



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117858902 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 09

(21) 申请号 202280057501.6

(22) 申请日 2022.08.25

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2021/114549 2021.08.25 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.02.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2022/114642 2022.08.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/025215 EN 2023.03.02

(71) 申请人 南京金斯瑞生物科技有限公司

地址 211100 江苏省南京市江宁科学园雍  
熙路28号

(72) 发明人 刘刚 李中道 赵志辉 邵翠英

刘斌 金夷 殷刘松

(74) 专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11436

专利代理师 程淼 唐莉

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书2页 说明书25页

序列表(电子公布) 附图14页

(54) 发明名称

针对人CD16a的抗体及其变体

(57) 摘要

本申请提供了结合分子。结合分子与自然杀伤(NK)细胞表面表达的CD16a(Fc $\gamma$ RIIIA)特异性结合,但不与CD16b(Fc $\gamma$ RIIIB)结合。还披露了这样的结合分子在刺激和活化原代人NK细胞中的用途。

1. 一种分离的抗体或其抗原结合部分,所述分离的抗体或其抗原结合部分包含:  
包含CDR1区、CDR2区和CDR3区的单体可变结构域,所述CDR1区、CDR2区和CDR3区包含以下的氨基酸序列:

分别为SEQ ID NO:2、3和4;或  
分别为SEQ ID NO:6、7和8;或  
分别为SEQ ID NO:14、15和16;或  
分别为SEQ ID NO:14、15和64;或  
分别为SEQ ID NO:14、15和66;或  
分别为SEQ ID NO:18、19和20;或  
分别为SEQ ID NO:26、27和28;或

在所述CDR1区、所述CDR2区和所述CDR3区的任一个或多个中包含至多约3个氨基酸取代的变体。

2. 如权利要求1所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述CDR1区、所述CDR2区和所述CDR3区包含以下的氨基酸序列:

分别为SEQ ID NO:2、3和4;或  
分别为SEQ ID NO:6、7和8;或  
分别为SEQ ID NO:18、19和20;或  
分别为SEQ ID NO:26、27和28;或

在所述CDR1区、所述CDR2区和所述CDR3区的任一个或多个中包含至多约3个氨基酸取代的变体。

3. 如权利要求1所述的抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分与人CD16a特异性结合。

4. 如权利要求1所述的抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分是单域抗体(sdAb)或V<sub>H</sub>H结构域。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分是骆驼科的、嵌合的、人的或人源化的。

6. 如权利要求1所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述单体可变结构域包含与选自由SEQ ID NO:1、5、13、17、25、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61和62组成的组的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

7. 如权利要求6所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述单体可变结构域包含选自由SEQ ID NO:1、5、13、17、25、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61和62组成的组的氨基酸序列。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述单体可变结构域包含与选自由SEQ ID NO:29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51和52组成的组的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

9. 如权利要求8所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述单体可变结构域包含选自由SEQ ID NO:29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、

51和52组成的组的氨基酸序列。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述单体可变结构域包含与选自SEQ ID NO:42、44、45、47和50组成的组的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

11. 如权利要求10所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述单体可变结构域包含选自SEQ ID NO:42、44、45、47和50组成的组的氨基酸序列。

12. 一种抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含单体可变结构域,所述单体可变结构域包含选自SEQ ID NO:1、5、13、17、25、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61和62组成的组的氨基酸序列。

13. 如权利要求12所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体是人源化抗体,并且所述单体可变结构域包含选自SEQ ID NO:42、44、45、47和50组成的组的氨基酸序列。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分进一步包含与所述单体可变结构域融合的IgG Fc区。

15. 如权利要求14所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述IgG Fc区是人IgG4Fc区或小鼠IgG1 Fc区。

16. 一种双特异性分子、免疫缀合物或嵌合抗原受体,所述双特异性分子、免疫缀合物或嵌合抗原受体包含如权利要求1-15中任一项所述的抗体或其抗原结合部分。

17. 一种核酸分子,其编码如权利要求1-15中任一项所述的抗体或其抗原结合部分或如权利要求16所述的双特异性分子、免疫缀合物或嵌合抗原受体。

18. 一种表达载体,其含有如权利要求17所述的核酸分子。

19. 一种宿主细胞,其含有如权利要求18所述的表达载体。

20. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-15中任一项所述的抗体或其抗原结合部分或如权利要求16所述的双特异性分子、免疫缀合物或嵌合抗原受体,以及药学上可接受的载剂。

21. 如权利要求20所述的药物组合物,其进一步包含细胞毒性剂。

22. 一种用于治疗受试者的癌症疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的如权利要求20或21所述的药物组合物。

23. 如权利要求22所述的方法,其中所述癌症疾病选自以下组成的组:肾上腺癌、膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌、胶质母细胞瘤、肾癌、非小细胞肺癌、急性淋巴细胞白血病、急性髓系白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓系白血病、毛细胞白血病、伯克特淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、肾细胞癌、睾丸癌和子宫癌。

24. 一种促进受试者中NK细胞增殖的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的如权利要求20或21所述的药物组合物。

## 针对人CD16a的抗体及其变体

### 背景技术

[0001] Fc  $\gamma$  受体 (Fc  $\gamma$  R) 是结合免疫球蛋白G (IgG) Fc区的细胞表面受体。这些受体形成抗体-抗原复合物,并在效应细胞反应中发挥作用。例如,免疫复合物交联活化的Fc  $\gamma$  受体可导致病原体的吞噬作用,通过直接细胞毒性杀死外来细胞和转化细胞,清除有毒物质以及引发炎症反应。在抗体治疗中,IgG通过抗原结合片段识别靶点,并通过Fc结构域结合白细胞上表达的多种类型的Fc  $\gamma$  R,以引发细胞介导的反应,来治疗白血病、淋巴瘤、肿瘤、自身免疫性疾病和其他疾病。

[0002] Fc  $\gamma$  受体有三类,Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RII和Fc  $\gamma$  RIII。Fc  $\gamma$  RIII,也称为CD16,是已知参与抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 的一些IgG的Fc部分的低亲和力受体,是负责触发NK细胞裂解靶细胞最典型的膜受体。人Fc  $\gamma$  RIII以两种亚型存在,Fc  $\gamma$  RIIIA (CD16a) 和Fc  $\gamma$  RIIIB (CD16b),它们在其胞外免疫球蛋白结合区具有96%序列同一性。Fc  $\gamma$  RIIIA (CD16a) 作为跨膜受体在巨噬细胞、肥大细胞和NK细胞上表达。然而,Fc  $\gamma$  RIIIB (CD16b) 作为糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定受体 (Fc  $\gamma$  RIIIB亚型) 存在于多形核粒细胞 (PMN) 上,不能触发肿瘤细胞杀伤。此外,Fc  $\gamma$  RIIIB作为可溶性受体存在于血清中,与抗体结合后,可能通过在体内形成免疫复合物引发副作用。

[0003] 表达Fc  $\gamma$  R的效应细胞已被证明通过ADCC参与破坏肿瘤细胞。这导致了癌症治疗的几种免疫治疗方法的发展,这些免疫治疗方法涉及使用Fc  $\gamma$  R活性。作为先天免疫的细胞介质,NK细胞是专业的细胞杀手,与T细胞不同,它往往以组成型活化状态存在,而不需要额外的(预)刺激。迄今为止产生的大多数抗CD16抗体无法区分两种CD16亚型:Fc  $\gamma$  RIIIA和Fc  $\gamma$  RIIIB。

[0004] 相对于CD16b,需要对CD16a具有特异性且具有期望的治疗特征的抗CD16a结合分子或抗体。

### 发明内容

[0005] 在一方面,本披露提供了一种分离的抗体或其抗原结合部分,该分离的抗体或其抗原结合部分包含:包含CDR1区、CDR2区和CDR3区的单体可变结构域,该CDR1区、CDR2区和CDR3区包含以下的氨基酸序列:分别为SEQ ID NO:2、3和4;或分别为SEQ ID NO:6、7和8;或分别为SEQ ID NO:14、15和16;或分别为SEQ ID NO:14、15和64;或分别为SEQ ID NO:14、15和66;或分别为SEQ ID NO:18、19和20;或分别为SEQ ID NO:26、27和28;或在该CDR1区、该CDR2区和该CDR3区的任一个或多个中包含至多约3个氨基酸取代的变体。

[0006] 在一些实施例中,CDR1区、CDR2区和CDR3区包含以下的氨基酸序列:分别为SEQ ID NO:2、3和4;或分别为SEQ ID NO:6、7和8;或分别为SEQ ID NO:18、19和20;或分别为SEQ ID NO:26、27和28;或在该CDR1区、该CDR2区和该CDR3区的任一个或多个中包含至多约3个氨基酸取代的变体。

[0007] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合部分与人CD16a特异性结合。

[0008] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合部分包含或是单域抗体(sdAb)或V<sub>H</sub>H结构域。

[0009] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合部分是骆驼科的、嵌合的、人的或人源化的。

[0010] 在一些实施例中,单体可变结构域包含与选自SEQ ID NO:1、5、13、17、25、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61和62组成的组的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在某些实施例中,单体可变结构域包含选自SEQ ID NO:1、5、13、17、25、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61和62组成的组的氨基酸序列。

[0011] 在一些实施例中,单体可变结构域包含与选自SEQ ID NO:29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51和52组成的组的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在某些实施例中,单体可变结构域包含选自SEQ ID NO:29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51和52组成的组的氨基酸序列。

[0012] 在一些实施例中,单体可变结构域包含与选自SEQ ID NO:42、44、45、47和50组成的组的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在这些实施例中的某些中,单体可变结构域包含选自SEQ ID NO:42、44、45、47和50组成的组的氨基酸序列。

[0013] 在另一方面,本披露提供了一种包含单体可变结构域的分离的抗体或其抗原结合部分,该单体可变结构域包含选自SEQ ID NO:1、5、13、17、25、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61和62组成的组的氨基酸序列。抗体可以是人源化抗体,并且单体可变结构域可包含选自SEQ ID NO:42、44、45、47和50组成的组的氨基酸序列。

[0014] 在本文披露的分离的抗体或其抗原结合部分中任一个中,抗体或其抗原结合部分可以进一步包含与单体可变结构域融合的IgG Fc区。IgG Fc区可以是人IgG4 Fc区或小鼠IgG1 Fc区。在某个实施例中,人IgG4 Fc区可包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列。在某个实施例中,小鼠IgG1 Fc区可包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列。

[0015] 在进一步的方面,本披露提供了一种双特异性分子、免疫缀合物或嵌合抗原受体,该双特异性分子、免疫缀合物或嵌合抗原受体包含如本文所述的抗体或其抗原结合部分。

[0016] 在进一步的方面,本披露提供了一种编码如本文所述的抗体或其抗原结合部分或其双特异性分子、免疫缀合物或嵌合抗原受体的核酸分子。在进一步的方面,本披露提供了含有上述核酸分子的表达载体。在进一步的方面,本披露提供了含有上述表达载体的宿主细胞。

[0017] 在进一步的方面,本披露提供了一种药物组合物,其包含如本文所述的抗体或其抗原结合部分,或如本文所述的双特异性分子、免疫缀合物或嵌合抗原受体,和药学上可接受的载剂。在一些实施例中,药物可以进一步包含细胞毒性剂。在进一步的方面,本披露提供了一种用于治疗受试者癌症疾病的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的如本文所述的药物组合物。癌症疾病选自以下组成的组:肾上腺癌、膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌、胶质母细胞瘤、肾癌、非小细胞肺癌、急性淋巴细胞白血病、急性髓系白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓系白血病、毛细胞白血病、伯克特淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、多发性骨

髓瘤、黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、肾细胞癌、睾丸癌和子宫癌。

[0018] 在进一步的方面,本披露提供了一种促进受试者中NK细胞增殖的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的如本文所述的药物组合物。

### 附图说明

[0019] 图1A-1和图1A-2显示了本披露某些实施例中的抗体与人CD16a蛋白的FACS结合曲线。

[0020] 图2A-1和图2A-2显示了本披露某些实施例的抗体与人CD16b蛋白的FACS结合曲线。

[0021] 图2B-1显示了本披露某些实施例的抗体与人CD16a蛋白的FACS结合曲线。

[0022] 图2B-2显示了本披露某些实施例的抗体与人CD16b蛋白的FACS结合亲和力。

[0023] 图3显示了本披露某些实施例的抗体在触发NK细胞的细胞毒性方面的细胞毒性测定结果。

[0024] 图4A和图4B显示了本披露的某些人源化sdAb与人CD16a蛋白的结合亲和力。

[0025] 图5A和图5B显示了本披露的某些人源化sdAb与人CD16b蛋白的结合亲和力。

[0026] 图6A显示了本披露的某些人源化sdAb与人CD16a蛋白的FACS结合曲线和数据;图6B显示了这些人源化sdAb与人CD16b蛋白的FACS结合曲线和数据。

[0027] 图7A显示了本披露的某些人源化sdAb与人CD16a蛋白的FACS结合曲线和数据;图7B显示了这些人源化sdAb与人CD16b蛋白的FACS结合曲线和数据。

[0028] 图8A显示了本披露的某些人源化sdAb与人CD16a蛋白的FACS结合曲线和数据;图8B显示了这些人源化sdAb与人CD16b蛋白的FACS结合曲线和数据。

[0029] 图9A显示了本披露的某些人源化sdAb与人CD16a蛋白的FACS结合曲线和数据;图9B显示了这些人源化sdAb与人CD16b蛋白的FACS结合曲线和数据。

[0030] 图10A显示了本披露的某些人源化sdAb与人CD16a蛋白的FACS结合曲线和数据;图10B显示了这些人源化sdAb与人CD16b蛋白的FACS结合曲线和数据。

[0031] 图11A和图11B显示了使用NK92/CD16a-158V/V细胞进行的本披露的某些人源化sdAb与人CD16a蛋白的乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性测定结果。

[0032] 图12显示了使用NK92/CD16a-158V/V细胞进行的本披露的某些人源化sdAb与人CD16a蛋白剂量依赖性反应的反向ADCC生物测定中的乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性测定结果。

[0033] 图13A和图13B显示了本披露的某些人源化sdAb与人CD16a蛋白的FACS Cyno结合曲线和数据。

### 具体实施方式

[0034] 在一方面,本披露提供了抗CD16美洲驼单域抗体,其对Fc  $\gamma$  RIIIA (CD16a) 表现出特异性,但不与Fc  $\gamma$  RIIIB (CD16b) 特异性结合。本披露进一步提供了基于这些美洲驼sdAb的人源化sdAb及其融合蛋白。本披露的抗体(或结合分子)可以在结合时活化NK细胞,并且可以用作针对疾病相关细胞的双特异性或多特异性结合分子的组分。

[0035] 如本文所用抗体的术语“抗原结合部分”是指抗体的一个或多个片段,其保留了结合抗原(例如,CD16a蛋白)的能力。这可以包括含有单个可变结构域的重链可变区,以及包

含这样的结构域和与其化学连接的另一个多肽片段的较大分子。这样的单链抗体也旨在涵盖于术语“抗原结合部分”中。

[0036] 如本文所用的“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。特异性结合CD16a蛋白的分离的抗体基本上不含不结合CD16a蛋白的抗体。结合人CD16a的分离的抗体也可以结合其他抗原,例如人CD16b蛋白或来自其他物种的CD16a蛋白。分离的抗体还可以基本上不含其他细胞物质和/或化学品。

[0037] 如本文所用,术语“CD16a结合蛋白”、“CD16a抗体”和“抗CD16a抗体”可互换使用,并指经由与VL和/或VH结构域相互作用而结合CD16a的多种分子(与Fc介导的结合不同)。CD16a结合蛋白的实例包括嵌合抗体、人源化抗体和人抗体(例如,包含2条重链和2条轻链)、其片段(例如,Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段)、双功能或多功能抗体、单链抗体、融合蛋白(例如,噬菌体展示融合蛋白)、“迷你抗体(minibodies)”(参见,例如,美国专利号5,837,821)和包含VL和/或VH结构域或其片段的其他抗原结合蛋白。

[0038] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指具有单一分子组成的抗体分子的制剂。

[0039] 术语“单域抗体”或“sdAb”是指包含具有三个互补决定区(CDR)的单个单体可变抗体结构域的单个抗原结合多肽,其能够与抗原结合,而不与相应的含CDR的多肽配对。在一些情况下,单域抗体是从骆驼科重链抗体(HCAb)工程化的,并且还称为HCAb的V<sub>H</sub>H结构域或片段。单域抗体是一种仅重链抗体的抗原结合部分。V<sub>H</sub>H还可以被称为纳米抗体。骆驼科sdAb是已知最小的抗原结合抗体片段之一(参见例如,Hamers-Casterman等人,Nature 363:446-8(1993);Greenberg等人,Nature 374:168-73(1995);Hassanzadeh-Ghassabeh等人,Nanomedicine (Lond), 8:1013-26(2013))。作为实例,本披露的实例中的特定单域抗体被指为AR[数字和/或其他符号],例如AR8866、AR8866-1.1、AR8804、AR8804-1.1等。

[0040] 如本文所用,“与人CD16a特异性结合”的抗体或分子是指与人CD16a蛋白结合但基本上不与非人CD16a蛋白的蛋白结合的抗体或多肽分子。特别地,本文中称为与人CD16a特异性结合的抗体或分子对人CD16a的结合亲和力应比其对人CD16b的结合亲和力高至少100倍。

[0041] 如本文所用,术语“融合蛋白(fused protein)”、“融合蛋白(fusion protein)”、“融合抗体(fusion antibody)”或“融合抗体(fused antibody)”是指同时包括单域抗体(例如,V<sub>H</sub>H)部分和IgG恒定区Fc(例如人IgG4 Fc区或小鼠IgG1 Fc区)的抗体分子,其中这两个部分例如通过重组方法化学连接。例如,sdAb可以通过IgG的天然铰链区直接融合到IgG Fc区。sdAb位于融合抗体中IgG Fc的上游,即更靠近N末端,其中sdAb和IgG Fc区被铰链区插入。融合的抗体蛋白可以作为其组成部分在本文中提及,例如,AR8776-sdAb-hIgG4Fc是指由与人IgG4 Fc区融合的AR8776-sdAb组成的融合蛋白或抗体。

[0042] 如本文所用,术语“骆驼科抗体”旨在包括具有可变区的抗体(或更特别地是单域抗体或V<sub>H</sub>H片段),其中框架区和CDR区都来源于骆驼科种系仅重链抗体序列。此外,如果该抗体含有恒定区,则该恒定区也可以来源于骆驼科种系抗体序列。本发明的骆驼科抗体可以包括并非由骆驼科种系抗体序列编码的氨基酸残基(例如,在体外通过随机或位点特异性诱变引入的突变或在体内通过体细胞突变引入的突变)。然而,如本文所用,术语“骆驼科抗体”并不旨在包括其中来源于另一种哺乳动物物种的种系的CDR序列已经被移植到骆驼科框架序列上的抗体。

[0043] 术语“嵌合抗体”是指通过将来自非人(例如,骆驼科)来源的遗传物质与来自人类的遗传物质组合而制备的抗体。或者更一般地,嵌合抗体是具有由不同物种的遗传物质产生的不同部分的抗体。

[0044] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指来自非人(例如,骆驼科)物种的抗体,其蛋白质序列已被修饰以增加与人类天然产生的抗体变体的相似性。

[0045] 如本文在两种或更多种核酸或蛋白质/肽的上下文中所用的术语“同一性”百分比是指当为了最大对应性进行比较和比对(如果需要,引入缺口)时,两种或更多种序列或亚序列具有相同的特定百分比的核苷酸或氨基酸残基,不考虑任何保守氨基酸取代作为序列同一性的一部分。可以使用序列比较软件或算法或通过目视检查来测量同一性百分比。可以用于获得氨基酸或核苷酸序列比对的各种算法和软件在本领域中是熟知的。这些包括但不限于BLAST、ALIGN、Megalign、BestFit、GCG Wisconsin Package及其变体。

[0046] 如本文所用,术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物。在某些实施例中,受试者是人。

[0047] 本领域技术人员使用多种方法/系统来定义抗体的CDR。这些系统和/或定义经过了多年的发展和完善,并且包括Kabat、Chothia、IMGT、AbM和Contact。Kabat定义是基于序列可变性,并且是常用的。Chothia定义是基于结构环区域的位置。IMGT系统是基于可变结构域结构内的序列可变性和位置。AbM定义是Kabat和Chothia之间的折中。Contact定义是基于对可用抗体晶体结构的分析。示例性系统是Kabat和Chothia的组合。

[0048] CD16a的蛋白质和核酸序列在Genbank中报道为登录号P08637(蛋白质)和X52645(核酸),在SWISS-PROT中报道为登录号CAA36870。CD16b的蛋白质和核酸序列在Genbank中报道为登录号075015(蛋白质)和X16863(核酸),在SWISS-PROT中报道为CAA34753。

[0049] 靶向人CD16a的抗体(或抗人CD16a抗体)

[0050] 在一方面,本披露提供了一种分离的抗体或其抗原结合部分,该分离的抗体或其抗原结合部分包含含有CDR1区、CDR2区和CDR3区的单体可变结构域,该CDR1区、CDR2区和CDR3区包含以下的氨基酸序列:分别为SEQ ID NO:2、3和4;或分别为SEQ ID NO:6、7和8;或分别为SEQ ID NO:14、15和16;或分别为SEQ ID NO:14、15和64;或分别为SEQ ID NO:14、15和66;或分别为SEQ ID NO:18、19和20;或分别为SEQ ID NO:26、27和28;或在CDR1区、CDR2区和CDR3区的任一个或多个中包含至多约3个氨基酸取代的变体。在一些实施例中,CDR1区、CDR2区和CDR3区包含以下的氨基酸序列:分别为SEQ ID NO:2、3和4;或分别为SEQ ID NO:6、7和8;或分别为SEQ ID NO:18、19和20;或分别为SEQ ID NO:26、27和28;或在CDR1区、CDR2区和CDR3区的任一个或多个中包含至多约3个氨基酸取代的变体。

[0051] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合部分与人CD16a特异性结合。

[0052] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合部分包含或是单域抗体(sdAb)或V<sub>H</sub>结构域。

[0053] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合部分是骆驼科的、嵌合的、人的或人源化的。

[0054] 在一些实施例中,单体可变结构域包含与选自由SEQ ID NO:1、5、13、17、25、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61和62组成的组的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在某些实施例中,单体可变结构域包含选自由SEQ ID NO:1、5、13、17、25、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、

45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61和62组成的组的氨基酸序列。

[0055] 在一些实施例中,单体可变结构域包含与选自SEQ ID NO:29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51和52组成的组的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在某些实施例中,单体可变结构域包含选自SEQ ID NO:29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51和52组成的组的氨基酸序列。

[0056] 在一些实施例中,单体可变结构域包含与选自SEQ ID NO:42、44、45、47和50组成的组的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在这些实施例中的某些中,单体可变结构域包含选自SEQ ID NO:42、44、45、47和50组成的组的氨基酸序列。

[0057] 在另一方面,本披露提供了一种包含单体可变结构域的分离的抗体或其抗原结合部分,该单体可变结构域包含选自SEQ ID NO:1、5、13、17、25、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61和62组成的组的氨基酸序列。抗体可以是人源化抗体,并且单体可变结构域可包含选自SEQ ID NO:42、44、45、47和50组成的组的氨基酸序列。

[0058] 本文所述的抗体或其抗原结合部分可以进一步包含与单体可变结构域融合的IgG Fc区。例如,IgG Fc区可以是人IgG4 Fc区或小鼠IgG1 Fc区。在某个实施例中,人IgG4 Fc区可包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列。在某个实施例中,小鼠IgG1 Fc区可包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列。

[0059] 在进一步的方面,本披露提供了一种双特异性分子、免疫缀合物(或抗体药物缀合物)或嵌合抗原受体,其包含如本文所述的抗体或其抗原结合部分。

[0060] 术语“双特异性分子”是指与至少一种其他功能性分子,例如另一种肽或蛋白质(例如,另一种抗体或受体配体)连接的本披露抗体。双特异性分子可以具有至少两个不同的结合位点或靶分子,并且可以包括具有三种或更多种特异性的分子。

[0061] 术语“免疫缀合物”是指本披露的抗体与治疗剂缀合,该治疗剂例如细胞毒素、烷化剂、DNA小沟结合剂、DNA嵌入剂、DNA交联剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、核输出抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶I或II抑制剂等。在ADC中,抗体和治疗剂可以经由可裂解的接头(例如肽基、二硫化物)缀合。

[0062] 术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指将确定的特异性移植到免疫效应细胞(典型的是T细胞)上并增强T细胞功能的工程化受体。新一代CAR包含胞外结合结构域,其包含单域抗体、铰链区、跨膜结构域和胞内信号传导结构域(主要是CD3- $\zeta$ 的胞内结构域,其是T细胞活化信号的主要传递者,加上一个或多个共刺激结构域)。CAR可以进一步具有增强T细胞扩增、持久性和抗肿瘤活性的因子,例如细胞因子和共刺激配体。

[0063] 在进一步的方面,本披露提供了一种编码本文所述的任何抗体(或其抗原结合部分)或双特异性分子、免疫缀合物或嵌合抗原受体的抗体或其抗原结合部分的核酸分子。含有包含核酸分子的表达载体的宿主细胞(例如,CHO细胞或淋巴细胞,或微生物,例如大肠杆菌,和真菌,例如酵母)可以用于产生本披露的抗体,优选单域抗体。

[0064] 已经描述了制备单域抗体的方法。例如,参见Els Pardon等人,Nature Protocol, 2014;9(3):674。单域抗体制备的常用方法涉及使用目的抗原如CD16a对骆驼科物种进行免

疫、从免疫动物中回收淋巴细胞、制备cDNA、使用标准克隆方案产生噬菌体展示文库、以及三到四轮噬菌体筛选以富集抗原特异性结合物。也可以通过以合成方式将多样性引入V<sub>H</sub>H支架中来制备多样化的单域抗体文库。

[0065] 单域抗体也可以从表达骆驼科单域抗体的噬菌体展示文库中分离出来。噬菌体文库的筛选可以通过本领域中已知的各种技术来完成。例如,可以通过用包被有CD16a蛋白的受体结合结构域的比色板在几轮越来越严格的选择中进行溶液淘选来筛选骆驼科天然单域抗体文库中与冠状病毒刺突蛋白结合的抗体。分离物可以首先表达为单域抗体并通过ELISA筛选与受体结合结构域的结合,并且可以随后将所选分离物克隆并表达为与IgG4或IgG1 Fc区连接的单域抗体,通过ELISA和/或SPR重新分析与CD16a蛋白的结合以及功能活性,并在CHO哺乳动物细胞系中进行转染以表达单域抗体。

[0066] 在一个实施例中,编码本披露的单域抗体或其抗原结合部分的DNA可以通过标准分子生物学技术获得,被插入一个或多个表达载体中,使得基因与转录和翻译调控序列可操作地连接。术语“可操作地连接”旨在意指将抗体基因连接到载体中,使得载体中的转录和翻译控制序列发挥其调节抗体基因转录和翻译的预期功能。术语“调控序列”旨在包括控制抗体基因转录或翻译的启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,聚腺苷酸化信号)。这样的调节序列描述于例如Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)) 中。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调节序列包括指导在哺乳动物细胞中高水平蛋白质表达的病毒元件,如衍生自巨细胞病毒(CMV)、猴病毒(Simian Virus) 40 (SV40)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP)) 和多瘤病毒的启动子和/或增强子。可替代地,可以使用非病毒调控序列,例如泛素启动子或 $\beta$ -珠蛋白启动子。再进一步地,调控元件由不同来源的序列构成,例如SR $\alpha$ 启动子系统,其含有SV40早期启动子序列及来自人T细胞白血病1型病毒的长末端重复序列(Takebe等人, (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466-472)。选择与所用表达宿主细胞相容的表达载体和表达控制序列。

[0067] 可以将编码DNA的抗体插入表达载体中。重组表达载体可以编码信号肽,其促进抗体链从宿主细胞中分泌。可以将编码抗体的DNA克隆到载体中,使得信号肽框内连接至编码抗体的DNA的氨基末端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即,来自非免疫球蛋白的信号肽)。

[0068] 为了表达sdAb(或sdAb-IgGFc), 可通过标准技术将编码抗体链的一个或多个表达载体转染到宿主细胞中。不同形式的术语“转染”旨在涵盖常用于将外源DNA引入到原核或真核宿主细胞中的多种技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。用于表达本披露抗体的哺乳动物宿主细胞包括HEK293细胞、中国仓鼠卵巢(CHO细胞)、NSO骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞时,通过培养宿主细胞足够的时间段以允许抗体在宿主细胞中表达或者更优选地允许抗体分泌到宿主细胞所生长的培养基中来产生抗体。可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基回收抗体。

[0069] 药物组合物和治疗方法

[0070] 在另一方面,本披露提供了一种药物组合物,其包含一种或多种本发明的抗体,或本文所述的双特异性分子、免疫缀合物或嵌合抗原受体,以及根据常规技术的药学上可接受的载剂。

[0071] 该组合物可以包含一种或多种另外的药物活性成分,例如另一种抗体、药物,例如细胞毒性剂或抗肿瘤剂。本发明的药物组合物还可以在与例如另一种抗癌剂、另一种抗炎剂等的组合治疗中施用。如本文所用,“药学上可接受的载剂”包括药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂。这些包括但不限于生理上相容的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、表面活性剂、增稠剂或乳化剂、固体粘合剂、分散或悬浮助剂、增溶剂、着色剂、调味剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、防腐剂、等渗剂等。合适载剂的选择在本领域技术人员知识范围内。

[0072] 该药物组合物可以适用于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、表皮和其他施用途。根据施用途,活性成分可以用一种材料包衣或以其他方式装载在一种材料或结构中,以保护其免受酸和可能使其失活的其他自然条件的作用。如本文所用的短语“肠胃外施用”意指除了肠施用和局部施用之外的、通常通过注射的施用模式,并且包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外以及胸骨内注射和输注。可替代地,本发明的抗体可以经由非肠胃外途径施用,例如局部、经表皮或经粘膜施用途,例如鼻内、口服、经阴道、经直肠、舌下或局部。

[0073] 在另一方面,本披露提供了一种用于治疗受试者(例如,人类或非人类哺乳动物)的免疫介导的疾病(例如癌症)的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的药物组合物。癌症可选自由以下组成的组:肾上腺癌、膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌、胶质母细胞瘤、肾癌、非小细胞肺癌、急性淋巴细胞白血病、急性髓系白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓系白血病、毛细胞白血病、伯克特淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、肾细胞癌、睾丸癌和子宫癌。

[0074] 在另一方面,本披露提供了一种促进受试者中NK细胞增殖的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的药物组合物。

[0075] 在向受试者施用组合物时,可以调整剂量方案以提供最佳的期望反应(例如,治疗反应)。可以基于受试者、待治疗疾病等施用单次推注或分开的剂量。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离散单位。每个单位含有预定量的活性成分,该活性成分经计算可与所需的药物载剂结合产生所期望的治疗效果。可以使用缓释制剂,在这种情况下需要减少施用频率。

[0076] 对于本披露抗体的施用,剂量可以范围为受试者体重的约0.0001至100mg/kg,更通常为0.01至5mg/kg。例如,剂量可以是0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg范围内。合适的治疗方案可以是每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次等。本发明的抗CD16a抗体的实例剂量方案可以包括经由静脉内施用的1mg/kg体重或3mg/kg体重。

[0077] “治疗有效量”或本发明的靶向CD16a的抗体的“治疗有效量”优选导致疾病症状严重性的降低、疾病无症状期的频率和/或持续时间的增加、预防或降低由于疾病折磨引起的损伤或残疾的可能性、或抑制或延缓疾病的进展。例如,对于治疗携带肿瘤的受试者,相对于未治疗的受试者,“治疗有效量”的抗体组合物可以将肿瘤生长抑制至少约20%,更优选至少约40%,甚至更优选至少约60%,仍更优选至少约80%。

**[0078] 实例**

**[0079]** 以下实例旨在仅是本发明的示例,并且因此不应视为以任何方式限制本发明。以下实例和详细描述是作为说明而并不是作为限制而提供的。

**[0080] 实例1:抗CD16a美洲驼单域抗体(sdAb)的产生****[0081] 免疫**

**[0082]** 根据现行动物福利法规,用重组人CD16a-His蛋白(Acro Biosystems;目录号:CDA-H52S1)对美洲驼进行免疫。对于免疫,将抗原以在PBS溶液中的形式施用或者将抗原配制为与CFA(完全弗氏佐剂;初次免疫)或IFA(不完全弗氏佐剂;加强免疫)的乳液。将抗原在颈部皮下施用。动物接受6次乳液注射,包括用200 $\mu$ g在CFA乳液中的抗原进行初次免疫,随后以1周的间隔用100 $\mu$ g在IFA乳液中的抗原进行3次加强免疫,以及随后以1周的间隔用50 $\mu$ g在IFA乳液中的抗原进行2次注射。在多轮免疫后,采集了100ml的血液样品。通过梯度离心从血液样品中分离外周血淋巴细胞(PBL),作为美洲驼重链抗体(HCAb)的遗传来源。将来自AFM13的靶向CD16a的可变片段(专利号:US 9,035,026 B2,Affirmed GMBH,德国)作为阳性对照(和参考抗体)掺入人IgG4或小鼠IgG1形式中,并将正常人IgG4或小鼠IgG1分别设定为同型对照。

**[0083] 噬菌体展示文库构建**

**[0084]** 根据制造商的方案,使用TRIZOL试剂(Thermo Fisher,目录号15596026)从分离的淋巴细胞中提取总RNA,将其用作RT-PCR的起始材料,以扩增编码sdAb的基因片段。对于基因扩增,根据制造商的方案,使用PRIMESCRIPT第1链cDNA合成试剂盒(Takara,目录号6110A),用寡(dT)<sub>20</sub>引物将分离的RNA逆转录成cDNA。设计了6个正向和2个反向特异性简并引物来扩增V<sub>H</sub>片段。

**[0085]** 通过两步PCR方法扩增V<sub>H</sub>片段的可变区。将第一次PCR的DNA产物在第二次PCR中用作模板。将含有V<sub>H</sub> PCR片段的扩增的第二PCR产物进行凝胶纯化和酶消化,随后插入噬菌粒质粒中。通过电穿孔将重组质粒转入大肠杆菌细胞中,产生了其大小大于 $1 \times 10^9$ 的噬菌体展示文库。根据标准方案制备文库噬菌体,并过滤灭菌后在-80 $^{\circ}$ C下作为储备储存。

**[0086] 噬菌体展示淘选**

**[0087]** 构建的噬菌体文库用过表达人CD16a细胞的CHO-K1细胞(ATCC;目录号:CCL-61)(由Genscript构建)进行筛选,或首先用过表达人CD16b细胞的CHO-K1细胞(由Genscript构建)进行反筛选,然后使用由GenScript开发的标准程序用过表达人CD16a的CHO-K1细胞进行淘选。进行至少两轮选择,并且分析每个选择输出的富集因子(洗脱液中存在的噬菌体相对于对照的数量)、多样性和CD16a阳性CD16b阴性或弱克隆的百分比。

**[0088]** 基于这些参数,选择最佳的挑选克隆用于进一步筛选,将其作为库亚克隆到可溶性表达载体中用于高通量筛选。在具有sdAb编码序列的读框中,载体编码了C末端His标签。挑取菌落并在96深孔板(1ml体积)中生长,并且通过添加IPTG和0.1% Triton诱导上清液中的sdAb表达。通过酶联免疫吸附测定(ELISA)筛选上清液。简言之,将96孔板分别用0.5 $\mu$ g/ml CD16a和CD16b蛋白包被,并在4 $^{\circ}$ C下孵育16小时,然后用3% MPBS封闭。通过向每个孔中添加50 $\mu$ l上清液进行一抗孵育,并将板在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。然后,将100 $\mu$ l抗V<sub>H</sub>二抗(Genscript;目录号:A01861)移液到每个孔中。然后将板在室温(RT)下孵育60min。使用0.05% PBST洗涤后,向每个孔中添加100 $\mu$ l TMB。然后将板在RT下孵育15min,并且添加50 $\mu$ l

1M HCL以终止反应。在450nm处读取板。

[0089] sdAb-Fc融合蛋白的产生

[0090] 通过将抗CD16a sdAb与人IgG4(或小鼠IgG1)Fc区融合来产生抗CD16a sdAb-Fc融合蛋白构建体。制备构建体的大量制备(maxiprep)用于CHO-3E7细胞瞬时表达。通过含有蛋白A琼脂糖树脂的柱色谱层析纯化表达的抗CD16a sdAb-Fc融合蛋白。产生了22个分子。

[0091] 实例2:抗CD16a sdAb的体外表征

[0092] 抗CD16a sdAb对CD16a的特异性亲和力

[0093] 如上所述,人CD16可以以两种亚型CD16a和CD16b表达,它们是高度同源的,在它们的胞外免疫球蛋白结合区具有96%序列同一性。此外,CD16b可以作为可溶性受体存在于血清中,与抗体结合后,可能经由在体内形成免疫复合物引发副作用。CD16a特异性抗体在构建针对疾病相关细胞的双特异性或多特异性抗体方面特别有价值。在这种情况下,抗体将主要募集NK细胞,并且不会被循环的可溶性CD16b结合或者通过与中性粒细胞或活化的嗜酸性粒细胞结合而从NK细胞结合中转移。

[0094] 为了确定22种sdAb对人CD16a而不是对CD16b的结合特异性,将人CD16a(Acro Biosystems;目录号:CDA-H52S1)或CD16b(Acro Biosystems;目录号:CDB-H5227)预包被到ELISA板(0.5 $\mu$ g/ml,100 $\mu$ l)上4 $^{\circ}$ C下过夜。第二天,将孔与3倍连续稀释的sdAb融合蛋白(具有hIgG4 Fc区,SEQ ID NO:73)(初始浓度为1.0 $\mu$ g/ml)一起孵育,然后与HRP缀合的山羊抗人IgG(H+L)(Rockland)一起孵育进行底物TMB显色反应。用450nm处的光密度读数对结合进行定量。选择对人CD16a显示出特异性亲和力,但对CD16b没有亲和力或具有可忽略的低亲和力的sdAb进行进一步筛选。根据结果(图1A-1、图1A-2、图2A-1、图2A-2),共选择7个sdAb分子,即AR8804、AR8820、AR8776、AR8875、AR8866、AR8887、AR8861(SEQ ID NO:1、5、9、13、17、21、25)进行进一步验证。然后将这些选定的靠前的序列与小鼠IgG1 Fc融合用于进一步研究。

[0095] 实例3:sdAb的NK细胞毒性引发效力

[0096] 在该部分中,将AR8776、AR8804、AR8820、AR8861、AR8866、AR8875和AR8887 sdAb重新连接至小鼠IgG1 Fc形式(SEQ ID NO:74),并通过ELISA验证其对CD16a的亲和力特异性。简言之,对于CD16a结合测定,将人CD16a(Acro Biosystems;目录号:CDA-H52S1)预包被到ELISA板(1 $\mu$ g/ml,100 $\mu$ l)上4 $^{\circ}$ C下过夜。第二天,将孔与3倍连续稀释的sdAb融合蛋白(具有mIgG1 Fc)(初始浓度为1.0 $\mu$ g/ml)一起孵育,然后与HRP缀合的山羊抗小鼠IgG(H+L)(Rockland;目录号:610-103-121)一起孵育,进行底物TMB显色反应。对于CD16b结合测定,在将CD16b(Acro Biosystems;目录号:CDB-H5227)预包被到ELISA板(1 $\mu$ g/ml,100 $\mu$ l)上4 $^{\circ}$ C下过夜。第二天,将孔与单剂量1.0 $\mu$ g/ml的sdAb融合蛋白(具有mIgG1Fc)一起孵育,然后与HRP缀合的山羊抗小鼠IgG(H+L)(Rockland;目录号:610-103-121)一起孵育,进行底物TMB显色反应。重新连接的分子保留了对CD16a的亲和力特异性(图2B-1,图2B-2)。AFM-CD16a-mIgG1(也称为CD16a-mLCK-IgG1或AFM13-CD16a-mIgG1)用作参考对照样品,而小鼠IgG用作同型对照。11H1D3是一种针对人CD16a的内部mAb-小鼠IgG1抗体,被证明对人CD16b具有高亲和力,在本实验中被用作阳性样品。ELISA实验之后进行反向ADCC测定,以测量这些分子引发NK细胞的细胞毒性的强度。简言之,将10,000个人NK-92158V/V细胞与用5 $\mu$ g/ml sdAb预处理的小鼠P815靶细胞(SailyBio,上海)以5:1的E/T比共培养4小时。然后,用LDH细胞毒

性试剂盒 (Roche) 计算特异性裂解的百分比。AFM-CD16a-mIgG1 (也称为CD16a-mLCK-IgG1) 用作参考对照样品,而小鼠IgG用作同型对照。结果表明,除AR8887外,所有sdAb均显示出显著的细胞毒性引发活性,而其中分子AR8861、AR8866和AR8875表现出优于参考抗体的细胞毒性引发活性(图3)。因此,选择AR8804、AR8820、AR8861、AR8866和AR8875分子进行人源化。

[0097] 实例4:人源化抗体的产生和分析

[0098] 候选抗体的人源化设计

[0099] 基于抗体在功能测定中的效力及其可变结构域序列,分析CDR、HV环和FR并进行同源性建模以获得AR8804、AR8820、AR8861、AR8866和AR8875的sdAb的建模结构。计算框架残基的溶剂可及表面积。基于结果,鉴定了被掩埋的框架残基(即溶剂可及表面积<15%)。选择了几种VH的人受体,它们与美洲驼对照物具有最高的序列同一性。将美洲驼抗体的CDR直接移植到人受体框架上,以获得移植抗体的序列。通过可开发性评估分析移植序列中的翻译后修饰和化学降解,包括脱酰胺、异构化氧化和糖基化等。鉴定了PTM热点,如N-糖基化位点、异常脯氨酸残基、脱酰胺位点、异构化位点、氧化位点和未配对的半胱氨酸残基等,它们可能会影响移植抗体的结合活性和可制造性。合成了编码人源化抗体的DNA序列。比较抗体特征以选择最佳候选抗体。成功地产生了这些人源化分子。

[0100] 人源化抗体的产生

[0101] 对于人源化抗体的产生,我们将人源化抗CD16a sdAb融合到人IgG4(或小鼠IgG1) Fc区的N末端,以产生抗CD16a sdAb-Fc融合蛋白。将表达每个抗CD16asdAb-Fc融合蛋白的DNA序列插入pTT5载体中EcoRI与HindIII限制位点之间。在37℃和100rpm下将用这些表达质粒转染的CHO-3E7细胞培养6天。将上清液部分通过离心收集,并且通过蛋白A柱纯化蛋白。

[0102] 人源化抗体特异性结合亲和力分析ELISA

[0103] 如上所讨论的,CD16a特异性抗体在构建针对疾病相关细胞的双特异性或多特异性抗体方面特别有价值。为了通过ELISA测定人源化sdAb的蛋白结合特异性,将41种纯化的衍生的人源化sdAb-mIgG1 Fc融合蛋白预包被到ELISA板(0.5μg/ml,100μl)上在4℃下过夜。第二天,将孔与1.0μg/ml一抗一起孵育,然后与HRP缀合的山羊抗小鼠IgG(H+L)(Rockland;目录号:610-103-121)一起孵育进行底物TMB显色反应。用450nm处的光密度读数定量抗体-CD16a和CD16b结合(图4A-4B,图5A-5B),并选择对CD16a具有特异性亲和力的候选物进行进一步筛选。AFM-CD16a-mIgG1用作参考对照样品,而小鼠IgG用作同型对照。

[0104] 选择对人CD16a具有显著亲和力但对人CD16b没有亲和力或具有可忽略的亲和力的共34种人源化分子通过FACS进行进一步确认。简言之,为了测定sdAb产物的细胞表面CD16a结合 $EC_{50}$ ,收获表达人CD16a的HEK293细胞(由Genscript构建),并与连续稀释的抗CD16a sdAb(最大浓度:100nM,3倍稀释)一起孵育,然后与荧光团(iFluor 647)标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)二抗(Jackson immuno research;目录号:115-605-062)一起孵育。然后用流式细胞术分析样品。用GraphPad Prism v6.02软件对原始数据进行作图,用四参数最佳拟合值程序分析 $EC_{50}$ 。AFM-CD16a-mIgG1(CD16a-mIgG1)用作参考对照样品,而小鼠IgG用作同型对照。结果(图6A/6B/7A/7B/8A/8B/9A/9B/10A/10B)证实了所选分子的亲和力特异性。然而,来自分子AR8866的所有衍生物(总共10个)显示出比来自其他亲本分子的那些弱得多的亲和力。

[0105] 人源化sdAb的NK细胞毒性引发效力

[0106] 如上所述,通过反向ADCC测定来测量人源化sdAb引发NK细胞的细胞毒性的强度。简言之,将10,000个人NK-92158V/V细胞与用0.008 $\mu$ g/ml sdAb-mIgG1 Fc融合蛋白(pTT5人源化sdAb-m IgG1Fc)预处理的小鼠P815靶细胞(SailyBio,上海)以5:1的E/T比共培养4小时。然后,用LDH细胞毒性试剂盒(Roche)计算特异性裂解的百分比。AFM13-CD16a-mIgG1用作参考对照,而小鼠IgG用作同型对照。如图11A和图11B所示,结果表明,16种分子,包括pTT5-AR8861-1.1mIgG1Fc、pTT5-AR8861-1.2mIgG1Fc、pTT5-AR8861-2.1mIgG1Fc、pTT5-AR8861-2.2mIgG1Fc、pTT5-AR8861-1.3mIgG1Fc、pTT5-AR8861-4.1mIgG1Fc、pTT5-AR8861-4.2mIgG1Fc、pTT5-AR8861-5.1mIgG1Fc、pTT5-AR8861-5.2mIgG1Fc、pTT5-AR8861-6mIgG1Fc、pTT5-AR8804-3.1mIgG1Fc、pTT5-AR8804-3.3mIgG1Fc、pTT5-AR8804-1.3mIgG1Fc、pTT5-AR8820-1.1mIgG1Fc、pTT5-AR8820-1.3mIgG1Fc和pTT5-AR8820-3.1mIgG1Fc,在引发NK细胞细胞毒性方面表现出显著效力(图11A/11B)。

[0107] 为了进一步证实体外活性,选择其中一些抗人CD16a sdAb靠前的序列进行反向ADCC生物测定的剂量依赖性反应。简言之,将10,000个人NK-92158V/V细胞与用5倍连续稀释的样品(从初始浓度1.0 $\mu$ g/ml稀释)预处理的小鼠P815靶细胞(SailyBio,上海)以5:1的E/T比共培养4小时。然后,用LDH细胞毒性试剂盒(Roche)计算特异性裂解的百分比。如图12所示,所选靠前的序列pTT5-AR8804-3.1mIgG1Fc、pTT5-AR8804-3.3mIgG1Fc和pTT5-AR8820-1.3mIgG1Fc表现出比AFM13-CD16a-mIgG1的参考抗体高得多的活性。

[0108] 抗CD16a人源化抗体与食蟹猴CD16a蛋白的跨物种反应

[0109] 为了确定抗体产物的交叉反应,收获表达食蟹猴CD16a的HEK293细胞(由Genscript构建),并分别与连续稀释的抗CD16a人源化sdAb-mIgG1Fc(最大浓度:100nM,3倍稀释)一起孵育,然后与荧光团(iFluor 647)标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)二抗(Jackson immuno research;目录号:115-605-062)一起孵育。然后用流式细胞术分析样品。用GraphPad Prism v6.02软件对原始数据进行作图,用四参数最佳拟合值程序分析EC<sub>50</sub>。pTT5-AR8804-3.2mIgG1Fc、pTT5-AR8804-3.3mIgG1Fc、pTT5-AR8820-1.1mIgG1Fc、pTT5-AR8820-1.2mIgG1Fc、pTT5-AR8820-1.3mIgG1Fc、pTT5-AR8820-2.1mIgG1Fc、pTT5-AR8820-2.3mIgG1Fc、pTT5-AR8820-3.1mIgG1Fc和pTT5-AR8820-3.3mIgG1Fc的分子表现出与食蟹猴CD16a蛋白的良好交叉反应(图13)。

## 序列表

带下划线的氨基酸序列分别为 CDR1、CDR2 和 CDR3。

骆驼科 sdAb

> AR8804

AVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGSSVSR~~YAMA~~WYRQAPGKERELVAVVRITGIPIYADF

[0110] ~~VKGRFTISRDN~~AKNTVLLQMNSLEPEDTAIYYCNTGNFNTYTRRYSPSETWGQGTQVTVSS

(SEQ ID NO:1)

AR8804 的 CDR1: RYAMA (SEQ ID NO:2)

AR8804 的 CDR2: VVRITGIPIYADFVKG (SEQ ID NO:3)

AR8804 的 CDR3: GNFNTYTRRYSPSET (SEQ ID NO:4)

> AR8820

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSSISRYAMAWYRQGPGERELVAVVRITGSPIYADF  
VGGFRFTISRDNAKSTVLLQMNSLKPEDTAIYYCNTGNFNTYTRRYSPSETWGQGTQVTVSS  
(SEQ ID NO:5)

AR8820 的 CDR1: RYAMA (SEQ ID NO:6)

AR8820 的 CDR2: VVRITGSPIYADFVGG (SEQ ID NO:7)

AR8820 的 CDR3: GNFNTYTRRYSPSET (SEQ ID NO:8)

> AR8776

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSSINRGG SITNYA  
DSVKGRFAISRDNANTYIYLMNNLRPEDTAQYSCARGDSTYSRLSAAYRGQGTQVTVSS  
(SEQ ID NO:9)

AR8776 的 CDR1: NYAMS (SEQ ID NO:10)

AR8776 的 CDR2: SINRGG SITNYADSVKG (SEQ ID NO:11)

AR8776 的 CDR3: GDSTYSRLSAAY (SEQ ID NO:12)

> AR8875

[0111] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMTWVRQAPGKGLEWVSSIDRGG SITSYAD  
SVKGRFAISRDNANTMYIYLMNNLRPEDTARYVCARGDSTYSRLTAAYRGQGTQVTVSS  
(SEQ ID NO:13)

AR8775 的 CDR1: NYAMT (SEQ ID NO:14)

AR8775 的 CDR2: SIDRGG SITSYADSVKG (SEQ ID NO:15)

AR8775 的 CDR3: GDSTYSRLTAAY (SEQ ID NO:16)

> AR8866

QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSVWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGIYTTYA  
DSVKGRFTISRDNAKNTLWLQLNALKPEDTAVYYCAQGNRRNSMLSGTLRGQGTQVTVSS  
(SEQ ID NO:17)

AR8866 的 CDR1: VWTMS (SEQ ID NO:18)

AR8866 的 CDR2: DISHSGIYTTYADSVKG (SEQ ID NO:19)

AR8866 的 CDR3: GNRRNSMLSGTL (SEQ ID NO:20)

> AR8887

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGFLYYSIGWFRQAPGKEREWVSCISRSGAGTSYANSV  
KGRSTISRDNDKNTVYIYLMNSLKSEDTAVYYCARRATSSCTATMTRGQYDYWGQGTQVTV  
SS (SEQ ID NO:21)

AR8887 的 CDR1: YSIG (SEQ ID NO:22)

AR8887 的 CDR2: CISRSGAGTSYANSVKG (SEQ ID NO:23)

AR8887 的 CDR3: RATSSCTATMTRGQYDY (SEQ ID NO:24)

> AR8861

AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSIWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGLYTTYAD  
SVKGRFTISRDNKNTLWLQLNALKPEDTAVYYCAQGNRRTSMLSGTLRGQGTQVTVSS  
(SEQ ID NO:25)

AR8861 的 CDR1: IWTMS (SEQ ID NO:26)

AR8861 的 CDR2: DISHSGLYTTYADSVKG (SEQ ID NO:27)

AR8861 的 CDR3: GNRRTSMLSGTL (SEQ ID NO:28)

以下是人源化 sdAb

> AR8861-1.1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGLYTTYAD  
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGNRRTSMLSGTLWGQGTQVTVSS  
(SEQ ID NO:29)

[0112] AR8861-1.1 的 CDR1: IWTMS (SEQ ID NO:26)

AR8861-1.1 的 CDR2: DISHSGLYTTYADSVKG (SEQ ID NO:27)

AR8861-1.1 的 CDR3: GNRRTSMLSGTL (SEQ ID NO:28)

> AR8861-1.2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGLYTTYAD  
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAQGNRRTSMLSGTLWGQGTQVTVSS  
(SEQ ID NO:30)

AR8861-1.2 的 CDR1: IWTMS (SEQ ID NO:26)

AR8861-1.2 的 CDR2: DISHSGLYTTYADSVKG (SEQ ID NO:27)

AR8861-1.2 的 CDR3: GNRRTSMLSGTL (SEQ ID NO:28)

> AR8861-2.1

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSIWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGLYTTYAD  
SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNRRTSMLSGTLWGQGTQVTVSS  
(SEQ ID NO:31)

AR8861-2.1 的 CDR1: IWTMS (SEQ ID NO:26)

AR8861-2.1 的 CDR2: DISHSGLYTTYADSVKG (SEQ ID NO:27)

AR8861-2.1 的 CDR3: GNRRTSMLSGTL (SEQ ID NO:28)

> AR8861-2.2

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSIWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGLYTTYAD  
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAQGNRRTSMLSGTLWGQGTLLTVSS  
(SEQ ID NO:32)

AR8861-2.2 的 CDR1: IWTMS (SEQ ID NO:26)

AR8861-2.2 的 CDR2: DISHSGLYTTYADSVKG (SEQ ID NO:27)

AR8861-2.2 的 CDR3: GNRRTSMLSGTL (SEQ ID NO:28)

> AR8861-3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIWTMSWVRQAPGKGLVWVSDISHSGLYTTYA  
DSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAQGNRRTSMLSGTLWGQGTLLTVSS  
(SEQ ID NO:33)

AR8861-3 的 CDR1: IWTMS (SEQ ID NO:26)

AR8861-3 的 CDR2: DISHSGLYTTYADSVKG (SEQ ID NO:27)

AR8861-3 的 CDR3: GNRRTSMLSGTL (SEQ ID NO:28)

[0113]

> AR8861-4.1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGLYTTYAD  
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNRRTSMLSGTLWGQGTLLTVSS  
(SEQ ID NO:34)

AR8861-4.1 的 CDR1: IWTMS (SEQ ID NO:26)

AR8861-4.1 的 CDR2: DISHSGLYTTYADSVKG (SEQ ID NO:27)

AR8861-4.1 的 CDR3: GNRRTSMLSGTL (SEQ ID NO:28)

> AR8861-4.2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGLYTTYAD  
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAQGNRRTSMLSGTLWGQGTLLTVSS  
(SEQ ID NO:35)

AR8861-4.2 的 CDR1: IWTMS (SEQ ID NO:26)

AR8861-4.2 的 CDR2: DISHSGLYTTYADSVKG (SEQ ID NO:27)

AR8861-4.2 的 CDR3: GNRRTSMLSGTL (SEQ ID NO:28)

> AR8861-5.1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGLYTTYADSVKGRFTISRDN  
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNRRTSMLSGTLWGQGTLVTVSS  
(SEQ ID NO:36)

AR8861-5.1 的 CDR1: IWTMS (SEQ ID NO:26)

AR8861-5.1 的 CDR2: DISHSGLYTTYADSVKG (SEQ ID NO:27)

AR8861-5.1 的 CDR3: GNRRTSMLSGTL (SEQ ID NO:28)

> AR8861-5.2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGLYTTYADSVKGRFTISRDN  
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAQGNRRTSMLSGTLWGQGTLVTVSS  
(SEQ ID NO:37)

AR8861-5.2 的 CDR1: IWTMS (SEQ ID NO:26)

AR8861-5.2 的 CDR2: DISHSGLYTTYADSVKG (SEQ ID NO:27)

AR8861-5.2 的 CDR3: GNRRTSMLSGTL (SEQ ID NO:28)

> AR8861-6

[0114] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSIWTMSWVRQAPGKGLEWVADISHSGLYTTYADSVKGRFTISRDN  
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAQGNRRTSMLSGTLWGQGTLVTVSS  
(SEQ ID NO:38)

AR8861-6 的 CDR1: IWTMS (SEQ ID NO:26)

AR8861-6 的 CDR2: DISHSGLYTTYADSVKG (SEQ ID NO:27)

AR8861-6 的 CDR3: GNRRTSMLSGTL (SEQ ID NO:28)

> AR8804-1.1

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGSSVSRYAMAWYRQAPGKGRELVSVVRITGIPIYADFVKGRFTISRDN  
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATGNFNTYTRRYSPSETWGQGTTVTVSS  
(SEQ ID NO:39)

AR8804-1.1 的 CDR1: RYAMA (SEQ ID NO:2)

AR8804-1.1 的 CDR2: VVRITGIPIYADFVKG (SEQ ID NO:3)

AR8804-1.1 的 CDR3: GNFNTYTRRYSPSET (SEQ ID NO:4)

> AR8804-1.3

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGSSVSRYAMAWYRQAPGKGRELVSVVRITGIPIYADFVKGRFTISRDN  
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNTGNFNTYTRRYSPSETWGQGTTVTVSS  
(SEQ ID NO:40)

AR8804-1.3 的 CDR1: RYAMA (SEQ ID NO:2)

AR8804-1.3 的 CDR2: VVRITGIPIYADFVKG (SEQ ID NO:3)

AR8804-1.3 的 CDR3: GNFNNTYTRRYSPSET (SEQ ID NO:4)

> AR8804-2.3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSVSR~~YAMA~~WVRQAPGKGRELVAVVRITGIPIYADF  
VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCNTGNFNNTYTRRYSPSETWGQGTLVTVSS  
(SEQ ID NO:41)

AR8804-2.3 的 CDR1: RYAMA (SEQ ID NO:2)

AR8804-2.3 的 CDR2: VVRITGIPIYADFVKG (SEQ ID NO:3)

AR8804-2.3 的 CDR3: GNFNNTYTRRYSPSET (SEQ ID NO:4)

> AR8804-3.1

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSSVSR~~YAMA~~WYRQAPGKGRELVAVVRITGIPIYADFV  
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATGNFNNTYTRRYSPSETWGKGTTTVTVSS  
(SEQ ID NO:42)

AR8804-3.1 的 CDR1: RYAMA (SEQ ID NO:2)

[0115] AR8804-3.1 的 CDR2: VVRITGIPIYADFVKG (SEQ ID NO:3)

AR8804-3.1 的 CDR3: GNFNNTYTRRYSPSET (SEQ ID NO:4)

> AR8804-3.2

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSSVSR~~YAMA~~WYRQAPGKGREWWAVVRITGIPIYADF  
VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATGNFNNTYTRRYSPSETWGKGTTTVTVSS  
(SEQ ID NO:43)

AR8804-3.2 的 CDR1: RYAMA (SEQ ID NO:2)

AR8804-3.2 的 CDR2: VVRITGIPIYADFVKG (SEQ ID NO:3)

AR8804-3.2 的 CDR3: GNFNNTYTRRYSPSET (SEQ ID NO:4)

> AR8804-3.3

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSSVSR~~YAMA~~WYRQAPGKGRELVAVVRITGIPIYADF  
VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNTGNFNNTYTRRYSPSETWGKGTTTVTVSS  
(SEQ ID NO:44)

AR8804-3.3 的 CDR1: RYAMA (SEQ ID NO:2)

AR8804-3.3 的 CDR2: VVRITGIPIYADFVKG (SEQ ID NO:3)

AR8804-3.3 的 CDR3: GNFNNTYTRRYSPSET (SEQ ID NO:4)

> AR8820-1.1

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSSISRYAMAWYRQAPGKGRELVAVVRITGSPYADF  
VGGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATGNFNTYTRRYSPSETWGKGTTVTVSS  
(SEQ ID NO:45)

AR8820-1.1 的 CDR1: RYAMA (SEQ ID NO:6)

AR8820-1.1 的 CDR2: VVRITGIPIYADFVGG (SEQ ID NO:7)

AR8820-1.1 的 CDR3: GNFNTYTRRYSPSET (SEQ ID NO:8)

> AR8820-1.2

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSSISRYAMAWYRQAPGKGREWVAVVRITGSPYADF  
FVGGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATGNFNTYTRRYSPSETWGKGTTVTVSS  
(SEQ ID NO:46)

AR8820-1.2 的 CDR1: RYAMA (SEQ ID NO:6)

AR8820-1.2 的 CDR2: VVRITGIPIYADFVGG (SEQ ID NO:7)

AR8820-1.2 的 CDR3: GNFNTYTRRYSPSET (SEQ ID NO:8)

[0116]

> AR8820-1.3

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSSISRYAMAWYRQAPGKGRELVAVVRITGSPYADF  
VGGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNTGNFNTYTRRYSPSETWGKGTTVTVSS  
(SEQ ID NO:47)

AR8820-1.3 的 CDR1: RYAMA (SEQ ID NO:6)

AR8820-1.3 的 CDR2: VVRITGIPIYADFVGG (SEQ ID NO:7)

AR8820-1.3 的 CDR3: GNFNTYTRRYSPSET (SEQ ID NO:8)

> AR8820-2.1

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGSSISRYAMAWYRQAPGKGRELVSVVRITGSPYADFV  
GGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATGNFNTYTRRYSPSETWGQGTTVTVSS  
(SEQ ID NO:48)

AR8820-2.1 的 CDR1: RYAMA (SEQ ID NO:6)

AR8820-2.1 的 CDR2: VVRITGIPIYADFVGG (SEQ ID NO:7)

AR8820-2.1 的 CDR3: GNFNTYTRRYSPSET (SEQ ID NO:8)

> AR8820-2.3

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGSSISRYAMAWYRQAPGKGRELVSVVRITGSPYADFV  
GGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNRGNFNTYTRRYSPSETWGQGT TVTVSS  
(SEQ ID NO:49)

AR8820-2.3 的 CDR1: RYAMA (SEQ ID NO:6)

AR8820-2.3 的 CDR2: VVRITGIPIYADFVGG (SEQ ID NO:7)

AR8820-2.3 的 CDR3: GNFNTYTRRYSPSET (SEQ ID NO:8)

> AR8820-3.1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSISRYAMAWYRQAPGKGRELVAVVRITGSPYADFV  
GGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATGNFNTYTRRYSPSETWGQGT LVTVSS  
(SEQ ID NO:50)

AR8820-3.1 的 CDR1: RYAMA (SEQ ID NO:6)

AR8820-3.1 的 CDR2: VVRITGIPIYADFVGG (SEQ ID NO:7)

AR8820-3.1 的 CDR3: GNFNTYTRRYSPSET (SEQ ID NO:8)

> AR8820-3.2

[0117] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSISRYAMAWYRQAPGKGREWVAVVRITGSPYADF  
VGGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATGNFNTYTRRYSPSETWGQGT LVTVSS  
(SEQ ID NO:51)

AR8820-3.2 的 CDR1: RYAMA (SEQ ID NO:6)

AR8820-3.2 的 CDR2: VVRITGIPIYADFVGG (SEQ ID NO:7)

AR8820-3.2 的 CDR3: GNFNTYTRRYSPSET (SEQ ID NO:8)

> AR8820-3.3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSISRYAMAWYRQAPGKGRELVAVVRITGSPYADFV  
GGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCNTGNFNTYTRRYSPSETWGQGT LVTVSS  
(SEQ ID NO:52)

AR8820-3.3 的 CDR1: RYAMA (SEQ ID NO:6)

AR8820-3.3 的 CDR2: VVRITGIPIYADFVGG (SEQ ID NO:7)

AR8820-3.3 的 CDR3: GNFNTYTRRYSPSET (SEQ ID NO:8)

> AR8866-1.1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGIYTTYA  
DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGNRRNSMLSGTLWGQGT LVTVSS  
(SEQ ID NO:53)

AR8866-1.1 的 CDR1: VWTMS (SEQ ID NO:18)

AR8866-1.1 的 CDR2: DISHSGIYTTYADSVKG (SEQ ID NO:19)

AR8866-1.1 的 CDR3: GNRRNSMLSGTL (SEQ ID NO:20)

> AR8866-1.2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGIYTTYA  
DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAQGNRRNSMLSGTLWGQGT LTVSS  
(SEQ ID NO:54)

AR8866-1.2 的 CDR1: VWTMS (SEQ ID NO:18)

AR8866-1.2 的 CDR2: DISHSGIYTTYADSVKG (SEQ ID NO:19)

AR8866-1.2 的 CDR3: GNRRNSMLSGTL (SEQ ID NO:20)

> AR8866-2.1

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSVWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGIYTTYA  
DSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNRRNSMLSGTLWGQGT LTVSS  
(SEQ ID NO:55)

AR8866-2.1 的 CDR1: VWTMS (SEQ ID NO:18)

[0118] AR8866-2.1 的 CDR2: DISHSGIYTTYADSVKG (SEQ ID NO:19)

AR8866-2.1 的 CDR3: GNRRNSMLSGTL (SEQ ID NO:20)

> AR8866-2.2

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSVWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGIYTTYA  
DSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAQGNRRNSMLSGTLWGQGT LTVSS  
(SEQ ID NO:56)

AR8866-2.2 的 CDR1: VWTMS (SEQ ID NO:18)

AR8866-2.2 的 CDR2: DISHSGIYTTYADSVKG (SEQ ID NO:19)

AR8866-2.2 的 CDR3: GNRRNSMLSGTL (SEQ ID NO:20)

> AR8866-3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVWTMSWVRQAPGKGLVWVSDISHSGIYTTYA  
DSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAQGNRRNSMLSGTLWGQGT LTVSS  
(SEQ ID NO:57)

AR8866-3 的 CDR1: VWTMS (SEQ ID NO:18)

AR8866-3 的 CDR2: DISHSGIYTTYADSVKG (SEQ ID NO:19)

AR8866-3 的 CDR3: GNRRNSMLSGTL (SEQ ID NO:20)

> AR8866-4.1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGIYTTYA  
DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNRRNSMLSGTLWGQGTLVTVSS  
(SEQ ID NO:58)

AR8866-4.1 的 CDR1: VWTMS (SEQ ID NO:18)

AR8866-4.1 的 CDR2: DISHSGIYTTYADSVKG (SEQ ID NO:19)

AR8866-4.1 的 CDR3: GNRRNSMLSGTL (SEQ ID NO:20)

> AR8866-4.2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGIYTTYA  
DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAQGNRRNSMLSGTLWGQGTLVTVSS  
(SEQ ID NO:59)

AR8866-4.2 的 CDR1: VWTMS (SEQ ID NO:18)

AR8866-4.2 的 CDR2: DISHSGIYTTYADSVKG (SEQ ID NO:19)

AR8866-4.2 的 CDR3: GNRRNSMLSGTL (SEQ ID NO:20)

[0119]

> AR8866-5.1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGIYTTYA  
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNRRNSMLSGTLWGQGTLVTVSS  
(SEQ ID NO:60)

AR8866-5.1 的 CDR1: VWTMS (SEQ ID NO:18)

AR8866-5.1 的 CDR2: DISHSGIYTTYADSVKG (SEQ ID NO:19)

AR8866-5.1 的 CDR3: GNRRNSMLSGTL (SEQ ID NO:20)

> AR8866-5.2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVWTMSWVRQAPGKGLEWVSDISHSGIYTTYA  
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAQGNRRNSMLSGTLWGQGTLVTVSS  
(SEQ ID NO:61)

AR8866-5.2 的 CDR1: VWTMS (SEQ ID NO:18)

AR8866-5.2 的 CDR2: DISHSGIYTTYADSVKG (SEQ ID NO:19)

AR8866-5.2 的 CDR3: GNRRNSMLSGTL (SEQ ID NO:20)

> AR8866-6

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVWTMSWVRQAPGKGLEWVADISHSGIYTTYA  
DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAQGNRRNSMLSGTLWGQGTLVTVSS  
(SEQ ID NO:62)

AR8866-6 的 CDR1: VWTMS (SEQ ID NO:18)

AR8866-6 的 CDR2: DISHSGIYTTYADSVKG (SEQ ID NO:19)

AR8866-6 的 CDR3: GNRRNSMLSGTL (SEQ ID NO:20)

>AR8875-1.1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMTWVRQAPGKGLVWVSSIDRGGSITSYAD  
SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARADSTYSRLTAAYWGQGTLVTVSS  
(SEQ ID NO:63)

AR8875-1.1 的 CDR1: NYAMT (SEQ ID NO:14)

AR8875-1.1 的 CDR2: SIDRGG SITSYADSVKG (SEQ ID NO:15)

AR8875-1.1 的 CDR3: ADSTYSRLTAAY (SEQ ID NO:64)

>AR8875-1.2

[0120] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMTWVRQAPGKGLVWVSSIDRGGSITSYAD  
SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSDSTYSRLTAAYWGQGTLVTVSS  
(SEQ ID NO:65)

AR8875-1.2 的 CDR1: NYAMT (SEQ ID NO:14)

AR8875-1.2 的 CDR2: SIDRGG SITSYADSVKG (SEQ ID NO:15)

AR8875-1.2 的 CDR3: SDSTYSRLTAAY (SEQ ID NO:66)

>AR8875-2

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMTWVRQAPGKGLEWVSSIDRGGSITSYAD  
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARADSTYSRLTAAYWGQGTLVTVSS  
(SEQ ID NO:67)

AR8875-2 的 CDR1: NYAMT (SEQ ID NO:14)

AR8875-2 的 CDR2: SIDRGG SITSYADSVKG (SEQ ID NO:15)

AR8875-2 的 CDR3: ADSTYSRLTAAY (SEQ ID NO:64)

>AR8875-3.2

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMTWVRQAPGKGLEWVSSIDRGGSITSYAD  
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSDSTYSRLTAAYWGQGTLVTVSS  
(SEQ ID NO: 68)

AR8875-3.2 的 CDR1: NYAMT (SEQ ID NO:14)

AR8875-3.2 的 CDR2: SIDRGGGSITSYADSVKG (SEQ ID NO:15)

AR8875-3.2 的 CDR3: SDSTYSRLTAAY (SEQ ID NO:66)

>AR8875-4.1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMTWVRQAPGKGLEWVSSSIDRGGGSITSYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARADSTYSRLTAAYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 69)

AR8875-4.1 的 CDR1: NYAMT (SEQ ID NO:14)

AR8875-4.1 的 CDR2: SIDRGGGSITSYADSVKG (SEQ ID NO:15)

AR8875-4.1 的 CDR3: ADSTYSRLTAAY (SEQ ID NO:64)

>AR8875-4.2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMTWVRQAPGKGLEWVSSSIDRGGGSITSYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSDSTYSRLTAAYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 70)

AR8875-4.2 的 CDR1: NYAMT (SEQ ID NO:14)

[0121] AR8875-4.2 的 CDR2: SIDRGGGSITSYADSVKG (SEQ ID NO:15)

AR8875-4.2 的 CDR3: SDSTYSRLTAAY (SEQ ID NO:66)

>AR8875-5

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMTWVRQAPGKGLEWVASSIDRGGGSITSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARADSTYSRLTAAYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 71)

AR8875-5 的 CDR1: NYAMT (SEQ ID NO:14)

AR8875-5 的 CDR2: SIDRGGGSITSYADSVKG (SEQ ID NO:15)

AR8875-5 的 CDR3: ADSTYSRLTAAY (SEQ ID NO:64)

>AR8875-6

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMTWVRQAPGKGLEWVSSSIDRGGGSITSYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARADSTYSRLTAAYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 72)

AR8875-6 的 CDR1: NYAMT (SEQ ID NO:14)

AR8875-6 的 CDR2: SIDRGGGSITSYADSVKG (SEQ ID NO:15)

AR8875-6 的 CDR3: ADSTYSRLTAAY (SEQ ID NO:64)

## 人 IgG4 Fc

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY  
TQKSLSLGK (SEQ ID NO:73)

[0122]

## 小鼠 IgG1 Fc

VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVVDISKDDPEVQFS  
WFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPA  
PIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNG  
QPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTE  
KSLSHSPGK (SEQ ID NO:74)

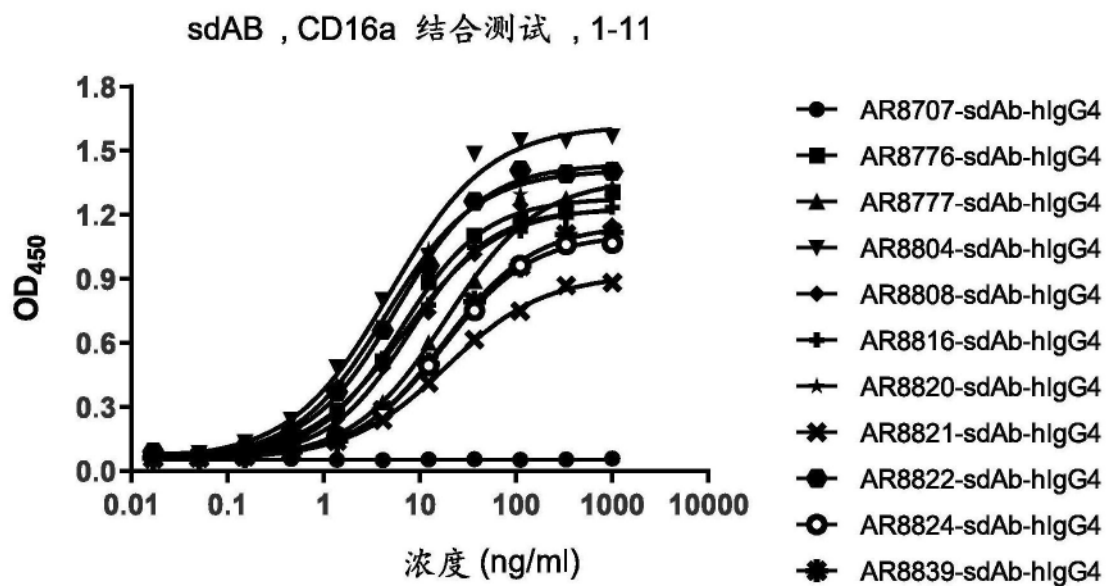


图1A-1

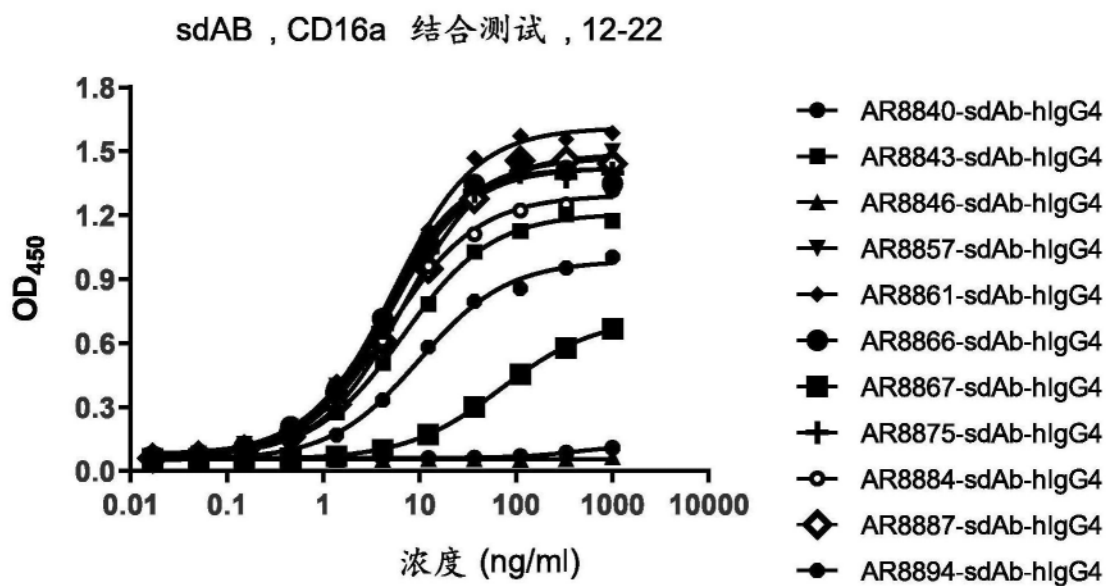


图1A-2

sdAB , CD16b 结合测试 , 1-11

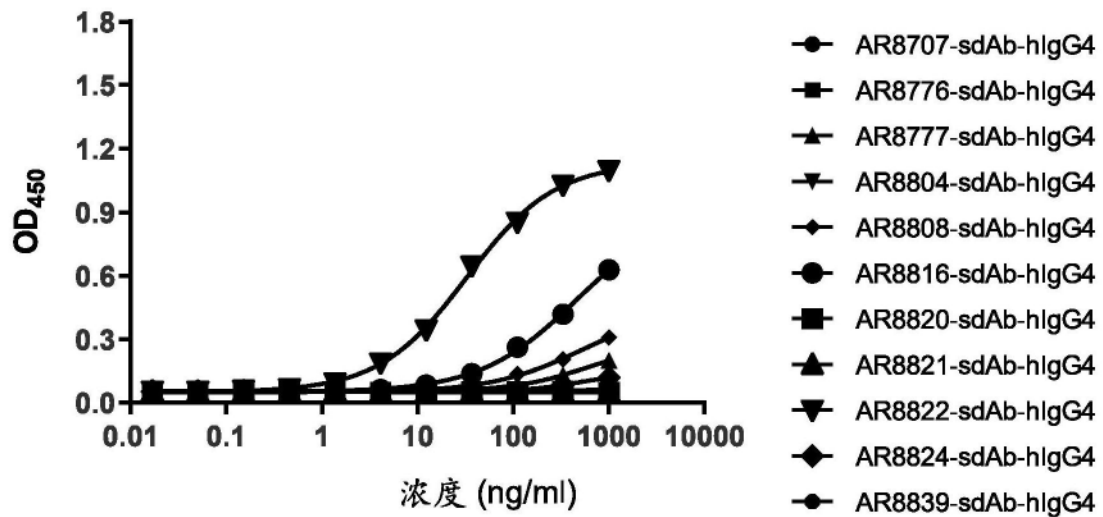


图2A-1

sdAB , CD16b 结合测试 , 12-22

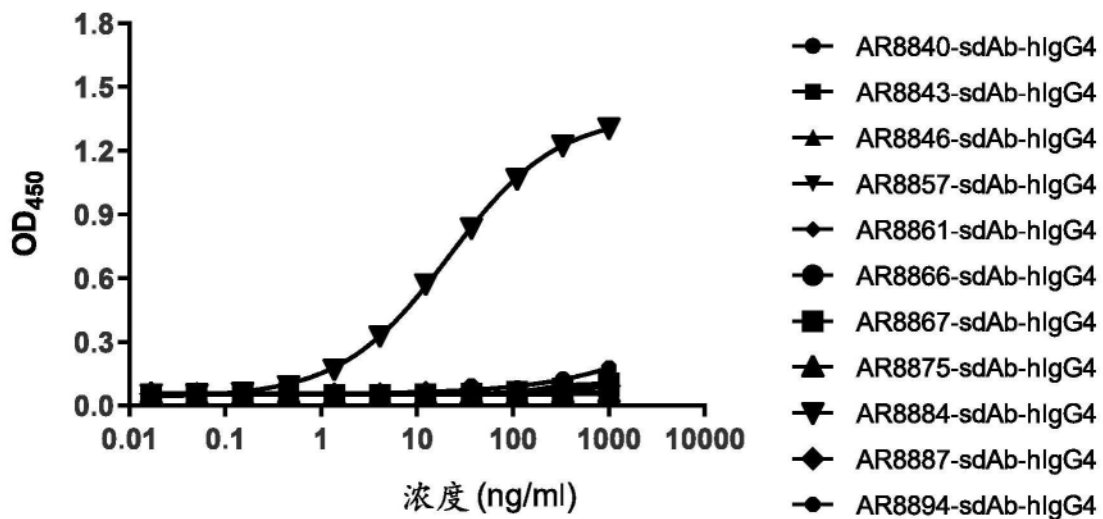
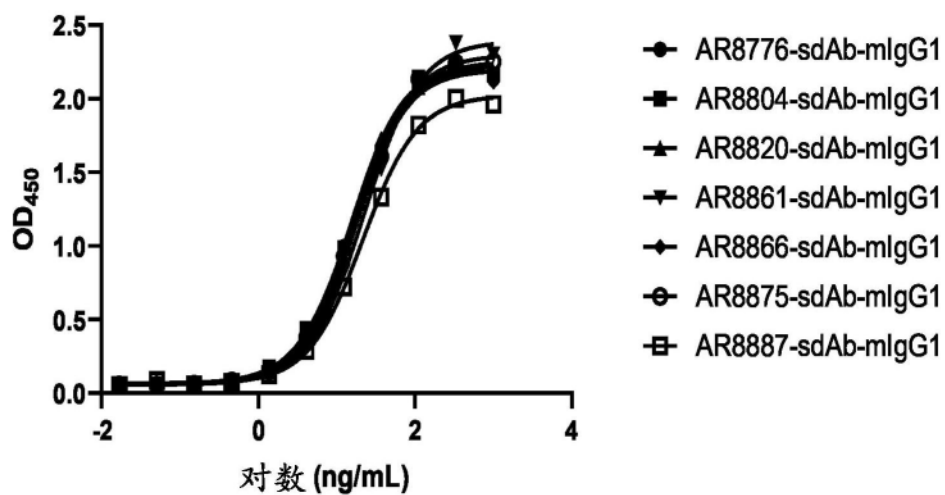


图2A-2



|                  | AR8776-sdAb-mIgG1 | AR8804-sdAb-mIgG1 | AR8820-sdAb-mIgG1 | AR8861-sdAb-mIgG1 | AR8866-sdAb-mIgG1 | AR8875-sdAb-mIgG1 | AR8887-sdAb-mIgG1 |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| EC <sub>50</sub> | 15.48             | 15.80             | 15.14             | 22.73             | 17.41             | 17.96             | 21.68             |
| 跨度               | 2.160             | 2.193             | 2.174             | 2.335             | 2.133             | 2.240             | 1.960             |

图2B-1

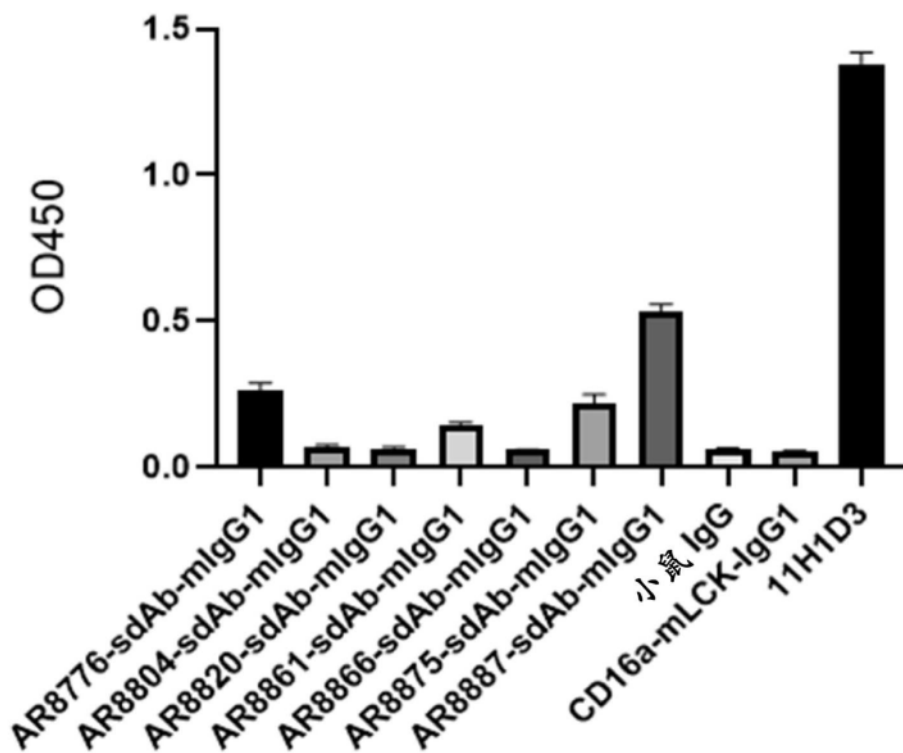


图2B-2

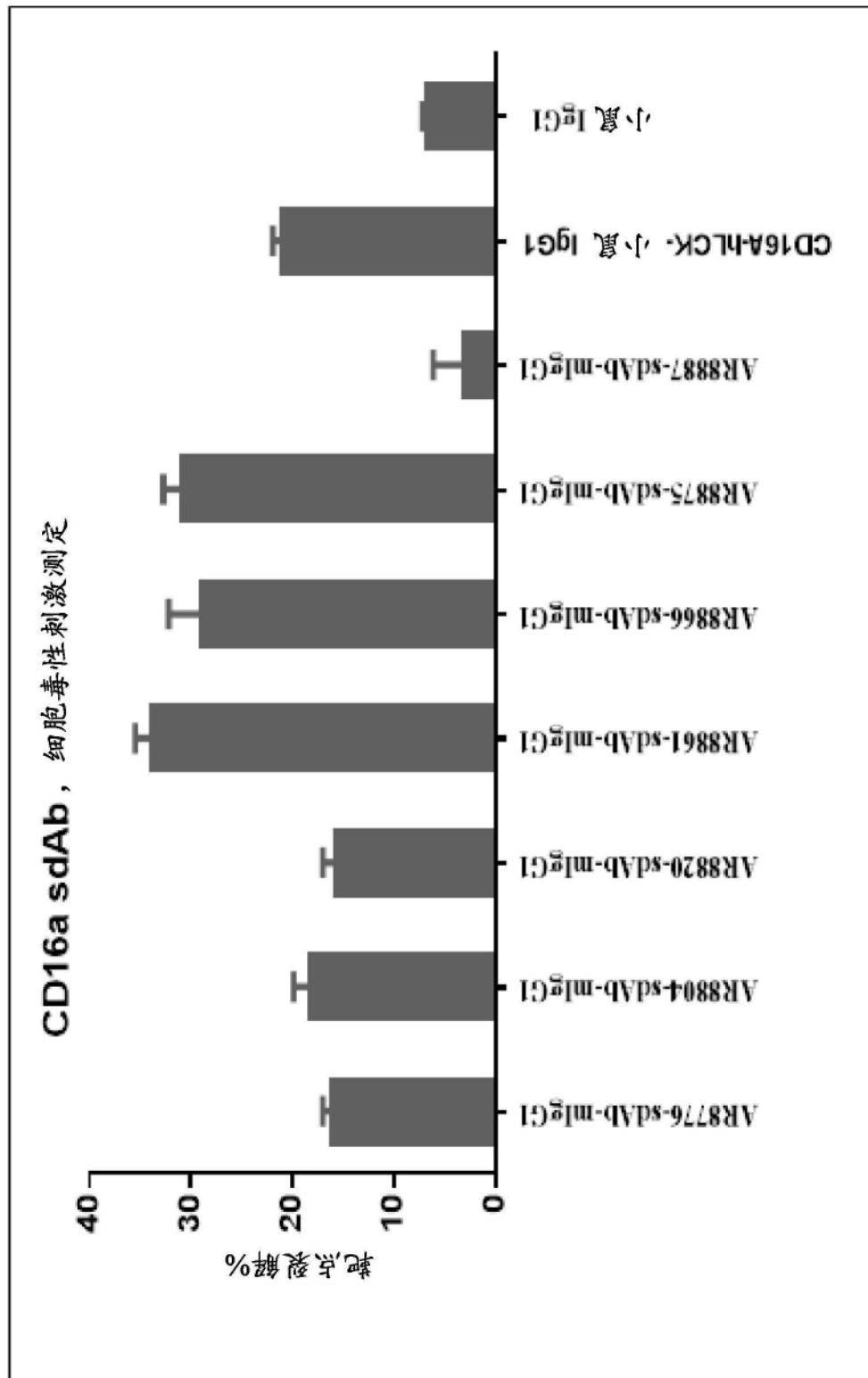


图3

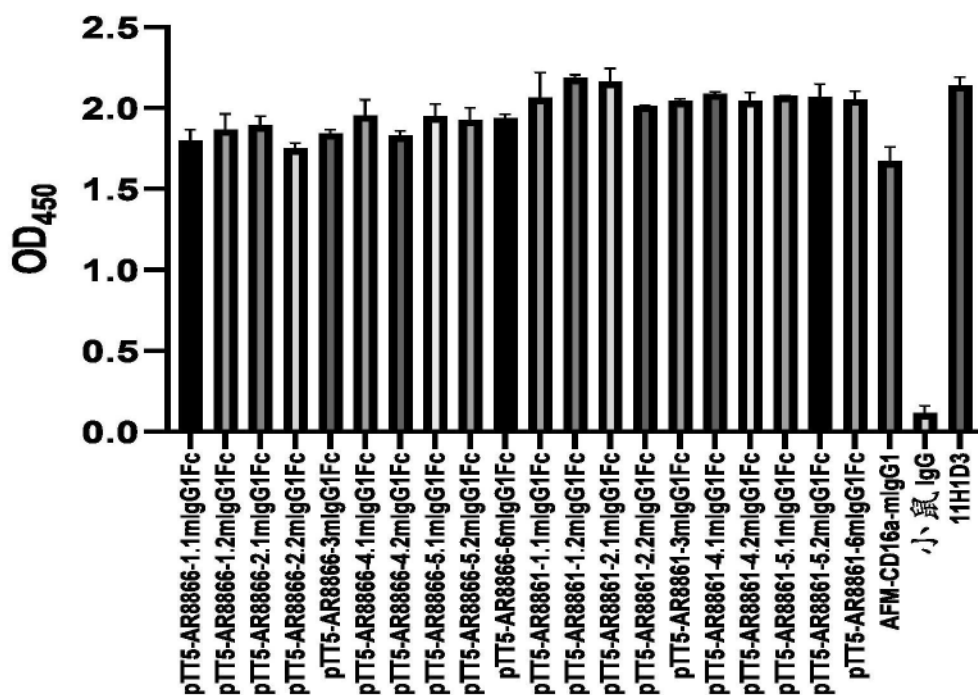
人源化 **sdAb** **CD16a** 结合测试,ELISA

图4A

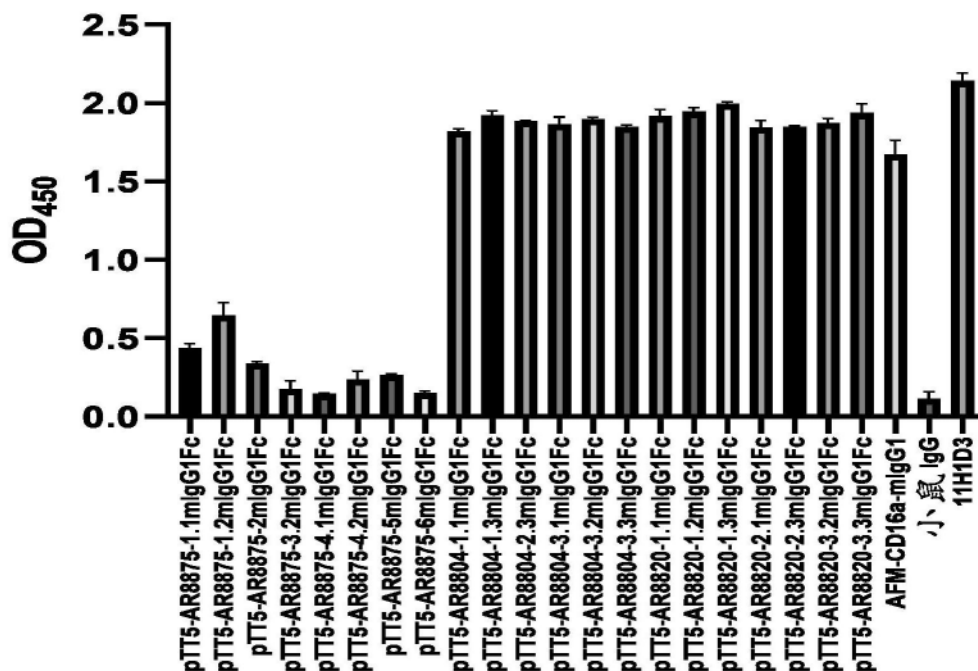
人源化 **sdAb** **CD16a** 结合测试,ELISA-2

图4B

## 人源化 sdAb CD16b 结合测试 ,ELISA

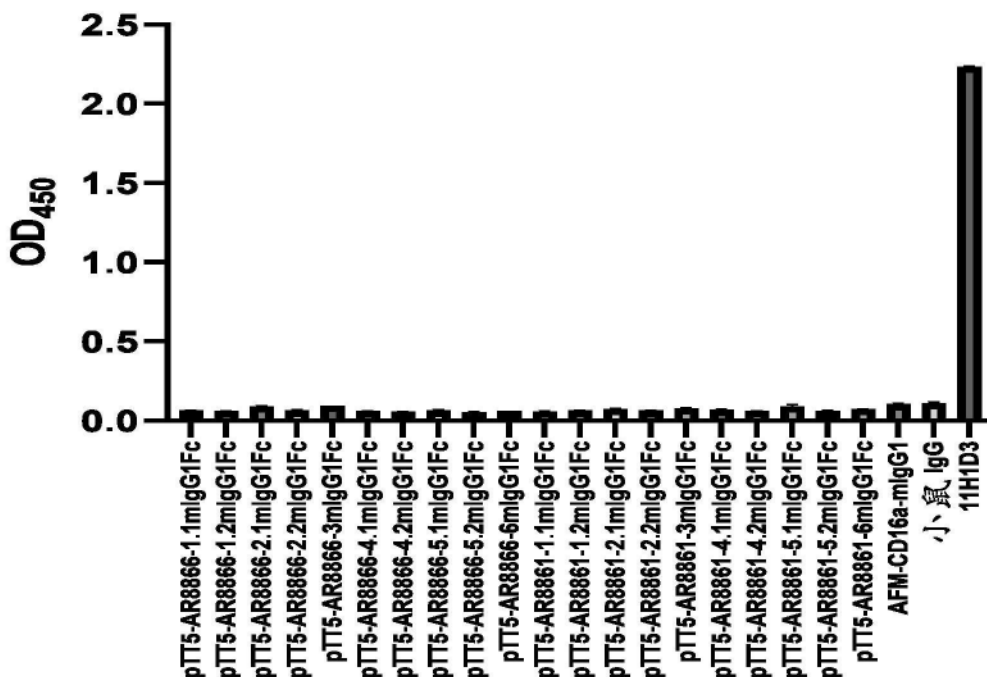


图5A

## 人源化 sdAb CD16b 结合测试 ,ELISA-2

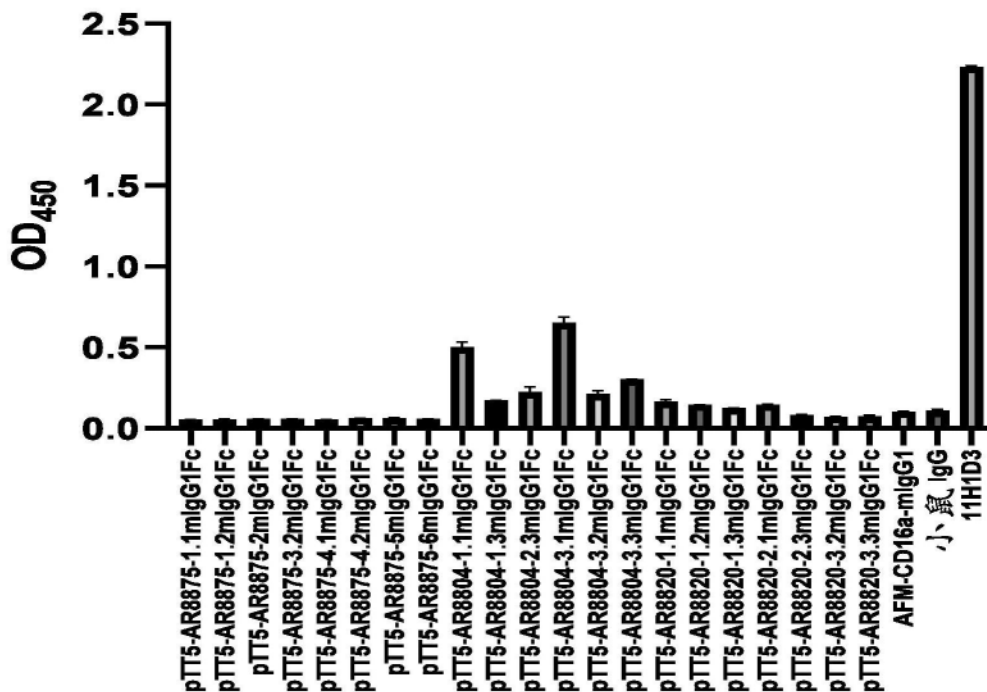


图5B

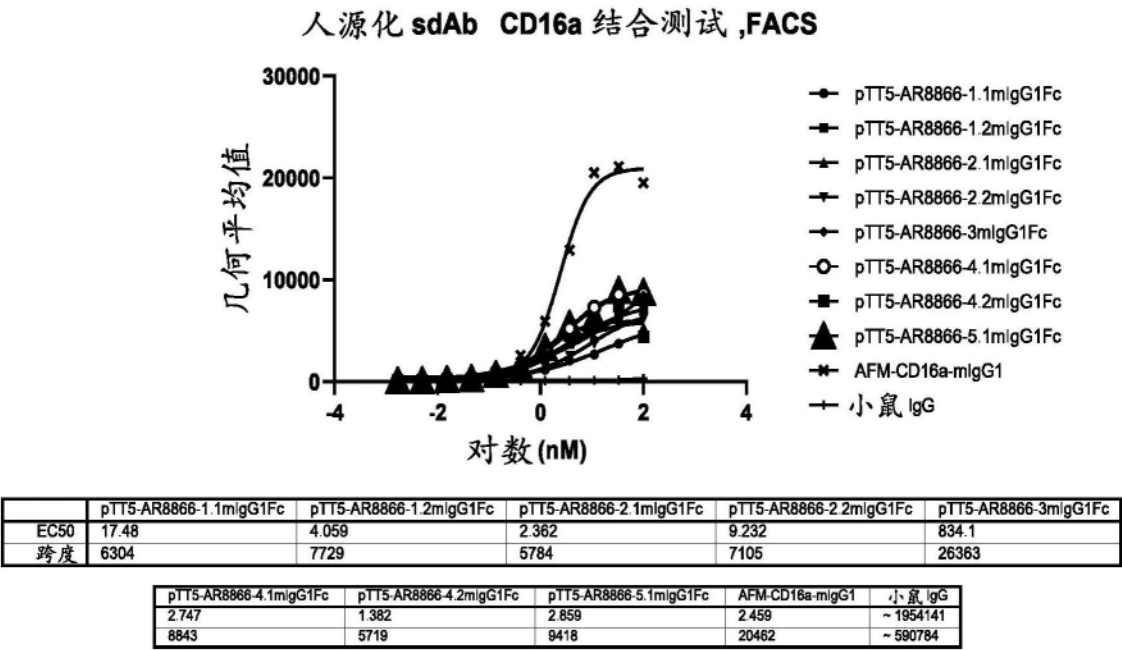


图6A

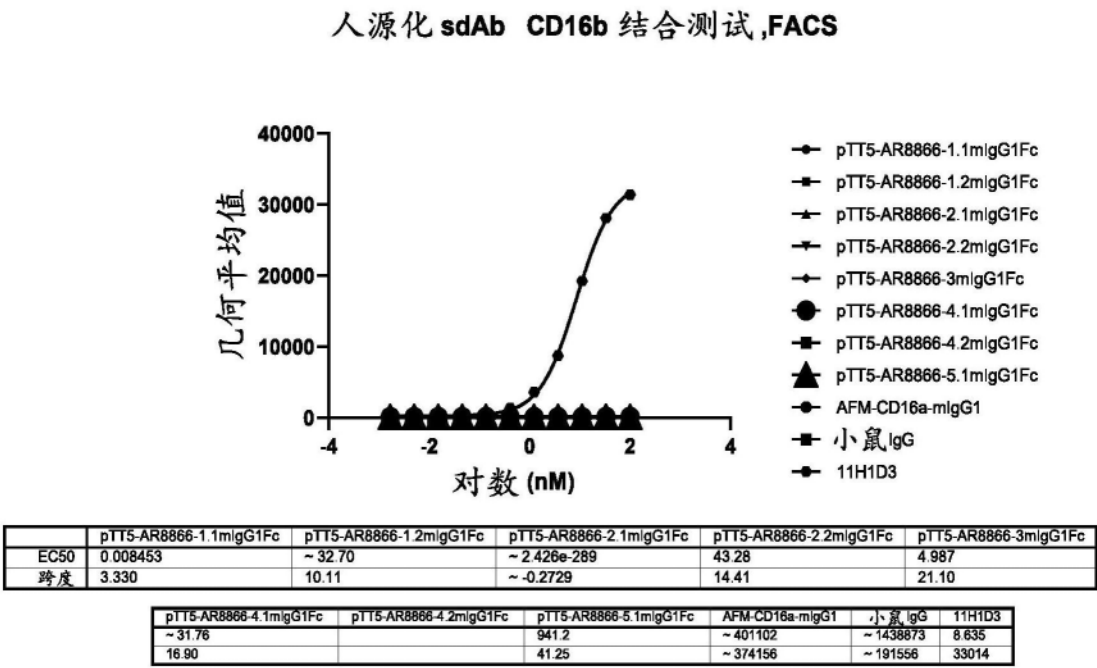


图6B

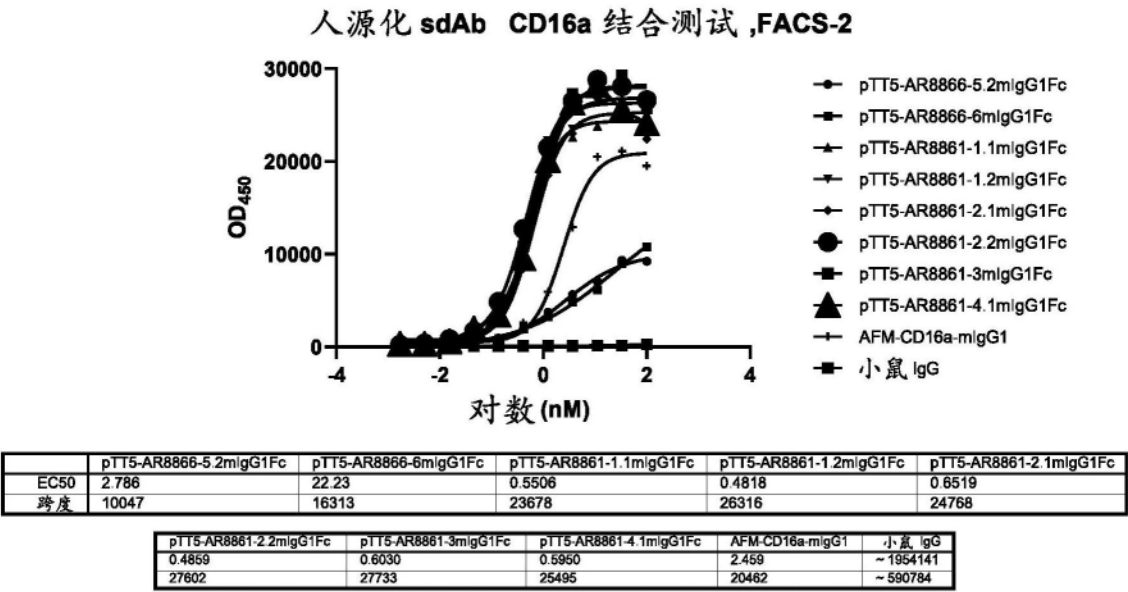


图7A

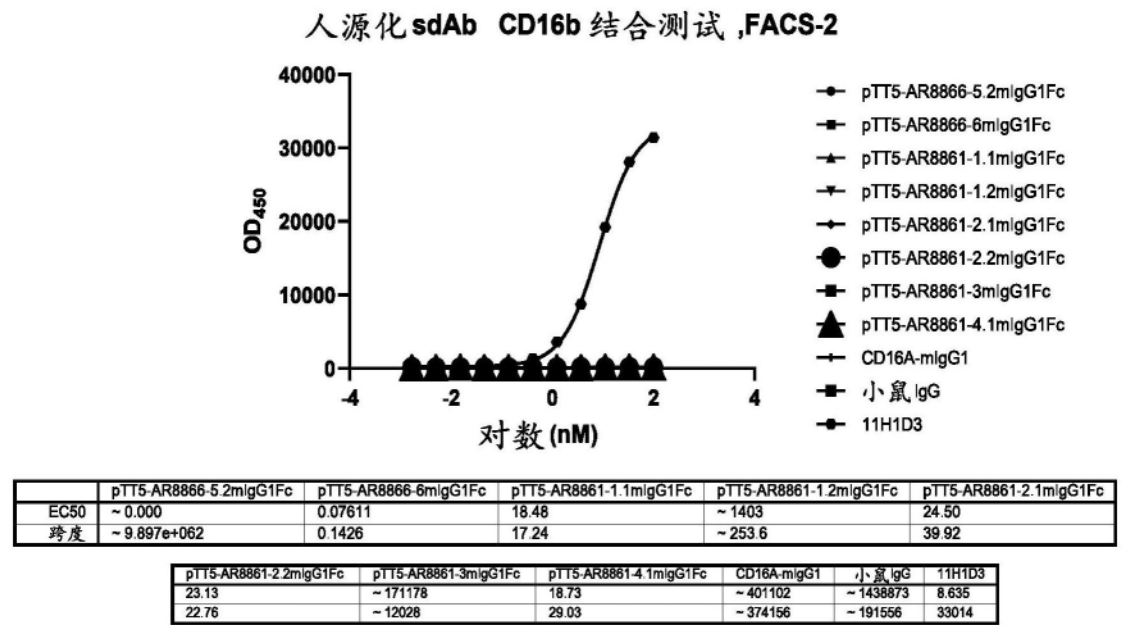


图7B

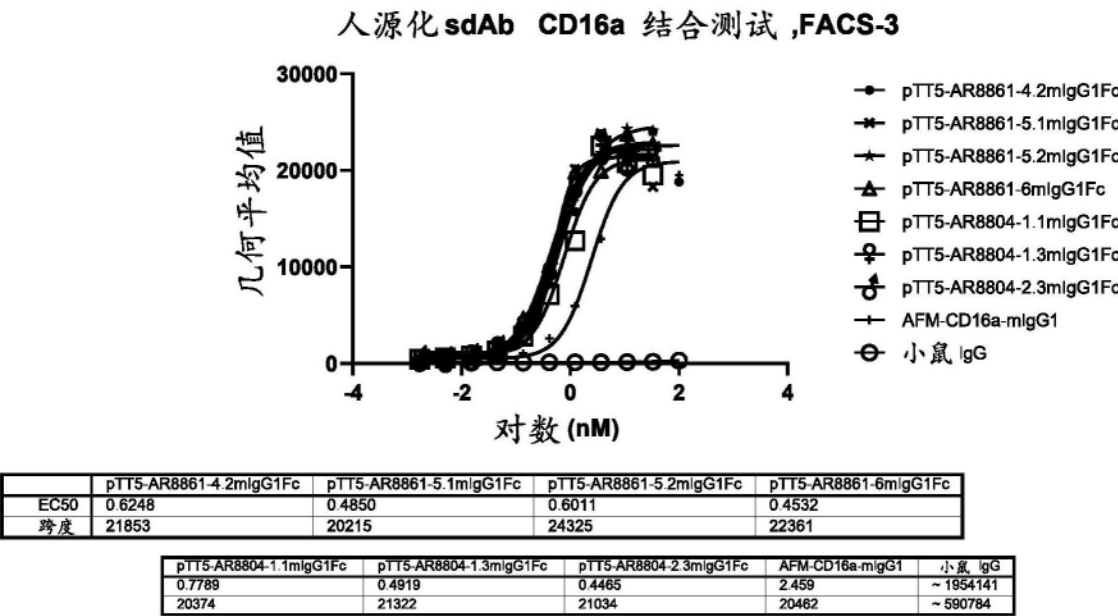


图8A

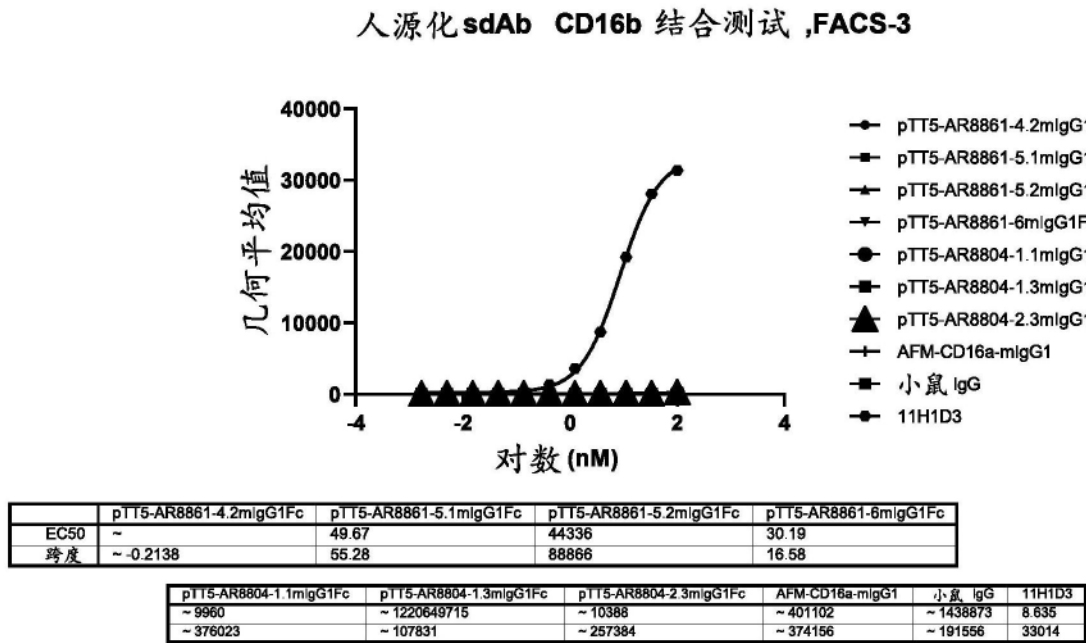
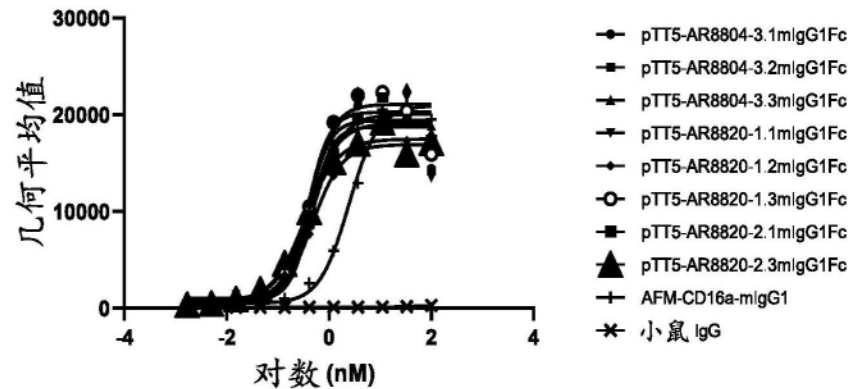


图8B

人源化 sdAb CD16a 结合测试 ,FACS-4

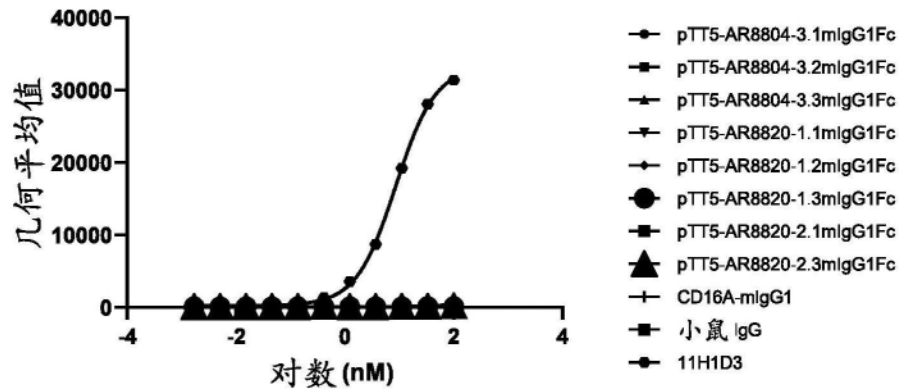


|      |                       |                       |                       |                       |                       |
|------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|      | pTT5-AR8804-3.1mgG1Fc | pTT5-AR8804-3.2mgG1Fc | pTT5-AR8804-3.3mgG1Fc | pTT5-AR8820-1.1mgG1Fc | pTT5-AR8820-1.2mgG1Fc |
| EC50 | 0.3920                | 0.4444                | 0.4121                | 0.3804                | 0.4700                |
| 跨度   | 18382                 | 17954                 | 20199                 | 18324                 | 16493                 |

|                       |                       |                       |                 |           |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|-----------|
| pTT5-AR8820-1.3mgG1Fc | pTT5-AR8820-2.1mgG1Fc | pTT5-AR8820-2.3mgG1Fc | AFM-CD16a-mIgG1 | 小鼠 IgG    |
| 0.3841                | 0.4937                | 0.3320                | 2.459           | ~ 1954141 |
| 19666                 | 19465                 | 16947                 | 20462           | ~ 590784  |

图9A

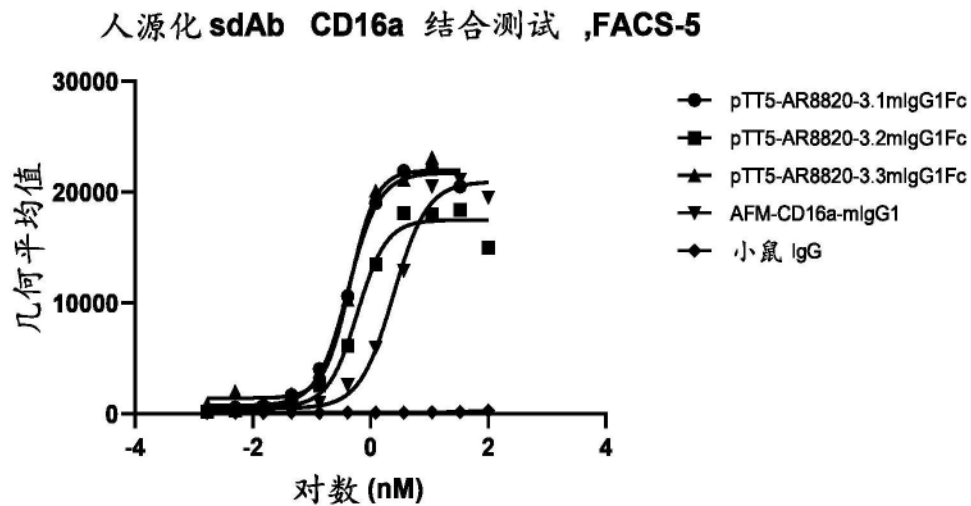
人源化 sdAb CD16b 结合测试 ,FACS-4



|      |                       |                       |                       |                       |                       |
|------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|      | pTT5-AR8804-3.1mgG1Fc | pTT5-AR8804-3.2mgG1Fc | pTT5-AR8804-3.3mgG1Fc | pTT5-AR8820-1.1mgG1Fc | pTT5-AR8820-1.2mgG1Fc |
| EC50 | ~ 7170                | ~ 194700              | ~ 187806700093        | ~ 65625               | ~ 497.2               |
| 跨度   | ~ 15709               | ~ 522300              | ~ 200349              | ~ 514906              | ~ 29787               |

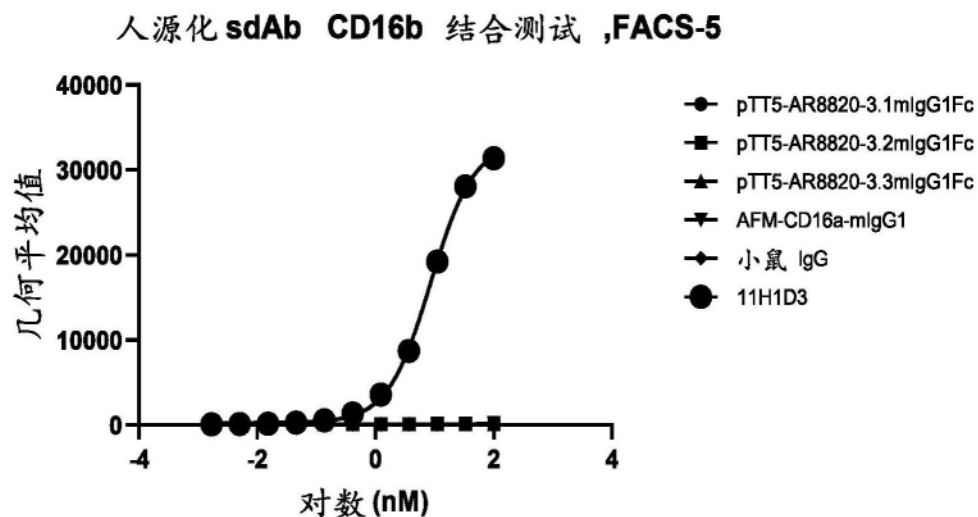
|                       |                       |                       |             |           |        |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------|-----------|--------|
| pTT5-AR8820-1.3mgG1Fc | pTT5-AR8820-2.1mgG1Fc | pTT5-AR8820-2.3mgG1Fc | CD16A-mIgG1 | 小鼠 IgG    | 11H1D3 |
| ~ 1.871e+018          | ~ 7842499             | ~ 166669              | ~ 401102    | ~ 1438873 | 8.635  |
| ~ 14575               | ~ 126314              | ~ 263412              | ~ 374156    | ~ 191556  | 33014  |

图9B



|      | pTT5-AR8820-3.1mIgG1Fc | pTT5-AR8820-3.2mIgG1Fc | pTT5-AR8820-3.3mIgG1Fc | AFM-CD16a-mIgG1 | 小鼠 IgG    |
|------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------|-----------|
| EC50 | 0.4192                 | 0.5985                 | 0.4523                 | 2.459           | ~ 1954141 |
| 跨度   | 21018                  | 16863                  | 20572                  | 20462           | ~ 590784  |

图10A



|      | pTT5-AR8820-3.1mIgG1Fc | pTT5-AR8820-3.2mIgG1Fc | pTT5-AR8820-3.3mIgG1Fc | AFM-CD16a-mIgG1 | 小鼠 IgG    |
|------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------|-----------|
| EC50 | 62.27                  | ~ 34.65                | 61.80                  | ~ 401102        | ~ 1438873 |
| 跨度   | 35.17                  | 14.60                  | 27.24                  | ~ 374156        | ~ 191556  |

图10B

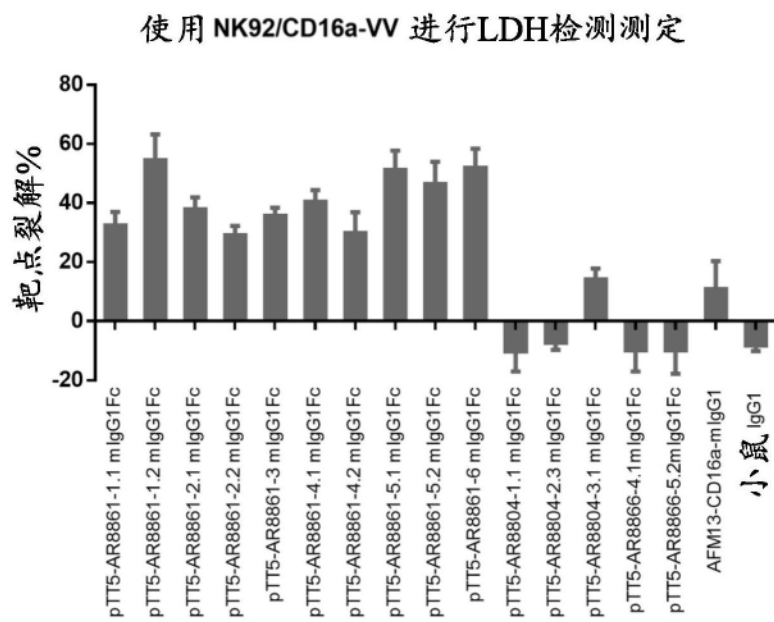


图11A

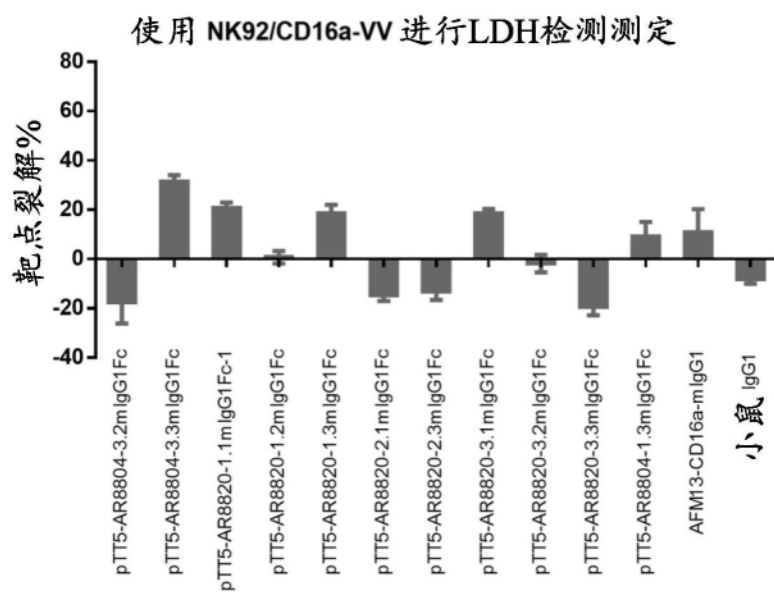


图11B

使用P815和NK92/CD16A-VV进行ADCC测定

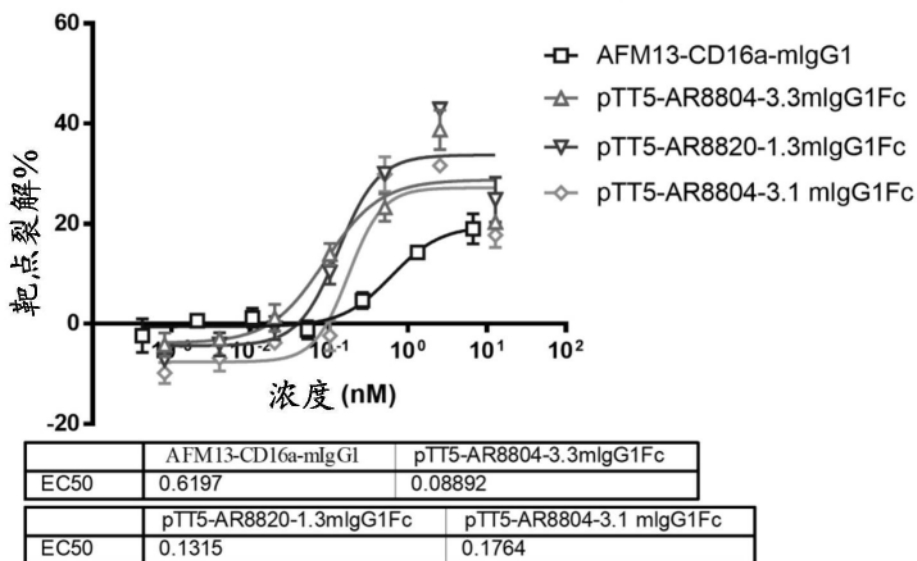


图12

人源化 sdAb CD16a Cyno 结合测试, FACS

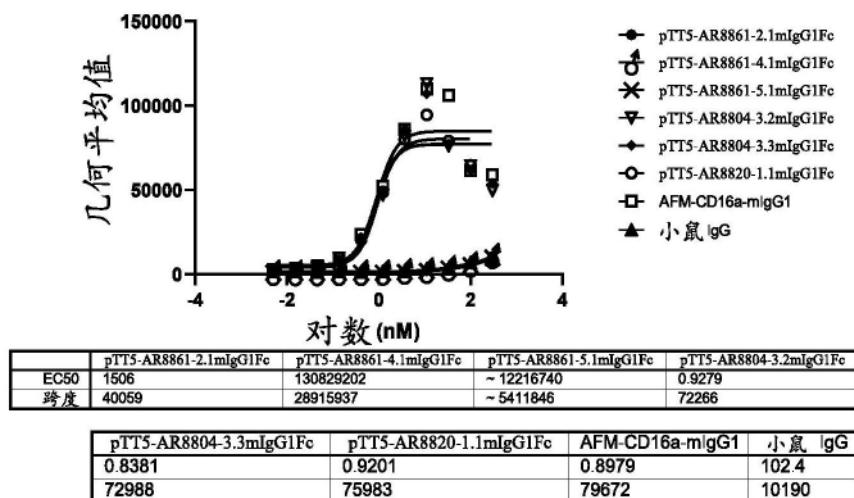


图13A

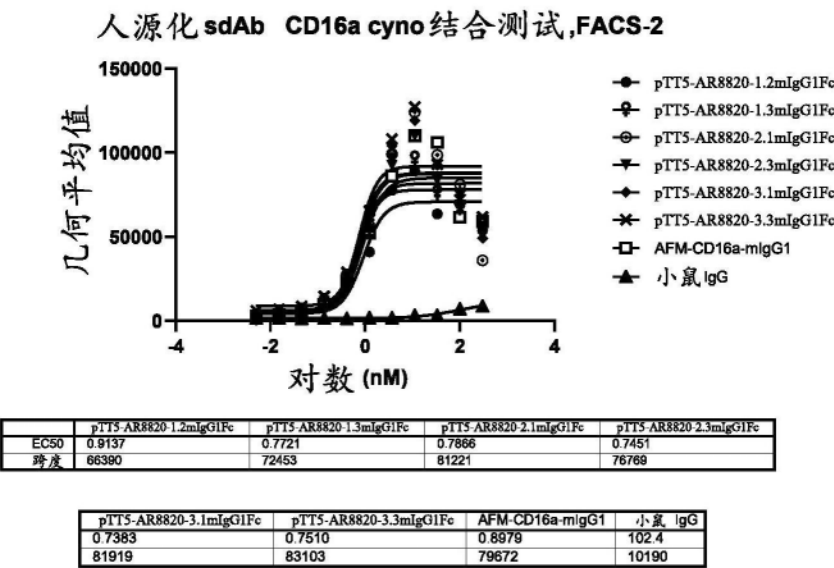


图13B