



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118317978 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 09

(21) 申请号 202280064771.X

(22) 申请日 2022.09.27

(30) 优先权数据

63/250,160 2021.09.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.03.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/077083 2022.09.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/056252 EN 2023.04.06

(71) 申请人 蜻蜓治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 A·贝利 安·F·张

S·V·德拉比克 D·法龙

B·费舍尔 阿斯亚·格林伯格

P·P·海因 A·伊万诺夫

Z·S·左 M·莱万多夫斯基

X·李 M·施奈德

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

G12N 15/86 (2006.01)

权利要求书5页 说明书161页

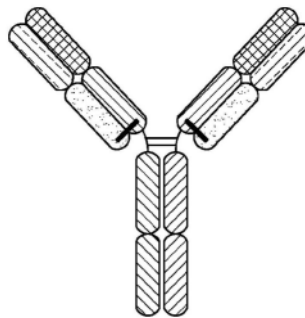
序列表(电子公布) 附图337页

(54) 发明名称

结合NKG2D、CD16和BAFF-R的蛋白

(57) 摘要

描述了结合NKG2D受体、CD16和B细胞激活因子受体(BAFF-R)的多特异性结合蛋白,以及可用于治疗癌症和自身免疫性炎症疾病的这些多特异性结合蛋白的药物组合物 and 治疗方法。



1. 一种蛋白,其包含:
  - (a) 结合NKG2D的第一抗原结合位点;
  - (b) 结合B细胞激活因子受体 (BAFF-R) 的第二抗原结合位点;以及
  - (c) 足以结合CD16的抗体Fc结构域或其部分,或结合CD16的第三抗原结合位点。
2. 如权利要求1所述的蛋白,其中结合NKG2D的该第一抗原结合位点是Fab片段,并且结合BAFF-R的该第二抗原结合位点是scFv。
3. 如权利要求1所述的蛋白,其中结合NKG2D的该第一抗原结合位点是scFv,并且结合BAFF-R的该第二抗原结合位点是Fab片段。
4. 如权利要求1所述的蛋白,其进一步包含结合BAFF-R的另外的抗原结合位点。
5. 如权利要求4所述的蛋白,其中结合NKG2D的该第一抗原结合位点是scFv,并且结合BAFF-R的该第二抗原结合位点和该另外的抗原结合位点各自是Fab片段。
6. 如权利要求4所述的蛋白,其中结合NKG2D的该第一抗原结合位点是scFv,并且结合BAFF-R的该第二抗原结合位点和该另外的抗原结合位点各自是scFv。
7. 如权利要求4-6中任一项所述的蛋白,其中该第二抗原结合位点和该另外的抗原结合位点的氨基酸序列是相同的。
8. 如权利要求3和6-7中任一项所述的蛋白,其中结合NKG2D的该scFv经由包含Ala-Ser或Gly-Ser的铰链连接至足以结合CD16的抗体恒定结构域或其部分,并且其中该scFv包含重链可变结构域和轻链可变结构域。
9. 如权利要求2和6-8中任一项所述的蛋白,其中每个结合BAFF-R的scFv经由包含Ala-Ser或Gly-Ser的铰链连接至足以结合CD16的抗体恒定结构域或其部分,并且其中该scFv包含重链可变结构域和轻链可变结构域。
10. 如权利要求8或9所述的蛋白,其中该铰链进一步包含氨基酸序列Thr-Lys-Gly。
11. 如权利要求3和5-10中任一项所述的蛋白,其中在结合NKG2D的该scFv中,该scFv的该重链可变结构域与该scFv的该轻链可变结构域形成二硫桥。
12. 如权利要求2和6-11中任一项所述的蛋白,其中在每个结合BAFF-R的scFv中,该scFv的该重链可变结构域与该scFv的该轻链可变结构域形成二硫桥。
13. 如权利要求11或12所述的蛋白,其中该二硫桥在该重链可变结构域的C44和该轻链可变结构域的C100之间形成,根据Kabat编号方案编号。
14. 如权利要求3和5-13中任一项所述的蛋白,其中在结合NKG2D的该scFv中,该重链可变结构域通过柔性接头连接至该轻链可变结构域。
15. 如权利要求2和6-14中任一项所述的蛋白,其中在每个结合BAFF-R的scFv中,该重链可变结构域通过柔性接头连接至该轻链可变结构域。
16. 如权利要求14或15所述的蛋白,其中该柔性接头包含 $(G_4S)_4$  (SEQ ID NO:119)。
17. 如权利要求3和5-16中任一项所述的蛋白,其中在结合NKG2D的该scFv中,该重链可变结构域位于该轻链可变结构域的C末端。
18. 如权利要求2和6-17中任一项所述的蛋白,其中在每个结合BAFF-R的scFv中,该重链可变结构域位于该轻链可变结构域的C末端。
19. 如权利要求3和5-16中任一项所述的蛋白,其中在结合NKG2D的该scFv中,该重链可变结构域位于该轻链可变结构域的N末端。

20. 如权利要求2、6-17和19中任一项所述的蛋白,其中在每个结合BAFF-R的scFv中,该重链可变结构域位于该轻链可变结构域的N末端。

21. 如权利要求2、9-10、12-13、15-16、18和20中任一项所述的蛋白,其中结合NKG2D的该Fab片段不位于抗原结合位点和该Fc或其部分之间。

22. 如权利要求3、5、7-8、10-11、13-14、16-17和19中任一项所述的蛋白,其中结合BAFF-R的Fab片段不位于抗原结合位点和该Fc或其部分之间。

23. 一种蛋白,其包含:

(a) 包含结合NKG2D的Fab片段的第一抗原结合位点;

(b) 第二抗原结合位点,其包含结合B细胞激活因子受体(BAFF-R)的单链可变片段(scFv);以及

(c) Fc结构域,其包含形成结合CD16的异二聚体的第一抗体恒定结构域和第二抗体恒定结构域,

其中该scFv通过铰链连接至该第一抗体恒定结构域的N末端,并且该Fab连接至该第二抗体恒定结构域的N末端。

24. 如权利要求23所述的蛋白,其中该铰链包含Gly-Ser。

25. 如权利要求1-24中任一项所述的蛋白,其中该第一抗原结合位点结合人NKG2D。

26. 如权利要求1-25中任一项所述的蛋白,其中结合NKG2D的该第一抗原结合位点包含以下:VH,其包含分别包含SEQ ID NO:81、82和112的氨基酸序列的互补决定区1(CDR1)、互补决定区2(CDR2)和互补决定区3(CDR3);和VL,其包含分别包含SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

27. 如权利要求1-26中任一项所述的蛋白,其中结合NKG2D的该第一抗原结合位点包含以下:VH,其包含分别由SEQ ID NO:81、82和97的氨基酸序列表示的CDR1、CDR2和CDR3序列;和VL,其包含分别由SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列表示的CDR1、CDR2和CDR3序列。

28. 如权利要求1-27中任一项所述的蛋白,其中结合NKG2D的该第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:95至少90%相同的氨基酸序列,并且该VL包含与SEQ ID NO:85至少90%相同的氨基酸序列。

29. 如权利要求1-28中任一项所述的蛋白,其中结合NKG2D的该第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列并且该VL包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列。

30. 如权利要求1-29中任一项所述的蛋白,其中该第二抗原结合位点包含以下:重链可变结构域,其包含分别为SEQ ID NO:260、249和261的CDR1、CDR2和CDR3序列;和轻链可变结构域,其包含分别为SEQ ID NO:217、77和259的CDR1、CDR2和CDR3序列。

31. 如权利要求1-30中任一项所述的蛋白,其中该第二抗原结合位点包含以下:重链可变结构域,其包含分别为SEQ ID NO:214、233和248的CDR1、CDR2和CDR3序列;和轻链可变结构域,其包含分别为SEQ ID NO:217、77和249的CDR1、CDR2和CDR3序列。

32. 如权利要求31所述的蛋白,其中该第二抗原结合位点包含与SEQ ID NO:250至少90%相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:251至少90%相同的轻链可变结构域。

33. 如权利要求32所述的蛋白,其中该第二抗原结合位点包含相对于SEQ ID NO:250具有G44C取代的VH,和相对于SEQ ID NO:251具有G100C取代的VL。

34. 如权利要求1-33中任一项所述的蛋白,其中该第二抗原结合位点包含含有SEQ ID

NO:252的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:253的氨基酸序列的VL,或含有SEQ ID NO:250的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:251的氨基酸序列的VL。

35. 如权利要求1-34中任一项所述的蛋白,其中该第二抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:252的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:253的氨基酸序列的VL。

36. 如权利要求1-32或34中任一项所述的蛋白,其中该第二抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:250的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:251的氨基酸序列的VL。

37. 如权利要求1-35中任一项所述的蛋白,其中该第二抗原结合位点包含单链可变片段(scFv),并且其中该scFv包含含有SEQ ID NO:252的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:253的氨基酸序列的VL。

38. 如权利要求1、2、9-10、12-13、15-16、18、20-21、23-35和37中任一项所述的蛋白,其中该第二抗原结合位点包含单链可变片段(scFv),并且其中该scFv包含与选自由SEQ ID NO:254和255组成的组的序列至少90%相同的氨基酸序列。

39. 如权利要求1、2、9-10、12-13、15-16、18、20-21、23-35和37-38中任一项所述的蛋白,其中该第二抗原结合位点包含scFv,并且该scFv包含与SEQ ID NO:254至少90%相同的氨基酸序列。

40. 如权利要求1、2、9-10、12-13、15-16、18、20-21、23-35和37-39中任一项所述的蛋白,其中该第二抗原结合位点包含scFv并且该scFv包含SEQ ID NO:254的氨基酸序列。

41. 如权利要求1、2、9-10、12-13、15-16、18、20-21、23-35和37-40中任一项所述的蛋白,其中该蛋白包含与SEQ ID NO:270至少90%相同的氨基酸序列。

42. 如权利要求1、2、9-10、12-13、15-16、18、20-21、23-35和37-41中任一项所述的蛋白,其中该蛋白包含SEQ ID NO:270的氨基酸序列。

43. 如权利要求1-3、5、7-8、10-11、13-14、16-17、19、24-34和36中任一项所述的蛋白,其中该蛋白包含与SEQ ID NO:271至少90%相同的氨基酸序列。

44. 如权利要求1-3、5、7-8、10-11、13-14、16-17、19、24-34、36和43中任一项所述的蛋白,其中该蛋白包含SEQ ID NO:271的氨基酸序列。

45. 如权利要求1-44中任一项所述的蛋白,其中该第二抗原结合位点以小于或等于5nM的解离常数( $K_D$ )结合人BAFF-R,如通过表面等离子体共振(SPR)测量。

46. 如权利要求1-45中任一项所述的蛋白,其中该第二抗原结合位点抑制BAFF-R与BAFF的结合。

47. 一种蛋白,其包含:

(a) 第一抗原结合位点,其包含抗NKG2D抗体的VH和VL,其中该VH包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列;

(b) 第二抗原结合位点,其包含抗BAFF-R抗体的VH和VL,其中该VH包含SEQ ID NO:252的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:253的氨基酸序列;以及

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

48. 一种蛋白,其包含:

(a) 第一抗原结合位点,其包含抗NKG2D抗体的VH和VL,其中该VH包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列;

(b) 第二抗原结合位点,其包含SEQ ID NO:254的氨基酸序列;以及

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

49. 如权利要求1-48中任一项所述的蛋白,其中该抗体Fc结构域是人IgG1抗体Fc结构域。

50. 如权利要求49所述的蛋白,其中该抗体Fc结构域或其部分包含与SEQ ID NO:118至少90%相同的氨基酸序列。

51. 如权利要求49或50所述的蛋白,其中该抗体Fc结构域的至少一个多肽链相对于SEQ ID NO:118在选自Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411、和K439的一个或多个位置处包含一个或多个突变,根据EU编号系统进行编号。

52. 如权利要求49-51中任一项所述的蛋白,其中该抗体Fc结构域的至少一个多肽链相对于SEQ ID NO:118包含选自Q347E、Q347R、Y349S、Y349K、Y349T、Y349D、Y349E、Y349C、L351K、L351D、L351Y、S354C、E356K、E357Q、E357L、E357W、K360E、K360W、Q362E、S364K、S364E、S364H、S364D、T366V、T366I、T366L、T366M、T366K、T366W、T366S、L368E、L368A、L368D、K370S、N390D、N390E、K392L、K392M、K392V、K392F、K392D、K392E、T394F、D399R、D399K、D399V、S400K、S400R、D401K、F405A、F405T、F405L、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、K409R、T411D、T411E、K439D、和K439E的一个或多个突变,根据EU编号系统进行编号。

53. 如权利要求49-52中任一项所述的蛋白,其中该抗体重链恒定区的一个多肽链相对于SEQ ID NO:118在选自Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411和K439的一个或多个位置处包含一个或多个突变;并且该抗体重链恒定区的另一个多肽链相对于SEQ ID NO:118在选自Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、D401、F405、Y407、K409、T411、和K439的一个或多个位置处包含一个或多个突变,根据EU编号系统进行编号。

54. 如权利要求53所述的蛋白,其中该抗体重链恒定区的一个多肽链包含相对于SEQ ID NO:118的K360E和K409W取代;并且该抗体重链恒定区的另一个多肽链包含相对于SEQ ID NO:118的Q347R、D399V和F405T取代,根据EU编号系统进行编号。

55. 如权利要求53所述的蛋白,其中该抗体重链恒定区的一个多肽链包含相对于SEQ ID NO:118的F405L取代;并且该抗体重链恒定区的另一个多肽链包含相对于SEQ ID NO:118的K409R取代,根据EU编号系统进行编号。

56. 如权利要求53-55中任一项所述的蛋白,其中该抗体重链恒定区的一个多肽链包含相对于SEQ ID NO:118的Y349C取代;并且该抗体重链恒定区的另一个多肽链包含相对于SEQ ID NO:118的S354C取代,根据EU编号系统进行编号。

57. 一种蛋白,其包含:

- (a) 包含SEQ ID NO:270的氨基酸序列的第一多肽;
- (b) 包含SEQ ID NO:194的氨基酸序列的第二多肽;以及
- (c) 包含SEQ ID NO:195的氨基酸序列的第三多肽。

58. 一种蛋白,其包含:

- (a) 包含SEQ ID NO:271的氨基酸序列的第一多肽;

(b) 包含SEQ ID NO:272的氨基酸序列的第二多肽;以及

(c) 包含SEQ ID NO:273的氨基酸序列的第三多肽。

59. 一种药物组合物,其包含如权利要求1至58中任一项所述的蛋白和药学上可接受的载剂。

60. 一种细胞,其包含一种或多种编码如权利要求1至58中任一项所述的蛋白的核酸。

61. 一种增强肿瘤细胞死亡的方法,该方法包括将肿瘤细胞和自然杀伤细胞暴露于有效量的如权利要求1至58中任一项所述的蛋白或如权利要求59所述的药物组合物。

62. 一种治疗癌症的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的如权利要求1至58中任一项所述的蛋白或如权利要求59所述的药物组合物。

63. 如权利要求62所述的方法,其中该癌症选自由以下组成的组: B细胞非霍奇金淋巴瘤(B-NHL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B-细胞淋巴瘤(DLBCL)、边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤和急性淋巴细胞白血病(ALL)。

64. 一种增强B细胞死亡的方法,该方法包括将B细胞和自然杀伤细胞暴露于有效量的如权利要求1至58中任一项所述的蛋白或如权利要求59所述的药物组合物。

65. 一种治疗自身免疫性炎性疾病的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的如权利要求1至58中任一项所述的蛋白或如权利要求59所述的药物组合物。

66. 如权利要求1-58中任一项所述的蛋白,其中该蛋白是纯化的蛋白。

67. 如权利要求66所述的蛋白,其中该蛋白使用选自由以下组成的组的方法纯化:离心、深度过滤、细胞裂解、均化、冻融、亲和纯化、凝胶过滤、离子交换色谱、疏水相互作用交换色谱和混合模式色谱。

## 结合NKG2D、CD16和BAFF-R的蛋白

### 交叉引用

[0001] 本申请要求2021年9月29日提交的美国临时申请号63/250,160的权益,其全部披露内容通过引用以其全文特此并入本文。

### 序列表

[0002] 本申请含有计算机可读序列表,该序列表已经以XML文件格式经由专利中心提交,其全部内容通过引用以其全文并入本文。经由专利中心提交的序列表XML文件名为“14247-700-228\_seqlist.xml”,创建于2022年9月16日,大小为305,046字节。

### 技术领域

[0003] 本申请涉及与细胞上的NKG2D、CD16和B细胞激活因子受体 (BAFF-R) 结合的多特异性结合蛋白、包含这样的蛋白的药物组合物以及使用这样的蛋白和药物组合物的治疗方法(包括用于癌症的治疗)。

### 背景技术

[0004] 尽管进行了大量的研究工作,但癌症仍然是全球各国的重大临床和经济负担。根据世界卫生组织 (WHO) 的数据,它是第二大死因。手术、放射疗法、化学疗法、生物疗法、免疫疗法、激素疗法、干细胞移植和精准医学是现有的治疗方式。尽管在这些领域进行了广泛的研究,但尚未确定一种高效的治愈性解决方案,特别是对于最具侵袭性的癌症。此外,许多现有的抗癌治疗方式具有显著的不良副作用。

[0005] 癌症免疫疗法是理想的,因为它们具有高度特异性,并且可以利用患者自身的免疫系统促进癌细胞的破坏。融合蛋白例如双特异性T细胞接合器是文献中描述的癌症免疫疗法,它们与肿瘤细胞和T细胞结合以促进肿瘤细胞的破坏。

[0006] 自然杀伤(NK)细胞是先天免疫系统的组分,约占循环淋巴细胞的15%。NK细胞浸润几乎所有组织,最初被表征为无需事先致敏即可有效杀伤肿瘤细胞。激活的NK细胞通过与细胞毒性T细胞相似的方式(即经由含有穿孔蛋白及颗粒酶的溶细胞颗粒以及经由死亡受体途径)杀伤靶细胞。激活的NK细胞还分泌炎性细胞因子如IFN- $\gamma$ 和趋化因子,它们促进其他白细胞募集到靶组织。

[0007] NK细胞通过其表面的各种激活性和抑制性受体对信号作出反应。例如,当NK细胞遇到健康的自身细胞时,它们的活性会通过杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的激活而受到抑制。可替代地,当NK细胞遇到外来细胞或癌细胞时,它们会通过其激活性受体(例如,NKG2D、NCR、DNAM1)被激活。NK细胞也可通过其表面的CD16受体被某些免疫球蛋白的恒定区激活。NK细胞对激活的总体敏感性取决于刺激性信号和抑制性信号的总和。NKG2D是II型跨膜蛋白,基本上由所有自然杀伤细胞表达,此时NKG2D作为激活性受体。NKG2D也存在于T细胞上,此时它充当共刺激受体。通过NKG2D调节NK细胞功能的能力可用于包括恶性肿瘤在内的各种治疗环境。

[0008] BAFF-R也称为BAFF受体、TNF受体超家族成员13C (TNFRSF13C)、CD268、或BR3,是

TNF受体超家族的III型跨膜蛋白。BAFF-R在晚期过渡(T2)B细胞阶段和所有成熟B细胞上表达,在生发中心B细胞上下调,在记忆细胞上重新表达,在浆细胞上不存在(Davidson(2012) *Curr.Rheumatol.Rep.* [当前风湿病报告], 14(4):295-302)。BAFF-R是B细胞激活因子(BAFF)的受体,BAFF是B细胞存活因子。BAFF可以接合三种受体:BAFF-R、跨膜激活物和CAML相互作用物(TACI)以及B细胞成熟抗原(BCMA)。在这三种受体中,BAFF-R是参与滤泡和边缘区脾脏B细胞发育的主要受体(Schiemann等人(2001) *Science* [科学], 293:2111-14)。

[0009] BAFF/BAFF-R信号传导轴可能在B细胞增生中发挥作用。在非霍奇金淋巴瘤(NHL)患者中观察到BAFF-R表达增加以及BAFF血清水平升高(Shen等人(2016) *Adv.Clin.Exp.Med.* [临床与实验医学进展], 25(5):837-44)。BAFF-R中的某些单核苷酸多态性(SNP)与慢性淋巴细胞白血病(CLL)的风险增加有关(Jesek等人(2016) *Tumour Biol.* [肿瘤生物学], 37(10):13617-26)。BAFF/BAFF-R轴也涉及自身免疫性炎症疾病(Mackay等人(1999) *J.Exp.Med.* [实验医学杂志], 190:1697-1710)。一些系统性红斑狼疮(SLE)患者血清中BAFF的水平升高(Cheema等人(2001) *Arthritis Rheum.* [关节炎与风湿病], 44:1313-19),并且BAFF-R始终占据SLE中的血液B细胞(Carter等人(2005) *Arthritis Rheum.* [关节炎与风湿病], 52:3943-54)。由于观察到与保护性B细胞相比,自身反应性B细胞的存活对BAFF有更大的依赖性(Lesley等人(2004) *Immunity* [免疫], 20:441-53),已经提出异常高水平的BAFF可能通过增强自身反应性B细胞的存活而促进自身免疫性疾病的发病机制。

[0010] 因此,在该领域仍然需要结合BAFF-R的新的和有用的蛋白,用于治疗癌症和自身免疫性炎症疾病。

## 发明内容

[0011] 本申请提供了与自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体、以及BAFF-R结合的多特异性结合蛋白。这样的蛋白可以接合多于一个类型的NK激活性受体,并可阻断天然配体与NKG2D的结合。在某些实施例中,蛋白可以激动人的NK细胞。在一些实施例中,蛋白可以激动人和其他物种例如啮齿动物和食蟹猴中的NK细胞。还提供含有本文披露的蛋白中的任一者的配制品;含有一种或多种表达这些蛋白的核酸的细胞以及使用这些蛋白增强肿瘤细胞死亡的方法。

[0012] 因此,在一方面,本申请提供了一种蛋白,其包含:

- (a) 结合NKG2D的第一抗原结合位点;
- (b) 结合B细胞激活因子受体(BAFF-R)的第二抗原结合位点;以及
- (c) 足以结合CD16的抗体Fc结构域或其部分,或结合CD16的第三抗原结合位点。

[0013] 在本文披露的蛋白的一些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点是Fab片段,并且结合BAFF-R的第二抗原结合位点是scFv。在一些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点是scFv,并且结合BAFF-R的第二抗原结合位点是Fab片段。

[0014] 在本文披露的蛋白的一些实施例中,该蛋白进一步包含结合BAFF-R的另外的抗原结合位点。在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点是scFv,并且结合BAFF-R的第二抗原结合位点和另外的抗原结合位点各自是Fab片段。在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点是scFv,并且结合BAFF-R的第二抗原结合位点和另外的抗原结合位点各自是scFv。在某些实施例中,第二抗原结合位点和另外的抗原结合位点的氨基酸序列是相同

的。在某些实施例中,第二抗原结合位点和另外的抗原结合位点的氨基酸序列是不同的。

[0015] 在本文披露的蛋白的一些实施例中,结合NKG2D的scFv经由包含Ala-Ser或Gly-Ser的铰链连接至足以结合CD16的抗体恒定结构域或其部分,其中scFv包含重链可变结构域和轻链可变结构域。在某些实施例中,每个结合BAFF-R的scFv经由包含Ala-Ser或Gly-Ser的铰链连接至足以结合CD16的抗体恒定结构域或其部分,其中scFv包含重链可变结构域和轻链可变结构域。在某些实施例中,铰链进一步包含氨基酸序列Thr-Lys-Gly。

[0016] 在本文披露的蛋白的一些实施例中,在结合NKG2D的scFv中,scFv的重链可变结构域与scFv的轻链可变结构域形成二硫桥。在一些实施例中,在每个结合BAFF-R的scFv中,scFv的重链可变结构域与scFv的轻链可变结构域形成二硫桥。在一些实施例中,二硫桥在重链可变结构域的C44和轻链可变结构域的C100之间形成,根据Kabat编号方案编号。在一些实施例中,在结合NKG2D的scFv中,重链可变结构域通过柔性接头连接至轻链可变结构域。在一些实施例中,在每个结合BAFF-R的scFv中,重链可变结构域通过柔性接头连接至轻链可变结构域。在某些实施例中,柔性接头包含 $(G_4S)_4$ 。在某些实施例中,在结合NKG2D的scFv中,重链可变结构域位于轻链可变结构域的C末端。在某些实施例中,在每个结合BAFF-R的scFv中,重链可变结构域位于轻链可变结构域的C末端。在某些实施例中,在结合NKG2D的scFv中,重链可变结构域位于轻链可变结构域的N末端。在某些实施例中,在每个结合BAFF-R的scFv中,重链可变结构域位于轻链可变结构域的N末端。在某些实施例中,结合NKG2D的Fab片段不位于抗原结合位点和Fc或其部分之间。在某些实施例中,结合BAFF-R的Fab片段没有位于抗原结合位点和Fc或其部分之间。

[0017] 另一方面,本文提供了一种蛋白,其包含:

(a) 包含结合NKG2D的Fab片段的第一抗原结合位点;

(b) 包含单链可变片段(scFv)的第二抗原结合位点结合B细胞激活因子受体(BAFF-R);以及

(c) Fc结构域,其包含第一抗体恒定结构域和第二抗体恒定结构域形成结合CD16的异二聚体,

其中scFv通过铰链连接到第一抗体恒定结构域的N末端,并且Fab连接到第二抗体恒定结构域的N末端。

[0018] 在一些实施例中,铰链包含Gly-Ser。

[0019] 在本文披露的蛋白的一些实施例中,第一抗原结合位点结合人NKG2D。在一些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含以下:VH,其包含分别包含SEQ ID NO:81、82和112的氨基酸序列的互补决定区1(CDR1)、互补决定区2(CDR2)和互补决定区3(CDR3);和VL,其包含分别包含SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含以下:VH,其包含分别由SEQ ID NO:81、82和97的氨基酸序列表示的CDR1、CDR2和CDR3序列;和VL,其包含分别由SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列表示的CDR1、CDR2和CDR3序列。在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:95至少90%相同的氨基酸序列,并且该VL包含与SEQ ID NO:85至少90%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列并且该VL包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列。

[0020] 在本文披露的蛋白的一些实施例中,第二抗原结合位点包含以下:重链可变结构

域,其包含分别为SEQ ID NO:260、249和261的CDR1、CDR2和CDR3序列;和轻链可变结构域,其包含分别为SEQ ID NO:217、77和259的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0021] 在本文披露的蛋白的一些实施例中,第二抗原结合位点包含以下:重链可变结构域,其包含分别为SEQ ID NO:214、233和248的CDR1、CDR2和CDR3序列;和轻链可变结构域,其包含分别为SEQ ID NO:217、77和249的CDR1、CDR2和CDR3序列。在一些实施例中,第二抗原结合位点包含与SEQ ID NO:250至少90%相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:251至少90%相同的轻链可变结构域。

[0022] 在本文披露的蛋白的一些实施例中,第二抗原结合位点包含相对于SEQ ID NO:250具有G44C取代的VH,和相对于SEQ ID NO:251具有G100C取代的VL。在一些实施例中,第二抗原结合位点包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:252的VH和含有氨基酸序列SEQ ID NO:253的VL,或含有氨基酸序列SEQ ID NO:250的VH和含有氨基酸序列SEQ ID NO:251的VL。在一些实施例中,第二抗原结合位点包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:252的VH和含有氨基酸序列SEQ ID NO:253的VL。在一些实施例中,第二抗原结合位点包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:250的VH和含有氨基酸序列SEQ ID NO:251的VL。

[0023] 在本文披露的蛋白的一些实施例中,第二抗原结合位点包含单链可变片段(scFv),并且scFv包含含有SEQ ID NO:252的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:253的氨基酸序列的VL。在一些实施例中,第二抗原结合位点包含scFv,并且scFv包含与选自SEQ ID NO:254和255组成的组的序列至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,第二抗原结合位点包含scFv,并且scFv包含与SEQ ID NO:254至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,第二抗原结合位点包含scFv并且scFv包含SEQ ID NO:254的氨基酸序列。

[0024] 在本文披露的蛋白的一些实施例中,该蛋白包含与SEQ ID NO:270至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,该蛋白包含SEQ ID NO:270的氨基酸序列。在一些实施例中,该蛋白包含与SEQ ID NO:271至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,该蛋白包含SEQ ID NO:271的氨基酸序列。

[0025] 在本文披露的蛋白的一些实施例中,第二抗原结合位点以小于或等于5nM的解离常数( $K_D$ )结合人BAFF-R,如通过表面等离子体共振(SPR)测量。

[0026] 在本文披露的蛋白的一些实施例中,第二抗原结合位点抑制(例如,阻断)BAFF-R与BAFF的结合(例如,至少50%,至少75%、至少90%、至少95%或至少99%,如在竞争性结合测定中测量)。

[0027] 另一方面,本文提供了一种蛋白,其包含:

(a) 第一抗原结合位点,其包含抗NKG2D抗体的VH和VL,其中该VH包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列;

(b) 第二抗原结合位点,其包含抗BAFF-R抗体的VH和VL,其中该VH包含SEQ ID NO:252的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:253的氨基酸序列;以及

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

[0028] 另一方面,本文提供了一种蛋白,其包含:

(a) 第一抗原结合位点,其包含抗NKG2D抗体的VH和VL,其中该VH包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列;

(b) 第二抗原结合位点,其包含SEQ ID NO:254的氨基酸序列;以及

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

[0029] 在本文披露的蛋白的一些实施例中,抗体Fc结构域是人IgG1抗体Fc结构域。在一些实施例中,抗体Fc结构域或其部分包含与SEQ ID NO:118至少90%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,抗体Fc结构域的至少一个多肽链相对于SEQ ID NO:118在选自Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411、和K439的一个或多个位置处包含一个或多个突变,根据EU编号系统进行编号。在某些实施例中,抗体Fc结构域的至少一个多肽链相对于SEQ ID NO:118包含选自Q347E、Q347R、Y349S、Y349K、Y349T、Y349D、Y349E、Y349C、L351K、L351D、L351Y、S354C、E356K、E357Q、E357L、E357W、K360E、K360W、Q362E、S364K、S364E、S364H、S364D、T366V、T366I、T366L、T366M、T366K、T366W、T366S、L368E、L368A、L368D、K370S、N390D、N390E、K392L、K392M、K392V、K392F、K392D、K392E、T394F、D399R、D399K、D399V、S400K、S400R、D401K、F405A、F405T、F405L、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、K409R、T411D、T411E、K439D、和K439E的一个或多个突变,根据EU编号系统进行编号。在某些实施例中,抗体重链恒定区的一个多肽链相对于SEQ ID NO:118在选自Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411和K439的一个或多个位置处包含一个或多个突变;并且抗体重链恒定区的另一个多肽链相对于SEQ ID NO:118在选自Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、D401、F405、Y407、K409、T411、和K439的一个或多个位置处包含一个或多个突变,根据EU编号系统进行编号。在某些实施例中,抗体重链恒定区的一个多肽链包含相对于SEQ ID NO:118的K360E和K409W取代;并且抗体重链恒定区的另一个多肽链包含相对于SEQ ID NO:118的Q347R、D399V和F405T取代,根据EU编号系统进行编号。在某些实施例中,抗体重链恒定区的一个多肽链包含相对于SEQ ID NO:118的F405L取代;并且抗体重链恒定区的另一个多肽链包含相对于SEQ ID NO:118的K409R取代,根据EU编号系统进行编号。在某些实施例中,抗体重链恒定区的一个多肽链包含相对于SEQ ID NO:118的Y349C取代;并且抗体重链恒定区的另一个多肽链包含相对于SEQ ID NO:118的S354C取代,根据EU编号系统进行编号。

[0030] 另一方面,本申请提供了一种蛋白,其包含:

- (a) 包含SEQ ID NO:270的氨基酸序列的第一多肽;
- (b) 包含SEQ ID NO:194的氨基酸序列的第二多肽;以及
- (c) 包含SEQ ID NO:195的氨基酸序列的第三多肽。

[0031] 另一方面,本申请提供了一种蛋白,其包含:

(a) 第一多肽,其包含与SEQ ID NO:270的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列;

(b) 第二多肽,其包含与SEQ ID NO:194的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列;以及

(c) 第三多肽,其包含与SEQ ID NO:195的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或

100%)相同的氨基酸序列。

[0032] 在一些实施例中,本文提供的蛋白包含:

(a) 第一多肽,其包含与SEQ ID NO:270的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列;

(b) 第二多肽,其包含与SEQ ID NO:194的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列;以及

(c) 第三多肽,其包含与SEQ ID NO:195的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0033] 在一些实施例中,本文提供的蛋白包含:

(a) 第一多肽,其包含与SEQ ID NO:270的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;

(b) 第二多肽,其包含与SEQ ID NO:194的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;以及

(c) 第三多肽,其包含与SEQ ID NO:195的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0034] 在一些实施例中,本文提供的蛋白包含:

(a) 第一多肽,其包含与SEQ ID NO:270的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列;

(b) 第二多肽,其包含与SEQ ID NO:194的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列;以及

(c) 第三多肽,其包含与SEQ ID NO:195的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。

[0035] 在一些实施例中,本文提供的蛋白包含:

(a) 第一多肽,其包含与SEQ ID NO:270的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列;

(b) 包含SEQ ID NO:194的氨基酸序列的第二多肽;以及

(c) 包含SEQ ID NO:195的氨基酸序列的第三多肽。

[0036] 在一些实施例中,本文提供的蛋白包含:

(a) 第一多肽,其包含与SEQ ID NO:270的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;

(b) 包含SEQ ID NO:194的氨基酸序列的第二多肽;以及

(c) 包含SEQ ID NO:195的氨基酸序列的第三多肽。

[0037] 在一些实施例中,本文提供的蛋白包含:

(a) 第一多肽,其包含与SEQ ID NO:270的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列;

(b) 包含SEQ ID NO:194的氨基酸序列的第二多肽;以及

(c) 包含SEQ ID NO:195的氨基酸序列的第三多肽。

[0038] 在一些实施例中,本文提供的蛋白包含多肽,该多肽包含与SEQ ID NO:270的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至

少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在一些实施例中,本文提供的蛋白包含含有与SEQ ID NO:270的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列的多肽。在一些实施例中,本文提供的蛋白包含含有与SEQ ID NO:270的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列的多肽。

[0039] 在一些实施例中,本文提供的蛋白包含多肽,该多肽包含与SEQ ID NO:194的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在一些实施例中,本文提供的蛋白包含含有与SEQ ID NO:194的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列的多肽。在一些实施例中,本文提供的蛋白包含含有与SEQ ID NO:194的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列的多肽。

[0040] 在一些实施例中,本文提供的蛋白包含多肽,该多肽包含与SEQ ID NO:195的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在一些实施例中,本文提供的蛋白包含含有与SEQ ID NO:195的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列的多肽。在一些实施例中,本文提供的蛋白包含含有与SEQ ID NO:195的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列的多肽。

[0041] 另一方面,本申请提供了一种蛋白,其包含:

- (a) 包含SEQ ID NO:271的氨基酸序列的第一多肽;
- (b) 包含SEQ ID NO:272的氨基酸序列的第二多肽;以及
- (c) 包含SEQ ID NO:273的氨基酸序列的第三多肽。

[0042] 另一方面,本申请提供了一种药物组合物,其包含本文披露的蛋白和药学上可接受的载剂。

[0043] 另一方面,本申请提供了一种细胞,其包含一种或多种编码本文披露的蛋白的核酸。

[0044] 另一方面,本申请提供了一种增强肿瘤细胞死亡的方法,该方法包括将肿瘤细胞和自然杀伤细胞暴露于有效量的本文披露的蛋白或本文披露的药物组合物。

[0045] 另一方面,本申请提供了一种治疗癌症的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的本文披露的蛋白或本文披露的药物组合物。在一些实施例中,癌症选自以下组成的组: B细胞非霍奇金淋巴瘤(B-NHL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B-细胞淋巴瘤(DLBCL)、边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤和急性淋巴细胞白血病(ALL)。

[0046] 另一方面,本申请提供了一种增强B细胞死亡的方法,该方法包括将B细胞和自然杀伤细胞暴露于有效量的本文披露的蛋白或本文披露的药物组合物。

[0047] 另一方面,本申请提供了一种治疗自身免疫性炎症性疾病的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的本文披露的蛋白或本文披露的药物组合物。

[0048] 在本文披露的蛋白的一些实施例中,蛋白是纯化的蛋白。在一些实施例中,蛋白使用选自以下组成的组的方法纯化:离心、深度过滤、细胞裂解、均化、冻融、亲和纯化、凝胶过滤、离子交换色谱、疏水相互作用交换色谱和混合模式色谱。

## 附图说明

[0049] 图1是异二聚体多特异性抗体的代表,例如,三特异性结合蛋白(TriNKET)。每个臂可以代表NKG2D结合结构域或BAFF-R结合结构域。在一些实施例中,NKG2D结合结构域和BAFF-R结合结构域可以共享共同的轻链。

[0050] 图2A-图2E展示了多特异性结合蛋白(例如三特异性结合蛋白(TriNKET))的五种示例性形式。如图2A所示,NKG2D结合结构域或BAFF-R结合结构域都可采用scFv形式(左臂)。包含靶向NKG2D的scFv、靶向BAFF-R的Fab片段和异二聚化抗体恒定区的抗体在本文中称为F3-TriNKET。包含靶向BAFF-R的scFv、靶向NKG2D的Fab片段和结合CD16的异二聚化抗体恒定区/结构域的抗体在本文中称为F3'-TriNKET(图2E)。如图2B所示,NKG2D结合结构域和BAFF-R结合结构域都可采用scFv形式。图2C-图2D是具有三个抗原结合位点(包括两个结合BAFF-R的抗原结合位点,以及与异二聚化抗体恒定区融合的NKG2D结合位点)的抗体的图示。这些抗体形式在本文中称为F4-TriNKET。图2C展示了两个BAFF-R结合位点呈Fab片段形式,且NKG2D结合位点呈scFv形式。图2D展示了BAFF-R结合位点呈scFv形式,且NKG2D结合位点呈scFv形式。图2E代表三特异性抗体(TriNKET),其包含靶向BAFF-R的scFv、靶向NKG2D的Fab片段和结合CD16的异二聚化抗体恒定区/结构域("CD结构域")。该抗体形式在本文中称为F3'-TriNKET。在某些示例性多特异性结合蛋白中,抗体恒定区上的异二聚化突变包括一个恒定结构域上的K360E和K409W;和相对的恒定结构域上的Q347R、D399V和F405T在(在CD结构域中显示为三角形锁匙形状)。Fab片段的重链和轻链可变结构域之间的粗线表示二硫键。

[0051] 图3是三功能抗体(Triomab)形式的TriNKET的代表,它是保持IgG样形状的双特异性抗体。这种嵌合体由两个半抗体组成,每个半抗体具有一个轻链和一个重链,它们源自两个亲代抗体。三功能抗体形式可以是含有1/2大鼠抗体和1/2小鼠抗体的异二聚体构建体。

[0052] 图4是呈KiH共同轻链形式的TriNKET的代表,它涉及杵-臼(KiH)技术。KiH是异二聚体,包含2个与靶标1和2结合的Fab片段,以及通过异二聚化突变稳定的Fc。呈KiH形式的TriNKET可以是异二聚体构建体,有2个与靶标1和2结合的Fab片段,包含两条不同的重链和与两条重链配对共同轻链。

[0053] 图5是呈双可变结构域免疫球蛋白(DVD-Ig<sup>TM</sup>)形式的TriNKET的代表,其通过柔性的天然存在的接头组合两个单克隆抗体的靶结合结构域,并产生四价IgG样分子。DVD-Ig<sup>TM</sup>是同二聚体构建体,其中靶向抗原2的可变结构域融合到靶向抗原1的Fab片段可变结构域的N末端。DVD-Ig<sup>TM</sup>形式包含正常Fc。

[0054] 图6是呈正交Fab片段界面(Ortho-Fab)形式的TriNKET的代表,它是异二聚体构建体,包含2个与靶标1和靶标2结合的Fab片段融合到Fc。正交界面确保了轻链(LC)-重链(HC)配对。Fc中的突变确保了异二聚化。

[0055] 图7是二合一Ig形式的TriNKET的代表。

[0056] 图8是呈ES形式的TriNKET的代表,它是异二聚体构建体,包含两个与靶标1和靶标2结合的不同Fab片段融合到Fc。Fc中的静电引导突变确保异二聚化。

[0057] 图9是呈Fab臂交换形式的TriNKET的代表:抗体,其通过将重链和附着的轻链(半分子)与另一分子的重-轻链对交换来交换Fab片段臂,产生双特异性抗体。Fab臂交换形式

(cFae) 是异二聚体, 包含2个与靶标1和2结合的Fab片段, 以及通过异二聚化突变稳定的Fc。

[0058] 图10是呈SEED体形式的TriNKET的代表, 它是异二聚体, 包含2个与靶标1和2结合的Fab片段, 以及通过异二聚化突变稳定的Fc。

[0059] 图11是呈LuZ-Y形式的TriNKET的代表, 其中亮氨酸拉链用于诱导两种不同HC的异二聚化。LuZ-Y形式是异二聚体, 包含两个与靶标1和2结合的不同scFab, 融合到Fc。通过融合到Fc的C末端的亮氨酸拉链基序确保异二聚化。

[0060] 图12是呈Cov-X-体形式的TriNKET的代表。

[0061] 图13A和图13B是呈 $\kappa\lambda$ 体形式的TriNKET的代表, 它们是异二聚体构建体, 具有融合到通过异二聚化突变稳定的Fc的两个不同的Fab片段: 一个靶向抗原1的Fab片段包含 $\kappa$ LC, 并且靶向抗原2的第二Fab片段包含 $\lambda$ LC。图13A是一种形式的 $\kappa\lambda$ 体的示例性代表; 图13B是另一个 $\kappa\lambda$ 体的示例性代表。

[0062] 图14是OAsc-Fab异二聚体构建体的代表, 其包括与靶标1结合的Fab片段和与靶标2结合的scFab, 两者均与Fc结构域融合。Fc结构域中的突变确保了异二聚化。

[0063] 图15是DuetMab的代表, 它是异二聚体构建体, 含有两个与抗原1和2结合的不同Fab片段, 以及通过异二聚化突变稳定的Fc。Fab片段1和2包含差异S-S桥, 可确保正确的轻链和重链配对。

[0064] 图16是CrossmAb的代表, 它是异二聚体构建体, 具有两个与靶标1和2结合的不同Fab片段, 以及通过异二聚化突变稳定的Fc。CL和CH1结构域以及VH和VL结构域被交换, 例如, CH1与VL串联融合, 并且CL与VH串联融合。

[0065] 图17是Fit-Ig的代表, 它是同二聚体构建体, 其中结合抗原2的Fab片段融合到结合抗原1的Fab片段的HC的N末端。该构建体包含野生型Fc。

[0066] 图18A-图18C的线图显示衍生自hCOH-2 (图18A)、Genentech Hu9.1-73 (图18B) 以及基于伊利尤单抗的抗原结合位点 (三个版本, F3', 2-Fab和伊利尤单抗mAb, 不包含商用伊利尤单抗抗体中存在的抗体依赖性细胞毒性增强突变) (图18C) 的靶向BAFF-R的TriNKET与BAFF-R阳性RAJI细胞的结合。

[0067] 图19A-图19C的线图显示在以下的存在下原代NK细胞对BAFF-R阳性RAJI细胞的NK细胞介导的裂解: 衍生自hCOH-2 (图19A)、Genentech Hu9.1-73 (图19B) 以及基于伊利尤单抗的抗原结合位点 (三个版本, F3', 2-Fab和伊利尤单抗mAb, 不包含商用伊利尤单抗抗体中存在的抗体依赖性细胞毒性增强突变) (图19C) 的靶向BAFF-R的TriNKET。

[0068] 图20A-图20C的线图显示在以下的存在下KHYG-CD16V细胞对BAFF-R阳性RAJI细胞的NK细胞介导的裂解: 衍生自hCOH-2 (图20A)、Genentech Hu9.1-73 (图20B) 以及基于伊利尤单抗的抗原结合位点 (三个版本, F3', 2-Fab和伊利尤单抗mAb, 不包含商用伊利尤单抗抗体中存在的抗体依赖性细胞毒性增强突变) (图20C) 的靶向BAFF-R的TriNKET。

[0069] 图21的图显示通过指定抗体来自BAFF-生物素结合到在CHO细胞上表达的hBAFF-R的阻断测定的荧光输出。

[0070] 图22A-图22D是来自CHO细胞结合测定的荧光输出图, 显示指定抗体与hBAFF-R的结合 (图22A, 图22B) 或通过指定抗体使BAFF-生物素结合BAFF-R的阻断测定 (图22C, 图22D)。

[0071] 图23A-图23E是流式细胞术图, 显示在酵母上表达的AB0369scFv与无抗原对照 (图

23A)、h-BAFF-R-hFc(图23B)、无关-hFc(图23C)、hBAFF-R-GST(图23D)或无关-GST(图23E)的结合。纵轴表示通过检测Flag表位标签测量的scFv表达;横轴表示BAFF-R构建体的生物素化对照与scFv的结合,如通过检测链霉亲和素-PE所测量的。

[0072] 图24A和图24B的图显示AB0369或指定对照与人(图24A)或食蟹猴(图24B)BAFF-R的结合。

[0073] 图25A-图25G详示了具有衍生自AB0369的BAFF-R结合位点的多特异性结合蛋白的多特异性测定。图25A是该测定的示意图。图25B-图25G显示了在不存在(上分图)或存在(下分图)多特异性试剂(PSR)的情况下AB0369(左分图)、曲妥珠单抗阴性对照(中分图)或依奇珠单抗(ixekizumab)阳性对照(右分图)的图。

[0074] 图26的图显示由具有衍生自AB0369的BAFF-R结合位点的多特异性结合蛋白诱导的Ramos细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定。

[0075] 图27是显示来自结合测定的荧光输出的图,该结合测定显示了BAFF-生物素与CHO细胞上表达的人BAFF-R的结合被AB0369或指示抗体的阻断。

[0076] 图28A-图28D是流式细胞术图,其显示hBAFF-R-hFc-His与亲代AB0369scFv或选自连续几轮选择后通过在酵母上表达的亲和力成熟产生的文库的克隆的结合。图28A显示与亲代AB0369scFv的结合;图28B显示与来自第一轮克隆选择的样品的结合;图28C显示与来自第二轮克隆选择的样品的结合;图28D显示与来自第二轮克隆选择的输出的结合。

[0077] 图29A-图29E的流式细胞术图显示hBAFF-R-hFc-His与AB0369和在酵母上表达的亲和力成熟的scFv克隆的结合。图29A显示与亲代AB0369的结合;图29B显示与AB0605的结合;图29C显示与AB0622的结合;图29D显示与AB0622的结合;并且图29E显示与基于伊利尤单抗的抗原结合位点的结合。

[0078] 图30A-图30C的图展示由AB0369的亲和力成熟开发的多特异性结合蛋白的BAFF-R结合和细胞毒性。图30A的图显示具有衍生自指定克隆的BAFF-R结合位点的多特异性结合蛋白与在CHO细胞上表达的人BAFF-R的结合。图30B的图显示Ramos细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定,该细胞毒性由具有衍生自指定克隆的BAFF-R结合位点的多特异性结合蛋白诱导。图30C的图显示Ramos细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定,该细胞毒性由具有衍生自AB0622的BAFF-R结合位点的多特异性结合蛋白诱导。

[0079] 图31A-图31E详示了具有衍生自AB0605和AB0606的BAFF-R结合位点的多特异性结合蛋白的多特异性测定。图31A是该测定的示意图。图31B-图31E显示了在不存在(上分图)或存在(下分图)多特异性试剂(PSR)的情况下AB0605(左分图)或AB0606(右分图)的图。

[0080] 图32A-图32C是流式细胞术图,其显示hBAFF-R-hFc-His与亲代AB0369scFv或选自连续几轮选择后通过亲和力成熟并且在酵母上表达产生的文库的克隆的结合。图32A显示与亲代AB0369scFv的结合;图32B显示与来自第一轮克隆选择的样品的结合;图32C显示与来自第二轮克隆选择的样品的结合。

[0081] 图33A-图33E的流式细胞术图显示hBAFF-R-hFc-His与AB0369和在酵母上表达的亲和力成熟的scFv克隆的结合。图33A显示与亲代AB0369的结合;图33B显示与AB0679的结合;图33C显示与AB0681的结合;图33D显示与AB0682的结合;并且图33E显示与基于伊利尤单抗的抗原结合位点的结合。

[0082] 图34A-图34C的图展示由AB0369的亲和力成熟开发的多特异性结合蛋白的BAFF-R

结合。图34A的图显示具有衍生自指定克隆的BAFF-R结合位点的多特异性结合蛋白与在CHO细胞上表达的人BAFF-R的结合。图34B的图显示具有衍生自指定克隆的BAFF-R结合位点的多特异性结合蛋白与在CHO细胞上表达的食蟹猴BAFF-R的结合。图34C是显示来自结合测定的荧光输出的图,该结合测定显示了BAFF-生物素与CHO细胞上表达的BAFF-R的结合被指示抗体的阻断。

[0083] 图35的图显示BJAB细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定,该细胞毒性由具有衍生自AB0679、AB0568或工具-F3' 阳性对照的BAFF-R结合位点的多特异性结合蛋白诱导。

[0084] 图36A-图36D是流式细胞术图,其显示hBAFF-R-hFc-His与选自连续几轮选择后通过在酵母上表达的亲和力成熟产生的文库的亲代AB0369scFv克隆的结合。图36A显示与亲代AB0369scFv的结合;图36B显示与来自第一轮克隆选择的样品的结合;图36C显示与来自第二轮克隆选择的样品的结合;并且图36D显示与来自第三轮克隆选择的样品的结合。

[0085] 图37A-图37F的流式细胞术图显示hBAFF-R-hFc-His与AB0369和在酵母上表达的亲和力成熟的scFv克隆的结合。图37A显示与亲代AB0369的结合;图37B显示与AB0682的结合;图37C显示与AB0898的结合;图37D显示与AB0899的结合;图37E显示与AB0900的结合;并且图37F显示与基于伊利尤单抗的抗原结合位点的结合。

[0086] 图38的图显示BJAB细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定,该细胞毒性由具有衍生自AB0898、AB0899或AB0900的BAFF-R结合位点的多特异性结合蛋白诱导。

[0087] 图39A-图39C的图显示AB0898 (图39A)、AB0899 (图39B) 和AB0900 (图39C) 的差示扫描量热法(DSC)谱。

[0088] 图40的流式细胞术图显示在通过与1mM非生物素化hBAFFR-Fc孵育进行激发之前(左)和之后(右)在酵母上表达的scFv克隆与生物素化hBAFFR-Fc的结合。

[0089] 图41A和图41B的流式细胞术图显示在通过与1mM非生物素化hBAFFR-Fc孵育进行激发之前(图41A)和之后(图41B)在酵母上表达的scFv克隆与生物素化hBAFFR-Fc的结合。测试的克隆是(从左到右)AB1080、AB1081、AB1084、AB1085和伊利尤单抗。

[0090] 图42A和图42B的图显示指定抗体克隆与人(图42A)或食蟹猴(图42B)BAFF-R的结合。

[0091] 图43A-图43I详示了具有衍生自AB1080或AB1081的BAFF-R结合位点的多特异性结合蛋白的多特异性测定。图43A是该测定的示意图。图43B-图43I的图显示了在不存在(上分图)或存在(下分图)多特异性试剂(PSR)的情况下的AB1080(左分图)、AB1081(左中分图)、曲妥珠单抗阴性对照(右中分图)或依奇珠单抗阳性对照(右分图)。

[0092] 图44A和图44B的图显示与Too1阳性对照相比BJAB细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定,该细胞毒性由具有衍生自AB1080(图44A)或AB1085(图44B)的BAFF-R结合位点的多特异性结合蛋白诱导。

[0093] 图45的图显示来自指定抗体克隆对BAFF-生物素结合到在CHO细胞上表达的人BAFF-R的阻断测定的荧光输出。

[0094] 图46A-图46D的图显示了具有衍生自AB1080(图46A)、AB1081(图46B)、AB1084(图46C)和AB1085(图46D)的BAFF-R结合位点的多特异性结合蛋白的纳米双扫描荧光法(nanoDSF)分析。

[0095] 图47的图显示了具有衍生自指定抗体的BAFF-R结合位点的多特异性结合蛋白的

疏水相互作用层析(HIC)分析。

[0096] 图48的图显示了AB1612与指定基准生物制剂相比的HIC分析。

[0097] 图49A和图49B的图显示指定抗体克隆与食蟹猴(图49A)或人(图49B)BAFF-R的结合。

[0098] 图50是显示来自结合测定的荧光输出的图,该结合测定显示了BAFF-生物素与CHO细胞上表达的人BAFF-R的结合被指示抗体的阻断。

[0099] 图51A-图51C显示了AB1424/1612 F3' TriNKET的BAFF-R结合臂的表面电荷分布。显示了三个取向:两个立面(左分图:主视图;中分图:后视图)和抗原接合表面(右分图:俯视图)。带正电的区域为蓝色,带负电的区域为红色,疏水表面为白色。

[0100] 图52A-图52E的图显示对AB1424/1612 F3' TriNKET的BAFF-R结合臂的表面块和CDR长度的评估。实线和相应的箭头表示AB1424/1612 F3' TriNKET的BAFF-R结合臂参考377种晚期治疗性抗体的数据库的评分。在图52A和图52B中,两条内部虚线表示2个标准差(该区域内>95%的参考分子),而两条最外部的虚线表示3个标准差(该区域内>99.7%的参考分子)。在图52C-图52E的每个图中,存在两条虚线,一条靠近实线且另一条远离实线。靠近实线的虚线表示2个标准差(该区域内>95%的参考分子),而远离实线的虚线表示3个标准差(该区域内>99.7%的参考分子)。

[0101] 图53A-图53C显示了AB1424/1612 F3' TriNKET的NKG2D结合臂的表面电荷分布。显示了三个取向:两个立面(左分图:主视图;中分图:后视图)和抗原接合表面(右分图:俯视图)。带正电的区域为蓝色,带负电的区域为红色,疏水表面为白色。

[0102] 图54A-图54E的图显示对AB1424/1612 F3' TriNKET的NKG2D-R结合臂的表面块和CDR长度的评估。实线和相应的箭头表示AB1424/1612 F3' TriNKET的BAFF-R结合臂参考377种晚期治疗性抗体的数据库的评分。在图54A和图54B中,两条内部虚线表示2个标准差(该区域内>95%的参考分子),而两条最外部的虚线表示3个标准差(该区域内>99.7%的参考分子)。在图54C-图54E的每个图中,存在两条虚线,一条靠近实线且另一条远离实线。靠近实线的虚线表示2个标准差(该区域内>95%的参考分子),而远离实线的虚线表示3个标准差(该区域内>99.7%的参考分子)。

[0103] 图55A和图55B是显示AB1424/1612 F3' TriNKET的HIC分析的色谱图(图55A)以及与阿达木单抗和派姆单抗的比较(图55B)。

[0104] 图56的图显示AB1424/1612 F3' TriNKET的毛细管等电聚焦(cIEF)分析。

[0105] 图57A和图57B的图显示AB1424/1612 F3' TriNKET在PBS pH 7.4(图57A)和HST pH 6.0(图57B)中的DSC分析。

[0106] 图58A和图58B的图显示使用Kinexa对基于AB1424/1612F3' TriNKET结合细胞的BAFF-R进行的n曲线分析(图58A)和置信区间(图58B)。

[0107] 图59A和图59B的图显示AB1424/1612 F3' TriNKET和相应亲代mAb与等基因人(图59A)和食蟹猴(图59B)BAFF-R-CHO细胞的结合。

[0108] 图60A-图60F的图显示AB1424/1612 F3' TriNKET与BAFF-R+肿瘤细胞系的结合。在存在BJAB(图60A)、Raji(图60B)、RL(图60C)、Rs4;11(图60D)、Jeko-1(图60E)、SUDHL-6细胞(图60F)的情况下进行滴定。FOB=染色相比于未染色样品的相比背景的倍数。

[0109] 图61A-图61H的图显示AB1424/1612 F3' TriNKET与人NKG2D的表面等离子体共振

(SPR) 结合。彩色线代表原始数据,黑色迹线代表1:1结合拟合(上分图)。相应的稳态拟合(下分图)。垂直线表示稳态 $K_D$ 。

[0110] 图62A-图62H的图显示AB1424/1612 F3' TriNKET与食蟹猴NKG2D的SPR结合。彩色线代表原始数据,黑色迹线代表1:1结合拟合(上分图)。相应的稳态拟合(下分图)。垂直线表示稳态 $K_D$ 。

[0111] 图63A-图63H的图显示AB1424/1612 F3' TriNKET与人CD16a V158(上分图)或曲妥珠单抗(下分图)的SPR结合。彩色线代表原始数据,黑色迹线代表1:1结合拟合。

[0112] 图64A-图64P的图显示AB1424/1612 F3' TriNKET(上分图)或曲妥珠单抗(下分图)与人CD16a F158的SPR结合。彩色线代表原始数据,黑色迹线代表1:1结合拟合(上分图)。

[0113] 图65A-图65H的图显示AB1424/1612 F3' TriNKET与食蟹猴CD16的SPR结合。彩色线代表原始数据,黑色迹线代表1:1结合拟合(上分图)。相应的稳态拟合(下分图)。垂直线表示稳态 $K_D$ 。

[0114] 图66的图显示AB1424/1612 F3' TriNKET与NKG2D(棕色)、CD16a(紫色)或混合的CD16a和NKG2D(蓝色)表面的SPR结合。

[0115] 图67A和图67B是传感图,表示BAFF-R(800nM)的结合,然后是hNKG2D(7 $\mu$ M)与捕获的AB1424/1612 F3' TriNKET的结合(图67A)或相反顺序的靶标与人NKG2D(7 $\mu$ M)结合,然后与BAFF-R(800nM)结合(图67B)。

[0116] 图68A和图68B的图显示BAFF-R和TACI与固定化AB1424/1612 F3' TriNKET(图68A)和特异性抗TACI mAb(图68B)结合的SPR分析。

[0117] 图69A和图69B的图显示AB1424/1612 F3' TriNKET与不表达BCMA的亲代细胞(图69A)和等基因BCMA+细胞的结合与对照mAb特异性抗BCMA(图69B)相比较。

[0118] 图70A和图70B的图显示AB1424/1612 F3' TriNKET与等基因BAFFR+CHO细胞结合(图70A)和与亲代CHO细胞系缺乏反应性(图70B)。

[0119] 图71A-图71G详示了AB1424/1612 F3' TriNKET的多特异性测定。图71A是该测定的示意图。图71B-图71G的图显示了在不存在(上分图)或存在(下分图)多特异性试剂(PSR)的情况下的AB1424/1612F3' TriNKET(左分图)、曲妥珠单抗阴性对照(中分图)或依奇珠单抗阳性对照(右分图)。

[0120] 图72A-图72C的图显示使用来自三个供体的NK细胞由AB1424/1612 F3' TriNKET(蓝色)或亲代单克隆抗体(红色)诱导的RL细胞的细胞毒性测定。

[0121] 图73A-图73D显示了AB1424/1612 F3' TriNKET的示意图和用于阐明作用机制的对照。

[0122] 图74的图显示了由AB1424/1612 F3' TriNKET(蓝色)、缺乏NKG2D结合的AB1424/1612 F3' TriNKET(黑色)或AB1424/1612 F3' TriNKET-Fc沉默(红色)或帕利珠单抗F3' TriNKET(灰色)诱导的BJAB细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定。

[0123] 图75A-图75H的传感图显示AB1424/1612 F3' TriNKET(上分图)和曲妥珠单抗(下分图)与人CD64的结合。原始传感图(彩色)与1:1拟合曲线叠加(黑色)。

[0124] 图76A-图76H的传感图显示AB1424/1612 F3' TriNKET(上分图)和曲妥珠单抗(下分图)与食蟹猴CD64的结合。原始传感图(彩色)与1:1拟合曲线叠加(黑色)。

[0125] 图77A-图77P的传感图显示AB1424/1612 F3' TriNKET(图77A-图77H)和曲妥珠单

抗(图77I-图77P)与人CD32a H131的结合。对于每个分子,上分图代表原始传感图,下分图代表稳态亲和拟合。

[0126] 图78A-图78P的传感图显示AB1424/1612 F3' TriNKET(图78A-图78H)和曲妥珠单抗(图78I-图78P)与人CD32a R131的结合。对于每个分子,上分图代表原始传感图,下分图代表稳态亲和拟合。

[0127] 图79A-图79P的传感图显示AB1424/1612 F3' TriNKET(图79A-图79H)和曲妥珠单抗(图79I-图79P)与人CD32b的结合。对于每个分子,上分图代表原始传感图,下分图代表稳态亲和拟合。

[0128] 图80A-图80P的传感图显示AB1424/1612 F3' TriNKET(图80A-图80H)和曲妥珠单抗(图80I-图80P)与人CD16b的结合。对于每个分子,上分图代表原始传感图,下分图代表稳态亲和拟合。

[0129] 图81A-图81H的传感图显示AB1424/1612 F3' TriNKET(上分图)和曲妥珠单抗(下分图)与食蟹猴CD16的结合。

[0130] 图82A-图82P的传感图显示AB1424/1612 F3' TriNKET(图82A-图82H)和曲妥珠单抗(图82I-图82P)在pH 6.0与人FcRn的结合。对于每个分子,上分图代表原始传感图,下分图代表稳态亲和拟合。

[0131] 图83A-图83P的传感图显示AB1424/1612 F3' TriNKET(图83A-图83H)和曲妥珠单抗(图83I-图83P)在pH 6.0与食蟹猴FcRn的结合。对于每个分子,上分图代表原始传感图,下分图代表稳态亲和拟合。

[0132] 图84A-图84H是原始传感图,显示AB1424/1612 F3' TriNKET(上分图)和曲妥珠单抗(下分图)在pH 7.4与人(左分图)和食蟹猴(右分图)FcRn的结合。

[0133] 图85的图显示了由两批AB1424/1612 F3' TriNKET(蓝色和红色)或人IgG1k(灰色)诱导的BJAB细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定。

[0134] 图86A的图显示了由两批AB1424/1612 F3' TriNKET(蓝色和红色)或人IgG1k(灰色)诱导的BJAB细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定。

[0135] 图86B的图显示了由AB1424/1612 F3' TriNKET在50% (红色)、100% (蓝色)和200% (绿色)的标称药物浓度(NDC)下诱导的BJAB细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定。

[0136] 图87A和图87B显示AB1424/1612 F3' TriNKET在组氨酸(图87A)和乙酸盐(图87B)中的PEG沉淀 $C_m$ 图。

[0137] 图88A和图88B显示阿达木单抗在组氨酸(图88A)和乙酸盐(图88B)中的PEG沉淀 $C_m$ 图。

[0138] 图89A-图89C显示阿达木单抗在乙酸盐(图89A)、组氨酸(图89B)和磷酸盐(图89C)中的 $k_p$ 图。

[0139] 图90A-图90C显示AB1424/1612 F3' TriNKET在乙酸盐(图90A)、组氨酸(图90B)和磷酸盐(图90C)中的 $k_p$ 图。

[0140] 图91是AB1424/1612 F3' TriNKET在25°C时的粘度相比于浓度。

[0141] 图92是AB1424/1612 F3' TriNKET在40°C在HST中在pH6.0 4周后与对照相比的尺寸排阻色谱(SEC)分析的色谱图。

[0142] 图93的图显示AB1424/1612 F3' TriNKET在40°C在HST中在pH 6.0 4周后与对照相

比的毛细管电泳十二烷基硫酸钠(CE-SDS)分析。

[0143] 图94的图显示AB1424/1612 F3' TriNKET在HST中在pH 6.0与对照相比的cIEF分析。

[0144] 图95A-图95C显示与对照相比,在40°C在HST中在pH 6.04周后AB1424/1612 F3' TriNKET与hBAFF-R、hNKG2D和hCD16aV的结合。图95A的图显示与BJAB细胞(BAFF-R)的结合;图95B的传感图通过SPR显示与hNKG2D的结合。图95C的传感图通过SPR显示与hCD16aV158的结合。彩色传感图代表原始数据,黑色叠加图代表原始数据的动力学拟合。

[0145] 图96的图显示了与对照(蓝色)相比在40°C在HST中在pH 6.0 1周(红色)、2周(绿色)、3周(紫色)后由AB1424/1612 F3' TriNKET诱导的BJAB细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定。

[0146] 图97A-图97C显示了AB1424/1612 F4 TriNKET的BAFF-R结合臂的表面电荷分布。显示了三个取向:两个立面(左分图:主视图;中分图:后视图)和抗原接合表面(右分图:俯视图)。带正电的区域为蓝色,带负电的区域为红色,疏水表面为白色。

[0147] 图98A-图98E的图显示对AB1424/1612 F4 TriNKET的BAFF-R结合臂的表面块和CDR长度的评估。实线和相应的箭头表示AB1424/1612 F4 TriNKET的BAFF-R结合臂参考377种晚期治疗性抗体的数据库的评分。在图98A和图98B中,两条内部虚线表示2个标准差(该区域内>95%的参考分子),而两条最外部的虚线表示3个标准差(该区域内>99.7%的参考分子)。在图98C-图98E的每个图中,存在两条虚线,一条靠近实线且另一条远离实线。靠近实线的虚线表示2个标准差(该区域内>95%的参考分子),而远离实线的虚线表示3个标准差(该区域内>99.7%的参考分子)。

[0148] 图99A-图99C显示了AB1424/1612 F4 TriNKET的NKG2D结合臂的表面电荷分布。显示了三个取向:两个立面(左分图:主视图;中分图:后视图)和抗原接合表面(右分图:俯视图)。带正电的区域为蓝色,带负电的区域为红色,疏水表面为白色。

[0149] 图100A-图100E的图显示对AB1424/1612 F4 TriNKET的NKG2D-R结合臂的表面块和CDR长度的评估。实线和相应的箭头表示AB1424/1612 F3' TriNKET的BAFF-R结合臂参考377种晚期治疗性抗体的数据库的评分。在图100A和图100B中,两条内部虚线表示2个标准差(该区域内>95%的参考分子),而两条最外部的虚线表示3个标准差(该区域内>99.7%的参考分子)。在图100C-图100E的每个图中,存在两条虚线,一条靠近实线且另一条远离实线。靠近实线的虚线表示2个标准差(该区域内>95%的参考分子),而远离实线的虚线表示3个标准差(该区域内>99.7%的参考分子)。

[0150] 图101A-图101C是第三批AB1424/1612 F4 TriNKET的SEC分析色谱图。

[0151] 图102的图显示第三批AB1424/1612 F4 TriNKET的cIEF分析。

[0152] 图103A和图103B。图103A的图显示AB1424/1612 F4 TriNKET与指定基准商用抗体相比的HIC分析。图103B的图显示通过DSC对AB1424/1612 F4 TriNKET的热稳定性分析。

[0153] 图104A和图104B显示了Fc(未还原和还原)中经工程改造的二硫化物对的提取离子色谱图(XIC)以及该肽对的最强电荷状态。

[0154] 图105A和图105B显示了scFv(未还原和还原)中经工程改造的二硫化物对的XIC以及该肽对的最强电荷状态。

[0155] 图106A和图106B的图显示AB1424/1612 F4 TriNKET、亲代mAb和F4-帕利珠单抗与

人(图106A)和食蟹猴(图106B)BAFF-R+等基因CHO细胞的结合。

[0156] 图107A-图107L是AB1424/1612 F4 TriNKET与人NKG2D的SPR结合的传感图。

[0157] 图108A-图108P的传感图显示AB1424/1612 F4 TriNKET(图108A-图108H)和曲妥珠单抗(图108I-图108P)与人CD32a R131的结合。对于每个分子,上分图代表原始传感图,下分图代表稳态亲和拟合。

[0158] 图109A-图109H的传感图显示AB1424/1612 F4 TriNKET(上分图)和曲妥珠单抗(下分图)与人CD16a V158的结合。对于每个分子,上分图代表原始传感图,下分图代表稳态亲和拟合。

[0159] 图110A-图110H的传感图显示AB1424/1612 F4 TriNKET(上分图)和曲妥珠单抗(下分图)与人CD16a V158的结合。对于每个分子,上分图代表原始传感图,下分图代表稳态亲和拟合。

[0160] 图111A-图111H的传感图显示AB1424/1612 F4 TriNKET(上分图)和曲妥珠单抗(下分图)与人CD64的结合。原始传感图(彩色)与1:1拟合曲线叠加(黑色)。

[0161] 图112A-图112H的传感图显示AB1424/1612 F4 TriNKET(上分图)和曲妥珠单抗(下分图)与食蟹猴CD64的结合。原始传感图(彩色)与1:1拟合曲线叠加(黑色)。

[0162] 图113A-图113P的传感图显示AB1424/1612 F4 TriNKET(图113A-图113H)和曲妥珠单抗(图113I-图113P)与人CD32a H131的结合。对于每个分子,上分图代表原始传感图,下分图代表稳态亲和拟合。

[0163] 图114A-图114P的传感图显示AB1424/1612 F4 TriNKET(图114A-图114H)和曲妥珠单抗(图114I-图114P)与人CD32b的结合。对于每个分子,上分图代表原始传感图,下分图代表稳态亲和拟合。

[0164] 图115A-图115P的传感图显示AB1424/1612 F4 TriNKET(图115A-图115H)和曲妥珠单抗(图115I-图115P)与人CD16b的结合。对于每个分子,上分图代表原始传感图,下分图代表稳态亲和拟合。

[0165] 图116A-图116P的传感图显示AB1424/1612 F4 TriNKET(图116A-图116H)和曲妥珠单抗(图116I-图116P)在pH 6.0与人FcRn的结合。对于每个分子,上分图代表原始传感图,下分图代表稳态亲和拟合。

[0166] 图117A-图117P的传感图显示AB1424/1612 F4 TriNKET(图117A-图117H)和曲妥珠单抗(图117I-图117P)在pH 6.0与食蟹猴FcRn的结合。对于每个分子,上分图代表原始传感图,下分图代表稳态亲和拟合。

[0167] 图118A-图118H是原始传感图,显示AB1424/1612 F4 TriNKET(上分图)和曲妥珠单抗(下分图)在pH 7.4与人(左分图)和食蟹猴(右分图)FcRn的结合。

[0168] 图119的图显示AB1424/1612 F4 TriNKET与NKG2D(棕色)、CD16a(紫色)或混合的CD16a和NKG2D(蓝色)表面的SPR结合。

[0169] 图120A和图120B的图显示AB1424/1612 F4 TriNKET对BAFF-R和NKG2D的顺序饱和。

[0170] 图121A-图121I详示了AB1424/1612 F4 TriNKET的多特异性测定。图121A是该测定的示意图。图121B-图121I的图显示了在不存在(上分图)或存在(下分图)多特异性试剂(PSR)的情况下的AB1424/1612 F4 TriNKET(左分图)、曲妥珠单抗(中左分图)、利妥昔单抗

(中右分图)或依奇珠单抗(右分图)。

[0171] 图122图显示了由AB1424/1612 F4 TriNKET(蓝色)和人IgG1k(灰色)诱导的BJAB细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定。

[0172] 图123的图显示了由AB1424/1612 F4 TriNKET(蓝色)和亲代mAb(红色)诱导的BJAB细胞的静息hNK诱导细胞毒性测定。

[0173] 图124是AB1424/1612 F4 TriNKET在40°C在HST中在pH6.0 4周后与对照相比的SEC分析的色谱图。

[0174] 图125的图显示AB1424/1612 F4 TriNKET在40°C在HST中在pH 6.0 4周后与对照相比的还原型CE-SDS分析。

[0175] 图126的图显示AB1424/1612 F4 TriNKET在40°C在HST中在pH 6.0 4周后与对照相比的cIEF分析。

[0176] 图127的图显示在40°C在HST中在pH 6.0 4周后与对照相比AB1424/1612 F4 TriNKET与hBAFF-R+细胞的结合。

[0177] 图128A和图128B的传感图显示与对照(图128A)相比,在40°C在HST中在pH 6.0 4周后hCD16aV与AB1424/1612 F4 TriNKET的SPR结合(图128B)。

[0178] 图129的图显示与对照(蓝色)相比,在40°C在HST中在pH 6.0 4周后AB1424/1612 F4 TriNKET诱导的BJAB细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定(红色)。

[0179] 图130是AB1424/1612 F4 TriNKET在强制氧化后与对照相比的SEC分析的色谱图。

[0180] 图131的图显示AB1424/1612 F4 TriNKET在强制氧化后与对照相比的还原型CE-SDS分析。

[0181] 图132的图显示AB1424/1612 F4 TriNKET在强制氧化后与hBAFF-R+细胞结合。

[0182] 图133A和图133B的传感图显示hCD16aV与AB1424/1612 F4 TriNKET对照(图133A)和强制氧化后(图133B)的SPR结合。

[0183] 图134是由AB1424/1612 F4 TriNKET在强制氧化后(红色)和由对照(蓝色)诱导的BJAB细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定。

[0184] 图135是AB1424/1612 F4 TriNKET在长期低pH应激后与对照相比的SEC分析的色谱图。

[0185] 图136的图显示AB1424/1612 F4 TriNKET在长期低pH应激后与对照相比的还原型CE-SDS分析。

[0186] 图137的图显示AB1424/1612 F4 TriNKET在长期低pH应激后与对照相比的cIEF分析。

[0187] 图138的图显示在长期低pH应激后与对照相比AB1424/1612 F4 TriNKET与hBAFF-R+细胞的结合。

[0188] 图139A和图139B的传感图显示与对照(图139A)相比,在长期低pH应激后hCD16aV与AB1424/1612 F4 TriNKET的SPR结合(图139B)。

[0189] 图140是由AB1424/1612 F4 TriNKET在长期低pH应激后(红色)和由对照(蓝色)诱导的BJAB细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定。

[0190] 图141是AB1424/1612 F4 TriNKET在长期高pH应激后与对照相比的SEC分析的色谱图。

[0191] 图142的图显示AB1424/1612 F4 TriNKET在长期高pH应激后与对照相比的还原型CE-SDS分析。

[0192] 图143的图显示AB1424/1612 F4 TriNKET在长期高pH应激后与对照相比的cIEF分析。

[0193] 图144的图显示与对照(蓝色)相比在长期高pH应激后AB1424/1612 F4 TriNKET与hBAFF-R+细胞的结合(红色)。

[0194] 图145A和图145B的传感图显示与对照(图145A)相比,在长期高pH应激后hCD16aV与AB1424/1612 F4 TriNKET的SPR结合(图145B)。

[0195] 图146是由AB1424/1612 F4 TriNKET在长期高pH应激后(红色)和由对照(蓝色)诱导的BJAB细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定。

[0196] 图147是AB1424/1612 F4 TriNKET在6次冷冻/解冻循环后与对照相比的SEC分析的色谱图。

[0197] 图148的图显示与AB1424/1612 F4 TriNKET在6次冷冻/解冻循环后对照相比的还原型CE-SDS分析。

[0198] 图149的图显示与对照(蓝色)相比在6次冷冻/解冻循环后AB1424/1612 F4 TriNKET与hBAFF-R+细胞的结合(红色)。

[0199] 图150是由AB1424/1612 F4 TriNKET在6次冷冻/解冻循环后(红色)和由对照(蓝色)诱导的BJAB细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定。

[0200] 图151是AB1424/1612 F4 TriNKET在搅拌应激后与对照相比的SEC分析的色谱图。

[0201] 图152的图显示与AB1424/1612 F4 TriNKET在搅拌应激后对照相比的还原型CE-SDS分析。

[0202] 图153的图显示与对照(蓝色)相比在搅拌应激后AB1424/1612 F4 TriNKET与hBAFF-R+细胞的结合(红色)。

[0203] 图154是由AB1424/1612 F4 TriNKET在搅拌应激后(红色)和由对照(蓝色)诱导的BJAB细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定。

[0204] 图155A和图155B的色谱图显示在低pH保持前(图155A)和后(图155B)AB1424/1612 F4 TriNKET蛋白A洗脱物的SEC分析。

[0205] 图156的图显示AB1424/1612 F4 TriNKET在低pH保持后与对照相比的cIEF分析。

[0206] 图157的图显示与AB1424/1612 F4 TriNKET在低pH保持后对照相比的还原型CE-SDS分析。

[0207] 图158的图显示与对照(红色)相比在低pH保持后AB1424/1612 F4 TriNKET与hBAFF-R+细胞的结合(蓝色)。

[0208] 图159是由AB1424/1612 F4 TriNKET在低pH保持后(蓝色)和由对照(红色)诱导的BJAB细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定。

[0209] 图160A和图160B的图显示AB1424/1612 F3' TriNKET(蓝色)、AB1424/1612 F4 TriNKET(红色)和亲代mAb(黑色)与KHYG-1(图160A)和KHYG-1-CD16V(图160B)细胞系的结合。

[0210] 图161A和图161B的图显示BAFF-R在暴露于AB1424/1612 F3' TriNKET(蓝色)、AB1424/1612 F4 TriNKET(红色)和亲代mAb(黑色)(图161A)以及用IL-2激活(图161B)的RL

细胞上的表面保留百分比。

[0211] 图162的图显示BAFF-R在暴露于AB1424/1612 F3' TriNKET (蓝色)、AB1424/1612 F4 TriNKET (红色) 和亲代mAb (黑色) 的Raji细胞上的表面保留百分比。

[0212] 图163的图显示RL细胞在与AB1424/1612 F3' TriNKET (蓝色)、AB1424/1612 F4 TriNKET (红色)、亲代mAb (黑色) 和人IgG1k (灰色) 孵育后的静息人NK细胞诱导细胞毒性测定。

[0213] 图164A和图164B的图是RL细胞在与AB1424/1612 F3' TriNKET (蓝色)、AB1424/1612 F4 TriNKET (红色)、F3'对照 (黑色) 和F4对照 (灰色) 孵育后的静息人NK细胞诱导细胞毒性测定。细胞与对照 (图164A) 或IL-2 (图164B) 共培养。

[0214] 图165的图显示了由AB1424/1612 F3' TriNKET (蓝色)、缺乏NKG2D结合的AB1424/1612 F3' TriNKET (黑色) 或AB1424/1612 F3' TriNKET-Fc沉默 (红色) 或帕利珠单抗F3' TriNKET (灰色) 诱导的BJAB细胞的KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定。

[0215] 图166的图显示了由AB1424/1612 F3' TriNKET (蓝色)、缺乏NKG2D结合的AB1424/1612 F3' TriNKET (黑色) 或AB1424/1612 F3' TriNKET-Fc沉默 (红色) 或帕利珠单抗F3' TriNKET (灰色) 诱导的BJAB细胞的静息人NK细胞诱导细胞毒性测定。

[0216] 图167的图显示RL细胞在与AB1424/1612 F3' TriNKET (蓝色)、AB1424/1612 F4 TriNKET (红色)、AB1424/1612 F3' TriNKET加可溶性MICA (黑色) 和AB1424/1612 F4 TriNKET加可溶性MICA (灰色) 孵育后的静息人NK细胞诱导细胞毒性测定。

[0217] 图168的图显示RL细胞在与AB1424/1612 F3' TriNKET (蓝色)、AB1424/1612 F4 TriNKET (红色)、AB1424/1612 F3' TriNKET加BAFF (黑色) 和AB1424/1612 F4 TriNKET加BAFF (灰色) 孵育后的静息人NK细胞诱导细胞毒性测定。

[0218] 图169的图显示BJAB细胞在与AB1424/1612 F3' TriNKET (蓝色)、AB1424/1612 F4 TriNKET (红色)、亲代mAb (黑色)、F3'-帕利珠单抗 (浅灰色) 和F4-帕利珠单抗 (深灰色) 孵育后的干扰素 $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) 和CD107a的产生。

[0219] 图170的图显示与AB1424/1612 F3' TriNKET (蓝色)、AB1424/1612 F4 TriNKET (红色)、亲代mAb (黑色) 和Fc沉默的AB1424/1612 F3' TriNKET (粉红色) 孵育后M0巨噬细胞吞噬BJAB细胞。

[0220] 图171的图显示Raji细胞在与利妥昔单抗 (黑色)、AB1424/1612 F3' TriNKET (蓝色) 或AB1424/1612 F3' TriNKET孵育后的人血清诱导细胞毒性测定。

[0221] 图172A-图172E的直方图显示AB1424/1612 F3' TriNKET (蓝色) 和F3'-帕利珠单抗 (红色) 与PBMC中指定BAFF-R+细胞结合的流式细胞术分析。

[0222] 图173A-图173F的直方图显示AB1424/1612 F3' TriNKET (蓝色) 和F3'-帕利珠单抗 (红色) 与人血液中指定细胞类型结合的流式细胞术分析。

[0223] 图174A-图174C的直方图显示AB1424/1612 F3' TriNKET (蓝色) 和F3'-帕利珠单抗 (红色) 与人红细胞结合的流式细胞术分析。

[0224] 图175A-图175F的图显示 (从左到右) AB1424/1612 F3' TriNKET、F3'-帕利珠单抗、AB1424/1612 F4 TriNKET、F4-帕利珠单抗和利妥昔单抗与指定人供体PBMC结合的流式细胞术分析。

[0225] 图176A-图176F的直方图显示AB1424/1612 F3' TriNKET (蓝色) 和F3'-帕利珠单抗

(红色)与来自食蟹猴全血供体CYN317060的指定PBMC结合的流式细胞术分析。

[0226] 图177A-图177F的图显示(从左到右)AB1424/1612 F3' TriNKET、F3'-帕利珠单抗、AB1424/1612 F4 TriNKET、F4-帕利珠单抗和利妥昔单抗与指定人供体PBMC结合的流式细胞术分析。

[0227] 图178的图显示BJAB细胞与来自食蟹猴全血供体CYN317060的PBMC的共培养物中CD16+CD8+NK细胞的CD107a阳性。

### 具体实施方式

[0228] 本申请提供了结合自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体以及癌细胞或B细胞上的BAFF-R的多特异性结合蛋白。在一些实施例中,多特异性蛋白进一步包括结合BAFF-R的另外的抗原结合位点。本申请还提供包含这些多特异性结合蛋白的药物组合物及使用这些多特异性蛋白和药物组合物的治疗方法,用于例如治疗自身免疫性疾病和癌症的目的。本申请中描述的多特异性结合蛋白的各个方面在以下部分中阐述;然而,一个特定部分中描述的多特异性结合蛋白的方面不限于任何特定部分。

[0229] 为了促进对本申请的理解,下面定义了许多术语和短语。

[0230] 如本文所用的术语“一个(a)”/“一种(an)”和“该(the)”意指“一个或多个”,并且包括复数,除非上下文是不适当的。

[0231] 如本文所用,术语“抗原结合位点”是指免疫球蛋白分子中参与抗原结合的部分。在人抗体中,抗原结合位点由重链(“H”)和轻链(“L”)的N末端可变区(“V”)的氨基酸残基形成。重链和轻链V区内的三个高度不同的延伸段称为“高变区”,它们介于更保守的称为“框架区”或“FR”的侧翼延伸段之间。因此,术语“FR”是指天然存在于免疫球蛋白高变区之间和附近的氨基酸序列。在人抗体分子中,轻链的三个高变区和重链的三个高变区在三维空间中相对彼此布置以形成抗原结合表面。抗原结合表面与结合抗原的三维表面互补,每条重链和轻链的三个高变区称为“互补决定区”或“CDR”。在某些动物中,例如骆驼和软骨鱼,抗原结合位点由提供“单结构域抗体”的单抗体链形成。抗原结合位点可以存在于完整抗体中、在保留抗原结合表面的抗体的抗原结合片段中,或在重组多肽如scFv中,其中在单个多肽中使用肽接头将重链可变结构域连接到轻链可变结构域。

[0232] 本文所用的术语“肿瘤相关抗原”是指与癌症相关的任何抗原,包括但不限于蛋白、糖蛋白、神经节苷脂、碳水化合物或脂质。这样的抗原可以在恶性细胞或肿瘤微环境中表达,例如肿瘤相关血管、细胞外基质、间充质基质或免疫浸润。在本披露的某些实施例中,术语“肿瘤相关抗原”是指BAFF-R,其被本披露的多特异性结合蛋白中存在的第二和/或另外的抗原结合位点靶向。然而,据了解,BAFF-R也可能与非肿瘤或癌症的疾病和障碍相关。

[0233] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”是指将通过本文所述的方法和组合物治疗的生物体。这样的生物体优选包括但不限于哺乳动物(例如鼠、猴、马科、牛科、猪、犬、猫等),并且,更优选包括人。

[0234] 如本文所用,术语“有效量”是指足以实现有益或期望结果的化合物(例如本申请的化合物)。有效量可以在一个或多个施用、应用或剂量来进行施用,并且不旨在限于特定的制品或施用途径。如本文所用,术语“治疗”包括任何作用,例如减轻、减少、调节、改善或消除,导致病症、疾病、障碍等的改善,或改善了其症状。

[0235] 如本文所用,术语“药物组合物”是指活性剂与载剂(惰性的或活性的)的组合,使得该组合物尤其适合体内或离体的诊断或治疗用途。

[0236] 如本文所用,术语“药学上可接受的载剂”是指任何标准药用载剂,例如磷酸盐缓冲盐溶液、水、乳液(例如,例如油/水或水/油乳液)和各种类型的润湿剂。组合物还可以包括稳定剂和防腐剂。对于载剂、稳定剂、和辅助剂的实例,参见例如Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences [雷明顿药物科学],第15版, Mack Publ. Co. [麦克出版公司], 伊斯顿,宾夕法尼亚州[1975]。

[0237] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指本申请中描述的化合物的任何药学上可接受的盐(例如酸或碱),当给予受试者时,其能够提供本申请中描述的化合物或其活性代谢物或残余物。如本领域的技术人员已知的,本申请中描述的化合物的“盐”可以源自无机的或有机的酸和碱。示例性酸包括但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、高氯酸、富马酸、马来酸、磷酸、乙醇酸、乳酸、水杨酸、丁二酸、对甲苯磺酸、酒石酸、乙酸、柠檬酸、甲磺酸、乙磺酸、甲酸、苯甲酸、丙二酸、萘-2-磺酸、苯磺酸、等。其他酸,例如草酸,虽然其自身不是药学上可接受的,但可以用作获得本申请中描述的化合物及其药学上可接受的酸加成盐的中间体来在盐的制备中采用。

[0238] 示例性碱包括但不限于碱金属(例如钠)氢氧化物、碱土金属(例如镁)氢氧化物、氨、以及具有式 $NW_4^+$ 的化合物,其中W是 $C_{1-4}$ 烷基等。

[0239] 示例性的盐包括但不限于:乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、氟庚酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘化物、2-羟基-乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、草酸盐、双羟萘酸盐(palmoate)、果胶酸盐(pectinate)、过硫酸盐、苯基丙酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐等。盐的其他实例包括与适合的阳离子(例如 $Na^+$ 、 $NH_4^+$ 、和 $NW_4^+$ (其中W是 $C_{1-4}$ 烷基基团))等复合的本申请中描述的化合物的阴离子。

[0240] 对于治疗用途,将本申请中描述的化合物考虑为是药学上可接受的。然而,非药学上可接受的酸和碱的盐也可以找到用途,例如在药学上可接受的化合物的制备或纯化方面。

[0241] 如本文所用,BAFF-R(也称为BAFF受体、B细胞激活因子

受体、BR3、TNFRSF13C、肿瘤坏死因子受体超家族成员13C、TNF受体超家族成员13C、CD268和BLYS受体3)是指Uniprot登录号Q96RJ3的蛋白及相关同种型和直系同源物。

[0242] 在整个说明书中,在组合物被描述为具有、包括或包含具体化合物的情况下,或在工艺和方法被描述为具有、包括、或包含具体步骤的情况下,考虑到另外地,存在本申请中描述的组合物,其基本上由或由叙述的化合物组成,并且存在根据本申请的工艺和方法,其基本上由或由叙述的加工步骤组成。

[0243] 一般而言,除非另有说明,否则指定百分比的组合物均按重量计。另外,如果变量未附带定义,则以该变量之前的定义为准。

#### I. 蛋白

[0244] 本申请提供了结合自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体以及癌细胞上的

BAFF-R的多特异性结合蛋白。多特异性结合蛋白可用于本文所述的药物组合物 and 治疗方法中。多特异性结合蛋白与自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体的结合增强了自然杀伤细胞破坏表达BAFF-R抗原的肿瘤细胞的活性。多特异性结合蛋白与表达BAFF-R的细胞的结合使癌细胞接近自然杀伤细胞,这促进了自然杀伤细胞对肿瘤细胞的直接和间接破坏。结合NKG2D、CD16和另一靶标的多特异性结合蛋白披露于国际申请公开号WO 2018148445和国际申请公开号WO 2019157366中,其未通过引用并入本文。下面提供了一些示例性多特异性结合蛋白的进一步描述。

[0245] 多特异性结合蛋白的第一组分是与表达NKG2D受体的细胞结合的抗原结合位点,这些表达NKG2D受体的细胞可包括但不限于NK细胞、 $\gamma\delta$ T细胞和CD8<sup>+</sup> $\alpha\beta$ T细胞。在NKG2D结合后,多特异性结合蛋白可能会阻止天然配体(例如ULBP6和MICA)与NKG2D结合并激活NK细胞。

[0246] 多特异性结合蛋白的第二组分是与BAFF-R结合的抗原结合位点。表达BAFF-R的细胞可以例如在以下中发现:B细胞非霍奇金淋巴瘤(B-NHL)、例如慢性淋巴细胞白血病(CLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B-细胞淋巴瘤(DLBCL)、边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL);和自身免疫性炎性疾病。

[0247] 多特异性结合蛋白的第三组分是抗体Fc结构域或其一部分,或与表达CD16的细胞结合的抗原结合位点,CD16是白细胞表面的Fc受体,白细胞包括自然杀伤细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞和滤泡树突细胞。

[0248] 多特异性结合蛋白的另外的抗原结合位点可以结合BAFF-R。在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点是scFv,并且结合BAFF-R的第二抗原结合位点和另外的抗原结合位点各自是Fab片段。在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点是scFv,并且结合BAFF-R的第二抗原结合位点和另外的抗原结合位点各自是scFv。在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点是Fab片段,并且结合BAFF-R的第二抗原结合位点和另外的抗原结合位点各自是scFv。在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点是Fab,并且结合BAFF-R的第二抗原结合位点和另外的抗原结合位点各自是Fab片段。

[0249] 本文所述的多特异性结合蛋白可以采用多种形式。例如,一种形式是异二聚体多特异性抗体,其包括第一免疫球蛋白重链、第一免疫球蛋白轻链、第二免疫球蛋白重链和第二免疫球蛋白轻链(图1)。第一免疫球蛋白重链包括第一Fc(铰链-CH2-CH3)结构域、第一重链可变结构域和任选的第一CH1重链结构域。第一免疫球蛋白轻链包括第一轻链可变结构域和任选的第一轻链恒定结构域。第一免疫球蛋白轻链与第一免疫球蛋白重链一起形成结合NKG2D的抗原结合位点。第二免疫球蛋白重链包含第二Fc(铰链-CH2-CH3)结构域、第二重链可变结构域和任选的第二CH1重链结构域。第二免疫球蛋白轻链包括第二轻链可变结构域和任选的第二轻链恒定结构域。第二条免疫球蛋白轻链与第二条免疫球蛋白重链一起形成结合BAFF-R的抗原结合位点。在一些实施例中,第一Fc结构域和第二Fc结构域一起能够结合CD16(图1)。在一些实施例中,第一免疫球蛋白轻链与第二免疫球蛋白轻链相同。

[0250] 抗原结合位点可以各自掺入抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域(例如,如在抗体中排列,或融合在一起形成scFv),或一个或多个抗原结合位点可以是单结构域抗体,例如像骆驼科动物抗体那样的V<sub>H</sub>抗体或像在软骨鱼中发现的抗体那样的V<sub>NAR</sub>抗体。

[0251] 在一些实施例中,第二抗原结合位点掺入具有与存在于第一抗原结合位点中的轻链可变结构域的氨基酸序列相同的氨基酸序列的轻链可变结构域。

[0252] 另一种示例性形式涉及异二聚体多特异性抗体,其包括第一免疫球蛋白重链、第二免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链(例如,图2A)。在一些实施例中,第一免疫球蛋白重链包括第一Fc(铰链-CH2-CH3)结构域,其通过接头或抗体铰链与由重链可变结构域和轻链可变结构域构成的单链可变片段(scFv)融合,该重链可变结构域和该轻链可变结构域配对并结合NKG2D,或结合BAFF-R。在一些实施例中,第二免疫球蛋白重链包括第二Fc(铰链-CH2-CH3)结构域、第二重链可变结构域和CH1重链结构域。免疫球蛋白轻链包括轻链可变结构域和轻链恒定结构域。在一些实施例中,第二免疫球蛋白重链与免疫球蛋白轻链配对并结合NKG2D或结合BAFF-R,条件是当第一Fc结构域融合到结合NKG2D的scFv时,与免疫球蛋白轻链配对的第二免疫球蛋白重链结合BAFF-R但不结合NKG2D,反之亦然。在一些实施例中,第一免疫球蛋白重链中的scFv结合BAFF-R;并且第二免疫球蛋白重链中的重链可变结构域和免疫球蛋白轻链中的轻链可变结构域在配对时结合NKG2D(例如,图2E)。在一些实施例中,第一免疫球蛋白重链中的scFv结合NKG2D;并且第二免疫球蛋白重链中的重链可变结构域和免疫球蛋白轻链中的轻链可变结构域配对时结合BAFF-R。在一些实施例中,第一Fc结构域和第二Fc结构域一起能够结合CD16(例如,图2A)。在一些实施例中,第一Fc结构域和第二Fc结构域一起能够结合CD16(例如,图2A)。

[0253] 另一种示例性形式涉及异二聚体多特异性抗体,其包括第一免疫球蛋白重链和第二免疫球蛋白重链(例如,图2B)。在一些实施例中,第一免疫球蛋白重链包括第一Fc(铰链-CH2-CH3)结构域,其通过接头或抗体铰链与由重链可变结构域和轻链可变结构域构成的单链可变片段(scFv)融合,该重链可变结构域和该轻链可变结构域配对并结合NKG2D,或结合BAFF-R。在一些实施例中,第二免疫球蛋白重链包括第二Fc(铰链-CH2-CH3)结构域,其通过接头或抗体铰链与由重链可变结构域和轻链可变结构域构成的单链可变片段(scFv)融合,该重链可变结构域和该轻链可变结构域配对并结合NKG2D,或结合BAFF-R,条件是当第一Fc结构域与结合NKG2D的scFv融合时,与scFv融合的第二Fc结构域结合BAFF-R但不结合NKG2D,反之亦然。在一些实施例中,第一Fc结构域和第二Fc结构域一起能够结合CD16(例如,图2B)。

[0254] 在一些实施例中,上述单链可变片段(scFv)通过铰链序列连接至抗体恒定结构域。在一些实施例中,铰链包含氨基酸Ala-Ser或Gly-Ser。在一些实施例中,铰链包含氨基酸Ala-Ser或Gly-Ser。在一些实施例中,连接scFv(例如,结合NKG2D的scFv或结合BAFF-R的scFv)和抗体重链恒定结构域的铰链包含氨基酸Ala-Ser。在一些实施例中,连接scFv(例如,结合NKG2D的scFv或结合BAFF-R的scFv)和抗体重链恒定结构域的铰链包含氨基酸Gly-Ser。在一些其他实施例中,铰链包含氨基酸Ala-Ser和Thr-Lys-Gly。铰链序列可以提供与靶抗原结合的柔性,以及柔性和最佳几何结构之间的平衡。

[0255] 在一些实施例中,上述单链可变区片段(scFv)包括重链可变结构域和轻链可变结构域。在一些实施例中,重链可变结构域与轻链可变结构域形成二硫桥以增强scFv的稳定性。例如,可在重链可变结构域的C44残基和轻链可变结构域的C100残基之间形成二硫桥,氨基酸位置根据Kabat编号。在一些实施例中,重链可变结构域通过柔性接头连接至轻链可变结构域。可以使用任何合适的接头,例如,(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>接头((GlyGlyGlyGlySer)<sub>4</sub>(SEQ ID NO:

119))。在scFv的一些实施例中,重链可变结构域位于轻链可变结构域的N末端。在scFv的一些实施例中,重链可变结构域位于轻链可变结构域的C末端。

[0256] 本文所述的多特异性结合蛋白进一步可包括一个或多个另外的抗原结合位点。一个或多个另外的抗原结合位点可以任选地通过接头序列融合到恒定区CH2结构域的N末端或恒定区CH3结构域的C末端。在某些实施例中,一个或多个另外的抗原结合位点采取单链可变区(scFv)的形式,其任选地经二硫键稳定,产生四价或三价多特异性结合蛋白。例如,多特异性结合蛋白包括结合NKG2D的第一抗原结合位点、结合BAFF-R的第二抗原结合位点、结合BAFF-R的另外的抗原结合位点,以及足以结合CD16的抗体恒定区或其部分或结合CD16的第四抗原结合位点。这些抗原结合位点中的任何一个都可以采用Fab片段或scFv的形式,例如上述的scFv。

[0257] 在一些实施例中,另外的抗原结合位点结合与第二抗原结合位点不同的BAFF-R表位。在一些实施例中,另外的抗原结合位点结合与第二抗原结合位点相同的表位。在一些实施例中,另外的抗原结合位点包含与第二抗原结合位点相同的重链和轻链CDR序列。在一些实施例中,另外的抗原结合位点包含与第二抗原结合位点相同的重链和轻链可变结构域序列。在一些实施例中,另外的抗原结合位点具有与第二抗原结合位点相同的一个或多个氨基酸序列。在一些实施例中,另外的抗原结合位点包含与第二抗原结合位点的重链和轻链可变结构域序列不同的重链和轻链可变结构域序列。在一些实施例中,另外的抗原结合位点具有与第二抗原结合位点的序列不同的氨基酸序列。在一些实施例中,第二抗原结合位点和另外的抗原结合位点结合不同的肿瘤相关抗原。在一些实施例中,第二抗原结合位点和另外的抗原结合位点结合不同的抗原。图2C和图2D中显示了示例性形式。因此,多特异性结合蛋白可以提供BAFF-R的二价接合。多特异性蛋白与BAFF-R的二价接合可以稳定肿瘤细胞表面的BAFF-R并增强NK细胞对肿瘤细胞的细胞毒性。多特异性蛋白与BAFF-R的二价接合可以赋予多特异性蛋白与肿瘤细胞更强的结合,从而促进NK细胞对肿瘤细胞、尤其是对表达低水平BAFF-R的肿瘤细胞产生更强的细胞毒性反应。

[0258] 多特异性结合蛋白可以采用其他形式。在一些实施例中,多特异性结合蛋白呈三功能抗体形式,它是保持IgG样形状的三功能双特异性抗体。这种嵌合体由两个半抗体组成,每个半抗体具有一个轻链和一个重链,它们源自两个亲代抗体。

[0259] 在一些实施例中,多特异性结合蛋白是呈KiH共同轻链(LC)形式,其掺入了杵-臼(KiH)技术(例如图21中表示的多特异性结合蛋白)。KiH共同LC形式是异二聚体,其包含结合第一靶标的Fab、结合第二靶标的Fab和通过异二聚化突变稳定的Fc结构域。两个Fab各自包含重链和轻链,其中每个Fab的重链彼此不同,并且与各自对应的重链配对的轻链是两个Fab共有的。

[0260] 在一些实施例中,多特异性结合蛋白是KiH形式,其涉及杵-臼(KiH)技术。KiH涉及对C<sub>H</sub>3结构域进行工程改造,以在每条重链中创建“杵”或“臼”,以促进异二聚化。“杵-臼(KiH)”Fc技术背后的概念是通过用大残基取代小残基(例如,T366W<sub>CH3A</sub>,EU编号)在一个CH3结构域(CH3A)中引入“杵”。为了容纳“杵”,通过用更小的残基替换离杵最近的邻近残基(例如,T366S/L368A/Y407V<sub>CH3B</sub>) 在另一个CH3结构域(CH3B)上创建了互补的“臼”表面。“臼”突变通过以下进行优化:结构化引导的噬菌体文库筛选(Atwell S,Ridgway JB,Wells JA,Carter P.,Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a

homodimer using a phage display library [利用噬菌体展示文库改造同二聚体的结构域界面得到稳定的异二聚体], *J. Mol. Biol.* [分子生物学杂志] (1997) 270(1):26-35)。KiH Fc变体的X射线晶体结构 (Elliott JM, Ultsch M, Lee J, Tong R, Takeda K, Spiess C等人, Antiparallel conformation of knob and hole aglycosylated half-antibody homodimers is mediated by a CH2-CH3 hydrophobic interaction [杵和白非糖基化半抗体同二聚体的反平行构象由CH2-CH3疏水相互作用介导]. *J. Mol. Biol.* [分子生物学杂志] (2014) 426(9):1947-57; Mimoto F, Kadono S, Katada H, Igawa T, Kamikawa T, Hattori K. Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for Fc  $\gamma$  Rs [新型不对称工程改造Fc变体的晶体结构对Fc  $\gamma$  R具有更高的亲和力]. *Mol. Immunol.* [分子免疫学] (2014) 58(1):132-8) 证实, 由CH3结构域间核心界面处的空间互补驱动的疏水相互作用在热力学上有利于异二聚化, 而杵-杵界面和白-白界面分别因空间位阻和破坏有利相互作用而不利于同二聚化。

[0261] 在一些实施例中, 多特异性结合蛋白呈双可变结构域免疫球蛋白 (DVD-Ig<sup>TM</sup>) 形式, 其通过柔性的天然存在的接头组合两个单克隆抗体的靶结合结构域, 并产生四价IgG样分子。

[0262] 在一些实施例中, 多特异性结合蛋白呈正交Fab界面 (Ortho-Fab) 形式。在ortho-Fab IgG方法 (Lewis SM, Wu X, Pustilnik A, Sereno A, Huang F, Rick HL等人, Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface [通过基于结构的正交Fab界面设计生成双特异性IgG抗体]. *Nat. Biotechnol.* [自然生物科技] (2014) 32(2):191-8) 中, 基于结构的区域设计将互补突变引入仅一个Fab片段中的LC和HC<sub>VH-CH1</sub>界面处, 并且不对另一Fab片段作出任何改变。

[0263] 在一些实施例中, 多特异性结合蛋白是二合一Ig形式。在一些实施例中, 多特异性结合蛋白呈ES形式, 它是异二聚体构建体, 包含两个与靶标1和靶标2结合的不同Fab片段融合到Fc。Fc中的静电引导突变确保异二聚化。

[0264] 在一些实施例中, 多特异性结合蛋白是 $\kappa\lambda$ 体形式, 它是异二聚体构建体, 具有两个不同的Fab片段融合到通过异二聚化突变稳定的Fc: 靶向抗原1的Fab片段1包含 $\kappa$ LC, 靶向抗原2的Fab片段2包含 $\lambda$ LC。图13A是一种形式的 $\kappa\lambda$ 体的示例性代表; 图13B是另一个 $\kappa\lambda$ 体的示例性代表。

[0265] 在一些实施例中, 多特异性结合蛋白呈Fab臂交换形式 (抗体, 其通过将重链和附着的轻链 (半分子) 与另一分子的重-轻链对交换来交换Fab片段臂, 产生双特异性抗体)。

[0266] 在一些实施例中, 多特异性结合蛋白是呈SEED体形式。链交换工程改造结构域 (SEED) 平台旨在生成不对称和双特异性抗体样分子, 这是一种扩展天然抗体治疗应用的能力。该蛋白工程平台基于在保守的CH3结构域内交换结构相关的免疫球蛋白序列。SEED设计允许有效生成AG/GA异二聚体, 而不利于AG和GA SEED CH3结构域的同二聚化。(Muda M. 等人, *Protein Eng. Des. Sel.* [蛋白工程化设计与筛选] (2011, 24(5):447-54))。

[0267] 在一些实施例中, 多特异性结合蛋白是呈LuZ-Y形式, 其中亮氨酸拉链用于诱导两个不同HC的异二聚化。(Wranik, BJ. 等人, *J. Biol. Chem.* [生物化学杂志] (2012), 287:43331-9)。

[0268] 在一些实施例中, 多特异性结合蛋白是呈Cov-X-体形式。在双特异性CovX-体中,

两种不同的肽使用支链氮杂环丁酮接头连接在一起,并在温和条件下以位点特异性方式融合到支架抗体上。药效团负责功能活性,而抗体支架则具有较长的半衰期和Ig样分布。可以对药效团进行化学优化或用其他药效团替换,以生成优化的或独特的双特异性抗体。(Doppalapudi VR等人,PNAS[美国国家科学院院刊](2010),107(52);22611-22616)。

[0269] 在一些实施例中,多特异性结合蛋白呈OAsc-Fab异二聚体形式,其包括结合靶标1的Fab片段,以及融合到Fc的结合靶标2的scFab。Fc中的突变确保了异二聚化。

[0270] 在一些实施例中,多特异性结合蛋白是呈DuetMab形式,它是异二聚体构建体,包含两个结合抗原1和2的不同Fab片段,以及通过异二聚化突变稳定的Fc。Fab片段1和2包含差异S-S桥,可确保正确的LC和HC配对。

[0271] 在一些实施例中,多特异性结合蛋白是呈CrossmAb形式,它是异二聚体构建体,具有两个结合靶标1和2不同Fab片段,融合到通过异二聚化稳定的Fc。CL和CH1结构域以及VH和VL结构域被交换,例如,CH1与VL在框内融合,并且CL与VH在框内融合。

[0272] 在一些实施例中,多特异性结合蛋白呈Fit-Ig形式,它是同二聚体构建体,其中结合抗原2的Fab片段融合到结合抗原1的Fab片段的HC的N末端。该构建体包含野生型Fc。

[0273] 下文更详细地描述了多特异性结合蛋白的各个组分。

#### NKG2D-结合位点

[0274] 在与自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体、以及BAFF-R结合后,多特异性结合蛋白可以接合多于一个类型的NK激活性受体,并可阻断天然配体与NKG2D的结合。在某些实施例中,蛋白可以激动人的NK细胞。在一些实施例中,蛋白可以激动人和其他物种例如啮齿动物和食蟹猴中的NK细胞。在一些实施例中,蛋白可以激动人和其他物种例如食蟹猴中的NK细胞。

[0275] 表1列出了重链可变结构域和轻链可变结构域的肽序列,它们组合起来可以结合NKG2D。在一些实施例中,重链可变结构域和轻链可变结构域以Fab形式排列。在一些实施例中,重链可变结构域和轻链可变结构域融合在一起形成scFv。

[0276] 表1中列出的NKG2D结合位点在其与NKG2D的结合亲和力方面可以不同,但是它们都激活人NK细胞。

[0277] 除非另有说明,表1中提供的CDR序列是根据Kabat编号确定的。

表 1		
克隆	重链可变区氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列
ADI- 27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1) CDR1 (SEQ ID NO:2) – GSFSGYYWS CDR2 (SEQ ID NO:3) – EIDHSGSTNYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:4) – ARARGPWSFDP	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESVPSRFSGSGSGTEFTL TISLQPDFFATYYCQQYNSYPITF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:5)
ADI- 27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITF GGGTKVEIK

克隆	重链可变区氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列
	(SEQ ID NO:1)	(SEQ ID NO:6)
ADI-27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYHSFYT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:7)
ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQSNSYYT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8)
ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYNSYPTF GGGKVEIK (SEQ ID NO:9)
ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWGFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:10)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVITCR TSQSISSYLNWYQQKPGQPPELLI YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDSATYYCQQSYDIPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:11)
ADI-28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYGSFPITF GGGKVEIK

克隆	重链可变区氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列
	(SEQ ID NO:1)	(SEQ ID NO:12)
ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:13)
ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYNSFPTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:14)
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLI IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYDIYPTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:15)
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYDSYPTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:16)
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYGSFPTF GGGTKVEIK

克隆	重链可变区氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列
	(SEQ ID NO:1)	(SEQ ID NO:17)
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYQSFPTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:18)
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYSSSFSTFG GGTKVEIK (SEQ ID NO:19)
ADI-29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYESYSTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:20)
ADI-29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYDSFITFG GGTKVEIK (SEQ ID NO:21)
ADI-29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYQSYPTF GGGTKVEIK

克隆	重链可变区氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列
	(SEQ ID NO:1)	(SEQ ID NO:22)
ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDFATYYCQQYHSFPTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:23)
ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDFATYYCQQYELYSY TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:24)
ADI-29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDFATYYCQQYDTFITFG GGTKVEIK (SEQ ID NO:25)
ADI-27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR GDSSIRHAYYYYGMDVWGQGT TVSS (SEQ ID NO:26) CDR1- GTFSSYAIS (非 Kabat) (SEQ ID NO:27) 或 SYAIS (SEQ ID NO:28) CDR2 (SEQ ID NO:29) -	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK SSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGS GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ QYYSTPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:32) CDR1 (SEQ ID NO:33) - KSSQSVLYSSNNKNYLA CDR2 (SEQ ID NO:34) - WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:35) -

克隆	重链可变区氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列
	GIIPFGTANYAQKFQG CDR3 – ARGDSSIRHAYYYYGMDV (非 Kabat) (SEQ ID NO:30) 或 GDSSIRHAYYYYGMDV (SEQ ID NO:31)	QQYYSTPIT
ADI- 29443 (F43 )	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS GGSSSSSYWGWIRQPPGKGLEWI GSIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARG SDRFHPYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:36) CDR1– GSISSSSYYWG (非 Kabat) (SEQ ID NO:37) 或 SSSYYWG (SEQ ID NO:38) CDR2 (SEQ ID NO:39) – SIYYSGSTYYNPSLKS CDR3 – ARGSDRFHPYFDY (非 Kabat) (SEQ ID NO:40) 或 GSDRFHPYFDY (SEQ ID NO:41)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASNRATGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCQQFDTWPP TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:42) CDR1 (SEQ ID NO:43) – RASQSVSRYLA CDR2 (SEQ ID NO:44) – DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:45) – QQFDTWPPT
ADI- 29404 (F04 )	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAV YGGFSFGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCEQYDSYPTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:46)
ADI- 28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARR GRKASGSFYFYYGMDVWGQGTIV	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCE SSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKPLIYWASTRESGVPDRFSGS GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ NDYSYPYTFGQGTKLEIK

克隆	重链可变区氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列
	TVSS (SEQ ID NO:47) CDR1 (SEQ ID NO:27) – GTFSSYAIS CDR2 (SEQ ID NO:29) – GIIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:48) – ARRRGRKASGSFYYYGMDV	(SEQ ID NO:49) CDR1 (SEQ ID NO:50) – ESSQSLNLSGNQKNYLT CDR2 (SEQ ID NO:34) – WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:51) – QNDYSYPYT
ADI-29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCA SGYTFTSYMHVWRQAPGQGLEW MGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCA RGAPNYGDTTHDYYYMDVWGKG TTVTSS (SEQ ID NO:52) CDR1 (SEQ ID NO:53) – YTFTSYMH (非 Kabat) 或 SYMH (SEQ ID NO:54) CDR2 (SEQ ID NO:55) – IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 – ARGAPNYGDTTHDYYYMDV (非 Kabat) (SEQ ID NO:56) 或 GAPNYGDTTHDYYYMDV (SEQ ID NO:57)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCR ASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLL IYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFT LTISSLQSEDFAVYYCQQYDDWPF TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:58) CDR1 (SEQ ID NO:59) – RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:60) – GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:61) – QQYDDWPFT
ADI-29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCA SGYTFTGYMHVWRQAPGQGLEW MGWINPSGGTNYAQKFQGRVTM TRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYY CARDTGEYYDTDDHGMDVWGQG	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDFAVYYCQQDDYWPPTF GGGGTKVEIK

克隆	重链可变区氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列
	TTVTSS (SEQ ID NO:62) CDR1 - YTFTGYMH (非 Kabat) (SEQ ID NO:63) 或 GYYMH (SEQ ID NO:64) CDR2 (SEQ ID NO:65) - WINPNSGGTNYAQKFQG CDR3 - ARDTGEYYDTDDHGMDV (非 Kabat) (SEQ ID NO:66) 或 DTGEYYDTDDHGMDV (SEQ ID NO:67)	(SEQ ID NO:68) CDR1 (SEQ ID NO:59) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:60) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:69) - QQDDYWPPT
ADI- 27744 (A44 )	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAA GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DGGYYDSGAGDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:70) CDR1- FTFSSYAMS (非 Kabat) (SEQ ID NO:71) 或 SYAMS (SEQ ID NO:115) CDR2 (SEQ ID NO:72) - AISGSGGSTYYADSVK CDR3 - AKDGGYYDSGAGDY (非 Kabat) (SEQ ID NO:73) 或 DGGYYDSGAGDY (SEQ ID NO:74)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCR ASQGIDSWLAWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQGVSYPR TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:75) CDR1 (SEQ ID NO:76) - RASQGIDSWLA CDR2 (SEQ ID NO:77) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:78) - QQGVSYPR
ADI- 27749 (A49 )	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWV SSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCR ASQGISSWVLAWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPR

克隆	重链可变区氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列
	RGAPMGAAAGWFDPWGQGLVTV SS (SEQ ID NO:79) CDR1 - FTFSSYSMN (SEQ ID NO:80) (非 Kabat) 或 SYSMN (SEQ ID NO:81) CDR2 (SEQ ID NO:82) - SSSSSSYIYYADSVKG CDR3- ARGAPMGAAAGWFDP (SEQ ID NO:83) (非 Kabat) 或 GAPMGAAAGWFDP (SEQ ID NO:84)	TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:85) CDR1 (SEQ ID NO:86) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:77) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:87) - QQGVSPRT
	scFv (VL-VH) , 在 VH 中有 Q44C, 在 VL 中有 G100C, 接头为斜体: DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSPRTFGCGT KVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKCLEWVSSSSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAL NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:88)	
ADI- 29378 (E78 )	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCA SGYFTFSYMHVWRQAPGQGLEW MGIINPSGGSTSYAQKFGQGRVTMTR DTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCA REGAGFAYGMDYYYMDVWGKGT TVTVSS (SEQ ID NO:89) CDR1 - YFTFSYMH (SEQ ID NO:53) (非 Kabat) 或 SYMH (SEQ ID NO:54) CDR2 (SEQ ID NO:55) -	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQSDNWPFT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:92) CDR1 (SEQ ID NO:93) - RASQSVSSYLA CDR2 (SEQ ID NO:44) - DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:94) -

克隆	重链可变区氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列
	IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 – AREGAGFAYGMDYYYMDV (SEQ ID NO:90) (非 Kabat) 或 EGAGFAYGMDYYYMDV (SEQ ID NO:91)	QQSDNWPFT
A49MI	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWV SSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGAPIGAAAGWFDPWGQGLTVTS S (SEQ ID NO:95) CDR1: FTFSSYSMN (SEQ ID NO:80) (非 Kabat) 或 SYSMN (SEQ ID NO:81) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:82) CDR3: ARGAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO:96) (非 Kabat) 或 GAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO:97)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICR ASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGVSPFRT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:85) CDR1 (SEQ ID NO:86) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:77) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:87) - QQGVSPFRT
	scFv (VL-VH) , 在 VH 中有 Q44C, 在 VL 中有 G100C, 接头为斜体: DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSPFRTFGCGT KVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKCLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWGQGLTVTS (SEQ ID NO:275)	
A49M Q	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWV	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICR ASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLL

克隆	重链可变区氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列
	<p>SSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGAPQGAAAGWFDPWGQGLVTV SS (SEQ ID NO:98) CDR1: FTFSSYSMN (SEQ ID NO:80) (非 Kabat) 或 SYSMN (SEQ ID NO:81) CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:82) CDR3 - ARGAPQGAAAGWFDP (SEQ ID NO:99) (非 Kabat) 或 GAPQGAAAGWFDP (SEQ ID NO:100)</p>	<p>IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGVSPRT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:85) CDR1 (SEQ ID NO:86) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:77) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:87) - QQGVSPRT</p>
A49ML	<p>EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWV SSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGAPLGAAAGWFDPWGQGLVTV SS (SEQ ID NO:101) CDR1: FTFSSYSMN (SEQ ID NO:80) (非 Kabat) 或 SYSMN (SEQ ID NO:81) CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:82) CDR3 - ARGAPLGAAAGWFDP (SEQ ID NO:102) (非 Kabat) 或 GAPLGAAAGWFDP (SEQ ID NO:103)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCR ASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGVSPRT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:85) CDR1 (SEQ ID NO:86) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:77) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:87) - QQGVSPRT</p>

克隆	重链可变区氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列
A49MF	EVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAA SGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWV SSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGAPFGAAAGWFDPWGQGLVTV SS (SEQ ID NO:104) CDR1: FTFSSYS MN (SEQ ID NO:80) (非 Kabat) 或 SYS MN (SEQ ID NO:81) CDR2: SSISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:82) CDR3 - ARGAPFGAAAGWFDP (SEQ ID NO:105) (非 Kabat) 或 GAPFGAAAGWFDP (SEQ ID NO:106)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCR ASQGISSWLA WYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGVSPFRT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:85) CDR1 (SEQ ID NO:86) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:77) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:87) - QQGVSPFRT
A49M V	EVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAA SGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWV SSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGAPVGAAAGWFDPWGQGLVTV SS (SEQ ID NO:107) CDR1: FTFSSYS MN (SEQ ID NO:80) (非 Kabat) 或 SYS MN (SEQ ID NO:81) CDR2: SSISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:82) CDR3- ARGAPVGAAAGWFDP (SEQ ID NO:108) (非 Kabat) 或	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCR ASQGISSWLA WYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGVSPFRT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:85) CDR1 (SEQ ID NO:86) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:77) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:87) - QQGVSPFRT

克隆	重链可变区氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列
	GAPVGAAAGWFDP (SEQ ID NO:109)	
A49-共有	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWV SSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGAPXGAAAGWFDPWGQGLVTV SS, 其中 X 是 M、L、I、V、Q 或 F (SEQ ID NO:110) CDR1: FTFSSYSMN (SEQ ID NO:80) (非 Kabat) 或 SYSMN (SEQ ID NO:81) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKGR (SEQ ID NO:82) CDR3- ARGAPXGAAAGWFDP (SEQ ID NO:111) (非 Kabat) 或 GAPXGAAAGWFDP (SEQ ID NO:112), 其中 X 是 M、L、I、V、Q 或 F	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCR ASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGVSPRT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:85) CDR1 (SEQ ID NO:86) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:77) - AASSLQSG CDR3 (SEQ ID NO:87) - QQGVSPRT
US 9,273,1 36 中的 NKG2 D 结合 物	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEW VAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKDRGLGDGTYFDYWGQGTITVTV SS (SEQ ID NO:113)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSS SNIGNNAVNWYQQLPKAPKLLI YYDDLPSGVSDRFSGSKSGTSAF LAISGLQSEDEADYYCAAWDDSL NGPVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:114)
US 7,879,9 85 中的 NKG2 D 结合 物	QVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS DDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGH ISYSGSANYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDD AFNIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:116)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRA SQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:117)

[0278] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点(例如,人NKG2D)包含抗体重链可变结构域(VH)和抗体轻链可变结构域(VL),该重链可变结构域包含与表1中披露的抗体

的VH至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,并且该抗体轻链可变结构域包含与表1中披露的相同的抗体的VL至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,第一抗原结合位点包含表1中披露的抗体的VH和VL序列的重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,根据Kabat (参见Kabat等人, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest [免疫学目的蛋白序列], NIH出版号91-3242, 贝塞斯达), Chothia (参见,例如,Chothia C&Lesk A M, (1987), J.Mol.Biol. [分子生物学杂志]196: 901-917), MacCallum (参见MacCallum R M等人, (1996) J.Mol.Biol. [分子生物学杂志] 262:732-745), 或本领域已知的任何其他CDR测定方法确定。在某些实施例中,第一抗原结合位点包含表1中披露的抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3。

[0279] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含衍生自SEQ ID NO:1的重链可变结构域,例如通过与SEQ ID NO:1至少90% (例如,至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,和/或掺入与SEQ ID NO:1的CDR1 (SEQ ID NO:2)、CDR2 (SEQ ID NO:3) 和CDR3 (SEQ ID NO:4) 序列相同的氨基酸序列。与SEQ ID NO:1相关的重链可变结构域可与多种轻链可变结构域偶联形成NKG2D结合位点。例如,掺入与SEQ ID NO:1相关的重链可变结构域的第一抗原结合位点可进一步掺入选自衍生自SEQ ID NO:5、6、7、8、9、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、和46的序列的轻链可变结构域。例如,第一抗原结合位点掺入具有与SEQ ID NO:1至少90% (例如,至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列的重链可变结构域和具有与选自SEQ ID NO:5、6、7、8、9、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、和46中任何一个序列至少90% (例如,至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列的轻链可变结构域。

[0280] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:32的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:27或28、29、和30或31的氨基酸序列 (例如,分别为SEQ ID NO: 27、29和30,或分别为SEQ ID NO:28、29和31)的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:33、34和35的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第一抗原结合位点包含 (a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:27或28、29、和30或31的氨基酸序列 (例如,分别为SEQ ID NO:27、29和30,或分别为SEQ ID NO:28、29和31)的CDR1、CDR2和CDR3;以及 (b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:33、34和35的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0281] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:36的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、

至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:42的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:37或38、39、和40或41的氨基酸序列 (例如,分别为SEQ ID NO:37、39和40,或分别为SEQ ID NO:38、39和41)的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:43、44和45的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第一抗原结合位点包含 (a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:37或38、39、和40或41的氨基酸序列 (例如,分别为SEQ ID NO:37、39和40,或分别为SEQ ID NO:38、39和41)的CDR1、CDR2和CDR3;以及 (b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:43、44和45的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0282] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:47的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:49的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:27、29和48的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:50、34和51的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第一抗原结合位点包含 (a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:27、29和48的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及 (b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:50、34和51的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0283] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:52的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:58的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:53或54、55、和56或57的氨基酸序列 (例如,分别为SEQ ID NO:53、55和56,或分别为SEQ ID NO:54、55和57)的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:59、60和61的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第一抗原结合位点包含 (a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:53或54、55、和56或57的氨基酸序列 (例如,分别为SEQ ID NO:53、55和56,或分别为SEQ ID NO:54、55和57)的CDR1、CDR2和CDR3;以及 (b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:59、60和61的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0284] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:62的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:68的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:63或64、65、和66或67的氨基酸序列 (例如,分别为SEQ ID NO:63、65和66,或分别为SEQ ID NO:64、65和67)的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含

分别包含SEQ ID NO:59、60和69的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第一抗原结合位点包含(a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:63或64、65、和66或67的氨基酸序列(例如,分别为SEQ ID NO:63、65和66,或分别为SEQ ID NO:64、65和67)的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:59、60和69的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0285] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:89的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:92的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:53或54、55、和90或91的氨基酸序列(例如,分别为SEQ ID NO:53、55和90,或分别为SEQ ID NO:54、55和91)的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:93、44和94的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第一抗原结合位点包含(a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:53或54、55、和90或91的氨基酸序列(例如,分别为SEQ ID NO:53、55和90,或分别为SEQ ID NO:54、55和91)的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:93、44和94的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0286] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:70的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:75的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:71或115、72、和73或74的氨基酸序列(例如,分别为SEQ ID NO:71、72和73,或分别为SEQ ID NO:115、72和74)的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:76、77和78的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第一抗原结合位点包含(a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:71或115、72、和73或74的氨基酸序列(例如,分别为SEQ ID NO:71、72和73,或分别为SEQ ID NO:115、72和74)的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:76、77和78的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0287] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:79的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:85的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:80或81、82、和83或84的氨基酸序列(例如,分别为SEQ ID NO:80、82和83,或分别为SEQ ID NO:81、82和84)的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第一抗原结合位点包含(a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:80或81、82、和83或84的氨基酸序列(例如,分别为SEQ ID NO:80、82和83,或分别为SEQ ID NO:81、82和84)的CDR1、CDR2和

CDR3;以及(b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0288] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:95的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:85的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:80或81、82、和96或97的氨基酸序列(例如,分别为SEQ ID NO:80、82和96,或分别为SEQ ID NO:81、82和97)的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第一抗原结合位点包含(a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:80或81、82、和96或97的氨基酸序列(例如,分别为SEQ ID NO:80、82和96,或分别为SEQ ID NO:81、82和97)的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0289] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:98的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:85的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:80或81、82、和99或100的氨基酸序列(例如,分别为SEQ ID NO:80、82和99,或分别为SEQ ID NO:81、82和100)的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第一抗原结合位点包含(a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:80或81、82、和99或100的氨基酸序列(例如,分别为SEQ ID NO:80、82和99,或分别为SEQ ID NO:81、82和100)的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0290] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:101的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:85的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:80或81、82、和102或103的氨基酸序列(例如,分别为SEQ ID NO:80、82和102,或分别为SEQ ID NO:81、82和103)的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第一抗原结合位点包含(a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:80或81、82、和102或103的氨基酸序列(例如,分别为SEQ ID NO:80、82和102,或分别为SEQ ID NO:81、82和103)的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0291] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID

NO:104的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:85的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列。在某些实施例中, VH包含分别包含SEQ ID NO:80或81、82、和105或106的氨基酸序列 (例如,分别为SEQ ID NO:80、82和105,或分别为SEQ ID NO:81、82和106) 的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, VL包含分别包含SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第一抗原结合位点包含 (a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:80或81、82、和105或106的氨基酸序列 (例如,分别为SEQ ID NO:80、82和105,或分别为SEQ ID NO:81、82和106) 的CDR1、CDR2和CDR3;以及 (b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0292] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:107的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:85的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列。在某些实施例中, VH包含分别包含SEQ ID NO:80或81、82、和108或109的氨基酸序列 (例如,分别为SEQ ID NO:80、82和108,或分别为SEQ ID NO:81、82和109) 的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, VL包含分别包含SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第一抗原结合位点包含 (a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:80或81、82、和108或109的氨基酸序列 (例如,分别为SEQ ID NO:80、82和108,或分别为SEQ ID NO:81、82和109) 的CDR1、CDR2和CDR3;以及 (b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0293] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:110的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:85的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列。在某些实施例中, VH包含分别包含SEQ ID NO:80或81、82、和111或112的氨基酸序列 (例如,分别为SEQ ID NO:80、82和111,或分别为SEQ ID NO:81、82和112) 的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, VL包含分别包含SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第一抗原结合位点包含 (a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:80或81、82、和111或112的氨基酸序列 (例如,分别为SEQ ID NO:80、82和111,或分别为SEQ ID NO:81、82和112) 的CDR1、CDR2和CDR3;以及 (b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:86、77和87的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0294] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:113的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:114的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、

至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。

[0295] 在某些实施例中,结合NKG2D的第一抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:116的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:117的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。

[0296] 多特异性结合蛋白可以结合表达NKG2D的细胞,包括但不限于NK细胞、 $\gamma$   $\delta$ T细胞和CD8<sup>+</sup> $\alpha$  $\beta$ T细胞。在NKG2D结合后,多特异性结合蛋白可能会阻止天然配体(例如ULBP6和MICA)与NKG2D结合并激活NK细胞。

[0297] 多特异性结合蛋白与表达CD16的细胞结合,CD16是白细胞表面的Fc受体,白细胞包括自然杀伤细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞和滤泡树突细胞。本披露的蛋白以2nM至120nM的K<sub>D</sub>亲和力结合NKG2D,例如,2nM至110nM、2nM至100nM、2nM至90nM、2nM至80nM、2nM至70nM、2nM至60nM、2nM至50nM、2nM至40nM、2nM至30nM、2nM至20nM、2nM至10nM、约15nM、约14nM、约13nM、约12nM、约11nM、约10nM、约9nM、约8nM、约7nM、约6nM、约5nM、约4.5nM、约4nM、约3.5nM、约3nM、约2.5nM、约2nM、约1.5nM、约1nM、约0.5nM至约1nM、约1nM至约2nM、约2nM至3nM、约3nM至4nM、约4nM至约5nM、约5nM至约6nM、约6nM至约7nM、约7nM至约8nM、约8nM至约9nM、约9nM至约10nM、约1nM至约10nM、约2nM至约10nM、约3nM至约10nM、约4nM至约10nM、约5nM至约10nM、约6nM至约10nM、约7nM至约10nM、或约8nM至约10nM。在一些实施例中,NKG2D结合位点以10至62nM的K<sub>D</sub>结合NKG2D。

#### BAFF-R结合位点

[0298] 本文披露的多特异性结合蛋白的BAFF-R位点包含重链可变结构域和轻链可变结构域。

[0299] 在一方面,本披露提供了与自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体、以及BAFF-R结合的多特异性结合蛋白。表2列出了重链可变结构域和轻链可变结构域的一些示例性序列,它们组合起来可以结合BAFF-R。

[0300] 除非另有说明,否则CDR序列按照Chothia编号鉴定。

表 2		
来源	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
伊利尤单抗 (莫弗西斯公司 (MorphoSys) /诺华公司 (Novartis))	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS GDSVSSNSAAWGWIRQSPGRGLEW LGRIYYRSKWNSYAVSVKSRITIN PDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYC ARYQWVPKIGVFDSWGQGLVTVS S (SEQ ID NO:145) CDR1: SNSAAWG (SEQ ID NO:157) (Kabat) 或 SSNSAAWG (SEQ ID NO:135) CDR2: RIYYRSKWNSYAVSVKS (SEQ ID NO:158) (Kabat) 或	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQFILPEYLSWYQQKPGQAPRLLI YGSSSRATGVPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCQQFYSSPLT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:146) CDR1: RASQFILPEYLS (SEQ ID NO:160) (Kabat) CDR2: GSSSRAT (SEQ ID NO:161) (Kabat) CDR3: QQFYSSPLT (SEQ ID NO:162) (Kabat)

来源	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	WLGRIYYRSKWYNS (SEQ ID NO:136) CDR3: YQWVPKIGVFDS (SEQ ID NO:159) (Kabat) 或 ARYQWVPKIGVFD (SEQ ID NO:137)	
衍生自 伊利尤 单抗的 scFv (接头 斜体)	VL-VH (SEQ ID NO:207) DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFILPEYLSWYQQKPGQAPRLLIYGS SSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQFYSSPLTFGCGTK VEIKGGGGSGGGSGGGSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISG DSVSSNSAAWGWIRQSPGRCLEWLGRIYYRSKWYNSYAVSVKSRITINPD TSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARYQWVPKIGVFDSWGQGLTVTVSS VH-VL (SEQ ID NO:138) QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWGWIRQSPGRCLEWL GRIYYRSKWYNSYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCA RYQWVPKIGVFDSWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSDIVLT QSPATLSLSPGERATLSCRASQFILPEYLSWYQQKPGQAPRLLIYGSSSRAT GVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQFYSSPLTFGCGTKVEIK	
V3-46s (基因 泰克公 司 (Gene ntech) ) (WO 2006073 941)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTISSSSIHWVRQAPGKGLEWVA WVLPVSGFTDYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC ARRVCYNRLGVCAGGMDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:147) CDR1: TISSSS (SEQ ID NO:163) (Kabat) CDR2: AWVLPVSGFTD (SEQ ID NO:164) (Kabat) CDR3: RVCYNRLGVCAGG (SEQ ID NO:165) (Kabat)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR ASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISLQPEDFATYYCQQSQISPP TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:148) CDR1: QDVSTA (SEQ ID NO:166) (Kabat) CDR2: YSASFLY (SEQ ID NO:167) (Kabat) CDR3: CQQSQIS (SEQ ID NO:168) (Kabat)

来源	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
衍生自 V3-46s 的 scFv (接头 斜体)	VL-VH (SEQ ID NO:139)  DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSQISPPTFGCGTK VEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTISSSSIHWVRQAPGKCLEWVAWVLPVSGFTDYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVCYNRLGVCAGGMDYWGQGLVT VSS VH-VL (SEQ ID NO:140)  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSSIHWVRQAPGKCLEWVAW VLPVSGFTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARR VCYNRLGVCAGGMDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS FLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSQISPPTFGCGTKV EIK	
V3-46s- 42 (基 因泰克 公司) (WO 2006073 941)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTISSSSIHWVRQAPGKGLEWVA WVLPVSGFTDYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC ARRVCYNRLGVCAGGMDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:147) CDR1: TISSSS (SEQ ID NO:163) (Kabat) CDR2: AWVLPVSGFTD (SEQ ID NO:164) (Kabat) CDR3: RVCYNRLGVCAGG (SEQ ID NO:165) (Kabat)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICR ASEDISTAVAWYQQKPGKAPKLLI YAASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQSQISPPTF GQGTKVEIK (SEQ ID NO:150) CDR1: EDISTA (SEQ ID NO:169) (Kabat) CDR2: YAASFLY (SEQ ID NO:170) (Kabat) CDR3: CQQSQIS (SEQ ID NO:168) (Kabat)
衍生自 V3-46s- 42 的 scFv	VL-VH (SEQ ID NO:141)  DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASEDISTAVAWYQQKPGKAPKLLIYAA SFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSQISPPTFGCGTKV EIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF	

来源	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
(接头 斜体)	TISSSSIHWVRQAPGKCLEWVAWVLPVSGFTDYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVCYNRLGVCAGGMDYWGQGLTVTS S VH-VL (SEQ ID NO:142) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSSIHWVRQAPGKCLEWVAW VLPVSGFTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARR VCYNRLGVCAGGMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDISTAVAWYQQKPGKAPKLLIYAASF LYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSQISPTFGCGTKVEI K	
Hu9.1- 73 (基 因泰克 公司) (WO 2006073 941)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGLPMAGFYTSWVRQAPGKGLEW VGFIRDKANGYTTEYNPSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCAQVRRALDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:151) CDR1: GFYTS (SEQ ID NO:171) (Kabat) CDR2: FIRDKANGYTTEYNPSVKG (SEQ ID NO:172) (Kabat) CDR3: VRRALDY (SEQ ID NO:173) (Kabat)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKS QSLLYSSNQNNYLAWYQQKPGK APKLLIYWAQHLD SGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YYTYPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:152) CDR1: KSSQSLLYSSNQNNYLA (SEQ ID NO:174) (Kabat) CDR2: WAQHLD (SEQ ID NO:175) (Kabat) CDR3: QQYYTYPYT (SEQ ID NO:176) (Kabat)
衍生自 Hu9.1- 73 的 scFv (接头 斜体)	VL-VH (SEQ ID NO:143) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSSNQNNYLAWYQQKPGKAP KLLIYWAQHLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYP YTFGCGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGLPMAGFYTSWVRQAPGKCLEWVGFIRDKANGYTTEYNPSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAQVRRALDYWGQGLTV TVSS VH-VL (SEQ ID NO:144)	

来源	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLPMAGFYTSWVRQAPGKCLEWV GFIRDKANGYTTTEYNPSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC AQVRRALDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRTITCKSSQSLLYSSNQNNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWAQ HLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGCGTK VEIK	
人源化 mAb hCOH-1 (希望 之城 (City of Hope) ) (WO 2017214 170)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS GDSITSGYWNWIRQHPGKGLLEYIG YISYSGSTYYNPSLKSRTISRDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCASP NYPFYAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:153) CDR1: GDSITSGY (非 Kabat) (SEQ ID NO:177) 或 SGYWN (SEQ ID NO:178) (Kabat) CDR2: ISYSGST (非 Kabat) (SEQ ID NO:179) 或 YISYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:180) (Kabat) CDR3: ASPNYPFYAMDY (非 Kabat) (SEQ ID NO:181) 或 PNYPFYAMDY (SEQ ID NO:182) (Kabat)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SESVDNYGISFLNWFQQKPGQAPR LLIYAASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVP WTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:154) CDR1: ESVDNYGISF (非 Kabat) (SEQ ID NO:183) 或 RASESVDNYGISFLN (SEQ ID NO:184) (Kabat) CDR2: AAS (SEQ ID NO:185) (非 Kabat) 或 AASNRAT (SEQ ID NO:186) (Kabat) CDR3: QQSKEVPWT (SEQ ID NO:187) (Kabat)
衍生自 hCOH-1 的 scFv (接头 斜体)	VL-VH (SEQ ID NO:149) EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFLNWFQQKPGQAPRLLI YAASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFG CGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTC TVSGDSITSGYWNWIRQHPGKCLEYIGYISYSGSTYYNPSLKSRTISRDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASPNYPFYAMDYWGQGLTVTVSS VH-VL (SEQ ID NO:190)	

来源	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKCLEYIGYI SYSGSTYYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASPNYPF YAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSL SPGERATLSCRASESDNYGISFLNWFQKPGQAPRLLIYAASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGCGTKVEIK	
人源化 mAb hCOH-2 (希望 之城 (City of Hope) ) (WO 2017214 170)	EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS GDSITSGYWNWIRQHPGKGLEIYIG YISYSGSTYYNPSLKSRVTISRDTSK NQYSLKLSSVTAADTAVYYCASP NYPFYAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:155) CDR1: GDSITSGY (非 Kabat) (SEQ ID NO:177) 或 SGYWN (SEQ ID NO:178) (Kabat) CDR2: ISYSGST (非 Kabat) (SEQ ID NO:179) 或 YISYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:180) (Kabat) CDR3: ASPNYPFYAMDY (非 Kabat) (SEQ ID NO:181) 或 PNYPFYAMDY (SEQ ID NO:182) (Kabat)	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SESVDNYGISFMNWFQKPGQAP RLLIYAASNRATGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKE VPWTFGGGKTKVEIK (SEQ ID NO:156) CDR1: ESVDNYGISF (非 Kabat) (SEQ ID NO:183) 或 RASESDNYGISFMN (SEQ ID NO:188) (Kabat) CDR2: AAS (非 Kabat) (SEQ ID NO:185) 或 AASNRAT (SEQ ID NO:186) (Kabat) CDR3: QQSKEVPWT (SEQ ID NO:187) (Kabat)
衍生自 hCOH-2 的 scFv (接头 斜体)	VL-VH (SEQ ID NO:191) DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESDNYGISFMNWFQKPGQAPRLLI YAASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFG CGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQESGPGLVKPSQTLSTC TVSGDSITSGYWNWIRQHPGKCLEYIGYISYSGSTYYNPSLKSRVTISRDT KNQYSLKLSSVTAADTAVYYCASPYPFYAMDYWGQGLTVTVSS VH-VL (SEQ ID NO:192) EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKCLEYIGYI	

来源	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	SYSGSTYYNPSLKS RVTISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCASP NYPF YAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPATLSL SPGERATLSCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQAPRLLIYAASN RATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGCGTKVEIK	
1129_A 01 (AB036 9 scFv)	EVQLVQSGGGV VQPGRSLRLSCAA SGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEW VAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRDED TAVY YCARRFTMLRGLIIEDYGM DVWGQ GTTVTVSS (SEQ ID NO:310) CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:214) CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:215) CDR3: RFTMLRGLIIEDYGM DV (SEQ ID NO:216)	EIVLTQSPSSLSASV GDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFG CGTKVEIK (SEQ ID NO:276) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:218)
1203_A 01	CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:214) CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:215) CDR3: RFTMLRGVFIEDYGM DV (SEQ ID NO:219)	CDR1: RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:59) CDR2: GASTRAT (SEQ ID NO:60) CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:218)
1203_A 02	CDR1: GFTFSTY (SEQ ID NO:220) CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:215) CDR3: RNTMVRGVIIEDYGM DV (SEQ ID NO:221)	CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSSPLT (SEQ ID NO:222)
AB0605 scfv	EVQLVQSGGGV VQPGRSLRLSCAA SGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEW	EIVLTQSPSSLSASV GDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY

来源	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	VAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRDEDTA VY YCARRFTMLRGQYIEDYGMDV WG QGTTVTVSS (SEQ ID NO:277) CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:214) CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:215) CDR3: RFTMLRGQYIEDYGMDV (SEQ ID NO:223)	AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFG CGTKVEIK (SEQ ID NO:276) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:218)
AB0606 scfv	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAA SGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEW VAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRDEDTA VY YCARRFTMLRGWYIEDYGMDV WG QGTTVTVSS (SEQ ID NO:278) CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:214) CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:215) CDR3: RFTMLRGWYIEDYGMDV (SEQ ID NO:224)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFG CGTKVEIK (SEQ ID NO:276) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:218)
AB0622 scfv	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAA SGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEW VAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRDEDTA VY YCARRFTMLRGWYIEDYGMDV WG QGTTVTVSS (SEQ ID NO:279) CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:214)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFG CGTKVEIK (SEQ ID NO:276) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID

来源	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:215) CDR3: RFTMLRGWIIEDYGMDV (SEQ ID NO:225)	NO:77) CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:218)
共有 1 (AB0605, AB0606, AB0622)	CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:214) CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:215) CDR3: RFTMLRGX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> IEDYGMDV 其中 X <sub>1</sub> 是 Q 或 W, X <sub>2</sub> 是 I 或 Y (SEQ ID NO:226)	CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:218)
AB0679 scFv	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAA SGPFSSYGMHWVRQAPGKCLEW VAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVY YCARRFTMLRGWYIEDYGMDVWG QGTTVTVSS (SEQ ID NO:280) CDR1: GFPFSSY (SEQ ID NO:227) CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:215) CDR3: RFTMLRGWYIEDYGMDV (SEQ ID NO:224)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFG CGTKVEIK (SEQ ID NO:276) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:218)
AB0681 scFv	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAA SGEWFSSYGMHWVRQAPGKCLEW VAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVY YCARRFTHLRGWIIEDYGMDVWG QGTTVTVSS (SEQ ID NO:281) CDR1: GEWFSSY (SEQ ID NO:228)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFG CGTKVEIK (SEQ ID NO:276) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID

来源	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:215) CDR3: RFTHLRGWIIEDYGMDV (SEQ ID NO:229)	NO:77) CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:218)
AB0682 scFv	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAA SGFTFSSSGMHWVRQAPGKCLEWV AVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYY CARRFTMLRGWYIEDYGMDVWGQ GTTVTVSS (SEQ ID NO:282) CDR1: GFTFSSS (SEQ ID NO:230) CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:215) CDR3: RFTMLRGWYIEDYGMDV (SEQ ID NO:224)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFG CGTKVEIK (SEQ ID NO:276) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:218)
共有 2 (AB0679, AB0681, , AB0682 )	CDR1: GX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> FSSX <sub>3</sub> 其中 X <sub>1</sub> 是 F 或 E, X <sub>2</sub> 是 T、P 或 W, X <sub>3</sub> 是 Y 或 S (SEQ ID NO:231) CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:215) CDR3: RFTX <sub>1</sub> LRGWX <sub>2</sub> IEDYGMDV 其中 X <sub>1</sub> 是 M 或 H, X <sub>2</sub> 是 I 或 Y (SEQ ID NO:232)	CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:218)
AB0898	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAA SGFTFSSSGMHWVRQAPGKCLEWV AVIWYDASNKYYGDSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYY CARRFTRLRGWYIEDYGLDVWGQ GTTVTVSS (SEQ ID NO:283) CDR1: GFTFSSS (SEQ ID NO:230)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFG CGTKVEIK (SEQ ID NO:276) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217)

来源	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	CDR2: WYDASN (SEQ ID NO:233) CDR3: RFTRLRGWYIEDYGLDV (SEQ ID NO:242)	CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:218)
AB0899	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAA SGFTFSSSGMHWVRQAPGKCLEWV AVIWDASNKYYGDSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRDEDTA VYY CARRFTYLRGWYIEDYGLDVWGQ GTTVTVSS (SEQ ID NO:284) CDR1: GFTFSSS (SEQ ID NO:230) CDR2: WYDASN (SEQ ID NO:233) CDR3: RFTYLRGWYIEDYGLDV (SEQ ID NO:234)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCQQSYSTPLTFG CGTKVEIK (SEQ ID NO:276) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:218)
AB0900	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAA SGFTFSSSGMHWVRQAPGKCLEWV AVIWDASNKYYGDSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRDEDTA VYY CARRFTSLRGWYIEDYGLDVWGQ GTTVTVSS (SEQ ID NO:285) CDR1: GFTFSSS (SEQ ID NO:230) CDR2: WYDASN (SEQ ID NO:233) CDR3: RFTSLRGWYIEDYGLDV (SEQ ID NO:235)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCQQSYSTPLTFG CGTKVEIK (SEQ ID NO:276) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:218)
共有 3 (AB0898, AB0899	CDR1: GFTFSSS (SEQ ID NO:230) CDR2: WYDASN (SEQ ID NO:233) CDR3: RFTXLRGWYIEDYGLDV 其	CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77)

来源	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
, AB0900 )	中 X 是 R、Y 或 S (SEQ ID NO:236)	CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:218)
AB1080 scFv	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAA SGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEW VAVIWYDASNKYYGDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVY YCARRFTHLRGWYIEDYGLDVWG QGTTVTVSS (SEQ ID NO:286) CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:214) CDR2: WYDASN (SEQ ID NO:233) CDR3: RFTHLRGWYIEDYGLDV (SEQ ID NO:237)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCQQSYSIPLTFG CGTKVEIK (SEQ ID NO:253) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSIPLT (SEQ ID NO:249)
AB1081 scFv	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAA SGFAFSSYGMHWVRQAPGKCLEW VAVIWYDESNKYYGDSVKGRFTIS RDNSRNTLYLQMNSLRDEDTAVYY CARRFTNLRGWIIEDYGLDVWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO:287) CDR1: GFAFSSY (SEQ ID NO:238) CDR2: WYDESN (SEQ ID NO:239) CDR3: RFTNLRGWIIEDYGLDV (SEQ ID NO:240)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCQQSYSIPLTFG CGTKVEIK (SEQ ID NO:253) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSIPLT (SEQ ID NO:249)
AB1084 scFv	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAA SGFTFSMYGMHWVRQAPGKCLEW VAVIWYDASNKYYGDSVKGRFTIS	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT

来源	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	RDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVY YCARRFTRLRGWYIEDYGLDVWG QGTTVTVSS (SEQ ID NO:288) CDR1: GFTFSMY (SEQ ID NO:241) CDR2: WYDASN (SEQ ID NO:233) CDR3: RFTRLRGWYIEDYGLDV (SEQ ID NO:242)	ISSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTFG CGTKVEIK (SEQ ID NO:253) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSIPLT (SEQ ID NO:249)
AB1085 scFv	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAA SGFTFGSYGMHWVRQAPGKCLEW VAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVY YCARRFTHLRGQYIEDYGMDVWG QGTTVTVSS (SEQ ID NO:289) CDR1: GFTFGSY (SEQ ID NO:243) CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:215) CDR3: RFTHLRGQYIEDYGMDV (SEQ ID NO:244)	EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTFG CGTKVEIK (SEQ ID NO:253) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5) CDR3: QQSYSIPLT (SEQ ID NO:249)
共有 4 (AB10 80, AB1081 , AB1084 , AB1085 )	CDR1: GFX <sub>1</sub> FX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> Y 其中 X <sub>1</sub> 是 T 或 A, X <sub>2</sub> 是 S 或 G, X <sub>3</sub> 是 S 或 M (SEQ ID NO:245) CDR2: WYDXSN 其中 X 是 G、A 或 E (SEQ ID NO:246) CDR3: RFTX <sub>1</sub> LRGX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> IEDYGX <sub>4</sub> DV 其中 X <sub>1</sub> 是 H、N 或 R, X <sub>2</sub> 是 W 或 Q, X <sub>3</sub> 是 I 或 Y, X <sub>4</sub> 是 M 或 L (SEQ ID NO:247)	CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSXPLT 其中 X 是 T 或 I (SEQ ID NO:259)

来源	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
AB1424 / AB1612	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAA SGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEW VAVIWYDASNKYYGDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVY YCARRFTHLRGQYIEDYGLDVWG QGTTVTVSS (SEQ ID NO:250) CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:214) CDR2: WYDASN (SEQ ID NO:233) CDR3: RFTHLRGQYIEDYGLDV (SEQ ID NO:248)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVITICRA SQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:251) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSIPLT (SEQ ID NO:249)
AB1424 /1612 (具有 半胱氨 酸异二 聚化突 变用于 二硫桥 形成)	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAA SGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEW VAVIWYDASNKYYGDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVY YCARRFTHLRGQYIEDYGLDVWG QGTTVTVSS (SEQ ID NO:252) CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:214) CDR2: WYDASN (SEQ ID NO:233) CDR3: RFTHLRGQYIEDYGLDV (SEQ ID NO:248)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVITICRA SQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTF GCGTKVEIK (SEQ ID NO:253) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSIPLT (SEQ ID NO:249)
AB1424 /1612 scFv (VH- VL)	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWV AVIWDASNKYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCA RRFTHLRGQYIEDYGLDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SEIVLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTFGCGTK VEIK	

来源	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	(SEQ ID NO:254)	
AB 1424/16 12 scFv (VL- VH)	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTFGCGTK VEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDASNKYYGDSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTHLRGQYIEDYGLDVWGQGT TVTSS (SEQ ID NO:255)	
共有 5 (AB03 69, AB1080 , AB1085 , AB1424 /AB161 2)	CDR1: GFTFXSY, 其中 X 是 S 或 G (SEQ ID NO:256) CDR2: WYDXSN, 其中 X 是 G 或 A (SEQ ID NO:257) CDR3: RFTX <sub>1</sub> LRGX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> IEDYGX <sub>4</sub> DV 其中 X <sub>1</sub> 为 M 或 H, X <sub>2</sub> 为 L, W, 或 Q, X <sub>3</sub> 是 I 或 Y, X <sub>4</sub> 是 M 或 L (SEQ ID NO:258)	CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSXPLT 其中 X 是 T 或 I (SEQ ID NO:259)
共有 6 (主共 有)	CDR1: GX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> FX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> 其中 X <sub>1</sub> 是 F 或 E, X <sub>2</sub> 是 T、P、W 或 A, X <sub>3</sub> 是 S 或 G, X <sub>4</sub> 是 S 或 M, X <sub>5</sub> 是 Y 或 S (SEQ ID NO:260) CDR2: WYDXSN 其中 X 是 G、A 或 E (SEQ ID NO:249) CDR3: RFTX <sub>1</sub> LRGX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> IEDYGX <sub>4</sub> DV 其中 X <sub>1</sub> 是 M、H、N、R、Y 或 S, X <sub>2</sub> 是 L、Q 或 W, X <sub>3</sub> 是 I 或 Y, X <sub>4</sub> 是 M 或 L (SEQ ID NO:261)	CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:77) CDR3: QQSYSXPLT 其中 X 是 T 或 I (SEQ ID NO:259)
3A1	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKA SGYFTFSYWMHWVKQRPGQGLE	DVVMQTPTPLSLPVSLGDQASISCR SSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQ

来源	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	<p>WIGEIDPFDSYTNYNQNFKGKATL            TVDKSSSTAYMLLSSLTSDDSAVY            YCARERLRLWSYFFDYWGQGTTL            TVSS (SEQ ID NO:263)            CDR1: GYTFTSY (SEQ ID            NO:291)            CDR2: DPFDSY (SEQ ID NO:292)            CDR3: ERLRLWSYFFDY (SEQ ID            NO:293)</p>	<p>SPKLLIYKVSNRLSGVPDRFSGSG            SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQ  <b>GSHDPFT</b>FGSGTKLEIK (SEQ ID            NO:264)            CDR1: RSSQSIVHSNGNTYLE            (SEQ ID NO:294)            CDR2: KVSNRLS (SEQ ID            NO:295)            CDR3: FQGSHDPFT (SEQ ID            NO:296)</p>
7G4	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKA            SGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLE            WIGEVDPDSYTNYNQKFKGKATL            TVDKSSSTAYILLSNLTSDDSAVYY            CARERVRLWSYFFDYWGQGTTLT            VSS (SEQ ID NO:265)            CDR1: GYTFTSY (SEQ ID            NO:291)            CDR2: DPDSY (SEQ ID NO:297)            CDR3: ERVRLWSYFFDY (SEQ ID            NO:298)</p>	<p>DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCR            SSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQ            SPKLLIYKVSNRLSGVPDRFSGSG            SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQ  <b>GSHDPFT</b>FGSGTKLEIK (SEQ ID            NO:266)            CDR1: RSSQSIVHSNGNTYLE            (SEQ ID NO:294)            CDR2: KVSNRLS (SEQ ID            NO:295)            CDR3: FQGSHDPFT (SEQ ID            NO:296)</p>
1B3-A7	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCVV            SGFTFSNYAMSWVRQTPEKRLEW            VATISDGGGYTYYPDSVKGRFTISR            DNAKNNLYLQMSHLKSEDTAIYYC            ARDDLGGGNYVSSYFDVWGTGTT            VTVSS (SEQ ID NO:267)            CDR1: GFTFSNY (SEQ ID            NO:299)</p>	<p>DVVMQTPLSLPVSPGDQASISCR            SSQSLVHSNGNTYLYWYLQKPG            QSPKLLIYRVSNRFSGVPDRFSGS            GSGTDFTLKINRVEAEDLGVYFCF  <b>QGTHVPLT</b>FGSGTKLELK (SEQ ID            NO:268)            CDR1: RSSQSLVHSNGNTYLY            (SEQ ID NO:302)</p>

来源	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列
	CDR2: DGGGY (SEQ ID NO:300) CDR3: DDLGGGNYVSSYFDV (SEQ ID NO:301)	CDR2: RVSNRFS (SEQ ID NO:303) CDR3: FQGTHVPLT (SEQ ID NO:304)
<b>10H7- C5</b>	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAA SGFSFSRYAMSWVRQTPEKRLEW VATISDGGSYTHYRDNVKGFRFTISR DNAKNNLNLQMSHLKSEDTAIYYC ARNEMGLYFDYDVYAMDYWGQG TSVTVSS (SEQ ID NO:269) CDR1: GFSFSRY (SEQ ID NO:305) CDR2: DGGSY (SEQ ID NO:306) CDR3: NEMGLYFDYDVYAMDY (SEQ ID NO:307)	DIVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRS SQSLLHSNGNTYLYWYLQKPGQ SPKLLIHRVSNRFSGVPDRFGGSG SGTDFTLKIIRVEAEDLGVYFCFQ GTHVPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:262) CDR1: RSSQSLLHSNGNTYLY (SEQ ID NO:308) CDR2: RVSNRFS (SEQ ID NO:303) CDR3: FQGTHVPWT (SEQ ID NO:309)

[0301] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点(例如,人BAFF-R)包含抗体重链可变结构域(VH)和抗体轻链可变结构域(VL),该重链可变结构域包含与表2中披露的抗体的VH至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,并且该抗体轻链可变结构域包含与表2中披露的相同的抗体的VL至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含表2中披露的抗原结合位点的VH和VL序列的重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,根据Kabat(参见Kabat等人,(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫学目的蛋白序列],NIH出版号91-3242,贝塞斯达),Chothia(参见,例如,Chothia C&Lesk A M,(1987),J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196:901-917),MacCallum(参见MacCallum R M等人,(1996)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]262:732-745),或本领域已知的任何其他CDR测定方法确定。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含表2中披露的抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3。

[0302] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:145的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:146的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实

施例中, VH包含分别包含SEQ ID NO:157或135、158或136、和159或137的氨基酸序列(例如, 分别为SEQ ID NO:157、158和159, 或分别为SEQ ID NO:135、136和137)的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, VL包含分别包含SEQ ID NO:160、161和162的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第二抗原结合位点包含(a) VH, 其包含分别包含SEQ ID NO:157或135、158或136和159或137的氨基酸序列(例如, 分别为SEQ ID NO:157、158和159, 或分别为SEQ ID NO:135、136和137)的CDR1、CDR2和CDR3; 以及(b) VL, 其包含分别包含SEQ ID NO:160、161和162的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第二抗原结合位点作为scFv存在, 其中scFv包含与SEQ ID NO:207或138至少90%(例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。

[0303] 在某些实施例中, 结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL, 该VH包含与SEQ ID NO:147的氨基酸序列至少90%(例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列, 该VL包含与SEQ ID NO:148的氨基酸序列至少90%(例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中, VH包含分别包含SEQ ID NO:163、164和165的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, VL包含分别包含SEQ ID NO:166、167和168的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第二抗原结合位点包含(a) VH, 其包含分别包含SEQ ID NO:163、164和165的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; 以及(b) VL, 其包含分别包含SEQ ID NO:166、167和168的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第二抗原结合位点作为scFv存在, 其中scFv包含与SEQ ID NO:139或140至少90%(例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。

[0304] 在某些实施例中, 结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL, 该VH包含与SEQ ID NO:147的氨基酸序列至少90%(例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列, 该VL包含与SEQ ID NO:150的氨基酸序列至少90%(例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中, VH包含分别包含SEQ ID NO:163、164和165的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, VL包含分别包含SEQ ID NO:169、170和168的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第二抗原结合位点包含(a) VH, 其包含分别包含SEQ ID NO:163、164和165的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; 以及(b) VL, 其包含分别包含SEQ ID NO:169、170和168的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第二抗原结合位点作为scFv存在, 其中scFv包含与SEQ ID NO:141或142至少90%(例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。

[0305] 在某些实施例中, 结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL, 该VH包含与SEQ ID NO:151的氨基酸序列至少90%(例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列, 该VL包含与SEQ ID NO:152的氨基酸序列至少90%(例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实

施例中, VH包含分别包含SEQ ID NO:171、172和173的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, VL包含分别包含SEQ ID NO:174、175和176的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第二抗原结合位点包含 (a) VH, 其包含分别包含SEQ ID NO:171、172和173的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; 以及 (b) VL, 其包含分别包含SEQ ID NO:174、175和176的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第二抗原结合位点作为scFv存在, 其中scFv包含与SEQ ID NO:143或144至少90% (例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列。

[0306] 在某些实施例中, 结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL, 该VH包含与SEQ ID NO:153的氨基酸序列至少90% (例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列, 该VL包含与SEQ ID NO:154的氨基酸序列至少90% (例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列。在某些实施例中, VH包含分别包含SEQ ID NO:177或178、179或180、和181或182的氨基酸序列 (例如, 分别为SEQ ID NO:177、179和181, 或分别为SEQ ID NO:178、180和182) 的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, VL包含分别包含SEQ ID NO:183或184、185或186和187的氨基酸序列 (例如, 分别为SEQ ID NO:183、185和187, 或分别为SEQ ID NO:184、186和187) 的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第二抗原结合位点包含 (a) VH, 其包含分别包含SEQ ID NO:177或178、179或180和181或182的氨基酸序列 (例如, 分别为SEQ ID NO:177、179和181, 或分别为SEQ ID NO:178、180和182) 的CDR1、CDR2和CDR3; 和 (b) VL, 其包含分别包含SEQ ID NO:183或184、185或186和187的氨基酸序列 (例如, 分别为SEQ ID NO:183、185和187, 或分别为SEQ ID NO:184、186和187) 的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第二抗原结合位点作为scFv存在, 其中scFv包含与SEQ ID NO:149或190至少90% (例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列。

[0307] 在某些实施例中, 结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL, 该VH包含与SEQ ID NO:155的氨基酸序列至少90% (例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列, 该VL包含与SEQ ID NO:156的氨基酸序列至少90% (例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列。在某些实施例中, VH包含分别包含SEQ ID NO:177或178、179或180、和181或182的氨基酸序列 (例如, 分别为SEQ ID NO:177、179和181, 或分别为SEQ ID NO:178、180和182) 的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, VL包含分别包含SEQ ID NO:183或188、185或186和187的氨基酸序列 (例如, 分别为SEQ ID NO:183、185和187, 或分别为SEQ ID NO:188、186和187) 的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第二抗原结合位点包含 (a) VH, 其包含分别包含SEQ ID NO:177或178、179或180和181或182的氨基酸序列 (例如, 分别为SEQ ID NO:177、179和181, 或分别为SEQ ID NO:178、180和182) 的CDR1、CDR2和CDR3; 和 (b) VL, 其包含分别包含SEQ ID NO:183或188、185或186和187的氨基酸序列 (例如, 分别为SEQ ID NO:183、185和187; 或分别为SEQ ID NO:188、186和187) 的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第二抗原结合位点作为scFv存在, 其中scFv包含与SEQ ID NO:191或192至少90% (例如, 至少91%、至少92%、

至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。

[0308] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点的VH包含分别包含SEQ ID NO:260、249和261的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点的VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和259的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含(a)VH,其包含分别包含SEQ ID NO:260、249和261的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b)VL,其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和259的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0309] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:310的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:276的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:214、215和216的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含(a)VH,其包含分别包含SEQ ID NO:214、215和216的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b)VL,其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0310] 在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:59、60和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含(a)VH,其包含分别包含SEQ ID NO:214、215和219的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b)VL,其包含分别包含SEQ ID NO:59、60和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0311] 在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:220、215和221的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和222的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含(a)VH,其包含分别包含SEQ ID NO:220、215和221的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b)VL,其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和222的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0312] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点的VH包含分别包含SEQ ID NO:214、215和226的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点的VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含(a)VH,其包含分别包含SEQ ID NO:214、215和226的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b)VL,其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0313] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:277的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:276的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:214、215和223的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某

些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含(a)VH,其包含分别包含SEQ ID NO:214、215和223的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b)VL,其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0314] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:278的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:276的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:214、215和224的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含(a)VH,其包含分别包含SEQ ID NO:214、215和224的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b)VL,其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0315] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:279的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:276的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:214、215和225的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含(a)VH,其包含分别包含SEQ ID NO:214、215和225的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b)VL,其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0316] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点的VH包含分别包含SEQ ID NO:231、215和232的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点的VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含(a)VH,其包含分别包含SEQ ID NO:231、215和232的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b)VL,其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0317] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:280的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:276的氨基酸序列至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:227、215和224的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含(a)VH,其包含分别包含SEQ ID NO:227、215和224的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b)VL,其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的

氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0318] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:281的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:276的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:228、215和229的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含 (a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:228、215和229的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及 (b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0319] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:282的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:276的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:230、215和224的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含 (a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:230、215和224的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及 (b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0320] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点的VH包含分别包含SEQ ID NO:230、233和236的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点的VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含 (a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:230、233和236的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及 (b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0321] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:283的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:276的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:230、233和242的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含 (a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:230、233和242的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及 (b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0322] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:284的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少

95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:276的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:230、233和234的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含(a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:230、233和234的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0323] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:285的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:276的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:230、233和235的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含(a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:230、233和235的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和218的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0324] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点的VH包含分别包含SEQ ID NO:245、246和247的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点的VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和259的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含(a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:245、246和247的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和259的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0325] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:286的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:253的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:214、233和237的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和249的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含(a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:214、233和237的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和249的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0326] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:287的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:253的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实

施例中, VH包含分别包含SEQ ID NO:238、239和240的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和249的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第二抗原结合位点包含 (a) VH, 其包含分别包含SEQ ID NO:238、239和240的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; 以及 (b) VL, 其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和249的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0327] 在某些实施例中, 结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL, 该VH包含与SEQ ID NO:288的氨基酸序列至少90% (例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列, 该VL包含与SEQ ID NO:253的氨基酸序列至少90% (例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列。在某些实施例中, VH包含分别包含SEQ ID NO:241、233和242的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和249的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第二抗原结合位点包含 (a) VH, 其包含分别包含SEQ ID NO:241、233和242的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; 以及 (b) VL, 其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和249的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0328] 在某些实施例中, 结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL, 该VH包含与SEQ ID NO:289的氨基酸序列至少90% (例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列, 该VL包含与SEQ ID NO:289的氨基酸序列至少90% (例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列。在某些实施例中, VH包含分别包含SEQ ID NO:243、215和244的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和249的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第二抗原结合位点包含 (a) VH, 其包含分别包含SEQ ID NO:243、215和244的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; 以及 (b) VL, 其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和249的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0329] 在某些实施例中, 结合BAFF-R的第二抗原结合位点的VH包含分别包含SEQ ID NO:256、257和258的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 结合BAFF-R的第二抗原结合位点的VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和259的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第二抗原结合位点包含 (a) VH, 其包含分别包含SEQ ID NO:256、257和258的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; 以及 (b) VL, 其包含分别包含SEQ ID NO:217、77和259的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0330] 在某些实施例中, 结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL, 该VH包含与SEQ ID NO:250或252的氨基酸序列至少90% (例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列, 该VL包含与SEQ ID NO:251或253的氨基酸序列至少90% (例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列。在某些实施例中, VH包含分别包含SEQ ID NO:214、233和248的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, VL包含分别包含SEQ ID NO:217、77和249的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中, 第二抗原结合位点包含 (a) VH, 其包含分别包含SEQ ID NO:

214、233和248的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3；以及 (b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO: 217、77和249的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点作为scFv存在,其中scFv包含与SEQ ID NO:254或255至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列。

[0331] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:263的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:264的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:291、292和293的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:294、295和296的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含 (a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:291、292和293的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3；以及 (b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:294、295和296的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0332] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:265的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:266的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:291、297和298的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:294、295和296的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含 (a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:291、297和298的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3；以及 (b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:294、295和296的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0333] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:267的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:268的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:299、300和301的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:302、303和304的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含 (a) VH,其包含分别包含SEQ ID NO:299、300和301的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3；以及 (b) VL,其包含分别包含SEQ ID NO:302、303和304的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0334] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点包含VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:269的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%) 相同的氨基酸序列,该VL包含与SEQ ID NO:262的氨基酸序列至少90% (例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至

少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,VH包含分别包含SEQ ID NO:305、306和307的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,VL包含分别包含SEQ ID NO:308、303和309的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在某些实施例中,第二抗原结合位点包含(a)VH,其包含分别包含SEQ ID NO:305、306和307的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;以及(b)VL,其包含分别包含SEQ ID NO:308、303和309的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0335] 在某些实施例中,结合BAFF-R的第二抗原结合位点是scFv。例如,在某些实施例中,第二抗原结合位点包含SEQ ID NO:207、138、139、140、141、142、143、144、149、190、191、192、254或255的氨基酸序列。

[0336] 可替代地,可结合BAFF-R的新抗原结合位点可通过筛选与氨基酸序列的结合来鉴定,所述氨基酸序列通过结合SEQ ID NO:189定义的氨基酸序列、其变体、其成熟胞外片段或含有BAFF-R结构域的片段来定义。

[0337] SEQ ID NO:189

```
MRRGPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRKPAGASSPAPRTALQPQESVGGAGAGE
AALPLPGLLFGAPALLGLALVLAIVLVGLVSWRRRQRRLRGASSAEAPDGDKDAPEPLDKVIIILSPGISDATAPAWP
PPGEDPGTTPPGHSVPVPATELGSTELVTTKTAGPEQQ
```

[0338] 考虑在scFv中,VH和VL可以通过接头连接,例如,(GlyGlyGlyGlySer)<sub>4</sub>即(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>接头(SEQ ID NO:119)。本领域的技术人员将理解,任何其他披露的接头(参见,例如,表10)可以用于具有本文披露的VH和VL序列的scFv中(例如,见表2)。

[0339] 在每个前述实施例中,本文考虑结合BAFF-R的scFv、VH和/或VL序列可包含VH和/或VL的框架区中的氨基酸改变(例如,至少1、2、3、4、5个或10个氨基酸取代、缺失或添加)而不影响它们对BAFF-R的能力。例如,本文考虑结合BAFF-R的scFv、VH和/或VL序列可含有半胱氨酸异二聚化突变,促进scFv的VH和VL之间二硫桥的形成。

[0340] 在某些实施例中,第二抗原结合位点与上述相应的抗原结合位点竞争结合BAFF-R。

[0341] 在某些实施例中,第二抗原结合位点阻断BAFF-R与BAFF配体的相互作用。

#### Fc结构域

[0342] 在Fc结构域内,CD16结合由铰链区和CH2结构域介导。例如,在人IgG1内,与CD16的相互作用主要集中在氨基酸残基Asp 265-Glu 269、Asn 297-Thr 299、Ala 327-Ile 332、Leu 234-Ser 239和CH2结构域中的碳水化合物残基N-乙酰基-D-葡萄糖胺(参见Sondermann等人,Nature[自然],406(6793):267-273)。基于已知的结构域,可以选择突变以增强或降低与CD16的结合亲和力,例如通过使用噬菌体展示文库或酵母表面展示的cDNA文库,或者可以基于已知的三维结构设计相互作用。因此,在某些实施例中,抗体Fc结构域或其部分包含铰链和CH2结构域。

[0343] 异二聚体抗体重链的组装可以通过在同一细胞中表达两个不同的抗体重链序列来完成,这可能导致每个抗体重链的同二聚体的组装以及异二聚体的组装。如US 13/494870、US 16/028850、US 11/533709、US 12/875015、US13/289934、US 14/773418、US 12/811207、US 13/866756、US 14/647480、US 13/642253、和US 14/830336中所示,促进异二聚体的优先装配可以通过在每个抗体重链恒定区的CH3结构域中掺入不同的突变来实现。例

如,可以基于人IgG1在CH3结构域中进行突变,并在第一多肽和第二多肽内掺入不同的氨基酸取代对,使这两条链彼此选择性异二聚化。下面所示的氨基酸取代位置均根据Kabat中的EU索引编号(Kabat等人,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫学目的蛋白序列],第5版,United States Public Health Service,National Institutes of Health[公共卫生服务,美国国立卫生研究院],贝塞斯达,其全部内容通过引用并入)。抗体领域的技术人员将理解,此惯例由免疫球蛋白序列特定区域的非连续编号组成,从而能够使对免疫球蛋白家族中的保守位置的引用标准化。因此,由EU索引或Kabat编号方案定义的任何给定免疫球蛋白的位置不一定与其顺序序列相对应。

[0344] 知道根据Kabat或EU索引编号的残基编号,普通技术人员可以应用本领域的教导根据任何常用的编号惯例来鉴定本发明内的氨基酸序列修饰。应当理解,SEQ ID NO提供给定多肽内氨基酸的顺序编号,因此可能不符合Kabat或EU索引提供的相应氨基酸编号。

[0345] 在一种情况下,第一多肽中的氨基酸取代用选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)的较大氨基酸替代原始氨基酸,并且第二多肽中的至少一个氨基酸取代用选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)或缬氨酸(V)的较小氨基酸替代一个或多个原始氨基酸,使得较大的氨基酸取代(突起)适合进入较小的氨基酸取代(腔)的表面。例如,一个多肽可以掺入T366W取代,而另一个可以掺入三个取代,包括T366S、L368A和Y407V。

[0346] 本申请中描述的抗体重链可变结构域可以任选地偶联至与抗体恒定区至少90%相同的氨基酸序列,例如包括铰链、CH2和CH3结构域(具有或不具有CH1结构域)的IgG恒定区。在一些实施例中,恒定区的氨基酸序列与人抗体恒定区(例如人IgG1恒定区、IgG2恒定区、IgG3恒定区或IgG4恒定区)至少90%相同。在一个实施例中,足以结合CD16的抗体Fc结构域或其部分包含与野生型人IgG1 Fc序列DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:118)至少90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%)相同的氨基酸序列。在一些其他实施例中,恒定区的氨基酸序列与来自其他哺乳动物(例如兔、狗、猫、小鼠或马)的抗体恒定区至少90%相同。

[0347] 在一些实施例中,与scFv或Fab片段连接的抗体恒定结构域能够结合CD16。在一些实施例中,蛋白掺入了抗体Fc结构域的一部分(例如,足以结合CD16的抗体Fc结构域的一部分),其中抗体Fc结构域包含铰链和CH2结构域(例如,铰链和人IgG1抗体的CH2结构域)和/或与人IgG抗体的氨基酸序列234-332至少90%相同的氨基酸序列。

[0348] 与人IgG1恒定区相比,一个或多个突变可以掺入恒定区,例如在Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411和/或K439。示例性取代包括,例如,Q347E、Q347R、Y349S、Y349K、Y349T、Y349D、Y349E、Y349C、T350V、L351K、L351D、L351Y、S354C、E356K、E357Q、E357L、E357W、K360E、K360W、Q362E、S364K、S364E、S364H、S364D、T366V、T366I、T366L、T366M、T366K、T366W、T366S、L368E、L368A、L368D、K370S、N390D、N390E、K392L、K392M、K392V、K392F、K392D、K392E、T394F、T394W、D399R、D399K、D399V、S400K、S400R、D401K、F405A、F405T、F405L、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、K409R、T411D、T411E、K439D、和

K439E。

[0349] 在某些实施例中,可掺入人IgG1恒定区的CH1中的突变可以在氨基酸V125、F126、P127、T135、T139、A140、F170、P171和/或V173处。在某些实施例中,可掺入人IgG1恒定区的C $\kappa$ 中的突变可以在氨基酸E123、F116、S176、V163、S174和/或T164处。

[0350] 可替代地,氨基酸取代可选自表3中所示的下列取代组。

表3		
	第一多肽	第二多肽
组1	S364E/F405A	Y349K/T394F
组2	S364H/D401K	Y349T/T411E
组3	S364H/T394F	Y349T/F405A
组4	S364E/T394F	Y349K/F405A
组5	S364E/T411E	Y349K/D401K
组6	S364D/T394F	Y349K/F405A
组7	S364H/F405A	Y349T/T394F
组8	S364K/E357Q	L368D/K370S
组9	L368D/K370S	S364K
组10	L368E/K370S	S364K
组11	K360E/Q362E	D401K
组12	L368D/K370S	S364K/E357L
组13	K370S	S364K/E357Q
组14	F405L	K409R
组15	K409R	F405L

[0351] 可替代地,氨基酸取代可选自表4中所示的下列取代组。

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

[0352] 可替代地,氨基酸取代可选自表5中所示的下列取代组。

表5		
	第一多肽	第二多肽
组1	T366K/L351K	L351D/L368E
组2	T366K/L351K	L351D/Y349E
组3	T366K/L351K	L351D/Y349D
组4	T366K/L351K	L351D/Y349E/L368E
组5	T366K/L351K	L351D/Y349D/L368E

组6	E356K/D399K	K392D/K409D
----	-------------	-------------

[0353] 可替代地,每条多肽链中的至少一个氨基酸取代可以选自表6。

表 6	
第一多肽	第二多肽
L351Y、D399R、D399K、 S400K、S400R、Y407A、 Y407I、Y407V	T366V、T366I、T366L、T366M、 N390D、N390E、K392L、 K392M、K392V、K392F K392D、 K392E、K409F、K409W、T411D 和 T411E

[0354] 可替代地,至少一个氨基酸取代可以选自表7中的以下取代组,其中第一多肽列中指示的一个或多个位置被任何已知的带负电的氨基酸替代,并且第二多肽列中指示的一个或多个位置被任何已知的带正电的氨基酸替代。

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

[0355] 可替代地,至少一个氨基酸取代可以选自表8中的以下组,其中第一多肽列中指示的一个或多个位置被任何已知的带正电的氨基酸替代,并且第二多肽列中指示的一个或多个位置被任何已知的带负电的氨基酸替代。

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

[0356] 可替代地,氨基酸取代可选自表9中的以下组。

表9	
第一多肽	第二多肽
T350V、L351Y、F405A、和Y407V	T350V、T366L、K392L、和T394W

[0357] 可替代地或另外地,异多聚体蛋白的结构稳定性可通过在第一或第二多肽链中的任一个上引入S354C和在相对多肽链上引入Y349C来增加,这在两个多肽的界面内形成人工二硫桥。

[0358] 在一些实施例中,抗体恒定区一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在位置T366处不同,并且其中抗体恒定区另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由T366、L368和Y407组成的组位置处不同。

[0359] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由T366、L368和Y407组成的组位置处不同,并且其中抗体恒定区另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在位置T366处不同。

[0360] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由E357、K360、Q362、S364、L368、K370、T394、D401、F405、和T411组成的组位置处不同,并且其中抗体恒定区的另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由Y349、E357、S364、L368、K370、T394、D401、F405、和T411组成的组位置处不同。

[0361] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由Y349、E357、S364、L368、K370、T394、D401、F405和T411组成的组位置处不同,并且其中抗体恒定区的另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由E357、K360、Q362、S364、L368、K370、T394、D401、F405和T411组成的组位置处不同。

[0362] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由L351、D399、S400和Y407组成的组位置处不同,并且其中抗体恒定区的另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由T366、N390、K392、K409和T411组成的组位置处不同。

[0363] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由T366、N390、K392、K409和T411组成的组位置处不同,并且其中抗体恒定区的另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由L351、D399、S400和Y407组成的组位置处不同。

[0364] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由Q347、Y349、K360和K409组成的组位置处不同,并且其中抗体恒定区的另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由Q347、E357、D399和F405组成的组位置处不同。

[0365] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由Q347、E357、D399和F405组成的组位置处不同,并且其中抗体恒定区的另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由Y349、K360、Q347和K409组成的组位置处不同。

[0366] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由K370、K392、K409和K439组成的组位置处不同,并且其中抗体恒定区的另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由D356、E357和D399组成的组位置处不同。

[0367] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由D356、E357和D399组成的组位置处不同,并且其中抗体恒定区的另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由K370、K392、K409和K439组成的组位置处不同。

[0368] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由L351、E356、T366和D399组成的组位置处不同,并且其中抗体恒定区的另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由Y349、L351、L368、K392和K409组成的组位置处不同。

[0369] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)

恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由Y349、L351、L368、K392和K409组成的组位置处不同,并且其中抗体恒定区的另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列在一个或多个选自由L351、E356、T366和D399组成的组位置处不同。

[0370] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于S354C取代,并且其中抗体恒定区另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于Y349C取代。

[0371] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于Y349C取代,并且其中抗体恒定区另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于S354C取代。

[0372] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于K360E和K409W取代,并且其中抗体恒定区另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于Q347R、D399V和F405T取代。

[0373] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于Q347R、D399V和F405T取代,并且其中抗体恒定区另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于K360E和K409W取代。

[0374] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于T366W取代,并且其中抗体恒定区另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于T366S、T368A和Y407V取代。

[0375] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于T366S、T368A和Y407V取代,并且其中抗体恒定区另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于T366W取代。

[0376] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于T350V、L351Y、F405A和Y407V取代,并且其中抗体恒定区另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于T350V、T366L、K392L和T394W取代。

[0377] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于T350V、T366L、K392L和T394W取代,并且其中抗体恒定区另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于T350V、L351Y、F405A和Y407V取代。

[0378] 在一些实施例中,抗体恒定区的一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于F405L取代,并且其中抗体恒定区另一个多肽链的氨基酸序列与IgG1(例如,人IgG1)恒定区的氨基酸序列的不同之处在于K409R取代。

#### 示例性多特异性结合蛋白

[0379] 下面列出的是包含结合BAFF-R的抗原结合位点和结合NKG2D的抗原结合位点的TriNKET的实例,每个抗原结合位点都连接到抗体恒定区,其中抗体恒定区包括能够使两条

Fc链异二聚化的突变。

[0380] 示例性的靶向BAFF-R的TriNKET被设想为呈F3’、F4和2-Fab形式。如上所述,在F3’形式中,结合BAFF-R的抗原结合位点是scFv,结合NKG2D的抗原结合位点是Fab。在F4形式中,结合BAFF-R的抗原结合位点是Fab片段,结合NKG2D的抗原结合位点是scFv。在每个TriNKET中,scFv可以包含VH和VL区域中的Cys取代,促进在scFv的VH和VL之间形成二硫桥。在2-Fab形式中,结合BAFF-R的抗原结合位点和结合NKG2D的抗原结合位点都是Fab。

[0381] scFv的VH和VL可通过接头连接,例如,肽接头。在某些实施例中,肽接头是柔性接头。关于接头的氨基酸组成,选择具有赋予柔性、不干扰本申请中描述的蛋白的其他结构域的结构和功能并且抵抗蛋白酶切割的特性的肽。例如,甘氨酸和丝氨酸残基通常提供蛋白酶抗性。在某些实施例中,VL通过(GlyGlyGlyGlySer)<sub>4</sub>((G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>)接头(SEQ ID NO:119)连接到VH的N末端或C末端。

[0382] 接头的长度(例如,柔性接头)可以是“短的”,例如,0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸残基,或“长的”,例如,至少13个氨基酸残基。在某些实施例中,接头长度是10-50、10-40、10-30、10-25、10-20、15-50、15-40、15-30、15-25、15-20、20-50、20-40、20-30、或20-25个氨基酸残基。

[0383] 在某些实施例中,接头包含以下或选自由以下组成的组:(GS)<sub>n</sub>(SEQ ID NO:120)、(GGS)<sub>n</sub>(SEQ ID NO:121)、(GGGS)<sub>n</sub>(SEQ ID NO:122)、(GGSG)<sub>n</sub>(SEQ ID NO:123)、(GSGG)<sub>n</sub>(SEQ ID NO:124)、和(GGGGS)<sub>n</sub>(SEQ ID NO:125)序列,其中n是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20。在某些实施例中,接头包含以下或由以下组成:选自SEQ ID NO:119和SEQ ID NO:126-134的氨基酸序列,如表10中所列。

表 10	
SEQ ID	氨基酸序列
SEQ ID NO:126	GSGSGSGSGSGSGSGSGSGS
SEQ ID NO:127	GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGS
SEQ ID NO:128	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS
SEQ ID NO:129	GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG



PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0388] A49MI-VH-CH1-Fc (SEQ ID NO:194) (“链H”)

EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFT  
ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA  
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPK  
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELLENQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0389] A49MI-VL-CL (SEQ ID NO:195) (“链L”)

DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQQGVSPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0390] scFv-伊利尤单抗-VL-VH-Fc (SEQ ID NO:193) 代表通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的结合BAFF-R的scFv的完整序列。连接至scFv的Fc结构域包括用于异二聚化的Q347R、D399V和F405T取代以及用于与如下文所述的A49MI-VH-CH1-Fc中的Y349C取代形成二硫键的S354C取代。scFv具有SEQ ID NO:207的氨基酸序列,其包括伊利尤单抗的重链可变结构域通过(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>接头连接到伊利尤单抗的轻链可变结构域的C末端。scFv包含VH和VL区域中在G44和Q100处的Cys取代,促进在scFv的VH和VL之间形成二硫桥。

[0391] A49MI-VH-CH1-Fc (SEQ ID NO:194) 代表Fab片段的轻链部分,它包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:95) 的重链可变结构域和CH1结构域,连接至Fc结构域。A49MI-VH-CH1-Fc中的Fc结构域包括CH3结构域中的Y349C取代,它与scFv-伊利尤单抗-VL-VH-Fc中Fc上的S354C取代形成二硫键。在A49MI-VH-CH1-Fc中,Fc结构域还包括K360E和K409W取代,用于与scFv-伊利尤单抗-VL-VH-Fc中的Fc异二聚化。

[0392] A49MI-VL-CL (SEQ ID NO:195) 代表Fab片段的轻链部分,包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:85) 的轻链可变结构域和轻链恒定结构域。

[0393] 本披露中描述的另一种TriNKET是伊利尤单抗-2-Fab。伊利尤单抗-2-Fab包括(a) 结合BAFF-R的Fab片段,其包含表2中描述的伊利尤单抗的VH序列和VL序列,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域连接到Fc结构域(不包括商用伊利尤单抗抗体中存在的抗体依赖性细胞毒性增强突变);(b) 衍生自A49MI的结合NKG2D的Fab片段,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域与Fc结构域连接。伊利尤单抗-2-Fab包括四种多肽:伊利尤单抗-VH-CH1-Fc-Genmab、伊利尤单抗-VL-CL、A49MI-VH-CH1-Fc、和A49MI-VL-CL-Genmab。

[0394] 伊利尤单抗-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:196)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSNSAAWGWIRQSPGRGLEWLGRIYYRSKWYNSYAVSVKS  
RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARYQWVVKIGVFDSWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT  
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPK  
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK

GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0395] 伊利尤单抗-VL-CL (SEQ ID NO:197)

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFILPEYLSWYQQKPGQAPRLLIYGSSSRATGVPARFSGSGGSDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQFYSSPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0396] A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:213)

EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVEPK SCDKTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0397] A49MI-VL-CL (SEQ ID NO:195)

DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQGVSPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0398] 伊利尤单抗-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:196) 代表Fab片段的重链部分,其包含结合BAFF-R的伊利尤单抗的重链可变结构域 (SEQ ID NO:145) 和CH1结构域,连接至Fc结构域。伊利尤单抗-VH-CH1-Fc-Genmab中的Fc结构域包括F405L取代,用于与A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab (其包括K409R取代) 中的Fc异二聚化。

[0399] 伊利尤单抗-VL-CL (SEQ ID NO:197) 代表包含结合的BAFF-R的伊利尤单抗的轻链可变结构域 (SEQ ID NO:146) 和轻链恒定结构域的Fab片段的轻链部分。

[0400] A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:213) 包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:95) 的重链可变结构域和CH1结构域,连接到Fc结构域。A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab中的Fc结构域包括K409R取代,用于与伊利尤单抗-VH-CH1-Fc-Genmab (包括F405L取代) 中的Fc异二聚化。

[0401] 如上所述,A49MI-VL-CL (SEQ ID NO:195) 包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:85) 的轻链可变结构域和轻链恒定结构域。

[0402] 本披露中描述的另一个示例性TriNKET是hCOH-1-F3' TriNKET.hCOH-1-F3' 包括 (a) 衍生自表2的hCOH-1的结合BAFF-R的scFv序列,呈VH位于VL的C末端的取向,连接到Fc结构域以及 (b) 衍生自A49MI的结合NKG2D的Fab片段,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域连接到Fc结构域。hCOH-1-F3' 包括三种多肽:scFv-hCOH-1-VL-VH-Fc、A49MI-VH-CH1-Fc和A49MI-VL-CL。

[0403] scFv-hCOH-1-VL-VH-Fc (SEQ ID NO:198) (“链S”)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESDNYGISFLNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKCLEYIGYISYSGSTYINPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCASPNIYPFYAMDYWGQGTLVTVSSASDKTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED

DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
RVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLSVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNV  
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0028] scFv-hCOH-1-VL-VH-Fc (SEQ ID NO:198) 代表通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的结合BAFF-R的scFv的完整序列。连接至scFv的Fc结构域包括用于异二聚化的Q347R、D399V和F405T取代以及用于与如下文所述的A49MI-VH-CH1-Fc中的Y349C取代形成二硫键的S354C取代。scFv具有SEQ ID NO:149的氨基酸序列,其包括hCOH-1的重链可变结构域通过 $(G_4S)_4$ 接头连接到hCOH-1的轻链可变结构域的C末端。scFv包含VH和VL区域中在G44和G100处的Cys取代,促进在scFv的VH和VL之间形成二硫桥。

[0404] 如上所述,A49MI-VH-CH1-Fc (SEQ ID NO:194) 包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:95) 的重链可变结构域和CH1结构域,连接到Fc结构域。A49MI-VH-CH1-Fc中的Fc结构域包括CH3结构域中的Y349C取代,它与scFv-hCOH-1-VL-VH-Fc中Fc上的S354C取代形成二硫键。在A49MI-VH-CH1-Fc中,Fc结构域还包括K360E和K409W取代,用于与scFv-hCOH-1-VL-VH-Fc中的Fc异二聚化。

[0405] 如上所述,A49MI-VL-CL (SEQ ID NO:195) 包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:85) 的轻链可变结构域和轻链恒定结构域。

[0406] 本披露中描述的另一TriNKET是hCOH-1-2-Fab。hCOH-1-2-Fab包括(a) 衍生自hCOH-1的结合BAFF-R的Fab片段,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域与Fc结构域连接;(b) 衍生自A49MI的结合NKG2D的Fab片段,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域与Fc结构域连接。hCOH-1-2-Fab包括四种多肽:hCOH-1-VH-CH1-Fc-Genmab、hCOH-1-VL-CL、A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab、和A49MI-VL-CL。

[0407] hCOH-1-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:208)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKGLYIGYISYSGSTYYNPSLKSRTV  
SRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASPYPFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK  
THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD  
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0408] hCOH-1-VL-CL (SEQ ID NO:209)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESDNYGISFLNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATGIPARFSGS  
GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR  
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0409] hCOH-1-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:208) 代表Fab片段的轻链部分,它包含结合BAFF-R的hCOH-1 (SEQ ID NO:153) 的轻链可变结构域和CH1结构域,连接至Fc结构域。hCOH-1-VH-CH1-Fc-Genmab中的Fc结构域包括F405L取代,用于与A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab (其包括K409R取代) 中的Fc异二聚化。

[0410] hCOH-1-VL-CL (SEQ ID NO:209) 代表包含结合的BAFF-R的hCOH-1的轻链可变结构

域(SEQ ID NO:154)和轻链恒定结构域的Fab片段的轻链部分。

[0411] A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab(SEQ ID NO:213)包含结合NKG2D的A49MI(SEQ ID NO:95)的重链可变结构域和CH1结构域,连接到Fc结构域。A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab中的Fc结构域包括K409R取代,用于与hCOH-1-VH-CH1-Fc-Genmab(包括F405L取代)中的Fc异二聚化。

[0412] A49MI-VL-CL(SEQ ID NO:195)包含结合NKG2D的A49MI(SEQ ID NO:85)的轻链可变结构域和轻链恒定结构域。

[0413] 本披露中描述的另一个示例性TriNKET是hCOH-2-F3'。hCOH-2-F3'包括(a)衍生自表2的hCOH-2的结合BAFF-R的scFv序列,呈VH位于VL的C末端的取向,连接到Fc结构域以及(b)衍生自A49MI的结合NKG2D的Fab片段,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域与Fc结构域连接。hCOH-2-F3'包括三种多肽:scFv-hCOH-1-VL-VH-Fc、A49MI-VH-CH1-Fc和A49MI-VL-CL。

[0414] scFv-hCOH-2-VL-VH-Fc(SEQ ID NO:210) (“链S”)

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESDVNYGISFMNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKCLEYIGYISYSGSTYINPSLKSRTISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCASPNIYPFYAMDYWGQGLVTVSSASDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP R VYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0415] scFv-hCOH-2-VL-VH-Fc(SEQ ID NO:210)代表通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的结合BAFF-R的scFv的完整序列。连接至scFv的Fc结构域包括用于异二聚化的Q347R、D399V和F405T取代以及用于与如下文所述的A49MI-VH-CH1-Fc中的Y349C取代形成二硫键的S354C取代。scFv具有SEQ ID NO:191的氨基酸序列,其包括hCOH-2的重链可变结构域通过(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>接头连接到hCOH-2的轻链可变结构域的C末端。scFv包含VH和VL区域中在G44和G100处的Cys取代,促进在scFv的VH和VL之间形成二硫桥。

[0416] A49MI-VH-CH1-Fc(SEQ ID NO:194)代表Fab片段的轻链部分,它包含结合NKG2D的A49MI(SEQ ID NO:95)的重链可变结构域和CH1结构域,连接至Fc结构域。A49MI-VH-CH1-Fc中的Fc结构域包括CH3结构域中的Y349C取代,它与scFv-hCOH-2-VL-VH-Fc中Fc上的S354C取代形成二硫键。在A49MI-VH-CH1-Fc中,Fc结构域还包括K360E和K409W取代,用于与scFv-hCOH-2-VL-VH-Fc中的Fc异二聚化。

[0417] A49MI-VL-CL(SEQ ID NO:195)代表Fab片段的轻链部分,包含结合NKG2D的A49MI(SEQ ID NO:85)的轻链可变结构域和轻链恒定结构域。

[0418] 本披露中描述的另一种TriNKET是hCOH-2-2-Fab。hCOH-2-2-Fab包括(a)衍生自hCOH-2的结合BAFF-R的Fab片段,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域与Fc结构域连接;(b)衍生自A49MI的结合NKG2D的Fab片段,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域与Fc结构域连接。hCOH-2-2-Fab包括四种多肽:hCOH-2-VH-CH1-Fc-Genmab、hCOH-2-VL-CL、A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab、和A49MI-VL-CL。

[0419] hCOH-2-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:199)

EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKGLYIGYISYSGSTYYNPSLKSRTI  
SRDTSKNQYSLKLSVTAADTAVYYCASPYPFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD  
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0420] hCOH-2-VL-CL (SEQ ID NO:200)

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESDVNYGISFMNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATGIPARFSGS  
GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR  
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0421] hCOH-2-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:199) 代表Fab片段的重链部分,它包含结合BAFF-R的hCOH-2 (SEQ ID NO:155) 的重链可变结构域和CH1结构域,连接至Fc结构域。hCOH-2-VH-CH1-Fc-Genmab中的Fc结构域包括F405L取代,用于与A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab (其包括K409R取代) 中的Fc异二聚化。

[0422] hCOH-2-VL-CL (SEQ ID NO:200) 代表包含结合的BAFF-R的hCOH-2的轻链可变结构域 (SEQ ID NO:156) 和轻链恒定结构域的Fab片段的轻链部分。

[0423] A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:213) 包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:95) 的重链可变结构域和CH1结构域,连接到Fc结构域。A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab中的Fc结构域包括K409R取代,用于与hCOH-2-VH-CH1-Fc-Genmab (包括F405L取代) 中的Fc异二聚化。

[0424] A49MI-VL-CL (SEQ ID NO:195) 包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:85) 的轻链可变结构域和轻链恒定结构域。

[0425] 本披露中描述的另一个示例性TriNKET是V3-46s-F3'。V3-46s-F3' 包括 (a) 衍生自表2的V3-46s的结合BAFF-R的scFv序列,呈VH位于VL的C末端的取向,连接到Fc结构域以及 (b) 衍生自A49MI的结合NKG2D的Fab片段,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域与Fc结构域连接。V3-46s-F3' 包括三种多肽:scFv-hCOH-1-VL-VH-Fc、A49MI-VH-CH1-Fc和A49MI-VL-CL。

[0426] scFv-V3-46s-VL-VH-Fc (SEQ ID NO:201) (“链S”)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFRSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSQISPPTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR  
LSCAASGFTISSSSIHWVRQAPGKCLEWVAWVLPVSGFTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC  
ARRVCYNRLGVCAGGMDYWGQGTLVTVSSASDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV  
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
REPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSLKLTVDKSRWQQ  
GNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0427] scFv-V3-46s-VL-VH-Fc (SEQ ID NO:201) 代表通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的结合BAFF-R的scFv的完整序列。连接至scFv的Fc结构域包括用于异二聚化的Q347R、D399V和F405T取代以及用于与如下文所述的A49MI-VH-CH1-Fc中的Y349C取代形成二硫键的S354C取代。scFv具有SEQ ID NO:139的氨基酸序列,其包括V3-46s的重链可变结

构域通过  $(G_4S)_4$  接头连接到V3-46s的轻链可变结构域的C末端。scFv包含VH和VL区域中在G44和Q100处的Cys取代,促进在scFv的VH和VL之间形成二硫桥。

[0428] A49MI-VH-CH1-Fc (SEQ ID NO:194) 代表Fab片段的轻链部分,它包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:95) 的重链可变结构域和CH1结构域,连接至Fc结构域。A49MI-VH-CH1-Fc中的Fc结构域包括CH3结构域中的Y349C取代,它与scFv-V3-46s-VL-VH-Fc中Fc上的S354C取代形成二硫键。在A49MI-VH-CH1-Fc中,Fc结构域还包括K360E和K409W取代,用于与scFv-V3-46s-VL-VH-Fc中的Fc异二聚化。

[0429] A49MI-VL-CL (SEQ ID NO:195) 代表Fab片段的轻链部分,包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:85) 的轻链可变结构域和轻链恒定结构域。

[0430] 本披露中描述的另一TriNKET是V3-46s-2-Fab。V3-46s-2-Fab包括(a) 衍生自V3-46s的结合BAFF-R的Fab片段,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域与Fc结构域连接;(b) 衍生自A49MI的结合NKG2D的Fab片段,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域与Fc结构域连接。V3-46s-2-Fab包括四种多肽:V3-46s-VH-CH1-Fc-Genmab、V3-46s-VL-CL、A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab、和A49MI-VL-CL。

[0431] V3-46s-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:202)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSSIHWVRQAPGKGLEWVAWVLPVSGFTDYADSVKGRFT  
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVCYNRLGVCAGMDYWGQGLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV  
EPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV  
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

[0432] V3-46s-VL-CL (SEQ ID NO:203)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFRSGSGSGT  
DFTLTISSLQPEDFATYYCQQSQISPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0433] V3-46s-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:202) 代表Fab片段的轻链部分,它包含结合BAFF-R的V3-46s (SEQ ID NO:147) 的重链可变结构域和CH1结构域,连接至Fc结构域。V3-46s-VH-CH1-Fc-Genmab中的Fc结构域包括F405L取代,用于与A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab (其包括K409R取代) 中的Fc异二聚化。

[0434] V3-46s-VL-CL (SEQ ID NO:203) 代表包含结合的BAFF-R的V3-46s的轻链可变结构域 (SEQ ID NO:148) 和轻链恒定结构域的Fab片段的轻链部分。

[0435] A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:213) 包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:95) 的重链可变结构域和CH1结构域,连接到Fc结构域。A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab中的Fc结构域包括K409R取代,用于与V3-46s-VH-CH1-Fc-Genmab (包括F405L取代) 中的Fc异二聚化。

[0436] A49MI-VL-CL (SEQ ID NO:195) 包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:85) 的轻链可变结构域和轻链恒定结构域。

[0437] 本披露中描述的另一TriNKET是V3-46s-42-F3'。V3-46s-42-F3' 包括(a)

衍生自表2的V3-46s-42的结合BAFF-R的scFv序列,呈VH位于VL的C末端的取向,连接到Fc结构域以及(b)衍生自A49MI的结合NKG2D的Fab片段,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域与Fc结构域连接。V3-46s-42-F3'包括三种多肽:scFv-V3-46s-42-VL-VH-Fc、A49MI-VH-CH1-Fc、和A49MI-VL-CL。

[0438] scFv-V3-46s-42-VL-VH-Fc (SEQ ID NO:204) (“链S”)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDISTAVAWYQQKPKAPKLLIYAASFLYSGVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSQISPPTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR  
LSCAASGFTISSSSIHWRQAPGKCLEWVAWVLPVSGFTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC  
ARRVCYNRLGVCAGGMDYWGQGLTVTVSSASDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV  
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP  
REPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDVSDGFTLYSKLTVDKSRWQQG  
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSPG

[0439] scFv-V3-46s-42-VL-VH-Fc (SEQ ID NO:204) 代表通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的结合BAFF-R的scFv的完整序列。连接至scFv的Fc结构域包括用于异二聚化的Q347R、D399V和F405T取代以及用于与如下文所述的A49MI-VH-CH1-Fc中的Y349C取代形成二硫键的S354C取代。scFv具有SEQ ID NO:141的氨基酸序列,其包括V3-46s-42的重链可变结构域通过(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>接头连接到V3-46s-42的轻链可变结构域的C末端。scFv包含VH和VL区域中在G44和Q100处的Cys取代,促进在scFv的VH和VL之间形成二硫桥。

[0440] A49MI-VH-CH1-Fc (SEQ ID NO:194) 代表Fab片段的的重链部分,它包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:95) 的重链可变结构域和CH1结构域,连接至Fc结构域。A49MI-VH-CH1-Fc中的Fc结构域包括CH3结构域中的Y349C取代,它与scFv-V3-46s-42-VL-VH-Fc中Fc上的S354C取代形成二硫键。在A49MI-VH-CH1-Fc中,Fc结构域还包括K360E和K409W取代,用于与scFv-V3-46s-42-VL-VH-Fc中的Fc异二聚化。

[0441] A49MI-VL-CL (SEQ ID NO:195) 代表Fab片段的轻链部分,包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:85) 的轻链可变结构域和轻链恒定结构域。

[0442] 本披露中描述的另一种TriNKET是V3-46s-42-2-Fab。V3-46s-42-2-Fab包括(a)衍生自V3-46s-42的结合BAFF-R的Fab片段,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域与Fc结构域连接; (b) 衍生自A49MI的结合NKG2D的Fab片段,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域与Fc结构域连接。V3-46s-42-2-Fab包括四种多肽:V3-46s-42-VH-CH1-Fc-Genmab、V3-46s-42-VL-CL、A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab和A49MI-VL-CL。

[0443] V3-46s-42-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:202)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSSIHWRQAPGKGLEWVAWVLPVSGFTDYADSVKGRFT  
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVCYNRLGVCAGGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGG  
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVK  
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV

KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG  
[0444] V3-46s-42-VL-CL (SEQ ID NO:206)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDITAVAWYQQKPKGKAPKLLIYAASFLYSGVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSQISPPTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0445] V3-46s-42-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:205) 代表Fab片段的重链部分,它包含结合BAFF-R的V3-46s-42 (SEQ ID NO:147) 的重链可变结构域和CH1结构域,连接至Fc结构域。V3-46s-42-VH-CH1-Fc中的Fc结构域包括F405L取代,用于与A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab (其包括K409R取代) 中的Fc异二聚化。

[0446] V3-46s-42-VL-CL (SEQ ID NO:206) 代表包含结合的BAFF-R的V3-46s-42的轻链可变结构域 (SEQ ID NO:150) 和轻链恒定结构域的Fab片段的轻链部分。

[0447] A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:213) 包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:95) 的重链可变结构域和CH1结构域,连接到Fc结构域。A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab中的Fc结构域包括K409R取代,用于与V3-46s-42-VH-CH1-Fc-Genmab (包括F405L取代) 中的Fc异二聚化。

[0448] A49MI-VL-CL (SEQ ID NO:195) 包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:85) 的轻链可变结构域和轻链恒定结构域。

[0449] 本披露中描述的另一个示例性TriNKET是Hu9.1-73-F3' TriNKET。Hu9.1-73-F3' TriNKET包括 (a) 衍生自表2的Hu9.1-73的结合BAFF-R的scFv序列,呈VH位于VL的C末端的取向,连接到Fc结构域以及 (b) 衍生自A49MI的结合NKG2D的Fab片段,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域与Fc结构域连接。Hu9.1-73-F3' 包括三种多肽:scFv-Hu9.1-73-VL-VH-Fc、A49MI-VH-CH1-Fc、和A49MI-VL-CL。

[0450] scFv-Hu9.1-73-VL-VH-Fc (SEQ ID NO:211) (“链S”)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKSSQSLLYSSNQNNYLAWYQQKPKGKAPKLLIYWAQHLDGSGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYTYPTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ  
PGGSLRLSCAASGLPMAGFYTSWVRQAPGKCLEWVGFIRDKANGYTTTEYNPSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA  
EDTAVYYCAQVRRALDYWGQGLVTVSSASDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR  
EPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

[0451] scFv-Hu9.1-73-VL-VH-Fc (SEQ ID NO:211) 代表通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的结合BAFF-R的scFv的完整序列。连接至scFv的Fc结构域包括用于异二聚化的Q347R、D399V和F405T取代以及用于与如下文所述的A49MI-VH-CH1-Fc中的Y349C取代形成二硫键的S354C取代。scFv具有SEQ ID NO:143的氨基酸序列,其包括scFv-Hu9.1-73的重链可变结构域通过(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>接头连接到scFv-Hu9.1-73的轻链可变结构域的C末端。scFv包含VH和VL区域中在G44和Q100处的Cys取代,促进在scFv的VH和VL之间形成二硫桥。

[0452] A49MI-VH-CH1-Fc (SEQ ID NO:194) 代表Fab片段的重链部分,它包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:95) 的重链可变结构域和CH1结构域,连接至Fc结构域。A49MI-VH-CH1-Fc

中的Fc结构域包括CH3结构域中的Y349C取代,它与scFv-Hu9.1-73-VL-VH-Fc中Fc上的S354C取代形成二硫键。在A49MI-VH-CH1-Fc中,Fc结构域还包括K360E和K409W取代,用于与scFv-Hu9.1-73-VL-VH-Fc中的Fc异二聚化。

[0453] A49MI-VL-CL (SEQ ID NO:195) 代表Fab片段的轻链部分,包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:85) 的轻链可变结构域和轻链恒定结构域。

[0454] 本披露中描述的另一种TriNKET是Hu9.1-73-2-Fab。Hu9.1-73-2-Fab包括(a) 衍生自Hu9.1-73的结合BAFF-R的Fab片段,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域与Fc结构域连接;(b) 衍生自A49MI的结合NKG2D的Fab片段,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域与Fc结构域连接。Hu9.1-73-2-Fab包括四种多肽:Hu9.1-73-VH-CH1-Fc-Genmab、Hu9.1-73-VL-CL、A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab、和A49MI-VL-CL。

[0455] Hu9.1-73-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:212)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLPMAGFYTSWVRQAPGKGLEWVGFIRDKANGYTTEYNPSVKGR  
FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAQVRRALDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLC  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK  
THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD  
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0456] Hu9.1-73-VL-CL (SEQ ID NO:205)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKSSQSLLYSSNQNNYLAWYQQKPKGKAPKLLIYWAQHLDGSGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY  
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0457] Hu9.1-73-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:212) 代表Fab片段的轻链部分,它包含结合BAFF-R的Hu9.1-73 (SEQ ID NO:151) 的重链可变结构域和CH1结构域,连接至Fc结构域。Hu9.1-73-VH-CH1-Fc中的Fc结构域包括F405L取代,用于与A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab (其包括K409R取代) 中的Fc异二聚化。

[0458] Hu9.1-73-VL-CL (SEQ ID NO:205) 代表包含结合的BAFF-R的Hu9.1-73的轻链可变结构域 (SEQ ID NO:152) 和轻链恒定结构域的Fab片段的轻链部分。

[0459] A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab (SEQ ID NO:213) 包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:95) 的重链可变结构域和CH1结构域,连接到Fc结构域。A49MI-VH-CH1-Fc-Genmab中的Fc结构域包括K409R取代,用于与Hu9.1-73-VH-CH1-Fc-Genmab (包括F405L取代) 中的Fc异二聚化。

[0460] A49MI-VL-CL (SEQ ID NO:195) 包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:85) 的轻链可变结构域和轻链恒定结构域。

[0461] 本披露中描述的TriNKET的另一个实例是AB1424/1612-F3'。AB1424/1612-F3'包括(a) 衍生自表2的AB1424/1612 (具有半胱氨酸异二聚化突变用于二硫桥形成) 的结合BAFF-R的scFv序列,呈VH位于VL的N末端的取向,连接到Fc结构域以及(b) 衍生自A49MI的结合NKG2D的Fab片段,包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变

结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域与Fc结构域连接。AB1424/1612-F3'包括三种多肽:scFv-AB1424/1612-VL-VH-Fc (SEQ ID NO:193)、A49MI-VH-CH1-Fc (SEQ ID NO:194)和A49MI-VL-CL (SEQ ID NO:195)。

[0462] scFv-AB1424/1612-VH-VL-Fc (SEQ ID NO:270) (“链S”)

EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAWIWYDASNKYYGDSVKGRFT  
ISRDN SKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTHLRGQYIEDYGLDVWGQGT TTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGS  
EIVLTQSPSSLSASVGRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFLT  
LQPEDFATYYCQQSYSIPLTFGCGTKVEIKGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
PREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLSVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQ  
GNVFSCSV MHEALHNHYTQKLSLSPG

[0463] A49MI-VH-CH1-Fc (SEQ ID NO:194) (“链H”)

EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFT  
ISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAAGWFDPWGQGT LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA  
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPK  
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKLSLSPG

[0464] A49MI-VL-CL (SEQ ID NO:195) (“链L”)

DIQMTQSPSSVSASVGRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQQGVSPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0465] scFv-AB1424/1612-VH-VL-Fc (SEQ ID NO:270)代表通过包含Ala-Ser的铰链连接到Fc结构域的结合BAFF-R的scFv的完整序列。连接至scFv的Fc结构域包括用于异二聚化的Q347R、D399V和F405T取代以及用于与如下文所述的A49MI-VH-CH1-Fc中的Y349C取代形成二硫键的S354C取代。scFv具有SEQ ID NO:254的氨基酸序列,其包括AB1424/1612的重链可变结构域通过(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>接头连接到AB1424/1612的轻链可变结构域的C末端。scFv包含VH和VL区域中在G44和G100处的半胱氨酸取代,促进在scFv的VH和VL之间形成二硫桥。

[0466] A49MI-VH-CH1-Fc (SEQ ID NO:194)代表Fab片段的轻链部分,它包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:95)的重链可变结构域和CH1结构域,连接至Fc结构域。A49MI-VH-CH1-Fc中的Fc结构域包括CH3结构域中的Y349C取代,它与scFv-AB1424/1612-VL-VH-Fc中Fc上的S354C取代形成二硫键。在A49MI-VH-CH1-Fc中,Fc结构域还包括K360E和K409W取代,用于与scFv-AB1424/1612-VL-VH-Fc中的Fc异二聚化。

[0467] A49MI-VL-CL (SEQ ID NO:195)代表Fab片段的轻链部分,包含结合NKG2D的A49MI (SEQ ID NO:85)的轻链可变结构域和轻链恒定结构域。

[0468] 本披露中描述的TriNKET的另一个实例是AB1424/1612-F4。AB1424/1612-F4包括(a)两个衍生自表2的AB1424/1612的结合BAFF-R的Fab片段,各自包括含有重链可变结构域和CH1结构域的重链部分,以及含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链部分,其中CH1结构域与Fc结构域连接;以及(b)衍生自A49MI的结合NKG2D的scFv序列,连接到Fc结构

域的C末端,呈VH位于VL的C末端的取向。AB1424/1612-F4包括四种多肽:包含AB1424/1612-VH-CH1-CH2-CH3-A49MI-scFv (SEQ ID NO:271)的第一多肽,包含AB-1424/1612-VH-CH1-CH2-CH3 (SEQ ID NO:272)的第二多肽,以及各自包含AB1424/1612-VL-CL (SEQ ID NO:273)的第三和第四多肽。

[0469] AB1424/1612-VH-CH1-CH2-CH3-A49MI-scFv (SEQ ID NO:271) (链“M”)

EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWYDASNKYYGDSVKGRFT  
ISRDNKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTHLRGQYIEDYGLDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG  
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK  
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCL  
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GSGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG  
TDFTLTISLQPEDFATYYCQQGVSPRTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGLVKPGGSL  
RLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKCLEWVSSISSSSSYIYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY  
CARGAPIGAAAGWFDPPWGGTTLTVSS

[0470] AB-1424/1612-VH-CH1-CH2-CH3 (SEQ ID NO:272) (链“H”)

EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWYDASNKYYGDSVKGRFT  
ISRDNKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTHLRGQYIEDYGLDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG  
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK  
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLTCL  
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
G

[0471] AB1424/1612-VL-CL (SEQ ID NO:273) (链“L”)

EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYIPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0472] AB1424/1612-VH-CH1-CH2-CH3-A49MI-scFv (SEQ ID NO:271)代表Fab片段的轻链部分,它包含结合BAFF-R的AB1424/1612 (SEQ ID NO:250)的轻链可变结构域和CH1结构域,连接至Fc结构域,进一步连接至scFv。scFv具有SEQ ID NO:275的氨基酸序列,其包含结合NKG2D的A49MI的轻链可变结构域 (SEQ ID NO:95),该轻链可变结构域通过 $(G_4S)_4$ 接头连接到A49MI的重链可变结构域 (SEQ ID NO:85)的C末端。scFv还包含VH和VL区域中在G44和G100处的Cys取代,促进在scFv的VH和VL之间形成二硫桥。AB1424/1612-VH-CH1-CH2-CH3-A49MI-scFv的scFv通过短SGSGGGGS (SEQ ID NO:274)接头连接到CH3结构域的C末端。AB1424/1612-VH-CH1-CH2-CH3-A49MI-scFv中的Fc结构域包括用于异二聚化的Q347R、D399V和F405T取代以及用于与AB-1424/1612-VH-CH1-CH2-CH3中的Y349C取代形成二硫键的S354C,如下所述。

[0473] AB1424/1612-VH-CH1-CH2-CH3 (SEQ ID NO:272)代表Fab片段的轻链部分,它包含结合BAFF-R的AB1424/1612 (SEQ ID NO:250)的轻链可变结构域和CH1结构域,连接至Fc结

构域。A49MI-VH-CH1-Fc中的Fc结构域包括CH3结构域中的Y349C取代,它与AB1424/1612-VH-CH1-CH2-CH3-A49MI-scFv中Fc上的S354C取代形成二硫键。在AB1424/1612-VH-CH1-CH2-CH3中,Fc结构域还包括用于与AB1424/1612-VH-CH1-CH2-CH3-A49MI-scFv中的Fc异二聚化的K360E和K409W取代。

[0474] AB1424/1612-VL-CL (SEQ ID NO:273) 代表包含结合的BAFF-R的AB1424/1612的轻链可变结构域 (SEQ ID NO:251) 和轻链恒定结构域的Fab片段的轻链部分。

[0475] 在某些实施例中,本披露描述的F3' TriNKET与上述示例性TriNKET之一相同,除了(a)与结合NKG2D的Fab片段连接的Fc结构域包括CH3结构域中用于异二聚化的Q347R、D399V和F405T取代,以及与结合BAFF-R的scFv连接的Fc结构域包括CH3结构域中匹配的K360E和K409W取代;和/或(b)与结合NKG2D的Fab片段连接的Fc结构域包括CH3结构域中的S354C取代,以及与结合BAFF-R的scFv连接的Fc结构域在CH3结构域中包括匹配的Y349C取代,用于形成二硫键。

[0476] 在某些实施例中,本披露描述的2-Fab TriNKET与上述示例性TriNKET之一相同,除了与结合NKG2D的Fab片段连接的Fc结构域在CH3结构域中包括用于异二聚化的F405L取代,以及与结合BAFF-R的Fab片段连接的Fc结构域在CH3结构域中包括匹配的K409R取代。

[0477] 本领域技术人员将理解,在蛋白的生产和/或储存过程中,N末端谷氨酸(E)或谷氨酰胺(Q)可以环化形成内酰胺(例如在生产和/或储存过程中自发地或通过存在的酶催化)。因此,在多肽的氨基酸序列的N末端残基是E或Q的一些实施例中,E或Q被焦谷氨酸取代的相应氨基酸序列也在本文中被考虑。

[0478] 本领域技术人员还将理解,在蛋白的生产和/或储存过程中,蛋白的C末端赖氨酸(K)可以被去除(例如在生产和/或储存过程中自发地或通过存在的酶催化)。对于在其C末端包含Fc结构域的蛋白,经常观察到这样的K的去除。因此,在多肽的氨基酸序列(例如,Fc结构域序列)的C末端残基为K的一些实施例中,本文还考虑去除了K的相应氨基酸序列。

[0479] 上述多特异性蛋白可以使用本领域技术人员熟知的重组DNA技术制备。例如,可以将编码第一免疫球蛋白重链的第一核酸序列克隆到第一表达载体中;可将编码第二免疫球蛋白重链的第二核酸序列克隆到第二表达载体中;可以将编码免疫球蛋白轻链的第三核酸序列克隆到第三表达载体中;并且将第一、第二和第三表达载体一起稳定转染到宿主细胞中以产生多聚体蛋白。

[0480] 为了实现多特异性蛋白的最高产量,可以探索第一、第二和第三表达载体的不同比例以确定转染到宿主细胞中的最佳比例。转染后,可以使用本领域已知的方法,例如有限稀释、ELISA、FACS、显微镜检查或Clonepix,分离单克隆用于细胞库生成。

[0481] 可以在适合生物反应器扩大和维持多特异性蛋白表达的条件下培养克隆。可以使用本领域已知的方法分离和纯化多特异性蛋白,包括离心、深度过滤、细胞裂解、均化、冻融、亲和纯化、凝胶过滤、离子交换色谱、疏水相互作用交换色谱和混合模式色谱。

## II. 多特异性蛋白的特征

[0482] 本文所述的多特异性蛋白包括NKG2D结合位点、BAFF-R结合位点和足以结合CD16的抗体Fc结构域或其部分,或结合CD16的抗原结合位点。在一些实施例中,多特异性蛋白含有结合BAFF-R的另外抗原结合位点,如F4-TriNKET形式中所示例的(例如,图2C和2D)。

[0483] 在一些实施例中,多特异性蛋白表现出与相应单克隆抗体(即含有与掺入多特异

性蛋白中的BAFF-R结合位点相同的BAFF-R结合位点的单克隆抗体)相似的热稳定性。

[0484] 在一些实施例中,多特异性蛋白同时结合表达NKG2D和/或CD16的细胞,例如NK细胞,以及表达BAFF-R的细胞,例如某些肿瘤细胞。多特异性蛋白与NK细胞的结合可以增强NK细胞破坏表达BAFF-R的细胞(例如,表达BAFF-R的肿瘤细胞)的活性。据报道,NK细胞对受应激的靶细胞表现出更强的细胞毒性(参见Chan等人,(2014)Cell Death Differ.[细胞死亡与分化]21(1):5-14)。不希望受理论的束缚,假设当NK细胞通过TriNKET与细胞群接合时,NK细胞可以选择性地杀伤受应激的靶细胞(例如,恶性细胞和肿瘤微环境中的细胞)。这种机制可能有助于提高TriNKET的特异性和降低毒性,从而有可能选择性地清除受应激的细胞,即使BAFF-R的表达不限于所期望的靶细胞。

[0485] 在一些实施例中,多特异性蛋白以与对应的抗BAFF-R单克隆抗体(即含有与掺入多特异性蛋白中的BAFF-R结合位点相同的BAFF-R结合位点的单克隆抗体)相似的亲和力结合BAFF-R。在一些实施例中,多特异性蛋白比相应的单克隆抗体更有效地杀伤表达BAFF-R的肿瘤细胞。

[0486] 在某些实施例中,本文所述的包括BAFF-R结合位点的多特异性蛋白在与表达BAFF-R的细胞共培养时激活原代人NK细胞。NK细胞激活的标志是CD107a脱粒和IFN- $\gamma$ 细胞因子产生的增加。此外,与相应的抗BAFF-R单克隆抗体相比,多特异性蛋白可以在表达BAFF-R的细胞存在的情况下表现出对人NK细胞的卓越激活。

[0487] 在一些实施例中,本文所述的包括BAFF-R结合位点的多特异性蛋白在与表达BAFF-R的细胞共培养时增强静息的和IL-2激活的人NK细胞的活性。

[0488] 在一些实施例中,与结合BAFF-R的相应单克隆抗体相比,多特异性蛋白在靶向表达中等和低水平BAFF-R的肿瘤细胞方面具有优势。

[0489] 在一些实施例中,TriNKET的二价F4形式(即TriNKET包括结合BAFF-R的另外的抗原结合位点)提高了TriNKET结合BAFF-R的亲合力,这实际上稳定了肿瘤细胞表面BAFF-R的表达并维持其高水平。在一些实施例中,F4-TriNKET比相应的F3-TriNKET或F3'-TriNKET介导更有效的肿瘤细胞杀伤。

### III. 治疗应用

[0490] 本申请还描述了使用本文所述的多特异性结合蛋白和/或本文所述的药物组合物治疗自身免疫性疾病或癌症的方法。该方法可用于治疗多种表达BAFF-R的癌症或自身免疫性疾病。

[0491] 治疗方法可以根据待治疗的癌症来表征。待治疗的癌症可以根据在癌细胞表面表达的特定抗原,例如BAFF-R的存在来表征。

[0492] 以表达BAFF-R为特征的癌症包括但不限于B细胞非霍奇金淋巴瘤(B-NHL)、例如慢性淋巴细胞白血病(CLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B-细胞淋巴瘤(DLBCL)、边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL);和自身免疫性炎性疾病。

[0493] 考虑本披露中描述的蛋白、缀合物、细胞和/或药物组合物可用于治疗多种癌症,不限于其中癌细胞或癌症微环境中的细胞表达BAFF-R的癌症。

[0494] 在某些实施例中,癌症是实体瘤。在某些其他实施例中,癌症是脑癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、白血病、肺癌、肝癌、黑色素瘤、卵巢癌、

胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、胃癌、睾丸癌或子宫癌。在仍其他实施例中,癌症是血管化肿瘤、鳞状细胞癌、腺癌、小细胞癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、成神经细胞瘤、肉瘤(例如,血管肉瘤或软骨肉瘤)、喉癌、腮腺癌、胆道癌、甲状腺癌、肢端黑色素瘤、光化性角化病、急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、腺样囊性癌、腺瘤、腺肉瘤、腺鳞癌、肛管癌、肛门癌、肛门直肠癌、星形细胞瘤、前庭大腺癌、基底细胞癌、胆管癌、骨癌、骨髓癌、支气管癌、支气管腺癌、类癌、胆管癌、软骨肉瘤、脉络丛乳头状瘤/癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓性白血病、透明细胞癌、结缔组织癌、囊腺瘤、消化系统癌症、十二指肠癌、内分泌系统癌、内胚窦瘤、子宫内膜增生、子宫内膜基质肉瘤、子宫内膜样腺癌、内皮细胞癌、室管膜癌、上皮细胞癌、尤因氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、眼睛和眼眶癌、女性生殖器癌、局灶性结节性增生、胆囊癌、胃窦癌、胃底癌、胃泌素瘤、胶质母细胞瘤、胰高血糖素瘤、心脏癌、血管母细胞瘤、血管内皮瘤、血管瘤、肝腺瘤、肝腺瘤病、肝胆癌、肝细胞癌、霍奇金病、回肠癌、胰岛瘤、上皮内瘤变、上皮内鳞状细胞瘤变、肝内胆管癌、浸润性鳞状细胞癌、空肠癌、关节癌、卡波西氏肉瘤、盆腔癌、大细胞癌、大肠癌、平滑肌肉瘤、恶性雀斑样痣黑色素瘤、淋巴瘤、男性生殖器癌、恶性黑色素瘤、恶性间皮肿瘤、髓母细胞瘤、髓上皮瘤、脑膜癌、间皮癌、转移癌、口腔癌、粘液表皮样癌、多发性骨髓瘤、肌肉癌、鼻道癌、神经系统癌症、神经上皮腺癌结节性黑色素瘤、非上皮性皮肤癌、非霍奇金淋巴瘤、燕麦细胞癌、少突胶质细胞癌、口腔癌、骨肉瘤、乳头状浆液性腺癌、阴茎癌、咽癌、垂体瘤、浆细胞瘤、假肉瘤、肺母细胞瘤、直肠癌、肾细胞癌、呼吸系统癌症、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、浆液性癌、窦癌、皮肤癌、小细胞癌、小肠癌、平滑肌癌、软组织癌、分泌生长抑素的肿瘤、脊柱癌、鳞状细胞癌、横纹肌癌、皮下癌、浅表扩散性黑色素瘤、T细胞白血病、舌癌、未分化癌、输尿管癌、尿道癌、膀胱癌、泌尿系统癌、子宫颈癌、子宫体癌、葡萄膜黑色素瘤、阴道癌、疣状癌、VIPoma, 外阴癌、高分化癌、或威尔姆斯瘤(Wilms tumor)。

[0495] 在某些实施例中,癌症是血液恶性肿瘤。在某些实施例中,血液恶性肿瘤是白血病。在某些实施例中,选自急性髓性白血病(AML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、骨髓增生异常、骨髓增生异常综合征、急性T淋巴细胞白血病或急性早幼粒细胞白血病、慢性粒髓单核细胞白血病或慢性髓性白血病的髓性母细胞危象。

[0496] 在一些实施例中,本申请提供了使用本文所述的多特异性结合蛋白和/或本文所述的药物组合物治疗自身免疫性炎性疾病的方法。方法可用于治疗多种表达BAFF-R的B细胞相关性自身免疫性炎性疾病,包括但不限于多发性硬化症、系统性红斑狼疮、格雷夫斯氏病(Graves' disease)、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、类风湿性关节炎、炎性肠病、I型糖尿病、格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome)、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、牛皮癣、重症肌无力和血管炎。

#### IV. 组合疗法

[0497] 本申请的另一方面提供组合疗法。本文所述的多特异性结合蛋白可以与另外的治疗剂组合使用以治疗自身免疫性疾病或治疗癌症。

[0498] 可以用作治疗自身免疫性炎性疾病的组合疗法的一部分的示例性治疗剂在Li等人(2017)Front.Pharmacol.[药理学前沿],8:460中进行了描述,并且包括例如非甾体抗炎药(NSAID)(例如,COX-2抑制剂)、糖皮质激素(例如,泼尼松/泼尼松龙、甲基泼尼松龙以及氟化糖皮质激素,如地塞米松和倍他米松)、疾病缓解性抗风湿药(DMARD)(例如,甲氨蝶呤、

来氟米特、金化合物、柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、环磷酰胺、抗疟药、D-青霉胺和环孢霉素)、抗TNF生物制剂(例如,英利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、戈利木单抗、赛妥珠单抗及其生物仿制药)以及其他靶向CTLA-4的生物制剂(例如,阿巴西普)、靶向IL-6受体的生物制剂(例如,托珠单抗)、靶向IL-1的生物制剂(例如,阿那白滞素)、靶向Th1免疫应答(IL-12/IL-23)的生物制剂(例如,优特克单抗(ustekinumab))、靶向Th17免疫应答(IL-17)的生物制剂(例如,苏金单抗)和靶向CD20的生物制剂(例如,利妥昔单抗)。

[0499] 可用作治疗癌症的组合疗法的一部分的示例性治疗剂包括例如放射、丝裂霉素、维甲酸、ribomustin、吉西他滨、长春新碱、依托泊苷、克拉屈滨(cladribine)、二溴甘露醇、甲氨蝶呤、多柔比星、卡波醌、喷司他丁(pentostatin)、硝基胺(nitracrine)、净司他丁、西曲瑞克、来曲唑、雷替曲塞、柔红霉素(daunorubicin)、法倔唑、福莫司汀、胸腺法新(thymalfasin)、索布佐生、奈达铂、阿糖胞苷、比卡鲁胺(bicalutamide)、长春瑞滨(vinorelbine)、维司力农(vesnarinone)、氨鲁米特(aminoglutethimide)、安吡啶、丙谷胺、依利醋铵(elliptinium acetate)、酮色林、去氧氟尿苷、依曲替酯、异维甲酸(isotretinoin)、链脲佐菌素、尼妥珠单抗、长春地辛、氟他胺(flutamide)、氟他胺(drogenil)、butocin、卡莫氟、丙亚胺(razoxane)、sizofilan、卡铂、二溴卫矛醇、替加氟、异环磷酰胺、泼尼氮芥、沙培林、左旋咪唑、替尼泊苷(teniposide)、英丙舒凡、依诺他滨、麦角乙脞、氧甲磺隆、它莫西芬(tamoxifen)、黄体酮、美雄烷、环硫雄醇、福美司坦、干扰素- $\alpha$ 、干扰素- $2\alpha$ 、干扰素- $\beta$ 、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、集落刺激因子-1、集落刺激因子-2、地托-迪尼白介素、白介素-2、促黄体生成素释放因子和上述药剂的变体(其可能表现出与其同源受体的不同结合,或增加或减少血清半衰期)。

[0500] 可用作治疗癌症的组合疗法的一部分的另一类药剂是免疫检查点抑制剂。示例性免疫检查点抑制剂包括抑制以下中的一种或多种的药剂:(i) 细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4), (ii) 程序性细胞死亡蛋白1(PD1), (iii) PDL1, (iv) LAG3, (v) B7-H3, (vi) B7-H4, 和(vii) TIM3。CTLA4抑制剂伊匹单抗(ipilimumab)已被美国食品和药物管理局批准用于治疗黑色素瘤。

[0501] 可用作治疗癌症的组合疗法的一部分的其他药剂是靶向非检查点靶标的单克隆抗体药剂(例如,赫赛汀)和非细胞毒性药剂(例如,酪氨酸激酶抑制剂)。

[0502] 再其他类别的抗癌药剂包括,例如:(i) 选自以下的抑制剂:ALK抑制剂、ATR抑制剂、A2A拮抗剂、碱基切除修复抑制剂、Bcr-Abl酪氨酸激酶抑制剂、布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂、CDC7抑制剂、CHK1抑制剂、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂、DNA-PK抑制剂、DNA-PK和mTOR两者的抑制剂、DNMT1抑制剂、DNMT1抑制剂加2-氯-脱氧腺苷、HDAC抑制剂、Hedgehog信号传导通路抑制剂、IDO抑制剂、JAK抑制剂、mTOR抑制剂、MEK抑制剂、MELK抑制剂、MTH1抑制剂、PARP抑制剂、磷酸肌醇3-激酶抑制剂、PARP1和DHODH两者的抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶-II抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、VEGFR抑制剂、和WEE1抑制剂;(ii) OX40、CD137、CD40、GITR、CD27、HVEM、TNFRSF25或ICOS的激动剂;和(iii) 选自IL-12、IL-15、GM-CSF和G-CSF的细胞因子。

[0503] 本申请的蛋白也可以用作手术切除原发性病灶的辅助手段。

[0504] 可以选择多特异性结合蛋白和另外的治疗剂的量,和施用的相对时间,以实现期望的组合治疗效果。例如,当向需要这样的施用的患者施用组合疗法时,组合中的治疗剂、

或包含治疗剂的一种或多种药物组合物可以以任何顺序施用,例如依次、并行、一起、同时等。此外,例如,多特异性结合蛋白可以在另外的一种或多种治疗剂发挥其预防或治疗作用时的期间施用,或反之亦然。

#### V. 药物组合物

[0505] 本披露还描述了包含治疗有效量的本文所述蛋白的药物组合物。可以配制组合物用于多种药物递送系统。一种或多种生理上可接受的赋形剂或载剂也可以包含在组合物中以用于适当的配制。在Remington's Pharmaceutical Sciences [雷明顿制药科学], Mack Publishing Company (麦克出版公司), Philadelphia, Pa. (费城,宾夕法尼亚州), 第17版, 1985中找到适用于本披露的配制品。有关药物递送方法的简要回顾, 参见例如, Langer (Science [科学] 249:1527-1533, 1990)。

[0506] 本申请中描述的静脉内药物递送配制品可以包含在袋、笔或注射器中。在某些实施例中, 袋可以连接到包括管和/或针的通道。在某些实施例中, 配制品可以是冻干配制品或液体配制品。在某些实施例中, 配制品可以被冷冻干燥(冻干)并包含在约12-60个小瓶中。在某些实施例中, 配制品可以被冻干并且45mg的冻干配制品可以包含在一个小瓶中。在某些实施例中, 约40mg至约100mg的冻干配制品可包含在一个小瓶中。在某些实施例中, 合并来自12、27或45个小瓶的冻干配制品以获得静脉内药物配制品中的治疗剂量的蛋白。在某些实施例中, 配制品可以是液体配制品并且以约250mg/瓶至约1000mg/瓶储存。在某些实施例中, 配制品可以是液体配制品并且以约600mg/小瓶储存。在某些实施例中, 配制品可以是液体配制品并且以约250mg/小瓶储存。

[0507] 蛋白可以存在于液体水性药物配制品中, 该液体水性药物配制品包括在形成配制品的缓冲溶液中的治疗有效量的蛋白。

[0508] 这些组合物可通过常规灭菌技术灭菌, 或可无菌过滤。所得水性溶液可以包装用于原样使用或冻干使用, 将冻干的制剂在施用前与无菌水性载剂组合。制剂的pH通常介于3和11之间, 例如介于5和9之间或介于6和8之间, 并且在某些实施例中, 介于7和8之间, 例如7至7.5。所得固体形式的组合物可以包装在多个单剂量单位中, 每个单位含有固定量的上述一种或多种药剂。固体形式的组合物也可以包装在容器中获得灵活的数量。

[0509] 在某些实施例中, 本申请描述了具有延长保质期的配制品, 其包含如本文所述的多特异性结合蛋白, 以及甘露醇、柠檬酸一水合物、柠檬酸钠、磷酸二钠二水合物、磷酸二氢钠二水合物、氯化钠、聚山梨醇酯80、水和氢氧化钠。

[0510] 在某些实施例中, 制备包含在pH缓冲溶液中的本披露的蛋白的水性配制品。配制品的缓冲液可具有约4至约8的pH, 例如, 约4.5至约6.0, 或约4.8至约5.5, 或可具有约5.0至约5.2的pH。上述pH值的中间范围也旨在成为本披露的一部分。例如, 旨在包括使用任何上述值的组合作为上限和/或下限的值范围。控制pH在该范围内的缓冲液的实例包括乙酸盐(例如乙酸钠)、琥珀酸盐(例如琥珀酸钠)、葡糖酸盐、组氨酸、柠檬酸盐和其他有机酸缓冲液。

[0511] 在某些实施例中, 配制品包括缓冲系统, 其含有柠檬酸盐和磷酸盐以将pH维持在约4至约8的范围内。在某些实施例中, pH范围可为约4.5至约6.0, 或约pH 4.8至约5.5, 或约5.0至约5.2的pH范围。在某些实施例中, 缓冲系统包括柠檬酸一水合物、柠檬酸钠、磷酸二钠二水合物和/或磷酸二氢钠二水合物。在某些实施例中, 缓冲系统包括约1.3mg/mL的柠檬

酸(例如,1.305mg/mL)、约0.3mg/mL的柠檬酸钠(例如,0.305mg/mL)、约1.5mg/mL磷酸二钠二水合物(例如,1.53mg/mL)、约0.9mg/mL磷酸二氢钠二水合物(例如,0.86mg/mL),以及约6.2mg/mL的氯化钠(例如,6.165mg/mL)。在某些实施例中,缓冲系统包括约1至约1.5mg/mL的柠檬酸、约0.25至约0.5mg/mL的柠檬酸钠、约1.25至约1.75mg/mL的磷酸二钠二水合物、约0.7至约1.1mg/mL磷酸二氢钠二水合物,和约6.0至约6.4mg/mL氯化钠。在某些实施例中,配制品的pH用氢氧化钠调节。

[0512] 作为张度调节剂并可稳定抗体的多元醇也可包含在配制品中。多元醇可以根据配制品的所期望等渗性而变化的量添加到配制品中。在某些实施例中,水性配制品可以是等渗的。添加的多元醇的量也可以相对于该多元醇的分子量而改变。例如,与二糖(例如海藻糖)相比,可以添加较低量的单糖(例如甘露醇)。在某些实施例中,可在配制品中用作张度剂的多元醇是甘露醇。在某些实施例中,甘露醇浓度可为约5至约20mg/mL。在某些实施例中,甘露醇的浓度可为约7.5至约15mg/mL。在某些实施例中,甘露醇的浓度可为约10至约14mg/mL。在某些实施例中,甘露醇的浓度可为约12mg/mL。在某些实施例中,多元醇山梨糖醇可包含在配制品中。

[0513] 也可以将去垢剂或表面活性剂添加到配制品中。示例性去垢剂包括非离子去垢剂,例如聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯20、80等)或泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆188)。添加的去垢剂的量使得它减少配制的抗体的聚集和/或最小化配制品中微粒的形成和/或减少吸附。在某些实施例中,配制品可以包括表面活性剂,其是聚山梨醇酯。在某些实施例中,配制品可含有去垢剂聚山梨醇酯80或吐温80。吐温80是用于描述聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯的术语(参见Fiedler, Lexikon der Hifsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 第4版, 1996)。在某些实施例中,配制品可含有约0.1mg/mL至约10mg/mL的聚山梨醇酯80,或约0.5mg/mL至约5mg/mL。在某些实施例中,可以在配制品中添加约0.1%的聚山梨醇酯80。

[0514] 在实施例中,如本申请中所述的多特异性结合蛋白被配制为液体配制品。液体配制品可以10mg/mL的浓度存在于USP/Ph Eur I型50R小瓶中,小瓶用橡皮塞封闭并用铝卷边密封盖密封。塞可以由符合USP和Ph Eur的弹性体制成。在某些实施例中,小瓶可以填充有61.2mL的蛋白产品溶液以允许60mL的可提取体积。在某些实施例中,液体配制品可以用0.9%盐水溶液稀释。

[0515] 在某些实施例中,如本申请中所述的液体配制品可以与处于稳定水平的糖组合制备为10mg/mL浓度的溶液。在某些实施例中,液体配制品可以在水性载剂中制备。在某些实施例中,稳定剂的添加量可以不大于可能导致不希望或不适合静脉内施用的粘度的量。在某些实施例中,糖可以是二糖,例如,蔗糖。在某些实施例中,液体配制品还可包括一种或多种缓冲剂、表面活性剂和防腐剂。

[0516] 在某些实施例中,液体配制品的pH可通过添加药学上可接受的酸和/或碱来设定。在某些实施例中,药学上可接受的酸可以是盐酸。在某些实施例中,碱可以是氢氧化钠。

[0517] 除聚集外,脱酰胺是肽和蛋白的常见产品变体,可能发生在发酵、收获/细胞澄清、纯化、原料药/药物产品储存和样品分析过程中。脱酰胺是蛋白中NH<sub>3</sub>的损失,形成可以进行水解的琥珀酰亚胺中间体。琥珀酰亚胺中间体导致母体肽质量减少17道尔顿。随后的水解导致18道尔顿的质量增加。由于在水性条件下不稳定,琥珀酰亚胺中间体的分离很困难。因

此,脱酰胺通常可检测为1道尔顿质量增加。天冬酰胺的脱酰胺作用产生天冬氨酸或异天冬氨酸。影响脱酰胺速率的参数包括pH、温度、溶剂介电常数、离子强度、一级序列、局部多肽构象和三级结构。肽链中与Asn相邻的氨基酸残基影响脱酰胺速率。蛋白序列中Asn之后的Gly和Ser导致对脱酰胺的敏感性更高。

[0518] 在某些实施例中,如本申请中所述的液体配制品可以在pH和湿度条件下保存以防止蛋白产品脱酰胺。

[0519] 本文中的目的水性载剂是药学上可接受的(对人施用安全且无毒)并且可用于制备液体配制品。示例性载剂包括无菌注射用水(SWFI)、抑菌注射用水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或葡萄糖溶液。

[0520] 可以任选地将防腐剂添加到本文所述的配制品中以减少细菌作用。添加防腐剂可以例如促进多用途(多剂量)配制品的生产。

[0521] 静脉内(IV)配制品在特定情况下可以是施用途径,例如当患者在移植后住院时通过IV途径接受所有药物。在某些实施例中,液体配制品在施用前用0.9%氯化钠溶液稀释。在某些实施例中,用于注射的稀释药物产品是等渗的并且适合通过静脉内输注施用。

[0522] 在某些实施例中,可以以10mM-200mM的量添加盐或缓冲液组分。盐和/或缓冲液是药学上可接受的,并且衍生自各种已知的酸(无机和有机)与“碱形成”金属或胺。在某些实施例中,缓冲液可以是磷酸盐缓冲液。在某些实施例中,缓冲液可以是甘氨酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐缓冲液,在这种情况下,钠、钾或铵离子可以用作抗衡离子。

[0523] 本申请中描述的多特异性结合蛋白可以存在于包括蛋白和冻干保护剂的冻干配制品中。冻干保护剂可以是糖,例如,二糖。在某些实施例中,冻干保护剂可以是蔗糖或麦芽糖。冻干配制品还可包含一种或多种缓冲剂、表面活性剂、填充剂和/或防腐剂。

[0524] 用于稳定冻干药物产品的蔗糖或麦芽糖的量可以是蛋白比蔗糖或麦芽糖的至少1:2重量比。在某些实施例中,蛋白比蔗糖或麦芽糖的重量比可为1:2至1:5。

[0525] 在某些实施例中,在冻干之前配制品的pH可以通过添加药学上可接受的酸和/或碱来设定。在某些实施例中,药学上可接受的酸可以是盐酸。在某些实施例中,药学上可接受的碱可以是氢氧化钠。

[0526] 在冻干之前,可以将包含本披露的蛋白的溶液的pH在6至8之间调节。在某些实施例中,冻干药物产品的pH范围可以是7至8。

[0527] 在某些实施例中,可以以10mM-200mM的量添加盐或缓冲液组分。盐和/或缓冲液是药学上可接受的,并且衍生自各种已知的酸(无机和有机)与“碱形成”金属或胺。在某些实施例中,缓冲液可以是磷酸盐缓冲液。在某些实施例中,缓冲液可以是甘氨酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐缓冲液,在这种情况下,钠、钾或铵离子可以用作抗衡离子。

[0528] 在某些实施例中,可以添加“填充剂”。“填充剂”是向冻干混合物增加质量并有助于冻干饼的物理结构的化合物(例如,有助于生产保持开孔结构的基本均匀的冻干饼)。示例性填充剂包括甘露醇、甘氨酸、聚乙二醇和山梨糖醇。本申请中描述的多特异性结合蛋白的冻干配制品可包含这样的填充剂。

[0529] 可以任选地将防腐剂添加到本文的配制品中以减少细菌作用。添加防腐剂可以例如促进多用途(多剂量)配制品的生产。

[0530] 在某些实施例中,冻干药物产品可以由水性载剂构成。本文中的目的水性载剂是

药上可接受的(例如,对人施用安全且无毒)并且在冻干后可用于制备液体配制品。示例性稀释剂包括无菌注射用水(SWFI)、抑菌注射用水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或葡萄糖溶液。

[0531] 在某些实施例中,冻干药物产品用无菌注射用水USP(SWFI)或0.9%氯化钠注射液USP重构。在重构过程中,冻干粉末溶解成溶液。

[0532] 在某些实施例中,冻干蛋白产品重构成约4.5mL注射用水并用0.9%盐水溶液(氯化钠溶液)稀释。

[0533] 本申请中描述的多特异性结合蛋白的药物组合中活性成分的实际剂量水平可以变化,以获得有效实现特定患者、组合物以及给药方式的所需治疗响应的活性成分的量,并且对患者无毒性。

[0534] 具体剂量可以是每个患者的统一剂量,例如50-5000mg蛋白。可替代地,患者的剂量可以根据患者的大致体重或表面积进行调整。确定合适剂量的其他因素可包括待治疗或预防的疾病或病症、疾病的严重程度、施用途径以及患者的年龄、性别和医学病症。确定合适的治疗剂量所需的计算的进一步细化由本领域技术人员常规地进行,尤其是根据本文披露的剂量信息和测定。剂量也可以通过使用已知的用以确定剂量的测定结合适当的剂量-反应数据来确定。当监测疾病的进展时,可以调整个体患者的剂量。可测量患者体内可靶向构建体或复合物的血液水平,以确定是否需要调整剂量以达到或维持有效浓度。可使用药物基因组学来确定对给定个体最可能有效的可靶向构建体和/或复合物和其剂量(Schmitz等人,Clinica Chimica Acta[临床化学学报]308:43-53,2001;Steimer等人,Clinica Chimica Acta[临床化学学报]308:33-41,2001)。

[0535] 总体上,基于体重的剂量是约0.01 $\mu$ g至约100mg/kg体重,例如约0.01 $\mu$ g至约100mg/kg体重、约0.01 $\mu$ g至约50mg/kg体重、约0.01 $\mu$ g至约10mg/kg体重、约0.01 $\mu$ g至约1mg/kg体重、约0.01 $\mu$ g至约100 $\mu$ g/kg体重、约0.01 $\mu$ g至约50 $\mu$ g/kg体重、约0.01 $\mu$ g至约10 $\mu$ g/kg体重、约0.01 $\mu$ g至约1 $\mu$ g/kg体重、约0.1 $\mu$ g至约100mg/kg体重、约0.1 $\mu$ g至约50mg/kg体重、约0.1 $\mu$ g至约10mg/kg体重、约0.1 $\mu$ g至约1mg/kg体重、约0.1 $\mu$ g至约100 $\mu$ g/kg体重、约0.1 $\mu$ g至约10 $\mu$ g/kg体重、约0.1 $\mu$ g至约1 $\mu$ g/kg体重、约1 $\mu$ g至约100mg/kg体重、约1 $\mu$ g至约50mg/kg体重、约1 $\mu$ g至约10mg/kg体重、约1 $\mu$ g至约1mg/kg体重、约1 $\mu$ g至约100 $\mu$ g/kg体重、约1 $\mu$ g至约50 $\mu$ g/kg体重、约1 $\mu$ g至约10 $\mu$ g/kg体重、约10 $\mu$ g至约100mg/kg体重、约10 $\mu$ g至约50mg/kg体重、约10 $\mu$ g至约10mg/kg体重、约10 $\mu$ g至约1mg/kg体重、约10 $\mu$ g至约100 $\mu$ g/kg体重、约10 $\mu$ g至约50 $\mu$ g/kg体重、约50 $\mu$ g至约100mg/kg体重、约50 $\mu$ g至约50mg/kg体重、约50 $\mu$ g至约10mg/kg体重、约50 $\mu$ g至约1mg/kg体重、约50 $\mu$ g至约100 $\mu$ g/kg体重、约100 $\mu$ g至约100mg/kg体重、约100 $\mu$ g至约50mg/kg体重、约100 $\mu$ g至约10mg/kg体重、约100 $\mu$ g至约1mg/kg体重、约1mg至约100mg/kg体重、约1mg至约50mg/kg体重、约1mg至约10mg/kg体重、约10mg至约100mg/kg体重、约10mg至约50mg/kg体重、约50mg至约100mg/kg体重。

[0536] 剂量可以每天、每周、每月或每年给予一次或多次,甚至每2至20年给予一次。本领域普通技术人员可以基于测量的停留时间和可靶向构建体或复合物在体液或组织中的浓度容易地估计给药的重复率。本申请中描述的多特异性结合蛋白的施用可以是静脉内、动脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、胸膜内、鞘内、腔内,通过导管灌注或通过直接病灶内注射。这可以每天一次或多次,每周一次或多次,每月一次或多次,每年一次或多次施用。

[0537] 上面的描述提供了本申请中描述的多特异性结合蛋白的多个方面和实施例。本申请确切地考虑了这些方面和实施例的所有组合和排列。本文中使用任何和所有实例或示例性语言,例如“例如”或“包括”,仅旨在更好地说明本申请中描述的多特异性结合蛋白,并且不对本披露的范围构成限制,除非明确声明。说明书中的任何语言都不应被解释为表明任何未要求保护的要素对于本申请中描述的多特异性结合蛋白的实践是必不可少的。

#### 实例

[0538] 以下实例仅是示例性的,并不旨在以任何方式限制本申请中描述的多特异性结合蛋白的范围或内容。

#### 实例1-TriNKET与细胞表达的人BAFF-R结合的评估

[0539] BAFF-R阳性人B淋巴母细胞RAJI细胞系用于评估TriNKET与细胞表面BAFF-R的结合。如上文“示例性多特异性结合蛋白”小节所述,2-Fab和F3'形式的某些BAFF-R TriNKET被稀释并与Raji细胞一起孵育。使用荧光团偶联的抗人IgG二抗检测TriNKET和亲代单克隆抗体的结合模式。然后将细胞与荧光团偶联的抗人IgG二抗一起孵育,并通过流式细胞术进行分析。将平均荧光强度(MFI)值归一化为仅二抗对照以获得相比于背景值的倍数(FOB)。

[0540] 如图18A-图18C所示,含有衍生自hCOH-2(图18A)、Hu9.1-73(图18B)以及基于伊利尤单抗的抗原结合位点(三个版本,F3'、2-Fab和伊利尤单抗mAb,不包含商用伊利尤单抗抗体中存在的抗体依赖性细胞毒性增强突变)(图18C)的BAFF-R结合位点的BAFF-RTriNKET以亚纳摩尔浓度且以与相应的亲代对照抗体(其不包含在伊利尤单抗中使用的ADCC增强突变)相似或更高的最大MFI结合。这些TriNKET结合BAFF-R的EC<sub>50</sub>值显示在表11中。用第二BAFF-R阳性细胞系Ramos获得了类似的结果(数据未显示)。

表11. 使用RAJI细胞的BAFF-R结合测定中的EC<sub>50</sub>值

测试品*	EC50 (nM)
伊利尤单抗-F3'	0.361
伊利尤单抗-2-Fab	0.115
伊利尤单抗-mAb	0.003

测试品*	EC50 (nM)
Hu9.1-73-F3'	0.765
Hu9.1-73-2-Fab	1.054
Hu9.1-73-mAb	0.379
hCOH-2-F3'	0.893
hCOH-2-2-Fab	0.942
hCOH-2-mAb	0.043

\*伊利尤单抗构建体不包括商用伊利尤单抗抗体中存在的抗体依赖性细胞毒性增强突变。

#### 实例2-人NK细胞细胞毒性测定

[0541] 通过DELFI A细胞毒性测定法测量在存在TriNKET的情况下免疫效应细胞对表达BAFF-R的靶细胞的裂解。简而言之,从培养物中收获表达BAFF-R的人癌细胞系RAJI,用HBS洗涤,并以 $10^6$ /mL重悬于生长培养基中,用于用BATDA试剂(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer)AD0116)标记。遵循制造商说明来标记靶细胞。标记后,用HBS洗涤细胞3次,并以 $0.5-1.0 \times 10^5$ /mL重悬于培养基中。向96孔板的每个孔中添加 $100 \mu\text{l}$ 经BATDA标记的细胞。将针对BAFF-R的单克隆抗体或TriNKET在培养基中稀释,并将 $50 \mu\text{l}$ 的稀释的mAb或TriNKET添加到每个孔中。

[0542] 为了制备NK细胞,使用密度梯度离心法从人外周血血沉棕黄层中分离出PBMC,洗涤并准备用于NK细胞分离。将NK细胞使用负选择技术与磁珠分离。分离的NK细胞的纯度通常 $>90\%$   $\text{CD}3^- \text{CD}56^+$ 。将分离的NK细胞静置过夜并从培养物中收获。然后将细胞洗涤并以 $10^5-2.0 \times 10^6$ /mL的浓度重悬于培养基中,效应细胞与靶细胞(E:T)的比例为5:1。将 $50 \mu\text{l}$  NK细胞加入板的每个孔中,总培养体积为 $200 \mu\text{l}$ 。将板在 $37^\circ\text{C}$ 和 $5\%$   $\text{CO}_2$ 孵育2-3小时。

[0543] 孵育后,将板从培养箱中取出,并通过以 $200 \times g$ 离心5分钟沉淀细胞。将 $20 \mu\text{l}$ 培养物上清液转移到干净的微孔板中,并将 $200 \mu\text{l}$ 室温铕溶液(珀金埃尔默公司C135-100)加入每个孔中。将板避光并在板振荡器上以 $250 \text{rpm}$ 孵育15分钟,然后使用SpectraMax i3X仪器读取。

[0544] 在没有NK细胞的情况下培养的靶细胞中测量了可与铕形成荧光螯合物的物质的自发释放。这样的物质的最大释放是在用 $1\%$  Triton-X裂解的靶细胞中测量的。特异性裂解%计算如下:

$$\text{特异性裂解}\% = ((\text{实验释放} - \text{自发释放}) / (\text{最大释放} - \text{自发释放})) \times 100\%$$

[0545] 图19A-图19C显示在以下的存在下原代NK细胞对BAFF-R阳性RAJI细胞的NK细胞介导的裂解:衍生自hCOH-2(图19A)、Genentech Hu9.1-73(图19B)以及基于伊利尤单抗的抗原结合位点(三个版本,F3'、2-Fab和伊利尤单抗mAb,不包含商用伊利尤单抗抗体中存在的抗体依赖性细胞毒性增强突变)(图19C)的靶向BAFF-R的TriNKET。亲代BAFF-R靶向单克隆抗体几乎没有增强NK细胞介导的RAJI靶细胞裂解。所有BAFF-R靶向型TriNKET(hCOH-2-F3'、hCOH-2-2-Fab、Hu9.1-73-F3'、Hu9.1-73-2-Fab、伊利尤单抗F3'和伊利尤单抗-2-Fab)与相应的BAFF-R靶向型单克隆抗体相比,显示出更好的靶细胞裂解。 $\text{EC}_{50}$ 值显示在表12中。

表12. 在原代NK介导的细胞毒性测定中,BAFF-R TriNKET与亲代mAb的效力比较。

测试品*	EC50 (nM)	最大裂解 (%)
伊利尤单抗-F3'	0.935	64.83
伊利尤单抗-2-Fab	0.244	54.30
伊利尤单抗-mAb	N/A	N/A
Hu9.1-73-F3'	0.417	54.16
Hu9.1-73-2-Fab	0.559	53.18
Hu9.1-73-mAb	N/A	N/A
hCOH-2-F3'	0.725	62.59
hCOH-2-2-Fab	1.042	73.53
hCOH-2-mAb	N/A	N/A

\*伊利尤单抗构建体不包括商用伊利尤单抗抗体中存在的抗体依赖性细胞毒性增强突变。

[0546] 为了证实细胞毒性发现, NK细胞系KHYG-1-CD16aV经工程改造为稳定表达CD16aV和NKG2D, 并如上所述进行测定。测量了衍生自hCOH-2(图20A)、Hu9.1-73(图20B)和基于伊利尤单抗的抗原结合位点(三个版本, F3'、2-Fab和伊利尤单抗mAb, 不包含商用伊利尤单抗抗体中存在的抗体依赖性细胞毒性增强突变)(图20C)的TriNKET和亲代mAb的细胞毒性。EC<sub>50</sub>值和最大裂解值是通过GraphPad Prizm软件使用四参数逻辑非线性回归曲线拟合模型从细胞裂解曲线得出的(表13)。在KHYG-1CD16aV介导的细胞毒性测定中, 测试的所有BAFF-R TriNKET均显示亚纳摩尔EC50和高效最大裂解。用第二BAFF-R阳性细胞系Ramos获得了类似的结果(数据未显示)。

表13. 在原代KHYG-1CD16aV介导的细胞毒性测定中, BAFF-R TriNKET与亲代mAb的效力比较。

测试品*	EC50 (nM)	最大裂解 (%)
伊利尤单抗-F3'	0.515	68.35
伊利尤单抗-2-Fab	0.183	74.02
伊利尤单抗-mAb	N/A	14.48
Hu9.1-73-F3'	0.246	89.11
Hu9.1-73-2-Fab	0.402	92.94
Hu9.1-73-mAb	N/A	19.84
hCOH-2-F3'	0.448	97.52
hCOH-2-2-Fab	0.539	93.76
hCOH-2-mAb	N/A	11.56

\*伊利尤单抗构建体不包括商用伊利尤单抗抗体中存在的抗体依赖性细胞毒性增强突变。

### 实例3-结合BAFF-R的mAb的生成和表征

#### 重组蛋白免疫方法

[0547] 通过用hBAFF-R-hFc-His融合蛋白免疫四种不同品系的小鼠(H2L2、NZBW、BALB-C和SJL/J)来产生BAFF-R特异性抗体。基于抗血清效价,从四种不同品系中选择了总共七只小鼠用于杂交瘤融合。来自每个免疫组的小鼠亚组的脾细胞被保留用于免疫文库生成;然而,只有来自H2L2小鼠的脾细胞被用于酵母展示mAb发现。

[0548] 从五只小鼠融合(两只小鼠的脾细胞被合并用于H2L2融合,两只小鼠的脾细胞被合并用于SJL/J融合),通过特异性ELISA分析每个杂交瘤融合体的十六个96孔板,其中比较了与人和食蟹猴BAFF-R-hFc-His蛋白的结合和与无关hFc-His蛋白的结合。选择来自33个BAFF-R阳性和特异性杂交瘤的上清液用于进一步分析。测试上清液与BAFF-R+等基因CHO细胞的结合,并进一步亚克隆16个阳性杂交瘤。如上所述通过特异性ELISA分析来自亚克隆的上清液,并测试20个BAFF-R阳性和特异性亚克隆与BAFF-R+细胞的结合。九个亚克隆mAb表现出与BAFF-R+细胞的强结合并被测序。获得了六个独特的序列,并进一步分析了相应的mAb在基于细胞的测定中阻断BAFF-R-BAFF相互作用的能力。

[0549] 在六种BAFF-R特异性mAb或同种型对照mAb存在或不存在的条件下,测试了生物素化BAFF与BAFF-R+CHO细胞的结合。在存在抗体的情况下平均荧光强度(MFI)的降低表明mAb抑制了BAFF与BAFF-R的接合,因此被指定为阻断性抗体。所有测试的克隆都不抑制BAFF与BAFF-R+细胞的结合,因此,所有六个都被称为非阻断性的(图21)。

#### DNA免疫方法

[0550] 分别对两组SWR/J小鼠进行DNA免疫。一组用全长人BAFF-R cDNA构建体免疫,另一组用全长人BAFF-R和人BAFF-R胞外结构域cDNA构建体的混合物免疫。基于抗血清效价,将

小鼠合并,随后选择用于单B细胞分选并且另一个池用于杂交瘤融合。

[0551] 单B细胞分选工作产生了44个人和食蟹猴交叉反应克隆。对这些克隆进行测序,在293细胞中瞬时表达,并通过流式细胞术分析纯化的mAb的特异性,其中比较与hBAFF-R<sup>+</sup>、cynoBAFF-R<sup>+</sup>等基因CHO细胞以及与亲代细胞系的结合。纯化了八种结合物,并进一步分析了它们结合BAFF-R和阻断BAFF-R-BAFF相互作用的能力。所有八个克隆都被确定为非阻断性,并且对hBAFF-R<sup>+</sup>癌细胞表现出弱亲和力。

[0552] 通过流式细胞术分析通过传统杂交瘤方法获得的克隆的特异性。进行了以下评估:a) 将其与表达全长人BAFF-R或人BAFF-R细胞外结构域的细胞的结合和与未转染的亲代细胞的结合进行比较;b) 将其与hBAFF-R<sup>+</sup>和cynoBAFF-R<sup>+</sup>等基因细胞的结合和与亲代细胞的结合进行比较;c) 其与hBAFF-R<sup>+</sup>癌细胞的结合。鉴定了25个阳性杂交瘤融合体,并基于结合强度对14个杂交瘤融合体进行了测序。获得了五个独特的序列,并分析了它们结合BAFF-R<sup>+</sup>细胞和阻断BAFF-R-BAFF相互作用的能力。尽管所有五个克隆都被确定为非阻断性克隆(图22),五个克隆中的四个(克隆3A1、1B3-A7、7G4和10H7-C5)表现出对hBAFF-R的良好亲和力。

从酵母文库中发现的BAFF-R特异性scFv

[0553] 酵母展示用于从获得自用如上所述的重组人hBAFF-R-hFc-His蛋白免疫的人源化H2L2小鼠的脾细胞构建scFv文库。用5nM的生物素化hBAFF-R-hFc-His进行三轮选择。挑取单个酵母菌落,对其进行测序,并对序列进行分析。序列收敛表明选择过程在富集结合物方面是成功的,因此是完整的。选择独特的序列用于进一步表征。从一个文库中发现了三个BAFF-R特异性scFv(表14)。然而,这些序列彼此非常相似,因此仅选择序列1129\_A01(也称为AB0369scFv)进行进一步研究。

表14. 从酵母文库中发现的BAFF-R结合物的CDR序列

	1129_A01 (AB0369 scFv)	1203_A01	1203_A02
<b>CDRH1</b>	GFTFSSY (SEQ ID NO:214)	GFTFSSY (SEQ ID NO:214)	GFTFSTY (SEQ ID NO:220)
<b>CDRH2</b>	WYDGSN (SEQ ID NO:215)	WYDGSN (SEQ ID NO:215)	WYDGSN (SEQ ID NO:215)
<b>CDRH3</b>	RFTMLRGLIIEDYGMDV (SEQ ID NO:216)	RFTMLRGVFIEDYGMDV (SEQ ID NO:219)	RNTMVRGVIIEDYGMDV (SEQ ID NO:221)
<b>CDRL1</b>	RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217)	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:59)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217)
<b>CDRL2</b>	AASSLQS (SEQ ID NO:77)	GASTRAT (SEQ ID NO:60)	AASSLQS (SEQ ID NO:77)
<b>CDRL3</b>	QQSYSTPLT (SEQ ID NO:218)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO:218)	QQSYSSPLT (SEQ ID NO:222)

[0554] 流式细胞术用于评估AB0369scFv在酵母上展示时与hBAFF-R-hFc-His、hBAFF-R-GST-His和带有hFc标签或GST标签的阴性对照蛋白结合的特异性。AB0369scFv对hBAFF-R表

现出中等至弱的亲和力;然而,它没有显示出与阴性对照的结合,因此表明对BAFF-R具有高特异性(图23)。

[0555] 1129\_A01(AB0369 scFv)被转化为包含scFv和两种非BAFF-R结合物的多特异性结合蛋白,产生AB0369。进一步分析了AB0369的以下能力:结合人(hBAFF-R-CHO)和食蟹猴(cBAFF-R-CHO)BAFF-R<sup>+</sup>细胞(图24A,图24B),通过多特异性试剂(PSR)测定缺乏非特异性相互作用(图25A-图25G),裂解BAFF-R<sup>+</sup>Ramos癌细胞(图26和表15)以及阻断BAFF-BAFF-R相互作用(图27)。AB0369与人和食蟹猴等基因CHO细胞表面的BAFF-R结合,BAFF-R结合的EC<sub>50</sub>约为10nM,这使得它是进一步开发的良好选择。

表15. AB0369在KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定中的效力。

分子	EC <sub>50</sub> (nM)	最大裂解 (%)
AB0369-001	0.6	73

[0556] 在基于细胞的阻断测定中测试了AB0369阻断BAFF-R-BAFF相互作用的能力。简而言之,收集表达人BAFF-R的CHO细胞,在冷FACS缓冲液中洗涤,并以每孔100,000个细胞的密度接种。测试品在FACS缓冲液中稀释,并将50μL稀释的多特异性结合蛋白或mAb添加到细胞中,在冰上孵育60分钟,然后用FACS缓冲液洗涤。将12nM BAFF-生物素稀释到FACS缓冲液中,每孔加入100μL,在冰上孵育60分钟,然后用FACS缓冲液洗涤。将细胞与在FACS缓冲液中稀释的100μL 1:200链霉亲和素-PE一起孵育,并在冰上孵育30分钟,然后用FACS缓冲液洗涤。然后将细胞在100μL的在PBS中稀释的1:1,000活/死染料中孵育15分钟,然后用FACS缓冲液洗涤并固定。孵育后,将细胞用FACS缓冲液洗涤并重悬于FACS缓冲液中用于流式细胞术分析。计算了每个样品和仅二抗对照的中值荧光强度(MFI)。最大MFI计算为单独的BAFF-生物素,最小MFI计算为单独的链霉亲和素-藻红蛋白。使用GraphPad Prism将数据拟合至四参数非线性回归曲线。

[0557] 这些研究表明AB0369能够部分阻断BAFF-R-BAFF相互作用。然而,可能是由于AB0369的低亲和力,阻断的效力明显低于基于伊利尤单抗的基准对照,基准对照不像亲代抗体那样包含抗体依赖性细胞毒性增强突变(图27和表16)。由于AB0369 scFv是从上述所有发现工作中鉴定出的唯一阻断性抗体,因此通过CDRH3和CDRH1/CDRH2的亲和力成熟,以及进一步的氨基酸变化来促进蛋白的产生和稳定性,它经历了进一步的发展。

表16. AB0369总结和基准mAb阻断BAFF与细胞BAFF-R的结合。

分子	IC <sub>50</sub> (nM)	最小值 (MFI)
AB0369-001	488	38,180
基于伊利尤单抗的工具mAb	0.5	224
人IgG1k	N/A	68,050

AB0369的亲和力成熟

聚焦CDRH3的随机亲和力成熟

[0558] 如上所述,AB0369表现出与表达BAFF-R的细胞的特异性结合。为搜索具有改进的结合亲和力的变体,通过突变AB0369的CDRH3残基(RFTMLRGLIIEDYGMDV (SEQ ID NO:216))创建了酵母展示亲和力成熟文库。为了富集对hBAFF-R具有更高亲和力的scFv,用1nM的生物素化hBAFF-R-hFc-His进行了两轮选择(图28A-图28D)。比较了亲代克隆AB0369和代表性的单个文库克隆之间的亲和力。三轮FACS分选产生了九个克隆,与亲代克隆相比,它们含有

一或两个氨基酸差异(粗体)RFTMLRGWYIEDYGMDV (SEQ ID NO:224);RFTMLRGQYIEDYGMDV (SEQ ID NO:223);RFTMLRGWIIEDYGMDV (SEQ ID NO:225)),并且使用基于伊利尤单抗的scFv作为基准对照,显示出比亲代克隆和亲代衍生的scFv更高的hBAFF-R结合亲和力(图29A-图29D)。

[0559] 具有最高hBAFF-R结合亲和力的scFv被转化为包含scFv和两个非BAFF-R结合物的多特异性结合蛋白,在Expi293细胞中表达,并进一步分析它们结合BAFF-R表达细胞的能力(图10A)和裂解表达BAFF-R的Ramos癌细胞的能力(图30B,图30C)。所有多特异性结合蛋白在多特异性测定中均得分为负,表明改善的结合亲和力是BAFF-R特异性的(图31A-图31E)。进一步的研究表明BAFF-R结合方面超过三倍的改善,这转化为效力的六到十倍改善,如通过EC<sub>50</sub>测量(表17)。最大裂解保持不变,表明BAFF-R结合亲和力的改善是这种效力改善的关键驱动因素。

表17. 与亲代AB0369相比,基于HCDR3亲和力成熟变体的多特异性结合蛋白证明的细胞结合和细胞裂解的总结。

分子	BAFF-R-CHO 细胞结合 EC <sub>50</sub> (Nm)	KHYG-A-CD16A <sub>v</sub> 介导的 Ramos 细胞的细胞裂解 EC <sub>50</sub> (Nm)
AB0605-001	5.72	0.15
AB0606-001	4.50	0.06
AB0622-001	3.45	0.09
AB0369-001	> 10	0.64

聚焦CDRH1和CDRH2的组合亲和力成熟

[0560] 聚焦CDRH3的亲和力成熟研究的结果表明亲和力改善,并且非常需要进一步的改进。因此,使用成熟的CDRH3骨架,针对亲和力成熟来选择CDRH1和CDRH2序列(CDRH1:GFTFSSY (SEQ ID NO:214)和CDRH2:WYDGSN (SEQ ID NO:215))。目标是工程改造和选择比亲代克隆(AB0369 scFv)或上述CDRH3优化变体具有更高亲和力的结合物。这创建了具有随机CDRH1和CDRH2的文库,同时保留了优化的CDRH3。进行两轮FACS以富集高亲和力结合物(图32A-图32C)。

[0561] 在FACS之后,鉴定了24个克隆。观察到,与亲代AB0369scFv (1129\_A01) (图33A-33D)或基于伊利尤单抗的scFv基准对照(scFv包括基于伊利尤单抗的VH和VL序列的VH和VL,但不包含亲代抗体中使用的ADCC增强突变)(图33E)相比,在优化的CDRH3骨架上具有CDRH1变化的几个克隆(RFTMLRGWYIEDYGMDV (SEQ ID NO:224);RFTMLRGQYIEDYGMDV (SEQ ID NO:223);RFTMLRGWIIEDYGMDV (SEQ ID NO:225))显示出hBAFF-R亲和力的显著改善。

[0562] 具有最高hBAFF-R结合亲和力的scFv被转化为包含scFv和两个非BAFF-R结合物的多特异性结合蛋白,在Expi293细胞中表达,并进一步分析它们结合人BAFF-R表达细胞(图34A)、结合食蟹猴BAFF-R<sup>+</sup>细胞(图34B)以及抑制BAFF-R-BAFF相互作用(图34C和表18)的能力。测试的多特异性结合蛋白显示所有这三个标准的改善,并证明在KHYG-1-CD16a介导的细胞毒性测定中有效杀伤BAFF-R<sup>+</sup>BJAB细胞(图35,表19)。

表18. 基于CDRH1和CDRH2亲和力成熟的多特异性结合蛋白证明的BAFF-R细胞结合和BAFF-R-BAFF阻断的总结

分子	人 BAFF-R 细胞结合 EC <sub>50</sub> (nM)	Cyno BAFF-R 细胞结合 EC <sub>50</sub> (nM)	BAFF-BAFF-R 阻断 IC <sub>50</sub> (nM)
AB0682-001	2.4	3.1	12.6
AB0681-001	5.1	5.6	-
AB0679-001	2.3	2.6	9.4
AB0369-001	>10	>15	-
工具-F3'	4.3	2.9	-
工具-mAb	-	-	0.38

表19. 在KHYG-1-CD16V细胞裂解测定中基于CDRH1和CDRH2亲和力成熟的代表性多特异性结合蛋白的效力。

分子	EC50 (nM)	最大裂解 (%)
AB0679-001	0.11	83
AB0682-001	0.09	79
工具-F3'	0.61	69

#### 修复潜在序列倾向性

[0563] 由于亲和力成熟的克隆在其CDR中含有可能对蛋白表达、稳定性或免疫原性产生负面影响的氨基酸,因此构建了另外的文库以选择不含这些氨基酸的克隆。用1nM生物素化的hBAFF-R-hFc-His蛋白进行三轮选择,导致高亲和力结合物的富集(图36A-图36D)。总共鉴定了23种结合物,其中12种被预测为不含不期望的氨基酸(“倾向性校正”)。

[0564] 来自这些文库的优选克隆包括AB0898(上述AB0682的倾向性校正版本)、AB0899和AB0900,它们在酵母上展示时已成功被鉴定和测试与hBAFF-R的结合。所有克隆都显示出比亲代AB0369scFv更高的对hBAFF-R的亲和力(图37A-图37F)。

#### 倾向性校正的多特异性结合蛋白的表征

[0565] 将倾向性校正的克隆中的三个转化为包含scFv和两个非BAFF-R结合物的多特异性结合蛋白,在Expi293细胞中表达,通过两步纯化工艺纯化,并通过尺寸排阻色谱(SEC)、差示扫描量热法(DSC)、与表达BAFF-R的细胞的结合以及在KHYG-1-CD16aV介导的细胞毒性测定中裂解BJAB细胞的能力进行表征。表20中总结了这些克隆的特征,并证明了倾向性校正是成功的。没有观察到对细胞结合的负面影响,并且所有三个克隆都表现出对表达BAFF-R的肿瘤细胞的有效杀伤(图38)。然而,分子的热稳定性为 $T_{m1} > 65^{\circ}\text{C}$ ,如图39A-图39C所示。

表20. 表达序列倾向性校正的BAFF-R结合物的多特异性结合蛋白的特征的总结。

测试品	SEC, 单体 (%)	DSC, T <sub>m1</sub> (°C)	hBAFF-R <sup>+</sup> 细胞结合 EC <sub>50</sub> (nM)	KHYG-A-CD16aV 介导的 BJAB 细胞溶解, EC <sub>50</sub> (nM)
AB0898	86.9	61.23	4.3	0.08
AB0899	96.5	58.79	4.3	0.06
AB0900	90.0	59.41	11.7	0.11

[0566] 如上所述,用CDR中的某些氨基酸替换潜在的序列倾向性残基对结合亲和力的影响很小;然而,表达BAFF-R的细胞结合和热稳定性数据表明需要进一步改进。因此,CDRH1和CDRH2序列(CDRH1:GFTFSSY (SEQ ID NO:214) 和CDRH2:WYDGSN (SEQ ID NO:215)) 被亲和力成熟为倾向性校正的CDRH3骨架,并施加解离速率压力以选择高亲和力克隆。简而言之,将克隆与浓度为100pM的生物素化hBAFF-R-hFc-His预孵育,然后用1μM非生物素化hBAFF-R-hFc-His激发2小时。分选展示抗BAFF-R scFv(其保持与生物素化的hBAFF-R-hFc-His结合)的酵母,并且重复该过程三次以富集具有较慢解离速率的高亲和力结合物。如图40所示,即使在解离速率压力激发后,克隆仍然与生物素化的hBAFF-R-hFc-His结合,而基于伊利尤单抗的scFv基准对照在这些条件下失去了与生物素化的hBAFF-R-hFc-His的结合,表明较慢的解离速率。

[0567] 单个克隆的分析表明对hBAFF-R-hFc-His具有高亲和力(图41),重要的是,克隆仍然与生物素化的hBAFF-R-hFc-His结合。值得注意的是,基于伊利尤单抗的基准scFv在激发后表现出与生物素化hBAFF-R-hFc-His的结合损失(图41A和图41B)。几个克隆被排除在进一步考虑之外,因为它们含有另外的不期望的氨基酸或特性。表21中显示了从上述研究中选择的克隆的序列。

表21. 所选克隆的CDR序列。

序列	CDRH1	CDRH2	CDRH3
AB1080scFv	GFTFSSY (SEQ ID NO:214)	WYDASN (SEQ ID NO:233)	RFTHLRGWYIEDYGLDV (SEQ ID NO:237)
AB1081scFv	GFAFSSY (SEQ ID NO:238)	WYDESN (SEQ ID NO:239)	RFTNLRGWIIEDYGLDV (SEQ ID NO:240)
AB1084scFv	GFTFSMY (SEQ ID NO:241)	WYDASN (SEQ ID NO:233)	RFTRLRGWYIEDYGLDV (SEQ ID NO:242)
AB1085scFv	GFTFGSY (SEQ ID NO:243)	WYDGSN (SEQ ID NO:215)	RFTHLRGQYIEDYGM <sup><u>D</u></sup> VDV (SEQ ID NO:244)

潜在的序列倾向性用粗体下划线表示,表明克隆之间多样性的残基用粗体表示。

[0568] 从上述解离速率激发研究中选择的克隆作为多特异性结合蛋白产生,其包含相应结合物的scFv和两种非BAFF-R结合物,在Expi293细胞中表达,并且特征在于与表达hBAFF-R的细胞和表达BAFF-R的食蟹猴细胞结合,在KHYG-1-CD16aV介导的细胞毒性测定中裂解表

达BAFF-R的癌细胞的能力,阻断BAFF-BAFF-R相互作用的能力,热稳定性(差示扫描荧光法,DSF)和疏水性(HIC)(结果总结于表22)。与亲代克隆相比,AB1080、AB1081和AB1085对BAFF-R<sup>+</sup>细胞的结合亲和力改善(图42A和图42B与表20相比)。另外,对cynoBAFF-R的结合亲和力类似于对hBAFF-R的结合亲和力(图42A和图42B)。多特异性的缺乏通过PSR测定法证实(图43A-图43I)。AB1084由于在HIC上的保留时间长以及随后可能具有更高的聚集倾向而被从进一步研究中移除。改善的多特异性结合蛋白表现出比基于伊利尤单抗序列的多特异性结合蛋白高得多的效力(图44A和图44B)。此外,与最初的AB0369多特异性结合蛋白相比,观察到效力改善了十倍以上。重要的是,与亲代AB0369多特异性结合蛋白相比,阻断BAFF-BAFF-R结合的能力显著改善(图45)。

表22. 所选多特异性结合蛋白的特征的总结。

测试品	hBAFF-R <sup>+</sup> 细胞 结合 EC <sub>50</sub> (nM)	cBAFF-R <sup>+</sup> 细胞结 合 EC <sub>50</sub> (nM)	细胞溶解, EC <sub>50</sub> (nM)	HIC, 保留 (min)	DSF, Tm1 (°C)
AB1080-002	1.97	1.36	0.03	11.40	66.3
AB1081-002	> 8	> 14	0.05	11.45	65.9
AB1084-001	-	-	0.06	11.79	67.5
AB1085-001	5.78	4.34	0.08	9.55	68.1

[0569] 与对照阿达木单抗(Humira)和派姆单抗(Keytruda)相比,这些多特异性结合蛋白满足可接受的热稳定性标准(图46)。HIC色谱图显示AB1080和AB1081的保留时间分别为11.4和11.5min。AB1085显示了9.5分钟的保留时间,这在已批准的和晚期治疗性抗体中处于较低的边缘,表明非常有利的疏水行为(图46A-图46D)。

[0570] AB1080和AB1081显示出与BAFF-R的结合得到改善,并且在CDR序列中不包含任何序列倾向性,但是,与一组基准治疗性抗体相比,它们的疏水性很高。AB1085表现出所期望的疏水性和亲和力,但在CDRH2和CDRH3序列中包含潜在序列倾向性(图47)。比较AB1080、AB1081和AB1085的序列,并分析和进一步校正AB1080序列,产生W至Q的疏水性降低突变(CDRH3:RFTMLRGWYIEDYGMDV(SEQ ID NO:224)至RFTMLRGQYIEDYGMDV(SEQ ID NO:223))。所得的AB1424/AB1612多特异性结合蛋白表现出良好的低疏水性,落入良好生物制剂的范围内(图48),同时保持对BAFF-R相同的高亲和力(表23,图49A和图49B),强效的BAFF-R-BAFF结合阻断(图50),并且包含亲代AB1080特有的无倾向性序列(表24)。

表23. 多特异性结合蛋白AB1424/AB1612谱系对BAFF-R结合和BAFF-R-BAFF阻断的总结。

分子	Cyno BAFF-R 细胞结合 EC <sub>50</sub> (nM)	人 BAFF-R 细胞结合 EC <sub>50</sub> (Nm)	配体阻断 IC <sub>50</sub> (Nm)
AB0369-001	7.11	6.80	> 1000
AB1080-003	2.36	2.71	5.72
AB1085-001	3.29	4.48	12.67
AB1612-003	1.85	3.09	6.76
人 IgG1k	N/A	N/A	N/A

表24. AB1424/AB1612及其祖先中结合BAFF-R的CDR的比较

TriNKET	CDRH1	CDRH2	CDRH3
AB0369	GFTFSSY (SEQ ID NO:214)	WYDGSN (SEQ ID NO:215)	RFTMLRGLIIEDYGMDV (SEQ ID NO:216)
AB1080	GFTFSSY (SEQ ID NO:214)	WYDASN (SEQ ID NO:233)	RFTHLRGWYIEDYGLDV (SEQ ID NO:237)
AB1085	GFTFGSY (SEQ ID NO:243)	WYDGSN (SEQ ID NO:215)	RFTHLRGQYIEDYGMDV (SEQ ID NO:244)
AB1424/AB1612	GFTFSSY (SEQ ID NO:214)	WYDASN (SEQ ID NO:233)	RFTHLRGQYIEDYGLDV (SEQ ID NO:248)

[0571] 总之,利用重组蛋白和DNA免疫的两个抗体发现活动已经完成。第一个活动确定了四种中等亲和力的非阻断性抗体。从第二次活动中发现的单个结合物AB0369scFv显示阻断BAFF-R-BAFF相互作用的能力。通过多轮亲和力成熟、倾向性校正和合理序列设计对AB0369scFv的广泛开发产生了结合物AB1612/AB1424,它证明了治疗性候选物的理想特性。

#### 实例4-AB1424/AB1612 F3' TriNKET形式的分子分析

[0572] 在此实例中,分析了AB1424/AB1612 F3' TriNKET的分子形式、设计、结构和特征。这些研究a) 提供了分子的基本生化和生物物理学特征,b) 确定了AB1424/AB1612 F3' TriNKET对BAFF-R、NKG2D和CD16a (V和F等位基因变体) 的亲和力,c) 证实了AB1424/AB1612 F3' TriNKET与细胞表面表达的BAFF-R的结合,d) 证明了AB1424/AB1612 F3' TriNKET的选择性,e) 并确定了AB1424/AB1612 F3' TriNKET杀伤BAFF-R+癌细胞的效力。

[0573] AB1424/AB1612 F3' TriNKET是如上所述的F3' 形式的TriNKET,包含三个多肽(抗BAFF-R scFv-CH2-CH3“链S”,SEQ ID NO:270;抗NKG2D VH-CH1-CH2-CH3,“链H”,SEQ ID NO:194;和抗NKG2D VL-CL,“链L”,SEQ ID NO:195)。评估了AB1424/AB1612 F3' TRINKET的一级序列在CDR中是否存在推定的序列倾向性,例如N-连接糖基化位点、Cys残基、潜在脱酰胺位点(Asn)、氧化(Met和Trp)、异构化(Asp)和化学不稳定键(DP)。这些修饰会影响产品功效、安全性、稳定性、一致性或可制造性。

[0574] 表25中提供了对CDR中假定序列倾向性的分析。BAFF-R结合链S不包含任何预测序

列倾向性。NKG2D结合链L不包含任何预测序列倾向性。NKG2D结合链H包含可能易于在CDRH3中截短的潜在序列倾向性。验证性测试表明,AB1424/AB1612 F3' TriNKET在加速稳定或强制降解的条件(其中分子受到热、化学和机械应激)下没有显示任何碎片,表明序列是稳定的。

表25. AB1424/AB1612 F3' TriNKET CDR序列。

链	可变区	框架	CDR1	CDR2	CDR3
S	VH	VH3-30	GFTFSSY (SEQ ID NO:214)	WYDASN (SEQ ID NO:233)	RFTHLRGQYIEDYGLDV (SEQ ID NO:248)
S	VL	VK1-39	RASQSISSYLN (SEQ ID NO:217)	AASSLQS (SEQ ID NO:77)	QQSYSIPLT (SEQ ID NO:249)
H	VH	VH3-21	GFTFSSY (SEQ ID NO:214)	SSSSSY (SEQ ID NO:290)	GAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO:97)
L	VL	VK1-12	RASQGISSWLA (SEQ ID NO:86)	AASSLQS (SEQ ID NO:77)	QQGVSPRT (SEQ ID NO:87)

#### 分子建模

[0575] 使用SabPred网站上提供的Therapeutic Antibody Profiler (TAP),将AB1424/AB1612 F3' TriNKET的抗BAFF-R和抗NKG2D结合臂与377种I期后生物治疗性分子进行了比较。TAP使用AbodyBuilder通过PEARS为带有侧链的AB1424/AB1612 F3' TriNKET生成模型。CDRH3因其多样性而由MODELLER构建。

[0576] 评估了五个不同的参数:

CDR总长度

CDR附近的表面疏水性 (PSH) 块

CDR附近的正电荷 (PPC) 斑块

CDR附近的负电荷 (PNC) 斑块

结构Fv电荷对称参数 (sFvCSP)

[0577] 然后将AB1424/AB1612 F3' TriNKET的这些参数与治疗性抗体的分布谱进行比较,以预测可开发性和可能导致下游挑战的任何潜在问题。

[0578] 图51A-图51C是AB1424/AB1612 F3' TriNKET的BAFF-R结合臂的可变片段(Fv)在三个不同取向的模型(上分图)和在相同取向的对应表面电荷分布(下分图)。图52A-图52E显示了AB1424/AB1612 F3' TriNKET的BAFF-R结合臂的CDR总长度和表面特征分析。该分析是使用治疗性抗体谱(TAP)进行的,并以377种晚期治疗性mAb为基准(Raybould, 2019)。AB1424/AB1612 F3' TriNKET的BAFF-R结合臂的CDR总长度与可比较的晚期治疗性抗体的

CDR一致(图52A-图52E)。

[0579] 单克隆抗体的疏水性是重要的生物物理特性,与其开发成治疗药物有关。AB1424/AB1612 F3' TriNKET的BAFF-R结合臂的疏水块分析证明该分子以绝大多数治疗性mAb为基准(图52A-图52E)。正电荷和负电荷的表面块与对mAb表达的不利影响和加速的体内清除有关。对于AB1424/AB1612 F3' TriNKET的BAFF-R结合臂,带正电的块、带负电的块和电荷对称性与大多数参考mAb一致(图52A-图52E)。

[0580] 结合NKG2D的Fab臂被建模并以三个不同取向描绘(图53A-图53C,上分图),并显示相应的表面电荷分布(图53A-图53C,下分图)。NKG2D臂的表面电荷分布似乎跨模拟的互补位均匀分布。图54A-图54E显示了AB1424/AB1612 F3' TriNKET的NKG2D结合臂的CDR总长度和表面特征分析。使用TAP进行分析(Raybould, 2019)。CDR总长度、疏水性、正/负电荷分布和Fv电荷对称性均优于治疗性mAb参考数据。总之,在这些分析中既没有发现异常的表面电荷特性,也没有发现异常的表面疏水性块。

#### 免疫原性评估

[0581] 使用EpiVax的EpiMatrix算法进行免疫原性评估。按照Cohen等人(2010) A method for individualizing the prediction of immunogenicity of protein vaccines and biologic therapeutics: individualized T cell epitope measure (iTEM). [蛋白疫苗和生物疗法免疫原性预测的个体化方法: 个体化T细胞表位测量(iTEM)] J. Biomed. Biotechnol. [生物医学与生物技术杂志] 961752中的描述进行评估。T<sub>reg</sub>调整的EpiMatrix蛋白得分,范围从-80(无免疫原性)到80(高免疫原性),对于AB1424/AB1612 F3' TriNKET的三个链的序列为S链:-15.78, L链:-23.49, H链:-33.39。因此,AB1424/AB1612 F3' TriNKET的免疫原性预测风险似乎较低。

#### 疏水相互作用色谱

[0582] 疏水性预测数据通过使用分析型疏水相互作用色谱(HIC)研究AB1424/AB1612 F3' TriNKET行为得到证实,该技术依赖于具有明显暴露的疏水块的蛋白更易于聚集。为进行HIC,简而言之,在高盐缓冲液(100mM磷酸钠、1.8M硫酸铵、pH 6.5)中以5:4的比例制备TriNKET(5μg蛋白)注射液以进行取样。使用配备Sepax Proteomix HIC Butyl-NP55μm柱的Agilent 1260 Infinity II HPLC在25°C下分析样品。以1.0mL/分钟的流速在6.5分钟内从0%低盐缓冲液(100mM磷酸钠,pH 6.5)运行梯度至100%低盐缓冲液。在280nm处监测色谱。AB1424/AB1612 F3' TriNKET在分析型HIC柱上的保留时间如表26中所示并且HIC谱如图55A和图55B中所示。商用阿达木单抗和派姆单抗被用作表现良好的生物制剂的实例,并作为测定的内部对照。AB1424/AB1612 F3' TRINKET的保留时间为9.7分钟,而派姆单抗为11.3分钟,阿达木单抗为8.8分钟。因此,实验疏水性分析表明,AB1424/AB1612 F3' TriNKET的疏水性对于进一步开发是可接受的。

表26. 通过HIC评估疏水性。

测试品	HIC保留时间 (min)
阿达木单抗	8.8
派姆单抗	11.3
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	9.7

毛细管等电聚焦(cIEF)

[0583] AB1424/AB1612 F3' TriNKET的实验pI通过cIEF获得(图56)。简而言之,用MilliQ水将样品稀释至1mg/mL,将15 $\mu$ L样品添加到60 $\mu$ L预混液(水、甲基纤维素、Pharmalyte 3-10、精氨酸、pI标志物4.05和9.99)中,涡旋并简短离心。从溶液顶部吸出60 $\mu$ L样品,加入到96孔板中,并在测试前离心。在Maurice仪器(ProteinSimple公司,圣何塞,加利福尼亚州)上,样品在1500伏特下分离1分钟,然后在3000伏特下分离8分钟。商用曲妥珠单抗作为内部对照包含在测定中。

[0584] AB1424/AB1612 F3' TriNKET的cIEF谱是单克隆抗体的典型特征,主峰位于pI 9.0(表27)。还观察到少量酸性和碱性物质的存在,如表28中所示。

表27.通过cIEF测定AB1424/AB1612 F3' TriNKET的pI。

测试品	主峰 (pI)
曲妥珠单抗	8.9
AB1424/AB1612 F3' TriNKET运行1	9.0
AB1424/AB1612 F3' TriNKET运行2	9.0
AB1424/AB1612 F3' TriNKET平均值 $\pm$ StDev	9.0 $\pm$ 0.0

表28.AB1424/AB1612 F3' TriNKET cIEF分析的总结。

测试品	pI (主)	%酸性	%主	%碱性
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	9.0	41.2	53.9	4.9

#### 热稳定性分析

[0585] AB1424/AB1612 F3' TriNKET的热稳定性通过差示扫描量热法(DSC)在PBS pH 7.4或HST中进行评估,HST包含20mM组氨酸、250mM蔗糖、0.01% tween-80,pH 6.0。为进行DSC,简而言之,用PBS将TriNKET稀释至0.5mg/mL。将325 $\mu$ L与匹配的缓冲液空白一起加入到96孔深孔板中。使用MicroCal PEAQ DSC(马尔文,宾夕法尼亚州)生成热谱图。温度以90 $^{\circ}$ C/小时的速度从20 $^{\circ}$ C升至100 $^{\circ}$ C。原始热谱图被减去背景,基线模型被花键化,数据使用非双态模型进行拟合。

[0586] AB1424/AB1612 F3' TriNKET在两种缓冲液中均表现出高热稳定性(图57A,图57B和表29)。

表29.AB1424/AB1612 F3' TriNKET的DSC热稳定性。

测试品	缓冲液	T <sub>开始</sub> ( $^{\circ}$ C)	T <sub>m1</sub> ( $^{\circ}$ C)	T <sub>m2</sub> ( $^{\circ}$ C)	T <sub>m3</sub> ( $^{\circ}$ C)	T <sub>m4</sub> ( $^{\circ}$ C)	T <sub>m5</sub> ( $^{\circ}$ C)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	PBS	61.7	68.1	69.3	76.4	81.4	83.2
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	A	61.8	67.9	69.8	79.1	84.3	86.4

#### 二硫键排列

[0587] AB1424/AB1612 F3' TriNKET是基于单克隆IgG1抗体骨架的经工程改造的分子。虽然典型的IgG1包含16个二硫键,但AB1424/AB1612 F3' TriNKET的F3'形式仅包含15个二硫键。

[0588] AB1424/AB1612 F3' TriNKET的二硫键排列通过非还原胰蛋白酶消化物的LC-MS/MS肽做图分析得到证实。二硫键肽通过MS/MS数据库搜索鉴定,并通过比较它们在天然和还原消化物中的强度来确认。确认了抗体结构中预期的所有标准二硫化物。在AB1424/AB1612 F3' TriNKET中观察到的二硫键连接的肽的总结显示在表30中。所有理论二硫键连接的肽均以高质量准确度(<2ppm)观察到,可还原,并通过MS/MS碎裂进行序列确认。

表30. AB1424/AB1612 F3' TriNKET中二硫键连接的肽的理论和实验质量。

链	结构域	肽	理论质量 (Da)	实验质量 (Da)	质量准确度 (ppm)
L	VL	L2:L7	4482.0784	4482.0842	1.7
	CL	L12:L19	3555.7490	3555.7552	1.9
H	VH	H3:H10	3371.4686	3371.4737	1.8

链	结构域	肽	理论质量 (Da)	实验质量 (Da)	质量准确度 (ppm)
	CH1	H13:H14-15	7916.9194	7916.9297	1.6
	CH2	H23:H30	2328.0977	2328.1024	2.0
	CH3	H37:H41	4432.0675	4432.0797	2.8
S	scFv VH	S3-S11	3408.4638	3408.4620	-0.5
	scFv*	S9:S48 <sup>a</sup>	1011.4154	1011.4155	0.0
	scFv VL	S32:S46 <sup>a</sup>	1316.5853	1316.5850	-0.2
	CH2	S26:S33	参见 H23:H30	N.A.	N.A.
	CH3	S42:S47	3844.8236	3844.8321	1.8
分子间	铰链	H20-21:S23-24	5454.7834	5454.7890	1.6
	CL-CH1	L20-21:H19	1260.4863	1260.4868	0.4
	CH3-CH3*	H36:S40-41*	2757.3830	2757.3888	2.5

\*表示经工程改造的二硫化物

<sup>a</sup>通过胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶消化

AB1424/AB1612 F3' TriNKET的结合特性

[0589] 为了表征AB1424/AB1612 F3' TriNKET对细胞上表达的人BAFF-R的亲和力,使用了动力学排斥平台仪器(KinExA)。图58A和图58B表明AB1424/AB1612 F3' TriNKET以2.55nM的亲和力结合在等基因BAFF-R-CHO细胞表面表达的BAFF-R。

[0590] 设计了在CHO细胞系的骨架上过表达人和食蟹猴BAFF-R的等基因细胞系。AB1424/AB1612 F3' TriNKET与相应的亲代抗体(AB1753)进行了比较。AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1753在与人和食蟹猴BAFF-R的结合方面表现出相似的剂量反应(图59A和图59B)。在比较与人和食蟹猴BAFF-R的结合时,AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1753的EC<sub>50</sub>几乎相同(表

31)。值得注意的是,在人和食蟹猴BAFF-R细胞中,AB1424/AB1612 F3' TriNKET的相比于背景的倍数(FOB)大于AB1753(图59A和图59B和表31)。不希望受理论的束缚,假设这可能归因于AB1424/AB1612 F3' TRINKET的形式改变,其中抗原接合是单价的(而不是AB1753的二价)并且有可能更高负载的TriNKET在细胞上。

表31. AB1424/AB1612 F3' TriNKET和相应的亲代mAb与等基因人和食蟹猴BAFF-R-CHO细胞的结合。

测试品	人 BAFF-R CHO		食蟹猴 BAFF-R CHO	
	EC <sub>50</sub> (nM)	最大 FOB	EC <sub>50</sub> (nM)	最大 FOB
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.9	85	0.9	141
亲代 mAb (AB1753)	0.4	57	0.4	116

[0591] 通过流式细胞术评估AB1424/AB1612 F3' TriNKET与多种BAFF-R+癌细胞系的结合。AB1424/AB1612 F3' TriNKET以低纳摩尔EC<sub>50</sub>结合到BJAB、Raji、RL、Rs4;11、Jeko-1和SUDHL-6癌细胞上的细胞表面BAFF-R。EC<sub>50</sub>在BAFF-R+癌细胞系之间是相当的(图60A-图60F)。

结合至NKG2D

[0592] AB1424/AB1612 F3' TriNKET与人和食蟹猴NKG2D的结合通过表面等离子体共振(SPR)评估(图61A-图61H和图62A-图62H)。NKG2D是天然二聚体,因此本实验使用重组mFc标记的NKG2D二聚体。利用两种不同的拟合来获得平衡亲和力数据:稳态亲和拟合和动力学拟合。动力学常数和平衡亲和常数显示在表32和表33中。AB1424/AB1612 F3' TriNKET旨在以低亲和力和快速解离速率结合人NKG2D。分别对于人NKG2D和食蟹猴靶标,解离速率常数为 $1.1 \pm 0.0 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 和 $1.1 \pm 0.0 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。通过动力学拟合和稳态亲和拟合获得的平衡亲和常数(K<sub>D</sub>)对于人NKG2D(分别为 $455.8 \pm 12.7 \text{ nM}$ 和 $456.4 \pm 13.9 \text{ nM}$ (表32))和食蟹猴NKG2D(分别为 $517.0 \pm 13.6 \text{ nM}$ 和 $520.5 \pm 15.5 \text{ nM}$ (表33))非常相似。

表32. 通过SPR测量的AB1424/AB1612 F3' TriNKET对人NKG2D的动力学参数和结合亲和力。

测试品	$k_a (\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}) \times 10^5$	$k_d (\text{s}^{-1}) \times 10^{-1}$	动力学拟合 K <sub>D</sub> (nM)	稳态拟合 K <sub>D</sub> (nM)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	2.4	1.1	439.0	438.3

测试品	$k_a (M^{-1}s^{-1}) \times 10^5$	$k_d (s^{-1}) \times 10^{-1}$	动力学拟合 $K_D$ (nM)	稳态拟合 $K_D$ (nM)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	2.4	1.1	452.9	453.0
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	2.3	1.1	466.1	468.2
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	2.4	1.1	465.1	466.3
<b>平均值 <math>\pm</math> StDev</b>	<b>2.4 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>1.1 <math>\pm</math> 0.0</b>	<b>455.8 <math>\pm</math> 12.7</b>	<b>456.4 <math>\pm</math> 13.9</b>

表33. 通过SPR测量的AB1424/AB1612 F3' TriNKET对食蟹猴NKG2D的动力学参数和结合亲和力。

测试品	$k_a (M^{-1}s^{-1}) \times 10^5$	$k_d (s^{-1}) \times 10^{-1}$	1 : 1 动力学拟合 $K_D$ (nM)	稳态拟合 $K_D$ (nM)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	2.1	1.1	498.2	500.6
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	2.0	1.0	515.8	516.4
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	2.0	1.0	528.4	534.9
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	2.1	1.1	525.4	530.3
<b>平均值 <math>\pm</math> StDev</b>	<b>2.0 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>1.1 <math>\pm</math> 0.0</b>	<b>517.0 <math>\pm</math> 13.6</b>	<b>520.5 <math>\pm</math> 15.5</b>

结合至CD16

[0593] 通过SPR评估AB1424/AB1612 F3' TriNKET与人CD16a (V158)、人CD16a (F158) 和食蟹猴CD16的结合, 并与曲妥珠单抗进行比较 (图63A-图63H, 图64A-图64P, 和图65A-图65H)。人CD16aV158接合的动力学在AB1424/AB1612 F3' TriNKET和IgG1同种型实验对照曲妥珠单抗之间是相当的 (表34)。同样, AB1424/AB1612 F3' TriNKET和曲妥珠单抗与人CD16a F158的稳态亲和力相当 (表35)。对于AB1424/AB1612 F3' TriNKET和曲妥珠单抗, 与食蟹猴CD16的亲和力跟与人CD16a V158的亲和力相当 (表36)。因此, AB1424/AB1612 F3' TriNKET对人CD16a V158/F158和食蟹猴CD16表现出良好的结合特性。

表34. AB1424/AB1612 F3' TriNKET 1对人CD16a V158的动力学参数和结合亲和力。

测试品	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	动力学拟合 $K_D$ (nM)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	$1.1 \times 10^5$	$1.4 \times 10^{-2}$	130.6
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	$1.0 \times 10^5$	$1.4 \times 10^{-2}$	131.3
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	$1.1 \times 10^5$	$1.4 \times 10^{-2}$	133.6
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	$1.1 \times 10^5$	$1.3 \times 10^{-2}$	121.7
<b>平均值 <math>\pm</math> StDev</b>	<b><math>(1.1 \pm 0.0) \times 10^5</math></b>	<b><math>(1.4 \pm 0.1) \times 10^{-2}</math></b>	<b><math>129.3 \pm 5.2</math></b>
曲妥珠单抗	$1.9 \times 10^5$	$9.2 \times 10^{-3}$	48.9
曲妥珠单抗	$1.9 \times 10^5$	$9.2 \times 10^{-3}$	48.6
曲妥珠单抗	$1.9 \times 10^5$	$9.0 \times 10^{-3}$	47.7
曲妥珠单抗	$1.6 \times 10^5$	$8.9 \times 10^{-3}$	56.1
<b>平均值 <math>\pm</math> StDev</b>	<b><math>(1.8 \pm 0.2) \times 10^5</math></b>	<b><math>(9.1 \pm 0.2) \times 10^{-3}</math></b>	<b><math>50.3 \pm 3.9</math></b>

表35. AB1424/AB1612 F3' TriNKET与人CD16a F158结合的稳态亲和力。

测试品	稳态 $K_D$ (nM)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1331.8
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1256.0
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1366.8
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1430.0
<b>平均值 <math>\pm</math> StDev</b>	<b><math>1346.2 \pm 72.6</math></b>
曲妥珠单抗	475.7

测试品	稳态 $K_D$ (nM)
曲妥珠单抗	428.5
曲妥珠单抗	447.9
曲妥珠单抗	440.2
<b>平均值 <math>\pm</math> StDev</b>	<b><math>448.1 \pm 20.1</math></b>

表36. AB1424/AB1612 F3' TriNKET对食蟹猴CD16的动力学参数和结合亲和力。

测试品	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	动力学拟合 $K_D$ (nM)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	$7.8 \times 10^4$	$2.0 \times 10^{-2}$	232.5
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	$7.8 \times 10^4$	$2.1 \times 10^{-2}$	225.4
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	$7.2 \times 10^4$	$2.0 \times 10^{-2}$	238.3
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	$7.8 \times 10^4$	$2.0 \times 10^{-2}$	239.1
<b>平均值 <math>\pm</math> StDev</b>	<b><math>(7.6 \pm 0.4) \times 10^4</math></b>	<b><math>(2.1 \pm 0.0) \times 10^{-2}</math></b>	<b><math>270.8 \pm 11.0</math></b>
曲妥珠单抗	$1.9 \times 10^5$	$1.2 \times 10^{-2}$	66.1
曲妥珠单抗	$1.6 \times 10^5$	$1.2 \times 10^{-2}$	76.2
曲妥珠单抗	$1.6 \times 10^5$	$1.2 \times 10^{-2}$	78.9
曲妥珠单抗	$1.6 \times 10^5$	$1.3 \times 10^{-2}$	79.0
<b>平均值 <math>\pm</math> StDev</b>	<b><math>(1.7 \pm 0.2) \times 10^5</math></b>	<b><math>(1.2 \pm 0.0) \times 10^{-2}</math></b>	<b><math>73.7 \pm 6.8</math></b>

#### 抗原结合位点的共接合

[0594] 为了证明人CD16a与人NKG2D结合的共接合的协同作用,进行了SPR实验,其中对AB1424/AB1612 F3' TriNKET与NKG2D、CD16a和混合NKG2D-CD16a Biacore芯片表面的结合进行了定性评估。AB1424/AB1612 F3' TriNKET对人NKG2D和人CD16a的亲合力都低,但是,同时结合这两个靶标会导致亲合力效应,表现为较慢的解离速率。因此,AB1424/AB1612 F3' TriNKET可以积极接合CD16a和NKG2D(图66)。

[0595] 为了确定一个靶标的结合是否会干扰第二靶标与AB1424/AB1612 F3' TriNKET的结合,将BAFF-R和NKG2D依次注射到捕获在抗hFc IgG (SPR) 芯片上的AB1424/AB1612 F3' TriNKET上。靶标结合传感图表明,BAFF-R结合臂或NKG2D结合臂在饱和后的占据状态不干扰第二靶抗原的结合(图67A和图67B)。描述每个靶标与游离AB1424/AB1612 F3' TriNKET和已被其他靶标饱和的AB1424/AB1612 F3' TriNKET的结合的各个传感图区段的形状的相似性表明AB1424/AB1612 F3' TriNKET的靶标占据状态对动力学参数没有显著影响。例如,两个分图中传感图的BAFF-R结合区段的形状相似。由于该靶标的快速解离速率,必须在整个实验过程中保持NKG2D的饱和浓度。另外,对每个靶标结合的相对化学计量没有任何影响(与结合未占据的AB1424/AB1612 F3' TriNKET相比)表示AB1424/AB1612 F3' TriNKET上的NKG2D和BAFF-R结合位点完全独立(表37)。因此,AB1424/AB1612 F3' TriNKET能够成功实现BAFF-R和NKG2D靶向臂的同时共接合。

表37. AB1424/AB1612 F3' TriNKET对BAFF-R和NKG2D的相对结合化学计量。

实验设置	BAFF-R 相对结合化学计量	NKG2D 相对结合化学计量
靶标结合到未被另一靶标占据的 AB1424/AB1612 F3' TriNKET (首先注射)	1.0	1.0
靶标结合到被另一靶标饱和的 AB1424/AB1612 F3' TriNKET (第二注射)	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1

### 细胞结合特异性

[0596] 为了评估AB1424/AB1612 F3' TriNKET对BAFF-R的特异性,测试了它与密切相关的蛋白的结合,该蛋白也结合BAFF配体。在图68A和图68B中,进行了SPR实验并证明固定化的AB1424/AB1612 F3' TriNKET特异性结合靶标BAFF-R而不是TACI。重组人TACI的活性和正确折叠通过与TACI特异性抗体(右侧分图)的结合得到证实。

[0597] 为了进一步评估AB1424/AB1612 F3' TriNKET对BAFF-R的特异性,通过流式细胞术评估了AB1424/AB1612 F3' TriNKET与表达另一个BAFF结合家族成员BCMA(BCMA-C6)的转基因细胞系的结合(图69A和图69B)。AB1424/AB1612 F3' TriNKET未显示与BCMA或大鼠衍生的亲代细胞系C6的交叉反应。具有已知BCMA特异性的mAb(EM901)用作BCMA检测的阳性对照。

[0598] AB1424/AB1612 F3' TriNKET的特异性和与不相关蛋白相互作用的缺乏通过探测与经工程改造以表达人或食蟹猴BAFF-R细胞的ExpiCHO等基因细胞系的结合来进一步评估(图70A和图70B)。

[0599] 另外,进行基于流式细胞术的PSR测定以测量与去垢剂溶解的CHO细胞膜蛋白制剂的结合(图71A-图71G)。PSR试验与交叉相互作用色谱(抗体溶解度的替代物)以及杆状病毒颗粒酶联免疫吸附试验(体内清除的替代物)密切相关(Xu等人(2013)。Addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system:a FACS-based,high-throughput selection and analytical tool.[解决从体外酵母展示系统中选择的抗体的多特异性:基于FACS的高通量选择和分析型工具]Protein engineering design and selection[蛋白质工程设计与选择],26,663-670)。

[0600] 在室温,将PBSF中的50 $\mu$ L的100nM TriNKET或对照mAb与预洗的5 $\mu$ L蛋白A Dynabeads™浆液(英杰公司(Invitrogen),目录#10001D)孵育30分钟。允许TriNKET或mAb结合的磁珠在磁力架上静置60秒,并弃去上清液。用100 $\mu$ L PBSF洗涤结合的珠。将珠与50 $\mu$ L生物素化PSR试剂一起在冰上孵育20分钟,该试剂从储备液中稀释25倍(Xu等人2013)。将样品放在磁力架上,弃去上清液,并用100 $\mu$ L PBSF洗涤。二抗FACS试剂用于检测生物素化PSR试剂与TriNKET或对照mAb的结合,其制备如下:在PBSF中将1:250 $\mu$ L的链霉亲和素-PE(百进公司(Biolegend),目录号405204)和1:100的驴抗人Fc组合。向每个样品中加入100 $\mu$ L二抗试剂,并在冰上孵育20分钟。用100 $\mu$ L PBSF洗涤珠两次,并在FACS Celesta(BD)上分析样品。在此测定中,曲妥珠单抗用作阴性对照。依奇珠单抗作为阳性对照,通过流式细胞术显示与PSR相互作用的倾向增加。AB1424/AB1612 F3' TriNKET与PSR的结合呈阴性,并且与PSR阴性

对照曲妥珠单抗最相当。这些结果表明AB1424/AB1612F3' TriNKET不表现出与非特异性蛋白的反应性(图71A-图71G)。

#### KHYG1-CD16aV介导的细胞毒性

[0601] AB1424/AB1612 F3' TriNKET在刺激KHYG-1-CD16aV介导的BAFF-R+BJAB细胞的细胞溶解中的效力是在细胞毒性测定中使用KHYG-1-CD16a细胞进行测定的,该细胞被工程改造为除NKG2D外还表达CD16a。通过DELFI A细胞毒性测定法测量靶细胞的裂解。简而言之,从培养物中收获表达BAFF-R的人癌细胞系,用HBS洗涤,并以 $10^6$ /mL重悬于生长培养基中,用于用BATDA试剂(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer) AD0116)标记。遵循制造商说明来标记靶细胞。标记后,用HBS洗涤细胞3次,并以 $0.5-1.0 \times 10^5$ /mL重悬于培养基中。向96孔板的每个孔中添加100 $\mu$ l经BATDA标记的细胞。将针对BAFF-R的单克隆抗体或TriNKET在培养基中稀释,并将50 $\mu$ l的稀释的mAb或TriNKET添加到每个孔中。

[0602] 为了制备NK细胞,使用密度梯度离心法从人外周血血沉棕黄层中分离出PBMC,洗涤并准备用于NK细胞分离。将NK细胞使用负选择技术与磁珠分离。分离的NK细胞的纯度通常>90% CD3-CD56+。将分离的NK细胞静置过夜并从培养物中收获。然后将细胞洗涤并以 $10^5-2.0 \times 10^6$ /mL的浓度重悬于培养基中,效应细胞与靶细胞(E:T)的比例为5:1。将50 $\mu$ l NK细胞加入板的每个孔中,总培养体积为200 $\mu$ l。将板在37 $^{\circ}$ C和5% CO<sub>2</sub>孵育2-3小时。

[0603] 孵育后,将板从培养箱中取出,并通过以200xg离心5分钟沉淀细胞。将20 $\mu$ l培养物上清液转移到干净的微孔板中,并将200 $\mu$ l室温铊溶液(珀金埃尔默公司C135-100)加入每个孔中。将板避光并在板振荡器上以250rpm孵育15分钟,然后使用SpectraMax i3X仪器读取。将BJAB细胞用BATDA试剂标记。标记后,洗涤细胞并重悬于原代细胞培养基中。经BATDA标记的细胞、AB1424/AB1612 F3' TRINKET和静息KHYG-1-CD16V细胞被添加到96孔板的孔中。通过添加1% Triton-X,准备另外的孔以最大程度地裂解靶细胞。从只有经BATDA标记的细胞的孔中监测自发释放。培养3小时后,沉淀细胞,将培养上清液转移至干净的微孔板中,每孔加入室温铊溶液。将板避光并在板振荡器上以250rpm孵育15分钟。使用SpectraMax i3X仪器读取板。特异性裂解%计算如下:

$$\text{特异性裂解\%} = ((\text{实验释放} - \text{自发释放}) / (\text{最大释放} - \text{自发释放})) * 100\%$$

[0604] AB1424/AB1612 F3' TriNKET表现出相当的亚纳摩尔效力和有效的最大细胞杀伤(表38)。AB1424/AB1612 F3' TriNKET在驱动BJAB细胞裂解方面高度有效,并且AB1424/AB1612 F3' TriNKET生产批次之间的效力有很强的相关性。

表38. AB1424/AB1612 F3' TriNKET在KHYG-1-CD16aV和BJAB细胞存在下的效力。呈现相对于对照的最大杀伤。

测试品	EC <sub>50</sub> (nM)	最大杀伤(%)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.13	108
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.13	105

#### NK细胞介导的细胞毒性

[0605] 将AB1424/AB1612 F3' TriNKET在驱动NK细胞介导的BAFF-R+肿瘤细胞系RL裂解中的效力与亲代AB1753抗体进行比较(图72A和图72B)。如实例2中所述进行细胞毒性测定。AB1753对BAFF-R+肿瘤细胞系的细胞溶解作用很低或检测不到。AB1424/AB1612 F3' TriNKET展示了亚纳摩尔EC<sub>50</sub>,有效的最大杀伤,并超过了AB1753在RL细胞裂解中的效力(表

39)。

表39. AB1424/AB1612 F3' TriNKET和亲代mAb在原代NK细胞和BAFF-R+肿瘤细胞系存在下的效力。

细胞系	AB1424/AB1612 F3' TriNKET		AB1753	
	EC <sub>50</sub> (nM)	最大杀伤 (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	最大杀伤 (%)
RL	0.12 ± 0.07	44.3 ± 19.2	ND	10.7 ± 9.6

AB1424/AB1612 F3' TriNKET的效力同时需要NKG2D接合和CD16a接合

[0606] 为了评估AB1424/AB1612 F3' TriNKET介导的细胞毒性的机制,生成了一组对照TriNKET。AB1424/AB1612 F3' TRINKET NKG2Dsi是AB1424/AB1612 F3' TriNKET的变体,其中NKG2D结合臂的轻链被取代,使该臂无法结合NKG2D。AB1424/AB1612 F3' TriNKET Fc $\gamma$ Rsi是AB1424/AB1612 F3' TriNKET的效应子沉默版本,带有Fc沉默突变:L234A、L235A和P329G(根据EU编号)。F3'同种型对照通过用帕利珠单抗的结合非人抗原的可变结构域取代BAFF-R-结合臂来构建,格式化为二硫键稳定的scFv(图73A-图71D)。沉默变体表现如预期,这取决于它们的预期目的,如通过SPR与人BAFF-R、NKG2D和CD16a V158的结合进行定性测量(表40)。AB1424/AB1612 F3' TriNKET在KHYG-1-CD16a和BAFF-R+BJAB存在的情况下表现出卓越的效力和最大杀伤;NKG2D和Fc沉默变体显示出最小的溶细胞活性(图74和表41)。

表41. 在KHYG-1-CD16a和BJAB细胞存在的情况下,AB1424/AB1612 F3' TriNKET和沉默变体的效力。

测试品	EC <sub>50</sub> (nM)	最大杀伤 (%)
AB1424/AB1612 F3' TRINKET	0.03	112
AB1424/AB1612 F3' TRINKET NKG2Dsi	0.06	74
AB1424/AB1612 F3' TRINKET Fc $\gamma$ Rsi	N.D.	48
F3' 同种型对照	N.D.	48

[0607] 如上所述,AB1424/AB1612 F3' TriNKET与人和食蟹猴BAFF-R的亲合力高,与人和食蟹猴NKG2D的亲合力低,与人和食蟹猴CD16a的亲合力低。AB1424/AB1612 F3' TriNKET没有显示任何虚假的脱靶相互作用。AB1424/AB1612 F3' TriNKET与BAFF-R+细胞紧密结合并对其具有高度效力。最后,AB1424/AB1612 F3' TriNKET可以同时与BAFF-R和NKG2D结合,并在NK接合臂之间表现出稳健的协同作用,其功效需要BAFF-R、NKG2D和CD16a的三部分结合,突出了TriNKET的作用机制。

实例5-AB1424/AB1612 F3' TriNKET与CD16受体结合的进一步分析

[0608] 如实例4中所述,使用SPR进行如本实例中所述的结合分析。测量了AB1424/AB1612 F3' TriNKET与人CD64 (Fc $\gamma$ RI) 的结合,并显示在图75A-图75H中。表42总结了从AB1424/AB1612 F3' TriNKET和曲妥珠单抗的传感图确定的动力学速率和人CD64亲合力值。

表42. AB1424/AB1612 F3' TriNKET与人CD64结合的动力学参数和亲合力值。

样品	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)
AB1424/AB1612 F3'TRINKET	$7.7 \times 10^4$	$2.2 \times 10^{-4}$	2.9
AB1424/AB1612 F3'TRINKET	$7.3 \times 10^4$	$2.3 \times 10^{-4}$	3.1
AB1424/AB1612 F3'TRINKET	$6.9 \times 10^4$	$2.3 \times 10^{-4}$	3.4
AB1424/AB1612 F3'TRINKET	$7.2 \times 10^4$	$2.3 \times 10^{-4}$	3.2
<b>平均值 ± SD</b>	<b><math>(7.3 \pm 0.3) \times 10^4</math></b>	<b><math>(2.3 \pm 0.0) \times 10^{-4}</math></b>	<b><math>3.2 \pm 0.2</math></b>
曲妥珠单抗	$9.9 \times 10^4$	$2.0 \times 10^{-4}$	2.0
曲妥珠单抗	$5.2 \times 10^4$	$2.0 \times 10^{-4}$	3.9
曲妥珠单抗	$9.2 \times 10^4$	$2.1 \times 10^{-4}$	2.2
曲妥珠单抗	$8.8 \times 10^4$	$2.2 \times 10^{-4}$	2.5
<b>平均值 ± SD</b>	<b><math>(8.3 \pm 2.1) \times 10^5</math></b>	<b><math>(2.1 \pm 0.1) \times 10^{-4}</math></b>	<b><math>2.7 \pm 0.9</math></b>

[0609] 测量了AB1424/AB1612 F3' TriNKET与食蟹猴CD64 (Fc  $\gamma$  RI) 的结合,并显示在图76A-图76H中。表43总结了从AB1424/AB1612 F3' TriNKET和曲妥珠单抗的传感图确定的动力学速率和食蟹猴CD64亲和力值。

表43. AB1424/AB1612 F3' TriNKET与食蟹猴CD64结合的动力学参数和亲和力值。

样品	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)
AB1424/AB1612 F3'TriNKET	$1.0 \times 10^5$	$1.3 \times 10^{-4}$	1.3
AB1424/AB1612 F3'TriNKET	$1.0 \times 10^5$	$1.9 \times 10^{-4}$	1.9
AB1424/AB1612 F3'TriNKET	$1.0 \times 10^5$	$2.5 \times 10^{-4}$	2.4

样品	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)
AB1424/AB1612 F3'TriNKET	$1.0 \times 10^5$	$2.7 \times 10^{-4}$	2.7
<b>平均值 ± SD</b>	<b><math>(1.0 \pm 0.0) \times 10^5</math></b>	<b><math>(2.1 \pm 0.7) \times 10^{-4}</math></b>	<b><math>2.1 \pm 0.6</math></b>
曲妥珠单抗	$1.7 \times 10^5$	$1.4 \times 10^{-4}$	0.8
曲妥珠单抗	$1.8 \times 10^5$	$1.5 \times 10^{-4}$	0.8
曲妥珠单抗	$1.8 \times 10^5$	$1.4 \times 10^{-4}$	0.9
曲妥珠单抗	$1.8 \times 10^5$	$1.2 \times 10^{-4}$	0.9
<b>平均值 ± SD</b>	<b><math>(1.8 \pm 0.0) \times 10^5</math></b>	<b><math>(1.4 \pm 0.1) \times 10^{-4}</math></b>	<b><math>0.8 \pm 0.1</math></b>

[0610] 测量了与人CD32a H131的结合,并显示在图77A-图77P中。从传感图确定的亲和力和值总结在表44中。

表44. AB1424/AB1612 F3'TriNKET和曲妥珠单抗对人CD32a H131的亲和力值。

样品	重复 $K_D$ ( $\mu$ M)	重复 $K_D$ ( $\mu$ M)	重复 $K_D$ ( $\mu$ M)	重复 $K_D$ ( $\mu$ M)	$K_D$ ( $\mu$ M) 平均值 ± SD
AB1424/AB16 12 F3' TriNKET	0.9	1.1	0.9	1.0	<b><math>1.0 \pm 0.1</math></b>
曲妥珠单抗	1.4	1.1	1.3	1.3	<b><math>1.3 \pm 0.1</math></b>

[0611] 测量了AB1424/AB1612 F3' TriNKET与人CD32a R131等位基因(Fc  $\gamma$  RIIa R131)的结合,并显示在图78A-图78P中。从传感图确定的所得亲和力值总结在表45中。

表45. AB1424/AB1612 F3'TriNKET和曲妥珠单抗对人CD32a R131的亲和力值。

样品	重复 $K_D$ ( $\mu$ M)	重复 $K_D$ ( $\mu$ M)	重复 $K_D$ ( $\mu$ M)	重复 $K_D$ ( $\mu$ M)	$K_D$ ( $\mu$ M) 平均值 ± SD
AB1424/AB16 12 F3' TriNKET	1.5	1.3	1.5	1.2	<b><math>1.4 \pm 0.1</math></b>
曲妥珠单抗	1.9	1.6	1.9	1.5	<b><math>1.7 \pm 0.2</math></b>

[0612] 测量了AB1424/AB1612 F3' TriNKET与人CD32b (Fc  $\gamma$  RIIb)的结合,并显示在图79A-图79P中。从传感图确定的所得亲和力值总结在表46中。

表46. 人CD32b对AB1424/AB1612 F3'TriNKET和曲妥珠单抗的亲和力值。

样品	重复 K <sub>D</sub> (μM)	重复 K <sub>D</sub> (μM)	重复 K <sub>D</sub> (μM)	重复 K <sub>D</sub> (μM)	K <sub>D</sub> (μM) 平均值 ± SD
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	5.9	5.5	5.8	6.3	5.9 ± 0.3
曲妥珠单抗	7.2	6.6	7.2	7.7	7.2 ± 0.5

[0613] 测量了AB1424/AB1612 F3' TriNKET与人CD16b(Fc γ RIIb)的结合,并显示在图80A-图80P中。从传感图确定的所得亲和力值总结在表47中。

表47. 人CD16b对AB1424/AB1612 F3' TriNKET和曲妥珠单抗的亲和力值。

样品	重复 K <sub>D</sub> (μM)	重复 K <sub>D</sub> (μM)	重复 K <sub>D</sub> (μM)	重复 K <sub>D</sub> (μM)	K <sub>D</sub> (μM) 平均值 ± SD
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	7.0	6.3	7.9	6.4	6.9 ± 0.7
曲妥珠单抗	4.0	3.5	4.4	3.4	3.8 ± 0.5

[0614] 测量了AB1424/AB1612 F3' TriNKET与食蟹猴CD16的结合,并显示在图81A-图81H中。从传感图确定的所得亲和力值总结在表48中。

表48. AB1424/AB1612 F3' TriNKET和曲妥珠单抗对食蟹猴CD16的亲和力值。

	<i>k<sub>a</sub></i> (1/Ms)	<i>k<sub>d</sub></i> (1/s)	K <sub>D</sub> (nM)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	7.8 x 10 <sup>4</sup>	2.0 x 10 <sup>-2</sup>	260.9

	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	$7.8 \times 10^4$	$2.1 \times 10^{-2}$	268.8
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	$7.2 \times 10^4$	$2.0 \times 10^{-2}$	282.6
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	$7.8 \times 10^4$	$2.0 \times 10^{-2}$	260.4
<b>平均值 ± SD</b>	<b><math>(7.6 \pm 0.4) \times 10^4</math></b>	<b><math>(2.1 \pm 0.0) \times 10^{-2}</math></b>	<b>270.8 ± 11.0</b>
曲妥珠单抗	$1.9 \times 10^5$	$1.2 \times 10^{-2}$	66.1
曲妥珠单抗	$1.6 \times 10^5$	$1.2 \times 10^{-2}$	76.2
曲妥珠单抗	$1.6 \times 10^5$	$1.2 \times 10^{-2}$	78.9
曲妥珠单抗	$1.6 \times 10^5$	$1.3 \times 10^{-2}$	79.0
<b>平均值 ± SD</b>	<b><math>(1.7 \pm 0.2) \times 10^5</math></b>	<b><math>(1.2 \pm 0.0) \times 10^{-2}</math></b>	<b>73.7 ± 6.8</b>

[0615] AB1424/AB1612 F3' TriNKET与人FcRn的结合在pH 6.0进行测量,并显示在图82A-图82P中。从传感图确定的所得亲和力值总结在表49中。

表49. AB1424/AB1612 F3' TriNKET和曲妥珠单抗在pH 6.0对人FcRn的亲和力值。

样品	重复 $K_D$ ( $\mu$ M)	重复 $K_D$ ( $\mu$ M)	重复 $K_D$ ( $\mu$ M)	重复 $K_D$ ( $\mu$ M)	$K_D$ ( $\mu$ M) 平均值 ± SD
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1.0	1.0	1.1	1.1	1.0 ± 0.0
曲妥珠单抗	1.6	1.4	1.5	1.5	1.5 ± 0.1

[0616] 测量了AB1424/AB1612 F3' TriNKET与食蟹猴FcRn的结合,并显示在图83A-图83P中。从传感图确定的所得亲和力值总结在表50中。

表50. AB1424/AB1612 F3' TriNKET和曲妥珠单抗在pH 6.0对食蟹猴FcRn的亲和力值。

样品	重复 $K_D$ ( $\mu$ M)	重复 $K_D$ ( $\mu$ M)	重复 $K_D$ ( $\mu$ M)	重复 $K_D$ ( $\mu$ M)	$K_D$ ( $\mu$ M) 平均值 ± SD
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0 ± 0.0
曲妥珠单抗	1.5	1.3	1.5	1.3	1.4 ± 0.1

[0617] AB1424/AB1612 F3' TriNKET和曲妥珠单抗在pH 7.4与人和食蟹猴FcRn的可量化结合的缺乏得到证实,并显示在图84A-图84H中。在pH 6.0FcRn结合实验之前,在相同的

Biacore芯片表面上运行pH 7.4结合。

[0618] AB1424/AB1612 F3' TriNKET和IgG1同种型对照曲妥珠单抗没有表现出生理上有意义的差异(差异小于3倍),并且它们与测试的人和食蟹猴CD64 (Fc  $\gamma$  RI) 和CD16 (Fc  $\gamma$  RIII) 重组受体的结合相当(表50)。AB1424/AB1612 F3' TriNKET和曲妥珠单抗在与人CD32 (Fc  $\gamma$  RII) 受体的结合方面相似(差异小于1.2倍)(表51)。

表51. Fc  $\gamma$  R对AB1424/AB1612 F3' TriNKET和曲妥珠单抗的亲合力的总结。

分析物	人 CD64 K <sub>D</sub> , nM	Cyno CD64 K <sub>D</sub> , nM	人 CD32a K <sub>D</sub> , $\mu$ M		人 CD16a K <sub>D</sub> , nM		人 CD32b K <sub>D</sub> , $\mu$ M	人 CD16b K <sub>D</sub> , $\mu$ M	Cyno CD16 K <sub>D</sub> , nM
			H131	R131	V158	F158			
AB1424/ AB1612 F3' TriNKET	3.2 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1	129.3 $\pm$ 5.2	1346.2 $\pm$ 72.6	5.9 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 0.7	270.8 $\pm$ 11.0
曲妥珠单 抗	2.7 $\pm$ 0.9	0.8 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.2	50.3 $\pm$ 3.9	448.1 $\pm$ 20.1	7.2 $\pm$ 0.5	3.8 $\pm$ 0.5	73.7 $\pm$ 6.8

[0619] 另外,AB1424/AB1612 F3' TriNKET在pH 6.0对人和食蟹猴FcRn的亲合力与曲妥珠单抗相似。AB1424/AB1612 F3' TriNKET和曲妥珠单抗在pH 7.4测试的浓度下未显示任何可检测的结合(表52)。

表52. AB1424/AB1612 F3' TriNKET和曲妥珠单抗结合人和食蟹猴FcRn的总结。

分析物	人 FcRn, pH 6.0 K <sub>D</sub> , $\mu$ M	人 FcRn, pH 7.4 K <sub>D</sub> , $\mu$ M	Cyno FcRn, pH 6.0 K <sub>D</sub> , $\mu$ M	Cyno FcRn, pH 7.4 K <sub>D</sub> , $\mu$ M
	AB1424/AB1 612 F3' TriNKET	1.0 $\pm$ 0.0	没有可量化的结合	1.0 $\pm$ 0.0
曲妥珠单抗	1.5 $\pm$ 0.1	没有可量化的结合	1.4 $\pm$ 0.1	没有可量化的结合

#### 实例6-效力分析AB1424/AB1612 F3 TriNKET

[0620] 如实例4中所述进行KHYG-1CD16V介导的细胞毒性测定。

[0621] 如图85所示,对AB1424/AB1612 F3' TriNKET的两个不同生产批次进行了效力测试。将在exp CHO细胞(AB1612-002)中表达的AB1424/AB1612 F3' TriNKET与在CHO-M细胞(AB1612-003)中表达的AB1424/AB1612 F3' TriNKET批次进行比较。两种分子都表现出相当的效力和BJAB靶细胞的最大裂解(显示在表53中)。这些结果证明了AB1424/AB1612 F3' TriNKET在两个不同生产批次和两个不同表达系统中的效力的一致性。此外,这些数据表明,使用KHYG-1-CD16V和BJAB细胞的细胞毒性测定是稳健的,可以用作批次释放生物测定。

表53. KHYG-1-CD16V EC<sub>50</sub>值

分子	EC <sub>50</sub> (nM)	最大裂解%
AB1612-002	0.13	108
AB1612-003	0.13	105

[0622] 确定了KHYG-1-CD16V+BJAB测定检测AB1424/AB1612 F3'TriNKET效力变化的灵敏度。图86B显示使用100% AB1424/AB1612 F3'TriNKET作为参考标准 (EC<sub>50</sub>=0.03nM) 与200%标称药物浓度 (NDC) 和50% NDC下的分子相比的剂量反应曲线。200%AB1424/AB1612 F3'TriNKET和50% AB1424/AB1612 F3'TriNKET的相对效力是通过将EC<sub>50</sub>值归一化为100% AB1424/AB1612 F3'TriNKET的EC<sub>50</sub>而计算的。使用100% AB1424/AB1612 F3'TriNKET作为参考,较高浓度 (200% AB1424/AB1612 F3'TriNKET) 表现出相对效力为200%,而较低浓度 (50% AB1424/AB1612 F3'TriNKET) 表现出相对效力为65%。使用KHYG-1-CD16V效应细胞和BJAB靶细胞的AB1424/AB1612 F3'TriNKET的200%、100%和50% NDC的相对效力表明,在这种基于细胞的效力测定中观察到的EC<sub>50</sub>值的变化是在50%-200%标称药物浓度范围内几乎呈线性(表54)。

表54.KHYG-1CD16V EC<sub>50</sub>值

分子	EC <sub>50</sub> (nM)	最大裂解%
50% AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.05	120
100% AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.03	119
200% AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.02	114

#### 实例7-高浓度AB1424/AB1612 F3 TriNKET可行性和稳定性分析 PEG沉淀

[0623] 进行PEG沉淀研究以确定AB1424/AB1612 F3'TriNKET的稳定性。简而言之,在10mM乙酸盐pH 5.0和20mM组氨酸pH 6.0中评估胶体稳定性。对于每种缓冲液,制备40%w/v的PEG-6000储备溶液,并将含乙酸盐的溶液的pH调整为5.0,含组氨酸的溶液的pH调整为6.0。从PEG储备液、缓冲液储备液和蛋白储备溶液(在PBS中浓度为36.9mg/mL或34.4mg/mL)生成了PEG-6000滴定曲线,由于稀释系数高达1mg/mL,因此无需更换缓冲液)。PEG滴定曲线涵盖从0到30%w/v PEG-6000的浓度,对于每个缓冲液中的阿达木单抗对照或AB1424/AB1612 F3'TriNKET,一式三份地准备每个点。混合溶液后,将样品在5°C下孵育过夜,并以15,000rpm的速度离心10分钟(在预冷的5°C离心机中)以去除沉淀的蛋白。然后去除上清液,通过280nm处的吸光度读取浓度。然后将浓度对PEG浓度作图以确定中点(C<sub>m</sub>);C<sub>m</sub>>20% PEG-6000被认为具有良好的胶体稳定性。

[0624] 使用PEG沉淀测定在两种缓冲液(20mM组氨酸,pH 6.0和10mM乙酸盐,pH 5.0)中研

究了AB1424/AB1612 F3' TriNKET的胶体稳定性。阿达木单抗被用作性能良好的商用生物治疗性抗体的基准参考。在这两种缓冲液中, AB1424/AB1612 F3' TriNKET显示出比阿达木单抗更高的胶体稳定性, 为其浓缩至高蛋白浓度的能力提供了信心(图87A和图87B, 图88A和图88B, 表55)。在组氨酸中, AB1424/AB1612 F3' TriNKET显示 $C_m$   $18.1 \pm 0.09$ , 而在乙酸盐中,  $C_m$ 为 $20.6 \pm 0.15$ , 满足高胶体稳定性标准。

表55. PEG沉淀 $C_m$ 总结汇总。

$C_m$ (%PEG)	10 mM 盐酸盐, pH 5		20 mM 组氨酸, pH 6	
	阿达木单抗	AB1424/AB1612 F3' TriNKET	阿达木单抗	AB1424/AB1612 F3' TriNKET
浓度	$13.3 \pm 0.5$	$20.6 \pm 0.2$	$11.2 \pm 0.3$	$18.1 \pm 0.1$

#### 动态光散射(DLS)

[0625] AB1424/AB1612 F3' TriNKET的自相互作用倾向通过DLS在pH范围从5.0到7.0的三种不同缓冲液(20mM乙酸盐, pH 5.0; 20mM组氨酸, pH 6.0; 或20mM磷酸盐, pH 7.0)中进行了探索。对于DLS, 简而言之,  $k_D$ 是使用在高灵敏度DLS模式下运行的Nanotemper Prometheus Panta确定的。简而言之, 在缓冲液中制备样品, 然后将10 $\mu$ L装入三个单独的毛细管中以进行每种浓度的分析。结果适用于Panta分析软件, 并分别计算每个缓冲液的 $k_D$ 值。阿达木单抗被用作已知能够以高浓度配制和施用的性能良好的商用生物制剂的实例。

[0626] 与PEG沉淀的发现一样, 当比较两种分子的缓冲液之间的 $k_D$ (通过DLS)值时, 乙酸盐和组氨酸表现出强正值, 而磷酸盐表现出负值或轻微正值, 如图89A, 图89B, 图90A, 图90B, 和表56所示。在乙酸盐和组氨酸中, AB1424/AB1612 F3' TriNKET与阿达木单抗相比表现出等效或更好的 $k_D$ , 这是根据正值的大小来判断的。这些数据证实了PEG沉淀的发现, AB1424/AB1612 F3' TriNKET在乙酸盐和组氨酸缓冲液中均优于阿达木单抗。PEG沉淀和DLS都强烈表明AB1424/AB1612 F3' TriNKET具有高构象和胶体稳定性, 并且适用于高浓度配制品。

表56. 自相互作用( $k_D$ )总结。

测试品	20 mM 盐酸盐, pH 5	20 mM 组氨酸, pH 6	20 mM 磷酸盐, pH 7
阿达木单抗	+8.5	+5.0	+1.1
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	+25.4	+18.3	-4.9

#### 浓缩可行性研究

[0627] 小规模进行的浓缩可行性研究表明, AB1424/AB1612 F3' TriNKET可以浓缩至约150mg/mL。总体而言, 基于蛋白的起始/结束量, 产率为88.5%, 如表57中所示。如表58中的SEC-MALS所示, 样品具有高纯度并匹配预期分子量。

表57. 可行性材料浓度总结。

旋转#	起始体积 (mL)	起始浓度 (mg/mL)	蛋白 (mg)	最终体积 (mL) <sup>a</sup>	最终浓度 (mg/mL)	蛋白 (mg)	%回收
1	8.0	12.8	102.5	3.3	31.3	101.7	99.2
2	3.1	31.3	95.4	1.5	66.2	98.6	103.4
3	1.4	66.2	92.0	0.9	101.4	95.4	103.6
4	0.8	101.4	85.2	0.7	126.1	87.0	102.1
5	0.6	126.1	80.7	0.6	146.3	86.3	107.0
最终回收 (浓缩、保留、洗涤)						90.7	88.5

<sup>a</sup>中间旋转的最终体积是通过手动移液渗透液并从起始体积中减去体积来确定的。最终%回收通过测量滞留物的体积来确定。

表58: 可行性材料SEC-MALS分析总结。

样品	%HMW	%单体	单体 Mw (kDa ± 不确定性) <sup>a</sup>
起始材料	0.2	99.8	110.3 ± 0.9%
旋转 1	0.2	99.8	115.2 ± 0.8%
旋转 2	0.3	99.7	115.9 ± 0.4%
旋转 3	0.3	99.7	116.9 ± 0.7%
旋转 4	0.3	99.7	117.7 ± 0.8%
旋转 5/最终材料	0.3	99.7	117.9 ± 0.7%

<sup>a</sup>基于序列的理论Mw约为125kDa

批量材料浓度

[0628] 将约350mg的AB1424/AB1612 F3' TriNKET浓缩至约140mg/mL, 用于热稳定性评估和粘度测定。用于加速稳定性和粘度的大批量高浓度材料与可行性批次分开生成。该材料是从HST中的缓冲液交换的AB1424/AB1612 F3' TriNKET生成的, 与可行性研究一样, 通过SEC产生了大量高单体含量的材料, 总结在表59中。

表59. 批量材料浓度总结。

旋转#	起始体积 (mL)	起始浓度 (mg/mL)	蛋白 (mg)	最终体积 (mL) <sup>a</sup>	最终浓度 (mg/mL)	蛋白 (mg)	%回收 <sup>b</sup>
1	25.5	13.5	344.3	14.5	23.50	339.6	98.6
2	14.5	23.5	339.6	10.1	33.90	340.7	100.3
3	10.1	33.9	340.7	6.8	49.50	336.6	98.8
4	6.8	49.5	336.6	3.7	110.50	408.9	121.5
5	3.7	110.5	408.9	3.2	136.40	429.7	105.1
6	3.2	136.4	429.7	1.9	154.1	288.2	62.5
最终回收 (浓缩、保留、洗涤)						303.5	89.4

<sup>a</sup>中间旋转的最终体积是通过手动移液渗透液并从起始体积中减去体积来确定的。最终%产率通过测量滞留物的体积来确定。

<sup>b</sup>注意:在评估浓缩过程的回收时,只应考虑最终的%回收。

表60. 批量材料浓度SEC分析总结。

样品	浓度 (mg/mL)	%HMW	%单体
起始材料	13.5	0.3	99.7
旋转1	23.5	0.5	99.5
旋转2	33.9	0.3	99.7
旋转3	49.5	0.3	99.7
旋转4	110.5	0.3	99.7
旋转5	136.4	0.3	99.7
旋转6	154.1	0.4	99.6
最终材料	154.1	0.3	99.7

#### 粘度测定

[0629] 在0至140mg/mL的AB1424/AB1612 F3' TriNKET (配制在HST缓冲液中) 浓度范围内在25°C测定配制品的粘度。浓度如下, 0、5、15、25、75、100、120和140mg/mL。使用配备B05流道 (深度=50 $\mu$ m,  $P_{max}$ =42kPa) 的VROC® initium高通量粘度计, 通过RheoSense (加利福尼亚州圣拉蒙) 分析样品。NIST可溯源牛顿标准油 (Cannon N10 Lot19201, 25°C下15.84cP) 经过测试, 以在分析样品之前确认流道和仪器的一致性能。在22,040秒<sup>-1</sup>的最大剪切速率下测量缓冲液和浓度5至75mg/mL。对三个最高浓度 (100、120和140mg/mL) 进行剪切速率扫描。

根据RheoSense测定, 在HST缓冲液中配制的浓度范围为5至140mg/mL的AB1424/AB1612 F3' TriNKET的粘度在可接受的范围内 (<20cP)。最高浓度 (140mg/mL) 的粘度仅为4.5cP, 完全在自动注射器溶液可接受的<20cP粘度范围内。结果示于图91和表61。

表61. 25°C时的粘度分析总结。

样品	缓冲液	浓度 (mg/mL)	平均粘度 (cP)	STDEV (cP)	%RSD	N
AB1424/A B1612 F3' TriNKET	HST	0	1.186	0.005	0.40	11
AB1424/A B1612 F3' TriNKET	HST	5	1.225	0.002	0.20	13
AB1424/A B1612 F3' TriNKET	HST	15	1.326	0.004	0.27	13
AB1424/A B1612 F3' TriNKET	HST	25	1.437	0.004	0.28	12

样品	缓冲液	浓度 (mg/mL)	平均粘度 (cP)	STDEV (cP)	%RSD	N
AB1424/A B1612 F3' TriNKET	HST	75	2.291	0.004	0.16	12
AB1424/A B1612 F3' TriNKET	HST	100	2.844	0.007	0.26	19
AB1424/A B1612 F3' TriNKET	HST	120	3.524	0.008	0.22	18
AB1424/A B1612 F3' TriNKET	HST	140	4.528	0.006	0.14	20

在HST中的高浓度加速(40℃)稳定性, pH 6.0

[0630] 为了探索AB1424/AB1612 F3' TriNKET在高浓度下是否稳定,通过在HST配制品中将AB1424/AB1612 F3' TriNKET在40℃孵育4周以上并通过以下方法评估蛋白的结构和功能稳定性进行了加速稳定性研究:A280、浊度、乳光、SEC、CE-SDS、cIEF、BAFFR+细胞结合、SPR和效力。4周后,AB1424/AB1612 F3' TriNKET的浓度从135mg/mL略微增加到160mg/mL,这与

高温下的一些蒸发一致。浊度和乳光不随时间变化(表62)。

表62.AB1424/AB1612 F3' TriNKET UV-VIS在40°C在HST在pH 6.0孵育后结果汇总。

测试品	浓度 (mg/mL)	浊度 (A350 nm)	乳光 (A500 nm)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 对照	135.4	0.3	< 0.1
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 1周	147.7	0.3	< 0.1

测试品	浓度 (mg/mL)	浊度 (A350 nm)	乳光 (A500 nm)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 2周	142.0	0.3	< 0.1
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 3周	146.9	0.3	< 0.1
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 4周	160.9	0.4	< 0.1

尺寸排阻色谱 (SEC)

[0631] SEC如实例4中所述进行。高浓度AB1424/AB1612 F3' TriNKET在40°C在pH 6.0在HST中孵育4周后表现出高稳定性。4周后, HMWS从1.2%轻微增加到2.0%, LMWS从1.1%增加到1.4%, 单体从99.4%减少到97.0%, 表明高浓度对应激评估期间的聚集没有有显著的影响(图92和表63)。

表63.AB1424/AB1612 F3' TriNKET SEC在40°C在HST中在pH 6.0孵育后的结果汇总。

测试品	单体 (%)	HMWS (%)	LMWS (%)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 对照	99.4	0.6	0.0
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 1周	98.6	1.4	0.0
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 2周	98.5	1.5	0.0
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 3周	96.9	2.2	0.9
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 4周	97.0	2.0	1.0

## CE-SDS (还原)

[0632] 通过还原的CE-SDS评估的纯度显示在40°C下4周孵育期间纯度损失0.1% (图93和表64)。在还原条件下,观察到三个预期链(LC、HC和scFv-Fc链)。

表64. AB1424/AB1612 F3' TriNKET R CE-SDS纯度在40°C在HST中在pH 6.0 4周后的总结。

测试品	R CE-SDS 纯度 (%)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 对照	99.7
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 1周	99.8
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 2周	99.7
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 3周	99.5
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 4周	99.6

## 毛细管等电聚焦(cIEF)

[0633] 如实例4中所述执行cIEF。通过cIEF确定的电荷谱表明在40°C在HST中4周后酸从对照中的55.7%主峰变为44.3%主峰(图94和表65)。

表65. AB1424/AB1612 F3' TriNKET iCIEF结果在40°C在HST中在pH 6.0孵育后的总结。

测试品	酸性 (%)	主 (%)	碱性 (%)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 对照	39.7	55.7	4.8
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 1周	40.2	53.7	6.1
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 2周	42.9	50.5	6.5
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 3周	47.2	46.1	6.8

测试品	酸性 (%)	主 (%)	碱性 (%)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 4周	48.7	44.3	7.0

#### 靶标结合和效力

[0634] 在对照样品和应激样品之间,在与所有三个预期靶标 (BAFF-R、NKG2D和CD16a) 的结合方面没有观察到有意义的差异 (图95A,图95B和表66)。

表66. 在40°C在HST中在pH 6.0 4周后高浓度AB1424/AB1612 F3' TriNKET对hNKG2D、hCD16a V158的动力学参数和结合亲和力以及对于细胞表达的hBAFF-R的 $EC_{50}$ 。

测试品	靶标	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (nM)	$K_D$ (nM) 稳态
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0 对照	hNKG2D	(2.2 ± 0.0) *10 <sup>5</sup>	(1.1 ± 0.0) *10 <sup>-1</sup>	502.9 ± 5.9	544.3 ± 8.3
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0 40°C, 4周	hNKG2D	(2.1 ± 0.1) *10 <sup>5</sup>	(1.0 ± 0.0) *10 <sup>-1</sup>	492.6 ± 9.7	521.9 ± 15.7
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0 对照	hCD16aV	(1.3 ± 0.3) *10 <sup>5</sup>	(1.7 ± 0.0) *10 <sup>-2</sup>	144.8 ± 40.3	N/A
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0 40°C, 4周	hCD16aV	(1.2 ± 0.4) *10 <sup>5</sup>	(1.6 ± 0.0) *10 <sup>-2</sup>	144.7 ± 40.4	N/A
<b>EC<sub>50</sub> (nM)</b>					
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0 对照	hBAFF-R	0.82			
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0 40°C, 4周	hBAFF-R	0.83			

n ≥ 3个重复

[0635] 在对照和应激样品之间没有检测到效力差异,在KHYG-1-CD16aV介导的细胞毒性测定中量化为细胞裂解百分比(图96和表67)。

表67:在HST中在pH 6.0 4周后高浓度AB1424/AB1612 F3'TriNKET EC<sub>50</sub>和最大裂解的总结。

测试品	EC <sub>50</sub> (nM)	最大杀伤 (%)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 对照	0.01	94
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 1周	0.01	100
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 2周	0.01	99
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 3周	0.01	94
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 4周	0.03	92

#### 实例8-AB1424/AB1612 F4 TriNKET形式的分子分析

[0636] 在此实例中,分析了AB1424/AB1612 F4 TriNKET的分子形式、设计、结构和特征。这些研究a) 提供了分子的基本生化和生物物理学特征,b) 确定了AB1424/AB1612 F4 TriNKET对BAFF-R、NKG2D、CD16a、一组Fc  $\gamma$  R和FcRn的亲和力,c) 证实了AB1424/AB1612 F4TriNKET对BAFF-R+癌细胞的结合,d) 证明了AB1424/AB1612 F4TriNKET的选择性,e) 确定了AB1424/AB1612 F4 TriNKET杀伤BAFF-R+癌细胞方面的效力,以及f) 评估AB1424/AB1612 F4 TriNKET在暴露于热、化学和机械应激后的结构和功能完整性。

[0637] AB1424/AB1612 F4 TriNKET是F4形式的TriNKET。AB1424/1612 F4 TriNKET在本文中有时称为AB1426。AB1424/1612 F4TriNKET (AB1424/1612-F4) 包括四种多肽:第一多肽包含AB1424/1612-VH-CH1-CH2-CH3-A49MI-scFv (SEQ ID NO:271) (“链M”),第二多肽包含AB-1424/1612-VH-CH1-CH2-CH3 (SEQ ID NO:272) (“链H”),以及第三和第四多肽,各自包含AB1424/1612-VL-CL (SEQ ID NO:273) (“链L”)。

#### 分子建模

[0638] 使用SAbPred网站上提供的Therapeutic Antibody Profiler (TAP),将AB1424/AB1612 F4 TriNKET的抗BAFF-R和抗NKG2D结合臂与377种I期后生物治疗性分子进行了比较。TAP使用ABodyBuilder通过PEARS为带有侧链的AB1424/AB1612生成模型。CDRH3因其多样性而由MODELLER构建。

[0639] 评估了五个不同的参数:

CDR总长度

CDR附近的表面疏水性 (PSH) 块

CDR附近的正电荷 (PPC) 斑块

CDR附近的负电荷 (PNC) 斑块

结构Fv电荷对称参数 (sFvCSP)

[0640] 然后将AB1424/AB1612 F4 TriNKET的这些参数与治疗性抗体的分布谱进行比较,以预测可开发性和可能导致下游挑战的任何潜在问题。

[0641] 图97A-图97C是AB1424/AB1612 F4 TriNKET的BAFF-RFab结合臂的可变结构域在三个不同取向的模型(上分图)和在相同取向的对应表面电荷分布(下分图)。CDR界面的表面电荷分布主要是带负电的(“俯视图”,下分图)和一些疏水残基簇。BAFF-R臂的表面电荷分布跨模拟的互补位均匀分布。AB1424/AB1612 F4 TriNKET的BAFF-R结合臂的疏水块分析以绝大多数治疗性mAb为基准(图98A-图98E)。正电荷和负电荷的表面块与对mAb表达的不利影响和加速的体内清除有关。对于AB1424/AB1612 F4 TriNKET的BAFF-R结合臂,带正电的块、带负电的块和电荷对称性类似于大多数参考mAb(图99A-图99C)。NKG2D结合臂被建模并以三个不同的取向描绘,并且显示了它们相应的表面电荷分布(图99A-图99C)。NKG2D臂的表面电荷分布跨模拟的互补位均匀分布。图100A-图100E显示了AB1424/AB1612 F4 TriNKET的NKG2D结合臂的CDR总长度和表面特征分析。总之,既没有发现异常的表面电荷特性,也没有发现异常的表面疏水性块。

#### AB1424/AB1612 F4 TriNKET表达和纯化

[0642] AB1424/AB1612 F4 TriNKET在ExpiCHO细胞中表达并纯化。AB1424/AB1612 F4 TriNKET的纯度通过尺寸排阻色谱法(SEC)和毛细管电泳十二烷基硫酸钠(CE-SDS)确定。AB1424/AB1612 F4 TriNKET表现出高单体含量( $\geq 98.6\%$ ,如图101A-图101C所示),并且在CE-SDS下未观察到主要杂质。通过SEC和CE-SDS确定的三批AB1424/AB1612 F4TriNKET的纯度总结在表68中。

表68.通过SEC和CE-SDS对AB1424/AB1612 F4 TriNKET的纯度分析。

测试品	SEC	CE-SDS
	%单体	%纯度
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	99.7	99.9
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	98.6	99.7
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	98.6	99.7

#### cIEF的电荷谱分析

[0643] AB1424/AB1612 F4 TriNKET的电荷谱通过毛细管等电聚焦(cIEF)进行分析(图102和表69)。AB1424/AB1612 F4 TriNKET在pI为9.3时显示出主峰。还观察到几个不太丰富的重叠酸性峰和次要碱性峰。

表69.根据cIEF的AB1424/AB1612 F4 TriNKET的电荷谱结果。

测试品	pI	%酸性	%主	%碱性
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	9.3	44.4	52.2	3.4
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	9.3	52.7	44.2	3.1
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	9.3	51.3	45.3	3.3

#### 疏水相互作用色谱

[0644] 疏水性预测数据通过使用分析型疏水相互作用色谱 (HIC) 研究AB1424/AB1612 F4 TriNKET行为得到证实,该技术依赖于具有明显暴露的疏水块的蛋白更易于聚集。HIC如以上实例4中所述进行。AB1424/AB1612 F4 TriNKET在分析型HIC柱上的保留时间如表70中所示并且HIC谱如图103A所示。商用阿达木单抗和派姆单抗被用作表现良好的生物制剂的实例,并作为测定的内部对照。AB1424/AB1612 F4 TriNKET的保留时间为9.7分钟,而派姆单抗为11.2分钟,阿达木单抗为8.7分钟。因此,实验疏水性分析表明,AB1424/AB1612 F4 TriNKET的疏水性对于进一步开发是可接受的。

表70. AB1424/AB1612 F4 TriNKET的HIC分析

测试品	保留时间 (min)	相对于阿达木单抗/Humira 的保留时间 (分钟)
阿达木单抗/Humira	8.7	N/A
派姆单抗/Keytruda	11.2	+2.5
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	9.7	+1.0

#### 热稳定性分析

[0645] AB1424/AB1612 F4 TriNKET的热稳定性通过差示扫描量热法 (DSC) 在PBS pH 7.4 或HST中进行评估,HST包含20mM组氨酸、250mM蔗糖、0.01% tween-80, pH 6.0。DSC如以上实例4中所述进行。

[0646] AB1424/AB1612 F4 TriNKET在两种缓冲液中均表现出高热稳定性 (图103B和表71)。

表71. AB1424/AB1612 F4 TriNKET的热稳定性

测试品	缓冲液	T <sub>开始</sub> (°C)	T <sub>m1</sub> (°C)	T <sub>m2</sub> (°C)	T <sub>m3</sub> (°C)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	PBS, pH 7.4	62.5	69.3	71.2	75.4
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	HST, pH 6.0	63.3	70.3	74.2	79.4

#### 二硫键排列

[0647] AB1424/AB1612 F4 TriNKET被构建为基于单克隆IgG1抗体骨架的经工程改造的分子。虽然典型的IgG1包含16个二硫键,但AB1424/AB1612 F4 TriNKET的F4形式由20个二硫键构建。

[0648] AB1424/AB1612 F4 TriNKET的二硫键排列通过非还原胰蛋白酶消化物的LC-MS/MS肽做图分析得到证实。二硫键肽通过MS/MS数据库搜索鉴定,并通过比较它们在天然和还原消化物中的强度来确认。确认了抗体结构中预期的所有标准二硫化物。图104A和图104B显示了Fc (未还原和还原) 中经工程改造的二硫化物对的提取离子色谱图 (XIC) 以及该肽对的最强电荷状态。类似地,图105A和图105B中的XIC证实了为稳定scFv而引入的经工程改造的二硫桥的存在。在AB1424/AB1612 F4TriNKET中观察到的二硫键连接的肽的总结显示在

表72中。所有理论二硫键连接的肽均以高质量准确度 (<2.0ppm) 观察到,可还原,并通过MS/MS碎裂进行序列确认。

表72. 二硫化物连接的肽理论和实验质量。

链	结构域	肽	理论质量 (Da)	实验质量 (Da)	质量准确度 (ppm)
L	VL	L2:L7	5147.4056	5147.4132	1.4
	CL	L11:L18	3555.7490	3555.7490	0.4
H	VH	H3:H11	3408.4638	3408.4599	-1.0
	CH1	H16:H17-18	7916.9194	7916.9058	-1.5
	CH2	H26:H33	2328.0977	2328.0961	-0.7
	CH3	H40:H44	4432.0675	4432.0636	-0.9
M	VH	M3:M11	非唯一, 参见 H3:H11		
	CH1	M16:M17-18	非唯一, 参见 H16:H17-18		
	CH2	M26:M33	非唯一, 参见 H26:H33		
	CH3	M42:M47	3844.8236	3844.8302	1.4
	scFv VL	M49:M54	4482.0784	4482.0759	-0.4
	scFv 稳定化 *	M55:M61*	3183.4417	3183.4433	0.8
	scFv VH	M59:M66	3371.4686	3371.4708	0.8
分子间	铰链	H23-24:M23-24	5454.7834	5454.7855	0.5

链	结构域	肽	理论质量 (Da)	实验质量 (Da)	质量准确度 (ppm)
	CL-CH1	L19-20:H22	1260.4863	1260.4843	-1.6
	CL-CH1	L19-20:M22	非唯一, 参见 L19-20:H22		
	CH3-CH3*	H39:M40-41*	2757.3830	2757.3889	1.9

#### AB1424/AB1612 F4 TriNKET的结合特性

[0649] 过表达人和食蟹猴BAFF-R的等基因细胞系是从CHO细胞开发的。将AB1424/AB1612 F4 TriNKET与细胞表面表达的BAFF-R的结合与亲代BAFF-R特异性抗体以及不含BAFF-R结合物的F4形式对照 (F4-帕利珠单抗) 进行比较。AB1424/AB1612 F4 TriNKET及其亲代mAb在与人和食蟹猴BAFF-R的结合方面表现出相似的剂量反应 (图106A和图106B)。在比较与人和食蟹猴BAFF-R的结合时, AB1424/AB1612 F4 TriNKET和亲代mAb的 $EC_{50}$ 和最大FOB几乎相同 (表73)。

表73. AB1424/AB1612 F4 TriNKET和亲代mAb与人和食蟹猴细胞表面表达的BAFF-R结合。

测试品	人 BAFF-R <sup>+</sup> 等基因 CHO		食蟹猴 BAFF-R <sup>+</sup> 等基因 CHO	
	EC <sub>50</sub> (nM)	最大 FOB	EC <sub>50</sub> (nM)	最大 FOB
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	0.37 ± 0.11	120 ± 86	0.51 ± 0.03	56 ± 52
亲代 mAb	0.39 ± 0.17	123 ± 85	0.57 ± 0.23	58 ± 50

[0650] 通过流式细胞术评估AB1424/AB1612 F4 TriNKET与BAFF-R<sup>+</sup>癌细胞系的子集的结合。AB1424/AB1612 F4 TriNKET以低纳摩尔EC<sub>50</sub>结合到BJAB、Raji、RL、Rs4;11、Jeko-1和SUDHL-6细胞上的细胞表面BAFF-R。EC<sub>50</sub>在BAFF-R<sup>+</sup>癌细胞系之间是相当的(表74)。

表74. AB1424/AB1612 F4 TriNKET与BAFF-R<sup>+</sup>人癌细胞系的结合

细胞系	AB1424/AB1612 F4 TriNKET EC <sub>50</sub> (nM)
BJAB	0.37 ± 0.16
Raji	0.13 ± 0.02
RL	0.17 ± 0.02
Rs4; 11	0.08 ± 0.03
Jeko-1	0.08 ± 0.03
SUDHL-6	0.18 ± 0.04

[0651] AB1424/AB1612 F4 TriNKET与人和食蟹猴NKG2D的结合通过SPR评估(图107A-图107L)。NKG2D是天然二聚体,因此本实验使用重组mFc标记的NKG2D二聚体。表75显示了对人和食蟹猴NKG2D的稳态亲和力。AB1424/AB1612 F4 TriNKET对人和食蟹猴NKG2D的亲和力相当。

表75. 通过SPR测量的AB1424/AB1612 F4 TriNKET对人NKG2D的稳态亲和力。

测试品	对人 NKG2D 的亲和力 K <sub>D</sub> (μM)	对 cyno NKG2D 的亲和力 K <sub>D</sub> (μM)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	6.9	7.0
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	6.7	7.7
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	7.0	6.9
平均值 ± StDev	6.9 ± 0.2	7.2 ± 0.5

[0652] AB1424/AB1612 F4 TriNKET是用人IgG1 Fc构建的,旨在维持与Fc受体的相互作用。CD16a的接合是TriNKET作用机制的关键驱动因素。如表76中所示,作为通过SPR进行的完整FcR组分析的一部分对人CD16a V158和F158等位基因以及食蟹猴CD16的结合进行了评估,并证明AB1424/AB1612 F4 TriNKET结合人和食蟹猴CD16与IgG1同种型对照曲妥珠单抗相当。图108A-图108P,图109A-图109H和图110A-图110H分别代表CD16a V158、F158和食蟹猴CD16的原始数据和拟合传感图。因此,AB1424/AB1612 F4 TriNKET表现出与CD16的良好结合。

[0653] AB1424/AB1612 F4 TriNKET以与曲妥珠单抗相当的亲和力结合人和食蟹猴Fc  $\gamma$  受体,曲妥珠单抗是一种已上市的IgG1生物制剂,用作实验对照。表76表示测试的Fc  $\gamma$  R的亲和力值的总结。图111A-图111H,图112A-图112H,图113A-图113P,图114A-图114P,图115A-图115P,图116A-图116P,图117A-图117P和图118A-图118H代表原始数据和拟合传感图。

表76.AB1424/AB1612 F4 TriNKET和曲妥珠单抗对人和食蟹猴Fc  $\gamma$  R的亲和力的总结。

分析物	人 CD64 K <sub>D</sub> , nM	Cyno CD64 K <sub>D</sub> , nM	人 CD32a K <sub>D</sub> , mM		人 CD16a K <sub>D</sub> , nM		人 CD32b K <sub>D</sub> , mM	人 CD16b K <sub>D</sub> , mM	Cyno CD16 K <sub>D</sub> , nM
			H131	R131	V158	F158			
			AB1424/A B1612 F4 TRINKET	3.4 ± 0.3	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.1			
曲妥珠单 抗	2.7 ± 0.9	0.8 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.7 ± 0.2	65.6 ± 8.3	448.1 ± 20.1	7.2 ± 0.5	3.8 ± 0.5	73.7 ± 6.8

[0654] 通过SPR评估AB1424/AB1612 F4 TriNKET与人和食蟹猴FcRn的结合。AB1424/AB1612 F4 TriNKET对人和食蟹猴FcRn的亲和力跨物种相似并且与曲妥珠单抗(用作实验对照的市售IgG1生物制剂)的亲和力相似(表77)。图116A-图116P和图117A-图117P分别表示在pH 6.0人和食蟹猴FcRn结合的稳态拟合和结合传感图。图118A-图118H表明,与IgG1同种型对照曲妥珠单抗类似,AB1424/AB1612 F4 TriNKET在pH7.4缺乏与人和食蟹猴FcRn的显著结合。

表77.AB1424/AB1612 F4 TriNKET和曲妥珠单抗与人和食蟹猴FcRn的结合。

分析物	人 FcRn, pH 6.0 K <sub>D</sub> , $\mu$ M	人 FcRn, pH 7.4 K <sub>D</sub> , $\mu$ M	Cyno FcRn, pH 6.0 K <sub>D</sub> , $\mu$ M	Cyno FcRn, pH 7.4 K <sub>D</sub> , $\mu$ M
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	1.3 ± 0.0	没有可量化的结合	1.2 ± 0.0	没有可量化的结合
曲妥珠单抗	1.5 ± 0.1	没有可量化的结合	1.4 ± 0.1	没有可量化的结合

抗原结合位点的共接合

[0655] 为了证明人CD16a与人NKG2D结合的共接合的协同作用,进行了SPR实验,其中AB1424/AB1612 F4 TriNKET分别与NKG2D和CD16a结合,与混合的NKG2D-CD16a Biacore芯片表面进行比较。AB1424/AB1612 F4 TriNKET对人NKG2D和人CD16a的亲和力都低,但是,同时结合这两个靶标会导致亲合力效应,表现为较慢的解离速率。数据表明AB1424/AB1612 F4 TriNKET可以积极接合CD16a和NKG2D(图119)。

[0656] 为了确定AB1424/AB1612 F4 TriNKET与一个靶标的结合是否会干扰其与另一个

靶标的结合,将BAFF-R和NKG2D依次注射到捕获在抗hFc IgG SPR芯片上的AB1424/AB1612 F4 TriNKET上(图120A)。靶标结合传感图表明BAFF-R结合臂的占据状态不干扰NKG2D结合(图120A)。同样,数据表明NKG2D结合臂的占据不禁止BAFF-R结合(图120B)。描述每个靶标与游离AB1424/AB1612 F4 TriNKET和已被其他靶标饱和的AB1424/AB1612 F4 TriNKET的结合的各个传感图区段的形状的相似性表明AB1424/AB1612 F4 TriNKET的靶标占据状态对动力学参数没有显著影响。例如,两个分图中传感图的BAFF-R结合区段的形状相似。由于该靶标的快速解离速率,必须在下分图中表示的整个实验过程中保持NKG2D的饱和浓度。另外,对每个靶标结合的相对化学计量没有任何影响(与结合未占据的AB1424/AB1612 F4 TriNKET相比)表示AB1424/AB1612 F4 TriNKET上的NKG2D和BAFF-R结合位点完全独立(表78)。

表78. AB1424/AB1612 F4 TriNKET对BAFF-R和NKG2D的相对结合化学计量。

实验设置	BAFF-R 相对结合化学计量	NKG2D 相对结合化学计量
靶标结合到未被另一靶标占据的 AB1424/AB1612 F4 TriNKET (首先注射)	1.00	1.00
靶标结合到被另一靶标饱和的 AB1424/AB1612 F4 TriNKET (第二注射)	0.97 ± 0.03	1.24 ± 0.22

[0657] 为评估AB1424/AB1612 F4 TriNKET的特异性,如上文实例4所述进行基于流式细胞术的PSR测定。AB1424/AB1612 F4 TriNKET与PSR的结合呈阴性,并且与阴性对照曲妥珠单抗的PSR最相当(图121A-图121I)。这些结果表明AB1424/AB1612 F4 TriNKET不表现出与非特异性蛋白的反应性。

AB1424/AB1612 F4 TriNKET的效力

[0658] AB1424/AB1612 F4 TriNKET的效力通过其刺激KHYG-1-CD16aV介导的BAFF-R<sup>+</sup>RL细胞的细胞溶解的能力来评估(图122)。AB1424/AB1612 F4 TriNKET在驱动BAFF-R+RL细胞的裂解方面非常有效,表现出亚纳摩尔效力和有效的最大细胞杀伤力(表79)。

表79. AB1424/AB1612 F4 TriNKET在KHYG-1-CD16aV和RL细胞存在下的效力。

测试品	EC <sub>50</sub> (nM)	最大杀伤 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	0.05	16

[0659] AB1424/AB1612 F4 TriNKET在原代NK细胞介导的BAFF-R<sup>+</sup>肿瘤细胞系RL的裂解中的效力进一步与亲代mAb进行比较(图123)。亲代mAb引起低或检测不到BAFF-R<sup>+</sup>细胞系RL的细胞溶解。AB1424/AB1612 F4 TriNKET展示了亚纳摩尔EC<sub>50</sub>,有效的最大杀伤力,并且超过了亲代mAb的效力(图123和表80)。

表80. AB1424/AB1612 F4 TriNKET在原代NK和BAFF-R<sup>+</sup>细胞存在下的效力。

细胞系	AB1424/AB1612 F4 TriNKET		亲代 mAb	
	EC <sub>50</sub> (nM)	最大杀伤 (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	最大杀伤 (%)
RL	0.03 ± 0.00	28 ± 15	ND	ND

ND=未确定

AB1424/AB1612 F4 TriNKET的可开发性

[0660] AB1424/AB1612 F4 TriNKET的可开发性通过施加一系列应激进行评估:热应激(40°C,4周),低pH应激(pH 5,40°C,2周),高pH应激(pH 8,40°C,2周),氧化应激(0.02%过氧化氢,25°C,24小时),搅拌,冷冻/解冻,保持低pH。

如上所述,AB1424/AB1612 F4 TriNKET在40°C在pH 6.0在HST中孵育4周后表现出高稳定性。通过SEC观察到非常少的聚集(+0.1%)和最小的单体损失(1.0%) (图124和表81)。通过R CE-SDS检测到2.6%的纯度损失(图125和表82)。由cIEF监测的电荷谱表明4周后酸性转变从对照中的52.5%主峰到29.9%主峰(图126和表83)。主峰的这种损失是在高温下孵育的蛋白的典型特征。另外,在对照和应激样品之间,在AB1424/AB1612 F4 TriNKET与人BAFF-R<sup>+</sup>细胞的结合或对人CD16aV的动力学和亲和力方面没有观察到有意义的差异(图127,表84,图128A,图128B和表85)。未检测到对照和应激样品之间的效力差异(图129和表86)。

表81.AB1424/AB1612 F4 TriNKET单体、HMWS和LMWS在40°C在HST中在pH 6.0孵育后的总结。

测试品	单体 (%)	HMWS (%)	LMWS (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET HST, pH 6.0 对照*	99.5	0.5	0.0
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 4周	98.5	0.6	0.9

\*HST、pH 6.0对照样品在分期后、分析前储存在-80°C。

表82.AB1424/AB1612 F4 TriNKET R CE-SDS纯度在40°C在HST中在pH 6.0 4周后的总结。

测试品	R CE-SDS 纯度 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0 对照	99.8
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 4周	97.2

表83.AB1424/AB1612 F4 TriNKET在40°C在HST中在pH 6.0中孵育后的酸性物质、主峰物质和碱性物质的总结。

测试品	酸性 (%)	主 (%)	碱性 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0 对照	44.1	52.5	3.5
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 4 周	64.7	29.9	5.2

表84. AB1424/AB1612 F4 TriNKET与hBAFF-R<sup>+</sup>细胞在40°C在HST中在pH 6.0 4周后的结合。

测试品	靶标	与 BAFF-R <sup>+</sup> 等基因 CHO 细胞结合 EC <sub>50</sub> , nM
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0 对照	hBAFF-R	0.18

测试品	靶标	与 BAFF-R <sup>+</sup> 等基因 CHO 细胞结合 EC <sub>50</sub> , nM
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 4 周	hBAFF-R	0.22

结果是n=3次重复的平均值

表85. 在40°C在HST中在pH 6.0 4周后AB1424/AB1612 F4 TriNKET对hCD16a的动力学参数和结合亲和力。

测试品	靶标	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (nM)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0 对照	hCD16aV	(1.2 ± 0.1) × 10 <sup>5</sup>	(1.8 ± 0.0) × 10 <sup>-2</sup>	149.8 ± 4.3
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 4 周	hCD16aV	(1.1 ± 0.1) × 10 <sup>5</sup>	(1.6 ± 0.0) × 10 <sup>-2</sup>	145.5 ± 16.6

结果是n=3次重复的平均值

表86. 在HST中在pH 6.0 4周后AB1424/AB1612 F4 TriNKET EC<sub>50</sub>和最大裂解的总结。

测试品	EC <sub>50</sub> (nM)	最大杀伤 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0 对照	0.01	91
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 4周	0.01	93

#### AB1424/AB1612 F4 TriNKET的化学稳定性

[0661] 为了评估AB1424/AB1612 F4 TriNKET在氧化应激下的稳定性,将AB1424/AB1612 F4 TriNKET与0.02%过氧化氢在PBS中于25°C孵育24小时。通过SEC没有观察到单体的聚集或损失(图130和表87)。通过R CE-SDS(图131和表88)未检测到有意义的碎片化增加。另外,在对照和应激样品之间,在与hBAFF-R细胞的结合或对hCD16a的动力学和亲和力方面没有观察到有意义的差异(图132,表89,图133A,图133B和表90)。最后,AB1424/AB1612 F4 TriNKET在KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定中的效力在氧化应激后没有变化(图134和表91)。

表87. AB1424/AB1612 F4 TriNKET单体、HMWS和LMWS在强制氧化后的总结。

测试品	单体 (%)	HMWS (%)	LMWS (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 氧化对照*	98.6	1.0	0.4
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 0.02% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 24 小时	98.8	0.8	0.4

\*氧化存在样品(用PBS代替H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>模拟稀释)在分期后储存在-80°C,然后再进行分析。

表88. 强制氧化后AB1424/AB1612 F4 TriNKET R CE-SDS纯度的总结。

测试品	R CE-SDS纯度 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 氧化对照	100.0
AB1424/AB1612 F4 TriNKET 0.02% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 24小时	100.0

表89. 强制氧化后AB1424/AB1612 F4 TriNKET与hBAFF-R<sup>+</sup>细胞的结合。

测试品	靶标	与表达 BAFF-R 的细胞结合
		EC <sub>50</sub> , nM
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 氧化对照	hBAFF-R	0.24
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 0.02% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 24 小时	hBAFF-R	0.21

表90. 强制氧化后AB1424/AB1612 F4 TriNKET对hCD16a的动力学参数和结合亲和力。

测试品	靶标	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (nM)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 氧化对照	hCD16aV	$(1.1 \pm 0.0) \times 10^5$	$(1.6 \pm 0.0) \times 10^{-2}$	$137.1 \pm 3.2$
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 0.02% $H_2O_2$ , 24 小时	hCD16aV	$(1.2 \pm 0.0) \times 10^5$	$(1.5 \pm 0.0) \times 10^{-2}$	$131.1 \pm 4.0$

结果是n=3次重复的平均值

表91.强制氧化后AB1424/AB1612 F4 TriNKET  $EC_{50}$ 和最大裂解的总结。

测试品	$EC_{50}$ (nM)	最大杀伤 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 氧化对照	0.02	96
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 0.02% $H_2O_2$ , 24 小时	0.02	100

长期pH 5应激

[0662] AB1424/AB1612 F4 TriNKET的化学稳定性通过在低pH(20mM乙酸钠, pH 5.0, 40 °C, 2周)下的长期孵育进行评估。通过SEC(图135和表92)没有观察到聚集和最小的单体损失(0.6%)。通过还原型CE-SDS(图136和表93)没有检测到有意义的碎片化增加。在长期pH 5应激后, cIEF监测的电荷谱表明酸从对照中的52.9%主峰转变为受应激样品中的41.2%主峰(图137和表94)。长期pH 5应激对与hBAFF- $R^+$ 细胞的结合或对hCD16aV的动力学和亲和力没有显著影响(图138, 表95, 图139A, 图139B和表96)。另外, 在KHYG-1-CD16aV介导的细胞毒性测定中, 在应激样品和对照样品之间未观察到效力的显著差异(图140和表97)。基于这些结果, 可以得出结论, AB1424/AB1612 F4 TriNKET可抵抗低pH应激引起的聚集和碎片化。

表92. 长期低pH应激后AB1424/AB1612 F4 TriNKET单体、HMWS和LMWS的总结。

测试品 (%)	单体 (%)	HMWS (%)	LMWS (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET pH 5 对照	99.7	0.3	0.0
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5, 40°C, 2 周	99.1	0.2	0.7

表93. 长期低pH应激后AB1424/AB1612 F4 TriNKET R CE-SDS纯度的总结。

测试品	R CE-SDS纯度 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5对照*	99.8
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5, 40°C, 2周	99.6

\*pH 5对照样品在分期后、分析前储存在-80°C。

表94. 长期低pH应激后AB1424/AB1612 F4 TriNKET中酸性物质、主峰物质和碱性物质的总结。

测试品	酸性 (%)	主 (%)	碱性 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5 对照	44.2	52.9	2.9
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5, 40°C, 2 周	50.4	41.2	8.4

表95. 长期低pH应激后AB1424/AB1612 F4 TriNKET与hBAFF-R<sup>+</sup>细胞的结合,

测试品	靶标	与表达 BAFF-R 的细胞的结合 EC <sub>50</sub> , nM
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5 对照	hBAFF-R	0.22
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5, 40°C, 2 周	hBAFF-R	0.19

表96. 长期低pH应激后AB1424/AB1612 F4 TriNKET对hCD16a的动力学参数和结合亲和力。

测试品	靶标	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (nM)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5 对照	hCD16aV	(1.1 ± 0.1) × 10 <sup>5</sup>	(1.7 ± 0.1) × 10 <sup>-2</sup>	150.5 ± 11.9
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5, 40°C, 2 周	hCD16aV	(1.1 ± 0.0) × 10 <sup>5</sup>	(1.6 ± 0.0) × 10 <sup>-2</sup>	152.6 ± 3.9

结果是n=3次重复的平均值

表97. 长期低pH暴露后AB1424/AB1612 F4 TriNKET EC<sub>50</sub>和最大裂解的总结。

测试品	EC <sub>50</sub> (nM)	最大杀伤 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5 对照	0.07	89
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5, 40°C, 2 周	0.05	93

长期pH 8应激

[0663] AB1424/AB1612 F4 TriNKET的化学稳定性通过在高pH(20mM Tris, pH 8.0, 40°C, 2周)下的长期孵育进行评估。通过SEC(图141和表98)观察到聚集的少量增加(0.2%)和单体的最小损失(1.3%)。通过还原型CE-SDS(2.2%)检测到碎片化的轻微增加(图142和表99)。在长期pH 8应激后, cIEF监测的电荷谱表明酸从对照中的49.2%主峰转变为受应激样品中的22.5%主峰(图143和表100)。这种酸性转变可归因于整个AB1424/AB1612 F4

TriNKET序列的脱酰胺作用。脱酰胺作用是pH升高时的主要化学降解。在相同的应激条件下,曲妥珠单抗观察到类似的酸性转变。长期pH 8应激对AB1424/AB1612 F4 TriNKET与hBAFF-R<sup>+</sup>细胞的结合或对hCD16aV的动力学和亲和力没有显著影响(图144,表101,图145A,图145B和表102)。另外,在KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定中,在长期pH 8应激后AB1424/AB1612 F4 TriNKET和对照样品之间的效力方面没有观察到显著差异(图146和表103)。基于这些结果,可以得出结论,AB1424/AB1612 F4 TRINKET可抵抗因pH升高应激引起的聚集。

表98.长期高pH应激后AB1424/AB1612 F4 TriNKET单体、HMWS和LMWS的总结。

测试品	单体 (%)	HMWS (%)	LMWS (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8 对照*	99.7	0.3	0.0
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8, 40°C, 2周	98.4	0.5	1.1

pH 8对照样品在分期后、分析前储存在-80°C。

表99.长期高pH应激后AB1424/AB1612 F4 TriNKET R CE-SDS纯度的总结。

测试品	R CE-SDS纯度 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8对照	99.8
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8, 40°C, 2周	96.6

表100.长期高pH应激后AB1424/AB1612 F4 TriNKET中酸性物质、主峰物质和碱性物质的总结。

测试品	酸性 (%)	主 (%)	碱性 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8 对照	47.8	49.2	3.0
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8, 40°C, 2周	74.5	22.5	3.0

表101.长期高pH应激后AB1424/AB1612 F4 TriNKET与hBAFF-R<sup>+</sup>细胞的结合。

测试品	靶标	与表达 BAFF-R 的细胞结合
		EC <sub>50</sub> , nM
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8 对照	hBAFF-R	0.19
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8, 40°C, 2周	hBAFF-R	0.20

表102.长期高pH应激后AB1424/AB1612 F4 TriNKET对hCD16a的动力学参数和结合亲和力。

测试品	靶标	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (nM)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8 对照	hCD16aV	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^5$	$(1.6 \pm 0.0) \times 10^{-2}$	$137.3 \pm 17.4$
测试品	靶标	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (nM)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8, 40°C, 2周	hCD16aV	$(1.0 \pm 0.0) \times 10^5$	$(1.3 \pm 0.0) \times 10^{-2}$	$120.7 \pm 5.0$

结果是n=3次重复的平均值。

表103. 长期高pH暴露后AB1424/AB1612 F4 TriNKET  $EC_{50}$ 和最大裂解的总结。

测试品	$EC_{50}$ (nM)	最大杀伤 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8 对照	0.04	96
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8, 40°C, 2周	0.05	85

可制造性

[0664] 冷冻/解冻 (F/T) 循环期间的稳定性对于生物治疗药物很重要, 因为工艺中间体和原料药可能会被冷冻以确保工艺步骤之间的稳定性。AB1424/AB1612 F4 TriNKET的冷冻/解冻稳定性在20mg/ml在HST中在pH 6.0进行评估。在研究完成时通过A280评估蛋白浓度。AB1424/AB1612 F4 TriNKET浓度在对照中为21.6mg/ml, 在6次冷冻/解冻循环后为24.2mg/ml, 表明没有因冷冻/解冻应激而造成的蛋白损失。在六次冷冻/解冻循环后, AB1424/AB1612 F4 TriNKET的纯度与对照相比没有变化, 如通过SEC (图147和表104) 和还原型CE-SDS (图148和表105) 评估。与BAFF-R+细胞的结合 (图149和表106) 和AB1424/AB1612 F4 TriNKET在KHYG-1-CD16aV介导的细胞毒性测定中的效力 (图150和表107) 与对照样品相比在6次冷冻/解冻循环后保持不变。这表明AB1424/AB1612 F4 TriNKET在冷冻/解冻应激期间能够抵抗聚集和碎片化。

表104. AB1424/AB1612 F4 TriNKET单体、HMWS和LMWS在6次冷冻/解冻循环后的总结。

测试品	单体 (%)	HMWS (%)	LMWS (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, F/T 对照*	99.6	0.4	0.0
测试品	单体 (%)	HMWS (%)	LMWS (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 6 F/T	99.6	0.4	0.0

\*HST, pH 6.0 F/T对照样品在分期后, 在没有F/T循环的情况下进行分析之前储存

在-80℃。

表105.冷冻/解冻应激后AB1424/AB1612 F4 TriNKET R CE-SDS纯度的总结。

测试品	R CE-SDS纯度(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET,F/T对照	99.9
AB1424/AB1612 F4 TriNKET,6F/T	99.9

表106.AB1424/AB1612 F4 TriNKET在6次冷冻/解冻循环后与BAFF-R+细胞结合的总结。

测试品	EC <sub>50</sub> (nM)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET F/T对照	0.18
AB1424/AB1612 F4 TriNKET F/T应激	0.14

表107.AB1424/AB1612 F4 TriNKET EC<sub>50</sub>和6次冷冻/解冻循环后的最大裂解的总结。

测试品	EC <sub>50</sub> (nM)	最大杀伤 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, F/T 对照	0.05	83
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 6 F/T	0.05	83

搅拌

AB1424/AB1612 F4 TriNKET (在HST中5mg/ml, pH 6.0) 在室温下以1000rpm的转速振荡7天。在搅拌应激后,通过SEC检测到没有单体损失 (图151和表108),通过还原型CE-SDS观察到没有纯度损失 (图152和表109) 并且没有蛋白浓度损失 (表108)。在结合BAFF-R<sup>+</sup>细胞 (图153和表110) 或在通过KHYG-1-CD16aV介导的细胞毒性测定评估的效力 (图154和表111) 方面没有观察到应激的和对照的AB1424/AB1612 F4 TriNKET样品之间的差异。

表108.搅拌应激后AB1424/AB1612 F4 TriNKET浓度和单体含量的总结。

测试品	浓度 (mg/mL)	单体 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET 搅 拌对照*	5.3	99.8
AB1424/AB1612 F4 TriNKET 搅 拌应激	5.5	99.8

\*HST, pH 6.0搅拌对照样品在25℃应激,应激后进行分析之前不搅拌保持1周并且储存在-80℃。

表109.搅拌后AB1424/AB1612 F4 TriNKET R CE-SDS的纯度的总结。

测试品	R CE-SDS纯度(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET搅拌对照	99.9
AB1424/AB1612 F4 TriNKET搅拌应激	99.9

表110.在搅拌应激后AB1424/AB1612 F4 TRINKET与BAFF-R+细胞结合的总结。

测试品	EC <sub>50</sub> (nM)
AB1424/AB1612 F4 TRINKET搅拌对照	0.17
AB1424/AB1612 F4 TRINKET搅拌应激	0.16

表111. 与对照相比,在搅拌应激后AB1424/AB1612 F4 TriNKET的效力。

测试品	EC <sub>50</sub> (nM)	最大杀伤(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET搅拌对照	0.04	87
AB1424/AB1612 F4 TriNKET搅拌应激	0.05	83

保持低pH

[0665] 为确定AB1424/AB1612 F4 TriNKET是否适合在生物制剂生产中通常用作病毒清除步骤的低pH保持,将AB1424/AB1612 F4 TriNKET蛋白A洗脱物的pH调整至3.51,并在室温保持1.5小时。保持期后,用1.0M Tris, pH 8.3中和蛋白A洗脱物以达到中性pH。进行分析型SEC以确定在低pH暴露之前和之后谱或聚集物含量是否存在任何变化(图155A和图155B)。AB1424/AB1612 F4 TriNKET在低pH保持后的SEC谱显示,与“无保持”对照样品相比,HMW种类增加,单体相应减少(8.1%),尽管LMW种类的数量没有变化。

[0666] AB1424/AB1612 F4 TriNKET通过离子交换色谱进一步处理,并使用一组另外的测定与未进行低pH保持的纯化蛋白进行比较分析。通常可以使用cIEF在全局范围内观察氨基酸侧链的化学修饰。AB1424/AB1612 F4 TriNKET对照和低pH保持的cIEF谱看起来非常相似,酸性物质、主峰物质和碱性物质的相对定量都在彼此的5%以内(图156和表112)。这表明在第二步纯化后,保持低pH对AB1424/AB1612 F4 TriNKET的电荷谱没有可测量的影响。另外,根据还原型CE-SDS,在完全纯化的AB1424/AB1612 F4 TriNKET(其已保持低pH)中未观察到纯度损失(图157和表113)。与对照相比,低pH保持对BAFF-R+细胞结合没有显著影响(图158和表114)。AB1424/AB1612 F4 TriNKET的完全纯化的低pH保持批次的效力与对照样品的效力保持相似,如通过KHYG-1-CD16aV细胞毒性测定评估的(图159和表115)。

表113. 低pH保持后完全纯化的AB1424/AB1612 F4 TriNKET R CE-SDS纯度的总结。

测试品	NR CE-SDS 纯度 (%)	R CE-SDS 纯度 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET 低 pH 保持对照	94.5	99.7
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 低 pH 保持	94.8	99.7

表114. 与对照相比,AB1424/AB1612 F4 TriNKET的低pH保持批的BAFF-R+细胞结合。

测试品	靶标	与表达 BAFF-R 的细胞的结合 (EC <sub>50</sub> , nM)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET 低 pH 保持对照	hBAFF-R	0.44
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 低 pH 保持	hBAFF-R	0.46

结果是n=3次重复的平均值。

表115. 与对照相比,完全纯化的AB1424/AB1612 F4 TriNKET低pH保持批的效力。

测试品	EC <sub>50</sub> (nM)	最大杀伤 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET 低 pH 保持对照	0.03	87
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 低 pH 保持	0.02	88

实例9-AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4TriNKET与BAFF-R结合的进一步分析

[0667] 对AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4TriNKET与原代B细胞和人癌细胞系的BAFF-R结合进行了进一步评估。如实例4中所述进行结合实验。

[0668] 使用抗BAFF-R mAb克隆1C11进行BAFF-R+细胞系和原代B细胞的抗体结合能力。在七种人癌细胞系以及经工程改造以表达人和食蟹猴BAFF-R的CHO细胞上测量BAFF-R表达,结果总结于表116中。也在来自三名健康供体的PBMC样品中的CD19+原代B细胞上测量了BAFF-R。发现原代B细胞上的BAFF-R表达类似于人癌细胞系上的表达,如表117中总结的。

表116. 细胞系上的BAFF-R定量

细胞系	抗体结合能力
<b>CHO-hBAFF-R</b>	239504
<b>CHO-cBAFF-R</b>	58922
<b>BJAB</b>	9806
<b>Raji</b>	9969
<b>Ramos</b>	4815
<b>RL</b>	8007
<b>Rs4:11</b>	2771
<b>Jeko1</b>	10438
<b>SUDHL-6</b>	14164

表117.原代B细胞上的BAFF-R定量

供体ID	BAFF-R ABC
55212	12253
54136	4511
21189	9564

[0669] 在表达人和食蟹猴BAFF-R的CHO细胞上测量了AB1424/AB1612 F3' TriNKET、AB1424/AB1612 F4 TriNKET、它们的亲代mAb和两种同种型对照TriNKET的剂量反应结合。AB1424/AB1612 F3' TriNKET与在CHO细胞上表达的人BAFF-R ( $0.70 \pm 0.33\text{nM}$ ) 和食蟹猴BAFF-R ( $0.96 \pm 0.21\text{nM}$ ) 具有相当的亚纳摩尔结合EC50。AB1424/AB1612 F4 TriNKET和亲代mAb也显示出与人和食蟹猴BAFF-R的相似结合,但与AB1424/AB1612 F3' TriNKET相比,效力高约2倍。AB1424/AB1612 F4 TriNKET结合人和食蟹猴BAFF-R,效力分别为 $0.37 \pm 0.11\text{nM}$ 和 $0.51 \pm 0.03\text{nM}$ 。亲代mAb与AB1424/AB1612 F4 TriNKET的结合相似,对人和食蟹猴BAFF-R的结合效力分别为 $0.39 \pm 0.17\text{nM}$ 和 $0.57 \pm 0.23\text{nM}$ 。这些结果证明了AB1424/AB1612 F3' TriNKET、AB1424/AB1612 F4 TriNKET及其亲代mAb与人和食蟹猴BAFF-R的交叉反应结合。

[0670] 六种具有内源BAFF-R表达的人癌细胞系被用于确认与过表达BAFF-R的CHO细胞观察到的结合。所选细胞系源自B细胞,代表各种BAFF-R+B细胞恶性肿瘤。AB1424/AB1612 F3' TriNKET与AB1424/AB1612 F4 TriNKET及其亲代mAb在测试的6个细胞系中的5个上相比,效力稍弱,但具有相比背景的高倍数(FOB)。AB1424/AB1612 F3' TriNKET、AB1424/AB1612 F4 TriNKET及其亲代mAb以等效最大FOB结合具有最低BAFF-R表达的Rs4;11细胞。表118中总结了所有分子和细胞系的结合EC50和最大FOB。

表118.细胞结合的总结

	AB1424/AB1612		AB1424/AB1612		亲代 mAb		F3'-对照		F4-对照	
	F3' TriNKET		F4 TriNKET		EC50	最大	EC50	最大	EC50	最大
	EC50 nM	最大 FOB	EC50 nM	最大 FOB						
<b>BJAB</b>	0.37 ± 0.16	16 ± 8	0.21 ± 0.03	12 ± 4	0.18 ± 0.04	12 ± 4	ND	ND	ND	ND
<b>Raji</b>	0.18 ± 0.01	10 ± 4	0.13 ± 0.02	7 ± 3	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	ND	ND	ND	ND
<b>RL</b>	0.27 ± 0.02	8 ± 2	0.17 ± 0.02	6 ± 1	0.14 ± 0.01	6 ± 1	ND	ND	ND	ND
<b>Rs4; 11</b>	0.09 ± 0.02	4 ± 1	0.08 ± 0.03	4 ± 1	0.06 ± 0.02	3 ± 1	ND	ND	ND	ND
<b>Jeko-1</b>	0.13 ± 0.03	7 ± 2	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.02	5 ± 1	ND	ND	ND	ND
<b>SUDHL-6</b>	0.41 ± 0.10	19 ± 3	0.18 ± 0.04	12 ± 3	0.19 ± 0.05	13 ± 3	ND	ND	ND	ND
<b>CHO- cBAFF-R</b>	0.96 ± 0.21	67 ± 64	0.51 ± 0.03	56 ± 52	0.57 ± 0.23	58 ± 50	ND	ND	ND	ND
<b>CHO- hBAFF-R</b>	0.70 ± 0.33	146 ± 78	0.37 ± 0.11	120 ± 86	0.39 ± 0.17	123 ± 85	ND	ND	ND	ND

[0671] 使用表达或不表达高亲和力CD16V变体的NK白血病KHYG-1细胞,将AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET的结合与其亲代mAb进行比较。观察到假设的KHYG-1和KHYG-1-CD16V细胞上AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET的结合模式(图160A和图160B)。对于AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET,在缺乏CD16表达的KHYG-1亲代细胞上观察到较弱的结合,并且未观察到与其亲代mAb的结合。与AB1424/AB1612 F3' TriNKET相比,AB1424/AB1612 F4 TriNKET的结合较弱是预期的,并且与这些分子与人NKG2D结合的SPR亲和力相关。

[0672] 与AB1424/AB1612 F3' TriNKET、AB1424/AB1612 F4TriNKET或亲代mAb孵育后,在孵育2小时或24小时后在RL和Raji细胞上测量BAFF-R的表面保留。观察到2小时后BAFF-R表面保留增加15-35% ( $120\% \pm 8\%$ 和 $135\% \pm 20\%$ ),在与AB1424/AB1612 F3' TriNKET孵育24小时后进一步增加到30-40% ( $139\% \pm 14\%$ 和 $138\% \pm 33\%$ )。对于AB1424/AB1612 F4 TriNKET及其亲代mAb,在2小时和24小时观察到类似的增加(图161A和图161B)。表119中总结了三个独立实验的结果。在Raji细胞上观察到类似的结果(图162和表120)。

表119. RL细胞上BAFF-R细胞表面保留的总结

	RL 2 小时	RL 24 小时
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	$120 \pm 8$	$139 \pm 14$
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	$116 \pm 6$	$136 \pm 16$
亲代 mAb	$117 \pm 5$	$139 \pm 16$

表120. Raji细胞上BAFF-R细胞表面保留的总结

	Raji 2 小时	Raji 24 小时
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	$135 \pm 20$	$138 \pm 33$
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	$130 \pm 7$	$134 \pm 27$
亲代 mAb	$126 \pm 10$	$131 \pm 35$

实例10-AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4TriNKET与BAFF-R结合的进一步分析

[0673] AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET刺激BAFF-R+细胞的NK细胞裂解的能力在使用非霍奇金淋巴瘤(NHL)细胞系RL作为靶细胞的2小时短期细胞溶解测定中进行了测试。来自三个健康供体的原代人NK细胞用作效应细胞。AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET与亲代mAb相比显示出更高的杀伤效力和RL靶细胞的最大裂解,如图163所示。AB1424/AB1612 F3' TriNKET与AB1424/AB1612 F4 TriNKET相比对靶细胞的最大裂解更高(分别为 $44 \pm 19$ 和 $28 \pm 15\%$ ),但杀伤效力降低(分别为 $0.13 \pm 0.07$ 和 $0.03 \pm 0.00nM$ )。表121中总结了来自三个原代NK供体的结果。

表121. RL细胞的短期静息NK细胞裂解的 $EC_{50}$ 和最大裂解%值

分子	EC <sub>50</sub> (nM)	最大裂解%
<b>AB1424/AB1612 F3' TriNKET</b>	0.13 ± 0.07	44 ± 19
<b>AB1424/AB1612 F4 TriNKET</b>	0.03 ± 0.00	28 ± 15
<b>亲代 mAb</b>	ND	ND

ND=未确定

[0674] AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET在使用RL细胞作为靶细胞的长期36小时细胞溶解测定中也表现出很强的活性。来自三个健康供体的原代人NK细胞用作效应细胞。与其亲代mAb相比,AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET显示出更高的杀伤效力和最大的RL靶细胞裂解。AB1424/AB1612 F3' TriNKET与AB1424/AB1612 F4 TriNKET相比对靶细胞的最大裂解更高(分别为44±7和32±13%),但杀伤效力降低(分别为0.06±0.04和0.05±0.04nM)。表122中总结了来自两个原代NK供体的结果。

表122. RL细胞的长期静息NK细胞裂解的EC<sub>50</sub>和最大裂解%值

分子	EC <sub>50</sub> (nM)	最大裂解%
<b>AB1424/AB1612 F3' TriNKET</b>	0.06 ± 0.04	44 ± 7
<b>AB1424/AB1612 F4 TriNKET</b>	0.04 ± 0.04	32 ± 13
<b>亲代 mAb</b>	ND	ND

ND=未确定

[0675] AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET还增强了IL-2激活的原代人NK细胞对RL靶细胞的细胞溶解作用。来自同一供体的人NK细胞静息过夜或通过与IL-2一起培养而激活过夜。在没有TriNKET的情况下,用IL-2激活的NK细胞显示RL靶细胞的背景杀伤增加。AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET增强静息和IL-2激活的NK细胞的活性,但在激活的人NK细胞情况下表现出更高的最大裂解和更有效的EC<sub>50</sub>值(图164A和图164B)。表123中总结了来自三个健康供体的数据。

表123. 激活的NK细胞对RL靶细胞的EC<sub>50</sub>和最大裂解%值

分子	静息的 hNK		IL-2 激活的 hNK	
	EC50 (nM)	最大裂解%	EC50 (nM)	最大裂解%
AB1424/AB1612 F3' TRINKET	0.07 ± 0.03	45 ± 17	0.02 ± 0.01	79 ± 8
AB1424/AB1612 F4 TRINKET	0.02 ± 0.01	29 ± 16	0.01 ± 0.01	76 ± 13

[0676] 为了了解每个TriNKET臂对分子整体活性的贡献,产生了在分子的各种结合臂中具有突变的AB1424/AB1612 F3'TriNKET的多个变体。在一种变体中,突变被引入恒定区的CH2结构域以取消Fc $\gamma$ R结合;该分子称为AB1424/AB1612 F3'TriNKET-Fc-si。产生了第二功能丧失分子,它可以消除NKG2D受体结合;该分子称为AB1424/AB1612 F3'TriNKET-Dead-NKG2D。最后,生成了不能结合BAFF-R的TriNKET分子;该分子称为F3'-帕利珠单抗。这四种分子首先使用KHYG-1-CD16V效应细胞在靶细胞裂解测定中进行了测试。AB1424/AB1612 F3'TriNKET能够以剂量反应方式调节BAFF-R+靶细胞的特异性裂解( $EC_{50}=0.05nM$ )。然而,在AB1424/AB1612 F3'TriNKET功能丧失变体F3'-帕利珠单抗或AB1424/AB1612 F3'TriNKET-Fc-si的剂量滴定中,没有观察到KHYG-1-CD16V效应细胞的活性。AB1424/AB1612 F3'TriNKET-死-NKG2D能够诱导BJAB靶细胞的裂解,与AB1424/AB1612 F3'TriNKET相比,具有降低的效力和最大裂解( $EC_{50}=0.93nM$ ) (图165)。

[0677] AB1424/AB1612 F3'TriNKET及其功能丧失变体也在第二测定系统中进行了评估,其中来自健康供体的静息原代人NK细胞被用作效应细胞。与KHYG-1-CD16V细胞的结果类似,原代NK细胞显示AB1424/AB1612 F3'TriNKET对CD16、NKG2D和BAFF-R的接合均是实现针对BJAB靶细胞的最大NK细胞反应所必需的( $EC_{50}=0.06nM$ ) (图166)。

[0678] 在可溶性NKG2D配体存在的情况下测试了AB1424/AB1612F3'TriNKET的活性。对于这些测定,使用了NKG2D配体MICA的重组版本。MICA在癌症适应症中具有广泛的表达,并且已知会从细胞表面脱落,从而导致患者血清中的积累。将20ng/mL (这是在癌症患者中发现的生理相关血清浓度)的可溶性MICA-Fc添加到NK细胞细胞溶解测定系统中。图167显示了在不存在和存在可溶性MICA的情况下,AB1424/AB1612 F3'TriNKET在针对BJAB靶细胞的原代NK细胞溶解测定中的剂量反应曲线。添加MICA对AB1424/AB1612 F3'TriNKET达到的效力或最大裂解没有影响。正如预期的那样,可溶性MICA对AB1424/AB1612 F4 TriNKET的活性也没有影响。表124总结了 $EC_{50}$ 和最大裂解值。

表124. 使用sMIC-A-Fc通过NK细胞裂解BJAB细胞的 $EC_{50}$ 和最大裂解%值

分子	EC <sub>50</sub> (nM)	最大裂解%
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.17 ± 0.24	49 ± 24
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	0.04 ± 0.02	44 ± 27
AB1424/AB1612 F3' TriNKET + MIC-A-Fc	0.07 ± 0.08	47 ± 28
AB1424/AB1612 F4 TriNKET + MIC-A-Fc	0.05 ± 0.05	46 ± 27

[0679] AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET展示了如上所述阻断BAFF与BAFF-R结合的能力。为了了解可溶性BAFF二聚体在人NK细胞溶解测定中的作用,使用了生理相关浓度的可溶性BAFF, 20ng/mL。在存在可溶性BAFF的情况下,观察到AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET的效力有微小变化,但实现了相同的最大裂解(图168)。表125中总结了来自三个供体样品的数据。

表125. 使用可溶性BAFF通过NK细胞裂解BJAB细胞的EC<sub>50</sub>和最大裂解%值

分子	EC <sub>50</sub> (nM)	最大裂解%
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.02 ± 0.02	62 ± 12
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	0.01 ± 0.00	56 ± 12
AB1424/AB1612 F3' TriNKET + MIC-A-Fc	0.21 ± 0.15	64 ± 11
AB1424/AB1612 F4 TriNKET + MIC-A-Fc	0.04 ± 0.01	51 ± 15

[0680] 除了直接裂解靶细胞外,NK细胞在激活后也会产生细胞因子。因此,评估了在存在AB1424/AB1612 F3' TriNKET、AB1424/AB1612 F4 TriNKET或其亲代mAb的情况下与BAFF-R+靶细胞共培养的NK细胞的IFN  $\gamma$  产生和CD107a脱粒。与BJAB靶细胞共培养的静息NK细胞在

四小时后显示出很少的CD107a脱粒或细胞内IFN  $\gamma$  积累的基础诱导(图169)。将AB1424/AB1612 F3' TriNKET添加到共培养物中,以剂量反应方式稳健诱导脱粒和IFN  $\gamma$  产生。相比之下,亲代mAb和非BAFF-R靶向型TriNKET F3'-帕利珠单抗和F4-帕利珠单抗均未显示CD107a+IFN  $\gamma$  +NK细胞的稳健增加。在与BJAB靶细胞的共培养中,对三个独立的NK细胞供体进行了测定;结果总结在表126中。

表126. 与BJAB细胞共培养时NK细胞诱导IFN  $\gamma$  和CD107a的总结

分子	EC <sub>50</sub> (nM)	% Max
AB1424/AB1612 F3' TRINKET	0.03 ± 0.02	35 ± 26
AB1424/AB1612 F4 TRINKET	0.03 ± 0.01	32 ± 23
亲代 mAb	0.07 ± 0.05	23 ± 16

[0681] 评估了AB1424/AB1612 F3' TriNKET诱导细胞因子刺激的CD8+T细胞杀伤BAFF-R+癌细胞的能力。激活的T细胞未显示靶细胞的基础裂解,添加AB1424/AB1612 F3' TriNKET、AB1424/AB1612 F3' TriNKET-死-NKG2D或F3'-帕利珠单抗均未显示任何CD8+T细胞活性的触发。相比之下,CD20靶向工具TriNKET显示了RL靶细胞的CD8+T细胞裂解的剂量依赖性诱导,证明了这些CD8+细胞对NKG2D刺激作出反应的能力。

[0682] 人IgG1抗体的Fc结构域可以介导三种不同类型的效应子功能。一个类型Fc介导的效应子功能是抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),这是通过NK细胞上CD16的接合来实现的;NK细胞刺激已针对AB1424/AB1612 F3' TriNKET进行了广泛表征。Fc介导的第二效应子功能是抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP),其中巨噬细胞攻击并吞噬包被有抗体的细胞。对于AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET,为了评估它们诱导经调理的靶细胞的ADCP的能力,利用M0巨噬细胞作为效应细胞的体外分析系统,该巨噬细胞来源于用M-CSF培养纯化的CD14+单核细胞。将BAFF-R+靶细胞用细胞追踪CFSE染料标记,用测试品调理并与经细胞追踪紫标记的M<sub>0</sub>巨噬细胞共培养。吞噬作用通过流式细胞术分析为细胞追踪紫+细胞追踪CFSE+(双阳性)事件。

[0683] AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TRINKET增强了M<sub>0</sub>巨噬细胞对BJAB靶细胞的吞噬作用。亲代mAb也显示出诱导M<sub>0</sub>巨噬细胞吞噬经调理的靶细胞的能力,类似于AB1424/AB1612 F4 TriNKET(图170)。AB1424/AB1612 F3' TriNKET-Fc-si在CH2结构域中带有突变以沉默Fc  $\gamma$  受体结合,用作阴性对照。AB1424/AB1612 F3' TriNKET-Fc-si未能介导经调理的靶细胞的ADCP。表127中总结了使用衍生自三个不同供体的M<sub>0</sub>巨噬细胞的结果。

表127. ADCP活性的EC<sub>50</sub>和%最大值的总结

分子	EC <sub>50</sub> (nM)	最大裂解%
<b>AB1424/AB1612 F3' TriNKET</b>	0.03 ± 0.02	57 ± 7
<b>AB1424/AB1612 F4 TriNKET</b>	0.01 ± 0.00	53 ± 6
<b>亲代 mAb</b>	0.09 ± 0.00	54 ± 6

[0684] 人IgG1同种型抗体的第三效应子功能是启动补体级联,导致补体依赖性细胞毒性(CDC)。AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET是使用人IgG1 Fc结构域构建的;因此,为了了解AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET刺激CDC活性的能力,Raji细胞被用于细胞毒性测定。AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET都不刺激补体介导的Raji靶细胞杀伤(图171)。相反,针对CD20的阳性对照抗体(利妥昔单抗)显示在人血清存在下Raji靶细胞的剂量依赖性裂解,证实血清具有活性补体因子。

实例11-AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET在人血中的安全性

[0685] 使用健康供体外周血单核细胞(PBMC)评估AB1424/AB1612 F3' TriNKET结合。类似于用商用抗体11C1获得的结果,AB1424/AB1612 F3' TriNKET结合BAFF-R+B细胞,但不结合来自三个健康供体的PBMC中的其他细胞亚群(图172A-图172E)。

[0686] 评估了AB1424/AB1612 F3' TriNKET在人全血样品中孵育后的结合。免疫表型分析抗体用于定义人血液中的每个细胞群,并评估了每种细胞类型的AB1424/AB1612 F3' TriNKET结合。与人PBMC样品中BAFF-R表达的克隆11C1染色模式一致,在全血中的B细胞上观察到AB1424/AB1612 F3' TriNKET染色(图173A-图173E)。未观察到与其他已鉴定细胞类型的明显结合,包括NKG2D阳性细胞群,如NK细胞和CD8+T细胞;与这些亚群缺乏明显的结合与AB1424/AB1612 F3' TriNKET对NKG2D结合的低亲和力设计一致。

[0687] 分析了AB1424/AB1612 F3' TriNKET与RBC的结合。红细胞通过FACS使用前向和侧向散点图、表面CD235a的表达和CD41的缺乏进行鉴定。对于AB1424/AB1612 F3' TriNKET(图174A-图174C)和AB1424/AB1612 F4 TriNKET,在红细胞上未观察到结合。这些结果与RBC上缺乏BAFF-R、NKG2D和CD16表达一致。

[0688] AB1424/AB1612 F3' TriNKET显示在人全血中的结合与BAFF-R表达一致。为了进一步研究AB1424/AB1612 F3' TriNKET在全血样品中的作用,检测了用AB1424/AB1612 F3' TriNKET、AB1424/AB1612 F4 TriNKET、F3'-帕利珠单抗、F4-帕利珠单抗或利妥昔单抗处理的样品中的免疫细胞频率。在制备用于FACS分析的样品之前,将全血暴露于100µg/mL的每种测试品并孵育四小时。

[0689] 利妥昔单抗靶向细胞表面抗原CD20,并已被批准用于治疗CD20+淋巴瘤。利妥昔单抗在体外和体内都得到了很好的表征,并且已知会导致人和食蟹猴全血样品中CD20+细胞的耗竭(Vugmeyer等人,2003)。因此,利妥昔单抗在基于全血的检测中用作阳性对照,以评估暴露于AB1424/AB1612 F3' TriNKET后的细胞耗竭。利妥昔单抗跨所测试的三个供体耗

竭约50% B细胞。对于与利妥昔单抗一起孵育的样品中的其他亚群,未观察到细胞频率的变化。在三个健康供体中,AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET分别与对照F3'-帕利珠单抗和F4-帕利珠单抗相比没有引起细胞频率的减少(图175A-图175F)。

实例12-AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4TriNKET与食蟹猴蛋白结合的分析

[0690] 在AB1424/AB1612 F3' TriNKET和对照hIgG1曲妥珠单抗之间观察到针对Fc $\gamma$ RI(分别为 $2.1 \pm 0.6$  nM和 $0.8 \pm 0.1$  nM)和Fc $\gamma$ RIII(分别为 $270.8 \pm 11.0$  nM和 $73.7 \pm 6.8$  nM)的相当的结合亲和力(参见表128)。AB1424/AB1612 F3' TriNKET和曲妥珠单抗在pH 6.0时针对FcRn的结合亲和力方面没有明显差异(分别为 $1.0 \pm 0.0$   $\mu$ M和 $1.4 \pm 0.1$   $\mu$ M),并且在pH 7.4时没有检测到针对FcRn的结合。

表128. 通过SPR包含针对各种食蟹猴FcR的亲合力的总结表

	靶标	AB1424/AB1612 F3' TriNKET	曲妥珠单抗, hIgG1 对照
		$K_D$	$K_D$
<b>Fc<math>\gamma</math>R</b>	Fc $\gamma$ RI	$2.1 \pm 0.6$ nM	$0.8 \pm 0.1$ nM
	Fc $\gamma$ RIII	$270.8 \pm 11.0$ nM	$73.7 \pm 6.8$ nM
<b>FcRn</b>	FcRn, pH 6.0	$1.0 \pm 0.0$ $\mu$ M	$1.4 \pm 0.1$ $\mu$ M
	FcRn, pH 7.4	没有可量化的结合	没有可量化的结合

[0691] 通过SPR评估AB1424/AB1612 F3' TriNKET与人和食蟹猴NKG2D的结合。利用两种不同的拟合来获得平衡亲和力数据:稳态亲和拟合和动力学拟合。动力学常数和平衡亲和常数显示在表129中。AB1424/AB1612 F3' TriNKET旨在以低亲和力和快速解离速率结合食蟹猴NKG2D。对于食蟹猴NKG2D的解离速率常数为 $1.1 \pm 0.1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。通过动力学拟合和稳态亲和拟合获得的平衡亲和常数( $K_D$ )对于食蟹猴NKG2D非常相似:分别是 $596.5 \pm 20.5$  nM和 $609.3 \pm 18.3$  nM,表明测量参数的置信度较高。总之,AB1424/AB1612 F3' TriNKET对食蟹猴NKG2D、Fc $\gamma$ R和BAFF-R的动力学相当,验证了食蟹猴用于测试AB1424/AB1612 F3' TriNKET的用途。

表129. 通过SPR包含针对食蟹猴NKG2D的亲合力的总结表

测试品	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	动力学拟合 $K_D$ (nM)	稳态拟合 $K_D$ (nM)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	$1.8 \times 10^5$	$1.1 \times 10^{-1}$	609.1	618.4
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	$1.9 \times 10^5$	$1.2 \times 10^{-1}$	617.3	630.0
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	$1.8 \times 10^5$	$1.1 \times 10^{-1}$	572.4	589.3
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	$1.9 \times 10^5$	$1.1 \times 10^{-1}$	587.2	599.6
<b>平均值 <math>\pm</math> StDev</b>	<b><math>(1.9 \pm 0.1) \times 10^5</math></b>	<b><math>(1.1 \pm 0.1) \times 10^{-1}</math></b>	<b><math>596.5 \pm 20.5</math></b>	<b><math>609.3 \pm 18.3</math></b>

[0692] 在所有免疫细胞亚群上测量了在食蟹猴全血中用AF647缀合的AB1424/AB1612 F3' TriNKET、AB1424/AB1612 F4 TriNKET和各自的对照分子F3'-帕利珠单抗和F4-帕利珠单抗进行染色的情况(代表性样品在图176A-图176F中显示为直方图)。非BAFF-R靶向型F3'-帕利珠单抗和F4-帕利珠单抗对照均具有与AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET在所有非B细胞亚群上所见相似的染色模式。AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET的显著且剂量依赖性结合仅在鉴定的B细胞群中观察到。

[0693] AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET显示在食蟹猴PBMC和全血中与BAFF-R+B细胞结合。为了进一步研究AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET在全血样品中的作用,检测了用AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET处理的样品中的免疫细胞频率。非BAFF-R靶向型对照TriNKET、F3'-帕利珠单抗和F4-帕利珠单抗用作阴性对照。在制备用于FACS分析的样品之前,将全血暴露于100 $\mu$ g/mL的每种测试品并孵育四小时。

[0694] 利妥昔单抗靶向细胞表面抗原CD20,并已被批准用于治疗CD20+淋巴瘤。利妥昔单抗在体外和体内都得到了很好的表征,并且已知会导致人和食蟹猴全血样品中CD20+细胞的耗竭(Vugmeyster等人,2003)。因此,利妥昔单抗在基于全血的检测中用作阳性对照,以评估暴露于AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET后的B细胞耗竭。利妥昔单抗显示跨所测试的三个供体耗竭约50% B细胞。在与利妥昔单抗一起孵育的样品中,没有观察到其他亚群的细胞频率发生变化,这表明耗竭的靶标特异性。AB1424/AB1612 F3' TriNKET和AB1424/AB1612 F4 TriNKET在来自三只健康动物的任何样品中与F3'-帕利珠单抗和F4-帕利珠单抗对照相比未引起细胞频率变化(图177A-图177F)。

[0695] 在与内源性表达BAFF-R的人淋巴瘤细胞系BJAB的共培养试验中评估了AB1424/AB1612 F3' TriNKET增强食蟹猴NK细胞激活的能力。在CD8+NK细胞上始终发现NKG2D表达,但在CD8-NK细胞上未发现。染色和门控策略与CD45+CD14-CD20-CD3-CD8+CD16+一起使用来定义CD8+NK细胞,其中预测了对BAFF-R靶向型TriNKET的反应。与F3'-帕利珠单抗相比,AB1424/AB1612 F3' TriNKET在增强来自两个测试的食蟹猴PBMC样品的CD8+NK细胞脱粒方面表现出优异的活性(代表性图显示在图178中;表130中的总结)。

[0696] 总体而言,AB1424/AB1612 F3' TriNKET在刺激NK细胞脱粒 (CD107a+) 方面的效力在食蟹猴和人激活测定之间相当 (食蟹猴NK细胞 $EC_{50}=0.19\pm 0.16\text{nM}$ 和人NK细胞 $EC_{50}=0.03\pm 0.02\text{nM}$ )。

表130. 与BJAB靶细胞共培养时食蟹猴NK细胞脱粒的EC50值

分子	EC <sub>50</sub> (nM)	Max %CD107a
F3'-帕利珠单抗	N/D	N/D
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.19 ± 0.16	23 ± 9

N/D=未确定

\*\*\*\*\*

通过引用并入

[0297] 除非另有说明,否则每份专利文件的全部披露内容以及本文提及的科学文章出于所有目的通过引用并入。

等效内容

[0298] 在不脱离本申请的精神或基本特征的情况下,本发明可以以其他特定形式实施。因此,前述实施例在所有方面都被认为是说明性的而不是限制本文描述的申请。因此,本申请的范围由所附权利要求而不是由前述说明书来指示,并且在权利要求的等效含义和范围内的所有变化旨在包含在其中。

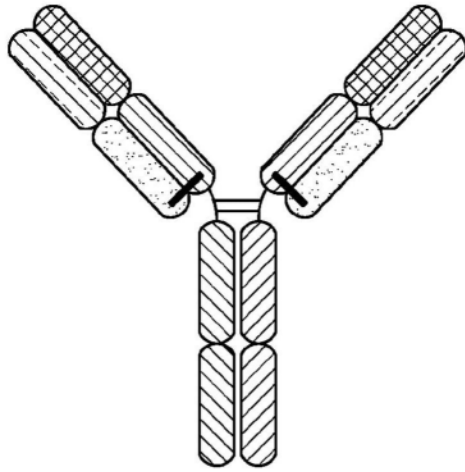


图1

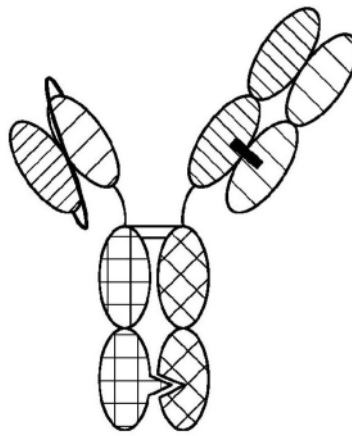


图2A

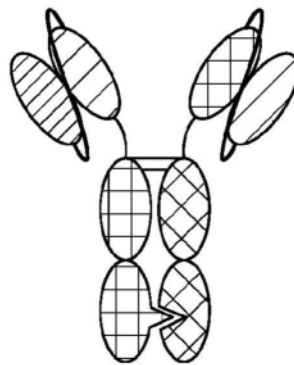


图2B

BAFF-R 结合臂

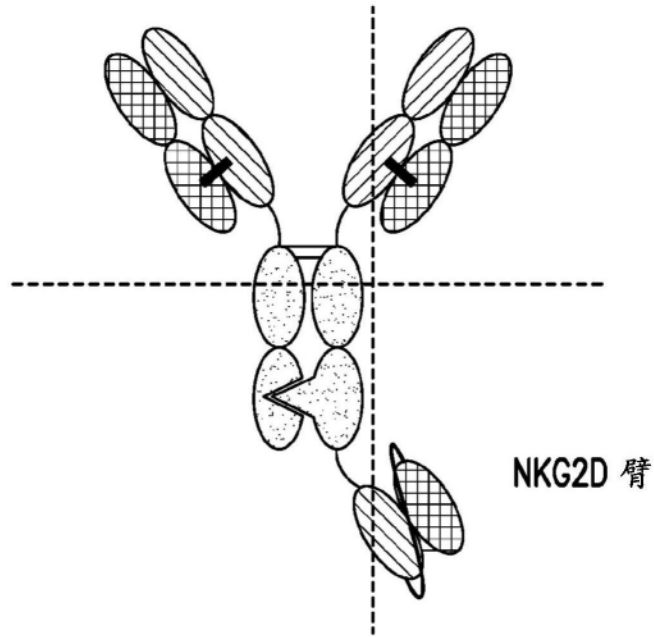


图2C

BAFF-R 结合臂

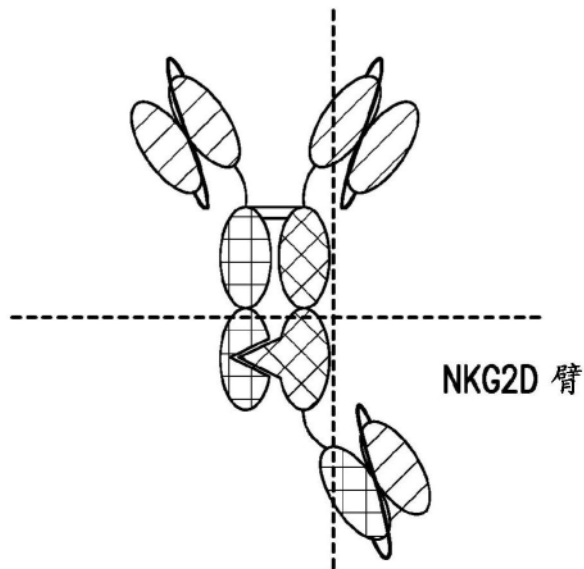


图2D

靶向NK细胞的  
Fab 片段

靶向 BAFF-R  
细胞的 scFv

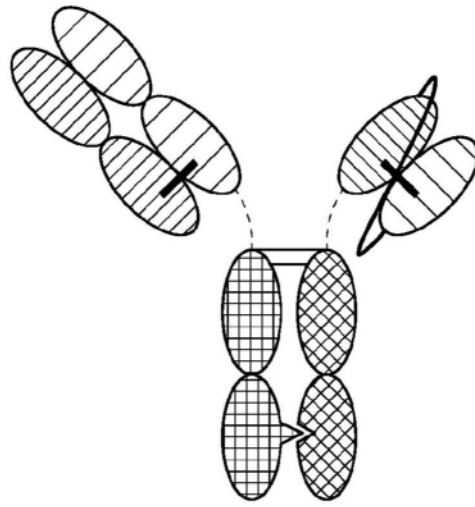


图2E

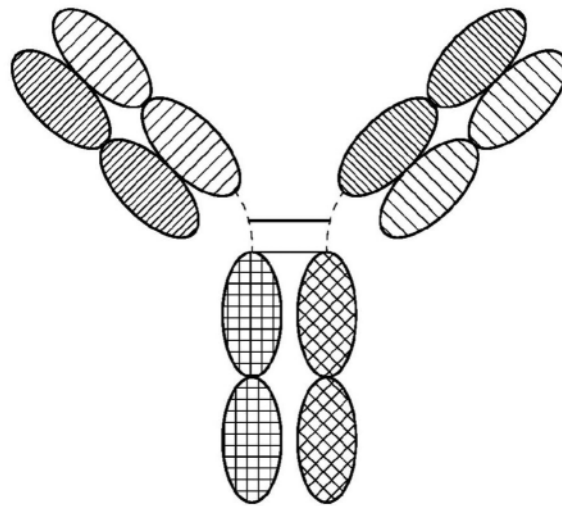


图3

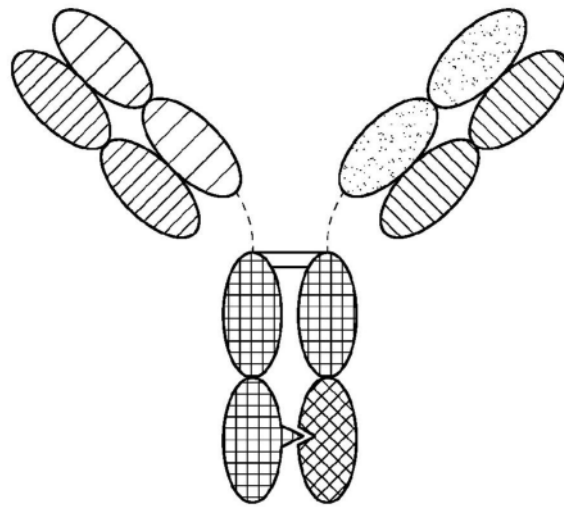


图4

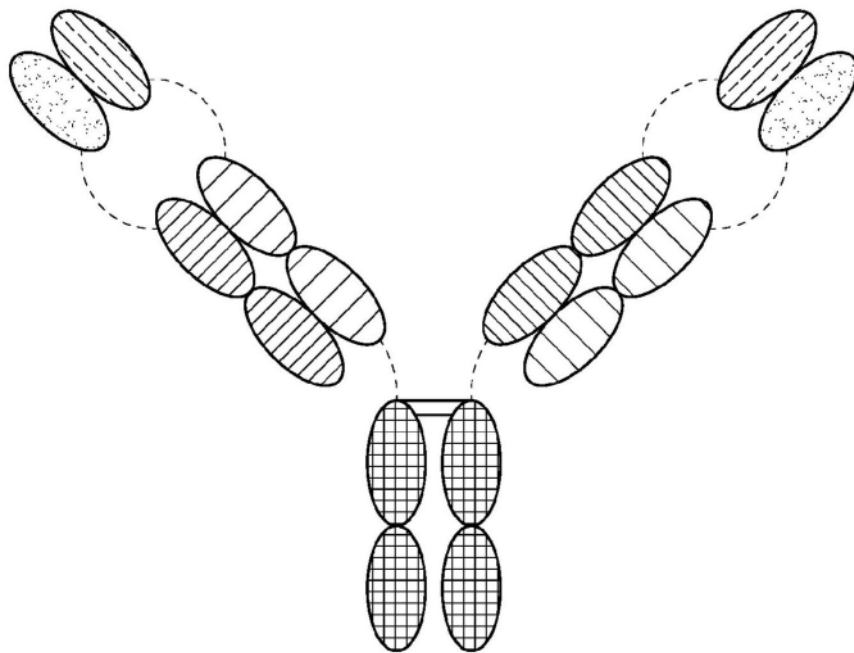


图5

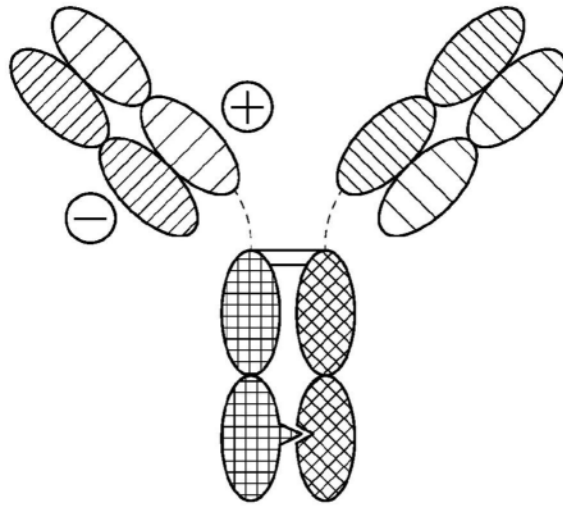


图6

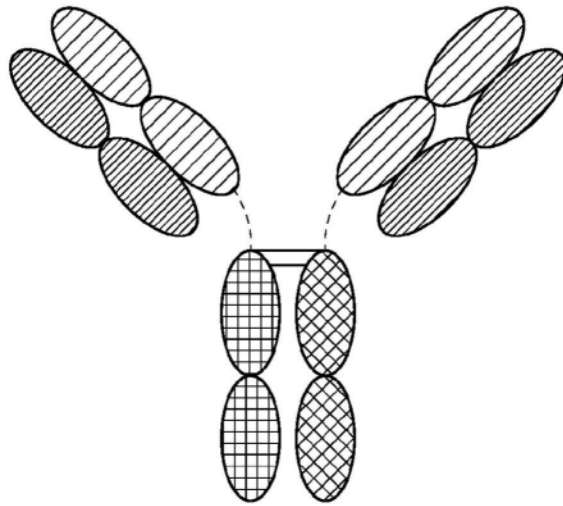


图7

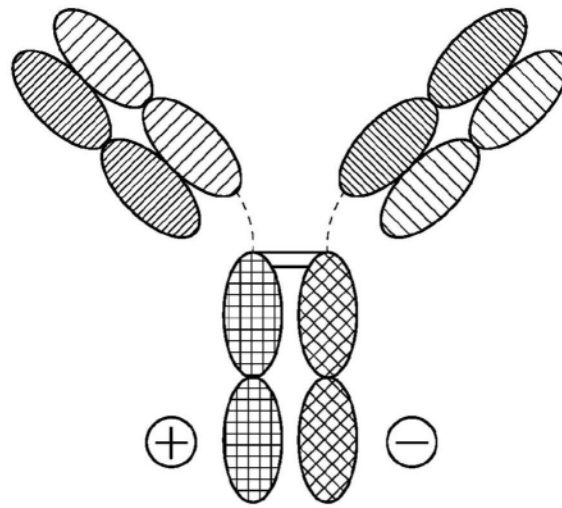


图8

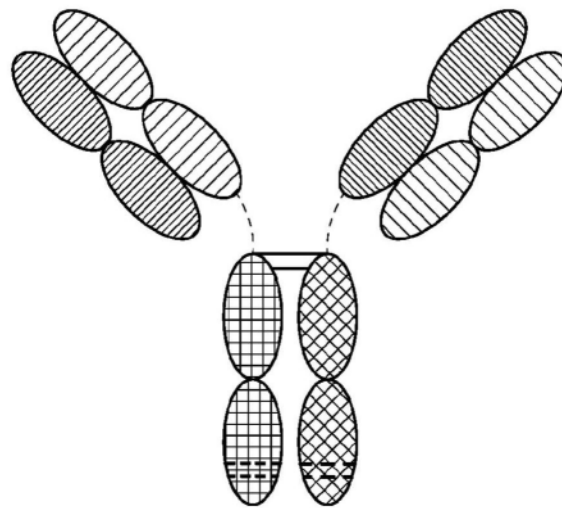


图9

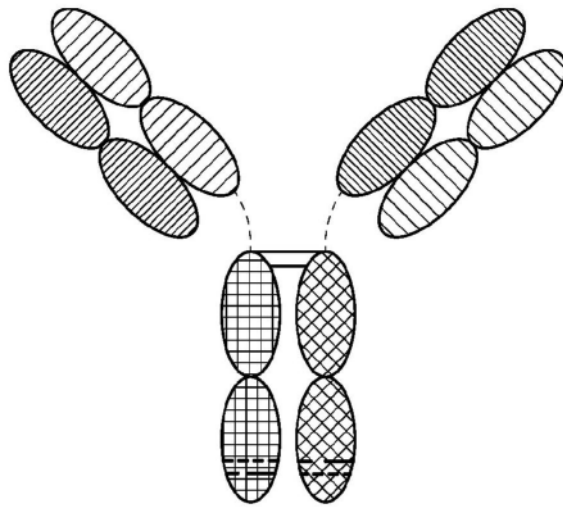


图10

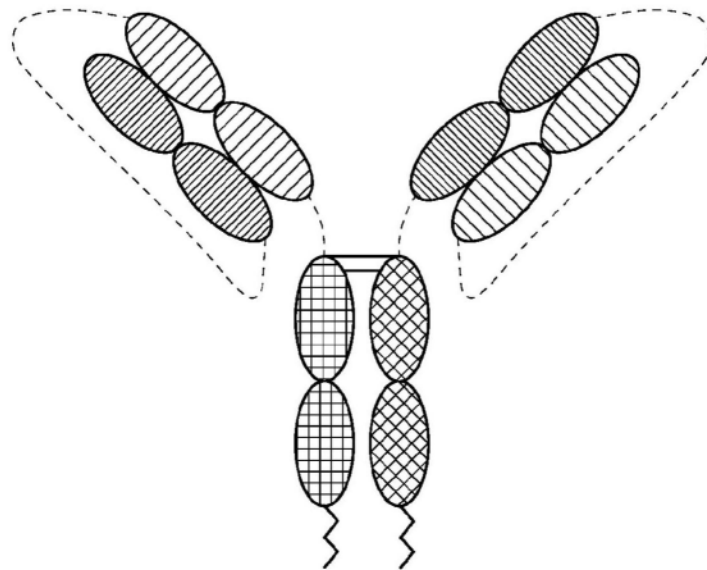


图11

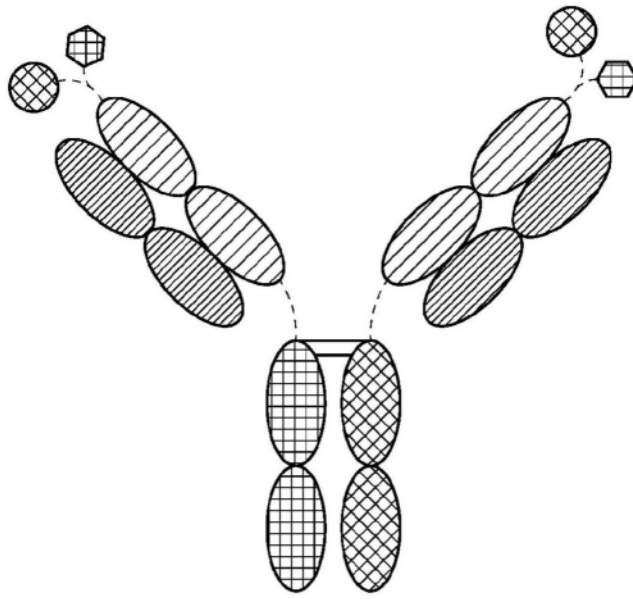


图12

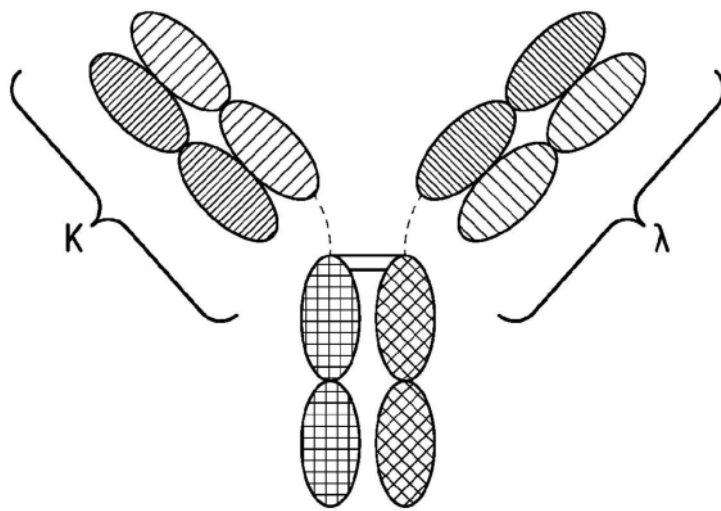


图13A

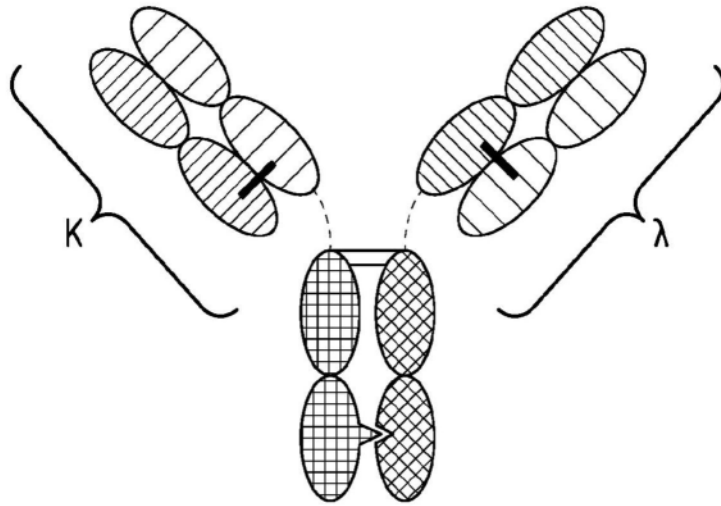


图13B

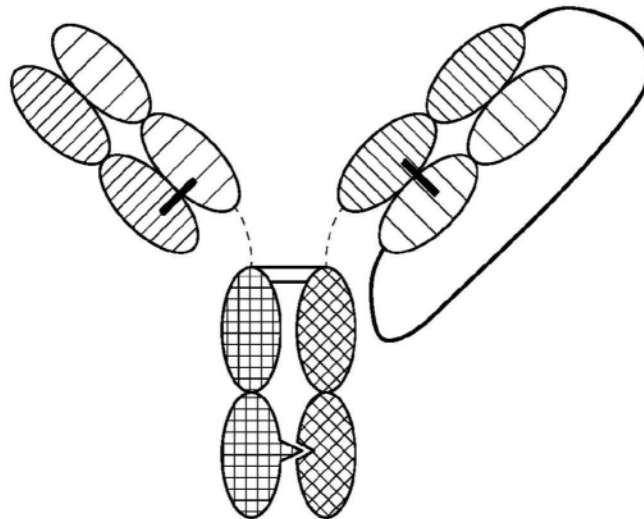


图14

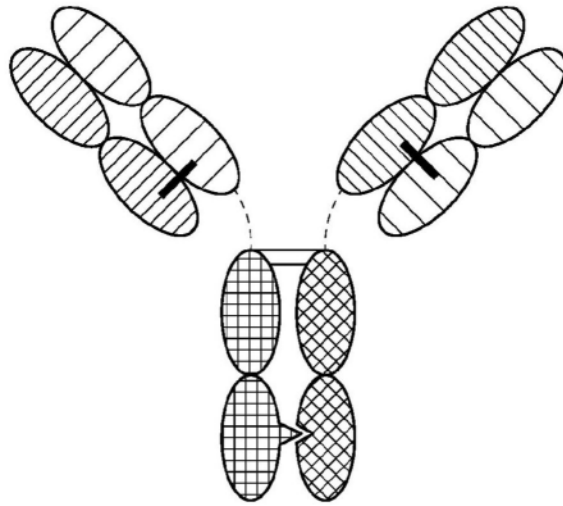


图15

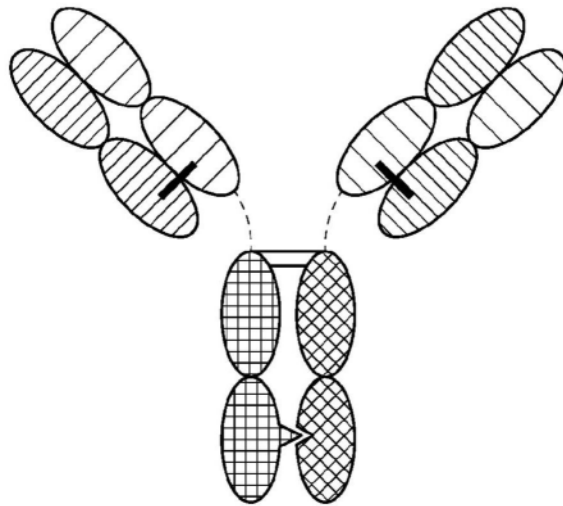


图16

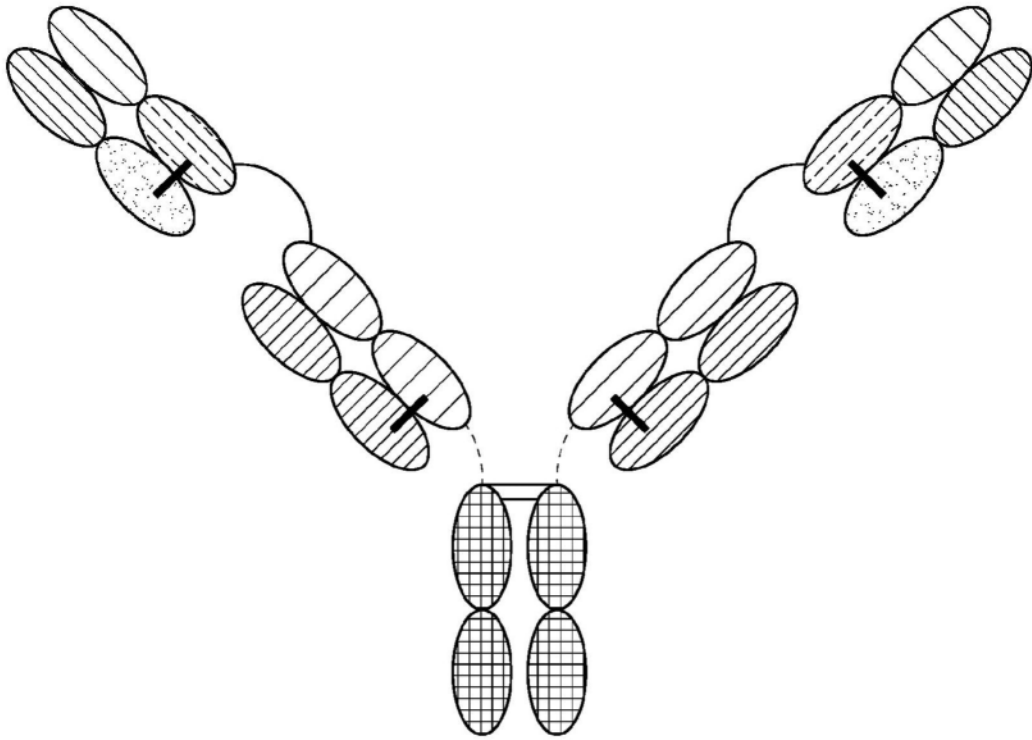


图17

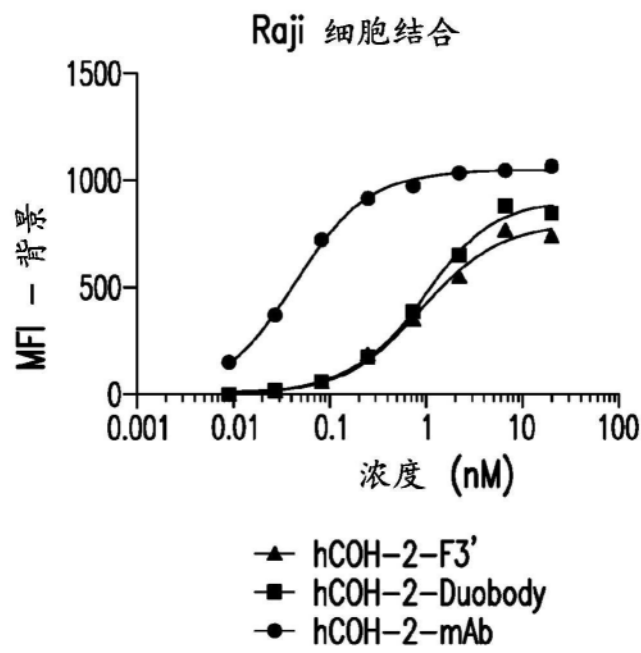


图18A

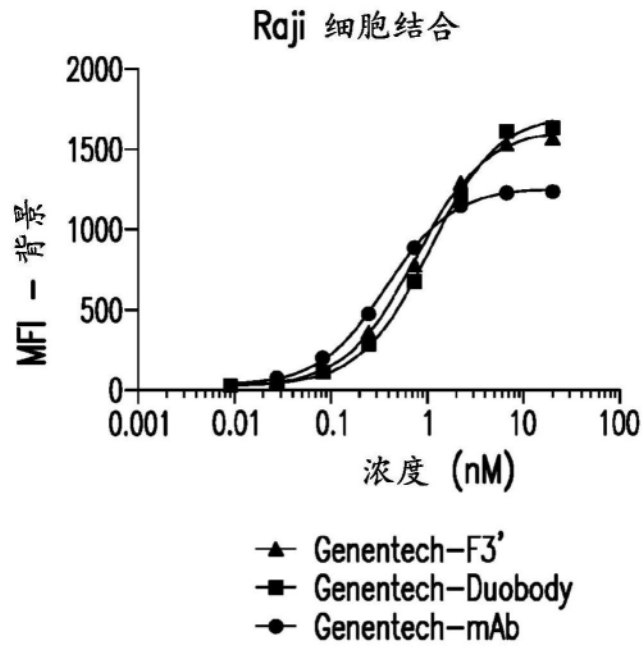


图18B

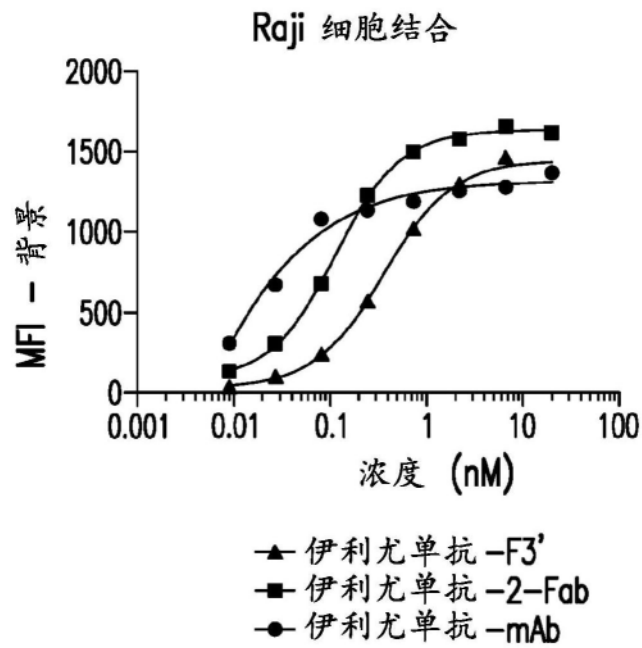


图18C

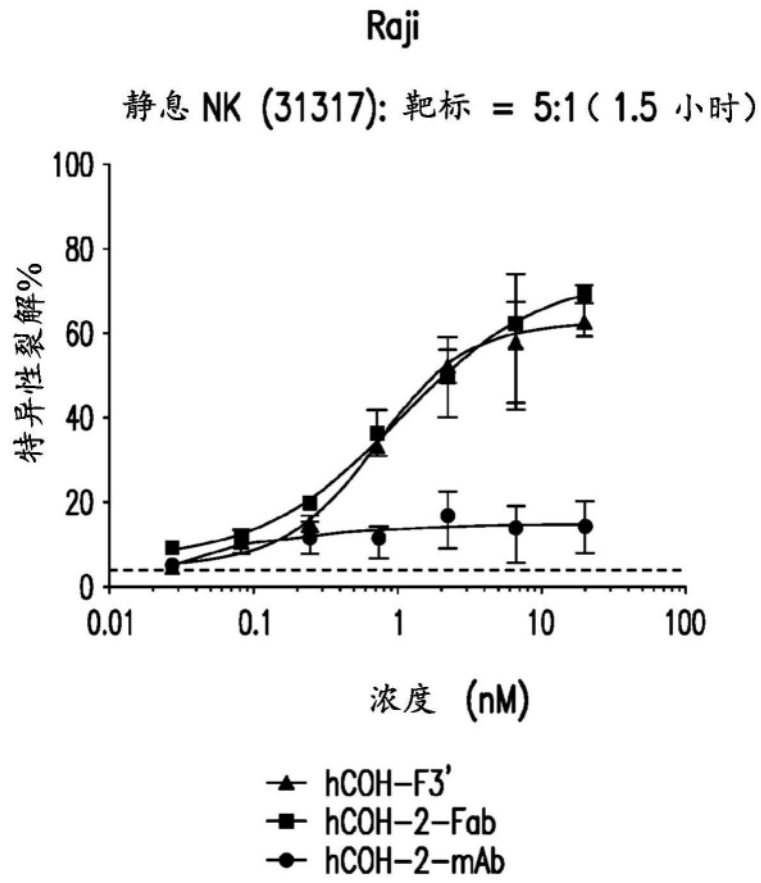


图19A

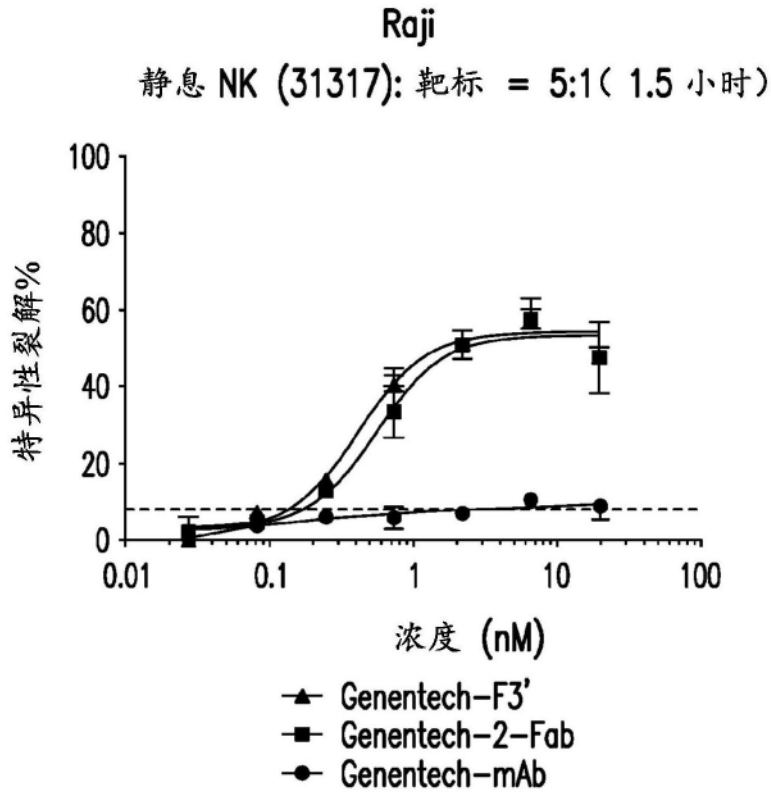


图19B

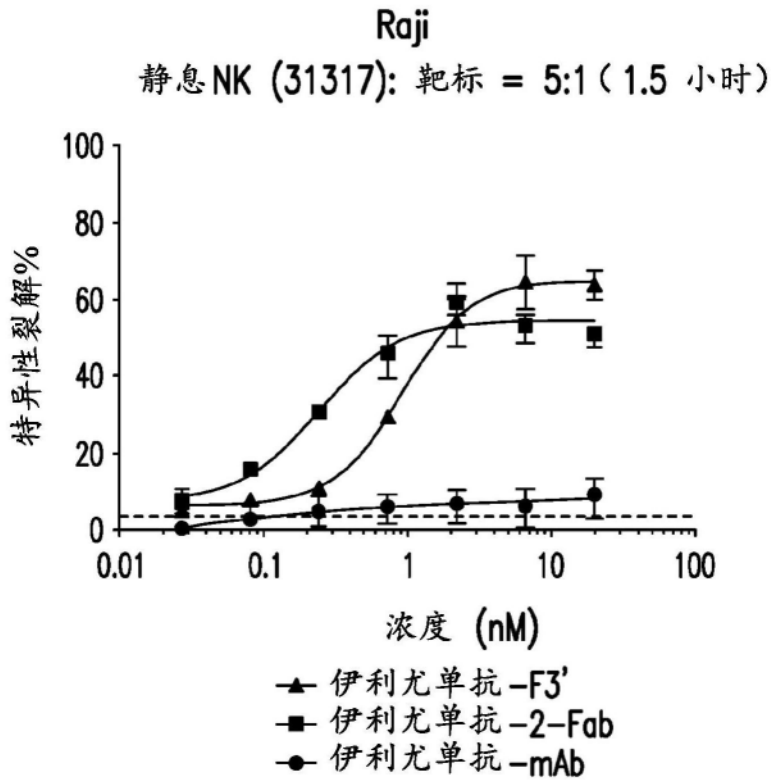


图19C

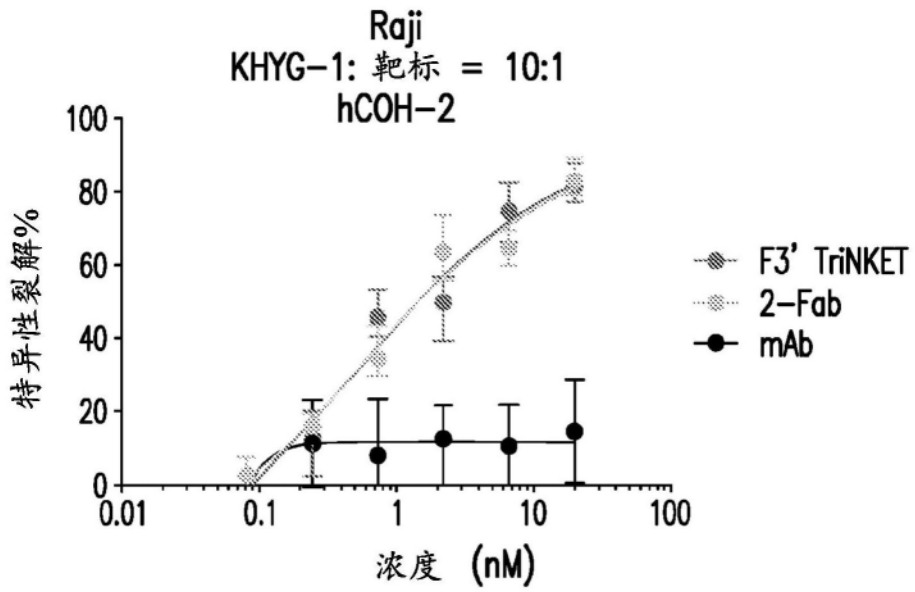


图20A

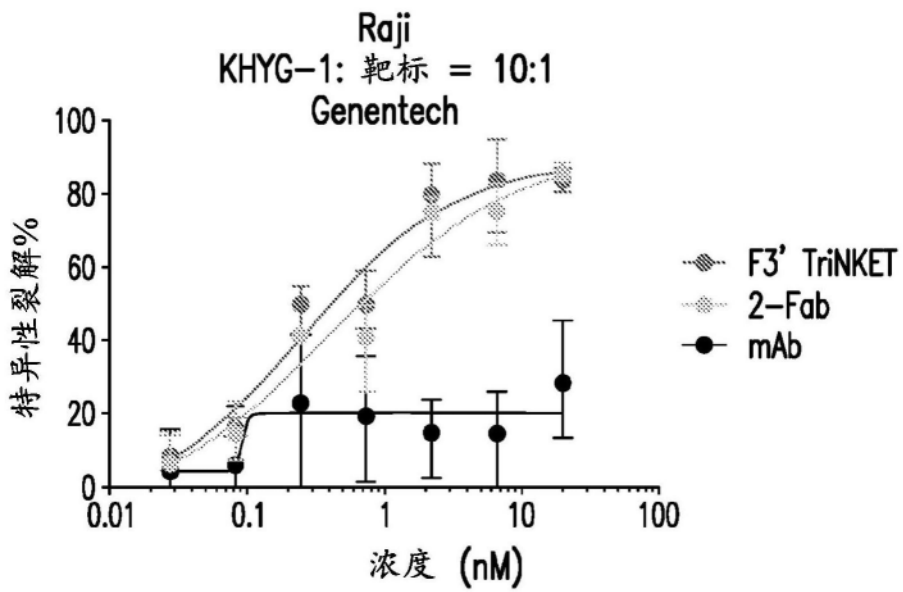


图20B

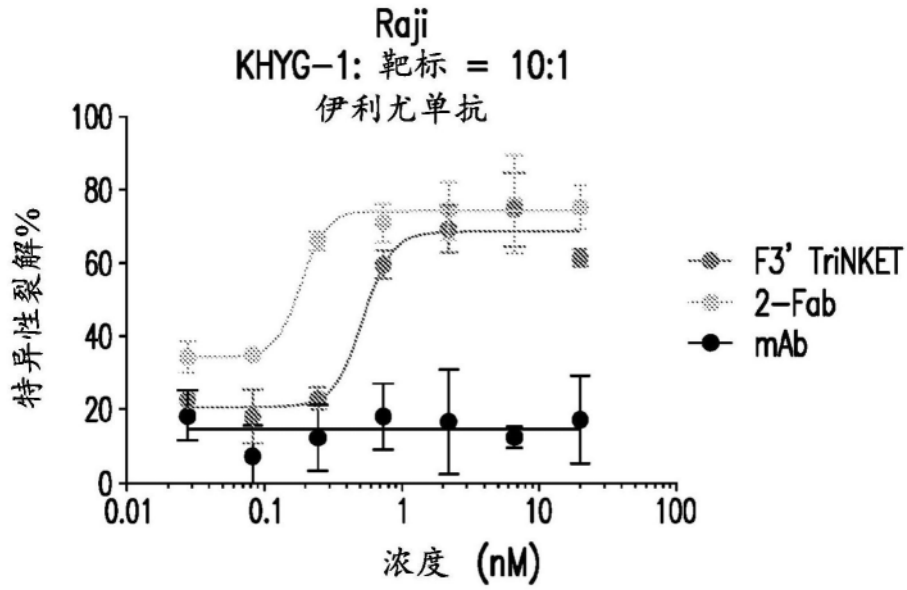


图20C

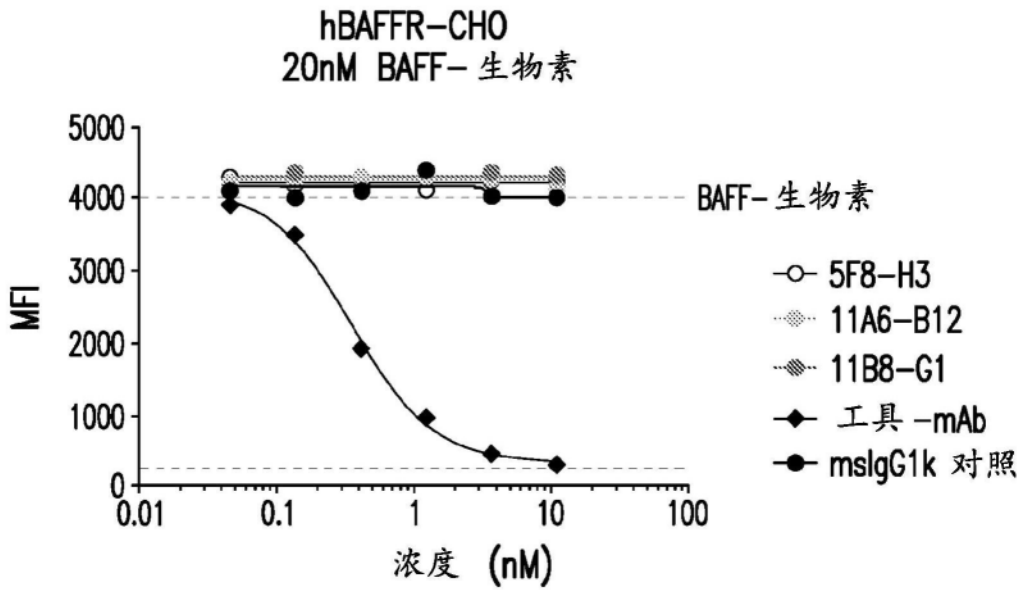


图21

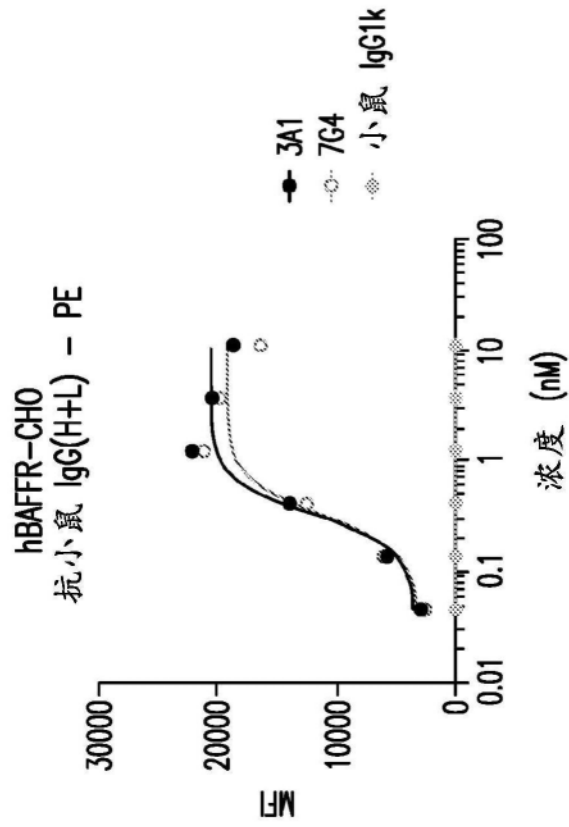


图22A

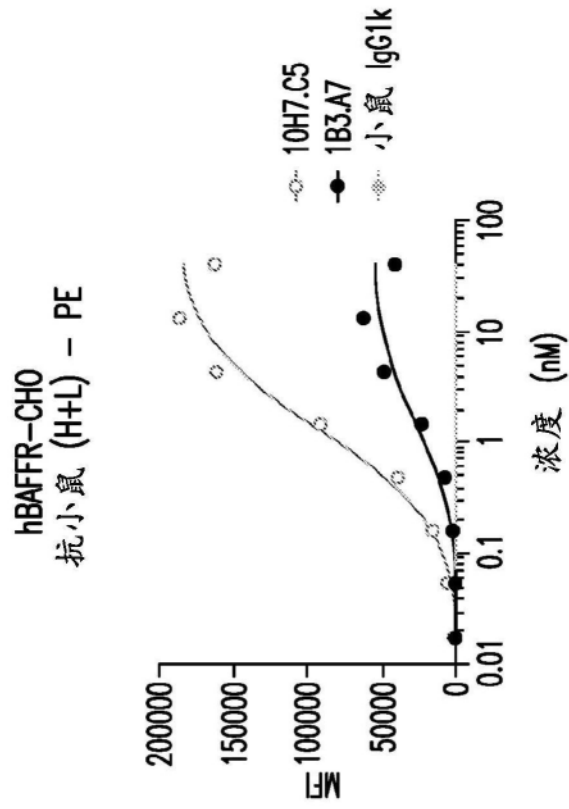


图22B

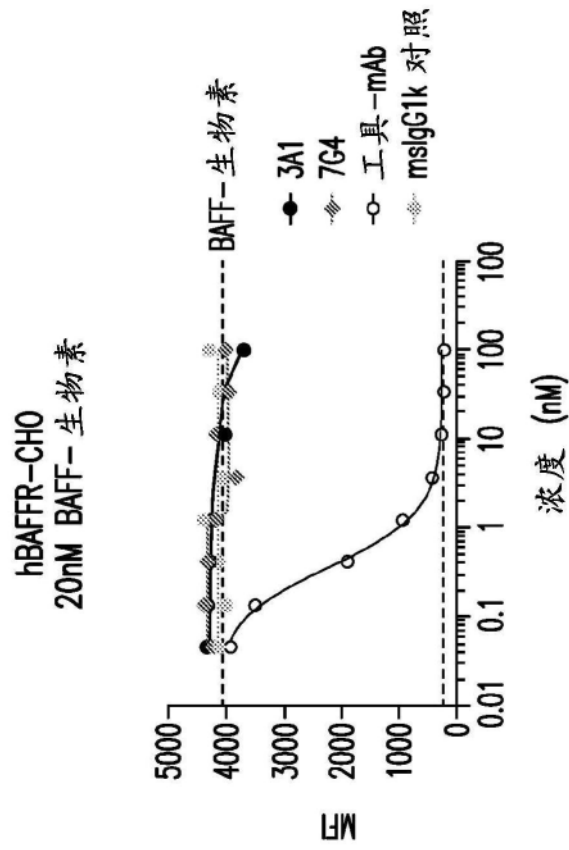


图22C

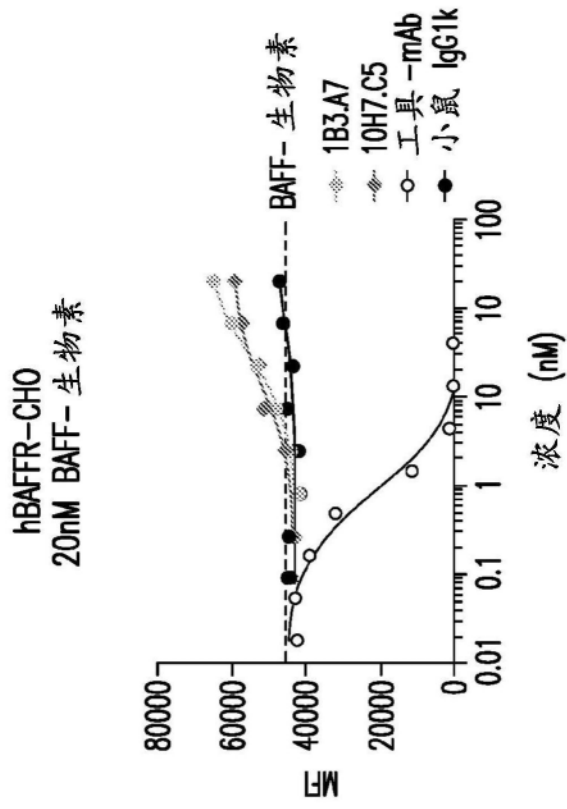


图22D

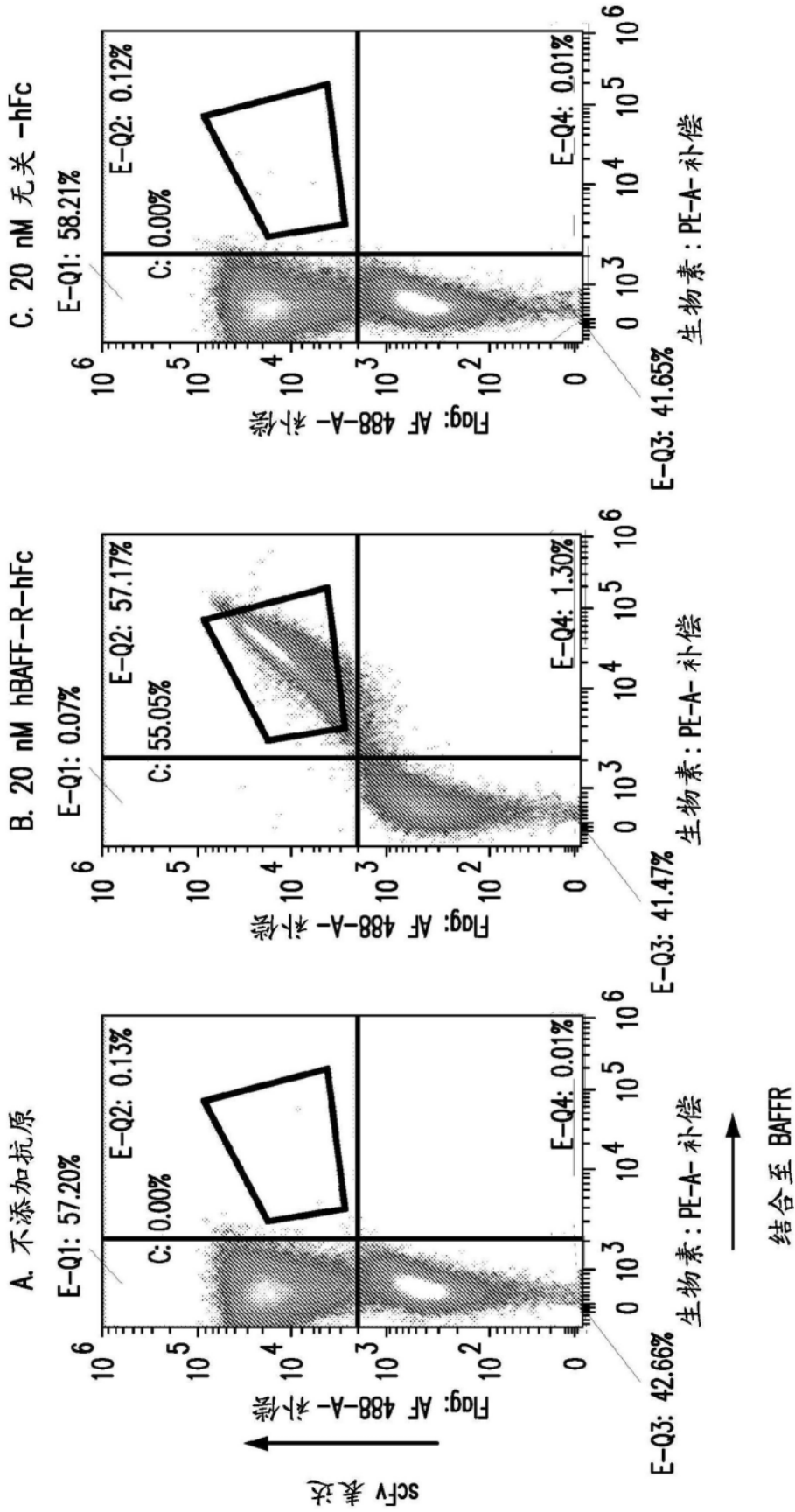


图 23A

图 23B

图 23C

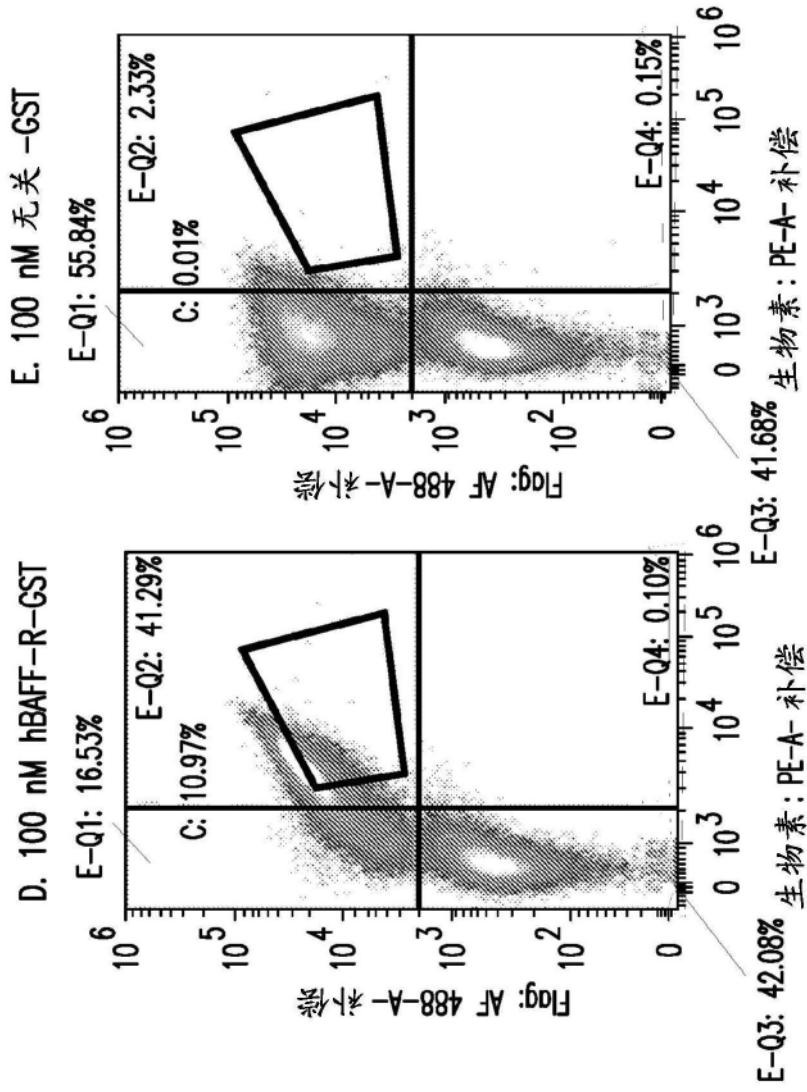


图 23D

图 23E

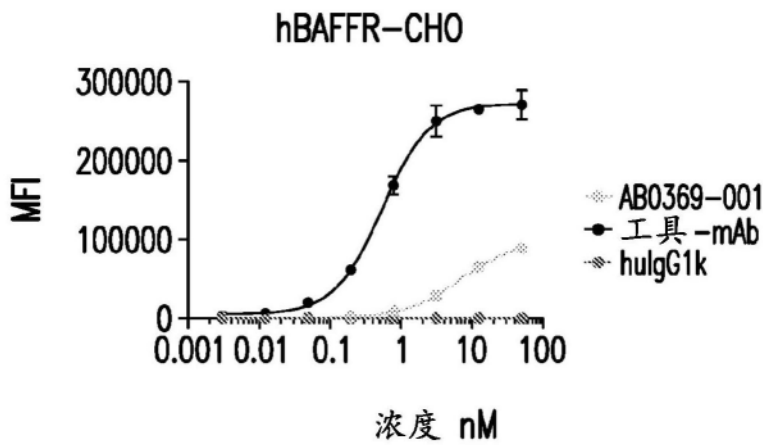


图24A

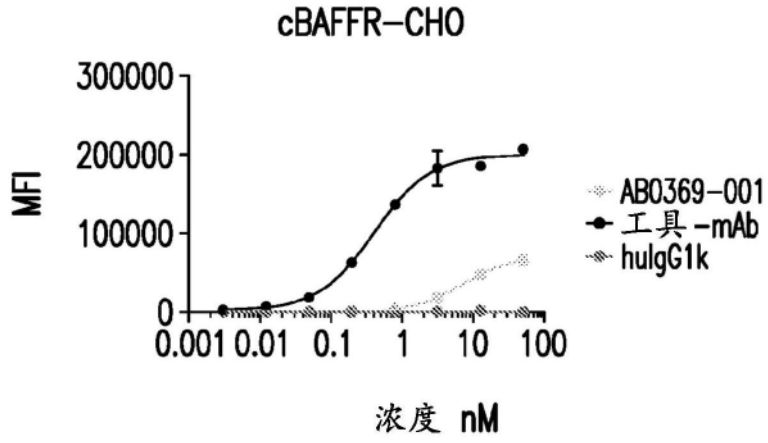


图24B

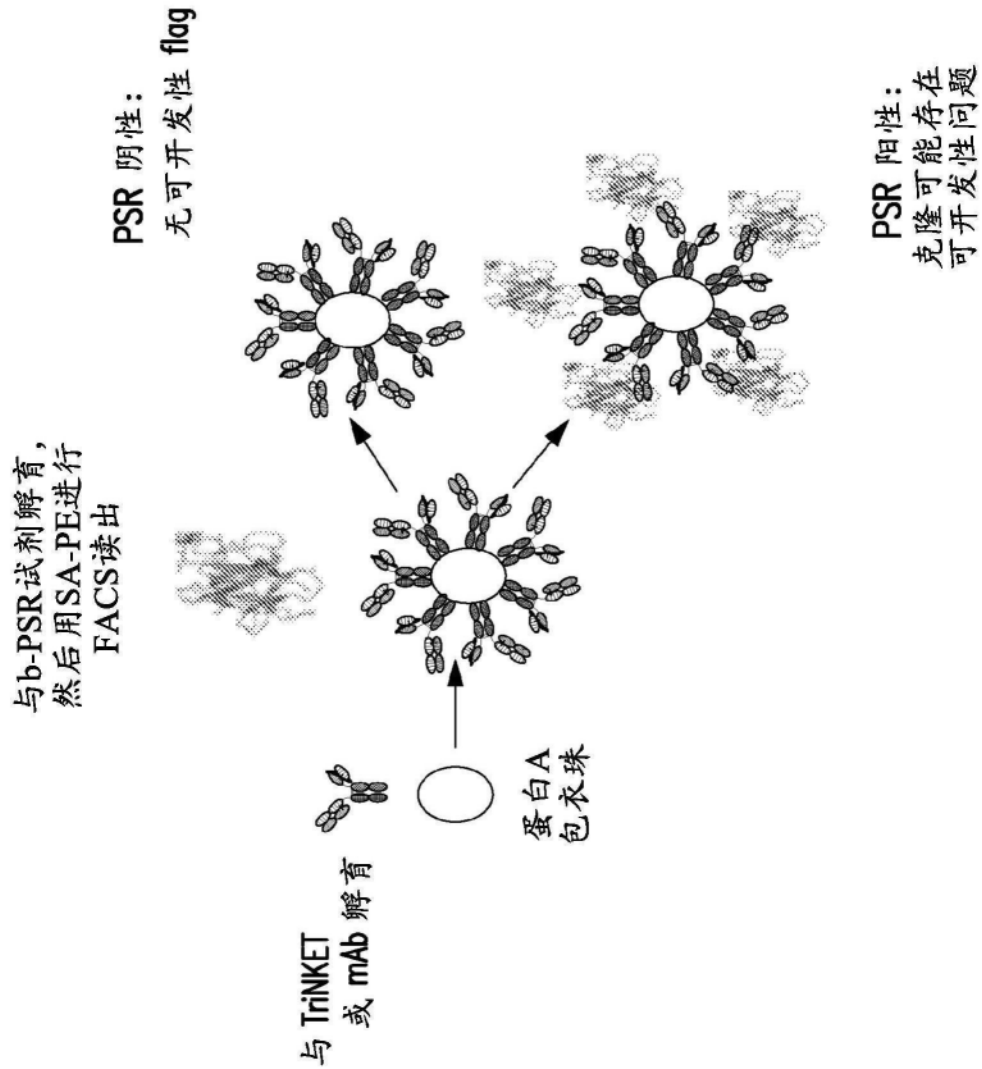


图25A

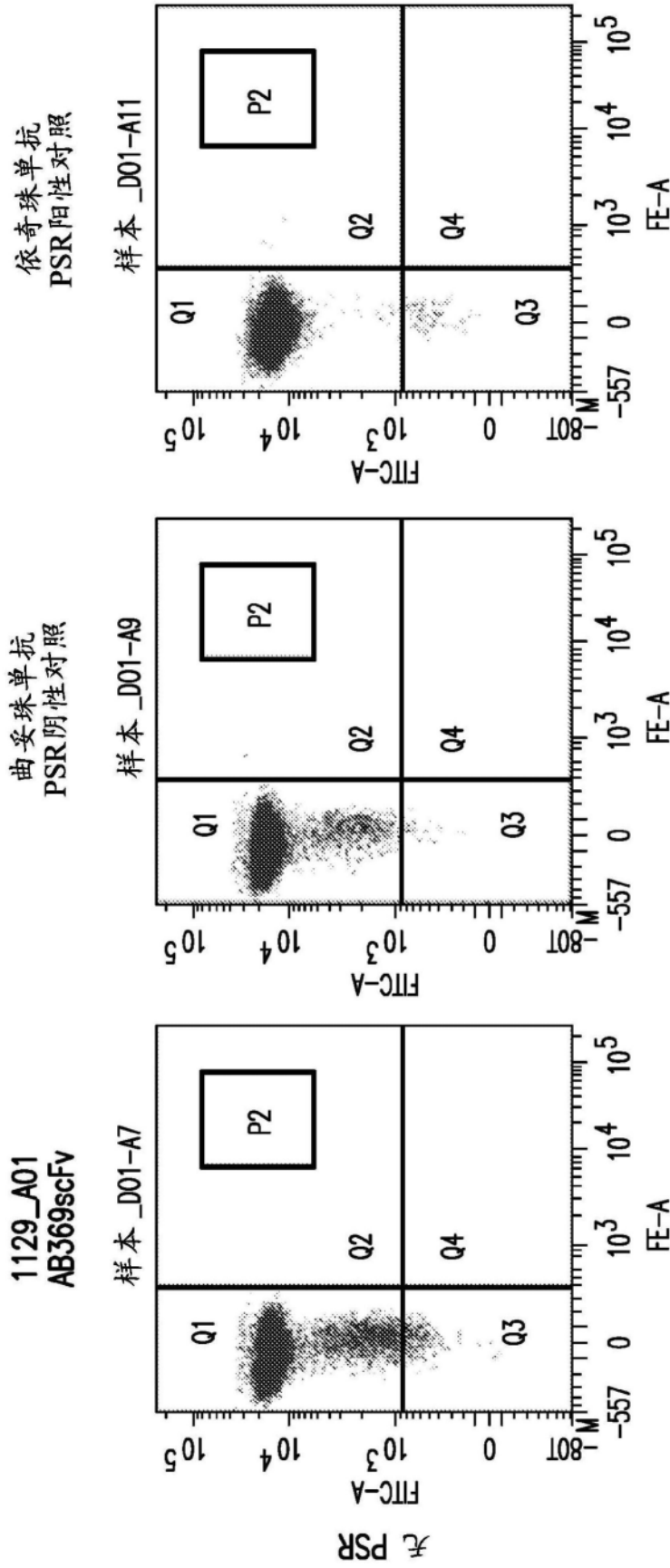


图 25B

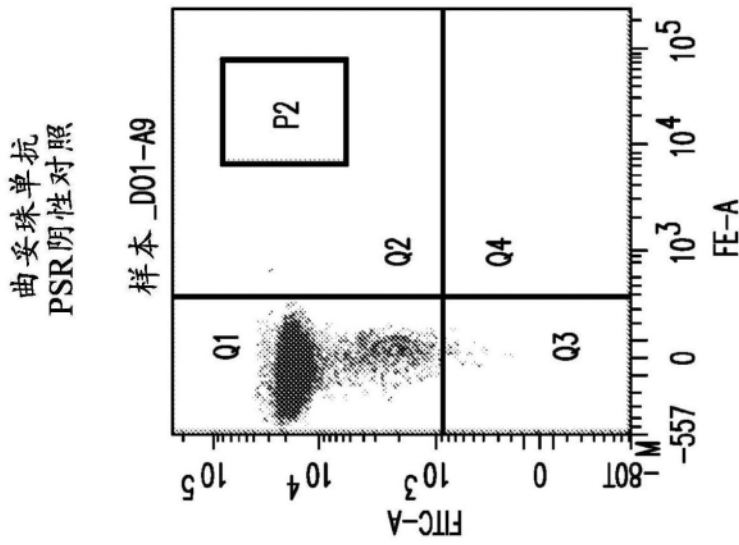


图 25C

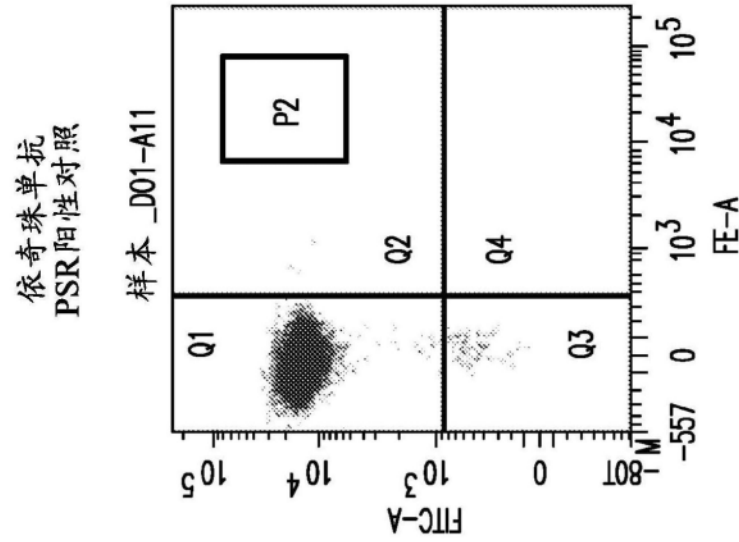


图 25D

1129\_A01  
AB369scFv

样本\_D01-C7

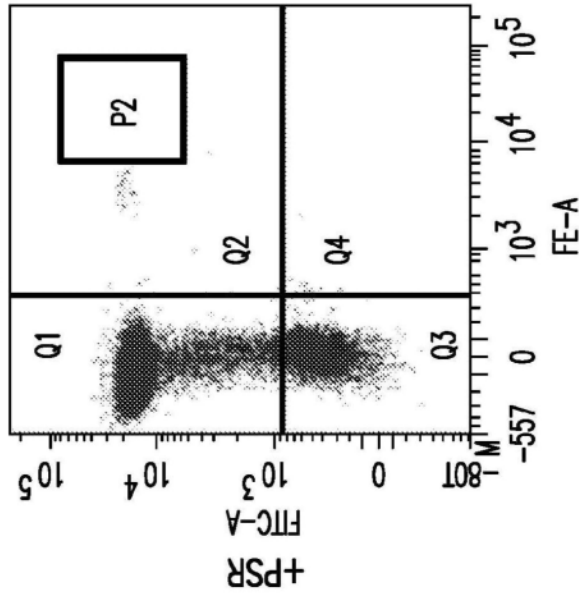


图 25E

曲妥珠单抗  
PSR阴性对照

样本\_D01-C9

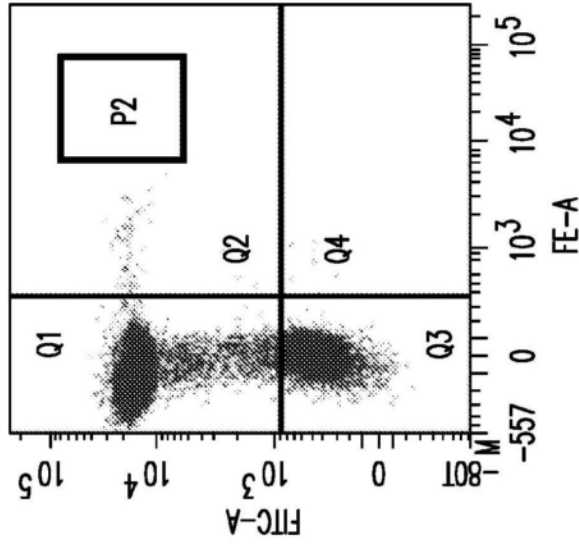


图 25F

依奇珠单抗  
PSR阳性对照

样本\_D01-C11

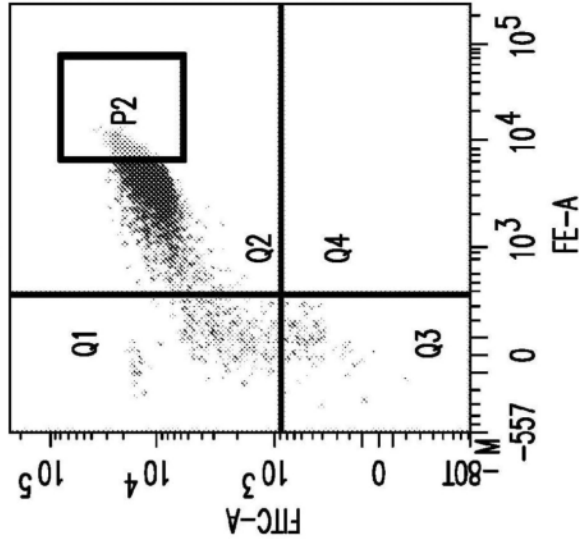


图 25G

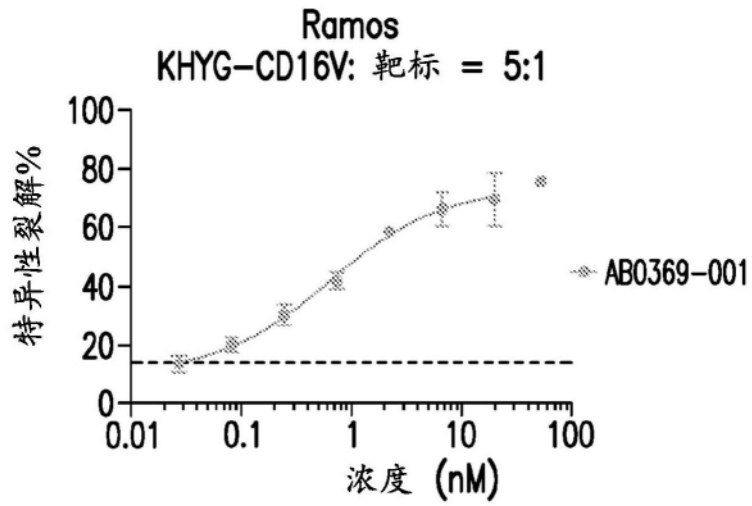


图26

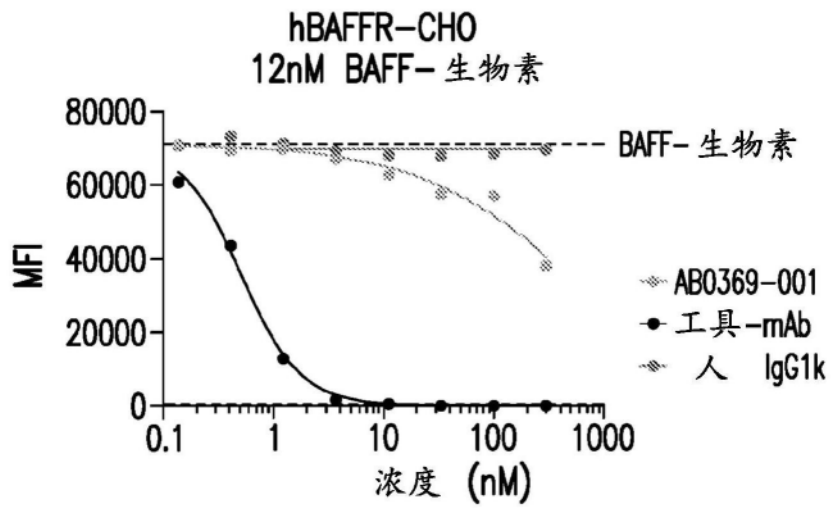


图27

B. 文库 67  
第 1 轮

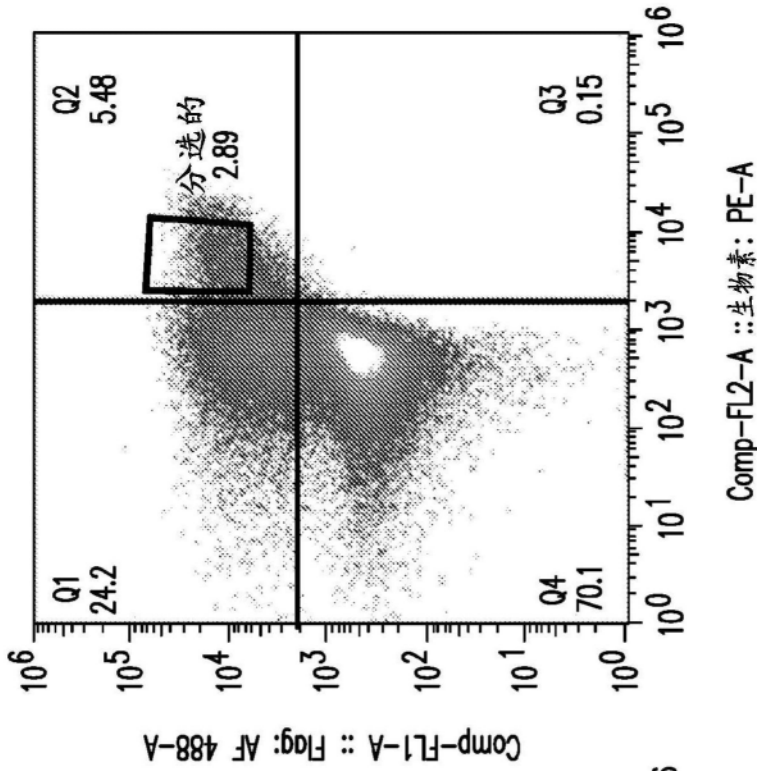


图 28B

A. 亲代  
AB0369scFv (1129\_A01)

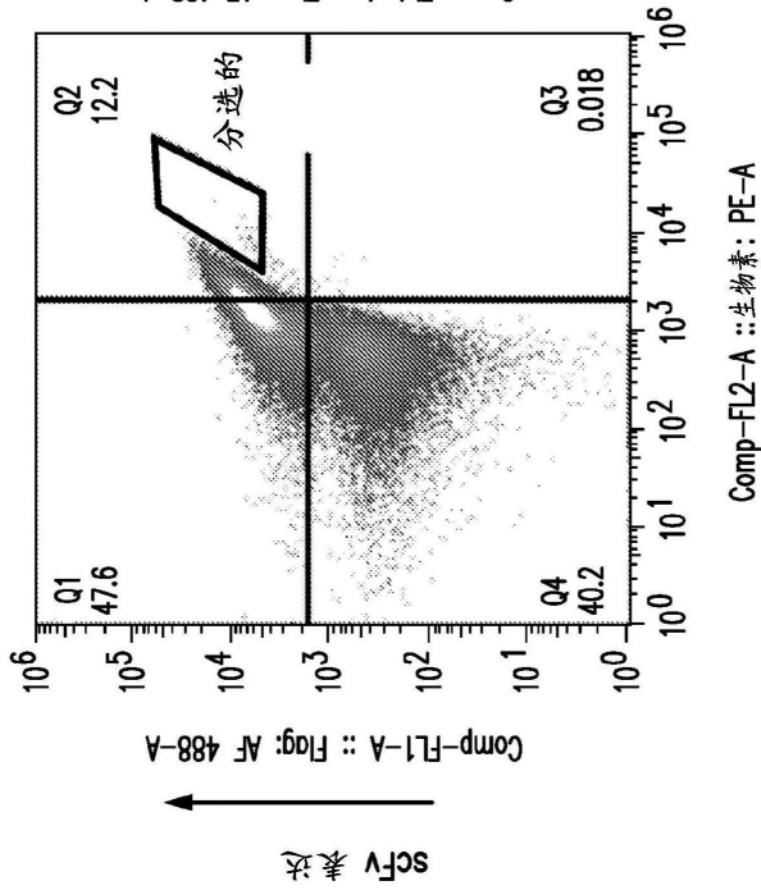


图 28A

C. 文库 67  
第 2 轮

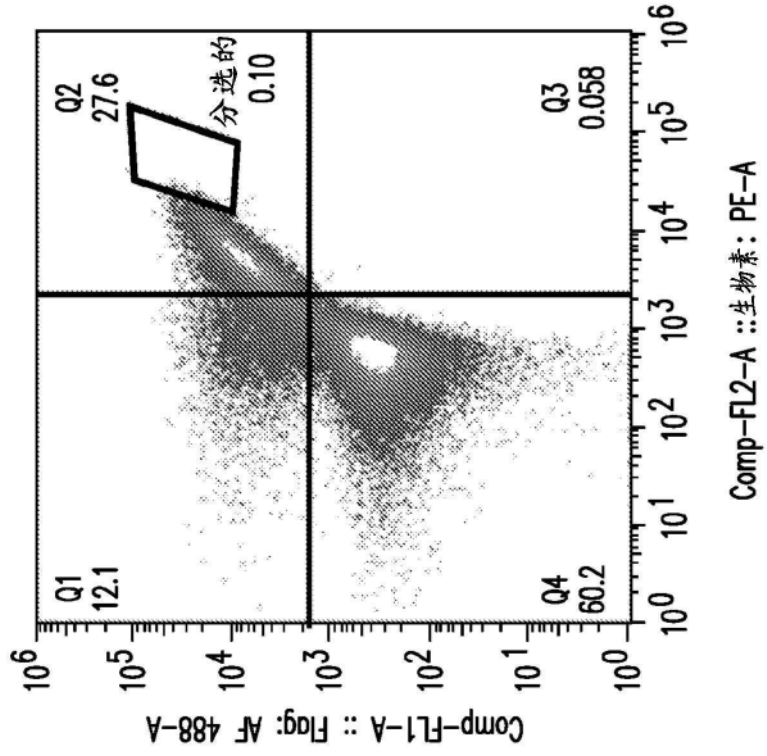


图28C

D. 文库 67  
第 2 轮输出

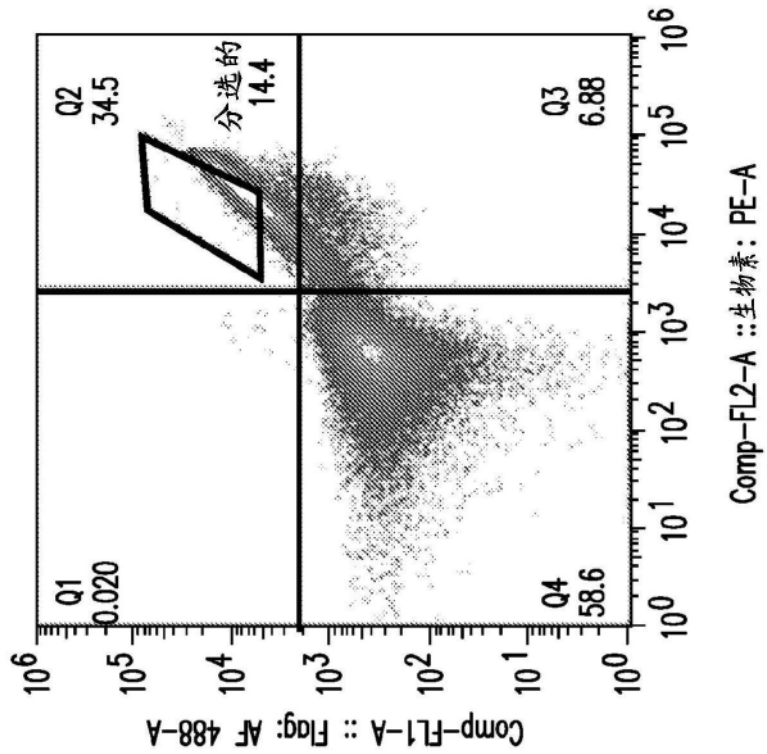


图28D

C. AB0606 scFv

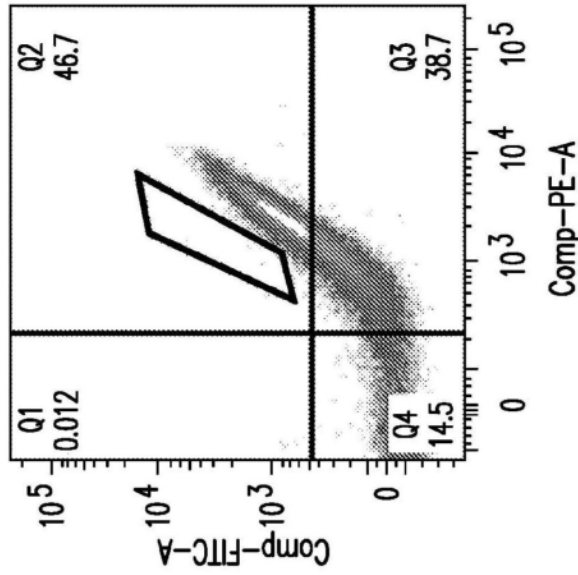


图 29C

B. AB0605 scFv

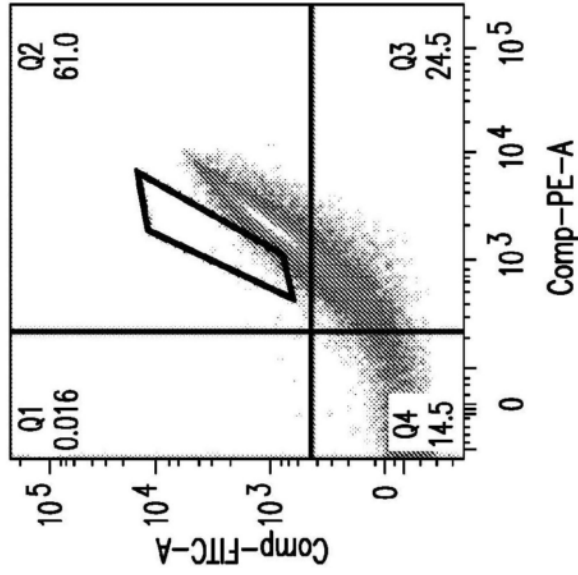
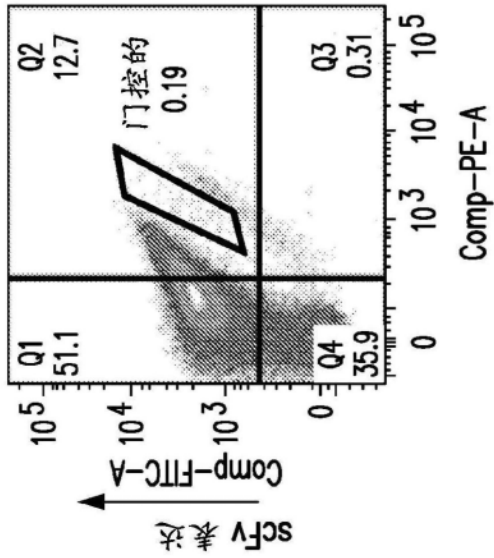


图 29B

A. 亲代

AB0369 scFv (1129\_A01)



结合至 BAFFR

图 29A

D. AB0622 scFv

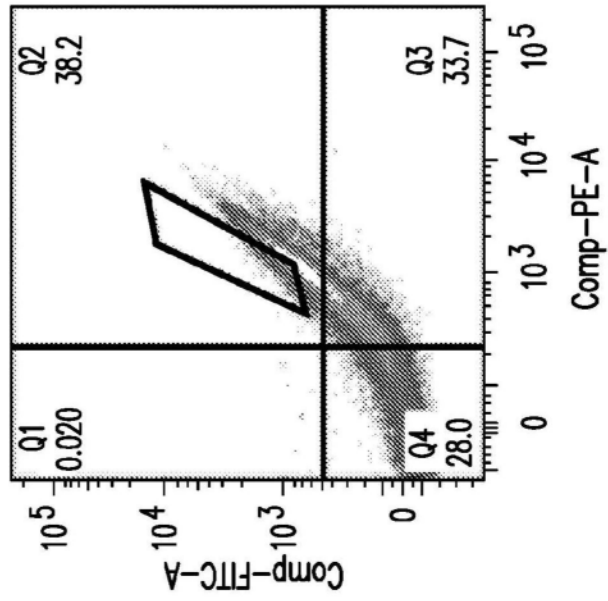


图29D

E. 基准  
基于伊利尤单抗的 scFv

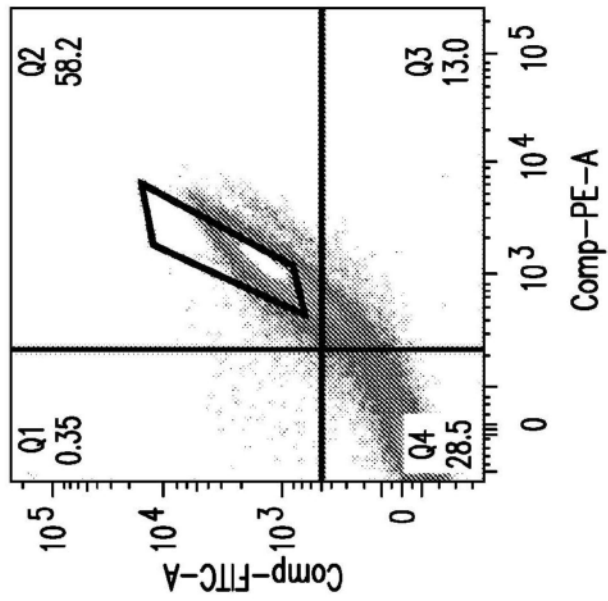


图29E

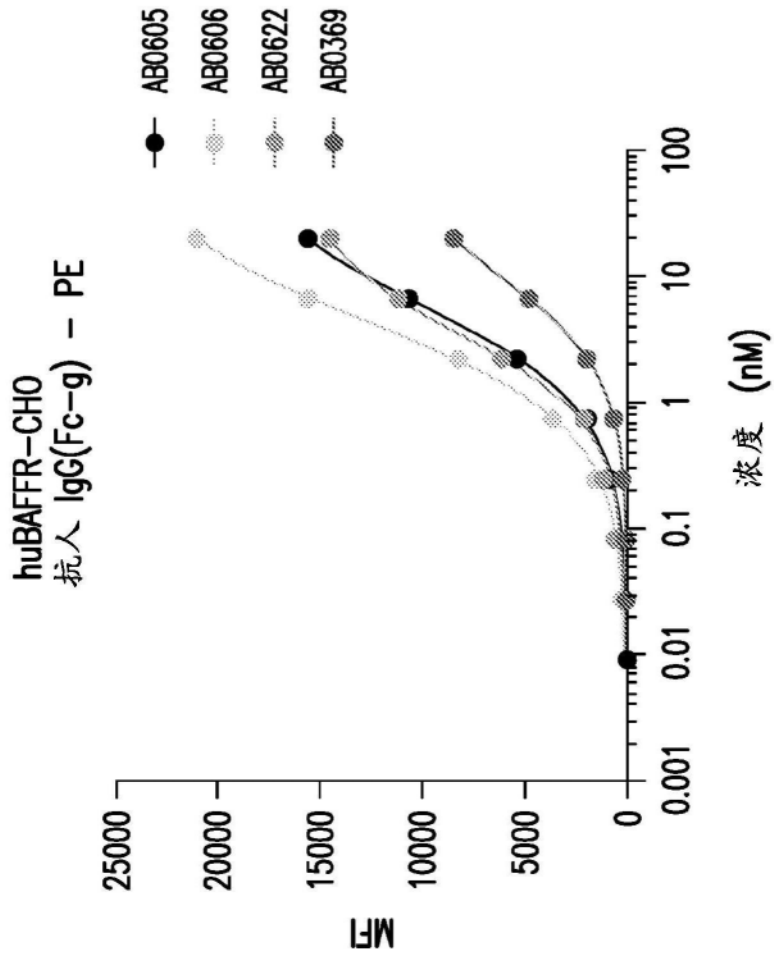


图30A

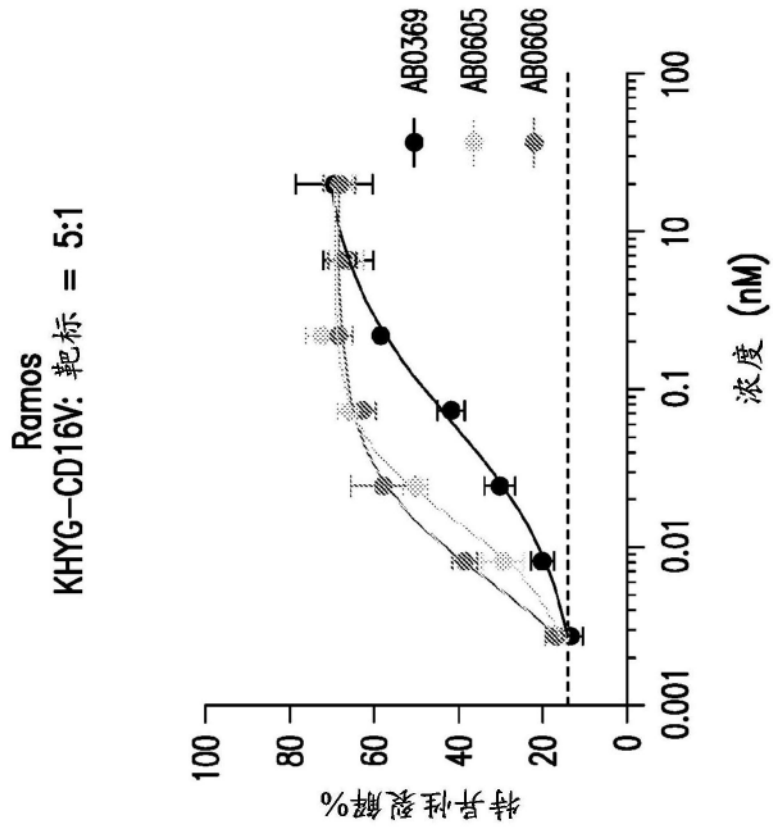


图30B

Ramos  
KHYG-CD16V: 靶标 = 5:1

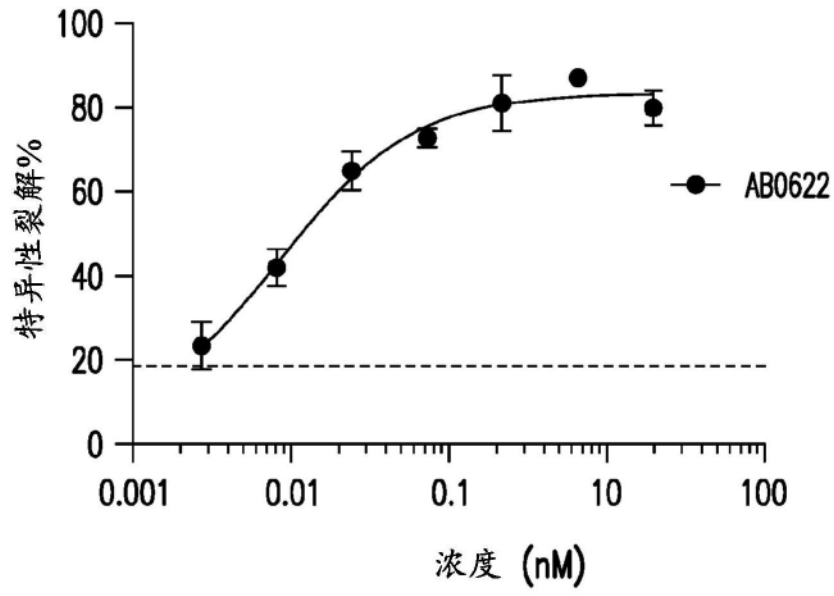


图30C

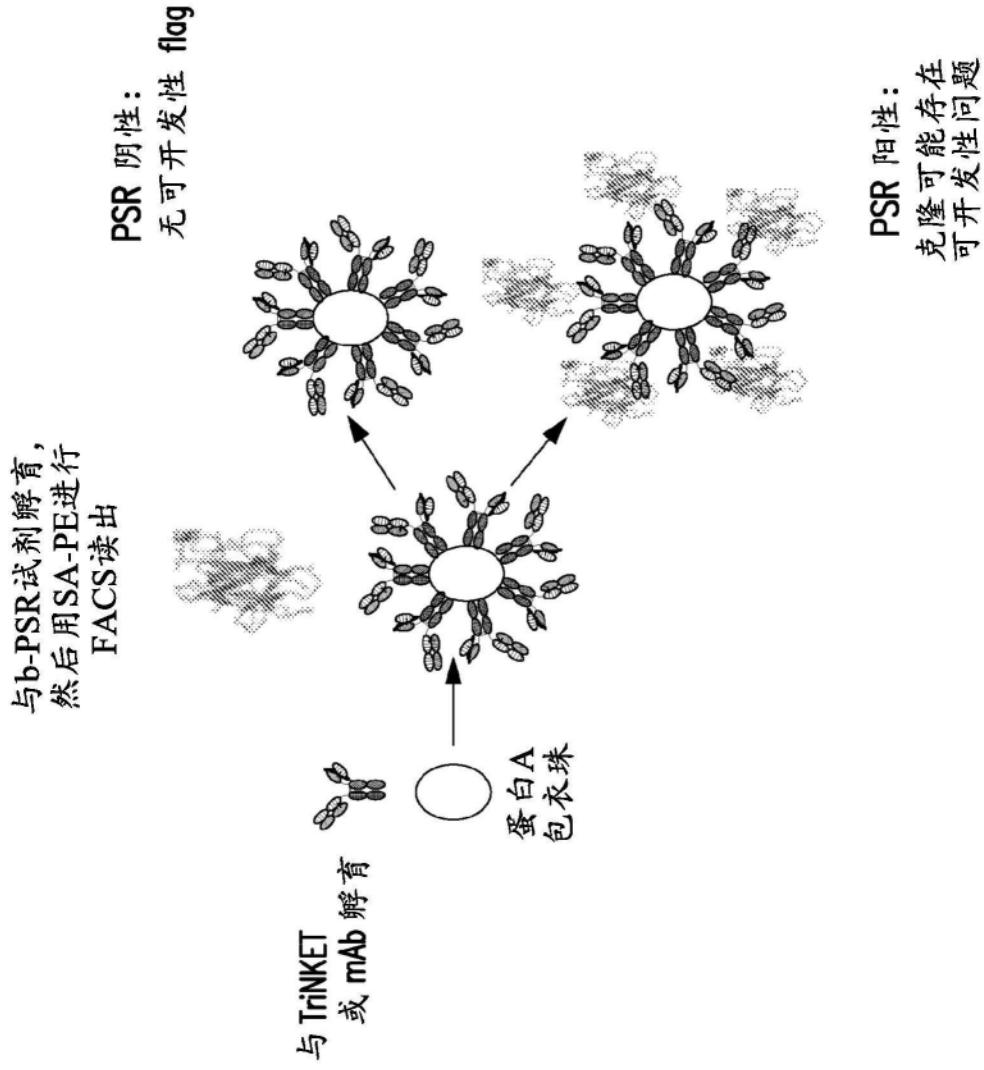


图31A

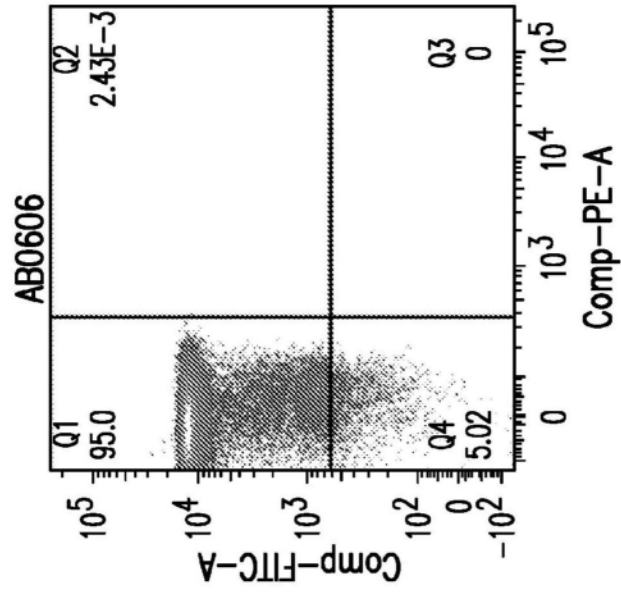


图 31C

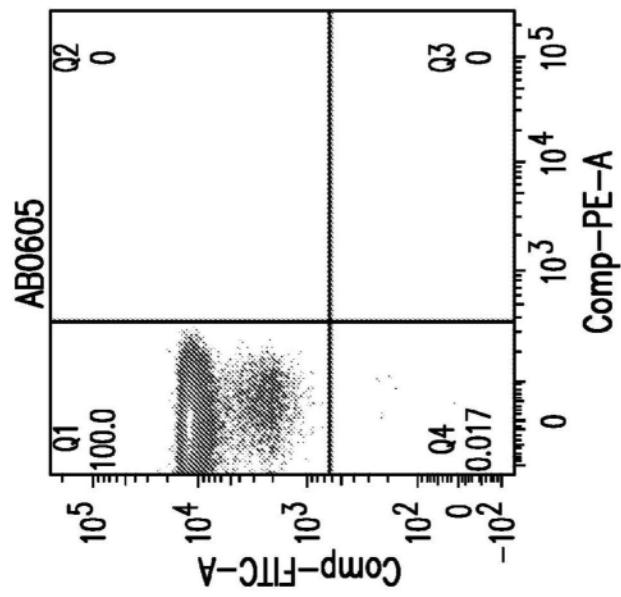


图 31B

无 PSR

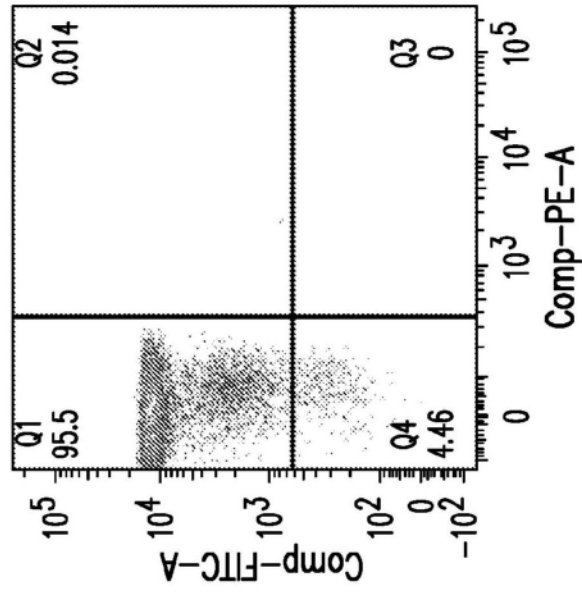


图 31E

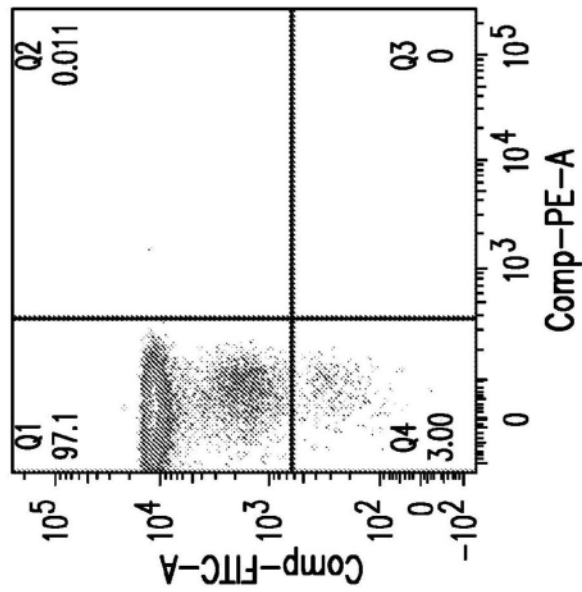


图 31D

+PSR

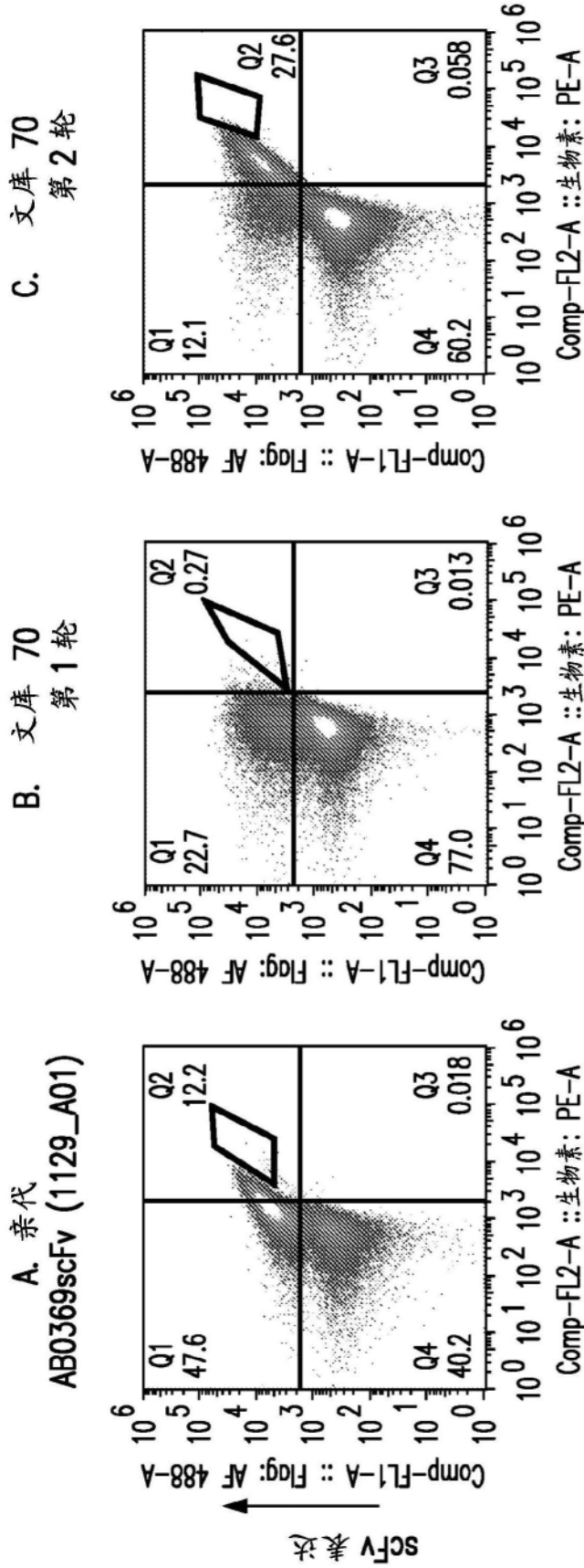


图 32C

图 32B

图 32A

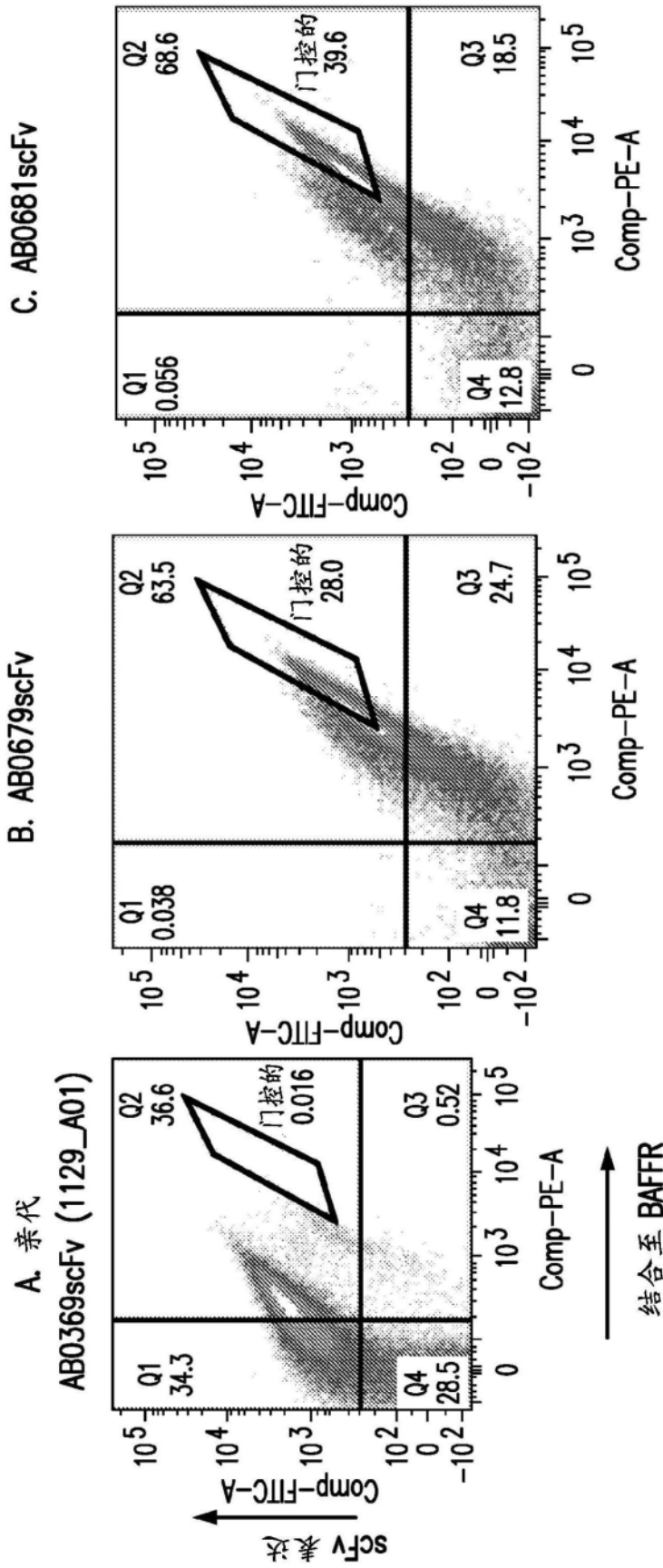


图 33C

图 33B

图 33A

D. AB0682scFv

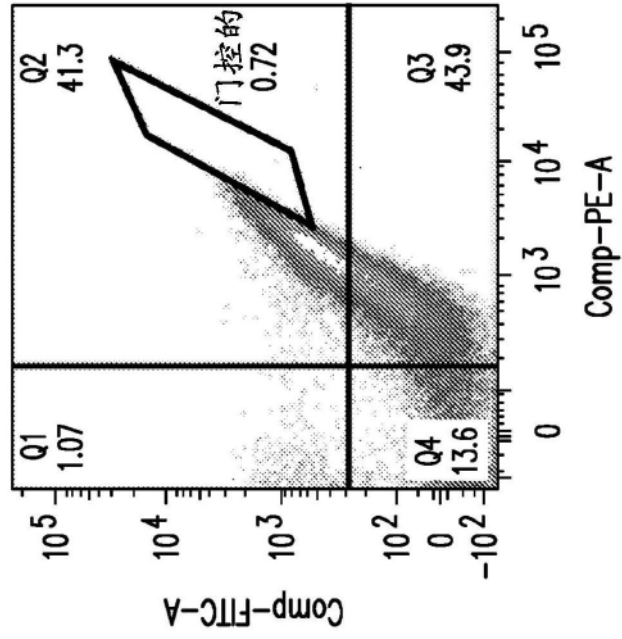


图33D

E. 基准  
基于伊利尤单抗的 scFv

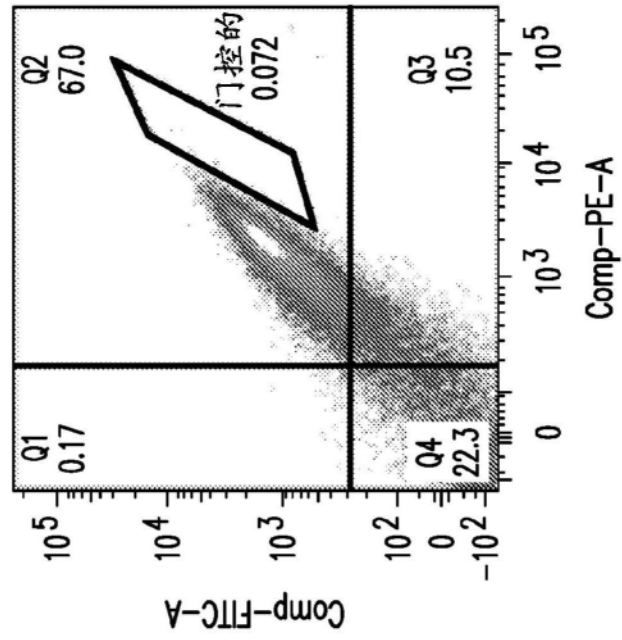


图33E

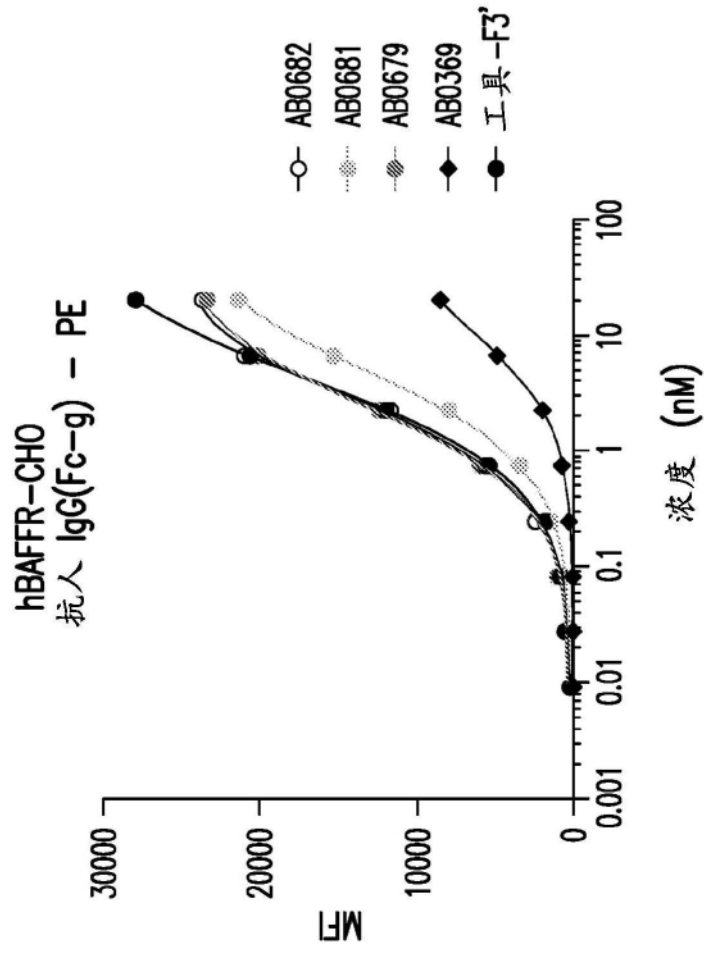


图34A

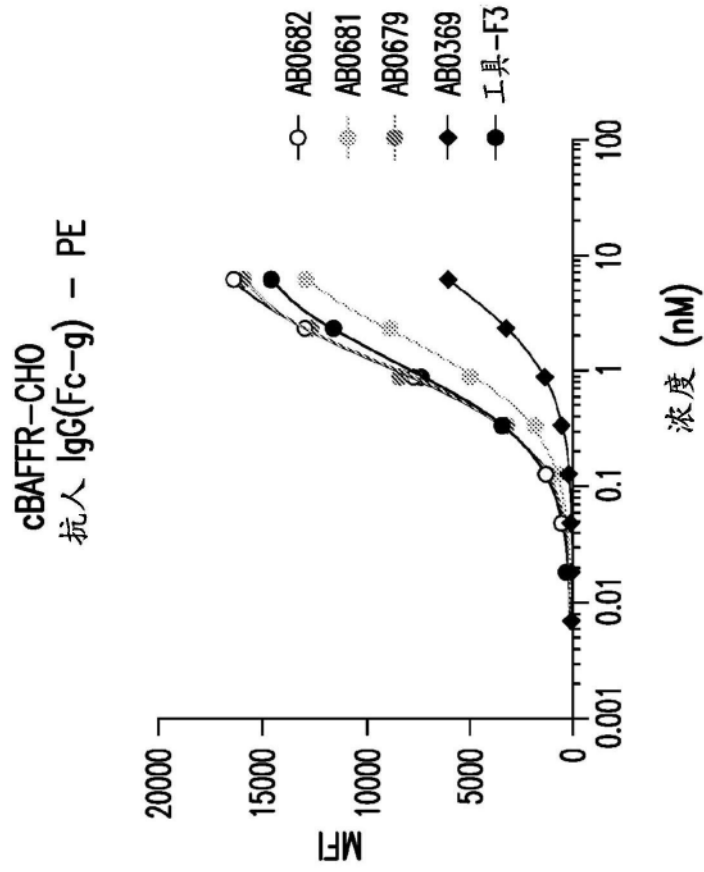


图34B

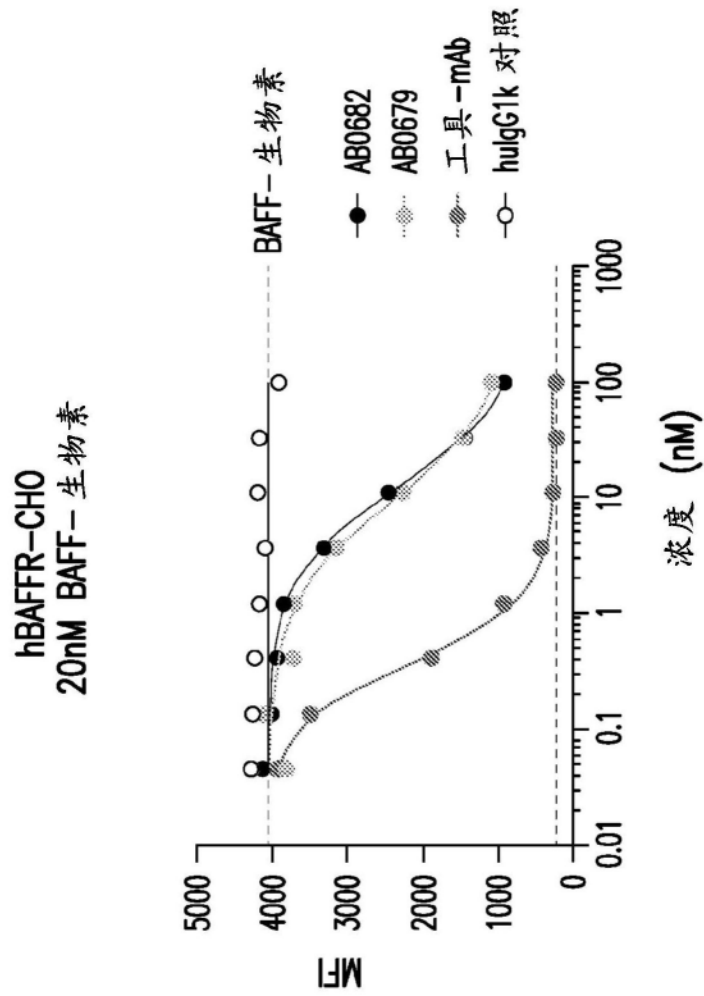


图34C

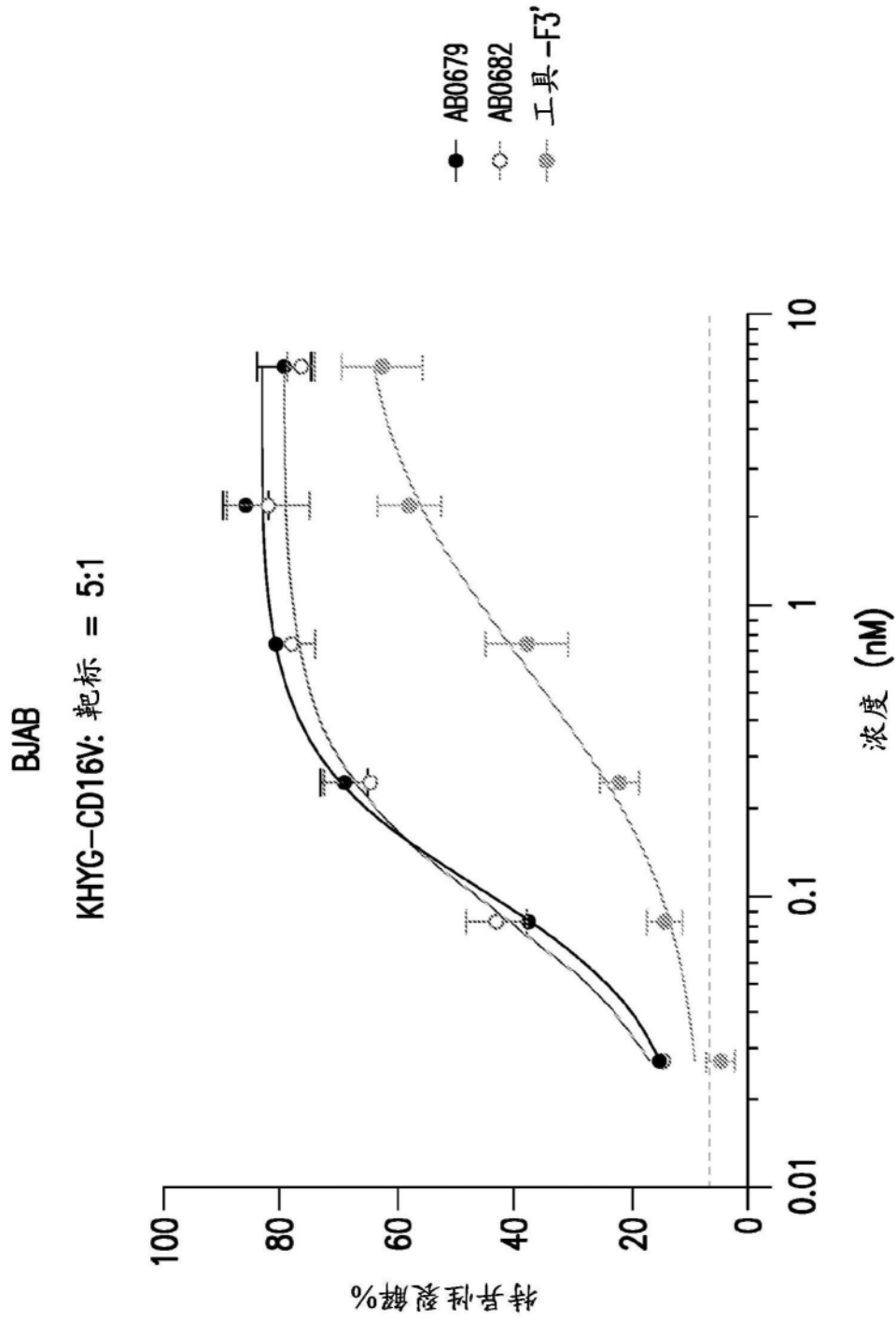


图35

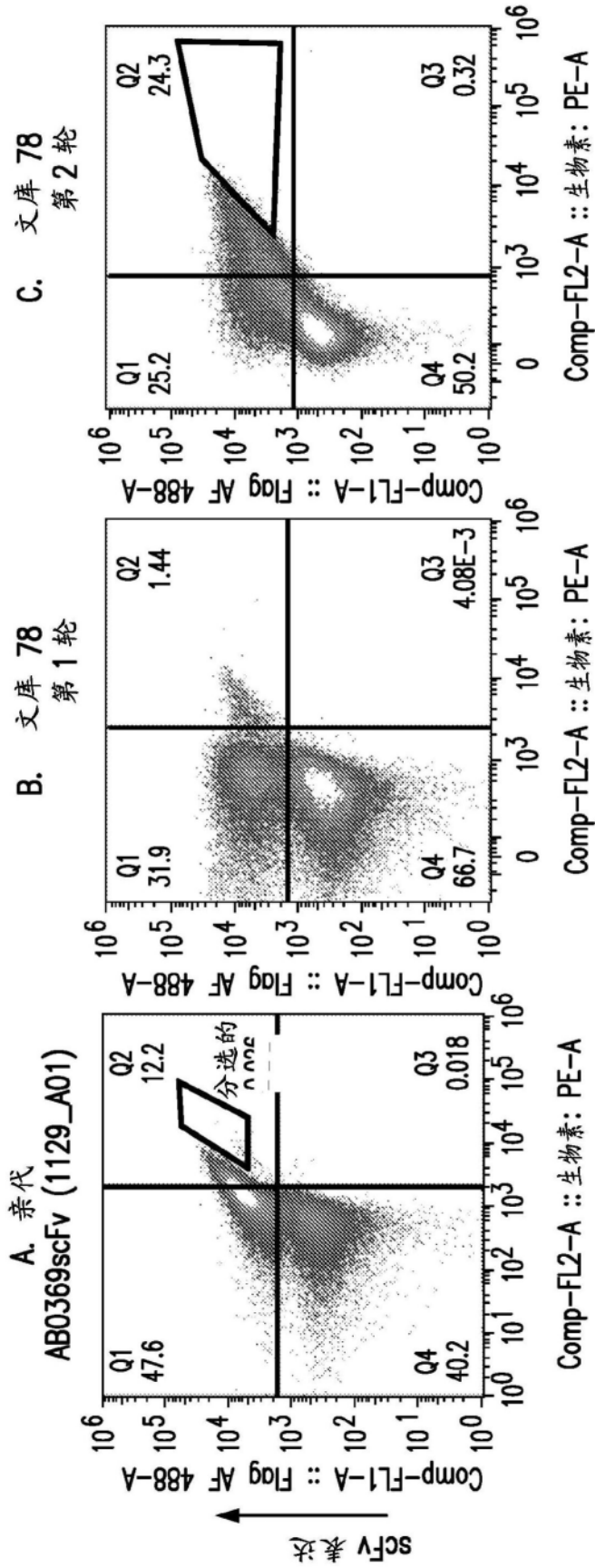


图 36C

图 36B

图 36A

D. 文库 78  
第 3 轮

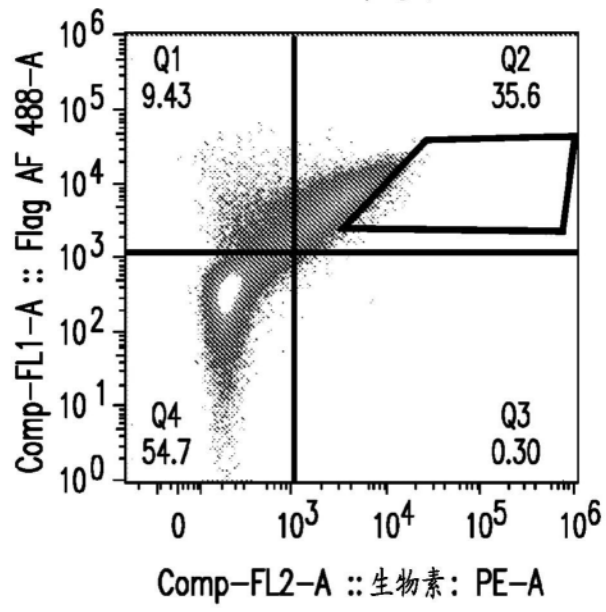


图36D

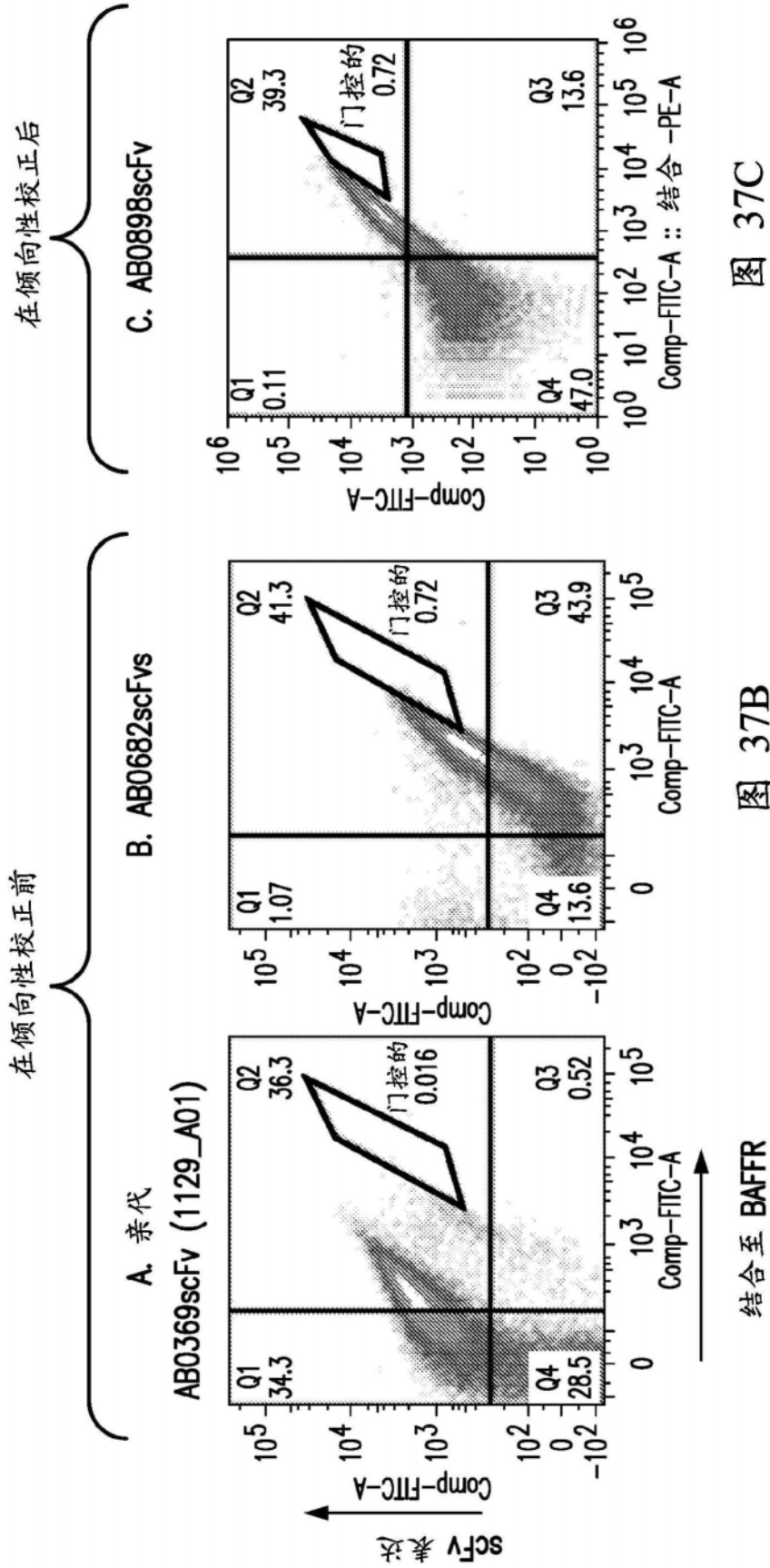


图 37C

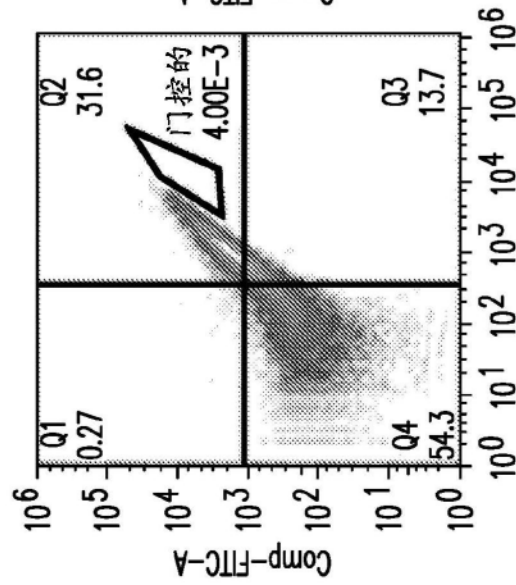
图 37B

图 37A

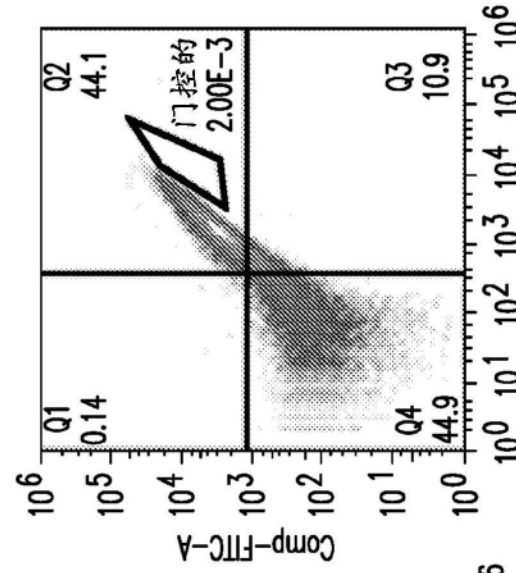
在倾向性校正后

D. AB0899scFv

E. AB0900scFv



Comp-FTTC-A :: 结合 -PE-A



Comp-FTTC-A :: 结合 -PE-A

图 37D

图 37E

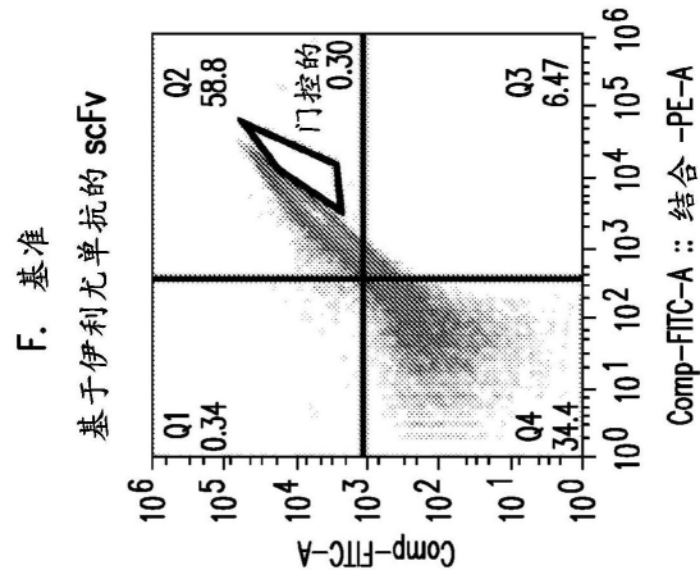


图37F

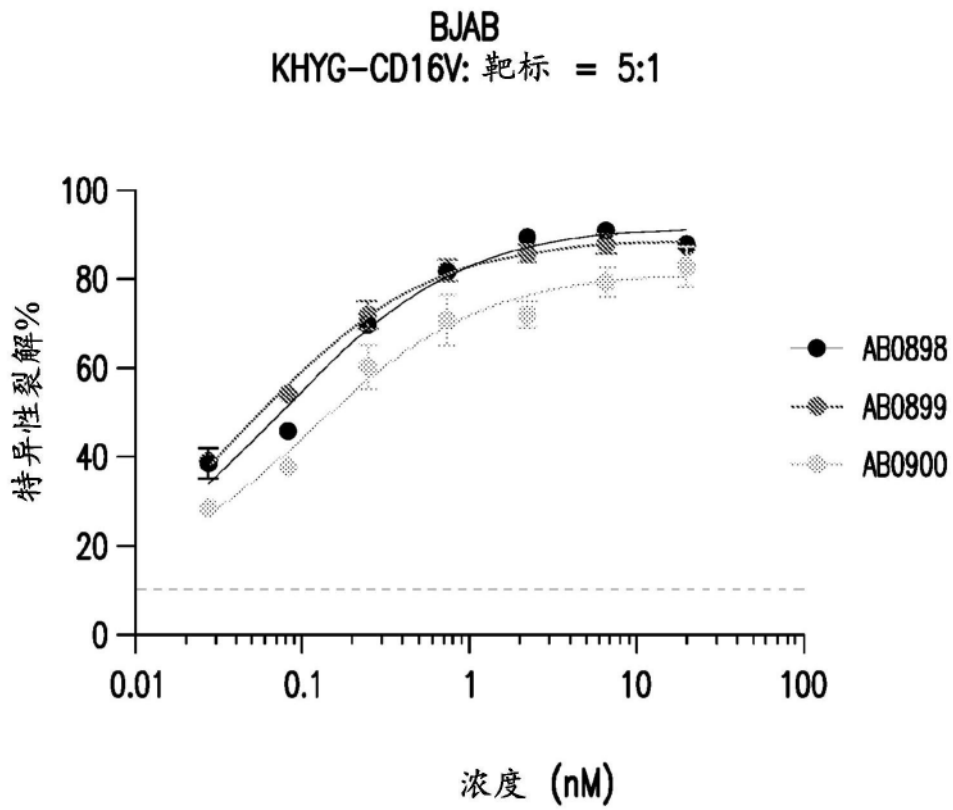
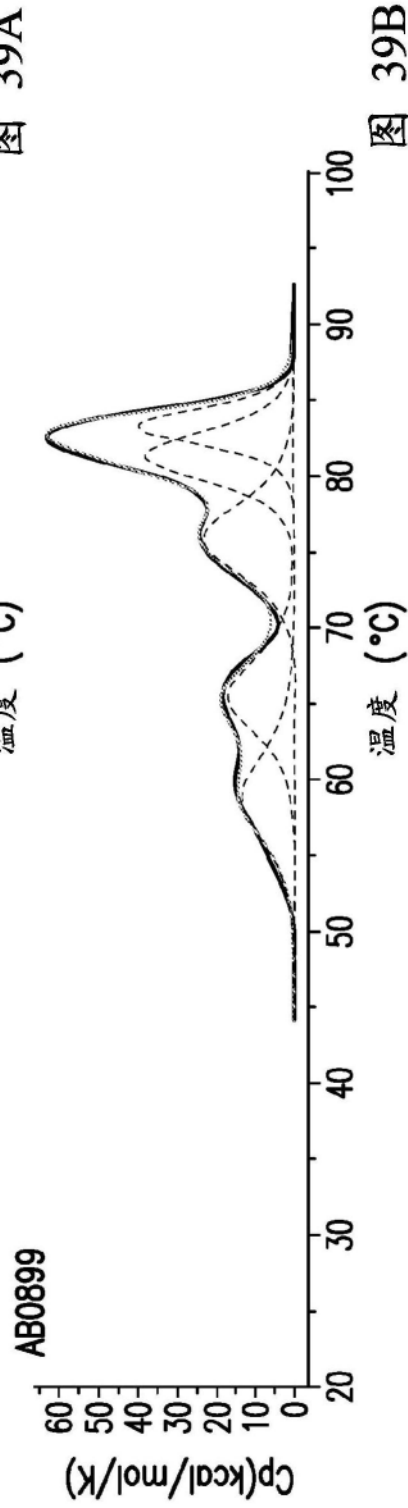
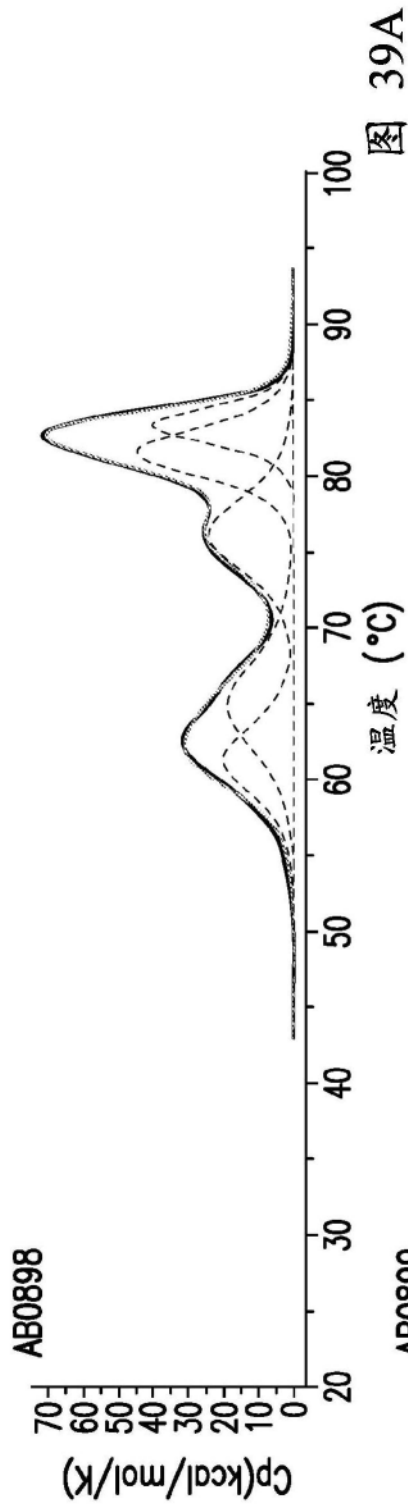


图38



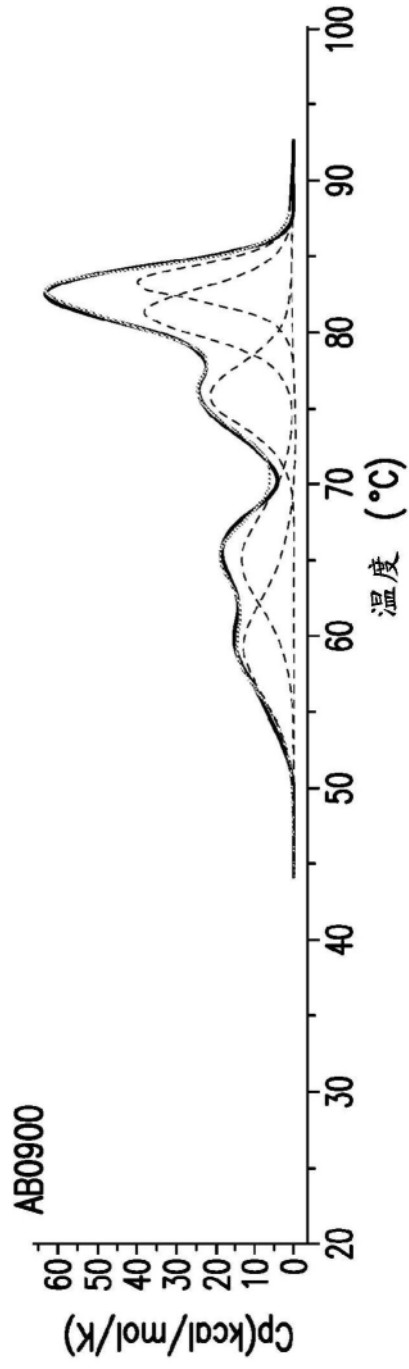


图39C

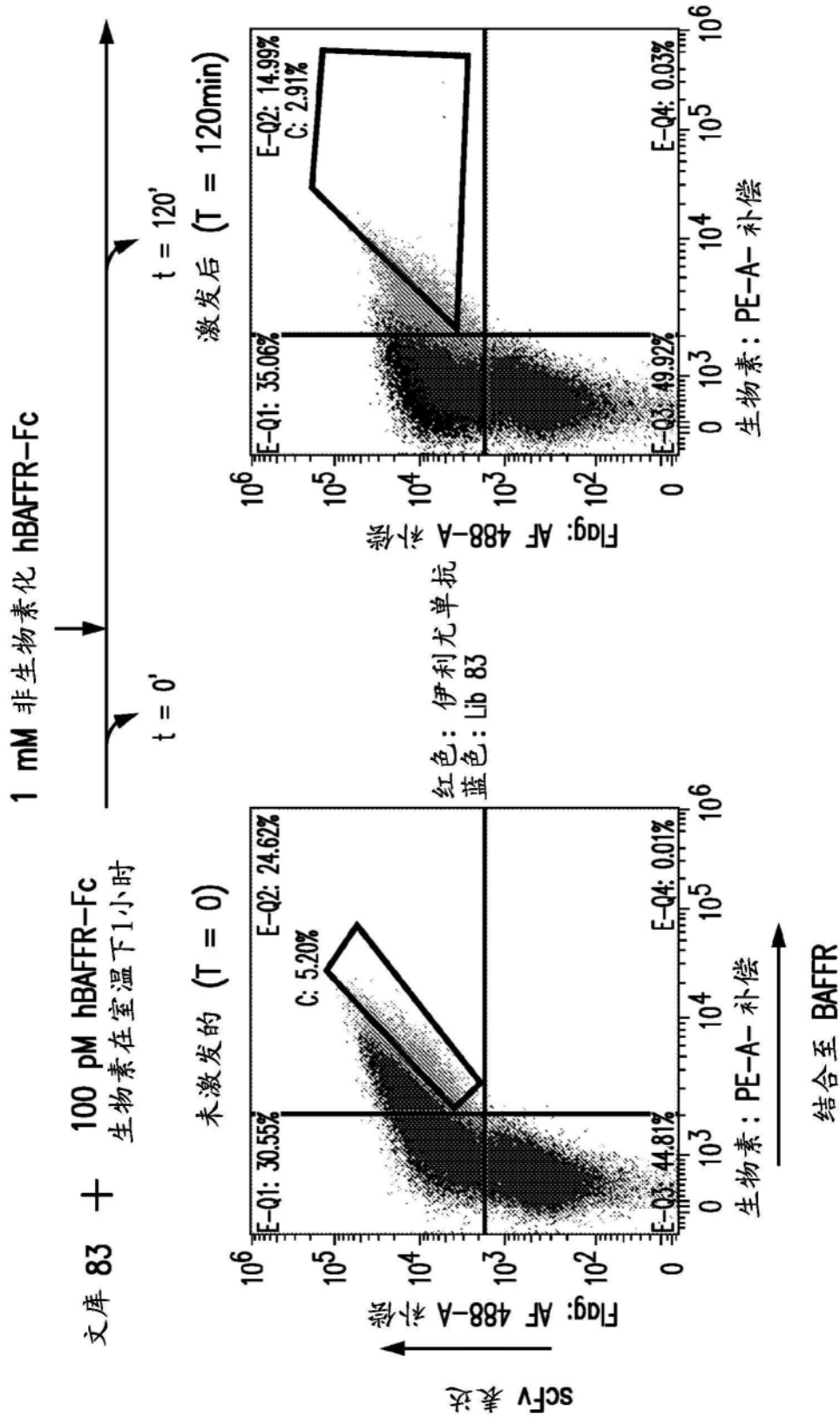


图40

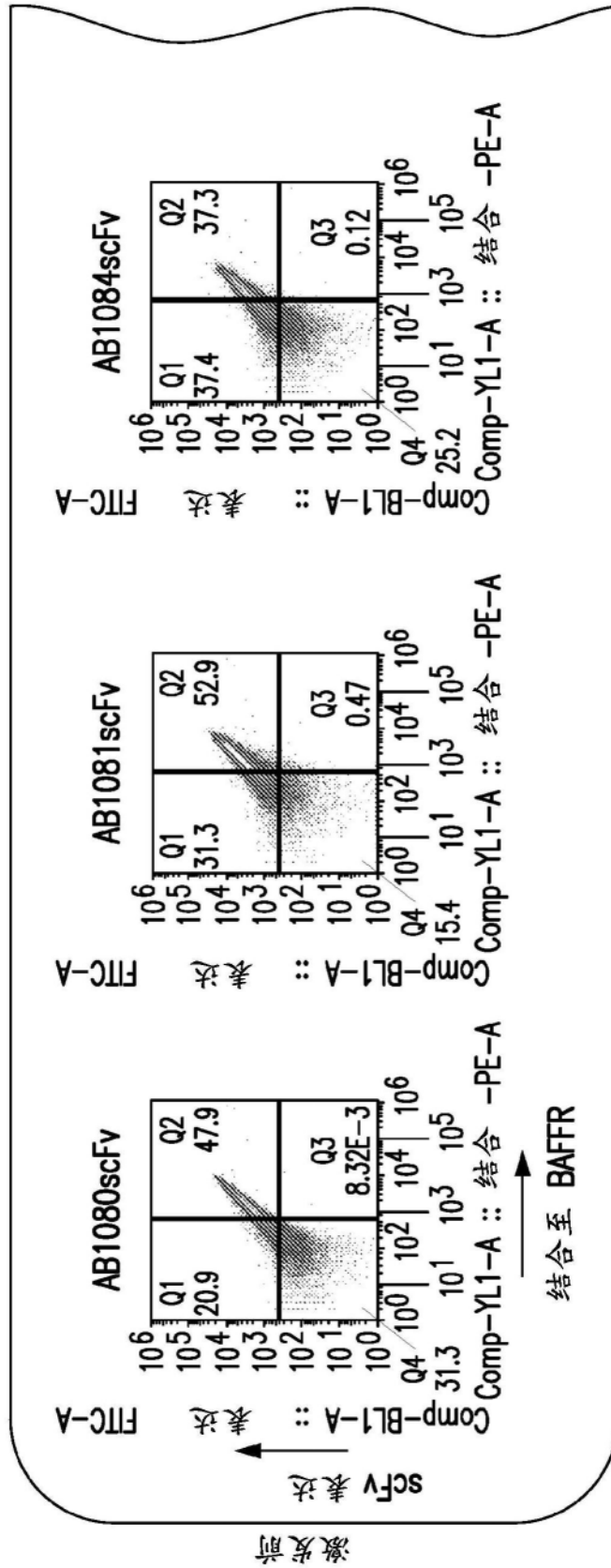


图41A

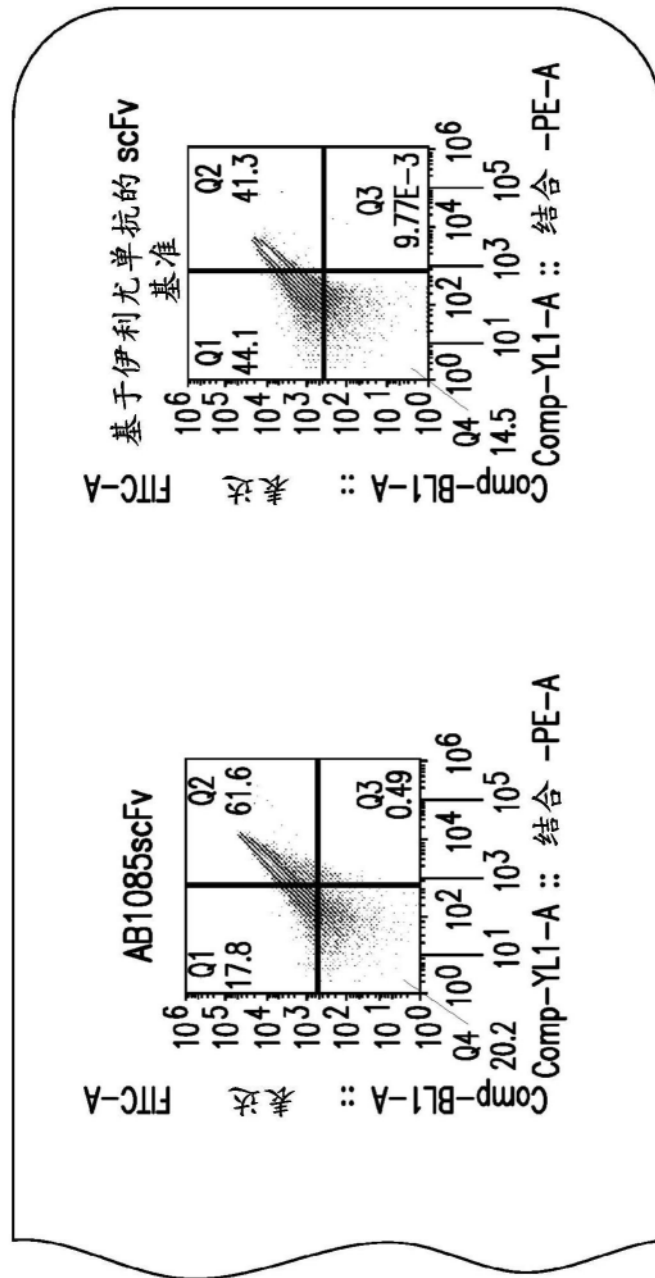


图41A续

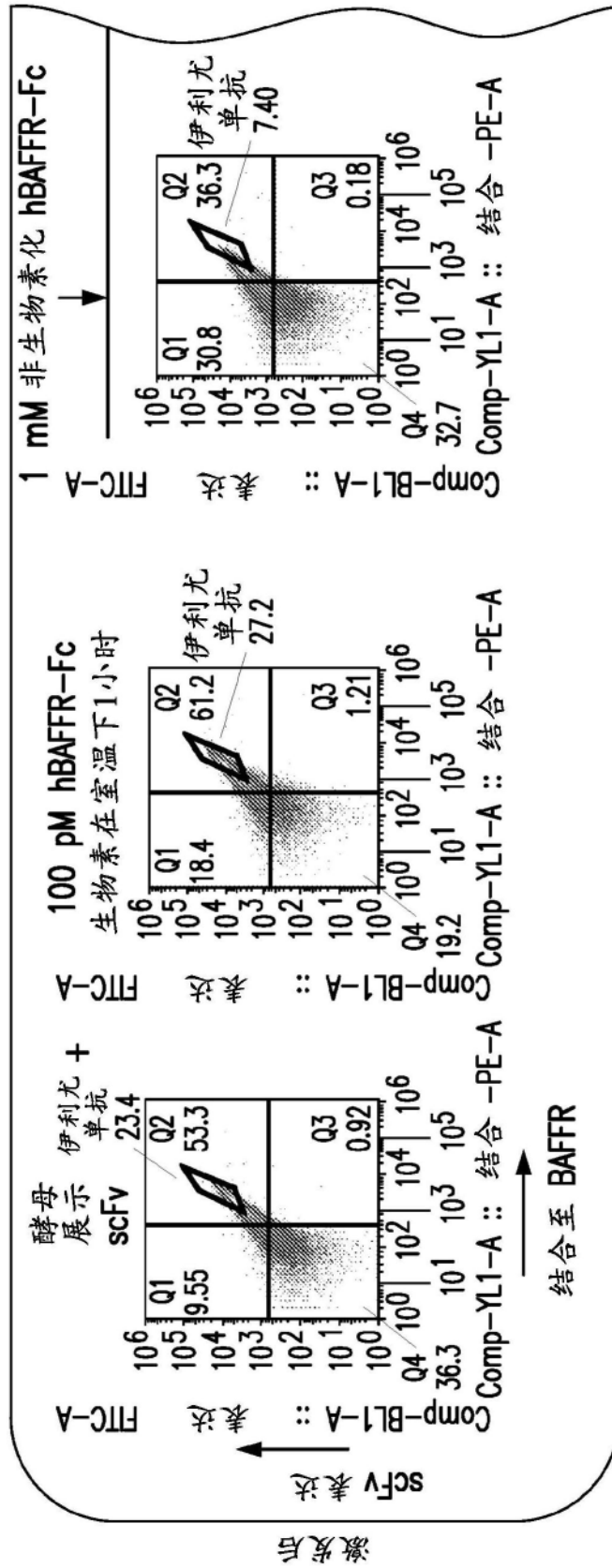


图41B

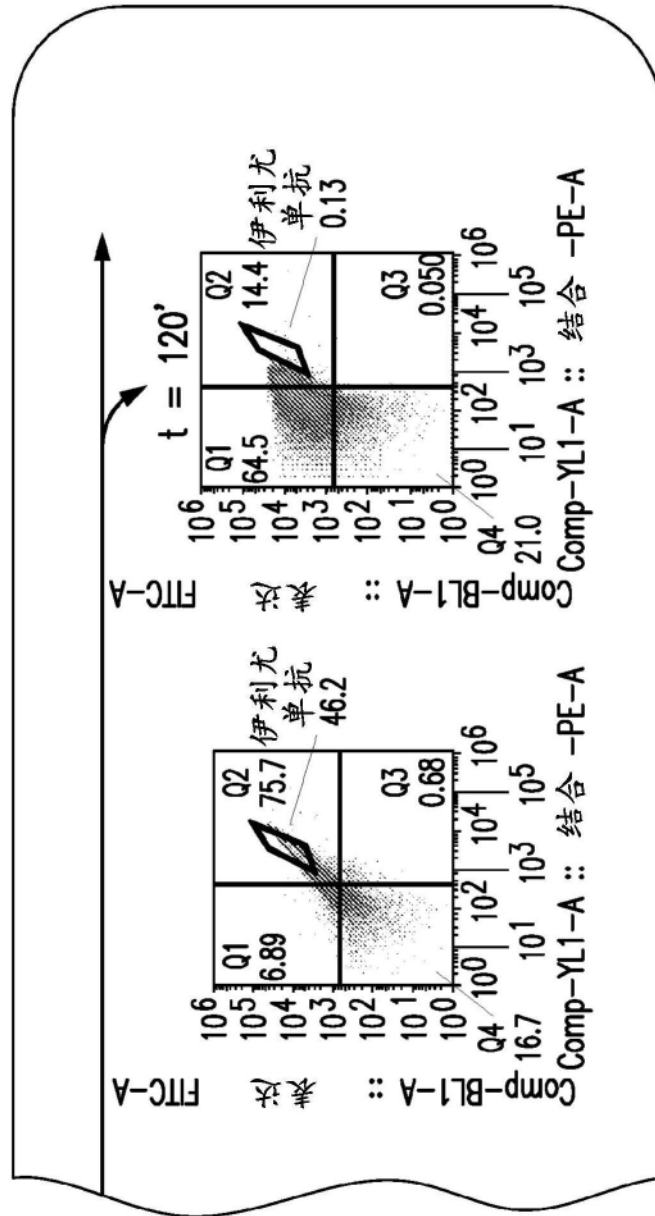
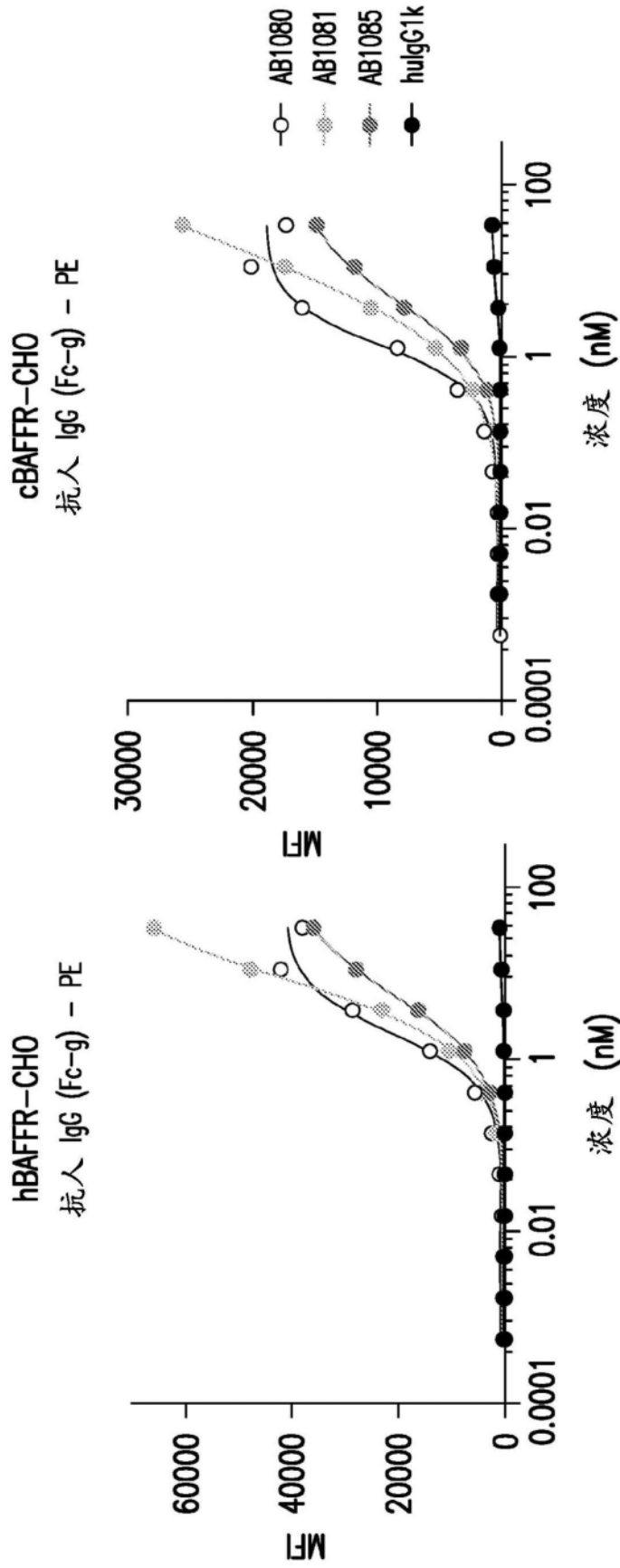


图41B续



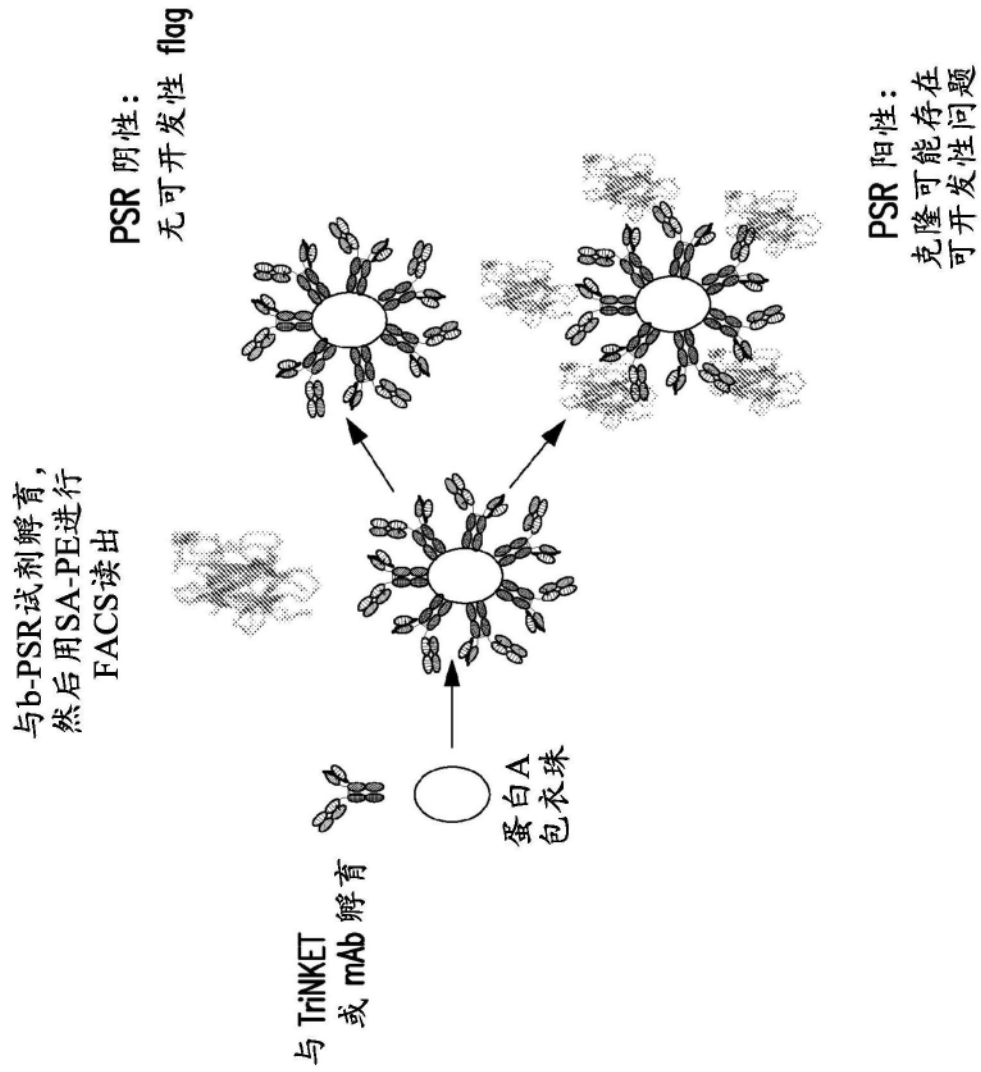


图43A

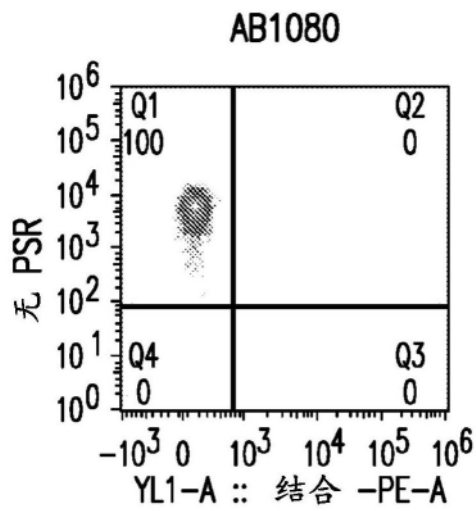


图43B

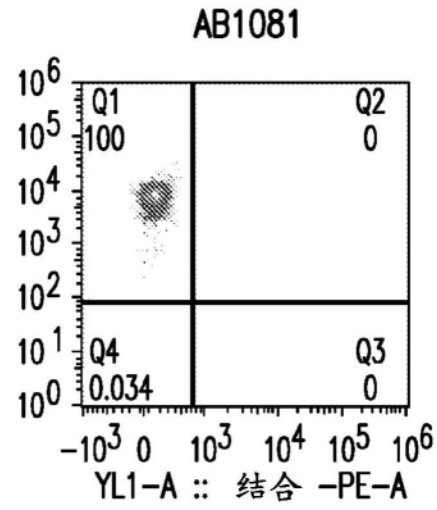


图43C

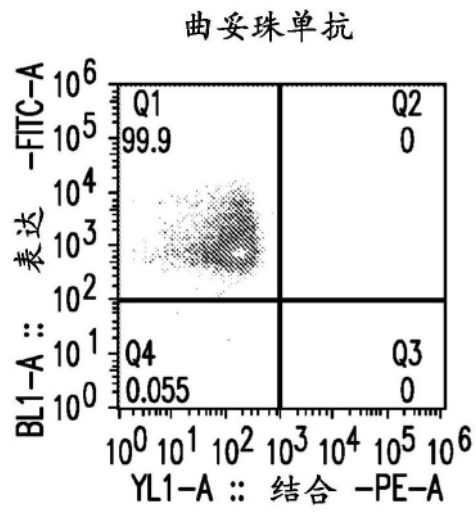


图43D

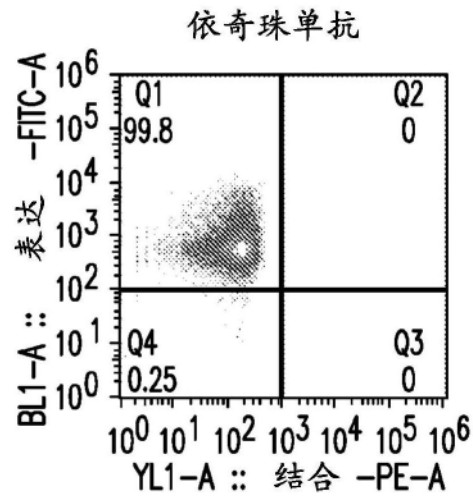


图43E

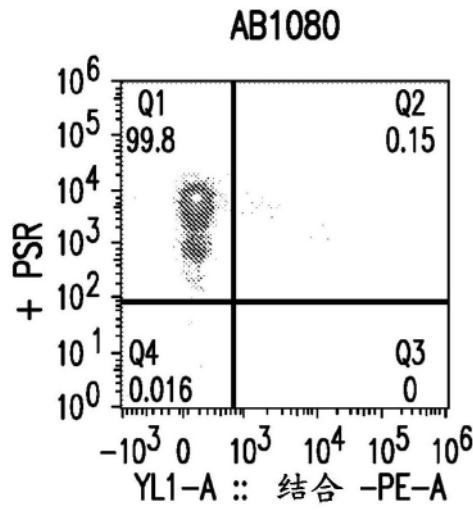


图43F

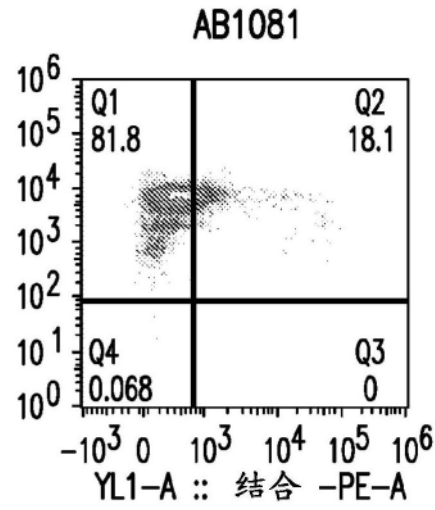


图43G

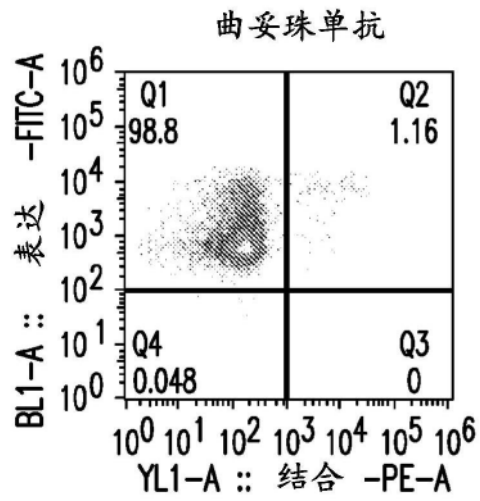


图43H

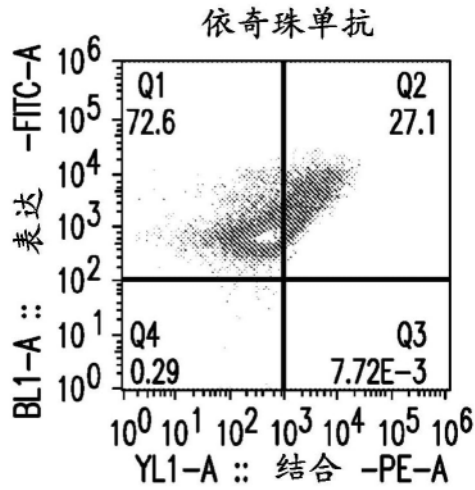


图43I

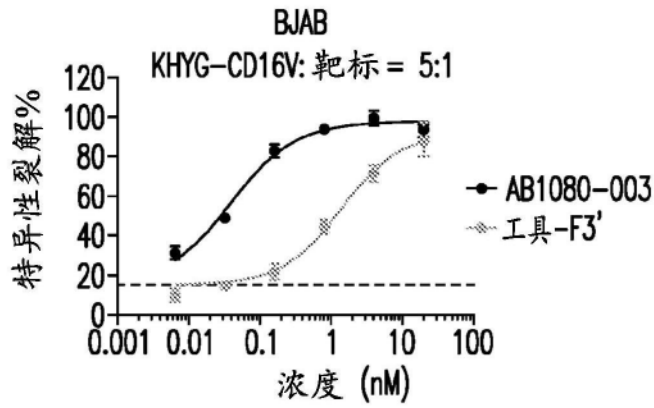


图44A

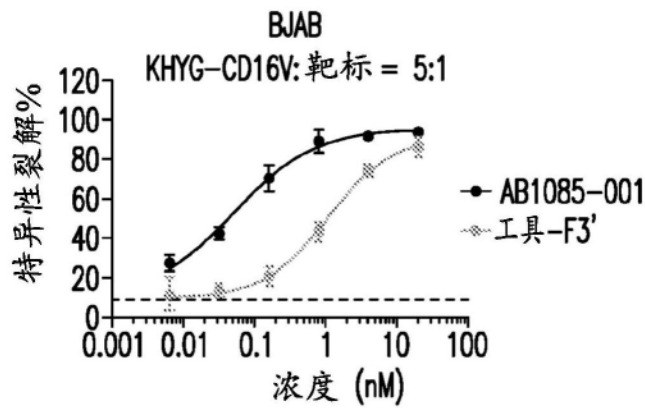


图44B

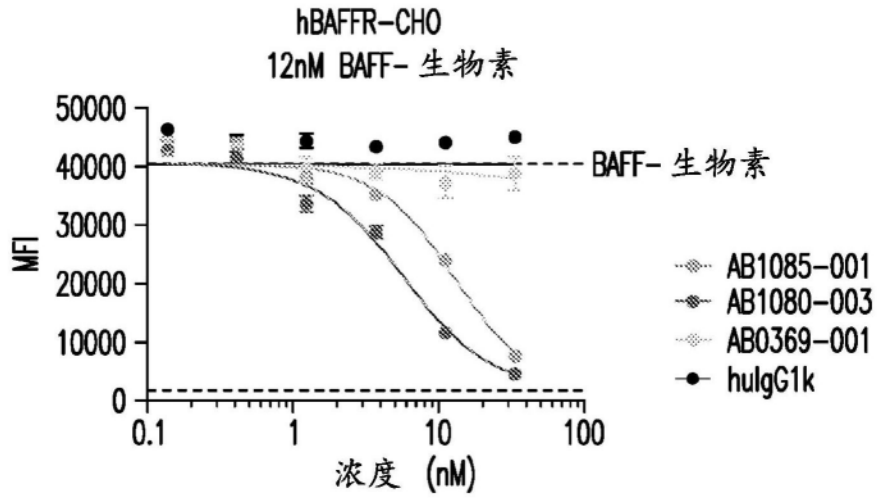


图45

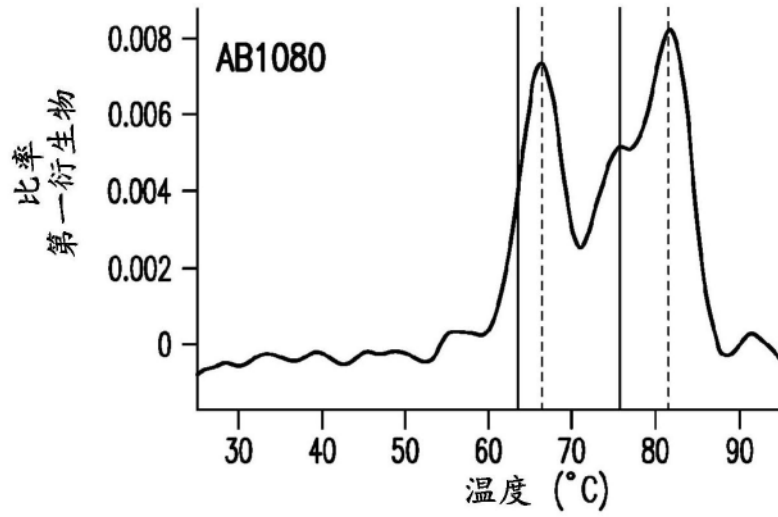


图46A

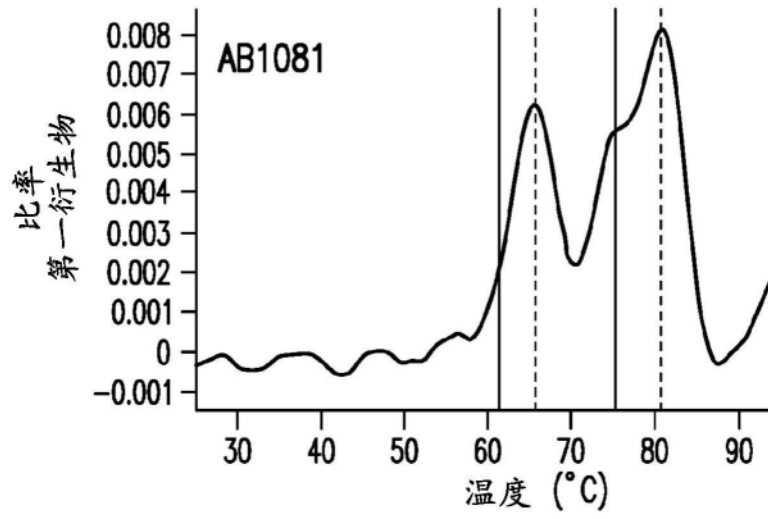


图46B

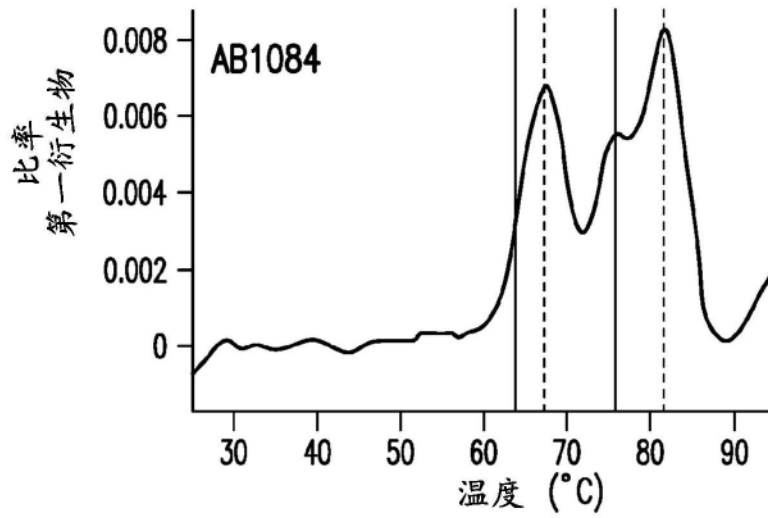


图46C

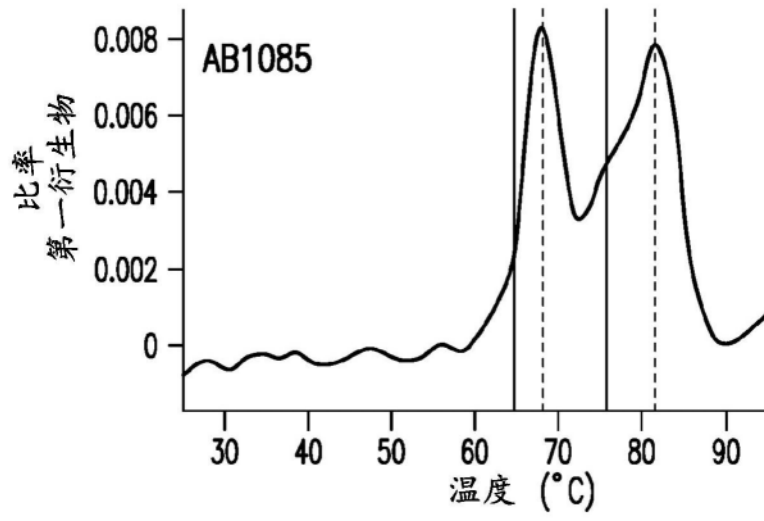


图46D

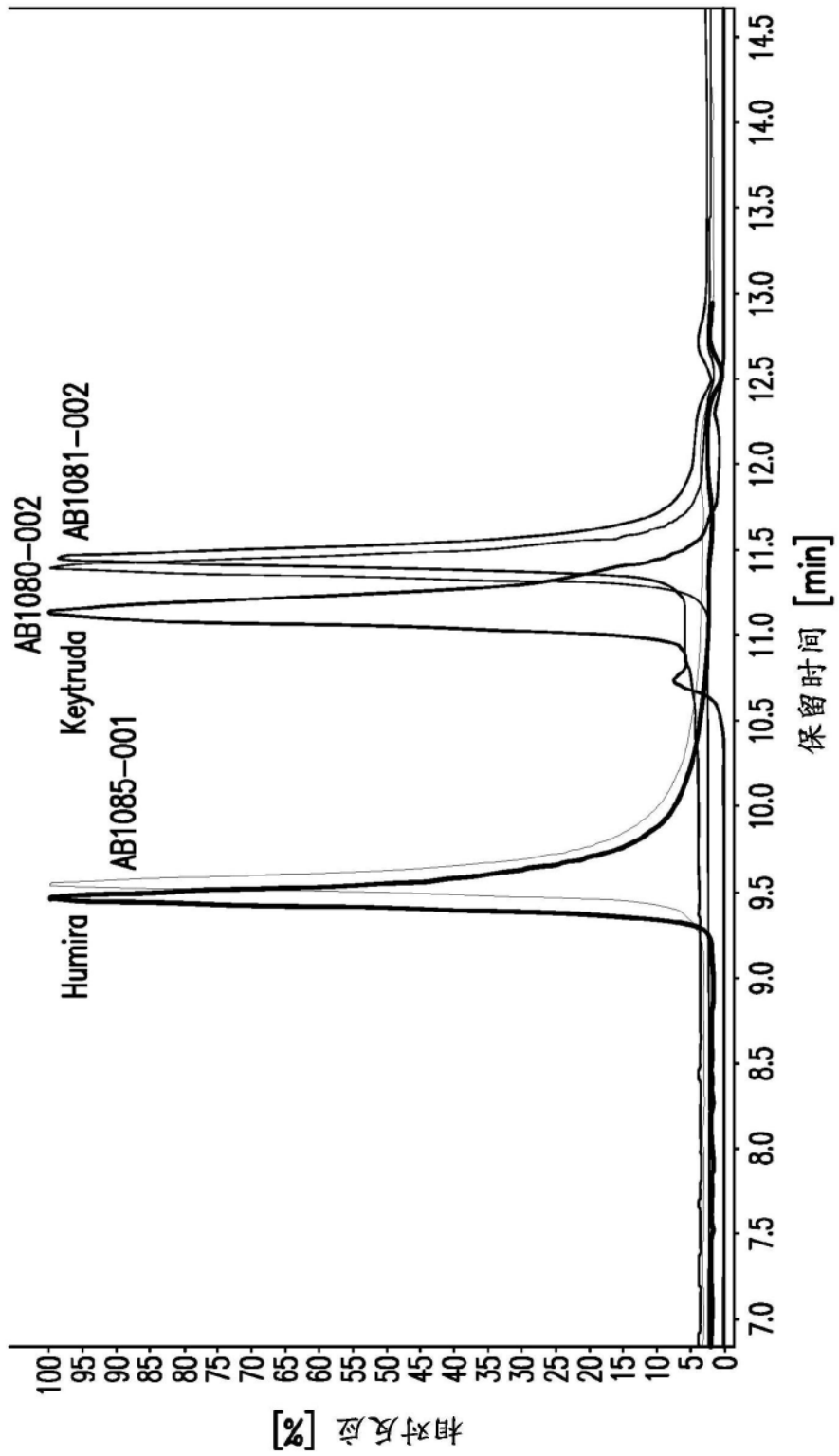


图47

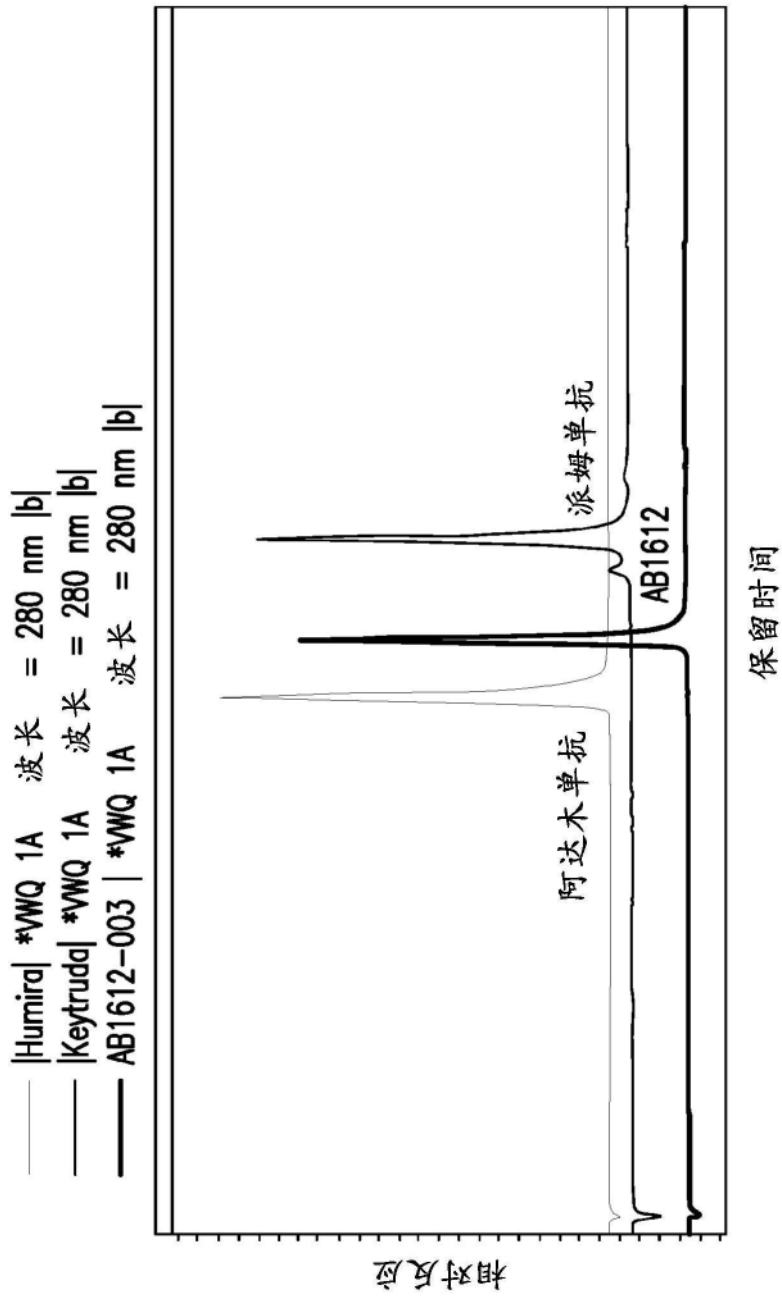


图48

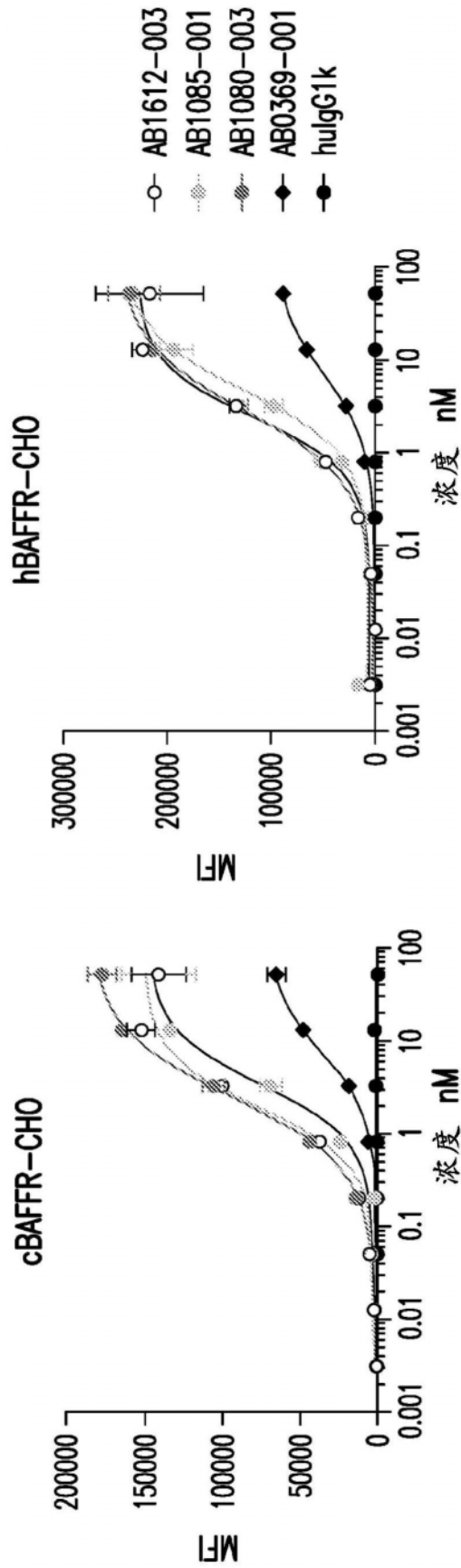


图 49B

图 49A

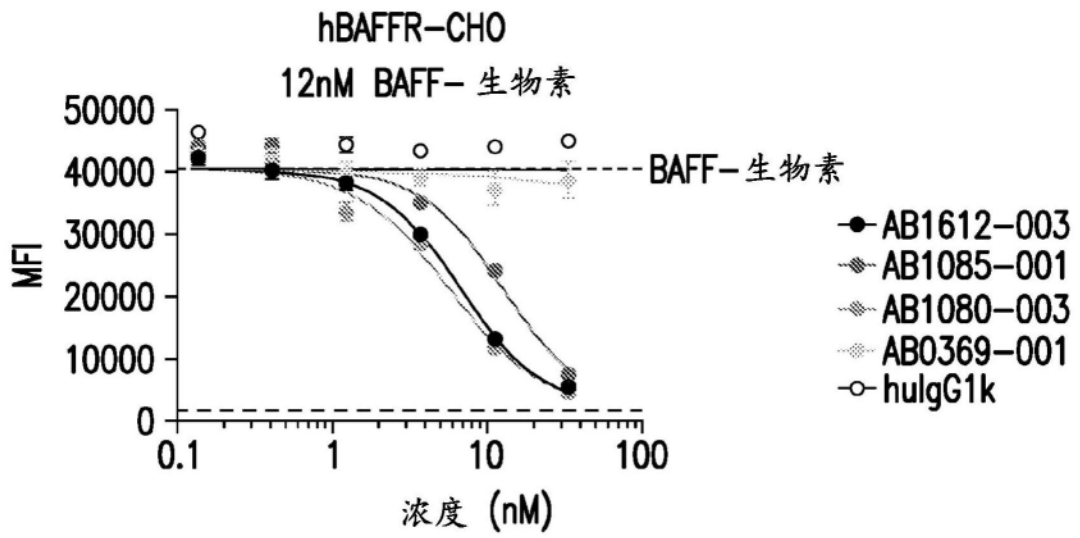
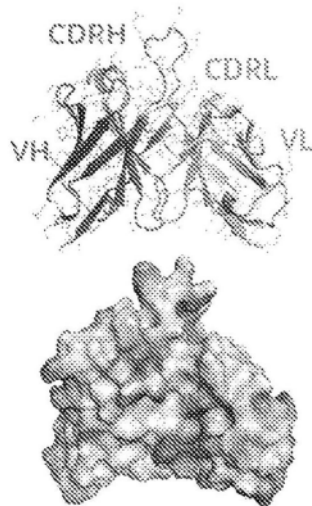
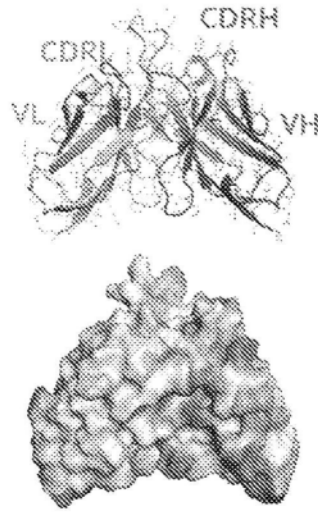


图50



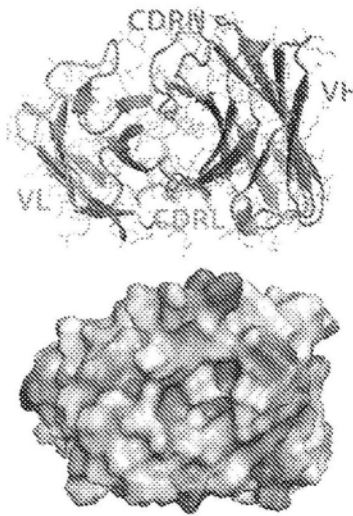
红色：带负电

图51A



蓝色：带正电

图51B



白色：疏水

图51C

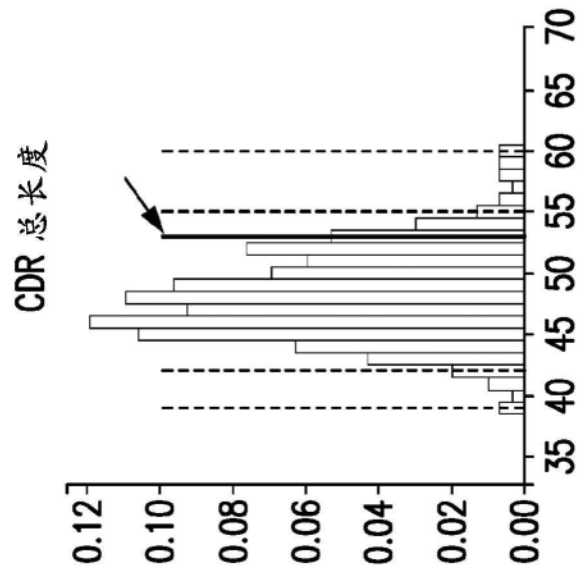


图52A

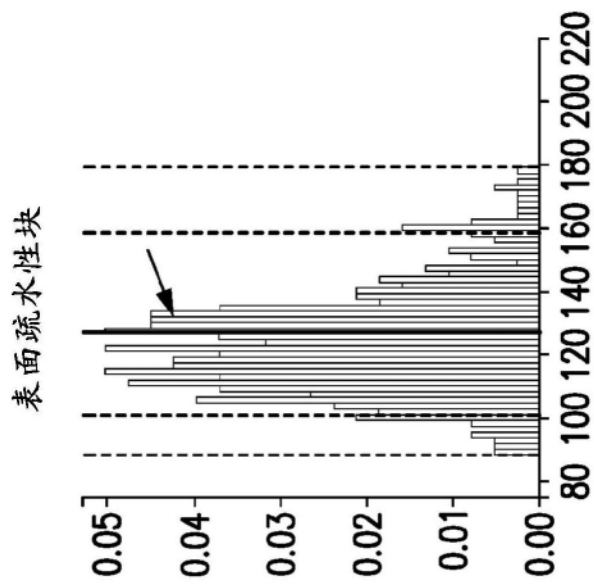


图52B

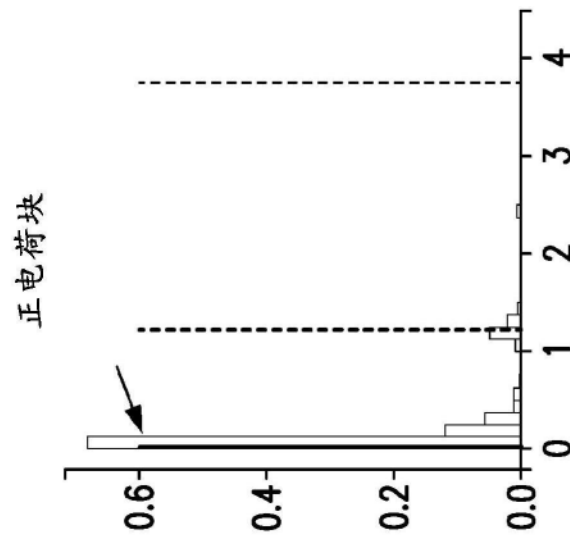


图52C

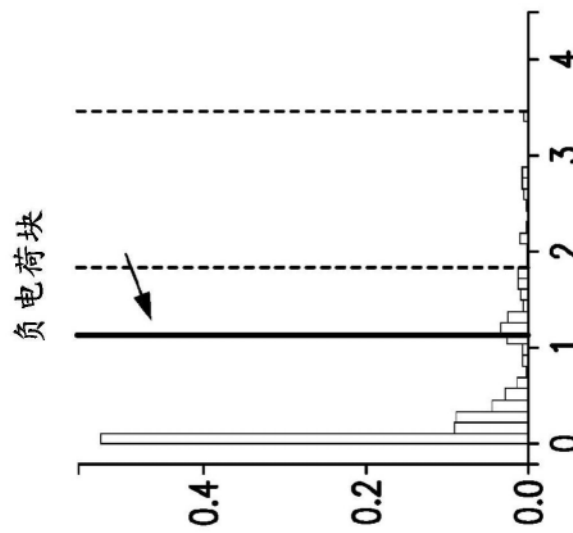


图52D

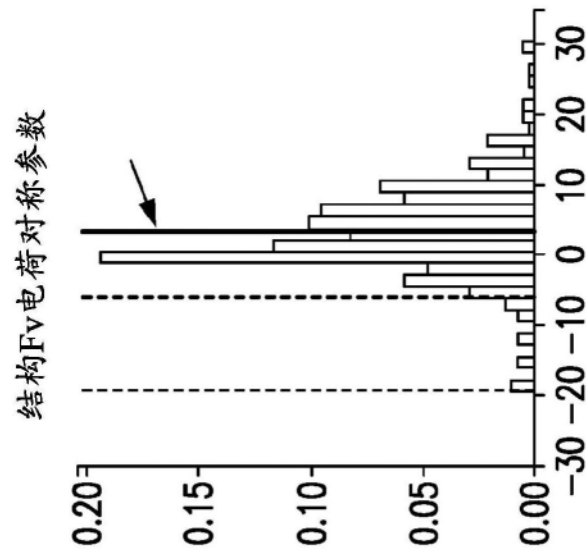


图52E

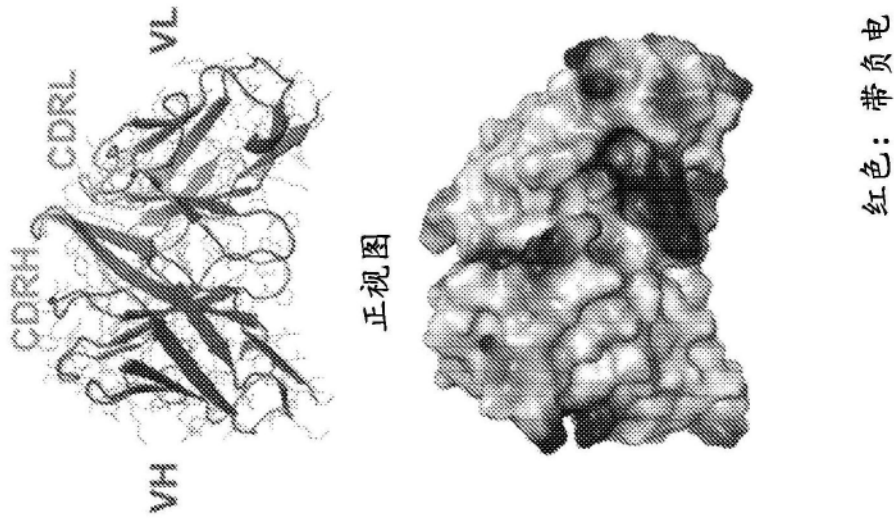


图53A

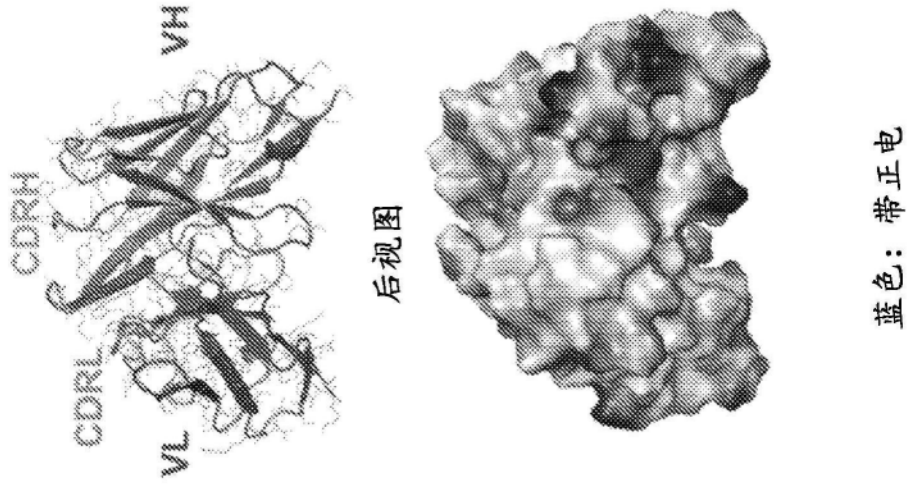


图53B

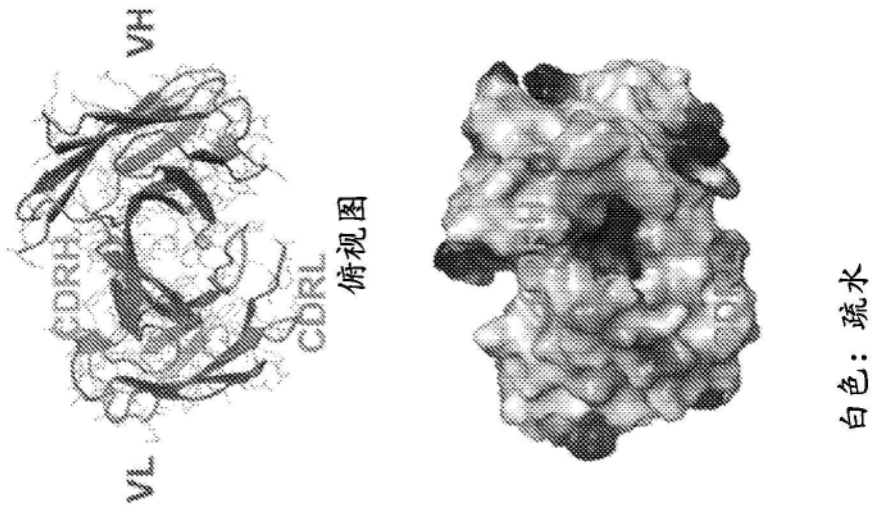


图53C

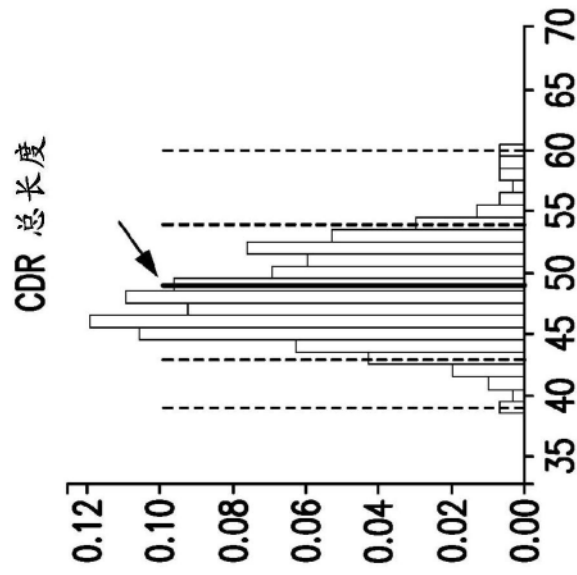


图54A

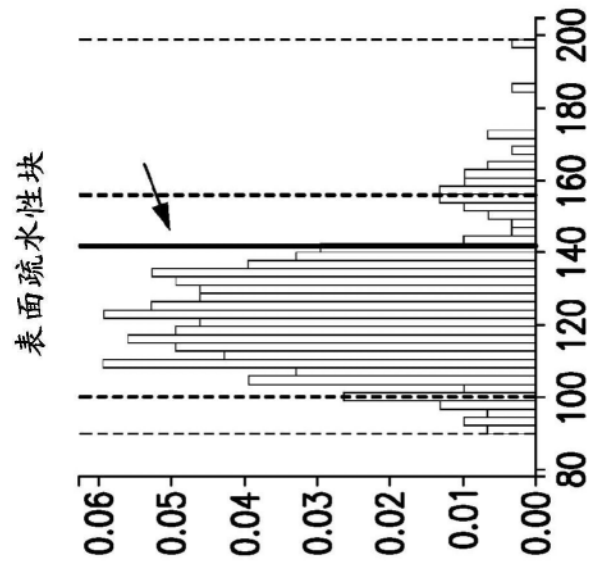


图54B

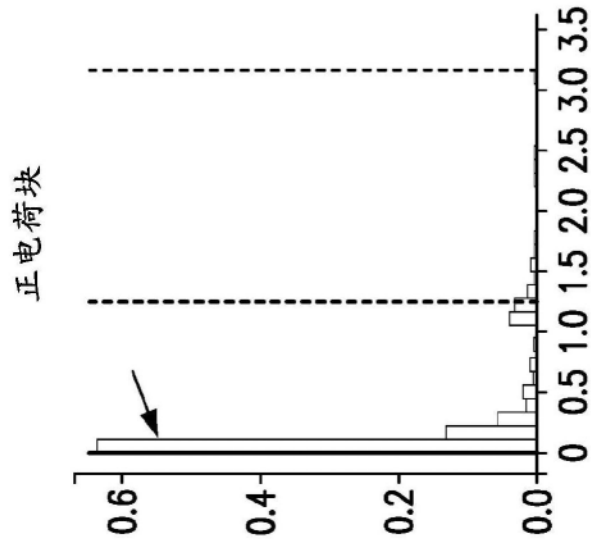


图54C

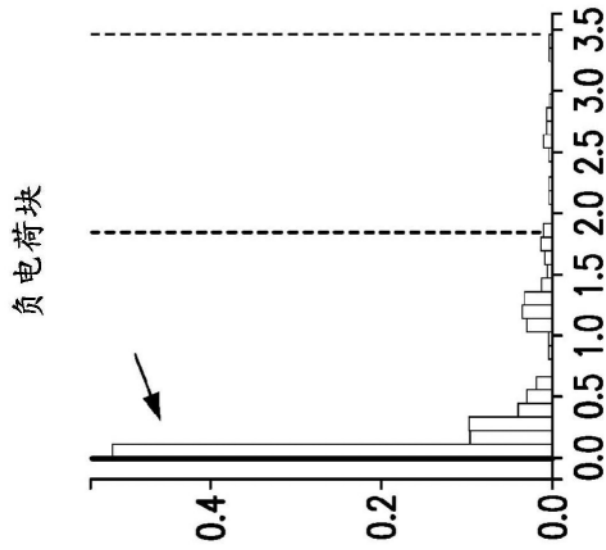


图54D

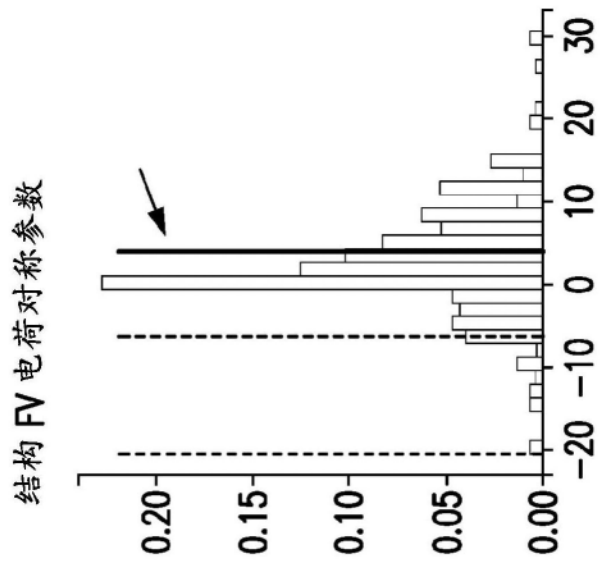


图54E

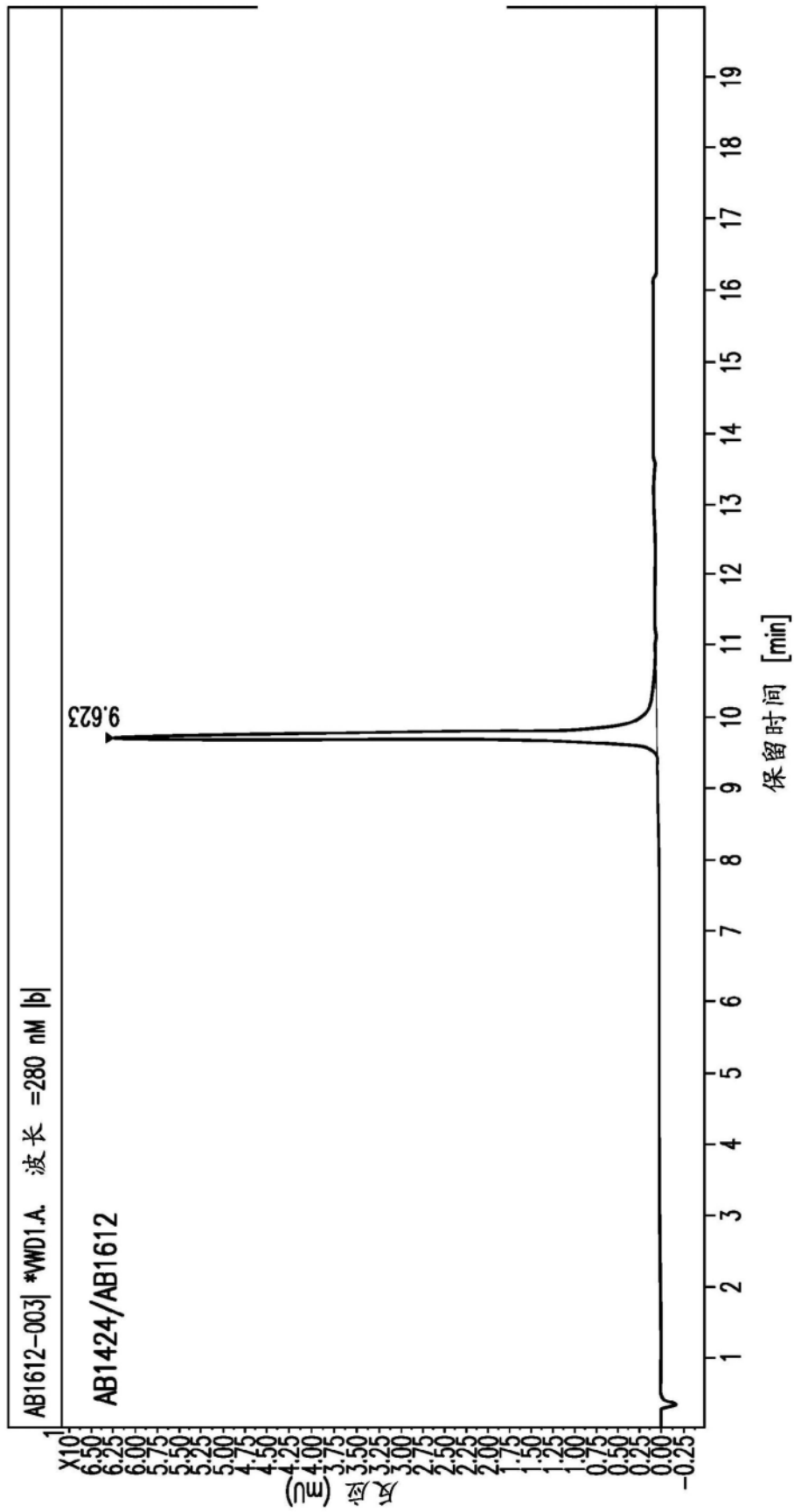


图55A

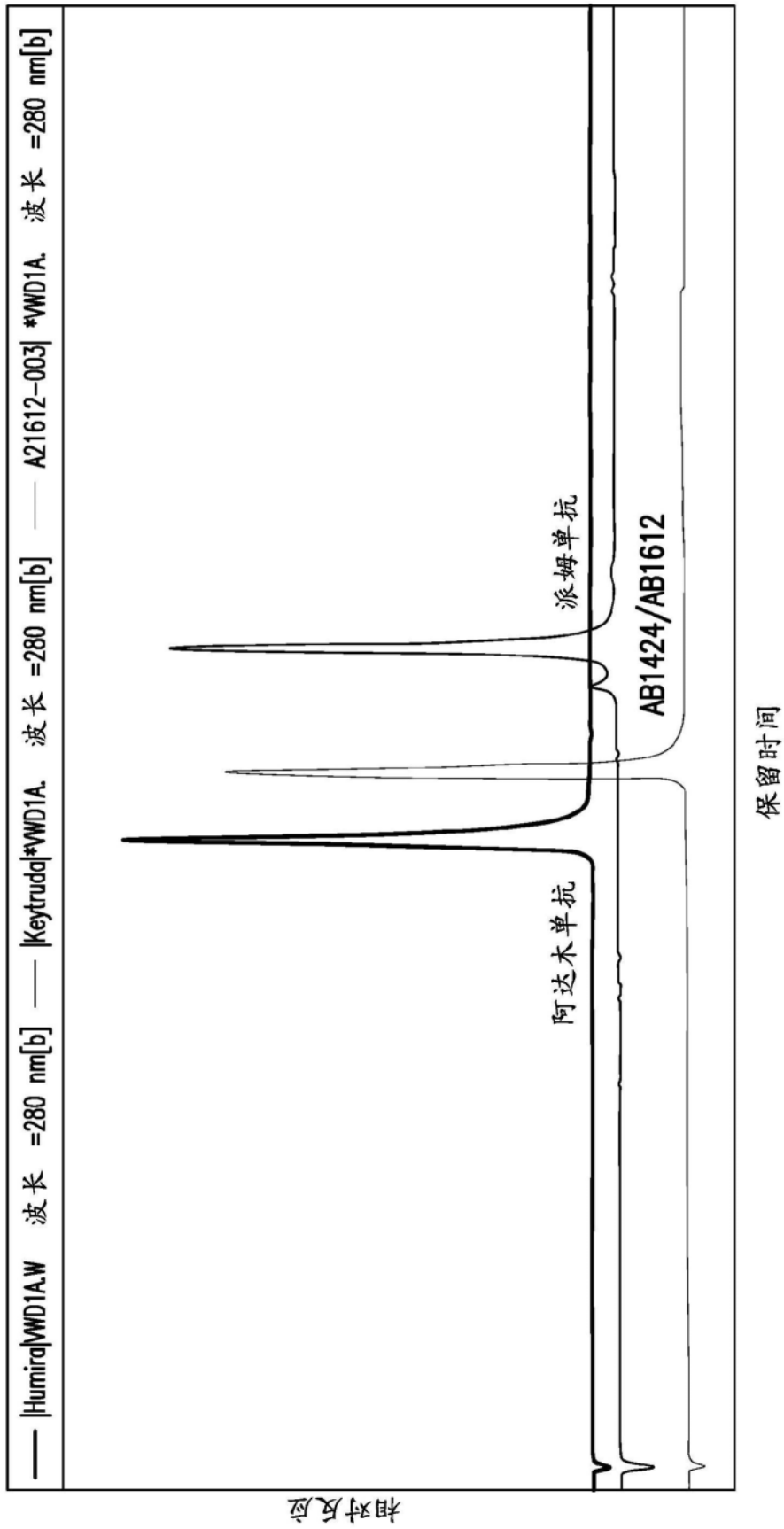


图55B

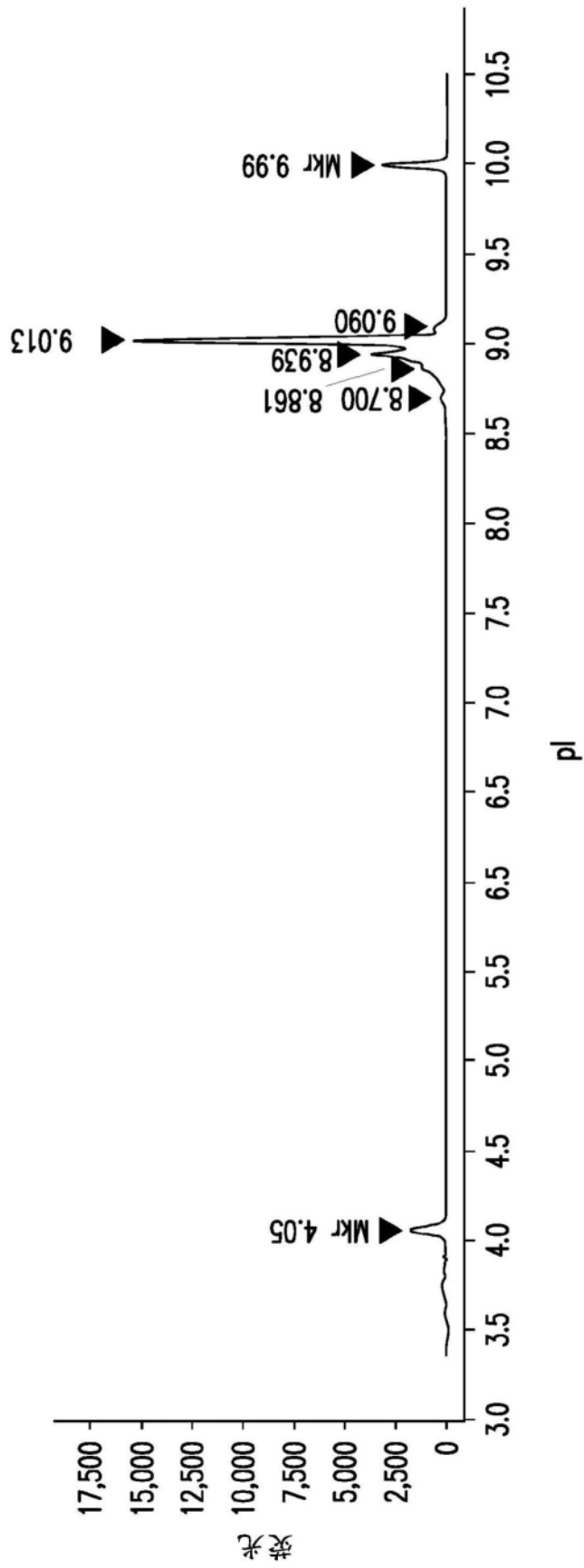


图56

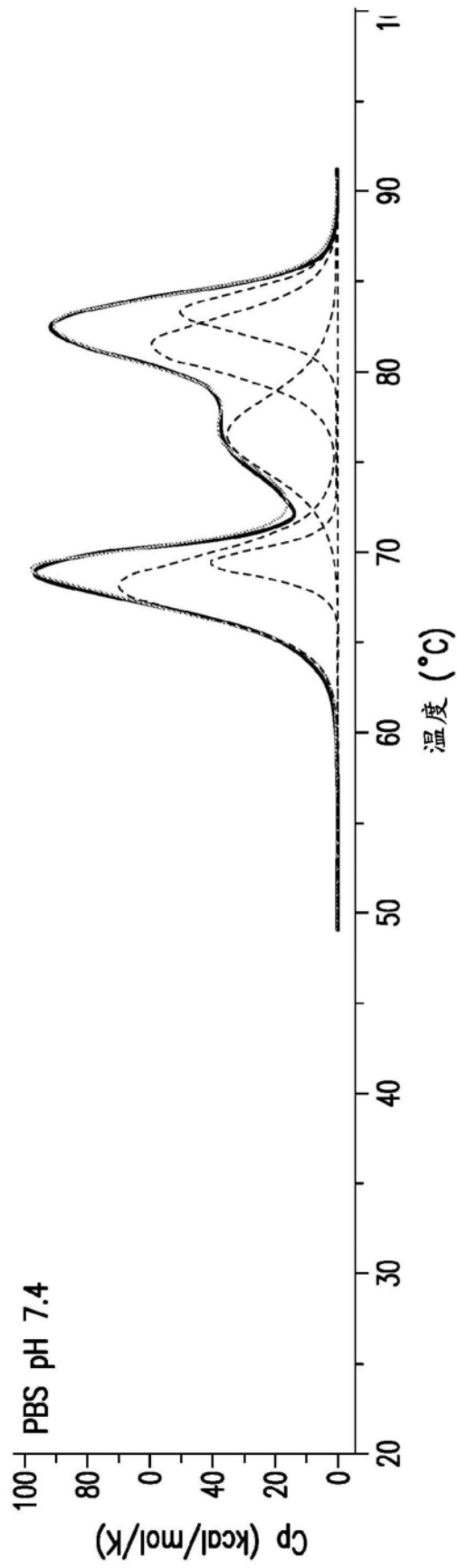


图57A

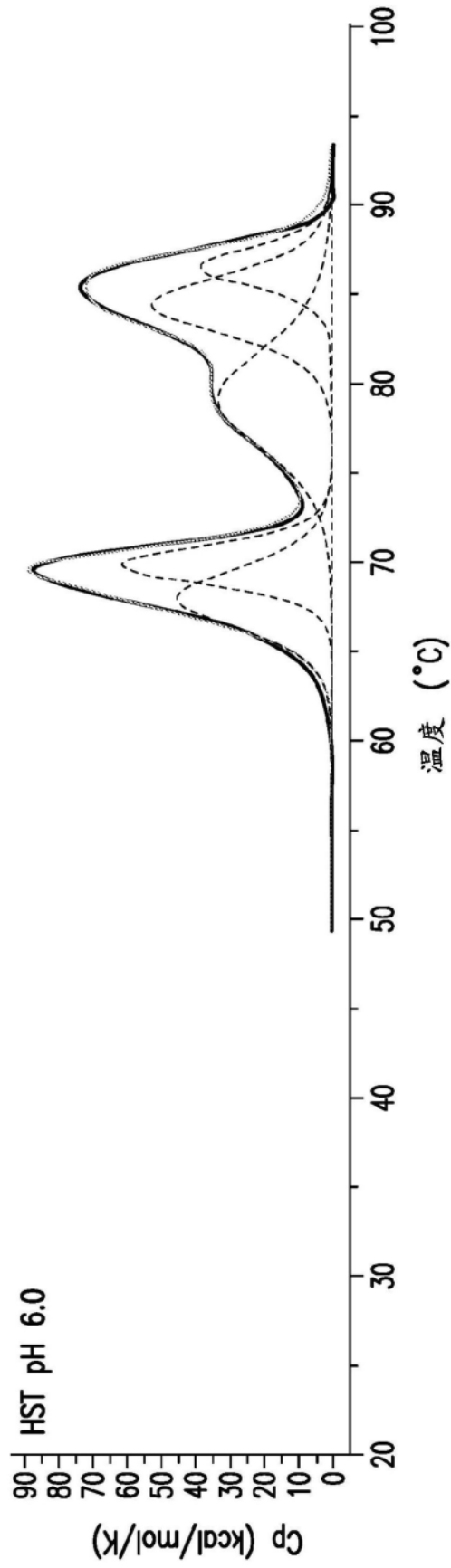


图57B

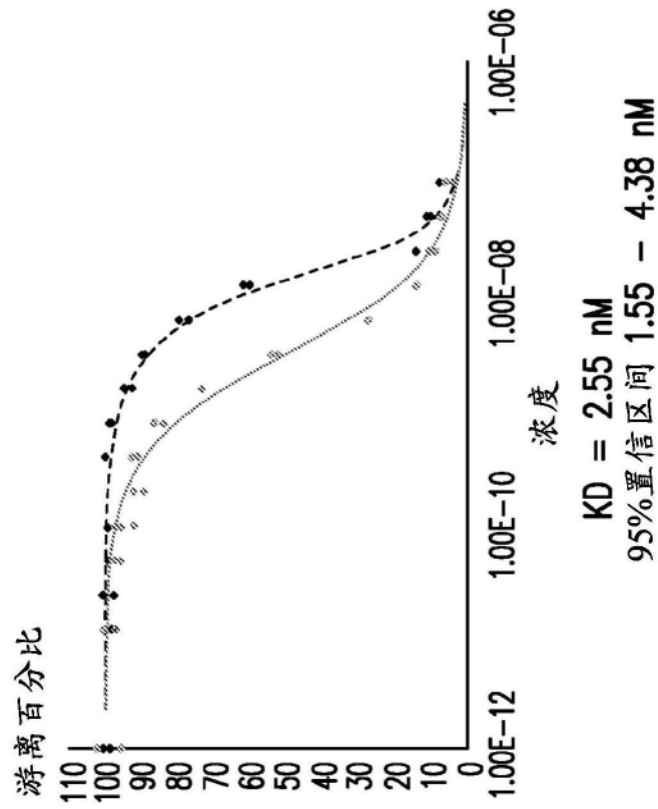


图58A

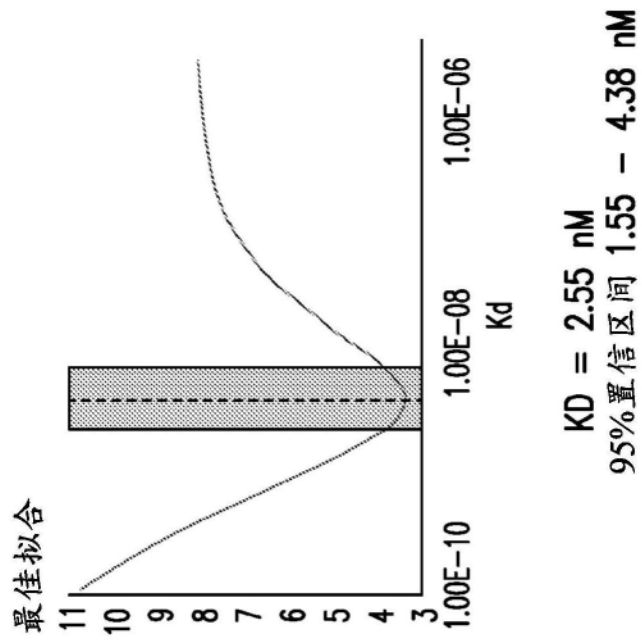


图58B

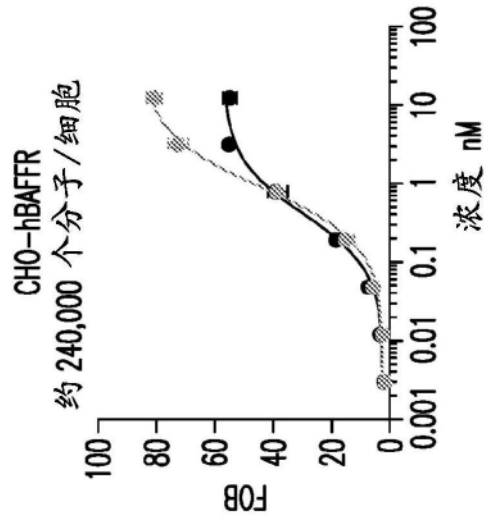


图59A

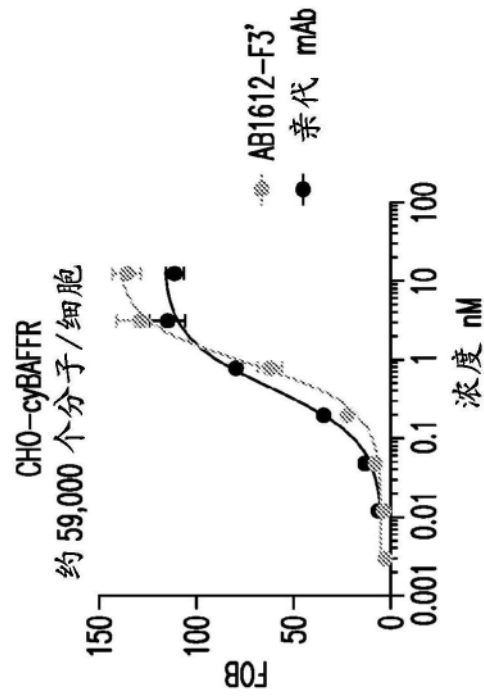


图59B

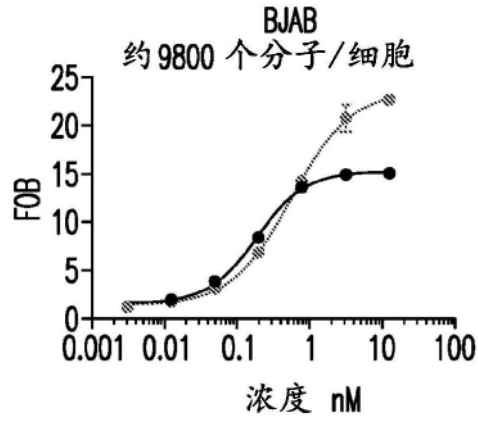


图60A

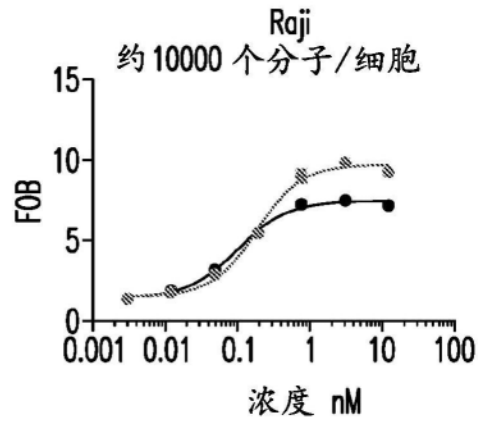


图60B

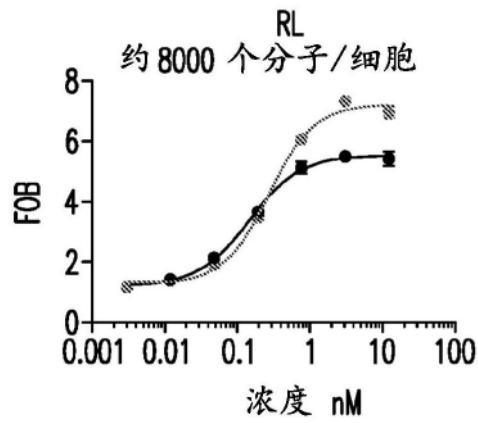


图60C

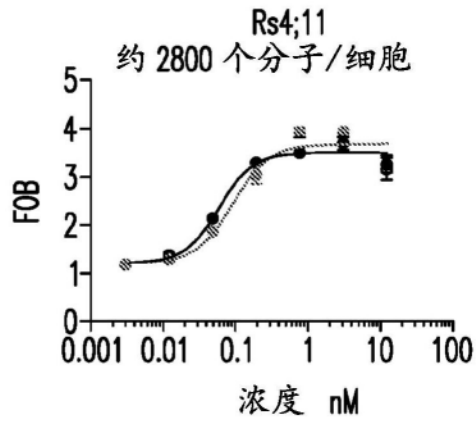


图60D

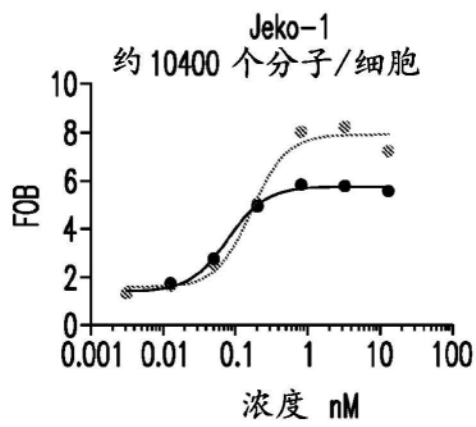


图60E

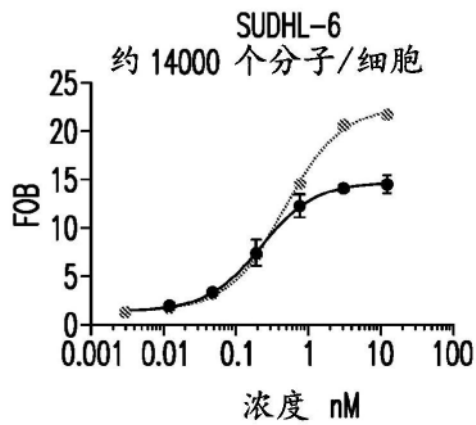


图60F

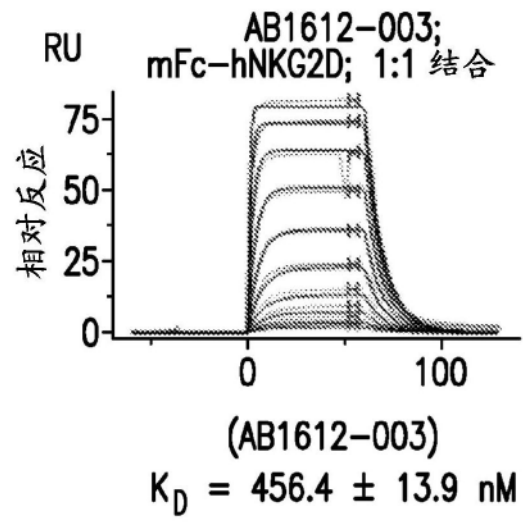


图61A

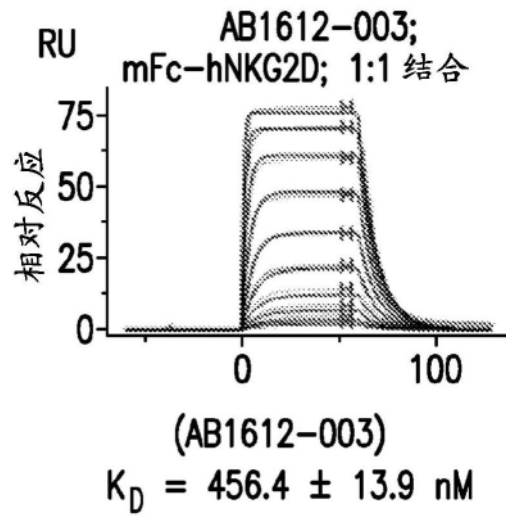


图61B

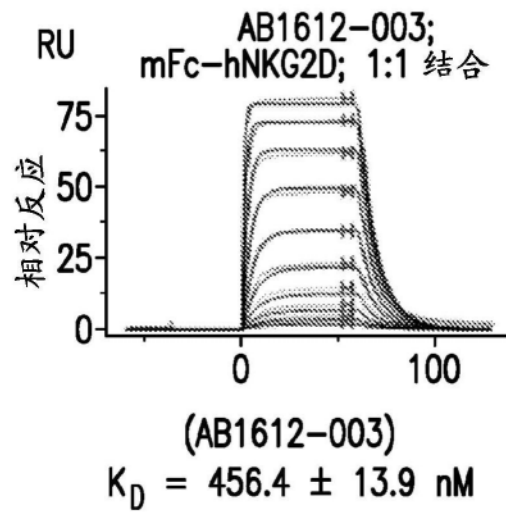


图61C

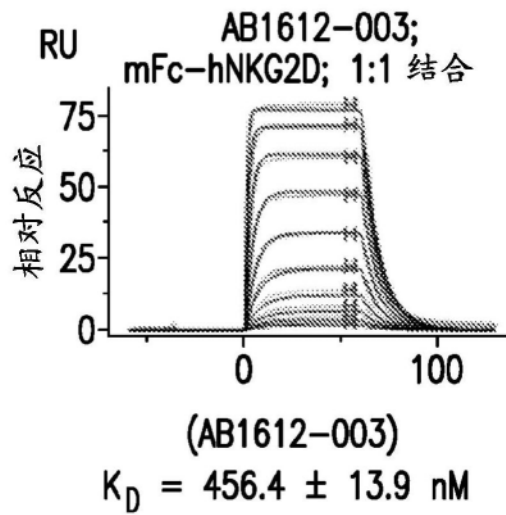


图61D

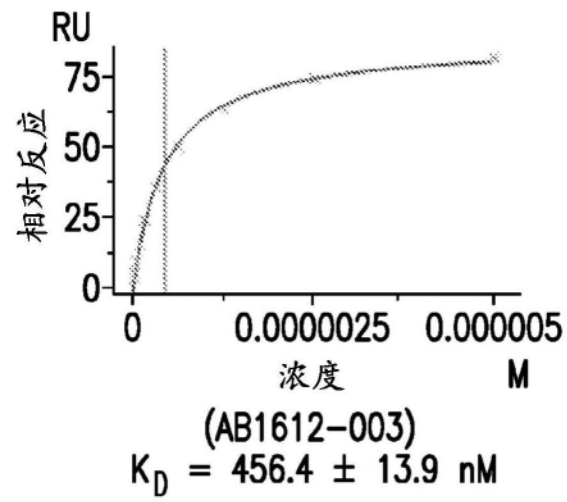


图61E

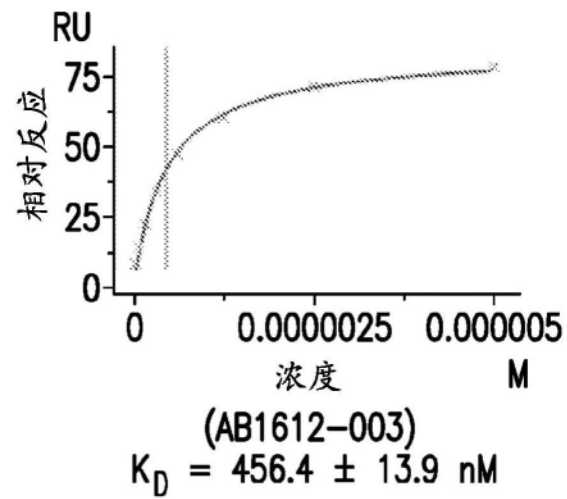


图61F

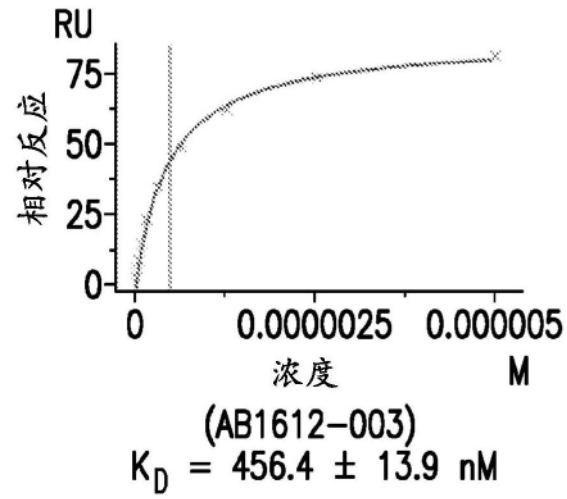


图61G

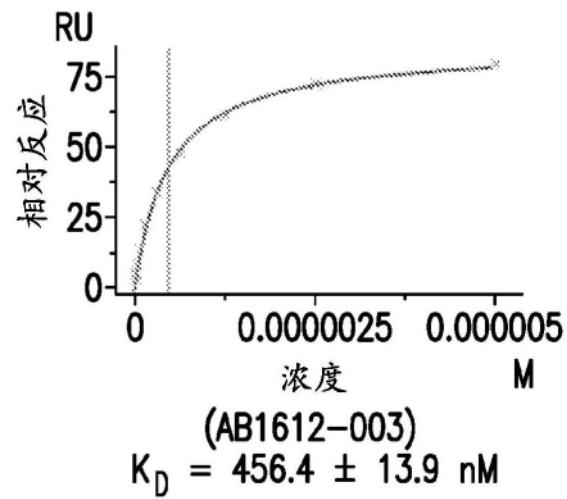


图61H

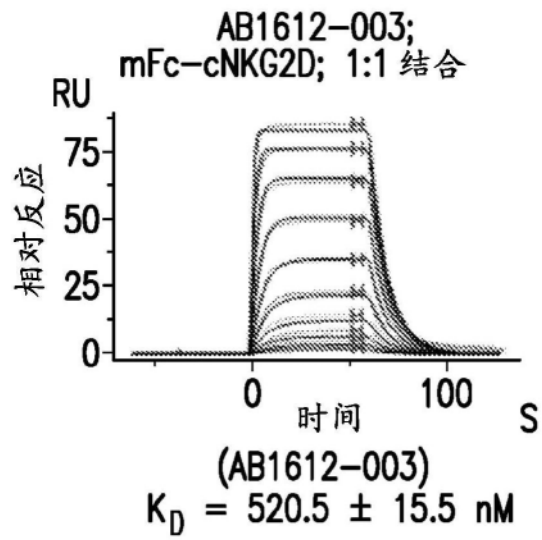


图62A

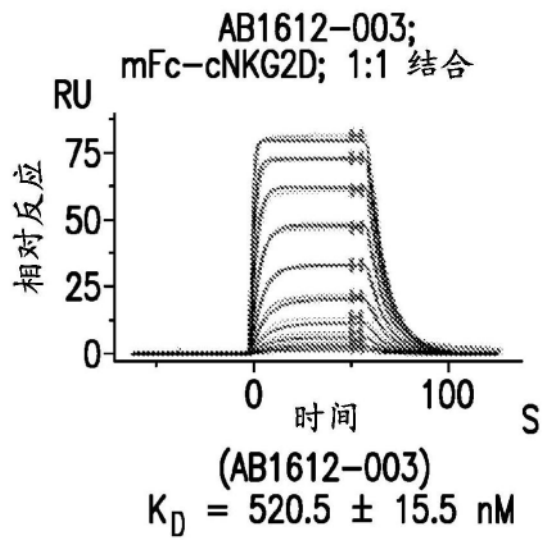


图62B

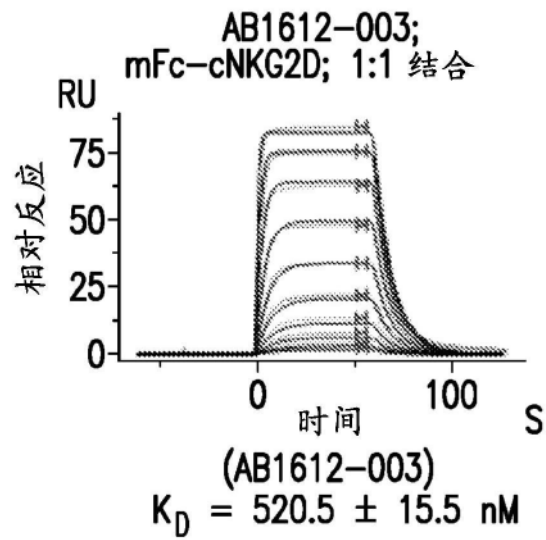


图62C

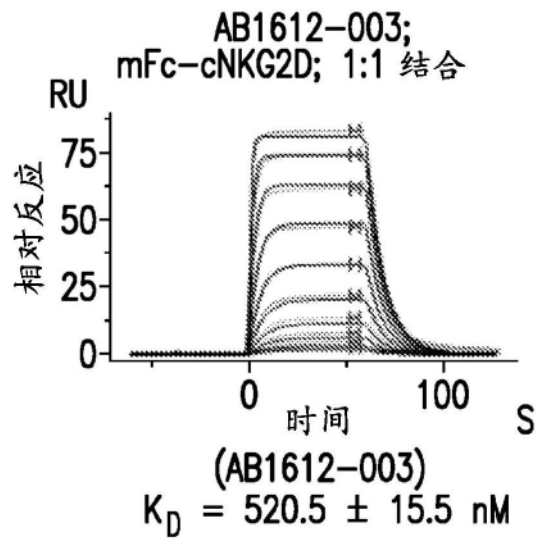
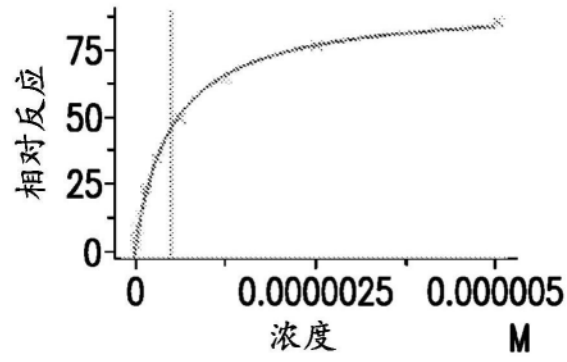
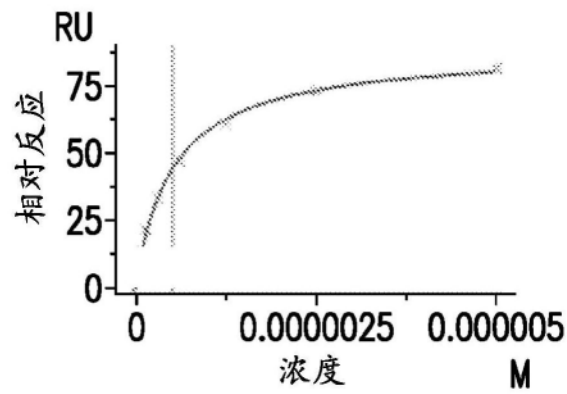


图62D



(AB1612-003)  
 $K_D = 520.5 \pm 15.5 \text{ nM}$

图62E



(AB1612-003)  
 $K_D = 520.5 \pm 15.5 \text{ nM}$

图62F

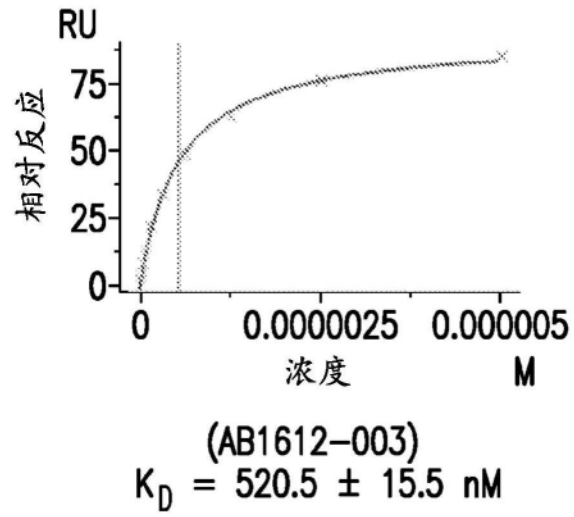


图62G

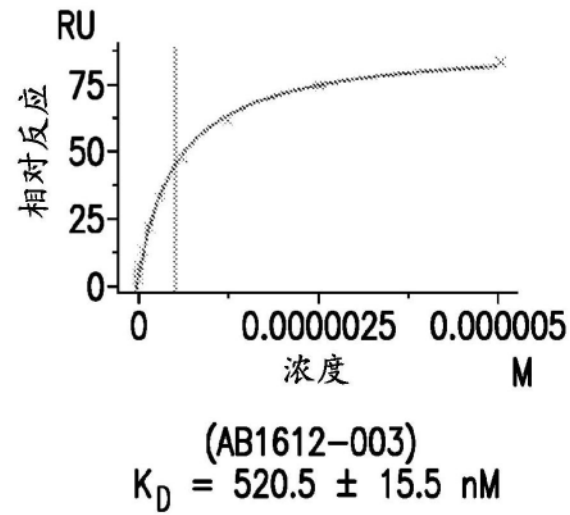


图62H

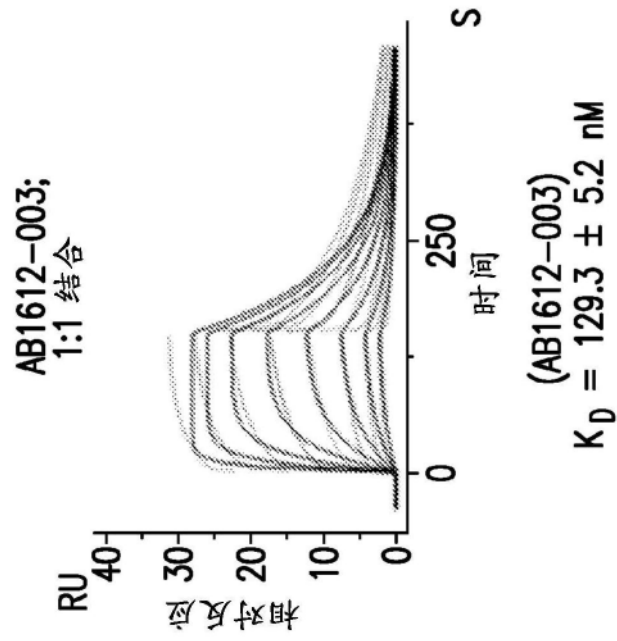


图63A

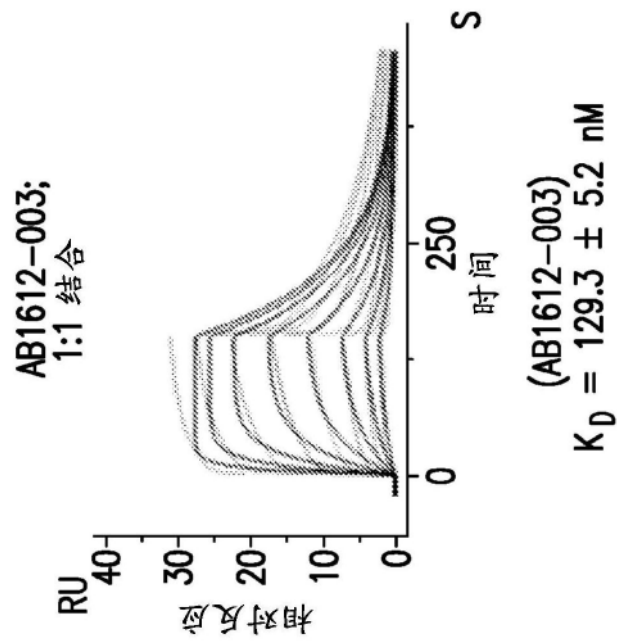


图63B

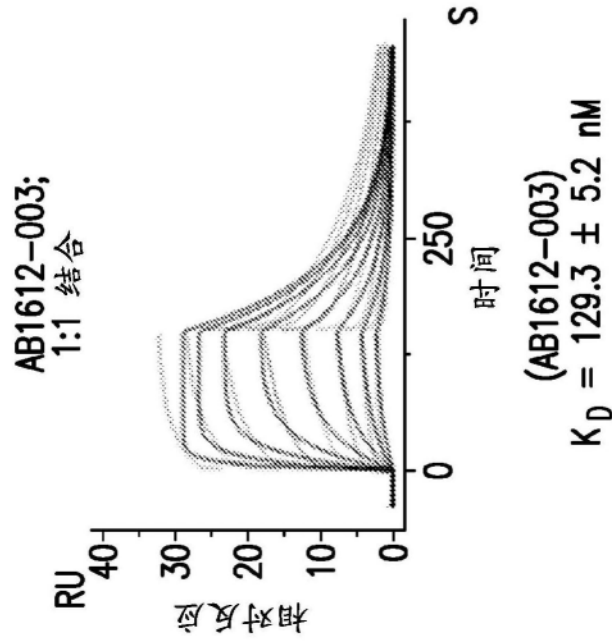


图63C

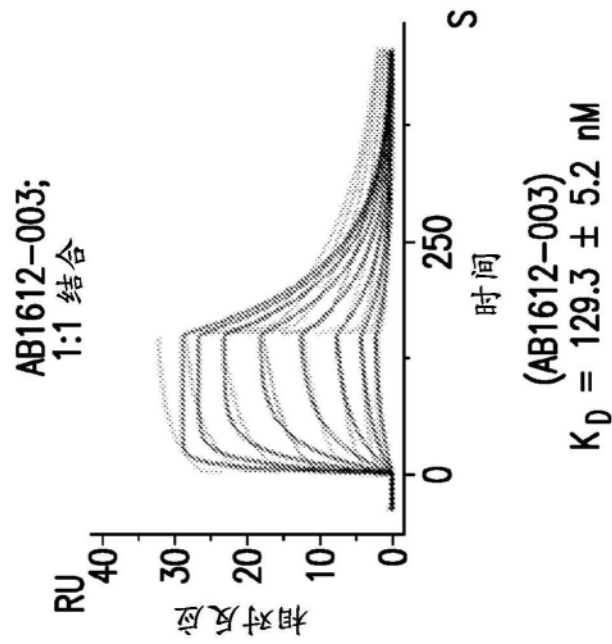


图63D

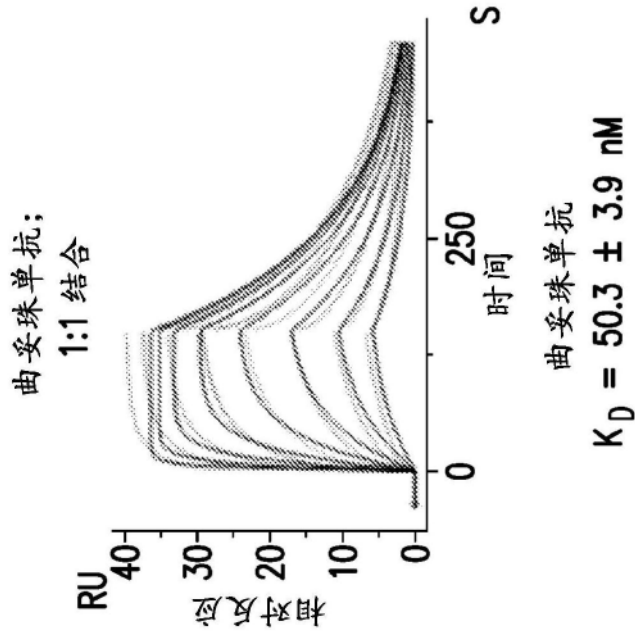


图63E

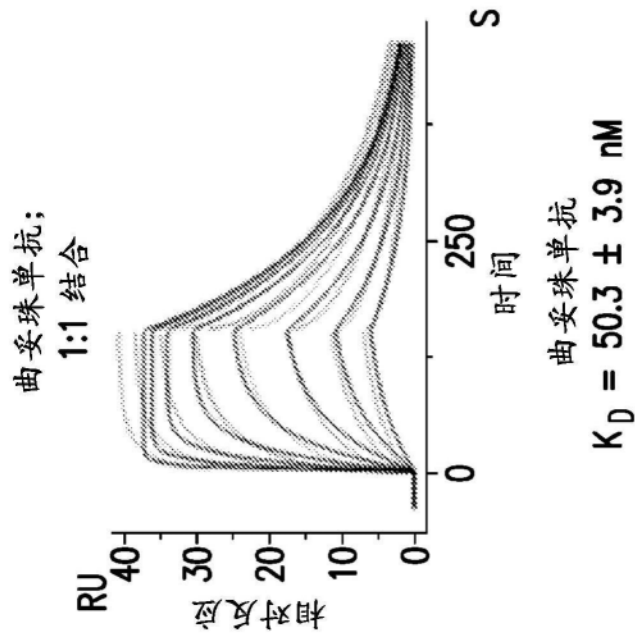


图63F

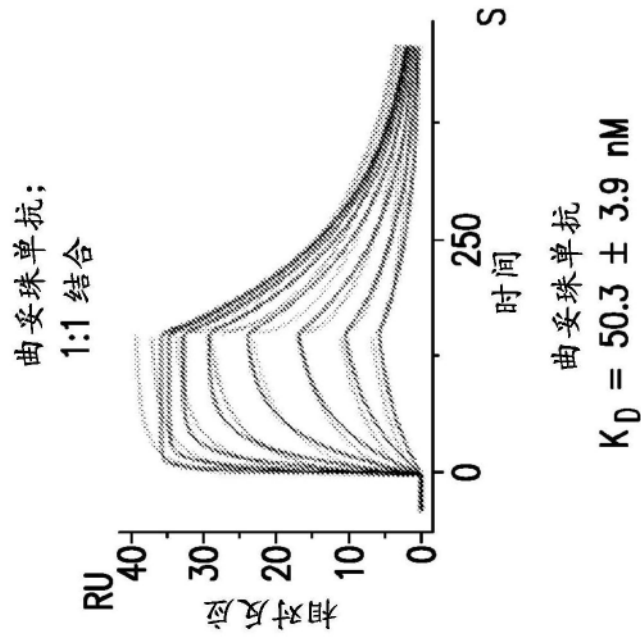


图63G

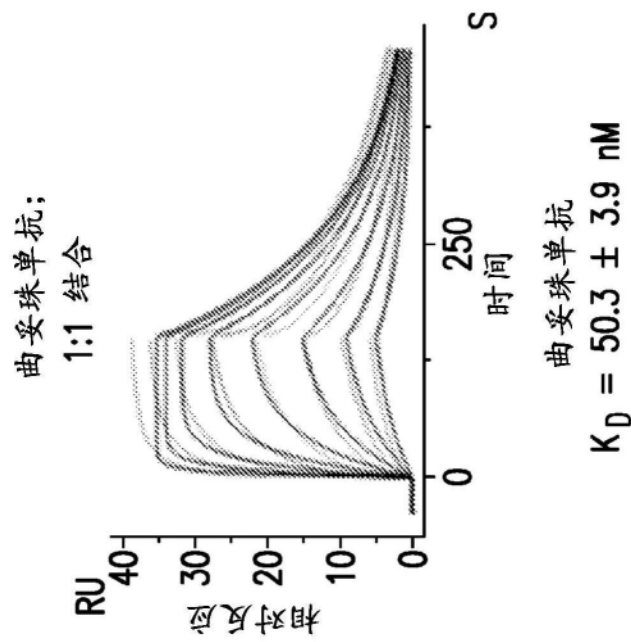


图63H

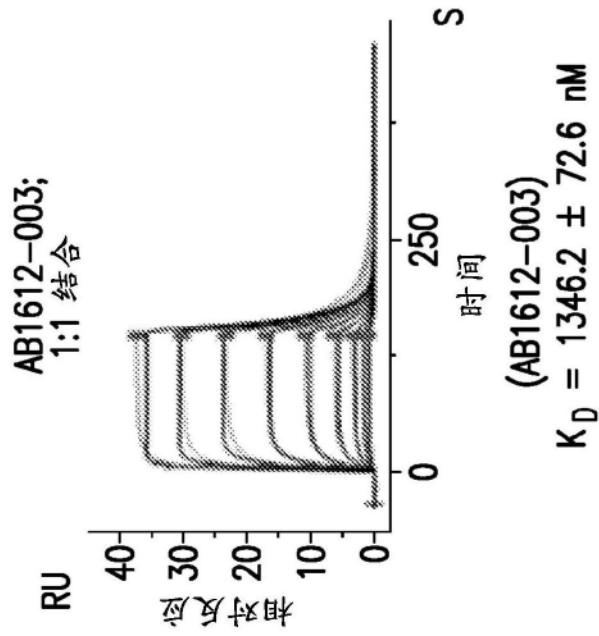


图64A

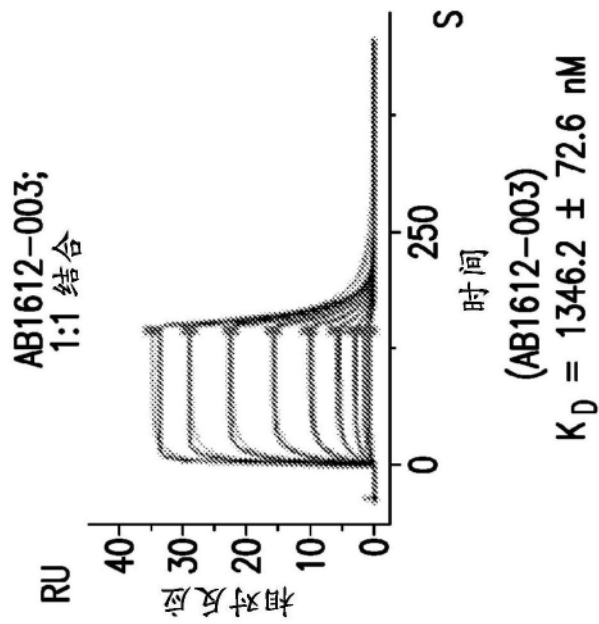


图64B

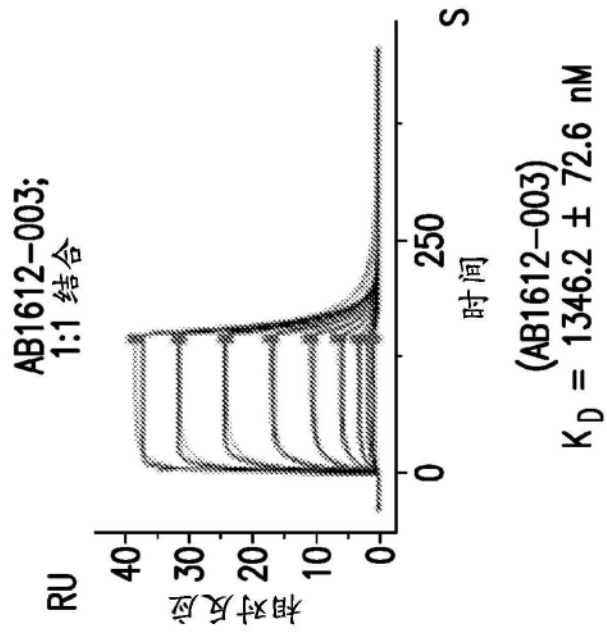


图64C

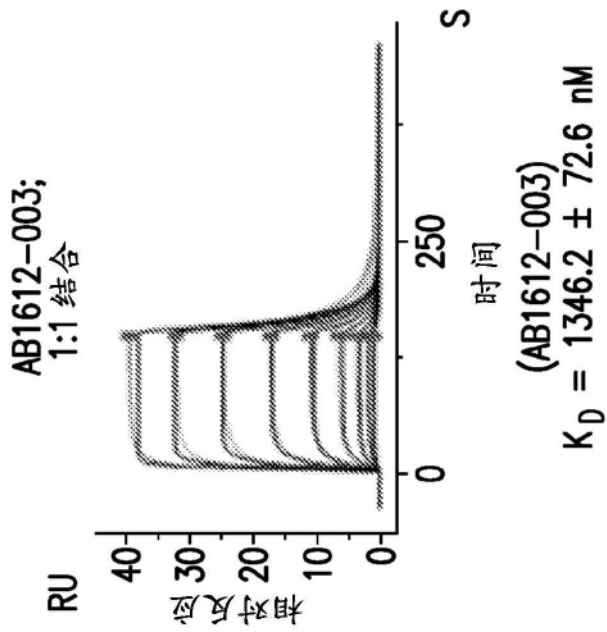


图64D

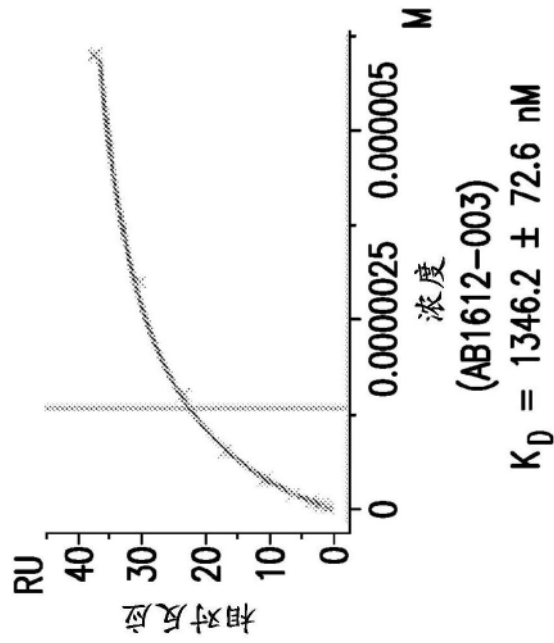


图64E

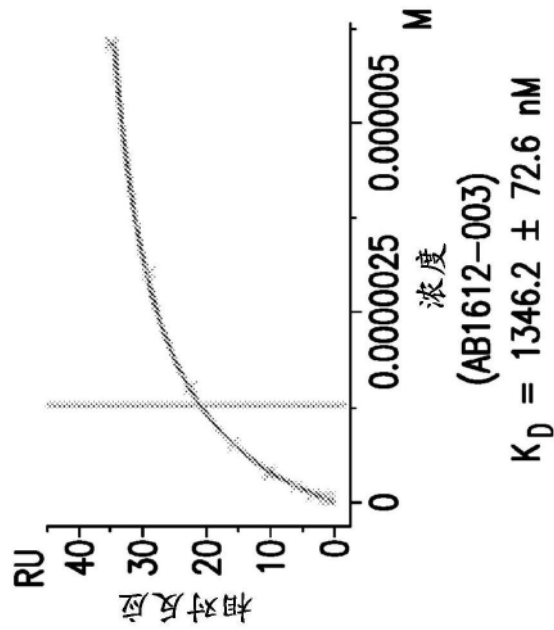


图64F

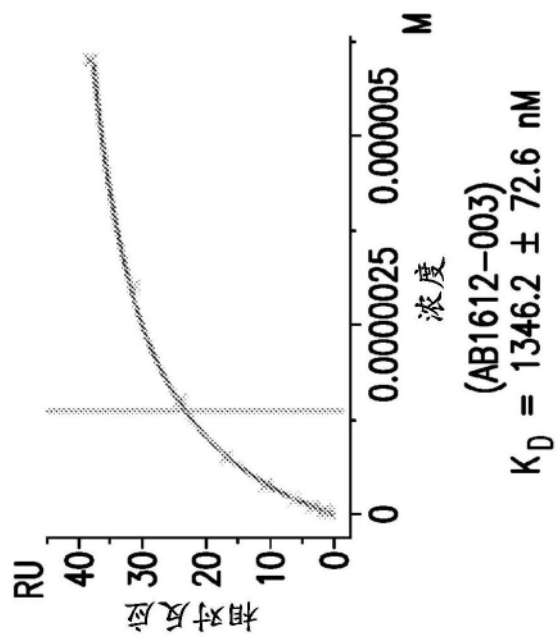


图64G

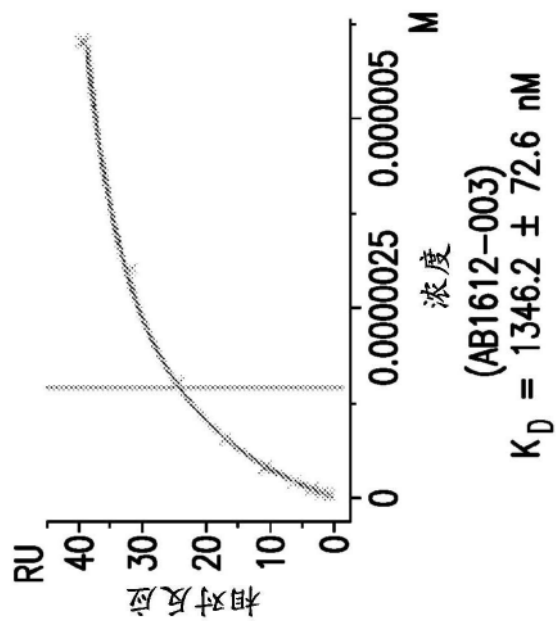


图64H

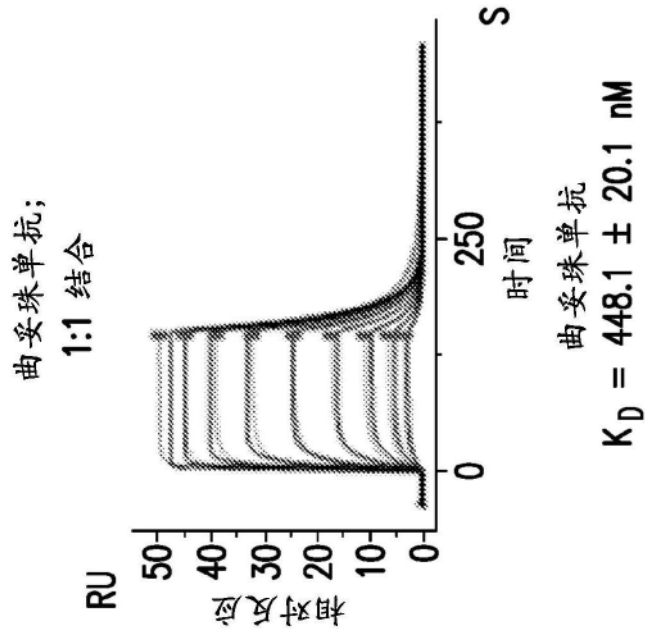


图64I

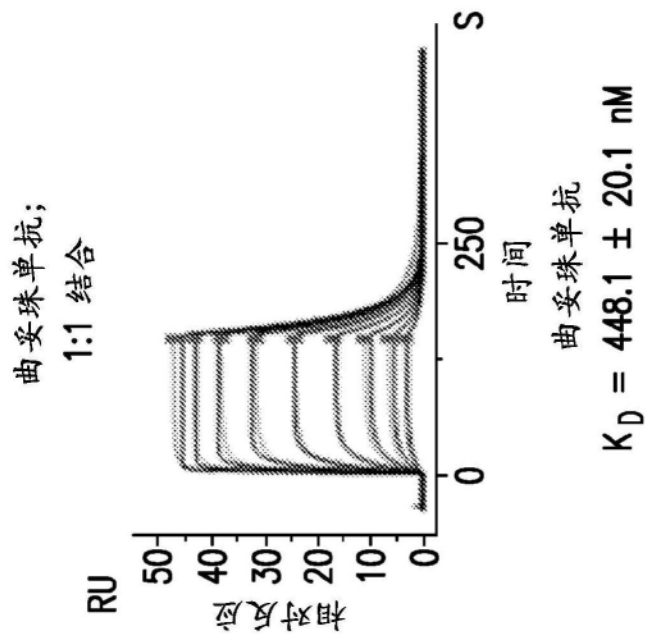


图64J

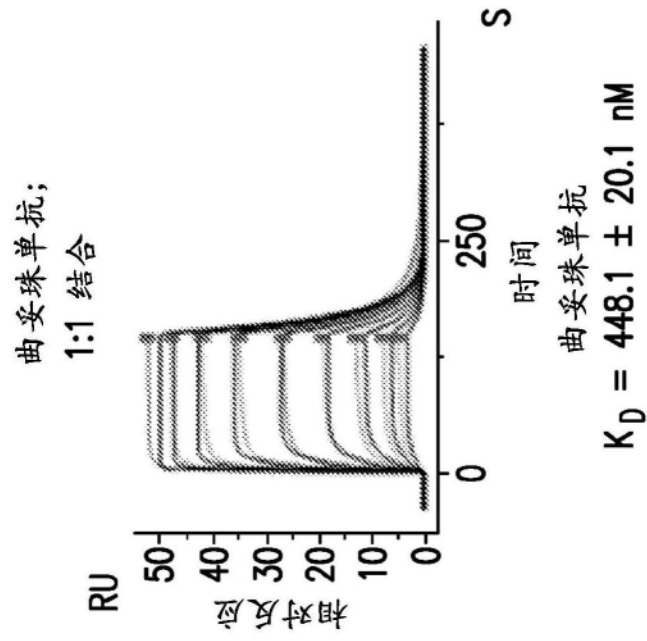


图64K

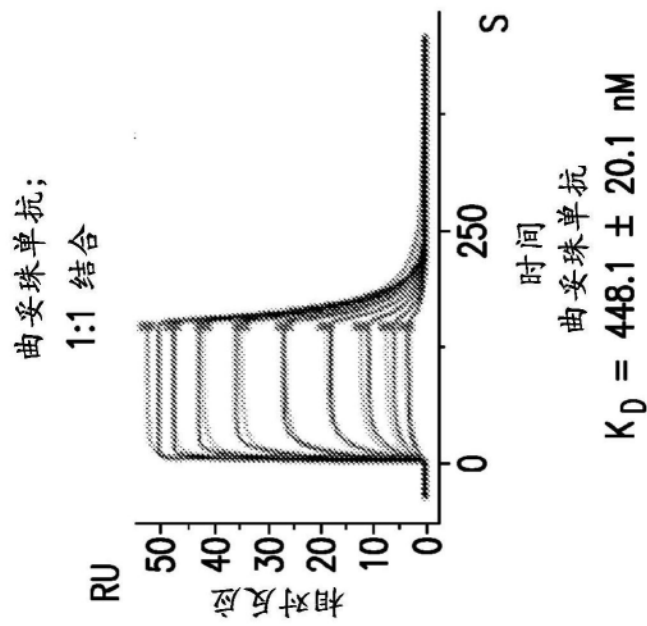


图64L

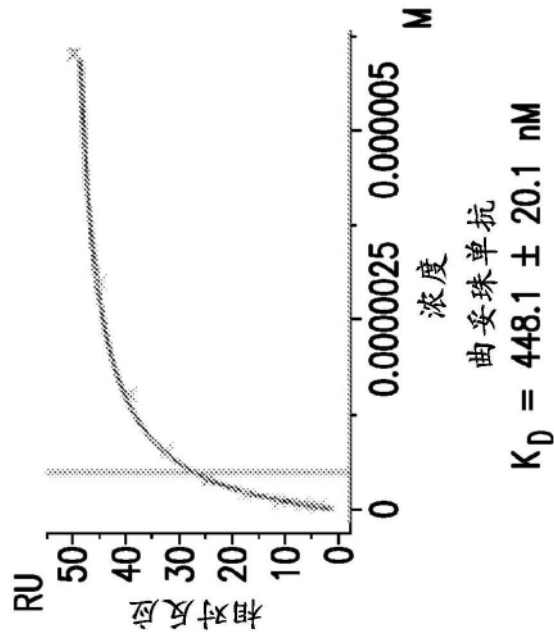


图64M

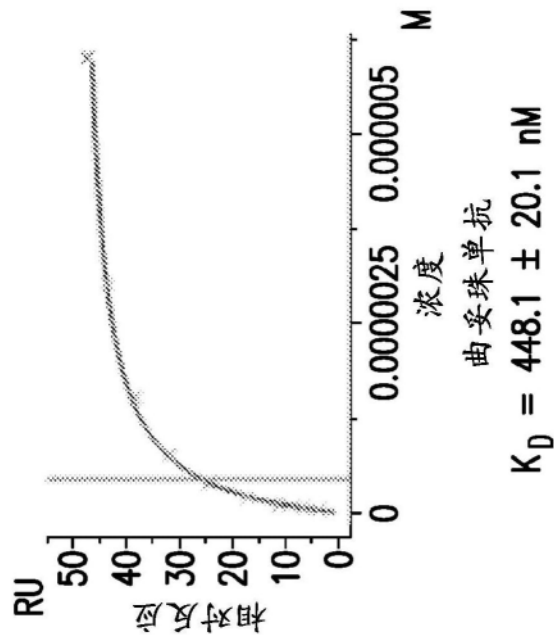


图64N

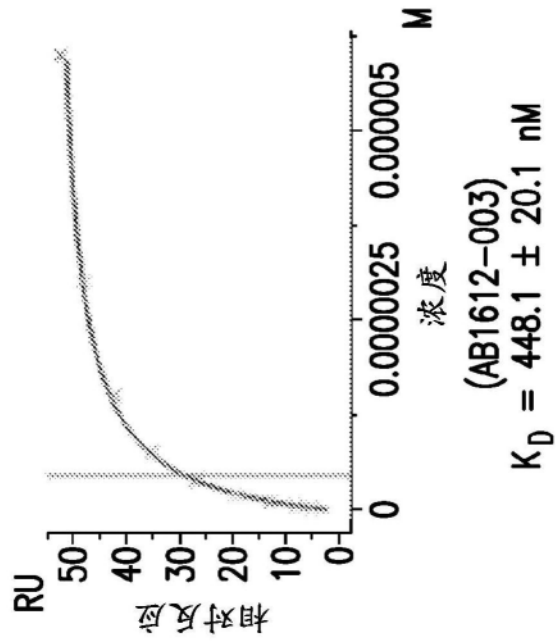


图640

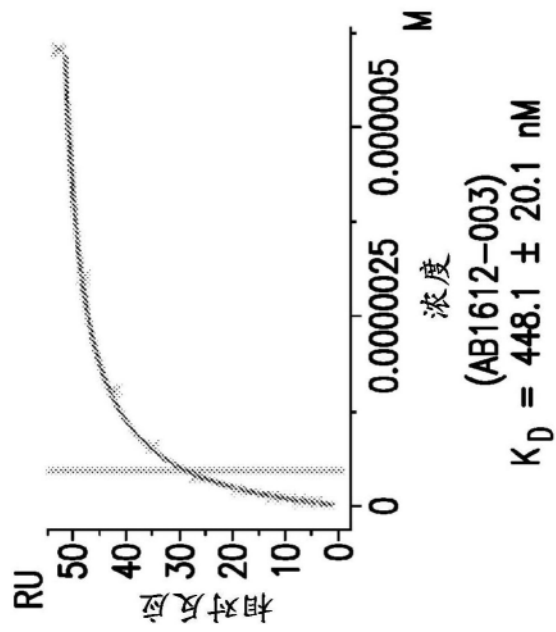


图64P

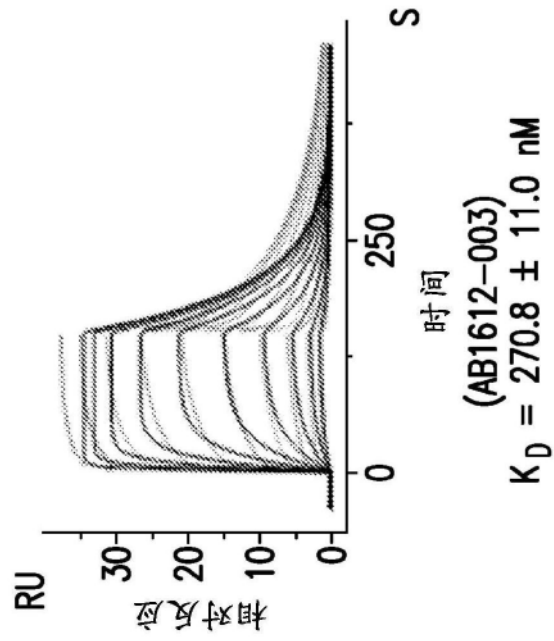


图65A

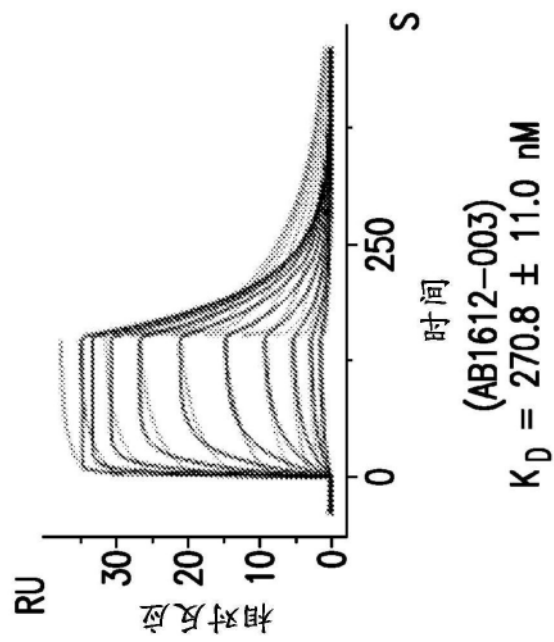


图65B

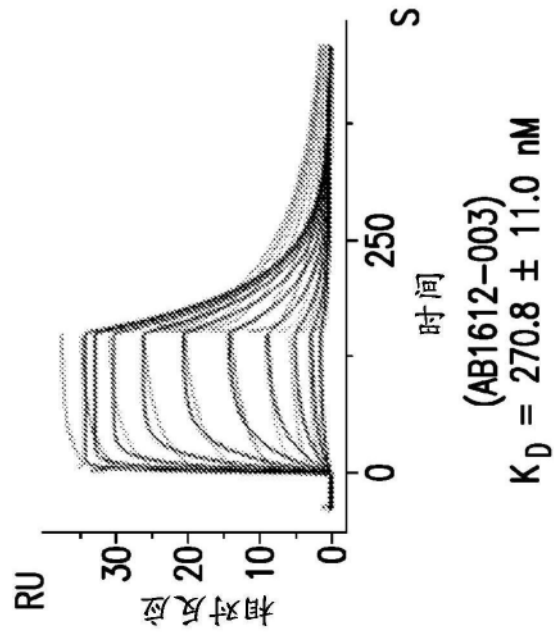


图65C

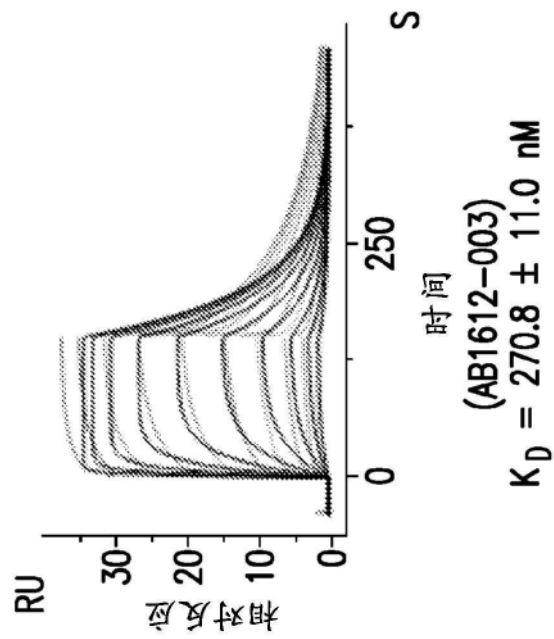


图65D

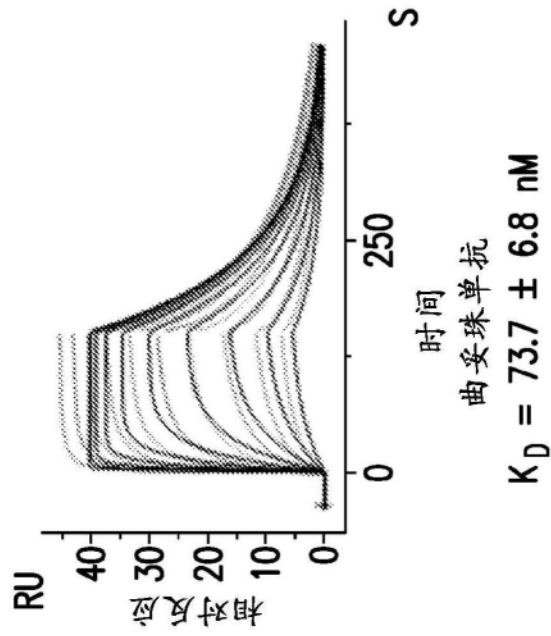


图65E

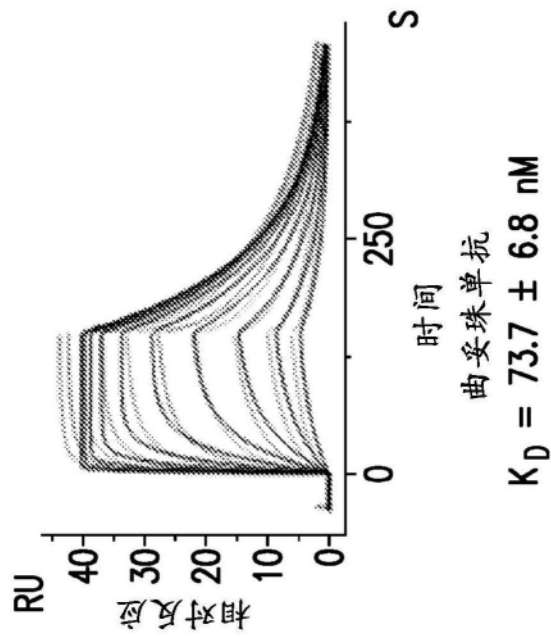


图65F

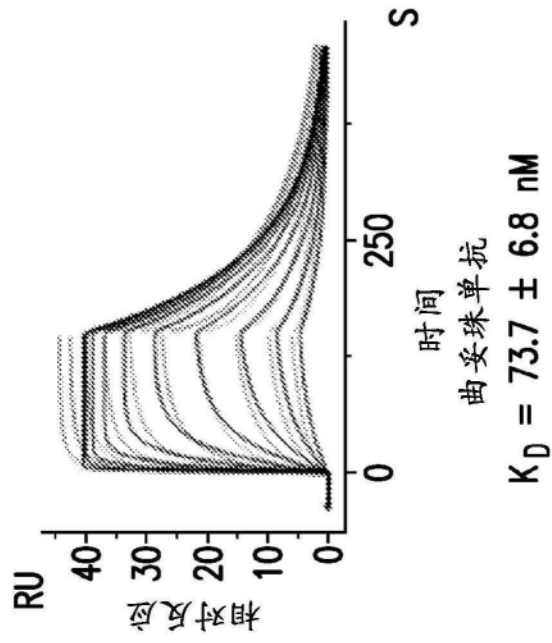


图65G

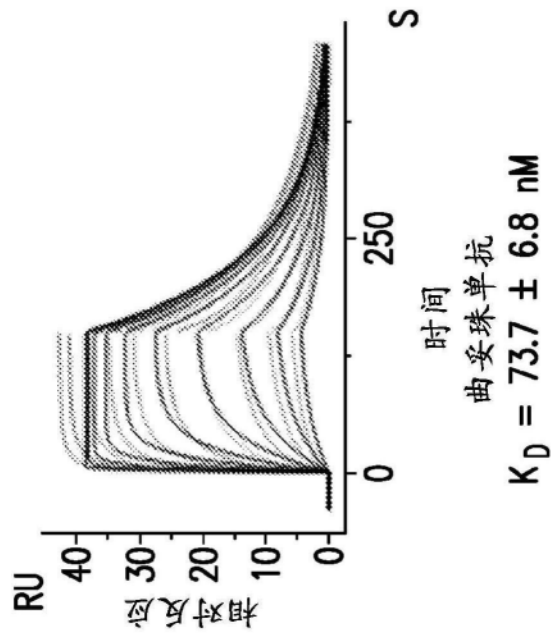


图65H

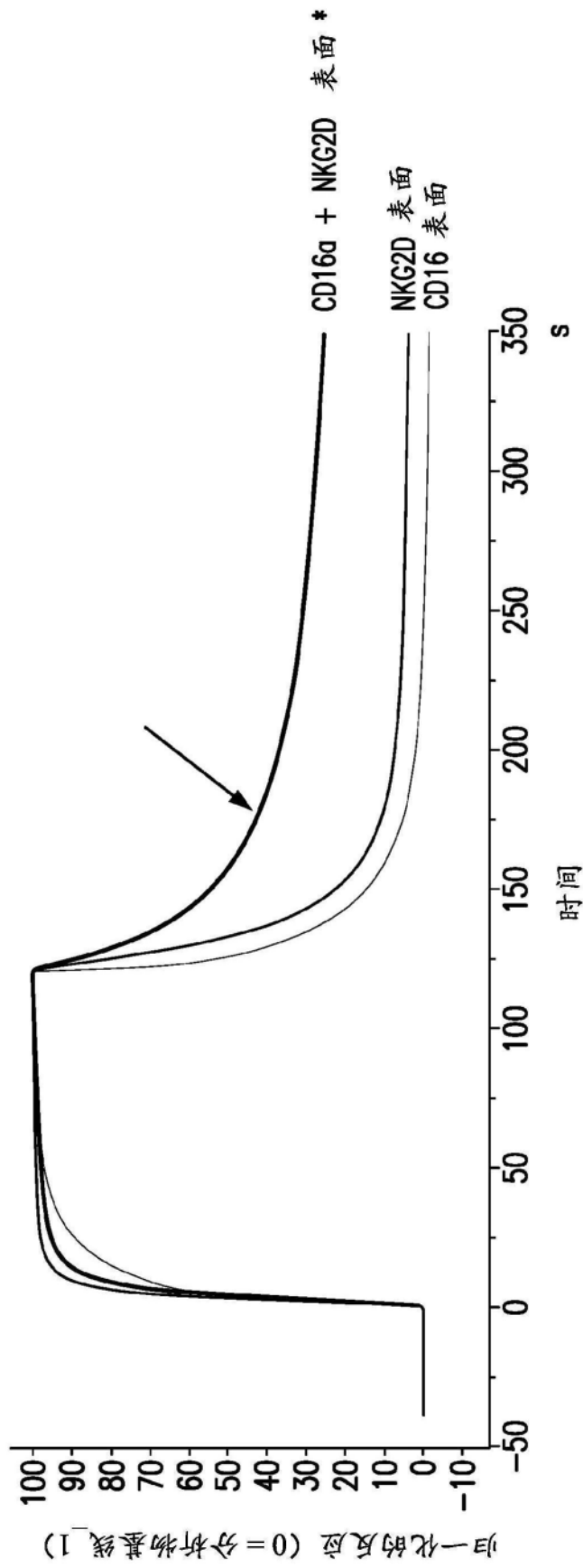


图66

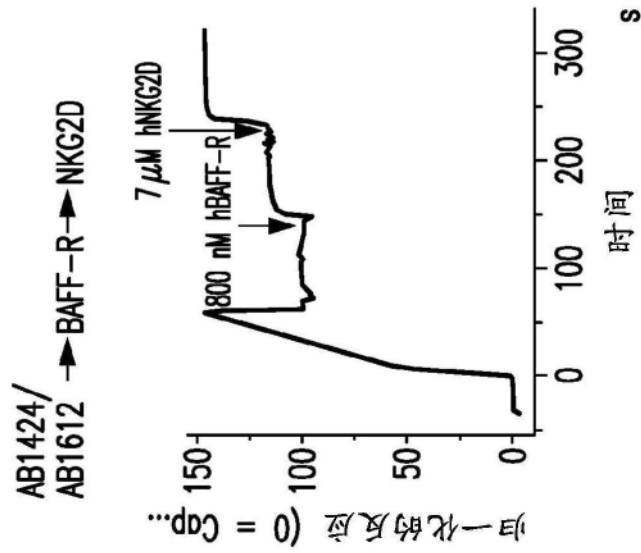


图67A

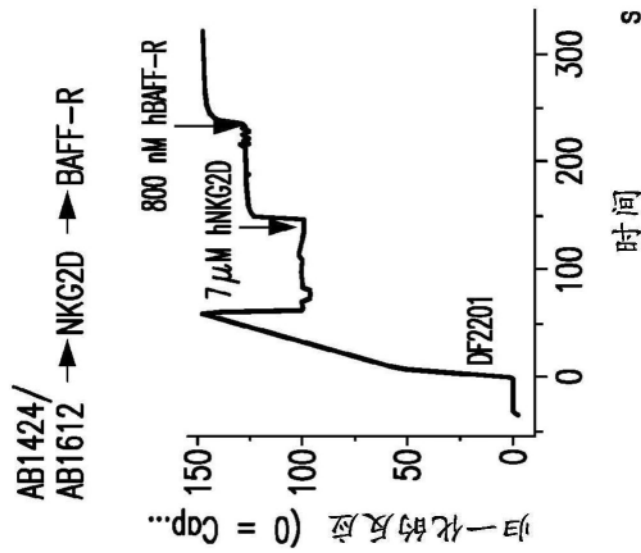


图67B

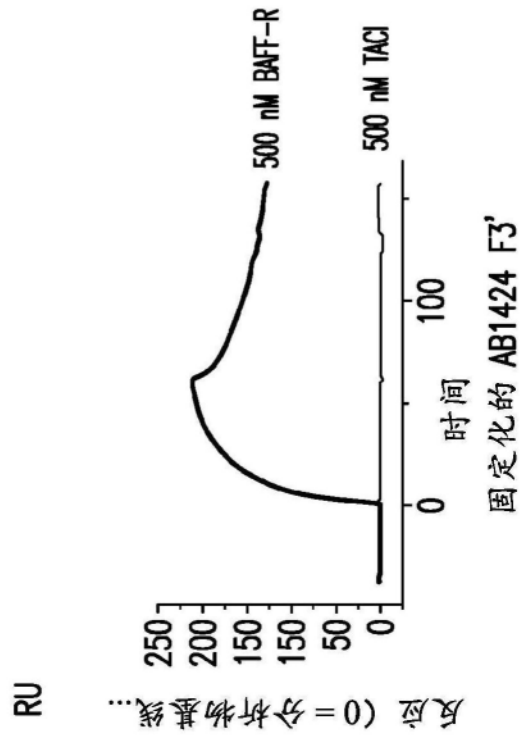


图68A

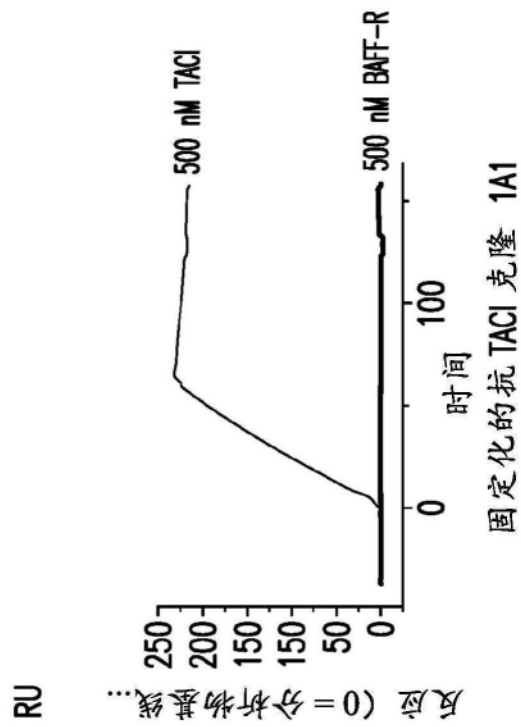


图68B

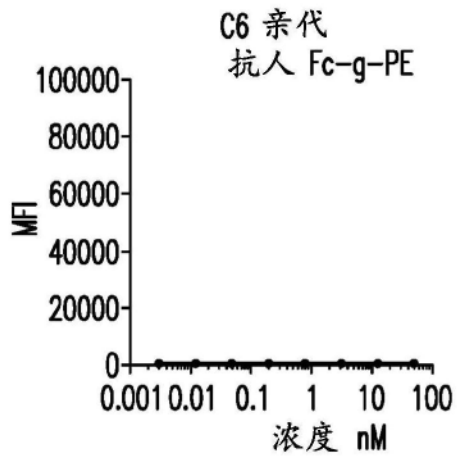


图 69A

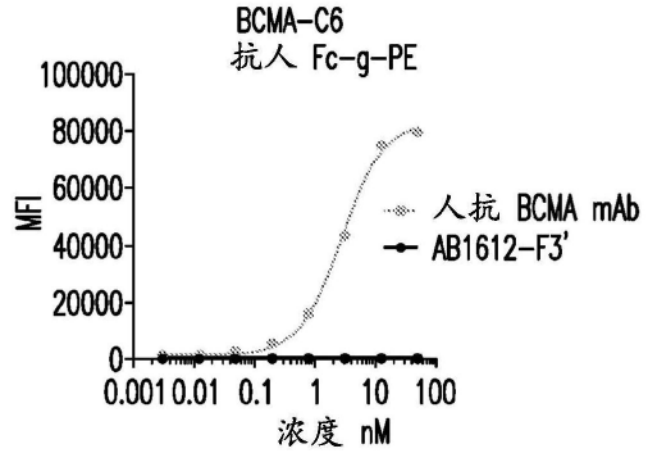


图 69B

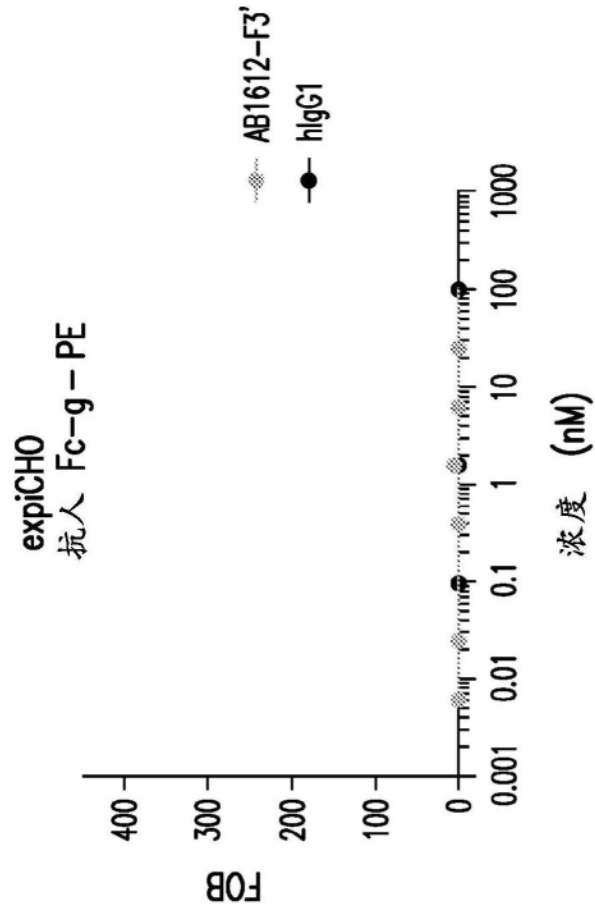


图 70A

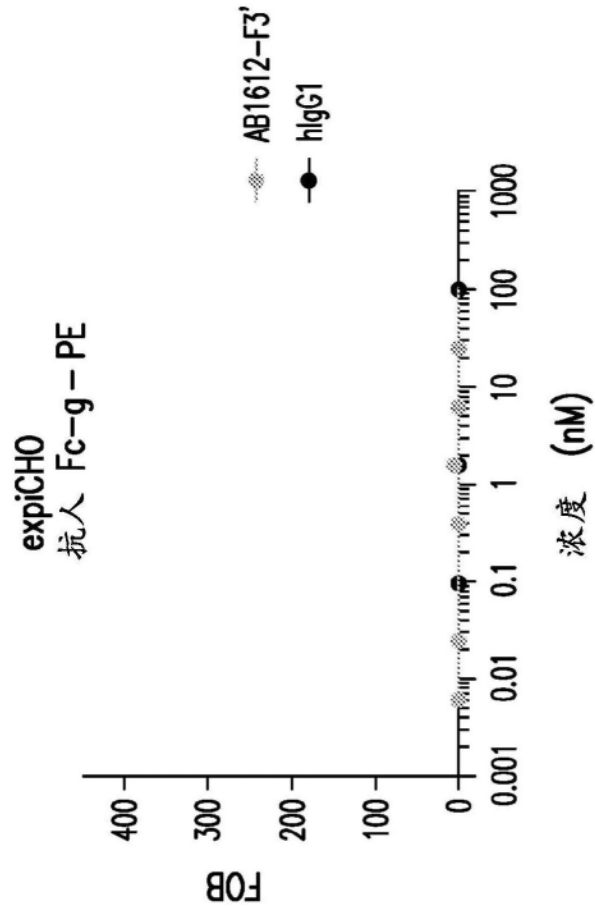


图 70B

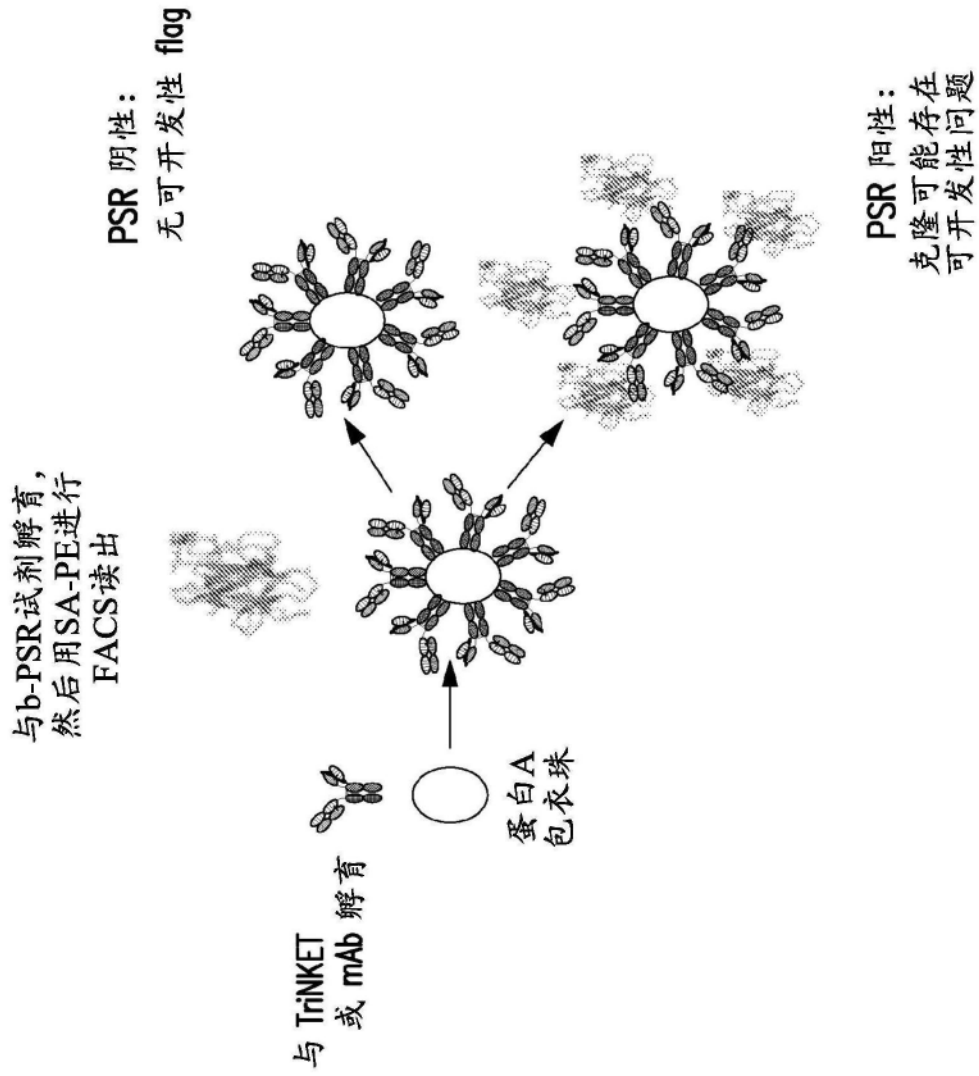


图71A

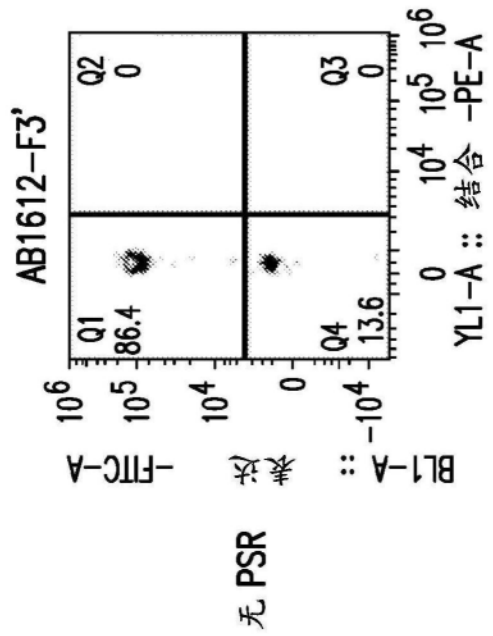


图 71B

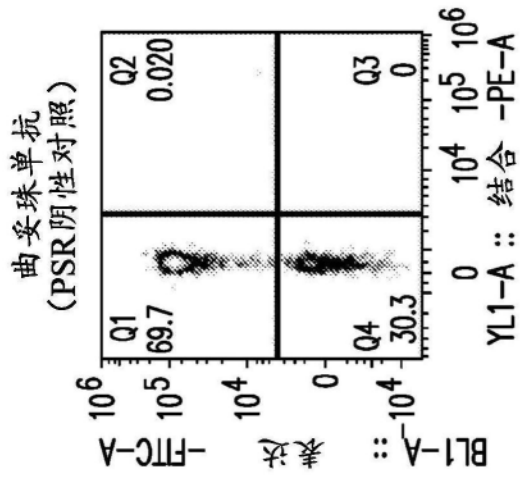


图 71C

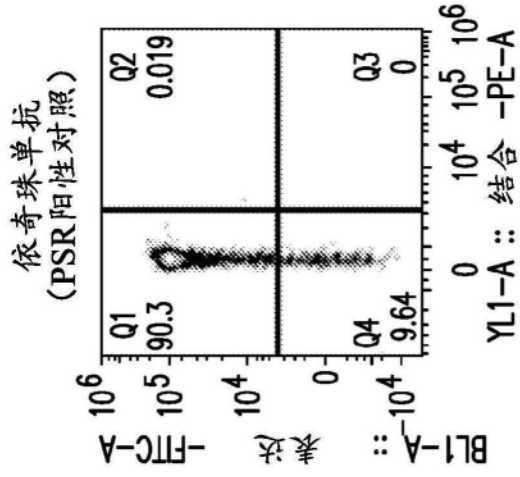
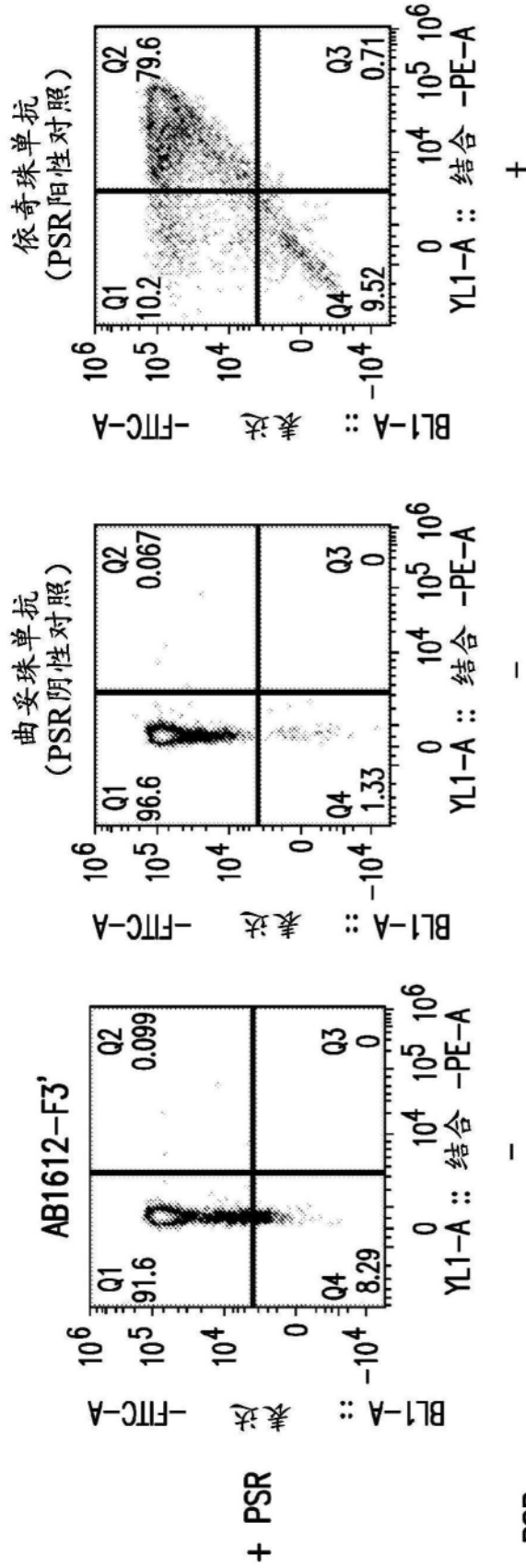


图 71D



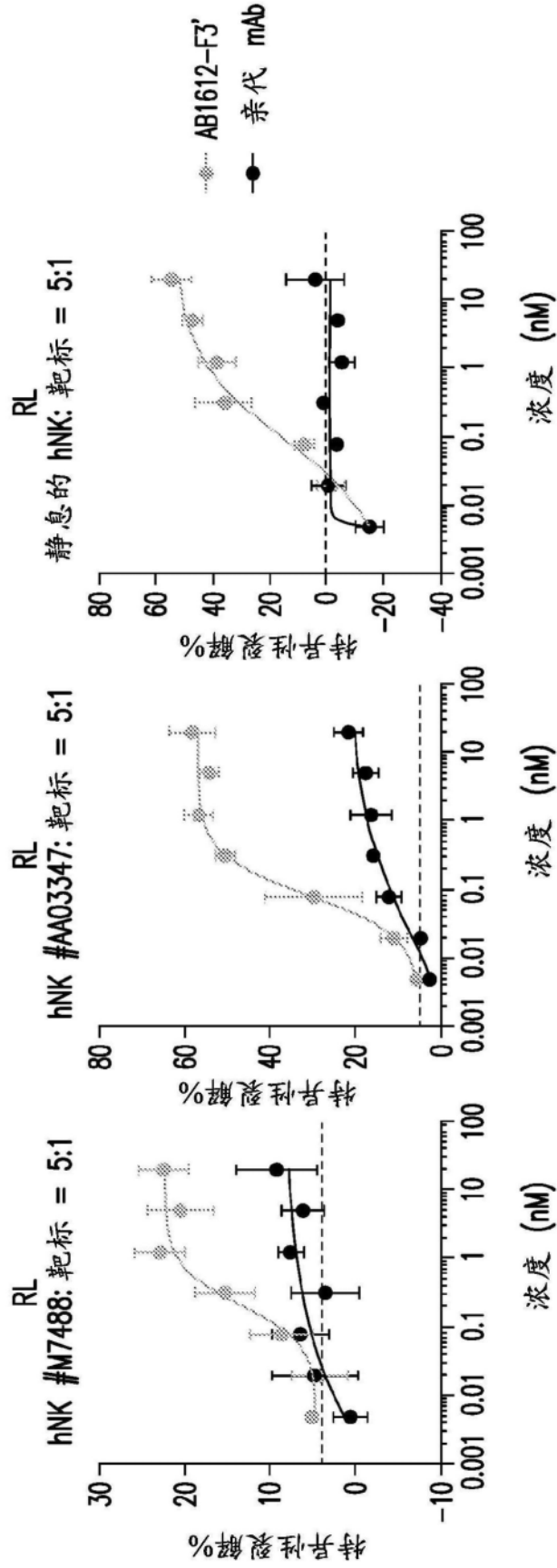


图 72C

图 72B

图 72A

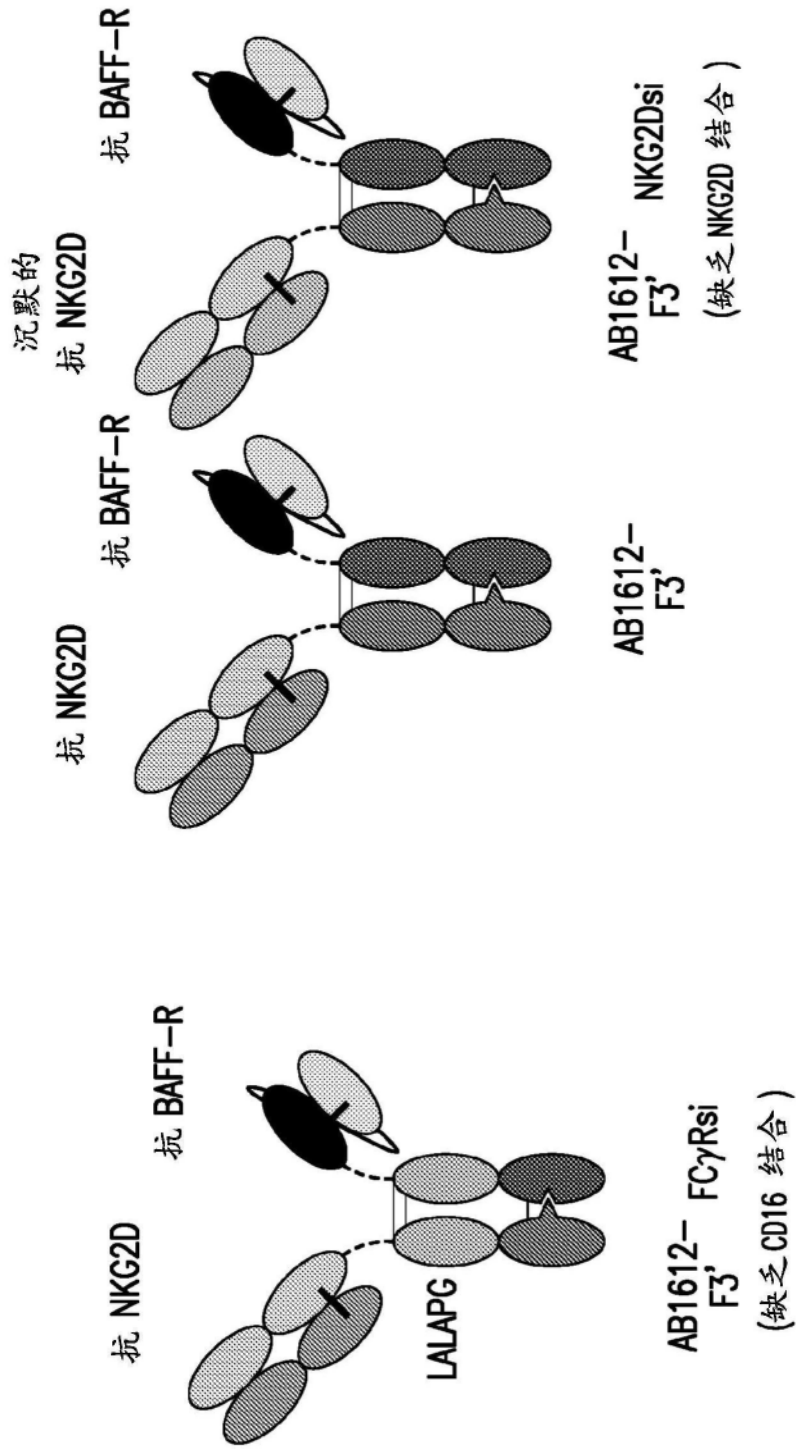


图 73B

图 73A

图73C

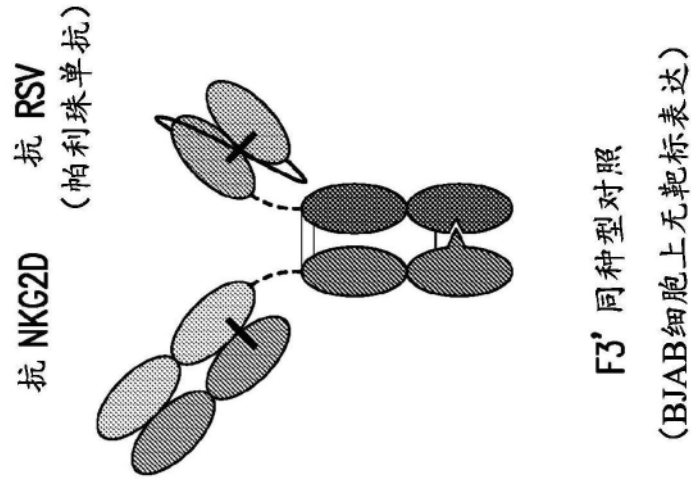


图73D

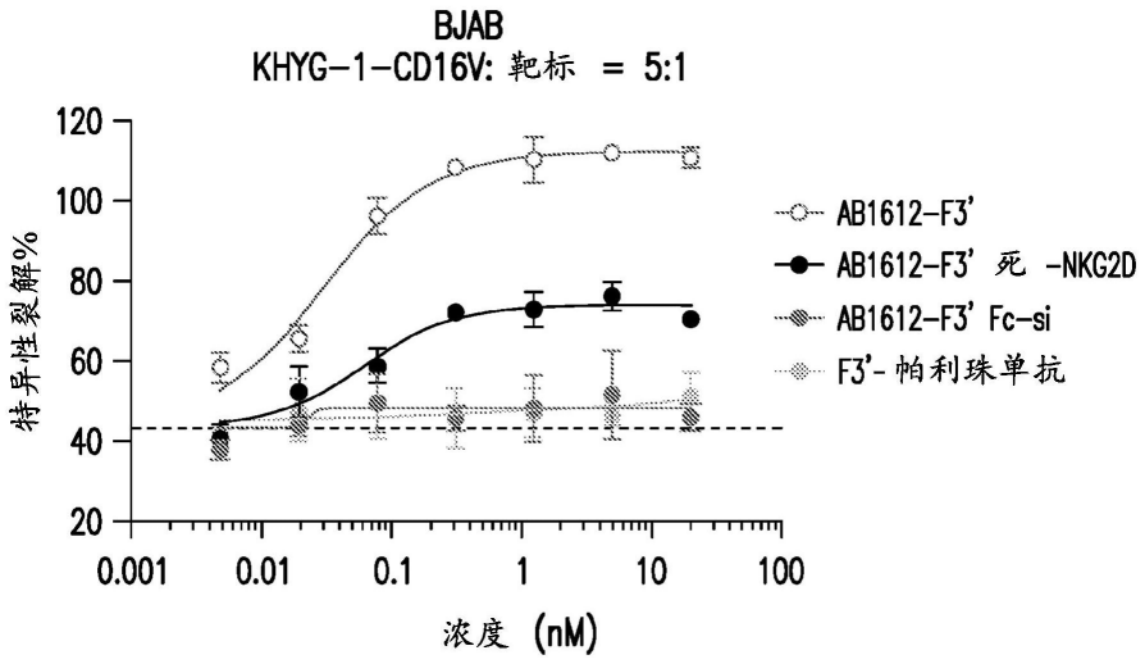


图74

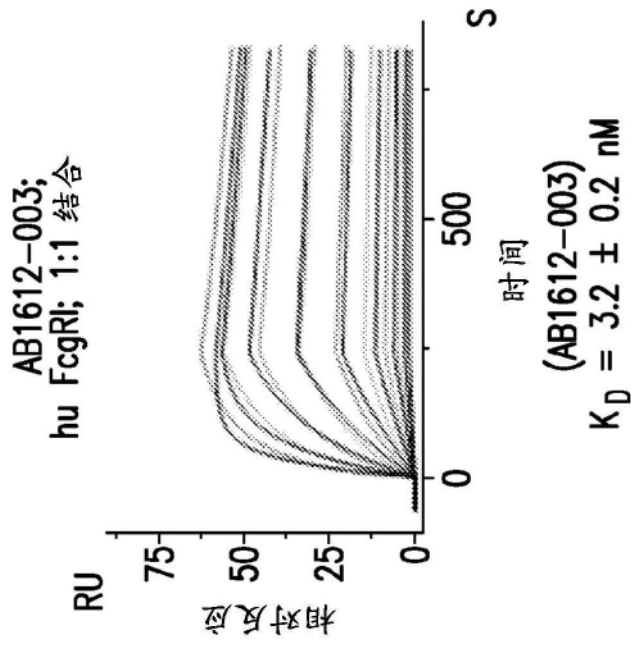


图75A

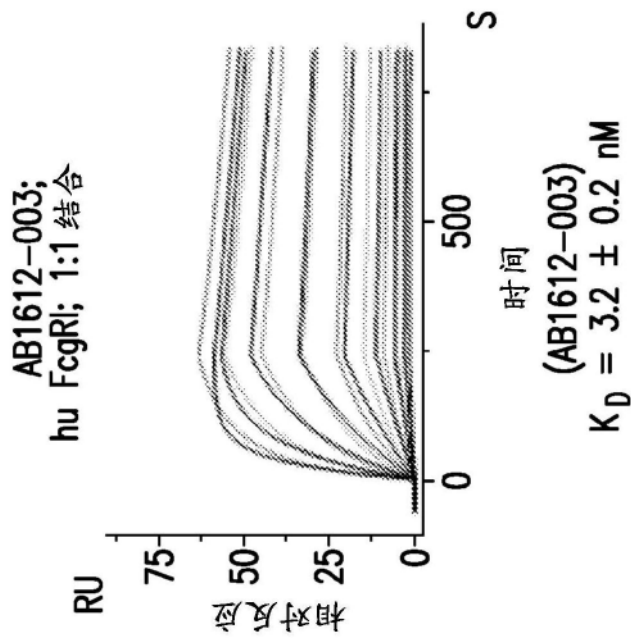


图75B

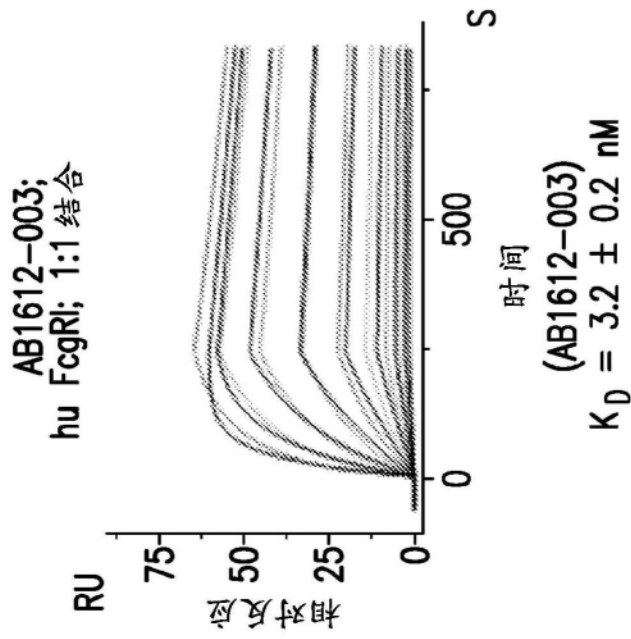


图75C

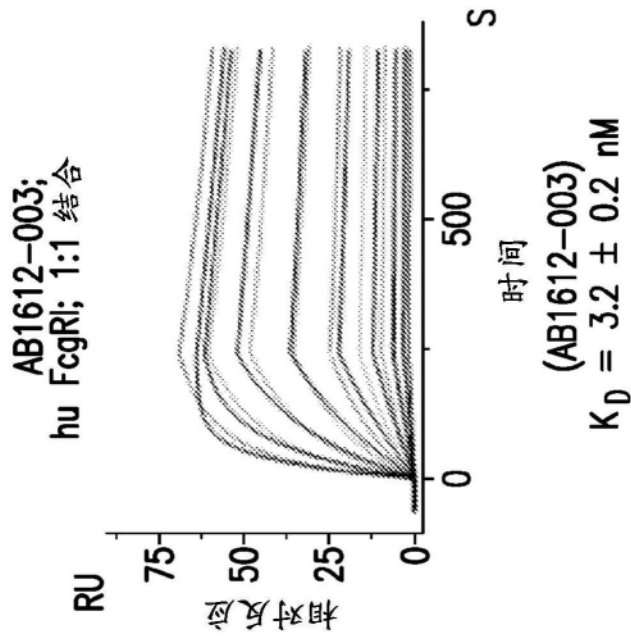


图75D

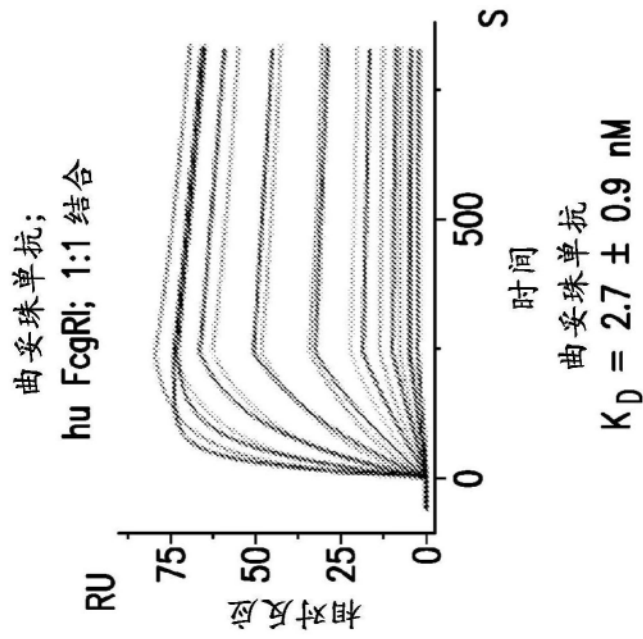


图75E

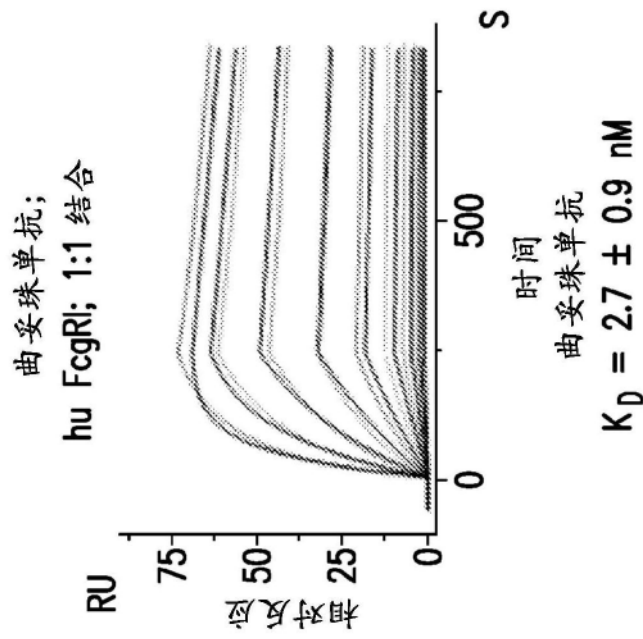


图75F

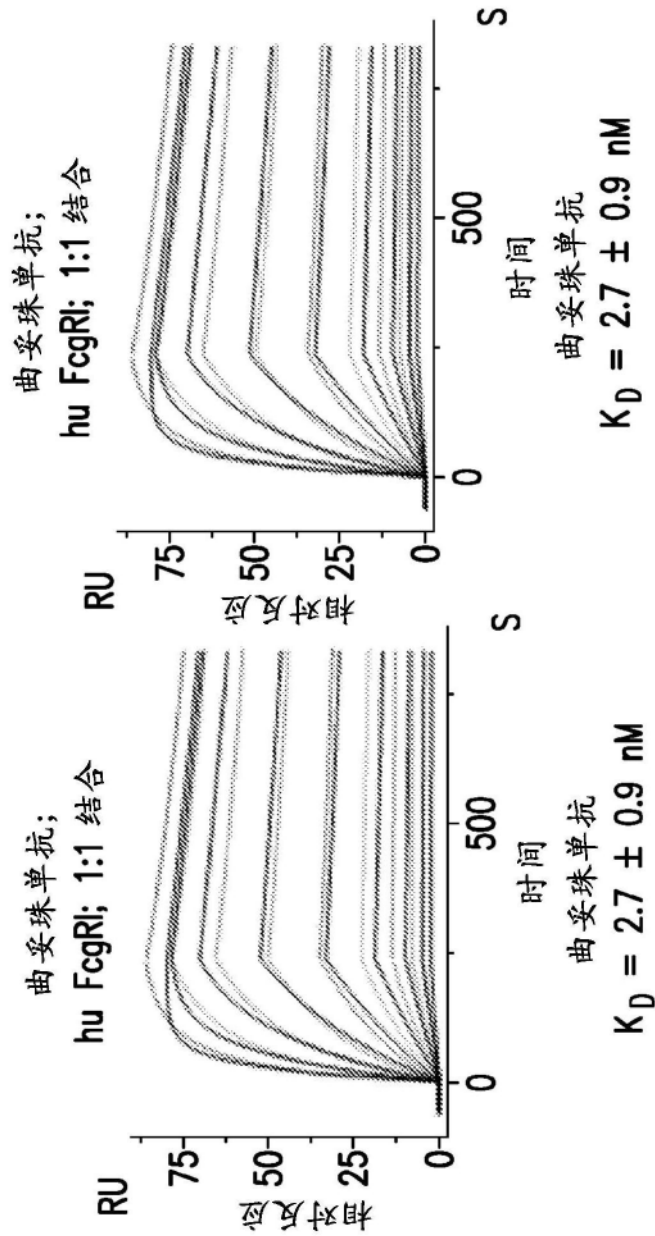


图 75H

图 75G

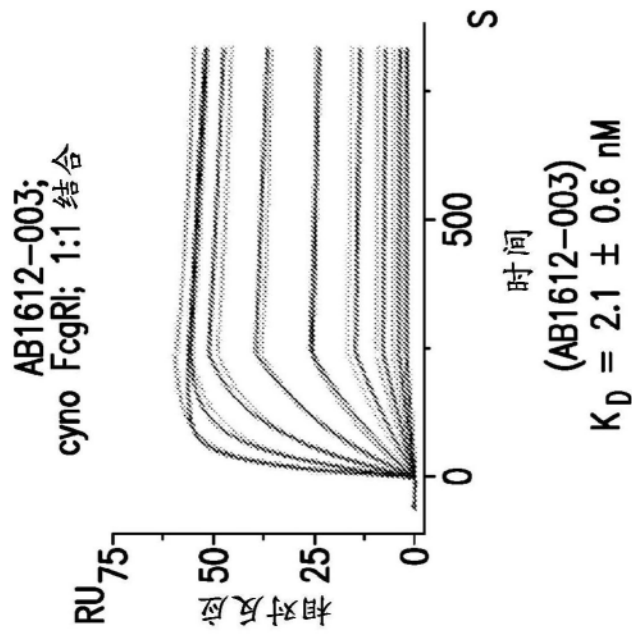


图76A

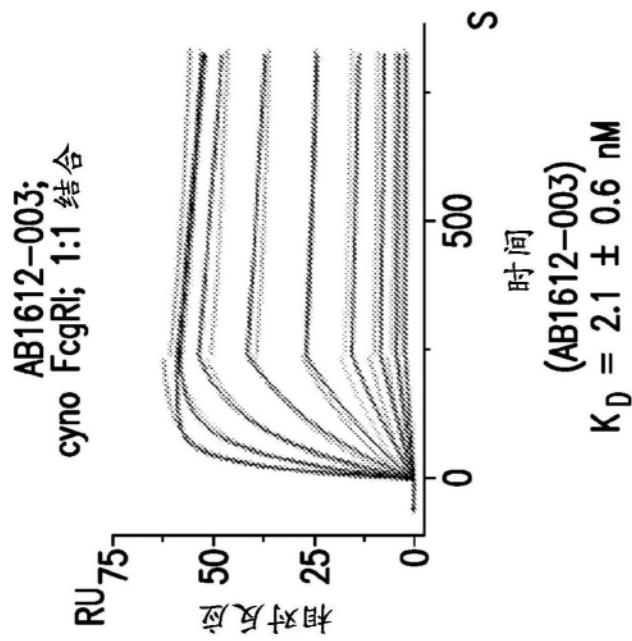


图76B

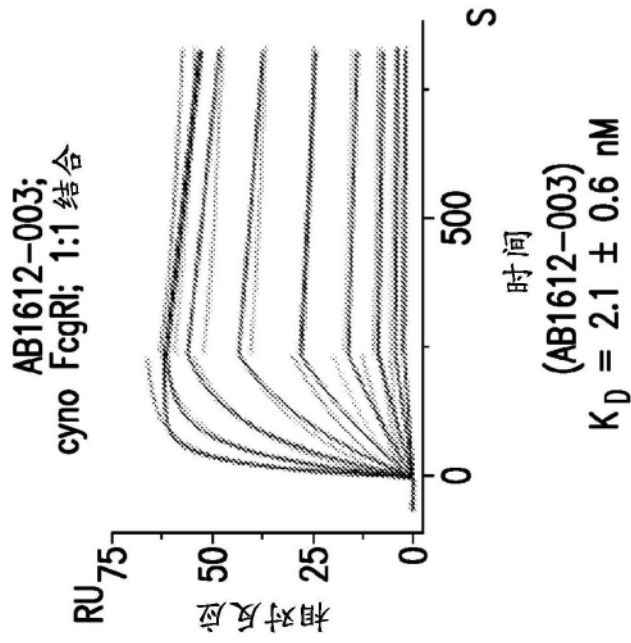


图76C

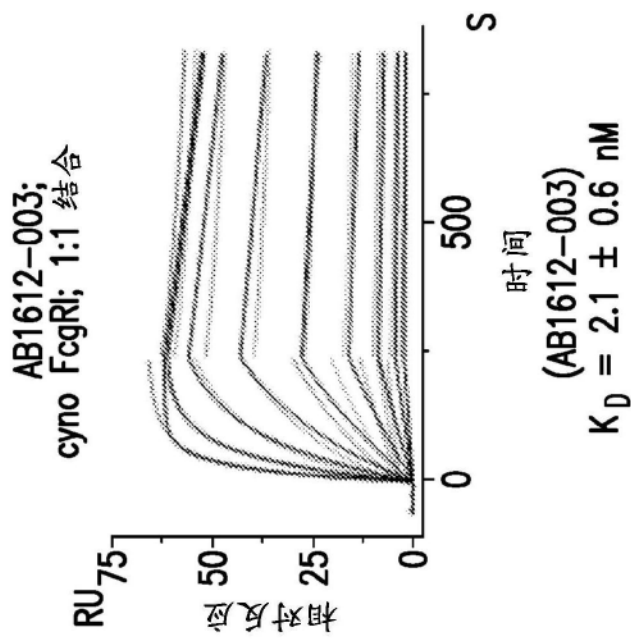


图76D

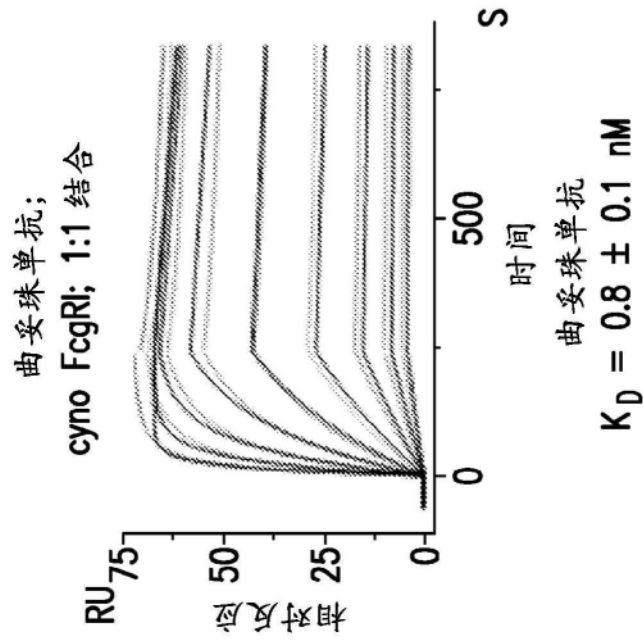


图76E

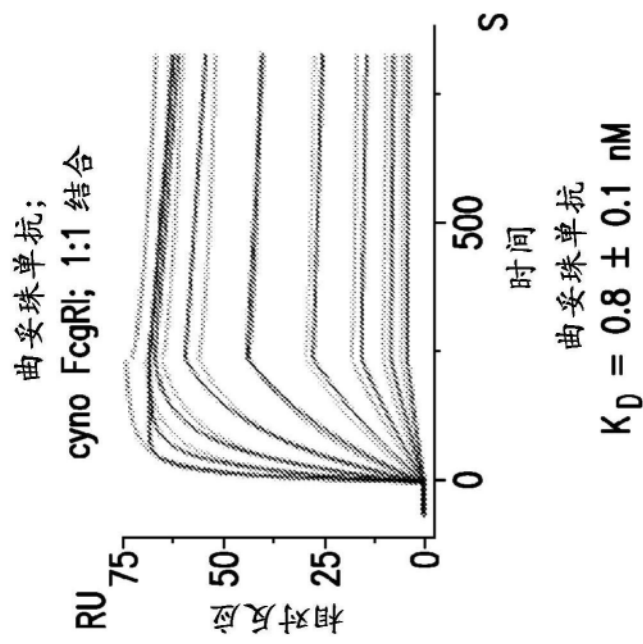


图76F

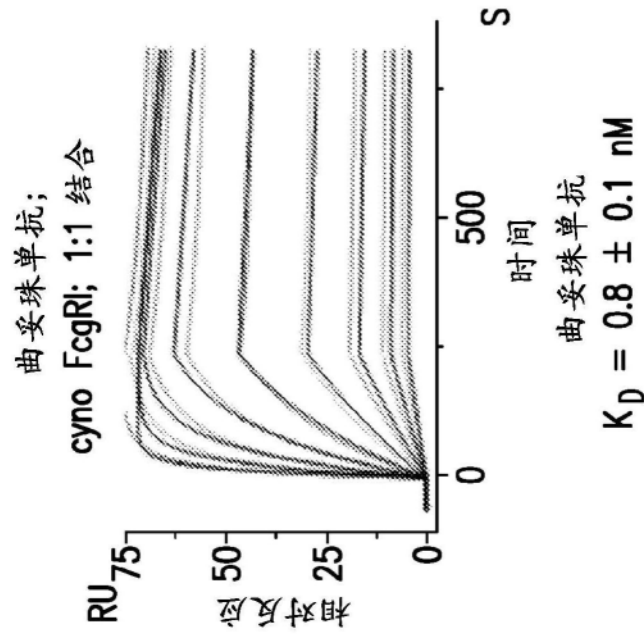


图76G

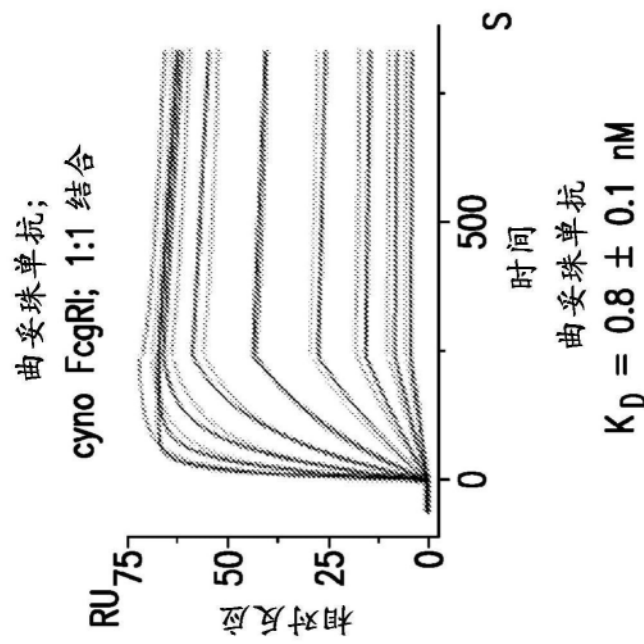


图76H

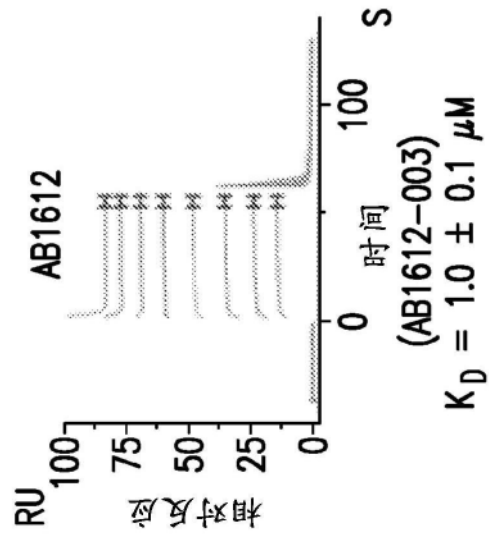


图77A

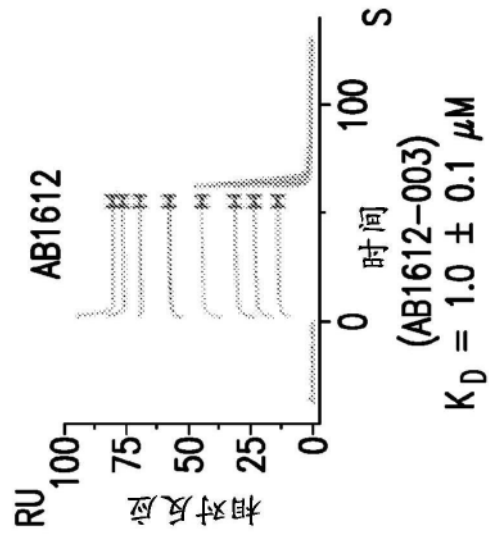


图77B

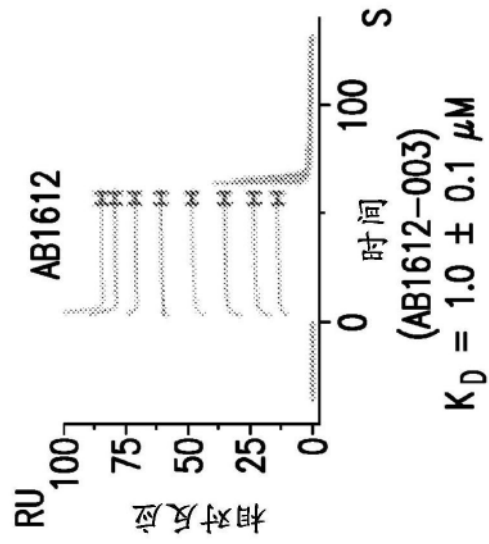


图77C

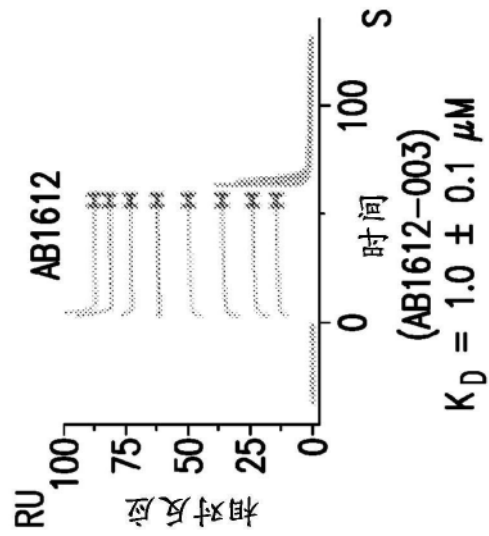


图77D

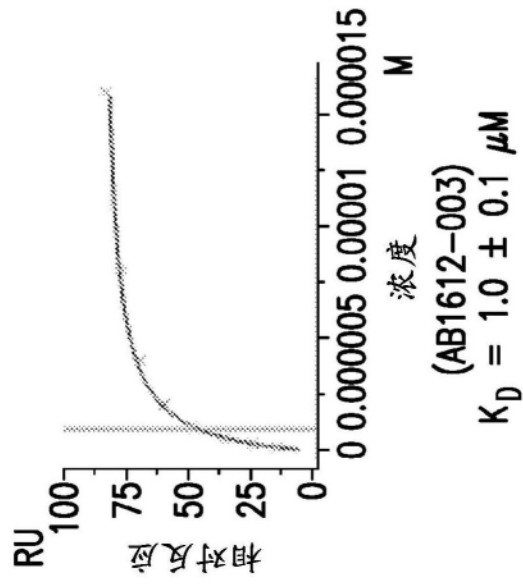


图77E

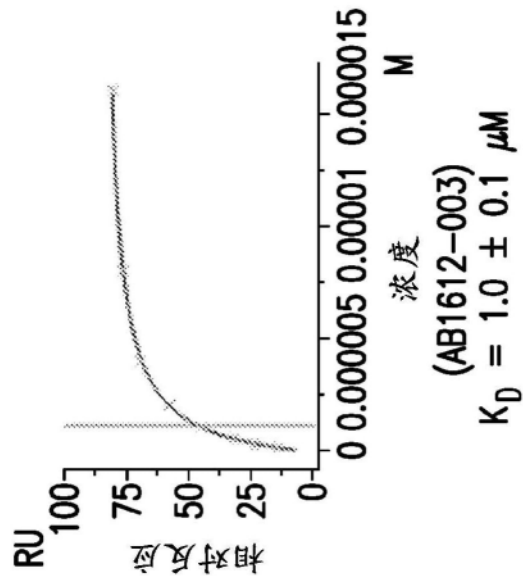


图77F

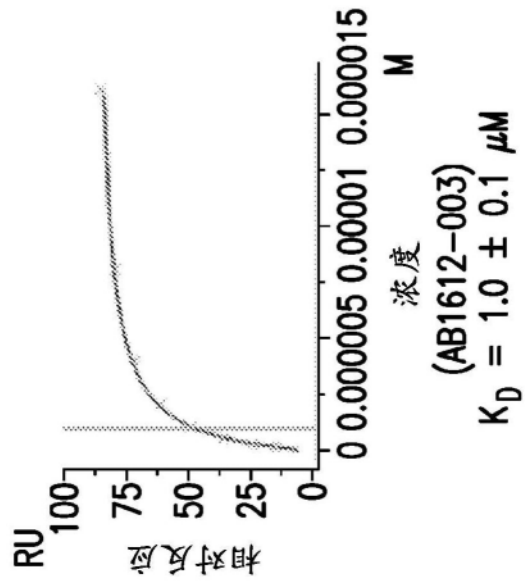


图77G

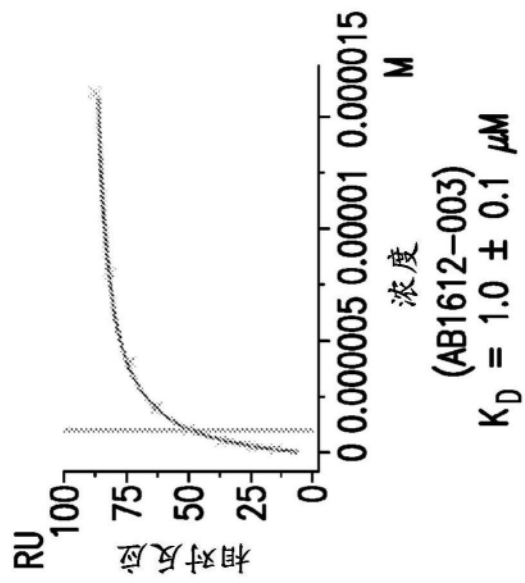


图77H

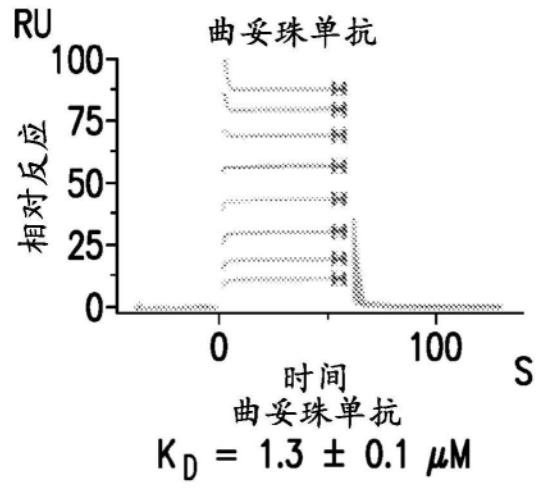


图77I

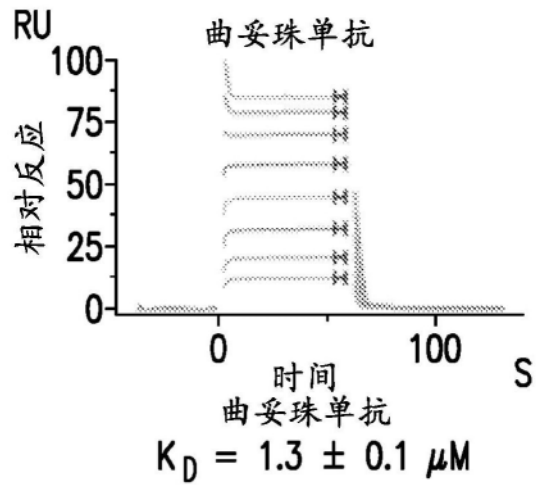


图77J

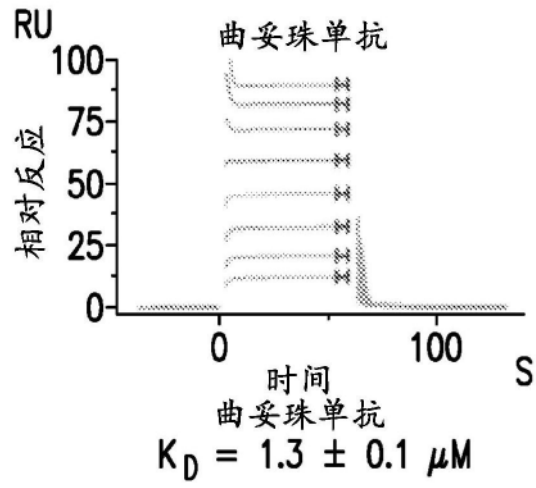


图77K

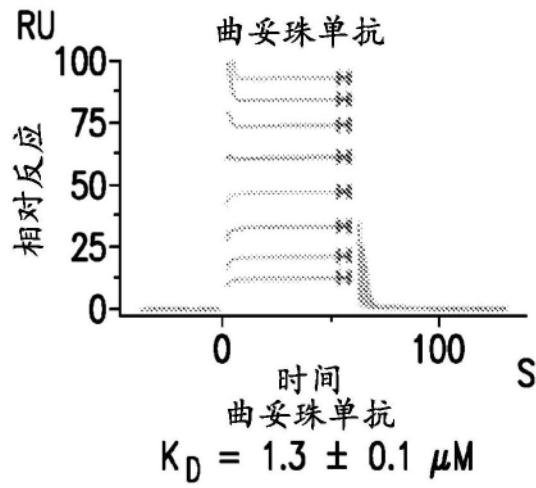


图77L

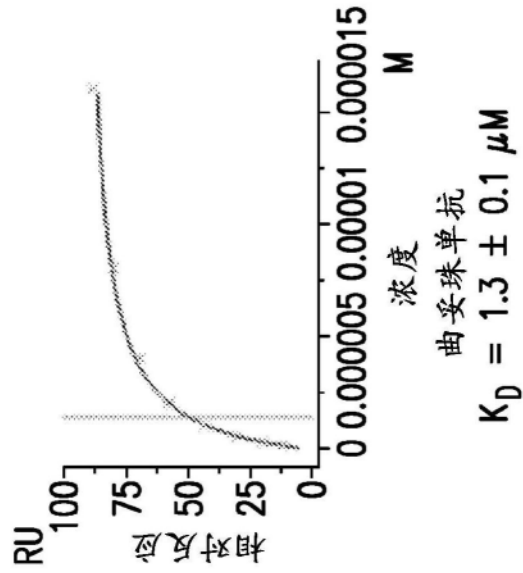


图77M

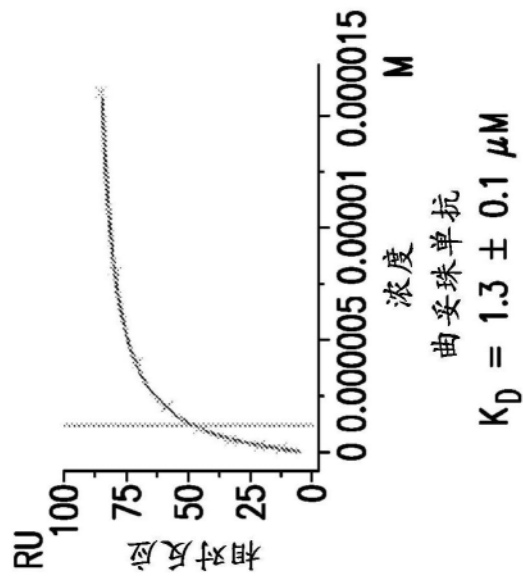


图77N

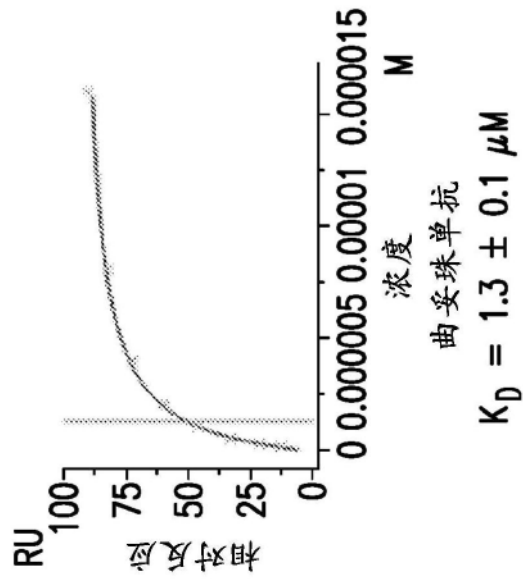


图770

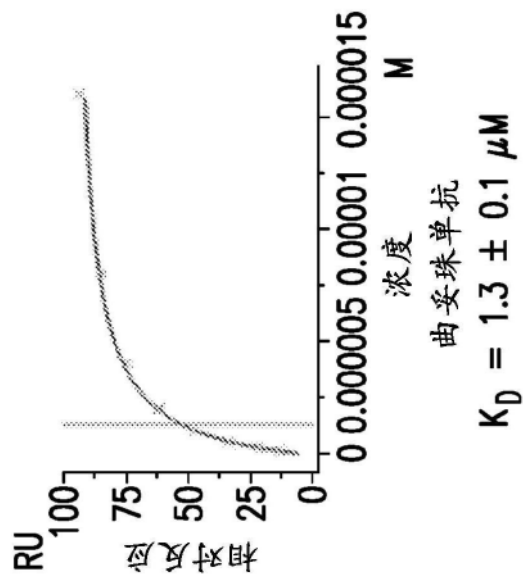


图77P

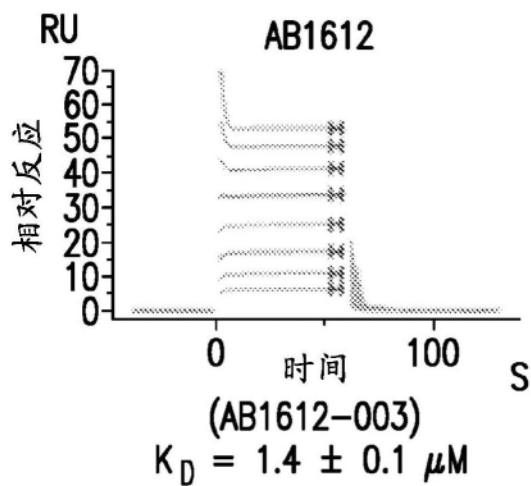


图78A

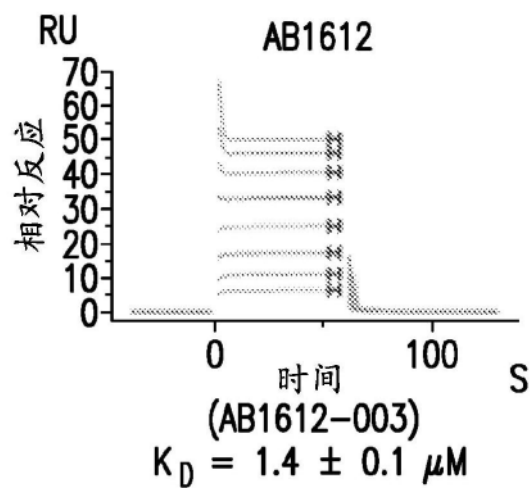


图78B

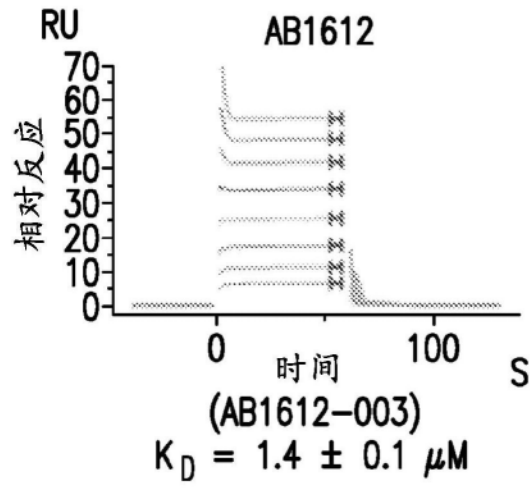


图78C

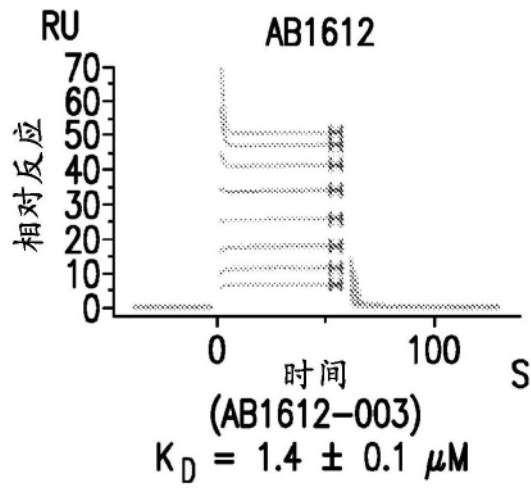


图78D

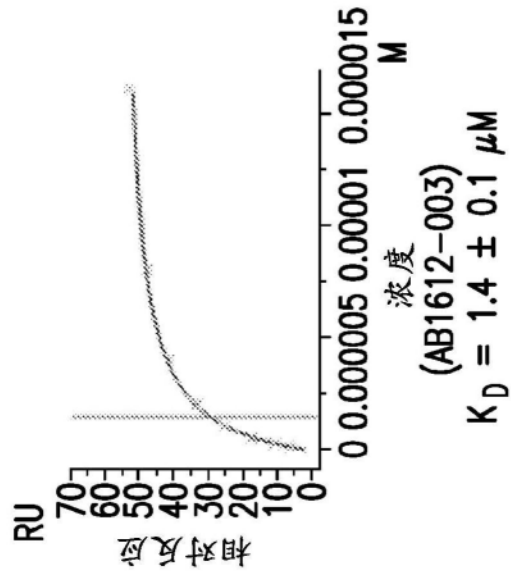


图78E

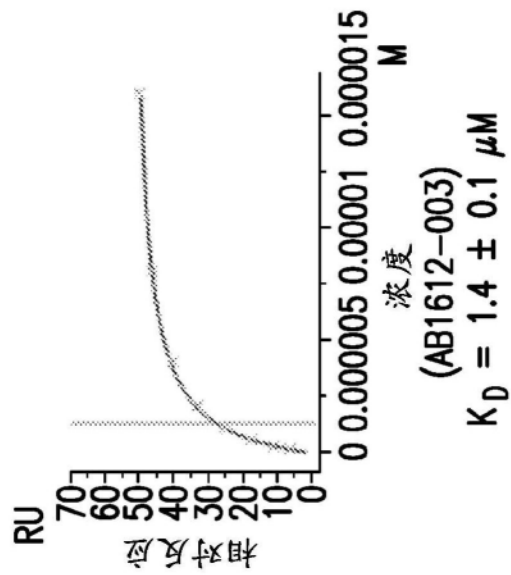


图78F

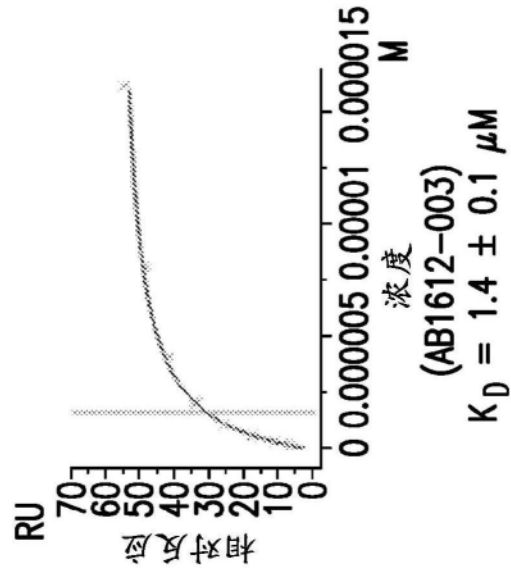


图78G

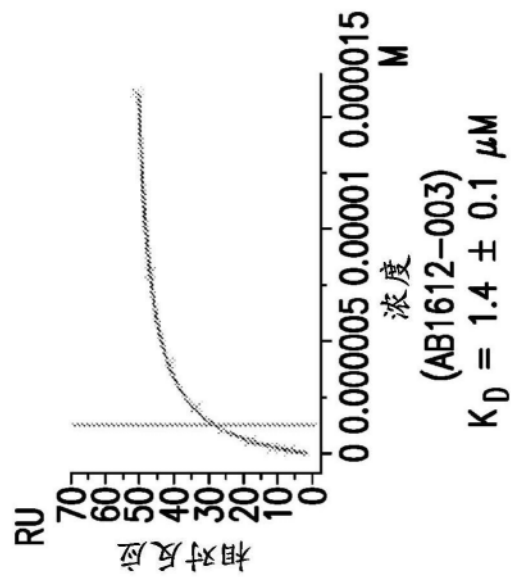


图78H

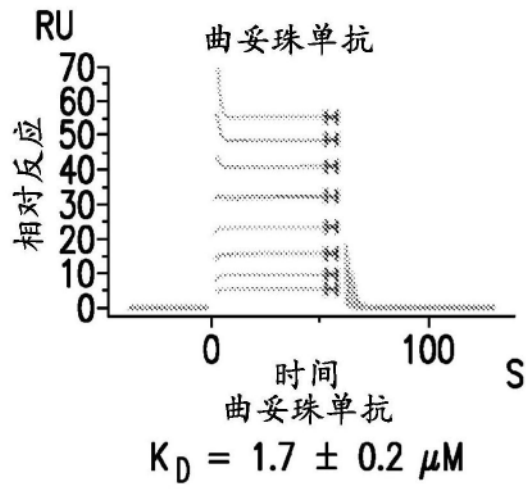


图78I

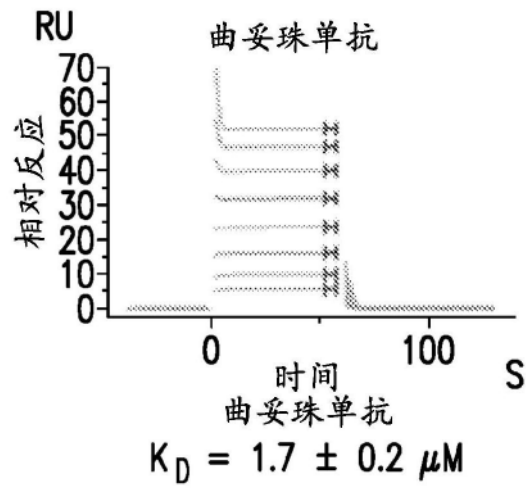


图78J

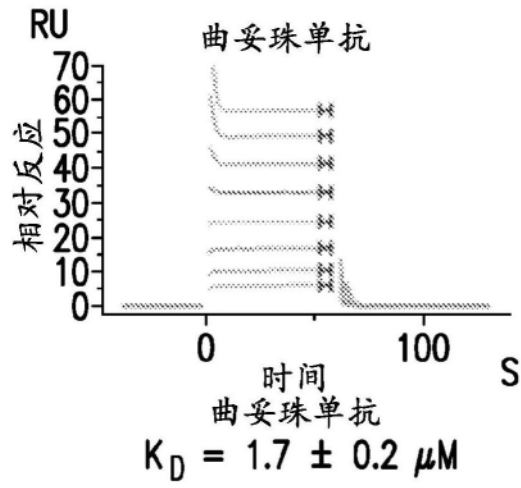


图78K

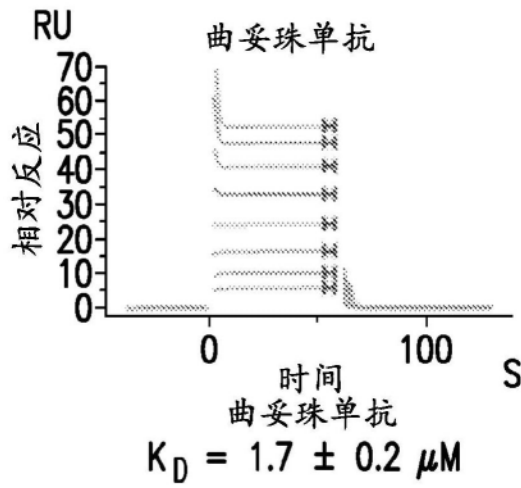


图78L

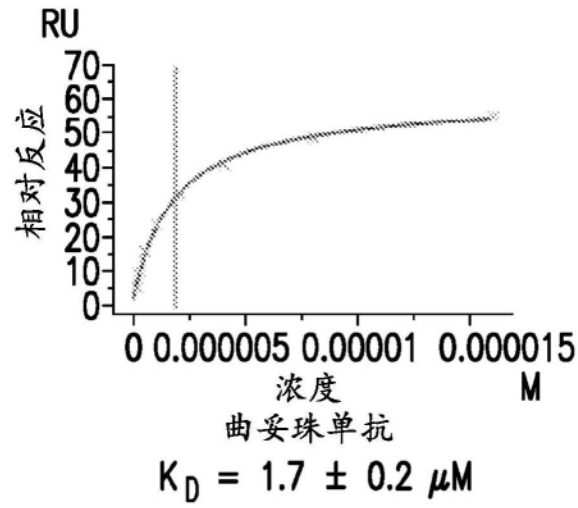


图78M

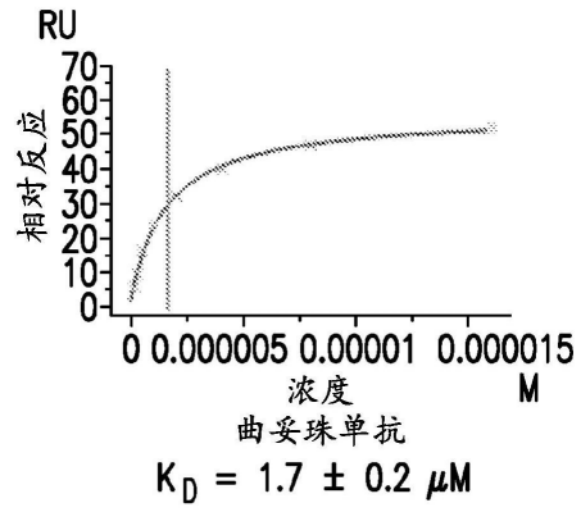


图78N

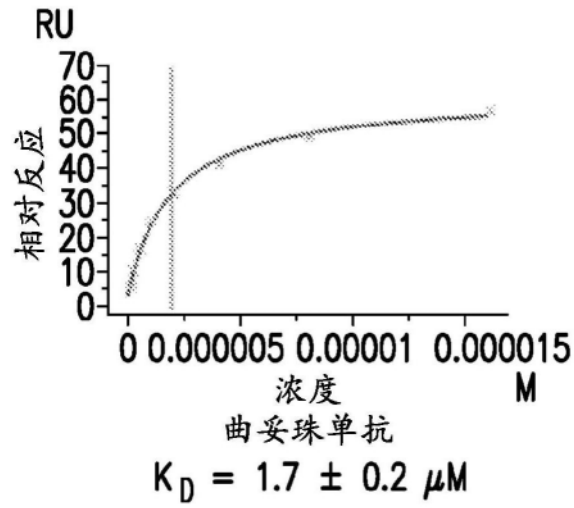


图780

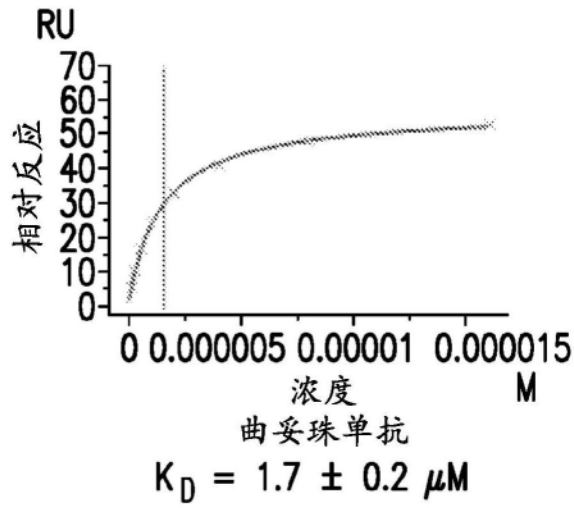


图78P

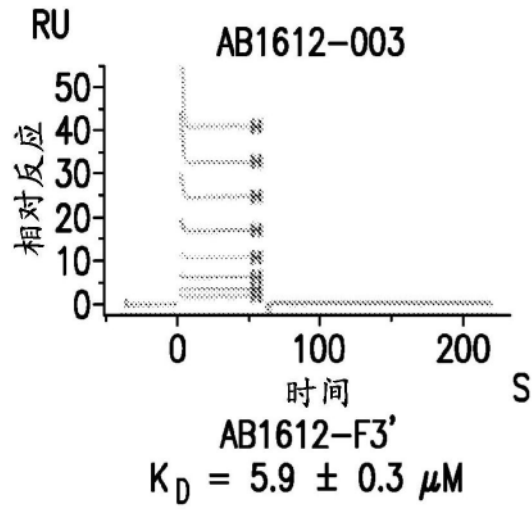


图79A

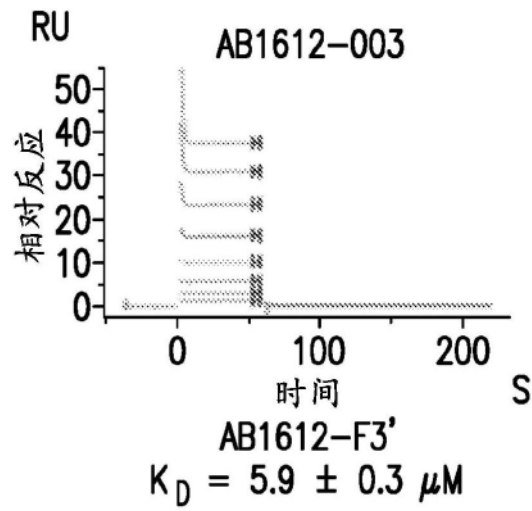


图79B

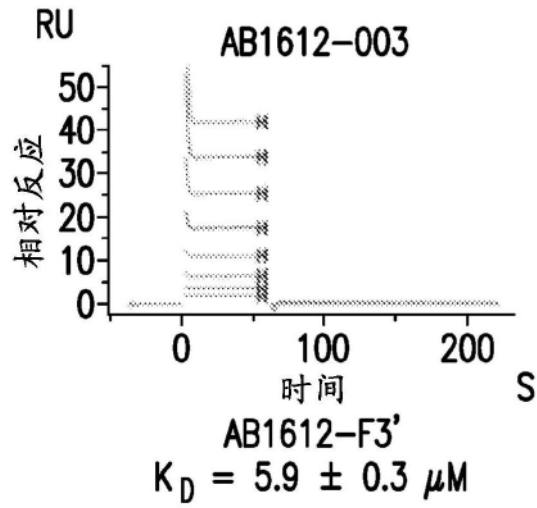


图79C

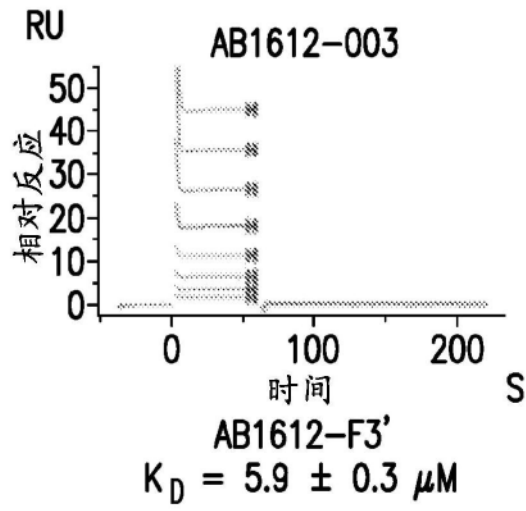


图79D

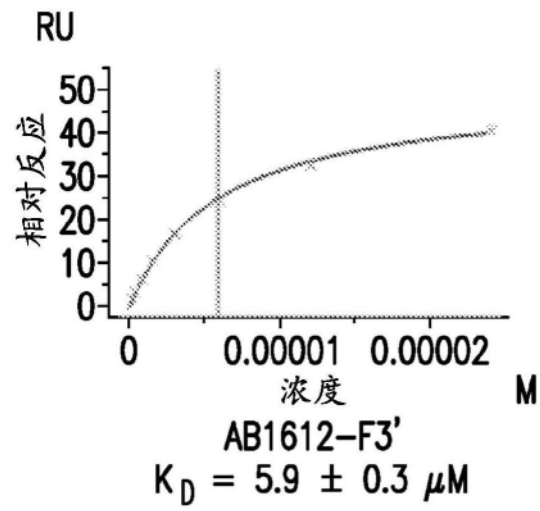


图79E

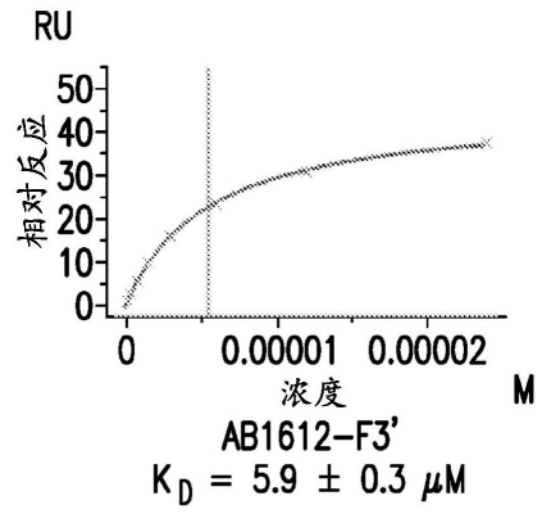


图79F

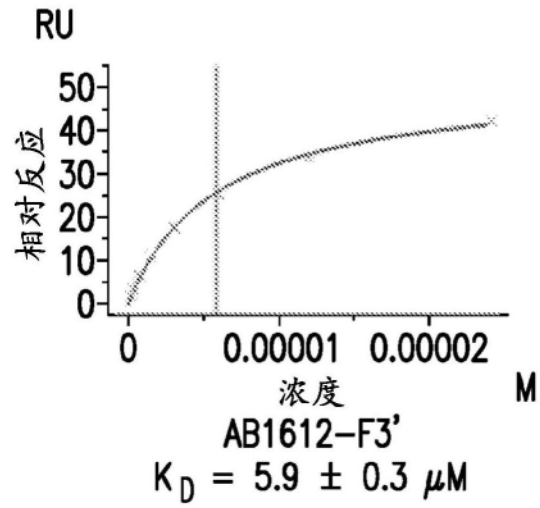


图79G

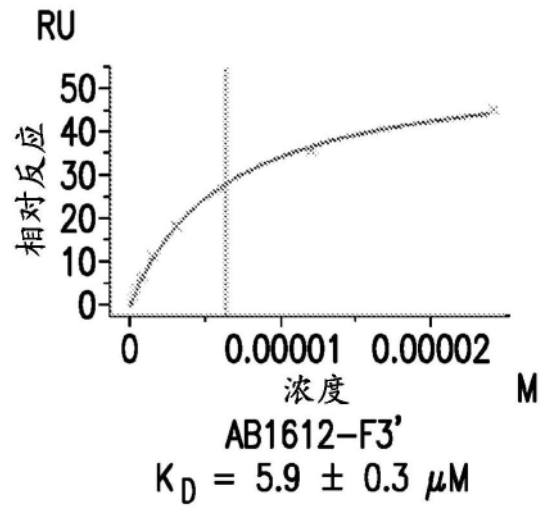


图79H

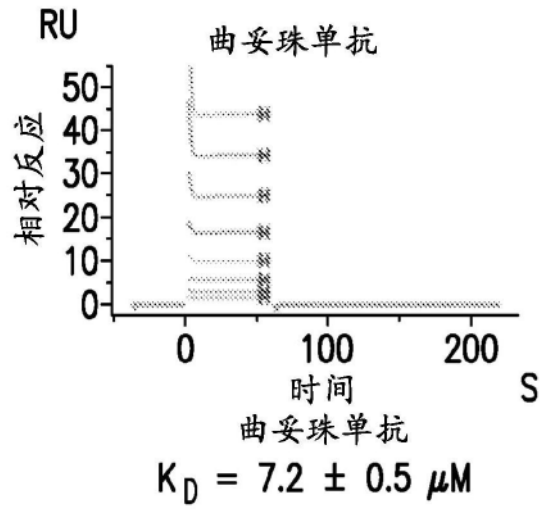


图79I

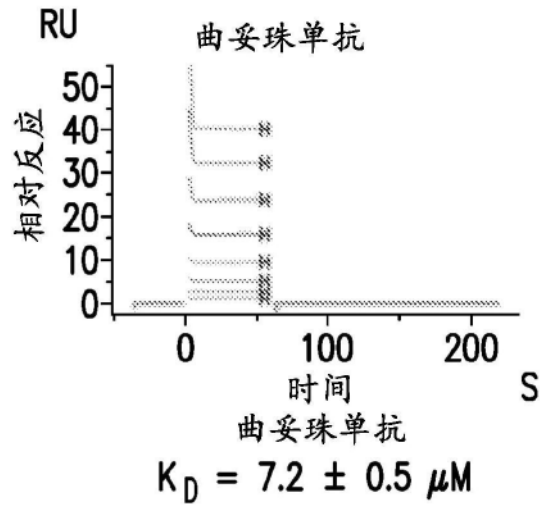


图79J

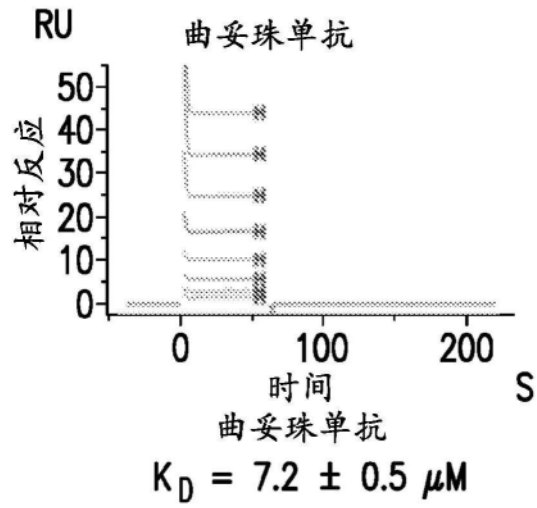


图79K

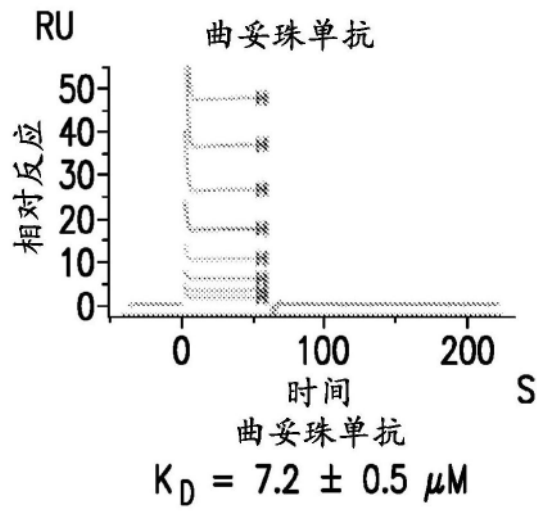


图79L

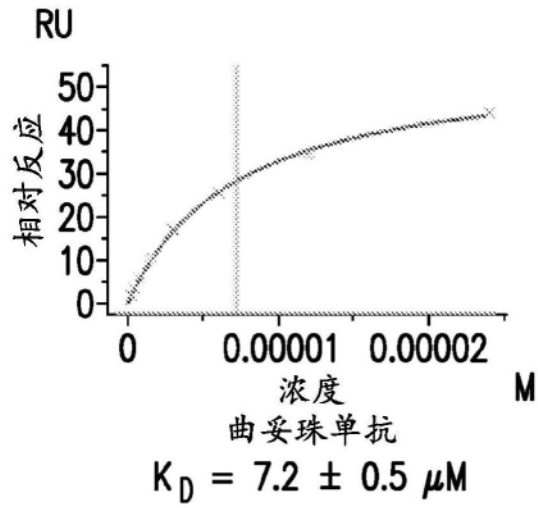


图79M

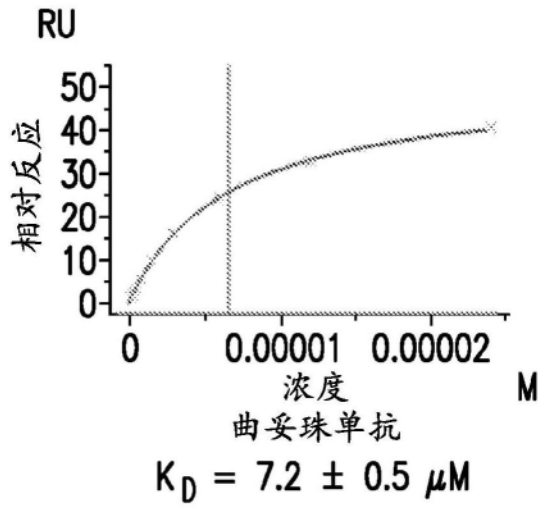


图79N

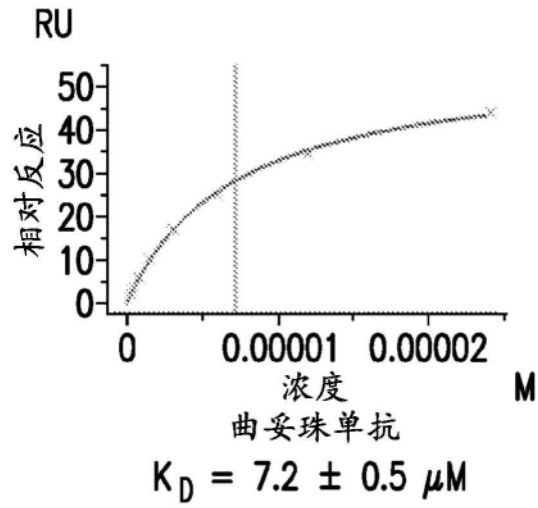


图790

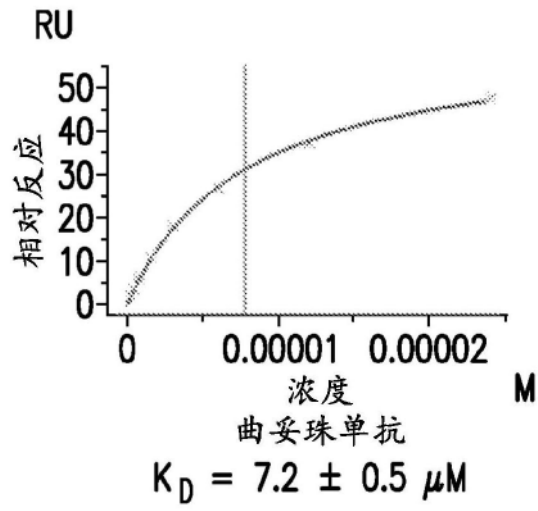


图79P

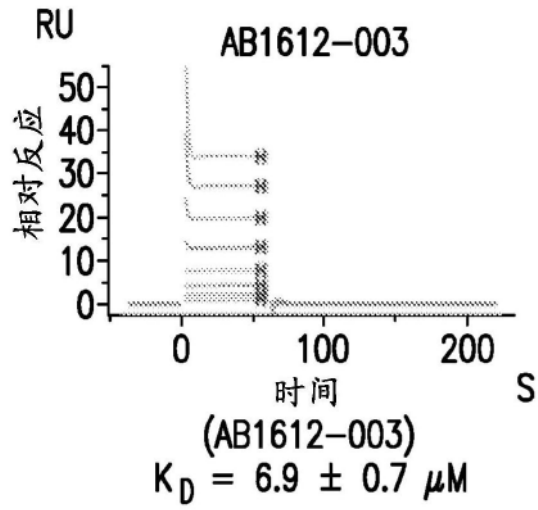


图80A

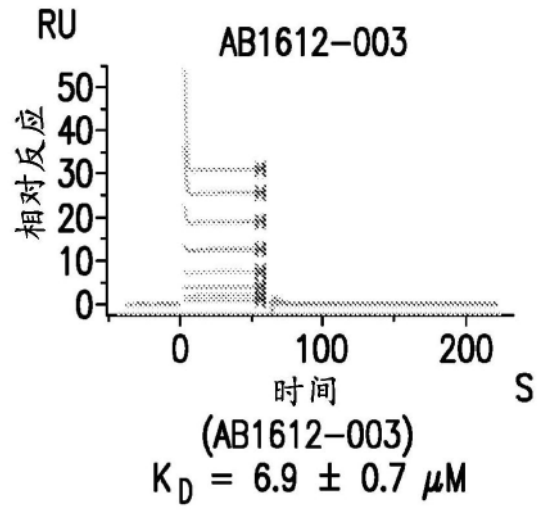


图80B

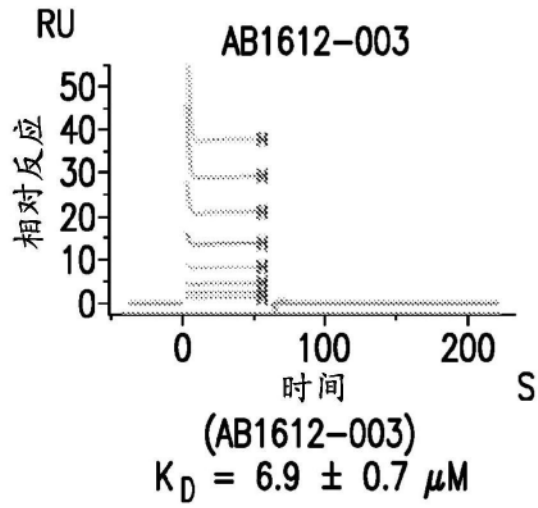


图80C

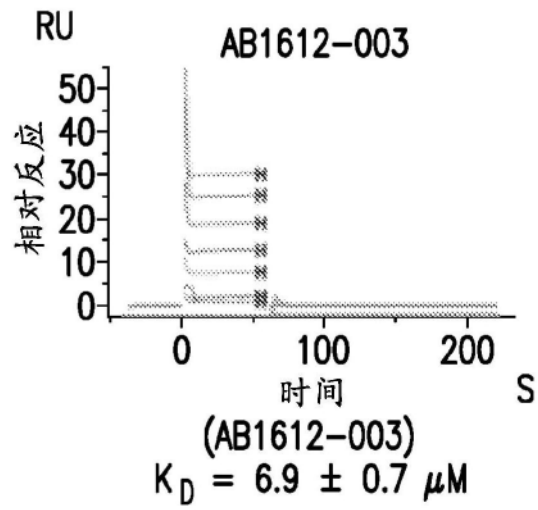


图80D

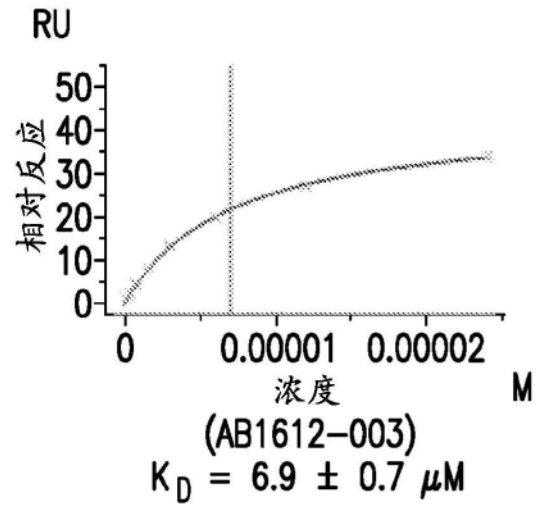


图80E

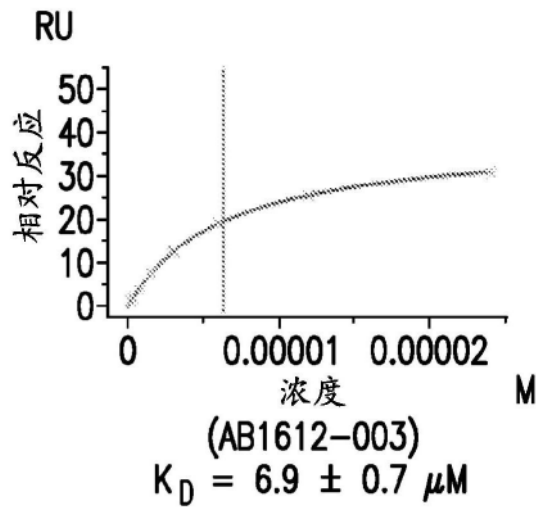


图80F

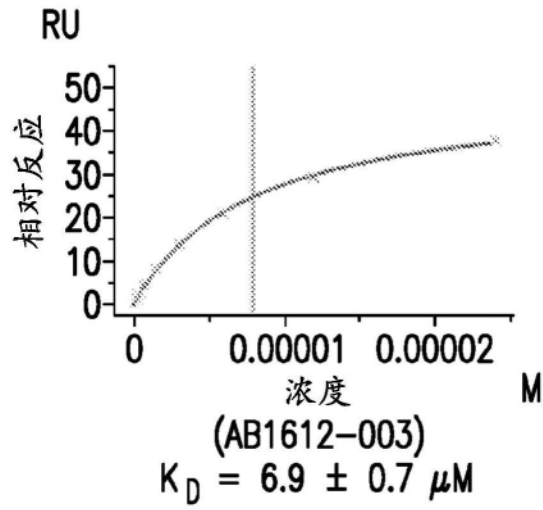


图80G

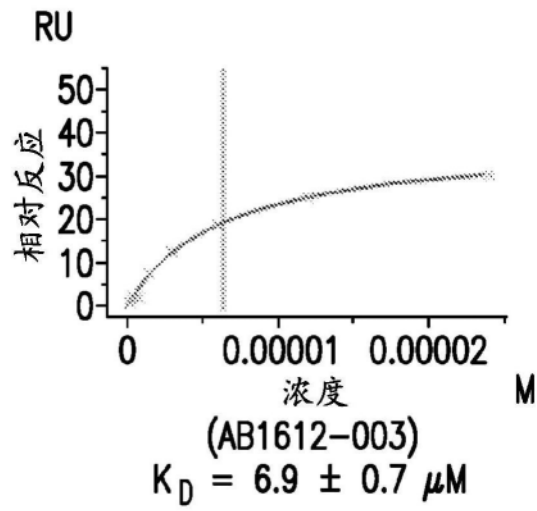


图80H

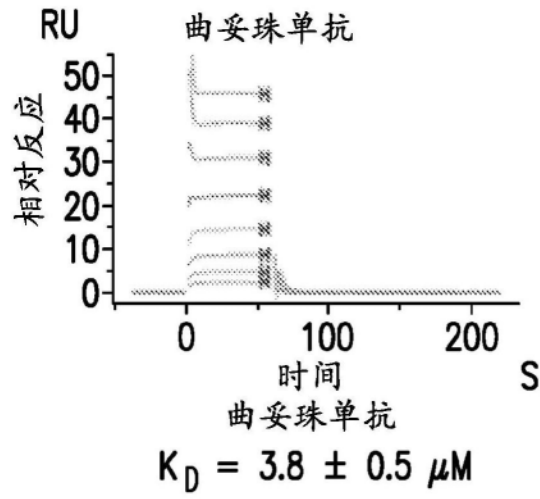


图80I

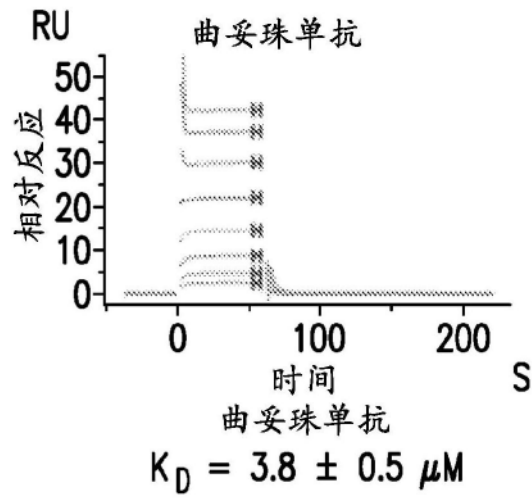


图80J

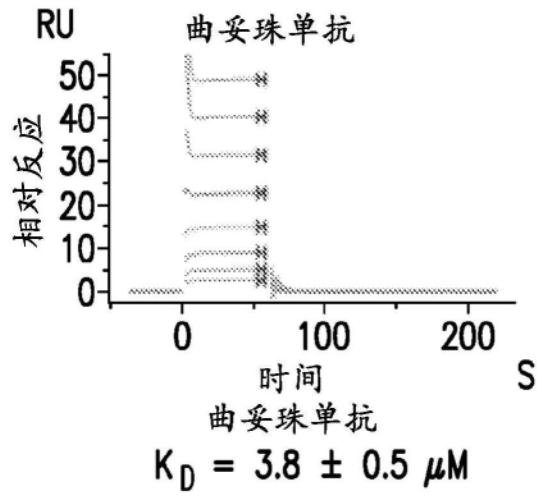


图80K

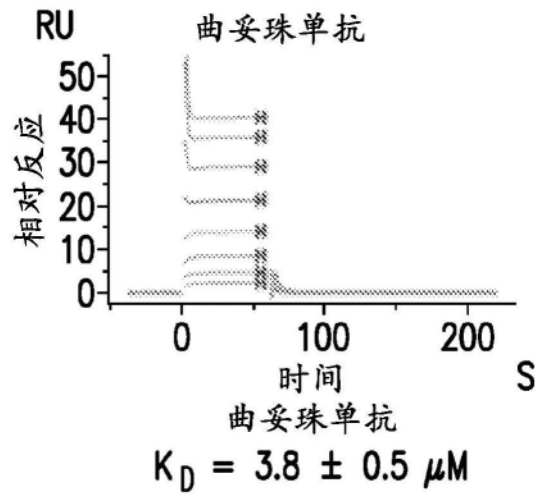


图80L

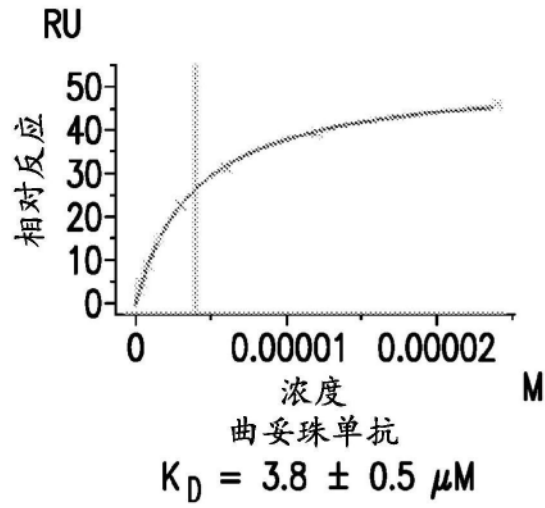


图80M

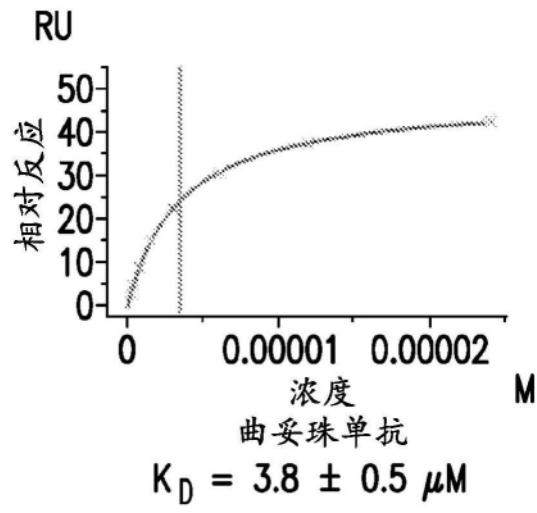


图80N

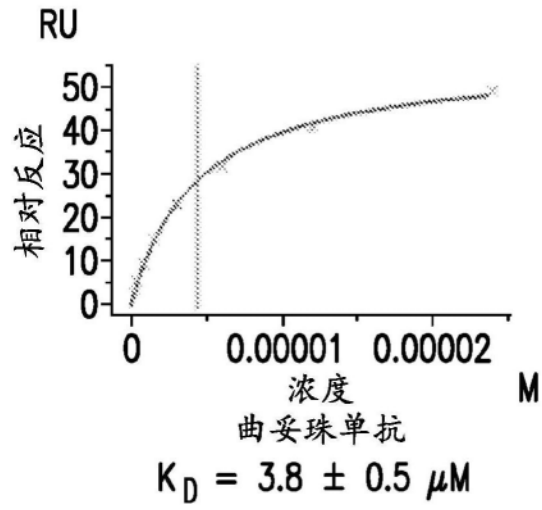


图800

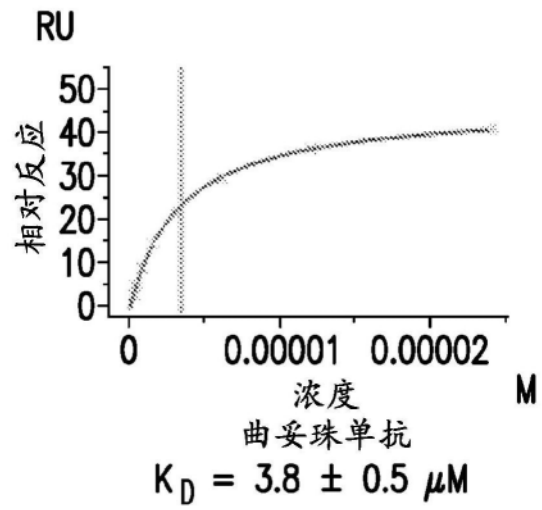


图80P

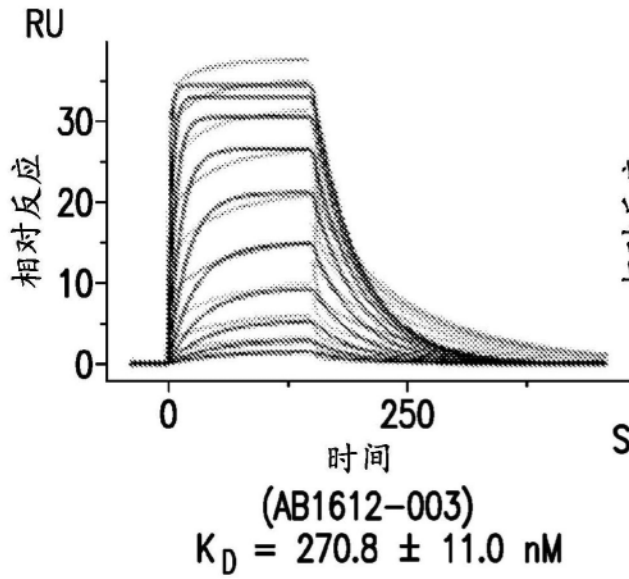


图 81A

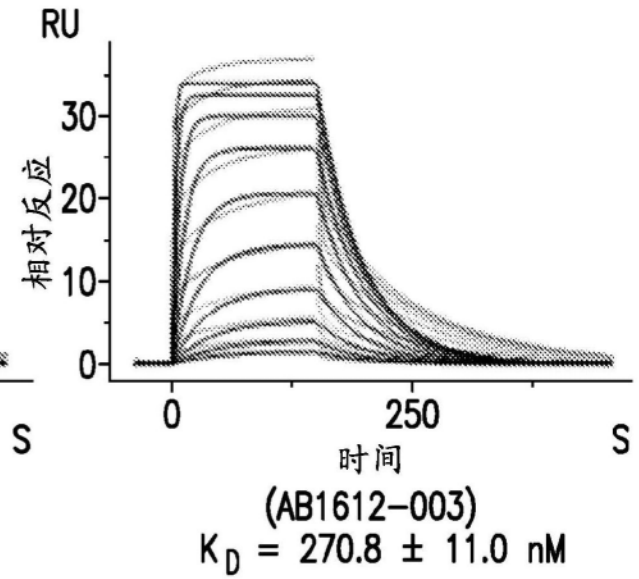


图 81B

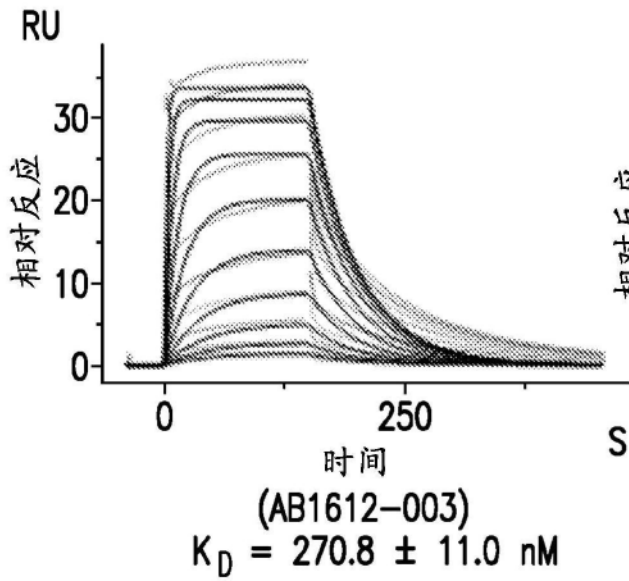


图 81C

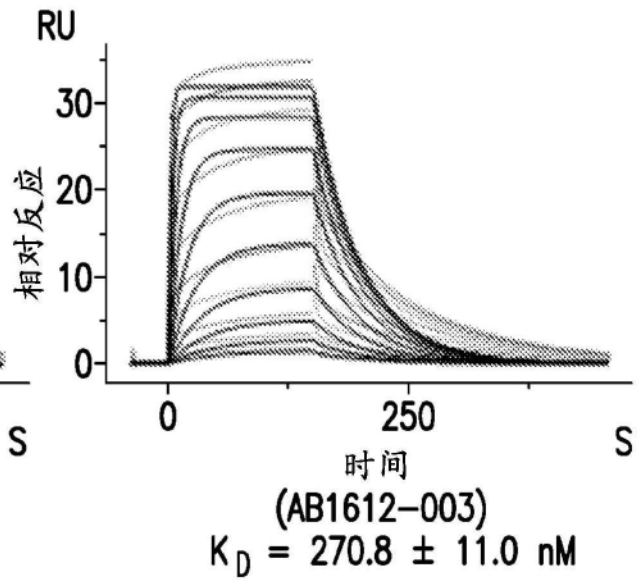
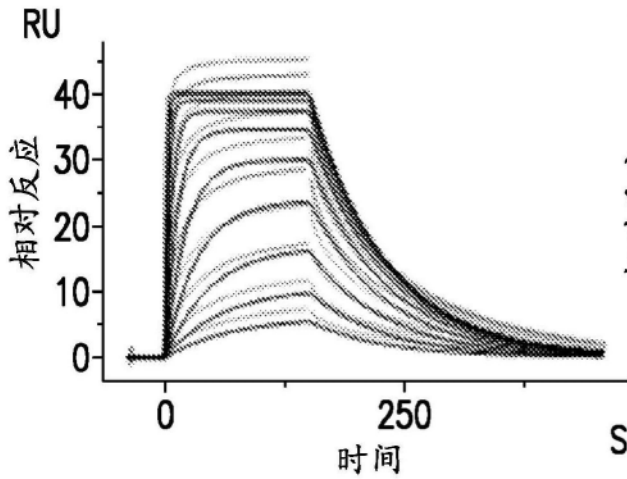
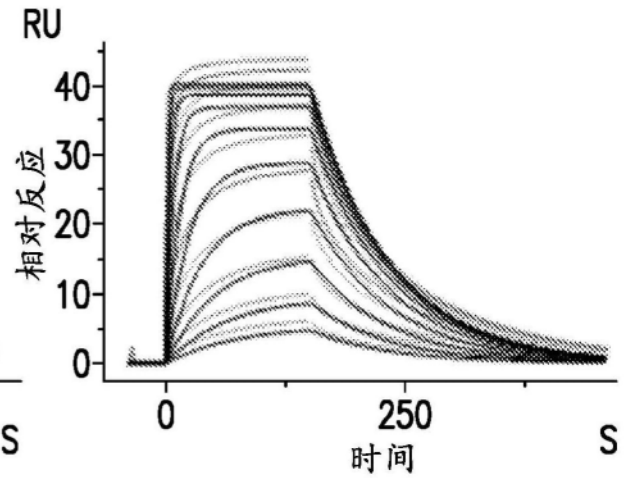


图 81D



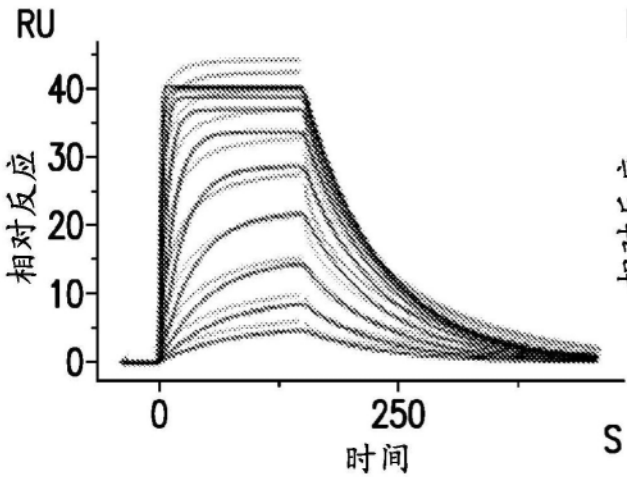
曲妥珠单抗  
 $K_D = 73.7 \pm 6.8 \text{ nM}$

图 81E



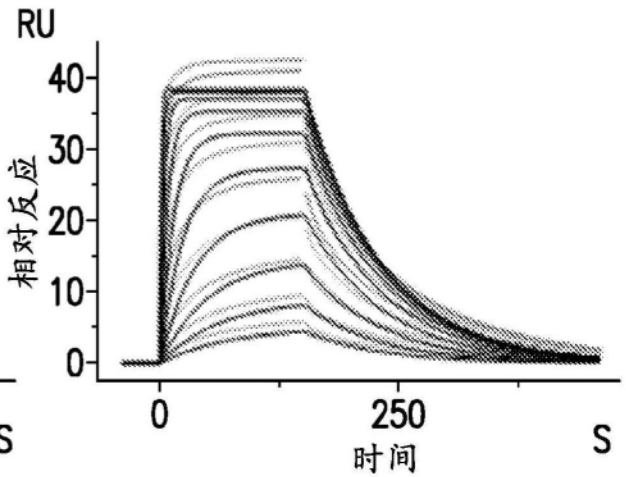
曲妥珠单抗  
 $K_D = 73.7 \pm 6.8 \text{ nM}$

图 81F



曲妥珠单抗  
 $K_D = 73.7 \pm 6.8 \text{ nM}$

图 81G



曲妥珠单抗  
 $K_D = 73.7 \pm 6.8 \text{ nM}$

图 81H

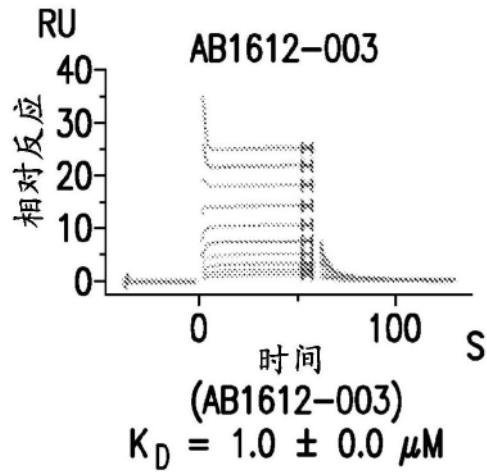


图82A

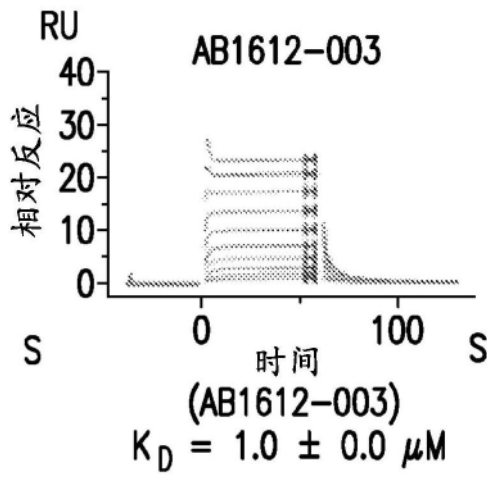


图82B

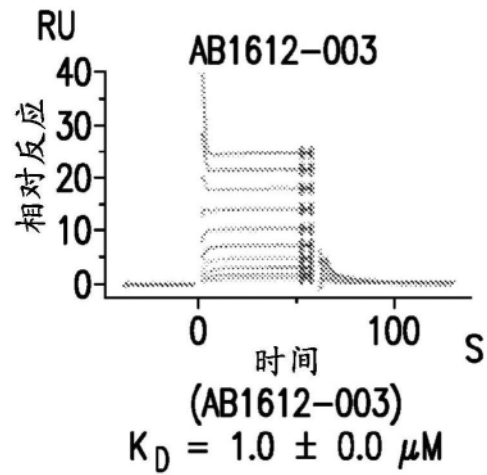


图82C

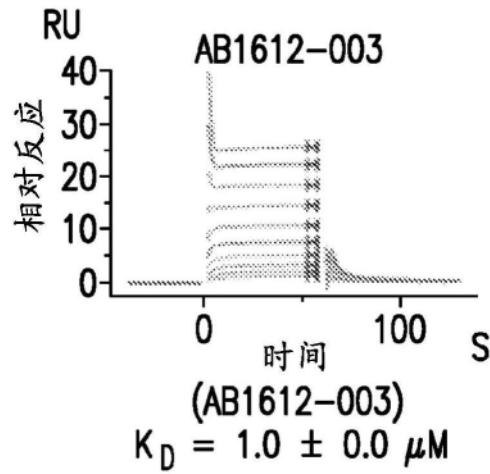


图82D

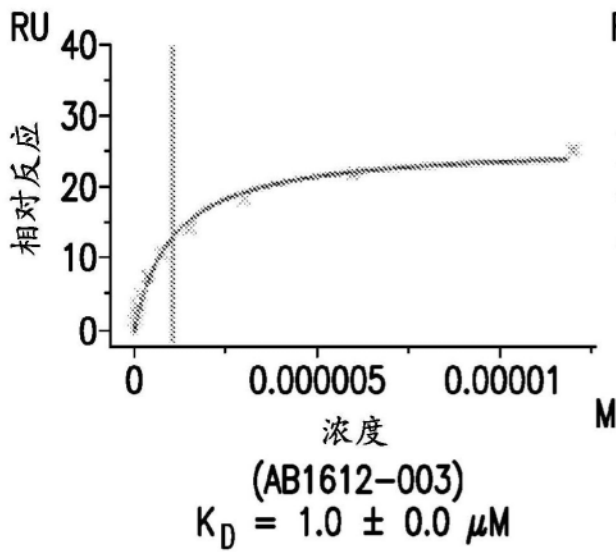


图 82E

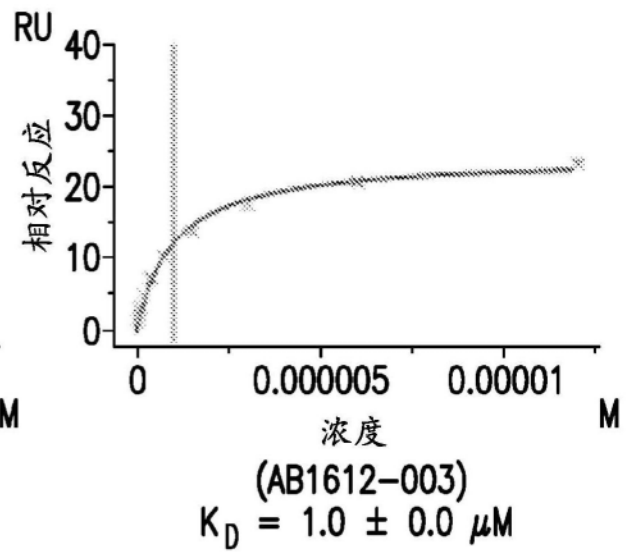
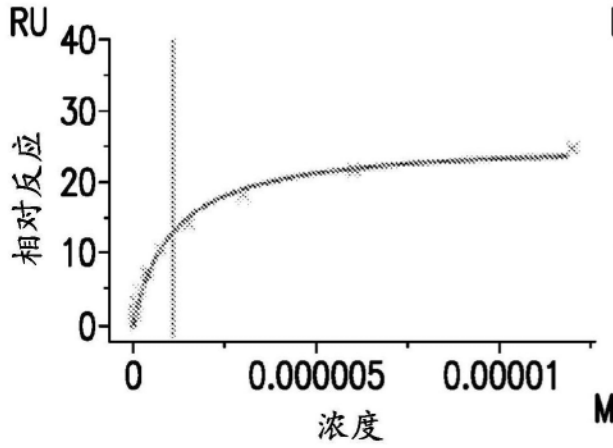
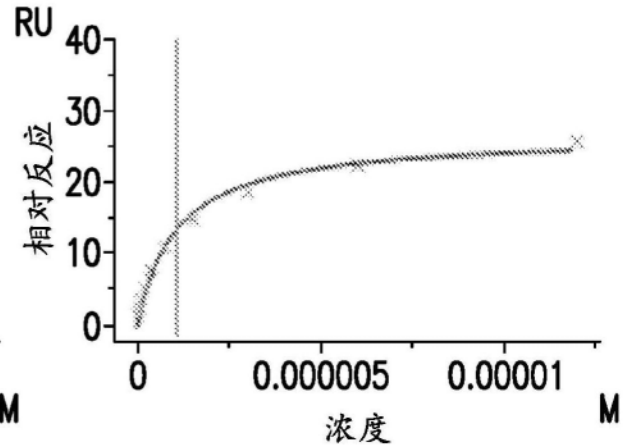


图 82F



(AB1612-003)  
 $K_D = 1.0 \pm 0.0 \mu\text{M}$

图 82G



(AB1612-003)  
 $K_D = 1.0 \pm 0.0 \mu\text{M}$

图 82H

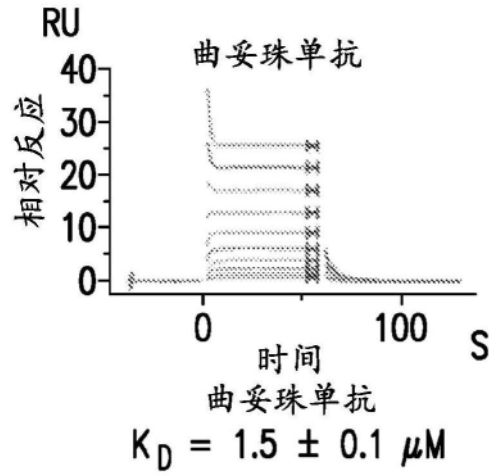


图82I

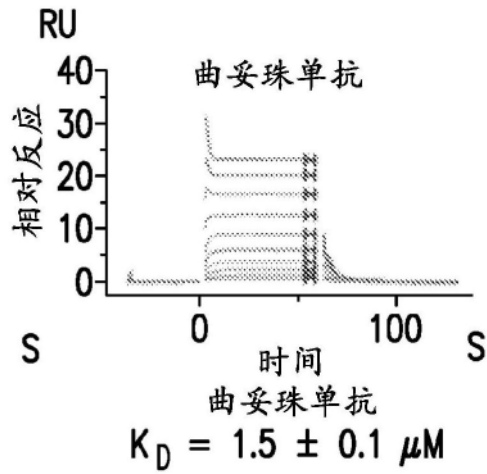


图82J

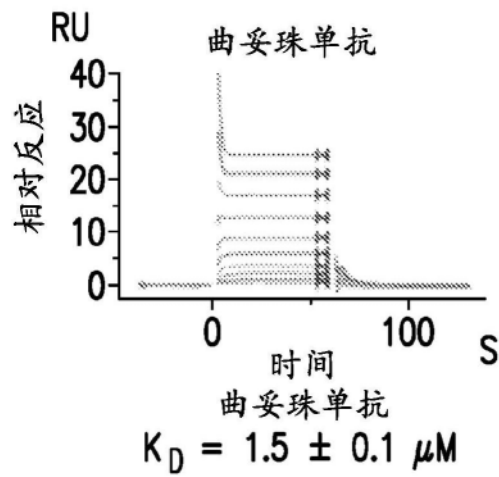


图82K

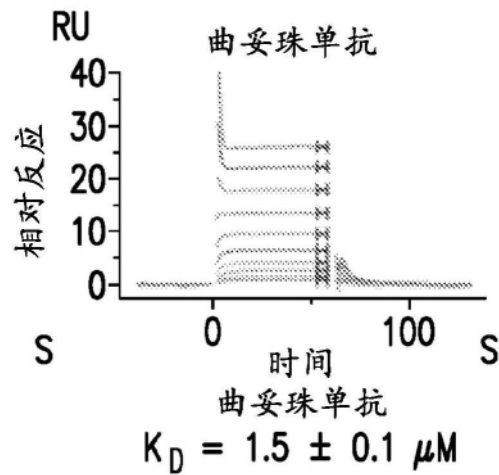


图82L

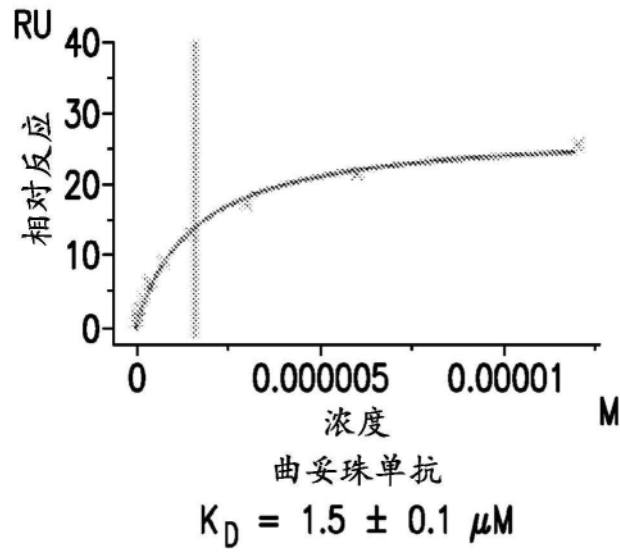


图82M

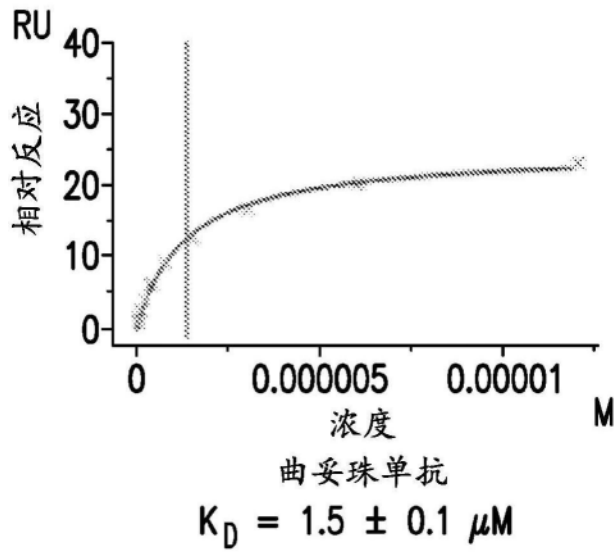
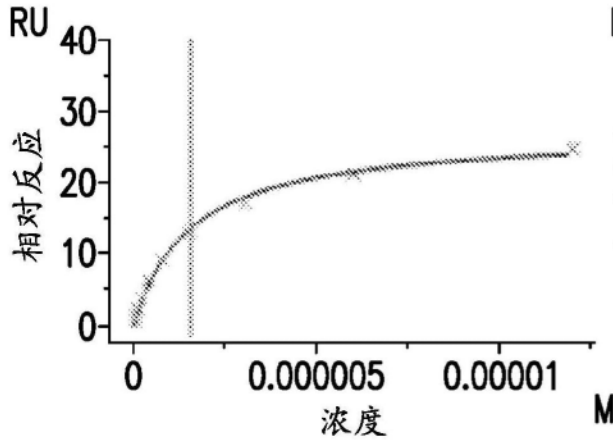
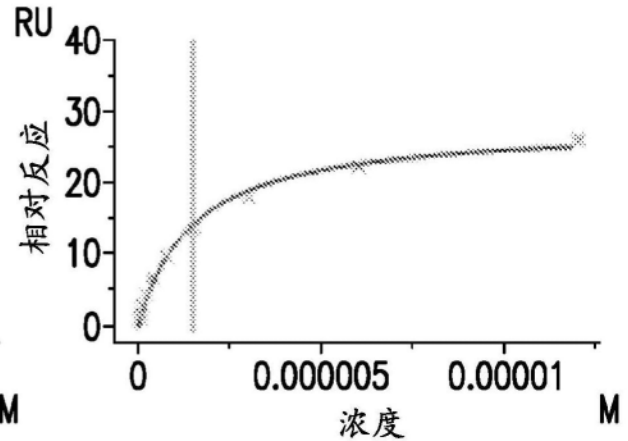


图82N



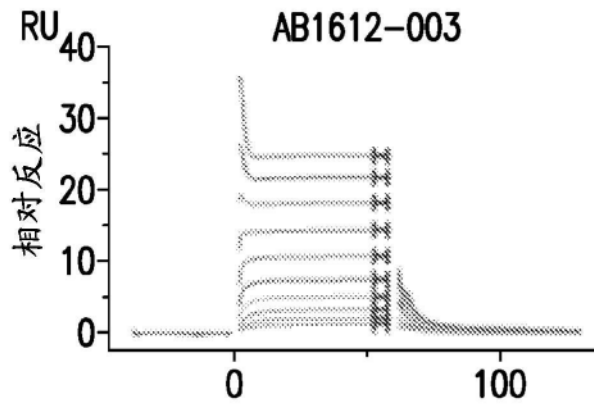
曲妥珠单抗  
 $K_D = 1.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$

图 82O



曲妥珠单抗  
 $K_D = 1.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$

图 82P



AB1612-003  
(AB1612-003)  
 $K_D = 1.0 \pm 0.0 \mu\text{M}$

图83A

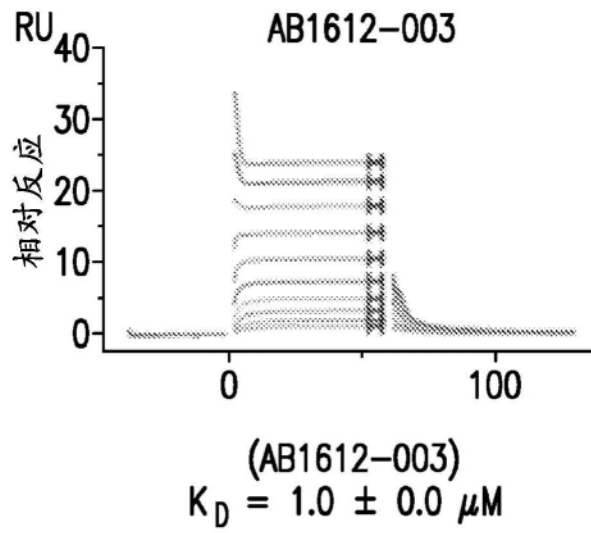


图83B

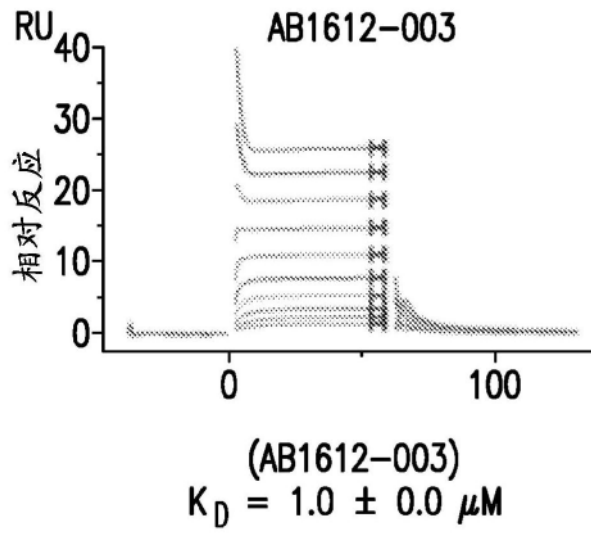


图83C

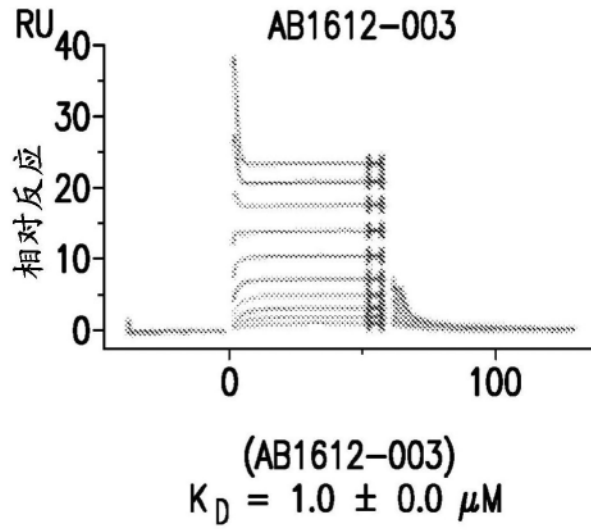


图83D

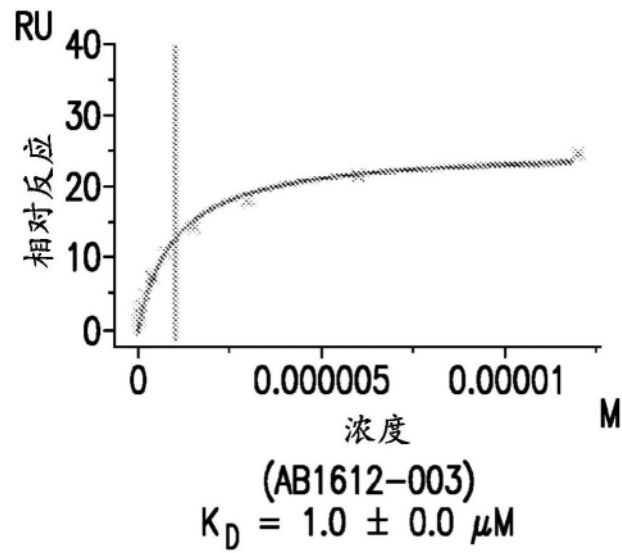


图83E

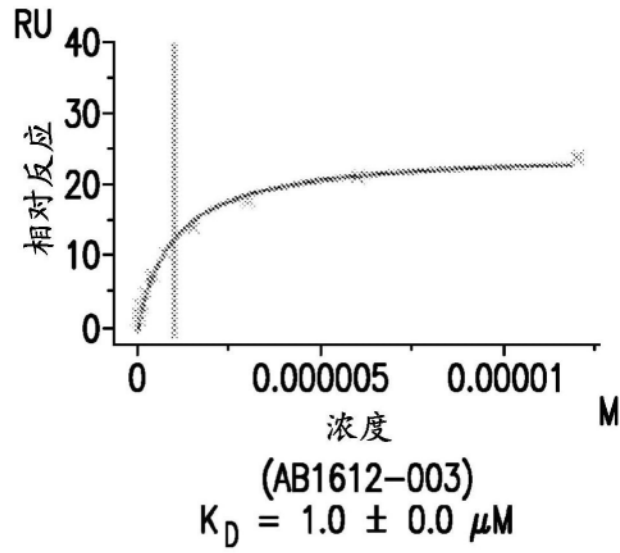


图83F

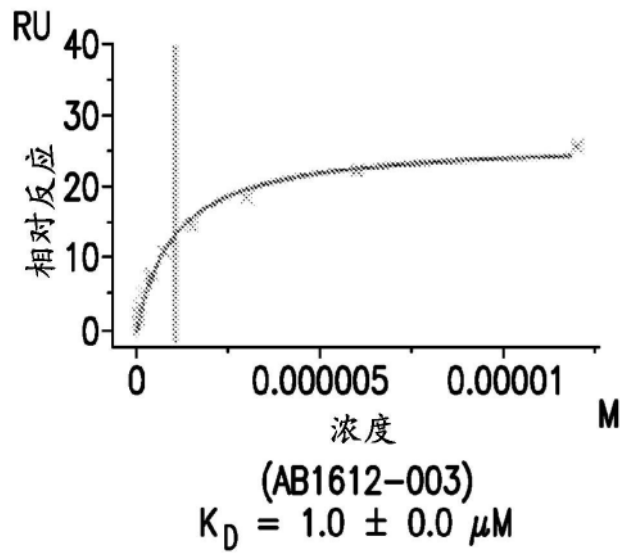


图83G

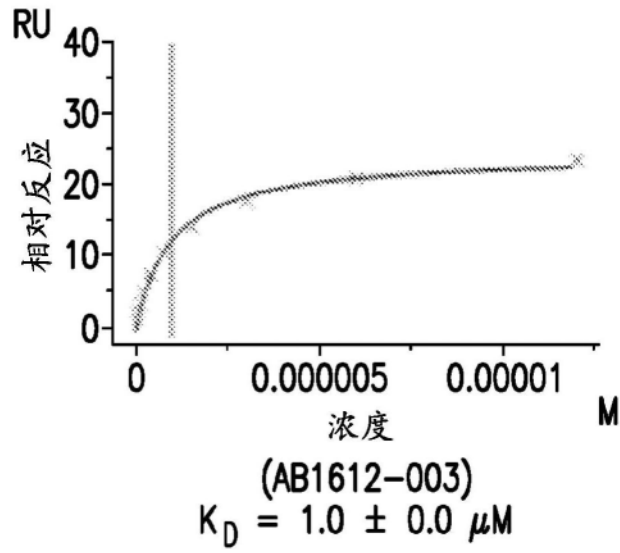


图83H

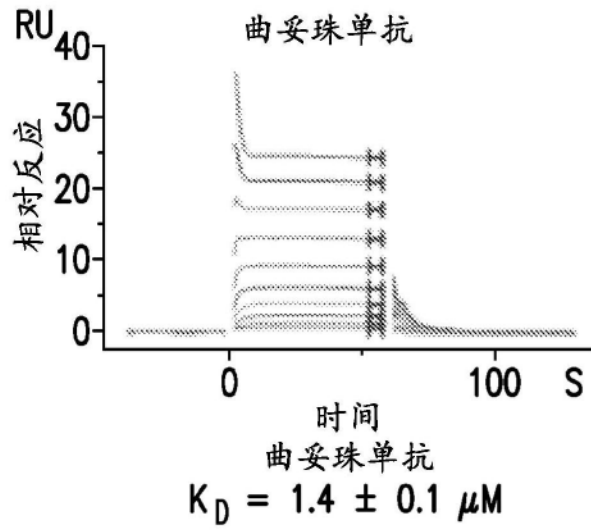


图83I

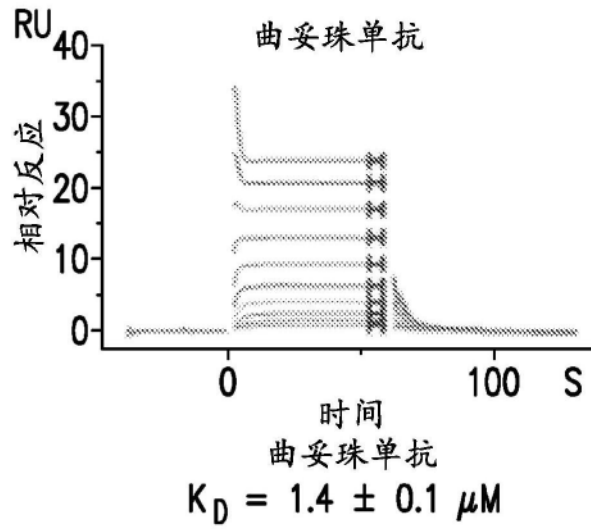


图83J

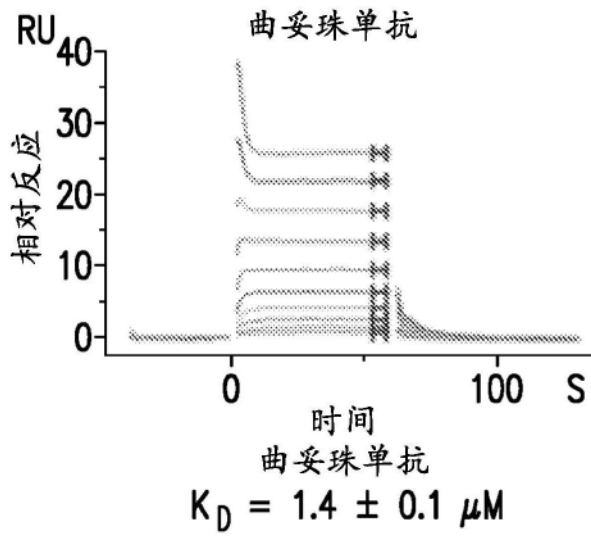


图83K

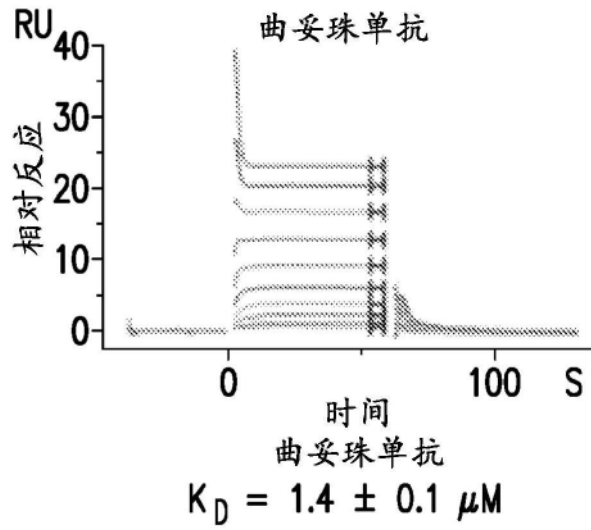


图83L

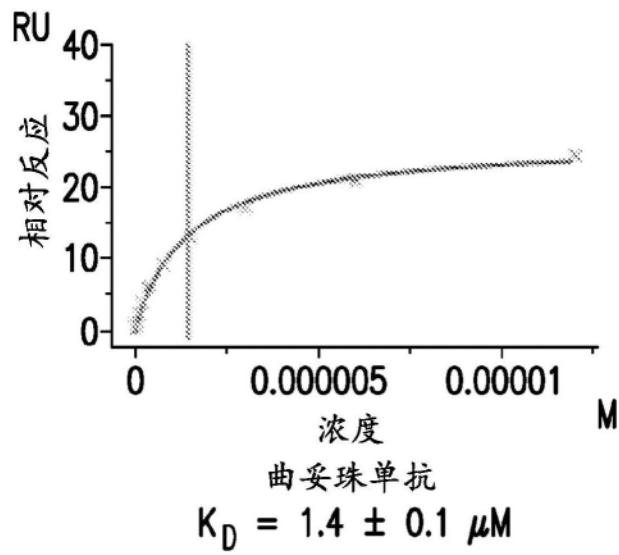


图83M

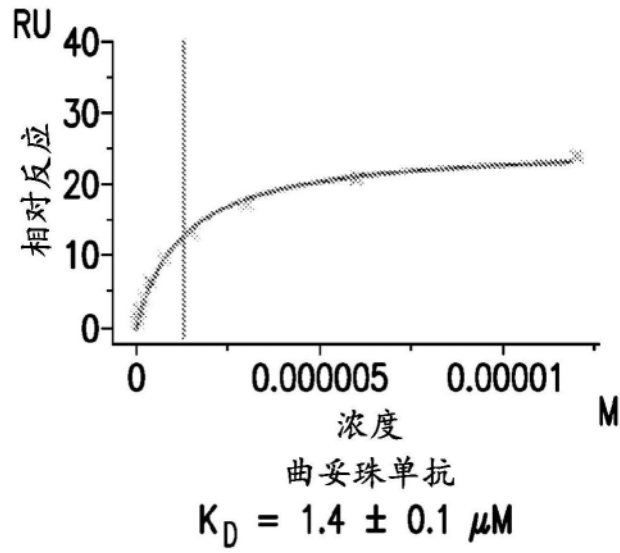


图83N

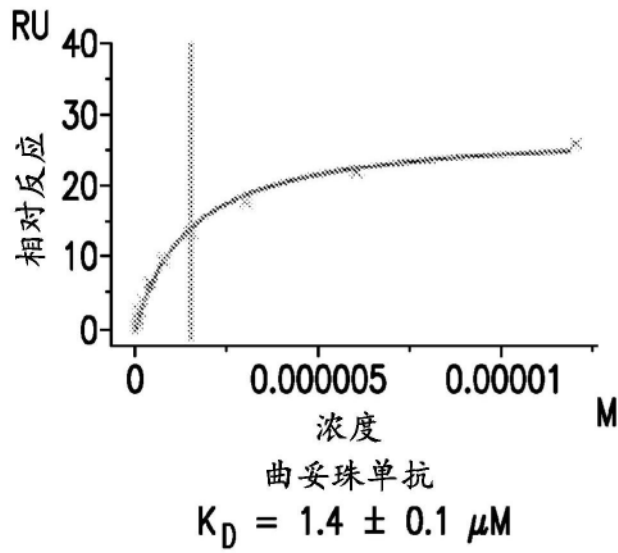


图830

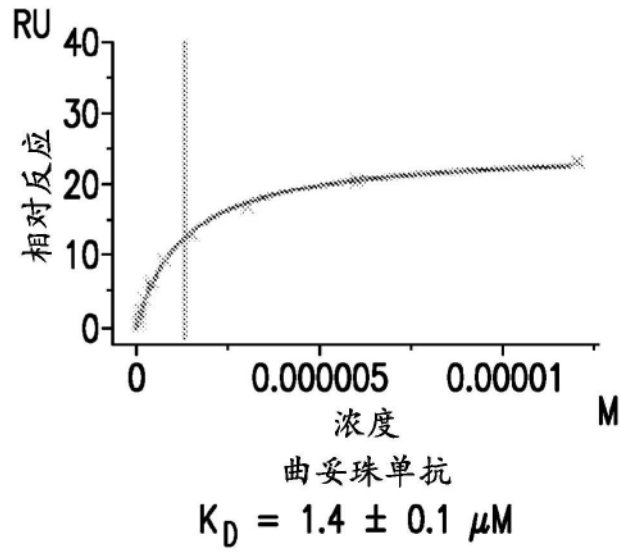


图83P

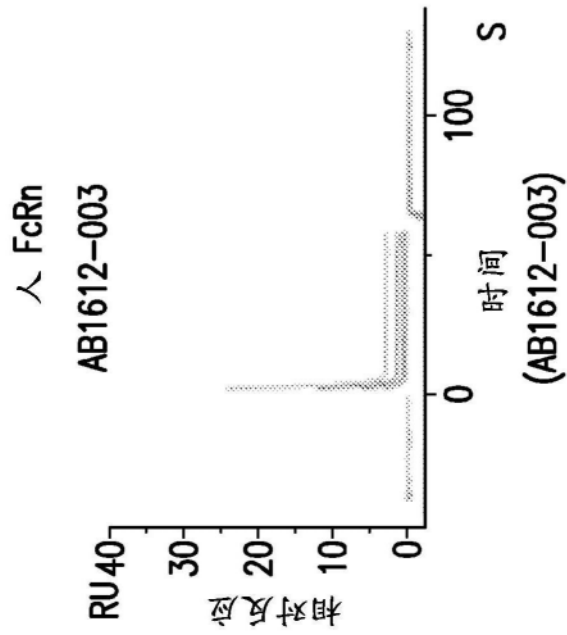


图84A

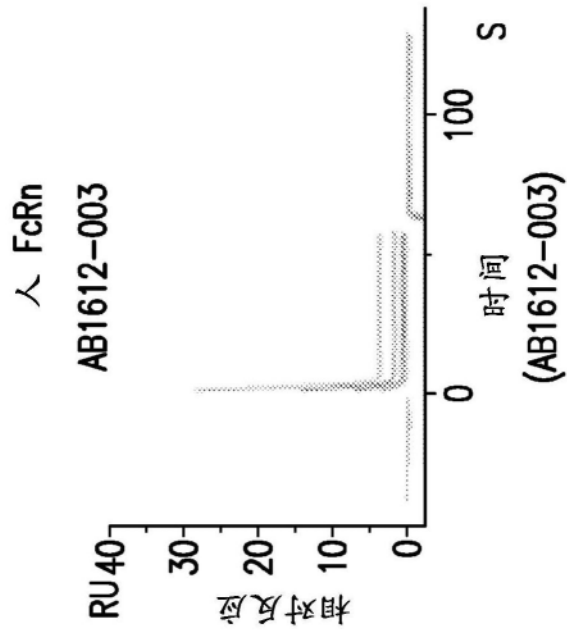


图84B

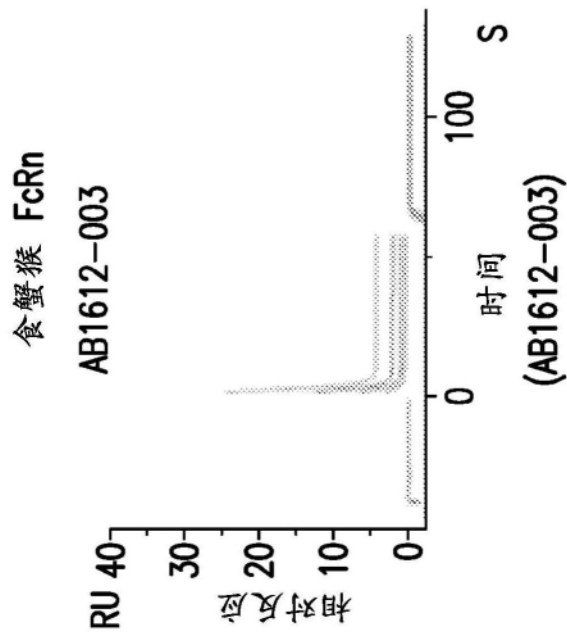


图84C

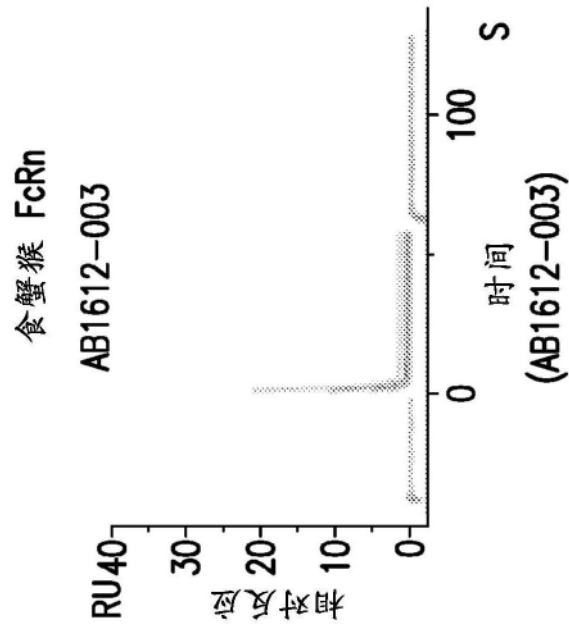


图84D

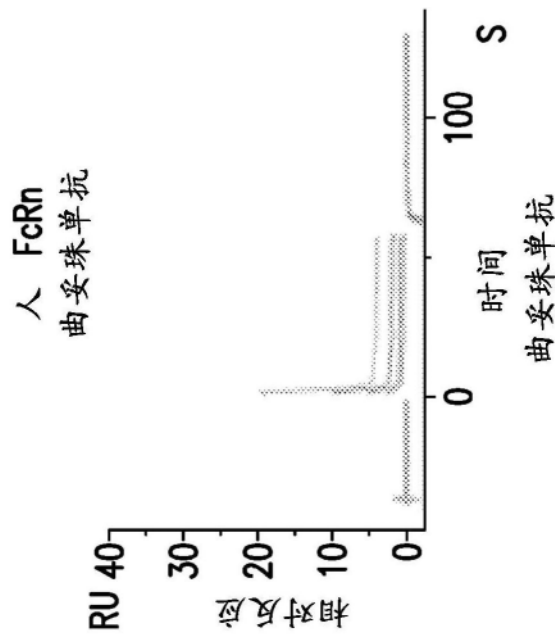


图84E

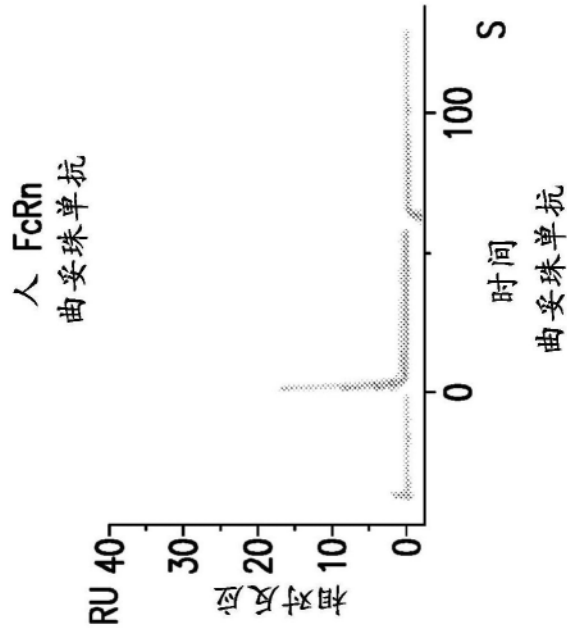


图84F

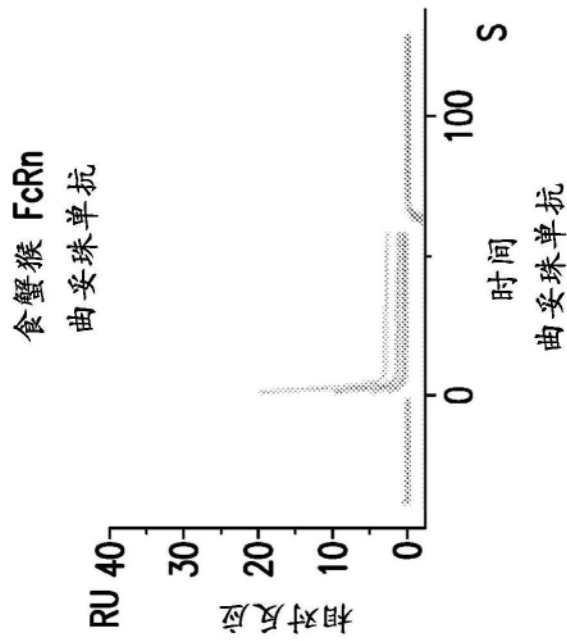


图84G

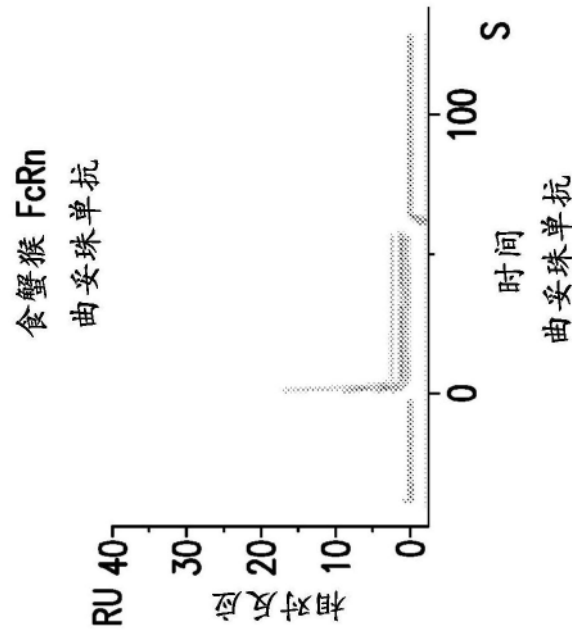


图84H

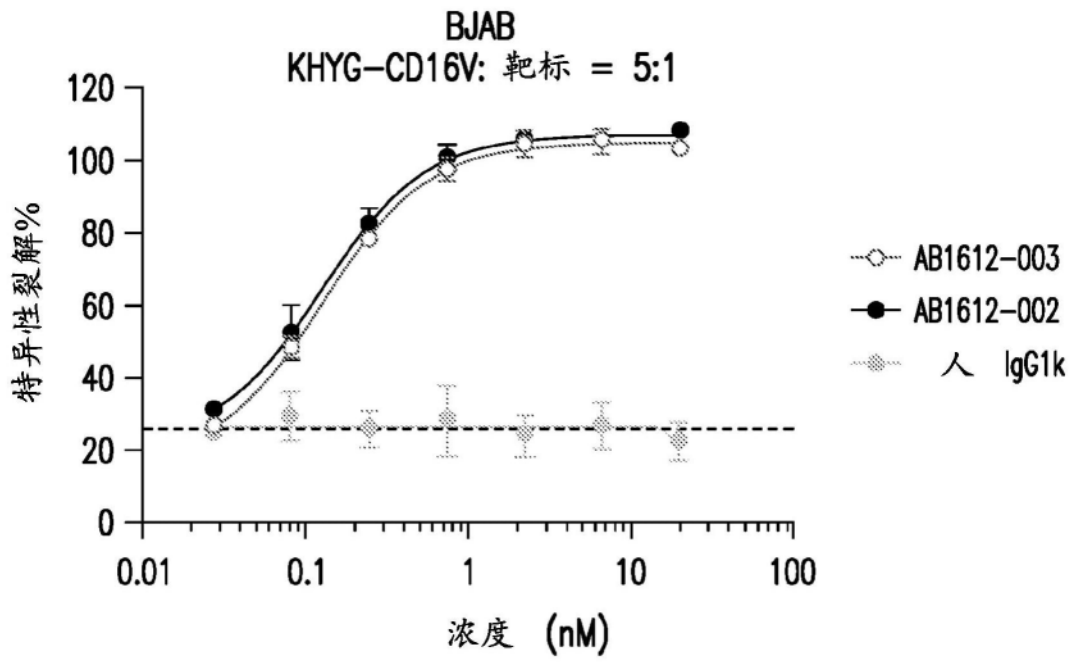


图85

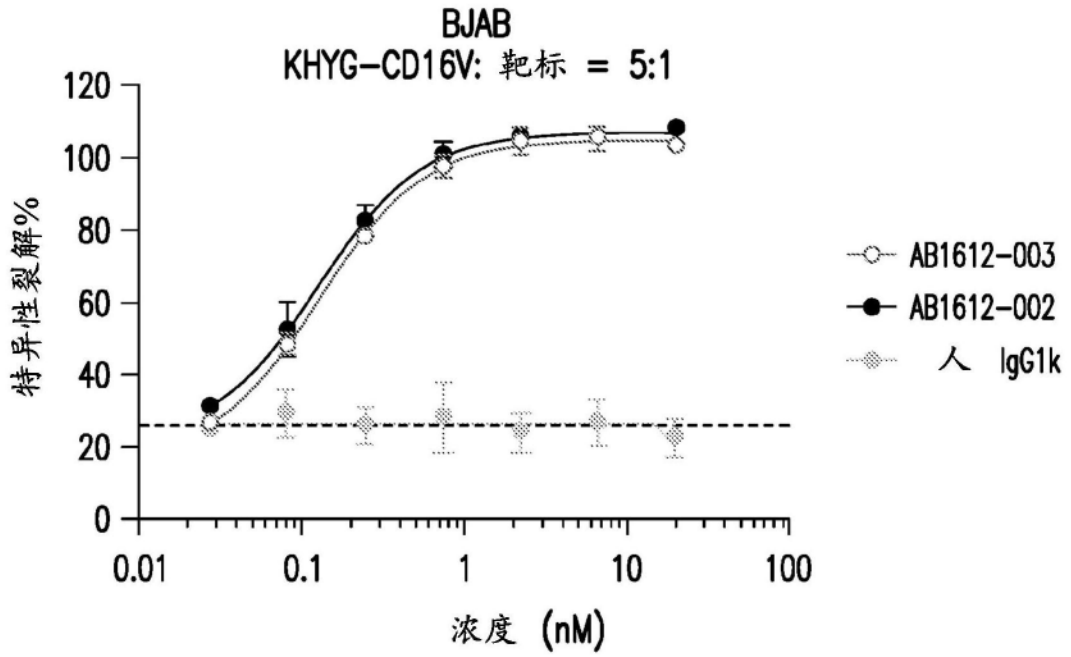


图86A

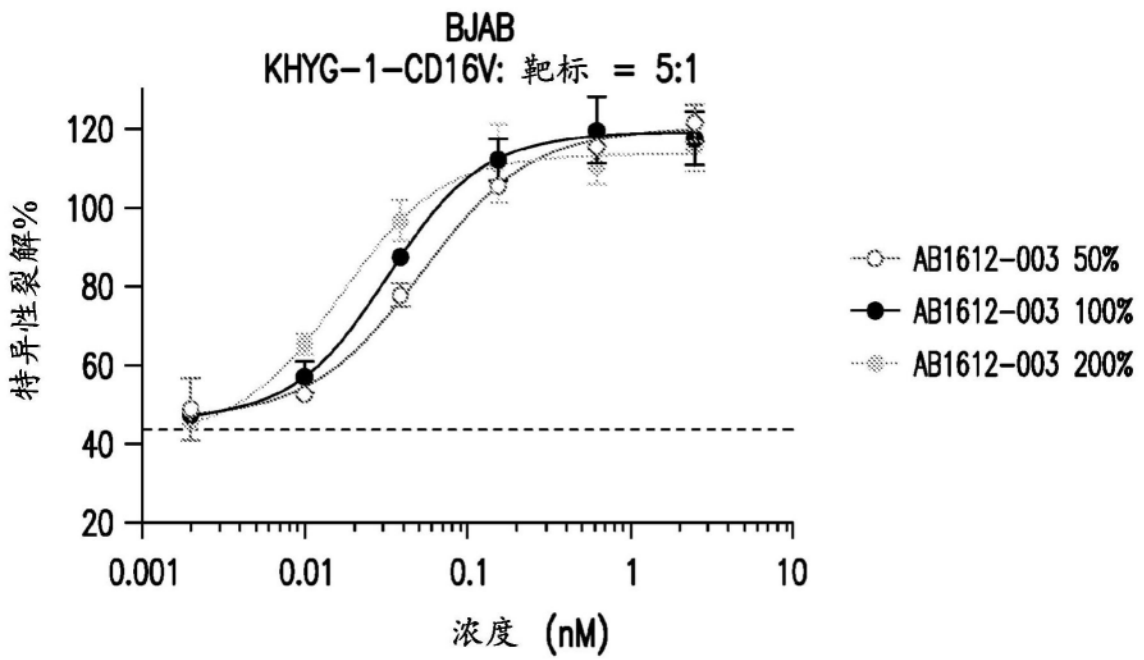


图86B

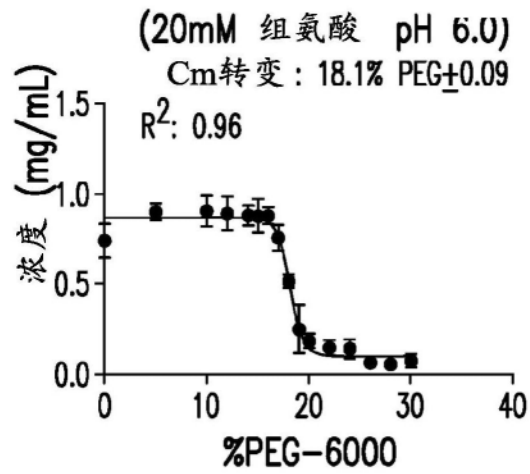


图87A

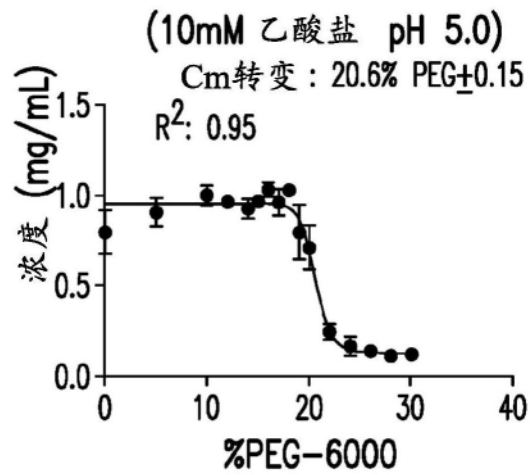


图87B

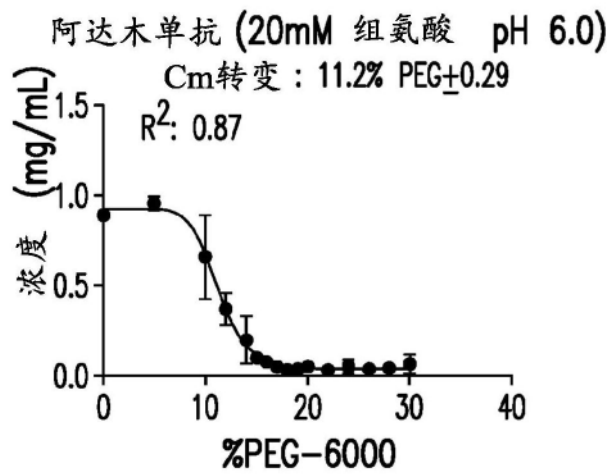


图88A

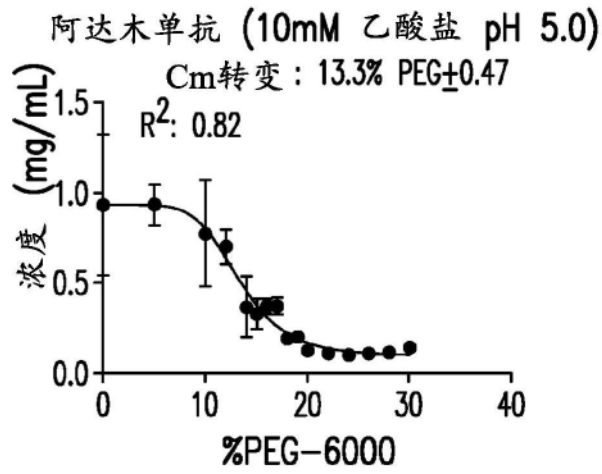


图88B

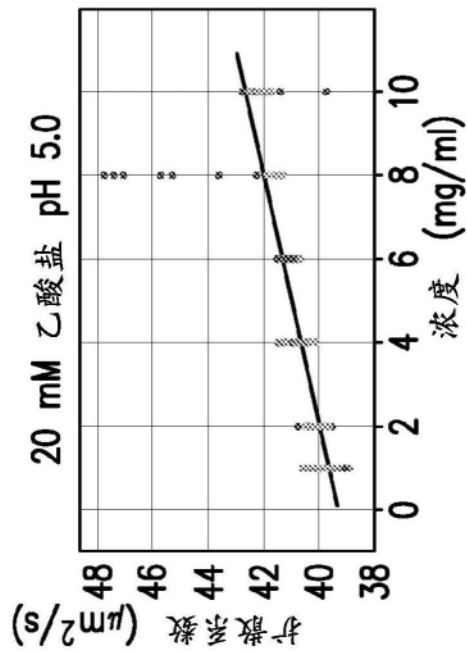


图89A

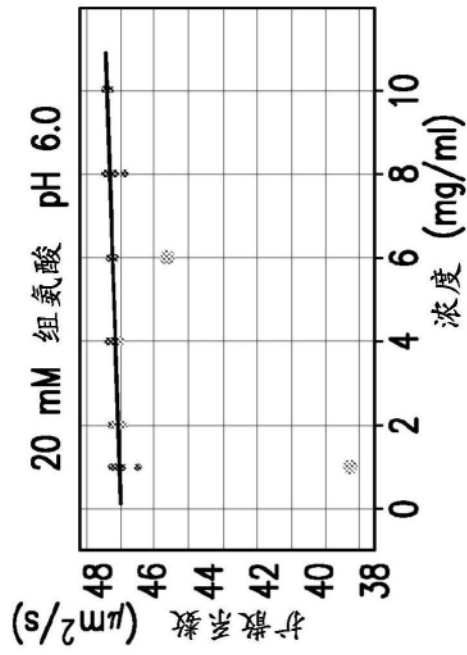


图89B

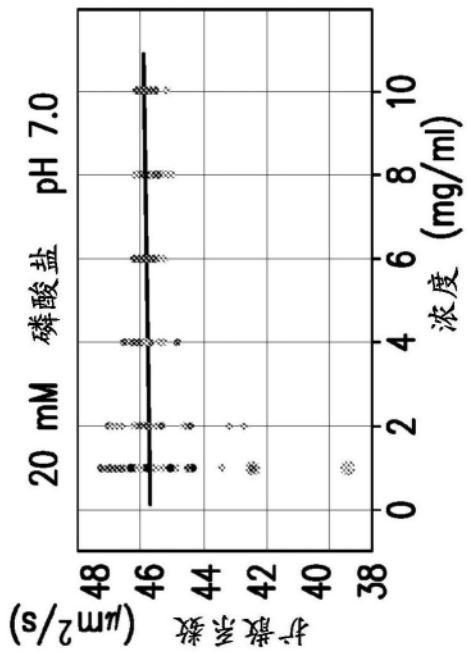


图89C

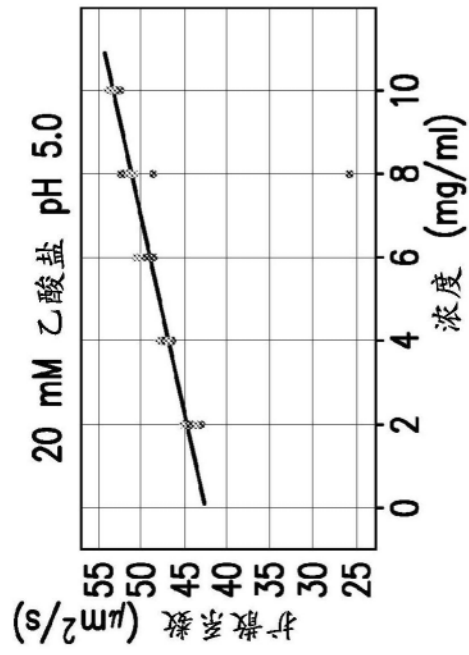


图90A

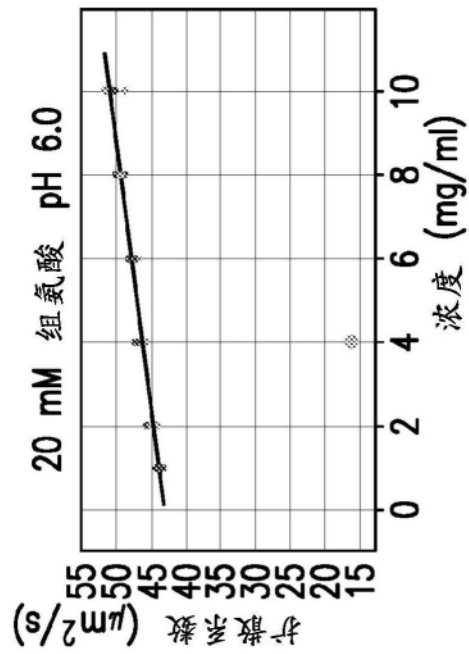


图90B

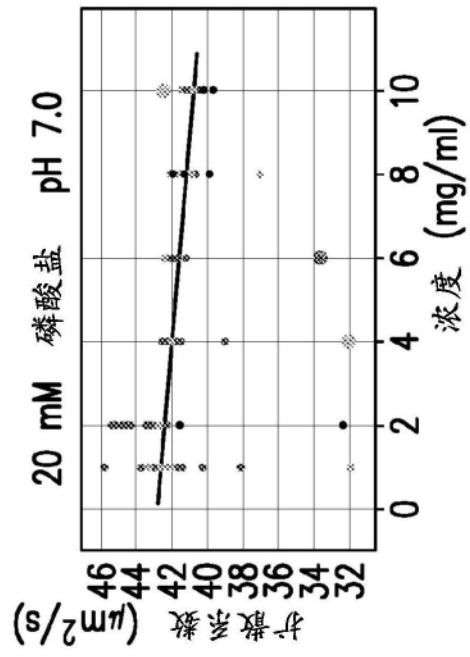


图90C

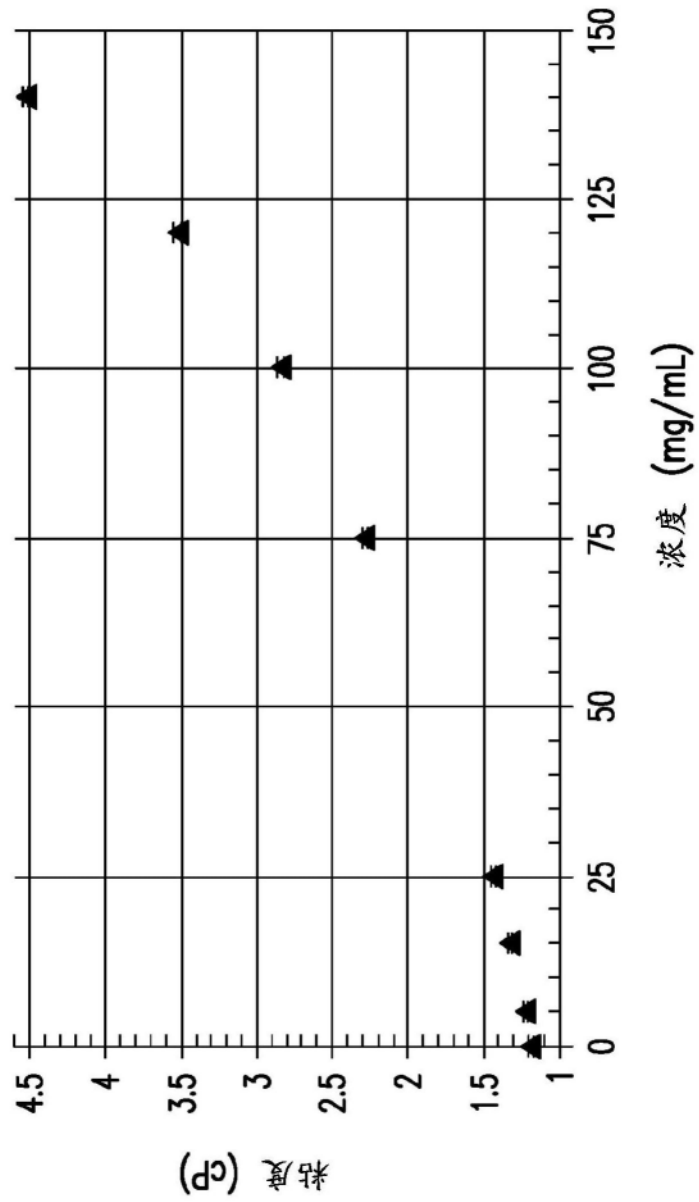


图91

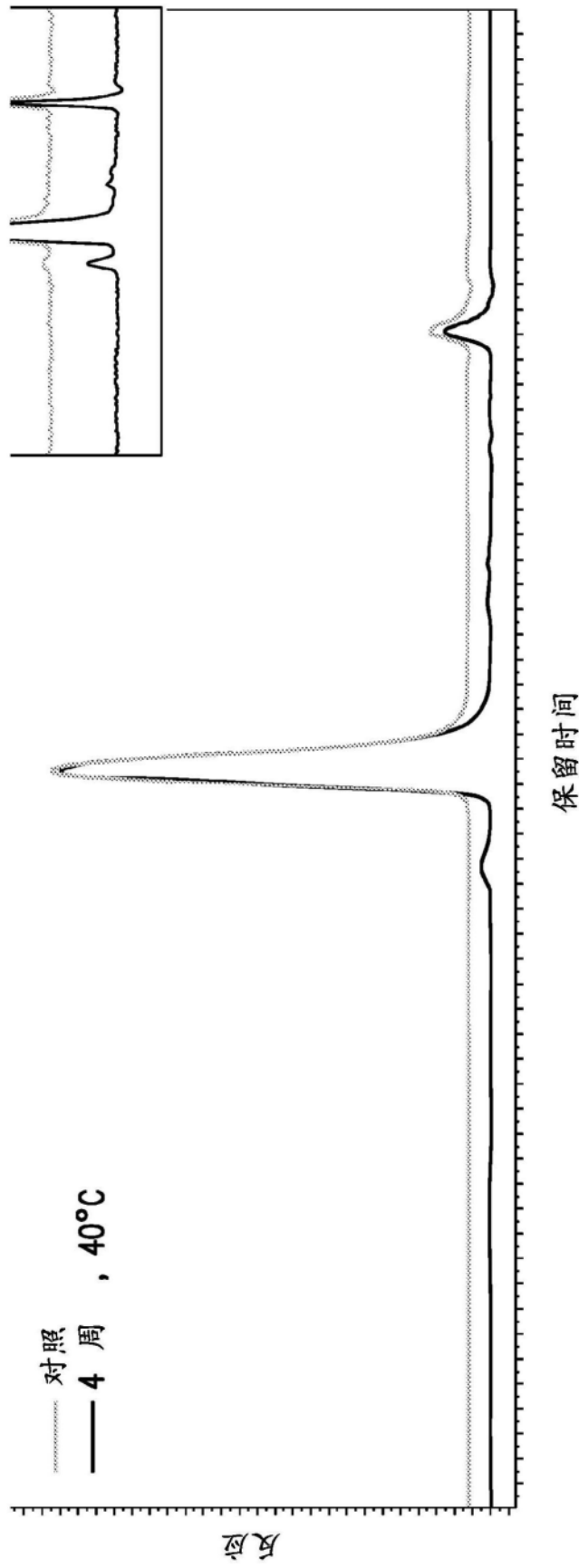


图92

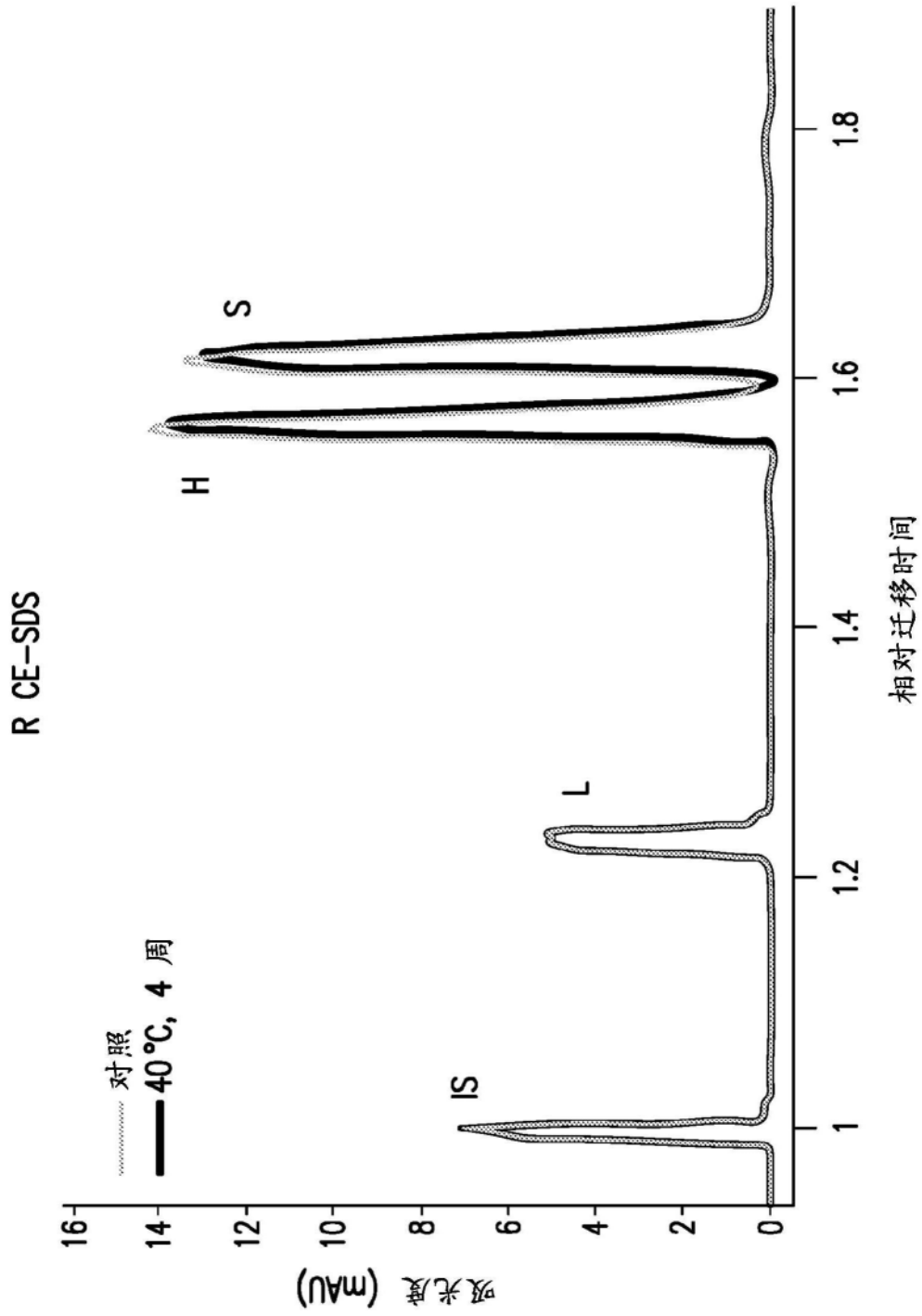


图93

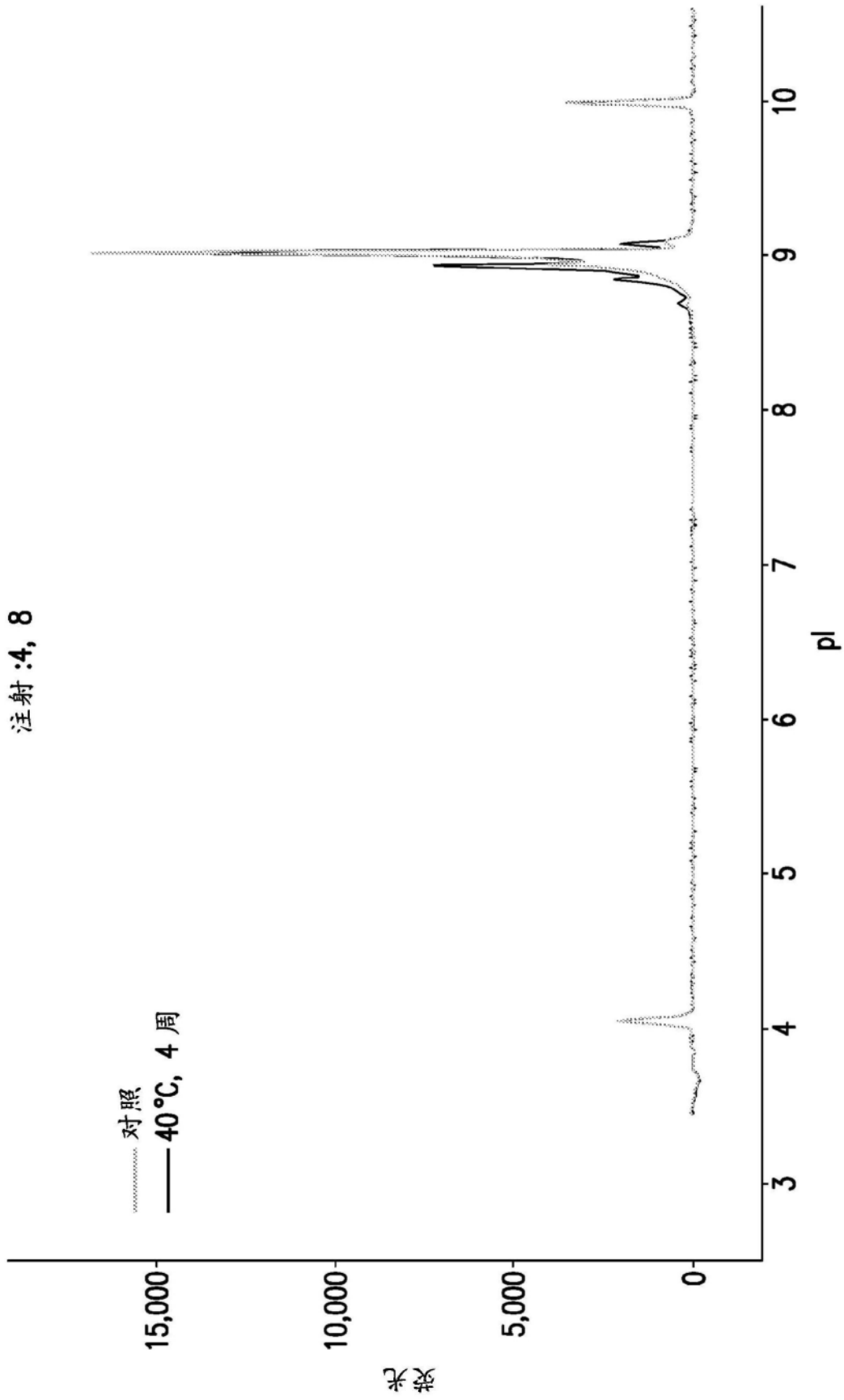


图94

与 BJAB 细胞结合

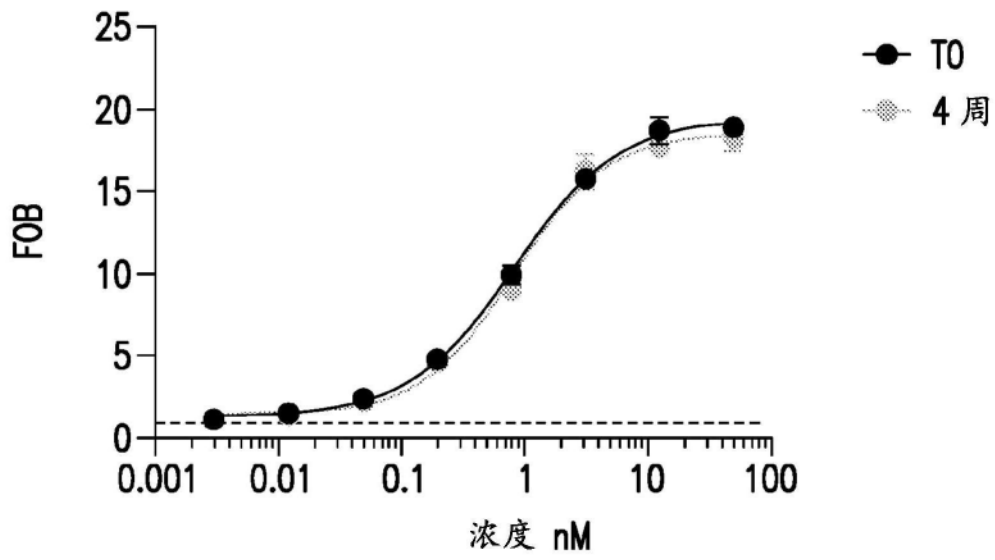


图95A

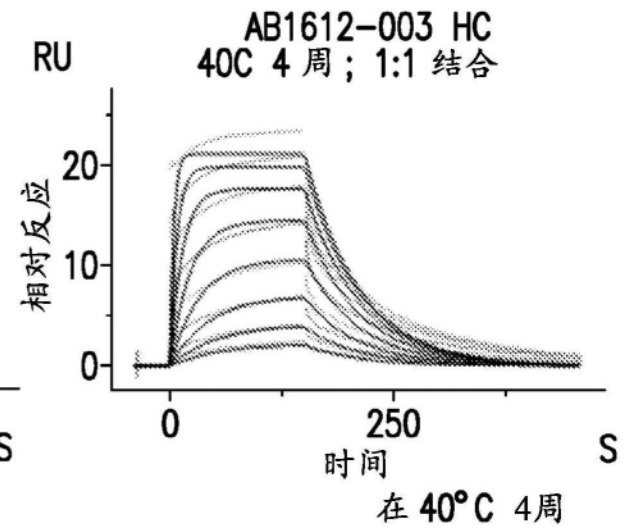
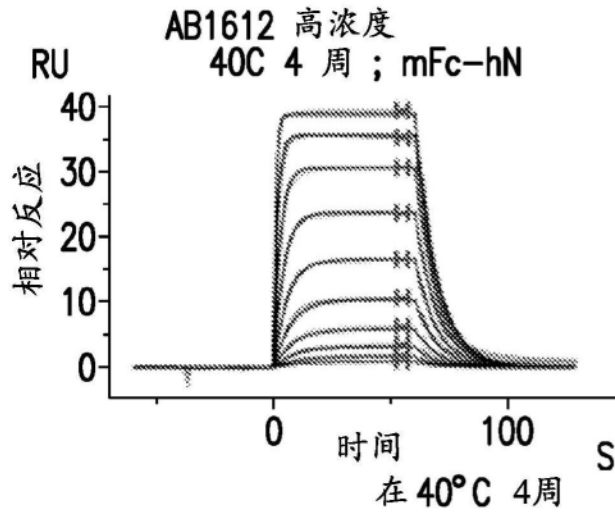
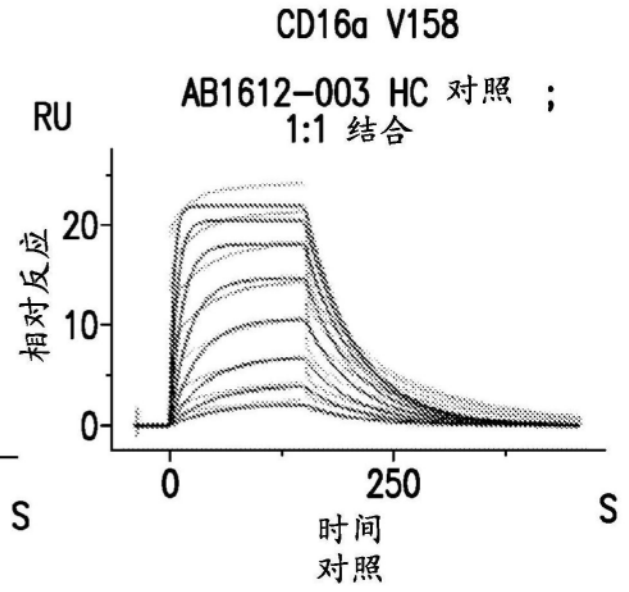
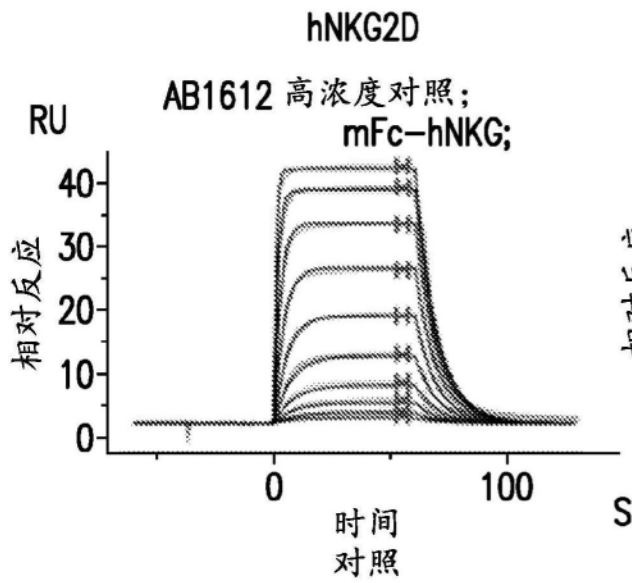


图 95B

图 95C

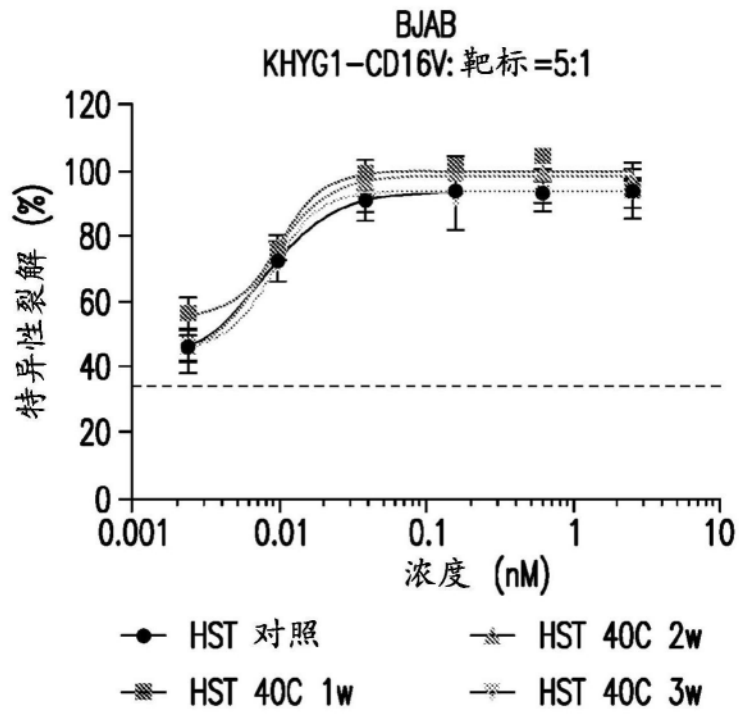


图96

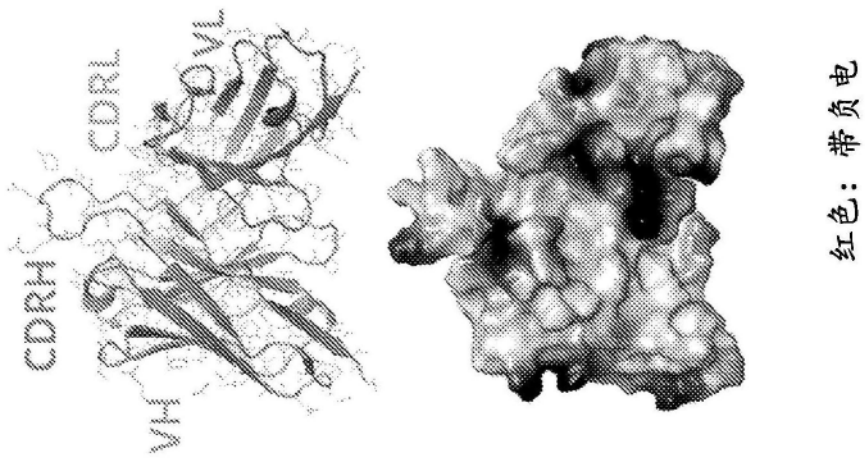


图97A

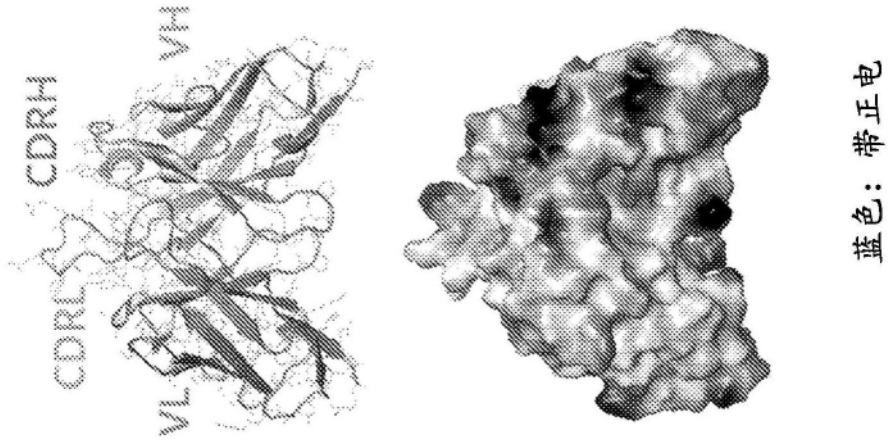


图97B

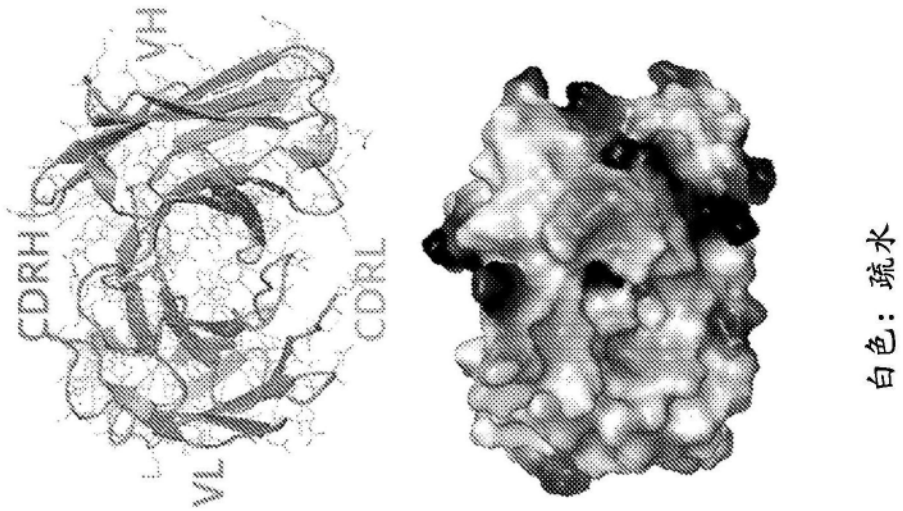


图97C

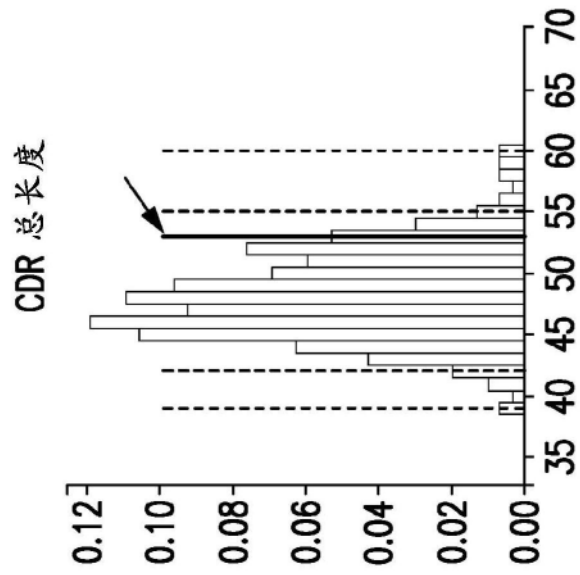


图98A

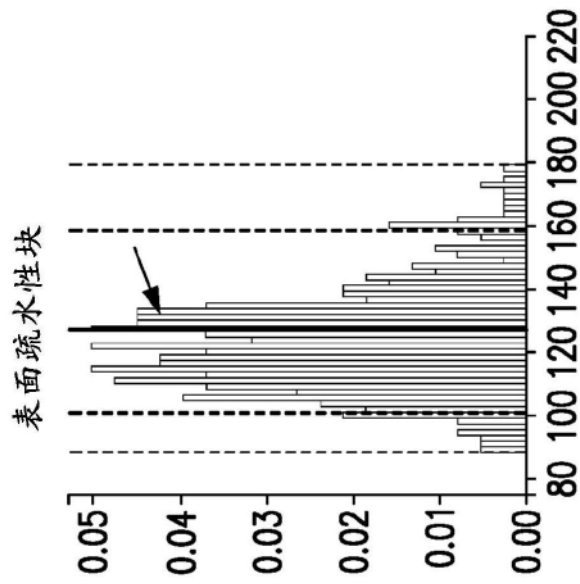


图98B

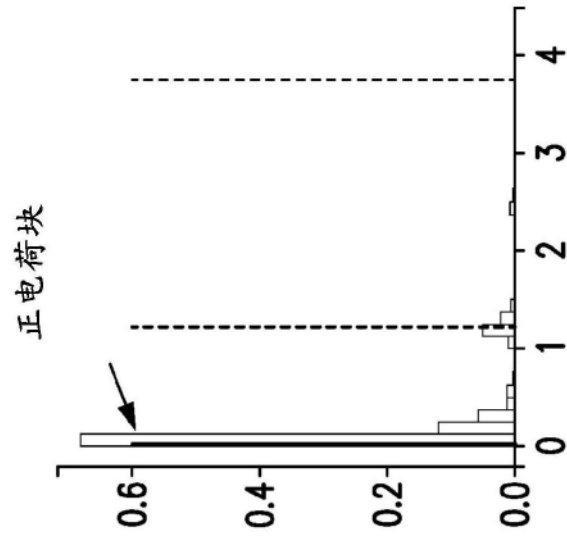


图98C

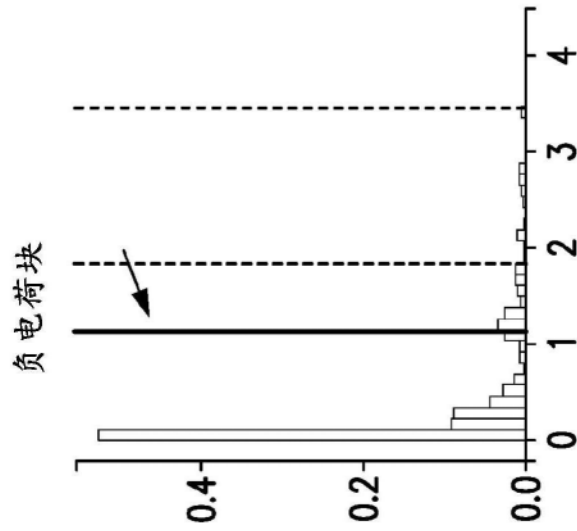


图98D

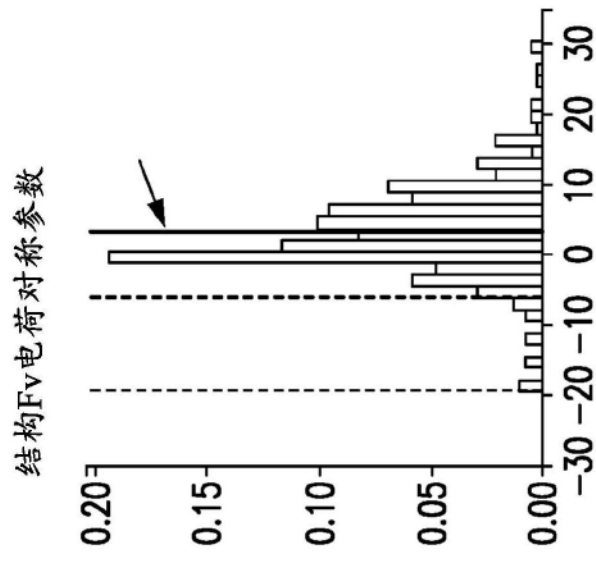
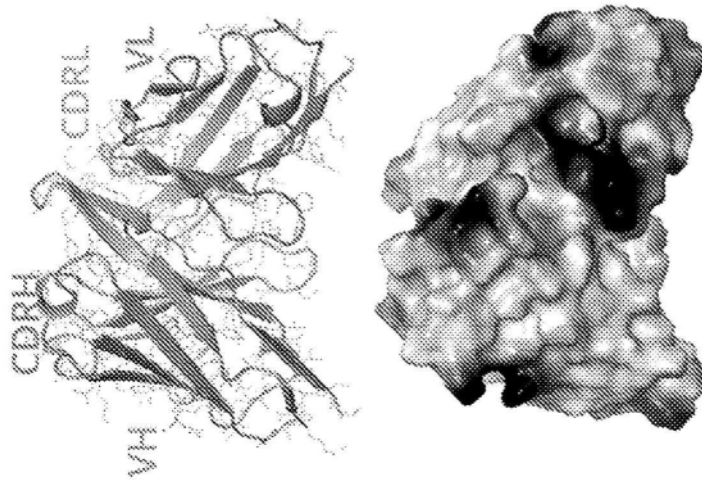
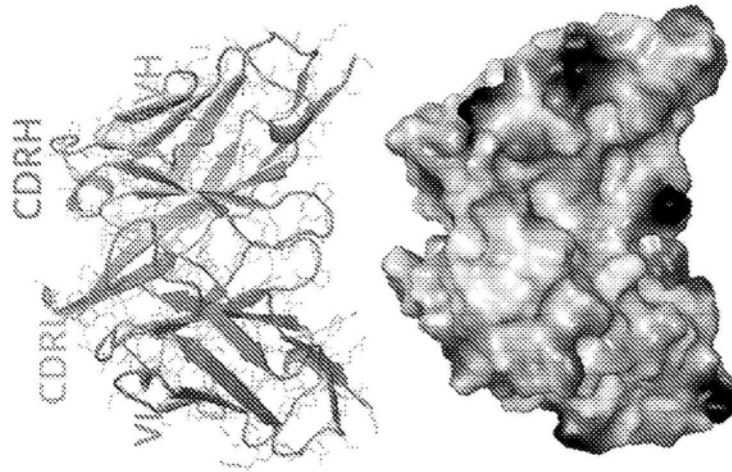


图98E



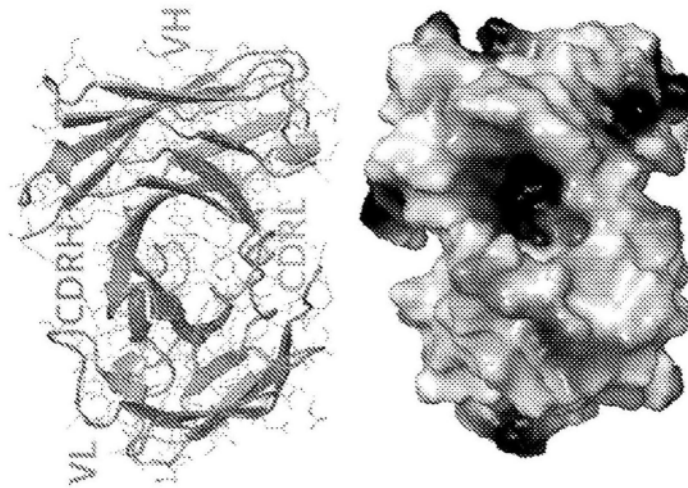
红色：带负电

图99A



蓝色：带正电

图99B



白色：疏水

图99C

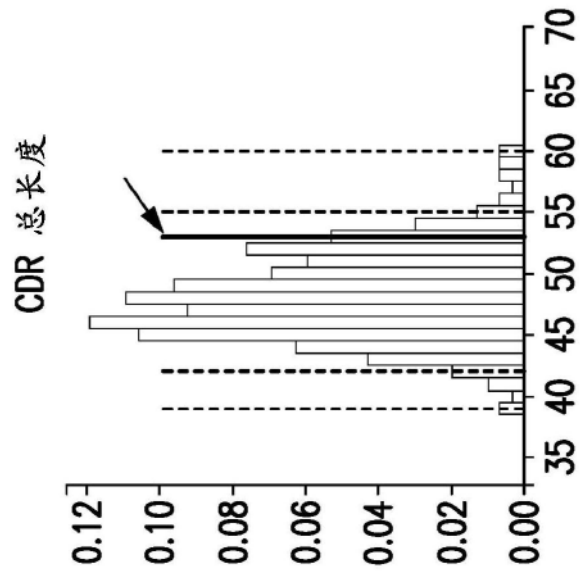


图100A

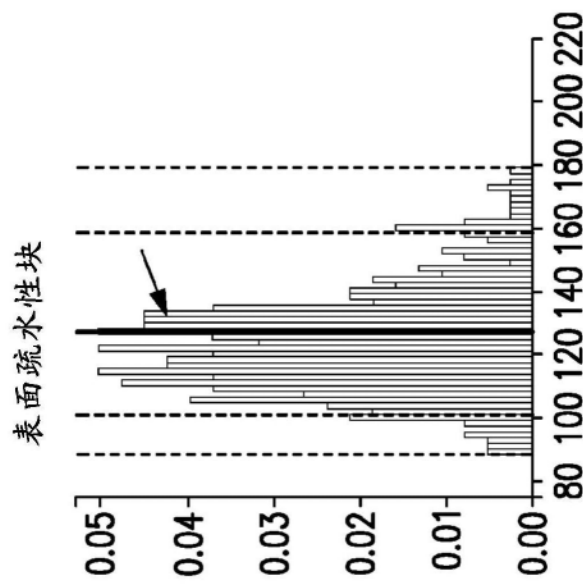


图100B

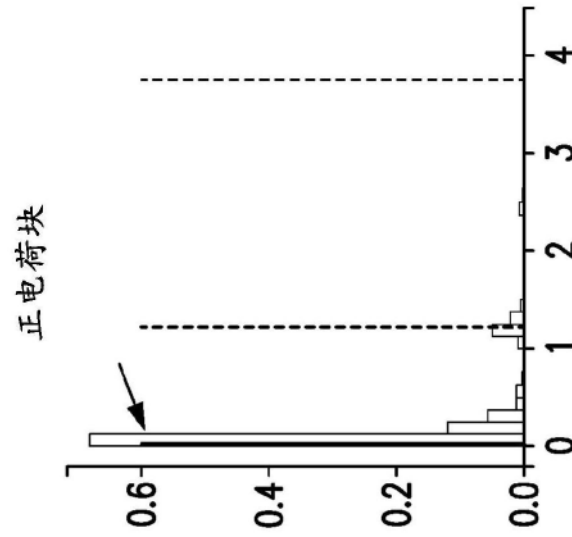


图100C

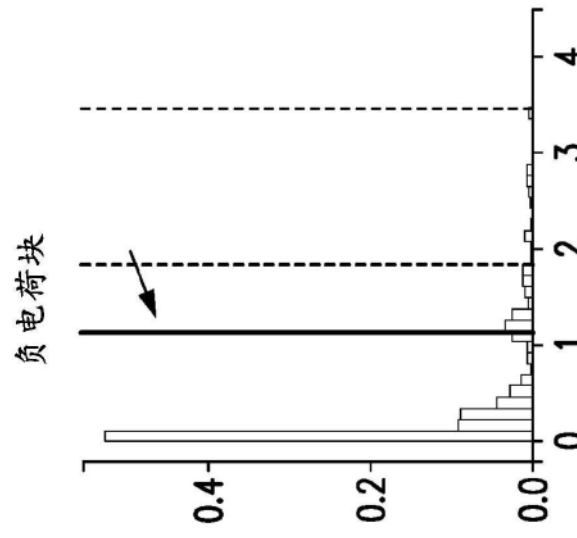


图100D

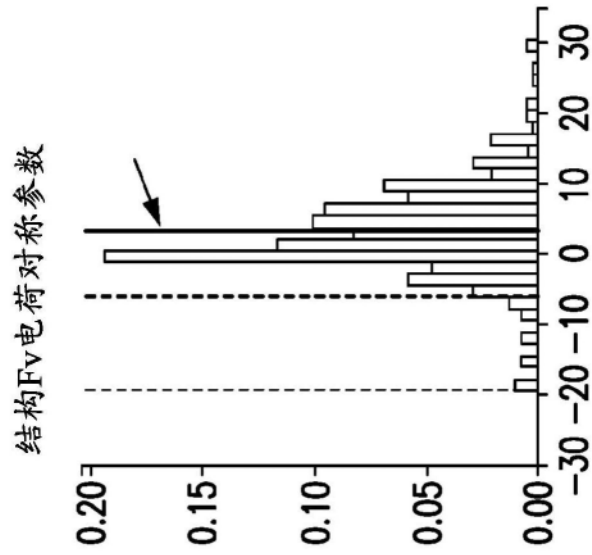


图100E

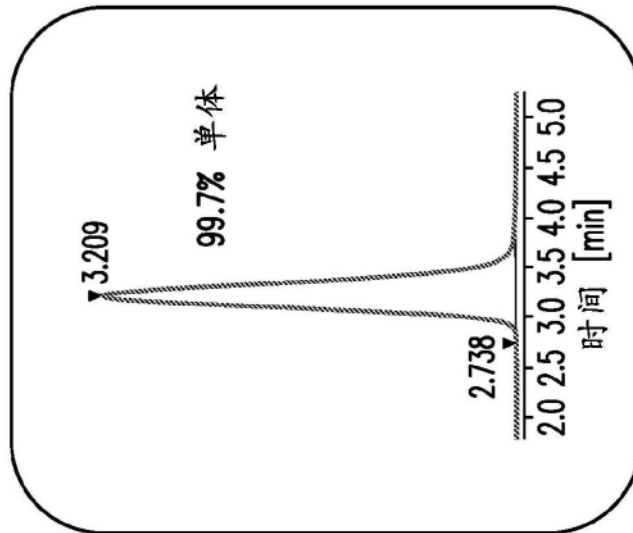


图101A

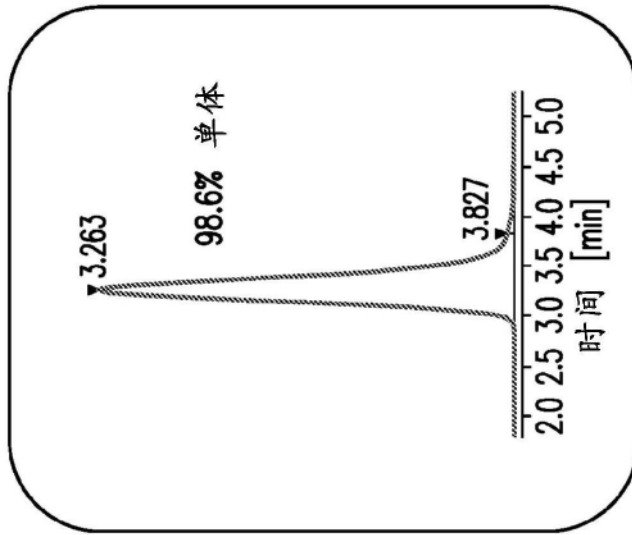


图101B

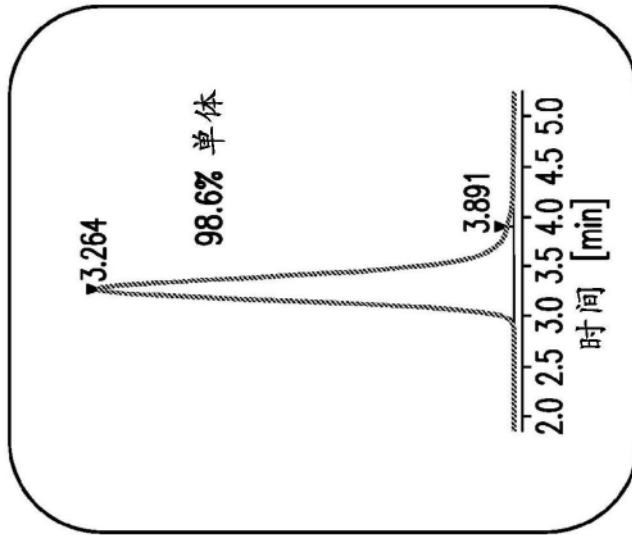


图101C

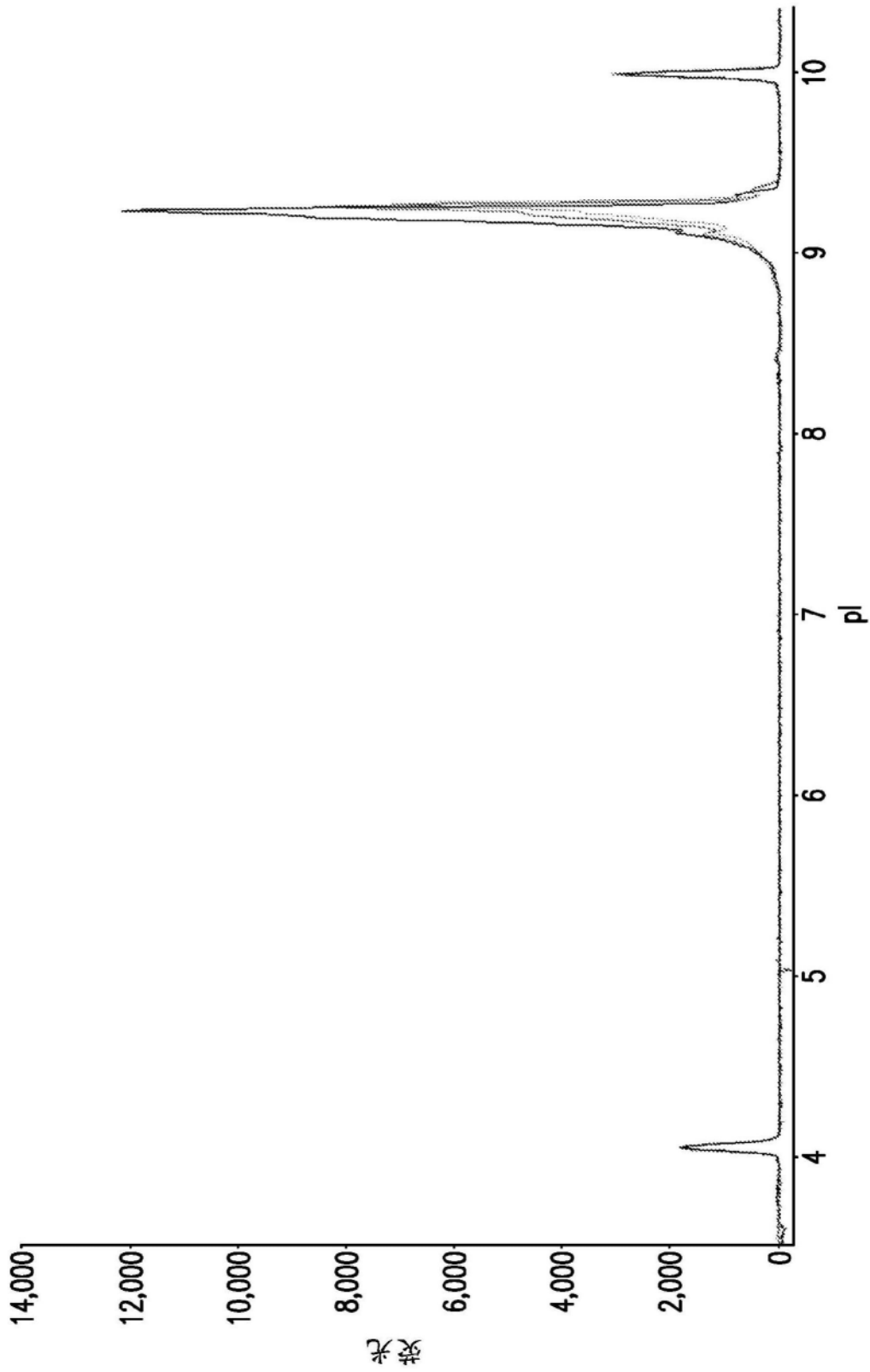


图102

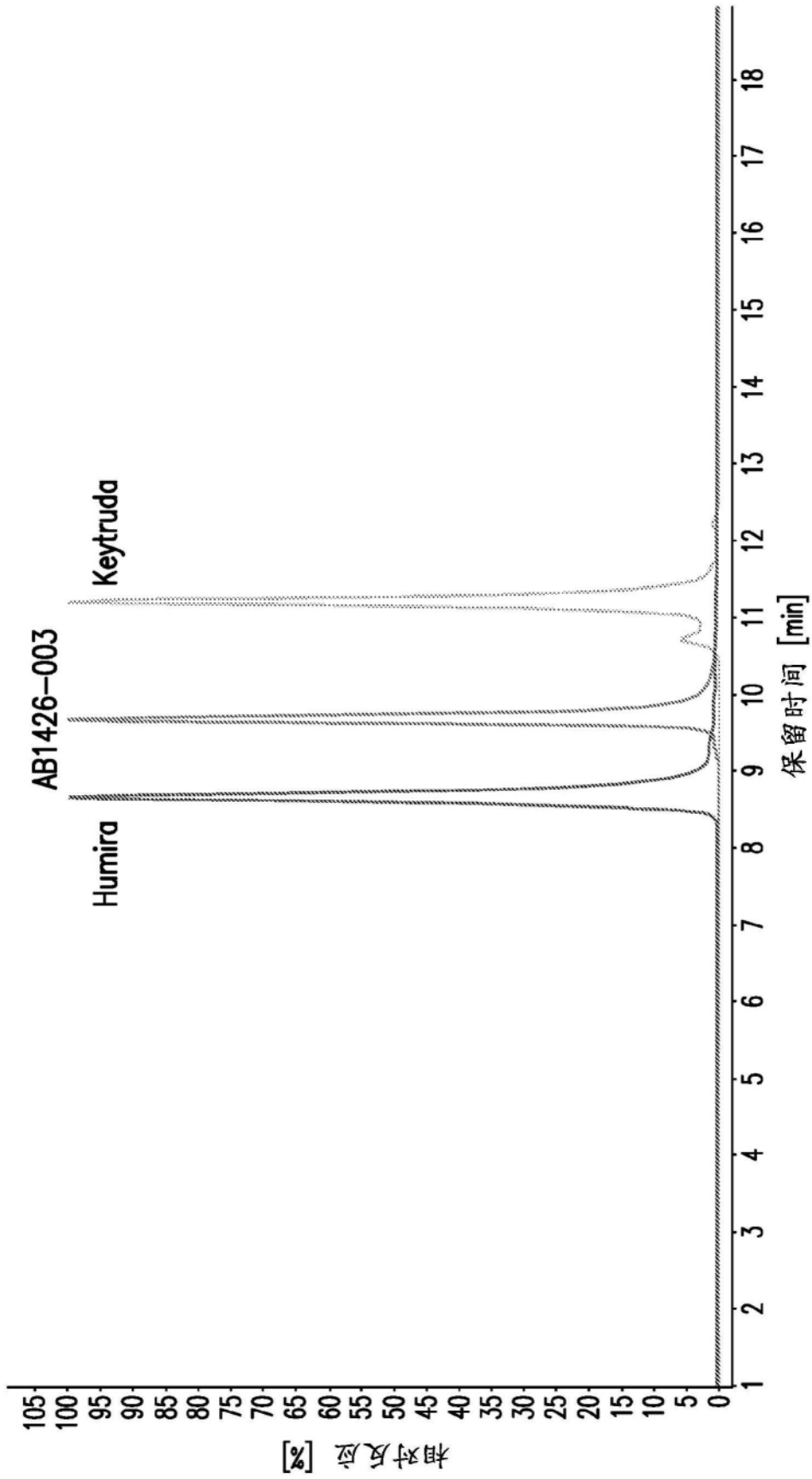


图103A

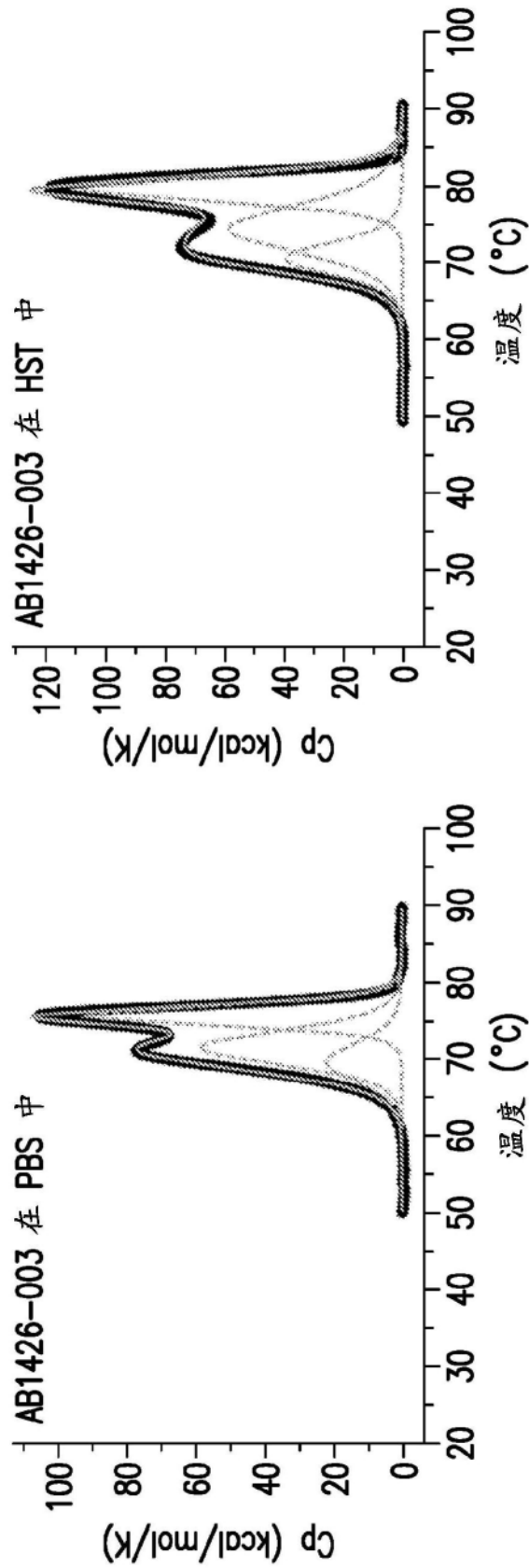


图103B

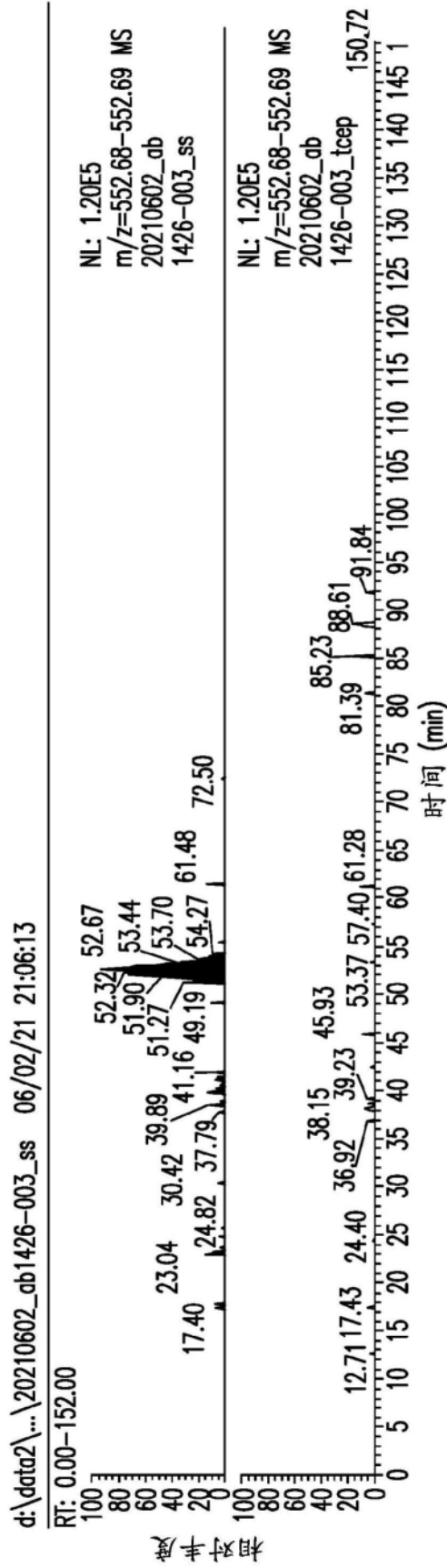


图104A

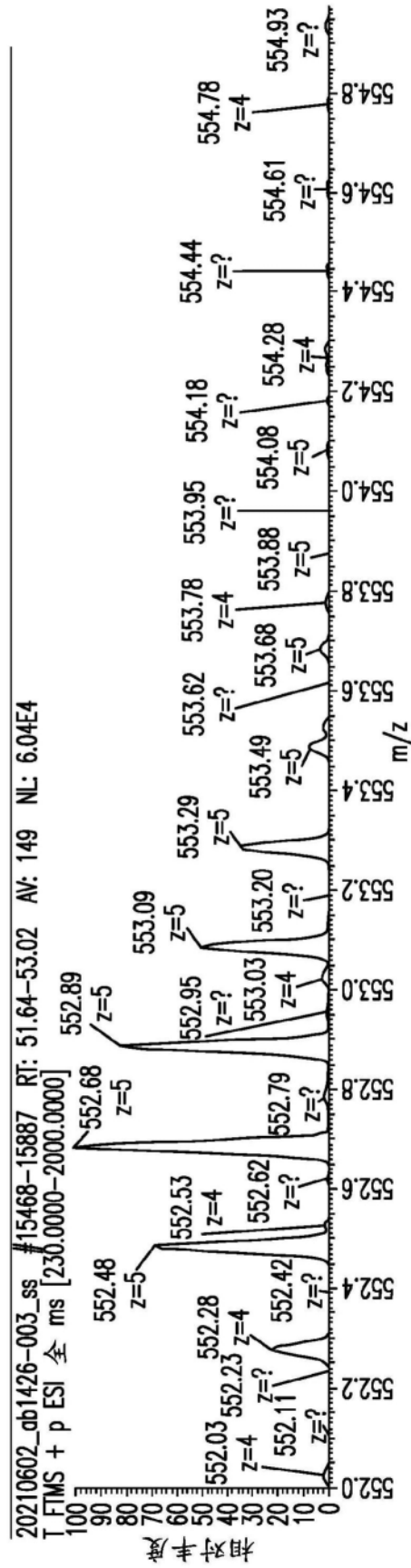


图104B

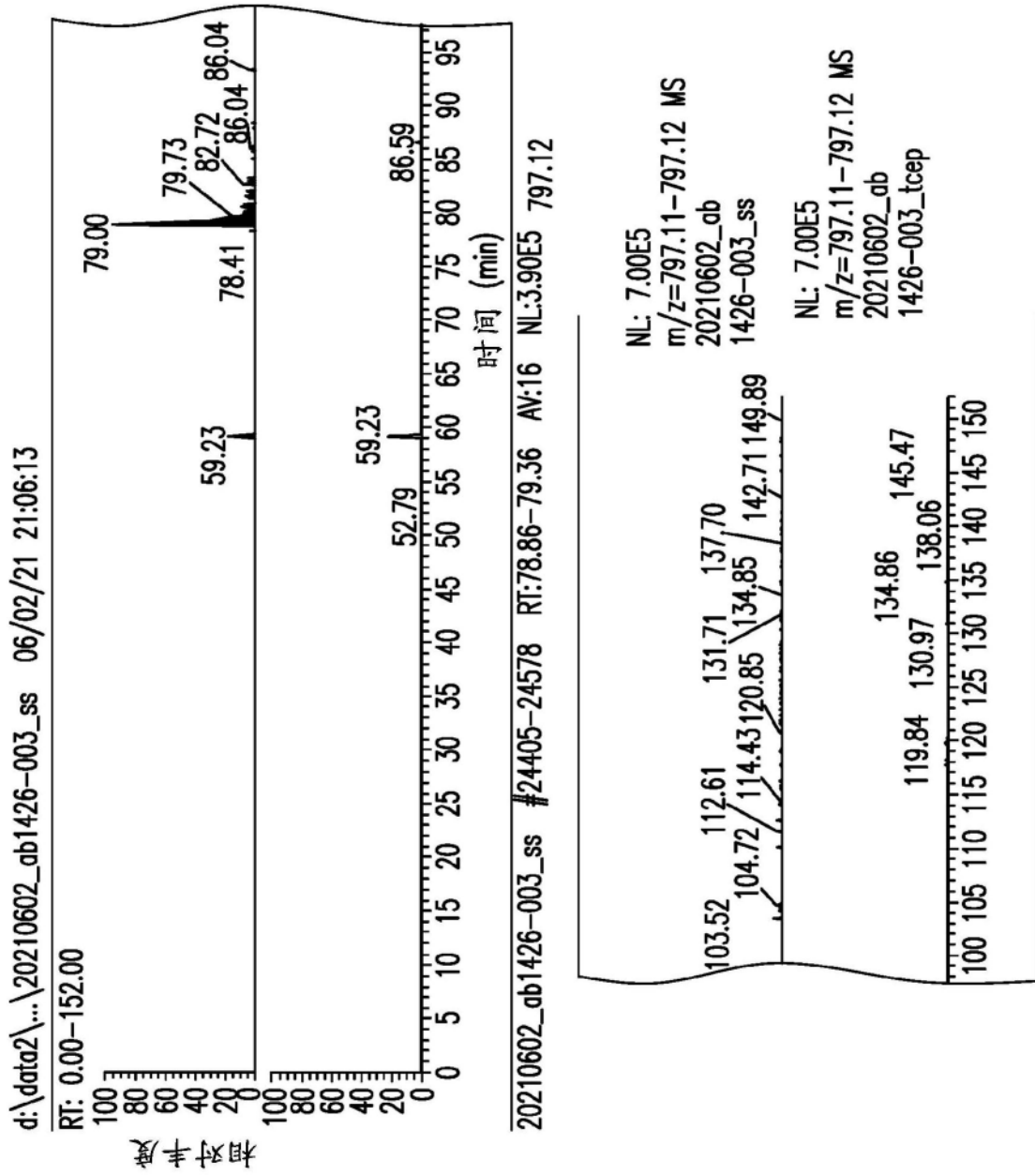


图105A

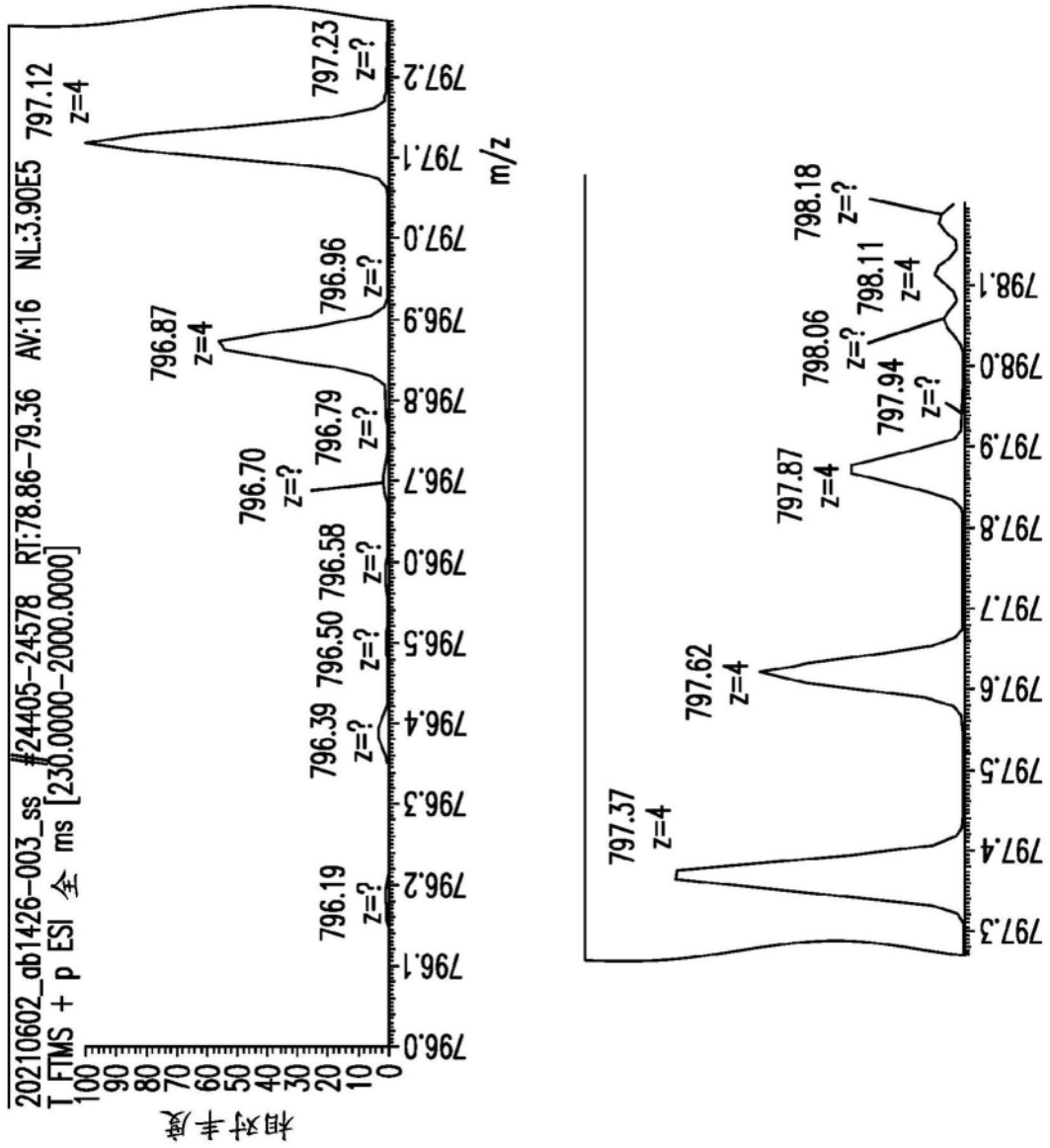


图105B

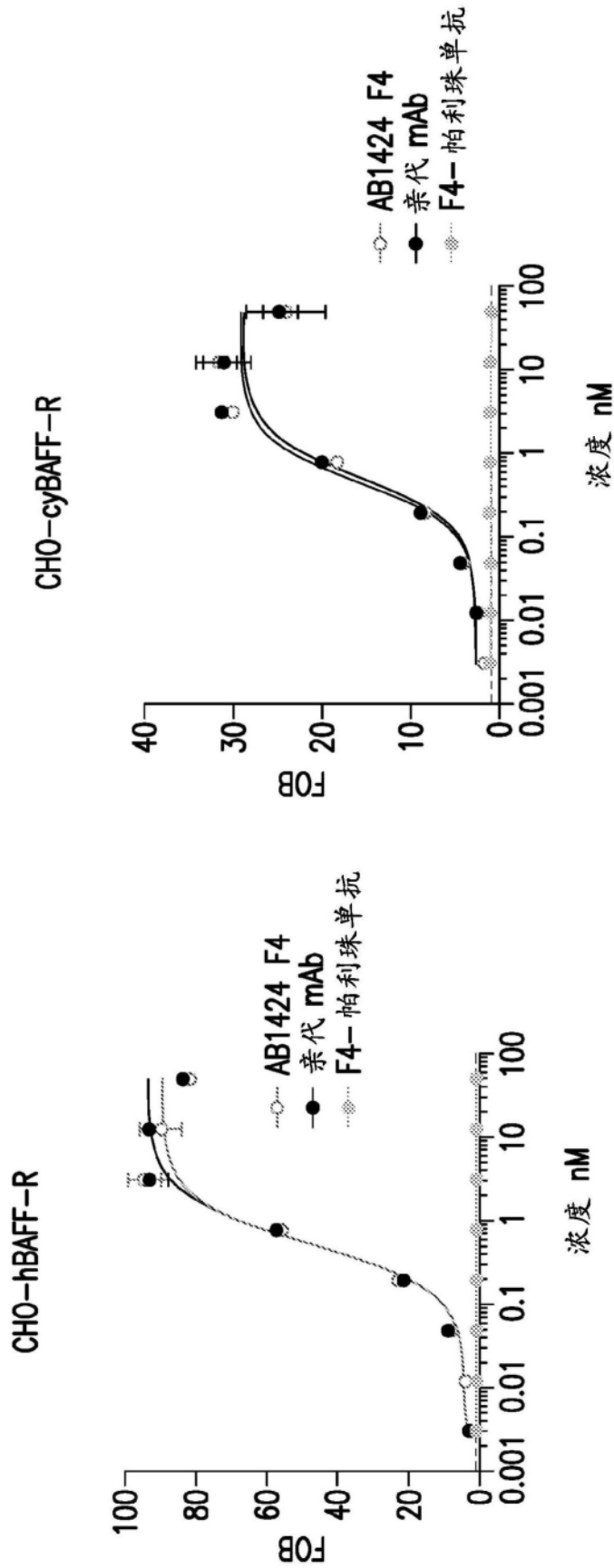


图 106A

图 106B

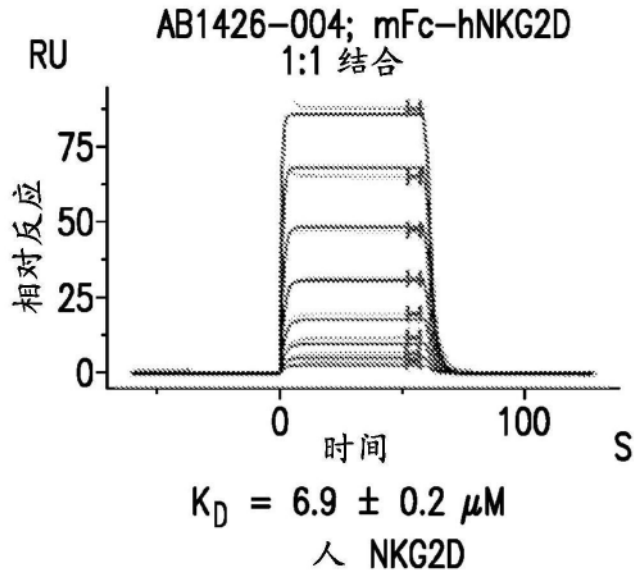


图107A

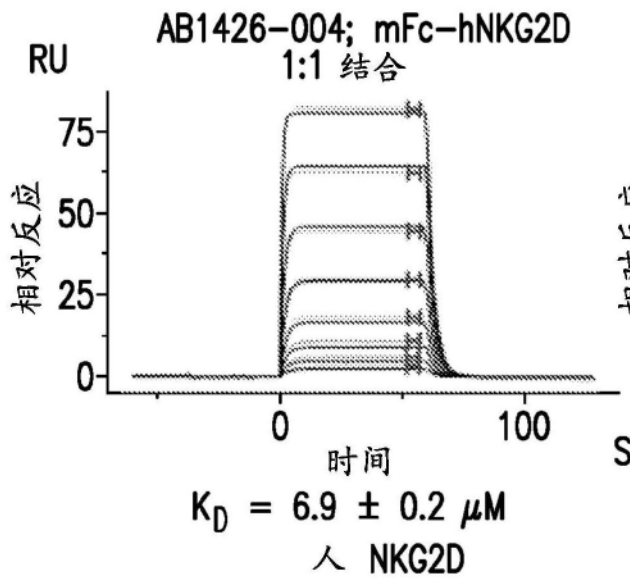


图 107B

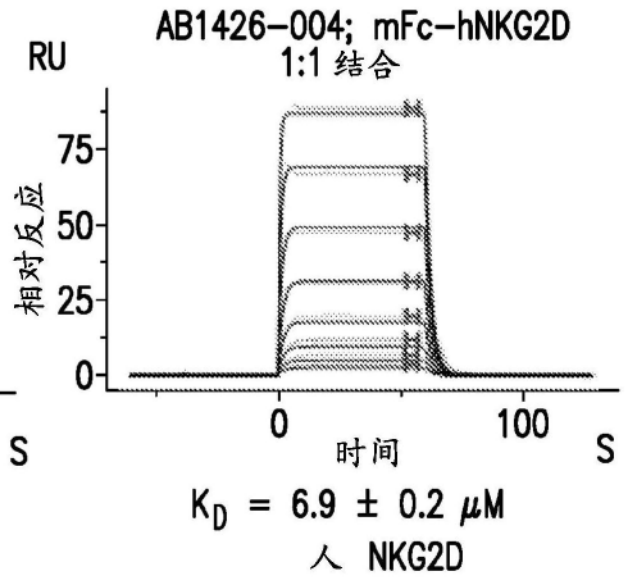


图 107C

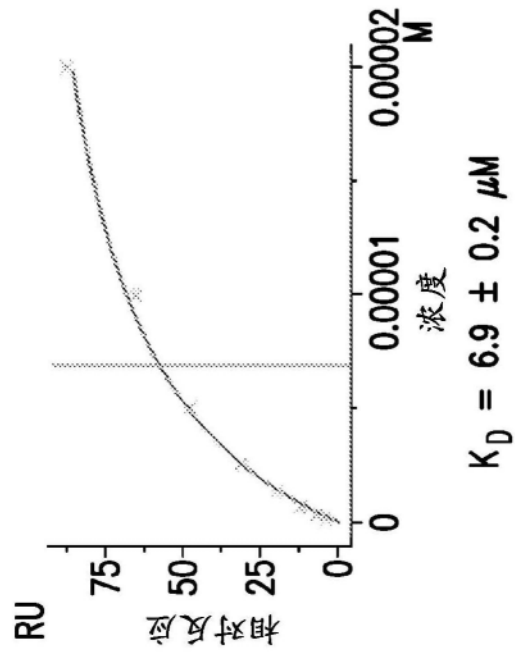


图107D

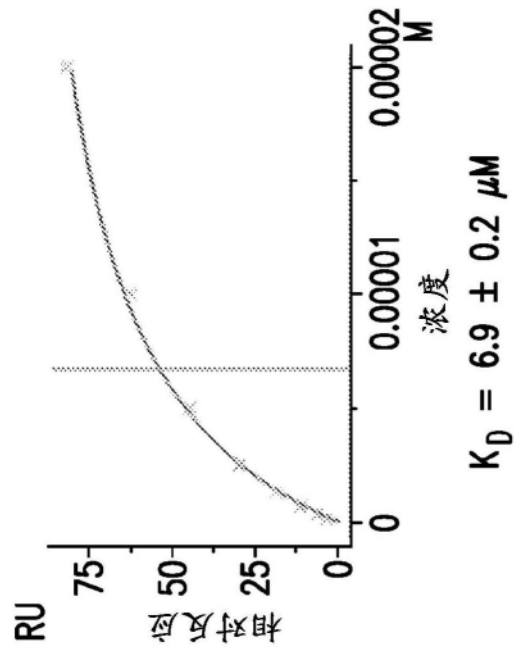


图107E

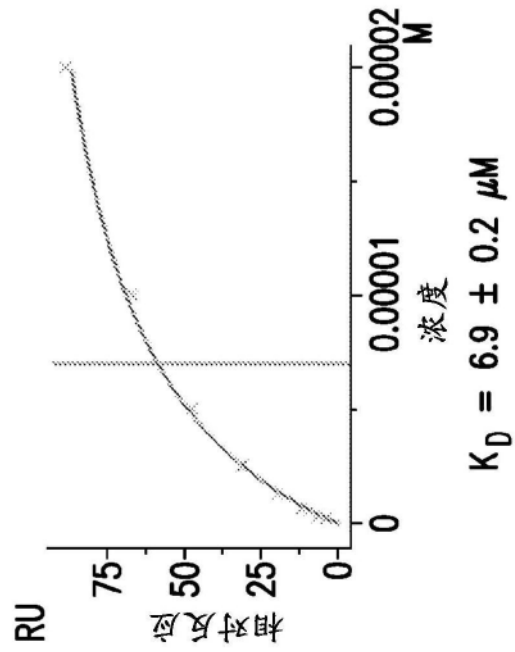


图107F

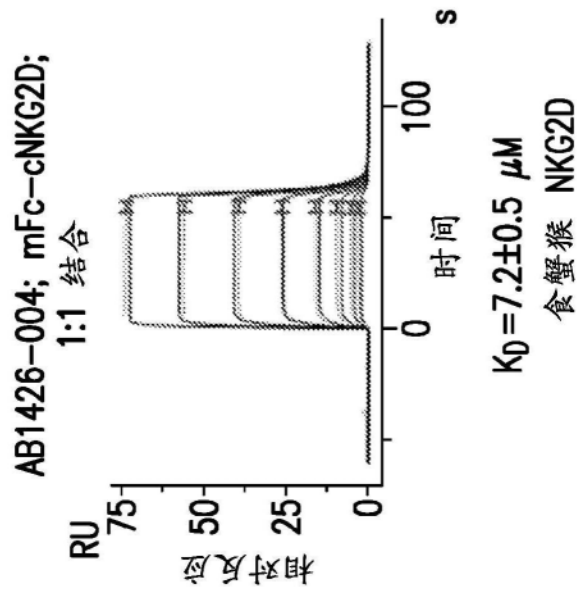


图107G

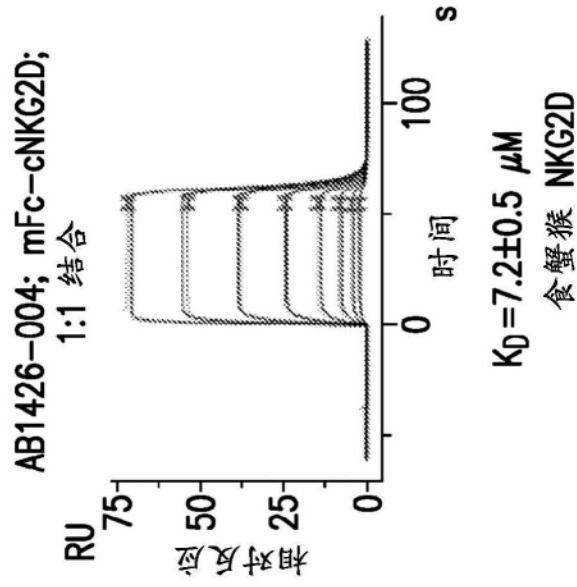


图107H

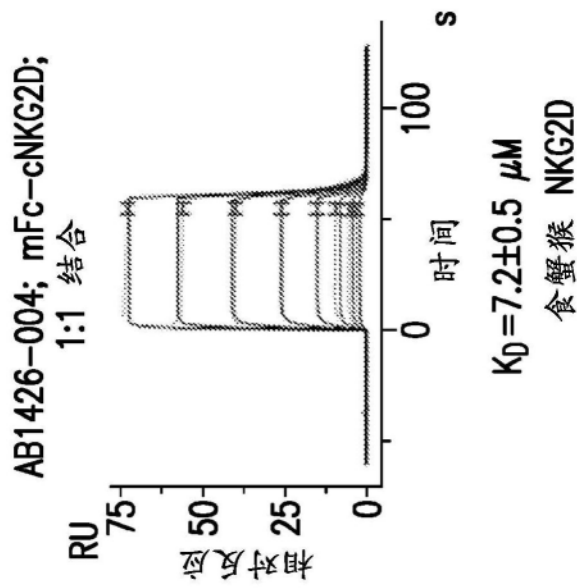


图107I

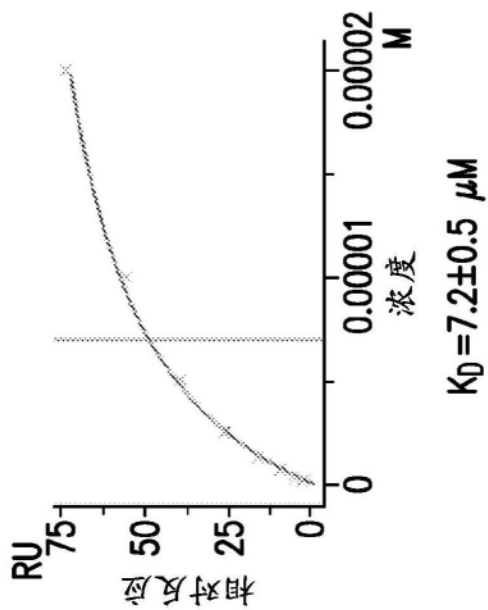


图107J

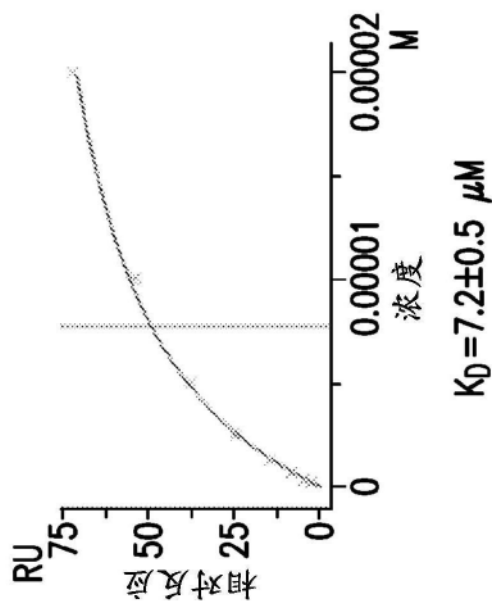


图107K

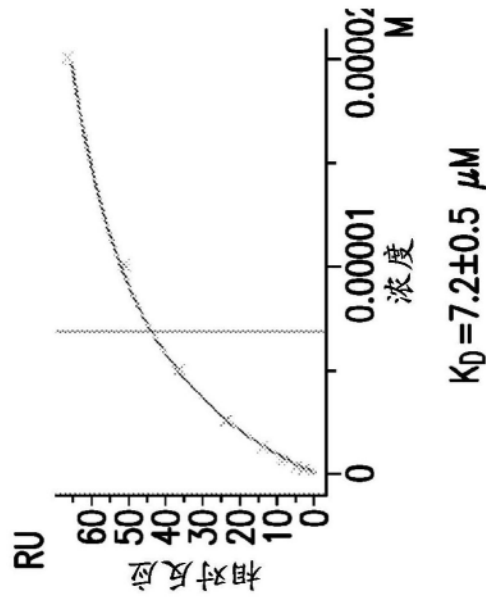
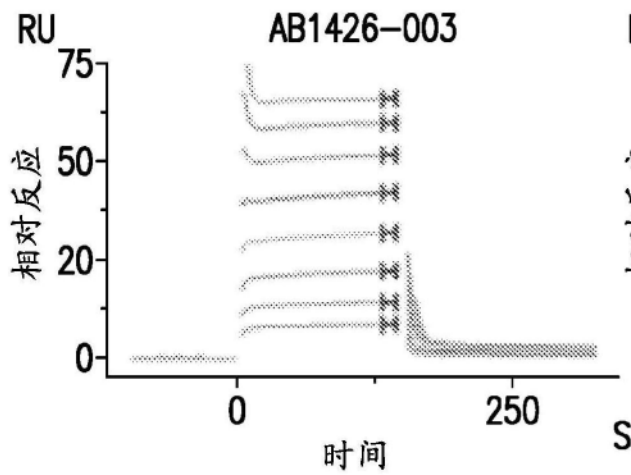
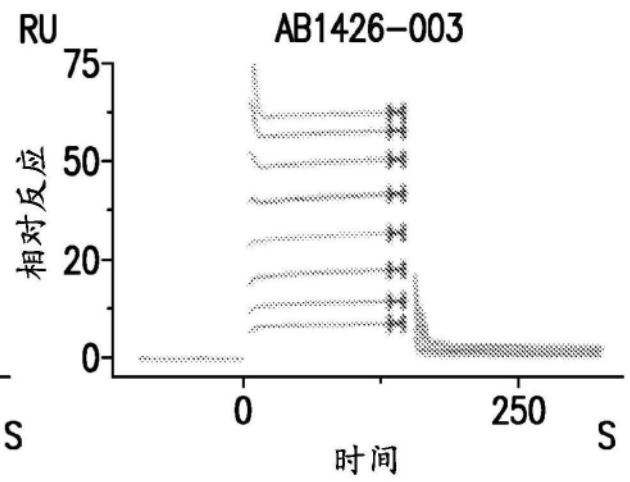


图107L



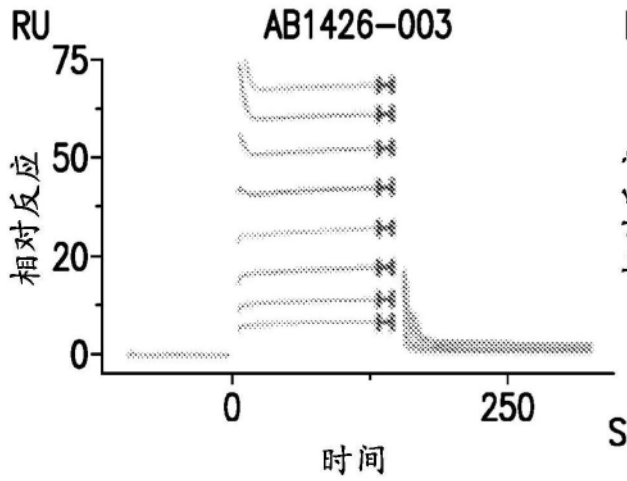
(AB1612-003)  
 $K_D = 1.4 \pm 0.2 \mu M$

图 108A



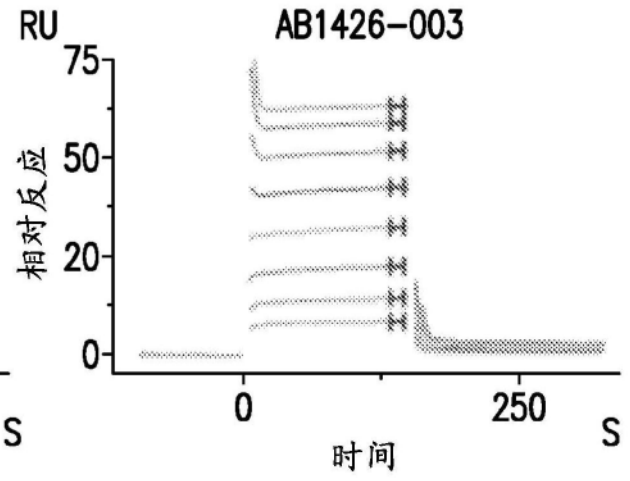
(AB1612-003)  
 $K_D = 1.4 \pm 0.2 \mu M$

图 108B



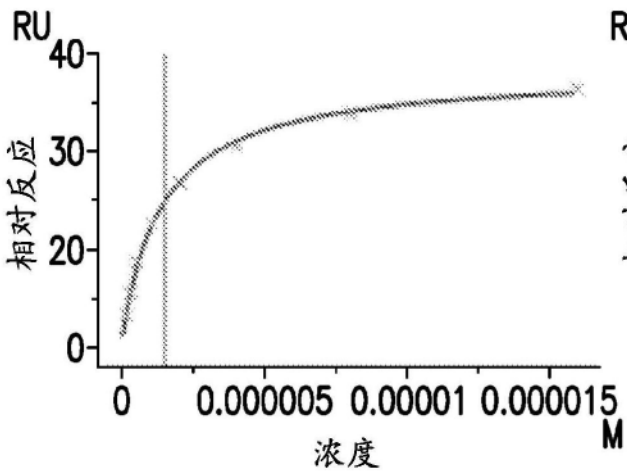
(AB1612-003)  
 $K_D = 1.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$

图 108C



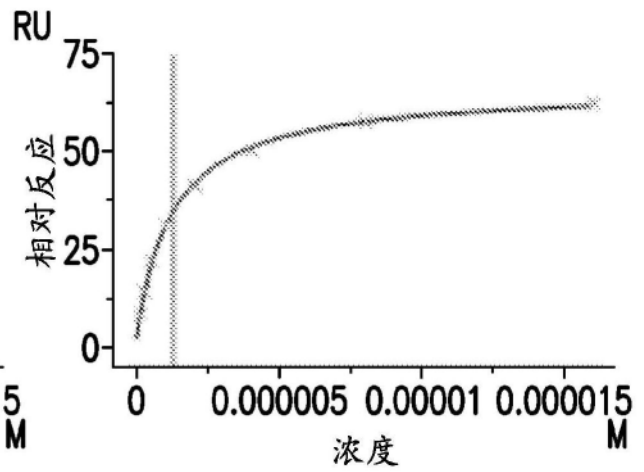
(AB1612-003)  
 $K_D = 1.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$

图 108D



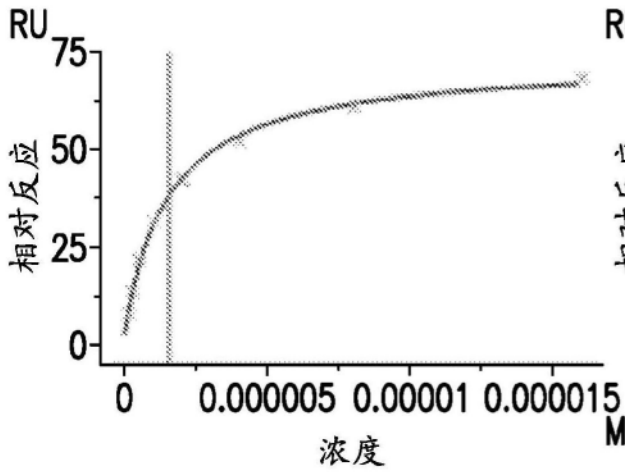
(AB1426-003)  
 $K_D = 1.4 \pm 0.2 \text{ M}$

图 108E



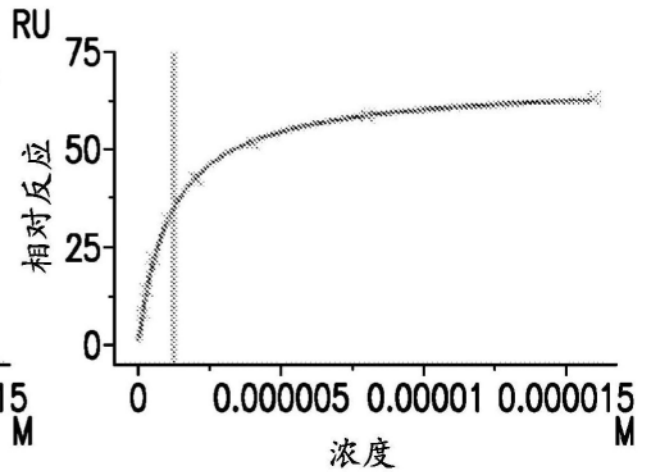
(AB1426-003)  
 $K_D = 1.4 \pm 0.2 \text{ M}$

图 108F



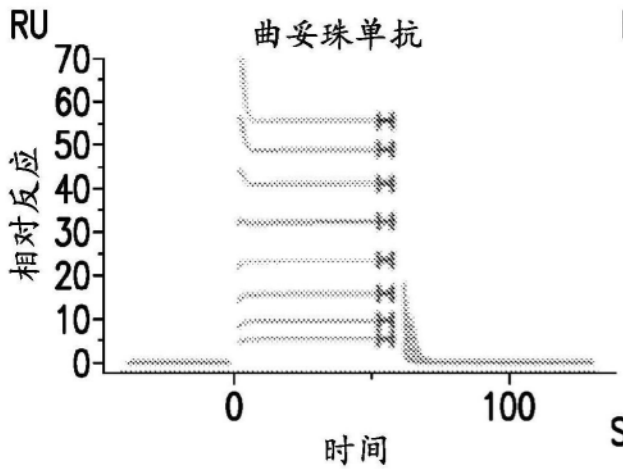
(AB1426-003)  
 $K_D = 1.4 \pm 0.2 \text{ M}$

图 108G



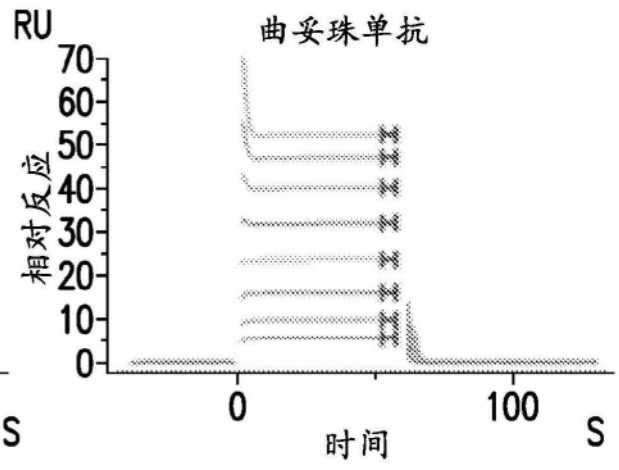
(AB1426-003)  
 $K_D = 1.4 \pm 0.2 \text{ M}$

图 108H



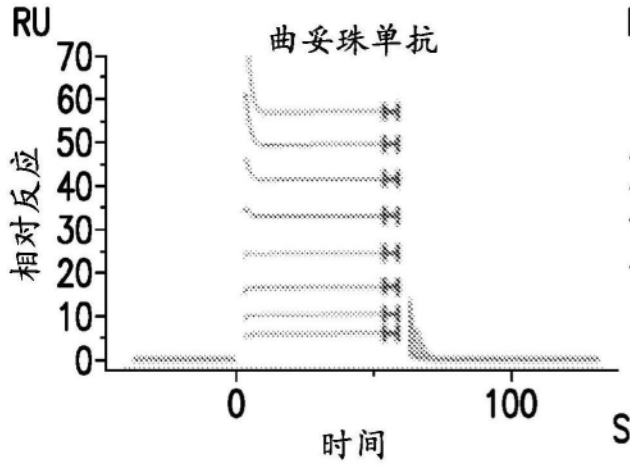
曲妥珠单抗  
 $K_D = 1.7 \pm 0.2 \text{ nM}$

图 108I



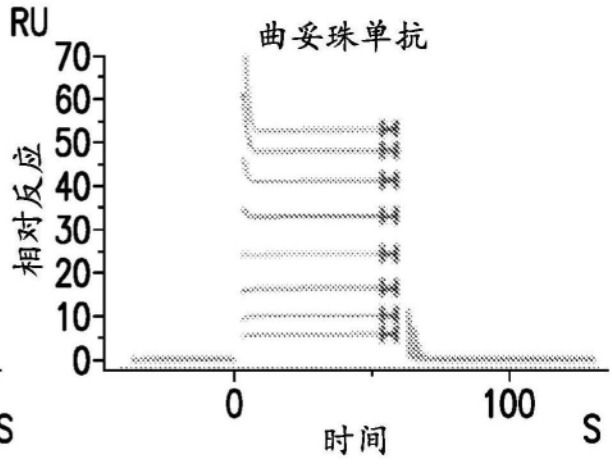
曲妥珠单抗  
 $K_D = 1.7 \pm 0.2 \text{ nM}$

图 108J



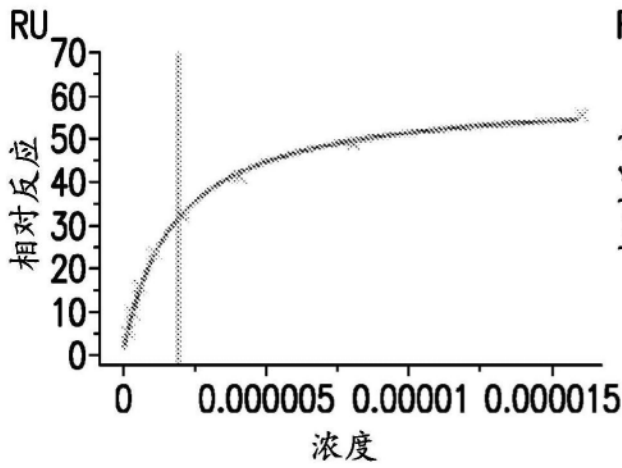
曲妥珠单抗  
 $K_D = 1.7 \pm 0.2 \text{ nM}$

图 108K



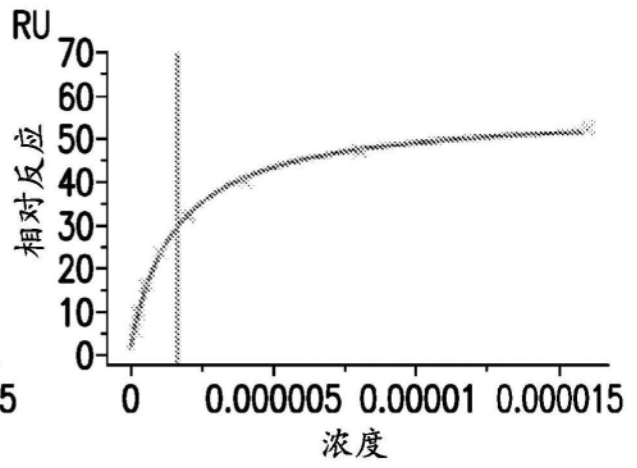
曲妥珠单抗  
 $K_D = 1.7 \pm 0.2 \text{ nM}$

图 108L



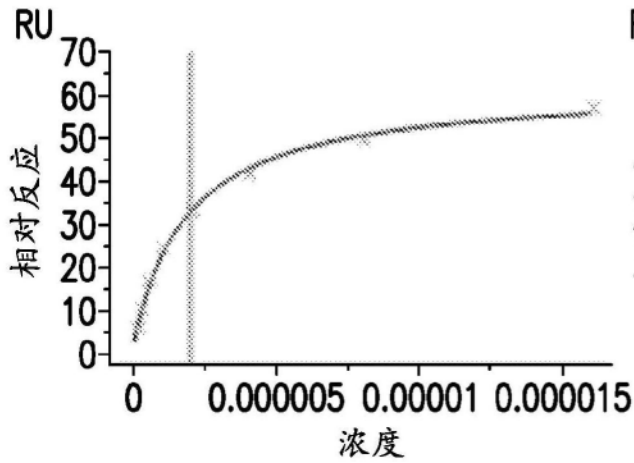
曲妥珠单抗  
 $K_D = 1.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$

图 108M



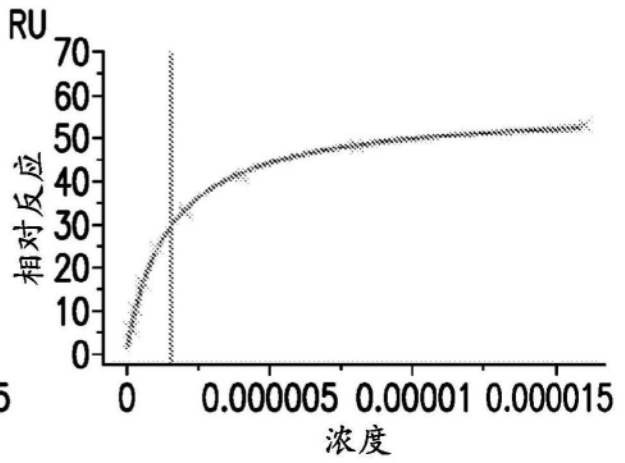
曲妥珠单抗  
 $K_D = 1.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$

图 108N



曲妥珠单抗  
 $K_D = 1.7 \pm 0.2 \mu M$

图 108O



曲妥珠单抗  
 $K_D = 1.7 \pm 0.2 \mu M$

图 108P

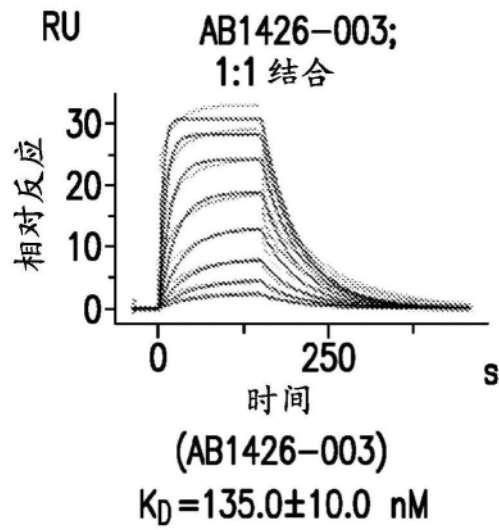


图109A

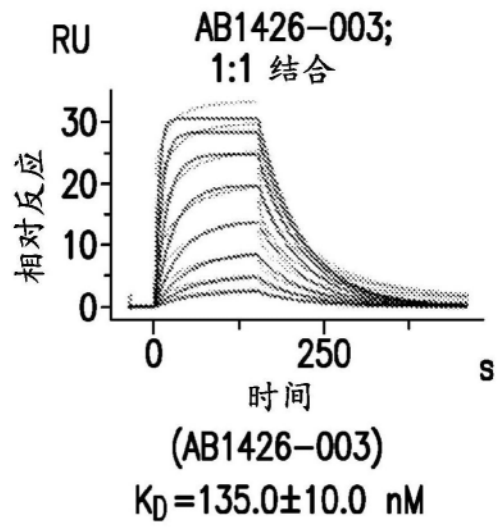


图109B

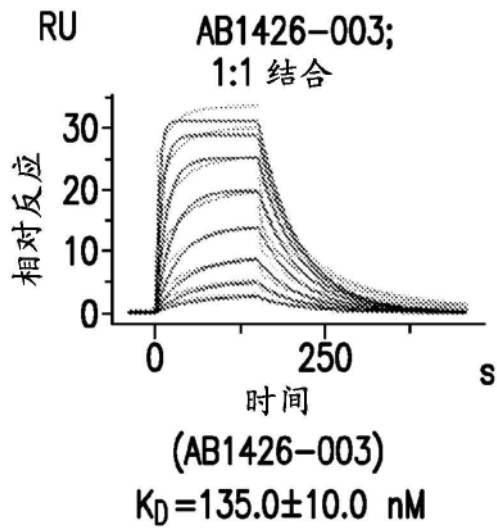


图109C

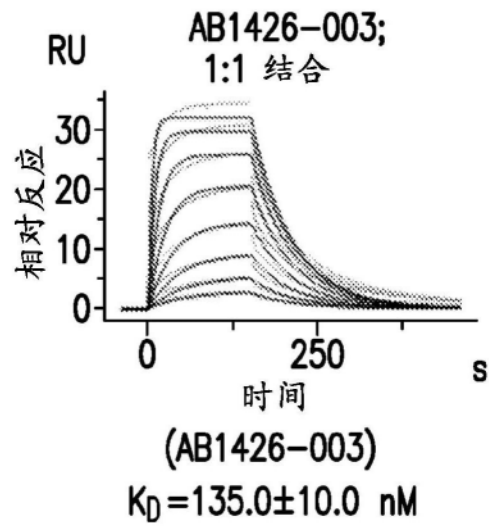


图109D

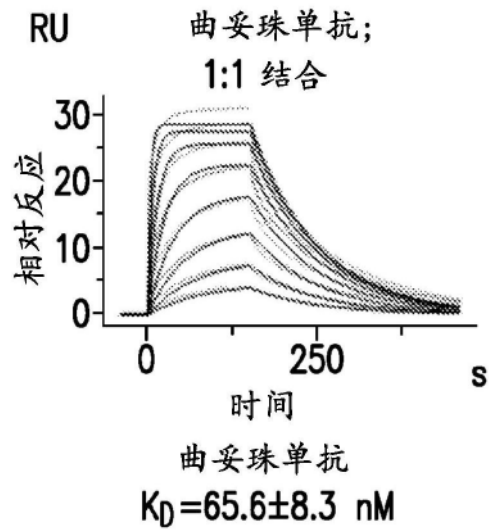


图109E

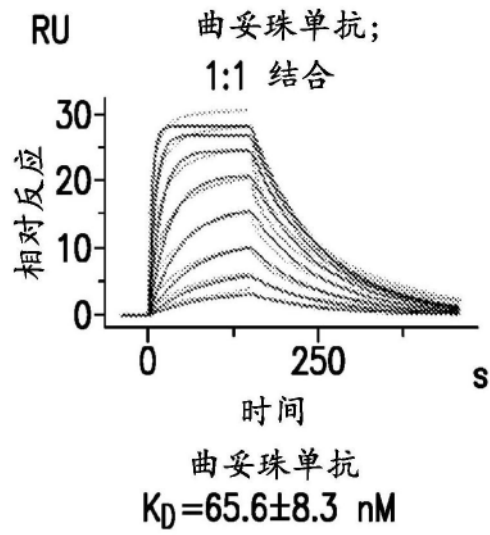


图109F

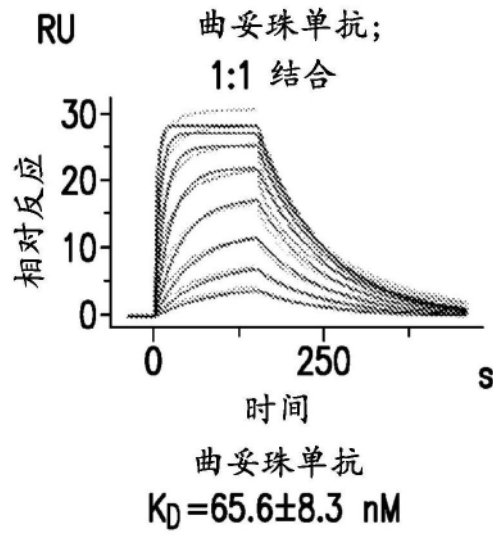


图109G

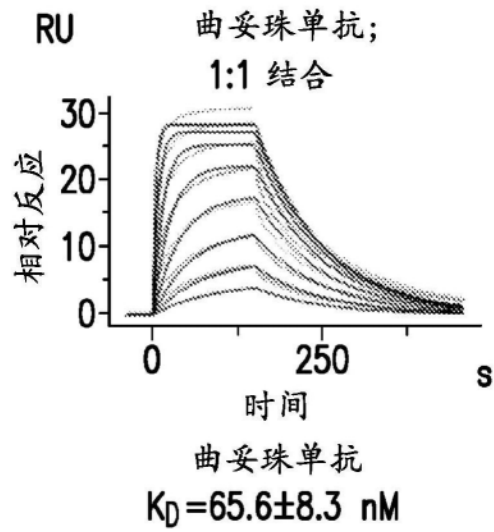


图109H

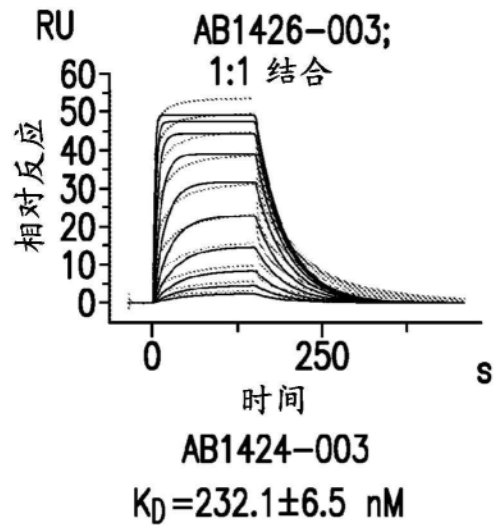


图110A

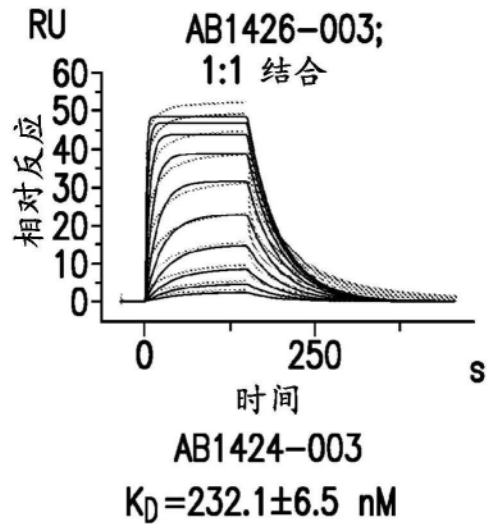


图110B

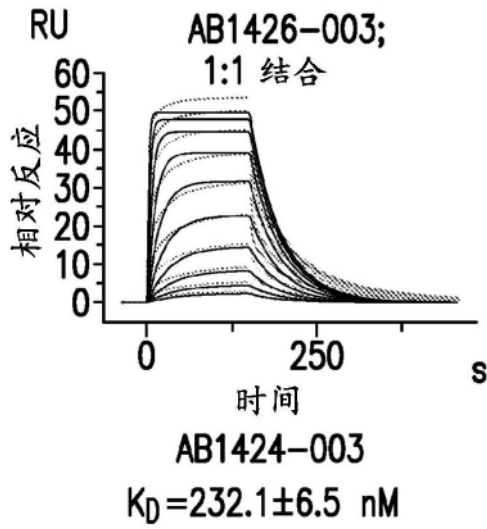


图110C

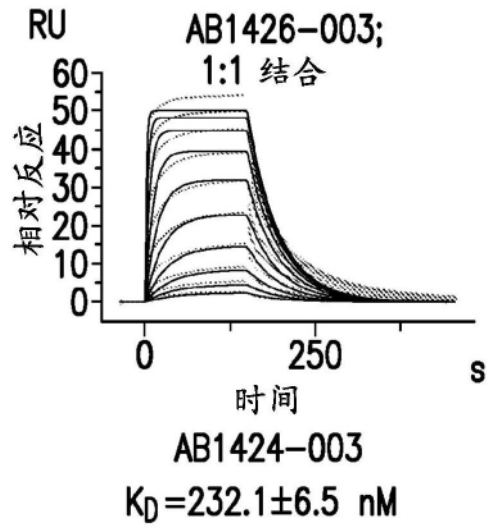


图110D

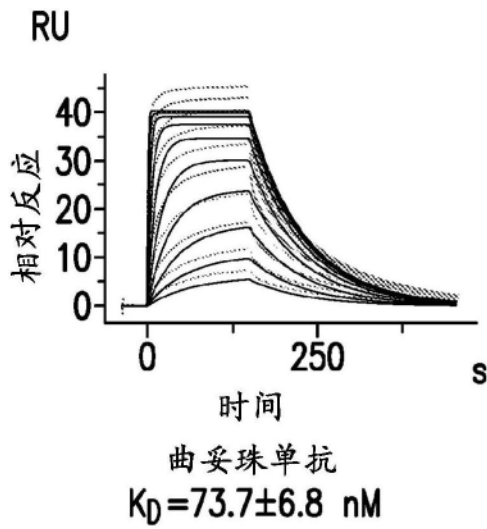


图110E

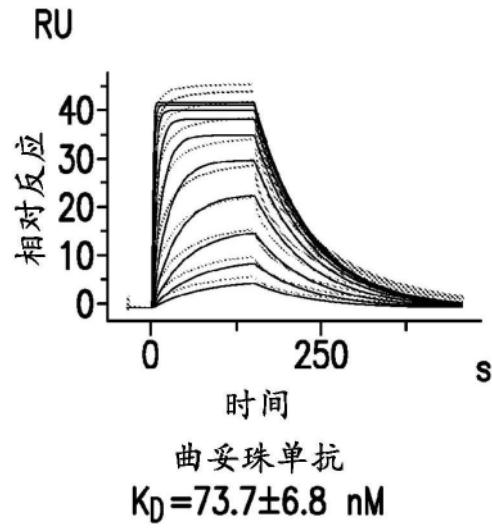


图110F

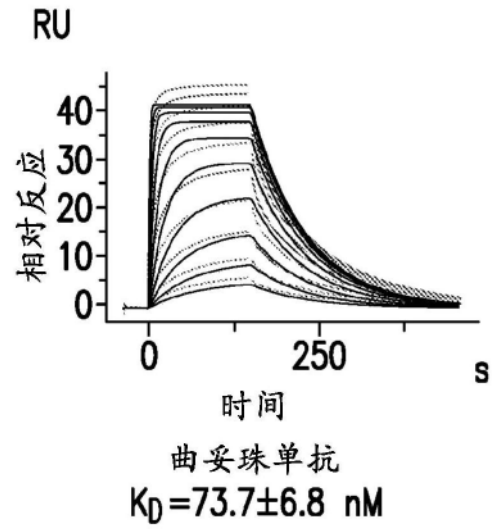


图110G

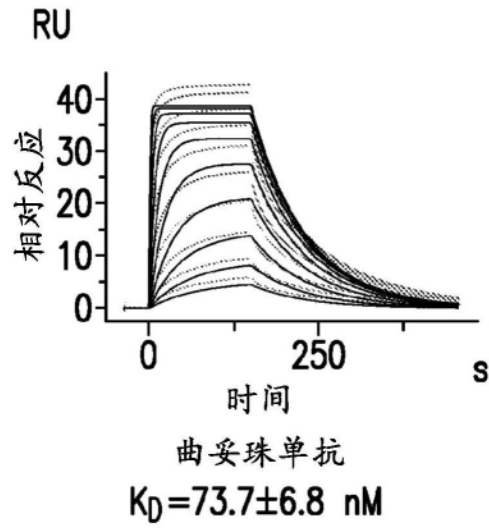


图110H

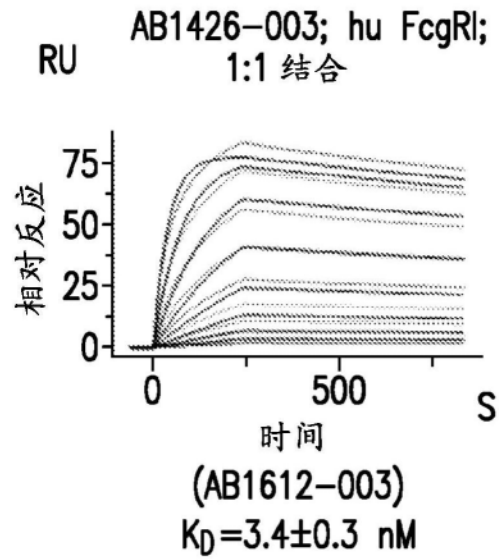


图111A

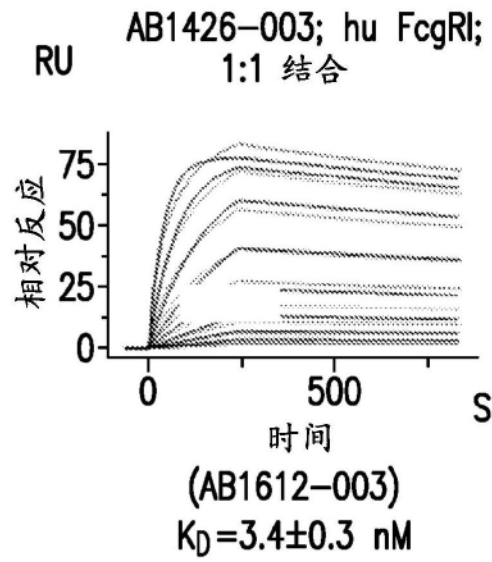


图111B

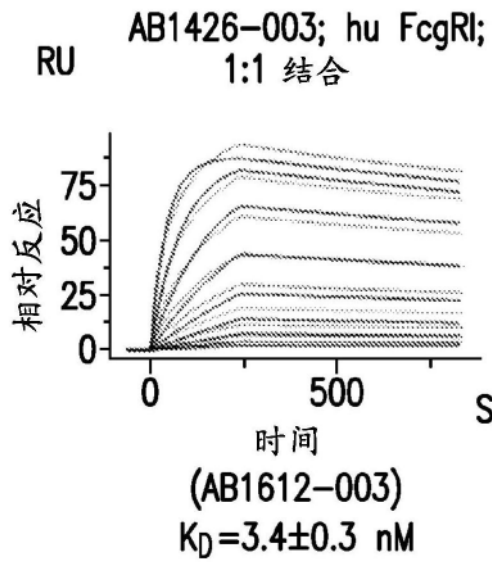


图111C

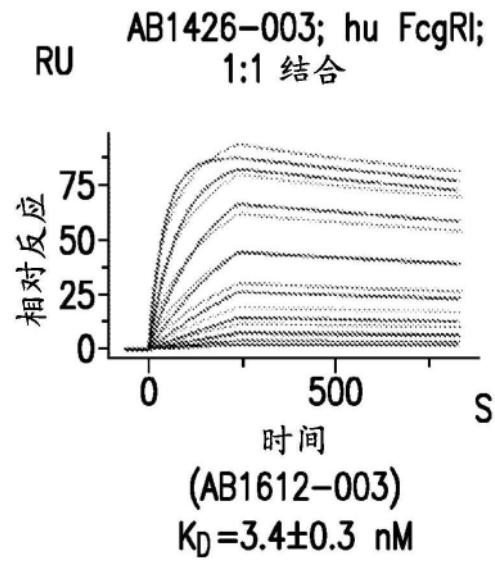


图111D

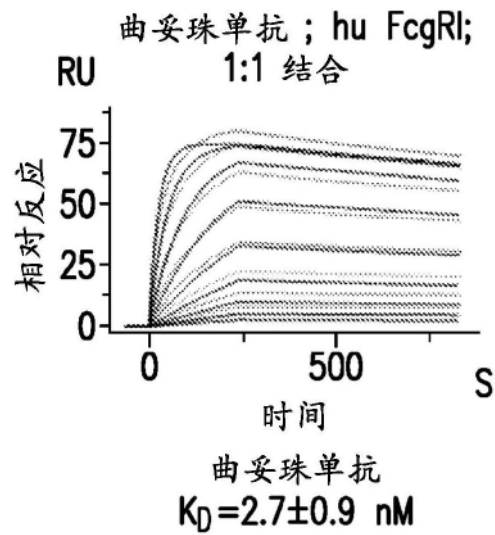


图111E

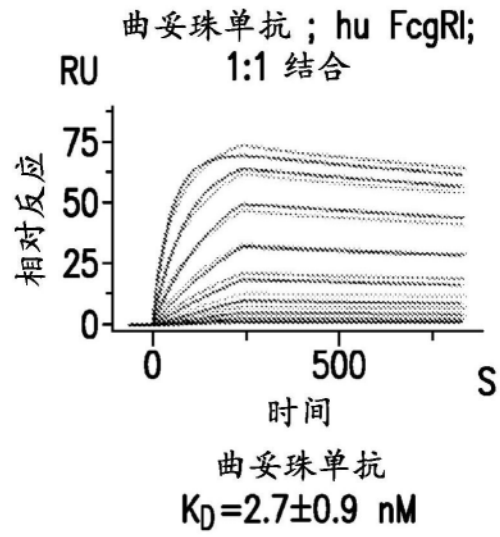


图111F

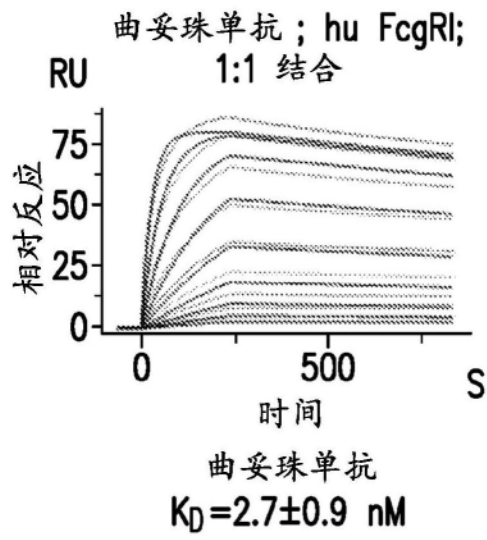


图111G

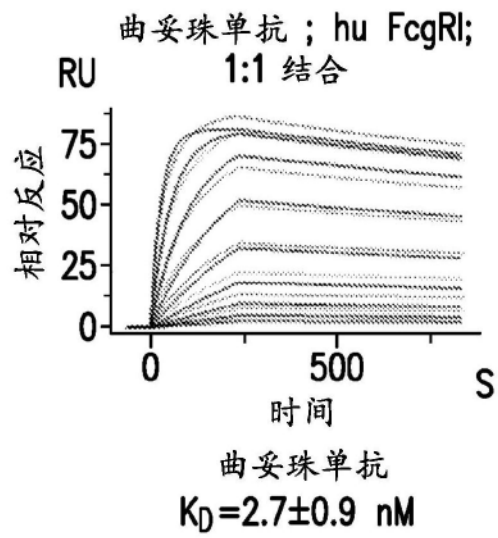


图111H

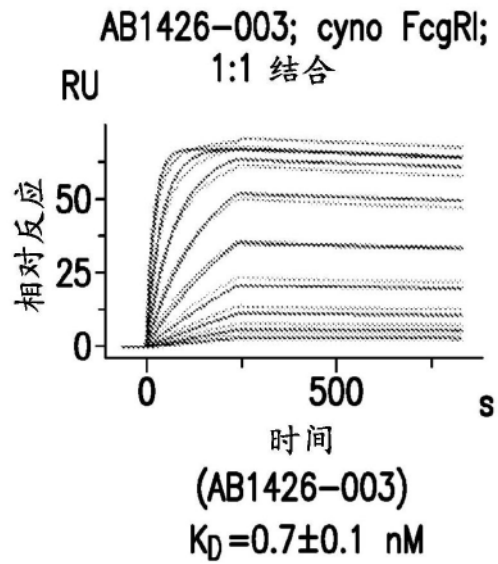


图112A

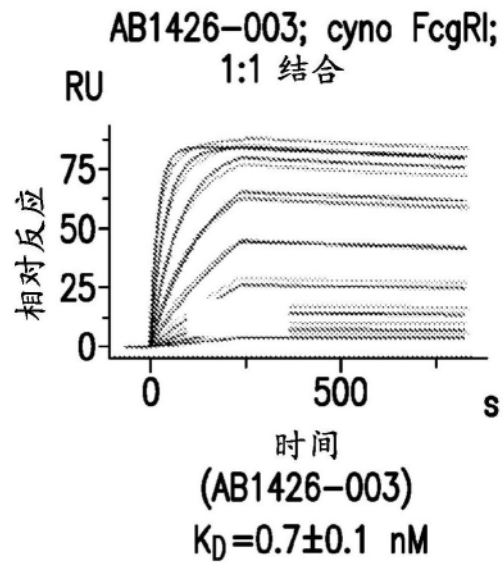


图112B

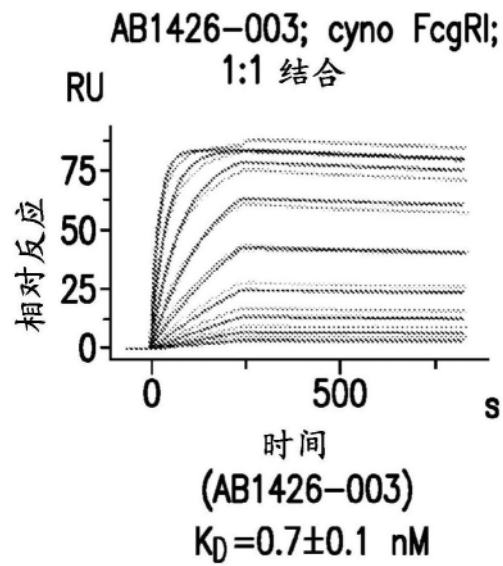


图112C

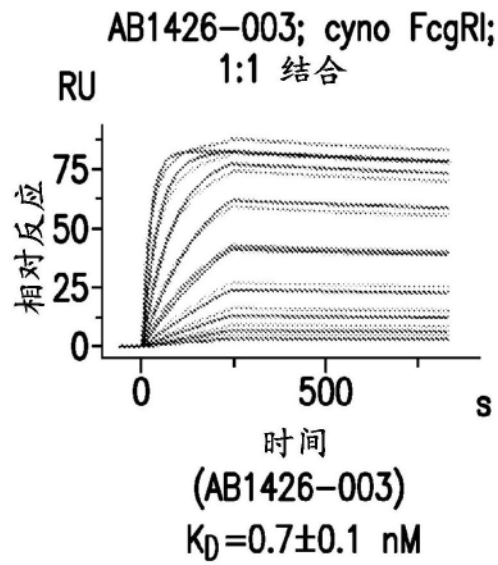


图112D

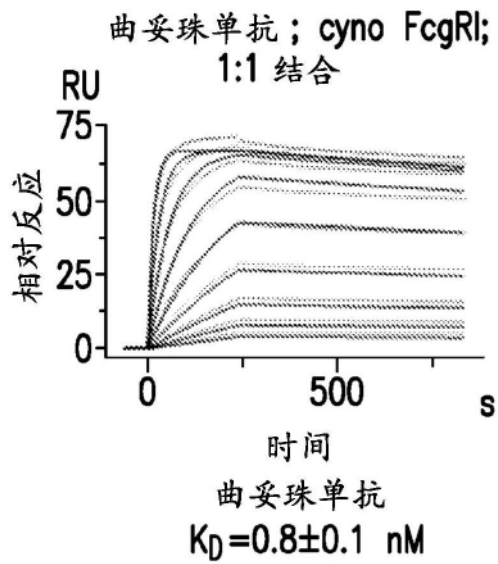


图112E

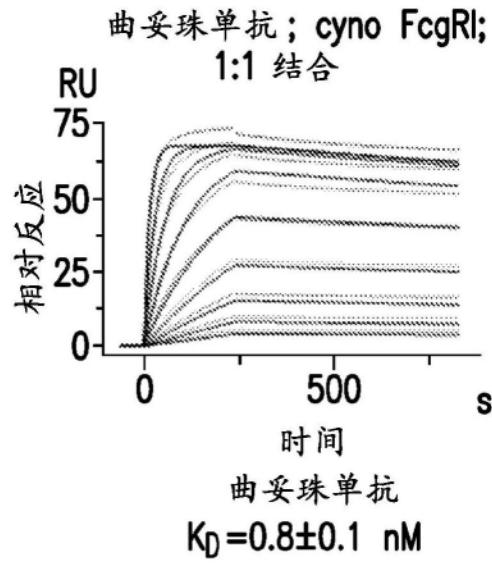


图112F

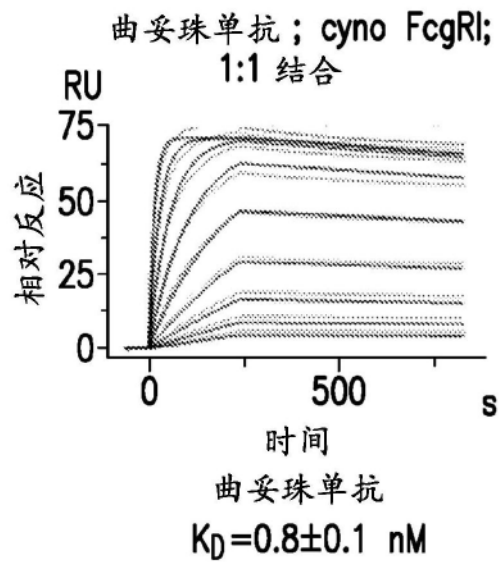


图112G

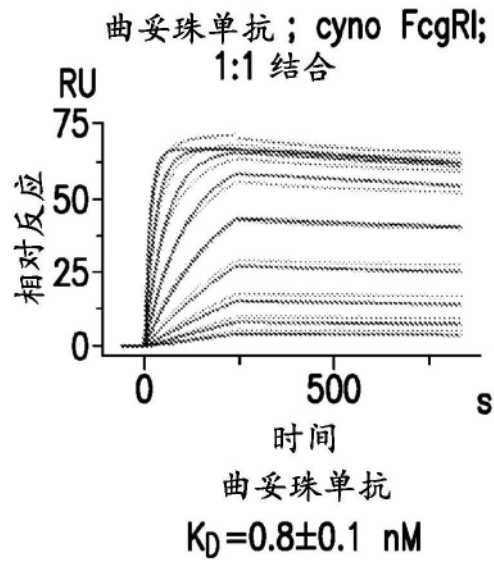


图112H

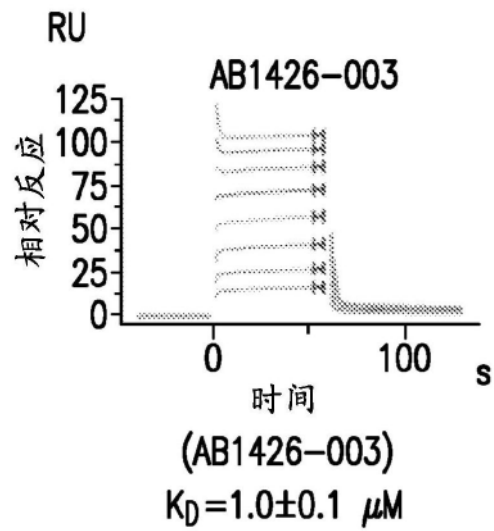


图113A

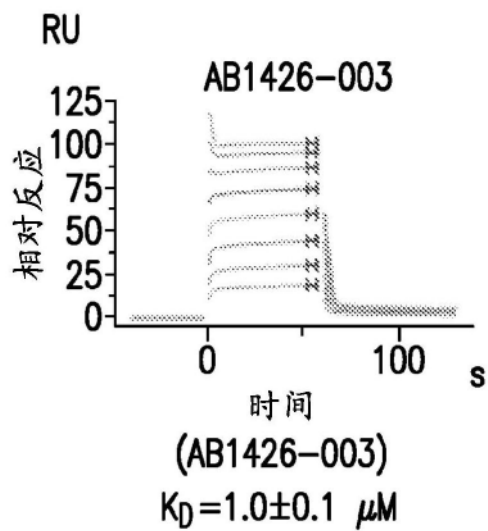


图113B

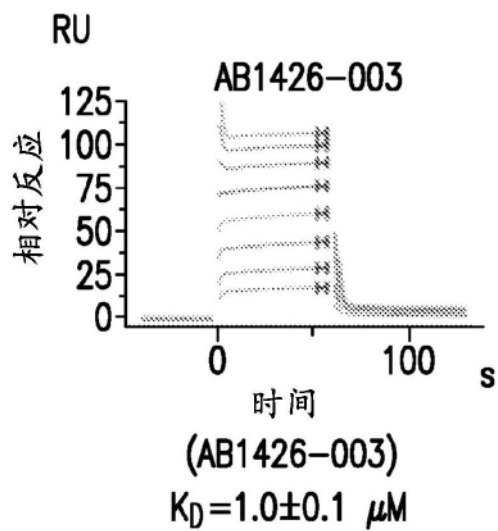


图113C

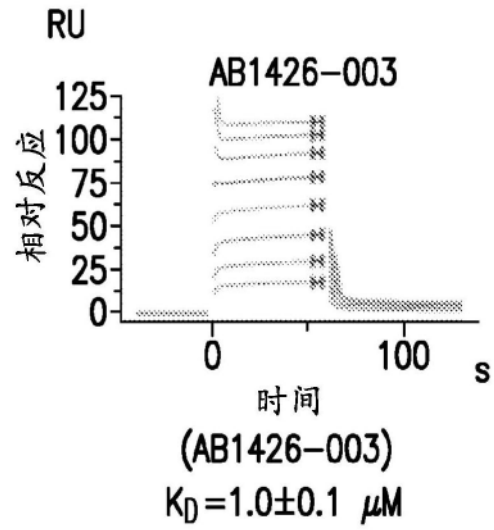


图113D

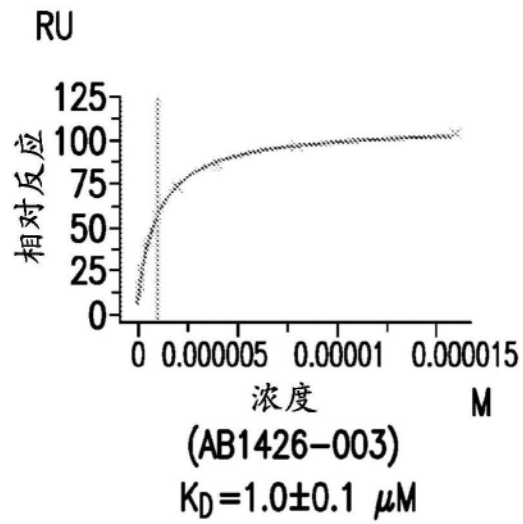


图113E

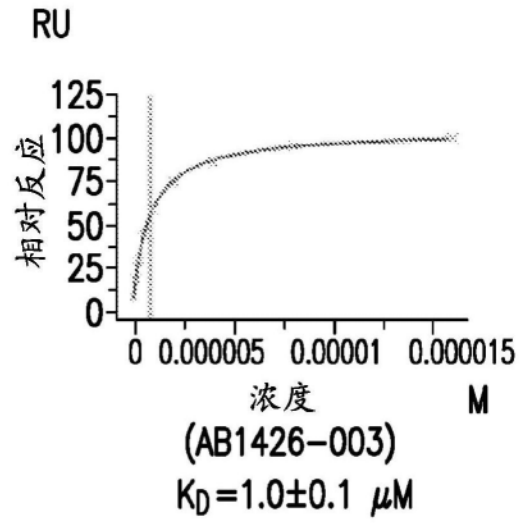


图113F

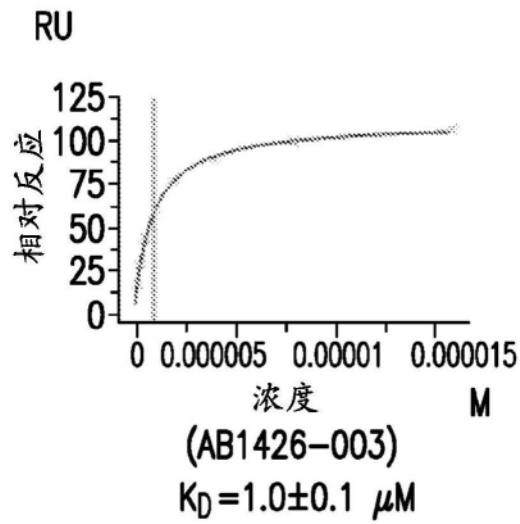


图113G

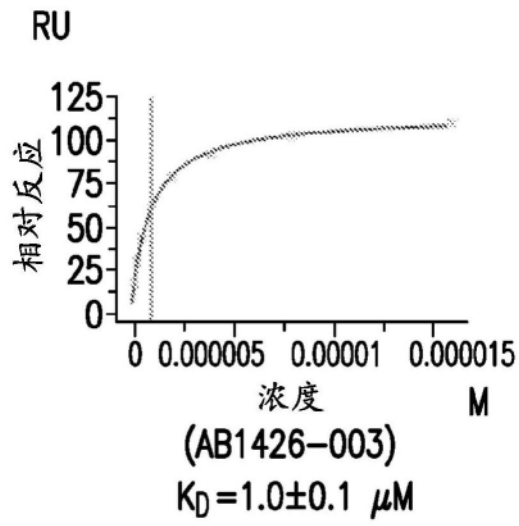


图113H

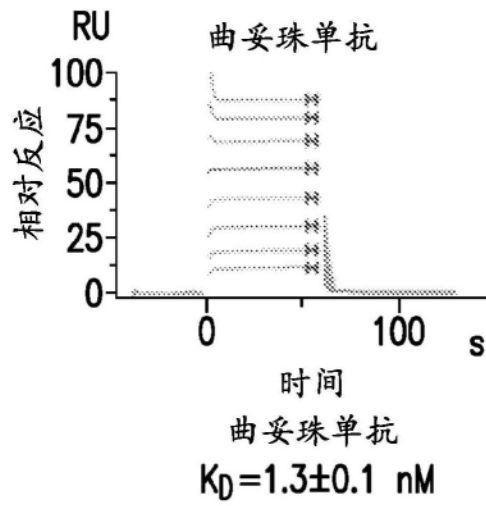


图113I

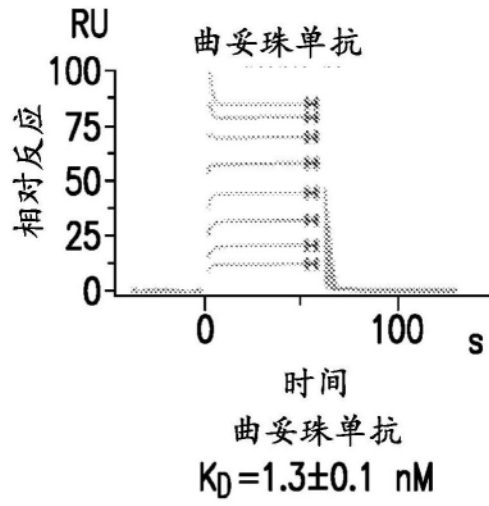


图113J

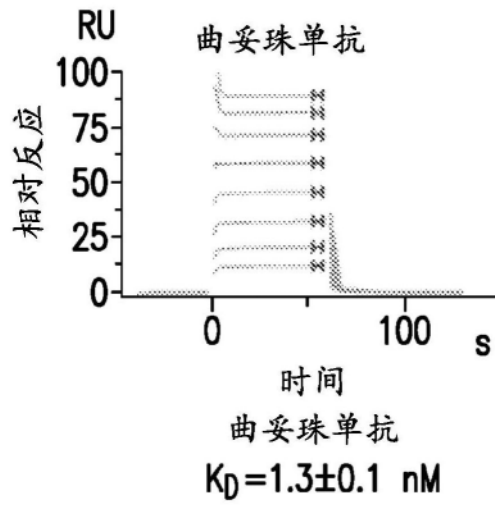


图113K

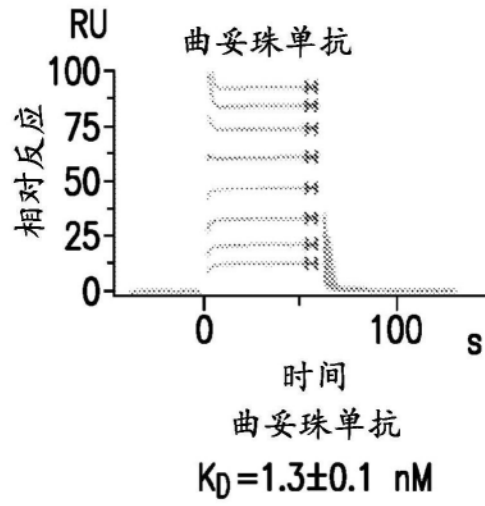


图113L

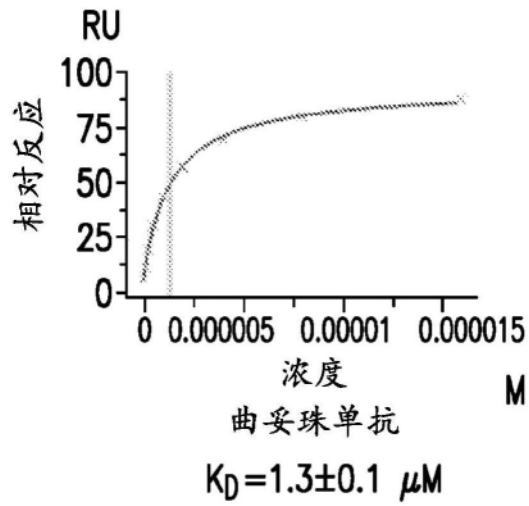


图113M

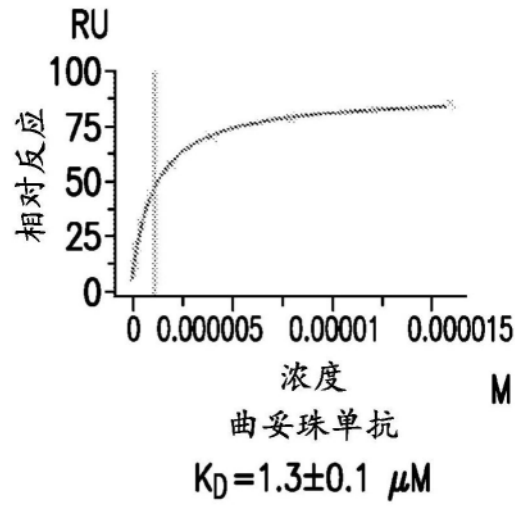


图113N

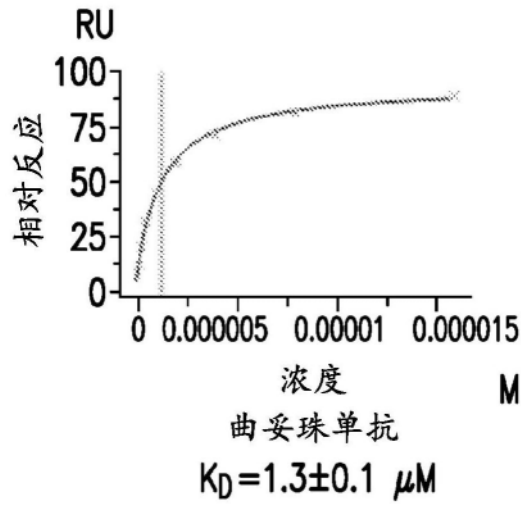


图1130

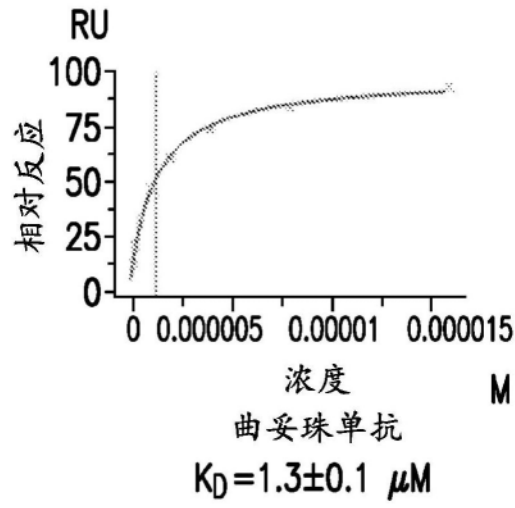


图113P

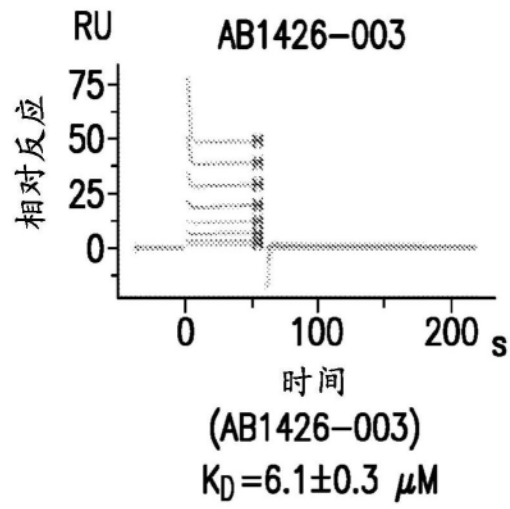


图114A

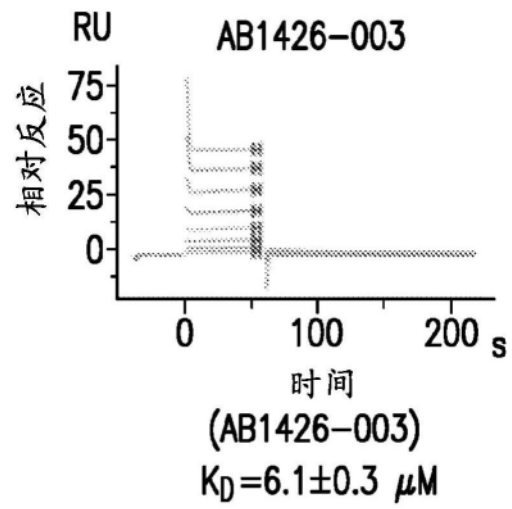


图114B

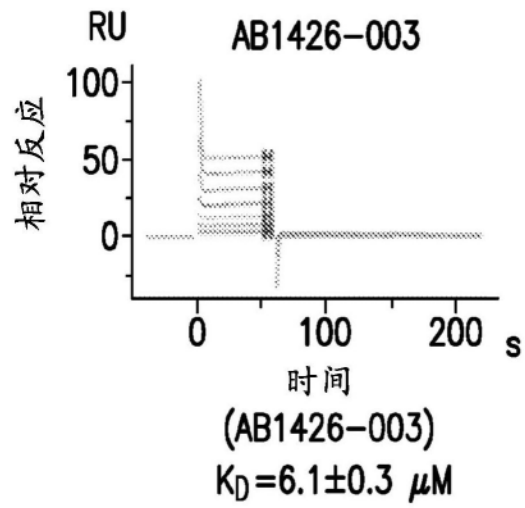


图114C

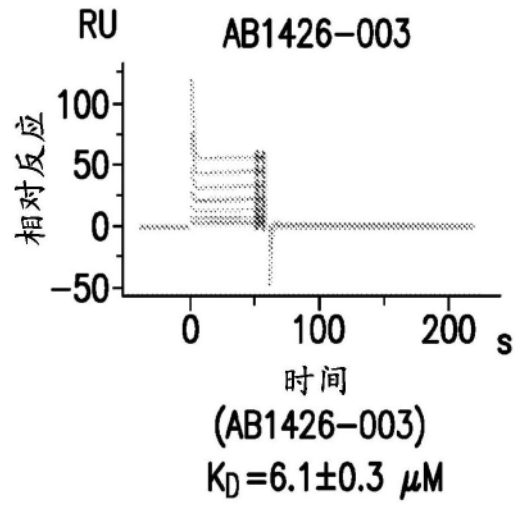


图114D

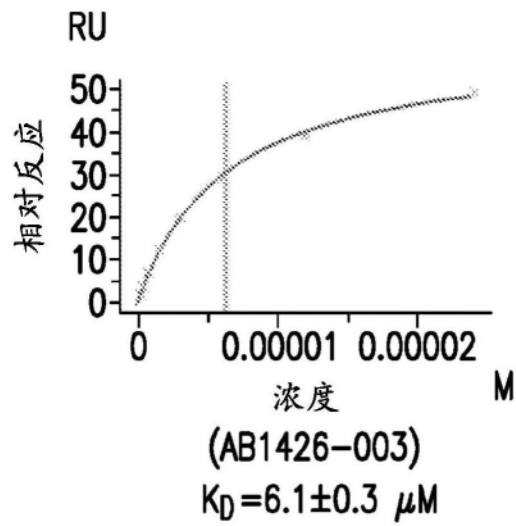


图114E

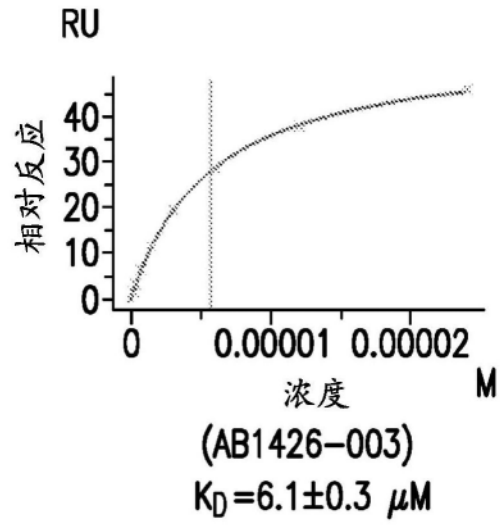


图114F

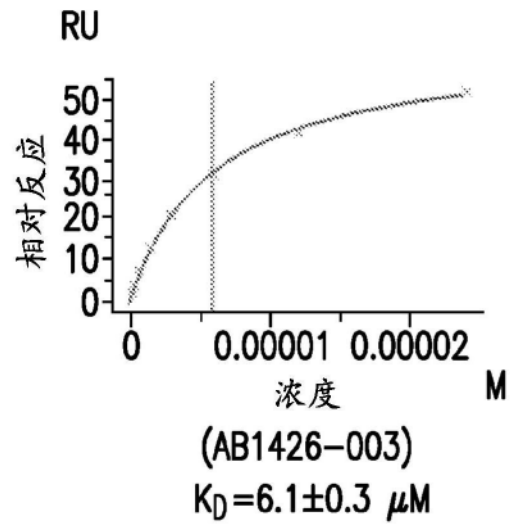


图114G

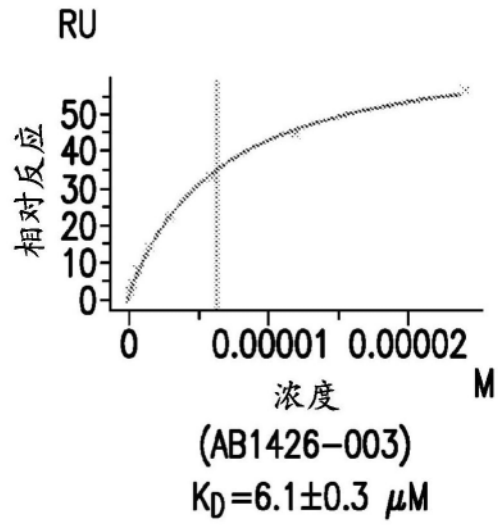


图114H

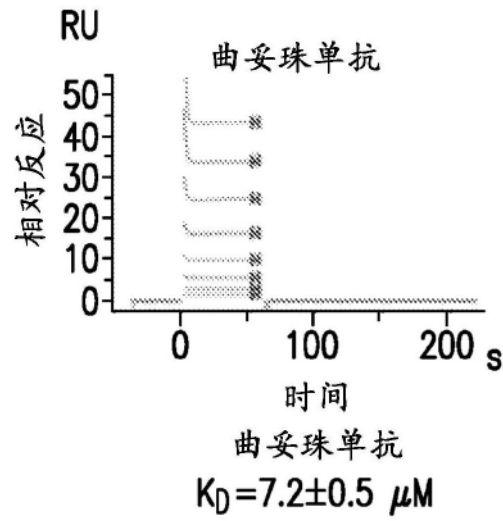


图114I

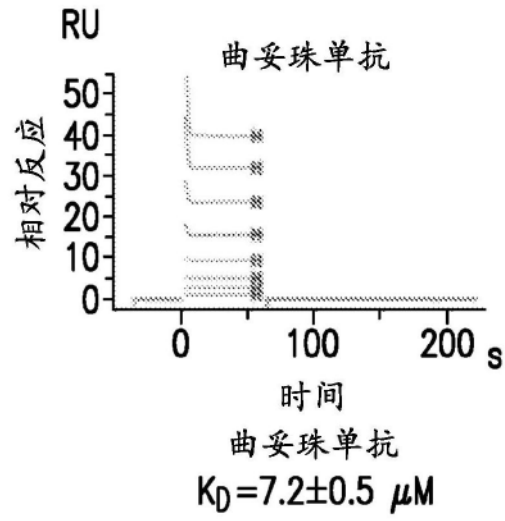


图114J

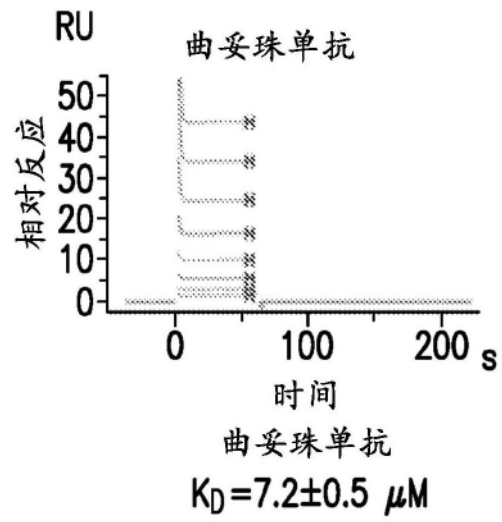


图114K

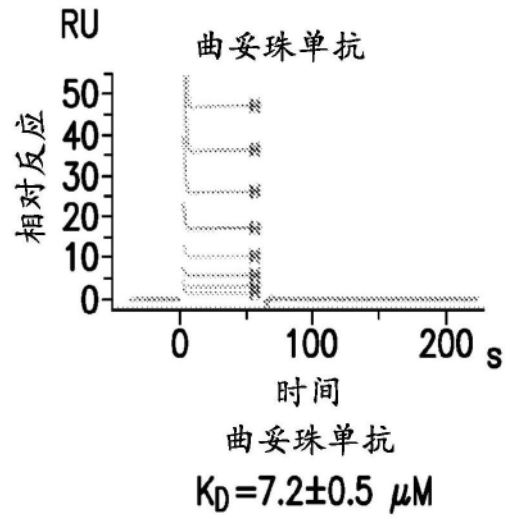


图114L

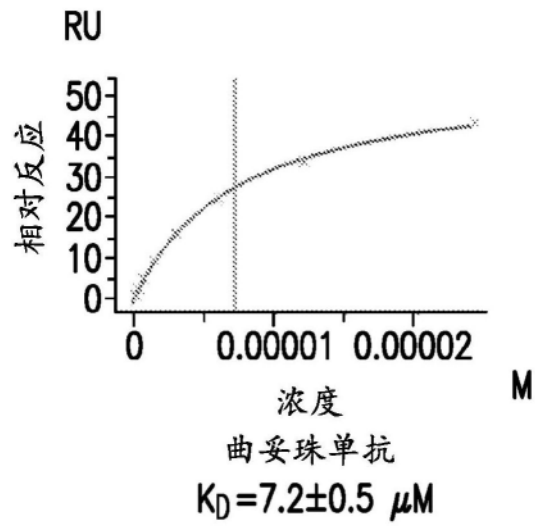


图114M

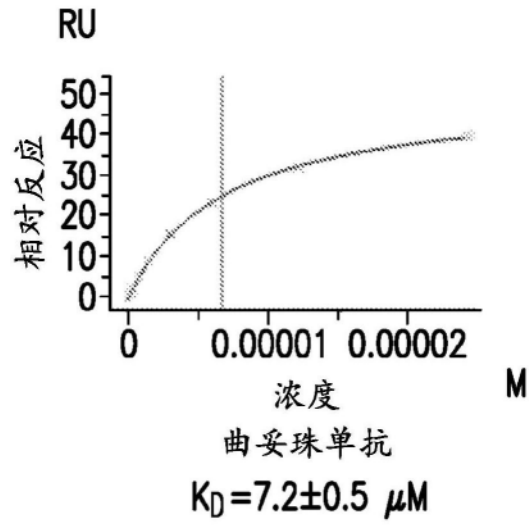


图114N

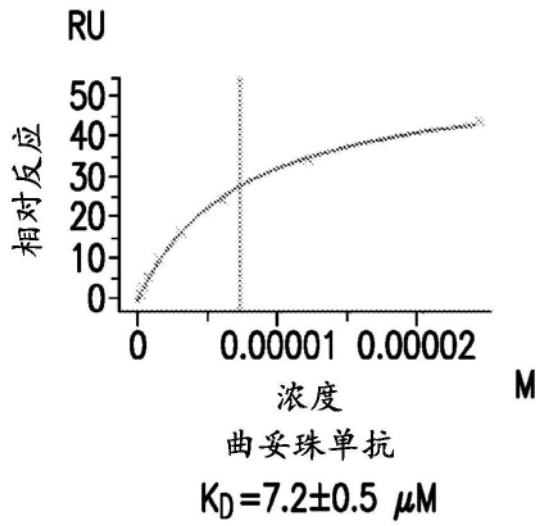


图1140

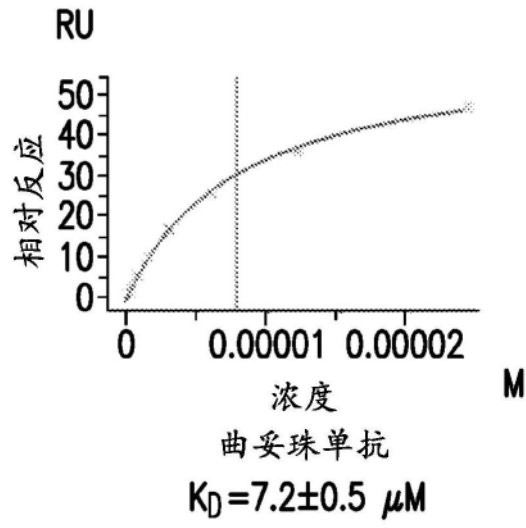


图114P

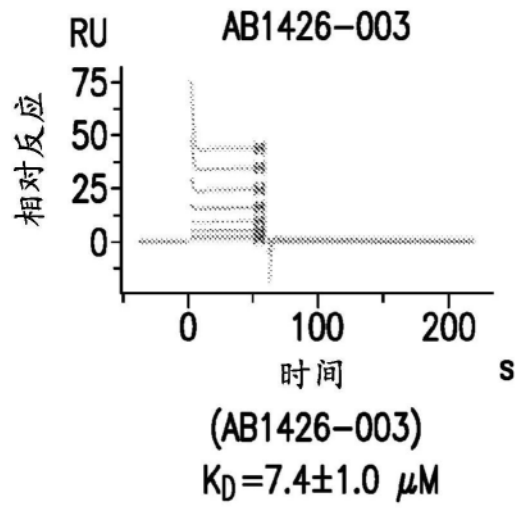


图115A

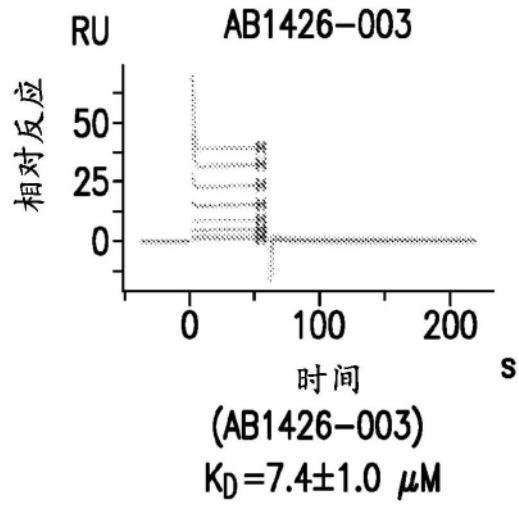


图115B

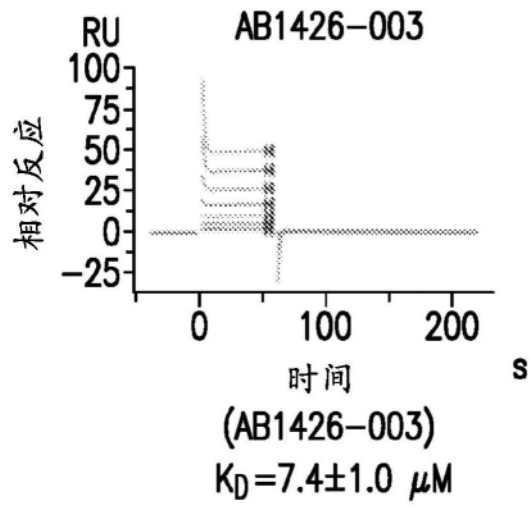


图115C

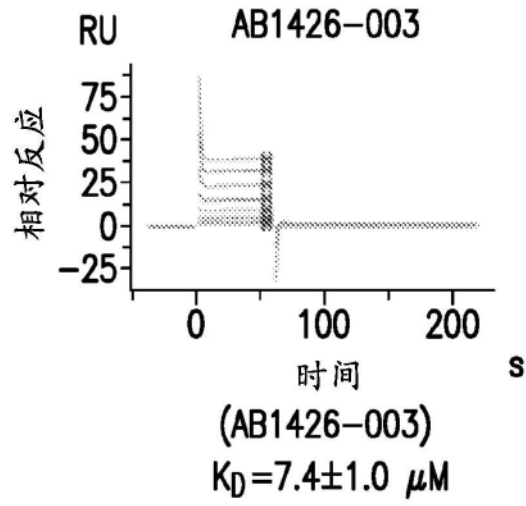


图115D

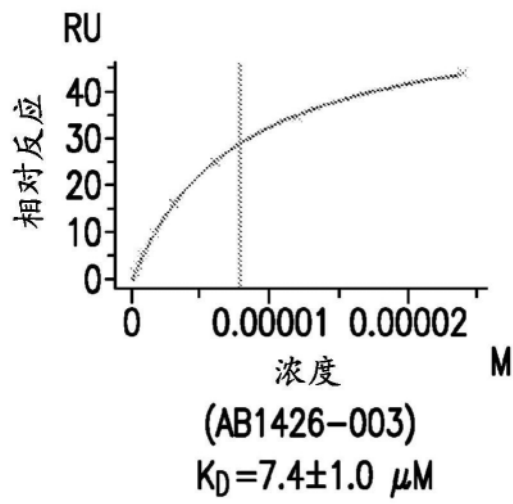


图115E

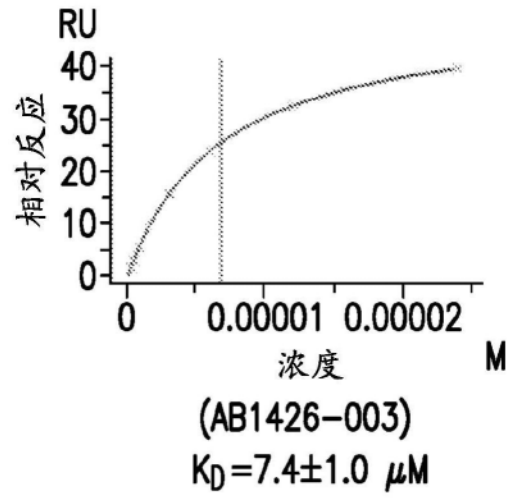


图115F

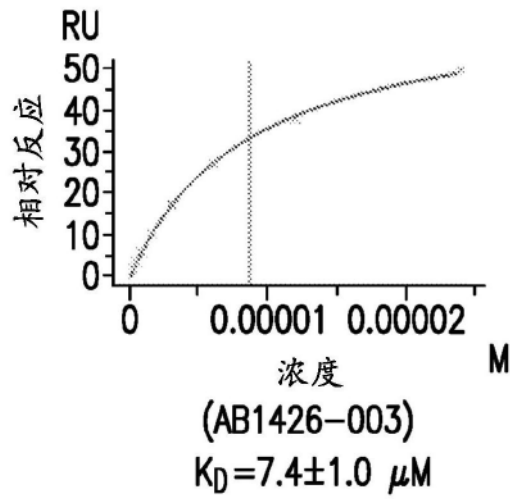


图115G

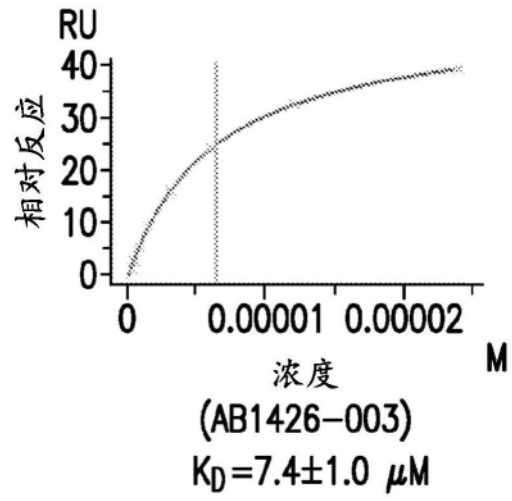


图115H

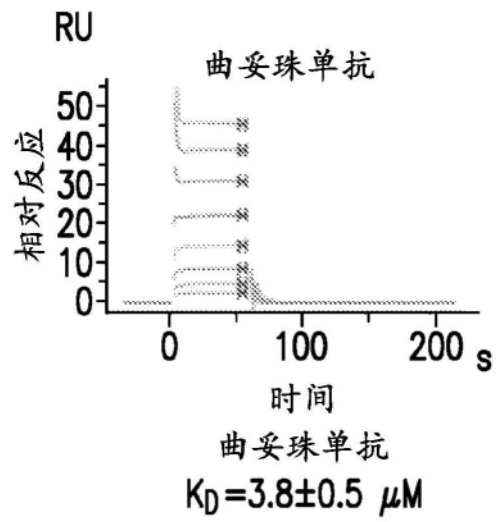


图115I

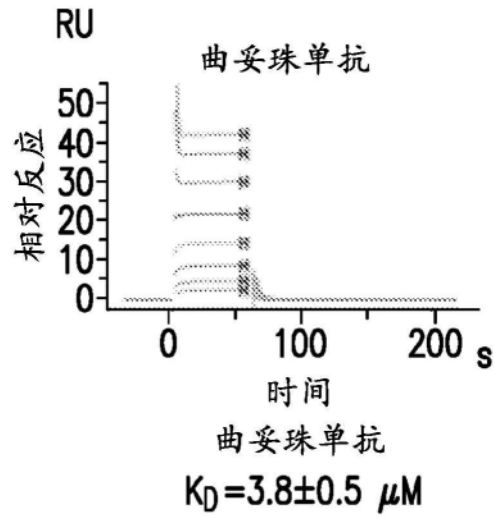


图115J

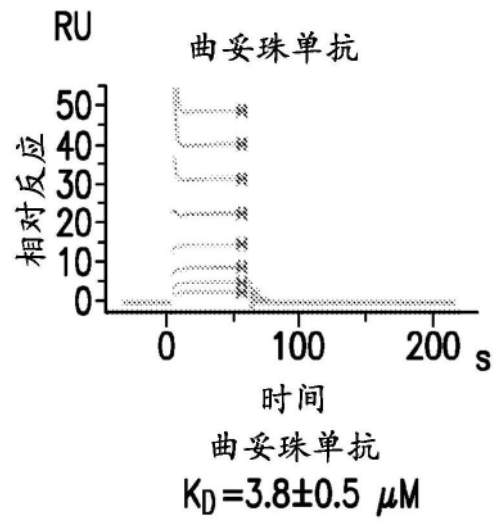


图115K

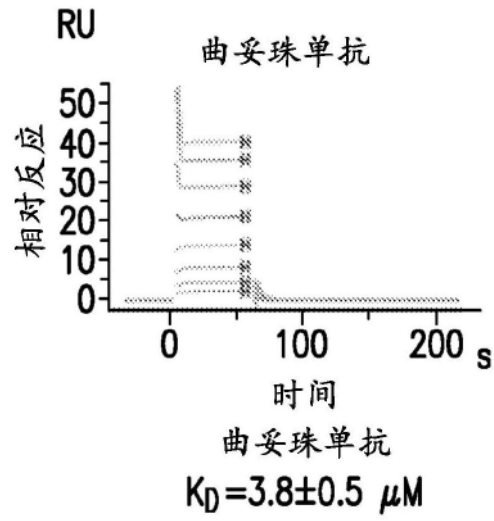


图115L

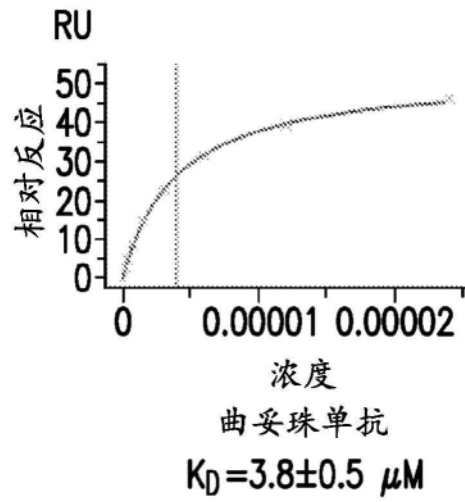


图115M

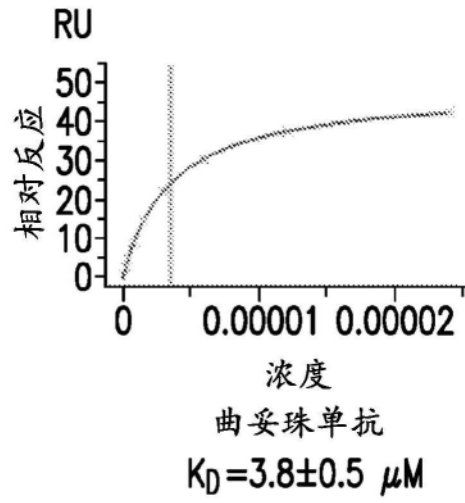


图115N

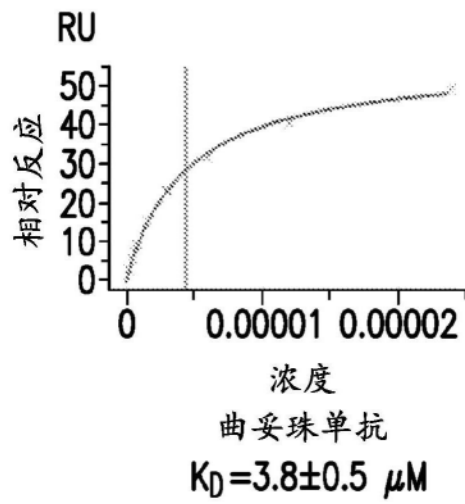


图1150

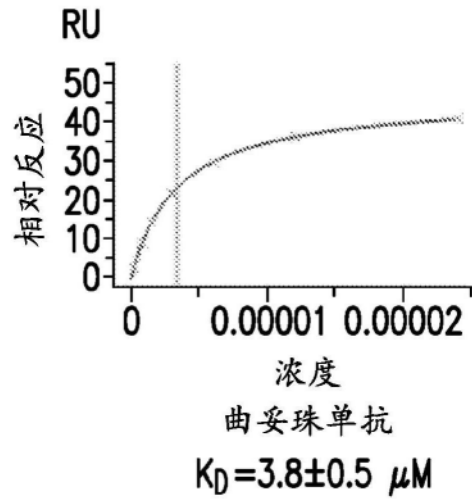


图115P

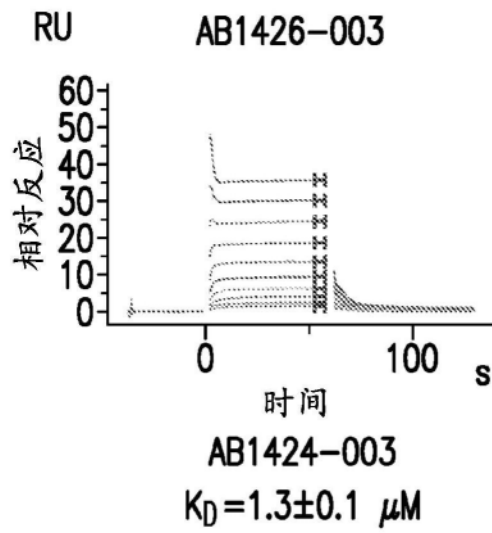


图116A

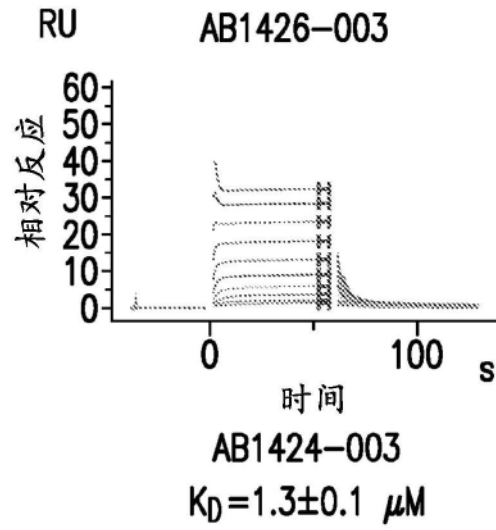


图116B

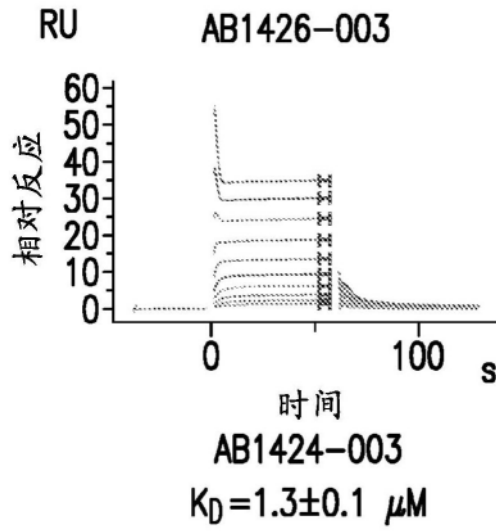


图116C

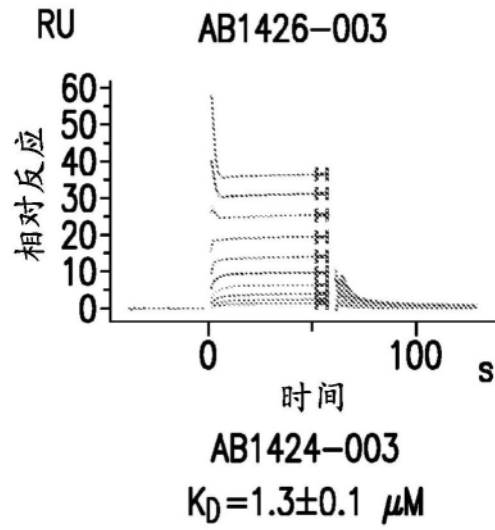


图116D

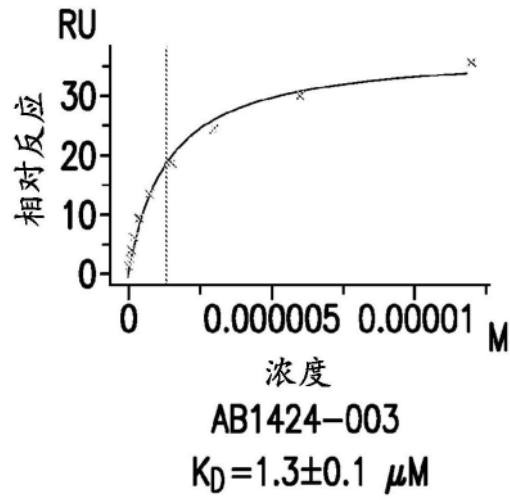


图116E

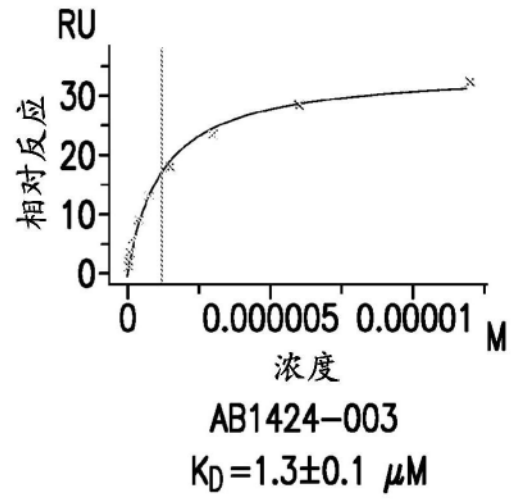


图116F

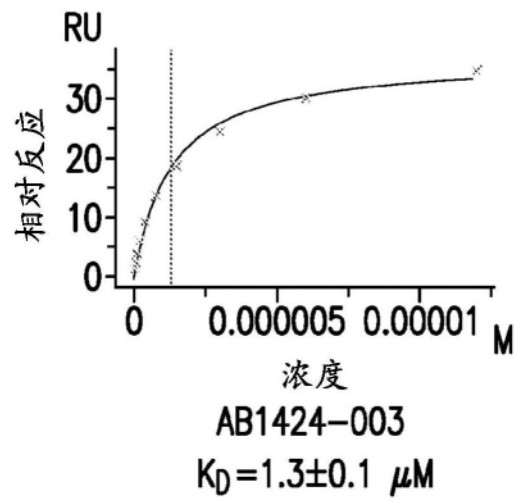


图116G

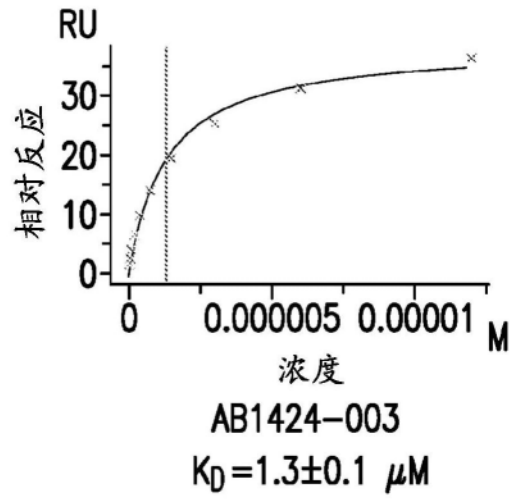


图116H

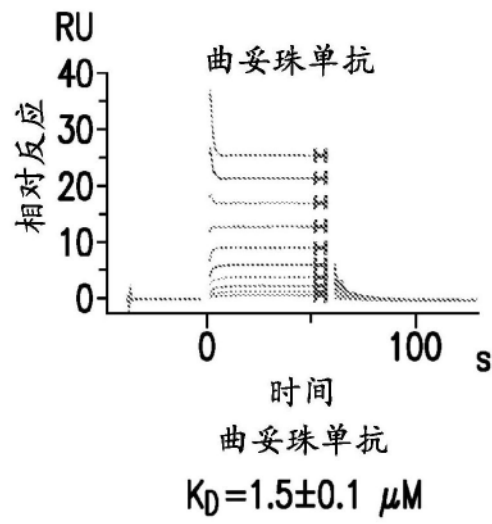


图116I

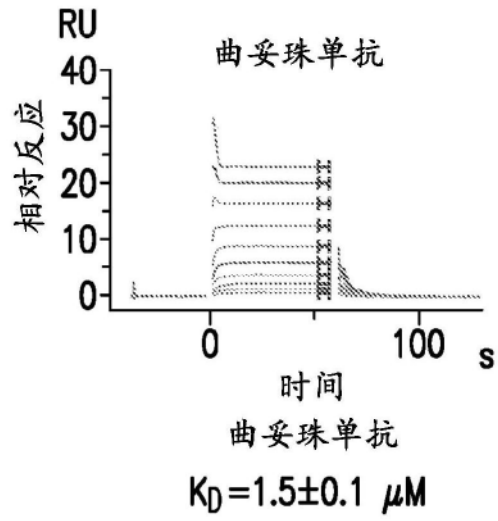


图116J

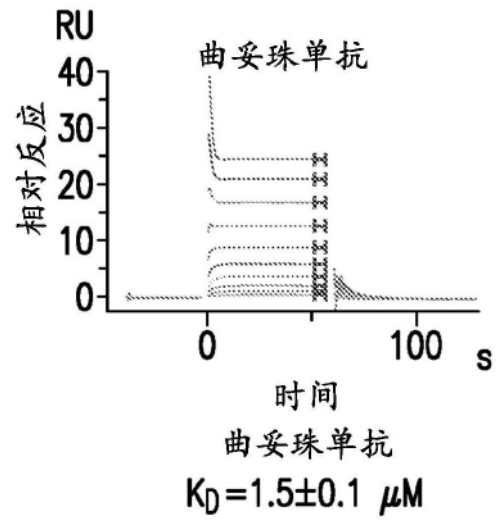


图116K

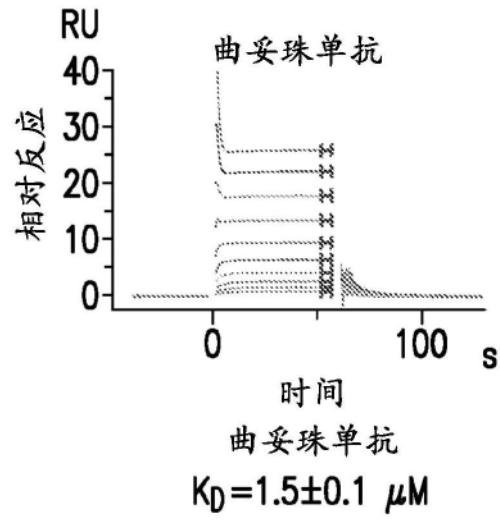


图116L

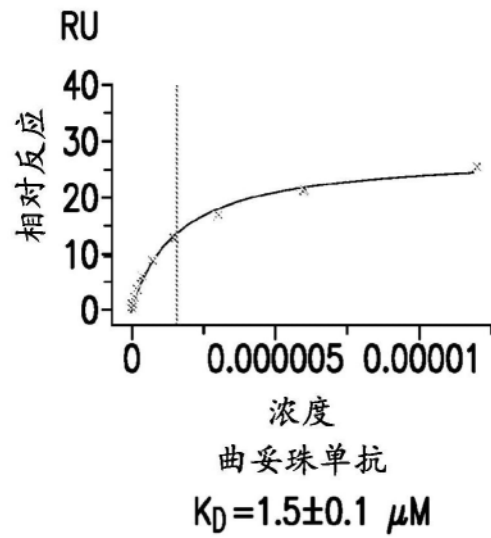


图116M

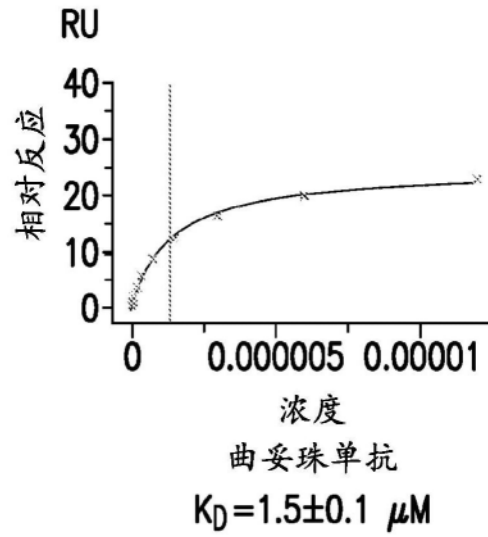


图116N

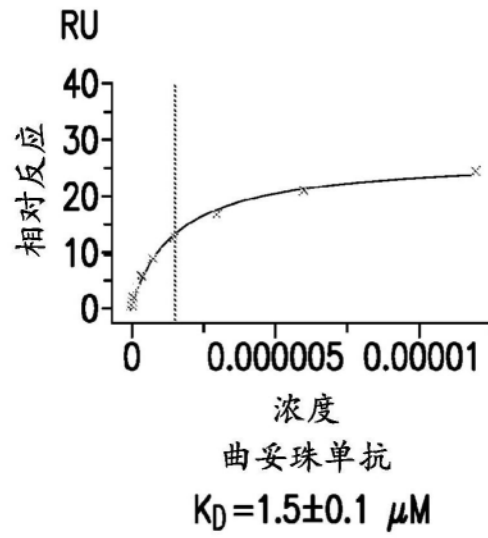


图1160

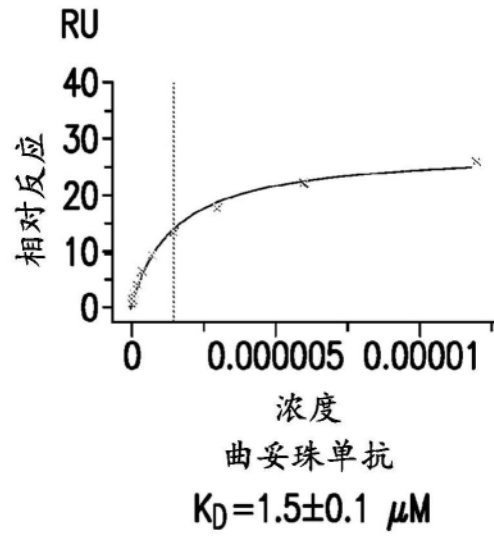


图116P

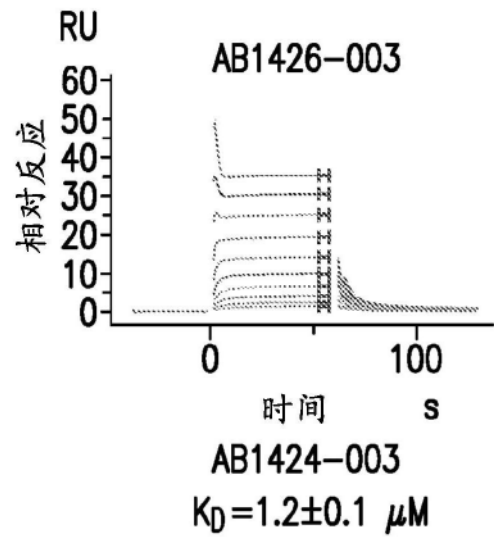


图117A

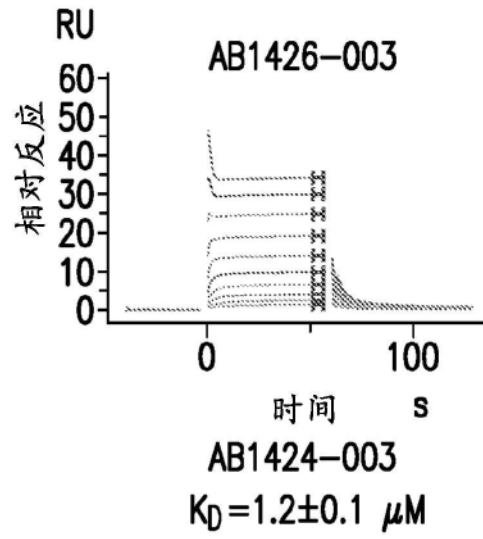


图117B

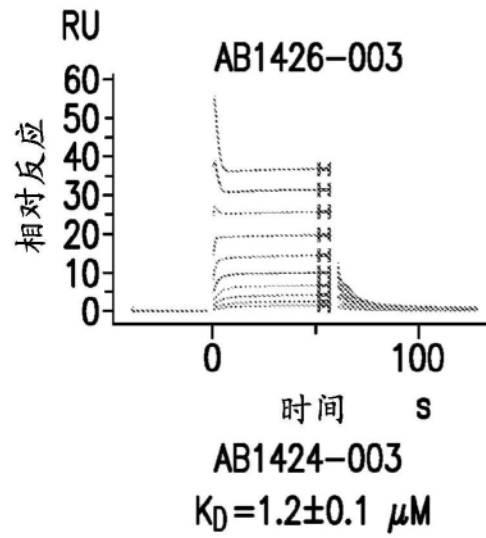


图117C

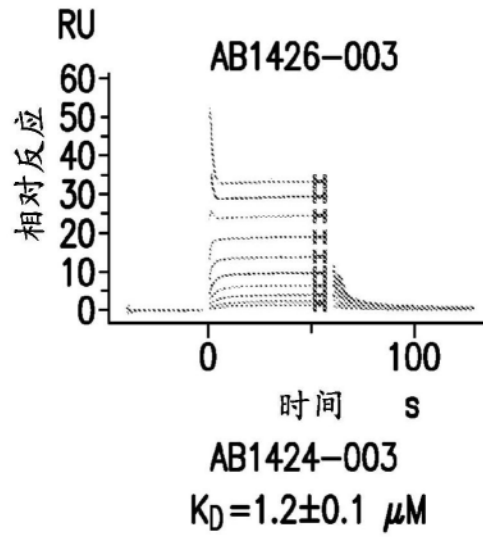


图117D

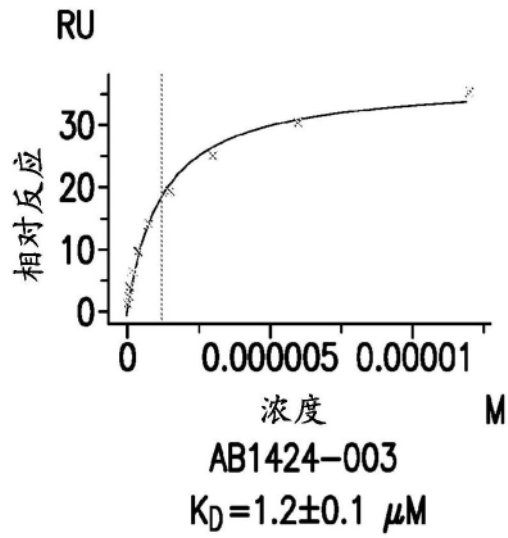


图117E

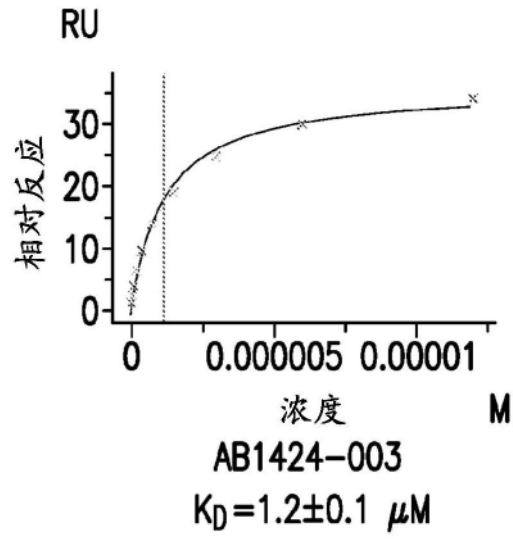


图117F

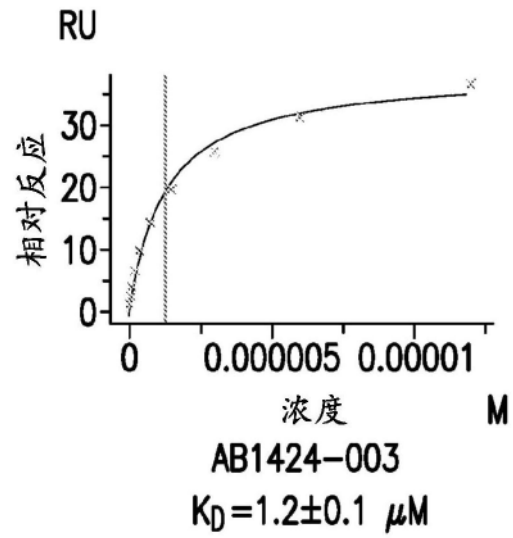


图117G

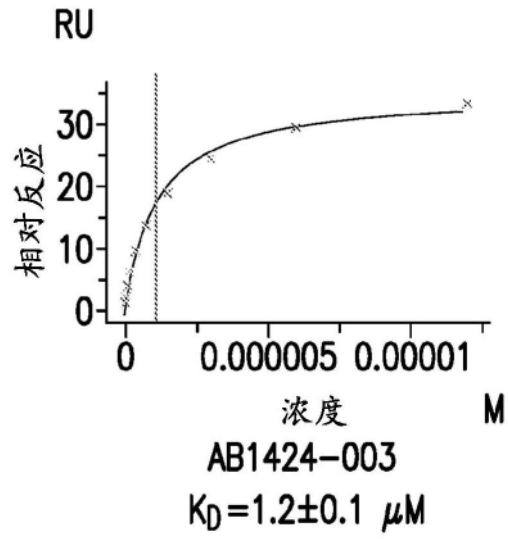


图117H

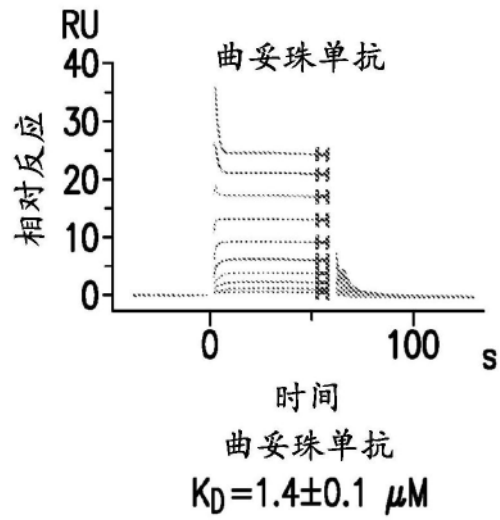


图117I

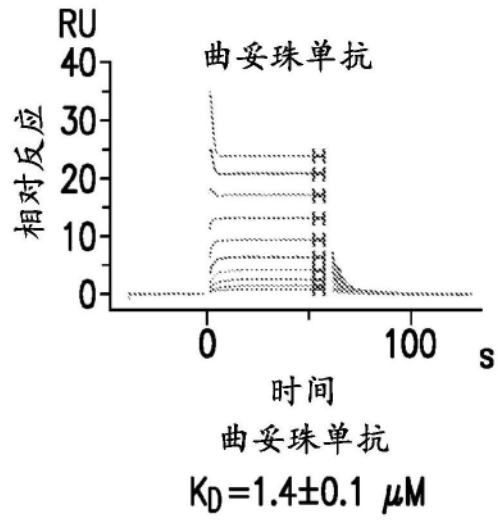


图117J

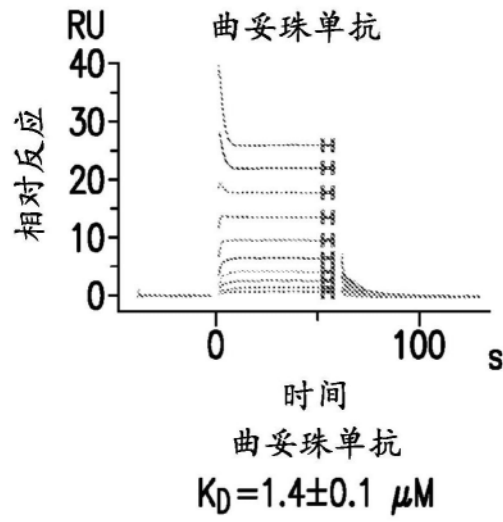


图117K

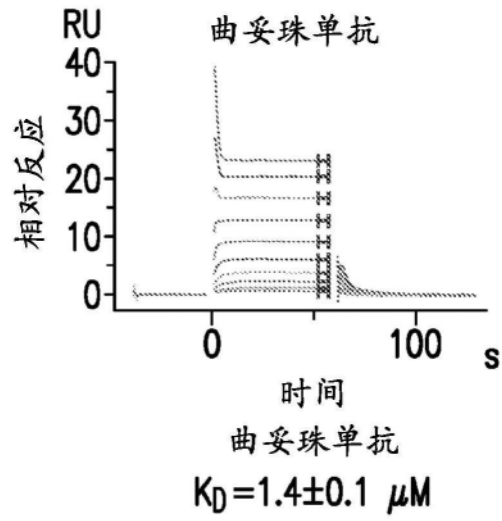


图117L

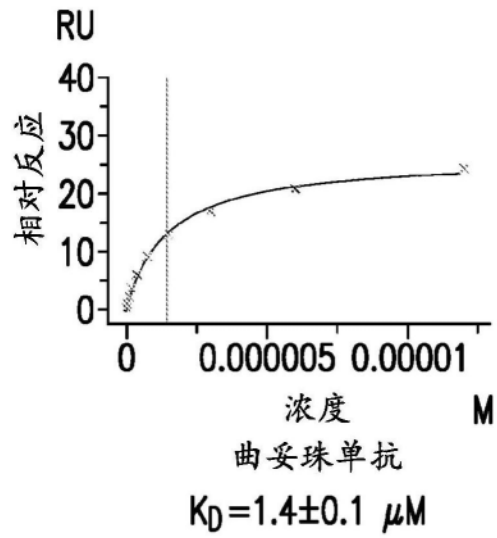


图117M

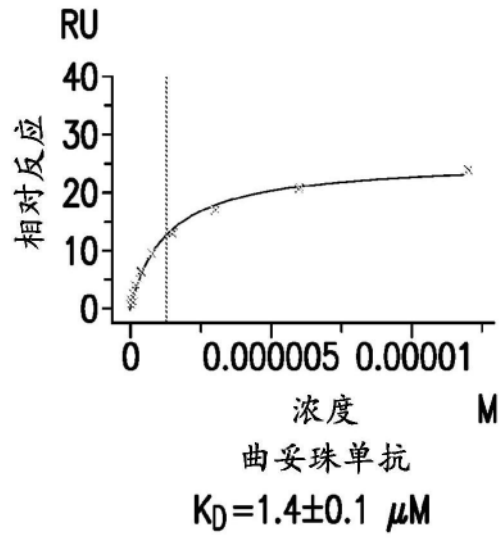


图117N

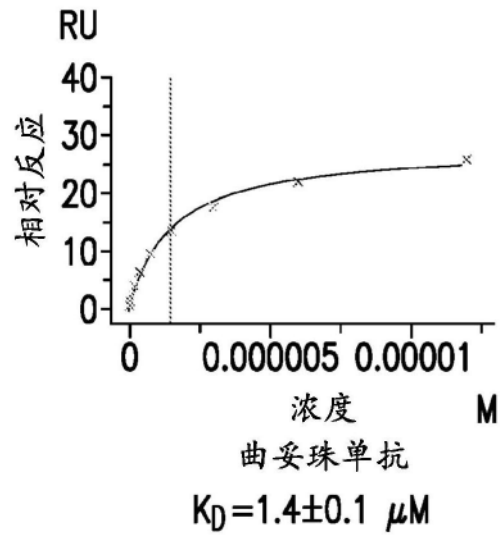


图1170

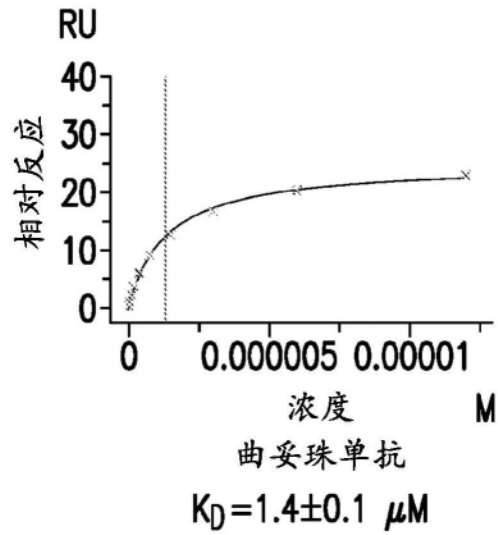


图117P

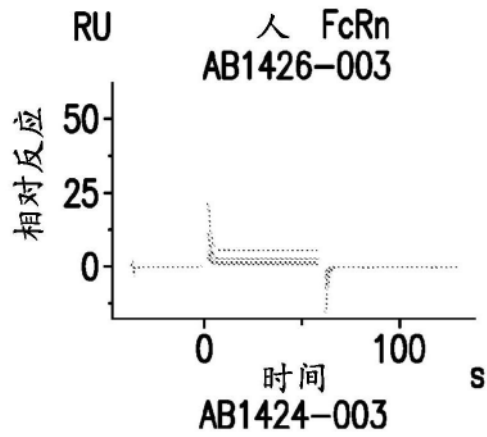


图118A

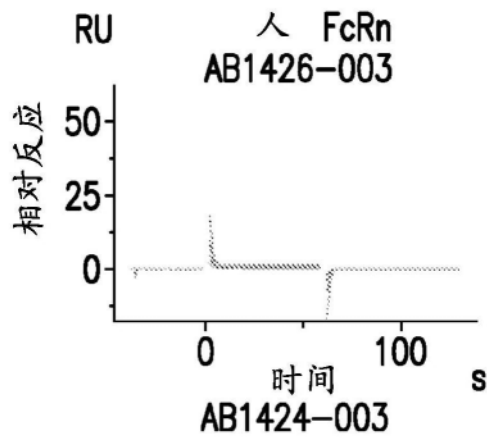


图118B

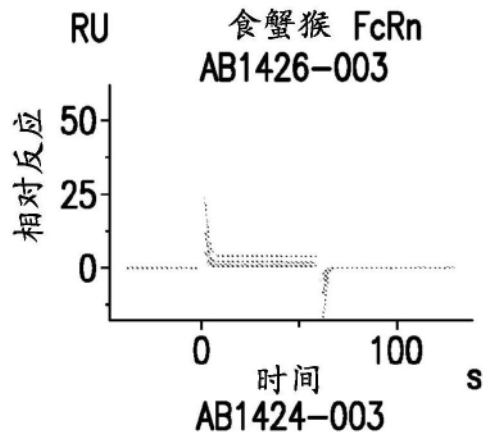


图118C

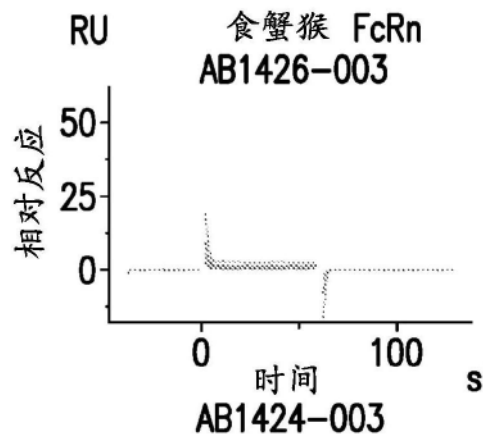


图118D

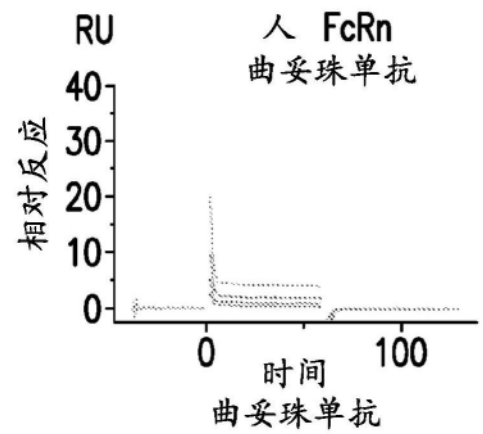


图118E

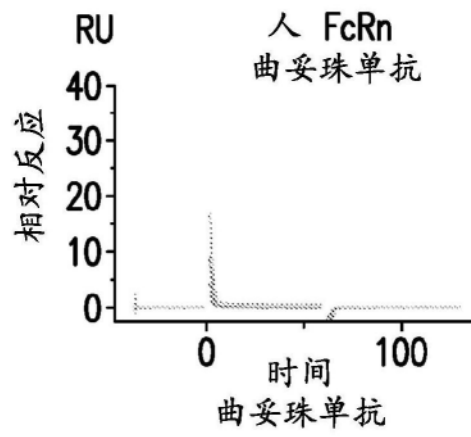


图118F

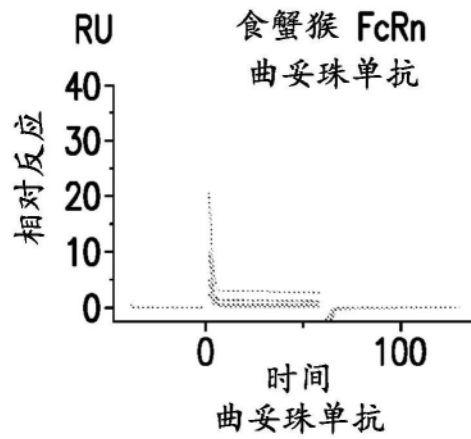


图118G

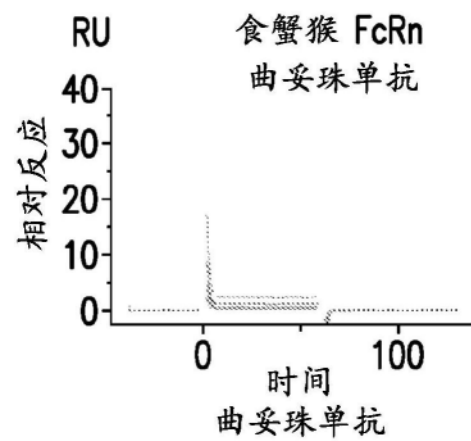


图118H

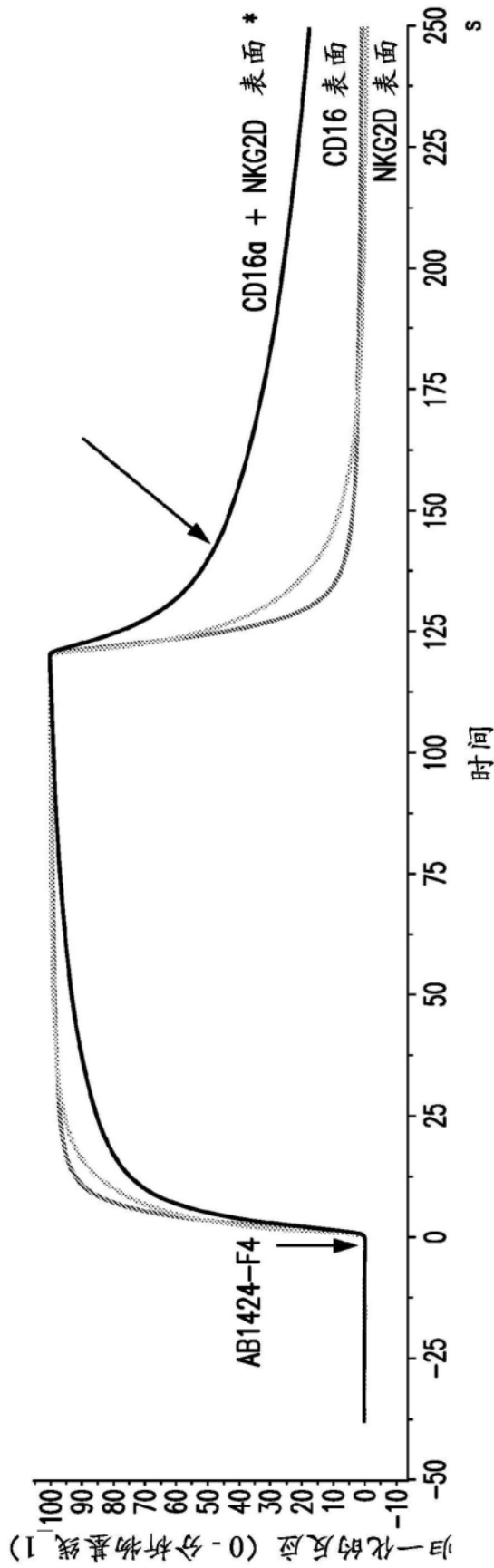


图119

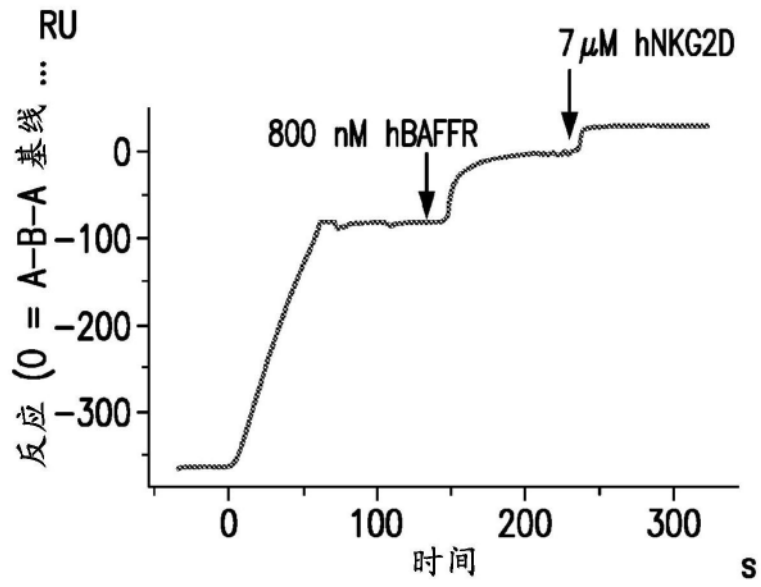


图120A

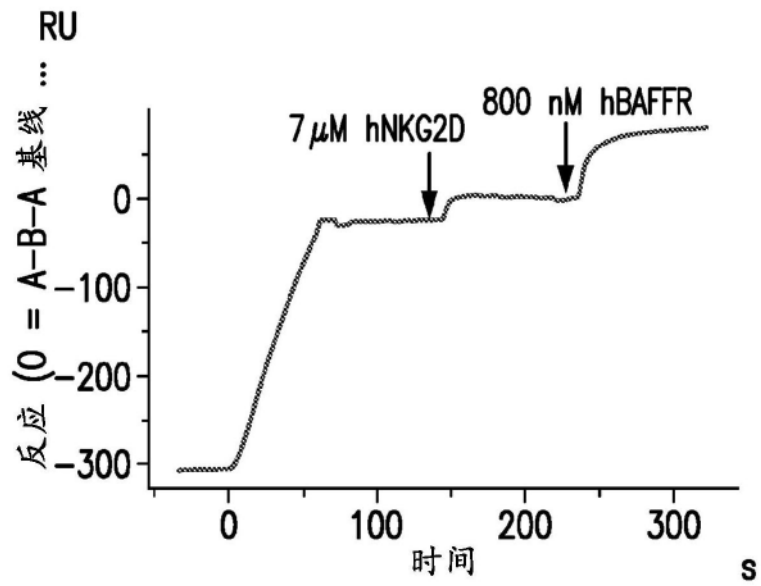


图120B

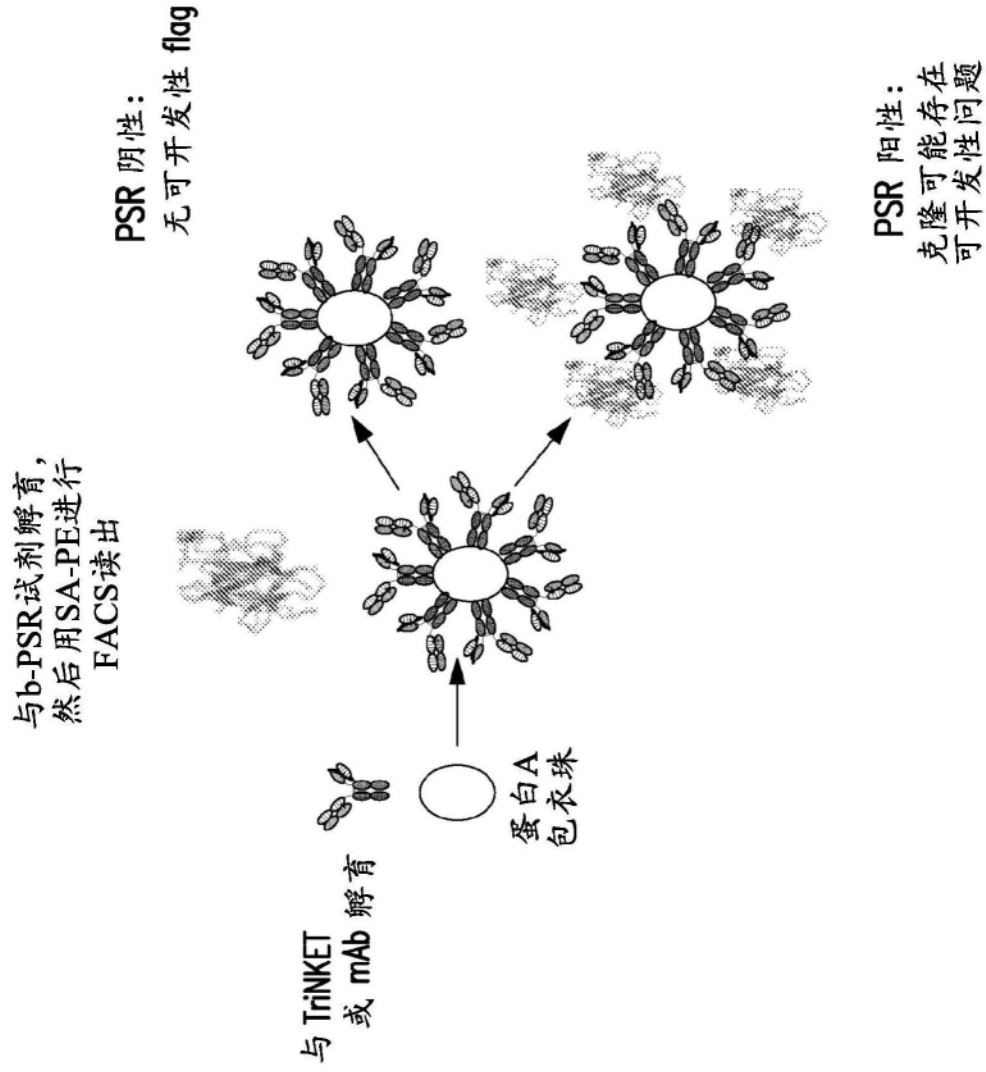


图121A

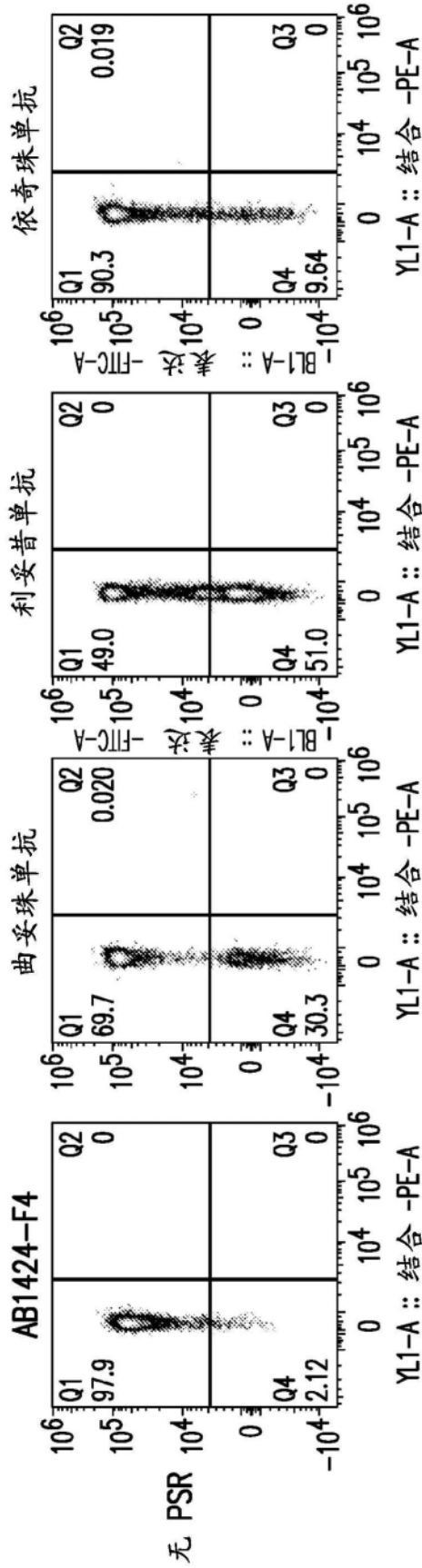


图 121B

图 121C

图 121D

图 121E

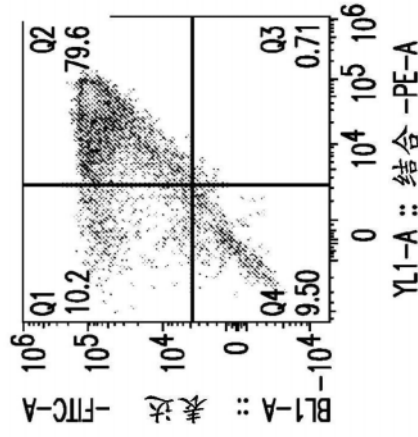


图 121I

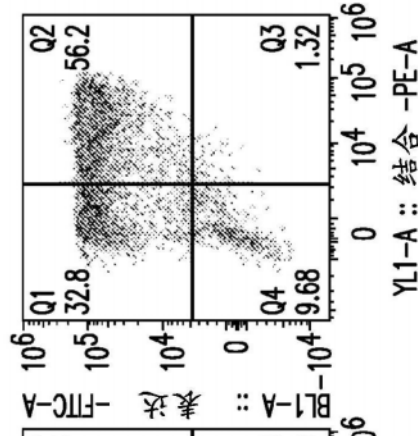


图 121H

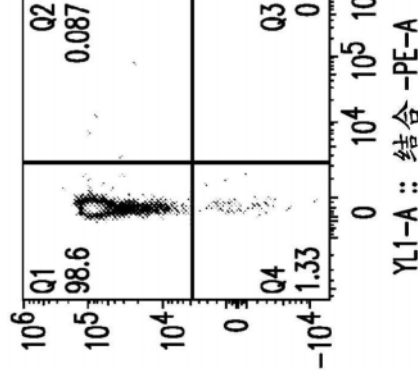


图 121G

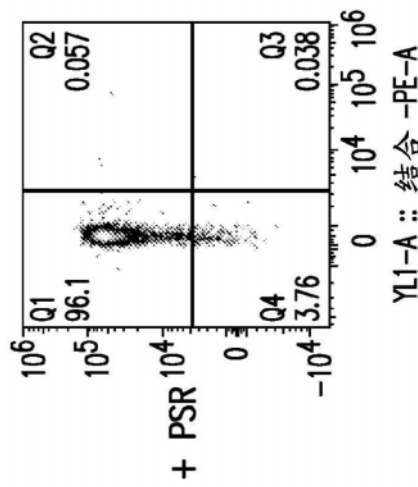


图 121F

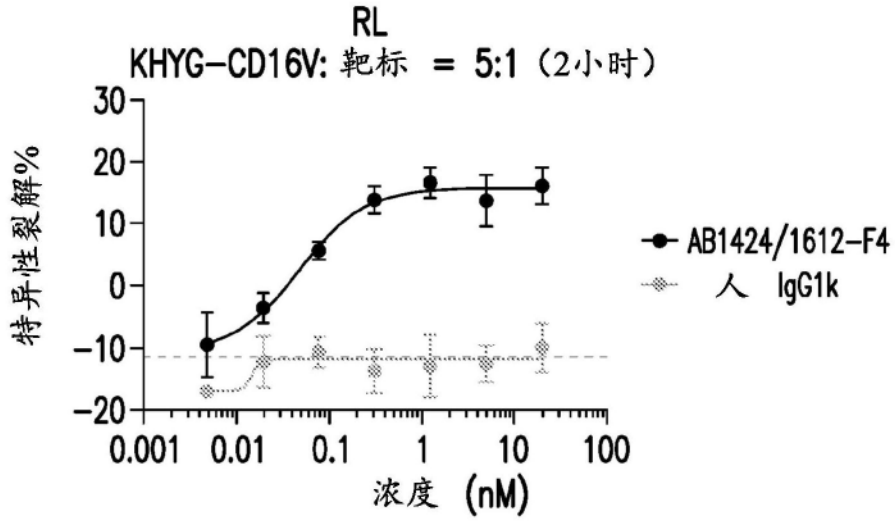


图122

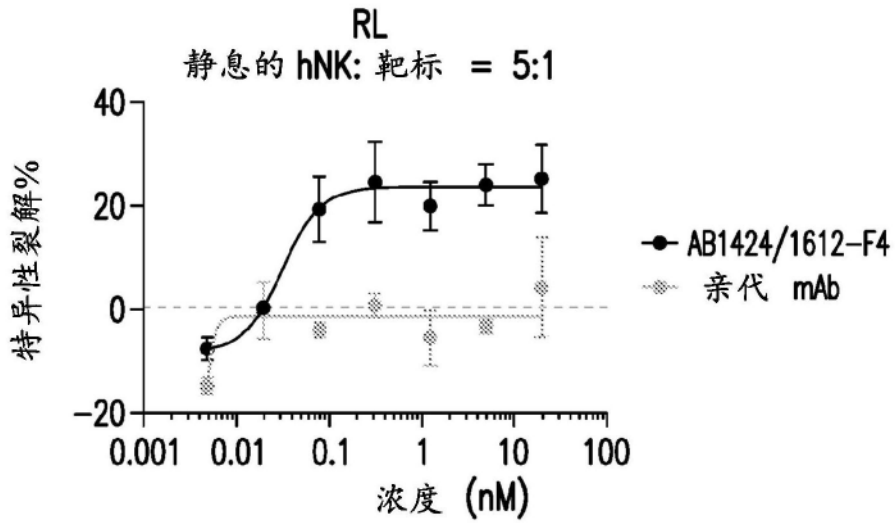


图123

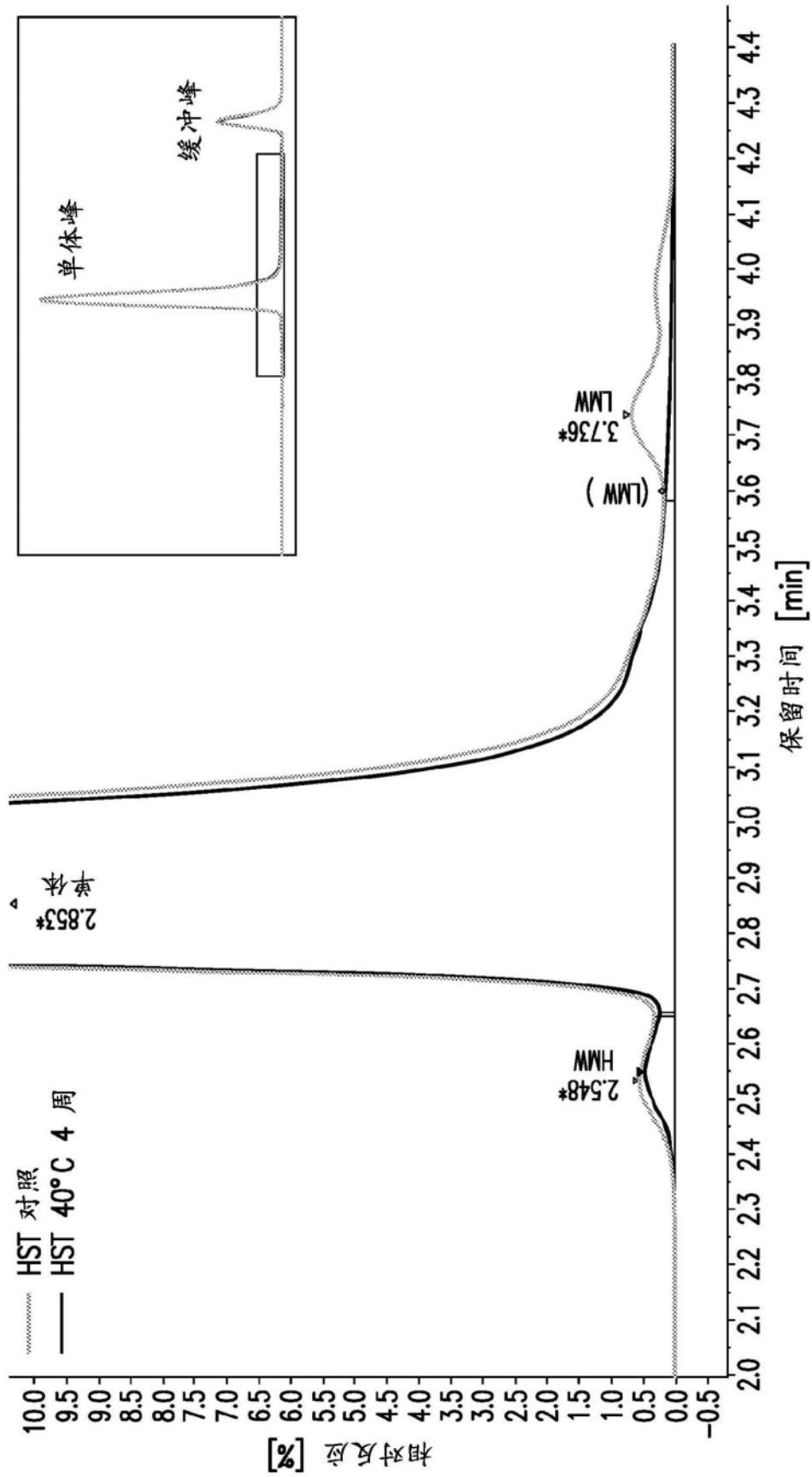


图124

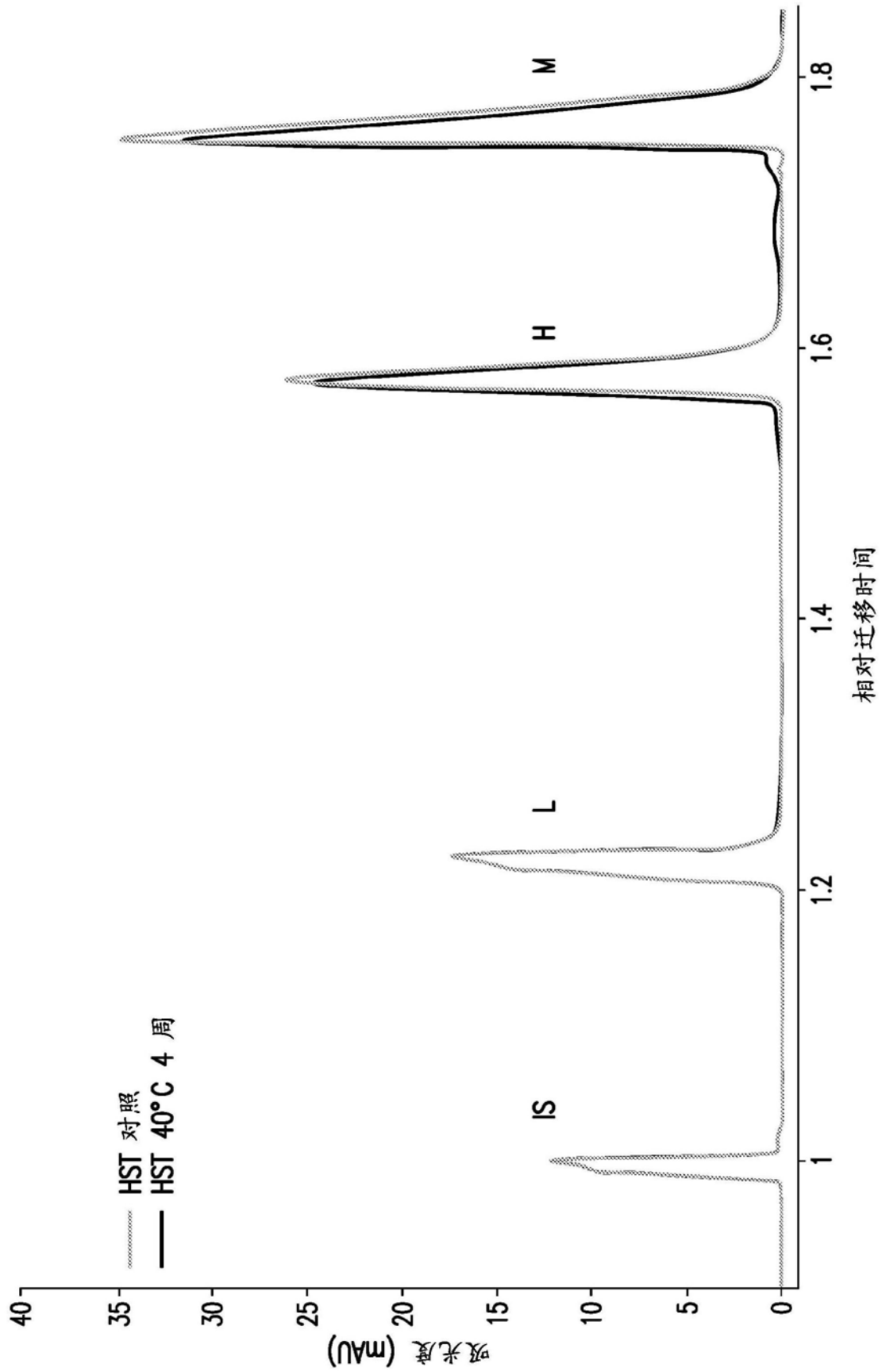


图125

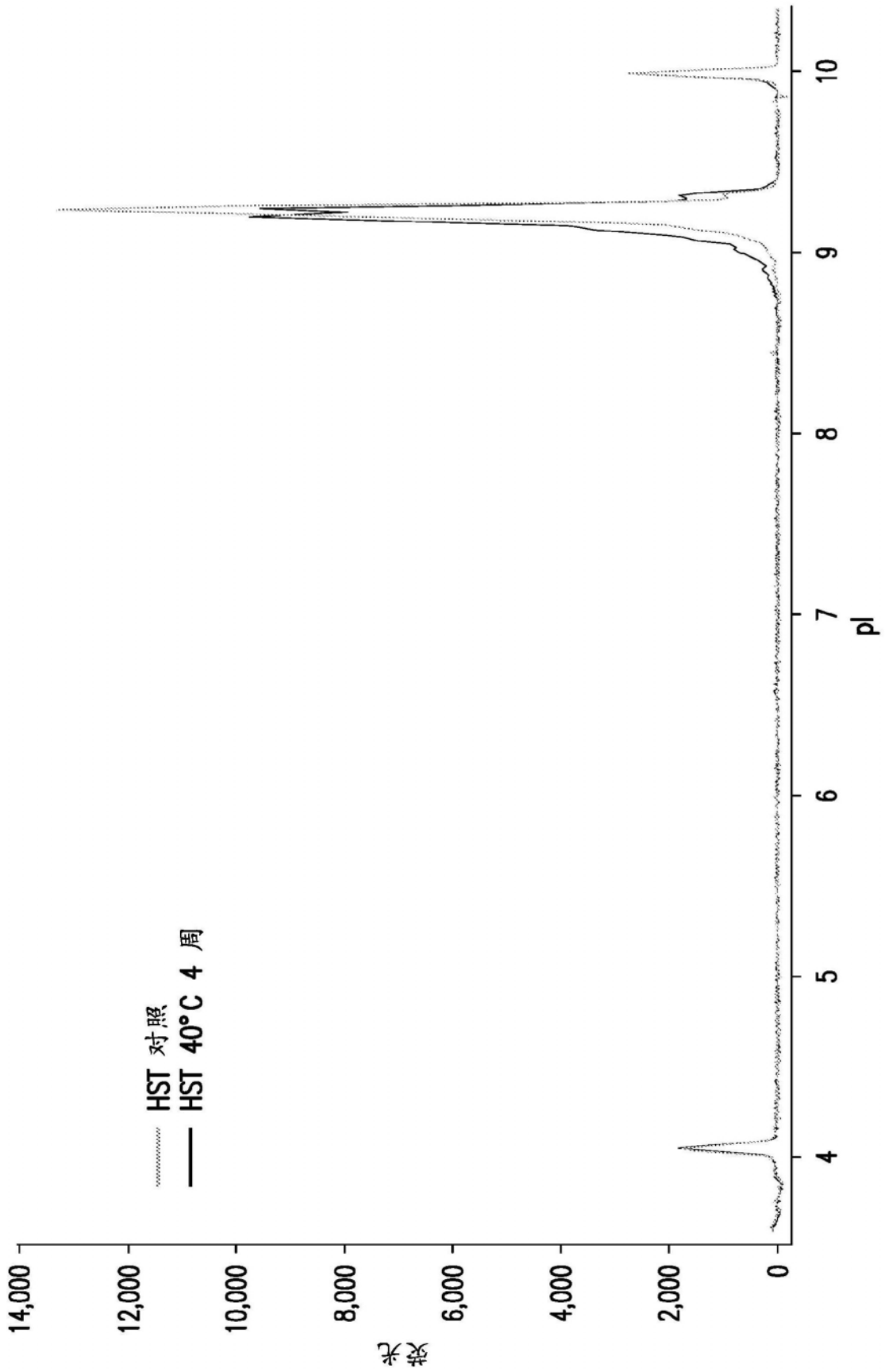


图126

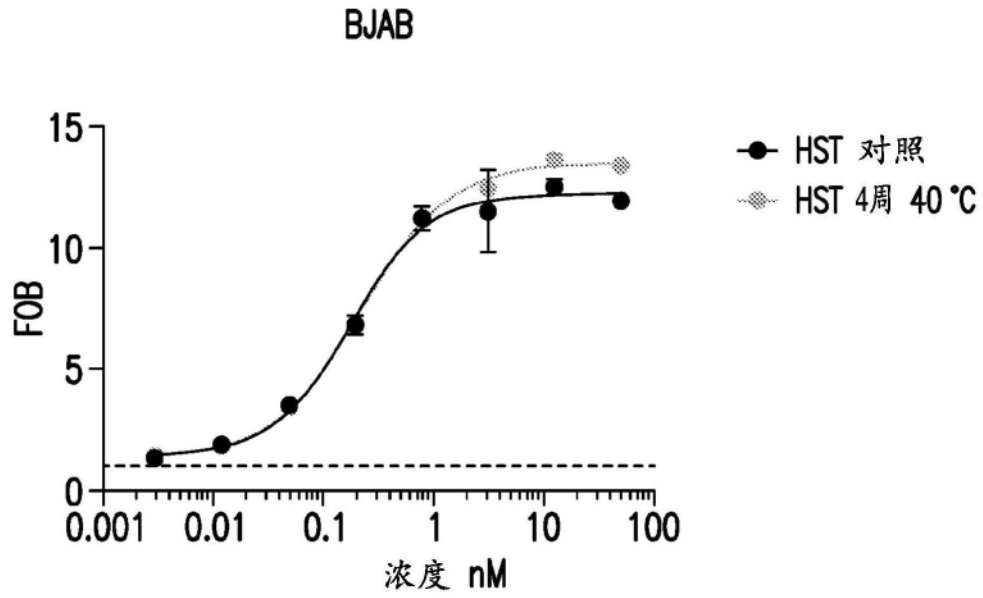


图127

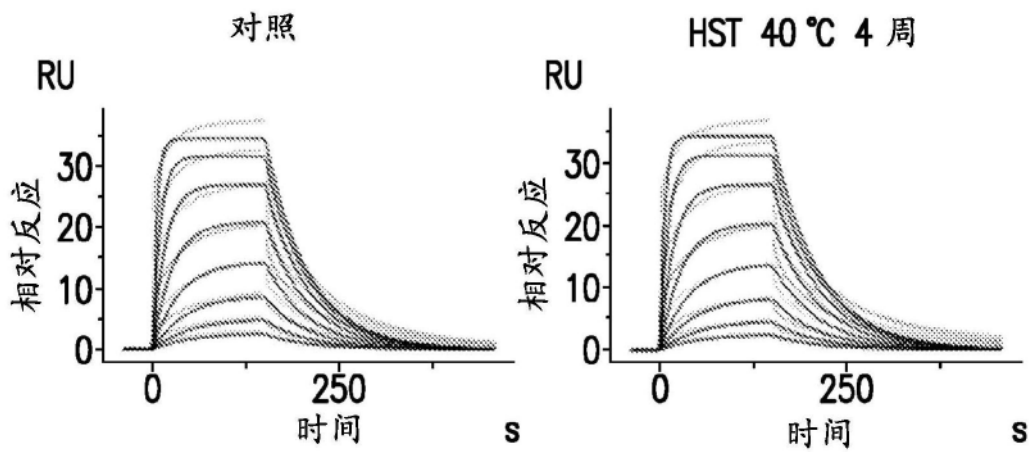


图 128A

图 128B

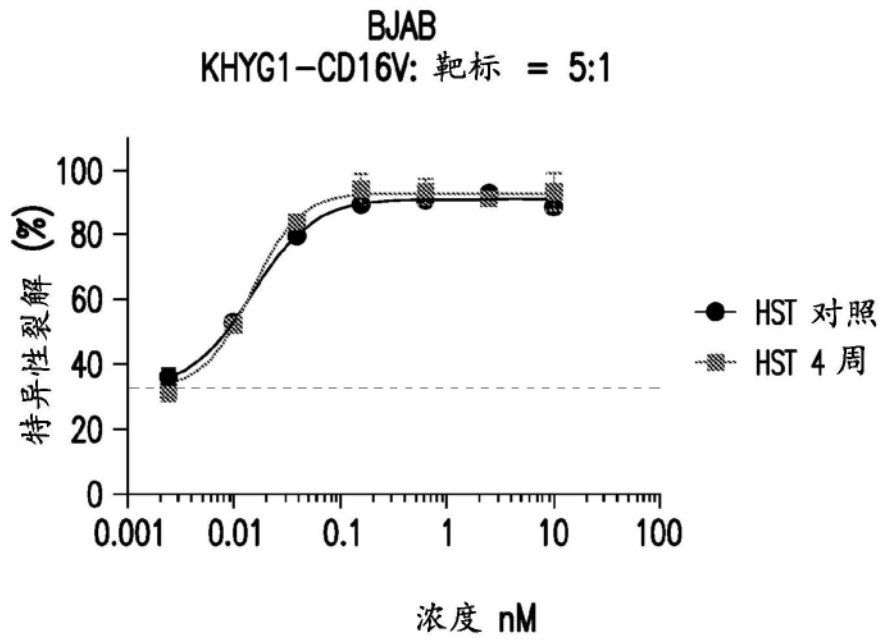


图129

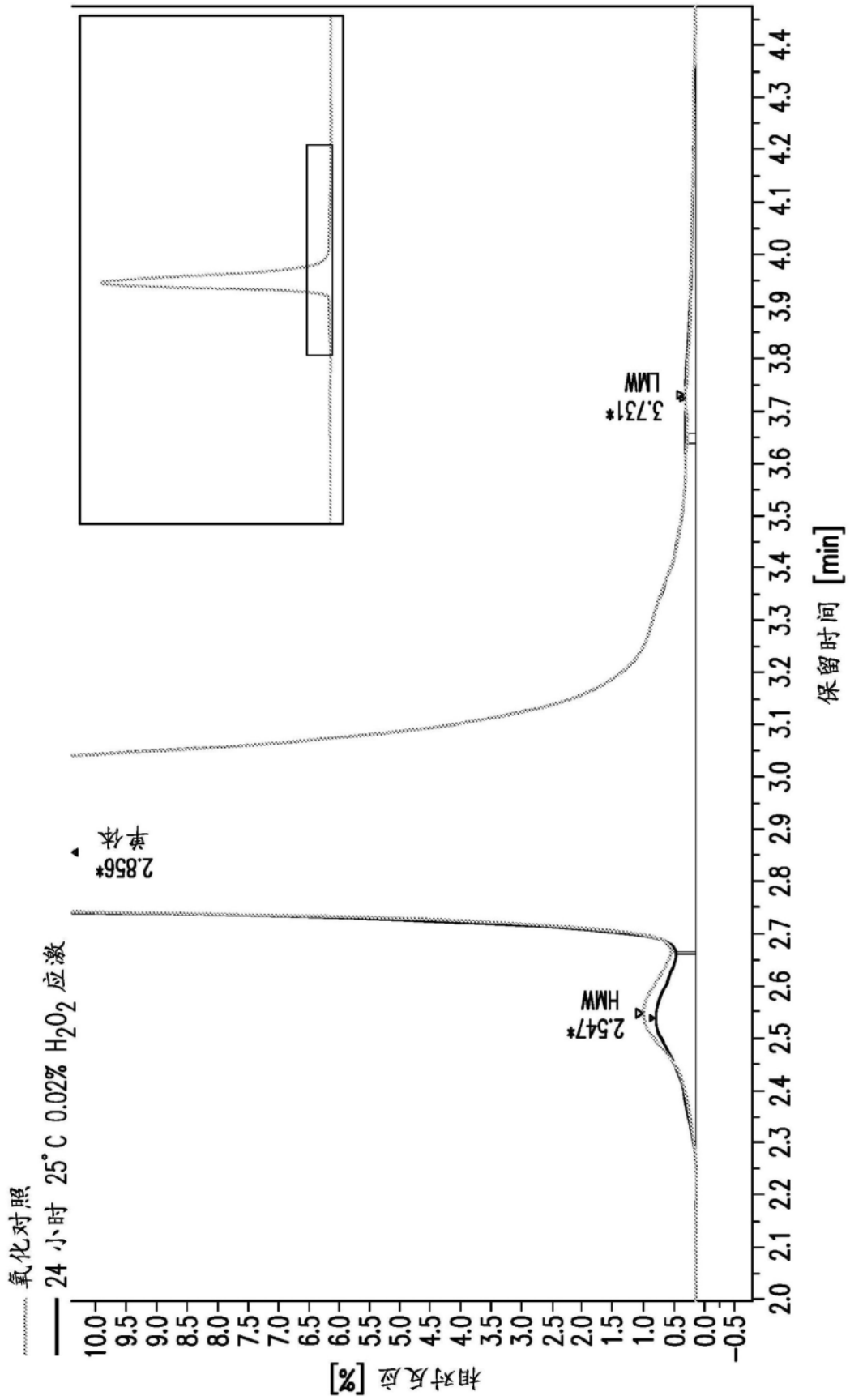


图130

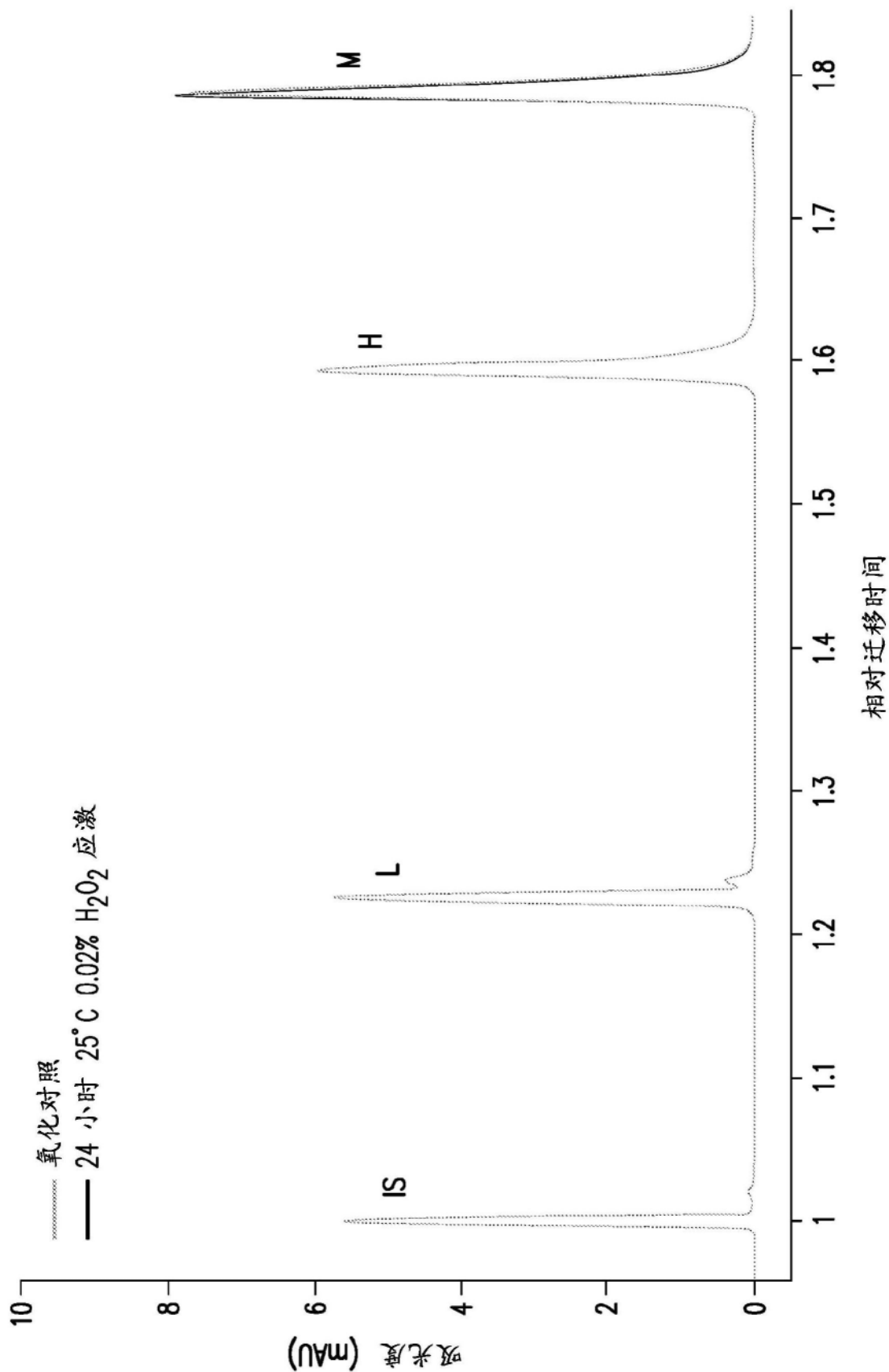


图131

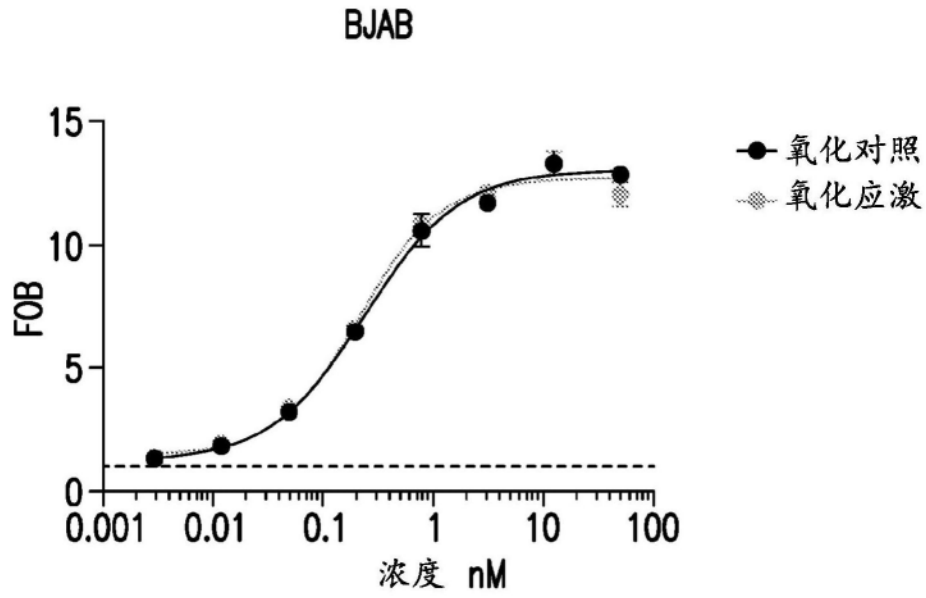


图132

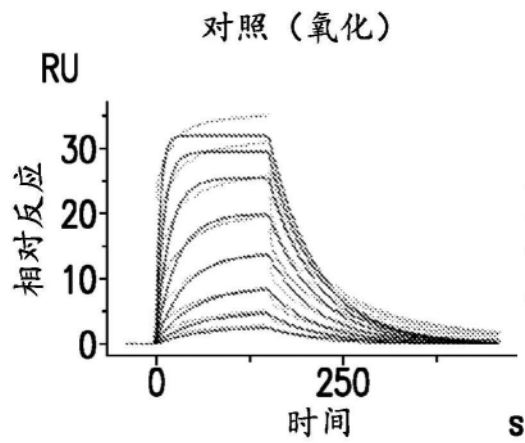


图133A

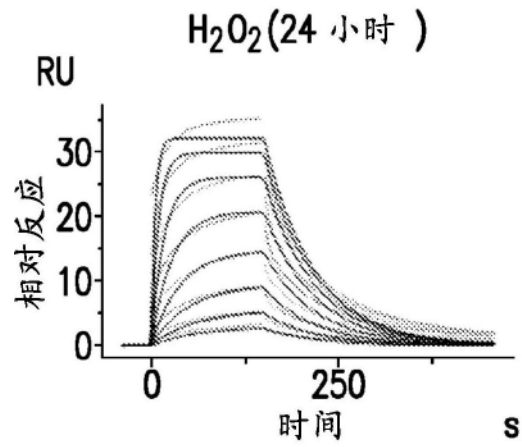


图133B

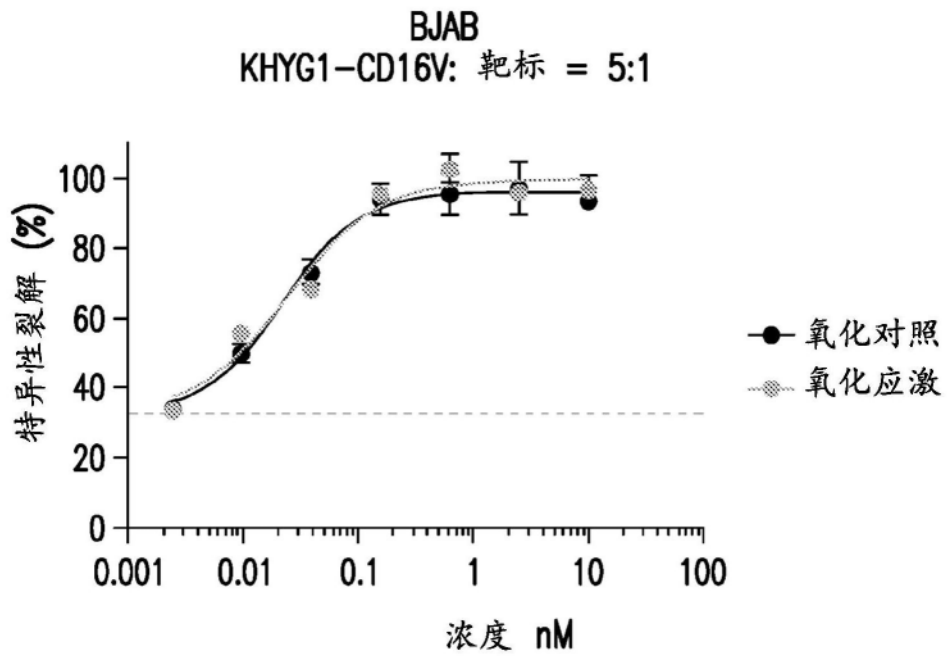


图134

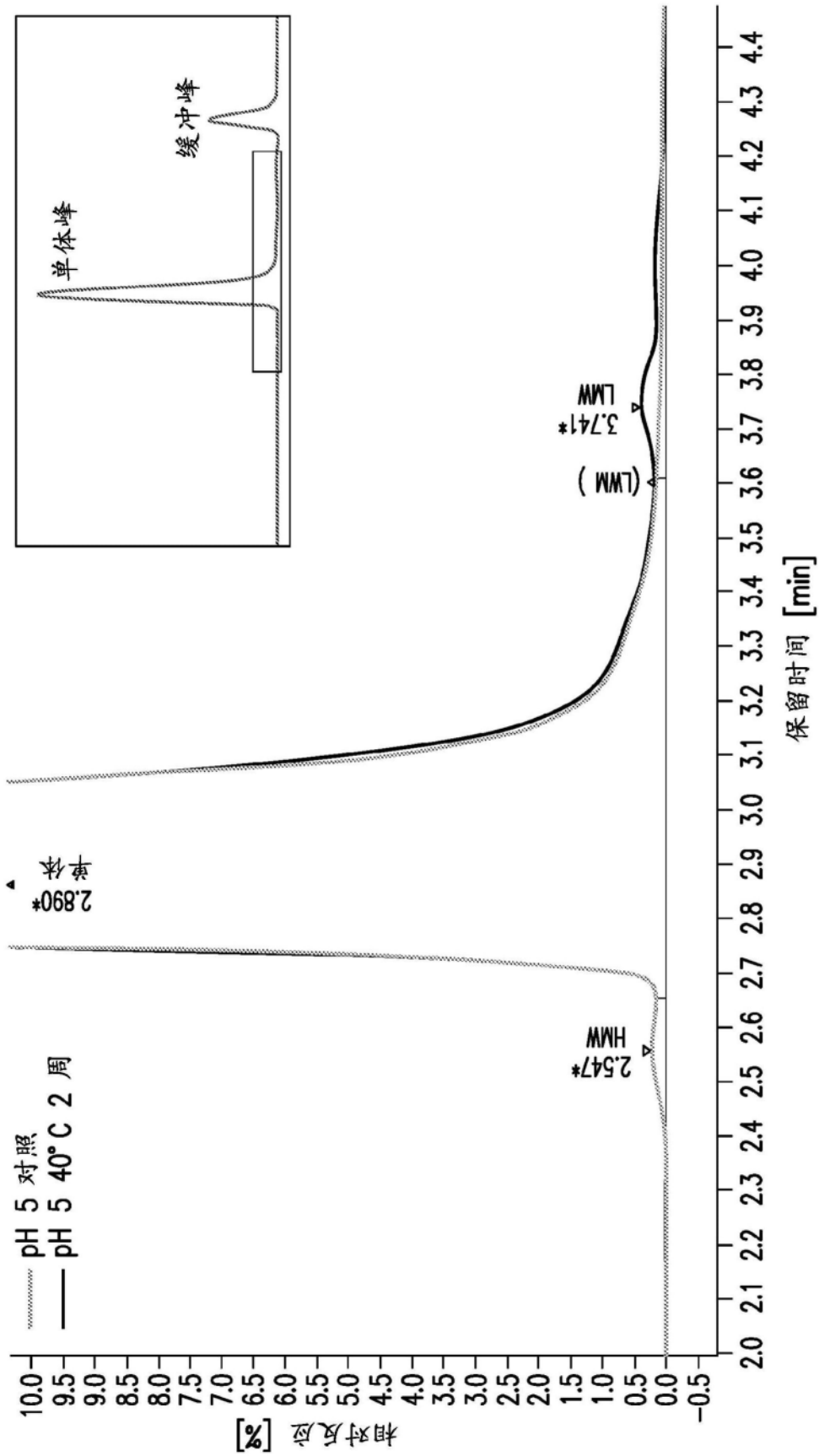


图135

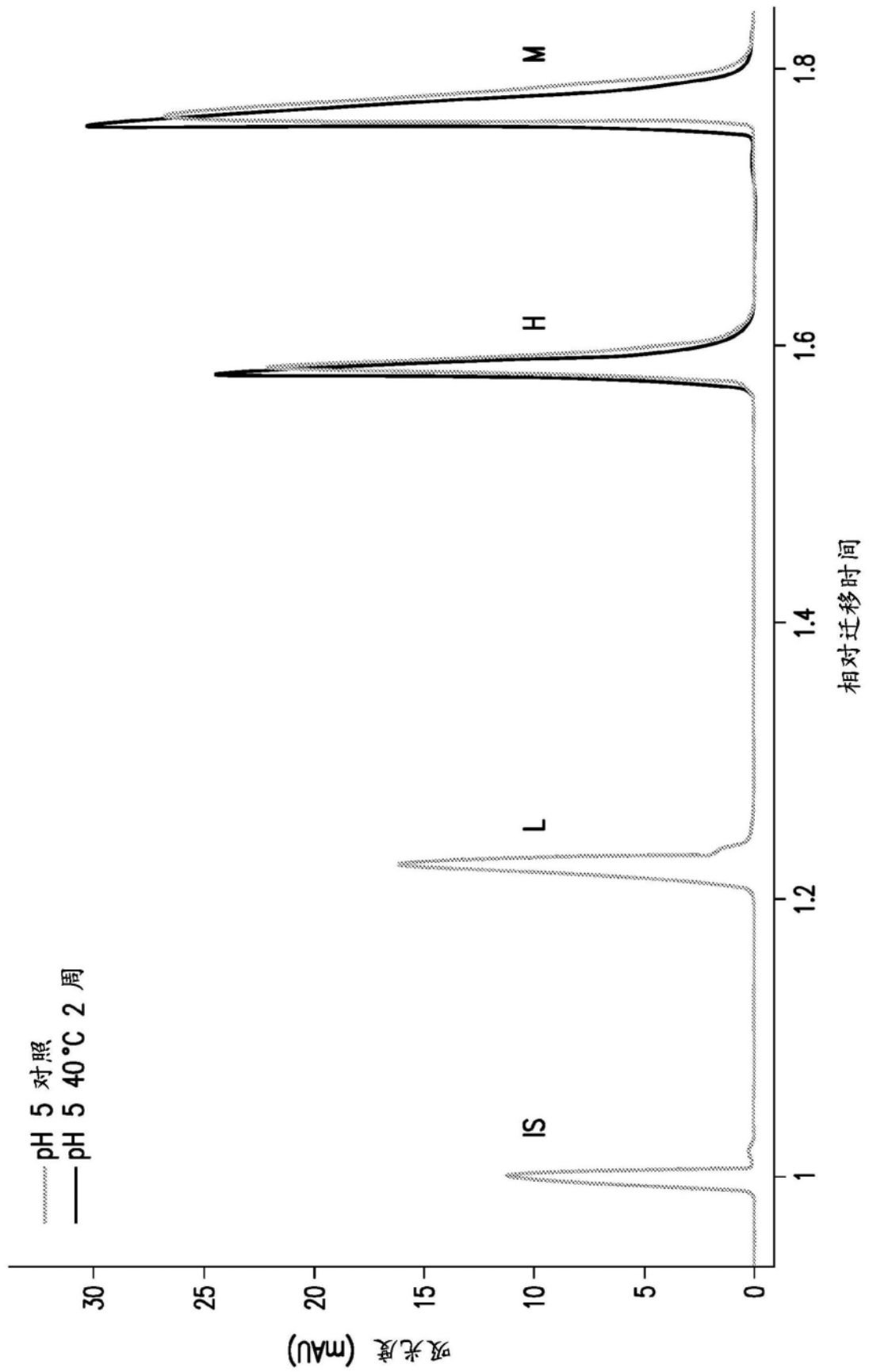


图136

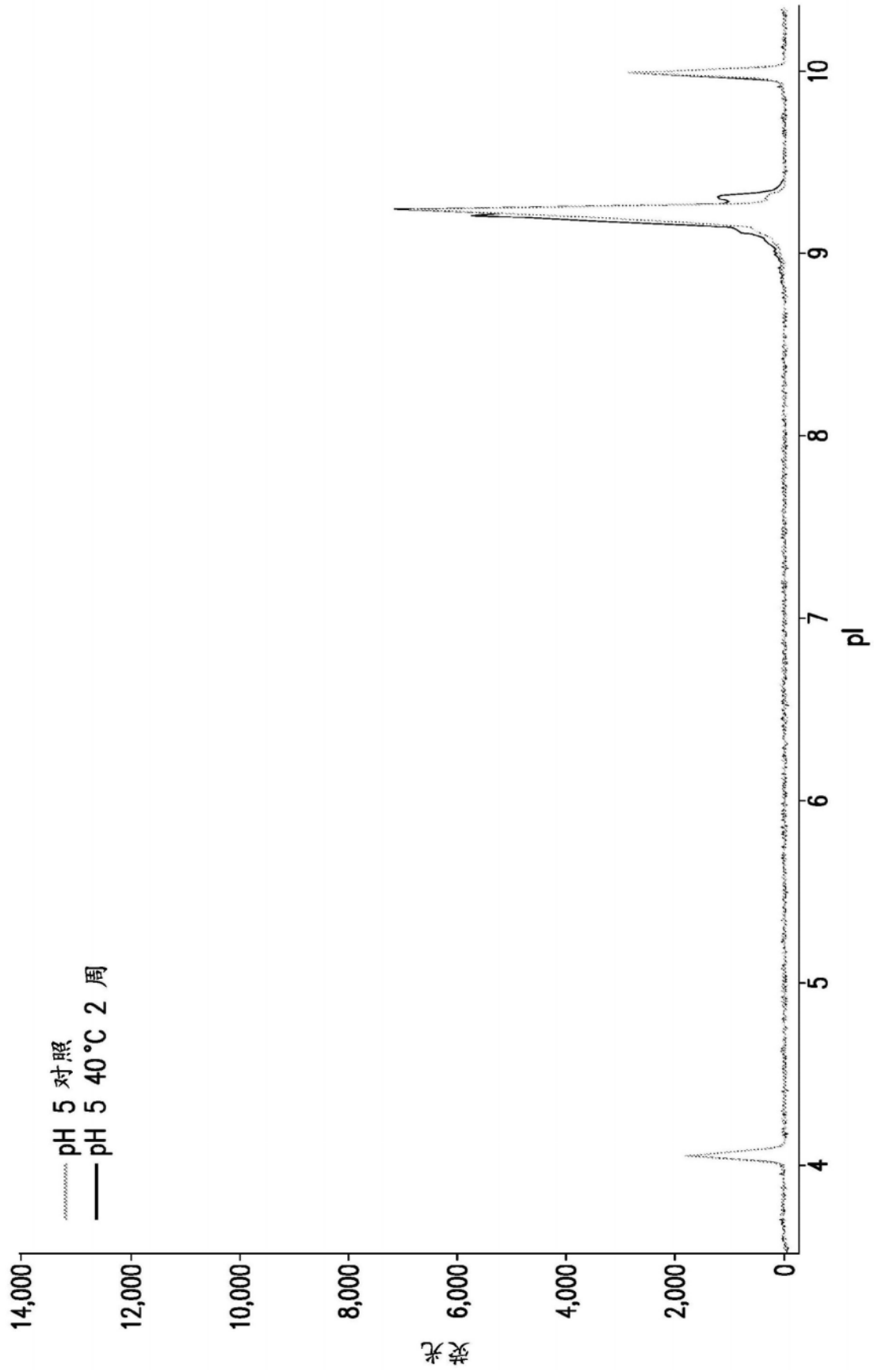


图137

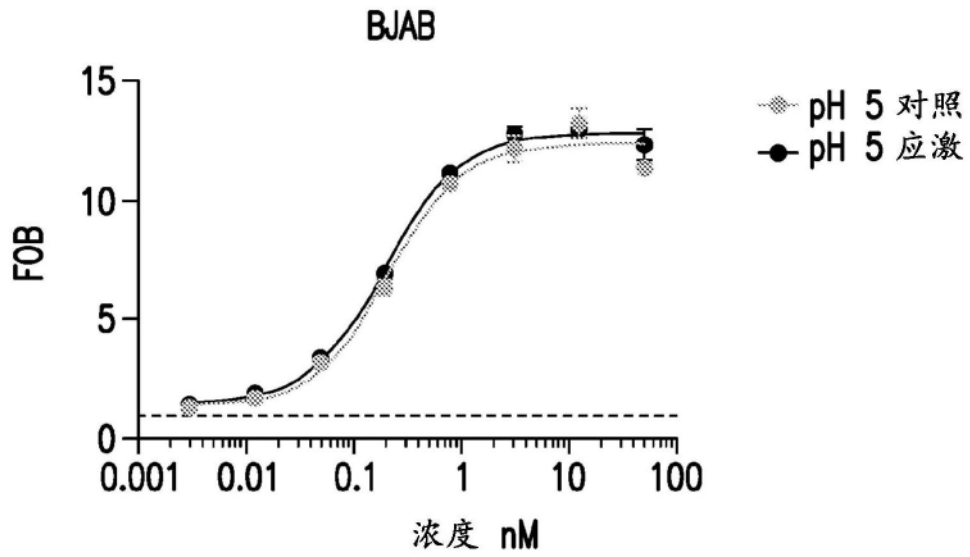


图138

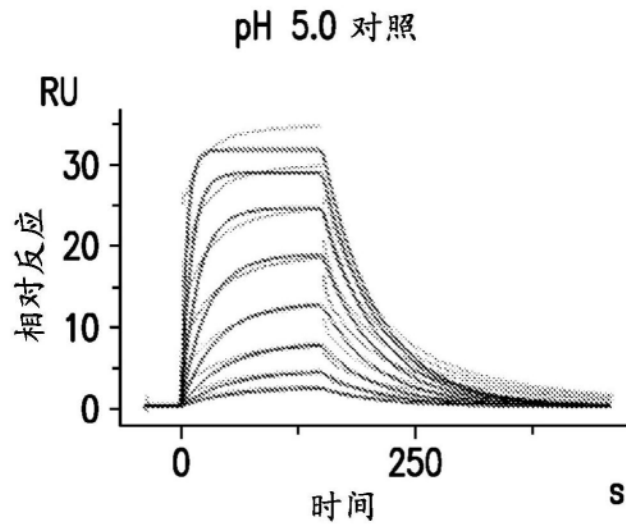


图139A

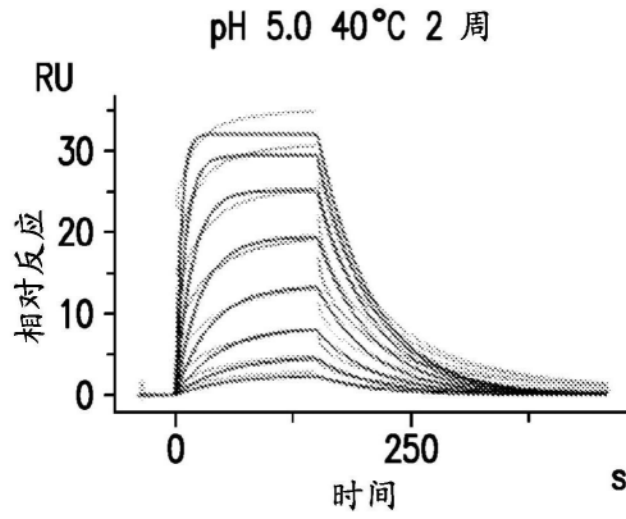


图139B

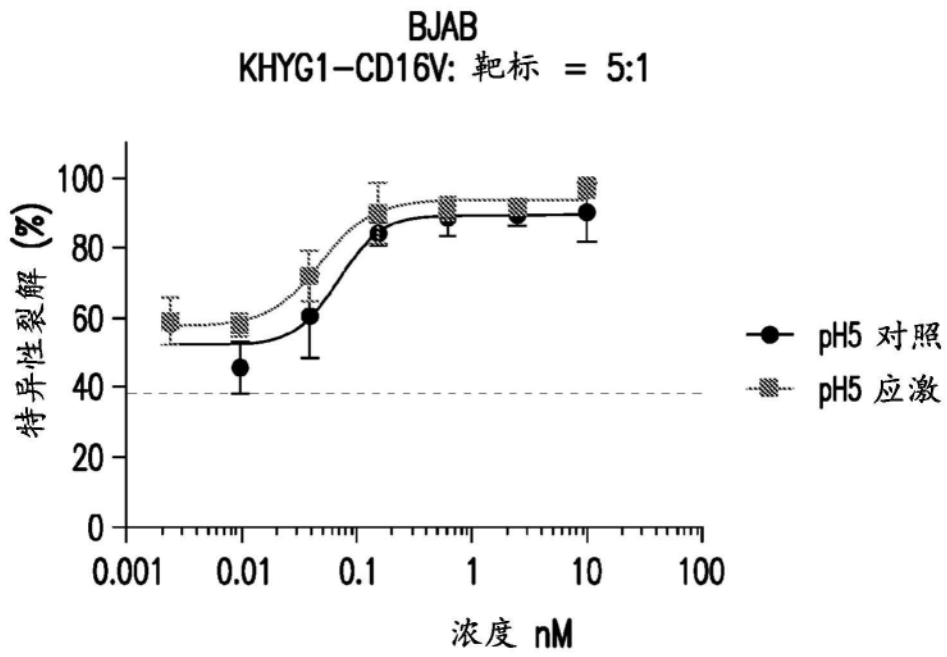


图140

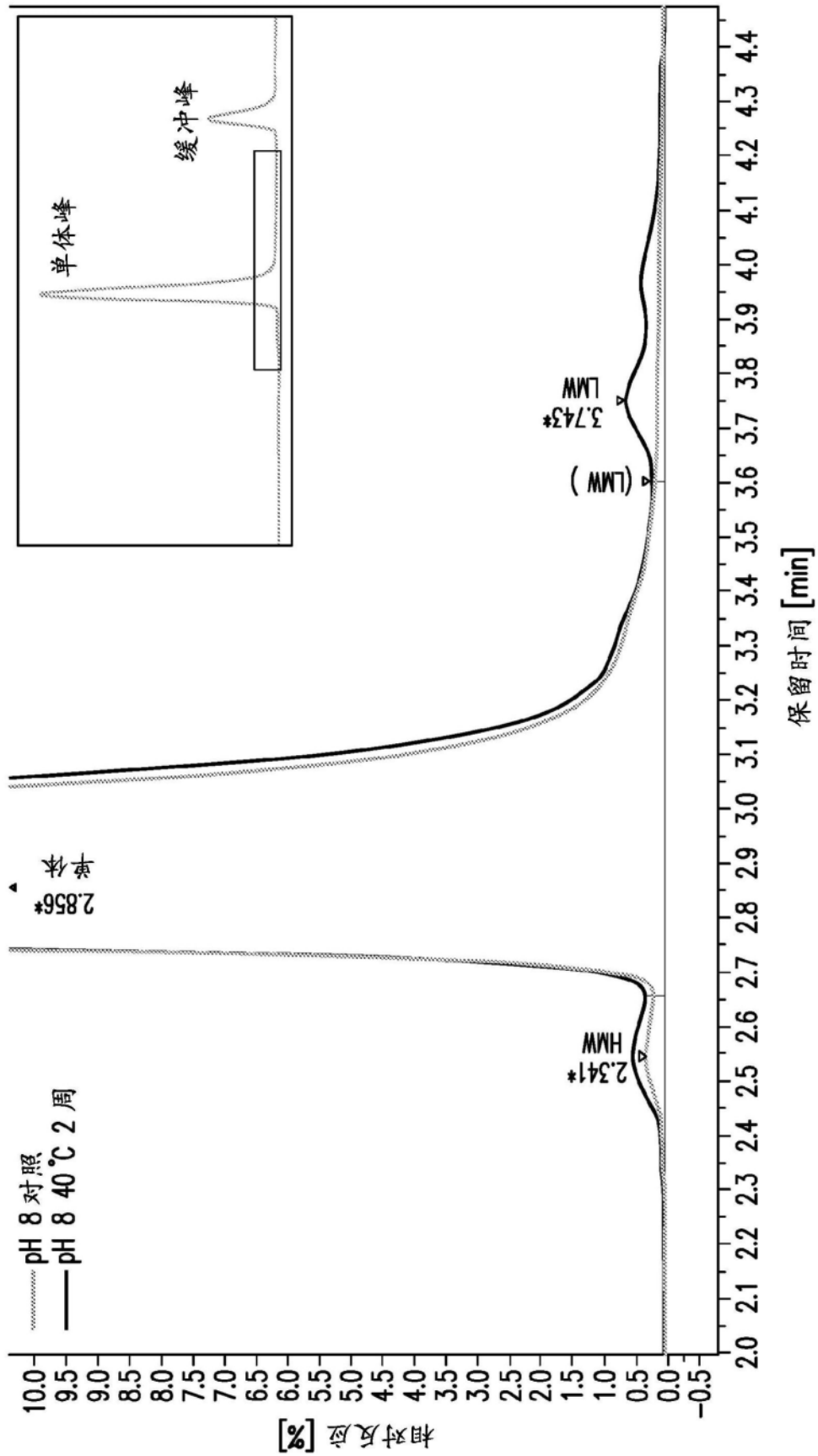


图141

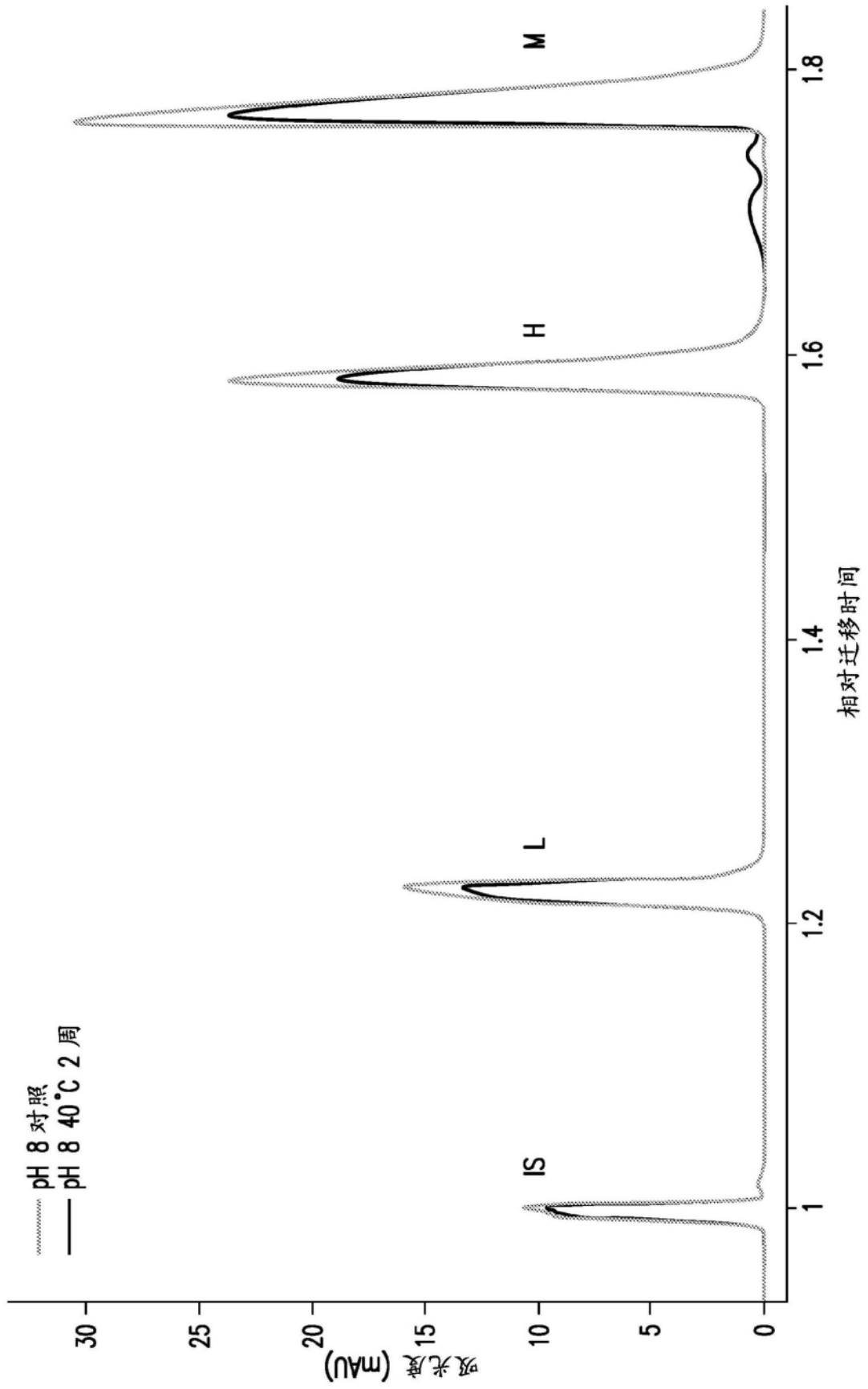


图142

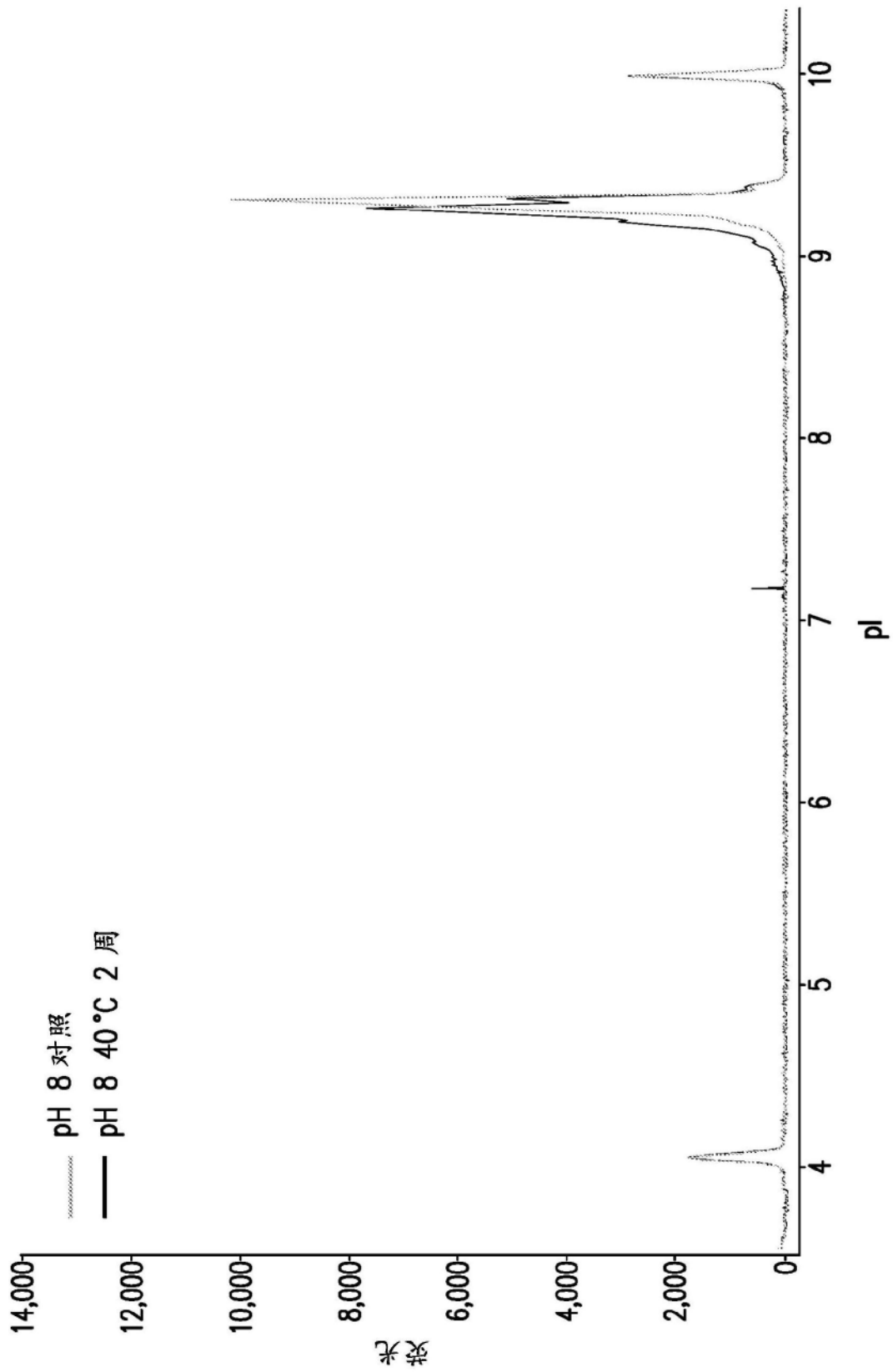


图143

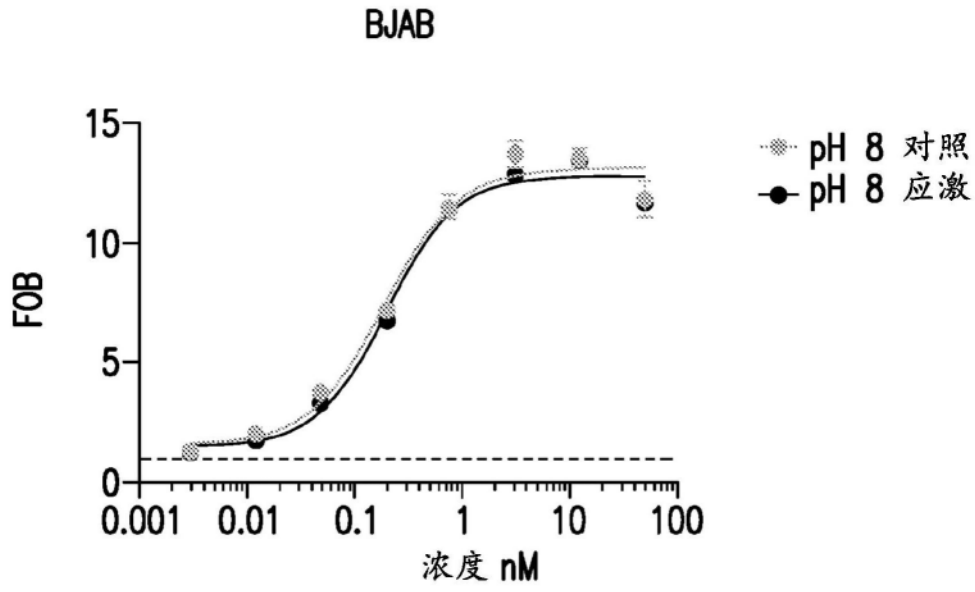


图144

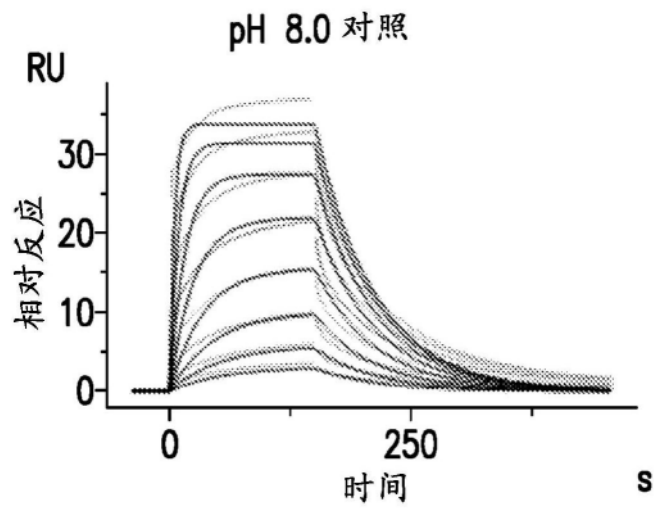


图145A

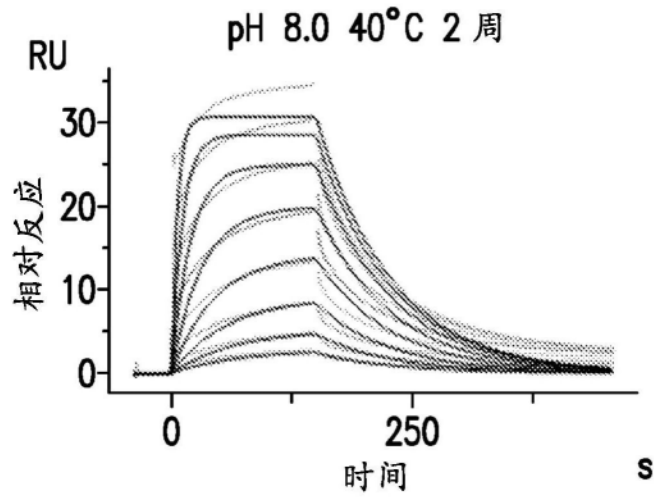


图145B

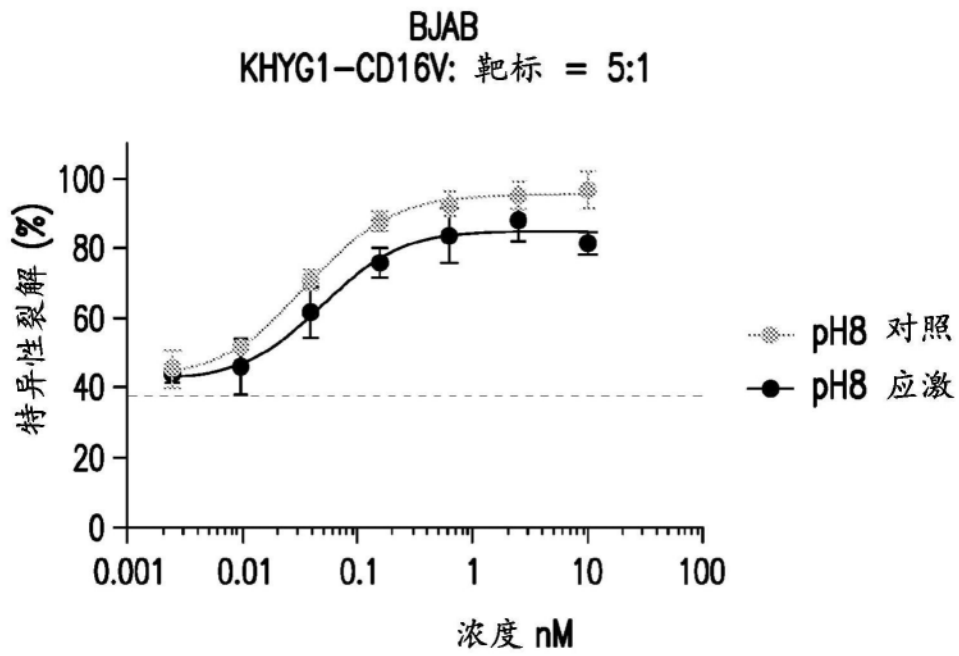


图146

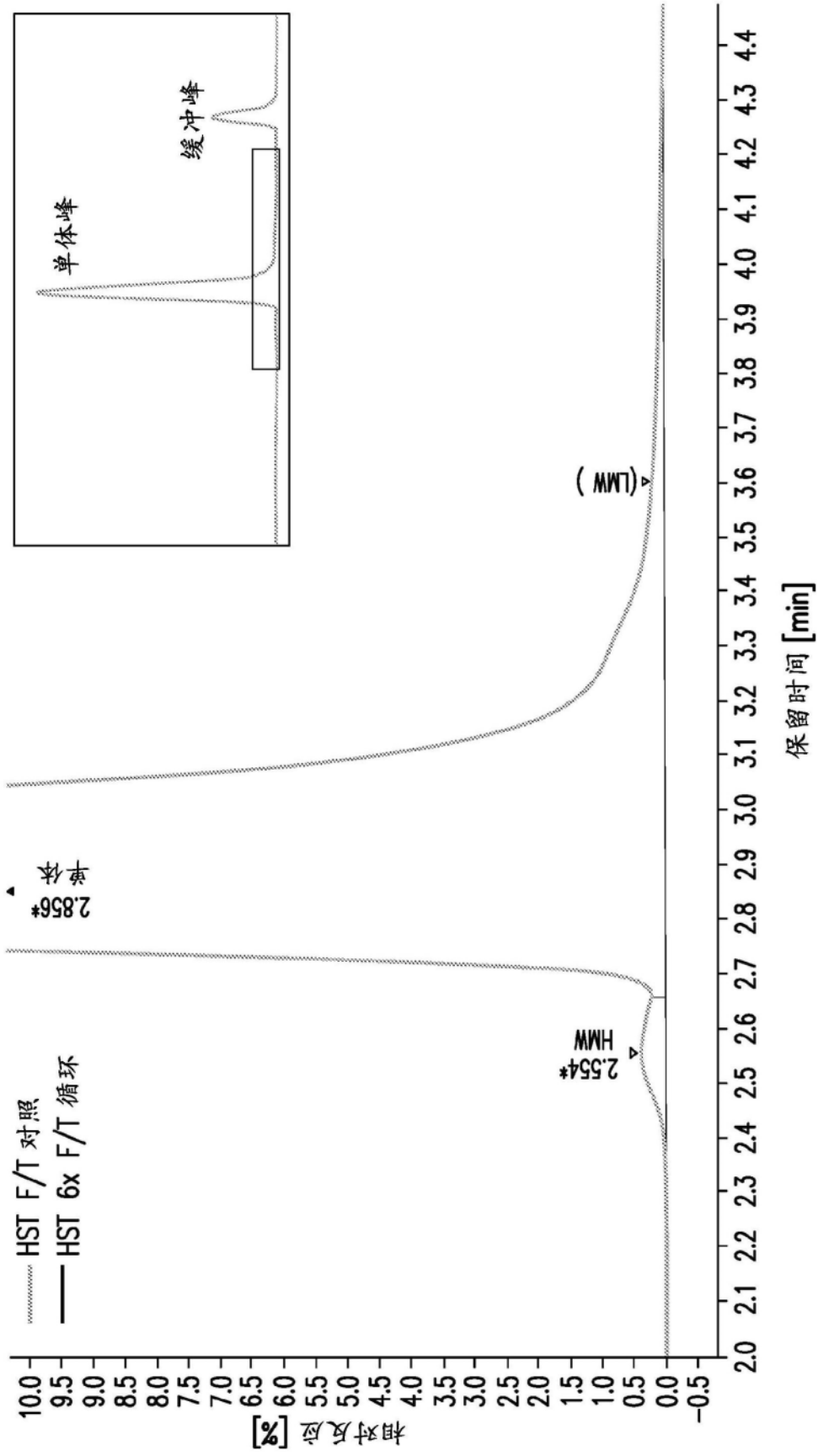


图147

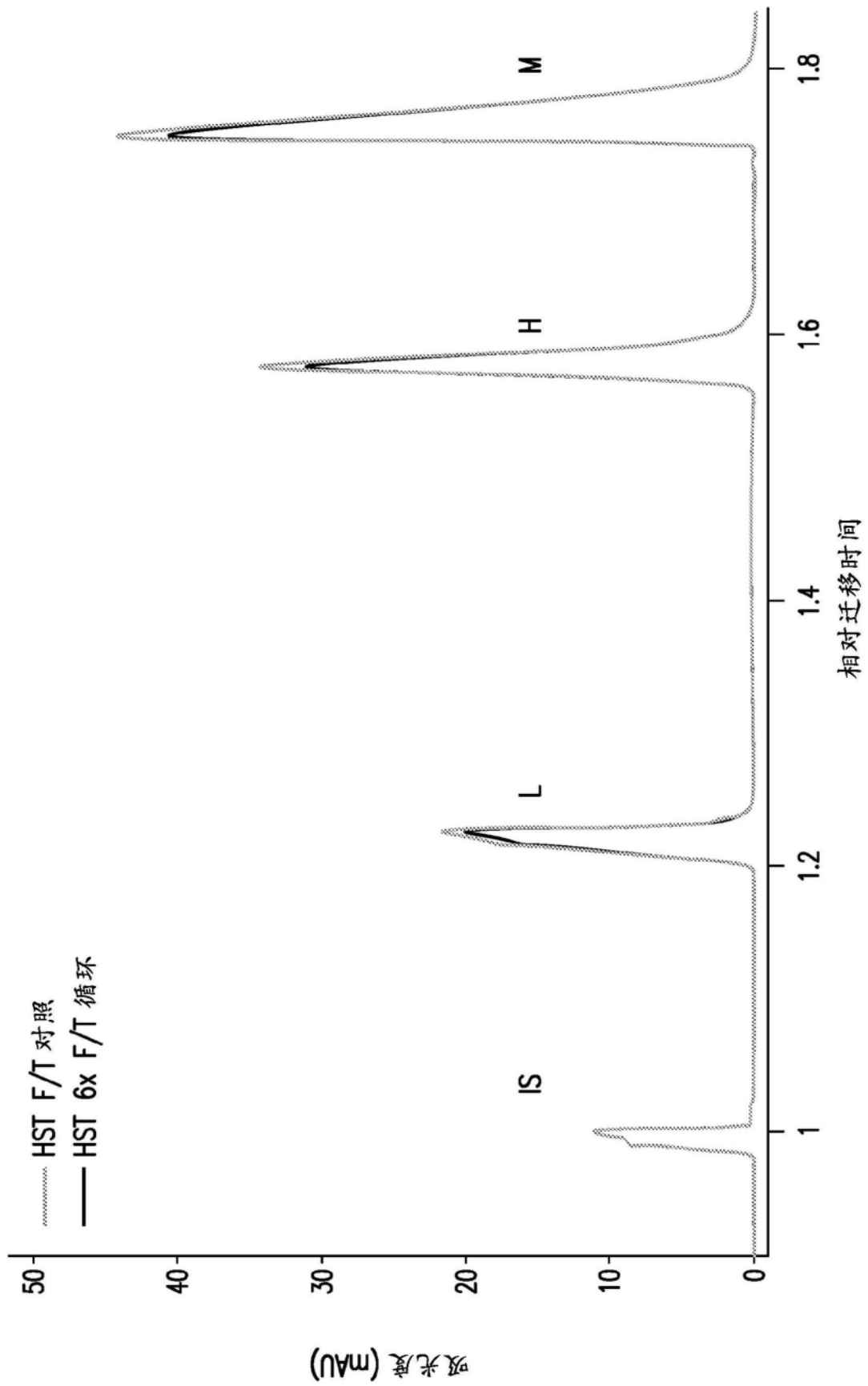


图148

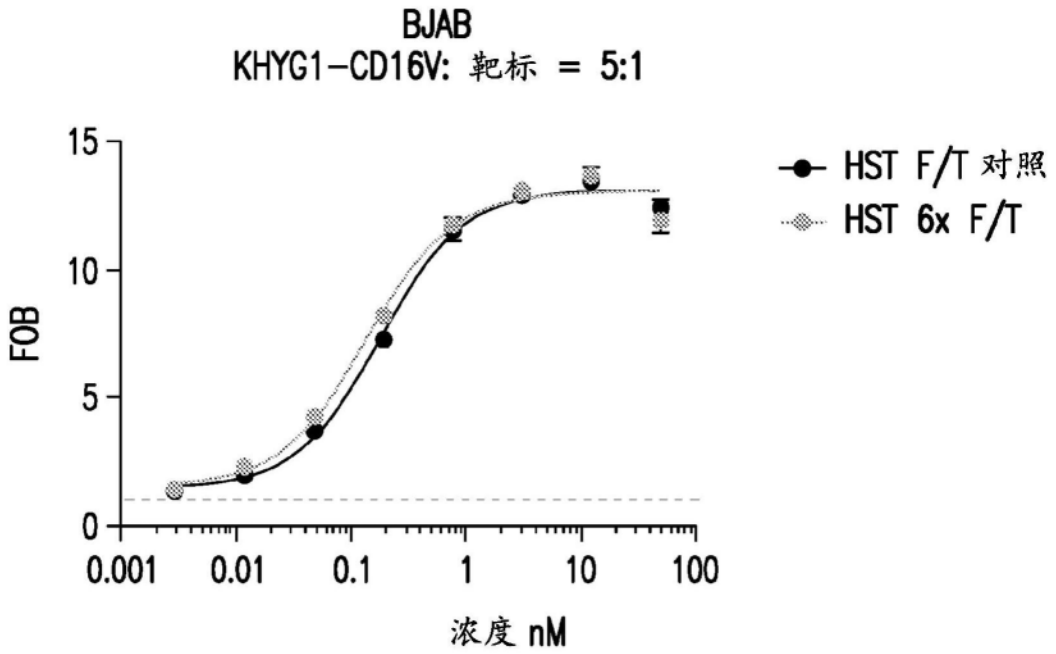


图149

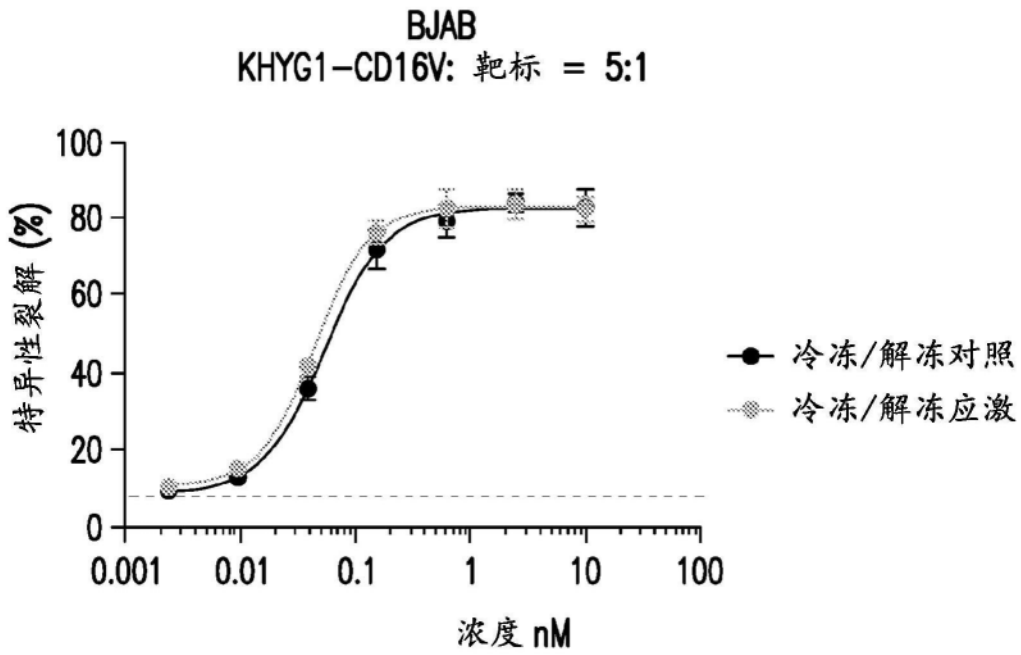


图150

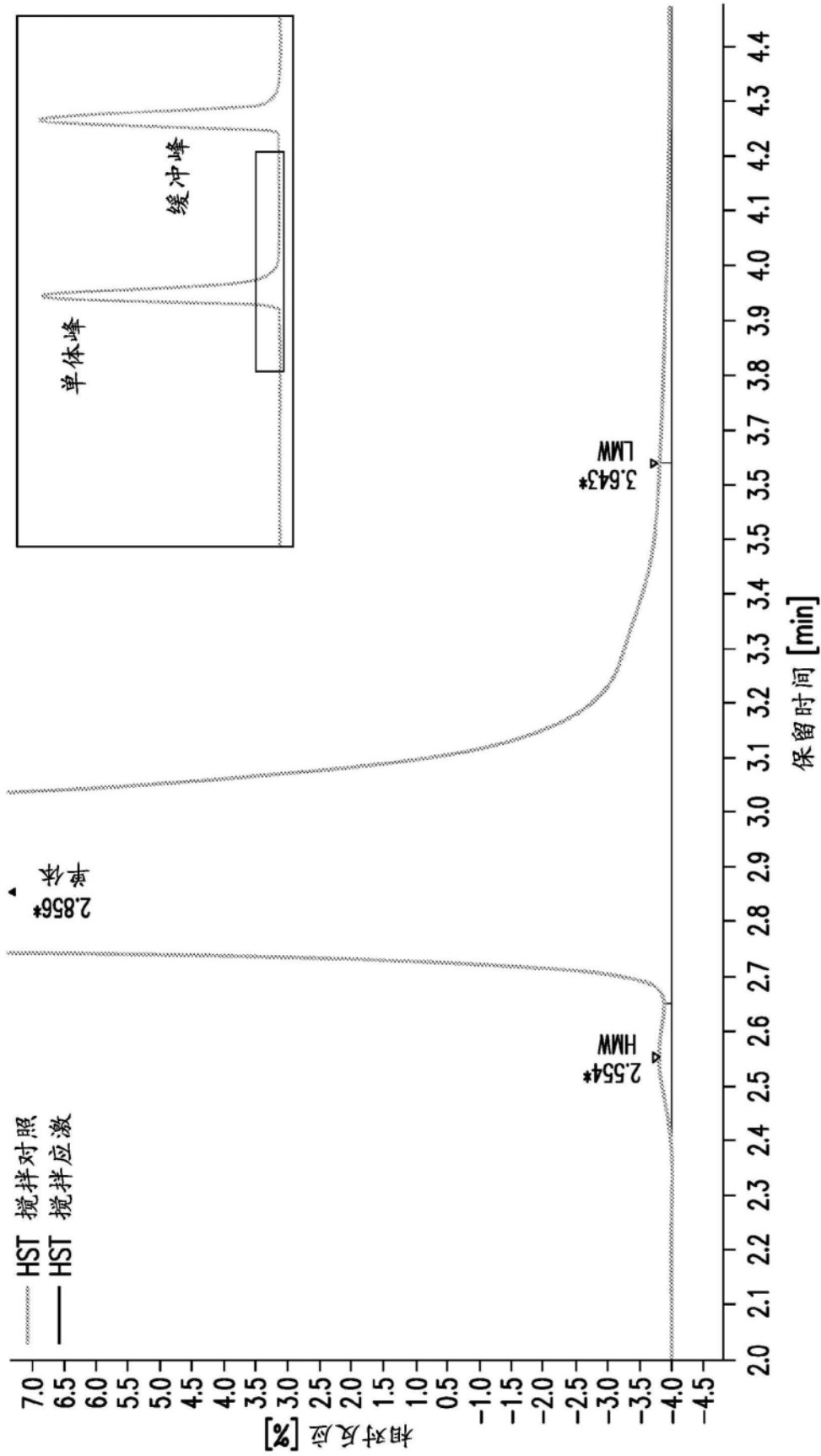


图151

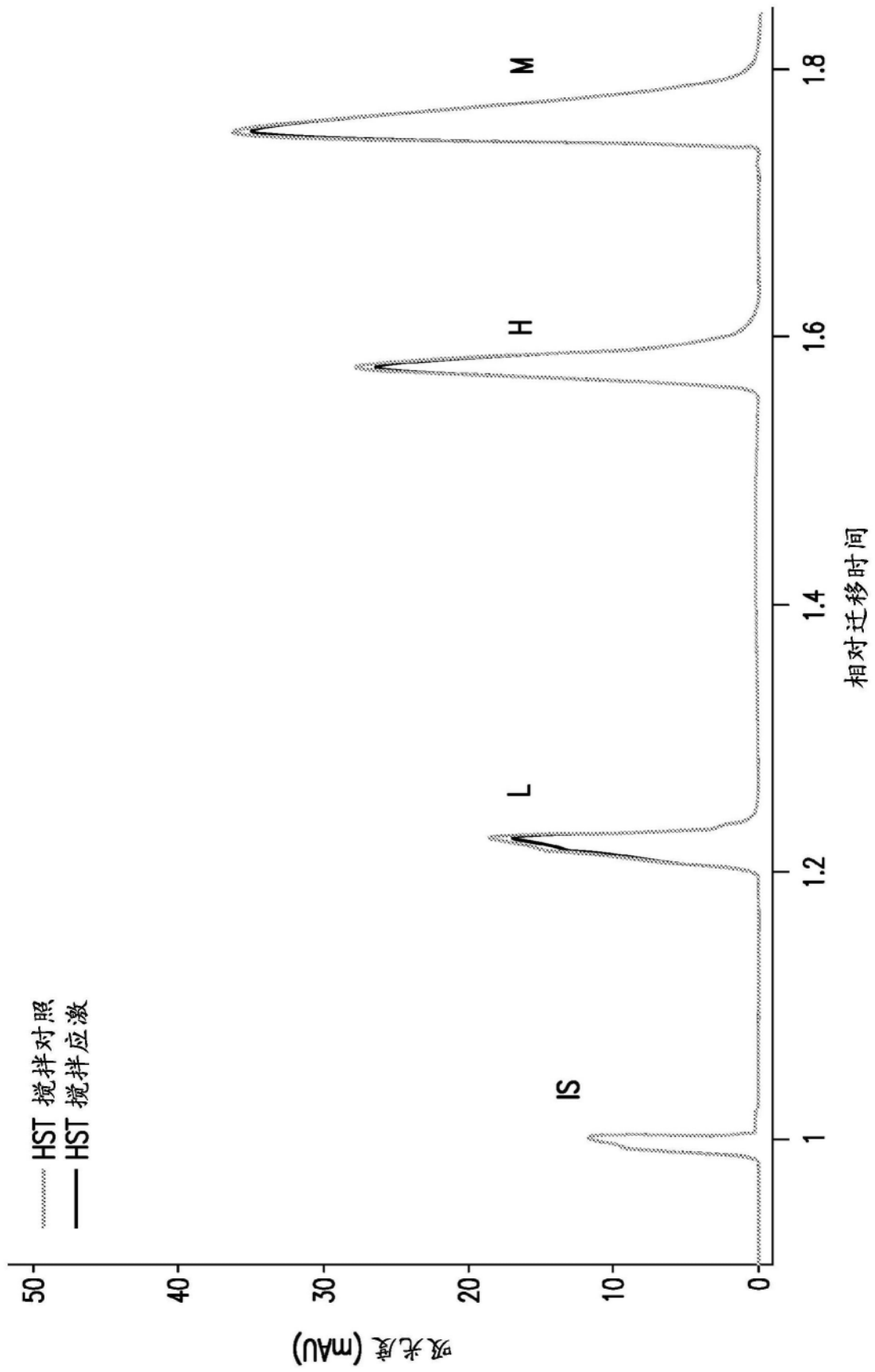


图152

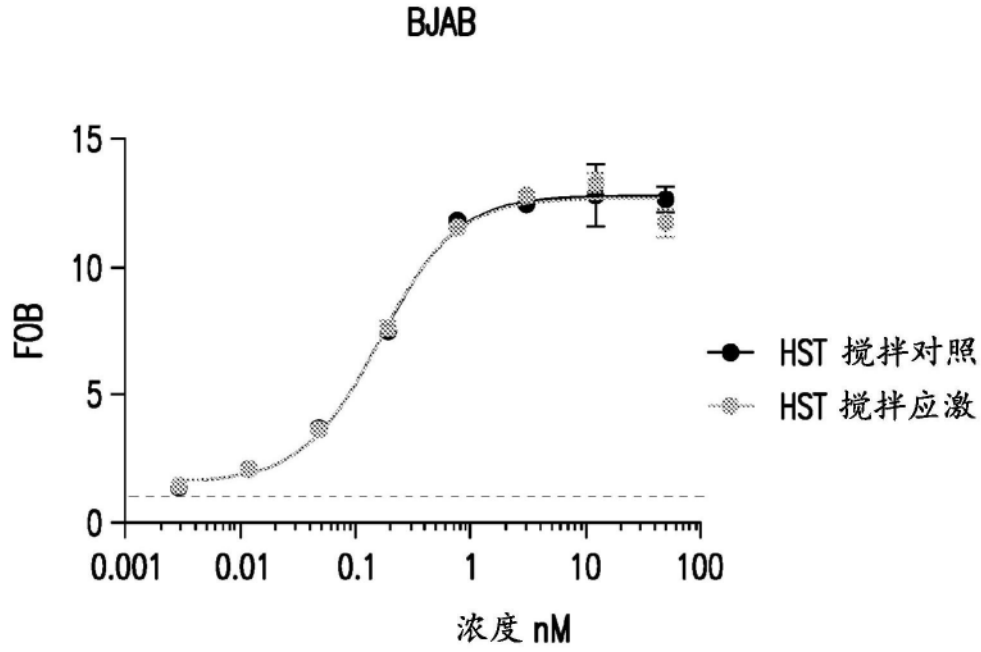


图153

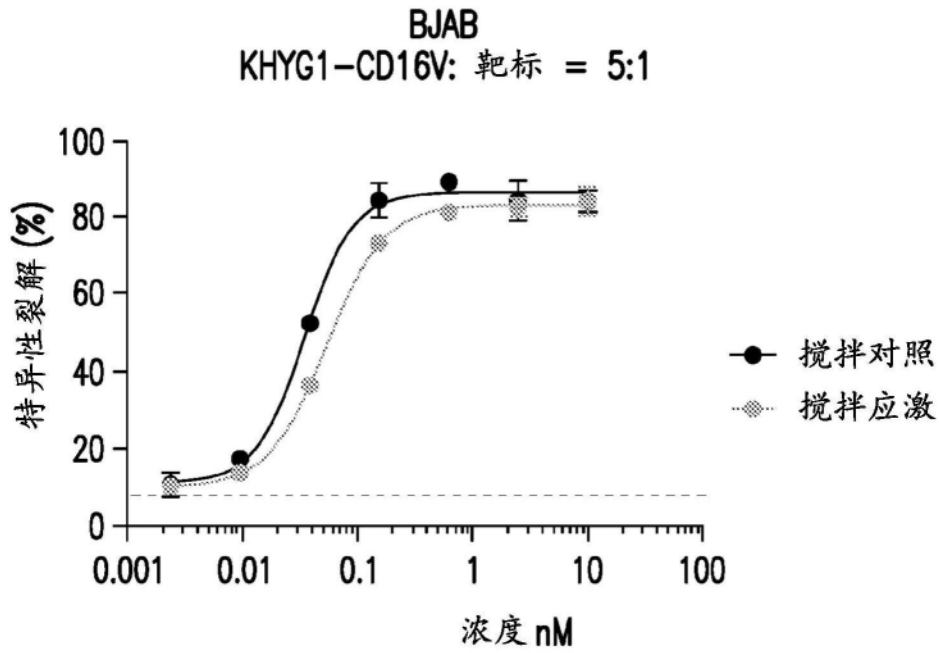


图154

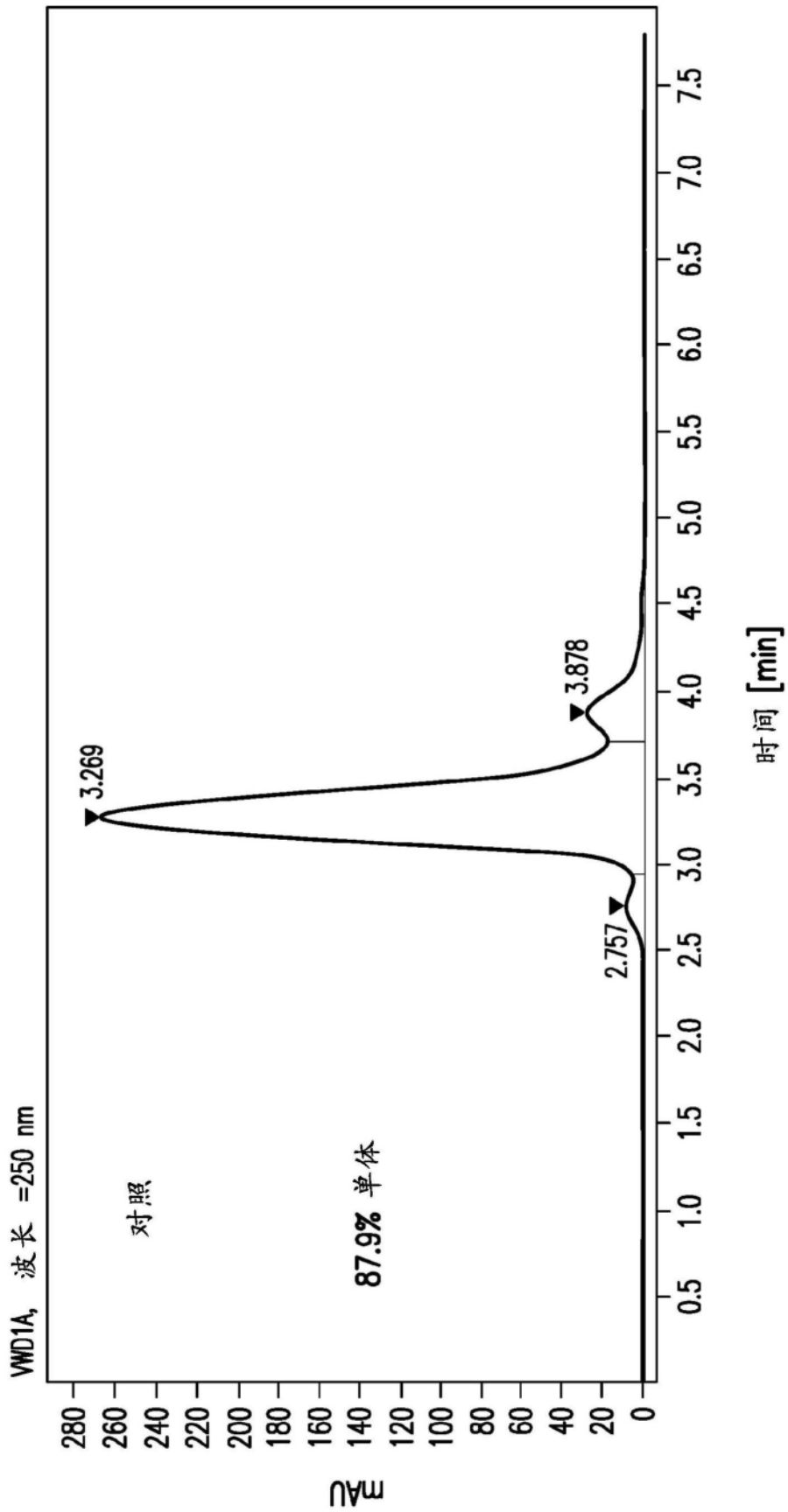


图155A

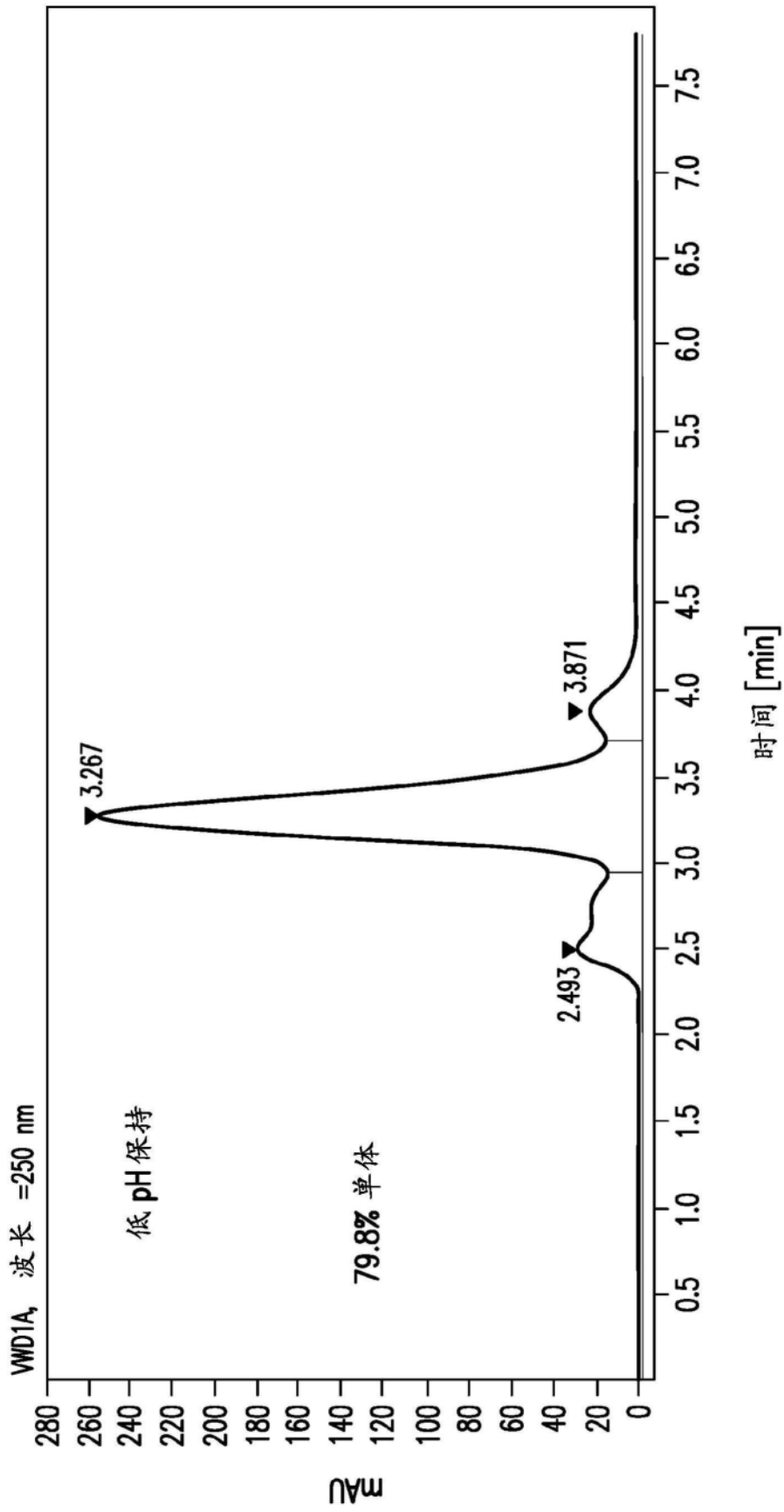


图155B

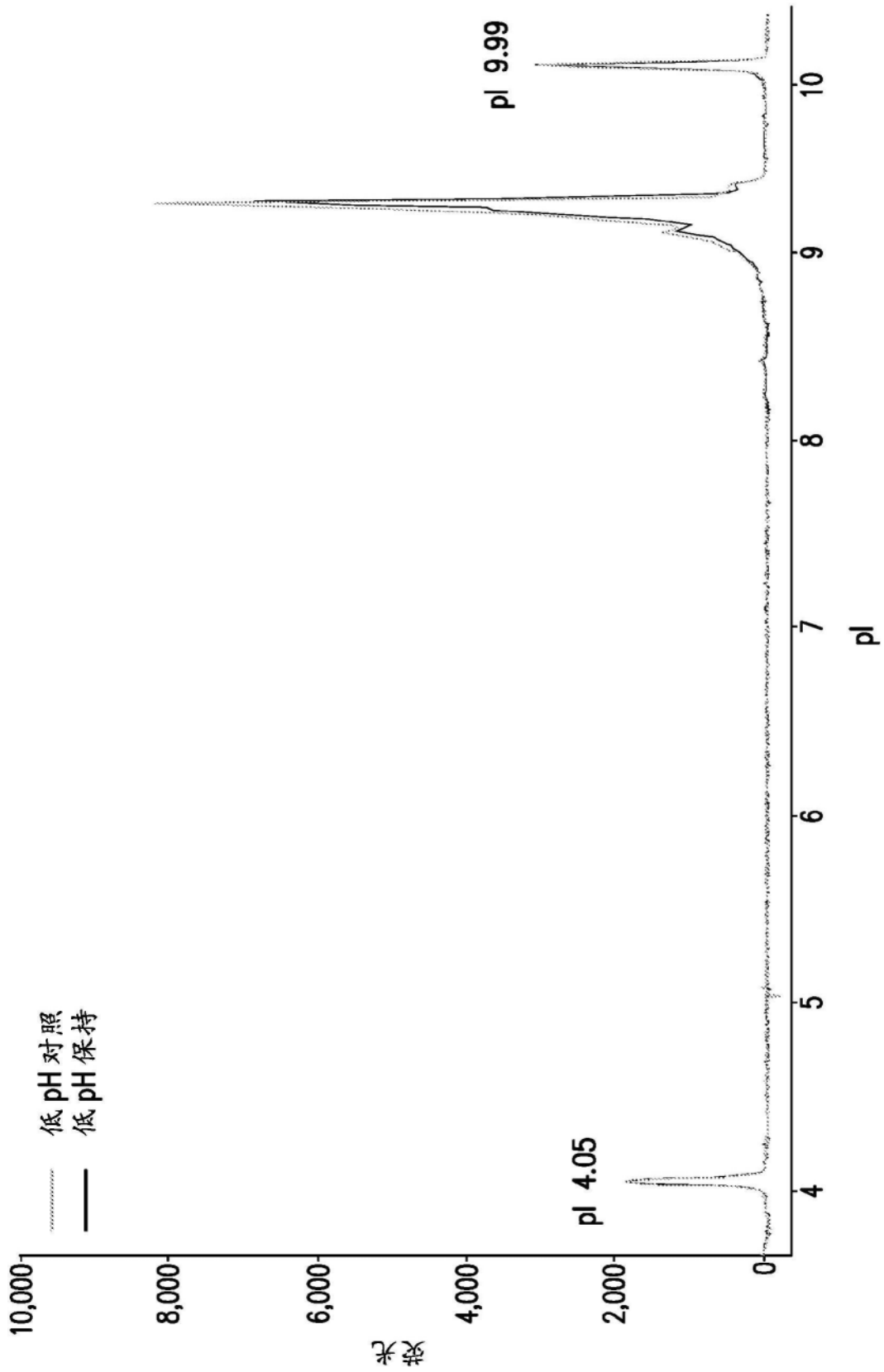


图156

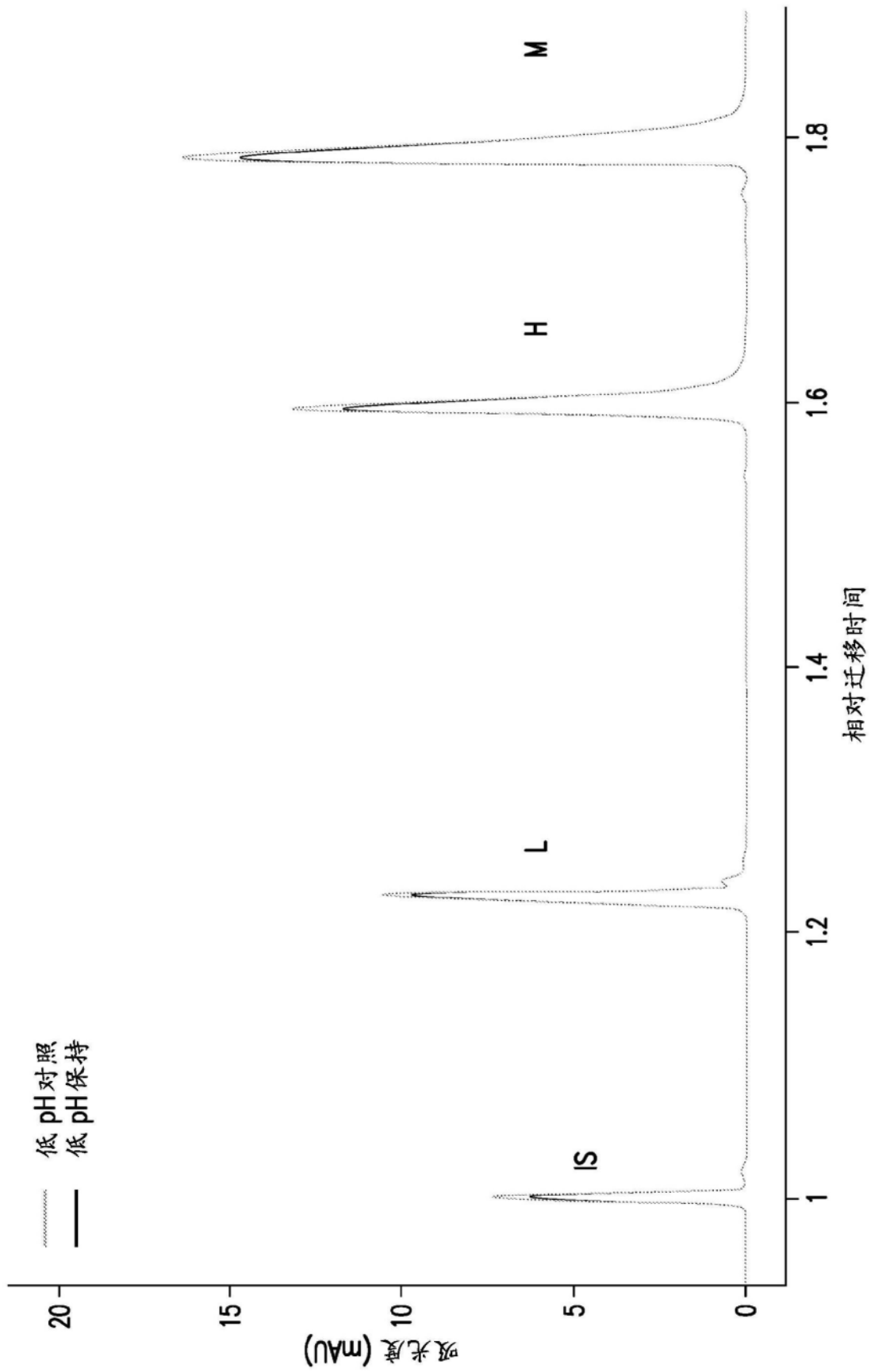


图157

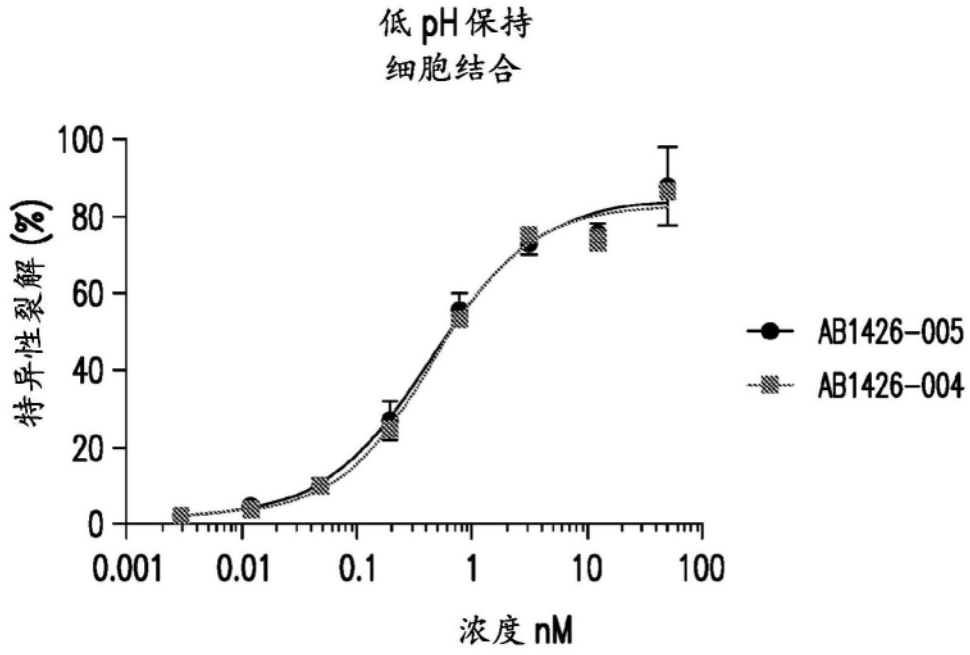


图158

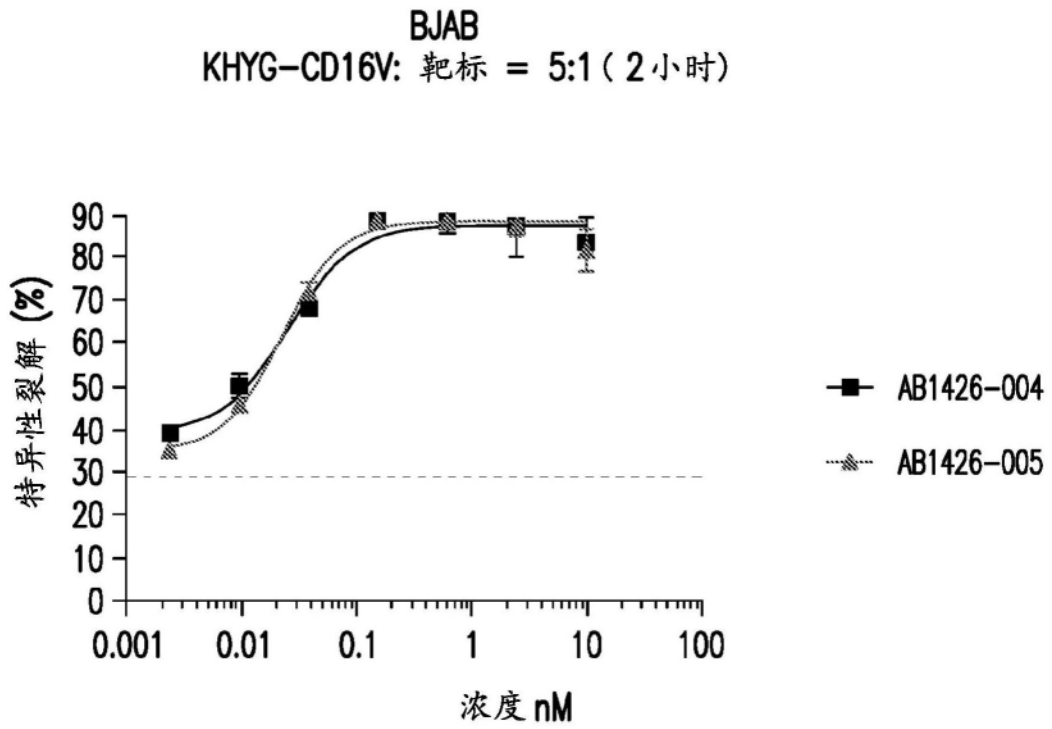


图159

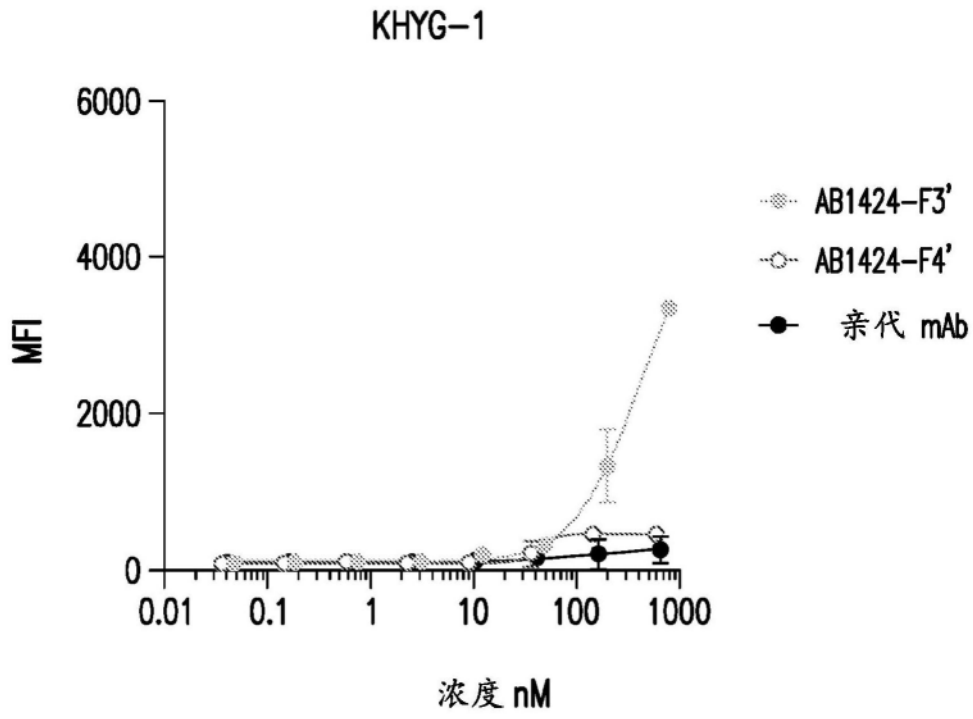


图160A

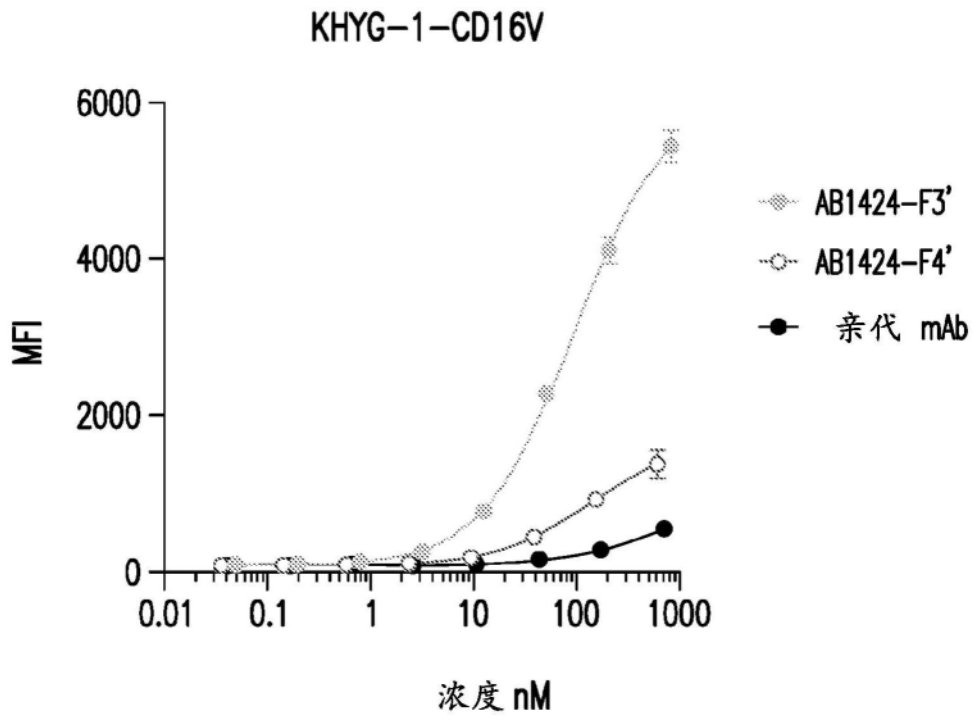


图160B

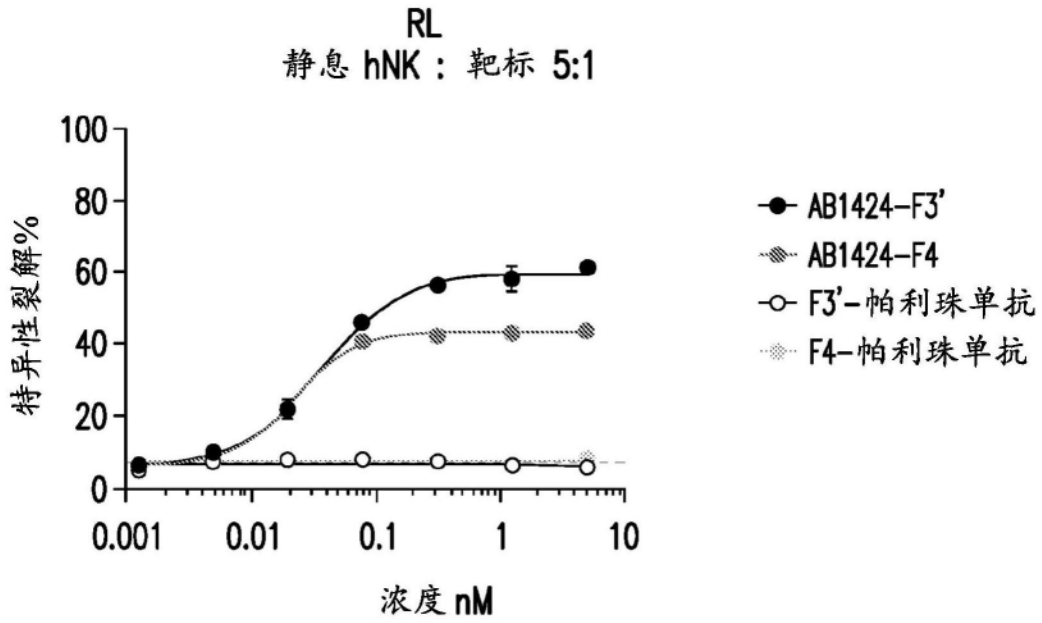


图161A

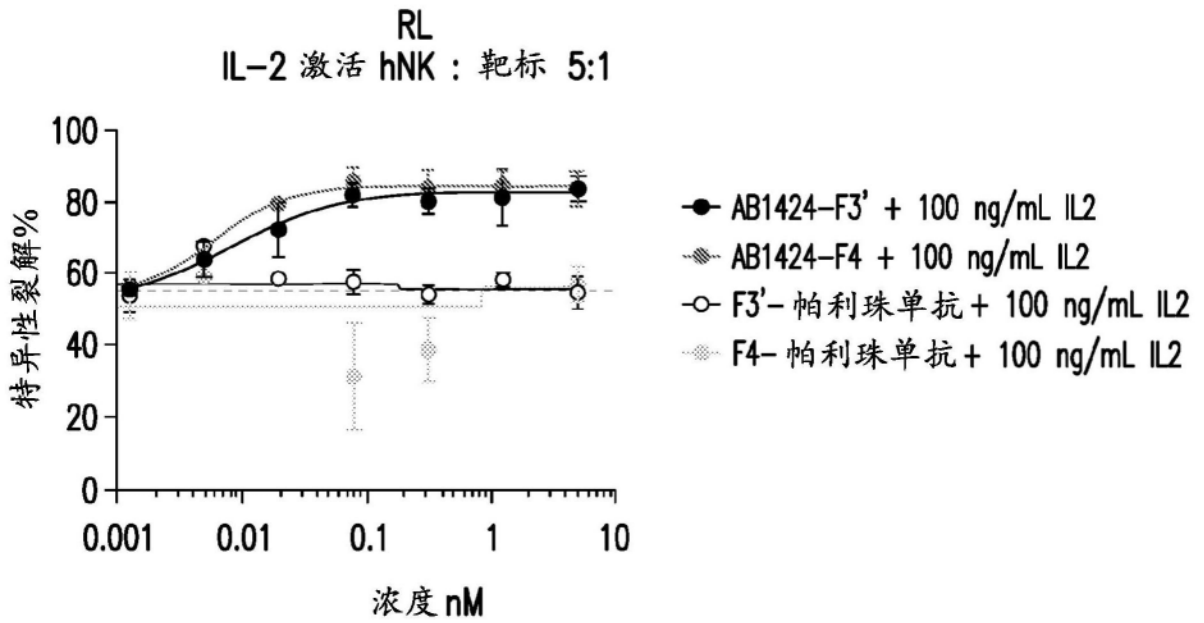


图161B

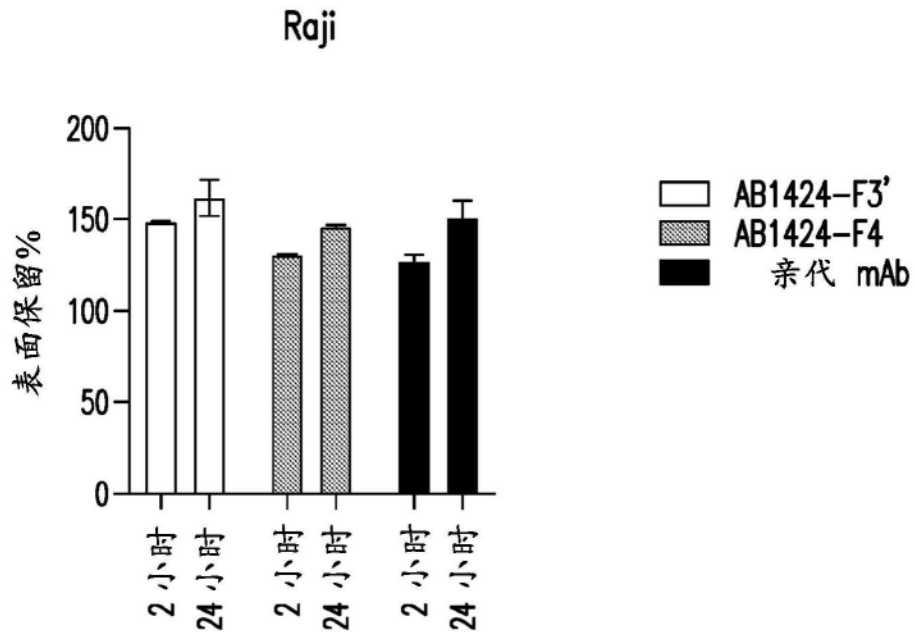


图162

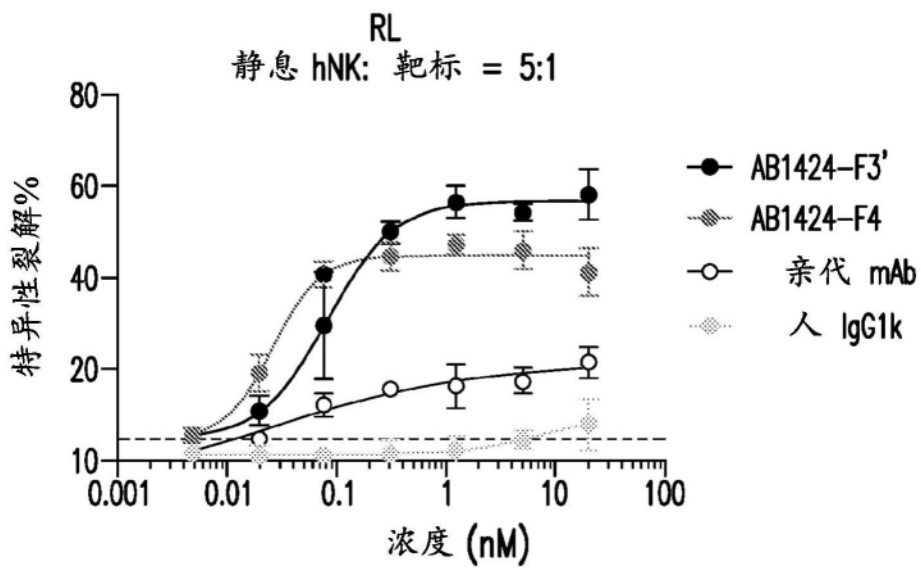


图163

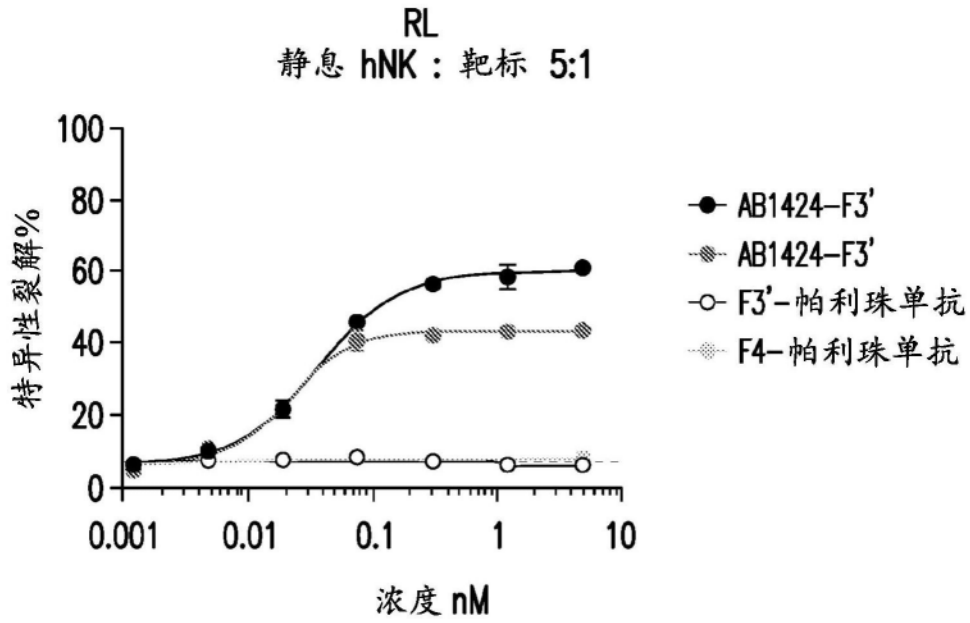


图164A

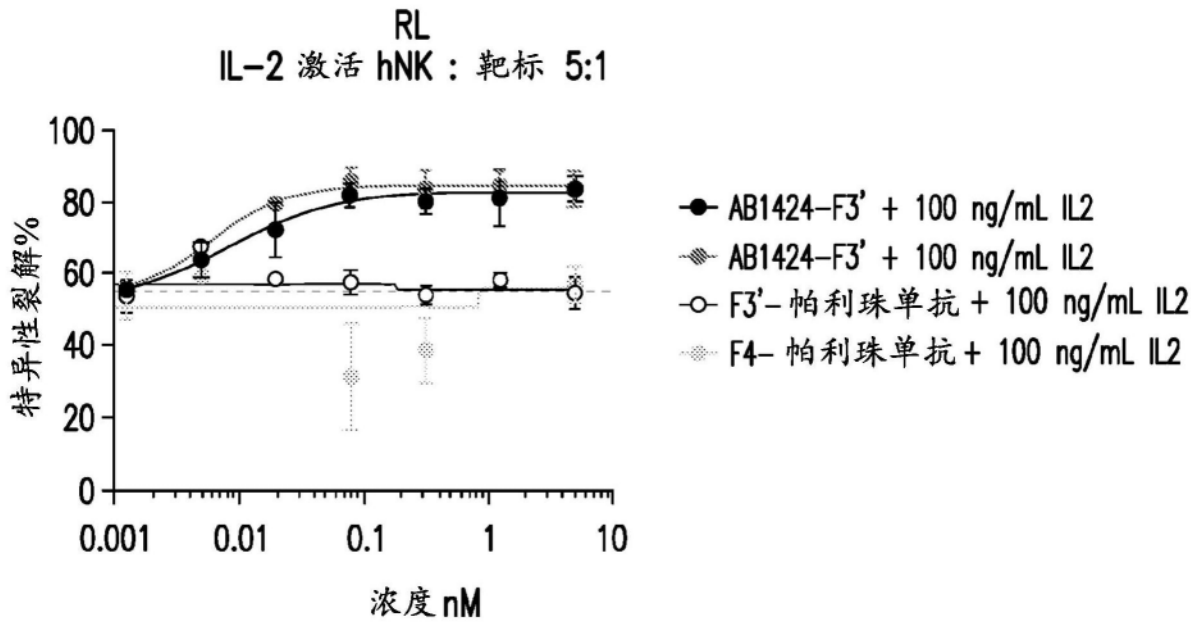


图164B

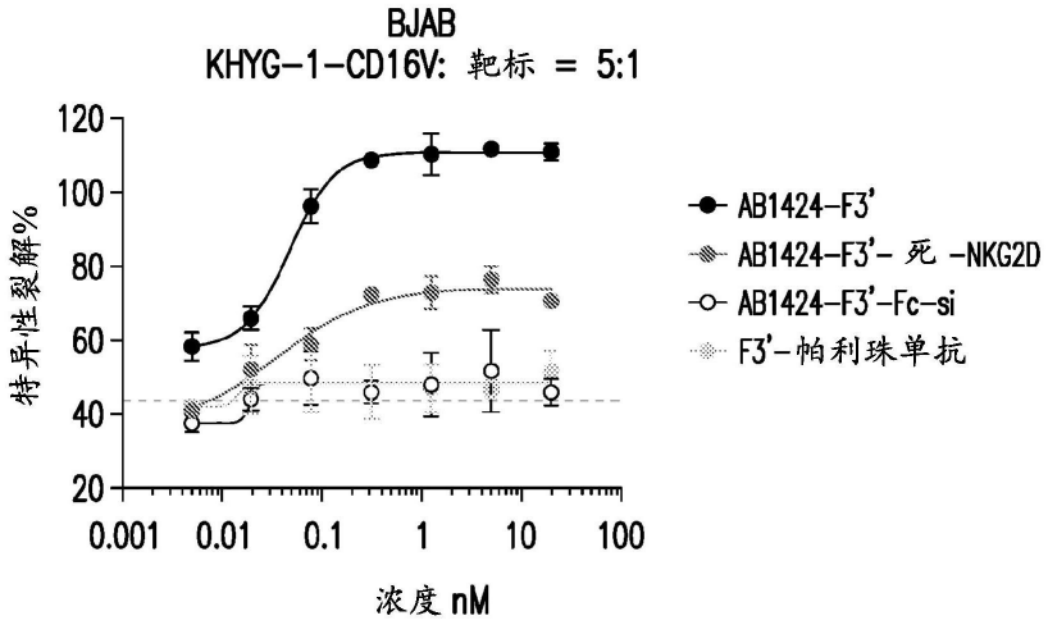


图165

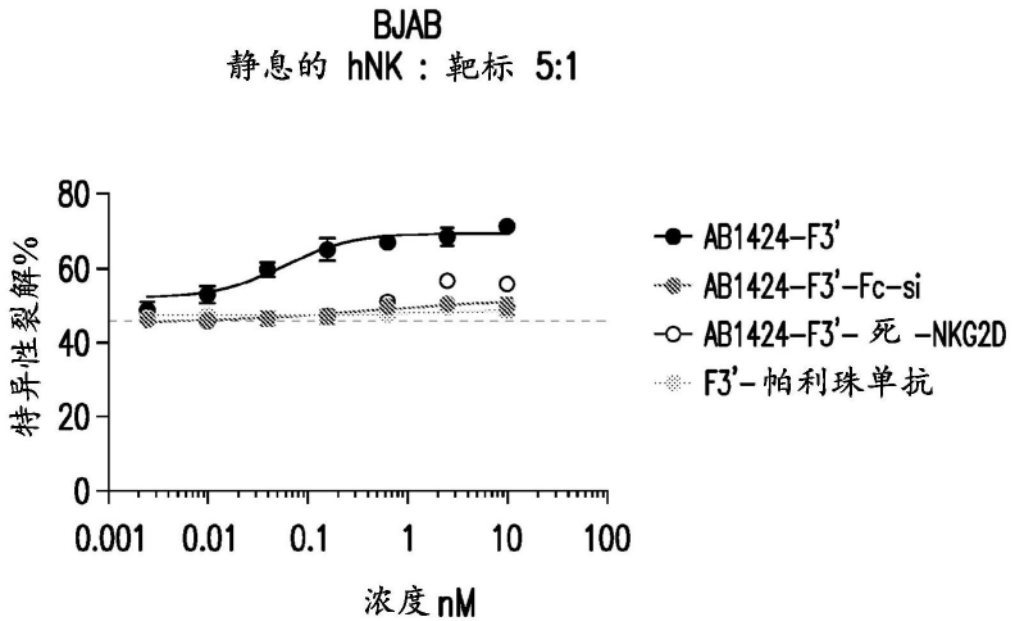


图166

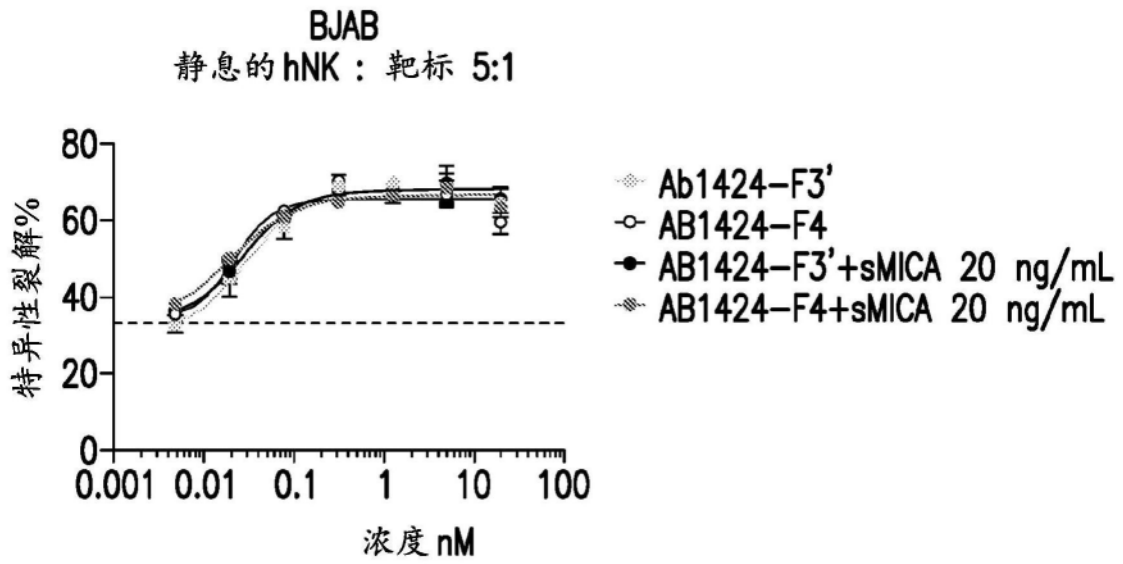


图167

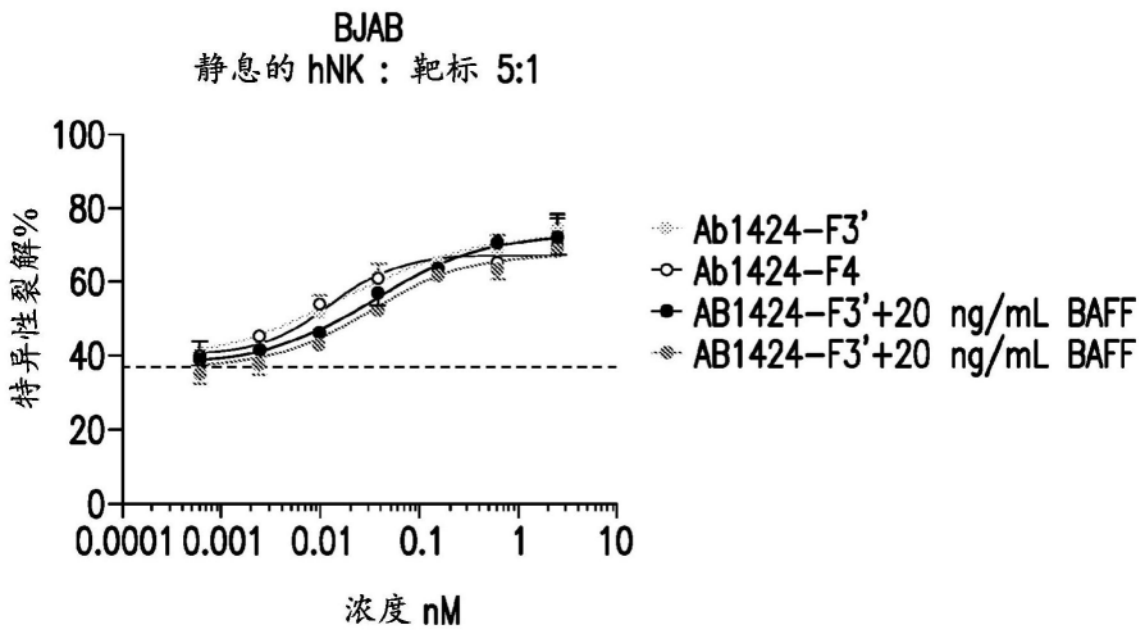


图168

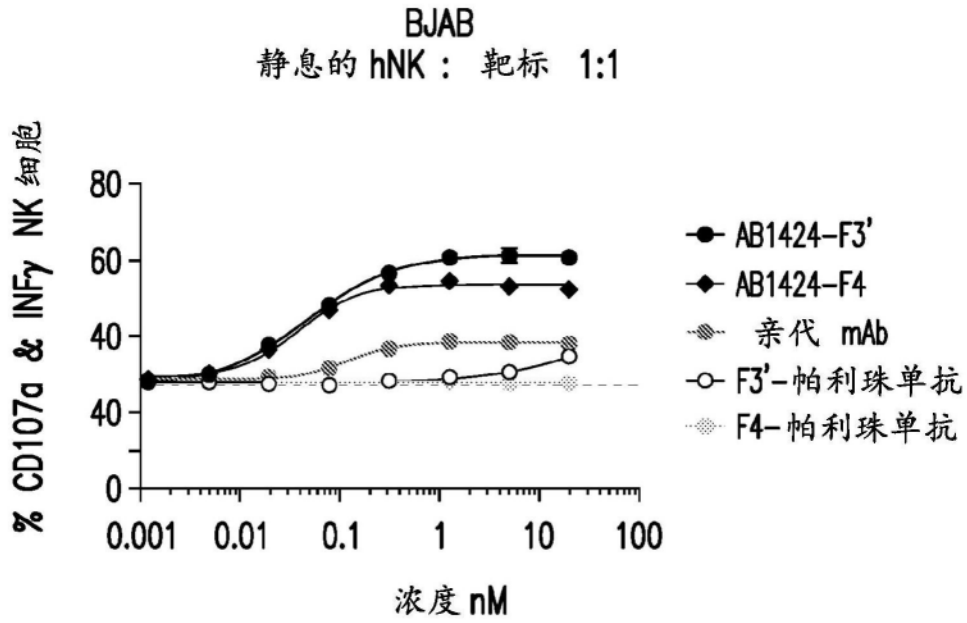


图169

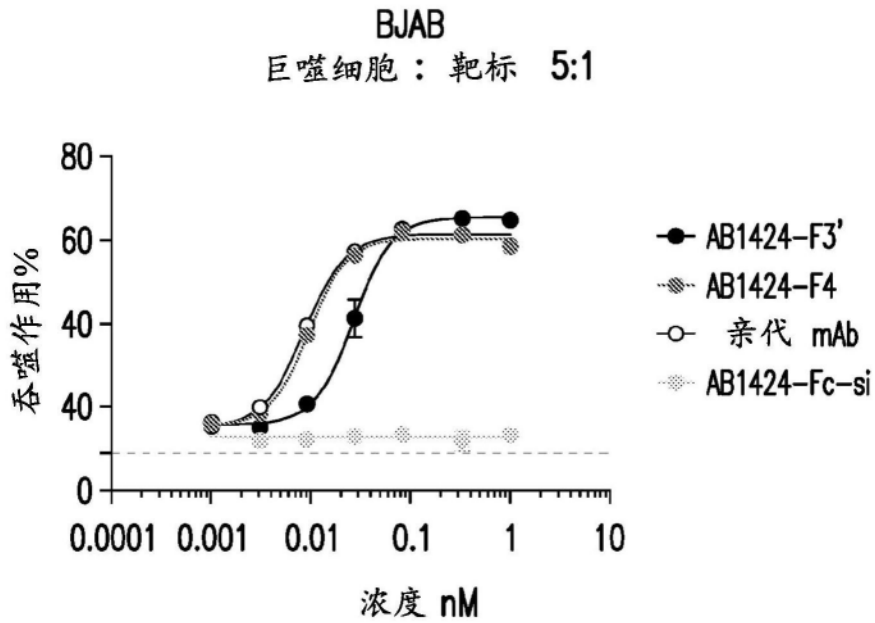


图170

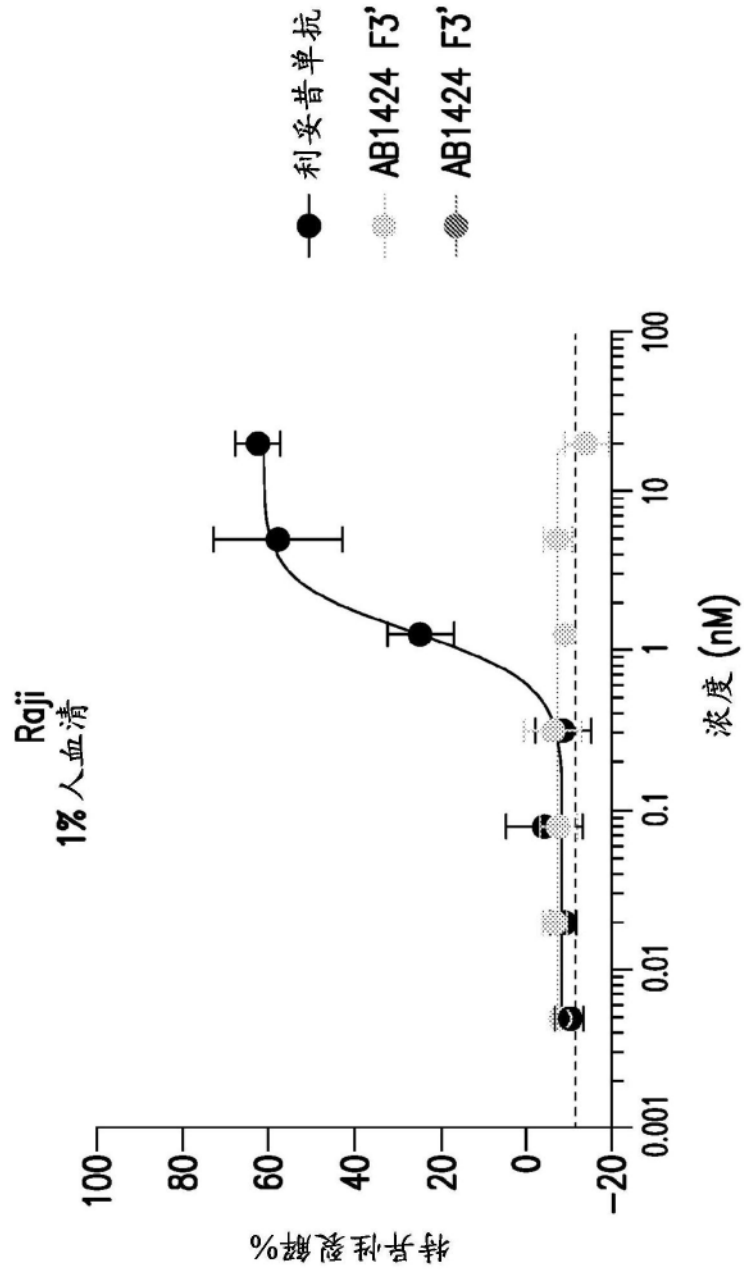


图171

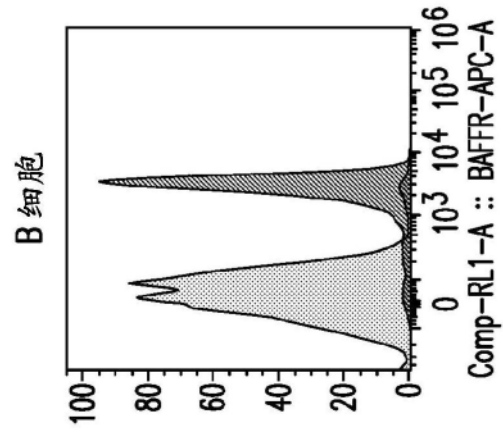


图172A

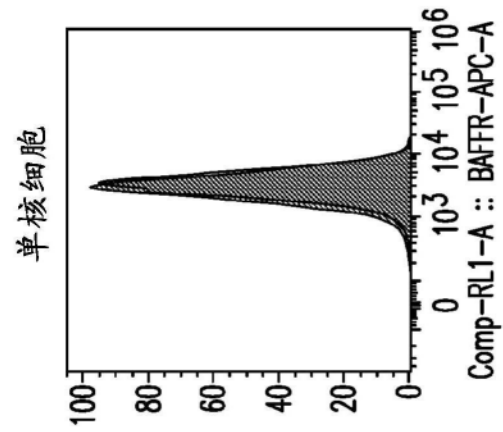


图172B

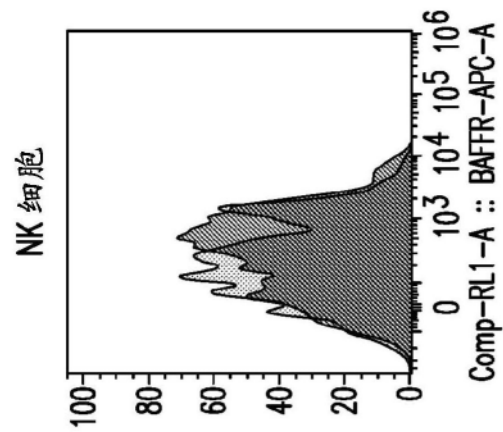


图172C

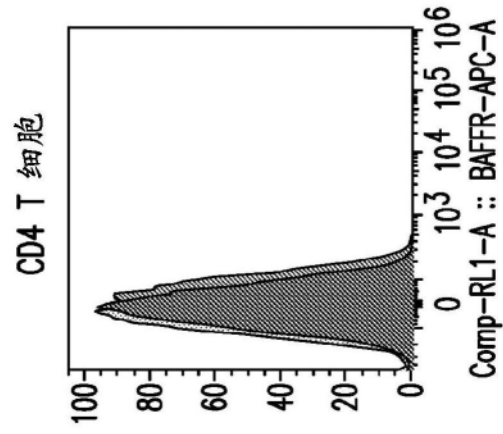


图172D

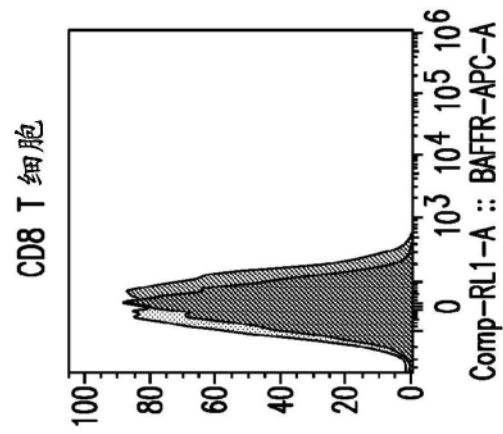


图172E

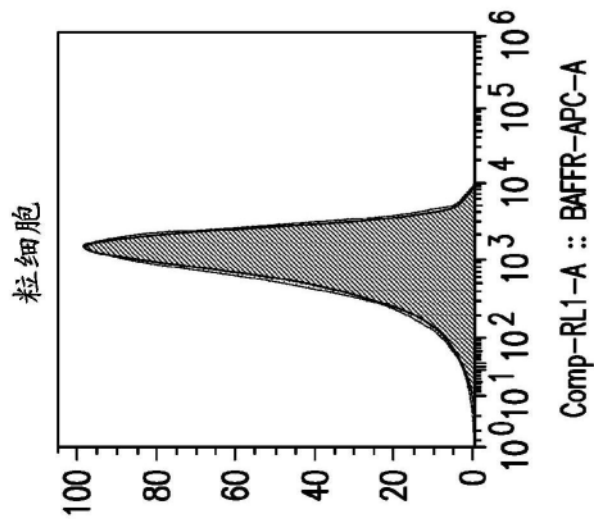


图173A

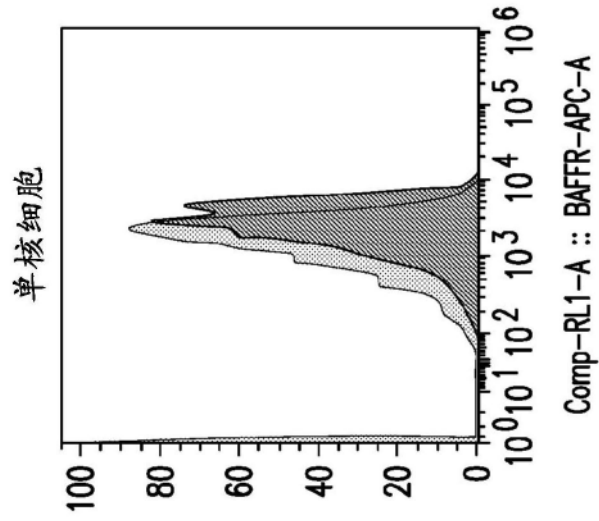


图173B

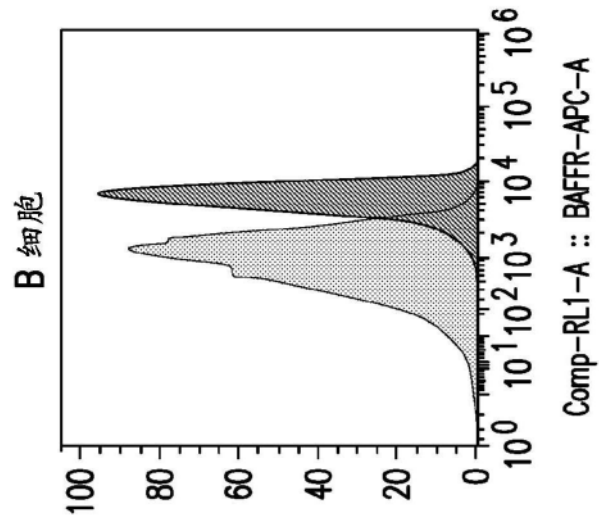


图173C

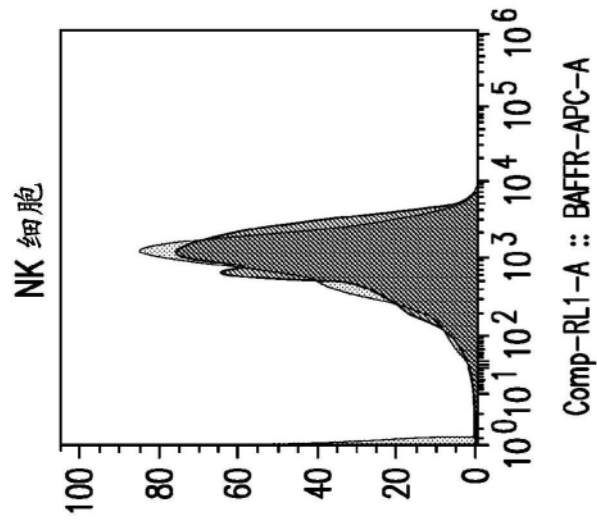


图173D

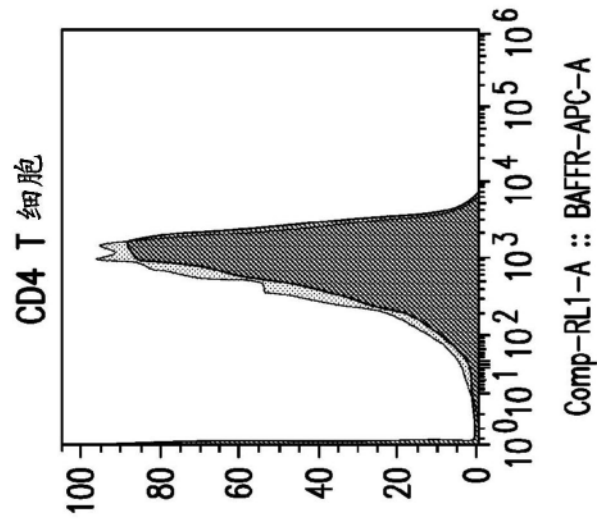


图173E

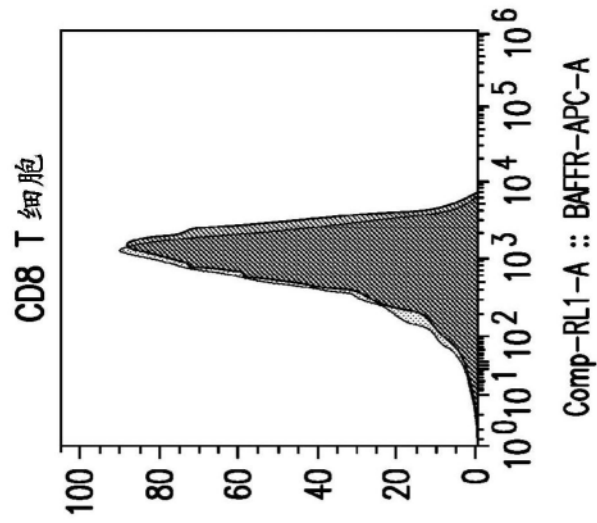


图173F

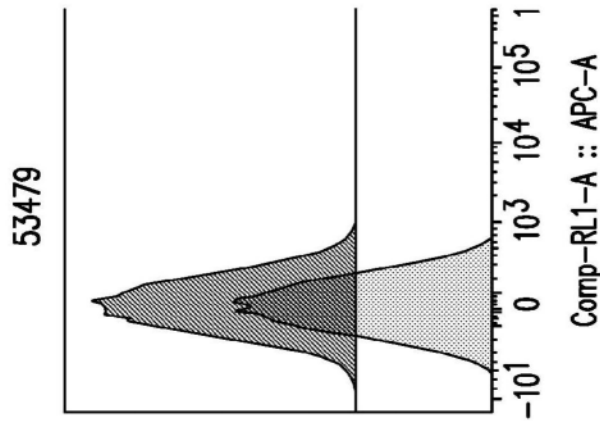


图174A

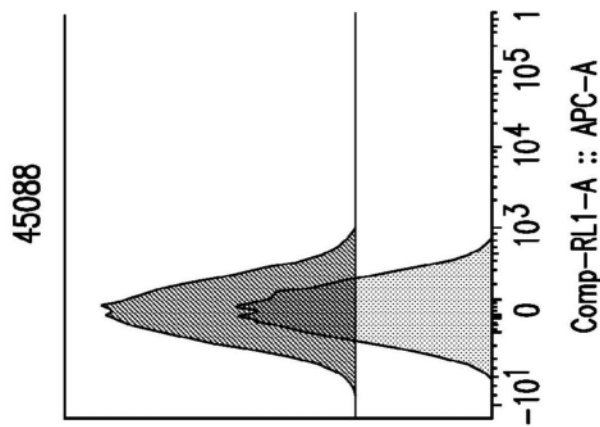


图174B

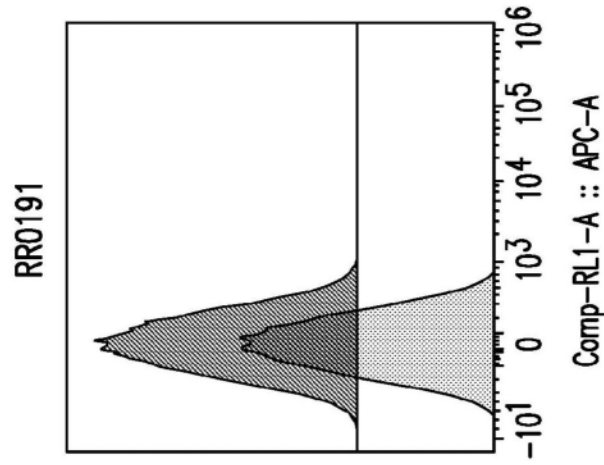


图174C

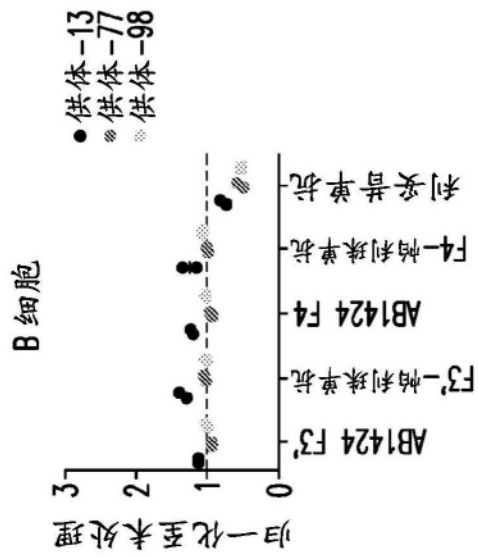


图175A

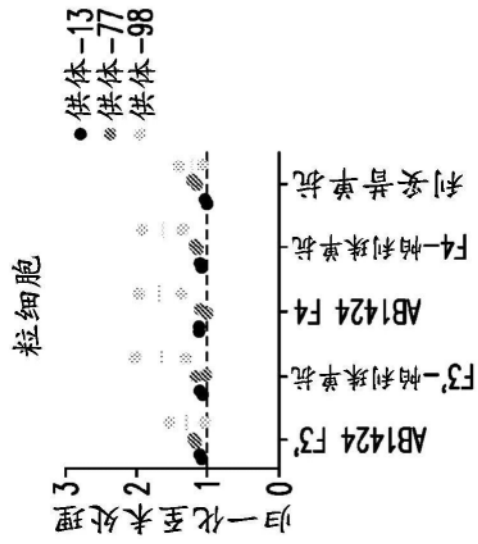


图175B

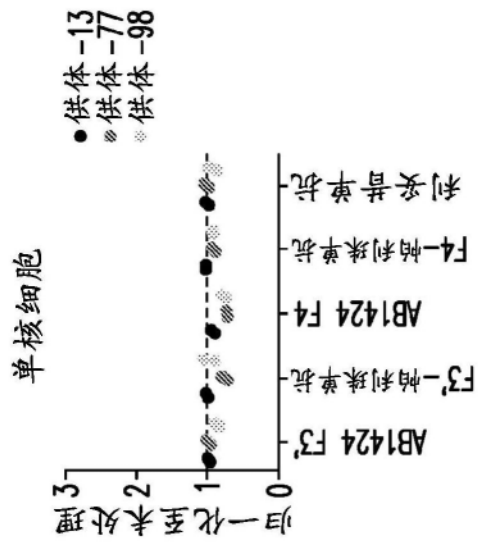


图175C

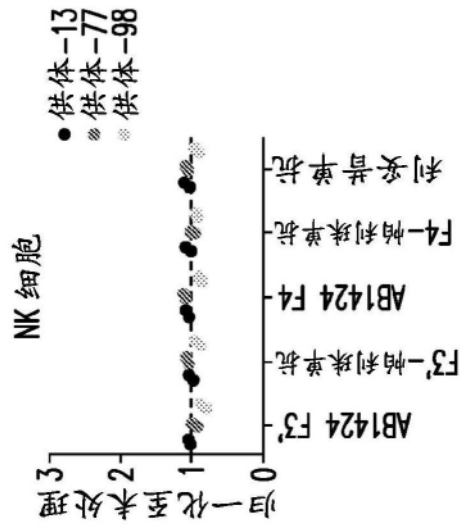


图175D

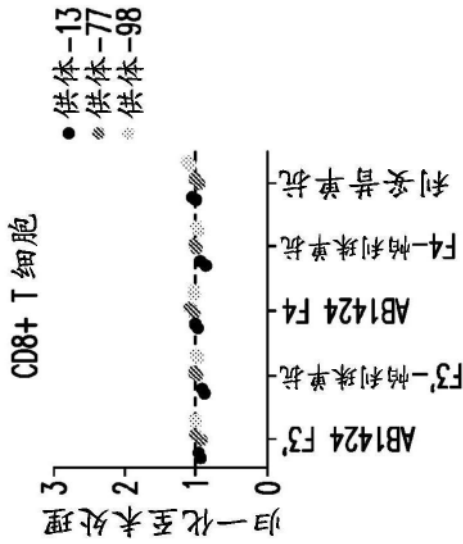


图175E

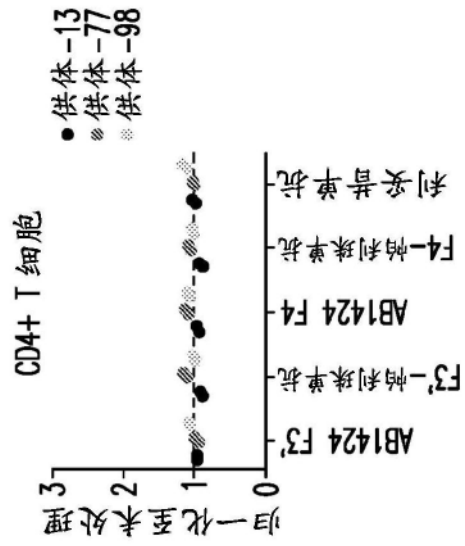


图175F

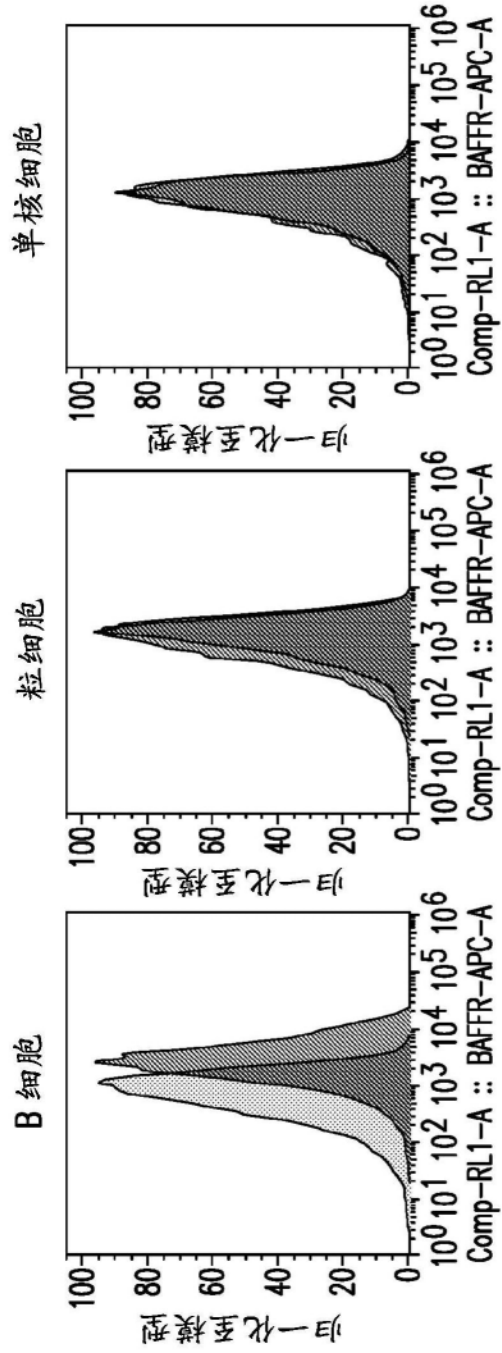


图 176A

图 176B

图 176C

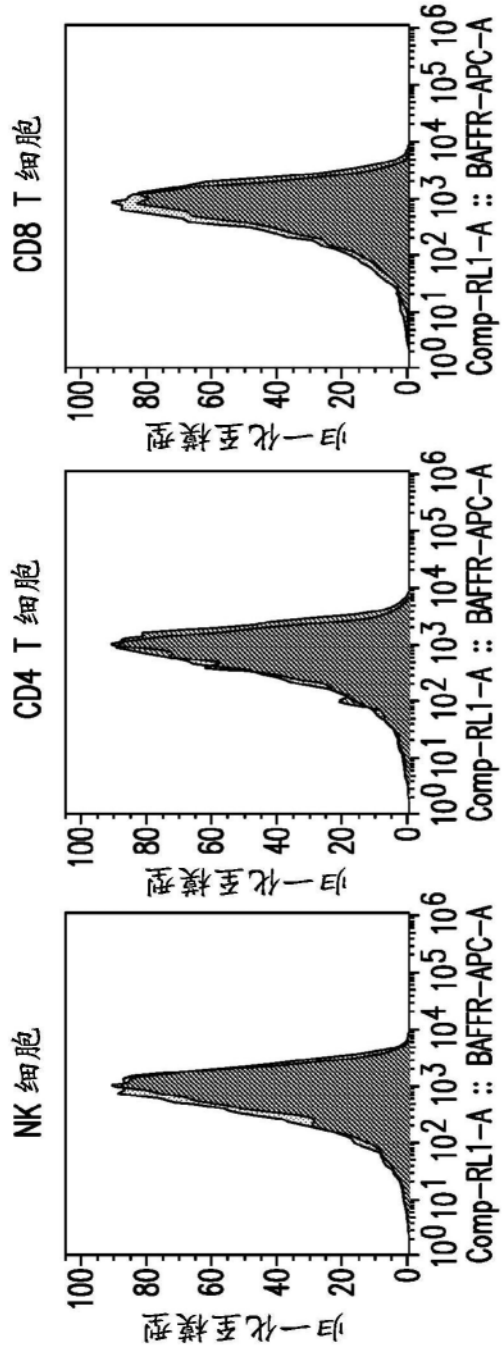


图 176F

图 176E

图 176D

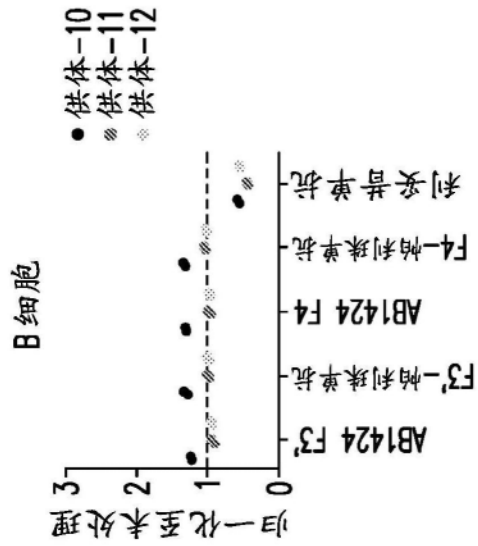


图177A

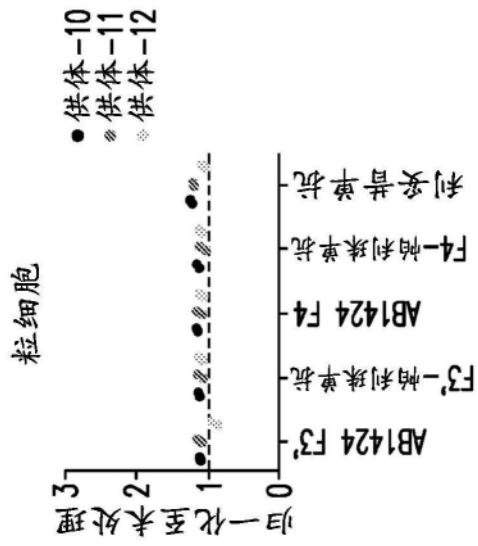


图177B

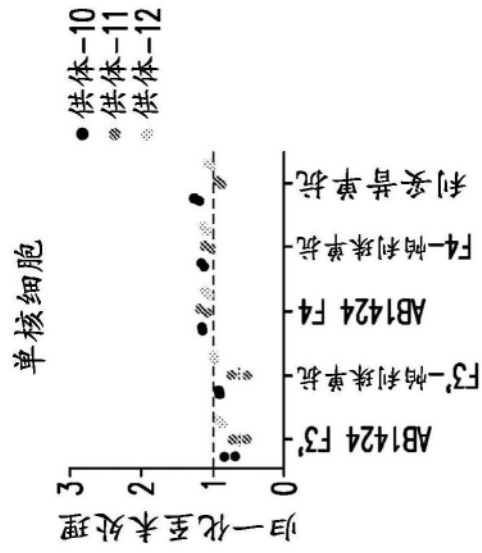


图177C

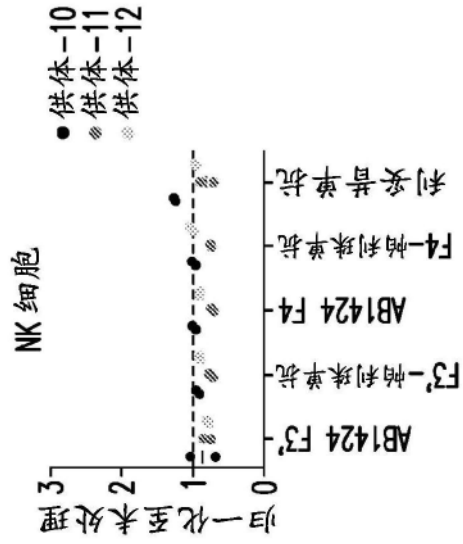


图177D

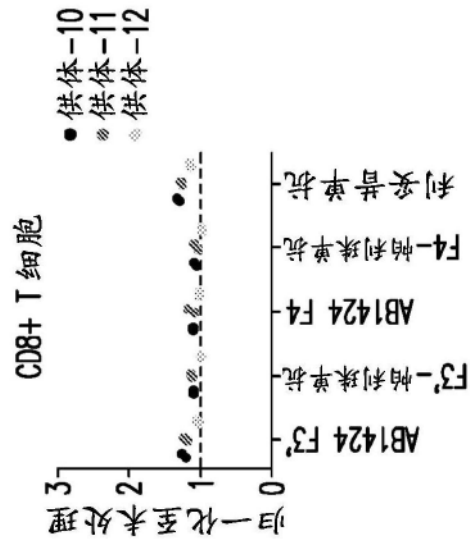


图177E

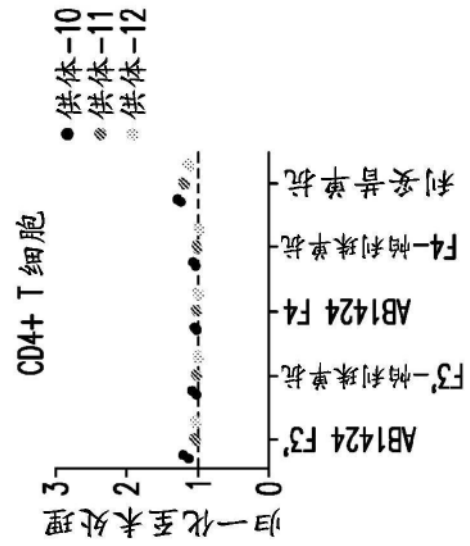


图177F

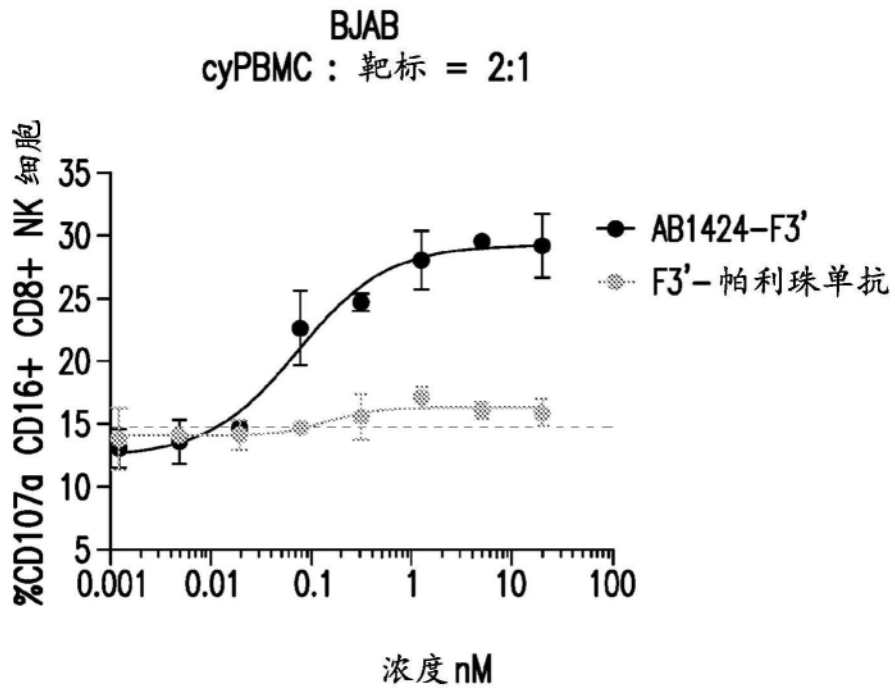


图178