(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112119097 B
(45)授权公告日 2021.10.15

(21)申请号 201980033176.8
(22)申请日 2019.04.12
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112119097 A
(43)申请公布日 2020.12.22
(30)优先权数据
18167384.9 2018.04.13 EP
18167385.6 2018.04.13 EP
18190661.1 2018.08.24 EP
18190662.9 2018.08.24 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.11.17
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2019/053040 2019.04.12
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/198051 EN 2019.10.17
(73)专利权人 艾菲默德有限责任公司
地址 德国海德堡

(72)发明人 米夏埃多·特萨
克里斯蒂娜·埃尔万格尔
伊维察·富切克 乌韦·罗伊施
托尔斯滕·罗斯 约阿希姆·科赫
埃里希·拉伊科维奇
梅尔廷·特雷德

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
代理人 张莹
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)

(56)对比文件
WO 2016207278 A1,2016.12.29
WO 2016177846 A1,2016.11.10
EP 3091031 A1,2016.11.09

审查员 吴永庆

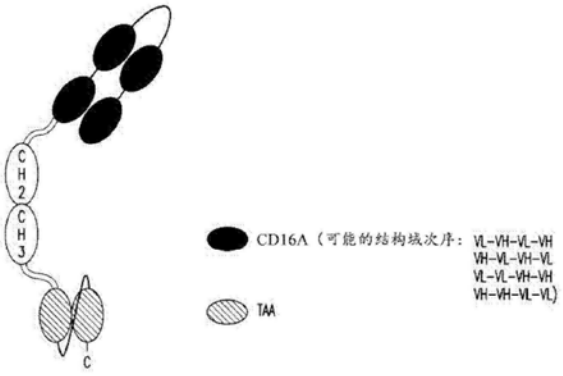
权利要求书3页 说明书126页
序列表67页 附图76页

(54)发明名称

自然杀伤细胞接合抗体融合构建体

(57)摘要

本发明涉及多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白用于通过接合在自然杀伤(NK)细胞上表达的CD16A(Fcγ RIIIA)来接合所述NK细胞以触发NK细胞的细胞毒性,其中所述抗原结合蛋白包含至少两个CD16A抗原结合部分和至少另一个靶抗原结合部分。所述CD16A抗原结合部分包含在多肽链中一个接一个地连接的轻链可变区和重链可变区,并且在所述多肽链的N末端处的包含所述CD16A抗原结合部分的所述可变区是轻链可变区。



CN 112119097 B

1.一种多特异性抗原结合蛋白,其包含:

a)两个B细胞成熟抗原(BCMA)抗原结合部分,每个包含Fab片段和Fc部分,并且其中每个Fab片段包含:重链可变区,其包含由SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列组成的CDR1,由SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列组成的CDR2,和由SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列组成的CDR3;和轻链可变区,其包含由SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列组成的CDR1,由SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列组成的CDR2,和由SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列组成的CDR3,和

b)两个CD16A抗原结合部分,每个为单链可变片段(scFv)形式,所述单链可变片段(scFv)包含:重链可变区,其包含由SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列组成的CDR1,由SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列组成的CDR2,和由SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列组成的CDR3;和轻链可变区,其包含由SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列组成的CDR1,由SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列组成的CDR2,和由SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列组成的CDR3,其中所述两个scFv的每个的N末端处的可变区是所述轻链可变区,

其中所述两个scFv的第一个的N末端与所述两个BCMA结合部分的第一个的Fc部分的C末端融合,并且所述两个scFv的第二个的N末端与所述两个BCMA结合部分的第二个的Fc部分的C末端融合。

2.根据权利要求1所述的多特异性抗原结合蛋白,其包含根据Kabat EU编号的选自由以下组成的组的Fc部分的突变:(a)C220S,C229S,E233P,L234A,L234V,L234F,L235A,L235E,P238S,D265A,N297A,N297Q,和P331S,或(b)L234A,L234V,L234F,L235A,L235E,P238S,和D265A。

3.根据权利要求1所述的多特异性抗原结合蛋白,其中,所述两个CD16A抗原结合部分每个包含:

含有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的重链可变区;和/或含有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的轻链可变区。

4.根据权利要求1所述的多特异性抗原结合蛋白,其中,所述蛋白是四聚体,所述四聚体包含由SEQ ID NO:61所示的氨基酸序列组成的第一多肽链,和由SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列组成的第二多肽链。

5.根据权利要求1所述的多特异性抗原结合蛋白,其中,所述两个BCMA抗原结合部分每个包含:含有SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:66所示的氨基酸序列的轻链可变区。

6.一种药物组合物,所述药物组合物包含多特异性抗原结合蛋白,所述多特异性抗原结合蛋白包含两个CD16A抗原结合部分,其中每个CD16A抗原结合部分为单链可变片段(scFv)形式,和两个B细胞成熟抗原(BCMA)抗原结合部分,其中每个BCMA抗原结合部分包含Fab片段和Fc部分,其中:

(i)所述两个CD16A抗原结合部分每个包含:

(a)重链可变区,其包含由SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列组成的CDR1,由SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列组成的CDR2,和由SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列组成的CDR3;和

(b)轻链可变区,其包含由SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列组成的CDR1,由SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列组成的CDR2,和由SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列组成的CDR3;其中所述两个scFv的每个的N末端处的可变区是所述轻链可变区;

(c)其中所述两个scFv的第一个的N末端与所述两个BCMA结合部分的第一个的Fc部分的C末端融合,并且所述两个scFv的第二个的N末端与所述两个BCMA结合部分的第二个的Fc部分的C末端融合;和

(ii)所述两个BCMA抗原结合部分每个包含:

(a)重链可变区,其包含由SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列组成的CDR1,由SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列组成的CDR2,和由SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列组成的CDR3;和

(b)轻链可变区,其包含由SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列组成的CDR1,由SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列组成的CDR2,和由SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列组成的CDR3;

以及药学上可接受的载体。

7.一种双特异性抗原结合蛋白,所述双特异性抗原结合蛋白包含:两个CD16A抗原结合部分,每个为单链可变片段(scFv)形式,和两个靶向B细胞成熟抗原(BCMA)部分,每个包含Fab片段和Fc部分,其中所述两个scFv的第一个的N末端与所述两个靶向BCMA的部分的第一个的C末端融合,并且所述两个scFv的第二个的N末端与所述两个靶向BCMA的部分的第二个的C末端融合:

(i)所述两个CD16A抗原结合部分每个包含:

(a)重链可变区,其包含由SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列组成的CDR1;由SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列组成的CDR2;和由SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列组成的CDR3,和

(b)轻链可变区,其包含由SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列组成的CDR1;由SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列组成的CDR2;和由SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列组成的CDR3;其中所述两个scFv的每个的N末端处的可变区是所述轻链可变区;和

(ii)所述两个BCMA抗原结合部分每个包含:

(a)重链可变区,其包含由SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列组成的CDR1;由SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列组成的CDR2;和由SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列组成的CDR3,和

(ii)轻链可变区,其包含由SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列组成的CDR1;由SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列组成的CDR2;和由SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列组成的CDR3。

8.根据权利要求7所述的双特异性抗原结合蛋白,其中:

(i)所述两个CD16A抗原结合部分每个包含含有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的重链可变区;

(ii)所述两个CD16A抗原结合部分每个包含含有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的轻链可变区;

(iii)所述两个BCMA抗原结合部分每个包含含有SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列的重链可变区;

(iv)所述两个BCMA抗原结合部分每个包含含有SEQ ID NO:66所示的氨基酸序列的轻链可变区;

(v)所述两个CD16A抗原结合部分每个包含含有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的轻链可变区;

(vi)所述两个BCMA抗原结合部分每个包含含有SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:66所示的氨基酸序列的轻链可变区;和/或

(vii)所述两个CD16A抗原结合部分每个包含含有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的重

链可变区和含有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的轻链可变区;并且所述两个BCMA抗原结合部分每个包含含有SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:66所示的氨基酸序列的轻链可变区。

9.根据权利要求6所述的药物组合物,其中所述双特异性抗原结合蛋白包含根据Kabat EU编号的选自由以下组成的组的Fc部分的突变:(a)C220S,C229S,E233P,L234A,L234V,L234F,L235A,L235E,P238S,D265A,N297A,N297Q,和P331S,或(b)L234A,L234V,L234F,L235A,L235E,P238S,和D265A。

10.根据权利要求6所述的药物组合物,其中所述两个CD16A抗原结合部分每个包含:含有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的重链可变区;和/或

含有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的轻链可变区。

11.根据权利要求6所述的药物组合物,其中所述两个BCMA抗原结合部分每个包含:含有SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:66所示的氨基酸序列的轻链可变区。

12.根据权利要求6所述的药物组合物,其中所述双特异性抗原结合蛋白是四聚体,所述四聚体包含由SEQ ID NO:61所示的氨基酸序列组成的第一多肽链,和由SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列组成的第二多肽链。

13.根据权利要求7所述的双特异性抗原结合蛋白,其包含根据Kabat EU编号的选自由以下组成的组的Fc部分的突变:(a)C220S,C229S,E233P,L234A,L234V,L234F,L235A,L235E,P238S,D265A,N297A,N297Q,和P331S,或(b)L234A,L234V,L234F,L235A,L235E,P238S,和D265A。

14.根据权利要求7所述的双特异性抗原结合蛋白,其中所述双特异性抗原结合蛋白是四聚体,所述四聚体包含由SEQ ID NO:61所示的氨基酸序列组成的第一多肽链,和由SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列组成的第二多肽链。

自然杀伤细胞接合抗体融合构建体

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年4月13日提交的欧洲临时专利申请号EP18167384.9、2018年4月13日提交的欧洲临时专利申请号EP18167385.6、2018年8月24日提交的欧洲临时专利申请号EP18190661.1、2018年8月24日提交的欧洲临时专利申请号EP18190662.9的优先权，这些专利内容以引用方式整体并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表，所述序列表已经以ASCII格式以电子方式提交并且以全文引用的方式并入本文中。所述ASCII副本创建于2019年4月10日，命名为087353_0101_SL.txt，大小为137,653个字节。

技术领域

[0005] 本发明涉及多特异性抗原结合蛋白，所述多特异性抗原结合蛋白用于通过接合在自然杀伤(NK)细胞上表达的CD16A(Fcγ RIIIA)来接合所述NK细胞以触发NK细胞的细胞毒性，其中所述抗原结合蛋白包含至少两个CD16A抗原结合部分和至少另一个靶抗原结合部分。

背景技术

[0006] WO 2006/125668和Reusch等人，MABS，2014，6:3:728-739描述了一种用于接合CD16A的双特异性串联双抗体及其用于NK细胞免疫疗法的用途。

[0007] 自然杀伤(NK)细胞是被认为构成了抵御病毒感染细胞和癌细胞的第一道防线的具有细胞毒性、产生IFN-γ的先天淋巴细胞(Cerwenka和Lanier，Nat Rev Immunol.2001;1(1):41-9)。通过将NK细胞裂解重定向至肿瘤细胞并刺激在NK细胞的表面上表达的活化受体CD16A(也称为Fcγ RIIIA)，可以将NK细胞的细胞毒性潜力用于癌症免疫疗法中。

[0008] 使用多特异性抗体指导NK细胞进行肿瘤细胞裂解被认为是一种有效的免疫治疗途径，该途径具有低毒性和可良好接受的安全特性。

[0009] CD16A是一种触发NK细胞的细胞毒活性的活化受体。抗体对CD16A的亲和力与它们触发NK细胞活化的能力直接相关，因此减少了活化所需的抗体剂量。

[0010] 可以通过与CD16A进行多价结合，例如与CD16A进行二价结合以提高亲和力，来提高NK细胞的细胞毒性。

[0011] 然而，CD16A的双价性和多价性可能导致表达CD16A的细胞(包括NK细胞、γδT细胞，以及单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞的子集)的抗体介导的交联。预期此类相互作用会导致经由CD16A的不期望细胞刺激。例如，NK细胞与表达CD16A的免疫细胞的交联导致NK细胞活化、细胞因子释放和细胞定向细胞毒性的诱导，这降低了NK细胞活性并且加速了NK细胞耗竭，所述NK细胞耗竭与期望抗肿瘤效用无关。因此，预期NK细胞与表达CD16A的免疫细胞交联会降低NK细胞接合的治疗功效。最重要的是，两个或更多个NK细胞通过与CD16A的二价或多价相互作用进行交联可导致NK细胞活化和同类杀伤(fratricide)(NK-NK细胞裂

解)的诱导,从而最终导致体内有效NK细胞耗竭,如先前使用对于恒河猴和绢毛猴中的CD16A是二价的CD16定向鼠IgG抗体(3G8)所述(Choi等人,Immunology2008;124:215-222;Yoshida等人,Frontier in Microbiology(2010);1:128)。因此,NK裂解的诱导减少了可用于介导ADCC的效应细胞的数量,并削弱了治疗性抗体的功效。

[0012] 因此,需要能够进行不会因同类杀伤(NK-NK细胞裂解)而减弱的增强NK细胞接合的抗体。

发明内容

[0013] 本发明提供了一种CD16A接合抗体,其能够与NK细胞上的CD16A至少二价相互作用,因此具有增加的结合亲和力和细胞毒性,但优选地不能诱导NK-NK细胞裂解。

[0014] 本发明涉及:

[0015] 一种多价且多特异性的抗原结合蛋白,其包含至少一个靶抗原结合部分和至少两个CD16A抗原结合部分,其中所述两个CD16A抗原结合部分与恒定结构域(例如Fab片段或Fc部分)融合。优选地,靶抗原结合部分还与Fab片段或Fc部分融合。

[0016] 例如,抗原结合部分中的任一个可以选自由以下项组成的组:单链双抗体(scDb)、双抗体(Db)、单链Fv(scFv)或Fab片段。

[0017] 在一些实施例中,CD16A抗原结合部分的轻链可变区和重链可变区在多肽中一个接一个地连接,使得在多肽链的N末端处的可变区是轻链可变区,从而防止了同类杀伤(NK-NK细胞裂解)的诱导。

[0018] 通过将抗原结合部分的N末端或C末端融合到各种包含恒定结构域的单元(诸如F(ab)′、$F(ab)_2$′、CH2-CH3、铰链-CH2-CH3、Fc、CH1-铰链-CH2-CH3或IgG),可以获得多种蛋白质架构。

[0019] 在一些实施例中,抗原结合蛋白包含沉默的Fc部分,其不与Fc-γR结合,但是保留与FcRn结合以及任选地至少一种其他的Fc功能性。

[0020] 在一些实施例中,抗原结合蛋白包含Fc部分,该Fc部分在一方面被沉默以使其不与Fc-γR结合,在另一方面可以包括进一步的突变以增加或降低其与FcRn结合的能力,这确实与基于不同的细胞转运和再循环能力的不同体内药代动力学相关。

[0021] 在某些实施例中,所述抗原结合蛋白包含至少一个HSA抗原结合部分。例如,抗原结合蛋白可包含2、3或4个HSA抗原结合部分。

[0022] 在某些实施例中,抗原结合蛋白包含至少两个不同的靶抗原结合部分,即第一靶抗原结合部分和第二靶抗原结合部分。

[0023] 在某些实施例中,施加对CD16A具有增加或减少的亲和力的CD16A抗原结合部分。

[0024] 本发明的特征尤其在于:

[0025] 1.由于与Fab片段或Fc部分融合的两个CD16A抗原结合部分,NK细胞接合功能得以增强,

[0026] • 从而由于与CD16A的二价结合而增加了细胞毒性潜力。

[0027] • 利用与CD16A具有高亲和力结合的抗CD16A抗原结合部分。

[0028] • 通过以不诱导同类杀伤的特定次序排列CD16A抗原结合来避免同类杀伤(NK-NK细胞裂解)的诱导,从而防止NK细胞对靶细胞的细胞毒活性减弱。

[0029] • 避免同类杀伤与CD16A抗原结合部分的结合亲和力无关。

[0030] • 使用沉默的Fc部分来避免与Fc-γR阳性单核细胞或其他表达Fc-γR的细胞的附加结合,同时保持与FcRn的结合,从而延长血清半衰期。

[0031] 2.这种增强的NK细胞接合功能可以归因于抗原结合部分的模块化,这归因于实现可调节的细胞毒性、靶标亲和力、CD16A功能性、靶标生物学、组织穿透和分布、半衰期和暴露的多种蛋白质架构。

[0032] 本文具体描述的多种抗体形式和包括变化的半衰期和不同的暴露在内的功能性的使用允许为具有高医疗需求的不同适应症定制新疗法,从而为相应的设置提供靶向产品开发。

[0033] 此外,NK细胞同类杀伤的缺乏是高亲和力,至少是二价免疫细胞接合剂形式的重要特征,这种二价免疫细胞接合剂形式的特征在于更长的细胞保留时间,并且将用于内源性NK细胞的接合或者与NK细胞治疗方法组合。这些NK细胞治疗方法包括来自不同来源的NK细胞,诸如来自脐带血、来自健康供体的外周血、来自进行自体治疗的患者或来自干细胞的NK细胞。这些接合剂可以与此类NK细胞共注入或预混合。

[0034] 本文提供了蛋白质形式,所述蛋白质形式进一步通过与靶标的至少二价结合来使得能够增加靶标结合亲和力和/或通过由两个不同的第一和第二靶标抗原结合部分对靶标进行双重靶向来使靶标选择性增大。

[0035] 可以将其他功能结合到抗原结合蛋白中,诸如人血清白蛋白(HSA)结合部分。

[0036] 附图简要说明

[0037] 图1至图2示出了scDb-mFc抗原结合蛋白,其是单体的并且包含与单体Fc部分融合的scDb形式的二价CD16A抗原结合部分,其中在图1中,由两个CD16A抗原结合部分组成的scDb与由变异CH2-CH3多肽组成的Fc部分的N末端融合并且包含单个靶抗原结合部分的scFv与该Fc部分的C末端融合,并且在图2中,由两个CD16A抗原结合部分组成的scDb与由变异CH2-CH3多肽组成的Fc部分的C末端融合并且包含单个靶抗原结合部分的scFv与该Fc部分的N末端融合。该靶标是肿瘤相关靶标。

[0038] 图3至图6展示了KiH-scDb-Fc抗原结合蛋白,其是异源二聚的并且包含与异源二聚(KiH)Fc部分融合的scDb形式的二价CD16A抗原结合部分,其中在图3中,由两个CD16A抗原结合部分组成的scDb在由CH2-CH3异二聚体组成的Fc部分的N末端处与铰链或中间铰链融合,并且包含单个靶抗原结合部分的scFv与该Fc部分的C末端融合;在图4中,由两个CD16A抗原结合部分组成的scDb在由CH2-CH3异二聚体组成的Fc部分的两个多肽中的一个多肽的N末端处与铰链或中间铰链融合,并且包含单个靶抗原结合部分的scFv与所述CH2-CH3异二聚(KiH)Fc部分的另一个多肽的N末端处与铰链融合;在图5中,由两个CD16A抗原结合部分组成的scDb与由CH2-CH3异二聚体组成的Fc部分的C末端融合,并且包含单个靶抗原结合部分的scFv在所述CH2-CH3异二聚(KiH)Fc部分的另一个多肽的N末端处与铰链或中间铰链融合;并且在图6中,由两个CD16A抗原结合部分组成的scDb与由CH2-CH3异二聚体组成的Fc部分的C末端融合,并且包含第一靶抗原结合部分的第一scFv在该Fc部分的N末端处与铰链或中间铰链融合,并且包含第二(并且不同于第一)靶抗原结合部分的第二scFv在CH2-CH3异二聚(KiH)Fc部分的另一多肽的N末端处与铰链或中间铰链融合。第一靶标和第二靶标是两个不同的肿瘤相关靶标。

[0039] 图7至图8示出了三特异性scDb-TriB抗原结合蛋白，其是包含CD16A、靶标和HSA抗原结合部分的异二聚Fab片段-scDb融合体，其中在图7中，由两个CD16A抗原结合部分组成的二价scDb与Fab片段的两个多肽中的一个多肽的C末端融合，并且由两个靶抗原结合部分组成的二价scDb与该Fab片段的另一个多肽的C末端融合，并且在该Fab片段的N末端处的Fv提供HSA抗原结合部分；并且在图8中，由两个CD16A抗原结合部分组成的二价scDb与Fab片段的两个多肽中的一个多肽的C末端融合，并且由单个靶抗原结合部分组成的scFv与该Fab片段的另一个多肽的C末端融合，并且在该Fab片段的N末端处的Fv提供HSA抗原结合部分。该靶标是肿瘤相关靶标。

[0040] 图9至图10示出了Db-Fc抗原结合蛋白，其是同型二聚的并且包含在N末端处与中间铰链融合或与同型二聚Fc部分的C末端融合的Db形式的二价CD16A抗原结合部分和scFvs形式的两个靶抗原结合部分，其中在图9中，scFv与同型二聚化的CH2-CH3多肽的C末端融合，并且包含Db的多肽在CH2-CH3多肽的N末端处与中间铰链融合，其中Db的两个多肽非共价地缔合至包含两个CD16A抗原结合部分的Db。靶标是与肿瘤相关的靶标，并且在图10中，scFv靶抗原结合部分在同型二聚化CH2-CH3多肽的N末端处与中间铰链融合，并且包含含有两个CD16A抗原结合部分的Db的多肽与Fc同型二聚体的C末端融合。该靶标是肿瘤相关靶标。

[0041] 图11至图12示出了Bi-scFv-Fc抗原结合蛋白，其是同型二聚并且四价的，包含两个CD16A抗原结合部分和两个靶抗原结合部分，每一个部分为与Fc同型二聚体融合的scFv的形式，其中在图11中，两个CD16A抗原结合scFv在CH2-CH3多肽中的一个多肽的N末端处与铰链融合，并且两个靶抗原结合的scFv与所述CH2-CH3多肽的C末端融合；并且在图12中，CD16A抗原结合部分是在C末端处与Fc同型二聚体融合的scFv，而靶抗原结合scFv在Fc同型二聚体的N末端处与铰链融合。该靶标是肿瘤相关靶标。

[0042] 图13示出了scFv-IgAb抗原结合蛋白，其包含具有两个CD16A抗原结合部分的IgG抗体融合物，该两个CD16A抗原结合部分为与H链的C末端融合的scFv的形式，而两个靶抗原结合部分是由IgG的Fab臂中的每个Fv提供的。该靶标是肿瘤相关靶标。

[0043] 图14示出了Bi-scFv-IgAb抗原结合蛋白，其包含IgG抗体融合体，该IgG抗体融合体具有与其融合的四个scFv抗原结合部分，其中scFv形式的两个CD16A抗原结合部分中的每一个与H链的C末端融合，而与第一靶标结合的两个抗原结合部分由IgG的Fab臂中的每个Fv提供，并且与第二靶标结合的两个抗原结合部分中的每一个与两条CL链的C末端融合。

[0044] 图15A和图15B示出了KiH-scFv-Fc抗原结合蛋白，其中四个抗原结合scFv与异二聚(KiH)Fc部分融合，其中两个CD16A抗原结合部分在N末端或或C末端与该Fc部分融合。图15A示出了具有两个CD16A抗原结合部分的KiH-scFv-Fc，所述两个CD16A抗原结合部分中均在CH2-CH3多肽中的一个多肽的N末端处与铰链融合，并且包含第一靶抗原结合部分的scFv与CH2-CH3多肽中的一个多肽的C末端融合，而另一个包含第二靶抗原结合部分的scFv与另一CH2-CH3多肽的C末端融合。图15B示出了具有两个CD16A抗原结合部分的KiH-scFv-Fc，所述两个CD16A抗原结合部分均与CH2-CH3多肽中的一个多肽的C末端融合，并且包含第一靶抗原结合部分的scFv在CH2-CH3多肽中的一个多肽的N末端处与铰链融合，而另一个包含第二靶抗原结合部分的scFv在另一CH2-CH3多肽的N末端处与铰链融合。

[0045] 图16示出了scFv-IgAb抗原结合蛋白，其包含具有两个靶抗原结合部分的IgG抗体

融合物，该两个靶抗原结合部分为与H链的C末端融合的scFv的形式，而两个CD16A抗原结合部分是由IgG的Fab臂中的每个Fv提供的。该靶标是肿瘤相关靶标。

[0046] 图17A至图17N示出了实施例6中抗体介导的NK-NK细胞裂解的结果。图17A示出了以双体抗体形式(scDb)在N末端处与单体Fc融合的两个抗CD16A部分(以及在N末端处靶向TAA的scFv)，如图1所示。图17B示出了以双体抗体形式(scDb)在C末端处与单体Fc融合的两个抗CD16A部分(以及将TAA靶向N末端的scFv)，如图2所示。图17C示出了以双体抗体形式(scDb)在N末端处与不对称Fc融合的两个抗CD16A部分(以及在N末端处靶向TAA的scFv)，如图3所示。图17D示出了以双体抗体形式(scDb)在N末端处与不对称Fc融合的两个抗CD16A部分(以及将TAA靶向N末端的scFv)，如图4所示。图17E示出了以双体抗体形式(scDb)在C末端处与不对称Fc融合的两个抗CD16A部分(以及将TAA靶向N末端的scFv)，如图5所示。图17F示出了以双体抗体形式(scDb)在CL的C末端处与Fab融合的两个抗CD16A部分(以及将TAA靶向CH1的C末端的scDb)，如图7所示。图17G示出了以双体抗体形式(scDb)在CH1的C末端处与Fab融合的两个抗CD16A部分(以及将TAA靶向CL的C末端的scDb)，如图8所示。图17H示出了以双体抗体(Db)形式在N末端处与Fc融合的两个抗CD16A部分(以及在N末端处靶向TAA的scFv)，如图9所示。图17I示出了以双体抗体(Db)形式在C末端处与Fc融合的两个抗CD16A部分(以及将TAA靶向N末端的scFv)，如图10所示。图17J示出了以scFv形式在N末端处与Fc融合的两个抗CD16A部分(以及在N末端处靶向TAA的scFv)，如图11所示。图17K示出了以scFv形式在C末端处与Fc融合的两个抗CD16A部分(以及在N末端处靶向TAA的scFv)，如图12所示。图17L示出了以scFv形式在C末端处与Fc融合的两个抗CD16A部分(以及在N末端处靶向TAA的Fab臂)，如图13所示。图17M示出了以scFv形式在N末端处与不对称Fc融合的两个抗CD16A部分(以及在C末端处靶向2个TAA的2个scFv)和以scFv形式在C末端处与不对称Fc融合的两个抗CD16A部分(以及在N末端处靶向2个TAA的2个scFv)，如图15a和图15b所示。图17N示出了具有在C末端处与Fc融合的两个靶向TAA的scFv(如图16所示)的IgG的Fab臂中的两个抗CD16A部分与以scFv形式在C末端处与Fc融合的两个抗CD16A部分(以及在N末端处的靶向TAA的Fab臂;如图13所示)的比较。

[0047] 图18A和图18B是对不同抗CD16 scFv的SPR分析。与野生型IgG1和经工程改造的人IgG1 Fc(S239D/I332E)相比，抗CD16结合scFv抗体(Ab16^{hi}、Ab16^{mid}、3G8、Ab16^{lo})的归一化的相对结合信号的SPR传感图。图18A示出了增强的与人CD16A-158V的结合。图18B示出了与人CD16A-158F的结合。被分析物是在312.5nM的单一浓度下测量的。

[0048] 图19A至图19C示出了位置140的酪氨酸(Y)对于scFv抗体的构象表位和CD16A特异性反应性的形成至关重要。分析了表达为ECD序列与单体Fc或膜锚的融合蛋白的不同重组CD16变体。图19A示出了测试在硝酸纤维素膜上含有确定的CD16抗原变体的蛋白质斑点与指示的CD16结合scFv的反应性。图19B示出了通过抗体染色和流式细胞术分析不同的抗CD16 scFv、对照scFv或mAb与在通过与EGFR跨膜结构域或GPI融合而锚定的CHO细胞上表达的CD16抗原变体或EGFR抗原的反应性。图19C示出了不同的抗CD16抗体在通过SDS-PAGE和蛋白质印迹法分离后与CD16抗原变体的结合。

[0049] 图20示出了抗CD16结合结构域(Ab16lo、Ab16mid、Ab16hi、3G8)与野生型人IgG1 Fc、增强型人IgG1 Fc(S239D/I332E)、沉默的人IgG1 Fc(L234F/L235E/D265A)相比，与人CD16A-158V和人CD16A-158F结合的SPR传感图。KD值是使用1:1结合模型计算的，并且如表5

所示。横坐标:响应(RU),纵坐标:时间[s]。

[0050] 图21示出了在本文所述的某些实验中用作重组抗原的人和食蟹猴CD16A和人CD16B变体的ECD序列的序列比对。人CD16A或CD16B中具有多态性的位置分别用细箭头和粗箭头标记。符号'#'标记将人CD16B连接至GPI膜锚的位置,标记为'd'的位置被从成熟的CD16B抗原序列上切除。食蟹猴CD16A ECD序列中的变异是粗体的。人CD16A和人CD16B之间具有序列变异的位置在方括号中(对于所测试的抗CD16抗体的CD16A特异性结合至关重要)。使用CLUSTAL O(1.2.4)多序列比对工具进行比对。

[0051] 图22示出了在ELISA中不同抗CD16 scFv抗体与mAb 3G8对CD16A的结合竞争。将包被有CD16A-158V ECD-Fc融合抗原的平板用1nM的mAb 3G8与不同抗CD16 scFv在指定浓度范围内的连续稀释的混合物孵育。用过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠IgG(H+L)检测结合了CD16A的mAb 3G8。在450nm下测量TMB底物反应(Ext(450nm)),作图并进行分析。

[0052] 图23示出了ROCK®平台概观。

[0053] 图24A至图24C示出了各种CD16A二价结合ROCK®接合物的归一化相对结合解离相的SPR传感图。将含有scFv-IgAb_C、Db-Fc_A、scFv-IgAb_D、KiH-scDb-Fc_A、TandAb_C的二价抗CD16A结构域与IgAb_E(增强型Fc;S239D/I332E)和固定的人CD16A-158V和食蟹猴CD16上的单价抗CD16A片段scFv $Ab16^{hi}$进行比较。图24A示出了固定的人CD16A-158V上的SPR传感图。图24B示出了食蟹猴CD16上的SPR传感图。图24C示出了解离3小时后保留在受体上的抗体的图例和百分比。被分析物是在50nM的单一浓度下测量的。

[0054] 图25示出了ROCK®抗体与NK细胞上的IgG相比的细胞表面保留。在冰上将富含的原代人NK细胞用100μg/mL TandAb或400μg/mL IgG预加载45分钟,洗涤并在37℃下孵育指定的时段以进行解离。洗涤后,通过His标记的可溶性BCMA之后是10μg/mL mAb抗His和15μg/mL FITC-缀合山羊抗小鼠IgG检测保留的抗体。将从时间点0开始的平均荧光强度设置为100%,并使用非线性回归对保留抗体的百分比作图。

[0055] 图26A至图26C示出了ROCK®形式的CD16A表观亲和力,其可通过可变结构域、定位和连接物长度进行调谐。以ELISA分析可溶性CD16抗原与在不同位置含有不同CD16结合Fv($Ab16^{mid}$、$Ab16^{hi}$)(N:Fc的抗CD16 Fv N末端,C:Fc的抗CD16 Fv C末端)的ROCK®抗体的结合、抗体形式和不同结构域的次序。示出了在每组下方有用虚线符号描绘的CD16结合Fv的代表性象形图。图26A示出了对通过基于Fab或基于scFv的CD16接合获得的CD16A表观亲和力的概观。图26B示出了对通过基于双体抗体(Db)的CD16接合获得的CD16A表观亲和力的概观。图26C示出了对通过C末端的基于scFv的CD16接合获得的CD16A表观亲和力的概观,所述接合包括不同的连接物长度(10aa或30aa)和抗CD16 Fv的结构域次序(HL:scFv结构域次序VH-VL,LH:scFv结构域次序VL-VH)。在与Fab的C末端融合的情况下,所有分析的抗体均含有沉默的Fc或缺乏Fc。以黑色或阴影描绘的结合特异性包括靶向BCMA、CD19、CD20、EGFR、HSA或RSV的抗体结构域。

[0056] 图27A至图27C示出了在存在或不存在人IgG的情况下ROCK®抗体与原代人NK细胞的结合。图27A示出了在37℃下在存在或不存10mg/mL多克隆人IgG的情况下用不断增加浓度的所示无FcROCK®对原代人NK细胞进行染色。图27B示出了在37℃下在存在或不存在10mg/mL多克隆人IgG的情况下用不断增加浓度的所示Fc融合体ROCK®对原代人NK

细胞进行染色。图27C示出了在37℃下在存在或不存在10mg/mL多克隆人IgG的情况下用不断增加浓度的所示IgG样ROCK®构建体对原代人NK细胞进行染色。通过流式细胞术检测与细胞结合的抗体，并使用中值荧光强度(MFI)来通过非线性回归计算表观亲和力(K_D)。

[0057] 图28示出了对各种ROCK®抗体形式关于体外NK同类杀伤的对比分析。富集的原代人NK细胞在针对自体NK细胞的不同ROCK®抗体形式的存在下在以1:1的E:T共孵育4小时后的体外钙黄绿素释放细胞毒性测定。汇总几个独立实验的平均EC_{50}值并作图为单独点。基于抗CD16结构域的位置和形式/结构域次序对ROCK®抗体形式进行分类。图中仅包括含有高亲和力抗CD16结构域和沉默的Fc的构建体。HL:scFv结构域次序VH-VL，LH:scFv结构域次序VL-VH。N-term.＝N末端，C-term.＝C末端。

[0058] 图29A至图29E示出了富集的原代人NK细胞在针对表达其对应肿瘤靶标的细胞系的几种ROCK®抗体的存在下的体外细胞毒性。图29A示出了在以5:1的E:T比使用NK细胞和表达差异水平的BCMA的靶细胞系NCI-H929的4小时钙黄绿素释放细胞毒性测定中，所示靶向BCMA的ROCK®抗体的代表性S形剂量反应曲线，所述差异水平如由SABC值(≥3次测定的平均值)所指示。图29B示出了在以5:1的E:T比使用NK细胞和表达差异水平的BCMA的靶细胞系MM.1S的4小时钙黄绿素释放细胞毒性测定中，所示靶向BCMA的ROCK®抗体的代表性S形剂量反应曲线，所述差异水平如由SABC值(≥3次测定的平均值)所指示。图29C示出了在以5:1的E:T比使用NK细胞和表达差异水平的BCMA的靶细胞系MC/CAR的4小时钙黄绿素释放细胞毒性测定中，所示靶向BCMA的ROCK®抗体的代表性S形剂量反应曲线，所述差异水平如由SABC值(≥3次测定的平均值)所指示。图29D示出了在以5:1的E:T比使用NK细胞和SW-982靶细胞的4小时钙黄绿素释放细胞毒性测定中，所示的靶向EGFR的ROCK®抗体、对比物或单价结合对照的代表性S形剂量反应曲线。图29E示出了ROCK®抗体关于NK细胞对体外肿瘤靶细胞的结合亲和力和细胞毒性效力的相关性。示出了ROCK®抗体形式在原代人NK细胞上的表观亲和力(K_D)。在NK细胞与表达BCMA的RPMI-8226靶细胞的E:T比为2:1的3小时钙黄绿素释放细胞毒性测量中(左)或在NK细胞与表达BCMA的NCI-H929靶细胞的E:T比为5:1的4小时钙黄绿素释放细胞毒性测定中(右)确定相同ROCK®抗体的EC_{50}值。SABC为特异性抗体结合能力。

[0059] 图30示出了不同ROCK®接合物形式的药代动力学的比较:单次静脉内施用300μg测试项后随时间(1或3周观察期)推移的抗体浓度。

[0060] 图31A至图31B示出了CD16A/BCMA抗体I对CD16A-158V/V健康供体(实线)和CD16A-158F/F(虚线)的细胞毒性。图31A示出了NCI-H929细胞系的结果。图31B示出了MM.1S细胞系的结果。

[0061] 图32A至图32E示出了CD16A/BCMA抗体I对多发性骨髓瘤细胞系的体外细胞毒性。每165K的PBMC中CD56+CD3e-NK细胞的大致数量为约8000个细胞，因此Nk:肿瘤比率为约0.4(类似于估计MM患者NK与肿瘤细胞比率的临床数据;数据未示出)。图32A示出了从健康的人类献血者分离并冷冻以供后续实验的人类PBMC。PBMC在解冻后通过台盼蓝染色为约85％有活力的，随后通过FACS使用7AAD确认。将PBMC(约165K)与BCMA+多发性骨髓瘤肿瘤细胞系(约20K)共培养，并在37℃和5％CO_2下暴露于0.1-3000pM的经3倍系列稀释的测试制品约20小时。每165K的PBMC中$CD56^+$CD3e-NK细胞的大致数量为约8000个细胞，因此Nk:肿瘤比率为

约0.4(类似于估计MM患者NK与肿瘤细胞比率的临床数据;数据未示出)。如图32B至图32E所示,使用抗体染色和FACS来确定MM肿瘤细胞上的BCMA表达并监测多发性骨髓瘤靶细胞的细胞毒性。使用软件程序FlowJo和GraphPad Prism 6分析数据:图32B示出了NCI-H929细胞系,图32C示出了RPMI-8226细胞系,图32D示出了MM.1S细胞系,并且图32E示出了MOLP-2细胞系。非靶向BCMA/CD16a阴性对照以空心符号示出。CD16A/BCMA抗体I以实心符号示出。

[0062] 图33A-33C示出了CD16A/BCMA抗体I对多发性骨髓瘤细胞系的体外细胞毒性。图33A示出了NCI-H929细胞系,图33B示出了RPMI-8226细胞系,并且图33C示出了MM.15细胞系。非靶向BCMA/CD16a阴性对照用未填充的正方形示出。CD16A/BCMA抗体I以实心圆圈示出。达雷木单抗("Dara")以实心方块示出。

[0063] 图34A至图34C示出了CD16A/BCMA抗体I对多发性骨髓瘤细胞系的体外细胞毒性。将NK细胞与BCMA+多发性骨髓瘤肿瘤细胞系以约4-5的E:T共培养。在添加NK细胞和测试制品之前,将供体A-NK和肿瘤细胞与0.5mg/ml低内毒素hIgG一起预孵育至少30分钟。供体B-没有预孵育步骤。图34A示出了供体A的$BCMA^+$靶细胞耗尽。图34B示出了供体B的SK-MM-2耗尽。图34C示出了供体B的MOLP-2耗尽。在图34B和图34C中,非靶向BCMA/CD16a阴性对照以空心符号示出,并且CD16A/BCMA抗体I以经填充的符号示出。

[0064] 图35A至图35D示出了CD16A/BCMA抗体I、CD16A/BCMA抗体II和CD16A/BCMA抗体III针对低BCMA表达Raji肿瘤细胞系的体外细胞毒性。尽管几乎检测不到BCMA表面表达,但是仍观察到了BCMA+靶细胞的体外裂解。使用E:T为5:1的富集的原代人NK细胞的4小时钙黄绿素释放测定执行这种体外细胞毒性测定。图35A示出了Raji细胞系的裂解。图35B示出了Raji细胞系的细胞毒性。图35C示出了通过可商购获得的抗BCMA抗体和同种型检测到的BCMA表达。图35D示出了通过CD16A/BCMA抗体I、CD16A/BCMA抗体II、CD16A/BCMA抗体III、BCMA(Fc沉默的)和同种型检测到的BCMA表达。

[0065] 图36A至图36C示出了CD16A/BCMA抗体I针对低BCMA表达Raji肿瘤细胞系的体外细胞毒性。图36A示出了Raji细胞上的BCMA表达。图36B示出了BCMA在NCI-H929(MM阳性对照)细胞上的表达。对于(A)和(B),使用与APC缀合的商购抗BCMA来对Raji和NCI-H929(MM阳性对照)细胞上的BCMA表达进行定量。(C)Raji细胞和H929细胞的细胞毒性。CD16A/BCMA抗体I以经填充的符号示出,而非靶向BCMA/CD16a阴性对照以空心符号示出。

[0066] 图37A和图37B示出了CD16A/BCMA抗体I针对自体$BCMA^+$正常人类血浆细胞的体外活性。图37A示出了作为阳性对照的同种异体细胞。图37B示出了自体BCMA+正常人浆细胞。CD16A/BCMA抗体I以经填充的符号示出,而非靶向BCMA/CD16a阴性对照以空心符号示出。

[0067] 图38A至图38C示出了在存在$BCMA^+$靶细胞的情况下,CD16A/BCMA抗体I对NK细胞上的CD16的激活。图38A示出了NK-$CD16^+$细胞的数量。图38B示出了$NKCD69^+CD25^+$细胞的数量。图38C示出了靶细胞的数量。

[0068] 图39A和图39B示出在没有$BCMA^+$靶细胞的情况下,CD16A/BCMA抗体I对NK细胞上的CD16的激活。图39A示出了NK-$CD16^+$细胞的数量。图39B示出了$NKCD69^+CD25^+$细胞的数量。

[0069] 图40A至图40E示出了在血清存在下CD16A/BCMA抗体I与NK细胞的结合以及CD16A/BCMA抗体I的细胞毒性。图40A示出了在外源人Ig存在下抗BCMA/CD16a的结合。将新鲜制备的人NK细胞在使用或不使用10mg/mL的SCIG(Hizentra)的情况下于37℃预孵育1小时,然后用指示浓度的经DyLight650标记的抗-AFM26/CD16a染色。图40B示出了在100%自体人类血

清存在下抗BCMA/CD16诱导的靶细胞裂解。使用新鲜制备的人NK细胞作为效应细胞，用指定浓度的CD16A/BCMA抗体I处理多发性骨髓瘤细胞系NCI-H929。在添加CD16A/BCMA抗体I之前，将细胞与来自同一健康供体的经热灭活的自体人血清一起在37℃下预孵育半小时。图40C和图40D示出，在50％自体人血清存在下，抗BCMA/CD16a耗尽了BCMA+靶细胞，而NK细胞没有损失。在图40C和图40D中，以使用CD16A/BCMA抗体I为例。在图40C和图40D中，从健康的人类血液供体分离出人类NK细胞。在测定设置之前，将NK(图40D)和MM.1S细胞(图40C)单独在50％人自体血清中预孵育2小时。将NK细胞与MM.1S肿瘤细胞系以大致为5的E:T比共培养，并且在37C和5％CO_2下暴露于0.1-100nM的经10倍系列稀释的测试制品约20小时。使用用CD138和CD56进行抗体染色之后是FACS来监测MM.1S靶细胞的细胞毒性和NK生存率。使用软件程序FlowJo和GraphPad Prism 6分析数据。非靶向BCMA/CD16a阴性对照Ab-1以空心符号示出。BCMA/CD16a抗体I以经填充的符号示出。图40E示出了第二细胞系R/R MM是用抗BCMA/CD16A抗体治疗的靶标指示。在该示例中，以使用BCMA/CD16A抗体I为例。特别地，该图中的数据表明抗BCMA/CD16A抗体(用于例示目的BCMA/CD16A抗体I)与抗CD38抗体(达雷木单抗)有所区别。达雷木单抗具有对MM的补体依赖性细胞毒性活性(de Weers，M.等人，2011.J.Immun.186(3):1840-1848)和通过经由CD38交联进行的信号传导来诱导凋亡的能力(Overdijk，M.B.等人，2016J.Immun.197(3):807-813)，而BCMA/CD16A抗体I则不具有这些活性。此外，与达雷木单抗不同，如图41A和图41B所示，BCMA/CD16A抗体I的活性不受CD16A多态性的影响，所述CD16A多态性降低了Fc介导的药物的活性。总之，图40E示出BCMA/CD16A抗体I不耗尽NK细胞(其为CD38阳性的)，而达雷木单抗则耗尽NK细胞。

[0070] 图41A和图41B示出了在不存在$BCMA^+$靶细胞的情况下，血清对NK细胞的CD16A表达和活化的影响。此外，血清存在下的低CD16表达提示非CD1A介导的NK细胞活化。图41A示出了使用血清的较低的CD16A检测。图41B示出了使用血清的较高非靶标介导的活化。

[0071] 图42A至图42C示出了IL-15治疗提高了抗CD16A/BCMA抗体在MM细胞上的活性。图42A示出了用a)无抗体；b)阴性对照1；c)阴性对照2；d)BCMA/CD16A抗体I；e)抗BCMA/CD19抗体；以及f)达雷木单抗处理的肿瘤细胞的裂解百分比。图42B示出了用a)无抗体+IL-15；b)阴性对照1+Il-15；c)阴性对照2+Il-15；d)BCMA/CD16A抗体I+Il-15；e)抗BCMA/CD19抗体+IL-15；以及f)达雷木单抗+IL-15处理的肿瘤细胞的裂解百分比。图42C示出了图42A和图42B中所示的阴性对照编号1、阴性对照编号2和BCMA/CD19的结构。

[0072] 图43示出了未用达雷木单抗处理过的患者、达雷木单抗难治的患者的外周血中NK细胞的数量。图43示出了在阿特珠单抗试验基线处外周血中的NK流数据(绝对计数/uL)。NK细胞被门控为CD56/CD16+淋巴细胞：CD45xSSC低群体(标准门控)，然后子门控到CD56/CD16+群体中。在阿特珠单抗中，雷木单抗难治的患者中的NK水平低于未用达雷木单抗处理过的患者中的NK水平并且低于健康供体范围(虚线之间的区域)。

[0073] 图44示出了R/R MM患者骨髓中的NK/肿瘤比率。

[0074] 图45A和图45B示出了使用CD16A/BCMA抗体I在体外杀伤细胞系。CD16A/BCMA抗体I以实心圆示出，达雷木单抗(“Dara”)以实心方块示出，而NTx16a(一种非靶向的抗CD16A双特异性抗体)以空心方块示出。在图45A中，E:T为0.05。在图45B中，E:T为0.5。

[0075] 图46A至图46D示出了新鲜NK细胞对于CD16A/BCMA抗体I和CD16A/BCMA抗体II的细胞毒性的影响。“新鲜制备的NK细胞”表示当天从新鲜分离的PBMC中纯化的NK细胞。“第2天

NK细胞”表示从第一天分离的PBMC纯化并在RPMI培养基中培养过夜的NK细胞。图46A示出了新鲜制备的NK细胞对NCI-H929细胞的细胞毒性。图46B示出了新鲜制备的NK细胞对MM.1S细胞的细胞毒性。图46C示出了第2天的NK细胞对NCI-H929细胞的细胞毒性。图46D示出了第2天的NK细胞对MM.1S细胞的细胞毒性。

[0076] 图47示出了FcRH5、BCMA和CD38在冷冻的原代骨髓瘤骨髓瘤骨髓单核细胞(BMMC)中的表达。评估了来自20个供体和对照(骨髓瘤细胞系MOLP-2)的冷冻原发性骨髓瘤骨髓单核细胞(BMMC)的FcRH5、BCMA(Biolegend 19F2)和CD38细胞表面表达。简而言之,将BMMC解冻,用无菌PBS洗涤,然后重悬至1×10^6个细胞/mL的终浓度。用活力和骨髓瘤标志物(CD45、CD319、CD138、CD38、BCMA、FcRH5)对BMMC进行染色。在固定细胞并洗涤后,在Canto II上读取细胞。通过选择活/单线态/CD45/CD319+细胞(骨髓瘤细胞),在FlowJo中执行对FcRH5、BCMA和CD38的分析。在统计绘图软件Prism中将FcRH5、BCMA和CD38的MESF(Log10)值作图。

[0077] 图48A和图48B示出了正常人浆细胞和原代MM细胞上的BCMA表达。图48A示出了正常人浆细胞上的BCMA表达。图48B示出了冷冻原发性骨髓瘤BMMC中的BCMA表达的示例。对于图48A和图48B两者,根据以上在图47中所述的方案,用BCMA对细胞进行染色和门控,然后将Max%在FlowJo中作图。灰色阴影峰是荧光减一(FMO)对照,并且红色峰是BCMA表达。

[0078] 图49A至图49F示出,通过ROCK接合剂活化NK细胞和诱导IFN-γ释放严格地依赖于靶标细胞的存在。图49A至图49C示出了在存在和不存在BCMA+RPMI-8226靶细胞的情况下,在不断增加浓度的BCMA/CD16A ROCK接合物TandAb_A、scFv-IgAb_D和KiH-scDb-Fc_A下PBMC培养物中CD69+NK细胞的百分比。图49A是针对TandAb_A,图49B是针对scFv-IgAb_D,并且图49C是针对KiH-scDb-Fc_A。将人PBMC在不断增加浓度的抗体存在下(正方形)或不使用抗体的情况下(三角形),使用(经填充的符号)或不使用(空心符号)RPMI-8226靶细胞(E:T比:50:1)进行培养。在22小时孵育后,通过流式细胞术分析CD56+NK细胞上的CD69表面表达。图49D至图49F示出了新鲜分离的人PBMC在存在或不存在BCMA+NCI-H929细胞的情况下以50:1的E:T比使用或不使用10μg/mL的TandAb_A、scFv-IgAb_D或KiH-scDb-Fc_A进行培养。图49D是针对TandAb_A,图49E是针对scFv-IgAb_D,并且图49F是针对KiH-scDb-Fc_A。在孵育24小时之后,将上清液中的IFN-γ浓度定量。*:低于检测下限。

[0079] 图50示出了由BCMA定向T细胞接合物和ROCK接合物诱导的人PBMC培养物中炎性细胞因子释放的比较。将新鲜分离的人PBMC与BCMA+细胞系NCI-H929(E:T比为50:1)一起在存在或不存在不断增加浓度的BCMA/CD3 BiTE或接合NK细胞的ROCK接合物scFv-IgAb_D或KiH-scDb-Fc_A的情况下共培养。在24小时孵育后,定量上清液中细胞因子的浓度。Ctrl.:未添加抗体。

[0080] 图51示出在几种ROCK®抗体形式的存在下,富集的原代人NK细胞对A-431细胞的体外细胞毒性。在以5:1的E:T比进行的4小时钙黄绿素释放细胞毒性测定中,所指示的靶向EGFR的ROCK抗体的代表性S形剂量反应曲线。SABC,特异性抗体结合能力(≥3次测定的平均值)。

[0081] 图52A至图52D示出了在存在或不存在竞争性多克隆、单克隆或Fc增强的IgG的情况下,在体外细胞毒性测定中ROCK®和IgG抗体的比较。在CD30/CD16A TandAb、抗CD30 IgG1(IgAb)或具有Fc介导的效应子功能增强突变的S239D/1332E抗CD30 IgG1(IgAb(Fc增

强的))的连续稀释的存在下,使用钙黄绿素标记的CD30+KARPAS-299靶细胞和作为效应细胞的原代人NK细胞以5:1的E:T比进行的4小时钙黄绿素释放细胞毒性测定。在RPMI 1640培养基或补充有10mg/mL多克隆人IgG、10mg/mL单克隆人抗EGFR IgG1(IgAb)或10mg/mL Fc增强的单克隆人抗EGFR IgG1(IgAb(Fc增强的))的培养基中执行测定。图52A示出了RPMI 1640培养基。图52B示出了补充有10mg/mL多克隆人IgG的培养基。图52C示出了10mg/mL的单克隆人抗EGFR IgG1。图52D示出了10mg/mL的Fc增强的单克隆人抗EGFR IgG1。

[0082] 图53A至图53D示出了CD16A/BCMA抗体I的靶向BCMA的部分和CD16A抗原结合部分的序列。图53A示出了CD16A/BCMA抗体I的靶向BCMA的部分的CDR序列。图53B示出了CD16A/BCMA抗体I的靶向BCMA的部分的重链可变区序列和轻链可变区序列。图53C示出了CD16A/BCMA抗体I的CD16A抗原结合部分的CDR序列。图53D示出了CD16A/BCMA抗体I的CD16A抗原结合部分的重链可变区序列和轻链可变区序列。

具体实施方式

[0083] I.定义

[0084] 术语“多特异性”是指抗原结合分子,其包含与至少两个不同表位,特别是不同抗原的表位结合的抗原结合位点。“多特异性”包括但不限于双特异性、三特异性和四特异性。

[0085] 术语“价”表示在抗原结合蛋白中存在确定数目的抗原结合部分。天然IgG具有两个抗原结合部分并且是二价的。根据本发明的抗原结合蛋白是至少三价的。本文描述了四价、五价和六价抗原结合蛋白的实例。

[0086] 术语“多肽”是指通过酰胺键连续连接的氨基酸残基的聚合物。在某些实施例中,术语“多肽”是指一组通常由多于30个氨基酸组成的分子。多肽可以进一步形成多聚体,诸如二聚体、三聚体和更高级的寡聚物,即由多于一个多肽分子组成。形成这种二聚体、三聚体等的多肽分子可以相同或不同。因此,此类多聚体的对应更高级结构被称为同型二聚体或异源二聚体、同型三聚体或异源三聚体等。异源多聚体的一个示例是抗体分子,该抗体分子以其天然存在的形式由两条相同的多肽轻链和两条相同的多肽重链组成。术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”还指天然修饰的肽/多肽/蛋白质,其中所述修饰受到例如翻译后修饰(如糖基化、乙酰化、磷酸化等)的影响。当在本文中提及时,“肽”、“多肽”或“蛋白质”也可以经化学修饰,例如聚乙二醇化。此类修饰是本领域中众所周知的,并且在下文中进行了描述。

[0087] “Fv多肽”表示其中抗体可变(Fv)结构域一个接一个地连接的融合多肽。除了N末端和/或C末端序列延伸部之外,多肽还可以具有连续的氨基酸残基。例如,多肽可包含标签序列,优选地在C末端处包含标签序列,所述标签序列可用于多肽的纯化以及检测。标签序列的实例是组氨酸标签,例如由六个His残基组成的His标签(SEQ ID NO:58),或C标签,例如EPEA四肽(SEQ ID NO:59)。对于多聚体抗原结合分子,可以将不同的标签序列用于不同的多肽,例如,His标签用于异二聚体分子的第一多肽并且和C标签用于异二聚体分子的第二多肽。在某些实施例中,多肽包含提供抗原结合位点的可变结构域和恒定抗体结构域,例如连接到多肽中的C_L、$C_H1$$C_H$和/或Fc部分(CH2-CH3)。例如,此类实施例包括融合至至少一个恒定抗体结构域(例如Fc部分)的Fv多肽。在进一步的实施例中,多肽可以连接至另一种试剂,例如毒素、免疫调节剂或信号产生剂。

[0088] 术语“Fc部分”是指包含免疫球蛋白H链的C末端部分并保留IgG区的Fc区的至少一

种功能，特别是与FcRn结合的功能的多肽。抗体效应子功能由Fc区中的序列确定。Fc部分可包含CH2结构域、CH3结构域或CH2-CH3多肽链。CH2-CH3多肽链与另一CH2-CH3多肽链装配成两条CH2-CH3多肽彼此组合而成的二聚体，其中所述二聚化是通过在CH2结构域的NC末端的铰链区中的共价键促进的。因此，在一些实施例中，Fc部分包含两条CH2-CH3多肽链的二聚体和铰链区。优选地，Fc部分包含Ig类恒定结构域，例如IgA、IgD、IgE、IgM，优选地IgG1、IgG2、IgG2、IgG4，特别是IgG1恒定结构域。轻链恒定区(CL)可选自卡帕(κ)、拉姆达(λ)和西格玛(σ)，其中人λ类具有λ1-4亚型。

[0089] “铰链”结构域可以是与Fc部分相同或不同的IgG类，或者是经工程改造的、非天然存在的铰链结构域。IgG铰链区的示例具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列。还包括野生型铰链区的变体，诸如缩短的铰链区，例如命名为具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的中间铰链的铰链。

[0090] 术语“抗原结合蛋白”和“抗原结合分子”(带有或不带有连字符)在本文中可互换使用地指具有抗原结合特性的免疫球蛋白衍生物；即结合蛋白是抗原结合分子。结合蛋白包含能够结合靶抗原的免疫学功能免疫球蛋白部分。免疫学功能免疫球蛋白部分可包括免疫球蛋白或其部分、来源于免疫球蛋白部分的融合肽，或组合形成抗原结合位点的免疫球蛋白部分的缀合物。每个抗原结合部分至少包含免疫球蛋白重链或轻链的CDR，抗原结合部分源自所述CDR。术语“抗原结合蛋白”和“抗原结合分子”(带有或不带有连字符)在本文中可互换使用地指保留对其抗原的特异性和亲和力的抗体片段、抗体衍生物或抗体样结合蛋白，包括例如基于具有附加恒定结构域的Fv结构域的IgG样融合多肽。取决于所需的特征，诸如化合价、多特异性、药代动力学和药效学特性，Fv和恒定结构域和/或其他功能结构域以不同的分子形式或蛋白质支架模块化地装配，例如在Brinkmann和Kontermann，mAbs，2017，9(2)：182-192或在Spiess等人，Molecular Immunology 2015；67：95-106中所述。

[0091] 在一些实施例中，抗原结合蛋白由单个多肽链组成。此类抗原结合蛋白是单体。在其他实施例中，抗原结合蛋白包含至少两条多肽链。此类抗原结合蛋白是多聚体，例如二聚体、三聚体或四聚体。

[0092] 优选地，抗原结合蛋白是人的，最优选地是全人的。

[0093] 术语“抗原结合部分”是指抗原结合蛋白的抗体-抗原组合位点或互补位，其具体地与抗原的抗原决定簇(表位)特异性结合。抗原结合位点是抗原结合蛋白的能够识别抗原并与抗原特异性结合的结合部分。

[0094] 如本文所述的“Fv”表示包含抗体的轻(V_L)链和重(V_H)链两者的可变结构域的抗原结合部分，该抗原结合部分识别抗原，即与抗原的表位结合。在某些实施例中，抗原结合位点可以是单个结构域(sdAb)，例如来自骆驼科动物的V_HH片段或来自软骨鱼类的V_{NAR}片段。

[0095] 每个抗原结合部分由与相同表位结合的抗体(即免疫球蛋白、可变重链结构域(V_H)和抗体可变轻链结构域(V_L)形成，而可变重链结构域(V_H)包含三个重链互补决定区(CDR)：HCDR1、HCDR2和HCDR3；并且可变轻链结构域(V_L)包含三个轻链互补决定区(CDR)：LCDR1、LCDR2和LCDR3。抗原结合位点的可变重链和轻链结构域可以例如通过肽接头彼此共价连接，或彼此非共价缔合以形成抗原结合位点。

[0096] “接头”是指构成接头肽的氨基酸序列，该接头肽连接两个并置的可变结构域，从而形成抗原结合部分，其中一个结构域的C末端与另一个并置结构域的N末端相连，反之亦

然。关于氨基酸组成，肽接头序列被选择为不干扰Fv形成的，即V_H/V_L、抗原结合位点和抗原识别位点以及不会干扰多特异性抗原结合蛋白的多肽的多聚化，例如二聚化。例如，包含甘氨酸残基和丝氨酸残基的接头通常提供蛋白酶抗性。在一些实施例中，使用$(G_2S)_x$肽接头，其中例如x＝1-20，例如使用(G_2S)、$(G_2S)_2$、(G2S)$_3$、$(G_2S)_4$、$(G_2S)_5$、$(G_2S)_6$、$(G_2S)_7$或$(G_2S)_8$、或$(G_3S)_x$肽接头，其中例如x＝1-15或使用$(G_4S)_x$肽接头，其中例如x＝1-10，优选地1-6。可以例如通过噬菌体展示方法来优化接头的氨基酸序列，以改善抗原结合位点的形成和多肽的产量。

[0097] “连接物”是指将抗原结合部分与Fab片段、铰链或Fc部分连接的肽。根据定义，连接物不是连接两个可变结构域的肽。

[0098] 接头和连接物的长度可以影响抗原结合部分的Fv多肽的折叠和柔性。Fv多肽的所需柔性取决于靶抗原密度和靶抗原的可及性，即靶抗原上的表位。较长的接头或连接物可以提供具有更多灵活抗原结合位点的较灵活的Fv多肽。接头长度对二聚体抗原结合多肽的形成的影响描述于例如Todorovska等人，Joumal of Immunological Methods2001;248:47-66;Perisic等人，Structure 1994;2:1217-1226;Le Gall等人，Protein Engineering 2004;17:357-366和WO 94/13804中。

[0099] “单链可变抗体片段”或“scFv”包含由任选地通过肽接头与轻链可变结构域(V_L)融合的重链可变结构域(V_H)组成的抗原结合位点。scFv可以从多肽链的N末端至C末端是以下多肽链：V_L-接头-V_H或V_H-接头-V_L(Huston等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，1988，85:5879-83)。V_H与V_L结构域之间的接头使得能够形成允许抗原结合的所需结构。

[0100] “抗原结合(Fab)片段”或“Fab”包含一个恒定结构域(CH1、CL)和一个通过重(H)链来源的序列和轻(L)链来源的序列的各自二聚化形成的可变结构域(V_H、V_L)，其中所述可变结构域V_H和V_L构成抗原结合位点。两个Fab′片段作为$F(ab')_2$片段通过铰链区在N末端与Fc部分连接。

[0101] “双体抗体”(Db)表示由两对可变重(V_H)链结构域和可变轻链(V_L)链结构域组成的二价Fv分子，所述第一对和第二对与两V_L/V_H抗原结合位点缔合。每对可变结构域在多肽中一个接一个地连接。在某些实施例中，二价Fv分子由第一对和第二对两个并置的可变结构域组成，其中在任一对中，所述两个可变结构域通过短肽接头融合，所述短肽接头排除了通过短接头连接的可变结构域之间的分子内结合。迫使第一对可变结构域与第二对可变结构域交叉缔合以形成两个Fv抗原结合位点。因此，两个抗原结合部分中的任一个由第一对可变结构域中的一个可变结构域和第二对可变结构域中的一个可变结构域形成。因此，此类双体抗体包含至少一个由两个不通过短接头直接连接的可变结构域构成的抗原结合位点。在双体抗体中，第一抗原结合部分的可变结构域通过接头与第二抗原结合部分的可变结构域连接。例如，第一抗原结合部分的V_H通过第一接头与第一多肽中的第二抗原结合部分的V_L连接，并且第一抗原结合部分的V_L通过第二接头与第二多肽中的第二抗原结合部分的V_H连接。在每对并置的可变结构域中，短的第一或第二接头将一个可变结构域的C末端与另一个可变结构域的N末端相连，或反之亦然。在每对中，可变结构域可以从N末端到C末端定向为V_L-V_H、V_H-V_L、V_H-V_H和V_L-V_L，其中该对的两个可变结构域可以具有不同的抗原表位特异性或相同的抗原表位特异性。在某些情况下，两个可变结构域通过该对的一个可变结构域的C末端与该对的另一个可变结构域的N末端之间的肽键直接连接。在双体抗体的第一对和第二

对可变结构域的任一对中连接两个可变结构域的短肽接头的长度使得通过该接头连接的可变结构域之间的分子内缔合被排除。此类接头是“短的”，即由0个、1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个或约12个氨基酸残基组成。在0个氨基酸残基的情况下，接头是肽键。此类短接头有利于两对可变结构域之间的正确二聚化和两个Fv抗原结合位点的形成。将接头缩短至约12个或更少的氨基酸残基通常防止同一条多肽链上的相邻结构域彼此相互作用。在本发明的实施例中，这些接头由约3个至约12个，例如5个至10个，特别是7个至9个连续的氨基酸残基组成。可以将接头长度调节至双体抗体的多肽内的特定结构域取向。此外，原则上可以是两个在该对的可变抗体结构域之间具有超过12个氨基酸残基的接头的多肽彼此正确地二聚化(参见例如Le Gall等人，Protein Engineering 2004;17:357-366)。

[0102] “单链双体抗体(scDb)”表示通过添加融合第一多肽和第二多肽的另外的接头而转化为单一多肽链的双体抗体衍生物(Kontermann等人，Immunol.Methods，1999;226:179-188)。因此，该另外的接头将包含通过第一接头连接的第一抗原结合部分和第二抗原结合部分的可变结构域的第一多肽的C末端与包含通过第二接头连接的第一抗原结合部分和第二抗原结合部分的同源可变结构域的第二多肽的N末端连接。因此，scDb由单一多肽链(即Fv多肽)组成，其中两个抗原结合部分的四个可变结构域从N末端至C末端排列如下：

[0103] -Vl-接头1-VH-接头3-VL-接头2-VH，或者

[0104] -VL-接头1-VL-接头3-VH-接头2-VH，或者

[0105] -VH-接头1-VL-接头3-VH-接头2-VL，或者

[0106] -VH-接头1-VH-接头3-VL-接头2-VL

[0107] 接头1和接头2是双体抗体中使用的“短”接头，例如由少于13个，例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个或12个氨基酸残基组成。

[0108] 接头3是如用于即scFv的更柔性的接头，其促进两个N末端可变结构域与两个C末端可变结构域的分子内向后折叠和与两个抗原结合部分的缔合。接头3由13个或更多个氨基酸残基组成，例如由13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个氨基酸残基组成。在一些实施例中，接头3为15个至25个，优选地15个至20个或13个至18个氨基酸。

[0109] 术语“双链双体抗体”是指通过以下方式构建的抗原结合分子：在单个基因构建体中连接至少四个可变结构域(两个重链可变结构域(VH)和两个轻链可变结构域(VL))，从而使得能够将经翻译的多肽链中的两个多肽链同源二聚化。在此类串联双体抗体中，接头长度使得其防止可变结构域的分子内配对，以便分子不能自身向后折叠而形成单体单链分子，而是被迫与另一条链的互补结构域配对。可变结构域还被布置为使得在该二聚化期间对应可变结构域配对(Weichel等人，European Pharmaceutical Review 2015;20(1):27-32;Reusch等人，mAbs2014;6:3,728-739)。

[0110] “双重亲和力重靶向分子(DART)”是指一种蛋白质支架，其中第一抗原结合部分的VH与第二多肽上的第二抗原结合部分的VL连接，并且第二抗原结合部分的VH以排列VL(A)-VH(B)+VL(B)-VH(A)连接至第一多肽上的VL，其中引入了链间二硫键以稳定化分子。

[0111] 术语“靶标”或“靶标抗原”是指由某种类型的细胞(即靶细胞，或病毒感染的细胞，NK细胞应针对所述病毒感染的细胞来诱导或触发NK细胞的细胞毒性)表达或与之相关的抗

原。靶抗原的实例可以是肿瘤抗原或肿瘤相关的抗原(TAA)。肿瘤抗原或TAA可以在靶细胞的表面上表达或由MHC复合物展示为MHC限制肽。肿瘤抗原的实例包括但不限于CD5、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD123、CD138、CCR4、CS-1、GD2、基质金属蛋白酶1(MMP1)、层粘连蛋白受体前体蛋白、BCMA、EGFR、EGFRvIII、Ep-CAM、gpA33、AMHRII、PDGFRα、SLAMF7、PLAP、Thomsen-Friedenreich(TF)抗原、MUC-1(粘蛋白)、IGFR、IL4-Rα、IL13-R、HER2/neu、HER3、PSMA、CEA、TAG-72、HPV E6、HPV E7、BING-4、细胞周期蛋白-B_1、9D7、EphA2、EphA3、端粒酶、间皮素、SAP-1、存活蛋白,睾丸癌抗原(BAGE家族、CAGE家族、GAGE家族、MAGE家族、SAGE家族、XAGE家族)、NY-ESO-1/LAGE-1、PRAME、SSX-2、Melan-A/MART-1、Gp100/pme117、酪氨酸酶、TRP-1/-2、MC1R、β-连环蛋白、BRCA1/2、CDK4、CML66、MART-2、p53、Ras、TGF-βRII和TCR(来自Categories of Tumor Antigens,Holland-Frei Cancer Medicine.第6版,Kufe DW,Pollock RE,Weichselbaum RR.等人,编辑者Hamilton(ON):Becker;2003)。“靶标”和“靶抗原”还包括血清白蛋白,特别是人血清白蛋白(HSA)。在某些实施例中,靶抗原是BCMA。

[0112] 在其他实施例中,靶抗原可以是例如来自登革热病毒、单纯性疱疹、巨细胞病毒、肝炎病毒、人T细胞淋巴病毒、流感病毒、RSV、乳头瘤病毒(包括除上述E6和E7之外的抗原)流感病毒或HIV的感染原,诸如病毒或细菌病原体。还包括由MHC复合体展示为MHC限制肽的肽靶标。

[0113] “CD16A”是指在NK细胞的细胞表面上表达的活化受体CD16A,也称为FcγRIIIA。CD16A是一种触发NK细胞的细胞毒活性的活化受体。抗体对CD16A的亲和力与它们触发NK细胞活化的能力直接相关,因此对CD16A的较高亲和力降低了活化所需的抗体剂量。抗原结合蛋白的抗原结合位点与CD16A结合,但不与CD16B结合。例如,包含与CD16A结合但不与CD16B结合的重(VH)链和轻(VL)链可变结构域的抗原结合位点可以由与CD16A的表位特异性结合的抗原结合位点提供,所述表位包含C末端序列的氨基酸残基SFFPPGYQ(SEQ ID NO:57)和/或CD16A的残基G130和/或Y141(SEQ ID NO:48)),这些残基是CD16B中不存在的。

[0114] “骨髓瘤细胞”是通过赘生性转化从骨髓中的浆细胞产生的恶性(癌)浆细胞。在骨髓瘤中,恶性浆细胞产生大量异常抗体,所述异常抗体缺乏抵抗感染的能力。这些异常抗体是所谓的单克隆蛋白或M蛋白,其可用作骨髓瘤的肿瘤标志物。骨髓瘤细胞具有表型CD19-/$CD38^+$/$CD138^+$/$BCMA^+$。因此,CD38、CD138和BCMA代表在骨髓瘤细胞上表达的抗原。还包括B细胞谱系中对CD19/CD20/CD22/BCMA和其他抗原呈阳性的恶性表型(这应该包括传统上不理解为浆细胞,但可能是记忆B细胞或前浆细胞谱系的表型)。

[0115] “EGFR”是指人中的表皮生长因子受体(EGFR;ErbB-1;HER1),包括被描述为具有活化、突变并且参与病理生理过程的所有同种型或变体。EGFR抗原结合位点识别EGFR细胞外结构域中的表位。在某些实施例中,抗原结合位点特异性结合人和食蟹猴EGFR。

[0116] 表皮生长因子受体(EGFR)是受体酪氨酸激酶HER家族的成员,并且由以下四个成员组成:EGFR(ErbB1/HER1)、HER2/neu(ErbB2)、HER3(ErbB3)和HER4(ErbB4)。通过配体结合(例如,EGF、TGFa、HB-EGF、神经调节蛋白、乙胞素、双调蛋白)刺激受体,通过酪氨酸磷酸化激活了细胞内结构域中的内在受体酪氨酸激酶,并且促进了与HER家族成员的同型或异源二聚化。这些细胞内磷酸酪氨酸充当各种衔接蛋白或酶(包括MAPK和PI(3)K/Akt)的停靠位点,所述停靠位点同时启动许多影响细胞增殖、血管生成、凋亡抗性、侵袭和转移的信号级联。

[0117] “EGFRvIII”是指由于跨越EGFR编码序列的外显子2-7的碱基对的框内缺失而导致的EGFR的细胞外结构域突变体(Gan HK等人,FEBS 2013,280:5350-5370)。

[0118] 术语“结合结构域”结合本发明表征为这样的结构域,所述结构域(特异性地)分别与靶分子(抗原)(例如CD16)和靶细胞表面抗原上的给定靶表位或给定靶标侧结合/相互作用/识别其。第一结合结构域的结构和功能(识别例如CD16),并且优选地第二结合结构域的结构和/或功能(识别靶细胞表面抗原),是基于抗体的结构和/或功能,例如全长或完整的免疫球蛋白分子的结构和/或功能和/或从抗体或其片段的可变重链(V_H)和/或可变轻链(V_L)结构域得到的结构和/或功能。优选地,第一结合结构域的特征在于存在三个轻链CDR(即,V_L区的CDR1、CDR2和CDR3)和/或三个重链CDR(即,V_H区的CDR1、CDR2和CDR3)。第二结合结构域优选地还包含允许靶结合的抗体的最低结构要求。更优选地,第二结合结构域包含至少三个轻链CDR(即,V_L区的CDR1、CDR2和CDR3)和/或三个重链CDR(即,V_H区的CDR1、CDR2和CDR3)。设想第一和/或第二结合结构域是通过噬菌体展示或文库筛选方法产生或可获得的,而不是通过将来自先前存在的(单克隆)抗体的CDR序列接枝到支架中而产生或可获得的。

[0119] 根据本发明,术语“(特异性地)结合至”、“(特异性地)识别”、“(特异性地)针对”或“(特异性地)与...反应”根据本发明意味着结合结构域分别与靶分子(抗原)(例如CD16a)和靶细胞表面抗原(例如BCMA)上的给定表位或给定靶侧相互作用或特异性地相互作用。

[0120] 术语“基本上/实质上不结合”或“不能够结合”是指本发明的结合结构域不结合除CD16a以外的蛋白质或抗原以及靶细胞表面抗原,即不显示大于约30%,优选地不大于约20%,更优选地不大于约10%,特别优选地不大于约9%、约8%、约7%、约6%或约5%的与除了CD16a以外的蛋白质或抗原以及靶细胞表面抗原的反应性,从而分别与CD16a和靶细胞表面抗原的结合被设定为约100%。

[0121] 据信特异性结合受结合结构域和抗原的氨基酸序列中特定基序的影响。因此,结合是作为其一级、二级和/或三级结构以及所述结构的二级修饰的结果而实现的。抗原相互作用侧与其特异性抗原的特异性相互作用可导致所述侧与抗原的简单结合。此外,抗原相互作用侧与其特异性抗原的特异性相互作用可替代地或另外地导致信号的起始,例如由于诱导抗原、抗原的寡聚等的构象改变。

[0122] 术语“可变”是指抗体或免疫球蛋白结构域的在其序列中表现出可变性并且参与确定特定抗体的特异性和结合亲和力的部分(即“可变结构域”)。可变重链(V_H)和可变轻链(V_L)的配对一起形成了单个抗原结合侧。

[0123] 变异性在抗体的可变结构域中不均地分布;其集中在重链和轻链可变区中的每个的子结构域中。这些子结构域被称为“高变区”或“互补决定区”(CDR)。可变结构域的更保守的(即,非高变的)部分被称为“构架”区域(FRM或FR),并为三维空间中的六个CDR提供了支架以形成抗原结合表面。天然存在的重链和轻链的可变结构域各自包含四个FRM区(FR1、FR2、FR3和FR4),该四个FRM区主要采用β片层构型,由三个高变区连接,这形成了连接的环,并且在一些情况下形成了β片层结构的一部分。每条链中的高变区通过FRM紧密结合在一起,并且与来自另一条链的高变区一起有助于抗原结合侧的形成(参见Kabat等人,在上述引文中)。

[0124] 术语“CDR”及其复数“CDRs”是指CDR的三个互补决定区组成了轻链可变区的结合

特征(CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3),并且CDR的三个互补决定区组成了重链可变区的结合特征(CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)。CDR包含负责抗体与抗原的特异性相互作用的残基中的大多数残基,因此有助于抗体分子的功能活性:它们是抗原特异性的主要决定因素。

[0125] 确切定义的CDR边界和长度受制于不同的分类和编号系统。因此,可以通过Kabat、Chothia、contact或任何其他边界定义(包括本文所述的编号系统)来引用CDR。尽管边界不同,但这些系统中的每个系统在构成可变序列内的所谓"高变区"方面都有一定程度的重叠。因此,根据这些系统的CDR定义可在关于相邻架构区的长度和边界区域方面不同。参见例如Kabat(一种基于种间序列变异性的方法)、Chothia(一种基于对抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法)、MacCallum、Honegger和IMGT(Wu和Kabat,J.Exp.Med.1970;132:211-250;Chothia等人,J.Mol.Biol,1987,196:901-917;MacCallum等人,J.Mol.Biol,1996,262:732;Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.2003;27:55-77;Honegger等人,J.Mol.Bol.(2001);309:657-670)。表征抗原结合侧的另一个标准是Oxford Molecular公司的AbM抗体建模软件所使用的AbM定义。参见例如Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains.在:Antibody Engineering Lab Manual(编辑Duebel,S.和Kontermann,R.,Springer-Verlag,Heidelberg)。在两种残基鉴定技术限定重叠但不相同的区域的程度而言,可以将它们组合以限定杂合CDR。然而,根据所谓的Kabat系统的编号是优选的。在某些实施例中,根据Kabat编号系统鉴定本文公开的CDR。在某些实施例中,根据IMGT方法鉴定本文公开的CDR。在某些实施例中,根据Honegger方法鉴定本文公开的CDR。

[0126] 轻链的CDR3,以及特别是重链的CDR3,可能构成轻链和重链可变区内抗原结合的最重要决定因素。在一些抗体构建体中,重链CDR3似乎构成了抗原与抗体之间的主要接触区域。其中仅改变CDR3的体外选择方案可用于改变抗体的结合特性或确定哪些残基有助于抗原的结合。因此,CDR3通常是抗体结合侧内的分子多样性的最大来源。H3例如可以短至两个氨基酸残基或大于26个氨基酸。

[0127] 在经典的全长抗体或免疫球蛋白中,每条轻(L)链通过一个共价二硫键与重(H)链相连,而两条H链则通过一个或多个二硫键彼此相连,具体取决于H链同种型。最接近VH的CH结构域通常称为CH1。恒定("C")结构域不直接参与抗原结合,但是表现出各种效应子功能,诸如抗体依赖性、细胞介导的细胞毒性和补体活化。抗体的Fc区包含在重链恒定结构域内,并且例如能够与位于细胞表面的Fc受体相互作用。

[0128] 还考虑了本文所述的抗体结合分子的氨基酸序列修饰。例如,可能期望改善抗体构建体的结合亲和力和/或其他生物特性。抗体构建体的氨基酸序列变体是通过将适当的核苷酸变化引入抗体构建体核酸或通过肽合成而制备的。所有下文所述的氨基酸序列修饰均应产生这样的抗体构建体,所述抗体构建体仍保留未修饰的亲本分子的所需生物学活性(与CD16a和靶细胞表面抗原结合)。

[0129] 氨基酸修饰包括例如抗体结合分子的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以达到最终分子,前提条件是最终分子具有所需的特征。氨基酸变化还可以改变抗体结合分子的翻译后过程,诸如改变糖基化位点的数量或位置。

[0130] 例如,可以在每个CDR中插入、取代或缺失1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸(当然,取决于它们的长度),同时可以在每个FR中插入、取代或缺失1个、2个、3个、4个、5个、6

个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或25个氨基酸。优选地，到抗体构建体中的氨基酸序列插入包括氨基和/或羧基末端融合体，其长度范围为从1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个残基至含有一百个或更多个残基的多肽，以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。也可以在本发明的上下文中定义的抗体构建体的第三结构域内进行对应的修饰。在本发明的上下文中定义的抗体构建体的插入变体包括与酶的抗体结合分子的N末端或C末端的融合或与多肽的融合。

[0131] 取代诱变最感兴趣的位点包括(但不限于)重链和/或轻链的CDR，特别是高变区，但是也考虑了重链和/或轻链中的FR改变。取代优选为如本文所述的保守取代。优选地，可以在CDR中取代1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸，而可以在构架区(FR)中取代1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或25个氨基酸，具体取决于CDR或FR的长度。例如，如果CDR序列包含6个氨基酸，则设想这些氨基酸中的一个、两个或三个被取代。类似地，如果CDR序列包含15个氨基酸，则设想这些氨基酸中的一个、两个、三个、四个、五个或六个被取代。

[0132] 通常，如果在重链和/或轻链的一个或多个或所有CDR中的氨基酸被取代，则优选的是随后获得的“经取代”序列与“原始”CDR序列至少约60％或约65％，更优选地约70％或约75％，甚至更优选地约80％或约85％，并且特别优选地约90％或约95％一致。这意味着它取决于CDR的长度在多大程度上与“经取代的”序列相同。例如，具有5个氨基酸的CDR优选地与其经取代的序列约80％一致，以便有至少一个氨基酸被取代。因此，抗体构建体的CDR可与其经取代的序列具有不同程度的一致性，例如，CDRL1可具有约80％的一致性，而CDRL3可具有约90％的一致性。

[0133] 优选的取代(或替代)是保守取代。然而，设想任何取代(包括非保守取代或来自下表A中列出的“示例性取代”中的一者或多者)，只要抗体构建体保持其经由第一结构域与CD16a结合并经由第二结构域与靶细胞表面抗原结合的能力和/或其CDR与随后经取代的序列具有一致性(与“原始”CDR序列至少约60％或约65％，更优选地约70％或约75％，甚至更优选地约80％或约85％，特别优选地约90％或约95％一致)即可。

[0134] 保守取代显示在表A的“优选取代”标题下。如果此类取代导致生物活性的改变，则可以引入在表A中命名为“示例性取代”或者如以下参考氨基酸类别进一步描述的更实质性的改变，并针对所需特征筛选产物。

[0135] 表A:氨基酸取代

[0136]

原始	示例性取代	优选的取代
Ala(A)	val、leu、ile	val
Arg(R)	lys、gln、asn	lys
Asn(N)	gln、his、asp、lys、arg	gln
Asp(D)	glu、asn	glu
Cys(C)	ser、ala	ser
Gln(Q)	asn、glu	asn
Glu(E)	asp、gln	asp
Gly(G)	ala	ala
His(H)	asn、gln、lys、arg	arg

lle(I)	leu、val、met、ala、phe	leu
Leu(L)	norleucine、ile、val、met、ala	lie
Lys(K)	arg、gln、asn	arg
Met(M)	leu、phe、ile	leu
Phe(F)	leu、val、ile、ala、tyr	tyr
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr、phe	tyr
Tyr(Y)	trp、phe、thr、ser	phe
Val(V)	ile、leu、met、phe、ala	leu

[0137] 本发明的抗体构建体的生物学特性的实质性修饰是通过以下方式完成的:选择对维持(a)该取代区中的多肽骨架的结构,例如作为片状或螺旋构象,(b)分子在靶位点的电荷或疏水性,或(c)侧链的体积的影响显著不同的取代。天然存在的残基基于常见的侧链特性分为以下几类:(1)疏水性:正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile;(2)中性亲水性:cys、ser、thr、asn、gin;(3)酸性:asp、glu;(4)碱型:his、lys、arg;(5)影响链取向的残基:gly、pro;以及(6)芳香族的:trp、tyr、phe。

[0138] 非保守性置换将需要用这些类别中的一个的成员交换另一类别。通常可以用丝氨酸取代不参与维持抗体构建体的适当构型的任何半胱氨酸残基,以改善分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反地,可将一个或多个半胱氨酸键添加至抗体以改善其稳定性(特别是当抗体是抗体片段诸如Fv片段时)。

[0139] 对于氨基酸序列,通过使用本领域已知的标准技术来确定序列一致性和/或相似性,所述标准技术包括但不限于史密斯和沃特曼局部序列一致性算法(the local sequence identity algorithm of Smith and Waterman),1981,Adv.Appl.Math.2:482;尼德曼和温斯奇序列一致性比对算法(the sequence identity alignment algorithm of Needleman and Wunsch),1970,J.Mol.Biol.48:443;皮尔逊和李普曼相似性搜索方法(the search for similarity method of Pearson and Lipman),1988,Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.85:2444;这些算法的计算机化实现(威斯康星州遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group,575Science Drive,Madison,Wis.);由Devereux等人,1984,Nucl.Acid Res.12:387-395描述的最佳拟合序列程序;优选地使用默认设置,或通过检查。优选地,由FastDB基于以下参数计算一致性百分比:错配罚分1;空位罚分1;空位大小罚分0.33;以及接合罚分30,“Current Methods in Sequence Comparison and Analysis,”Macromolecule Sequencing and Synthesis,Selected Methods and Applications,第127-149页(1988),Alan R.Liss,Inc。

[0140] 有用算法的一个示例是PILEUP。PILEUP使用渐进的成对比对,从一组相关序列中创建多序列比对。它还可以作图为显示用于创建对比的聚类关系的树。PILEUP使用Feng&Doolittle,1987,J.Mol.Evol.35:351-360的渐进比对方法的简化;该方法类似于由Higgins和Sharp,1989,CABIOS 5:151-153所描述的方法。有用的PILEUP参数包括默认空位

权重3.00、默认空位长度权重0.10和经加权的末端空位。

[0141] 有用算法的另一个示例是在以下文献中描述的BLAST算法:Altschul等人,1990,J.Mol.Biol.215:403-410;Altschul等人,1997,Nucleic Acids Res.25:3389-3402;And和Karin等人,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:5873-5787。一种特别有用的BLAST程序是WU-BLAST-2程序,其是从Altschul等人,1996,Methods in Enzymology266:460-480获得的。WU-BLAST-2使用几个搜索参数,所述搜索参数中的大多数被设置为默认值。可调参数设置为以下值:重叠跨度=1,重叠分数=0.125,字阈值(T)=11。HSP S和HSP S2参数是动态值,并且由程序本身根据特定序列的组成和要搜索感兴趣的序列的特定数据库的组成来建立;然而,可以调整所述值以增加灵敏度。

[0142] 另外的有用算法是如由Altschul等人,1993,Nucl.Acids Res.25:3389-3402所报道的空位BLAST。空位BLAST使用BLOSUM-62取代得分;设置为9的阈值T参数;用于触发空位扩展的两次命中方法、为k的空位长度变化、为10+k的成本;设置为16的Xu以及设置为40(用于数据库搜索阶段)和67(用于算法的输出阶段)的Xg。空位比对由对应于约22比特的评分触发。

[0143] 通常,各个变异CDR或V_H/V_L序列之间的氨基酸同源性、相似性或一致性是与本文所述的序列至少60%一致,并且更通常的是优选地增加至少约65%或约70%,更优选地至少约75%或约80%,甚至更优选至少约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%和几乎约100%的同源性或一致性。以类似的方式,相对于本文鉴定的结合蛋白的核酸序列的"核酸序列一致性百分比(%)"被定义为候选序列中与抗体构建体的编码序列中的核苷酸残基相同的核苷酸残基的百分比。一种特定的方法利用设置为默认参数的WU-BLAST-2的BLASTN模块,其中重叠跨度和重叠分数分别设置为1和0.125。

[0144] 通常,编码单个变异CDR或V_H/V_L序列的核苷酸序列与本文所述核苷酸序列之间的核酸序列同源性、相似性或一致性为至少约60%,并且更通常的是优选地增加至少约65%、约70%、约75%,约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、或约99%、以及几乎100%的同源性或一致性。因此,"变异CDR"或"变异V_H/V_L区"是指这样的区域,所述区域与在本发明的上下文中限定的亲本CDR/VH/VL具有指定的同源性、相似性或一致性,并且共享亲本CDR或V_H/V_L的生物学功能,包括但不限于亲本CDR或V_H/V_L的特异性和/或活性的至少约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%。

[0145] 在一个实施例中,与根据本发明的抗体构建体的人种系的一致性百分比为≥约70%或≥约75%,更优选地≥约80%或≥约85%,甚至更优选地≥约90%,并且最优选地≥约91%、≥约92%、≥约93%、≥约94%、≥约95%或甚至≥约96%。人们认为与人抗体种系基因产物的一致性是用于降低治疗性蛋白质在治疗期间引起针对患者药物的免疫应答的风险的重要特征。Hwang和Foote("Immunogenicity of engineered antibodies";Methods 36(2005)3-10)证明,减少药物抗体构建体的非人类部分导致治疗期间诱导患者中的抗药物抗体的风险降低。通过比较穷尽数量的经临床评估的抗体药物和相应的免疫原性数据,

趋势显示，抗体V区域的人源化使与携带未改变的非人V区域的抗体(平均为患者的约23.59%)相比，蛋白质的免疫原性更低(平均为患者的约5.1%)。因此对于抗体构建体形式的基于V区域的蛋白质治疗剂，期望与人序列更高的一致性。出于该确定种系一致性的目的，可以使用Vector NTI软件和通过将相同的氨基酸残基除以V_L的氨基酸残基总数计算出的百分比形式的氨基酸序列将V_L的V区域与人种系V区域和J区段的氨基酸序列(http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/)进行比对。对于VH区段(http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/)而言可为相同的，区别在于V_H CDR3可能由于其高多样性和缺乏现有的人种系V_H CDR3比对配偶体而被排除。然后可以使用重组技术来增加与人抗体种系基因的序列一致性。

[0146] 本文的术语“抗体”以最广泛的含义使用，并且包括各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)和抗体片段，只要它们表现出所需的抗原结合活性即可。

[0147] 如本文所用，术语“约”或“大致”是指在如本领域普通技术人员所确定的特定值的可接受误差范围内，所述可接受误差范围将部分地取决于如何测量或确定该值，即测量系统的局限性。例如，按照本领域中的实践，“约”可以意谓3个或多于3个标准偏差。另选地，“约”可以表示给定值的至多20%，优选地至多10%，更优选地至多5%，并且更优选地至多1%的范围。另选地，特别是关于生物系统或过程，该术语可以意指在某一值的某一数量级内，优选地在5倍以内，更优选地在2倍以内。

[0148] 如本文所用，除非上下文另有明确指示，否则单数形式“一(a/an)”和“该”包括复数个引用物。因此，例如，对“一试剂”的提及包括此类不同试剂中的一种或多种，并且对“该方法”的提及包括对本领域普通技术人员已知的可以对本文所述的方法进行修饰或替代的等同步骤和方法的引用。

[0149] 除非另有说明，否则应将一系列要素之前的术语“至少”理解为是指该系列中的每个要素。仅使用常规实验，本领域技术人员就将认识到或能够确定本文所述的本发明的特定实施例的许多等同实施例。此类等同物旨在被本发明涵盖。

[0150] 本文无论什么地方所使用的术语“和/或”都包括“和”、“或”和“由所述术语连接的要素的全部或任何其他组合”。

[0151] 术语“小于”或“大于”包括具体数字。例如，小于20意谓小于或等于20。类似地，多于或大于分别意味着多于或等于或大于或等于。

[0152] 在整个说明书和随后的权利要求中，除非上下文另有要求，否则词语“包括”以及诸如“包含”和“含有”的变体应被理解为暗示包括所陈述的整数或步骤或整数或步骤组，但不排除任何其他整数或步骤或整数或步骤组。当在本文中使用时，术语“包含”可以用术语“含有”或“包括”代替，或者有时当在本文中使用时用术语“具有”代替。

[0153] 当在本文中使用时，“由.....组成”排除了未在权利要求要素中指定的任何要素、步骤或成分。当在本文中使用时，“基本上由.....组成”不排除不会实质上影响权利要求的基本和新颖特征的材料或步骤。

[0154] 在本文的每种情况下，术语“包括”、“基本上由.....组成”和“由.....组成”中的每个都可以用其他两个术语中的任一个代替。

[0155] II.CD16A抗原结合蛋白

[0156] 在第一方面中，本发明提供了用于基于自然杀伤(NK)细胞的靶向途径的CD16A抗

原结合蛋白,即:

[0157] 一种多特异性抗原结合蛋白,其包含

[0158] -至少第一靶抗原结合部分;

[0159] -至少两个CD16A抗原结合部分;以及

[0160] -至少一个抗体恒定结构域。

[0161] 在一些实施例中,恒定结构域是Fab片段或Fc部分的一部分。

[0162] 在一些实施例中,CD16A抗原结合部分与恒定结构域融合,其中所述恒定结构域可以是Fab片段的一部分(CH1或CL)或Fc部分。

[0163] 因此,在另一个实施例中,多特异性抗原结合蛋白包含:

[0164] -至少第一靶抗原结合部分;

[0165] -与例如Fab片段或Fc部分的恒定结构域融合的至少两个CD16A抗原结合部分。

[0166] 该抗原结合蛋白与NK细胞接合以将NK细胞介导的细胞毒性重定向至靶标,例如肿瘤抗原阳性细胞、病毒感染的细胞或病原体。

[0167] 由于由两个CD16A结合部分进行的二价结合,与单克隆抗体或抗体片段片段相比,通过CD16A的NK细胞结合强度的亲合力被增强,并且NK细胞效应子功能(例如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC))可得以增强。

[0168] NK细胞通过其CD16A受体由多特异性抗原结合蛋白接合,从而重定向至靶标,例如表达肿瘤相关抗原(TAA)的靶标细胞。因此,此类多特异性抗原结合蛋白能够选择性地重定向NK细胞并介导对肿瘤细胞、病毒感染的细胞或病原体的裂解。相比之下,IgG同种型的全长抗体通过其Fc区与活化和抑制性Fcγ受体结合,所述活化和抑制性Fcγ受体包括CD16A、CD16B(FcγRIIIB)、CD32A(FcγRIIA)、CD32B(FcγRIIB)和CD64(FcγRI)。然而,对CD16A具有特异性的抗原结合蛋白选择性地靶向活化亚型CD16A,所述活化亚型CD16A是在NK细胞和巨噬细胞上,而不是在嗜中性粒细胞上发现的。此外,NK细胞接合抗原结合蛋白与CD16A二价地相互作用,从而导致了与常规抗体相比约1,000倍高的亲和力。

[0169] CD16A是一种触发NK细胞的细胞毒活性的活化受体。抗体对CD16A的亲和力与其触发NK细胞活化的能力直接相关。提供与CD16A二价结合,即具有两个抗原结合部分的抗原结合蛋白,从而由于对CD16A的较高亲合力而增加了亲和力。

[0170] 此外,通过将抗原结合部分与Fc部分或能够进行FcRn结合的基于IgG的抗体融合,可以与基于scFv的抗原结合支架相比延长血清半衰期,这使得体内治疗性应用更方便。因此,可以修饰此类Fc部分以增加或减少与FcRn的结合,这进一步调节了血清半衰期和/或结合的IgG跨细胞的转运。后者也被描述为转胞吞作用(Dickinson等人,1999)。

[0171] 此外,可以通过抗原结合蛋白与人血清白蛋白(HSA)或HSA结合部分的融合来延长血清半衰期。例如,Fab片段的血清半衰期可以通过Fab片段的Fv区域中的HSA结合部分来延长,而CD16A结合部分和靶抗原结合部分被融合至Fab片段的C末端。或者,可以将HSA结合部分融合至Fab片段的C末端,并且Fab片段的Fv区可以提供靶抗原结合部分或CD16A结合部分。

[0172] 抗原结合部分可以以许多方式与Fab片段或Fc部分融合,并且本文所述的抗原结合蛋白的模块结构使得许多支架可用,这可以根据期望的应用容易地设计和选择。

[0173] 优选地,V_H和V_L可变区通过肽接头连接,这使得可变区能够以所需的构象缔合以进

行抗原结合。包含额外可变结构域区域的多肽通过连接物与Fab片段的恒定结构域或与Fc部分融合。

[0174] 抗原结合部分通过包含一个或多个Fv多肽的抗原结合分子形式提供，所述Fv多肽为例如单链Fv(scFv)、由连接在单个多肽中的两个scFv组成的串联单链Fv($(scFv)_2$)、双体抗体(Db)、单链双体抗体(scDb)、串联双体抗体(TandAb®)、Fab、$F(ab')_2$或双亲和力重靶向抗体($DART^{TM}$)。对于CD16A抗原结合蛋白特别优选的是scFv、Db或scDb。尽管每个scFv提供单个抗原结合部分，但是二价Db、scDb和$(scFv)_2$向抗原结合蛋白提供了两个抗原结合部分。优选地，二价Db、scDb或$(scFv)_2$或两个scFv是单特异性的，并且提供具有相同抗原(即CD16A或靶抗原)特异性的两个抗原结合部分。

[0175] 每个抗原结合部分通过“连接物”或肽键与Fab的恒定结构域或与Fc部分连接。优选地，连接物是肽。特别地，连接物是由1至30个氨基酸残基(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14.15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个氨基酸残基)的连续链组成的肽。更特别地，连接物由3至30、6至20、6至18或6至15个氨基酸残基组成。在一些实施例中，连接物由G和S个氨基酸残基组成，例如，连接物是$(G_2S)_x$肽，其中x＝1-10，或$(G_4S)_y$，其中y＝1-6，例如，具有如SEQ ID NO:19、20、21或22所表示的氨基酸序列的连接物。

[0176] 在某些实施例中，抗原结合部分经由铰链区与Fc部分的CH2结构域的N末端融合。铰链区可以与Fc部分具有相同或不同的IgG类别，或者是工程改造的、非天然存在的铰链域。IgG野生型铰链区的实例具有如SEQ ID NO:23中所表示的氨基酸序列。修饰的(缩短的)铰链区(中间铰链)的实例具有如SEQ ID NO:24所表示的氨基酸序列。

[0177] 在一些实施例中，两个CD16A抗原结合部分与Fc部分的N末端融合，而一个或两个靶抗原结合部分与Fc部分的C末端融合；或者将两个CD16A抗原结合部分与Fc部分的C末端融合，并且一个或两个靶抗原结合部分与Fc部分的N末端融合(例如，KiH-scDb-Fc；图3-6；Db-Fc，图9-10；Bi-scFv-Fc，图11-12和KiH-scFv-Fc，图15A和15B)。

[0178] 在另一个实施例中，抗原结合部分与Ig抗体(例如IgG)整合或融合。CD16A抗原结合部分中的每个可作为scFv与Fc部分的C末端融合，并且靶抗原结合部分被整合至两个Fab臂中的每个之中(scFv-IgAb，图13)。可替换地，可将CD16A抗原结合部分中的每个整合为在Fab臂中的每个之中的Fv结构域，而一个或两个靶抗原结合部分可与Fc部分的C末端融合(scFv-IgAb，图16)。在某些实施例中，额外的靶抗原结合部分可与CL结构域中的每个的C末端融合(Bi-scFv-IgAb，图14)。

[0179] 在另一个实施例中，两个CD16A抗原结合部分和靶抗原部分与Fab的C末端融合，而Fab的Fv结构域提供了第二靶抗原结合部分或第三靶抗原结合部分(scDb-TriBs(-scFv)，图7和8)。可替换地，两个CD16A抗原结合部分可Fab的C末端融合，并且靶抗原结合部分被整合至Fab的Fv结构域中。

[0180] 抗原结合蛋白对于CD16A至少为二价的，即包含至少两个CD16A抗原结合部分。

[0181] 在一些实施例中，抗原结合蛋白为四价的和双特异性的，该抗原结合蛋白包含至少两个用于相同抗原的靶抗原结合部分和两个CD16A抗原结合部分。

[0182] 在另一个实施例中，抗原结合部分为四价的和三特异性的，该抗原结合蛋白包含第一靶抗原结合部分和第二靶抗原结合部分以及两个CD16A抗原结合部分。此类抗原结合蛋白可用于共同靶向或双重靶向。例如，此类抗原结合蛋白包含第一肿瘤抗原结合部分

(TAA1)和第二肿瘤抗原结合部分(TAA2)以及两个CD16A抗原结合部分，用于将NK细胞的细胞毒性朝向显示第一(TAA1)肿瘤抗原和第二(TAA2)肿瘤抗原的细胞进行重定向。可替换地，包含第一(TAA1)肿瘤抗原结合部分和第二(TAA2)肿瘤抗原结合部分以及两个CD16A抗原结合部分的此类三特异性抗原结合蛋白可用于将NK细胞的细胞毒性重定向至表型上不同的细胞类型，该细胞类型表达第一(TAA1)肿瘤抗原和第二(TAA2)肿瘤抗原。

[0183] 在某些实施例中，抗原结合蛋白可以是三价的和双特异性的、三价的和三特异性的、四价的和双特异性的、四价的和三特异性的、四价的和四特异性的、六价的和三特异性的或六价的和双特异性的。

[0184] 在第二方面，本发明提供了特定的抗原结合蛋白形式，该抗原结合蛋白具有至少两个CD16A抗原结合部分和在CD16A抗原结合部分的多肽内的确定的抗CD16A结构域排列，其预防NK细胞同类杀伤并且使NK细胞能够有效地结合和补充，用于增强免疫效应子功能(例如增强的ADCC)。

[0185] 当在达雷木单抗诱导50％以上的NK细胞裂解的测定中，当在抗体浓度高达30μg/mL的情况下没有或仅有10％以下的最小裂解可测时，CD16A抗原结合蛋白被认为对诱导NK-NK细胞裂解呈阴性。

[0186] 在增强NK细胞结合和补充以用于效应子功能的同时，防止NK细胞同类杀伤的作用应与本文所述的抗原结合蛋白的特定3D结构的内在特性相关联。

[0187] 在本文公开的抗原结合蛋白(例如，实例7中所述的抗原结合蛋白)的N末端的CD16A接合通常导致NK细胞同类杀伤比在C末端的CD16A接合更少。然而，本公开涵盖了在N末端或C末端接合CD16A的抗原结合蛋白(例如，参见实例7、8和9的任一末端处的接合的实例)。关于N末端CD16接合的详细情况，如实例8所公开，使用基于Fab的CD16A接合，观察到更明显的NK细胞耗尽。此外，通过分析CD16 Fv的结构域次序，与包含VH-VL次序的抗体形式相比，通过包含VL-VH结构域次序的抗体形式可明显减少NK细胞同类杀伤的情况发生。

[0188] 在某些实施例中，通过避免基于Fab的CD16A接合并专注于CD16结合Fv结构域的有益VL-VH顺序，改善NK细胞同类杀伤诱导抗体的比例以及NK细胞杀伤的效力。

[0189] 在某些实施例中，CD16A抗原结合部分的多肽内的可变区必须一个接一个地链接，使得轻链可变区(V_L)在多肽的N末端(即Fv多肽)得以定位。与定位在N末端处的V_L相邻的可变区可以是V_L或V_H。值得注意的是，如果对CD16A抗原结合部分的可变区加以定位，使得V_L在CD16A抗原结合部分的多肽的N末端，则可以独立于CD16A抗原结合部分的结合亲和力来避免同类杀伤。

[0190] 特别地，如果CD16A抗原结合部分为scFv，则可变区从多肽的N末端至C末端加以定位：V_L-V_H。

[0191] 尤其是，如果CD16A抗原结合部分为Db，则可变区从形成Db的两个多肽中的每个中的N末端至C末端加以定位：V_L-V_H。

[0192] 特别是，如果CD16A抗原结合部分为scDb，则可变区从多肽(i)V_L-V_H-V_L-V_H或(ii)V_L-V_L-V_H-V_H或(iii)V_H-V_H-V_L-V_L的N末端至C末端加以定位。

[0193] 特别地，如果CD16A抗原结合部分为$(scFv)_2$，则可变区从多肽的N末端至C末端加以定位：V_L-V_H-V_L-V_H

[0194] CD16A抗原结合部分的多肽(例如scFv、Db或scDb)经由连接物(i)通过其C末端与

Fc部分CH2结构域的N末端融合或者与铰链/中间铰链区融合,或(ii)通过其N末端与Fc部分的CH3结构域的C末端融合或者与CL或CH1结构域的C末端融合。

[0195] 优选地,两个CD16A抗原结合部分均在N末端或C末端定位于抗原结合蛋白中。

[0196] 在一些实施例中,CD16A抗原结合部分与Fc部分融合。优选地,两个CD16A结合部分均在N末端或C末端与Fc部分融合。Fc部分包含恒定区的一部分,该恒定区保持了IgG Fc区的至少一个功能。"Fc部分"包括天然序列Fc区和变体Fc区。

[0197] 优选地,Fc部分为"沉默的"。"沉默的Fc部分"是指经修饰的Fc部分,其本身不与包括CD16A(FcγRIIIA)的Fc-γ(Fcγ)受体(FcγR)结合,但保持与新生儿Fc受体(FcRn)的结合。FcRn结合能够跨上皮屏障进行胞吞转运并且进行循环,以保护IgG或含有FcRn结合Fc部分的融合蛋白免受溶酶体降解,从而导致血清半衰期得以延长并延长了循环的持久性。抗原结合蛋白设计成经由CD16A抗原结合部分特异性接合NK细胞上的CD16A,因此,在优选的实施例中,应预防Fc与其他Fc-γ受体结合。因此,保持或增强FcRn结合的Fc融合抗原结合蛋白的Fc部分的修饰是优选的。

[0198] 已经描述了若干组突变或变化(称为"沉默突变"或"无效应子突变"),该突变或变化生成与Fc-γ受体结合力降低或没有结合的IgG1 Fc部分,其可以选自由以下项组成的组的突变:C220S、C229S、E233P、L234A、L234V、L234F、L235A、L235E、P238S、D265A、N297A、N297Q、P331S;或用于产生与Fc-γ受体结合力降低的IgG2 Fc部分的突变,其可以选自由以下项组成的组:H268Q、V309L、A330S、A331S或用于产生与Fc-γ受体结合力降低的IgG4 Fc部分的突变,其可以选自由以下项组成的组:L235A、G237A、E318A(Strohl W.,Current Opinion in Biotechnology(2009);20:1-7;Kaneko E and Niwa R,Biodrugs(2011);25(1):1-11;Baudino L.,J.Immunology(2008);181:6664-6669)。

[0199] 此外,可以将Fc部分工程化以调节血清半衰期,例如增加或减少。已经描述了IgG1 Fc部分中增加抗原结合蛋白的血清半衰期的以下突变:T250Q、M252Y、S254T、T256E、T307A、E380A、M428L、H433K、N434A、N434Y(Sroh1 W,Current Opinion in Biotechnology(2009);20:1-7;Borrok MJ等人,J.Pharmaceutical Sciences 2017;106(4):1008-1017)。

[0200] 在一些实施例中,根据Kabat EU编号,IgG(特别是IgG1)Fc部分在234、235和265位包含突变组,特别是该突变组选自L234F/V/A、L235A/E和D265A。特别优选的是包含突变组L234F、L235E和D265A的IgG1 Fc部分。因此,在一些实施例中,抗原结合蛋白包含具有突变组L234F、L235E和D265A的沉默的IgG1 Fc部分。所有列举的突变均对应于Kabat EU编号系统(Kabat,E.A.等人,Sequences of proteins of immunological interest第5版-US Department of Health and Human Services,NIH publication n°91-3242,第662、680、689页(1991)。在某些实施例中,抗原结合蛋白包含具有突变组L234F和L235E的沉默的IgG1 Fc部分。

[0201] 在一些实施例中,CD16A抗原结合部分与同二聚体Fc部分融合,该同二聚体Fc部分包含彼此组装的两个相同的CH2-CH3多肽,其中共价二聚化通过至CH2结构域的铰链区N末端加以促进。

[0202] 抗原结合部分可经由铰链区在N末端与Fc部分融合,或者在C末端与CH3结构域融合。当CD16A抗原结合部分在N末端融合时,第一靶抗原结合部分优选地在C末端与Fc区融合。

[0203] 在一个特别的实施例中，两个CD16A抗原结合部分被融合，使得通过二聚化作用在Fc部分(Db-Fc)的N末端或C末端形成Db，其中CD16A抗原结合VL-VH多肽经由连接物和铰链区在N末端与CH2-CH3多肽融合或与CH3的C末端融合，并且将靶抗原结合部分作为scFv与相应的相反末端融合(图9、10)。优选地，该铰链为中间铰链(SEQ ID NO:24)。例如，此类抗原结合蛋白包含在Fc区中二聚化的两条多肽链，其中每条多肽链包含从N末端至C末端：

[0204] (i)V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-铰链-CH2-CH3-V_H(靶标)-V_L(靶标)(图9)；

[0205] (ii)V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-铰链-CH2-CH3-V_L(靶标)-V_H(靶标)(图9)；

[0206] (iii)V_L(靶标)-V_H(靶标)-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)(图10)；或

[0207] (iv)V_H(靶标)-V_L(靶标)-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)(图10)。

[0208] 在另一个实施例中，两个CD16A抗原结合部分作为scFv与Fc部分(Bi-scFv-Fc)融合，其中第一特异性(靶标或CD16A结合)的scFv与CH2-CH3多肽的一个末端融合，并且第二特异性(CD16A或靶标结合)的scFv与形成二聚体Fc部分的CH2-CH3多肽的另一个末端融合。因此，两个靶抗原结合部分中的每个作为scFv与两个CH2-CH3多肽中的每个的相应的相反末端融合(图11、12)。例如，此类抗原结合蛋白包含在铰链和Fc区中均发生同二聚化的两条多肽链，其中每条多肽链在N末端和C末端均包含scFv，CH2-CH3多肽和结构域中的每个均从N末端至C末端加以定位：

[0209] (i)V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-铰链-CH2-CH3-V_H(靶标)-V_L(靶标)(图11)；

[0210] (ii)V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-铰链-CH2-CH3-V_L(靶标)-V_H(靶标)(图11)；

[0211] (iii)V_L(靶标)-V_H(靶标)-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)(图12；或

[0212] (iv)V_H(靶标)-V_L(靶标)-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)(图12)。

[0213] 在一些实施例中，CD16A抗原结合部分与异二聚体(不对称)Fc部分融合。此类异二聚体Fc部分包含Fc区的两个CH2-CH3多肽中的每个的修饰，该修饰促进两个多肽的(异源)二聚化。这些在多肽中的每个中包括独立的修饰，该修饰彼此互补以促进两个CH2-CH3多肽的组装。修饰可以是核酸突变，被翻译成氨基酸取代。此类修饰被称为“旋钮插入孔”(KiH)，并且例如由Ridgway等人(Protein Engineering第9卷，编号7，第.617-621页，1996)描述了许多变体的构造：例如，根据EU编号系统(Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，NIH，1991)，在一个CH2-CH3多肽中的T366Y取代和另一个多肽中的Y407T取代。包含在第一IgG1 CH2-CH3多肽中的T366Y旋钮插入孔取代和在第二IgG1 CH2-CH3多肽中的Y407T取代的Fc部分的实例具有如SEQ ID NO:31、32所表示的氨基酸序列。另外，已经发展了其他策略以生成促进异二聚化的互补界面(在Brinkmann和Kontermann，MABS 2017;9(2):182-212中进行了综述)。在另一个实施例中，可以合并二硫键以进一步稳定异二聚体并增加产率(Merchant等人，Nature Biotech.1998;16:677-681；Atwell等人；J.Mol.Biol，270(1997)26-35)。

[0214] 在一个特别的实施例中，两个CD16A抗原结合部分作为scDb与异二聚体Fc部分(KiH-scDb-Fc)融合，其中scDb的单个多肽与第一CH2-CH3多肽融合，并且单个靶抗原结合部分作为scFv与相同或第二CH2-CH3多肽的相应的相反末端融合(图3、5)。例如，此类抗原结合蛋白包含在中间异源二聚化的两条多肽链。铰链或者铰链和Fc区，其中第一多肽链包含从N末端至C末端：V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-铰链-CH2-CH3或V_L(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_H(CD16A)-铰链-CH2-CH3并且第二多肽包含从N末端至C末

端:铰链-CH2-CH3-V_H(靶标)-V_L(靶标)或铰链-CH2-CH3-V_L(靶标)-V_H(靶标)(图3);或者第一多肽链包含从N末端至C末端:铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)或铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_H(CD16A)并且第二多肽包含从N末端至C末端:V_H(靶标)-V_L(靶标)-铰链-CH2-CH3或V_L(靶标)-V_H(靶标)-铰链-CH2-CH3(图5);或者scDb的单个多肽与第一CH2-CH3多肽融合,并且单个靶抗原结合部分作为scFv与第二CH2-CH3多肽的相同末端融合(图4)。例如,此类抗原结合蛋白包含两条多肽链,其中第一多肽链包含从N末端至C末端:V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-铰链-CH2-CH3或V_L(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_H(CD16A)-铰链-CH2-CH3并且第二多肽包含从N末端至C末端:V_H(靶标)-V_L(靶标)-铰链-CH2-CH3或V_L(靶标)-V_H(靶标)-铰链-CH2-CH3(图4)。

[0215] 在另一个实施例中,两个CD16A抗原结合部分作为scDb与异二聚体Fc部分融合,并且scDb的单个多肽与第一CH2-CH3多肽融合,并且单个第一靶抗原结合部分(TAA1)作为scFv与此第一CH2-CH3多肽的相应的相反末端融合,并且第二靶抗原结合部分(TAA2)作为scFv与第二CH2-CH3多肽在与第一靶抗原结合部分相同的末端处融合(图6)。例如,此类抗原结合蛋白包含在铰链或中间铰链和Fc区中异源二聚化的两条多肽链,其中第一多肽链包含从N末端至C末端:V_H(靶标1)-V_L(靶标1)-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A))或V_H(靶标1)-V_L(靶标1)-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_H(CD16A)或V_L(靶标1)-V_H(靶标1)-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)或V_L(靶标1)-V_H(靶标1)-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_H(CD16A)并且第二多肽包含从N末端至C末端:V_H(靶标2)-V_L(靶标2)-铰链-CH2-CH3或V_L(靶标2)-V_H(靶标2)-铰链-CH2-CH3(图6)。

[0216] 在另一个实施例中,两个CD16A抗原结合部分作为scFv各自与异二聚体Fc部分(KiH-scFv-Fc)融合,并且两个scFv中的每个与第一CH2-CH3多肽和第二CH2-CH3多肽中的一个融合,并且单个第一靶抗原结合部分(TAA1)作为scFv与此第一CH2-CH3多肽的相应的相反末端融合,并且第二靶抗原结合部分(TAA2)作为scFv与第二CH2-CH3多肽在与第一靶抗原结合部分相同的末端处融合(图15)。例如,此类抗原结合蛋白包含在Fc区中异源二聚化的两条多肽链,其中第一多肽链包含从N末端至C末端:V_H(靶标1)-V_L(靶标1)-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)或V_L(靶标1)-V_H(靶标1)-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)并且第二多肽包含从N末端至C末端:V_H(靶标2)-V_L(靶标2)-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)或V_L(靶标2)-V_H(靶标2)-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)(图15b);可替换地,此类抗原结合蛋白包含在Fc区中异源二聚化的两条多肽链,其中第一多肽链包含从N末端至C末端:V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-铰链-CH2-CH3-V_H(靶标1)-V_L(靶标1)或V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-铰链-CH2-CH3-V_L(靶标1)-V_H(靶标1)并且第二多肽包含从N末端至C末端:V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-铰链-CH2-CH3-V_H(靶标2)-V_L(靶标2)或V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-铰链-CH2-CH3-V_L(靶标2)-V_H(靶标2)(图15a)。

[0217] 在另一个实施例中,两个CD16A抗原结合部分作为scDb与单体Fc部分融合(scDb-mFc,图1、2)。此类单体Fc部分(mFc)包含在CH3结构域中的突变并且缺少铰链区,但是保持与FcRn受体融合并且不与其他Fc-γR融合,该突变预防与另一CH2-CH3多肽二聚化。在Ying等人(MABS,2014;6(5):1201-1210;或WO 2013/138643)中描述了此类突变。此类单体Fc部分的实例具有如SEQ ID NO:30所表示的氨基酸序列。此类抗原结合蛋白由单个多肽链组

成,其中包含两个CD16A抗原结合部分的scDb与单体Fc部分的一个末端融合,并且靶抗原结合部分与单体Fc部分的另一末端融合。此类抗原结合蛋白由包含从N末端至C末端的单个多肽链组成:V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-CH2-CH3-V_H(靶标)-V_L(靶标)或V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-CH2-CH3-V_L(靶标)-V_H(靶标),或V_L(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_H(CD16A)-CH2-CH3-V_H(靶标)-V_L(靶标),或V_L(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_H(CD16A)-CH2-CH3-V_L(靶标)-V_H(靶标)(图1),或V_H(靶标)-V_L(靶标)-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A),或V_L(靶标)-V_H(靶标)-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A),或V_H(靶标)-V_L(靶标)-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_H(CD16A),或V_L(靶标)-V_H(靶标)-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_H(CD16A)(图2)。

[0218] 在其他实施例中,抗原结合部分的多肽的N末端与Fab片段的C末端融合。例如,将包含两个CD16A抗原结合部分的Db、scDb或两个scFv与Fab片段的C末端融合,并且Fab片段的Fv包含靶抗原结合部分。

[0219] 在其他实施例中,抗原结合蛋白是三特异性的(scDb-TriBs(-scFv)),其中包含两个CD16A抗原结合部分的scDb在C末端与Fab片段的两个多肽的第一多肽融合,并且第一靶抗原结合部分(TAA1)作为scFv或二价scDb在C末端与Fab片段的第二多肽融合,并且Fab片段的Fv提供了第二靶抗原结合部分(TAA2)。在一个特定的实施例中,Fv的第二靶抗原结合部分为人血清白蛋白(HSA)抗原结合部分。此类抗原结合蛋白包含以两条scDb异源二聚化至Fab片段-融合的两条多肽链,所述两个scDb在C末端与Fab融合,其中第一多肽链包含N末端至C末端:V_L(HSA)-CL-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A),第二种多肽包含从N末端至C末端:V_H(HSA)-CH1-V_H(靶标1)-V_L(靶标1)-V_H(靶标1)-V_L(靶标1)(图7)。在另一个实施例中,将包含两个CD16A抗原结合部分的scDb和包含第一靶抗原结合部分的scFv在C末端与Fab片段融合,其中第一条多肽链包含从N末端至C末端:V_L(HSA)-CL-V_H(靶标1)-V_L(靶标1),并且第二多肽包含从N末端至C末端:V_H(HSA)-CH1-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)(图8)。

[0220] 在另一个实施例中,两个CD16A抗原结合部分在C末端与IgG融合,其中IgG的两个Fab臂提供两个其他的抗原结合部分(scFv-IgAb,图13)。在此类抗原结合蛋白中,包含CD16A抗原结合部分的第一scFv在C末端与第一H链的CH3融合,包含CD16A抗原结合部分的第二scFv与第二H链的CH3融合,并且两个Fab臂向每个Fv提供靶抗原结合部分。两个Fv均可具有相同的靶抗原结合部分,或者两个Fv均可提供第一靶抗原结合部分和第二靶抗原结合部分。例如,此类抗原结合蛋白包含两个相同的H链和两个相同的L链,其中H链包含从N末端至C末端:V_H(靶标)-CH1-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A),并且L链包含从N末端至C末端:V_L(靶标)-CL(图13)。

[0221] 可替换地,由IgG的Fab臂的两个Fv提供scFv-IgAb两个CD16A抗原结合部分,并且将一个或两个其他抗原结合部分在C末端与IgG融合。在此类抗原结合蛋白中,两个Fab臂中的每个向每个Fv提供CD16A抗原结合部分,并且包含靶抗原结合部分的第一scFv在C末端与第一H链的CH3融合,并且可选地将包含其他的第一靶抗原结合部分或第二靶抗原结合部分的第二scFv与第二H链的CH3融合。例如,此类抗原结合蛋白包含两个相同的H链和两个相同的L链,其中H链包含从N末端至C末端:V_H(CD16A)-CH1-铰链-CH2-CH3-V_L(靶标)-V_H(靶标),

并且L链包含从N末端至C末端:V_L(CD16A)-CL(图16)或者H链包含从N末端至C末端:V_H(CD16A)-CH1-铰链-CH2-CH3-V_H(靶标)-V_L(靶标),并且L链包含从N末端至C末端:V_L(CD16A)-CL。

[0222] 在另一个实施例中,两个CD16A抗原结合部分在C末端与IgG融合,IgG的两个Fab臂提供两个第一靶抗原结合部分(TAA1)并且另一个scFv第二靶抗原结合部分(TAA2)在C末端与两个CL结构域中的每个(Bi-scFv-IgAb,图14)融合。在此类抗原结合蛋白中,将包含CD16A抗原结合部分的第一scFv在C末端与第一H链的CH3融合,包含CD16A抗原结合部分的第二scFv与第二H链的CH3融合,两个Fab臂向每个Fv提供第一靶抗原结合部分(TAA1),并且通过与CL结构域中的每个融合的scFv第二靶抗原结合部分中的每个来提供另外两个第二靶抗原结合部分(TAA2)。例如,此类抗原结合蛋白包含两个相同的H链和两个相同的L链,其中H链包含从N末端至C末端:V_H(靶标1)-CH1-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A),并且L链包含从N末端至C末端:V_L(靶标1)-CL-V_L(靶标2)-V_H(靶标2)或V_L(靶标1)-CL-V_H(靶标2)-V_L(靶标2)(图14)。

[0223] 根据本发明,多特异性抗原结合蛋白包含与CD16A和至少一个不同于CD16A的靶抗原(TA)特异性结合的CD16A抗原结合部分。

[0224] 在一些实施例中,CD16A结合部分与人和食蟹猴CD16A结合。

[0225] 在一些实施例中,CD16A抗原结合部分包含对CD16A具有特异性的重链可变域和轻链可变域,其中(i)对CD16A具有特异性的重链可变域(V_H)包含具有SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列的重链CDR1;具有SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列的重链CDR2;具有SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列的重链CDR3,并且对CD16A具有特异性的轻链可变域(V_L)包含具有SEQ ID NO:53中所示的氨基酸序列的轻链CDR1;具有SEQ ID NO:54中所示的氨基酸序列的轻链CDR2;以及具有SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列的轻链CDR3;或者

[0226] (ii)对CD16A具有特异性的重链可变域(V_H)具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列;和/或

[0227] (iii)对CD16A具有特异性的轻链可变域(V_L)具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。

[0228] 在一些实施例中,CD16A抗原结合部分包含重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L),其中(a)V_H包括包含或具有SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列的CDR1、包含或具有SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的CDR2以及包含或具有SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的CDR3;并且(b)V_L包括包含或具有SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的CDR1、包含或具有SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的轻链CDR2以及包含或具有SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0229] 在某些实施例中,CD16A抗原结合部分的V_H包含或具有SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列。在某些实施例中,CD16A抗原结合部分的V_L包含或具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。

[0230] 在一些实施例中,CD16A抗原结合部分包含V_H和V_L,其中(a)V_H包括包含或具有SEQ ID NO:82中所示的氨基酸序列的CDR1、包含或具有SEQ ID NO:83中所示的氨基酸序列的CDR2以及包含或具有SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列的CDR3;并且(b)V_L包括包含或具

有SEQ ID NO:84中所示的氨基酸序列的CDR1、包含或具有SEQ ID NO:85中所示的氨基酸序列的CDR2以及包含或具有SEQ ID NO:86中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0231] 在某些实施例中,CD16A抗原结合部分的V_H包含或具有SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列。在某些实施例中,CD16A抗原结合部分的V_L包含或具有SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列。

[0232] 在一些实施例中,CD16A抗原结合部分包含V_H和V_L,其中(a)V_H包括包含或具有SEQ ID NO:87中所示的氨基酸序列的CDR1、包含或具有SEQ ID NO:88中所示的氨基酸序列的CDR2以及包含或具有SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列的CDR3;并且(b)V_L包括包含或具有SEQ ID NO:89中所示的氨基酸序列的CDR1、包含或具有SEQ ID NO:95中所示的氨基酸序列的CDR2以及包含或具有SEQ ID NO:90中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0233] 在某些实施例中,CD16A抗原结合部分的V_H包含或具有SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。在某些实施例中,CD16A抗原结合部分的V_L包含或具有SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列。

[0234] 在一些实施例中,CD16A抗原结合部分包含V_H和V_L,其中(a)V_H包括包含或具有SEQ ID NO:91中所示的氨基酸序列的CDR1、包含或具有SEQ ID NO:92中所示的氨基酸序列的CDR2以及包含或具有SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列的CDR3;并且(b)V_L包括包含或具有SEQ ID NO:93中所示的氨基酸序列的CDR1、包含或具有SEQ ID NO:85中所示的氨基酸序列的CDR2以及包含或具有SEQ ID NO:94中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0235] 在某些实施例中,CD16A抗原结合部分的V_H包含或具有SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列。在某些实施例中,CD16A抗原结合部分的V_L包含或具有SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列。

[0236] 在一些实施例中,CD16A抗原结合部分包含V_H和V_L,其中(a)V_H包括包含或具有SEQ ID NO:82中所示的氨基酸序列的CDR1、包含或具有SEQ ID NO:95中所示的氨基酸序列的CDR2以及包含或具有SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列的CDR3;并且(b)V_L包括包含或具有SEQ ID NO:96中所示的氨基酸序列的CDR1、包含或具有SEQ ID NO:97中所示的氨基酸序列的CDR2以及包含或具有SEQ ID NO:98中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0237] 在某些实施例中,CD16A抗原结合部分的V_H包含或具有SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列。在某些实施例中,CD16A抗原结合部分的V_L包含或具有SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列。

[0238] 在一些实施例中,CD16A抗原结合部分包含V_H和V_L,其中(a)V_H包括包含或具有SEQ ID NO:82中所示的氨基酸序列的CDR1、包含或具有SEQ ID NO:99中所示的氨基酸序列的CDR2以及包含或具有SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列的CDR3;并且(b)V_L包括包含或具有SEQ ID NO:100中所示的氨基酸序列的CDR1、包含或具有SEQ ID NO:101中所示的氨基酸序列的CDR2以及包含或具有SEQ ID NO:102中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0239] 在某些实施例中,CD16A抗原结合部分的V_H包含或具有SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列。在某些实施例中,CD16A抗原结合部分的V_L包含或具有SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列。

[0240] 在一些实施例中,CD16A抗原结合部分包含V_H和V_L,其中(a)V_H包括包含或具有SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列的CDR1、包含或具有SEQ ID NO:103中所示的氨基酸序列的

CDR2以及包含或具有SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列的CDR3;并且(b)V_L包括包含或具有SEQ ID NO:53中所示的氨基酸序列的CDR1、包含或具有SEQ ID NO:54中所示的氨基酸序列的CDR2以及包含或具有SEQ ID NO:104中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0241] 在一些实施例中,CD16A抗原结合部分包含V_H和V_L,其中(a)V_H包括包含或具有SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列的CDR1、包含或具有SEQ ID NO:103中所示的氨基酸序列的CDR2以及包含或具有SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列的CDR3;并且(b)V_L包括包含或具有SEQ ID NO:53中所示的氨基酸序列的CDR1、包含或具有SEQ ID NO:54中所示的氨基酸序列的CDR2以及包含或具有SEQ ID NO:105中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0242] 用于CD16A的此CD16A抗原结合部分不与CD16B结合,并且与已知的具有相似亲和力的CD16A同种异型F158和V158结合。已在人CD16A中鉴定出两个等位基因单核苷酸多态性,从而改变了158位中的氨基酸,这对于与IgG铰链区的相互作用非常重要。在白种人群体内,纯合子158F/F和杂合子158V/F等位基因的等位基因频率相似,分别在35%与52%或38%与50%之间,而纯合子158V/V等位基因仅在10-15%的群体中发现(Lopez-Escamez JA等人;BMC Med Genet 2011;12:2)。因此,由于亲和力相似,在所有患者群体中,NK细胞通过此抗CD16A结构域而进行接合和活化是有利的。此CD16A抗原结合部分与人和食蟹猴CD16A结合。此外,在WO2006/125668中描述了包含与CD16A结合但不与CD16B结合的重链可变域和轻链可变域的CD16A抗原结合部分。

[0243] 在一些实施例中,多特异性抗原结合分子包含抗CD16A Fv结构域,与具有SEQ ID NO:1和2的抗CD16A相比,该抗CD16A Fv结构域具有与CD16A的经改善的结合,并且该抗CD16A Fv结构域不与CD16B结合并识别已知的具有相似亲和力的CD16A同种异型F158和V158。在某些实施例中,亲和力经改善的抗CD16A Fv结构域包含VCDR,该VCDR具有如SEQ ID NO:53、54、55所表示的序列;或者该抗CD16A Fv结构域由V_L和V_H组成,该V_L具有如SEQ ID NO:2所表示的序列,该V_H具有如SEQ ID NO:1所表示的序列。

[0244] 此类改进的结合剂可以是亲和力成熟的CD16A Fv抗原结合部分。

[0245] 因此,在一些实施例中,如果在以0.16μg/ml人CD16A(SEQ ID NO:48)(在Biacore T200系统中使用纯化scFv分子来测量)包被的孔上进行ELISA测试,则CD16A抗原结合部分包含Fv结构域,该Fv结构域显示出比对SEQ ID NO:1和2的抗CD16A Fv更高的对人CD16A的亲和力(例如,通过亲和力成熟的改善)和/或选择性。例如,此类对人CD16A的更高亲和力可以大于2、3、4、5、6、7、8、9、10、50、100和150倍。例如,在Biacore T200系统上测得的单价结合亲和力可为K_D=0.27nM至1.91nM,这比对SEQ ID NO:1和2与人CD16A的结合测得的40.5nM高21至150倍的亲和力。

[0246] 优选地,如果在以0.16μg/ml食蟹猴CD16A(SEQ ID NO:49)(在Biacore T200系统X100中使用纯化scFv分子来测量)包被的孔上进行ELISA测试,则此类亲和力成熟的Fv结构域还显示出对食蟹猴CD16A的相似改善的亲和力。例如,此类对食蟹猴CD16A的更高亲和力可以大于2、3、4、5、6、7、8、9、10、50、100、150、200、250、300、400、500和541倍。例如,在Biacore T200系统上测得的单价结合亲和力可为K_D=0.24nM至3.63nM,这比对SEQ ID NO:1、2与食蟹猴CD16A的结合测得的132nM高36至541倍的亲和力。

[0247] 在SEQ ID NO:1、2的抗CD16 Fv中,已鉴定出某些序列位置(X37、X44、X46),其中氨基酸取代有益于在V_L结构域中的特定CD16A结合(SEQ ID NO:2)。参见表1。

[0248] 表1:氨基酸取代的最强作用的总结。给出在种系序列和SEQ ID NO:1-2的参考序列中的编码的残基以用于比较。

[0249]

位置	部位	选择的氨基酸	取消选择的氨基酸	种系残留	SEQ ID NO:1
X9	HCDR1	Q	H	H	H
X11	HCDR2	V	I	I	I
					SEQ ID NO:2
X37	LCDR2	K	D	D	K
X44	LCDR3	Y		S	Y
X46	LCDR3	V		D	V

[0250] 并非表1所示的所有氨基酸取代对于与CD16A的结合都同样重要。X44和X46位的取代可能更重要,并且优选地,亲和力成熟的克隆保留SEQ ID NO:2的氨基酸。

[0251] 在某些实施例中,进一步负责CD16A结合的是LCDR3的序列以及LCDR1的N末端残基NI或LCDR2中的QDX序列基序。

[0252] 在某些实施例中,CD16A抗原结合部分的V_L包含轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3,与SEQ ID NO:53、54和55中所示的序列相比,其包含1、2、3、4或5个氨基酸取代,并且V_L保持对CD16A的结合特异性。在某些实施例中,SEQ ID NO:53的序列中的一个或多个取代是从3至6位。在某些实施例中,SEQ ID NO:54的序列中的取代在3位中。在某些实施例中,SEQ ID NO:55的序列的6位的残基Y和8位的残基V不被取代。优选地,LCDR3具有如SEQ ID NO:55所表示的序列。

[0253] 在另一个实施例中,与SEQ ID NO:2的序列相比,CD16A抗原结合部分的V_L具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%或80%的序列一致性,其中在SEQ ID NO:2中的从23至27位的残基GGHNI、在SEQ ID NO:2中的从49至52位的序列基序QDXK未突变,并且V_L保持对CD16A的结合特异性。

[0254] 在CD16A抗原结合部分的V_H中,与SEQ ID NO:1的序列相比,HCDR1中的9位和/或HCDR2中的11位的取代有益于改善与CD16A的结合。特别地,HCDR1中的9位的残基为Q和/或在HCDR2中的11位的残基为V。

[0255] 因此,在另一个实施例中,与SEQ ID NO:1的序列相比,CD16A抗原结合部分的V_H具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%或80%的序列一致性,HCDR1中的9位的残基为Q和/或在HCDR2中的11位的残基为V。

[0256] 因此,在某些实施例中,CD16A抗原结合部分包含V_L和V_H,其中与SEQ ID NO:2的序列相比,CD16A的V_L具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%或80%的序列一致性,其中在SEQ ID NO:2中的从23至27位的残基GGHNI、在SEQ ID NO:2中的从49至52位的序列基序QDXK未突变,并且V_L保持对CD16A的结合特异性;并且与SEQ ID NO:1的序列相比,CD16A抗原结合部分的V_H具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、

87％、86％、85％、84％、83％、82％、81％或80％的序列一致性，HCDR1中的9位的残基为Q和/或在HCDR2中的11位的残基为V。

[0257] 在另一个实施例中，与SEQ ID NO:2的序列相比，CD16A抗原结合部分的V_L具有至少约99％、约98％、约97％、约96％、约95％、约94％、约93％、约92％、约91％、约90％、约89％、约88％、约87％、约86％、约85％、约84％、约83％、约82％、约81％或约80％的序列一致性，其中在SEQ ID NO:2中的从23至27位的残基GGHNI、在SEQ ID NO:2中的从49至52位的序列基序QDXK未突变，并且V_L保持对CD16A的结合特异性。

[0258] 在CD16A抗原结合部分的V_H中，与SEQ ID NO:1的序列相比，HCDR1中的9位和/或HCDR2中的11位的取代有益于改善与CD16A的结合。特别地，HCDR1中的9位的残基为Q和/或在HCDR2中的11位的残基为V。

[0259] 因此，在另一个实施例中，与SEQ ID NO:1的序列相比，CD16A抗原结合部分的V_H具有至少约99％、约98％、约97％、约96％、约95％、约94％、约93％、约92％、约91％、约90％、约89％、约88％、约87％、约86％、约85％、约84％、约83％、约82％、约81％或约80％的序列一致性，HCDR1中的9位的残基为Q和/或在HCDR2中的11位的残基为V。

[0260] 因此，在某些实施例中，CD16A抗原结合部分包含V_L和V_H，其中与SEQ ID NO:2的序列相比，CD16A抗原结合部分的V_L具有至少约99％、约98％、约97％、约96％、约95％、约94％、约93％、约92％、约91％、约90％、约89％、约88％、约87％、约86％、约85％、约84％、约83％、约82％、约81％或约80％的序列一致性，其中在SEQ ID NO:2中的从23至27位的残基GGHNI、在SEQ ID NO:2中的从49至52位的序列基序QDXK未突变，并且V_L保持对CD16A的结合特异性；并且与SEQ ID NO:1的序列相比，CD16A抗原结合部分的V_H具有至少约99％、约98％、约97％、约96％、约95％、约94％、约93％、约92％、约91％、约90％、约89％、约88％、约87％、约86％、约85％、约84％、约83％、约82％、约81％或约80％的序列一致性，HCDR1中的9位的残基为Q和/或在HCDR2中的11位的残基为V。

[0261] 在某些实施例中，与SEQ ID NO:3中所示的序列相比，CD16A抗原结合部分的V_H具有至少约99％、约98％、约97％、约96％、约95％、约94％、约93％、约92％、约91％、约90％、约89％、约88％、约87％、约86％、约85％、约84％、约83％、约82％、约81％或约80％的序列一致性。

[0262] 在某些实施例中，CD16A抗原结合部分包含：包含与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列至少约99％、约98％、约97％、约96％、约95％、约94％、约93％、约92％、约91％、约90％、约89％、约88％、约87％、约86％、约85％、约84％、约83％、约82％、约81％或约80％一致或同源的氨基酸序列的V_H，和包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少约99％、约98％、约97％、约96％、约95％、约94％、约93％、约92％、约91％、约90％、约89％、约88％、约87％、约86％、约85％、约84％、约83％、约82％、约81％或约80％一致或同源的氨基酸序列的V_L。

[0263] 在一个特别的实施例中，CD16A抗原结合部分包含V_L和V_H，其中V_L选自由以下区域组成的组：具有SEQ ID NO:2、5、7、9、11和13的区域，并且V_H选自由以下项组成的组：SEQ ID NO:1、3、4、6、8、10和12。

[0264] III.靶抗原结合部分

[0265] 在某些实施例中，靶抗原结合部分的靶抗原是在骨髓瘤细胞或浆细胞上显示的抗

原。骨髓瘤细胞是从骨髓中的浆细胞产生的恶性(癌性)浆细胞。在骨髓瘤中,恶性浆细胞产生大量异常抗体,所述异常抗体缺乏抵抗感染的能力。这些异常抗体是单克隆蛋白或M蛋白,作为骨髓瘤的肿瘤标志物。骨髓瘤细胞具有表型CD19-/$CD38^{+}$/$CD138^{+}$/$BCMA^{+}$。因此,CD38、CD138和BCMA代表在骨髓瘤细胞上表达的抗原。

[0266] A.BCMA

[0267] B细胞成熟抗原(BCMA、CD269或TNFRSF17)是TNF受体超家族的一种蛋白质,该B细胞成熟抗原通过其与B细胞活化(BAFF)和增殖诱导配体(APRIL)的结合,对于浆细胞的长期存活至关重要(O'Connor、B.P等人,BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells,J.Exp.Med,2004,199,91-96)。人BCMA是一种具有184个氨基酸(aa)的蛋白,该蛋白由具有54个氨基酸的胞外结构域、具有23个氨基酸的跨膜结构域和具有107个氨基酸的胞内域组成(Entrez Gene ID:608(人)102145399(食蟹猴);UniProt Q02223(人))。

[0268] BCMA在浆细胞的长期细胞存活中发挥作用(O'Connor,JEM2004;199(1):91-98)。BCMA在正常浆细胞中表达,并且在多发性骨髓瘤中上调且高发。

[0269] 在某些实施例中,靶抗原结合部分与BCMA(例如BCMA的胞外结构域)特异性结合。

[0270] 优选地,在本发明的抗原结合蛋白中使用的此类抗BCMA Fv以小于10^{-7}M、优选地小于10^{-8}M、小于10^{-9}M、最优选地小于10^{-10}M的平衡解离常数(K_D)(由Biacore测量)与BCMA相互作用。合并在靶抗原结合部分中的此类抗BCMA Fv结构域能够在$BCMA^{+}$MM(多发性骨髓瘤)细胞存在的情况下重定向CD16A结合的NK细胞并且诱导ADCC。已经报道了双特异性抗体在体外和体内经由CD3对$BCMA^{+}$骨髓瘤细胞来接合T细胞的概念验证(例如,Hipp S.等人,Leukemia.2017Aug;31(8):1743-1751.Epub 2016Dec 27)。在某些实施例中,靶抗原结合部分以介于约1×10^{-9}M与约5×10^{-9}M之间的K_D与BCMA结合。在某些实施例中,靶抗原结合部分以约2×10^{-9}M的K_d与BCMA结合。

[0271] 此类BCMA抗原结合部分例如可通过在例如Ryan M.C等人的Antibody targeting of B-cell maturation antigen on malignant plasma cells.Mol Cancer Ther.(2007);6:3009-3018中所述的噬菌体或核糖体文库筛选方法或者使用BCMA的胞外域的非人类动物的免疫来获得。

[0272] Ryan等人在描述了具有细胞毒活性的抗BCMA抗体(作为IgG或抗体药物缀合物)的产生。以引用的方式并入本文中的Ryan M.C等人描述了用于肿瘤细胞靶向的人BCMA选择性抗体的产生。产生针对人BCMA胞外结构域(ECD,氨基酸5-51;NP_001183)的抗体。该抗体在体外对MM细胞诱导出有效的ADCC作用,这随着增强CD16A结合的Fc突变而增加。通过饱和结合,SG1对H929细胞的结合亲和力K_D为51nmol/L。这些抗体证明了对MM细胞系的体外抗肿瘤活性并且因此它们的Fv结构域可以用作根据本发明的抗原结合蛋白中的BCMA抗原结合部分。

[0273] 此外,WO 02/066516描述了与TACI交叉反应的BCMA抗体。描述了与BCMA的残基1-48以及TACI的残基30-67和68-154结合的抗-BCMA/TACI双特异性抗体。其重链可变域和轻链可变域可以用作本发明的抗原结合蛋白中的BCMA抗原结合部分,并且以引用的方式并入本文中。

[0274] Ramadoss等人在J.Am.Chem.Soc.2015;137:5288-5291(以引用的方式并入本文

中)中描述了双特异性(BiFab-BCMA)抗体,该双特异性抗体将T细胞重定向以裂解恶性MM细胞。据描述,双特异性抗体可用于MM的治疗,因为该双特异性抗体靶向静止的癌症干细胞并且具有少量的肿瘤相关抗原。

[0275] WO 2014/122144描述了以双特异性形式与人BCMA和CD3特异性结合的双特异性抗体。所公开的抗BCMA可变域适用于根据本发明的BCMA抗原结合部分。

[0276] WO 2013/072406公开了在双特异性单链抗体中命名为BCMA-1至BCMA-108的抗BCMA Fv结构域,该双特异性单链抗体对CD3具有第二特异性以用于接合T细胞。描述了这些BCMA/CD3双特异性单链抗体在人肿瘤异种移植模型中的抗肿瘤功效,因此这些抗BCMA Fv结构域可以用于本发明的BCMA抗原结合部分。

[0277] 在WO 2010/104949、WO 2012/163805、WO 2013/072415、WO2014/140248和WO 2014/068079中公开了可用于接合免疫效应细胞(诸如T细胞或NK细胞)的双特异性抗体中的其他抗BCMA抗体。这些参考文献还描述了特异性靶向具有高亲和力的BCMA的抗-BCMA Fv结构域和采用此类抗-BCMA Fv结构域的双特异性抗体,该双特异性抗体诱导强效且有效的骨髓瘤细胞裂解。因此,已经显示了用于双特异性抗体中的抗BCMA Fv结构域的概念验证,用于将T细胞重定向以裂解MM细胞。

[0278] 与骨髓瘤细胞上表达的抗原(特别是BCMA)结合的其他抗原结合部分可以衍生自其他已知或可购得的抗体,或通过本领域众所周知的方法重新产生。例如,可以通过选择对BCMA具有特异性的可变片段(Fv)来获得对BCMA具有特异性的可变域。这可以例如通过筛选单链Fv(scFv)噬菌体展示文库或通过杂交瘤技术来实现。例如,可以对人scFv序列的基于IgM的噬菌体展示文库进行若干轮体外选择,以富集对BCMA具有特异性的结合物(实例1)。所选scFv的亲和力可通过亲和力成熟而进一步增加。

[0279] 在某些实施例中,靶向BCMA的部分包含:包含SEQ ID NO:67中中所示的氨基酸序列的V_H CDR1、包含SEQ ID NO:68中中所示的氨基酸序列的V_H CDR2、包含SEQ ID NO:69中中所示的氨基酸序列的V_H CDR3、包含SEQ ID NO:70中中所示的氨基酸序列的V_LCDR1、包含SEQ ID NO:71中中所示的氨基酸序列的V_LCDR2以及包含SEQ ID NO:72中中所示的氨基酸序列的V_LCDR3。

[0280] 在某些实施例中,靶向BCMA的部分的V_H包含与SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源或一致的氨基酸序列。

[0281] 在某些实施例中,靶向BCMA的部分的V_L包含与SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源或一致的氨基酸序列。

[0282] 在某些实施例中,靶向BCMA的部分的V_H包含或具有SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列。在某些实施例中,靶向BCMA的部分的V_L包含或具有SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列。

[0283] 在某些实施例中,靶向BCMA的部分的V_H包含与SEQ ID NO:37中所示的氨基酸序列至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约

90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或约100％同源或一致的氨基酸序列。

[0284] 在某些实施例中，靶向BCMA的部分的V_L包含与SEQ ID NO:38中所示的氨基酸序列至少约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或约100％同源或一致的氨基酸序列。

[0285] 在某些实施例中，靶向BCMA的部分的V_H包含或具有SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列。在某些实施例中，靶向BCMA的部分的V_L包含或具有SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列。

[0286] 在某些实施例中，CD16A/BCMA结合抗体I是具有图13中所示结构的scFv-IgAb抗原结合蛋白，其包含(a)两个以scFv形式与顺序为V_L-V_H的同型二聚体人IgG CH2-CH3 Fc部分的C末端融合的CD16A抗原结合部分以及(b)由IgG的Fab臂中每个Fv提供的两个靶抗原结合部分，其中靶抗原结合部分与BCMA结合。

[0287] 在某些实施例中，CD16A抗原结合部分中的每个包含：包含SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列的V_HCDR1、包含SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的V_H CDR2、包含SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的V_H CDR3、包含SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的V_LCDR1、包含SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的V_LCDR2以及包含SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的V_LCDR3。在某些实施例中，CDR是根据Kabat编号系统鉴定的。CD16A抗原结合部分中的每个包含：具有SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的V_H以及具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的V_L。

[0288] 在某些实施例中，CD16A抗原结合部分与Fc部分的C末端融合，经由具有SEQ ID NO:22中所示的氨基酸序列的连接物以下述顺序连接：V_L(CD16A)-接头L3-V_L(CD16A)，其中接头L3具有SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列。

[0289] 在某些实施例中，靶向BCMA的部分中的每个包含：包含SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列的V_HCDR1、包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列的V_HCDR2、包含SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列的V_H CDR3、包含SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列的V_LCDR1、包含SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列的V_LCDR2以及包含SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列的V_LCDR3。在某些实施例中，CDR是根据Kabat编号系统鉴定的。靶向BCMA的部分中的每个包含具有SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列的V_H和具有SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列的V_L。

[0290] 在某些实施例中，CD16A/BCMA抗体的Fc部分是沉默的Fc部分，该Fc部分包含人IgG1 CH2和CH3重链恒定结构域，该重链恒定结构域包含SED ID NO:29中所示的氨基酸序列。CH2重链恒定结构域具有两个沉默突变(也称为“无效应子突变”)：L234F和L235E。CH2重链恒定结构域包含SED ID NO:79中所示的氨基酸序列。CH3重链恒定结构域包含SED ID NO:109中所示的氨基酸序列。连接至靶向BCMA的部分的CH1重链恒定结构域包含SEQ ID NO:33中所示的氨基酸序列。

[0291] 在某些实施例中，CD16A/BCMA抗体I包含具有SEQ ID NO:61中所示的氨基酸序列的多肽链1和具有SEQ ID NO:62中所示的氨基酸序列的多肽链2。

[0292] 在某些实施例中，CD16A/BCMA抗体是具有图5中所示结构的KiH-scDb-Fc，其包含

(a)以scDb形式与顺序为V_L-V_H-V_L-V_H的IgG CH2-CH3 Fc部分的C末端融合的两个CD16A抗原结合部分,以及(b)以scFv形式与Fc部分的N末端融合的单个靶抗原结合部分,其中靶抗原结合部分与BCMA结合。

[0293] 在某些实施例中,CD16A抗原结合部分中的每个包含:包含SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列的V_H CDR1、包含SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的V_H CDR2、包含SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的V_H CDR3、包含SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的V_LCDR1、包含SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的V_LCDR2以及包含SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的V_LCDR3。在某些实施例中,CDR是根据Kabat编号系统鉴定的。CD16A抗原结合部分中的每个包含具有SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的V_H和具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的V_L。

[0294] 在某些实施例中,CD16A抗原结合部分与异二聚体Fc部分融合,并且经由具有SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列的连接物以下述顺序连接:V_L(CD16A)-接头L1-V_H(CD16A)-接头L2-V_L(CD16A)-接头L1-V_H(CD16A),其中接头L1具有SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列,并且接头L2具有SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列。

[0295] 在某些实施例中,靶向BCMA的部分中的每个包含:包含SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列的V_H CDR1、包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列的V_H CDR2、包含SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列的V_HCDR3、包含SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列的V_LCDR1、包含SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列的V_LCDR2以及包含SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列的V_LCDR3。在某些实施例中,CDR是根据Kabat编号系统鉴定的。靶向BCMA的部分中的每个包含具有SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列的V_H和具有SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列的V_L。

[0296] 在某些实施例中,CD16A/BCMA抗体III的Fc部分是沉默的Fc部分,该Fc部分包含人IgG1 CH2和CH3重链恒定结构域,该重链恒定结构域具有SED ID NO:31中所示的氨基酸序列。CH2重链恒定结构域具有两个沉默突变或无效应子突变:L234F和L235E。CH2重链恒定结构域包含SED ID NO:79中所示的氨基酸序列。CH3重链恒定结构域具有一个沉默突变或无效应子突变D265A。CH3重链恒定结构域包含SED ID NO:81中所示的氨基酸序列。

[0297] 在某些实施例中,CD16A/BCMA抗体包含具有SEQ ID NO:63中所示的氨基酸序列的多肽链1和具有SEQ ID NO:64中所示的氨基酸序列的多肽链2。

[0298] 在本发明的多特异性抗原结合蛋白的一个实施例中,该蛋白为包含多肽的四聚体,该多肽具有如SEQ ID NO:61和62或SEQ ID NO:63和64所表示的氨基酸序列。

[0299] B.EGFR

[0300] 还提供了EGFR/CD16A抗原结合蛋白,用于基于自然杀伤(NK)细胞的靶向EGFR的方法。

[0301] 在一些实施例中,本文所述的用于EGFR的抗原结合部分也与EGFRvIII结合。因此,EGFR/CD16A抗原结合蛋白可用于治疗表达EGFR的癌症和表达EGFRvIII的癌症。与EGFR相反,EGFRvIII仅在癌细胞上表达,而在健康组织上不表达。因此,可使用本文所述的EGFR/CD16A抗原结合蛋白来靶向更多种类的EGFR阳性肿瘤和/或EGFRvIII阳性肿瘤,并因此可以靶向更广泛的患者群体。适用于本文所述的抗原结合蛋白的EGFR结合域的实例作为VH时,包含SEQ ID NO:40中所表示的氨基酸序列;作为VL时,包含如SEQ ID NO:41中所表示的氨

基酸序列。

[0302] IV.多核苷酸

[0303] 可以通过表达编码形成抗原结合分子的单个多肽链的多核苷酸来产生根据本文所述的实施例中任一项的抗原结合蛋白。因此,本发明的其他实施例是编码如上所述的抗体分子的多肽的多核苷酸,例如DNA或RNA。

[0304] 多核苷酸可以通过技术人员已知的方法来构建,例如,将编码可变域(该可变域通过肽接头分离或通过多肽链的肽键直接链接)的基因组合成可操作地链接至合适的启动子和任选合适的转录终止子的基因构建体,并且将其表达在细菌或其它合适的表达系统中,并且将其在细菌或其他合适的表达系统(例如CHO细胞)中进行表达。取决于所利用的载体系统和宿主,可以使用任何数量的合适的转录和翻译元件,该转录和翻译元件包括组成型和诱导型启动子。选择启动子使得其驱动在相应宿主细胞中的多核苷酸的表达。

[0305] 可以将多核苷酸插入代表本发明的另一个实施例的载体,优选为表达载体。

[0306] 可以利用多种表达载体/宿主系统以包含和表达编码本发明的多肽链的多核苷酸。用于在大肠杆菌中表达的表达载体的实例为pSKK(LeGall等人,J Immunol Methods(2004);285(1):111-27)或用于在哺乳动物细胞中的表达的pcDNA5(Invitrogen)。

[0307] V.治疗方法

[0308] 本发明进一步提供了多特异性抗原结合蛋白,特别是包含如上所述的多特异性抗原结合蛋白和至少一种其他成分的组合物。

[0309] 本发明进一步提供了如上所述的多特异性抗原结合蛋白或包含该多特异性抗原结合蛋白的组合物,用于基于NK细胞的免疫疗法中。基于NK细胞的免疫疗法包括基于活性NK细胞的疗法,其中内源性或过继转移的NK细胞通过与本发明的抗原结合分子接合而活化。特别地,增强了用于攻击和杀死异常细胞(诸如癌细胞)的NK细胞的能力。

[0310] 此外,当前的免疫肿瘤学(IO)领域包括市售的检查点调节剂,诸如抗CTLA4和抗PD-1抗体。即使已证明这些药物具有临床功效(在一定范围的适应症中通常为20-30%ORR),但医疗需求和机会仍然存在。因此,尽管在治疗中取得了此类进步,但仍需要新的疗法来在更多数量的患者中实现患者反应率和长效缓解的增长。例如,NK细胞在对MM的免疫反应中发挥关键作用,并且与当前的护理干预标准的临床功效有关,该护理干预包括IMiD、蛋白酶体抑制剂、最近批准的免疫疗法和自体干细胞移植(ASCT)。正在发展多种策略以增强针对骨髓瘤细胞的天然NK细胞的细胞毒性,该骨髓瘤细胞通常在MM中失调。方法包括通过细胞因子刺激或免疫检查点靶向来调节活性,以及在适用ASCT的MM中培养扩增的NK细胞的过继转移。虽然这些方法具有很高的吸引力,但这些方法是非靶向的,因为它们依赖于NK细胞的天然细胞毒性,并且可能受益于抗原特异性重定向和效应子活化。

[0311] 此外,在IO中的合理组合应基于能够释放最大免疫效力同时保持安全性得到控制的试剂。有前景的方法不仅为适应性免疫(大多数检查点抗体仅在T细胞上有活性),并且包括先天免疫的激活,从而产生整合的免疫反应。基于延长的血清半衰期,本文所述的抗体形式非常适合于这些目的,并且与当前市售的单克隆抗体相似,能够方便地给药,并且可以理想地与检查点调节剂(诸如抗LAG3或抗PD1抗体)组合。

[0312] 在某些实施例中,本发明提供了与CD16A和在骨髓瘤细胞或浆细胞上表达的抗原特异性结合的多特异性抗原结合蛋白,用于多发性骨髓瘤的治疗,该治疗包括施用多特异

性抗原结合蛋白的步骤，该抗原选自由如上所述BCMA、CS-1、CD19、CD20、CD22、CD38和CD138组成的组。在某些实施例中，本发明提供了与靶细胞抗原(例如肿瘤抗原)和CD16A特异性结合的多特异性抗原结合分子，用于NK细胞免疫治疗，其中多特异性抗原结合蛋白与NK细胞离体混合，并且将NK细胞和多特异性抗原结合分子的组合物施用于患者。

[0313] 在一个特别的实施例中，肿瘤抗原为BCMA，并且该组合物用于治疗浆细胞疾病或自身免疫疾病，特别是多发性骨髓瘤。

[0314] 浆细胞疾病包括多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、浆细胞白血病、巨球蛋白血症、淀粉样变性、Waldenstrom巨球蛋白血症、孤立性骨浆细胞瘤、髓外浆细胞瘤、骨硬化性骨髓瘤、重链病、意义未明单克隆免疫球蛋白血症(MGUS)和阴燃骨髓瘤。

[0315] 自身免疫性疾病是例如系统性红斑狼疮(SLE)或类风湿关节炎(RA)。

[0316] 因此，在某些实施例中，本文提供了医学用途和方法，其中如上文所述以有效剂量将对BCMA和CD16A具有特异性的抗原结合蛋白(例如，scDb-mFc、KiH-scDb-Fc、scDb-Trib(-scFv)、scFv-IgAb、Bi-scFv-IgAb、KiH-scFv-Fc、Db-Fc或Bi-scFv-Fc)施用于受试者，以治疗$BCMA^+$癌症或自身免疫性疾病(例如多发性骨髓瘤)。

[0317] 施用通过不同方式进行，例如，静脉内、腹膜内、皮下、肌内、局部或皮内施用。剂量将由主治医师和其他临床因素决定。任何一个受试者的剂量取决于许多因素，包括患者的体重、体表面积、年龄、性别、要施用的特定化合物、施用的时间和途径、治疗的种类、总体健康状况以及同时施用的其他药物。“有效剂量”是指足以影响疾病的进程和严重程度，从而导致此类病理减轻或缓解的活性成分的量。可使用已知方法确定可用于治疗和/或预防$BCMA^+$疾病的“有效剂量”。

[0318] 此外，本发明提供用于治疗或改善疾病的方法，所述方法包含向有需要的受试者施用本发明的多特异性抗原结合蛋白的步骤。

[0319] 在用于治疗或改善疾病的方法的优选实施例中，所述疾病是多发性骨髓瘤。

[0320] 本发明提供目前所公开的抗原结合分子(例如CD16A/BCMA抗原结合分子)在治疗和/或预防癌症(例如多发性骨髓瘤)中的用途。在某些实施例中，所述方法包含向患有多发性骨髓瘤(“MM”)的受试者施用目前所公开的抗原结合分子，例如，CD16A/BCMA抗原结合分子，或包含CD16A/BCMA抗原结合分子的药物组合物。

[0321] 在某些实施例中，接受抗原结合分子(例如CD16A/BCMA抗原结合分子或包含CD16A/BCMA抗原结合分子的药物组合物)治疗的受试者是复发/难治性(“R/R”)多发性骨髓瘤患者。在某些实施例中，受试者已接受达雷木单抗。在某些实施例中，受试者未使用过达雷木单抗。在某些实施例中，受试者对达雷木单抗具有耐药性。在某些实施例中，受试者属于达雷木单抗难治性患者。在某些实施例中，受试者属于达雷木单抗复发性患者。

[0322] 在某些实施例中，接受抗原结合分子(例如CD16A/BCMA抗原结合分子或包含CD16A/BCMA抗原结合分子的药物组合物)治疗的受试者表达CD16A多晶型物。例如，但不限于此，CD16A多态性是CD16A-158V/F多态性。参见实例8(例如，图31A和31B)。

[0323] 在某些实施例中，本文所述的治疗方法进一步包含施用第二疗法，例如，基于T细胞的疗法或基于检查点抑制剂的疗法。此类第二疗法包括但不限于，包含施用抗TIGIT抗体的疗法、包含施用抗PD-1抗体(例如纳武单抗、派姆单抗)的疗法、包含施用抗PD-L1抗体(例如阿特珠单抗)的疗法、包含施用抗VEGF抗体(例如贝伐单抗)的疗法和包含施用CD3双特异

性抗体(例如抗FcRH5/CD3抗体(包括但不限于,PCT/US2016/037879中公开的那些抗体,其以引用方式整体并入))的疗法。

[0324] 在某些实施例中,本文所述的治疗方法进一步包含施用细胞因子疗法。如本文所用,"细胞因子疗法"是指包含细胞因子的任何衍生物或修饰的任何疗法,包括但不限于,聚乙二醇化细胞因子和Fc融合细胞因子。可与此类实施例结合使用的细胞因子的非限制性实例包括IL-15、IL-2、IL-12、IL-21、IL-17、IL-18、IL-23、IL-27和IL-6。在某些实施例中,所述方法进一步包含施用IL-15。在某些实施例中,所述方法进一步包含施用IL-2。如实例8所示,IL-15和IL-2可增加目前所公开的CD16A/BCMA抗原结合分子的活性。

[0325] 在某些实施例中,施用本文公开的抗原结合分子(例如CD16A/BCMA抗原结合分子或包含CD16A/BCMA抗原结合分子的药物组合物)将作为一线(1L)疗法。例如,但不限于此,此类一线施用将在表现出CD16A多态性的受试者中进行,所述CD16A多态性表明通过基于Fc的MOA起作用的疗法(例如达雷木单抗疗法)的有效性降低。在某些实施例中,本公开的抗原结合分子的一线施用将在禁忌NK细胞同类杀伤的受试者中进行。参见实例8(例如,图40A-40E)。在某些实施例中,本公开的抗原结合分子的一线施用将在需要避免CRS的受试者中进行。

[0326] 在某些实施例中,施用本文公开的抗原结合分子(例如CD16A/BCMA抗原结合分子或包含CD16A/BCMA抗原结合分子的药物组合物)将作为二线(2L)或三线(3L)疗法。例如,但不限于此,此类二线或三线施用将在已经接受了通过基于Fc的MOA起作用的治疗(例如达雷木单抗治疗)的受试者中进行。在某些实施例中,此类二线或三线治疗将在对达雷木单抗治疗效果不佳或有耐药性的受试者中进行。

[0327] 在某些实施例中,使用以下标准中的一项或多项来选择用于治疗多发性骨髓瘤的NK细胞接合剂:

[0328] • NK细胞接合剂能够结合两个靶标:NK细胞上的CD16A,以及多发性骨髓瘤细胞上的BCMA,

[0329] • NK细胞接合剂对于CD16A至少是二价的,例如,包含至少两个CD16A抗原结合部分,

[0330] • NK细胞接合剂是不与CD16B交叉反应,且优选地与非人灵长类动物交叉反应的NK细胞双特异性抗体,

[0331] • NK细胞接合剂有效且普遍,并且具有靶标依赖性体外杀伤$BCMA^{+}$肿瘤细胞(例如,EC50≤5nM时,杀伤≥约60%的细胞)和原发性骨髓瘤的能力,

[0332] • NK细胞接合剂不会显著杀伤NK细胞,例如,减少或避免NK细胞同类杀伤,

[0333] • NK细胞接合剂具有可接受的安全特性,例如,具有优于其他T细胞接合剂的体外细胞因子释放特性(例如,NK细胞接合剂缺乏CRS),不良事件是可监测的、可控制的和可逆的,

[0334] • NK细胞接合剂可静脉内施用于多发性骨髓瘤患者,并且

[0335] • NK细胞接合剂需要每周一次(QW)或更少的施用频率。

[0336] 在某些实施例中,以下药效动力学(PD)生物标志物可与本公开的抗原结合蛋白的施用结合使用:血清M蛋白和游离轻链(FLC)的浓度、单克隆浆细胞的减少、治疗后骨髓样本中NK细胞的活化和募集,以及外周NK细胞活化。在某些实施例中,治疗方法可包括依赖于

BMCA的诊断，尽管根据多发性骨髓瘤中BMCA的高发病率，并不一定需要此类诊断。

[0337] VI.示例性实施例

[0338] 在某些实施例中，本公开涉及多特异性抗原结合蛋白，其包含(a)至少第一靶抗原结合部分，和(b)至少两个CD16A抗原结合部分，其中所述至少两个CD16A抗原结合部分与包含至少一个恒定结构域的Fab片段或Fc部分融合。在某些实施例中，所述两个CD16A抗原结合部分中的至少一者是选自由单链Fv(scFv)、单链双抗体(scDb)和双抗体Db组成的组的抗原结合分子。在某些实施例中，所述至少两个CD16A抗原结合部分中的每个是scFv。在某些实施例中，所述至少两个CD16A抗原结合部分为scDb形式。在某些实施例中，所述至少两个CD16A抗原结合部分中的每个包含在多肽链中一个接一个地连接的轻链可变区(V_L)和重链可变区(V_H)，并且在所述多肽链的N末端的所述可变区是V_L。在某些实施例中，所述多肽链中的所述至少两个CD16A抗原结合部分的所述可变区从N末端到C末端以V_L-V_H、V_L-V_L-V_H-V_H或V_L-V_H-V_L-V_H的次序定位。在某些实施例中，所述多肽链中的所述至少两个CD16A抗原结合部分的所述可变区从N末端到C末端以V_L-V_H的次序定位。在某些实施例中，所述多肽链中的所述至少两个CD16A抗原结合部分的可变区从N末端到C末端以V_L-V_H-V_L-V_H的次序定位。在某些实施例中，(i)所述多肽链的C末端与所述Fc部分的CH2结构域的N末端融合；或者(ii)所述多肽链的C末端与所述Fc部分的铰链的N末端融合；(iii)所述多肽链的N末端与所述Fc部分的CH3结构域的C末端融合，或者(iv)所述多肽链的N末端与Fab片段的C末端融合。在某些实施例中，所述多肽链的N末端与所述Fc部分的CH3结构域的C末端融合。在某些实施例中，所述Fc部分选自由单体CH2-CH3片段、异二聚体Fc区和同二聚体Fc区组成的组。在某些实施例中，所述Fc部分不与Fc-γ受体结合，而是保持与新生儿Fc受体结合。在某些实施例中，包含两个CD16抗原结合部分的scDb或Db与所述Fab片段的一条链的C末端融合，而所述第一靶抗原结合部分与所述Fab片段的另一条链的C末端融合。在某些实施例中，所述Fab片段在N末端处包含结合HSA抗原的Fv。

[0339] 在某些实施例中，本文所述的抗原结合蛋白是四价的。

[0340] 在某些实施例中，本文所述的多特异性抗原结合蛋白包含至少两个靶抗原结合部分。

[0341] 在某些实施例中，本文所述的多特异性抗原结合蛋白包含与二聚体Fc部分融合的第一靶抗原结合部分、第二靶抗原结合部分和至少两个CD16A抗原结合部分。

[0342] 在某些实施例中，本文所述的多特异性抗原结合蛋白包含与IgG的每条重链的C末端融合的CD16A抗原结合部分，并且其中所述IgG在N末端处包含在所述两个Fab中的每个中的第一靶抗原结合Fv部分，而第二靶抗原结合部分在C末端处与所述CL结构域中的每个融合。

[0343] 在某些实施例中，本文所述的CD16A抗原结合部分包含：(i)重链可变区，所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列的CDR1；具有SEQ ID NO:51中所示的氨基酸序列的CDR2；以及具有SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列的CDR3，和/或(ii)轻链可变区，所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:53中所示的氨基酸序列的CDR1；具有SEQ ID NO:54中所示的氨基酸序列的CDR2；以及具有SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0344] 在某些实施例中，本文所述的多特异性抗原结合蛋白包含CD16A抗原结合部分，所述CD16A抗原结合部分包含：(i)重链可变区，所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:73中所

示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的CDR3,和/或(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0345] 在某些实施例中,本文所述的多特异性抗原结合蛋白包含CD16A抗原结合部分,所述CD16A抗原结合部分包含(i)重链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少约80%同源或一致的氨基酸序列,和/或(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列至少约80%同源或一致的氨基酸序列。

[0346] 在某些实施例中,本文所述的多特异性抗原结合蛋白包含CD16A抗原结合部分,所述CD16A抗原结合部分包含(i)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列,和/或(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。

[0347] 在某些实施例中,本文所述的多特异性抗原结合蛋白与选自BCMA和EGFR的第一靶抗原结合。在某些实施例中,本文所述的多特异性抗原结合蛋白与是BCMA的第一靶抗原结合。

[0348] 在某些实施例中,本文所述的多特异性抗原结合蛋白包含四聚体,所述四聚体包含具有SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:63中所示的氨基酸序列的第一多肽链和具有SEQ ID NO:62或SEQ ID NO:64中所示的氨基酸序列的第二多肽链。在某些实施例中,本文所述的多特异性抗原结合蛋白包含四聚体,所述四聚体包含选自以下项的第一和第二多肽:(i)具有SEQ ID NO:61中所示的氨基酸序列的第一多肽和具有SEQ ID NO:62中所示的氨基酸序列的第二多肽;(ii)具有SEQ ID NO:61中所示的氨基酸序列的第一多肽和具有SEQ ID NO:64中所示的氨基酸序列的第二多肽;(iii)具有SEQ ID NO:63中所示的氨基酸序列的第一多肽和具有SEQ ID NO:62中所示的氨基酸序列的第二多肽;以及(iv)具有SEQ ID NO:63中所示的氨基酸序列的第一多肽和具有SEQ ID NO:64中所示的氨基酸序列的第二多肽。

[0349] 在某些实施例中,本文所述的多特异性抗原结合蛋白包含BCMA抗原结合部分,所述BCMA抗原结合部分包含:(i)重链可变区,所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列的CDR3,和/或(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0350] 在某些实施例中,本文所述的多特异性抗原结合蛋白包含BCMA抗原结合部分,所述BCMA抗原结合部分包含:(i)重链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列至少约80%同源或一致的氨基酸序列,和/或(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列至少约80%同源或一致的氨基酸序列。

[0351] 在某些实施例中,本文所述的多特异性抗原结合蛋白包含BCMA抗原结合部分,所述BCMA抗原结合部分包含:(i)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列,和/或(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列。

[0352] 在某些实施例中,本文所述的多特异性抗原结合蛋白包含抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含:(i)CD16A抗原结合部分,其包含:(a)重链可变区,所述重链可变区包含具

有SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的CDR3,和(b)轻链可变区,所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的CDR3;和(ii)BCMA抗原结合部分,其包含:(a)重链可变区,所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列的CDR3,和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NQ:72中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0353] 在某些实施例中,本公开涉及包含如本文所述的多特异性抗原结合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0354] 在某些实施例中,描述了将本文所述的多特异性抗原结合蛋白用作药物。

[0355] 在某些实施例中,本公开涉及用于治疗或改善疾病的方法,所述方法包含向有需要的受试者施用如本文所述的多特异性抗原结合蛋白或如本文所述的药物组合物。在某些实施例中,所述疾病是癌症。在某些实施例中,所述疾病是血液学癌症。在某些实施例中,所述疾病是多发性骨髓瘤。

[0356] 在某些实施例中,本公开涉及治疗和/或预防受试者疾病的方法,所述方法包含向有需要的受试者施用如本文所述的双特异性抗原结合蛋白或如本文所述的药物组合物。在某些实施例中,静脉内施用所述多特异性抗原结合蛋白。在某些实施例中,皮下施用所述多特异性抗原结合蛋白。在某些实施例中,本文公开的方法包含施用第二疗法。在某些实施例中,所述第二疗法选自由以下项组成的组:包含抗PD-1抗体的疗法、包含抗PD-L1抗体的疗法、包含CD3双特异性抗体的疗法、包含抗TIGIT抗体的疗法、包含抗VEGF抗体的疗法,以及包含抗FcRH5抗体的疗法。在某些实施例中,所述第二疗法是细胞因子疗法。在某些实施例中,所述细胞因子疗法包含施用选自以下项组成的组的细胞因子:IL-15、IL-2、IL-12、IL-21和IL6。在某些实施例中,所述细胞因子疗法包含施用IL-2。在某些实施例中,所述细胞因子疗法包含施用IL-15。

[0357] 在某些实施例中,如本文所述接受治疗的受试者是癌症患者。在某些实施例中,所述受试者是血液学癌症患者。在某些实施例中,所述受试者是多发性骨髓瘤患者。在某些实施例中,所述受试者是复发/难治性多发性骨髓瘤患者。在某些实施例中,受试者已接受抗CD38疗法。在某些实施例中,受试者已接受达雷木单抗。在某些实施例中,所述受试者是未使用过达雷木单抗的、抗达雷木单抗的、达雷木单抗难治的或达雷木单抗复发的。在某些实施例中,所述受试者是抗达雷木单抗的、达雷木单抗难治性的或达雷木单抗复发的。在某些实施例中,所述受试者表达CD16A多态性。在某些实施例中,所述CD16A多态性是CD16A-158V/F多态性。

[0358] 在某些实施例中,本公开涉及双特异性抗原结合蛋白,其包含(a)至少一个BCMA结合部分,和(b)至少两个CD16A抗原结合部分,其中所述至少两个CD16A抗原结合部分部分与包含至少一个恒定结构域的Fab片段或Fc部分融合。在某些实施例中,所述两个CD16A抗原结合部分中的至少一者是选自由单链Fv(scFv)、单链双抗体(scDb)和双抗体Db组成的组的抗原结合分子。在某些实施例中,所述至少两个CD16A抗原结合部分中的每个是scFv。在某

些实施例中，所述至少两个CD16A抗原结合部分为scDb形式。在某些实施例中，所述至少两个CD16A抗原结合部分中的每个包含在多肽链中一个接一个地连接的轻链可变区(V_L)和重链可变区(V_H)，并且在所述多肽链的N末端的所述可变区是V_L。在某些实施例中，所述多肽链中的所述至少两个CD16A抗原结合部分的所述可变区从N末端到C末端以V_L-V_H、V_L-V_L-V_H-V_H或V_L-V_H-V_L-V_H的次序定位。

[0359] 在某些实施例中，所述多肽链中的所述至少两个CD16A抗原结合部分的所述可变区从N末端到C末端以V_L-V_H的次序定位。在某些实施例中，所述多肽链中的所述至少两个CD16A抗原结合部分的可变区从N末端到C末端以V_L-V_H-V_L-V_H的次序定位。

[0360] 在某些实施例中，本公开涉及双特异性抗原结合蛋白，其中：(i)所述多肽链的C末端与所述Fc部分的CH2结构域的N末端融合；或者(ii)所述多肽链的C末端与所述Fc部分的铰链的N末端融合；(iii)所述多肽链的N末端与所述Fc部分的CH3结构域的C末端融合，或者(iv)所述多肽链的N末端与Fab片段的C末端融合。在某些实施例中，所述多肽链的N末端与所述Fc部分的CH3结构域的C末端融合。在某些实施例中，所述Fc部分选自由单体CH2-CH3片段、异二聚体Fc区和同二聚体Fc区组成的组。在某些实施例中，所述Fc部分不与Fc-γ受体结合，而是保持与新生儿Fc受体结合。在某些实施例中，所述Fc部分包含至少一个无效应子突变。在某些实施例中，所述至少一个无效应子突变选自由以下项组成的组：C220S、C229S、E233P、L234A、L234V、L234F、L235A、L235E、P238S、D265A、N297A、N297Q和P331S。在某些实施例中，所述至少一个无效应子突变选自由以下项组成的组L234A、L234V、L234F、L235A、L235E、P238S和D265A。在某些实施例中，所述至少一个无效应子突变选自由以下项组成的组L234F、L235E和D265A。在某些实施例中，所述Fc部分具有两个无效应子突变。在某些实施例中，所述两个无效应子突变是L234F和L235E。在某些实施例中，所述Fc部分具有三个无效应子突变。在某些实施例中，所述三个无效应子突变是L234F、L235E和D265A。

[0361] 在某些实施例中，本公开的双特异性抗原结合蛋白包含与Fc部分融合的至少两个CD16A抗原结合部分。在某些实施例中，本公开的双特异性抗原结合蛋白包含两靶向BCMA的部分。在某些实施例中，本公开的双特异性抗原结合蛋白包含两个CD16A抗原结合部分和两个靶向BCMA的部分。在某些实施例中，两个CD16A抗原结合部分中的每个与IgG的每条重链的C末端融合，而两个靶向BCMA的部分中的每个与IgG的N末端融合。

[0362] 在某些实施例中，本公开的双特异性抗原结合蛋白包含具有图13所示结构的双特异性抗原结合蛋白。在某些此类实施例中，所述双特异性抗原结合蛋白包含一个靶向BCMA的部分。在某些此类实施例中，所述靶向BCMA的部分与所述Fc部分的N末端融合，所述Fc部分与所述至少两个CD16A抗原结合部分融合。

[0363] 在某些实施例中，所述双特异性抗原结合蛋白具有图5所示的结构。

[0364] 在某些实施例中，本公开的双特异性抗原结合蛋白包含CD16A抗原结合部分，所述CD16A抗原结合部分包含：(i)重链可变区，所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列的CDR1；具有SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列的CDR2；具有SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列的CDR3，和/或(ii)轻链可变区，所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:53中所示的氨基酸序列的CDR1；具有SEQ ID NO:54中所示的氨基酸序列的CDR2；以及具有SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列的CDR3。在某些实施例中，所述重链可变区CDR2具有SEQ ID NO:51中所示的氨基酸序列。在某些实施例中，所述重链可变区CDR2具

有SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列。

[0365] 在某些实施例中,本公开的双特异性抗原结合蛋白包含CD16A抗原结合部分,所述CD16A抗原结合部分包含:(i)重链可变区,所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的CDR3,和/或(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的CDR3。在某些实施例中,所述CD16A抗原结合部分包含(i)重链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少约80%同源或一致的氨基酸序列,和/或(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列至少约80%同源或一致的氨基酸序列。在某些实施例中,所述CD16A抗原结合部分包含(i)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列,和/或(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。

[0366] 在某些实施例中,本公开的双特异性抗原结合蛋白包含BCMA抗原结合部分,所述BCMA抗原结合部分包含:(i)重链可变区,所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列的CDR3,和/或(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列的CDR3。在某些实施例中,所述BCMA抗原结合部分包含(i)重链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列至少约80%同源或一致的氨基酸序列,和/或(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列至少约80%同源或一致的氨基酸序列。在某些实施例中,所述BCMA抗原结合部分包含(i)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列,和/或(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列。

[0367] 在某些实施例中,本发明的双特异性抗原结合蛋白包含两个CD16A抗原结合部分和两个靶向BCMA的部分,其中:(a)所述CD16A抗原结合部分中的每个包含:具有SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列的V_HCDR1、具有SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的V_HCDR2、具有SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的V_HCDR3、具有SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的V_LCDR1、具有SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的V_LCDR2和具有SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的V_LCDR3;和(b)所述靶向BCMA的部分中的每个包含:具有SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列的V_HCDR1、具有SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列的V_HCDR2、具有SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列的V_HCDR3、具有SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列的V_LCDR1、具有SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列的V_LCDR2和具有SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列的V_LCDR3。在某些实施例中,(a)所述CD16A抗原结合部分中的每个包含具有SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的轻链可变区;(b)所述靶向BCMA的部分中的每个包含具有SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列的重链可变区,和(ii)具有SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0368] 在某些实施例中,本公开的双特异性抗原结合蛋白是四聚体,所述四具体包含具有SEQ ID NO:61中所示的氨基酸序列的第一多肽和具有SEQ ID NO:62中所示的氨基酸序列的第二多肽。在某些实施例中,本公开的双特异性抗原结合蛋白是四聚体,所述四具体包

含具有SEQ ID NO:63中所示的氨基酸序列的第一多肽和具有SEQ ID NO:64中所示的氨基酸序列的第二多肽。

[0369] 在某些实施例中,本公开的双特异性抗原结合蛋白包含两个CD16A抗原结合部分和两个BCMA抗原结合部分,其中:(i)所述CD16A抗原结合部分各自包含:(a)重链可变区,所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的CDR3,和(b)轻链可变区,所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的CDR3;和(ii)所述BCMA抗原结合部分各自包含:(a)重链可变区,所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列的CDR3,和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0370] 在某些实施例中,本公开涉及包含如本文所述的双特异性抗原结合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物。在某些实施例中,所述药物组合物用作药物。

[0371] 在某些实施例中,本公开涉及治疗和/或预防疾病的方法,所述方法包含施用如本文所述的双特异性抗原结合蛋白或药物组合物。在某些实施例中,所述疾病是癌症。在某些实施例中,所述疾病是血液学癌症。在某些实施例中,所述疾病是多发性骨髓瘤。在某些实施例中,静脉内施用所述双特异性抗原结合蛋白。在某些实施例中,皮下施用所述双特异性抗原结合蛋白。在某些实施例中,所述双特异性抗原结合蛋白与第二疗法一起施用。在某些实施例中,所述第二疗法选自由以下项组成的组:包含抗PD-1抗体的疗法、包含抗PD-L1抗体的疗法、包含CD3双特异性抗体的疗法、包含抗TIGIT抗体的疗法、包含抗VEGF抗体的疗法,以及包含抗FcRH5抗体的疗法。在某些实施例中,所述第二疗法是细胞因子疗法。在某些实施例中,所述细胞因子疗法为施用选自由以下项组成的组的细胞因子:IL-15、IL-2、IL-12、IL-21、IL-17、IL-18、IL-23、IL-27和IL-6。在某些实施例中,所述细胞因子是IL-15。在某些实施例中,所述细胞因子是IL-2。在某些实施例中,所述受试者是癌症患者。在某些实施例中,所述受试者是血液学癌症患者。在某些实施例中,所述受试者是多发性骨髓瘤患者。在某些实施例中,所述受试者是复发/难治性多发性骨髓瘤患者。在某些实施例中,受试者已接受抗CD38疗法。在某些实施例中,受试者已接受达雷木单抗。在某些实施例中,所述受试者是未使用过达雷木单抗的、抗达雷木单抗的、达雷木单抗难治的或达雷木单抗复发的。在某些实施例中,所述受试者是抗达雷木单抗的、达雷木单抗难治性的或达雷木单抗复发的。在某些实施例中,所述受试者表达CD16A多态性。在某些实施例中,所述CD16A多态性是CD16A-158V/F多态性。

[0372] 在某些实施例中,本公开涉及如本文所述的多特异性抗原结合蛋白或如本文所述的双特异性抗原结合蛋白,其中当向所述受试者施用所述多特异性抗原结合蛋白或双特异性抗原结合蛋白时,基本不耗尽或减少受试者的自然杀伤(NK)细胞群。

[0373] 在某些实施例中,本公开涉及治疗具有耗尽或减少的NK细胞群的受试者的方法,所述方法包含施用如本文所述的多特异性抗原结合蛋白或如本文所述的双特异性抗原结合蛋白。在某些实施例中,所述受试者先前已经用抗cd38疗法治疗。在某些实施例中,所述

抗cd38疗法是达雷木单抗疗法。

[0374] 在某些实施例中,本公开涉及双特异性抗原结合蛋白,其包含两个CD16A抗原结合部分和两个靶向BCMA的部分,其中所述两个CD16A抗原结合部分中的每个与IgG的每个重链的C末端融合,而所述两个靶向BCMA的部分中的每个与所述IgG的所述重链中的每个的N末端融合,并且其中:(i)所述CD16A抗原结合部分各自包含:(a)重链可变区,所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的CDR3,和(b)轻链可变区,所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的CDR3;和(ii)所述BCMA抗原结合部分各自包含:(a)重链可变区,所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列的CDR3,和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0375] 在某些实施例中,本公开涉及治疗受试者的癌症的方法,所述方法包含:向所述受试者施用双特异性抗原结合蛋白,所述双特异性抗原结合蛋白包含两个CD16A抗原结合部分和两个靶向BCMA的部分,其中所述两个CD16A抗原结合部分中的每个与IgG的每条重链的C末端融合,而所述两个靶向BCMA的部分中的每个与所述IgG的所述重链中的每个的N末端融合,并且其中:(i)所述CD16A抗原结合部分各自包含:(a)重链可变区,所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的CDR3,和(b)轻链可变区,所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的CDR3;和(ii)所述BCMA抗原结合部分各自包含:(a)重链可变区,所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列的CDR3,和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列的CDR3。在某些实施例中,所述癌症是多发性骨髓瘤。

[0376] 在某些实施例中,本公开涉及与或能够与CD16A和BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白,所述抗体或抗原结合蛋白包含:(i)第一重链可变区,所述第一重链可变区包含具有SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的CDR3,(ii)第一轻链可变区,所述第一轻链可变区包含具有SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的CDR3;(iii)第二重链可变区,所述第二重链可变区包含具有SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列的CDR3,和(iv)第二轻链可变区,所述第二轻链可变区包含具有SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列的CDR3。例如,在某些实施例中,与或能够与CD16A和BCMA结合的所述抗体或抗原

结合蛋白包含:(i)第一重链可变区,所述第一重链可变区包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列;(ii)第一轻链可变区,所述第一轻链可变区包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列;(iii)第二重链可变区,所述第二重链可变区包含SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列;(iv)第二轻链可变区,所述第二轻链可变区包含SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列;(v)第一重链可变区,所述第一重链可变区包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列,以及第一轻链可变区,所述第一轻链可变区包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列;(vi)第二重链可变区,所述第二重链可变区包含SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列,以及第二轻链可变区,所述第二轻链可变区包含SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列;或(vii)第一重链可变区,所述第一重链可变区包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列;第一轻链可变区,所述第一轻链可变区包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列;第二重链可变区,所述第二重链可变区包含SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列,以及第二轻链可变区,所述第二轻链可变区包含SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列。在某些实施例中,如本文所述的与或能够与CD16A和BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白不与CD16B结合。在某些实施例中,当向所述受试者施用如本文所述的与或能够与CD16A和BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白时,基本上不耗尽或减少受试者的自然杀伤(NK)细胞群。在某些实施例中,如本文所述的与或能够与CD16A和BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白与人CD16A结合。在某些实施例中,如本文所述的与或能够与CD16A和BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白与人BCMA结合。

[0377] 在某些实施例中,本公开涉及药物组合物,所述药物组合物包含如本文所述的与或能够与CD16A和BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白,以及药学上可接受的载体。

[0378] 在某些实施例中,如本文所述的与或能够与CD16A和BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白用作药物。

[0379] 143.在某些实施例中,本公开涉及治疗和/或预防疾病的方法,其中所述方法包含向有需要的受试者施用如本文所述的与或能够与CD16A和BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白,或者施用包含如本文所述的与或能够与CD16A和BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白的所述药物组合物。在某些实施例中,所述疾病是癌症。在某些实施例中,所述疾病是血液学癌症。在某些实施例中,所述疾病是多发性骨髓瘤。在某些实施例中,静脉内施用所述抗体或抗原结合蛋白。在某些实施例中,皮下施用所述抗体或抗原结合蛋白。在某些实施例中,本公开涉及治疗和/或预防疾病的方法,其中所述方法包含施用如本文所述的与或能够与CD16A和BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白,或者施用包含如本文所述的与或能够与CD16A和BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白的所述药物组合物;包含施用第二疗法。在某些实施例中,所述第二疗法选自由以下项组成的组:包含抗PD-1抗体的疗法、包含抗PD-L1抗体的疗法、包含CD3双特异性抗体的疗法、包含抗TIGIT抗体的疗法、包含抗VEGF抗体的疗法,以及包含抗FcRH5抗体的疗法。在某些实施例中,所述第二疗法是细胞因子疗法。在某些实施例中,所述细胞因子疗法为施用选自由以下项组成的组的细胞因子:IL-15、IL-2、IL-12、IL-21、IL-17、IL-18、IL-23、IL-27和IL-6。在某些实施例中,所述细胞因子是IL-15。在某些实施例中,所述细胞因子是IL-2。在某些实施例中,所述受试者是癌症患者。在某些实施例中,所述受试者是血液学癌症患者。在某些实施例中,所述受试者是多发性骨髓瘤患者。在某些实施例中,所述受试者是复发/难治性多发性骨髓瘤患者。在某些实施例中,受试者已接受抗CD38疗法。在某些实施例中,受试者已接受达雷木单抗。在某些实施例中,所述受试者是未使用

过达雷木单抗的、抗达雷木单抗的、达雷木单抗难治的或达雷木单抗复发的。在某些实施例中，所述受试者是抗达雷木单抗的、达雷木单抗难治性的或达雷木单抗复发的。在某些实施例中，所述受试者表达CD16A多态性。在某些实施例中，所述CD16A多态性是CD16A-158V/F多态性。

[0380] 在某些实施例中，本公开涉及治疗具有耗尽或减少的NK细胞群的受试者的方法，所述方法包含施用如本文所述的与或能够与CD16A和BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白，或者施用包含如本文所述的与或能够与CD16A和BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白的药物组合物。在某些实施例中，所述受试者先前已经用抗CD38疗法治疗。在某些实施例中，所述抗CD38疗法是达雷木单抗疗法。

[0381] 在某些实施例中，本公开涉及抗体或抗原结合蛋白，所述抗体或抗原结合蛋白包含至少一个与或能够与CD16A结合的臂，以及至少一个与或能够与BCMA结合的臂，其中：(i)所述至少一个与或能够与CD16A结合的臂包含：(a)重链可变区，所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列的CDR1；具有SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的CDR2；以及具有SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的CDR3，和(b)轻链可变区，所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的CDR1；具有SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的CDR2；以及具有SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的CDR3；和(ii)所述至少一个与或能够与BCMA结合的臂包含：(a)重链可变区，所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列的CDR1；具有SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列的CDR2；以及具有SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列的CDR3，和(ii)轻链可变区，所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列的CDR1；具有SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列的CDR2；以及具有SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列的CDR3。在某些此类实施例中，所述至少一个与或能够与CD16A结合的臂不同于所述至少一个与或能够与BCMA结合的臂。在某些此类实施例中：(i)所述至少一个与或能够与CD16A结合的臂包含重链可变区，所述重链可变区包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列；(ii)所述至少一个与或能够与CD16A结合的臂包含轻链可变区，所述轻链可变区包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列；(iii)所述至少一个与或能够与BCMA结合的臂包含重链可变区，所述重链可变区包含SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列；(iv)所述至少一个与或能够与BCMA结合的臂包含轻链可变区，所述轻链可变区包含SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列；(v)所述至少一个与或能够与CD16A结合的臂包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列，所述轻链可变区包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列；(vi)所述至少一个与或能够与BCMA结合的臂包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列，所述轻链可变区包含SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列；或(vii)所述至少一个与或能够与CD16A结合的臂包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列，所述轻链可变区包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列；而所述至少一个与或能够与BCMA结合的臂包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列，所述轻链可变区包含SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列。在某些此类实施例中，所述抗体或抗原结合蛋白不与CD16B结合。在某些此类实施例中，当向所述受试者施用所述抗体或抗原结合蛋白时，基本上不耗尽或减少受试者的自然杀伤(NK)细胞群。在某些此类实施例中，所述抗体或抗原结合蛋白与人CD16A结合。在某些此类实施例中，

所述抗体或抗原结合蛋白与人BCMA结合。

[0382] 在某些实施例中，本公开涉及药物组合物，所述药物组合物包含抗体或抗原结合蛋白，所述抗体或抗原结合蛋白包含如本文所公开的至少一个与或能够与CD16A结合的臂和至少一个与或能够与BCMA结合的臂，以及药学上可接受的载体。

[0383] 在某些实施例中，本公开涉及用作药物的抗体或抗原结合蛋白，所述抗体或抗原结合蛋白包含至少一个与或能够与CD16A结合的臂和至少一个与或能够与BCMA结合的臂。

[0384] 在某些实施例中，本公开涉及治疗和/或预防疾病的方法，所述方法包含：向有需要的受试者施用抗体或抗原结合蛋白，所述抗体或抗原结合蛋白包含如本文所述的至少一个与或能够与CD16A结合的臂和至少一个与或能够与BCMA结合的臂，或者施用包含此类抗体或抗原结合蛋白的药物组合物。在某些实施例中，所述疾病是癌症。在某些实施例中，所述疾病是血液学癌症。在某些实施例中，所述疾病是多发性骨髓瘤。在某些实施例中，静脉内施用所述抗体或抗原结合蛋白。在某些实施例中，皮下施用所述抗体或抗原结合蛋白。在某些实施例中，所述治疗和/或预防疾病的方法，所述方法包含：向有需要的受试者施用抗体或抗原结合蛋白，所述抗体或抗原结合蛋白包含如本文所述的至少一个与或能够与CD16A结合的臂和至少一个与或能够与BCMA结合的臂，或者施用包含此类抗体或抗原结合蛋白的药物组合物；包含施用第二疗法。在某些实施例中，所述第二疗法选自由以下项组成的组：包含抗PD-1抗体的疗法、包含抗PD-L1抗体的疗法、包含CD3双特异性抗体的疗法、包含抗TIGIT抗体的疗法、包含抗VEGF抗体的疗法，以及包含抗FcRH5抗体的疗法。在某些实施例中，所述第二疗法是细胞因子疗法。在某些实施例中，所述细胞因子疗法为施用选自由以下项组成的组的细胞因子：IL-15、IL-2、IL-12、IL-21、IL-17、IL-18、IL-23、IL-27和IL-6。在某些实施例中，所述细胞因子是IL-15。在某些实施例中，所述细胞因子是IL-2。在某些实施例中，所述受试者是癌症患者。在某些实施例中，所述受试者是血液学癌症患者。在某些实施例中，所述受试者是多发性骨髓瘤患者。在某些实施例中，所述受试者是复发/难治性多发性骨髓瘤患者。在某些实施例中，受试者已接受抗CD38疗法。在某些实施例中，受试者已接受达雷木单抗。在某些实施例中，所述受试者是未使用过达雷木单抗的、抗达雷木单抗的、达雷木单抗难治的或达雷木单抗复发的。在某些实施例中，所述受试者是抗达雷木单抗的、达雷木单抗难治性的或达雷木单抗复发的。在某些实施例中，所述受试者表达CD16A多态性。在某些实施例中，所述CD16A多态性是CD16A-158V/F多态性。在某些实施例中，所述方法包含治疗具有耗尽或减少的NK细胞群的受试者。在某些实施例中，所述受试者先前已经用抗CD38疗法治疗。在某些实施例中，所述抗CD38疗法是达雷木单抗疗法。

[0385] 在某些实施例中，本公开涉及与或能够与BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白，所述抗体或抗原结合蛋白包含：(i)重链可变区，所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列的CDR1；具有SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列的CDR2；以及具有SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列的CDR3，和(ii)轻链可变区，所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列的CDR1；具有SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列的CDR2；以及具有SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列的CDR3。在某些实施例中，所述BCMA是人BCMA。在某些实施例中，所述抗体或抗原结合蛋白包含至少一个与或能够与CD16A结合的臂。在某些实施例中，所述CD16A是人CD16A。在某些此类实施例中，所述至少一个与或能够与CD16A结合的臂包含：(i)重链可变区，所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列的

CDR1;具有SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的CDR3,和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的CDR3。在某些此类实施例中,所述与或能够与BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白包含:(i)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列;(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列;(iii)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列;(iv)轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列;(v)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列,以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列;(vi)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列,以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列;或(vii)第一重链可变区,所述第一重链可变区包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列,第一轻链可变区,所述第一轻链可变区包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列;以及第二重链可变区,所述第二重链可变区包含SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列,和第二链可变区,所述第二链可变区包含SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列。

[0386] 在某些实施例中,本公开涉及药物组合物,所述药物组合物包含如本文所公开的与或能够与BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白,以及药学上可接受的载体。

[0387] 在某些实施例中,本公开涉及如本文所公开的用作药物的与或能够与BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白。

[0388] 在某些实施例中,本公开涉及治疗和/或预防疾病的方法,所述方法包含向有需要的受试者施用与或能够与BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白,或者施用包含与或能够与BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白的药物组合物。在某些实施例中,所述疾病是癌症。在某些实施例中,所述疾病是血液学癌症。在某些实施例中,所述疾病是多发性骨髓瘤。在某些实施例中,静脉内施用所述抗体或抗原结合蛋白。在某些实施例中,皮下施用所述抗体或抗原结合蛋白。在某些实施例中,治疗和/或预防疾病的方法,所述方法包含向有需要的受试者施用与或能够与BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白,或者施用包含与或能够与BCMA结合的抗体或抗原结合蛋白的药物组合物;包含施用第二疗法。在某些实施例中,所述第二疗法选自由以下项组成的组:包含抗PD-1抗体的疗法、包含抗PD-L1抗体的疗法、包含CD3双特异性抗体的疗法、包含抗TIGIT抗体的疗法、包含抗VEGF抗体的疗法,以及包含抗FcRH5抗体的疗法。在某些实施例中,所述第二疗法是细胞因子疗法。在某些实施例中,所述细胞因子疗法为施用选自由以下项组成的组的细胞因子:IL-15、IL-2、IL-12、IL-21、IL-17、IL-18、IL-23、IL-27和IL-6。在某些实施例中,所述细胞因子是IL-15。在某些实施例中,所述细胞因子是IL-2。在某些实施例中,所述受试者是癌症患者。在某些实施例中,所述受试者是血液学癌症患者。在某些实施例中,所述受试者是多发性骨髓瘤患者。在某些实施例中,所述受试者是复发/难治性多发性骨髓瘤患者。在某些实施例中,受试者已接受抗CD38疗法。在某些实施例中,受试者已接受达雷木单抗。在某些实施例中,所述受试者是未使用过达雷木单抗的、抗达雷木单抗的、达雷木单抗难治的或达雷木单抗复发的。在某些实施例中,所述受试者是抗达雷木单抗的、达雷木单抗难治性的或达雷木单抗复发的。在某些实施例中,所述受试者表达CD16A多态性。在某些实施例中,所述CD16A多态性是CD16A-158V/F多态性。在某些实施例

中,将所述抗体或抗原结合蛋白施用于具有耗尽或减少的NK细胞群的受试者。在某些实施例中,所述受试者先前已经用抗CD38疗法治疗。在某些实施例中,所述抗CD38疗法是达雷木单抗疗法。

[0389] 实例

[0390] 实例1:构建BCMA抗原结合部分

[0391] 为了构建抗原结合部分,可以通过在丝状融合噬菌体上表达和显示单链Fv结构域(scFv),然后通过淘选重组靶抗原或靶抗原阳性细胞来富集编码scFv显示靶标结合的噬菌体颗粒,从人抗体库中分离与所选靶抗原选择性结合的抗体片段,例如,如Smith GP(Science,1985,228:1315-7)和Clackson等人(Nature,1991,352:624-8)所述。为了分离结合BCMA的抗体片段,重组人BCMA(1-54)-Fc、食蟹猴BCMA(1-53)-Fc和CHO细胞稳定表达细胞表面锚定的人BCMA(1-54)或融合至人CD3zeta的跨膜区和胞质结构域的食蟹猴BCMA(1-53)可用于后续淘选循环,以富集结合的噬菌体颗粒。为此,将噬菌体颗粒与重组Fc融合抗原在溶液中孵育,例如,在室温下孵育2小时,然后用蛋白G包被的磁珠捕获并在PBS-Tween和PBS中洗涤以除去未结合的噬菌体。用甘氨酸洗脱结合的噬菌体。为了在靶抗原表达细胞上富集结合的噬菌体,将噬菌体与稳定转染的CHO细胞一起孵育,例如,在室温下孵育1小时,然后用细胞培养基洗涤并用甘氨酸洗脱结合的噬菌体。为了减少与Fc或未转染的CHO细胞选择性结合的编码抗体片段的噬菌体颗粒的富集,将噬菌体池与无关的Fc融合抗原或靶抗原阴性的CHO细胞一起孵育。在任一轮淘选和洗脱结合的噬菌体之后,将洗脱的噬菌体颗粒用于感染大肠杆菌(XL1 Blue),并增殖噬菌体和编码scFv的DNA。经过反复的噬菌体淘选和富集的噬菌体克隆的繁殖,使用标准的分子生物学技术从大肠杆菌中分离DNA并将其再克隆到细菌表达载体(例如pSKK2)中,用于随后在大肠杆菌中产生His标记的(SEQ ID NO:59)scFv抗体片段并制备细菌周质提取物。采用筛选方法(诸如ELISA或流式细胞术)对包含scFv抗体片段的周质提取物进行筛选,以评估靶抗原结合。例如,重组人BCMA(1-54)-Fc或食蟹猴BCMA(1-53)-Fc与包被在标准ELISA微孔板上的抗人Fc抗体结合,然后与细菌周质提取物一起孵育并充分洗涤。使用抗His-HRP缀合物检测scFv结合。为了评估scFv与细胞表达的BCMA的结合,将细菌周质提取物与表达细胞表面锚定的人或食蟹猴BCMA的重组CHO细胞一起孵育,然后通过流式细胞术使用抗His-R-PE洗涤并检测结合的scFv。从各个细菌克隆中分离编码与人和/或食蟹猴BCMA抗原选择性结合的scFv抗体片段的质粒,并通过DNA测序进行分析以获得编码scFv的DNA序列。例如,已经获得了具有如SEQ ID NO:39中所表示的氨基酸序列的BCMA抗原结合部分,其中VH在SEQ ID NO:37中表示,而VL在SEQ ID NO:38中表示。

[0392] 实例2:生成不同的抗原结合蛋白支架

[0393] 2.1scDb-mFc(图1和图2):

[0394] scDb-mFc是指抗原结合蛋白,其为单体并包含与单体Fc部分融合的scDb形式的二价CD16A抗原结合部分。由两个CD16A抗原结合部分组成的scDb与Fc部分的N末端融合,所述Fc部分由一个变体CH2-CH3多肽和一个scFv组成,所述scFv由与Fc部分的C末端融合的单个靶抗原结合部分组成(图1),或者由两个CD16A抗原结合部分组成的scDb与Fc部分的C末端融合,所述Fc部分由一个变体CH2-CH3多肽和一个scFv组成,所述scFv由与Fc部分的N末端融合的单个靶抗原结合部分组成(图2)。

[0395] 为了在CHO细胞中表达scDb-mFc抗原结合蛋白，将该分子的编码序列克隆到哺乳动物表达载体系统中。简而言之，编码抗TAA(Tumor associated Antigen，肿瘤相关抗原)Fv结构域和抗CD16A Fv结构域(SEQ ID NO:1-13)的基因序列，为scFv形式，由scFv中编码短肽接头(SEQ ID NO:16-18)的基因序列连接，由Thermo Fisher Scientific/Invitrogen GeneArt(德国雷根斯堡)合成。使用相应的引物生成不同可变结构域的和包含沉默点突变(SEQ ID NO:30)的单体Fc部分的PCR扩增子。然后，将不同的重叠DNA片段和线性化的骨架载体结合在一个等温反应中。将scDb-mFc表达构建体设计为分别包含用于促进抗体分泌的N末端信号肽和用于促进抗体分泌和纯化的Fc部分的编码序列。通过使用定制引物在GATC(德国科隆)进行DNA测序，确认了所有构建体的序列。克隆scDb-mFc的表达盒，使抗CD16A结构域位于单体Fc部分的N末端或C末端，并通过连接物序列(SEQ ID NO:19-22)按以下可能的顺序连接：

[0396] 1.)VL(CD16A)-L1-VH(CD16A)-L2-VL(CD16A)-L1-VH(CD16A)

[0397] 2.)VH(CD16A)-L1-VL(CD16A)-L3-VH(CD16A)-L1-VL(CD16A)

[0398] 3.)VL(CD16A)-L4-VL(CD16A)-L3-VH(CD16A)-L4-VH(CD16A)

[0399] 4.)VH(CD16A)-L4-VH(CD16A)-L2-VL(CD16A)-L4-VL(CD16A)

[0400] 在抗原结合蛋白scDb-mFc_01、scDb-mFc_02、scDb-mFc_05和scDb-mFc_06的结构中，SEQ ID NO:16用于接头L1，SEQ ID NO:17用于接头L2，SEQ ID NO:18用于L3。在抗原结合蛋白scDb-mFc_03、scDb-mFc_04、_scDb-mFc_07和scDb-mFc_08的结构中，SEQ ID NO:60用于接头L4，SEQ ID NO:17用于接头L2，SEQ ID NO:18用于L3。

[0401] 2.2KiH-scDb-Fc(图3-6)：

[0402] KiH-scDb-Fc抗原结合蛋白是异二聚体，并包含与异二聚体(KiH)Fc部分融合的scDb形式的二价CD16A抗原结合部分。单个靶抗原结合部分由scFv提供。

[0403] 编码KiH-scDb-Fc的DNA表达构建体是通过将抗CD16A Fv结构域(SEQ ID NO:1-13)的编码序列克隆到修饰的哺乳动物表达载体中而生成的，所述表达载体包含CMV控制的表达盒，所述表达盒包括具有Fc沉默和“旋钮插入孔”点突变(SEQ ID NO:31、32)的IgG1恒定结构域CH2和CH3，用于从同一载体中共表达两个基因盒。“旋钮插入孔”突变允许生成异二聚体三价双特异性(图3-5)或四价三特异性(图6)Fc融合构建体。之后，使用相应引物从编码抗TAA(Tumor associated Antigen，肿瘤相关抗原)Fv结构域的基因序列生成PCR扩增子。将生成的重叠DNA片段在相关位置插入到共表达载体中。所有需要的编码可变结构域和包含Fc沉默和“旋钮插入孔”点突变的恒定结构域的基因序列均由Thermo Fisher Scientific/Invitrogen GeneArt(德国雷根斯堡)合成。将KiH-scDb-Fc表达构建体设计为分别包含N末端信号肽、C标签和/或His标签(6xHis)的编码序列，以促进抗体分泌和纯化。通过使用定制引物在GATC(德国科隆)进行DNA测序，确认了所有构建体的序列。克隆KiH-scDb-Fc构建体的表达盒，使CD16A抗原结合部分位于异二聚体Fc部分的N末端，并通过连接物(SEQ ID NO:19-22)和铰链(SEQ ID NO:23)或中间铰链(SEQ ID NO:24)或异二聚体Fc部分的C末端连接，并仅按以下可能的顺序通过连接物(SEQ ID NO:19-22)连接：

[0404] 1.)VL(CD16A)-L1-VH(CD16A)-L2-VL(CD16A)-L1-VH(CD16A)

[0405] 2.)VH(CD16A)-L1-VL(CD16A)-L3-VH(CD16A)-L1-VL(CD16A)

[0406] 3.)VL(CD16A)-L4-VL(CD16A)-L3-VH(CD16A)-L4-VH(CD16A)

[0407] 4.)VH(CD16A)-L4-VH(CD16A)-L2-VL(CD16A)-L4-VL(CD16A)

[0408] SEQ ID NO:16用于接头L1,SEQ ID NO:17用于接头L2,SEQ ID NO:18用于接头L3,而SEQ ID NO:60用于接头L4。

[0409] 此类抗原结合蛋白的实例是KiH-scDb-Fc_08和KiH-scDb-Fc_12,其从N末端到C末端包含以下结构:

[0410] 第一多肽链V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-中间铰链-CH2-CH3和第二多肽链铰链-CH2-CH3-V_H(靶标)-V_L(靶标)(图3);或第一多肽链中间铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)和第二多肽V_H(靶标)-V_L(靶标)-铰链-CH2-CH3(图5)。

[0411] 2.3scDb-TriBs或scDb-TriBs-scFv

[0412] scDb-TriBs是一种三特异性抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白是包含CD16A-、靶标和HSA抗原结合部分的异二聚体Fab片段,其中所述抗原结合部分由两个与Fab片段的C末端融合的scDb提供(图7)或由包含两个CD16A抗原结合蛋白的scDb和包含与Fab片段的C末端融合的靶抗原结合部分的scFv提供(图8)。

[0413] 编码scDb-TriBs(-scFv)的DNA表达构建体是通过将抗HSA Fv结构域(SEQ ID NO:14、15)的编码序列克隆到修饰的哺乳动物表达载体中而生成的,所述表达载体包含CMV控制的表达盒,所述表达盒包括具有融合的仅重链和轻链恒定结构域(SEQ ID NO:33-35)的Fab部分,用于从同一载体共表达两个基因盒。之后,使用相应引物从编码抗TAA(Tumor associated Antigen,肿瘤相关抗原)Fv结构域和抗CD16A Fv结构域(SEQ ID NO:1-13)的基因序列生成PCR扩增子。将生成的重叠DNA片段在相关位置插入到共表达载体中。所有需要的编码可变结构域和仅Fab部分恒定结构域的基因序列均由Thermo Fisher Scientific/Invitrogen GeneArt(德国雷根斯堡)合成。将scDb-TriBs(-scFv)表达构建体设计为分别包含N末端信号肽、C标签和/或His标签(6xHis)的编码序列,以促进抗体分泌和纯化。通过使用定制引物在GATC(德国科隆)进行DNA测序,确认了所有构建体的序列。克隆scDb-TriBs(-scFv)构建体的表达盒,使抗CD16A结构域位于Fab的CL或CH1的C末端,并通过连接物(SEQ ID NO:19-22)按以下可能的顺序连接至Fab的重链或轻链:

[0414] 1.)VL(CD16A)-L1-VH(CD16A)-L2-VL(CD16A)-L1-VH(CD16A)

[0415] 2.)VL(CD16A)-L1-VL(CD16A)-L2-VH(CD16A)-L1-VH(CD16A)

[0416] 此类抗原结合蛋白的例子是scDb-TriB-scFv_01,其从N末端到C末端包含以下结构:第一多肽链V_H(HSA)-CH1-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)和第二多肽链V_L(HSA)-CL-V_H(靶标)-V_L(靶标)(图8)。SEQ ID NO:16用于接头L1,而SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18用于接头L2。

[0417] 2.4Db-Fc(图9-10):

[0418] Db-Fc是同二聚体抗原结合蛋白,且包含与同二聚体Fc部分(CH2-CH3)的N末端处的铰链融合的Db形式的二价CD16A抗原结合部分,以及两个与Fc部分的另一个末端融合的scFv形式的抗原结合部分。为了在CHO细胞中表达Db-Fc抗原结合蛋白,将该分子的编码序列克隆到哺乳动物表达载体系统中。简而言之,编码由短肽接头(SEQ ID NO:16)连接的抗TAA(Tumor associated Antigen,肿瘤相关抗原)Fv结构域和抗CD16A Fv结构域(SEQ ID NO:1-13)的基因序列,是由Thermo Fisher Scientific/Invitrogen GeneArt(德国雷根斯

堡)合成的。使用相应的引物生成不同可变结构域的和包含沉默点突变(SEQ ID NO:29)的Fc部分的PCR扩增子。然后,将不同的重叠DNA片段和线性化的骨架载体结合在一个等温反应中。将Db-Fc表达构建体设计为包含N末端信号肽的序列,以促进抗体分泌。通过使用定制引物在GATC(德国科隆)进行DNA测序,确认了所有构建体的序列。克隆Db-Fc的表达盒,使抗CD16A结构域位于同二聚体Fc部分(CH2-CH3)的N末端或C末端,并仅按以下可能的顺序通过连接物(SEQ ID NO:19-22)连接至中间铰链(SEQ ID NO:24)或通过连接物(SEQ ID NO:19-22)连接至CH3的C末端:

[0419] 1.)VL(CD16A)-L1-VH(CD16A)

[0420] 2.)VH(CD16A)-L1-VL(CD16A)

[0421] 此类抗原结合蛋白的例子是Db-Fc_02和Db-Fc_04,它们从N末端到C末端包含以下结构:V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-中间铰链-CH2-CH3-V_H(靶标)-V_L(靶标)(图9);或V_H(靶标)-V_L(靶标)-中间铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)(图10)。SEQ ID NO:16用于接头L1。

[0422] 2.5Bi-scFv-Fc(图11-12):

[0423] Bi-scFv-Fc是同二聚体四价抗原结合蛋白,其包含两个CD16A抗原结合部分和两个靶抗原结合部分,均为scFv形式且与Fc同二聚体融合。

[0424] 为了在CHO细胞中表达Bi-scFv-Fc抗原结合蛋白,将该分子的编码序列克隆到哺乳动物表达载体系统中。简而言之,编码由短肽接头(SEQ ID NO:17-18)连接的抗TAA(Tumor associated Antigen,肿瘤相关抗原)Fv结构域和抗CD16A Fv结构域(SEQ ID NO:1-13)的基因序列,是由Thermo Fisher Scientific/Invitrogen GeneArt(德国雷根斯堡)合成的。使用相应的引物生成不同可变结构域的和包含沉默点突变(SEQ ID NO:29)的Fc部分的或野生型Fc部分(SEQ ID NO:36)的PCR扩增子。然后,将不同的重叠DNA片段和线性化的骨架载体结合在一个等温反应中。将Bi-scFv-Fc表达构建体设计为分别包含N末端信号肽和Fc部分的编码序列,以促进抗体分泌和纯化。通过使用定制引物在GATC(德国科隆)进行DNA测序,确认了所有构建体的序列。克隆Bi-scFv-Fc的表达盒,使抗CD16A结构域定位于仅按以下可能的顺序通过连接物(SEQ ID NO:19-22)或铰链(SEQ ID NO:23)连接的Fc部分的N末端,或通过连接物(SEQ ID NO:19-22)连接至CH3的Fc部分的C末端:

[0425] 1.)VL(CD16A)-L3-VH(CD16A)

[0426] 2.)VH(CD16A)-L2-VL(CD16A)

[0427] 此类抗原结合蛋白的例子是Bi-scFv-Fc_27和Bi-scFv-Fc_26,它们从N末端到C末端包含以下结构:V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-铰链-CH2-CH3-V_H(靶标)-V_L(靶标)(图11);或V_H(靶标)-V_L(靶标)-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)(图12)。SEQ ID NO:17用于接头L2,而SEQ ID NO:18用于接头L3。

[0428] 2.6scFv-IgAb(图13):

[0429] scFv-IgAb抗原结合蛋白包含IgG抗体和两个scFv形式的CD16A抗原结合部分,其中scFv CD16A抗原结合部分中的每个均与H链中的一者的C末端融合,而两个靶抗原结合部分由IgG的Fab臂中的每个Fv提供。

[0430] 编码scFv-IgAb的DNA表达构建体是通过将抗TAA Fv结构域的编码序列克隆到修饰的哺乳动物表达载体中而生成的,所述表达载体包含CMV控制的表达盒,所述表达盒包括具有Fc沉默点突变(SEQ ID NO:25、27-28)的重链和轻链恒定结构域或具有野生型Fc部分

(SEQ ID NO:26-28),用于从同一载体共表达两个基因盒。然后,使用相应的引物,从编码由短肽接头(SEQ ID NO:17-18)分隔开的抗CD16A Fv结构域(SEQ ID NO:1-13)的基因序列生成PCR扩增子。将生成的重叠DNA片段在相关位置插入到共表达载体中。所有需要的编码可变结构域和包含Fc沉默点突变的恒定结构域的基因序列均由Thermo Fisher Scientific/Invitrogen GeneArt(德国雷根斯堡)合成。将scFv-IgAb表达构建体设计为分别包含N末端信号肽和Fc部分的编码序列,以促进抗体分泌和纯化。通过使用定制引物在GATC(德国科隆)进行DNA测序,确认了所有构建体的序列。克隆scFv-IgAb的表达盒,使抗CD16A结构域定位于按以下可能的顺序通过连接物(SEQ ID NO:19-22)连接的Fc部分的C末端:

[0431] 1.)VL(CD16A)-L3-VH(CD16A)

[0432] 2.)VH(CD16A)-L2-VL(CD16A)

[0433] 此类抗原结合蛋白的例子是scFv-IgAb_30,其从N末端到C末端包含以下结构:

[0434] 第一多肽链V_H(靶标)-CH1-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)和第二多肽链V_L(靶标)-CL(图13)。SEQ ID NO:17用于接头L2,而SEQ ID NO:18用于接头L3。

[0435] 2.7Bi-scFv-IgAb(图14):

[0436] Bi-scFv-IgAb抗原结合蛋白包含IgG抗体和与其融合的四个scFv抗原结合部分,其中scFv形式的两个CD16A抗原结合部分中的每个与两个H链中的一者的C末端融合,而两个靶抗原结合部分中的每个与两个CL区域中的一者的C末端融合。

[0437] 编码Bi-scFv-IgAb的DNA表达构建体是通过将抗TAA Fv结构域的编码序列克隆到修饰的哺乳动物表达载体中而生成的,所述表达载体包含CMV控制的表达盒,所述表达盒包括具有Fc沉默点突变的重链和轻链恒定结构域(SEQ ID NO:25、27-28),用于从同一载体共表达两个基因盒。然后,使用相应的引物,从编码由短肽接头分隔开的抗CD16A或靶抗原结合Fv结构域(SEQ ID NO:1-13)的基因序列生成PCR扩增子。将生成的重叠DNA片段在相关位置插入到共表达载体中。所有需要的编码可变结构域和包含Fc沉默点突变的恒定结构域的基因序列均由Thermo Fisher Scientific/Invitrogen GeneArt(德国雷根斯堡)合成。将Bi-scFv-IgAb表达构建体设计为分别包含N末端信号肽和Fc部分的编码序列,以促进抗体分泌和纯化。通过使用定制引物在GATC(德国科隆)进行DNA测序,确认了所有构建体的序列。克隆Bi-scFv-IgAb的表达盒,使抗CD16A结构域定位于按以下可能的顺序通过连接物(SEQ ID NO:19-22)连接的Fc部分的C末端:

[0438] 1.)VL(CD16A)-L3-VH(CD16A)

[0439] 2.)VH(CD16A)-L2-VL(CD16A)

[0440] 此类抗原结合蛋白的例子是Bi-scFv-IgAb_03,其从N末端到C末端包含以下结构:

[0441] 第一多肽链V_H(靶标1)-CH1-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)和第二多肽链V_L(靶标1)-CL-V_L(靶标2)-V_H(靶标2)(图14)。SEQ ID NO:17用于接头L2,而SEQ ID NO:18用于接头L3。

[0442] 2.8KiH-scFv-Fc(图15a和图15b):

[0443] KiH-scFv-Fc抗原结合蛋白包含与异二聚体(KiH)Fc部分融合的四个scFv抗原结合部分,其中两个CD16A抗原结合部分在N末端或C末端与Fc部分融合。

[0444] 编码KiH-scFv-Fc的DNA表达构建体是通过将抗CD16A Fv结构域(SEQ ID NO:1-13)的编码序列克隆到修饰的哺乳动物表达载体中而生成的,所述表达载体包含CMV控制的

表达盒,所述表达盒包括具有Fc沉默和“旋钮插入孔”点突变(SEQ ID NO:31-32)的IgG1恒定结构域CH2和CH3,用于从同一载体中共表达两个基因盒。“旋钮插入孔”突变允许生成双特异性Fc融合构建体。之后,使用相应引物从编码抗TAA(Tumor associated Antigen,肿瘤相关抗原)Fv结构域的基因序列生成PCR扩增子。将生成的重叠DNA片段在相关位置插入到共表达载体中。所有需要的编码可变结构域和包含Fc沉默和“旋钮插入孔”点突变的恒定结构域的基因序列均由Thermo Fisher Scientific/Invitrogen GeneArt(德国雷根斯堡)合成。将KiH-scFv-Fc表达构建体设计为分别包含N末端信号肽、Fc部分、C标签和His标签(6xHis)的编码序列,以促进抗体分泌和纯化。通过使用定制引物在GATC(德国科隆)进行DNA测序,确认了所有构建体的序列。克隆KiH-scFv-Fc构建体的表达盒,使抗CD16A结构域定位于仅按以下可能的顺序通过连接物(SEQ ID NO:19-22)和铰链(SEQ ID NO:23)连接的异二聚体Fc部分的N末端或通过连接物(SEQ ID NO:19-22)连接的Fc部分的C末端:

[0445] 1.)VL(CD16A)-L3-VH(CD16A)

[0446] 2.)VH(CD16A)-L2-VL(CD16A)

[0447] 此类抗原结合蛋白的实例是KiH-scFv-Fc_09和KiH-scFv-Fc_11,它们从N末端到C末端包含以下结构:

[0448] 第一多肽链V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-铰链-CH2-CH3-V_H(靶标1)-V_L(靶标1)和第二多肽链V_L(CD16A)-V_H(CD16A)-铰链-CH2-CH3-V_H(靶标2)-V_L(靶标2)(图15a);或第一多肽链V_H(靶标1)-V_L(靶标1)-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)和第二多肽链V_H(靶标2)-V_L(靶标2)-铰链-CH2-CH3-V_L(CD16A)-V_H(CD16A)(图15b)。SEQ ID NO:17用于接头L2,而SEQ ID NO:18用于接头L3。

[0449] 实例3:使用稳定的CHO细胞池产生NK细胞接合剂抗体形式

[0450] 宿主细胞培养

[0451] Flp-In CHO细胞(Life Technologies)是CHO-K1中国仓鼠卵巢细胞(ATCC,CCL-61)(Kao和Puck,1968)的衍生物,在添加了L-谷氨酰胺、10%FCS和100μg/ml Zeocin的Ham′s F-12营养混合物中进行培养。用0.25%胰蛋白酶-EDTA分离贴壁细胞,并根据Life Technologies提供的标准细胞培养方案进行传代培养。

[0452] 为了适应在悬浮液中的生长,将细胞从组织培养瓶中分离,并置于无血清的HyClone CDM4 CHO培养基中,随后在37℃、5%CO_2和120rpm条件下的摇瓶中孵育。用于培养悬浮液适应性Flp-In CHO宿主细胞的标准培养基是HyClone CDM4 CHO,其中添加了L-谷氨酰胺、HT补充剂、青霉素/链霉素和100μg/ml Zeocin。将悬浮液适应性细胞冷冻保存在含有10%DMSO的培养基中,并使用MycoAlert支原体检测试剂盒(Lonza)测试支原体是否阴性。

[0453] 稳定转染的细胞池的生成

[0454] 通过转染悬浮液适应性宿主细胞生成稳定表达分泌的重组抗体、Fc融合构建体或对比物抗体的重组Flp-In CHO细胞系。为此,将细胞置于不含Zeocin的标准培养基中一天,然后使用聚乙烯亚胺(PEI)将其与编码目的蛋白(pcDNA5-FRT)和Flp重组酶(pOG44,Life Technologies)的表达质粒(2.5μg)共转染。简而言之,将载体DNA和转染试剂以1:3(μg/μg)的DNA:PEI比例在共100μL OptiMEM I培养基中混合并孵育10分钟,然后将其添加到悬浮于1ml CHO-S-SFMII培养基(Life Technologies)中的2E+6Flp-In CHO细胞。孵育24-48小时后,通过在CHO-S-SFMII培养基中将培养基稀释至0.2E+6个活细胞/mL的密度,然后添加6-7

μg/mL嘌呤霉素二盐酸盐，开始选择稳定转染的细胞。Flp重组酶通过位点特异性DNA重组介导Flp-In表达构建体在整合的FRT位点插入到基因组中(O'Gorman等人，1991)。在选择过程中，每周测量两次活细胞密度，将细胞离心，然后以最大为0.2E+6个活细胞/mL的密度重悬浮在新鲜的选择培养基中。选择2-3周后，回收稳定表达重组蛋白产物的细胞池，然后将细胞转移到摇瓶内的标准培养基中。重组分泌蛋白的表达通过使用Criterion Stain-Free(Bio-Rad)技术对细胞培养上清液进行蛋白凝胶电泳来确认(请参见下文)。将稳定的细胞池冷冻保存在含有7.5％DMSO的培养基中。分批补料CHO细胞悬浮培养物中重组蛋白的产生

[0455] 通过分泌到细胞培养上清液中，在稳定转染的CHO细胞的10天或11天分批补料培养物中产生重组蛋白。为此，将稳定表达重组抗体、Fc融合抗原或对比物抗体的细胞以6E+5细胞/mL的起始密度接种在带有透气帽(Corning)的聚碳酸酯Erlenmeyer瓶内的标准培养基中，并在37℃和5％CO_2下以140rpm搅拌孵育。在分批补料培养过程中，在第0天(开始日)向培养基补充40mL/L ActiCHO补料A(GE Healthcare)和4mL/L ActiCHO补料B(GE Healthcare)，并在第3天、第5天和第7天以两倍量补充。在10天或11天后以通常＞75％的生存力收集细胞培养上清液。每隔一天，在补料前从生产培养物中收集样本，并评估细胞密度和生存力。在收集之日，在进一步使用之前，使用Millipore Express PLUS膜过滤器(Millipore)通过离心和真空过滤(0.22μm)清除细胞培养上清液。

[0456] 表达滴度定量：

[0457] 在生产培养的第5天、第7天和第10天或第11天，通过SDS-PAGE分析细胞培养上清液(CSS)中的蛋白表达滴度和产物完整性。将样本与SDS PAGE样本缓冲液混合，然后加载到4-20％Criterion TGX预制SDS PAGE凝胶(Biorad)上。使用Criterion Stain-free Molecular Imaging System(免染分子成像系统)(Biorad)，在凝胶中对总蛋白进行可视化。通过与已知浓度的参考抗体进行比较，半定量确定产物滴度。

[0458] 抗原结合蛋白的纯化

[0459] 1.包含Fc部分的抗原结合蛋白(如实例2中所述的scDb-mFc、Db-Fc、Bi-scFv-Fc、Bi-scFv-IgAb、scFv-Fc、scFv-IgAb)

[0460] 以包含蛋白A和制备型SEC的两步程序，从澄清的CHO细胞培养上清液中纯化靶蛋白。对于蛋白A，将澄清的上清液加载到HiTrap MabSelectSuRe柱(GE-Healthcare)上。用磷酸盐缓冲盐水(pH 7.4)和10mM磷酸钠(pH 7.0)洗涤后，用50mM乙酸钠(pH 3.5)和10mM甘氨酸/HCL(pH 2.0)以两步梯度洗脱蛋白。使用SE-HPLC和SDS-PAGE分析级分的纯度。合并具有可接受纯度的级分，并使用Superdex 200制备级柱(GE-Healthcare)进行制备型凝胶过滤。合并含有纯化的靶分子的洗脱级分，并使用Sephadex G-25柱以10mM乙酸钠、4.5％山梨糖醇(pH 5.0)进行缓冲液交换，并通过超滤浓缩至约为1mg/ml的典型浓度。这些构建体的典型纯度(通过SE-HPLC测定)在87.6％至99.8％的范围内，同质性(在非还原SDS-PAGE中)在58.4％至100％之间。

[0461] 2.根据实例2的抗原结合蛋白KiH-scDb-Fc和scDb-三体抗体-scFv，其包含κ轻链和His标签

[0462] 以包含蛋白L、IMAC和制备型SEC的三步程序，从澄清的CHO细胞培养上清液中纯化靶蛋白。对于蛋白质L，将澄清的上清液加载到HiTrap蛋白L柱(GE Healthcare)上。用磷酸盐缓冲盐水(pH 7.4)和10mM磷酸钠(pH 7.0)洗涤后，用10mM甘氨酸/HCL(pH 3.0)和10mM甘

氨酸/HCL(pH 2.0)以两步梯度洗脱蛋白。使用SE-HPLC和SDS-PAGE分析级分的纯度。合并具有可接受纯度的级分,并进行进一步的IMAC纯化。为此,用平衡缓冲液(50mM Tris/HCL,150mM氯化钠(pH 7.5))稀释样本(1:4),然后将其加载到HisTrap FF柱(GE Healthcare)上。用平衡缓冲液(50mM Tris/HCL,150mM氯化钠(pH7.5))洗涤后,用7%/30%/100%洗脱缓冲液(50mM Tris/HCL,0.4M精氨酸,500mM咪唑(pH 7.5))以三步梯度洗脱蛋白。使用SE-HPLC和SDS-PAGE分析级分的纯度。合并具有可接受纯度的级分,并使用Superdex 200制备级柱(GE-Healthcare)进行制备型凝胶过滤。合并含有纯化的靶分子的洗脱级分,并使用Sephadex G-25柱以10mM乙酸钠、4.5%山梨糖醇(pH 5.0)进行缓冲液交换,并通过超滤浓缩至约为1mg/ml的典型浓度。这些构建体的典型纯度(通过SE-HPLC测定)在95.9%至99.8%的范围内,同质性(在非还原SDS-PAGE中)在72.2%至99.0%之间。

[0463] 3)抗原结合蛋白分子KiH-scFv-Fc和KiH-scDb-Fc,其在第一多肽上包含C标签,在第二多肽上包含His标签

[0464] 以包含C标签亲和色谱法、IMAC和制备型SEC的三步程序,从澄清的CHO细胞培养上清液中纯化靶蛋白。对于C标签亲和色谱法,将澄清的上清液加载到CaptureSelect C标签XL柱(Thermo Scientific)上。用磷酸盐缓冲盐水(pH 7.4)洗涤后,用20mM柠檬酸钠(pH 3.0)洗脱蛋白。使用SE-HPLC和SDS-PAGE分析级分的纯度。合并具有可接受纯度的级分,并进行进一步的IMAC纯化。为此,用平衡缓冲液(50mM Tris/HCL,150mM氯化钠(pH 7.5))稀释样本(1:4),然后将其加载到HisTrap FF柱(GE Healthcare)上。用平衡缓冲液(50mM Tris/HCL,150mM氯化钠(pH 7.5))洗涤后,用7%/30%/100%洗脱缓冲液(50mM Tris/HCL,0.4M精氨酸,500mM咪唑(pH 7.5))以三步梯度洗脱蛋白。使用SE-HPLC和SDS-PAGE分析级分的纯度。合并具有可接受纯度的级分,并使用Superdex 200制备级柱(GE-Healthcare)进行制备型凝胶过滤。合并含有纯化的靶分子的洗脱级分,并使用Sephadex G-25柱以10mM乙酸钠、4.5%山梨糖醇(pH 5.0)进行缓冲液交换,并通过超滤浓缩至约为1mg/ml的典型浓度。这些构建体的典型纯度(通过SE-HPLC测定)在94.8%至99.0%的范围内,同质性(在非还原SDS-PAGE中)在86.8%至100%之间。

[0465] 4)scDb-三体抗体

[0466] 以包含IMAC和制备型SEC的两步程序从澄清的CHO细胞培养上清液中纯化蛋白质。对于IMAC,将澄清的上清液和5mM咪唑(pH7.0)加载到HisTrap FF柱(GE Healthcare)上。使用平衡缓冲液(50mM Tris/HCL,150mM氯化钠pH 7.5)洗涤后,使用7%/30%/100%洗脱缓冲液(50mM Tris/HCL,0.4M精氨酸,500mM咪唑,pH7.5)以三阶梯度洗脱蛋白质。使用SE-HPLC和SDS-PAGE分析级分的纯度。合并具有可接受纯度的级分,并使用Superdex 200制备级柱(GE-Healthcare)进行制备型凝胶过滤。合并含有纯化的靶分子的洗脱级分,并使用Sephadex G-25柱以10mM乙酸钠、4.5%山梨糖醇(pH5.0)进行缓冲液交换,并通过超滤浓缩至约为1mg/ml的典型浓度。这些构建体的典型纯度(通过SE-HPLC测得)在95.1%至100%的范围内,并且同质性(在非还原SDS-PAGE中)高于85.8%。

[0467] a)scDb-三体抗体_09-10

[0468] 从包含Fab/λ亲和色谱和制备性SEC的两步过程中,从澄清的CHO细胞培养上清液中纯化蛋白质。对于Fab/λ亲和色谱,在Fab Select Lambda柱(GE Healthcare)上加载澄清的上清液。用磷酸盐缓冲盐水pH 7.4洗涤后,用100mM乙酸钠pH 3.5洗脱蛋白。使用SE-HPLC

和SDS-PAGE分析级分的纯度。合并具有可接受纯度的级分，并使用Superdex 200制备级柱(Ge-Healthcare)进行制备型凝胶过滤。合并含有纯化的靶分子的洗脱级分，并使用Sephadex G-25柱以10mM乙酸钠、4.5％山梨糖醇(pH 5.0)进行缓冲液交换，并通过超滤浓缩至约为1mg/ml的典型浓度。这些构建体的典型纯度(通过SE-HPLC测得)高于94.8％，并且同质性(在非还原SDS-PAGE中)高于92.7％。

[0469] 蛋白质分析

[0470] 通过还原和非还原条件下的SDS-PAGE评估最终样品的同质性。将样品与非还原2x SDS PAGE样品缓冲液或包含二硫苏糖醇(DTT)作为还原剂的还原2x SDS-Page样品缓冲液混合。将所有样品在95℃下加热5分钟，然后在4-20％Criterion TGX Precast SDS Page Gel上加载。加载2μg纯化的蛋白质样品。为了分离凝胶中的蛋白质，将SDS-PAGE在1x Tris/甘氨酸/SDS缓冲液中于300V下运行约22分钟。使用Criterion Stain-free Molecular Imaging System(Biorad)使总蛋白在凝胶中可视化。Page Ruler Unstained Protein ladder用作分子量标记。将非还原SDS-PAGE中产物带的相对信号强度与可能的高分子量或低分子量种类进行比较。

[0471] 蛋白制品的纯度通过使用Superdex 200Increase 10/300GL柱(GE-Healthcare)的分析型SE-HPLC进行评价。

[0472] 纯化的蛋白质作为等分试样保存在-80℃下，直至进一步使用。

[0473] 实例4:ELISA中CD16A抗原结合蛋白与37℃下的原代人NK细胞或与重组人CD16A可溶性抗原的结合

[0474] 方法

[0475] 从血沉棕黄层中分离PBMC并富集人NK细胞

[0476] 通过密度梯度离心从血沉棕黄层(德国红十字会，曼海姆，德国)中分离PBMC。用两至三倍体积的PBS(Invitrogen，目录号:14190-169)，分层放置在Lymphoprep(Stem Cell Technologies，目录号:07861)的垫层上，并且在室温下以800x g离心25分钟(没有制动器)稀释血沉棕黄层样品。收集位于界面中的PBMC并使用PBS洗涤3次，然后在补充有10％FCS的完全RPMI 1640培养基中过夜培养该PBMC而不受刺激。为了富集NK细胞，从过夜培养物中收获PBMC，并且该PBMC使用EasySep™人NK细胞富集试剂盒(Stem Cell Technologies，目录号:(19955)以用于一轮阴性选择，用于根据制造商的使用说明书进行未接触的人NK细胞与Big Easy EasySep™ Magnet(Stem Cell Technologies，目录号:18001)的免疫磁性分离。

[0477] 细胞结合测定和流式细胞仪分析

[0478] 将富集的人NK细胞的等分试样使用100μL所示CD16A AAF构建体的系列稀释液(该构建体在FACS缓冲液(PBS，Invitrogen，目录号:14190-169)中)(该系列稀释液包含2％热灭活的FCS(Invitrogen，目录号:10270-106)、0.1％叠氮化钠(Roth，Karlsruhe，目录号:A1430.0100))在37℃下孵育45分钟。用FACS缓冲液反复洗涤后，用15μg/mL FITC缀合的山羊抗人IgG(Dianova，目录号:109-095-098)检测细胞结合抗体。在最后一个染色步骤之后，再次洗涤细胞，并将其重悬于0.2mL FACS缓冲液中，该缓冲液含有2μg/mL碘化丙啶(PI)(Sigma，目录号:P4170)以便排除死细胞。使用Millipore Guava EasyCyte流式细胞仪(Merck Millipore，Schwalbach，Germany)测量2-5x10^3活细胞的荧光。使用Incyte软件(Merck Millipore，Schwalbach，Germany)计算细胞样品的平均荧光强度。在减去单独使用

第二试剂和第三试剂染色的细胞的荧光强度值之后，使用GraphPad Prism软件(适用于Windows的GraphPad Prism6.00版，GraphPad Software，La Jolla California USA)将该值用于非线性回归分析。为了计算K_D，使用了单位点结合方程(双曲线)。

[0479] ELISA中CD16A可溶性抗原结合的分析

[0480] 将96孔ELISA板(Immuno MaxiSorp;Nunc)于4℃在100mM碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中用重组NK细胞接合抗体形式或对照抗体包被过夜。取决于分子量，抗体以2.0-5.0μg/mL的浓度(相当于约20nM的摩尔浓度)包被。在将3％(w/v)脱脂奶粉(Merck)溶于PBS的阻断步骤后，将生物素化的重组人CD16A(48R-158V)的系列稀释液在室温下在板上孵育1.5小时，该人CD16A(48R-158V)与含有0.3％(w/v)脱脂奶粉的PBS中的人IgG1 Fc部分融合。用每孔300μL的含0.1％(v/v)吐温20的PBS洗涤三次后，将板使用检测缀合物链霉亲和素-HRP(Roche)以1:10000稀释液在室温下孵育1小时。用每孔300μL的含0.1％(v/v)吐温20的PBS洗涤三次后，使用四甲基联苯胺(TMB)底物(Seramun)对板进行孵育，直至显色清晰可见为止。通过每孔添加100μL 0.5M H_2SO_4使反应停止。使用多标记酶标仪(Victor，Perkin Elmer)在450nm处测量吸光度。使用以GraphPad Prism 6.07版(GraphPad Software，La Jolla California USA)进行的非线性回归、S形剂量响应(变斜率)、最小二乘法拟合来绘制和分析吸光度值。

[0481] 结果

[0482] 在至少两个独立的实验中，在37℃下在原代人NK细胞上确定了指定的CD16A抗原结合蛋白的表观结合亲和力。此外，在ELISA中分析了CD16A抗原结合蛋白结合可溶性CD16A的能力。两种方法均表明CD16A抗原结合蛋白显示出与CD16A的特异性结合。由于二价CD16结合，获得了高亲和力。在NK细胞结合中测得的KD值的绝对值与ELISA中测得的EC50值的绝对值的差异是由于不同的方法、试剂和测定设置。结果如表2所示。

[0483]

表 2 - 在原代人 NK 细胞上在 37℃ 下的 CD16A 抗体构建体的表观亲和力（给出了平均值 K_D 和独立实验）或 CD16A 抗原与包被的抗体构建体的表观结合通过 ELISA 加以分析（给出了 EC50 值）。

产品	NK 细胞接合剂形式	CD16A 结合结构域	CD16A 结合结构域次序	靶结合结构域 1	靶结合结构域 2	连接物 1 SEQ ID	铰链 SEQ ID	Fc 部分	连接物 2 SEQ ID	NK 细胞结合平均 K_D [nM]	CD16A 结合 (ELISA) EC50 [nM]
scDb-mFc_01	图 1	P2C47	VL-VH-VL-VH	BCMA		NO: 20	没有	沉默的 mFc	NO: 20	1.2	0.32
scDb-mFc_02	图 1	P2C47	VH-VL-VH-VL	BCMA		NO: 20	没有	沉默的 mFc	NO: 20	4.9	0.42
scDb-mFc_03	图 1	P2C47	VL-VL-VH-VH	BCMA		NO: 20	没有	沉默的 mFc	NO: 20	未测试	0.23
scDb-mFc_04	图 1	P2C47	VH-VH-VL-VL	BCMA		NO: 20	没有	沉默的 mFc	NO: 20	未测试	0.22
scDb-mFc_06	图 2	P2C47	VH-VL-VH-VL	BCMA		NO: 20	没有	沉默的 mFc	NO: 20	3.8	0.64
scDb-mFc_07	图 2	P2C47	VL-VL-VH-VH	BCMA		NO: 20	没有	沉默的 mFc	NO: 20	未测试	0.29
scDb-mFc_08	图 2	P2C47	VH-VH-VL-VL	BCMA		NO: 20	没有	沉默的 mFc	NO: 20	未测试	0.33
KiH-scDb-Fc_08	图 3	P2C47	VL-VH-VL-VH	BCMA		NO: 19	NO: 24	沉默的	0	0.9	0.27
KiH-scDb-Fc_09	图 3	P2C47	VH-VL-VH-VL	BCMA		NO: 19	NO: 24	沉默的	0	6.2	0.40
KiH-scDb-Fc_10	图 3	P2C47	VL-VL-VH-VH	BCMA		NO: 19	NO: 24	沉默的	0	未测试	0.21
KiH-scDb-Fc_11	图 3	P2C47	VH-VH-VL-VL	BCMA		NO: 19	NO: 24	沉默的	0	未测试	0.19
KiH-scDb-Fc_04	图 4	P2C47	VL-VH-VL-VH	BCMA		NO: 19	NO: 24	沉默的	0	1.0	0.19

[0484]

产品	NK 细胞接合剂形式	CD16A 结合结构域	CD16A 结合结构域次序	靶结合结构域 1	靶结合结构域 2	连接物 1 SEQ ID	铰链 SEQ ID	Fc 部分	连接物 2 SEQ ID	NK 细胞结合平均 K_D [nM]	CD16A 结合 (ELISA) EC50 [nM]
KiH-scDb-Fc_05	图 4	P2C47	VH-VL-VH-VL	BCMA		NO: 19	NO: 24	沉默的	0	28.0	0.23
KiH-scDb-Fc_06	图 4	P2C47	VL-VL-VH-VH	BCMA		NO: 19	NO: 24	沉默的	0	2.3	0.22
KiH-scDb-Fc_07	图 4	P2C47	VH-VH-VL-VL	BCMA		NO: 19	NO: 24	沉默的	0	未测试	0.21
KiH-scDb-Fc_12	图 5	P2C47	VL-VH-VL-VH	BCMA		0	NO: 24	沉默的	NO: 20	1.8	0.29
KiH-scDb-Fc_13	图 5	P2C47	VH-VL-VH-VL	BCMA		0	NO: 24	沉默的	NO: 20	4.0	0.41
KiH-scDb-Fc_14	图 5	P2C47	VL-VL-VH-VH	BCMA		0	NO: 24	沉默的	NO: 20	未测试	0.39
KiH-scDb-Fc_15	图 5	P2C47	VH-VH-VL-VL	BCMA		0	NO: 24	沉默的	NO: 20	未测试	0.21
KiH-scDb-Fc_01	图 6	P2C47	VL-VH-VL-VH	CD19	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.17
KiH-scDb-Fc_02	图 6	P2C47	VL-VH-VL-VH	CD20	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.16
KiH-scDb-Fc_03	图 6	P2C47	VL-VH-VL-VH	CD20	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.11
scDb-三体抗体_01	图 7	LSIV21	VL-VL-VH-VH	HSA(N1)	EGFR	NO: 20	没有	没有	NO: 20	未测试	0.65
scDb-三体抗体_09	图 7	P2C47	VL-VH-VL-VH	HSA(N1)	BCMA	NO: 20	没有	没有	NO: 20	未测试	0.25

[0485]

产品	NK 细胞接合剂形式	CD16A 结合结构域	CD16A 结合结构域次序	靶结合结构域 1	靶结合结构域 2	连接物 1 SEQ ID	铰链 SEQ ID	Fc 部分	连接物 2 SEQ ID	NK 细胞结合平均 K_D [nM]	CD16A 结合 (ELISA) EC50 [nM]
scDb-三体抗体_10	图 7	P2C47	VL-VH-VL-VH	HSA(N1)	BCMA	NO: 20	没有	没有	NO: 20	未测试	0.25
scDb-TriB-scFv_01	图 8	P2C47	VL-VH-VL-VH	HSA(CA)	BCMA	NO: 20	没有	没有	NO: 20	未测试	0.30
Db-Fc_01	图 9	P2C47	VH-VL	BCMA		NO: 20	NO: 24	沉默的	NO: 20	87.7	0.27
Db-Fc_02	图 9	P2C47	VL-VH	BCMA		NO: 20	NO: 24	沉默的	NO: 20	1.5	0.15
Db-Fc_03	图 10	P2C47	VH-VL	BCMA		0	NO: 24	沉默的	NO: 21	17.6	0.50
Db-Fc_17	图 10	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 24	沉默的	NO: 22	未测试	0.31
双-scFv-Fc_02	图 11	LSIV21	VL-VH	EGFR		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.38
双-scFv-Fc_04	图 11	LSIV21	VL-VH	EGFR		0	没有	野生型	0	未测试	0.37
双-scFv-Fc_17	图 11	P2C47	VH-VL	BCMA		NO: 21	NO: 23	沉默的	NO: 20	5.1	0.29
双-scFv-Fc_22	图 11	LSIV21	VL-VH	EGFR		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.39
双-scFv-Fc_24	图 11	LSIV21	VL-VH	EGFR		0	NO: 23	野生型	NO: 20	未测试	0.34
双-scFv-Fc_27	图 11	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	1.7	0.33

[0486]

产品	NK 细胞接合剂形式	CD16A 结合结构域	CD16A 结合结构域次序	靶结合结构域 1	靶结合结构域 2	连接物 1 SEQ ID	铰链 SEQ ID	Fc 部分	连接物 2 SEQ ID	NK 细胞结合平均 K_D [nM]	CD16A 结合 (ELISA) EC50 [nM]
双-scFv-Fc_28	图 11	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.27
双-scFv-Fc_31	图 11	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	野生型	NO: 20	0.9	0.24
双-scFv-Fc_32	图 11	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	野生型	NO: 20	未测试	0.27
双-scFv-Fc_39	图 11	LSIV21	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.38
双-scFv-Fc_03	图 12	LSIV21	VH-VL	EGFR		0	没有	野生型	0	未测试	0.47
双-scFv-Fc_19	图 12	P2C47	VH-VL	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 22	4.2	0.23
双-scFv-Fc_21	图 12	LSIV21	VL-VH	EGFR		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	51.1	0.50
双-scFv-Fc_23	图 12	LSIV21	VL-VH	EGFR		0	NO: 23	野生型	NO: 20	6.4	0.33
双-scFv-Fc_25	图 12	P2C47	VH-VL	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.47
双-scFv-Fc_26	图 12	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	15.7	0.47
双-scFv-Fc_29	图 12	P2C47	VH-VL	BCMA		0	NO: 23	野生型	NO: 20	未测试	0.32
双-scFv-Fc_30	图 12	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	野生型	NO: 20	未测试	0.29
scFv-IgAb_03	图 13	LSIV21	VH-VL	EGFR		0	没有	野生型	0	未测试	0.78

[0487]

产品	NK 细胞接合剂形式	CD16A 结合结构域	CD16A 结合结构域次序	靶结合结构域 1	靶结合结构域 2	连接物 1 SEQ ID	铰链 SEQ ID	Fc 部分	连接物 2 SEQ ID	NK 细胞结合 平均 K_D [nM]	CD16A 结合 (ELISA) EC50 [nM]
scFv-IgAb_17	图 13	P2C47	VH-VL	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 22	8.0	0.44
scFv-IgAb_18	图 13	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 22	6.7	0.51
scFv-IgAb_25	图 13	LSIV21	VL-VH	EGFR		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.85
scFv-IgAb_27	图 13	LSIV21	VL-VH	EGFR		0	没有	野生型	0	未测试	0.53
scFv-IgAb_29	图 13	P2C47	VH-VL	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	20.9	0.82
scFv-IgAb_30	图 13	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	22.2	0.67
scFv-IgAb_32	图 13	P2C47	VH-VL	BCMA		0	没有	野生型	0	未测试	0.71
scFv-IgAb_36	图 13	P2C47	VL-VH	CD20		0	NO: 23	野生型	NO: 20	未测试	0.16
scFv-IgAb_37	图 13	P2C47	VL-VH	CD20		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.18
scFv-IgAb_43	图 13	P2C47	VL-VH	EGFR		0	NO: 23	沉默的	NO: 22	未测试	0.26
双-scFv-IgAb_02	图 14	P2C47	VL-VH	CD20	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	22.0	0.21
双-scFv-IgAb_03	图 14	P2C47	VL-VH	CD19	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 22	未测试	0.25
双-scFv-IgAb_04	图 14	P2C47	VL-VH	CD19	His	0	NO: 23	沉默的	NO: 22	未测试	0.22

[0488]

产品	NK 细胞接合剂形式	CD16A 结合结构域	CD16A 结合结构域次序	靶结合结构域 1	靶结合结构域 2	连接物 1 SEQ ID	铰链 SEQ ID	Fc 部分	连接物 2 SEQ ID	NK 细胞结合平均 K_D [nM]	CD16A 结合 (ELISA) EC50 [nM]
双-scFv-IgAb_05	图 14	P2C47	VL-VH	BCMA	His	0	NO: 23	沉默的	NO: 22	未测试	0.16
双-scFv-IgAb_06	图 14	P2C47	VL-VH	CD19	RSV	0	NO: 23	沉默的	NO: 22	11.3	0.21
双-scFv-IgAb_07	图 14	P2C47	VL-VH	BCMA	RSV	0	NO: 23	沉默的	NO: 22	未测试	0.15
KiH-scFv-Fc_09	图 15a	P2C47	VL-VH	CD19	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	3.2	0.20
KiH-scFv-Fc_10	图 15a	P2C47	VL-VH	CD20	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.22
KiH-scFv-Fc_17	图 15a	P2C47	VL-VH	CD20	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	3.2	0.20
KiH-scFv-Fc_19	图 15a	P2C47	VL-VH	CD19	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.25
KiH-scFv-Fc_20	图 15a	P2C47	VL-VH	CD20	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.22
KiH-scFv-Fc_11	图 15b	P2C47	VL-VH	CD19	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	22.6	0.41
KiH-scFv-Fc_12	图 15b	P2C47	VL-VH	CD20	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.47
KiH-scFv-Fc_18	图 15b	P2C47	VL-VH	CD20	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	41.0	0.30
KiH-scFv-Fc_21	图 15b	P2C47	VL-VH	CD19	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.50
KiH-scFv-Fc_22	图 15b	P2C47	VL-VH	CD20	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.41

[0489]

产品	NK 细胞接合剂形式	CD16A 结合结构域	CD16A 结合结构域次序	靶结合结构域 1	靶结合结构域 2	连接物 1 SEQ ID	铰链 SEQ ID	Fc 部分	连接物 2 SEQ ID	NK 细胞结合 平均 K_D [nM]	CD16A 结合 (ELISA) EC50 [nM]
scFv-IgAb_02	图 16	LSIV21	Fab	EGFR	n.a.	n.a.	NO: 23	沉默的	NO: 20	7.7	0.24
scFv-IgAb_22	图 16	P2C47	Fab	BCMA	n.a.	n.a.	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.13
scFv-IgAb_26	图 16	LSIV21	Fab	EGFR	n.a.	n.a.	NO: 23	沉默的	NO: 20	5.3	0.19
scFv-IgAb_31	图 16	P2C47	Fab	BCMA	n.a.	n.a.	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.16
scFv-IgAb_34	图 16	P2C47	Fab	BCMA	n.a.	n.a.	NO: 23	野生型	NO: 20	未测试	0.13
scFv-IgAb_35	图 16	P2C47	Fab	BCMA	n.a.	n.a.	NO: 23	野生型	NO: 20	未测试	0.17
scFv-IgAb_42	图 16	LSIV21	Fab	BCMA	n.a.	n.a.	NO: 23	沉默的	NO: 20	8.7	0.19
scFv-IgAb_44	图 16	LSIV21	Fab	RSV	n.a.	n.a.	NO: 23	沉默的	NO: 20	未测试	0.14

未测试，未经测试

[0490] 实例5:CD16A抗原结合蛋白对肿瘤靶细胞的细胞毒活性

[0491] 方法：

[0492] 细胞系培养

[0493] A-431(ATCC,目录号:CRL-1555)在标准条件下在补充有10％热灭活的FCS、2mM L-谷氨酰胺和100IU/mL青霉素G钠以及100μg/mL硫酸链霉素的DMEM培养基中培养(所有组分均来自Invitrogen)。RPMI-8226(DSMZ,目录号:ACC402)和MM.1S(ATCC,目录号:CRL2974)在补充有10％热灭活的FCS、2mM L-谷氨酰胺和100IU/mL青霉素G钠以及100μg/mL硫酸链霉素的RPMI1640培养基中培养。SU-DHL-6(DSMZ,目录号:ACC572)在补充有20％热灭活的FCS、2mM L-谷氨酰胺和100IU/mL青霉素G钠以及100μg/mL硫酸链霉素的RPMI 1640培养基中培养。NCI-H929(DSMZ,目录号:ACC163)在补充有20％热灭活的FCS、2mM L-谷氨酰胺和100IU/mL青霉素G钠、100μg/mL硫酸链霉素,1mM丙酮酸钠和50μM巯基乙醇的RPMI 1640培养基中培养(所有组分均来自Invitrogen)。

[0494] 在37℃和5％CO_2的湿润环境中培养所有细胞系。

[0495] 从血沉棕黄层中分离PBMC并富集人NK细胞

[0496] 通过密度梯度离心从血沉棕黄层(德国红十字会,曼海姆,德国)中分离PBMC。用两至三倍体积的PBS(Invitrogen,目录号:14190-169),分层放置在Lymphoprep(Stem Cell Technologies,目录号:07861)的垫层上,并且在室温下以800xg离心25分钟(没有制动器)稀释血沉棕黄层样品。收集位于界面中的PBMC并使用PBS洗涤3次,然后在补充有10％热灭活的FCS、2mM L-谷氨酰胺和100IU/mL青霉素G钠以及100μg/mL硫酸链霉素的RPMI 1640培养基中过夜培养该PBMC而不受刺激。为了富集NK细胞,从过夜培养物中收获PBMC,并且该PBMC使用EasySep™人NK细胞富集试剂盒(Stem Cell Technologies,目录号:(19055)以用于一轮阴性选择,用于根据制造商的使用说明书进行未接触的人NK细胞与Big Easy EasySep™ Magnet(Stem Cell Technologies,目录号:18001)的免疫磁性分离。

[0497] 4h钙黄绿素释放细胞毒性测定

[0498] 对于钙黄绿素释放细胞毒性测定,从培养物中收获指定的靶细胞,使用不含FCS的RPMI 1640培养基洗涤,并用10μM钙黄绿素AM(英杰/分子探针(Invitrogen/Molecular Probes),目录号:C3100MP)在没有FCS的RPMI培养基中于37℃标记30分钟。轻柔洗涤后,将标记的细胞重悬于完全RPMI培养基(补充有10％热灭活的FCS、4mM L-谷氨酰胺、100U/mL青霉素G钠、100μg/mL硫酸链霉素的RPMI 1640培养基)中至1x10^5/mL的密度。然后将1x10^4个靶细胞与富集的原代人NK细胞一起以指定的(效应子与靶标)E:T比(通常为5:1或2:1)和指定的抗体接种到圆底96孔微孔板的各个孔中,总体积为200μL/孔,一式两份。在每块板上一式四份确定在不存在抗体的情况下的由效应子导致的自发释放、最大释放和靶标杀伤。

[0499] 以200g离心2分钟后,通常将测定液于37℃在5％CO_2的湿润环境中孵育4小时(根据指示,在一些测定中为3小时)。孵育结束前15分钟,将20μL在RPMI培养基中的10％Triton X-100加入到含有靶细胞的孔中。将20μL RPMI培养基加入到所有其他孔中。以500g额外离心5分钟后,从每个孔中收获100μL细胞培养上清液,并使用荧光酶标仪(Victor 3,Perkin Elmer)在520nm下测量释放的钙黄绿素的荧光。基于测得的计数,根据下式计算特定的细胞裂解:[荧光(样品)-荧光(自发)]/[荧光(最大)-荧光(自发)]x100％。荧光(自发)表示在不存在效应细胞和抗体的情况下来自靶细胞的荧光计数,荧光(最大)表示通过添加Triton X-100诱导的总细胞裂解。使用GraphPad Prism软件(适用于Windows的GraphPad Prism 6.00版,GraphPad Software,La Jolla California USA),通过非线性回归/4参数逻辑拟

合，计算出S型剂量响应曲线和EC_{50}值。

[0500] 表3显示了抗原结合蛋白对肿瘤靶细胞的细胞毒性活性的结果。

[0501]

表 3： 在钙黄绿素释放测定中，以富集的人 NK 细胞作为效应细胞，以指示的 E:T 比（5:1 或 2:1）在存在指定的抗体构建体的系列稀释液和 3 h 或 4 h 测定孵育的情况下，评估了指定的肿瘤细胞系的抗体介导裂解。

产品	NK 细胞接合剂形式	CD16A 结合结构域	CD16A 结合结构域次序	靶结合结构域 1	靶结合结构域 2	Fc 部分	靶细胞系	E:T 比	孵育时间 [h]	平均 EC50 [pM]
		P2C47	VH-VL-VH-VL	BCMA		沉默的 mFc	MM.1S	5	4	6.8
scDb-mFc_06	图 2	P2C47	VH-VL-VH-VL	BCMA		沉默的 mFc	MM.1S	5	4	3.3
KiH-scDb-Fc_08	图 3	P2C47	VL-VH-VL-VH	BCMA		沉默的	MM.1S	5	4	1.6
KiH-scDb-Fc_09	图 3	P2C47	VH-VL-VH-VL	BCMA		沉默的	MM.1S	5	4	9.4
KiH-scDb-Fc_06	图 4	P2C47	VL-VL-VH-VH	BCMA		沉默的	MM.1S	5	4	5.0
KiH-scDb-Fc_12	图 5	P2C47	VL-VH-VL-VH	BCMA		沉默的	RPMI-8226	5	4	54.2
scDb-三体抗体_01	图 7	LSIV21	VL-VL-VH-VH	HSA(N1)	EGFR	没有	A-431	2	4	10.1
scDb-三体抗体_02	图 7	LSIV21	VL-VH-VL-VH	HSA(N1)	EGFR	没有	A-431	2	4	6.3
scDb-三体抗体_03	图 7	LSIV21	VL-VL-VH-VH	HSA(CA)	EGFR	没有	A-431	2	4	40.1
scDb-三体抗体_04	图 7	LSIV21	VL-VH-VL-VH	HSA(CA)	EGFR	没有	A-431	2	4	16.7
scDb-TriB-scFv_01	图 8	P2C47	VL-VH-VL-VH	HSA(CA)	BCMA	没有	MM.1S	5	4	6.4
Db-Fc_01	图 9	P2C47	VH-VL	BCMA		沉默的	NCI-H929	5	4	53.0
Db-Fc_02	图 9	P2C47	VL-VH	BCMA		沉默的	NCI-H929	5	4	4.9
Db-Fc_03	图 10	P2C47	VH-VL	BCMA		沉默的	NCI-H929	5	4	17.0
双-scFv-Fc_02	图 11	LSIV21	VL-VH	EGFR		沉默的	A-431	2	4	6.6
双-scFv-Fc_04	图 11	LSIV21	VL-VH	EGFR		野生型	A-431	2	4	5.4
双-scFv-Fc_17	图 11	P2C47	VH-VL	BCMA		沉默的	RPMI-8226	2	4	160.7

[0502]

产品	NK 细胞接合剂形式	CD16A 结合结构域	CD16A 结合结构域次序	靶结合结构域 1	靶结合结构域 2	Fc 部分	靶细胞系	E:T 比	孵育时间 [h]	平均 EC50 [pM]
双-scFv-Fc_22	图 11	CD16LSIV21	VL-VH	EGFR		沉默的	A-431	2	4	7.5
双-scFv-Fc_24	图 11	CD16LSIV21	VL-VH	EGFR		野生型	A-431	2	4	8.3
双-scFv-Fc_27	图 11	P2C47	VL-VH	BCMA		沉默的	RPMI-8226	2	4	100.0
双-scFv-Fc_31	图 11	P2C47	VL-VH	BCMA		野生型	RPMI-8226	2	4	64.1
双-scFv-Fc_03	图 12	LSIV21	VH-VL	EGFR		野生型	A-431	2	4	2.7
双-scFv-Fc_19	图 12	P2C47	VH-VL	BCMA		沉默的	RPMI-8226	2	3	432.7
双-scFv-Fc_21	图 12	LSIV21	VL-VH	EGFR		沉默的	A-431	2	4	5.1
双-scFv-Fc_23	图 12	LSIV21	VL-VH	EGFR		野生型	A-431	2	4	3.6
双-scFv-Fc_26	图 12	P2C47	VL-VH	BCMA		沉默的	RPMI-8226	2	4	1361.5
scFv-IgAb_03	图 13	LSIV21	VH-VL	EGFR		野生型	A-431	2	4	2.5
scFv-IgAb_17	图 13	P2C47	VH-VL	BCMA		沉默的	RPMI-8226	2	3	190.2
scFv-IgAb_18	图 13	P2C47	VL-VH	BCMA		沉默的	NCI-H929	5	4	48.7
scFv-IgAb_29	图 13	P2C47	VH-VL	BCMA		沉默的	RPMI-8226	2	3	2029.5
scFv-IgAb_30	图 13	P2C47	VL-VH	BCMA		沉默的	RPMI-8226	2	3	892.0
双-scFv-IgAb_02	图 14	P2C47	VL-VH	CD20	BCMA	沉默的	SU-DHL-6	5	4	1.2
双-scFv-IgAb_03	图 14	P2C47	VL-VH	CD19	BCMA	沉默的	SU-DHL-6	5	4	13.5
双-scFv-IgAb_04	图 14	P2C47	VL-VH	CD19	His	沉默的	SU-DHL-6	5	4	23.1
双-scFv-IgAb_05	图 14	P2C47	VL-VH	BCMA	His	沉默的	SU-DHL-6	5	4	16.8
KiH-scFv-Fc_09	图 15a	P2C47	VL-VH	CD19	BCMA	沉默的	SU-DHL-6	5	4	11.8
KiH-scFv-Fc_17	图 15a	P2C47	VL-VH	CD20	BCMA	沉默的	SU-DHL-6	5	4	4.3

[0503]

产品	NK 细胞接合剂形式	CD16A 结合结构域	CD16A 结合结构域次序	靶结合结构域 1	靶结合结构域 2	Fc 部分	靶细胞系	E:T 比	孵育时间 [h]	平均 EC50 [pM]
scFv-IgAb_02	图 16	LSIV21	Fab	EGFR	n.a.	沉默的	A-431	2	4	4.3
scFv-IgAb_22	图 16	P2C47	Fab	BCMA	n.a.	沉默的	RPMI-8226	2	3	170.3
scFv-IgAb_26	图 16	LSIV21	Fab	EGFR	n.a.	沉默的	A-431	2	4	5.8
scFv-IgAb_31	图 16	P2C47	Fab	BCMA	n.a.	沉默的	RPMI-8226	2	3	325.1
scFv-IgAb_34	图 16	P2C47	Fab	BCMA	n.a.	野生型	RPMI-8226	2	3	74.6
scFv-IgAb_35	图 16	P2C47	Fab	BCMA	n.a.	野生型	RPMI-8226	2	3	244.4

使用 S 形剂量响应分析来计算 EC_{50} [pM] 值。给出了至少两个独立实验的平均值。

[0504] 实例6:通过CD16A抗原结合蛋白评估NK-NK裂解

[0505] 方法:

[0506] 从血沉棕黄层中分离PBMC并富集人NK细胞

[0507] 通过密度梯度离心从血沉棕黄层(德国红十字会,曼海姆,德国)中分离PBMC。用两至三倍体积的PBS(Invitrogen,目录号:14190-169),分层放置在Lymphoprep(Stem Cell Technologies,目录号:07861)的垫层上,并且在室温下以800xg离心25分钟(没有制动器)稀释血沉棕黄层样品。收集位于界面中的PBMC并使用PBS洗涤3次,然后在补充有10%FCS的完全RPMI 1640培养基中过夜培养该PBMC而不受刺激。为了富集NK细胞,从过夜培养物中收获PBMC,并且该PBMC使用EasySep™人NK细胞富集试剂盒(Stem Cell Technologies,目录号:(19055)以用于一轮阴性选择,用于根据制造商的使用说明书进行未接触的人NK细胞与Big Easy EasySep™ Magnet(Stem Cell Technologies,目录号:18001)的免疫磁性分离。

[0508] 4h钙黄绿素释放细胞毒性测定

[0509] 对于用来评估NK-NK细胞裂解的钙黄绿素释放的细胞毒性测定,一半富集的未活化NK细胞用不含FCS的RPMI 1640培养基洗涤,并用10μM钙黄绿素AM(英杰/分子探针(Invitrogen/Molecular Probes),目录号:C3100MP)在没有FCS的RPMI培养基中于37℃标记30分钟。轻柔洗涤后,将标记的细胞重悬于完全RPMI培养基(补充有10%热灭活的FCS、4mM L-谷氨酰胺、100U/mL青霉素G钠、100μg/mL硫酸链霉素的RPMI 1640培养基)中。然后将$5x10^4$靶细胞与来自同一供体的NK细胞一起以1:1的E:T比和指定的抗体接种到圆底96孔微孔板的单个孔中,总体积为200μL,一式两份。在每块板上一式四份确定在不存在抗体的情况下的由效应子导致的自发释放、最大释放和靶标杀伤。

[0510] 以200xg离心2分钟后,将测定液于37℃在5%CO_2的湿润环境中孵育4小时。孵育结束前15分钟,将20μL在RPMI培养基中的10%Triton X-100加入到含有靶细胞的孔中。将20μL RPMI培养基加入到所有其他孔中。以500g额外离心5分钟后,从每个孔中收获100μL细胞培养上清液,并使用荧光酶标仪(Victor 3,Perkin Elmer)在520nm下测量释放的钙黄绿素的荧光。基于测得的计数,根据下式计算特定的细胞裂解:[荧光(样品)-荧光(自发)]/[荧光(最大)-荧光(自发)]x100%。荧光(自发)表示在不存在效应细胞和抗体的情况下来自靶细胞的荧光计数,荧光(最大)表示通过添加Triton X-100诱导的总细胞裂解。使用GraphPad Prism软件(适用于Windows的GraphPad Prism 6.00版,美国加利福尼亚州拉荷亚的GraphPad软件公司),通过非线性回归/4参数逻辑拟合,计算出S型剂量响应曲线,并用来确定EC_{50}[pM]和$E_{最大}$[%]值。

[0511] 当在达雷木单抗诱导50%以上的NK细胞裂解的测定中,当在抗体浓度高达30μg/mL的情况下没有或仅有10%以下的最小裂解可测时,CD16A抗原结合蛋白被认为对诱导NK-NK细胞裂解呈阴性。

[0512] 结果:

[0513] 在针对NK细胞介导的NK裂解的至少两个独立的4h钙黄绿素释放细胞毒性测定中测试了每种抗原结合蛋白。

[0514] 总结在表4和图17A-17N中的结果清楚地表明,由CD16A抗原结合蛋白诱导的NK-NK裂解的效力(EC_{50})和功效($E_{最大}$)与这些蛋白结合重组CD16A抗原或NK细胞上的CD16A的表观结合亲和力无关(总结于表2中)。此外,CD16A抗原结合蛋白对于抗原阳性肿瘤靶细胞裂解的效力(EC_{50})也与介导NK-NK裂解的效力无关。从这些发现可以得出结论,介导NK-NK裂解的倾向不是抗CD16A Fv结构域本身的特性,也不是其表观亲和力的函数,而是该形式尤其是

给定CD16A抗原结合蛋白可变重链段和轻链段的结构域次序的特征性特性。

[0515]

表 4： 在 4 小时钙黄绿素释放测定中评估了抗体介导的 NK-NK 细胞裂解，使用钙黄绿素标记的 NK 细胞作为靶细胞，来自同一供体的未标记的 NK 细胞作为效应细胞，其 E:T 比为 1:1，在所示抗体构建体的系列稀释液的存在下进行评估。

产品	NK 细胞接合剂形式	CD16A 结合结构域	CD16A 结合结构域次序	靶结合结构域 1	靶结合结构域 2	连接物 1 SEQ ID NO:	铰链 SEQ ID	Fc 部分	连接物 2 SEQ ID NO:	NK-NK 裂解的平均 EC_{50} [pM]	平均 $E_{最大}$ [%]
scDb-mFc_01	图 1	P2C47	VL-VH-VL-VH	BCMA		20	没有	沉默的 mFc	20	没有	没有
scDb-mFc_02	图 1	P2C47	VH-VL-VH-VL	BCMA		20	没有	沉默的 mFc	20	1418.4	46.6
scDb-mFc_04	图 1	P2C47	VH-VH-VL-VL	BCMA		20	没有	沉默的 mFc	20	没有	没有
scDb-mFc_06	图 2	P2C47	VH-VL-VH-VL	BCMA		20	没有	沉默的 mFc	20	2810.1	44.0
scDb-mFc_07	图 2	P2C47	VL-VL-VH-VH	BCMA		20	没有	沉默的 mFc	20	没有	没有
scDb-mFc_08	图 2	P2C47	VH-VH-VL-VL	BCMA		20	没有	沉默的 mFc	20	没有	没有
KiH-scDb-Fc_08	图 3	P2C47	VL-VH-VL-VH	BCMA		19	24	沉默的	0	没有	没有
KiH-scDb-Fc_09	图 3	P2C47	VH-VL-VH-VL	BCMA		19	24	沉默的	0	3302.0	45.8
KiH-scDb-Fc_10	图 3	P2C47	VL-VL-VH-VH	BCMA		19	24	沉默的	0	没有	没有
KiH-scDb-Fc_04	图 4	P2C47	VL-VH-VL-VH	BCMA		19	24	沉默的	0	没有	没有
KiH-scDb-Fc_05	图 4	P2C47	VH-VL-VH-VL	BCMA		19	24	沉默的	0	2506.9	52.2
KiH-scDb-Fc_06	图 4	P2C47	VL-VL-VH-VH	BCMA		19	24	沉默的	0	没有	没有
KiH-scDb-Fc_12	图 5	P2C47	VL-VH-VL-VH	BCMA		0	24	沉默的	20	没有	没有
KiH-scDb-Fc_13	图 5	P2C47	VH-VL-VH-VL	BCMA		0	24	沉默的	20	4235.5	58.0
KiH-scDb-Fc_14	图 5	P2C47	VL-VL-VH-VH	BCMA		0	24	沉默的	20	没有	没有
KiH-scDb-Fc_15	图 5	P2C47	VH-VH-VL-VL	BCMA		0	24	沉默的	20	没有	没有

[0516]

产品	NK 细胞接合剂形式	CD16A 结合结构域	CD16A 结合结构域次序	靶结合结构域 1	靶结合结构域 2	连接物 1 SEQ ID	铰链 SEQ ID	Fc 部分	连接物 2 SEQ ID	NK-NK 裂解的平均 EC_{50} [pM]	平均 $E_{最大}$ [%]
scDb-三体抗体_01	图 7	LSIV21	VL-VL-VH-VH	HSA(N1)	EGFR	NO: 20	没有	没有	0	没有	没有
scDb-三体抗体_02	图 7	LSIV21	VL-VH-VL-VH	HSA(N1)	EGFR	NO: 20	没有	没有	0	没有	没有
scDb-三体抗体_03	图 7	LSIV21	VL-VL-VH-VH	HSA(CA)	EGFR	NO: 20	没有	没有	0	没有	没有
scDb-三体抗体_04	图 7	LSIV21	VL-VH-VL-VH	HSA(CA)	EGFR	NO: 20	没有	没有	0	没有	没有
scDb-三体抗体_09	图 7	P2C47	VL-VH-VL-VH	HSA(N1)	BCMA	NO: 20	没有	没有	0	没有	没有
scDb-三体抗体_10	图 7	P2C47	VL-VH-VL-VH	HSA(N1)	BCMA	NO: 20	没有	没有	0	没有	没有
scDb-TriB-scFv_01	图 8	P2C47	VL-VH-VL-VH	HSA(CA)	BCMA	NO: 20	没有	没有	0	没有	没有
Db-Fc_01	图 9	P2C47	VH-VL	BCMA		NO: 20	NO: 24	沉默的	NO: 20	2511.3	52.8
Db-Fc_02	图 9	P2C47	VL-VH	BCMA		NO: 20	NO: 24	沉默的	NO: 20	没有	没有
Db-Fc_03	图 10	P2C47	VH-VL	BCMA		0	NO: 24	沉默的	NO: 21	1191.5	57.8
Db-Fc_17	图 10	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 24	沉默的	NO: 22	没有	没有
双-scFv-Fc_02	图 11	LSIV21	VL-VH	EGFR		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	没有	没有
双-scFv-Fc_04	图 11	LSIV21	VL-VH	EGFR		0	没有	野生型	0	394.0	75.8

[0517]

产品	NK 细胞接合剂形式	CD16A 结合结构域	CD16A 结合结构域次序	靶结合结构域 1	靶结合结构域 2	连接物 1 SEQ ID	铰链 SEQ ID	Fc 部分	连接物 2 SEQ ID	NK-NK 裂解的平均 EC_{50} [pM]	平均 $E_{最大}$ [%]
双-scFv-Fc_17	图 11	P2C47	VH-VL	BCMA		NO: 21	NO: 23	沉默的	NO: 20	648.4	11.1
双-scFv-Fc_27	图 11	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	没有	没有
双-scFv-Fc_28	图 11	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	没有	没有
双-scFv-Fc_31	图 11	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	野生型	NO: 20	273.4	56.9
双-scFv-Fc_32	图 11	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	野生型	NO: 20	416.5	64.2
双-scFv-Fc_39	图 11	LSIV21	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	没有	没有
双-scFv-Fc_03	图 12	LSIV21	VH-VL	EGFR		0	没有	野生型	0	1215.1	38.6
双-scFv-Fc_19	图 12	P2C47	VH-VL	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 22	2510.7	27.3
双-scFv-Fc_21	图 12	LSIV21	VL-VH	EGFR		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	没有	没有
双-scFv-Fc_25	图 12	P2C47	VH-VL	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	4935.5	28.1
双-scFv-Fc_26	图 12	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	没有	没有
双-scFv-Fc_29	图 12	P2C47	VH-VL	BCMA		0	NO: 23	野生型	NO: 20	300.8	40.8
双-scFv-Fc_30	图 12	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	野生型	NO: 20	555.6	12.7
scFv-IgAb_03	图 13	LSIV21	VH-VL	EGFR		0	没有	野生型	0	1482.5	31.8
scFv-IgAb_17	图 13	P2C47	VH-VL	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 22	4419.9	17.1
scFv-IgAb_18	图 13	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 22	没有	没有
scFv-IgAb_25	图 13	LSIV21	VL-VH	EGFR		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	没有	没有
scFv-IgAb_29	图 13	P2C47	VH-VL	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	15622.0	15.2
scFv-IgAb_30	图 13	P2C47	VL-VH	BCMA		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	没有	没有
scFv-IgAb_32	图 13	P2C47	VH-VL	BCMA		0	没有	野生型	0	495.3	39.9

[0518]

产品	NK 细胞接合剂形式	CD16A 结合结构域	CD16A 结合结构域次序	靶结合结构域 1	靶结合结构域 2	连接物 1 SEQ ID	铰链 SEQ ID	Fc 部分	连接物 2 SEQ ID	NK-NK 裂解的平均 EC_{50} [pM]	平均 $E_{最大}$ [%]
scFv-IgAb_37	图 13	P2C47	VL-VH	CD20		0	NO: 23	沉默的	NO: 20	没有	没有
scFv-IgAb_43	图 13	P2C47	VL-VH	EGFR		0	NO: 23	沉默的	NO: 22	没有	没有
双-scFv-IgAb_02	图 14	P2C47	VL-VH	CD20	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	没有	没有
双-scFv-IgAb_03	图 14	P2C47	VL-VH	CD19	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 22	没有	没有
双-scFv-IgAb_04	图 14	P2C47	VL-VH	CD19	His	0	NO: 23	沉默的	NO: 22	没有	没有
双-scFv-IgAb_05	图 14	P2C47	VL-VH	BCMA	His	0	NO: 23	沉默的	NO: 22	没有	没有
双-scFv-IgAb_06	图 14	P2C47	VL-VH	CD19	RSV	0	NO: 23	沉默的	NO: 22	没有	没有
KiH-scFv-Fc_09	图 15a	P2C47	VL-VH	CD19	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	没有	没有
KiH-scFv-Fc_17	图 15a	P2C47	VL-VH	CD20	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	没有	没有
KiH-scFv-Fc_11	图 15b	P2C47	VL-VH	CD19	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	没有	没有
KiH-scFv-Fc_18	图 15b	P2C47	VL-VH	CD20	BCMA	0	NO: 23	沉默的	NO: 20	没有	没有
scFv-IgAb_02	图 16	LSIV21	Fab	EGFR	n.a.	n.a.	NO: 23	沉默的	NO: 20	10989.3	32.2
scFv-IgAb_22	图 16	P2C47	Fab	BCMA	n.a.	n.a.	NO: 23	沉默的	NO: 20	2389.0	16.1
scFv-IgAb_26	图 16	LSIV21	Fab	EGFR	n.a.	n.a.	NO: 23	沉默的	NO: 20	8085.3	27.0
scFv-IgAb_31	图 16	P2C47	Fab	BCMA	n.a.	n.a.	NO: 23	沉默的	NO: 20	2221.5	7.2
scFv-IgAb_34	图 16	P2C47	Fab	BCMA	n.a.	n.a.	NO: 23	野生型	NO: 20	522.8	61.5
scFv-IgAb_35	图 16	P2C47	Fab	BCMA	n.a.	n.a.	NO: 23	野生型	NO: 20	602.1	63.1
scFv-IgAb_42	图 16	LSIV21	Fab	BCMA	n.a.	n.a.	NO: 23	沉默的	NO: 20	19538.0	16.8

[0519]

产品	NK 细胞接合剂形式	CD16A 结合结构域	CD16A 结合结构域次序	靶结合结构域 1	靶结合结构域 2	连接物 1 SEQ ID	铰链 SEQ ID	Fc 部分	连接物 2 SEQ ID	NK-NK 裂解的平均 EC_{50} [pM]	平均 $E_{最大}$ [%]
scFv-IgAb_44	图 16	LSIV21	Fab	RSV	n.a.	n.a.	NO: 23	沉默的	NO: 20	4402.7	19.1
IgAb_51（达雷木单抗）						0			0	144.2	> 50

使用 S 形剂量响应分析来计算 EC_{50} [pM] 值和 E_{max} [%] 值。给出了两个独立实验的平均值。N.t.，未测试；n.a.，不适用；否，没有靶细胞裂解。

[0520] 表4显示，在scDb V_L-V_H-V_L-V_H或scDb V_L-V_L-V_H-V_H中，在Db V_L-V_H或scFv V_L-V_H中，如果可变区从N末端至C末端开始排列，则包含两个与Fc部分或Fab区融合的scDb、Db或scFv

形式的CD16A抗原结合部分的抗原结合蛋白不会诱导NK-NK裂解。因此，结果表明NK-NK裂解不依赖于这些抗原结合部分结合重组CD16A或NK细胞上的CD16A的表观结合亲和力，如EC50和Emax所定义。此外，NK-NK裂解也独立于靶抗原结合结构域。

[0521] 实例7-重定向优化细胞杀死(ROCK®):用于接合先天性免疫力的高度通用的多特异性适用抗体平台

[0522] 概要

[0523] 基于ROCK®(重定向优化细胞杀伤)平台，开发了具有独特特性的免疫细胞接合剂组合。与传统的单克隆抗体和其他接合剂概念相比，这种新颖的模块化平台具有NK细胞接合的优势。考虑了分子设计、结合亲和力、免疫效应细胞的激活和PK特性。ROCK®平台可用于产生旨在激活先天性和适应性免疫力的新型抗体。

[0524] 在这一实例中，提出了一种新颖的完全模块化的平台，称为“重定向优化细胞杀伤”(ROCK®)平台，该平台包括多种不同形式，并配备了这种独特的抗CD16A结合结构域，用于产生一类旨在激活先天性和适应性免疫力的新的NK细胞募集抗体。

[0525] 材料与方法

[0526] 产生ROCK®重组抗体、对照物和抗原变体

[0527] 不同的重组蛋白(抗原、抗体、对照物)的基因序列由德国雷根斯堡的赛默飞科技/英杰基因(Thermo Fisher Scientific/Invitrogen GeneArt(Regensburg,Germany))合成，或通过PCR衍生。编码这些重组蛋白的表达载体是通过使用标准分子生物学技术将相应的序列元件克隆到哺乳动物表达载体pcDNA5/FRT(生命技术公司(Life Technologies))或其修饰形式中而产生的。可溶性重组抗原变体被构建为ECD序列与单体Fc的融合蛋白(Ying等人，J Biol Chem 2012;287:19399-408)。对于细胞表面锚定的抗原变体的表达，ECD序列或者融合到人EGFR的跨膜结构域(Wang等人.,Blood 2011;118:1255-63)，或者通过GPI锚定，使用人类CD16B内源序列和全长前肽序列进行GPI锚定的翻译后加工和脂化。在某些表达构建体中，将原始载体修饰为包含两个CMV启动子控制的表达盒，进行两条抗体链的共表达。哺乳动物表达载体的进一步修饰是用嘌呤霉素抗性基因代替潮霉素抗性。此外，将表达构建体设计为包含N末端信号肽的编码序列，以促进分泌。对于重组融合构建体(例如，具有IgG1 Fc部分的抗原)，使用细长引物PCR扩增编码融合伴侣的序列，以构建用于基因融合或限制酶消化的相应接头或连接物序列。使用吉布森组装法将得到的重叠DNA片段在相关位置插入共表达载体中，以产生最终构建体(Gibson等人，Nat Methods2010;7:901-3;Gibson等人，Nat Methods 2009;6:343-5)。通过使用定制引物在GATC(德国科隆)进行的Sanger测序来确认所有构建体的序列。

[0528] 如前所述，可溶性抗体或抗原或细胞表面锚定抗原在CHO中表达(Reusch等人，Clin Cancer Res 2016;22:5829-38)。使用一种或两种标准亲和色谱方法(蛋白A、蛋白L、Capture Select C标签或IMAC)从细胞培养上清液中纯化靶蛋白，具体取决于单体或多聚体(同二聚体、异二聚体或四聚体)的产物形式和融合形式亲和标签、κ轻链或Fc部分的存在。通过体积排阻色谱法进一步润饰所有蛋白制品，并使用SEC-MALS、SDS-PAGE和UV-Vis光谱进行分析。

[0529] 点印迹法、SDS-PAGE和蛋白质印迹法

[0530] 将纯化的重组CD16抗原变体点在硝酸纤维素膜上，或与样品缓冲液混合并在4-20％的Criterion TGX预制凝胶(Bio-Rad)上分离。使用Bio-Rad分子成像仪凝胶记录系统对总蛋白成像。使用Trans-Blot Turbo系统(Bio-Rad)，通过蛋白质印迹将蛋白质转移到PVDF Midi膜上。用溶于TBS的3％(w/v)脱脂奶粉(Merck)封闭膜30分钟，并在室温下使用2-4μg/mL的抗CD16 scFv抗体孵育1小时，然后用TBST(含0.1％(v/v)吐温20溶液的TBS)洗涤并且用TBS洗涤两次。使用稀释为次级检测缀合物的抗Penta-His-HRP(QIAGEN)1∶3000稀释液在室温下将膜孵育1小时。洗涤后，通过添加新鲜制备的0.66mg/mL DAB、0.02％$CoCl_2$、0.015％H_2O_2混合物在TBS中开始比色显影，并通过在水中冲洗膜来停止。干燥膜并照相。

[0531] ELISA中CD16A抗原结合的分析

[0532] 将96孔ELISA板(Immuno MaxiSorp;Nunc)于4℃在100mM碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中用重组抗原或不同的NK细胞接合抗体形式包被过夜。根据分子质量，包被0.5-3μg/mL的抗原或2-5μg/mL的抗体形式，使包被抗原的摩尔浓度等于大约30nM或包被抗体的摩尔浓度等于10-20nM。用溶解在PBS中的3％(w/v)脱脂奶粉(Merck)封闭后，在室温下，将His标记的scFv抗体或生物素化的CD16A-158V ECD单体Fc融合抗原在含有0.3％(w/v)脱脂奶粉的PBS中的系列稀释液分别在包被有抗原或抗体的板上孵育1.5小时。为了评估结合竞争，将scFv滴定并在板上与1nM或10nM的3G8 mAb共同孵育。用每孔300μL的含0.1％(v/v)吐温20的PBS洗涤三次后，使用1∶3000稀释度的检测缀合物Penta-His-HRP(Qiagen)、链霉亲和素-HRP(Roche)或1∶10000稀释度的用于检测竞争对手3G8的过氧化物酶AffiniPure山羊抗小鼠IgG(H+L)(Dianova)在室温孵育1小时。洗涤后，使用四甲基联苯胺(TMB)底物(Seramun)将板孵育1-2分钟或直至显色清晰可见为止。加入0.5M H_2SO_4(100μL/孔)，使反应停止。使用多孔酶标仪(Victor，珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))在450nm(1s)测量吸光度。绘制吸光度值，并使用GraphPad Prism 6.07版(GraphPad Software，La Jolla California USA)，通过将非线性回归模型拟合到S形剂量响应曲线(四参数对数拟合)来确定EC_{50}值。

[0533] 细胞系和细胞培养

[0534] NCI-H929(DSMZ，目录号：ACC-163)、MC/CAR(ATCC，目录号：CRL-8083)、MM.1S(ATCC，目录号：CRL-2974)、RPMI-8226(DSMZ，目录号：ACC 402)、KARPAS-299(DSMZ，目录号：ACC 31)和SW-982(ATCC，目录号：HTB-93)是购买的，而A-431由G.Moldenhauer博士(DKFZ Heidelberg)提供。所有细胞均在标准条件下于DMEM(目录号：41965-039)、IMDM(目录号：12440-053)或RPMI 1640(目录号：21875-034)培养基中，补充有：10％热灭活的胎牛血清(FCS)(目录号：10270-106)、100U/mL青霉素G/100mg/mL链霉素(目录号：1540-122)和2mM L-谷氨酰胺(目录号：25030-024；均来自Life Technologies)，在37℃的湿润5％CO_2气氛中培养。

[0535] 人NK细胞的分离

[0536] 使用Lymphoprep(StemCell Technologies，目录号：07861)通过密度梯度离心从健康志愿者的血沉棕黄层(德国红十字会，曼海姆，德国)中分离外周血单核细胞(PBMC)，如前所述(Fuss等人，Curr Protoc Immunol 2009;Chapter 7:Unit7 1)。在补充有10％热灭活的FCS、2mM L-谷氨酰胺和100U/mL青霉素G钠/100μg/mL硫酸链霉素的RPMI 1640培养基中，在37℃和5％CO_2的条件下在湿润的环境中进行PBMC的过夜(O/N)培养，然后使用EasySEP™阴性NK细胞富集试剂盒(StemCell Technologies，目录号：17955)根据制造商的

使用说明书富集NK细胞。NK细胞分离的纯度通过流式细胞术确定，通常表明＞80％$CD56^+$细胞(数据未显示)。

[0537] 细胞结合测定和流式细胞分析

[0538] 将0.2-1x10^6富集的人NK细胞的等分试样使用100μL所示构建体的系列稀释液在FACS缓冲液(PBS，Invitrogen，目录号:14190-169)中)(该系列稀释液包含2％热灭活的FCS(Invitrogen，目录号:10270-106)、0.1％叠氮化钠(Roth，Karlsruhe，目录号:A1430.0100)中，在不存在或(如果指示)存在10mg/mL多克隆人IgG(Gammanorm，Octapharma)的情况下，在37℃孵育45分钟。用FACS缓冲液反复洗涤后，用10μg/mL抗His mAb 13/45/31-2(Dianova，德国汉堡，目录号:DIA910-1MG)检测细胞结合的His标记的scFv、TandAb或aTriFlex抗体，然后加入15μg/mL FITC缀合的山羊抗小鼠IgG(Dianova，目录号:115-095-062)检测细胞结合抗体。先后使用可溶性His标记的BCMA、10μg/mL抗His mAb13/45/31-2和15μg/mL FITC缀合的山羊抗小鼠IgG检测双特异性BCMA/CD16A抗体构建体，而双特异性的含Fc的EGFR/CD16A构建体使用以下检测:15μg/mL FITC缀合的山羊抗人IgG(Dianova，目录号:109-095-098)检测细胞结合抗体。在最后一个染色步骤之后，再次洗涤细胞，并将其重悬于0.2mL FACS缓冲液中，该缓冲液含有2μg/mL碘化丙啶(PI)(Sigma，目录号:P4170)以便排除死细胞。使用Millipore Guava EasyCyte流式细胞仪(德国施瓦尔巴赫的默克密理博公司(Merck Millipore，Schwalbach，Germany))或CytoFlex细胞仪(德国克雷菲尔德的贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter，Krefeld，Germany))测量2-5x10^3活细胞的荧光，并且确定细胞样品的平均荧光强度。在减去单独使用第二和/或第三试剂染色的细胞的荧光强度值之后，将这些值用于非线性回归分析。使用单点结合(双曲线)拟合和GraphPad Prism软件V6或V7(美国加利福尼亚州拉荷亚的GraphPad软件公司(GraphPad Software，La Jolla California USA))计算平衡解离常数(K_D)。

[0539] 细胞毒性测定

[0540] 对于钙黄绿素释放测定，靶细胞用10mM钙黄绿素AM(Life Technologies，目录号:C3100MP)在RPMI培养基中于37℃标记30分钟，洗涤，在抗体浓度不断增加的情况下，将总体积为200μL的1x10^4肿瘤靶细胞与效应细胞一起以所指示的效应子:靶(E:T)比接种到96孔微孔板的各个孔中。为评估NK同类杀伤，在抗体浓度增加的情况下，将5x10^4钙黄绿素标记的原代人NK细胞与自体NK细胞以1:1的E:T比共同孵育。如果没有另做说明，则在37℃的湿润5％CO_2气氛中孵育4小时后，用酶标仪(Victor 3或EnSight，芬兰图尔库的珀金埃尔默公司(Perkin Elmer，Turku，Finland))在520nm测量释放到上清液中的钙黄绿素的荧光(F)。具体的细胞裂解计算如下:[F(样本)-F(自发)]/[F(最大)-F(自发)]x100％。F(自发)表示在不存在效应细胞和抗体的情况下从靶细胞释放的荧光，而F(最大)表示在通过添加Triton X-100(Roth，目录号:3051.2)至最终浓度为1％而诱导的总细胞裂解后释放的荧光。绘制特异性靶细胞裂解的平均值(％)和标准偏差(SD)，并通过使用GraphPad Prism(v6和v7;美国加利福尼亚拉荷亚的GraphPad软件公司)将非线性回归模型拟合到S形剂量反应曲线(变斜率)来确定体外效力(EC_{50})。

[0541] 表面等离子体共振

[0542] 在25℃，使用HBS-P+(10mM HEPES、150mM NaCl、0.05％(w/v)聚山梨酸酯20，pH 7.4)作为运行缓冲液并用于稀释，在Biacore T200仪器(GE Healthcare)上实施对CD16A的

单价相互作用的动力学结合分析并且对单价抗CD16A结合分析物与二价CD16A结合分析物进行定性解离相的比较。使用HBS-P+缓冲液将CAP传感器芯片(生物素捕获试剂盒,GE Healthcare)预处理过夜。在预捕获步骤中,将芯片表面用生物素捕获试剂(GE Healthcare)以5μL/min的速度在流通池1-4中处理100秒。

[0543] 为了对各种抗CD16A scFv进行动力学结合分析,在HBS-P+中制备了生物素化的单Fc(沉默)-Avi标记的受体,并且在流通池Fc 2和Fc 4中捕获了这些受体(人CD16A-158V、人CD16A-158F,对于测量与scFvs的相互作用为大约40RU,而对于测量与IgG的相互作用则为大约10RU)。在HBS-P+缓冲液中以指定的浓度系列制备IgG和scFv,并以40μL/min(缔合时间180秒,解离时间300秒)的流速注入参考表面(Fc 1,Fc 3)和受体捕获表面(Fc 2,Fc 4)。使用多循环动力学模式测量相互作用(所有抗体均以4倍稀释系列制备:scFv-Ab16^{中}150nM-0.586nM;scFv-Ab16^{高}50nM-0.195nM,scFv-AB16^{低}500nM-1.953nM,scFv-3G8和人IgG1 Fc增强型200nM-0.781nM,人IgG1和人IgG1 Fc沉默型2000nM-7.813nM),之后使用6M盐酸胍/250mM NaOH以10mL/min的速度进行120秒的再生循环。通过减去来自参考表面的信号(Fc 2-1,Fc 4-3)和零浓度(缓冲液对照物)信号来引用数据。使用Biacore T200评估软件(v3.1),通过将数据拟合为1:1结合模型(局部拟合的Rmax和RI)进行动力学评估。为了对感觉图进行定性比较,将单一浓度(312.5nM)的scFv和IgG以增加的捕获水平(人CD16A-158V 180RU和人CD16A-158F 90RU)注射到参考和受体捕获表面上。将参考曲线归一化为每个曲线的最大值并重叠。为了通过比较单价和二价CD16A结合抗体或配体的定性解离相来研究受体保留,在HBS-P+中制备了生物素化的单Fc(沉默)-Avi标记的受体并在流通池Fc 2和Fc 3中捕获了这些受体(人CD16A-158V大约160RU,食蟹猴CD16大约320RU)。将合并Ab16^{高}结合结构域和比较物、增强的人IgG1 Fc(S239D/I332E)和单价结合scFv-Ab16^{高}的关注抗体(scFv-IgAb、Db-Fc、KiH-scDb-Fc、TandAb)在HBS-P+缓冲液中稀释至50nM,并且以30μL/min(缔合时间180秒,解离时间3小时)的流速注射到参考表面(Fc 1)和受体捕获表面(Fc 2,Fc 3)。用6M盐酸胍/250mM NaOH以10mL/min的速度再生表面120秒。通过减去来自参考表面的信号(Fc 2-1,Fc 4-3)和零浓度(缓冲液控制物)信号来引用数据。将参考曲线归一化为每个曲线的最大值并重叠

[0544] ROCK接合剂的药代动力学研究

[0545] 在CD-1SWISS小鼠中评估了不同ROCK®平台形式的基本药代动力学参数。生命阶段由海德堡制药有限公司(Heidelberg Pharma GmbH)执行。CD-1SWISS雌性小鼠(例如,n=24)接受了0.3mg(∽10mg/kg体重)的静脉内单次施用。在1至3周内,在不同的时间点收集血液。取血液中的血清,并基于ELISA或MSD技术通过已建立的测定法进行分析。代表性的抽血时间表涵盖了13个时间点,例如,给药前d-7、5分钟、30分钟、30分钟、1小时、4小时、8小时以及第1、2、3、4、7、14和21天。使用增强的化学发光(ECL)检测,通过ELISA在Tristar LB941(Berthold仪器)上测定血清浓度。为了建立测定设置,测试了作为捕获和/或检测器的血清抗原和/或单克隆抗体的不同组合。对测定的其他关键参数进行表征,例如测定间/测定内的精密度和准确性、稀释线性和选择性、胡克效应和基质效应。

[0546] NK细胞活化测定

[0547] 在存在指示抗体浓度的完全RPMI 1640培养基中存在或不存在1x10^{4}RPMI-8226细胞的情况下,将5x10^{5}人PBMC接种到平底96孔微板的各个孔中。在37℃和5%CO_2的湿润环境

中孵育22小时后，收获细胞，洗涤并重悬于FACS/hIgG缓冲液(补充有1mg/mL多克隆人IgG的FACS缓冲液)中。然后在黑暗中在冰上用FACS/hIgG缓冲液中的CD56-PC7和CD69-PC5染色细胞15分钟。用FACS缓冲液反复洗涤后，通过流式细胞仪分析$1x10^3$-$1x10^4$细胞，并且将$CD56^+$ NK细胞的$CD69^+$细胞百分比定量。

[0548] 细胞因子释放测定

[0549] 将平底96孔微量滴定板在室温下用RPMI-1640/5％FCS封闭2-4小时，然后接种$5x10^5$PBMC，有或没有$1x10^4$NCI-H929肿瘤细胞，含或不含10μg/mL所示抗体，总体积为200μL/孔。将板在湿润培养箱中于37℃和5％CO_2下孵育24小时。收获细胞培养上清液，并在-80℃下保存，直到使用BD™细胞计数微珠阵列(CBA)人Th1/Th2细胞因子试剂盒II(BD Bioscience)在Bioassay GmbH(德国海德堡)进行细胞因子定量。

[0550] 结果

[0551] 合理生成抗CD16A抗体结构域

[0552] 大多数包含Fc部分的经典治疗性抗体均显示出较低的内在CD16A结合亲和力(FcγRIIIA)结合亲和力，并且采用CD16A上识别位点的免疫接合剂也受到IgG抗体的Fc比例的约束(de Palazzo等人，Cancer Res.1990;50:7123-8;de Palazzo等人，Cancer Res.1992;52:5713-9)并且不得不与血清IgG竞争CD16A结合，从而限制了CD16A的占用并增加了有效治疗性抗体的所需剂量。在以高水平血浆IgG为特征的疾病诸如多发性骨髓瘤中，与血浆IgG的竞争可能会更加明显(Michallet等人，Leukemia 2017)。此外，人类的CD16A多态性(Mahaweni等人，Sci.Rep2018;8:15983)，其中最突出的变体CD16A-158V和CD16A-158F与IgG的结合亲和力不同，因此FcR功能例如ADCC也存在差异，导致经典mAb疗法的疗效水平不同，具体取决于患者的个体CD16A基因型(Bowles等人，Blood 2006;108:2648-54;Burchard等人，Cancer Genetics 2013;206:130-4)。借助ROCK®平台，发明人创建了抗CD16A结构域，其识别CD16A2上的独特表位并且实际上不受血浆IgG竞争和CD16A多态性的影响。另外，它被设计用于与介导高效ADCC的CD16A的高亲和力结合，从而实现有效的免疫监视。

[0553] 为了满足上述此类抗体部分对CD16A具有高亲和力和选择性的标准，筛选了衍生自人PBMC的scFv库。使用人CD16B变体进行阴性选择，可以鉴定出最初具有低亲和力但对CD16A具有高选择性的抗体。使用不同的亲和力成熟方法(例如，轻链改组、重链CDR中的基本突变)，对CD16A的亲和力可以提高至少100倍，直至Kd为2nM(AB16高，表5)。低亲和力($Ab16^{低}$)、中等亲和力($Ab16^{中}$)和高亲和力结合scFv($Ab16^{高}$)抗体的CD16A结合性质在SPR中表征并与先前描述且充分表征的CD16泛特异性抗体3G8(Tamm等人，J Immunol 1996;157:1576-81)以及IgG1 Fc或经过遗传修饰的Fc变体进行比较，该经过遗传修饰的Fc变体具有CD16A结合和Fc介导的效应子功能增强性突变S239D/I332E(Lazar等人，Proc Natl Acad Sci U S A2006;103:4005-10)或沉默性突变L234F/L235E/D265A(Vidarsson等人，Front Immunol 2014;5:520;Baudino等人，J Immunol 2008;181:6664-9;Hezareh等人，Joumal of virology 2001;75:12161-8)。Ab16中和$Ab16^{高}$都证实了CD16A具有优越的结合性质(图18A和18B)。尽管野生型IgG1 Fc、增强型IgG1 Fc和CD16泛特异性抗体3G8的CD16A结合动力学取决于CD16A多态性，但$Ab16^{高}$以及$Ab16^{中}$和$Ab16^{低}$显示出可比较的动力学结合性质，而与等位基因形式CD16A-158V和CD16A-158F无关(表5，图18A、18B和20)。两种抗体还显示出与食蟹猴CD16A的良好交叉反应性(图19A，表6)。此外，从不同的亲和力成熟策略中鉴定出的

抗CD16A结合剂的表征证实了另一个独特的特征:不论CD16A基因型变异如何,CD16A的接合是均一的(表5,图18A、18B和20)。

[0554]

表 5: 不同 CD16A 结合 scFvs 或 Fc 部分的 SPR 结合动力学。

CD16 结合部分	人 CD16A-158V				人 CD16A-158F		
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)		k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
scFv Ab16^{低}	1.73E+05 ± 1.21E+03	5.34E-02 ± 1.55E-04	308		1.66E+05 ± 1.09E+03	4.74E-02 ± 1.26E-04	286
scFv Ab16^{中}	6.05E+5 ± 3.12e+3	1.27E-02 ± 5.44E-05	21		5.14E+05 ± 2.81E+03	1.02E-02 ± 4.36E-05	19.80
scFv Ab16^{高}	7.07E+05 ± 4.52E+02	1.38E-03 ± 5.96E-07	1.96		6.42E+05 ± 3.53E+02	2.01E-03 ± 5.49E-07	3.13
scFv 3G8	1.24E+06 ± 6.01E+03	1.06E-02 ± 4.15E-05	8.60		复杂的结合相互作用，无法进行 1:1 结合评估		
IgG1 Fc（野生型）	2.35E+04 ± 9.50E+01	9.95E-03 ± 1.23E-05	424		2.48E+04 ± 2.19E+02	6.75E-02 ± 1.78E-04	2720
IgG1 Fc（增强型，S239D / I332E）	4.74E+05 ± 3.85E+03	6.39E-03 ± 3.46E-05	13.50		复杂的结合相互作用，无法进行 1:1 结合评估		
IgG1 Fc（沉默型，L234F / L235E / D265A）	无结合信号				2.04E+04 ± 3.02E+02	7.10E-01 ± 6.34E-03	34700

显示了平均结合常数和标准误差 SE（缔合速率常数 k_a ($M^{-1}s^{-1}$)、解离速率常数 (s^{-1})、平衡解离常数 K_D (nM)）。感觉图如图 20 所示。

[0555] **表 6：** 不同抗 CD16 scFv 抗体与以 1.5μg/mL (32nM) 浓度包被并在 ELISA 中分析的 CD16 抗原变体的结合的总结。

	3G8 scFv		Ab16^{中} scFv		Ab16^{高} scFv	
包被抗原	平均 EC_{50} [nM]	SD	平均 EC_{50} [nM]	SD	平均 EC_{50} [nM]	SD
人 CD16A-158F	0.58	0.33	8.90	0.42	1.55	0.36
人 CD16A-158V	0.33	0.15	8.33	0.88	1.13	0.26
人 CD16B ^{变变}	0.28	0.12	没有结合	n.a.	没有结合	n.a.
人 CD16B^{pr}	0.25	0.09	没有结合	n.a.	没有结合	n.a.
人 CD16B^{pr,D129G}	0.25	0.06	没有结合	n.a.	没有结合	n.a.
人 CD16B^{pr,H140Y}	0.26	0.05	6.43	0.06	0.93	0.09
人 CD16B^{pr,S185F}	0.34	0.07	没有结合	n.a.	没有结合	n.a.
食蟹猴 CD16A	0.87	0.24	13.69	1.58	1.55	0.10

显示了在 2 次独立测定中测得的结合 scFv 的平均 EC_{50} [nM] 和 SD。

[0556] 在血清IgG存在下CD16A特异性结合不同表位

[0557] 除了显示高度多态性的CD16A以外，人CD16B的同种异型变体(Fc γ RIIIB)在细胞

外域(ECD)的五个氨基酸上存在差异(图21),其中一些能够进行额外的糖基化,从而导致GPI锚定的CD16B粒细胞抗原的三个不同变体,称为NA1、NA2和SH。值得注意的是,在CD16A和B的成熟ECD中,只有两个氨基酸位置始终存在差异(图21)。另外的变化在于CD16A和CD16B的膜锚定的不同模式。以成熟的GPI锚定形式裂解的CD16B的羧基末端前肽序列与将CD16A ECD连接至其跨膜结构域的序列具有高度同源性(图21)。为了研究哪种CD16A/CD16B序列变异决定了我们的CD16A严格选择性抗体的结合位点,生成了一组重组CD16抗原变体并进行了表征。CD16B(NA1)ECD表示为成熟形式(缺少前肽)($CD16B^{突变}$),也可以表示为含有前肽序列的前体($CD16B^{pr}$)。此外,生成了$CD16B^{pr}$ ECD突变体,其中CD16B特异性氨基酸被CD16A的同源残基替代,并在结合测定中进行了测试:$CD16B^{pr,D129G}$、$CD16B^{pr,H140Y}$、$CD16B^{pr,S185F}$。

[0558] 所有测试的CD16A和CD16B抗原变体都被CD16泛特异性抗体3G8识别,从而确认了它们的分子完整性(图19A、19B、19C和表6)。ScFv抗体$Ab16^{中}$或亲和力改善的$Ab16^{高}$识别CD16A抗原,但不识别CD16B的成熟抗原或含前肽的ECD融合抗原。但是,如果位置140的CD16B ECD组氨酸(H)突变为酪氨酸(Y)——在CD16A中相应位置的氨基酸——CD16B的这种突变形式($CD16B^{pr,H140Y}$)被亲和力优化的scFv抗体$Ab16^{中}$和$Ab16^{高}$充分识别(图19A-19C、表6)。如图19A、19B和19C所示,位置140的酪氨酸(Y)对于构象表位的形成和scFv抗体的CD16A特异性反应性至关重要。

[0559] 两种抗CD16 scFv都保持了良好的与食蟹猴CD16的交叉反应性(图19A、19B、19C和表6),尽管食蟹猴CD16 ECD序列与人CD16A共有总计16个氨基酸不同(参见图21中的比对)。使用具有不同CD16抗原变体的转基因表达的重组CHO细胞,证实了CD16ECD中位置140的酪氨酸(Y)对于通过所测试抗体$Ab16^{中}$和$Ab16^{高}$进行CD16A特异性识别的结合选择性和重要性(图19B)。使用这些scFv抗体在蛋白质印迹上进行SDS-PAGE后,还识别出与$CD16B^{pr}$或$CD16B^{突变}$抗原变体对比鲜明的CD16A或$CD16B^{pr,H140Y}$(图19C并且数据未显示)。在还原样品的蛋白质印迹上未获得信号(数据未显示),表明构象表位在被$Ab16^{中}$和$Ab16^{高}$识别的情况下可以通过位于CD16的位置140的酪氨酸确定。

[0560] CD16A上的IgG结合位点是受体的膜近端ECD上的不连续结合区域。先前已鉴定并且描述了CD16A与IgG的Fc部分之间低亲和力相互作用的关键氨基酸(Ahmed等人,J Struct Biol 2016;194:78-89)。据报道,抗体3G8结合CD16A和CD16B并阻断IgG结合(Tamm等人,J Immunol 1996;157:1576-81)。没有观察到IgG阻断所测试抗体与CD16A的结合。虽然3G8 mAb与CD16A的结合随着包含3G8相应可变结构域的scFv抗体的浓度增加而竞争性增强,但抗CD16 scFv抗体$Ab16^{中}$和$Ab16^{高}$并未阻断或替代CD16A上的3G8 mAb并且独立地结合(图22),而且在不存在或存在竞争性3G8 mAb的情况下具有相似的亲和力(表8)。如表8所示,3G8阻断了CD16上的Fc结合位点。由于已知占据CD16A上的3G8结合位点可阻断IgG结合,因此可以得出结论,所测试的抗CD16抗体在CD16A上的结合位点与IgG结合位点不同。因此,加入10mg/mL人IgG只会轻微影响scFv抗体$Ab16^{高}$和$Ab16^{中}$的NK细胞结合K_D值,而在生理IgG浓度下,抗体3G8的CD16结合部分的结合亲和力降低了20倍以上(表7)。因此,这些结果表明,所测试的CD16A结合抗体$Ab16^{高}$和$Ab16^{中}$具有高亲和力结合至CD16A特异性表位的优势,该结合不会受到竞争性IgG水平的损害或仅受到最小损害(例如,在人血液中),接下来它们的能力在多价抗肿瘤NK细胞接合ROCK®抗体中发挥作用。

[0561] 表7:抗CD16 scFv对原代人NK细胞的表观亲和力。

[0562]

scFv 克隆体	在缓冲液存在下的 K_D [nM]		在 10 mg/mL IgG 存在下的 K_D [nM]		10 mg/mL IgG 诱导的亲和力损失倍数	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
3G8	3.8	2.3	64.6	58.4	21.4	10.5
Ab16^{中}	52.3	18.8	138.3	22.1	2.7	0.5
Ab16^{高}	7.9	2.4	37.2	39.5	7.7	3.9

[0563] 在存在或不存在10mg/mL多克隆人IgG的情况下,在37℃对富集的原代人NK细胞进行了4次独立实验,确定了所指示的scFv的K_D值。

[0564] 表8:不同抗CD16 scFv抗体与以0.5μg/mL(10nM)包被并在不存在或存在竞争对手的等摩尔浓度CD16泛特异性抗体3G8(10nM)的情况下在ELISA中进行分析的CD16抗原的结合和竞争的总结。

[0565]

	3G8 scFv		Ab16^{中} scFv		Ab16^{高} scFv	
	平均 EC_{50} [nM]	SD	平均 EC_{50} [nM]	SD	平均 EC_{50} [nM]	SD
没有竞争	0.9	0.9	13.3	7.0	2.1	1.1
具有 8-10 nM 3G8 IgG	19.7	9.9	12.3	6.2	3.3	1.5
	抑制倍数		抑制倍数		抑制倍数	
通过 3G8 抑制的倍数	30.5		0.9		1.6	

[0566] 显示了在2次独立测定中测得平均EC_{50}[nM]和SD。

[0567] *ROCK*®平台

[0568] *ROCK*®形式

[0569] 为了证明抗CD16A结构域的多功能性并发挥其全部潜力,基于已知抗体形式创建了多种ROCK®架构(Spiess等人,Mol Immunol 2015;67:95-106)及其新设计的变体。

[0570] ROCK®平台抗体是多价和多特异性的,具有至少一个靶结合位点和两个CD16A抗原结合部分,能够进行二价结合。取决于所需的特征,诸如化合价、多特异性、药代动力学和药效动力学性质,构建体是从具有或不具有恒定区的结合结构域中模块化组装的。ROCK®抗体形式可分为四个不同的家族,包括:i)不含Fc的ROCK®,ii)Fc融合ROCK®,iii)IgG样ROCK®和iv)片段抗体结合结构域(Fab)融合ROCK®。家族成员ii)、iii)和iv)的靶细胞结合部分和效应细胞结合部分可以被形式化为单链Fv(scFv)、单链双抗体(scDb)、双抗体(Db)或能够实现多种功能的Fab。结合结构域或者通过柔性接头融合到CH2/CH3恒定结构域的N末端和C末端,或者通过铰链或更短的中间铰链融合到N末端(Merchant等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.2013;110:E2987-96)。对于家族i),结合结构域通过肽接头连接并组装成TandAb(McAleese等人,Future Oncol 2012;8:687-95)或aTriFlex分子(Gantke等人,Protein Eng Des Sel 2017;30:673-84)。为了确保NK细胞强

大的接合和活化，抗CD16A部分被设计用于所有家族中的二价结合。ROCK®中的肿瘤靶结合结构域接合剂可以是一价的或二价的，具体取决于所需的结合强度和/或靶生物学。平台的模块化进一步促进了用于共同靶向一种以上肿瘤抗原的多价和多特异性接合剂的构建。图23显示了所有四个ROCK®家族(i-iv)，及其关联形式。为了显示ROCK®形式的多功能性，使用了不同的靶结合部分，诸如BCMA、CD19、CD20、EGFR、HSA或RSV。

[0571] 在本文所述的功能测定中更详细表征的ROCK®构建体的代表性实例靶向实体瘤靶标EGFR或B细胞成熟抗原(BCMA)，即多发性骨髓瘤的靶标(表9A、9B和9C)。表9A、9B和9C中的结构中所示的符号与图23所示的符号一致。所有ROCK®构建体均包含完整的人类抗体结构域，并且具有大约102-250kDa的分子量。在一些情况下，标签(C标签和/或6xHis标签)在C末端添加，以使得能够通过亲和色谱进行异源二聚体抗体的选择性纯化，分析非对称产品中的两个不同多肽链，并最终获得高纯度(>90％)的所需产品种类。

[0572] 不含Fc的ROCK®家族(i)：这组不含Fc的构建体结合了众所周知的TandAb分子(其中一些产品已经在临床开发中(Reusch等人，MAbs 2014;6:728-39;Reusch等人，MAbs 2015;7:584-604;Ellwanger等人，Frontiers in Oncology 2017;7;Reusch等人，Clin.Cancer Res.2016;22:5829-38))以及aTriFlex分子(Gantke等人，Protein Eng Des Sel 2017;30:673-84)。后者可以被工程化为三特异性形式，采用两种不同的scFv特异性来解决两种不同的肿瘤相关抗原或目标表位，或用于PK延伸。为此目的，使用抗人血清白蛋白(HSA)结合结构域来延长原本寿命较短的不含Fc的抗体形式的血清半衰期。这一家族中的两种形式通过在两条独立的多肽链上的相应重链和轻链可变结构域的相互作用而组装成二聚体，作为头对尾的同二聚体(TandAb形式)或头对尾或头对头模式的异二聚体(aTriFlex)。这一组的成员是尺寸最小的ROCK®双特异性构建体，其功能二聚体的质量约为105kDa，并且缺少Fc部分和糖基化两者。

[0573] Fc融合ROCK®家族(ii)：这一含Fc的抗体形式的家族包含几种Fc变体(Vidarsson等人，Front Immunol 2014;5:520;Baudino等人，J Immunol 2008;181:6664-9;Hezareh等人，Journal of virology 2001;75:12161-8)，以避免Fcγ受体结合，但仍保持FcγRn结合以延长半衰期。因此，Fcγ受体结合完全由NK细胞结合结构域介导并且仅限于CD16A。此外，这一家族的Fc部分可以是基于IgG1的同二聚体(Bi-scFv-Fc，Db-Fc)、异二聚体(KiH-scFv-Fc，KiH-scDb-Fc)或单体Fc(scDb-mFc)。为了促进异二聚化，已经使用了使用经典Y407T(“孔”)和T366Y(“旋钮”)突变的“旋钮插入孔”(KiH)技术(Ridgway等人，Protein Eng1996;9:617-21)。单体Fc(mFc)部分已按照先前公布的方法(Ying等人，J.Biol.Chem.2012;287:19399-408)进行工程改造，使用柔性连接物与靶标和NK细胞结合部分融合。如已经针对KiH-scDb-Fc构建体之一显示的，抗CD16A或者在N末端或C末端位于与抗靶结合结构域相对的位置，或者在N末端与它并列。将CD16A结合结构域的scDb形式应用于KiH-scDb-Fc和scDb-mFc构建体。Db-Fc形式是在C末端或N末端表现出双抗体分子的同二聚体。这种Db-Fc形式由两个VL/VH结构域组装而成，这两个VL/VH结构域通过在C末端的柔性接头或在N末端的延伸铰链区融合到恒定区。

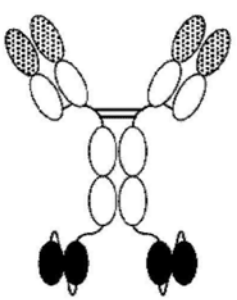
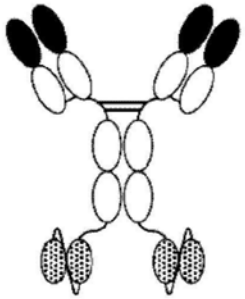
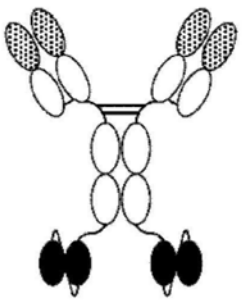
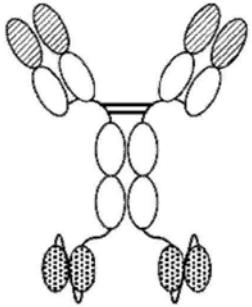
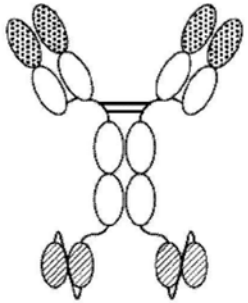
[0574] IgG样的ROCK®家族(iii)：这一双特异性抗体组包括scFv-IaAb和Bi-scFv-

IgAb,它们原则上是具有两个CD16A抗原结合部分的“延伸的人IgG1”分子(Coloma等人,Nat Biotechnol 1997;15:159-63),该抗原结合部分融合到C末端或位于N末端,作为两个Fab臂内的可变片段(Fv)。对于位于相应相对端的肿瘤靶结合结构域也是如此。双-scFv-IgAb分子表现出六价三特异性IgG样架构,具有两个额外的通过柔性接头融合到κ或λ恒定区的C末端和CH3的抗原结合scFv。

[0575] Fab融合ROCK®家族(iv):这一组的成员是“延伸的Fab”分子,可以细分为scDb-TriB和scDb-TriB-scFv形式。两者都包括抗CD16A结合部分,该抗CD16A结合部分作为二价scDb融合到scDb-TriB-scFv中的κ或λ恒定区的C末端,或者在scDb-TriB的情况下融合到CH1的C末端。对于PK延伸,位于Fab片段的N末端的可变结构域提供HSA结合。肿瘤靶向可以通过一价(scDb-TriB-scFv)或二价(scDb-TriB)结合部分(scFv对scDb)融合到各自的游离C末端来实现。

[0576]

表 9A- ROCK® 实例概述，该实例包含功能测定中使用的 Fab 或 scFv 融合排列中的 CD16 结合部分（蓝色表示）。

ROCK® 实例		**scFv-IgAb_A**	**scFv-IgAb_B**	**scFv-IgAb_C**	**scFv-IgAb_D**	**scFv-IgAb_E**
						
ROCK®	家族	IgG 样	IgG 样	IgG 样	IgG 样	IgG 样
	形式	scFv-IgAb	scFv-IgAb	scFv-IgAb	scFv-IgAb	scFv-IgAb
抗 CD16	位置	N	C	N	C	N
	Fv	中	中	高	高	中
	形式	Fab	scFv (HL)	Fab	scFv (LH)	Fab
靶标		EGFR	EGFR	EGFR	BCMA	BCMA
恒定区域		沉默型#	沉默型#	沉默型#	沉默型#	沉默型#

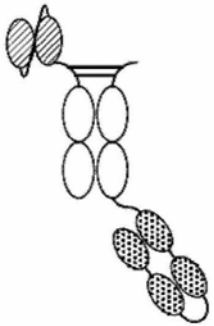
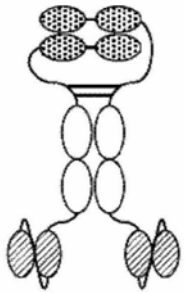
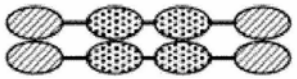
[0577]

表 9A（续表）

ROCK® 实例	scFv-IgAb_F	scFv-IgAb_G	双-scFv-Fc_A	双-scFv-Fc_B	双-scFv-Fc_C	双-scFv-Fc_D
ROCK® 家族	IgG 样	IgG 样	Fc 融合	Fc 融合	Fc 融合	Fc 融合
形式	scFv-IgAb	scFv-IgAb	双-scFv-Fc	双-scFv-Fc	双-scFv-Fc	双-scFv-Fc
位置	C	C	N	C	C	N
Fv	高	高	中	高	中	高
形式	scFv (LH)	scFv (LH)	scFv (LH)	scFv (LH)	scFv (HL)	scFv (LH)
靶标	EGFR	CD19	EGFR	BCMA	EGFR	EGFR
恒定区域	沉默型#	沉默型#	沉默型#	沉默型#	沉默型#	沉默型#

[0578]

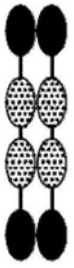
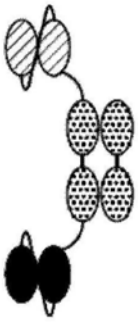
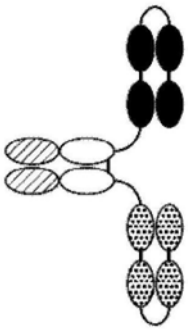
表 9B- ROCK® 实例概述，该实例包含功能测定中使用的双抗体 (Db) 样排列中的 CD16 结合部分（蓝色表示）。

ROCK® 实例		KiH-scDb-Fc_A	Db-Fc_A	TandAb_A	TandAb_B
					
ROCK®	家族	Fc 融合	Fc 融合	不含 Fc	不含 Fc
	形式	KiH-scDb-Fc	Db-Fc	TandAb	TandAb
抗 CD16	位置	C	N	核心	核心
	Fv	高	高	高	中
	形式	scDb	Db (LH)	Db (-LH-)	Db (-LH-)
靶标		BCMA	BCMA	BCMA	EGFR
恒定区域		沉默型#	沉默型#	-	-

#Fc 被突变 L234F/L235E/D265A 沉默；HSA^{低}：低亲和力的抗 HSA 结构域，HSA^{高}：高亲和力的抗 HAS 结构域

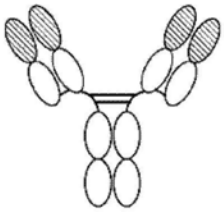
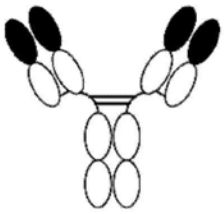
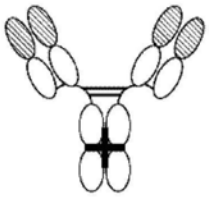
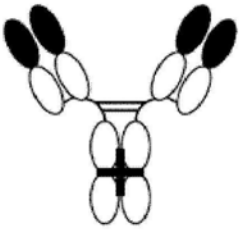
[0579]

表 9B（续表）

ROCK® 实例	TandAb_C	aTriFlex_A	aTriFlex_B	scDb-Trib_A
				
ROCK® 家族	不含 Fc	不含 Fc	不含 Fc	Fab 融合
ROCK® 形式	TandAb	aTriFlex	aTriFlex	scDb-Trib
ROCK® 位置	核心	核心	核心	C
CD16 Fv 亲和力	高	中	中	中
CD16 形式	Db (-LH-)	hetDb (-LL-/HH)	hetDb (-LL-/HH)	scDb
靶标	EGFR	EGFR / HSA[高]	EGFR/HSA[低]	EGFR/HSA[低]
恒定区域	-	-	-	-

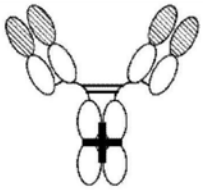
[0580] 表9C-功能测定中使用的对照抗体概述。

[0581]

名称		同型	抗 CD16 Fv	靶标	恒定区
IgAb_A		huIgG1	-	BCMA	野生型
IgAb_B		huIgG1	-	EGFR	野生型
IgAb_C		huIgG1	-	BCMA	增强*
IgAb_D		huIgG1	-	EGFR	增强*

[0582] 表9C(续)

[0583]

名称		同型	抗 CD16 Fv	靶标	恒定区
IgAb_E		huIgG1	-	CD19	增强*
scFv Ab16^{高}		-	高	-	-
BIKE		-	高	EGFR	-

[0584] *Fc被突变S239D/I332E增强(以+粗体显示)

[0585] *ROCK*®接合剂利用亲和力通过CD16A使NK细胞接合最大化

[0586] 在SPR中研究了多种ROCK®结合剂形式的CD16A结合保留,并将其与scFv Ab16^{高}的一价结合以及与工程化人IgG1 Fc(S239D/I332E)的一价结合进行比较,通过比较与人CD16A-158V或食蟹猴CD16的解离,与人CD16A的结合增强。所测试抗体在3小时解离过程中的相对结合信号显示,所有所测试ROCK®结合剂在人CD16A-158V(76.6%-92.5%)和食蟹猴CD16(84.9%-97.9%)上的受体保留信号明显优于解离速度快得多的IgG Fc(S239D/I332E)(10%)或一价结合scFv Ab16^{高}(0%-2.4%)(图24A-24C)。与SPR的解离测量结果一致,ROCK®接合剂,诸如具有Ab16^{高}Fv结构域的TandAb,在NK细胞表面的保留时间实质上长于经典的具有野生型Fc结构域的IgG或在Fc中具有S239D/I332E突变的增强型IgG(图25)。

[0587] 所有包含两个CD16A结合位点的不同ROCK®NK细胞接合剂的表观CD16结合强度进一步取决于抗CD16可变结构域的一致性(高亲和力Ab16^{高}或中等亲和力Ab16^{中})、抗体形式以及多特异性(包括但不限于,双特异性或三特异性)和多价(四价或六价)ROCK®NK细胞接合剂中抗CD16的位置。类似于一价结合性质,含有Ab16^{高}的ROCK®抗体的二价CD16A结合在ELISA中的表观亲和力高于相应的含有Ab16^{中}结构域的ROCK®接合剂。此外,ROCK®接合剂中抗CD16A结构域的不同位置可实现逐步亲和力调整:在Fc结构域N末端含有CD16结合部分的ROCK®架构介导的对CD16A的表观结合亲和力高于含有抗CD16结构域与Fc C末端融合体的抗体(图26A和26B)。结合亲和力的微调可以通过使用位于Fc的N末端的基于Fab或双抗体的结合模块来实现,与两个CD16结合scFvs的融合体相比,结合模块的结合强度更高(图26A和26B)。可以通过改变连接物的长度来进一步调节位于Fc的C末

端的含scFvs的ROCK®接合剂的CD16结合强度，从而使较长连接物的CD16结合的表观亲和力高于较短连接物(图26C)。同样，在这些设置中，亲合力以及空间位点都可能影响表观结合亲和力，而对CD16A结合进行工程化的不同靶标结合特异性的影响则可以忽略不计。

[0588] 为了评估通过ELISA测量的CD16A结合特性是否与与结合至NK细胞相关，在不存在或存在模仿人类血清生理状况的多克隆人IgG的情况下，在人原代NK细胞上对选定的一组含有Ab16^{中}Fv结构域的ROCK®接合剂进行滴定，并通过非线性回归确定表观亲和力(图27A、27B和27C)。再一次地，与在C末端scFv具有抗CD16A结构域的构建体(scFv-IgAb_B和Bi-scFv-Fc_C)相比，在N末端Fab或scFv中具有抗CD16A结构域的相应构建体(scFv-IgAb_A和Bi-scFv-Fc_A)对NK细胞表现出实质上更高的亲和力。有趣的是，具有中央抗CD16A双抗体的TandAb(表9B)显示与具有N末端Fab或scFv的构建体相似的对于NK细胞的高亲和力，但aTriFlex对NK细胞的亲和力却最低，尽管构建体核心中的抗CD16A双抗体基序相似而且也是不对称的可变结构域次序。高IgG浓度对在N末端Fab中具有抗CD16A结构域的TandAb和scFv-IgAb构建体的表观亲和力没有实质性影响，对包含无论是在N末端还是C末端融合到构建体上的抗CD16A scFv的构建体的结合有中等影响(4-9倍)，并且观察到了对aTriflex的亲和力的抑制作用最强。

[0589] NK细胞同类杀伤和*ROCK*®形式的设计

[0590] 抗体与CD16的多价高亲和力结合承担使多个NK细胞上的受体发生交联的风险，从而导致CD16A介导的对交联细胞的杀伤，从而耗尽了NK细胞群体(Choi等人，Immunology 2008;124:215-22)。这种NK细胞同类杀伤已被证明可用于其他单克隆抗体，如达雷木单抗，其靶向NK细胞浆膜上的CD38(Casneuf等人，Blood Adv.20170ct24;1(23):2105-2114)。减少主要效应细胞群体很可能会阻碍抗体介导的抗肿瘤反应的功效。因此，建立了一种体外检测方法，以监测由各种ROCK®形式诱导的NK细胞同类杀伤的程度。在此，将来自同一供体的原代人NK细胞用作效应细胞和靶细胞，从而如上所述确定NK细胞裂解的效力。作为阳性对照，达雷木单抗包含在检测设置中。发明人从未观察到使用仅包含单个CD16A结合位点的抗体进行的NK-NK同类杀伤，表明CD16A的双价性是NK细胞交联和随后的同类杀伤的先决条件。有趣的是，取决于ROCK®抗体的形式或结构域次序，不仅可以调节NK细胞同类杀伤的出现，而且可以调节NK细胞杀的效力(图28)。

[0591] 通常，与达雷木单抗相比，所有所分析的ROCK®抗体形式均显示出改善的NK细胞同类杀伤状况，从而导致NK细胞定向杀伤，平均效力为158pM。所有所测试的ROCK®抗体形式或引起较不明显的杀伤或根本不杀伤NK细胞。

[0592] 与在C末端进行CD16A接合相比，通过ROCK®抗体的N末端融合抗CD16A部分进行CD16A接合似乎更牢固地避免了NK细胞同类杀伤。然而，全面关注N末端CD16接合，揭示了使用基于Fab的CD16A接合造成的NK细胞耗尽更为明显，平均效力在1439和2389pM之间。

[0593] 有趣的是，通过分析CD16 Fv的结构域次序，与几乎全部诱导NK细胞裂解的VH-VL结构域次序相反，当结构域次序为VL-VH时，实质上较少的构建体诱导NK细胞同类杀伤。在那些在C末端或N末端包含CD16 Fv VL-VH结构域的ROCK®抗体中，只有很少的构建体可完全诱导NK细胞同类杀伤。

[0594] 总之，可通过避免基于Fab的CD16A接合并专注于CD16结合Fv结构域的有益VL-VH

顺序,有效地改善NK细胞同类杀伤诱导抗体的比例以及NK细胞杀伤的效力。

[0595] ROCK接合剂的优异体外细胞毒性

[0596] 在钙黄绿素释放测定中评估了各种靶向EGFR或BCMA的ROCK®接合剂的体外细胞毒性(图29A、29B、29C、29D和29E)。将具有Ab16^{高}Fv结构域的靶向BCMA的接合剂(TandAb_A、scFv-IgAb_D、Bi-scFv-Fc_B和KiH-scDb-Fc_A)与含Ab16^{中}Fv的接合剂scFv-IgAb_E和位于在细胞表面上表达高(NCI-H929)、中(MM.1S)或低(MC/CAR)BCMA水平的靶细胞上的Fc中具有S239D/I332E突变的Fc增强型抗BCMA IgG1(IgAb_C)进行了比较(图29A-29C)。示例性细胞毒性结果显示,不同的ROCK®接合剂形式对于BCMA^{高}NCI-H929靶细胞的效力和功效之间仅存在微小差异(EC_{50}范围:9.5pM-52.7pM),对于BCMA^{中}MM.1S靶细胞的功效相似但效力差异较大(EC_{50}范围:1.8pM-29.1pM),而对于BCMA^{低}MAC/CAR靶细胞的功效和效力之间有很大差异(EC_{50}范围:59pM-859pM)。针对靶向BCMA的TandAb_A、KiH-scDb-Fc_A和scFv-IgAb_D,产生了较低的EC_{50}值。这些结果表明,CD16A的两个化合价和对NK细胞的表观亲和力有利于触发不太敏感的靶细胞和/或表达较少数量细胞表面靶抗原的靶细胞的NK细胞介导的裂解。值得注意的是,仅CD16A的二价性不足以介导NK细胞的活化,因为抗体诱导的NK细胞活化标记物CD69的表达和人PBMC培养物中细胞因子的释放严格取决于靶细胞的存在(图49A-49F)。此外,与ROCK®抗体接合的NK细胞在人PBMC培养物中释放的炎性细胞因子水平比由BCMA定向的T细胞接合剂释放的炎性细胞因子水平低几个数量级(图50)。

[0597] 当与在Fc中具有S239D/I332E突变的Fc增强型抗EGFR IgG1(IgAb_D)、经典的靶向EGFR的IgG1(IgAb_B)或包含相同效应子接合结构域和靶结合结构域的一价接合双特异性接合剂(BiKE)比较时,与使用靶向BCMA的ROCK接合剂获得的结果相似,靶向EGFR的ROCK®接合剂、靶向EGFR的ROCK®接合剂在SW-982和A-431靶细胞的杀伤测定中显示出优异的效力,达到个位数的pM EC_{50}值(图29D和图51)。尽管EGFR/CD16A aTriFlex_A对人NK细胞的表观亲和力要比其他ROCK®接合剂低(图27A-27C),但其仍显露了与Fc增强型抗EGFR IgG1(IgAb_D)相似的效力(图51)。由于靶向BCMA的scFv-IgAb_E显示其对于EGFR阳性、BCMA阴性的靶细胞系A-431没有杀伤活性,因此可以排除非特异性杀伤(图51)。

[0598] 在图29E所示的体外细胞毒性测定中,对各种BCMA/CD16A接合剂的表观亲和力和各自效力的分析表明,对NK细胞上CD16A的表观亲和力与效力之间存在相关性。不仅在E:T为2:1的RPMI-8226靶细胞的3小时细胞毒性测定中观察到这种相关性,而且还在E:T比为5:1的NCI-H929靶细胞的4小时测定中观察到了这种相关性,从而证明了与NK细胞上CD16A的高亲和力结合促成了优异的细胞毒性效力。

[0599] 当在存在生理水平的竞争性IgG的情况下进行体外细胞毒性测定时,ROCK® CD30/CD16A靶向TandAb优于常规的和Fc工程化的抗CD30抗体。补充10mg/mL多克隆IgG明显增加了所有培养物中的背景裂解(图52B),这很可能是由于NK细胞引起的血清IgG诱导的脱颗粒作用(Jacobi等人,Clin.Immunol.2009;133:393-401)。但是,与单克隆IgG(图52C)或Fc工程化的IgG(图52D)的竞争完全阻断了常规抗体的活性或明显削弱了其效力和功效。即使在存在生理浓度的竞争性IgG的情况下,ROCK CD30/CD16A TandAb抗体在所有测试条件下仍显示出最大的细胞毒性效力和功效(图52A-52D、表10)。

[0600]

表 10 – 在体外细胞毒性试验中，在存在或不存在竞争性多克隆、单克隆或 Fc 增强型 IgG 的情况下，不同抗 CD30 抗体的效力 (EC50) 和功效 (Emax) 的总结。

	EC_{50} [pM]				$E_{最大}$ [%]			
	中等	+IgG 竞争 (10 mg/mL)			中等	+IgG 竞争 (10 mg/mL)		
竞争者 抗 CD30 抗体	w/o	多克隆人 IgG	抗 EGFR 人 IgG1 (IgAb_B)	抗 EGFR 人 $IgG1^{S239D/I332E}$ (IgAb_D（Fc 增强型）)	w/o	多克隆人 IgG	抗 EGFR 人 IgG1 (IgAb_B)	抗 EGFR 人 $IgG1^{S239D/I332E}$ (IgAb_D（Fc 增强型）)
ROCK 抗 CD30/CD16A (TandAb)	22.2	107.8	53.9	68.6	77.4	49.2	73.8	72.4
抗 CD30 IgG1 (IgAb)	517.9	n/a	n/a	n/a	44.1	没有	没有	没有
抗 CD30 $IgG1^{S239D/I332E}$（IgAb（Fc 增强型））	89.2	371.8	671.4	612.6	55.0	38.2	55.4	8.8

在存在连续稀释的 CD30/CD16A TandAb、抗 CD30 IgG1 (IgAb) 或 Fc 增强型抗 CD30 IgG1（IgAb（Fc 增强型））的情况下，以钙黄绿素标记的 CD30+ KARPAS-299 靶细胞与原代人 NK 细胞作为效应细胞，以 5:1 的 E:T 比进行 4 小时钙黄绿素释放细胞毒性测定。在下列中进行测定：仅 RPMI 1640 培养基，或者补充有 10 mg/mL 多克隆人 IgG、10 mg/mL 单克隆抗 EGFR IgG1 (IgAb_B) 或 10 mg/mL Fc 增强型抗 EGFR IgG1（IgAb_D（Fc-增强型））。

[0601] PK的调制

[0602] 治疗性抗体的另一个重要参数是其血清半衰期。对于具有高细胞毒性的抗体，半

衰期短可能是优选的，这样可以快速清除。相反，对于具有良好安全性的抗体，就通过避免频繁给药或需要连续输注而增加患者的便利性而言，较长的半衰期可能有利。

[0603] 在CD-1SWISS小鼠中分析了选定的一组ROCK®平台形式的基本药代动力学参数。对于IgG样家族的ROCK®，选择了两种代表性的scFv-IgAb抗体(scFv-IgAb_A和scFv-IgAb_D)，该抗体或在N末端Fab中含有抗CD16部分或作为scFv融合到CH3的C末端。对于Fc融合家族的ROCK®接合剂，分析了对称的Bi-scFv-Fc_A和不对称的含scDb的KiH-scDb-Fc_A抗体。最后，对于Fab融合和不含Fc的家族，选择了TandAb_B、aTriFlex_A、aTriFlex_B和scDb-Trib_A抗体进行PK分析。后两者采用n HSA结合部分，该结合部分对于PK延伸的亲和力低于aTriFlex_A中的高亲和力HSA结合结构域。选定的ROCK®接合剂中的肿瘤靶向结构域对人EGFR或BCMA具有特异性。由于靶结合部分和CD16A结合部分都不与相应的小鼠类似物发生交叉反应(数据未显示)，因此无法推测靶标相关的药效。在不同时间点收集接受单次静脉注射0.3mg(∽10mg/kg体重)不同测试项目的动物的血清样品，持续1或3周，并通过基于ELISA或MSD技术的既定方法进行分析。通过非房室药代动力学分析确定基本药代动力学参数(表11)。表11中的结构中所示的符号与图23所示的符号一致。在静脉注射不同的ROCK®形式后，血清浓度以双指数方式下降(图30)。两种IgG样形式的半衰期分别显示在329.2和364.3小时的同一范围内，与标准IgG分子相当[63]。Fc融合形式Bi-scFv-Fc_A和KiH-scDb-Fc_A的半衰期分别为95.8或74.3小时。它们的血清半衰期介于IgG样、不含Fc的和Fab融合ROCK®形式之间。但是，Bi-scFv-Fc_A的观察期仅为1周，而两种scFv-IgAb形式的观察期为3周。因此，这个值可能被低估了。测量了不含Fc的和Fab融合ROCK®形式的最短半衰期。含有高亲和力抗HSA结合部分的aTriFlex_A的平均表观终末半衰期为37.4小时，而TandAb的平均表观终末半衰期为18.0小时。scDb-Trib_A中的低亲和力抗HSA结构域不能延长这一构建体的半衰期(14.0小时)。可以基于平均停留时间(MRT)进行类似的排名，该平均停留时间定义了循环中未改变的药物。IgG样和Fc融合测试项目的MRT最高，为528.5至110.6小时，随后是分别以TandAb、aTriFlex和scDb-Trib为代表的不含Fc的和Fab融合形式，其MRT值相对较短，为从61.6至28.5小时。对于范围在0.006-1.228mL/h之间的清除率(C)，排名也是如此，既不包含Fc结构域也不包含抗HSA结构域的TandAb构建体获得了最高值。一个重要的参数也由曲线下面积(AUC)决定，该面积定义了有机体中分子随时间推移的最大量或暴露量。如预期的那样，使用含Fc的形式获得了最高的AUC值。对于较小的不含Fc的形式，测得的值降低了近10倍。同样，与寿命长的测试项目相比，TandAb的暴露最低，AUC差异为100倍。如果药物在体内均匀分布，稳态分布体积(V_{ss})定义了TandAb的导致体内药物总量所需的表观体积最高(4.8mL)，之后依次是两种IgG样格式(分别为3.3mL和3.1mL)，Fc融合格式(2.2mL)，aTriFlex(2.2mL)和scDb三体抗体(1.5mL)。scDb三体抗体的较低V_{ss}值表示该分子的大部分保留在血液隔室(血液)中。总之，不同的ROCK®形式在CD-1小鼠中表现出不同的PK分布，半衰期范围在14到364小时。

[0604]

表 11：在小鼠 PK 研究中分析的 ROCK® 形式

ROCK® 实例		scFv-IgAb_A	scFv-IgAb_D	双-scFv-Fc_A	KiH-scDb-Fc_A
ROCK® 家族		IgG 样	IgG 样	Fc 融合	Fc 融合
ROCK® 形式		scFv-IgAb	scFv-IgAb	双-scFv-Fc	KiH-scDb-Fc
抗 CD16	位置	N	C	N	C
	Fv	中	高	中	高
	形式	Fab	scFv (LH)	scFv (LH)	scDb
Fc		沉默型#	沉默型#	沉默型#	沉默型#
靶标		EGFR	BCMA	EGFR	BCMA
分析	周数	3	3	1	3
$C_{最大}$	[ng/mL]	204933	183848	227758	159789
$t_{最大}$	[h]	0.1	0.1	0.1	0.1
AUC ∞ (面积)	[(ng/mL)*h]	$4.36*10^7$	$4.94*10^7$	$2.17*10^7$	$7.55*10^6$
AUC ∞ (暴露)	[(ng/mL)*h]	$4.40*10^7$	$4.91*10^7$	$1.89*10^7$	$7.07*10^6$
$t_{一半}$ (E 阶段)	[h]	329.2	364.3	95.8	74.3
$t_{一半}$ (D/A 阶段)	[h]	14.7	1.9	1.17	2.3
MRT (暴露)	[h]	496.3	528.5	139.9	110.6
清除率 (面积)	[mL/h]	0.007	0.006	0.014	0.040
V_{ss} (面积)	[mL]	3.3	3.1	2.2	3.8
V_{ss} (暴露)	[mL]	3.2	3.2	2.2	4.4
R^2		0.987	0.975	0.977	0.980

$C_{最大}$：峰值血浆浓度；$t_{最大}$：达到 $C_{最大}$ 的时间；AUC：曲线下面积；$t_{一半}$：分子的半衰期。MRT：平均停留时间；V_{ss}：稳态分布体积；# Fc 被突变 L234F/L235E/D265A 沉默

[0605]

表 11（续）

ROCK®实例	TandAb_B	aTriFlex_A	aTriFlex_B	scDb-Trib_A
ROCK® 家族	不含 Fc	不含 Fc	不含 Fc	Fab 融合
ROCK® 形式	TandAb	aTriFlex	aTriFlex	scDb-Trib
抗 CD16 位置	核心	核心	核心	C
抗 CD16 Fv	中	中	中	中
抗 CD16 形式	Db (-LH-)	hetDb (LL/HH)	hetDb (LL/HH)	scDb
Fc	-	-	-	-
靶标	EGFR	EGFR / HSA[高]	EGFR/ HSA[低]	EGFR/HSA[低]
分析 周数	1	3	3	1
C 最大 [ng/mL]	144739	230447	235349	289826
t 最大 [h]	0.1	0.0	0.1	0.1
AUC ∞ (面积) [(ng/mL)*h]	$2.44*10^5$	$5.37*10^6$	$2.39*10^6$	$2.71*10^6$
AUC ∞ (暴露) [(ng/mL)*h]	$2.45*10^5$	$4.90*10^6$	$2.15*10^6$	$2.51*10^6$
$t_{一半}$ (E 阶段) [h]	18.0	37.4	11.8	14.4
$t_{一半}$ (D/A 阶段) [h]	5.4	4.9	1.1	5.3
MRT (暴露) [h]	33.8	61.1	18.1	28.5
清除率 (面积) [mL/h]	1.228	0.056	0.126	0.120
V_{ss} (面积) [mL]	4.8	2.2	2.0	1.5
V_{ss} (暴露) [mL]	10.7	2.6	2.2	1.7
R^2	0.947	0.994	0.986	0.989

[0606] $C_{最大}$：峰值血浆浓度；$t_{最大}$：达到$C_{最大}$的时间；**AUC**：曲线下面积；$t_{1/2}$：分子的半衰期。**MRT**：平均停留时间；V_{ss}：稳态分布体积；# Fc被突变L234F/L235E/D265A沉默

[0607] 实例8-CD16A/BCMA结合抗体的活性

[0608] 8.1.CD16A/BCMA结合抗体

[0609] 在此实例中，呈现了对以下CD16A/BCMA结合抗体的研究：CD16A/BCMA抗体I、CD16A/BCMA抗体II和CD16A/BCMA抗体III。

[0610] 如本实例中显示的数据所示，CD16A/BCMA抗体I是用于治疗多发性骨髓瘤的NK细胞接合剂，其机制与ADCC类似，并且具有实现显著活性并具有良好安全性的潜力。此外，已显示CD16A/BCMA抗体I具有治疗达雷木单抗(抗CD38抗体)耐药和难治性多发性骨髓瘤患者的潜力。此外，CD16A/BCMA抗体I可以与多发性骨髓瘤的另一种治疗联合使用，例如，包含抗体(包括但不限于，抗TIGIT抗体、抗PD1抗体、抗PD-L1抗体以及抗VEGF抗体)的治疗，以及包括细胞因子(例如，IL-12、IL-2等)的治疗。

[0611] 8.1.1.CD16A/BCMA抗体I

[0612] CD16A/BCMA抗体I是具有图13中所示结构的scFv-IgAb抗原结合蛋白，其包含(a)两个以scFv形式融合到顺序为V_L-V_H的同型二聚体人IgG CH2-CH3 Fc的C末端的CD16A抗原结合部分和(b)由IgG的Fab臂中每个Fv提供的两个靶抗原结合部分，其中靶抗原结合部分与BCMA结合。

[0613] 每个CD16A抗原结合部分包含包含SEQ ID NO:73中所示氨基酸序列的V_HCDR1、包含SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的V_HCDR2、包含SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的V_HCDR3、包含SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的V_LCDR1、包含SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的V_LCDR2、以及包含SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的V_L，CDR3。CDR是根据Kabat编号系统鉴定的。CD16A抗原结合部分中的每个包含：具有SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的V_H以及具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的V_L。

[0614] CD16A/BCMA抗体I的CD16A抗原结合部分与分子Fc部分的C末端融合，并通过连接物(具有SEQ ID NO:22中所示的氨基酸序列)以下述顺序连接：V_L(CD16A)-接头L3-V_L(CD16A)。接头L3具有SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列。

[0615] 每个靶向BCMA的部分包含：包含SEQ ID NO:67所示氨基酸序列的V_HCDR1、包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列的V_HCDR2、包含SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列的V_HCDR3、包含SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列的V_LCDR1、包含SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列的V_LCDR2、以及包含SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列的V_LCDR3。CDR是根据Kabat编号系统鉴定的。靶向BCMA的部分中的每个包含具有SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列的V_H和具有SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列的V_L。

[0616] CD16A/BCMA抗体I包含两个CD16A抗原结合部分和两个靶向BCMA的部分，其中，(a)两个CD16A抗原结合部分各自包含：包含SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列的V_HCDR1、包含SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的V_HCDR2、包含SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的V_HCDR3、包含SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的V_LCDR1、包含SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的V_LCDR2、以及包含SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的V_LCDR3；并且(b)两个靶向BCMA的部分各自包含：包含SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列的V_HCDR1、包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列的V_HCDR2、包含SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列的V_H CDR3、包含SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列的V_LCDR1、包含SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列的V_LCDR2、以及包含SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列的V_LCDR3。

[0617] CD16A/BCMA抗体I的CD16A抗原结合部分和靶向BCMA的部分的CDR序列的总结显示在图53A和53C中。

[0618] CD16A/BCMA抗体I包含两个CD16A抗原结合部分和两个靶向BCMA的部分，其中(a)两个CD16A抗原结合部分各自包含：包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的V_L；并且(b)两个靶向BCMA的部分各自包含：包含SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列的V_H和包含如SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列的V_L。

[0619] CD16A/BCMA抗体I的CD16A抗原结合部分和靶向BCMA的部分的V_H和V_L序列的总结显示在图53B和53D中。CD16A/BCMA抗体I的Fc部分是沉默的Fc部分，其包含人IgG1 CH2和CH3重链恒定结构域，其包含SED ID NO:29中所示的氨基酸序列。CH2重链恒定结构域具有两个沉默突变(也称为“无效应子突变”)：L234F和L235E。CH2重链恒定结构域包含SED ID NO:79中所示的氨基酸序列。CH3重链恒定结构域包含SED ID NO:109中所示的氨基酸序列。连接至靶向BCMA的部分的CH1重链恒定结构域包含SEQ ID NO:33中所示的氨基酸序列。

[0620] CD16A/BCMA抗体I包含一条多肽链1，该多肽链1包含一个CD16A抗原结合部分、同型二聚体人IgG CH2-CH3 Fc部分、靶向BCMA的部分的V_H，其中该多肽链1具有SEQ ID NO:61中所示的氨基酸序列。CD16A/BCMA抗体I包含多肽链2，该多肽链2包含靶向BCMA的部分的V_L，其中该多肽链2具有SEQ ID NO:62中所示的氨基酸序列。

[0621] 8.1.2.CD16A/BCMA抗体II

[0622] CD16A/BCMA抗体II是不含Fc的TandAb，其结构如图23(参见“TandAb”的结构)所示，其包含两个CD16A抗原结合部分和两个靶抗原结合部分，其中CD16A抗原结合部分以scFv的形式提供并且位于靶抗原结合部分的V_H和VL之间。

[0623] CD16A抗原结合部分按以下顺序与靶抗原结合部分融合：

[0624] V_HBCMA-接头L5-V_LCD16A-接头L6-V_HCD16A-接头L5-V_LBCMA

[0625] 接头L5具有SEQ ID NO:129中所示的氨基酸序列。接头L5具有SEQ ID NO:130中所示的氨基酸序列。

[0626] 每个CD16A抗原结合部分包含包含SEQ ID NO:73中所示氨基酸序列的V_HCDR1、包含SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的V_HCDR2、包含SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的V_HCDR3、包含SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的V_LCDR1、包含SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的V_LCDR2、以及包含SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的V_LCDR3。CDR是根据Kabat编号系统鉴定的。CD16A抗原结合部分中的每个包含：具有SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的V_H以及具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的V_L。

[0627] 每个靶向BCMA的部分包含：包含SEQ ID NO:67中所示氨基酸序列的V_HCDR1、包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列的V_HCDR2、包含SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列的V_HCDR3、包含SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列的V_LCDR1、包含SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列的V_LCDR2、以及包含SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列的V_LCDR3。CDR是根据Kabat编号系统鉴定的。靶向BCMA的部分中的每个包含具有SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列的V_H和具有SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列的V_L。

[0628] CD16A/BCMA抗体II包含两个多肽，每个多肽具有SEQ ID NO:126中所示的氨基酸序列。

[0629] 8.1.3.CD16A/BCMA抗体III

[0630] CD16A/BCMA抗体III是KiH-scDb-Fc，具有图5中所示的结构，其包含(a)两个CD16A抗原结合部分，该抗原结合部分以scDb形式融合到顺序为V_L-V_H-V_L-V_H的IgG CH2-CH3 Fc的

C末端，以及(b)一个靶抗原结合部分，其以scFv形式融合到Fc部分的N末端，其中靶抗原结合部分与BCMA结合。

[0631] 每个CD16A抗原结合部分包含包含SEQ ID NO:73中所示氨基酸序列的V_HCDR1、包含SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的V_HCDR2、包含SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的V_HCDR3、包含SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的V_LCDR1、包含SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的V_LCDR2、以及包含SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的V_LCDR3。CDR是根据Kabat编号系统鉴定的。CD16A抗原结合部分中的每个包含：具有SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的V_H以及具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的V_L。

[0632] CD16A抗原结合部分与异二聚体Fc部分融合，并通过具有SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列的连接物以下述顺序连接：V_L(CD16A)-接头L1-V_H(CD16A)-接头L2-V_L(CD16A)-接头L1-V_H(CD16A)。接头L1具有SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列，并且接头L2具有SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列。

[0633] 靶向BCMA的部分包含：包含SEQ ID NO:67所示氨基酸序列的V_HCDR1、包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列的V_HCDR2、包含SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列的V_HCDR3、包含SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列的V_LCDR1、包含SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列的V_LCDR2、以及包含SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列的V_LCDR3。CDR是根据Kabat编号系统鉴定的。靶向BCMA的部分中的每个包含具有SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列的V_H和具有SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列的V_L。

[0634] CD16A/BCMA抗体III包含两个CD16A抗原结合部分和一个靶向BCMA的部分，其中，(a)两个CD16A抗原结合部分各自包含：包含SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列的V_HCDR1、包含SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列的V_HCDR2、包含SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列的V_HCDR3、包含SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的V_LCDR1、包含SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的V_LCDR2、以及包含SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的V_LCDR3；并且(b)靶向BCMA的部分包含：包含SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列的V_HCDR1、包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列的V_HCDR2、包含SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列的V_HCDR3、包含SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列的V_LCDR1、包含SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列的V_LCDR2、以及包含SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列的V_LCDR3。

[0635] CD16A/BCMA抗体III的Fc部分是沉默的Fc部分，其包含人IgG1 CH2和CH3重链恒定结构域，其具有SED ID NO:31中所示的氨基酸序列。CH2重链恒定结构域具有两个沉默突变(“无效应子”突变)：L234F和L235E。CH2重链恒定结构域包含SED ID NO:79中所示的氨基酸序列。CH3重链恒定结构域具有一个沉默突变(无效应子突变)D265A。CH3重链恒定结构域包含SED ID NO:81中所示的氨基酸序列。

[0636] CD16A/BCMA抗体III包含一条多肽链1，该多肽链1包含两个CD16A抗原结合部分和一个IgG CH2-CH3 Fc部分，其中多肽链1具有SEQ ID NO:63中所示的氨基酸序列。CD16A/BCMA抗体III包含多肽链2，该多肽链2包含一个靶向BCMA的部分，其中该多肽链2具有SEQ ID NO:64中所示的氨基酸序列。

[0637] 8.2.结合特性

[0638] CD16A/BCMA抗体I和CD16A/BCMA抗体III都特异性结合CD16A，但不结合CD16B。CD16A/BCMA抗体I对CD16A和BCMA具有高结合亲和力，例如，抗体以约16nM的K_D结合CD16A，

并以约2nM的K_D结合BCMA。

[0639] CD16A/BCMA抗体I缺乏Fcγ R结合，如通过ELISA所证实。由于CD16A/BCMA抗体I不通过其Fc区与CD16A结合，因此其以不依赖于CD16A多态性的方式与CD16A结合。例如，在同一天用CD16A-158V/V健康捐献者和CD16A-158F/F健康捐献者评估了CD16A/BCMA抗体I对多发性骨髓瘤细胞系的细胞毒性。结果示于图31A和31B中。与CD16A-158V/V相比，使用CD16A-158F/F时，CD16A/BCMA抗体I未表现出变化或甚至增加的活性。相比之下，与CD16A-158V/V相比，使用CD16A-158F/F时，通过其Fc区与Cd16a结合的达雷木单抗显示了降低的活性。还使用CD16A-158V/F健康捐献者评估了CD16A/BCMA抗体I对多发性骨髓瘤细胞系的细胞毒性，对于CD16A-158F/F和CD16A-158V/V均观察到了大约在之间的细胞毒性(数据未显示)。

[0640] 8.3多发性骨髓瘤靶细胞的体外细胞毒性

[0641] 8.3.1.使用钙黄绿素AM细胞毒性测定评估细胞毒性

[0642] 使用人NK细胞作为效应细胞，多发性骨髓瘤细胞系作为靶细胞，进行钙黄绿素AM细胞毒性测定。简而言之，使用无血清培养基，将目标细胞在37℃用10uM钙黄绿素AM(Thermo Fisher Scientific;Waltham,MA)新鲜标记30分钟。离心两次洗涤后，将细胞重悬于测定培养基(补充有10％热灭活胎牛血清的RPMI 1640)中，并以1X10^4细胞/孔的密度分配到96孔U型底组织培养板中。然后将新鲜制备的效应细胞以5X10^4细胞/孔的密度添加到每个孔中。孵育30分钟后，将测试样品的系列稀释液(0.64、3.2、16、80、400和2000pm)加入板中，并在37℃的含5％CO_2的湿润培养箱中再孵育4小时。孵育后，将板以300×g离心10分钟。将上清液转移至黑色不透明的96孔微孔板(OptiPlate-96;PerkinElmer;Waltham,MA)中，并使用Infinite M1000 PRO酶标仪(Tecan Trading AG;Männedorf,Switzerland)以相对荧光单位(RFU)测量荧光信号，激发/发射波长为495/515nm。来自仅包含靶细胞的孔的信号代表钙黄绿素自标记细胞的自发释放，而包含使用10％Triton X-100(Sigma-Aldrich;St.Louis,MO)裂解的靶细胞的孔的信号代表最大释放。在不添加测试样品的情况下，在含有靶细胞和效应细胞的孔中测量了非特异性效应细胞介导的细胞毒性。具体的细胞毒性程度计算如下：

[0643] 细胞毒性百分比＝100*(实验性释放-非特异性释放)/(最大释放-自发释放)

[0644] 使用GraphPad Prism 6软件(Graphpad Software;San Diego,CA)，通过拟合四参数非线性回归模型来分析和绘制数据。

[0645] 结果如表12所示。

[0646] 表12-CD16A/BCMA抗体I的细胞毒效力

[0647]

细胞系	抗BCMA SABC	平均ED_{50}[pM]
NCI-H929	51,479	21.8
RPMI-8226	14,707	55.1
MM.1S	13,182	12.1
U266	10,614	19.8
Daudi	10,371	5.7
SK-MM2	3,617	3.3
HuNS1	1,438	59.3
ARH77	1,183	79.6

MC/CAR	449	96.5

[0648] *SABC代表特异性抗体结合能力，在这种情况下，由抗BCMA mAb ANC3B1和QIFIKIT(Agilent)确定。

[0649] 8.3.2.使用FACS评定细胞毒性

[0650] 从健康的人类献血者A分离出人PBMC和分离的NK细胞，并冷冻以备后用。PBMC在解冻后通过台盼蓝染色为约85％有活力的，随后通过FACS使用7AAD确认。将PBMC与$BCMA^+$多发性骨髓瘤肿瘤细胞系以约0.4或约4-5的E:T比共培养，并在37℃和5％CO_2的条件下在0.1-3000pM的3倍系列稀释的测试样品中暴露大约20小时。抗体染色和FACS用于确定MM肿瘤细胞上的BCMA表达，并监测多发性骨髓瘤靶细胞的细胞毒性。使用软件程序FlowJo和GraphPad Prism 6分析数据。结果示于图32A-32E、33A-33C和34A-34C。图32A-32E显示，CD16A/BCMA抗体I在E:T比为约0.4时有效(由多发性骨髓瘤患者队列确定)。图33A-33C和34A-34C显示，暴露于CD16A/BCMA抗体I的人NK细胞特异性地靶向并耗尽了$BCMA^+$靶细胞。

[0651] 两种方法的评估均表明，CD16A/BCMA抗体I广泛的靶标表达水平上均具有体外效力。观察到的功效与E:T比无关，也与BCMA表达无关。另外，CD16A/BCMA抗体I在多发性骨髓瘤细胞系中显示出与达雷木单抗类似的效力。参见图33A至图33C。

[0652] 8.4.针对低BCMA表达肿瘤细胞的体外细胞毒性

[0653] 通过钙荧光素释放测定法和FACS评估CD16A/BCMA抗体I针对低BCMA表达的Raji肿瘤细胞系的体外细胞毒性。如上所述，用于评估多发性骨髓瘤靶细胞的体外细胞毒性的钙黄绿素释放测定法被用于本研究。新鲜制备的NK细胞和Raji Burkitt淋巴瘤肿瘤细胞系的E:T比为约5。结果示于图35A-35D尽管几乎检测不到BCMA表面表达，但观察到CD16A/BCMA抗体I、CD16A/BCMA抗体II和CD16A/BCMA抗体III对BCMA+靶细胞的体外裂解。

[0654] 对于FACS测定，从健康的人类献血者中分离出人类NK细胞。在测定设置之前，将NK细胞和Raji细胞分别与0.5mg/ml低内毒素hIgG分别预孵育至少1小时。将NK细胞与Raji Burkitt淋巴瘤肿瘤细胞系以大约5的E:T比共培养，并在37℃和5％CO_2的条件下在10-1000pM的3倍系列稀释的测试样品中暴露约20小时。抗体染色和FACS用于监测RAJI靶细胞的细胞毒性。使用软件程序FlowJo和GraphPad Prism 6分析数据。结果示于图36A-36C。如图36C所示，CD16A/BCMA抗体I对低表达BCMA的Raji肿瘤细胞系表现出体外细胞毒性。

[0655] 8.5.针对自体$BCMA^+$正常人浆细胞的体外活性

[0656] 通过FACS评估CD16A/BCMA抗体I对自体$BCMA^+$正常人浆细胞的体外活性。从健康人类献血者的外周血中分离出人NK。来自同一人类供体的骨髓被用于分离人浆细胞。在测定设置之前，将NK细胞、浆细胞和NCI-H929细胞分别与0.5mg/ml低内毒素hIgG分别预孵育至少1小时。同种异体:将NK细胞与NCI-H929肿瘤细胞系以约3的E:T比共培养，并同时在37℃和5％CO2的条件下在3-3000pM的3倍系列稀释的测试样品中暴露约20小时。自体:将NK细胞与人浆细胞以约23的E:T比共培养，并与上述测试品一起孵育。使用抗CD56 E-450和CD138-APC进行抗体染色并随后进行FACS来监测H929和浆细胞的细胞毒性。使用软件程序FlowJo和GraphPad Prism 6分析数据。

[0657] 结果示于图37A和37B中。CD16A/BCMA抗体I表现出针对自体$BCMA^+$正常人浆细胞的体外活性。

[0658] 8.6.在不存在$BCMA^+$靶细胞的情况下，CD16A的活化不足

[0659] 发明人还研究了在不存在BCMA$^+$靶细胞的情况下,CD16A/BCMA抗体I是否可以使NK细胞活化。首先,研究了在存在BCMA$^+$靶细胞的情况下,NK细胞上CD16的活化和CD16水平的维持。NK细胞来自两个独立的健康人类献血者。将NK细胞与MM.1S BCMA$^+$靶细胞共培养,并于37℃在0、0.03或0.1nM的抗BCMA/CD16A抗体I或Ab-1(阴性对照物/CD16a)或抗-CD38(达雷木单抗阳性对照物)中暴露20小时。使用抗体染色和FACS确定活CD56^{dim}/CD16$^+$细胞和CD56^{dim}/CD16$^+$/CD69$^+$/CD25$^+$,分别如图34A和34B所示。BCMA$^+$靶细胞的耗尽如图34C所示。使用软件程序FlowJo和GraphPad Prism 6分析数据。结果示于图38A-38C。在存在BCMA$^+$靶细胞的情况下,CD16A/BCMA抗体I活化并维持NK细胞上CD16的水平。

[0660] 接下来,研究了在不存在BCMA$^+$靶细胞的情况下,NK细胞上CD16的活化和CD16水平的维持。NK细胞来自两个独立的健康人类献血者。单独培养NK细胞,并于37℃在0、0.03或0.1nM的抗BCMA/CD16a抗体I或Ab-1(阴性对照物/CD16a)或抗CD38(达雷木单抗阳性对照物)中暴露20小时。使用针对CD标记物(CD56、CD16、CD69和CD25)的抗体染色和FACS确定活CD56^{dim}/CD16$^+$细胞和CD56^{dim}/CD16$^+$/CD69$^+$/CD25$^+$,分别如图32A和图32B所示。使用软件程序FlowJo和GraphPad Prism 6分析数据。结果示于图39A-39C。如图39A-39C所示,在不存在BCMA$^+$靶细胞的情况下,CD16A/BCMA抗体I不会活化或降低NK细胞上的CD16水平。与达雷木单抗相比,在不存在BCMA$^+$靶细胞的情况下,CD16A/BCMA抗体I显示了NK细胞上的CD16$^+$数量和表达的最小程度的下降,并且表现出显著减少的CD69$^+$25$^+$NK细胞数(例如,～100倍(n＝2个供体;单次实验))。在存在BCMA$^+$靶细胞的情况下,CD16A/BCMA抗体I显示出与达雷木单抗类似的活性。参见图38C。

[0661] 8.7.存在血清Ig时的活性

[0662] 在存在血清或Ig的情况下,研究了CD16A/BCMA抗体I与NK细胞的结合以及CD16A/BCMA抗体I的细胞毒性和NK存活率。

[0663] 从健康的人类献血者中分离出人类NK细胞。在测定设置之前,将NK细胞和NCI-H929细胞或MM.1S细胞分别在10mg/mL血清Ig、50％人自体血清或100％人血清中预孵育2小时。将NK细胞与NCI-H929或MM.1S细胞以大约5的E:T比共培养,并在37℃和5％CO_2的条件下在0.1-100nM的10倍系列稀释的测试样品中暴露约20小时。使用CD138和CD56进行抗体染色并随后进行FACS来监测MM.1S或NCI-H929靶细胞的细胞毒性和NK存活率。使用软件程序FlowJo和GraphPad Prism 6分析数据。

[0664] 如图40A所示,与不存在Ig或血清的情况相比,在存在10mg/mL Ig或血清的情况下,CD16A/BCMA抗体I能够以降低的亲和力与NK细胞结合。如图40B所示,与不存在Ig或血清的情况相比,在存在血清的情况下,CD16A/BCMA抗体I能够以降低的效力杀伤BCMA$^+$靶细胞。如图40C和40D中所示,在存在50％自体人类血清的情况下,CD16A/BCMA抗体I耗尽了BCMA$^+$靶细胞,而没有NK细胞的损失。如图40D和40E中所示,CD16A/BCMA抗体I并未耗尽NK细胞,而达雷木单抗却耗尽了。因此,人Ig不会干扰CD16A/BCMA抗体I的NK活性。

[0665] 在不存在BCMA$^+$靶细胞的情况下,血清影响CD16A的表达和NK细胞的活化。参见图41A和41B中。如图41A所示,血清降低了CD16A表达。如图41B所示,血清增加了NK细胞的非靶向介导的活化。因此,CD16在存在血清时的低表达表明NK细胞的非CD16A介导的活化。

[0666] 8.8.细胞因子联合治疗

[0667] 达雷木单抗和埃罗妥珠单抗(elotuzumab)与免疫调节药物(IMiD)和蛋白酶体抑

制剂联合时有效。联合活性的机制有望应用于NK细胞接合剂。例如，IMiD会影响TNF-α、IL-12和IL-6的产生，并刺激T细胞分泌间接增强NK细胞数量和功能的IL-2和IFN-γ(Liu等人，Jour.Of Leukocyte.(2018)；103(5)：821-828)。蛋白酶抑制剂降低I类MH的表达。联合CD16A/BCMA抗体I与iMiD的理由包括下列：IL-15通过增殖增加NK细胞的数量，抗TIGIT抗体是CD8+ T细胞和NK细胞的检查点抑制剂，并且抗FcRH5/CD3抗体利用NK细胞的细胞毒性潜力促使T细胞进一步浸润到肿瘤内。

[0668] 为了研究细胞因子治疗是否可以影响CD16A/BCMA抗体的活性，将IL-15加入到CD16A/BCMA抗体I的治疗中。如图42A和42B中所示，IL-15增加了MM细胞中CD16A/BCMA抗体I的活性。添加IL-15的CD16A/BCMA抗体I的MM耗尽增加，而达雷木单抗则没有。

[0669] 8.9.CD16A/BCMA抗体I在治疗达雷木单抗R/R多发性骨髓瘤患者中的用途

[0670] CD16A/BCMA抗体不同于达雷木单抗(也称为“Dara”)。例如，达雷木单抗在多发性骨髓瘤(也称为“MM”)中具有补体依赖性细胞毒性活性(de Weers，M.等人，J.immun.2011，186(3)：1840-1848)以及通过CD38的交联进行信号传导而诱导凋亡的能力(Overdijk，M.B.等人，Journal of immunology2016；197(3)：807-813)。但是，CD16A/BCMA抗体I没有这些活性

[0671] 与达雷木单抗不同，CD16A/BCMA抗体I的活性不受降低Fc介导药物活性的CD16A多态性的影响。参见图31A和31B中。此外，与CD38疗法(例如，达雷木单抗)不同，CD16A/BCMA抗体I不会耗尽NK细胞。参见图40A、40B、40C、40D和40E。此外，IL-15治疗可增加CD16A/BCMA抗体I的活性，但不能增加达雷木单抗的活性。参见图42A和42B中。

[0672] 鉴于本文公开的抗BCMA/CD16A抗体(例如，CD16A/BCMA抗体I)的与达雷木单抗区别开来的特征，这些抗BCMA/CD16A抗体(例如，CD16A/BCMA抗体I)是治疗复发/难治性(“R/R”)MM患者(例如，达雷木单抗R/R多发性骨髓瘤患者)的候选药物。达雷木单抗难治性表型似乎是由CD38的下调和补体抑制蛋白的上调介导的(Nijhof等人，Leukemia(2015)；29(10)；2039-2049；Nijhof等人.，Blood(2016)；128(7)：959-970)。此类CD38表达以及NK细胞同类杀伤的损失也有助于达雷木单抗耐药性。本文公开的抗BCMA/CD16A抗体的作用机理表明，这种抗BCMA/CD16A抗体可用于治疗达雷木单抗R/R多发性骨髓瘤患者。

[0673] 达雷木单抗难治性患者外周血NK水平较低(Casneuf等人，Blood Adv.(2017)；24；1(23)：2105-2114)。Steward等人，Blood Cancer J.(2019)；9(2)：17公开了DFRF4539A的I期研究，DFRF4539A是与单甲基澳瑞他汀E(MMAE)缀合的抗FcRH5抗体-药物，用于治疗R/R MM。在DFRF4539A的I期研究中，比较了未用达雷木单抗处理过的MM患者、达雷木单抗难治的MM患者和R/R MM患者外周血的NK细胞数，结果显示在图43中。

[0674] 在DFRF4539A的I期研究中，R/R MM患者的骨髓中NK/肿瘤E:T比显示在图44中。显示在图45A和图45B中的CD16A/BCMA抗体I的体外细胞系杀伤数据表明，在DFRF4539A I期人群中发现，这些E:T比的CD16A/BCMA抗体I是有效的。

[0675] 8.10.新鲜NK细胞影响细胞毒性

[0676] 将CD16A/BCMA抗体I和CD16A/BCMA抗体II对新鲜NK细胞与第二天NK细胞的细胞毒性进行了比较。新鲜的NK细胞是在同一天从新鲜分离的PBMC中纯化的NK细胞。第二(2nd)天NK细胞是来自被隔离在第一天的PBMC精制并在RPMI培养基中培养过夜的NK细胞。结果示于图46A、46B、46C和46D中。如图46A、46B、46C和46D中所示，新鲜NK细胞显示高于第二天NK细

胞的细胞毒性。

[0677] 实例9-CD16A/BCMA结合抗体在治疗多发性骨髓瘤中的用途

[0678] 多发性骨髓瘤(“MM”)是浆细胞恶性肿瘤。在美国和欧洲,每年大约诊断出56,000例MM新病例。尽管总体存活率有所提高,但仍存在高度未满足需求的区域,包括:那些复发/难于获得可用治疗的区域,以及那些表现出高危一线(“1L”)疾病的区域。三种疗法类别已经改变了MM疗法并形成了当前护理标准(“SOC”)的基础,在某些情况下,包括跨多个治疗类别采用的类别:(1)免疫调节剂(“IMiDs”,例如,来那度胺)-多种潜在的MOA,包括抗增殖作用、增强适应性免疫系统和先天性免疫系统;(2)蛋白酶体抑制剂(例如,硼替佐米);(3)达雷木单抗(抗CD38抗体,其ADCC、CDC和凋亡是由CD38交联触发的)。

[0679] NK细胞已广泛用于免疫疗法。活化和抑制受体信号的平衡调节NK细胞的活化和细胞毒性,例如抑制信号在正常健康组织中占主导地位。NK细胞已成为多发性骨髓瘤(例如达雷木单抗和埃罗妥珠单抗(抗SLAMF7抗体))的Fc介导的癌症治疗中的关键效应物。NK细胞活化和肿瘤杀伤可以通过以下作用机理(“MOA”)发生:(a)肿瘤细胞上的I类MHC损失(例如,避免T细胞反应);(b)通过连接活化的NK细胞受体(NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46和DNAM-1)的受损细胞过度表达应激配体,以及(c)通过经由它们的Fc区与活化受体CD16A结合的肿瘤相关抗原(TAA)特异性治疗性抗体(Fcγ RIIIa)活化NK细胞。NK细胞接合剂模拟MOA(c),但是,如此处所讨论的,采用了与达雷木单抗不同的MOA。不经由常规Fc-CD16A相互作用募集NK细胞的本公开的NK接合剂具有与SOC联合治疗MM患者,特别是二线(“2L”)患者的潜力。此外,预计会有大量2L和三线(“3L”)患者在复发时是达雷木单抗难治的,但仍预计会对NK细胞接合剂例如本文公开的CD16A/BCMA抗体I和III有反应(由于MOA的不同)。

[0680] 当前公开的CD16A抗原结合蛋白(例如,CD16A/BCMA抗体I和III)是结合CD16A的NK细胞接合剂。CD16A在约95%的NK细胞和巨噬细胞上组成性表达,并且是NK细胞活化受体。

[0681] CD16A/BCMA抗体I、II和III与B细胞成熟抗原(BCMA)结合。如本文所述,BCMA是TNF受体超家族的成员,并且在浆细胞的长期细胞存活中发挥作用(O'Connor,JEM 2004;199(1):91-98)。BCMA在正常浆细胞中表达,并且在多发性骨髓瘤中上调且高发。BCMA是R/R多发性骨髓瘤免疫疗法的良好靶标,包括靶向BCMA的嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法和BCMA抗体-药物缀合物(ADC)治疗。

[0682] 测量冷冻的原发性骨髓瘤骨髓单核细胞(BMMC)中BCMA、CD38和FcRH5的表达水平,结果显示在图47中。如图47中所示,评估了来自20个供体和对照物(骨髓瘤细胞系MOLP-2)的冷冻原发性骨髓瘤骨髓单核细胞(BMMC)的FcRH5、BCMA(Biolegend 19F2)、CD38细胞表面表达。简而言之,将BMMC解冻,用无菌PBS洗涤,然后重悬至1×10^6个细胞/mL的终浓度。用活力和骨髓瘤标志物(CD45、CD319、CD138、CD38、BCMA、FcRH5)对BMMC进行染色。在固定细胞并洗涤后,在Canto II上读取细胞。通过选择活/单线态/CD45/CD319+细胞(骨髓瘤细胞),在FlowJo中执行对FcRH5、BCMA和CD38的分析。在统计绘图软件Prism中将FcRH5、BCMA和CD38的MESF(Log10)值作图。

[0683] 如图48A和48B中所示,BCMA在正常人浆细胞中表达(图48A)并且在MM中被上调并以高发病率被发现(图48B)。在图48B中所示的实验中使用的原代MM细胞是冷冻的原发性骨髓瘤BMMC,其根据以上针对图47描述的方案进行染色和门控,然后在FlowJo中绘制Max的百分比。图48B中灰色阴影的峰是荧光值减一(FMO)对照物,而另一个峰是BCMA表达。CD16A/

BCMA抗体I表现出与测试的抗BCMA抗体相似的结果。

[0684] 尽管靶向BCMA的CAR-T细胞疗法和CD3/BCMA双特异性抗体显示出令人印象深刻的抗MM活性,但它们也与细胞因子释放综合征(“CRS”)的重要案例相关。当前公开的CD16A抗原结合蛋白(例如,CD16A/BCMA抗体I)的MOA是NK接合剂,使得能够与这种CRS相关疗法区分开。例如,有利的安全性和不存在CRS使得当前公开的CD16A抗原结合蛋白(例如,CD16A/BCMA抗体I)能够与SOC或MM中的其他免疫疗法(例如细胞因子(例如IL-15和Il-12,如本文中所示(参见例如图42A和42B)。本文公开的基于NK细胞的方法还可与T细胞疗法和检查点抑制剂疗法(例如CD3双特异性抗体、抗PD-1抗体(例如,纳武单抗(nivolumab),派姆单抗(pembrolizumab))、抗TIGIT抗体、抗PD-L1抗体(例如,阿特珠单抗(atezolizumab))、抗VEGF抗体(例如,贝伐单抗(bevacizumab))、FcRH5/CD3双特异性抗体等)协同增效。

[0685] 鉴于前述内容,使用以下一种或多种标准来选择用于治疗多发性骨髓瘤的NK细胞接合剂:

[0686] • NK细胞接合剂能够结合两个靶标:NK细胞上的CD16A,以及多发性骨髓瘤细胞上的BCMA,

[0687] • NK细胞接合剂对于CD16A至少是二价的,例如,包含至少两个CD16A抗原结合部分,

[0688] • NK细胞接合剂是不与CD16B交叉反应的NK细胞双特异性抗体,但可以与非人灵长类动物的CD16A交叉反应,

[0689] • NK细胞接合剂是有效的和普遍的,并且具备$BCMA^{+}$肿瘤细胞和原代骨髓瘤(例如,≥约60%的细胞被杀死,并且EC_{50}≤5nM)的靶依赖性体外杀伤,

[0690] • NK细胞接合剂不会显著杀伤NK细胞,例如,减少或避免NK细胞同类杀伤,

[0691] • NK细胞接合剂具有可接受的安全特性,例如,具有优于其他T细胞接合剂的体外细胞因子释放特性(例如,NK细胞接合剂缺乏CRS),不良事件是可监测的、可控制的和可逆的,

[0692] • NK细胞接合剂可静脉内施用于多发性骨髓瘤患者,并且

[0693] • NK细胞接合剂需要每周一次(QW)或更少的施用频率。

[0694] 结合即时描述的选择策略,可以使用以下药效学(PD)生物标记物:血清M蛋白和游离轻链(FLC)、单克隆浆细胞的减少、治疗后骨髓样品中NK细胞的活化和募集、以及外周NK细胞激活。尽管即时描述的选择策略可以包括诊断方法,但由于多发性骨髓瘤中BMCA的高发病率,因此不必进行诊断。

[0695] 某些CD16A/BCMA抗原结合蛋白(例如,CD16A/BCMA抗体I和CD16A/BCMA抗体III)符合上述标准。

[0696] 总之,当前公开的CD16A/BCMA抗原结合蛋白(例如,CD16A/BCMA抗体I和CD16A/BCMA抗体III)可用于治疗多发性骨髓瘤,以实现具备有利安全性的持久缓解。

[0697] 尽管为了清楚理解的目的,已经通过图示和实例的方式在一定程度上详细描述了前述的当前公开的主题,但是这些描述和实例不应被解释为限制了本公开的主题的范围。本文引用的所有专利和科学文献的公开内容的全部内容以引用方式明确地并入。

[0698] 序列总结:

[0699]

SEQ ID	序列
1	VH CD16A (LSIV21) QVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCARGSAYYYDFADYWGQGTLVTVSS
2	VL CD16A (LSIV21/P2C-47) SYVLTQPSSVSVAPGQTATISCGGHNIGSKNVHWYQQRPGQS PVLVIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADY YCQVWDNYSVLFGGGTKLTVL
3	VH CD16A (P2C-47) QVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGAIEPMYGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARGSAYYYDFADYWGQGTLVTVSS
4	VH CD16A (ABC1163) QVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFTNYYMQWVRQA PGQGLEWMGVINPGGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDTAVYYCARGSAYYYDFADYWGQGTLVTVSS
5	VL CD16A (ABC1163) SYVLTQPSSVSVAPGQTARITCGGHNIGSQSVHWYQQKPGQA PVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADY YCQVWDNYSVVFGGGTKLTVL
6	VH CD16A (ABC1165) QVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYSFSDFYIQWVRQAPG QGLEWMGIINPGGASTTYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCARGSAYYYDFADYWGQGTLVTVSS
7	VL CD16A (ABC1165) SYVLTQPSSVSVAPGQTARITCGGYNIGRQSVHWYQQKPGQA PVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADY YCQVWDNYTVVFGGGTKLTVL
8	VH CD16A (ABC1192) QVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFSSYYMHWVRQAP GQGLEWMGAIEPRGVRISYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARGSAYYYDFADYWGQGTLVTVSS
9	VL CD16A (ABC1192) SYVLTQPSSVSVAPGQTARITCGGHNIGSTNVHWYQQKPGQA PVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADY YCQVWDNYSVQFGGGTKLTVL
10	VH CD16A (ABC1197) QVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFTNYYMQWVRQA PGQGLEWMGIINPSGGVTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDTAVYYCARGSAYYYDFADYWGQGTLVTVSS
11	VL CD16A (ABC1197)

[0700]

	SYVLTQPSSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQA PVLVIYQDKKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADY YCQVWDDYIVLFGGGTKLTVL
12	VH CD16A (ABC1199) QVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFTNYYMHWVRQA PGQGLEWMGVIEPDGGRRTYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDTAVYYCARGSAYYYDFADYWGQGTLVTVSS
13	VL CD16A (ABC1199) EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRGHQGVSGDVHWYQQKPGQ APRLLIYQANKRASGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLEPEDFAVY YCQQWDNYSVTFGQGTKVEIK
14	VH HSA EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPG KGLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNS LRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLVTVSS
15	VL HSA DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPG KAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCGGGYSSISDTTFGGGTKVEIK
16	接头 L1 GGSGGS
17	接头 L2 GGSGGSGGSGGSGGSGGS
18	接头 L3 GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGS
19	连接物 GGGGS
20	连接物 GGGGSGGGGS
21	连接物 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
22	连接物 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
23	铰链 EPKSCDKTHTCPPCP
24	中间铰链 DKTHTCPPCP
25	具有沉默突变 1 的人 IgG1 CH1、CH2 和 CH3 重链恒定结构域: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL

[0701]

	PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
26	人 IgG1 CH1、CH2 和 CH3 重链恒定结构域（野生型） ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
27	人 λ 轻链恒定结构域 GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
28	人 κ 轻链恒定结构域 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
29	具有沉默突变 1 的 CH2-CH3 重链恒定结构域： APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
30	具有沉默突变 1 的单体 CH2-CH3 重链恒定结构域 APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTKPPSRD ELTKNQVSLSCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTVPVL DSDGSFRLASYLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSP
31	旋钮链，具有沉默突变 1 的 CH2-CH3 重链恒定结构域 APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
32	孔链，具有沉默突变 1 的 CH2-CH3 重链恒定结构域 APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW

[0702]

	LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
33	CH1 重链恒定结构域 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKV
34	在 C 末端具有点突变的人 λ 轻链恒定结构域 GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTESS
35	在 C 末端具有点突变的人 κ 轻链恒定结构域 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES
36	CH2-CH3 重链恒定结构域（野生型） APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
37	BCMA VH QVQLVQSGAEVKTPGEPLKISCKGSGYSFTDSWIGWVRQMPG KGLEWMGIIYAGDSDARYSPSFQGQVTISADTSTSTVYLQWS SLKASDTAMYYCARNFGDHWGQGTLVTVSS
38	BCMA VL SYELTQSPSVSVAPGQTARIFCGGDNIGSKNVHWYQQKPGQA PVLVIYRDSNRPSGIPERFSGANSENTATLTISRAQAGDEADY YCQVWDSRTYVFGTGTKLTVL
39	BCMA scFv QVQLVQSGAEVKTPGEPLKISCKGSGYSFTDSWIGWVRQMPG KGLEWMGIIYAGDSDARYSPSFQGQVTISADTSTSTVYLQWS SLKASDTAMYYCARNFGDHWGQGTLVTVSSGGSGGSGGSGG GSGGSGGSSYELTQSPSVSVAPGQTARIFCGGDNIGSKNVHW YQQKPGQAPVLVIYRDSNRPSGIPERFSGANSENTATLTISRA QAGDEADYYCQVWDSRTYVFGTGTKLTVLAAAGSHHHHHH
40	VH EGFR QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPP GKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARNPISIPAFDIWGQGTMVTVSS
41	VL EGFR

[0703]

	QPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQA PVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYY CQVWDTSSDHVLFGGGTKLTVL
42	HCDR1 EGFR GGSVSSGSYY
43	HCDR2 EGFR IYYSGST
44	HCDR3 EGFR ARNPISIPAFDI
45	LCDR1 EGFR NIGSKS
46	LCDR2 EGFR YDS
47	LCDR3 EGFR QVWDTSSDHVL
48	人 CD16A GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNS TQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPV QLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYL QNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSSE TVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQ
49	食蟹猴 CD16A GMRAEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDRVTLKCQGAYSPEDNS TRWFHNESLISSQTSSYFIAAARVNNSGEYRCQTSLSTLSDPV QLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEESIHLRCHSWKNTLLHKVTYL QNGKGRKYFHQNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLIGSKNVSSET VNITITQDLAVSSISSFFPPGYQ
50	HCDR1 CD16A GYTFTSYY
51	HCDR2 CD16A IEPMYGST
52	HCDR3 CD16A ARGSAYYYDFADY
53	LCDR1 CD16A NIGSKN
54	LCDR2 CD16A QDN

[0704]

55	LCDR3 CD16A QVWDNYSVL
56	HCDR2 CD16A INPSGGST
57	CD16A 的 C 末端序列 SFFPPGYQ
58	His 标签 HHHHHH
59	C 标签 EPEA
60	接头 L4 GGSGGSGGS
61	scFv-IgAb_I BCMA/CD16a 多肽链 1: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMAWVRQAP GKGLEWVSSISTRGDITSYRDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARQDYYTDYMGFAYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSSYVLTQPSSVSVAPGQTATISCGG HNIGSKNVHWYQQRPGQSPVLVIYQDNKRPSGIPERFSGSNSG NTATLTISGTQAMDEADYYCQVWDNYSVLFGGGTKLTVLGG SGGSGGSGGSGGSGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGESLKVSC KASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGAIEPMYGSTSYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGSAYY YDFADYWGQGTLVTVSS
62	scFv-IgAb_I BCMA/CD16a 多肽链 2: AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNGLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQDGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDEATY YCAGPHKYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE

[0705]

	C
63	KiH-scDb-Fc BCMA/CD16a 多肽链 1： DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV AVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSSYVLTQPSSVSVAPGQT ATISCGGHNIGSKNVHWYQQRPGQSPVLVIYQDNKRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQVWDNYSVLFGGGT KLTVLGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFTS YYMHWVRQAPGQGLEWMGAIEPMYGSTSYAQKFQGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGSAYYYDFADYWGQ GTLVTVSSGGSGGSGGSGGSGGSGGSSYVLTQPSSVSVAPGQ TATISCGGHNIGSKNVHWYQQRPGQSPVLVIYQDNKRPSGIPE RFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQVWDNYSVLFGGG TKLTVLGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFT SYYMHWVRQAPGQGLEWMGAIEPMYGSTSYAQKFQGRVTM TRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGSAYYYDFADYWG QGTLVTVSSAAAGSHHHHHH
64	KiH-scDb-Fc BCMA/CD16a 多肽链 2： EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMAWVRQAP GKGLEWVSSISTRGDITSYRDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARQDYYTDYMGFAYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSAIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYN GLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQDGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPEDEATYYCAGPHKYPLTFGGGTKVEIKDKTHTCPPCP APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
65	BCMA VH-2 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMAWVRQAP GKGLEWVSSISTRGDITSYRDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARQDYYTDYMGFAYWGQGTLVTVSS

[0706]

66	BCMA VL-2 AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNGLAWYQQKPGK APKLLIYGASSLQDGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDEATY YCAGPHKYPLTFGGGTKVEIK
67	HCDR1 BCMA-2 NYDMA
68	HCDR2 BCMA-2 SISTRGDITSYRDSVKG
69	HCDR3 BCMA-2 QDYYTDYMGFAY
70	LCDR1 BCMA-2 RASEDIYNGLA
71	LCDR2 BCMA-2 GASSLQD
72	LCDR3 BCMA-2 AGPHKYPLT
73	HCDR1 CD16A-2 (P2C-47) SYYMH
74	HCDR2 CD16A-2 (P2C-47) AIEPMYGSTSYAQKFQG
75	HCDR3 CD16A-2 (P2C-47) GSAYYYDFADY
76	LCDR1 CD16A-2 (LSIV21/P2C-47) GGHNIGSKNVH
77	LCDR2 CD16A-2 (LSIV21/P2C-47) QDNKRPS
78	LCDR3 CD16A-2 (LSIV21/P2C-47) QVWDNYSVL
79	具有沉默突变 1 的 CH2 重链恒定结构域: APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
80	CH3 重链恒定结构域-1 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
81	CH3 重链恒定结构域-2

[0707]

	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
82	HCDR1 CD16A-3 (ABC1163): GYTFTNYY
83	HCDR2 CD16A-3 (ABC1163): INPGGGST
52	HCDR3 CD16A-3 (ABC1163): ARGSAYYYDFADY
84	LCDR1 CD16A-3 (ABC1163): NIGSQS
85	LCDR2 CD16A-3 (ABC1163): QDS
86	LCDR3 CD16A-3 (ABC1163): QVWDNYSVV
87	HCDR1 CD16A-4 (ABC1165): GYSFSDFY
88	HCDR2 CD16A-4 (ABC1165): INPGGAST
52	HCDR3 CD16A-4 (ABC1165): ARGSAYYYDFADY
89	LCDR1 CD16A-4 (ABC1165): NIGRQS
85	LCDR2 CD16A-4 (ABC1165): QDS
90	LCDR3 CD16A-4 (ABC1165): QVWDNYTVV
91	HCDR1 CD16A-5 (ABC1192): GYTFSSYY
92	HCDR2 CD16A-5 (ABC1192): IEPRGVRI
52	HCDR3 CD16A-5 (ABC1192): ARGSAYYYDFADY
93	LCDR1 CD16A-5 (ABC1192): NIGSTN
85	LCDR2 CD16A-5 (ABC1192): QDS

[0708]

94	LCDR3 CD16A-5 (ABC1192): QVWDNYSVQ
82	HCDR1 CD16A-6 (ABC1197): GYTFTNYY
95	HCDR2 CD16A-6 (ABC1197): INPSGGVT
52	HCDR3 CD16A-6 (ABC1197): ARGSAYYYDFADY
96	LCDR1 CD16A-6 (ABC1197): NIGSKS
97	LCDR2 CD16A-6 (ABC1197): QDK
98	LCDR3 CD16A-6 (ABC1197): QVWDDYIVL
82	HCDR1 CD16A-7 (ABC1199): GYTFTNYY
99	HCDR2 CD16A-7 (ABC1199): IEPDGGRR
52	HCDR3 CD16A-7 (ABC1199): ARGSAYYYDFADY
100	LCDR1 CD16A-7 (ABC1199): QGVSGD
101	LCDR2 CD16A-7 (ABC1199): QAN
102	LCDR3 CD16A-7 (ABC1199): QQWDNYSVT
50	HCDR1 CD16A-8: GYTFTSYY
103	HCDR2 CD16A-8: IEPSGGST
52	HCDR3 CD16A-8: ARGSAYYYDFADY
53	LCDR1 CD16A-8: NIGSKN
54	LCDR2 CD16A-8: QDN
104	LCDR3 CD16A-8:

[0709]

	QVWDSYSVL
50	HCDR1 CD16A-9: GYTFTSYY
103	HCDR2 CD16A-9: IEPSGGST
52	HCDR3 CD16A-9: ARGSAYYYDFADY
53	LCDR1 CD16A-9: NIGSKN
54	LCDR2 CD16A-9: QDN
105	LCDR3 CD16A-9: QVWDNYNVL
106	具有沉默突变 2 的人 IgG1 CH1、CH2 和 CH3 重链恒定结构域: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
107	具有沉默突变 2 的 CH2-CH3 重链恒定结构域: APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
108	具有沉默突变 2 的 CH2 重链恒定结构域: APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
109	CH3 重链恒定结构域-3: GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS

		CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
	110	具有沉默突变 3 的人 IgG1 CH1、CH2 和 CH3 重链恒定结构域： ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
	111	具有沉默突变 3 的 CH2-CH3 重链恒定结构域： APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
[0710]	112	具有沉默突变 3 的 CH2 重链恒定结构域： APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
	113	CDR-H1 BCMA (BCMA-1)： GFTFSNYD
	114	CDR-H2 BCMA (BCMA-1)： ISTRGDIT
	115	CDR-H3 BCMA (BCMA-1)： ARQDYYTDYMGFAY
	116	CDR-L1 BCMA (BCMA-1)： EDIYNG
	117	CDR-L2 BCMA (BCMA-1)： GAS

	118	CDR-H1 BCMA (BCMA-2): GFTFSNFD
	119	CDR-H2 BCMA (BCMA-2): ITTGGGDT
	120	CDR-H3 BCMA (BCMA-2): VRHGYYDGYHLFDYWG
	121	CDR-L1 BCMA (BCMA-2): QGISNN
	122	CDR-L2 BCMA (BCMA-2): YTS
	123	CDR-L3 BCMA (BCMA-2): QQFTSLPYT
[0711]	124	VH BCMA (BCMA-2): EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAP GKGLVWVSSITTGGGDTYYADSVKGRFTISRDNAKSTLYLQM DSLRSEDTAVYYCVRHGYYDGYHLFDYWGQGTLVTVSS
	125	VL BCMA (BCMA-2): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRANQGISNNLNWYQQKPGK APKPLIYYTSNLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY YCQQFTSLPYTFGQGTKLEIK
	126	TandAb (BCMA-A1_T): EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMAWVRQAP GKGLEWVSSISTRGDITSYRDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARQDYYTDYMGFAYWGQGTLVTVSSGGS GGSGGSGGSSYVLTQPSSVSVAPGQTATISCGGHNIGSKNVH WYQQRPGQSPVLVIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISG TQAMDEADYYCQVWDNYSVLFGGGTKLTVLGGSQVQLVQS GAEVKKPGESLKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEW

[0712]

	MGAIEPMYGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARGSAYYYDFADYWGQGTLVTVSSGGSGGSGGS GGSAIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNGLAWYQQKP GKAPKLLIYGASSLQDGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDEA TYYCAGPHKYPLTFGGGTKVEIK
127	Db-Fc (CD16-2-BCMA-1): SYVLTQPSSVSVAPGQTATISCGGHNIGSKNVHWYQQRPGQS PVLVIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADY YCQVWDNYSVLFGGGTKLTVLGGSGGSQVQLVQSGAEVKKP GESLKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGAIEPM YGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC ARGSAYYYDFADYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDKTHTCP PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSNYDMAWVRQAPGKGLEWVSSISTRGDITSYRDSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDYYTDYM GFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSAIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASEDIYNGLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSL QDGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDEATYYCAGPHKYPLTF GGGTKVEIK
128	scDb-mFc (CD16-2-BCMA-1): EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMAWVRQAP GKGLEWVSSISTRGDITSYRDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARQDYYTDYMGFAYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSAIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYN GLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQDGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPEDEATYYCAGPHKYPLTFGGGTKVEIKGGGGSGGGG SAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTKPPSR DELTKNQVSLSCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTVPV

[0713]

	LDSDGSFRLASYLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGSGGGGSSYVLTQPSSVSVAPGQTATISCGGHN IGSKNVHWYQQRPGQSPVLVIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNT ATLTISGTQAMDEADYYCQVWDNYSVLFGGGTKLTVLGGSG GSQVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQ APGQGLEWMGAIEPMYGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCARGSAYYYDFADYWGQGTLVTVSSG GSGGSGGSGGSGGSGGSSYVLTQPSSVSVAPGQTATISCGGH NIGSKNVHWYQQRPGQSPVLVIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISGTQAMDEADYYCQVWDNYSVLFGGGTKLTVLGGS GGSQVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFTSYYMHWVR QAPGQGLEWMGAIEPMYGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARGSAYYYDFADYWGQGTLVTVSS
129	接头 L5 GGSGGSGGSGGS
130	接头 L6 GGS

序列表

<110> 艾菲默德有限责任公司

<120> 自然杀伤细胞接合抗体融合构建体

<130> 087353.0101

<140>
<141>

<150> EP 18190661.1
<151> 2018-08-24

<150> EP 18190662.9
<151> 2018-08-24

<150> EP 18167384.9
<151> 2018-04-13

<150> EP 18167385.6
<151> 2018-04-13

<160> 136

<170> PatentIn 第 3.5 版

<210> 1
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 1

[0001]

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1               5                  10                  15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 2
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源

<223> /注意=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 2

```
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1               5                  10                  15

Thr Ala Thr Ile Ser Cys Gly Gly His Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val
            20                  25                  30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
        35                  40                  45

Gln Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65                  70                  75                  80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu
                85                  90                  95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
            100                 105
```

<210> 3
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0002]

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 3

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1               5                  10                  15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Ala Ile Glu Pro Met Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 4
<211> 120

<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 4
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0003]

<210> 5
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 5
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly His Asn Ile Gly Ser Gln Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 6
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 6
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Gly Gly Ala Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0004]

Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 7
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Tyr Asn Ile Gly Arg Gln Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Tyr Thr Val Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 8
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 8
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile Glu Pro Arg Gly Val Arg Ile Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

[0005]

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 9
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly His Asn Ile Gly Ser Thr Asn Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Gln
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 10
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 10
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Val Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

[0006]

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 11
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Lys Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asp Tyr Ile Val Leu
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 12
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 12
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

[0007]

Gly Val Ile Glu Pro Asp Gly Gly Arg Arg Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 13
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Gly His Gln Gly Val Ser Gly Asp

20 25 30

Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gln Ala Asn Lys Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Asn Tyr Ser Val
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 14
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 14
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0008] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 15

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
20 25 30

Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile
85 90 95

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

[0009]

<400> 16
Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 17
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 17
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Ser

<210> 18
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 18
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Ser
20

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 19
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 20
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 21
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0010]

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 21
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 22
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 22
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 23
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 24
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 25
<211> 329
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 25
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

[0011]

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

[0012]

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 26
<211> 329
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 26
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

[0013]

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 27
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 27
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp

20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 28
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 28
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

[0014]

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 29
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 29
Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

```
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            20                  25                  30

Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
        35                  40                  45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    50                  55                  60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65                  70                  75                  80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                85                  90                  95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
        115                 120                 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175
```

[0015]

```
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            180                 185                 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        195                 200                 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
    210                 215


<210> 30
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
      多肽”

<400> 30
Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1               5                   10                  15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            20                  25                  30

Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
        35                  40                  45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    50                  55                  60
```

```
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65                  70                  75                  80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                85                  90                  95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Lys Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
        115                 120                 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Thr Thr Val Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Arg Leu
                165                 170                 175

Ala Ser Tyr Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            180                 185                 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        195                 200                 205
```

[0016]

```
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
    210                 215
```

<210> 31
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 31

```
Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1               5                   10                  15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            20                  25                  30

Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
        35                  40                  45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    50                  55                  60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65                  70                  75                  80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                85                  90                  95
```

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Tyr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

<210> 32
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0017]
<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 32
Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Thr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

<210> 33
<211> 98
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 33
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

[0018]

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val

<210> 34
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 34
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp

20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Ser Ser
100 105

<210> 35
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 35
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

[0019]

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser
100 105

<210> 36
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 36
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

```
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            20                  25                  30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
        35                  40                  45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    50                  55                  60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65                  70                  75                  80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                85                  90                  95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
        115                 120                 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175
```

[0020]

```
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            180                 185                 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        195                 200                 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
    210                 215


<210> 37
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
      多肽”

<400> 37
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Thr Pro Gly Glu
1               5                   10                  15

Pro Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Ser
            20                  25                  30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Ile Ile Tyr Ala Gly Asp Ser Asp Ala Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
    50                  55                  60
```

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Phe Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 38
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 38
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Phe Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

[0021]

Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ala
50 55 60

Asn Ser Glu Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Arg Thr Tyr Val
85 90 95

Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 39
<211> 249
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 39
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Thr Pro Gly Glu
1 5 10 15

Pro Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Ser
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Ala Gly Asp Ser Asp Ala Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Phe Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Ser Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Val
130 135 140

Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Phe Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly
145 150 155 160

Ser Lys Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
165 170 175

Leu Val Ile Tyr Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg
180 185 190

[0022]

Phe Ser Gly Ala Asn Ser Glu Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg
195 200 205

Ala Gln Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser
210 215 220

Arg Thr Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ala Ala
225 230 235 240

Ala Gly Ser His His His His His His
245

<210> 40
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 40
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Asn Pro Ile Ser Ile Pro Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 41
Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

[0023]

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Ser Ser Asp His
85 90 95

Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 42
Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr
1 5 10

<210> 43
<211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 43
Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 44
Ala Arg Asn Pro Ile Ser Ile Pro Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 45
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

[0024]

<400> 45
Asn Ile Gly Ser Lys Ser
1 5

<210> 46
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 46
Tyr Asp Ser
1

<210> 47
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 47
Gln Val Trp Asp Thr Ser Ser Asp His Val Leu
1 5 10

<210> 48
<211> 192
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 48
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
1 5 10 15

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
20 25 30

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
35 40 45

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
50 55 60

Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
65 70 75 80

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
85 90 95

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
100 105 110

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
115 120 125

[0025]

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
130 135 140

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe
145 150 155 160

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
165 170 175

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
180 185 190

<210> 49
<211> 192
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 49
Gly Met Arg Ala Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
1 5 10 15

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Arg Val Thr Leu Lys Cys Gln
20 25 30

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Arg Trp Phe His Asn Glu
35 40 45

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Thr Ser Ser Tyr Phe Ile Ala Ala Ala Arg
50 55 60

Val Asn Asn Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Ser Leu Ser Thr Leu
65 70 75 80

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
85 90 95

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Glu Ser Ile His Leu Arg Cys
100 105 110

His Ser Trp Lys Asn Thr Leu Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
115 120 125

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His Gln Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
130 135 140

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Ile
145 150 155 160

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
165 170 175

Asp Leu Ala Val Ser Ser Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
180 185 190

[0026]

<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 50
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 51
Ile Glu Pro Met Tyr Gly Ser Thr
1 5

<210> 52
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 52
Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr
1 5 10

<210> 53
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 53
Asn Ile Gly Ser Lys Asn
1 5

<210> 54
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 54
Gln Asp Asn
1

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
[0027] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 55
Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu
1 5

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 56
Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 57
Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln

1 5

<210> 58
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 6xHis tag”

<400> 58
His His His His His His
1 5

<210> 59
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 59
Glu Pro Glu Ala
1

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0028]

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 60
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 61
<211> 727
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 多肽”

<400> 61
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Asp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Thr Arg Gly Asp Ile Thr Ser Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

```
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gln Asp Tyr Tyr Thr Asp Tyr Met Gly Phe Ala Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220
```

[0029]

```
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                245                 250                 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His
            260                 265                 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        275                 280                 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
                325                 330                 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
            340                 345                 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
        355                 360                 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
    370                 375                 380
```

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
450 455 460

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
465 470 475 480

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
485 490 495

Thr Ala Thr Ile Ser Cys Gly Gly His Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val
500 505 510

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
515 520 525

[0030] Gln Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
530 535 540

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
545 550 555 560

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu
565 570 575

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser
580 585 590

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln
595 600 605

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser
610 615 620

Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
625 630 635 640

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
645 650 655

Ala Ile Glu Pro Met Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
660 665 670

Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met
675 680 685

```
Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
    690                 695                 700

Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
705                 710                 715                 720

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                725

<210> 62
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
      多肽”

<400> 62
Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Gly
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
```

[0031]

```
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Glu Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Pro His Lys Tyr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 63
<211> 729
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 63
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

[0032] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Thr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Val Leu
225 230 235 240

Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Thr Ile
245 250 255

```
Ser Cys Gly Gly His Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val His Trp Tyr Gln
            260                 265                 270

Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Gln Asp Asn Lys
        275                 280                 285

Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn
    290                 295                 300

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp
305                 310                 315                 320

Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu Phe Gly Gly Gly
                325                 330                 335

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
            340                 345                 350

Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Val
        355                 360                 365

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His Trp
    370                 375                 380

Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Ala Ile Glu
385                 390                 395                 400

Pro Met Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val
                405                 410                 415
```

[0033]

```
Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser
            420                 425                 430

Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser
        435                 440                 445

Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
    450                 455                 460

Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
465                 470                 475                 480

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val
                485                 490                 495

Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Thr Ile Ser Cys Gly Gly His Asn
            500                 505                 510

Ile Gly Ser Lys Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        515                 520                 525

Pro Val Leu Val Ile Tyr Gln Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro
    530                 535                 540

Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile
545                 550                 555                 560

Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp
```

565 570 575

Asp Asn Tyr Ser Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
580 585 590

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
595 600 605

Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
610 615 620

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
625 630 635 640

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Ala Ile Glu Pro Met Tyr Gly Ser Thr
645 650 655

Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
660 665 670

Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
675 680 685

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe
690 695 700

Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala
705 710 715 720

[0034]

Ala Gly Ser His His His His His His
725

<210> 64
<211> 469
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 64
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Asp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Thr Arg Gly Asp Ile Thr Ser Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

```
Ala Arg Gln Asp Tyr Tyr Thr Asp Tyr Met Gly Phe Ala Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
    130                 135                 140

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg
145                 150                 155                 160

Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
                165                 170                 175

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Asp
            180                 185                 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
        195                 200                 205

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Thr Tyr Tyr Cys
    210                 215                 220

Ala Gly Pro His Lys Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
225                 230                 235                 240
```

[0035]

```
Glu Ile Lys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

Gln Val Ser Leu Tyr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400
```

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly
465

<210> 65
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 65
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

[0036]

Asp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Thr Arg Gly Asp Ile Thr Ser Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Asp Tyr Tyr Thr Asp Tyr Met Gly Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 66
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 66
Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Gly
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Glu Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Pro His Lys Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 67
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 67
Asn Tyr Asp Met Ala
1 5

[0037]

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 68
Ser Ile Ser Thr Arg Gly Asp Ile Thr Ser Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 69
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 69
Gln Asp Tyr Tyr Thr Asp Tyr Met Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 70
<211> 11
<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 70
Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Gly Leu Ala
1 5 10

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 71
Gly Ala Ser Ser Leu Gln Asp
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 72
[0038] Ala Gly Pro His Lys Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 73
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 73
Ser Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 74
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 74
Ala Ile Glu Pro Met Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 75

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 75
Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr
1 5 10

<210> 76
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 76
Gly Gly His Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val His
1 5 10

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

[0039]

<400> 77
Gln Asp Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 78
Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu
1 5

<210> 79
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 79
Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 80
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 80
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

[0040]

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Thr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105

<210> 81
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 81
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Tyr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105

<210> 82
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成peptide”

<400> 82
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Tyr
1 5

[0041]

<210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成peptide”

<400> 83
Ile Asn Pro Gly Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 84
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成peptide”

<400> 84
Asn Ile Gly Ser Gln Ser
1 5

<210> 85
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成peptide”

<400> 85
Gln Asp Ser
1

<210> 86
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 86
Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Val
1 5

<210> 87
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 87
Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Phe Tyr
1 5

<210> 88
<211> 8
<212> PRT
[0042] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 88
Ile Asn Pro Gly Gly Ala Ser Thr
1 5

<210> 89
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 89
Asn Ile Gly Arg Gln Ser
1 5

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 90
Gln Val Trp Asp Asn Tyr Thr Val Val

1 5

<210> 91
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 91
Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 92
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 92
Ile Glu Pro Arg Gly Val Arg Ile
1 5

<210> 93
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0043]

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 93
Asn Ile Gly Ser Thr Asn
1 5

<210> 94
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 94
Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Gln
1 5

<210> 95
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 95
Ile Asn Pro Ser Gly Gly Val Thr
1 5

<210> 96
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 96
Asn Ile Gly Ser Lys Ser
1 5

<210> 97
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 97
Gln Asp Lys
1

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
[0044] <223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 98
Gln Val Trp Asp Asp Tyr Ile Val Leu
1 5

<210> 99
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 99
Ile Glu Pro Asp Gly Gly Arg Arg
1 5

<210> 100
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 100
Gln Gly Val Ser Gly Asp
1 5

<210> 101

<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 101
Gln Ala Asn
1

<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 102
Gln Gln Trp Asp Asn Tyr Ser Val Thr
1 5

<210> 103
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

[0045]

<400> 103
Ile Glu Pro Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 104
Gln Val Trp Asp Ser Tyr Ser Val Leu
1 5

<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 105
Gln Val Trp Asp Asn Tyr Asn Val Leu
1 5

<210> 106
<211> 329
<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 106

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                  10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125
```

[0046]

```
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
```

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 107
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 107
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

[0047]

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

<210> 108
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 108
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

[0048]

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 109
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 109
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105

<210> 110
<211> 329
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 110
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

[0049] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 111
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 111
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

[0050]

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

<210> 112
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 112
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

[0051]

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 113
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成peptide”

<400> 113
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Asp
1 5

<210> 114
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成peptide”

<400> 114
Ile Ser Thr Arg Gly Asp Ile Thr
1 5

<210> 115
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 115
Ala Arg Gln Asp Tyr Tyr Thr Asp Tyr Met Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 116
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 116
Glu Asp Ile Tyr Asn Gly
1 5

<210> 117
<211> 3
[0052] <212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 117
Gly Ala Ser
1

<210> 118
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 118
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Asp
1 5

<210> 119
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 119

Ile Thr Thr Gly Gly Gly Asp Thr
1 5

<210> 120
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 120
Val Arg His Gly Tyr Tyr Asp Gly Tyr His Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

<210> 121
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 121
Gln Gly Ile Ser Asn Asn
1 5

<210> 122
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0053]

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 122
Tyr Thr Ser
1

<210> 123
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
peptide”

<400> 123
Gln Gln Phe Thr Ser Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 124
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 124
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

Asp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Thr Thr Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg His Gly Tyr Tyr Asp Gly Tyr His Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 125
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

[0054]

<400> 125
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Gln Gly Ile Ser Asn Asn
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Thr Ser Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 126
<211> 481
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成

多肽”

<400> 126

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

Asp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ser Ile Ser Thr Arg Gly Asp Ile Thr Ser Tyr Arg Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gln Asp Tyr Tyr Thr Asp Tyr Met Gly Phe Ala Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Ser Gly Gly Ser Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser
    130                 135                 140
```

[0055]

```
Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Thr Ile Ser Cys Gly Gly His Asn Ile
145                 150                 155                 160

Gly Ser Lys Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
                165                 170                 175

Val Leu Val Ile Tyr Gln Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu
            180                 185                 190

Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser
        195                 200                 205

Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp
    210                 215                 220

Asn Tyr Ser Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
225                 230                 235                 240

Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
                245                 250                 255

Gly Glu Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
            260                 265                 270

Ser Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
        275                 280                 285

Trp Met Gly Ala Ile Glu Pro Met Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln
    290                 295                 300
```

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr
305 310 315 320

Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
325 330 335

Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr Trp
340 345 350

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
370 375 380

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
385 390 395 400

Glu Asp Ile Tyr Asn Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
405 410 415

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val
420 425 430

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
435 440 445

[0056] Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly
450 455 460

Pro His Lys Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
465 470 475 480

Lys

<210> 127
<211> 721
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 127
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Thr Ile Ser Cys Gly Gly His Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

```
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65                  70                  75                  80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu
                85                  90                  95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser
            100                 105                 110

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
        115                 120                 125

Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
    130                 135                 140

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
145                 150                 155                 160

Gly Ala Ile Glu Pro Met Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
                165                 170                 175

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
            180                 185                 190

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
        195                 200                 205

Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr Trp Gly Gln
    210                 215                 220
```

[0057]

```
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
                245                 250                 255

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
            260                 265                 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val
        275                 280                 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
    290                 295                 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305                 310                 315                 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
                325                 330                 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
            340                 345                 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
        355                 360                 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
```

370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
465 470 475 480

Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
485 490 495

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Asp Met
500 505 510

Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
515 520 525

[0058]

Ile Ser Thr Arg Gly Asp Ile Thr Ser Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly
530 535 540

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
545 550 555 560

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
565 570 575

Gln Asp Tyr Tyr Thr Asp Tyr Met Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
580 585 590

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
595 600 605

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
610 615 620

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
625 630 635 640

Glu Asp Ile Tyr Asn Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
645 650 655

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val
660 665 670

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
675 680 685

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly
690 695 700

Pro His Lys Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
705 710 715 720

Lys

<210> 128
<211> 960
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 128
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Asp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0059]
Ser Ser Ile Ser Thr Arg Gly Asp Ile Thr Ser Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Asp Tyr Tyr Thr Asp Tyr Met Gly Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
130 135 140

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg
145 150 155 160

Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Asp
180 185 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
195 200 205

```
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Thr Tyr Tyr Cys
    210                 215                 220

Ala Gly Pro His Lys Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
225                 230                 235                 240

Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365
```

[0060]

```
Pro Gln Val Tyr Thr Lys Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
    370                 375                 380

Gln Val Ser Leu Ser Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

Thr Val Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Arg Leu Ala Ser Tyr
            420                 425                 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr
465                 470                 475                 480

Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala
                485                 490                 495

Thr Ile Ser Cys Gly Gly His Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val His Trp
            500                 505                 510

Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Gln Asp
```

515 520 525

Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
530 535 540

Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu
545 550 555 560

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu Phe Gly
565 570 575

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val
580 585 590

Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu
595 600 605

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met
610 615 620

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Ala
625 630 635 640

Ile Glu Pro Met Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly
645 650 655

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
660 665 670

[0061]

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
675 680 685

Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
690 695 700

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
705 710 715 720

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Ser
725 730 735

Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Thr Ile Ser Cys Gly Gly
740 745 750

His Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly
755 760 765

Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Gln Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly
770 775 780

Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu
785 790 795 800

Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln
805 810 815

Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
820 825 830

Val Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
835 840 845

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala
850 855 860

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala
865 870 875 880

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Ala Ile Glu Pro Met Tyr Gly
885 890 895

Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg
900 905 910

Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
915 920 925

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr
930 935 940

Asp Phe Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
945 950 955 960

<210> 129
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0062]
<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 129
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 130
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成 peptide”

<400> 130
Gly Gly Ser
1

<210> 131
<211> 190
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 131
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
1 5 10 15

```
Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
            20                  25                  30

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
        35                  40                  45

Ser Arg Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
    50                  55                  60

Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
65                  70                  75                  80

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
                85                  90                  95

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
            100                 105                 110

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
        115                 120                 125

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
    130                 135                 140

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
145                 150                 155                 160
```

[0063]

```
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
                165                 170                 175

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly
            180                 185                 190
```

<210> 132
<211> 190
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 132

```
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
1               5                   10                  15

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
            20                  25                  30

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
        35                  40                  45

Ser Arg Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
    50                  55                  60

Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
65                  70                  75                  80
```

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
85 90 95

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
100 105 110

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
115 120 125

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
130 135 140

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe
145 150 155 160

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
165 170 175

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly
180 185 190

<210> 133
<211> 190
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

[0064] <400> 133
Gly Met Arg Ala Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
1 5 10 15

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Arg Val Thr Leu Lys Cys Gln
20 25 30

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Arg Trp Phe His Asn Glu
35 40 45

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Thr Ser Ser Tyr Phe Ile Ala Ala Ala Arg
50 55 60

Val Asn Asn Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Ser Leu Ser Thr Leu
65 70 75 80

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
85 90 95

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Glu Ser Ile His Leu Arg Cys
100 105 110

His Ser Trp Lys Asn Thr Leu Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
115 120 125

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His Gln Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
130 135 140

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Ile
145 150 155 160

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
165 170 175

Asp Leu Ala Val Ser Ser Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly
180 185 190

<210> 134
<211> 190
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 134
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
1 5 10 15

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
20 25 30

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
35 40 45

Asn Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
50 55 60

Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
65 70 75 80

[0065]

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Val Gly Trp Leu Leu Leu Gln
85 90 95

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
100 105 110

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
115 120 125

Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro
130 135 140

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
145 150 155 160

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
165 170 175

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly
180 185 190

<210> 135
<211> 190
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成

多肽”

<400> 135
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
1 5 10 15

Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
20 25 30

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
35 40 45

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
50 55 60

Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
65 70 75 80

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Val Gly Trp Leu Leu Leu Gln
85 90 95

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
100 105 110

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
115 120 125

Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro
130 135 140

[0066]

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
145 150 155 160

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
165 170 175

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly
180 185 190

<210> 136
<211> 190
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注意=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 136
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
1 5 10 15

Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
20 25 30

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
35 40 45

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Asp Ala Thr
50 55 60

Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
65 70 75 80

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Val Gly Trp Leu Leu Leu Gln
85 90 95

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
100 105 110

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
115 120 125

[0067]

Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro
130 135 140

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
145 150 155 160

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
165 170 175

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly
180 185 190

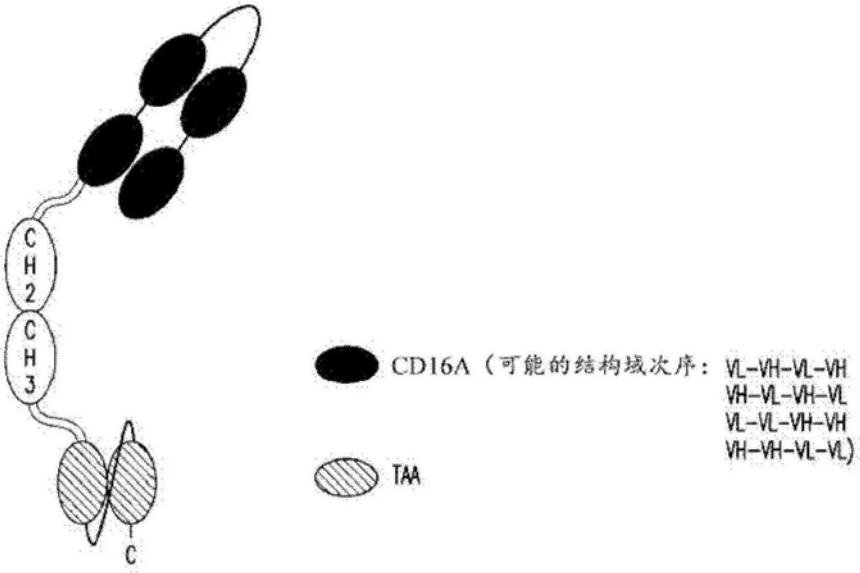

CH2
CH3
C
CD16A（可能的结构域次序：VL-VH-VL-VH
VH-VL-VH-VL
VL-VL-VH-VH
VH-VH-VL-VL）
TAA

图1

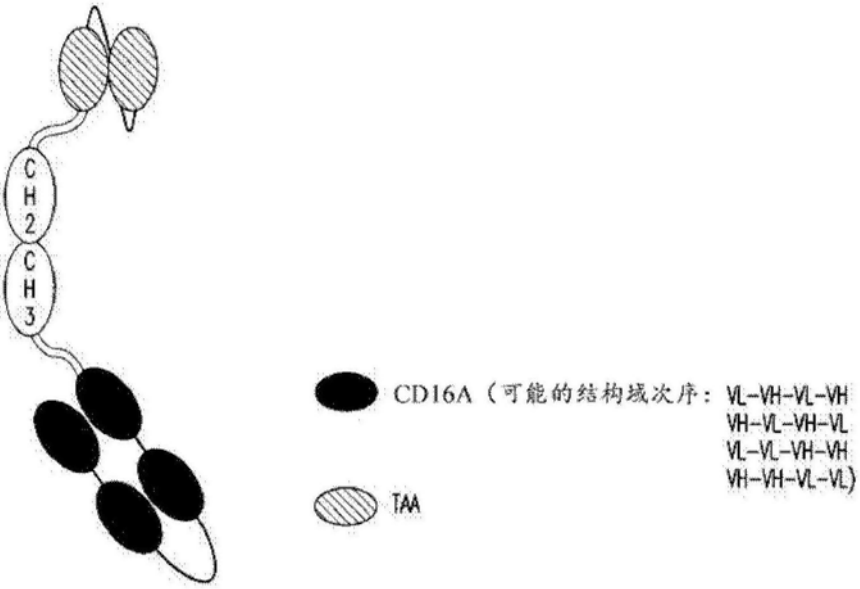

CH2
CH3
CD16A（可能的结构域次序：VL-VH-VL-VH
VH-VL-VH-VL
VL-VL-VH-VH
VH-VH-VL-VL）
TAA

图2

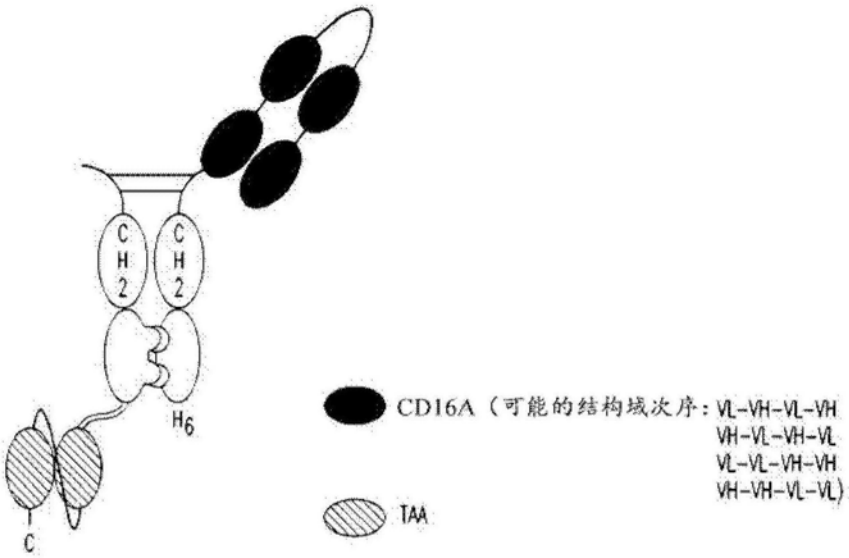

CH2
CH2
H6
C
CD16A（可能的结构域次序：VL-VH-VL-VH
VH-VL-VH-VL
VL-VL-VH-VH
VH-VH-VL-VL）
TAA

图3

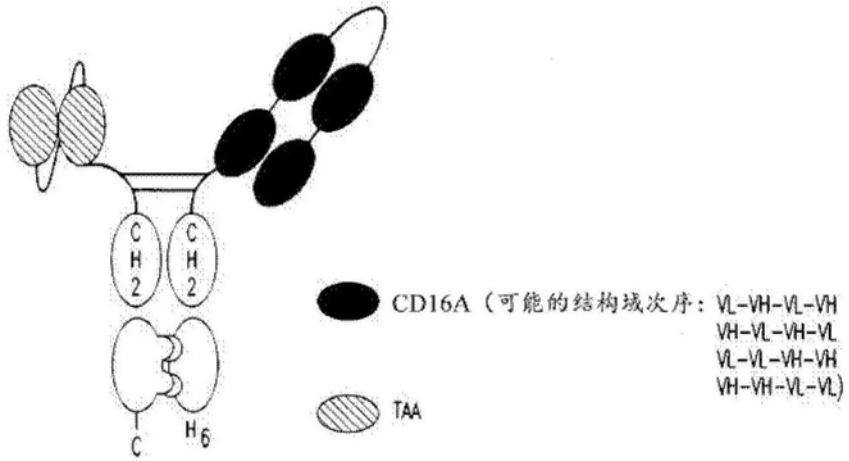

CH2
CH2
H6
C
CD16A（可能的结构域次序：VL-VH-VL-VH
VH-VL-VH-VL
VL-VL-VH-VH
VH-VH-VL-VL）
TAA

图4

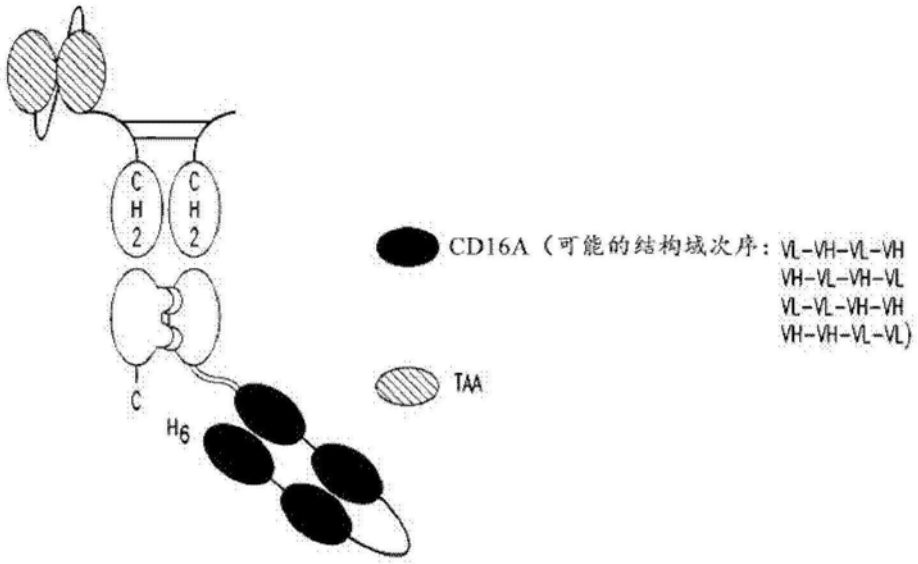

CH2
CH2
C
H6
CD16A（可能的结构域次序：VL-VH-VL-VH
VH-VL-VH-VL
VL-VL-VH-VH
VH-VH-VL-VL）
TAA

图5

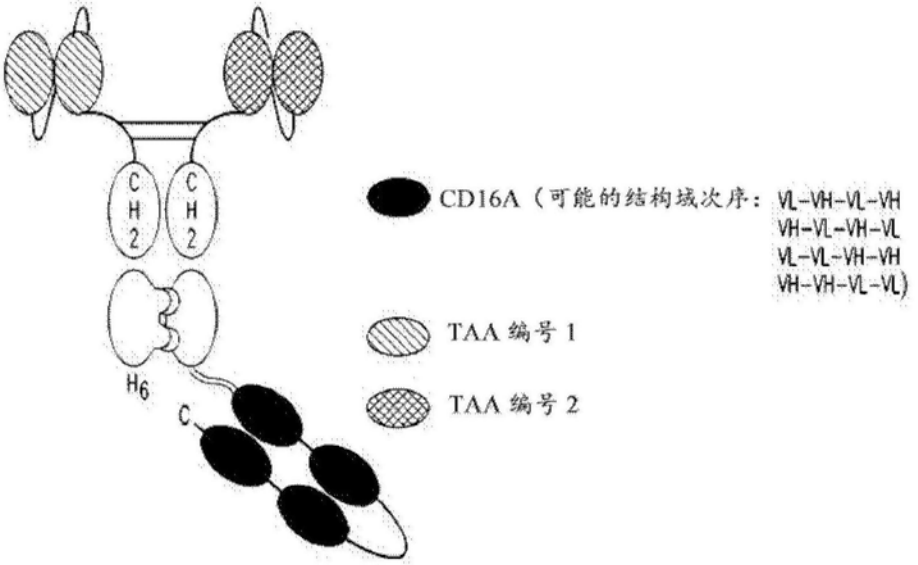

CH2
CH2
H6
C
CD16A（可能的结构域次序：VL-VH-VL-VH
VH-VL-VH-VL
VL-VL-VH-VH
VH-VH-VL-VL）
TAA 编号 1
TAA 编号 2

图6

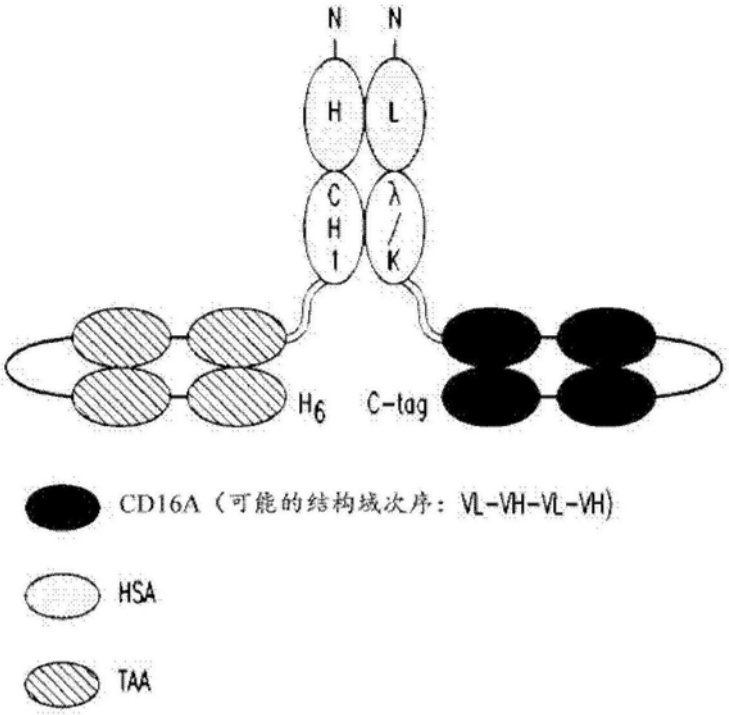

N
N
H
L
CH1
λ/K
H6
C-tag
CD16A（可能的结构域次序：VL-VH-VL-VH）
HSA
TAA

图7

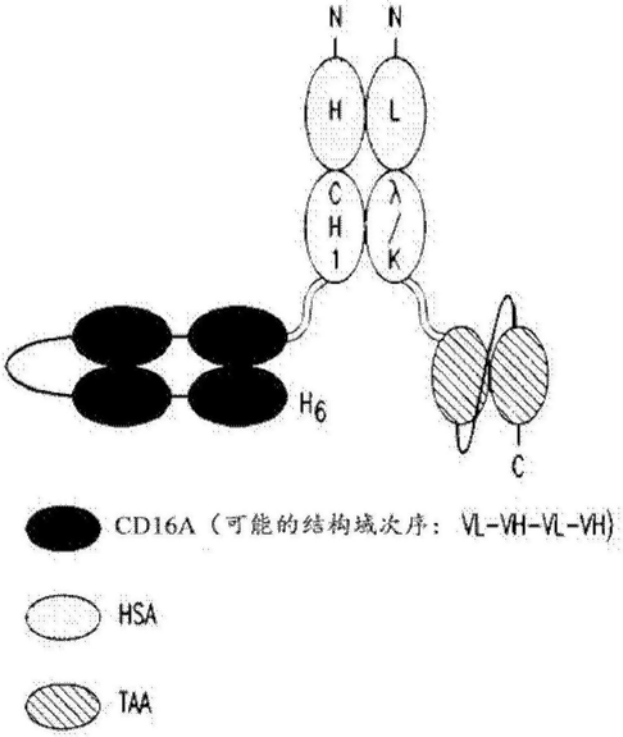

N
N
H
L
CH1
λ/K
H6
C
CD16A（可能的结构域次序：VL-VH-VL-VH）
HSA
TAA

图8

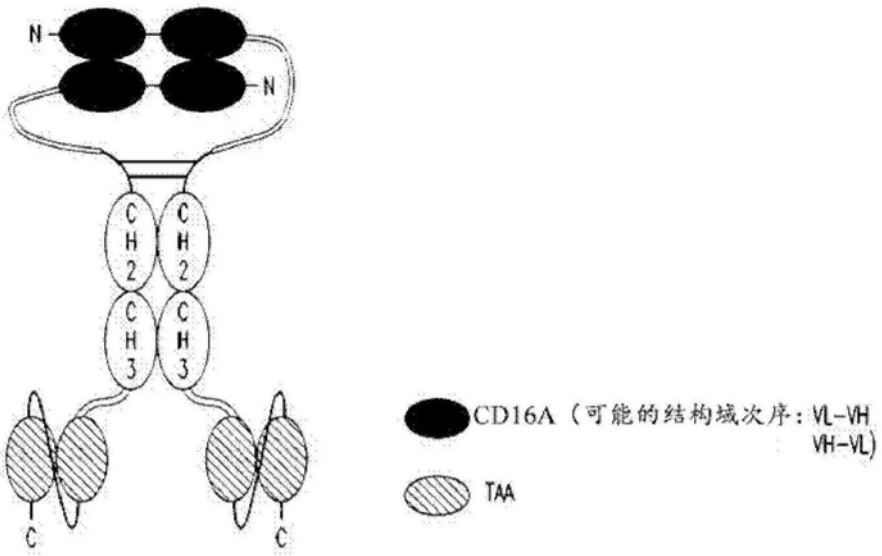

N
N
CH2
CH2
CH3
CH3
C
C
CD16A（可能的结构域次序：VL-VH VH-VL）
TAA

图9

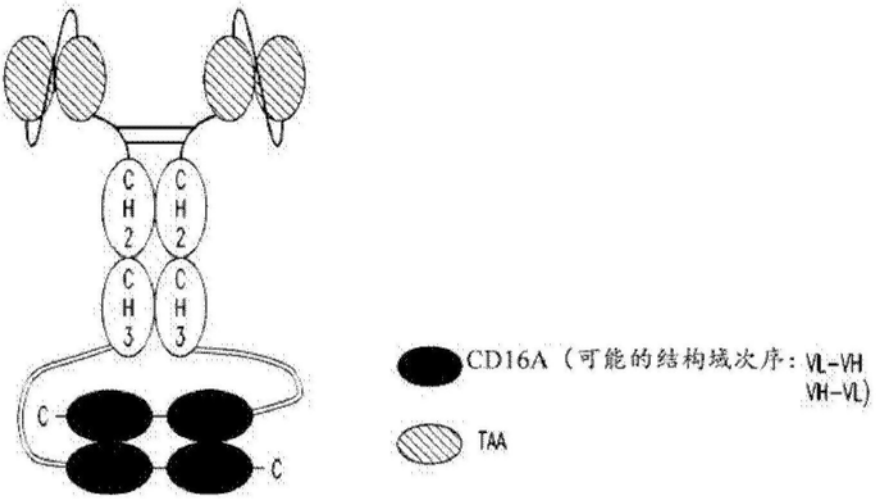

CH2
CH2
CH3
CH3
C
C
CD16A（可能的结构域次序：VL-VH VH-VL）
TAA

图10

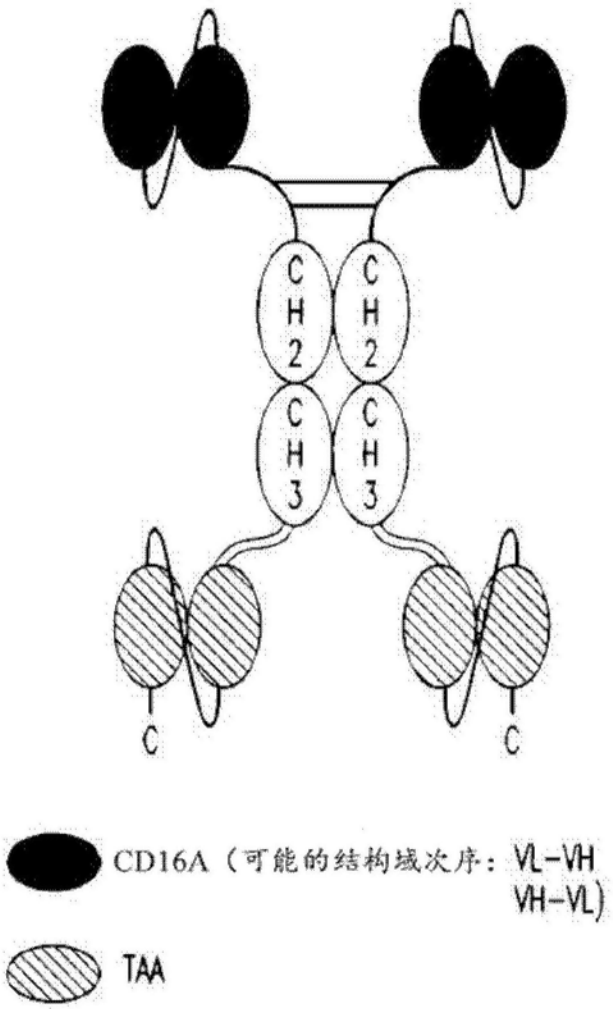


图11

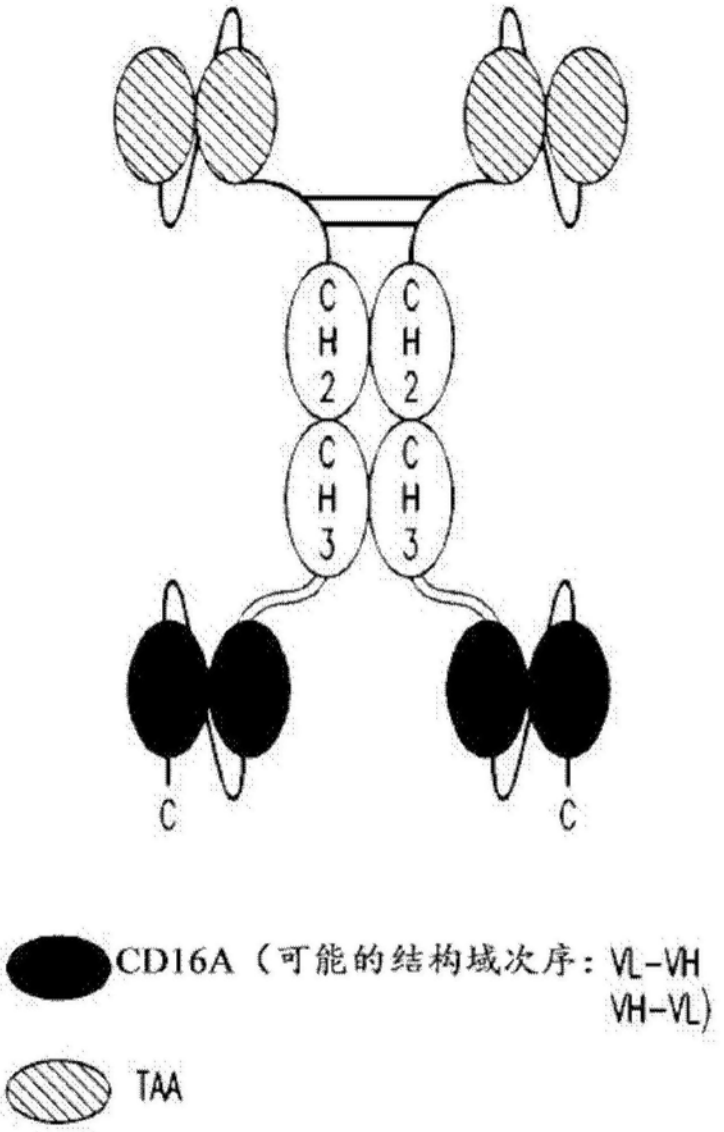


图12

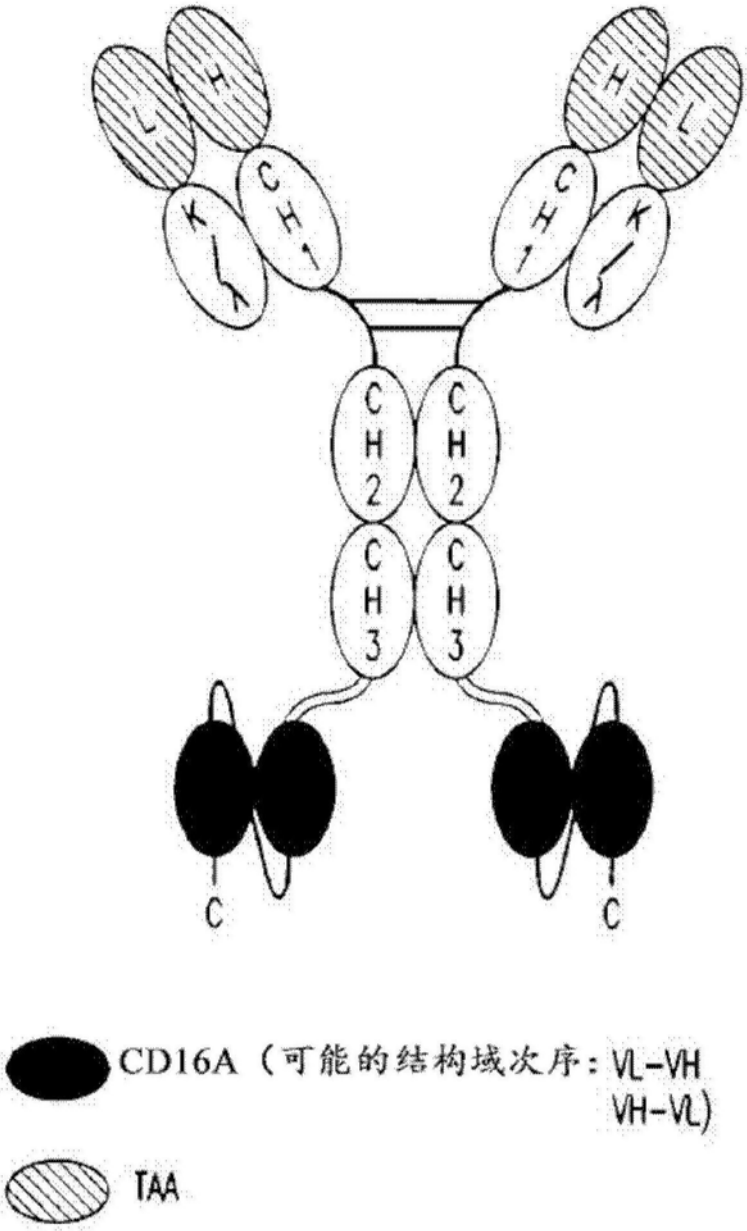


图13

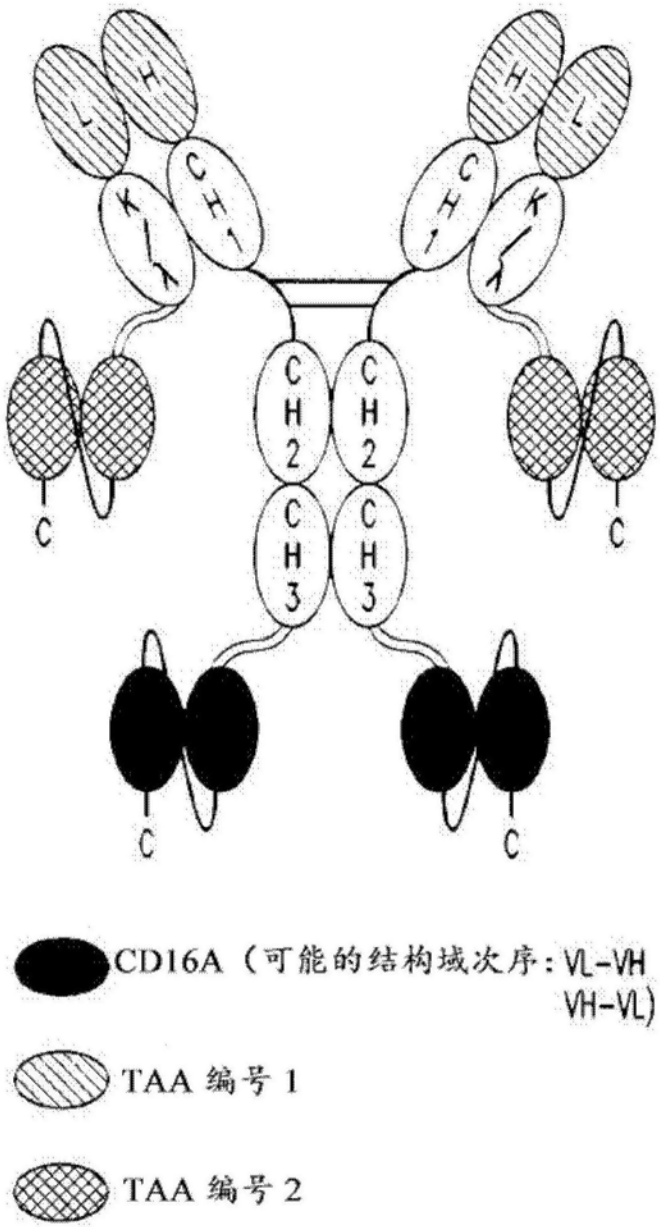


图14

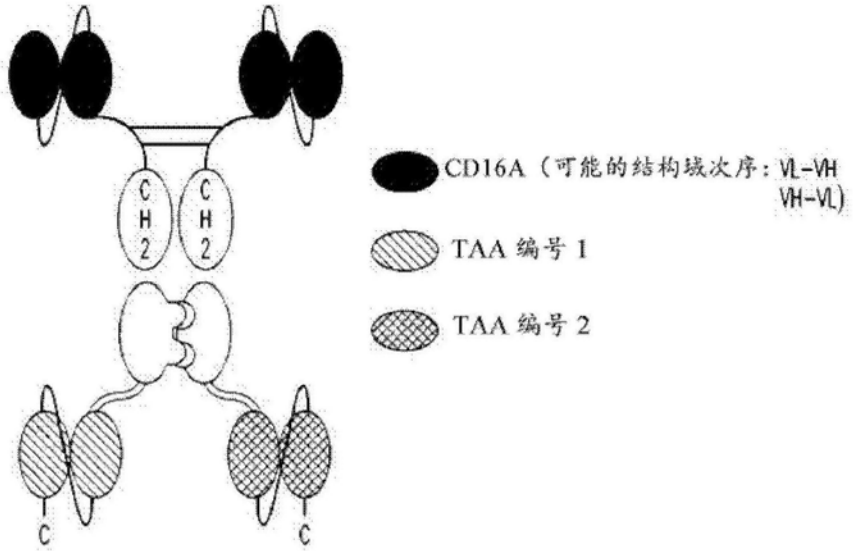

CH2
CH2
C
C
CD16A（可能的结构域次序：VL-VH VH-VL）
TAA 编号 1
TAA 编号 2

图15A

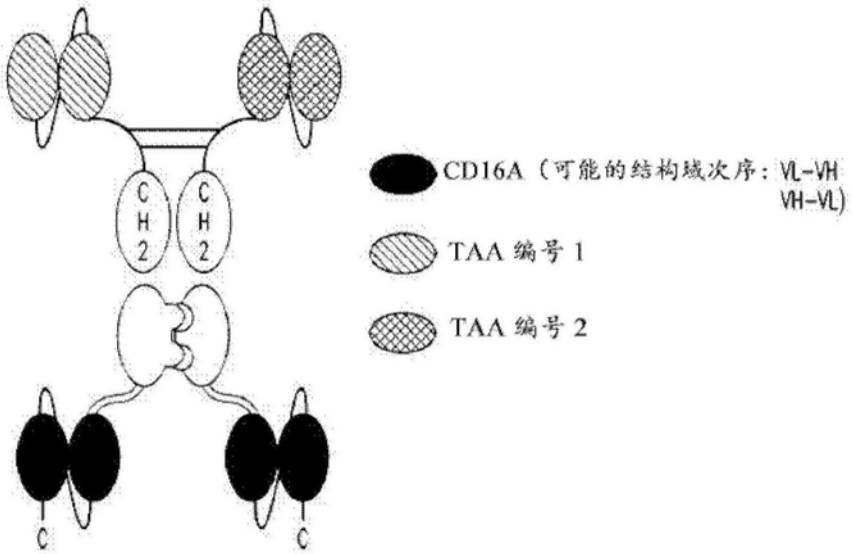

CH2
CH2
C
C
CD16A（可能的结构域次序：VL-VH VH-VL）
TAA 编号 1
TAA 编号 2

图15B

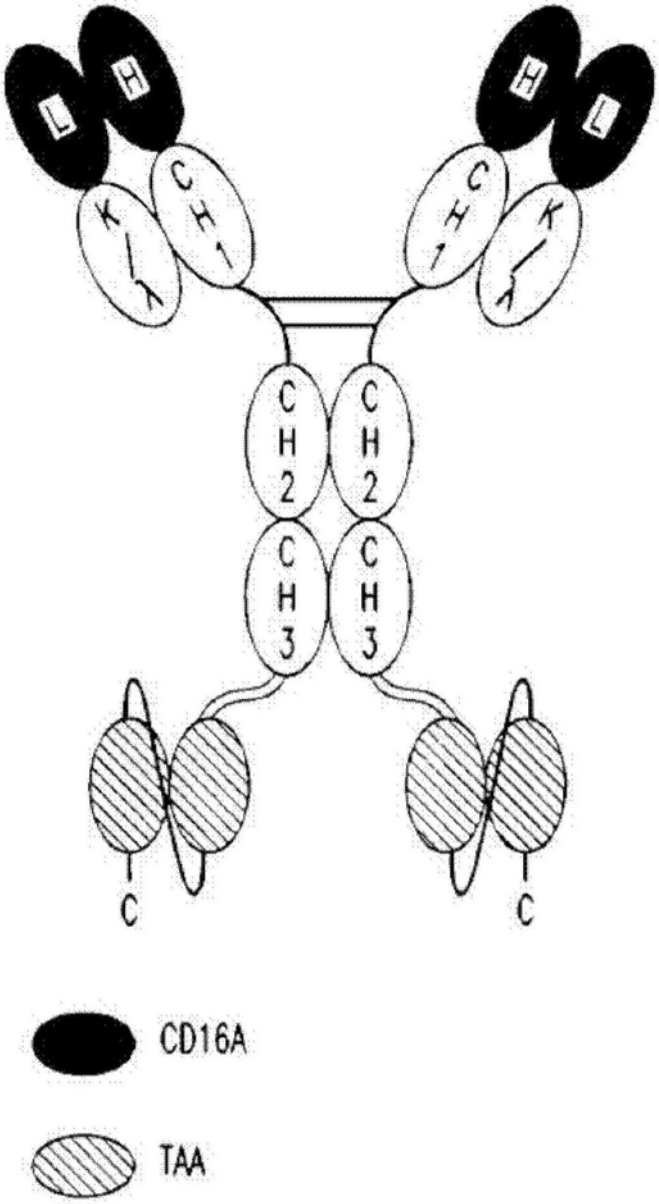


图16

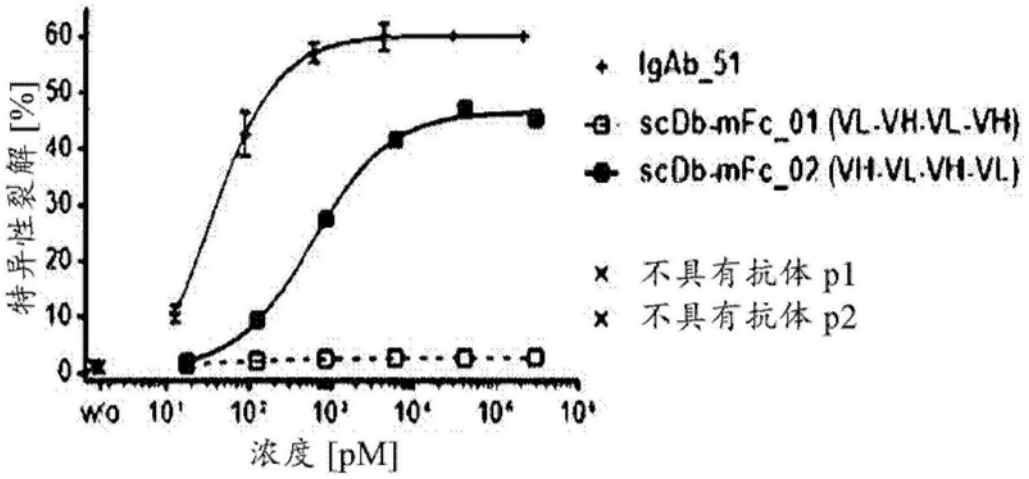
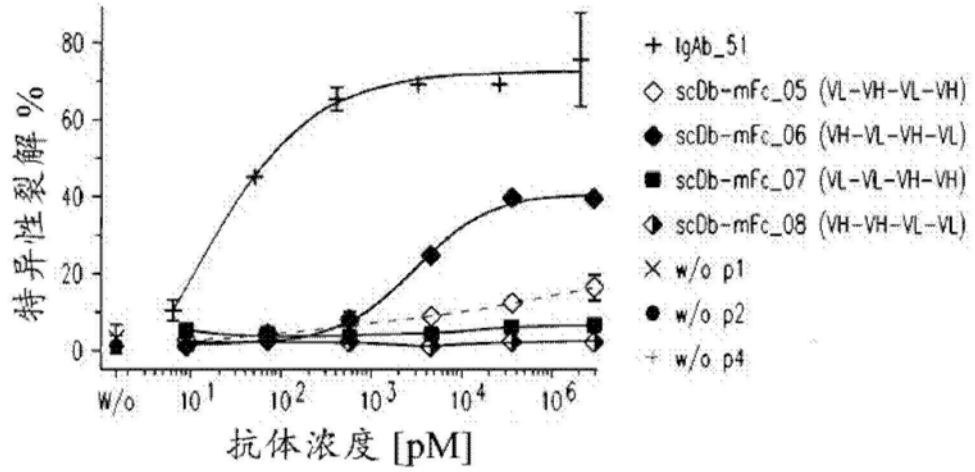

特异性裂解 [%]
浓度 [pM]
IgAb_51
scDb-mFc_01 (VL-VH-VL-VH)
scDb-mFc_02 (VH-VL-VH-VL)
不具有抗体 p1
不具有抗体 p2

图17A


特异性裂解 %
抗体浓度 [pM]
IgAb_51
scDb-mFc_05 (VL-VH-VL-VH)
scDb-mFc_06 (VH-VL-VH-VL)
scDb-mFc_07 (VL-VL-VH-VH)
scDb-mFc_08 (VH-VH-VL-VL)
w/o p1
w/o p2
w/o p4

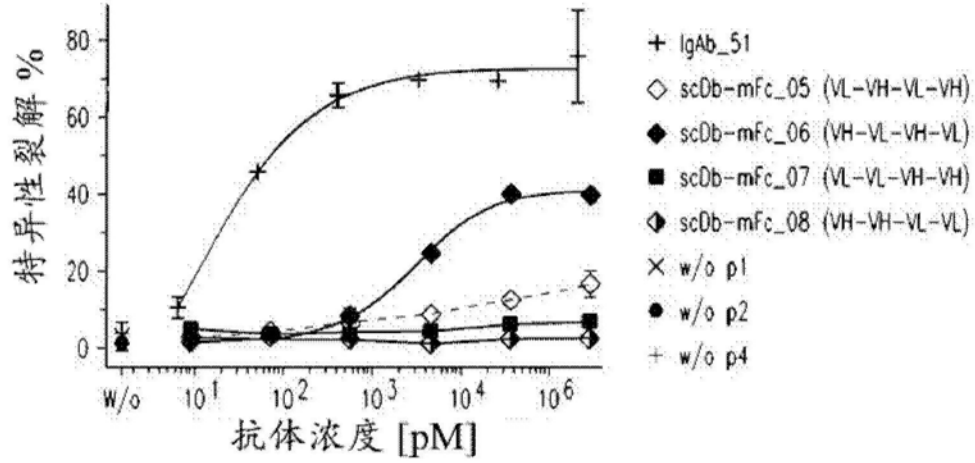

特异性裂解 %
抗体浓度 [pM]
IgAb_51
scDb-mFc_05 (VL-VH-VL-VH)
scDb-mFc_06 (VH-VL-VH-VL)
scDb-mFc_07 (VL-VL-VH-VH)
scDb-mFc_08 (VH-VH-VL-VL)
w/o p1
w/o p2
w/o p4

图17B

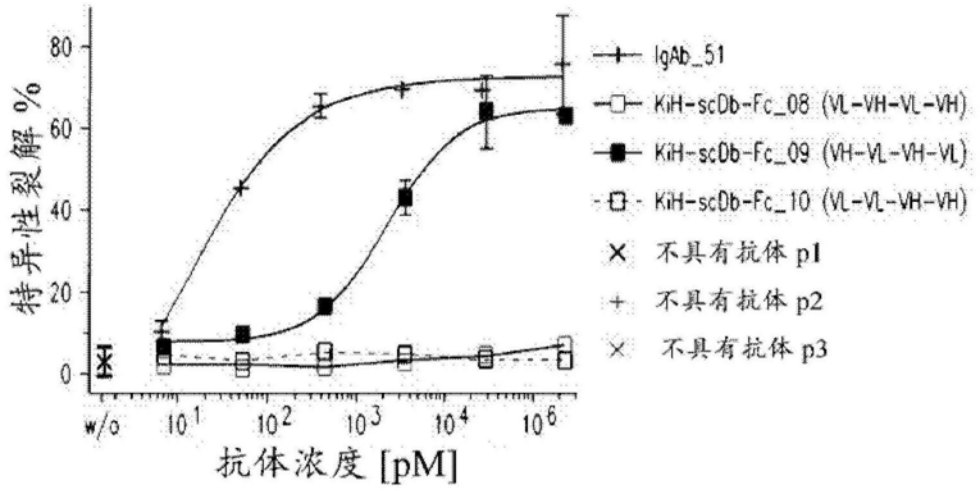


图17C

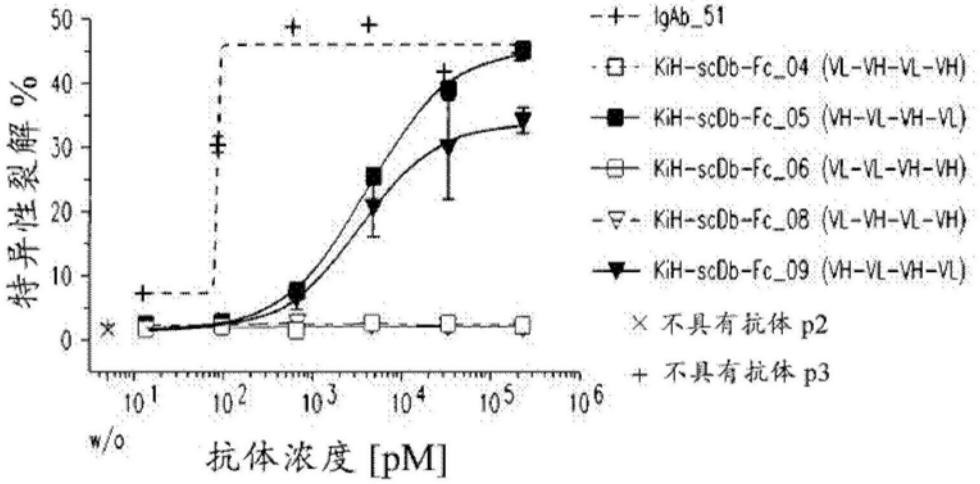


图17D

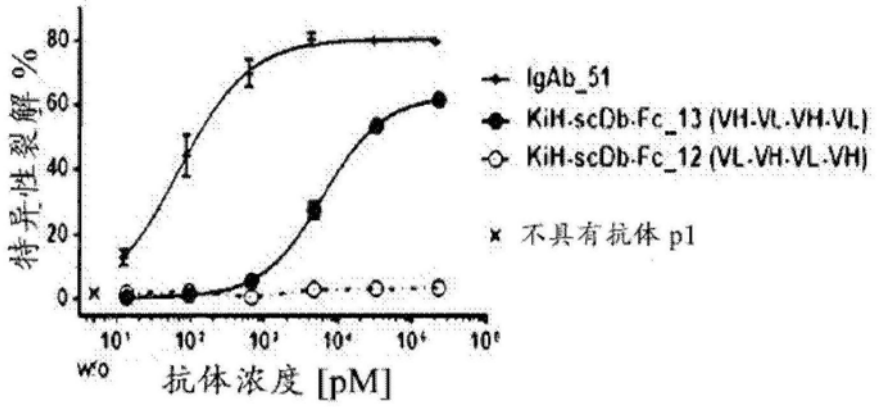


图17E

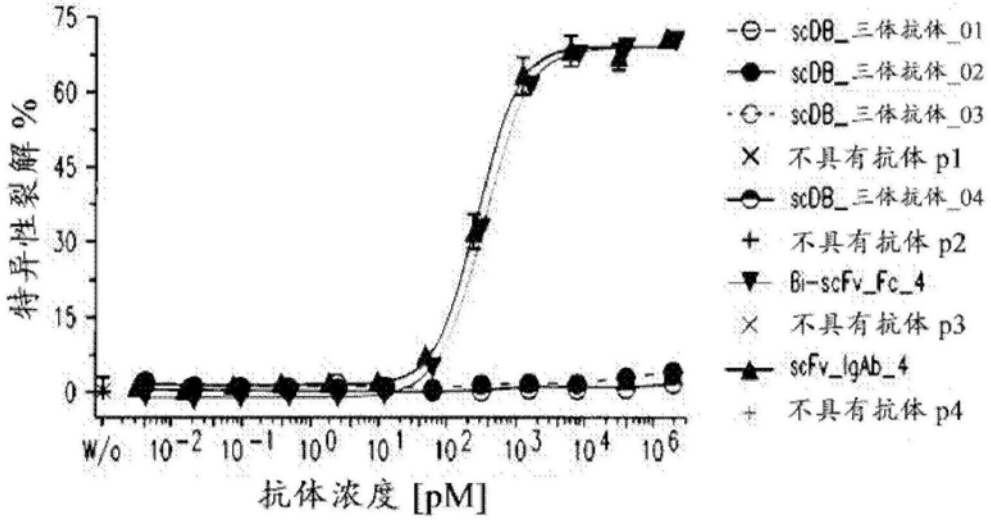


图17F

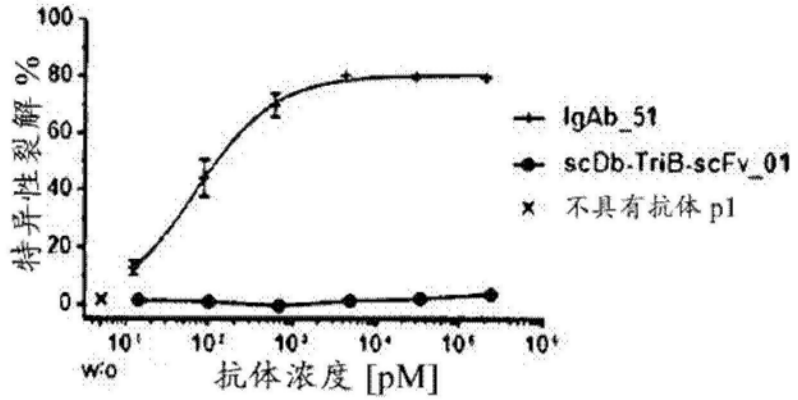


图17G

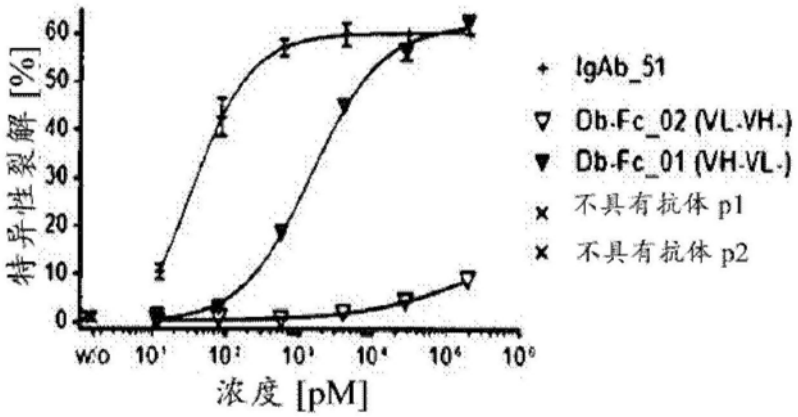


图17H

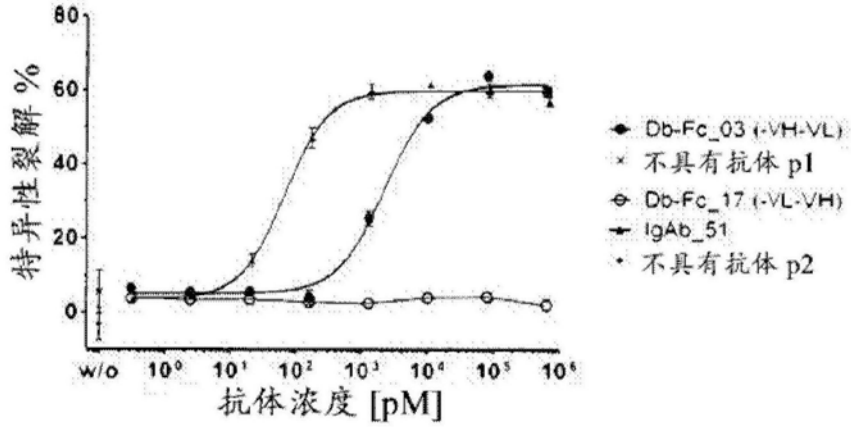

特异性裂解 %
80
60
40
20
0
w/o
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
抗体浓度 [pM]
Db-Fc_03 (-VH-VL)
不具有抗体 p1
Db-Fc_17 (-VL-VH)
IgAb_51
不具有抗体 p2

图17I

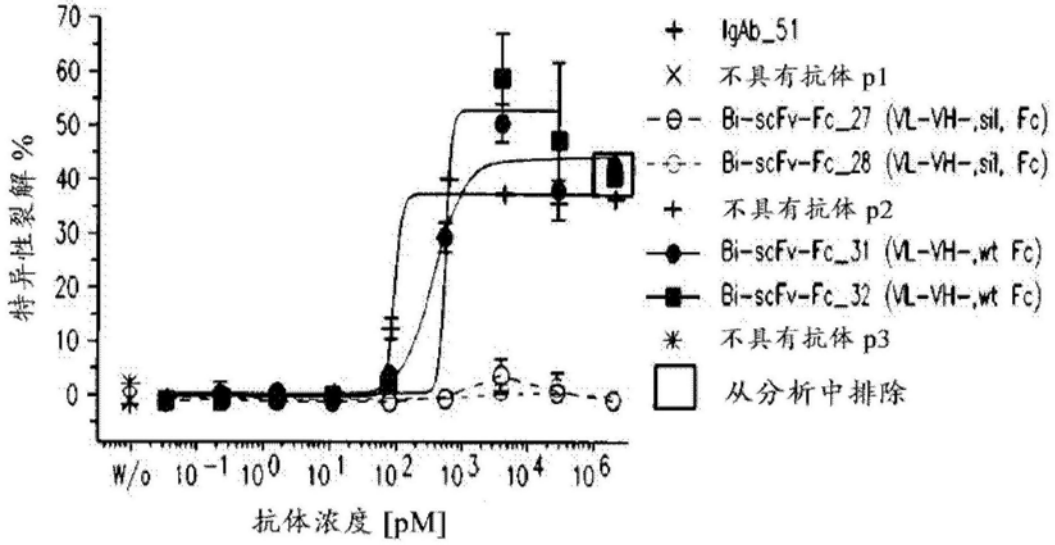

特异性裂解 %
70
60
50
40
30
20
10
0
W/o
10^{-1}
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^6
抗体浓度 [pM]
IgAb_51
不具有抗体 p1
Bi-scFv-Fc_27 (VL-VH-,sil, Fc)
Bi-scFv-Fc_28 (VL-VH-,sil, Fc)
不具有抗体 p2
Bi-scFv-Fc_31 (VL-VH-,wt Fc)
Bi-scFv-Fc_32 (VL-VH-,wt Fc)
不具有抗体 p3
从分析中排除

图17J

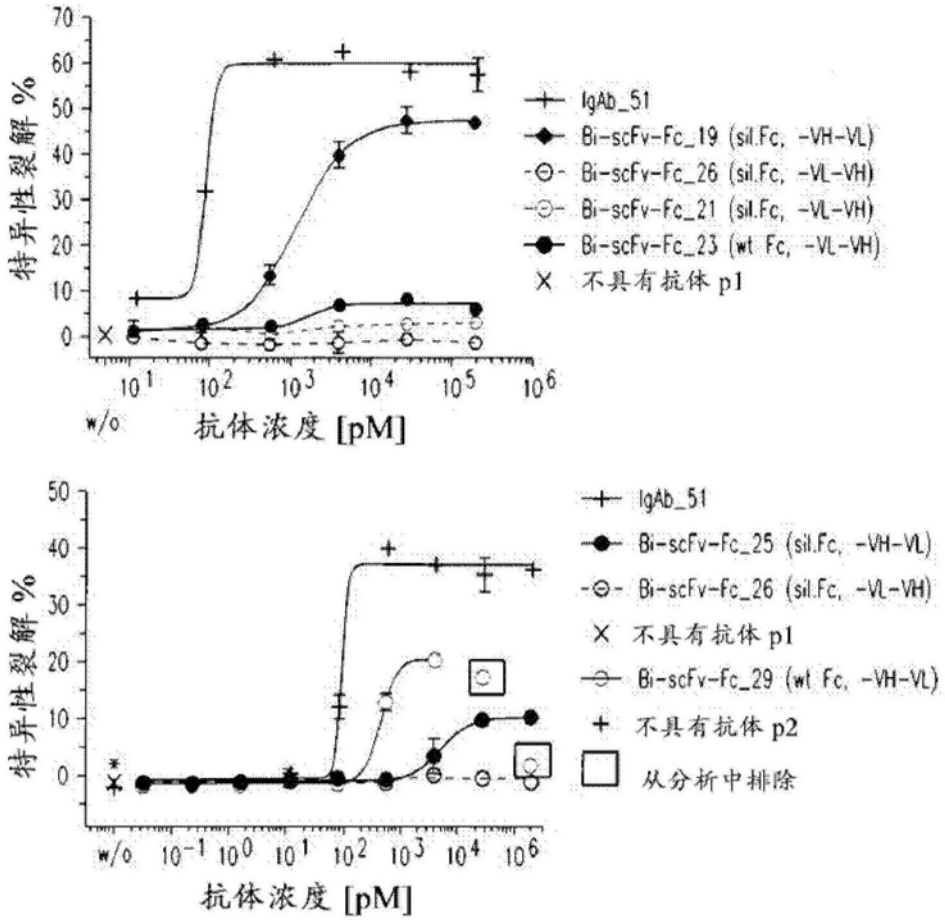

特异性裂解 %
抗体浓度 [pM]
w/o
IgAb_51
Bi-scFv-Fc_19 (sil.Fc, -VH-VL)
Bi-scFv-Fc_26 (sil.Fc, -VL-VH)
Bi-scFv-Fc_21 (sil.Fc, -VL-VH)
Bi-scFv-Fc_23 (wt Fc, -VL-VH)
不具有抗体 p1
Bi-scFv-Fc_25 (sil.Fc, -VH-VL)
Bi-scFv-Fc_29 (wt Fc, -VH-VL)
不具有抗体 p2
从分析中排除

图17K

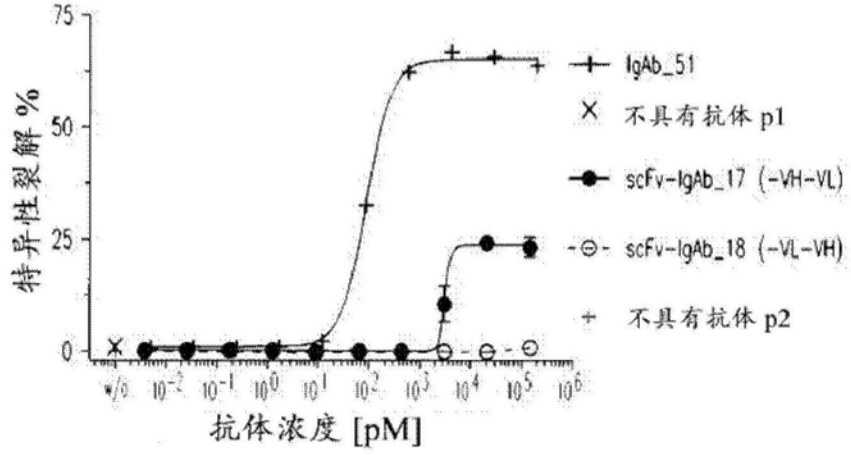

特异性裂解 %
抗体浓度 [pM]
w/o
IgAb_51
不具有抗体 p1
scFv-IgAb_17 (-VH-VL)
scFv-IgAb_18 (-VL-VH)
不具有抗体 p2

图17L

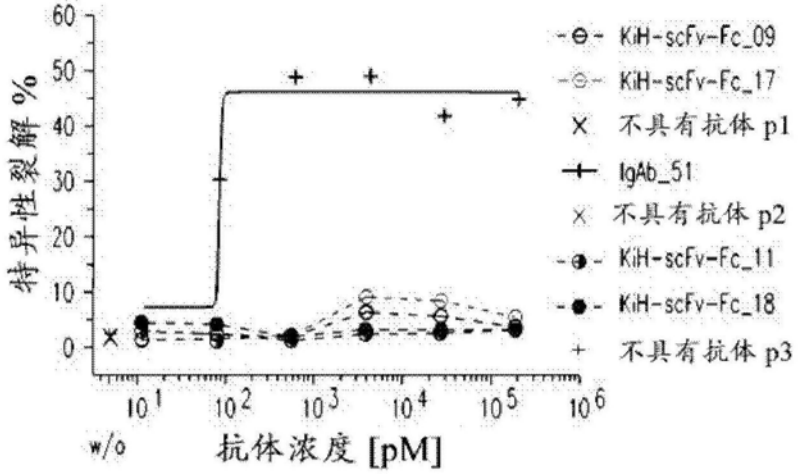

特异性裂解 %
抗体浓度 [pM]
w/o
KiH-scFv-Fc_09
KiH-scFv-Fc_17
不具有抗体 p1
IgAb_51
不具有抗体 p2
KiH-scFv-Fc_11
KiH-scFv-Fc_18
不具有抗体 p3

图17M

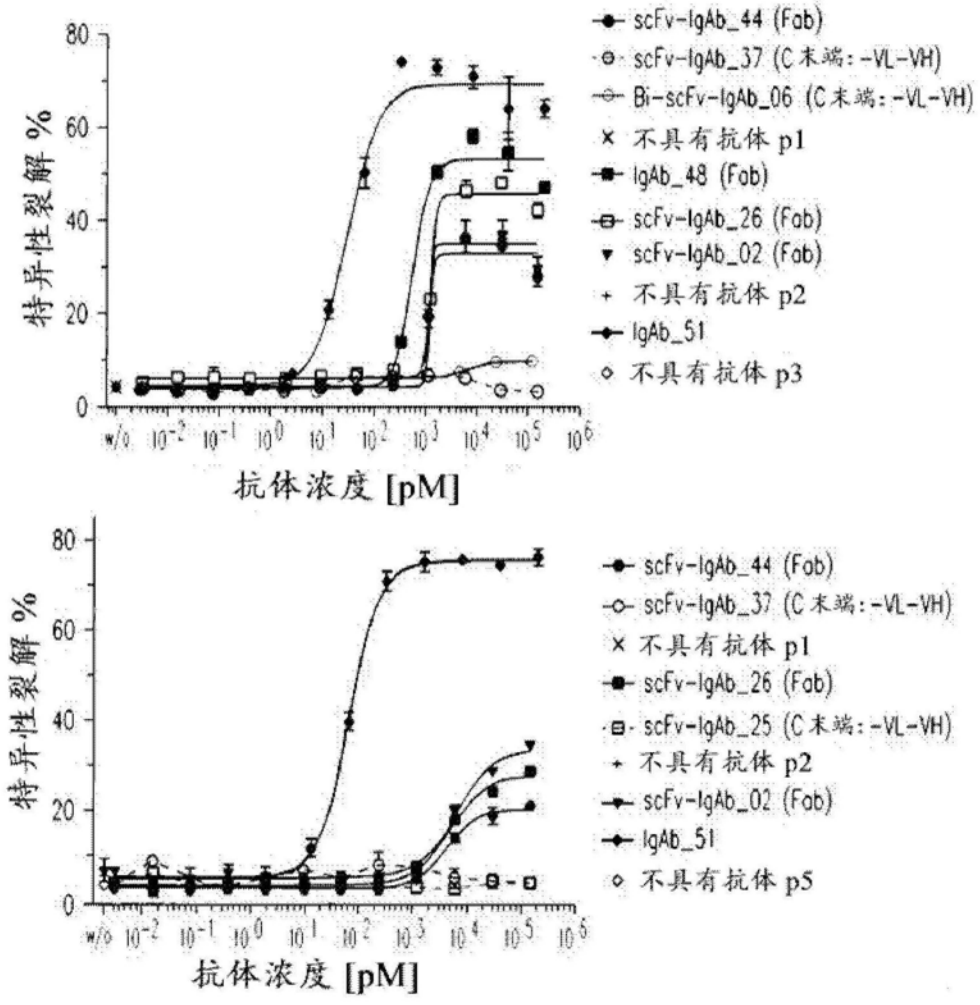

特异性裂解 %
抗体浓度 [pM]
scFv-IgAb_44 (Fab)
scFv-IgAb_37 (C末端:-VL-VH)
Bi-scFv-IgAb_06 (C末端:-VL-VH)
不具有抗体 p1
IgAb_48 (Fab)
scFv-IgAb_26 (Fab)
scFv-IgAb_02 (Fab)
不具有抗体 p2
IgAb_51
不具有抗体 p3
特异性裂解 %
抗体浓度 [pM]
scFv-IgAb_44 (Fab)
scFv-IgAb_37 (C末端:-VL-VH)
不具有抗体 p1
scFv-IgAb_26 (Fab)
scFv-IgAb_25 (C末端:-VL-VH)
不具有抗体 p2
scFv-IgAb_02 (Fab)
IgAb_51
不具有抗体 p5

图17N

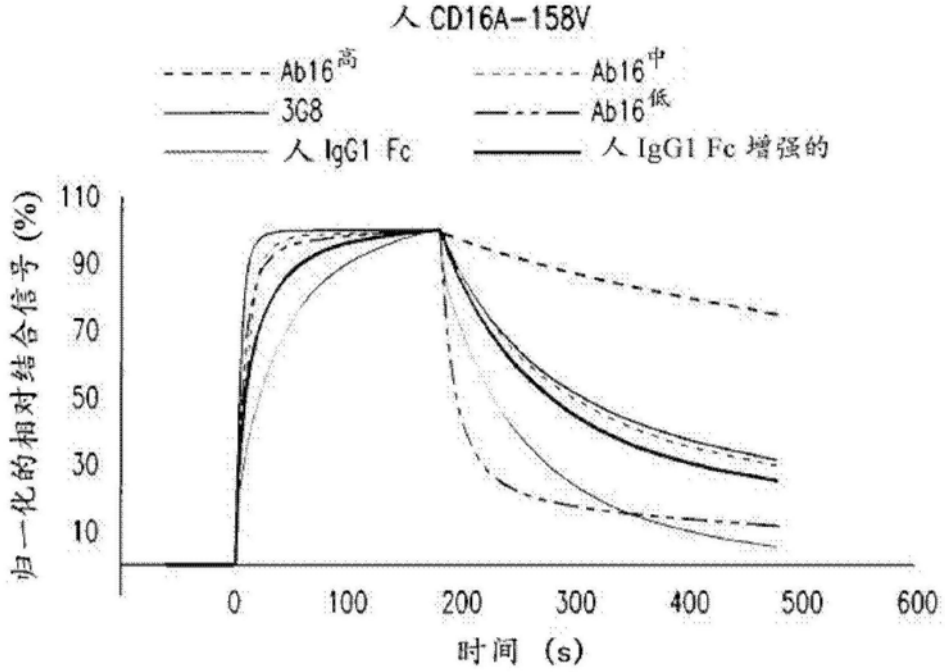

人 CD16A-158V
Ab16高
Ab16中
3G8
Ab16低
人 IgG1 Fc
人 IgG1 Fc 增强的
归一化的相对结合信号 (%)
110
90
70
50
30
10
0
100
200
300
400
500
600
时间 (s)

图18A

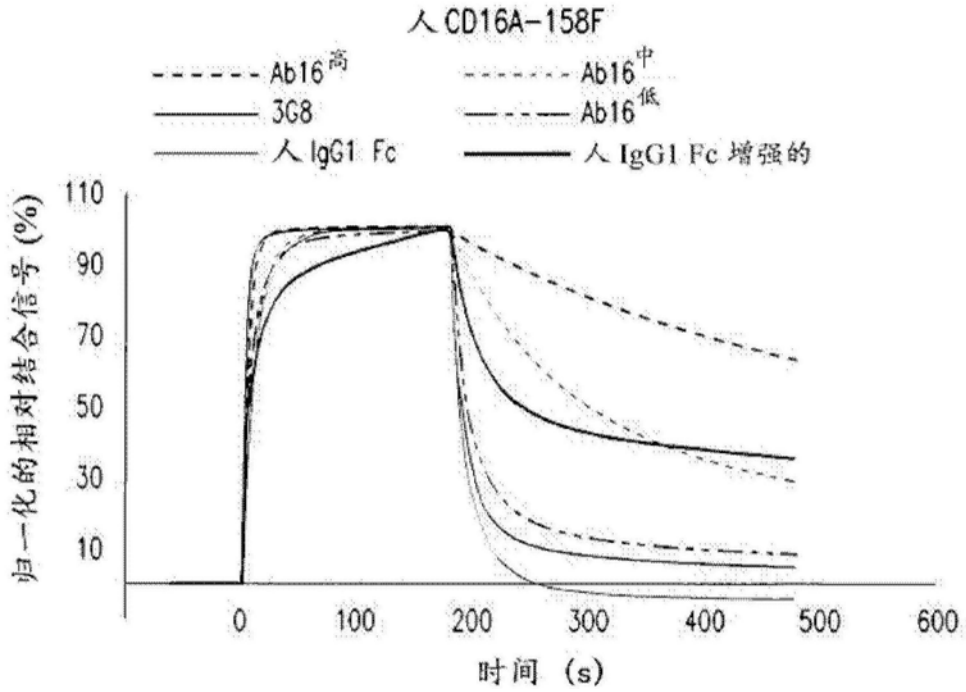

人 CD16A-158F
Ab16高
Ab16中
3G8
Ab16低
人 IgG1 Fc
人 IgG1 Fc 增强的
归一化的相对结合信号 (%)
110
90
70
50
30
10
0
100
200
300
400
500
600
时间 (s)

图18B

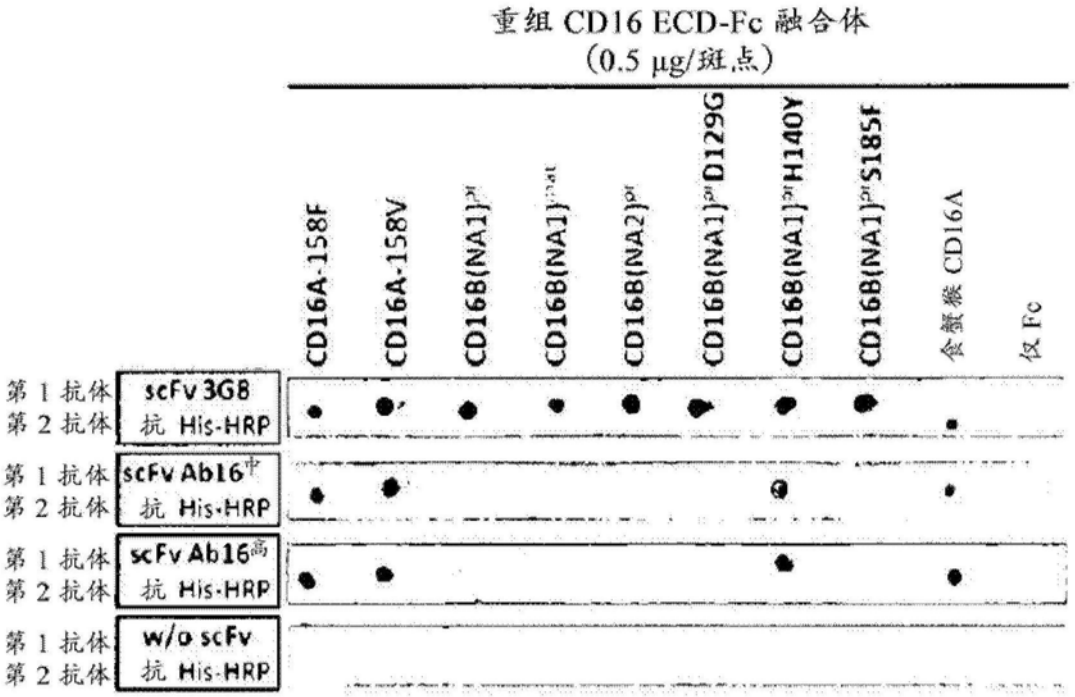

重组 CD16 ECD-Fc 融合体
(0.5 μg/斑点)
CD16A-158F
CD16A-158V
CD16B(NA1)pr
CD16B(NA1)pr
CD16B(NA2)pr
CD16B(NA1)prD129G
CD16B(NA1)prH140Y
CD16B(NA1)prS185F
食蟹猴 CD16A
仅 Fc
第 1 抗体 scFv 3G8
第 2 抗体 抗 His-HRP
第 1 抗体 scFv Ab16中
第 2 抗体 抗 His-HRP
第 1 抗体 scFv Ab16高
第 2 抗体 抗 His-HRP
第 1 抗体 w/o scFv
第 2 抗体 抗 His-HRP

图19A

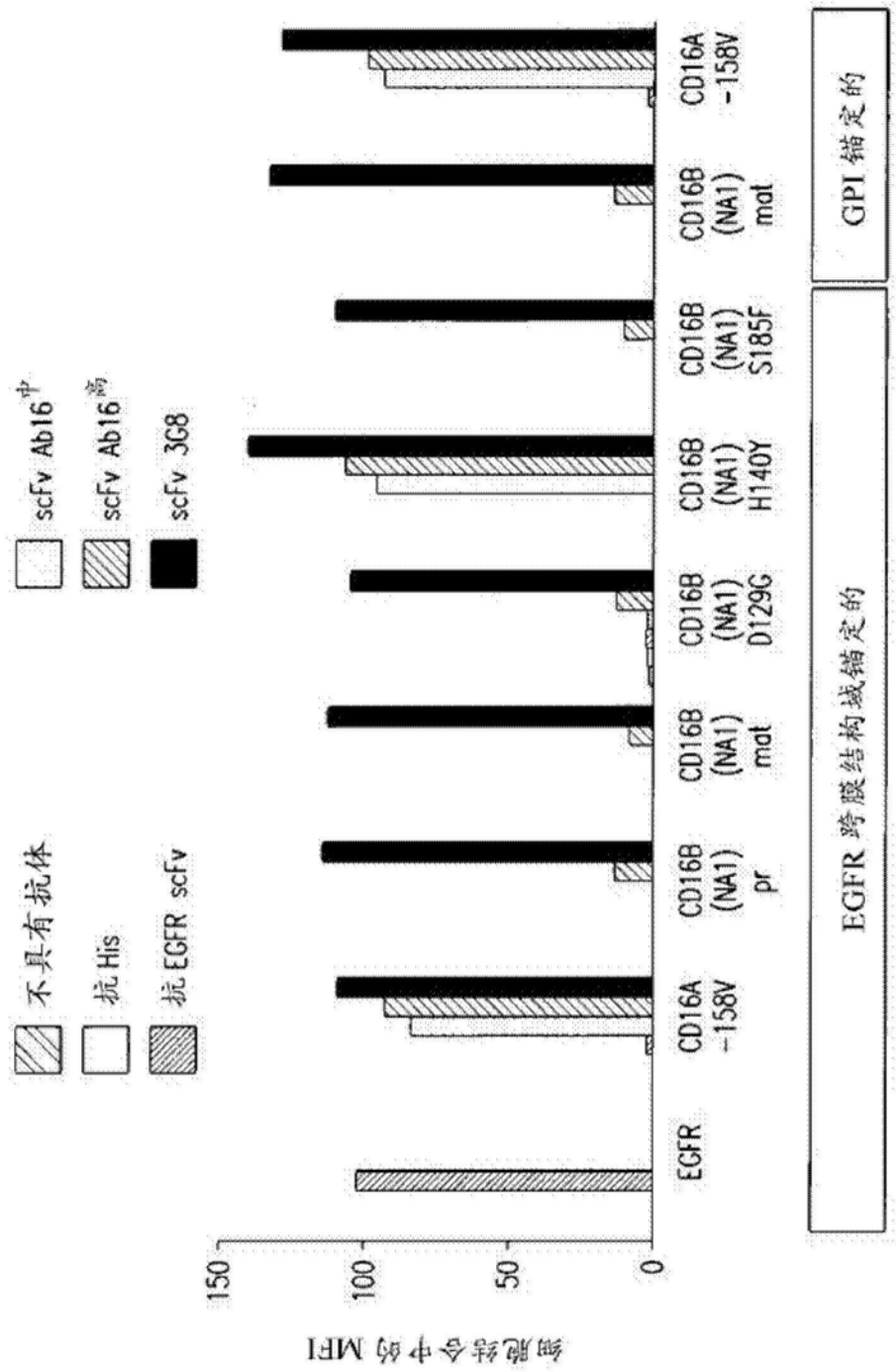

细胞结合中的 MFI
150
100
50
0
不具有抗体
抗 His
抗 EGFR scFv
scFv Ab16中
scFv Ab16高
scFv 3G8
EGFR
CD16A -158V
CD16B (NA1) pr
CD16B (NA1) mat
CD16B (NA1) D129G
CD16B (NA1) H140Y
CD16B (NA1) S185F
CD16B (NA1) mat
CD16A -158V
EGFR 跨膜结构域锚定的
GPI 锚定的

图19B

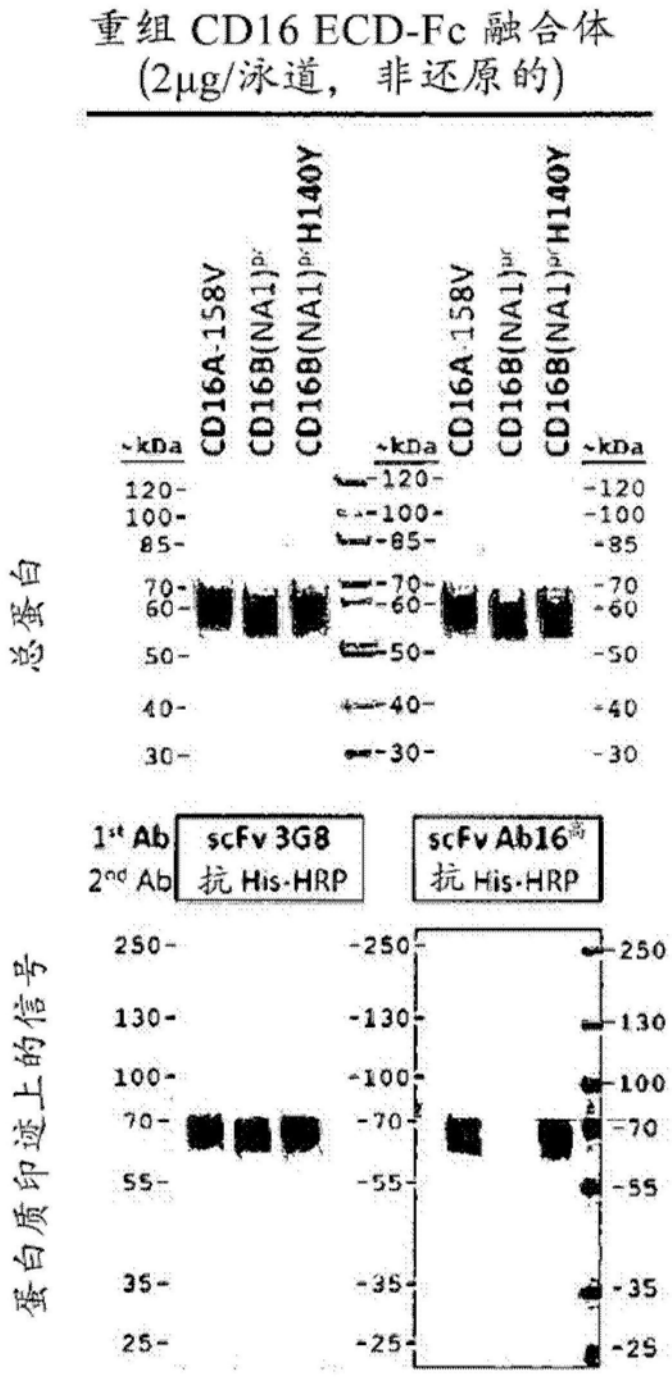

重组 CD16 ECD-Fc 融合体
(2μg/泳道，非还原的)
总蛋白
CD16A-158V
CD16B(NA1)pr
CD16B(NA1)pr-H140Y
~kDa
120-
100-
85-
70-
60-
50-
40-
30-
1st Ab
scFv 3G8
2nd Ab
抗 His-HRP
scFv Ab16高
抗 His-HRP
蛋白质印迹上的信号
250-
130-
100-
70-
55-
35-
25-

图19C

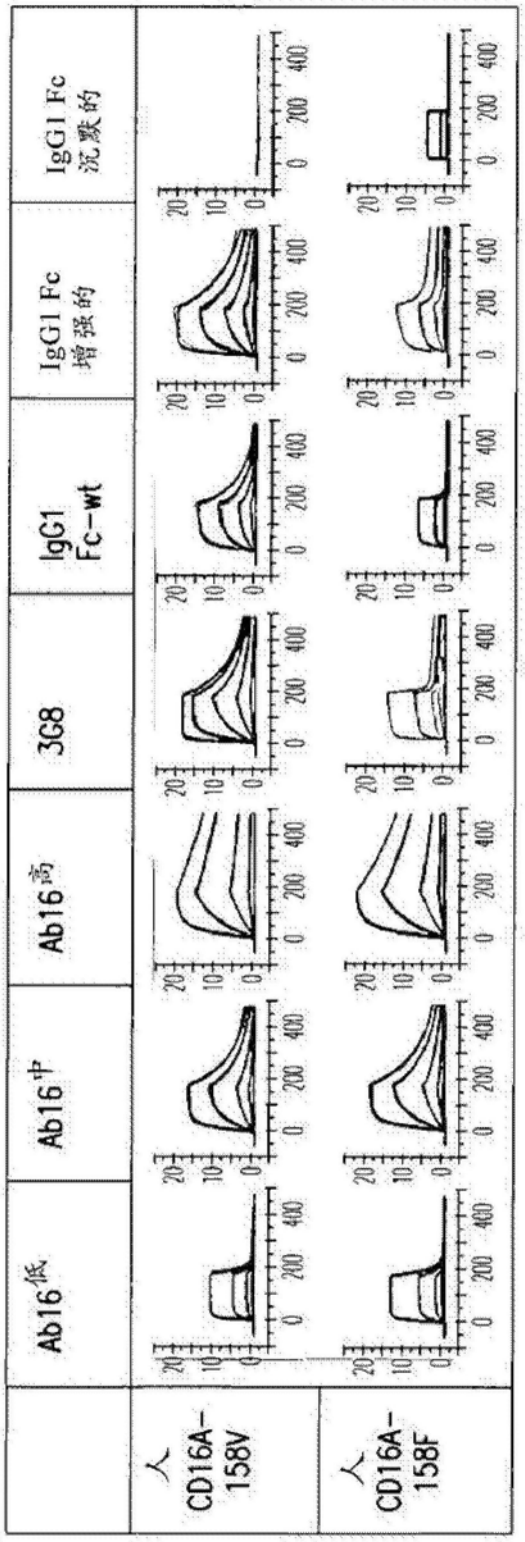

Ab16低
Ab16中
Ab16高
3G8
IgG1 Fc-wt
IgG1 Fc 增强的
IgG1 Fc 沉默的
人 CD16A-158V
人 CD16A-158F

图20

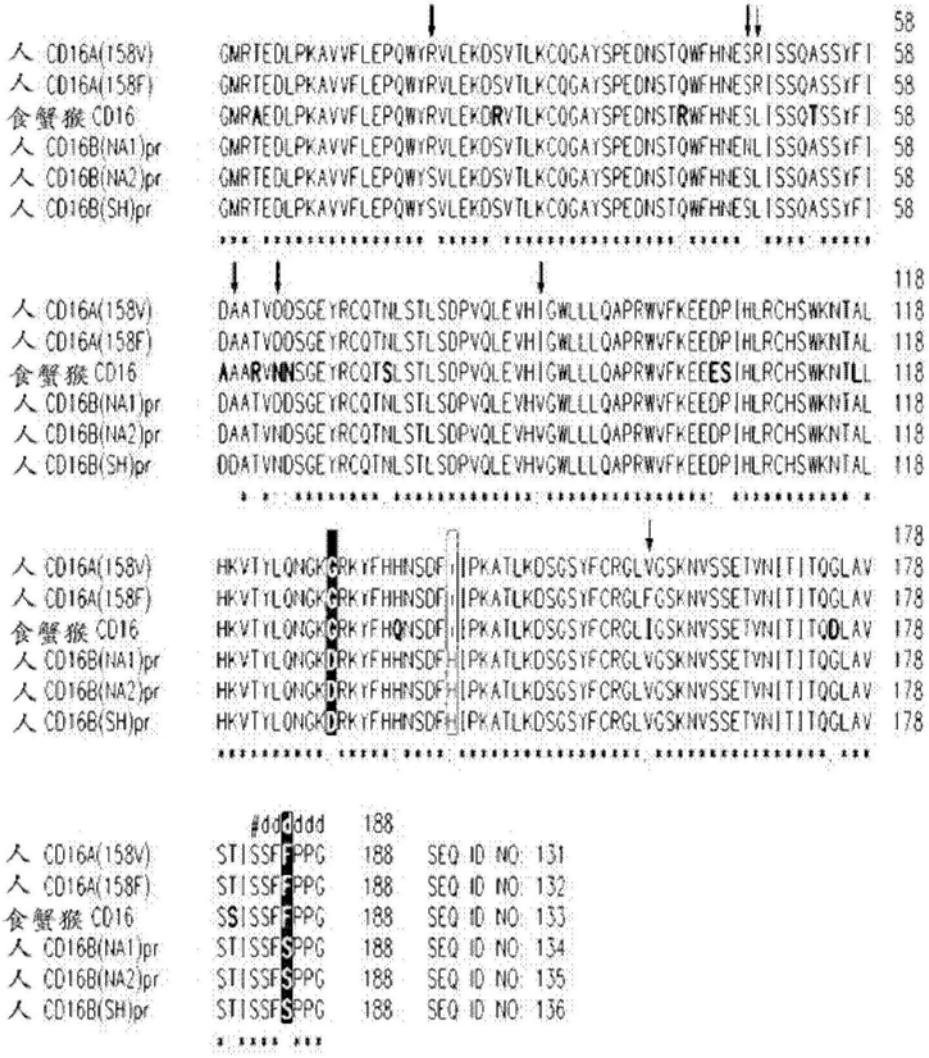

人 CD16A(158V)
人 CD16A(158F)
食蟹猴 CD16
人 CD16B(NA1)pr
人 CD16B(NA2)pr
人 CD16B(SH)pr
SEQ ID NO: 131
SEQ ID NO: 132
SEQ ID NO: 133
SEQ ID NO: 134
SEQ ID NO: 135
SEQ ID NO: 136

图21

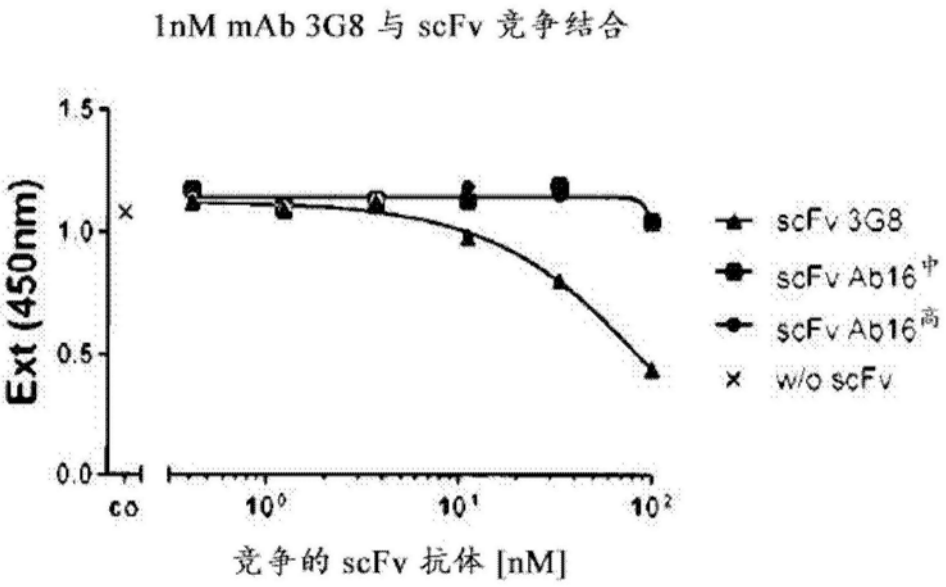

1nM mAb 3G8 与 scFv 竞争结合
Ext (450nm)
1.5
1.0
0.5
0.0
co
10^0
10^1
10^2
竞争的 scFv 抗体 [nM]
scFv 3G8
scFv Ab16中
scFv Ab16高
w/o scFv

图22

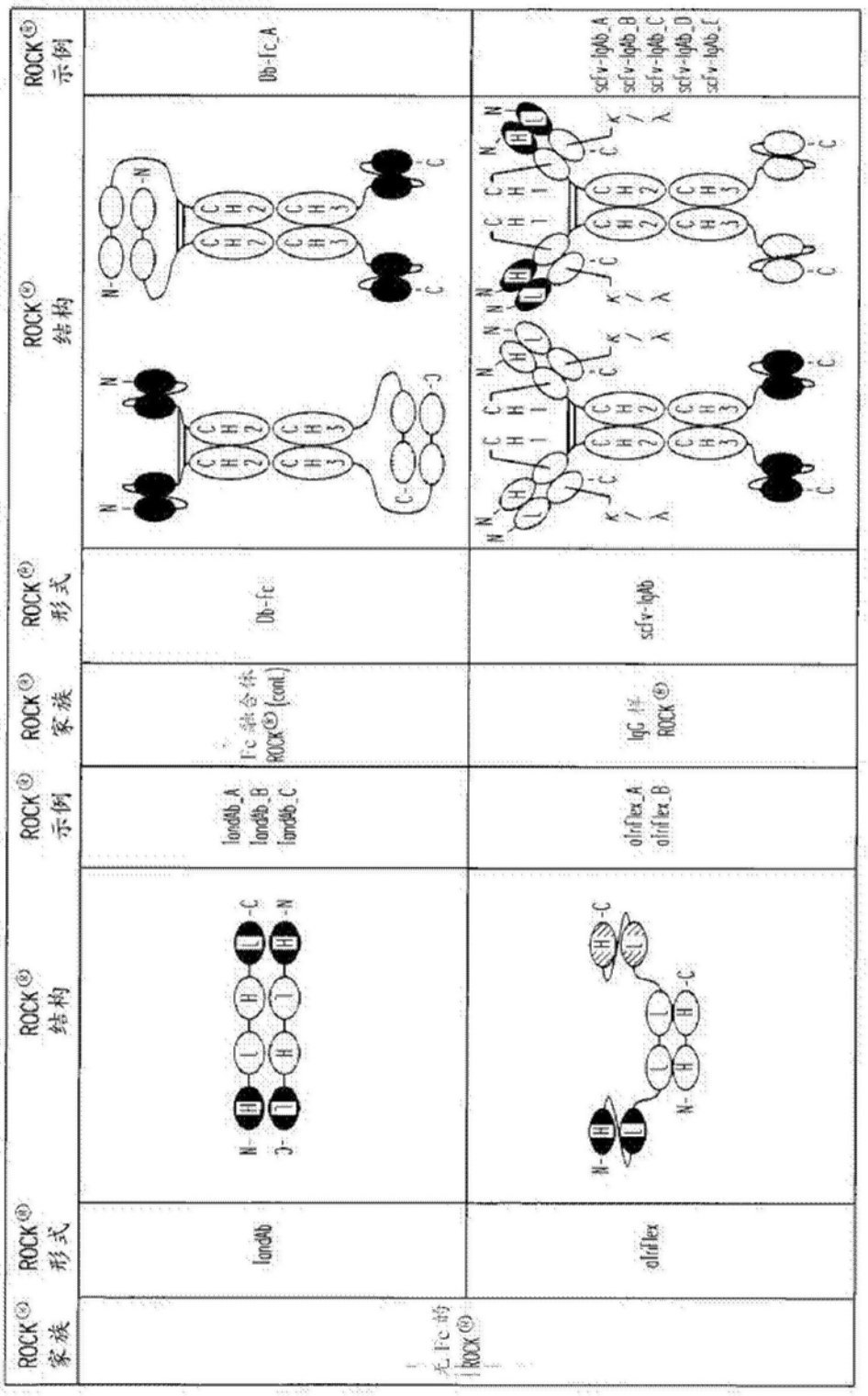

ROCK① 家族
ROCK② 形式
ROCK③ 结构
ROCK④ 示例
ROCK⑤ 家族
ROCK⑥ 形式
ROCK⑦ 结构
ROCK⑧ 示例
无Fc的ROCK⑨
landAb
landAb_A
landAb_B
landAb_C
Fc融合体ROCK⑩(cont.)
Db-fc
Db-fc_A
IgG型ROCK⑪
scFv-IgAb
scFv-IgAb_A
scFv-IgAb_B
scFv-IgAb_C
scFv-IgAb_D
scFv-IgAb_E
olrlflex
olrlflex_A
olrlflex_B

图23

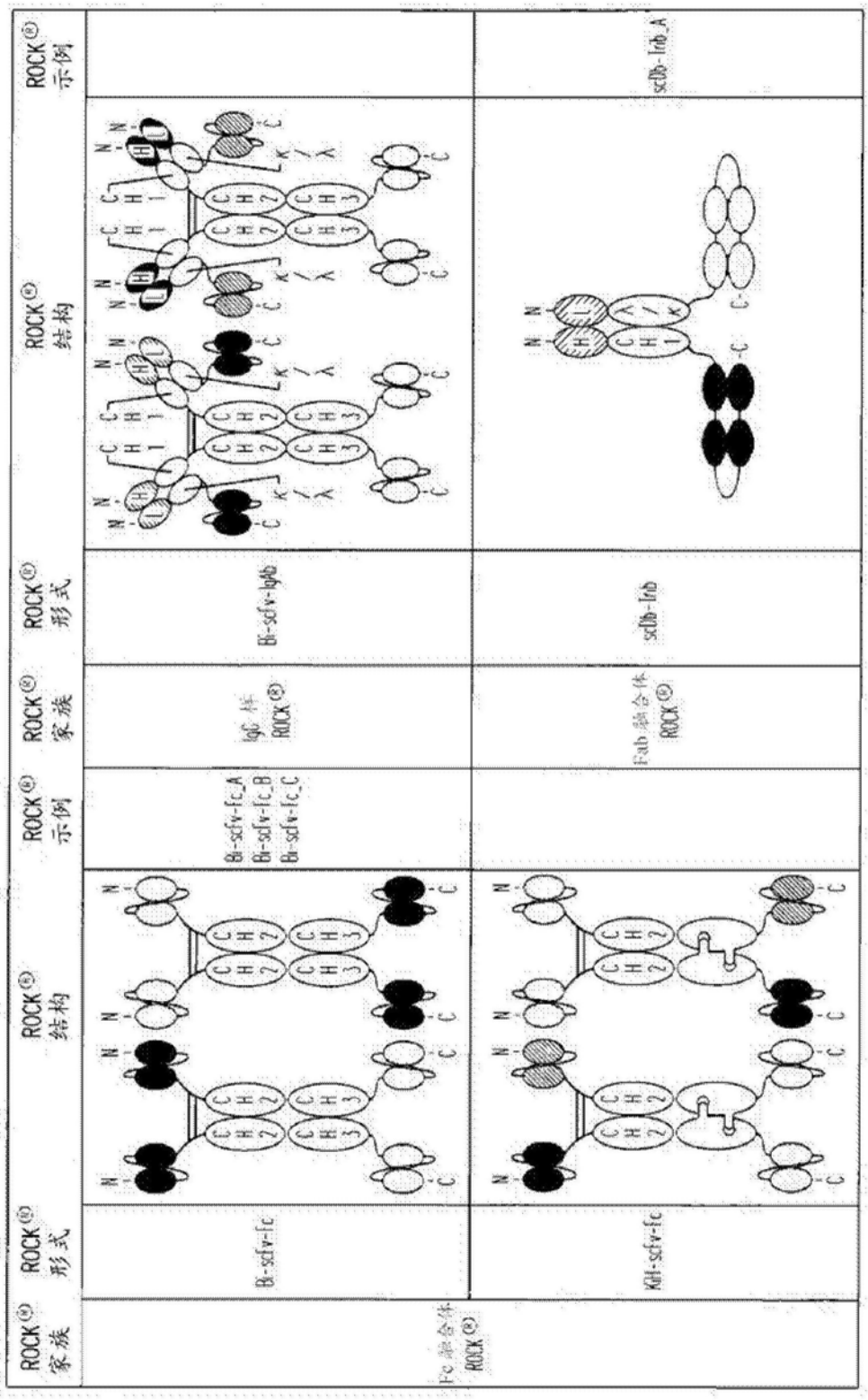

ROCK® 家族
ROCK® 形式
ROCK® 结构
ROCK® 示例
ROCK® 家族
ROCK® 形式
ROCK® 结构
ROCK® 示例
Fc 融合体 ROCK®
Bi-scfv-fc
Bi-scfv-fc_A
Bi-scfv-fc_B
Bi-scfv-fc_C
IgG 样 ROCK®
Bi-scfv-IgHb
KiH-scfv-fc
Fab 融合体 ROCK®
scDb-Inb
scDb-Inb_A

图23(续图)

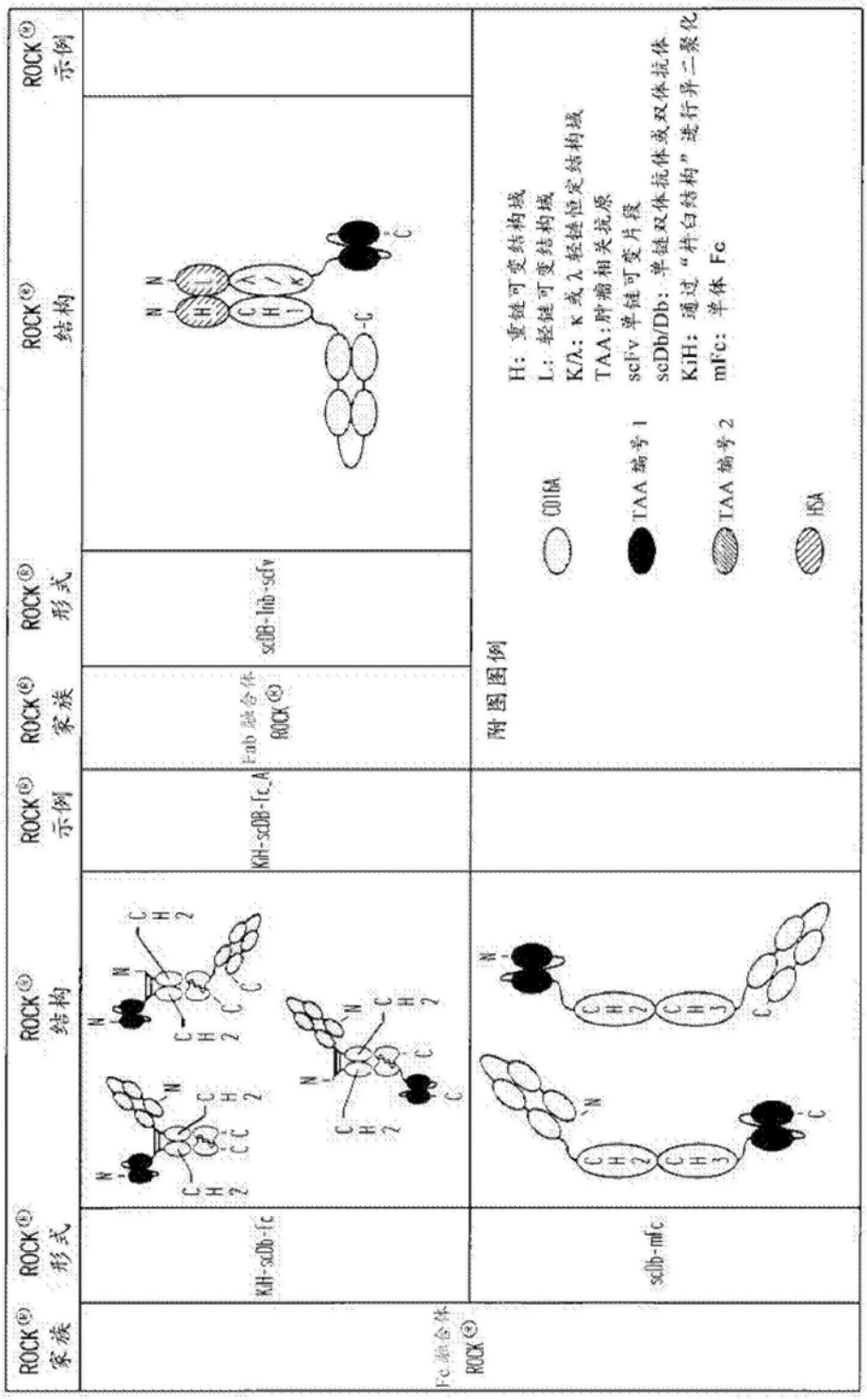

ROCK® 家族
ROCK® 形式
ROCK® 结构
ROCK® 示例
ROCK® 家族
ROCK® 形式
ROCK® 结构
ROCK® 示例
KiH-scDb-Fc
KiH-scDB-Fc_A
Fab 融合体 ROCK®
scDB-linb-scFv
Fc 融合体 ROCK®
scDb-mFc
附图图例
H：重链可变结构域
L：轻链可变结构域
Kλ：κ或λ轻链恒定结构域
TAA：肿瘤相关抗原
scFv 单链可变片段
scDb/Db：单链双体抗体或双体抗体
KiH：通过“杵臼结构”进行异二聚化
mFc：单体 Fc
CD16A
TAA 编号 1
TAA 编号 2
HSA

图23(续图)

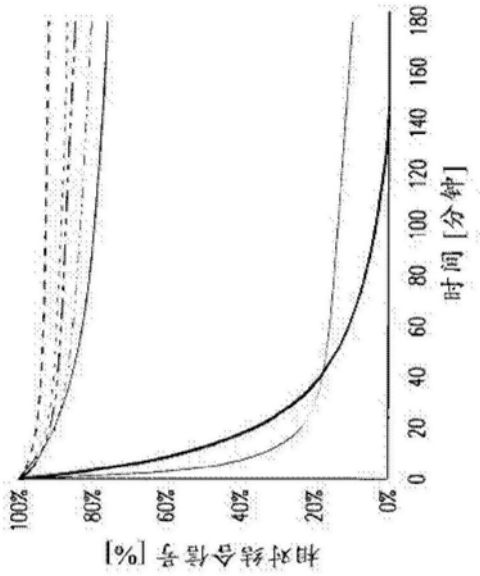

相对结合信号 [%]
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
时间 [分钟]

图24A

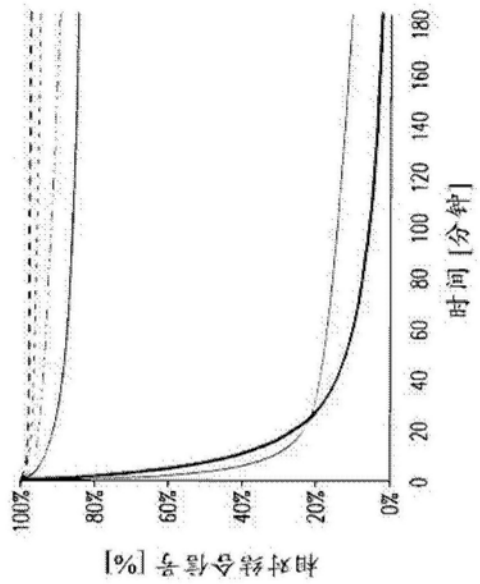

相对结合信号 [%]
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
时间 [分钟]

图24B

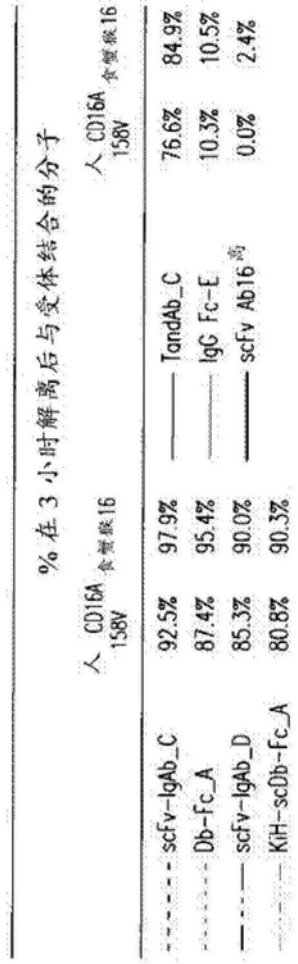

% 在 3 小时解离后与受体结合的分子
人 CD16A 158V
人 CD16A 158F
scFv-IgAb_C 92.5% 97.9%
Db-Fc_A 87.4% 95.4%
scFv-IgAb_D 85.3% 90.0%
KiH-scDb-Fc_A 80.8% 90.3%
TandAb_C 76.6% 84.9%
IgG Fc-E 10.3% 10.5%
scFv Ab16高 0.0% 2.4%

图24C

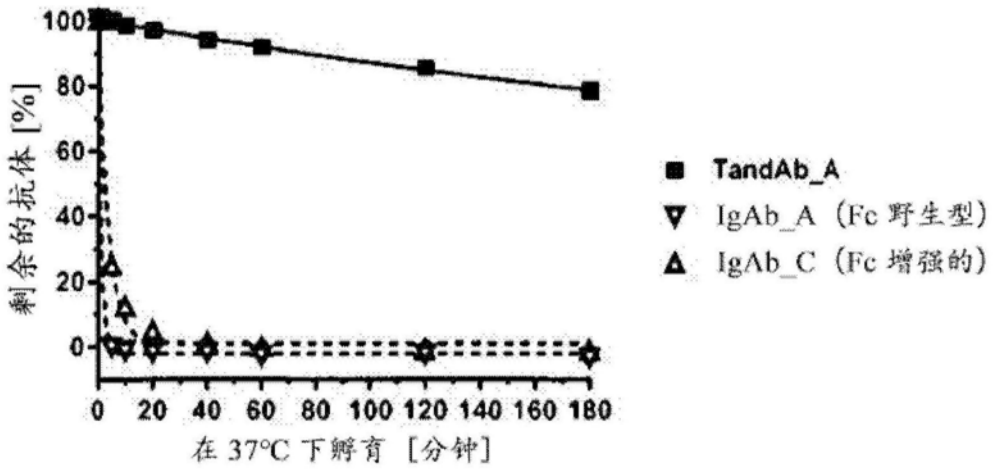

剩余的抗体 [%]
100
80
60
40
20
0
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180
在 37°C 下孵育 [分钟]
TandAb_A
IgAb_A (Fc 野生型)
IgAb_C (Fc 增强的)

图25

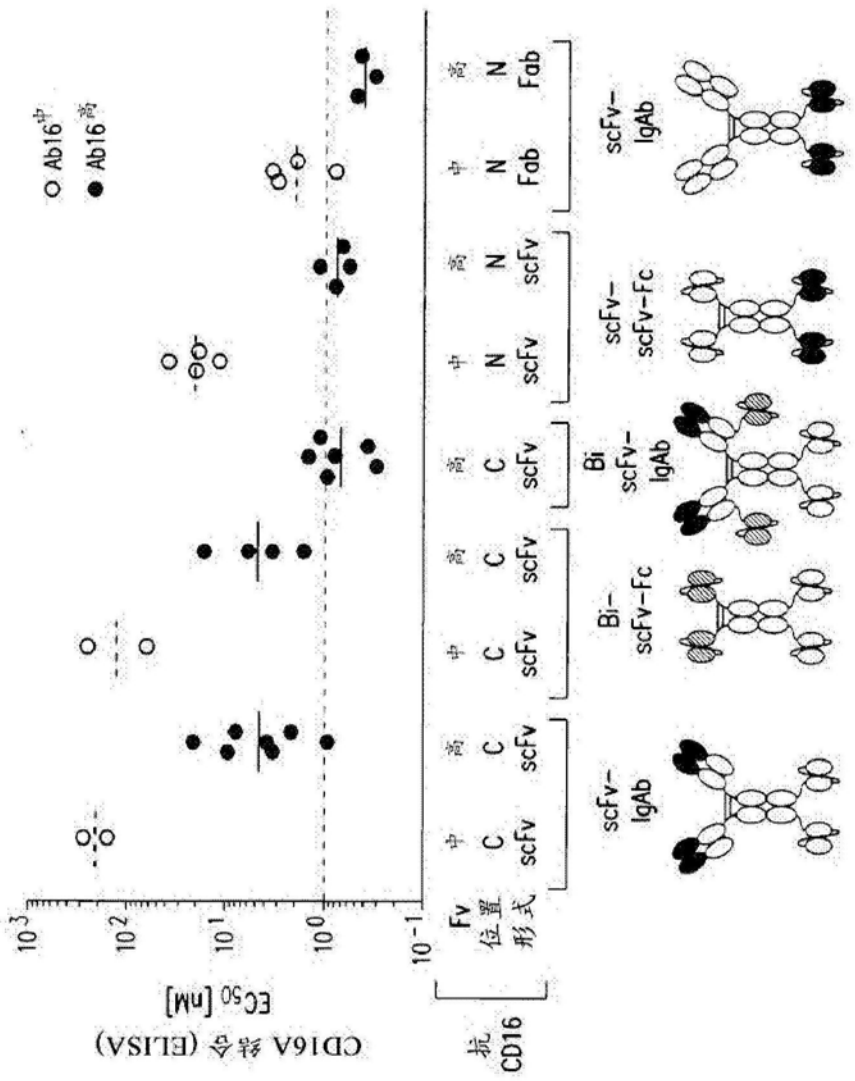

CD16A 结合 (ELISA)
EC50 [nM]
○ Ab16中
● Ab16高
抗CD16
Fv位置形式
scFv-IgAb
Bi-scFv-Fc
Bi scFv-IgAb
scFv-scFv-Fc
scFv-IgAb

图26A

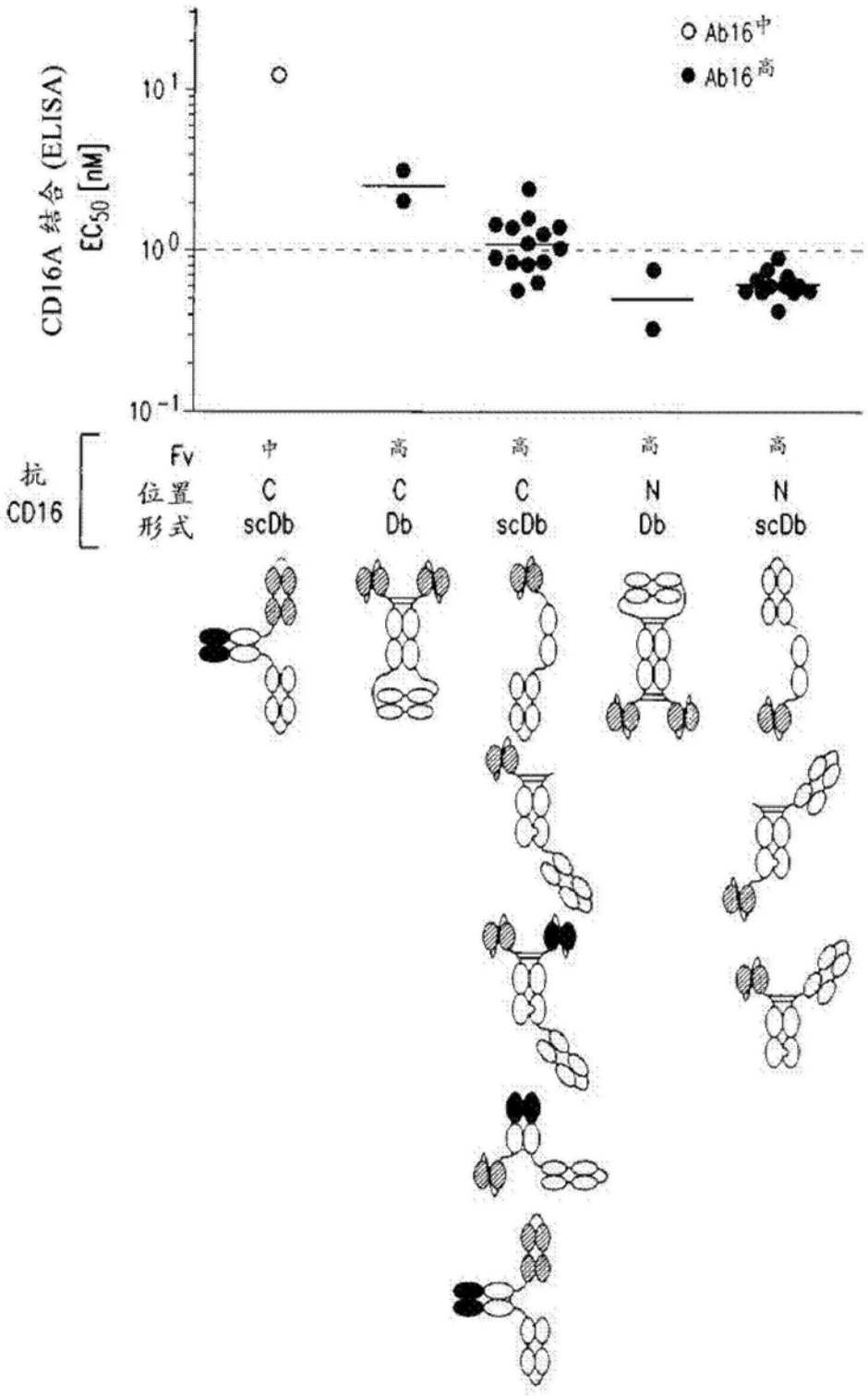

Ab16中
Ab16高
CD16A 结合 (ELISA)
EC50 [nM]
10 1
10 0
10 -1
抗 CD16
Fv
位置
形式
中
高
高
高
高
C
scDb
C
Db
C
scDb
N
Db
N
scDb

图26B

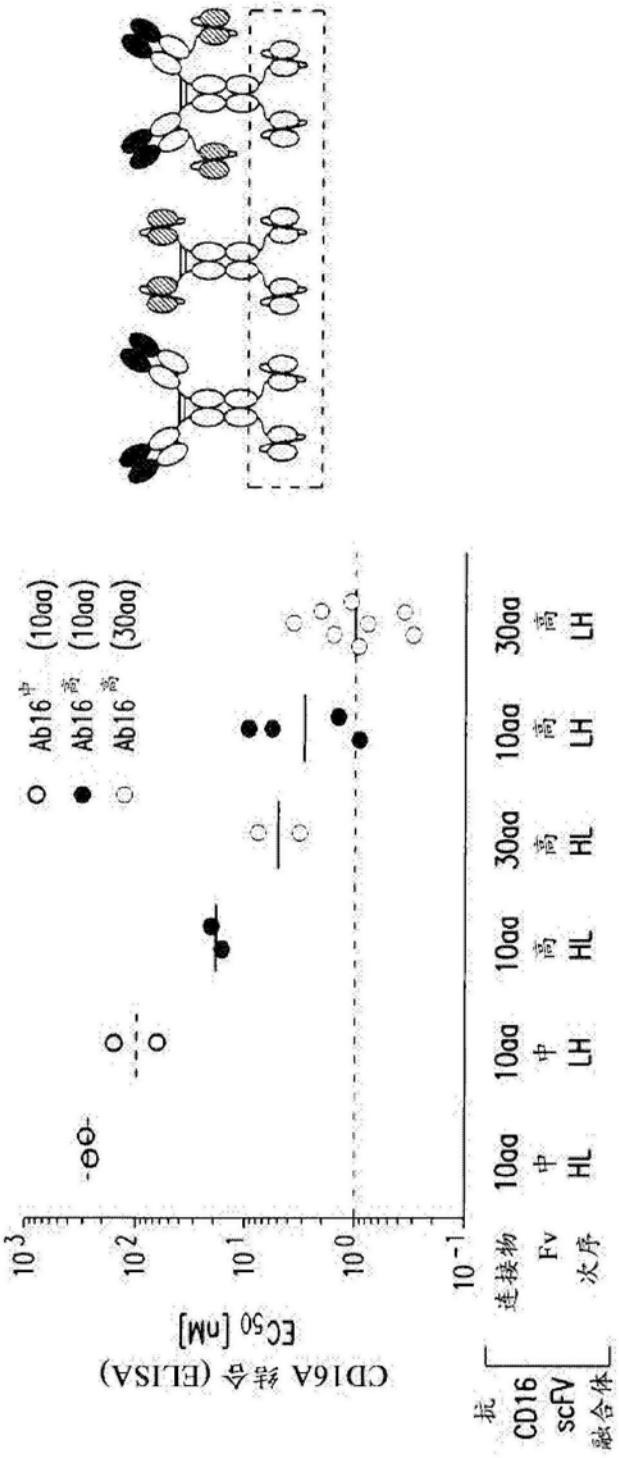

Ab16中 (10aa)
Ab16高 (10aa)
Ab16高 (30aa)
CD16A 结合 (ELISA)
EC50 [nM]
10^3
10^2
10^1
10^0
10^-1
抗CD16 scFV融合体
连接物
Fv次序
中 HL
10aa 中 LH
10aa 高 HL
30aa 高 HL
10aa 高 LH
30aa 高 LH

图26C

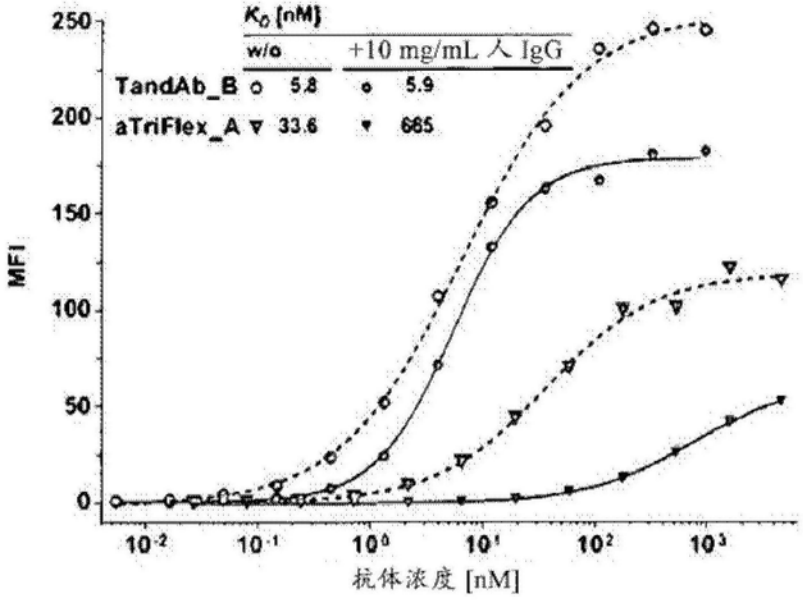

K_D [nM]
w/o
+10 mg/mL 人 IgG
TandAb_B 5.8 5.9
aTriFlex_A 33.6 685
MFI
250
200
150
100
50
0
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
10^{3}
抗体浓度 [nM]

图27A

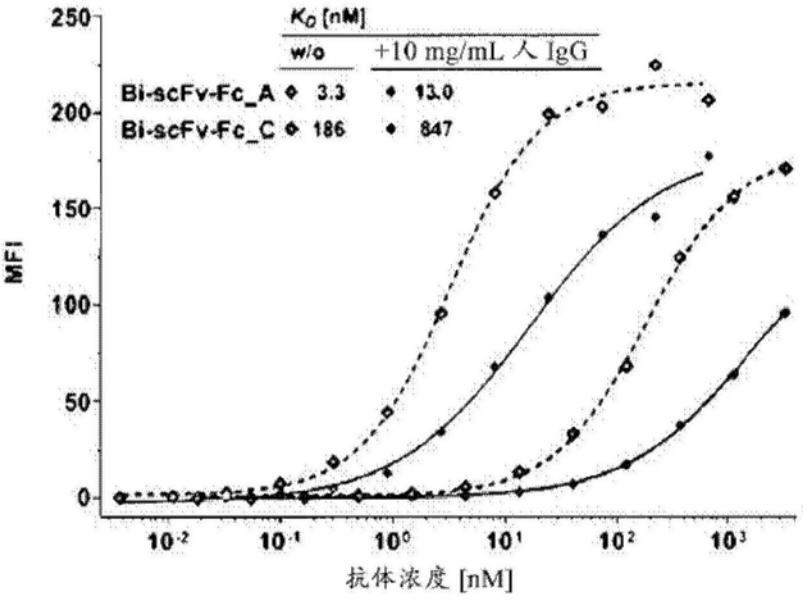

K_D [nM]
w/o
+10 mg/mL 人 IgG
Bi-scFv-Fc_A 3.3 13.0
Bi-scFv-Fc_C 186 847
MFI
250
200
150
100
50
0
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
10^{3}
抗体浓度 [nM]

图27B

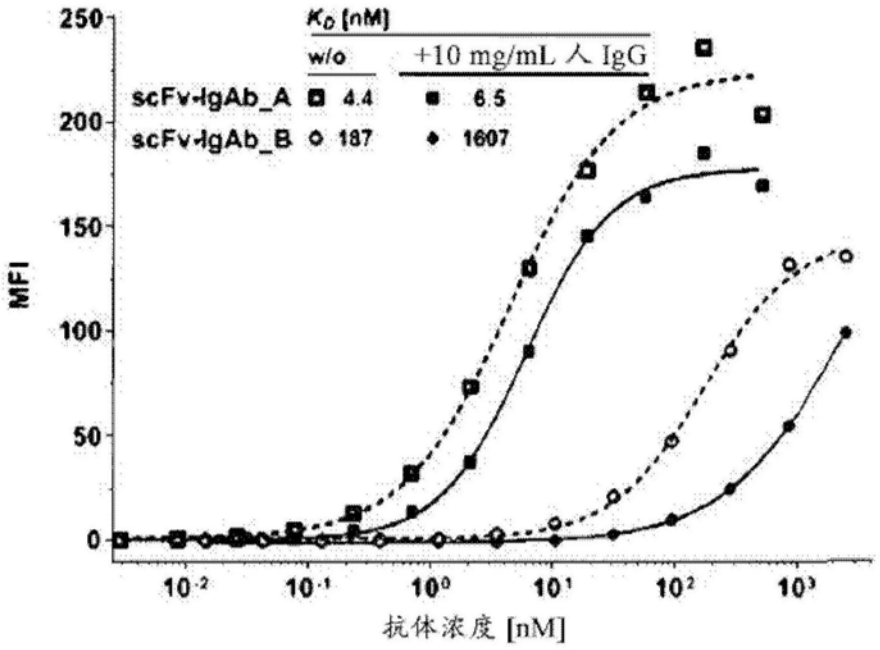

K_D [nM]
w/o
+10 mg/mL 人 IgG
scFv-IgAb_A 4.4 6.5
scFv-IgAb_B 187 1607
MFI
250
200
150
100
50
0
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
10^{3}
抗体浓度 [nM]

图27C

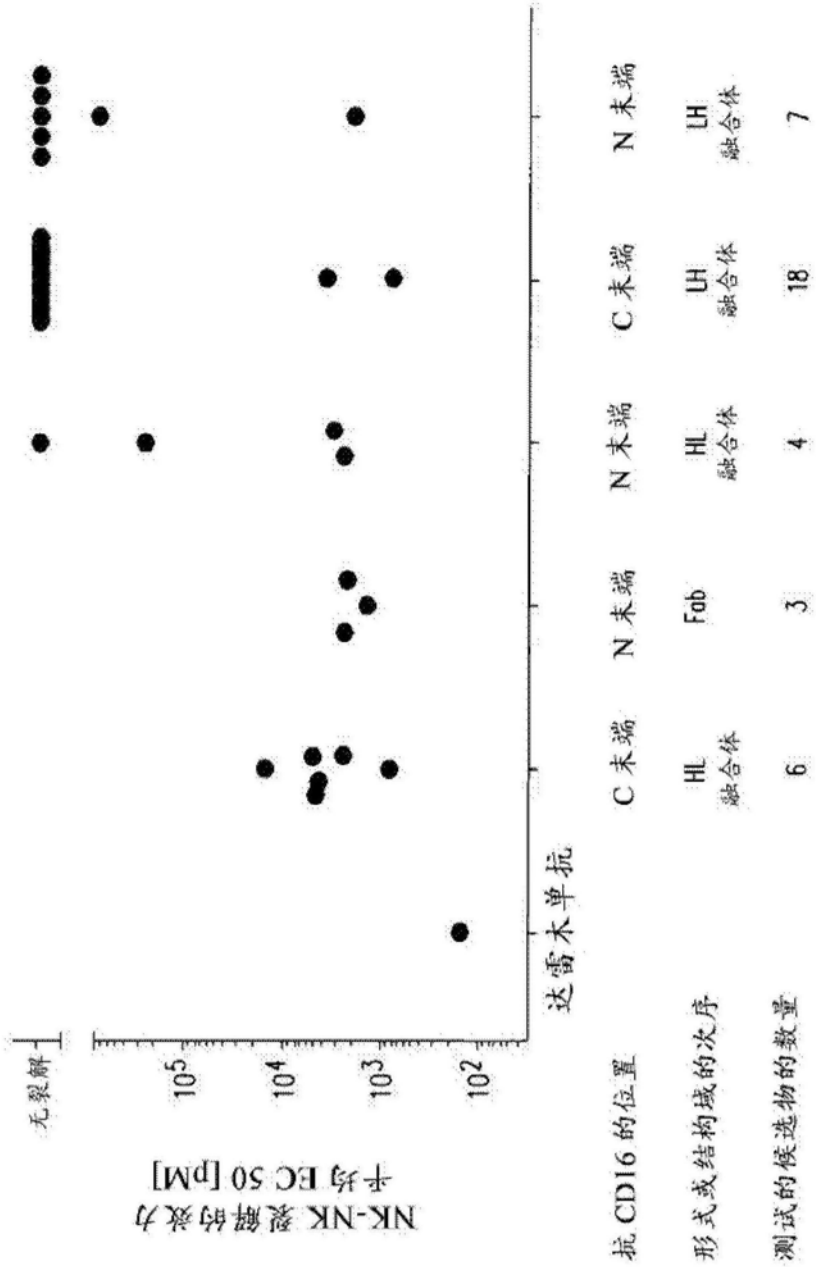

NK-NK 介导裂解的效力
中位 EC 50 [pM]
无裂解
10^5
10^4
10^3
10^2
达雷木单抗
抗 CD16 的位置
C 末端
N 末端
Fab
N 末端
C 末端
N 末端
形式或结构域的次序
HL
融合体
HL
融合体
LH
融合体
LH
融合体
测试的候选物的数量
6
3
4
18
7

图28

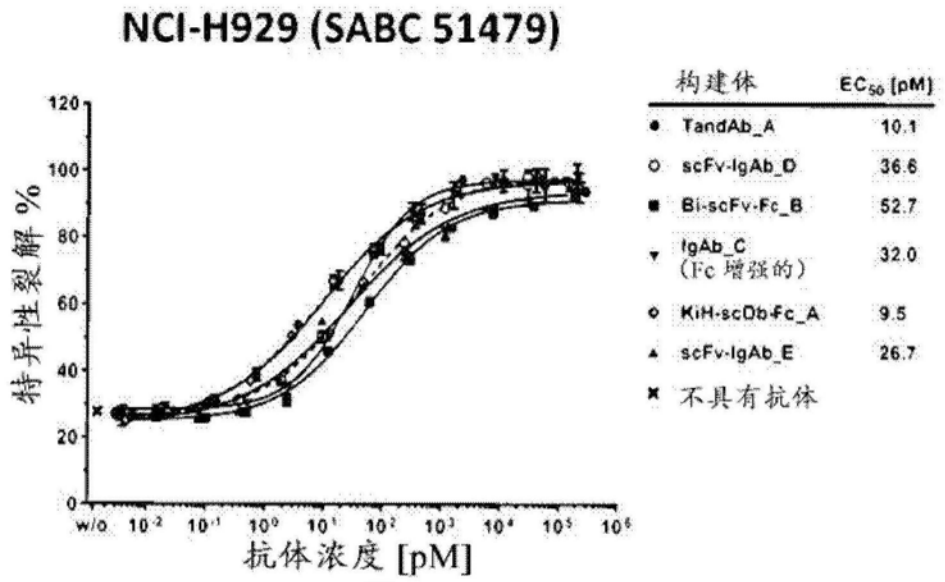

NCI-H929 (SABC 51479)
特异性裂解 %
抗体浓度 [pM]
w/o
构建体
EC50 [pM]
TandAb_A 10.1
scFv-IgAb_D 36.6
Bi-scFv-Fc_B 52.7
IgAb_C (Fc 增强的) 32.0
KiH-scDb-Fc_A 9.5
scFv-IgAb_E 26.7
不具有抗体

图29A

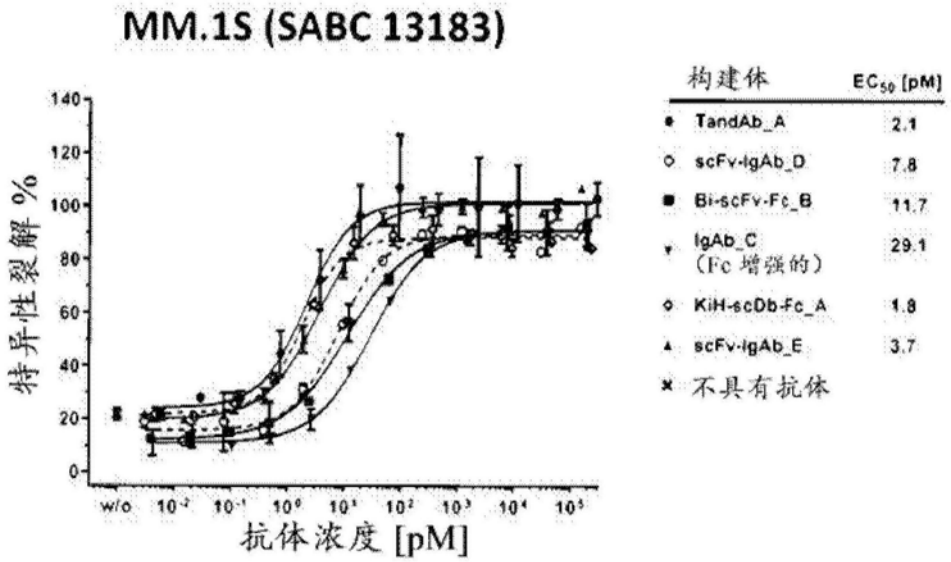

MM.1S (SABC 13183)
特异性裂解 %
抗体浓度 [pM]
w/o
构建体
EC50 [pM]
TandAb_A 2.1
scFv-IgAb_D 7.8
Bi-scFv-Fc_B 11.7
IgAb_C (Fc 增强的) 29.1
KiH-scDb-Fc_A 1.8
scFv-IgAb_E 3.7
不具有抗体

图29B

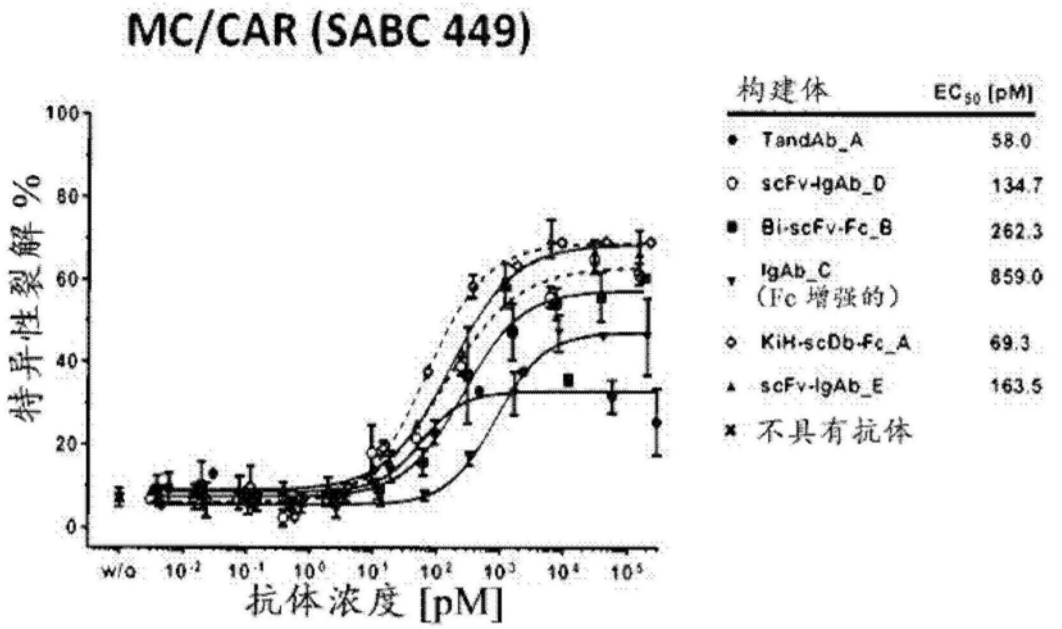

MC/CAR (SABC 449)
特异性裂解 %
抗体浓度 [pM]
w/o
构建体
EC50 [pM]
TandAb_A 58.0
scFv-IgAb_D 134.7
Bi-scFv-Fc_B 262.3
IgAb_C (Fc 增强的) 859.0
KiH-scDb-Fc_A 69.3
scFv-IgAb_E 163.5
不具有抗体

图29C

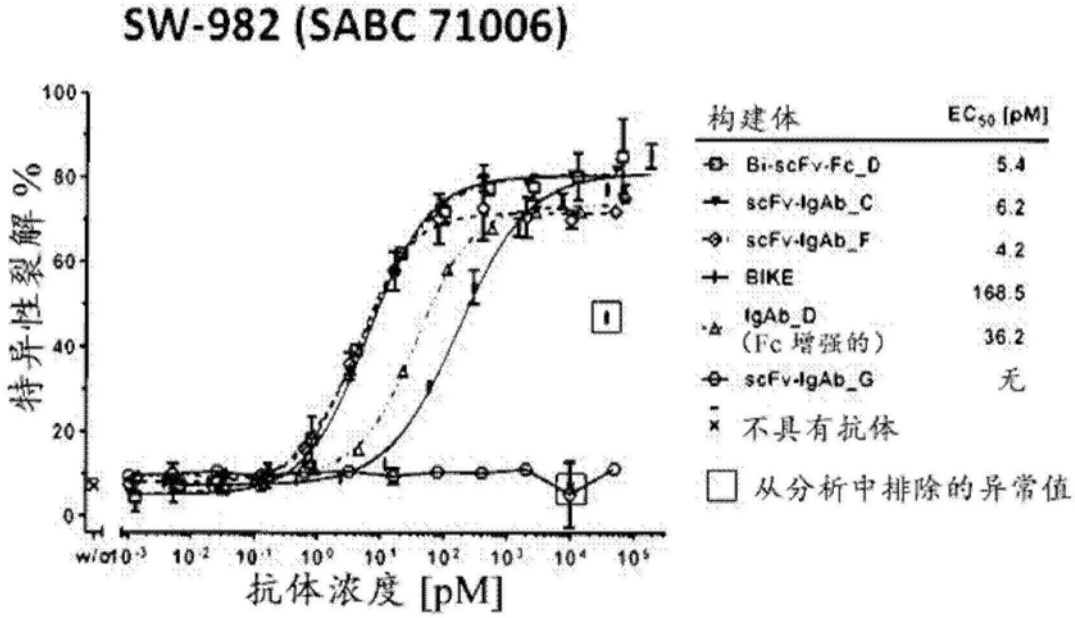

SW-982 (SABC 71006)
特异性裂解 %
抗体浓度 [pM]
w/o
构建体
EC50 [pM]
Bi-scFv-Fc_D 5.4
scFv-IgAb_C 6.2
scFv-IgAb_F 4.2
BIKE 168.5
IgAb_D (Fc 增强的) 36.2
scFv-IgAb_G 无
不具有抗体
从分析中排除的异常值

图29D

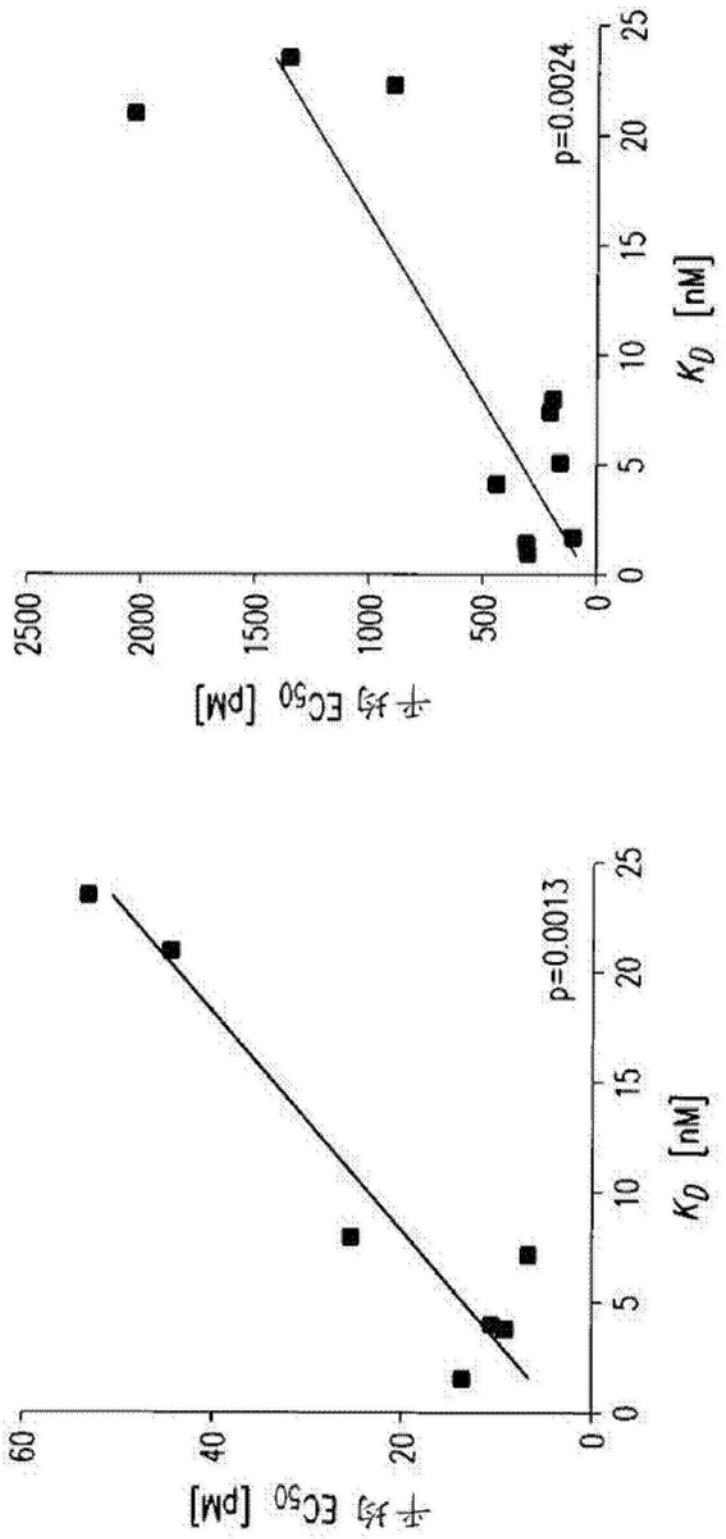

半抗 EC50 [pM]
2500
2000
1500
1000
500
0
p=0.0024
0
5
10
15
20
25
KD [nM]
半抗 EC50 [pM]
60
40
20
0
p=0.0013
0
5
10
15
20
25
KD [nM]

图29E

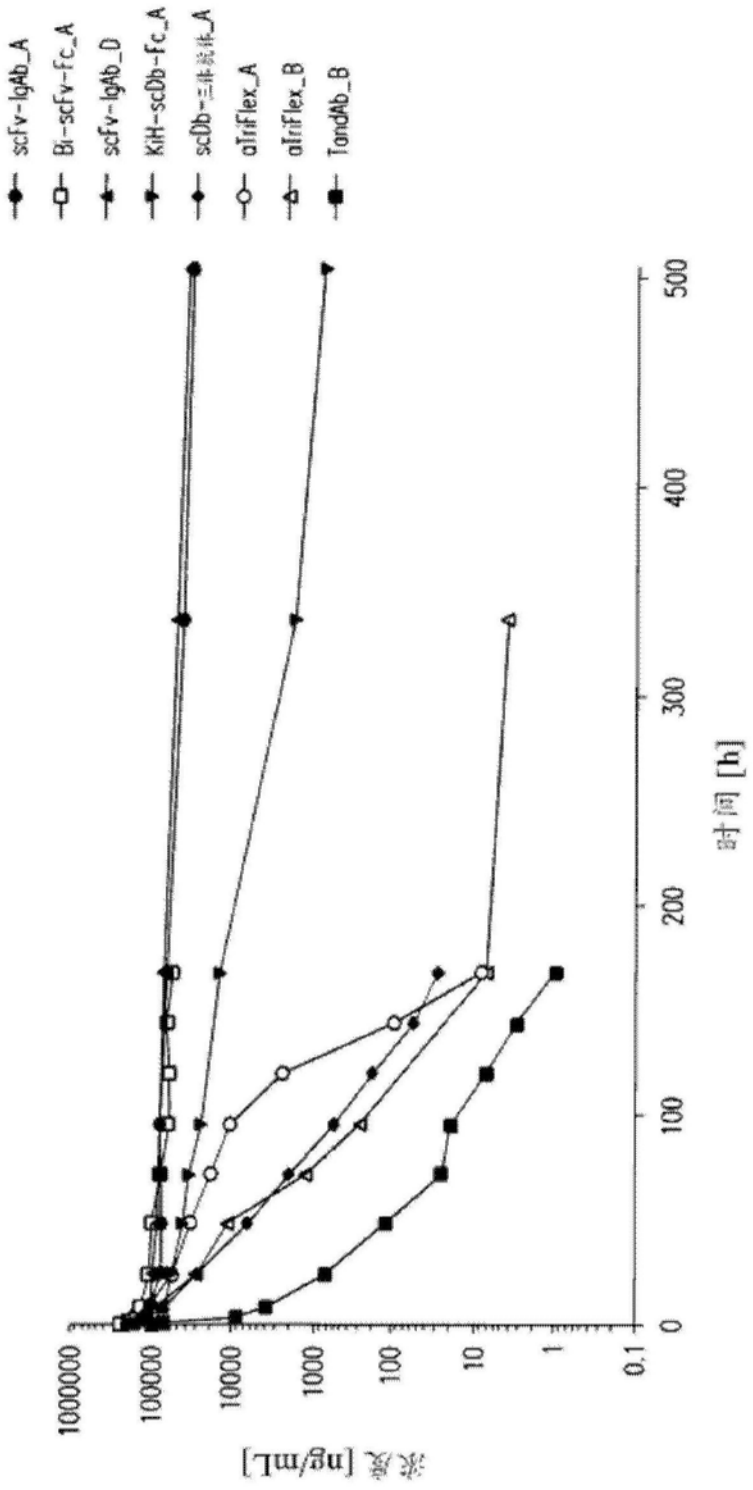

scFv-IgAb_A
Bi-scFv-fc_A
scFv-IgAb_D
KiH-scDb-fc_A
scDb-三抗_A
aTriFlex_A
aTriFlex_B
TandAb_B
浓度 [ng/mL]
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0.1
0
100
200
300
400
500
时间 [h]

图30

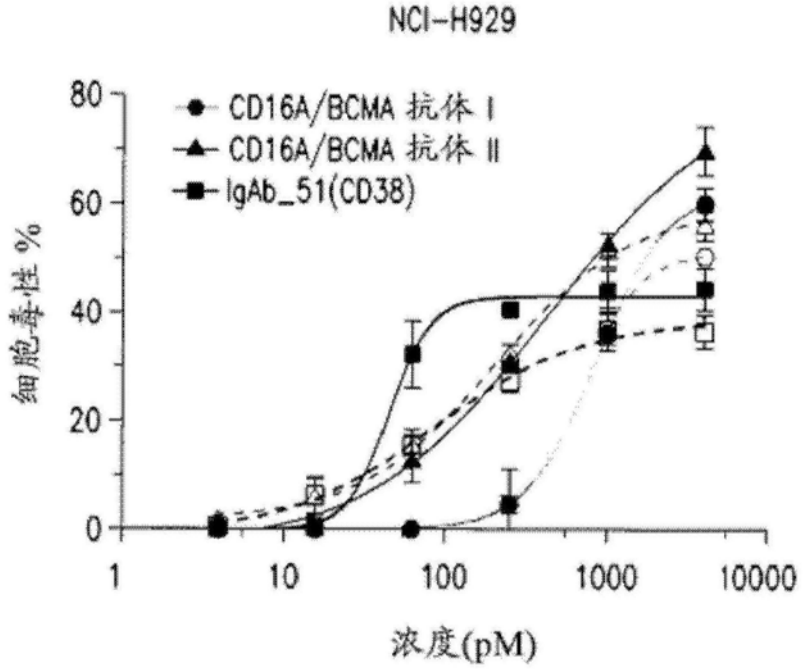

NCI-H929
CD16A/BCMA 抗体 I
CD16A/BCMA 抗体 II
IgAb_51(CD38)
细胞毒性 %
浓度(pM)
0
20
40
60
80
1
10
100
1000
10000

图31A

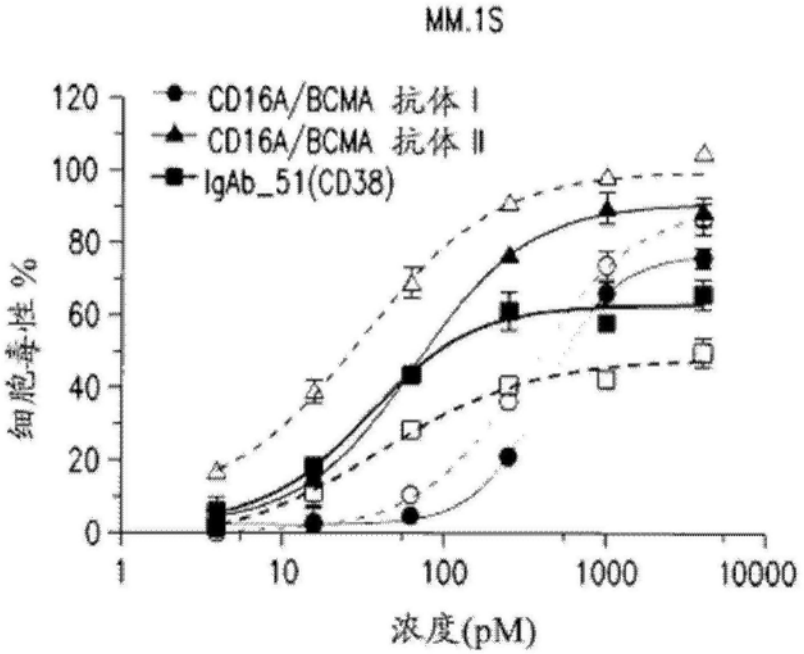

MM.1S
CD16A/BCMA 抗体 I
CD16A/BCMA 抗体 II
IgAb_51(CD38)
细胞毒性 %
浓度(pM)
0
20
40
60
80
100
120
1
10
100
1000
10000

图31B

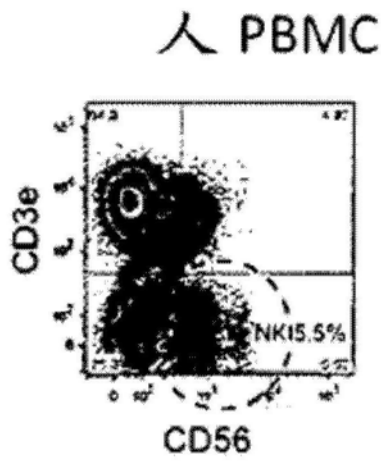

人 PBMC
CD3e
NK15.5%
CD56

图32A

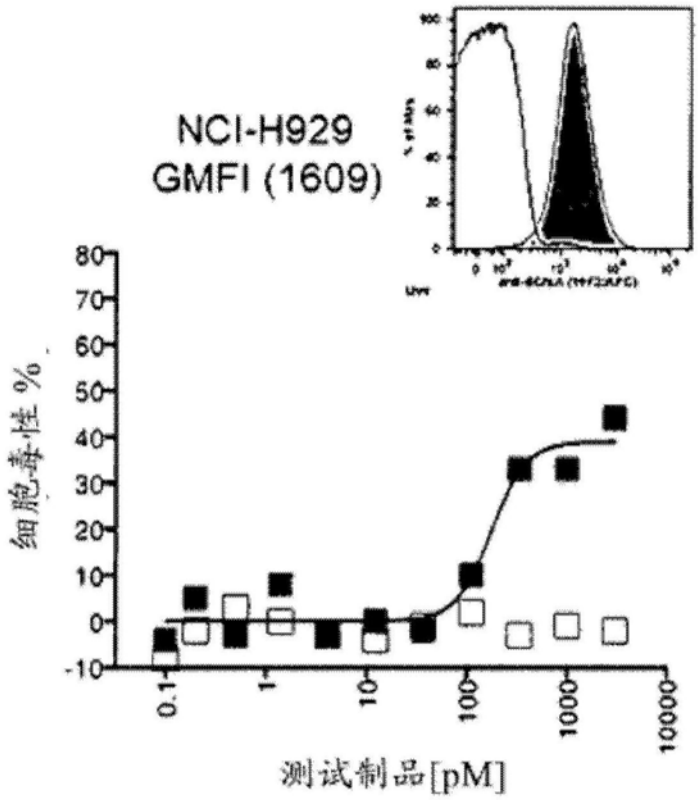

NCI-H929
GMFI (1609)
细胞毒性 %
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
0.1
1
10
100
1000
10000
测试制品[pM]

图32B

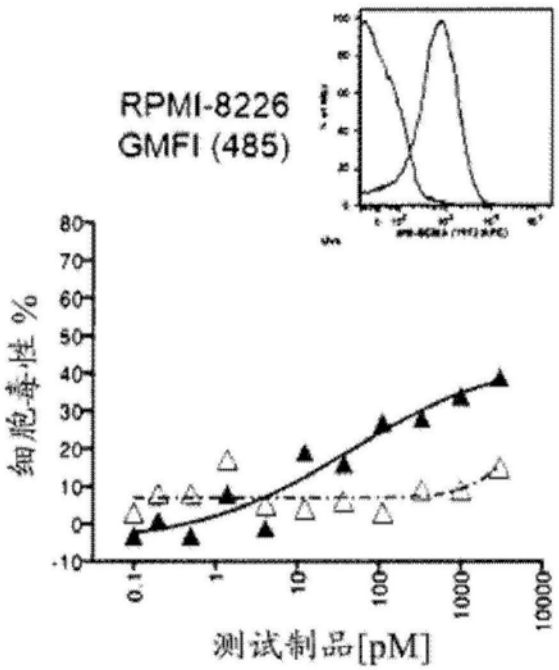


图32C

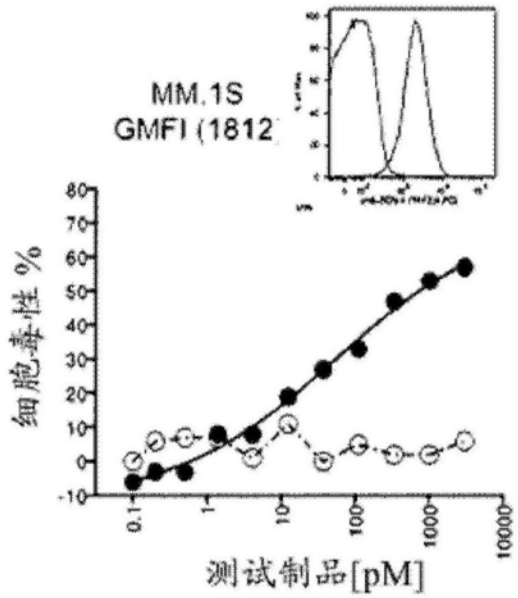


图32D

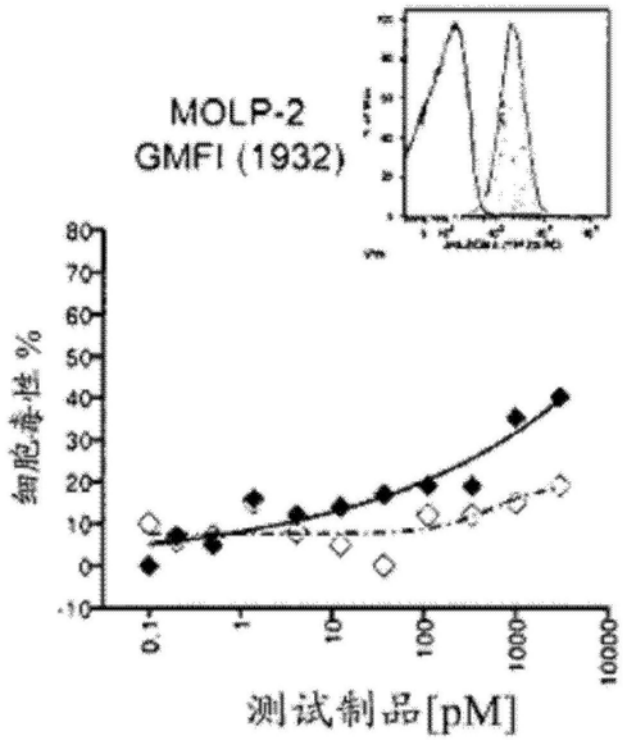

MOLP-2
GMFI (1932)
细胞毒性 %
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
0.1
1
10
100
1000
10000
测试制品[pM]

图32E

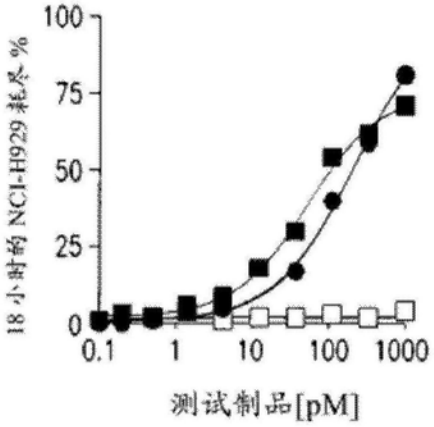


图 33A

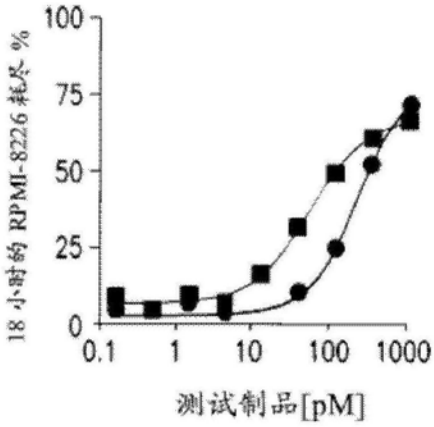


图 33B

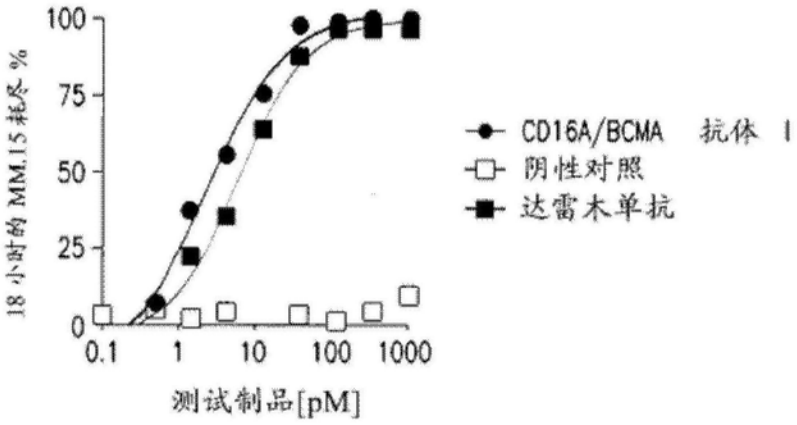


图 33C

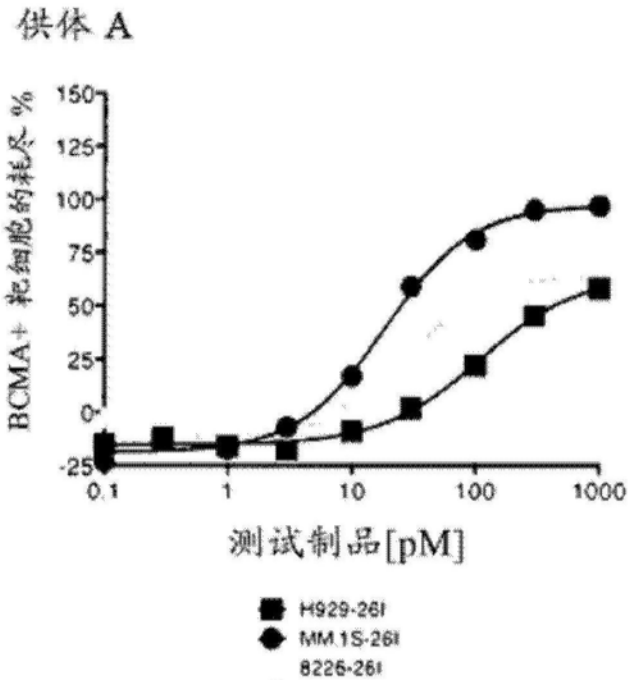

供体 A
BCMA+ 靶细胞的耗尽 %
150
125
100
75
50
25
0
-25
0.1
1
10
100
1000
测试制品[pM]
H929-26I
MM.1S-26I
8226-26I

图34A

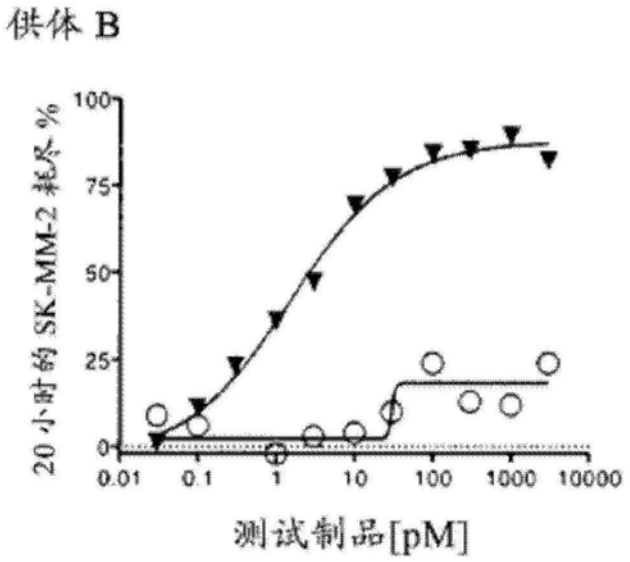

供体 B
20 小时的 SK-MM-2 耗尽 %
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
测试制品[pM]

图34B

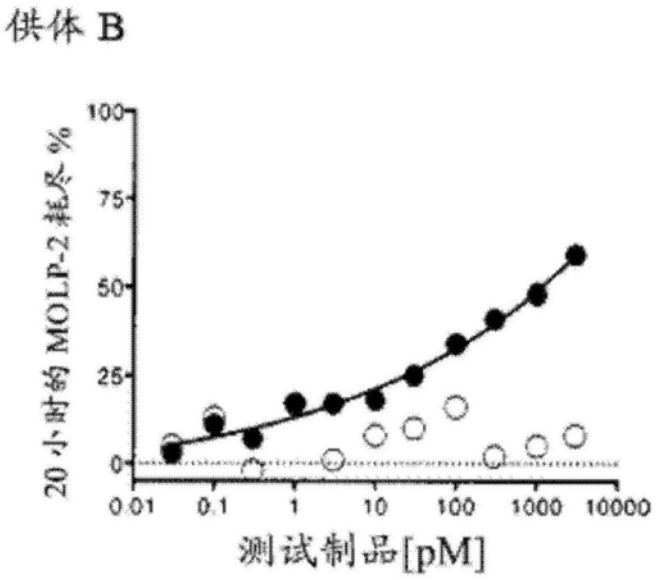

供体 B
20 小时的 MOLP-2 耗尽 %
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
测试制品[pM]

图34C

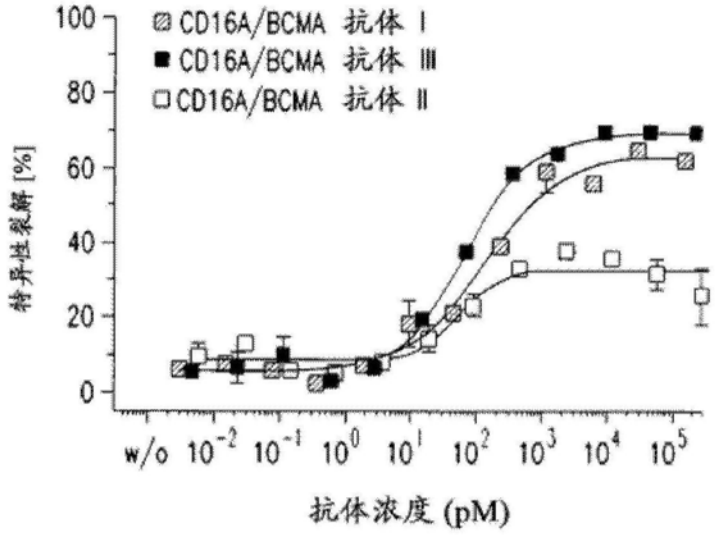

CD16A/BCMA 抗体 I
CD16A/BCMA 抗体 III
CD16A/BCMA 抗体 II
特异性裂解 [%]
100
80
60
40
20
0
w/o 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3} 10^{4} 10^{5}
抗体浓度 (pM)

图 35A

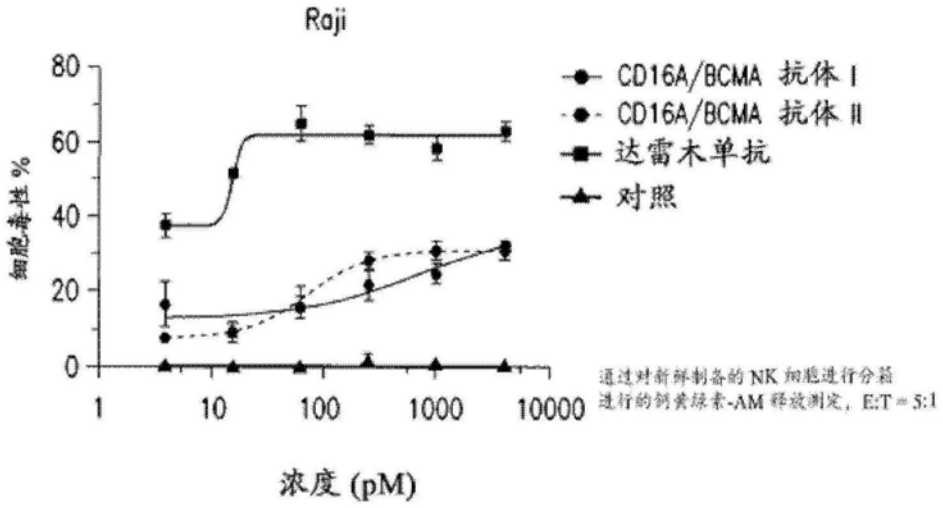

Raji
细胞毒性 %
80
60
40
20
0
1
10
100
1000
10000
浓度 (pM)
CD16A/BCMA 抗体 I
CD16A/BCMA 抗体 II
达雷木单抗
对照
通过对新鲜制备的 NK 细胞进行分离
进行的钙黄绿素-AM 释放测定，E:T = 5:1

图 35B

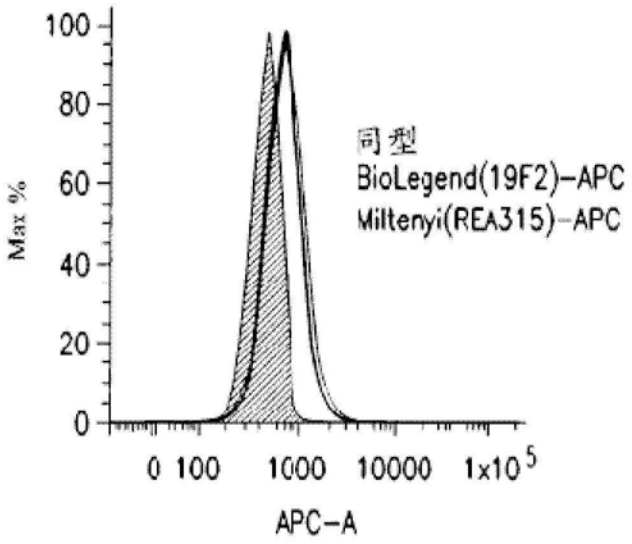

100
80
60
40
20
0
Max %
同型
BioLegend(19F2)-APC
Miltenyi(REA315)-APC
0 100 1000 10000 1x10^5
APC-A

图35C

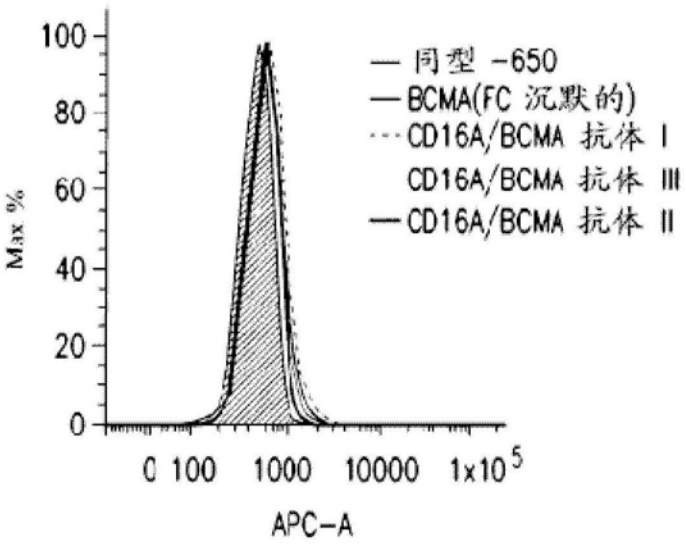

100
80
60
40
20
0
Max %
— 同型 -650
— BCMA(FC 沉默的)
··· CD16A/BCMA 抗体 I
CD16A/BCMA 抗体 III
— CD16A/BCMA 抗体 II
0 100 1000 10000 1x10^5
APC-A

图35D

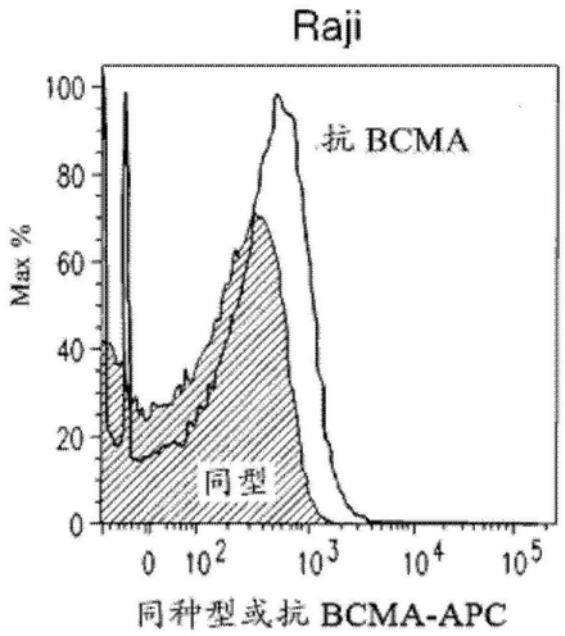

Raji
100
80
60
40
20
0
Max %
抗 BCMA
同型
0 10^2 10^3 10^4 10^5
同种型或抗 BCMA-APC

图36A

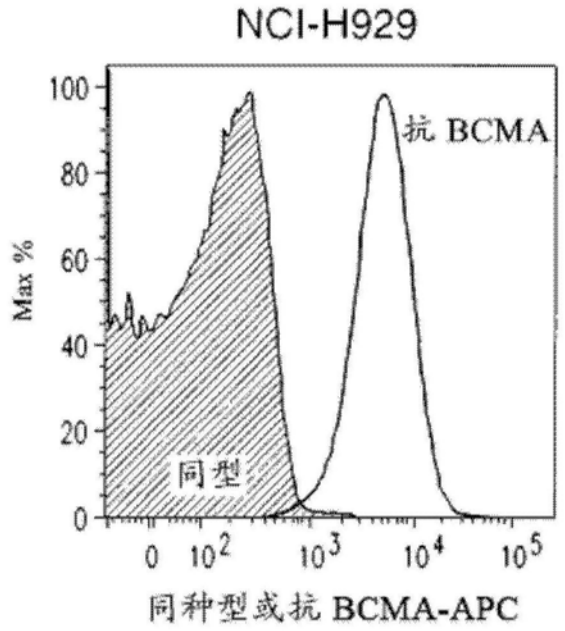

NCI-H929
100
80
60
40
20
0
Max %
抗 BCMA
同型
0 10^2 10^3 10^4 10^5
同种型或抗 BCMA-APC

图36B

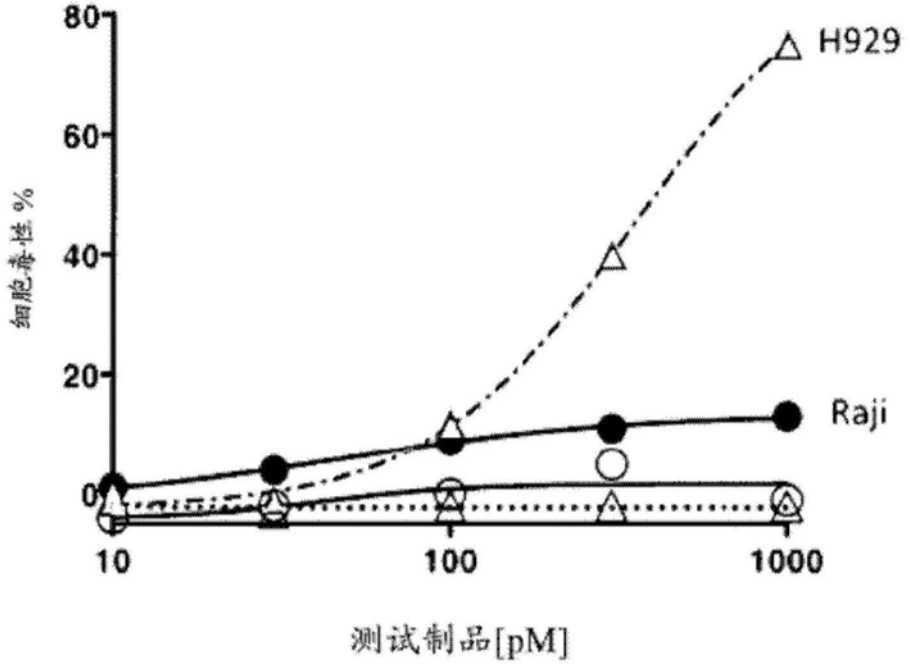

80
60
40
20
0
细胞毒性 %
H929
Raji
10
100
1000
测试制品[pM]

图36C

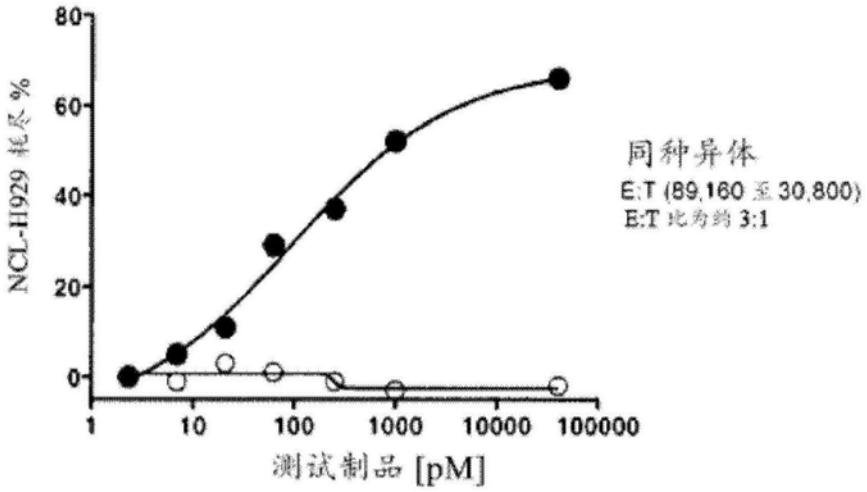

80
60
40
20
0
NCL-H929 耗尽 %
同种异体
E:T (89,160 至 30,800)
E:T 比为约 3:1
1
10
100
1000
10000
100000
测试制品 [pM]

图37A

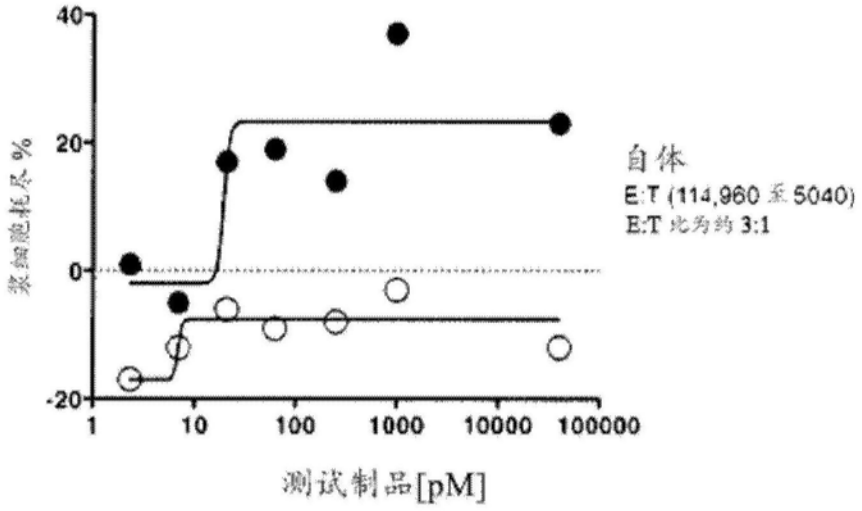

40
20
0
-20
1
10
100
1000
10000
100000
靶细胞耗尽 %
测试制品[pM]
自体
E:T (114,960 至 5040)
E:T 比为约 3:1

图37B

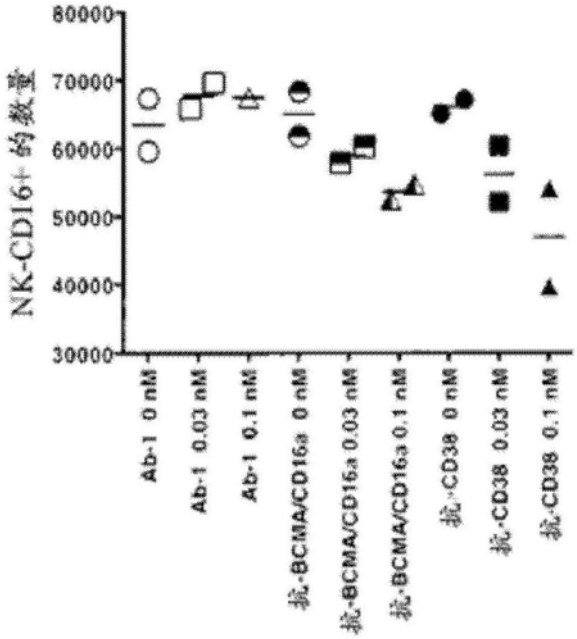

80000
70000
60000
50000
40000
30000
NK-CD16+ 的数量
Ab-1 0 nM
Ab-1 0.03 nM
Ab-1 0.1 nM
抗-BCMA/CD16a 0 nM
抗-BCMA/CD16a 0.03 nM
抗-BCMA/CD16a 0.1 nM
抗-CD38 0 nM
抗-CD38 0.03 nM
抗-CD38 0.1 nM

图38A

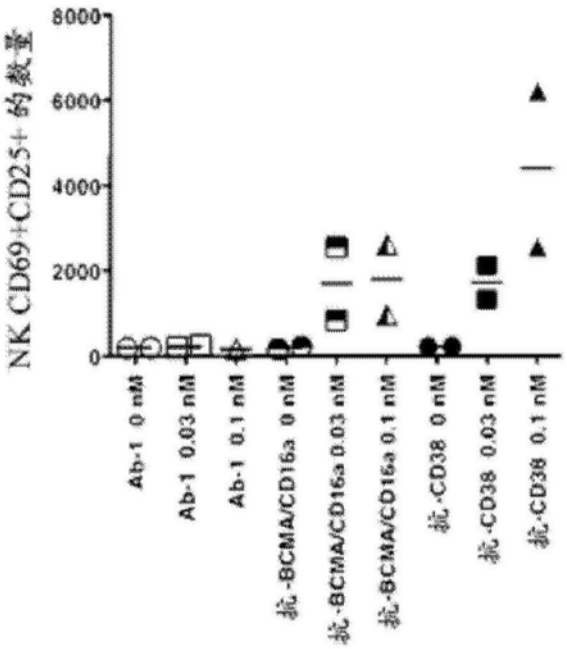

NK CD69+CD25+ 的数量
8000
6000
4000
2000
0
Ab-1 0 nM
Ab-1 0.03 nM
Ab-1 0.1 nM
抗-BCMA/CD16a 0 nM
抗-BCMA/CD16a 0.03 nM
抗-BCMA/CD16a 0.1 nM
抗-CD38 0 nM
抗-CD38 0.03 nM
抗-CD38 0.1 nM

图38B

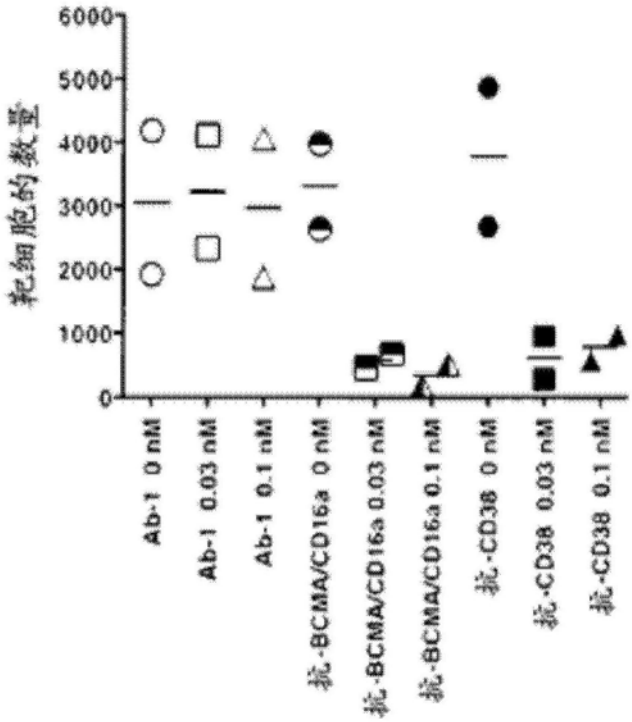

靶细胞的数量
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Ab-1 0 nM
Ab-1 0.03 nM
Ab-1 0.1 nM
抗-BCMA/CD16a 0 nM
抗-BCMA/CD16a 0.03 nM
抗-BCMA/CD16a 0.1 nM
抗-CD38 0 nM
抗-CD38 0.03 nM
抗-CD38 0.1 nM

图38C

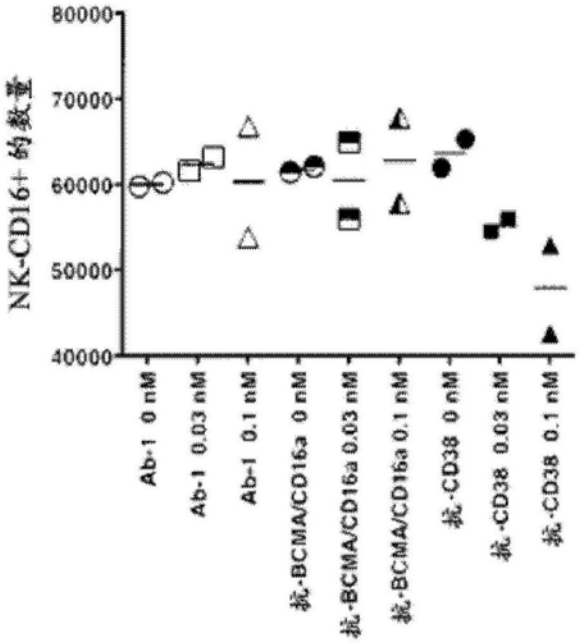

NK-CD16+ 的数量
80000
70000
60000
50000
40000
Ab-1 0 nM
Ab-1 0.03 nM
Ab-1 0.1 nM
抗-BCMA/CD16a 0 nM
抗-BCMA/CD16a 0.03 nM
抗-BCMA/CD16a 0.1 nM
抗-CD38 0 nM
抗-CD38 0.03 nM
抗-CD38 0.1 nM

图39A

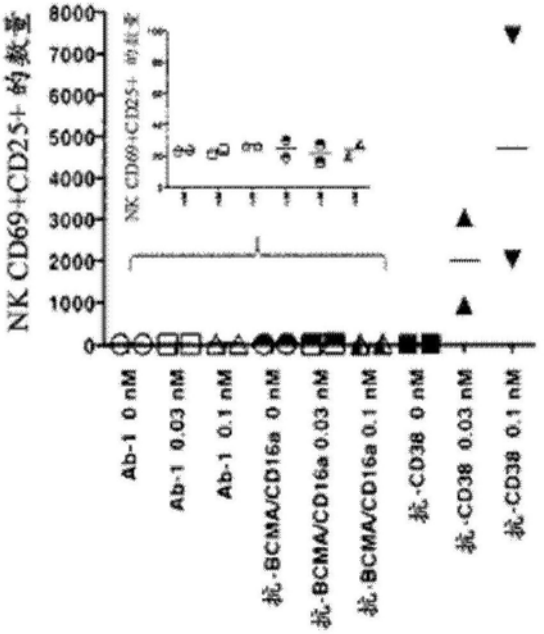

NK CD69+CD25+ 的数量
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Ab-1 0 nM
Ab-1 0.03 nM
Ab-1 0.1 nM
抗-BCMA/CD16a 0 nM
抗-BCMA/CD16a 0.03 nM
抗-BCMA/CD16a 0.1 nM
抗-CD38 0 nM
抗-CD38 0.03 nM
抗-CD38 0.1 nM

图39B

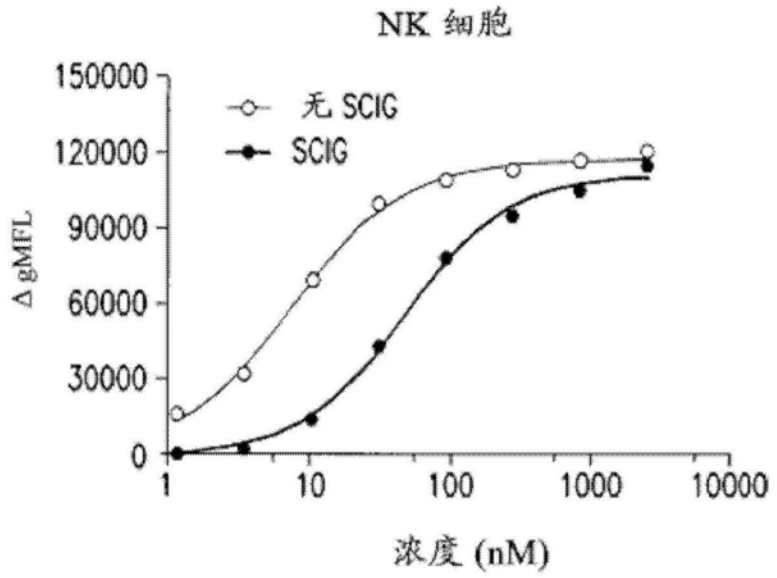

NK 细胞
150000
120000
90000
60000
30000
0
ΔgMFL
无 SCIG
SCIG
1
10
100
1000
10000
浓度 (nM)

图40A

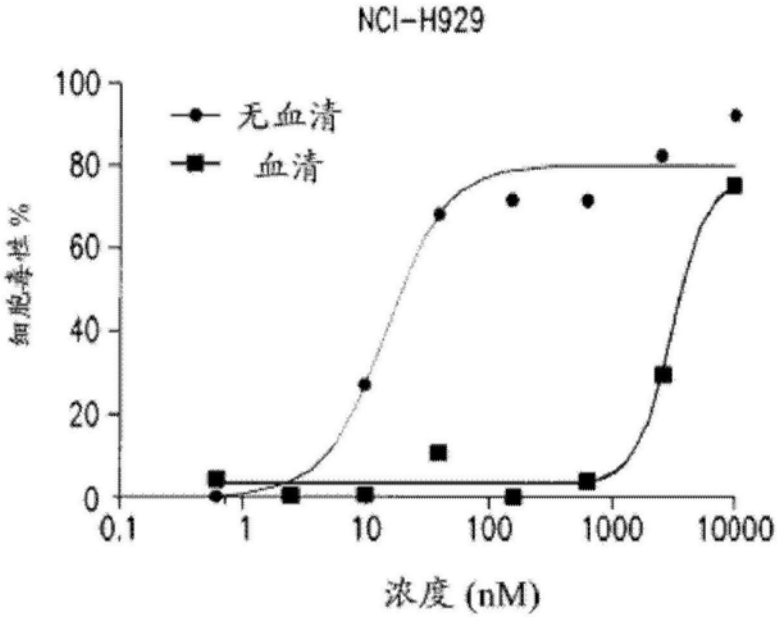

NCI-H929
100
80
60
40
20
0
细胞毒性 %
无血清
血清
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度 (nM)

图40B

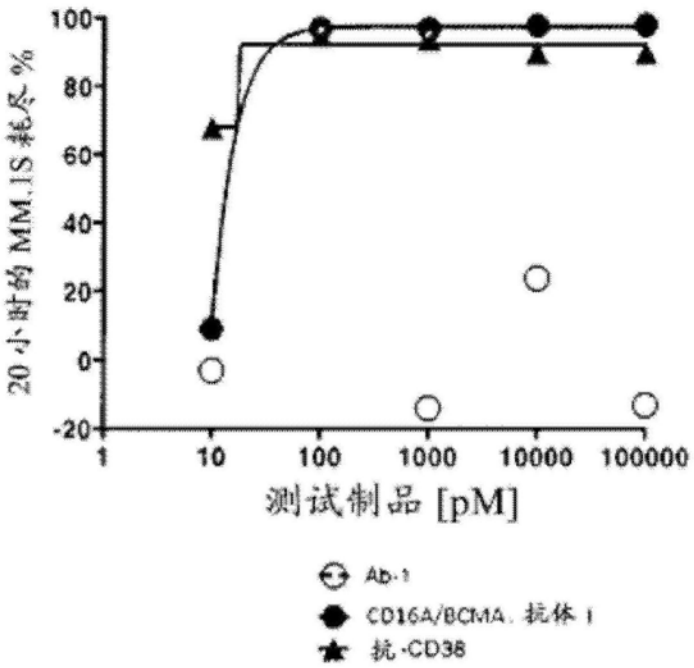

20小时的MM.1S耗尽%
100
80
60
40
20
0
-20
1
10
100
1000
10000
100000
测试制品 [pM]
Ab-1
CD16A/BCMA. 抗体 1
抗-CD38

图40C

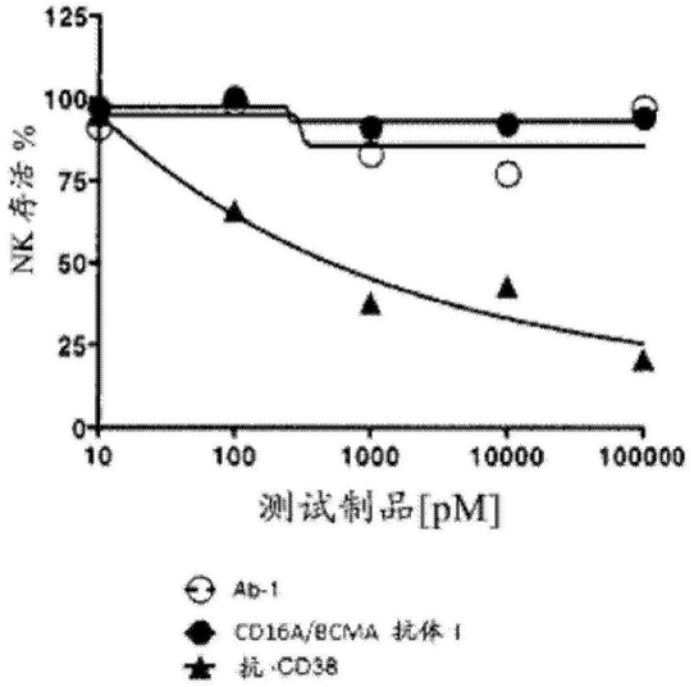

NK存活%
125
100
75
50
25
0
10
100
1000
10000
100000
测试制品[pM]
Ab-1
CD16A/BCMA 抗体 1
抗-CD38

图40D

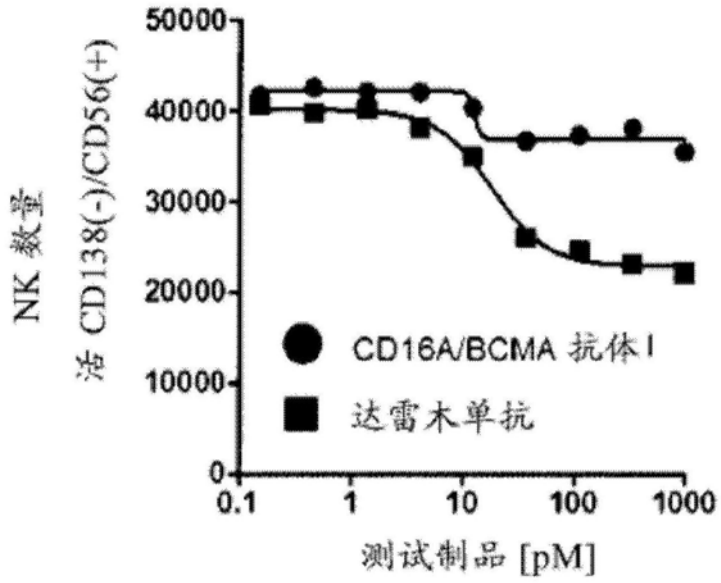

NK 数量
活 CD138(-)/CD56(+)
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.1
1
10
100
1000
测试制品 [pM]
CD16A/BCMA 抗体1
达雷木单抗

图40E

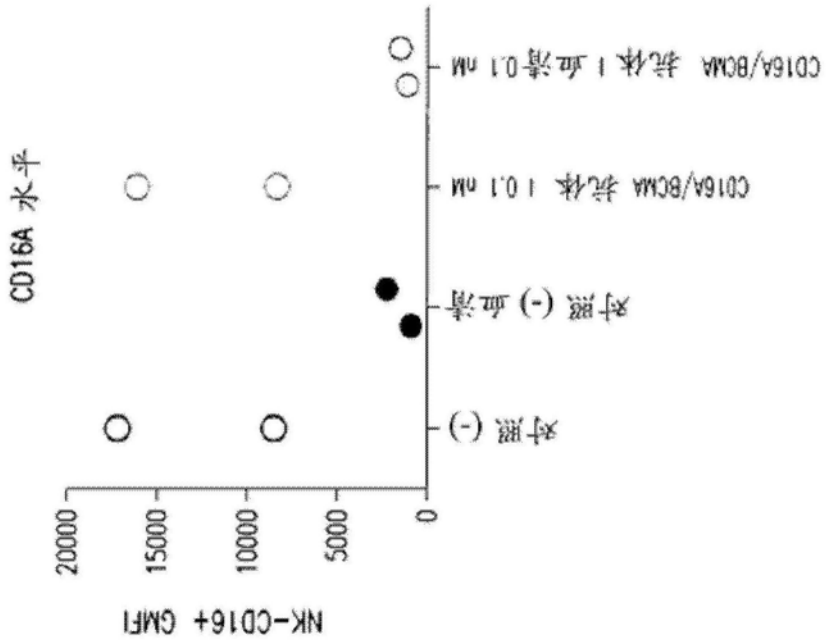

CD16A 水平
NK-CD16+ GMFI
20000
15000
10000
5000
0
对照 (-)
对照 (-) 血清
CD16A/BCMA 抗体 1 0.1 nM
CD16A/BCMA 抗体 1 血清0.1 nM

图41A

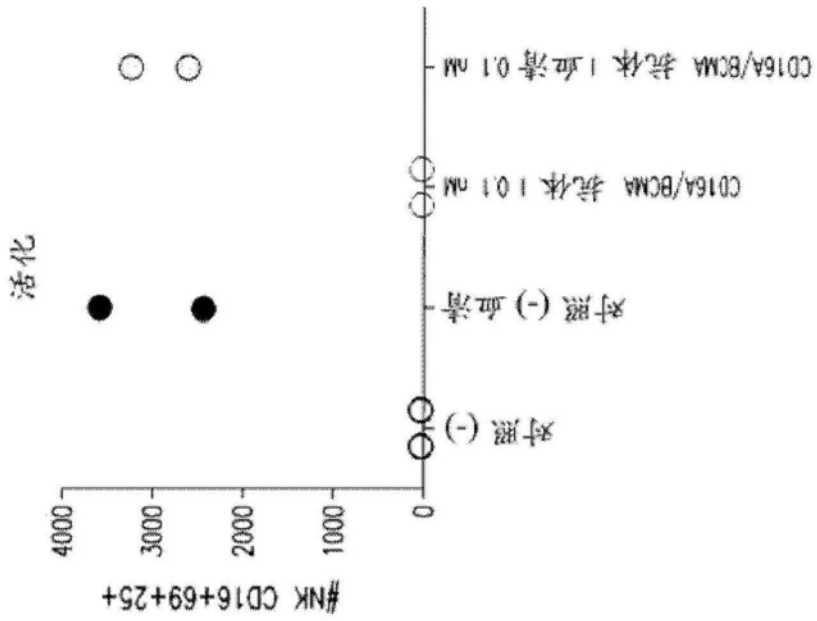

#NK CD16+69+25+
4000
3000
2000
1000
0
对照 (-)
对照 (-) 血清
CD16A/BCMA 抗体 1 0.1 nM
CD16A/BCMA 抗体 1 血清 0.1 nM
活化

图41B

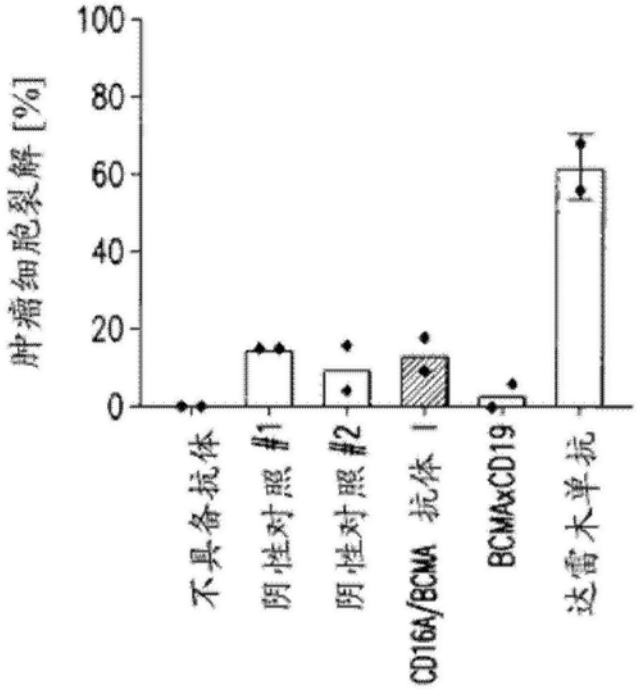

肿瘤细胞裂解 [%]
100
80
60
40
20
0
不具备抗体
阴性对照 #1
阴性对照 #2
CD16A/BCMA 抗体 1
BCMAxCD19
达雷木单抗

图42A

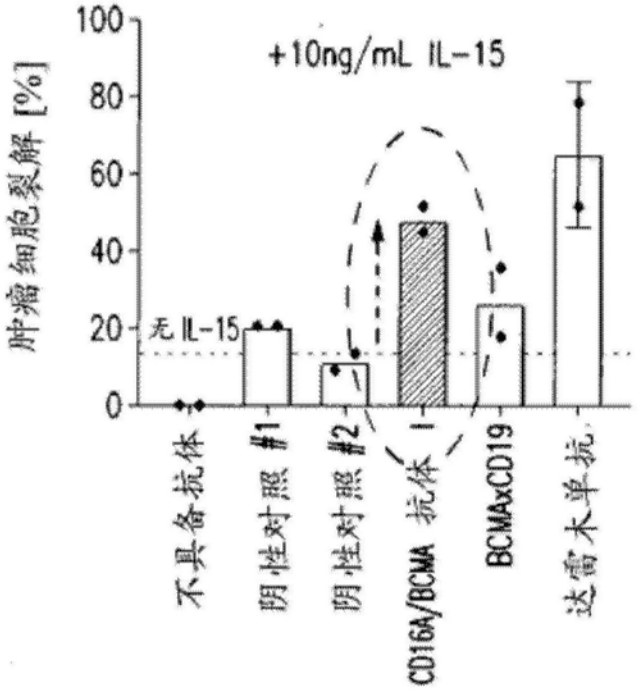

肿瘤细胞裂解 [%]
100
80
60
40
20
0
+10ng/mL IL-15
无 IL-15
不具备抗体
阴性对照 #1
阴性对照 #2
CD16A/BCMA 抗体 1
BCMAxCD19
达雷木单抗

图42B

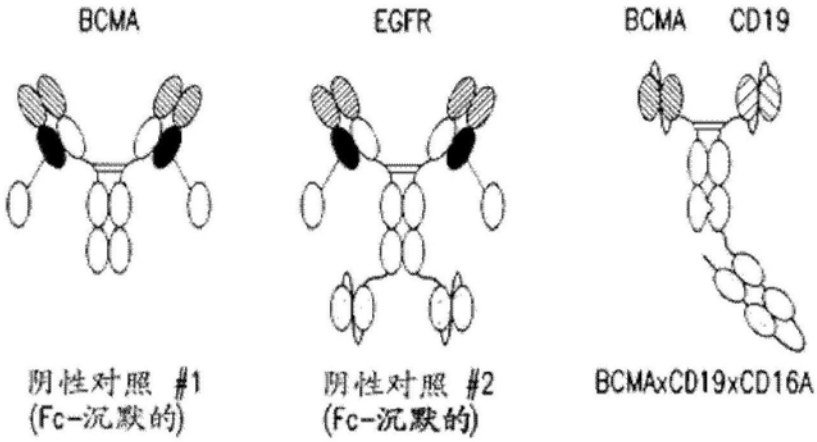

BCMA
EGFR
BCMA CD19
阴性对照 #1
(Fc-沉默的)
阴性对照 #2
(Fc-沉默的)
BCMAxCD19xCD16A

图42C

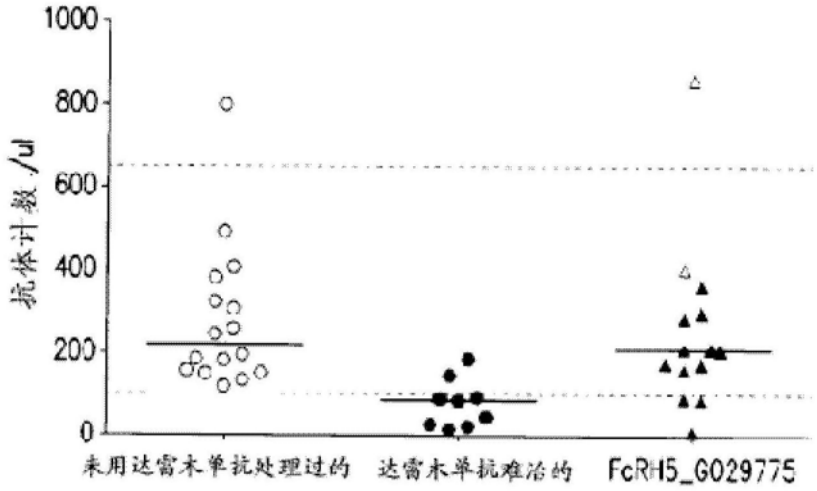

1000
800
600
400
200
0
抗体计数 /ul
未用达雷木单抗处理过的
达雷木单抗难治的
FcRH5_G029775

图43

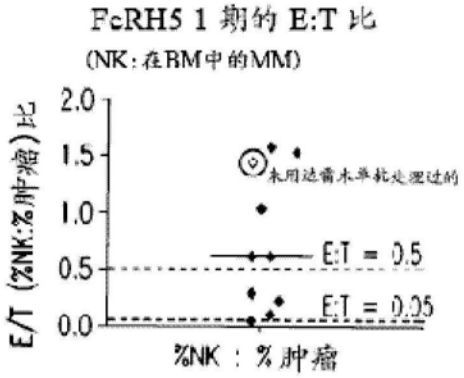

FcRH5 1 期的 E:T 比
(NK:在BM中的MM)
E/T (%NK:%肿瘤)比
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
未用达雷木单抗处理过的
E:T = 0.5
E:T = 0.05
%NK : %肿瘤

图44

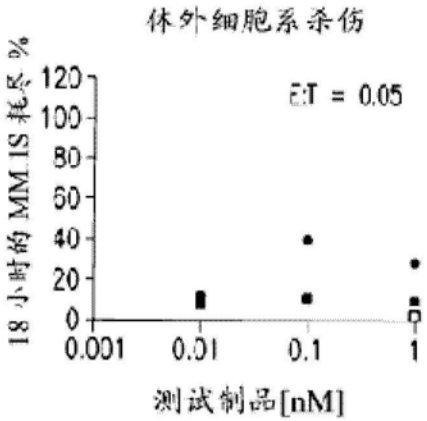

体外细胞系杀伤
18 小时的 MM.1S 耗尽 %
120
100
80
60
40
20
0
E:T = 0.05
0.001
0.01
0.1
1
测试制品[nM]

图45A

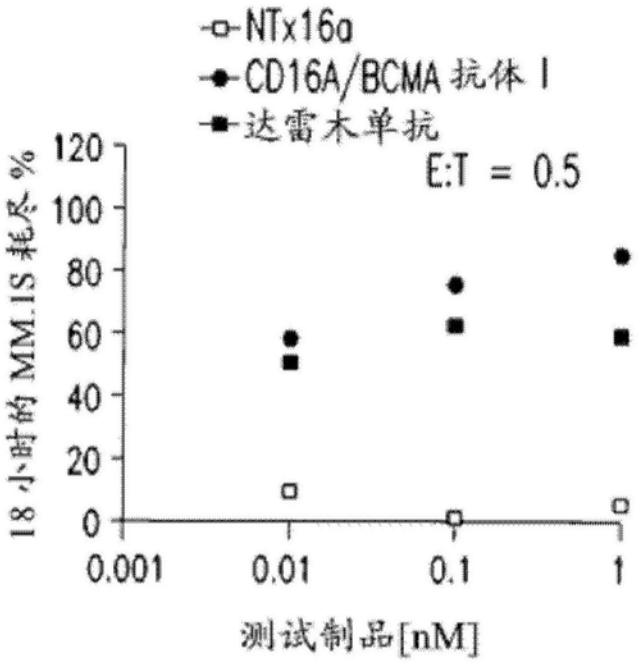

NTx16a
CD16A/BCMA 抗体 I
达雷木单抗
E:T = 0.5
18 小时的 MM.1S 耗尽 %
120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
测试制品[nM]

图45B

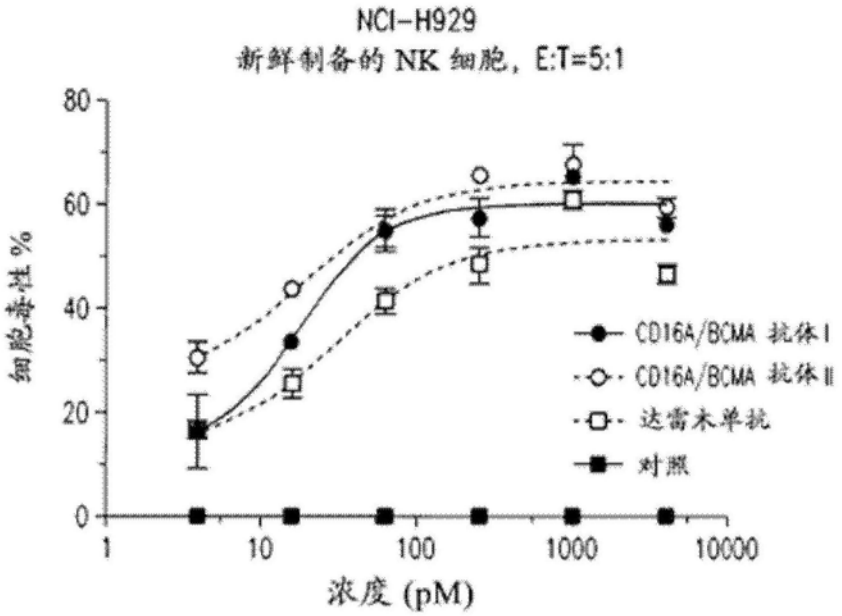

NCI-H929
新鲜制备的 NK 细胞，E:T=5:1
细胞毒性 %
80
60
40
20
0
1
10
100
1000
10000
浓度 (pM)
CD16A/BCMA 抗体 I
CD16A/BCMA 抗体 II
达雷木单抗
对照

图46A

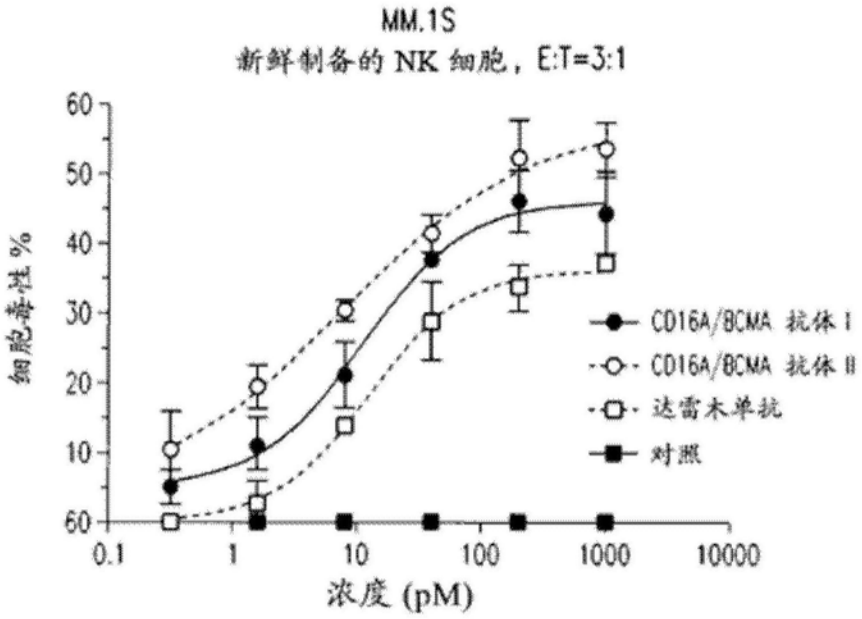

MM.1S
新鲜制备的 NK 细胞，E:T=3:1
细胞毒性 %
60
50
40
30
20
10
60
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度 (pM)
CD16A/BCMA 抗体 I
CD16A/BCMA 抗体 II
达雷木单抗
对照

图46B

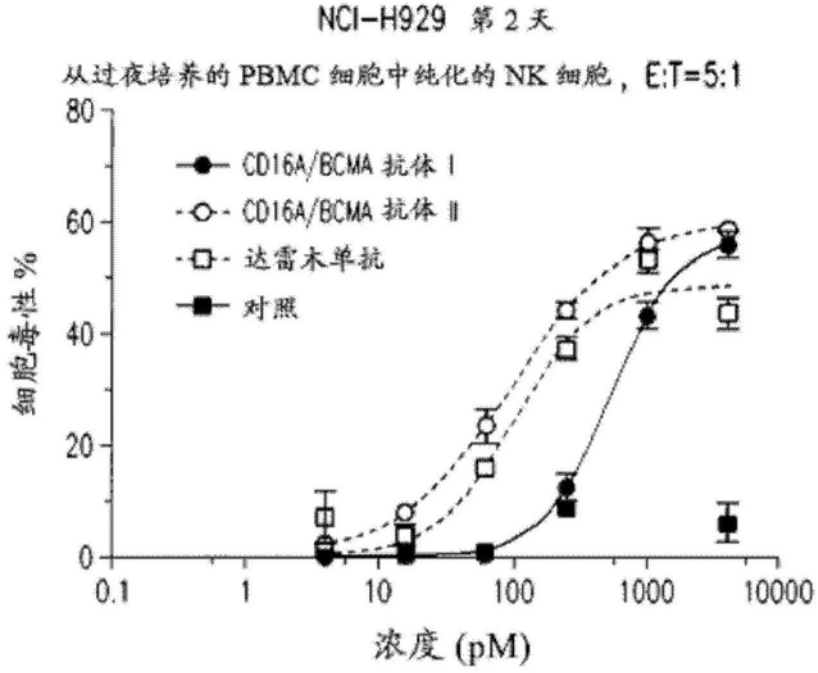

NCI-H929 第 2 天
从过夜培养的 PBMC 细胞中纯化的 NK 细胞，E:T=5:1
细胞毒性 %
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度 (pM)
CD16A/BCMA 抗体 I
CD16A/BCMA 抗体 II
达雷木单抗
对照

图46C

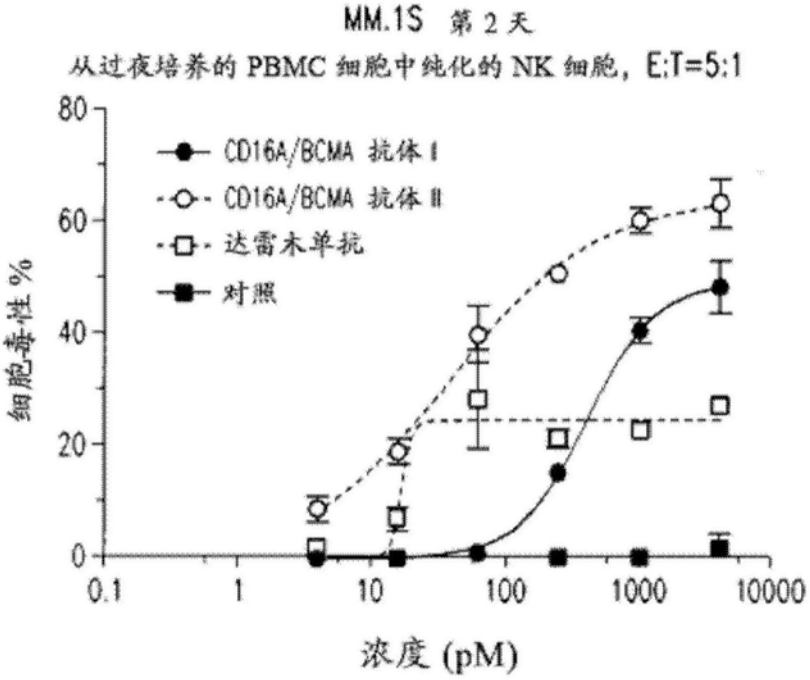

MM.1S 第 2 天
从过夜培养的 PBMC 细胞中纯化的 NK 细胞，E:T=5:1
CD16A/BCMA 抗体 I
CD16A/BCMA 抗体 II
达雷木单抗
对照
细胞毒性 %
浓度 (pM)

图46D

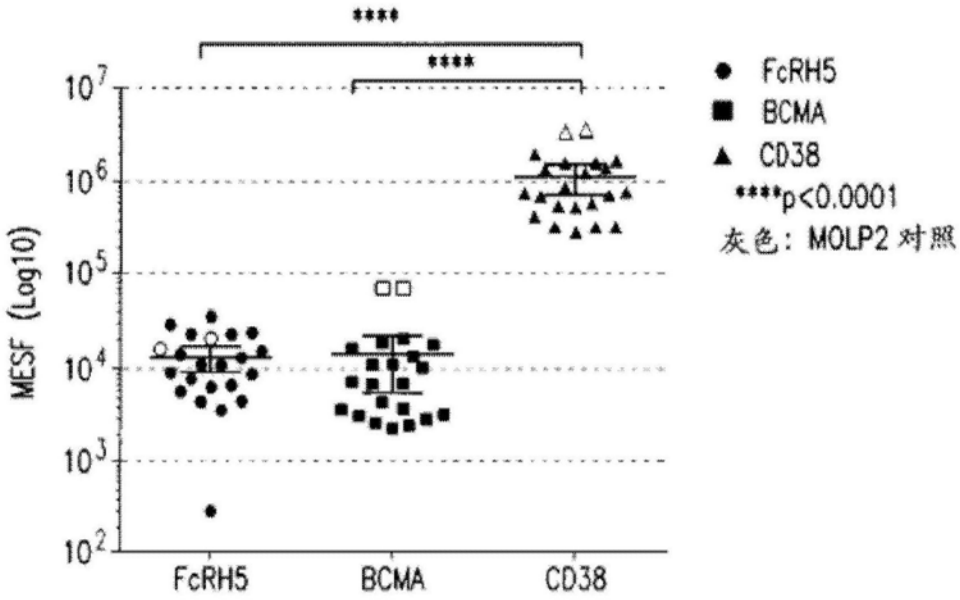

****
****
FcRH5
BCMA
CD38
****p<0.0001
灰色：MOLP2 对照
MESF (Log10)
FcRH5
BCMA
CD38

图47

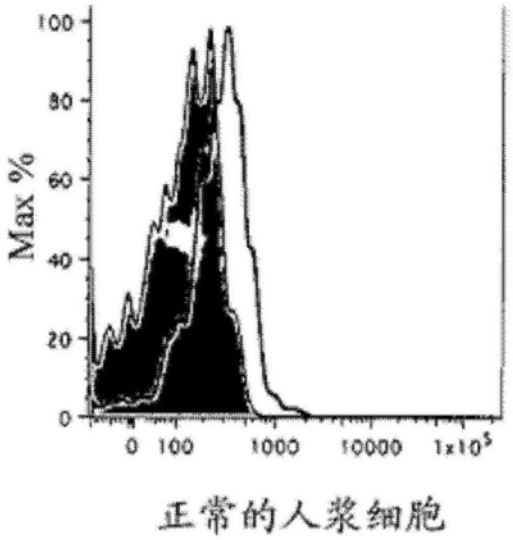

Max %
100
80
60
40
20
0
0 100 1000 10000 1x10^5
正常的人浆细胞

图48A

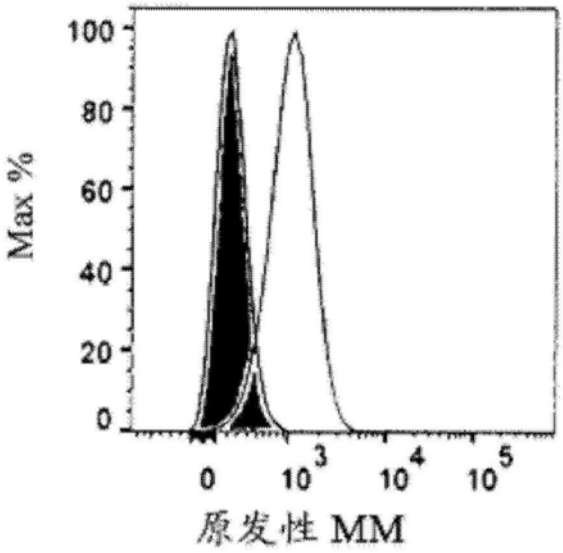

Max %
100
80
60
40
20
0
0 10^3 10^4 10^5
原发性 MM

图48B

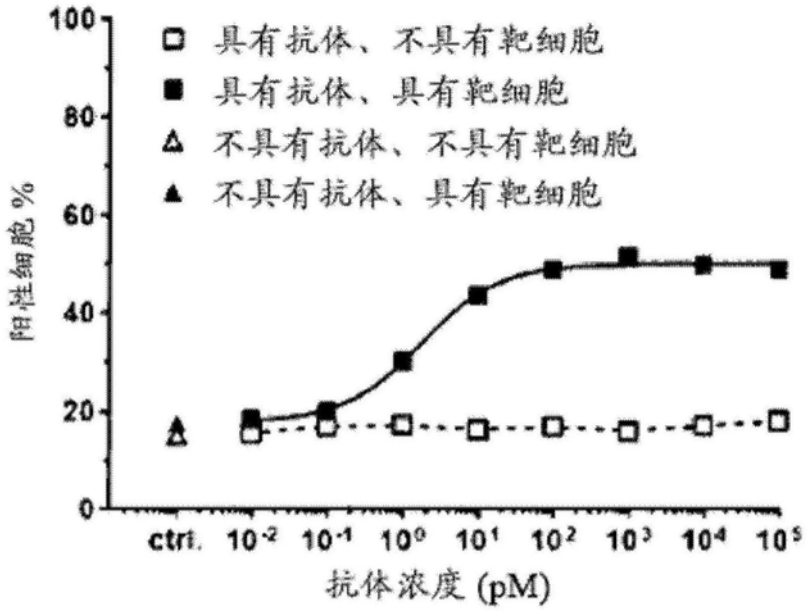

具有抗体、不具有靶细胞
具有抗体、具有靶细胞
不具有抗体、不具有靶细胞
不具有抗体、具有靶细胞
阳性细胞 %
100
80
60
40
20
0
ctrl.
10-2
10-1
100
101
102
103
104
105
抗体浓度 (pM)

图49A

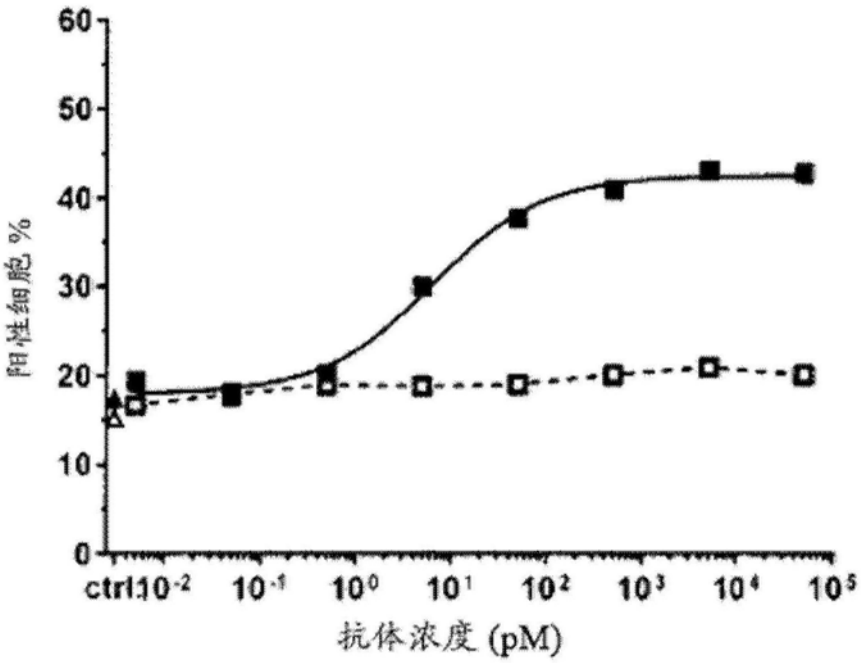

阳性细胞 %
60
50
40
30
20
10
0
ctrl
10-2
10-1
100
101
102
103
104
105
抗体浓度 (pM)

图49B

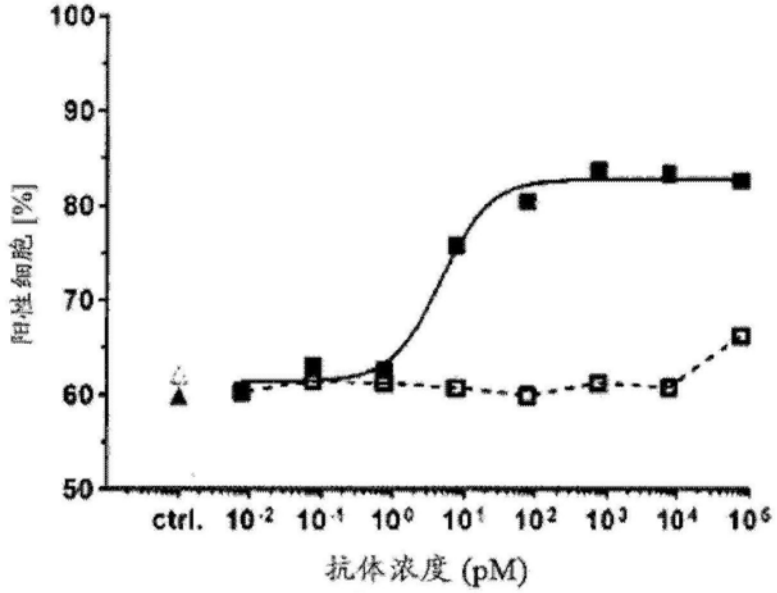

100
90
80
70
60
50
阳性细胞 [%]
ctrl.
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
10^{3}
10^{4}
10^{5}
抗体浓度 (pM)

图49C

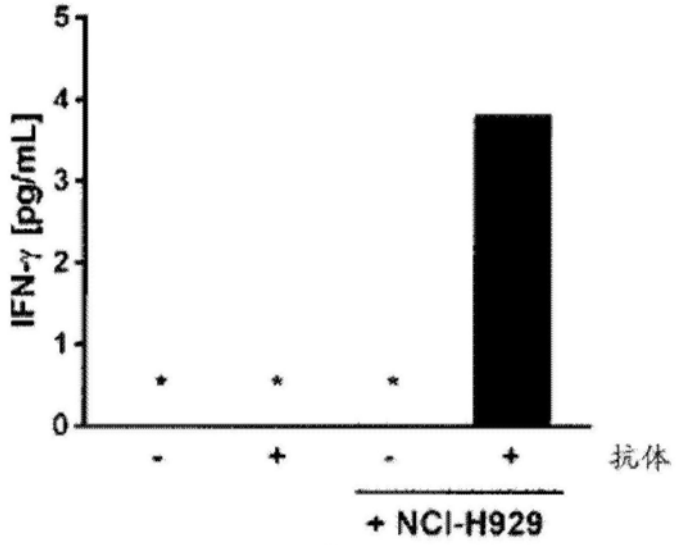

5
4
3
2
1
0
IFN-γ [pg/mL]
-
+
-
+
抗体
+ NCI-H929

图49D

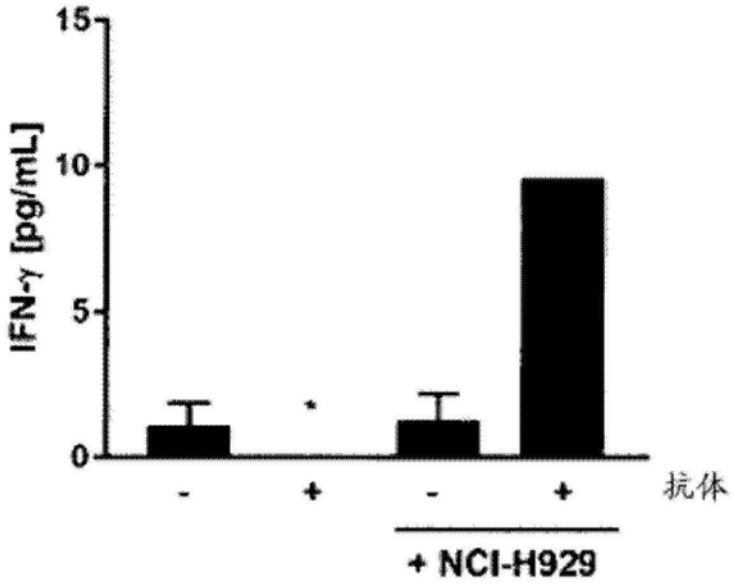


图49E

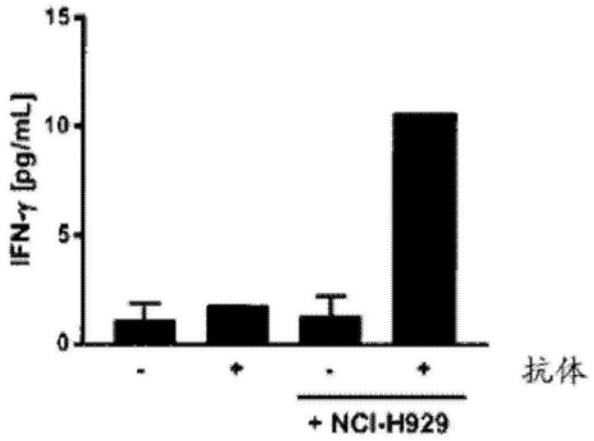


图49F

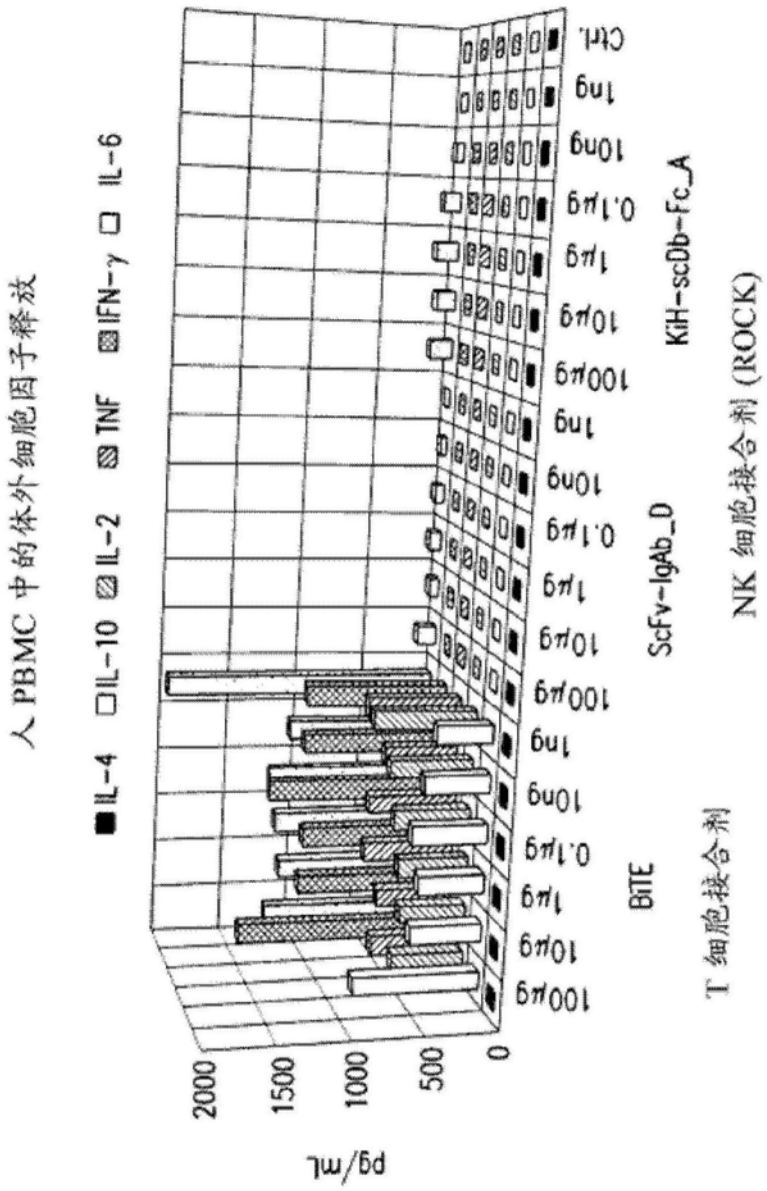

人 PBMC 中的体外细胞因子释放
IL-4 IL-10 IL-2 TNF IFN-γ IL-6
pg/mL
2000
1500
1000
500
0
BiTE
T 细胞接合剂
ScFv-IgAb_D
KiH-scDb-Fc_A
NK 细胞接合剂 (ROCK)
100μg
10μg
1μg
0.1μg
10ng
1ng
Ctrl.

图50

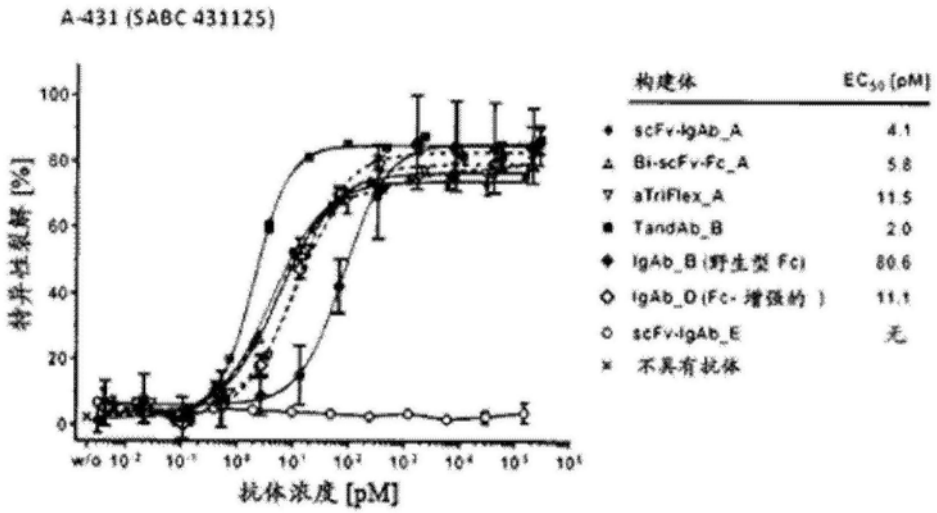

A-431 (SABC 431125)
特异性裂解 [%]
抗体浓度 [pM]
构建体
EC50 [pM]
scFv-IgAb_A 4.1
Bi-scFv-Fc_A 5.8
aTriFlex_A 11.5
TandAb_B 2.0
IgAb_B (野生型 Fc) 80.6
IgAb_D (Fc- 增强的) 11.1
scFv-IgAb_E 无
不具有抗体

图51

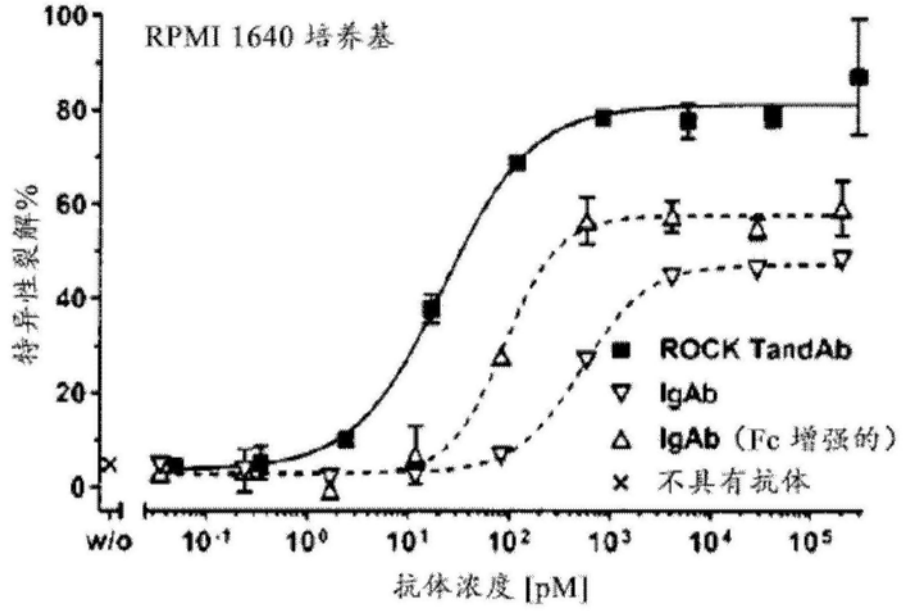

RPMI 1640 培养基
特异性裂解%
抗体浓度 [pM]
ROCK TandAb
IgAb
IgAb（Fc 增强的）
不具有抗体

图52A

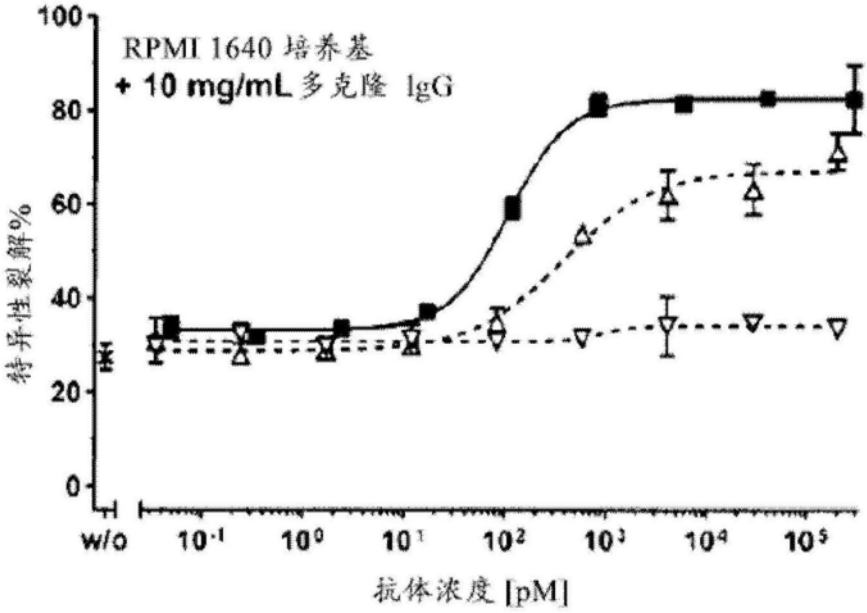

RPMI 1640 培养基
+ 10 mg/mL 多克隆 IgG
特异性裂解%
100
80
60
40
20
0
w/o
10⁻¹
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
10⁵
抗体浓度 [pM]

图52B

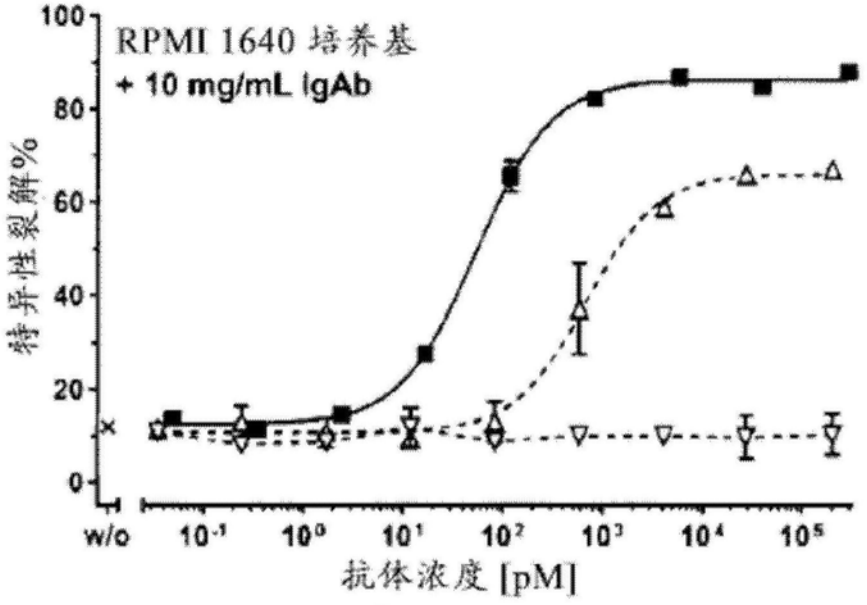

RPMI 1640 培养基
+ 10 mg/mL IgAb
特异性裂解%
100
80
60
40
20
0
w/o
10⁻¹
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
10⁵
抗体浓度 [pM]

图52C

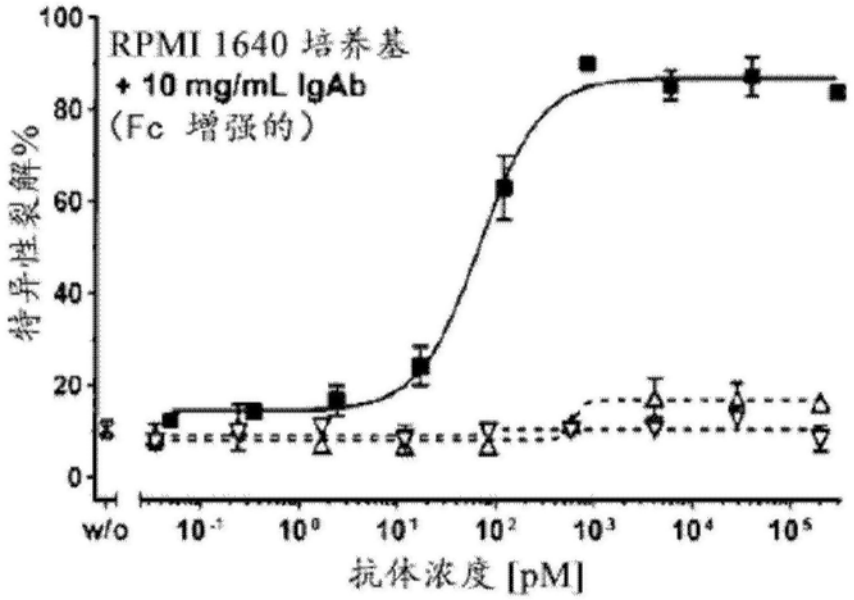

RPMI 1640 培养基
+ 10 mg/mL IgAb
(Fc 增强的)
特异性裂解%
100
80
60
40
20
0
w/o
10⁻¹
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
10⁵
抗体浓度 [pM]

图52D

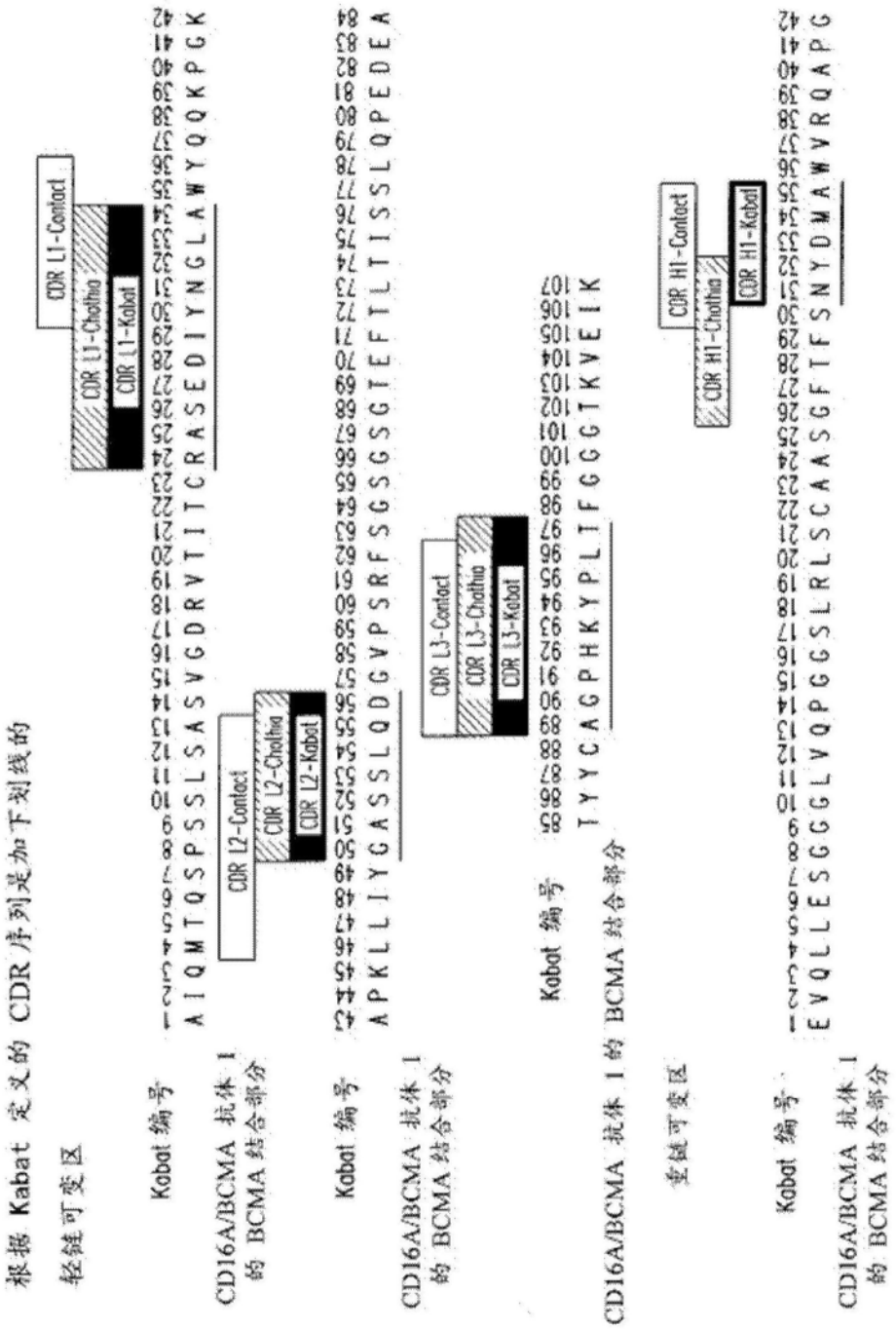
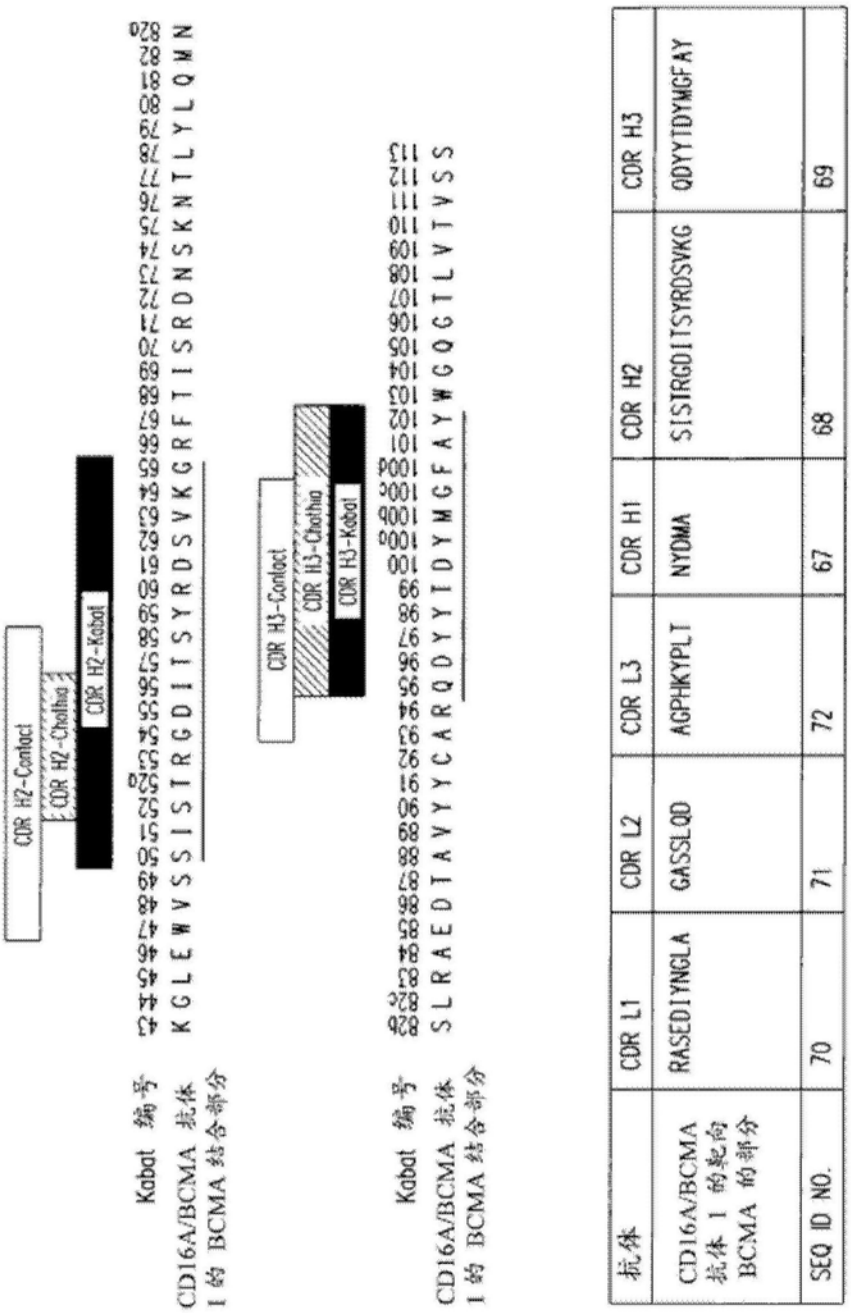

根据 Kabat 定义的 CDR 序列是加下划线的
轻链可变区
CDR L1-Contact
CDR L1-Chothia
CDR L1-Kabat
CDR L2-Contact
CDR L2-Chothia
CDR L2-Kabat
CDR L3-Contact
CDR L3-Chothia
CDR L3-Kabat
Kabat 编号
CD16A/BCMA 抗体 1 的 BCMA 结合部分
重链可变区
CDR H1-Contact
CDR H1-Chothia
CDR H1-Kabat

图53A



抗体	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
CD16A/BCMA 抗体 1 的靶向 BCMA 的部分	RASEDIYNGLA	GASSLQD	AGPHKYPLT	NYDMA	SISTRGDITSYRDSVKG	QDYYTDYMGFAY
SEQ ID NO.	70	71	72	67	68	69

图53A(续图)

CD16A/BCMA 抗体 1 的靶向 BCMA 的部分的轻链可变区

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNGLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQDGVPSRFSGSGSGTEFTLT

ISSLQPEDEATYYCAGPHKYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 66)

CD16A/BCMA 抗体 1 的靶向 BCMA 的部分的重链可变区

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMAWVRQAPGKGLEWVSSISTRGDITSYRDSVKGRFTISR

DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDYYTDYMGFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65)

图53B

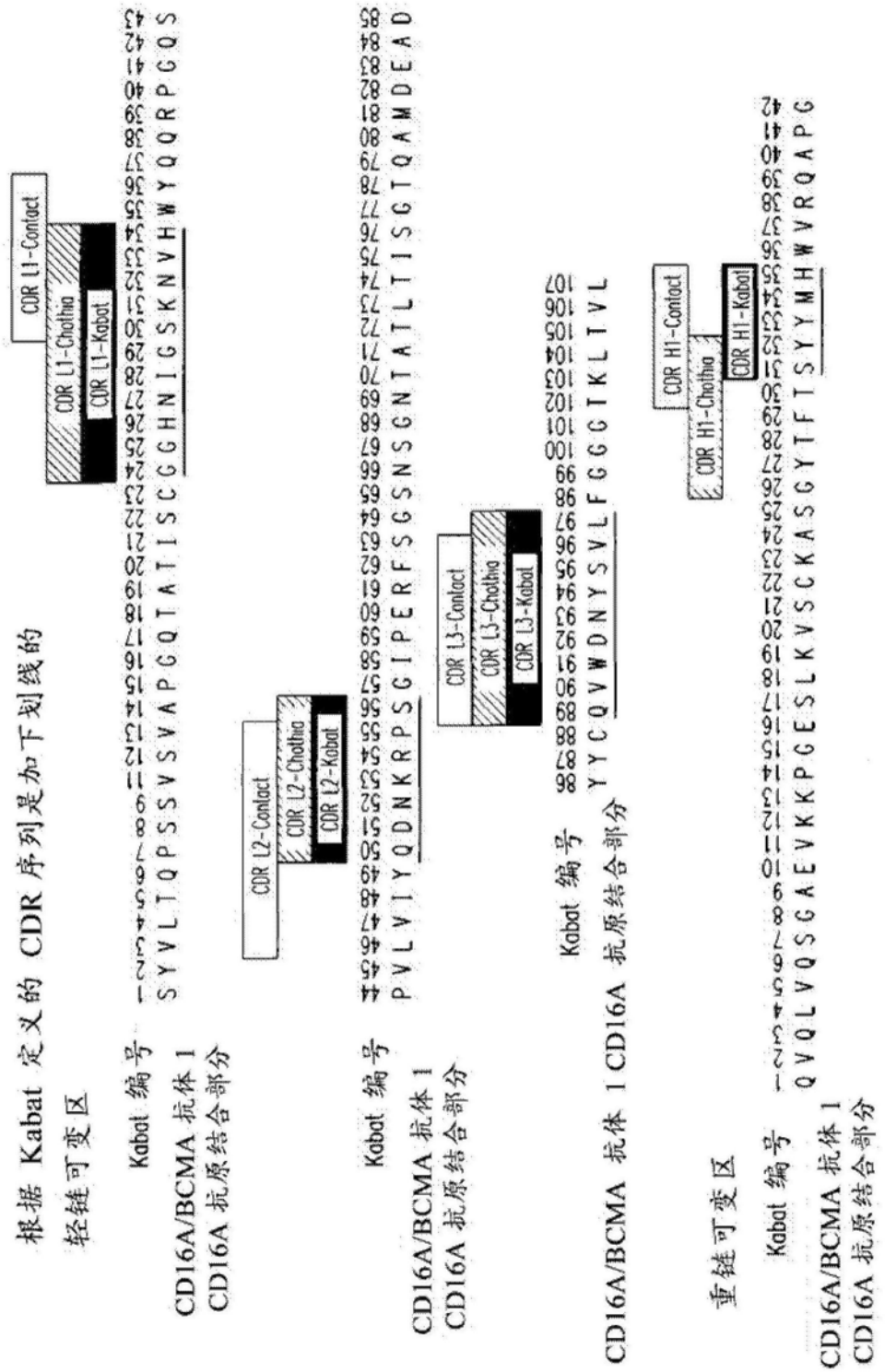
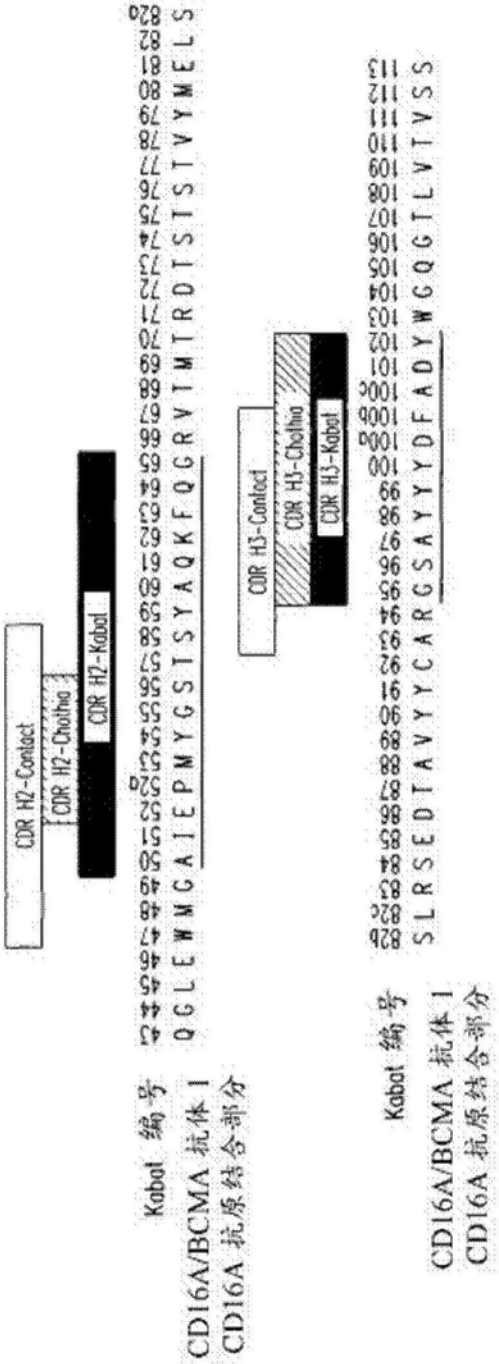

根据 Kabat 定义的 CDR 序列是加下划线的
轻链可变区
CDR L1-Contact
CDR L1-Chothia
CDR L1-Kabat
CDR L2-Contact
CDR L2-Chothia
CDR L2-Kabat
CDR L3-Contact
CDR L3-Chothia
CDR L3-Kabat
Kabat 编号
CD16A/BCMA 抗体 1
CD16A 抗原结合部分
S Y V L T Q P S S V S V A P G Q T A T I S C G G H N I G S K N V H W Y Q Q R P G Q S
P V L V I Y Q D N K R P S G I P E R F S G S N S G N T A T L T I S G T Q A M D E A D
Y Y C Q V W D N Y S V L F G G G T K L T V L
重链可变区
CDR H1-Contact
CDR H1-Chothia
CDR H1-Kabat
Q V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K V S C K A S G Y T F T S Y Y M H W V R Q A P G

图53C



抗体	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
CD16A/BCMA 抗体 1 的靶向 BCMA 的部分	GGHN1GSKNVH	QDNKRPS	QVWDNYSVL	SYYMH	AIEPNYGSTSYAQKFQG	GSAYYYDFADY
SEQ ID NO.	76	77	78	73	74	75

图53C(续图)

CD16A/BCMA 抗体 1 的靶向 BCMA 的部分的轻链可变区

SYVLTQPSSVSVAPGQTATISCGGHNIGSKNVHWYQQRPGQSPVLVIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATL

TISGTQAMDEADYYCQVWDNYSVLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:2)

CD16A/BCMA 抗体 1 的靶向 BCMA 的部分的重链可变区

QVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGAIEPMYGSTSYAQKFQGRVT

MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGSAYYYDFADYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:3)

图53D