



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119735693 A

(43) 申请公布日 2025.04.01

(21) 申请号 202411838715.4

(74) 专利代理机构 北京市立方律师事务所

(22) 申请日 2018.09.07

11330

(30) 优先权数据

62/555,110 2017.09.07 US

(51) Int.Cl.

62/566,824 2017.10.02 US

C07K 16/46 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61K 39/395 (2006.01)

201880071464.8 2018.09.07

A61P 35/00 (2006.01)

(71) 申请人 蜻蜓疗法股份有限公司

权利要求书8页 说明书54页

地址 美国马萨诸塞州

序列表(电子公布) 附图25页

(72) 发明人 格雷戈里·P·常 安·F·张

F4 格式

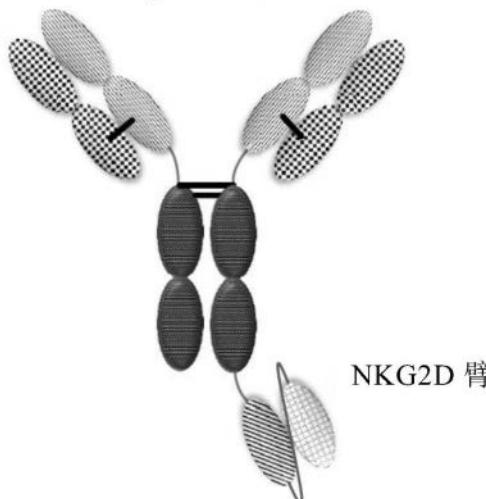
威廉·哈尼 布拉德利·M·伦德

EpCAM 臂

比昂卡·普林茨  
阿斯亚·格林贝格

(54) 发明名称

结合NKG2D、CD16和肿瘤相关抗原的蛋白质



(57) 摘要

描述了结合NKG2D受体、CD16和肿瘤相关抗原的多特异性结合蛋白，以及可用于治疗癌症的药物组合物和治疗方法。

1.一种蛋白质,其包含:

(a)结合自然杀伤细胞表面活性受体2族成员D(NKG2D)的第一抗原结合位点;

(b)结合选自下述的抗原的第二抗原结合位点:EpCAM,癌抗原125(CA125)、钠/磷酸盐共转运蛋白2B(NaPi2b)、结合素细胞粘附分子4(结合素4)、岩藻糖基-GM1(单唾液酰四己糖基神经节苷脂)、含去整合蛋白和金属蛋白酶结构域蛋白8(ADAM8)、含去整合蛋白和金属蛋白酶结构域蛋白9(ADAM9)、溶质载体家族44成员4(SLC44A4)和唾液酸化路易斯a抗原(CA19-9);和

(c)抗体Fc结构域或其足以结合分化抗原簇16(CD16)的部分,或结合CD16的第三抗原结合位点。

2.一种蛋白质,其包含:

(a)结合NKG2D的第一抗原结合位点;

(b)结合EpCAM的第二抗原结合位点;和

(c)抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分,或结合CD16的第三抗原结合位点。

3.一种蛋白质,其包含:

(a)结合NKG2D的第一抗原结合位点;

(b)结合选自下述的肿瘤相关抗原的第二抗原结合位点:癌抗原125(CA125)、钠/磷酸盐共转运蛋白2B(NaPi2b),结合素细胞粘附分子4(结合素4),岩藻糖基-GM1(单唾液酰四己糖基神经节苷脂)、含去整合蛋白和金属蛋白酶结构域蛋白8(ADAM8)、含去整合蛋白和金属蛋白酶结构域蛋白9(ADAM9)、溶质载体家族44成员4(SLC44A4)和唾液酸化路易斯a抗原(CA19-9);和

(c)抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分,或结合CD16的第三抗原结合位点。

4.一种蛋白质,其包含:

(a)结合NKG2D的第一抗原结合位点;

(b)结合选自钠依赖性磷酸盐转运蛋白2b(NaPi2b)的肿瘤相关抗原的第二抗原结合位点;和

(c)抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分,或结合CD16的第三抗原结合位点。

5.一种蛋白质,其包含:

(a)结合NKG2D的第一抗原结合位点;

(b)结合肿瘤相关抗原结合素4的第二抗原结合位点;和

(c)抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分,或结合CD16的第三抗原结合位点。

6.一种蛋白质,其包含:

(a)结合NKG2D的第一抗原结合位点;

(b)结合多发性骨髓瘤相关抗原岩藻糖基-GM1的第二抗原结合位点;和

(c)抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分,或结合CD16的第三抗原结合位点。

7.一种蛋白质,其包含:

(a)结合NKG2D的第一抗原结合位点;

(b)结合选自SLC44A4的T-细胞相关肿瘤抗原的第二抗原结合位点;和

(c)抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分,或结合CD16的第三抗原结合位点。

8.权利要求1-7中任一项所述的蛋白质,其中所述第一抗原结合位点结合到人类、非人

类灵长动物和啮齿动物中的NKG2D。

9. 权利要求1-8中任一项所述的蛋白质,其中所述第一抗原结合位点包含重链可变结构域和轻链可变结构域。

10. 根据权利要求9所述的蛋白质,其中所述重链可变结构域和轻链可变结构域存在于同一多肽上。

11. 根据权利要求9或10所述的蛋白质,其中所述第二抗原结合位点包含重链可变结构域和轻链可变结构域。

12. 根据权利要求11所述的蛋白质,其中所述第二抗原结合位点的重链可变结构域和轻链可变结构域存在于同一多肽上。

13. 根据权利要求11或12所述的蛋白质,其中所述第一抗原结合位点的轻链可变结构域具有与所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

14. 一种蛋白质,其包含:

- (a) 第一抗原结合位点,其包含结合NKG2D的Fab片段;
- (b) 第二抗原结合位点,其包含结合EpCAM的单链可变片段(scFv);和
- (c) 抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分,或结合CD16的第三抗原结合位点。

15. 权利要求14所述的蛋白质,其中所述scFv通过包含Ala-Ser或Gly-Ala-Ser的铰链连接到所述抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分或所述结合CD16的第三抗原结合位点,其中所述scFv包含重链可变结构域和轻链可变结构域。

16. 权利要求15所述的蛋白质,其中所述scFv被连接到所述抗体Fc结构域。

17. 权利要求14或15所述的蛋白质,其中所述scFv的重链可变结构域与所述scFv的轻链可变结构域形成二硫桥。

18. 权利要求17所述的蛋白质,其中所述二硫桥在来自于所述重链可变结构域的C44与来自于所述轻链可变结构域的C100之间形成。

19. 权利要求18所述的蛋白质,其中所述scFv被连接到所述抗体Fc结构域,其中所述scFv的轻链可变结构域位于所述scFv的重链可变结构域的N-端处,并且通过柔性连接物(GlyGlyGlyGlySer)<sub>4</sub>((G4S)<sub>4</sub>)连接到所述scFv的重链可变结构域,并且所述Fab被连接到所述抗体Fc结构域。

20. 根据权利要求15-19中任一项所述的蛋白质,其中所述scFv的重链可变结构域通过柔性连接物连接到所述scFv的轻链可变结构域。

21. 权利要求20所述的蛋白质,其中所述柔性连接物包含(GlyGlyGlyGlySer)<sub>4</sub>((G4S)<sub>4</sub>)。

22. 根据权利要求15-21中任一项所述的蛋白质,其中所述scFv的重链可变结构域位于所述scFv的轻链可变结构域的N-端或C-端处。

23. 权利要求22所述的蛋白质,其中所述scFv的轻链可变结构域位于所述scFv的重链可变结构域的N-端处。

24. 根据权利要求14至23中任一项所述的蛋白质,其中所述Fab片段被连接到所述抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分或所述结合CD16的第三抗原结合位点。

25. 权利要求24所述的蛋白质,其中所述Fab片段的重链部分包含重链可变结构域和CH1结构域,并且其中所述重链可变结构域被连接到所述CH1结构域。

26. 根据权利要求24或25所述的蛋白质,其中所述Fab片段被连接到所述抗体Fc结构域。

27. 根据权利要求14至26中任一项所述的蛋白质,其包含选自SEQ ID NO:208和SEQ ID NO:209的序列。

28. 根据权利要求15-27中任一项所述的蛋白质,其包含连接到抗体Fc结构域的scFv,其中所述连接到抗体Fc结构域的scFv由选自SEQ ID NO:210和SEQ ID NO:211的序列表示。

29. 根据权利要求15-27中任一项所述的蛋白质,其包含选自SEQ ID NO:212和SEQ ID NO:213的序列。

30. 根据权利要求15-26中任一项所述的蛋白质,其包含与选自SEQ ID NO:210和SEQ ID NO:211的氨基酸序列至少90%同一性的序列。

31. 根据权利要求15-26中任一项所述的蛋白质,其包含与选自SEQ ID NO:210和SEQ ID NO:211的氨基酸序列至少95%同一性的序列。

32. 根据权利要求15-26中任一项所述的蛋白质,其包含与选自SEQ ID NO:210和SEQ ID NO:211的氨基酸序列至少99%同一性的序列。

33. 根据权利要求15-32中任一项所述的蛋白质,其包含与选自SEQ ID NO:212和SEQ ID NO:213的氨基酸序列至少90%同一性的序列。

34. 根据权利要求15-32中任一项所述的蛋白质,其包含与选自SEQ ID NO:212和SEQ ID NO:213的氨基酸序列至少95%同一性的序列。

35. 根据权利要求15-32中任一项所述的蛋白质,其包含与选自SEQ ID NO:212和SEQ ID NO:213的氨基酸序列至少99%同一性的序列。

36. 一种蛋白质,其包含:

(a) 包含结合NKG2D的单链可变片段(scFv)的第一抗原结合位点;

(b) 结合EpCAM的第二抗原结合位点;和

(c) 抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分,或结合CD16的第三抗原结合位点。

37. 根据权利要求36所述的蛋白质,其还包含结合EpCAM的另外的抗原结合位点。

38. 根据权利要求36或37所述的蛋白质,其中所述结合EpCAM的第二抗原结合位点是Fab片段。

39. 根据权利要求37或38所述的蛋白质,其中所述结合EpCAM的第二和另外的抗原结合位点是Fab片段。

40. 根据权利要求36或37所述的蛋白质,其中所述结合EpCAM的第二和另外的抗原结合位点是scFv。

41. 根据权利要求36-40中任一项所述的蛋白质,其中所述结合NKG2D的scFv的重链可变结构域位于所述scFv的轻链可变结构域的N-端或C-端处。

42. 根据权利要求41所述的蛋白质,其中所述轻链可变结构域位于所述结合NKG2D的scFv的重链可变结构域的N-端处。

43. 根据权利要求36-42中任一项所述的蛋白质,其中所述结合到NKG2D的scFv被连接到所述抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分或结合CD16的第三抗原结合位点。

44. 根据权利要求43所述的蛋白质,其中所述结合到NKG2D的scFv通过包含Ala-Ser或Gly-Ala-Ser的铰链连接到所述抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分或结合CD16的第三

抗原结合位点。

45. 根据权利要求43所述的蛋白质,其中所述结合到NKG2D的scFv通过包含SGSGGGGS (SEQ ID NO:207) 的柔性连接物连接到所述抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分或结合CD16的第三抗原结合位点的C-端。

46. 根据权利要求45所述的蛋白质,其中所述抗体Fc结构域的C-端被连接到所述结合NKG2D的scFv的轻链可变结构域的N-端。

47. 根据权利要求36-46中任一项所述的蛋白质,其中在所述结合NKG2D的scFv内,二硫桥在所述scFv的重链可变结构域与所述scFv的轻链可变结构域之间形成。

48. 根据权利要求47所述的蛋白质,其中所述二硫桥在来自于所述重链可变结构域的C44与来自于所述轻链可变结构域的C100之间形成。

49. 根据权利要求36-48中任一项所述的蛋白质,其中在所述结合NKG2D的scFv内,所述重链可变结构域通过柔性连接物连接到所述轻链可变结构域。

50. 根据权利要求49所述的蛋白质,其中所述柔性连接物包含  $(\text{GlyGlyGlyGlySer})_4 ((\text{GlyGlyGlyGlySer}))_4$ 。

51. 根据权利要求40至50中任一项所述的蛋白质,其中所述第二和另外的抗原结合位点scFv通过包含Ala-Ser的铰链连接到所述抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分或所述结合CD16的第三抗原结合位点。

52. 根据权利要求40至51中任一项所述的蛋白质,其中所述第二和另外的抗原结合位点scFv通过包含Ala-Ser的铰链连接到所述抗体Fc结构域。

53. 根据权利要求51或52所述的蛋白质,其中二硫桥在所述第二抗原结合位点和/或另外的抗原结合位点的重链可变结构域与轻链可变结构域之间形成。

54. 根据权利要求53所述的蛋白质,其中所述二硫桥形成在来自于所述重链可变结构域的C44与来自于所述轻链可变结构域的C100之间。

55. 根据权利要求36至54中任一项所述的蛋白质,其中所述结合NKG2D的scFv包含位于重链可变结构域的N-端处的轻链可变结构域,其中所述轻链可变结构域通过柔性连接物  $(\text{GlyGlyGlyGlySer})_4 ((\text{GlyGlyGlyGlySer}))_4$  连接到所述scFv的重链可变结构域,并且所述结合NKG2D的scFv通过包含Ala-Ser或Gly-Ala-Ser的铰链连接到所述抗体Fc结构域。

56. 一种蛋白质,其包含SEQ ID NO:203的氨基酸序列。

57. 一种蛋白质,其包含SEQ ID NO:203和SEQ ID NO:204的氨基酸序列。

58. 一种蛋白质,其包含与SEQ ID NO:203的氨基酸序列至少90%同一性的氨基酸序列。

59. 一种蛋白质,其包含与SEQ ID NO:203的氨基酸序列至少95%同一性的氨基酸序列。

60. 一种蛋白质,其包含与SEQ ID NO:203的氨基酸序列至少99%同一性的氨基酸序列。

61. 根据前述权利要求任一项所述的蛋白质,其中所述第一抗原结合位点包含与选自下述的氨基酸序列至少90%同一性的重链可变结构域:SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:85和SEQ ID NO:93。

62. 根据权利要求1-60中任一项所述的蛋白质,其中所述第一抗原结合位点包含与SEQ ID NO:41至少90%同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:42至少90%同一性的轻链可变结构域。

63. 根据权利要求1-60中任一项所述的蛋白质,其中所述第一抗原结合位点包含与SEQ ID NO:49至少90%同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:50至少90%同一性的轻链可变结构域。

64. 根据权利要求1-60中任一项所述的蛋白质,其中所述第一抗原结合位点包含与SEQ ID NO:57至少90%同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:58至少90%同一性的轻链可变结构域。

65. 根据权利要求1-60中任一项所述的蛋白质,其中所述第一抗原结合位点包含与SEQ ID NO:59至少90%同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:60至少90%同一性的轻链可变结构域。

66. 根据权利要求1-60中任一项所述的蛋白质,其中所述第一抗原结合位点包含与SEQ ID NO:61至少90%同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:62至少90%同一性的轻链可变结构域。

67. 根据权利要求1-60中任一项所述的蛋白质,其中所述第一抗原结合位点包含与SEQ ID NO:69至少90%同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:70至少90%同一性的轻链可变结构域。

68. 根据权利要求1-60中任一项所述的蛋白质,其中所述第一抗原结合位点包含与SEQ ID NO:77至少90%同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:78至少90%同一性的轻链可变结构域。

69. 根据权利要求1-60中任一项所述的蛋白质,其中所述第一抗原结合位点包含与SEQ ID NO:85至少90%同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:86至少90%同一性的轻链可变结构域。

70. 根据权利要求1-60中任一项所述的蛋白质,其中所述第一抗原结合位点包含与SEQ ID NO:93至少90%同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:94至少90%同一性的轻链可变结构域。

71. 根据权利要求1-60中任一项所述的蛋白质,其中所述第一抗原结合位点包含与SEQ ID NO:101至少90%同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:102至少90%同一性的轻链可变结构域。

72. 根据权利要求1-60中任一项所述的蛋白质,其中所述第一抗原结合位点包含与SEQ ID NO:103至少90%同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:104至少90%同一性的轻链可变结构域。

73. 权利要求1-10中任一项所述的蛋白质,其中所述第一抗原结合位点是单域抗体。

74. 权利要求73所述的蛋白质,其中所述单域抗体是V<sub>H</sub>片段或V<sub>NAR</sub>片段。

75. 权利要求1-10或73-74中任一项所述的蛋白质,其中所述第二抗原结合位点包含重链可变结构域和轻链可变结构域。

76. 权利要求75所述的蛋白质,其中所述第二抗原结合位点的重链可变结构域和轻链可变结构域存在于同一多肽上。

77. 权利要求1、2或61-72中任一项所述的蛋白质,其中所述第二抗原结合位点结合EpCAM,所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:115至少90%同一性的氨基酸序列,并且所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:119至少90%同一性的氨基酸序列。

78. 权利要求77所述的蛋白质,其中所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含的氨基酸序列包括:

- 与SEQ ID NO:116的氨基酸序列相同的重链CDR1序列;
- 与SEQ ID NO:117的氨基酸序列相同的重链CDR2序列;和
- 与SEQ ID NO:118的氨基酸序列相同的重链CDR3序列。

79. 权利要求78所述的蛋白质,其中所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含的氨基酸序列包括:

- 与SEQ ID NO:120的氨基酸序列相同的轻链CDR1序列;
- 与SEQ ID NO:121的氨基酸序列相同的轻链CDR2序列;和
- 与SEQ ID NO:122的氨基酸序列相同的轻链CDR3序列。

80. 权利要求1、2或61-72中任一项所述的蛋白质,其中所述第二抗原结合位点结合EpCAM,所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:123至少90%同一性的氨基酸序列,并且所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:127至少90%同一性的氨基酸序列。

81. 权利要求80所述的蛋白质,其中所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含的氨基酸序列包括:

- 与SEQ ID NO:124的氨基酸序列相同的重链CDR1序列;
- 与SEQ ID NO:125的氨基酸序列相同的重链CDR2序列;和
- 与SEQ ID NO:126的氨基酸序列相同的重链CDR3序列。

82. 根据权利要求81所述的蛋白质,其中所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含的氨基酸序列包括:

- 与SEQ ID NO:128的氨基酸序列相同的轻链CDR1序列;
- 与SEQ ID NO:129的氨基酸序列相同的轻链CDR2序列;和
- 与SEQ ID NO:130的氨基酸序列相同的轻链CDR3序列。

83. 权利要求1、2或61-72中任一项所述的蛋白质,其中所述第二抗原结合位点结合EpCAM,所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:131至少90%同一性的氨基酸序列,并且所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:135至少90%同一性的氨基酸序列。

84. 权利要求83所述的蛋白质,其中所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含的氨基酸序列包括:

- 与SEQ ID NO:132的氨基酸序列相同的重链CDR1序列;
- 与SEQ ID NO:133的氨基酸序列相同的重链CDR2序列;和
- 与SEQ ID NO:134的氨基酸序列相同的重链CDR3序列。

85. 权利要求84所述的蛋白质,其中所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含的氨基酸序列包括:

与SEQ ID NO:136的氨基酸序列相同的轻链CDR1序列；  
与SEQ ID NO:137的氨基酸序列相同的轻链CDR2序列；和  
与SEQ ID NO:138的氨基酸序列相同的轻链CDR3序列。

86. 权利要求1、2或61-72中任一项所述的蛋白质，其中所述第二抗原结合位点结合EpCAM，所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:139至少90%同一性的氨基酸序列，并且所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:143至少90%同一性的氨基酸序列。

87. 权利要求86所述的蛋白质，其中所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含的氨基酸序列包括：

与SEQ ID NO:140的氨基酸序列相同的重链CDR1序列；  
与SEQ ID NO:141的氨基酸序列相同的重链CDR2序列；和  
与SEQ ID NO:142的氨基酸序列相同的重链CDR3序列。

88. 权利要求87所述的蛋白质，其中所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含的氨基酸序列包括：

与SEQ ID NO:144的氨基酸序列相同的轻链CDR1序列；  
与SEQ ID NO:145的氨基酸序列相同的轻链CDR2序列；和  
与SEQ ID NO:146的氨基酸序列相同的轻链CDR3序列。

89. 权利要求1、3或61-72中任一项所述的蛋白质，其中所述第二抗原结合位点结合CA125，所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:155至少90%同一性的氨基酸序列，并且所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:159至少90%同一性的氨基酸序列。

90. 权利要求1、3或61-72中任一项所述的蛋白质，其中所述第二抗原结合位点结合CA125，所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:163至少90%同一性的氨基酸序列，并且所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:167至少90%同一性的氨基酸序列。

91. 权利要求1、4或61-72中任一项所述的蛋白质，其中所述第二抗原结合位点结合NaPi2b，所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:171至少90%同一性的氨基酸序列，并且所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:175至少90%同一性的氨基酸序列。

92. 权利要求1、5或61-72中任一项所述的蛋白质，其中所述第二抗原结合位点结合结合素4，所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:179至少90%同一性的氨基酸序列，并且所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:183至少90%同一性的氨基酸序列。

93. 权利要求1、6或61-72中任一项所述的蛋白质，其中所述第二抗原结合位点结合岩藻糖基-GM1，所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:187至少90%同一性的氨基酸序列，并且所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:191至少90%同一性的氨基酸序列。

94. 权利要求1、7或61-72中任一项所述的蛋白质，其中所述第二抗原结合位点结合SLC44A4，所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:195至少90%同一性

的氨基酸序列，并且所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:199至少90%同一性的氨基酸序列。

95. 根据权利要求1-94中任一项所述的蛋白质，其中所述抗体Fc结构域包含人类IgG1抗体的铰链和CH2结构域。

96. 权利要求95所述的蛋白质，其中所述Fc结构域包含与人类IgG1抗体的第234-332位氨基酸至少90%同一性的氨基酸序列。

97. 权利要求96所述的蛋白质，其中所述Fc结构域包含与人类IgG1的Fc结构域至少90%同一性的氨基酸序列，并在选自Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411、K439的一个或多个位置处有差异。

98. 根据权利要求1-96中任一项所述的蛋白质，其中所述蛋白质以10nM的K<sub>D</sub>或更弱的亲和力结合到NKG2D。

99. 一种剂型，其包含根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质和可药用载体。

100. 一种细胞，其包含表达根据权利要求1-98中任一项所述的蛋白质的一种或多种核酸。

101. 一种直接和/或间接增加肿瘤细胞死亡的方法，所述方法包括将肿瘤和自然杀伤细胞暴露于根据权利要求1-98中任一项所述的蛋白质。

102. 一种治疗癌症的方法，其中所述方法包括向患者施用根据权利要求1-98中任一项所述的蛋白质或根据权利要求99所述的剂型。

103. 权利要求102所述的方法，其中当所述第二结合位点结合EpCAM时，所述癌症选自头颈部癌、卵巢癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胃癌、肝癌、食道癌和肺癌。

## 结合NKG2D、CD16和肿瘤相关抗原的蛋白质

[0001] 本申请是申请日为2018年9月7日、申请号为201880071464.8、发明名称为“结合NKG2D、CD16和结合素4的蛋白质”的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 与相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2017年9月7日提交的美国临时专利申请号62/555,110和2017年10月2日提交的美国临时专利申请号62/566,824的利益和优先权，每个所述临时申请的全部公开内容为所有目的整体通过引用并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有以ASCII格式电子提交并整体通过引用并入本文的序列表。所述在2018年9月6日生成的ASCII拷贝被命名为DFY-038W0\_SL.txt，大小为321,395字节。

### 技术领域

[0006] 本发明涉及结合到NKG2D、CD16和肿瘤相关抗原的多特异性结合蛋白。

### 背景技术

[0007] 尽管在文献中已报道了治疗癌症的大量研究尝试和科学进展，但这种疾病依然是显著的健康问题。一些最频繁被诊断到的癌症包括前列腺癌、乳腺癌、肺癌和结肠直肠癌。前列腺癌是男性中最常见的癌症形式。乳腺癌仍然是女性中主导的死亡原因。血液和骨髓癌症、包括多发性骨髓瘤、白血病和淋巴瘤，也是频繁被诊断到的癌症类型。当前用于这些癌症的治疗选项不对所有患者有效和/或可能具有实质性严重副作用。其他类型的癌症对于使用现有治疗选项治疗来说也仍然具有挑战性。

[0008] 癌症免疫疗法是理想的，因为它们是高度特异性的并且可以使用患者自己的免疫系统来促进癌细胞的破坏。融合蛋白例如双特异性T-细胞衔接器是文献中描述的结合到肿瘤细胞和T-细胞以促进肿瘤细胞破坏的癌症免疫疗法。结合到某些肿瘤相关抗原和结合到某些免疫细胞的抗体在文献中已有描述。参见例如WO 2016/134371和WO 2015/095412。

[0009] 自然杀伤(NK)细胞是先天性免疫系统的组成部分，占循环淋巴细胞的大约15%。NK细胞事实上浸润所有组织，并且最初因它们不需前期致敏即可杀伤肿瘤细胞的能力而被表征。激活的NK细胞通过与细胞毒性T细胞相似的手段杀伤靶细胞，即通过含有穿孔素和颗粒酶的细胞溶解颗粒以及通过死亡受体途径。激活的NK细胞还分泌炎性细胞因子例如IFN- $\gamma$ 和促进其他白细胞向靶组织的召集的趋化因子。

[0010] NK细胞通过它们表面上的各种不同激活和抑制受体对信号做出响应。例如，当NK细胞遇到健康的自体细胞时，它们的活性通过杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的激活而被抑制。或者，当NK细胞遇到外来细胞或癌细胞时，它们通过它们的激活受体(例如自然杀伤细胞表面活性受体2族成员D(NKG2D)、NCR、DNAM1)而被激活。NK细胞也通过它们表面上的CD16受体被某些免疫球蛋白的恒定区激活。NK细胞对激活的总体灵敏度取决于刺激性和抑制性信号的总和。

[0011] 上皮细胞粘附分子(EpCAM)是一种跨膜糖蛋白，其介导上皮细胞中Ca<sup>2+</sup>不依赖性同

型细胞-细胞粘附。EpCAM还参与细胞信号传导、迁移、增殖和分化。此外,EpCAM通过它上调c-myc、e-fabp和细胞周期蛋白A和E的能力而具有致癌潜力。由于EpCAM只在上皮和上皮来源的赘生物中表达,因此EpCAM可以作为诊断标志物用于各种不同的癌症,例如头颈部癌、卵巢癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胃癌、肝癌、食道癌和肺癌。它似乎在肿瘤发生和癌的转移中发挥作用,因此它还可以充当潜在的预后标志物并充当免疫治疗策略的潜在靶标。

[0012] CA125,也被称为粘蛋白16,是粘蛋白家族糖蛋白的成员。已发现CA-125用作肿瘤标志物或生物标志物,其在某些患有特定类型的癌症包括卵巢癌、子宫内膜癌和胰腺癌的患者的血液中可能升高。已显示,CA-125通过几种不同的机制在促进肿瘤发生和肿瘤增殖中发挥作用,所述机制包括抑制自然杀伤细胞的响应,从而保护癌细胞免受免疫应答影响;以及通过使细胞生长和促进细胞运动。

[0013] 钠依赖性磷酸盐转运蛋白2b (Sodium-dependent phosphate transport protein2b, NaPi2b) 参与通过Na<sup>+</sup>共转运将磷酸盐主动转运到细胞中。例如,它是肠刷状缘膜中的主要磷酸盐转运蛋白,并在肺泡中表面活性剂的合成中有作用。NaPi2b还是在各种不同癌症例如肺癌、卵巢癌和甲状腺癌中表达的抗原。

[0014] 结合素4(Nectin4)是结合素家族的成员,所述结合素家族是一个参与Ca<sup>2+</sup>不依赖性细胞粘附的细胞粘附分子家族。结合素广泛地表达,并在大范围的组织例如上皮的黏着连接或神经元组织的化学突触中具有粘附作用。它也是一种肿瘤相关抗原,并在诸如膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、结肠直肠癌和肺癌的癌症中表达。

[0015] 已暗示神经节苷脂通过调节细胞信号传导过程以及细胞与细胞和细胞与基质的相互作用两者而参与了许多生理过程,包括生长、分化、迁移和凋亡。GM1是一种神经节苷脂,并且岩藻糖基-GM1是具有独特结构的神经节苷脂,其中末端半乳糖在非还原端被α-1,2-岩藻糖基化。它在很少的正常组织中表达,但在各种不同的癌症中例如在小细胞肺癌、成神经细胞瘤、肝癌中出现。因此,岩藻糖基-GM1已被认为是小细胞肺癌、成神经细胞瘤、肝癌的抗体免疫疗法中的肿瘤标志物和靶抗原的候选者。

[0016] ADAM(去整合蛋白和金属蛋白酶)蛋白在膜结合分子的蛋白质胞外域脱落中起主要作用。它们已成为发育和体内平衡过程中细胞信号传导的关键调节剂,并且据信会导致病理改变,例如癌症,其调节被改变。ADAM8是ADAM家族的成员,在胰腺癌、乳腺癌、肺癌和肾癌中过表达。ADAM9已显示切割并释放许多在肿瘤发生和血管生成中具有重要作用的分子,例如EGF、FGFR2iiib、Tie-2、Flk-1、EphB4、CD40、VCAM-1和VE-钙粘蛋白。ADAM9在肾癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、黑素瘤、宫颈癌、前列腺癌、骨肉瘤和脑癌中过表达。

[0017] SLC44A4也称为CTL4,是称为胆碱转运蛋白样蛋白的溶质载体蛋白家族的成员(CTL1-5)。尚未显示SLC44A4参与胆碱转运,但它已与乙酰胆碱的合成和转运以及维生素B1的磷酸化形式焦磷酸硫胺素的摄取相关联。SLC44A4通常在分泌型上皮细胞的顶表面上表达,但它在各种不同的上皮肿瘤尤其是胰腺癌、前列腺癌和胃癌中被显著上调。

[0018] CA19-9是糖类抗原唾液酸基路易斯a的通用术语。它在诸如胰腺癌、结肠直肠癌、胆管癌和肝癌的消化器官癌症中过表达。因此,它是最常用于诊断上述这些癌症的血清肿瘤标志物。

## 发明内容

[0019] 本发明提供了结合到肿瘤相关抗原(选自表11中提供的抗原中的任一者)并结合到自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体的多特异性结合蛋白。这些蛋白质可以结合超过一种NK激活受体，并且可以阻断天然配体与NKG2D的结合。在某些实施方式中，所述蛋白质可以在人类和其他物种例如啮齿动物和食蟹猴中激动NK细胞。本发明的各个不同方面和实施方式将在下文中更详细描述。

[0020] 因此，本发明的一个方面提供了一种蛋白质，其包含：结合NKG2D的第一抗原结合位点；结合选自EpCAM、癌抗原125(CA125)、钠/磷酸盐共转运蛋白2B(NaPi2b)、结合素细胞粘附分子4(结合素4)、岩藻糖基-GM1(单唾液酰四己糖基神经节苷脂)、含去整合蛋白和金属蛋白酶结构域蛋白8(ADAM8)、含去整合蛋白和金属蛋白酶结构域蛋白9(ADAM9)、溶质载体家族44成员4(SLC44A4)和唾液酸化路易斯a抗原(CA19-9)的抗原的第二抗原结合位点；和抗体Fc结构域、其足以结合CD16的部分或结合CD16的第三抗原结合位点。所述抗原结合位点可以各自包含抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域(例如像在抗体中那样排列或融合在一起以形成scFv)，或者一个或多个所述抗原结合位点可以是单域抗体，例如V<sub>H</sub><sup>H</sup>抗体如骆驼抗体或V<sub>NAR</sub>抗体如在软骨鱼中发现的。

[0021] 本发明提供了结合NKG2D受体、CD16和选自下述的抗原的多特异性结合蛋白：EpCAM，癌抗原125(CA125)，钠/磷酸盐共转运蛋白2B(NaPi2b)，结合素细胞粘附分子4(结合素4)，岩藻糖基-GM1(单唾液酰四己糖基神经节苷脂)，含去整合蛋白和金属蛋白酶结构域蛋白8(ADAM8)，含去整合蛋白和金属蛋白酶结构域蛋白9(ADAM9)，溶质载体家族44成员4(SLC44A4)和唾液酸化路易斯a抗原(CA19-9)。

[0022] 本公开的某些蛋白质包括连接到所述抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分或所述结合CD16的第三抗原结合位点的Fab片段。

[0023] 本公开的某些蛋白质包括Fab片段，其中所述Fab片段的重链部分包含重链可变结构域和CH1结构域，并且其中所述重链可变结构域被连接到所述CH1结构域。

[0024] 本公开的某些蛋白质包括连接到所述抗体Fc结构域的Fab片段。

[0025] 一方面，本发明提供了一种蛋白质，其包含：(a)第一抗原结合位点，其包含结合NKG2D的Fab片段；(b)第二抗原结合位点，其包含结合EpCAM的单链可变片段(scFv)；和(c)抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分，或结合CD16的第三抗原结合位点。本发明提供了一种蛋白质，其中所述结合NKG2D的第一抗原结合位点是Fab片段，并且所述结合肿瘤相关抗原EpCAM的第二抗原结合位点是scFv。

[0026] 本公开中描述的某些蛋白质包括靶向EpCAM的scFv，其包含重链可变结构域和轻链可变结构域，并通过包含Ala-Ser或Gly-Ala-Ser的铰链连接到抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分或所述结合CD16的第三抗原结合位点。本公开的某些蛋白质包括连接到抗体Fc结构域的靶向EpCAM的scFv。本公开的某些蛋白质包括靶向EpCAM的scFv的重链可变结构域，其与所述scFv的轻链可变结构域形成二硫桥。

[0027] 本公开的某些蛋白质包括靶向EpCAM的scFv，其中二硫桥在来自于所述重链可变结构域的C44与来自于所述轻链可变结构域的C100之间形成。

[0028] 本公开的某些蛋白质包括连接到抗体Fc结构域的靶向EpCAM的scFv，其中所述scFv的轻链可变结构域位于所述scFv的重链可变结构域的N-端处，并通过柔性连接物

(GlyGlyGlyGlySer)<sub>4</sub>((G4S)<sub>4</sub>) (SEQ ID NO:206) 连接到所述scFv的重链可变结构域，并且所述结合NKG2D的Fab片段被连接到所述抗体Fc结构域。

[0029] 本公开的某些蛋白质包括靶向EpCAM的scFv，其中所述重链可变结构域位于所述scFv的轻链可变结构域的N-端或C-端处。

[0030] 本公开的某些蛋白质包括靶向EpCAM的scFv，其中所述轻链可变结构域位于所述scFv的重链可变结构域的N-端处。

[0031] 在本发明的一个方面中提供了一种蛋白质，其包含：(a) 包含结合NKG2D的单链可变片段(scFv)的第一抗原结合位点；(b) 结合EpCAM的第二抗原结合位点；和(c) 抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分或结合CD16的第三抗原结合位点。在某些实施方式中，本公开的蛋白质还包含结合EpCAM的另外的抗原结合位点。在某些实施方式中，本公开中描述的蛋白质的所述第二抗原结合位点是结合EpCAM的Fab片段。在某些实施方式中，本公开中描述的蛋白质的所述第二和另外的抗原结合位点是结合EpCAM的Fab片段。

[0032] 在某些实施方式中，本公开中描述的蛋白质的所述第二和另外的抗原结合位点是结合EpCAM的scFv。在某些实施方式中，所述结合NKG2D的scFv的重链可变结构域位于所述scFv的轻链可变结构域的N-端或C-端处。在某些实施方式中，所述轻链可变结构域位于所述结合NKG2D的scFv的重链可变结构域的N-端处。

[0033] 在某些实施方式中，所述结合到NKG2D的scFv被连接到所述抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分或结合CD16的第三抗原结合位点。在某些实施方式中，所述结合到NKG2D的scFv通过包含Ala-Ser(例如在包含结合EpCAM、CA125、NaPi2b、结合素4、岩藻糖基-GM1、ADAM8、ADAM9、SLC44A4或CA19-9的另外的抗原结合位点的TriNKET中)或Gly-Ala-Ser(例如在不包含结合EpCAM、CA125、NaPi2b、结合素4、岩藻糖基-GM1、ADAM8、ADAM9、SLC44A4或CA19-9的另外的抗原结合位点的TriNKET中)的铰链，被连接到所述抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分或结合CD16的第三抗原结合位点。在某些实施方式中，所述结合到NKG2D的scFv通过包含G4S的柔性连接物连接到所述抗体Fc结构域或其足以结合CD16的部分或结合CD16的第三抗原结合位点的C-端。在某些实施方式中，所述抗体Fc结构域的C-端被连接到所述结合NKG2D的scFv的轻链可变结构域的N-端。

[0034] 在某些实施方式中，在所述结合NKG2D的scFv内，二硫桥在所述scFv的重链可变结构域与所述scFv的轻链可变结构域之间形成。在某些实施方式中，所述二硫桥形成在来自于所述重链可变结构域的C44与来自于所述轻链可变结构域的C100之间。

[0035] 本公开的某些蛋白质包括选自SEQ ID NO:210和SEQ ID NO:211的序列。

[0036] 本公开的某些蛋白质包括连接到抗体Fc结构域的scFv，其中所述连接到抗体Fc结构域的scFv由选自SEQ ID NO:208和SEQ ID NO:209的序列表示。

[0037] 本公开的某些蛋白质包括SEQ ID NO:205和SEQ ID NO:213的序列。

[0038] 本公开的某些蛋白质包括与选自SEQ ID NO:210和SEQ ID NO:211的氨基酸序列至少90%同一性的序列。

[0039] 本公开的某些蛋白质包括与选自SEQ ID NO:210和SEQ ID NO:211的氨基酸序列至少95%同一性的序列。

[0040] 本公开的某些蛋白质包括与选自SEQ ID NO:210和SEQ ID NO:211的氨基酸序列至少99%同一性的序列。

[0041] 本公开的某些蛋白质包括SEQ ID NO:203的氨基酸序列。

[0042] 本公开的某些蛋白质包括SEQ ID NO:203和SEQ ID NO:204的氨基酸序列。

[0043] 本公开的某些蛋白质包括与SEQ ID NO:203的氨基酸序列至少90%同一性的氨基酸序列。本公开的某些蛋白质包括与SEQ ID NO:203的氨基酸序列至少95%同一性的氨基酸序列。本公开的某些蛋白质包括与SEQ ID NO:203的氨基酸序列至少99%同一性的氨基酸序列。

[0044] 在某些实施方式中,所述结合到NKG2D的第一抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:1相关的重链可变结构域,例如通过具有与SEQ ID NO:1至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列,和/或包含与SEQ ID NO:1的CDR1 (SEQ ID NO:105)、CDR2 (SEQ ID NO:106) 和CDR3 (SEQ ID NO:107) 序列相同的氨基酸序列。所述与SEQ ID NO:1相关的重链可变结构域可以与各种不同的轻链可变结构域偶联,以形成NKG2D结合位点。例如,所述包含与SEQ ID NO:1相关的重链可变结构域的第一抗原结合位点还可以包含选自与SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38和40相关的序列中的任一者的轻链可变结构域。例如,所述第一抗原结合位点包含具有与SEQ ID NO:1至少90% (例如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,和具有与选自SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38和40的序列中的任一者至少90% (例如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。

[0045] 可选地,所述第一抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:41相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:42相关的轻链可变结构域。例如,所述第一抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:41至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:41的CDR1 (SEQ ID NO:43)、CDR2 (SEQ ID NO:44) 和CDR3 (SEQ ID NO:45) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:42至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:42的CDR1 (SEQ ID NO:46)、CDR2 (SEQ ID NO:47) 和CDR3 (SEQ ID NO:48) 序列相同的氨基酸序列。

[0046] 在其他实施方式中,所述第一抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:49相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:50相关的轻链可变结构域。例如,所述第一抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:49至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:49的CDR1 (SEQ ID NO:51)、CDR2 (SEQ ID NO:52) 和CDR3 (SEQ ID NO:53) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:50至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:50的CDR1 (SEQ ID NO:54)、CDR2 (SEQ ID NO:55) 和CDR3 (SEQ ID NO:56) 序列相同的氨基酸序列。

[0047] 可选地,所述第一抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:57相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:58相关的轻链可变结构域,例如通过具有分别与SEQ ID NO:57至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性和与SEQ

ID NO:58至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列。

[0048] 在另一个实施方式中,所述第一抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:59相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:60相关的轻链可变结构域,例如,所述第一抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:59至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:59的CDR1 (SEQ ID NO:109)、CDR2 (SEQ ID NO:110) 和 CDR3 (SEQ ID NO:111) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:60至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:60的CDR1 (SEQ ID NO:112)、CDR2 (SEQ ID NO:113) 和 CDR3 (SEQ ID NO:114) 序列相同的氨基酸序列。

[0049] 在某些实施方式中,所述结合到NKG2D的第一抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:61相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:62相关的轻链可变结构域。例如,所述第一抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:61至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:61的CDR1 (SEQ ID NO:63)、CDR2 (SEQ ID NO:64) 和 CDR3 (SEQ ID NO:65) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:62至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:62的CDR1 (SEQ ID NO:66)、CDR2 (SEQ ID NO:67) 和 CDR3 (SEQ ID NO:68) 序列相同的氨基酸序列。

[0050] 在某些实施方式中,所述第一抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:69相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:70相关的轻链可变结构域。例如,所述第一抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:69至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:69的CDR1 (SEQ ID NO:71)、CDR2 (SEQ ID NO:72) 和 CDR3 (SEQ ID NO:73) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:70至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:70的CDR1 (SEQ ID NO:74)、CDR2 (SEQ ID NO:75) 和 CDR3 (SEQ ID NO:76) 序列相同的氨基酸序列。

[0051] 在某些实施方式中,所述第一抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:77相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:78相关的轻链可变结构域。例如,所述第一抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:77至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:77的CDR1 (SEQ ID NO:79)、CDR2 (SEQ ID NO:80) 和 CDR3 (SEQ ID NO:81) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:78至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:78的CDR1 (SEQ ID NO:82)、CDR2 (SEQ ID NO:83) 和 CDR3 (SEQ ID NO:84) 序列相同的氨基酸序列。

[0052] 在某些实施方式中,所述第一抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:85相关的重链

可变结构域和与SEQ ID NO:86相关的轻链可变结构域。例如,所述第一抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:85至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:85的CDR1 (SEQ ID NO:87)、CDR2 (SEQ ID NO:88) 和CDR3 (SEQ ID NO:89) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:86至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:86的CDR1 (SEQ ID NO:90)、CDR2 (SEQ ID NO:91) 和CDR3 (SEQ ID NO:92) 序列相同的氨基酸序列。

[0053] 在某些实施方式中,所述第一抗原结合位点可以包含与相关的重链可变结构域 SEQ ID NO:93和与相关的轻链可变结构域SEQ ID NO:94. 例如,所述第一抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:93至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:93的CDR1 (SEQ ID NO:95)、CDR2 (SEQ ID NO:96) 和CDR3 (SEQ ID NO:97) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:94至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:94的CDR1 (SEQ ID NO:98)、CDR2 (SEQ ID NO:99) 和CDR3 (SEQ ID NO:100) 序列相同的氨基酸序列。

[0054] 在某些实施方式中,所述第一抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:101相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:102相关的轻链可变结构域,例如通过具有分别与SEQ ID NO:101至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性和与SEQ ID NO:102至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列。

[0055] 在某些实施方式中,所述第一抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:103相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:104相关的轻链可变结构域,例如通过具有分别与SEQ ID NO:103至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性和与SEQ ID NO:104至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列。

[0056] 在某些实施方式中,所述第二抗原结合位点可以结合到EpCAM,并且可以包含与SEQ ID NO:115相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:119相关的轻链可变结构域。例如,所述第二抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:115至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:115的CDR1 (SEQ ID NO:116)、CDR2 (SEQ ID NO:117) 和CDR3 (SEQ ID NO:118) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:119至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:119的CDR1 (SEQ ID NO:120)、CDR2 (SEQ ID NO:121) 和CDR3 (SEQ ID NO:122) 序列相同的氨基酸序列。

[0057] 在某些实施方式中,所述第二抗原结合位点可以结合到EpCAM,并且可以包含与SEQ ID NO:123相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:127相关的轻链可变结构域。例如,所述第二抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:123至少90% (例如90%、

91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:123的CDR1 (SEQ ID NO:124)、CDR2 (SEQ ID NO:125) 和CDR3 (SEQ ID NO:126) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:127至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:127的CDR1 (SEQ ID NO:128)、CDR2 (SEQ ID NO:129) 和CDR3 (SEQ ID NO:130) 序列相同的氨基酸序列。

[0058] 在某些实施方式中,所述第二抗原结合位点可以结合到EpCAM,并且可以包含与SEQ ID NO:131相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:135相关的轻链可变结构域。例如,所述第二抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:131至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:131的CDR1 (SEQ ID NO:132)、CDR2 (SEQ ID NO:133) 和CDR3 (SEQ ID NO:134) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:135至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:135的CDR1 (SEQ ID NO:136)、CDR2 (SEQ ID NO:137) 和CDR3 (SEQ ID NO:138) 序列相同的氨基酸序列。

[0059] 在某些实施方式中,所述第二抗原结合位点可以结合到EpCAM,并且可以包含与SEQ ID NO:139相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:143相关的轻链可变结构域。例如,所述第二抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:139至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:139的CDR1 (SEQ ID NO:140)、CDR2 (SEQ ID NO:141) 和CDR3 (SEQ ID NO:142) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:143至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:143的CDR1 (SEQ ID NO:144)、CDR2 (SEQ ID NO:145) 和CDR3 (SEQ ID NO:146) 序列相同的氨基酸序列。

[0060] 在某些实施方式中,所述第二抗原结合位点可以结合到CA125,并且可以包含与SEQ ID NO:155相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:159相关的轻链可变结构域。例如,所述第二抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:155至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:155的CDR1 (SEQ ID NO:156)、CDR2 (SEQ ID NO:157) 和CDR3 (SEQ ID NO:158) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:159至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:159的CDR1 (SEQ ID NO:160)、CDR2 (SEQ ID NO:161) 和CDR3 (SEQ ID NO:162) 序列相同的氨基酸序列。

[0061] 在某些实施方式中,所述第二抗原结合位点可以结合到CA125,并且可以包含与SEQ ID NO:163相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:167相关的轻链可变结构域。例如,所述第二抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:163至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:163的CDR1 (SEQ ID NO:164)、CDR2 (SEQ ID NO:165) 和CDR3 (SEQ ID NO:166) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:167至

少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:167的CDR1 (SEQ ID NO:168)、CDR2 (SEQ ID NO:169) 和CDR3 (SEQ ID NO:170) 序列相同的氨基酸序列。

[0062] 在某些实施方式中,所述第二抗原结合位点可以结合到NaPi2b,并且可以包含与SEQ ID NO:171相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:175相关的轻链可变结构域。例如,所述第二抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:171至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:171的CDR1 (SEQ ID NO:172)、CDR2 (SEQ ID NO:173) 和CDR3 (SEQ ID NO:174) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:175至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:175的CDR1 (SEQ ID NO:176)、CDR2 (SEQ ID NO:177) 和CDR3 (SEQ ID NO:178) 序列相同的氨基酸序列。

[0063] 在某些实施方式中,所述第二抗原结合位点可以结合到结合素4,并且可以包含与SEQ ID NO:179相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:183相关的轻链可变结构域。例如,所述第二抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:179至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:179的CDR1 (SEQ ID NO:180)、CDR2 (SEQ ID NO:181) 和CDR3 (SEQ ID NO:182) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:183至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:183的CDR1 (SEQ ID NO:184)、CDR2 (SEQ ID NO:185) 和CDR3 (SEQ ID NO:186) 序列相同的氨基酸序列。

[0064] 在某些实施方式中,所述第二抗原结合位点可以结合到岩藻糖基-GM1,并且可以包含与SEQ ID NO:187相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:191相关的轻链可变结构域。例如,所述第二抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:187至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:187的CDR1 (SEQ ID NO:188)、CDR2 (SEQ ID NO:189) 和CDR3 (SEQ ID NO:190) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:191至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:191的CDR1 (SEQ ID NO:192)、CDR2 (SEQ ID NO:193) 和CDR3 (SEQ ID NO:194) 序列相同的氨基酸序列。

[0065] 在某些实施方式中,所述第二抗原结合位点可以结合到SLC44A4,并且可以包含与SEQ ID NO:195相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:199相关的轻链可变结构域。例如,所述第二抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:195至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:195的CDR1 (SEQ ID NO:196)、CDR2 (SEQ ID NO:197) 和CDR3 (SEQ ID NO:198) 序列相同的氨基酸序列。同样地,所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:199至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,和/或包含与SEQ ID NO:199的CDR1 (SEQ ID NO:200)、CDR2 (SEQ ID NO:201) 和CDR3 (SEQ ID NO:202) 序列相同的氨基酸序列。

[0066] 在某些实施方式中,所述第二抗原结合位点包含与所述第一抗原结合位点中存在的轻链可变结构域的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

[0067] 在某些实施方式中,所述蛋白质包含抗体Fc结构域的足以结合CD16的部分,其中所述抗体Fc结构域包含铰链和CH2结构域,和/或与人类IgG抗体的第234-332位氨基酸序列至少90%同一性的氨基酸序列。

[0068] 本公开的某些蛋白质以10nM的 $K_D$ 或更弱的亲和力结合到NKG2D。

[0069] 还提供了含有这些蛋白质之一的剂型,含有表达这些蛋白质的一种或多种核酸的细胞,和使用这些蛋白质增加肿瘤细胞死亡的方法。

[0070] 本发明的另一方面提供了一种在患者中治疗癌症的方法。所述方法包括向需要的患者施用治疗有效量的本文中描述的多特异性结合蛋白。使用所述多特异性结合蛋白治疗的示例性癌症包括例如头颈部癌、卵巢癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胃癌、肝癌、食道癌和肺癌。

## 附图说明

[0071] 图1是一种异二聚体多特异性抗体(三特异性结合蛋白(TrinKET))的图示。每个臂可以代表NKG2D结合结构域或肿瘤相关抗原结合结构域。在某些实施方式中,所述NKG2D和所述肿瘤相关抗原结合结构域可以享有共同轻链。

[0072] 图2是一种异二聚体多特异性抗体的图示。所述NKG2D结合结构域或所述肿瘤相关抗原结合结构域中的任一者可以采取scFv格式(右臂)。

[0073] 图3是通过ELISA测定显示的NKG2D结合结构域(作为克隆列出)对人类重组NKG2D的结合亲和力的线图。

[0074] 图4是通过ELISA测定显示的NKG2D结合结构域(作为克隆列出)对食蟹猴重组NKG2D的结合亲和力的线图。

[0075] 图5是通过ELISA测定显示的NKG2D结合结构域(作为克隆列出)对小鼠重组NKG2D的结合亲和力的线图。

[0076] 图6是通过流式细胞术显示的NKG2D结合结构域(作为克隆列出)与表达人类NKG2D的EL4细胞的结合的柱状图,示出了平均荧光强度(MFI)与背景相比的倍数(FOB)。

[0077] 图7是通过流式细胞术显示的NKG2D结合结构域(作为克隆列出)与表达小鼠NKG2D的EL4细胞的结合的柱状图,示出了平均荧光强度(MFI)与背景相比的倍数(FOB)。

[0078] 图8是通过与天然配体ULBP-6的竞争显示的NKG2D结合结构域(作为克隆列出)对重组人类NKG2D-Fc的特异性结合亲和力的线图。

[0079] 图9是通过与天然配体MICA的竞争显示的NKG2D结合结构域(作为克隆列出)对重组人类NKG2D-Fc的特异性结合亲和力的线图。

[0080] 图10是通过与天然配体Rae-1 $\delta$ 的竞争显示的NKG2D结合结构域(作为克隆列出)对重组小鼠NKG2D-Fc的特异性结合亲和力的线图。

[0081] 图11是通过对表达人类NKG2D-CD3 $\zeta$ 融合蛋白的TNF- $\alpha$ 阳性细胞百分率的定量测定显示的人类NKG2D被NKG2D结合结构域(作为克隆列出)激活的柱状图。

[0082] 图12是通过对表达小鼠NKG2D-CD3 $\zeta$ 融合蛋白的TNF- $\alpha$ 阳性细胞百分率的定量测定显示的小鼠NKG2D被NKG2D结合结构域(作为克隆列出)激活的柱状图。

- [0083] 图13是显示出人类NK细胞被NKG2D结合结构域(作为克隆列出)激活的柱状图。
- [0084] 图14是显示出人类NK细胞被NKG2D结合结构域(作为克隆列出)激活的柱状图。
- [0085] 图15是显示出小鼠NK细胞被NKG2D结合结构域(作为克隆列出)激活的柱状图。
- [0086] 图16是显示出小鼠NK细胞被NKG2D结合结构域(作为克隆列出)激活的柱状图。
- [0087] 图17是显示了NKG2D结合结构域(作为克隆列出)对肿瘤细胞的细胞毒性效应的柱状图。
- [0088] 图18是显示了通过差示扫描荧光测定法测量的NKG2D结合结构域(作为克隆列出)的熔解温度的柱状图。
- [0089] 图19A-19C是NK细胞使用CD16和NKG2D结合的协同激活的柱状图。图19A显示了CD107a的水平;图19B显示了IFN  $\gamma$  的水平;图19C显示了CD107a和IFN  $\gamma$  的水平。图指示了平均值( $n=2$ )  $\pm$  SD。数据代表了使用5位不同健康供体的5个独立实验。
- [0090] 图20是采取双特异性抗体(Triomab)形式的三特异性结合蛋白(TrinKET)的图示,其是一种维持IgG样形状的三功能、双特异性抗体。该嵌合体由源自于两个亲本抗体的两个半抗体构成,各自具有一条轻链和一条重链。Triomab型可以是含有1/2的大鼠抗体和1/2的小鼠抗体的异二聚体构建体。
- [0091] 图21是采取KiH共同轻链形式的TrinKET的图示,其包含杵臼结构(knobs-into-holes)(KiH)技术。KiH是含有结合到靶1和2的2个Fab片段和通过异二聚化突变稳定化的Fc的异二聚体。采取KiH格式的TrinKET可以是具有结合到靶1和靶2的2个Fab片段,含有2个不同重链和与两个重链配对的共同轻链的异二聚体构建体。
- [0092] 图22是采取双可变结构域免疫球蛋白(DVD-Ig<sup>TM</sup>)形式的TrinKET的图示,其将两个单克隆抗体的靶结合结构域通过柔性的天然存在的连接物结合,并产生四价IgG样分子。DVD-Ig<sup>TM</sup>是同二聚体构建体,其中靶向抗原2的可变结构域被融合到靶向抗原1的Fab片段的可变结构域的N端。DVD-Ig<sup>TM</sup>形式含有正常的Fc。
- [0093] 图23是采取正交Fab界面(Ortho-Fab)形式的TrinKET的图示,其是含有结合到融合到Fc的靶1和靶2的2个Fab片段的异二聚体构建体。轻链(LC)-重链(HC)配对通过正交界面来确保。异二聚化通过Fc中的突变来确保。
- [0094] 图24是采取二合一Ig格式的TrinKET的图示。
- [0095] 图25是采取ES形式的TrinKET的图示,其是含有结合到融合到Fc的靶1和靶2的2个不同Fab片段的异二聚体构建体。异二聚化通过Fc中的静电操控突变来确保。
- [0096] 图26是采取Fab片段臂交换形式的TrinKET的图示:通过将重链和附连的轻链(半分子)与来自于另一个分子的重链-轻链对交换来交换Fab臂以产生双特异性抗体的抗体。Fab臂交换形式(cFae)是含有结合到靶1和2的2个Fab片段和通过异二聚化突变稳定化的Fc的异二聚体。
- [0097] 图27是采取SEED体形式的TrinKET的图示,其是含有结合到靶1和2的2个Fab片段和通过异二聚化突变稳定化的Fc的异二聚体。
- [0098] 图28是采取LuZ-Y形式的TrinKET的图示,其中使用亮氨酸拉链来诱导两个不同HC的异二聚化。所述LuZ-Y形式是含有融合到Fc的结合到靶1和2的两个不同scFab的异二聚体。异二聚化通过融合到Fc的C-端的亮氨酸拉链基序来确保。
- [0099] 图29是采取Cov-X体形式的TrinKET的图示。

[0100] 图30A和30B是采取K $\lambda$ 体形式的TriNKET的图示,其是具有融合到通过异二聚化突变稳定化的Fc的2个不同Fab片段的异二聚体构建体:靶向抗原1的一个Fab片段含有 $\kappa$ LC,并且靶向抗原2的第二个Fab片段含有 $\lambda$ LC。图30A是K $\lambda$ 体的一种形式的示例性图示;图30B是另一种K $\lambda$ 体的示例性图示。

[0101] 图31是0asc-Fab异二聚体构建体,其包括结合到靶1的Fab片段和结合到靶2的scFab,两者均融合到Fc结构域。异二聚化通过Fc结构域中的突变来确保。

[0102] 图32是DuetMab,其是含有结合到抗原1和2的2个不同Fab片段和通过异二聚化突变稳定化的F $c$ 的异二聚体构建体。Fab片段1和2含有不同的S-S桥,其确保正确的轻链和重链配对。

[0103] 图33是CrossmAb,其是具有结合到靶1和2的2个不同Fab片段和通过异二聚化突变稳定化的Fc的异二聚体构建体。CL和CH1结构域与VH和VL结构域被调换,例如CH1与VL内联融合,而CL与VH内联融合。

[0104] 图34是Fit-Ig,其是一种同二聚体构建体,其中结合到抗原2的Fab片段被融合到结合到抗原1的Fab片段的HC的N端。所述构建体含有野生型Fc。

[0105] 图35示出了一种三特异性抗体(TriNKET),其含有结合肿瘤相关抗原的scFv、靶向NKG2D的Fab和结合CD16的异二聚化的抗体恒定区/结构域(“CD结构域”)(scFv-Fab格式)。所述抗体格式在本文中被称为F3'-TriNKET。

[0106] 图36示出了一种示例性三特异性抗体(TriNKET),其包括结合NKG2D的scFv第一抗原结合位点、结合肿瘤相关抗原(例如EpCAM)的第二抗原结合位点、结合肿瘤相关抗原(例如EpCAM)的另外的肿瘤相关抗原结合位点和结合CD16的异二聚化的抗体恒定区。这些抗体格式在本文中被称为F4-TriNKET。

[0107] 图37是显示了TriNKET和mAb结合到在H747人类结肠直肠癌细胞上表达的EpCAM的线图。

[0108] 图38是显示了TriNKET和mAb结合到在HCC827人类肺癌细胞上表达的EpCAM的线图。

[0109] 图39是显示了TriNKET和mAb结合到在HCT116人类结肠直肠癌细胞上表达的EPCAM的线图。

[0110] 图40A和图40B是示出了使用来自于两个不同供体的静息人类NK细胞的TriNKET介导的H747细胞的杀伤的线图。效应细胞与靶细胞比例为10:1。

[0111] 图41A和图41B是示出了使用来自于两个不同供体的静息人类NK细胞的TriNKET介导的HCC827细胞的杀伤的线图。效应细胞与靶细胞比例为10:1。

[0112] 图42A和图42B是示出了使用来自于两个不同供体的静息人类NK细胞的TriNKET介导的MCF7细胞的杀伤的线图。效应细胞与靶细胞比例为10:1。

[0113] 图43A和图43B是示出了使用来自于两个不同供体的静息人类NK细胞的TriNKET介导的HCT116细胞的杀伤的线图。效应细胞与靶细胞比例为10:1。

## 详细描述

[0115] 本发明提供了结合癌细胞上的EPCAM和自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体以激活所述自然杀伤细胞的多特异性结合蛋白,包含这些多特异性结合蛋白的药物组合

物,以及使用这些多特异性蛋白和药物组合物的治疗方法,包括用于癌症治疗。本发明的各个不同方面在下文分章节阐述;然而,在一个特定章节中描述的本发明的方面不应限于任何特定章节。

[0116] 为了便于本发明的理解,下文定义了许多术语和短语。

[0117] 当在本文中使用时,没有具体数目的指称意味着“一个或多个”,并包括复数指称物,除非上下文不适合。

[0118] 当在本文中使用时,术语“抗原结合位点”是指免疫球蛋白分子的参与抗原结合的部分。在人类抗体中,抗原结合位点由重(“H”)链和轻(“L”)链的N-端可变(“V”)区的氨基酸残基形成。所述重链和轻链的V区内的三个高度趋异的区段被称为“高变区”,它们插入在被称为“构架区”或“FR”的更保守的侧翼区段之间。因此,术语“FR”是指天然存在于免疫球蛋白中的高变区之间并与其相邻的氨基酸序列。在人类抗体分子中,轻链的三个高变区和重链的三个高变区在三维空间中相对于彼此配置,以形成抗原结合表面。所述抗原结合表面与被结合的抗原的三维表面互补,并且每个重链和轻链的三个高变区被称为“互补决定区”或“CDR”。在某些动物例如骆驼和软骨鱼中,抗原结合位点由单一抗体链形成,提供了“单域抗体”。抗原结合位点可以存在于完整抗体中、抗体的保留了抗原结合表面的抗原结合片段中或重组多肽例如scFv中,所述scFv在单一多肽中使用肽连接物将重链可变结构域连接到轻链可变结构域。

[0119] 当在本文中使用时,术语“肿瘤相关抗原”意味着与癌症相关的任何抗原,包括但不限于蛋白质、糖蛋白、神经节苷脂、糖类、脂类。这些抗原可以表达在恶性细胞上或肿瘤微环境中,例如与肿瘤相关的血管、细胞外基质、间充质基质或免疫浸润物上。

[0120] 当在本文中使用时,术语“受试者”和“患者”是指将要通过本文描述的方法和组合物治疗的生物体。这些生物体优选地包括但不限于哺乳动物(例如鼠科、猴科、马科、牛科、猪科、犬科、猫科动物等),更优选地包括人类。

[0121] 当在本文中使用时,术语“有效量”是指化合物(例如本发明的化合物)的足以实现有益或所需结果的量。有效量可以在一次或多次施用、应用或剂量中施用,并且不打算限于特定剂型或施用途径。当在本文中使用时,术语“治疗”包括导致病症、疾病、障碍等的改善的任何效应例如减轻、降低、调节、改善或消除或改善其症状。

[0122] 当在本文中使用时,术语“药物组合物”是指活性药剂与惰性或有活性的载体的组合,使得所述组合物特别适合于体内或离体诊断或治疗用途。

[0123] 当在本文中使用时,术语“可药用载体”是指任何标准的制药载体,例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液(例如油/水或水/油乳液)和各种不同类型的润湿剂。所述组合物也可以包括稳定剂和防腐剂。对于载体、稳定剂和佐剂的实例,参见例如Martin,《Remington's 制药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第15版,Mack Publ. Co., Easton, PA [1975]。

[0124] 当在本文中使用时,术语“可药用盐”是指本发明的化合物的任何制药上可接受的盐(例如酸或碱式盐),其在施用到受试者后,能够提供本发明的化合物或其有活性的代谢物或残留物。正如本领域技术人员所知,本发明的化合物的“盐”可以源自于无机或有机酸和碱。示例性的酸包括但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、高氯酸、延胡索酸、马来酸、磷酸、乙醇酸、乳酸、水杨酸、琥珀酸、对甲苯磺酸、酒石酸、乙酸、柠檬酸、甲磺酸、乙磺酸、甲酸、苯

甲酸、丙二酸、萘-2-磺酸、苯磺酸等。其他酸例如草酸，尽管本身不是可药用的，但可用于制备在获得本发明的化合物及其可药用酸加成盐中可用作中间体的盐。

[0125] 示例性的碱包括但不限于碱金属(例如钠)氢氧化物、碱土金属(例如镁)氢氧化物、氨和式 $NW_4^+$ 的化合物(其中W是C<sub>1-4</sub>烷基)等。

[0126] 示例性的盐包括但不限于：乙酸盐，己二酸盐，藻酸盐，天冬氨酸盐，苯甲酸盐，苯磺酸盐，硫酸氢盐，丁酸盐，柠檬酸盐，樟脑酸盐，樟脑磺酸盐，环戊烷丙酸盐，二葡萄糖酸盐，十二烷基硫酸盐，乙磺酸盐，延胡索酸盐，氟代庚酸盐，甘油磷酸盐，半硫酸盐，庚酸盐，己酸盐，盐酸盐，氢溴酸盐，氢碘酸盐，2-羟基乙磺酸盐，乳酸盐，马来酸盐，甲磺酸盐，2-萘磺酸盐，烟酸盐，草酸盐，棕榈酸盐，果胶酸盐，过硫酸盐，苯基丙酸盐，苦味酸盐，新戊酸盐，丙酸盐，琥珀酸盐，酒石酸盐，硫氰酸盐，甲苯磺酸盐，十一烷酸盐等。盐的其他实例包括与适合的阳离子例如Na<sup>+</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>和NW<sub>4</sub><sup>+</sup>(其中W是C<sub>1-4</sub>烷基)等化合的本发明的化合物的阴离子。

[0127] 对治疗应用来说，设想的本发明的化合物的盐是可药用的。然而，不可药用的酸和碱的盐也可以在例如可药用化合物的制备或纯化中发现用途。

[0128] 在整个本描述中，在组合物被描述为具有、包括或包含特定组分时，或在过程和方法被描述为具有、包括或包含特定步骤时，设想了另外还存在基本上由所叙述的组分构成或由所叙述的组分构成的本发明的组合物，并且还存在基本上由所叙述的过程步骤构成或由所叙述的过程步骤构成的符合本发明的过程和方法。

[0129] 一般来说，除非另有规定，否则规定百分率的组成是以重量计的。此外，如果变量不伴有定义，则以所述变量的以前的定义为准。

### [0130] I. 蛋白质

[0131] 本发明提供了结合到自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体以及选自表11中提供的抗原中的任一者的肿瘤相关抗原的多特异性结合蛋白。所述多特异性结合蛋白在本文描述的药物组合物和治疗方法中有用。所述多特异性结合蛋白与自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体的结合增强了所述自然杀伤细胞对表达选自表11中提供的抗原中的任一者的肿瘤相关抗原的肿瘤细胞的破坏的活性。所述多特异性结合蛋白与表达肿瘤相关抗原的细胞的结合将所述癌细胞带到所述自然杀伤细胞附近，促进了所述癌细胞被所述自然杀伤细胞的直接和间接破坏。一些示例性的多特异性结合蛋白的进一步描述在下文中提供。

[0132] 所述多特异性结合蛋白的第一组分结合到表达NKG2D受体的细胞，其可以包括但不限于NK细胞、 $\gamma\delta$ T细胞和CD8<sup>+</sup> $\alpha\beta$ T细胞。在结合NKG2D后，所述多特异性结合蛋白可以阻断天然配体例如ULBP6(UL16结合蛋白6)和MICA(I类主要组织相容性复合物链相关蛋白A)结合到NKG2D并激活NKG2D受体。

[0133] 所述多特异性结合蛋白的第二组分结合选自表11中提供的抗原中的任一者的肿瘤相关抗原。表达所述肿瘤相关抗原的细胞可以在白血病例如急性髓系白血病和T-细胞白血病中发现。

[0134] 所述多特异性结合蛋白的第三组分结合到表达CD16的细胞，所述CD16是白细胞包括自然杀伤细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜曙红细胞、肥大细胞和滤泡树突细胞的表面上的Fc受体。

[0135] 本文中描述的多特异性结合蛋白可以采取各种不同的格式。例如，一种格式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(图1)。所述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。所述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。所述第一免疫球蛋白轻链与所述第一免疫球蛋白重链一起，形成结合NKG2D的抗原结合位点。所述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。所述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。所述第二免疫球蛋白轻链与所述第二免疫球蛋白重链一起，形成结合选自表11中提供的抗原中的任一者的肿瘤相关抗原的抗原结合位点。所述第一Fc结构域和第二Fc结构域一起能够结合到CD16(图1)。在某些实施方式中，所述第一免疫球蛋白轻链与所述第二免疫球蛋白轻链相同。

[0136] 另一种示例性格式涉及一种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(图2)。所述第一免疫球蛋白重链包括通过连接物或抗体铰链融合到单链可变片段(scFv)的第一Fc(铰链-CH2-CH3)结构域，所述scFv由配对并结合NKG2D或结合选自表11中提供的抗原中的任一者的肿瘤相关抗原的重链可变结构域和轻链可变结构域构成。所述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。所述免疫球蛋白轻链包括轻链可变结构域和轻链恒定结构域。所述第二免疫球蛋白重链与所述免疫球蛋白轻链配对并结合到NKG2D或结合选自表11中提供的抗原中的任一者的肿瘤相关抗原。所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域一起能够结合到CD16(图2)。

[0137] 一个或多个另外的结合基序，可以任选地通过连接物序列融合到所述恒定区CH3结构域的C-端。在某些实施方式中，所述抗原结合基序是单链或二硫键稳定的可变区(scFv)，形成四价或三价分子。

[0138] 在某些实施方式中，所述多特异性结合蛋白采取三功能抗体形式，其是维持IgG样形状的三功能、双特异性抗体。这种嵌合体由源自于两个亲本抗体的两个半抗体构成，各自具有一条轻链和一条重链。

[0139] 在某些实施方式中，所述多特异性结合蛋白是KiH共同轻链(LC)形式，其涉及杆臼结构(KiH)技术。所述KiH包括工程化的C<sub>H</sub>3结构域，以在每条重链中产生“杆”或“臼”来促进异二聚化。在“杆臼结构(KiH)”Fc技术背后的概念是通过将小残基用大体积的残基替换而在一个CH3结构域(CH3A)中引入“杆”(例如采取EU编号的T366W<sub>CH3A</sub>)。为了容纳所述“杆”，通过将最邻近所述球的残基用较小的残基代替，在另一个CH3结构域(CH3B)上产生互补的“臼”表面(例如T366S/L368A/Y407V<sub>CH3B</sub>)。所述“臼”突变通过结构化指导的噬菌体筛选进行优化(Atwell S,Ridgway JB,Wells JA,Carter P.,使用噬菌体展示文库从同二聚体的结构域界面的重塑得到的稳定的异二聚体(Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using 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，杆和臼非糖基化半抗体同二聚体的反平行构象由CH2-CH3疏水相互作用介导(Antiparallel conformation of knob and hole aglycosylated half-antibody homodimers is mediated by a CH2-CH3 hydrophobic interaction),J Mol Biol (2014) 426(9):1947-57; Mimoto F,Kadono S,Katada H,Igawa T,Kamikawa T,Hattori K等，对Fc γ R具有提高的亲和力的新的不对称工程化Fc变体的晶体结构(Crystal

structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for FcgammaRs), Mol Immunol (2014) 58(1):132-8) 证实了由CH3结构域间核心界面处的空间互补性驱动的疏水相互作用使异二聚化在热力学上有利,而 $\text{C}\text{H}_1$ - $\text{C}\text{H}_1$ 和 $\text{V}\text{H}$ - $\text{C}\text{H}_1$ 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。

[0140] 在某些实施方式中,所述多特异性结合蛋白采取双可变结构域免疫球蛋白(DVD-Ig<sup>TM</sup>)形成,其通过柔性的天然存在的连接物将两个单克隆抗体的靶结合结构域合并,并得到四价IgG样分子。

[0141] 在某些实施方式中,所述多特异性结合蛋白采取正交Fab界面(Ortho-Fab)形式。在ortho-Fab IgG方法中(Lewis SM,Wu X,Pustilnik A,Sereno A,Huang F,Rick HL等,通过正交Fab界面的基于结构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),基于结构的区域性设计在仅仅一个Fab片段中的LC和 $\text{HC}_{\text{V}\text{H}-\text{C}\text{H}_1}$ 界面处引入互补突变,对另一个Fab片段没有做出任何改变。

[0142] 在某些实施方式中,所述多特异性结合蛋白采取二合一Ig格式。在某些实施方式中,所述多特异性结合蛋白采取ES形式,其是含有结合到融合到Fc的靶1和靶2的2个不同Fab片段的异二聚体构建体。异二聚化通过所述Fc中的静电操控突变来确保。

[0143] 在某些实施方式中,所述多特异性结合蛋白采取 $\kappa\lambda$ 体形式,其是具有融合到通过异二聚化突变稳定化的Fc的2个不同Fab片段的异二聚体构建体:靶向抗原1的Fab片段1含有 $\kappa$ LC,而靶向抗原2的第二个Fab片段含有 $\lambda$ LC。图30A是一种形式的 $\kappa\lambda$ 体的示例性图示;图30B是另一种 $\kappa\lambda$ 体的示例性图示。

[0144] 在某些实施方式中,所述多特异性结合蛋白采取Fab臂交换形式(通过将重链和附连的轻链(半分子)与来自于另一个分子的重链-轻链对交换来交换Fab臂以产生双特异性抗体的抗体)。

[0145] 在某些实施方式中,所述多特异性结合蛋白采取SEED体形式。所述链交换工程化结构域(SEED)平台被设计成产生不对称且双特异性的抗体样分子,这种能力扩展了天然抗体的治疗性应用。这种蛋白质工程化平台是基于保守的CH3结构域内免疫球蛋白的结构相关的序列的交换。所述SEED设计允许高效产生AG/GA异二聚体,而不利于AG和GA SEED CH3结构域的同二聚作用。(Muda M.等,Protein Eng.Des.Sel.,2011,24(5):447-54)。

[0146] 在某些实施方式中,所述多特异性结合蛋白采取LuZ-Y形式,其中使用亮氨酸拉链来诱导两个不同HC的异二聚化(Wranik,BJ.等,J.Biol.Chem.(2012),287:43331-9)。

[0147] 在某些实施方式中,所述多特异性结合蛋白采取Cov-X体形式。在双特异性CovX体中,两个不同的肽使用支链氮杂环丁酮连接物联结在一起,并在温和条件下以位点特异性方式融合到支架抗体。所述抗体支架提供长的半衰期和Ig样分布,而所述药效团负责功能活性。所述药效团可以被化学优化或用其他药效团代替,以产生优化的或独特的双特异性抗体(Doppalapudi VR等,PNAS(2010),107(52);22611-22616)。

[0148] 在某些实施方式中,所述多特异性结合蛋白采取Oasc-Fab异二聚体形式,其包括结合到融合到Fc的靶1的Fab片段和结合到靶2的scFab。异二聚化通过所述Fc中的突变来确保。

[0149] 在某些实施方式中,所述多特异性结合蛋白采取DuetMab形式,其是含有结合到抗

原1和2的两个不同Fab片段和通过异二聚化突变稳定化的Fc的异二聚体构建体。Fab片段1和2含有不同的S-S桥，其确保正确的LC和HC配对。

[0150] 在某些实施方式中，所述多特异性结合蛋白采取CrossmAb形式，其是具有融合到通过异二聚化稳定化的Fc的结合到靶1和2的两个不同Fab片段的异二聚体构建体。CL和CH1结构域与VH和VL结构域被调换，例如CH1与VL内联融合，而CL与VH内联融合。

[0151] 在某些实施方式中，所述多特异性结合蛋白采取Fit-Ig形式，其是一种同二聚体构建体，其中结合到抗原2的Fab片段被融合到结合到抗原1的Fab片段的HC的N端。所述构建体含有野生型Fc。

[0152] 表1列出了相组合可以结合到NKG2D的重链可变结构域和轻链可变结构域的肽序列。所述NKG2D结合结构域在它们对NKG2D的结合亲和力方面可以不同，然而它们都激活人类NKG2D和NK细胞。

表 1			
	克隆	重链可变区氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列
[0153]	ADI-27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTYNPNS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYNSYPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 2)

	CDR1 (SEQ ID NO: 105) – GSFSGYYWS CDR2 (SEQ ID NO: 106) – EIDHSGSTNYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO: 107) – ARARGPWSFDP		
[0154]	ADI-27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTNYNPS LKSRTVISVDTSKNQFSKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 3)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLS CRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSPITFGGGTKEIK (SEQ ID NO: 4)
	ADI-27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTNYNPS LKSRTVISVDTSKNQFSKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 5)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESQVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYHSFYTFGGGTKEIK (SEQ ID NO: 6)
	ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTNYNPS LKSRTVISVDTSKNQFSKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 7)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESQVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQSNSYTFGGGTKEIK (SEQ ID NO: 8)
	ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTNYNPS LKSRTVISVDTSKNQFSKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 9)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAQYQQKPGK APKLLIYKASSLESQVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYNSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 10)
	ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTNYNPS LKSRTVISVDTSKNQFSKLSS VTAADTAVYYCARARGPWF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 11)	ELQMTQSPSSLASVGDRVIT CRTSQSISSYLNWYQQKPGQP PKLLIYWASTRESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISLQPEDSATYY CQQSYDIPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 12)
	ADI-28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTNYNPS LKSRTVISVDTSKNQFSKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 13)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAQYQQKPGK APKLLIYKASSLESQVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYGSPITFGGGTKEIK (SEQ ID NO: 14)
	ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTNYNPS LKSRTVISVDTSKNQFSKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 15)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAQYQQKPGK APKLLIYKASSLESQVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPDDFATY YCQQSKEVWPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)
	ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTNYNPS LKSRTVISVDTSKNQFSKLSS	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAQYQQKPGK APKLLIYKASSLESQVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY

[0155]

	VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 17)	YCQQYNSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 18)
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLK PSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTYNPNS LKS RVTISVDT SKNQFSKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 19)	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TIT CRASQSIGSWLA WYQQKPGK APKLLIYKASSLES GVP SRF SG SGSGTEFTLTIS SLQPDDFAT Y YCQQYDIYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 20)
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLK PSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTYNPNS LKS RVTISVDT SKNQFSKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 21)	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TIT CRASQSISSWLA WYQQKPGK APKLLIYKASSLES GVP SRF SG SGSGTEFTLTIS SLQPDDFAT Y YCQQYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 22)
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLK PSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTYNPNS LKS RVTISVDT SKNQFSKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 23)	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TIT CRASQSISSWLA WYQQKPGK APKLLIYKASSLES GVP SRF SG SGSGTEFTLTIS SLQPDDFAT Y YCQQYGSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 24)
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLK PSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTYNPNS LKS RVTISVDT SKNQFSKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 25)	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TIT CRASQSISSWLA WYQQKPGK APKLLIYKASSLES GVP SRF SG SGSGTEFTLTIS SLQPDDFAT Y YCQQYQSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 26)
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLK PSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTYNPNS LKS RVTISVDT SKNQFSKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 27)	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TIT CRASQSISSWLA WYQQKPGK APKLLIYKASSLES GVP SRF SG SGSGTEFTLTIS SLQPDDFAT Y YCQQYSSFSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 28)
ADI-29421	QVQLQQWGAGLLK PSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTYNPNS LKS RVTISVDT SKNQFSKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 29)	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TIT CRASQSISSWLA WYQQKPGK APKLLIYKASSLES GVP SRF SG SGSGTEFTLTIS SLQPDDFAT Y YCQQYESYSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 30)
ADI-29424	QVQLQQWGAGLLK PSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTYNPNS LKS RVTISVDT SKNQFSKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 31)	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TIT CRASQSISSWLA WYQQKPGK APKLLIYKASSLES GVP SRF SG SGSGTEFTLTIS SLQPDDFAT Y YCQQYDSFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 32)
ADI-29425	QVQLQQWGAGLLK PSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTYNPNS LKS RVTISVDT SKNQFSKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 33)	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TIT CRASQSISSWLA WYQQKPGK APKLLIYKASSLES GVP SRF SG SGSGTEFTLTIS SLQPDDFAT Y YCQQYQSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 34)

[0156]

ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTNYNPS LKSRTVISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 35)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYHSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 36)
ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTNYNPS LKSRTVISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 37)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYELYSYTFGGGTKEIK (SEQ ID NO: 38)
ADI-29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTNYNPS LKSRTVISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 39)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYDTFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 40)
ADI-27727	QVQLVQSGAEVKKGPGSSVKV SCKASGGTFSSYAIWVRQAP GQGLEWMGGIIPIFGTANYAQ KFQGRVTITADESTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARGDSSIR HAYYYYGMDVWGQGTTVTV SS (SEQ ID NO: 41) CDR1 (SEQ ID NO: 43) – GTFSYYAIS CDR2 (SEQ ID NO: 44) – GIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO: 45) – ARGDSSIRHAYYYYGMDV	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSVLYSSNNKNYLAWY QQKPGQPPKLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYCQQYYSTPITFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 42) CDR1 (SEQ ID NO: 46) – KSSQSVLYSSNNKNYL CDR2 (SEQ ID NO: 47) – WASTRES CDR3 (SEQ ID NO: 48) – QQYYSTPIT
ADI-29443 (F43)	QLQLQESGPGLVKPSETSLTC TVSGGSISSSYYWGWRQPPG KGLEWIGSIYSGSTYYNPSLK SRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGSDRFHPYF DYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 49) CDR1 (SEQ ID NO: 51) – GSISSSYYWG CDR2 (SEQ ID NO: 52) – SIYYSGSTYYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO: 53) – ARGSDRFHPYFDY	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSRYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASN RATGIPARFSG SGSGTDFTLTISLLEPEDFAVY YCQQFDTWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 50) CDR1 (SEQ ID NO: 54) – RASQSVSRYLA CDR2 (SEQ ID NO: 55) – DASN RAT CDR3 (SEQ ID NO: 56) – QQFDTWPPT
ADI-29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIDHSGSTNYNPS LKSRTVISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARARGPWSF DPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 57)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCEQYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 58)
ADI-28200	QVQLVQSGAEVKKGPGSSVKV SCKASGGTFSSYAIWVRQAP GQGLEWMGGIIPIFGTANYAQ KFQGRVTITADESTSTAYMEL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CESSQSLLNSGNQKNYLWY QQKPGQPPKPLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ

[0157]

	<p>SSLRSEDTAVYYCARRGRKAS GSFYYYYGMDVWGQGTTVT VSS (SEQ ID NO: 59)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO: 109) - GTFSSYAI CDR2 (SEQ ID NO: 110) - GIIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO: 111) - ARRGRKASGSFYYYYGMDV</p>	<p>AEDVAVYYCQNDYSYPYTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 60)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO: 112) - ESSQSLNSGNQKNYLT CDR2 (SEQ ID NO: 113) - WASTRES CDR3 (SEQ ID NO: 114) - QNDYSYPY</p>
ADI-29379 (E79)	<p>QVQLVQSGAEVKPGASVKV SCKASGYTFTSYYMHWVRQA PGQGLEWMGIINPSGGSTS QKFQGRVTMTRDTSTVYM ELSSLRSEDTAVYYCARGAPN YGDTHDYYYMDVWGKGTT VTVSS (SEQ ID NO: 61)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO: 63) - YTFTSYYMH CDR2 (SEQ ID NO: 64) - IINPSGGSTS YAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO: 65) - ARGAPNYGDTTHDYYYMDV</p>	<p>EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISLQSEDFAVY YCQQYDDWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 62)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO: 66) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO: 67) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO: 68) - QQYDDWPFT</p>
ADI-29463 (F63)	<p>QVQLVQSGAEVKPGASVKV SCKASGYTFTGYYMHWVRQA PGQGLEWMWINPNSGGTN AQKFQGRVTMTRDT SISTAYM ELSLRLRSDDTAVYYCARDTGE YYDTDDHGM DVWGQGTT VSS (SEQ ID NO: 69)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO: 71) - YTFTGYYMH CDR2 (SEQ ID NO: 72) - WINPN SGGTNYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO: 73) - ARDTGEYYDTDDHGM DV</p>	<p>EIVLTQSPGTLSLSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISLQSEDFAVY YCQQDDYWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 70)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO: 74) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO: 75) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO: 76) - QQDDYWPPT</p>
ADI-27744 (A44)	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKDGGYY DSGAGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 77)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO: 79) - FTFSSYAMS CDR2 (SEQ ID NO: 80) - AISGSGGSTYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO: 81) - AKDGGYYDSGAGDY</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGIDSWLA WYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLT ISLQPEDFATY YCQQGVSY PRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 78)</p> <p>CDR1 (SEQ ID NO: 82) - RASQGIDSWLA CDR2 (SEQ ID NO: 83) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO: 84) - QQGVSY PRT</p>
ADI-27749 (A49)	<p>EVQLVESGGGLVKG PGGSLRLS CAASGFTFSSY SMN WVRQAP GKGLEWV SS I SS YY ADS VK GRFT IS RD NA K N L Q M N SL RA ED T A V YY C A R G A P M G A A A G W F D P W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO: 85)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLA WYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLT ISLQPEDFATY YCQQGV SF PRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 86)</p>

	CDR1 ( SEQ ID NO: 87 ) - FTFSSYSMN CDR2 ( SEQ ID NO: 88 ) - SISSSSYYIYYADSVKG CDR3 ( SEQ ID NO: 89 ) - ARGAPMGAAAGWFDP	CDR1 ( SEQ ID NO: 90 ) - RASQGISSWLA CDR2 ( SEQ ID NO: 91 ) - AASSLQS CDR3 ( SEQ ID NO: 92 ) - QQGVSFPR
[0158]	ADI-29378 (E78)  [0159] 可选地,由SEQ ID NO:101所表示的重链可变结构域可以与由SEQ ID NO:102所表示的轻链可变结构域配对,以形成如US 9,273,136中所示的可以结合到NKG2D的抗原结合位点。 [0160] SEQ ID NO:101 [0161] QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGYFDYWGQGTTVTVSS [0162] SEQ ID NO:102 [0163] QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLLPSGVSDRFSGSKGTS AFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL [0164] 可选地,由SEQ ID NO:103表示的重链可变结构域可以与由SEQ ID NO:104所表示的轻链可变结构域配对,以形成如US 7,879,985中所示的可以结合到NKG2D的抗原结合位点。 [0165] SEQ ID NO:103 [0166] QVHLQESGPLVKPSETLSLTCTVSDDSISYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYGSANYNPSLKSRTISV DTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMVTVSS [0167] SEQ ID NO:104 [0168] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPWTFGQGTTKVEIK [0169] 表2列出了相组合可以结合到EpCAM的重链可变结构域和轻链可变结构域的肽序列。	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASN RATGIPARFSG SGSGTDFTLTISLEPEDFAVY YCQQQSDNWPFTFGGGTKVEIK ( SEQ ID NO: 94 ) CDR1 ( SEQ ID NO: 98 ) - RASQSVSSYLA CDR2 ( SEQ ID NO: 99 ) - DASN RAT CDR3 ( SEQ ID NO: 100 ) - QQSDNWPFT

表 2		
克隆	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
Oportuzumab	EVQLVQSGPGLVQPGGSVRISC AASGYTFTNYGMNWVKQAPGK GLEWMGWINTYTGESTYADSF KGRFTSLLDTSSAAYLQINSLR AEDTAVYYCARFAIKGDYWGQ GTLLTVSSE (SEQ ID NO: 115) CDR1 (SEQ ID NO: 116) - GYTFTNY CDR2 (SEQ ID NO: 117) - NTYTGE CDR3 (SEQ ID NO: 118) - FAIKGDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC RSTKSLHSNGITYLYWYQQKP GKAPKLLIYQMSNLASGVPSRF SSSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCAQNLEIPRTFGQGTKVELKR (SEQ ID NO: 119) CDR1 (SEQ ID NO: 120) - KSLLHSNGITYLY CDR2 (SEQ ID NO: 121) - QMSNLAS CDR3 (SEQ ID NO: 122) - AQNLEIPRT
[0170]	阿达卡莫单抗  EVQLLESGGGVVQPGRSRLLSC AASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGNSNKYYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKDMGWGSGW RPYYYYGMDVWGQTTVTVSS A (SEQ ID NO: 123) CDR1 (SEQ ID NO: 124) - GFTFSSY CDR2 (SEQ ID NO: 125) - SYDGSN CDR3 (SEQ ID NO: 126) - DMGWGSGWRPYYYYGMDV	ELQMTQSPSSLSASVGDRVITIC RTSQSISYYLNWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDFSGSGSG TDFTLTISLQPEDSATYYCQQS YDIPYTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 127) CDR1 (SEQ ID NO: 128) - QSISSYLN CDR2 (SEQ ID NO: 129) - WASTRES CDR3 (SEQ ID NO: 130) - QQSYDIPYT
	西他土珠单抗  EVQLVQSGPGLVQPGGSVRISC AASGYTFTNYGMNWVKQAPGK GLEWMGWINTYTGESTYADSF KGRFTSLLDTSSAAYLQINSLR AEDTAVYYCARFAIKGDYWGQ GTLLTVSSA (SEQ ID NO: 131) CDR1 (SEQ ID NO: 132) - GYTFTNY CDR2 (SEQ ID NO: 133) - NTYTGE CDR3 (SEQ ID NO: 134) - FAIKGDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC RSTKSLHSNGITYLYWYQQKP GKAPKLLIYQMSNLASGVPSRF SSSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCAQNLEIPRTFGQGTKVELKR (SEQ ID NO: 135) CDR1 (SEQ ID NO: 136) - KSLLHSNGITYLY CDR2 (SEQ ID NO: 137) - QMSNLAS CDR3 (SEQ ID NO: 138) - AQNLEIPRT
	Solitomab (MT110)  EVQLLEQSGAELVRPGTSVKISC KASGYAFTNYWLGVVKQRPGH GLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTF EDSAVYFCARLRNWDEPMDYW GQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 139)  CDR1 (SEQ ID NO: 140) -	ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMS CKSSQSLNNSGNQKNYLTWYQ QKPGQPKLLIYWASTRESGP DRFTGSGSGTDFTLTISVQAED LAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKL EIKG (SEQ ID NO: 143)  CDR1 (SEQ ID NO: 144) -
[0171]	GYAFTNY CDR2 (SEQ ID NO: 141) - FPGSGN CDR3 (SEQ ID NO: 142) - LRNWDEPMDY	QSLLNSGNQKNYLT CDR2 (SEQ ID NO: 145) - WASTRES CDR3 (SEQ ID NO: 146) - QNDYSYPLT

[0172] 可选地,可以通过筛选与由SEQ ID NO:147所定义的氨基酸序列的结合,来确定可以结合到EpCAM的新的抗原结合位点。

[0173] SEQ ID NO:147

[0174] MAPPQVLAFGLLAAATATFAAAQEEVCENYKLAVNCFVNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLAAKCLVM  
KAEMNGSKLRRAKPEGALQNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSMCWCVNTAGVRRTDKDTEITCSERVRTYWIII  
ELKHKAREKPYDSKSLRTLQKEITTRYQLDPKFITSILYENNITIDLVQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVGE  
SLFHSKKMDLTVNGEQLLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVVIAVVAGIVVLVISRKKRMAYEKA  
EIKEMGEMHRELNA

[0175] 可以通过筛选与由SEQ ID NO:148所定义的氨基酸序列的结合,来确定可以结合到肿瘤相关抗原CA125的抗原结合位点。

[0176] SEQ ID NO:148

[0177] MLKPSGLPGSSPTRSLMTGSRSTKATPEMDSGLTGATLSPKTSTGAIIVTEHTLPFTSPDKTLASPTS  
SVVGRTTQSLGVMSALPESTSRGMTHSEQRTSPSLSPQVNGTPSRNYPATSMVGLSSPRTRTSSTEGNFTKEAST  
YTLTVETTSGPVTEKYTVPTETSTTEGDSTETPWDTRYIPVKITSPMKTfadstaskenapvsmtpaettvtdshtp  
GRTNPSFGTLYSSFLDLSPKGTPNSRGETSLELILSTTGYPFSSPEPGSAGHSRISTSAPLSSASVLDNKISETSI  
FSGQSLTSPLSPGVPEARASTMPNSAIPFSMTLSNAETSAAERVSTISSLGTPSISTKQTAETILTFAFAETMDIP  
STHIAKTLASEWLGPGLGGTSTSALTTSPSTTLVSEETNTHHSTSGKETEGTLNTSMTPLETSAPGEESEMTAT  
LVPTLGFTTLDISKIRSPSQVSSHPTRRELRTTGSTSGRQSSSTAHHGSSDILRATTSSSKASSWTSESTAQQFSEP  
QHTQWVETPSMKTERPPASTSVAAPITTSVPSVVGFTTLKTSSTKGIWLEETSADTLIGESTAGPTTHQFAVPTG  
ISMTGGSSTRGSQGTTHLLTRATASSETSADLTATNGVPVSVPASVSKTAAGSSPPGKTPSYTMVSSVIPETSSL  
QSSAFREGTSLGLTPLNTRHPFSSPEPDASAGHTKISTSIPLLSSAVLEDKVSATSTFHHKATSSITTGTPEISTK  
TKPSSAVLSSMTLSNAATSPERVRNATSPLTHPSGEETAGSVTLSTAETTDSPNIHPTGTLTSESSESPSTLS  
LPSVGVKTTFSSTPSTHLFTSGEETEETSNPSVSQPETSVSRVTTLASTSVPTPVFPMTWPTRSAQFSSSHL  
VSELRATSSTSVNSTGSALPKISHLTGTATMSQTNRDTFNDSAAPQSTTWETSPRFKGLPSATTVSTSATSL  
ATVMVSKFTSPATSSMEATSIREPSTTILTETTNGPGMAVASTNIPIGKGYITEGRLDTSHLPIGTTASSETSM  
FTMAKESVMSVSPSQMDAAGSSTPGRTSQFVDTFSDDVYHTSREITIPRDGTSSALTPQMTATHPPSPDGSAR  
STWLGILSSSPSSPTPKVMSSTFSTQRVTTSMIMDTVETSRWNMPNLPSTSLTPSNIPTSGAIGKSTLVPLDTPS  
PATSLLEASEEGGLPTLTYPESTNTPSIHLGAHASSESPSTIKLTMASVVKPGSYTPLFPSIETHIHVSTAR  
GSSPEM TAPGETNTGSTWDPTTYITTDPKDTSSAQVSTPHSVRTLRTENHPKTESATPAAYSGSPKISSSPNL  
PATKAWTIIDTTEHSTQLHYTKLAEKSSGFETQSAPGPVSVVIPTSPTIGSSTLETSVDVGEPLVLA  
PSEQTITL  
PMATWLSTSLEEMASTDLDISSLSSPSPMSTFAIFPPMSTPSHELSKSEADTSAIRNTDSTLDQHLGIRSLGRTGDL  
TTVPITPLTTWTSVIEHSTQAQDTLSATMSPTHVTQLKDQTSIPASASPSHLTEVYPELGTQGRSSSEATTFWKP  
STDLSREIETGPTNIQSTPPMDNTTGSSSGVTLGIAHLPIGTSSPAETSTNMALERRSSTATVSMAGTMGL  
SAPGRSISQLGRVSSVLSESTTEGVDSSKGSSPRLNTQGNTALSSLEPSYAEGSQMSTSIPLTSSPTPDVEFI  
GGSTFWTKEVTTVMTSDISKSSARTESSSATLMSTALGSTENTGKEKLRTASMDLSPTPSMEVTPWISLTL  
SNAPNTTDSDLHGVHTSSAGTLATDRSLNTGVTRASRLENGSDTSSKSLMGNSTHTSMTY  
TEKSEVSSSIHPRPETS  
GAETTTLSTPGNRAISLTLFSSIPVEEVISTGITSGPDINSAPMTHSPITPP  
TIVWTSTGTIEQSTQPLHAV  
SSEK  
VSVQTQSTPYVNSAVSASP  
THENSVSSGSSTSSPYSSASLES  
LDSTISRRNAITSWLWDL  
TTSLPTTWPSTS  
LSE  
ALSSGHSGVSNPSSTTEFPL  
FSAASTSAAKQRNPET  
ETHGPQNTAAS  
LNTDASSV  
TGLSET  
PVGAS  
ISSEVPL  
P  
M  
A  
ITS  
RS  
DV  
S  
GLT  
SE  
ST  
AN  
PS  
L  
GT  
ASS  
AG  
T  
KL  
RT  
IS  
L  
PT  
SE  
LS  
V  
S  
F  
RM  
N  
K  
D  
P  
T  
V  
S  
I  
PL  
G  
S  
H  
P  
T  
T  
E  
T  
S  
I  
P  
V  
N  
S  
A  
G  
P  
G  
L  
S  
T  
V  
A  
S  
D  
V  
I  
D  
T  
P  
S  
D  
G  
A  
E  
I  
P  
T  
V  
S  
F  
S  
P  
P  
D  
T  
E  
V  
T  
T  
I  
S  
H  
F  
P  
E  
K  
T  
T  
H  
S  
F  
R  
T  
I  
S  
S  
L  
T  
H  
E  
L  
T  
S  
R  
V  
T  
P  
I  
P  
G  
D  
W  
M  
S  
A  
M  
S  
T  
I  
P  
K  
T  
G  
A  
S  
P  
S  
I  
T  
L  
G  
E  
R  
R  
T  
I  
T  
S  
A  
A  
P  
T  
T  
S  
P  
I  
V  
L  
T  
A  
S  
F  
T  
E  
T  
S  
V  
L  
D  
N  
E  
T  
T  
V  
K  
T  
S  
D  
I  
L  
D  
A  
R  
K  
T  
N  
E  
L  
P  
S  
D  
S  
S  
S  
D  
L  
I  
N  
T  
S  
I  
A

SSTMDVTKTASISPTISGMTASSSPSLFSSDRPQVPTSTTETNTATSPSVSSNTYSLDGGSNVGGTPSTLPPFTIT  
HPVETSSALLAWSRPVRTFSTMVSTDASGENPTSSNSVVTSPAPGTWTSVGSTTDLPAMGFLKTSPAGEAHSLA  
STIEPATAFTPHLSAAVTGSSATSEASLLTSESKAIIHSSPQTPTTPTSGANWETSATPESLLVVTETSDTTLTSK  
ILVTDILFSTVSTPPSKFPSTGTLGASFPTLLPDPAIPLTATEPTSSLATSFDSTPLVTIASDSLGTVPETTLT  
MSETSNGDALVLKTVSNPDRSIPGITIQQVTESPHPSSTSPSKIVAPRNTTYEGSITVALSTLPAGTTGSLVFSQS  
SENSETALVDSSAGLERASVMPLTTGSQGMASSGGIRSGSTHSTGTKFSSLPLTMNPGEVTAMSEITTNRLTATQ  
STAPKGIPVKPTSAEGLLTPVSASSSPSKAFASLTAPPTWGIPQSTLTFEFSEVPSLDTSASLPTPGQSLNTIP  
DSDASTASSSLSKSPEKNPRARMMTSTKAISASSFQSTGFETPEGSASPMSGHEPRVPTSGTGDPRYASESMSYP  
DPSKASSAMTSTSASKLTLFSTGQAARSGSSSSPISLSTEKE TSFLSPTASTSRKTSFLGPSMARQPNILVHLQ  
TSALTLSPTSTLNMSQEPPPELTSSQTIAEEGTTAETQTLTFTPSETPTSLPVSSPTEPTARRKSSPETWASSIS  
VPAKTSLVETTDGTLVTIKMSSQAAQGNSTWPAPAEETGSSPAGTSPGSPEMSTTLKIMSSKEPSISPEIRSTVRN  
SPWKTPETTVPMETTVEPVTLQSTALGSGSTSISHLPTGTTSPKSPTENMLATERVSLSPSPPEAWTNLYSGTPGG  
TRQLATMSSVSLESPTARSITGTQQSSPELVSKTTGMEFSMWHGSTGGTTGDTHVSLSTSSNILEDPTSPNSVS  
SLTDKSKHKTEWVSTTAIPSTVNNKIMAAEQQTSRVDEAYSSTSSWDQTSGSDITLGASPDVTNTLYITSTAQ  
TTSLVSLPSGDQGITSLTNPSGGKTSSASSVTSPSIGLETLRANSAVKSDIAPTAGHLSQTSSPAEVSIIDVTTAP  
TPGISTTITMGTONSISTTPNPEVGMSTMDSTPATERRTSTEHPSTWSSTAASDSWTVDMTSNLKVARSPGTIS  
TMHTTSFLASSTELDSMSTPHGRITVIGTLSVTPSSDASAVKTETSTERTLSPSDTTASTPISTFSRVQRMSISVP  
DILSTS WTPSSTEADVPVSMVSTDHASTKTDPLSTFLFDLSLTDWDTGRSLSSATATT SAPQGATTPQELTL  
ETMISPATSQLPFSIGHITSAVTPAAMARSSGVTFSRPDPTS KKA EQTSTQLPTTSAHPGVPRSAATTLDVIPHT  
AKTPDATFQRQGQTALTTEARATSDSNEKEKSTPSAPWITEMMNSVSEDTIKEVTSSSVLRTLNTLDINLESGTT  
SSPSWKSSPYERIAPSETTDKEAIHPSNTVETTGWTSSEHASHSTIPAH SASSKL TSPVVTSTREQAI VSMST  
TTWPESTRARTEPNSFLTIELRDVSPYMDTSSTTQTSIISSPGSTA ITKGPRTEITSSKRISSSFLAQSMRSSDSPS  
EAITRLSNFPAMTESGGMILAMQTSPPGATSLSA PLDT SATASWTGTPLATTQRFTYSEK TTLFSKG PEDTSQPS  
PSVEETSSSSSLVPIATTSPSNILLTSQGHSPSSTPPVTSVFLSETSGLGTTDMRSRISLEPGTSLPPNLSSTAGE  
ALSTYEASRTKAIHSADTAVNMEATSSEYSPIPGHTKPSKATSPVLTSHIMGDITSSTS VFGSSETTEIETVSS  
VNQGLQERSTS QVASSATETSTVITHVSSGATTHVTKTQATFSSGTSISSPHQFITSTNTFTDVSTNPSTS LIMTE  
SSGVTITTQGPTGAATQGPYLLDTSTMPYL TETPLAVTPDFMQSEK TTLISKGPKDVS WTSPPSVAETSYPSLTP  
FLVTTIPPATSTLQGQHTSSPVSATSVLGLVKTTDMLNTSMEPV TNSPQNLNNPSNEILATLAATT DIETIHPSI  
NKAVTNMGTASSAHVLHSTLPVSE PSTATSPMV PASSMG DALASIIPGSETTDIEGEPTSSLAGRKENSTLQEM  
NSTTESNIILSNVSVGAI TEATKMEVPSFDATF IPTPAQSTKFPDIFSVASSRLSNSPPMTISTHMTT QTGSSGAT  
SKIPLALDTSTLETSAGTPSVVTEGFAHSKITT AMNN DVKDVSQTNPFFQDEASSPSSQAPVLTLPSSVAFTPQW  
HSTSSPVSMSVLTSSLVKTAGKVDT SLETVSSPQSMSNTLDDISVTS ATT DIETTHPSINTVVTNVGTTGSAFE  
SHSTVSAYPEPSKVTSPNVTTSTMEDTTISRSIPKSSKTRTETETTSSLTPKLRETSISQEITSSTETSTV PYKEL  
TGATTEVSRTDV TSSSTS FPGPDQSTVSLDISTETNTRLSTSPIMTESAEITITTQGPHGAT SQDTFTMDPSNTT  
PQACIHSAMTHGFSQLDVTTLMSRIPQDVWTSPPSVDKTSSPSSFLSSPAMTPSLISSTLPEDKLSSPM TSLLTS  
GLVKITDILRTRLEPVTSLLPNFSSTS D KILATSKD SKDT KEIFPSINTEETNVKANN GHES HSPALADSETPKAT  
TQMVI TT VGDPA P STS MPV HGSSET TNIKREPTYFLTPRLRETSTS QESSFPTDTSFLLSKVPTGTITEV SSTGVN  
SSSKISTPDHDKSTVPPDTFTGEIPRVFTSSIKTKSAEMTITTQASPPESASHSTPLD STTLSQGGTHSTV TQGF  
PYSEVTTLMGMGP NVSWM TPPVEETSSVSSLMSSPAMTSPSPV SSTS PQSIPSSPLPV TALPTSVL VTTDVLGT

TSPESVTSSPPNLSSITHERTPATYKDTAHTEAAMHHSTNTAVTNVGTSGSGHKSQSSVLADSETSKATPLMSTTSTL  
GDTSVSTSTPNISQTNQIQTEPTASLSPRLRESSTSEKTSSTETNTAFSYVPTGAITQASRTEISSRTSISDLDR  
PTIAPDISTGMITRLFTSPIMTKSAEMTVTTQTTPGATSQGILPWDTSTTLFQGGTHSTVSQGFPHSEITLRSRT  
PGDVSWMTPPVEETSSGFLMSPSMTSPSPSSTSPEIPSSPLPVTLTSLVLTNVLGTTSPEVTSSPPNL  
SSPTQERLTTYKDTAHTTEAMHASMHTNTAVANVTSISGHESQSSVPADSHTSKATSPMGITFAMGDTSVSTSTPAF  
FETRIQTESTSSLIPGLRDTRTSEEINTVTETSTVLSEVPTTTEVSRTEVITSSRTTISGPDHSKMSPYISTETI  
TRLSTFPVTGSTEMAINTNQTGPIGTISQATLTDTSSTASWEGTHSPVTQRFPSEETTMSRSTKGVSWQSPPSV  
EETSSPSSPVPLPAITSHSSLYSAVGSSPTSALPVTSLLTSGRRKTIDMLDTHSELVTSSLPASSFSGEILTSEA  
STNTETIHFSENATAETNMGTTNSMHKLHSSVIHSQPSGHTPPKVTGSMMEDAIVSTSTPGSPETKNVDRDSTSPLT  
PELKEDSTALVMNSTTESNTVFSSVSLDAATEVSRAEVYYDPFTMPASAQSTKSPDISPEASSHSNSPPLTISTH  
KTIATQTGPSGVTLGQLTLDSTIATSAGTPSARTQDFVDSETTSVMNDNDVLKTPSFSAEEANSLSSQAPLLV  
TTSPSPVTSTLQEHTSSLVSVTSPVPTLAKITDMDTNLEPVTRSPQNLNRNLTSEATTDTHTMHPINTAVANV  
GTTSSPNEFYFTVSPDSDPYKATSAVVIITSTSGDSIVSTSMPRSSAMKKIESETTFSLIFRLRETSTSQKIGSSSDT  
STVFDKAFTAATTEVSRETELSSSRITSIQGTEKPTMSPDTSTRSVTMLSTFAGLTKSEERTIATQTGPHRATSQGTL  
TWDTTSITTSQAGTHSAMTHGFSQLDLSTLTSRVPEYISGTSPPSVEKTSSSSLLSLPAITSPSPVPTLPESRPSS  
PVHLTSLPTSGLVKTTDMLASVALPPNLGSTSHKIPTTSEDIKDEKMYPSTNIAVTNVGTTSEKESYSSVPAYS  
EPPKVTPMVTSFNIRDITVTSMPGSSEITRIEMESTFSLAHGLKGTSTSQDPIVSTEKSABLHKLTGATETSRT  
EVASSRRTSIPGPDHSTESPDISTEVIPSLPISLGITESSNMTIITRTGPPLGSTSQGFTLDTPTTSSRAGTHSMA  
TQEFPHSEMTVMNKDPEILSWTISSIEKTSFSSSLMPSPAMTSPPVSTLPKIHTTPSPMTSLLTPSLVMTTDT  
LGTSPEPTSSPPNLSSTSHEILTTDEDTTAIEAMHPSTSTAATNVETTSSGHGSQSSVLADSEKTKATAPMDTTST  
MGHTTVSTSMSVSSETTKIKRESTYSLPGLRETSISQNASFSTDTSIVLSEVPTGTTAEVRTEVTSSGRTSIPGP  
SQSTVLPEISTRMTRLFASPTMTEAEMTIPTQTGPSGSTSQDTLDTSTKSQAKTHSTLTQRFPSEMTTLM  
RGPGDMSWQSSPSLENPSSLPSLLSLPATTSPPPISSTLPVTISSPLVTSLLTSSPVTTDMHTSPELVTSPP  
KLSHTSDERLTTGKDNTNEAVHPSTNTAASNVEIPSSGHESPSSALADSETSKATSPMFITSTQEDTTVAISTPHF  
LETSRIQKESISSLSPKLRETGSSVETSSAIETSAVLSEVSIGATTEISRTEVTSSRTSISGSAESTMLPEISTTR  
KIIKFPTSPILAESSEMTIKTQTSPPGSTSESTFTLDTSTPSLVITHSTMTQRLPHSEITLVSRGAGDVPRPSSL  
PVEETSPSSQLSLSAMISPSPVSVTLPASSHSSASVTSLLTPQVKTEVLDASAEPETSSPPSLSSTSVEILAT  
SEVTTDTEKIHPFSNTAVKVGTSSTGHESPSSVLPDSETTKATSAMGTISIMGDTSVSTLPALSNTRKIQSEPAS  
SLTTRLRETSEETSLATEANTVLSKVSTGATTEVSRTEAISFSRTMSGPEQSTMSQDISIGTIPRISASSVLTE  
SAKMTITTQTGPSESTLESTLNLTATPSWVETHSIVIQGFPEMTSMGRGPGGVWPSPPFKETSPSSPLS  
LPAVTSPHPVSTTFLAHIPPSPLPVTSLLSGPATTTDILGSTEPGTSSSSLSHTSHERLTTYKDTAHTEAHVPS  
TNTGGTNVATTSSGYKSQSSVLADSSPMCTTSTMGDTSVLTSTPAFLETRRIQTELASSLTPGLRESSGSEGTS  
KMSTVLSKVPTGATTEISKEDVTSIPGPAQSTISPDISTRVWFSTSPVMTESAEITMNTHTSPLGATTQGTSTLD  
TSSTTSLSMTHSTISQGFSHSQMSTLMRRGPEDVWMSPPLLEKTRPSFSLMSSPATTSPSPVSVTLPESISSPLP  
VTSLLTSGLAKTDMHLKSSEPVTNSPANLSSSTSVEILATSEVTTDTEKTHPSSNRTVDVGTSSCHESTSFVLAD  
SQTSKVTSPMVITSTMEDTSVSTSTPGFFETSRQTEPTSSLTGLRKTSSEGTSLATESTVLSGVPTGATAEVS  
RTEVTSSSRTSISGFAQLTVSPETSTETITRLPTSSIMTESAEMMIKTQDPPGSTPESTHTVDISTTPNWVETHST  
VTQRFSHSEMTLVSRSRPGDMLWPSQSSVEETSSASSLLSLPATTSPSPVSVTLPEDFPSASLPVTSLLNPGLVITT  
DRMGIISREPGTSSTSNSSTSHERLTLEDVTDEDMQPSTHTAVNRTSISGHESQSSVLSDSETPKATSPMGTT

YTMGETSVSISTSDFEFETSRIQIEPTSSLTGLRETSSSERISSATEGSTVLSEVPSGATTEVSRTVEVISSRGTSMS  
GPDQFTISPDISTEAIRLSTSPIMTESAESAITIETGSPGATSEGTLTLDSTTTFWSGTHSTASPGFSHSEM TTL  
MSRTPGDVPWPSLPSVEEASSVSSSLSSPAMTSTSFFSTLPESISSSPHPVTALLTGPVKTDMLRTSSEPETSSP  
PNLSSTS AELATSEVTKDREKIHPSSNTPVNVGTIVYKHLSPSSVLADLVTKPTSPMATTSTLGNTSVSTSTPA  
FPETMMTQPTSSLTSGLREISTSQETSSATERSASLSGMPTGATTKVS RTEALSLGRSTPGPAQSTISPEISTETI  
TRISTPLTTGSAEMTITPKTGHS GASSQGTFTLDTSSRASWPGTHSAATHRSPHSGMTTPMSRGPEDVSWPSRPSV  
EKTSPSSLVSLSAVTSPSPLYSTPSESSHSSPLRVTSLFTPVMMKTTDMLDTSLEPVTTSPSMNITSDESLATSK  
ATMETEAIQLSENTAVTQMGTISARQE FYSSYPGLPEPSKVTSPVTSSTIKDIVSTTI PASSEITRIEMESTSTLT  
PTPRETSTSQEIHSAK P STV PYKALT SATIEDSMTQVMSSSRGPSPDQSTMSQDISTEVITRLSTSPIKTESTEMT  
ITTQTGSPGATSRGTLTLDSTTFMSGTHSTASQGFHSQMTALMSRTPGDVWL SHPS VEEASSASFSLSSPVMTS  
SSPVSS TLPDI IHSSSLPVTSLTSGLVKTTELLGSSE PETSSPPNLSSTS AELAITEVTTDTEKLEM TNVVTSG  
YTHESPSSVLADSVTTKATSSMGITYPTGDTNVL TSTPAFSDTSRIQTKSKLSLTPGLMETSISEETSSATEKSTVL  
SSVPTGATTEVSRTEAISSRTSIPGPAQSTMSSDTSMETITRISTPLTRKESTDMAITPKTGSPGATSQGFTLDS  
SSTASWPGTHSATTQRFPQS VVTPMSRGPEDVWPSPLSVEKNSSPSSLVSSSVTSPSPLYSTPSGSSHSSPV  
TSLFTSIMMKATDMLDASLEPETTSAPNMITSDES LAASKATTETEAIHV FENTAASHVETTSATEELYSSSPGFS  
EPTKVISPVVTSSSIRD NMVSTT MPGSSGIRIEIESMSSLTPGLRETRTSQDITSSTETSTVLYKMP SGATPEV  
TEVMPSSRTSIPGPAQSTMSDLISDEVVTRLSTSPIMTESAEITITQTGYSLAT SQVTPLGTSMTFLSGTHSTMS  
QGLSHSEMTNLMSRGPELSWTSPRFVETTRSSSLTSLPLTSLSPVSSTLLDSSPSSPLPVTS LILPGLVKTTEV  
LDTSEPKTSSSPNLSSTSVEIPATSEIMTDTEKIHPSSNTAVAKVRTSSVHESHSSVLADSETTITIPSMGITS  
VDDTVFTSNPAFSETRRIPTEPTFSLTPGFRETSTSEETTSITETSAVLYGVPTSATTEVSMTEIMSSNRHIPDS  
DQSTMSPDIITEVITRLSSSSMMESTQMTITTKQSSPGATAQSTLTATTAPLARTHSTVPPRFLHSEMTLMSR  
SPENPSWKSSLFVEKTSSSLSPVTTSPSVSSTLPQSI PSSSFVTSLLTPGMVTTDTSTEPGTSLSPLNSGT  
SVEILAASEVTTDTEKIHPSSMAVN VGTSSGHELYSSVSIHSEPSKATYPVGT PSSMAETSISTSM PANFETTG  
FEAEPFSHLTSGFRKTNMSLDTSSVPTNTPSSPGSTHLLQSSKTDFTSSAKTSSPDWPPASQYTEIPVDIITPFNA  
SPSITESTGITSFPESRFTMSVTESTHHLDLLPSAETISTGTVMPSLSEAMTSFATTGV PRAISGGSPFSRTES  
GPGDATLSTIAESLPSSTPVFSSSTFTTDSSTIPALHEITSSSATPYRVDTSLGTESSTEGRLVMVSTLDTSSQ  
PGRTSSSPILDTRMTE SVELGTVTSAYQVPSLSTRLRTDGIMEHITKIPNEAAHGTIRPVKG QTSTSPASP KGL  
HTGGTKRMETTTALKTTALKTSRATL TS VYTPTL GTL TPL N ASM QMASTI PT EMM ITTPYVFPDV PETTSSL  
ATSLGAETSTALPRTT SVFNRESETTASL VSRSGAERSPVIQTL DVSS SEPDTTASWV IHPAET IPTVSKTPNFF  
HSELD TVSSTATSHGADV SSAIPTNISP SELD ALTPLVTISG TDSTT FPTLK SPHETETRTTWLTHPAET SSTIP  
RTIPNF SHES DATPSIATSPGAETSSAIPIMTVSPGAEDLVT SQVTSSG DRNMTIPTL TLSPGEPKTIA SLVTHP  
EAQTSSAIPTSTISPAV SRLV TSMV TSLAAK TSTT NRALT NSPGEPAT TVSLV THPAQ TSPTV WTT SIFFHSKSDT  
TPSMTTSHGAESSSAVPTPTVSTE VPGVVTPLV TSSRAV TSTTIP ILT LSS SE PETT PSMAT SHG VEEASSA IPTPTV  
SPG VPGVVTSLV TSSRAV TSTTIP ILT FSL GE PETT PSMAT SHG TEAGS A VPTV LPEV PGV TSLV ASSRAV TSTL  
PTL TLSPGE PETT PSMAT SHG AEAS STVPTV SPEV PGV VTSLV TSSG VN STS IPTL L ISPGE LETT PSMAT SHG AE  
ASSA VPTV SPG VGV TPLV TSSRAV TSTTIP ILT LSS SE PETT PSMAT SHG VEA SAVL TVSPEV PGV TSLV  
SSRAV TSTTIP LT IS SDE PETT SLV THSE AKMISAIPTLA VSPV QGLV TSLV TSSG SETS AF SNLTV ASSQ PET  
IDS WVAHPGTEASSVVPTLTVSTGEPFTNISLVTHPAESSSTLPR TT SRF SHSELD TMPSTV TSPEAESSA ISTT I  
SPGIPGVLTSLV TSSGRD ISATFPTV PES PHE SEAT ASWVTHPAV TSTV PR TPP NYSHSEPD TTPS IATSPGAEAT

SDFPTITVSPDVPDMVTSQVTSSGTDTSITIPTLTSSGEPETTSFITYSEHTSSAIPTLPVSPGASKMLTSLVI  
SSGTDSTTFPTLTETPYEPETTAIQLIHPAETNTMVPRTTPKFHSKSDTLPVAITSPGPEASSAVTTTISPD  
SDLVTSVPSSGTDSTTFPTLSETPYEPETTATWLTHPAETSTTVSGTIPNFSHRGSDTAPSMVTSPGVDRSGVP  
TTTIPPSIPGVVTSQVTSSATDTSTAIPTLTPSPGEPETTASSATHPGQTGFTVPIRTVPSSEPDTMASWVTHPPQ  
TSTPVSRTTSSFSHSSPDATPMATSPRTEASSAVLTTISPGAPEMVTSQLTSSGAATSTVPTLTHSPGMETTAL  
LSTHPRTETSKEFPASTVFPQVSETTASLTIRGAETSTALPTQTSSLFTLLVTGTSRVDSLPTASPGVSAKTAPL  
STHPGTETSTMPISTLSLGLLETTGLLATSSAETSTSTLTLVSPAVGLSSASITTDKPQTWSWNTETSPSVT  
SVGPEFSRTVTGTTMLIPSEMPPKTSHGEVSPPTILRTTMVEATNLATTGSSPTVAKTTTFNLAGSLFTP  
LTTPGMSTLAESVTSRTSYNHRSWISTTSSYNRRYWTPATSTPVTSFGISTSSIPSSTAATVPFMVPFTLNFT  
ITNLQYEEDMRHPGSRKFNATERELQGLLKPLFRNSSLEYLYSGCRLASLRPEKDSSATAVDAICTHRDPDPELGLD  
RERLYWELSNTNGIQELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSMPTSTPGTSTVDGTSGPSSPSPTAGPLLMPFTLN  
FTITNLQYEEDMRRTGSRKFNTMESVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGAATGVDAICTHRDPKSPG  
LNREQLYWELSKELTNDIEELGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSVSTTSTPGTSTVDLRTSGTPSSLSSPTIMAAGPLLVP  
FTLNFTITNLQYEEDMRHPGSRKFNTTERVLQTLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAICHL  
KSPGLNRERLYWELSSQLTNGIKELGPyTLDRNSLYVNGFTHRSTSSTPGTSTVDLGTSGPSSLPSPATAGPLL  
VLFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSRKFNTTERVLQTLGPMFKNTSVGPLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAICHL  
DPKSPGVDRQLYWELSSQLTNGIKELGPyTLDRNSLYVNGFTHWIPVPTSSTPGTSTVDLGTSGPSSLPSPTAGPL  
LVPFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSRKFNTTERVLQTLGPMFKNTSVGPLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAICHL  
LDPKSPGVDRQLYWELSSQLTNGIKELGPyTLDRNSLYVNGFTHQTSAPNTSTPGTSTVDLGTSGPSSLPSPSTSAG  
PLLPVFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSRKFNTTERVLQGLLGPLKNTSVGLLYSGCRLTLLRPEKNGAATGMDAICS  
HRLDPKSPGLNREQLYWELSSQLTNGIKELGPyTLDRNSLYVNGFTHRSSVAPTSTPGTSTVDLGTSGPSSLPSPTT  
AVPLLPVFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSRKFNTTERVLQGLLGPLKNTSVGLLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAI  
CTHHLNPQSPGLDREQLYWQLSQMTNGIKELGPyTLDRNSLYVNGFTHRSSGLTTSTPGTSTVDLGTSGPSSLPSP  
TTTGPLLVPFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSRKFNTTERVLQGLLGPLKNTSVGLLYSGCRLTLLRPEKDGATRVD  
AICTHRDPDKIPGLDRQQLYWELSSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFTQRSSVPTTSTPGTFTVQPETSETPSSL  
GPTATGPVLLPFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSRKFNTTERVLQGLLGPLKNTSVGLLYSGCRLTLLRPEKDGATR  
VDAVCTHRDPDKSPGLDRERLYWKLSQLTHGITELGPyTLDRHSLYVNGFTHQSSMTTRPDTSTMHLATSRTPAS  
LSGPMTASPLLVLFITNFTITNLRYEENMHPGSRKFNTTERVLQGLLRPVFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPKKDGAA  
TKVDAICTYRDPDKSPGLDREQLYWELSSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFTQRSSVPTTIPGPTVDLGTSGP  
VSKPGPSAASPLLVLFITNLRYEENMQHPGSRKFNTTERVLQGLLRSLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKD  
TATGVDAICTHHPDPKSPRLDREQLYWELSSQLTHNITELGPyALDNDSLFVNGFTHRSSVSTTSTPGTPTVYL  
TPASIFGPSAASHLLILFTLNFTITNLRYEENMWPGSRKFNTTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKD  
GEATGVDAICTHRDPDTGPGLDREQLYLELSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLN  
FTINNLRYMADMGQPGSLKFNITDNVMQHLLSPLFQRSSLGARYTCRVIALRSVKNGAETRVDLLCTYLQPLSGPG  
LPIKQVFHELSQQTHGIRLGPYSLDKDSLNLNGYNEPGPDEPPTPKPATTFLPPLSEATTAMGYHLKTLTNFTI  
SNLQYSPDMGKGSATNFNSTEGVLQHLLRPLFQKSSMGPFYLCQLISLRPEKDGAATGVDTTCTYHPDPVGPGDIQ  
QLYWELSSQLTHGVTQLGFYVLDRDSLFINGYAPQNLSIRGEYQINFHIVNWNLNSNPDPSTSSEYITLLRDIQDKVTT  
YKGSQLHDTFRFCLVTNLTMDSVLTVKALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNASFHWLGSTYQLVDIHTEMESVYQP  
TSSSSTQHFYLNFTITNLPYSQDKAQPGTTNYQRNKRNIEDALNQLFRNSSIKSYFSDCQVSTFRSVPNRHHTGVDS

LCNFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLPFWAVILIGLAGLLGVIT  
CLICGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQCPGYYQSHLDLEDLQ

[0178] 可以通过筛选与由SEQ ID NO:149所定义的氨基酸序列的结合,来确定可以结合到肿瘤相关抗原NaPi2b的抗原结合位点。

[0179] SEQ ID NO:149

[0180] MAPWPELGDAQPNDPKYLEGAAGQQPTAPDKSKETNKTDNTTEAPVTKIELLPSYSTATLIDEPTEVDDP  
WNLPLTDGSIKWSERTKGKILCFFQGIGRLILLGFYFFVCSLDILSSAFQLVGGKMAGQFFSNSSIMSNPLL  
LVIGVLVTVLVQSSSTSTSIVVSMVSSLLTVRAAIPIIMGANIGTSITNTIVALMQVGDRSEFRRAFAGATVHDFF  
NWLSVLVLLPVEVATHYLEIITQLIVESFHFKNGEDAPDLLKVIKPFTKLIVQLDKKVISQIAMNDEKAKNLSLV  
IWCKTFTNKTQINVTPSTANCTSPSLCWTDGIQNWTMKNVTYKENIAKCQHIFVNFDLAVGTILLILSLLVLC  
GCLIMIVKILGSVLKGQVATVIKKINTDFPFPAWLTYLAILVGAGMTFIVQSSSVFTSALTPLIGIGVITIERA  
YPLTLGSNIGTTTAILAALASPGNALRSSLQIALCHFFFNISGILLWYPPIPTRLPIRMAKGLGNISAKYRWFAVF  
YLIIFFFLIPLTVFGLSLAGWRVLVGVPVVFIILVLCRLLQSRCPRVLPKKLNWNFLPLWMRSLKPWDAVVS  
KFTGCFQMRCCCCCRVCCRACCLLCDCPKCCRSKCCEDLEEAQEQQDVPVKAPETFDNITISREAQGEVPASDSKT  
ECTAL

[0181] 可以通过筛选与由SEQ ID NO:150所定义的氨基酸序列的结合,来确定可以结合到肿瘤相关抗原结合素4的抗原结合位点。

[0182] SEQ ID NO:150

[0183] MPLSLGAEMWGPEAWLLLLLASFTGRCPAGELETSDVVTVVLGQDAKLPFYRGDSGEQVGQVAWAR  
VDAGEGAQELALLHSKYGLHVSPAYEGRVEQPPPPRNPLGSVLLRNAVQADEGEYECSVTFPAGSFQARLRLRV  
VPPLPSLNPGPALEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDTEVKGTTSSRSFKHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTC  
VVSHPGLLQDQRITHILHVSFLAEASVRGLEDQNLWHIGREGAMLKCLSEGQPPPSYNTRLGPLSGVRVDGDTL  
GFPPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQTVDVDLPQEDSGKQVDLVSASVVVGVIAALLFCLLVVVVVLMRSYHRR  
KAQQMTQKYEEEELTRENSIRRLHSHTDPRSQPEESVGLRAEGHPDSLKDNSSCSVMSSEEPEGRSYSTLTVREI  
ETQTELLSPGSGRAEEEEQDEGIKQAMNHFVQENGTLRAKPTGNGIYINGRGHLV

[0184] 可以通过筛选与单唾液酰四己糖基神经节苷脂的结合,来确定可以结合到肿瘤相关抗原岩藻糖基-GM1的抗原结合位点。

[0185] 可以通过筛选与由SEQ ID NO:151所定义的氨基酸序列的结合,来确定可以结合到肿瘤相关抗原ADAM8的抗原结合位点。

[0186] SEQ ID NO:151

[0187] LGATGHNFTLHLRKNRDLLGSGYTETYTAANGSEVTEQPRGQDHCFYQGHVEGYPDSAASLSTCAGLRG  
FFQVGSDLHLIEPLDEGGEGGRHAVYQAEHLLQTAGTCGVSDDSLGSLLGPRTAAVFRPRPGDSLPSRETRYVELYV  
VVDNAEFQMLGSEAAVRHRLEVNVHVDKLYQKLNFRVVLVGLEIWNQDRFHVPDPSTVLENLLTWQARQRTRRH  
LHDNVQLITGVDFGTGTTVG FARVSAMCSHSSGAVNQDHSKNPVGVACTMAHEMGHNLGMDHDENVQGCRCQERFEAG  
RCIMAGSIGSSFPRMFSDCSQAYLESFLERPQSVCPLANAPDL SHLVGGPVCGNLFVERGEQCDCGPPEDCRNRCCNS  
TTCQLAEGAQCAHGTCCQECKVKPAGELCRPKKDMCDLEEFCDGRHPECPEADQENGTPCSGGCYNGACPTLAQQ  
CQAFWGPQQAAEESCFSYDILPGCKASRYRADMCGVLQCKGGQQPLGRAICIVDVCHALTTEDGTAYEPVPEGTRC  
GPEKVCWKGRQDLHVYRSSNC SAQCHNHGVNCNHQECHCHAGWAPPACKLLTEVHAASGSLPVVVVLVLLAVV  
LVTLAGIIIVYRKARSRILSRNVAPKTTMGRSNPLHQASRVPAKGAPAPS RGPQELVPTTHPGQPARHPASSVAL

KRPPPAPPVTSSPPFPVPVYTRQAPKQVIKPTFAPPVPPVKPGAGAANPGPAEGAVGPVALKPPIQRKQGAGAPT  
AP

[0188] 可以通过筛选与由SEQ ID NO:152所定义的氨基酸序列的结合,来确定可以结合到肿瘤相关抗原ADAM9的抗原结合位点。

[0189] SEQ ID NO:152

[0190] MGSGARFPSGTLRVWLLLLGLVGPVLGAARPGFQQTSHLSSYEIITPWRLTRERREAPRPYSKQVSYV  
IQAEKGKEHI IHLERNKDLLPEDFVVYTYNKEGTI TDHPNIQNHCHYRGYVEGVHNSSIALSDCFGRLRGLLHLENAS  
YGIEPLQNSSHFEHI IYRMDDVYKEPLKCGVSNKDIKEKETAKDEEEPPSMTQLLRRRAVLPQTRYVELFIVVDKE  
RYDMMGRNQTAVEREEMILLANYLDSMYIMLNIRIVLVGLEIWTNGNLINIVGGAGDVLGNFVQWREKFLITRRRHDS  
AQLVLKKGFGGTAGMAFGTVCSRSHAGGINVFGQITVETFASIVAHELGHNLGMNHDDRDCSCGAKSCIMNSGAS  
GSRNFSSCSAEDFEKLTNKGGNCLLNIPKPDEAYSAPSCGNKLVDAGEECDCGTPKECELDPCCEGSTCKLKSFAE  
CAYGDCCDKDCRFLPGGTLRGKTSECDVPEYCNGSSQFCQPDVF IQNGYPCQNNKACYNGMCQYYDAQCQVIFGSK  
AKAAPKDCFIEVNSKGDRFGNCFGSGNEYKKCATGNALCGKLQCENVQEIPVFGIVPAIIQTPSRGTTKCWGVDQFLG  
SDVPDPGMVNENGTKGAGKICRNFQCVDASVNYDCVQKKCHGHGVCNSKNCHCENGWAPPNCETKGYGGSVDSG  
PTYNEMNTALRDGLLVFFFILVPLIVCAIFIFIKRQLWRSYFRKKRSQTYESDGKNQANPSRQPGSVPRHVSPVTP  
PREVPIYANRFAVPTYAAKQPQQFPSRPPPQPKVSSQGNLIPARPAPAPPLYSSLT

[0191] 可以通过筛选与由SEQ ID NO:153所定义的氨基酸序列的结合,来确定可以结合到肿瘤相关抗原SLC44A4的抗原结合位点。

[0192] SEQ ID NO:153

[0193] MGGKQRDEDDEAYGKPVKYDPSFRGPIKNRSCTDVICCVLFLLFILGYIVVGIVAWLYGDPRQVLYPRN  
STGAYCGMGENKDPYLLYFNIFSCILSSNIISVAENGLQCPTPQCVSSCPEDPWTVGKNEFSQTGEVFYTKNRN  
FCLPGVPWNMTVITSQQELCPSFLLPSAPALGRCPWTNVTPPALPGITNDTTIQQGISGLIDSLNARDISVKIFE  
DFAQSWEWILVALGVALVLSLLFILLRLVAGPLVLVILGVGVLAYGIYYCWEERYVRDKGASISQLGFTTNLS  
AYQSVQETWLAALIVLAVLEAILLMLIFLRQRIRIAIALLKEASKAVGQMMSTMFYPLTFVLLICIAYWAMTAL  
YLATSGQPQYVLWASNISSPGCEKVPINTSCNPTAHLVNSSCPGLMCVQGYSSKGLIQRSVFNLQIYGVGLFWTL  
NWVLALGQCVLAGAFASFYWAFHKPQDIPTFPLISAFIRTLRYHTGSLAFGALILTVQIARVILEYIDHKLGVQN  
PVARCIMCCFKCCLWCLEKFIFKFLNRNAYIMIAIYGKNFCVSAKNAFMLLMRNIVRVVLDKVTDLLFFGKLLVVG  
GVGVLSSFFSGRIPGLKDFKSPHLNYYWLPIMTSILGAYVIASGFFSVFGMCVDTLFLCFLEDLERNNNGSLDRPY  
YMSKSLLKILGKKNEAPPDNKKRKK

[0194] 可以通过筛选与由SEQ ID NO:154所定义的氨基酸序列的结合,来确定可以结合到肿瘤相关抗原CA19-9的抗原结合位点。

[0195] SEQ ID NO:154

[0196] MACSRPPSQCEPTSLPPGPPAGRRHLPLSRRRREMSSNKEQRSAVFVILFALITILILYSSNSANEVFH  
YGSLRGRSRRPVNLKKWSITDGYVPILGNKTLPSRCHQCVIVSSSSHLLGKLGPEIERAECTIRMNDAPTTGYSAD  
VGNKTTYRVVAHSSVFRVLRRPQEfvNRTPETVFIFWGPPSKMQKPQGSLVRVIQRAGLVFPNMEAAYAVSPGRMRQF  
DDLFRGETGKDREKSHSWLSTGWFTMVIABELCDHVHVYGMVPPNYCSQRPRLQRMPYHYYEPKGPDECVTYIQNEH  
SRKGNNHHRFITEKRVFSSWAQLYGITFSHPSWT

[0197] 可选地,表3列出了相组合可以结合到CA125(阿巴伏单抗、sofituzumab)、NaPi2b(lifastuzumab)、结合素4(enfortumab)、岩藻糖基-GM1(描述在美国专利申请公布号

20130142789中,具体序列通过引用并入本文)或SLC44A4(描述在国际申请公布号W02010111018中,具体序列通过引用并入本文)的重链可变结构域和轻链可变结构域的肽序列。

表 3			
克隆	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列	
[0198]	阿巴伏单抗	<p>QVKLQESGAELARPAGASVKLSC KASGYTFTNYWMQWVVKQRPG QLDWIGAIYPGDGNTRYTHKF KGKATLTADKSSTAYMQLSSL ASEDSGVYYCARGEGNYAWFA YWGQGTTVTVSSA (SEQ ID NO: 155) CDR1 (SEQ ID NO: 156) - GYTFTNY CDR2 (SEQ ID NO: 157) - YPGDGN CDR3 (SEQ ID NO: 158) - GEGNYAWFAY</p>	<p>DIELTQSPASLSASVGGETVTITC QASENIYSYLAWHQQKQGKSP QLLVYNNAKTLAGGVSSRFSGSG SGTHFSLKIKSLQPEDFGIYYCQ HHYGILPTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 159) CDR1 (SEQ ID NO: 160) - ENIYSYLA CDR2 (SEQ ID NO: 161) - NAKTLAG CDR3 (SEQ ID NO: 162) - QHHYGILPT</p>
	sofituzumab	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGYSITNDYAWNWRQAPG KGLEWVGYISYSGYTTYNPSLK SRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARWTSGLDYWGQ GTLTVSSA (SEQ ID NO: 163) CDR1 (SEQ ID NO: 164) - GYSITNDY CDR2 (SEQ ID NO: 165) - SYSGY CDR3 (SEQ ID NO: 166) - WTSGLDY</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC KASDLIHNLAWYQQKPGKAP KLLIYGATSLETGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YWTPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 167) CDR1 (SEQ ID NO: 168) - DLIHNWLA CDR2 (SEQ ID NO: 169) - GATSLET CDR3 (SEQ ID NO: 170) - QQYWTPFT</p>
	lifastuzumab	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFSFSDFAMSWVRQAPGK GLEWVATIGRVAFHTYYPDMSM KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARHRGFDVGHF DFWGQGT LTVSSA (SEQ ID NO: 171) CDR1 (SEQ ID NO: 172) - GFSFSDF CDR2 (SEQ ID NO: 173) - GRVAFH CDR3 (SEQ ID NO: 174) - HRGF DVGHFDF</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RSSETLVHSSGNTYLEWYQQKP GKAPKLLIYRVSNRFSGVPSRFS GSGSGTDFLTISSLQPEDFATY YCFQGSFNPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 175) CDR1 (SEQ ID NO: 176) - ETLVHSSGNTYLE CDR2 (SEQ ID NO: 177) - RVSNRFS CDR3 (SEQ ID NO: 178) - FQGSFNPLT</p>
	enfortumab	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYNNMNWVRQAPGK GLEWVSYI SSSSTI YYADSVKG RFTISRDN AKNSL SLSQMNSLRD EDTAVYYCAR AYY YGMDVWG QGTTVTVSSA (SEQ ID NO: 179) CDR1 (SEQ ID NO: 180) - GFTFSSY CDR2 (SEQ ID NO: 181) - SSSSST CDR3 (SEQ ID NO: 182) - AYYYGMDV</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC RASQGISGWLA WYQQKPGKAP KFLIYAAS T LQSGVPSRF SGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANSFPPTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 183) CDR1 (SEQ ID NO: 184) - QGISGWLA CDR2 (SEQ ID NO: 185) - AASTLQS CDR3 (SEQ ID NO: 186) - QQANSFPPT</p>
	抗岩藻糖基-GM1 抗体	<p>EVQLVESGGGSVQPGESLRLSC VASGFTFSRYKMNWVRQAPGK GLEWVSYISRSGRDIYYADSVK</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGISSWLA WYQQKPEKAP KSLIYAASSLQSGVPSRF SGSGS</p>

表 3		
克隆	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
[0199]	GRFTISRDNKNSLYLQMNSLR DEDTAVYYCAGTVTTYYYYDFG MDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 187) CDR1 (SEQ ID NO: 188) - GFTFSRY CDR2 (SEQ ID NO: 189) - SRSGRD CDR3 (SEQ ID NO: 190) - TVTTYYYYDFGMDV	GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YNSYPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 191) CDR1 (SEQ ID NO: 192) - QGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO: 193) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO: 194) - QQYNSYPPT
	抗 SLC44A4 抗体	DIQMTQSPSTLSASIGDRVITTC RASQGISYYLAWYQQKPGKIPK LLIYDTSSLQSGVPSRFSGSRSG TDLSLTISLQPEDVATYYCQRY DSAPLTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 199) CDR1 (SEQ ID NO: 200) - QGISYYLA CDR2 (SEQ ID NO: 201) - DTSSLQS CDR3 (SEQ ID NO: 202) - QRYDSAPLT

[0200] 下面列出的是连接到抗体恒定区的scFv的实例,所述恒定区还包括能够使两条多肽链异二聚化的突变。将含有来自于抗NKG2D抗体的重链可变结构域( $V_H$ )和轻链可变结构域( $V_L$ )的scFv用于制备本公开的多特异性蛋白。每个序列代表 $V_L$ - $(G4S)_4$ - $V_H$ -铰链(AS或GAS)-含有异二聚化突变的Fc(下划线)。 $V_L$ 和 $V_H$ 含有100 $V_L$ -44 $V_H$  S-S桥(下划线),并且可以来自于任何靶向肿瘤或结合NKG2D的抗体。Ala-Ser(AS,粗体且下划线)被包含在肘状结构铰链区序列处,以在柔性与最佳几何形状之间平衡。在某些实施方式中,可以将另外的Gly添加到AS序列的N-端,产生具有序列Gly-Ala-Ser(GAS,粗体且下划线)的铰链。在某些实施方式中,可以将另外的序列Thr-Lys-Gly在铰链处添加到AS序列。在下面的段落中列出的序列中, $(G4S)_4$ 连接物被下划线。

[0201] 本公开的TriNKET是结合NKG2D的F4-TriNKET-EpCAM,其包含含有SEQ ID NO:203的序列的第一多肽(F4-EpCAMFc-AJ链B-结合NKG2D的scFv),和含有SEQ ID NO:204的序列的第二多肽(抗EpCAM抗体HC-铰链-Fc)。所述结合NKG2D的F4-TriNKET-EpCAM还包含两条靶向EpCAM的轻链,其各自包含抗EpCAM抗体 $V_L$ -包含SEQ ID NO:214的序列的恒定结构域。例如,在图36的结构中,当所述Fab片段靶向EpCAM时,所述结合NKG2D的F4-TriNKET-EpCAM包括形成所述TriNKET的一条臂的SEQ ID NO:203和SEQ ID NO:214,以及形成所述TriNKET的第二条臂的SEQ ID NO:204和SEQ ID NO:214。

[0202] 所述臂各自包含结合EpCAM的Fab片段,其包含:重链部分,其包含重链可变结构域和CH1结构域,其中所述重链可变结构域被连接到所述CH1结构域;以及轻链部分,其包含轻链可变结构域和轻链恒定结构域(SEQ ID NO:214)。在所述第一条臂中(例如在F4-EpCAMFc-AJ链B-结合NKG2D的scFv中),所述CH1结构域被连接到所述Fc结构域,后者被连接到靶向scFv的NKG2D,形成包含SEQ ID NO:203的序列的多肽。在所述第二条臂中,所述CH1结构域被连接到所述Fc结构域,形成包含SEQ ID NO:204的序列的多肽。

[0203] 例如, F4-EpCAMFc-AJ链B-结合NKG2D的scFv (SEQ ID NO:203) 包含靶向EpCAM的重链可变结构域 ( $V_H$ ) (SEQ ID NO:139) 和连接到Fc结构域(铰链-CH2-CH3)的CH1结构域, 其在所述Fc的C-端处被连接到结合NKG2D的单链可变片段 (scFv)。所述SEQ ID NO:203中的Fc结构域包含S354C替换, 其与另一个Fc结构域 (SEQ ID NO:204, 在下文描述) 中的Y349C替换形成二硫键。所述SEQ ID NO:203中的Fc结构域包括Q347R、D399V和F405T替换。所述结合NKG2D的scFv由SEQ ID NO:205的氨基酸序列表示, 并且包括通过  $(G4S)_4$  连接物 GGGGSGGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:206) 连接到重链可变结构域 ( $V_H$ ) 的轻链可变结构域 ( $V_L$ )。所述包含在SEQ ID NO:205内的  $V_L$  和  $V_H$  被连接成  $V_L - (G4S)_4 - V_H$ ;  $V_L$  和  $V_H$  含有  $100V_L - 44V_H$  S-S桥 (分别从G100C和G44C替换得到) (半胱氨酸残基为粗体-斜体-下划线)。正如在SEQ ID NO:203中所表示的, 所述Fc结构域的C-端通过短的SGSGGGGS连接物 (SEQ ID NO:207) 连接到所述scFv (SEQ ID NO:205) 的N-端。

[0204] 结合NKG2D的scFv

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITCRASQGISSWLA~~WYQQKPGKAPKLIY~~AASS  
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGVSFPTFGCGTKVEIK

[0205] ~~GGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSY~~  
~~SMNWVRQAPGKCLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS~~ (SEQ ID NO: 205)

[0206] F4-EpCAMFc-AJ链B-结合NKG2D的scFv

EVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGVVKQRPGHGLEWIGDI  
FPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLRNWD

EPMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVPLAPSSKSTSGGTAA~~LGCLVKDYFPEP~~  
VTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKP

SNTKVDKKVEPKSCDKTH~~T~~CPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVT  
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN~~AK~~KPREEQYNSTYRVVSVLTVLH

[0207] QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPP~~CR~~DELTKNQ  
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFTLYSKLTVDKS  
RWQQGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGS~~G~~SGGGSDIQMTQSPSSVSA  
SVGDRVITCRASQGISSWLA~~WYQQKPGKAPKLIY~~AASSLQSGVPSRFSGSG  
SGTDFLTISLQPEDFATYYCQQGVSFPTFGCGTKVEIKGGGGSGGGSGGG  
GGSGGGSEVQLVESGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGK  
CLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC  
ARGAPMGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 203)

[0208] 抗EpCAM抗体HC-铰链-Fc (SEQ ID NO:204) 包括靶向EpCAM的重链可变结构域和连接到Fc结构域(铰链-CH2-CH3)的CH1结构域。所述SEQ ID NO:204中的Fc结构域包括Y349C替换, 其与所述连接到结合NKG2D的scFv (SEQ ID NO:203) 的Fc的CH3结构域中的S354C替换形成二硫键。在SEQ ID NO:204中, 所述Fc结构域还包括K360E和K409W替换。

- [0209] 抗EpCAM抗体V<sub>H</sub>-CH1-Fc  
EVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDI  
FPGSGNIHYNEFKKGATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLRNWD  
EPMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEP  
VTVSWNSGALTSGVHTFPAPLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKP
- [0210] SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVT  
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTEENQ  
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDK  
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 204)
- [0211] 抗EpCAM抗体V<sub>L</sub>-恒定结构域(SEQ ID NO:214)包括靶向EpCAM的轻链部分,其包含轻链可变结构域和轻链恒定结构域。
- [0212] 抗EpCAM抗体V<sub>L</sub>-恒定结构域
- [0213] ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF  
TGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCNN  
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
(SEQ ID NO:214)
- [0214] 在示例性实施方式中,所述连接到结合NKG2D的scFv片段的Fc结构域包含K360E和K409W的突变,并且所述连接到EPCAM Fab片段的Fc结构域包含用于形成异二聚体的匹配的突变Q347R、D399V和F405T。
- [0215] 在示例性实施方式中,所述连接到结合NKG2D的scFv的Fc结构域在所述CH3结构域中包括Y349C替换,其与未连接到结合NKG2D的scFv的Fc结构域上的S354C替换形成二硫键。
- [0216] 另一个本公开的TrinKET是结合NKG2D的F3' -TrinKET-EPCAM,其序列在下文描述(CDR (Kabat编号)被下划线)。
- [0217] 某些本公开的TrinKET采取A49-F3' -TrinKET-EPCAM的形式,其序列在下文提供(CDR (Kabat编号)被下划线)。
- [0218] A49-F3' -TrinKET-EPCAM包括:结合EPCAM的单链可变片段(scFv) (SEQ ID NO:208和209是这种结合EPCAM的scFv多肽的示例性序列),其通过包含Gly-Ala-Ser的铰链(例如在SEQ ID NO:210和SEQ ID NO:211中)连接到Fc结构域;以及结合NKG2D的Fab片段("A49"),其包括包含重链可变结构域(SEQ ID NO:85)和CH1结构域的重链部分,以及包含轻链可变结构域(SEQ ID NO:86)和轻链恒定结构域的轻链部分,其中所述重链可变结构域被连接到所述CH1结构域,并且所述CH1结构域被连接到所述Fc结构域。所述连接到靶向EpCAM的Fab的Fc结构域包含Q347R、D399V和F405T替换,用于与包含K360E和K409W替换的Fab(参见例如下文描述的SEQ ID NO:212)形成异二聚体。
- [0219] 本公开的结合EPCAM的scFv可以包括使用(G4S)<sub>4</sub>连接物连接到轻链可变结构域的重链可变结构域(被表示成V<sub>L</sub>(G4S)<sub>4</sub>V<sub>H</sub>或LH,其中V<sub>L</sub>在V<sub>H</sub>的N-端,和被表示成V<sub>H</sub>(G4S)<sub>4</sub>V<sub>L</sub>或HL,其中V<sub>H</sub>在V<sub>L</sub>的N-端)。SEQ ID NO:208和209是这种结合EPCAM的scFv多肽的示例性序列。所述包含在scFv (SEQ ID NO:208或209)内的V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>含有100V<sub>L</sub>-44V<sub>H</sub> S-S桥(由分别的G100C和

G44C替换得到) (在下述序列中半胱氨酸残基是粗体-斜体-下划线)。在SEQ ID NO:208和SEQ ID NO:209中(G4S)<sub>4</sub>是粗体-下划线的序列GGGGSGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:206)。

- [0220] EPCAM(MT110LH) scFv  

$$\text{ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPK}$$

$$\text{LLIYWASTRESGPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCQNDYSYPLTF}$$

$$\text{GC GTKLEIK \underline{\underline{GGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKIS}}$$

$$\text{CKASGYAFTNYWLGVVKQRPGH \underline{\underline{CLEWIGDIFPGSGNIHYNEFKGKATLTA}}$$

$$\text{DKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLNWDEPMDYWGQGTTVTVSS}$$
 (SEQ ID NO: 208)
- [0221] EPCAM(MT100HL) scFv  

$$\text{EVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGVVKQRPGH \underline{\underline{CLEWIGDI}}$$

$$\underline{\underline{FPGSGNIHYNEFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLNWD}}$$

$$\underline{\underline{EPMDYWGQGTTVTVSS \underline{\underline{GGGGSGGGSGGGSGGGSELVMTQSPSSLTVT}}}}$$

$$\text{AGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIY \underline{\underline{WASTRESGP}}}$$

$$\text{DRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCQNDYSYPLTFG \underline{\underline{CGTKLEIK}}}$$
 (SEQ ID NO: 209)
- [0222] SEQ ID NO:210和SEQ ID NO:211代表了结合EPCAM的scFv的两个序列,其可以通过包含Gly-Ala-Ser的铰链(粗体-下划线)连接到Fc结构域。所述连接到scFv的Fc结构域包括Q347R、D399V和F405T替换。  
[0223] EPCAM(MT110LH) scFv-Fc  

$$\text{ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPK}$$

$$\text{LLIYWASTRESGPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCQNDYSYPLTF}$$

$$\text{GC GTKLEIK \underline{\underline{GGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKIS}}$$

$$\text{CKASGYAFTNYWLGVVKQRPGH \underline{\underline{CLEWIGDIFPGSGNIHYNEFKGKATLTA}}$$

$$\text{DKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLNWDEPMDYWGQGTTVTVSS \underline{\underline{GASD}}}$$

$$\text{KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF}$$

$$\text{[0227] NWYVDGVEVHNNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN}$$

$$\text{KALPAPIEKTIASKAKGQP\textbf{REPRVYTLPP}CRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV}$$

$$\text{EWESNGQPENNYKTPPVLYSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE}$$

$$\text{ALHNHYTQKSLSLSPG}$$
 (SEQ ID NO: 210)
- [0228] EPCAM(MT110HL) scFv-Fc

EVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQRPGHCLEWIGDI  
FPGSGNIHYNEFKKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLRNWD  
EPMDYWQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSELVMTQSPSSLTVT  
AGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQNYLTWYQQKPGQPKLLIYWASTRESGVP

[0229] DRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGCGTKLEIKGASDK

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
 WYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
 ALPAPIEKTIKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYKTPPVLYSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA

LHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 211)

[0230] SEQ ID NO:212代表了Fab片段的重链部分,其包含NKG2D结合位点的重链可变结构域(SEQ ID NO:85)和CH1结构域,并被连接到Fc结构域。所述SEQ ID NO:212中的Fc结构域在所述CH3结构域中包括Y349C替换,其与所述连接到结合EpCAM的scFv(例如SEQ ID NO: 210和SEQ ID NO:211)的Fc上的S354C替换形成二硫键。在SEQ ID NO:212中,所述Fc结构域还包括K360E和K409W替换。

[0231] A49-V<sub>H</sub>

[0232] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAGWFDPWGQGTLTVSS(SEQ ID NO:85)

[0233] A49 V<sub>H</sub>-CH1-Fc

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAGWFDPWGQGTLTVSSASTKGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVYDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTE

[0234] KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVYDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 212)

[0235] SEQ ID NO:213代表了Fab片段的轻链部分,其包含NKG2D结合位点的轻链可变结构域(SEQ ID NO:86)和轻链恒定结构域。

[0236] A49-V<sub>L</sub>

[0237] DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGTKVEIK(SEQ ID NO:86)

[0238] A49 LC V<sub>L</sub>-恒定结构域

[0239] DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGTKVEIKRTVAAPSPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQW

KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 213)

[0240] 在示例性实施方式中,所述连接到结合NKG2D的Fab片段的Fc结构域包括Q347R、D399V和F405T的突变,并且所述连接到EPCAM scFv的Fc结构域包含用于形成异二聚体的匹配的突变K360E和K409W。在示例性实施方式中,所述连接到结合NKG2D的Fab片段的Fc结构域在CH3结构域中包括S354C替换,其与所述连接到结合EPCAM的scFv的Fc上的Y349C替换形成二硫键。

[0241] 在所述Fc结构域内,CD16结合由所述铰链区和CH2结构域介导。例如,在人类IgG1内,与CD16的相互作用主要聚焦于氨基酸残基Asp 265-Glu 269、Asn 297-Thr 299、Ala 327-Ile 332、Leu 234-Ser 239和CH2结构域中的糖残基N-乙酰基-D-葡萄糖胺(参见 Sondermann等,Nature,406 (6793) :267-273)。在所述已知结构域的基础上,可以选择突变以提高或降低与CD16的结合亲和力,例如通过使用噬菌体展示文库或酵母表面展示cDNA文库,或者可以在相互作用的已知三维结构的基础上设计突变。

[0242] 异二聚体抗体重链的组装可以通过在同一细胞中表达两种不同抗体重链序列来实现,这可能导致每种抗体重链的同二聚体的组装以及异二聚体的组装。促进异二聚体的偏好性组装可以通过在每种抗体重链恒定区的CH3结构域中并入不同的突变来实现,如US13/494870、US16/028850、US11/533709、US12/875015、US13/289934、US14/773418、US12/811207、US13/866756、US14/647480和US14/830336中所示。例如,可以在人类IgG1的基础上在CH3结构域中制造突变,并在第一多肽和第二多肽内并入不同对的氨基酸替换,以允许这两条链选择性地彼此异二聚化。下面示出的氨基酸替换的位置都按照Kabat中的EU指数来编号。

[0243] 在一种情形中,所述第一多肽中的氨基酸替换将原始氨基酸用选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)的较大氨基酸代替,并且所述第二多肽中的至少一个氨基酸替换将原始氨基酸用选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)或缬氨酸(V)的较小氨基酸代替,使得所述较大氨基酸替换(突起)契合到所述较小氨基酸替换(孔穴)的表面中。例如,一个多肽可以包含T366W替换,并且另一个多肽可以包含三个替换,包括T366S、L368A和Y407V。

[0244] 本发明的抗体重链可变结构域可以被任选地偶联到与抗体恒定区,例如包括铰链、CH2和CH3结构域并含有或不含CH1结构域的IgG恒定区至少90%同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述恒定区的氨基酸序列与人类抗体恒定区例如人类IgG1恒定区、IgG2恒定区、IgG3恒定区或IgG4恒定区至少90%同一性。在某些其他实施方式中,所述恒定区的氨基酸序列与来自于另一种哺乳动物例如兔、狗、猫、小鼠或马的抗体恒定区至少90%同一性。与人类IgG1恒定区相比可以在所述恒定区内并入一个或多个突变,例如在Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411和/或K439处。示例性的替换包括例如Q347E、Q347R、Y349S、Y349K、Y349T、Y349D、Y349E、Y349C、T350V、L351K、L351D、L351Y、S354C、E356K、E357Q、E357L、E357W、K360E、K360W、Q362E、S364K、S364E、S364H、S364D、T366V、T366I、T366L、T366M、T366K、T366W、T366S、L368E、L368A、L368D、K370S、N390D、N390E、K392L、K392M、K392V、K392F、K392D、K392E、T394F、T394W、D399R、D399K、D399V、S400K、S400R、

D401K、F405A、F405T、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、T411D、T411E、K439D和K439E。

[0245] 在某些实施方式中,可以并入到人类IgG1恒定区的CH1中的突变可以在氨基酸V125、F126、P127、T135、T139、A140、F170、P171和/或V173处。在某些实施方式中,可以并入到人类IgG1恒定区的C<sub>κ</sub>中的突变可以在氨基酸E123、F116、S176、V163、S174和/或T164处。

[0246] 可选地,氨基酸替换可以选自下面表4中示出的成组替换。

[0247]

表4		
	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

[0248]

可选地,氨基酸替换可以选自下面表5中示出的成组替换。

[0249]

表 5		
	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

[0250]

组 6	Y349S/K409W	E357W/D399V/F405T
-----	-------------	-------------------

[0251]

可选地,氨基酸替换可以选自下面表6中示出的成组替换。

[0252]

表6		
	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

[0253] 可选地,每条多肽链中的至少一个氨基酸替换可以选自表7。

表 7	
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

[0255] 可选地,至少一个氨基酸替换可以选自下面表8中的成组替换,其中在所述第一多肽列中标注的位置被任何已知的带负电荷的氨基酸代替,并且在所述第二多肽列中标注的位置被任何已知的带正电荷的氨基酸代替。

表8	
第一多肽	第二多肽
K392, K370, K409或K439	D399, E356或E357

[0257] 可选地,至少一个氨基酸替换可以选自下面表9中的成组替换,其中在所述第一多肽列中标注的位置被任何已知的带正电荷的氨基酸代替,并且在所述第二多肽列中标注的位置被任何已知的带负电荷的氨基酸代替。

表9	
第一多肽	第二多肽
D399, E356或E357	K409, K439, K370或K392

[0259] 可选地,氨基酸替换可以选自下面表10中的成组替换。

表10	
第一多肽	第二多肽
T350V, L351Y, F405A和Y407V	T350V, T366L, K392L和T394W

[0261] 可选地或另外地,异多聚体蛋白的结构稳定性可以通过在所述第一或第二多肽链任一者上引入S354C并在相对的多肽链上引入Y349C来提高,所述突变在所述两个多肽的界面内形成人造二硫桥。

[0262] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在T366位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自T366、L368和Y407的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0263] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自T366、L368和Y407的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在T366位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0264] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自E357、K360、Q362、S364、L368、K370、T394、D401、F405和T411的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自Y349、E357、S364、L368、K370、T394、D401、F405和T411的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0265] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自Y349、

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

[0266] 在某些实施方式中，所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自L351、D399、S400和Y407的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列，并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自T366、N390、K392、K409和T411的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0267] 在某些实施方式中，所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自T366、N390、K392、K409和T411的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列，并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自L351、D399、S400和Y407的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0268] 在某些实施方式中，所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自Q347、Y349、K360和K409的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列，并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自Q347、E357、D399和F405的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0269] 在某些实施方式中，所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自Q347、E357、D399和F405的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列，并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自Y349、K360、Q347和K409的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0270] 在某些实施方式中，所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自K370、K392、K409和K439的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列，并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自D356、E357和D399的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0271] 在某些实施方式中，所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自D356、E357和D399的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列，并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自K370、K392、K409和K439的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0272] 在某些实施方式中，所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自L351、E356、T366和D399的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列，并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自Y349、L351、L368、K392和K409的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0273] 在某些实施方式中，所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自Y349、L351、L368、K392和K409的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列，并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自L351、E356、T366和D399的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0274] 在某些实施方式中，所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于S354C替换，并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于Y349C替换。

[0275] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于Y349C替换,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于S354C替换。

[0276] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于K360E和K409W替换,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于Q347R、D399V和F405T替换。

[0277] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于Q347R、D399V和F405T替换,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于K360E和K409W替换。

[0278] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于T366W替换,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于T366S、T368A和Y407V替换。

[0279] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于T366S、T368A和Y407V替换,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于T366W替换。

[0280] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于T350V、L351Y、F405A和Y407V替换,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于T350V、T366L、K392L和T394W替换。

[0281] 在某些实施方式中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于T350V、T366L、K392L和T394W替换,并且其中所述抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的差异在于T350V、L351Y、F405A和Y407V替换。

[0282] 上述的多特异性蛋白可以使用本领域技术人员公知的重组DNA技术来制造。例如,可以将编码所述第一免疫球蛋白重链的第一核酸序列克隆到第一表达载体中;可以将编码所述第二免疫球蛋白重链的第二核酸序列克隆到第二表达载体中;可以将编码所述免疫球蛋白轻链的第三核酸序列克隆到第三表达载体中;并且可以将所述第一、第二和第三表达载体一起稳定转染到宿主细胞中,以产生所述多聚体蛋白。

[0283] 为了获得所述多特异性蛋白的最高产量,可以探索所述第一、第二和第三表达载体的不同比率,以确定用于转染到所述宿主细胞中的最佳比率。在转染后,可以使用本领域中已知的方法例如有限稀释法、ELISA、FACS、显微术或Clonepix来分离单一克隆,用于细胞库产生。

[0284] 可以将克隆在适合于生物反应器规模放大的条件下培养,并维持所述多特异性蛋白的表达。所述多特异性蛋白可以使用本领域中已知的方法包括离心、深度过滤、细胞裂解、匀浆、冻融、亲和纯化、凝胶过滤、离子交换层析、疏水相互作用交换层析和混合模式层析来分离和纯化。

[0285] II. 多特异性蛋白的特征

[0286] 本文描述的多特异性蛋白包括NKG2D结合位点、CD16结合位点和选自表11中提供的抗原中的任一者的肿瘤相关抗原的结合位点。在某些实施方式中,所述多特异性蛋白同

时结合到表达NKG2D和/或CD16的细胞例如NK细胞并结合到表达选自表11中提供的抗原中的任一者的肿瘤相关抗原的肿瘤细胞。所述多特异性蛋白与NK细胞的结合能够提高所述NK细胞对所述肿瘤细胞的破坏的活性。

[0287] 表11

抗原类型	生物学名称
介导上皮细胞中 $\text{Ca}^{2+}$ 不依赖性同型细胞-细胞粘附的跨膜糖蛋白	上皮细胞粘附分子 (EpCAM)
粘蛋白家族糖蛋白	癌抗原 125 (CA125)
参与通过 $\text{Na}^+$ 共转运将磷酸盐转运到细胞中的磷酸盐转运蛋白	钠/磷酸盐共转运蛋白 2B (NaPi2b)
参与 $\text{Ca}^{2+}$ 不依赖性细胞粘附的细胞粘附分子	结合素细胞粘附分子 4 (结合素 4)
神经节苷脂	岩藻糖基-GM1 (单唾液酰四己糖基神经节苷脂)
ADAM (去整合蛋白和金属硫蛋白) 蛋白	含去整合蛋白和金属蛋白酶结构域蛋白 8 (ADAM8)
ADAM (去整合蛋白和金属硫蛋白) 蛋白	含去整合蛋白和金属蛋白酶结构域蛋白 9 (ADAM9)
被称为胆碱转运蛋白样蛋白 (CTL1-5) 的溶质载体蛋白	溶质载体家族 44 成员 4 (SLC44A4)
糖类抗原唾液酸基路易斯 a	唾液酸化路易斯 a 抗原 (CA19-9)

[0288] [0289] 在某些实施方式中,所述多特异性蛋白以与相应的单克隆抗体(即含有与所述多特异性蛋白中所包含的相同的肿瘤相关抗原(选自表11中提供的抗原中的任一者)的结合位点的单克隆抗体)相近的亲和力结合到选自表11中提供的抗原中的任一者的肿瘤相关抗原。在某些实施方式中,所述多特异性蛋白与相应的单克隆抗体相比在杀伤表达选自表11中提供的抗原中的任一者的肿瘤相关抗原的肿瘤细胞方面更加有效。

[0290] 在某些实施方式中,本文中描述的包括NKG2D结合位点和用于选自表11中提供的抗原中的任一者的肿瘤相关抗原的结合位点的多特异性蛋白,当与表达所述肿瘤相关抗原的细胞共培养时激活原代人类NK细胞。NK细胞激活以CD107a脱颗粒和IFN- $\gamma$  细胞因子生产的增加为特征。此外,与用于选自表11中提供的抗原中的任一者的肿瘤相关抗原的相应单克隆抗体相比,在表达所述肿瘤相关抗原的细胞存在下,所述多特异性蛋白可能显示出人类NK细胞的更高的激活。

[0291] 在某些实施方式中,本文中描述的包括NKG2D结合位点和用于选自表11中提供的抗原中的任一者的肿瘤相关抗原的结合位点的多特异性蛋白,提高与表达所述肿瘤相关抗原的细胞共培养的静息和IL-2激活的人类NK细胞的活性。

[0292] 在某些实施方式中,与结合到选自表11中提供的抗原中的任一者的肿瘤相关抗原的相应单克隆抗体相比,所述多特异性蛋白在靶向表达所述肿瘤相关抗原的肿瘤细胞方面提供优势。本文中描述的多特异性结合蛋白在降低肿瘤生长和杀伤癌细胞方面可能更加有效。

[0293] 在某些实施方式中,靶向EpCAM的F4-TriNKET(例如结合NKG2D的F4-TriNKET-EpCAM)比靶向EpCAM的母体mAb更有效地杀伤靶细胞。在某些实施方式中,所述F4-TriNKET也比F3' -TriNKET(例如结合NKG2D的F3' -TriNKET-EpCAM)更高效地杀伤靶细胞,这可能是F4-TriNKET与靶细胞的更强结合的反映。

[0294] III. 治疗性应用

[0295] 本发明提供了使用本文中描述的多特异性结合蛋白和/或本文中描述的药物组合物治疗癌症的方法。所述方法通过向需要的患者施用治疗有效量的本文中描述的多特异性结合蛋白，可用于治疗表达EPCAM的各种不同的癌症。

[0296] 所述治疗方法可以根据待治疗的癌症来表征。例如，在某些实施方式中，所述癌症是急性髓系白血病、多发性骨髓瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、胸腺瘤、腺样囊性癌、胃肠癌、肾癌、乳腺癌、成胶质细胞瘤、肺癌、卵巢癌、脑癌、前列腺癌、胰腺癌或黑素瘤。

[0297] 在某些其他实施方式中，所述癌症是实体肿瘤。在某些其他实施方式中，所述癌症是结肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫内膜癌、食管癌、白血病、肝癌、直肠癌、胃癌、睾丸癌或子宫癌。在其他实施方式中，所述癌症是血管化肿瘤、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、胆管癌、甲状腺癌、肢端雀斑痣样黑素瘤、光化性角化病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、腺样囊性癌、腺瘤、腺肉瘤、腺鳞癌、肛管癌、肛门癌、肛门直肠癌、星形胶质细胞瘤、巴氏腺癌、基底细胞癌、胆管癌、骨癌、骨髓癌、支气管癌、支气管腺体癌、类癌瘤、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、慢性髓系白血病、透明细胞癌、结缔组织癌、囊腺瘤、消化系统癌症、十二指肠癌、内分泌系统癌症、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、尤文氏肉瘤、眼和眼眶癌、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、心脏癌症、成血管细胞瘤、血管内皮瘤、血管瘤、肝腺瘤、肝腺瘤病、肝胆管癌、肝细胞癌、霍奇金氏病、回肠癌、胰岛细胞瘤、上皮内瘤变、上皮内鳞状细胞瘤变、肝内胆管癌、侵入性鳞状细胞癌、空肠癌、关节癌、卡波斯肉瘤、盆腔癌、大细胞癌、大肠癌、平滑肌肉瘤、恶性雀斑样痣黑素瘤、淋巴瘤、男性生殖器癌、恶性黑素瘤、恶性间皮肿瘤、成神经管细胞瘤、髓上皮瘤、脑膜癌、间皮癌、转移性癌、口腔癌、粘液表皮样癌、多发性骨髓瘤、肌肉癌、鼻道癌、神经系统癌症、神经上皮腺癌、结节性黑素瘤、非上皮性皮肤癌、非霍奇金氏淋巴瘤、燕麦细胞癌、少突神经胶质癌、口腔癌、骨肉瘤、浆液性乳头状腺癌、阴茎癌、舌咽癌、垂体肿瘤、浆细胞瘤、假性肉瘤、肺母细胞瘤、直肠癌、肾细胞癌、呼吸系统癌症、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、浆液性癌、窦癌、皮肤癌、小细胞癌、小肠癌、平滑肌癌、软组织癌、分泌生长抑素的肿瘤、脊椎癌、鳞状细胞癌、横纹肌癌、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、尿道膀胱癌、泌尿系统癌症、宫颈癌、宫体癌、葡萄膜黑素瘤、阴道癌、疣状癌、血管活性肠肽瘤、外阴癌、高分化癌或肾母细胞瘤。

[0298] 在某些其他实施方式中，所述癌症是非霍奇金氏淋巴瘤例如B-细胞淋巴瘤或T-细胞淋巴瘤。在某些实施方式中，所述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、小淋巴细胞性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区B-细胞淋巴瘤、淋巴结外边缘区B-细胞淋巴瘤、淋巴结边缘区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。在某些其他实施方式中，所述非霍奇金氏淋巴瘤是T-细胞淋巴瘤，例如前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、淋巴结外自然杀伤细胞/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。

[0299] 所述待治疗的癌症可以根据在癌细胞的表面上表达的特定抗原的存在来表征。在某些实施方式中，除了EpCAM之外，所述癌细胞可以表达下述一者或多者：CD2, CD19, CD20, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, TROP2, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4和PD1。

[0300] 在某些其他实施方式中，当所述第二结合位点结合EpCAM时，所述待治疗的癌症选自头颈部癌、卵巢癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胃癌、肝癌、食道癌和肺癌。在某些其他实施方式中，当所述第二结合位点结合选自癌抗原125(CA125)、钠/磷酸盐共转运蛋白2B(NaPi2b)、结合素细胞粘附分子4(结合素4)、岩藻糖基-GM1(单唾液酰四己糖基神经节苷脂)、含去整合蛋白和金属蛋白酶结构域蛋白8(ADAM8)、含去整合蛋白和金属蛋白酶结构域蛋白9(ADAM9)、溶质载体家族44成员4(SLC44A4)和唾液酸化路易斯a抗原(CA19-9)的抗原时，所述待治疗的癌症选自卵巢癌、子宫内膜癌、胰腺癌、肺癌、甲状腺癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、小细胞肺癌、成神经细胞瘤、肝癌、肾癌、黑素瘤、宫颈癌、前列腺癌、骨肉瘤、脑癌、胃癌、胆管癌。

[0301] IV. 组合疗法

[0302] 本发明的另一方面提供了组合疗法。本文描述的多特异性结合蛋白可以与其他治疗剂组合使用以治疗癌症。

[0303] 可以在治疗癌症中用作组合疗法的一部分的示例性治疗剂包括例如放射线、丝裂霉素、维甲酸、盐酸苯达莫司汀(ribomustine)、吉西他滨、长春新碱、依托泊苷、克拉屈滨、二溴甘露醇、甲氨蝶呤、多柔比星、卡波醌、喷司他丁、硝基可润、净司他丁、西曲瑞克、来曲唑、雷替曲塞、柔红霉素、法匹拉韦、福莫司汀、胸腺法新、索布佐生、奈达铂、阿糖胞苷、比卡鲁胺、长春瑞滨、维司力农、氨鲁米特、安吖啶、丙谷胺、依利醋铵、酮色林、去氧氟尿苷、依曲替酯、异维甲酸、链脲佐菌素、尼莫司汀、长春地辛、氟他胺(Flutamide)、氟他胺(drogenil)、布缩宫素、卡莫氟、雷佐生、西佐喃、卡铂、二溴卫矛醇、替加氟、异环磷酰胺、泼尼莫司汀、毕西巴尼、左旋咪唑、替尼泊苷、英丙舒凡、依诺他滨、麦角乙脲、羟甲烯龙、他莫昔芬、孕酮、美雄烷、环硫雄醇、福美司坦、干扰素- $\alpha$ 、干扰素- $2\alpha$ 、干扰素- $\beta$ 、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、集落刺激因子-1、集落刺激因子-2、地尼白介素、白介素-2、黄体生成激素释放因子和上述药剂的可能表现出对同源受体的差异结合和增加或减少的血清半衰期的变化形式。

[0304] 可以在治疗癌症中用作组合疗法的一部分的另一类药剂是免疫检查点抑制剂。示例性的免疫检查点抑制剂包括抑制下述一者或多者的药剂：(i) 细胞毒性T-淋巴细胞相关抗原4(CTLA4)，(ii) 程序化细胞死亡蛋白1(PD1)，(iii) PDL1，(iv) LAG3，(v) B7-H3，(vi) B7-H4，和(vii) TIM3。CTLA4抑制剂伊匹单抗已被美国食品和药品监督管理局(United States Food and Drug Administration)批准用于治疗黑素瘤。

[0305] 可以在治疗癌症中用作组合疗法的一部分的另一类药剂是靶向非检查点靶的单克隆抗体(例如赫赛汀)和非细胞毒性药剂(例如酪氨酸激酶抑制剂)。

[0306] 另一类抗癌药剂包括例如：(i) 选自ALK抑制剂、ATR抑制剂、A2A拮抗剂、碱基切除修复抑制剂、Bcr-Ab1酪氨酸激酶抑制剂、Bruton's酪氨酸激酶抑制剂、CDC7抑制剂、CHK1抑制剂、周期蛋白依赖性激酶抑制剂、DNA-PK抑制剂、DNA-PK和mTOR两者的抑制剂、DNMT1抑制剂、DNMT1抑制剂加2-氯-脱氧腺苷、HDAC抑制剂、Hedgehog信号传导途径抑制剂、IDO抑制剂、JAK抑制剂、mTOR抑制剂、MEK抑制剂、MELK抑制剂、MTH1抑制剂、PARP抑制剂、磷脂酰肌醇

3-激酶抑制剂、PARP1和DHODH两者的抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶-II抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、VEGFR抑制剂和WEE1抑制剂的抑制剂；(ii) OX40、CD137、CD40、GITR、CD27、HVEM、TNFRSF25或ICOS的激动剂；和(iii) 选自IL-12、IL-15、GM-CSF和G-CSF的细胞因子。

[0307] 本发明的蛋白质也可用作原发性病灶的手术去除的辅助物。

[0308] 为了实现所需的组合治疗效果，可以选择多特异性结合蛋白和其他治疗剂的量和施用的相对时间安排。例如，当向需要这种施用的患者施用组合疗法时，所述组合的治疗剂或包含所述治疗剂的一种或多种药物组合物可以以任何顺序施用，例如顺序、并行、一起、同时施用等。此外，例如，多特异性结合蛋白可以在所述其他治疗剂发挥其预防或治疗效果的时间内施用，反之亦然。

[0309] V. 药物组合物

[0310] 本发明还描述了含有治疗有效量的本文中描述的蛋白质的药物组合物。所述组合物可以被配制成用于各种不同的药物递送系统。对于适合的剂型来说，一种或多种生理上可接受的赋形剂或载体也可以包含在所述组合物中。适合在本公开中使用的剂型参见《Remington's制药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985)。对于用于药物递送的方法的简要综述，参见例如Langer(Science 249:1527-1533, 1990)。

[0311] 药物组合物可以含有治疗有效量的包含抗原(表11中列出的)位点的多特异性结合蛋白。

[0312] 本公开的静脉内药物递送剂型可以包含在袋子、笔或注射器中。在某些实施方式中，所述袋子可以被连接到包含管和/或针头的通道。在某些实施方式中，所述剂型可以是冷冻干燥剂型或液体剂型。在某些实施方式中，所述剂型可以被冷冻干燥(冻干)并包含在约12-60个小瓶中。在某些实施方式中，所述剂型可以被冷冻干燥，并且可以将45mg所述冷冻干燥的剂型包含在一个小瓶中。在某些实施方式中，可以将约40mg-约100mg所述冷冻干燥的剂型包含在一个小瓶中。在某些实施方式中，将来自于12、27或45个小瓶的冷冻干燥的剂型合并，以获得所述蛋白质在静脉内药物剂型中的治疗剂量。在某些实施方式中，所述剂型可以是液体剂型，并以约250mg/小瓶至约1000mg/小瓶储存。在某些实施方式中，所述剂型可以是液体剂型并以约600mg/小瓶储存。在某些实施方式中，所述剂型可以是液体剂型并以约250mg/小瓶储存。

[0313] 所述蛋白质可以以水性液体药物剂型的形式存在，其在形成剂型的缓冲溶液中包括治疗有效量的所述蛋白质。

[0314] 这些组合物可以通过常规的灭菌技术灭菌，或者可以除菌过滤。得到的水性溶液可以原样包装以备使用，或者可以被冷冻干燥，所述冷冻干燥的制剂在施用之前与无菌水性载体合并。所述制剂的pH通常在3至11之间，更优选地在5至9之间或6至8之间，最优选地在7至8之间，例如7至7.5。所述得到的固体形式的组合物可以被包装在多个单一剂量单元中，各自含有固定量的上述一种或多种药剂。所述固体形式的组合物也可以以灵活的量包装在容器中。

[0315] 在某些实施方式中，本公开提供了具有延长的储存期限的剂型，其包含本公开的蛋白质与甘露糖醇、单水柠檬酸、柠檬酸钠、二水磷酸氢二钠、二水磷酸二氢钠、氯化钠、聚山梨醇酯80、水和氢氧化钠的组合。

[0316] 在某些实施方式中，制备了一种水性剂型，其在pH缓冲的溶液中包含本公开的蛋白质。本发明的缓冲液可以具有约4至约8，例如约4.5至约6.0或约4.8至约5.5范围内的pH，或者可以具有约5.0至约5.2的pH。在上述pH之间的范围也打算作为本公开的一部分。例如，打算包括使用任何上述值的组合作为上限和/或下限的值范围。将pH控制在这个范围之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。

[0317] 在某些实施方式中，所述剂型包括含有柠檬酸盐和磷酸盐的缓冲系统，以将pH维持在约4至约8的范围内。在某些实施方式中，所述pH范围可以是约4.5至约6.0或约pH 4.8至约5.5，或在约5.0至约5.2的pH范围内。在某些实施方式中，所述缓冲系统包括单水柠檬酸、柠檬酸钠、二水磷酸氢二钠和/或二水磷酸二氢钠。在某些实施方式中，所述缓冲系统包括约1.3mg/mL柠檬酸（例如1.305mg/mL）、约0.3mg/mL柠檬酸钠（例如0.305mg/mL）、约1.5mg/mL二水磷酸氢二钠（例如1.53mg/mL）、约0.9mg/mL二水磷酸二氢钠（例如0.86）和约6.2mg/mL氯化钠（例如6.165mg/mL）。在某些实施方式中，所述缓冲系统包括1-1.5mg/mL柠檬酸、0.25至0.5mg/mL柠檬酸钠、1.25至1.75mg/mL二水磷酸氢二钠、0.7至1.1mg/mL二水磷酸二氢钠和6.0至6.4mg/mL氯化钠。在某些实施方式中，所述剂型的pH用氢氧化钠调节。

[0318] 充当等渗剂并且可以使抗体稳定的多元醇，也可以包含在所述剂型中。所述多元醇以可能根据剂型的所需等渗性而变的量添加到所述剂型。在某些实施方式中，所述水性剂型可以是等渗的。添加的多元醇的量也可能根据所述多元醇的分子量而变。例如，与二糖（例如海藻糖）相比，可以添加较少量的单糖（例如甘露糖醇）。在某些实施方式中，可以在所述剂型中用作等渗剂的多元醇是甘露糖醇。在某些实施方式中，甘露糖醇的浓度可以是约5至约20mg/mL。在某些实施方式中，甘露糖醇的浓度可以是约7.5至15mg/mL。在某些实施方式中，甘露糖醇的浓度可以是约10-14mg/mL。在某些实施方式中，甘露糖醇的浓度可以是约12mg/mL。在某些实施方式中，多元醇山梨糖醇可以包含在所述剂型中。

[0319] 也可以向所述剂型添加去污剂或表面活性剂。示例性的去污剂包括非离子型去污剂例如聚山梨醇酯（例如聚山梨醇酯20、80等）或泊洛沙姆（例如泊洛沙姆188）。添加的去污剂的量使得它减少所述配制的抗体的聚集和/或将所述剂型中颗粒物的形成降至最低和/或减少吸附。在某些实施方式中，所述剂型可以包含作为表面活性剂的聚山梨醇酯。在某些实施方式中，所述剂型可以含有去污剂聚山梨醇酯80或吐温80。吐温80是用于描述聚氧乙烯(20)失水山梨糖醇单油酸酯的术语（参见Fiedler, Lexikon der Hifsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4th ed., 1996）。在某些实施方式中，所述剂型可以含有约0.1mg/mL至约10mg/mL之间或约0.5mg/mL至约5mg/mL之间的聚山梨醇酯80。在某些实施方式中，可以在所述剂型中添加约0.1%聚山梨醇酯80。

[0320] 在实施方式中，本公开的蛋白质产品被配制成液体剂型。所述液体剂型可以以10mg/mL的浓度存在于USP/Ph Eur I型50R小瓶中，用橡胶塞封闭并用铝压制合密封盖密封。所述橡胶塞可以由符合USP和Ph Eur的弹性体制成。在某些实施方式中，小瓶可以装填有61.2mL所述蛋白质产品溶液，以便允许可抽出体积为60mL。在某些实施方式中，可以将所述液体剂型用0.9%盐水溶液稀释。

[0321] 在某些实施方式中，本公开的液体剂型可以被制备成浓度为10mg/mL的溶液，并与稳定剂水平的糖相组合。在某些实施方式中，所述液体剂型可以在水性载体中制备。在某些

实施方式中,稳定剂可以以不超过可能产生对静脉内给药来说不理想或不适合的黏度的量添加。在某些实施方式中,所述糖可以是二糖例如蔗糖。在某些实施方式中,所述液体剂型也可以包括一种或多种缓冲剂、表面活性剂和防腐剂。

[0322] 在某些实施方式中,所述液体剂型的pH可以通过添加可药用酸和/或碱来设定。在某些实施方式中,所述可药用酸可以是盐酸。在某些实施方式中,所述碱可以是氢氧化钠。

[0323] 除了聚集之外,脱酰胺是肽和蛋白质在发酵、收获/细胞澄清、纯化、药物物质/药物制品储存期间和样品分析期间可能发生的常见产品变异。脱酰胺是从蛋白质失去NH<sub>3</sub>,形成琥珀酰亚胺中间体,其可能经历水解。所述琥珀酰亚胺中间体引起母体肽的质量减少17道尔顿。随后的水解导致质量增加18道尔顿。由于在水性条件下不稳定,所述琥珀酰亚胺中间体的分离是困难的。因此,脱酰胺通常可检测为质量增加1道尔顿。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。在肽链中与Asn相邻的氨基酸残基影响脱酰胺速率。蛋白质序列中Asn之后的Gly和Ser导致对脱酰胺更高的敏感性。

[0324] 在某些实施方式中,本公开的液体剂型可以在防止所述蛋白质产品脱酰胺的pH和湿度条件下保存。

[0325] 本文中感兴趣的水性载体是可药用(对于向人类施用来说安全且无毒)并且可用于制备液体剂型的水性载体。示例性载体包括无菌注射用水(SWFI)、抑菌性注射用水(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。

[0326] 防腐剂可以任选地添加到本发明的剂型以减少细菌作用。防腐剂的添加可以例如便于生产多次使用(多剂)剂型。

[0327] 在特定情况下,例如当患者在医院中在移植后通过IV途径接受所有药物时,静脉内(IV)剂型可能是优选的施用途径。在某些实施方式中,在施用前将所述液体剂型用0.9%氯化钠溶液稀释。在某些实施方式中,所述稀释的注射用药物产品是等渗的,并适合于通过静脉内输注施用。

[0328] 在某些实施方式中,盐或缓冲剂组分可以以10mM-200mM的量添加。所述盐和/或缓冲剂是可药用的,并源自于各种不同的已知酸(无机和有机酸)和“成碱”金属或胺。在某些实施方式中,所述缓冲剂可以是磷酸盐缓冲剂。在某些实施方式中,所述缓冲剂可以是甘氨酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐缓冲剂,在所述情况下,钠、钾或铵离子可以充当平衡离子。

[0329] 防腐剂可以任选地添加到本发明的剂型以减少细菌作用。防腐剂的添加可以例如便于生产多次使用(多剂)剂型。

[0330] 本文中感兴趣的水性载体是可药用(对于向人类施用来说安全且无毒)并且可用于制备液体剂型的水性载体。示例性载体包括无菌注射用水(SWFI)、抑菌性注射用水(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。

[0331] 本公开的蛋白质可以以冷冻干燥剂型的形式存在,其包括所述蛋白质和冻干保护剂。所述冻干保护剂可以是糖例如二糖。在某些实施方式中,所述冻干保护剂可以是蔗糖或麦芽糖。所述冷冻干燥剂型也可以包括一种或多种缓冲剂、表面活性剂、增量剂和/或防腐剂。

[0332] 可用于使所述冷冻干燥的药物制品稳定的蔗糖或麦芽糖的量可以是蛋白质与蔗糖或麦芽糖至少1:2的重量比。在某些实施方式中,所述蛋白质与蔗糖或麦芽糖的重量比可

以为1:2至1:5。

[0333] 在某些实施方式中,在冷冻干燥之前,所述剂型的pH可以通过添加可药用酸和/或碱来设定。在某些实施方式中,所述可药用酸可以是盐酸。在某些实施方式中,所述可药用碱可以是氢氧化钠。

[0334] 在冷冻干燥之前,含有本公开的蛋白质的溶液的pH可以被调整到6至8之间。在某些实施方式中,用于所述冷冻干燥的药物制品的pH范围可以是7至8。

[0335] 在某些实施方式中,盐或缓冲剂组分可以以10mM-200mM的量添加。所述盐和/或缓冲剂是可药用的,并源自于各种不同的已知酸(无机和有机酸)和“成碱”金属或胺。在某些实施方式中,所述缓冲剂可以是磷酸盐缓冲剂。在某些实施方式中,所述缓冲剂可以是甘氨酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐缓冲剂,在所述情况下,钠、钾或铵离子可以充当平衡离子。

[0336] 在某些实施方式中,可以添加“增量剂”。“增量剂”是为冻干混合物增添质量并对冻干饼的物理结构有贡献(例如便于生产维持开放孔隙结构基本上均匀的冻干饼)的化合物。示例性的增量剂包括甘露糖醇、甘氨酸、聚乙二醇和山梨糖醇。本发明的冷冻干燥剂型可以含有这些增量剂。

[0337] 防腐剂可以任选地添加到本发明的剂型以减少细菌作用。防腐剂的添加可以例如便于生产多次使用(多剂)剂型。

[0338] 在某些实施方式中,所述冷冻干燥的药物制品可以用水性载体构造。本文中感兴趣的水性载体是可药用(例如对于向人类施用来说安全且无毒)并且可用于在冷冻干燥后制备液体剂型的水性载体。示例性稀释剂包括无菌注射用水(SWFI)、抑菌性注射用水(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。

[0339] 在某些实施方式中,本公开的冷冻干燥的药物制品用USP级无菌注射用水(SWFI)或USP级0.9%氯化钠注射液重构。在重构期间,将所述冷冻干燥的粉剂溶解在溶液中。

[0340] 在某些实施方式中,本公开的冷冻干燥的蛋白质产品构造到约4.5mL注射用水,并用0.9%盐水溶液(氯化钠溶液)稀释。

[0341] 本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以改变,以便获得对特定患者、组合物和施用方式来说有效实现所需治疗响应并且对所述患者无毒的活性成分的量。

[0342] 具体剂量可以是对每位患者来说均一的剂量,例如50-5000mg蛋白质。或者,患者的剂量可以根据所述患者的大致体重或表面积定制。确定适合剂量的其他因素可以包括待治疗或预防的疾病或病症、疾病的严重性、施用途径和患者的年龄、性别和医疗状况。确定用于治疗的适合剂量所必需的计算的进一步精化由本领域技术人员按常规进行,特别是根据本文中公开的剂量信息和测定法。所述剂量也可以通过使用用于确定使用剂量的已知测定法并联合适合的剂量响应数据来确定。当监测到疾病进展时,个体患者的剂量可以进行调整。可以测量患者中可靶向构建体或复合物的血液水平,以观察是否需要调整剂量来达到或维持有效浓度。可以使用药物基因组学来确定哪些可靶向构建体和/或复合物及其剂量最可能对给定个体有效(Schmitz等,Clinica Chimica Acta 308:43-53,2001;Steimer等,Clinica Chimica Acta 308:33-41,2001)。

[0343] 一般来说,基于体重的剂量是每kg体重约0.01 $\mu$ g至约100mg,例如约0.01 $\mu$ g至约100mg/kg体重、约0.01 $\mu$ g至约50mg/kg体重、约0.01 $\mu$ g至约10mg/kg体重、约0.01 $\mu$ g至约1mg/kg体重、约0.01 $\mu$ g至约100 $\mu$ g/kg体重、约0.01 $\mu$ g至约50 $\mu$ g/kg体重、约0.01 $\mu$ g至约10 $\mu$ g/kg体

重、约0.01μg至约1μg/kg体重、约0.01μg至约0.1μg/kg体重、约0.1μg至约100mg/kg体重、约0.1μg至约50mg/kg体重、约0.1μg至约10mg/kg体重、约0.1μg至约1mg/kg体重、约0.1μg至约100μg/kg体重、约0.1μg至约10μg/kg体重、约0.1μg至约1μg/kg体重、约1μg至约100mg/kg体重、约1μg至约50mg/kg体重、约1μg至约10mg/kg体重、约1μg至约1mg/kg体重、约1μg至约100μg/kg体重、约1μg至约50μg/kg体重、约1μg至约10μg/kg体重、约10μg至约100mg/kg体重、约10μg至约50mg/kg体重、约10μg至约10mg/kg体重、约10μg至约1mg/kg体重、约10μg至约100μg/kg体重、约10μg至约50μg/kg体重、约50μg至约100mg/kg体重、约50μg至约50mg/kg体重、约50μg至约10mg/kg体重、约50μg至约1mg/kg体重、约50μg至约100μg/kg体重、约100μg至约50mg/kg体重、约100μg至约10mg/kg体重、约100μg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。

[0344] 药剂可以每日、每周、每月或每年施用一次或多次,或甚至每2至20年施用一次,本领域普通技术人员可以根据体液或组织中可靶向构建体或复合物的测量到的停留时间和浓度,容易地估算施用的重复率。本发明的施用可以是静脉内、动脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、胸膜内、鞘内、腔内、通过导管灌注或通过直接病灶内注射。这可以施用每日一次或多次、每周一次或多次、每月一次或多次或每年一次或多次。

[0345] 上面的描述描述了本发明的多个方面和实施方式。本申请具体来说设想了所述方面和实施方式的所有组合和排列。

## 实施例

[0346] 现在正一般性描述的本发明,通过参考下面的实施例将更容易被理解,包括所述实施例仅仅是出于说明本发明的某些方面和实施方式的目的,并且不打算限制本发明。

[0347] 实施例1-NKG2D结合结构域结合到NKG2D

[0348] NKG2D结合结构域结合到纯化的重组NKG2D

[0349] 将人类、小鼠或食蟹猴NKG2D胞外结构域(ectodomains)的核酸序列与编码人类IgG1 Fc结构域的核酸序列融合,并引入到哺乳动物细胞中进行表达。在纯化后,将NKG2D-Fc融合蛋白吸附到微孔板的孔。在用牛血清白蛋白阻断所述孔以防止非特异性结合后,对NKG2D结合结构域进行滴定并将其添加到预先吸附有NKG2D-Fc融合蛋白的孔。第一抗体结合使用偶联到辣根过氧化物酶并特异性识别人类κ轻链以避免Fc交叉反应性的第二抗体来检测。向所述孔添加辣根过氧化物酶的底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)以可视化结合信号,所述信号在450nM处测量并在540nM处校正。向每个孔添加NKG2D结合结构域克隆、同种型对照或阳性对照(包含选自SEQ ID NO:101-104的重链和轻链可变结构域,或可以在eBioscience获得的抗小鼠NKG2D抗体克隆MI-6和CX-5)。

[0350] 所述同种型对照显示出与重组NKG2D-Fc蛋白极小的结合,而所述阳性对照最强结合到所述重组抗原。由所有克隆产生的NKG2D结合结构域都表现出跨人类、小鼠和食蟹猴重组NKG2D-Fc蛋白的结合,尽管在不同克隆之间具有不同的亲和力。总体来说,每种抗NKG2D克隆以相近的亲和力结合到人类(图3)和食蟹猴(图4)重组NKG2D-Fc,但结合到小鼠(图5)重组NKG2D-Fc的亲和力较低。

[0351] NKG2D结合结构域结合到表达NKG2D的细胞

[0352] 对EL4小鼠淋巴瘤细胞系进行工程化改造,以表达人类或小鼠NKG2D-CD3 $\zeta$ 信号传导结构域嵌合抗原受体。将NKG2D结合克隆、同种型对照或阳性对照以100nM的浓度用于染色在所述EL4细胞上表达的细胞外NKG2D。抗体结合使用荧光团偶联的抗人类IgG第二抗体来检测。细胞通过流式细胞术进行分析,并使用表达NKG2D的细胞与母体EL4细胞的平均荧光强度(MFI)的比较来计算高于背景的倍数(FOB)。

[0353] 由所有克隆产生的NKG2D结合结构域都结合到表达人类和小鼠NKG2D的EL4细胞。阳性对照抗体(包含选自SEQ ID NO:101-104的重链和轻链可变结构域,或可以在eBioscience获得的抗小鼠NKG2D抗体克隆MI-6和CX-5)给出最好的FOB结合信号。在表达人类NKG2D(图6)和小鼠(图7)NKG2D的细胞之间,每种克隆的NKG2D结合亲和力相近。

[0354] 实施例2-NKG2D结合结构域阻断天然配体结合到NKG2D

[0355] 与ULBP-6的竞争

[0356] 将重组人类NKG2D-Fc蛋白吸附到微孔板的孔,并将所述孔用牛血清白蛋白阻断以降低非特异性结合。向所述孔添加饱和浓度的ULBP-6-His-生物素,然后添加NKG2D结合结构域克隆。在温育2小时后,将孔清洗,并通过链亲合素偶联的辣根过氧化物酶和TMB底物检测仍结合于NKG2D-Fc包被的孔的ULBP-6-His-生物素。吸收值在450nM处测量并在540nM处校正。在减去背景后,从被阻断与孔中的NKG2D-Fc蛋白结合的ULBP-6-His-生物素的百分率,来计算NKG2D结合结构域与NKG2D-Fc蛋白的特异性结合。阳性对照抗体(包含选自SEQ ID NO:101-104的重链和轻链可变结构域)和各种不同的NKG2D结合结构域阻断ULBP-6结合到NKG2D,而同种型对照显示出很小的与ULBP-6的竞争(图8)。

[0357] ULBP-6序列由SEQ ID NO:108表示

[0358] MAAAAIPALLCLPLLFLLFGWSRARRDDPHSLCYDITVIPKFRPGPRWC AVQGQVDEKTF LH YDCGN KTVTPVSPLGKKLNVTMAWKAQNPVLREVVDILTEQLLDIQLENYTPKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSGSWQFSID GQTFLFDSEKRMWTTVHPGARKMKEKWENDKDVA MSFHYISMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSAGAPLAMSSGTT QLRATATT LILCCLL IILPCFILPGI (SEQ ID NO:108) 与MICA的竞争

[0359] 将重组人类MICA-Fc蛋白吸附到微孔板的孔,并将所述孔用牛血清白蛋白阻断以降低非特异性结合。向所述孔添加NKG2D-Fc-生物素,然后添加NKG2D结合结构域。在温育和清洗后,使用链亲合素-HRP和TMB底物检测仍结合于MICA-Fc包被的孔的NKG2D-Fc-生物素。吸收值在450nM处测量并在540nM处校正。在减去背景后,从被阻断与MICA-Fc包被的孔结合的NKG2D-Fc-生物素的百分率,来计算NKG2D结合结构域与NKG2D-Fc蛋白的特异性结合。阳性对照抗体(包含选自SEQ ID NO:101-104的重链和轻链可变结构域)和各种不同的NKG2D结合结构域阻断MICA结合到NKG2D,而同种型对照显示出很小的与MICA的竞争(图9)。

[0360] 与Rae-1 $\delta$ 的竞争

[0361] 将重组小鼠Rae-1 $\delta$ -Fc(购自R&D Systems)吸附到微孔板的孔,并将所述孔用牛血清白蛋白阻断以降低非特异性结合。向所述孔添加小鼠NKG2D-Fc-生物素,然后添加NKG2D结合结构域。在温育和清洗后,使用链亲合素-HRP和TMB底物检测仍结合于Rae-1 $\delta$ -Fc包被的孔的NKG2D-Fc-生物素。吸收值在450nM处测量并在540nM处校正。在减去背景后,从被阻断与Rae-1 $\delta$ -Fc包被的孔结合的NKG2D-Fc-生物素的百分率,来计算NKG2D结合结构域与NKG2D-Fc蛋白的特异性结合。阳性对照(包含选自SEQ ID NO:101-104的重链和轻链可变结构域,或可以在eBioscience获得的抗小鼠NKG2D抗体克隆MI-6和CX-5)和各种不同的NKG2D

结合结构域克隆阻断Rae-1 $\delta$ 结合到小鼠NKG2D,而同种型对照抗体显示出很小的与Rae-1 $\delta$ 的竞争(图10)。

[0362] 实施例3-NKG2D结合结构域克隆激活NKG2D

[0363] 将人类和小鼠NKG2D的核酸序列融合到编码CD3 $\zeta$ 信号传导结构域的核酸序列以获得嵌合抗原受体(CAR)构建体。然后将所述NKG2D-CAR构建体使用Gibson组装克隆到逆转录病毒载体中,并转染到expi293细胞中用于逆转录病毒生产。将EL4细胞用含有NKG2D-CAR的病毒与8 $\mu$ g/mL聚凝胺一起感染。感染后24小时,通过流式细胞术分析所述EL4细胞中NKG2D-CAR的表达水平,并选择在细胞表面上表达高水平NKG2D-CAR的克隆。

[0364] 为了确定NKG2D结合结构域是否激活NKG2D,将它们吸附到微孔板的孔,并将NKG2D-CAR EL4细胞在布雷菲德菌素-A和莫能菌素存在下在抗体片段包被的孔上培养4小时。通过流式细胞术测定细胞内TNF- $\alpha$ 生产这种NKG2D激活的指示。将TNF- $\alpha$ 阳性细胞归一化到用阳性对照处理的细胞。所有NKG2D结合结构域激活人类NKG2D(图11)和小鼠NKG2D(图12)两者。

[0365] 实施例4-NKG2D结合结构域激活NK细胞

[0366] 原代人类NK细胞

[0367] 使用密度梯度离心从人类外周血血沉棕黄层分离外周血单核细胞(PBMC)。使用磁珠负选择从PBMC分离NK细胞(CD3 $^-$ CD56 $^+$ ),分离到的NK细胞的纯度通常>95%。然后将分离的NK细胞在含有100ng/mL IL-2的培养基中培养24-48小时,然后将它们转移到吸附有NKG2D结合结构域的微孔板孔,并在含有荧光团偶联的抗CD107a抗体、布雷菲德菌素-A和莫能菌素的培养基中培养。在培养后,使用荧光团偶联的针对CD3、CD56和IFN- $\gamma$ 的抗体通过流式细胞术测定NK细胞。在CD3 $^-$ CD56 $^+$ 细胞中分析CD107a和IFN- $\gamma$ 染色,以评估NK细胞激活。CD107a/IFN- $\gamma$ 双阳性细胞的增加指示了通过结合两个激活受体而不是一个受体的更好的NK细胞激活。NKG2D结合结构域和阳性对照(例如由SEQ ID NO:101或SEQ ID NO:103表示的重链可变结构域,和由SEQ ID NO:102或SEQ ID NO:104表示的轻链可变结构域)与同种型对照相比显示出变成CD107a $^+$ 和IFN- $\gamma$  $^+$ 的NK细胞的百分率更高(图13和图14代表了来自于两个独立实验的数据,其各自使用不同供体的PBMC用于NK细胞制备)。

[0368] 原代小鼠NK细胞

[0369] 从C57B1/6小鼠获得脾脏并将其通过70 $\mu$ m细胞筛压碎,以获得单细胞悬液。将细胞离心沉淀并重悬浮在ACK裂解缓冲液(购自Thermo Fisher Scientific#A1049201;155mM氯化铵,10mM碳酸氢钾,0.01mM EDTA)中,以除去红细胞。将剩余的细胞用100ng/mL mIL-2培养72小时,然后收获并准备用于NK细胞分离。然后用磁珠使用反向贫化技术从脾细胞分离NK细胞(CD3 $^-$ NK1.1 $^+$ ),通常纯度>90%。将纯化的NK细胞在含有100ng/mL mIL-15的培养基中培养48小时,然后将它们转移到吸附有NKG2D结合结构域的微孔板孔,并在含有荧光团偶联的抗CD107a抗体、布雷菲德菌素-A和莫能菌素的培养基中培养。在NKG2D结合结构域包被的孔中培养后,使用荧光团偶联的针对CD3、NK1.1和IFN- $\gamma$ 的抗体通过流式细胞术测定NK细胞。在CD3 $^-$ NK1.1 $^+$ 细胞中分析CD107a和IFN- $\gamma$ 染色,以评估NK细胞激活。CD107a/IFN- $\gamma$ 双阳性细胞的增加指示了通过结合两个激活受体而不是一个受体的更好的NK细胞激活。NKG2D结合结构域和阳性对照(选自可以在eBioscience获得的抗小鼠NKG2D抗体克隆MI-6和CX-5)与同种型对照相比显示出变成CD107a $^+$ 和IFN- $\gamma$  $^+$ 的NK细胞的百分率更高(图15和图16代

表了来自于两个独立实验的数据,其各自使用不同小鼠用于NK细胞制备)。

[0370] 实施例5-NKG2D结合结构域能够引起对靶肿瘤细胞的细胞毒性

[0371] 人类和小鼠原代NK细胞激活测定法显示了在与NKG2D结合结构域温育后NK细胞上的细胞毒性标志物增加。为了研究这是否转变成肿瘤细胞裂解的增加,利用了基于细胞的测定法,其中将每个NKG2D结合结构域开发成单特异性抗体。将Fc区用作一个靶向臂,而Fab片段区(NKG2D结合结构域)充当另一个靶向臂,以激活NK细胞。将人类起源并表达高水平Fc受体的THP-1细胞用作肿瘤靶,并使用Perkin Elmer DELFIA细胞毒性试剂盒。将THP-1细胞用BATDA试剂标记,并以 $10^5$ /mL重悬浮在培养基中。然后将标记的THP-1细胞与NKG2D抗体和分离的小鼠NK细胞在微孔板的孔中合并,在37°C下温育3小时。在温育后,取出20μL培养上清液,与200μL铕溶液混合,并在暗处振摇温育15分钟。通过装备有时间分辨荧光模块(激发337nm,发射620nm)的PheraStar读板器随时间测量荧光,并按照试剂盒说明书计算特异性裂解。

[0372] 阳性对照偶联到Fc的ULBP-6,即NKG2D的天然配体,显示出THP-1靶细胞被小鼠NK细胞的特异性裂解的增加。NKG2D抗体也增加了THP-1靶细胞的特异性裂解,而同种型对照抗体显示出特异性裂解的减少。虚线指示在不添加抗体的情况下THP-1细胞被小鼠NK细胞的特异性裂解(图17)。

[0373] 实施例6-NKG2D抗体显示出高的热稳定性

[0374] 使用差示扫描荧光测定法测定NKG2D结合结构域的熔解温度。外推的表观熔解温度相对于典型的IgG1抗体来说更高(图18)。

[0375] 实施例7-人类NK细胞被交联的NKG2D和CD16的协同激活

[0376] 原代人类NK细胞激活测定法

[0377] 使用密度梯度离心从人类外周血血沉棕黄层分离外周血单核细胞(PBMC)。使用负磁珠(StemCell#17955)从PBMC纯化NK细胞。通过流式细胞术确定NK细胞为>90% CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>。然后将分离的NK细胞在含有100ng/mL hIL-2(Peprotech#200-02)的培养基中扩增48小时,然后用于激活测定法中。将抗体以2μg/mL(抗CD16抗体,Biolegend#302013)和5μg/mL(抗NKG2D抗体,R&D#MAB139)的浓度,在100μL无菌PBS中在96孔平底板上在4°C包被过夜,然后充分清洗所述孔以除去过量抗体。为了评估脱颗粒,将IL-2激活的NK细胞以 $5 \times 10^5$ 个细胞/mL重悬浮在增补有100ng/mL hIL2和1μg/mL APC偶联的抗CD107a mAb(Biolegend#328619)的培养基中。然后将 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔添加到抗体包被的板上。分别以1:1000和1:270的最终稀释度添加蛋白质转运抑制剂布雷菲德菌素A(BFA,Biolegend#420601)和莫能菌素(Biolegend#420701)。将铺板的孔在5% CO<sub>2</sub>中在37°C下温育4小时。对于IFN-γ的细胞内染色来说,将NK细胞用抗CD3抗体(Biolegend#300452)和抗CD56 mAb(Biolegend#318328)标记,然后固定、透化,并用抗IFN-γ mAb(Biolegend#506507)标记。在对活的CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>细胞进行门选后,通过流式细胞术分析NK细胞的CD107a和IFN-γ表达。

[0378] 为了调查受体组合的相对效能,通过板结合刺激进行了NKG2D或CD16的交联和两种受体的共同交联。如图19(图19A-19C)中所示,CD16和NKG2D的组合刺激产生大大提高的CD107a水平(脱颗粒)(图19A)和/或IFN-γ生产(图19B)。虚线表示每种受体的单独刺激的累加效应。

[0379] 在用抗CD16抗体、抗NKG2D抗体或两种单克隆抗体的组合进行4小时的板结合刺激

后,分析IL-2激活的NK细胞的CD107a水平和细胞内IFN- $\gamma$ 生产。图指示了平均值( $n=2$ ) $\pm$ Sd。图19A显示了CD107a的水平;图19B显示了IFN  $\gamma$ 的水平;图19C显示了CD107a和IFN  $\gamma$ 的水平。图19A-19C中示出的数据代表了使用5位不同健康供体的5个独立实验。

[0380] 实施例8-三特异性结合蛋白(TrinKET)介导的靶细胞的增强的细胞毒性TrinKET或mAb与表达人类癌抗原的细胞的结合的评估

[0381] 使用表达EPCAM的人类癌细胞系来评估采取F4和F3'格式的源自于靶向EPCAM的克隆MT110的TrinKET的肿瘤抗原结合。使用人类细胞系H747、HCC827和HCT116来评估TrinKET和mAb与表达EPCAM的细胞的结合。将TrinKET或mAb稀释并与相应的细胞温育。结合使用荧光团偶联的抗人类IgG第二抗体来检测。通过流式细胞术分析细胞,将结合到表达EPCAM的细胞的MFI归一化到人类重组IgG1染色的对照,以获得与背景值相比的倍数。

[0382] 图37示出了本公开的三特异性结合蛋白(TrinKET)(A49-F4-TrinKET-MT110和A49-F3'-TrinKET-MT110)和母体单克隆抗体(mAb)与表达EpCAM的H747人类结肠直肠癌细胞的结合。图38示出了本公开的三特异性结合蛋白(TrinKET)(A49-F4-TrinKET-MT110和A49-F3'-TrinKET-MT110)和母体单克隆抗体(mAb)与表达EpCAM的HCC827人类肺癌细胞的结合。图39示出了本公开的三特异性结合蛋白(TrinKET)(A49-F4-TrinKET-MT110和A49-F3'-TrinKET-MT110)和母体单克隆抗体(mAb)与表达EpCAM的HCT116人类结肠直肠癌细胞的结合。包含MT110 EPCAM结合物的F4-TrinKET与F3'-TrinKET相比总体结合更强。

[0383] 原代人类NK细胞细胞毒性测定法

[0384] 使用密度梯度离心从人类外周血血沉棕黄层分离PBMC。将分离的PBMC洗涤并准备用于NK细胞分离。使用磁珠通过负选择技术分离NK细胞。获得的分离的NK细胞的纯度通常高于90% CD3 $^-$ CD56 $^+$ 。将分离的NK细胞在不含细胞因子的情况下温育过夜,并在第二天用于细胞毒性测定法中。

[0385] DELFIA细胞毒性测定法

[0386] 从培养物收集表达感兴趣的靶的人类癌细胞系,用HBS清洗,并以 $10^6$ 个细胞/mL的密度重悬浮在生长培养基中,以备使用BATDA试剂(Perkin Elmer, AD0116)进行标记。遵照制造商的说明书进行靶细胞的标记。在标记后,将细胞用HBS清洗三次并以 $0.5 \times 10^5$ 个细胞/mL的密度重悬浮在培养基中。为了制备背景孔,将标记的细胞的等分试样放在一边,然后将细胞从培养基中离心出来。向孔一式三份小心地添加100 $\mu$ L培养基,以避免扰动沉积的细胞。向96孔板的每个孔添加100 $\mu$ L BATDA标记的细胞。保留用于测量从靶细胞的自发释放的孔,并准备用于通过添加1% Triton-X来裂解靶细胞的孔。将针对感兴趣的肿瘤靶的单克隆抗体或TrinKET在培养基中稀释,并向每个孔添加50 $\mu$ L稀释的mAb或TrinKET。从培养基收获静息NK细胞,清洗,并根据所需的效应细胞与靶细胞比例以 $1.0 \times 10^5$ - $2.0 \times 10^6$ 个细胞/mL的密度重悬浮在培养基中。向所述板的每个孔添加50 $\mu$ L NK细胞,以提供总共200 $\mu$ L培养体积。在测定法显色之前,将所述板在37°C和5% CO<sub>2</sub>下温育2-4小时。

[0387] 在培养2-3小时后,将板从温箱取出,并通过以200xg离心5分钟将细胞沉积。将20 $\mu$ L培养上清液转移到由制造商提供的干净的微孔板,并向每个孔添加200 $\mu$ L室温铕溶液。将板避光并在摇板器上以250 rpm温育15分钟。使用SpectraMax® i3X仪器(Molecular Devices)读板,并计算特异性裂解的% (特异性裂解的% = ((实验释放-自发释放) / (最大释放-自发释放))  $\times$  100)。

[0388] 图40A和图40B示出了来自于两个不同的健康供体的静息人类NK细胞针对H747人类癌细胞的TriNKET介导的细胞毒性。图41A和图41B示出了来自于两个不同的健康供体的静息人类NK细胞针对HCC827人类癌细胞的TriNKET介导的细胞毒性。图42A和图42B示出了来自于两个不同的健康供体的静息人类NK细胞针对MCF7人类癌细胞的TriNKET介导的细胞毒性。图43A和图43B示出了来自于两个不同的健康供体的静息人类NK细胞针对HCT116人类癌细胞的TriNKET介导的细胞毒性。与靶向EPCAM的母体mAb相比，靶向EPCAM的F4-TriNKET更有效地杀伤靶细胞。与F3'-TriNKET相比F4-TriNKET也更高效地杀伤靶细胞，这可能是F4-TriNKET与靶细胞的更强的结合的反映。

[0389] 通过参考并入

[0390] 本文中提到的每个专利文献和科学论文的整个公开内容为所有目的通过参考并入本文。

[0391] 等同性

[0392] 本发明可以以其他特定形式体现而不背离其精神或本质特征。因此，前述实施方式应该在所有情况下被认为是说明性的而不是限制本文描述的发明。因此，本发明的范围由随附的权利要求书而不是上面的描述指明，并且打算将进入权利要求书的意义和等同性范围之内的所有变化涵盖在其中。

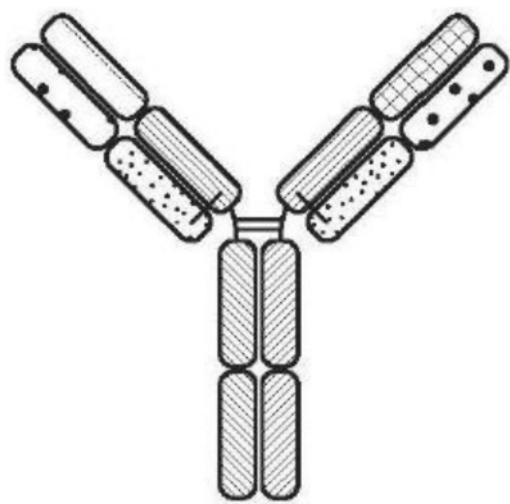


图1

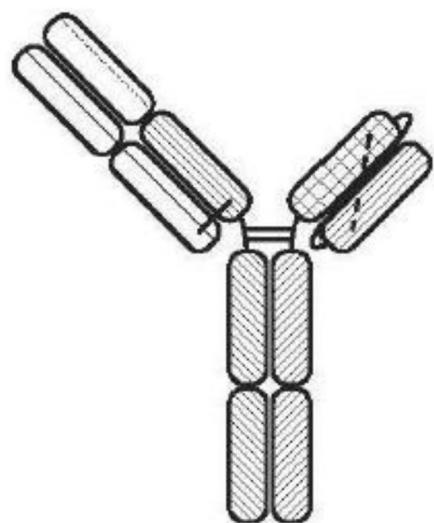


图2

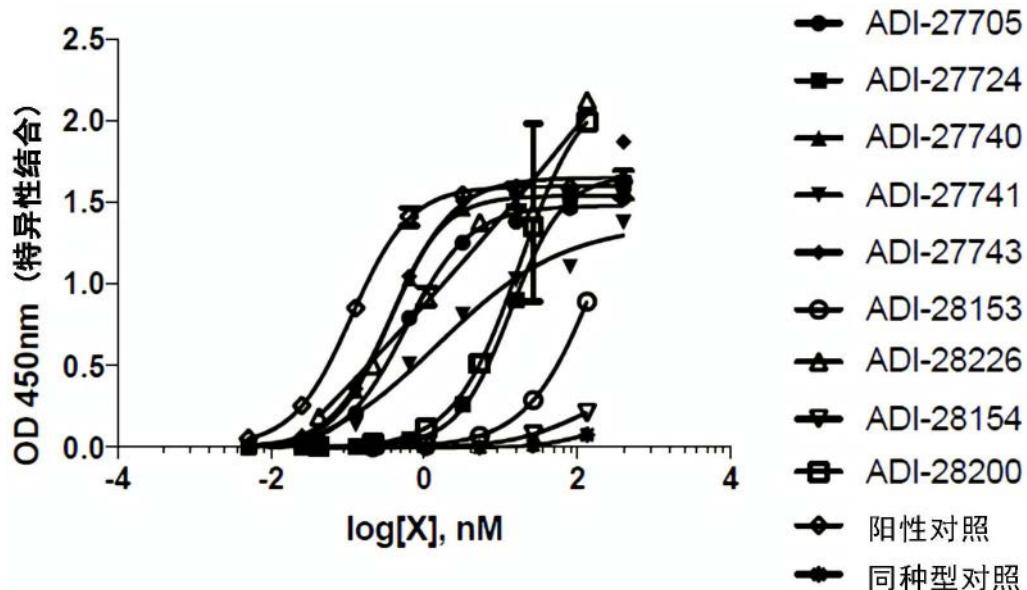


图3

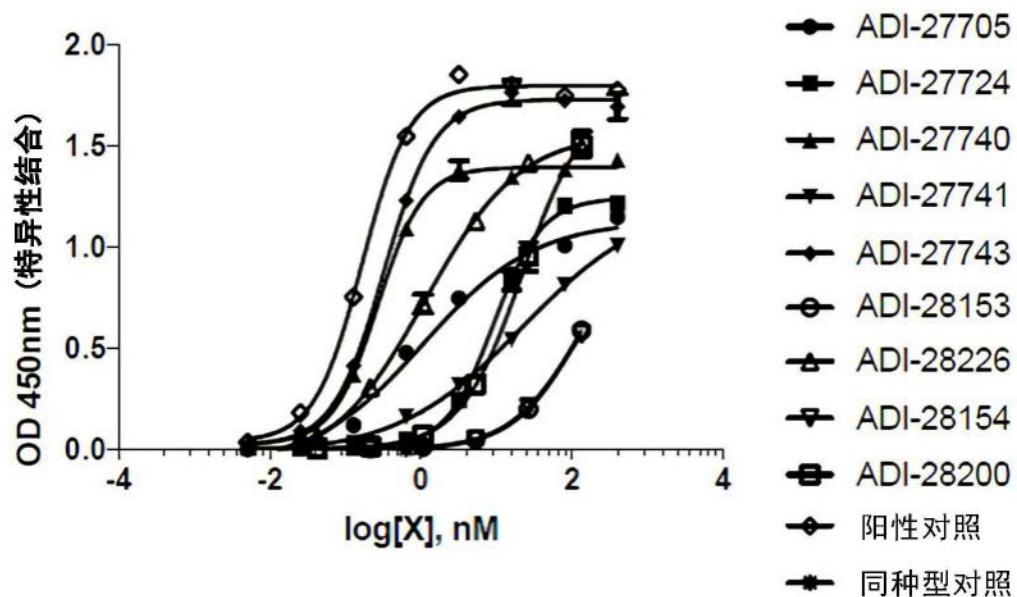


图4

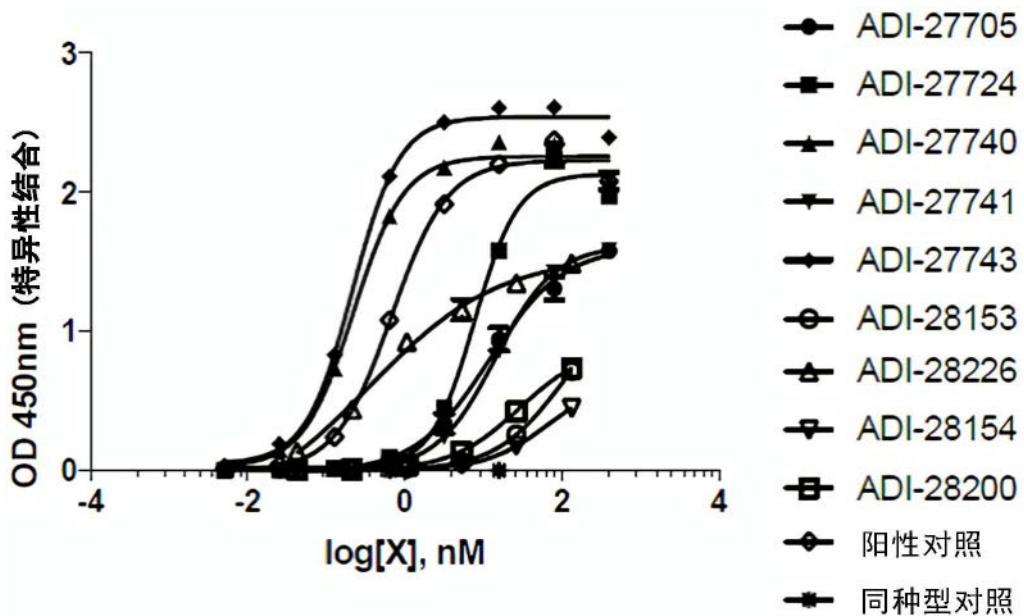


图5

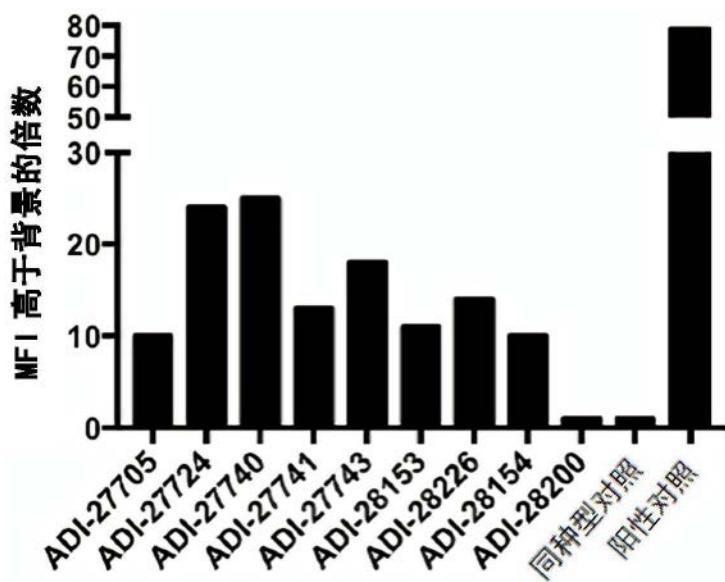


图6

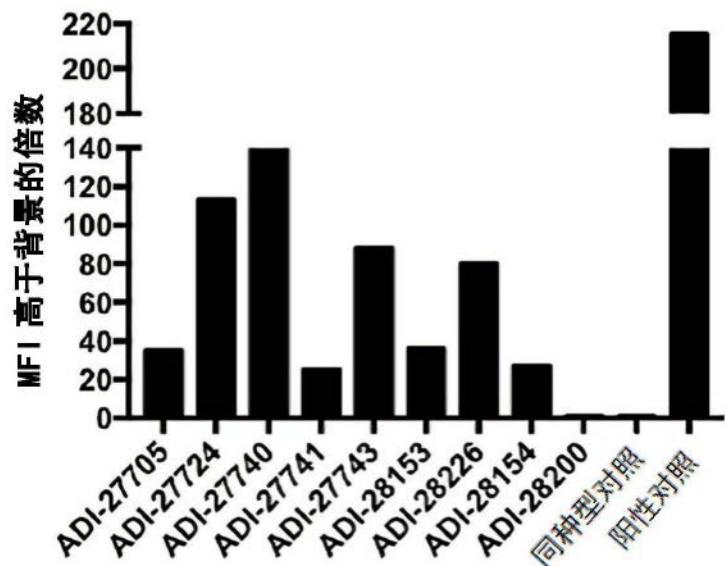


图7

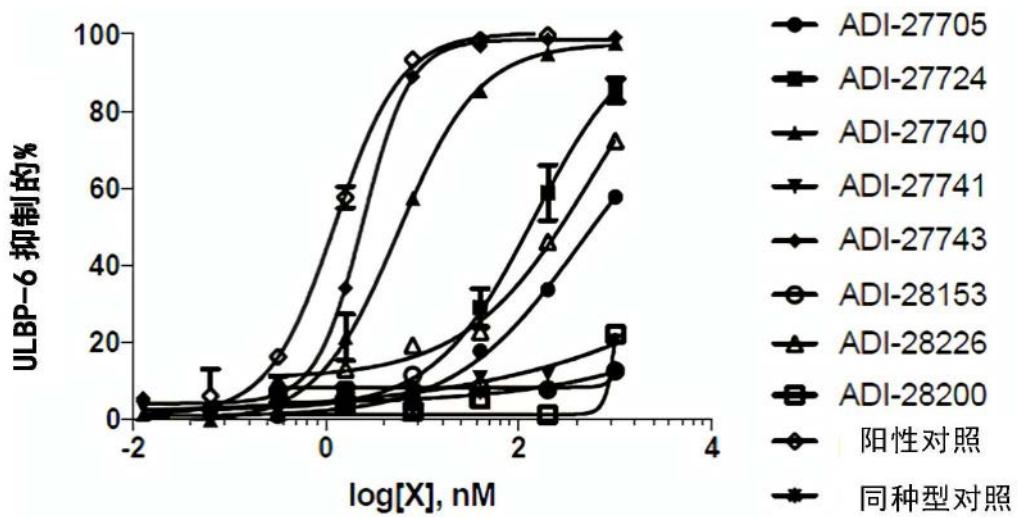


图8

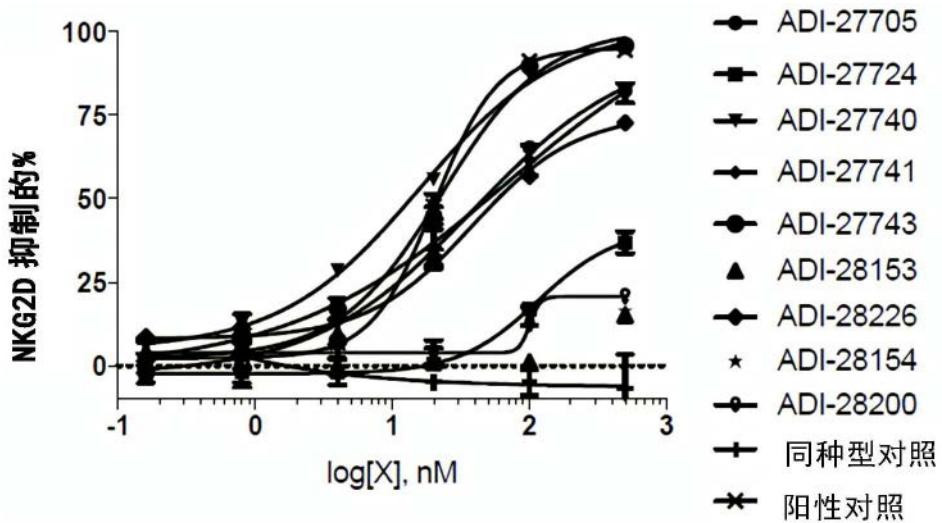


图9

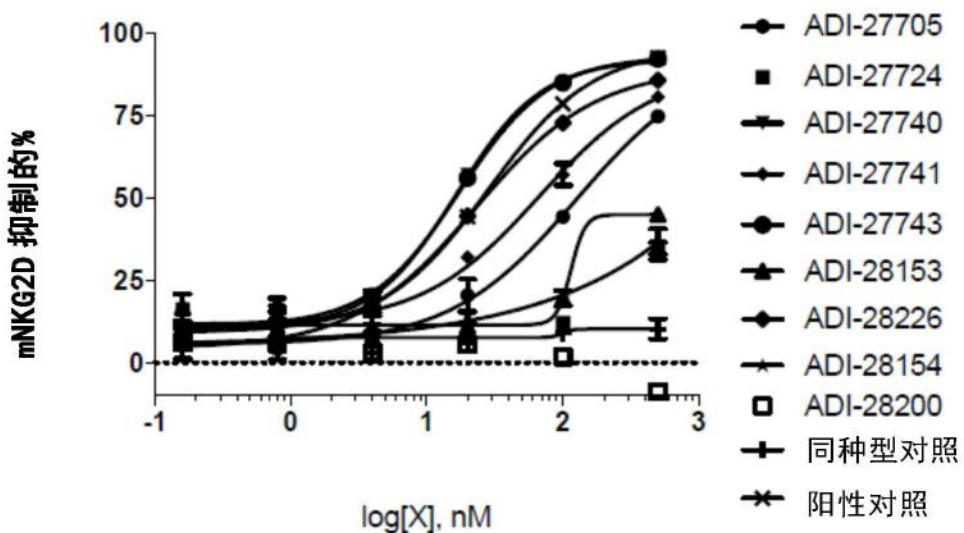


图10

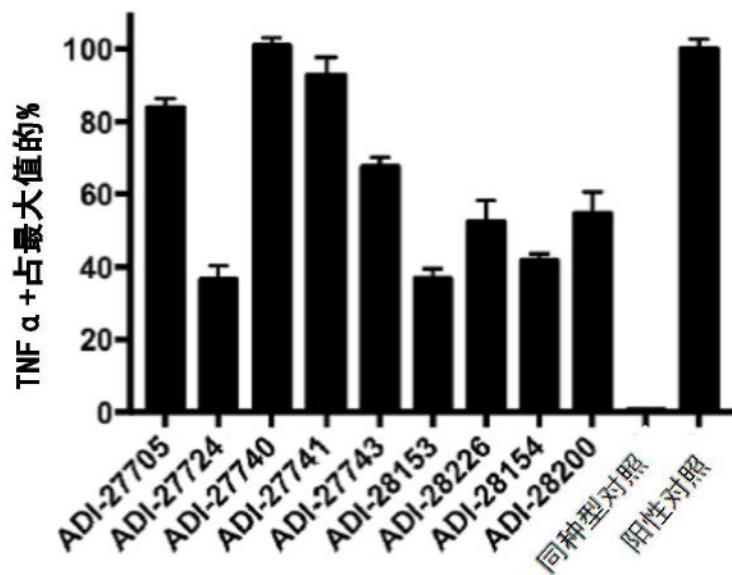


图11

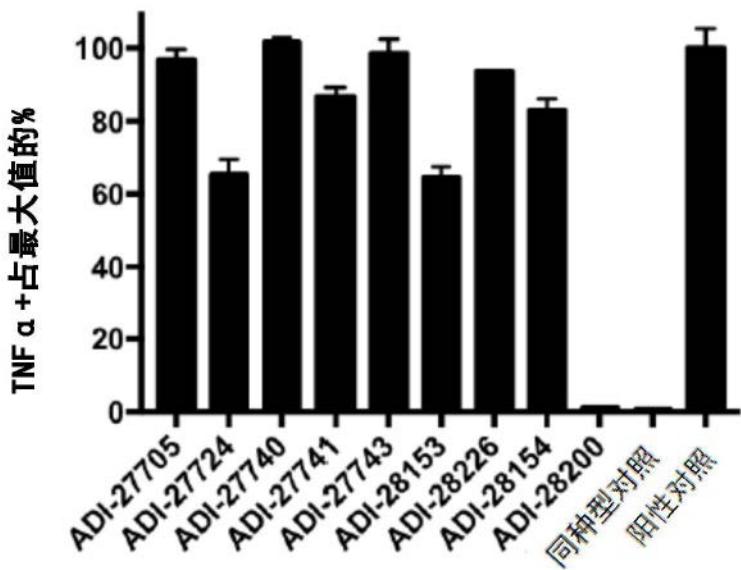


图12

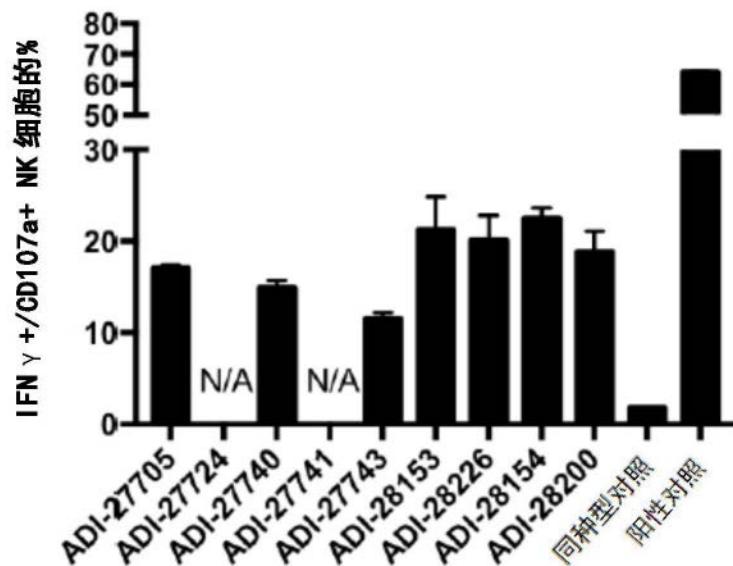


图13

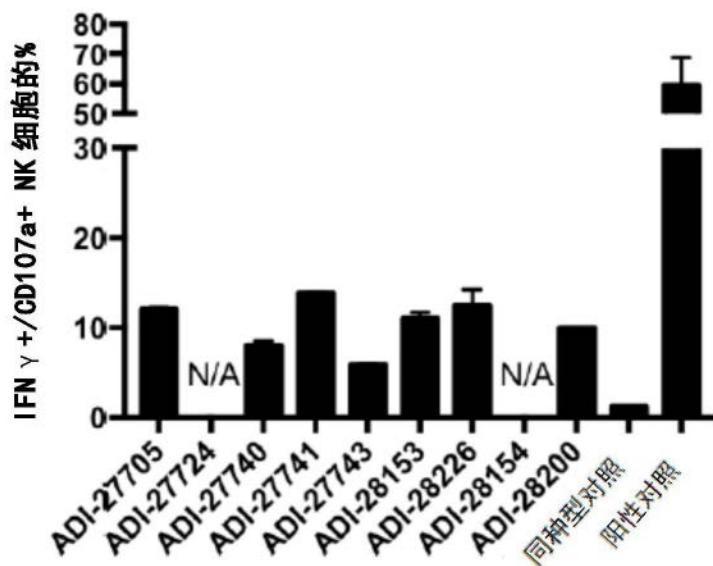


图14

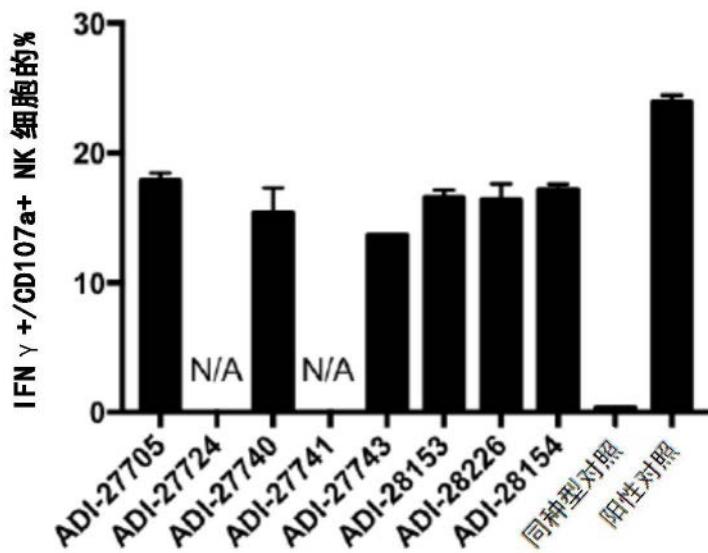


图15

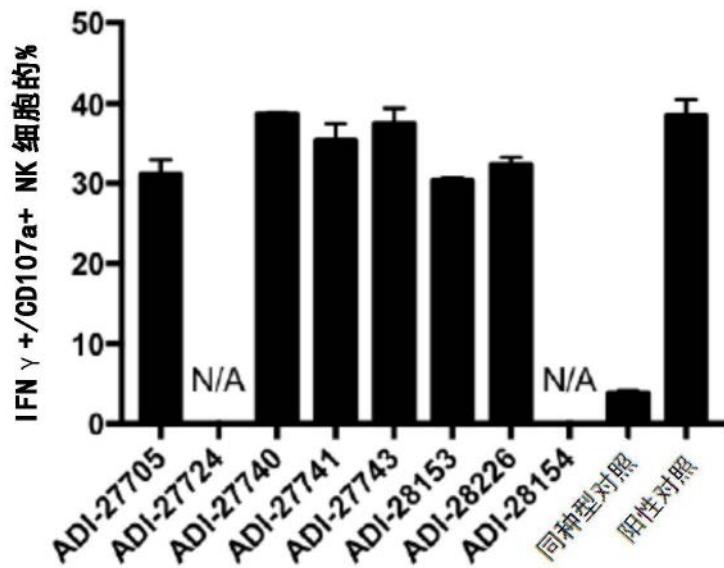


图16

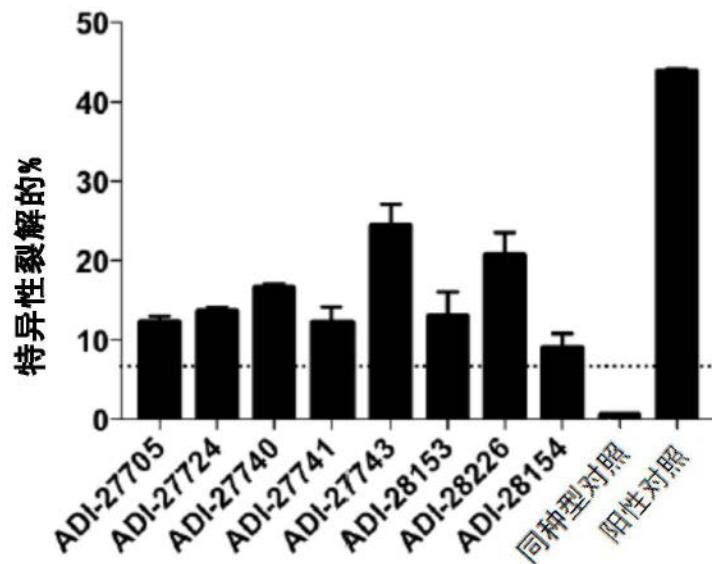


图17

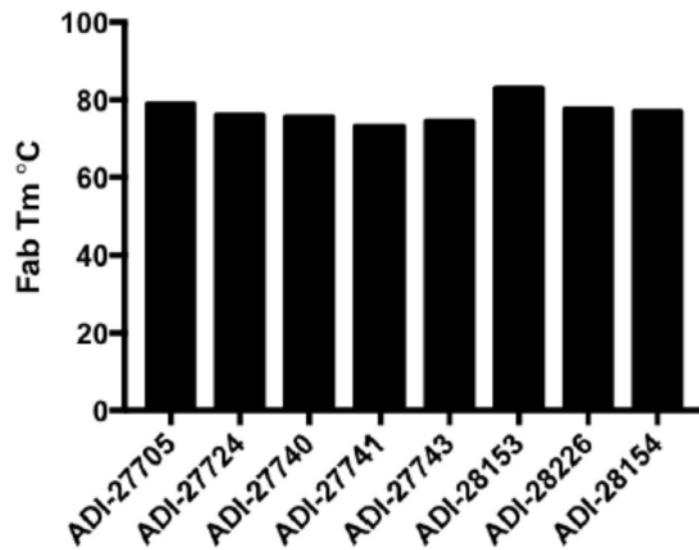


图18

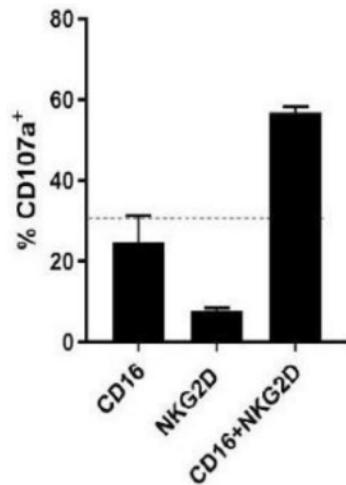


图19A

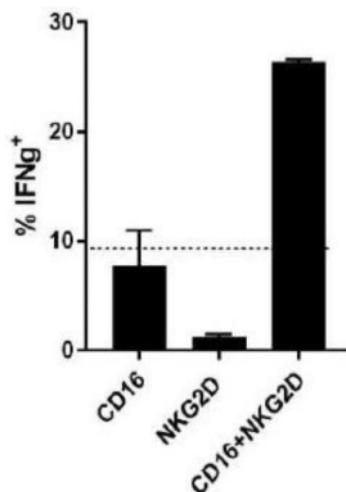


图19B

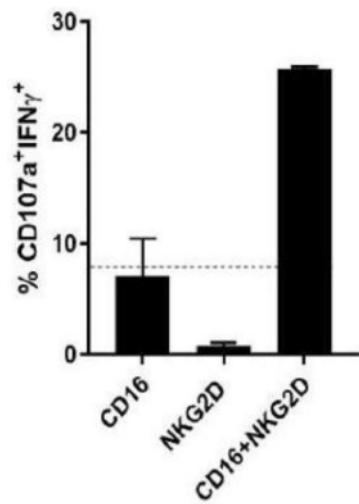


图19C

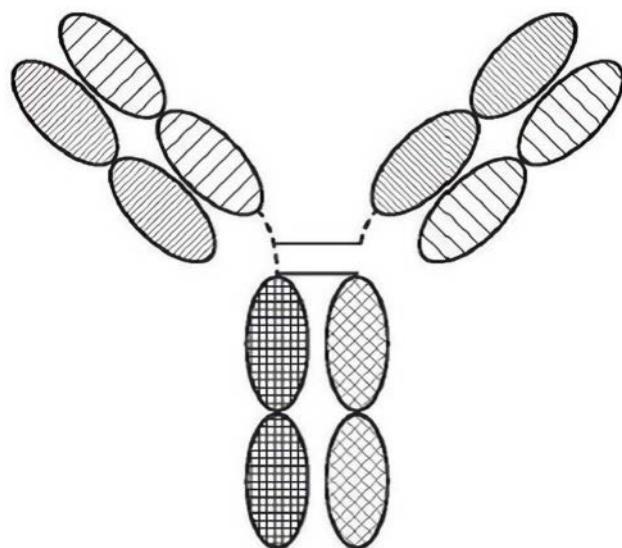


图20

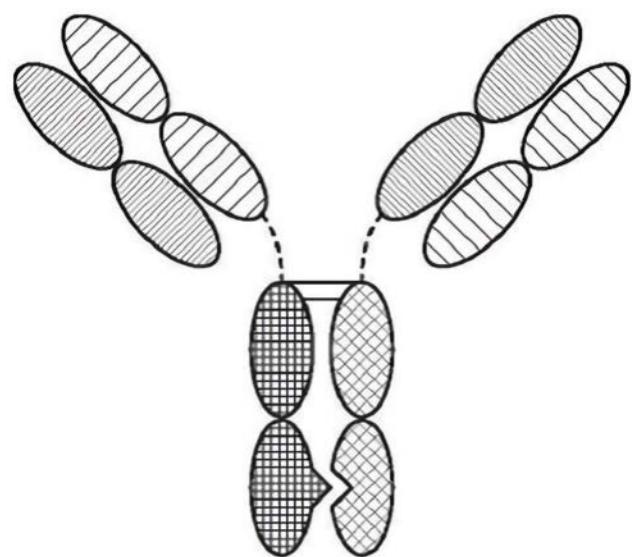


图21

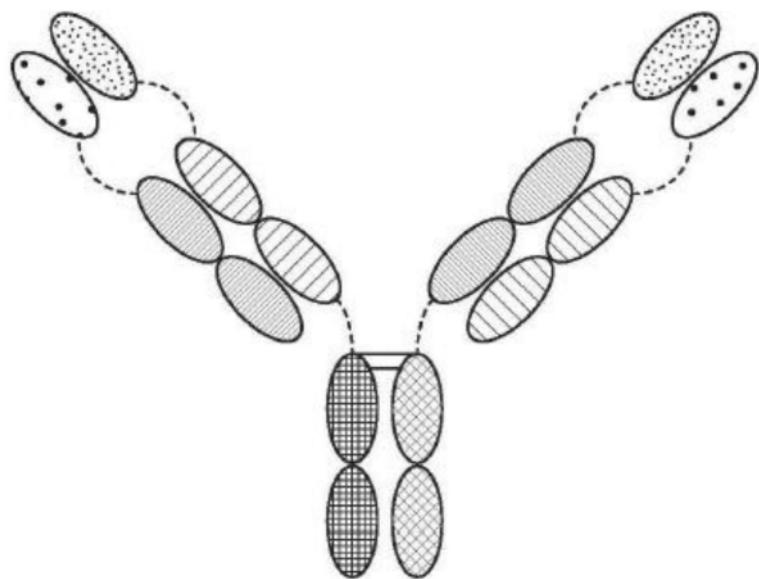


图22

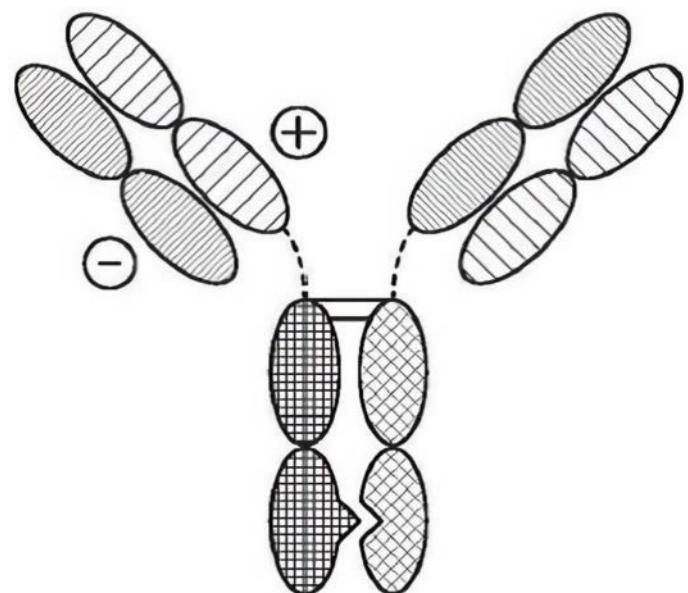


图23

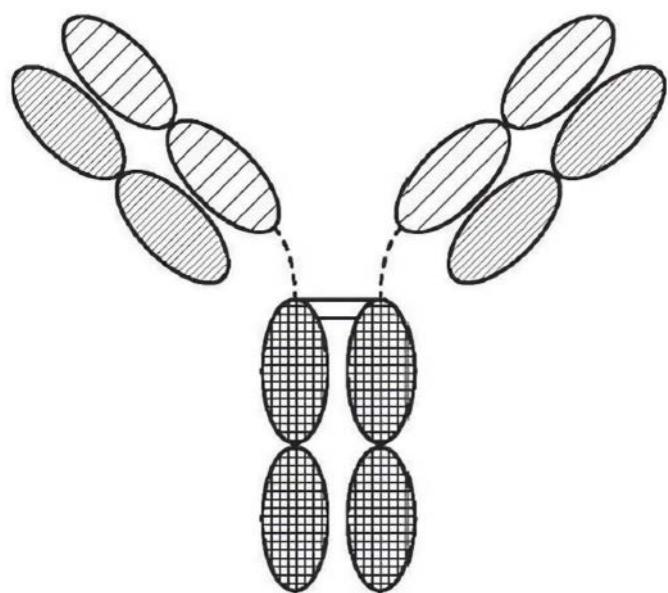


图24

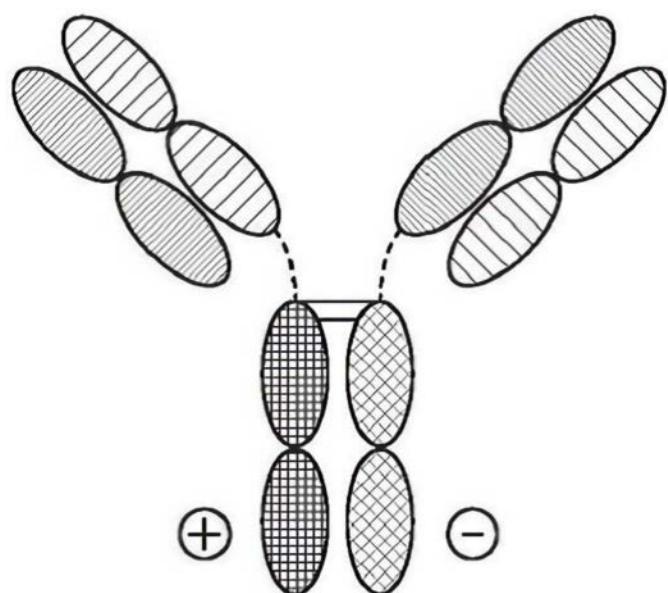


图25

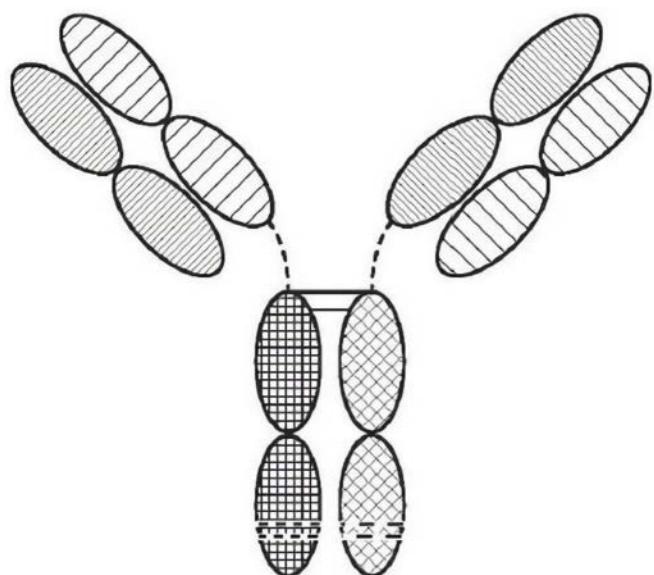


图26

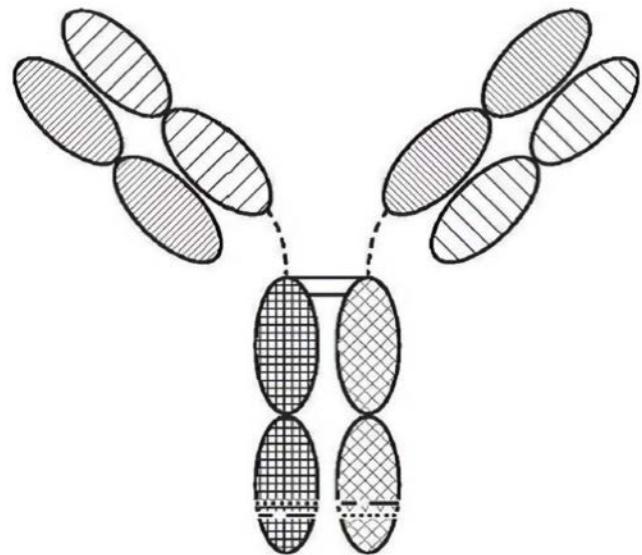


图27

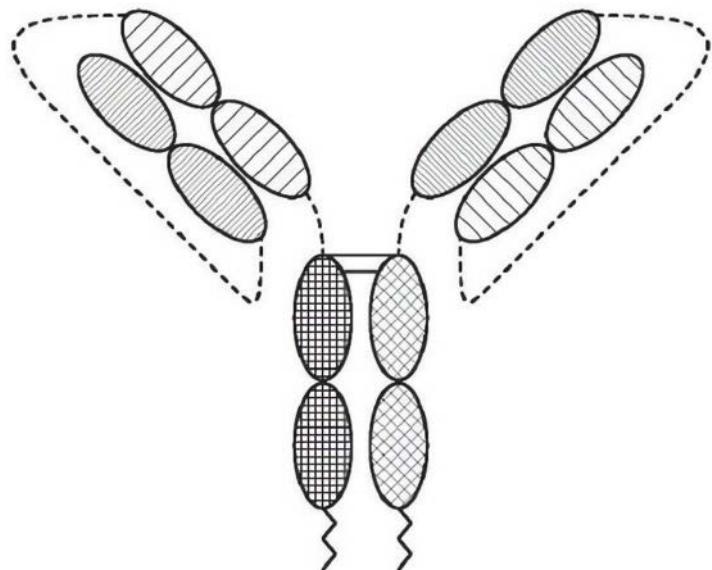


图28

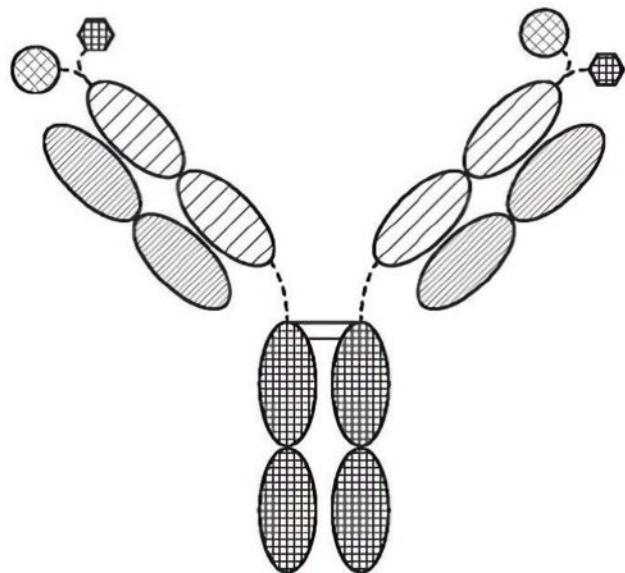


图29

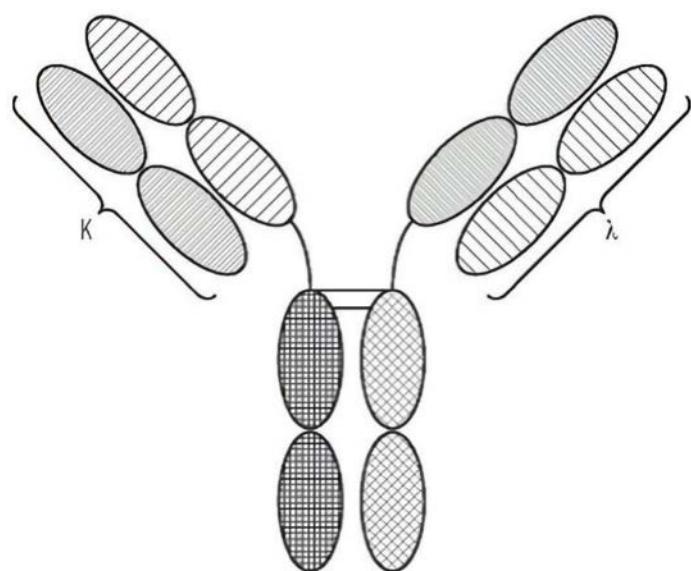


图30A

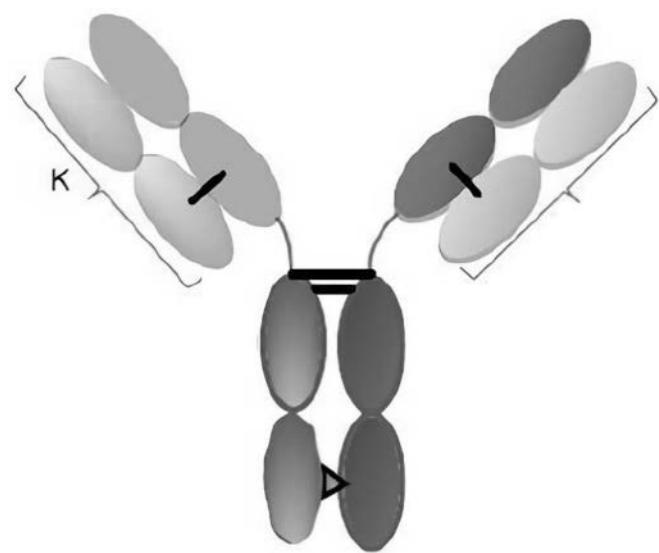


图30B

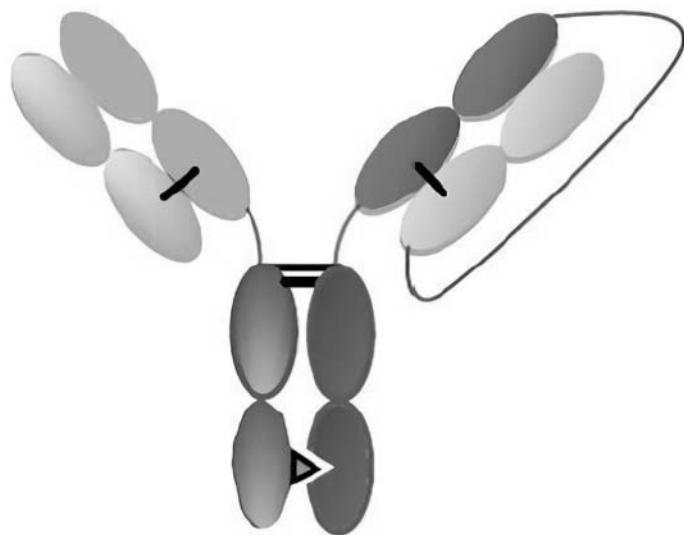


图31

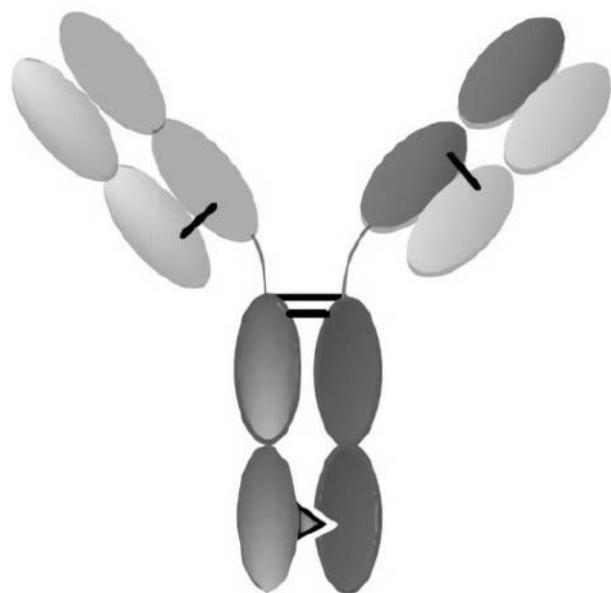


图32

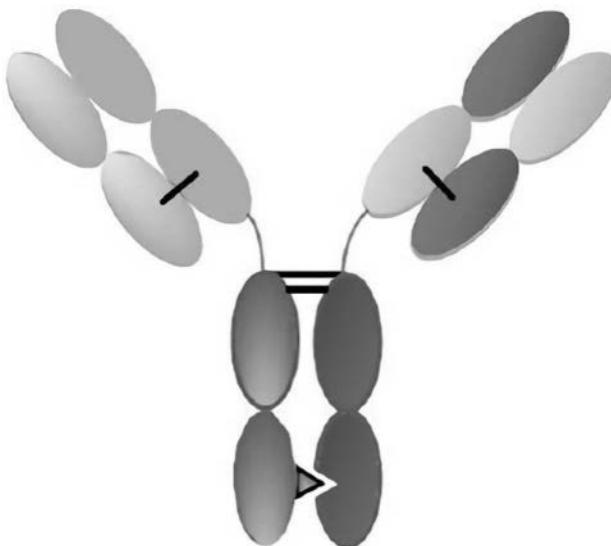


图33

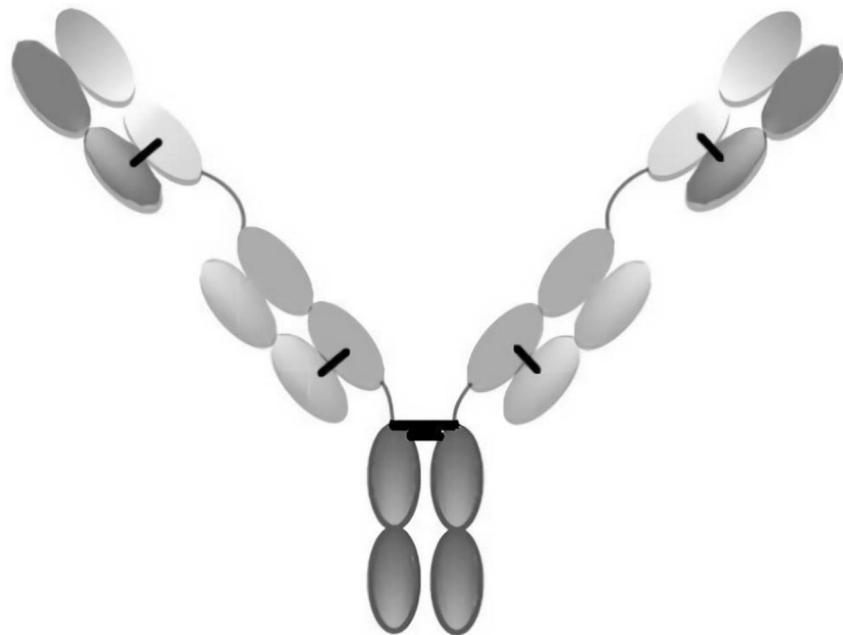


图34

F3'格式

靶向 NK 细胞的  
FAB                    靶向肿瘤的 scFV

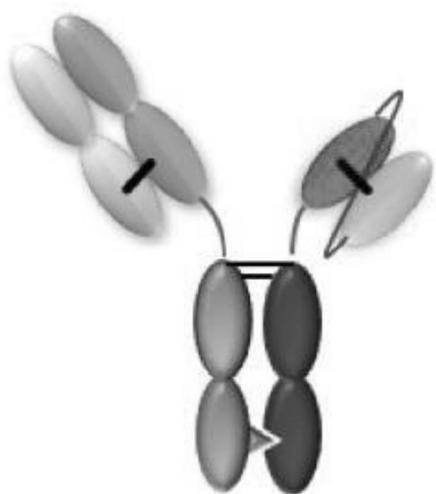


图35

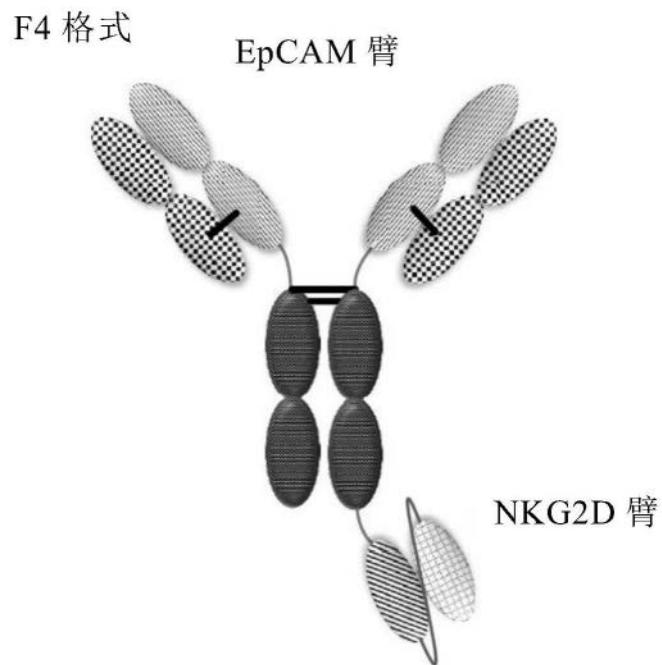


图36

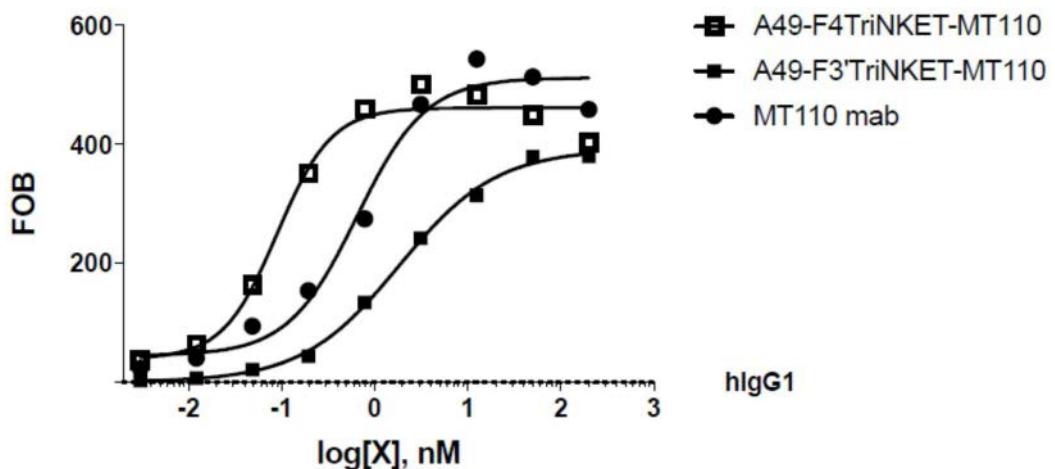


图37

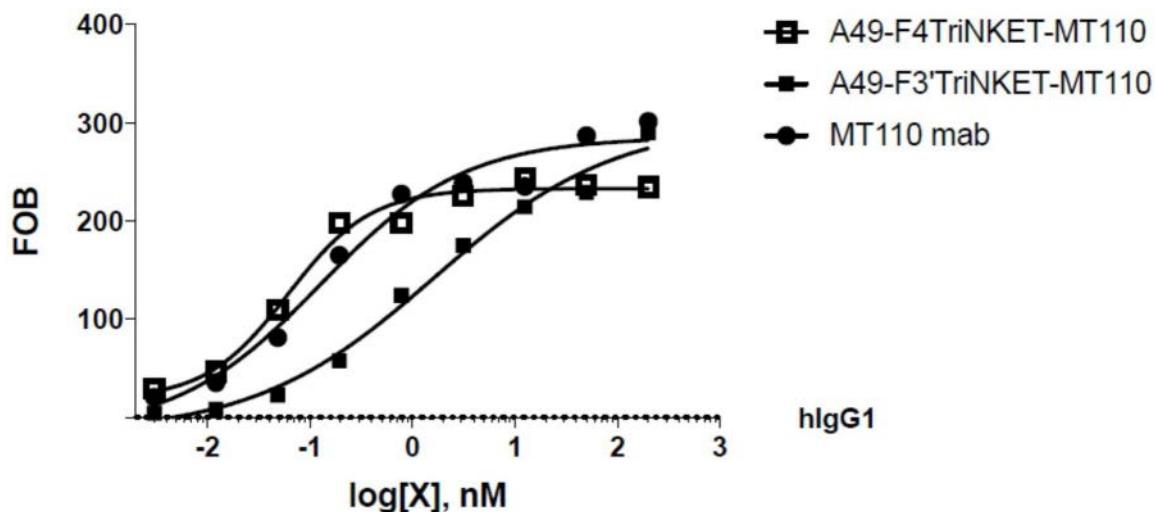


图38

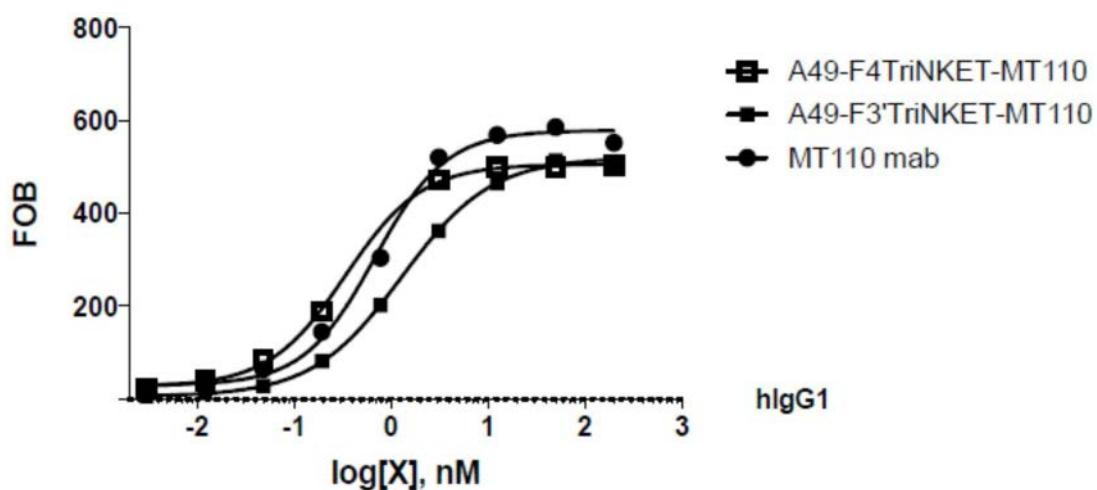


图39

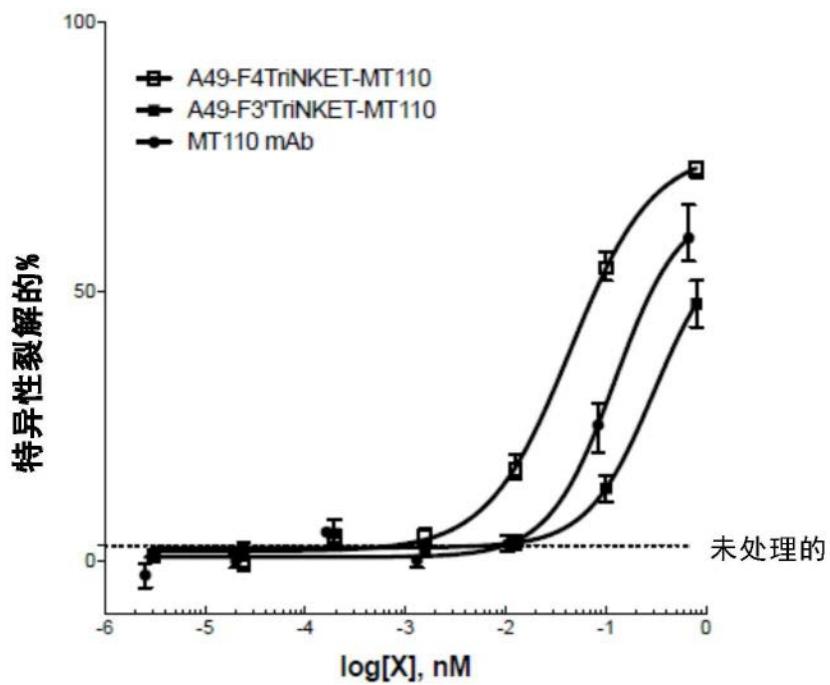


图40A

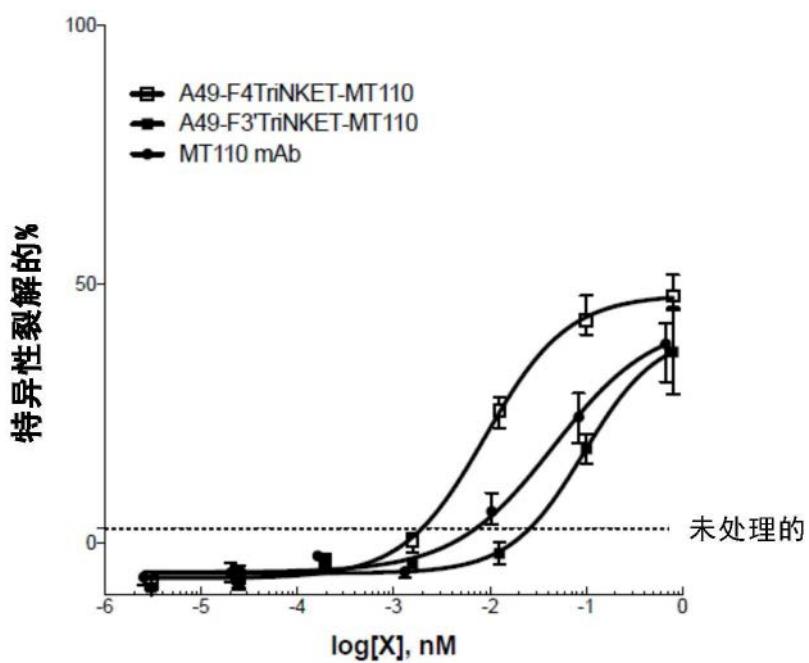


图40B

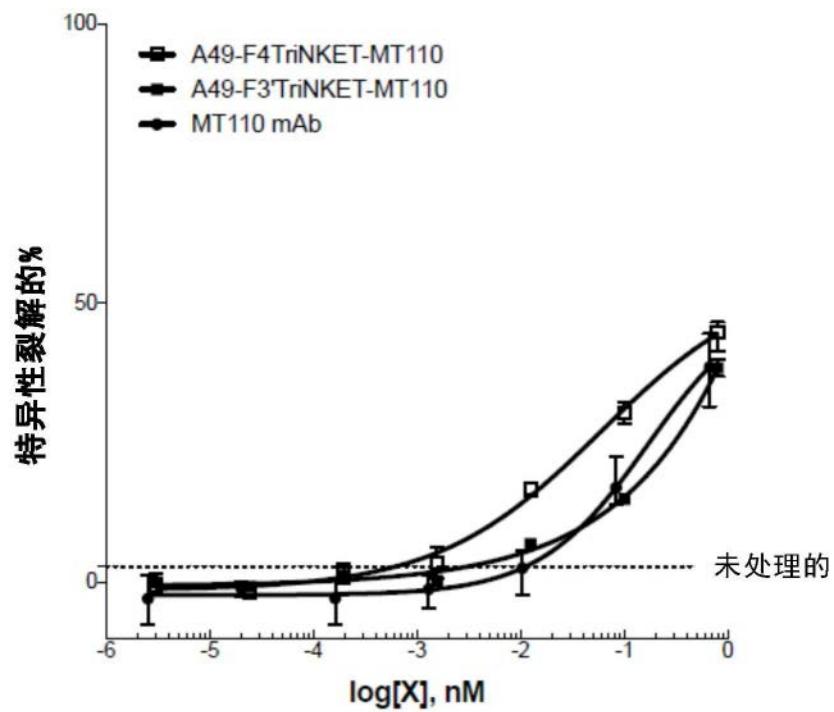


图41A

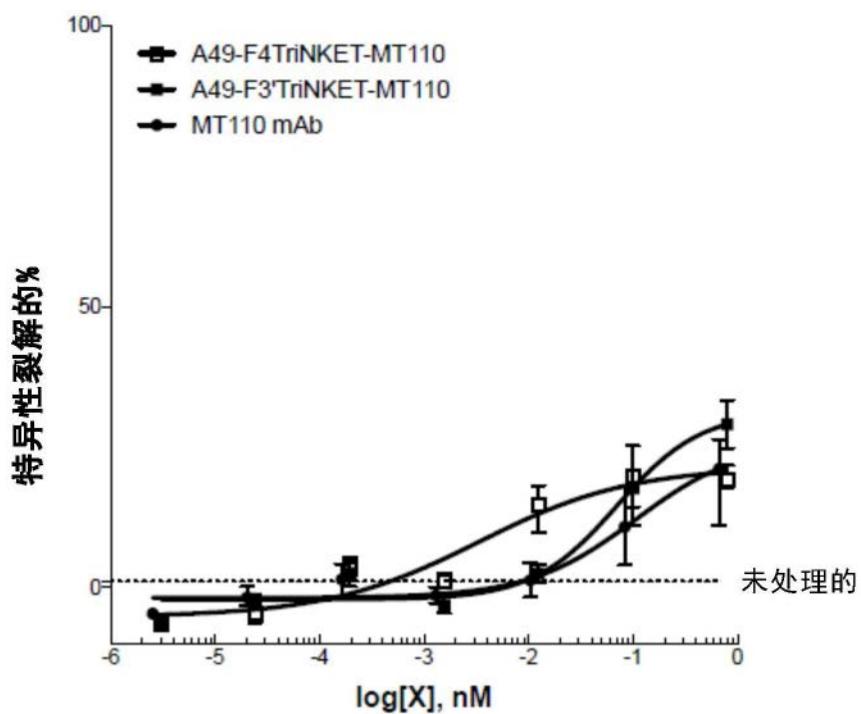


图41B

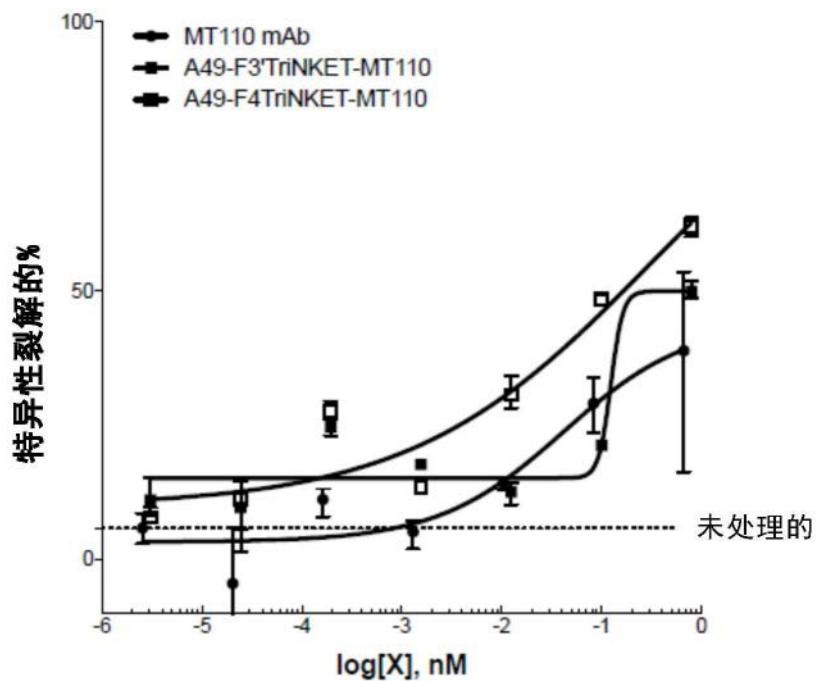


图42A

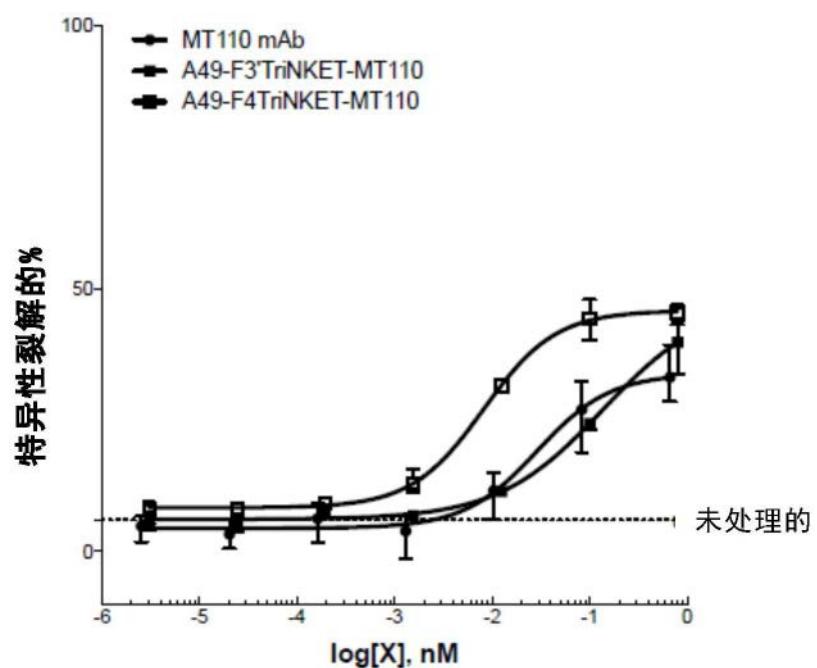


图42B

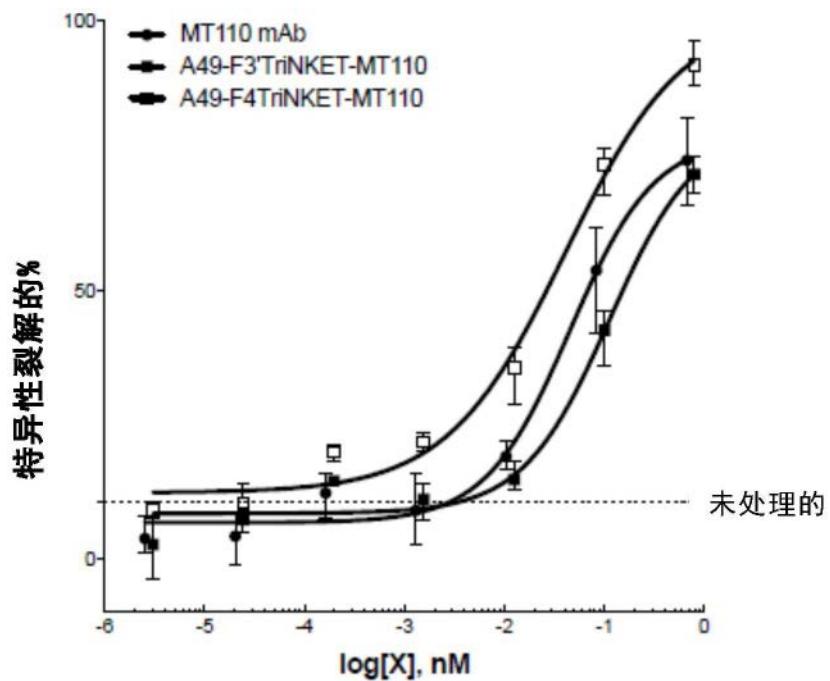


图43A

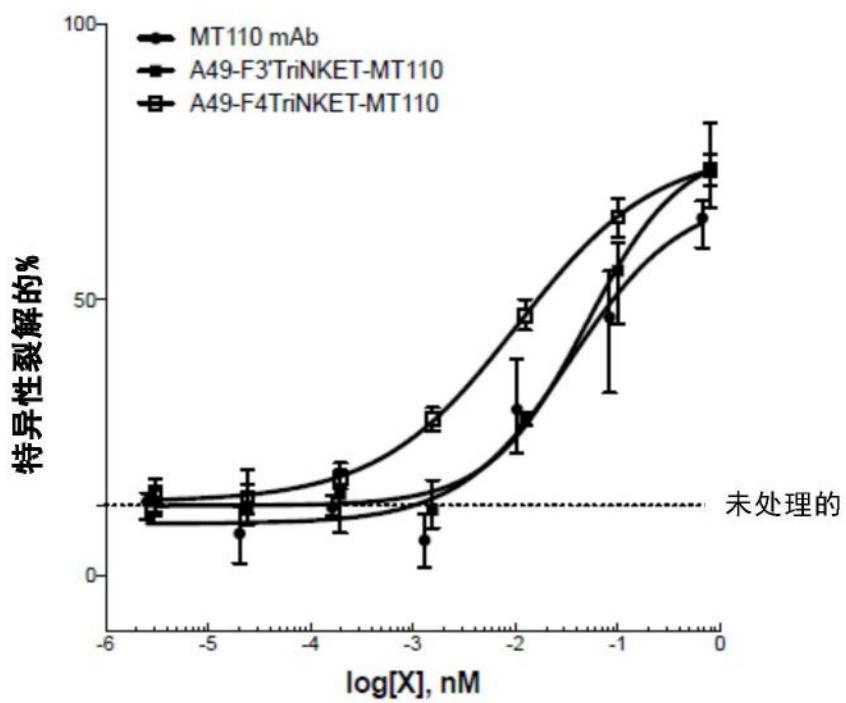


图43B