



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112368012 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 10

(21) 申请号 201980012297.4

(22) 申请日 2019.02.08

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112368012 A

(43) 申请公布日 2021.02.12

(30) 优先权数据
62/628,161 2018.02.08 US
62/716,259 2018.08.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.08.07

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/017330 2019.02.08

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/157366 EN 2019.08.15

(73) 专利权人 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
阿斯亚·格林贝格 威廉·哈尼
布拉德利·M·伦德
比昂卡·普林茨

(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

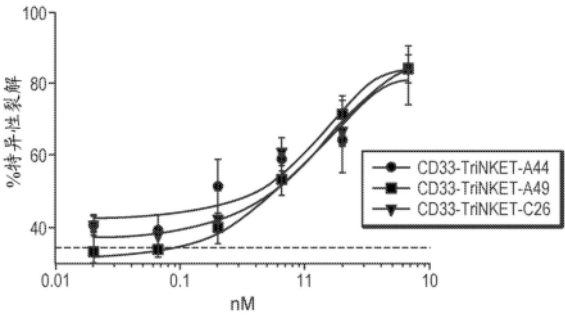
(51) Int.Cl.
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101945893 A, 2011.01.12
WO 2010017103 A2, 2010.02.11
审查员 陈莹

权利要求书2页 说明书40页
序列表29页 附图22页

(54) 发明名称
靶向NKG2D受体的抗体可变结构域

(57) 摘要
描述了抗体重链可变结构域,所述抗体重链可变结构域可以与抗体轻链可变结构域配对以形成靶向天然杀伤细胞上的NKG2D受体的抗原结合位点。还描述了包含NKG2D抗原结合位点的蛋白质、其药物组合物及治疗方法,包括用于治疗癌症。



1. 一种抗NKG2D抗体或其抗原结合片段,其包含:

(i) 抗体重链可变结构域,其包含SEQ ID NO:48的互补决定区1(CDR1)序列、SEQ ID NO:30的互补决定区2(CDR2)序列和SEQ ID NO:71、78、74、76、80或82的互补决定区3(CDR3)序列;以及

抗体轻链可变结构域,其包含SEQ ID NO:32的CDR1序列、SEQ ID NO:33的CDR2序列和SEQ ID NO:34的CDR3序列;

前提是CDR序列是根据Kabat确定的;或者

(ii) 抗体重链可变结构域,其包含SEQ ID NO:29的CDR1序列、SEQ ID NO:30的CDR2序列和SEQ ID NO:31、73、75、77、79或81的CDR3序列;以及

抗体轻链可变结构域,其包含SEQ ID NO:32的CDR1序列、SEQ ID NO:33的CDR2序列和SEQ ID NO:34的CDR3序列;

前提是CDR序列是根据非-Kabat确定的。

2. 根据权利要求1所述的抗NKG2D抗体或抗原结合片段,其中所述抗体重链可变结构域由SEQ ID NO:7的氨基酸序列构成,并且所述抗体轻链可变结构域由SEQ ID NO:8的氨基酸序列构成。

3. 一种蛋白质,其包含:

根据权利要求1或2所述的抗NKG2D抗体或抗原结合片段;和额外的抗原结合结构域。

4. 根据权利要求3所述的蛋白质,其中所述额外的抗原结合结构域与肿瘤相关抗原结合。

5. 根据权利要求3所述的蛋白质,其中所述额外的抗原结合结构域包含抗体重链可变结构域;并且

所述抗NKG2D抗体或其抗原结合片段的抗体重链可变结构域存在于还包含第一抗体恒定区的第一多肽上,并且所述额外的抗原结合结构域的抗体重链可变结构域存在于还包含第二抗体恒定区的第二多肽上。

6. 根据权利要求5所述的蛋白质,其中所述第一抗体恒定区和所述第二抗体恒定区形成能够结合CD16的复合物。

7. 根据权利要求6所述的蛋白质,其中所述第一抗体恒定区和所述第二抗体恒定区各自包含铰链、CH2和CH3结构域。

8. 根据权利要求6所述的蛋白质,其中所述第一抗体恒定区和所述第二抗体恒定区各自进一步包含CH1结构域。

9. 根据权利要求6所述的蛋白质,其中所述第一抗体恒定区和所述第二抗体恒定区的氨基酸序列各自与人IgG1恒定区具有至少90%同一性。

10. 根据权利要求9所述的蛋白质,其中所述第一抗体恒定区的所述氨基酸序列与IgG1恒定区的所述氨基酸序列的区别在于S354C取代,并且所述第二抗体恒定区的所述氨基酸序列与IgG1恒定区的所述氨基酸序列的区别在于Y349C取代。

11. 根据权利要求9所述的蛋白质,其中所述第一抗体恒定区的所述氨基酸序列与IgG1恒定区的所述氨基酸序列的区别在于Y349C取代,并且所述第二抗体恒定区的所述氨基酸序列与IgG1恒定区的所述氨基酸序列的区别在于S354C取代。

12. 根据权利要求9所述的蛋白质,其中所述第一抗体恒定区的所述氨基酸序列与IgG1

恒定区的所述氨基酸序列的区别在于K360E和K409W取代,并且所述第二抗体恒定区的所述氨基酸序列与IgG1恒定区的所述氨基酸序列的区别在于Q347R、D399V和F405T取代。

13. 根据权利要求9所述的蛋白质,其中所述第一抗体恒定区的所述氨基酸序列与IgG1恒定区的所述氨基酸序列的区别在于Q347R、D399V和F405T取代,并且所述第二抗体恒定区的所述氨基酸序列与IgG1恒定区的所述氨基酸序列的区别在于K360E和K409W取代。

14. 根据权利要求9所述的蛋白质,其中所述第一抗体恒定区的所述氨基酸序列与IgG1恒定区的所述氨基酸序列的区别在于T366W取代,并且所述第二抗体恒定区的所述氨基酸序列与IgG1恒定区的所述氨基酸序列的区别在于T366S、L368A和Y407V取代。

15. 根据权利要求9所述的蛋白质,其中所述第一抗体恒定区的所述氨基酸序列与IgG1恒定区的所述氨基酸序列的区别在于T366S、L368A和Y407V取代,并且所述第二抗体恒定区的所述氨基酸序列与IgG1恒定区的所述氨基酸序列的区别在于T366W取代。

16. 根据权利要求3所述的蛋白质,其中所述蛋白质还包含能够结合CD16的抗原结合结构域。

17. 一种制剂,其包含根据权利要求3-16中任一项所述的蛋白质和药学上可接受的载剂。

18. 一种细胞,其包含一种或多种编码根据权利要求3-16中任一项所述的蛋白质的核酸。

靶向NKG2D受体的抗体可变结构域

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年2月8日提交的美国临时专利申请第62/628,161号,其公开内容出于所有目的通过引用整体并入文中;以及2018年8月8日提交的美国临时专利申请第62/716,259号的权益和优先权。

发明领域

[0003] 本发明提供了具有抗体重链和轻链可变结构域的蛋白质,所述抗体重链和轻链可变结构域可以配对以形成靶向天然杀伤细胞上的天然杀伤组2D(NKG2D)受体的抗原结合位点、包含这种蛋白质的药物组合物,以及使用这种蛋白质和药物组合物的治疗方法,包括用于治疗癌症。

背景技术

[0004] 尽管在文献中报道了用于治疗该疾病的大量研究努力和科学进展,但是癌症仍然是一个重要的健康问题。一些最常被诊断的癌症包括前列腺癌、乳腺癌和肺癌。前列腺癌是男性中最常见的癌症形式。乳腺癌仍然是女性死亡的主要原因。这些癌症的当前治疗选择不是对所有患者都有效,且/或可能具有严重的不良副作用。使用现有的治疗选择来治疗其他类型的癌症也仍然具有挑战性。

[0005] 癌症免疫疗法是理想的,因为它们具有高度特异性,并且可以利用患者自身免疫系统来促进癌细胞的破坏。融合蛋白如双特异性T细胞接合剂是文献中描述的与肿瘤细胞和T细胞结合以促进肿瘤细胞破坏的癌症免疫疗法。在文献中已经描述了与某些肿瘤相关抗原和某些免疫细胞结合的抗体。参见例如WO 2016/134371和WO 2015/095412。

[0006] 自然杀伤(NK)细胞是先天免疫系统的组分,并构成循环淋巴细胞的约15%。NK细胞几乎浸润所有组织,并且最初的特征在于它们在不需要引发的情况下有效杀死肿瘤细胞的能力,这将它们与T细胞区分开来。激活的NK细胞通过类似于细胞毒性T细胞的方式杀死靶细胞,即通过包含穿孔素和颗粒酶的溶细胞颗粒以及通过死亡受体途径。激活的NK细胞还分泌促进其他白细胞募集到靶组织的炎性细胞因子如IFN- γ 和趋化因子。

[0007] NK细胞对于通过其表面上的各种激活和抑制受体的信号作出响应。例如,当NK细胞遇到健康的自身细胞时,它们的活性通过杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的激活而得到抑制。替代地,当NK细胞遇到癌细胞时,它们通过其激活受体(例如NKG2D、NCR、DNAM1)而得到激活。NK细胞还通过其表面上的CD16受体而被一些免疫球蛋白的恒定区域激活。NK细胞对激活的总体敏感性取决于刺激信号和抑制信号的总和。NKG2D是一种II型跨膜蛋白,其基本上由所有天然杀伤细胞表达,其中NKG2D充当激活受体。通过NKG2D来调节NK细胞功能的能力在包括恶性肿瘤的各种治疗情形中是有用的。

发明内容

[0008] 已经鉴定了NKG2D的抗体,这些抗体在设计治疗剂时具有重要的优势。例如,这些

抗体中的一些不仅结合人NKG2D受体,还具有一个或多个其他优势,例如激动受体的能力;与天然配体竞争结合受体的能力;和/或与来自其他物种(例如食蟹猴)的NKG2D发生交叉反应的能力。这些优势可以在对NKG2D的亲合力范围内实现。

[0009] 因此,本发明一方面涉及与氨基酸序列QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMH WVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGAPNYGDTTHDYY YMDVWGKGTTTVTVSS (SEQ ID NO:1, ADI-29379) 具有至少90%同一性的抗体重链可变结构域。在一些实施方案中,所述抗体重链可变结构域与SEQ ID NO:1具有至少95%同一性。在一些实施方案中,所述重链可变结构域包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列YTFTSYMH (SEQ ID NO:11) 作为第一互补决定区1 (“CDR1”)、IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:12) 作为第二CDR (“CDR2”),以及ARGAPNYGDTTHDYYYMDV (SEQ ID NO:13) 作为第三CDR (“CDR3”)。在一些实施方案中,所述重链可变结构域包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列SYMH (SEQ ID NO:45) 作为 CDR1、IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:12) 作为CDR2,以及GAPNYGDTTHDYYYMDV (SEQ ID NO:68) 作为CDR3。

[0010] 本发明另一方面涉及与氨基酸序列QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWVR QAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRSDDTAVYYCARDTGEYYDTDDHGMDVW GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:3, ADI-29463) 具有至少90%同一性的抗体重链可变结构域。在一些实施方案中,所述抗体重链可变结构域与SEQ ID NO:3具有至少95%同一性。在一些实施方案中,所述重链可变结构域包括SEQ ID NO:3的氨基酸序列YTFTGYMH (SEQ ID NO:17) 作为第一互补决定区 (“CDR1”)、WINPNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO:18) 作为第二CDR (“CDR2”),以及ARDTGEYYDTDDHGMDV (SEQ ID NO:19) 作为第三CDR (“CDR3”)。在一些实施方案中,所述重链可变结构域包括SEQ ID NO:3的氨基酸序列GYMH (SEQ ID NO:92) 作为CDR1、WINPNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO:18) 作为CDR2,以及DTGEYYDTDDHGMDV (SEQ ID NO:69) 作为 CDR3。

[0011] 本发明另一方面涉及与氨基酸序列EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGYYDSGAGDYWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO:5, ADI-27744) 具有至少90%同一性的抗体重链可变结构域。在一些实施方案中,所述抗体重链可变结构域与SEQ ID NO:5具有至少95%同一性。在一些实施方案中,所述重链可变结构域包括SEQ ID NO:5的氨基酸序列FTFSSYAMS (SEQ ID NO:23) 作为第一互补决定区 (“CDR1”)、AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:24) 作为第二CDR (“CDR2”),以及 AKDGGYYDSGAGDY (SEQ ID NO:25) 作为第三CDR (“CDR3”)。在一些实施方案中,所述重链可变结构域包括SEQ ID NO:5的氨基酸序列SYAMS (SEQ ID NO:47) 作为CDR1、AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:24) 作为CDR2,以及DGGYYDSGAGDY (SEQ ID NO:70) 作为 CDR3。

[0012] 本发明另一方面涉及与氨基酸序列EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPWGQ GTLTVTVSS (SEQ ID NO:7, ADI-27749) 具有至少90%同一性的抗体重链可变结构域。在一些实施方案中,所述抗体重链可变结构域与SEQ ID NO:7具有至少95%同一性。在一些实施方案中,所述重链可变结构域包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列FTFSSYSMN (SEQ ID NO:29) 作为第一互补决定区 (“CDR1”)、SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:30) 作为第二CDR (“CDR2”),以

及ARGAPMGAAAGWFDP (SEQ ID NO:31) 作为第三CDR (“CDR3”)。在一些实施方案中,所述重链可变结构域包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列SYSMN (SEQ ID NO:48) 作为CDR1、SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:30) 作为CDR2,以及GAPMGAAAGWFDP (SEQ ID NO:71) 作为CDR3。

[0013] 本发明另一方面涉及与氨基酸序列EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:85, A49MI) 具有至少90%同一性的抗体重链可变结构域。在一些实施方案中,所述抗体重链可变结构域与SEQ ID NO:85具有至少95%同一性。在一些实施方案中,所述重链可变结构域包括SEQ ID NO:85的氨基酸序列FTFSSYSMN (SEQ ID NO:29) 作为CDR1、SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:30) 作为CDR2,以及ARGAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO:77) 作为CDR3。在一些实施方案中,所述重链可变结构域包括SEQ ID NO:85的氨基酸序列SYSMN (SEQ ID NO:48) 作为CDR1、SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:30) 作为CDR2,以及GAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO:78) 作为CDR3。

[0014] 本发明另一方面涉及与氨基酸序列QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAREGAGFAYGMDYYYMDVWGKGTITVSS (SEQ ID NO:9, ADI-29378) 具有至少90%同一性的抗体重链可变结构域。在一些实施方案中,所述抗体重链可变结构域与SEQ ID NO:9具有至少95%同一性。在一些实施方案中,所述重链可变结构域包括SEQ ID NO:9的氨基酸序列YTFTSYMH (SEQ ID NO:35) 作为第一互补决定区 (“CDR1”)、IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:36) 作为第二CDR (“CDR2”), 以及AREGAGFAYGMDYYYMDV (SEQ ID NO:37) 作为第三CDR (“CDR3”)。在一些实施方案中,所述重链可变结构域包括SEQ ID NO:9的氨基酸序列SYMH (SEQ ID NO:45) 作为CDR1、IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:36) 作为CDR2,以及EGAGFAYGMDYYYMDV (SEQ ID NO:72) 作为CDR3。

[0015] 本发明的抗体重链可变结构域可以任选地偶联至与抗体恒定区具有至少90%同一性的氨基酸序列,所述抗体恒定区例如包括铰链、CH2和CH3结构域且具有或不具有CH1结构域的IgG恒定区。在一些实施方案中,恒定区的氨基酸序列与人抗体恒定区具有至少90%同一性,所述人抗体恒定区例如人IgG1恒定区、IgG2恒定区、IgG3恒定区或IgG4恒定区。在一些其他实施方案中,恒定区的氨基酸序列与来自另一种哺乳动物 (例如兔、狗、猫、小鼠或马) 的抗体恒定区具有至少90%同一性。与人IgG1恒定区相比,恒定区可以包含一个或多个突变,例如位于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。示例性取代包括例如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。

[0016] 在某些实施方案中,可以包括在人IgG1恒定区的CH1中的突变可以位于氨基酸V125、F126、P127、T135、T139、A140、F170、P171和/或V173。在某些实施方案中,可以包括在

人IgG1恒定区的C_κ中的突变可以位于氨基酸E123、F116、S176、V163、S174和/或T164。

[0017] 在一些实施方案中,本文所述的重链可变结构域中的一种与轻链可变结构域结合以形成能够结合NKG2D的抗原结合位点。例如,与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%同一性的抗体重链可变结构域可以配对与氨基酸序列EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDDWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2, ADI-29379) 具有至少90%同一性的抗体轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体轻链可变结构域与SEQ ID NO:2具有至少95%同一性。在一些实施方案中,轻链可变结构域包含氨基酸序列RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:14) 作为第一互补决定区(“CDR”)、GASTRAT (SEQ ID NO:15) 作为第二CDR和QQYDDWPFT (SEQ ID NO:16) 作为第三CDR。

[0018] 例如,与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90%同一性的抗体重链可变结构域可配对与氨基酸序列EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQDDYWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:4, ADI-29463) 具有至少90%同一性的抗体轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体轻链可变结构域与SEQ ID NO:4具有至少95%同一性。在一些实施方案中,轻链可变结构域包含氨基酸序列RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:20) 作为第一互补决定区(“CDR”)、GASTRAT (SEQ ID NO:21) 作为第二CDR和QQDDYWPFT (SEQ ID NO:22) 作为第三CDR。

[0019] 例如,与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90%同一性的抗体重链可变结构域可以配对与氨基酸序列DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIDSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSYPRFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:6, ADI-27744) 具有至少90%同一性的抗体轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体轻链可变结构域与SEQ ID NO:6具有至少95%同一性。在一些实施方案中,轻链可变结构域包含氨基酸序列RASQGIDSWLA (SEQ ID NO:26) 作为第一互补决定区(“CDR”)、AASSLQS (SEQ ID NO:27) 作为第二CDR,以及QQGVSYPRT (SEQ ID NO:28) 作为第三CDR。

[0020] 例如,与SEQ ID NO:7或85的氨基酸序列具有至少90%同一性的抗体重链可变结构域可以配对与氨基酸序列DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSPRFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8, ADI-27749) 具有至少90%同一性的抗体轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体轻链可变结构域与SEQ ID NO:8具有至少95%同一性。在一些实施方案中,轻链可变结构域包含氨基酸序列RASQGISSWLA (SEQ ID NO:32) 作为第一互补决定区(“CDR”)、AASSLQS (SEQ ID NO:33) 作为第二CDR,以及QQGVSPRFT (SEQ ID NO:34) 作为第三CDR。

[0021] 例如,与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%同一性的抗体重链可变结构域可以配对与氨基酸序列EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSDNWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:10, ADI-29378) 具有至少90%同一性的抗体轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体轻链可变结构域与SEQ ID NO:10具有至少95%同一性。在一些实施方案中,轻链可变结构域包含氨基酸序列RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:38) 作为第一互补决定区(“CDR”)、DASNRAT (SEQ ID NO:39) 作为第二CDR,以及QQSDNWPFT (SEQ ID NO:40) 作为第三CDR。

[0022] 当重链可变结构域与轻链可变结构域结合以形成能够结合NKG2D的抗原结合位点时,抗原结合位点可以包括在多种结构中,例如具有两条相同重链和两条相同轻链以形成

一对能够结合NKG2D的抗原结合位点的典型抗体结构；双特异性、三特异性、四特异性或其他多特异性抗体；或较小的结构，例如scFv（其中重链可变结构域连接到轻链可变结构域）。

[0023] 在一些实施方案中，本发明中公开的任何NKG2D抗原结合位点包括在蛋白质中，所述蛋白质还包括结合肿瘤相关抗原的单独的抗原结合位点，这可以允许所述蛋白质同时与NK细胞和肿瘤细胞相互作用。肿瘤相关抗原例如可以是CD33、HER2、EpCAM、CD2、CD3、CD8、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD30、CD37、CD38、CD40、CD45R0、CD48、CD52、CD55、CD59、CD70、CD74、CD80、CD86、CD138、CD147、HLA-DR、CSAp、CA-125、TAG-72、EFGR/ERBB1、IGF1R、HER2、HER3、HER4、IGF-1R、c-Met、PDGFR、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、TNFR1、TNFR2、NGFR、TRAILR1、TRAILR2、Fas (CD95)、DR3、DR4、DR5、DR6、VEGF、PIGF、肌腱蛋白、ED-B纤连蛋白、PSA、和IL-6、MAGE-A3、B7.1、B7.2、CTLA4或PD1。

[0024] 在一些实施方案中，本发明中公开的任何NKG2D抗原结合位点包括在蛋白质中，所述蛋白质还包含肿瘤相关抗原位点和CD16结合位点。CD16结合位点可以是另外的抗原结合位点或抗体恒定区或其一部分，例如IgG1恒定区（其可以任选地包括一个或多个影响例如效应子活性或CD16结合亲和力的突变）。

[0025] 本发明的另一方面提供了在患者中增强肿瘤细胞死亡和治疗癌症的方法。所述方法包括向有此需要的患者施用治疗有效量的本文所述的蛋白以治疗癌症。

附图说明

[0026] 图1表示包含NKG2D结合结构域（右臂）、肿瘤相关抗原结合结构域（左臂）和结合CD16的Fc结构域或其一部分的多特异性结合蛋白。

[0027] 图2表示包含NKG2D结合结构域或肿瘤相关抗原结合结构域（其中任一个可以是scFv形式）和结合CD16的Fc结构域或其一部分的多特异性结合蛋白。

[0028] 图3A-3F是通过表面等离子体激元共振测量的NKG2D结合结构域的NKG2D结合亲和力的概况。图3A是通过表面等离子体激元共振测量的NKG2D结合结构域ADI-27744的NKG2D结合亲和力；图3B是通过表面等离子体激元共振测量的NKG2D结合结构域ADI-29379的NKG2D结合亲和力；图3C是通过表面等离子体激元共振测量的NKG2D结合结构域ADI-27749的NKG2D结合亲和力；图3D是通过表面等离子体激元共振测量的NKG2D结合结构域ADI-29463的NKG2D结合亲和力；并且图3E是通过表面等离子体激元共振测量的NKG2D结合结构域ADI-29378的NKG2D结合亲和力。

[0029] 图4A-H是通过表面等离子体激元共振测量的NKG2D结合结构域ADI-27744 (A44) 和ULBP6或其他NKG2D抗体的竞争性NKG2D结合的概况。图4A显示了包含ADI-27744的NKG2D单克隆抗体注射在固定NKG2D上，然后注射ULBP6的概况。图4B显示了ULBP6注射在固定NKG2D上，然后注射包含ADI-27744的NKG2D单克隆抗体的概况。图4C显示了MS单克隆抗体注射在固定NKG2D上，然后注射ULBP6的概况。图4D显示了MS注射在固定NKG2D上，然后注射包含ADI-27744的NKG2D单克隆抗体的概况。图4E显示了1D11注射在固定NKG2D上，然后注射包含ADI-27744的NKG2D单克隆抗体的概况。图4F显示了MAB139注射在固定NKG2D上，然后注射包含ADI-27744的NKG2D单克隆抗体的概况。图4G显示了包含ADI-27744的NKG2D单克隆抗体注射在固定NKG2D上，然后注射包含ADI-27749的NKG2D单克隆抗体 (A49) 的概况；并且图4H显示了包含ADI-27744的NKG2D单克隆抗体注射在固定NKG2D上，然后注射包含F47的NKG2D单

克隆抗体的概况。

[0030] 图5是显示靶向CD33的TriNKET与在EL4细胞上表达的NKG2D的结合概况的线状图。

[0031] 图6是显示靶向HER2的TriNKET与在EL4细胞上表达的NKG2D的结合概况的线状图。

[0032] 图7是显示靶向CD33的TriNKET与在Mv4-11细胞上表达的CD33的结合概况的柱状图。

[0033] 图8是显示靶向HER2的TriNKET与在786-0细胞上表达的HER2的结合概况的柱状图。

[0034] 图9是显示靶向HER2的TriNKET与在NCI-H661细胞上表达的HER2的结合概况的柱状图。

[0035] 图10是显示靶向HER2的TriNKET介导与表达HER2的NCI-H661细胞共培养的人NK细胞的激活的柱状图。

[0036] 图11是显示靶向HER2的TriNKET介导与表达HER2的SkBr-3细胞共培养的人NK细胞的激活的柱状图。

[0037] 图12是显示靶向CD33的TriNKET介导与表达CD33的人AML Mv4-11细胞共培养的人NK细胞的激活的柱状图。

[0038] 图13是显示靶向CD33的TriNKET使静息的NK细胞对表达CD33的Molm-13癌细胞产生细胞毒性的线状图。

[0039] 图14是显示靶向CD33的TriNKET使激活的NK细胞对表达CD33的Molm-13癌细胞产生细胞毒性的线状图。

[0040] 图15是显示靶向HER2的TriNKET使静息的NK细胞对表达HER2的786-0癌细胞产生细胞毒性的柱状图。

[0041] 图16显示靶向HER2的TriNKET使激动的NK细胞对表达HER2的786-0癌细胞产生细胞毒性的柱状图。

[0042] 图17表示Triomab形式的TriNKET,其为保持IgG样形状 of 三功能双特异性抗体。这种嵌合体由源自两个亲本抗体的两个半抗体组成,每个半抗体具有一个轻链和一个重链。Triomab形式是包含1/2大鼠抗体和1/2小鼠抗体的异二聚体构建体。

[0043] 图18表示KiH共同轻链(LC)形式的TriNKET,其涉及孔中结(KIH)技术。KiH是含有结合靶标1和2的2个Fab和通过异二聚化突变来稳定的Fc的异二聚体。KiH形式的TriNKET可能是具有结合靶标1和靶标2的2个fab的异二聚体构建体,其包含2条不同的重链和一条与两条HC配对共同轻链。

[0044] 图19表示双重可变结构域免疫球蛋白(DVD-IgTM)形式的TriNKET,其通过柔性天然存在的接头来组合两个单克隆抗体的靶结合结构域,并产生四价IgG样分子。DVD-IgTM是一种同二聚体构建体,其中靶向抗原2的可变结构域与靶向抗原1的Fab的可变结构域的N末端融合。构建体含有正常Fc。

[0045] 图20表示正交Fab界面(Ortho-Fab)形式的TriNKET,其为含有与Fc融合的结合靶标1和靶标2的2个Fab的异二聚体构建体。正交界面可确保LC-HC配对。通过Fc中的突变确保异二聚化。

[0046] 图21表示二合一Ig形式的TriNKET。

[0047] 图22表示ES形式的TriNKET,其为含有与Fc融合的结合靶标1和靶标2的2个不同

Fab的异二聚体构建体。通过Fc中的静电转向突变确保异二聚化。

[0048] 图23表示Fab臂交换形式的TriNKET:通过用来自另一分子的重-轻链对交换重链和连接的轻链(半分子)来交换Fab臂,从而产生双特异性抗体的抗体。Fab臂交换形式(cFae)是一种异二聚体,其包含结合靶标1和2的2个Fab,以及通过异二聚化突变来稳定的Fc。

[0049] 图24表示SEED体形式的TriNKET,其为一种异二聚体,其包含结合靶标1和2的2个Fab,以及通过异二聚化突变来稳定的Fc。

[0050] 图25表示LuZ-Y形式的TriNKET,其中亮氨酸拉链用于诱导两条不同HC的异二聚化。LuZ-Y形式是一种异二聚体,其包含与Fc融合的结合靶标1和2的2个不同scFab。通过与Fc的C末端融合的亮氨酸拉链基序确保异二聚化。

[0051] 图26表示Cov-X体形式的TriNKET。

[0052] 图27A-27B表示K λ 体形式的TriNKET,其为具有与通过异二聚化突变来稳定的Fc融合的2个不同Fab的异二聚体构建体:靶向抗原1的Fab1包含 κ LC,而靶向抗体2的第二Fab包含 λ LC。图27A是K λ 体的一种形式的示例性表示;图27B是另一种K λ 体的示例性表示。

[0053] 图28是Oasc-Fab异二聚体构建体,其包括与Fc融合的结合靶标1的Fab和结合靶标2的scFab。通过Fc中的突变确保异二聚化。

[0054] 图29是DuetMab,其为含有结合抗原1和2的2个不同Fab和通过异二聚化突变来稳定的Fc的异二聚体构建体。Fab 1和2包含确保正确的LC和HC配对的差分S-S桥。

[0055] 图30是CrossmAb,其为具有与通过异二聚化来稳定的Fc融合的结合靶标1和2的2个不同Fab的异二聚体构建体。CL和CH1结构域以及VH和VL结构域进行交换,例如CH1与VL串联融合,而CL与VH串联融合。

[0056] 图31是Fit-Ig,其为同二聚体构建体,其中结合抗原2的Fab与结合抗原1的Fab的HC的N末端融合。所述构建体包含野生型Fc。

[0057] 图32是显示通过SPR测试的TriNKET A*和TriNKET A与人NKG2D的结合的一系列线状图。上图表示动力学拟合,而下图表示稳态亲和拟合。

[0058] 图33是显示TriNKET A和TriNKET A*在介导NK细胞对靶细胞的细胞毒性中的效力的线状图。

[0059] 图34是显示TriNKET A和TriNKET A*在介导NK细胞对靶细胞的细胞毒性中的效力的线状图。

具体实施方式

[0060] 本发明提供了可以与抗体轻链可变结构域配对以形成靶向天然杀伤细胞上的NKG2D受体的抗原结合位点的抗体重链可变结构域、包括NKG2D抗原结合位点的蛋白质、包含这种蛋白质的药物组合物,以及使用这种蛋白质和药物组合物治疗癌症的治疗方法。本发明的多个方面在以下部分中阐述;然而,在一个特定部分中描述的本发明的方面不限于任何特定部分。

[0061] 为了促进对本发明的理解,下面定义了许多术语和短语。

[0062] 除非上下文不适当,否则本文所用的术语“一(a)”和“一(an)”表示“一个或多个”并且包括复数。

[0063] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”是指要通过本文所述的方法和组合物治疗的生物体。这样的生物体优选包括但不限于哺乳动物(例如,鼠、猿、马、牛、猪、犬、猫等),并且更优选包括人。

[0064] 如本文所用,术语“抗原结合位点”是指免疫球蛋白分子中参与抗原结合的部分。在人抗体中,抗原结合位点由重链(“H”)和轻链(“L”)的N末端可变(“V”)区的氨基酸残基形成。在重链和轻链的V区内的三个非常不同的片段被称为“高变区”,它们插入在称为“框架区”或“FR”的更保守的侧翼片段之间。因此,术语“FR”是指天然存在于免疫球蛋白中的高变区之间和附近的氨基酸序列。在人抗体分子中,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布置以形成抗原结合表面。抗原结合表面与结合抗原的三维表面互补,并且每条重链和轻链的三个高变区被称为“互补决定区”或“CDR”。在某些动物如骆驼和软骨鱼中,抗原结合位点由单抗体链形成,从而提供“单结构域抗体”。抗原结合位点可以存在于完整抗体中,存在于保留抗原结合表面的抗体的抗原结合片段中,或存在于重组多肽如scFv中,所述重组多肽使用肽接头以将重链可变结构域连接到轻链可变结构域,产生单个多肽。

[0065] 如本文所用,术语“有效量”是指足以实现有益或期望结果的化合物(例如,本发明的化合物)的量。有效量可以以一次或多次施用、应用或剂量施用,并且不旨在限于特定的制剂或施用途径。如本文所用,术语“治疗”包括导致病症、疾病、障碍等的改善或减轻其症状的任何效果,例如减轻、减少、调节、改善或消除。

[0066] 如本文所用,术语“药物组合物”是指活性剂与惰性或活性载剂的组合,使得组合物特别适合于体内或离体的诊断或治疗应用。

[0067] 如本文所用,术语“药学上可接受的载剂”是指任何标准药物载剂,例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液(例如,油/水或水/油乳液)和各种类型的润湿剂。组合物还可包含稳定剂和防腐剂。对于载剂、稳定剂和佐剂的实例,参见例如Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences,第15版, Mack Publ.Co., Easton, PA[1975]。

[0068] 在整个说明书中,当组合物被描述为具有、包括或包含特定组分时,或当过程和方法被描述为具有、包括或包含特定步骤时,可以预期,另外存在基本上由所述组分组成或由其组成的本发明的组合物,并且存在基本上由所述处理步骤组成或由其组成的根据本发明的过程和方法。

[0069] 通常,除非另有说明,否则指定百分比的组合物以重量计。此外,如果变量没有定义,则以变量的先前定义为准。

[0070] NKG2D抗原结合位点

[0071] 本发明提供了结合NKG2D的抗原结合位点,以及可用于产生这种抗原结合位点的抗原重链可变结构域。

[0072] 现在已经鉴定了它们配对以形成能够结合和激动NKG2D受体的抗原结合位点的抗体重链可变结构域和轻链可变结构域,并在下表1中提供。除非另有说明,否则表1中提供的CDR序列是在Kabat下测定的。

[0073]	表 1		
	克隆	重链可变区氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列

[0074]

ADI-2937 9 (E79)	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFTSYMH WVRQAPGQGLEWMGIINP SGGSTSYAQKFQGRVTMT RDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARGAPNYGDTT HDYYYMDVWGKGTTVT VSS (SEQ ID NO:1) CDR1 非 -Kabat (SEQ ID NO:11) - YTFTSYMH 或 CDR1 (SEQ ID NO:45) - SYMH CDR2 (SEQ ID NO:12) - IINPSGGSTSYAQKFQ CDR3 非 -Kabat (SEQ ID NO:13) - ARGAPNYGDTTHDYYM DV 或 CDR3 (SEQ ID NO:68) - GAPNYGDTTHDYYMDV	EIVMTQSPATLSVSPGER ATLSCRASQSVSSNLAW YQKPGQAPRLLIYGAST RATGIPARFSGSGSGTEF TLTISSLQSEDAVYYCQ QYDDWPFTFGGGTKVEI K (SEQ ID NO:2) CDR1 (SEQ ID NO:14) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:15) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:16) - QQYDDWPFT
ADI-2946 3 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFTGYM HWVRQAPGQGLEWMGW INPNSGGTNYAQKFQGRV TMTRDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCARDTGEYY DTDDHGMDVWGQGTTVT VSS (SEQ ID NO:3) CDR1 非 -Kabat (SEQ ID NO:17) - YTFTGYMH 或 CDR1 (SEQ ID NO:46) - GYYMH CDR2 (SEQ ID NO:18) - WINPNSGGTNYAQKFQ CDR3 非 -Kabat (SEQ ID NO:19) - ARDTGEYYDTDDHGMDV 或 CDR3 (SEQ ID NO:69) - DTGEYYDTDDHGMDV	EIVLTQSPGTLSLSPGERA TLSCRASQSVSSNLAWY QKPGQAPRLLIYGASTR ATGIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDAVYYCQQD DYWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:4) CDR1 (SEQ ID NO:20) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:21) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:22) - QQDDYWPPT

[0075]

ADI-2774 4 (A44)	EVQLLES GGGLVQP GGS L RLSCAASGFT FSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKDGGYYDSGA GDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:5) CDR1 非-Kabat (SEQ ID NO:23) - FTFSSYAMS 或 CDR1 (SEQ ID NO:47) - SYAMS CDR2 (SEQ ID NO:24) - AISGSGGSTYYADSVKG CDR3 非-Kabat (SEQ ID NO:25) - AKDGGYYDSGAGDY 或 CDR3 (SEQ ID NO:70) - DGGYYDSGAGDY	DIQMTQSPSSVSASVGDR VTITCRASQGIDSWLAW YQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQ QGVSYPRTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO:6) CDR1 (SEQ ID NO:26) - RASQGIDSWLA CDR2 (SEQ ID NO:27) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:28) - QQGVSYPRT
ADI-2774 9 (A49)	EVQLVES GGGLVKP GGS L RLSCAASGFT FSSYS MNW VRQAPGKGLEWVSSISSSS SYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGAPMGAAAGWF DPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:7) CDR1 非-Kabat (SEQ ID NO:29) - FTFSSYS MN 或 CDR1 (SEQ ID NO:48) - SYS MN CDR2 (SEQ ID NO:30) - SISSSSYIYYADSVKG CDR3 非-Kabat (SEQ ID NO:31) - ARGAPMGAAAGWFDP 或 CDR3 (SEQ ID NO:71) - GAPMGAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDR VTITCRASQGISSWLAWY QQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQ GVSFPRTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8) CDR1 (SEQ ID NO:32) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:33) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:34) - QQGVSFPRT
ADI-2937	QVQLVQSGAEVKKPGAS	EIVLTQSPATLSLSPGERA

[0076]

8 (E78)	VKVSCKASGYTFTSYMH WVRQAPGQGLEWMGIINP SGGSTSYAQKFQGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAREGAGFAYGM DYYMDVWGKGTTVTVS S (SEQ ID NO:9) CDR1 非-Kabat (SEQ ID NO:35) - YTFTSYMH 或 CDR1 (SEQ ID NO:45) - SYMH CDR2 (SEQ ID NO:36) - IINPSGGSTSYAQKFQ CDR3 非-Kabat (SEQ ID NO:37) - AREGAGFAYGMDYYM DV 或 CDR3 (SEQ ID NO:72) - EGAGFAYGMDYYMDV	TLSCRASQSVSSYLAWY QKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QSDNWPFTFGGGTKVEI K (SEQ ID NO:10) CDR1 (SEQ ID NO:38) - RASQSVSSYLA CDR2 (SEQ ID NO:39) - DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:40) - QQSDNWPFT
A49MQ	EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISSSS SYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGAPQGAAAGWF DPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:83) CDR1 非-Kabat (SEQ ID NO:29) - FTFSSYSMN 或 CDR1 (SEQ ID NO:48) - SYSMN CDR2 (SEQ ID NO:30) - SISSSSYIYYADSVKG CDR3 非-Kabat (SEQ ID NO:73) - ARGAPQGAAAGWFDP 或 CDR3 (SEQ ID NO:74) - GAPQGAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDR VTITCRASQGISSWLAWY QKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQ GVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8) CDR1 (SEQ ID NO:32) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:33) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:34) - QQGVSPRT
A49ML	EVQLVESGGGLVKPGGSL	DIQMTQSPSSVSASVGDR

[0077]

	RLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISSSS SYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGAP <u>L</u> GAAAGWF DPWGQGT ^L LVTVSS (SEQ ID NO:84) CDR1 非-Kabat (SEQ ID NO:29) - FTFSSYSMN 或 CDR1 (SEQ ID NO:48) - SYSMN CDR2 (SEQ ID NO:30) - SISSSSYIYYADSVKG CDR3 非-Kabat (SEQ ID NO:75) - ARGAP <u>L</u> GAAAGWFDP 或 CDR3 (SEQ ID NO:76) - GAP <u>L</u> GAAAGWFDP	VTITCRASQGISSWLAWY QQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQ GVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8) CDR1 (SEQ ID NO:32) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:33) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:34) - QQGVSPRT
A49MI	EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISSSS SYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGAP <u>I</u> GAAAGWF DPWGQGT ^L LVTVSS (SEQ ID NO:85) CDR1 非-Kabat (SEQ ID NO:29) - FTFSSYSMN 或 CDR1 (SEQ ID NO:48) - SYSMN CDR2 (SEQ ID NO:30) - SISSSSYIYYADSVKG CDR3 非-Kabat (SEQ ID NO:77) - ARGAP <u>I</u> GAAAGWFDP 或 CDR3 (SEQ ID NO:78) - GAP <u>I</u> GAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDR VTITCRASQGISSWLAWY QQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQ GVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8) CDR1 (SEQ ID NO:32) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:33) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:34) - QQGVSPRT
A49MF	EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISSSS	DIQMTQSPSSVSASVGDR VTITCRASQGISSWLAWY QQKPGKAPKLLIYAASSL

[0078]

	SYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGAP <u>F</u> GAAAGWF DPWGQGT ^L LVTVSS (SEQ ID NO:86) CDR1 非-Kabat (SEQ ID NO:29) - FTFSSYSMN 或 CDR1 (SEQ ID NO:48) - SYSMN CDR2 (SEQ ID NO:30) - SSSSSSYIYYADSVKG CDR3 非-Kabat (SEQ ID NO:79) - ARGAP <u>F</u> GAAAGWFDP 或 CDR3 (SEQ ID NO:80) - GAP <u>F</u> GAAAGWFDP	QSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQ GVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8) CDR1 (SEQ ID NO:32) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:33) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:34) - QQGVSPRT
A49MV	EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSSSSS SYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGAP <u>V</u> GAAAGWF DPWGQGT ^L LVTVSS (SEQ ID NO:41) CDR1 非-Kabat (SEQ ID NO:29) - FTFSSYSMN 或 CDR1 (SEQ ID NO:48) - SYSMN CDR2 (SEQ ID NO:30) - SSSSSSYIYYADSVKG CDR3 非-Kabat (SEQ ID NO:81) - ARGAP <u>V</u> GAAAGWFDP 或 CDR3 (SEQ ID NO:82) - GAP <u>V</u> GAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDR VTITCRASQGISSWLAWY QKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQ GVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8) CDR1 (SEQ ID NO:32) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:33) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:34) - QQGVSPRT
A49-共有	EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSSSSS SYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTA	DIQMTQSPSSVSASVGDR VTITCRASQGISSWLAWY QKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQ

[0079]	VYYCARGAP <u>X</u> GAAAGWF DPWGQGT _L TVSS, 其中 X 是 M、L、I、V、Q 或 F (SEQ ID NO:42) CDR1 非 -Kabat (SEQ ID NO:29) - FTFSSYSMN 或 CDR1 (SEQ ID NO:48) - SYSMN CDR2 (SEQ ID NO:30) - SISSSSSYIYYADSVKG CDR3 非 -Kabat (SEQ ID NO:43) - ARGAP <u>X</u> GAAAGWFDP 或 CDR3 (SEQ ID NO:44) - GAP <u>X</u> GAAAGWFDP, 其中 X 是 M、L、I、V、Q 或 F	GVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8) CDR1 (SEQ ID NO:32) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:33) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:34) - QQGVSPRT
--------	--	--

[0080] 上述一种或多种抗体重链可变结构域氨基酸序列的一个优点是它们可以与来自人和食蟹猴的NKG2D结合以激动受体,并与天然配体竞争结合所述受体。结合NKG2D并且共有一种或多种这些特性的其他抗原结合位点也是特别有用的,并且可以通过本领域已知的结合竞争测定法来鉴定。例如,可以通过与ADI-29379、ADI-29463、ADI-27744、ADI-27749或ADI-29378竞争结合人和任选的食蟹猴NKG2D来鉴定另外的抗原结合位点。

[0081] 包含上述抗体重链可变结构域和轻链可变结构域序列的NKG2D结合位点的另一个优点是它们可以高亲和力结合NKG2D。在一些实施方案中,NKG2D结合位点以0.1至1000nM的 K_D 结合NKG2D。在一些实施方案中,NKG2D结合位点以1至500nM的 K_D 结合NKG2D。在一些实施方案中,NKG2D结合位点以5至100nM的 K_D 结合NKG2D。在一些实施方案中,NKG2D结合位点以10至62nM的 K_D 结合NKG2D。

[0082] 在某些实施方案中,本发明提供了包括抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域的抗原结合位点,所述抗体重链可变结构域包括与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述抗体轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:2具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列的抗体重链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:91的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:12的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:13或68的氨基酸序列表示的CDR3序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列的抗体轻链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:14的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:15的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:16的氨基酸序列表示的CDR3序列。

[0083] 在某些实施方案中,本发明提供了包括抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域的抗原结合位点,所述抗体重链可变结构域包括与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述抗体轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:4具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列的抗体重链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:92的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:18的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:69的氨基酸序列表示的CDR3序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列的抗体轻链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:20的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:21的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:22的氨基酸序列表示的CDR3序列。

[0084] 在某些实施方案中,本发明提供了包括抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域的抗原结合位点,所述抗体重链可变结构域包括与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述抗体轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:6具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列的抗体重链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:93的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:24的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:70的氨基酸序列表示的CDR3序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列的抗体轻链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:26的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:27的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:28的氨基酸序列表示的CDR3序列。

[0085] 在某些实施方案中,本发明提供了包括抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域的抗原结合位点,所述抗体重链可变结构域包括与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述抗体轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:8具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列的抗体重链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:94的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:30的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:71的氨基酸序列表示的CDR3序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列的抗体轻链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:32的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:33的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:34的氨基酸序列表示的CDR3序列。

[0086] 在重链可变结构域的CDR3中的SEQ ID NO:7的102位的氨基酸残基M可以发生突变。在某些实施方案中,M102被不带电荷的残基取代。在某些实施方案中,M102被疏水残基(Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp)取代。在某些实施方案中,M102被极性残基(Ser、Thr、Cys、Asn、Gln或Tyr)取代。在某些实施方案中,M102被Leu、Ile、Val、Gln或Phe取代。

[0087] 因此,在某些实施方案中,本发明提供了包括抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域的抗原结合位点,所述抗体重链可变结构域包括与SEQ ID NO:83的氨基酸序列具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列,所述抗体轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:8具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:83的氨基酸序列具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列的抗体重链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:94的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:30的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:74的氨基酸序列表示的CDR3序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列的抗体轻链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:32的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:33的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:34的氨基酸序列表示的CDR3序列。

[0088] 在某些实施方案中,本发明提供了包括抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域的抗原结合位点,所述抗体重链可变结构域包括与SEQ ID NO:84的氨基酸序列具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列,所述抗体轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:8具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:84的氨基酸序列具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列的抗体重链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:94的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:30的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:76的氨基酸序列表示的CDR3序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列的抗体轻链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:32的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:33的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:34的氨基酸序列表示的CDR3序列。

[0089] 在某些实施方案中,本发明提供了包括抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域的抗原结合位点,所述抗体重链可变结构域包括与SEQ ID NO:85的氨基酸序列具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列,所述抗体轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:8具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:85的氨基酸序列具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列的抗体重链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:94的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:30的氨基

酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:78的氨基酸序列表示的CDR3序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列的抗体轻链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:32的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:33的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:34的氨基酸序列表示的CDR3序列。

[0090] 在某些实施方案中,本发明提供了包括抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域的抗原结合位点,所述抗体重链可变结构域包括与SEQ ID NO:86的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述抗体轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:8具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:86的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列的抗体重链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:94的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:30的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:79或80的氨基酸序列表示的CDR3序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列的抗体轻链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:32的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:33的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:34的氨基酸序列表示的CDR3序列。

[0091] 在某些实施方案中,本发明提供了包括抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域的抗原结合位点,所述抗体重链可变结构域包括与SEQ ID NO:41的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述抗体轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:8具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:41的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列的抗体重链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:94的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:30的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:82的氨基酸序列表示的CDR3序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列的抗体轻链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:32的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:33的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:34的氨基酸序列表示的CDR3序列。

[0092] 在某些实施方案中,本发明提供了包括抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域的抗原结合位点,所述抗体重链可变结构域包括与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述抗体轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:10具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列的抗体重链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:91的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:36的氨基

酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:37或SEQ ID NO:72的氨基酸序列表示的CDR3序列。在某些实施方案中,包括具有与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列的抗体轻链可变结构域的抗原结合位点包括由SEQ ID NO:38的氨基酸序列表示的CDR1序列、由SEQ ID NO:39的氨基酸序列表示的CDR2序列,以及由SEQ ID NO:40的氨基酸序列表示的CDR3序列。

[0093] 在某些实施方案中,本发明提供了包括抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域的抗原结合位点,所述抗体重链可变结构域包括与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述抗体轻链可变结构域包括与SEQ ID NO:6具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述抗原结合位点不阻断抗NKG2D抗体MS、1D11和MAB139与NKG2D的结合。

[0094] 在实施方案中,包括抗体重链可变结构域(其包括与SEQ ID NO:7、83、84、85、86或87的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列)和抗体轻链可变结构域(其包括与SEQ ID NO:8具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列)的抗原结合位点不阻断包括抗体重链可变结构域(其包括与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列)和抗体轻链可变结构域(其包括与SEQ ID NO:6具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列)的抗原结合位点与NKG2D的结合。

[0095] 在某些实施方案中,包括抗体重链可变结构域(其包括与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列)和抗体轻链可变结构域(其包括与SEQ ID NO:6具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列)的抗原结合位点结合NKG2D上的不同于MS、1D11、MAB139、ADI-27749和F47结合表位的独特表位。

[0096] 抗体和多特异性结合蛋白

[0097] 在本发明的一些实施方案中,通过将本文所述的抗体重链可变结构域与轻链可变结构域配对而形成的NKG2D抗原结合位点可以包括在较大的蛋白质中,例如完整抗体、多特异性结合蛋白或多特异性结合抗体。例如,NKG2D结合位点可以与第二组分例如第二抗原结合位点组合。在一些实施方案中,第二抗原结合位点结合一种或多种肿瘤相关抗原,例如CD33、HER2、EpCAM、CD2、CD3、CD8、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD45R0、CD48、CD52、CD55、CD59、CD70、CD74、CD80、CD86、CD138、CD147、HLA-DR、CSAp、CA-125、TAG-72、EGFR/ERBB1、IGF1R、HER3、HER4、IGF-1R、c-Met、PDGFR、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、TNFR1、TNFR2、NGFR、TRAILR1、TRAILR2、Fas (CD95)、DR3、DR4、DR5、DR6、VEGF、PIGF、肌腱蛋白、ED-B纤连蛋白、PSA、和IL-6、MAGE-A3、B7.1、B7.2、CTLA4或PD1。多特异性蛋白与NKG2D和与癌细胞上的肿瘤相关抗原的结合使癌细胞接近天然杀伤细胞,这促进天然杀伤细胞直接或间接破坏癌细胞。

[0098] 在一些实施方案中,除了NKG2D结合位点和肿瘤相关抗原结合位点之外,多特异性结合蛋白还可包括与CD16结合的结构域,CD16是白细胞表面上的Fc受体,所述白细胞包括

天然杀伤细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞和滤泡树突细胞。在一些实施方案中,CD16结合结构域可包括抗体Fc区或其一部分。在一些实施方案中,与CD16结合的结构域包含抗体Fc区的铰链、CH2和CH3结构域且具有或不具有CH1结构域。在一些实施方案中,抗体Fc区衍生自人和/或其他哺乳动物免疫球蛋白中的Fc区。已知在Fc区内,CD16结合由铰链区和CH2结构域介导。例如,在人IgG1中,与CD16的相互作用是通过氨基酸残基Asp 265-Glu 269、Asn 297-Thr 299、Ala 327-Ile 332、Leu 234-Ser 239和CH2结构域中的碳水化合物残基N-乙酰基-D-葡萄糖胺介导的(参见,Sondermann等人,Nature,406(6793):267-273)。在一些实施方案中,基于已知的结构域和氨基酸残基,可以在CD16结合结构域内选择突变,以增强或降低其与CD16的结合亲和力。选择方法是本领域众所周知的方法,例如噬菌体展示文库或酵母表面展示cDNA文库。也可以由本领域技术人员基于已知的相互作用的三维结构来设计适当的选择方法。

[0099] 文中所述的多特异性结合蛋白可采取几种形式。例如,一种形式是异二聚体、多特异性抗体,其包括第一免疫球蛋白重链、第一免疫球蛋白轻链、第二免疫球蛋白重链和第二免疫球蛋白轻链。第一免疫球蛋白重链包括第一Fc(铰链-CH2-CH3)结构域、第一重链可变结构域和任选的第一CH1重链结构域。第一免疫球蛋白轻链包括第一轻链可变结构域和第一轻链恒定结构域。第一免疫球蛋白轻链与第一免疫球蛋白重链一起形成结合NKG2D的抗原结合位点。第二免疫球蛋白重链包含第二Fc(铰链-CH2-CH3)结构域、第二重链可变结构域和任选的第二CH1重链结构域。第二免疫球蛋白轻链包括第二轻链可变结构域和第二轻链恒定结构域。第二免疫球蛋白轻链与第二免疫球蛋白重链一起形成结合肿瘤抗原的抗原结合位点。第一Fc结构域和第二Fc结构域一起能够结合CD16(图1)。

[0100] 另一示例性形式涉及异二聚体、多特异性抗体,其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。第一免疫球蛋白重链包括经由接头或抗体铰链与单链可变片段(scFv)融合的第一Fc(铰链-CH2-CH3)结构域,所述单链可变片段由配对并结合NKG2D的重链可变结构域和轻链可变结构域组成。第二免疫球蛋白重链包括第二Fc(铰链-CH2-CH3)结构域、第二重链可变结构域和任选的CH1重链结构域。免疫球蛋白轻链包括轻链可变结构域和恒定轻链结构域。第二免疫球蛋白重链与免疫球蛋白轻链配对并结合肿瘤相关抗原。第一Fc结构域和第二Fc结构域一起能够结合CD16(图2)。通过组合本文所述的NKG2D结合片段的各种形式,可以设计出多特异性结合蛋白的其他形式。

[0101] 一个或多个另外的结合基序可以任选地经由接头序列融合至恒定区CH3结构域的C末端。在某些实施方案中,抗原结合位点可以是单链或二硫键稳定的可变区(scFv)或可以形成四价或三价分子。

[0102] 在一些实施方案中,多特异性结合蛋白为Triomab形式,其为保持IgG样形状的三功能双特异性抗体。这种嵌合体由源自两个亲本抗体的两个半抗体组成,每个半抗体具有一个轻链和一个重链。Triomab形式是包含1/2大鼠抗体和1/2小鼠抗体的异二聚体构建体。

[0103] 在一些实施方案中,多特异性结合蛋白是KiH共同轻链(LC)形式,其涉及孔中结(KIH)技术。KIH涉及工程化 C_H3 结构域,以在每个重链中创建“结”或“孔”以促进异二聚化。“孔中结(KiH)”Fc技术背后的概念是通过用大残基(即,EU编号中T366W_{CH3A})替换小残基而在一个CH3结构域(CH3A)中引入“结”。为了容纳“结”,通过用较小的残基(即T366S/L368A/Y407V_{CH3B})替换最靠近结的残基来在另一个CH3结构域(CH3B)上创建互补的“孔”表面。通过

结构化指导的噬菌体文库筛选来优化“孔”突变 (Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P. 通过使用噬菌体展示文库重建同二聚体的结构域界面的稳定异二聚体 (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, 等人, 结和孔无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Fc γ R具有提高的亲力的新型不对称工程化Fc变体的晶体结构 (Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for Fc γ Rs.) Mol Immunol (2014) 58(1):132-8) 表明, CH3结构域核心间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化, 而结-结和孔-孔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。

[0104] 在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为双可变结构域免疫球蛋白 (DVD-IgTM) 形式, 其通过柔性天然存在的接头来组合两个单克隆抗体的靶结合结构域, 并产生四价IgG样分子。DVD-IgTM是一种同二聚体构建体, 其中靶向抗原2的可变结构域与靶向抗原1的Fab的可变结构域的N末端融合。构建体含有正常Fc。

[0105] 在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为正交Fab界面 (Ortho-Fab) 形式, 其为含有与Fc融合的结合靶标1和靶标2的2个Fab的异二聚体构建体。通过正交界面确保LC-HC配对。通过Fc中的突变确保异二聚化。在ortho-Fab IgG方法中 (Lewis SM, Wu X, Pustilnik A, Sereno A, Huang F, Rick HL, 等人. 通过基于结构的正交Fab界面的设计产生双特异性IgG抗体 (Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface.) Nat. Biotechnol. (2014) 32(2):191-8), 基于结构的区域设计仅在一个Fab中的LC和HC_{VH-CH1}界面处引入互补突变, 而对另一个Fab不进行任何改变。

[0106] 在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为二合一Ig形式。在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为ES形式, 其为一种含有与Fc融合的结合靶标1和靶标2的2个Fab的异二聚体构建体。通过Fc中的静电转向突变确保异二聚化。

[0107] 在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为K λ 体形式, 其为具有与通过异二聚化突变来稳定的Fc融合的2个不同Fab的异二聚体构建体: 靶向抗原1的Fab1包含 κ LC, 而靶向抗原2的第二Fab包含 λ LC。

[0108] 在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为Fab臂交换形式 (通过用来自另一分子的重-轻链对交换重链和连接的轻链 (半分子) 来交换Fab臂, 从而产生双特异性抗体的抗体)。Fab臂交换形式 (cFae) 是一种异二聚体, 其包含结合靶标1和2的2个Fab, 以及通过异二聚化突变来稳定的Fc。

[0109] 在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为SEED体形式, 其为一种包含结合靶标1和2的2个Fab, 以及通过异二聚化突变来稳定的Fc的异二聚体。链交换工程化结构域 (SEED) 平台被设计为产生不对称和双特异性抗体样分子, 所述能力扩展了天然抗体的治疗应用。该蛋白质工程化平台基于在保守的CH3结构域内交换免疫球蛋白的结构相关序列。SEED设计允许有效生成AG/GA异二聚体, 同时不利于AG和GA SEED CH3结构域的同二聚化 (Muda M. 等

人,Protein Eng.Des.Sel.(2011,24(5):447-54))。

[0110] 在一些实施方案中,多特异性结合蛋白是LuZ-Y形式,其中亮氨酸拉链用于诱导两条不同HC的异二聚化。(Wranik,BJ.等人,J.Biol.Chem.(2012),287:43331-9)。LuZ-Y形式是一种异二聚体,其包含与Fc融合的结合靶标1和2的2个不同scFab。通过与Fc的C末端融合的亮氨酸拉链基序确保异二聚化。

[0111] 在一些实施方案中,多特异性结合蛋白是Cov-X体形式(在双特异性CovX体中,使用支链氮杂环丁酮接头将两种不同的肽连接在一起,并在温和条件下以位点特异性方式与支架抗体融合。尽管药效团负责功能活性,但抗体支架赋予长的半衰期和Ig样分布。药效团可以进行化学优化或用其他药效团替代,以生成优化的或独特的双特异性抗体。(Doppalapudi VR等人,PNAS(2010),107(52);22611-22616)。

[0112] 在一些实施方案中,多特异性结合蛋白为Oasc-Fab异二聚体形式,其包括与Fc融合的结合靶标1的Fab和结合靶标2的scFab。通过Fc中的突变确保异二聚化。

[0113] 在一些实施方案中,多特异性结合蛋白为DuetMab形式,其为一种包含结合抗原1和2的2个不同Fab以及通过异二聚化突变来稳定的Fc的异二聚体构建体。Fab 1和2包含确保正确的LC和HC配对的差分S-S桥。

[0114] 在一些实施方案中,多特异性结合蛋白为CrossmAb形式,其为具有与通过异二聚化来稳定的Fc融合的结合靶标1和2的2个不同Fab的异二聚体构建体。CL和CH1结构域以及VH和VL结构域进行交换,例如CH1与VL串联融合,而CL与VH串联融合。

[0115] 在一些实施方案中,多特异性结合蛋白为CrossmAb形式,其为同二聚体构建体,其中结合抗原2的Fab与结合抗原1的Fab的HC的N末端融合。该构建体包含野生型。

[0116] 异二聚体抗体重链

[0117] 异二聚体抗体重链的装配可以通过在同一细胞中表达两种不同的抗体重链序列来完成,这可以导致每个抗体重链的同二聚体的装配以及异二聚体的装配。可以通过将不同的氨基酸取代对并入第一重链多肽内的第一CH3结构域和第二重链多肽内的第二CH3结构域,使这两条链选择性地彼此异二聚化来促进本文所述的多特异性结合蛋白内的异二聚体重链的优先装配,如US13/494870、US16/028850、US11/533709、US12/875015、US13/289934、US14/773418、US12/811207、US13/866756、US14/647480、US14/830336所示。在一些实施方案中,多特异性结合蛋白包含人IgG1的Fc结构域。以下列出人IgG1 Fc结构域对内的氨基酸取代的各种实施例,以促进两条重链的异二聚化。氨基酸取代的每个位置均如在Kabat中按照EU索引进行编号。

[0118] 在一种情况下,第一多肽中的氨基酸取代用较大的氨基酸代替原始氨基酸,所述较大的氨基酸选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W),以及第二多肽中的至少一个氨基酸取代用较小的氨基酸代替原始氨基酸,所述较小的氨基酸选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)或缬氨酸(V),使得较大的氨基酸取代(突起)适合较小的氨基酸取代的表面(空腔)。例如,一个多肽可以包括T366W取代,而另一个可以包括三个取代,包括T366S、L368A和Y407V。

[0119] 替代地,氨基酸取代可以选自表2所示的以下取代组。

[0120]

表2		
	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

[0121] 替代地,氨基酸取代可以选自表3所示的以下取代组。

[0122]

表3		
	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

[0123] 替代地,氨基酸取代可以选自表4所示的以下取代组。

[0124]

表4		
	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

[0125] 替代地,每个多肽链中的至少一个氨基酸取代可选自表5。

[0126]	表 5	
	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

[0127] 替代地,至少一个氨基酸取代可以选自表6中的以下取代组,其中第一多肽列中所示的位置被任何已知的带负电荷的氨基酸替换,并且第二多肽列中所示的位置被任何已知的带正电荷的氨基酸替换。

[0128]	表 6	
	第一多肽	第二多肽
	K392、K370、K409 或	D399、E356 或 E357

[0129]	K439	
--------	-------------	--

[0130] 替代地,至少一个氨基酸取代可以选自表7中的以下组,其中第一多肽列中所示的位置被任何已知的带正电荷的氨基酸替换,并且第二多肽列中所示的位置被任何已知的带负电荷的氨基酸替换。

[0131]	表 7	
	第一多肽	第二多肽
	D399、E356或E357	K409、K439、K370或K392

[0132] 替代地,氨基酸取代可以选自表8中的以下组。

[0133]	表 8	
	第一多肽	第二多肽
	T350V、L351Y、F405A 和 Y407V	T350V、T366L、K392L 和 T394W

[0134] 替代地,或另外地,可以通过在第一或第二多肽链中的任一个上引入S354C和在相反的多肽链上引入Y349C,在两个多肽的界面内形成人工二硫键来增加多特异性结合蛋白内的异二聚体重链的结构稳定性。

[0135] 可以使用本领域技术人员众所周知的重组DNA技术来制备上述多特异性结合蛋白质。例如,可以将编码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;可以将编码第一免疫球蛋白轻链的第三核酸序列克隆到第三表达载体中;可以将编码第二免疫球蛋白轻链的第四核酸序列克隆到第四表达载体中;可以将第一、第二、第三和第四表达载体一起稳定地转染到宿主细胞中以产生多聚体蛋白。

[0136] 为了获得多特异性结合蛋白质的最高产量,可以探索第一、第二、第三和第四表达载体的不同比率,以确定转染到宿主细胞中的最佳比率。转染后,可以使用本领域已知的方法

法(例如有限稀释、ELISA、FACS、显微镜或Clonepix)分离单个克隆以用于产生细胞库。

[0137] 克隆可以在适合生物反应器放大并保持多特异性蛋白的表达的条件下培养。可以使用本领域已知的方法分离和纯化多特异性结合蛋白质,包括离心、深度过滤、细胞裂解、均质化、冻融、亲和纯化、凝胶过滤、离子交换色谱、疏水相互作用交换色谱和混合模式色谱。

[0138] 包含与本文所述的NKG2D结合位点竞争的抗原结合位点的蛋白质

[0139] 在某些实施方案中,本发明提供了一种蛋白质,其包括与本文所述的NKG2D结合位点竞争结合NKG2D的抗原结合位点。本文所述的NKG2D结合位点包含SEQ ID NO:1和2的氨基酸序列;SEQ ID NO:3和4的氨基酸序列;SEQ ID NO:5和6的氨基酸序列;SEQ ID NO:7和8的氨基酸序列;SEQ ID NO:9和10的氨基酸序列;SEQ ID NO:83和8的氨基酸序列;SEQ ID NO:84和8的氨基酸序列;SEQ ID NO:85和8的氨基酸序列;SEQ ID NO:86和8的氨基酸序列;或SEQ ID NO:87和8的氨基酸序列。这些NKG2D结合位点可以结合在NKG2D上通过表面等离子体激元共振来标定的不同表位。例如,ADI-27744结合NKG2D上不同于ADI-27749和其他现有NKG2D抗体的表位,如实施例2所示。

[0140] 在一些实施方案中,与NKG2D结合位点竞争的蛋白质的抗原结合位点包括具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少50%(例如50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列的重链可变结构域和具有至少与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少50%(例如50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列的轻链可变结构域。在一些实施方案中,与NKG2D结合位点竞争的蛋白质的抗原结合位点包括具有至少与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少50%(例如50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列的重链可变结构域和具有至少与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少50%(例如50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列的轻链可变结构域。在一些实施方案中,与NKG2D结合位点竞争的蛋白质的抗原结合位点包括具有至少与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少50%(例如50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列的重链可变结构域和具有至少与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少50%(例如50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列的轻链可变结构域。在一些实施方案中,与NKG2D结合位点竞争的蛋白质的抗原结合位点包括具有至少与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少50%(例如50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列的重链可变结构域和具有至少与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少50%(例如50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列的轻链可变结构域。在一些实施方案中,与NKG2D结合位点竞争的蛋白质的抗原结合位点包括具有至少与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少50%(例如50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列的重链可变结构域和具有至少与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少50%(例如50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)

同一性的氨基酸序列的轻链可变结构域。

[0141] 在一些实施方案中,包括与本文所述的NKG2D结合位点竞争的抗原结合位点的蛋白质还包括结合肿瘤相关抗原的第二抗原结合位点和/或CD16结合位点。在一些实施方案中,CD16结合位点是能够结合CD16的抗体恒定区或其一部分。在一些实施方案中,CD16结合位点包含人IgG1 Fc结构域。

[0142] 表达蛋白质的细胞

[0143] 在一方面,本公开提供了一种细胞,其包含一种或多种编码蛋白质的核酸,所述蛋白质包含:具有重链可变结构域和轻链可变结构域的NKG2D结合位点,所述重链可变结构域具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列;具有重链可变结构域和轻链可变结构域的NKG2D结合位点,所述重链可变结构域具有与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列;具有重链可变结构域和轻链可变结构域的NKG2D结合位点,所述重链可变结构域具有与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列;具有重链可变结构域和轻链可变结构域的NKG2D结合位点,所述重链可变结构域具有与SEQ ID NO:7、83、84、85、86或87的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列;或具有重链可变结构域和轻链可变结构域的NKG2D结合位点,所述重链可变结构域具有与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列。

[0144] 治疗应用

[0145] 本发明提供了使用本文所述的多特异性结合蛋白和/或本文所述的药物组合物来增强肿瘤细胞死亡和/或治疗癌症的方法。所述方法可用于治疗多种癌症。理想地,要治疗的癌症类型与蛋白质结合的癌细胞类型相匹配。治疗方法的其他方面和实施方案描述如下。

[0146] 药物组合物

[0147] 在一方面,本公开还涉及包含有效量蛋白质以及药学上可接受的载剂的药物组合物,所述蛋白质包含本文所述的NKG2D结合位点或与本文所述的NKG2D结合位点竞争的NKG2D结合位点。

[0148] 在某些实施方案中,制剂包括蛋白质,所述蛋白质包含具有重链可变结构域和轻

链可变结构域的抗原结合位点,所述重链可变结构域具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90% (例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,制剂包括蛋白质,所述蛋白质包含具有重链可变结构域和轻链可变结构域的抗原结合位点,所述重链可变结构域具有与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,制剂包括蛋白质,所述蛋白质包含具有重链可变结构域和轻链可变结构域的抗原结合位点,所述重链可变结构域具有与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,制剂包括蛋白质,所述蛋白质包含具有重链可变结构域和轻链可变结构域的抗原结合位点,所述重链可变结构域具有与SEQ ID NO:7、83、84、85、86或87的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,制剂包括蛋白质,所述蛋白质包含具有重链可变结构域和轻链可变结构域的抗原结合位点,所述重链可变结构域具有与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列,所述轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列。

[0149] 所述组合物可以配制用于各种药物递送系统。一种或多种生理上可接受的赋形剂或载剂可包括在组合物中以进行适当配制。用于本公开的合适制剂参见Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 第17版, 1985。关于药物递送方法的简要综述, 参见, 例如, Langer (Science 249:1527-1533, 1990)。

[0150] 例如, 本公开可以以水性药物制剂存在, 其在形成制剂的缓冲溶液中包括治疗有效量的蛋白质。水性载剂可以包括无菌注射用水 (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。在某些实施方案中, 制备在pH缓冲溶液中包含本文公开的蛋白质的水性制剂。制剂的pH通常为3至11, 更优选5至9或6至8, 并且最优选7至8, 例如7至7.5。上述pH值的中间范围也意图成为本公开的一部分。例如, 意图包括使用上述任意值的组合作为上限和/或下限的值的范围。将pH控制在该范围内的缓冲剂的实例包括乙酸盐 (例如乙酸钠)、琥珀酸盐 (例如琥珀酸钠)、葡萄糖酸盐、组氨酸、柠檬酸盐和其他有机酸缓冲剂。在某些实施方案中, 缓冲体系包括柠檬酸一水合物、柠檬酸钠、磷酸二钠二水合物和/或磷酸二氢钠二水合物。在某些实施方案中, 缓冲体系包含约1.3mg/ml的柠檬酸 (例如1.305mg/ml)、约0.3mg/ml的柠檬酸钠 (例如0.305mg/ml)、约1.5mg/ml的磷酸二钠二水合物 (例如1.53mg/ml)、约0.9mg/ml的磷酸二氢钠二水合物 (例如

0.86) 和约6.2mg/ml的氯化钠(例如6.165mg/ml)。在某些实施方案中,缓冲体系包括1-1.5mg/ml的柠檬酸、0.25至0.5mg/ml的柠檬酸钠、1.25至1.75mg/ml的磷酸二钠二水合物、0.7至1.1mg/ml的磷酸二氢钠二水合物、以及6.0至6.4mg/ml的氯化钠。液体制剂的pH可以通过添加药学上可接受的酸和/或碱来设定。在某些实施方案中,药学上可接受的酸可以是盐酸。在某些实施方案中,碱可以是氢氧化钠。

[0151] 在一些实施方案中,制剂包括水性载剂,其为药学上可接受的(对于施用于人而言是安全且无毒的)并且可用于制备液体制剂。示例性载剂包括无菌注射用水(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。

[0152] 在制剂中还可以包括多元醇,其可以用作张力剂并可以稳定抗体。将多元醇以相对于制剂的所需等渗性可变化的量加入到制剂中。在某些实施方案中,水性制剂可以是等渗的。相对于多元醇的分子量,多元醇的添加量也可以改变。例如,与二糖(例如海藻糖)相比,可以加入较少量的单糖(例如甘露醇)。在某些实施方案中,可以在制剂中用作张度剂的多元醇是甘露醇。在某些实施方案中,甘露醇浓度可以为约5至约20mg/ml。在某些实施方案中,甘露醇的浓度可以为约7.5至15mg/ml。在某些实施方案中,甘露醇的浓度可以为约10-14mg/ml。在某些实施方案中,甘露醇的浓度可以为约12mg/ml。在某些实施方案中,多元醇山梨糖醇可包含在制剂中。

[0153] 也可以将洗涤剂或表面活性剂加入制剂中。示例性洗涤剂包括非离子型洗涤剂,例如聚山梨酸酯(例如聚山梨酸酯20、80等)或泊洛沙姆(例如泊洛沙姆188)。添加的洗涤剂的量应使得其减少配制的抗体的聚集和/或最小化制剂中颗粒的形成和/或减少吸附。在某些实施方案中,制剂可包含表面活性剂,其为聚山梨酸酯。在某些实施方案中,制剂可包含洗涤剂聚山梨酸酯80或吐温80。吐温80是用于描述聚氧乙烯(20)失水山梨醇单油酸酯的术语(参见Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 第4版, 1996)。在某些实施方案中,制剂可包含约0.1mg/mL至约10mg/mL的聚山梨酸酯80,或约0.5mg/mL至约5mg/mL。在某些实施方案中,可以在制剂中添加约0.1%的聚山梨酸酯80。

[0154] 在某些实施方案中,本公开的液体制剂可以与稳定水平的糖组合制成10mg/mL浓度的溶液。在某些实施方案中,液体制剂可以在水性载剂中制备。在某些实施方案中,稳定剂可以以不大于可能导致不希望的或不适合静脉内施用的粘度的量加入。在某些实施方案中,糖可以是二糖,例如蔗糖。在某些实施方案中,液体制剂还可包含缓冲剂、表面活性剂和防腐剂中的一种或多种,将其添加到本文的制剂中以减少细菌作用。添加防腐剂可以例如促进多用途(多剂量)制剂的生产。

[0155] 在一些实施方案中,本公开提供了具有延长的保质期的制剂,其包括本公开的蛋白质以及甘露醇、柠檬酸一水合物、柠檬酸钠、磷酸氢二钠二水合物、磷酸二氢钠二水合物、氯化钠、聚山梨酸酯80、水和氢氧化钠。

[0156] 脱酰胺是肽和蛋白质的常见产物变体,其可能在发酵、收获/细胞澄清、纯化、药物物质/药物产物储存以及样品分析期间发生。脱酰胺是从蛋白质中损失NH₃,形成可以发生水解的琥珀酰亚胺中间体。琥珀酰亚胺中间体导致亲本肽质量降低17Da。随后的水解导致质量增加18u。琥珀酰亚胺中间体由于在水性条件下的不稳定性而难以分离。因此,脱酰胺通常可检测为质量增加1u。天冬酰胺的脱酰胺产生天冬氨酸或异天冬氨酸。影响脱酰胺速

率的参数包括pH、温度、溶剂介电常数、离子强度、一级序列、局部多肽构象和三级结构。肽链中与Asn相邻的氨基酸残基会影响脱酰胺速率。蛋白质序列中Asn之后的Gly和Ser导致对脱酰胺具有更高敏感性。在某些实施方案中,本公开的液体制剂可以在防止蛋白质产物的脱氨基的pH和湿度的条件下保存。

[0157] 在一些实施方案中,制剂是冻干制剂。在某些实施方案中,将制剂冷冻干燥(冻干)并包含在约12-60个小瓶中。在某些实施方案中,将制剂冷冻干燥,并且在一个小瓶中可以包含45mg冷冻干燥制剂。在某些实施方案中,在一个小瓶中包含约40mg至约100mg冷冻干燥制剂。在某些实施方案中,将来自12、27或45个小瓶的冷冻干燥制剂合并以获得在静脉内药物制剂中的治疗剂量的蛋白质。制剂可以是液体制剂。在一些实施方案中,液体制剂以约250mg/小瓶至约1000mg/小瓶存储。在某些实施方案中,液体制剂以约600mg/小瓶存储。在某些实施方案中,液体制剂以约250mg/小瓶存储。

[0158] 在一些实施方案中,冻干制剂包含文中所述的蛋白质和冻干保护剂。冻干保护剂可以是糖,例如二糖。在某些实施方案中,所述冻干保护剂可以是蔗糖或麦芽糖。冻干制剂还可以包含缓冲剂、表面活性剂、填充剂和/或防腐剂中的一种或多种。用于稳定冻干药物产品的蔗糖或麦芽糖的量可以是至少1:2蛋白质与蔗糖或麦芽糖的重量比。在某些实施方案中,蛋白质与蔗糖或麦芽糖的重量比可以为1:2至1:5。

[0159] 在某些实施方案中,可在冻干之前通过添加药学上可接受的酸和/或碱来设定制剂的pH。在某些实施方案中,药学上可接受的酸可以是盐酸。在某些实施方案中,药学上可接受的碱可以是氢氧化钠。在冻干之前,可以将包含本公开的蛋白质的溶液的pH调节在6与8之间。在某些实施方案中,冻干药物产品的pH范围可以是7至8。

[0160] 在某些实施方案中,可以添加“填充剂”。“填充剂”是这样的化合物,其增加冻干混合物质量并且有助于冻干饼的物理结构(例如,促进维持开孔结构的基本上均匀的冻干饼的生产)。示例性填充剂包括甘露醇、甘氨酸、聚乙二醇和山梨醇。本发明的冻干制剂可包含此类填充剂。

[0161] 在某些实施方案中,冻干蛋白产品可以用水性载剂构制。本文所关注的水性载剂是药学上可接受的(例如对于施用于人而言是安全且无毒的)并且在冻干后可用于制备液体制剂。示例性稀释剂包括无菌注射用水(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。在某些实施方案中,将本公开的冻干药物产品用无菌注射用水USP(SWFI)或0.9%氯化钠注射液USP复水。在复水期间,冻干粉末溶解成溶液。在某些实施方案中,将本公开的冻干蛋白产物构制到约4.5mL注射用水中,并用0.9%盐水溶液(氯化钠溶液)稀释。

[0162] 蛋白组合物可以通过常规的灭菌技术进行灭菌,或者可以进行无菌过滤。可将得到的水溶液包装用于原样使用,或冻干,将冻干的制剂在施用之前与无菌水性载剂合并。可以将固体形式的所得组合物包装在多个单剂量单位中,每个单位包含固定量的上述一种或多种药剂。固体形式的组合物也可以包装在容器中以灵活取量。

[0163] 可以改变本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平,以便获得对于特定患者、组合物和施用模式有效实现所需治疗应答而对患者无毒的活性成分的量。

[0164] 对于每个患者,特定剂量可以是统一剂量,例如50-5000mg蛋白质。替代地,患者的剂量可根据患者的近似体重或表面积进行调整。确定合适剂量的其他因素可包括要治疗或

预防的疾病或病症、疾病的严重程度、施用途径以及患者的年龄、性别和医疗状况。确定合适的治疗剂量所必需的计算的进一步改进是本领域技术人员常规进行的,尤其是根据本文公开的剂量信息和测定法。剂量也可以通过使用已知的用于确定剂量的测定法结合适当的剂量-应答数据来确定。可以在监测疾病进展时调整个体患者的剂量。可以测量患者中可靶向构建体或复合物的血液水平,以查看是否需要调整剂量以达到或维持有效浓度。药物基因组学可用于确定哪种可靶向的构建体和/或复合物及其剂量对于给定个体最可能有效(Schmitz等人,Clinica Chimica Acta 308:43-53,2001;Steimer等人,Clinica Chimica Acta 308:33-41,2001)。

[0165] 通常,基于体重的剂量为每kg体重约0.01 μ g至约100mg,例如约0.01 μ g至约100mg/kg体重、约0.01 μ g至约50mg/kg体重、约0.01 μ g至约10mg/kg体重、约0.01 μ g至约1mg/kg体重、约0.01 μ g至约100 μ g/kg体重、约0.01 μ g至约50 μ g/kg体重、约0.01 μ g至约10 μ g/kg体重、约0.01 μ g至约1 μ g/kg体重、约0.01 μ g至约0.1 μ g/kg体重、约0.1 μ g至约100mg/kg体重、约0.1 μ g至约50mg/kg体重、约0.1 μ g至约10mg/kg体重、约0.1 μ g至约1mg/kg体重、约0.1 μ g至约100 μ g/kg体重、约0.1 μ g至约10 μ g/kg体重、约0.1 μ g至约1 μ g/kg体重、约1 μ g至约100mg/kg体重、约1 μ g至约50mg/kg体重、约1 μ g至约10mg/kg体重、约1 μ g至约1mg/kg体重、约1 μ g至约100 μ g/kg体重、约1 μ g至约50 μ g/kg体重、约1 μ g至约10 μ g/kg体重、约10 μ g至约100mg/kg体重、约10 μ g至约50mg/kg体重、约10 μ g至约10mg/kg体重、约10 μ g至约1mg/kg体重、约10 μ g至约100 μ g/kg体重、约10 μ g至约50 μ g/kg体重、约50 μ g至约100mg/kg体重、约50 μ g至约50mg/kg体重、约50 μ g至约10mg/kg体重、约50 μ g至约1mg/kg体重、约50 μ g至约100 μ g/kg体重、约100 μ g至约100mg/kg体重、约100 μ g至约50mg/kg体重、约100 μ g至约10mg/kg体重、约100 μ g至约1mg/kg体重、约1mg至约100mg/kg体重、约1mg至约50mg/kg体重、约1mg至约10mg/kg体重、约10mg至约100mg/kg体重、约10mg至约50mg/kg体重、约50mg至约100mg/kg体重。剂量可以每天、每周、每月或每年给药一次或多次,或甚至每2至20年给药一次。本领域普通技术人员可以基于体液或组织中可靶向构建体或复合物的测得停留时间和浓度轻易地估算给药的重复率。本发明的施用可以是静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、胸膜内、鞘内、腔内、通过导管灌注或通过病灶内直接注射。可以每天施用一次或多次、每周施用一次或多次、每月施用一次或多次、每年施用一次或多次施用。

[0166] 增强肿瘤细胞死亡和癌症治疗

[0167] 本发明提供了增强患者肿瘤细胞死亡和/或治疗癌症的方法。在一些实施方案中,所述方法包括将肿瘤和天然杀伤细胞暴露于本文公开的多特异性结合蛋白。在一些实施方案中,所述方法包括向有此需要的患者施用治疗有效量的本文所述的蛋白质和或其所需制剂。在那些实施方案中,多特异性结合蛋白可包含:具有重链可变结构域和轻链可变结构域的抗原结合位点,所述重链可变结构域具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列,所述轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列;具有重链可变结构域和轻链可变结构域的抗原结合位点,所述重链可变结构域具有与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列,所述轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少90%(例如

91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列;具有重链可变结构域和轻链可变结构域的抗原结合位点,所述重链可变结构域具有与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列,所述轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列;具有重链可变结构域和轻链可变结构域的抗原结合位点,所述重链可变结构域具有与SEQ ID NO:7、83、84、85、86或87的氨基酸序列具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列,所述轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列;或具有重链可变结构域和轻链可变结构域的抗原结合位点,所述重链可变结构域具有与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列,所述轻链可变结构域具有与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列。

[0168] 理想地,要治疗的癌症类型与文中公开的多特异性结合蛋白所结合的癌细胞类型相匹配。例如,理想地,使用本文所述的与EpCAM和NKG2D结合的多特异性结合蛋白来治疗表达上皮细胞粘附分子(EpCAM)的癌症,例如表达EpCAM的结肠癌。

[0169] 在一些实施方案中,要治疗的患者含有表达以下一种或多种的癌细胞:CD33、HER2、CD2、CD19、CD20、CD30、CD38、CD40、CD52、CD70、EGFR/ERBB1、IGF1R、HER3/ERBB3、HER4/ERBB4、MUC1、CEA、cMET、SLAMF7、PSCA、MICA、MICB、TRAILR1、TRAILR2、MAGE-A3、B7.1、B7.2、CTLA4和PD1。在一些实施方案中,要治疗的患者患有实体癌,例如脑癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、白血病、肺癌、肝癌、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、胃癌、睾丸癌或子宫癌。在又其他实施方案中,癌症是血管化肿瘤、鳞状细胞癌、腺癌、小细胞癌、黑素瘤、神经胶质瘤、成神经细胞瘤、肉瘤(例如血管肉瘤或软骨肉瘤)、喉癌、腮腺癌、胆道癌、甲状腺癌、肢端雀斑黑素瘤、光化性角化病、急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、腺样囊性癌、腺瘤、腺肉瘤、腺鳞癌、肛管癌、肛门癌、肛门直肠癌、星形细胞瘤、前庭大腺癌、基底细胞癌、胆管癌、骨癌、骨髓癌、支气管癌、支气管腺癌、类癌、胆管癌、软骨肉瘤、脉络丛乳头状瘤/癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、透明细胞癌、结缔组织癌、囊腺瘤、消化系统癌、十二指肠癌、内分泌系统癌、内胚窦瘤、子宫内膜增生、子宫内膜间质肉瘤、子宫内膜样腺癌、内皮细胞癌、室管膜癌、上皮细胞癌、尤因氏肉瘤、眼眶癌、女性生殖器癌、局灶性结节性增生、胆囊癌、胃窦癌、胃底癌、胃泌素瘤、成胶质细胞瘤、胰高血糖素瘤、心脏癌、血管母细胞瘤、血管内皮瘤、血管瘤、肝腺瘤、肝腺瘤病、肝胆道癌、肝细胞癌、霍奇金氏病、回肠癌、胰岛素瘤、上皮内瘤变、上皮间鳞状细胞癌、肝内胆管癌、浸润性鳞状细胞癌、空肠癌、关节癌、卡波西肉瘤、盆腔癌、大细胞癌、大肠癌、平滑肌肉瘤、雀斑恶性黑色素瘤、淋巴瘤、男性生殖器癌、恶性黑色素瘤、恶性间皮瘤、成神经管细胞瘤、髓上皮瘤、脑膜癌、间皮癌、转移癌、口腔癌、粘液表皮样癌、多发性骨髓瘤、肌肉癌、鼻道癌、神经系统癌、神经上皮腺癌结节性黑色素瘤、非上皮性皮肤癌、非霍奇金氏淋巴瘤、燕麦细胞癌、少突胶质瘤、口腔癌、骨肉瘤、乳头状浆液性腺癌、阴茎癌、咽癌、垂体瘤、浆细胞瘤、假性肉瘤、肺母细胞瘤、直肠癌、肾细胞癌、呼吸系统癌、视网膜母细胞

瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、浆液性癌、鼻窦癌、皮肤癌、小细胞癌、小肠癌、平滑肌瘤、软组织癌、生长抑素分泌肿瘤、脊柱癌、鳞状细胞癌、横纹肌瘤、间皮下癌、浅表扩散性黑素瘤、T细胞白血病、舌癌、未分化癌、输尿管癌、尿道癌、膀胱癌、泌尿系统癌、子宫颈癌、子宫体癌、葡萄膜黑色素瘤、阴道癌、疣状癌、VIP瘤、外阴癌、高分化癌或肾母细胞瘤。

[0170] 在一些实施方案中,要治疗的患者患有非霍奇金氏淋巴瘤,例如B细胞淋巴瘤或T细胞淋巴瘤。在某些实施方案中,非霍奇金氏淋巴瘤是B细胞淋巴瘤,例如弥漫性大B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、毛细胞白血病或原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤。在某些其他实施方案中,非霍奇金氏淋巴瘤是T细胞淋巴瘤,例如前体T淋巴母细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤、结外天然杀伤/T细胞淋巴瘤、肠病型T细胞淋巴瘤、皮下脂膜炎样T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤或外周T细胞淋巴瘤。

[0171] 在一些实施方案中,本文所述的蛋白质与其他治疗剂组合使用以治疗癌症患者。可以用作治疗癌症的联合疗法的一部分的示例性治疗剂包括,例如辐射、丝裂霉素(mitomycin)、维甲酸(tretinoin)、盐酸苯达莫司汀(ribomustin)、吉西他滨(gemcitabine)、长春新碱(vincristine)、依托泊苷(etoposide)、克拉屈滨(cladribine)、二溴甘露醇(mitobronitol)、甲氨蝶呤(methotrexate)、阿霉素(doxorubicin)、卡波醌(carboquone)、喷司他汀(pentostatin)、硝氮吡啶(nitracrine)、净司他丁(zinostatin)、西曲瑞克(cetrorelix)、来曲唑(letrozole)、雷替曲塞(raltitrexed)、柔红霉素(daunorubicin)、法屈唑(fadrozole)、福莫司汀(fotemustine)、腺法新(thymalfasin)、索布佐生(sobuzoxane)、奈达铂(nedaplatin)、阿糖胞苷(cytarabine)、比卡鲁胺(bicalutamide)、长春瑞滨(vinorelbine)、维司立农(vesnarinone)、氨基葡萄糖(aminogluthetamide)、安吡啶(amsacrine)、丙谷胺(proglumide)、依利醋铵(elliptinium acetate)、酮舍林(ketanserin)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依曲替酯(etretinate)、异维甲酸(isotretinoin)、链佐星(streptozocin)、尼莫司汀(nimustine)、长春地辛(vindesine)、氟他米特(flutamide)、氟他胺(drogenil)、甘氨酸嘌呤(butocin)、卡莫氟(carmofur)、雷佐生(razoxane)、裂褶菌素(sizofilan)、卡铂(carboplatin)、二溴卫矛醇(mitolactol)、替加氟(tegafur)、异磷酰胺(ifosfamide)、泼尼莫司汀(prednimustine)、毕西巴尼(picibanil)、左旋咪唑(levamisole)、替尼泊苷(teniposide)、英丙舒凡(improsulfan)、依诺他滨(enocitabine)、麦角乙脲(lisuride)、羟甲基龙(oxymetholone)、他莫昔芬(tamoxifen)、黄体酮(progesterone)、美雄烷(mepitiostane)、环硫雄醇(epitiostanol)、福美司坦(formestane)、干扰素- α 、干扰素- 2α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、集落刺激因子-1、集落刺激因子-2、地尼白介素-白喉毒素连接物(denileukin diftotox)、白介素-2、促黄体激素释放因子和可能表现出与其同源受体的不同结合以及增加或减少的血清半衰期的上述药剂的各种变体。

[0172] 可以用作治疗癌症的联合疗法的一部分的另一类药剂是免疫检查点抑制剂。示例性免疫检查点抑制剂包括抑制以下一种或多种的药剂:(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抑制剂伊匹木单抗已被美国食品和药物管理局批准用于治疗黑素瘤。

[0173] 可以用作治疗癌症的联合疗法的一部分的其他药剂是靶向非检查点靶标的单克隆抗体药剂(例如赫赛汀(herceptin))和非细胞毒性剂(例如酪氨酸激酶抑制剂)。

[0174] 其他类别的抗癌剂包括例如:(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、布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂、CDC7抑制剂、CHK1抑制剂、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂、DNA-PK抑制剂、DNA-PK和mTOR抑制剂、DNMT1抑制剂、DNMT1抑制剂加2-氯-脱氧腺苷、HDAC抑制剂、Hedgehog信号传导通路抑制剂、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。

[0175] 本发明的蛋白质也可以用作手术切除原发病灶的辅助物。

[0176] 可以选择蛋白和另外的治疗剂的量以及施用的相对时间,以便获得期望的联合治疗效果。例如,当向需要这种施用的患者施用联合疗法时,组合中的治疗剂或包含治疗剂的一种或多种药物组合物可以以任何顺序施用,例如依次、共同、一起、同时等。此外,例如,文中所述蛋白可以在另外的治疗剂发挥其预防或治疗作用期间施用,反之亦然。

[0177] 上面的说明描述了本发明的多个方面和实施方案。专利申请具体地涵盖了各方面和实施方案的所有组合和置换。

[0178] 实施例

[0179] 现在参考以下实施例将更容易理解本发明的一般描述,所述实施例仅出于说明本发明的某些方面和实施方案的目的,而无意于限制本发明。

[0180] 实施例1-各种NKG2D结合结构域的结合亲和力

[0181] 使用Biacore 8K仪器(GE Healthcare)通过表面等离子体激元共振评估各种NKG2D结合结构域的动力学和亲和力。使用标准胺偶联化学将抗人Fc抗体固定在CM5芯片上。将包含各种NKG2D结合结构域的人单克隆抗体以约100RU的密度捕获在抗人Fc芯片上。将含有0.411-100nM可溶性小鼠Fc-人NKG2D二聚体的溶液在37°C下以30 μ l/min注射到捕获的NKG2D抗体和对照表面上。通过快速注射10mM甘氨酸pH 1.8在循环之间再生表面。为了获得动力学速率常数,使用Biacore 8K评估软件(GE Healthcare)将双参考数据拟合至1:1相互作用模型。平衡结合常数 K_D 由解离常数 k_d 与缔合常数 k_a 的比值(k_d/k_a)确定。如表9和图3所示,NKG2D结合结构域与NKG2D的结合亲和力在10-62nM的范围内。

表 9			
[0182]	NKG2D 结合结构域	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
	ADI-27744 (A44)	2.95E+05	2.99E-03
	ADI-27749 (A49)	3.95E+05	4.89E-03
	ADI-29378 (E78)	8.32E+05	4.87E-02
	ADI-29379 (E79)	4.43E+05	2.25E-02
	ADI-29463 (F63)	1.64E+06	1.01E-01
K_D (nM)			
			10.1
			12.4
			58.5
			50.7
			61.8

[0183] 实施例2-ADI-27744克隆的结合表位聚类

[0184] 使用Biacore 8K仪器通过表面等离子体激元共振对一系列抗体和ULBP6 (NKG2D天然配体) 进行ADI-27744 (A44) NKG2D结合结构域的聚类。简而言之,使用固定在CM5芯片上的抗小鼠Fc抗体以约100RU的密度捕获小鼠Fc-人NKG2D。随后在25°C下以30 μ l/min连续注射抗体,包括包含ADI-27744、ADI-27749、F47 (下面列出的序列) 或1D11 (商业单克隆NKG2D抗体)、ULBP6 (下面列出的序列)、MS (来自Novo Nordisk的NKG2D抗体,下面列出的序列) 和MAB139 (来自R&D system的NKG2D抗体,克隆149810) 的NKG2D单克隆抗体。Biacore 8K评估软件用于所有数据分析。

[0185] 表10

	重链可变区	轻链可变区
[0186]	F47 QVQLQQWGAGLLKPSETL SLTCAVYGGSFSGYYWSW IRQPPGKGLEWIGEIDHSGS TNYNPSLKSRTVISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYY CARARGPWSFDPWGQGT LVTSS (SEQ ID NO:51) CDR1 (SEQ ID NO:52) - GSFSGYYWS	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TITCRASQSISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYKASSLESG VPSRFSGSGSGTEFTLTIS LQPDDFATYYCQQYDTFIT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:55) CDR1 (SEQ ID NO:56) - RASQSISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:57) -
	CDR2 (SEQ ID NO:53) - EIDHSGSTNYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:54) - ARARGPWSFDP	KASSLES CDR3 (SEQ ID NO:58) - QQYDTFIT
[0187]	MS QVHLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSDDSISSYYWSWIR QPPGKGLEWIGHISYSGSA NYNPSLKSRTVISVDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYC ANWDDAFNIWGQGTMT VSS (SEQ ID NO:59) CDR1 (SEQ ID NO:60) - SYYWS CDR2 (SEQ ID NO:61) - HISYSGSANYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:62) - WDDAFNI	EIVLTQSPGTLSPGERAT LSCRASQSVSSSYLA WKPGQAPRLIYGASSRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSS PWTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:63) CDR1 (SEQ ID NO:64) - RASQSVSSSYLA CDR2 (SEQ ID NO:65) - GASSRAT CDR3 (SEQ ID NO:66) - QQYGSSPWT

[0188] ULBP氨基酸序列SEQ ID NO:67:

[0189] RRDDPHSLCYDITVIPKFRPGPRWCAVQGGQVDEKTFLLHYDCGNKTVTPVSPLGKKLN
VTMAWKAQNPVLREVVDILTEQLLDIQLENYTPKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSGS
WQFSIDGQTFLFLFDSEKRMWTTVHPGARKMKEKWENDKDVAMSFHYISMGDCIGW
LEDFLMGMDSTLEPSAGAPLAMSSG

[0190] 图4A显示了包含ADI-27744的NGK2D单克隆抗体注射在固定NGK2D上,然后注射ULBP6的概况。图4B显示了ULBP6注射在固定NGK2D上,然后注射包含ADI-27744的NGK2D单克隆抗体的概况。这些结果表明,包括ADI-27744抗原结合位点的NGK2D单克隆抗体不会阻断ULBP6与NGK2D的结合,即ADI-27744结合NBP2D上与ULBP6不同的表位。

[0191] 图4C显示了MS单克隆抗体注射在固定NGK2D上,然后注射ULBP6的概况。MS单克隆抗体阻断ULBP6与NGK2D结合。图4D-F显示MS、1D11或MAB139注射在固定NGK2D上,然后注射包含ADI-27744的NGK2D单克隆抗体的概况。图4G-H显示了包含ADI-27744的NGK2D单克隆抗体注射在固定NGK2D上,然后注射包含ADI-27749或F47的NGK2D单克隆抗体的概况。ADI-27744没有阻断MS、1D11和MAB139与NGK2D的结合。ADI-27749和F47没有阻断ADI-27744与NGK2D的结合。这些结果表明,ADI-27744与NGK2D上与MS、1D11、MAB139、ADI-27749和F47结合表位不同的独特表位结合。

[0192] 实施例3-三特异性结合蛋白与NGK2D结合

[0193] 将EL4小鼠淋巴瘤细胞系工程化以表达人NGK2D。检测如图1所示各自含有NGK2D结合结构域、肿瘤相关抗原结合结构域(例如CD33或HER2结合结构域)和结合CD16的Fc结构域三特异性结合蛋白(TriNKET)对EL4细胞上表达的细胞外NGK2D的亲和力。使用荧光团缀合的抗人IgG二抗检测多特异性结合蛋白与NGK2D的结合。通过流式细胞术分析细胞,并与亲代EL4细胞相比,使用表达NGK2D的细胞的平均荧光强度(MFI)计算背景倍数(FOB)。

[0194] 测试的TriNKET包括CD33-TriNKET-A44(ADI-27744和CD33结合结构域)、CD33-TriNKET-A49(ADI-27749和CD33结合结构域)、CD33-TriNKET-F63(ADI-29463和CD33结合结构域)、HER2-TriNKET-A44(ADI-27744和CD33结合结构域)、HER2-TriNKET-A49(ADI-27749和HER2结合结构域)、HER2-TriNKET-F63(ADI-29463和HER2结合结构域)、以及HER2-TriNKET-E79(ADI-29379和HER2结合结构域)。HER2结合结构域由曲妥珠单抗的重链可变结构域和轻链可变结构域组成。CD33结合结构域由下面列出的重链可变结构域和轻链可变结构域组成。

SEQ ID NO:49

[0195] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYVHWVRQAPGQGLEWMGYINPY
ND

CDR1

GTKYNEKFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDYRYEYVGM DYWG

Q

CDR2

CDR3

GTLVTVSS

[0196] SEQ ID NO:50

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCTASSSVNYIHWYQQKPGQPPKLLIYDTSKVASGV

AR

CDR1

CDR1

FSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQQWRSYPLTFGQGGTKLEIK

CDR3

[0197] 所有的TriNKET与EL4细胞上的NKG2D结合,但亲和力不同。CD33-TriNKET-A44显示与HER2-TriNKET-A44相同的结合概况,CD33-TriNKET-A49对HER2-TriNKET-A49如此,CD33-TriNKET-F63对HER2-TriNKET-F63也是如此。每个克隆的NKG2D结合亲和力在表达人和小鼠NKG2D的细胞之间是相似的(图5-6)。

[0198] 实施例4-三特异性结合蛋白与人肿瘤抗原结合

[0199] 三特异性结合蛋白与CD33结合

[0200] 将表达CD33的人AML细胞系MV4-11用于测定TriNKET与肿瘤相关抗原的结合。将TriNKET和亲本CD33单克隆抗体与细胞一起孵育,并使用荧光团缀合的抗人IgG二抗检测结合。通过流式细胞术分析细胞,并使用归一化至二抗对照的来自TriNKET和亲本单克隆CD33抗体的平均荧光强度(MFI)计算背景倍数(FOB)。

[0201] 与亲本CD33抗体相比,CD33-TriNKET-A44、CD33-TriNKET-A49和CD33-TriNKET-F63显示出相当的与CD33结合水平(图7)。

[0202] 三特异性结合蛋白与HER2结合

[0203] 将表达HER2的人癌细胞系用于测定TriNKET与肿瘤相关抗原的结合。肾细胞癌细胞系786-0表达低水平的HER2,并且人肺癌细胞系NCI-H661表达中等水平的HER2。将TriNKET和任选的亲本HER2单克隆抗体(曲妥珠单抗)与细胞一起孵育,并使用荧光团缀合的抗人IgG二抗检测结合。通过流式细胞术分析细胞,并使用归一化至二抗对照的来自TriNKET和曲妥珠单抗的平均荧光强度(MFI)计算背景倍数(FOB)。

[0204] 与曲妥珠单抗相比,HER2-TriNKET-A44、HER2-TriNKET-A49和HER2-TriNKET-F63显示出相当的与786-0细胞上表达的HER2结合水平(图8)。显示了HER2-TriNKET-E79与NCI-H661细胞上表达的HER2的结合(图9)。

[0205] 实施例5-三特异性结合蛋白激活NK细胞

[0206] 使用密度梯度离心从人外周血血沉棕黄层中分离出外周血单核细胞(PBMC)。用磁珠通过负选择从PBMC中分离出NK细胞(CD3⁻CD56⁺),并且分离出的NK细胞的纯度通常>90%。将分离的NK细胞在含有100ng/mL IL-2的培养基中培养以进行激活或在无细胞因子的情况下静息过夜。在激活后24-48小时内使用IL-2激活的NK细胞。

[0207] 收获表达肿瘤抗原的人癌细胞,并以 2×10^6 个细胞/mL重悬于培养基中。在培养基中稀释靶向肿瘤抗原的单克隆抗体或TriNKET。收获激活的NK细胞,洗涤,并以 2×10^6 个细胞/mL重悬于培养基中。然后在IL-2存在下,将癌细胞与单克隆抗体/TriNKET和激活的NK细

胞混合。也将布雷菲德菌素A和莫能菌素添加到混合培养物中,以阻断蛋白质从细胞转运出用于细胞内细胞因子染色。将荧光团缀合的抗CD107a添加到混合培养物中,将培养物孵育4小时,然后使用抗CD3、CD56和IFN- γ 的荧光团缀合的抗体制备样品进行FACS分析。在CD3⁻CD56⁺细胞中分析CD107a和IFN- γ 染色,以评估NK细胞激活。CD107a/IFN- γ 双阳性细胞的增加表明通过两个激活受体而不是一个受体的接合,NK细胞的激活更好。

[0208] TriNKET分别介导与表达HER2的NCI-H661细胞(图10)和SkBr-3细胞(图11)共培养的人NK细胞的激活,如CD107a脱粒和IFN- γ 产生的增加所示。与单克隆抗体曲妥珠单抗相比,TriNKET在人癌细胞存在下显示出对人NK细胞的优异激活。

[0209] TriNKET介导与表达CD33的人AML Mv4-11细胞共培养的人NK细胞的激活,如通过CD107a脱粒和IFN- γ 产生的增加来显示(图12)。与单克隆抗CD33抗体相比,在人癌细胞存在下,TriNKET显示出对人NK细胞的优异激活。

[0210] 实施例6-三特异性结合蛋白实现靶癌细胞的细胞毒性

[0211] 使用密度梯度离心从人外周血血沉棕黄层中分离出外周血单核细胞(PBMC)。用磁珠通过负选择从PBMC中分离出NK细胞(CD3⁻CD56⁺),并且分离出的NK细胞的纯度通常>90%。将分离的NK细胞在含有100ng/mL IL-2的培养基中培养以进行激活或在无细胞因子的情况下静息过夜。第二天,将IL-2激活或静息的NK细胞用于细胞毒性测定。

[0212] 为了测试在TriNKET存在下人NK细胞裂解癌细胞的能力,根据制造商的说明使用来自Promega(G1780)的cyto Tox 96非放射性细胞毒性测定。简而言之,收获表达肿瘤抗原的人癌细胞,洗涤,并以 $1-2 \times 10^5$ 个细胞/mL重悬于培养基中。收获静息的和/或激动的NK细胞,洗涤并以 $10^5-2.0 \times 10^6$ 个细胞/mL重悬于与癌细胞相同的培养基中。在96孔板的每个孔中,在具有或不具有靶向在癌细胞上表达的肿瘤抗原的TriNKET的情况下,将50 μ l癌细胞悬浮液与50 μ l NK细胞悬浮液混合。在37°C与5%CO₂下孵育3小时和15分钟后,将10x裂解缓冲液分别添加到仅包含癌细胞的孔中和仅包含培养基的孔中,以分别获得最大裂解和阴性试剂对照。然后将板放回培养箱中另外45分钟,以达到总共4小时的孵育。然后沉淀细胞,并将培养上清液转移至新的96孔板中,并与底物混合以进行显影。将新板在室温下孵育30分钟,并在SpectraMax i3x上于492nm处读取吸光度。癌细胞的特异性裂解的百分比计算如下:%特异性裂解=(实验裂解-来自单独的NK细胞的自发裂解-来自单独的癌细胞的自发裂解)/(最大裂解-阴性试剂对照)*100%。

[0213] TriNKET介导人NK细胞对CD33阳性Molm-13人AML细胞系的细胞毒性。如图13所示,将静息的人NK细胞与Molm-13癌细胞混合,并且TriNKET能够以剂量反应方式增强静息的人NK细胞对癌细胞的细胞毒性活性。虚线表示在没有TriNKET下的静息NK细胞的细胞毒性活性。如图14中所示,将激活的人NK细胞与Molm-13癌细胞混合,并且TriNKET甚至进一步以剂量反应方式增强激活的人NK细胞对癌细胞的细胞毒性活性。

[0214] TriNKET介导人NK细胞对HER2阳性786-0人肾细胞癌细胞系的细胞毒性。如图15中所示,将静息的人NK细胞与786-0癌细胞混合,并且TriNKET能够以剂量反应方式增强静息人NK细胞对癌细胞的细胞毒性活性(在测定中每个TriNKET以5、1、0.2 μ g/ml添加,并且结果在图15-16中的每个TriNKET中从左到右以3列表示)。虚线表示在TriNKET不存在下静息NK细胞对786-0细胞的细胞毒性活性。如图16所示,将激活的人NK细胞与786-0细胞混合,TriNKET甚至进一步以剂量反应方式增强激活人NK细胞对癌细胞的细胞毒性活性。虚线表

示在TriNKET不存在下激活NK细胞对786-0细胞的细胞毒性活性。

[0215] 实施例7-ADI-27749的变体和包含变体的TriNKET

[0216] 如上所述,ADI-27749(A49)尤其包含具有GAPMGAAAGWFDP(SEQ ID NO:71)的氨基酸序列的重链CDR3。SEQ ID NO:7的102位(即,该CDR3序列的4位)的Met可以被Gln、Leu、Ile、Phe或Val替换,从而分别生成具有表1中提供的相应重链可变区、轻链可变区和CDR序列的NKG2D抗体A49MQ、A49ML、A49MI、A49MF和A49MV。

[0217] 使用avg_pro_patch_cdr_hyd的参数设置,使用MOE2018.01程序分析了这些突变对疏水性的影响。使用蛋白构建器模块对残基进行突变,并在连接所有残基后将整个Fab最小化。使用BIOMOE中的lowMD方案执行动态特性取样。如表11所示,这些突变对预测的A49 Fab的疏水性没有实质性的负面影响。

[0218]	表 11	
	氨基酸残基	avg_pro_patch_cdr_hyd
	M	524.0968
	L	529.67743
	I	551.93549
	V	477.09677
	Q	447.09677
	F	542.25806

[0219] 通过分析性疏水相互作用色谱(HIC)测试含有A49的TriNKET(“TriNKET A”)和Ile、Leu、Val、Gln或Phe取代Met的突变形式的TriNKET A(“TriNKET A*”)的疏水性。每个TriNKET也结合第一肿瘤抗原。如表12所示,TriNKET A*的保留时间与TriNKET A相似。

[0220]	表 12	
	蛋白	保留时间
	TriNKET A*	8.6 min
	TriNKET A	8.65 ±0.05 min

[0221] 通过差示扫描量热法分析(DSC),在pH 6.0下,在20mM组氨酸、260mM蔗糖和0.005%PS-80中检测TriNKET A和TriNKET A*的热稳定性。 T_m 值如表13所示,其中 T_m 是单个域的中点转变温度。与TriNKET A相比,M102突变将两个最稳定的转变(T_{m3} 和 T_{m4})的 T_m 值降低0.6和0.7°C,对其影响很小。较早的转变(T_{m1} 和 T_{m2})不受影响。因此,M102突变仅对TriNKET A的总体热稳定性具有边缘效应。

[0222]

表 13				
蛋白质	T _{m1}	T _{m2}	T _{m3}	T _{m4}
TriNKET A	66.2	80.2	86.3	88.4
TriNKET A*	66.2	80.5	85.7	87.7

[0223] 在37℃下通过表面等离子体激元共振 (SPR) 表征TriNKET A和TriNKET A*与人NKG2D和鼠Fc的融合蛋白 (“mFc-hNKG2D”) 的结合。利用两种不同的拟合,即稳态亲和力拟合和动力学拟合,来获得平衡亲和数据 (图32)。计算动力学常数和平衡亲和力常数,并且对来自两个TriNKET A*的独立实验和TriNKET A的三个独立实验的数据求平均值。

[0224]

表 14						
捕获	分析物	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	动力学 K_D (M)	稳态亲和力 K_D (M)	化学计量
mFc-hNKG2D	TriNKET A*	1.41×10^5	1.31×10^{-1}	9.31×10^{-7}	6.98×10^{-7}	0.86
mFc-hNKG2D	TriNKET A*	1.56×10^5	1.28×10^{-1}	8.19×10^{-7}	6.76×10^{-7}	0.85
平均值		1.49×10^5	1.30×10^{-1}	8.75×10^{-7}	6.87×10^{-7}	0.85
mFc-hNKG2D	TriNKET A	1.91×10^5	1.16×10^{-1}	6.05×10^{-7}	4.62×10^{-7}	1.01
mFc-hNKG2D	TriNKET A	2.03×10^5	1.06×10^{-1}	5.23×10^{-7}	4.20×10^{-7}	0.88
mFc-hNKG2D	TriNKET A	1.93×10^5	1.15×10^{-1}	5.95×10^{-7}	5.80×10^{-7}	1.12
平均值±标准偏差		$(1.96 \pm 0.06) \times 10^5$	$(1.12 \pm 0.06) \times 10^{-1}$	$(5.74 \pm 0.45) \times 10^{-7}$	$(4.87 \pm 0.83) \times 10^{-7}$	1.01 ± 0.11

[0225] 如表14所示,从亲和力和动力学拟合获得的平衡亲和力常数 (K_D) 在重复实验之间是非常相似的,这表明测量参数具有高置信度。与TriNKET A相比,M102变体对人NKG2D的亲和力降低不到2倍。TriNKET A*的 K_D 为 $(6.87 \pm 0.16) \times 10^{-7}$ M,而TriNKET A的 K_D 为 $(4.87 \pm 0.83) \times 10^{-7}$ M (根据亲和力拟合计算)。当从动力学拟合计算 K_D 时,在亲和力上观察到类似的差异。与TriNKET A*结合的NKG2D的化学计量为 0.85 ± 0.12 ,类似于TriNKET A的 1.01 ± 0.11 ,这证实了每个NKG2D二聚体均与TriNKET A*的一个分子结合。这表明,M102突变对含A49的TriNKET与人NKG2D的结合只有很小的影响。

[0226] 最后,在细胞毒性试验中评估了M102突变对TriNKET效力的影响。简而言之,通过逆转录病毒转导产生表达CD16a的高亲和力变体 (158V) 的KHYG-1细胞。转导后,在含嘌呤霉素的生长培养基中选择细胞,以产生选定的KHYG-1-CD16V细胞群体。所选群体维持在含有

10ng/mL人IL-2的培养基中。为了制备KHYG-1-CD16V细胞用作细胞毒性测定的效应子,从培养物中收获细胞,沉淀,在不含IL-2的培养基中洗涤3次,并重悬在不含IL-2的培养基中,并且静置24小时。

[0227] 从培养物中收获表达所关注靶标的人癌细胞系。将细胞用HBS洗涤,并以 10^6 个细胞/mL重悬于生长培养基中以用BATDA试剂(Perkin Elmer C136-100)标记。按照制造商的说明来标记靶细胞。标记后,将细胞用HBS洗涤3次,并以 0.5×10^5 个细胞/mL重悬于培养基中。将100 μ l BATDA标记的细胞添加到96孔板的每个孔中。

[0228] 将TriNKET在培养基中连续稀释,并向每个孔中加入50 μ l稀释的TriNKET。从培养物中收获静息NK细胞,洗涤,并以 1.0×10^6 个细胞/mL重悬于培养基中。将50 μ l NK细胞添加到平板的每个孔中,以达到10:1的所需E:T比率,并使每个孔中的培养物总体积为200 μ l。将平板在37°C和5%CO₂下孵育2-3小时。

[0229] 培养后,将平板从培养箱中移出,并以200 \times g离心5分钟来使细胞沉淀。将20 μ l培养上清液转移至制造商提供的干净的微孔板中。将来自在没有NK细胞下单独孵育的标记细胞的上清液用于测量TDA的自发释放。将来自与1%Triton-X孵育的标记细胞的上清液用于测量靶细胞的最大裂解。将来自孵育2-3小时之前的标记细胞的上清液用于测量背景并用于质量控制目的。

[0230] 将200 μ l室温铀溶液(Perkin Elmer C135-100)添加到含有培养上清液的每个孔中。将平板避光,并在平板振荡器上以250rpm孵育15分钟。使用SpectraMax i3X仪器测量荧光。荧光水平表示靶细胞的裂解。%特异性裂解的值计算为:(实验释放-自发释放)/(最大释放-自发释放) \times 100%。

[0231] 为了测量TriNKET A和TriNKET A*的活性,选择表达第一肿瘤抗原的细胞系作为靶细胞。使用两批不同的TriNKET A进行比较。在图33中绘制了%特异性裂解值,并且EC50和最大%特异性裂解值总结在表15中。TriNKET A*的EC50和最大%特异性裂解值与TriNKET A相似,这表明M102突变没有影响TriNKET A的生物学活性。

[0232]	表 15		
	蛋白质	EC ₅₀ (μ M)	最大裂解 (%)
	TriNKET A*	0.15	73
	TriNKET A - 批次 1	0.17	76
	TriNKET A - 批次 2	0.15	76

[0233] 为了证实M102突变对TriNKET活性没有影响不是肿瘤抗原特异性的,构建了与第二不同的肿瘤抗原结合的TriNKET A和TriNKET A*。使用表达第二肿瘤抗原的细胞系作为靶细胞并将KHYG-1-CD16V细胞作为效应细胞,在细胞毒性试验中比较了两种TriNKET的活性。如图34所示,TriNKET A*表现出与TriNKET A等效的活性。

[0234] 以引用的方式并入

[0235] 本文中所提及的每一个专利文献和科技文章的全部公开内容出于全部目的通过

引用结合。

[0236] 等价方案

[0237] 在不脱离本发明的精神或基本特征的情况下,本发明能以其它具体形式来实施。因此,前述实施方案在所有方面都应被视为说明性的,而非是对本文中描述的本发明的限制。因此,本发明的范围是由随附权利要求而非由上述描述所指示,且属于权利要求的等效性含义和范围内的所有变化都意图包括在本文中。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 蜻蜓疗法股份有限公司 (DRAGONFLY THERAPEUTICS, INC.)
[0003]	<120> 靶向NKG2D受体的抗体可变结构域
[0004]	<130> AJ4309PT2009
[0005]	<150> 62/716,259
[0006]	<151> 2018-08-08
[0007]	<150> 62/628,161
[0008]	<151> 2018-02-08
[0009]	<160> 86
[0010]	<170> PatentIn version 3.5
[0011]	<210> 1
[0012]	<211> 126
[0013]	<212> PRT
[0014]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0015]	<220>
[0016]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0017]	<400> 1
[0018]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0019]	1 5 10 15
[0020]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[0021]	20 25 30
[0022]	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0023]	35 40 45
[0024]	Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
[0025]	50 55 60
[0026]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
[0027]	65 70 75 80
[0028]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0029]	85 90 95
[0030]	Ala Arg Gly Ala Pro Asn Tyr Gly Asp Thr Thr His Asp Tyr Tyr Tyr
[0031]	100 105 110
[0032]	Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[0033]	115 120 125
[0034]	<210> 2
[0035]	<211> 107
[0036]	<212> PRT
[0037]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0038]	<220>

[0039]	<223> 人工序列的描述:合成多肽															
[0040]	<400> 2															
[0041]	Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly
[0042]	1				5					10					15	
[0043]	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
[0044]					20					25					30	
[0045]	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
[0046]					35					40					45	
[0047]	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
[0048]					50					55					60	
[0049]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser
[0050]	65					70					75					80
[0051]	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asp	Asp	Trp	Pro	Phe
[0052]						85					90					95
[0053]	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
[0054]						100					105					
[0055]	<210> 3															
[0056]	<211> 124															
[0057]	<212> PRT															
[0058]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[0059]	<220>															
[0060]	<223> 人工序列的描述:合成多肽															
[0061]	<400> 3															
[0062]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
[0063]	1					5					10				15	
[0064]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr
[0065]						20					25				30	
[0066]	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
[0067]						35					40				45	
[0068]	Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
[0069]						50					55				60	
[0070]	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
[0071]	65					70					75					80
[0072]	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0073]						85					90					95
[0074]	Ala	Arg	Asp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Asp	Thr	Asp	Asp	His	Gly	Met	Asp
[0075]						100					105				110	
[0076]	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
[0077]						115					120					

[0078]	<210> 4
[0079]	<211> 107
[0080]	<212> PRT
[0081]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0082]	<220>
[0083]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0084]	<400> 4
[0085]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0086]	1 5 10 15
[0087]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
[0088]	20 25 30
[0089]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
[0090]	35 40 45
[0091]	Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
[0092]	50 55 60
[0093]	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
[0094]	65 70 75 80
[0095]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Asp Tyr Trp Pro Pro
[0096]	85 90 95
[0097]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0098]	100 105
[0099]	<210> 5
[0100]	<211> 121
[0101]	<212> PRT
[0102]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0103]	<220>
[0104]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0105]	<400> 5
[0106]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0107]	1 5 10 15
[0108]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0109]	20 25 30
[0110]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0111]	35 40 45
[0112]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0113]	50 55 60
[0114]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0115]	65 70 75 80
[0116]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0117]	85	90	95
[0118]	Ala Lys Asp Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Gly Ala Gly Asp Tyr Trp Gly		
[0119]	100	105	110
[0120]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0121]	115	120	
[0122]	<210> 6		
[0123]	<211> 107		
[0124]	<212> PRT		
[0125]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0126]	<220>		
[0127]	<223> 人工序列的描述:合成多肽		
[0128]	<400> 6		
[0129]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly		
[0130]	1 5 10 15		
[0131]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asp Ser Trp		
[0132]	20 25 30		
[0133]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
[0134]	35 40 45		
[0135]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0136]	50 55 60		
[0137]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0138]	65 70 75 80		
[0139]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Val Ser Tyr Pro Arg		
[0140]	85 90 95		
[0141]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0142]	100 105		
[0143]	<210> 7		
[0144]	<211> 122		
[0145]	<212> PRT		
[0146]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0147]	<220>		
[0148]	<223> 人工序列的描述:合成多肽		
[0149]	<400> 7		
[0150]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly		
[0151]	1 5 10 15		
[0152]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0153]	20 25 30		
[0154]	Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0155]	35 40 45		

[0156]	Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0157]	50 55 60
[0158]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[0159]	65 70 75 80
[0160]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0161]	85 90 95
[0162]	Ala Arg Gly Ala Pro Met Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro Trp
[0163]	100 105 110
[0164]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0165]	115 120
[0166]	<210> 8
[0167]	<211> 107
[0168]	<212> PRT
[0169]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0170]	<220>
[0171]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0172]	<400> 8
[0173]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
[0174]	1 5 10 15
[0175]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
[0176]	20 25 30
[0177]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0178]	35 40 45
[0179]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0180]	50 55 60
[0181]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0182]	65 70 75 80
[0183]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Val Ser Phe Pro Arg
[0184]	85 90 95
[0185]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0186]	100 105
[0187]	<210> 9
[0188]	<211> 125
[0189]	<212> PRT
[0190]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0191]	<220>
[0192]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0193]	<400> 9
[0194]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

[0195]	1	5	10	15
[0196]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
[0197]	20	25	30	
[0198]	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
[0199]	35	40	45	
[0200]	Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe			
[0201]	50	55	60	
[0202]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr			
[0203]	65	70	75	80
[0204]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0205]	85	90	95	
[0206]	Ala Arg Glu Gly Ala Gly Phe Ala Tyr Gly Met Asp Tyr Tyr Tyr Met			
[0207]	100	105	110	
[0208]	Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
[0209]	115	120	125	
[0210]	<210> 10			
[0211]	<211> 107			
[0212]	<212> PRT			
[0213]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0214]	<220>			
[0215]	<223> 人工序列的描述:合成多肽			
[0216]	<400> 10			
[0217]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
[0218]	1	5	10	15
[0219]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr			
[0220]	20	25	30	
[0221]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile			
[0222]	35	40	45	
[0223]	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
[0224]	50	55	60	
[0225]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro			
[0226]	65	70	75	80
[0227]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Asn Trp Pro Phe			
[0228]	85	90	95	
[0229]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
[0230]	100	105		
[0231]	<210> 11			
[0232]	<211> 9			
[0233]	<212> PRT			

[0234] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0235] <220>
[0236] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0237] <400> 11
[0238] Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His
[0239] 1 5
[0240] <210> 12
[0241] <211> 17
[0242] <212> PRT
[0243] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0244] <220>
[0245] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0246] <400> 12
[0247] Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
[0248] 1 5 10 15
[0249] Gly
[0250] <210> 13
[0251] <211> 19
[0252] <212> PRT
[0253] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0254] <220>
[0255] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0256] <400> 13
[0257] Ala Arg Gly Ala Pro Asn Tyr Gly Asp Thr Thr His Asp Tyr Tyr Tyr
[0258] 1 5 10 15
[0259] Met Asp Val
[0260] <210> 14
[0261] <211> 11
[0262] <212> PRT
[0263] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0264] <220>
[0265] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0266] <400> 14
[0267] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
[0268] 1 5 10
[0269] <210> 15
[0270] <211> 7
[0271] <212> PRT
[0272] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0273]	<220>
[0274]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0275]	<400> 15
[0276]	Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
[0277]	1 5
[0278]	<210> 16
[0279]	<211> 9
[0280]	<212> PRT
[0281]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0282]	<220>
[0283]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0284]	<400> 16
[0285]	Gln Gln Tyr Asp Asp Trp Pro Phe Thr
[0286]	1 5
[0287]	<210> 17
[0288]	<211> 9
[0289]	<212> PRT
[0290]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0291]	<220>
[0292]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0293]	<400> 17
[0294]	Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His
[0295]	1 5
[0296]	<210> 18
[0297]	<211> 17
[0298]	<212> PRT
[0299]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0300]	<220>
[0301]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0302]	<400> 18
[0303]	Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
[0304]	1 5 10 15
[0305]	Gly
[0306]	<210> 19
[0307]	<211> 17
[0308]	<212> PRT
[0309]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0310]	<220>
[0311]	<223> 人工序列的描述:合成肽

[0312]	<400> 19
[0313]	Ala Arg Asp Thr Gly Glu Tyr Tyr Asp Thr Asp Asp His Gly Met Asp
[0314]	1 5 10 15
[0315]	Val
[0316]	<210> 20
[0317]	<211> 11
[0318]	<212> PRT
[0319]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0320]	<220>
[0321]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0322]	<400> 20
[0323]	Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
[0324]	1 5 10
[0325]	<210> 21
[0326]	<211> 7
[0327]	<212> PRT
[0328]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0329]	<220>
[0330]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0331]	<400> 21
[0332]	Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
[0333]	1 5
[0334]	<210> 22
[0335]	<211> 9
[0336]	<212> PRT
[0337]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0338]	<220>
[0339]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0340]	<400> 22
[0341]	Gln Gln Asp Asp Tyr Trp Pro Pro Thr
[0342]	1 5
[0343]	<210> 23
[0344]	<211> 9
[0345]	<212> PRT
[0346]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0347]	<220>
[0348]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0349]	<400> 23
[0350]	Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser

[0351]	1	5	
[0352]	<210>	24	
[0353]	<211>	17	
[0354]	<212>	PRT	
[0355]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0356]	<220>		
[0357]	<223>	人工序列的描述:合成肽	
[0358]	<400>	24	
[0359]	Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
[0360]	1	5	10 15
[0361]	Gly		
[0362]	<210>	25	
[0363]	<211>	14	
[0364]	<212>	PRT	
[0365]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0366]	<220>		
[0367]	<223>	人工序列的描述:合成肽	
[0368]	<400>	25	
[0369]	Ala Lys Asp Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Gly Ala Gly Asp Tyr		
[0370]	1	5	10
[0371]	<210>	26	
[0372]	<211>	11	
[0373]	<212>	PRT	
[0374]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0375]	<220>		
[0376]	<223>	人工序列的描述:合成肽	
[0377]	<400>	26	
[0378]	Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asp Ser Trp Leu Ala		
[0379]	1	5	10
[0380]	<210>	27	
[0381]	<211>	7	
[0382]	<212>	PRT	
[0383]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0384]	<220>		
[0385]	<223>	人工序列的描述:合成肽	
[0386]	<400>	27	
[0387]	Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser		
[0388]	1	5	
[0389]	<210>	28	

[0390]	<211>	9
[0391]	<212>	PRT
[0392]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0393]	<220>	
[0394]	<223>	人工序列的描述:合成肽
[0395]	<400>	28
[0396]	Gln Gln Gly Val Ser Tyr Pro Arg Thr	
[0397]	1	5
[0398]	<210>	29
[0399]	<211>	9
[0400]	<212>	PRT
[0401]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0402]	<220>	
[0403]	<223>	人工序列的描述:合成肽
[0404]	<400>	29
[0405]	Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Asn	
[0406]	1	5
[0407]	<210>	30
[0408]	<211>	17
[0409]	<212>	PRT
[0410]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0411]	<220>	
[0412]	<223>	人工序列的描述:合成肽
[0413]	<400>	30
[0414]	Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys	
[0415]	1	5 10 15
[0416]	Gly	
[0417]	<210>	31
[0418]	<211>	15
[0419]	<212>	PRT
[0420]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0421]	<220>	
[0422]	<223>	人工序列的描述:合成肽
[0423]	<400>	31
[0424]	Ala Arg Gly Ala Pro Met Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro	
[0425]	1	5 10 15
[0426]	<210>	32
[0427]	<211>	11
[0428]	<212>	PRT

[0429] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0430] <220>
[0431] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0432] <400> 32
[0433] Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
[0434] 1 5 10
[0435] <210> 33
[0436] <211> 7
[0437] <212> PRT
[0438] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0439] <220>
[0440] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0441] <400> 33
[0442] Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
[0443] 1 5
[0444] <210> 34
[0445] <211> 9
[0446] <212> PRT
[0447] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0448] <220>
[0449] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0450] <400> 34
[0451] Gln Gln Gly Val Ser Phe Pro Arg Thr
[0452] 1 5
[0453] <210> 35
[0454] <211> 9
[0455] <212> PRT
[0456] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0457] <220>
[0458] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0459] <400> 35
[0460] Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His
[0461] 1 5
[0462] <210> 36
[0463] <211> 17
[0464] <212> PRT
[0465] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0466] <220>
[0467] <223> 人工序列的描述:合成肽

[0468]	<400> 36
[0469]	Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
[0470]	1 5 10 15
[0471]	Gly
[0472]	<210> 37
[0473]	<211> 18
[0474]	<212> PRT
[0475]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0476]	<220>
[0477]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0478]	<400> 37
[0479]	Ala Arg Glu Gly Ala Gly Phe Ala Tyr Gly Met Asp Tyr Tyr Tyr Met
[0480]	1 5 10 15
[0481]	Asp Val
[0482]	<210> 38
[0483]	<211> 11
[0484]	<212> PRT
[0485]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0486]	<220>
[0487]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0488]	<400> 38
[0489]	Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
[0490]	1 5 10
[0491]	<210> 39
[0492]	<211> 7
[0493]	<212> PRT
[0494]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0495]	<220>
[0496]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0497]	<400> 39
[0498]	Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
[0499]	1 5
[0500]	<210> 40
[0501]	<211> 9
[0502]	<212> PRT
[0503]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0504]	<220>
[0505]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0506]	<400> 40

[0507]	Gln Gln Ser Asp Asn Trp Pro Phe Thr
[0508]	1 5
[0509]	<210> 41
[0510]	<211> 122
[0511]	<212> PRT
[0512]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0513]	<220>
[0514]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0515]	<400> 41
[0516]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[0517]	1 5 10 15
[0518]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0519]	20 25 30
[0520]	Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0521]	35 40 45
[0522]	Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0523]	50 55 60
[0524]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[0525]	65 70 75 80
[0526]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0527]	85 90 95
[0528]	Ala Arg Gly Ala Pro Val Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro Trp
[0529]	100 105 110
[0530]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0531]	115 120
[0532]	<210> 42
[0533]	<211> 122
[0534]	<212> PRT
[0535]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0536]	<220>
[0537]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0538]	<220>
[0539]	<221> 变体
[0540]	<222> (102) .. (102)
[0541]	<223> Met、Leu、Ile、Val、Gln或Phe
[0542]	<400> 42
[0543]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[0544]	1 5 10 15
[0545]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

[0546]	20	25	30
[0547]	Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0548]	35	40	45
[0549]	Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[0550]	50	55	60
[0551]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
[0552]	65	70	75
[0553]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0554]	85	90	95
[0555]	Ala Arg Gly Ala Pro Xaa Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro Trp		
[0556]	100	105	110
[0557]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0558]	115	120	
[0559]	<210> 43		
[0560]	<211> 15		
[0561]	<212> PRT		
[0562]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0563]	<220>		
[0564]	<223> 人工序列的描述:合成肽		
[0565]	<220>		
[0566]	<221> 变体		
[0567]	<222> (6) .. (6)		
[0568]	<223> Met、Leu、Ile、Val、Gln或Phe		
[0569]	<400> 43		
[0570]	Ala Arg Gly Ala Pro Xaa Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro		
[0571]	1	5	10
[0572]	<210> 44		
[0573]	<211> 13		
[0574]	<212> PRT		
[0575]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0576]	<220>		
[0577]	<223> 人工序列的描述:合成肽		
[0578]	<220>		
[0579]	<221> 变体		
[0580]	<222> (4) .. (4)		
[0581]	<223> Met、Leu、Ile、Val、Gln或Phe		
[0582]	<400> 44		
[0583]	Gly Ala Pro Xaa Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro		
[0584]	1	5	10

[0585] <210> 45
[0586] <211> 5
[0587] <212> PRT
[0588] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0589] <220>
[0590] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0591] <400> 45
[0592] Ser Tyr Tyr Met His
[0593] 1 5
[0594] <210> 46
[0595] <211> 5
[0596] <212> PRT
[0597] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0598] <220>
[0599] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0600] <400> 46
[0601] Gly Tyr Tyr Met His
[0602] 1 5
[0603] <210> 47
[0604] <211> 5
[0605] <212> PRT
[0606] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0607] <220>
[0608] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0609] <400> 47
[0610] Ser Tyr Ala Met Ser
[0611] 1 5
[0612] <210> 48
[0613] <211> 5
[0614] <212> PRT
[0615] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0616] <220>
[0617] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0618] <400> 48
[0619] Ser Tyr Ser Met Asn
[0620] 1 5
[0621] <210> 49
[0622] <211> 120
[0623] <212> PRT

[0624]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[0625]	<220>															
[0626]	<223> 人工序列的描述:合成多肽															
[0627]	<400> 49															
[0628]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
[0629]	1				5					10					15	
[0630]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
[0631]					20					25					30	
[0632]	Val	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
[0633]					35					40					45	
[0634]	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
[0635]					50					55					60	
[0636]	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
[0637]	65					70					75					80
[0638]	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0639]					85						90					95
[0640]	Ala	Arg	Asp	Tyr	Arg	Tyr	Glu	Val	Tyr	Gly	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
[0641]					100						105					110
[0642]	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
[0643]					115						120					
[0644]	<210> 50															
[0645]	<211> 106															
[0646]	<212> PRT															
[0647]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[0648]	<220>															
[0649]	<223> 人工序列的描述:合成多肽															
[0650]	<400> 50															
[0651]	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Gly
[0652]	1				5					10					15	
[0653]	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Asn	Tyr	Ile
[0654]					20					25					30	
[0655]	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
[0656]					35					40					45	
[0657]	Asp	Thr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
[0658]					50					55					60	
[0659]	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn	Pro	Val	Glu	Ala	Asn
[0660]	65					70					75					80
[0661]	Asp	Thr	Ala	Asn	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Arg	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr
[0662]					85						90					95

[0663]	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0664]	100 105
[0665]	<210> 51
[0666]	<211> 117
[0667]	<212> PRT
[0668]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0669]	<220>
[0670]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0671]	<400> 51
[0672]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
[0673]	1 5 10 15
[0674]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
[0675]	20 25 30
[0676]	Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[0677]	35 40 45
[0678]	Gly Glu Ile Asp His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
[0679]	50 55 60
[0680]	Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
[0681]	65 70 75 80
[0682]	Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0683]	85 90 95
[0684]	Arg Ala Arg Gly Pro Trp Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu
[0685]	100 105 110
[0686]	Val Thr Val Ser Ser
[0687]	115
[0688]	<210> 52
[0689]	<211> 9
[0690]	<212> PRT
[0691]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0692]	<220>
[0693]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0694]	<400> 52
[0695]	Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser
[0696]	1 5
[0697]	<210> 53
[0698]	<211> 16
[0699]	<212> PRT
[0700]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0701]	<220>

[0741]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0742]	<400> 56
[0743]	Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala
[0744]	1 5 10
[0745]	<210> 57
[0746]	<211> 7
[0747]	<212> PRT
[0748]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0749]	<220>
[0750]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0751]	<400> 57
[0752]	Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser
[0753]	1 5
[0754]	<210> 58
[0755]	<211> 8
[0756]	<212> PRT
[0757]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0758]	<220>
[0759]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0760]	<400> 58
[0761]	Gln Gln Tyr Asp Thr Phe Ile Thr
[0762]	1 5
[0763]	<210> 59
[0764]	<211> 115
[0765]	<212> PRT
[0766]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0767]	<220>
[0768]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0769]	<400> 59
[0770]	Gln Val His Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
[0771]	1 5 10 15
[0772]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Asp Ser Ile Ser Ser Tyr
[0773]	20 25 30
[0774]	Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[0775]	35 40 45
[0776]	Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
[0777]	50 55 60
[0778]	Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
[0779]	65 70 75 80

[0780]	Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0781]	85 90 95
[0782]	Asn Trp Asp Asp Ala Phe Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
[0783]	100 105 110
[0784]	Val Ser Ser
[0785]	115
[0786]	<210> 60
[0787]	<211> 5
[0788]	<212> PRT
[0789]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0790]	<220>
[0791]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0792]	<400> 60
[0793]	Ser Tyr Tyr Trp Ser
[0794]	1 5
[0795]	<210> 61
[0796]	<211> 16
[0797]	<212> PRT
[0798]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0799]	<220>
[0800]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0801]	<400> 61
[0802]	His Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
[0803]	1 5 10 15
[0804]	<210> 62
[0805]	<211> 7
[0806]	<212> PRT
[0807]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0808]	<220>
[0809]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0810]	<400> 62
[0811]	Trp Asp Asp Ala Phe Asn Ile
[0812]	1 5
[0813]	<210> 63
[0814]	<211> 108
[0815]	<212> PRT
[0816]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0817]	<220>
[0818]	<223> 人工序列的描述:合成多肽

[0819] <400> 63
 [0820] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [0821] 1 5 10 15
 [0822] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 [0823] 20 25 30
 [0824] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 [0825] 35 40 45
 [0826] Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 [0827] 50 55 60
 [0828] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 [0829] 65 70 75 80
 [0830] Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 [0831] 85 90 95
 [0832] Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 [0833] 100 105
 [0834] <210> 64
 [0835] <211> 12
 [0836] <212> PRT
 [0837] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0838] <220>
 [0839] <223> 人工序列的描述:合成肽
 [0840] <400> 64
 [0841] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 [0842] 1 5 10
 [0843] <210> 65
 [0844] <211> 7
 [0845] <212> PRT
 [0846] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0847] <220>
 [0848] <223> 人工序列的描述:合成肽
 [0849] <400> 65
 [0850] Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 [0851] 1 5
 [0852] <210> 66
 [0853] <211> 9
 [0854] <212> PRT
 [0855] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0856] <220>
 [0857] <223> 人工序列的描述:合成肽

[0858] <400> 66
 [0859] Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 [0860] 1 5
 [0861] <210> 67
 [0862] <211> 193
 [0863] <212> PRT
 [0864] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0865] <400> 67
 [0866] Arg Arg Asp Asp Pro His Ser Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro
 [0867] 1 5 10 15
 [0868] Lys Phe Arg Pro Gly Pro Arg Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp
 [0869] 20 25 30
 [0870] Glu Lys Thr Phe Leu His Tyr Asp Cys Gly Asn Lys Thr Val Thr Pro
 [0871] 35 40 45
 [0872] Val Ser Pro Leu Gly Lys Lys Leu Asn Val Thr Met Ala Trp Lys Ala
 [0873] 50 55 60
 [0874] Gln Asn Pro Val Leu Arg Glu Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu
 [0875] 65 70 75 80
 [0876] Leu Asp Ile Gln Leu Glu Asn Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu
 [0877] 85 90 95
 [0878] Gln Ala Arg Met Ser Cys Glu Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly
 [0879] 100 105 110
 [0880] Ser Trp Gln Phe Ser Ile Asp Gly Gln Thr Phe Leu Leu Phe Asp Ser
 [0881] 115 120 125
 [0882] Glu Lys Arg Met Trp Thr Thr Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys
 [0883] 130 135 140
 [0884] Glu Lys Trp Glu Asn Asp Lys Asp Val Ala Met Ser Phe His Tyr Ile
 [0885] 145 150 155 160
 [0886] Ser Met Gly Asp Cys Ile Gly Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met
 [0887] 165 170 175
 [0888] Asp Ser Thr Leu Glu Pro Ser Ala Gly Ala Pro Leu Ala Met Ser Ser
 [0889] 180 185 190
 [0890] Gly
 [0891] <210> 68
 [0892] <211> 17
 [0893] <212> PRT
 [0894] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0895] <220>
 [0896] <223> 人工序列的描述:合成肽

[0897]	<400> 68
[0898]	Gly Ala Pro Asn Tyr Gly Asp Thr Thr His Asp Tyr Tyr Tyr Met Asp
[0899]	1 5 10 15
[0900]	Val
[0901]	<210> 69
[0902]	<211> 15
[0903]	<212> PRT
[0904]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0905]	<220>
[0906]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0907]	<400> 69
[0908]	Asp Thr Gly Glu Tyr Tyr Asp Thr Asp Asp His Gly Met Asp Val
[0909]	1 5 10 15
[0910]	<210> 70
[0911]	<211> 12
[0912]	<212> PRT
[0913]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0914]	<220>
[0915]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0916]	<400> 70
[0917]	Asp Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Gly Ala Gly Asp Tyr
[0918]	1 5 10
[0919]	<210> 71
[0920]	<211> 13
[0921]	<212> PRT
[0922]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0923]	<220>
[0924]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0925]	<400> 71
[0926]	Gly Ala Pro Met Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro
[0927]	1 5 10
[0928]	<210> 72
[0929]	<211> 16
[0930]	<212> PRT
[0931]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0932]	<220>
[0933]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[0934]	<400> 72
[0935]	Glu Gly Ala Gly Phe Ala Tyr Gly Met Asp Tyr Tyr Tyr Met Asp Val

[0936]	1	5	10	15
[0937]	<210> 73			
[0938]	<211> 15			
[0939]	<212> PRT			
[0940]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0941]	<220>			
[0942]	<223> 人工序列的描述:合成肽			
[0943]	<400> 73			
[0944]	Ala Arg Gly Ala Pro Gln Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro			
[0945]	1	5	10	15
[0946]	<210> 74			
[0947]	<211> 13			
[0948]	<212> PRT			
[0949]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0950]	<220>			
[0951]	<223> 人工序列的描述:合成肽			
[0952]	<400> 74			
[0953]	Gly Ala Pro Gln Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro			
[0954]	1	5	10	
[0955]	<210> 75			
[0956]	<211> 15			
[0957]	<212> PRT			
[0958]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0959]	<220>			
[0960]	<223> 人工序列的描述:合成肽			
[0961]	<400> 75			
[0962]	Ala Arg Gly Ala Pro Leu Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro			
[0963]	1	5	10	15
[0964]	<210> 76			
[0965]	<211> 13			
[0966]	<212> PRT			
[0967]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0968]	<220>			
[0969]	<223> 人工序列的描述:合成肽			
[0970]	<400> 76			
[0971]	Gly Ala Pro Leu Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro			
[0972]	1	5	10	
[0973]	<210> 77			
[0974]	<211> 15			

[0975]	<212>	PRT
[0976]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0977]	<220>	
[0978]	<223>	人工序列的描述:合成肽
[0979]	<400>	77
[0980]	Ala Arg Gly Ala Pro Ile Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro	
[0981]	1	5 10 15
[0982]	<210>	78
[0983]	<211>	13
[0984]	<212>	PRT
[0985]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0986]	<220>	
[0987]	<223>	人工序列的描述:合成肽
[0988]	<400>	78
[0989]	Gly Ala Pro Ile Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro	
[0990]	1	5 10
[0991]	<210>	79
[0992]	<211>	15
[0993]	<212>	PRT
[0994]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0995]	<220>	
[0996]	<223>	人工序列的描述:合成肽
[0997]	<400>	79
[0998]	Ala Arg Gly Ala Pro Phe Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro	
[0999]	1	5 10 15
[1000]	<210>	80
[1001]	<211>	13
[1002]	<212>	PRT
[1003]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1004]	<220>	
[1005]	<223>	人工序列的描述:合成肽
[1006]	<400>	80
[1007]	Gly Ala Pro Phe Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro	
[1008]	1	5 10
[1009]	<210>	81
[1010]	<211>	15
[1011]	<212>	PRT
[1012]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1013]	<220>	

[1014]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[1015]	<400> 81
[1016]	Ala Arg Gly Ala Pro Val Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro
[1017]	1 5 10 15
[1018]	<210> 82
[1019]	<211> 13
[1020]	<212> PRT
[1021]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1022]	<220>
[1023]	<223> 人工序列的描述:合成肽
[1024]	<400> 82
[1025]	Gly Ala Pro Val Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro
[1026]	1 5 10
[1027]	<210> 83
[1028]	<211> 122
[1029]	<212> PRT
[1030]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1031]	<220>
[1032]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[1033]	<400> 83
[1034]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[1035]	1 5 10 15
[1036]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1037]	20 25 30
[1038]	Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1039]	35 40 45
[1040]	Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1041]	50 55 60
[1042]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[1043]	65 70 75 80
[1044]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1045]	85 90 95
[1046]	Ala Arg Gly Ala Pro Gln Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro Trp
[1047]	100 105 110
[1048]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1049]	115 120
[1050]	<210> 84
[1051]	<211> 122
[1052]	<212> PRT

[1053]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[1054]	<220>															
[1055]	<223> 人工序列的描述:合成多肽															
[1056]	<400> 84															
[1057]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
[1058]	1				5					10					15	
[1059]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
[1060]				20					25					30		
[1061]	Ser	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
[1062]			35					40					45			
[1063]	Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
[1064]		50					55					60				
[1065]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
[1066]	65					70					75				80	
[1067]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[1068]				85						90				95		
[1069]	Ala	Arg	Gly	Ala	Pro	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp
[1070]				100						105				110		
[1071]	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
[1072]				115						120						
[1073]	<210> 85															
[1074]	<211> 122															
[1075]	<212> PRT															
[1076]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[1077]	<220>															
[1078]	<223> 人工序列的描述:合成多肽															
[1079]	<400> 85															
[1080]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
[1081]	1				5					10					15	
[1082]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
[1083]				20					25					30		
[1084]	Ser	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
[1085]			35					40					45			
[1086]	Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
[1087]		50					55					60				
[1088]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
[1089]	65					70					75				80	
[1090]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[1091]				85						90				95		

[1092]	Ala Arg Gly Ala Pro Ile Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro Trp
[1093]	100 105 110
[1094]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1095]	115 120
[1096]	<210> 86
[1097]	<211> 122
[1098]	<212> PRT
[1099]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1100]	<220>
[1101]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[1102]	<400> 86
[1103]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[1104]	1 5 10 15
[1105]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1106]	20 25 30
[1107]	Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1108]	35 40 45
[1109]	Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1110]	50 55 60
[1111]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[1112]	65 70 75 80
[1113]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1114]	85 90 95
[1115]	Ala Arg Gly Ala Pro Phe Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro Trp
[1116]	100 105 110
[1117]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1118]	115 120

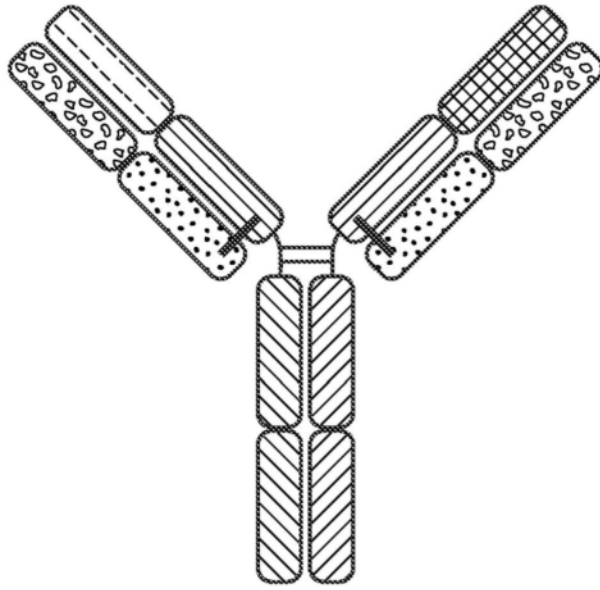


图1

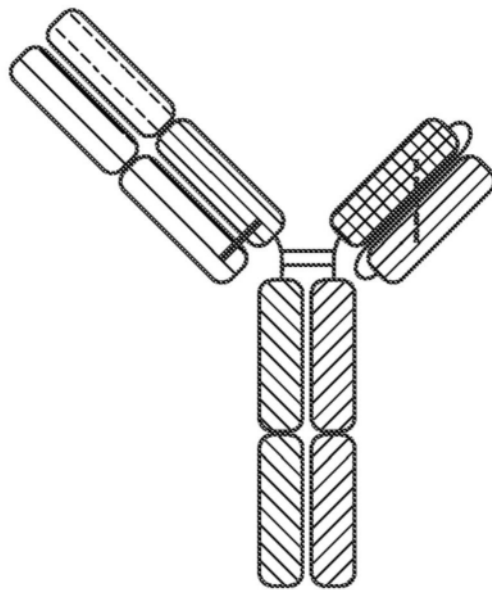


图2

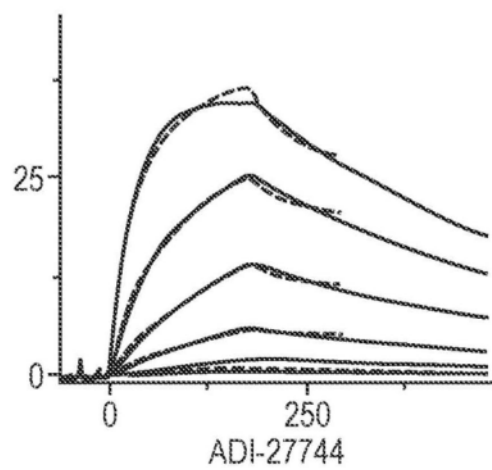


图3A

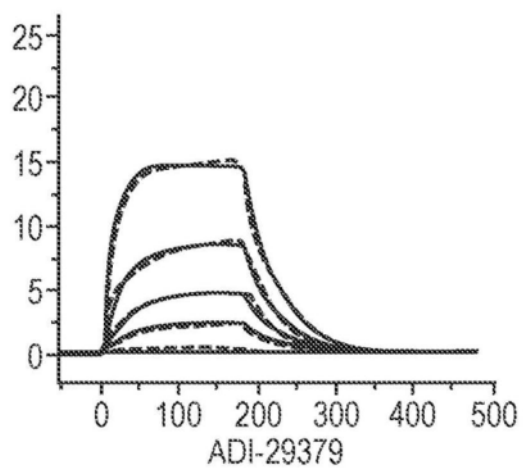


图3B

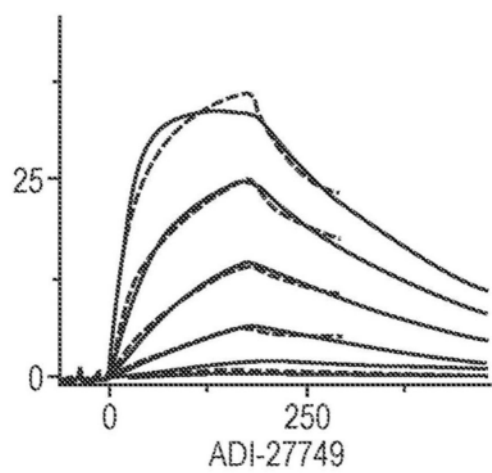


图3C

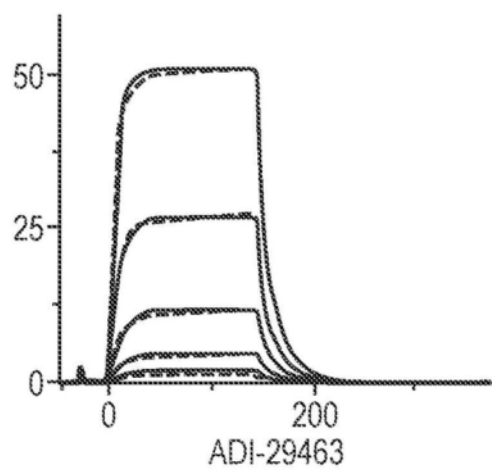


图3D

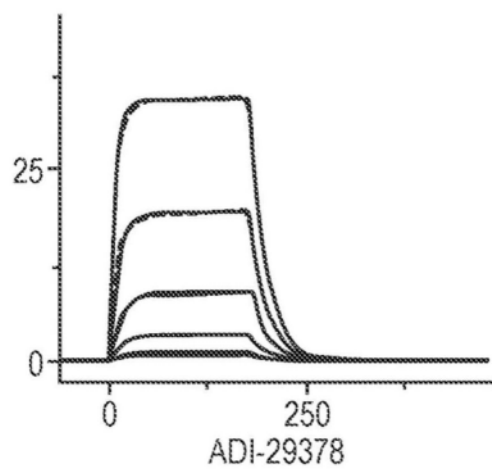


图3E

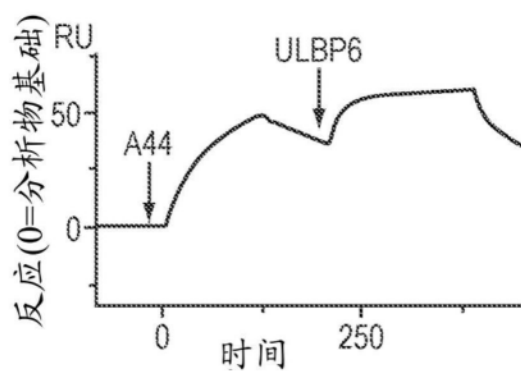


图4A

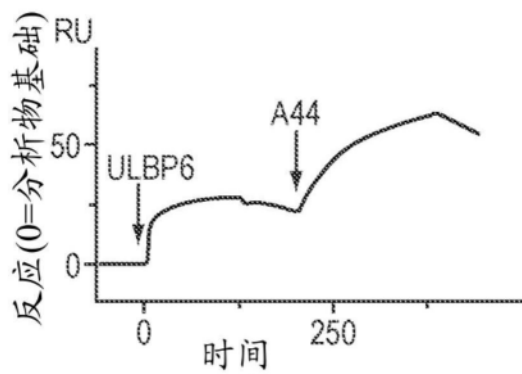


图4B

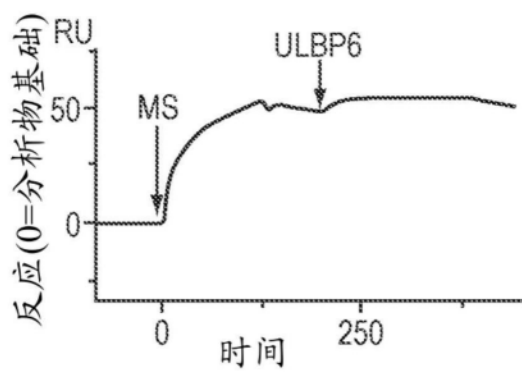


图4C

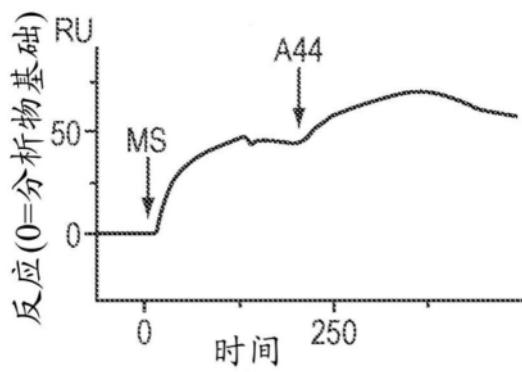


图4D

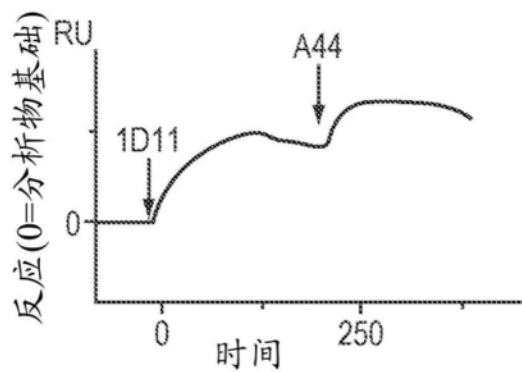


图4E

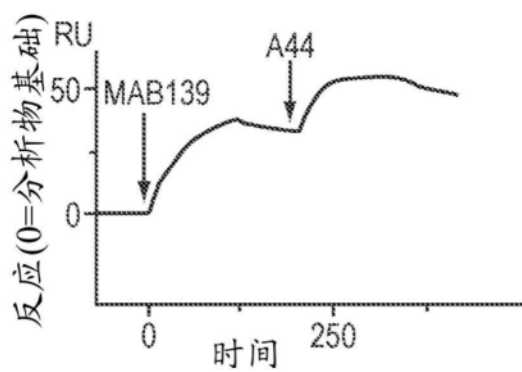


图4F

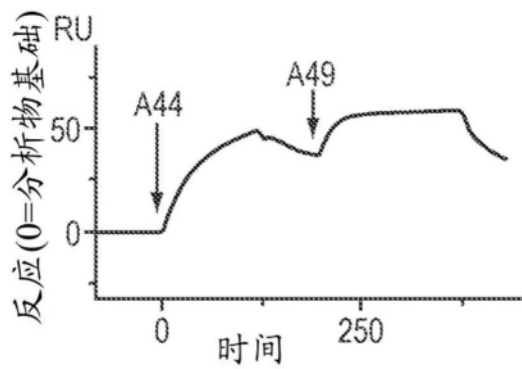


图4G

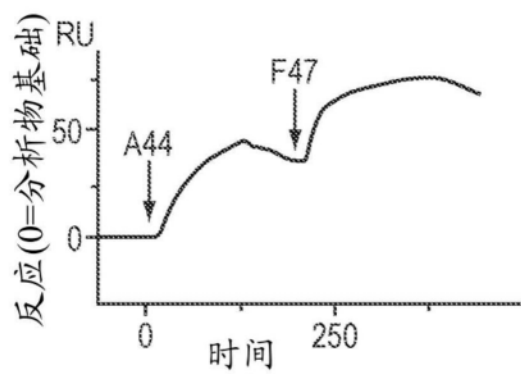


图4H

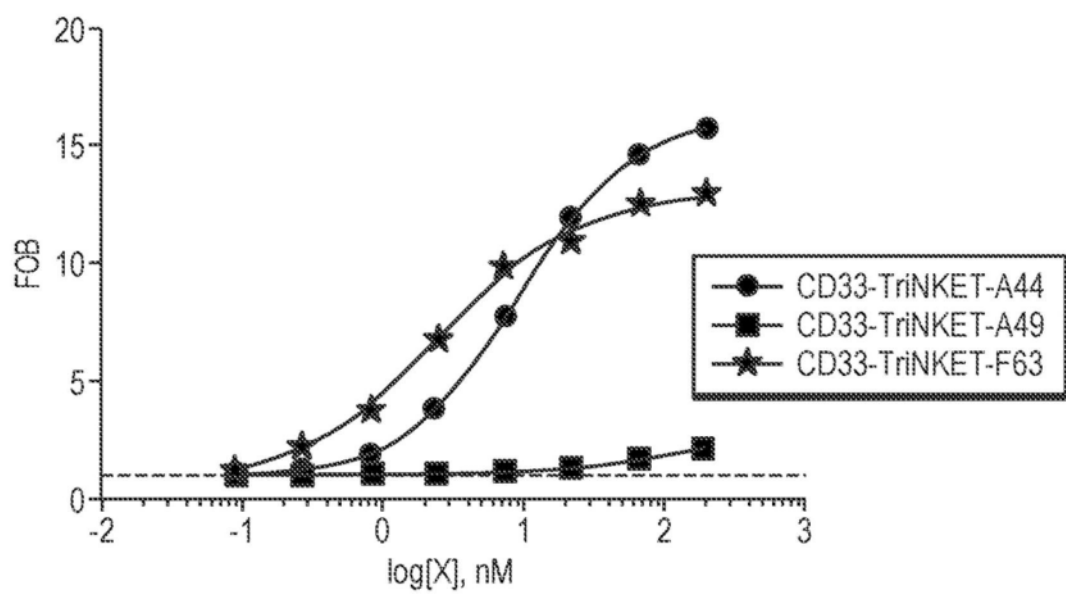


图5

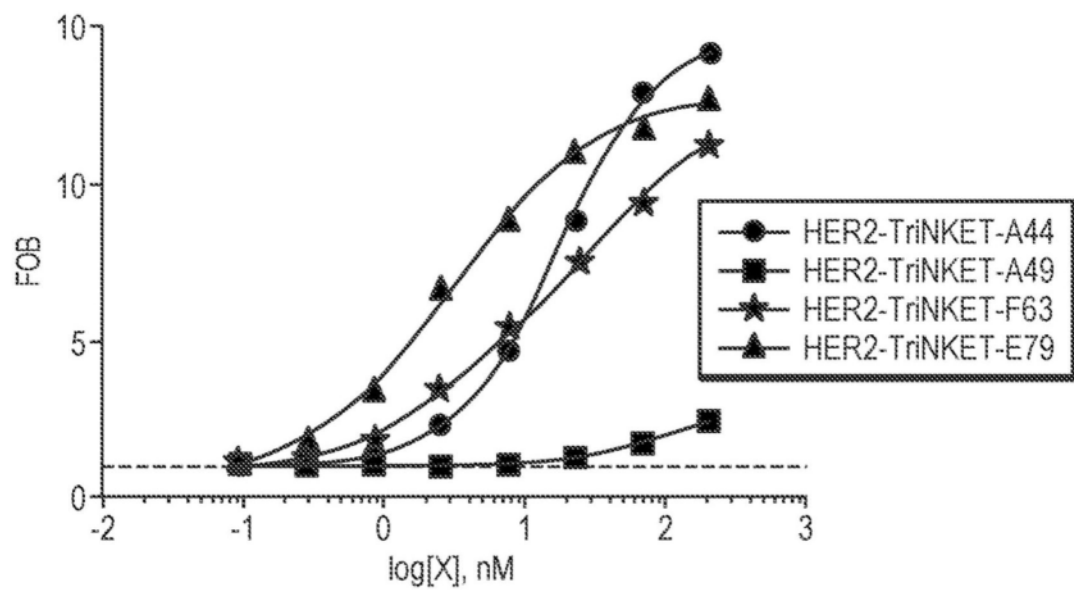


图6

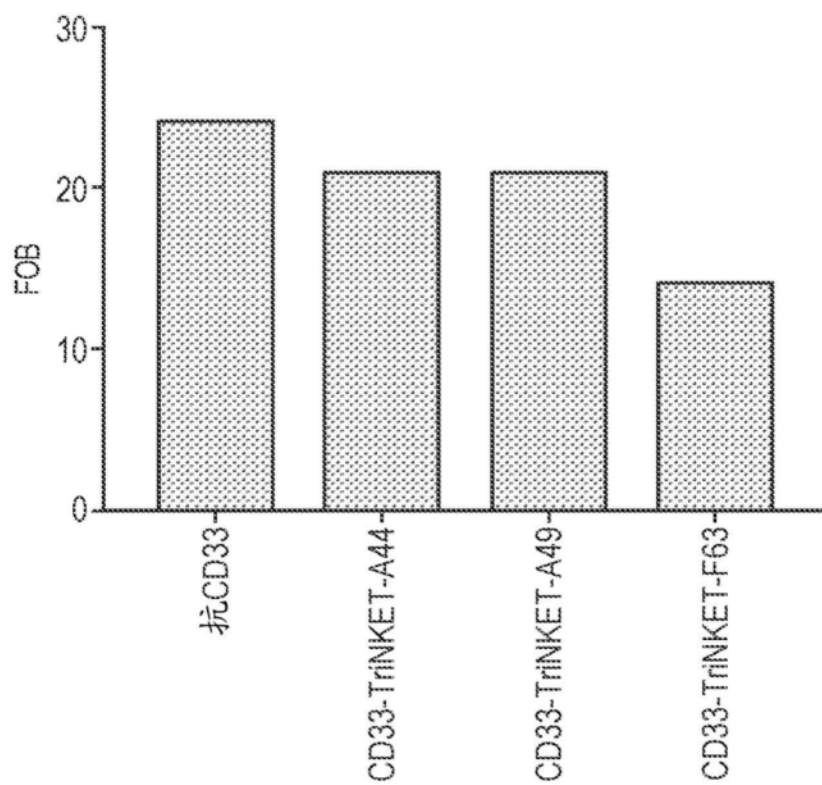


图7

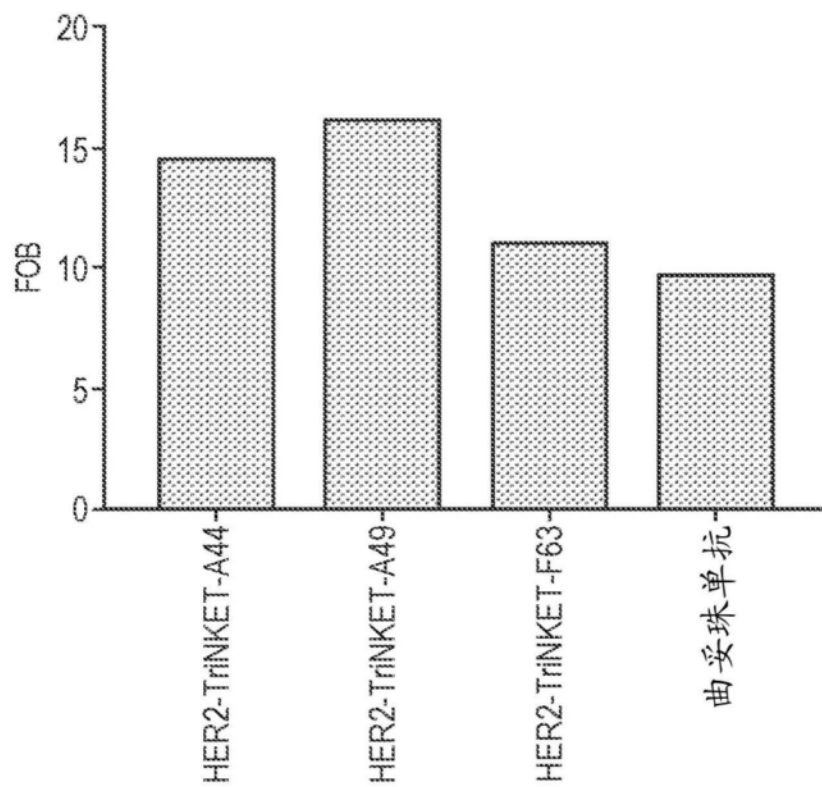


图8

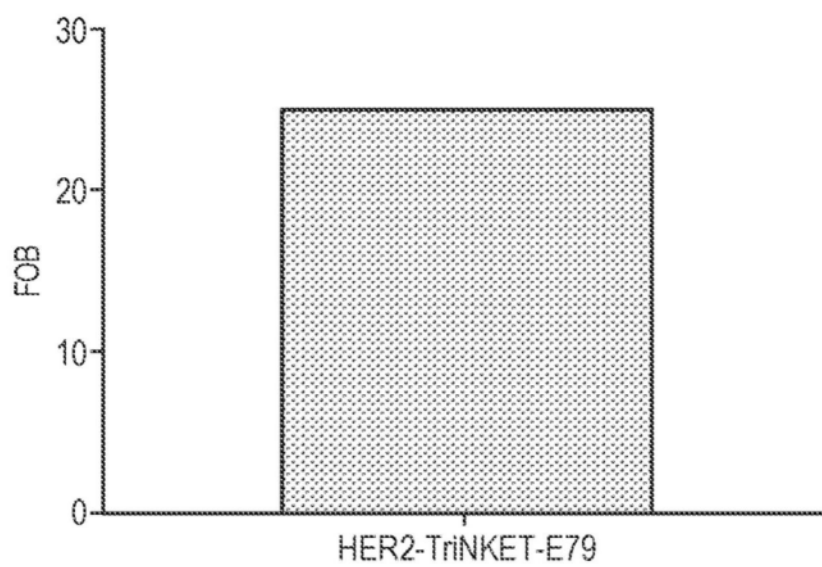


图9

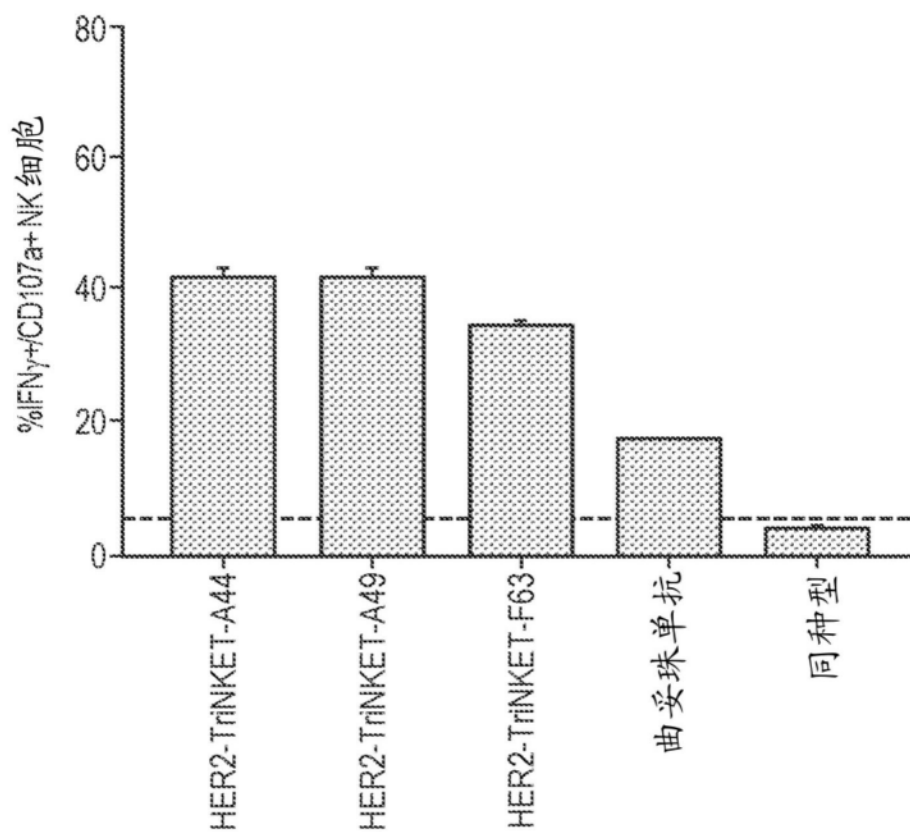


图10

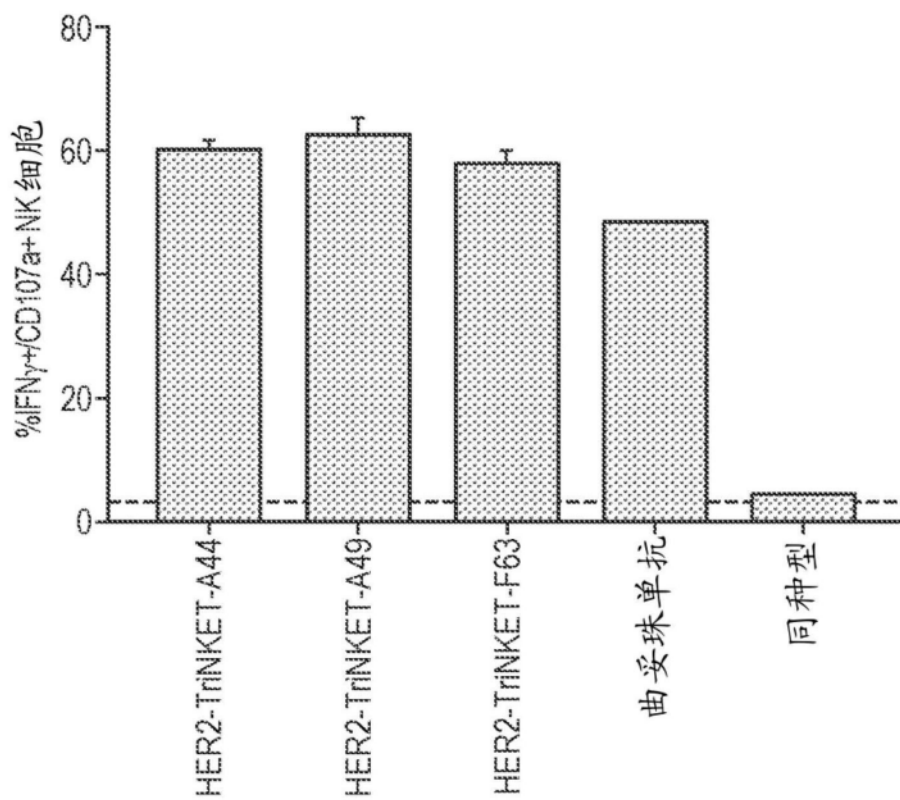


图11

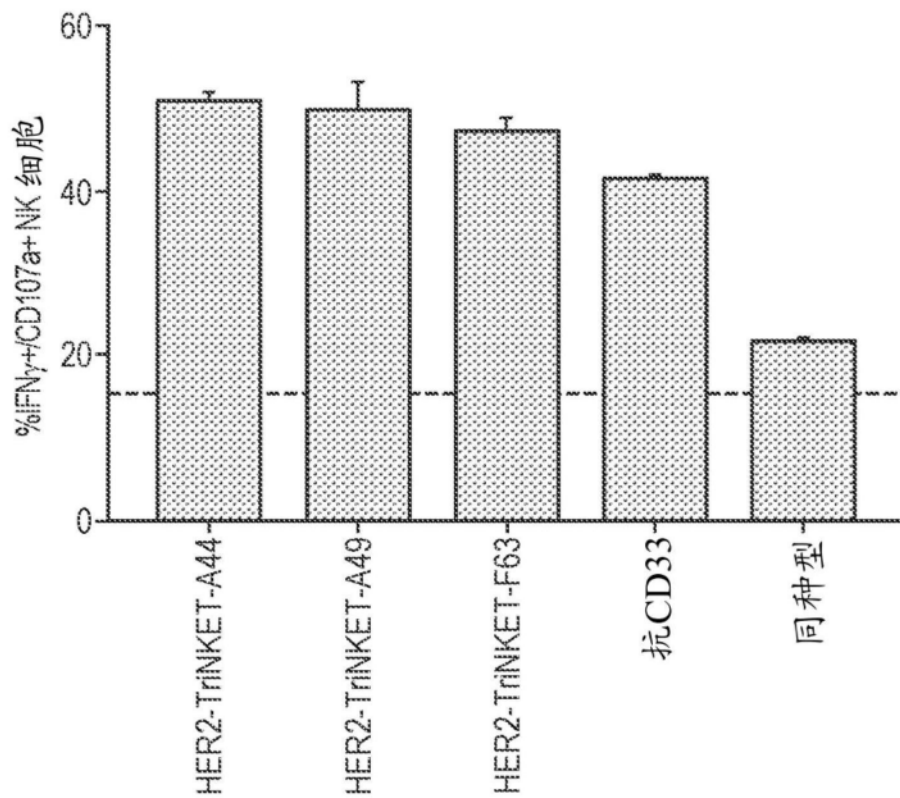


图12

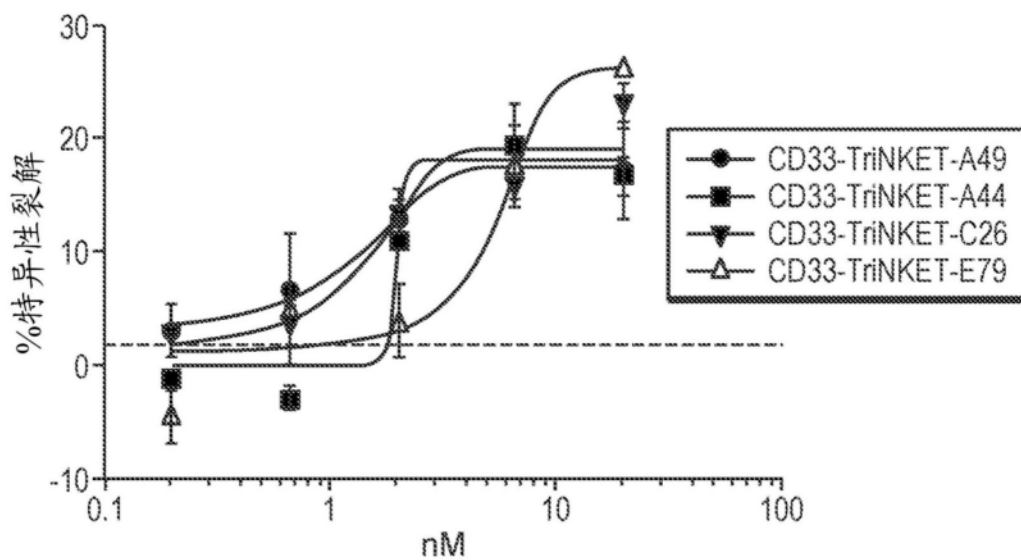


图13

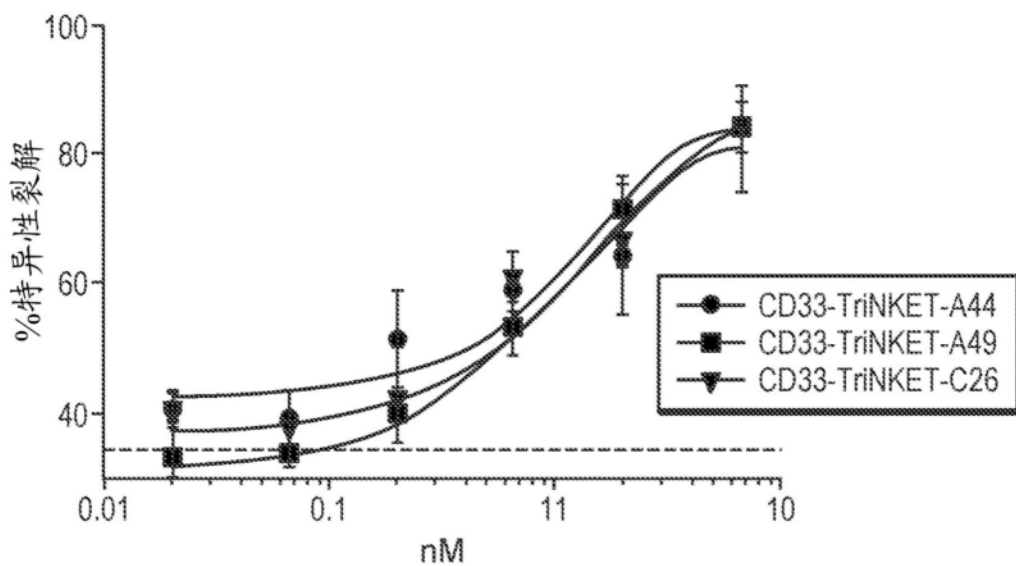


图14

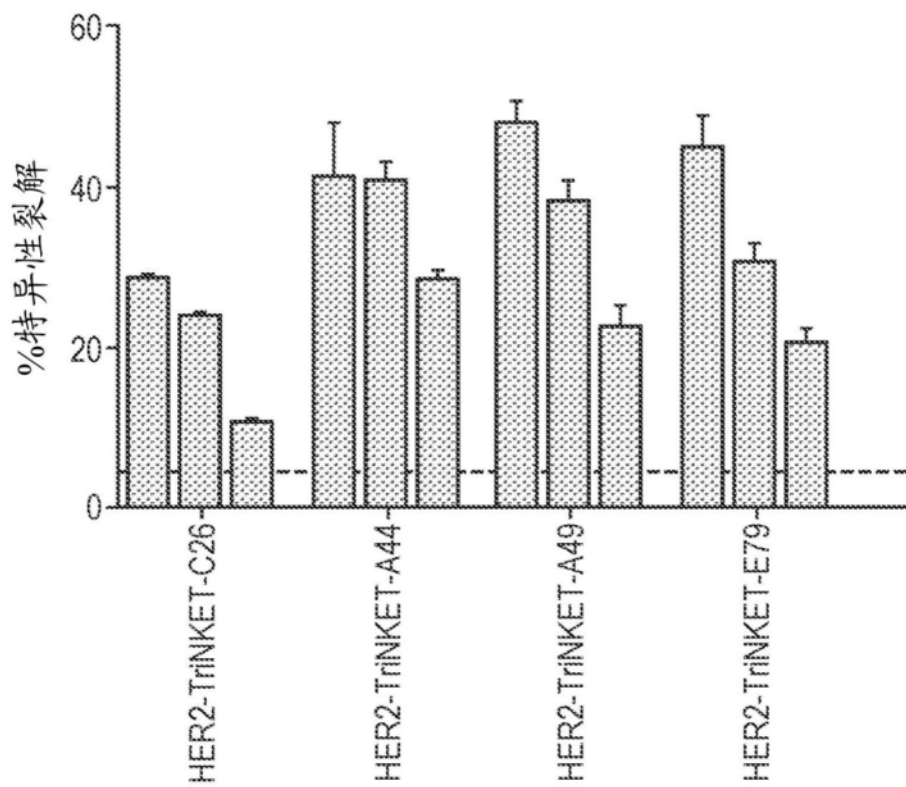


图15

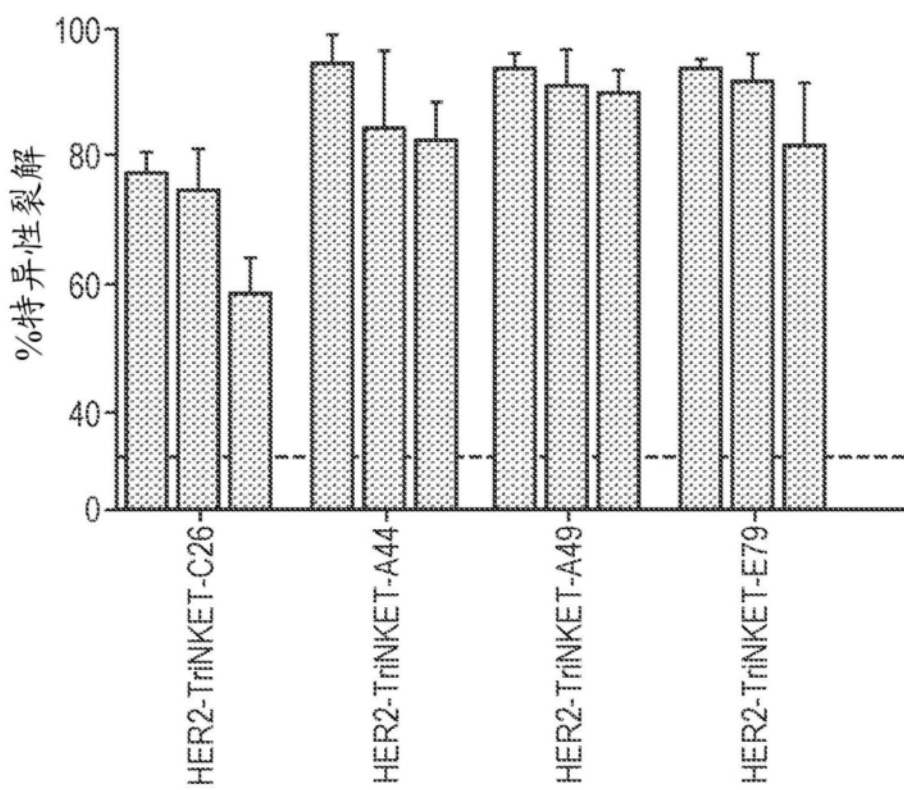


图16

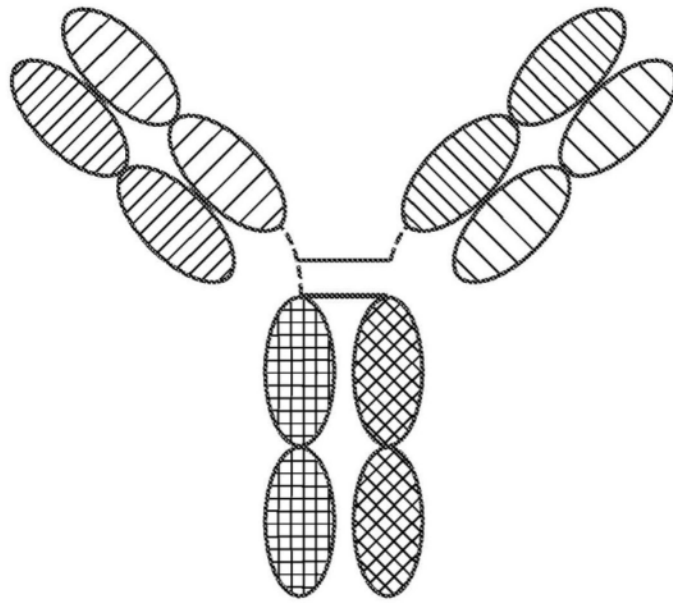


图17

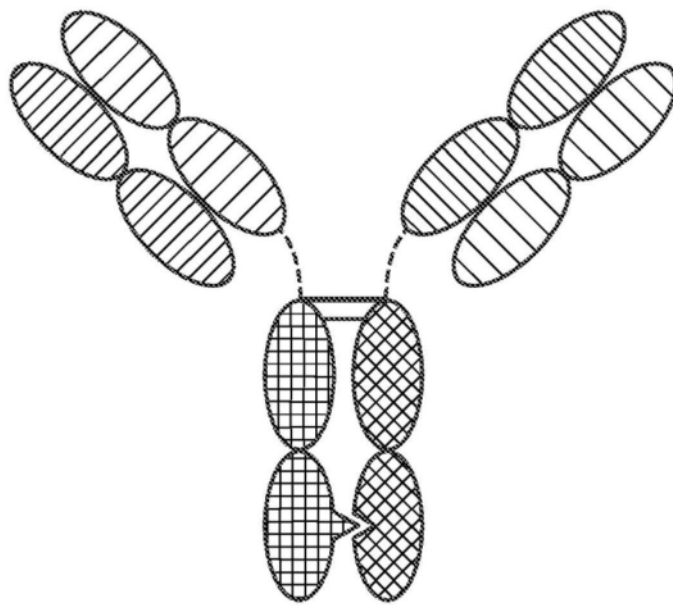


图18

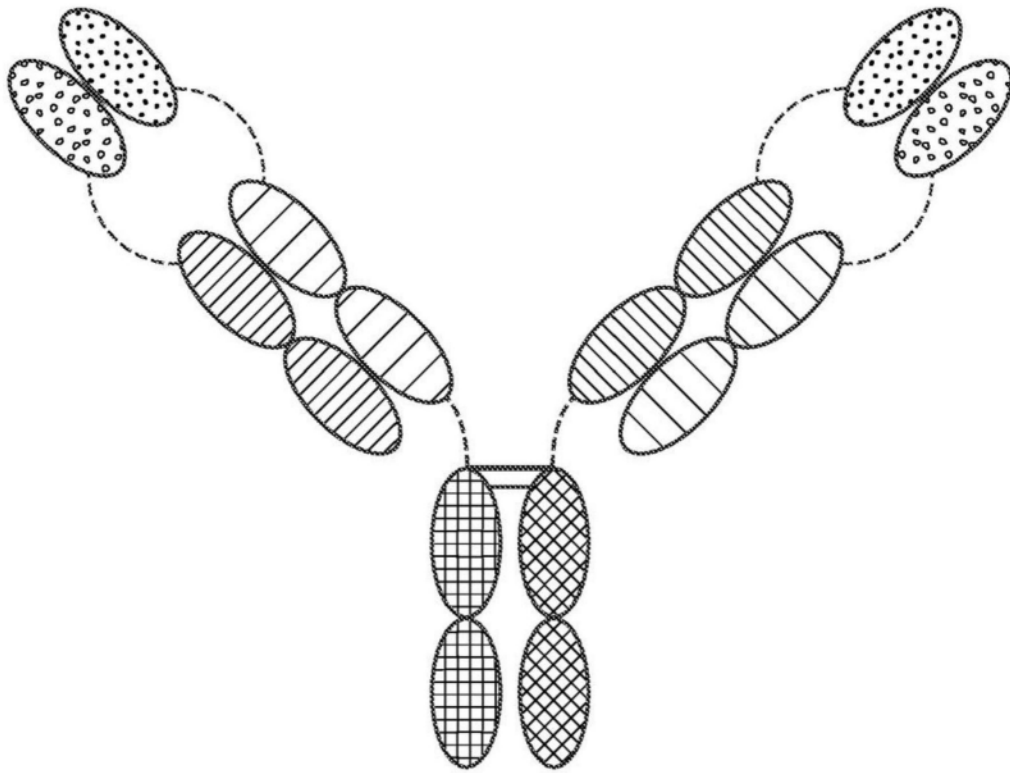


图19

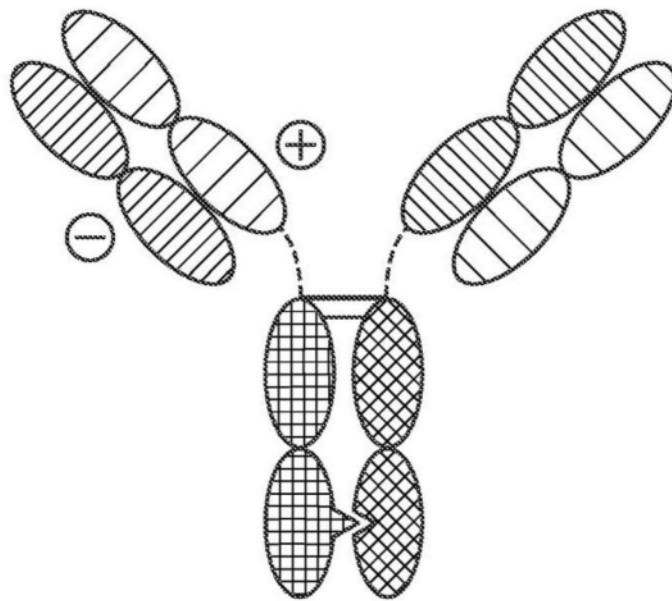


图20

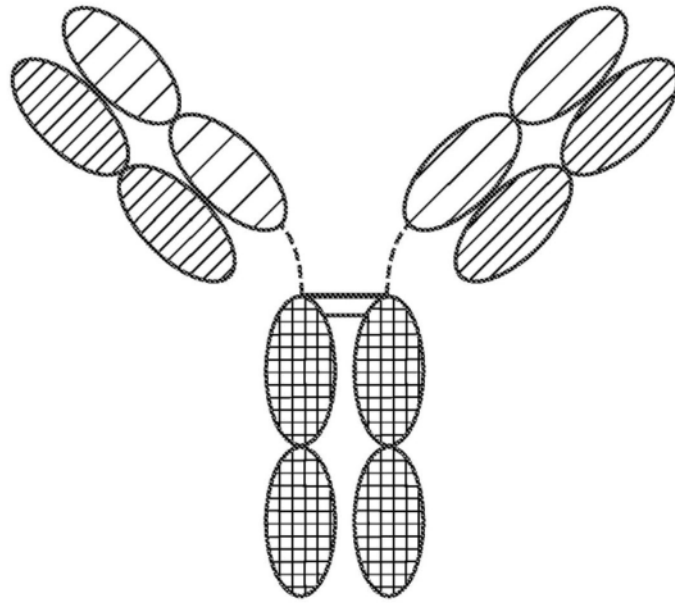


图21

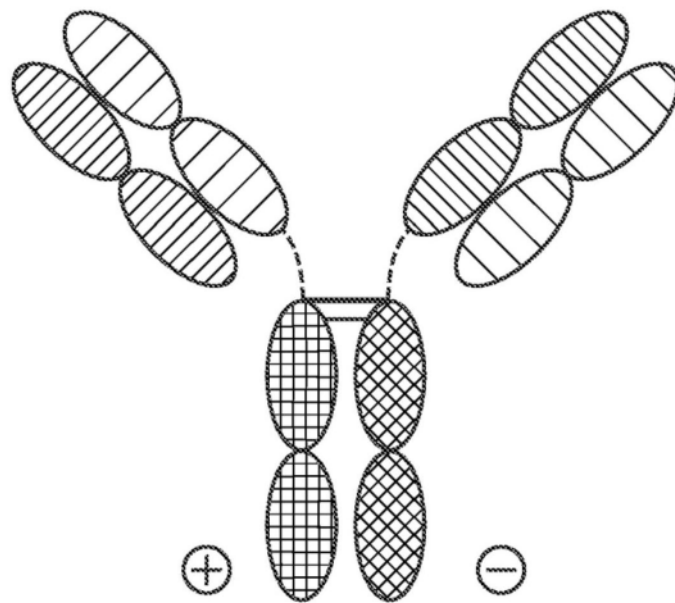


图22

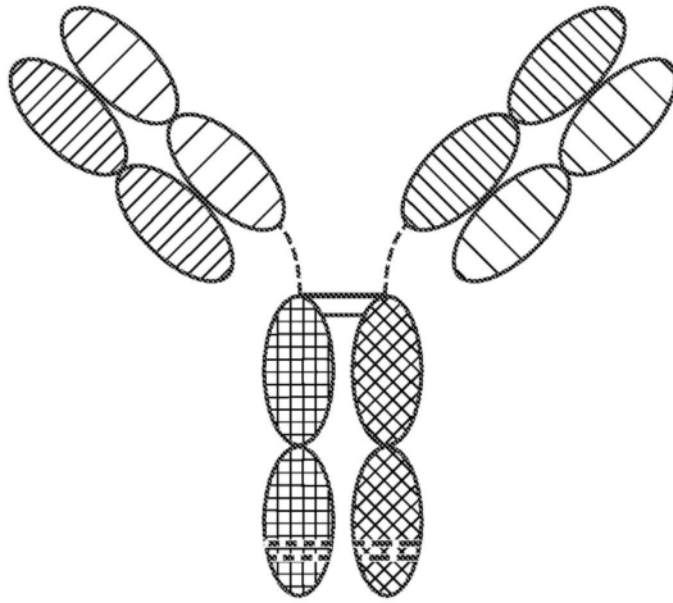


图23

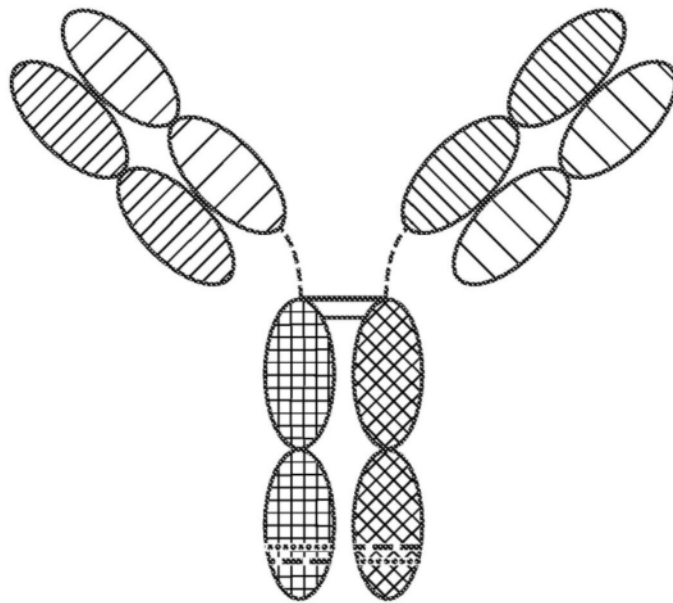


图24

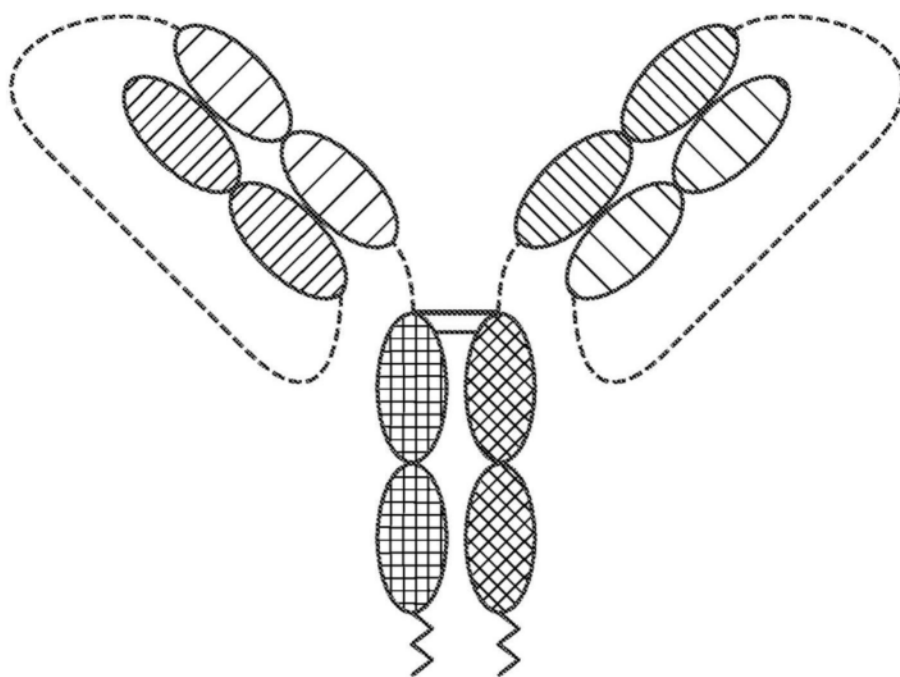


图25

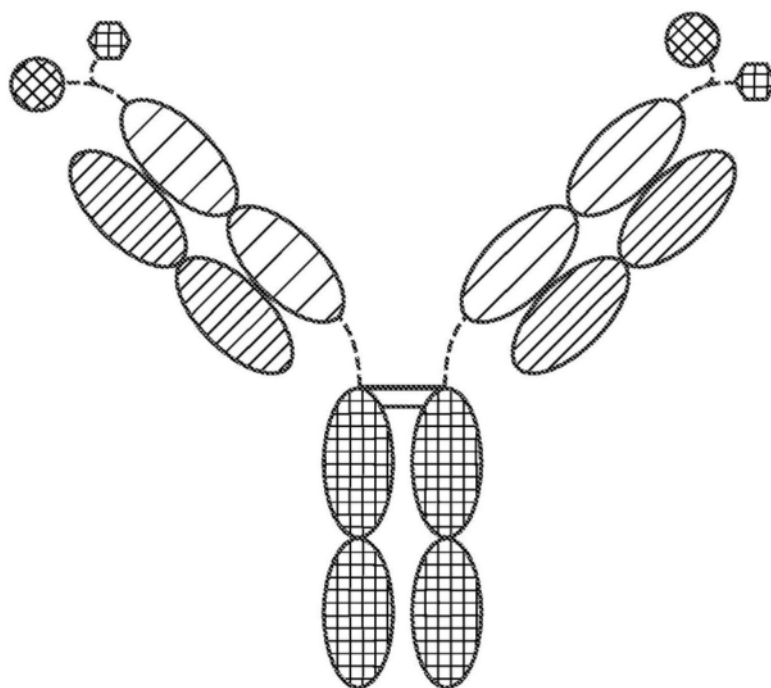


图26

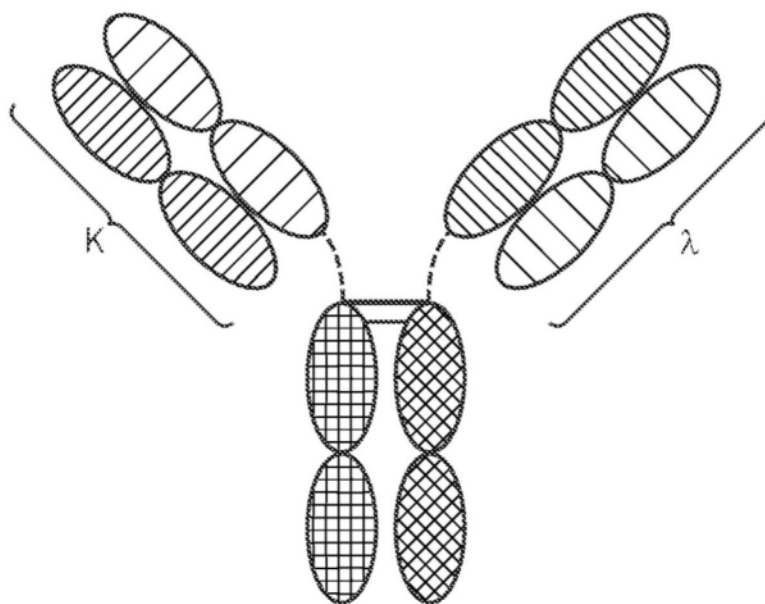


图27A

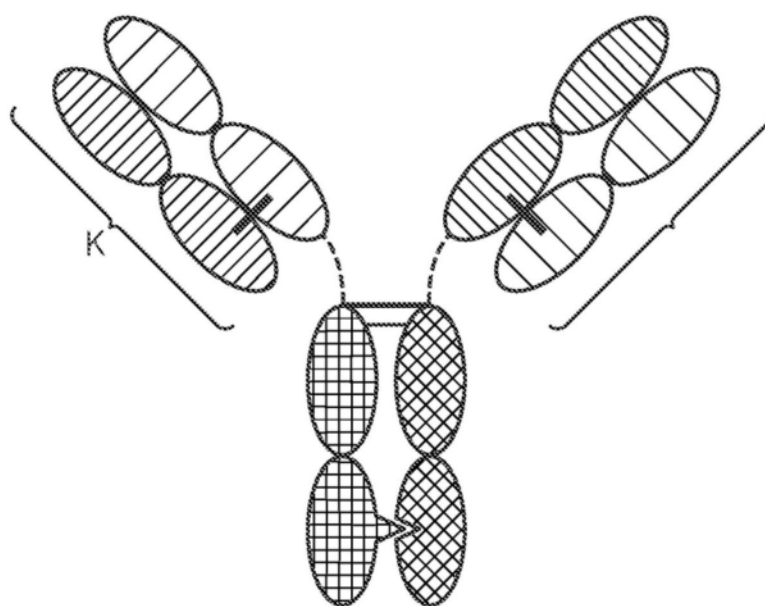


图27B

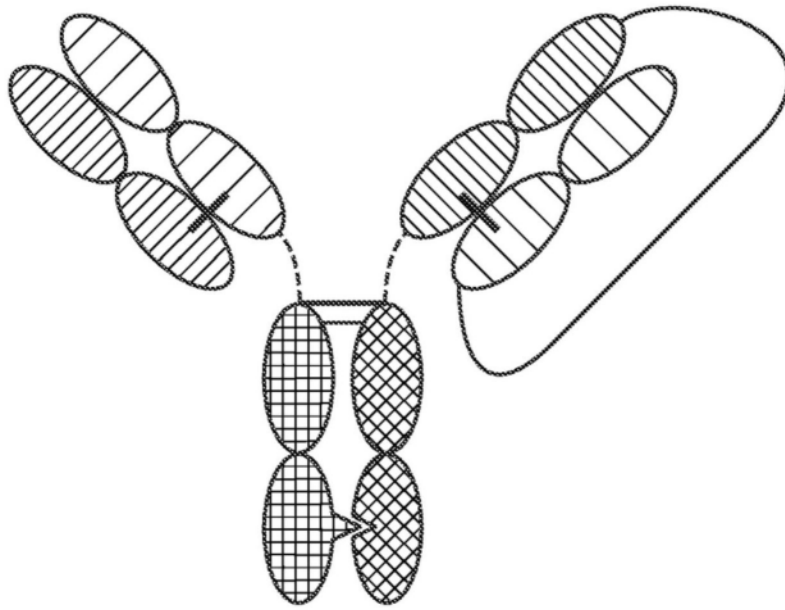


图28

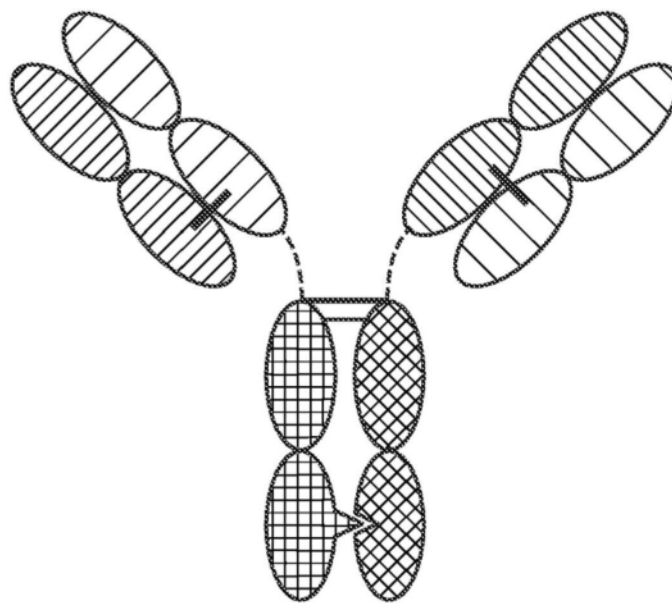


图29

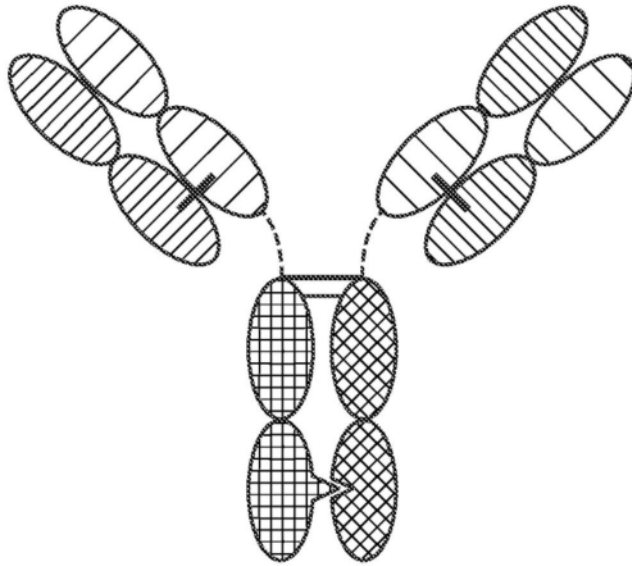


图30

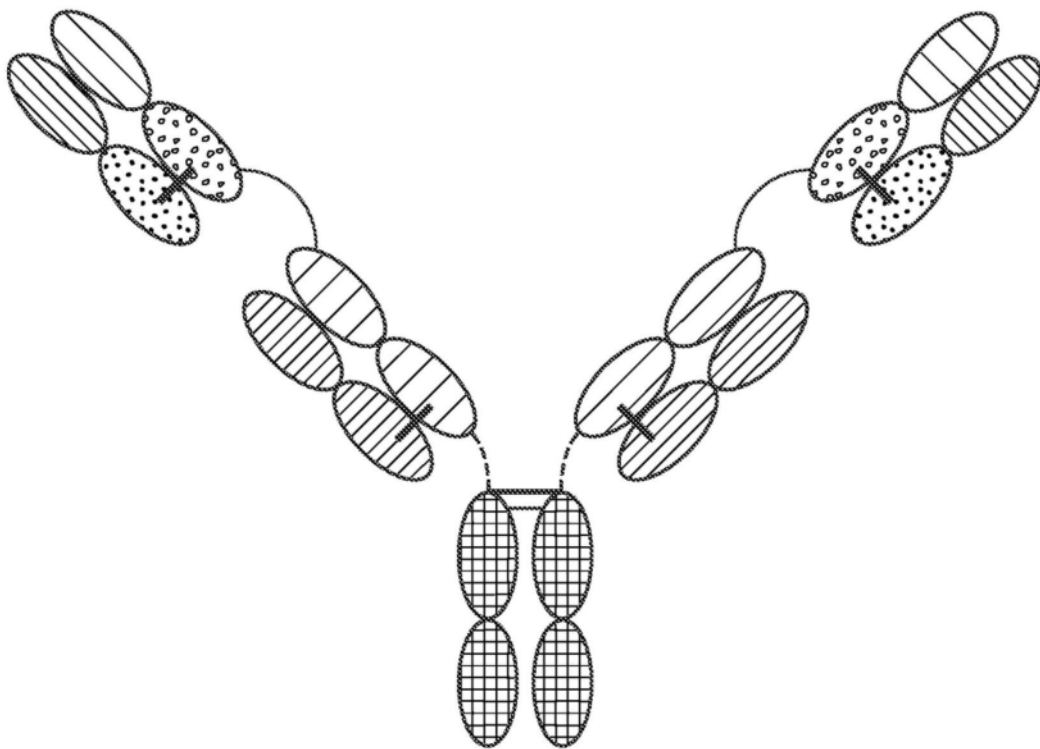


图31

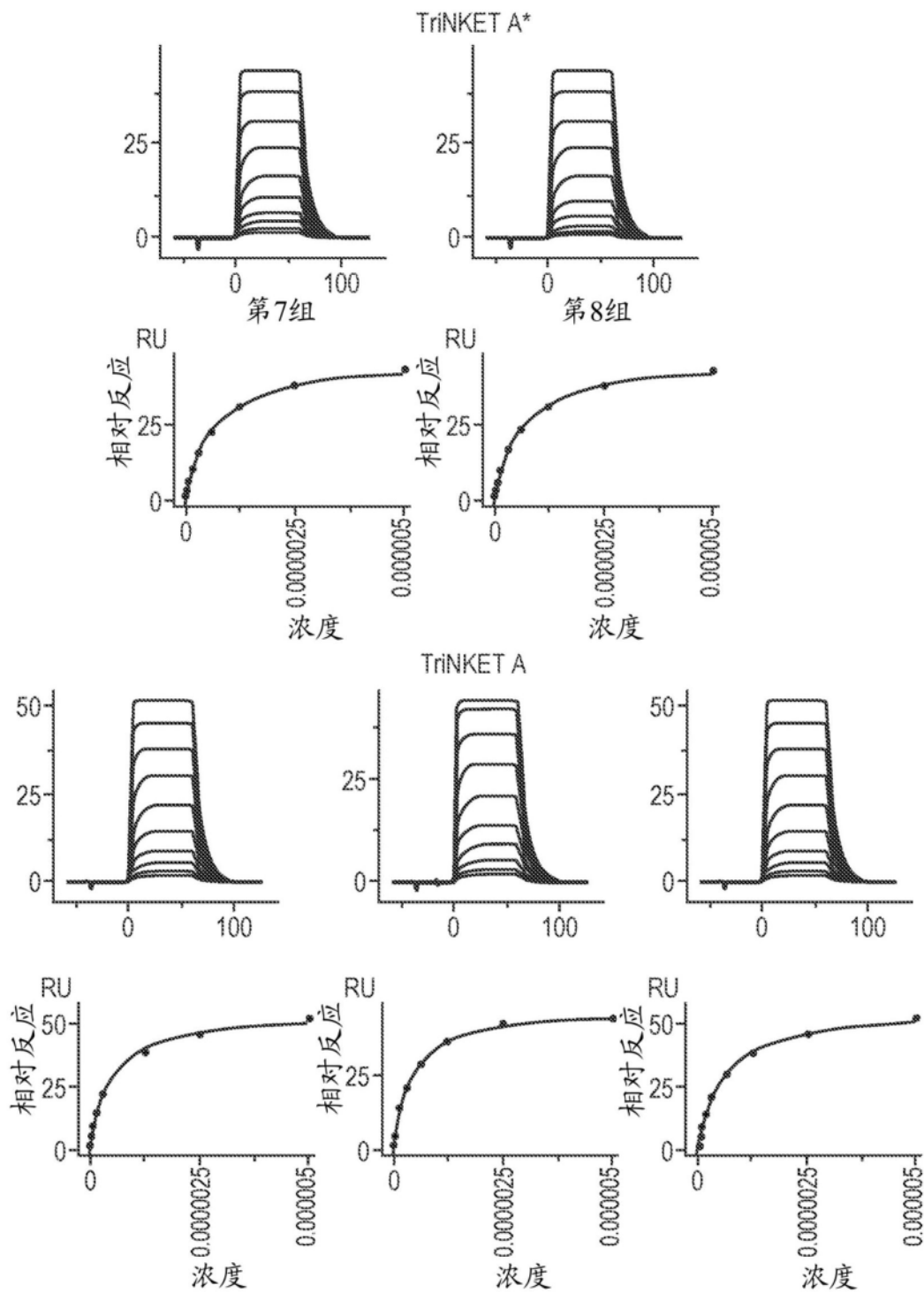


图32

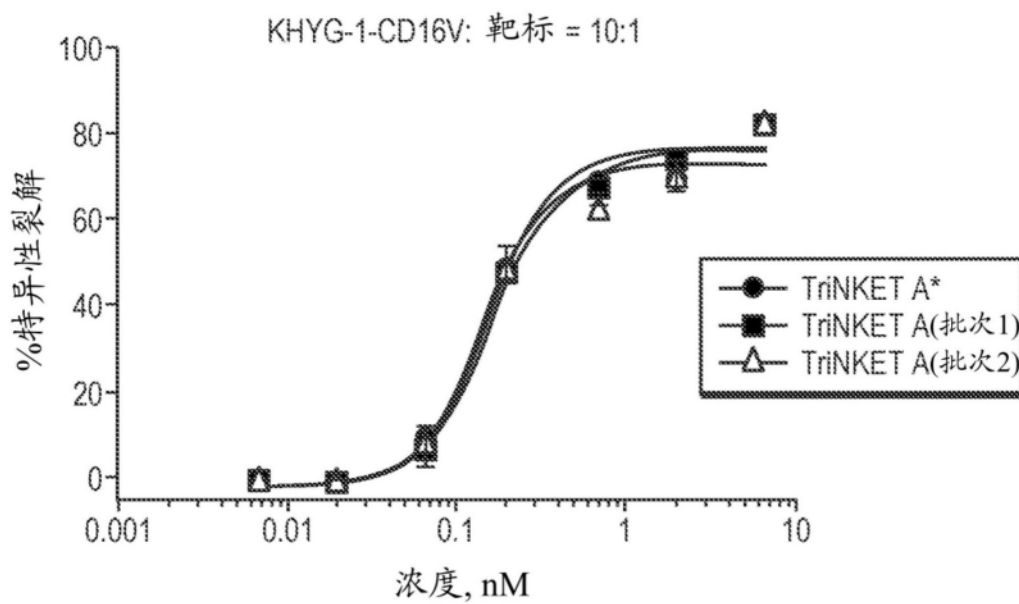


图33

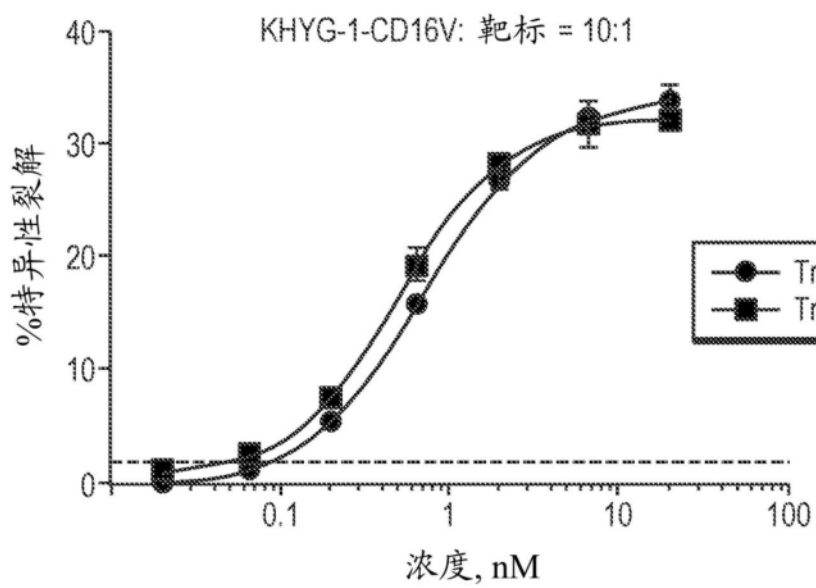


图34