合共刺激受体结合区(cx3091)。作为对照,也测试了相应的没有共刺激受体结合区的B7H3靶向性受限CD3(cx3095)。靶细胞是表达B7H3的A375或不表达B7H3的CCRF-CEM细胞。抗原靶向性受限CD3接合构建体以B7H3依赖性方式引发了从T细胞产生细胞因子,如仅在含有表达B7H3的靶细胞的共培养物中产生IFN- γ (图12A)但在与B7H3阴性(B7H3-)靶细胞的共培养物中没有产生IFN- γ (图12B)所示的。在含有41BB结合结构域(cx3091)构建体的存在下,细胞因子产生的程度明显更高,这与41BB结合结构域的掺入增强特异性T细胞激活的能力一致。

4. T细胞细胞因子产生(ELISA)

[0467] 通过夹心ELISA(BioLegend,美国)分析来自T细胞介导的细胞毒性测定(在上文第1部分中所述用5T4靶向性受限CD3构建体进行)的上清液的IFN γ 含量。另外,还在测定中评估了含有41BB结合结构域的构建体cx3499和不含有41BB结合结构域的构建体cx3546(参见例如实施例1和图3)。遵循制造商的说明书,并且生成上清液样品的细胞因子浓度值进行内插的标准曲线。向吸光度值低于检测下限的样品分配等于最低标准浓度的一半的细胞因子浓度。

[0468] 图13显示当将41BB结合结构域掺入构建体(cx3499和cx3497)中时,观察到代表性的5T4靶向性受限CD3接合构建体以抗原依赖性方式引发增强的从T细胞产生IFN γ ,但是在不含有41BB结合结构域类似构建体(cx3546和cx3547)中没有观察到。

5. NF κ B-萤光素酶报告物

[0469] 还评估了含有共刺激受体结合结构域的受限CD3接合构建体介导对应共刺激信号传导途径的特异性激动的能力。使用Jurkat OX40(图14A)或41BB(图14B)NF κ B-萤光素酶报告细胞来测试不含有共刺激受体结合结构域(cx3834)、含有OX40结合结构域(cx3723)或含有41BB结合结构域(cx3091)的示例性的靶向B7H3的受限CD3接合构建体。如图14A和图14B所示,发现分别掺入OX40或41BB结合结构域(cx3723和cx3091)诱导所靶向的共刺激受体的特异性激动。在所有构建体(包括不含有共刺激受体结合区的构建体)的情况下都观察到一

些诱导的NF κ B信号传导,表明在此系统中靶标依赖性CD3信号传导介导了一些NF κ B信号传导。使用了B7H3阳性细胞系A375。

实施例6:PD-1 sdAb的产生

[0470] 经由免疫美洲驼和羊驼产生了靶向人PD-1的单结构域抗体。用如下所示出的人PD-1细胞外结构域(ECD;SEQ ID NO:242所示的人PD-1的氨基酸25-167,例如UniProt编号Q15116)的重组版本免疫了美洲驼和羊驼:LDSPDRPWNPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFV LNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCFRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRA ELRVTERRAEVPTAHPSPSPRSAGQFQ(SEQ ID NO:242的残基25-167)

[0471] 在产生特异性抗PD1抗体滴度后,从500mL来自经免疫动物的血液中分离出美洲驼/羊驼外周血单个核细胞(PBMC),并且使用Qiagen RNeasy Maxi试剂盒分离出总mRNA并随后使用Thermo Superscript IV逆转录酶和寡聚dT引发将其转化为第一链cDNA。使用cDNA作为模板经由PCR特异性扩增出单结构域抗体(sdAb;也称为VHH)序列,并且将其克隆到酵母表面展示载体中作为sdAb-Fc-AGA2融合蛋白。Fc是人IgG1 Fc(示出于SEQ ID NO:1中)。

[0472] 经由磁珠分离、之后经由荧光激活细胞分选(FACS)使用重组形式的PD-1ECD富集了展示这些sdAb的酵母文库。将分选的酵母均铺,并且将分离的菌落挑选到96孔块中并使其在将表面展示的sdAb-Fc的表达转换为分泌到培养基中的培养基中生长。示例性的鉴定出的sdAb示出于表E2中。

克隆名称	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
18H10	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	243

实施例7:骆驼源PD-1sdAb的人源化

[0473] 使用人VH3-23种系作为支架使示例性的骆驼源PD-1sdAb18H10人源化。有助于溶解度、特异性、稳定性和/或亲和力的骆驼残基保持未修饰。另外,所有人源化变体都含有Leu11Glu(L11E)的修饰以及Ser112Lys(S112K)和Ser113Pro(S113P)的羧基末端修饰,因为已知这些阻止或减少针对sdAb的预先存在的ADA的识别(如US20160207981中所述)。

表E3示出了示例性PD-1sdAb人源化变体。

表E3: PD-1 sdAb人源化变体							
克隆名称	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
18H10人源化变体							
hz18H10v1	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	251
hz18H10v2	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	252
hz18H10v3	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	253
hz18H10v4	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	254
hz18H10v5	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	255
hz18H10v6	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	256
hz18H10v7	GSITGANTMG	273	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	257
hz18H10v8	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	258
hz18H10v9	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	259
hz18H10v10	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	260
hz18H10v11	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	261
hz18H10v12	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	262
hz18H10v13	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	263
hz18H10v14	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	264
hz18H10v15	GSITGANTMG	273	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	265
hz18H10v16	GSITGANTMG	273	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	266
hz18H10v17	GSITGANTMG	273	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	267

实施例8:通过流式细胞术测得sdAb与表达PD-1的细胞的结合

[0474] 评估了经纯化的sdAb-Fc对表达PD-1的细胞的特异性和相对亲和力。为了瞬时转染293细胞,将freeStyle 293细胞以 1×10^6 个细胞/mL重悬在新鲜的FreeStyle 293表达培养基中。在制备转染试剂的同时每次转染将细胞接种到50mL中并在37°C下在摇床上进行孵育。将50 μ g的每种转染质粒稀释到500 μ L的OptiMEM中。对于每次转染,在单独的管中,将150 μ g聚乙烯亚胺(PEI;75 μ L的2mg/mL溶液)添加到500 μ L的OptiMEM中,然后与DNA:OptiMEM溶液1:1混合。使DNA与PEI在室温下复合15分钟。然后将DNA:PEI复合物滴加到准备好的FreeStyle 293细胞烧瓶中,并且通过涡旋混合。将经转染的细胞在37°C的摇床中孵育过夜,以允许为蛋白表达留出时间。所使用的转染质粒编码柠檬黄标记的人(hu)、食蟹猴(cy)和鼠(mu)起源的全长PD1蛋白。

[0475] 使用经瞬时转染的表达PD-1的细胞通过流式细胞术评估了实施例6和7中所述的示例性PD-1-sdAb-Fc融合蛋白的结合。将未经转染的FreeStyle 293细胞(UT 293)或经瞬

时转染的FreeStyle 293细胞(huPD1-FL 293、cyPD1-FL 293或muPD1-FL 293)在FACS缓冲液(1x TBS、0.01%FBS、0.002%叠氮化钠)中稀释到 0.5×10^6 个细胞/mL,并且在96孔圆底测定板中以100 μ L/孔铺板。将测定板以约750rpm离心5分钟,然后除去上清液并如下添加一抗稀释液。制备18H10或hz18H10v7在FACS缓冲液中的三倍9点系列稀释液,范围从111nM至0.0169nM,并且将50 μ L/孔的经稀释抗体添加到含有293细胞的测定板中。将细胞在抗体稀释液中在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。在孵育30分钟后,将测定板以约750rpm离心5分钟,用150 μ L FACS缓冲液洗涤,并再以约750rpm离心5分钟。除去洗涤液,并且添加50 μ L/孔的在FACS缓冲液中1:1000稀释的Alexa Fluor 647缀合的驴抗人IgG,并且在4 $^{\circ}$ C下孵育20分钟。然后将测定板以750rpm离心5分钟,用150 μ L FACS缓冲液洗涤,并且再以750rpm离心5分钟。除去洗涤液,并且将细胞重悬在30 μ L/孔的FACS缓冲液中,用于通过流式细胞术(iQue Intellicyte)进行分析。

[0476] 18H10(源自美洲驼的亲本;SEQ ID NO:243)或18H10hzv7(SEQ ID NO:257)的结合表达人PD-1的细胞(huPD1-FL 293,图15A)、表达食蟹猴PD-1的细胞(cynoPD1-FL 293,图15B)或表达小鼠PD-1的细胞(muPD1-FL 293,图15C)的示例性结果示出于图15A-15C中,每种细胞与非表达(UT293)细胞相比较。

实施例9:通过流式细胞术评估PD-1sAb与激活的人T细胞的结合

[0477] 通过流式细胞术评估了PD-1-sdAb-Fc融合蛋白与激活的人T细胞的结合。

[0478] 为了富集和激活人T细胞,使用密度梯度离心从人类供体血液中分离出外周血单核细胞(PBMC)。将血液样品用PBS/2%FBS(1:2)稀释,并且将30mL的经稀释血液分层到15mL的Lymphoprep密度梯度培养基上。离心后,除去血浆和Lymphoprep界面处的PBMC层,并且在室温下使用红细胞裂解缓冲液将剩余的红细胞裂解5分钟。用针对CD14、CD16、CD19、CD20、CD36、CD56、CD123、TCR γ/δ 的生物素化的抗谱系标记抗体标记非T细胞群(20分钟,室温),并且将其使用磁性链霉抗生物素蛋白颗粒耗尽。保留含有T细胞级分的未结合的细胞上清液。通过在使用1 μ g/mL小鼠抗人CD3(OKT3)包被的组织培养板中以约 2×10^6 个细胞/mL培养基的密度铺板来将富集的人T细胞激活3天。将激活的T细胞在PBS中洗涤一次,然后进一步用于结合测定。

[0479] 基本上如实施例8所述通过流式细胞术评估和量化结合,除了为了与激活的人T细胞结合,使用范围从167nM至0.00847nM的18H10(SEQ ID NO:243)或人源化18H10(hzv7;SEQ ID NO:257)的四倍10点系列稀释液进行孵育。如图16所示,发现所测试的示例性的靶向PD-1的构建体和人源化变体结合富集和激活的人T细胞。

实施例10:使用报告物测定评估PD-1/PD-L1阻断

[0480] 使用表达PD-1的Jurkat效应报告细胞系(其中TCR接合导致萤光素酶报告基因的转录)来评估靶向PD-1的示例性sdAb阻断PD-1和PD-L1相互作用的能力。在测定中,将表达PD-L1的aAPC/CHOK1细胞与Jurkat报告细胞共培养,以提供TCR特异性激活信号,同时通过接合效应细胞上的PD-1来阻遏此信号。监测PD-1sdAb阻断被阻遏信号和增强TCR接合的能力。

[0481] 在测定前一天将表达PD-L1的aAPC/CHOK1细胞铺在补充有10%FBS的100 μ l Ham's F12中。在测定当天,丢弃所有培养基并替换为40 μ L测定培养基(RPMI 1640,补充有1%FBS),所述测定培养基含有包含含有18H10(SEQ ID NO:243)或人源化18H10(hzv7;SEQ ID

NO:257)的试验蛋白的滴定液(起始浓度:50nM,1:4滴定)。然后将Jurkat PD-1报告细胞添加到板中(40 μ L),并且将板孵育6h(37 $^{\circ}$ C,5%CO₂在湿润气氛中)。孵育后,将等体积的BioGlo萤光素酶测定底物添加到孔中并在室温下孵育10分钟,并且评估和分析发光。

[0482] 如图17所示,观察到示例性的所测试的蛋白质18H10(SEQ ID NO:243)或人源化18H10(hzv7;SEQ ID NO:257)对PD-1/PD-L1的阻断,如TCR接合和萤光素酶转录的存在所指示的。

实施例11:产生具有抗PD1 sdAb的TAA靶向性受限CD3结合蛋白的方法

[0483] 产生了多特异性多肽构建体,其含有展现出受限的CD3结合的二硫化物稳定的抗CD3 Fv结合区;异二聚体Fc结构域;一个或多个位于相对于Fc区的氨基末端和/或位于相对于CD3结合区的羧基末端的TAA抗原结合结构域;以及含有针对PD-1的单结构域抗体(sdAb)的抑制性受体结合区(IRBR),其位于相对于Fc区的氨基末端和/或位于相对于CD3结合区的羧基末端。在一些情况下,产生了多特异性多肽构建体以含有至少一个共刺激受体结合区(CRBR)(例如针对41BB),其位于相对于Fc区的氨基末端和/或位于相对于CD3结合区的羧基末端。以各种构型产生了多特异性构建体,如图18A-18B所示。

[0484] 在示例性构建体中,产生了至少编码异二聚体多特异性多肽构建体的第一多肽链和第二多肽链的多核苷酸,并且将其克隆到质粒中进行表达。第一多肽链从N末端到C末端按顺序通常包含Fc白多肽(例如示出于SEQ ID NO:91或在一些情况下SEQ ID NO:93中);可切割或不可切割接头,如含有蛋白酶的一个或多个底物识别位点的接头;和dsFv抗CD3抗体的可变轻链(VL)结构域(例如示出于SEQ ID NO:241中)。第二多肽链从N末端到C末端按顺序通常包含Fc杆多肽(例如示出于SEQ ID NO:84或在一些情况下SEQ ID NO:88中);与第一多肽链情况下相同的可切割接头或相同的不可切割接头;和dsFv抗CD3抗体的可变重链结构域(例如示出于SEQ ID NO:44中)。产生了构建体,其具有示例性不可切割接头GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:119)或示例性可切割接头GGSGGGIEPDIGGSGGS(SEQ ID NO:105),所述可切割接头含有颗粒酶B的底物识别位点。多肽链中的一条或两条另外以各种构型编码在Fc结构域的氨基末端和/或在CD3结合区的羧基末端的作为抑制性受体结合区的PD-1sdAb(例如SEQ ID NO:243或SEQ ID NO:257)和/或在Fc结构域的氨基末端和/或在CD3结合区的羧基末端的作为共刺激受体结合结构域的4-1BB sdAb(例如SEQ ID NO:215)。

[0485] 使用聚乙烯亚胺将编码异二聚体受限CD3结合蛋白的每一条链的单独质粒以等摩尔比率瞬时转染到哺乳动物细胞(HEK293或CHO)中。3-7天后收集分泌到上清液中的重组蛋白,并且通过蛋白A色谱、之后通过制备型尺寸排阻色谱(SEC)或流通疏水相互作用色谱(HIC)纯化分泌的重组蛋白。由于突变被设计到异二聚体Fc的一条链(在位置I253R或H435R处)(通常是白-Fc)使得其结合蛋白A,因此选择性纯化了异二聚体蛋白。使用通过SEC(采用Superdex-200树脂的AKTA)或FT-HIC(采用丁基/苯基琼脂糖凝胶的AKTA)进行的第二色谱步骤去除含有两个异二聚体Fc的不期望的交叉配对种类,所述交叉配对种类疏水性更高且是预期分子量的两倍。

[0486] 所述方法有利于产生异二聚体多特异性多肽构建体,其含有正确配对的种类的异二聚体Fc和所述的二硫化物稳定的抗CD3 Fv(例如如SEQ ID NO:44所示的具有突变G44C的抗CD3 VH和如SEQ ID NO:241所示的具有突变G100C的VL)。在4 $^{\circ}$ C或增加的蛋白质浓度下延

长孵育时,经纯化的异二聚体受限CD3结合蛋白是稳定的且不积累交叉配对种类。

实施例12:具有受限的CD3结合的构建体的产生

[0487] 实施例12描述了含有展现出受限的CD3结合的CD3结合区的多特异性多肽构建体的产生和表达。如图1、图19A-C和图20所示,以各种构型产生了多特异性构建体,以含有通过接头(例如不可切割接头)与CD3结合区偶联的免疫球蛋白的异二聚体Fc区和一个或多个结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域,所述抗原结合结构域位于相对于多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和/或位于相对于多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。

A. 构建体的设计和产生

[0488] 产生了至少编码异二聚体多特异性多肽构建体的第一多肽链和第二多肽链的多核苷酸,并且将其克隆到质粒中进行表达。第一多肽链从N末端到C末端按顺序通常包含第一Fc多肽(例如Fc₀多肽);不可切割接头;和抗CD3抗体的可变轻(VL)结构域。第二多肽链从N末端到C末端按顺序通常包含第二Fc多肽(例如Fc₁多肽);与第一多肽链情况下相同的不可切割接头;和抗CD3抗体的可变重(VH)结构域。抗CD3抗体包括二硫化物稳定的(dsFv)抗体(具有突变G44C的抗CD3 VH和具有突变G100C的VL)或含有非二硫化物稳定的Fv抗体,如表E4所示出。如表E12所示出,使用了各种示例性Fc多肽对促进多肽链的异二聚化。多肽链中的一条或两条另外以各种构型编码在Fc结构域的氨基末端和/或在CD3结合区的羧基末端的一个或多个TAA抗原结合结构域。可以使用其他异二聚体Fc构型产生类似的构建体,包括其他杵臼结构构型,如所述的任一种;也可以使用其他CD3结合区,包括其他抗CD3抗体,包括dsFv或其他单价片段;或其他TAA抗原结合片段,如scFv、sdAb或Fab形式。

[0489] 在所产生的构建体中,不可切割接头包括大小范围从3-18个氨基酸的接头。在所产生的示例性分子中使用的不可切割接头的例子是GGG、GGSGGS (SEQ ID NO:10)、GGSGGSGGS (SEQ ID NO:11)、GGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:12)、GGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:13)、和GGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:119,包含在示例性构建体cx5823和cx5952中)或GGSGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:147)。

[0490] 可以在所提供的多特异性多肽构建体中采用与TAA结合的任何抗原结合结构域。所产生的示例性蛋白质含有结合B7H3 (CD276)或 δ 样3 (DLL3)的抗原结合结构域。抗原结合结构域可以包括单链片段(例如sdAb或scFv)或两链抗原结合片段(Fab)。当TAA作为单链片段(例如sdAb或scFv)提供时,TAA抗原结合结构域通过肽接头(例如PGGG (SEQ ID NO:102))在Fc异二聚体的一条或两条多肽链(例如 α 和/或 μ)的N末端连接和/或通过肽接头(例如GGGG (SEQ ID NO:103))在CD3结合区的一个或两个结构域(例如VH和/或VL)的C末端连接。可以采用其他类似的肽接头。当TAA作为Fab抗原结合片段提供时,构建体由在没有接头的情况下直接连接至一条或两条Fc多肽的VH和CH1、以及由VL和CL构成的轻链构成。这些结合TAA的Fab可以位于异二聚体Fc的氨基末端或羧基末端。

[0491] 产生了含有1、2、3或4个TAA抗原结合结构域的多特异性多肽构建体,如以分别提供单价、二价、三价或四价结合。在一些情况下,TAA抗原结合结构域是相同的(单表位的)。在一些情况下,TAA抗原结合结构域是不同的,使得所产生的多特异性多肽构建体展现出对至少两种不同的TAA的特异性,展现出对相同TAA的不同表位(双表位)或相同TAA的相同表位(单表位)的特异性。

[0492] 所产生的蛋白质包括其中TAA抗原结合结构域构成为抗原结合片段(Fab)的单结构域抗体(sdAb)的构建体。产生了多核苷酸以编码含有不可切割接头的示例性多特异性多肽构建体的多肽链。这些包括靶向B7H3的指定为cx3072、cx5952、cx6079、cx6080、cx6081、cx5823、cx5873和cx5965的含有sdAb的构建体,如图19A和19B所描绘;靶向B7H3的指定为cx5067、cx6083和cx6084的含有Fab的构建体,如图19C所描绘;以及靶向DLL3的含有sdAb的cx5352、cx5800和cx5801,如图20所描绘。产生了一些构建体,其中dsFv抗CD3抗体的VH结构域和sdAb均连接至Fc异二聚体的同一侧(例如白或杵侧)(例如图19A所示的cx3072和cx5952)。构建体被工程化为没有二硫化物稳定的Fv,或被工程化为具有稳定抗CD3抗体的VH和VL结构域的二硫键。值得注意的是,所产生的一些示例性构建体另外含有靶向4-1BB共刺激受体的sdAb(含有SEQ ID No:308、309和310分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;例如示出于SEQ ID NO:215中)(例如cx5823、cx5873、cx5965、cx5352、cx5801、cx5800)。下表E4中给出了具有sdAb和Fab TAA结构域的示例性受限CD3结合构建体的列表。

构建体 ID	链	N末端 sdAb (靶标)	Fc	接头	CD3结合结构域	C末端sdAb (靶标)	二硫化物稳定的
cx5823	1	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO: 301)	xELL-杵 (SEQ ID NO: 88)	GGGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	B7H3 sdAb 5 (SEQ ID NO: 303)	是
	2	无	xELL-白 (SEQ ID NO: 93)	GGGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	共刺激受体 sdAb	
cx5952	1	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO: 301)	xELL-杵 (SEQ ID NO: 88)	GGGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	B7H3 sdAb 5 (SEQ ID NO: 303)	是

表E4: 示例性受限CD3接合构建体							
构建体 ID	链	N末端 sdAb (靶标)	Fc	接头	CD3结合结构域	C末端sdAb (靶标)	二硫化物稳定的
	2	无	xELL-白 (SEQ ID NO: 93)	GGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	无	
cx6079	1	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO: 301)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO: 285)	GGGGSGGGGSGG GGS (SEQ ID NO: 170)	VH32 (SEQ ID NO: 287)	无	否
	2	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO: 301)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO: 286)	GGGGSGGGGSGG GGS (SEQ ID NO: 170)	VL20 (SEQ ID NO: 288)	无	
cx6080	1	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO: 301)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO: 285)	GGGGSGGGGSGG GGS (SEQ ID NO: 170)	VH33 (SEQ ID NO: 311)	无	是
	2	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO: 301)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO: 286)	GGGGSGGGGSGG GGS (SEQ ID NO: 170)	VL21 (SEQ ID NO: 289)	无	
cx6081	1	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO: 301)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO: 285)	GGGGSGGGGSGG GGS (SEQ ID NO: 170)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	无	是

表E4: 示例性受限CD3接合构建体							
构建体 ID	链	N末端 sdAb (靶标)	Fc	接头	CD3结合结构域	C末端sdAb (靶标)	二硫化物稳定的
		301)					
	2	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO: 301)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO: 286)	GGGGSGGGGSGG GGS (SEQ ID NO: 170)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	无	
cx3072	1	B7H3 sdAb 2 (SEQ ID NO: 302)	IgG1-杆 (SEQ ID NO: 82、86或291)	GGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	B7H3 sdAb 1 (SEQ ID NO: 305)	是
	2	无	IgG1-杆 (SEQ ID NO: 83、87或292)	GGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	无	
cx5873	1	无	xELL-杆 (SEQ ID NO: 84、88或293)	GGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	B7H3 sdAb 3 (SEQ ID NO: 304)	是
	2	无	xELL-白 (SEQ ID NO: 91、93或296)	GGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	共刺激受体 sdAb	
cx5965	1	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO: 301)	xELL-杆 (SEQ ID NO: 84、88或293)	GGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	无	是

表E4: 示例性受限CD3接合构建体							
构建体 ID	链	N末端 sdAb (靶标)	Fc	接头	CD3结合结构域	C末端sdAb (靶标)	二硫化物稳定的
		301)					
	2	无	xELL-白 (SEQ ID NO: 91、93或296)	GGGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	共刺激受体 sdAb	
cx5352	1	DLL3 sdAb 1 (SEQ ID NO: 306)	xELL-白 (SEQ ID NO: 84、88或293)	GGGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	DLL3 sdAb2 (SEQ ID NO: 307)	是
	2	无	xELL-白 (SEQ ID NO: 91、93或296)	GGGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	共刺激受体 sdAb	
cx5800	1	DLL3 sdAb 1 (SEQ ID NO: 306)	xELL-白 (SEQ ID NO: 84、88或293)	GGGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	无	是
	2	无	xELL-白 (SEQ ID NO: 91、93或296)	GGGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	共刺激受体 sdAb	
cx5801	1	无	xELL-白 (SEQ ID NO: 84、88或或	GGGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	DLL3 sdAb 2 (SEQ ID NO: 307)	是

表E4: 示例性受限CD3接合构建体							
构建体 ID	链	N末端 sdAb (靶标)	Fc	接头	CD3结合结构域	C末端sdAb (靶标)	二硫化物稳定的
			293)				
	2	无	xELL-白 (SEQ ID NO: 91、93或296)	GGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	共刺激受体 sdAb	
cx5187	1	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO: 301)	xELL-苄 (SEQ ID NO: 84、88或293)	GGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	B7H3 sdAb 3 (SEQ ID NO: 304)	是
	2	无	xELL-白 (SEQ ID NO: 91、93或296)	GGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	共刺激受体 sdAb	
cx5067	1	B7H3-Fa b (SEQ ID NO: 127、128)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO: 285)	GGGGSGGGGSGG GGS (SEQ ID NO: 170)	VH32 (SEQ ID NO: 287)	无	否
	2	B7H3-Fa b (SEQ ID NO: 127、128)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO: 286)	GGGGSGGGGSGG GGS (SEQ ID NO: 170)	VL20 (SEQ ID NO: 288)	无	
cx6083	1	B7H3-Fa b (SEQ ID NO: 127、128)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO: 285)	GGGGSGGGGSGG GGS (SEQ ID NO: 170)	VH33 (SEQ ID NO: 311)	无	是

表E4: 示例性受限CD3接合构建体							
构建体 ID	链	N末端 sdAb (靶标)	Fc	接头	CD3结合结构域	C末端sdAb (靶标)	二硫化物稳定的
		127、128)					
	2	B7H3-Fa b (SEQ ID NO: 127、128)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO: 286)	GGGGSGGGSGG GGS (SEQ ID NO: 170)	VL21 (SEQ ID NO: 289)	无	
cx6084	1	B7H3-Fa b (SEQ ID NO: 127、128)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO: 285)	GGGGSGGGSGG GGS (SEQ ID NO: 170)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	无	是
	2	B7H3-Fa b (SEQ ID NO: 127、128)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO: 286)	GGGGSGGGSGG GGS (SEQ ID NO: 170)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	无	

B. 所产生的构建体的表达和纯化

[0493] 使用聚乙烯亚胺将编码异二聚体受限CD3结合蛋白的每一条链的单独质粒以等摩尔比率瞬时转染到哺乳动物细胞 (HEK293或CHO) 中。3-14天后收集分泌到上清液中的重组蛋白,并且通过蛋白A色谱、之后通过制备型尺寸排阻色谱 (SEC) 或流通疏水相互作用色谱 (HIC) 纯化。在一些情况下,由于突变被设计到异二聚体Fc的一条链中 (在位置I253R或H435R处) (例如在白-Fc中) 使得其不结合蛋白A并且因此不纯化I253R或H435R的同二聚体,因此在纯化期间富集了异二聚体蛋白。使用通过SEC (采用Superdex-200树脂的AKTA) 或FT-HIC (采用丁基/苯基琼脂糖凝胶的AKTA) 进行的第二色谱步骤去除含有两个异二聚体Fc的不期望的交叉配对种类,所述交叉配对种类疏水性更高且是预期分子量的两倍。

[0494] 所述方法有利于产生异二聚体多特异性多肽构建体,其含有正确配对的种类的异二聚体Fc和抗CD3 Fv (例如二硫化物稳定的抗CD3 Fv)。在4°C或增加的蛋白质浓度下延长孵育时,经纯化的异二聚体受限CD3结合蛋白是稳定的且不积累交叉配对种类。

实施例13:对含有单个或多个B7H3结合靶向结构域的CD3受限多特异性构建体的评估

[0495] 将含有单价sdAb抗原结合结构域(位于N末端或C末端)的构建体的活性与含有位于N末端和C末端两者的靶向抗原的sdAb的双重结合构建体的活性进行比较。所测试的每种构建体均含有位于CD3结合结构域C末端的CRBR。

A. 结合

[0496] 评估了含有针对B7H3的抗原结合结构域的示例性多特异性构建体与B7H3阳性A375肿瘤细胞、B7H3阴性CCRF-CEM细胞或原代T细胞的结合。如图21A所示,与单价版本cx5873和cx5965相比,二价的靶向B7H3的受限CD3接合构建体cx5187和cx5823显示出与B7H3阳性A375细胞的更高亲和力结合。这些构建体中没有一种显示出与B7H3阴性CCRF-CEM细胞或单独的T细胞的任何可检测结合(图21B)。

B. T细胞报告物活性

[0497] 使用CD3-NFAT Jurkat报告细胞评估了以单价或二价方式与抗原接合的抗原靶向性受限CD3接合构建体的B7H3抗原依赖性CD3激动能力。Jurkat细胞表达NFAT驱动的绿色荧光蛋白(GFP)。CD3的激动导致NFAT信号传导和绿色荧光产生。在此测定中,靶细胞包括A375(B7H3阳性)或CCRF-CEM(B7H3阴性)细胞。对于利用表达抗原的贴壁靶细胞的报告物测定,接种靶细胞,允许其在室温下沉降以便均匀分布,并且在37°C下孵育若干小时以允许在添加报告细胞和靶向抗原的受限CD3接合构建体之前贴壁。使用IncuCyte ZOOM系统对测定板进行连续成像,并且通过测量所积分的总绿色对象来确定CD3报告细胞激活。

[0498] 如图21C所示,与示例性单价构建体cx5873和cx5965的报告物活性相比,在示例性的二价B7H3靶向性构建体cx5187的存在下观察到明显增加的荧光报告物活性。当将构建体和与B7H3阴性CCRF靶细胞共培养的Jurkat报告细胞一起孵育时,没有观察到报告物活性(图21D)。

C. 细胞毒活性

[0499] 评估了B7H3靶向性CD3受限结合构建体对黑色素瘤细胞系A375和T细胞急性淋巴细胞性白血病细胞系CCRF-CEM(其分别用作B7H3阳性和阴性细胞系)的细胞毒性。为了评估细胞毒性,将靶细胞以 1.0×10^4 个细胞/孔接种,允许其在室温下沉降以便均匀分布,并且在37°C下孵育若干小时。从分离自健康人类供体leukopak的PBMC中负性富集了原代T细胞,并且以10:1T细胞比靶细胞的比率添加。添加绿色半胱天冬酶-3/7试剂,其荧光标记经历凋亡的细胞的核DNA。将具有受限的CD3接合活性的多特异性构建体滴定到共培养物上,并且使用IncuCyte ZOOM系统对测定板进行连续成像。通过测量总红色/绿色重叠对象面积来确定靶细胞死亡。

[0500] 如图22A所示,与构建体的单价版本cx5873和cx5965相比,示例性的二价B7H3靶向性受限CD3接合构建体cx5187显示出增强的靶标依赖性T细胞介导的细胞毒性。在这些测定中,在不存在靶细胞的B7H3表达的情况下没有观察到细胞毒性,如图22B所示,其中将CCRF-CEM细胞用作靶细胞。

D. T细胞调节

[0501] 通过在来自以上T细胞细胞毒性测定的悬浮细胞中表达CD25监测T细胞激活来评估T细胞调节,所述测定涉及在cx5187、cx5873或cx5965的存在下将T细胞与B7H3阳性(A375)或B7H3阴性细胞系(CCRF-CEM)一起培养。为了评估T细胞激活,收集来自以上T细胞细胞毒性测定的悬浮细胞,所述测定涉及在示例性的B7H3靶向性受限CD3接合构建体的存

在下将T细胞与B7H3阳性 (A375) 或B7H3阴性细胞系 (CCRF-CEM) 一起培养。将细胞用live/dead染色剂和荧光团缀合的抗CD4、抗CD8和抗CD25抗体染色。使用SONY SA3800光谱分析仪分析了细胞,并且通过测量CD25表达水平或CD25阳性细胞百分比来确定CD4+或CD8+ T细胞激活。

[0502] 如图23A和23B所示,与构建体的单价版本cx5873和cx5965相比,示例性的二价B7H3靶向性受限CD3接合构建体cx5187显示出增强的靶标依赖性T细胞介导的激活,如通过CD4和CD8 T细胞上CD25上调的增强效力所证实的。在这些测定中,在不存在靶细胞的B7H3表达的情况下没有观察到T细胞激活,如图23C和23D所示,其中将CCRF-CEM细胞用作靶细胞。这些结果证明,靶向B7H3的受限CD3接合构建体诱导了CD4和CD8 T细胞两者的有效抗原依赖性激活。

D. 总结

[0503] 这些结果共同证明,含有单价或二价sdAb抗原结合结构域和CRBR的构建体能够进行抗原依赖性CD3结合和T细胞激活。值得注意的是,与单价抗原靶向性受限CD3接合构建体相比,二价抗原靶向性受限CD3接合构建体显示出优越的抗原依赖性CD3结合和活性。这些结果与以下发现一致,即与仅含有单个单价抗原结合结构域的单价构建体相比,含有位于N末端和C末端两者处的双抗原结合结构域的构建体具有优越的结合和T细胞活性。此外,不希望受到理论的束缚,与其中sdAb仅位于Fc的N末端的构建体相比,将sdAb中的一个定位于CD3结合结构域的C末端可以形成更最佳的免疫突触,因为前者可能增加免疫突触距离。

实施例14:对含有单个或多个抗原结合DLL3靶向结构域的CD3受限多特异性构建体的评估

[0504] 此实施例描述了在人原代T细胞体外测定中对所产生的示例性的DLL3靶向性受限CD3接合构建体的评估和表征。

[0505] 在T细胞报告物测定中评估了含有DLL3靶向性sdAb的构建体的T细胞激活活性。评估了用作为一个或多个抗原结合结构域的抗DLL3sdAb格式化的DLL3靶向性受限CD3接合构建体(例如cx5352、cx5800和cx5801)的活性(参见图20,还参见表E4和E7)。所测试的所有构建体都含有二硫化物稳定的抗CD3 Fv (dsFv),其含有通过抗CD3 VH G44C与VL G100C的配对修饰而产生的链间二硫键。此外,每种DLL3靶向性构建体被工程化以含有在CD3 dsFv C末端的共刺激受体sdAb。

A. 结合

[0506] 评估了含有针对DLL3的抗原结合结构域的示例性多特异性构建体与DLL3阳性SHP-77肿瘤细胞或原代T细胞的结合。如图24A所示,与单价版本cx5800和cx5801相比,二价的靶向DLL3的受限CD3接合构建体cx5352显示出与DLL3阳性SHP-77细胞的更高亲和力结合。如图24B所描绘,所测试的构建体中没有一种显示出与DLL3阴性原代T细胞的结合。通过流式细胞术进行这些结合测定,其中使用荧光团缀合的抗人IgG Fc二抗检测结合的构建体。

B. T细胞报告物活性

[0507] 在基本上如实施例13所述的报告物测定中评估了T细胞活性,不同的是使用表达NFAT驱动的荧光素酶的Jurkat细胞并监测荧光素酶活性。在含有针对DLL3抗原的抗原结合结构域的单价和二价构建体的存在下,将NFAT驱动的荧光素酶CD3 Jurkat报告细胞与SHP-

77 (DLL3阳性) 靶细胞共培养(参见图20)。具体地,如图24C所示,与示例性单价构建体cx5800和cx5801相比,示例性二价构建体cx5352在此测定中诱导了明显更高的萤光素酶活性。这些结果与在B7H3靶向性构建体的情况下观察到的结果一致,从而表明构建体的活性不是对特定靶抗原具有特异性的。

C. 总结

[0508] 这些结果共同证明,用抗DLL3 sdAb结合结构域和CRBR格式化的受限抗CD3构建体能够与表达DLL3的细胞系SHP-77结合,并且引发抗原依赖性T细胞激活。这表明本文所述的受限抗CD3构建体不是对靶抗原具有特异性的,但是在结合各种抗原以引发针对表达靶标的细胞的T细胞细胞毒性和激活方面是有效的。

实施例15:含有抗原结合5T4靶向结构域与或不与共刺激结合区的CD3受限多特异性构建体的产生和评估

[0509] 产生了多特异性构建体,以含有通过接头(例如不可切割接头)与CD3结合区偶联的免疫球蛋白的异二聚体Fc区和结合5T4肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合结构域,所述抗原结合结构域位于相对于多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和位于相对于多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。产生了具有或没有靶向4-1BB的sdAb作为CRBR的构建体,并且在各种测定中比较了T细胞活性。

A. 构建体的设计和产生

[0510] 产生了具有如图3所描绘的形式的示例性多特异性构建体。产生了至少编码异二聚体多特异性多肽构建体的第一多肽链和第二多肽链的多核苷酸,并且将其克隆到质粒中进行表达。第一多肽链从N末端到C末端按顺序通常包含第一Fc多肽(例如Fc白多肽);不可切割接头;和抗CD3抗体的可变轻(VL)结构域。第二多肽链从N末端到C末端按顺序通常包含第二Fc多肽(例如Fc杵多肽);与第一多肽链情况下相同的不可切割接头;和抗CD3抗体的可变重(VH)结构域。抗CD3抗体包括二硫化物稳定的(dsFv)抗体(具有突变G44C的抗CD3 VH和具有突变G100C的VL),如表E5所示出。多肽链中的一条另外编码两个5T4抗原结合结构域,一个在Fc结构域的氨基末端,一个在CD3结合区的羧基末端。产生了没有CRBR的示例性构建体cx5951,而构建体cx5185含有位于相对于CD3结合区的羧基末端的作为CRBR的4-1BB抗原结合结构域(例如sdAb),例如含有SEQ ID NO:308、309和310分别所示的CDR1、CDR2和CDR3的sdAb;例如示出于SEQ ID NO:215中)。

[0511] 下表E5中给出了具有靶向5T4的sdAb结构域的示例性受限CD3结合构建体的组分。基本上如实施例12所述表达和纯化构建体。

构建体 ID	链	N末端 sdAb (靶标)	Fc	接头	CD3结合结构域	C末端sdAb (靶标)	二硫化物稳定的
cx5951	1	5T4 sdAb hz12E9v9 (SEQ ID NO: 322)	xELL- 杵 (SEQ ID NO: 84)	GGGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	5T4 sdAb hz16G10v11 (SEQ ID NO: 323)	是
	2	无	xELL- 白 (SEQ ID NO: 85)	GGGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	无	
cx5185	1	5T4 sdAb hz12E9v9 (SEQ ID NO: 322)	xELL- 杵 (SEQ ID NO: 84)	GGGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	5T4 sdAb hz16G10v11 (SEQ ID NO: 323)	是
	2	无	xELL- 白 (SEQ ID NO: 91)	GGGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	41BB sdAb (例如 SEQ ID NO: 215)	

B. T细胞活性

[0512] 在各种测定中比较了上述构建体接合CD3的活性。

1. 细胞毒活性

[0513] 在具有41BB结合共刺激受体结合区(cx5185)或没有CRBR(cx5951)的示例性的5T4靶向性构建体的存在下评估了针对靶细胞的细胞毒活性。对于细胞毒性测定,使用表达5T4的Ovcar-5细胞或不表达5T4的对照CCRF-CEM细胞作为靶细胞并接种,允许其在室温下沉降以便均匀分布,并且在37°C下孵育若干小时以允许在添加其他测定组分之前贴壁。从分离自健康人类供体leukopak的PBMC中负性富集了原代T细胞,并且以10:1-40:1T细胞比靶细胞的比率添加。在本文中用CytoID红将靶细胞标记为红色,同时用绿色荧光半胱天冬酶-3/7底物监测凋亡,因此凋亡靶细胞是红色和绿色双重标记的那些。使用IncuCyte ZOOM系统对测定板进行连续成像。通过测量总红色/绿色重叠对象面积来确定靶细胞死亡。

[0514] 如图25A所示,48小时后,与缺乏41BB结合共刺激受体结合区的相同构建体cx5951相比,在具有41BB结合共刺激受体结合区的5T4靶向性受限CD3接合构建体cx5185的情况下观察到T细胞介导的针对表达5T4的靶细胞的靶细胞细胞毒性的效力的显著差异。没有观察到针对非靶细胞的细胞毒活性(图25B)。

[0515] 这些观察结果支持与其他CD3接合形式相比,本文提供的具有另外的共刺激能力的抗原依赖性受限CD3形式显示出增强的介导的细胞毒性的效力。

2. T细胞激活

[0516] 为了评估由示例性的5T4靶向性受限CD3接合构建体介导的T细胞激活,将cx5185和cx5951在T细胞和表达5T4的靶细胞(A375细胞、Ovcar-5细胞或SHP-77细胞)的共培养物中孵育。为了评估T细胞激活,收集细胞,并且将其用live/dead染色剂和荧光团缀合的抗CD4、抗CD8和/或抗CD25抗体染色。使用SONY SA3800光谱分析仪分析了细胞,并且通过测量CD25的表达水平来确定CD4⁺或CD8⁺ T细胞激活。通过CD4和CD8群体上的CD25表达来评估T细胞激活。在已经在示例性构建体的存在下与表达5T4的靶细胞一起孵育的CD4(图26A-C)和CD8(图26D-F) T细胞中T细胞激活(如通过CD25的表达所测量的)是明显的。如图26A-F所示,与缺乏41BB结合结构域类似构建体cx5951相比,掺入41BB结合结构域的5T4靶向性受限CD3接合构建体(cx5185)显示出增强的针对CD4和CD8 T细胞两者的激活能力。

3. T细胞细胞因子产生

[0517] 使用各种表达5T4的细胞系A375(图27A)、SHP-77(图27B)或Ovcar5(图27C)评估了将41BB结合结构域掺入示例性的5T4靶向性受限CD3接合构建体中对T细胞介导的IFN γ 产生的影响。在将T细胞和表达5T4的靶细胞共培养后,通过夹心ELISA(BioLegend,美国)分析上清液的IFN γ 含量。遵循制造商的说明书,并且生成上清液样品的细胞因子浓度值进行内插的标准曲线。向吸光度值低于检测下限的样品分配等于最低标准浓度的一半的细胞因子浓度。如图27A-27C所示,与缺乏41BB结合结构域类似构建体cx5951相比,掺入41BB结合结构域的5T4靶向性受限CD3接合构建体cx5185显示出增强的IFN γ 产生。

4. T细胞增殖

[0518] 通过流式细胞术测量CellTrace™ Violet染料(Thermo Fisher Scientific)在经标记的CD4⁺或CD8⁺ T细胞中的稀释来评估T细胞增殖。从PBMC中负性富集了T细胞,并且根据制造商的方案,将其用CellTrace™ Violet标记。将5T4靶向性受限CD3接合构建体滴定到经标记的T细胞和表达5T4的细胞A375(图28A和28D)、Ovcar-5(图28B和28D)或SHP-77(图28C和28F)的共培养物上,并且将测定板在37°C下孵育五天。将细胞用活力染料碘化丙啶以及荧光团缀合的抗CD4和抗CD8抗体染色,并且使用SONY SA3800光谱分析仪进行分析。通过门控适当的有活力的T细胞亚群并测量CellTrace™ Violet强度低于来自未经处理的共培养物的T细胞的强度的细胞的百分比来确定增殖的CD4⁺或CD8⁺ T细胞的百分比。

[0519] 与缺乏41BB结合结构域类似构建体cx5951相比,掺入41BB结合结构域的5T4靶向性受限CD3接合构建体cx5185显示出增强的CD4(图28A-C)和CD8(图28D-F) T细胞两者的增殖。

5. T细胞线粒体评估

[0520] 已经表明41BB信号传导增强线粒体功能。可以使用在活跃的线粒体中积累的线粒体选择性荧光探针MitoTracker Green(Thermo Fisher Scientific)监测线粒体功能。为了评估T细胞的线粒体功能,在示例性的5T4靶向性受限CD3接合构建体的存在下将T细胞与表达5T4的细胞系A375(图29A和29D)、Ovcar-5(图29B和29E)或SHP-77(图29C和29F)共培养五天。以100nM的最终细胞染色浓度添加MitoTracker Green以及活力染料碘化丙啶和荧光团缀合的抗CD4和抗CD8抗体,并且使用SONY SA3800光谱分析仪分析细胞。通过门控适当的有活力的T细胞亚群来确定CD4⁺或CD8⁺ T细胞的中值MitoTracker Green荧光强度。与缺乏41BB结合结构域类似构建体cx5951相比,掺入41BB结合结构域的5T4靶向性受限CD3接合

构建体cx5185显示出增强的CD4 (图29A-C) 和CD8 (图29D-F) T细胞两者的线粒体功能。

6. T细胞报告物测定

[0521] 还评估了含有5T4靶向性sdAb的受限CD3接合构建体介导41BB共刺激信号传导途径的特异性激动的能力。使用Jurkat 41BB NF κ B- 萤光素酶报告细胞(参见例如实施例3) 来测试没有共刺激受体结合结构域(cx5951) 或具有41BB结合结构域(cx5185) 的示例性的靶向5T4的受限CD3接合构建体。将重组板结合的5T4用作抗原的来源。如图30所示,发现掺入41BB结合结构域(cx5185) 诱导靶向性共刺激受体的特异性激动。

C. 总结

[0522] 这些结果共同证明,含有具有和没有CRBR的靶向5T4的sdAb结构域的CD3接合构建体都能够进行T细胞的抗原依赖性激活。值得注意的是,与没有41BB结合结构域的5T4靶向性受限CD3接合构建体相比,掺入41BB结合结构域的5T4靶向性受限CD3接合构建体显示出优越的抗原依赖性和活性。

实施例16:CD3结合区在含有B7H3靶向结构域的CD3受限多特异性构建体中的定位的比较

[0523] 产生了另外的靶向B7H3的多特异性多肽构建体,其含有作为CD3结合区的Fv,其中构建体中抗CD3 Fv的VH或VL位于异二聚体Fc区的Fc-杆或Fc-白的C末端。在T细胞报告物测定中评估了所产生的CD3受限多特异性多肽构建体经由CD3接合激活T细胞的能力。

A. 构建体的设计和产生

[0524] 如图31A所示,产生了多特异性构建体,以含有通过接头(例如不可切割接头)与CD3结合区偶联的免疫球蛋白的异二聚体Fc区;作为CRBR的4-1BB抗原结合结构域(例如sdAb),其位于相对于CD3结合区的羧基末端;以及结合B7H3肿瘤相关抗原(TAA) 的双抗原结合区,其位于相对于多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和位于相对于多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。

[0525] 产生了至少编码异二聚体多特异性多肽构建体的第一多肽链和第二多肽链的多核苷酸,并且将其克隆到质粒中进行表达。第一多肽链从N末端到C末端按顺序通常包含第一Fc多肽(例如Fc白多肽);不可切割接头;抗CD3抗体的可变轻(VL;例如cx5187) 或可变重(VH;例如cx5841) 结构域;以及作为CRBR的4-1BB结合结构域(例如sdAb,其含有SEQ ID No: 308、309和310分别所示的CDR1、CDR2和CDR3;例如示出于SEQ ID NO:215中)。第二多肽链从N末端到C末端按顺序通常包含第一B7H3抗原结合结构域(例如B7H3 sdAb#1);第二Fc多肽(例如Fc杆多肽);与第一多肽链情况下相同的接头;抗CD3抗体的可变重(VH) 或可变轻(VL) 结构域中的另一个;以及第二B7H3抗原结合结构域(例如B7H3 sdAb#2)。抗CD3抗体包括二硫化物稳定的(dsFv) 抗体(具有突变G44C的抗CD3 VH和具有突变G100C的VL)。

[0526] 值得注意的是,如图31A所示,CD3 Fv的抗CD3 VH和抗CD3 VL的定位相对于异二聚体Fc区的Fc杆或Fc白的定位不同。如图31A的顶部所示,产生了cx5841,其中异二聚体构建体的第一多肽具有位于Fc杆C末端的CD3 Fv的VL以及在最N末端和C末端的B7H3结合结构域,并且异二聚体构建体的第二多肽具有位于Fc白C末端的CD3 Fv的VH以及在最C末端的41BB结合结构域。相比之下,图31A的底部描绘了示例性构建体cx5187,其中异二聚体构建体的第一多肽具有位于Fc杆C末端的CD3 Fv的VH以及在最N末端和C末端的B7H3结合结构域,并且异二聚体构建体的第二多肽具有位于Fc白C末端的CD3 Fv的VL以及在最C末端的

41BB结合结构域。

[0527] 表E6中示出了所产生的示例性受限CD3结合构建体的组分。基本上如实施例12所述表达和纯化构建体。

表E6: 含有B7H3靶向结构域的示例性受限CD3接合构建体							
构建体 ID	链	N末端 sdAb (靶标)	Fc	接头	CD3结合 结构域	C末端sdAb (靶标)	二硫化物 稳定的
cx5841	1	B7H3 sdAb 4 hz1A5v51 (SEQ ID NO: 301)	xELL- 苈 (SEQ ID NO: 84,88)	GGGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	B7H3 sdAb 3 hz58E05v48 (SEQ ID NO: 304)	是
	2	无	xELL- 白 (SEQ ID NO: 91,93)	GGGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	41BB sdAb (例如 SEQ ID NO: 215)	
cx5187	1	B7H3 sdAb 4 hz1A5v51 (SEQ ID NO: 301)	xELL- 苈 (SEQ ID NO: 84, 88)	GGGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	B7H3 sdAb 3 hz58E05v48 (SEQ ID NO: 304)	是
	2	无	xELL- 白 (SEQ ID NO: 91、93)	GGGGGSGGGGGS GGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	41BB sdAb (例如 SEQ ID NO: 215)	

B. T细胞报告物活性

[0528] 为了比较CD3接合,通过评估它们在与靶抗原表达细胞的共培养物中激活CD3 NFAT报告Jurkat细胞系的能力在抗原依赖性CD3报告物测定中测试了示例性构建体。通过监测Jurkat报告细胞中的绿色荧光或萤光素酶报告信号来评估激活。

[0529] 将靶向抗原的受限CD3接合构建体滴定到表达B7H3的A375细胞或不表达B7H3的对照CCRF-CEM细胞和表达NFAT驱动的绿色荧光蛋白(GFP)的工程化Jurkat细胞的共培养物上。CD3的接合导致NFAT信号传导和绿色荧光产生。对于利用贴壁靶细胞的报告物测定,接种靶细胞,允许其在室温下沉降以便均匀分布,并且在37°C下孵育若干小时以允许在添加报告细胞和靶向抗原的受限CD3接合构建体之前贴壁。使用IncuCyte ZOOM系统对测定板进

行连续成像,并且通过测量总绿色对象积分强度来确定CD3报告细胞激活。

[0530] 如图31B所示,当在表达B7H3的靶细胞的存在下在报告T细胞共培养物中孵育时,示例性的B7H3靶向性受限CD3接合构建体展现出介导靶抗原特异性T细胞激活的能力。然而,在与不表达B7H3的细胞的共培养物中没有观察到报告物活性(图31C)。值得注意的是,与具有杵-VL、臼-VH形式的cx5841相比,具有杵-VH、臼-VL形式的cx5187显示出增强的T细胞激活。

[0531] 在类似的测定中,将相同的靶向抗原的受限CD3接合构建体滴定到表达B7H3的A375细胞或不表达B7H3的对照CCRF-CEM细胞和表达NFAT驱动的萤光素酶的工程化Jurkat细胞的共培养物上。如图31D所示,当在表达B7H3的靶细胞的存在下在报告T细胞共培养物中孵育时,示例性的B7H3靶向性受限CD3接合构建体展现出介导靶抗原特异性T细胞激活的能力。同样,在与不表达B7H3的细胞的共培养物中没有观察到报告物活性(图31E)。如在GFP报告物测定中的那样,与具有杵-VL、臼-VH形式的构建体(cx5841)相比,具有杵-VH、臼-VL形式的构建体(cx5187)显示出增强的T细胞激活。

[0532] 这些结果与以下观察结果一致,即当CD3 F_v的组分的定向使得VH和VL分别位于Fc杵区和Fc臼区的C末端时,观察到增强的CD3接合和活性。

实施例17:共刺激受体结合区在含有DLL3靶向结构域的CD3受限多特异性构建体中的作用

[0533] 产生了具有或没有靶向4-1BB的共刺激受体结合区的另外的靶向DLL3的多特异性多肽构建体。在T细胞报告物测定中评估了所产生的CD3受限多特异性多肽构建体经由CD3接合激活T细胞的能力。

A. 构建体的设计和产生

[0534] 如图32A-B所示,产生了多特异性构建体,以含有通过接头(例如不可切割接头)与CD3结合区偶联的免疫球蛋白的异二聚体Fc区和结合DLL3肿瘤相关抗原(TAA)的双抗原结合结构域,所述抗原结合结构域位于相对于多特异性多肽构建体的Fc区的氨基末端和位于相对于多特异性多肽构建体的CD3结合区的羧基末端。在一些情况下,构建体还含有作为CRBR的4-1BB抗原结合结构域(例如含有SEQ ID NO:308、309和310分别所示的CDR1、CDR2和CDR3的sdAb;例如示出于SEQ ID NO:215中),其位于相对于CD3结合区的羧基末端。

[0535] 产生了至少编码异二聚体多特异性多肽构建体的第一多肽链和第二多肽链的多核苷酸,并且将其克隆到质粒中进行表达。第一多肽链从N末端到C末端按顺序通常包含第一Fc多肽(例如Fc臼多肽);不可切割接头;和抗CD3抗体的可变轻(VL)结构域。在一种构建体中,第一多肽另外包含在CD3 F_v的VL结构域的羧基末端的作为CRBR的4-1BB结合结构域(例如sdAb)。第二多肽链从N末端到C末端按顺序通常包含第二Fc多肽(例如Fc杵多肽);与第一多肽链情况下相同的接头;和抗CD3抗体的可变重(VH)结构域。抗CD3抗体包括二硫化物稳定的(dsFv)抗体(具有突变G44C的抗CD3 VH和具有突变G100C的VL)。第二多肽链另外编码两个DLL3抗原结合结构域,一个在Fc结构域的氨基末端,一个在CD3结合区的羧基末端。值得注意的是,所产生的示例性构建体中的一种另外含有靶向4-1BB共刺激受体的sdAb(例如cx5352)。

[0536] 下表E7中给出了具有靶向DLL3的sdAb结构域的示例性受限CD3结合构建体。基本上如实施例12所述表达和纯化构建体。

构建体 ID	链	N末端 sdAb (靶标)	Fc	接头	CD3结合结构域	C末端sdAb (靶标)	二硫化物稳定的
cx5499	1	DLL3 sdAb 1 (SEQ ID NO: 306)	xELL- 杆 (SEQ ID NO: 84、88或293)	GGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	DLL3 sdAb2 (SEQ ID NO: 307)	是

构建体 ID	链	N末端 sdAb (靶标)	Fc	接头	CD3结合结构域	C末端sdAb (靶标)	二硫化物稳定的
	2	无	xELL- 白 (SEQ ID NO: 91、93或296)	GGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	无	
cx5352	1	DLL3 sdAb 1 (SEQ ID NO: 306)	xELL- 杆 (SEQ ID NO: 84、88或293)	GGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	DLL3 sdAb2 (SEQ ID NO: 307)	是
	2	无	xELL- 白 (SEQ ID NO: 91、93或296)	GGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO: 119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	共刺激受体 sdAb (例如 SEQ ID NO: 215)	

B. T细胞活性

[0537] 为了比较含有位于CD3结合结构域C末端的CRBR的DLL3靶向性构建体与不含有CRBR的构建体的活性,在各种分析中测试了示例性构建体以评估其对T细胞活性的影响。

1. T细胞报告物测定

[0538] 评估了含有共刺激受体结合结构域的受限CD3接合构建体介导共刺激信号传导途径的特异性激动的能力。使用Jurkat 41BB NFκB- 萤光素酶报告细胞来测试没有共刺激受体结合结构域(cx5499)或具有41BB结合结构域(cx5352)的示例性的靶向DLL3的受限CD3接

合构建体。将报告细胞与DLL3阴性细胞系HEK-293或被转染以瞬时表达DLL3的截短版本(例如SEQ ID NO:324的276-618)的HEK-293细胞共培养。如图33所示, cx5352显示出DLL3依赖性41BB激动作用, 其中仅在表达DLL3的细胞的存在下观察到稳健的萤光素酶活性。在cx5499的情况下观察到低水平的DLL3依赖性NFkB激活, 表明此测定中的CD3信号传导可能导致一些NFkB激活。

2. 细胞毒活性

[0539] 从分离自三个不同健康人类供体leukopak的PBMC中负性富集了原代人T细胞, 并且以10:1-40:1 T细胞比靶细胞的比率添加。在本文中用CytoID红将靶细胞标记为红色, 同时用绿色荧光半胱天冬酶-3/7底物监测凋亡, 因此凋亡靶细胞是红色和绿色双重标记的那些。使用IncuCyte ZOOM系统对测定板进行连续成像。通过测量总红色/绿色重叠对象面积来确定靶细胞死亡(如图34A-B所示)。

[0540] 在示例性测定中, 所测试的CD3接合构建体包含具有41BB结合CRBR的DLL3靶向性sdAb(cx5352)。靶细胞是表达DLL3的SHP-77细胞或不表达DLL3的293FS细胞。如图34A所示, cx5352能够引发T细胞介导的抗原特异性细胞毒性。在不存在抗原的情况下没有观察到细胞毒性, 如在含有DLL3表达细胞的共培养物中没有红色/绿色重叠对象面积所示的(图34B)。此数据展示出了具有41BB结合结构域的示例性的DLL3靶向性受限CD3接合构建体引发T细胞介导的抗原特异性细胞毒性的能力。

[0541] 在类似的测定中, 以10:1、5:1或1.25:1的效应细胞比靶细胞(E:T)的比率添加分离自健康人类供体leukopak的原代人PBMC。将PBMC与表达DLL3的SHP-77靶细胞共培养, 并且在浓度增加的含有具有CRBR(cx53532)和没有CRBR(cx5499)的DLL3靶向性sdAb的示例性构建体的存在下孵育。如图35A-C所示, 在所分析的所有三个E:T比率下, cx5352都显示出针对靶细胞的细胞毒性。

3. T细胞细胞因子表达

[0542] 通过夹心ELISA(BioLegend, 美国)分析了来自T细胞介导的细胞毒性测定(基本上如上所述以SHP-77细胞作为靶细胞进行)的上清液的IFN γ 含量。遵循制造商的说明书, 并且生成上清液样品的细胞因子浓度值进行内插的标准曲线。向吸光度值低于检测下限的样品分配等于最低标准浓度的一半的细胞因子浓度。

[0543] 如图36所示, 与缺乏41BB结合结构域类似构建体cx5499相比, 掺入41BB结合结构域的DLL3靶向性受限CD3接合构建体cx5352导致T细胞的IFN γ 产生增强。

其他实施方案

[0544] 虽然已经结合本发明的具体实施方式描述了本发明, 但前面的描述旨在说明而不是限制本公开文本的范围, 本公开文本的范围由所附权利要求的范围限定。其他方面、优点和修改在以下权利要求的范围内。

序列表

SEQ ID NO	序列	描述
1	PAPPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	IgG1 Fc
2	PAPGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK	xELL Fc
3	PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	IgG2 Fc
4	PAPPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFKWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST FRVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESSGQPEN NYNTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNIFSCSVMH EALHNRFTQK SLSLSPGK	IgG3 Fc
5	PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	IgG4 Fc
6	PAPPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLV	IgG4 Fc

	KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	
7	EPKSSDKTHTCPPC	铰链
8	DKTHTCPPC	铰链
9	ESKYGPPCPPC	铰链
10	GGSGGS	(GGG)2
11	GGSGGSGGS	(GGG)3
12	GGSGGSGGSGGS	(GGG)4
13	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGG)5
14	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVR HGNGFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSA	抗CD3 Hv
15	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGG GTKLTVL	抗CD3 Lv
16	TYAMN	抗CD3 VH CDR1
17	RIRSKYNNYATYYADSVKD	抗CD3 VH CDR2
18	HGNGFGNSYVSWFAY	抗CD3 VH CDR3
19	RSSTGAVTTSNYAN	抗CD3 VL CDR1
20	GTNKRAP	抗CD3 VL CDR2
21	ALWYSNLWV	抗CD3 VL CDR3
22	LEAD	颗粒酶B底 物
23	RQAR	颗粒酶B底 物

24	PAGL	MMP底物
25	TGLEADGSPAGLGRQARVG	接头
26	TGLEADGSRQARVGPAGLG	接头
27	TGSPAGLEADGSRQARVGS	接头
28	TGPAGLGLEADGSRQARVG	接头
29	TGRQARVGGLEADGSPAGLG	接头
30	TGSRQARVGPAGLEADGS	接头
31	TGPAGLGSRQARVGGLEADGS	接头
32	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVG RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS	抗CD3 VH1
33	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYVCV RHGNGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS	抗CD3 VH2
34	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYVCV HGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS	抗CD3 VH3
35	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYVCV HGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS	抗CD3 VH4
36	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYVCV HGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS	抗CD3 VH5
37	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS	抗CD3 VH6
38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVGR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR HGNFGDSYVSWFAYWGQGLVTVSS	抗CD3 VH7
39	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV	抗CD3 VH8

	RHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTS	
40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSWFAYWGQTTVTVSS	抗CD3 VH9
41	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSYFAYWGQTTVTVSS	抗CD3 VH10
42	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVR HGNGFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH11
43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTKP	抗CD3 VH12
44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTKP	抗CD3 VH13
45	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSWFAYWGCGLTVTKP	抗CD3 VH14
46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH15
47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVS RIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH16
48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVR HGNGFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH17
49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKCLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVR HGNGFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH18

50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVSR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVR HGNTFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH19
51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKCLEWVSR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVR HGNTFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH20
52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKCLEWVGR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HGNTFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH21
53	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCV RHGNTFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH22
54	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVR HGNTFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH23
55	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVR HGNTFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH24
56	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVR HGNTFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH25
57	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKCLEWVSR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR HGNTFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH26
58	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKCLEWVGR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR HGNTFGDSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH27
59	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKCLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHGNTFGNSYISYWAYWGQGLTVTVS	抗CD3 VH28
60	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVA	抗CD3

	RIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSWFAYWGQTTVTVSS	VH29
61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSYFAYWGQTTVTVSS	抗CD3 VH30
62	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQTLVTVSS	抗CD3 VH31
63	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGG GTKLTVL	抗CD3 VL1
64	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHVWVFG CGTKLEIK	抗CD3 VL2
65	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIG GTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEEADYYCALWYSNLWVFG GGTKLTVL	抗CD3 VL3
66	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTTPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGG GTKLTVL	抗CD3 VL4
67	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTTPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGG GTKLTVL	抗CD3 VL5
68	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTTPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNLWVFG GGTKLTVL	抗CD3 VL6
69	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIG GTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFG GGTKLTVL	抗CD3 VL7
70	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVALWYSNRWVFG	抗CD3 VL8

	GGTKLTVL	
71	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHVWVFG GGTKLEIK	抗CD3 VL9
72	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHVWVFG CGTKLEIK	抗CD3 VL10
73	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGQCFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHVWVFG EGTKLEIK	抗CD3 VL11
74	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDLFTGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGC GTKLTVL	抗CD3 VL12
75	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHVWVFG GGTKLEIK	抗CD3 VL13
76	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIG GTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFG CGTKLTVL	抗CD3 VL14
77	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGG GTKLTVL	抗CD3 VL15
78	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGC GTKLTVL	抗CD3 VL16
79	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESYYCALWYSNLWVFG CGTKLTVL	抗CD3 VL17
80	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPQAFRGLIG GTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFG CGTKLTVL	抗CD3 VL18

81	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFG CGTKLTVL	抗CD3 VL19
82	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	种Fc
83	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	白Fc
84	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWXVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSP	种Fc
85	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWXVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS MHEALHNHYTQKSLSLSP	白Fc
86	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	种Fc
87	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF	白Fc

	YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
88	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWKYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	杵Fe
89	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWKYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	白Fe
90	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPT	白Fe
91	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWKYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNRYTQKSLSLSPT	白Fe
92	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPG	白Fe
93	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWKYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV	白Fe

	MHEALHNRYTQKSLSLSPG	
94	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVVHEALHNHYTQKSLSLSPT	种Fe
95	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWXVVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VVHEALHNHYTQKSLSLSPT	种Fe
96	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVVHEALHNHYTQKSLSLSPG	种Fe
97	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWXVVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VVHEALHNHYTQKSLSLSPG	种Fe
98	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVVHEALHNRYTQKSLSLSPT	白Fe
99	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWXVVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS VHEALHNRYTQKSLSLSPT	白Fe

100	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVVHEALHNRYTQKSLSLSPG	白Fc
101	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWXVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS VHEALHNRYTQKSLSLSPG	白Fc
102	PGGGG	肽接头
103	GGGG	肽接头
104	GPAGLGLPDGSRQARVG	接头
105	GGSGGGGIEPDIGSGGS	接头
106	GGSGGGGLEADTGGSGGS	接头
107	GSIEPDIGS	接头
108	GSLEADTGS	接头
109	GGSGGGGIEPDGGSGGS	接头
110	GGSGGGGIEPDVGGSGGS	接头
111	GGSGGGGIEPDSGGSGGS	接头
112	GGSGGGGIEPDTGGSGGS	接头
113	GGGSLEPDGSGS	接头
114	GPAGLGLEADGSRQARVG	接头
115	GGEGGGGSGSGGGGS	接头
116	GSSAGSEAGSGQAGVGS	接头
117	GGSGGGGLEAEGSGGGGS	接头
118	GGSGGGGIEPDGGSGGS	接头
119	GGGGGSGGGGSGGGGS	接头
120	QLQLQESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTLDNYAIGWFRQAPGKEREVSCI SSSDGSTYYADSVKGRFTISRNNAKGTVYLLMNSLKPEDTAVYYCATELVP ACTYSNGRGPLDGM DYWGKGTQVTKP	FR α sdAb

121	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSIDATAWYRQAPGKQRELVAIITS SGSTNYPESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNAITRYGGS TYDFWGQGLVTVKP	FR α sdAb
122	EVQPGGSLRLSCAASETFGVVFTLGWYRQAPGKREFVARVTGTDVTDYA ESVKGRFTISSDFARNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNTGAYWGQGLVTVK P	FR α sdAb
123	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFILDYYAIGWFRQAPGKEREGLCI DASDDITYYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTGVYYCATPIGL SSSCLLEYDYDYWGQGLVTVKP	cMET sdAb
124	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWRQAPGKGLEWVAY ISSDSSAIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGRGRE NIYYGSRLDYWGQGTTVTVSSSGGGSGGGSGGGGSDIQLTQSPSFLSAS VGDRVITICKASQNVDTNVAWYQQKPKAPKALIYSASYRYSVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQYNNYPFTFGQGTKLEIK	B7H3 scFv
125	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMG RIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNV FDGYWL VYWGQGLVTVSGSGGGSGGGGTGGGSDIVMTQTPLSLPVT GEPASISCRSSKSLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIK	CD20 scFv
126	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYVY YSGTTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCASIAVTGFY FDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERVTL CRASQRVNNNYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGTDF LTISRLEPEDFAVYYCQYDRSPLTFGGGTKLEIK	DLL3 scFv
127	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWRQAPGKGLEWVAY ISSDSSAIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGRGRE NIYYGSRLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKEPKSC	B7H3 Fd
128	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITICKASQNVDTNVAWYQQKPKAPKALIYSA SYRYSVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQYNNYPFTFGQGTK	B7H3 LC

	LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	
129	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMY YCV RQWDYDVRAMNYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	5T4 Fd
130	DIVMTQSHIFMSTSVGDRVSITCKASQDVDTA VAWYQQKPGQSPKLLIYWA STRLTGVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFCQYSSYPYTFGGGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	5T4 LC
131	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSFNYYWSWIRHHPGKGLEWIGY IYYSGSTYSNPSLKSRTISVDTSKNQFSLTSSVTAADTAVYYCARGYNWN YFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC	gpNMB Fd
132	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSDNNLVWYQQKPGQAPRLLIYGA STRATGIPARFSGSGSTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQYNNWPPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	gpNMB LC
133	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMA WINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTASLQIINLKNEDTATYFCARIGDS SPSDYWGQGTTLTVSSSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSC	DLL3 Fd
134	SIVMTQTPKFLLSAGDRVITITCKASQSVSNDVVWYQQKPGQSPKLLIYYA SNRYTGVPDRFAGSGYGTDFSTISTVQAEDLAVYFCQDYTSPWTFGGGT KLEIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL	DLL3 LC

	QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	
135	GGGGGS	肽接头
136	IEPDI	接头
137	LEADT	接头
138	IEPDG	接头
139	IEPDV	接头
140	IEPDS	接头
141	IEPDT	接头
142	LEPD	接头
143	LEAE	接头
144	IEPDP	接头
145	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIG GTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDADYYCALWYSNLWVFG GGTKLTVLGGGSGGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGM HWVRQAPGKGLEWVAIYSSDSSAIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRDEDTAVYYCGRGRENIYYGSRLDYWGQGTITVTVSSGGCGGGKVAAL KEKVAALKEKVAALKEKVAALKE	B7-H3 x CD3双特异性DART-A 双抗体的 第二多肽 链
146	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPPEPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK	B7-H3 x CD3双特异性DART-A 双抗体的 第三多肽 链
147	GGSGGGSGGGSGGGGS	接头
148	TGGSGGGIEPDIGSGGS	接头
149	GGGGS	接头
150	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ (P4 P3 P2 P1 ↓ P1') X1 = I、L、Y、M、F、V或A; (P4 = I、L、Y、M、F、V或A) X2 = A、G、S、V、E、D、Q、N或Y; (P3 = A、G、S、V、E、D、Q、N或Y)	接头共有 序列

	<p>X3 = H、P、A、V、G、S或T; (P2 = H、P、A、V、G、S或T)</p> <p>X4 = D或E; (P1 = D或E)</p> <p>X5 = I、L、Y、M、F、V、T、S、G或A (P1' = I、L、Y、M、F、V、T、S、G或A)</p>	
151	<p>X1 E X3 D X5 (P4 P3 P2 P1 ↓ P1')</p> <p>X1 = I或L; (P4 = I或L)</p> <p>(P3 = E)</p> <p>X3 = P或A; (P2 = P或A)</p> <p>X5 = I、V、T、S或G (P1' = I、V、T、S或G)</p>	接头共有 序列
152	LEPDG	接头
153	LEADG	接头
154	<p>X₁QARX₅ (P1QAR↓(A/V))</p> <p>X1 = 任何氨基酸; (P1是任何氨基酸)</p> <p>X5 = A或V</p>	接头共有 序列
155	<p>RQARX₅ (RQAR(A/V))</p> <p>X5 = A或V</p>	接头共有 序列
156	RQARV	接头
157	<p>X1X2 X3 X4 (P3 P2 P1 ↓ P1')</p> <p>X1 = P、V或A; (P3 = P、V或A)</p> <p>X2 = Q或D; (P2 = Q或D)</p> <p>X3 = A或N; (P1 = A或N)</p> <p>X4 = L、I或M (P1' = L、I或M)</p>	接头共有 序列
158	<p>PX2X3X4 (P3 P2 P1 ↓ P1')</p> <p>(P3 = P)</p> <p>X2 = Q或D; (P2 = Q或D)</p> <p>X3 = A或N; (P1是A或N)</p> <p>X4 = L或I (P1'是L或I)</p>	接头共有 序列
159	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
160	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
161	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
162	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A

163	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
164	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A
165	GGATCTGGAGCAACAACTTCTCACTACTCAAACAAGCAGGTGACGTGG AGGAGAATCCCGGACCC	P2A DNA
166	GSPAGLEADGSRQARVGS	接头
167	EVQLVESGGGL VQPKGSLKLS CAASGFTFNT YAMNWVRQAP GKGLEWVARI RSKSNNYATY YADSVKDRFT ISRDDSQSML YLQMNNLKTE DTAMYXCVRQ WDYDVRAMNY WGQGTSVTVS S	抗5T4 VH
168	DIVMTQSHIF MSTSVGDRVS ITCKASQDVD TAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRLTGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLADYFCQQ YSSYPYTFGG GTKLEIK	抗5T4 VL
169	DIQLTQSPSF LSASVGDRVIT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISR DSKNSLYLQM NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS GCGGGEVAA LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKLSL SPGK	B7-H3 x CD3双特异性 DART-A 双抗体的 第一多肽 链
170	GGGGSGGGSGGGGS	接头
171	GGG(GGS) _n 其中n是0至10	接头
172	(GGGGGS) _n 其中n是1至4	接头

173	(GGGGS) _n 其中n是1至5	接头
174	Gly _x Xaa-Gly _y -Xaa-Gly _z Xaa独立地选自A、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、 H、D或E x、y和z各自是1-5范围内的整数	接头
175	Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly Xaa独立地选自A、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、 H、D或E	接头
176	ATTTGSSPGPT	接头
177	GGGGG-C-GGGGG	接头
178	(EAAAK) _n n = 2-20	接头
179	AS-(AP) _n -GT n = 2-20	接头
180	AS-(EAAAK) _n -GT n = 2-20	接头
181	(GGGGA) _n n = 2-20	接头
182	(PGGGS) _n n = 2-20	接头
183	(AGGGS) _n n = 2-20	接头
184	GGS-(EGKSSGSGSESKST) _n -GGG n = 2-20	接头
185	(SSSSG) _n n = 1-9	接头
186	SSSASASSA	接头
187	GSPGSPG	接头
188	QVQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGGSIS SYIWSWIRQP PGKGLEWIGY VYYSGTTNIN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCASIIV	DLL3 scFv

	TGFYFDYWGQ GTLVTVSSGG GSGGGGGSGG GGSEIVLTQS PGTLSPGGE RVTLSCRASQ RVNNNYLAWY QQRPGQAPRL LIYGASSRAT GIPDRFSGSG SGTDFTLTIS RLEPEDFAVY YCQQYDRSPL TFGGGTKLEI K	
189	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQA PGQGLEWMGR IFPGDGDYDY NGKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARNV FDGYWLVYWG QGTLTVSS	CD20 VH
190	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSL HSNNGITYLYW YLQKPGQSPQ LLIYQMSNLV SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCAQNLELP YTFGGGKVE IKRTV	CD20 VL
191	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEANSAFGFQGR LLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVGLFRVTPEIPAGLPSPRS E	41BBL
192	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGKGLEWMGK IYPGDSYTNYSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGI FDYWGQGTTLTVSS	41BB VH
193	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVLVIYQDK NRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCATYTGFGSLAVFGGGT KLTVL	41BB VL
194	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWIRQSPEKGLEWIGEI NHGGYVTYNPSLESRVTVSDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCARDYGP NYDWYFDLWGRGTLTVSS	41BB VH
195	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGTDFLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGT KVEIK	41BB VL
196	QMQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFSGYYMHVVRQAPGQGLEWM GWVNPMSGGTNYAQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSED TAVYYCAR EGMAMRLELDKWGQGTTLTVSS	41BB VH
197	SYELTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDS DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSVVFGGGTQL	41BB VL

	TVL	
198	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGK WYVVVGQAGNIKLREDKDPNK MMATIELKEDKSYNVTGVTFDKKCTYAISTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPG HTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFQNRREEFYITLYGRTELKELTSELKENFIR FSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG	41BB抗运 载蛋白
199	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGK WYVVVGQAGNIRLREDKDPIKM MATIELKEDKSYDVTMVKFDDKKCMYDIWTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPG HTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFQNRREEFYITLYGRTELKELTSELKENFIR FSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG	41BB抗运 载蛋白
200	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGK WYVVVGQAGNIRLREDKDPNK MMATIELKEDKSYDVTAVAFDDKKCTYDIWTFVPGSQPGEFTLGKIKSFP GHTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFQNRREEFYITLYGRTELKELTSELKENFI RFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG	41BB抗运 载蛋白
201	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGK WYVVVGQAGNIKLREDKDPNK MMATIELKEDKSYDVTAVAFDDKKCTYDIWTFVPGSQPGEFTLGKIKSFP GHTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFQNRREEFYITLYGRTELKELTSELKENFI RFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG	41BB抗运 载蛋白
202	QDSTSDLIPA PPLSKVPLQQ NFQDNQFHGK WYVVVGQAGNI KLREDSKMMATIELKEDKSYDVTGVSFDD KKCTYAIMTF VPGSQPGEFT LGKIKSFPGH TSSLVRVST NYNQHAMVFF KFVFQNRREEF YITLYGRTELKELTSELKENFI RFSKSLGLPENHIVFPVPID QCIDG	41BB抗运 载蛋白
203	QDSTSDLIPA PPLSKVPLQQ NFQDNQFHGK WYVVVGQAGNI KLREDKDPVK MMATIELKEDKSYDVTGVT FDDKKCRYDI STFVPGSQPGEFTFGKIKSFPGHTSSLVRV VSTNYNQHAM VFFKFVFQNR EEFYITLYGR TELKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPV PIDQCIDG	41BB抗运 载蛋白
204	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGK WYVVVGQAGNIRLREDKDHPK MMATIELKEDKSYDVTGVTFDKKCTYAISTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPG HTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFQNRREEFYITLYGRTELKELTSELKENFIR FSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG	41BB抗运 载蛋白
205	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGK WYVVVGQAGNIKLREDKDPNK MMATIELKEDKSYDVTGVTFDKKCTYAISTLVPGSQPGEFTFGKIKSFPG	41BB抗运 载蛋白

	HTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIR FSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG	
206	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKQWYVVGQAGNIRLREDKDPSKM MATIYELKEDKSYDVTAVTFDDKKCNYAISTFVPGSQPGEFTLGKIKSFGH TSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIR SKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG	41BB抗运 载蛋白
207	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	人41BBL 的71-254
208	DLDRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSRSE	人41BBL 的85-254
209	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKED TKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	人41BBL 的80-254
210	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVL LIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	人4-1BBL 的52-254
211	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	人41BBL 的71-248
212	DLDRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGL	人41BBL 的85-248
213	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKED	人41BBL

	TKELVVAKAGVYYVFFQLELRRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGL	的80-248
214	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVL LIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	人41BBL 的52-248
215	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSSINAMGWYRQAPGKRREFVAAI ESGRNTVYAESVKGRFTISRDNANTVYVYLMSSLRSEDVAVYYCGLLKGN RVVSPSVAYWGQGLTVTKP	41BB sdAb
216	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDFYLI SLKGYFSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVT TDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL	OX40配体
217	QVSHRYPRFQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDF YLISLKGYS QEVNLSLHYQ KDEEPLFQLK KRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEFCVL	OX40配体
218	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDFYLI SLKGYFSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVT TDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL	OX40配体
219	QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDF YLISLKGYS QEVNLSLHYQ KDEEPLFQLK KRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEFCVL	OX40配体
220	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDFYLI SLKGYFSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVT TDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL	OX40配体
221	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDSYMSWVRQAPGQGLEWIG DMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLESSLRSEDVAVYYCFLAP RWYFSVWGQGLTVTVSS	OX40 VH
222	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKAPKLLIYYTS RLRSGVPSRFSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQQGHTLPPTFGQGTKVE IKRT	OX40 VL

223	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSGSAMHWVRQASGKGLEWVG RIRSKANSYATAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTS GIYDSSGYDYWGQGLTLTVSS	OX40 VH
224	DIVMTQSPLSLPVTPEPASICRSSQSLHNSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPFTFG GGTKVEIK	OX40 VL
225	EVQLLESGGGEVQPGSLRLS AASGFTFSDAFMYWVRQAPGKGLEWVSSI SNRGLKTAYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCSRDVD GDFRGQGLTLTVKVP	OX40 sdAb
226	QLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQ VAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTIDLI FNSEHQVLKNNTYWGIIILLANPQFIS	GITR 配体
227	QVQLVESGGGVVQGRSLRLS AASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVAS ISSGGTTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGGY YDSMDYWGQGLTLTVSS	GITR VH
228	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASESDNYGVSEFMNWWYQQKPGQAPRLLI YAASNQSGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTKVETWTFGQ GTKVEIK	GITR VL
229	QVTLRESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPPGKALEWLA HIWWDDDKYYQPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARTR RYFPFAYWGQGLTLTVSS	GITR VH
230	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQNVGTNVAWYQQKPGQAPRLLIYSA SYRYSGIPARFSGSGGTFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNTDPLTFGGGTKV EIK	GITR VL
231	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGSISGGYFWSWIRQPPGKGLEWIGY IYYSGTTYYNPSLKSRLTISIDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDLFYY DTSGPRGFDPPWGQGLTLTVSS	GITR VH
232	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTVSSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGS STRATGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDSSPWTFGGGTK VEIK	GITR VL
233	QVQLVESGGGVVQGRSLRLS AASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA	GITR VH

	VIWYPGSNKYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG GELGRYYYYGMDVWGQGTTVTVSS	
234	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTVTCRASQGIRNDLGWYQQKPKAPKRLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNNYPWTFGQGTK VDIK	GITR VL
235	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVFSIDAMGWYRQAPGKQRELVAV LSGISSAKYAASAPGRFTISRDNKNTVYLMSSLRAEDTAVYYCYADVST GWGRDAHGYWGQGLTVTV	GITR sdAb
236	MPEEGSGCSVRRRYPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLE <u>SLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWOGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRD</u> <u>GIYMVHIQVTLAICSSTTASRHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIAS</u> <u>QRLTPLARGDTLCTNLTGTLPSRNTDETFFGVQWVRP</u>	UniProt编 号P32970, CD70-ECD 残基39-193 (下划线)
237	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG SGNWGFFDYWGQGLTVTVSS	CD70 VH
238	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPRTFGQGTKV EIK	CD70 VL
239	QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINGMGWYRQAPGKERELVAGL TSGGSVTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCRAEIFT RTGENYYGMDYWGKGTQVTVKP	ICOS sdAb
240	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMGWFRQAPGKEREFVAA INYYRDAADYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCGFTY AGWASSRRDDYNYWGQGLTVTVKP	CD28 sdAb
241	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHVWVFG CGTKLTVL	抗CD3 VL (CON)
242	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSPALLVVTEGDNA TFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPN GRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPT	PD-1

	AHPSPPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARR TGQPLKEDPSAVPVFVSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFSPG MGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL	
243	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGSMTGANTMGWYRQAPGKQRDLVA LIGNYHYADSVKGRFTISRENAKNTVILQMNSLNPEDTAVYYCYLYTDNLG TSWGQGTTLVTVKPGG	18H10
244	GGSGGS	(GGG)2接 头
245	GGSGGS	(GGG)2接 头
246	GGSGGSGGS	(GGG)3接 头
247	GGSGGSGGSGGS	(GGG)4接 头
248	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGG)5接 头
249	GGGG	甘氨酸接 头
250	GGGGG	甘氨酸接 头
251	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAPGKGRDLVS LIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDN LGTSWGQGTTLVTVKPGG	hz18H10v1
252	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAPGKQRDLVS LIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDN LGTSWGQGTTLVTVKPGG	hz18H10v2
253	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAPGKQRDLVS LIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTD NLGTSWGQGTTLVTVKPGG	hz18H10v3
254	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAPGKQRDLVA LIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTD	hz18H10v4

	NLGTSWGQGLVTVKPGG	
255	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAPGKQRDLVA LIGNYVTHYAESVKGRFTISRENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDN LGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v5
256	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDLVA LIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTD NLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v6
257	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPGKQRDLVAL IGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDN LGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v7
258	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDLVSL IGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v8
259	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDLVSL IGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDN LGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v9
260	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAPGKQRDLVS LIGNYVTHYAESVKGRFTISRENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDN LGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v1 0
261	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDLVSL IGNYVTHYAESVKGRFTISRENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v1 1
262	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDLVA LIGNYVTHYAESVKGRFTISRENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDN LGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v1 2
263	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAPGKQRELVA LIGNYVTHYAESVKGRFTISRENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDN LGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v1 3
264	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDLVA LIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDN LGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v1 4

265	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPGKQRDLVAL IGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v1 5
266	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPGKQRDLVAL IGNYVTHYAESVKGRFTISRRENAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v1 6
267	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPGKQRDLVAL IGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYLYTDN LGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v1 7
268	GSMTGANTMG	CDR1
269	GGSGGSGGS	(GGG)3接 头
270	GGSGGSGGSGGS	(GGG)4接 头
271	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGG)5接 头
272	GSVTGANTMG	CDR1
273	GSITGANTMG	CDR1
274	GGSGGS	(GGG)2接 头
275	GGSGGSGGS	(GGG)3接 头
276	GGSGGSGGSGGS	(GGG)4接 头
277	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGG)5接 头
278	LIGNYVTH	CDR2
279	GGSGGS	(GGG)2接 头
280	GGSGGSGGS	(GGG)3接 头

281	GGSGGSGGSGGS	(GGS)4接头
282	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGS)5接头
283	YTDNLGTS	CDR3
284	PAPGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TPPVLDSGD SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	Fc xELL
285	DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYF SDIAVEWESDGPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVDFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc-Het-1
286	DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc-Het-2
287	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKGLEWVG RIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCV RHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	CD3-VH32
288	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHVWVFG GGTKLTVL	CD3-VL20
289	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHVWVFG CGTKLTVL	CD3-VL21
290	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKCLEWVAR IRSKYNNYATYYADTVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVR	CD3-VH34

	HGNFGDSYVSWFAYWGQGLTV	
291	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	杵Fe
292	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	白Fe
293	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWKYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP	杵Fe
294	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWKYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP	白Fe
295	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNRYTQKSLSLSP	白Fe
296	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWKYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNRYTQKSLSLSP	白Fe

297	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVVHEALHNHYTQKSLSLSP	杵Fc
298	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWXVVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VVHEALHNHYTQKSLSLSP	杵Fc
299	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVVHEALHNRYTQKSLSLSP	白Fc
300	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWXVVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS VHEALHNRYTQKSLSLSP	白Fc
301	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSSNMWVRQAPGKGLEWVST IYSSGTGTFYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRPEDTAVYYCATSGPV RGWGPRSQGTLVTVKP	B7H3 sdAb B7h3 hz1A5v51
302	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPGKQREPVATS HHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNTLRAEDTAVYYCKADHG YQGRGYWGQGLVTVKP	sdAb B7H3 hz58E05v2 7
303	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYHMSWFRQAPGKQRELVATS HHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNTLRAEDTAVYYCKADHG YQGRGYWGQGLVTVKP	sdAb B7H3 hz58E05v5 5
304	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYHMSWFRQAPGKQREPVATS HHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNTLRAEDTAVYYCKADHG	sdAb B7H3 hz58E05v4

	YQGRGYWGQGLVTVKP	8
305	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAPSERTFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAVV NWGGGSKYYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAGG AYSGPYYDTRQYTYWGQGLVTVKPGG	sdAb B7H3 hz57B04v2 4
306	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAGF TGDTNTIYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAADVQLF SRDYEFYWGQGLVTVKP	sdAb DLL3 hz10D9v7
307	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGPSEIITSDKSMGWVRQAPGKQRNLVAGI SNVGSTNYAQSVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYARDFE NEYWGQGLVTVKP	sdAb DLL3 hz8E7v16
308	GFSFSINAMG	41BB CDR1
309	AIESGRNTV	41BB CDR2
310	LKGNRVVSPSVAY	41BB CDR3
311	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKCLEWVGR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR HGDFGDSYVSWFAYWGQGLVTVSS	CD3-VH33
312	GFTFNTYAMN	抗CD3 VH CDR1
313	RIRSKYNNYATY	抗CD3 VH CDR2
314	HGDFGDSYVSWFAY	CD3-VH7, VH33 CDR3
315	ALWYSNHVV	CD3-VL2, VL21 CDR3
316	VLWYSNRVV	CD3-VL8 CDR3

317	GFTFSTYAMN	CD3 VH33 CDR1
318	RIRSKYNNYATY	CD3 VH33 CDR1
319	GSSTGAVTTSNYAN	CD3 VL21 CDR1
320	GTNKRAP	CD3 VL21 CDR2
321	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLS CAASGFSFSINAMGWYRQAPGK RREFVAAI ESGRNTVYAESVKGRFTISR DNAKNTVYVYLMSSSLRAEDT AVYYCGLLKGN RVVSPSVAYWGQGLVTVKP	sdAb 41BB
322	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLS CAASGRPFSSKMAWFRQAPGK EREFVAA VRWIGGATRYTESVKGRFTISR DNAKNTVYVYLMSSSLRAEDT AVYYCAAGQ AWGTKFTDYSWGWQGLVTVKP	sdAb 5T4 hz12E9v9
323	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLS CAASGRPFSSYAMGWFRQAPGK ERETVAA VSRNAGSSYYAESVKGRFTISR DNAKNTVYVYLMSSSLRAEDT AVYYCAARS AAYSRSSEYTEKHDYTYWGQGL VTVKP	sdAb 5T4 hz16G10v1 1
324	MVSPRMSGLLSQTIVILALIFLP QTRPAGVFELQIHSFGPGPGAP RSPCSAR LPCRLFFRVCLKPGLSEEAESP CALGAALSARGPVYTEQPGAP PDLPLPD GLLQVPPFRDAWPGTFSFIET WREELGDQIGGPAWSSLARV AGRRLAAGGPWARDIQRAGAW ELRFSYRARCEPPAVGTACTRL CRPSA PSRCGPGLRPCAPLEDECEAP LVCRAGCSPEHGFCEQPGE CRCLEGWTGPLC TVPVSTSSCLSPRGSSATTG CLVPGPGPCDGNPCANGGS CSETPRSFECTCPRGFYGLR CEVSGVTCADGPCFNGGLCV GGADPDSAYICH CPPGFQGSNCEKRVDRCSLQ PCRNGGLCLDLGHALRCRCR AGFAGPRCEH DLDDCAGRACANGGTCVEGG GAHRCSCALG FGGRDCRERADPCAARPCA HGGRCYAHFSGLVACAPGYM GARCEFPVHP DGASALPAAPPGLRPGDPQ RYLLPPALGLLVAAGVAGA ALLLVHVRRRGH SQDAGSRLLAGTPEPSVHAL PDALNNLRTQEG SGDGPSSVDWNRPEVDVPQ GIYVISAPSIYAREVATPLF PPLHTGRAGQRQ HLLFPYPSSILSVK	人DLL3

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> 3
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG2 Fc
 <400> 3
 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> 4
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG3 Fc
 <400> 4
 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> 5
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG4 Fc
 <400> 5
 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> 6
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG4 Fc
 <400> 6
 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> 7
 <211> 14

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> 15

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 Lv

<400> 15

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> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH CDR1

<400> 16

Thr Tyr Ala Met Asn
 1 5

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH CDR2

<400> 17

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH CDR3

<400> 18

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VL CDR1

<400> 19

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VL CDR2

<400> 20

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

1	5	10	15
Arg Val Gly			
<210> 26			
<211> 19			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 26			
Thr Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Arg Gln Ala Arg Val Gly Pro Ala			
1	5	10	15
Gly Leu Gly			
<210> 27			
<211> 19			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 27			
Thr Gly Ser Pro Ala Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Arg Gln Ala Arg			
1	5	10	15
Val Gly Ser			
<210> 28			
<211> 19			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 28			
Thr Gly Pro Ala Gly Leu Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Arg Gln Ala			
1	5	10	15
Arg Val Gly			
<210> 29			
<211> 19			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 29			

Thr Gly Arg Gln Ala Arg Val Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Pro Ala
 1 5 10 15
 Gly Leu Gly
 <210> 30
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头
 <400> 30
 Thr Gly Ser Arg Gln Ala Arg Val Gly Pro Ala Gly Leu Glu Ala Asp
 1 5 10 15
 Gly Ser
 <210> 31
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头
 <400> 31
 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> 32
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗CD3 VH1
 <400> 32
 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

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> 35			
<211> 125			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 抗CD3 VH4			
<400> 35			
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> 36			

<211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗CD3 VH5
 <400> 36
 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> 37
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗CD3 VH6
 <400> 37
 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> 38

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH7

<400> 38

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> 39

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH8

<400> 39

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>	40																		
<211>	125																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	抗CD3 VH9																		
<400>	40																		
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>	41																		
<211>	125																		
<212>	PRT																		

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH10

<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	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> 42

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH11

<400> 42

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> 43

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH12

<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 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> 44

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH13

<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 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> 45
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗CD3 VH14
 <400> 45

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> 46
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 抗CD3 VH15

<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	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> 47

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH16

<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	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> 48

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH17

<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 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> 49

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH18

<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 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
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
	85	90
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe		
	100	105
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 VH19

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr		
	20	25
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val		
	35	40
Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp		
	50	55
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr		
65	70	75
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
	85	90
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe		
	100	105
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 VH20

<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 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> 52

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH21

<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
 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> 53

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH22

<400> 53

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							80	
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr
							85							90	
Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe
									105					110	
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
									120					125	

<210> 54

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH23

<400> 54

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> 55

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH24

<400> 55

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> 56

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH25

<400> 56

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> 57

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH26

<400> 57

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> 58

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH27

<400> 58

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	
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
							85							90	
Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asp	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe
									105					110	
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
									120					125	

<210> 59

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH28

<400> 59

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	
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> 60

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH29

<400> 60

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> 61

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH30

<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 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> 62

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH31

<400> 62

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> 63

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

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 VL5

<400> 67

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> 68

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VL6

<400> 68

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> 69

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VL7

<400> 69

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> 70

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VL8

<400> 70

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> 71

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VL9

<400> 71

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> 72

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VL10

<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	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> 73

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VL11

<400> 73

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> 74

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VL12

<400> 74

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> 75

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VL13

<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 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> 76

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VL14

<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	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> 77

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VL15

<400> 77

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> 78

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VL16

<400> 78

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> 79

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VL17

<400> 79

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> 80

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VL18

<400> 80

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> 81

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VL19

<400> 81

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>	82														
<211>	226														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	杵Fc														
<400>	82														
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									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> 83		
<211> 226		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 白Fc		
<400> 83		
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
1	5	10
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
	20	25
Arg Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
	35	40
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
	50	55
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
65	70	75
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
	85	90
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
	100	105
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
	115	120
Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
	130	135
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
145	150	155
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
	165	170
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val		
	180	185
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
	195	200
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
	210	220
Pro Thr		

225

<210> 84

<211> 223

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 杵Fc

<400> 84

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> 85

<211> 223

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 白Fc

<400> 85

```

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> 86

<211> 226

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 杵Fc

<400> 86

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> 87
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 白Fc
 <400> 87
 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> 88
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 杵Fc
 <400> 88
 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 Gly
 210 215 220
 <210> 89
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 白Fc
 <400> 89
 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 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> 91
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 白Fc
 <400> 91
 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> 92
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 白Fc
 <400> 92
 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> 93
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 白Fc
 <400> 93
 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> 94
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 杵Fc
 <400> 94
 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> 95
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 杵Fc
 <400> 95
 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> 96
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 杵Fc
 <400> 96
 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 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly
 225

<210> 97
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 杵Fc
 <400> 97
 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> 98
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 白Fc
 <400> 98
 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> 99
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 白Fc

<400> 99

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> 100

<211> 226

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 白Fc

<400> 100

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

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> 102

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽接头

<400> 102

Pro Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 103

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽接头

<400> 103

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 104

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 104

Gly Pro Ala Gly Leu Gly Leu Glu Pro Asp Gly Ser Arg Gln Ala Arg

1

5

10

15

Val Gly

<210> 105

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 105

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Ile Gly Gly Ser Gly

1

5

10

15

Gly Ser

<210> 106

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 106

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Leu Glu Ala Asp Thr Gly Gly Ser Gly

1

5

10

15

Gly Ser

<210> 107

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 107

Gly Ser Ile Glu Pro Asp Ile Gly Ser

1 5

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 108

Gly Ser Leu Glu Ala Asp Thr Gly Ser

1 5

<210> 109

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 109

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 110

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Val Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 111

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 111

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Ser Gly Gly Ser Gly

1	5	10	15
Gly Ser			
<210> 112			
<211> 18			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 112			
Gly	Gly	Ser	Gly
Gly	Gly	Gly	Gly
Ile	Glu	Pro	Asp
Thr	Gly	Gly	Ser
Gly			
1	5	10	15
Gly Ser			
<210> 113			
<211> 12			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 113			
Gly	Gly	Gly	Ser
Leu	Glu	Pro	Asp
Gly	Ser	Gly	Ser
1	5	10	
<210> 114			
<211> 18			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 114			
Gly	Pro	Ala	Gly
Leu	Gly	Leu	Glu
Ala	Asp	Gly	Ser
Arg	Gln	Ala	Arg
1	5	10	15
Val Gly			
<210> 115			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 115			
Gly	Gly	Glu	Gly
Gly	Gly	Gly	Gly
Ser	Gly	Gly	Ser
Gly	Gly	Gly	Ser

1	5	10	15
<210> 116			
<211> 18			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 116			
Gly Ser Ser Ala Gly Ser Glu Ala Gly Gly Ser Gly Gln Ala Gly Val			
1	5	10	15
Gly Ser			
<210> 117			
<211> 18			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 117			
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Leu Glu Ala Glu Gly Ser Gly Gly Gly			
1	5	10	15
Gly Ser			
<210> 118			
<211> 18			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 118			
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Pro Gly Gly Ser Gly			
1	5	10	15
Gly Ser			
<210> 119			
<211> 18			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 119			
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			

Ala Ile Ile Thr Ser Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Pro 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 Asn
 85 90 95
 Ala Ile Thr Arg Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
 115

<210> 122

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR α sdAb

<400> 122

Glu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Phe Gly Val Val Phe Thr Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30
 Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Val Thr Gly Thr Asp Thr Val Asp
 35 40 45
 Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Phe Ala
 50 55 60
 Arg Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 65 70 75 80
 Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 85 90 95
 Val Thr Val Lys Pro
 100

<210> 123

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> cMET sdAb

<400> 123

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 Ile Leu Asp Tyr Tyr			
	20	25	30
Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val			
	35	40	45
Leu Cys Ile Asp Ala Ser Asp Asp Ile Thr Tyr 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 Gly Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Thr Pro Ile Gly Leu Ser Ser Ser Cys Leu Leu Glu Tyr Asp Tyr			
	100	105	110
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro			
	115	120	125
<210> 124			
<211> 245			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> B7H3 scFv			
<400> 124			
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 Ser Phe			
	20	25	30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr 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 Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp			
	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
	115	120	125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln			

130	135	140
Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr		
145	150	155
Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln		
	165	170
Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg		
	180	185
Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp		
	195	200
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr		
	210	220
Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr		
225	230	235
Lys Leu Glu Ile Lys		
	245	
<210> 125		
<211> 247		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CD20 scFv		
<400> 125		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser		
	20	25
Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
	35	40
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe		
	50	55
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly		
	100	105
Thr Leu Val Thr Val Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
	115	120
Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu		

130	135	140
Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser		
145	150	155
Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr		
	165	170
Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser		
	180	185
Asn Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly		
	195	200
Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly		
	210	220
Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly		
225	230	235
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	245	
<210> 126		
<211> 241		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> DLL3 scFv		
<400> 126		
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr		
	20	25
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
	35	40
Gly Tyr Val Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys		
	50	55
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu		
65	70	75
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
	85	90
Ser Ile Ala Val Thr Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
	100	105
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
	115	120
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu		

130	135	140
Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln		
145	150	155
Arg Val Asn Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln		
	165	170
Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile		175
	180	185
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		190
	195	200
Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln		205
210	215	220
Tyr Asp Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
225	230	235
		240
Lys		
<210> 127		
<211> 225		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> B7H3 Fd		
<400> 127		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe		
	20	25
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35	40
Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val		
	50	55
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90
Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp		
	100	105
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
	115	120
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
130	135	140

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 129
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 5T4 Fd
 <400> 129
 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 Ser 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 Met
 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 Gln Trp Asp Tyr Asp Val Arg Ala Met Asn Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys
 225
 <210> 130
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 5T4 LC
 <400> 130
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Ile Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Leu Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> gpNMB LC
 <400> 132
 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 Asp Asn Asn
 20 25 30
 Leu Val 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 Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 133
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> DLL3 Fd

<400> 133

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Ser
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ile Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ile Gly Asp Ser Ser Pro Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

<210> 134

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DLL3 LC

<400> 134

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp

<223> 接头
<400> 136
Ile Glu Pro Asp Ile
1 5
<210> 137
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 137
Leu Glu Ala Asp Thr
1 5
<210> 138
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 138
Ile Glu Pro Asp Gly
1 5
<210> 139
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 139
Ile Glu Pro Asp Val
1 5
<210> 140
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 140
Ile Glu Pro Asp Ser

1 5
<210> 141
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 141
Ile Glu Pro Asp Thr
1 5
<210> 142
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 142
Leu Glu Pro Asp
1
<210> 143
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 143
Leu Glu Ala Glu
1
<210> 144
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 144
Ile Glu Pro Asp Pro
1 5
<210> 145
<211> 274

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> B7-H3 x CD3双特异性DART-A双抗体的第二多肽链

<400> 145

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	Gly	Gly	Gly	100	105	110	
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	115	120	125	
Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	130	135	140	
Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	145	150	155	160
Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Ala	Ile	165	170	175	
Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	180	185	190	
Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Asp	Glu	Asp	195	200	205	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gly	Arg	Gly	Arg	Glu	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Gly	210	215	220	
Ser	Arg	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	225	230	235	240
Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	245	250	255	
Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	260	265	270	

Lys Glu
 <210> 146
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> B7-H3 x CD3双特异性DART-A双抗体的第三多肽链
 <400> 146
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Ser Arg Glu Glu Met 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 Lys
 225
 <210> 147

<211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头
 <400> 147
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser
 <210> 148
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头
 <400> 148
 Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Ile Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Gly Ser
 <210> 149
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头
 <400> 149
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 150
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头共有序列
 <220>
 <221> 变体
 <222> (1) .. (1)
 <223> X1= I、L、Y、M、F、V或A
 <220>

<221> 变体
 <222> (2) .. (2)
 <223> X2 = A、G、S、V、E、D、Q、N或Y
 <220>
 <221> 变体
 <222> (3) .. (3)
 <223> X3 = H、P、A、V、G、S或T
 <220>
 <221> 变体
 <222> (4) .. (4)
 <223> X4 = D或E
 <220>
 <221> 变体
 <222> (5) .. (5)
 <223> X5 = I、L、Y、M、F、V、T、S、G或A
 <400> 150
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 151
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头共有序列
 <220>
 <221> 变体
 <222> (1) .. (1)
 <223> X1 = I或L
 <220>
 <221> 变体
 <222> (3) .. (3)
 <223> X3 = P或A
 <220>
 <221> 变体
 <222> (5) .. (5)
 <223> X5 = I、V、T、S或G
 <400> 151
 Xaa Glu Xaa Asp Xaa
 1 5

<210> 152
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 152
Leu Glu Pro Asp Gly
1 5
<210> 153
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 153
Leu Glu Ala Asp Gly
1 5
<210> 154
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头共有序列
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (1)
<223> X1 = 任何氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> (5) .. (5)
<223> X5 = A或V
<400> 154
Xaa Gln Ala Arg Xaa
1 5
<210> 155
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头共有序列
<220>
<221> 变体
<222> (5) .. (5)
<223> X5 = A或V
<400> 155
Arg Gln Ala Arg Xaa
1 5
<210> 156
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 156
Arg Gln Ala Arg Val
1 5
<210> 157
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头共有序列
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (1)
<223> X1 = P、V或A
<220>
<221> 变体
<222> (2) .. (2)
<223> X2 = Q或D
<220>
<221> 变体
<222> (3) .. (3)
<223> X3 = A或N
<220>
<221> 变体
<222> (4) .. (4)

<223> X4 = L、I或M

<400> 157

Xaa Xaa Xaa Xaa

1

<210> 158

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头共有序列

<220>

<221> 变体

<222> (2) .. (2)

<223> X2 = Q或D

<220>

<221> 变体

<222> (3) .. (3)

<223> X3 = A或N

<220>

<221> 变体

<222> (4) .. (4)

<223> X4 = L或I

<400> 158

Pro Xaa Xaa Xaa

1

<210> 159

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 159

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1

5

10

15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 160

<211> 19

<212> PRT

<210> 164

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T2A

<400> 164

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp

1 5 10 15

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg

20

<210> 165

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 165

ggatctggag caacaaactt ctactactc aaacaagcag gtgacgtgga ggagaatccc 60

ggaccc 66

<210> 166

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 166

Gly Ser Pro Ala Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Arg Gln Ala Arg Val

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 167

<211> 122

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> 抗5T4 VH

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (97) .. (97)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 167

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	Ser	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	Met
65					70					75					80
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr
					85					90					95
Xaa	Cys	Val	Arg	Gln	Trp	Asp	Tyr	Asp	Val	Arg	Ala	Met	Asn	Tyr	Trp
			100						105					110	
Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
			115						120						

<210> 168

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> 抗5T4 VL

<400> 168

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	His	Ile	Phe	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asp	Thr	Ala
				20					25					30	
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
				35				40					45		
Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Leu	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly
				50				55				60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Val	Gln	Ser
65					70					75					80
Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Pro	Tyr
					85					90					95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 169
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> B7-H3 x CD3双特异性DART-A双抗体的第一多肽链
 <400> 169
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr 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 Asn Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 115 120 125
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 130 135 140
 Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 145 150 155 160
 Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
 165 170 175
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 180 185 190
 Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
 195 200 205
 Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
 210 215 220
 Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
 245 250 255
 Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu
 260 265 270
 Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 275 280 285
 Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 290 295 300
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 305 310 315 320
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 325 330 335
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 340 345 350
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 355 360 365
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 370 375 380
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 385 390 395 400
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 405 410 415
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 420 425 430
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 435 440 445
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 450 455 460
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 465 470 475 480
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 485 490 495
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 170

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重复1至5次
 <400> 173
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 174
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头
 <220>
 <221> 重复
 <222> (1) .. (1)
 <223> 重复1至5次
 <220>
 <221> 变体
 <222> (2) .. (2)
 <223> X2= 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> (3) .. (3)
 <223> 重复1至5次
 <220>
 <221> 变体
 <222> (4) .. (4)
 <223> X4 = 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> (5) .. (5)
 <223> 重复1至5次
 <400> 174
 Gly Xaa Gly Xaa Gly
 1 5
 <210> 175
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头

<400> 178

Glu Ala Ala Ala Lys

1 5

<210> 179

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<220>

<221> 重复

<222> (3) .. (4)

<223> 重复2至20次

<400> 179

Ala Ser Ala Pro Gly Thr

1 5

<210> 180

<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> 180

Ala Ser Glu Ala Ala Ala Lys Gly Thr

1 5

<210> 181

<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> 181
Gly Gly Gly Gly Ala
1 5
<210> 182
<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> 182
Pro Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 183
<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> 183
Ala Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 184
<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

<220>

<223> CD20 VH

<400> 189

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 190

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD20 VL

<400> 190

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val 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 Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 194

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 41BB VH

<400> 194

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> 195

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 41BB VL

<400> 195

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
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro		80
	85	90
Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		95
	100	105

<210> 196

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 41BB VH

<400> 196

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Gly Tyr		15
	20	25
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		30
	35	40
Gly Trp Val Asn Pro Met Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		45
	50	55
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr		60
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
	85	90
Ala Arg Glu Gly Met Ala Met Arg Leu Glu Leu Asp Lys Trp Gly Gln		95
	100	105
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		110
	115	120

<210> 197

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 41BB VL

<400> 197

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> 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
 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> 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

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> 200

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 41BB抗运载蛋白

130	135	140
Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu		
145	150	155
Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly		160
	165	170
		175
<210> 203		
<211> 178		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 41BB抗运载蛋白		
<400> 203		
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val		
1	5	10
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr		15
	20	25
Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Lys Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro		30
	35	40
Val Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr		45
	50	55
Asp Val Thr Gly Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Arg Tyr Asp Ile		60
65	70	75
Ser Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Phe Gly Lys		80
	85	90
Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser		95
	100	105
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln		110
	115	120
Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu		125
	130	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly		150
145	150	155
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		160
	165	170
		175
Asp Gly		
<210> 204		
<211> 178		
<212> PRT		
<213> 人工序列		

<220>

<223> 41BB抗运载蛋白

<400> 204

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> 205

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 41BB抗运载蛋白

<400> 205

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> 206

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 41BB抗运载蛋白

<400> 206

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
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		
165	170	175
Asp Gly		
<210> 207		
<211> 184		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人41BBL的71-254		
<400> 207		
Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp		
1	5	10
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
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
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> 208

<211> 170

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人41BBL的85-254

<400> 208

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> 209

<211> 175

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人41BBL的80-254

<400> 209

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> 210
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人41BBL的52-254
 <400> 210

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	165	170
Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln		
175	180	185
Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu		
190	195	200
Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu		
<210> 211		
<211> 178		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人41BBL的71-248		
<400> 211		
Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp		
1	5	10
15	20	25
Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu		
30	35	40
Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val		
45	50	55
Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val		
60	65	70
Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg		
75	80	85
Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His		
90	95	100
Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr		
105	110	115
Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly		
120	125	130
Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val		
135	140	145
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> 212			
<211> 164			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人41BBL的85-248			
<400> 212			
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> 213			
<211> 169			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人41BBL的80-248			
<400> 213			

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> 214

<211> 197

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人41BBL的52-248

<400> 214

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

<210> 216

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OX40配体

<400> 216

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> 217

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OX40配体

<400> 217

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
Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys		80
	85	90
Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp		95
	100	105
Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly		110
	115	120
		125
Glu Phe Cys Val Leu		
130		
<210> 218		
<211> 133		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> OX40配体		
<400> 218		
Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe		
1	5	10
Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu		15
	20	25
Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp		30
	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
Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys		80
	85	90
Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp		95
	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> 219		
<211> 133		
<212> PRT		

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> 223

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OX40 VH

<400> 223

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> 224

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OX40 VL

<400> 224

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> 225

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OX40 sdAb

<400> 225

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> 226
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> GITR配体
 <400> 226
 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> 227
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> GITR VH
 <400> 227
 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> 228

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR VL

<400> 228

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> 229

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR VH

<400> 229

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> 230

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR VL

<400> 230

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> 231

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR VH

<400> 231

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> 232

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR VL

<400> 232

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>	233		
<211>	123		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	GITR VH		
<400>	233		
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> 234

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR VL

<400> 234

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

	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> 237

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD70 VH

<400> 237

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> 238

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD70 VL

<400> 238

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> 239

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ICOS sdAb

<400> 239

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
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90
Arg Ala Glu Ile Phe Thr Arg Thr Gly Glu Asn Tyr Tyr Gly Met Asp		
	100	110
Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Lys Pro		
115	120	

<210> 240

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD28 sdAb

<400> 240

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Met Phe Ser Asn Tyr		
	20	25
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val		
	35	40
Ala Ala Ile Asn Tyr Arg Arg Asp Ala Ala Asp Tyr Ala Glu Ser Val		
	50	55
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90
Gly Phe Thr Tyr Ala Gly Trp Ala Ser Ser Arg Arg Asp Asp Tyr Asn		
	100	110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro		
115	120	

<210> 241

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VL (CON)

<400> 241

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> 242

<211> 288

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD-1

<400> 242

Met	Gln	Ile	Pro	Gln	Ala	Pro	Trp	Pro	Val	Val	Trp	Ala	Val	Leu	Gln
1				5					10					15	
Leu	Gly	Trp	Arg	Pro	Gly	Trp	Phe	Leu	Asp	Ser	Pro	Asp	Arg	Pro	Trp
				20					25					30	
Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Glu	Gly	Asp
				35				40					45		
Asn	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Asn	Thr	Ser	Glu	Ser	Phe	Val
				50				55				60			
Leu	Asn	Trp	Tyr	Arg	Met	Ser	Pro	Ser	Asn	Gln	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala
65						70					75				80
Ala	Phe	Pro	Glu	Asp	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Asp	Cys	Arg	Phe	Arg
						85					90				95
Val	Thr	Gln	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp	Phe	His	Met	Ser	Val	Val	Arg
						100					105			110	
Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu
						115					120				125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
 130 135 140
 Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
 145 150 155 160
 Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
 165 170 175
 Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
 180 185 190
 Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
 195 200 205
 Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
 210 215 220
 Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
 225 230 235 240
 Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
 245 250 255
 Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
 260 265 270
 Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
 275 280 285

<210> 243
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 18H10
 <400> 243

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> 244
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (GGS) 2接头
<400> 244

Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 245
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (GGS) 2接头
<400> 245

Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 246
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (GGS) 3接头
<400> 246

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 247
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (GGS) 4接头
<400> 247

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

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> 252

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hz18H10v2

<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 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> 253

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hz18H10v3

<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	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> 254

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hz18H10v4

<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	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> 255					
<211> 117					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> z18H10v5					
<400> 255					
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> 256					
<211> 117					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> hz18H10v6					
<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 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> 257

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hz18H10v7

<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 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> 258

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hz18H10v8

<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 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> 259

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hz18H10v9

<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 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> 260

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hz18H10v10

<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	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> 261

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hz18H10v11

<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	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				

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> 264

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hz18H10v14

<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 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> 265

<211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> (GGS) 3接头
 <400> 269
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 270
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> (GGS) 4接头
 <400> 270
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 271
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> (GGS) 5接头
 <400> 271
 Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 272
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 272
 Gly Ser Val Thr Gly Ala Asn Thr Met Gly
 1 5 10
 <210> 273
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR1
 <400> 273
 Gly Ser Ile Thr Gly Ala Asn Thr Met Gly
 1 5 10
 <210> 274
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> (GGS) 2接头
 <400> 274
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 275
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> (GGS) 3接头
 <400> 275
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 276
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> (GGS) 4接头
 <400> 276
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 277
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> (GGS) 5接头
 <400> 277

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
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
	165	170
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
	180	185
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
	195	200
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	210	215
<210> 285		
<211> 226		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Fc-Het-1		
<400> 285		
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly		
1	5	10
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
	20	25
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Lys His Glu		
	35	40
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
	50	55
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Glu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
65	70	75
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
	85	90
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
	100	105
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
	115	120
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
	130	135
Thr Cys Asp Val Ser Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		

	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> 287					
<211> 125					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> CD3-VH32					
<400> 287					
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> 288					
<211> 109					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> CD3-VL20					
<400> 288					

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> 289

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3-VL21

<400> 289

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> 290

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3-VH34

<400> 290

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> 291

<211> 225

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 杵Fc

<400> 291

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
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> 292		
<211> 225		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 白Fc		
<400> 292		
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
1	5	10
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
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	165	170
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
175	180	185
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val		
190	195	200
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
205	210	215
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
220		
Pro		
225		
<210> 293		
<211> 222		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 杵Fc		
<400> 293		
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser		
1	5	10
15	20	25
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
30	35	40
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
45	50	55
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
60	65	70
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
75	80	85
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
90	95	100
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
105	110	115
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
120	125	
Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys		

	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> 295					
<211> 225					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 白Fc					
<400> 295					
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>	296				
<211>	222				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	白Fc				
<400>	296				
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> 297		
<211> 225		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 杵Fc		
<400> 297		
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
1	5	10
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr		
	20	25
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
	35	40
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
	50	55
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
65	70	75
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
	85	90
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
	100	105
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
	115	120
Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
	130	135
Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
145	150	155
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
	165	170
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
	180	185
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val		
	195	200
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
	210	220
Pro		
225		
<210> 298		

Val Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Tyr Ser Ser Gly Thr Gly Thr Phe 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 Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Ser Gly Pro Val Arg Gly Trp Gly Pro Arg Ser Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Lys Pro
 115

<210> 302

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> sdAb B7H3 hz58E05v27

<400> 302

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 Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 His Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Pro Val
 35 40 45
 Ala Thr Ser His His Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Gly 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 Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys
 85 90 95
 Ala Asp His Gly Tyr Gln Gly Arg Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Lys Pro
 115

<210> 303

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> sdAb B7H3 hz58E05v55

<400> 303

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	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
His	Met	Ser	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu	Val
		35				40						45			
Ala	Thr	Ser	His	His	Gly	Gly	Thr	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gly	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	Asn	Thr	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Lys
				85					90					95	
Ala	Asp	His	Gly	Tyr	Gln	Gly	Arg	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			100					105					110		
Val	Thr	Val	Lys	Pro											
			115												

<210> 304

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> sdAb B7H3

hz58E05v48

<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	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
His	Met	Ser	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Pro	Val
		35				40						45			
Ala	Thr	Ser	His	His	Gly	Gly	Thr	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gly	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	Asn	Thr	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Lys
				85					90					95	

Ala Asp His Gly Tyr Gln Gly Arg Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Lys Pro
 115

<210> 305

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> sdAb B7H3 hz57B04v24

<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 Pro Ser Glu Arg Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45

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

Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro Gly Gly
 115 120 125

<210> 306

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> sdAb DLL3 hz10D9v7

<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 Ile Phe Ser Ile Asn
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

35	40	45																	
Ala	Gly	Phe	Thr	Gly	Asp	Thr	Asn	Thr	Ile	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	Ala				
		85							90					95					
Ala	Asp	Val	Gln	Leu	Phe	Ser	Arg	Asp	Tyr	Glu	Phe	Tyr	Trp	Gly	Gln				
		100							105					110					
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Lys	Pro												
	115						120												
<210> 307																			
<211> 115																			
<212> PRT																			
<213> 人工序列																			
<220>																			
<223> sdAb DLL3 hz8E7v16																			
<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	Gly	Pro	Ser	Glu	Ile	Ile	Thr	Ser	Asp	Lys				
			20					25						30					
Ser	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Asn	Leu	Val				
		35						40						45					
Ala	Gly	Ile	Ser	Asn	Val	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	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	Tyr				
								85						90					95
Ala	Arg	Asp	Phe	Glu	Asn	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr				
								100						105					110
Val	Lys	Pro																	
		115																	
<210> 308																			
<211> 10																			
<212> PRT																			
<213> 人工序列																			
<220>																			

<223> 41BB CDR1
 <400> 308
 Gly Phe Ser Phe Ser Ile Asn Ala Met Gly
 1 5 10
 <210> 309
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 41BB CDR2
 <400> 309
 Ala Ile Glu Ser Gly Arg Asn Thr Val
 1 5
 <210> 310
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 41BB CDR3
 <400> 310
 Leu Lys Gly Asn Arg Val Val Ser Pro Ser Val Ala Tyr
 1 5 10
 <210> 311
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CD3-VH33
 <400> 311
 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> 312

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH CDR1

<400> 312

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn
 1 5 10

<210> 313

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 VH CDR2

<400> 313

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
 1 5 10

<210> 314

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3-VH7,VH33 CDR3

<400> 314

His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 315

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3-VL2,VL21 CDR3

<400> 315

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val

1 5

<210> 316

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3-VL8 CDR3

<400> 316

Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val

1 5

<210> 317

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3 VH33 CDR1

<400> 317

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn

1 5 10

<210> 318

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3 VH33 CDR1

<400> 318

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr

1 5 10

<210> 319

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3 VL21 CDR1

<400> 319

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 320

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3 VL21 CDR2

<400> 320

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

1 5

<210> 321

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 41BB sdAb

<400> 321

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> 322

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> sdAb 5T4 hz12E9v9

<400> 322

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> 323

<211> 129

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> sdAb 5T4 hz16G10v11

<400> 323

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> 324
 <211> 618
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人DLL3
 <400> 324
 Met Val Ser Pro Arg Met Ser Gly Leu Leu Ser Gln Thr Val Ile Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Ile Phe Leu Pro Gln Thr Arg Pro Ala Gly Val Phe Glu Leu
 20 25 30
 Gln Ile His Ser Phe Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Ala Pro Arg Ser
 35 40 45
 Pro Cys Ser Ala Arg Leu Pro Cys Arg Leu Phe Phe Arg Val Cys Leu
 50 55 60
 Lys Pro Gly Leu Ser Glu Glu Ala Ala Glu Ser Pro Cys Ala Leu Gly
 65 70 75 80
 Ala Ala Leu Ser Ala Arg Gly Pro Val Tyr Thr Glu Gln Pro Gly Ala
 85 90 95
 Pro Ala Pro Asp Leu Pro Leu Pro Asp Gly Leu Leu Gln Val Pro Phe
 100 105 110
 Arg Asp Ala Trp Pro Gly Thr Phe Ser Phe Ile Ile Glu Thr Trp Arg
 115 120 125
 Glu Glu Leu Gly Asp Gln Ile Gly Gly Pro Ala Trp Ser Leu Leu Ala
 130 135 140
 Arg Val Ala Gly Arg Arg Arg Leu Ala Ala Gly Gly Pro Trp Ala Arg
 145 150 155 160
 Asp Ile Gln Arg Ala Gly Ala Trp Glu Leu Arg Phe Ser Tyr Arg Ala
 165 170 175
 Arg Cys Glu Pro Pro Ala Val Gly Thr Ala Cys Thr Arg Leu Cys Arg
 180 185 190
 Pro Arg Ser Ala Pro Ser Arg Cys Gly Pro Gly Leu Arg Pro Cys Ala
 195 200 205
 Pro Leu Glu Asp Glu Cys Glu Ala Pro Leu Val Cys Arg Ala Gly Cys
 210 215 220
 Ser Pro Glu His Gly Phe Cys Glu Gln Pro Gly Glu Cys Arg Cys Leu
 225 230 235 240
 Glu Gly Trp Thr Gly Pro Leu Cys Thr Val Pro Val Ser Thr Ser Ser

	245	250	255
Cys Leu Ser Pro Arg Gly Pro Ser Ser Ala Thr Thr Gly Cys Leu Val			
	260	265	270
Pro Gly Pro Gly Pro Cys Asp Gly Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Ser			
	275	280	285
Cys Ser Glu Thr Pro Arg Ser Phe Glu Cys Thr Cys Pro Arg Gly Phe			
	290	295	300
Tyr Gly Leu Arg Cys Glu Val Ser Gly Val Thr Cys Ala Asp Gly Pro			
305	310	315	320
Cys Phe Asn Gly Gly Leu Cys Val Gly Gly Ala Asp Pro Asp Ser Ala			
	325	330	335
Tyr Ile Cys His Cys Pro Pro Gly Phe Gln Gly Ser Asn Cys Glu Lys			
	340	345	350
Arg Val Asp Arg Cys Ser Leu Gln Pro Cys Arg Asn Gly Gly Leu Cys			
	355	360	365
Leu Asp Leu Gly His Ala Leu Arg Cys Arg Cys Arg Ala Gly Phe Ala			
	370	375	380
Gly Pro Arg Cys Glu His Asp Leu Asp Asp Cys Ala Gly Arg Ala Cys			
385	390	395	400
Ala Asn Gly Gly Thr Cys Val Glu Gly Gly Gly Ala His Arg Cys Ser			
	405	410	415
Cys Ala Leu Gly Phe Gly Gly Arg Asp Cys Arg Glu Arg Ala Asp Pro			
	420	425	430
Cys Ala Ala Arg Pro Cys Ala His Gly Gly Arg Cys Tyr Ala His Phe			
	435	440	445
Ser Gly Leu Val Cys Ala Cys Ala Pro Gly Tyr Met Gly Ala Arg Cys			
	450	455	460
Glu Phe Pro Val His Pro Asp Gly Ala Ser Ala Leu Pro Ala Ala Pro			
465	470	475	480
Pro Gly Leu Arg Pro Gly Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Leu Pro Pro Ala			
	485	490	495
Leu Gly Leu Leu Val Ala Ala Gly Val Ala Gly Ala Ala Leu Leu Leu			
	500	505	510
Val His Val Arg Arg Arg Gly His Ser Gln Asp Ala Gly Ser Arg Leu			
	515	520	525
Leu Ala Gly Thr Pro Glu Pro Ser Val His Ala Leu Pro Asp Ala Leu			
	530	535	540
Asn Asn Leu Arg Thr Gln Glu Gly Ser Gly Asp Gly Pro Ser Ser Ser			
545	550	555	560

Val Asp Trp Asn Arg Pro Glu Asp Val Asp Pro Gln Gly Ile Tyr Val
565 570 575

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

Pro Pro Leu His Thr Gly Arg Ala Gly Gln Arg Gln His Leu Leu Phe
595 600 605

Pro Tyr Pro Ser Ser Ile Leu Ser Val Lys
610 615

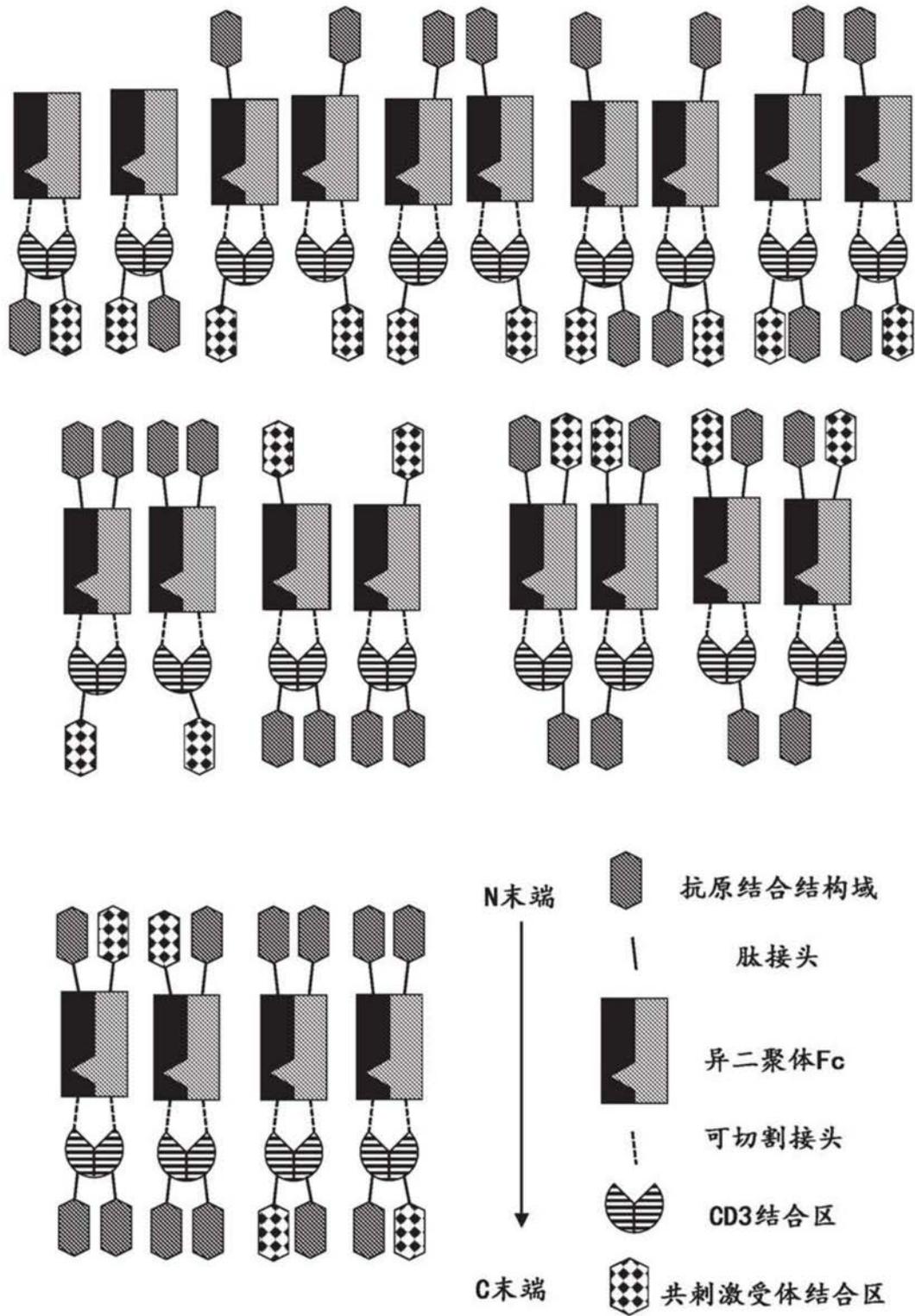


FIG.1

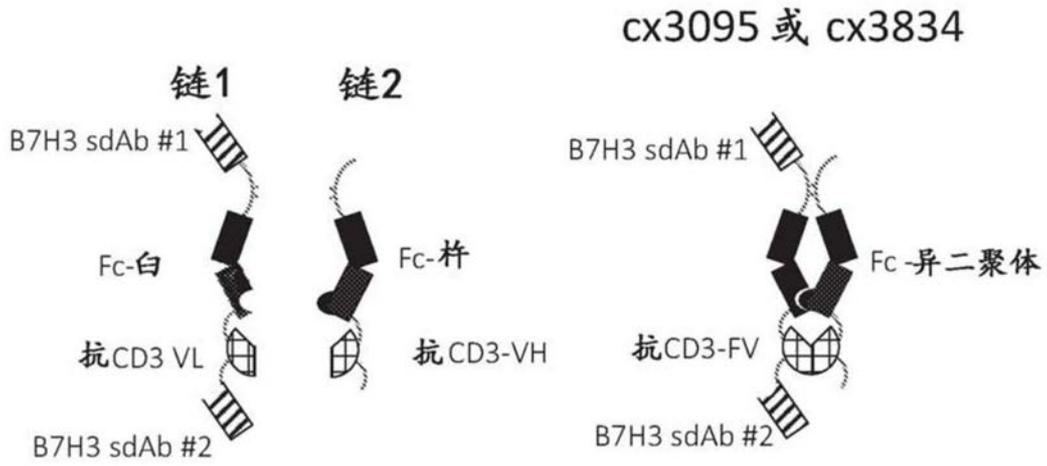


FIG. 2A

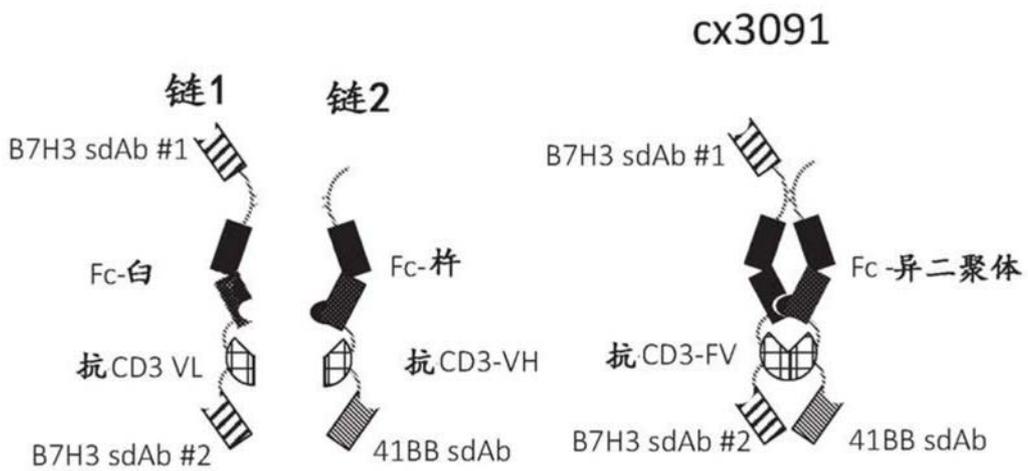


FIG. 2B

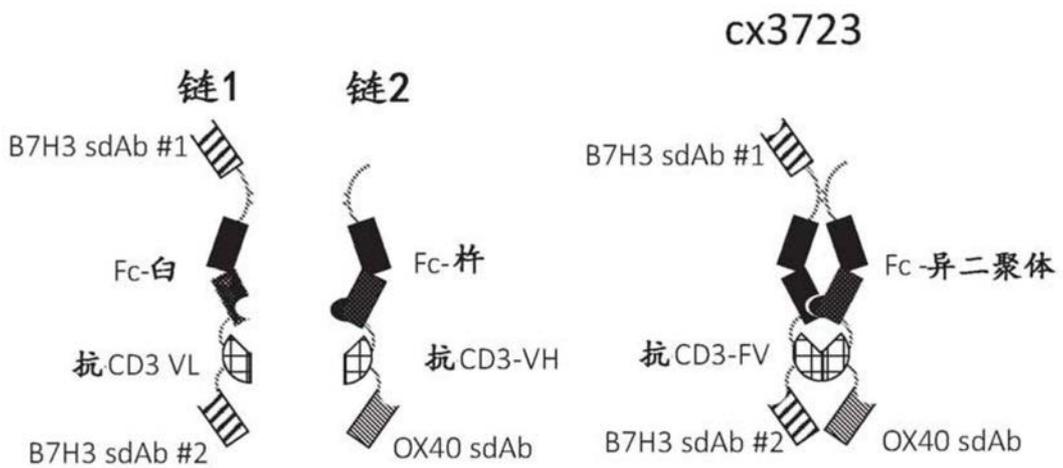


FIG. 2C

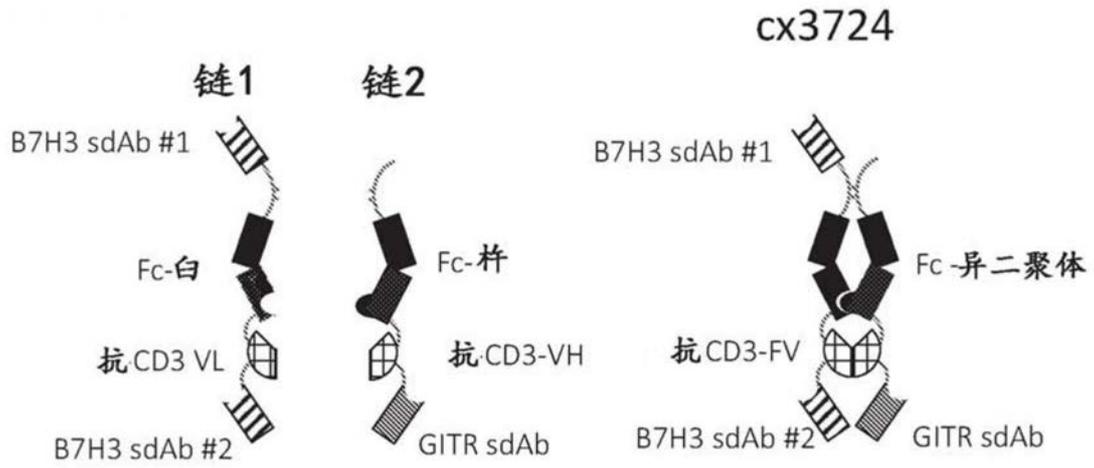


FIG. 2D

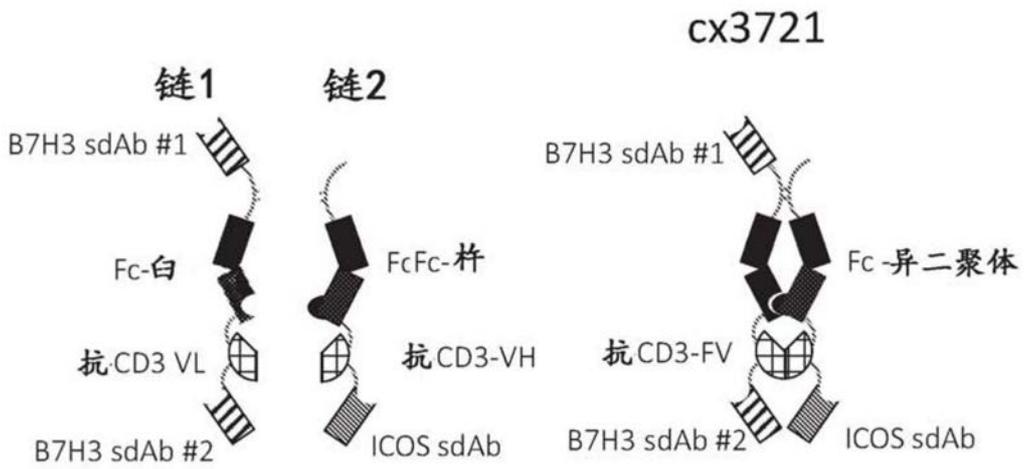


FIG. 2E

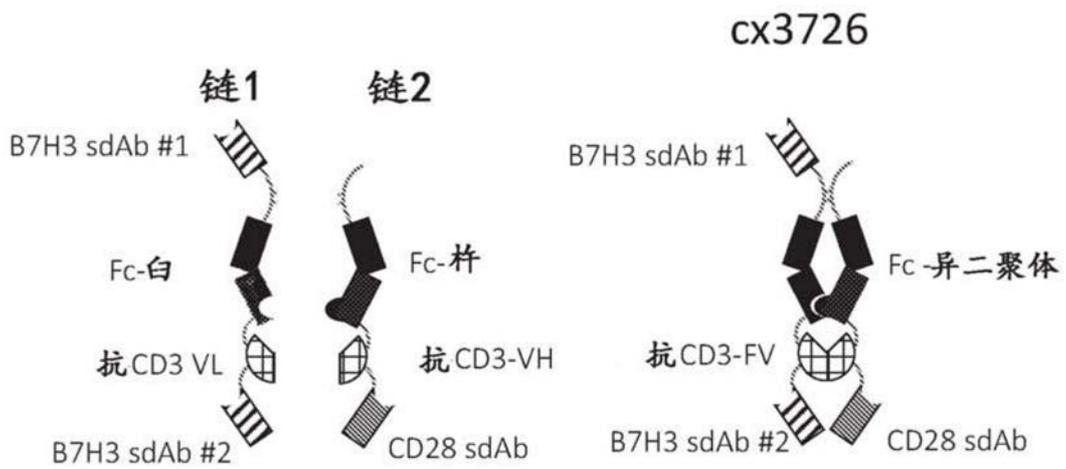
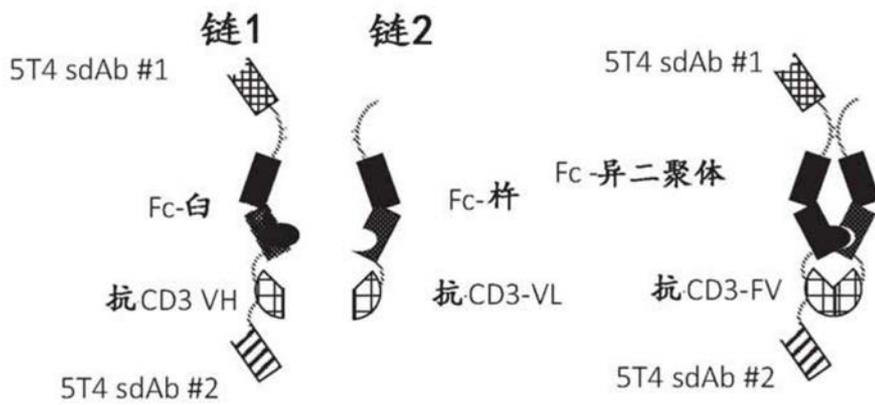


FIG. 2F

cx3546, cx3547, cx5951



cx3499, cx3497, cx5185

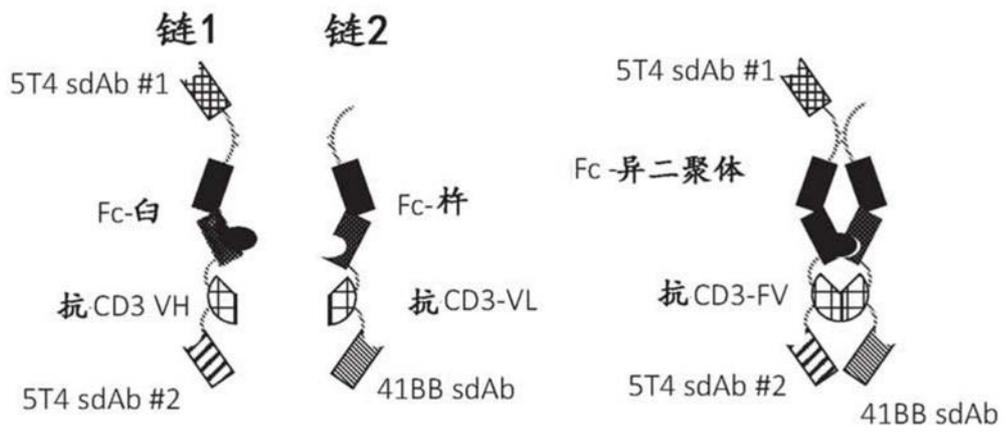


FIG.3

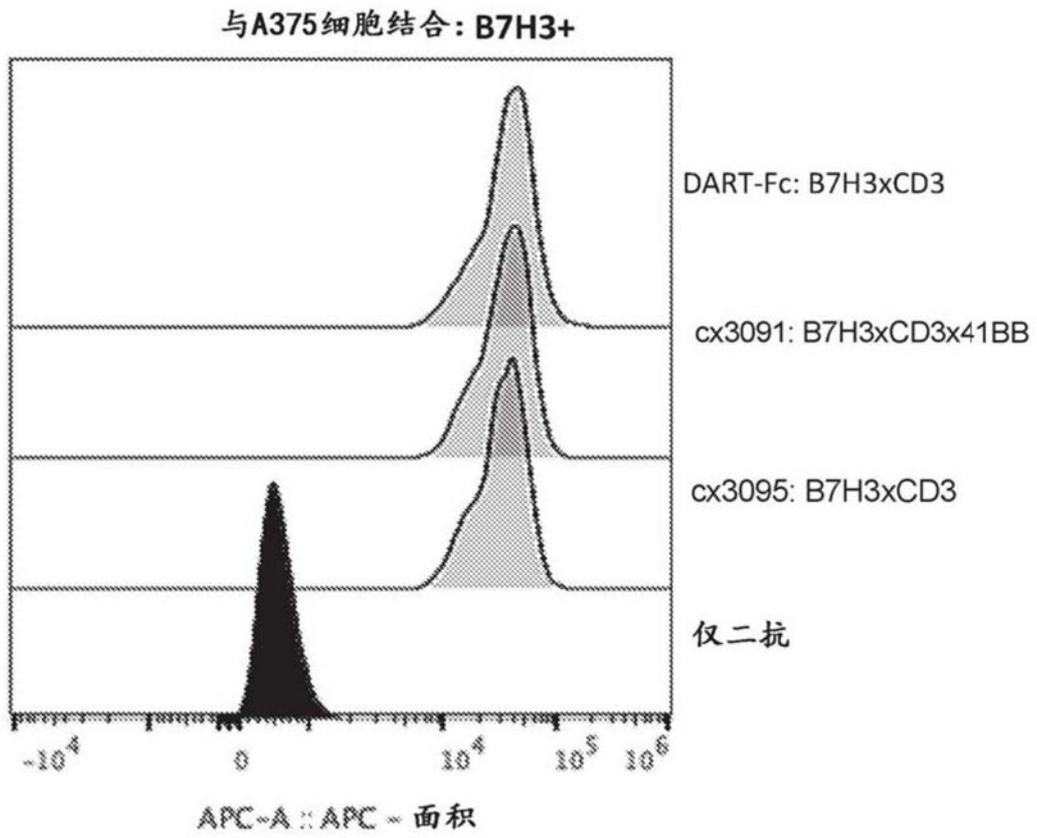


FIG. 4A

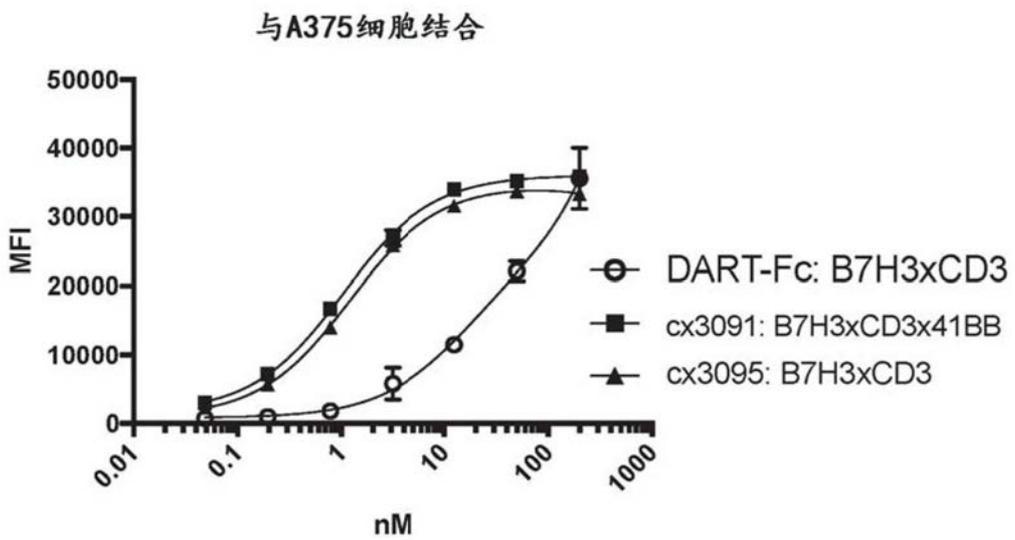


FIG. 4B

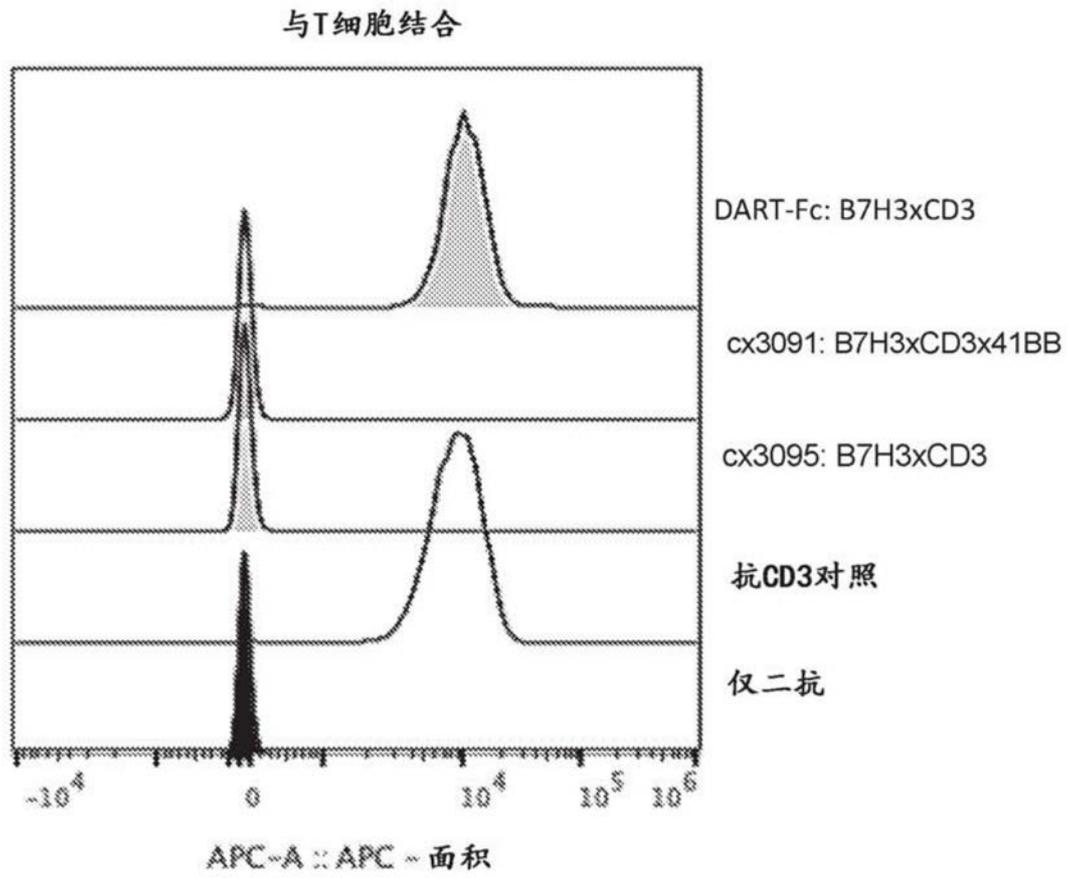


FIG.4C

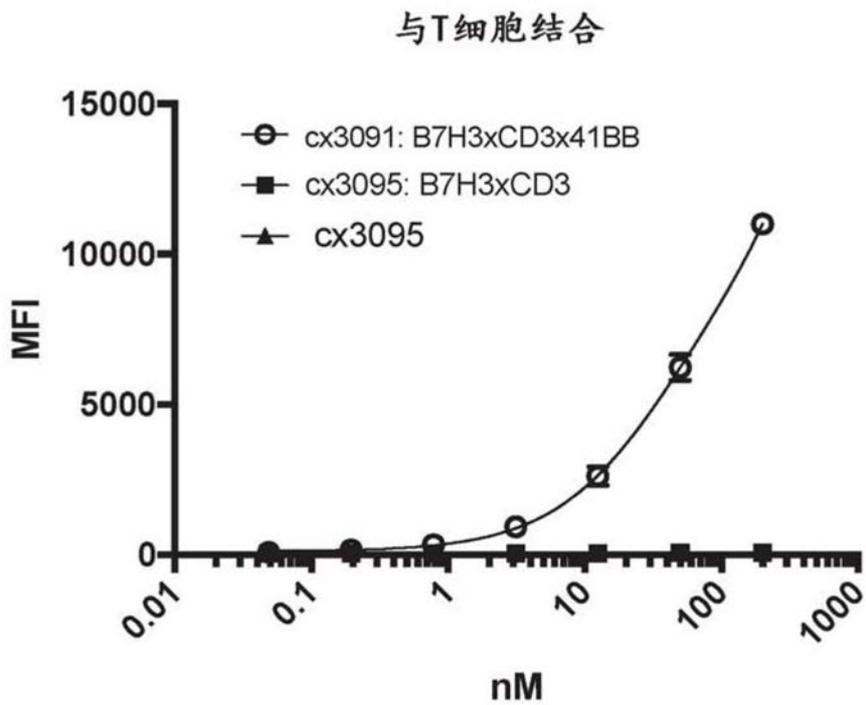


FIG.4D

5T4 -/+ 41BB 结合

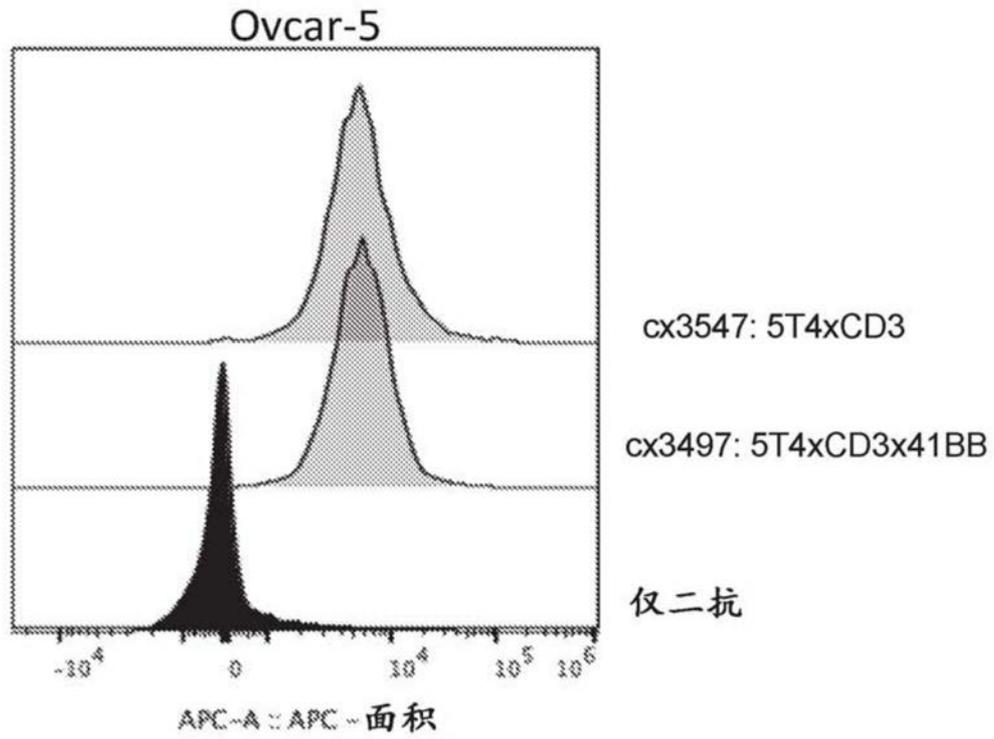


FIG. 5A

与OVCAR5细胞结合

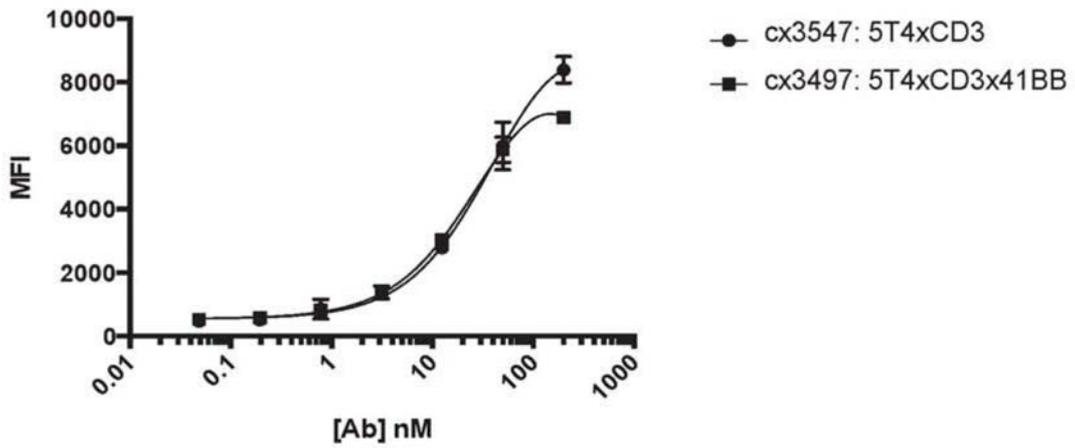


FIG. 5B

5T4 -/+ 41BB 结合

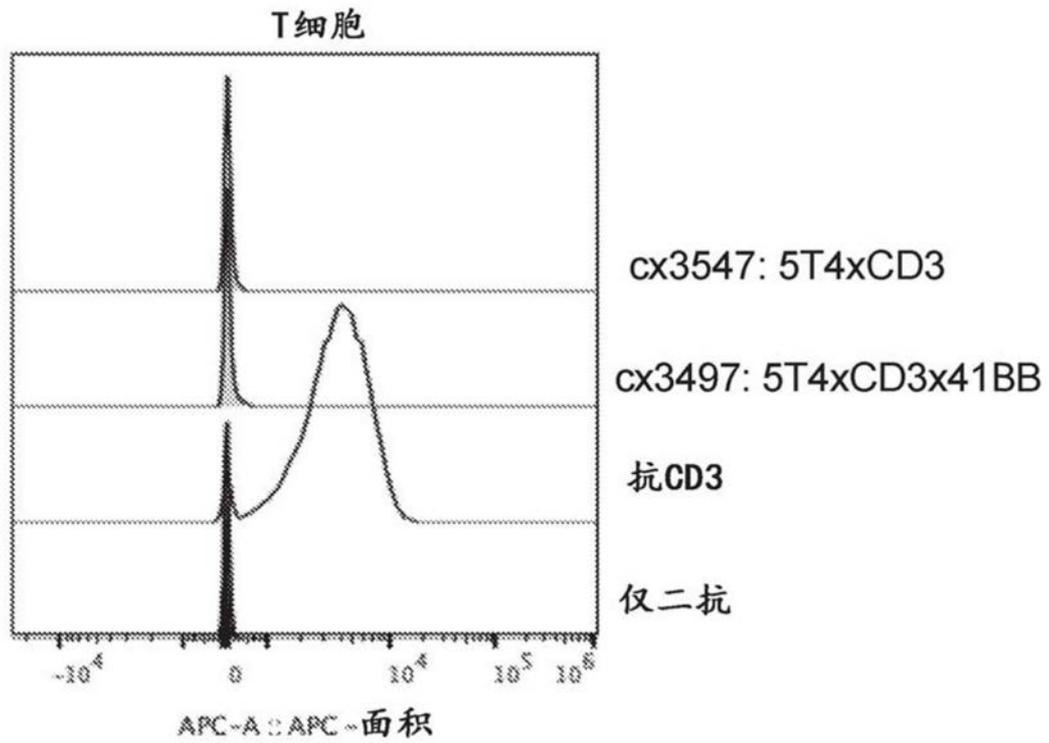


FIG.5C

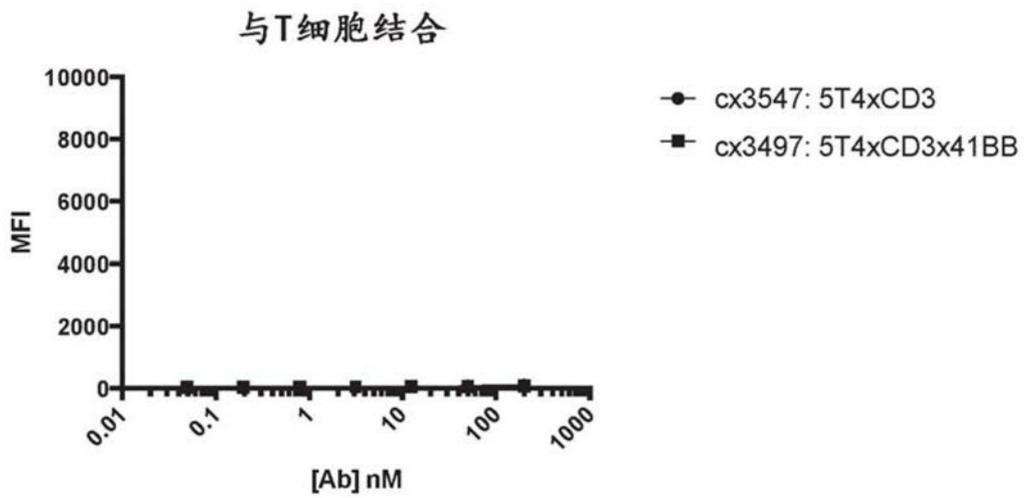
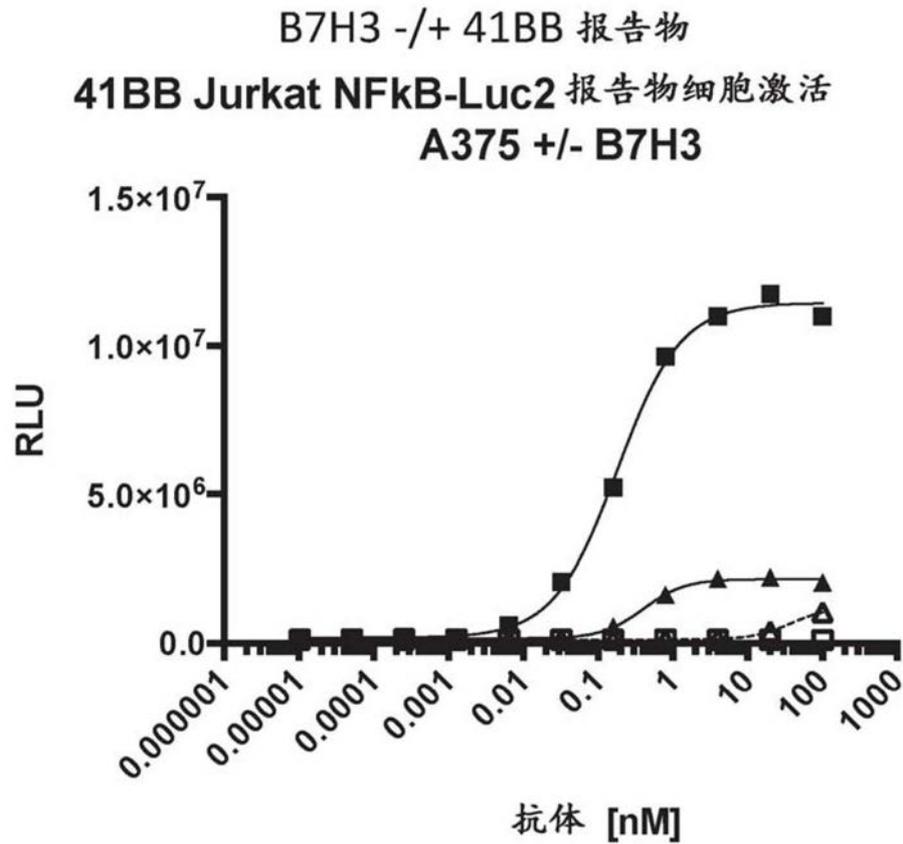


FIG.5D



- ▲ A375: cx3095: B7H3xCD3
- A375: cx3091: B7H3xCD3x41BB
- A375 ΔB7H3: cx3095: B7H3xCD3
- △ A375 ΔB7H3: cx3091: B7H3xCD3x41BB

FIG. 6A

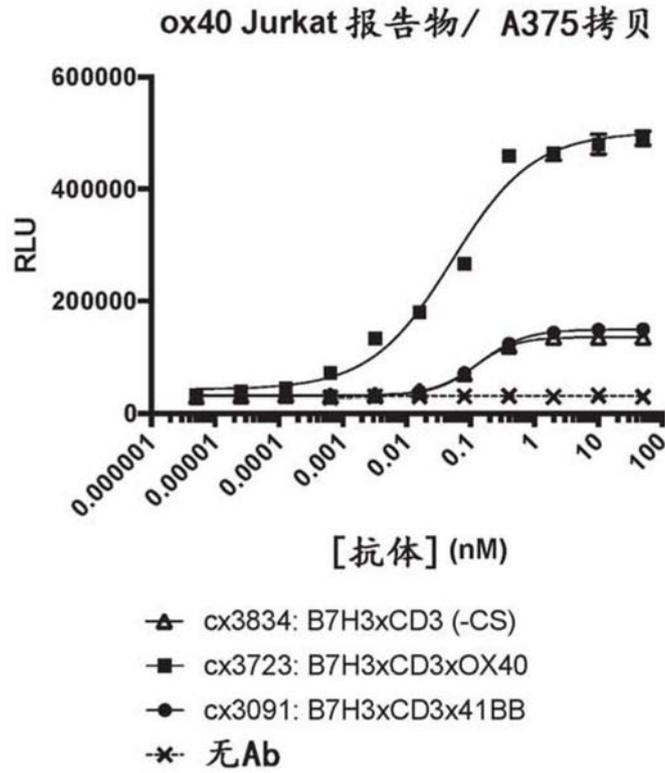


FIG.6B

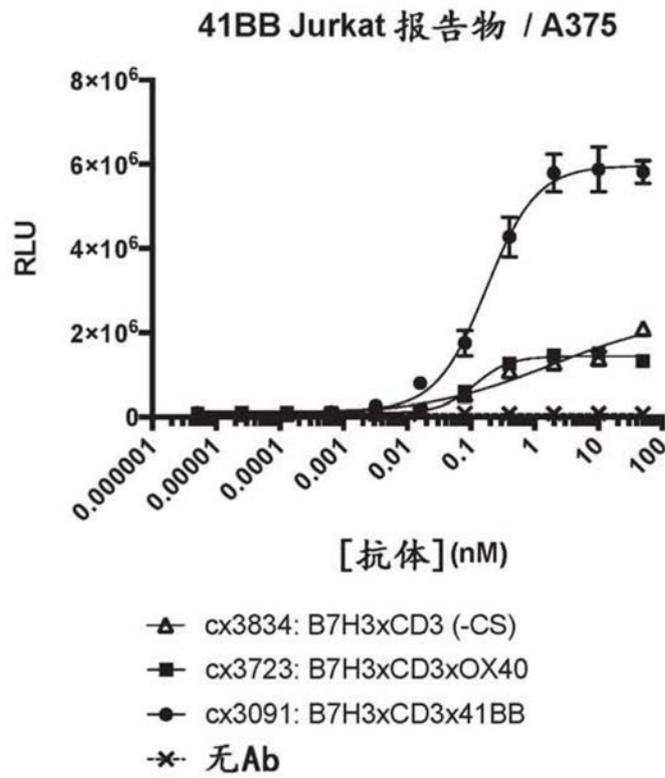


FIG.6C

CD3 报告物 -/+ 41BB

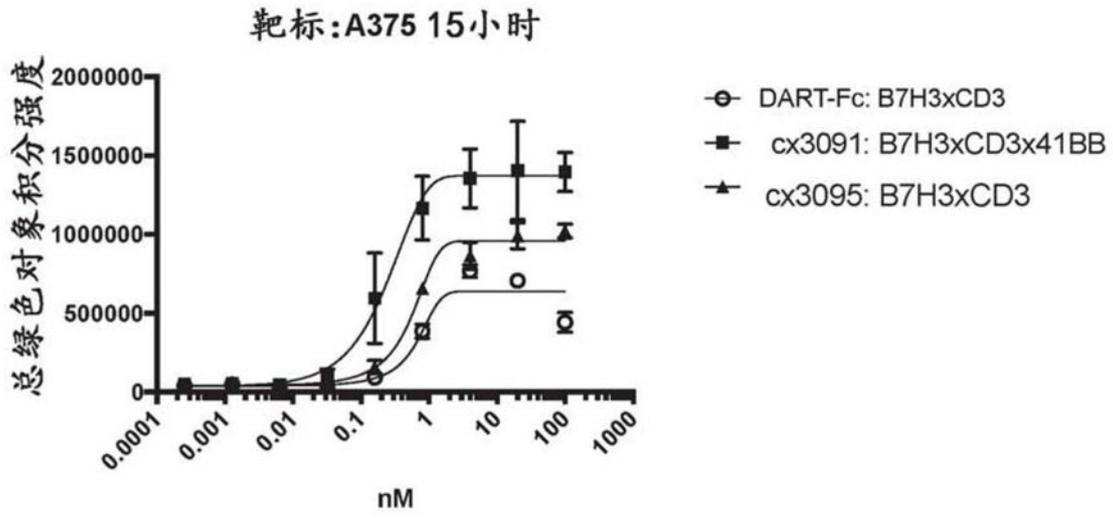


FIG. 7A

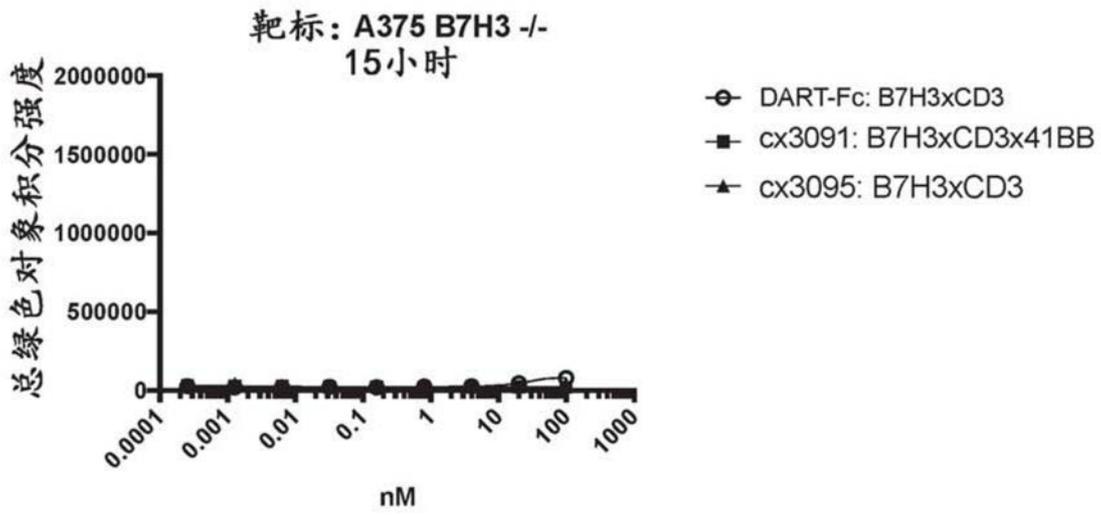


FIG. 7B

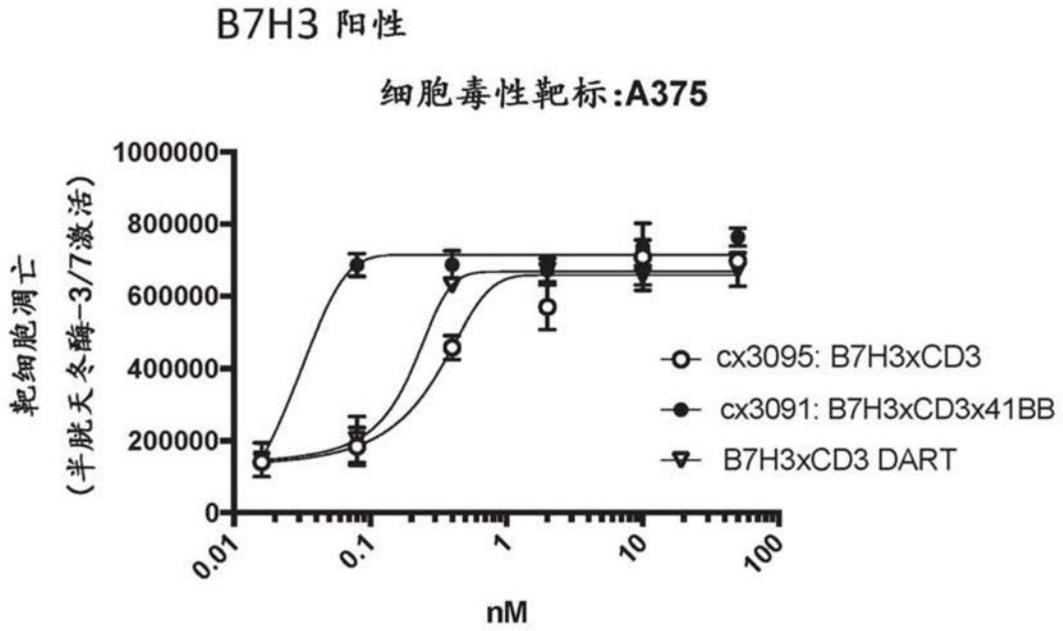


FIG. 8A

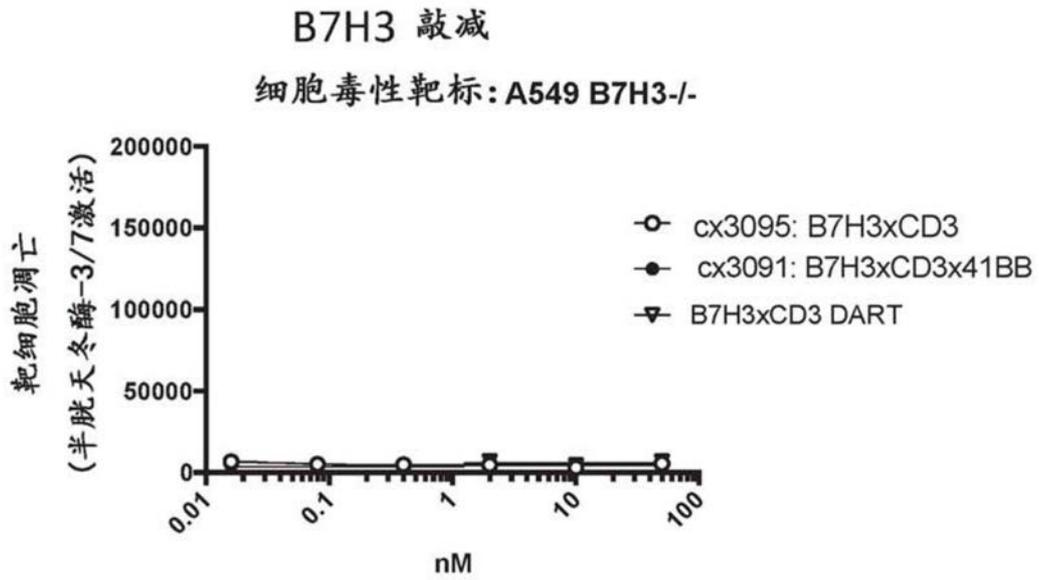


FIG. 8B

B7H3 阳性

靶细胞耗尽: A375

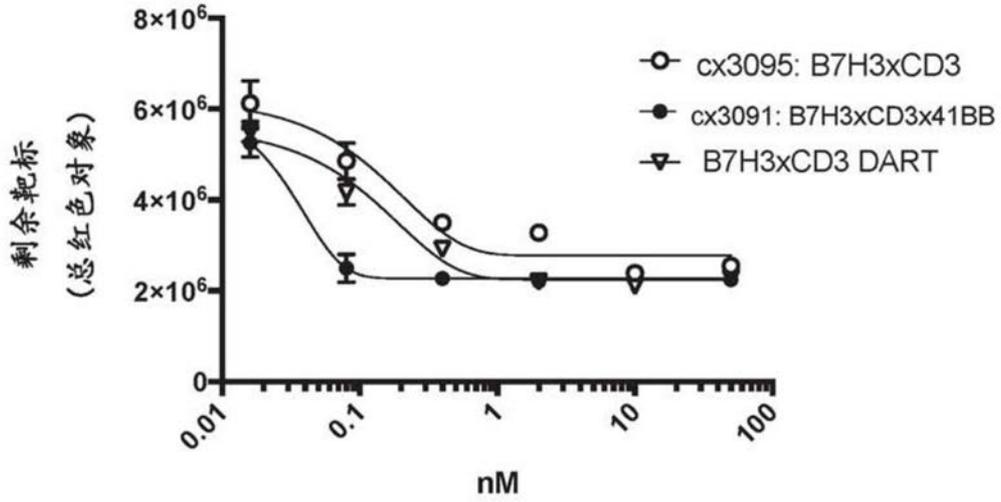


FIG.8C

B7H3 敲减

靶细胞耗尽: A549 B7H3-/-

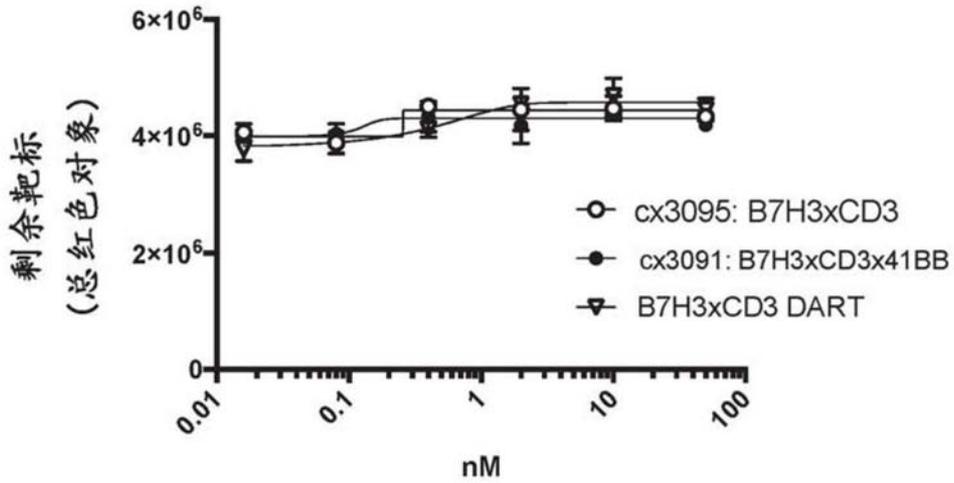


FIG.8D

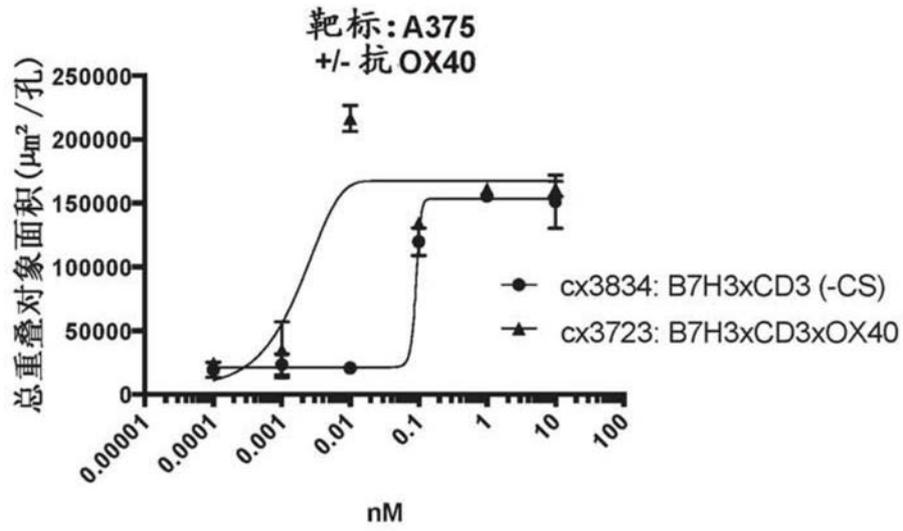


FIG. 9A

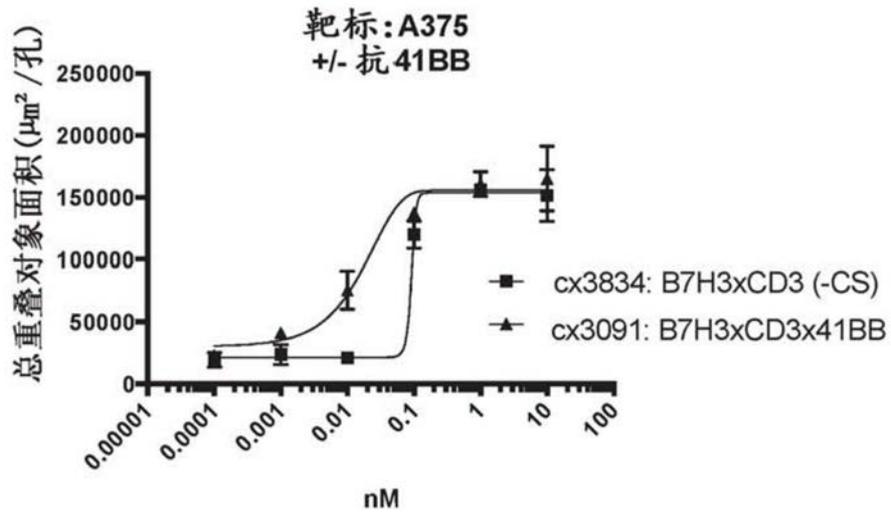


FIG. 9B

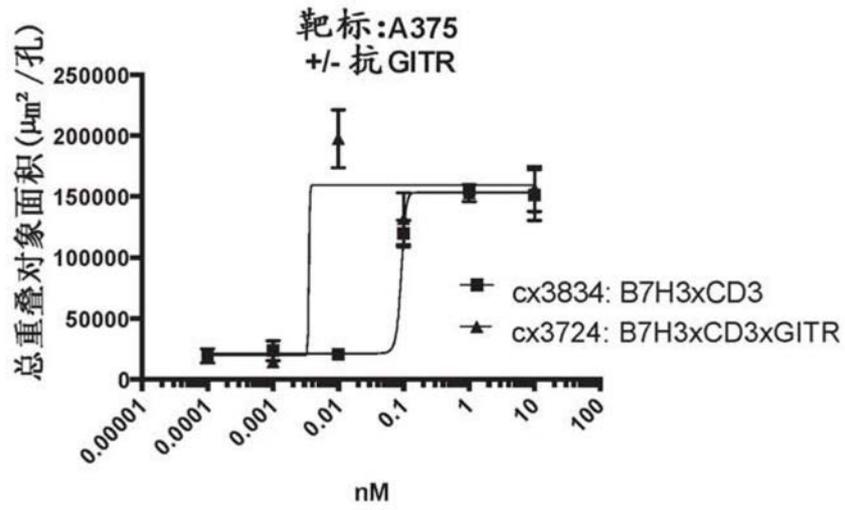


FIG. 9C

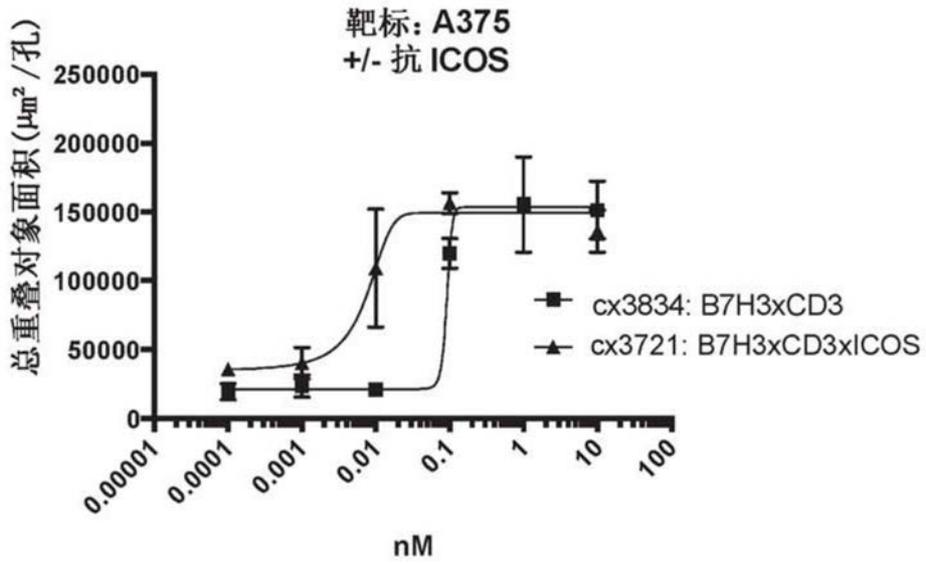


FIG. 9D

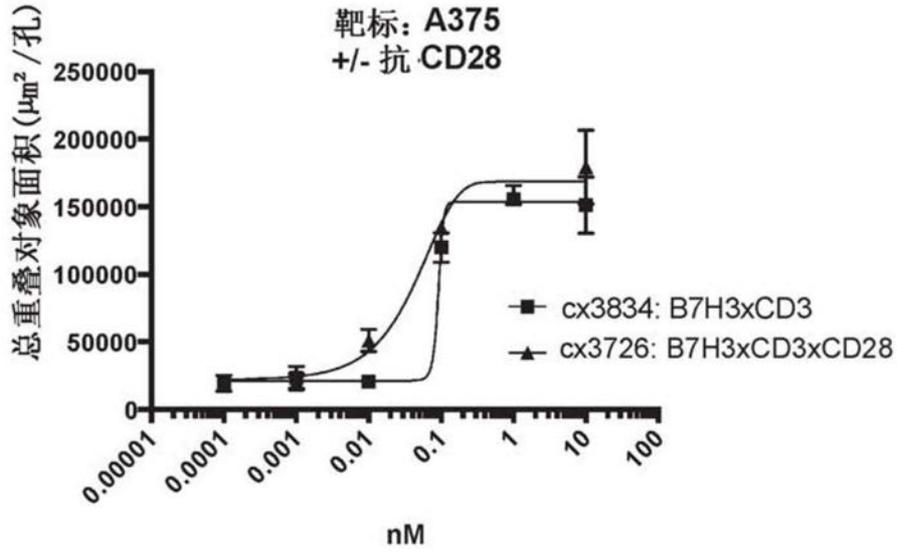


FIG. 9E

5T4 -/+ 41BB 细胞毒性

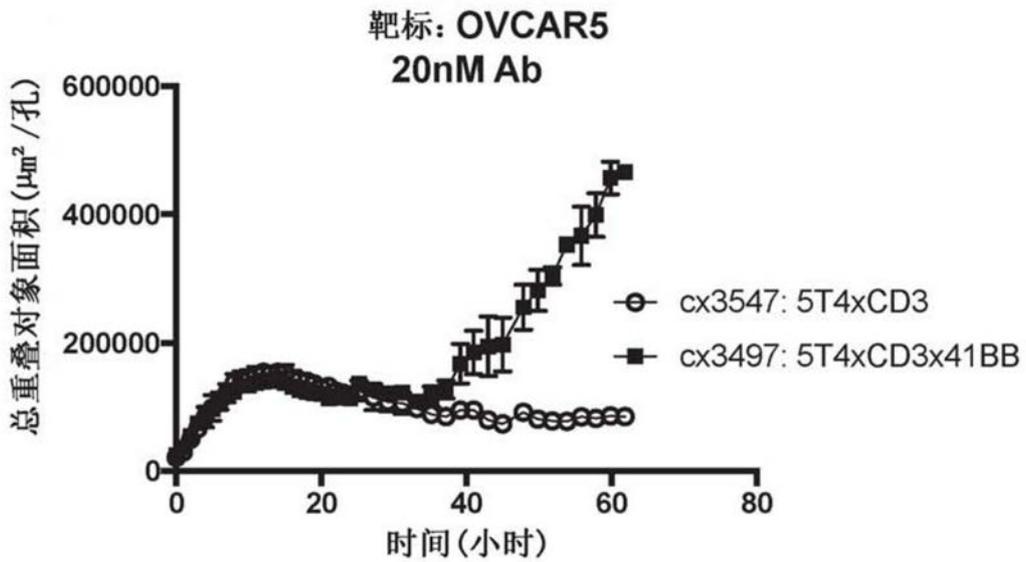


FIG. 10A

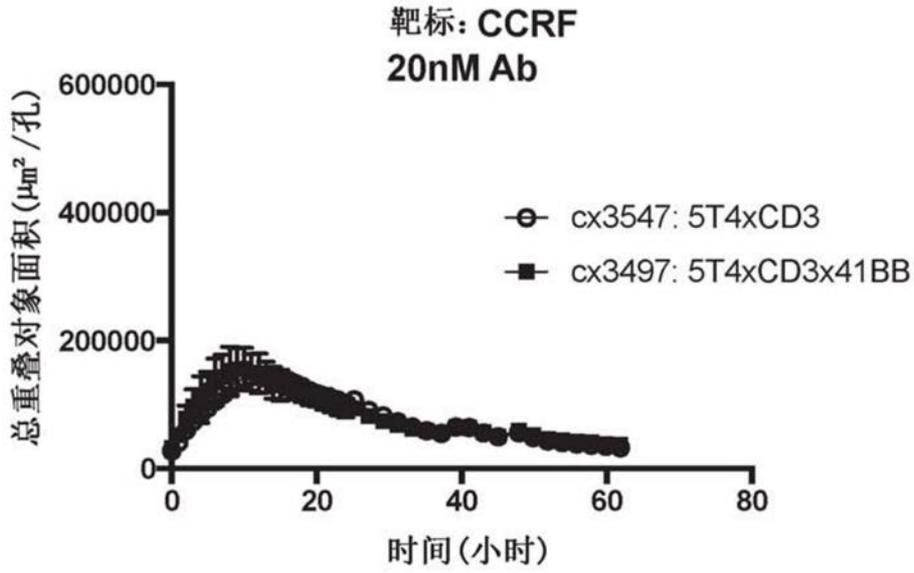


FIG. 10B

B7H3 阳性

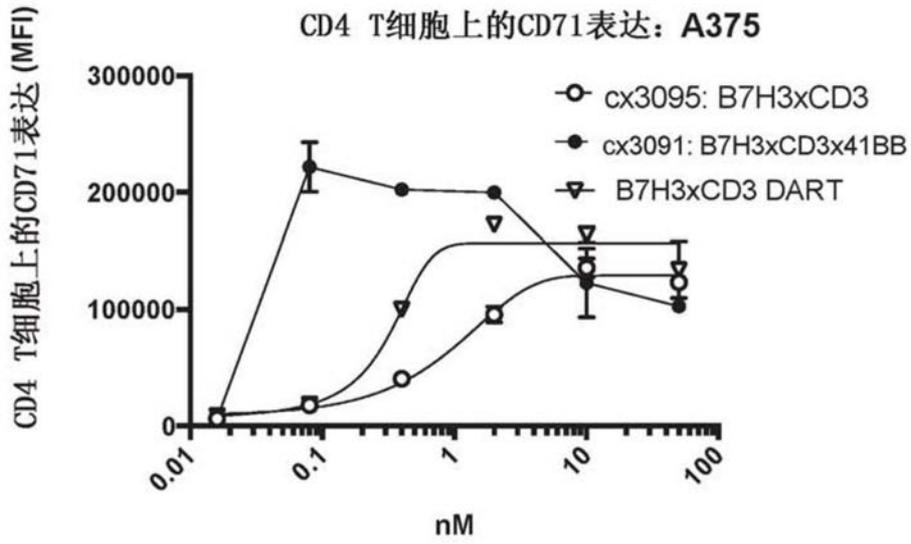


FIG. 11A

B7H3 敲减

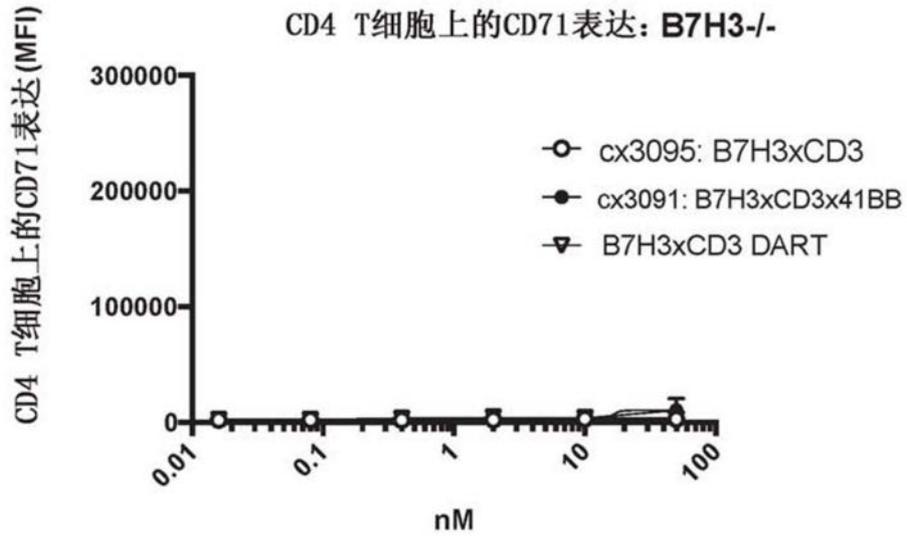


FIG.11B

B7H3 阳性

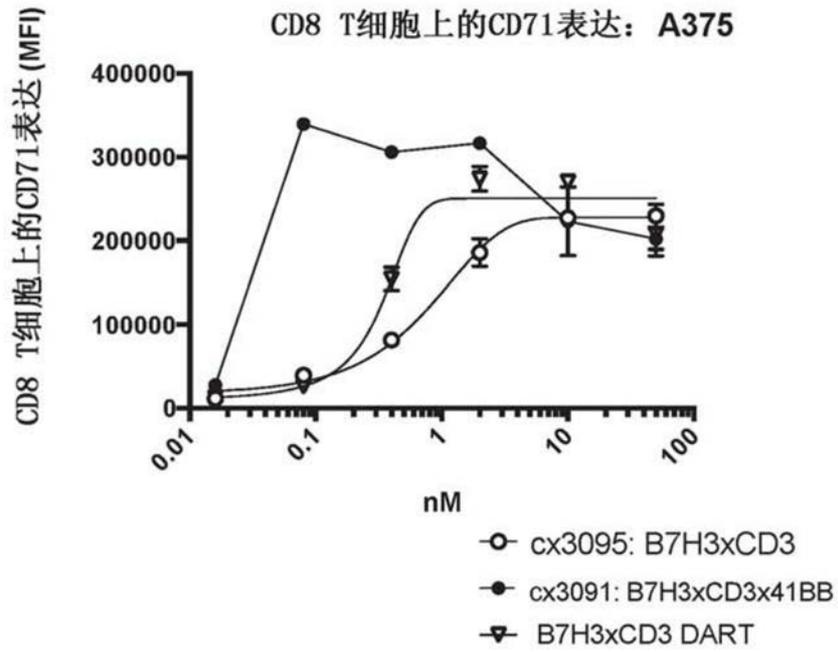


FIG.11C

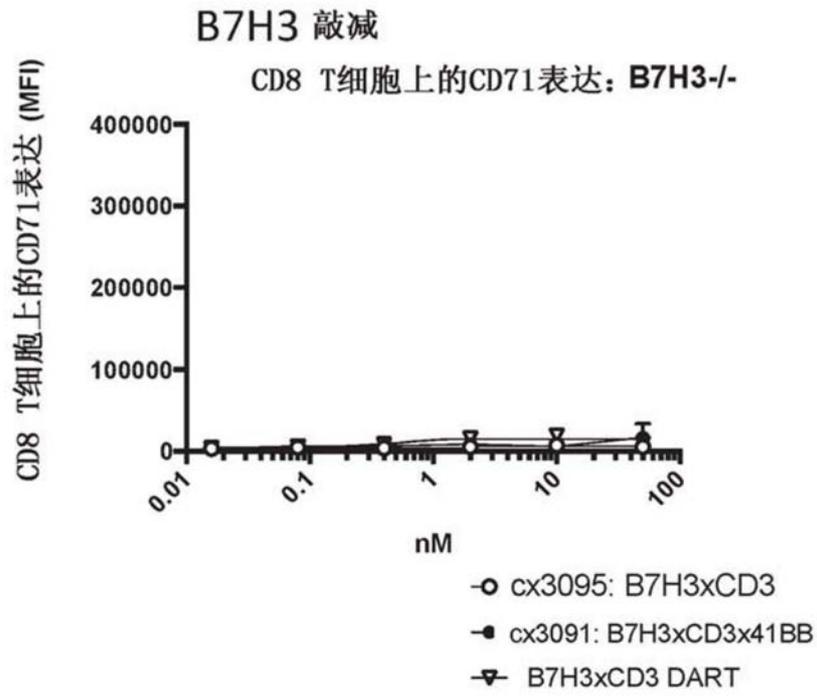


FIG.11D

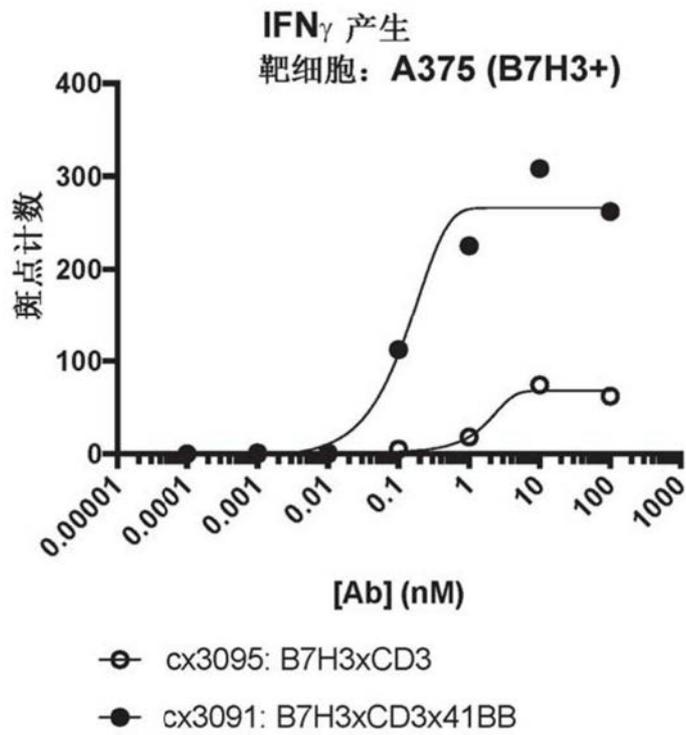


FIG.12A

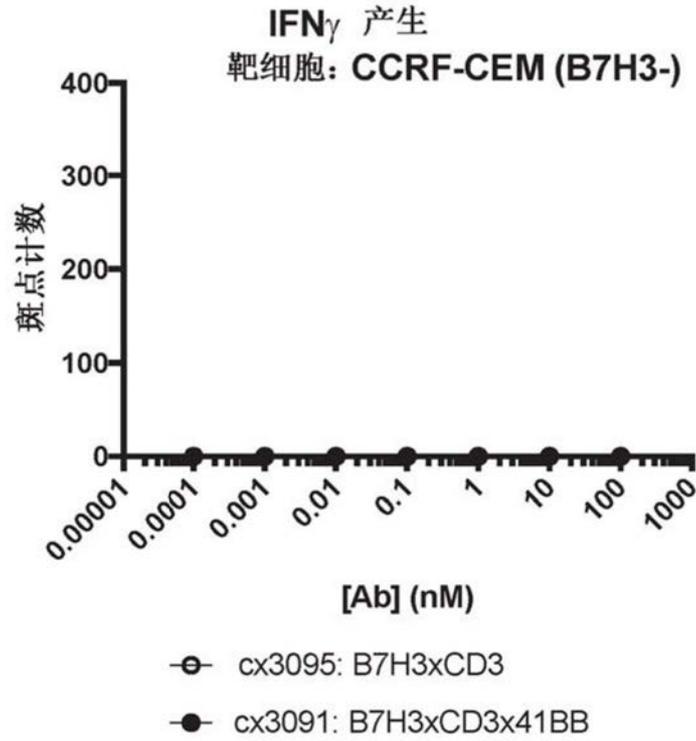


FIG.12B

5T4 -/+ 41BB INF ELISA

在20nM Ab下的IFN γ 产生

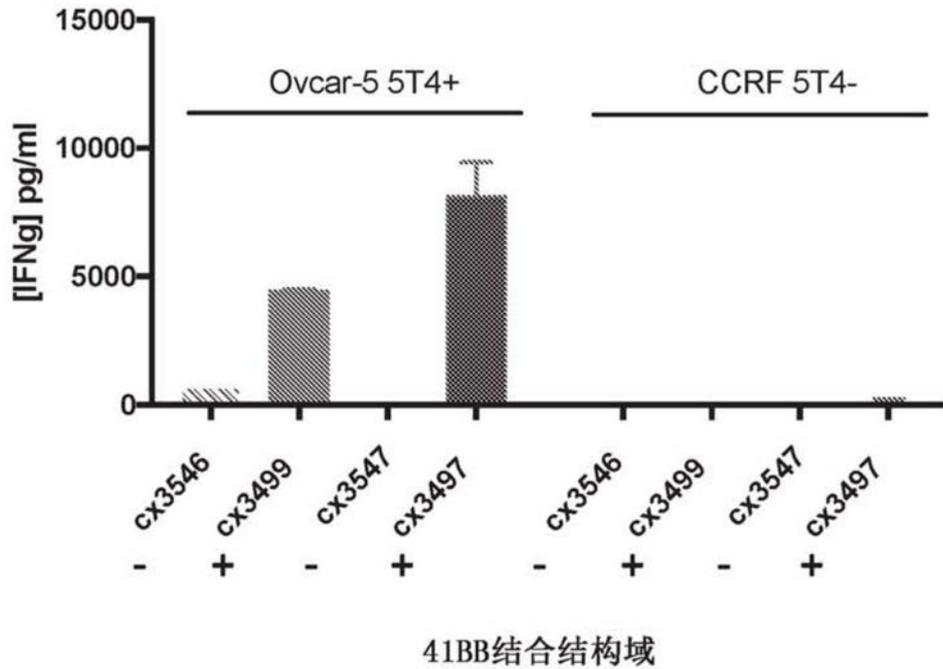


FIG.13

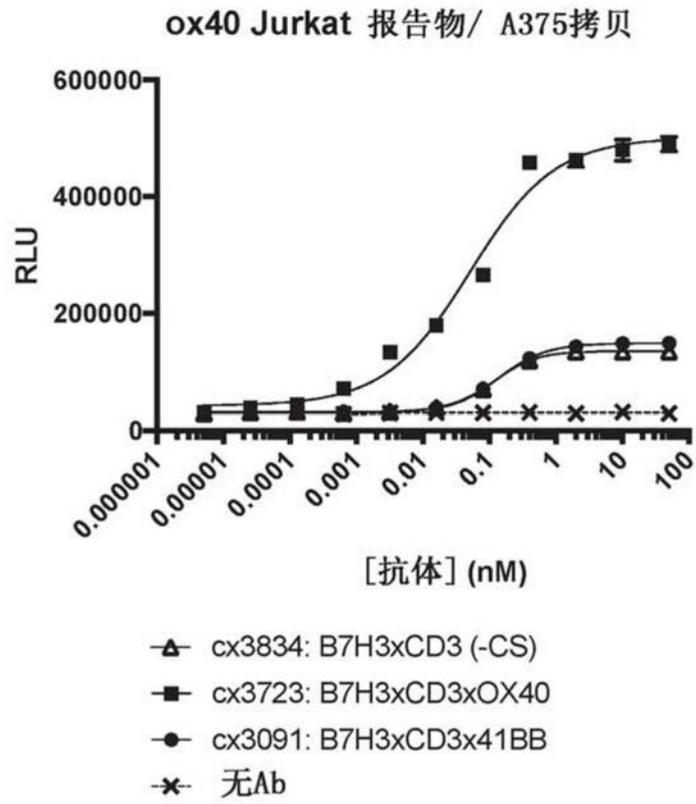


FIG. 14A

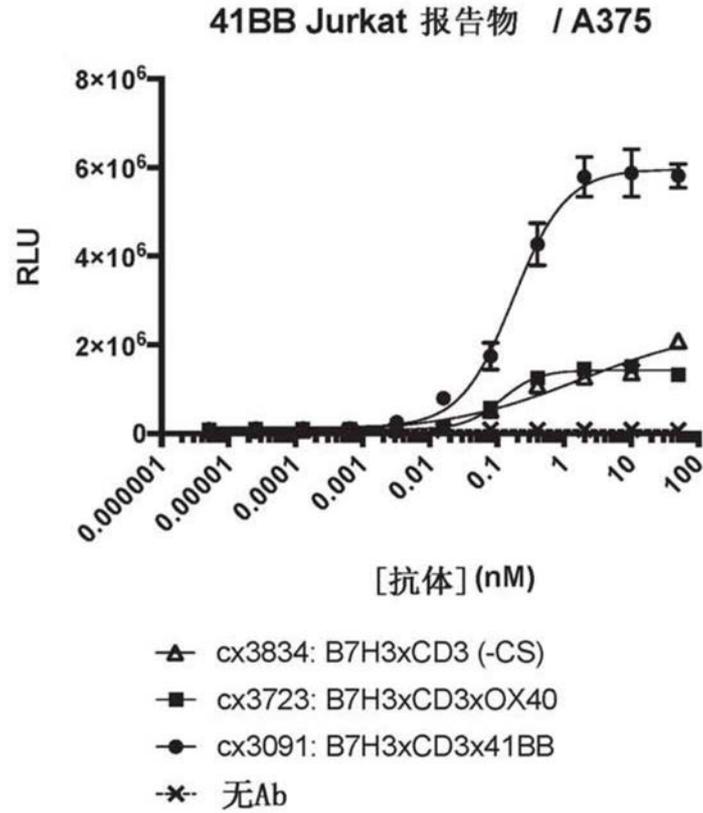


FIG. 14B

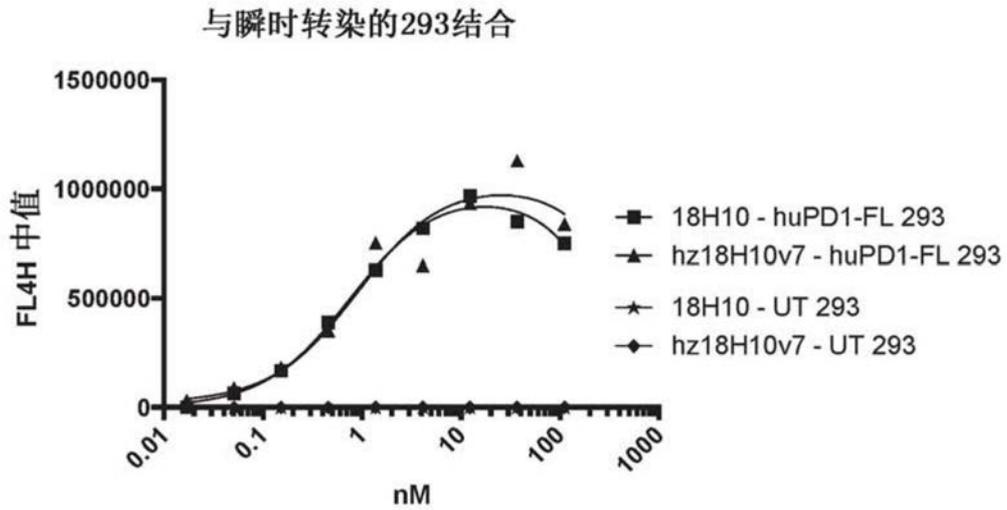


FIG. 15A

与瞬时转染的293结合

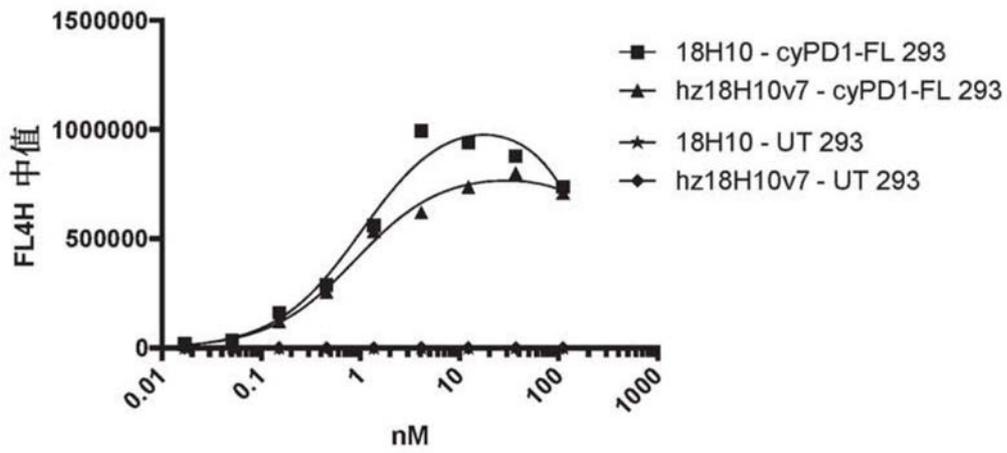


FIG.15B

与瞬时转染的 293 结合

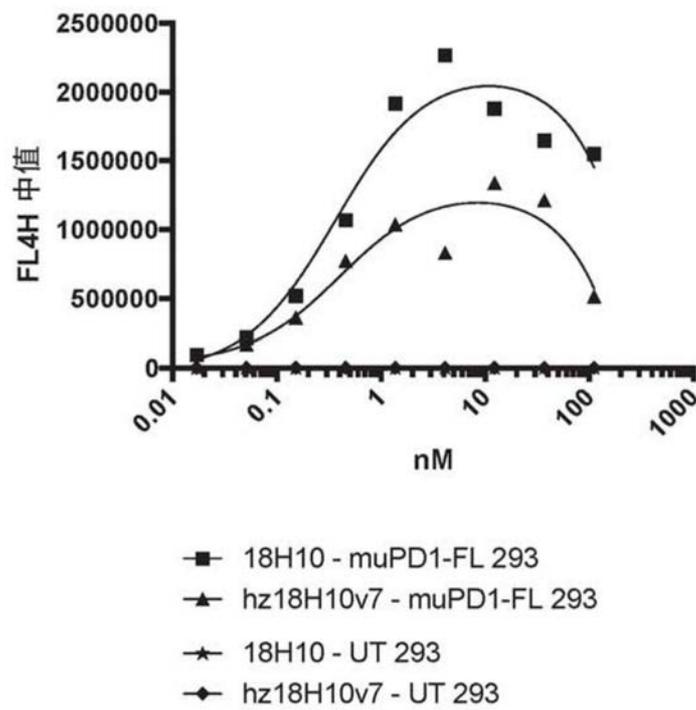


FIG.15C

与激活的人T细胞结合

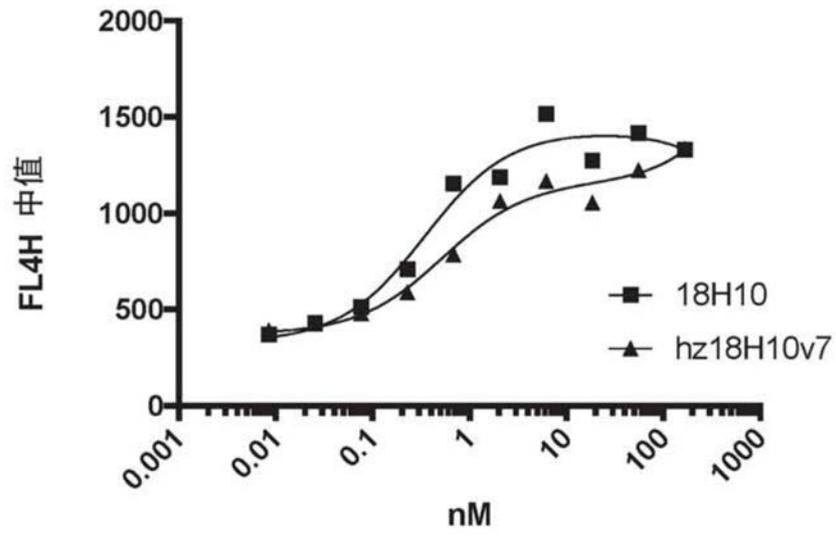


FIG.16

PD1/PDL1 阻断报告物测定

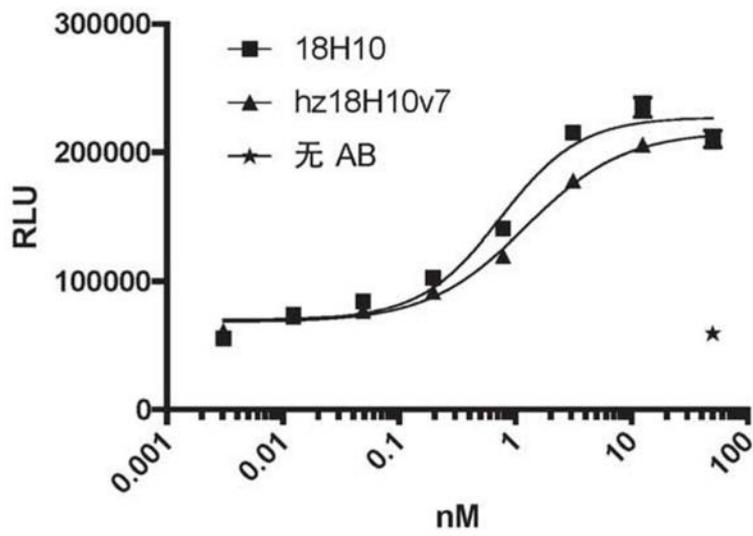


FIG.17

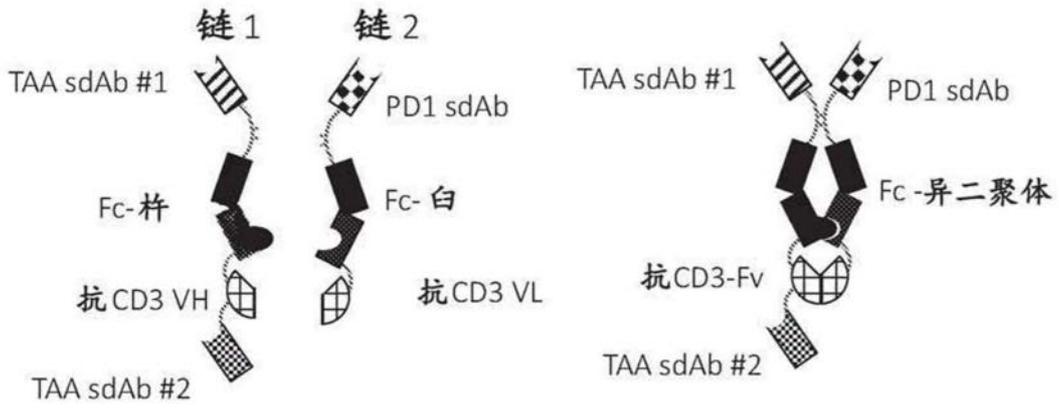


FIG. 18A

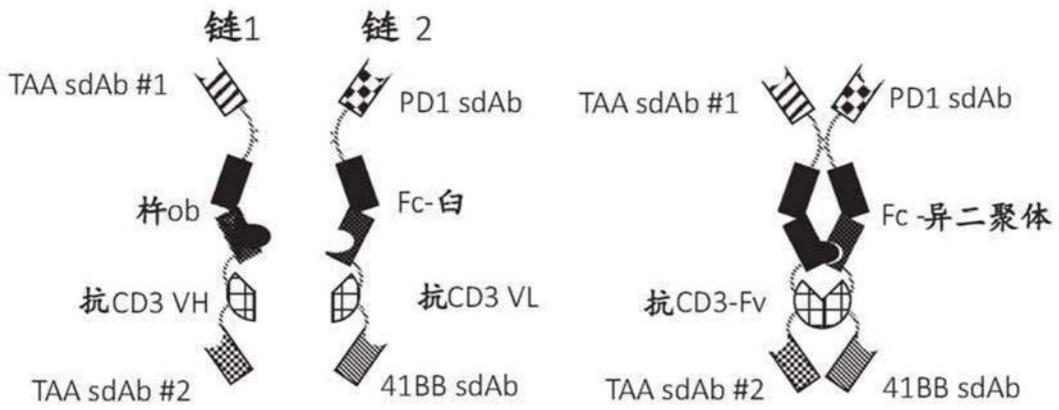


FIG. 18B

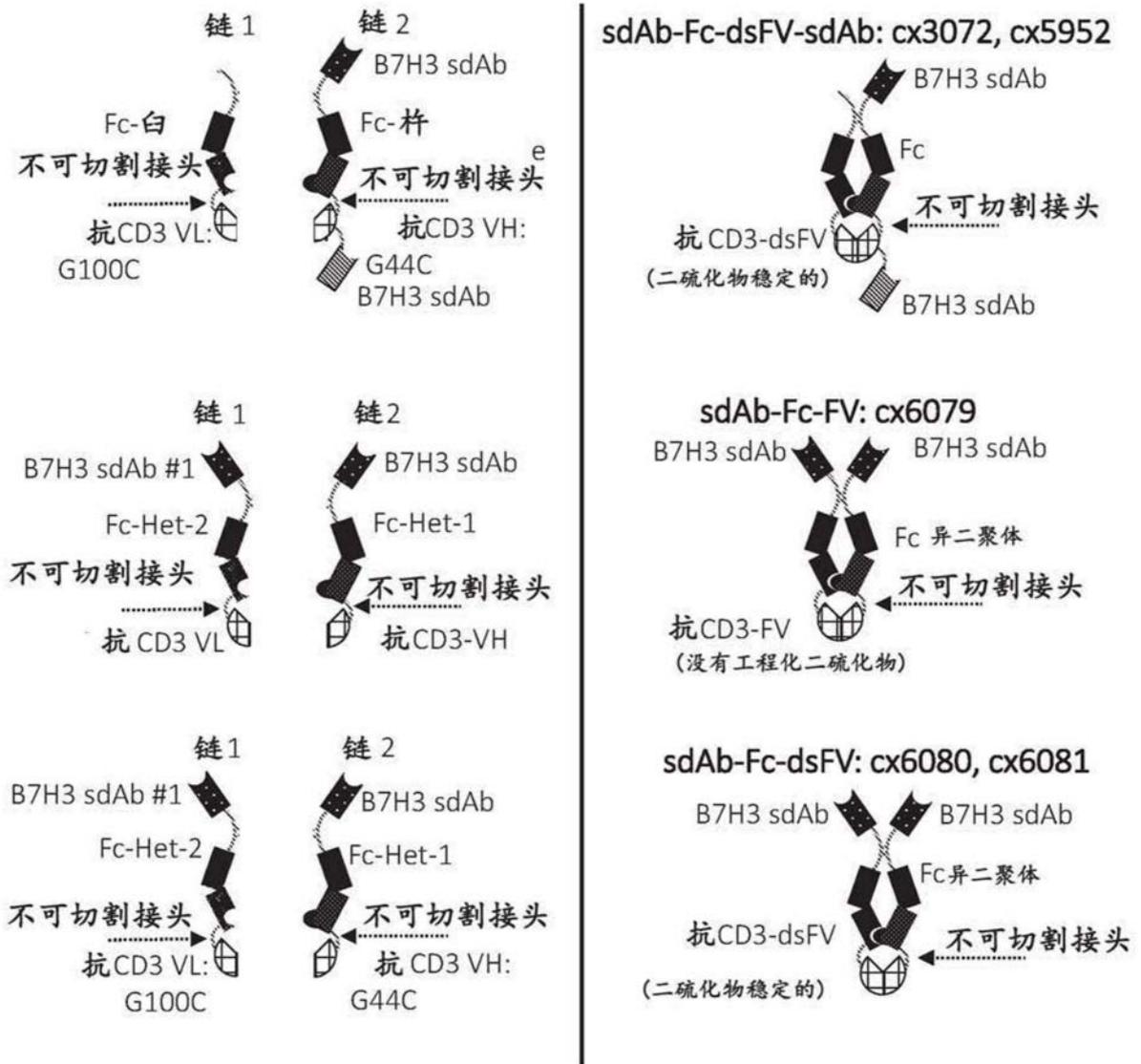


FIG. 19A

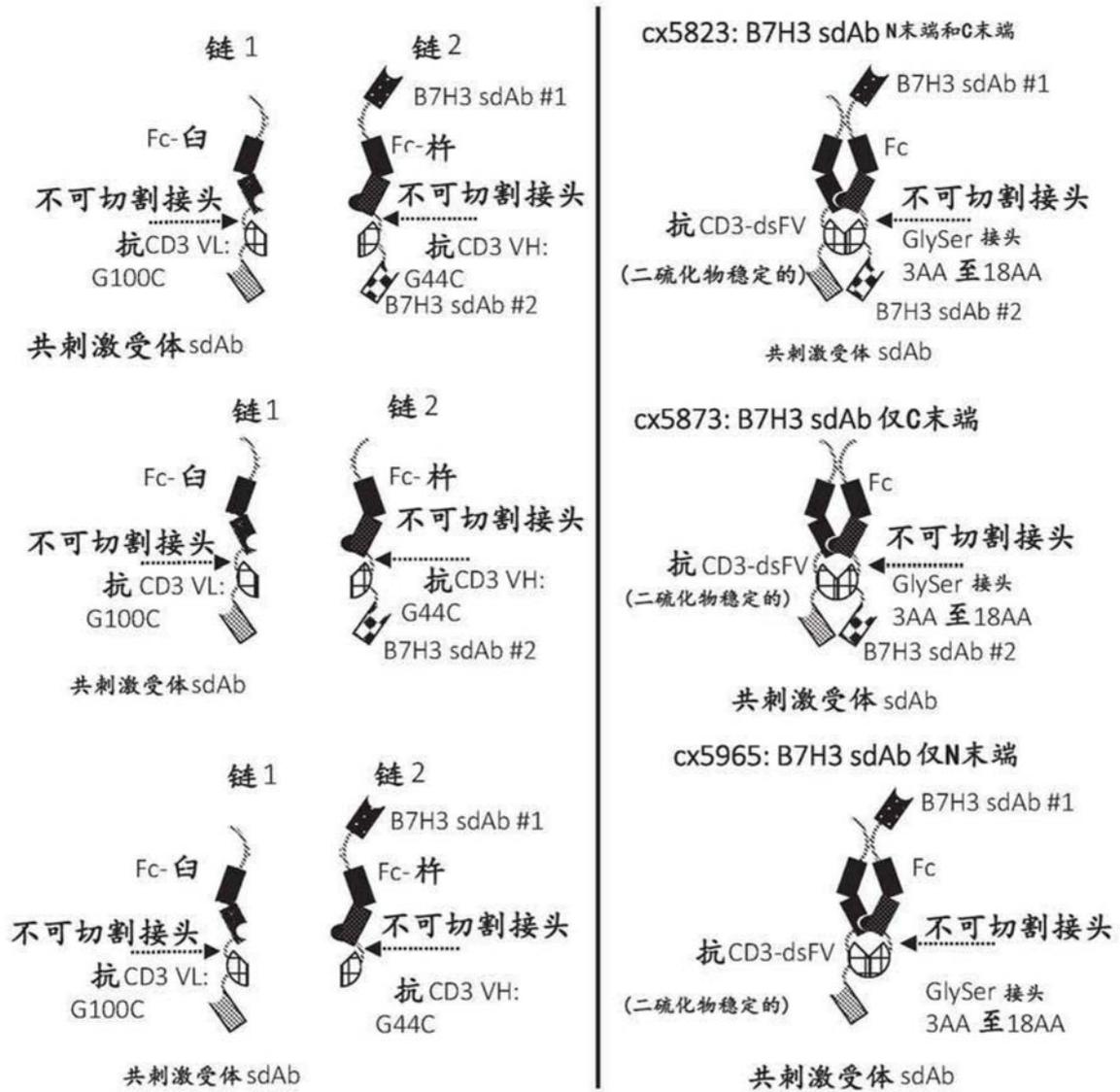


FIG. 19B

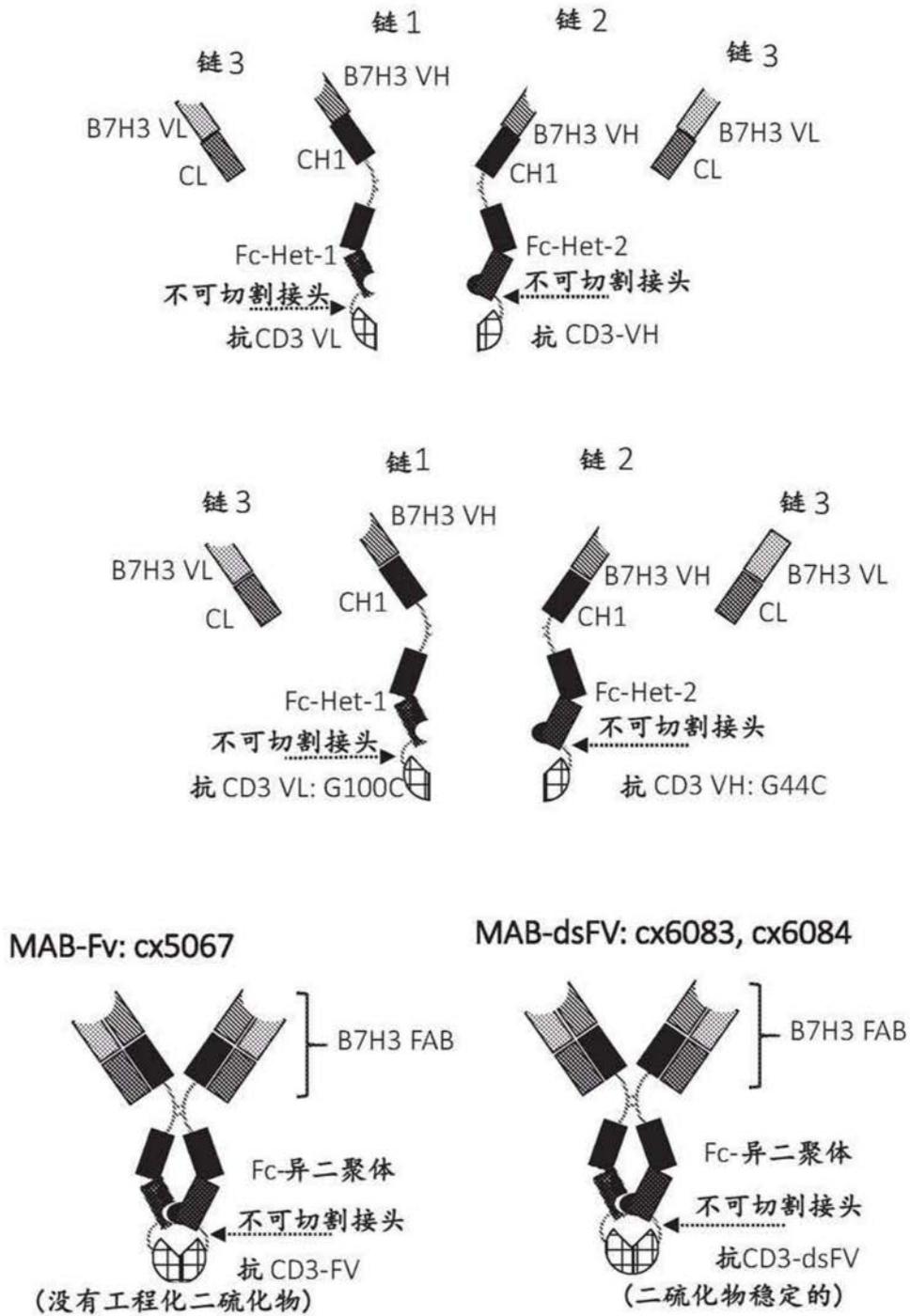


FIG. 19C



FIG. 20

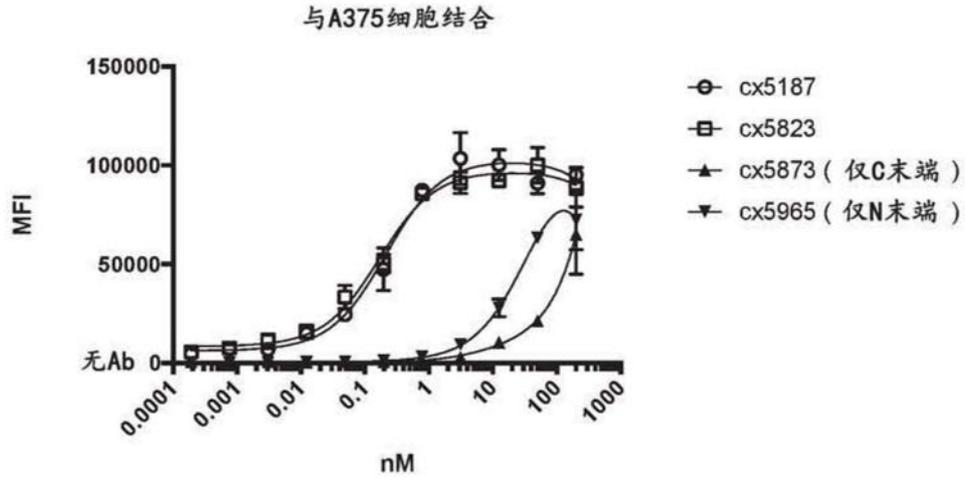


FIG. 21A

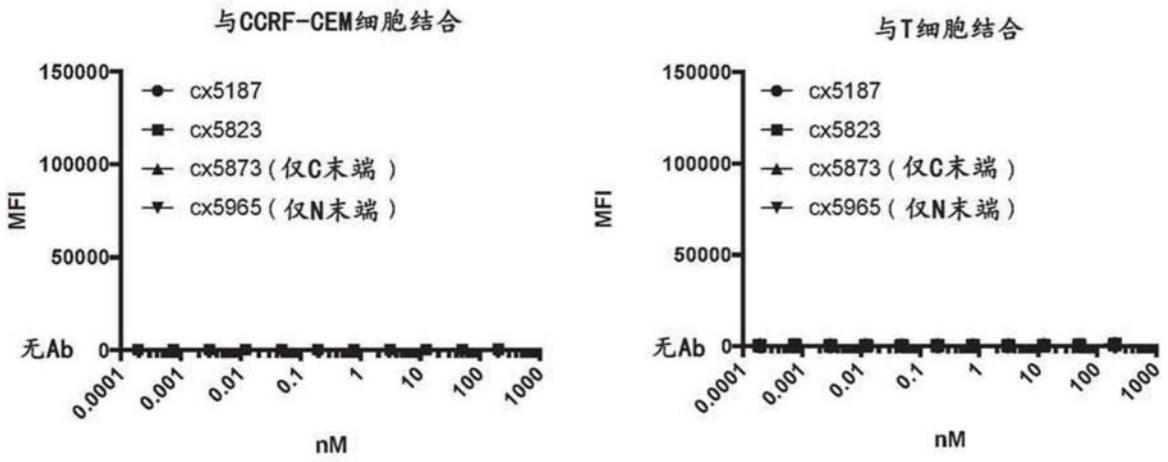


FIG. 21B

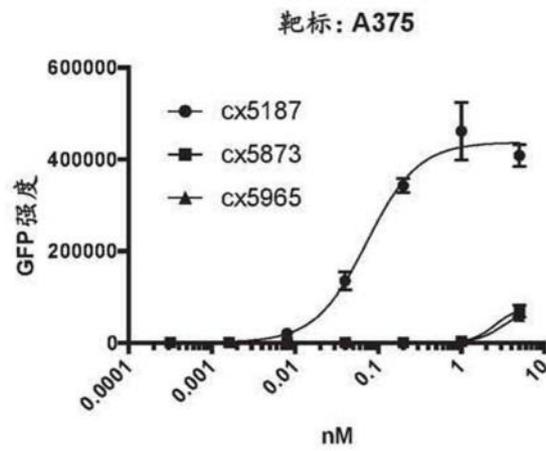


FIG. 21C

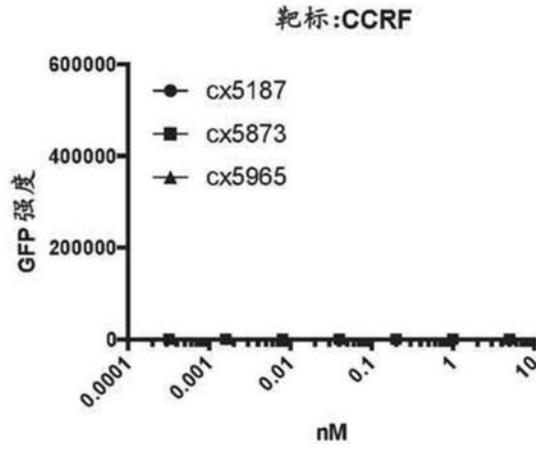


FIG.21D

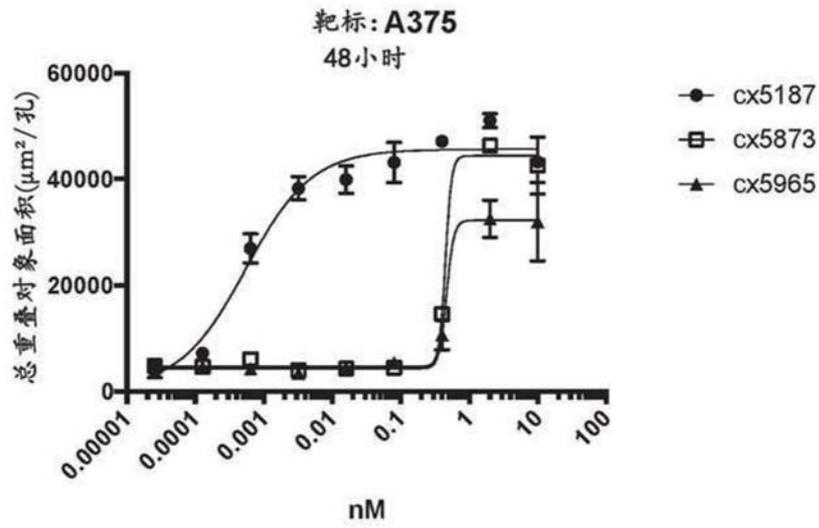


FIG.22A

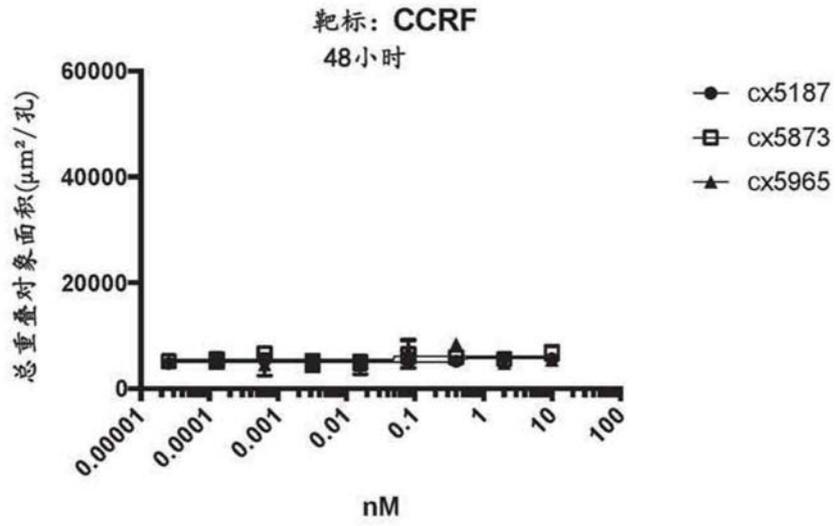


FIG. 22B

FIG. 23A

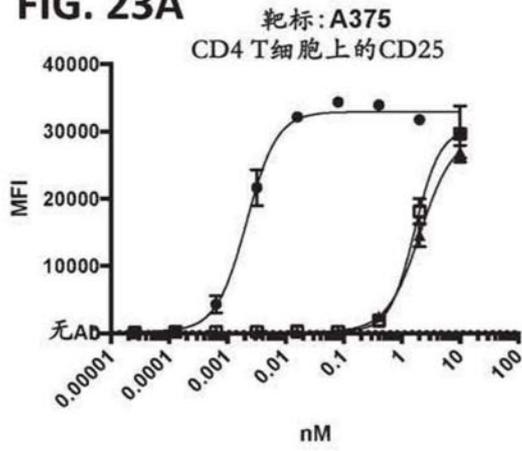


FIG. 23C

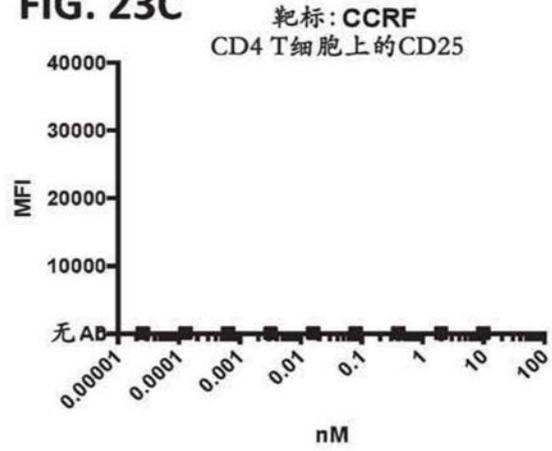


FIG. 23B

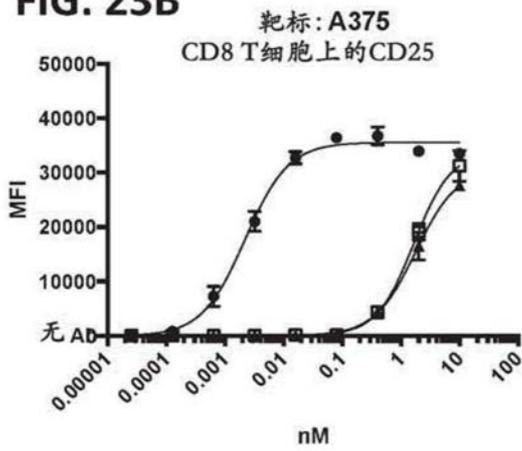
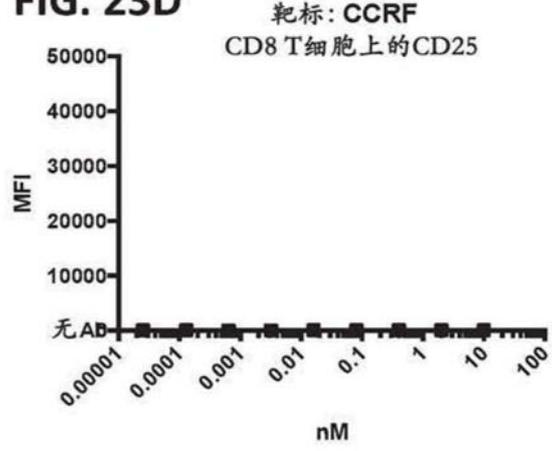


FIG. 23D



- cx5187
- cx5873
- ▲ cx5965

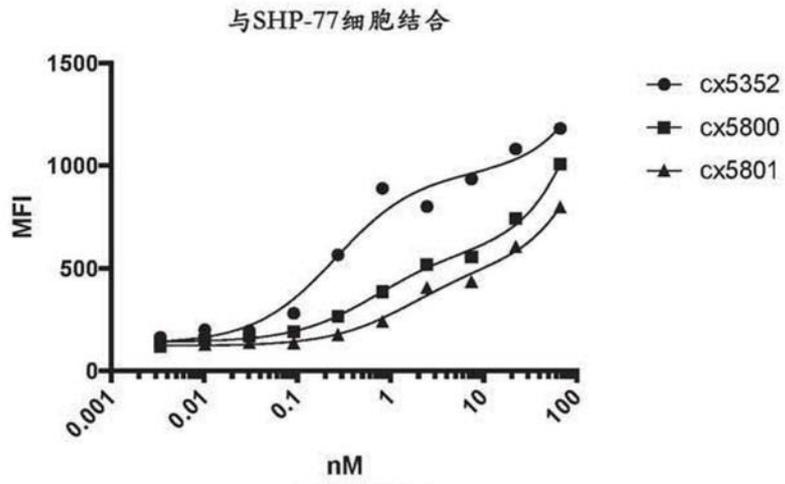


FIG. 24A

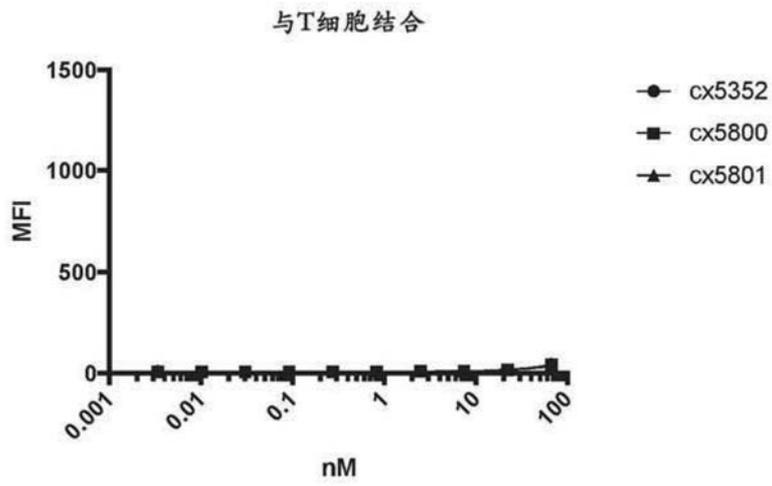


FIG. 24B

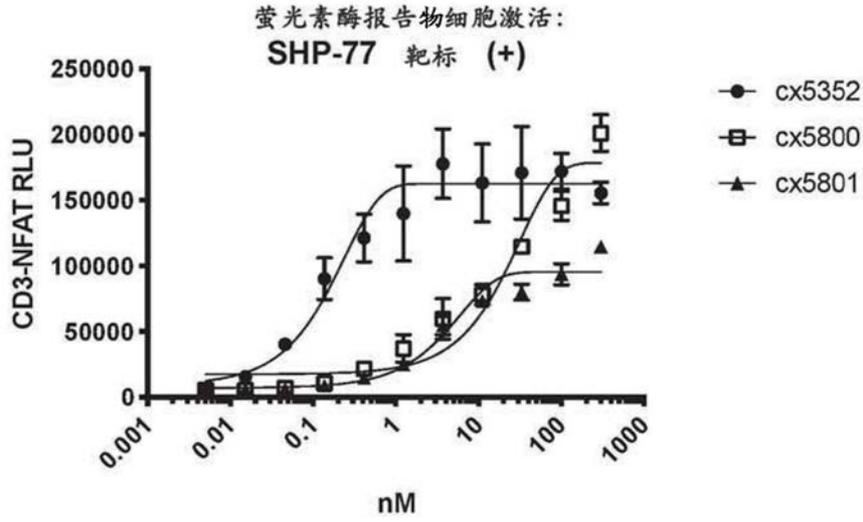


FIG.24C

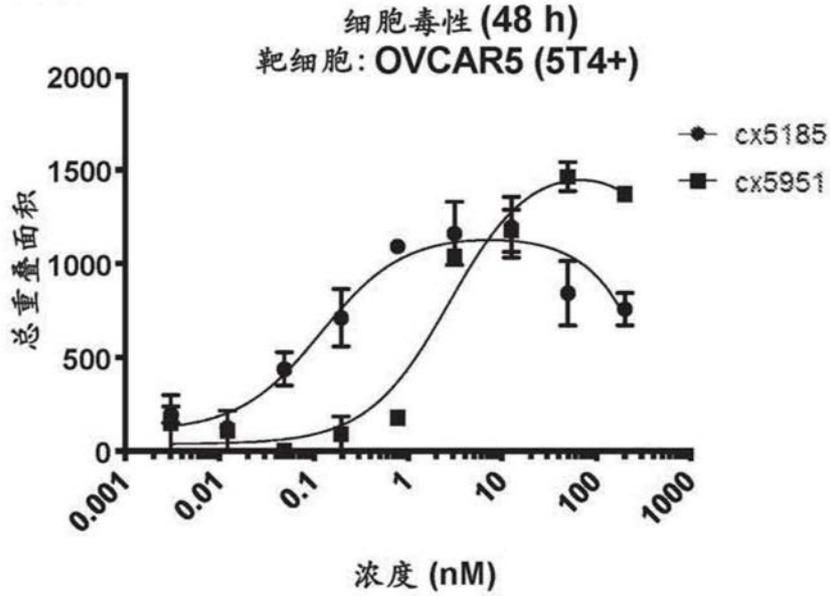


FIG.25A

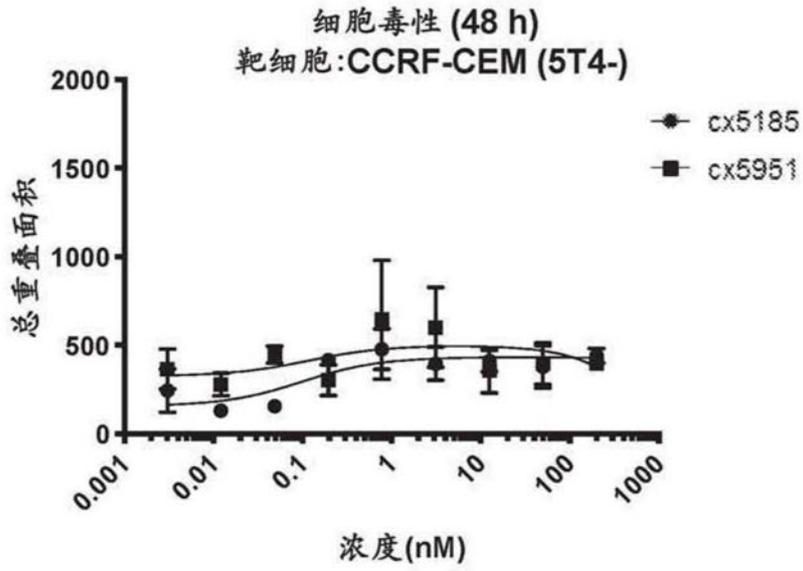


FIG. 25B

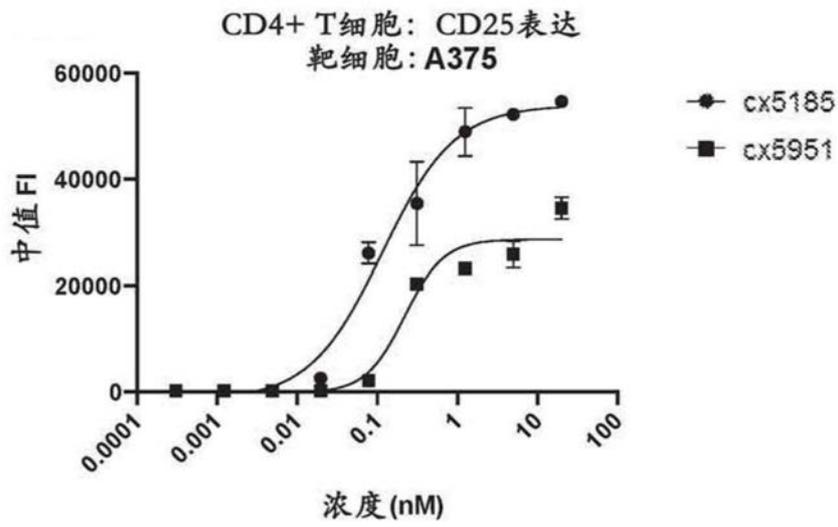


FIG. 26A

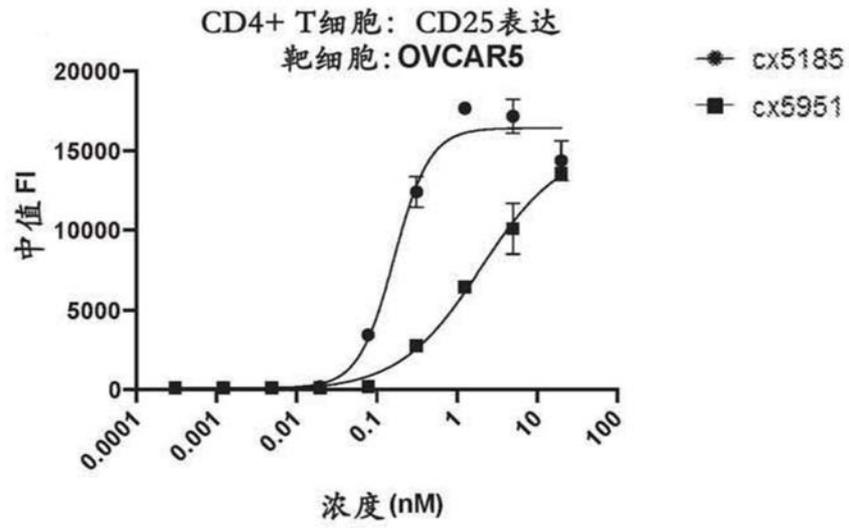


FIG.26B

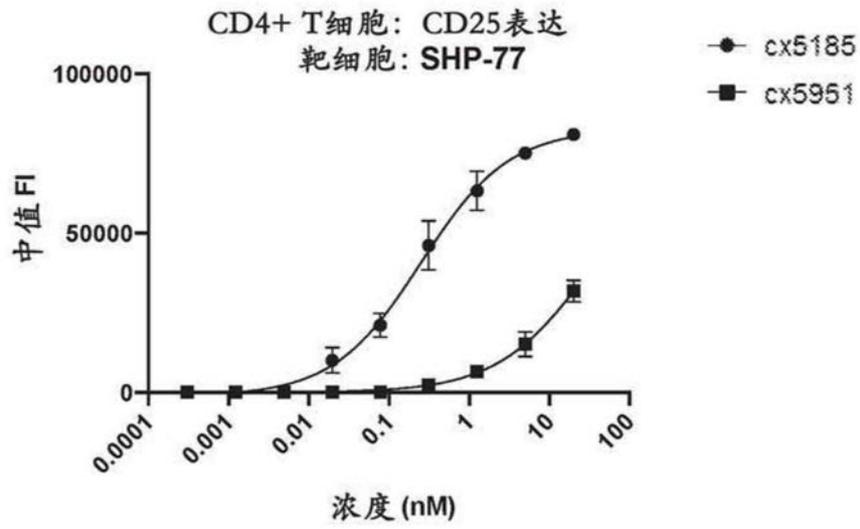


FIG.26C

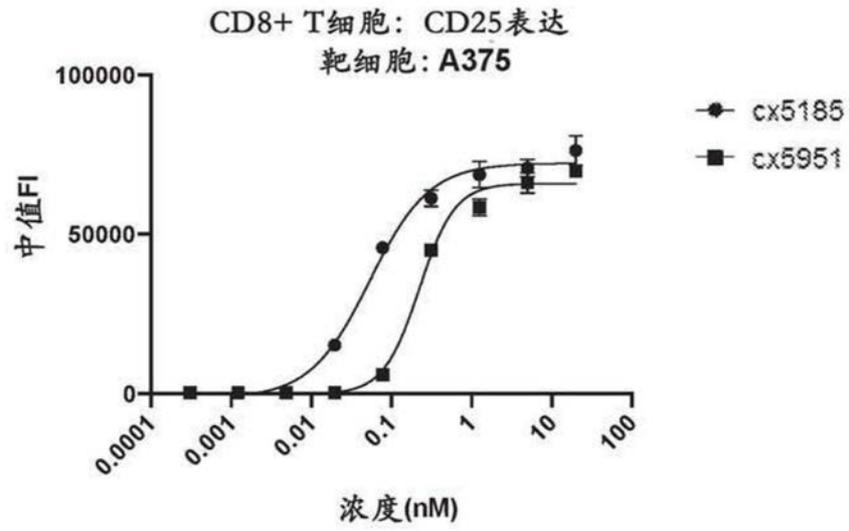


FIG.26D

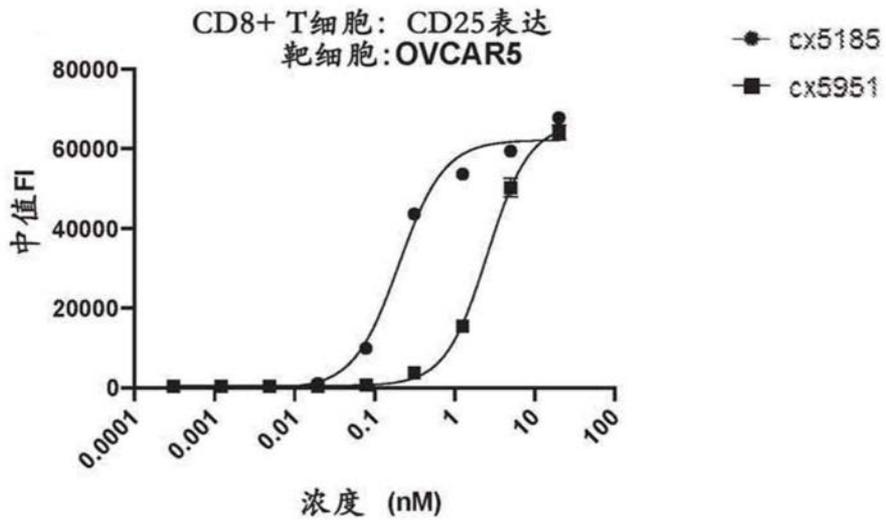


FIG.26E

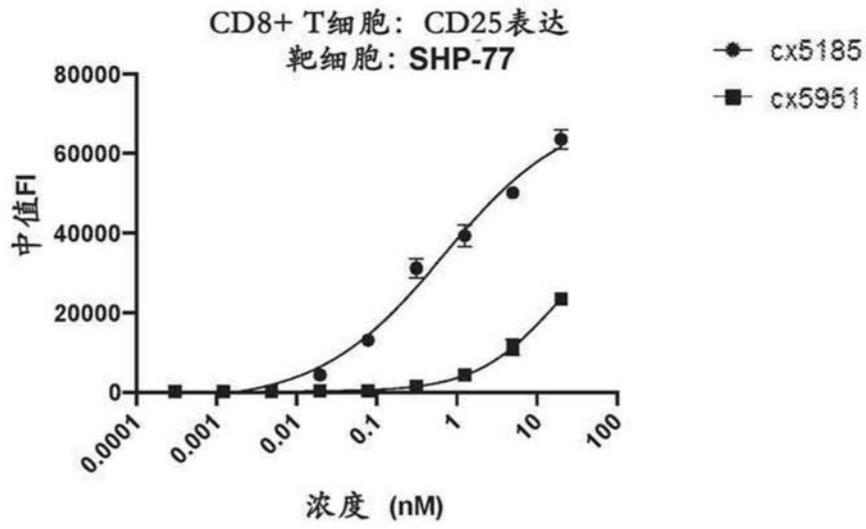


FIG.26F

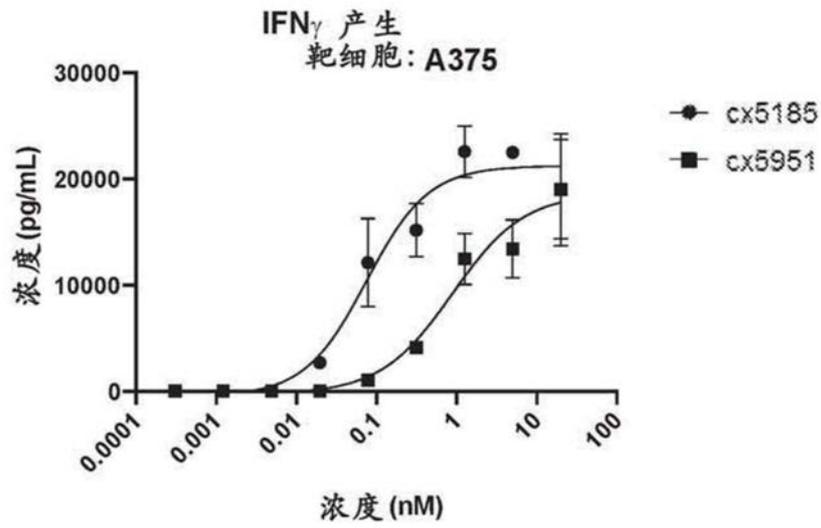


FIG.27A

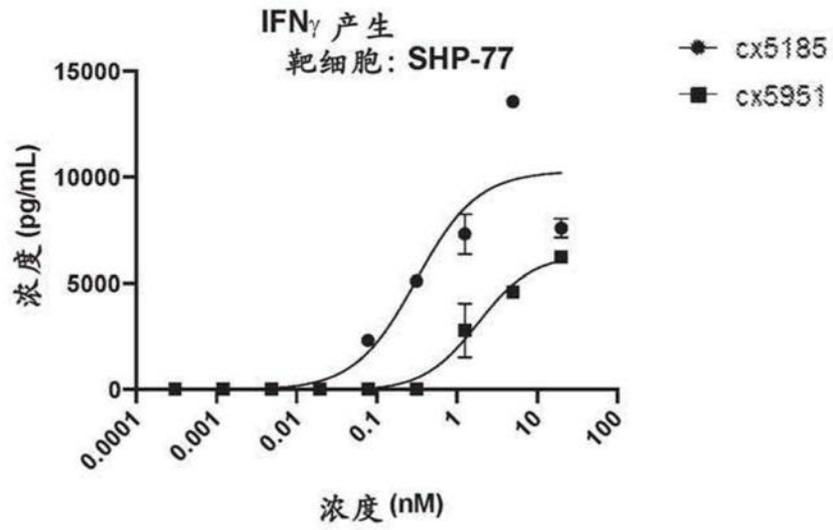


FIG.27B

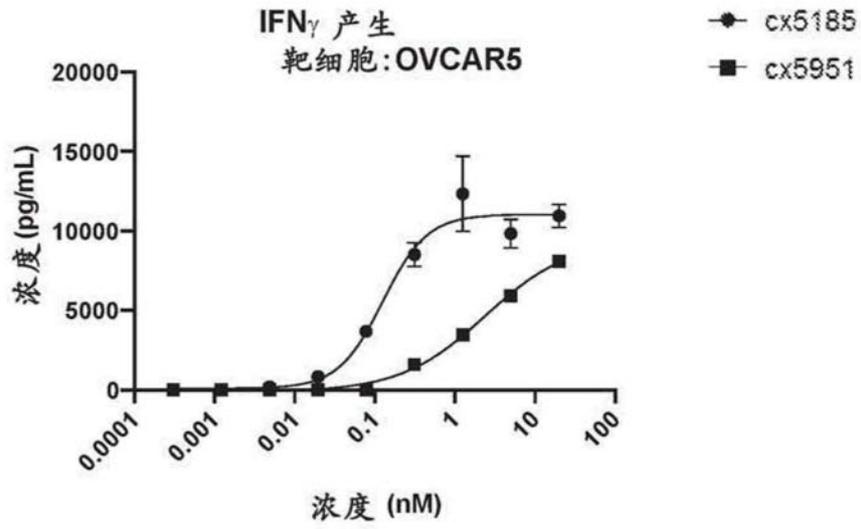


FIG.27C

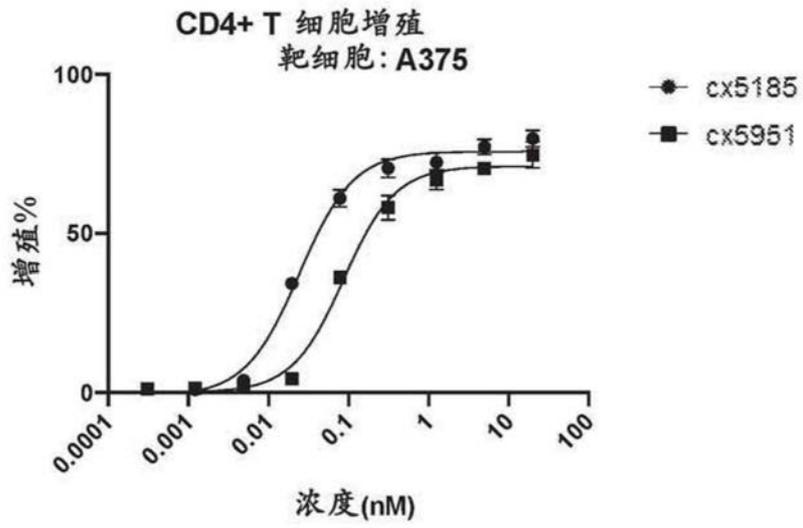


FIG.28A

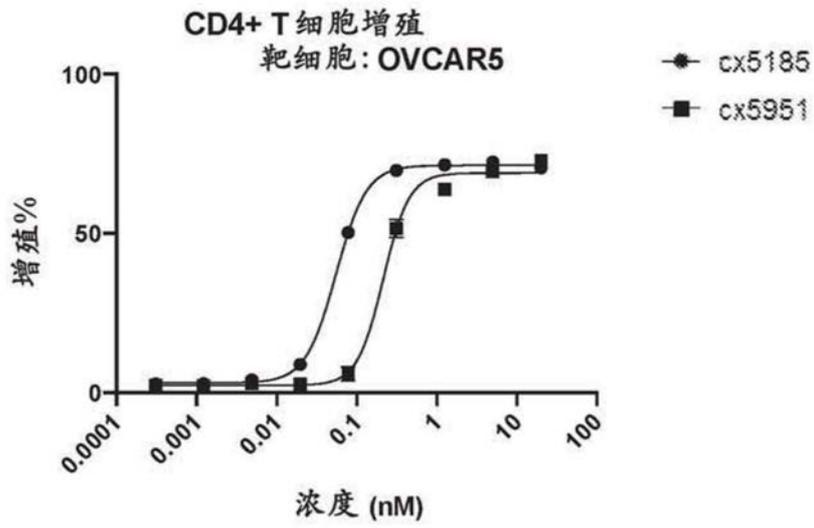


FIG.28B

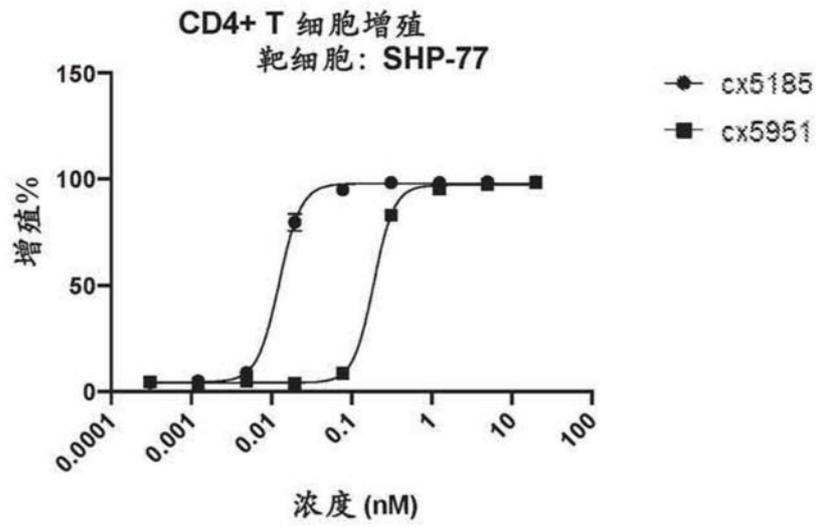


FIG. 28C

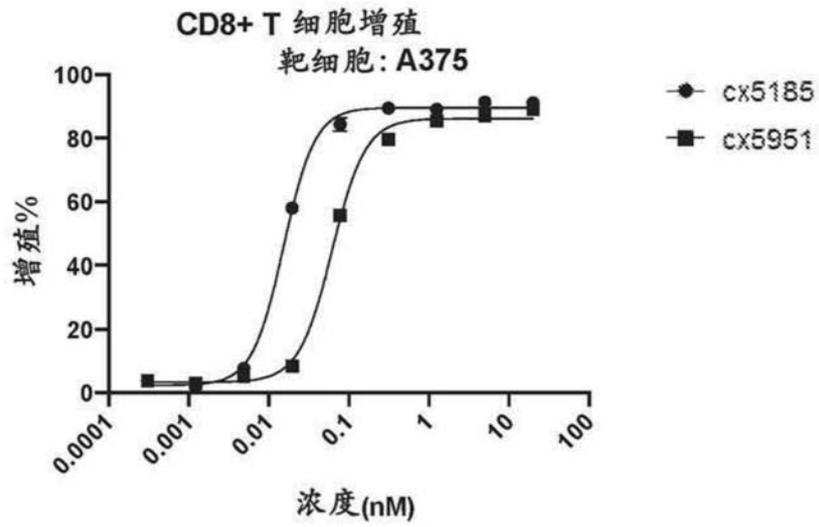


FIG. 28D

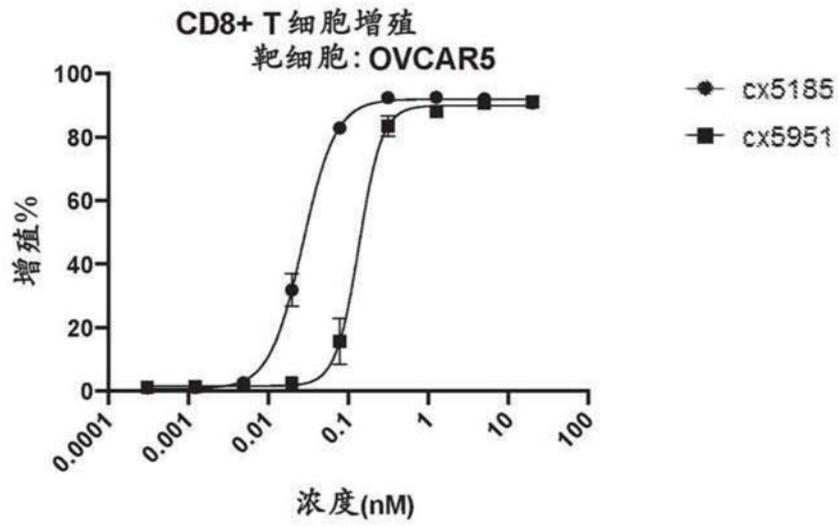


FIG.28E

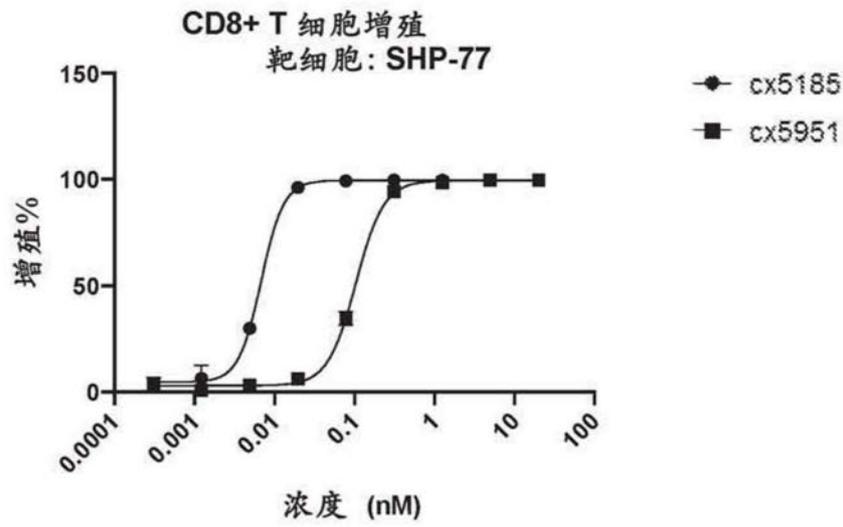


FIG.28F

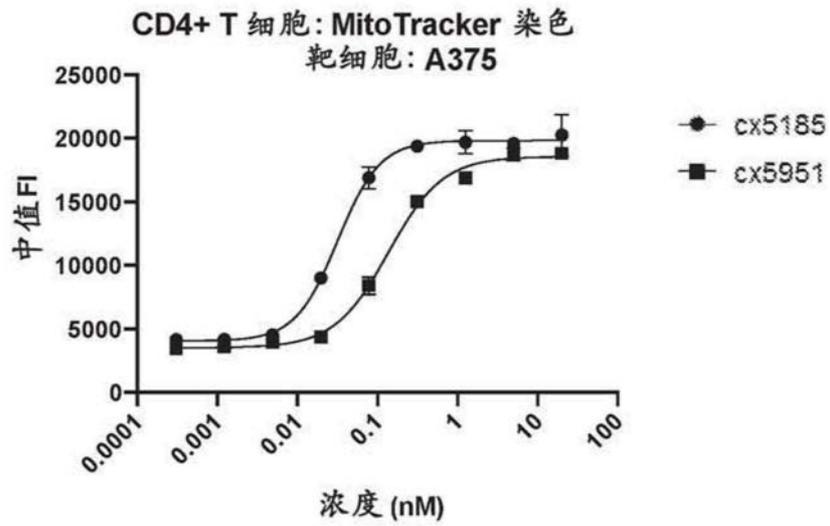


FIG.29A

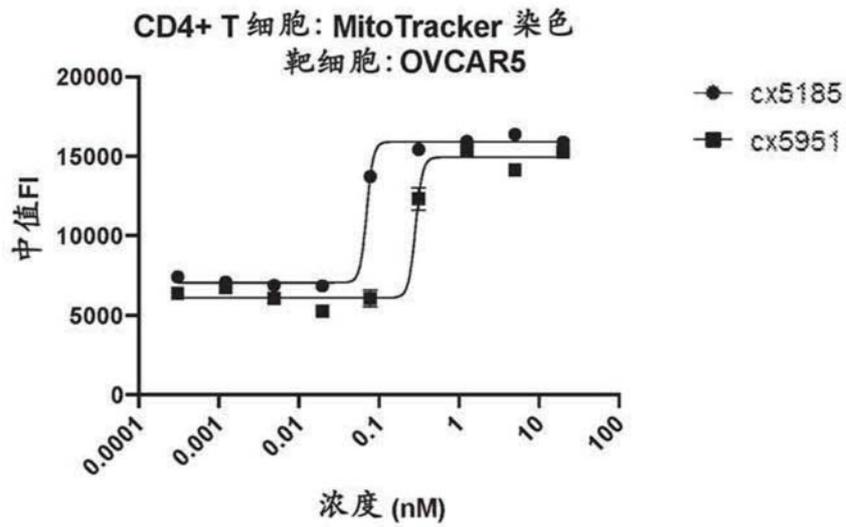


FIG.29B

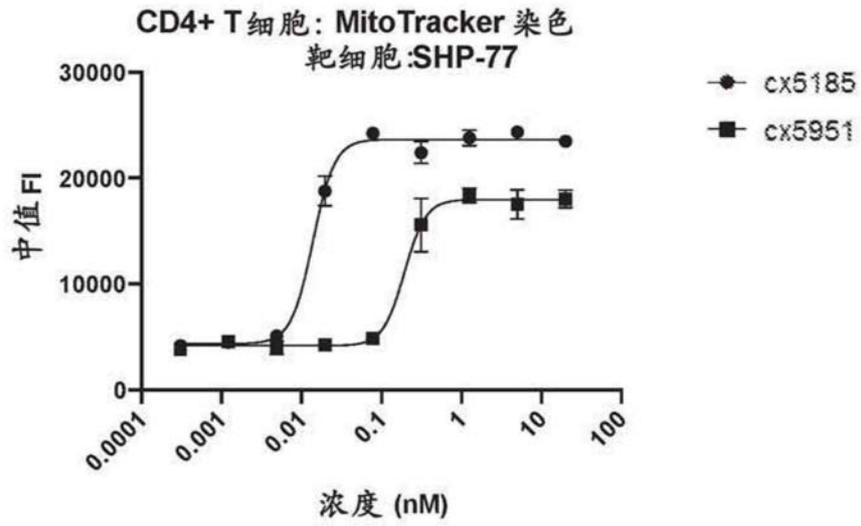


FIG.29C

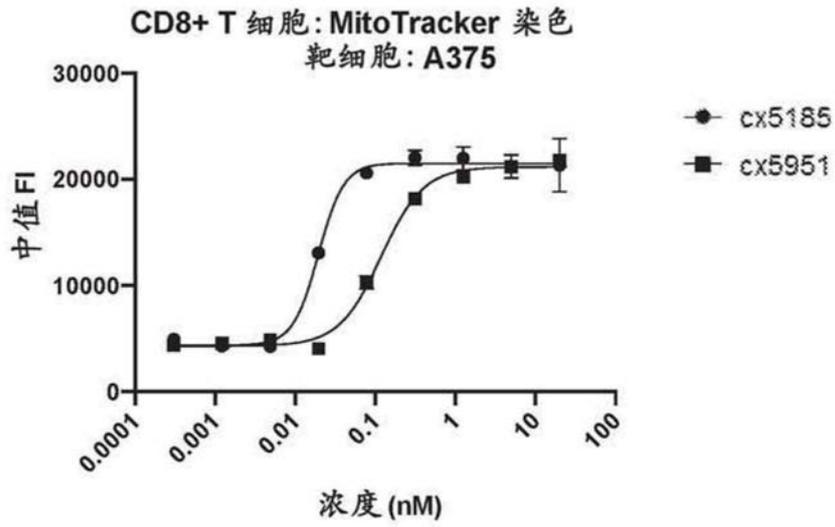


FIG.29D

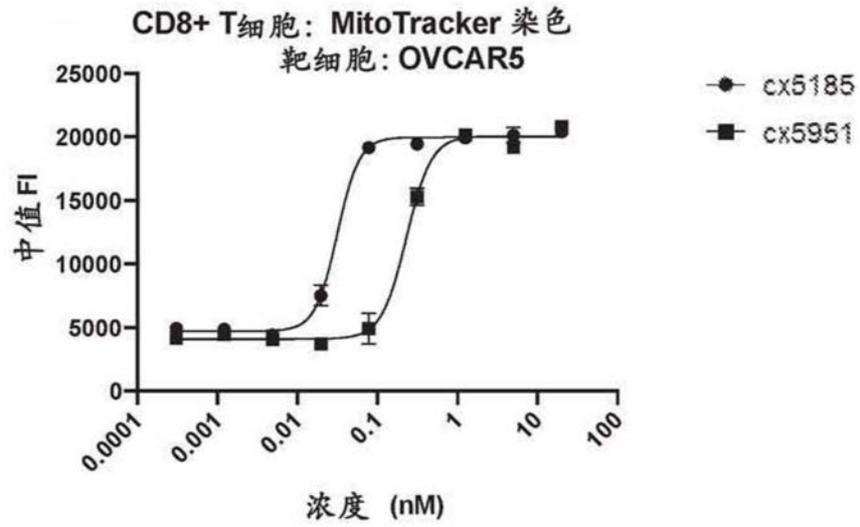


FIG.29E

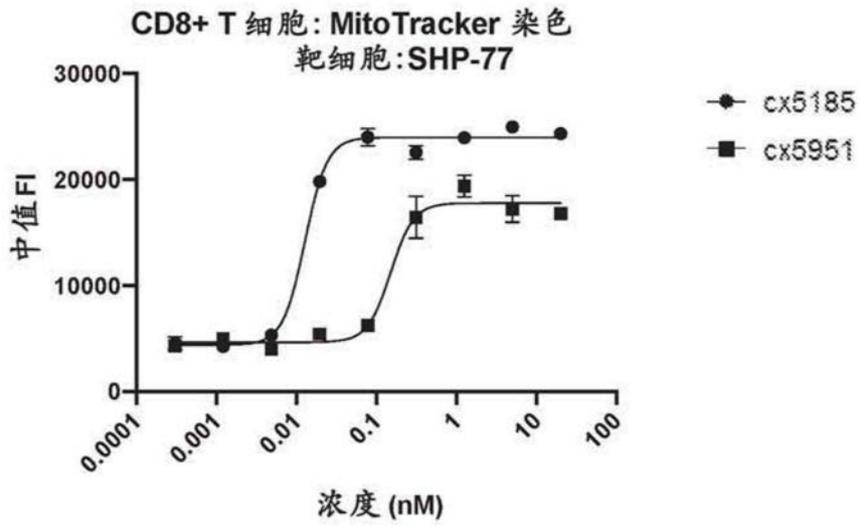


FIG.29F

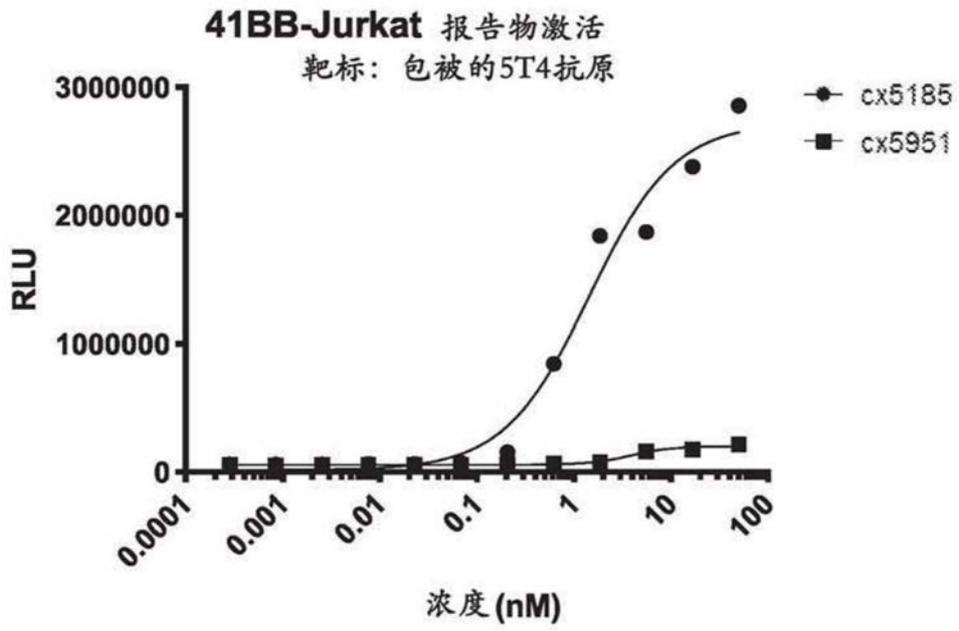


FIG.30

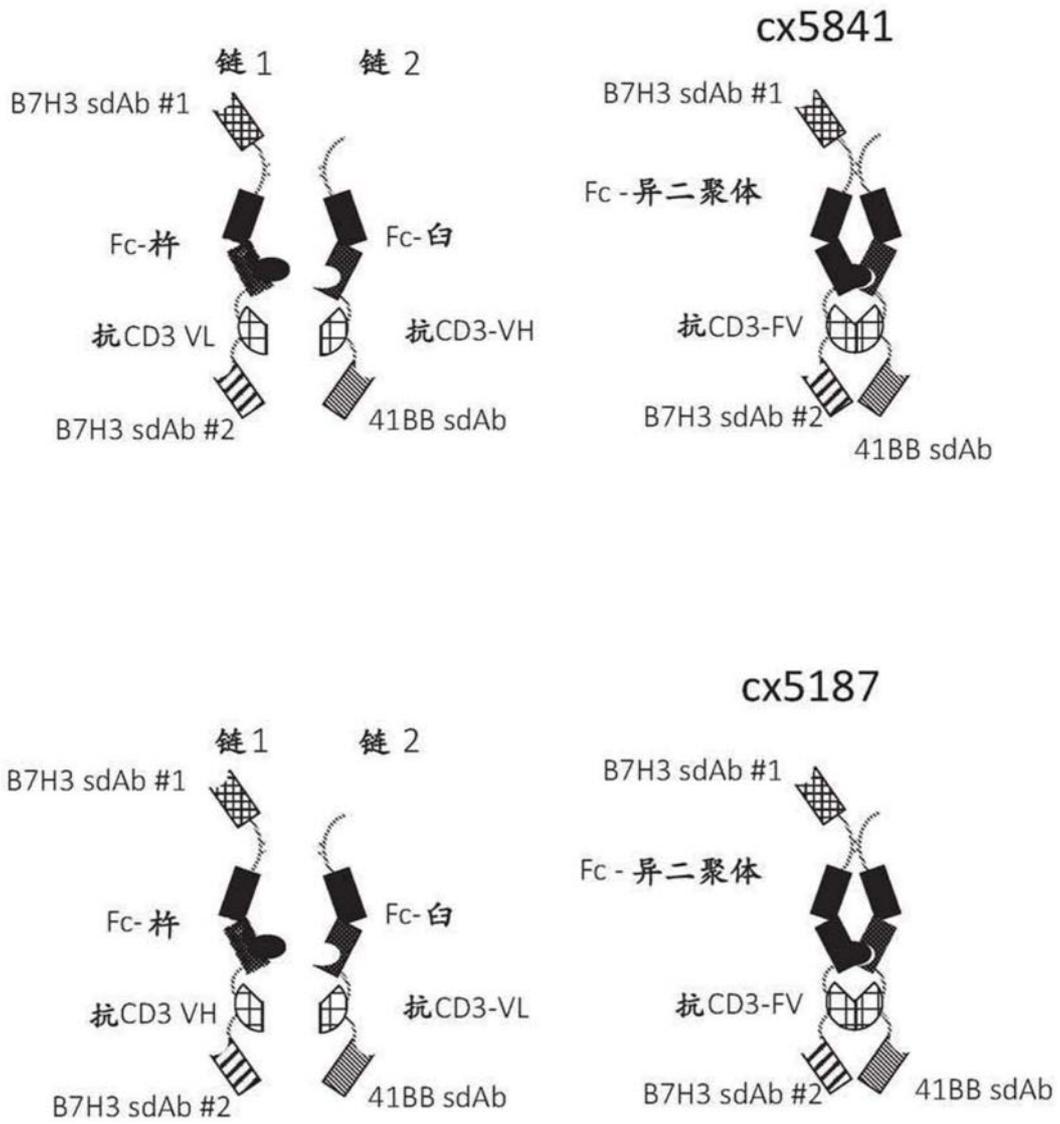


FIG.31A

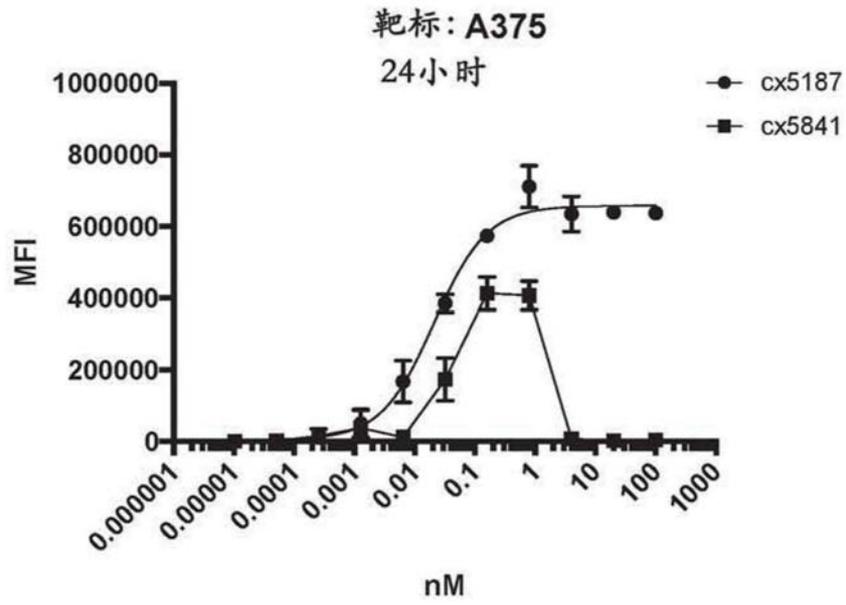


FIG.31B

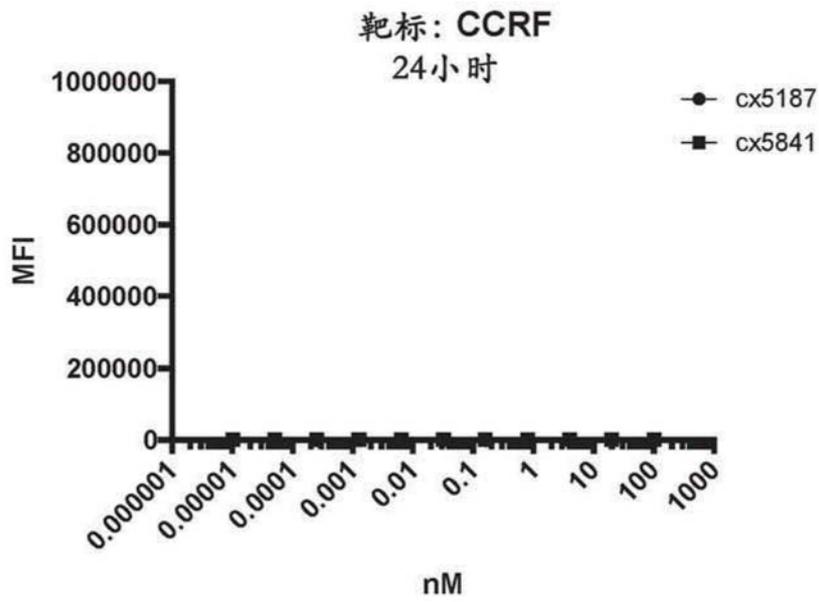


FIG.31C

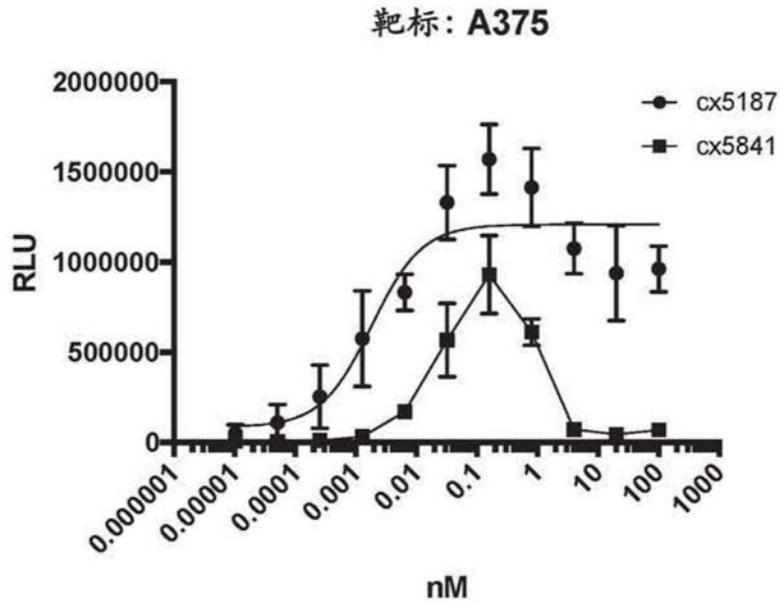


FIG.31D

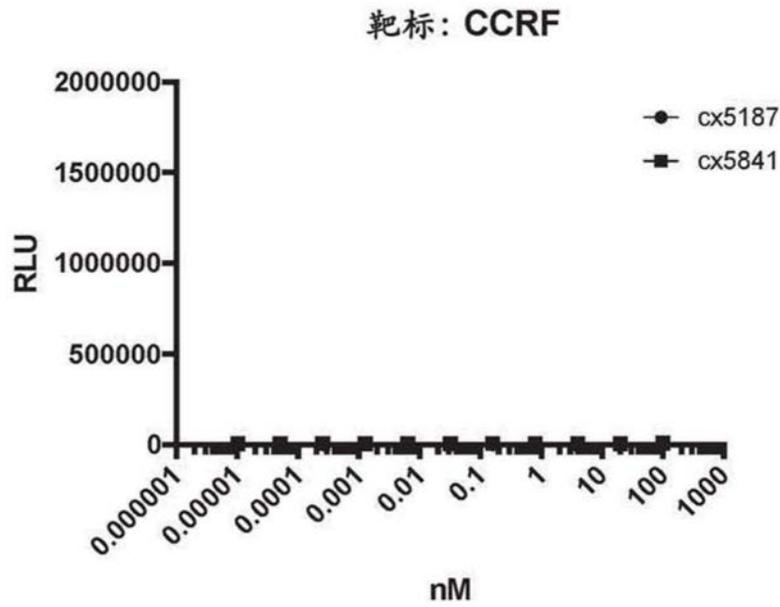


FIG.31E

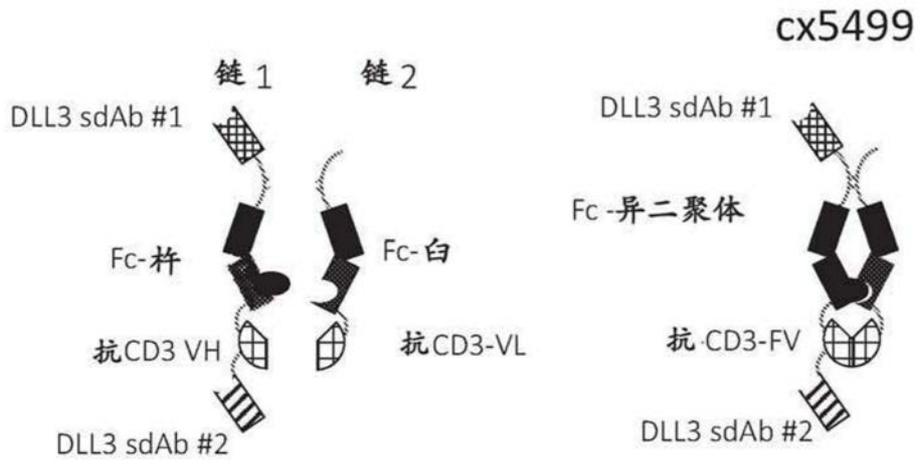


FIG. 32A

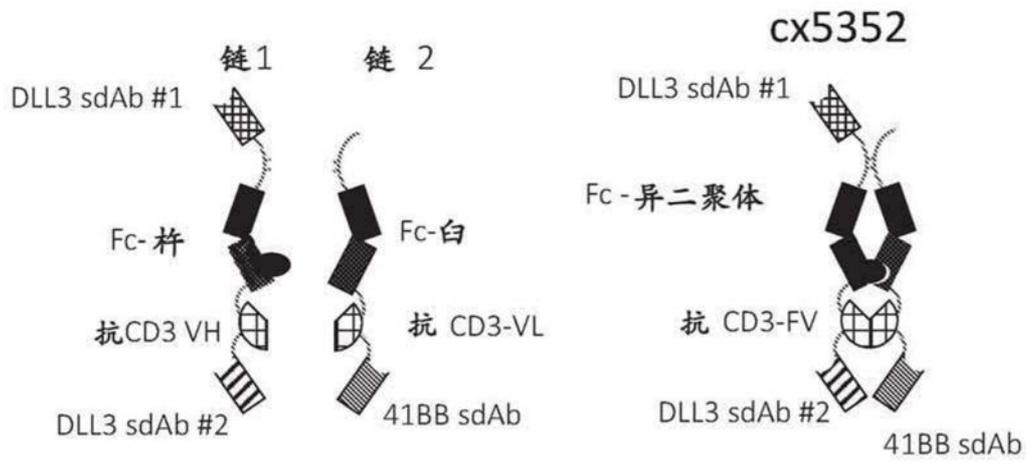


FIG. 32B

41BB-Jurkat 报告物激活

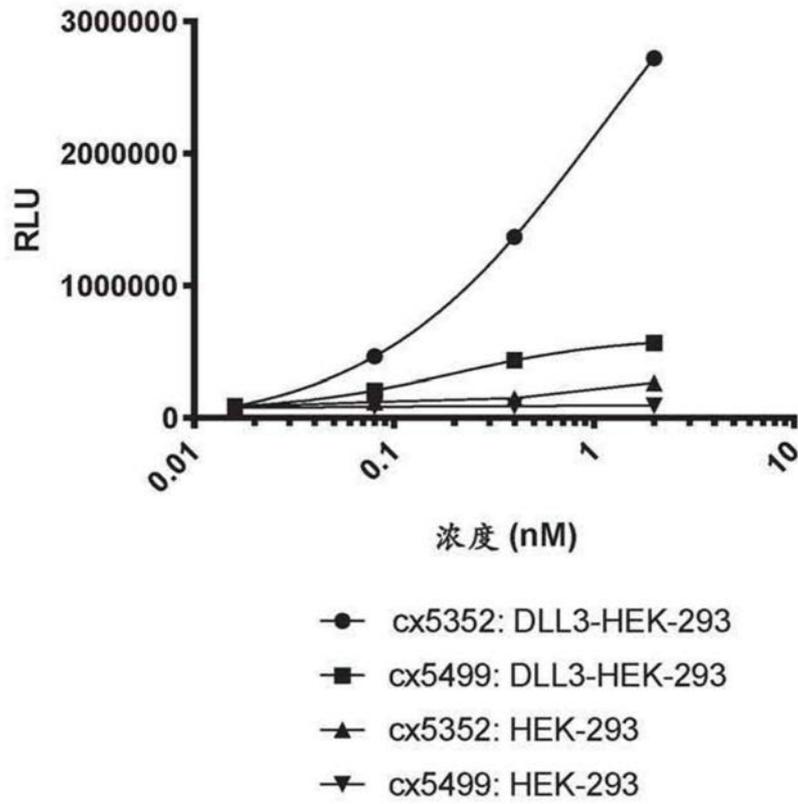


FIG. 33

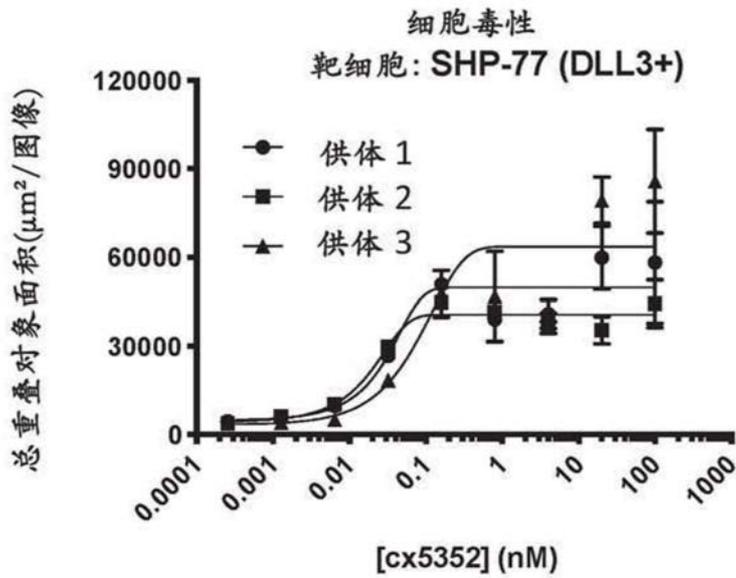


FIG. 34A

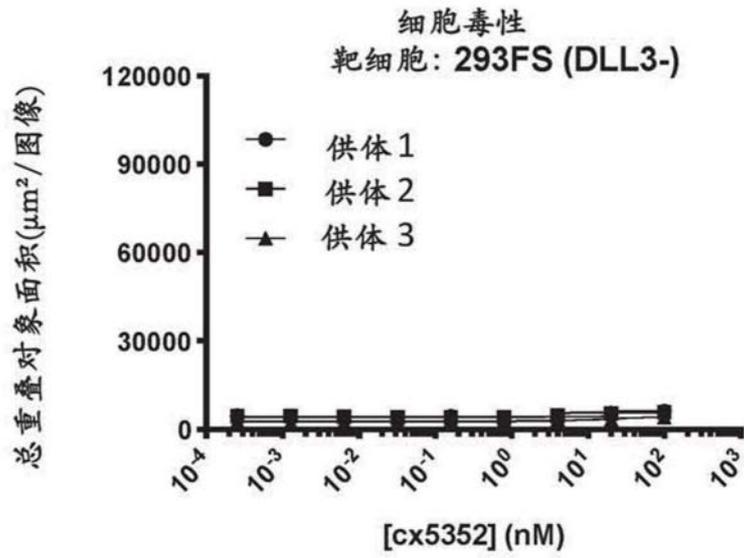


FIG. 34B

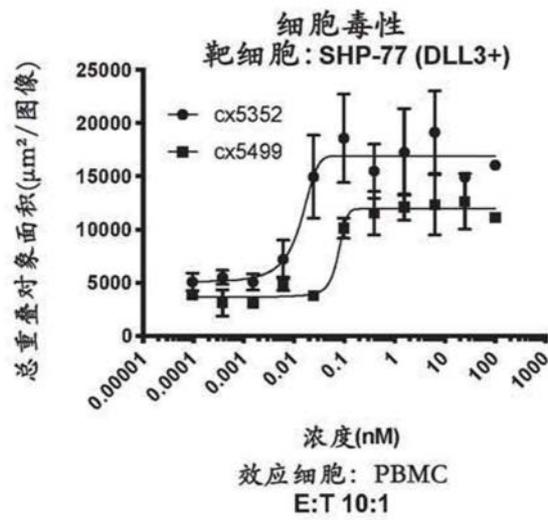


FIG. 35A

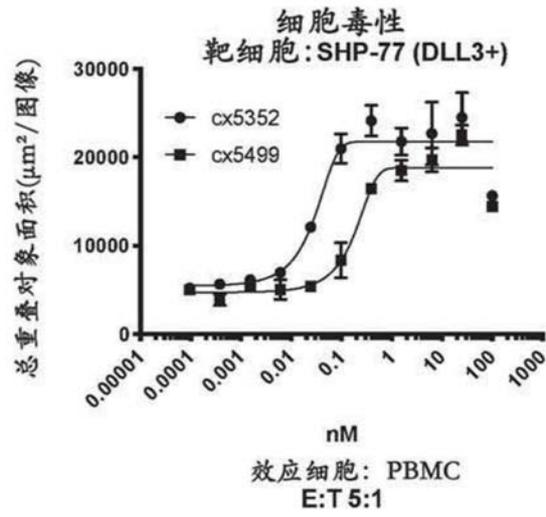


FIG. 35B

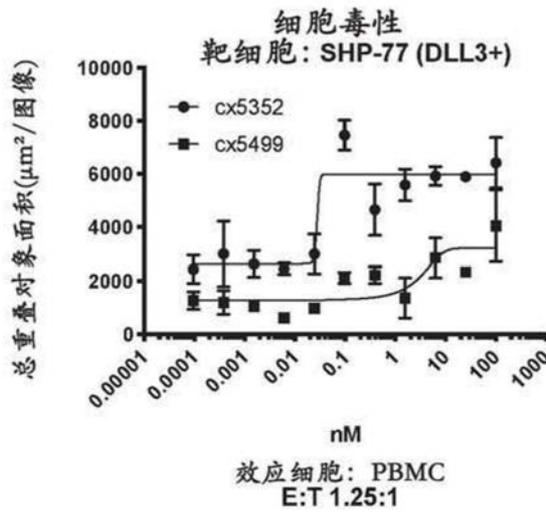


FIG. 35C

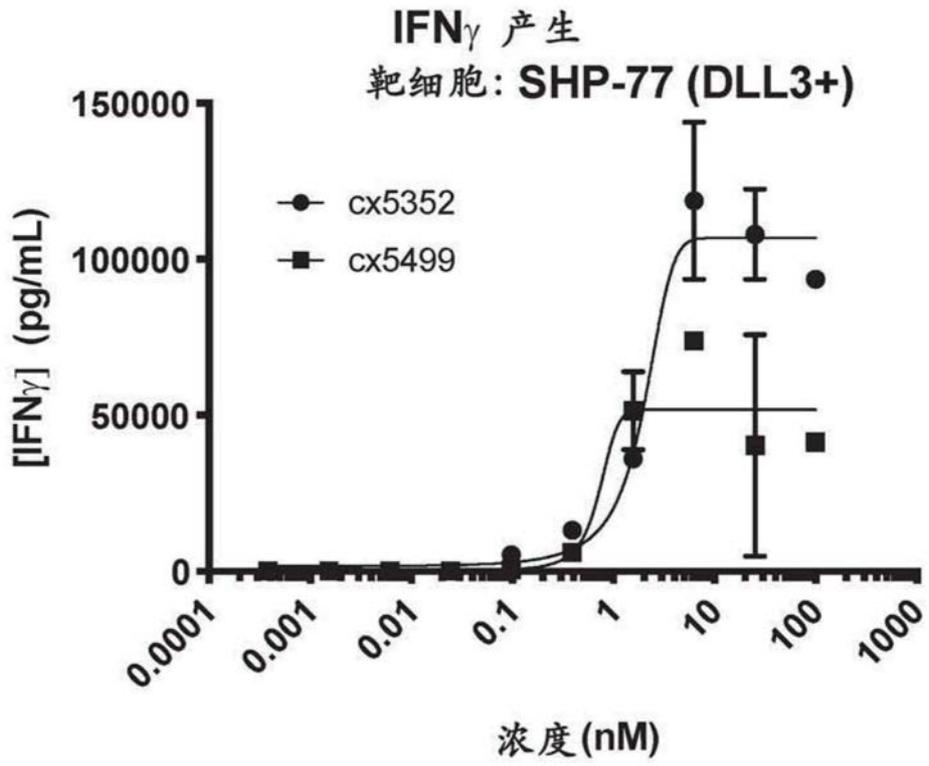


FIG.36