(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118924895 A
(43)申请公布日 2024.11.12

(21)申请号 202410920352.2

(22)申请日 2020.08.28

(30)优先权数据
62/894,047 2019.08.30 US
62/895,320 2019.09.03 US
62/916,935 2019.10.18 US

(62)分案原申请数据
202080075846.5 2020.08.28

(71)申请人 蜻蜓疗法股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州沃尔瑟姆第三大道180号六层

(72)发明人 格雷戈里·P·常 安·F·张 让-玛丽·库勒洛特 阿斯亚·格林贝格 威廉·哈尼 克里斯托弗·瑞安·摩根 迈克尔·C·奈尔 尼古拉·瓦格曼 罗尼·魏 斯蒂芬·奥尼尔 丹尼尔·法伦

(74)专利代理机构 北京市立方律师事务所 11330
专利代理师 杨剑

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61K 47/22(2006.01)
A61K 47/26(2006.01)
A61K 47/18(2017.01)
A61K 9/08(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)
C07K 16/32(2006.01)

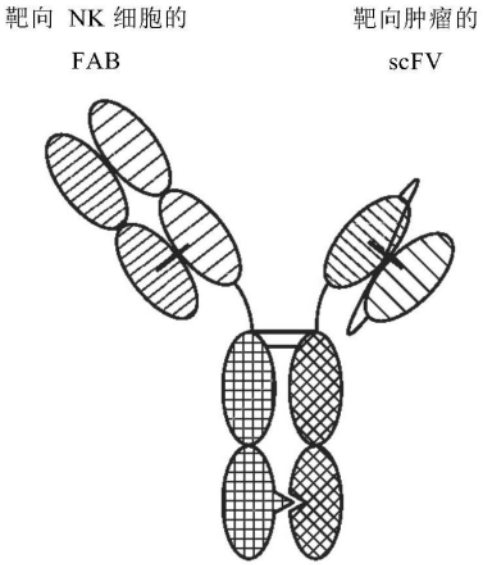
权利要求书2页 说明书73页
序列表（电子公布） 附图16页

(54)发明名称

用于癌症治疗的结合HER2、NKG2D和CD16的多特异性结合蛋白的药物制剂和剂量方案

(57)摘要

本公开涉及用于多特异性结合蛋白的药物制剂，所述多特异性结合蛋白具有结合表皮生长因子受体2(ErbB2或HER2)的scFv、结合NKG2D的Fab和抗体Fc结构域。还提供了此类多特异性结合蛋白和药物制剂用于治疗癌症例如局部晚期或转移性实体肿瘤的剂量方案。



CN 118924895 A

1.一种多特异性结合蛋白在制备用于在初始的4周治疗周期中在第1天、第8天和第15天但不在第22天,并在一个或多个后续的4周治疗周期中的每个后续治疗周期中的第1天和第15天,治疗有需要的受试者中癌症的药物中的用途,其中所述多特异性结合蛋白包含:

(a)结合NKG2D的Fab;

(b)结合HER2的scFv;和

(c)结合CD16的抗体Fc结构域。

2.根据权利要求1所述的用途,其中所述多特异性结合蛋白以选自由5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg和20mg/kg的每次剂量组成的组中的量通过静脉输注给药。

3.根据权利要求1所述的用途,其中所述治疗还包括向所述受试者给药抗PD-1抗体。

4.根据权利要求1所述的用途,其中按照ASCO/CAP指南,所述癌症是HER2阳性的。

5.根据权利要求1所述的用途,其中所述癌症是局部晚期或转移性实体肿瘤。

6.根据权利要求1所述的用途,其中当通过免疫组织化学测定时,所述癌症中的HER2水平被评分为3+。

7.根据权利要求1所述的用途,其中当通过免疫组织化学测定时,所述癌症中的HER2水平被评分为2+或3+。

8.根据权利要求7所述的用途,其中所述癌症具有ERBB2基因的扩增。

9.根据权利要求1所述的用途,其中所述癌症具有ERBB2基因的扩增。

10.根据权利要求6或8所述的用途,其中所述癌症是胃癌。

11.根据权利要求6或8所述的用途,其中所述癌症是食道癌。

12.根据权利要求6或8所述的用途,其中所述癌症是乳腺癌。

13.根据权利要求1所述的用途,其中所述Fab包含:

(a)重链可变结构域,其包含分别由SEQ ID NO:168、96和169的氨基酸序列表示的CDR1、CDR2和CDR3序列;并且

(b)轻链可变结构域,其包含分别由SEQ ID NO:99、100和101的氨基酸序列表示的CDR1、CDR2和CDR3序列。

14.根据权利要求13所述的用途,其中所述Fab的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:94至少90%同一性的氨基酸序列,并且所述Fab的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:98至少90%同一性的氨基酸序列。

15.根据权利要求1所述的用途,其中所述scFv包含:

(a)重链可变结构域,其包含分别由SEQ ID NO:115、116和117的氨基酸序列表示的CDR1、CDR2和CDR3序列;并且

(b)轻链可变结构域,其包含分别由SEQ ID NO:119、120和121的氨基酸序列表示的CDR1、CDR2和CDR3序列。

16.根据权利要求15所述的用途,其中所述scFv的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:195至少90%同一性的氨基酸序列,并且所述scFv的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:196至少90%同一性的氨基酸序列。

17.根据权利要求15所述的用途,其中所述scFv的轻链可变结构域通过包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列的柔性连接物连接到所述scFv的重链可变结构域的N-端。

18.根据权利要求15所述的用途,其中所述scFv的重链可变结构域包含位于第44位的

半胱氨酸残基,所述scFv的轻链可变结构域包含位于第100位的半胱氨酸残基,氨基酸位置按照Kabat编号,并且其中这两个半胱氨酸残基形成二硫键。

19.根据权利要求1所述的用途,其中所述抗体Fc结构域包含连接到所述Fab的重链部分的第一抗体Fc序列和通过包含Ala-Ser的铰链连接到所述scFv的第二抗体Fc序列,并且其中所述第一和第二抗体Fc序列包含不同的促进异二聚化的突变。

20.根据权利要求19所述的用途,其中所述第一和第二抗体Fc序列各自包含人类IgG1抗体的铰链和CH2结构域。

21.根据权利要求1所述的用途,其中所述多特异性结合蛋白包含:

(a)包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列的第一多肽;

(b)包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的第二多肽;和

(c)包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的第三多肽。

22.一种药物制剂,其包含:

(a)多特异性结合蛋白,其包含:

(i)结合NKG2D的Fab;

(ii)结合HER2的单链可变片段(scFv);和

(iii)抗体Fc结构域;

(b)组氨酸;

(c)糖或糖醇;和

(d)聚山梨醇酯,

并具有5.5至6.5的pH。

用于癌症治疗的结合HER2、NKG2D和CD16的多特异性结合蛋白的药物制剂和剂量方案

[0001] 分案申请

[0002] 本申请是申请号为202080075846.5、申请日为2020年08月28日、发明名称为“用于癌症治疗的结合HER2、NKG2D和CD16的多特异性结合蛋白的药物制剂和剂量方案”的中国发明专利申请的分案申请。

[0003] 与相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求2019年8月30日提交的美国临时专利申请No.62/894,047、2019年9月3日提交的美国临时专利申请No.62/895,320和2019年10月18日提交的美国临时专利申请No.62/916,935的利益和优先权,每个所述临时申请的公开内容为所有目的整体通过参考并入本文。

[0005] 序列表

[0006] 本申请含有以ASCII格式电子提交并整体通过参考并入本文的序列表。所述在2020年8月27日生成的ASCII拷贝被命名为DFY-078WO_SL.txt,大小为194,972个字节。

技术领域

[0007] 本公开总的来说涉及具有结合表皮生长因子受体2(ErbB2或HER2)的单链可变片段(scFv)、结合NKG2D的Fab和抗体Fc结构域的多特异性结合蛋白的药物制剂,以及此类多特异性结合蛋白和药物制剂用于治疗癌症例如局部晚期或转移性实体肿瘤的剂量方案。

背景技术

[0008] 尽管在文献中已报道了治疗癌症的大量研究尝试和科学进展,但这种疾病依然是显著的健康问题。正在开发癌症免疫疗法,以利用患者自身的免疫系统促进癌细胞的破坏。被癌症免疫疗法激活的免疫细胞包括T细胞和自然杀伤(NK)细胞。例如,设计了双特异性T-细胞衔接物以引导T-细胞对抗肿瘤细胞,从而对所述肿瘤细胞产生细胞毒性。也已创造了结合NK细胞和肿瘤相关抗原(TAA)的双特异性抗体,用于癌症治疗(参见例如WO 2016/134371)。

[0009] HER2是表皮生长因子受体家族中的一种跨膜糖蛋白。它是一种受体酪氨酸激酶,并调控细胞存活、增殖和生长。HER2在人类恶性肿瘤中发挥重要作用。在大约30%的人类乳腺癌中ERBB2基因被扩增或过表达。具有HER2过表达的乳腺癌的患者与具有不过表达HER2的癌症的患者相比,具有实质上更低的总体生存率和更短的无病间期。此外,HER2的过表达导致乳腺癌转移的增加。已知HER2的过表达也发生在许多其他癌症类型中,包括卵巢、食管、膀胱和胃癌、唾液腺导管癌、肺腺癌和侵蚀性子宫癌,例如子宫浆液性内膜癌。

[0010] 已研究了结合HER2和一种或多种免疫细胞表面蛋白的多特异性结合蛋白。例如,WO 2018/152518描述了结合HER2、NKG2D和CD16的多特异性结合蛋白。本公开对这些开发做出了补充,并提供了使用特异性靶向HER2的癌症免疫疗法以所需的安全性和效能治疗患者的临床方法,包括剂量方案。此外,本公开通过提供包含此类癌症免疫疗法的足够稳定且适

合于给药到患者的制剂,对所述领域中的早期开发做出了补充。

发明内容

[0011] 本公开提供了包含多特异性结合蛋白的药物制剂,所述多特异性结合蛋白具有结合HER2的scFv、结合NKG2D的Fab和抗体Fc结构域,所述制剂中的成分为所述多特异性结合蛋白的稳定进行了优化。还提供了在治疗癌症例如局部晚期或转移性实体肿瘤中使用所述多特异性结合蛋白和药物制剂的剂量方案。

[0012] 因此,一方面,本公开提供了一种pH为5.5至6.5的药物制剂,其包括组氨酸、聚山梨醇酯、糖或糖醇和包含抗体Fc结构域、结合NKG2D的Fab和结合HER2的单链可变片段(scFv)的多特异性结合蛋白。

[0013] 在某些实施方式中,所述药物制剂中组氨酸的浓度为10至25mM。在某些实施方式中,所述药物制剂中组氨酸的浓度为约20mM。

[0014] 在某些实施方式中,所述糖或糖醇是二糖。在某些实施方式中,所述二糖是蔗糖。在某些实施方式中,所述糖或糖醇是衍生自单糖的糖醇。在某些实施方式中,所述衍生自单糖的糖醇是山梨糖醇。在某些实施方式中,所述药物制剂中所述糖或糖醇的浓度为200至300mM。在某些实施方式中,所述药物制剂中糖或糖醇的浓度为约250mM。

[0015] 在某些实施方式中,所述聚山梨醇酯是聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,所述药物制剂中聚山梨醇酯80的浓度为0.005%至0.05%。在某些实施方式中,所述药物制剂中聚山梨醇酯80的浓度为约0.01%。

[0016] 在某些实施方式中,所述药物制剂中NaCl如果存在的话,其浓度为约10mM或更低。在某些实施方式中,所述药物制剂中NaCl如果存在的话,其浓度为约1mM或更低。

[0017] 在某些实施方式中,所述药物制剂的pH为5.8至6.2。在某些实施方式中,所述药物制剂的pH为5.95至6.05。

[0018] 在某些实施方式中,所述药物制剂中所述多特异性结合蛋白的浓度为约10至约20mg/mL。

[0019] 在某些实施方式中,当通过体积排阻色谱法测定时,在50℃温育3周后超过94%的所述多特异性结合蛋白具有天然构象。在某些实施方式中,当通过体积排阻色谱法测定时,在50℃温育3周后少于4%的所述多特异性结合蛋白形成高分子量复合物。

[0020] 另一方面,本公开提供了本文公开的药物制剂在治疗癌症中的用途。在某些实施方式中,所述药物制剂在使用之前用0.9% NaCl溶液稀释。

[0021] 另一方面,本公开提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括在初始的4周治疗周期中,在第1天、第8天和第15天向有需要的受试者给药多特异性结合蛋白,其中所述多特异性结合蛋白包含:(a)结合NKG2D的Fab;(b)结合HER2的scFv;和(c)抗体Fc结构域。

[0022] 在某些实施方式中,所述方法还包括在所述初始治疗周期后,在一个或多个后续的4周治疗周期中向所述受试者给药所述多特异性结合蛋白,其中在每个后续治疗周期中所述多特异性结合蛋白在第1天和第15天给药。在某些实施方式中,每个所述药剂包含选自5.2×10^{-5}mg/kg、1.6×10^{-4}mg/kg、5.2×10^{-4}mg/kg、1.6×10^{-3}mg/kg、5.2×10^{-3}mg/kg、1.6×10^{-2}mg/kg、5.2×10^{-2}mg/kg、1.6×10^{-1}mg/kg、0.52mg/kg、1mg/kg、1.6mg/kg、5.2mg/kg、10mg/kg、20mg/kg和50mg/kg的量的所述多特异性结合蛋白。在某些实施方式中,所述多特

异性结合蛋白通过静脉输注给药。

[0023] 在某些实施方式中,所述多特异性结合蛋白被用作单一疗法。

[0024] 在某些实施方式中,所述方法还包括向所述受试者给药抗PD-1抗体。在某些实施方式中,所述抗PD-1抗体是派姆单抗。在某些实施方式中,在所述初始治疗周期的第1天给药200mg的派姆单抗。在某些实施方式中,如果所述受试者接受一个或多个后续治疗周期,则在所述后续治疗周期中每三周一次给药200mg的派姆单抗。

[0025] 在某些实施方式中,当通过免疫组织化学测定时,所述癌症是HER2阳性的。在某些实施方式中,当通过免疫组织化学测定时,所述癌症中的HER2水平被评分为至少1+。在某些实施方式中,所述癌症中的HER2水平被评分为2+或3+。在某些实施方式中,所述癌症中的HER2水平被评分为3+。

[0026] 在某些实施方式中,所述癌症具有ERBB2基因的扩增。在某些实施方式中,所述ERBB2基因扩增通过荧光原位杂交来确定。在某些实施方式中,所述ERBB2基因扩增通过DNA测序来确定。

[0027] 在某些实施方式中,所述癌症是实体肿瘤。在某些实施方式中,所述癌症是局部晚期或转移性实体肿瘤。在某些实施方式中,所述癌症选自胃癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈癌、胆道癌、成胶质细胞瘤、肉瘤、子宫癌、宫颈癌、卵巢癌、食道癌、皮肤鳞状细胞癌、前列腺癌、唾液腺癌、乳腺癌、胰腺癌和胆囊癌。在某些实施方式中,所述癌症是尿路上皮膀胱癌或转移性乳腺癌。

[0028] 下述特点可以被并入到上文叙述的任一实施方式中:

[0029] 在某些实施方式中,所述Fab包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中(a)所述重链可变结构域包含分别由SEQ ID NOs:168、96和188的氨基酸序列表示的互补决定区1(CDR1)、互补决定区2(CDR2)和互补决定区3(CDR3)序列;并且(b)所述轻链可变结构域包含分别由SEQ ID NOs:99、100和101的氨基酸序列表示的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0030] 在某些实施方式中,(a)所述重链可变结构域包含分别由SEQ ID NOs:168、96和169的氨基酸序列表示的CDR1、CDR2和CDR3序列;并且(b)所述轻链可变结构域包含分别由SEQ ID NOs:99、100和101的氨基酸序列表示的CDR1、CDR2和CDR3序列。在某些实施方式中,所述Fab的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:94至少90%同一性的氨基酸序列,并且所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:98至少90%同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述Fab的重链可变结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列,并且所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列。

[0031] 在某些实施方式中,所述scFv包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中(a)所述重链可变结构域包含分别由SEQ ID NOs:115、116和117的氨基酸序列表示的CDR1、CDR2和CDR3序列;并且(b)所述轻链可变结构域包含分别由SEQ ID NOs:119、120和121的氨基酸序列表示的CDR1、CDR2和CDR3序列。在某些实施方式中,所述scFv的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:195至少90%同一性的氨基酸序列,并且所述scFv的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:196至少90%同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述scFv的重链可变结构域包含SEQ ID NO:195的氨基酸序列,并且所述scFv的轻链可变结构域包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列。

[0032] 在某些实施方式中,所述scFv的轻链可变结构域通过柔性连接物连接到所述scFv

的重链可变结构域。在某些实施方式中,所述柔性连接物包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述柔性连接物由SEQ ID NO:143的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,所述scFv的轻链可变结构域放置在所述scFv的重链可变结构域的N-端。

[0033] 在某些实施方式中,所述scFv的重链可变结构域与所述scFv的轻链可变结构域形成二硫键。在某些实施方式中,所述二硫键在所述重链可变结构域的C44与所述轻链可变结构域的C100之间形成。

[0034] 在某些实施方式中,所述scFv包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列。

[0035] 在某些实施方式中,所述抗体Fc结构域包含连接到所述Fab的第一抗体Fc序列和连接到所述scFv的第二抗体Fc序列。在某些实施方式中,所述第一抗体Fc序列连接到所述Fab的重链部分。在某些实施方式中,所述scFv通过包含Ala-Ser的铰链连接到所述第二抗体Fc序列。

[0036] 在某些实施方式中,所述第一和第二抗体Fc序列各自包含人类IgG1抗体的铰链和CH2结构域。在某些实施方式中,所述第一和第二抗体Fc序列各自包含与野生型人类IgG1抗体的第234-332位氨基酸至少90%同一性的氨基酸序列。

[0037] 在某些实施方式中,所述第一和第二抗体Fc序列包含不同的促进异二聚化的突变。在某些实施方式中,所述第一抗体Fc序列是包含K360E和K409W替换的人类IgG1 Fc序列。在某些实施方式中,所述第二抗体Fc序列是包含Q347R、D399V和F405T替换的人类IgG1 Fc序列。

[0038] 在某些实施方式中,所述多特异性结合蛋白包含(a)包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列的第一多肽;(b)包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的第二多肽;和(c)包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的第三多肽。

[0039] 本公开的其他实施方式和详情呈现在下文中。

附图说明

[0040] 图1说明了一种三特异性抗体(TriNKET),其含有结合HER2的scFv、靶向NKG2D的Fab和结合CD16的异二聚化抗体Fc结构域(“F3’-TriNKET”格式)。在示例性实施方式中,所述连接到Fab片段的Fc结构域包含突变K360E和K409W,并且所述连接到scFv的Fc结构域包含匹配的突变Q347R、D399V和F405T,用于形成Fc异二聚体(在图1中被显示为Fc结构域中的三角形锁匙格式)。在另一个示例性实施方式中,所述连接到Fab片段的Fc结构域包含突变Q347R、D399V和F405T,并且所述连接到scFv的Fc结构域包含匹配的突变K360E和K409W,用于形成异二聚体。

[0041] 图2A是在50℃温育3周后通过动态光散射(DLS)测量的平均尺寸的相互作用图。图2B是在2-8℃温育3周后通过DLS测量的平均尺寸的相互作用图。

[0042] 图3A是在50℃温育3周后通过DLS测量的单体尺寸的相互作用图。图3B是在2-8℃温育3周后通过DLS测量的单体尺寸的相互作用图。

[0043] 图4A是在50℃温育3周后通过体积排阻色谱法(SEC)确定的主要物质的%的相互作用图。图4B是在2-8℃温育3周后通过SEC确定的主要物质的%的相互作用图。

[0044] 图5A是在50℃温育3周后通过SEC确定的高分子量物质的百分数(%HMW)的相互作用图。图5B是在2-8℃温育3周后通过SEC确定的%HMW的相互作用图。

[0045] 图6A是在50℃温育3周后通过SEC确定的低分子量物质的百分数(%LMW)的相互作用图。图6B是在2-8℃温育3周后通过SEC确定的%LMW的相互作用图。

[0046] 图7A是在50℃温育3周后通过成像毛细管等电聚焦(icIEF)确定的酸性物质的%的相互作用图。图7B是在4-8℃温育3周后通过icIEF为仅仅蔗糖确定的碱性物质的%的相互作用图。

[0047] 图8A是在50℃温育3周后通过icIEF确定的主要物质的%的相互作用图。图8B-8D是在4℃和pH 5.5(图8B)、pH 6.0(图8C)和pH 6.5(图8D)下温育3周后通过icIEF确定的主要物质的%的相互作用图。

[0048] 图9A是在50℃温育3周后通过icIEF确定的碱性物质的%的相互作用图。图9B在2-8℃温育3周后通过icIEF为仅仅蔗糖确定的碱性物质的%的相互作用图。

[0049] 图10A是在50℃温育3周后通过毛细管电泳(CE)确定的纯度的%的相互作用图。图10B是在50℃温育3周后通过CE确定的杂质的%的相互作用图。

[0050] 图11A是在50℃和pH 6.0下温育3周后通过毛细管电泳(非还原型)(CE(NR))确定的主要物质的%的相互作用图。图11B是在2-8℃和pH 6.0下温育3周后通过CE(NR)确定的主要物质的%的相互作用图。

[0051] 图12A是在50℃温育3周后通过CE(NR)确定的%HMW的相互作用图。图12B是在2-8℃温育3周后通过CE(NR)确定的%HMW的相互作用图。

[0052] 图13A是在50℃温育3周后通过CE(NR)为仅仅蔗糖确定的%LMW的相互作用图。图13B是在2-8℃温育3周后通过CE(NR)为仅仅蔗糖确定的%LMW的相互作用图。

[0053] 图14A-14B是临床试验设计的示意图。图14A描述了用于剂量递增阶段的试验设计。图14B描述了用于疗效扩展组群阶段的试验设计。图中使用的缩略语包括:DL＝剂量水平;Combo PD-1＝与派姆单抗的组合疗法;PK＝药代动力学;PD＝药效学;Her2 HIGH＝通过免疫组织化学确定的3+的HER2高表达;MBC HER22+/1+＝具有通过免疫组织化学确定的2+/1+的HER2中/低表达的转移性乳腺癌;UBC 2L/3L＝尿路上皮膀胱癌的第2线/第3线治疗。

详细描述

[0055] 定义

[0056] 为了便于本发明的理解,下文定义了许多术语和短语。

[0057] 当在本文中使用时,没有具体数目的指称意味着“一个或多个”,并包括复数指称物,除非上下文不适合。

[0058] 在本文中使用时,术语“Fab”和“scFv”是指各自包括抗原结合位点的两种不同形式的蛋白质片段。术语“抗原结合位点”是指免疫球蛋白分子的参与抗原结合的部分。在人类抗体中,抗原结合位点由重(“H”)链和轻(“L”)链的N-端可变(“V”)区(其分别也被称为“VH”和“VL”)的氨基酸残基形成。所述重链和轻链的V区内的三个高度趋异的区段被称为“高变区”,它们插入在被称为“构架区”或“FR”的更保守的侧翼区段之间。因此,术语“FR”是指天然存在于免疫球蛋白中的高变区之间并与其相邻的氨基酸序列。在人类抗体分子中,轻链的三个高变区和重链的三个高变区在三维空间中相对于彼此配置,以形成抗原结合表面。所述抗原结合表面与被结合的抗原的三维表面互补,并且每个重链和轻链的三个高变区被称为“互补决定区”或“CDR”。在某些动物例如骆驼和软骨鱼中,抗原结合位点由单一抗

体链形成,提供了“单域抗体”。抗原结合位点可以存在于完整抗体中、抗体的保留了抗原结合表面的抗原结合片段例如Fab中或重组多肽例如scFv中,所述scFv在单一多肽中使用肽连接物将重链可变结构域连接到轻链可变结构域。本文公开的重链或轻链可变区中的所有氨基酸位置均按照Kabat编号系统编号。

[0059] 抗原结合位点的CDR可以通过下述文献中描述的方法来确定:Kabat等,J.Biol.Chem.252,6609-6616(1977);Kabat等,《免疫学重要的蛋白质的序列》(Sequences of protein of immunological interest),(1991);Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);MacCallum等,J.Mol.Biol.262:732-745(1996)。在这些定义下确定的CDR在相互比较时通常包括氨基酸残基的交叠或子集。在某些实施方式中,术语“CDR”是由下述文献所定义的CDR:MacCallum等,J.Mol.Biol.262:732-745(1996)和Martin A.,抗体可变结构域的蛋白质序列和结构分析(Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains),《抗体工程》(Antibody Engineering),Kontermann和Dubel主编,第31章,pp.422-439,Springer-Verlag,Berlin(2001)。在某些实施方式中,术语“CDR”是由下述文献所定义的CDR:Kabat等,J.Biol.Chem.252,6609-6616(1977),和Kabat等,《免疫学重要的蛋白质的序列》(Sequences of protein of immunological interest),(1991)。在某些实施方式中,抗体的重链CDR和轻链CDR使用不同的惯例来定义。例如,在某些实施方式中,重链CDR按照MacCallum(同上)来定义,并且轻链CDR按照Kabat(同上)来定义。CDRH1、CDRH2和CDRH3表示重链的CDR,并且CDRL1、CDRL2和CDRL3表示轻链的CDR。

[0060] 当在本文中使用时,术语“药物制剂”是指活性药剂与惰性或活性载体的组合,使得所述组合物特别适合于体内或离体诊断或治疗用途。

[0061] 当在本文中使用时,术语“受试者”和“患者”是指将要通过本文描述的方法和组合物治疗的生物体。这些生物体优选地包括但不限于哺乳动物(例如鼠科、猿猴、马科、牛科、猪科、灵长类、犬科、猫科动物等),更优选地包括人类。

[0062] 当在本公开中使用时,术语“治疗”和其他语法等同语包括缓解、减轻、改善或预防疾病、病症或症状,预防额外的症状,改善或预防症状的潜在代谢原因,抑制疾病或病症例如阻止疾病或病症的发展,缓解疾病或病症,导致疾病或病症消退,缓解由疾病或病症引起的病症,或停止疾病或病症的症状,并旨在包括预防。所述术语还包括实现治疗益处和/或预防益处。治疗益处是指正在治疗的潜在障碍的根除或改善。此外,治疗益处通过与潜在障碍相关的一种或多种生理症状的根除或改善来实现,从而在患者中观察到改善,尽管所述患者可能仍患有所述潜在障碍。

[0063] 术语“约”是指药剂的浓度或量的任何极小变化,其不改变所述药剂在制剂制备和疾病或障碍的治疗中的功效。在某些实施方式中,术语“约”可以包括指定数值或数据点的±5%、±10%或±15%。

[0064] 在本公开中,范围可以被表示为从“约”一个特定值和/或至“约”另一个特定值。当表述这种范围时,另一种情况包括从所述一个特定值和/或至所述另一个特定值。类似地,当通过使用先行词“约”将值表示为近似值时,应该理解所述特定值形成了另一种情况。还应该理解,每个所述范围的端点在与另一个端点相关联和独立于另一个端点两种情况下都是重要的。还应该理解,在本公开中公开了多个值,并且每个值除了所述值本身之外,还被公开为“约”该特定值。还应该理解,在整个本申请中,数据以多种不同格式提供,并且该数

据表示端点和起点以及所述数据点的任何组合的范围。例如,如果公开了特定数据点“10”和特定数据点“15”,则应该理解,除了10至15之间以外,认为也公开了大于、大于或等于、小于、小于或等于和等于10和15。还应该理解,两个特定单位之间的每个单位也被公开。例如,如果公开了10和15,则11、12、13和14也被公开。

[0065] 在整个说明书中,在组合物被描述为具有、包括或包含特定组分时,或在过程和方法被描述为具有、包括或包含特定步骤时,设想了另外还存在基本上由所叙述的组分组成或由所叙述的组分组成的本发明的组合物,并且还存在基本上由所叙述的过程步骤组成或由所叙述的过程步骤组成的符合本发明的过程和方法。

[0066] 一般来说,除非另有规定,否则规定百分率的组成是以重量计的。此外,如果变量不伴有定义,则以所述变量的以前的定义为准。

[0067] 多特异性结合蛋白

[0068] 本公开提供了包含多特异性结合蛋白的药物制剂,所述多特异性结合蛋白具有结合HER2的scFv、结合NKG2D的Fab和抗体Fc结构域,所述制剂中的成分为所述多特异性结合蛋白的稳定而被优化。还提供了在治疗癌症例如局部晚期或转移性实体肿瘤中使用所述多特异性结合蛋白和药物制剂的剂量方案。所述多特异性结合蛋白能够结合癌细胞上的HER2和自然杀伤细胞上的NKG2D和CD16。这种结合将所述癌细胞带到自然杀伤细胞附近,促进了所述癌细胞被所述自然杀伤细胞的直接和间接破坏。

[0069] 所述多特异性结合蛋白的第一组分结合到表达NKG2D受体的细胞,所述细胞可以包括但不限于NK细胞、NKT细胞、γδT细胞和$CD8^+$αβT细胞。在NKG2D结合后,所述多特异性结合蛋白可以阻断天然配体例如ULBP6和MICA结合到NKG2D并激活NK细胞。所述多特异性结合蛋白的第二组分结合到表达HER2的细胞,所述细胞可以包括但不限于乳腺癌、卵巢癌、食道癌、膀胱癌和胃癌、唾液腺导管癌、肺腺癌和子宫癌的攻击性形式例如子宫浆液性内膜癌的细胞。所述多特异性结合蛋白的第三组分是抗体Fc结构域,其结合到表达CD16的细胞例如NK细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞和滤泡树突状细胞。

[0070] 本文描述的多特异性结合蛋白可以采取各种不同的格式。例如,一种格式涉及包括第一免疫球蛋白重链、第二免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链的异二聚体多特异性抗体(图1)。所述第一免疫球蛋白重链包括通过连接物或抗体铰链融合到Fab的重链部分的第一抗体Fc序列(铰链-CH2-CH3),所述Fab的重链部分包括重链可变结构域和CH1结构域。所述免疫球蛋白轻链包括Fab的轻链部分,其包括轻链可变结构域和轻链恒定结构域(CL),其中所述Fab片段的重链和轻链部分配对并结合NKG2D。所述第二免疫球蛋白重链包括通过连接物或抗体铰链融合到单链可变片段(scFv)的第二抗体Fc序列(铰链-CH2-CH3),所述scFv由配对并结合HER2的重链可变结构域和轻链可变结构域组成。

[0071] 下面更详细地描述所述多特异性结合蛋白的各个组分。

[0072] NKG2D结合位点

[0073] 在与自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体和癌细胞上的肿瘤相关抗原结合后,所述多特异性结合蛋白可以衔接超过一种NK活化受体,并且可以阻断天然配体与NKG2D的结合。在某些实施方式中,所述蛋白可以在人类中激动NK细胞。在某些实施方式中,所述蛋白可以在人类和其他物种例如啮齿动物和食蟹猴中激动NK细胞。

[0074] 表1列出了相组合可以结合到NKG2D的重链可变结构域和轻链可变结构域的肽序

列。在某些实施方式中,所述重链可变结构域和轻链可变结构域以Fab格式排布。这些结合NKG2D的结构域对NKG2D的结合亲和性可能各不相同,但它们全都激活人类NK细胞。除非另有指明,否则表1中提供的CDR序列均在Kabat下确定。

[0075] 表1.示例性NKG2D结合位点

[0076]

克隆	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
ADI-27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：1） CDR1（SEQ ID NO：3）－ GSFSGYYWS CDR2（SEQ ID NO：4）－ EIDHSGSTNYNPSLKS CDR3（SEQ ID NO：5）－ ARARGPWSFDP	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISS WLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPS RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YNSYPITFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：2）
ADI-27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：6）	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYGSSPITFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：7）
ADI-27740 （A40）	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIG SWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVP

[0077]

克隆	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：8）	SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYHSFYTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：9）
ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：10）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIG SWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVP SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QSNSYYTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：11）
ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：12）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISS WLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPS RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YNSYPTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：13）
ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW GFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：14）	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSISS YLNWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDSATYYCQ QSYDIPYTFGQGTKLEIK （SEQ ID NO：15）
ADI-28226 （C26）	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：16）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISS WLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPS RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YGSFPITFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：17）
ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：18）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISS WLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQ SKEVPWTFGQGTKVEIK （SEQ ID NO：19）
ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：20）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISS WLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPS RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YNSFPTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：21）
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：22）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIG SWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVP SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYDIYPTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：23）
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：24）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISS WLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPS RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YDSYPTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：25）
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：26）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISS WLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPS RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YGSFPTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：27）

[0078]

克隆	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：28）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISS WLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPS RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YQSFPTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：29）
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：30）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISS WLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPS RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YSSFSTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：31）
ADI-29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：32）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISS WLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPS RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YESYSTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：33）
ADI-29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：34）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISS WLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPS RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YDSFITFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：35）
ADI-29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：36）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISS WLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPS RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YQSYPTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：37）
ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：38）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIG SWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVP SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYHSFPTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：39）
ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：40）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIG SWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVP SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYELYSYTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：41）
ADI-29447 （F47）	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：42）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISS WLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPS RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YDTFITFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：43）
ADI-27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARGDSSIR HAYYYYGMDVWGQGTTVTVSS （SEQ ID NO：44） CDR1（SEQ ID NO：45） – GTFSSYAIS（非 Kabat）或 SYAIS（SEQ ID NO：158）	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL YSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQYYSTPITFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：48） CDR1（SEQ ID NO：49） – KSSQSVLYSSNNKNYLA CDR2（SEQ ID NO：50） – WASTRES

[0079]

克隆	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	CDR2（SEQ ID NO：46）－GIIPIFGTANYAQKFQG CDR3（SEQ ID NO：47）－ARGDSSIRHAYYYYGMDV（非 Kabat）或 GDSSIRHAYYYYGMDV（SEQ ID NO：159）	CDR3（SEQ ID NO：51）－QQYYSTPIT
ADI-29443（F43）	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGSDRFHPYFDYWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO：52） CDR1（SEQ ID NO：53）－GSISSSSYYWG（非 Kabat）或 SSSYYWG（SEQ ID NO：160） CDR2（SEQ ID NO：54）－SIYYSGSTYYNPSLKS CDR3（SEQ ID NO：55）－ARGSDRFHPYFDY（非 Kabat）或 GSDRFHPYFDY（SEQ ID NO：161）	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQFDTWPPTFGGGTKVEIK（SEQ ID NO：56） CDR1（SEQ ID NO：57）－RASQSVSRYLA CDR2（SEQ ID NO：58）－DASNRAT CDR3（SEQ ID NO：59）－QQFDTWPPT
ADI-29404（F04）	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPWSFDPWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO：60）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCEQYDSYPTFGGGTKVEIK（SEQ ID NO：61）
ADI-28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGRKASGSFYYYYGMDVWGQGTTVTVSS（SEQ ID NO：62） CDR1（SEQ ID NO：63）－GTFSSYAIS（非 Kabat）或 SYAIS（SEQ ID NO：158） CDR2（SEQ ID NO：64）－GIIPIFGTANYAQKFQG CDR3（SEQ ID NO：65）－ARRGRKASGSFYYYYGMDV	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK（SEQ ID NO：66） CDR1（SEQ ID NO：67）－ESSQSLLNSGNQKNYLT CDR2（SEQ ID NO：68）－WASTRES CDR3（SEQ ID NO：69）－QNDYSYPYT
ADI-29379（E79）	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGAPNYGDTTHDYYYMDVWGKGTTVTVSS（SEQ ID NO：70） CDR1（SEQ ID NO：71）－YTFTSYYMH（非 Kabat）或 SYYMH（SEQ ID NO：162） CDR2（SEQ ID NO：72）－IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3（SEQ ID NO：73）－ARGAPNYGDTTHDYYYMDV（非 Kabat）或 GAPNYGDTTHDYYYMDV（SEQ ID NO：163）	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDDWPFTFGGGTKVEIK（SEQ ID NO：74） CDR1（SEQ ID NO：75）－RASQSVSSNLA CDR2（SEQ ID NO：76）－GASTRAT CDR3（SEQ ID NO：77）－QQYDDWPFT
ADI-29463（F63）	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMG	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPA

[0080]

克隆	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	WINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDTGEYYDTDDHGMDVWGQGTTVTVSS（SEQ ID NO：78） CDR1（SEQ ID NO：79）-YTFTGYYMH（非 Kabat）或 GYYMH（SEQ ID NO：164） CDR2（SEQ ID NO：80）-WINPNSGGTNYAQKFQG CDR3（SEQ ID NO：81）–ARDTGEYYDTDDHGMDV（非 Kabat）或 DTGEYYDTDDHGMDV（SEQ ID NO：165）	RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQDDYWPPTFGGGTKVEIK（SEQ ID NO：82） CDR1（SEQ ID NO：75）- RASQSVSSNLA CDR2（SEQ ID NO：76）- GASTRAT CDR3（SEQ ID NO：85）- QQDDYWPPT
ADI-27744（A44）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGGYYDSGAGDYWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO：86） CDR1（SEQ ID NO：87）-FTFSSYAMS（非 Kabat）或 SYAMS（SEQ ID NO：166） CDR2（SEQ ID NO：88）-AISGSGGSTYYADSVKG CDR3（SEQ ID NO：89）–AKDGGYYDSGAGDY（非 Kabat）或 DGGYYDSGAGDY（SEQ ID NO：167）	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIDSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSYPRTFGGGTKVEIK（SEQ ID NO：90） CDR1（SEQ ID NO：91）- RASQGIDSWLA CDR2（SEQ ID NO：92）- AASSLQS CDR3（SEQ ID NO：93）- QQGVSYPRT
ADI-27749（A49）	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO：94） CDR1（SEQ ID NO：95）-FTFSSYSMN（非 Kabat）或 SYSMN（SEQ ID NO：168） CDR2（SEQ ID NO：96）-SISSSSSYIYYADSVKG CDR3（SEQ ID NO：97）–ARGAPMGAAAGWFDP（非 Kabat）或 GAPMGAAAGWFDP（SEQ ID NO：169）	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK（SEQ ID NO：98） CDR1（SEQ ID NO：99）- RASQGISSWLA CDR2（SEQ ID NO：100）- AASSLQS CDR3（SEQ ID NO：101）- QQGVSFPRT
ADI-29378（E78）	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGAGFAYGMDYYYMDVWGKGTTVTVSS（SEQ ID NO：102） CDR1（SEQ ID NO：71）–YTFTSYYMH（非 Kabat）或 SYYMH（SEQ ID NO：162） CDR2（SEQ ID NO：72）-IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3（SEQ ID NO：105）–AREGAGFAYGMDYYYMDV（非 Kabat）或 EGAGFAYGMDYYYMDV	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSDNWPFTFGGGTKVEIK（SEQ ID NO：106） CDR1（SEQ ID NO：107）- RASQSVSSYLA CDR2（SEQ ID NO：108）- DASNRAT CDR3（SEQ ID NO：109）- QQSDNWPFT

[0081]

克隆	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	（SEQ ID NO：170）	
A49MI	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP**I**GA AAGWFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：144） CDR1（SEQ ID NO：95）- FTFSSYSMN（非 Kabat）或 SYSMN（SEQ ID NO：168） CDR2（SEQ ID NO：96）- SISSSSSYIYYADSVKG CDR3:（非 Kabat）ARGAP**I**GAAAGWFDP（SEQ ID NO：172）或 GAP**I**GAAAGWFDP（SEQ ID NO：173）	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIS SWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGVSFPRTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：98） CDR1（SEQ ID NO：99）- RASQGISSWLA CDR2（SEQ ID NO：100）- AASSLQS CDR3（SEQ ID NO：101）- QQGVSFPRT
A49MQ	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP**Q**G AAAGWFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：174） CDR1（SEQ ID NO：95）- FTFSSYSMN（非 Kabat）或 SYSMN（SEQ ID NO：168） CDR2（SEQ ID NO：96）- SISSSSSYIYYADSVKG CDR3（非 Kabat）（SEQ ID NO：175）- ARGAP**Q**GAAAGWFDP 或 CDR3（SEQ ID NO：176）- GAP**Q**GAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIS SWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGVSFPRTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：98） CDR1（SEQ ID NO：99）- RASQGISSWLA CDR2（SEQ ID NO：100）- AASSLQS CDR3（SEQ ID NO：101）- QQGVSFPRT
A49ML	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP**L**GA AAGWFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：177） CDR1（SEQ ID NO：95）- FTFSSYSMN（非 Kabat）或 SYSMN（SEQ ID NO：168） CDR2（SEQ ID NO：96）- SISSSSSYIYYADSVKG CDR3（非 Kabat）（SEQ ID NO：178）- ARGAP**L**GAAAGWFDP 或 CDR3（SEQ ID NO：179）- GAP**L**GAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIS SWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGVSFPRTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：98） CDR1（SEQ ID NO：99）- RASQGISSWLA CDR2（SEQ ID NO：100）- AASSLQS CDR3（SEQ ID NO：101）- QQGVSFPRT
A49MF	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP**F**GA AAGWFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：180） CDR1（SEQ ID NO：95）- FTFSSYSMN（非 Kabat）或 SYSMN（SEQ ID NO：168） CDR2（SEQ ID NO：96）-	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIS SWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGVSFPRTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：98） CDR1（SEQ ID NO：99）- RASQGISSWLA CDR2（SEQ ID NO：100）- AASSLQS CDR3（SEQ ID NO：101）- QQGVSFPRT

[0082]

克隆	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	SISSSSSYIYYADSVKG CDR3（非 Kabat）（SEQ ID NO：181） - ARGAPFGAAAGWFDP 或 CDR3(SEQ ID NO：182) - GAPFGAAAGWFDP	
A49MV	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPVGA AAGWFDPWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：183） CDR1（SEQ ID NO：95）- FTFSSYSMN（非 Kabat）或 SYSMN（SEQ ID NO：168） CDR2（SEQ ID NO：96）- SISSSSSYIYYADSVKG CDR3（非 Kabat）（SEQ ID NO：184） - ARGAPVGAAAGWFDP 或 CDR3(SEQ ID NO：185) - GAPVGAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIS SWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGVSFPRTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：98） CDR1（SEQ ID NO：99）- RASQGISSWLA CDR2（SEQ ID NO：100）- AASSLQS CDR3（SEQ ID NO：101）- QQGVSFPRT
A49-共有序列	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPXGA AAGWFDPWGQGTLVTVSS, 其中 X 是 M、L、I、V、Q 或 F （SEQ ID NO：186） CDR1（SEQ ID NO：95）- FTFSSYSMN（非 Kabat）或 SYSMN（SEQ ID NO：168） CDR2（SEQ ID NO：96）- SISSSSSYIYYADSVKG CDR3（非 Kabat）（SEQ ID NO：187） - ARGAPXGAAAGWFDP 或 CDR3(SEQ ID NO：188) – GAPXGAAAGWFDP, 其中 X 是 M、L、I、V、Q 或 F	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIS SWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGVSFPRTFGGGTKVEIK （SEQ ID NO：98） CDR1（SEQ ID NO：99）- RASQGISSWLA CDR2（SEQ ID NO：100）- AASSLQS CDR3（SEQ ID NO：101）- QQGVSFPRT
US 9,273,136 中的 NKG2D 结合物	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFI RYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRG LGDGTYFDYWGQGTTVTVSS(SEQ ID NO：110)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGN NAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLLPSGV SDRFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYC AAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL（SEQ ID NO：111）
US 7,879,985 中的 NKG2D 结合物	QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSD DSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISY SGSANYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIW GQGTMVTVSS（SEQ ID NO：112）	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYGSSPWTFGQGTKVEIK（SEQ ID NO：113）

[0083] 在某些实施方式中,所述Fab包含与SEQ ID NO:94相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:98相关的轻链可变结构域。例如,所述所述Fab的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:94至少90％(例如90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:94的CDR1(SEQ ID NO:95或168)、CDR2(SEQ ID NO:96)和CDR3(SEQ ID NO:97或169)序列相同的氨基酸序列。同样地,所述Fab的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:98至少90％(例如90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:98的CDR1(SEQ ID NO:99)、CDR2(SEQ ID NO:100)和CDR3(SEQ ID NO:101)序列相同的氨基酸序列。

[0084] 在某些实施方式中,所述Fab包含与SEQ ID NO:144相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:98相关的轻链可变结构域。例如,所述Fab的重链可变结构域可以SEQ ID NO:144与至少90％(例如90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同

一性,和/或并入与SEQ ID NO:144的CDR1(SEQ ID NO:95或168)、CDR2(SEQ ID NO:96)和CDR3(SEQ ID NO:172或173)序列相同的氨基酸序列。同样地,所述Fab的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:98至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:98的CDR1(SEQ ID NO:99)、CDR2(SEQ ID NO:100)和CDR3(SEQ ID NO:101)序列相同的氨基酸序列。

[0085] 在某些实施方式中,所述Fab包含与SEQ ID NO:174相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:98相关的轻链可变结构域。例如,所述Fab的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:174至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:174的CDR1(SEQ ID NO:95或168)、CDR2(SEQ ID NO:96)和CDR3(SEQ ID NO:175或176)序列相同的氨基酸序列。同样地,所述Fab的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:98至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:98的CDR1(SEQ ID NO:99)、CDR2(SEQ ID NO:100)和CDR3(SEQ ID NO:101)序列相同的氨基酸序列。

[0086] 在某些实施方式中,所述Fab包含与SEQ ID NO:177相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:98相关的轻链可变结构域。例如,所述Fab的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:177至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:177的CDR1(SEQ ID NO:95或168)、CDR2(SEQ ID NO:96)和CDR3(SEQ ID NO:178或179)序列相同的氨基酸序列。同样地,所述Fab的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:98至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:98的CDR1(SEQ ID NO:99)、CDR2(SEQ ID NO:100)和CDR3(SEQ ID NO:101)序列相同的氨基酸序列。

[0087] 在某些实施方式中,所述Fab包含与SEQ ID NO:180相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:98相关的轻链可变结构域。例如,所述Fab的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:180至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:180的CDR1(SEQ ID NO:95或168)、CDR2(SEQ ID NO:96)和CDR3(SEQ ID NO:181或182)序列相同的氨基酸序列。同样地,所述Fab的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:98至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:98的CDR1(SEQ ID NO:99)、CDR2(SEQ ID NO:100)和CDR3(SEQ ID NO:101)序列相同的氨基酸序列。

[0088] 在某些实施方式中,所述Fab包含与SEQ ID NO:183相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:98相关的轻链可变结构域。例如,所述Fab的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:183至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:183的CDR1(SEQ ID NO:95或168)、CDR2(SEQ ID NO:96)和CDR3(SEQ ID NO:184或185)序列相同的氨基酸序列。同样地,所述Fab的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:98至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:98的CDR1(SEQ ID NO:99)、CDR2(SEQ ID NO:100)和CDR3(SEQ ID NO:101)序列相同的氨基酸序列。

[0089] 在某些实施方式中,所述Fab包含与SEQ ID NO:186相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:98相关的轻链可变结构域。例如,所述Fab的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:

186至少90％(例如90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:186的CDR1(SEQ ID NO:95或168)、CDR2(SEQ ID NO:96)和CDR3(SEQ ID NO:187或188)序列相同的氨基酸序列。同样地,所述Fab的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:98至少90％(例如90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:98的CDR1(SEQ ID NO:99)、CDR2(SEQ ID NO:100)和CDR3(SEQ ID NO:101)序列相同的氨基酸序列。

[0090] 在某些实施方式中,所述Fab包含与SEQ ID NO:86相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:90相关的轻链可变结构域。例如,所述Fab的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:86至少90％(例如90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:86的CDR1(SEQ ID NO:87或166)、CDR2(SEQ ID NO:88)和CDR3(SEQ ID NO:89或167)序列相同的氨基酸序列。同样地,所述Fab的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:90至少90％(例如90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:90的CDR1(SEQ ID NO:91)、CDR2(SEQ ID NO:92)和CDR3(SEQ ID NO:93)序列相同的氨基酸序列。

[0091] 在某些实施方式中,所述Fab包含与SEQ ID NO:102相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:106相关的轻链可变结构域。例如,所述Fab的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:102至少90％(例如90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:102的CDR1(SEQ ID NO:71或162)、CDR2(SEQ ID NO:72)和CDR3(SEQ ID NO:105或170)序列相同的氨基酸序列。同样地,所述Fab的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:106至少90％(例如90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:106的CDR1(SEQ ID NO:107)、CDR2(SEQ ID NO:108)和CDR3(SEQ ID NO:109)序列相同的氨基酸序列。

[0092] 在某些实施方式中,所述Fab包含与SEQ ID NO:70相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:74相关的轻链可变结构域。例如,所述Fab的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:70至少90％(例如90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:70的CDR1(SEQ ID NO:71或162)、CDR2(SEQ ID NO:72)和CDR3(SEQ ID NO:73或163)序列相同的氨基酸序列。同样地,所述Fab的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:74至少90％(例如90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:74的CDR1(SEQ ID NO:75)、CDR2(SEQ ID NO:76)和CDR3(SEQ ID NO:77)序列相同的氨基酸序列。

[0093] 在某些实施方式中,所述Fab包含与SEQ ID NO:70相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:74相关的轻链可变结构域。例如,所述Fab的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:70至少90％(例如90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:70的CDR1(SEQ ID NO:71或162)、CDR2(SEQ ID NO:72)和CDR3(SEQ ID NO:73或163)序列相同的氨基酸序列。同样地,所述Fab的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:74至少90％(例如90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:74的CDR1(SEQ ID NO:75)、CDR2(SEQ ID NO:76)和CDR3(SEQ ID NO:77)序列相同的氨基酸序列。

[0094] 在某些实施方式中,所述Fab包含与SEQ ID NO:78相关的重链可变结构域和与SEQ

ID NO:82相关的轻链可变结构域。例如,所述Fab的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:78至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:78的CDR1(SEQ ID NO:79或164)、CDR2(SEQ ID NO:80)和CDR3(SEQ ID NO:81或165)序列相同的氨基酸序列。同样地,所述Fab的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:82至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:82的CDR1(SEQ ID NO:75)、CDR2(SEQ ID NO:76)和CDR3(SEQ ID NO:77)序列相同的氨基酸序列。

[0095] 所述多特异性结合蛋白可以结合到表达NKG2D的细胞,所述细胞包括但不限于NK细胞、γδT细胞和$CD8^+$αβT细胞。在结合NKG2D后,所述多特异性结合蛋白可以阻断天然配体例如ULBP6和MICA结合到NKG2D并活化NK细胞。

[0096] 在某些实施方式中,所述Fab或多特异性结合蛋白以K_D为2nM至120nM例如2nM至110nM、2nM至100nM、2nM至90nM、2nM至80nM、2nM至70nM、2nM至60nM、2nM至50nM、2nM至40nM、2nM至30nM、2nM至20nM、2nM至10nM、约15nM、约14nM、约13nM、约12nM、约11nM、约10nM、约9nM、约8nM、约7nM、约6nM、约5nM、约4.5nM、约4nM、约3.5nM、约3nM、约2.5nM、约2nM、约1.5nM、约1nM、约0.5nM至约1nM、约1nM至约2nM、约2nM至3nM、约3nM至4nM、约4nM至约5nM、约5nM至约6nM、约6nM至约7nM、约7nM至约8nM、约8nM至约9nM、约9nM至约10nM、约1nM至约10nM、约2nM至约10nM、约3nM至约10nM、约4nM至约10nM、约5nM至约10nM、约6nM至约10nM、约7nM至约10nM或约8nM至约10nM的亲和性结合到NKG2D。

[0097] 在某些实施方式中,当通过表面等离子体共振测量时,所述Fab以2nM至120nM的K_D结合到NKG2D。在某些实施方式中,当通过表面等离子体共振测量时,所述多特异性结合蛋白以2nM至120nM的K_D结合到NKG2D。在某些实施方式中,当通过表面等离子体共振测量时,所述Fab以10nM至62nM的K_D结合到NKG2D。在某些实施方式中,当通过表面等离子体共振测量时,所述多特异性结合蛋白以10nM至62nM的K_D结合到NKG2D。

[0098] 在某些实施方式中,上述Fab被连接到抗体Fc序列。在某些实施方式中,所述Fab的重链部分连接到抗体Fc序列的N-端。

[0099] HER2结合位点

[0100] 本文公开的多特异性结合蛋白的HER2结合位点包含融合在一起形成scFv的重链可变结构域和轻链可变结构域。表2列出了相组合可以结合到HER2的重链可变结构域和轻链可变结构域的肽序列。

[0101] 表2.示例性HER2结合位点

[0102]

克隆	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
曲妥珠单抗	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO：114） CDR1（SEQ ID NO：115）-GFNIKDT CDR2（SEQ ID NO：116）-YPTNGY CDR3（SEQ ID NO：117）-WGGDGFYAMDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK （SEQ ID NO：118） CDR1（SEQ ID NO：119）-QDVNTAVA CDR2（SEQ ID NO：120）-SASFLYS CDR3（SEQ ID NO：121）-QQHYTTPPT
曲妥珠单抗（scFv 构建物中的 VH 和 VL）	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK***C***LEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO：195） CDR1（SEQ ID NO：115）-GFNIKDT CDR2（SEQ ID NO：116）-YPTNGY CDR3（SEQ ID NO：117）-WGGDGFYAMDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFG***C***GTKVEIK （SEQ ID NO：196） CDR1（SEQ ID NO：119）-QDVNTAVA CDR2（SEQ ID NO：120）-SASFLYS CDR3（SEQ ID NO：121）-QQHYTTPPT
曲妥珠单抗-scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFG*C*GTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK*C*LEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO：139）		
帕妥珠单抗	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSA （SEQ ID NO：122） CDR1（SEQ ID NO：123）-GFTFTDY CDR2（SEQ ID NO：124）-NPNSGG CDR3（SEQ ID NO：125）-NLGPSFYFDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKR （SEQ ID NO：126） CDR1（SEQ ID NO：127）-QDVSIGVA CDR2（SEQ ID NO：128）-SASYRYT CDR3（SEQ ID NO：129）-QQYYIYPYT
帕妥珠单抗（scFv 构建物中的 VH 和 VL）	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGK***C***LEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSA（SEQ ID NO：197） CDR1（SEQ ID NO：123）-GFTFTDY CDR2（SEQ ID NO：124）-NPNSGG CDR3（SEQ ID NO：125）-NLGPSFYFDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFG***C***GTKVEIKR （SEQ ID NO：198） CDR1（SEQ ID NO：127）-QDVSIGVA CDR2（SEQ ID NO：128）-SASYRYT CDR3（SEQ ID NO：129）-QQYYIYPYT
帕妥珠单抗 scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFG*C*GTKVEIKRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGK*C*LEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSA （SEQ ID NO：189）		
MGAH22（US 8,802,093）	QVQLQQSGPELVKPGASLKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIYPTNGYTRYDPKFQDKATITADTSSNT	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPGHSPKLLIYSASFRYTGVPDRFTGSRSGTDFTFTISSV

[0103]

克隆	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	AYLQVSRLTSEDTAVYYCSRWGGDG FYAMDYWGQGASVTVSS （SEQ ID NO：130） CDR1（SEQ ID NO：131）-GFNIKDT CDR2（SEQ ID NO：132）-YPTNGY CDR3（SEQ ID NO：133）-WGGDGFYAMDY	QAEDLAVYYCQQHYTTPPTFGGGTK VEIK （SEQ ID NO：134） CDR1（SEQ ID NO：135）-QDVNTAVA CDR2（SEQ ID NO：136）-SASFRYT CDR3（SEQ ID NO：137）-QQHYTTPPT
MGAH22（scFv 构建物中的 VH 和 VL）	QVQLQQSGPELVKPGASLKLSCTASG FNIKDTYIHWVKQRPEQ**C**LEWIGRIY PTNGYTRYDPKFQDKATITADTSSNT AYLQVSRLTSEDTAVYYCSRWGGDG FYAMDYWGQGASVTVSSA（SEQ ID NO：199） CDR1（SEQ ID NO：131）-GFNIKDT CDR2（SEQ ID NO：132）-YPTNGY CDR3（SEQ ID NO：133）-WGGDGFYAMDY	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKAS QDVNTAVAWYQQKPGHSPKLLIYSA SFRYTGVPDRFTGSRSGTDFTFTISSV QAEDLAVYYCQQHYTTPPTFG**C**GTK VEIKR（SEQ ID NO：200） CDR1（SEQ ID NO：135）-QDVNTAVA CDR2（SEQ ID NO：136）-SASFRYT CDR3（SEQ ID NO：137）-QQHYTTPPT
MGAH22 scFv	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPGHSPKLLIYSASFR YTGVPDRFTGSRSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYTTPPTFG**C**GTKVEIKRG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGPELVKPGASLKLSCTASGFNIKDTYIH WVKQRPEQ**C**LEWIGRIYPTNGYTRYDPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRLTSE DTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGASVTVSSA （SEQ ID NO：171）	

[0104] 或者,可以通过筛选与SEQ ID NO:138所定义的氨基酸序列或其成熟的细胞外片段的结合,来鉴定可以结合到HER2的新的抗原结合位点。

[0105] MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTN

[0106] ASLSFLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGL

[0107] RELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWG E

[0108] SSEDCQSLTRTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNT

[0109] DTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGL

[0110] GMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISA WP

[0111] DSLPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHHNTHLCFVHTVPWDQL F

[0112] RNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREY

[0113] VNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGA

[0114] CQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLL QE

[0115] TELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPK A

[0116] NKEILDEAYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRGRLGSQDLLNWCMQIAK

[0117] GMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKVPIKWMALESILRRRFT

[0118] HQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRF

[0119] RELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEDLGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPG

[0120] AGGMVHHRHRSSSTRSGGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAKGLQSLPTHDPS

[0121] PLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPG

KN

[0122] GVVKDVFAFGGAVENPEYLTPQGGAAPQPHPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV(SEQ ID NO:138)

[0123] 在某些实施方式中,所述scFv包含与SEQ ID NO:195相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:196相关的轻链可变结构域。例如,所述scFv的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:195至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:195的CDR1(SEQ ID NO:115)、CDR2(SEQ ID NO:116)和CDR3(SEQ ID NO:117)序列相同的氨基酸序列。同样地,所述scFv的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:196至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:196的CDR1(SEQ ID NO:119)、CDR2(SEQ ID NO:120)和CDR3(SEQ ID NO:121)序列相同的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述scFv包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列。

[0124] 在某些实施方式中,所述scFv包含与SEQ ID NO:197相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:198相关的轻链可变结构域。例如,所述scFv的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:197至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:197的CDR1(SEQ ID NO:123)、CDR2(SEQ ID NO:124)和CDR3(SEQ ID NO:125)序列相同的氨基酸序列。同样地,所述scFv的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:198至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:198的CDR1(SEQ ID NO:127)、CDR2(SEQ ID NO:128)和CDR3(SEQ ID NO:129)序列相同的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述scFv包含SEQ ID NO:189的氨基酸序列。

[0125] 在某些实施方式中,所述scFv包含与SEQ ID NO:199相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:200相关的轻链可变结构域。例如,所述scFv的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:199至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:199的CDR1(SEQ ID NO:131)、CDR2(SEQ ID NO:132)和CDR3(SEQ ID NO:133)序列相同的氨基酸序列。同样地,所述scFv的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:200至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或并入与SEQ ID NO:200的CDR1(SEQ ID NO:135)、CDR2(SEQ ID NO:136)和CDR3(SEQ ID NO:137)序列相同的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述scFv包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列。

[0126] 上述scFv包括重链可变结构域和轻链可变结构域。在某些实施方式中,所述重链可变结构域与所述轻链可变结构域形成二硫键,以增强所述scFv的稳定性。例如,二硫键可以在所述重链可变结构域的C44残基与所述轻链可变结构域的C100残基之间形成,所述氨基酸位置在Kabat下编号。

[0127] 所述scFv的VH和VL可以以各种不同的方向放置。在某些实施方式中,所述VL放置在所述VH的N-端。在某些实施方式中,所述VL放置在所述VH的C-端。

[0128] 所述scFv的VH和VL可以通过连接物例如肽连接物相连。在某些实施方式中,所述肽连接物是柔性连接物。关于所述连接物的氨基酸组成,肽被选择成具有赋予柔性、不干扰本发明的蛋白质的其他结构域的结构和功能并且抗拒蛋白酶切割的性质。例如,甘氨酸和

丝氨酸残基通常提供蛋白酶抗性。在某些实施方式中,所述VL放置在所述VH的N-端,并通过连接物连接到所述VH。

[0129] 所述连接物(例如柔性连接物)的长度可以是“短的”,例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸残基,或者是“长的”,例如至少13个氨基酸残基。在某些实施方式中,所述连接物的长度为10-50、10-40、10-30、10-25、10-20、15-50、15-40、15-30、15-25、15-20、20-50、20-40、20-30或20-25个氨基酸残基。

[0130] 在某些实施方式中,所述连接物包含$(GS)_n$(SEQ ID NO:204)、$(GGS)_n$(SEQ ID NO:205)、$(GGGS)_n$(SEQ ID NO:151)、$(GGSG)_n$(SEQ ID NO:153)、$(GGSGG)_n$(SEQ ID NO:156)和$(GGGGS)_n$(SEQ ID NO:157)序列或由所述序列组成,其中n是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。在某些实施方式中,所述连接物包含选自表3中所列出的SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:201、SEQ ID NO:202、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:152和SEQ ID NO:154的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成。在某些实施方式中,所述连接物是由SEQ ID NO:143的序列组成的$(G_4S)_4$(SEQ ID NO:203)连接物。

[0131] 表3.示例性连接物

[0132]

SEQ ID	氨基酸序列
SEQ ID NO：201	GSGSGSGSGSGSGSGSGS
SEQ ID NO：202	GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGS
SEQ ID NO：103	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS
SEQ ID NO：104	GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG
SEQ ID NO：83	GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGG

[0133]

SEQ ID	氨基酸序列
SEQ ID NO：84	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGS
SEQ ID NO：143	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO：150	GGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO：152	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO：154	GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGG

[0134] 在特定实施方式中,所述轻链可变结构域通过柔性连接物例如$(G_4S)_4$连接物(SEQ ID NO:203)连接到所述重链可变结构域的N-端。

[0135] 在某些实施方式中,上述scFv通过铰链序列连接到抗体Fc序列。在某些实施方式中,所述铰链包含氨基酸Ala-Ser。在某些其他实施方式中,所述铰链包含氨基酸Ala-Ser和Thr-Lys-Gly。所述铰链序列可以提供与靶抗原结合的柔性和柔性与最佳几何形状之间的平衡。

[0136] Fc结构域

[0137] 所述多特异性结合蛋白的抗体Fc结构域包含连接到所述Fab的第一抗体Fc序列和连接到所述scFv的第二抗体Fc序列。所述两个抗体Fc序列配对并形成结合CD16的二聚体。

[0138] 在所述抗体Fc结构域内,CD16结合由所述铰链区和CH2结构域介导。例如,在人类

IgG1内,与CD16的相互作用主要聚焦于氨基酸残基Asp 265-Glu269、Asn 297-Thr 299、Ala 327-Ile 332、Leu 234-Ser 239和CH2结构域中的糖残基N-乙酰基-D-葡萄糖胺(参见Sondermann等,Nature,406(6793):267-273)。在所述已知结构域的基础上,可以选择突变以提高或降低与CD16的结合亲和性,例如通过使用噬菌体展示文库或酵母表面cDNA文库,或者可以在相互作用的已知三维结构的基础上设计突变。

[0139] 异二聚体抗体重链的组装可以通过在同一细胞中表达两种不同抗体重链序列来实现,这可能导致每种抗体重链的同二聚体的组装以及异二聚体的组装。促进异二聚体的偏好性组装可以通过在每种抗体重链恒定区的CH3结构域中并入不同的突变来实现,如US13/494870、US16/028850、US11/533709、US12/875015、US13/289934、US14/773418、US12/811207、US13/866756、US14/647480和US14/830336中所示。例如,可以在人类IgG1的基础上,通过在第一多肽和第二多肽内并入不同对的氨基酸替换而在CH3结构域中制造突变,以允许这两条链选择性地彼此异二聚化。下面示出的氨基酸替换的位置都按照Kabat中的EU指数来编号。

[0140] 在一种情形中,所述第一多肽中的氨基酸替换将原始氨基酸用选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)的较大氨基酸代替,并且所述第二多肽中的至少一个氨基酸替换将原始氨基酸用选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)或缬氨酸(V)的较小氨基酸代替,使得所述较大氨基酸替换(突起)契合到所述较小氨基酸替换(孔穴)的表面中。例如,一个多肽可以包含T366W替换,并且另一个多肽可以包含三个替换,包括T366S、L368A和Y407V。

[0141] 本发明的抗体重链可变结构域可以被任选地偶联到与抗体恒定区、例如包括铰链、CH2和CH3结构域并含有或不含CH1结构域的IgG恒定区至少90%同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述恒定区的氨基酸序列与人类抗体恒定区例如人类IgG1恒定区、IgG2恒定区、IgG3恒定区或IgG4恒定区至少90%同一性。在某些其他实施方式中,所述恒定区的氨基酸序列与来自于另一种哺乳动物例如兔、狗、猫、小鼠或马的抗体恒定区至少90%同一性。与人类IgG1恒定区相比可以在所述恒定区内并入一个或多个突变,例如在Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411和/或K439处。示例性的替换包括例如Q347E、Q347R、Y349S、Y349K、Y349T、Y349D、Y349E、Y349C、T350V、L351K、L351D、L351Y、S354C、E356K、E357Q、E357L、E357W、K360E、K360W、Q362E、S364K、S364E、S364H、S364D、T366V、T366I、T366L、T366M、T366K、T366W、T366S、L368E、L368A、L368D、K370S、N390D、N390E、K392L、K392M、K392V、K392F、K392D、K392E、T394F、T394W、D399R、D399K、D399V、S400K、S400R、D401K、F405A、F405T、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、T411D、T411E、K439D和K439E。本文公开的Fc结构域或铰链区中的所有氨基酸位置均按照EU编号系统编号。

[0142] 在某些实施方式中,可以并入到人类IgG1恒定区的CH1中的突变可以在氨基酸V125、F126、P127、T135、T139、A140、F170、P171和/或V173处。在某些实施方式中,可以并入到人类IgG1恒定区的Cκ中的突变可以在氨基酸E123、F116、S176、V163、S174和/或T164处。

[0143] 氨基酸替换可以选自下面表4中示出的成组替换。

[0144] 表4.促进异二聚化的示例性Fc替换

[0145]

	第一多肽	第二多肽

组1	S364E/F405A	Y349K/T394F
组2	S364H/D401K	Y349T/T411E
组3	S364H/T394F	Y349T/F405A
组4	S364E/T394F	Y349K/F405A
组5	S364E/T411E	Y349K/D401K
组6	S364D/T394F	Y349K/F405A
组7	S364H/F405A	Y349T/T394F
组8	S364K/E357Q	L368D/K370S
组9	L368D/K370S	S364K
组10	L368E/K370S	S364K
组11	K360E/Q362E	D401K
组12	L368D/K370S	S364K/E357L
组13	K370S	S364K/E357Q
组14	F405L	K409R
组15	K409R	F405L

[0146] 或者,氨基酸替换可以选自下面表5中示出的成组替换。

[0147] 表5.促进异二聚化的示例性Fc替换

[0148]

	第一多肽	第二多肽
组1	K409W	D399V/F405T
组2	Y349S	E357W
组3	K360E	Q347R
组4	K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
组5	Q347E/K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
组6	Y349S/K409W	E357W/D399V/F405T

[0149] 或者,氨基酸替换可以选自下面表6中示出的成组替换。

[0150] 表6.促进异二聚化的示例性Fc替换

[0151]

	第一多肽	第二多肽
组1	T366K/L351K	L351D/L368E
组2	T366K/L351K	L351D/Y349E
组3	T366K/L351K	L351D/Y349D
组4	T366K/L351K	L351D/Y349E/L368E
组5	T366K/L351K	L351D/Y349D/L368E
组6	E356K/D399K	K392D/K409D

[0152] 或者,每条多肽链中的至少一个氨基酸替换可以选自表7。

[0153] 表7.促进化的示例性Fc替换

[0154]

第一多肽	第二多肽
L351Y， D399R， D399K， S400K， S400R， Y407A， Y407I， Y407V	T366V，T366I，T366L，T366M，N390D，N390E，K392L，K392M，K392V，K392F K392D，K392E，K409F，K409W，T411D 和 T411E

[0155] 或者,至少一个氨基酸替换可以选自下面表8中的成组替换,其中在所述第一多肽列中标注的位置被任何已知的带负电荷的氨基酸代替,并且在所述第二多肽列中标注的位置被任何已知的带正电荷的氨基酸代替。

[0156] 表8.用于替换的示例性Fc位置

[0157]

第一多肽	第二多肽
K392,K370,K409或K439	D399,E356或E357

[0158] 或者,至少一个氨基酸替换可以选自下面表9中的成组替换,其中在所述第一多肽列中标注的位置被任何已知的带正电荷的氨基酸代替,并且在所述第二多肽列中标注的位置被任何已知的带负电荷的氨基酸代替。

[0159] 表9.用于替换的示例性Fc位置

[0160]

第一多肽	第二多肽
D399,E356或E357	K409,K439,K370或K392

[0161] 或者,氨基酸替换可以选自下面表10中的成组替换。

[0162] 表10.促进异二聚化的示例性Fc替换

[0163]

第一多肽	第二多肽
T350V,L351Y,F405A和Y407V	T350V,T366L,K392L和T394W

[0164] 在选择Fc替换时,专业技术人员将会认识到,所述表4-10中的第一多肽和第二多肽可能分别对应于所述第一抗体Fc序列和第二抗体Fc序列。可选地,所述表4-10中的第一多肽和第二多肽可能分别对应于所述第二抗体Fc序列和第一抗体Fc序列。

[0165] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在T366位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自T366、L368和Y407的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0166] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自T366、L368和Y407的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在T366位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0167] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自E357、K360、Q362、S364、L368、K370、T394、D401、F405和T411的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自Y349、E357、S364、L368、K370、T394、D401、F405和T411的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0168] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自Y349、E357、S364、L368、K370、T394、D401、F405和T411的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自E357、K360、Q362、S364、L368、K370、T394、D401、F405和T411的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0169] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自L351、D399、S400和Y407的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自T366、N390、K392、K409和T411的一个或多个

位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0170] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自T366、N390、K392、K409和T411的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自L351、D399、S400和Y407的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0171] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自Q347、Y349、K360和K409的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自Q347、E357、D399和F405的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0172] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自Q347、E357、D399和F405的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自Y349、K360、Q347和K409的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0173] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自K370、K392、K409和K439的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自D356、E357和D399的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0174] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自D356、E357和D399的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自K370、K392、K409和K439的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0175] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自L351、E356、T366和D399的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自Y349、L351、L368、K392和K409的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0176] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自Y349、L351、L368、K392和K409的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自L351、E356、T366和D399的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0177] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于K360E和K409W替换,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于Q347R、D399V和F405T替换。

[0178] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于Q347R、D399V和F405T替换,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于K360E和K409W替换。

[0179] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于T366W替换,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于T366S、T368A和Y407V替换。

[0180] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的

氨基酸序列的差异在于T366S、T368A和Y407V替换,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于T366W替换。

[0181] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于T350V、L351Y、F405A和Y407V替换,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于T350V、T366L、K392L和T394W替换。

[0182] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于T350V、T366L、K392L和T394W替换,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于T350V、L351Y、F405A和Y407V替换。

[0183] 可选地或另外地,异多聚体蛋白的结构稳定性可以通过在所述第一或第二多肽链任一者上引入S354C并在相对的多肽链上引入Y349C来提高,所述突变在所述两条多肽的界面内形成人造二硫键。在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于S354C替换,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于Y349C替换。

[0184] 在选择Fc替换时,专业技术人员将会认识到,上述抗体恒定区的“一条多肽链”和“另一条多肽链”可能分别对应于所述第一抗体Fc序列和第二抗体Fc序列。可选地,上述抗体恒定区的“一条多肽链”和“另一条多肽链”可能分别对应于所述第二抗体Fc序列和第一抗体Fc序列。

[0185] 示例性多特异性结合蛋白

[0186] 下面列出了包含各自连接到抗体恒定区的结合HER2的scFv和结合NKG2D的Fab的TriNKET的实例,其中所述抗体恒定区包括能够使两条Fc链异二聚化的突变。所述scFv包含源自于抗HER2抗体(例如曲妥珠单抗)的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL),并且还包含VL的第100位和VH的第44位处的氨基酸残基被Cys的替换,从而促进所述scFv的VH和VL之间二硫键的形成。所述VL通过$(G_4S)_4$连接物(SEQ ID NO:203)连接到所述VH的N-端,并且所述VH通过Ala-Ser连接物连接到Fc的N-端。所述Ala-Ser连接物被包含在弯头铰链区序列处,以在柔性与最佳几何形状之间达成平衡。在某些实施方式中,可以将额外的序列Thr-Lys-Gly添加到铰链处Ala-Ser序列的N-端或C-端。当在本文中用于描述这些示例性TriNKET时,所述Fc包括抗体铰链、CH2和CH3。

[0187] 因此,下面描述的每个TriNKET包含下述三条多肽链:

[0188] 链A,其从N-端至C-端包含:结合NKG2D的Fab的VH,CH1和Fc;

[0189] 链B,其从N-端至C-端包含:结合HER2的scFv的VL,$(G_4S)_4$连接物(SEQ ID NO:203),结合HER2的scFv的VH,Ala-Ser连接物,和Fc;以及

[0190] 链C,其从N-端至C-端包含:结合NKG2D的Fab的VL,和CL。

[0191] 所述示例性TriNKET的氨基酸序列概述在表11中。

[0192] 在某些实施方式中,本公开的多特异性结合蛋白包含第一多肽链、第二多肽链和第三多肽链,其中所述第一、第二和第三多肽链分别包含表11中公开的TriNKET的链A、链B和链C的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述第一、第二和第三多肽链分别由表11中公开的TriNKET的链A、链B和链C的氨基酸序列组成。

[0193] 在示例性实施方式中,所述连接到结合NKG2D的Fab片段的Fc结构域包含突变Q347R、D399V和F405T,并且所述连接到HER2 scFv的Fc结构域包含匹配的突变K360E和K409W,用于形成异二聚体。在另一个示例性实施方式中,所述连接到结合NKG2D的Fab片段的Fc结构域包含杵突变T366S、L368A和Y407V,并且所述连接到结合HER2的scFv的Fc结构域包含“臼”突变T366W。在示例性实施方式中,所述连接到结合NKG2D的Fab片段的Fc结构域包括CH3结构域中的S354C替换,其与连接到所述结合HER2的scFv的Fc上的Y349C替换形成二硫键。

[0194]

表 11. 示例性多特异性结合蛋白

TriNKET 构建物	结合 NKG2D 的 Fab	结合 HER2 的 scFv	人类 IgG1 Fc	链 A	链 B	链 C
A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗	A49	曲妥珠单抗	EW-RVT	SEQ ID NO：141	SEQ ID NO：140	SEQ ID NO：142
A49-F3'-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗	A49	曲妥珠单抗	KiH	SEQ ID NO：147	SEQ ID NO：146	SEQ ID NO：142
A49-F3'-TriNKET-帕妥珠单抗	A49	帕妥珠单抗	EW-RVT	SEQ ID NO：141	SEQ ID NO：190	SEQ ID NO：142
A49-F3'-KiH-TriNKET-帕妥珠单抗	A49	帕妥珠单抗	KiH	SEQ ID NO：147	SEQ ID NO：191	SEQ ID NO：142
A49-F3'-TriNKET- MGAH22	A49	MGAH22	EW-RVT	SEQ ID NO：141	SEQ ID NO：192	SEQ ID NO：142
A49-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22	A49	MGAH22	KiH	SEQ ID NO：147	SEQ ID NO：193	SEQ ID NO：142
A49MI-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗	A49MI	曲妥珠单抗	EW-RVT	SEQ ID NO：145	SEQ ID NO：140	SEQ ID NO：142
A49MI-F3'-KiH-TriNKET- 曲妥珠单抗	A49MI	曲妥珠单抗	KiH	SEQ ID NO：194	SEQ ID NO：146	SEQ ID NO：142
A49MI-F3'-TriNKET- 帕妥珠单抗	A49MI	帕妥珠单抗	EW-RVT	SEQ ID NO：145	SEQ ID NO：190	SEQ ID NO：142
A49MI-F3'-KiH-TriNKET- 帕妥珠单抗	A49MI	帕妥珠单抗	KiH	SEQ ID NO：194	SEQ ID NO：191	SEQ ID NO：142
A49MI-F3'-TriNKET- MGAH22	A49MI	MGAH22	EW-RVT	SEQ ID NO：145	SEQ ID NO：192	SEQ ID NO：142
A49MI-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22	A49MI	MGAH22	KiH	SEQ ID NO：194	SEQ ID NO：193	SEQ ID NO：142
A44-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗	A44	曲妥珠单抗	EW-RVT	SEQ ID NO：155	SEQ ID NO：140	SEQ ID NO：149
A44-F3'-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗	A44	曲妥珠单抗	KiH	SEQ ID NO：148	SEQ ID NO：146	SEQ ID NO：149
A44-F3'-TriNKET-帕妥珠单抗	A44	帕妥珠单抗	EW-RVT	SEQ ID NO：155	SEQ ID NO：190	SEQ ID NO：149
A44-F3'-KiH-TriNKET-帕妥珠单抗	A44	帕妥珠单抗	KiH	SEQ ID NO：148	SEQ ID NO：191	SEQ ID NO：149
A44-F3'-TriNKET-MGAH22	A44	MGAH22	EW-RVT	SEQ ID NO：155	SEQ ID NO：192	SEQ ID NO：149
A44-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22	A44	MGAH22	KiH	SEQ ID NO：148	SEQ ID NO：193	SEQ ID NO：149

[0195] 下面更详细地描述特定TriNKET和它们的多肽链。在所述氨基酸序列中，$(G_4S)_4$ (SEQ ID NO:203)和Ala-Ser连接物是下划线的粗体;所述scFv中形成二硫键的Cys残基是

下划线的粗体-斜体;Fc异二聚化突变是下划线的粗体;并且在Kabat下的CDR序列被下划线。

[0196] 例如,本公开的TriNKET是A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗。A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗包括:源自于曲妥珠单抗的结合HER2的单链可变片段(scFv)(SEQ ID NO:139),其通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域;和源自于A49的结合NKG2D的Fab片段,其包括包含重链可变结构域(SEQ ID NO:94)和CH1结构域的重链部分,以及包含轻链可变结构域(SEQ ID NO:98)和轻链恒定结构域的轻链部分,其中所述重链可变结构域连接到所述CH1结构域,并且所述CH1结构域连接到所述Fc结构域。A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗包括具有SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141和SEQ ID NO:142的序列的三个多肽。

[0197] SEQ ID NO:140表示通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的结合HER2的scFv(scFv-Fc)的完整序列。所述连接到scFv的Fc结构域包括用于异二聚化的Q347R、D399V和F405T替换和用于与如下所述的SEQ ID NO:141中的Y349C替换形成二硫键的S354C替换。所述scFv(SEQ ID NO:139)包括通过$(G_4S)_4$连接物(SEQ ID NO:203)连接到曲妥珠单抗的轻链可变结构域的N-端的曲妥珠单抗的重链可变结构域,所述scFv被表示成VL-$(G_4S)_4$-VH("$(G_4S)_4$"由SEQ ID NO:203或SEQ ID NO:143表示)。所述scFv的重链和轻链可变结构域也通过分别作为VL和VH中Q100C和G44C替换的结果的VL的C100与VH的C44之间的二硫键相连。

[0198] 曲妥珠单抗scFv

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRS
GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFG**C**GTKVEIK

[0199] **GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK**C**LEWVARIYPTNGYTRYADSVK
GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 139)

[0200] 曲妥珠单抗scFv-Fc(RVT)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRS
GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFG**C**GTKVEIK
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK**C**LEWVARIYPTNGYTRYADSVK
GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS

[0201] **AS**
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**R
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 140)

[0202] SEQ ID NO:141表示连接到Fc结构域的Fab片段的重链部分,所述重链部分包含NKG2D结合位点的重链可变结构域(SEQ ID NO:94)和CH1结构域。SEQ ID NO:141中的Fc结构域包括CH3结构域中的Y349C替换,其与连接到结合HER2的scFv的Fc(SEQ ID NO:140)上的S354C替换形成二硫键。在SEQ ID NO:141中,所述Fc结构域还包括K360E和K409W替换,用于与SEQ ID NO:140中的Fc异二聚化。

[0203] A49 VH

[0204] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:94)

[0205] A49 VH-CH1-Fc(EW)

[0206] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQV**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS **W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（SEQ ID NO：141）

[0207] SEQ ID NO:142表示所述Fab片段的轻链部分,其包含NKG2D结合位点的轻链可变结构域(SEQ ID NO:98)和轻链恒定结构域。

[0208] A49 VL

[0209] DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:98)

[0210] A49 VL-LC

[0211] DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO: 142)

[0212] 本公开的另一种TriNKET是A49MI-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗。A49MI-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗包括通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:139);和源自于A49MI的结合NKG2D的Fab片段,其包括包含重链可变结构域(SEQ ID NO:144)和CH1结构域的重链部分,以及包含轻链可变结构域(SEQ ID NO:98)和轻链恒定结构域的轻链部分,其中所述重链可变结构域连接到所述CH1结构域,并且所述CH1结构域连接到所述Fc结构域。A49MI-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗包括具有SEQ ID NO:140(与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)、SEQ ID NO:145和SEQ ID NO:142(与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)的序列的三个多肽。

[0213] SEQ ID NO:145表示连接到Fc结构域的Fab片段的重链部分,所述重链部分包含NKG2D结合位点的重链可变结构域(SEQ ID NO:144)和CH1结构域。在SEQ ID NO:144中,其中SEQ ID NO:94的CDR3中的甲硫氨酸已被异亮氨酸替换(M→I替换;示出在SEQ ID NO:144和SEQ ID NO:145中的第三个括号[]内)。SEQ ID NO:145中的Fc结构域包括CH3结构域中的Y349C替换,其与连接到结合HER2的scFv的Fc(SEQ ID NO:140)中的S354C替换形成二硫键。在SEQ ID NO:145中,所述Fc结构域还包括K360E和K409W替换。

[0214] A49MI VH

[0215] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP**[I]**GAAAGWFDPWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO：144）

[0216] A49MI VH-CH1-Fc(EW)

[0217] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP**[I]**GAAAGWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（SEQ ID NO：145）

[0218] 本公开的另一种TriNKET是A49-F3'-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗。KiH是指杵入臼(KiH)Fc技术,其包括对CH3结构域进行工程化改造,以在每条重链中产生促进异二聚化的"杵"或"臼"。在KiH Fc技术之后的概念是通过将小残基用体积较大的残基替换,在一个CH3

结构域(CH3A)中引入“杵”(例如EU编号中的$T366W_{CH3A}$)。为了容纳所述“杵”,通过将距所述杵最近的邻近残基用较小的残基替换,在另一个CH3结构域(CH3B)上产生互补的“臼”表面(例如$T366S/L368A/Y407V_{CH3B}$)。将所述“臼”突变通过结构指导的噬菌体文库筛选进行优化(Atwell S,Ridgway JB,Wells JA,Carter P.,使用噬菌体展示文库从同二聚体的结构域界面重新建模得到的稳定的异二聚体(Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library),J.Mol.Biol.(1997)270(1):26-35)。KiH Fc变体的X-射线晶体结构(Elliott JM,Ultsch M,Lee J,Tong R,Takeda K,Spiess C等,杵和臼非糖基化半抗体同二聚体的反平行构象由CH2-CH3疏水相互作用介导(Antiparallel conformation of knob and hole aglycosylated half-antibody homodimers is mediated by a CH2-CH3 hydrophobic interaction),J.Mol.Biol.(2014)426(9):1947-57;Mimoto F,Kadono S,Katada H,Igawa T,Kamikawa T,Hattori K,对FcγR具有改进的亲和性的新的不对称工程化Fc变体的晶体结构(Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for FcγRs),Mol.Immunol.(2014)58(1):132-8)证实了由CH3结构域间核心界面处的空间互补性驱动的疏水相互作用在热力学上有利于异二聚体化,而杵-杵和臼-臼界面分别由于空间位阻和有利相互作用的破坏而不利于同二聚化。

[0219] A49-F3’-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗包括与中A49-F3’-TriNKET-曲妥珠单抗相同的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:139),其通过包含Ala-Ser的铰链连接到包含T366S、L368A和Y407V的“臼”替换的Fc结构域;以及与A49-F3’-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合NKG2D的Fab片段,其CH1结构域连接到包含T366W的“杵”替换的Fc结构域。A49-F3’-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗包括具有SEQ ID NO:146、SEQ ID NO:147和SEQ ID NO:142(与A49-F3’-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)的序列的三个多肽。

[0220] SEQ ID NO:146表示通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:139)(scFv-Fc)的完整序列。所述连接到scFv的Fc结构域包括用于异二聚化的T366S、L368A和Y407V替换和用于与下文所述的SEQ ID NO:147中的Y349C替换形成二硫键的S354C替换。

[0221] 曲妥珠单抗scFv-Fc(KiH)

[0222]
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRS
GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFG**C**GTKVEIK
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK**C**LEWVARIYPTNGYTRYADSVK
GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
AS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSR
DELTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（SEQ ID NO：146）

[0223] SEQ ID NO:147表示连接到Fc结构域的Fab片段的重链部分,所述重链部分包括源自于A49的NKG2D结合位点的重链可变结构域(SEQ ID NO:94)和CH1结构域。SEQ ID NO:147中的Fc结构域包括S354C替换,其与连接到结合HER2的scFv的Fc(SEQ ID NO:146)的CH3结构域中的Y349C替换形成二硫键。在SEQ ID NO:147中,所述Fc结构域还包括T366W替换。

[0224] A49 VH-CH1-Fc(KiH)

[0225] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPP**C**RDELTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（SEQ ID NO：147）

[0226] 本公开的另一种TriNKET是A49MI-F3'-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗。A49MI-F3'-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗包括与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:139),其通过包含Ala-Ser的铰链连接到包含T366S、L368A和Y407V的"臼"替换的Fc结构域;以及与A49MI-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合NKG2D的Fab片段,其CH1结构域连接到包含T366W的"杵"替换的Fc结构域。A49MI-F3'-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗包括具有SEQ ID NO:146(与A49-F3'-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)、SEQ ID NO:194和SEQ ID NO:142(与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)的序列的三个多肽。

[0227] SEQ ID NO:194表示连接到Fc结构域的Fab片段的重链部分,其包含源自于A49MI的NKG2D结合位点的重链可变结构域(SEQ ID NO:144)和CH1结构域。SEQ ID NO:194中的Fc结构域包括S354C替换,其与连接到结合HER2的scFv的Fc(SEQ ID NO:146)中的CH3结构域中的Y349C替换形成二硫键。在SEQ ID NO:194中,所述Fc结构域还包括T366W替换。

[0228] A49MI VH-CH1-Fc(KiH)

[0229] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP**I**GAAAGWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPP**C**RDELTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（SEQ ID NO：194）

[0230] 本公开的另一种示例性TriNKET是A44-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗。A44-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗包括与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:139),其通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域;和源自于A44的结合NKG2D的Fab片段,其包括包含重链可变结构域(SEQ ID NO:86)和CH1结构域的重链部分,以及包含轻链可变结构域(SEQ ID NO:90)和轻链恒定结构域的轻链部分,其中所述重链可变结构域连接到所述CH1结构域,并且所述CH1结构域连接到所述Fc结构域。A44-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗包括具有SEQ ID NO:140(与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)、SEQ ID NO:155和SEQ ID NO:149的序列的三个多肽。

[0231] SEQ ID NO:155表示连接到Fc结构域的源自于A44的NKG2D结合位点的重链可变结构域(SEQ ID NO:86)。SEQ ID NO:155中的Fc结构域包括CH3结构域中的Y349C替换,其与连接到结合HER2的scFv的Fc(SEQ ID NO:140)上的S354C替换形成二硫键。在SEQ ID NO:155中,所述Fc结构域还包括K360E和K409W替换。

[0232] A44 VH

[0233] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGGYYDSGAGDYWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:86)

[0234] A44 VH-CH1-Fc(EW)

[0235] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGGYYDSGAGDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS WLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（SEQ ID NO：155）

[0236] SEQ ID NO:149表示所述Fab片段的轻链部分,其包含NKG2D结合位点的轻链可变结构域(SEQ ID NO:90)和轻链恒定结构域。

[0237] A44 VL

[0238] DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIDSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSYPRTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:90)

[0239] A44 VL-CL

[0240] DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIDSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSYPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:149)

[0241] 本公开的另一种示例性TriNKET是A44-F3'-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗。A44-F3'-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗包括与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:139),其通过包含Ala-Ser的铰链连接到包含T366S、L368A和Y407V的"臼"替换的Fc结构域;以及与A44-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合NKG2D的Fab片段,其CH1结构域连接到包含T366W的"杵"替换的Fc结构域。A44-F3'-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗包括具有SEQ ID NO:146(与A49-F3'-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)、SEQ ID NO:148和SEQ ID NO:149(与A44-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)的序列的三个多肽。

[0242] SEQ ID NO:148表示连接到Fc结构域的源自于A44的NKG2D结合位点的重链可变结构域(SEQ ID NO:86)。SEQ ID NO:148中的Fc结构域包括CH3结构域中的Y349C替换,其与连接到结合HER2的scFv的Fc(SEQ ID NO:146)上的S354C替换形成二硫键。在SEQ ID NO:148中,所述Fc结构域还包括T366W替换。

[0243] A44 VH-CH1-Fc(KiH)

[0244] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGGYYDSGAGDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（SEQ ID NO：148）

[0245] 本公开的另一种TriNKET是A49-F3'-TriNKET-帕妥珠单抗。A49-F3'-TriNKET-帕妥珠单抗包括通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的源自于帕妥珠单抗的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:189),和与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合NKG2D的Fab片段,其CH1结构域连接到Fc结构域。所述连接到scFv的Fc结构域包括Q347R、D399V和F405T替换,并且所述连接到Fab片段的Fc结构域包括K360E和K409W替换。A49-F3'-TriNKET-帕妥珠单抗包括具有SEQ ID NO:190、SEQ ID NO:141(与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)和SEQ ID NO:142(与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)的序列的三个多肽。

[0246] SEQ ID NO:190表示通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的结合HER2的scFv

(scFv-Fc)的完整序列。所述连接到scFv的Fc结构域包括用于异二聚化的Q347R、D399V和F405T替换以及用于与如上所述的SEQ ID NO:141中的Y349C替换形成二硫键的S354C替换。所述scFv(SEQ ID NO:189)包括通过$(G_4S)_4$连接物(SEQ ID NO:203)连接到帕妥珠单抗的轻链可变结构域的N-端的帕妥珠单抗的重链可变结构域,所述scFv被表示成VL-$(G_4S)_4$-VH("$(G_4S)_4$"由SEQ ID NO:203或SEQ ID NO:143表示)。所述scFv的重链和轻链可变结构域也通过分别作为VL和VH中的Q100C和G44C替换的结果的VL的C100与VH的C44之间的二硫键相连。

[0247] 帕妥珠单抗scFv

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFG*C*GTKVEIKR
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGK*C*LEWVADVNPNSGGSIYNQRF
KGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSA(SEQ ID NO:189)

[0249] 帕妥珠单抗scFv-Fc

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFG*C*GTKVEIKR
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGK*C*LEWVADVNPNSGGSIYNQRF
KGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSA

[0250]
AS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPP*C*R
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:190)

[0251] 本公开的另一种示例性TriNKET是A49MI-F3'-TriNKET-帕妥珠单抗。A49MI-F3'-TriNKET-帕妥珠单抗包括通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的与A49-F3'-TriNKET-帕妥珠单抗中相同的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:189);以及与A49MI-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合NKG2D的Fab片段,其CH1结构域连接到Fc结构域。所述连接到scFv的Fc结构域包括Q347R、D399V和F405T替换,并且所述连接到Fab片段的Fc结构域包括K360E和K409W替换。A49MI-F3'-TriNKET-帕妥珠单抗包括具有SEQ ID NO:190(与A49-F3'-KiH-TriNKET-帕妥珠单抗中相同)、SEQ ID NO:145(与A49MI-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)和SEQ ID NO:142(与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)的序列的三个多肽。

[0252] 本公开的另一种示例性TriNKET是A49-F3'-KiH-TriNKET-帕妥珠单抗。A49-F3'-KiH-TriNKET-帕妥珠单抗包括通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的与A49-F3'-TriNKET-帕妥珠单抗中相同的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:189);以及与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合NKG2D的Fab片段,其CH1结构域连接到Fc结构域。所述连接到scFv的Fc结构域包括T366S、L368A和Y407V的"臼"替换,并且所述连接到Fab片段的Fc结构域包括T366W的"杵"替换。A49-F3'-KiH-TriNKET-帕妥珠单抗包括具有SEQ ID NO:191、SEQ ID NO:147(与A49-F3'-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)和SEQ ID NO:142(与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)的序列的三个多肽。

[0253] SEQ ID NO:191表示通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:189)(scFv-Fc)的完整序列。所述连接到scFv的Fc结构域包括用于异二聚化的T366S、L368A和Y407V替换和用于与如上所述的SEQ ID NO:191中的Y349C替换形成二硫键的S354C替换。

[0254] 帕妥珠单抗scFv-Fc(KiH)

[0255] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFG**C**GTKVEIKR **GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS** EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGK**C**LEWVADVNPNSGGSIYNQRF KGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSA **AS** DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSR DELTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（SEQ ID NO：191）

[0256] 本公开的另一种示例性TriNKET是A49MI-F3'-KiH-TriNKET-帕妥珠单抗。A49MI-F3'-KiH-TriNKET-帕妥珠单抗包括通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的与A49-F3'-TriNKET-帕妥珠单抗中相同的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:189);以及与A49MI-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合NKG2D的Fab片段,其CH1结构域连接到Fc结构域。所述连接到scFv的Fc结构域包括T366S、L368A和Y407V的"臼"替换,并且所述连接到Fab片段的Fc结构域包括T366W的"杵"替换。A49MI-F3'-KiH-TriNKET-帕妥珠单抗包括具有SEQ ID NO:191(与A49-F3'-KiH-TriNKET-帕妥珠单抗中相同)、SEQ ID NO:194(与A49MI-F3'-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)和SEQ ID NO:142(与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)的序列的三个多肽。

[0257] 本公开的另一种示例性TriNKET是A44-F3'-TriNKET-帕妥珠单抗。A44-F3'-TriNKET-帕妥珠单抗包括通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的与A49-F3'-TriNKET-帕妥珠单抗中相同的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:189);以及与A44-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合NKG2D的Fab片段,其CH1结构域连接到Fc结构域。所述连接到scFv的Fc结构域包括Q347R、D399V和F405T替换,并且所述连接到Fab片段的Fc结构域包括K360E和K409W替换。A44-F3'-TriNKET-帕妥珠单抗包括具有SEQ ID NO:190(与A49-F3'-KiH-TriNKET-帕妥珠单抗中相同)、SEQ ID NO:155(与A44-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)和SEQ ID NO:149(与A44-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)的序列的三个多肽。

[0258] 本公开的另一种示例性TriNKET是A44-F3'-KiH-TriNKET-帕妥珠单抗。A44-F3'-KiH-TriNKET-帕妥珠单抗包括通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的与A49-F3'-TriNKET-帕妥珠单抗中相同的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:189);以及与A44-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合NKG2D的Fab片段,其CH1结构域连接到Fc结构域。所述连接到scFv的Fc结构域包括T366S、L368A和Y407V的"臼"替换,并且所述连接到Fab片段的Fc结构域包括T366W的"杵"替换。A44-F3'-KiH-TriNKET-帕妥珠单抗包括具有SEQ ID NO:191(与A49-F3'-KiH-TriNKET-帕妥珠单抗中相同)、SEQ ID NO:148(与A44-F3'-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)和SEQ ID NO:149(与A44-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)的序列的三个多肽。

[0259] 本公开的另一种TriNKET是A49-F3'-TriNKET-MGAH22。A49-F3'-TriNKET-MGAH22包括通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的源自于MGAH22的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:171);以及与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合NKG2D的Fab片段,其CH1结构域连接到Fc结构域。所述连接到scFv的Fc结构域包括Q347R、D399V和F405T替换,并且所述连接到Fab片段的Fc结构域包括K360E和K409W替换。A49-F3'-TriNKET-MGAH22包括具有SEQ ID NO:192、SEQ ID NO:141(与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)和SEQ ID NO:142(与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)的序列的三个多肽。

[0260] SEQ ID NO:192表示通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的结合HER2的scFv(scFv-Fc)的完整序列。所述连接到scFv的Fc结构域包括用于异二聚化的Q347R、D399V和F405T替换,以及用于与如上所述的SEQ ID NO:141中的Y349C替换形成二硫键的S354C替换。所述scFv(SEQ ID NO:171)包括通过$(G_4S)_4$连接物(SEQ ID NO:203)连接到帕妥珠单抗的轻链可变结构域的N-端的帕妥珠单抗的重链可变结构域,所述scFv被表示为VL-$(G_4S)_4$-VH("$(G_4S)_4$"由SEQ ID NO:203或SEQ ID NO:143表示)。所述scFv的重链和轻链可变结构域也通过分别作为VL和VH中的G100C和G44C替换的结果的VL的C100与VH的C44之间的二硫键相连。

[0261] MGAH22 scFv

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPGHSPKLLIYSASFRYTGVPDRFTGSR
SGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIKR

[0262] **GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**

QVQLQQSGPELVKPGASLKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQCLEWIGRIYPTNGYTRYDPKFQD
KATITADTSSNTAYLQVSRLTSEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGASVTVSSA (SEQ ID NO: 171)

[0263] MGAH22 scFv-Fc

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPGHSPKLLIYSASFRYTGVPDRFTGSR
SGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIKR

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

QVQLQQSGPELVKPGASLKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQCLEWIGRIYPTNGYTRYDPKFQD
KATITADTSSNTAYLQVSRLTSEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGASVTVSSA

[0264] **AS**

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**R
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 192)

[0265] 本公开的另一种TriNKET是A49MI-F3'-TriNKET-MGAH22。A49MI-F3'-TriNKET-MGAH22包括通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的与A49-F3'-TriNKET-MGAH22中相同的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:171);以及与A49MI-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合NKG2D的Fab片段,其CH1结构域连接到Fc结构域。所述连接到scFv的Fc结构域包括Q347R、D399V和F405T替换,并且所述连接到Fab片段的Fc结构域包括K360E和K409W替换。A49MI-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22包括具有SEQ ID NO:192(与A49-F3'-TriNKET-MGAH22中相同)、SEQ ID NO:145(与A49MI-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)和SEQ ID NO:142(与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)的序列的三个多肽。

[0266] 本公开的另一种TriNKET是A49-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22。A49-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22包括通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的与A49-F3'-TriNKET-MGAH22中相同的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:171);以及与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合NKG2D的Fab片段,其CH1结构域连接到Fc结构域。所述连接到scFv的Fc结构域包括T366S、L368A和Y407V的"臼"替换,并且所述连接到Fab片段的Fc结构域包括T366W的"杵"替换。A49-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22包括具有SEQ ID NO:193、SEQ ID NO:147(与A49-F3'-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的)和SEQ ID NO:142(与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的)的序列的三个多肽。

[0267] SEQ ID NO:193表示通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:171)(scFv-Fc)的完整序列。所述连接到scFv的Fc结构域包括用于异二聚化的T366S、L368A和Y407V替换以及用于与如上所述的SEQ ID NO:147中的Y349C替换形成二硫键的S354C替换。

[0268] MGAH22 scFv-Fc(KiH)

[0269] DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPGHSPKLLIYSASFRYTGVPDRFTGSR SGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIKR **GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS** QVQLQQSGPELVKPGASLKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQCLEWIGRIYPTNGYTRYDPKFQD KATITADTSSNTAYLQVSRLTSEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGASVTVSSA **AS** DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（SEQ ID NO：193）

[0270] 本公开的另一种示例性TriNKET是A49MI-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22。A49MI-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22包括通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的与A49-F3'-TriNKET-MGAH22中相同的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:171);以及与A49MI-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合NKG2D的Fab片段,其CH1结构域连接到Fc结构域。所述连接到scFv的Fc结构域包括T366S、L368A和Y407V的"臼"替换,并且所述连接到Fab片段的Fc结构域包括T366W的"杵"替换。A49MI-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22包括具有SEQ ID NO:193(与A49-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22中相同)、SEQ ID NO:194(与A49MI-F3'-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)和SEQ ID NO:142(与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)的序列的三个多肽。

[0271] 本公开的另一种示例性TriNKET是A44-F3'-TriNKET-MGAH22。A44-F3'-TriNKET-MGAH22包括通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的与A49-F3'-TriNKET-MGAH22中相同的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:171);以及与A44-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合NKG2D的Fab片段,其CH1结构域连接到Fc结构域。所述连接到scFv的Fc结构域包括Q347R、D399V和F405T替换,并且所述连接到Fab片段的Fc结构域包括K360E和K409W替换。A44-F3'-TriNKET-MGAH22包括具有SEQ ID NO:192(与A49-F3'-TriNKET-MGAH22中相同)、SEQ ID NO:155(与A44-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)和SEQ ID NO:149(与A44-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)的序列的三个多肽。

[0272] 本公开的另一种示例性TriNKET是A44-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22。A44-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22包括通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的与A49-F3'-TriNKET-MGAH22中相同的结合HER2的scFv(SEQ ID NO:171);以及与A44-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同的结合NKG2D的Fab片段,其CH1结构域连接到Fc结构域。所述连接到scFv的Fc结构域包括T366S、L368A和Y407V的"臼"替换,并且所述连接到Fab片段的Fc结构域包括T366W的"杵"替换。A44-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22包括具有SEQ ID NO:193(与A49-F3'-KiH-TriNKET-MGAH22中相同)、SEQ ID NO:148(与A44-F3'-KiH-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)和SEQ ID NO:149(与A44-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗中相同)的序列的三个多肽。

[0273] 在某些实施方式中,本公开的一种TriNKET与上述包括EW-RVT Fc突变的示例性TriNKET之一相同,区别在于所述连接到结合NKG2D的Fab片段的Fc结构域包含Q347R、D399V和F405T的替换,并且所述连接到结合HER2的scFv的Fc结构域包含匹配的替换K360E和K409W,用于形成异二聚体。在某些实施方式中,本公开的一种TriNKET与上述包括KiH Fc突变的示例性TriNKET之一相同,区别在于所述连接到结合NKG2D的Fab片段的Fc结构域包含T366S、L368A和Y407V的"臼"替换,并且所述连接到结合HER2的scFv的Fc结构域包含T366W的"杵"替换,用于形成异二聚体。

[0274] 在某些实施方式中,本公开的一种TriNKET与上述的示例性TriNKET之一相同,区

别在于所述连接到结合NKG2D的Fab片段的Fc结构域包括CH3结构域中的S354C替换,并且所述连接到结合HER2的scFv的Fc结构域包括CH3结构域中的匹配的Y349C替换,用于形成二硫键。

[0275] 正如在国际申请No.PCT/US2019/045561中所述,本文公开的多特异性结合蛋白在体外测定和动物模型中有效地降低肿瘤生长并杀死癌细胞。例如,A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗在诱导针对各种不同的人类癌细胞系例如表达低水平HER2(HER2+)的786-O细胞、表达中水平HER2(HER2++)的H661细胞和表达高水平HER2(HER2+++)的SkBr3细胞的NK细胞介导的细胞毒性方面优于曲妥珠单抗。此外,所述多特异性结合蛋白不显著诱导健康的非癌性人类细胞(例如人类心肌细胞)的NK介导的灭杀。

[0276] 多特异性结合蛋白的生产

[0277] 上述多特异性结合蛋白可以使用本领域技术人员公知的重组DNA技术来制造。例如,可以将编码所述第一免疫球蛋白重链的第一核酸序列克隆到第一表达载体中;可以将编码所述第二免疫球蛋白重链的第二核酸序列克隆到第二表达载体中;可以将编码所述免疫球蛋白轻链的第三核酸序列克隆到第三表达载体中;并且可以将所述第一、第二和第三表达载体一起稳定转染到宿主细胞中,以产生所述多聚体蛋白。

[0278] 本领域技术人员将会认识到,在蛋白质生产和/或储存期间,N-端谷氨酸(E)或谷氨酰胺(Q)可能被环化以形成内酰胺(例如在生产和/或储存期间自发地或由存在的酶催化)。因此,在多肽的氨基酸序列的N-端残基是E或Q的某些实施方式中,本文也设想了E或Q被焦谷氨酸代替的相应的氨基酸序列。

[0279] 暴露于技术人员也将会认识到,在蛋白质生产和/或储存期间,蛋白质的C-端赖氨酸(K)可能被移除(例如在生产和/或储存期间自发地或由存在的酶催化)。使用包含Fc结构域的蛋白质时,这种K的移除通常在C-端处发现。因此,在多肽的氨基酸序列(例如Fc结构域序列)的C-端残基是K的某些实施方式中,本文也设想了K被移除的相应的氨基酸序列。

[0280] 为了获得所述多特异性结合蛋白的最高产量,可以探索所述第一、第二和第三表达载体的不同比率,以确定用于转染到所述宿主细胞中的最佳比率。在转染后,可以使用本领域中已知的方法例如有限稀释法、ELISA、FACS、显微术或Clonepix来分离单一克隆,用于细胞库产生。

[0281] 可以将克隆在适合于生物反应器规模放大的条件下培养,并维持所述多特异性结合蛋白的表达。所述多特异性结合蛋白可以使用本领域中已知的方法包括离心、深度过滤、细胞裂解、匀浆、冻融、亲和纯化、凝胶过滤、离子交换层析、疏水相互作用交换层析和混合模式层析来分离和纯化。

[0282] 药物制剂

[0283] 本公开还提供了含有治疗有效量的本文公开的多特异性结合蛋白(例如A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗)的药物制剂。所述药物制剂包含一种或多种赋形剂,并被维持在一定pH下。当在本文中使用时,术语"赋形剂"意味着添加到所述制剂以提供所需物理或化学性质例如pH、渗透压、黏度、透明度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸附或渗透的任何非治疗药剂。

[0284] 赋形剂和pH

[0285] 本发明的药物制剂中的所述一种或多种赋形剂包括缓冲剂。当在本文中使用时,

术语“缓冲剂”是指当添加到水性溶液时能够保护所述溶液对抗在添加酸或碱时或在用溶剂稀释后pH的变化的一种或多种组分。除了磷酸盐缓冲剂之外,还可以使用甘氨酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐、组氨酸缓冲剂等,在这种情况下,钠、钾或铵离子可以充当平衡离子。

[0286] 在某些实施方式中,所述缓冲剂或缓冲系统包含缓冲范围与pH 5.5-7.4的范围完全或部分重叠的至少一种缓冲剂。在某些实施方式中,所述缓冲剂具有约6.0±0.5的pKa。在某些实施方式中,所述缓冲剂包含组氨酸缓冲剂。在某些实施方式中,所述组氨酸以5至100mM、10至100mM、15至100mM、20至100mM、5至50mM、10至50mM、15至100mM、20至100mM、5至25mM、10至25mM、15至25mM、20至25mM、5至20mM、10至20mM或15至20mM的浓度存在。在某些实施方式中,所述组氨酸以5mM、10mM、15mM、20mM、25mM或50mM的浓度存在。在某些实施方式中,所述组氨酸以20mM的浓度存在。

[0287] 本发明的药物制剂可以具有5.5至6.5的pH。例如,在某些实施方式中,所述药物制剂具有5.5至6.5(即6.0±0.5)、5.6至6.4(即6.0±0.4)、5.7至6.3(即6.0±0.3)、5.8至6.2(即6.0±0.2)、5.9至6.1(即6.0±0.1)或5.95至6.05(即6.0±0.05)的pH。在某些实施方式中,所述药物制剂具有5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4或6.5的pH。在某些实施方式中,所述药物制剂具有6.0的pH。在科学舍入规则下,大于或等于5.95并小于或等于6.05的pH被舍入为6.0。

[0288] 在某些实施方式中,所述药物制剂的缓冲系统包含10至25mM的组氨酸,pH为6.0±0.2。在某些实施方式中,所述药物制剂的缓冲系统包含20mM的组氨酸,pH为6.0±0.2。在某些实施方式中,所述药物制剂的缓冲系统包含10至25mM的组氨酸,pH为6.0±0.05。在某些实施方式中,所述药物制剂的缓冲系统包含20mM的组氨酸,pH为6.0±0.05。

[0289] 本发明的药物制剂中的所述一种或多种赋形剂还包括糖或糖醇。糖和糖醇可以在药物制剂中用作热稳定剂。在某些实施方式中,所述药物制剂包含糖,例如单糖(葡萄糖、木糖或赤藓糖醇)、二糖(例如蔗糖、海藻糖、麦芽糖或半乳糖)或寡糖(例如水苏糖)。在特定实施方式中,所述药物制剂包含蔗糖。在某些实施方式中,所述药物组合物包含糖醇,例如源自于单糖的糖醇(例如甘露糖醇、山梨糖醇或木糖醇)、源自于二糖的糖醇(例如乳糖醇或麦芽糖醇)或源自于寡糖的糖醇。在特定实施方式中,所述药物制剂包含山梨糖醇。

[0290] 在所述制剂中包含的糖或糖醇的量可以随着使用所述制剂的具体情况和所打算的目的而变。在某些实施方式中,所述药物制剂包含50至300mM、50至250mM、100至300mM、100至250mM、150至300mM、150至250mM、200至300mM、200至250mM或250至300mM的所述糖或糖醇。在某些实施方式中,所述药物制剂包含50mM、75mM、100mM、125mM、150mM、200mM、250mM或300mM的所述糖或糖醇。在特定实施方式中,所述药物制剂包含250mM的所述糖或糖醇(例如蔗糖或山梨糖醇)。

[0291] 本文公开的药物制剂中的所述一种或多种赋形剂还包括表面活性剂表面活性剂。当在本文中使用时,术语“表面活性剂”是指含有疏水部分(例如烷基链)和亲水性部分(例如羧基和羧酸酯基团)两者的表面活性分子。表面活性剂可以在药物制剂中用于减少治疗性蛋白的聚集。适用于所述药物制剂的表面活性剂通常是非离子型表面活性剂,例如但不限于聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯20或80);泊洛沙姆(例如泊洛沙姆188);失水山梨糖醇酯和衍生物;曲拉通;月桂基硫酸钠;辛基糖苷钠;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-或硬脂基-磺基甜菜碱;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-或硬脂基-肌氨酸;亚油基-、肉豆蔻基-或鲸蜡基-

甜菜碱;月桂酰胺丙基-、椰油酰胺丙基-、亚油酰胺丙基-、肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈酰胺丙基-或异硬脂酰胺丙基-甜菜碱(例如月桂酰胺丙基);肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈酰胺丙基-或异硬脂酰胺丙基-二甲胺;甲基椰油酰基钠或甲基油基牛磺酸二钠;和MONAQUAT™系列(Mona Industries,Inc.,Paterson,N.J.)、聚乙二醇、聚丙二醇以及乙二醇和丙二醇的共聚物(例如Pluronics、PF68等)。在某些实施方式中,所述表面活性剂是山梨醇酯。在某些实施方式中,所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0292] 本发明的药物制剂中包含的非离子型表面活性剂的量可以随着所述制剂的所需具体性质以及所述制剂打算用于的具体情况和目的而变。在某些实施方式中,所述药物制剂包含0.005%至0.5%、0.005%至0.2%、0.005%至0.1%、0.005%至0.05%、0.005%至0.02%、0.005%至0.01%、0.01%至0.5%、0.01%至0.2%、0.01%至0.1%、0.01%至0.05%或0.01%至0.02%的所述非离子型表面活性剂(例如聚山梨醇酯80)。在某些实施方式中,所述药物制剂包含0.005%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%、0.35%、0.4%、0.45%或0.5%的所述非离子型表面活性剂(例如聚山梨醇酯80)。

[0293] 在某些实施方式中,所述药物制剂是等渗的。"等渗"制剂与具有与人类血液基本上相同的渗透压的制剂。等渗制剂通常具有约250至350mOsmol/kgH_2O的渗透压。等渗性可以使用蒸气压或冰冻类型的渗透压计来测量。在某些实施方式中,所述药物制剂的渗透压为250至350mOsmol/kgH_2O。在某些实施方式中,所述药物制剂的渗透压为300至350mOsmol/kgH_2O。

[0294] 可以在所述药物制剂中包含诸如糖、糖醇和NaCl的物质来获得所需渗透压。在某些实施方式中,所述药物制剂中NaCl如果存在的话,其浓度等于或低于10mM、9mM、8mM、7mM、6mM、5mM、4mM、3mM、2mM、1mM、0.5mM、0.1mM、50μM、10μM、5μM或1μM。在某些实施方式中,所述药物制剂中NaCl的浓度低于检测极限。在某些实施方式中,在制备所述药物制剂时不添加NaCl盐。

[0295] 本发明的药物制剂还可以包含一种或多种其他物质,例如增量剂或防腐剂。"增量剂"是为冻干混合物增添质量并对冻干饼的物理结构有贡献(例如便于生产基本上均匀的维持开孔结构的冻干饼)的化合物。说明性的增量剂包括甘露糖醇、甘氨酸、聚乙二醇和山梨糖醇。本发明的冻干制剂可以含有此类增量剂。防腐剂可以减少细菌的作用,并可以例如促进多用途(多剂)制剂的生产。

[0296] 示例性制剂

[0297] 在某些实施方式中,本发明的药物制剂包含多特异性结合蛋白、组氨酸、糖或糖醇(例如蔗糖或山梨糖醇)和聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80),具有5.5至6.5的pH。

[0298] 在某些实施方式中,所述药物制剂包含10至50mg/mL的所述多特异性结合蛋白、10至25mM的组氨酸、200至300mM的糖或糖醇(例如蔗糖或山梨糖醇)和0.005%至0.05%的聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80),pH为5.5至6.5。在某些实施方式中,所述药物制剂包含10至50mg/mL的所述多特异性结合蛋白、20mM的组氨酸、250mM的糖或糖醇(例如蔗糖或山梨糖醇)和0.01%的聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80),pH为5.5至6.5。在某些实施方式中,所述药物制剂包含10至50mg/mL的所述多特异性结合蛋白、20mM的组氨酸、250mM的糖或糖醇(例如蔗糖或山梨糖醇)和0.01%的聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80),pH为5.8至6.2。在某些实

施方式中,所述药物制剂包含10至50mg/mL的所述多特异性结合蛋白、20mM的组氨酸、250mM的糖或糖醇(例如蔗糖或山梨糖醇)和0.01%的聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80),pH为5.95至6.05。

[0299] 在某些实施方式中,所述药物制剂包含10至50mg/mL的所述多特异性结合蛋白、10至25mM的组氨酸、200至300mM的蔗糖和0.005%至0.05%的聚山梨醇酯80,pH为5.5至6.5。在某些实施方式中,所述药物制剂包含10至50mg/mL的所述多特异性结合蛋白、20mM的组氨酸、250mM的蔗糖和0.01%的聚山梨醇酯80,pH为5.5至6.5。在某些实施方式中,所述药物制剂包含10至50mg/mL的所述多特异性结合蛋白、20mM的组氨酸、250mM的蔗糖和0.01%的聚山梨醇酯80,pH为5.8至6.2。在某些实施方式中,所述药物制剂包含10至50mg/mL的所述多特异性结合蛋白、20mM的组氨酸、250mM的蔗糖和0.01%的聚山梨醇酯80,pH为5.95至6.05。

[0300] 在某些实施方式中,所述药物制剂包含10至50mg/mL的所述多特异性结合蛋白、10至25mM的组氨酸、200至300mM的山梨糖醇和0.005%至0.05%的聚山梨醇酯80,pH为5.5至6.5。在某些实施方式中,所述药物制剂包含10至50mg/mL的所述多特异性结合蛋白、20mM的组氨酸、250mM的山梨糖醇和0.01%的聚山梨醇酯80,pH为5.5至6.5。在某些实施方式中,所述药物制剂包含10至50mg/mL的所述多特异性结合蛋白、20mM的组氨酸、250mM的山梨糖醇和0.01%的聚山梨醇酯80,pH为5.8至6.2。在某些实施方式中,所述药物制剂包含10至50mg/mL的所述多特异性结合蛋白、20mM的组氨酸、250mM的山梨糖醇和0.01%的聚山梨醇酯80,pH为5.95至6.05。

[0301] 多特异性结合蛋白的稳定性

[0302] 本发明的药物制剂表现出高水平的稳定性。当在限定条件下储存后药物制剂中的多特异性结合蛋白保留可接受程度的物理性质、化学结构和/或生物学功能时,所述制剂是稳定的。

[0303] 稳定性可以通过在限定温度下储存限定量的时间后确定所述制剂中保留天然构象的多特异性结合蛋白的百分率来度量。处于天然构象的蛋白质的百分率可以通过例如体积排阻层析(例如体积排阻高效液相色谱)来确定,其中处于天然构象的蛋白质不聚集(在高分子量级分中洗脱)或降解(在低分子量级分中洗脱)。在某些实施方式中,在4℃温育3周后,当通过体积排阻色谱法测定时,超过95%、96%、97%、98%或99%的所述多特异性结合蛋白具有天然构象。在某些实施方式中,在50℃温育3周后,当通过体积排阻色谱法测定时,超过90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的所述多特异性结合蛋白具有天然构象。在某些实施方式中,在4℃温育3周后,当通过体积排阻色谱法测定时,少于0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%或1%的所述多特异性结合蛋白形成高分子量复合物(即具有比天然蛋白更高的分子量)。在某些实施方式中,在50℃温育3周后,当通过体积排阻色谱法测定时,少于1%、2%、3%、4%或5%的所述多特异性结合蛋白形成高分子量复合物(即具有比天然蛋白更高的分子量)。在某些实施方式中,在4℃温育3周后,当通过体积排阻色谱法测定时,少于0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%或1%的所述多特异性结合蛋白被降解(即具有比天然蛋白更低的分子量)。在某些实施方式中,在50℃温育3周后,当通过体积排阻色谱法测定时,少于1%、1.5%、2%、2.5%或3%的所述多特异性结合蛋白被降解(即具有比天然蛋白更低的分子量)。

[0304] 稳定性也可以通过确定在更酸性级分中存在的多特异性结合蛋白(“酸性形式”)

相对于蛋白质的主要级分(“主要电荷形式”)的百分率来度量。不希望受到理论限制,蛋白质的脱酰胺化可能导致它相对于未脱酰胺化的蛋白质变得带有更多负电荷并因此酸性更高(参见例如Robinson,蛋白质脱酰胺化(Protein Deamidation)(2002)PNAS 99(8):5283-88)。蛋白质的酸性形式的百分率可以通过离子交换层析(例如阳离子交换高效液相色谱)或成像毛细管等电聚焦(icIEF)来确定。在某些实施方式中,在4℃温育3周后,所述药物制剂中至少50%、60%、70%、80%或90%的多特异性结合蛋白采取主要电荷形式。在某些实施方式中,在50℃温育3周后,所述药物制剂中至少15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的多特异性结合蛋白采取主要电荷形式。在某些实施方式中,在4℃温育3周后,所述药物制剂中不超过10%、20%、30%、40%或50%的多特异性结合蛋白采取酸性形式。在某些实施方式中,在50℃温育3周后,所述药物制剂中不超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%或85%的多特异性结合蛋白采取酸性形式。

[0305] 稳定性也可以通过在用十二烷基硫酸钠(SDS)变性蛋白质后通过电泳确定所述多特异性结合蛋白的纯度来度量。所述蛋白质样品可以在存在或不存在还原蛋白质二硫键的试剂(例如β-巯基乙醇)的情况下变性。在某些实施方式中,在4℃温育3周后,在还原条件下(例如在β-巯基乙醇存在下)变性蛋白质样品后,通过毛细管电泳测量的所述药物制剂中多特异性结合蛋白的纯度为至少95%、96%、97%、98%或99%。在某些实施方式中,在50℃温育3周后,在还原条件下(例如在β-巯基乙醇存在下)变性蛋白质样品后,通过毛细管电泳测量的所述药物制剂中多特异性结合蛋白的纯度为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在某些实施方式中,在4℃温育3周后,在非还原条件下变性蛋白质样品后,通过毛细管电泳测量的所述药物制剂中多特异性结合蛋白的纯度为至少95%、96%、97%、98%或99%。在某些实施方式中,在50℃温育3周后,在非还原条件下变性蛋白质样品后,通过毛细管电泳测量的所述药物制剂中多特异性结合蛋白的纯度为至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0306] 稳定性也可以通过经动态光散射确定蛋白质溶液的参数来度量。Z-平均值和多分散指数(PDI)值指示了溶液中粒子的平均直径,并且当溶液中存在聚集体时这些测量值增加。单体%Pd值指示检测到的不同单体的分布,其中较低的值表明单分散溶液,这是优选的。通过DLS检测到的单体尺寸可用于确认主要群体是单体,并用于表征可能存在的任何更高阶聚集体。在某些实施方式中,在4℃温育3周后,所述药物制剂的Z-平均值的增加不超过5%、10%或15%。在某些实施方式中,在50℃温育3周后,所述药物制剂的Z-平均值的增加不超过5%、10%、15%、20%或25%。在某些实施方式中,在4℃温育3周后,所述药物制剂的PDI值的增加不超过10%、20%、30%、40%或50%。在某些实施方式中,在50℃温育3周后,所述药物制剂的PDI值的增加不超过2倍、3倍、4倍或5倍。

[0307] 确定所述药物制剂中的多特异性结合蛋白的稳定性的示例性方法描述在本公开的实施例1中。此外,所述蛋白质的稳定性可以通过在某些体外测定法例如WO 2018/152518中描述的NK细胞活化测定法和细胞毒性测定法中测量所述多特异性结合蛋白与其靶的结合亲和性或所述多特异性结合蛋白的生物学活性来评估。

[0308] 剂型

[0309] 所述药物制剂可以作为液体制剂或冻干形式来制备和储存。在某些实施方式中,所述药物制剂是用于在2-8℃(例如4℃)储存的液体制剂或用于在-20℃或更低温度下储存

的冷冻制剂。所述制剂中的糖或糖醇被用作冻干保护剂。

[0310] 在药物使用之前,可以将所述药物制剂在适合于给药途径的水性载体中稀释或重构。其他示例性载体包括无菌注射用水(SWFI)、抑菌注射用水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或右旋糖溶液。例如,当所述药物制剂被制备用于静脉内给药时,可以将所述药物制剂在0.9%氯化钠(NaCl)溶液中稀释。在某些实施方式中,所述稀释的药物制剂是等渗的,并适合于通过静脉输注给药。

[0311] 所述药物制剂以适合于储存的浓度包含所述多特异性结合蛋白。在某些实施方式中,所述药物制剂以10-50mg/mL、10-40mg/mL、10-30mg/mL、10-25mg/mL、10-20mg/mL、10-15mg/mL、15-50mg/mL、15-40mg/mL、15-30mg/mL、15-25mg/mL、15-20mg/mL、20-50mg/mL、20-40mg/mL、20-30mg/mL、20-25mg/mL、30-50mg/mL、30-40mg/mL或40-50mg/mL的浓度包含所述多特异性结合蛋白。在某些实施方式中,所述药物制剂以10mg/mL、11mg/mL、12mg/mL、13mg/mL、14mg/mL、15mg/mL、16mg/mL、17mg/mL、18mg/mL、19mg/mL、20mg/mL、25mg/mL、30mg/mL、35mg/mL、40mg/mL、45mg/mL或50mg/mL的浓度包含所述多特异性结合蛋白。

[0312] 在某些实施方式中,所述药物制剂被包装在容器(例如小瓶、袋子、笔或注射器)中。在某些实施方式中,所述制剂可以是冻干制剂或液体制剂。在某些实施方式中,所述容器中多特异性结合蛋白的量适合于作为单剂给药。在某些实施方式中,所述容器中多特异性结合蛋白的量适合于多剂给药。在某些实施方式中,所述药物制剂以0.1至2000mg的量包含所述多特异性结合蛋白。在某些实施方式中,所述药物制剂以1至2000mg、10至2000mg、20至2000mg、50至2000mg、100至2000mg、200至2000mg、500至2000mg、1000至2000mg、0.1至1000mg、1至1000mg、10至1000mg、20至1000mg、50至1000mg、100至1000mg、200至1000mg、500至1000mg、0.1至500mg、1至500mg、10至500mg、20至500mg、50至500mg、100至500mg、200至500mg、0.1至200mg、1至200mg、10至200mg、20至200mg、50至200mg、100至200mg、0.1至100mg、1至100mg、10至100mg、20至100mg、50至100mg、0.1至50mg、1至50mg、10至50mg、20至50mg、0.1至20mg、1至20mg、10至20mg、0.1至10mg、1至10mg或0.1至1mg的量包含所述多特异性结合蛋白。在某些实施方式中,所述药物制剂以0.1mg、1mg、2mg、5mg、10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、500mg、600mg、700mg、800mg、900mg、1000mg、1500mg或2000mg的量包含所述多特异性结合蛋白。

[0313] 剂量方案和治疗用途

[0314] 另一方面,本公开提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括在初始的4周治疗周期中,在第1天、第8天和第15天向有需要的受试者给药本文公开的多特异性结合蛋白(例如A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗)。在某些实施方式中,所述多特异性结合蛋白仅在所述初始的4周治疗周期中的这三天给药到所述受试者。在特定实施方式中,所述多特异性结合蛋白不在第22天给药到所述受试者。这种方案是剂量强化计划,其被设计成在治疗过程中尽可能早地达到靶的最大饱和,同时将患者的输液负担降至最低。

[0315] 在某些实施方式中,所述方法还包括在所述初始治疗周期后,在一个或多个后续的4周治疗周期中向所述受试者给药所述多特异性结合蛋白,其中在每个后续治疗周期中所述多特异性结合蛋白在第1天和第15天给药。在某些实施方式中,在每个后续4周治疗周期中所述多特异性结合蛋白仅在这两天给药到所述受试者。在特定实施方式中,所述多特异性结合蛋白不在第8天或第22天给药到所述受试者。所述其中受试者每两周一次接受多

特异性结合蛋白的给药的后续治疗周期,被设计用于将所述受试者中的多特异性结合蛋白维持在一定水平。在某些实施方式中,所述受试者接受至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个后续治疗周期。在某些实施方式中,所述受试者接受后续治疗周期直至癌症消退。

[0316] 在某些实施方式中,所述初始和后续治疗周期中的一剂或多剂以0.1-20mg/kg、0.1-10mg/kg、0.1-5mg/kg、0.1-2mg/kg、0.1-1mg/kg、0.1-0.5mg/kg、0.1-0.2mg/kg、0.2-20mg/kg、0.2-10mg/kg、0.2-5mg/kg、0.2-2mg/kg、0.2-1mg/kg、0.2-0.5mg/kg、0.5-20mg/kg、0.5-10mg/kg、0.5-5mg/kg、0.5-2mg/kg、0.5-1mg/kg、1-20mg/kg、1-10mg/kg、1-5mg/kg或1-2mg/kg的量包含所述多特异性结合蛋白。在某些实施方式中,所述初始和后续治疗周期中的一剂或多剂以选自0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2mg/kg、2.5mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg和20mg/kg的量包含所述多特异性结合蛋白。

[0317] 在某些实施方式中,所述初始和后续治疗周期中的每个药剂以选自0.1-20mg/kg、0.1-10mg/kg、0.1-5mg/kg、0.1-2mg/kg、0.1-1mg/kg、0.1-0.5mg/kg、0.1-0.2mg/kg、0.2-20mg/kg、0.2-10mg/kg、0.2-5mg/kg、0.2-2mg/kg、0.2-1mg/kg、0.2-0.5mg/kg、0.5-20mg/kg、0.5-10mg/kg、0.5-5mg/kg、0.5-2mg/kg、0.5-1mg/kg、1-20mg/kg、1-10mg/kg、1-5mg/kg和1-2mg/kg的量包含所述多特异性结合蛋白。在某些实施方式中,所述初始和后续治疗周期中的每个药剂以选自0.1-20mg/kg、0.1-10mg/kg、0.1-5mg/kg、0.1-2mg/kg、0.1-1mg/kg、0.1-0.5mg/kg、0.1-0.2mg/kg、0.2-20mg/kg、0.2-10mg/kg、0.2-5mg/kg、0.2-2mg/kg、0.2-1mg/kg、0.2-0.5mg/kg、0.5-20mg/kg、0.5-10mg/kg、0.5-5mg/kg、0.5-2mg/kg、0.5-1mg/kg、1-20mg/kg、1-10mg/kg、1-5mg/kg和1-2mg/kg的相同量包含所述多特异性结合蛋白。

[0318] 在某些实施方式中,所述初始和后续治疗周期中的每个药剂以选自0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2mg/kg、2.5mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg和20mg/kg的量包含所述多特异性结合蛋白。在某些实施方式中,所述初始和后续治疗周期中的每个药剂以选自0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2mg/kg、2.5mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg和20mg/kg的相同量包含所述多特异性结合蛋白。

[0319] 在某些实施方式中,所述初始和后续治疗周期中的每个药剂以选自5.2×10^{-5}mg/kg、1.6×10^{-4}mg/kg、5.2×10^{-4}mg/kg、1.6×10^{-3}mg/kg、5.2×10^{-3}mg/kg、1.6×10^{-2}mg/kg、5.2×10^{-2}mg/kg、1.6×10^{-1}mg/kg、0.52mg/kg、1.6mg/kg、5.2mg/kg、10mg/kg和20mg/kg的量包含所述多特异性结合蛋白。在某些实施方式中,所述初始和后续治疗周期中的每个药剂以选自5.2×10^{-5}mg/kg、1.6×10^{-4}mg/kg、5.2×10^{-4}mg/kg、1.6×10^{-3}mg/kg、5.2×10^{-3}mg/kg、1.6×10^{-2}mg/kg、5.2×10^{-2}mg/kg、1.6×10^{-1}mg/kg、0.52mg/kg、1mg/kg、1.6mg/kg、5.2mg/kg、10mg/kg、20mg/kg和50mg/kg的相同量包含所述多特异性结合蛋白。

[0320] 在某些实施方式中,所述多特异性结合蛋白静脉内给药。例如,在某些实施方式

中,所述多特异性结合蛋白通过静脉输注给药,例如使用预装袋、预装笔或预装注射器。在某些实施方式中,本文公开的药物制剂中的多特异性结合蛋白在给药之前进行稀释。例如,在某些实施方式中,将所述药物制剂用氯化钠稀释并从250ml盐水袋静脉内给药。所述静脉输注可以进行约1小时(例如50至80分钟)。在某些实施方式中,将所述袋子连接到包括管和/或针的通道。

[0321] 可以用本文公开的多特异性结合蛋白或药物制剂治疗的癌症类型包括但不限于乳腺癌、甲状腺癌、胃癌、肾细胞癌、肺腺癌、前列腺癌、胆管癌、子宫癌、胰腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌、宫颈癌、头颈癌、NSCLC、成胶质细胞瘤、食道癌、皮肤鳞状细胞癌、唾液腺癌、胆道癌、肺鳞癌、间皮瘤、肝癌、肉瘤、膀胱癌和胆囊癌。在某些实施方式中,所述癌症是实体肿瘤。在某些实施方式中,所述癌症是局部晚期或转移性实体肿瘤。在某些实施方式中,所述癌症是尿路上皮膀胱癌或转移性乳腺癌。

[0322] 在某些实施方式中,通过本文公开的方法治疗的受试者患有HER2阳性癌症。确定癌症中HER2的表达的方法包括但不限于免疫组织化学。抗HER2抗体(例如Ventana 4B5抗体和Bond Oracle CB11抗体)已被FDA批准用于检测HER2,并且免疫组织化学试剂盒(例如HercepTest™)是可商购的。当通过免疫组织化学检测时,肿瘤样品中的HER2表达水平可以按照ASCO/CAP指南被定量和评分为1+、2+或3+(Wolff等,(2007)J.Clin.Oncol.25(1):118-45)。在某些实施方式中,通过本文公开的方法治疗的受试者具有HER2水平被评分为1+、2+或3+的肿瘤。在某些实施方式中,通过本文公开的方法治疗的受试者具有HER2水平被评分为2+或3+的肿瘤。在某些实施方式中,通过本文公开的方法治疗的受试者具有HER2水平被评分为3+的肿瘤。在某些实施方式中,所述HER2水平通过免疫组织化学(例如HercepTest™)来确定。在某些实施方式中,通过本文公开的方法治疗的受试者所具有的肿瘤显示出在至少或超过10%的肿瘤细胞中检测到至少为微弱/几乎无法察觉的膜染色的HER2表达。在某些实施方式中,通过本文公开的方法治疗的受试者所具有的肿瘤显示出在至少或超过10%的肿瘤细胞中检测到至少为弱至中度的完全膜染色的HER2表达。在某些实施方式中,通过本文公开的方法治疗的受试者所具有的肿瘤显示出在至少或超过10%的肿瘤细胞中检测到至少为强的完全膜染色的HER2表达。

[0323] 在某些实施方式中,通过本文公开的方法治疗的受试者患有具有ERBB2基因扩增的癌症。ERBB2基因扩增通过与HER2过表达相关,并且确定癌组织样品中ERBB2基因是否被扩增可以帮助减少来自于同一样品的免疫组织化学的假阳性结果(参见例如Sarode等,(2015)Arch.Pathol.Lab.Med.139:922-28)。检测基因扩增的方法包括但不限于荧光原位杂交(FISH)、显色原位杂交(CISH)、定量PCR和DNA测序。在某些实施方式中,ERBB2基因扩增通过FISH来确定。在某些实施方式中,ERBB2基因扩增通过DNA测序(例如深度测序)来确定。

[0324] 在某些实施方式中,按照本文公开的方法治疗的受试者尚未接受用于治疗所述癌症的先前疗法。在某些实施方式中,按照本文公开的方法治疗的受试者尚未接受用于治疗所述癌症的先前化学治疗或免疫治疗。在某些实施方式中,按照本文公开的方法治疗的受试者已接受先前治疗(例如化学治疗或免疫治疗),但尽管接受所述先前治疗却继续经历癌症进展。在某些实施方式中,按照本文公开的方法治疗的受试者在接受先前治疗(例如化学治疗或免疫治疗)后已经历癌症消退,但在晚些时候经历癌症复发。在某些实施方式中,按照本文公开的方法治疗的受试者对先前治疗(例如化学治疗或免疫治疗)不耐受。

[0325] 在某些实施方式中,按照本文公开的方法治疗的受试者满足实施例3中描述的临床试验组群(例如加速滴定组群、“3+3”剂量递增组群、安全性/PK/PD扩展组群、尿路上皮膀胱癌(UBC)组群、转移性乳腺癌(MBC)组群、具有高HER2表达(HER2 3+)的Basket实体肿瘤组群或与派姆单抗的组合治疗组群)的所有纳入标准。在某些实施方式中,按照本文公开的方法治疗的受试者不满足实施例3中描述的任何排除标准。

[0326] 本文公开的多特异性结合蛋白可以作为单一疗法或与一种或多种疗法联合使用。在某些实施方式中,所述多特异性结合蛋白按照本文公开的剂量方案用作单一疗法。在其他实施方式中,所述多特异性结合蛋白与一种或多种疗法联合使用,其中所述多特异性结合蛋白按照本文公开的剂量方案给药,并且所述一种或多种疗法按照已知适合于治疗患有特定癌症的特定受试者的剂量方案给药。在某些实施方式中,本文公开的治疗方法用作手术移除原发病灶的辅助治疗。

[0327] 可以与所述多特异性结合蛋白联合使用的示例性治疗剂包括例如辐射、丝裂霉素、维甲酸、核莫司汀、吉西他滨、长春新碱、依托泊苷、克拉屈滨、二溴甘露醇、甲氨蝶呤、多柔比星、卡波醌、喷司他丁、nitracrine、净司他丁、西曲瑞克、来曲唑、雷替曲塞、柔红霉素、法屈唑、福莫司汀、胸腺法新、索布佐生、奈达铂、阿糖胞苷、比卡鲁胺、长春瑞滨、维司力农、氨鲁米特、安吖啶、丙谷胺、依利醋铵、酮色林、去氧氟尿苷、依曲替酯、异维甲酸、链脲佐菌素、尼莫司汀、长春地辛、氟他胺、drogenil、butocin、卡莫氟、雷佐生、sizofilan、卡铂、二溴卫矛醇、替加氟、异环磷酰胺、泼尼莫司汀、沙培林、左旋咪唑、替尼泊苷、英丙舒凡、依诺他滨、麦角乙脲、羟甲烯龙、他莫昔芬、黄体酮、美雄烷、环硫雄醇、福美司坦、干扰素-α、干扰素-2α、干扰素-β、干扰素-γ(IFN-γ)、集落刺激因子-1、集落刺激因子-2、地尼白介素、白介素-2、促黄体生成素释放因子,以及可能表现出与其同源受体的差异结合或增加或减少的血清半衰期的上述药剂的任何变化形式。

[0328] 可以在治疗癌症中用作组合疗法的一部分的另一类药剂是免疫检查点抑制剂。示例性的免疫检查点抑制剂包括抑制下述一者或多者的抑制剂:(i)细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4),(ii)程序性细胞死亡蛋白1(PD1),(iii)PDL1,(iv)LAG3,(v)B7-H3,(vi)B7-H4,和(vii)TIM3。CTLA4抑制剂伊匹单抗已被美国食品与药品监督管理局(United States Food and Drug Administration)批准用于治疗黑素瘤。

[0329] 可以在治疗癌症中用作组合疗法的一部分的其他药剂是靶向非检查点靶的单克隆抗体药剂(例如赫塞汀)和非细胞毒性药剂(例如酪氨酸激酶抑制剂)。

[0330] 另一类抗癌药剂包括例如:(i)选自ALK抑制剂、ATR抑制剂、A2A拮抗剂、碱基切除修复抑制剂、Bcr-Abl酪氨酸激酶抑制剂、Bruton's酪氨酸激酶抑制剂、CDC7抑制剂、CHK1抑制剂、周期蛋白依赖性激酶抑制剂、DNA-PK抑制剂、DNA-PK和mTOR两者的抑制剂、DNMT1抑制剂、DNMT1抑制剂加2-氯-脱氧腺苷、HDAC抑制剂、刺猬信号传导途径抑制剂、IDO抑制剂、JAK抑制剂、mTOR抑制剂、MEK抑制剂、MELK抑制剂、MTH1抑制剂、PARP抑制剂、磷酸肌醇3-激酶抑制剂、PARP1和DHODH两者的抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶-II抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、VEGFR抑制剂和WEE1抑制剂的抑制剂;(ii)OX40、CD137、CD40、GITR、CD27、HVEM、TNFRSF25或ICOS的激动剂;和(iii)选自IL-12、IL-15、GM-CSF和G-CSF的细胞因子。

[0331] 在某些实施方式中,本发明的方法还包括向所述受试者给药抗PD-1抗体。已开发了许多抗PD-1抗体用于治疗目的,它们描述在例如Gong等,(2018)J.ImmunoTher Cancer

(2018)6:8中。在某些实施方式中,所述抗PD-1抗体是派姆单抗。在某些实施方式中,在所述初始治疗周期的第1天给药200mg的派姆单抗。在某些实施方式中,如果所述受试者接受一个或多个后续治疗周期,则在所述后续治疗周期中从第一个后续治疗周期的第1天开始每三周一次给药200mg的派姆单抗。

[0332] 在某些实施方式中,本文公开的治疗方法引起所述受试者或患者的疾病响应或改善他们的生存。例如,在某些实施方式中,所述疾病响应是完全响应、部分响应或稳定的疾病。在某些实施方式中,所述改善的生存是改善的无进展生存期(PFS)或总生存期。改善(例如在PFS方面)可以相对于本公开的治疗开始之前的时间段来确定。对于BTC(例如晚期BTC、转移性BTC)或胆道肿瘤疗法来说,确定疾病响应(例如完全响应、部分响应或稳定的疾病)和患者生存(例如PFS、总生存期)的方法在本领域中是常规的并在本文中考虑到了。在某些实施方式中,疾病响应在对被治疗的患者进行对比增强计算机断层扫描(CT)或对受影响的区域(例如覆盖从胸廓入口上方到耻骨联合的区域的胸部/腹部和骨盆)进行磁共振成像(MRI)之后,根据RECIST 1.1来评估。

实施例

[0333] 通过参考下述实施例,现在正一般性描述的本公开将更容易被理解,包括这些实施例仅仅是出于说明本公开的某些方面和实施方式的目的,并且不打算以任何方式限制本公开的范围。

[0334] 实施例1:A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的配制、包装和储存

[0335] 对表12中列出的制剂进行了一式两份且随机化的评估,以评估pH和赋形剂对A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗(Kermit BDS批号7443-C3,11.9mg/mL)的稳定性的影响。将A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗通过离心超滤(Amicon Ultra-4 30k装置MWCO)在相应的缓冲剂和赋形剂组合中进行缓冲液交换至目标浓度为30mg/mL。在最后的缓冲液交换并确认目标浓度后,使用带有Durapore膜(Fisher Scientific目录号UFC40GV0S)的0.22μm EMD Millipore Ultrafree-CL离心过滤装置对每个配制的样品进行过滤除菌。在除菌过滤后,将每个制剂在层流净化罩中无菌操作。向所述配制的样品掺入聚山梨醇酯80(PS80)至终浓度为0.01%。取出每种制剂的等分试样用于零时测试,并将剩余的材料分成两等份,置于2mL x 13mm的去热原1型硼硅酸盐玻璃小瓶中(West Pharmaceuticals目录号68000377),用13mm Fluorotec塞子(West Pharmaceuticals目录号19700302)塞住并密封。将零时等分试样用于根据表13进行初始时间点测试。将一个小瓶储存在2-8℃下,并将另一个小瓶置于50℃下用于3周的加速稳定性研究。在温育3周后,按照表13中指示的测试方法分析所述2-8℃和50℃样品。

[0336] 表12.评估的制剂

[0337]

缓冲剂	赋形剂	表面活性剂	pH					条件	浓度
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇	0.01% PS80	5.5	5.8	6.0	6.2	6.5	零时,在2-8℃温育3周在50℃温育3周	30 mg/mL
	250 mM 蔗糖								
	75 mM NaCl,125 mM 山梨糖醇								
	75 mM NaCl,125 mM 蔗糖								

[0338] 表13.在制剂评估中使用的测定法小组

[0339]

测试方法	初始	3周温育	
		2－8℃	50℃
外观	X	X	X
浓度，（ϵ = 1.595 mL/cm*mg）	X	X	X
pH	X	X	X
DLS	X	X	X
SEC-HPLC	X	X	X
Osmo	X	X	X
CE-SDS		X	X
icIEF		X	X

[0340] 进行了A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的加速稳定性研究,其中将A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗制备在20个如表12中所示的制剂中。将样品一式两份运行并在2-8℃和50℃下温育3周。在零时和3周温育结束后,使用如表13中所概述的测定法对每个配制的样品进行测试。正如通过外观、浓度、pH和渗透压所评估的,所有制剂行为相似并在预期范围之内。

[0341] 外观

[0342] 在将样品瓶打开之前,将样品在实验室环境条件下针对黑色和白色背景进行观察。所有样品在零时和三周两种条件下均不存在可见颗粒物。

[0343] 紫外浓度测定

[0344] 对于每个样品和条件,通过在光密度(OD)280nm处的紫外(UV)吸收来确定蛋白质浓度。在零时、2-8℃温育3周后和50℃温育3周后的蛋白质浓度概述在表14中。

[0345] pH测定

[0346] 测定了每个样品和条件的pH。在零时、2-8℃温育3周后和50℃温育3周后的pH值概述在表15中。

[0347] 动态光散射

[0348] 在25℃下,在300秒平衡后收集动态光散射(DLS)样品。为每个样品采集5个测量值。在零时、2-8℃温育3周后和50℃温育3周后的Z-平均值概述在表16中。

[0349] 也记录了平均多分散指数(%PDI)。在零时、2-8℃温育3周后和50℃温育3周后的%PDI值概述在表17中。

[0350] 还进行了样品中A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的其他DLS分析。在零时、2-8℃温育3周后和50℃温育3周后的平均单体多分散百分率(%PD)概述在表18中。在零时、2-8℃温育3周后和50℃温育3周后的平均单体尺寸值概述在表19中。

[0351] 表14.从UV吸收计算的蛋白质浓度

[0352]

缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	零时		3 周温育			
			1	2	2 – 8℃		50℃	
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	32.2	32.5	33.0	32.8	32.4	32.7
		5.8	30.2	32.4	31.3	32.6	31.3	32.5
		6.0	31.0	29.9	31.0	31.1	30.9	31.7
		6.2	28.0	32.1	29.4	31.9	28.6	31.2
		6.5	31.0	27.7	33.1	28.9	33.3	28.2
20 mM 组氨酸	250 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	31.0	30.9	31.8	33.2	31.4	31.6
		5.8	29.1	30.2	30.6	30.5	31.0	29.8
		6.0	31.0	29.7	33.1	30.3	32.2	30.4
		6.2	30.6	31.2	31.5	32.2	31.4	32.5
		6.5	31.4	30.6	31.6	32.4	31.0	31.6
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	28.7	31.3	30.1	31.1	29.6	30.7
		5.8	31.9	29.5	32.1	30.7	32.5	31.4
		6.0	32.2	29.9	32.4	31.3	31.8	30.0
		6.2	30.5	29.0	30.9	29.9	30.2	29.9
		6.5	31.6	32.0	32.4	33.6	32.4	31.5
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	28.9	29.3	29.5	30.6	29.0	30.5
		5.8	30.8	31.3	31.4	31.6	31.3	31.4
		6.0	30.9	28.6	31.1	30.9	30.4	30.3
		6.2	30.6	29.3	31.3	30.7	30.6	30.5
		6.5	31.8	30.7	30.7	29.7	30.2	29.8

[0353] 表15.pH值

[0354]

缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	零时		3 周温育			
			1	2	2 – 8℃		50℃	
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
		5.8	5.7	5.8	5.8	5.8	5.8	5.7
		6.0	6.0	5.9	6.0	5.9	6.0	5.9
		6.2	6.3	6.2	6.2	6.2	6.2	6.1
		6.5	6.4	6.4	6.5	6.4	6.5	6.4
20 mM 组氨酸	250 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
		5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.7
		6.0	6.0	5.9	6.0	6.0	6.0	6.0

[0355]

缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	零时		3 周温育			
			1	2	2 – 8℃		50℃	
		6.2	6.2	6.2	6.1	6.1	6.1	6.1
		6.5	6.4	6.5	6.4	6.5	6.4	6.4
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	5.5	5.5	5.4	5.5	5.5	5.5
		5.8	5.8	5.8	5.8	5.7	5.7	5.7
		6.0	5.9	6.0	5.9	6.0	5.9	5.9
		6.2	6.2	6.2	6.2	6.1	6.1	6.1
		6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.4
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	5.5	5.4	5.5	5.5	5.5	5.5
		5.8	5.8	5.9	5.8	5.7	5.8	5.7
		6.0	6.0	5.9	6.0	5.9	6.0	5.9
		6.2	6.2	6.2	6.1	6.2	6.1	6.1
		6.5	6.5	6.5	6.4	6.4	6.4	6.4

[0356] 表16.来自于DLS的Z-平均值

[0357]

Z-平均值								
缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	零时		3 周温育			
			1	2	2 – 8℃		50℃	
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	8.65	9.09	8.83	8.93	10.0	10.16
		5.8	8.86	8.54	8.80	8.62	9.52	9.46
		6.0	8.69	8.34	8.33	8.84	9.17	8.98
		6.2	8.45	8.03	8.62	7.94	8.75	9.48
		6.5	7.47	7.78	7.30	7.91	8.75	9.48
20 mM 组氨酸	250 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	9.86	9.58	10.58	9.53	10.41	10.61
		5.8	9.60	9.91	9.54	9.55	10.51	10.61
		6.0	9.24	9.23	9.30	9.55	10.64	10.05
		6.2	8.90	8.80	8.96	9.12	10.11	10.26
		6.5	8.14	7.86	8.67	8.44	10.06	9.49
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	12.33	11.89	12.12	11.88	16.36	15.60
		5.8	12.55	11.98	12.13	12.03	14.22	14.01
		6.0	12.32	13.05	12.55	12.43	14.20	13.86
		6.2	12.42	13.10	12.81	12.79	13.61	13.81
		6.5	12.87	12.85	13.06	12.59	14.11	13.44
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	12.83	12.42	13.05	12.61	16.65	16.32
		5.8	12.89	12.68	13.19	12.65	15.61	14.68
		6.0	13.33	12.72	13.11	12.92	14.67	14.25
		6.2	13.02	13.17	13.21	13.08	14.42	14.23
		6.5	13.22	13.47	13.44	13.39	14.48	14.16

[0358] 表17.来自于DLS的PDI值

[0359]

PDI								
缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	零时		3 周温育			
					2 - 8℃		50℃	
			1	2	1	2	1	2
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	0.05	0.08	0.05	0.07	0.18	0.19
		5.8	0.05	0.01	0.06	0.08	0.15	0.14
		6.0	0.05	0.04	0.03	0.14	0.09	0.06
		6.2	0.08	0.05	0.12	0.05	0.15	0.14
		6.5	0.11	0.05	0.09	0.12	0.17	0.19
20 mM 组氨酸	250 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	0.05	0.07	0.16	0.07	0.12	0.09
		5.8	0.06	0.08	0.05	0.05	0.10	0.12
		6.0	0.07	0.08	0.07	0.11	0.18	0.12
		6.2	0.05	0.05	0.08	0.10	0.09	0.15

[0360]

		6.5	0.08	0.06	0.16	0.19	0.18	0.14
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	0.06	0.02	0.03	0.01	0.22	0.19
		5.8	0.05	0.03	0.03	0.01	0.13	0.15
		6.0	0.03	0.09	0.04	0.04	0.14	0.13
		6.2	0.02	0.12	0.06	0.07	0.12	0.11
		6.5	0.05	0.03	0.07	0.03	0.10	0.06
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	0.07	0.03	0.08	0.06	0.22	0.20
		5.8	0.04	0.03	0.08	0.03	0.18	0.15
		6.0	0.06	0.03	0.06	0.06	0.12	0.12
		6.2	0.05	0.05	0.04	0.07	0.14	0.07
		6.5	0.03	0.06	0.05	0.05	0.09	0.10

[0361] 表18.单体%PD值

[0362]

单体%Pd								
缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	零时		3周温育			
					2-8℃		50℃	
			1	2	1	2	1	2
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	27.0	30.9	27.7	30.8	35.0	37.0
		5.8	27.3	23.0	29.7	30.6	34.1	29.5
		6.0	27.9	26.2	25.1	29.8	30.9	26.5
		6.2	31.0	27.5	33.8	26.3	36.4	30.6
		6.5	35.6	27.0	33.9	33.1	38.0	36.9
20 mM 组氨酸	250 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	28.1	31.9	39.5	31.1	36.4	31.7
		5.8	29.2	30.6	28.4	28.6	33.8	35.3
		6.0	30.4	31.3	28.8	34.8	37.2	36.3
		6.2	29.0	28.1	31.7	35.3	33.1	35.0
		6.5	31.2	29.2	36.6	36.0	38.2	39.3
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	28.7	23.6	24.6	23.0	43.8	30.7
		5.8	26.5	24.2	24.1	23.4	29.7	34.4
		6.0	25.1	32.1	25.9	24.1	35.1	33.0
		6.2	24.3	33.3	27.1	29.7	34.9	35.5
		6.5	26.1	24.6	29.9	24.0	33.0	26.1
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	29.3	24.7	29.6	26.5	45.7	30.8
		5.8	25.8	24.8	30.4	24.2	36.8	37.5
		6.0	29.1	24.2	28.3	27.2	36.4	35.1
		6.2	26.6	26.8	25.7	27.5	36.2	24.5
		6.5	25.6	29.3	27.1	27.3	32.4	32.5

[0363] 表19.单体尺寸值

[0364]

单体尺寸（d.nm）								
缓冲剂	赋形剂 / 表面活性剂	pH	零时		3周温育			
					2-8℃		50℃	
			1	2	1	2	1	2
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	9.22	9.96	9.46	9.73	10.80	11.07
		5.8	9.47	8.89	9.51	9.42	10.43	10.13
		6.0	9.32	8.87	8.78	9.51	10.05	9.60
		6.2	9.27	8.60	9.54	8.45	10.68	9.84
		6.5	8.42	8.30	8.10	8.75	9.78	10.25
20 mM 组氨酸	250 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	10.58	10.51	12.14	10.40	11.87	11.22
		5.8	10.35	10.89	10.24	10.24	11.70	11.86
		6.0	10.11	10.17	10.10	10.82	11.70	11.47
		6.2	9.58	9.42	9.85	10.24	11.20	11.30
		6.5	8.93	8.48	9.72	9.11	11.25	10.90
		5.5	13.29	12.44	12.75	12.37	18.16	16.12

[0365]

单体尺寸（d.nm）								
缓冲剂	赋形剂 / 表面活性剂	pH	零时		3周温育			
					2-8℃		50℃	
			1	2	1	2	1	2
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.8	13.40	12.61	12.75	12.56	15.37	15.33
		6.0	12.99	14.35	13.34	13.10	15.73	15.23
		6.2	13.03	14.51	13.72	13.90	15.24	15.55
		6.5	13.70	13.54	14.15	13.22	15.69	14.33
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	13.94	13.09	14.25	13.46	19.09	16.75
		5.8	13.70	13.37	14.39	13.28	17.15	16.43
		6.0	14.40	13.39	14.11	13.86	16.70	15.96
		6.2	13.87	14.11	14.00	14.06	16.29	15.17
		6.5	13.99	14.53	14.41	14.30	16.03	15.60

[0366] 正如通过DLS所评估的,由于平均尺寸和单体尺寸≤20nm,并且多分散性(PDI)≤0.300,所有A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗制剂均表现出构象稳定性。在评估赋形剂和pH组合中,在2-8℃和50℃温育3周后,仅仅山梨糖醇和蔗糖的制剂相对于NaCl与山梨糖醇和NaCl与蔗糖的组合制剂具有更低的平均尺寸(比较性模型示出在图2A和图2B中)。在2-8℃和50℃温育3周后,相比于与NaCl的组合制剂,在仅仅山梨糖醇和蔗糖的制剂中平均单体尺

寸也更低(图3A和3B)。

[0367] 体积排阻色谱法(SEC)

[0368] 按照草案方法进行体积排阻色谱法,以确定高分子量物质的百分率(%HMW)、主要物质的百分率(%Main)和低分子量物质的百分率(%LMW)。将样品在流动相缓冲剂(含有100mM磷酸盐,150mM氯化钠,pH 7.3)中稀释到2.0mg/mL并以100μg载量进样。分离使用Tosoh G3000SWxl(7.8x 300mm,目录号08541)柱进行,检测波长为280nm,带宽为8nm。样品在零时和2-8℃或50℃温育3周后进行实时分析。%HMW值概述在表20中,%main值概述在表21中,并且%LMW值概述在表22中。

[0369] 表20.%HMW SEC

[0370]

%HMW								
缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	零时		3周温育			
					2-8℃		50℃	
			1	2	1	2	1	2
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇, 0.01% PS80	5.5	0.6	0.5	0.6	0.6	3.1	3.2
		5.8	0.6	0.6	0.6	0.6	2.9	2.9
		6.0	0.6	0.6	0.6	0.6	3.0	2.9
		6.2	0.6	0.6	0.7	0.7	3.1	3.0
		6.5	0.6	0.6	0.8	0.7	3.5	3.2
	250 mM 蔗糖, 0.01% PS80	5.5	0.5	0.5	0.6	0.6	3.2	2.8
		5.8	0.5	0.6	0.6	0.6	3.1	3.0
		6.0	0.5	0.6	0.6	0.6	3.2	2.9
		6.2	0.6	0.6	0.7	0.7	3.3	3.2

[0371]

%HMW								
缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	零时		3周温育			
					2-8℃		50℃	
			1	2	1	2	1	2
		6.5	0.6	0.6	0.7	0.7	3.4	3.5
	75 mM NaCl, 125 mM 山梨糖醇, 0.01% PS80	5.5	0.6	0.6	0.6	0.6	6.1	5.6
		5.8	0.6	0.6	0.7	0.7	4.7	4.8
		6.0	0.6	0.6	0.7	0.7	4.5	4.3
		6.2	0.6	0.6	0.7	0.7	4.2	4.1
		6.5	0.6	0.7	0.8	0.8	4.3	4.3
	75 mM NaCl, 125 mM 蔗糖, 0.01% PS80	5.5	0.6	0.5	0.6	0.6	5.9	5.7
		5.8	0.6	0.6	0.6	0.6	5.0	4.9
		6.0	0.6	0.6	0.7	0.7	4.5	4.5
		6.2	0.6	0.6	0.7	0.7	4.3	4.1
		6.5	0.6	0.6	0.8	0.7	4.0	4.1

[0372] 表21.%主峰SEC

[0373]

主峰的%								
缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	零时		3 周温育			
					2 - 8℃		50℃	
			1	2	1	2	1	2
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	99.2	99.2	98.9	99.0	94.6	94.7
		5.8	99.1	99.1	98.9	98.8	95.2	95.1
		6.0	99.1	99.1	98.9	98.8	95.1	95.2
		6.2	99.1	99.0	98.8	98.8	95.1	95.2
		6.5	99.1	99.1	98.8	98.8	94.6	94.9
20 mM 组氨酸	250 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	99.2	99.1	98.9	98.8	94.5	95.0
		5.8	99.1	99.1	98.8	98.7	94.7	94.9
		6.0	99.2	99.1	98.9	98.8	94.9	95.1
		6.2	99.1	99.0	98.7	98.7	94.6	94.9
		6.5	99.1	99.0	98.7	98.6	94.6	94.4
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	99.1	99.2	98.9	99.0	91.3	92.0
		5.8	99.1	99.1	98.9	98.9	93.2	93.2
		6.0	99.2	99.0	98.9	98.9	93.5	93.7
		6.2	99.1	99.1	98.9	98.9	94.0	93.9
		6.5	99.1	99.1	98.8	98.8	93.7	93.8
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	99.1	99.2	98.9	99.0	91.3	91.9
		5.8	99.2	99.1	98.9	98.8	92.7	93.0
		6.0	99.1	99.1	98.9	98.9	93.5	93.4
		6.2	99.0	99.1	98.9	98.9	93.6	93.8
		6.5	99.1	99.1	98.8	98.8	93.9	94.0

[0374] 表22.%LMW SEC

[0375]

%LMW								
缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	零时		3 周温育			
					2 - 8℃		50℃	
			1	2	1	2	1	2
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	0.3	0.3	0.5	0.5	2.3	2.2
		5.8	0.4	0.3	0.5	0.5	2.0	2.0
		6.0	0.3	0.3	0.5	0.6	1.9	1.8
		6.2	0.3	0.4	0.5	0.5	1.8	1.8
		6.5	0.2	0.3	0.4	0.5	1.9	1.9
		5.5	0.3	0.3	0.6	0.6	2.3	2.2

[0376]

%LMW								
缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	零时		3 周温育			
					2 - 8℃		50℃	
			1	2	1	2	1	2
20 mM 组氨酸	250 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.8	0.4	0.4	0.6	0.7	2.2	2.1
		6.0	0.3	0.4	0.5	0.6	1.9	2.0
		6.2	0.3	0.4	0.7	0.6	2.1	1.9
		6.5	0.3	0.4	0.6	0.7	2.1	2.1
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	0.4	0.3	0.5	0.4	2.6	2.4
		5.8	0.3	0.3	0.4	0.5	2.1	2.0
		6.0	0.2	0.4	0.4	0.4	2.0	2.0
		6.2	0.3	0.3	0.4	0.4	1.9	2.0
		6.5	0.3	0.3	0.4	0.4	1.9	1.9
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	0.3	0.3	0.5	0.4	2.8	2.4
		5.8	0.3	0.3	0.5	0.5	2.2	2.1
		6.0	0.3	0.3	0.4	0.4	2.1	2.0
		6.2	0.4	0.3	0.4	0.4	2.0	2.1
		6.5	0.3	0.3	0.5	0.5	2.1	1.9

[0377] 在50℃温育3周后,所述配制的样品具有91.3%-95.2%范围内的%主峰值,相对于NaCl与山梨糖醇和NaCl与蔗糖的组合赋形剂,那些仅具有山梨糖醇和蔗糖的制剂维持更大的%主峰和更低的%HMW物质(分别示出在图4A和图5A中)。重要的是,单一赋形剂蔗糖和山梨糖醇两者在5.5-6.5的pH范围内均维持主峰物质的%,并且随着pH从5.5升高至6.5,均表现出仅仅略微升高的%HMW物质。对于所有赋形剂来说,随着pH从5.5升高至约6.2,%LMW

物质趋于更低(图6A)。

[0378] 在2-8℃温育3周后,所有配制的样品维持大于98%的主要物质峰的百分率。如图4B中所示,较低pH值(5.5)相比于较高pH值(pH 6.5),%主峰更大。相对于NaCl与山梨糖醇和NaCl与蔗糖的组合赋形剂,单一赋形剂山梨糖醇和蔗糖倾向于更低的%HMW。对于所有赋形剂来说,提高的pH倾向于提高的%HMW物质(图4B)。对于组合赋形剂来说%LMW物质趋于更低,但不依赖于pH(图6B)。

[0379] 渗透压

[0380] 通过凝固点降低法测量所有样品的渗透压(osmo)。所有样品在所有条件下维持渗透压。在零时、2-8℃温育3周后和50℃温育3周后的渗透压数据概述在表23中。

[0381] 表23.渗透压值

[0382]

缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	零时		3周温育			
					2-8℃		50℃	
			1	2	1	2	1	2
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇, 0.01% PS80	5.5	314	319	309	315	309	317
		5.8	310	314	317	320	307	320
		6.0	309	299	311	303	313	301
		6.2	304	351	304	354	308	354
		6.5	304	302	297	298	301	300
20 mM 组氨酸	250 mM 蔗糖, 0.01% PS80	5.5	343	347	342	348	354	360
		5.8	349	352	350	351	362	364
		6.0	344	340	345	337	348	346
		6.2	343	339	346	344	349	348
		6.5	335	337	332	340	334	344
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl, 125 mM 山梨糖醇, 0.01% PS80	5.5	322	326	321	330	322	330
		5.8	327	317	326	320	330	320
		6.0	323	372	317	376	320	375
		6.2	313	310	309	308	311	315
		6.5	313	312	312	316	313	313
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl, 125 mM 蔗糖, 0.01% PS80	5.5	348	331	345	338	354	343
		5.8	343	345	340	350	349	354
		6.0	347	339	344	338	346	343
		6.2	341	335	337	338	343	337
		6.5	342	339	332	343	339	342

[0383] 成像毛细管等电聚焦(icIEF)

[0384] 为了确定电荷变体分析,使用了成像毛细管等电聚焦(icIEF)。使用简单蛋白质-Maurice的草案方法评估电荷非均质性。将起始原料和样品在水中稀释至5mg/mL,然后与主混合物合并,将10μL样品添加到90μL主混合物。所述主混合物是1%甲基纤维素、Pharmalyte 3-10、Pharmalyte 8-10.5、pI标志物5.12、pI标志物9.50和DI水的组合。在以96孔板格式运行样品之前,制备系统适用性标准品并运行。用于Maurice的方法参数如下:#1聚焦时段=1min,1500V,#2聚焦时段=8min,3000V,检测=5次曝光,载样=55s,下限pI标志物=5.12,300像素,上限pI标志物=9.50,1800像素。每18次进样运行一次起始原料以确保读数一致。

[0385] "主峰"被鉴定为零时的配制样品中的主峰。在温育后,具有相同洗脱时间的峰可能减小并且不再代表具有最大曲线下面积的峰,但仍被鉴定为"主峰"。在2-8℃温育3周后和50℃温育3周后存在于酸性级分中的蛋白质的百分率(%酸性)值概述在表24中。存在于主峰级分中的蛋白质的百分率(%主峰)值概述在表25中。存在于碱性级分中的蛋白质的百分率(%碱性)值概述在表26中。

[0386] 表24.%酸性icIEF

[0387]

缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	3 周温育			
			2 - 8°C		50°C	
			1	2	1	2
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	35.8	36.0	73.1	73.3
		5.8	34.3	36.2	74.5	75.0
		6.0	36.0	36.2	76.1	75.5
		6.2	36.2	36.9	77.0	75.8
		6.5	36.7	35.7	81.1	80.4
20 mM 组氨酸	250 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	34.5	36.5	81.6	80.5
		5.8	35.0	36.5	81.4	80.8
		6.0	34.7	34.5	79.0	78.4
		6.2	36.1	36.4	79.8	80.1
		6.5	36.5	37.2	81.0	81.5
20 mM 组氨酸	75 mMNaCl，125 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	36.1	36.3	70.6	70.8
		5.8	35.1	36.4	73.7	73.1
		6.0	36.3	35.6	75.0	74.2
		6.2	35.3	35.2	76.4	76.3
		6.5	36.4	35.5	78.9	78.6
20 mM 组氨酸	75 mMNaCl，125 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	35.0	36.1	75.7	74.5
		5.8	35.3	36.4	77.0	75.9
		6.0	36.4	36.6	78.0	77.4
		6.2	35.0	36.9	78.1	76.5
		6.5	38.4	36.8	79.6	78.5

[0388] 表25.%主峰icIEF

[0389]

缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	3 周温育			
			2 - 8°C		50°C	
			1	2	1	2
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	60.8	60.4	21.5	21.8
		5.8	62.2	60.2	21.4	21.0
		6.0	60.3	60.3	20.4	20.9
		6.2	60.4	59.5	19.8	20.8
		6.5	59.9	60.9	16.1	17.2
20 mM 组氨酸	250 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	62.0	59.9	14.9	16.0
		5.8	61.6	59.8	15.6	16.0
		6.0	61.9	62.0	17.7	18.3
		6.2	60.5	60.1	17.5	17.0
		6.5	60.2	59.3	16.3	15.7
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	60.4	60.2	20.5	22.7
		5.8	61.4	60.1	21.8	22.1
		6.0	60.3	60.9	20.8	22.0
		6.2	61.4	61.4	19.9	20.4
		6.5	60.2	61.2	18.2	18.4
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	61.5	60.4	18.9	20.4
		5.8	61.2	60.1	19.0	20.1
		6.0	60.2	59.9	18.7	18.9
		6.2	61.6	59.6	18.7	20.3
		6.5	58.3	59.7	17.6	18.4

[0390] 表26.%碱性峰icIEF

[0391]

缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	3 周温育			
			2 - 8°C		50°C	
			1	2	1	2
		5.5	3.4	3.6	5.4	4.9

[0392]

20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.8	3.5	3.5	4.1	3.9
		6.0	3.6	3.5	3.5	3.7
		6.2	3.4	3.6	3.2	3.4
		6.5	3.3	3.3	2.8	2.4
20 mM 组氨酸	250 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	3.5	3.6	3.6	3.5
		5.8	3.4	3.7	3.0	3.2
		6.0	3.4	3.5	3.3	3.3
		6.2	3.4	3.5	2.7	2.9
		6.5	3.4	3.5	2.7	2.8
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	3.6	3.5	8.8	6.5
		5.8	3.5	3.5	4.5	4.8
		6.0	3.4	3.5	4.3	3.8
		6.2	3.4	3.4	3.7	3.3
		6.5	3.4	3.3	2.9	3.0
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	3.5	3.5	5.4	5.1
		5.8	3.5	3.5	4.0	4.0
		6.0	3.4	3.4	3.3	3.7
		6.2	3.4	3.5	3.2	3.2
		6.5	3.3	3.5	2.8	3.0

[0393] 对于配制的样品来说,在2-8℃温育3周后,%主峰值范围为58.3%-62.2%,%酸性值范围为34.3%-38.4%,%碱性值范围为3.3%-3.7%。没有显著模型来拟合%主峰数据,表明pH和赋形剂对icIEF值均无显著影响(图8B-8D)。在为%酸性和%碱性物质建模中赋形剂也不显著,并且%酸性物质倾向于随着pH而提高,而%碱性物质则降低(图7B和9B)。然而,正如通过所有值的狭窄范围所观察到的,所述变化是边际的。

[0394] 对于配制的样品来说,在50℃温育3周后,%主峰值范围为14.9%-22.7%,%酸性值范围为70.6%-81.6%,并且%碱性值范围为2.4%-8.8%。数据表明,与2-8℃温育3周的结果相比从%主峰物质向%酸性物质迁移,而%碱性保持相对一致。在评估50℃3周的配制样品中,具有蔗糖作为唯一赋形剂的样品具有最高的%酸性物质(图7A)和最低的%主峰和%碱性物质(图8A和9A)。这在所有pH值(5.5-6.5)下是一致的,而具有其他3种赋形剂的制剂在较低pH值下倾向于较低的%酸性物质,其随着pH升高而增加。

[0395] 毛细管电泳(CE)

[0396] 进行了还原毛细管凝胶电泳以评估纯度。SDS-CGE按照ATM草案,使用Sciex PA800+来评估,在220nm处UV检测。通过将100μg样品在Beckman SDS样品缓冲剂中稀释并添加5μL β-巯基乙醇来制备样品。将样品在70℃加热10分钟。使用正常极性、1分钟匀变升压、15kV电压和20psi压力,分离在20分钟内发生。毛细管长度为30.2cm,到检测器的长度为10.2cm。将起始原料用作参比。样品纯度百分率的概述示出在表27中。样品杂质百分率的概述示出在表28中。

[0397] 表27.纯度的%

[0398]

缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	3 周温育			
			2 - 8°C		50°C	
			1	2	1	2
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	98.8	98.7	91.3	92.8
		5.8	98.9	98.7	92.9	92.7
		6.0	98.8	98.2	94.1	93.3
		6.2	98.7	98.6	93.5	93.4
		6.5	98.9	98.8	92.2	92.5
20 mM 组氨酸	250 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	99.0	98.8	91.5	93.1
		5.8	98.8	98.5	93.5	93.9
		6.0	98.9	98.7	94.0	93.8
		6.2	98.9	98.7	92.6	93.0
		6.5	98.7	98.7	93.0	92.2
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	99.1	98.7	89.9	89.8
		5.8	98.7	98.7	90.6	92.2
		6.0	98.0	98.5	92.9	93.2
		6.2	98.7	99.1	94.7	93.5
		6.5	98.9	99.0	92.9	93.2
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	98.7	98.5	91.1	89.8
		5.8	98.8	99.1	93.9	92.8
		6.0	99.0	99.2	93.1	92.7
		6.2	99.0	98.7	93.3	92.9
		6.5	97.2	98.9	93.9	94.3

[0399] 表28.杂质的%

[0400]

缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	3 周温育			
			2 - 8°C		50°C	
			1	2	1	2
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	1.2	1.3	8.7	7.2
		5.8	1.1	1.3	7.1	7.3
		6.0	1.2	1.8	5.9	6.7
		6.2	1.3	1.4	6.5	6.6
		6.5	1.1	1.2	7.8	7.5
20 mM 组氨酸	250 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	1.0	1.2	8.5	6.9
		5.8	1.2	1.5	6.5	6.1
		6.0	1.1	1.3	6.0	6.2
		6.2	1.1	1.3	7.4	7.0
		6.5	1.3	1.3	7.0	7.8
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	0.9	1.3	10.1	10.2
		5.8	1.3	1.3	9.4	7.8
		6.0	2.0	1.5	7.1	6.8
		6.2	1.3	0.9	5.3	6.5
		6.5	1.1	1.0	7.1	6.8
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	1.3	1.5	8.9	10.2
		5.8	1.2	0.9	6.1	7.2
		6.0	1.0	0.8	6.9	7.3
		6.2	1.0	1.3	6.7	7.1
		6.5	2.8	1.1	6.1	5.7

[0401] 也进行了非还原毛细管凝胶电泳来评估纯度。SDS-CGE按照ATM草案,使用Sciex PA800+来评估,在220nm处UV检测。通过将100μg样品在Beckman SDS样品缓冲剂中稀释并添加5μL 250mM碘乙酰胺来制备样品。将样品在70℃加热10分钟。使用正常极性、1分钟匀变升压、15kV电压和20psi压力,分离在20分钟内发生。毛细管长度为30.2cm,到检测器的长度为10.2cm。将起始原料用作参比。%HMW CE(NR)数据的概述示出在表29中。%主峰CE(NR)数据的概述示出在表30中。%LMW CE(NR)数据的概述示出在表31中。

[0402] 表29.%HMW CE(NR)

[0403]

缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	3 周温育			
			2 - 8℃		50℃	
			1	2	1	2
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	1.2	1.3	1.4	2.0
		5.8	1.3	1.1	2.0	1.1
		6.0	1.1	0.8	2.1	1.8
		6.2	1.0	1.1	2.3	1.8
		6.5	0.9	1.0	2.6	2.3
20 mM 组氨酸	250 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	1.3	1.1	1.4	1.1
		5.8	1.0	1.2	2.0	1.8
		6.0	1.1	0.9	2.3	2.2
		6.2	1.0	0.9	2.5	2.1
		6.5	0.8	0.6	2.3	2.0
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	1.3	1.5	2.1	1.5
		5.8	0.6	1.5	2.4	1.8
		6.0	1.2	1.3	2.1	2.1
		6.2	0.9	1.2	3.0	2.6
		6.5	1.2	1.2	3.0	3.2
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	1.4	1.3	2.3	1.6
		5.8	1.0	1.2	2.5	2.4
		6.0	1.1	1.0	2.7	2.2
		6.2	1.0	1.4	2.7	2.3
		6.5	1.1	1.1	2.7	2.8

[0404] 表30.%主峰CE(NR)

[0405]

缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	3 周温育			
			2 - 8℃		50℃	
			1	2	1	2
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	96.1	95.9	87.7	87.6
		5.8	95.8	95.9	90.0	90.6
		6.0	95.9	96.1	88.3	90.4
		6.2	95.9	95.6	88.3	90.8
		6.5	95.7	95.6	89.4	88.1
20 mM 组氨酸	250 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	95.7	95.9	90.0	90.7
		5.8	95.7	95.9	88.4	89.3
		6.0	95.9	96.2	89.6	88.9
		6.2	95.9	96.0	89.6	90.3
		6.5	95.8	95.9	88.5	90.4
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 山梨	5.5	95.7	95.8	88.1	88.8
		5.8	95.7	95.5	87.5	89.7

[0406]

缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	3 周温育			
			2 - 8℃		50℃	
			1	2	1	2
	糖醇，0.01% PS80	6.0	95.5	95.7	88.1	89.7
		6.2	95.9	95.7	88.0	87.8
		6.5	95.6	95.9	87.6	87.4
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	95.3	95.7	87.9	88.6
		5.8	95.8	95.8	88.9	87.5
		6.0	95.8	95.7	87.7	89.6
		6.2	95.7	95.3	89.0	89.9
		6.5	95.4	95.5	87.9	88.3

[0407] 表31.%LMW CE(NR)

[0408]

缓冲剂	赋形剂/表面活性剂	pH	3 周温育			
			2 - 8℃		50℃	
			1	2	1	2
20 mM 组氨酸	250 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	2.7	2.8	10.9	10.5
		5.8	2.9	3.1	7.9	8.2
		6.0	3.1	3.1	9.6	7.8
		6.2	3.1	3.3	9.4	7.3
		6.5	3.4	3.4	7.9	9.5
20 mM 组氨酸	250 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	2.9	2.9	8.6	8.2
		5.8	3.3	2.9	9.5	8.9
		6.0	2.9	3.0	8.1	8.9
		6.2	3.1	3.1	7.9	7.6
		6.5	3.5	3.5	9.3	7.6
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 山梨糖醇，0.01% PS80	5.5	3.0	2.8	9.8	9.7
		5.8	3.7	3.0	10.1	8.5
		6.0	3.3	3.0	9.8	8.2
		6.2	3.3	3.1	9.0	9.6
		6.5	3.3	2.8	9.3	9.4
20 mM 组氨酸	75 mM NaCl，125 mM 蔗糖，0.01% PS80	5.5	3.3	3.1	9.8	9.8
		5.8	3.1	3.0	8.6	10.1
		6.0	3.1	3.2	9.6	8.2
		6.2	3.3	3.3	8.3	7.8
		6.5	3.5	3.4	9.3	8.9

[0409] 正如通过还原CE所评估的，在3周50℃样品中，仅仅山梨糖醇和仅仅蔗糖的制剂的%纯度值在pH范围(pH 5.5-6.5)内维持(图10A)，而组合赋形剂对pH表现出更高可变性，其中在较低值(5.5相比于6.5)下%纯度降低(图10B)。

[0410] 正如通过非还原CE所评估的，在3周50℃样品中，相对于NaCl与山梨糖醇和NaCl与蔗糖的组合赋形剂，包含仅仅山梨糖醇或仅仅蔗糖的制剂具有更低的%HMW物质(图11A和12A)。pH水平对%主峰值没有显著影响。

[0411] 正如通过还原和非还原CE所评估的，没有显著模型能够拟合3周2-8℃样品的还原CE数据，并且对于非还原CE数据来说，仅仅山梨糖醇和蔗糖的制剂具有更大的%主峰物质(图11B)。

[0412] 统计分析

[0413] 使用Design Expert v9软件来分析趋势。分析的概述示出在表32中。粗体模型未被包含在最终的优化评估中。

[0414] 表32.分析模型的概述

[0415]

条件	测定法	反应	模型	注释
3 周 50℃	DLS	Z-平均值	RCubic	
		PDI	RLinear	赋形剂不显著
		单体尺寸	线性	
		%Pd	未选择模型	
	SEC	%HMW	RCubic	
		%主峰	RCubic	
		%LMW	二次方	
	icIEF	%酸性	立方	
		%主峰	二次方	
		%碱性	RCubic	
	CE（R & NR）	%纯度	二次方	
		%杂质	二次方	
		%主峰	RLinear	pH 不显著
		%HMW	线性	
		%LMW	RLinear	赋形剂不显著
3 周 2 - 8℃	DLS	Z-平均值	2FI	
		PDI	线性	
		单体尺寸	RLinear	pH 不显著
		%Pd	线性	
	SEC	%HMW	RQuadratic	
		%主峰	线性	
		%LMW	RLinear	pH 不显著
	icIEF	%酸性	RLinear	赋形剂不显著
		%主峰	**未选择模型**	**无显著模型**
		%碱性	RLinear	赋形剂不显著
	CE（R & NR）	**%纯度**	**未选择模型**	**无显著模型**
		%杂质	**未选择模型**	**无显著模型**
		%主峰	RLinear	pH 不显著
		%HMW	线性	
		%LMW	RLinear	赋形剂不显著

[0416] 赋形剂选择

[0417] 与含有山梨糖醇与NaCl或蔗糖与NaCl的组合的制剂相比,含有250mM山梨糖醇或250mM蔗糖作为赋形剂的制剂的性能更加合乎需要。因此,对于A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗来说最佳制剂被确定为20mM组氨酸、50mM蔗糖或山梨糖醇和0.01％ PS80,pH 6.0。

[0418] 实施例2:A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的药代动力学(PK)

[0419] 本研究被设计成用于确定A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗在研究的第1天和第15天以1mg/kg、10mg/kg或50mg/kg作为30分钟IV输液给药到食蟹猴,然后分别进行13天和6天的观察期时的药代动力学(PK)情况。A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗在第1天向雄性和雌性食蟹猴的第一次静脉输注后的关键PK参数的概述分别呈现在表33和表34中。

[0420] 表33:在雄性食蟹猴中A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗在第1天的第一次静脉输注后的PK参数

[0421]

剂量（mg/kg）	C_{max}（μg/mL）	C_{max}/剂量（μg/mL）（mg/kg）	t_{max}[a]（小时）	$AUC_{0-144小时}$（μg.h/mL）	$AUC_{0-144小时}$/剂量（μg.h/mL）/（mg/kg）	AUC_{0-336}（μg.h/mL）	$t_{1/2}$（小时）	CL（mL/h/kg）	V_{ss}（mL/kg）
1	28.6	28.6	0.25	1510	1510	2080	86.3	0.450	53.2
10	300	30	EOI	13800	1380	19400	113.6	0.457	65.8
50	1370	27.4	0.25	56100	1120	86400	（162.1）[b]	（0.456）[b]	（95.2）[b]

[0422] 表中使用的缩略语：AUC_{0-t}＝从给药之时至最后一次观察之时浓度-时间曲线下的面积；C_{max}＝给药后观察到的最高血清浓度；CL＝清除率；tmax＝达到最高浓度的时间；EOI＝输注结束；$t_{1/2}$＝半衰期；V_{ss}＝稳态分布体积。a：从IV输注结束起的时间；b：不满足估算半衰期的可接受的标准——值被当作估算值。

[0423] 表34：在雌性食蟹猴中A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗在第1天的第一次静脉输注后的PK参数

[0424]

剂量（mg/kg）	C_{max}（μg/mL）	C_{max}/剂量（μg/mL）（mg/kg）	t_{max}[a]（小时）	$AUC_{0-144小时}$（μg.h/mL）	$AUC_{0-144小时}$/剂量（μg.h/mL）/（mg/kg）	AUC_{0-336}（μg.h/mL）	$t_{1/2}$（小时）	CL（mL/h/kg）	V_{ss}（mL/kg）
1	33.1	33.1	0.25	1480	1480	2040	90.9	0.455	55.3
10	217	21.7	0.25	14100	1410	21500	（155.3）[b]	（0.371）[b]	（75.8）[b]
50	1270	25.4	0.25	73200	1460	121000	（241.6）[b]	（0.269）[b]	（86.1）[b]

[0425] 表中使用的缩略语：AUC_{0-t}＝从给药之时至最后一次观察之时浓度-时间曲线下的面积；C_{max}＝给药后观察到的最高血清浓度；CL＝清除率；tmax＝达到最高浓度的时间；$t_{1/2}$＝半衰期；V_{ss}＝稳态分布体积。a：从IV输注结束起的时间；b：不满足估算半衰期的可接受的标准——值被当作估算值。

[0426] A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗在第15天向雄性和雌性食蟹猴的第二次静脉输注后的关键PK参数的概述分别呈现在表35和表36中。

[0427] 表35：在雄性食蟹猴中A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗在第15天的第二次静脉输注后的PK参数

[0428]

剂量（mg/kg）	C_{max}（μg/mL）	C_{max}/剂量（μg/mL）（mg/kg）	t_{max}[a]（小时）	$AUC_{0-144小时}$（μg.h/mL）	$AUC_{0-144小时}$/剂量（μg.h/mL）/（mg/kg）	k（小时$^{-1}$）	$t_{1/2}$（小时）	CL（mL/h/kg）	V_{ss}（mL/kg）
1	30.7	30.7	0.25	1510	1510	（0.0088）[b]	（78.5）[b]	（0.510）[b]	（52.2）[b]
10	208	20.8	0.25	13300	1330	（0.0066）[b]	（105.7）[b]	（0.527）[b]	（76.8）[b]
50	1260	25.2	0.5	70300	1410	（0.0057）[b]	（122.4）[b]	（0.474）[b]	（79.5）[b]

[0429] 表中使用的缩略语:AUC_{0-t}＝从给药之时至最后一次观察之时浓度-时间曲线下的面积;C_{max}＝给药后观察到的最高血清浓度;CL＝清除率;tmax＝达到最高浓度的时间;$t_{1/2}$＝半衰期;V_{ss}＝稳态分布体积。a:从IV输注结束起的时间;b:不满足估算半衰期的可接受的标准——值被当作估算值。

[0430] 表36:在雌性食蟹猴中A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗在第15天的第二次静脉输注后的PK参数

[0431]

剂量（mg/kg）	C_{max}（μg/mL）	C_{max}/剂量（μg/mL）（mg/kg）	t_{max}[a]（小时）	$AUC_{0-144小时}$（μg.h/mL）	$AUC_{0-144小时}$/剂量（μg.h/mL）/（mg/kg）	k（小时$^{-1}$）	$t_{1/2}$（小时）	CL（mL/h/kg）	V_{ss}（mL/kg）
1	28.2	28.2	1	1580	1580	（0.0064）[b]	（107.6）[b]	（0.452）[b]	（63.3）[b]
10	224	22.4	0.25	15800	1580	（0.0069）[b]	（101.0）[b]	（0.448）[b]	（63.7）[b]
50	1590	31.8	1	108000	2160	（0.0051）	（137.0）	（0.304）[c]	（58.4）[c]

[0432]

剂量（mg/kg）	C_{max}（μg/mL）	C_{max}/剂量（μg/mL）（mg/kg）	t_{max}[a]（小时）	$AUC_{0-144小时}$（μg.h/mL）	$AUC_{0-144小时}$/剂量（μg.h/mL）/（mg/kg）	k（小时$^{-1}$）	$t_{1/2}$（小时）	CL（mL/h/kg）	V_{ss}（mL/kg）
						[c]	[c]		

[0433] 表中使用的缩略语:AUC_{0-t}＝从给药之时至最后一次观察之时浓度-时间曲线下的面积;C_{max}＝给药后观察到的最高血清浓度;CL＝清除率;tmax＝达到最高浓度的时间;$t_{1/2}$＝半衰期;V_{ss}＝稳态分布体积。a:从IV输注结束起的时间;b:不满足估算半衰期的可接受的标准——值被当作估算值。

[0434] 出现t_{max}的时间通常为输注结束(EOI)后15分钟。但如表33和35中所示,t_{max}也分别在接受10mg/kg的雄性食蟹猴中第1天的EOI时和接受50mg/kg的雄性食蟹猴中第15天的EOI后30分钟出现。如表34和36中所示,t_{max}也分别在接受1mg/kg或50mg/kg的雌性食蟹猴中第

15天的EOI后1小时出现。这些数据表明在30分钟IV给药后A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗缓慢下降,并具有长的终末半衰期($t_{1/2}$),例如超过90小时。所述数据还表明低的血清清除率,并且分布体积接近血液体积(73.4mL/kg)并低于体内总水体积(693mL/kg)。

[0435] 对于多种剂量水平来说,也评估了A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗最高血清浓度(C_{max})之间和浓度-时间曲线下面积($AUC_{0-144hr}$)之间的比率。表37示出了按照剂量水平进行的A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的C_{max}比率和AUC比率。

[0436] 表37:在雄性和雌性食蟹猴中按照剂量水平进行的A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的C_{max}比率和AUC比率

[0437]

剂量水平(mg/kg)	剂量水平比率	C_{max} 比率				$AUC_{0-144\text{小时}}$ 比率			
		第1天		第15天		第1天		第15天	
		雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	10.0	10.5	6.6	6.8	7.9	9.1	9.5	8.8	10.0
50	50.0	47.9	38.4	41.0	56.4	37.2	49.5	46.6	68.4

[0438] 如表37中所示,在1至50mg/kg的剂量范围内,C_{max}和$AUC_{0-144hr}$值随着剂量提高几乎成比例地增加。A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗在雌性食蟹猴中的C_{max}和$AUC_{0-144hr}$值与在雄性食蟹猴中暴露时的这些指数相近。在1和10mg/kg剂量水平下,在第15天的第二次注射时A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的C_{max}和$AUC_{0-144hr}$值与第1天的第一次给药后的这些值相近,但在50mg/kg剂量水平下通常略微更高。在50mg/kg剂量水平下,基于$AUC_{0-144hr}$值的累积比率略微高于1,表明在该剂量水平下,在A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的重复IV输注给药后发生一定的积累。

[0439] 此外,来自于A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗治疗的动物的所有样品均未确认到抗药物抗体阳性,因此在本研究中未观察到测试品相关的抗药物抗体。

[0440] 实施例3:使用A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗治疗局部晚期或转移性实体肿瘤

[0441] 目的

[0442] 本临床研究被设计成具有两个阶段:剂量递增阶段,然后是疗效扩展组群阶段。所述研究的剂量递增阶段的主要目的是评估A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的安全性和耐受性,以及在不存在有效标准疗法或已经复发或对标准疗法不耐受的晚期(不可切除、复发或转移的)实体肿瘤患者中确定A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的最高耐受剂量。所述研究的疗效扩展组群阶段的主要目的是由独立终点审查委员会(IERC)根据修改的实体肿瘤中的响应评估标准第1.1版(mRECIST 1.1)评估总体响应率(ORR)。

[0443] 本临床研究的次要目的是:

[0444] -表征A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的药代动力学;

[0445] -评估A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的免疫原性并与其暴露和临床活性相关联;

[0446] -由IERC评估A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的响应持续时间(DOR);

[0447] -由IERC评估最佳总体响应(BOR);

[0448] -由IERC评估A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的无进展生存期(PFS);

[0449] -评估总生存(OS)时间;和

[0450] -评估A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗与派姆单抗的组合疗法的安全性。

[0451] 研究设计

[0452] 本研究是一项I/II期开放标签剂量递增研究和一项连续平行组疗效扩展研究,被设计用于确定单独的和与派姆单抗联合的A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的安全性、耐受性、药代动力学(PK)、药效学(PD)和初步抗肿瘤活性。本研究由两部分组成:

[0453] (1)剂量递增部分(I期)分为三个阶段:

[0454] (A)加速滴定;

[0455] (B)"3+3"剂量递增;和

[0456] (C)安全性/药代动力学(PK)/药效学(PD)扩展组群

[0457] (2)疗效扩展组群部分(II期)分为下述四个组群:

[0458] (A)尿路上皮膀胱癌(UBC)

[0459] (B)转移性乳腺癌(MBC)

[0460] (C)具有高HER2表达的Basket实体肿瘤(HER2 3+)

[0461] (D)与派姆单抗的联合疗法。

[0462] 在一个示例性实施方式中,在剂量递增部分和疗效扩展(UBC、MBC或Basket[HER2 3+]组群)部分中召集的患者在4周的治疗周期中接受1小时静脉内输注的A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗作为单一疗法。对于治疗周期1来说,患者在第1天、第8天和第15天接受A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗。对于治疗周期2和后续周期来说,患者每两周一次(例如第1天和第15天)接受A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗,直至出现确认的进展、不可接受的毒性(正如在本实施例中在"剂量限制性毒性(DLT)"章节下所描述的)或从所述试验或研究性医药产品(IMP)退出的任何原因。在疗效扩展组群部分的与派姆单抗的联合疗法组群中召集的患者在3周的治疗周期中接受作为1小时IV输注的A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗和作为30分钟IV输注的派姆单抗。在一个示例性实施方式中,与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗一起按照说明书给药200mg派姆单抗。

[0463] 对于治疗周期1来说,患者在第1天接受A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗和派姆单抗,并在第8天接受单独的A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗。对于治疗周期2和后续周期来说,患者每3周一次在每个周期的第1天接受A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗和派姆单抗,直至出现确认的进展、不可接受的毒性(正如在本实施例中在"剂量限制性毒性(DLT)"章节下所描述的)或从所述试验或IMP退出的任何原因。

[0464] 经历确认的完全响应(CR)的患者在确认后接受由调查人员决定的最多12个月的治疗。如果调查人员在与申办者医学监察员讨论后相信患者将从继续治疗获益,则超过12个月的治疗是容许的。

[0465] 图14A-B是所述临床试验设计的示意图。图14A描述了用于剂量递增阶段的试验设计。图14B描述了用于疗效扩展组群阶段的试验设计。

[0466] 纳入标准

[0467] 在本实施例的临床研究中的任何组群中召集的患者的总体纳入标准包括:

[0468] -已签署书面知情同意书;

[0469] -年龄≥18岁(包括男性和女性患者);

[0470] -患有组织学或细胞学证实的局部晚期或转移性实体肿瘤,对所述肿瘤不存在标准疗法或标准疗法已经失败。原发性肿瘤必须具有通过免疫组织化学证实的HER2表达;

[0471] -在研究开始时具有0或1的ECOG表现状态,并且预计寿命为至少3个月;

[0472] -当通过超声心动图(优选地)或多门控采集(MUGA)扫描测量时基线左心室射血分数(LVEF)≥55%;

[0473] -具有由白细胞(WBC)计数≥3×10^9/L且绝对嗜中性粒细胞计数(ANC)≥1.5×10^9/L、淋巴细胞计数≥0.5×10^9/L、血小板计数≥75×10^9/L和血红蛋白≥9g/dL(可能已经输血)定义的足够的血液学功能;

[0474] -具有由总胆红素水平≤1.5×正常值上限(ULN)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平≤2.5×ULN和丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平≤2.5×ULN定义的足够的肝功能,或者对于疾病向肝脏转移已被证实的患者来说AST和ALT水平≤5×ULN;

[0475] -具有由根据Cockcroft-Gault公式估算的肌酐清除率>50mL/min定义的足够的肾功能;和

[0476] -对于具有生育潜力的女性(WOCBP)患者来说,采取由WHO的1“高度有效”方法或2“有效”方法指南所定义的有效避孕措施。

[0477] 对于在本实施例中描述的剂量递增部分的加速滴定或“3+3”剂量递增阶段中召集的患者来说,额外的纳入标准包括:

[0478] -具有客观疾病的证据,但参加不需要可测量的病变;和

[0479] -具有可用的已存档肿瘤活检样品(≤6个月,至少8个载片)或在筛选窗口内获得的新鲜活检样品(至少10个载片和3个核心)。

[0480] 对于在本实施例中描述的剂量递增部分的安全性/PK/PD扩展组群阶段中召集的患者来说,额外的纳入标准包括:

[0481] -具有在筛选窗口内获得的新鲜肿瘤活检样品,以获得福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE)石蜡块或足够的未染色载片用于进行IHC(至少3个未染色载片),具有总共至少12个载片并具有至少3个新鲜核心;和

[0482] -在筛选时通过IHC检测HER2为至少1+。

[0483] 对于在本实施例中描述的UBC扩展组群中召集的患者来说,额外的纳入标准包括:

[0484] -具有组织学或细胞学证实的尿路上皮(包括肾盂、输尿管、尿道上皮、尿道)的局部晚期或转移性移行细胞癌;

[0485] -在最后一线治疗后出现影像学疾病进展;

[0486] -已接受一种(且不超过一种)含铂方案(例如铂加另一种药剂例如吉西他滨、甲氨蝶呤、长春碱、多柔比星等)用于无法手术的局部晚期或转移性尿路上皮癌,其在最后一次给药含铂方案作为辅助治疗后6个月内具有影像学进展或复发,这将被视为第一线含铂方案失败;

[0487] -已接受使用检查点抑制剂(即抗PD-1或抗PD-L1抗体)的治疗,具有影像学进展(可选地已接受基于铂的治疗与基于PD-1/PD-L1的治疗的组合);

[0488] -通过IHC检测具有至少1+的HER2表达;和

[0489] -具有在筛选窗口内获得的新鲜肿瘤活检样品,以获得福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE)石蜡块或足够的未染色载片用于进行IHC(至少3个未染色载片),具有总共至少12

个载片并具有至少3个新鲜核心。

[0490] 对于在本实施例中描述的MBC扩展组群中召集的患者来说,额外的纳入标准包括:

[0491] -具有组织学确认的MBC;

[0492] -已接受不超过3种先前的用于转移性疾病的细胞毒性疗法;

[0493] -除非有蒽环类药物禁忌,否则已接受紫杉烷类和蒽环类药物;

[0494] -通过IHC检测具有肿瘤评分1+或2+,并且如果评分为2+,则必须通过FDA批准的方法裁定肿瘤的ERRB2扩增的存在;

[0495] -再最后一线系统疗法后已有进展(影像学);和

[0496] -具有在筛选窗口内获得的新鲜肿瘤活检样品,以获得福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE)石蜡块或足够的未染色载片用于进行IHC(至少3个未染色载片),具有总共至少12个载片并具有至少3个新鲜核心。

[0497] 对于在本实施例中描述的basket(HER2 3+)组群中召集的患者来说,额外的纳入标准包括:

[0498] -具有除了乳腺癌或胃癌之外的任何实体肿瘤、肿瘤内ERRB2扩增的历史以及下述之一:1)在最后一线治疗后影像学进展后的6个月内,在最近的活检样品中通过IHC证实了HER2 3+,或2)在筛选窗口中通过IHC检测到HER 3+;

[0499] -已接受至少一线的已批准或确立的疗法;和

[0500] -具有在筛选窗口内获得的新鲜肿瘤活检样品,以获得福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE)石蜡块或足够的未染色载片用于进行IHC(至少3个未染色载片),具有总共至少12个载片并具有至少3个新鲜核心。

[0501] 对于在本实施例中描述的疗效扩展部分的与派姆单抗的组合疗法组群阶段中召集的患者来说,额外的纳入标准包括:

[0502] -根据说明书,因上皮起源的恶性肿瘤而有资格接受派姆单抗;和

[0503] -具有在筛选窗口内获得的新鲜肿瘤活检样品,以获得福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE)石蜡块或足够的未染色载片用于进行IHC(至少3个未染色载片),具有总共至少12个载片并具有至少3个新鲜核心。

[0504] 排除标准

[0505] 在本实施例的临床研究中召集的患者的排除标准包括:

[0506] -使用未经许可的药物同时治疗,所述药物包括:

[0507] ○免疫疗法、免疫抑制性药物(包括化疗或全身性皮质类固醇,过敏反应的短期治疗或irAE的治疗除外)或其他实验性药物产品。

[0508] ■例外情况:

[0509] ●允许全身性甾类(例如用于过敏反应或irAE的管理)的短期给药;

[0510] ●允许无全身效应或全身效应极低的甾类(局部、吸入);

[0511] ○靶向HER2的TKI或靶向HER2或NKG2D的任何重组分子;

[0512] ○生长因子(粒细胞集落刺激因子或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子)。

[0513] ■例外情况:

[0514] ■研究者可自行决定开出促红细胞生成素和促红细胞生成素类似物;

[0515] ○不允许使用双膦酸盐或地诺单抗的治疗。

[0516] ■例外情况:允许使用双膦酸盐或地诺单抗,除非在接受A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的第一次给药之前超过14天它已开始。

[0517] -使用特异性靶向HER2途径的药物的先前治疗。

[0518] ■例外情况:mAb或酪氨酸激酶抑制剂(TKI)是可接受的,只要超出洗脱期(对于mAb或蛋白治疗剂来说4周,对于TKI来说2周);

[0519] -同时进行的抗癌治疗(例如细胞减灭疗法、放射疗法(姑息性骨定向放射疗法除外)、免疫疗法或促红细胞生成素除外的细胞因子疗法),大手术(不包括先前的诊断性活检),同时使用甾类或其他免疫抑制剂进行的全身治疗,或在研究治疗开始前28天内使用任何研究药物。允许短期给药全身性甾类(例如用于过敏反应或irAE的管理)。接受双膦酸盐的患者是合格的,只要治疗在第一剂A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗之前至少14天开始即可;

[0520] -过去3年内除本研究要调查的目标恶性肿瘤之外的既往恶性疾病,皮肤基底或鳞状细胞癌或原位宫颈癌除外;

[0521] -疾病进展迅速;

[0522] -具有中枢神经系统(CNS)转移的活性或病史;

[0523] -接受任何器官移植,包括自体或同种异体干细胞移植;

[0524] -显著的急性或慢性感染(包括人免疫缺陷病毒(HIV)的历史阳性检测,或在筛查窗口期间检测到活动性或潜伏性乙型肝炎或活动性丙型肝炎);

[0525] -在过去3年内需要用全身性免疫抑制剂治疗超过28天的现有自身免疫疾病(白癜风患者除外)或临床相关免疫缺陷(例如异常丙种球蛋白血症或先天性免疫缺陷),或在第1天后的7天内发热;

[0526] -已知对mAb的严重超敏反应(≥3级NCI-CTCAE v5.0),任何过敏反应史,或不受控制的哮喘(例如部分受控哮喘的3个或更多个特征);

[0527] -与先前治疗相关的持续毒性>1级NCI-CTCAE v5.0,但秃头症和感觉神经病变≤2级是可接受的;

[0528] -女性在研究期间妊娠或哺乳;

[0529] -已知的酒精或药物滥用;

[0530] -严重的心脏疾病或医学状况,包括但不限于:

[0531] ○纽约心脏协会第III或IV类心力衰竭或收缩功能障碍(LVEF<55%)的病史;

[0532] ○高危不受控心律失常,即静息时心率>100/min的心动过速;

[0533] ○显著的室性心律失常(室性心动过速)或更高级别的AV阻滞(二度

[0534] AV阻滞2型(Mobitz 2)或三度AV阻滞);

[0535] ○需要抗心绞痛药物的心绞痛;

[0536] ○临床显著的心脏瓣膜病;

[0537] ○ECG上有透壁性梗塞的证据;

[0538] ○控制不佳的高血压(定义为:收缩压>180mmHg或舒张压>100mmHg);

[0539] ○临床相关的不受控制的心脏危险因素、临床相关的肺部疾病或研究者认为可能限制参与本研究的任何临床相关的医疗状况;

[0540] -研究者认为可能会损害患者参与本研究的能力的所有其他重大疾病(例如炎性

肠病)；

[0541] -任何会阻碍知情同意书的理解或提供的精神疾病；

[0542] -无法律行为能力或法律行为能力有限；或

[0543] -无法签署知情同意书，包括遵守知情同意书(ICF)和本协议中列出的要求和限制。

[0544] 剂量限制性毒性(DLT)

[0545] 在每个组群中对安全性和耐受性进行评估。对于在剂量递增部分中和派姆单抗组合组群中召集的患者来说，在前21天评估剂量限制性毒性(DLT)。根据美国国家癌症研究所不良事件通用术语标准(NCI-CTCAE)v5.0，DLT是≥3级药物不良反应，发生在剂量递增组群的DLT评估期间。药物不良反应可能是研究者和/或发起人怀疑与A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗有关的不良事件。对于在剂量递增部分和派姆单抗组合组群中召集的患者来说，DLT被定义为在治疗的前21天内发生的下述任一情况：

[0546] -任何3至4级非血液学毒性，例外的是：

[0547] i.3级恶心、呕吐和腹泻，在没有最大药物治疗的情况下持续<72小时；

[0548] ii.4级呕吐和腹泻，在没有最大药物治疗的情况下持续<72小时；

[0549] iii.3级疲劳<5天；

[0550] iv.在没有最大药物治疗的情况下出现3级高血压。

[0551] -任何下述血液学毒性：

[0552] i.4级中性粒细胞减少症>5天；

[0553] ii.3级血小板减少症并伴有出血；

[0554] iii.4级血小板减少症。

[0555] -并且下述情况除外：

[0556] i.根据研究者的观点不太可能与研究治疗相关，没有任何临床相关性，并且在7天内通过适当的医疗管理消退至≤1级的在正常范围之外的单个实验室值。

[0557] 对于所有剂量组群来说，对于其数据被用于实施剂量递增算法以确定最大耐受剂量(MTD)的所有患者来说，DLT的观察期可以包括剂量递增部分中研究性药物产品治疗的前3周。在剂量递增阶段中可能召集额外的患者，并且可能会收集不良事件；任选地，这些患者可能没有特定的DLT观察期。安全监督委员会可能会采取保守的方法将治疗相关毒性与药物的相关性归因于药物。与治疗相关的严重不良事件被归因于与药物有关，除非与潜在疾病或公认的合并症具有明显关系。

[0558] 安全性通过记录、报告和分析基线医疗状况、不良事件(AE)、体检结果(包括生命体征和左心室射血分数的测定)、心电图和实验室测试来评估。

[0559] 剂量和给药

[0560] A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗剂量递增

[0561] 在试验开始时，向每位患者指派一定的剂量水平。所述剂量水平根据需要进行调整以适应体重变化。在组群的所有患者都达到第21天(DLT评估期)后，在安全性评估的基础上决定递增到下一个剂量水平。在某些实施方式中，患者每两周一次在1小时(例如50至70分钟)内接受A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的IV输注。在每次药物给药的前一天或当天确定的患者体重的基础上计算A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的剂量。在示例性实施方式中，

A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的起始剂量为5.2x 10^{-5}mg/kg,并且前8个剂量水平(DL)遵照剂量递增的加速设计,并由具有不超过3.3倍的递增步级的单一患者组群构成。在观察到DLT的情况下,将剂量递增切换到"3+3"设计,其中在观察到DLT的剂量水平下增加5位额外的患者。

[0562] 与加速滴定阶段相似,在"3+3"递增阶段中剂量递增以剂量水平之间不超过3.3倍的增加来进行。表38概述了根据体重(mg/kg)和递增方案的剂量水平(DL)确定的起始剂量。

[0563] 表38:"加速滴定"和"3+3"剂量递增阶段中的示例性DL(单位为mg/kg体重)

[0564]

"加速滴定"							
DL1	DL2	DL3	DL4	DL5	DL6	DL7	DL8
$5.2x10^{-5}$	$1.6x10^{-4}$	$5.2x10^{-4}$	$1.6x10^{-3}$	$5.2x10^{-3}$	$1.6x10^{-2}$	$5.2x10^{-2}$	$1.6x10^{-1}$

"3+3" 剂量递增				
DL9	DL10	DL11	DL12	DL13
0.52	1.6	5.2	10	20

[0565] 在示例性实施方式中,在"3+3"阶段期间一开始在给定剂量组群中召集三位患者。在第一位患者召集后,在向第一位患者第二次注射A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗后不早于2天召集第二位患者。在向第二位患者给药A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗后随访至少48小时后,向第三位患者提供A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的第一次给药。在特定剂量组群中可以召集超过3位患者(例如在特定组群的前3位患者中观察到DLT的情况下或在DL 7已召集3位患者之后)而在治疗开始之间没有任何预定的时间间隔,除非在前3位患者的治疗期间观察到输注反应或细胞因子释放综合征或任何3级或更高级的治疗相关毒性。在这种情况下,重复用于前3位患者的相同的预定时间间隔。在任何这些患者中没有观察到DLT的情况下,研究继续进行,以在下一个更高剂量组群中召集额外的3位患者。如果在特定剂量下1位患者发生DLT,则在该相同剂量组群中召集额外的3位患者。在特定剂量组群中,在6位患者中的超过1位患者中发生DLT表明已超过MTD,并且不继续进行进一步的剂量递增(参见本实施例中的剂量限制性毒性(DLT)章节)。

[0566] 在示例性实施方式中,一旦安全监督委员会确立了DL 10(1.6mg/kg)的安全性,以DL9治疗多达10位额外的患者(每个DL总共多达16位患者),以便增加该DL下的安全性、PK和PD数据库,同时遵照"3+3"规则以DL 11进行递增。将类似的过程应用于DL 10至13。在不使用预定观察期的情况下继续进行安全性/PK/PD扩展组群阶段中的递增。在筛选时(第一次研究药品给药前30天内)和第6次研究药品给药前1至7天内进行强制性肿瘤活检。安全性信息通常在这些患者的治疗过程中产生,并被传达给安全监督委员会。对安全性/PK/PD扩展组群的后续DL实施相同的过程。

[0567] 疗效扩展组群剂量

[0568] 正如在前面本实施例中提到的,存在4个疗效扩展组群:UBC;MBC;basket(HER2 3+)组群,其包含已接受至少一种由已确立的或批准的疗法组成的第一线治疗的具有HER2高表达的实体肿瘤的患者;和与派姆单抗的组合疗法。这些组群中的递增如下所述开始:

[0569] -在前三个组群(UBC、MBC和basket(HER2 3+)中,在A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的剂量确定和计划后开始3个单一疗法组群。

[0570] -在安全监督委员会确立了DL11的安全性后,对于A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗与派姆单抗的组合来说开始安全性磨合的递增。将要与派姆单抗组合的A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的剂量在使用A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗作为单一疗法的"3+3"剂量递增期间被宣布是安全的,然后与派姆单抗相组合进行测试(在所述剂量递增期间后续的DL被安全监督委员会认为是安全的)。

[0571] 在前三个疗效扩展组群中,患者接受A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗作为单一疗法。在这三个扩展组群中的每一者中最多可以召集40位患者,并在对每个组群中的前20位患者观察至少3个月后进行无效分析。在筛选时(第一次研究药品给药前30天内)和第6次研究药品给药前1至7天内进行强制性肿瘤活检。

[0572] 在与派姆单抗的组合疗法的疗效扩展组群中,患者在3周的治疗周期中接受DL 10的A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗(作为1小时的IV输注)和200mg的批准剂量的派姆单抗(作为30分钟的IV输注)。这种安全性磨合练习遵循与以前描述的相同的"3+3"设计。本研究中的患者满足在"纳入标准"章节中描述的患者纳入标准。

[0573] 疗效扩展组群(A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗单一疗法组群)期间的安全性:来自于参与患者的所有安全性信息均由安全监督委员会持续监测。在示例性实施方式中,召集了一组20位患者并由安全监督委员会进行为期4周的随访。随后,在对40位患者进行治疗并随访至少4周后的4周内进行此类安全性审查。然后,在每次召集40位患者并进行至少4周的随访时都会执行类似的过程。

[0574] 疗效扩展组群(A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗与派姆单抗的组合疗法组群)期间的安全性:与为"3+3"剂量递增部分所描述的相似,来自于参与患者的所有安全性信息均由安全监督委员会持续监测。对于每位患者来说,安全性和耐受性数据由安全监督委员会在21天的DLT评估期内进行审查,而进展到进一步剂量的给药取决于安全监督委员会。如果组合治疗可以安全地进行(根据安全监督委员会的决定),则召集一组20位患者并进行3周的随访。

[0575] 终点

[0576] 所述研究被设计用于评估主要和次要终点,以评估任选地与派姆单抗组合的A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗作为局部晚期或转移性实体肿瘤患者的治疗的临床益处。

[0577] 主要终点和主要终点的分析

[0578] 在剂量递增部分中,测量治疗的前三周中DLT的发生作为主要终点。在所述剂量递增部分期间确定最高耐受剂量(MTD),其被定义为所治疗的6位患者中不超过1位患者经历DLT事件的最高剂量水平(DL)。最高耐受剂量通过来自于剂量递增部分的个体患者数据来确定。此外,为了进行最终统计分析,可以对下述参数进行分析:

[0579] -在每个剂量水平下,DLT群体中在第一个DLT评估期间经历DLT的患者的数目和比例;

[0580] -在每个剂量水平下,DLT群体中的患者在第一个DLT评估期间经历的治疗中出现的不良事件的数目和比例。

[0581] 对于疗效扩展组群来说,测量由独立终点审查委员会(IERC)根据mRECIST 1.1A裁定的确认总体响应率作为主要终点。总体响应率被定义为在试验治疗开始后直至记录到的疾病进展,在所有肿瘤评估访问中获得的最佳响应,同时将下述确认要求考虑在内。对于完

全响应和部分响应来说,需要根据mRECIST 1.1确认响应。确认可以在定期安排的6周评估间期内评估,但不早于开始记录到完全响应或部分响应后4周。部分响应的确认可以在比开始记录到部分响应后的下一次评估更晚的评估时得以确认。

[0582] 稳定疾病的最佳总体响应可能需要在研究治疗开始后至少37天的时间点确定稳定疾病的总体响应。为每位患者列出了在每次计划肿瘤评估时的响应和最佳总体响应。

[0583] 次要终点和次要终点的分析

[0584] 所述研究的次要终点可以包括下述参数:

[0585] -根据NCI-CTCAE v5.0,所有剂量组/适应症的治疗出现的不良事件的数目、严重程度和持续时间;

[0586] -根据NCI-CTCAE v5.0,治疗相关不良事件的数目、严重程度和持续时间;

[0587] -根据研究者评估,根据mRECIST 1.1确定的响应持续时间;

[0588] -药代动力学情况;

[0589] -根据研究者评估,根据mRECIST 1.1确定的最佳总体响应;

[0590] -根据研究者评估,根据mRECIST 1.1确定的无进展生存期;

[0591] -总生存时间;

[0592] -进行性疾病概况;

[0593] -抗A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗抗体的血清滴度;

[0594] -肿瘤组织上的HER2表达;

[0595] -ERBB2状态(扩增/未扩增的,突变/未突变的);

[0596] -在第13周时根据mRECIST 1.1未被确认的响应(对于安全性/PK/PD扩展组群来说);

[0597] -根据IERC,根据mRECIST 1.1确定的无进展生存期;根据IERC,根据mRECIST 1.1确定的响应持续时间(对于疗效扩展组群来说)。

[0598] 疗效参数:所述扩展部分中的主要疗效参数是根据mRECIST 1.1确定的最佳总体响应。根据研究者评估,ORR将根据mRECIST 1来确定。在整个试验时间段内评估总体响应率。对于部分响应或完全响应的最佳总体响应来说,需要根据mRECIST 1.1进行响应的确认。为每位患者列出了在每次计划肿瘤评估时的响应和最佳总体响应。将总体响应率(被定义为完全响应+部分响应)的数量和比例按照组群进行列表。对于高HER2的basket组群来说,对于召集超过5位患者并治疗4周的每种肿瘤类型来说,将总体响应率的数量和比例进行列表。由少于5位患者(1位患者至4位患者)代表的肿瘤类型被表示为一个亚组。对于扩展组群中具有确认的响应的每位患者来说,根据mRECIST 1.1计算响应持续时间,并使用Kaplan-Meier方法在所有组群中进行分析。无进展生存时间和总生存时间呈现在患者列表中,并在召集了完全计划患者数目的扩展组群的完全分析集中使用Kaplan-Meier方法进行分析。

[0599] 药代动力学情况:A49-F3'-TriNKET-曲妥珠单抗的血清浓度通过验证的方法来确定。估算并报告了下述PK参数:

[0600] -AUC0→t:从给药时间到最后一次观察时间的浓度-时间曲线下面积(通过线性梯形求和来计算);

[0601] -AUC0→∞:从给药时间外推到无穷的曲线下面积(通过线性梯形求和来计算并使

用Clast/λz外推到无穷)；

[0602] -λz:终末消除率常数。λz的值从log(浓度)与时间的回归线的斜率确定,并使用下述约束条件:(i)必须存在至少3个连续的可测量浓度,(ii)

[0603] 所有浓度都必须随时间下降,并且(iii)回归的相关系数(r)必须≥0.95;

[0604] -Cmax:在给药后观察到的最高血清浓度;

[0605] -tmax:出现Cmax的时间;和

[0606] -t1/2:消除半衰期,被确定为0.693/λz。

[0607] PK参数使用描述性统计进行汇总。描绘了个体以及平均浓度-时间图。当分析的完整性受到影响时,可以插补未解出的缺失数据。将保守性原则用于数据插补。

[0608] 抗药物抗体的血清滴度:安全免疫原性测试策略的实施和执行符合:

[0609] -生物技术来源的治疗性蛋白的免疫原性评估(参见“治疗性蛋白质免疫原性评估指南”(Guideline on Immunogenicity Assessment of TherapeuticProteins),18May 2017EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006Rev 1,人类用医药产品委员会(CHMP);欧洲药品管理局);

[0610] -旨在用于体内临床使用的mAb的免疫原性评估(参见“旨在用于体内临床使用的单克隆抗体的免疫原性评估指南”Guideline on ImmunogenicityAssessment of Monoclonal Antibodies Intended for In Vivo Clinical Use),24May 2012EMA/CHMP/BMWP/86289/2010,人类用医药产品委员会(CHMP);欧洲药品管理局);

[0611] -FDA(2009,草案)行业指南:用于治疗性蛋白的免疫原性测试的测定法开发(Assay Development for Immunogenicity Testing of TherapeuticProteins)。

[0612] 应用利用酸解离步骤在过量药物存在下检测人类血清中的抗药物(即抗A49-F3’-TriNKET-曲妥珠单抗)抗体的合格方法。在酸处理后不需要除去药物。确定阳性样品的ADA滴度。

[0613] 生物标志物:为每个DL或组群分别提供所有预先计划的时间点的生物标志物的汇总统计量。在适用时呈现与基线水平相比的改变。以每位患者为基础显示随时间的变化曲线。

[0614] 安全性分析:向A49-F3’-TriNKET-曲妥珠单抗的暴露程度通过持续时间(周)、给药次数、累积剂量(mg/kg)、剂量强度(mg/kg/周)、相对剂量强度(给药的实际剂量/计划剂量)、剂量降低的次数和剂量延迟的次数来表征。安全性分析在安全性群体上进行。安全性终点使用描述性统计量按照DL和组群来列表。安全性评估是基于对不良事件发生率的审查,包括特别关注的不良事件、不良药物反应和生命体征、心电图、体重和实验室值(血液学和血清化学)的变化。治疗时段被定义为从第一剂研究治疗到最后一剂研究治疗+30天或新抗癌治疗的最早日期-1天的时间,以先发生者为准。

[0615] 不良事件(AEs):不良事件根据《监管活动医学词典》(Medical Dictionary for Regulatory Activities)(MedDRA)进行编码。AE的严重性使用NCI-CTCAE v5.0毒性分级量表进行分级。治疗中出现的不良事件(TEAE)是那些发生日期在治疗时段内或在治疗时段内发生事件恶化的不良事件。不论何种归因的TEAE和被定义为可能与A49-F3’-TriNKET-曲妥珠单抗相关的AE的发生率按优选项和系统器官类别进行汇总,并根据强度和与A49-F3’-TriNKET-曲妥珠单抗的关系进行描述。所有过早/永久中止均按研究退出的主要原因进行

总结。TEAE的持续时间被定义为从发作至消退到基线之间的时间。3级和4级的持续时间由特定TEAE在其过程中达到3或4级严重程度的时间段来定义。检查描述性统计量以寻找与剂量相关的ADR的迹象。

[0616] 实验室变量:实验室结果根据NCI-CTCAE按等级分类。总结了第一次试验治疗后的最差试验等级。展示了从第一次治疗到最高等级的毒性分级变化。不是NCI-CTCAE的一部分的变量的结果被呈现为低于正常限度、在正常限度内或高于正常限度。这些分析中仅包括具有基线后实验室值的患者。

[0617] PE(包括生命体征、12导联心电图和经胸超声心动图(TT-ECHO)/MUGA):记录了PE数据,包括生命体征(体温、呼吸率、心率和血压)和导联ECG。

[0618] 通过参考并入

[0619] 本文中提到的每个专利文献和科学论文的整个公开内容为所有目的通过参考并入本文。

[0620] 等同性

[0621] 本公开可以以其他特定形式体现而不背离其精神或本质特征。因此,前述实施方式应该在所有情况下被认为是说明性的而不是限制本文描述的公开。不同实施方式的各种不同结构要素和各个不同的公开的方法步骤可以以各种不同的组合和排列使用,并且所有此类变化形式都被认为是本公开的形式。因此,本公开的范围由随附的权利要求书而不是上面的描述指明,并且打算将进入权利要求书的含义和等同性范围之内的所有变化涵盖在其中。

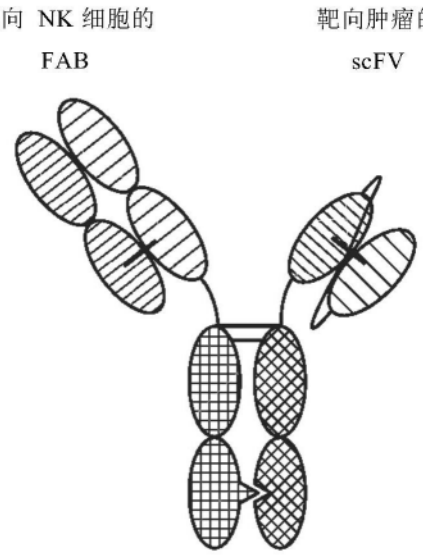

靶向 NK 细胞的
FAB
靶向肿瘤的
scFV

图1

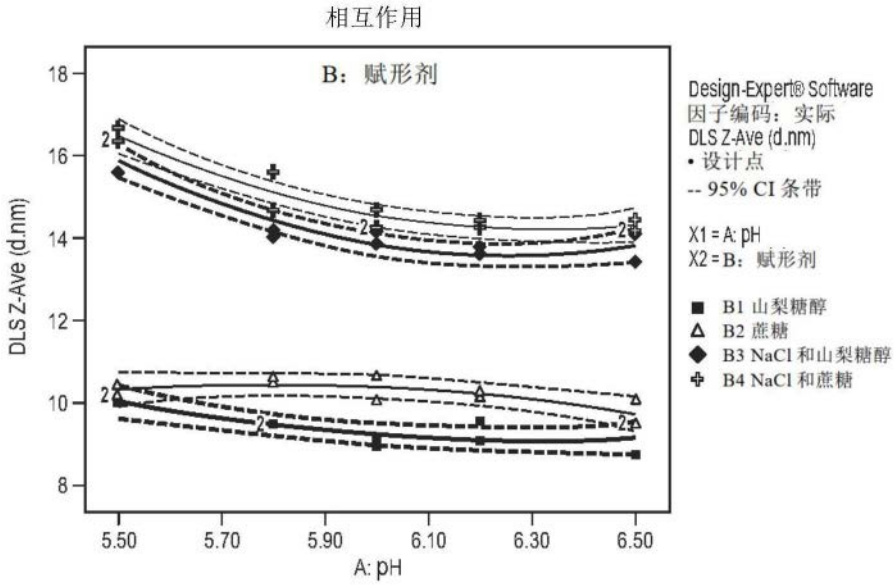

相互作用
B：赋形剂
DLS Z-Ave (d.nm)
A: pH
18
16
14
12
10
8
5.50
5.70
5.90
6.10
6.30
6.50
Design-Expert® Software
因子编码：实际
DLS Z-Ave (d.nm)
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
X2 = B：赋形剂
B1 山梨糖醇
B2 蔗糖
B3 NaCl 和山梨糖醇
B4 NaCl 和蔗糖

图2A

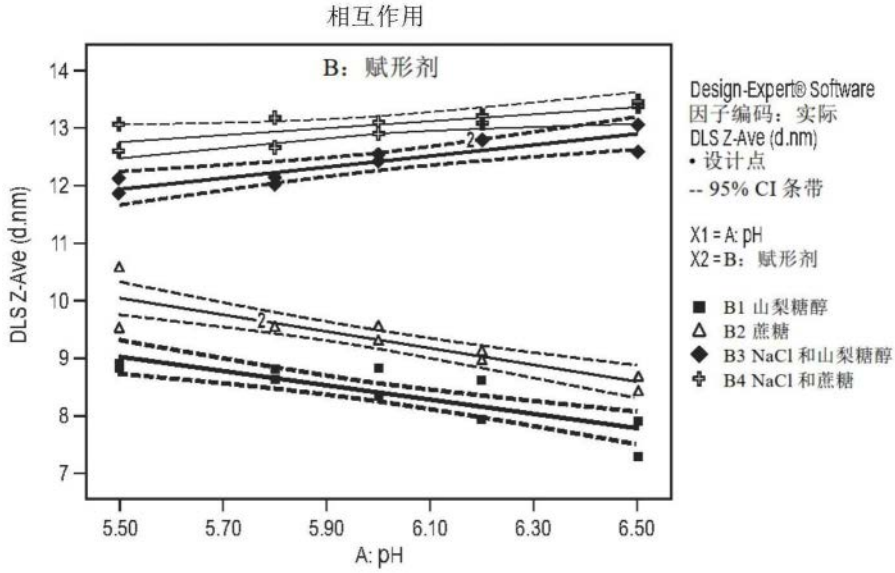

相互作用
B：赋形剂
DLS Z-Ave (d.nm)
A: pH
Design-Expert® Software
因子编码：实际
DLS Z-Ave (d.nm)
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
X2 = B：赋形剂
B1 山梨糖醇
B2 蔗糖
B3 NaCl 和山梨糖醇
B4 NaCl 和蔗糖

图2B

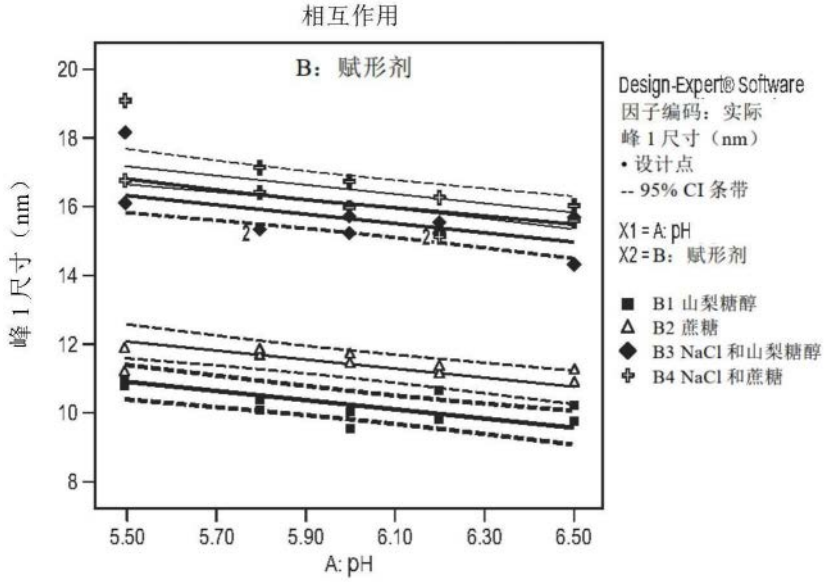

相互作用
B：赋形剂
峰 1 尺寸（nm）
A: pH
Design-Expert® Software
因子编码：实际
峰 1 尺寸（nm）
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
X2 = B：赋形剂
B1 山梨糖醇
B2 蔗糖
B3 NaCl 和山梨糖醇
B4 NaCl 和蔗糖

图3A

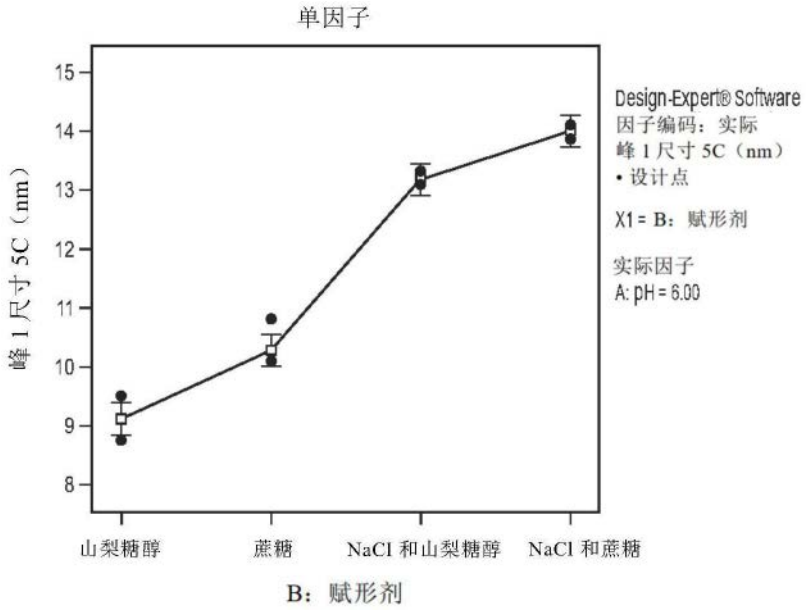

单因子
峰 1 尺寸 5C（nm）
15
14
13
12
11
10
9
8
山梨糖醇
蔗糖
NaCl 和山梨糖醇
NaCl 和蔗糖
B：赋形剂
Design-Expert® Software
因子编码：实际
峰 1 尺寸 5C（nm）
• 设计点
X1 = B：赋形剂
实际因子
A: pH = 6.00

图3B

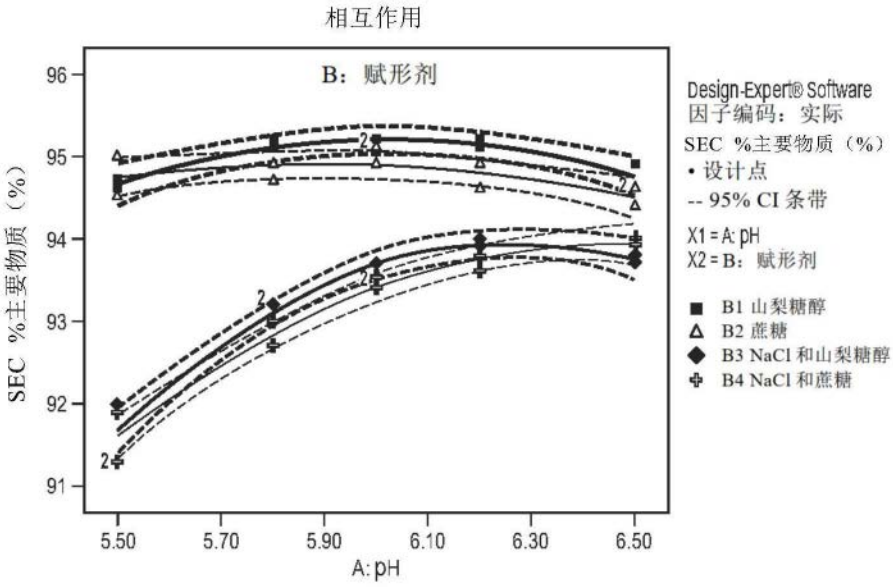

相互作用
B：赋形剂
SEC %主要物质（%）
96
95
94
93
92
91
5.50
5.70
5.90
6.10
6.30
6.50
A: pH
Design-Expert® Software
因子编码：实际
SEC %主要物质（%）
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
X2 = B：赋形剂
B1 山梨糖醇
B2 蔗糖
B3 NaCl 和山梨糖醇
B4 NaCl 和蔗糖

图4A

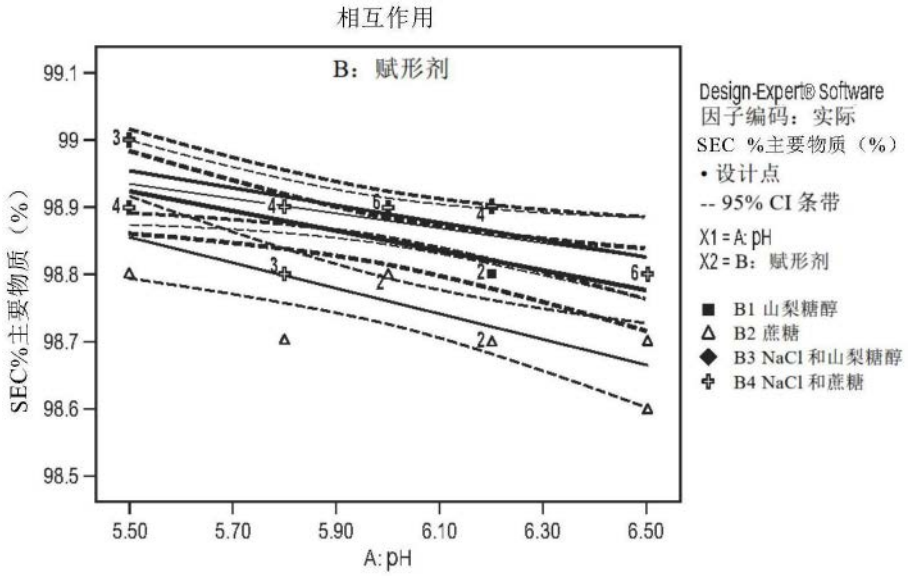

相互作用
B：赋形剂
SEC %主要物质（%）
99.1
99
98.9
98.8
98.7
98.6
98.5
5.50
5.70
5.90
6.10
6.30
6.50
A: pH
Design-Expert® Software
因子编码：实际
SEC %主要物质（%）
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
X2 = B：赋形剂
B1 山梨糖醇
B2 蔗糖
B3 NaCl 和山梨糖醇
B4 NaCl 和蔗糖

图4B

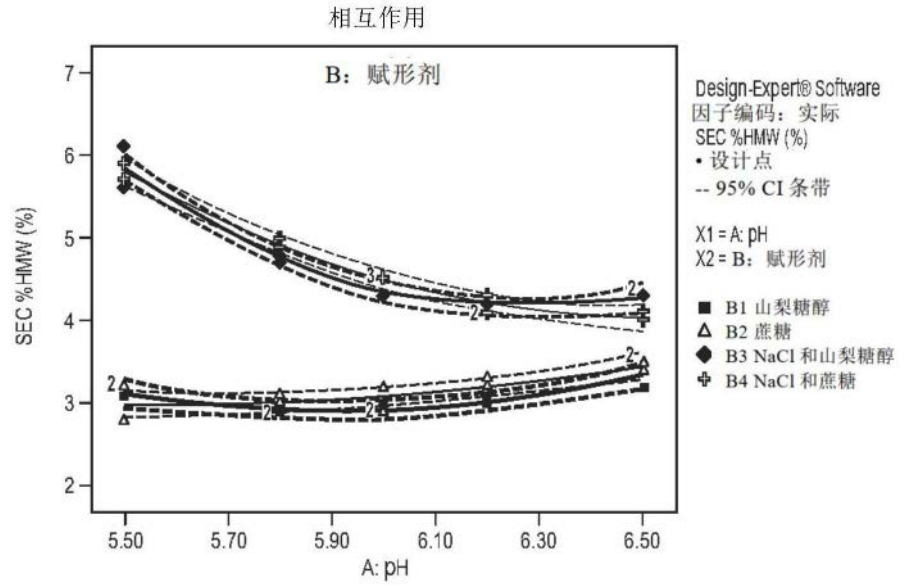

相互作用
B：赋形剂
SEC %HMW (%)
7
6
5
4
3
2
5.50
5.70
5.90
6.10
6.30
6.50
A: pH
Design-Expert® Software
因子编码：实际
SEC %HMW (%)
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
X2 = B：赋形剂
B1 山梨糖醇
B2 蔗糖
B3 NaCl 和山梨糖醇
B4 NaCl 和蔗糖

图5A

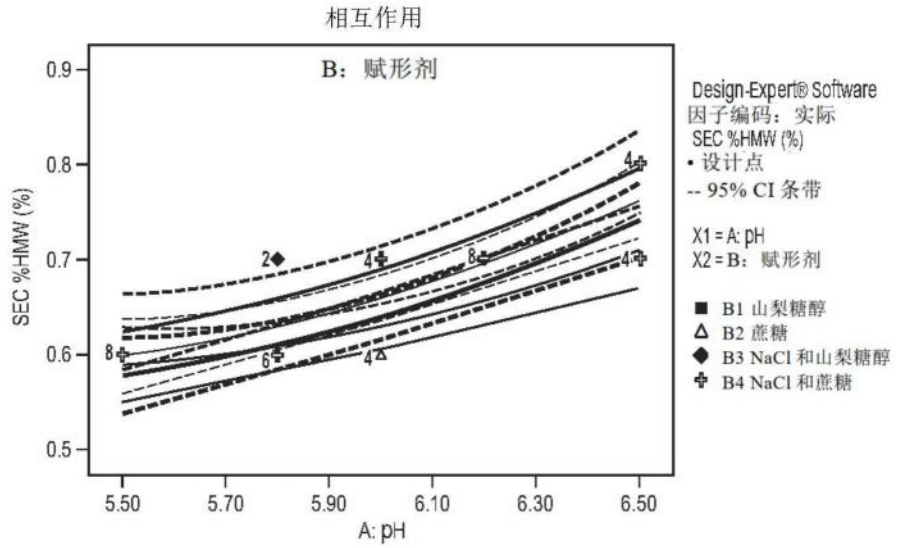

相互作用
B：赋形剂
SEC %HMW (%)
A: pH
Design-Expert® Software
因子编码：实际
SEC %HMW (%)
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
X2 = B：赋形剂
B1 山梨糖醇
B2 蔗糖
B3 NaCl 和山梨糖醇
B4 NaCl 和蔗糖

图5B

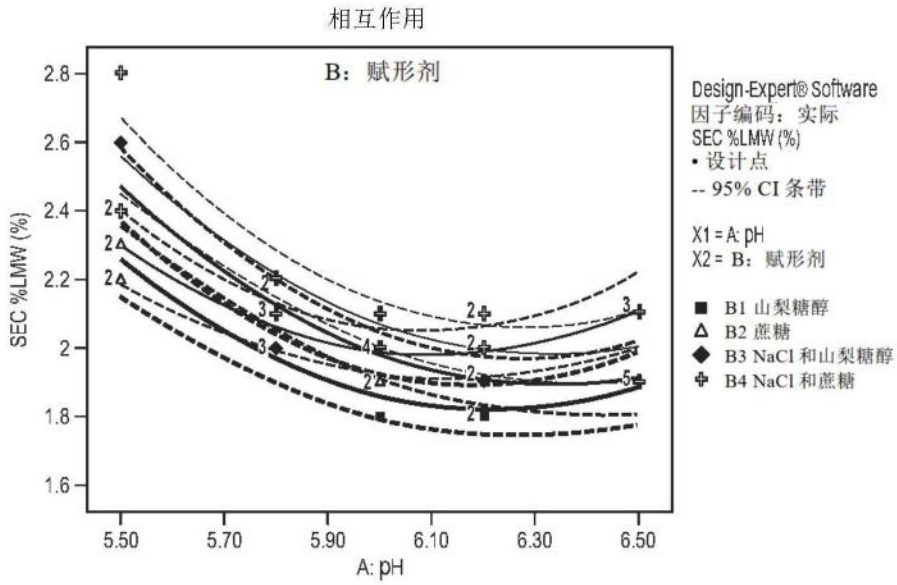

相互作用
B：赋形剂
SEC %LMW (%)
A: pH
Design-Expert® Software
因子编码：实际
SEC %LMW (%)
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
X2 = B：赋形剂
B1 山梨糖醇
B2 蔗糖
B3 NaCl 和山梨糖醇
B4 NaCl 和蔗糖

图6A

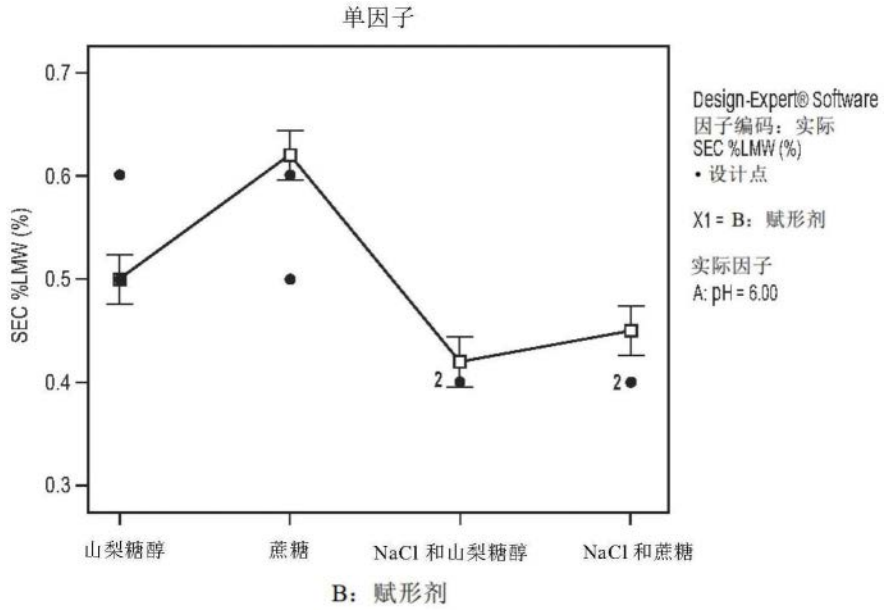

单因子
SEC %LMW (%)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
2
2
山梨糖醇
蔗糖
NaCl 和山梨糖醇
NaCl 和蔗糖
B：赋形剂
Design-Expert® Software
因子编码：实际
SEC %LMW (%)
• 设计点
X1 = B：赋形剂
实际因子
A: pH = 6.00

图6B

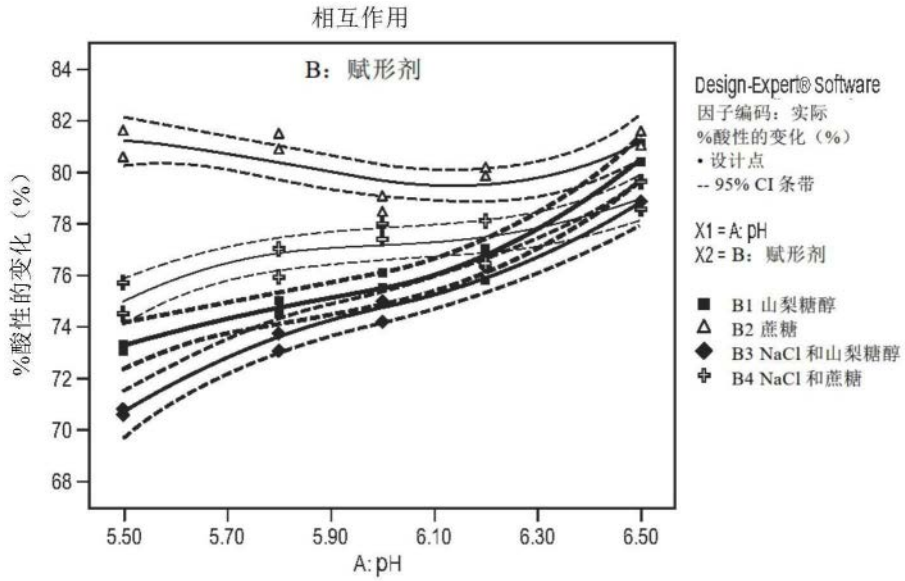

相互作用
B：赋形剂
%酸性的变化（%）
84
82
80
78
76
74
72
70
68
5.50
5.70
5.90
6.10
6.30
6.50
A: pH
Design-Expert® Software
因子编码：实际
%酸性的变化（%）
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
X2 = B：赋形剂
B1 山梨糖醇
B2 蔗糖
B3 NaCl 和山梨糖醇
B4 NaCl 和蔗糖

图7A

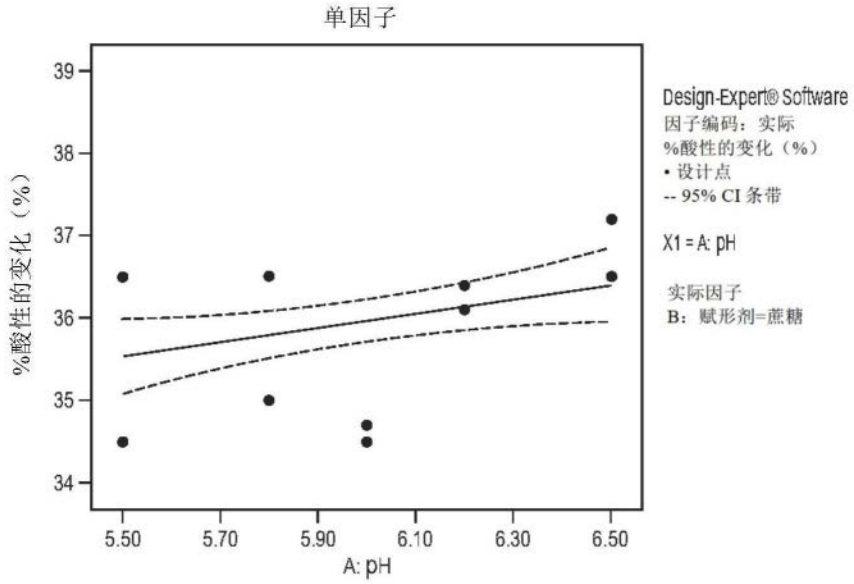

单因子
%酸性的变化（%）
39
38
37
36
35
34
5.50
5.70
5.90
6.10
6.30
6.50
A: pH
Design-Expert® Software
因子编码：实际
%酸性的变化（%）
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
实际因子
B：赋形剂=蔗糖

图7B

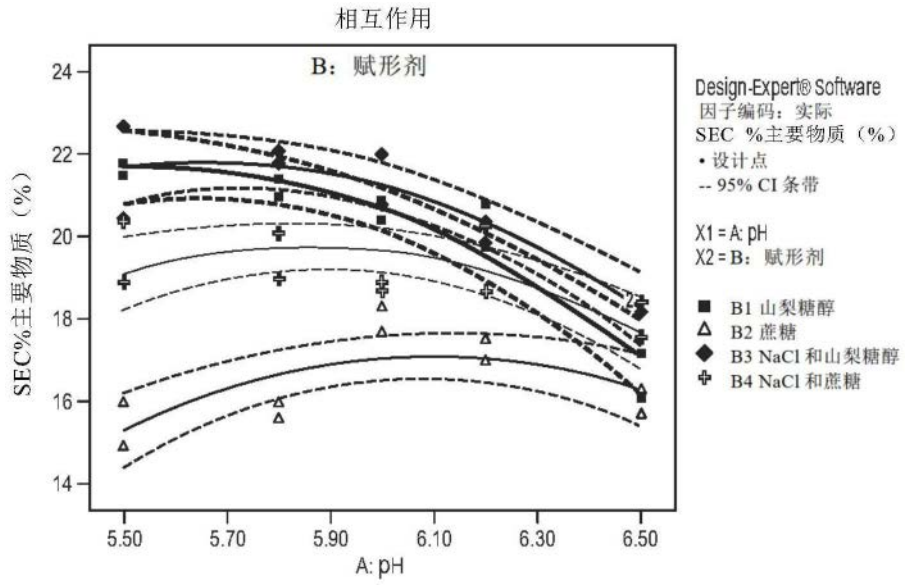

相互作用
B：赋形剂
SEC%主要物质（%）
24
22
20
18
16
14
5.50
5.70
5.90
6.10
6.30
6.50
A: pH
Design-Expert® Software
因子编码：实际
SEC %主要物质（%）
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
X2 = B：赋形剂
B1 山梨糖醇
B2 蔗糖
B3 NaCl 和山梨糖醇
B4 NaCl 和蔗糖

图8A

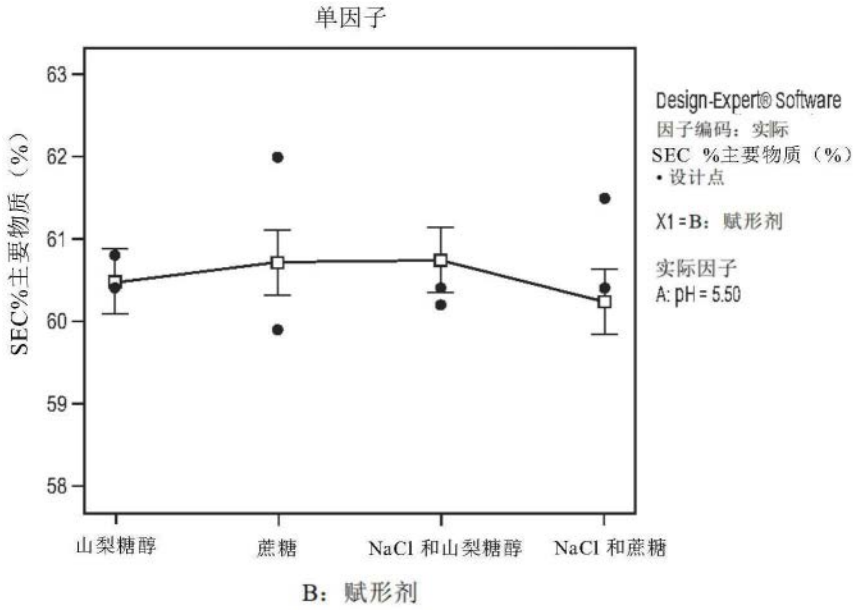

单因子
SEC%主要物质（%）
63
62
61
60
59
58
山梨糖醇
蔗糖
NaCl 和山梨糖醇
NaCl 和蔗糖
B：赋形剂
Design-Expert® Software
因子编码：实际
SEC %主要物质（%）
• 设计点
X1 = B：赋形剂
实际因子
A: pH = 5.50

图8B

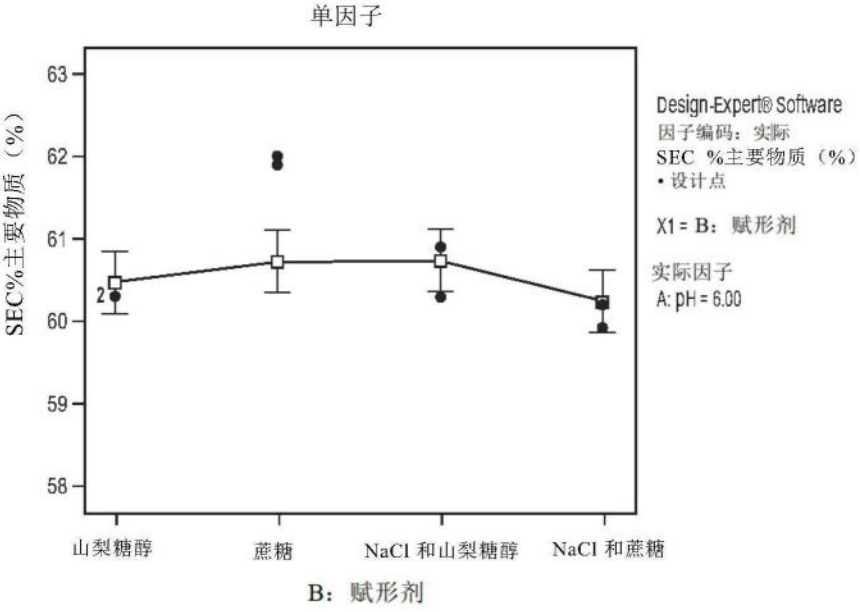

单因子
SEC%主要物质（%）
63
62
61
60
59
58
2
山梨糖醇
蔗糖
NaCl 和山梨糖醇
NaCl 和蔗糖
B：赋形剂
Design-Expert® Software
因子编码：实际
SEC %主要物质（%）
• 设计点
X1 = B：赋形剂
实际因子
A: pH = 6.00

图8C

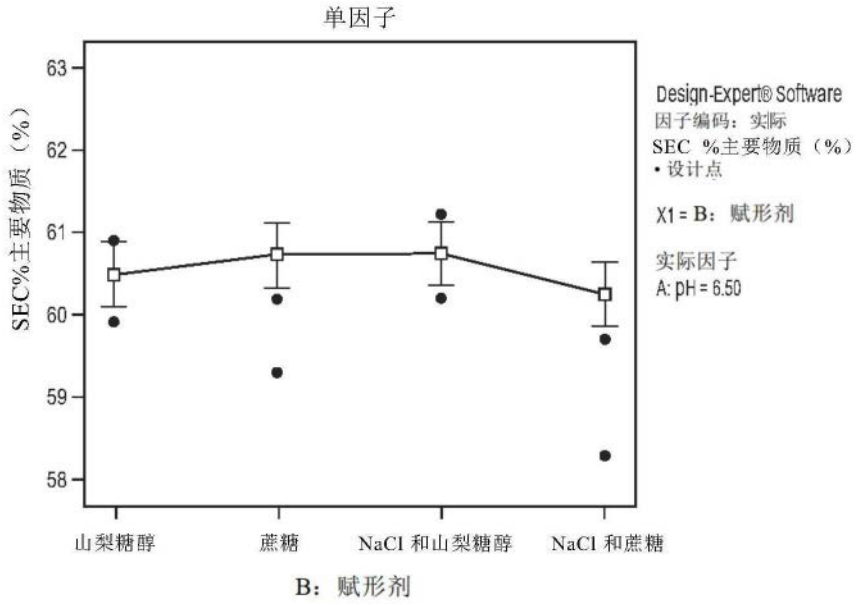

单因子
SEC%主要物质（%）
63
62
61
60
59
58
山梨糖醇
蔗糖
NaCl 和山梨糖醇
NaCl 和蔗糖
B：赋形剂
Design-Expert® Software
因子编码：实际
SEC %主要物质（%）
• 设计点
X1 = B：赋形剂
实际因子
A: pH = 6.50

图8D

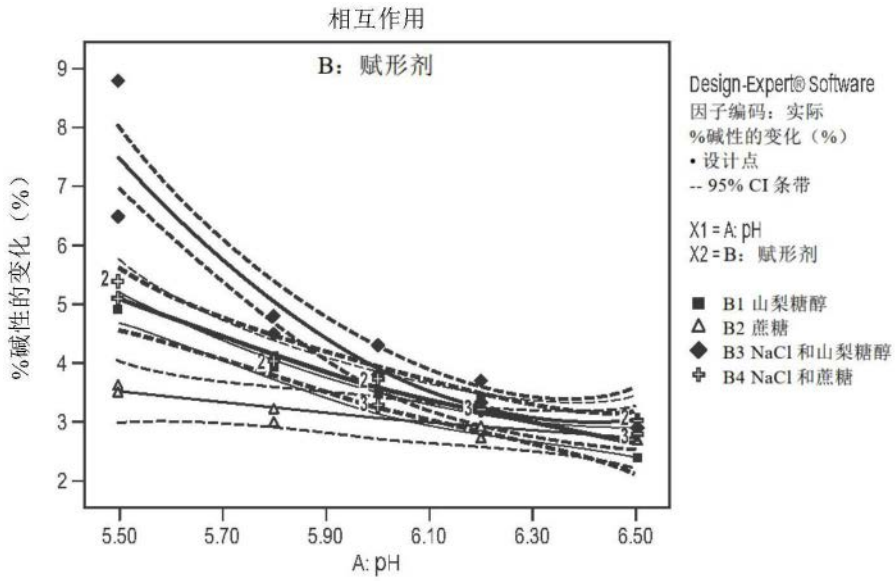

相互作用
B：赋形剂
%碱性的变化（%）
9
8
7
6
5
4
3
2
5.50
5.70
5.90
6.10
6.30
6.50
A: pH
Design-Expert® Software
因子编码：实际
%碱性的变化（%）
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
X2 = B：赋形剂
B1 山梨糖醇
B2 蔗糖
B3 NaCl 和山梨糖醇
B4 NaCl 和蔗糖

图9A

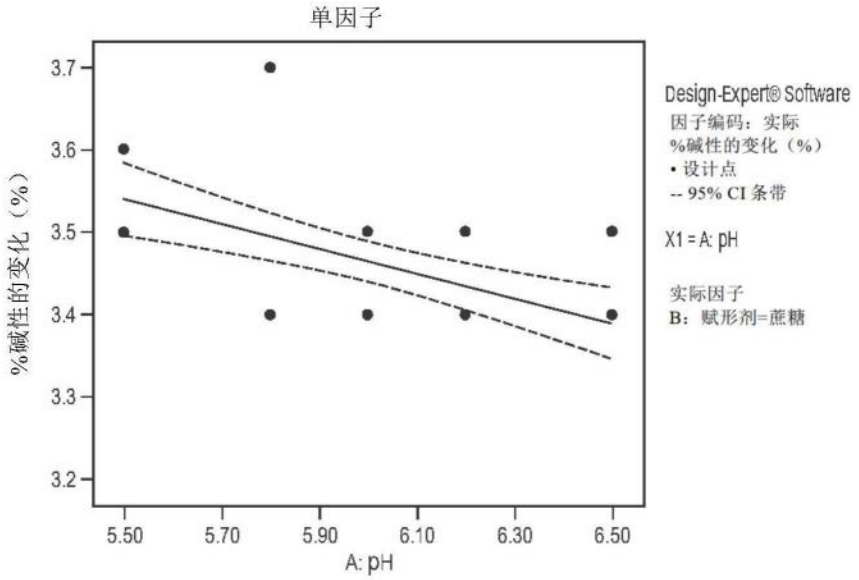

单因子
%碱性的变化（%）
3.7
3.6
3.5
3.4
3.3
3.2
5.50
5.70
5.90
6.10
6.30
6.50
A: pH
Design-Expert® Software
因子编码：实际
%碱性的变化（%）
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
实际因子
B：赋形剂=蔗糖

图9B

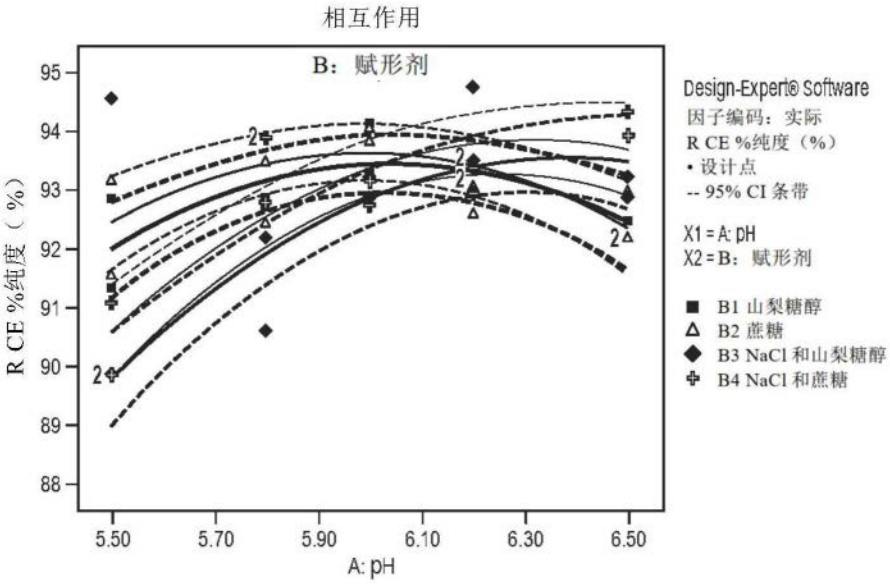

相互作用
B：赋形剂
R CE %纯度（%）
95
94
93
92
91
90
89
88
5.50
5.70
5.90
6.10
6.30
6.50
A: pH
Design-Expert® Software
因子编码：实际
R CE %纯度（%）
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
X2 = B：赋形剂
B1 山梨糖醇
B2 蔗糖
B3 NaCl 和山梨糖醇
B4 NaCl 和蔗糖

图10A

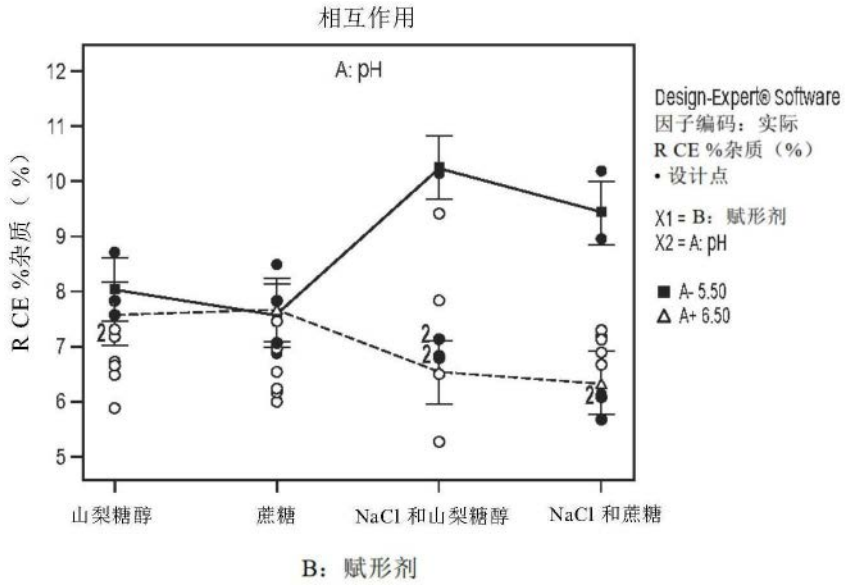

相互作用
A: pH
R CE %杂质（%）
12
11
10
9
8
7
6
5
山梨糖醇
蔗糖
NaCl 和山梨糖醇
NaCl 和蔗糖
B：赋形剂
Design-Expert® Software
因子编码：实际
R CE %杂质（%）
• 设计点
X1 = B：赋形剂
X2 = A: pH
■ A- 5.50
△ A+ 6.50

图10B

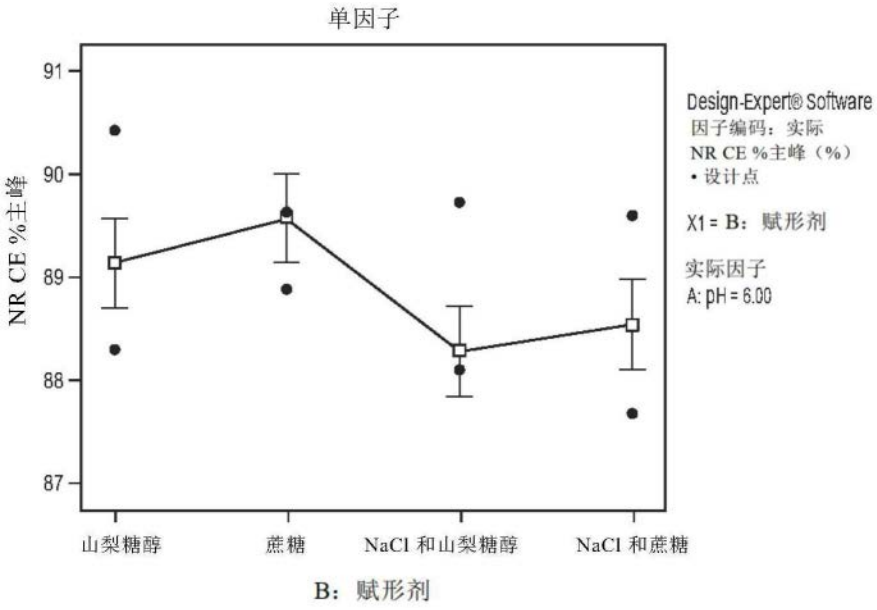

单因子
NR CE %主峰
91
90
89
88
87
山梨糖醇
蔗糖
NaCl 和山梨糖醇
NaCl 和蔗糖
B：赋形剂
Design-Expert® Software
因子编码：实际
NR CE %主峰（%）
• 设计点
X1 = B：赋形剂
实际因子
A: pH = 6.00

图11A

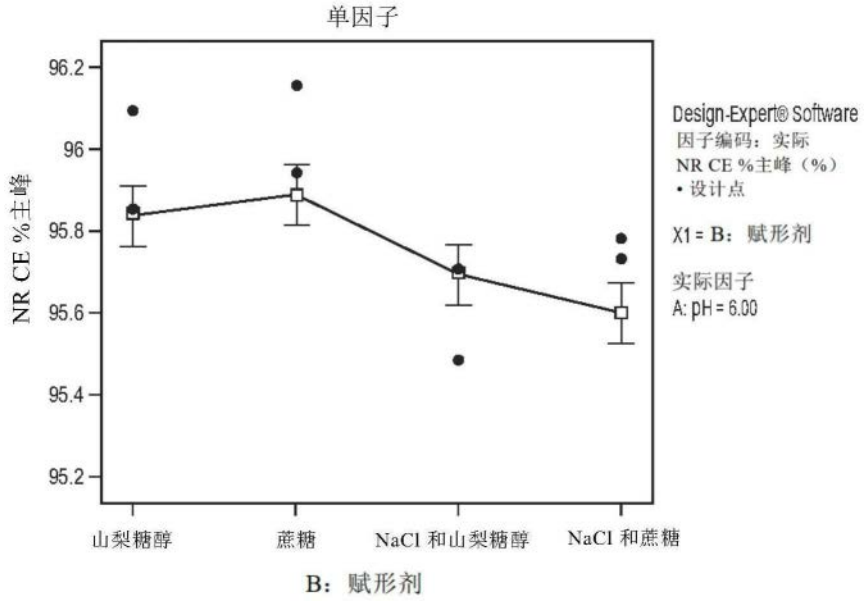

单因子
96.2
96
95.8
95.6
95.4
95.2
NR CE %主峰
山梨糖醇
蔗糖
NaCl 和山梨糖醇
NaCl 和蔗糖
B：赋形剂
Design-Expert® Software
因子编码：实际
NR CE %主峰（%）
• 设计点
X1 = B：赋形剂
实际因子
A: pH = 6.00

图11B

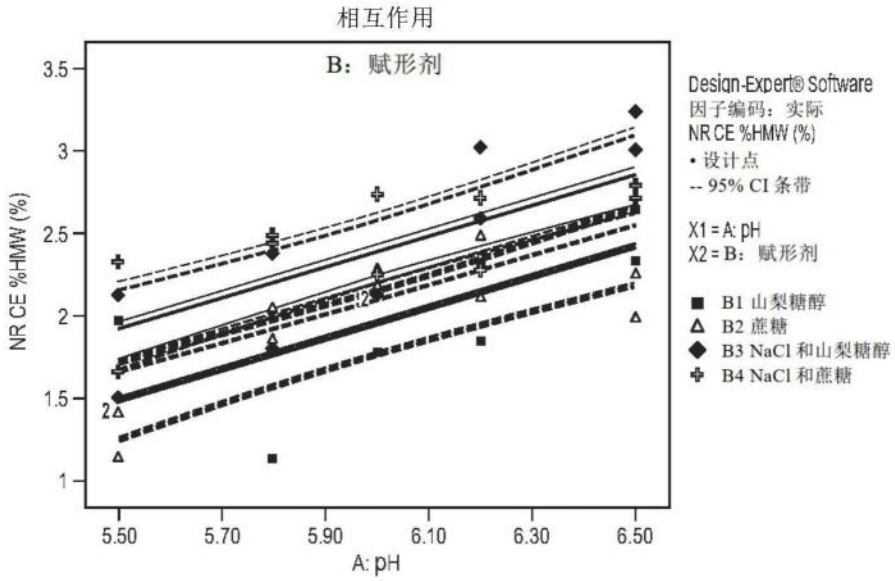

相互作用
B：赋形剂
3.5
3
2.5
2
1.5
1
NR CE %HMW (%)
5.50
5.70
5.90
6.10
6.30
6.50
A: pH
Design-Expert® Software
因子编码：实际
NR CE %HMW (%)
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
X2 = B：赋形剂
B1 山梨糖醇
B2 蔗糖
B3 NaCl 和山梨糖醇
B4 NaCl 和蔗糖

图12A

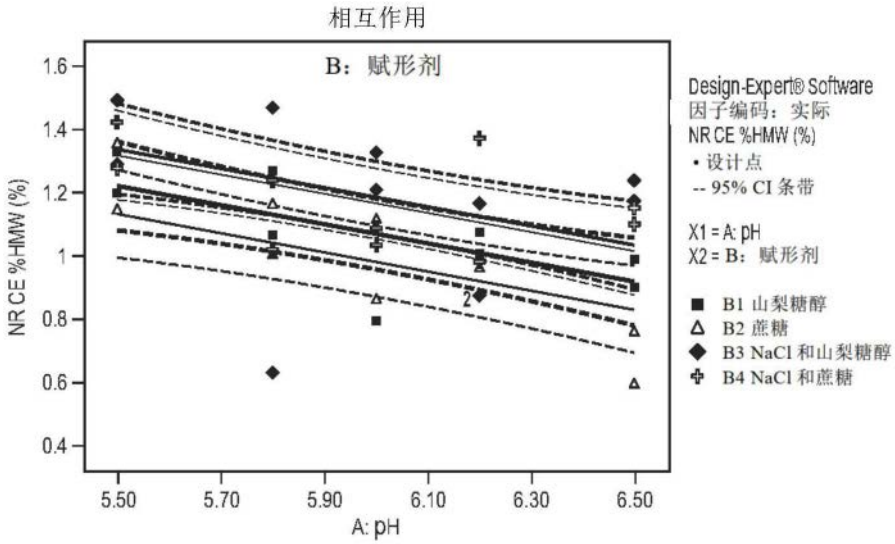

相互作用
B：赋形剂
NR CE %HMW (%)
A: pH
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
5.50
5.70
5.90
6.10
6.30
6.50
Design-Expert® Software
因子编码：实际
NR CE %HMW (%)
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
X2 = B：赋形剂
B1 山梨糖醇
B2 蔗糖
B3 NaCl 和山梨糖醇
B4 NaCl 和蔗糖

图12B

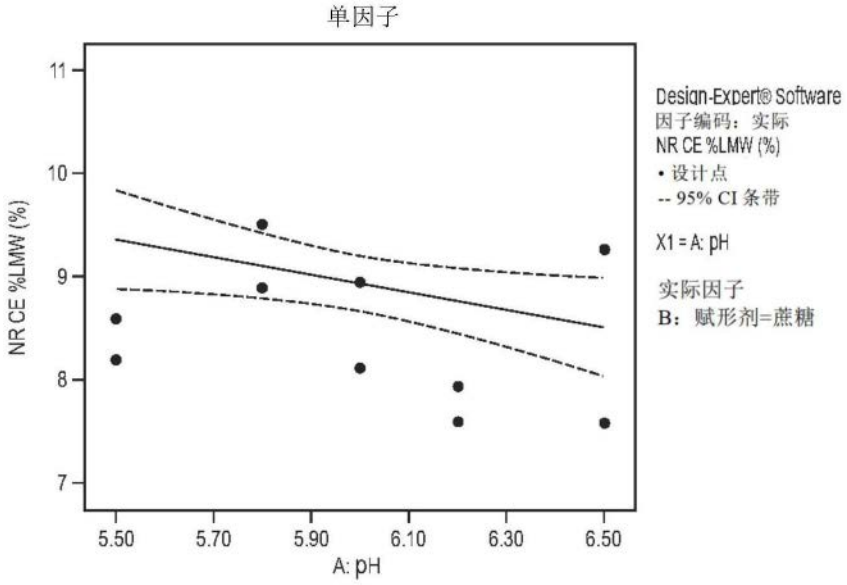

单因子
NR CE %LMW (%)
A: pH
11
10
9
8
7
5.50
5.70
5.90
6.10
6.30
6.50
Design-Expert® Software
因子编码：实际
NR CE %LMW (%)
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
实际因子
B：赋形剂=蔗糖

图13A

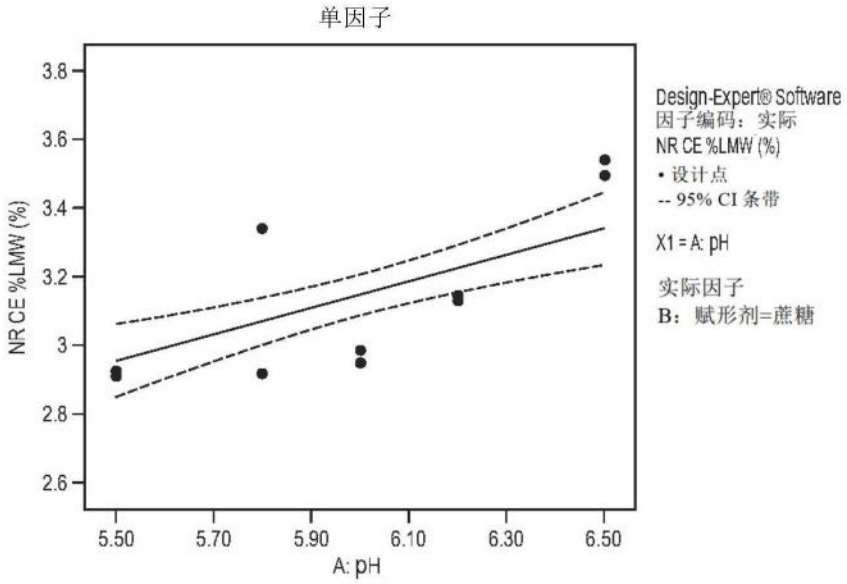

单因子
NR CE %LMW (%)
3.8
3.6
3.4
3.2
3
2.8
2.6
5.50
5.70
5.90
6.10
6.30
6.50
A: pH
Design-Expert® Software
因子编码：实际
NR CE %LMW (%)
• 设计点
-- 95% CI 条带
X1 = A: pH
实际因子
B：赋形剂=蔗糖

图13B

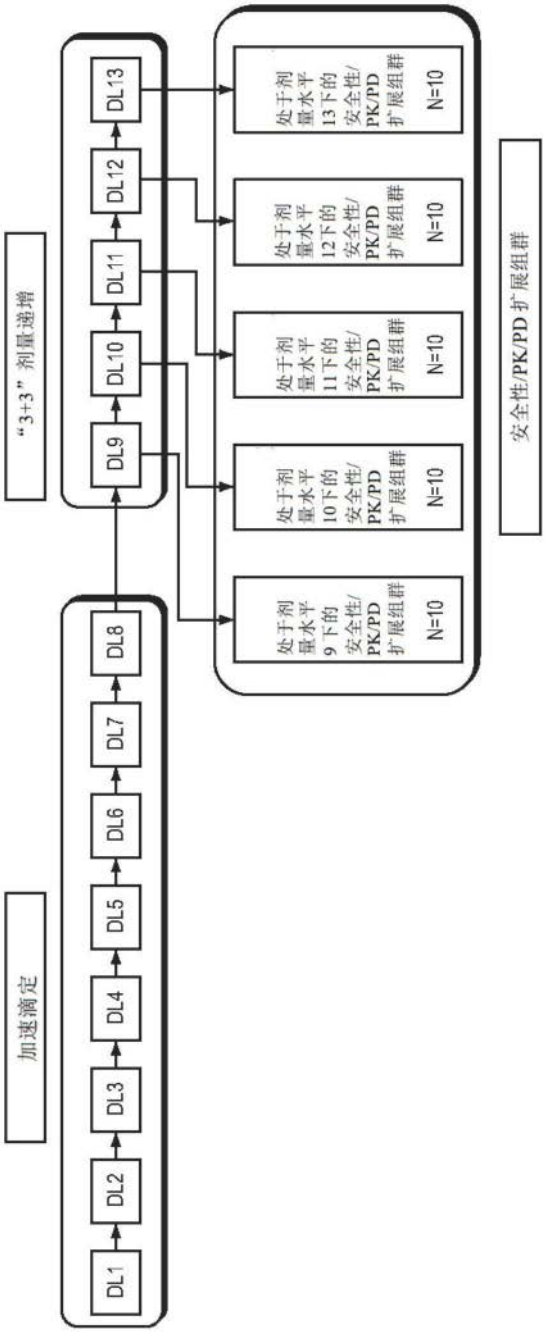

加速滴定
DL1
DL2
DL3
DL4
DL5
DL6
DL7
DL8
“3+3”剂量递增
DL9
DL10
DL11
DL12
DL13
处于剂量水平9下的安全性/PK/PD扩展组群 N=10
处于剂量水平10下的安全性/PK/PD扩展组群 N=10
处于剂量水平11下的安全性/PK/PD扩展组群 N=10
处于剂量水平12下的安全性/PK/PD扩展组群 N=10
处于剂量水平13下的安全性/PK/PD扩展组群 N=10
安全性/PK/PD扩展组群

图14A

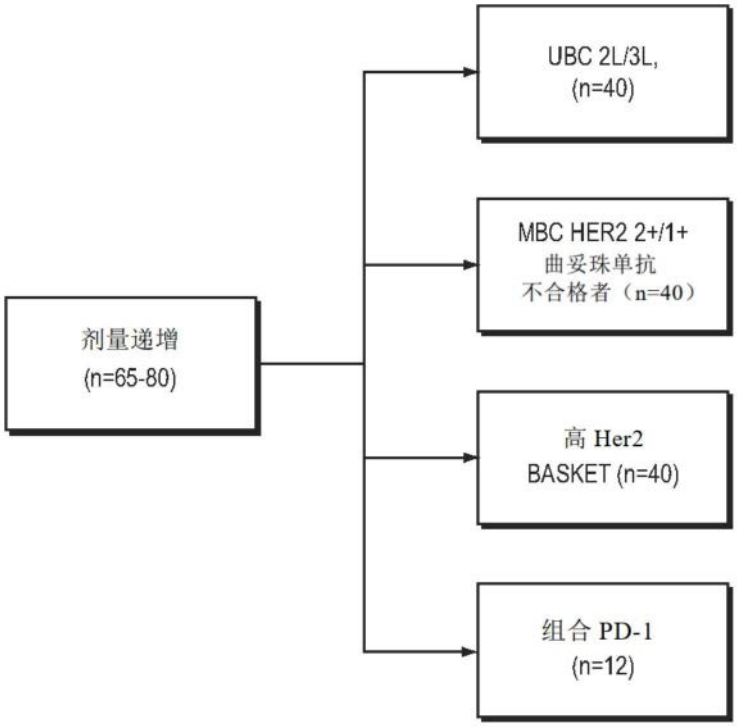

剂量递增
(n=65-80)
UBC 2L/3L,
(n=40)
MBC HER2 2+/1+
曲妥珠单抗
不合格者（n=40）
高 Her2
BASKET (n=40)
组合 PD-1
(n=12)

图14B