

(19) 国家知识产权局



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117964773 A

(43) 申请公布日 2024.05.03

(21) 申请号 202311768455.3

(74) 专利代理机构 北京市立方律师事务所

(22) 申请日 2019.05.28

11330

(30) 优先权数据

62/677,137 2018.05.28 US

专利代理人 杨剑

(62) 分案原申请数据

201980049197.9 2019.05.28

(51) Int.Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

(71) 申请人 蜻蜓疗法股份有限公司

C12N 15/13 (2006.01)

地址 美国马萨诸塞州

A61K 39/395 (2006.01)

(72) 发明人 格雷戈里·P·常 安·F·张

A61P 35/00 (2006.01)

杜金燕 丹尼尔·法伦

A61P 35/02 (2006.01)

阿斯亚·格林贝格 威廉·哈尼

斯蒂芬·奥尼尔 罗尼·魏

布拉德利·M·伦德

比昂卡·普林茨

权利要求书2页 说明书73页

序列表(电子公布) 附图20页

(54) 发明名称

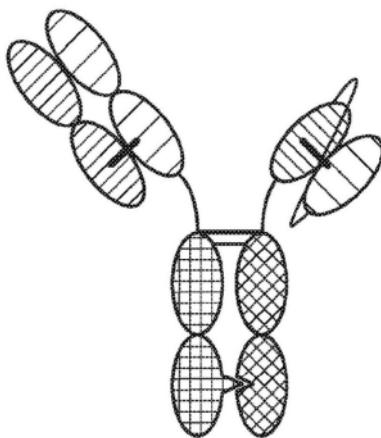
多特异性结合蛋白及其改进

(57) 摘要

本发明提供了对单链可变片段(scFv)抗体的改进、多特异性结合蛋白、包含此类蛋白质的药物组合物,以及使用此类蛋白质和药物组合物的治疗方法,包括用于治疗癌症。

靶向NK  
细胞的FAB

靶向肿瘤的  
scFV



1.一种蛋白质,其包含:

(a)结合肿瘤相关抗原的单链可变片段(scFv),其中所述scFv包含重链可变结构域和轻链可变结构域;

(b)结合NKG2D的Fab,其中所述Fab包含:

(i)抗体重链可变结构域,其包含SEQ ID NO:319的互补决定区1(CDR1)氨基酸序列、SEQ ID NO:96的互补决定区2(CDR2)氨基酸序列和SEQ ID NO:339的互补决定区3(CDR3)氨基酸序列;和

(ii)抗体轻链可变结构域,其包含SEQ ID NO:99的CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:100的CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:101的CDR3氨基酸序列;以及

(c)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结构域,其中所述第一抗体恒定结构域和第二抗体恒定结构域包含异二聚化突变,并且

其中所述scFv与所述第一抗体恒定结构域的N端连接,且所述Fab与所述第二抗体恒定结构域的N端连接。

2.根据权利要求1所述的蛋白质,其中所述scFv通过包含Ala-Ser的铰链与所述第一抗体恒定结构域的N端连接。

3.根据权利要求2所述的蛋白质,其中所述铰链还包含氨基酸序列Thr-Lys-Gly。

4.根据权利要求1所述的蛋白质,其中所述scFv的重链可变结构域与所述scFv的轻链可变结构域形成二硫桥,任选地形成在来自所述scFv的重链可变结构域的C44与来自所述scFv的轻链可变结构域的C100之间。

5.根据权利要求1所述的蛋白质,其中所述scFv的重链可变结构域通过柔性接头与所述scFv的轻链可变结构域连接,任选地其中所述柔性接头包含(G4S)4。

6.根据权利要求1所述的蛋白质,其中所述scFv的重链可变结构域位于所述scFv的轻链可变结构域的C端。

7.根据权利要求1所述的蛋白质,其中所述第一抗体恒定结构域和所述第二抗体恒定结构域均包含人IgG1抗体的CH2结构域和CH3结构域。

8.根据权利要求7所述的蛋白质,其中所述第一抗体恒定结构域和所述第二抗体恒定结构域均包含与人IgG1抗体的氨基酸234-332具有至少90%同一性的氨基酸序列。

9.根据权利要求8所述的蛋白质,其中所述异二聚化突变位于选自由Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411和K439组成的组中的一个或多个位置。

10.根据权利要求9所述的蛋白质,其中所述异二聚化突变包含选自由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、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、T411D、T411E、K439D和K439E组成的组中的一个或多个取代。

11.根据权利要求10所述的蛋白质,其中所述异二聚化突变包含在所述第一抗体恒定结构域中的Q347R、D399V和F405T取代,以及在所述第二抗体恒定结构域中的K360E和K409W

取代。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的蛋白质,其中:

所述Fab的抗体重链可变结构域分别包含SEQ ID NO:319、96和320;或95、96和97的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列;且

所述Fab的抗体轻链可变结构域分别包含SEQ ID NO:99、100和101的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,

任选地其中所述Fab的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:94具有至少90%同一性的氨基酸序列,且所述Fab的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:98具有至少90%同一性的氨基酸序列。

13. 根据权利要求1-11中任一项所述的蛋白质,其中:

所述Fab的抗体重链可变结构域分别包含SEQ ID NO:319、96和324;或95、96和323的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列;且

所述Fab的抗体轻链可变结构域分别包含SEQ ID NO:99、100和101的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,

任选地其中所述Fab的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:322具有至少90%同一性的氨基酸序列,且所述Fab的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:98具有至少90%同一性的氨基酸序列。

14. 一种制剂,其包含权利要求1-13中任一项所述的蛋白质和药学上可接受的载剂。

15. 一种细胞,其包含编码权利要求1-13中任一项所述的蛋白质的一种或多种核酸。

16. 权利要求1-13中任一项所述的蛋白质或权利要求14所述的制剂在制备药物中的用途。

17. 权利要求1-13中任一项所述的蛋白质在制备用于增强肿瘤细胞死亡的药物中的用途,所述用途包含将肿瘤和自然杀伤细胞暴露于所述蛋白质。

18. 权利要求1-13中任一项所述的蛋白质或权利要求14所述的制剂在制备用于治疗癌症的药物中的用途,其中所述用途包含向患者给药所述蛋白质或所述制剂。

19. 根据权利要求18所述的用途,其中所述癌症选自由以下组成的组:急性骨髓性白血病、急性粒单核细胞白血病、B细胞淋巴瘤、膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤、食道癌、尤文氏肉瘤、滤泡性淋巴瘤、胃癌、胃肠道癌、胃肠道间质瘤、胶质母细胞瘤、头颈癌、黑素瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、肾细胞癌、神经母细胞瘤、非小细胞肺癌、神经内分泌肿瘤、卵巢癌和胰腺癌、前列腺癌、肉瘤、小细胞肺癌、T细胞淋巴瘤、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、尿路上皮癌、髓源性抑制细胞浸润的癌症、具有细胞外基质沉积的癌症、具有高水平反应性基质的癌症,以及具有新生血管形成的癌症。

## 多特异性结合蛋白及其改进

[0001] 本申请是申请号为201980049197.9、申请日为2019年5月28日、发明名称为“多特异性结合蛋白及其改进”的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2018年5月28日提交的美国临时专利申请62/677,137的权益和优先权,所述申请的公开内容出于所有目的据此以引用方式整体并入。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有已经以ASCII格式电子递交的序列表,并且该序列表据此以引用方式整体并入。所述ASCII副本创建于2019年5月28日,名称为DFY-049W0\_SL\_ST25.txt并且大小为340,101字节。

### 技术领域

[0006] 本发明提供了对单链可变片段(scFv)抗体的改进和多特异性结合蛋白、包含此类蛋白质的药物组合物,以及使用此类蛋白质和药物组合物的治疗方法,包括用于治疗癌症。

### 背景技术

[0007] 尽管在文献中报道了治疗癌症的大量研究尝试和科学进展,但这种疾病依然是重大的健康问题。一些最经常诊断到的癌症包括前列腺癌、乳腺癌和肺癌。前列腺癌是男性中最常见的癌症形式。乳腺癌仍然是女性死亡的主要原因。当前用于这些癌症的治疗选项不是对于所有患者都有效的和/或可能具有大量的不良副作用。其他类型的癌症对于使用现有治疗选项治疗来说也仍然具有挑战性。

[0008] 癌症免疫疗法是理想的,因为它们是高度特异性的并且可以使用患者自身的免疫系统促进癌细胞的破坏。融合蛋白诸如双特异性T细胞衔接器是文献中描述的与肿瘤细胞和T细胞结合以促进肿瘤细胞破坏的癌症免疫疗法。与某些肿瘤相关抗原和某些免疫细胞结合的抗体在文献中已有描述。参见,例如WO 2016/134371和WO 2015/095412。

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

[0010] NK细胞通过其表面上的多种激活和抑制受体对信号做出响应。例如,当NK细胞遇到健康的自体细胞时,其活性通过杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的激活而被抑制。可替代地,当NK细胞遇到外来细胞或癌细胞时,则通过其激活受体(例如,NKG2D、NCR、DNAM1)被激活。NK细胞还通过其表面上的CD16受体被一些免疫球蛋白的恒定区激活。NK细胞对激活的总体敏感度取决于刺激性和抑制性信号的总和。NKG2D是基本上由所有自然杀伤细胞表达的II型跨膜蛋白,在其中NKG2D用作激活受体。NKG2D也存在于T细胞上,在其中它充当共刺激受体。通过NKG2D调节NK细胞功能的能力在包括恶性肿瘤的各种治疗背景中是有用的。

## 发明内容

[0011] 在一个方面,本发明提供对通过铰链序列与抗体恒定结构域连接的单链可变片段(scFv)的改进。在一些实施方案中,铰链包含氨基酸Ala-Ser。在一些其他实施方案中,铰链包含氨基酸Ala-Ser和Thr-Lys-Gly。scFv可包括重链可变结构域和轻链可变结构域。在一些实施方案中,scFv结合NKG2D或肿瘤相关抗原。铰链序列提供与靶抗原结合的灵活性。

[0012] 在scFv的一些实施方案中,重链可变结构域与轻链可变结构域形成二硫桥。例如,可以在重链可变结构域的C44残基与轻链可变结构域的C100残基之间形成二硫桥。在一些实施方案中,重链可变结构域通过柔性接头诸如(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>(SEQ ID NO:427)与轻链可变结构域连接。在scFv的一些实施方案中,重链可变结构域位于轻链可变结构域的N端。在scFv的一些实施方案中,重链可变结构域位于轻链可变结构域的C端。

[0013] 在一些实施方案中,与scFv连接的抗体恒定结构域能够与CD16结合。在一些实施方案中,抗体恒定结构域包含IgG抗体例如人IgG1抗体的CH2结构域和CH3结构域。在一些实施方案中,将突变引入抗体恒定结构域中,使其能够与另一抗体恒定结构域异二聚化。例如,如果抗体恒定结构域衍生自人IgG1的恒定结构域,那么所述抗体恒定结构域可以包含与人IgG1抗体的氨基酸234-332具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且在选自由以下组成的组的一个或多个位置上有所不同:Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411和K439。在一些实施方案中,抗体恒定结构域可以包含与人IgG1抗体的氨基酸234-332具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且不同之处在于选自由以下组成的组的一个或多个取代: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、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、T411D、T411E、K439D和K439E。

[0014] 在另一方面,本发明提供了一种蛋白质,其包含上述与抗体恒定区连接的scFv。在一些实施方案中,所述蛋白质包括第一抗原结合位点,其包含与抗体恒定结构域连接的scFv;第二抗原结合位点,其可采取Fab或此处所述的scFv形式;以及与第二抗原结合位点连接的第二抗体恒定结构域。在一些实施方案中,所述蛋白质是多特异性的,其中第一抗原结合位点结合NKG2D,第二抗原结合位点结合肿瘤相关抗原,并且抗体恒定区结合CD16。

[0015] 在一些其他实施方案中,所述蛋白质是多特异性的,其中第一抗原结合位点结合肿瘤相关抗原,第二抗原结合位点结合NKG2D,并且抗体恒定区结合CD16。与scFv连接的抗体恒定区可以与第二抗体恒定区异二聚化。这些实施方案中的多特异性结合蛋白与自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体结合,并且与癌细胞上的肿瘤相关抗原结合。此类蛋白质可以衔接多于一种NK激活受体,并且可阻断天然配体与NKG2D的结合。在某些实施方案中,所述蛋白质可以在人中激动NK细胞。在一些实施方案中,所述蛋白质可以在人,和/或其他物种诸如啮齿动物和/或食蟹猴中激动NK细胞。

[0016] 在另一方面,本发明提供了一种多特异性结合蛋白,并且所述蛋白质包含结合肿瘤相关抗原的第一抗原结合位点;与第一抗原结合位点结合相同的肿瘤相关抗原的第二抗

原结合位点；结合NKG2D的第三抗原结合位点；以及抗体恒定区或其足以结合CD16的部分，或结合CD16的第四抗原结合位点。抗原结合位点中的任一个可以采取Fab或scFv的形式，诸如上文描述的那些。此处提供的多特异性结合蛋白提供肿瘤相关抗原的二价衔接，从而稳定癌细胞表面上的肿瘤相关抗原，并增强NK细胞对癌细胞的细胞毒性。

[0017] 在一些实施方案中，多特异性结合蛋白对肿瘤相关抗原的二价衔接赋予多特异性结合蛋白对癌细胞的更强结合，从而促进NK细胞对癌细胞，尤其是对表达低水平的肿瘤相关抗原的癌细胞的更强的细胞毒性反应。

[0018] 在一些实施方案中，多特异性结合蛋白掺入抗体Fc结构域的足以结合CD16的部分，其中抗体Fc结构域包含人IgG抗体的铰链和CH2结构域和/或与其氨基酸序列234-332具有至少90%同一性的氨基酸序列。可以将突变引入抗体恒定结构域中，以使其能够与另一抗体恒定结构域异二聚化。例如，如果抗体恒定结构域衍生自人IgG1的恒定结构域，那么所述抗体恒定结构域可以包含与人IgG1抗体的氨基酸234-332具有至少90%同一性的氨基酸序列，并且在选自由以下组成的组的一个或多个位置上有所不同：Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411和K439。

[0019] 在一些实施方案中，抗体恒定结构域可以包含与人IgG1抗体的氨基酸234-332具有至少90%同一性的氨基酸序列，并且不同之处在于选自由以下组成的组的一个或多个取代：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、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、T411D、T411E、K439D和K439E。

[0020] 上述肿瘤相关抗原结合位点可以是与任何肿瘤相关抗原结合的位点，所述肿瘤相关抗原例如，AN01、BCMA、EpCAM、CAIX、CEA、CCR4、CD2、CD123、CD133、CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CLAUDIN-18.2、DLL3、EGFR/ERBB1、GD2、IGF1R、HER2、HER3/ERBB3、HER4/ERBB4、MUC1、cMET、SLAMF7、PSMA、间皮素、MICA、MICB、TRAILR1、TRAILR2、TROP2、MAGE-A3、B7.1、B7.2、CTLA4、PD1、5T4、GPNMB、FR- $\alpha$ 、PAPP-A、FLT3、GPC3、CXCR4、ROR1、ROR2、HLA-E、PD-L1、VLA4、CD44、CD13、CD15、CD47、CLL1、CD81、CD23、CD79a、CD79b、CD80、CRLF2、SLAMF7、CD138、CA125、NaPi2b、结合素4(Nectin4)、ADAM8、ADAM9、SLC44A4、CA19-9、LILRB1、LILRB2、LILRB3、LILRB4、LILRB5、ULRA 1、LILRA2、LILRA3、ULRA4、LILRA5和ULRA6、CCR8、CD7、CTLA4、CX3CR1、ENTPD1、HAVCR2、IL-1R2、PDCD1LG2、TIGIT、TNFRSF4、TNFRSF8、TNFRSF9、GEM、NT5E、TNFRSF18、MUC1、P-钙粘素、丛状蛋白-A1(Plexin-A1)、TNFRSF10B、STEAP1、CDCP1、PTK7、Ax1、erbB-3、EDNRB、Tyrp1、CD14、CD163、CSF3R、Siglec-9、ITGAM、VISTA、B7-H4(VTCN1)、CCR1、LRRC25、PTAFR、SIRPB1、TLR2、TLR4、CD300LB、ATP1A3、CCR5、MUC1(或MUC1-C)、丛状蛋白-A1、TNFRSF10B、STEAP1、CDCP1、PTK7、AXL、EDNRB、OLR1和TYRP1。

[0021] 在另一方面，本发明提供一种蛋白质，其包含：(a)结合NKG2D的抗原结合位点；(b)抗原结合性T细胞受体(TCR)片段；以及(c)抗体恒定区或其足以结合CD16的部分，或结合

CD16的另外的抗原结合位点。在某些实施方案中,所述蛋白质是多特异性结合蛋白,其包含结合肿瘤相关抗原(TAA)的抗原结合性TCR片段。

[0022] 在某些实施方案中,抗原结合位点是Fab片段,并且抗原结合性TCR片段是单链TCR(scTCR)片段。在某些实施方案中,scTCR片段通过包含Ala-Ser的铰链与抗体恒定区的多肽链连接。在某些实施方案中,铰链还包含氨基酸序列Thr-Lys-Gly。

[0023] 在某些实施方案中,抗原结合位点是scFv,并且抗原结合性TCR片段是细胞外TCR片段。在某些实施方案中,scFv通过包含Ala-Ser的铰链与抗体恒定区的多肽链连接。在某些实施方案中,铰链还包含氨基酸序列Thr-Lys-Gly。

[0024] 在某些实施方案中,抗原结合位点是Fab片段,并且抗原结合性TCR片段是细胞外TCR片段。

[0025] 在某些实施方案中,多特异性结合蛋白还包含与抗原结合性TCR片段结合相同抗原的另外的抗原结合性TCR片段。在某些实施方案中,抗原结合位点是scFv,并且抗原结合性TCR片段和另外的抗原结合性TCR片段是细胞外TCR片段。在某些实施方案中,抗原结合位点是scFv,并且抗原结合性TCR片段和另外的抗原结合性TCR片段是scTCR片段。

[0026] 在包含scFv的多特异性结合蛋白的某些实施方案中,scFv包含通过柔性接头与轻链可变结构域连接的重链可变结构域。在某些实施方案中,柔性接头包含(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>。在某些实施方案中,scFv包含位于轻链可变结构域的N端或C端的重链可变结构域。

[0027] 在某些实施方案中,抗原结合位点包含重链可变结构域和轻链可变结构域,并且其中重链可变结构域与轻链可变结构域形成二硫桥。在某些实施方案中,二硫桥在重链可变结构域的位置44处的Cys与轻链可变结构域的位置100处的Cys之间形成,所述位置根据Kabat编号定义。在某些实施方案中,包含这样的二硫桥的抗原结合位点是scFv。

[0028] 在某些实施方案中,抗原结合位点在人中与NKG2D结合。

[0029] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由主要组织相容性复合物(MHC)呈递的来自肿瘤相关抗原的肽。

[0030] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由HLA-A\*02:01:48呈递的具有SEQ ID NO:425的氨基酸序列的ELAVL4肽。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:351相关的α链可变结构域和与SEQ ID NO:352相关的β链可变结构域。例如,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:351具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的α链可变结构域,和/或掺入与α链可变结构域的CDR3α序列(SEQ ID NO:353)相同的氨基酸序列。类似地,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:352具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的β链可变结构域,和/或掺入与β链可变结构域的CDR3β序列(SEQ ID NO:354)相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含SEQ ID NO:349所示的α链氨基酸序列和SEQ ID NO:350所示的β链氨基酸序列。

[0031] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由HLA-A\*02:01:48呈递的具有SEQ ID NO:426的氨基酸序列的胰岛素肽。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:357相关的α链可变结构域和与SEQ ID NO:358相关的β链可变结构域。例如,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:357具有至少90% (例如,90%、91%、

92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的 $\alpha$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\alpha$ 链可变结构域的CDR3 $\alpha$ 序列(SEQ ID NO:359)相同的氨基酸序列。类似地,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:358具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的 $\beta$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\beta$ 链可变结构域的CDR3 $\beta$ 序列(SEQ ID NO:360)相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含SEQ ID NO:355所示的 $\alpha$ 链氨基酸序列和SEQ ID NO:356所示的 $\beta$ 链氨基酸序列。

[0032] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由HLA-A\*02:01:48呈递的具有SEQ ID NO:340的氨基酸序列的TERT肽。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:363相关的 $\alpha$ 链可变结构域和与SEQ ID NO:364相关的 $\beta$ 链可变结构域。例如,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:363具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的 $\alpha$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\alpha$ 链可变结构域的CDR3 $\alpha$ 序列(SEQ ID NO:365)相同的氨基酸序列。类似地,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:364具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的 $\beta$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\beta$ 链可变结构域的CDR3 $\beta$ 序列(SEQ ID NO:366)相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含SEQ ID NO:361所示的 $\alpha$ 链氨基酸序列和SEQ ID NO:362所示的 $\beta$ 链氨基酸序列。

[0033] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由HLA-A\*02呈递的具有SEQ ID NO:341的氨基酸序列的ERBB2肽。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:430相关的 $\alpha$ 链可变结构域和与SEQ ID NO:431相关的 $\beta$ 链可变结构域。例如,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:430具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的 $\alpha$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\alpha$ 链可变结构域的CDR3 $\alpha$ 序列(SEQ ID NO:367)相同的氨基酸序列。类似地,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:431具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的 $\beta$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\beta$ 链可变结构域的CDR3 $\beta$ 序列(SEQ ID NO:368)相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含SEQ ID NO:428所示的 $\alpha$ 链氨基酸序列和SEQ ID NO:429所示的 $\beta$ 链氨基酸序列。

[0034] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由HLA-A\*02呈递的具有SEQ ID NO:342的氨基酸序列的WT1肽。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:434相关的 $\alpha$ 链可变结构域和与SEQ ID NO:435相关的 $\beta$ 链可变结构域。例如,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:434具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的 $\alpha$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\alpha$ 链可变结构域的CDR3 $\alpha$ 序列(SEQ ID NO:369)相同的氨基酸序列。类似地,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:435具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的 $\beta$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\beta$ 链可变结构域的CDR3 $\beta$ 序列(SEQ ID NO:370)相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含SEQ ID NO:432所示的 $\alpha$ 链氨基酸序列和SEQ ID NO:433所示的 $\beta$ 链氨基酸序列。

[0035] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由HLA-A\*02呈递的具有SEQ ID NO:342的氨基酸序列的WT1肽。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:438相关的 $\alpha$ 链可变结构域和与SEQ ID NO:439相关的 $\beta$ 链可变结构域。例如,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:438具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的 $\alpha$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\alpha$ 链可变结构域的CDR3 $\alpha$ 序列 (SEQ ID NO:371) 相同的氨基酸序列。类似地,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:439具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的 $\beta$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\beta$ 链可变结构域的CDR3 $\beta$ 序列 (SEQ ID NO:372) 相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含SEQ ID NO:436所示的 $\alpha$ 链氨基酸序列和SEQ ID NO:437所示的 $\beta$ 链氨基酸序列。

[0036] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由HLA-A1呈递的具有SEQ ID NO:343的氨基酸序列的MAGE-A3肽。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:375相关的 $\alpha$ 链可变结构域和与SEQ ID NO:376相关的 $\beta$ 链可变结构域。例如,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:375具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的 $\alpha$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\alpha$ 链可变结构域的CDR3 $\alpha$ 序列 (SEQ ID NO:377) 相同的氨基酸序列。类似地,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:376具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的 $\beta$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\beta$ 链可变结构域的CDR3 $\beta$ 序列 (SEQ ID NO:378) 相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含SEQ ID NO:373所示的 $\alpha$ 链氨基酸序列和SEQ ID NO:374所示的 $\beta$ 链氨基酸序列。

[0037] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由HLA-A2呈递的具有SEQ ID NO:344的氨基酸序列的MART1肽。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:381相关的 $\alpha$ 链可变结构域和与SEQ ID NO:382相关的 $\beta$ 链可变结构域。例如,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:381具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的 $\alpha$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\alpha$ 链可变结构域的CDR3 $\alpha$ 序列 (SEQ ID NO:383) 相同的氨基酸序列。类似地,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:382具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的 $\beta$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\beta$ 链可变结构域的CDR3 $\beta$ 序列 (SEQ ID NO:384) 相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含SEQ ID NO:379所示的 $\alpha$ 链氨基酸序列和SEQ ID NO:380所示的 $\beta$ 链氨基酸序列。

[0038] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由HLA-A2呈递的具有SEQ ID NO:346的氨基酸序列的BIRC5肽。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:442相关的 $\alpha$ 链可变结构域和与SEQ ID NO:443相关的 $\beta$ 链可变结构域。例如,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:442具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的 $\alpha$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\alpha$ 链可变结构域的CDR3 $\alpha$ 序列 (SEQ ID NO:389) 相同的氨基酸序列。类似地,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:443具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的 $\beta$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\beta$ 链可变结构域的CDR3 $\beta$ 序列 (SEQ ID NO:390) 相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片

CN 117964773 A

段包含SEQ ID NO:440所示的 $\alpha$ 链氨基酸序列和SEQ ID NO:441所示的 $\beta$ 链氨基酸序列。

[0039] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由HLA-A2呈递的具有SEQ ID NO:346的氨基酸序列的BIRC5肽。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:444相关的 $\alpha$ 链可变结构域和与SEQ ID NO:445相关的 $\beta$ 链可变结构域。例如,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:444具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的 $\alpha$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\alpha$ 链可变结构域的CDR3 $\alpha$ 序列 (SEQ ID NO:391) 相同的氨基酸序列。类似地,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:445具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的 $\beta$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\beta$ 链可变结构域的CDR3 $\beta$ 序列 (SEQ ID NO:392) 相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含SEQ ID NO:385所示的 $\alpha$ 链氨基酸序列和SEQ ID NO:386所示的 $\beta$ 链氨基酸序列。

[0040] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由HLA-A2呈递的具有SEQ ID NO:347的氨基酸序列的PRAME肽。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:395相关的 $\alpha$ 链可变结构域和与SEQ ID NO:396相关的 $\beta$ 链可变结构域。例如,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:395具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的 $\alpha$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\alpha$ 链可变结构域的CDR3 $\alpha$ 序列 (SEQ ID NO:397) 相同的氨基酸序列。类似地,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:396具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的 $\beta$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\beta$ 链可变结构域的CDR3 $\beta$ 序列 (SEQ ID NO:398) 相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含SEQ ID NO:393所示的 $\alpha$ 链氨基酸序列和SEQ ID NO:394所示的 $\beta$ 链氨基酸序列。

[0041] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由HLA-A2呈递的具有SEQ ID NO:347的氨基酸序列的PRAME肽。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:401相关的 $\alpha$ 链可变结构域和与SEQ ID NO:402相关的 $\beta$ 链可变结构域。例如,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:401具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的 $\alpha$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\alpha$ 链可变结构域的CDR3 $\alpha$ 序列 (SEQ ID NO:403) 相同的氨基酸序列。类似地,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:402具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的 $\beta$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\beta$ 链可变结构域的CDR3 $\beta$ 序列 (SEQ ID NO:404) 相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含SEQ ID NO:399所示的 $\alpha$ 链氨基酸序列和SEQ ID NO:400所示的 $\beta$ 链氨基酸序列。

[0042] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由HLA-A2呈递的具有SEQ ID NO:347的氨基酸序列的PRAME肽。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:407相关的 $\alpha$ 链可变结构域和与SEQ ID NO:408相关的 $\beta$ 链可变结构域。例如,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:407具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的 $\alpha$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\alpha$ 链可变结构域的CDR3 $\alpha$ 序列 (SEQ ID NO:409) 相同的氨基酸序列。类似地,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:408具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的 $\beta$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\beta$ 链可变结构域的CDR3 $\beta$ 序列 (SEQ ID NO:410) 相同的氨基酸序列。

域的CDR3 $\beta$ 序列 (SEQ ID NO:410) 相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含SEQ ID NO:405所示的 $\alpha$ 链氨基酸序列和SEQ ID NO:406所示的 $\beta$ 链氨基酸序列。

[0043] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由HLA-A2呈递的具有SEQ ID NO:348的氨基酸序列的NY-ESO-1肽。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:413相关的 $\alpha$ 链可变结构域和与SEQ ID NO:414相关的 $\beta$ 链可变结构域。例如,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:413具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的 $\alpha$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\alpha$ 链可变结构域的CDR3 $\alpha$ 序列 (SEQ ID NO:415) 相同的氨基酸序列。类似地,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:414具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的 $\beta$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\beta$ 链可变结构域的CDR3 $\beta$ 序列 (SEQ ID NO:416) 相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含SEQ ID NO:411所示的 $\alpha$ 链氨基酸序列和SEQ ID NO:412所示的 $\beta$ 链氨基酸序列。

[0044] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由HLA-A2呈递的具有SEQ ID NO:348的氨基酸序列的NY-ESO-1肽。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:418相关的 $\alpha$ 链可变结构域和与SEQ ID NO:414相关的 $\beta$ 链可变结构域。例如,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:418具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的 $\alpha$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\alpha$ 链可变结构域的CDR3 $\alpha$ 序列 (SEQ ID NO:415) 相同的氨基酸序列。类似地,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:414具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的 $\beta$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\beta$ 链可变结构域的CDR3 $\beta$ 序列 (SEQ ID NO:416) 相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含SEQ ID NO:417所示的 $\alpha$ 链氨基酸序列和SEQ ID NO:412所示的 $\beta$ 链氨基酸序列。

[0045] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由HLA-A2呈递的具有SEQ ID NO:348的氨基酸序列的NY-ESO-1肽。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:421相关的 $\alpha$ 链可变结构域和与SEQ ID NO:422相关的 $\beta$ 链可变结构域。例如,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:421具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的 $\alpha$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\alpha$ 链可变结构域的CDR3 $\alpha$ 序列 (SEQ ID NO:423) 相同的氨基酸序列。类似地,在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含与SEQ ID NO:422具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的 $\beta$ 链可变结构域,和/或掺入与 $\beta$ 链可变结构域的CDR3 $\beta$ 序列 (SEQ ID NO:424) 相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含SEQ ID NO:419所示的 $\alpha$ 链氨基酸序列和SEQ ID NO:420所示的 $\beta$ 链氨基酸序列。

[0046] 在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由HLA-A2呈递的具有SEQ ID NO:345的氨基酸序列的SSX2肽。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含掺入SEQ ID NO:387所示的CDR3 $\alpha$ 序列的 $\alpha$ 链可变结构域。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段包含掺入SEQ ID NO:388所示的CDR3 $\beta$ 序列的 $\beta$ 链可变结构域。

[0047] 在某些实施方案中,多特异性结合蛋白包含抗体恒定区或其足以结合CD16的部分,其中抗体恒定区或其足以结合CD16的部分包含人IgG1抗体的铰链和CH2结构域。在某些实施方案中,抗体恒定区或其足以结合CD16的部分包含与人IgG1抗体的氨基酸234-332具有至少90%同一性的氨基酸序列。可以将突变引入抗体恒定结构域中,以使其能够与另一抗体恒定结构域异二聚化。例如,如果抗体恒定结构域衍生自人IgG1的恒定结构域,那么所述抗体恒定结构域可以包含与人IgG1抗体的氨基酸234-332具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且在选自由以下组成的组的一个或多个位置上有所不同:Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411和K439。在一些实施方案中,抗体恒定结构域可以包含与人IgG1抗体的氨基酸234-332具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且不同之处在于选自由以下组成的组的一个或多个取代: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、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、T411D、T411E、K439D和K439E。

[0048] 在包含结合NKG2D的抗原结合位点(也称为“NKG2D结合位点”)的前述多肽或蛋白质中的任一种的某些实施方案中,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID N0:1相关的重链可变结构域,诸如通过具有与SEQ ID N0:1具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列,和/或掺入与SEQ ID N0:1的CDR1(SEQ ID N0:3或SEQ ID N0:307)、CDR2(SEQ ID N0:4)和CDR3(SEQ ID N0:5或SEQ ID N0:308)序列相同的氨基酸序列。与SEQ ID N0:1相关的重链可变结构域可以与多种轻链可变结构域偶联,以形成NKG2D结合位点。例如,掺入与SEQ ID N0:1相关的重链可变结构域的NKG2D结合位点可以进一步掺入选自与SEQ ID N0:2、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41和43相关的任一序列的轻链可变结构域。例如,NKG2D结合位点掺入具有与SEQ ID N0:1具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列的重链可变结构域和具有与选自SEQ ID N0:2、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41和43的任一序列具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列的轻链可变结构域。

[0049] 可替代地,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID N0:44相关的重链可变结构域和与SEQ ID N0:48相关的轻链可变结构域。例如,NKG2D结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID N0:44具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的一同一性,和/或掺入与SEQ ID N0:44的CDR1(SEQ ID N0:45或SEQ ID N0:309)、CDR2(SEQ ID N0:46)和CDR3(SEQ ID N0:47或SEQ ID N0:310)序列相同的氨基酸序列。类似地,第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID N0:48具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的一同一性,和/或掺入与SEQ ID N0:48的CDR1(SEQ ID N0:49)、CDR2(SEQ ID N0:50)和CDR3(SEQ ID N0:51)序列相同的氨基酸序列。

[0050] 在其他实施方案中,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID NO:52相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:56相关的轻链可变结构域。例如,NKG2D结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:52具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:52的CDR1 (SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:311)、CDR2 (SEQ ID NO:54) 和CDR3 (SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:312) 序列相同的氨基酸序列。类似地,NKG2D结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:56具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:56的CDR1 (SEQ ID NO:57)、CDR2 (SEQ ID NO:58) 和CDR3 (SEQ ID NO:59) 序列相同的氨基酸序列。

[0051] 可替代地,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID NO:60相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:61相关的轻链可变结构域,诸如通过具有分别与SEQ ID NO:60具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性以及与SEQ ID NO:61具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列。

[0052] 在另一个实施方案中,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID NO:62相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:66相关的轻链可变结构域,例如,NKG2D结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:62具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:62的CDR1 (SEQ ID NO:63)、CDR2 (SEQ ID NO:64) 和CDR3 (SEQ ID NO:65) 序列相同的氨基酸序列。类似地,NKG2D结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:66具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:66的CDR1 (SEQ ID NO:67)、CDR2 (SEQ ID NO:68) 和CDR3 (SEQ ID NO:69) 序列相同的氨基酸序列。

[0053] 在一些实施方案中,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID NO:70相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:74相关的轻链可变结构域。例如,NKG2D结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:70具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:70的CDR1 (SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:313)、CDR2 (SEQ ID NO:72) 和CDR3 (SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:314) 序列相同的氨基酸序列。类似地,NKG2D结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:74具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:74的CDR1 (SEQ ID NO:75)、CDR2 (SEQ ID NO:76) 和CDR3 (SEQ ID NO:77) 序列相同的氨基酸序列。

[0054] 在一些实施方案中,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID NO:78相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:82相关的轻链可变结构域。例如,NKG2D结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:78具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:78的CDR1 (SEQ ID NO:79或SEQ ID NO:315)、CDR2 (SEQ ID NO:80) 和CDR3 (SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:316) 序列相同的氨基酸序列。类似地,NKG2D结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:82具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:82的CDR1 (SEQ ID NO:83)、CDR2 (SEQ ID NO:84) 和CDR3 (SEQ ID NO:85) 序列相

同的氨基酸序列。

[0055] 在一些实施方案中,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID NO:86相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:90相关的轻链可变结构域。例如,NKG2D结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:86具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:86的CDR1 (SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:317)、CDR2 (SEQ ID NO:88) 和CDR3 (SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:318) 序列相同的氨基酸序列。类似地,NKG2D结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:90具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:90的CDR1 (SEQ ID NO:91)、CDR2 (SEQ ID NO:92) 和CDR3 (SEQ ID NO:93) 序列相同的氨基酸序列。

[0056] 在一些实施方案中,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID NO:94相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:98相关的轻链可变结构域。例如,NKG2D结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:94具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:94的CDR1 (SEQ ID NO:95或SEQ ID NO:319)、CDR2 (SEQ ID NO:96) 和CDR3 (SEQ ID NO:97或SEQ ID NO:320) 序列相同的氨基酸序列。类似地,NKG2D结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:98具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:98的CDR1 (SEQ ID NO:99)、CDR2 (SEQ ID NO:100) 和CDR3 (SEQ ID NO:101) 序列相同的氨基酸序列。

[0057] 在一些实施方案中,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID NO:102相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:106相关的轻链可变结构域。例如,NKG2D结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:102具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:102的CDR1 (SEQ ID NO:103或SEQ ID NO:313)、CDR2 (SEQ ID NO:104) 和CDR3 (SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:321) 序列相同的氨基酸序列。类似地,NKG2D结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:106具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:106的CDR1 (SEQ ID NO:107)、CDR2 (SEQ ID NO:108) 和CDR3 (SEQ ID NO:109) 序列相同的氨基酸序列。

[0058] 在一些实施方案中,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID NO:322相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:98相关的轻链可变结构域。例如,NKG2D结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:322具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:322的CDR1 (SEQ ID NO:95或SEQ ID NO:319)、CDR2 (SEQ ID NO:96) 和CDR3 (SEQ ID NO:323或SEQ ID NO:324) 序列相同的氨基酸序列。类似地,NKG2D结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:98具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:98的CDR1 (SEQ ID NO:99)、CDR2 (SEQ ID NO:100) 和CDR3 (SEQ ID NO:101) 序列相同的氨基酸序列。

[0059] 在一些实施方案中,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID NO:325相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:98相关的轻链可变结构域。例如,NKG2D结合位点的重链可变结构域可

以与SEQ ID NO:325具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:325的CDR1 (SEQ ID NO:95或SEQ ID NO:319)、CDR2 (SEQ ID NO:96) 和CDR3 (SEQ ID NO:326或SEQ ID NO:327) 序列相同的氨基酸序列。类似地,NKG2D结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:98具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:98的CDR1 (SEQ ID NO:99)、CDR2 (SEQ ID NO:100) 和CDR3 (SEQ ID NO:101) 序列相同的氨基酸序列。

[0060] 在一些实施方案中,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID NO:328相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:98相关的轻链可变结构域。例如,NKG2D结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:328具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:328的CDR1 (SEQ ID NO:95或SEQ ID NO:319)、CDR2 (SEQ ID NO:96) 和CDR3 (SEQ ID NO:329或SEQ ID NO:330) 序列相同的氨基酸序列。类似地,NKG2D结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:98具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:98的CDR1 (SEQ ID NO:99)、CDR2 (SEQ ID NO:100) 和CDR3 (SEQ ID NO:101) 序列相同的氨基酸序列。

[0061] 在一些实施方案中,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID NO:331相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:98相关的轻链可变结构域。例如,NKG2D结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:331具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:331的CDR1 (SEQ ID NO:95或SEQ ID NO:319)、CDR2 (SEQ ID NO:96) 和CDR3 (SEQ ID NO:332或SEQ ID NO:333) 序列相同的氨基酸序列。类似地,NKG2D结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:98具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:98的CDR1 (SEQ ID NO:99)、CDR2 (SEQ ID NO:100) 和CDR3 (SEQ ID NO:101) 序列相同的氨基酸序列。

[0062] 在一些实施方案中,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID NO:334相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:98相关的轻链可变结构域。例如,NKG2D结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:334具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:334的CDR1 (SEQ ID NO:95或SEQ ID NO:319)、CDR2 (SEQ ID NO:96) 和CDR3 (SEQ ID NO:335或SEQ ID NO:336) 序列相同的氨基酸序列。类似地,NKG2D结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:98具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:98的CDR1 (SEQ ID NO:99)、CDR2 (SEQ ID NO:100) 和CDR3 (SEQ ID NO:101) 序列相同的氨基酸序列。

[0063] 在一些实施方案中,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID NO:337相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:98相关的轻链可变结构域。例如,NKG2D结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:337具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:337的CDR1 (SEQ ID NO:95或SEQ ID NO:319)、CDR2 (SEQ ID NO:96) 和CDR3 (SEQ ID NO:338或SEQ ID NO:339) 序列相同的氨基

酸序列。类似地,NKG2D结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:98具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 的同一性,和/或掺入与SEQ ID NO:98的CDR1 (SEQ ID NO:99)、CDR2 (SEQ ID NO:100) 和CDR3 (SEQ ID NO:101) 序列相同的氨基酸序列。

[0064] 在一些实施方案中,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID NO:110相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:111相关的轻链可变结构域,诸如通过具有分别与SEQ ID NO:110具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性以及与SEQ ID NO:111具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,NKG2D结合位点可以掺入与SEQ ID NO:112相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:113相关的轻链可变结构域,诸如通过具有分别与SEQ ID NO:112具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性以及与SEQ ID NO:113具有至少90% (例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的氨基酸序列。

[0065] 还提供了包含本文所述的任一蛋白质的制剂;包含表达所述蛋白质的一种或多种核酸的细胞,以及使用所述蛋白质增强肿瘤细胞死亡的方法。

[0066] 本发明的另一方面提供一种治疗患者癌症的方法。所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的本文所述的多特异性结合蛋白。待治疗的癌症可包括急性骨髓性白血病、急性粒单核细胞白血病、B细胞淋巴瘤、膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤、食道癌、尤文氏肉瘤 (Ewing's sarcoma)、滤泡性淋巴瘤、胃癌、胃肠道癌、胃肠道间质肿瘤、胶质母细胞瘤、头颈癌、黑素瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、肾细胞癌、神经母细胞瘤、非小细胞肺癌、神经内分泌肿瘤、卵巢癌和胰腺癌、前列腺癌、肉瘤、小细胞肺癌、T细胞淋巴瘤、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、尿路上皮癌、髓源性抑制细胞浸润的癌症、调节性T细胞浸润的癌症、具有细胞外基质沉积的癌症、具有高水平反应性基质的癌症,以及具有新生血管形成 (neoangiogenesis) 的癌症。

## 附图说明

[0067] 图1A-1C示出多特异性结合蛋白的三种示例性形式,其包括通过铰链与抗体恒定区/结构域连接的scFv。图1A (F3' 形式) 表示三特异性抗体 (TriNKET),其包含靶向肿瘤的scFv或单链TCR (scTCR) 片段、靶向NKG2D的Fab,以及结合CD16的异二聚化的抗体恒定区/结构域 (“CD结构域”)。所述抗体形式在本文称为F3' - TriNKET。图1B (F3形式) 表示包含靶向NKG2D的scFv、靶向肿瘤的Fab或细胞外TCR片段,以及异二聚化的抗体恒定区的抗体。所述抗体形式在本文称为F3 - TriNKET。图1C表示包含靶向NKG2D的scFv、靶向肿瘤的scFv或scTCR片段,以及异二聚化的抗体恒定区的抗体。在某些示例性TriNKET中,与结合NKG2D的抗原结合位点连接的CD结构域上的异二聚化突变包括K360E和K409W;相反CD上的异二聚化突变包括Q347R、D399V和F405T。

[0068] 图2A示出三特异性抗体 (TriNKET),其中第一抗原结合位点或抗原结合性TCR片段结合由主要组织相容性复合物 (MHC) 呈递的肿瘤相关抗原 (诸如此处所示的BCMA) 或其肽;第二抗原结合位点结合NKG2D;并且异二聚化的抗体恒定区结合CD16。在某些示例性TriNKET中,与结合NKG2D的抗原结合位点连接的CD结构域上的异二聚化突变包括K360E和

K409W；相反CD上的异二聚化突变包括Q347R、D399V和F405T。

[0069] 图2B-2C示出三特异性抗体(TriNKET)，其中第一抗原结合位点和第二抗原结合位点，或第一抗原结合性TCR片段和第二抗原结合性TCR片段，结合由相同MHC呈递的相同肿瘤相关抗原(诸如此处所示的BCMA)或来自肿瘤相关抗原的相同肽；第三抗原结合位点结合NKG2D；并且异二聚化的抗体恒定区结合CD16。这些抗体形式在本文称为F4-TriNKET。在某些示例性TriNKET中，与结合NKG2D的抗原结合位点连接的CD结构域上的异二聚化突变包括K360E和K409W；相反CD上的异二聚化突变包括Q347R、D399V和F405T。图2B示出呈Fab形式的前两个抗原结合位点。图2C示出呈scFv形式的前两个抗原结合位点。

[0070] 图3A-3C示出在37°C下进行的加速稳定性研究的结果，其中发现F3'-TriNKET在4周内是稳定的。

[0071] 图4示出纯化的F3'-TriNKET在低pH保持期间是稳定的。

[0072] 图5A和图5B示出无论pH如何，纯化的F3'-TriNKET在5个冻-融循环后都是稳定的(图5A示出在PBS中的冻-融循环，并且图5B示出在pH 5.5的柠檬酸盐中的冻-融循环)。

[0073] 图6示出其中F3'-TriNKET保持稳定的强制降解条件的条形图。

[0074] 图7示出F3'-TriNKET-HER2或曲妥珠单抗(Trastuzumab)与HER2+Colo-201细胞的结合。

[0075] 图8示出F3'-TriNKET-CD33或CD33单克隆抗体与在Molm-13细胞上表达的CD33的结合。

[0076] 图9和图10分别示出F3'-TriNKET-HER2介导的对HER2低表达细胞系(HER2-low cell line)786-0和HER2高表达细胞系(HER2-high cell line)SkBr-3的细胞毒性。

[0077] 图11和图12分别示出F3'-TriNKET-CD33介导的对两种CD33阳性人细胞系EOL-1和THP-1的细胞毒性。

[0078] 图13A示出与Fc γ RIa结合的F3'-TriNKET-HER2类似于赫赛汀(Herceptin)。

[0079] 图13B示出与Fc γ RIIa结合的F3'-TriNKET-HER2类似于赫赛汀。图13C示出与Fc γ RIIIa 158V结合的F3'-TriNKET-HER2类似于赫赛汀。

[0080] 图14A示出与人HER2结合的F3'-TriNKET-HER2(其中HER2结合子(binder)是scFv)类似于赫赛汀(其中HER2结合子是Fab)。图14B示出与人CD33结合的F3'-TriNKET-CD33(其中CD33结合子是scFv)类似于CD33单克隆抗体(其中CD33结合子是Fab)。

[0081] 图15示出F3-TriNKET-BCMA的两步纯化实现99%的纯度。

[0082] 图16示出F3-TriNKET-CD33同时高效衔接NKG2D和CD33靶标。

[0083] 图17示出F3-TriNKET-BCMA同时高效衔接NKG2D和BCMA靶标。

[0084] 图18A示出F3-TriNKET形式持续至少长达14天是稳定的。图18B示出F3-TriNKET形式在低pH保持后是稳定的。图18C示出F3-TriNKET形式在至少多达5个冻-融循环之后是稳定的。

[0085] 图19是示出具有不同的NKG2D结合结构域的靶向BCMA的F4-TriNKET增强KMS12-PE骨髓瘤细胞的人NK细胞裂解的线图。

[0086] 图20是示出具有不同的NKG2D结合结构域的靶向BCMA的F4-TriNKET增强MM.1R骨髓瘤细胞的人NK细胞裂解的线图。

[0087] 图21是示出F4-TriNKET、duobody-TriNKET和BCMA单克隆抗体与MM.1R骨髓瘤细胞

的结合的线图。

[0088] 图22是示出与F4-TriNKET一起孵育随时间推移增加表面BCMA表达的FACS。

[0089] 图23是示出F4-TriNKET使表面BCMA稳定的线图。

[0090] 图24是示出在不同浓度下,经30小时,具有A49结合子的靶向BCMA的F4-TriNKET介导比Duobody-TriNKET更有效的KMS12-PE骨髓瘤细胞的杀伤的条形图。

[0091] 图25是示出在不同浓度下,经30小时,具有A49结合子的靶向BCMA的F4-TriNKET介导比Duobody-TriNKET更有效的MM.1S骨髓瘤细胞的杀伤的条形图。

## 具体实施方式

[0092] 本发明提供对通过铰链序列与抗体恒定结构域连接的单链可变片段(scFv)的改进。铰链序列提供scFv与抗原结合的灵活性。本发明还提供了包括一个或多个scFv的多特异性结合蛋白,其中多特异性结合蛋白结合自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体,以及肿瘤相关抗原。本发明还提供了多特异性结合蛋白,其包含与相同肿瘤相关抗原结合的两个肿瘤相关抗原结合位点,并结合自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体。还提供了包含此类多特异性结合蛋白的药物组合物,以及使用此类多特异性结合蛋白和药物组合物的治疗方法,出于诸如治疗癌症的目的。本发明的各个方面在以下部分中阐述;然而,在一个特定部分中描述的本发明的方面不限于任何特定部分。

[0093] 为了有助于理解本发明,在下文定义多个术语和短语。

[0094] 除非上下文不合适,否则如本文所用的术语“一个/种(a和an)”意指“一个/种或多个/种”并且包括复数个/种。

[0095] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”是指待通过本文所述的方法和组合物治疗的生物体。此类生物体优选包括但不限于哺乳动物(例如,鼠、猿、马、牛、猪、犬、猫等),并且更优选包括人。

[0096] 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端可变(“V”)区的氨基酸残基形成。重链和轻链的V区内的三个高度差异链段(hightly divergent stretches)称为“高变区”,其插置在被称为“框架区”或“FR”的更为保守的侧翼链段之间。因此,术语“FR”是指天然存在于免疫球蛋白中的高变区之间且与其邻近的氨基酸序列。在人抗体分子中,轻链的三个高变区和重链的三个高变区在三维空间中相对于彼此设置以形成抗原结合表面。抗原结合表面与所结合抗原的三维表面互补,并且重链和轻链中的每一个的三个高变区被称为“互补决定区”或“CDR”。在某些动物,诸如骆驼和软骨鱼中,抗原结合位点由单个抗体链形成,从而提供“单结构域抗体”。抗原结合位点可以存在于完整抗体中,存在于抗体的保留抗原结合表面的抗原结合片段中,或存在于在单个多肽中使用肽接头将重链可变结构域与轻链可变结构域连接的重组多肽诸如scFv中。

[0097] 如本文所用,术语“抗原结合性T细胞受体片段”和“抗原结合性TCR片段”可互换使用,并且是指结合同源抗原的T细胞受体(TCR)的部分。在人 $\alpha\beta$ TCR中,抗原结合性TCR片段包含 $\alpha$ 链可变结构域( $V\alpha$ )和 $\beta$ 链可变结构域( $V\beta$ ),其各自包含三个互补决定区(CDR)。被称为 $CDR3\alpha$ 和 $CDR3\beta$ 的高变环占据了用于结合抗原肽的中心位置;种系编码的 $CDR1\alpha$ 、 $CDR2\alpha$ 、 $CDR1\beta$ 和 $CDR2\beta$ 环与呈递抗原肽的MHC接触最多。在人 $\gamma\delta$ TCR中,抗原结合性TCR片段包含 $\gamma$ 链可

变结构域( $V\gamma$ )和 $\delta$ 链可变结构域( $V\delta$ )，其各自包含三个CDR。人 $\gamma\delta$ TCR识别由MHC或MHC相关分子(例如,CD1、内皮蛋白C受体(EPCR)或MHC I类多肽相关序列A(MICA))呈递的抗原(例如,肽或脂质)。应当理解,其他蛋白质,诸如F1-ATP酶,也可向 $\gamma\delta$ TCR呈递抗原。抗原结合性TCR片段可以存在于完整TCR中,存在于具有通过二硫键连接的TCR链的工程改造的TCR中,存在于完整或工程改造的TCR的保留抗原结合表面的抗原结合片段中,或存在于具有在单个多肽中通过肽接头连接的TCR的可变结构域(例如, $V\alpha$ 和 $V\beta$ )的重组多肽中。抗原结合性TCR片段的非限制性实例包括这样的TCR片段,其包含TCR的可变结构域(例如, $V\alpha$ 和 $V\beta$ )和恒定结构域(例如, $C\alpha$ 和 $C\beta$ )，但是缺乏其连接区、跨膜区和细胞质区,在本文称为“细胞外TCR片段”,以及通过肽接头连接的TCR的可变区(例如, $V\alpha$ 和 $V\beta$ ),在本文称为“单链TCR(scTCR)片段”。

[0098] 如本文所用,术语“有效量”是指足以实现有益或期望结果的化合物(例如,本发明的化合物)的量。有效量可以一次或多次施用、施加或给药来施用,并且不意图限于具体制剂或施用途径。如本文所用,术语“治疗”包括导致病状、疾病、病症等的改善或缓解其症状的任何效应,例如减轻、减少、调节、缓解或消除。

[0099] 如本文所用,术语“药物组合物”是指活性剂与惰性或活性载剂的组合,其使组合物尤其适于体内或离体的诊断或治疗用途。

[0100] 如本文所用,术语“药学上可接受的载剂”是指任何标准的药物载剂,诸如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液(例如像水包油或油包水型乳液)以及各种类型的润湿剂。组合物还可以包含稳定剂和防腐剂。关于载剂、稳定剂和佐剂的实例,参见例如Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences,第15版,Mack Publ. Co., Easton, PA[1975]。

[0101] 贯穿本说明书,在组合物被描述为具有、包括或包含特定组分的情况下,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,设想到,另外,还存在基本由或由列举出的组分组成的本发明的组合物,并且还存在基本由或由列举出的加工步骤组成的根据本发明的工艺和方法。

[0102] 一般情况下,除非另有说明,否则指定百分比的组合物以重量计。此外,如果变量没有定义,则以变量的先前定义为准。

### [0103] I. 蛋白质

[0104] 本发明提供对通过铰链序列与抗体恒定结构域连接的单链可变片段(scFv)的改进。在一些实施方案中,铰链包含氨基酸Ala-Ser。在一些其他实施方案中,铰链包含氨基酸Ala-Ser和Thr-Lys-Gly。scFv可包括重链可变结构域和轻链可变结构域。在一些实施方案中,scFv结合NKG2D或肿瘤相关抗原。铰链序列提供scFv与靶抗原结合的灵活性。

[0105] 在scFv的一些实施方案中,重链可变结构域与轻链可变结构域形成二硫桥,以提高scFv的稳定性。例如,可以在重链可变结构域的C44残基与轻链可变结构域的C100残基之间形成二硫桥。在一些实施方案中,重链可变结构域通过柔性接头与轻链可变结构域连接。可以使用任何合适的接头,例如,(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>接头。在scFv的一些实施方案中,重链可变结构域位于轻链可变结构域的N端。在scFv的一些实施方案中,重链可变结构域位于轻链可变结构域的C端。

[0106] 在一些实施方案中,与scFv连接的抗体恒定结构域可以衍生自与CD16结合的任何物种的抗体的恒定区。在一些实施方案中,恒定区的氨基酸序列与人抗体恒定区具有至少

90%的同一性,所述人抗体恒定区诸如人IgG1恒定区、IgG2恒定区、IgG3恒定区或IgG4恒定区。在一些其他实施方案中,恒定区的氨基酸序列与来自另一哺乳动物(诸如兔、狗、猫、小鼠或马)的抗体恒定区具有至少90%的同一性。在一些实施方案中,抗体恒定区包括铰链、CH2结构域、CH3结构域和任选的CH1结构域。在一些实施方案中,包括铰链、CH2结构域、CH3结构域和任选的CH1结构域的抗体恒定区衍生自人IgG1抗体。在一些实施方案中,抗体恒定区包括与人IgG1抗体的氨基酸234-332具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0107] 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CH2结构域中的氨基酸残基Asp 265-Glu 269、Asn 297-Thr 299、Ala 327-Ile 332、Leu 234-Ser 239和碳水化合物残基N-乙酰基-D-葡萄糖胺处(参见,Sondermann等,Nature,406(6793):267-273)。基于已知结构域,可以选择突变来增强或降低与CD16的结合亲和力,诸如通过使用噬菌体展示文库或酵母表面展示cDNA文库,或可以基于相互作用的已知三维结构进行设计。

[0108] 在一些实施方案中,抗体恒定结构域包含IgG抗体例如人IgG1抗体的CH2结构域和CH3结构域。在一些实施方案中,将突变引入抗体恒定结构域中,使其能够与另一抗体恒定结构域异二聚化。例如,如果抗体恒定结构域衍生自人IgG1的恒定结构域,那么所述抗体恒定结构域可以包含与人IgG1抗体的氨基酸234-332具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且在选自由以下组成的组的一个或多个位置上有所不同:Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411和K439。在一些实施方案中,抗体恒定结构域可以包含与人IgG1抗体的氨基酸234-332具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且不同之处在于选自由以下组成的组的一个或多个取代: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、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、T411D、T411E、K439D和K439E。

[0109] 下面列出与抗体恒定区连接的scFv的实例,所述抗体恒定区也包括能够使两条多肽链异二聚化的突变。使用来自曲妥珠单抗的含有重链可变结构域( $V_H$ )和轻链可变结构域( $V_L$ )的scFv作为实例。每个序列表示含有异二聚化突变(加有下划线)的 $V_L$ - $(G_4S)_4$ - $V_H$ -铰链(AS)-Fc。 $V_L$ 和 $V_H$ 包含44 $V_H$ -100 $V_L$  S-S桥(加有下划线),并且可以来自任何靶向肿瘤的抗体或NKG2D结合抗体。肘关节铰链(elbow hinge)区域序列包括Ala-Ser(AS,加有下划线),以在柔韧性与最佳几何形状之间取得平衡。在某些实施方案中,可以在铰链处将附加序列Thr-Lys-Gly添加至AS序列。 $(G_4S)_4$ 接头在以下段落列出的序列中加有下划线。

[0110] 曲妥珠单抗-scFv-Fc A1和曲妥珠单抗-scFv-Fc B1可以优先配对并形成异二聚体。曲妥珠单抗-scFv-Fc A2和曲妥珠单抗-scFv-Fc B2可以优先配对并形成异二聚体。

[0111] 曲妥珠单抗-scFv-Fc A1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG  
VPSRSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGCGTKVEIK

**GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKCLEWVARIYPTNG  
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYW  
GQGTLTVSS

[0112]

**AS**

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
YKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
(SEQ ID NO:303)

[0113]

曲妥珠单抗-scFv-Fc B1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG  
VPSRSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGCGTKVEIK

**GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKCLEWVARIYPTNG  
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYW  
GQGTLTVSS

[0114]

**AS**

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
YKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
(SEQ ID NO:304)

[0115]

曲妥珠单抗-scFv-Fc A2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG  
VPSRSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGCGTKVEIK

**GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKCLEWVARIYPTNG  
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYW  
GQGTLTVSS

[0116]

**AS**

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPVCTLPPSRDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
YKTPVLDSDGSFFLYSWLTVVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
(SEQ ID NO:305)

[0117]

曲妥珠单抗-scFv-Fc B2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG  
VPSRSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGCGTKVEIK

**GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKCLEWVARIYPTNG  
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYW  
GQGTLTVSS

[0118]

**AS**

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
YKTPVLYSVDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
(SEQ ID NO:306)

[0119] 在另一方面,本发明提供了一种蛋白质,其包含上述与抗体恒定区连接的scFv。在一些实施方案中,所述蛋白质包括第一抗原结合位点,其包含与抗体恒定结构域连接的

scFv；第二抗原结合位点，其可采取Fab或scFv形式；以及与第二抗原结合位点连接的第二抗体恒定结构域。在一些实施方案中，所述蛋白质是多特异性的，其中第一抗原结合位点结合NKG2D，呈Fab形式的第二抗原结合位点结合肿瘤相关抗原，并且抗体恒定区结合CD16（在本文称为F3-TriNKET，如图1B所示）。在一些其他实施方案中，所述蛋白质是多特异性的，其中第一抗原结合位点结合肿瘤相关抗原，呈Fab形式的第二抗原结合位点结合NKG2D，并且抗体恒定区结合CD16（在本文称为F3'-TriNKET，如图1A所示）。与scFv连接的抗体恒定区与本文所述的蛋白质的第二抗原结合位点的抗体恒定区异二聚化。本文所述的包括scFv的多特异性结合蛋白可以采取如图1A-1C所示的若干形式。

[0120] 多特异性结合蛋白可以结合表达NKG2D受体的细胞，其可以包括但不限于NK细胞、 $\gamma\delta$ T细胞和CD8<sup>+</sup> $\alpha\beta$ T细胞。在NKG2D结合后，多特异性结合蛋白可阻断天然配体，诸如ULBP6和MICA，与NKG2D的结合并激活NKG2D受体。

[0121] 多特异性结合蛋白结合表达CD16的细胞，CD16是白细胞表面上的Fc受体，所述白细胞包括自然杀伤细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞和滤泡树突状细胞。

[0122] 在与自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体以及癌细胞上的肿瘤相关抗原结合后，多特异性结合蛋白可以衔接多于一种NK激活受体，并可阻断天然配体与NKG2D的结合。在某些实施方案中，所述蛋白质可以在人中激动NK细胞。在一些实施方案中，所述蛋白质可以在人和其他物种诸如啮齿动物和食蟹猴中激动NK细胞。

[0123] 在本发明的某些实施方案中，多特异性结合蛋白包含结合肿瘤相关抗原的第一抗原结合位点；与第一抗原结合位点结合相同的肿瘤相关抗原的第二抗原结合位点；结合NKG2D的第三抗原结合位点；以及抗体恒定区或其足以结合CD16的部分，或结合CD16的第四抗原结合位点。抗原结合位点中的任一个可以采取Fab或scFv的形式。示例性形式在图2B-2C中示出。scFv的V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>和V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>取向都是本公开的实施方案。

[0124] 在某些实施方案中，与相同的肿瘤相关抗原结合的第一抗原结合位点或第二抗原结合位点是scFv，并且结合NKG2D的第三抗原结合位点是scFv。在某些实施方案中，与相同的肿瘤相关抗原结合的第一抗原结合位点和第二抗原结合位点各自是scFv，并且结合NKG2D的第三抗原结合位点是scFv。在某些实施方案中，与相同的肿瘤相关抗原结合的第一抗原结合位点或第二抗原结合位点是Fab，并且结合NKG2D的第三抗原结合位点是scFv。在某些实施方案中，与相同的肿瘤相关抗原结合的第一抗原结合位点和第二抗原结合位点各自是Fab，并且结合NKG2D的第三抗原结合位点是scFv。在某些实施方案中，本公开的F4-TriNKET的第一抗原结合位点和第二抗原结合位点具有相同的氨基酸序列。

[0125] 在其他实施方案中，本文公开的多特异性结合蛋白包含结合肿瘤相关抗原的第一抗原结合位点；结合不同抗原的第二抗原结合位点；结合NKG2D的第三抗原结合位点；以及抗体恒定区或其足以结合CD16的部分，或结合CD16的第四抗原结合位点。抗原结合位点中的任一个可以采取Fab或scFv的形式（以VH-VL或VL-VH取向）。在某些实施方案中，与两种不同抗原结合的第一抗原结合位点或第二抗原结合位点是scFv，并且结合NKG2D的第三抗原结合位点是scFv。在某些实施方案中，与两种不同抗原结合的第一抗原结合位点和第二抗原结合位点各自是scFv，并且结合NKG2D的第三抗原结合位点是scFv。在某些实施方案中，与两种不同抗原结合的第一抗原结合位点或第二抗原结合位点是Fab，并且结合NKG2D的第

三抗原结合位点是scFv。在某些实施方案中,与两种不同抗原结合的第一抗原结合位点和第二抗原结合位点各自是Fab,并且结合NKG2D的第三抗原结合位点是scFv。

[0126] 在某些实施方案中,此处提供的多特异性结合蛋白(在本文称为F4-TriNKET)提供肿瘤相关抗原的二价衔接,从而稳定并维持癌细胞表面上的肿瘤相关抗原,并增强NK细胞对癌细胞的细胞毒性。在一些实施方案中,多特异性结合蛋白对肿瘤相关抗原的二价衔接赋予多特异性结合蛋白对癌细胞更高的亲合力,从而促进NK细胞对癌细胞,尤其是对表达低水平的肿瘤相关抗原的癌细胞的更强的细胞毒性反应。

[0127] 本发明还提供一种多特异性结合蛋白,其包含(a)结合NKG2D的抗原结合位点;(b)抗原结合性TCR片段;以及(c)抗体恒定区或其足以结合CD16的部分,或结合CD16的另外的抗原结合位点。在某些实施方案中,抗原结合性TCR片段结合由MHC呈递的来自肿瘤相关抗原(TAA)的肽,例如,由人白细胞抗原(HLA)呈递的来自人肿瘤相关抗原的肽。元件(b)可以各种形式(例如,可溶形式)存在,诸如细胞外TCR片段或scTCR片段。元件(a)和(c)可以各种形式存在和/或包含以上公开的各种突变。例如,在某些实施方案中,元件(c)是抗体恒定区或其足以结合CD16的部分,所述抗体恒定区或其部分包含(i)与结合NKG2D的抗原结合位点连接的第一抗体恒定结构域,以及(ii)与抗原结合性TCR片段连接的第二抗体恒定结构域,其中第一和第二抗体恒定结构域可以异二聚化。

[0128] 在某些实施方案中,抗原结合位点是Fab片段,并且抗原结合性TCR片段是scTCR片段。考虑到其NKG2D结合部分是Fab并且其TAA结合部分包含在单链中通过肽接头连接的可变结构域(类似于多特异性结合蛋白,所述多特异性结合蛋白包含第一抗原结合位点,其包含与抗体恒定结构域连接的scFv;第二抗原结合位点,其采取Fab的形式;以及与第二抗原结合位点连接的第二抗体恒定结构域,其中第一抗原结合位点结合肿瘤相关抗原,第二抗原结合位点结合NKG2D,并且抗体恒定区结合CD16),此多特异性结合蛋白的形式在本文也称为F3'-TriNKET,如图1A所示。

[0129] 在某些实施方案中,抗原结合位点是scFv,并且抗原结合性TCR片段是细胞外TCR片段。考虑到其NKG2D结合部分是scFv并且其TAA结合部分包含可变结构域和恒定结构域(类似于多特异性结合蛋白,所述多特异性结合蛋白包含第一抗原结合位点,其包含与抗体恒定结构域连接的scFv;第二抗原结合位点,其采取Fab的形式;以及与第二抗原结合位点连接的第二抗体恒定结构域,其中第一抗原结合位点结合NKG2D,第二抗原结合位点结合肿瘤相关抗原,并且抗体恒定区结合CD16),此多特异性结合蛋白的形式在本文也称为F3-TriNKET,如图1B所示。

[0130] 在某些实施方案中,抗原结合位点是scFv,并且抗原结合性TCR片段是scTCR片段。这种形式在图1C中示出。在某些实施方案中,抗原结合位点是Fab,并且抗原结合性TCR片段是细胞外TCR片段。这种形式在图2A中示出。

[0131] 在某些实施方案中,多特异性结合蛋白包含结合抗原(例如,由MHC呈递的TAA肽)的第一抗原结合性TCR片段;与第一抗原结合性TCR片段结合相同抗原的第二抗原结合性TCR片段;结合NKG2D的抗原结合位点;以及抗体恒定区或其足以结合CD16的部分,或结合CD16的第四抗原结合位点。可替代地,预期第一抗原结合性TCR片段和第二抗原结合性TCR片段可以结合由相同或不同MHC呈递的两种不同的TAA肽。抗原结合位点中的任一个可以采取Fab或scFv的形式。第一和第二抗原结合性TCR片段可以采取细胞外TCR片段或scTCR片段

的形式。提供抗原(例如,由MHC呈递的TAA肽)的二价衔接的示例性形式在本文称为F4-TriNKET,并且在图2B-2C中示出。

[0132] 在某些实施方案中,本公开的F4-TriNKET的第一抗原结合性TCR片段和第二抗原结合性TCR片段结合由相同MHC呈递的相同TAA肽。在某些实施方案中,第一抗原结合性TCR片段或第二抗原结合性TCR片段是scFv。在某些实施方案中,第一抗原结合性TCR片段和第二抗原结合性TCR片段各自是scFv。在某些实施方案中,第一抗原结合性TCR片段或第二抗原结合性TCR片段是Fab。在某些实施方案中,第一抗原结合性TCR片段和第二抗原结合性TCR片段各自是Fab。

[0133] 此处提供的具有抗原结合性TCR片段的F4-TriNKET提供抗原(例如,由MHC呈递的TAA肽)的二价衔接,从而稳定并维持癌细胞表面上的TAA肽,并增强NK细胞对癌细胞的细胞毒性。在一些实施方案中,多特异性结合蛋白对TAA肽的二价衔接赋予多特异性结合蛋白对癌细胞更高的亲合力,从而促进NK细胞对癌细胞,尤其是对呈递低水平的TAA肽的癌细胞的更强的细胞毒性反应。

[0134] 应当理解,在本发明的蛋白质包含scFv的情况下, $V_H$ 可以位于 $V_L$ 的C端或N端。类似地,在本发明的蛋白质包含scTCR片段的情况下, $V\alpha$ 可以位于 $V\beta$ 的C端或N端。

[0135] 本文列出可以掺入F3/F3'和F4-TriNKET中的NKG2D结合位点和肿瘤相关抗原结合位点或抗原结合性TCR片段的示例性序列。

[0136] NKG2D结合位点

[0137] 表1列出可以组合地结合NKG2D的重链可变结构域和轻链可变结构域的肽序列。除非另外指明,否则表1提供的CDR序列是根据Kabat确定的。在一些实施方案中,重链可变结构域和轻链可变结构域被布置成Fab形式。在一些实施方案中,重链可变结构域和轻链可变结构域融合在一起形成scFv。

[0138] NKG2D结合结构域在其与NKG2D的结合亲和力方面可以变化,尽管如此,它们全部激活人NKG2D和NK细胞。

表1		
克隆	重链可变区氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列
[0139]	<p>ADI-27705</p> <p>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:1)</p> <p>CDR1: GSFSGYYWS (非 Kabat) (SEQ ID NO:3) 或 GYYWS (SEQ ID NO:307)</p> <p>CDR2: EIDHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:4)</p> <p>CDR3: ARARGPWSFDP (非 Kabat) (SEQ ID NO:5) 或 ARGPWSFDP (SEQ ID NO:308)</p>	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTSSLQPDDFATYYC QQYNSYPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2)</p>
	<p>ADI-27724</p> <p>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:6)</p>	<p>EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG SGTDFLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:7)</p>
	<p>ADI-27740 (A40)</p> <p>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSK</p>	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSGS</p>

	NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:8)	GSGTEFTLTISLQPDDFATYY CQQYHSFYTFGGTKVEIK (SEQ ID NO:9)	
ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:10)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISLQPDDFATYY CQQSNSYYTFGGTKVEIK (SEQ ID NO:11)	
ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:12)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDDFATYYC QQYNSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:13)	
[0140]	ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:14)	ELQMTQSPSSLASVGDRVITIT CRTSQSISSYLNWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDFRGSG SGTDFLTISLQPEDSATYYC QQSYDIPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:15)
	ADI-28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:16)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDDFATYYC QQYGSFPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:17)
	ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:18)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTDFLTISLQPDDFATYYC QQSKEVPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:19)

[0141]

ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:20)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDDFATYYC QQYNSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:21)
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:22)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISLQPDDFATYY CQQYDIYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:23)
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:24)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDDFATYYC QQYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:25)
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:26)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDDFATYYC QQYGSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:27)
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:28)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDDFATYYC QQYQSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:29)
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVTISVDTSK	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG

	NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:30)	SGTEFTLTISLQPDDFATYYC QQYSSFSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:31)	
ADI-29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:32)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDDFATYYC QQYESYSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:33)	
ADI-29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:34)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDDFATYYC QQYDSFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:35)	
[0142]	ADI-29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:36)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDDFATYYC QQYQSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:37)
	ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:38)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISLQPDDFATYY CQQYHSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:39)
	ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:40)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISLQPDDFATYY CQQYELEYSYTFGGGTKEIK (SEQ ID NO:41)

	ADI-29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:42)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTSSLQPDDFATYYC QQYDTFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:43)
[0143]	ADI-27727	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKA SGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWM GGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARG DSSIRHAYYYYGMDVWGQGTTVTV SS (SEQ ID NO:44) CDR1: GTFSSYAIS (非 Kabat) (SEQ ID NO:45) 或 SYAIS (SEQ ID NO:309) CDR2: GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO:46) CDR3: ARGDSSIRHAYYYYGMDV (非 Kabat) (SEQ ID NO:47) 或 GDSSIRHAYYYYGMDV (SEQ ID NO:310)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQYYSTPITFGGGT KVEIK (SEQ ID NO:48) CDR1: KSSQSVLYSSNNKNYL (SEQ ID NO:49) CDR2: WASTRES (SEQ ID NO:50) CDR3: QQYYSTPIT (SEQ ID NO:51)
	ADI-29443 (F43)	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSSSYYWGIRQPPGKGLEWIGS IYYSGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARGSDR FHPYFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:52) CDR1: GSISSSSYYWG (非 Kabat) (SEQ ID NO:53) 或 SSSYYWG (SEQ ID NO:311) CDR2: SIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:54) CDR3: ARGSDRFHPYFDY (非	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSRYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASN RATGIPARFSGS GSGTDFTLTISLEPEDFAVYY CQQFDTWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:56) CDR1: RASQSVSRYLA (SEQ ID NO:57) CDR2: DASN RAT (SEQ ID NO:58) CDR3: QQFDTWPPT (SEQ ID NO:59)

	Kabat) (SEQ ID NO:55) 或 GSDRFHPYFDY (SEQ ID NO:312)	
ADI-29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAR GPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:60)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDDFATYYCE QYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:61)
ADI-28200  [0144]	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKA SGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWM GGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARR GRKASGSFYYYYGMDVWGQGTTV TVSS (SEQ ID NO:62)  CDR1: GTFSSYAI (非Kabat) (SEQ ID NO:63) CDR2: GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO:64) CDR3: ARRGRKASGSFYYYYGMDV (非Kabat) (SEQ ID NO:65)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CESSQSLLNSGNQKNYLTWYQ QKPGQPKPLIYWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISLQAE DVAVYYCQNDYSYPYTFGQG TKLEIK (SEQ ID NO:66)  CDR1: ESSQSLLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO:67) CDR2: WASTRES (SEQ ID NO:68) CDR3: QNDYSYPY (SEQ ID NO:69)
ADI-29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKA SGYTFTSYYMHWRQAPGQGLEW MGIINPSGGSTSQAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA RGAPNYGDTTHDYYMDVWGKGT TVTVSS (SEQ ID NO:70)  CDR1: YTFTSYYMH (非Kabat) (SEQ ID NO:71) 或 SYYMH (SEQ ID NO:313) CDR2: IINPSGGSTSQAQKFQG (SEQ ID NO:72)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGS GSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYDDWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:74)  CDR1: RASQSVSSNL (SEQ ID NO:75) CDR2: GASTRAT (SEQ ID NO:76) CDR3: QQYDDWPFT (SEQ ID NO:77)

	CDR3: ARGAPNYGDTTHDYYYMDV (非Kabat) (SEQ ID NO:73)或 GAPNYGDTTHDYYYMDV (SEQ ID NO:314)	
[0145]	ADI-29463 (F63)  [0145]  ADI-27744 (A44)	CDR1: RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:82) CDR2: GASTRAT (SEQ ID NO:84) CDR3: QQDDYWPP (SEQ ID NO:85)  CDR1: RASQGIDSWLA (SEQ ID NO:91) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:92) CDR3: QQGVSYPR (SEQ ID NO:93)
	EVQLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGGGSTYYADSVKGRTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKD GGYYDSGAGDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:86)  CDR1: FTFSSYAMS (非Kabat) (SEQ ID NO:87)或SYAMS (SEQ ID NO:317) CDR2: AISGGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:88) CDR3: AKDGGYYDSGAGDY (非Kabat) (SEQ ID NO:89)或 DGGYYDSGAGDY (SEQ ID NO:318)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVSSNLA WYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGS GTEFTLTISLQSEDFAVYYCQ QDDYWPPFGGGTKVEIK  DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGIDSWLA WYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQGVSYPR (FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:90)  CDR1: RASQGIDSWLA (SEQ ID NO:91) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:92) CDR3: QQGVSYPR (SEQ ID NO:93)

[0146]	ADI-27749 (A49)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNVVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PMGAAAGWFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:94) CDR1: FTFSSYSMN (非 Kabat) (SEQ ID NO:95) 或 SYSMN (SEQ ID NO:319) CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96) CDR3: ARGAPMGAAAGWFDP (非 Kabat) (SEQ ID NO:97) 或 GAPMGAAAGWFDP (SEQ ID NO:320)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAQYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQGVSFPRTFGGGTKEIK (SEQ ID NO:98) CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100) CDR3: QQGVSFPR (SEQ ID NO:101)
	ADI-29378 (E78)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFTSYMMHWVRQAPGQGLEW MGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMEPLLSEDTAVYYCA REGAGFAYGMDYYYMDVWKGKTT VTVSS (SEQ ID NO:102) CDR1: YTFTSYMH (非 Kabat) (SEQ ID NO:103) 或 SYMH (SEQ ID NO:313) CDR2: IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:104) CDR3: AREGAGFAYGMDYYYMDV (非 Kabat) (SEQ ID NO:105) 或 EGAGFAYGMDYYYMDV (SEQ ID NO:321)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAQYQQKPGQAP RLLIYDASN RATGIPARFSGSG SGTDFTLTISLLEPEDFAVYYC QQSDNWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:106) CDR1 (SEQ ID NO:107) - RASQSVSSYLA CDR2 (SEQ ID NO:108) - DASN RAT CDR3 (SEQ ID NO:109) - QQSDNWPFT
	A49MI	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNVVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAK	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAQYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG

[0147]

	<p>NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PIGAAAGWFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:322)</p> <p>CDR1: FTFSSYSMN (非 Kabat) (SEQ ID NO:95)或 SYSMN (SEQ ID NO:319)</p> <p>CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96)</p> <p>CDR3: ARGAPIGAAAGWFDP (非 Kabat) (SEQ ID NO:323)或 GAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO:324)</p>	<p>SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98)</p> <p>CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100)</p> <p>CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)</p>
A49MQ	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PQGAAAGWFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:325)</p> <p>CDR1: FTFSSYSMN (非 Kabat) (SEQ ID NO:95)或 SYSMN (SEQ ID NO:319)</p> <p>CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96)</p> <p>CDR3: ARGAPQGAAAGWFDP (非 Kabat) (SEQ ID NO:326)或 GAPQGAAAGWFDP (SEQ ID NO:327)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAQYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98)</p> <p>CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100)</p> <p>CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)</p>
A49ML	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PLGAAAGWFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:328)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAQYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98)</p>

[0148]

	<p>CDR1: FTFSSYSMN (非Kabat) (SEQ ID NO:95)或SYSMN (SEQ ID NO:319)</p> <p>CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96)</p> <p>CDR3: ARGAPLGAAAGWFDP (非 Kabat) (SEQ ID NO:329)或 GAPLGAAAGWFDP (SEQ ID NO:330)</p>	<p>CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100)</p> <p>CDR3: QQGVSFPR (SEQ ID NO:101)</p>
A49MF	<p>EVQLVESGGGLVKPGGLSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PFGAAAGWFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:331)</p> <p>CDR1: FTFSSYSMN (非 Kabat) (SEQ ID NO:95)或SYSMN (SEQ ID NO:319)</p> <p>CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96)</p> <p>CDR3: ARGAPFGAAAGWFDP (非 Kabat) (SEQ ID NO:332)或 GAPFGAAAGWFDP (SEQ ID NO:333)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVIT CRASQGISSWLAQYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQGVSFPRTFGGGTKEIK (SEQ ID NO:98)</p> <p>CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100)</p> <p>CDR3: QQGVSFPR (SEQ ID NO:101)</p>
A49MV	<p>EVQLVESGGGLVKPGGLSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PVGAAAGWFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:334)</p> <p>CDR1: FTFSSYSMN (非Kabat) (SEQ ID NO:95)或SYSMN (SEQ ID NO:319)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVIT CRASQGISSWLAQYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQGVSFPRTFGGGTKEIK (SEQ ID NO:98)</p> <p>CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100)</p>

	CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96)  CDR3: ARGAPVGAAAGWFDP (非 Kabat) (SEQ ID NO:335) 或 GAPVGAAAGWFDP (SEQ ID NO:336)	CDR3: QQGVSFPR (SEQ ID NO:101)
[0149]	A49-consensus  EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PXGAAAGWFDPWGQGTLTVSS, 其中X为M、L、I、V、Q或F (SEQ ID NO:337)  CDR1: FTFSSYSMN (非 Kabat) (SEQ ID NO:95) 或 SYSMN (SEQ ID NO:319)  CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96)  CDR3: ARGAPXGAAAGWFDP, 其中X为M、L、I、V、Q或F (非 Kabat) (SEQ ID NO:338) 或 GAPXGAAAGWFDP, 其中X为M、 L、I、V、Q或F (SEQ ID NO:339)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAQYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQGVSFPRTFGGGTKEIK (SEQ ID NO:98)  CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99)  CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100)  CDR3: QQGVSFPR (SEQ ID NO:101)

[0150] 可替代地,通过SEQ ID NO:110表示的重链可变结构域可以与通过SEQ ID NO:111表示的轻链可变结构域配对,以形成可以结合NKG2D的抗原结合位点,如US 9,273,136中所示。

[0151] SEQ ID NO:110

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGS

[0152] NKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGYFDYW  
QQGTTVTVSS

[0153] SEQ ID NO:111

QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQLPGKAPKLLIYYDDLLPSG  
VSDRFSGSKSGTS AFLAISGLQSEDEADYYCAA WDDSLNGPVFGGGTKLTVL

[0155] 可替代地,通过SEQ ID NO:112表示的重链可变结构域可以与通过SEQ ID NO:113表示的轻链可变结构域配对,以形成可以结合NKG2D的抗原结合位点,如US 7,879,985中所示。

[0156] SEQ ID NO:112

QVHLQESGPGLVKPSETSLTCTVSDDSISYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGSAN

[0157] YNPSLKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQQGTMVTVS  
S

[0158] SEQ ID NO:113

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI  
[0159] PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGGSSPWTFGQQGKVEIK

[0160] 肿瘤相关抗原结合位点

[0161] 本文所用的肿瘤相关抗原是指与癌症相关的任何抗原,包括但不限于蛋白质、糖蛋白、神经节苷脂、碳水化合物、脂质。这样的抗原可以在恶性细胞上或在肿瘤微环境中表达,诸如在肿瘤相关的血管、细胞外基质、间充质基质(mesenchymal stroma)或免疫浸润物上表达。例如,肿瘤相关抗原可以包括在癌细胞上表达的AN01、BCMA、EpCAM、CAIX、CEA、CCR4、CD2、CD123、CD133、CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CLAUDIN-18.2、DLL3、EGFR/ERBB1、GD2、IGF1R、HER2、HER3/ERBB3、HER4/ERBB4、MUC1、cMET、SLAMF7、PSMA、间皮素、MICA、MICB、TRAILR1、TRAILR2、TROP2、MAGE-A3、B7.1、B7.2、CTLA4、PD1、5T4、GPNMB、FR- $\alpha$ 、PAPP-A、FLT3、GPC3、CXCR4、ROR1、ROR2、HLA-E、PD-L1、VLA4、CD44、CD13、CD15、CD47、CLL1、CD81、CD23、CD79a、CD79b、CD80、CRLF2、SLAMF7、CD138、CA125、NaPi2b、结合素4、ADAM8、ADAM9、SLC44A4、CA19-9、LILRB1、LILRB2、LILRB3、LILRB4、LILRB5、ULRA 1、LILRA2、LILRA3、ULRA4、LILRA5和ULRA6、CCR8、CD7、CTLA4、CX3CR1、ENTPD1、HAVCR2、IL-1R2、PD-1LG2、TIGIT、TNFRSF4、TNFRSF8、TNFRSF9、GEM、NT5E、TNFRSF18、MUC1、P-钙粘素、丛状蛋白-A1、TNFRSF10B、STEAP1、CDCP1、PTK7、Ax1、erbB-3、EDNRB、Tyrp1、CD14、CD163、CSF3R、Siglec-9、ITGAM、VISTA、B7-H4 (VTCN1)、CCR1、LRRC25、PTAFR、SIRPB1、TLR2、TLR4、CD300LB、ATP1A3、CCR5、MUC1 (或MUC1-C)、丛状蛋白-A1、TNFRSF10B、STEAP1、CDCP1、PTK7、AXL、EDNRB、OLR1和TYRP1。

[0162] 可以开发肿瘤相关抗原结合位点以结合任何肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,肿瘤相关抗原结合位点包括重链可变结构域和轻链可变结构域,它们可以配对以结合肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,重链可变结构域和轻链可变结构域被布置成Fab形式。在一些实施方案中,重链可变结构域和轻链可变结构域融合在一起形成scFv。示例性的肿瘤相关抗原结合位点在下面列出。

[0163] 表2列出可以组合地结合BCMA的重链可变结构域和轻链可变结构域的肽序列。

[0164]

表2		
克隆	重链可变结构域肽 序列	轻链可变结构域肽 序列
1 (US14/776, 649)	<p>QVQLVQSGAEVKPGASVKVSC KASGYSFPDYYINWVRQAPGQGL EWMGWIYFASGNSEYNQKFTGR VTMTRDTSSSTAYMELSSLRSEDT AVYFCASLYDYDWYFDVVGQGT MVTVSS (SEQ ID NO:114)</p> <p>CDR1(SEQ ID NO:115) - DYYIN CDR2 (SEQ ID NO:116) - WIYFASGNSEYNQKFTG CDR3 (SEQ ID NO:117) - LYDYDWYFDV</p>	<p>DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCKS SQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ SPQLLIYKVSNRFSGVPDFRSGS SGADFTLKISRVEAEDVGVYYCA ETSHVPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:118) 或 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCK SSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPG QSPQLLIYKVSNRFSGVPDFRSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCS QSSIYPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:119) CDR1(SEQ ID NO:120) - KSSQSLVHSNGNTYLH CDR2 (SEQ ID NO:121) - KVSNRFS</p>

		CDR3 - AETSHVPWT (SEQ ID NO:122)或SQSSIYPWT (SEQ ID NO:123)	
[0165]	2 (PCT/US15 /64269)	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKA SGYTFTDYSINWVKRAPGKGLK WMGWINTETREPAYAYDFRGRF AFSLETSASTAYLQINNLKYEDTA TYFCALDYSYAMDYWGQGTSVT VSS (SEQ ID NO:124) CDR1 (SEQ ID NO:125) - DYSIN CDR2 (SEQ ID NO:126) - WINETREPAYAYDFR CDR3 (SEQ ID NO:127) - DYSYAMDY	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCR ASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPP TLLIQLASNQVTGVPARFSGSGSR TDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQS RTIPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:128) CDR1 (SEQ ID NO:129) - RASESVTILGSHLIH CDR2 (SEQ ID NO:130) - LASNVQT CDR3 (SEQ ID NO:131) - LQSRTIPRT
	3 (US14/122, 391)	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCK ASGGTFSNYWMHWVRQAPGQGL EWMGATYRGHSDTYYNQKFKG VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDT AVYYCARGAIYNGYDVLDNWGQ GTLTVVSS (SEQ ID NO:132) CDR1 (SEQ ID NO:133) - NYWMH CDR2 (SEQ ID NO:134) - ATYRGHSDTYYNQKFKG CDR3 (SEQ ID NO:135) - GAIYNGYDVLDN	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCS ASQDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYYTSNLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYRKL PWTFGQGTKEIKR (SEQ ID NO:136) CDR1 (SEQ ID NO:137) - SASQDISNYLN CDR2 (SEQ ID NO:138) - YTSNLHS CDR3 (SEQ ID NO:139) - QQYRKLPWT
	4 (US201700 51068)	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTV SGGSISSSSYFWGWIRQPPGKGLE WIGSIYYSGITYYNPSLKSRTVISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARHDGATAGLFDYWGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:140)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGG NNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVV VYDDSDRPGSIPER FSGNSNGNTA TLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSS SDHVVFGGGTKLTVL (SEQ ID

		CDR1: SSSYFWG (SEQ ID NO:141) CDR2: SIYYSGITYYNPSLKS (SEQ ID NO:142) CDR3: HDGATAGLFDY (SEQ ID NO:143)	NO:144)  CDR1: GGNNIGSKSVH (SEQ ID NO:145) CDR2: DDSDRPSS (SEQ ID NO:146) CDR3: QVWDSSSDHV (SEQ ID NO:147)
[0166]	5 (WO20170 21450)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGL EWVSAISGPGSSTYYADSVKGFR TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKVLGWF DYW GQGTLV TVSS (SEQ ID NO:148) CDR1: RASQSVSDEYLS (SEQ ID NO:149) CDR2: SASTRAT (SEQ ID NO:150) CDR3: QQYGYPDPFT (SEQ ID NO:151)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCR ASQSVSDEYLSWYQQKPGQAPR LLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGT DFTLAISRLEPEDFAVYYCQQYGD YPPDFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:152) CDR1: RASQSVSDEYLS (SEQ ID NO:153) CDR2: SASTRAT (SEQ ID NO:154) CDR3: QQYGYPDPFT (SEQ ID NO:155)

[0167] 可替代地，BCMA结合结构域可以包括如下在EM-801和EM-901中列出的重链可变结构域和轻链可变结构域。

[0168] EM-801重链可变结构域(SEQ\_ID\_N0:157)：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS  
CDR1 CDR2

[0169] STYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKVLGWFDYWGQGTL  
CDR3

VTVSS

[0170] EM-801轻链可变结构域(SEQ ID NO:158):

EIVLTQSPGTLSSLPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI  
CDR1 CDR2

[0171] PDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK  
CDR1  
CDR3

[0172] EM-901重链可变结构域(SEQ ID NO:159):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPGS  
CDR1 CDR2

[0173] STYYADSVKGRTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTL  
CDR3  
VTVSS

[0174] EM-901轻链可变结构域 (SEQ ID NO:160)

EIVLTQSPGTLSSLPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQKPGQAPRLLIHSASTRATGI

CDR1

CDR2

[0175]

PDRFSGSGSGTDFTLAISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK

CDR3

[0176] 可替代地,可以通过针对与通过SEQ ID NO:156限定的氨基酸序列的结合进行筛选来鉴定可以结合BCMA的新型抗原结合位点。

[0177] SEQ ID NO:156

MLQMAGQCSQNEYFDLLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAIL

[0178]

WTCLGLSLIISLAVFVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILP  
RGLEYTVEECTCEDCIKSXPVDSDHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSA  
TEIEKSISAR

[0179] 表3列出可以组合地结合CD33的重链可变结构域和轻链可变结构域的肽序列。CD33结合结构域在其与CD33的结合亲和力方面可以有所变化。

[0180]

表3	重链可变结构域肽 序列	轻链可变结构域肽 序列
ADI-10159 [Ab1]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYGMSWVRQAPGK GLEWVANIKQDGSEKYYVDSV	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKL LIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTE

[0181]	<p>(G59)</p> <p>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCAREGGPYYDSS GYFVYYGMDVWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:161]</p> <p>CDR1: FTFSSYGM [SEQ ID NO:162]</p> <p>CDR2: NIKQDGSEKYYVDSVKG [SEQ ID NO:163]</p> <p>CDR3: AREGGPYYDSSGYFVYYGMDV [SEQ ID NO:164]</p>	<p>FTLTSSLQPDDFATYYCQQYESF PTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO165]</p> <p>CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID NO:166]</p> <p>CDR2: DASSLES [SEQ ID NO:167]</p> <p>CDR3: QQYESFPT [SEQ ID NO:168]</p>
	<p>ADI-10177 [Ab2]</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYWMSWVRQAPGK GLEWVANIKQDGSEKYYVDSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARPLNAGELDV WGQGTMTVSS [SEQ ID NO:169]</p> <p>CDR1: FTFSSYWMS [SEQ ID NO:170]</p> <p>CDR2: NIKQDGSEKYYVDSVKG [SEQ ID NO:171]</p> <p>CDR3: ARPLNAGELDV [SEQ ID NO:172]</p>	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKL LIYEASSLESGVPSRFSGSGSGTE FTLTSSLQPDDFATYYCQQLESY PLTFGGGTKEIK [SEQ ID NO:173]</p> <p>CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID NO:174]</p> <p>CDR2: EASSLES [SEQ ID NO:175]</p> <p>CDR3: QQLESYPLT [SEQ ID NO:176]</p>
	<p>ADI-11776 [Ab3] (H76)</p> <p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSKYTMSWVRQAPGK GLEWVSAIVGSGESTYFADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREGGPYYDSSG YFVYYGMDVWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:177]</p>	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKL LIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTE FTLTSSLQPDDFATYYCQQYDD LPTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:181]</p> <p>CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID NO:182]</p>

	<p>CDR1: FTFSKYTMS [SEQ ID NO:178]</p> <p>CDR2: AIVGSGESTYFADSVKG [SEQ ID NO:179]</p> <p>CDR3:</p> <p>AREGGPYYDSSGYFVYYGMDV [SEQ ID NO:180]</p>	<p>NO:182]</p> <p>CDR2: KASSLES [SEQ ID NO:183]</p> <p>CDR3: QQYDDLPT [SEQ ID NO:184]</p>
[0182]	<p>ADI-11801 [Ab4]</p> <p>QVQLVQSGAEVKPGASVKVS CKASGYTFSDYYMHWVRQAPG QGLEWMGMINPSWGSTSQAQK FQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCAREAADGFVGE RYFDLWGRGTLTVSS [SEQ ID NO:185]</p> <p>CDR1: YTFSDYYMH [SEQ ID NO:186]</p> <p>CDR2: MINPSWGSTSQAQKFQG [SEQ ID NO:187]</p> <p>CDR3: AREAADGFVGERYFDL [SEQ ID NO:188]</p>	<p>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR SSQSLLYSNGYNLYLDWYLQPKG QSPQLLIYLGSNRASGVPDFRSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQDVALPITFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:189]</p> <p>CDR1: RSSQSLLYSNGYNLYLD [SEQ ID NO:190]</p> <p>CDR2: LGSNRAS [SEQ ID NO:191]</p> <p>CDR3: MQDVALPIT [SEQ ID NO:192]</p>
	<p>ADI-11807 [Ab5] (I07)</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFGSYWMSWVRQAPGK GLEWVATIKQDGSEKSYVDSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARPLNAGELDVW GQGTMVTVSS [SEQ ID NO:193]</p> <p>CDR1: FTFGSYWM [SEQ ID NO:194]</p> <p>CDR2: TIKQDGSEKSYVDSVK [SEQ ID NO:195]</p>	<p>DIQMTQSPTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAQYQQKPKGAPKL LIYEASSLESGVPSRFSGSGSGTE FTLTSSLQPDDFATYYCQQSQSY PPITFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:197]</p> <p>CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID NO:198]</p> <p>CDR2: EASSLES [SEQ ID NO:199]</p> <p>CDR3: QQSQSYPPI [SEQ ID</p>

	CDR3: ARPLNAGELDV [SEQ ID NO:196]	NO:200]	
[0183]	ADI-11809 [Ab6]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFPSYWMSWVRQAPGK GLEWVATIKRDGSEKGYVDSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARPLNAGELDV WGQGTMTVSS [SEQ ID NO:201] CDR1: FTFPSYWMS [SEQ ID NO:202] CDR2: TIKRDGSEKGYVDSVKG [SEQ ID NO:203] CDR3: ARPLNAGELDV [SEQ ID NO:204]	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKL LIYEASSLESGVPSRFSGSGSGTE FTLTISLQPDDFATYYCQQSQSY PPITFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:205] CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID NO:206] CDR2: EASSLES [SEQ ID NO:207] CDR3: QQSQSYPPIT [SEQ ID NO:208]
	ADI-11815 [Ab7]	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFGTYYMHWVRQAPG QGLEWMGIINPSRGSTVYAQKF QGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCARGAGYDDEDM DVWGKGTTTVTSS [SEQ ID NO:209] CDR1: YTFGTYYMH [SEQ ID NO:210] CDR2: IINPSRGSTVYAQKFQG [SEQ ID NO:211] CDR3: ARGAGYDDEDMDV [SEQ ID NO:212]	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC RASQGIDSWLAWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQAHS YPLTFGGGTKEIK [SEQ ID NO:213] CDR1: RASQGIDSWLA [SEQ ID NO:214] CDR2: AASSLQS [SEQ ID NO:215] CDR3: QQAHSYPLT [SEQ ID NO:216]
	ADI-11819 [Ab8]	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSC AASGFTFSSYAMSWVRQAPGK	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASNSISSWLAWYQQKPGKAPKL

[0184]

	<p>GLEWVSSISSSEGIYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCAREGGPYYDSSGYF VYYGMDVGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:217]</p> <p>CDR1: FTFSSYAMS [SEQ ID NO:218]</p> <p>CDR2: SISSSEGIYYADSVKG [SEQ ID NO:219]</p> <p>CDR3: AREGGPYYDSSGYFVYYGMDV [SEQ ID NO:220]</p>	<p>LIYEASSTKSGVPSRFSGSGSGTE FTLTSSLQPDDFATYYCQQYDD LPTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:221]</p> <p>CDR1: RASNNSISSLWA [SEQ ID NO:222]</p> <p>CDR2: EASSTKS [SEQ ID NO:223]</p> <p>CDR3: QQYDDLPT [SEQ ID NO:224]</p>
ADI-11830 [Ab9]	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYWMSWVRQAPGK GLEWVANINTDGSEVYYVDSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDVPGIAYQ GHFDYWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO:225]</p> <p>CDR1: FTFSSYWMS [SEQ ID NO:226]</p> <p>CDR2: NINTDGSEVYYVDSVKG [SEQ ID NO:227]</p> <p>CDR3: ARDVPGIA YQGHFDY [SEQ ID NO:228]</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICR ASQVIYSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLKSGVPSRFSGSGSGTD FTLTSSLQPEDFATYYCQQVYD TPLTFGGGTKEIK [SEQ ID NO:229]</p> <p>CDR1: RASQVIYSYLN [SEQ ID NO:230]</p> <p>CDR2: AASSLKS [SEQ ID NO:231]</p> <p>CDR3: QQVYDTPLT [SEQ ID NO:232]</p>
ADI-11835 [Ab10] (I35)	<p>QLQLQESGPGLVKPSETSLTCT VSGGSISSTDYYWGWRQPPGK GLEWIGSIGYSGTYYNPSLKSRV TISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARETAHDVHGMDVWG QGTTVTVSS [SEQ ID NO:233]</p>	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASHSVSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASN RATGIPARFSGSGSGTD FTLTSSLPEPEDFAVYYCQQYDN LPTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:237]</p>

	CDR1: GSISSTDYYWG [SEQ ID NO:234] CDR2: SIGYSGTYYNPSLKS [SEQ ID NO:235] CDR3: ARETAHDVHGMDV [SEQ ID NO:236]	CDR1: RASHSVSYLA [SEQ ID NO:238] CDR2: DASN RAT [SEQ ID NO:239] CDR3: QQYDNLPT [SEQ ID NO:240]	
[0185]	林妥珠单抗 (Lintuzum ab)	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSC KASGYTFTDYNMHWVRQAPGQ GLEWIGIYIPYNGGTGYNQKFK SKATITADESTNTAYMELSSLRS EDTAVYYCARGRPAMDYWGQ GTLTVSS (SEQ ID NO:241)  CDR1 (SEQ ID NO:242) - GYTFTDY CDR2 (SEQ ID NO:243) - YIYPYNGGTG CDR3 (SEQ ID NO:244) - GRPAMDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCR ASESVDNYGISFMNWFQQKPGK APKLLIYAASNQGSGVPSRFSGS GSGTDFLTISLQPDDFATYYCQ QSKEVPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:245)  CDR1(SEQ ID NO:246) - ESVDNYGISFMN CDR2 (SEQ ID NO:247) - AASNQGS CDR3 (SEQ ID NO:248) - QQSKEVPWT
	吉妥珠单抗 (Gemtuzum ab)	EVQLVQSGAEVKPGSSVKVSC KASGYTITDSNIHWVRQAPGQS LEWIGIYIPYNGGT DYNQKFKN RATLTVDNPNTNTAYMELSSLRS EDTAFYYCVNGNPWLAYWGQ GTLTVSS (SEQ ID NO:249)  CDR1 (SEQ ID NO:250) - GYTITDS CDR2 (SEQ ID NO:251) - YIYPYNGGTD CDR3 (SEQ ID NO:252) - GNPWLAY	DIQLTQSPSTLSASVGDRV TITCR ASESLDNYGIRFLTWFQQKPGKA PKLLMYAASNQGSGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDDFATYYCQQ TKEVPWSFGQGTKVEVK (SEQ ID NO:253)  CDR1 (SEQ ID NO:254) - ESLDNYGIRFLT CDR2 (SEQ ID NO:255) - AASNQGS CDR3 (SEQ ID NO:256) - QQTKEVPWS

[0186]	抗CD33 (US 7,557,189)	QVQLQQPGAEVVKPGASVKMS CKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQ GLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQ GKATLTADKSSTAYMQLSSLT SEDSAVYYCAREVRLRYFDVW GQGTTTVSS (SEQ ID NO:257)  CDR1 (SEQ ID NO:258) - GYTFTSY CDR2 (SEQ ID NO:259) - YPGNDD CDR3 (SEQ ID NO:260) - EVRLRYFDV	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSC KSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIP GQSPRLLIYWASTRESGVPDFRT GSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYY CHQYLSSRTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO:261)  CDR1 (SEQ ID NO:262) - QSVFFSSSQKNYLA CDR2 (SEQ ID NO:263) - WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:264) - HQYLSSRT
	凡达斯单抗 (vadastuxim ab) (US 13/804,227)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTNYDINWVRQAPG QGLEWIGWIYPGDGSTKYNEKF KAKATLTADTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCASGYEDAMDY WGQGTTTVSSA (SEQ ID NO:265)  CDR1 (SEQ ID NO:266): GYTFTNY CDR2 (SEQ ID NO:267): YPGDGS CDR3 (SEQ ID NO:268): GYEDAMDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVINC KASQDINSYLSWFQQKPGKAPKT LIYRANRLVDGVPSRFSGSGSQ DYTLTISSLQPEDFATYYCLQYD EFPLTFGGGTKEIKR (SEQ ID NO:269)  CDR1 (SEQ ID NO:270): QDINSYLS CDR2 (SEQ ID NO:271): RANRLVD CDR3 (SEQ ID NO:272): LQYDEFPLT

[0187] 可替代地,可以通过针对与通过SEQ ID NO:273限定的氨基酸序列的结合进行筛选来鉴定可以结合CD33的新型抗原结合位点。

[0188] SEQ ID NO:273

MPLLLLLLPLLWAGALAMDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYDKNSPV  
 HGYWFREGAIISRDSPVATNKLDQEVEQETQGRFRLLGDPNSRNNCSLSIVDARRDN  
 GSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDLTHRKPILIPGTLEPGHSKNLTCVSWACEQ  
 [0189] GTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLN  
 VTYVPQNPTTGIFPGDGSGKQETRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRK  
 AARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKKSKLHGPTETSSCSGAAPTVEMDEELHYASLN  
 FHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ

[0190] 表4列出可以组合地结合HER2的重链可变结构域和轻链可变结构域的肽序列。

表4			
克隆	重链可变结构域氨基酸序列	轻链可变结构域氨基酸序列	
	曲妥珠单抗	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTL VTVSS (SEQ ID NO:274)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC RASQDVNTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ HYTPPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:278)
[0191]		CDR1(SEQ ID NO:275) - GFNIKDT CDR2 (SEQ ID NO:276) - YPTNGY CDR3 (SEQ ID NO:277) - WGGDGFYAMDY	CDR1(SEQ ID NO:279) - QDVNTAVA CDR2 (SEQ ID NO:280) - SASFLYS CDR3 (SEQ ID NO:281) - QQHYTTPPPT
	帕妥珠单抗 (Pertuzumab)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFTDYTMWDVVRQAPGKGLE WVADVNPNSSGSIYNQRFKGRFT LSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLV TVSSA	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC KASQDVSIGVAWYQQKPGKAP KLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YYIYPYTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:286)

	(SEQ ID NO:282)  CDR1 (SEQ ID NO:283) - GFTFTDY CDR2 (SEQ ID NO:284) - NPNSGG CDR3 (SEQ ID NO:285) - NLGPSFYFDY	CDR1 (SEQ ID NO:287) - QDV SIGVA CDR2 (SEQ ID NO:288) - SASY RYT CDR3 (SEQ ID NO:289) - QQYYIYPYT
[0192]	MGAH22 (US 8,802,093)  GRIYPTNGYTRYDPKFQDKATITA DTSSNTAYLQVSRLTSEDTAVYYC SRWGGDGFYAMDYWQGQGASVTV SSA (SEQ ID NO:290)  CDR1 (SEQ ID NO:291) - GFNIKDT CDR2 (SEQ ID NO:292) - YPTNGY CDR3 (SEQ ID NO:293) - WGGDGFYAMDY	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIT CKASQDVNTAVAWYQQKPGH SPKLLIYSASFRTGVPDRFTGS RSGTDFTFTISSVQAEDLAVYY CQQHYTTPPTFGGGTKEIKR (SEQ ID NO:294)  CDR1 (SEQ ID NO:295) - QDVNTAVA CDR2 (SEQ ID NO:296) - SASFRT CDR3 (SEQ ID NO:297) - QQHYTTPPPT

[0193] 可替代地,可以通过针对与通过SEQ ID NO:298限定的氨基酸序列的结合进行筛选来鉴定可以结合HER2的新型抗原结合位点。

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMLKLRPASPETHLDMLRHLYQGCQV  
VQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVTQGYVLIAHNQRQVPLQRLRIVRGQLFEDNY  
ALA VLDNGDPLNNNTTPVTGASPGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILW  
KDIFHKNNQLALTLDTNRSRACHPCSPMCKSRCWGESSEDQSLTRVCAGGCAR  
CKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMP  
[0194] NPEGRYTFGASCVTACPYNLSTDVGSC TLVCPLHNQEVTAEDEGTQRCEKCSKPCA  
RVCYGLGM EHLREVRAVTSANIQEFGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQL  
QVFETLEEITGYLYISA WPDSL PDL SVF QNL QVIRGRILHNGA YSL TLQGLGI SWL GLR  
SLRELGSGLALIH HNTL CFVHTV PW DQL FRN PHQ ALL HTAN RPE DEC VGE GLA CH  
QLCARGHCWGP GP TQCVNC SQFL RGQEC VEE CRV LQGL PREY VNAR HCL PC HPEC Q

PQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQ  
PCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIR  
KYTMRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRLKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWI  
PDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVT  
QLMPYGCLLDHVRENGRGLGSQDLLNWCQMIAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVL  
VKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKVPIKWMALESILRRRFTHQSDVWSYG  
[0195] VTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRP  
RFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEDLGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEYLY  
VPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLTLGLEPSEEAPRSPLAPSEG  
GSDVFDGDLGMGAAKGLQLSLPTHDPSPQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPE  
YVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPE  
YLTPQGGAAPQPHPPPSPAfdnLYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGDL  
VPV (SEQ ID NO:298)。

[0196] 可以开发抗原结合性TCR片段以结合由MHC呈递的肿瘤相关抗原肽。在一些实施方案中，抗原结合性TCR片段包括 $\alpha$ 链可变结构域和 $\beta$ 链可变结构域，它们可以配对以结合由MHC呈递的TAA肽。在一些实施方案中， $\alpha$ 链可变结构域和 $\beta$ 链可变结构域被布置成细胞外TCR片段的形式。在一些实施方案中， $\alpha$ 链可变结构域和 $\beta$ 链可变结构域融合在一起形成scTCR片段。

[0197] 可以加工成TCR可靶向的TAA肽的蛋白质的非限制性实例包括组织分化抗原(例如,MART-1、gp100、CEA、CD19和酪氨酸酶)、肿瘤种系抗原(例如,NY-ESO-1、MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A12、MAGE-C2、BAGE1、GAGE1、CTAG1、CTAG2、XAGE-1B和SSX2)、癌细胞过表达的正常蛋白(例如,hTERT、EGFR、ERBB2、WT1、MUC1和间皮素)、病毒蛋白(例如,HPV、EBV和MCC)以及肿瘤特异性突变抗原。示例性的肿瘤相关抗原结合位点在下面列出。

[0198] 表5列出TCR靶标的肽序列以及相应的TCR $\alpha$ 链和 $\beta$ 链序列。

表5			
[0199]	<p>靶蛋白和 MHC呈递的 肽</p> <p>ELAVL4 (UniProt ID P26378) 由HLA- A*02:01:48呈递的 LGYGFVNYI (SEQ ID NO:425)</p>	<p>细胞外TCR<math>\alpha</math>片段 <math>\alpha</math>链可变结构域(V<math>\alpha</math>) <math>\alpha</math>链CDR3 (CDR3<math>\alpha</math>)</p> <p>KEVEQNNSGPLSVPEGAIASL NCTYSDRGSQSFFWYRQYS GKSPELIMSIYSNGDKEDGRF TAQLNKASQYVSLLIRDSQP SDSATYLCAVTTDSWGKLQ FGAGTQVVVTVDIQNPDPAV YQLRDSKSSDKSVCVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKTV LDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:349)</p> <p>V<math>\alpha</math>:</p> <p>KEVEQNNSGPLSVPEGAIASL NCTYSDRGSQSFFWYRQYS GKSPELIMSIYSNGDKEDGRF TAQLNKASQYVSLLIRDSQP SDSATYLCAVTTDSWGKLQ FGAGTQVVVTVDIQNPDPAV (SEQ ID NO:351)</p> <p>CDR3<math>\alpha</math>: CAVTTDSWGKLQF (SEQ ID NO:353)</p>	<p>细胞外TCR<math>\beta</math>片段 <math>\beta</math>链可变结构域(V<math>\beta</math>) <math>\beta</math>链CDR (CDR3<math>\beta</math>)</p> <p>NAGVTQTPKFQVLKTGQSMLQ CAQDMNHEYMSWYRQDPGMG LRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYN VSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVY FCASRPGLAGGRPEQYFGPGTRL TVTEDLKNVFPPPEAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WWVNGKEVHSGVSTDPLQPLKE QPALNDSRYALSSRLRVSATFW QDPRNHFRCCQVQFYGLSENDEW TQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:350)</p> <p>V<math>\beta</math>:</p> <p>NAGVTQTPKFQVLKTGQSMLQ CAQDMNHEYMSWYRQDPGMG LRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYN VSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVY FCASRPGLAGGRPEQYFGPGTRL TVTEDLKNVF (SEQ ID NO:352)</p> <p>CDR3<math>\beta</math>: CASRPGLAGGRPEQYF (SEQ ID NO:354)</p>
	<p>胰岛素 (UniProt ID P01308) 由HLA- A*02:01:48呈递的 ALWGPDPAAA (SEQ ID NO:426)</p>	<p>EVEQDPGPLSVPEGAIVSLNC TYSNSAFQYFMWYRQYSRK GPELLMYTYSSGNKEDGRFT AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD SATYLCAMRGDSSYKLIFGS GTRLLVRPDIQNPDPAVYQL RDSKSSDKSVCVCLFTDFDSQT NVSQSKDSDVYITDKCVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSD FACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:355)</p> <p>V<math>\alpha</math>:</p> <p>EVEQDPGPLSVPEGAIVSLNC TYSNSAFQYFMWYRQYSRK GPELLMYTYSSGNKEDGRFT AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD</p>	<p>AGVIQSPRHEVTEMQQVTLRC KPISGHDYLFWYRQTMMRGLEL LIYFNNNVPIDDGMPEDRFSAK MPNASFSTLKIQPSEPRDSA VYF CASSLWEKLAKNIQYFGAGTRL VLEDLKNVFPPPEAVFEPSEAEIS HTQKATLVCLATGFYPDHVELS WWVNGKEVHSGVCTDPQPLKE QPALNDSRYALSSRLRVSATFW QDPRNHFRCCQVQFYGLSENDEW TQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:356)</p> <p>V<math>\beta</math>:</p> <p>AGVIQSPRHEVTEMQQVTLRC KPISGHDYLFWYRQTMMRGLEL LIYFNNNVPIDDGMPEDRFSAK</p>

[0200]

	SATYLCAMRGDSSYKLIFGS GTRLLVRPDIQNP (SEQ ID NO:357)  CDR3 $\alpha$ : CAMRGDSSYKLIF (SEQ ID NO:359)	MPNASFSTLKIQPSEPRDSA VYF CASSLWEKLAKNIQYFGAGTRL VLEDLKNVF (SEQ ID NO:358)  CDR3 $\beta$ : CASSLWEKLAKNIQYF (SEQ ID NO:360)
TERT (UniProt ID O14746) 由HLA- A*02:01:48呈递的 ILAKFLHWL (SEQ ID NO:340)	IQVEQSPPDLILQEGANSTLR CNFSDSVNNLWWFHQNWP GQLINLFYIPSGTKQNGRLSA TTVATERYSLLYISSSQTDS GVYFCAVDSATALPYGYIFG TGTRLKVLANIQNPDPAVYQ LRDSKSSDKSVCLFTDFDSQ TNVSQSKDSDVYITDKCVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSD FACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:361)  V $\alpha$ : IQVEQSPPDLILQEGANSTLR CNFSDSVNNLWWFHQNWP GQLINLFYIPSGTKQNGRLSA TTVATERYSLLYISSSQTDS GVYFCAVDSATALPYGYIFG TGTRLKVLANIQN (SEQ ID NO:363)  CDR3 $\alpha$ : CAVDSATALPYGYIF (SEQ ID NO:365)	AGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQC AQDMNHEYMSWYRQDPGMGL RLIHYSIHPEYTDQGEVPNGYN SRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVY CASSYQGTEAFFGQGTRLTVVE DLNKVFVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYPDHVELSWW NGKEVHSGVCTDPQPLKEQPAL NDSRYALSSRLRVSATFWQDPR NHFRCQVQFYGLSENDEWTQDR AKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:362)  V $\beta$ : AGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQC AQDMNHEYMSWYRQDPGMGL RLIHYSIHPEYTDQGEVPNGYN SRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVY CASSYQGTEAFFGQGTRLTVVE DLNKVF (SEQ ID NO:364)  CDR3 $\beta$ : CASSYQGTEAFF (SEQ ID NO:366)
ERBB2 (UniProt ID P04626) 由HLA- A*02呈递的 KIFGSLAFL (SEQ ID NO:341)	EVEQDPGPLSVPEGAI VSLNC TYSNSAFQYFMWYRQYSRK GPELLMYTYSSGNKEDGRFT AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD SATYLCAMS LYGGSQGNLI FGKGTKL SVKPDP AVYQLR DSKSSDKSVCLFTDFDSQT VSQSKDSDVYITDKCVLD RSMDFKSNSAVAWSNKSD ACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:428)  V $\alpha$ : EVEQDPGPLSVPEGAI VSLNC TYSNSAFQYFMWYRQYSRK GPELLMYTYSSGNKEDGRFT	AGVAQSPRYKII EKRQSVAFWCN PISGHATLYWYQQILGQGP KLLI QFQNNGVVDDSQLPKDRFSAER LKGVDSTLKIQPAKLED SAVYLC ASSLEIFGGIADDTDTQYFGPGTR TVLEDLKVNFPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYPDHVEL WWVNGKEVHSGVCTDPQPLKE QPALNDSRYALSSRLRV SATFW QDPRNHFRCQVQFYGLSENDEW TQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:429)  V $\beta$ : AGVAQSPRYKII EKRQSVAFWCN PISGHATLYWYQQILGQGP KLLI

	AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD SATYLCAMSLYYGGSQGNLI FGKGTKLSVKP (SEQ ID NO:430)  CDR3 $\alpha$ : CAMS LYGGSQGNLIF (SEQ ID NO:367)	QFQNNGVVDDSQLPKDRFSAER LKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLC ASSLEIFGGIADTDTQYF GPGTRLTVLEDLKNUF (SEQ ID NO:431)  CDR3 $\beta$ : CASSLEIFGGIADTDTQYF (SEQ ID NO:368)	
[0201]	WT1 (UniProt ID P19544)  由HLA- A*02呈递的 RMFPNAPYL (SEQ ID NO:342)	EVEQNNSGPLSVPEGAIASLNC TYSDRGQSFFWYRQYSGKS PELIMFIYSNGDKEDGRFTA QLNKASQYVSLLIRDSQPSD SATYLCAVNDQGGGADGLT FGKGTHLIIQPDPAVYQLRDS KSSDKSVCVCLFTDFDSQTNV QSKDSDVYITDKCVLDMRS MDFKSNSAVAWSNKSDFAC ANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:432)  V $\alpha$ : EVEQNNSGPLSVPEGAIASLNC TYSDRGQSFFWYRQYSGKS PELIMFIYSNGDKEDGRFTA QLNKASQYVSLLIRDSQPSD SATYLCAVNDQGGGADGLT FGKGTHLIIQP (SEQ ID NO:434)  CDR3 $\alpha$ : CAVNDQGGGADGLTF (SEQ ID NO:369)	NAGVTQTPKFRVLKTGQSMALL CAQDMNHEYMYWYRQDPGMG LRLIHYSVGEGETAKGEVPDGY NVSRKKQNFLLGLESAAPSQTS VYFCASSWWDTGELFFGEGSRL TVLEDLKNVFPPPEAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WWVNGKEVHSGVCTDPQPLKE QPALNDSRYALSSRLRVSATFW QDPRNHFRCQVQFYGLSENDEW TQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:433)  V $\beta$ : NAGVTQTPKFRVLKTGQSMALL CAQDMNHEYMYWYRQDPGMG LRLIHYSVGEGETAKGEVPDGY NVSRKKQNFLLGLESAAPSQTS VYFCASSWWDTGELFFGEGSRL TVLEDLKNVF (SEQ ID NO:435)  CDR3 $\beta$ : CASSWWDTGELFF (SEQ ID NO:370)
	WT1 (UniProt ID P19544)  由HLA- A*02呈递的 RMFPNAPYL (SEQ ID NO:342)	AQSVTQLGSHVSSEGALVL LRCNYSSSVPPYLFWYVQYP QGLQLLLKYTSAAATLVKGIN GFEAEFKKSETSFHLTKPSAH MSDAAEYFCAVSEGHDYKL SFGAGTTVTVRADPAVYQL RDSKSSDKSVCVCLFTDFDSQT NVSQSKDSDVYITDKCVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSD FACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:436)	DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFL CVQDMRDHENMFWYRQDPGLGL RLIYFSYDVKMKEKGDIPEGYSV SREKKERFSLILEASTNQTSMYL CAWGTIMATEQYFGPGTRLTVE DLKNVFPPEAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYPDHVELSWWV NGKEVHSGVCTDPQPLKEQPAL NDSRYALSSRLRVSATFWQDPR NHFRCQVQFYGLSENDEWTQDR AKPVTQIVSAEAWGRAD

	<p>V<math>\alpha</math>:</p> <p>AQSVTQLGSHVSVSEGALVL LRCNYSSSVPPYLFWYVQYP QGLQLLLKYTSAAATLVKGIN GFEAEFKKSETSFLTKPSAH MSDAAEYFCAVSEGGDYKL SFGAGTTVTVRA (SEQ ID NO:438)</p> <p>CDR3<math>\alpha</math>: CAVSEGGDYKLSF (SEQ ID NO:371)</p>	<p>(SEQ ID NO:437)</p> <p>V<math>\beta</math>:</p> <p>DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLE CVQDMMDHENMFWYRQDPGLGL RLIYFSYDVKMKEKGDIPEGYSV SREKKERFSLILESASTNQTSMYL CAWGTIMATEQYFGPGTRLTVTE DLKNVF (SEQ ID NO:439)</p> <p>CDR3<math>\beta</math>: CAWGTIMATEQYF (SEQ ID NO:372)</p>	
[0202]	<p>MAGE-A3 (UniProt ID P43357)</p> <p>由HLA- A1呈递的 CASSFNMATG QYF (SEQ ID NO:343)</p>	<p>AQEVTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQDP GKGLTSLLYVRPYQREQTSG RLNASLDKSSGRSTLYIAAS QPGDSATYLCAVRPAGPFF FVVFGKGTKLSVIPNIQNPD AVYQLRDSKSSDKSVCLFTD FDSQTNVSQSKDSVDYITDK CVLDMRSMDFKNSAVAWS NKSDFACANAFNNSIIP (SEQ ID NO:373)</p> <p>V<math>\alpha</math>:</p> <p>AQEVTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQDP GKGLTSLLYVRPYQREQTSG RLNASLDKSSGRSTLYIAAS QPGDSATYLCAVRPAGPFF FVVFGKGTKLSVIPNIQNP (SEQ ID NO:375)</p> <p>CDR3<math>\alpha</math>: CAVRPAGPFF (SEQ ID NO:377)</p>	<p>AGVTQTPRYLIKTRGQQVTLSCS PISGHRSVSWYQQTPGQGLQFLF EYFSETQRNKGNFPGRFSGRQFS NSRSEMNVSTLELGDSALYLCAS SFNMATGQYFGPGTRLTVTEDL KNVFPPEAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYDPDHVELWWVN GKEVHSGVCTDPQPLKEQPALN DSRYALSSRLRVSATFWQDPRN HFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:374)</p> <p>V<math>\beta</math>:</p> <p>AGVTQTPRYLIKTRGQQVTLSCS PISGHRSVSWYQQTPGQGLQFLF EYFSETQRNKGNFPGRFSGRQFS NSRSEMNVSTLELGDSALYLCAS SFNMATGQYFGPGTRLTVTEDL KNVF (SEQ ID NO:376)</p> <p>CDR3<math>\beta</math>: CASSFNMATGQYF (SEQ ID NO:378)</p>
	<p>MART1 (UniProt ID Q16655)</p> <p>由HLA- A2呈递的 EAAGIGILTV (SEQ ID NO:344)</p>	<p>EVEQDPGPLSVPEGAIVSLNC TYSNSAFQYFMWYRQYSRK GPELLMYTYSSGNKEDGRFT AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD SATYLCAMSETGGFKTIFGA GTRLFVKANIQNPDPAVYQL RDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKDSVDYITDKTVLD MRSMDFKNSAVAWSNKSD FACANAFNNSIIPEDTFFPS</p>	<p>EAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTC SQNMNHEYMSWYRQDPGLGLR QIYYSMNVEVTDKGDVPEGYKV SRKEKRNFPLILESPSPNQTSLYF CASSLVTAGSPLHFGNGTRLTV TEDLNKVFPPEAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFFPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDTPQPLKEQP ALND SRYCLSSRLRVSATFWQN PRNHFCQVQFYGLSENDEWTQ</p>

	(SEQ ID NO:379)  V $\alpha$ : EVEQDPGPLSVPEGAIVSLNC TYSNSAFQYFMWYRQYSRK GPELLMYTYSSGNKEDGRFT AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD SATYLCAMSETGGFKTIFGA GTRLFVKANIQNP (SEQ ID NO:381)  CDR3 $\alpha$ : CAMSETGGFKTIF (SEQ ID NO:383)	DRAKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:380)  V $\beta$ : EAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTC SQNMNHEYMSWYRQDPGLGLR QIYYSMNVEVTDKGDVPEGYKV SRKEKRNFPLILESPSPNQTSLYF CASSLVGTAGSPLHFNGNTRLTV TEDLNKVF (SEQ ID NO:382)  CDR3 $\beta$ : CASSLVGTAGSPLHF (SEQ ID NO:384)	
[0203]	SSX2 (UniProt ID Q16385)  由HLA- A2呈递的 KASEKIFYV (SEQ ID NO:345)	CDR3 $\alpha$ : CAMTSGFGNEKLTF (SEQ ID NO:387)	
	BIRC5,也称为 存活素 (UniProt ID O15392)  由HLA- A2呈递的 ELTLGEFLKL (SEQ ID NO:346)	GESVGLHLPTLSVQEGDNSII NCAYSNSASDYFIWYKQESG KGPFQFIIDIRSNSMDKRQGQR VTVLLNKTVKHLQLQIAATQ PGDSAVYFCENAETVTDS WGKLQFGAGTQVVVTPDPA VYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVSQSKDSDVYITDKT VLDMRSMDFKNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFF PS (SEQ ID NO:440)  V $\alpha$ : GESVGLHLPTLSVQEGDNSII NCAYSNSASDYFIWYKQESG KGPFQFIIDIRSNSMDKRQGQR VTVLLNKTVKHLQLQIAATQ PGDSAVYFCENAETVTDS WGKLQFGAGTQVVVTP (SEQ ID NO:442)  CDR3 $\alpha$ : CAETVTDSWGKLQF (SEQ ID NO:389)	DAMVIQNPRYQVTQFGKPVTLS CSQTLNHNVMYWYQQKSSQAP KLLFHYYDKDFNNEADTPDNFQ SRRPNTSFCFLDIRSPGLGDAAM YLCATSRGDSTAEPQHFGDGTRL SILEDLNKVFPPPEAVFEPSEAEI SHTQKATLVLCLATGFYPDHVELS WWVNGKEVHSGVCTDPQPLKE QPALNDSRYALSSRLRVSATFW QDPRNHFRCCQVQFYGLSENDEW TQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:441)  V $\beta$ : DAMVIQNPRYQVTQFGKPVTLS CSQTLNHNVMYWYQQKSSQAP KLLFHYYDKDFNNEADTPDNFQ SRRPNTSFCFLDIRSPGLGDAAM YLCATSRGDSTAEPQHFGDGTRL SILEDLNKVF (SEQ ID NO:443)  CDR3 $\beta$ : CATSRGDSTAEPQHF (SEQ ID NO:390)

[0204]	<p>BIRC5,也称为存活素(UniProt ID O15392)由HLA-A2呈递的ELTLGEFLKL(SEQ ID NO:346)</p>	<p>AQKITQTQPGMFVQEKEAVT LDCTYDTSDQSYGLFWYKQ PSSGEMIFLIYQGSYDEQNAT EGRYSLNFQKARKSANLVIS ASQLGDSAMYFCAMREGGG YNKLIFGAGTRLAVHPDPAV YQLRDSKSSDKSVCCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKTV LDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFPS (SEQ ID NO:385)</p> <p>V<math>\alpha</math>: AQKITQTQPGMFVQEKEAVT LDCTYDTSDQSYGLFWYKQ PSSGEMIFLIYQGSYDEQNAT EGRYSLNFQKARKSANLVIS ASQLGDSAMYFCAMREGGG YNKLIFGAGTRLAVHP (SEQ ID NO:444)</p> <p>CDR3<math>\alpha</math>: CAMREGGGYNKLIF (SEQ ID NO:391)</p>	<p>SQTIHQWPATLVQPVGSPSLEC TVEGTSNPPLYWYRQAAGRGLQ LLFYSVGIGQISSEVPQNLASRP QDRQFILSSKKLLSDSGFYLC GQDLNTEAFFGQGTRLTVVEDL NKVFPPPEAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWWN GKEVHSGVCTDPQPLKEQPALN DSRYALSSRLRVSATFWQDPRN HFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:386)</p> <p>V<math>\beta</math>: SQTIHQWPATLVQPVGSPSLEC TVEGTSNPPLYWYRQAAGRGLQ LLFYSVGIGQISSEVPQNLASRP QDRQFILSSKKLLSDSGFYLC GQDLNTEAFFGQGTRLTVVEDL NKVF (SEQ ID NO:445)</p> <p>CDR3<math>\beta</math>: CAGQDLNTEAFF (SEQ ID NO:392)</p>
	<p>PRAME(UniProt ID P78395)由HLA-A2呈递的QLLALLPSL(SEQ ID NO:347)</p>	<p>AQSVTQLGSHVSVERALVL LRCNYSSSVPPYLFWYVQYP NQGLQLLLKYTSAATLVKG NGFEAEFKSETSFHLTKPSA HMSDAAEYFCAVSGQTGAN NLFFGTGTRLTVIPYIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCCLFTD FDSQTNVSQSKDSDVYITDK TVLDMRSMDFKSNSAVAWS NKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPS (SEQ ID NO:393)</p> <p>V<math>\alpha</math>: AQSVTQLGSHVSVERALVL LRCNYSSSVPPYLFWYVQYP NQGLQLLLKYTSAATLVKG NGFEAEFKSETSFHLTKPSA HMSDAAEYFCAVSGQTGAN NLFFGTGTRLTVIPYIQNP (SEQ ID NO:395)</p> <p>CDR3<math>\alpha</math>: CAVSGQTGANNLF</p>	<p>DSGVTQTPKHLITATGQRVTLRC SPRGDLSVYWYQQSLDQGLQF LIQYYNGEERAKGNIERFSAQQ FPDLHSELNLSSLELGDSALYFC ASARWDRGGEQYFGPGTRLT EDLKNVFPPPEAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPA LNDsRYCLSSRLRVSATFWQNPR NHFCQVQFYGLSENDEWTQDRA AKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:394)</p> <p>V<math>\beta</math>: DSGVTQTPKHLITATGQRVTLRC SPRGDLSVYWYQQSLDQGLQF LIQYYNGEERAKGNIERFSAQQ FPDLHSELNLSSLELGDSALYFC ASARWDRGGEQYFGPGTRLT EDLKNVF (SEQ ID NO:396)</p> <p>CDR3<math>\beta</math>: CASARWDRGGEQYF</p>

	(SEQ ID NO:397)	(SEQ ID NO:398)
[0205]	<p>PRAME (UniProt ID P78395) 由HLA-A2呈递的 QLLALLPSL (SEQ ID NO:347)</p> <p>GQQLNQSPQSMFIQEGEDVS MNCTSSSIFNTWLWYKQDP GEGPVLLIALYKAGELTSNG RLTAQFGITRKDSFLNISASIP SDVGIYFCAGIPRDNYGQNF VFGPGTRLSVLPYIQNPDA VYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVSQSKDSVDYITDKT VLDMRSMDFKNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFF PS (SEQ ID NO:399)</p> <p>V<math>\alpha</math>:</p> <p>GQQLNQSPQSMFIQEGEDVS MNCTSSSIFNTWLWYKQDP GEGPVLLIALYKAGELTSNG RLTAQFGITRKDSFLNISASIP SDVGIYFCAGIPRDNYGQNF VFGPGTRLSVLPYIQNP (SEQ ID NO:401)</p> <p>CDR3<math>\alpha</math>:</p> <p>CAGIPRDNYGQNFVF (SEQ ID NO:403)</p>	<p>DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLE CVQDMDHENMFWYRQDPGLGL RLIYFSYDVKMKEKGDIPEGYSV SREKKERFSLILESLASTNQTSMYL CASTPWLAGGNEQFFGPGRTRLT VLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEIS HTQKATLVCLATGFYPDHVELS WWVNGKEVHSGVSTDPPQLKE QPALNDSRYCLSSRLRVSATFW QNPRNHFRCCQVQFYGLSENDEW TQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:400)</p> <p>V<math>\beta</math>:</p> <p>DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLE CVQDMDHENMFWYRQDPGLGL RLIYFSYDVKMKEKGDIPEGYSV SREKKERFSLILESLASTNQTSMYL CASTPWLAGGNEQFFGPGRTRLT VLEDLKNVF (SEQ ID NO:402)</p> <p>CDR3<math>\beta</math>: CASTPWLAGGNEQFF (SEQ ID NO:404)</p>
	<p>PRAME (UniProt ID P78395) 由HLA-A2呈递的 QLLALLPSL (SEQ ID NO:347)</p> <p>QKEVEQNSGPLSVPEGAIAS LNCTYSDRGSQSFFWYRQYS GKSPELIMFIYSNGDKEDGRF TAQLNKASQYVSSLIRDSQP SDSATYLCAVKDNAGNMLT FGGGTRLMVKPHIQNPDAV YQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSVDYITDKTV LDMRSMDFKNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:405)</p> <p>V<math>\alpha</math>:</p> <p>QKEVEQNSGPLSVPEGAIAS LNCTYSDRGSQSFFWYRQYS GKSPELIMFIYSNGDKEDGRF TAQLNKASQYVSSLIRDSQP SDSATYLCAVKDNAGNMLT FGGGTRLMVKPHIQNP</p>	<p>DSGVTQTPKHLITATGQRVTLRC SPRGDLSVWYQQSLDQGLQF LIQYYNGEERAKGNIKERFSAQQ FPDLHSELNLSSLELGDSALYFC ASSDGGGVYEQYFGPGTRLT EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPPQLKEQPA LNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP NHFRCCQVQFYGLSENDEWTQDR AKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:406)</p> <p>V<math>\beta</math>:</p> <p>DSGVTQTPKHLITATGQRVTLRC SPRGDLSVWYQQSLDQGLQF LIQYYNGEERAKGNIKERFSAQQ FPDLHSELNLSSLELGDSALYFC ASSDGGGVYEQYFGPGTRLT</p>

	(SEQ ID NO:407) CDR3 $\alpha$ : CAVKDNAGNMLTF (SEQ ID NO:409)	EDLKNVF (SEQ ID NO:408) CDR3 $\beta$ : CASSDGGGVYEQYF (SEQ ID NO:410)	
[0206]	NY-ESO-1 (UniProt ID P78358) 由HLA- A*02:01:48呈递的 SLLMWITQC (SEQ ID NO:348)	QEVTQIPAALSVPEGENLVL NCSFTDSAIYNLQWFRQDPG KGLTSLLIQQSSQREQTSGRL NASLDKSSGRSTLYIAASQP GDSATYLCAVRPTSGGSYIP TFGRGTSLIVHPYIQNPDPAV YQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSCKSDVYITDKCV LDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:411)  V $\alpha$ : QEVTQIPAALSVPEGENLVL NCSFTDSAIYNLQWFRQDPG KGLTSLLIQQSSQREQTSGRL NASLDKSSGRSTLYIAASQP GDSATYLCAVRPTSGGSYIP TFGRGTSLIVHPYIQNP (SEQ ID NO:413)  CDR3 $\alpha$ : CAVRPTSGGSYIPTF (SEQ ID NO:415)	GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSR STTEDFPLRLLSAAPSQTsvyfca SSYVGNTGELFFGEGSRLTVLED LKNVFPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELWWVN GKEVHSGVCTDPQPLKEQPALN DSRYALSSRLRVSATFWQDPRN HFRCQVQFYGLSENDDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:412)  V $\beta$ : GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSR STTEDFPLRLLSAAPSQTsvyfca SSYVGNTGELFFGEGSRLTVLED LKNVF (SEQ ID NO:414)  CDR3 $\beta$ : CASSYVGNTGELFF (SEQ ID NO:416)
	NY-ESO-1 (UniProt ID P78358) 由HLA- A*02:01:48呈递的 SLLMWITQC (SEQ ID NO:348)	KQQVTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQDP GGKLTSLLIQQSSQREQTSGR LNASLDKSAGSSTLYIAASQP GDSATYLCAVRPTSGGSYIP TFGRGTSLIVHPYIQNPDPAV YQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSCKSDVYITDKCV LDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPS PE (SEQ ID NO:417)  V $\alpha$ : KQQVTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQDP GGKLTSLLIQQSSQREQTSGR LNASLDKSAGSSTLYIAASQP GDSATYLCAVRPTSGGSYIP	GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSR STTEDFPLRLLSAAPSQTsvyfca SSYVGNTGELFFGEGSRLTVLED LKNVFPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELWWVN GKEVHSGVCTDPQPLKEQPALN DSRYALSSRLRVSATFWQDPRN HFRCQVQFYGLSENDDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:412)  V $\beta$ : GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSR STTEDFPLRLLSAAPSQTsvyfca

	TFGRGTSLIVHPYIQNP (SEQ ID NO:418)  CDR3 $\alpha$ : CAVRPTSGGSYIPTF (SEQ ID NO:415)	SSYVGNTGELFFGEGRSLTVLED LKNVF (SEQ ID NO:414)  CDR3 $\beta$ : CASSYVGNTGELFF (SEQ ID NO:416)	
[0207]	NY-ESO-1 (UniProt ID P78358)  由HLA- A*02:01:48呈递的 SLLMWITQC (SEQ ID NO:348)	KQEVTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQDP GKGLTSLLIQSSQREQTSGR LNASLDKSSGSSTLYIAASQP GDSATYLCAVRPLLDGYIP TFGRGTSLIVHPYIQNPDPAV YQLRDSKSSDKSVCVCLFTDFD SQTNVSQSKSDVDYITDKCV LDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNN (SEQ ID NO:419)  V $\alpha$ : KQEVTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQDP GKGLTSLLIQSSQREQTSGR LNASLDKSSGSSTLYIAASQP GDSATYLCAVRPLLDGYIP TFGRGTSLIVHPYIQNP (SEQ ID NO:421)  CDR3 $\alpha$ : CAVRPLLDGYIPTF (SEQ ID NO:423)	GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGTTDQGEVPNGYNVS RSTIEDFPLRLSAAPSQTSVYFC ASSYLGNTGELFFGEGRSLTVLE DLKNVFPPPEAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYPDHVELSWWV NGKEVHSGVCTDPQPLKEQPAL NDSRYALSSRLRVSATFWQDPR NHFRCQVQFYGLSENDEWTQDR AKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:420)  V $\beta$ : GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGTTDQGEVPNGYNVS RSTIEDFPLRLSAAPSQTSVYFC ASSYLGNTGELFFGEGRSLTVLE DLKNVF (SEQ ID NO:422)  CDR3 $\beta$ : CASSYLGNTGELFF (SEQ ID NO:424)

[0208] 抗体恒定区和异二聚化

[0209] 本发明中描述的抗体恒定区(Fc结构域)可以衍生自与CD16结合的任何物种的抗体的恒定区。在一些实施方案中,恒定区的氨基酸序列与人抗体恒定区具有至少90%的一同一性,所述人抗体恒定区诸如人IgG1恒定区、IgG2恒定区、IgG3恒定区或IgG4恒定区。在一些其他实施方案中,恒定区的氨基酸序列与来自另一哺乳动物(诸如兔、狗、猫、小鼠或马)的抗体恒定区具有至少90%的一同一性。在一些实施方案中,抗体恒定区包括铰链、CH2结构域、CH3结构域和任选的CH1结构域。在一些实施方案中,包括铰链、CH2结构域、CH3结构域和任选的CH1结构域的抗体恒定区衍生自人IgG1抗体。在一些实施方案中,抗体恒定区包括与人IgG1抗体的氨基酸234-332具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0210] 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CH2结构域中的氨基酸残基Asp 265-Glu 269、Asn 297-Thr 299、Ala 327-Ile 332、Leu 234-Ser 239和碳水化合物残基N-乙酰基-D-葡萄糖胺处(参见,Sondermann等,Nature,406 (6793) :267-273)。基于已知结构域,可以选择突变来增强或降低与CD16的结合亲和力,诸如通过使用噬菌体展示文库或酵母表面展示cDNA文库,或可以基于相互作用的已知三维结构进行设计。

[0211] 在某些实施方案中,可以掺入人IgG1恒定区的CH1中的突变可位于氨基酸V125、F126、P127、T135、T139、A140、F170、P171和/或V173处。在某些实施方案中,可以掺入人IgG1

恒定区的C<sub>K</sub>中的突变可处于氨基酸E123、F116、S176、V163、S174和/或T164处。

[0212] 异二聚体抗体重链的组装可以通过在同一细胞中表达两种不同的抗体重链序列来完成,这可能导致每种抗体重链的同二聚体的组装以及异二聚体的组装。可以通过在每个抗体恒定区的CH3结构域中掺入不同的突变来促进异二聚体的优先组装,如US13/494870、US16/028850、US11/533709、US12/875015、US13/289934、US14/773418、US12/811207、US13/866756、US14/647480和US14/830336中所示。例如,可以基于人IgG1并且在第一多肽和第二多肽内掺入使这两条链选择性地彼此异二聚化的不同氨基酸取代对来在CH3结构域中进行突变。下文所示的氨基酸取代的位置均如在Kabat中一样按照EU索引进行编号。

[0213] 在一种情况下,第一多肽中的氨基酸取代将原始氨基酸替换为较大氨基酸,所述较大氨基酸选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W),并且第二多肽中的至少一个氨基酸取代将原始氨基酸替换为较小氨基酸,所述较小氨基酸选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)或缬氨酸(V),使得较大氨基酸取代(隆凸)配合到较小氨基酸取代的表面(腔体)中。例如,一个多肽可以掺入T366W取代,并且另一个多肽可以掺入三个取代,包括T366S、L368A和Y407V。

[0214] 与人IgG1恒定区相比,可以将一个或多个突变掺入恒定区中,例如在Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411和/或K439处。示例性取代包括,例如,Q347E、Q347R、Y349S、Y349K、Y349T、Y349D、Y349E、Y349C、T350V、L351K、L351D、L351Y、S354C、E356K、E357Q、E357L、E357W、K360E、K360W、Q362E、S364K、S364E、S364H、S364D、T366V、T366I、T366L、T366M、T366K、T366W、T366S、L368E、L368A、L368D、K370S、N390D、N390E、K392L、K392M、K392V、K392F、K392D、K392E、T394F、T394W、D399R、D399K、D399V、S400K、S400R、D401K、F405A、F405T、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、T411D、T411E、K439D和K439E。

[0215] 可替代地,氨基酸取代可以选自表6所示的以下各组取代。

[0216]

表6	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

[0217] 可替代地,氨基酸取代可以选自表7所示的以下各组取代。

[0218]

表7	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

[0219] 可替代地,氨基酸取代可以选自表8所示的以下各组取代。

[0220]

表8	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

[0221] 可替代地,每个多肽链中的至少一个氨基酸取代可选自表9。

[0222]

表 9	
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

[0223] 可替代地,至少一个氨基酸取代可以选自表10中的以下组的取代,其中第一多肽列中所示的一个或多个位置被任何已知的带负电荷的氨基酸替换,并且第二多肽列中所示的一个或多个位置被任何已知的带正电荷的氨基酸替换。

[0224]

表10	
第一多肽	第二多肽
K392、K370、K409或K439	D399、E356或E357

[0225] 可替代地,至少一个氨基酸取代可以选自表11中的以下组,其中第一多肽列中所示的一个或多个位置被任何已知的带正电荷的氨基酸替换,并且第二多肽列中所示的一个或多个位置被任何已知的带负电荷的氨基酸替换。

[0226]

表11	
第一多肽	第二多肽
D399、E356或E357	K409、K439、K370或K392

[0227]

可替代地,氨基酸取代可以选自表12中的以下组。

[0228]

表 12	
第一多肽	第二多肽
T350V 、 L351Y 、 F405A 和 Y407V	T350V 、 T366L 、 K392L 和 T394W

[0229] 可替代地,或另外地,可通过在第一或第二多肽链中的任一个上引入S354C并且在相反多肽链上引入Y349C(它们在两个多肽的界面内形成人工二硫桥)来增加异源多聚体蛋白的结构稳定性。

[0230] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在位置T366上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自由T366、L368和Y407组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同。

[0231] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自由T366、L368和Y407组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在位置T366上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同。

[0232] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自由E357、K360、Q362、S364、L368、K370、T394、D401、F405和T411组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自由Y349、E357、S364、L368、K370、T394、D401、F405和T411组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同。

[0233] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自由Y349、E357、S364、L368、K370、T394、D401、F405和T411组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自由E357、K360、Q362、S364、L368、K370、T394、D401、F405和T411组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同。

[0234] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自由L351、D399、S400和Y407组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自由T366、N390、K392、K409和T411组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同。

[0235] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自由T366、N390、K392、K409和T411组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自由L351、D399、S400和Y407组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同。

[0236] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自由Q347、Y349、K360和K409组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自由Q347、E357、D399和F405组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同。

[0237] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自由Q347、E357、D399和F405组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自由Y349、K360、Q347和K409组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同。

[0238] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自由K370、K392、K409和K439组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自由D356、E357和D399组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同。

[0239] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自由D356、E357和D399组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自由K370、K392、K409和K439组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同。

[0240] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自由L351、E356、T366和D399组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自由Y349、L351、L368、K392和K409组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同。

[0241] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自由Y349、L351、L368、K392和K409组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列在选自由L351、E356、T366和D399组成的组的一个或多个位置上与IgG1恒定区的氨基酸序列不同。

[0242] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处是S354C取代,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处是Y349C取代。

[0243] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处是Y349C取代,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处是S354C取代。

[0244] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处是K360E和K409W取代,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处是Q347R、D399V和F405T取代。

[0245] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处是Q347R、D399V和F405T取代,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处是K360E和K409W取代。

[0246] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处是T366W取代,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处是T366S、T368A和Y407V取代。

[0247] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处是T366S、T368A和Y407V取代,并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处是T366W取代。

[0248] 在一些实施方案中,抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基

酸序列的不同之处是T350V、L351Y、F405A和Y407V取代，并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处是T350V、T366L、K392L和T394W取代。

[0249] 在一些实施方案中，抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处是T350V、T366L、K392L和T394W取代，并且其中抗体恒定区的另一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处是T350V、L351Y、F405A和Y407V取代。

[0250] 下面列出恒定区中能够使两条多肽链异二聚化的突变的实例。曲妥珠单抗重链A1、A2、B1和B2各自包括曲妥珠单抗的重链可变结构域(粗体序列)和衍生自人IgG1的具有呈加下划线的氨基酸形式的突变的恒定区。曲妥珠单抗重链A1和曲妥珠单抗重链B1可以优先配对并形成异二聚体。曲妥珠单抗重链A2和曲妥珠单抗重链B2可以优先配对并形成异二聚体。

[0251] 曲妥珠单抗重链A

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKGLEWVARIYPT  
NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRaedtavyycsrwggdgyam  
DYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK**  
[0252] **SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP  
IEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTEENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
YKTPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
(SEQ ID NO:299)。**

[0253] 曲妥珠单抗重链B

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKGLEWVARIYPT  
NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRaedtavyycsrwggdgyam  
DYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK**  
[0254] **SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP  
IEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
NYKTPVVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
(SEQ ID NO:300)。**

[0255] 曲妥珠单抗重链A1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP  
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRGGDGFYA  
MDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTSWN  
SGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP  
[0256] KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF  
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSL  
LSPG\* (SEQ ID NO:301)。

[0257] 曲妥珠单抗重链B1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP  
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRGGDGFYA  
MDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTSWN  
SGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP  
[0258] KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF  
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP  
ENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSL  
SPG\* (SEQ ID NO:302)。

[0259] 可以使用本领域技术人员众所周知的重组DNA技术制备上述蛋白质。例如,可以将编码包含scFv、铰链和抗体恒定区的第一免疫球蛋白链的第一核酸序列克隆到第一表达载体中;可以将编码例如包含另一scFv、铰链和抗体恒定区或包含抗体重链的第二免疫球蛋白链的第二核酸序列克隆到第二表达载体中;并且可以将编码抗体轻链的第三核酸序列克隆到第三表达载体中。可以将第一、第二和任选的第三表达载体一起稳定地转染到宿主细胞中,以产生本文所述的多聚体蛋白。

[0260] 为了实现多特异性结合蛋白的最高收率,可以对第一、第二和第三表达载体的不同比率进行探究,以确定用于转染到宿主细胞中的最佳比率。转染后,可以使用本领域已知的方法,诸如有限稀释、ELISA、FACS、显微镜检查或Clonepix分离单个克隆以用于产生细胞库。

[0261] 克隆可以在适于生物反应器放大和多特异性结合蛋白的表达维持的条件下培养。可以使用本领域已知的方法分离和纯化多特异性结合蛋白,包括离心、深度过滤、细胞裂解、匀化、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。

[0262] II. 治疗应用

[0263] 本发明提供了用于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癌症的方法。所述方法可用于治疗多种癌症,包括实体肿瘤、淋巴瘤和白血病。期望待治疗的癌症类型与蛋白质结合的癌细胞的类型相匹配。例如,表达HER2的癌症,诸如表达HER2的乳腺癌的治疗期望使用与蛋白质结合的本文所述的蛋白质进行治疗。在某些实施方

案中,本发明提供了用于治疗多种表达BCMA的癌症的方法,其通过向有需要的患者施用治疗有效量的本文所述的多特异性结合蛋白来实现。在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗多种表达CD33的癌症的方法,其通过向有需要的患者施用治疗有效量的本文所述的多特异性结合蛋白来实现。

[0264] 因此,本发明的一个方面提供了一种治疗患者癌症的方法,其中所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的本文所述的蛋白质,以治疗癌症。治疗方法的另外的方面和实施方案描述如下。

[0265] 可以根据待治疗的癌症表征治疗方法。例如,在某些实施方案中,癌症是实体肿瘤。在某些其他实施方案中,癌症是脑癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、白血病、肺癌、肝癌、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、胃癌、睾丸癌或子宫癌。在其他实施方案中,癌症是血管化肿瘤(vascularized tumor)、鳞状细胞癌、腺癌、小细胞癌、黑素瘤、成神经细胞瘤、肉瘤(例如,血管肉瘤或软骨肉瘤)、喉癌、腮腺癌、胆道癌、甲状腺癌、肢端雀斑样黑素瘤、光化性角化病、急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、腺样囊性癌、腺瘤、腺肉瘤、腺鳞癌、肛管癌、肛门癌、肛门直肠癌(anorectum cancer)、星形细胞肿瘤、前庭大腺癌(bartholin gland carcinoma)、基底细胞癌、胆管癌、骨癌、骨髓癌、支气管癌、支气管腺体癌、类癌、胆管癌、软骨肉瘤、脉络丛乳头状瘤/癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、透明细胞癌、结缔组织癌、囊腺瘤、消化系统癌、十二指肠癌、内分泌系统癌、内胚窦癌、子宫内膜增生、子宫内膜间质肉瘤、子宫内膜样腺癌、内皮细胞癌、室管膜癌、上皮细胞癌、尤文氏肉瘤、眼和眼眶癌、女性生殖器癌、局灶性结节性增生、胆囊癌、胃窦癌、胃底癌、胃泌素瘤、成胶质细胞瘤、胰高血糖素瘤、心脏癌、成血管细胞瘤、血管内皮瘤、血管瘤、肝腺瘤、肝腺瘤病、肝胆管癌、肝细胞癌、霍奇金病、回肠癌、胰岛瘤、上皮内瘤变、上皮间鳞状细胞瘤变(interepithelial squamous cell neoplasia)、肝内胆管癌、浸润性鳞状细胞癌、空肠癌、关节癌、卡波西肉瘤、盆腔癌、大细胞癌、大肠癌、平滑肌肉瘤、雀斑型恶性黑素瘤、淋巴瘤、男性生殖器癌、恶性黑素瘤、恶性间皮肿瘤、成神经管细胞瘤、髓上皮瘤、脑膜癌、间皮癌、转移癌、口腔癌、粘液表皮样癌、多发性骨髓瘤、肌肉癌、鼻道癌、神经系统癌、神经上皮腺癌结节性黑素瘤、非上皮性皮肤癌、燕麦细胞癌、少突胶质细胞癌(oligodendroglial cancer)、口腔癌、骨肉瘤、乳头状浆液性腺癌(papillary serous adenocarcinoma)、阴茎癌、咽癌、垂体肿瘤、浆细胞瘤、假性肉瘤、肺母细胞瘤、直肠癌、肾细胞癌、呼吸系统癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、浆液性癌、鼻窦癌(sinus cancer)、皮肤癌、小细胞癌、小肠癌、平滑肌瘤、软组织癌、生长抑素分泌型肿瘤(somatostatin-secreting tumor)、脊柱癌、鳞状细胞癌、横纹肌瘤、间皮下癌(submesothelial cancer)、浅表扩散性黑素瘤、T细胞白血病、舌癌、未分化癌、输尿管癌、尿道癌、膀胱癌、泌尿系统癌、子宫颈癌、子宫体癌、葡萄膜黑素瘤、阴道癌、疣状癌、血管活性肠肽瘤(VIPoma)、外阴癌、高分化癌或肾母细胞瘤(Wilms tumor)。

[0266] 在某些其他实施方案中,待治疗的癌症是非霍奇金淋巴瘤,诸如B细胞淋巴瘤或T细胞淋巴瘤。在某些实施方案中,非霍奇金淋巴瘤是B细胞淋巴瘤,诸如弥漫性大B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、毛细胞白血病,或原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤。在某些

其他实施方案中,非霍奇金淋巴瘤是T细胞淋巴瘤,诸如前体T淋巴母细胞性淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、结外自然杀伤/T细胞淋巴瘤、肠病型T细胞淋巴瘤、皮下脂膜炎样T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤或外周T细胞淋巴瘤。

[0267] 在某些实施方案中,癌症是AML、骨髓增生异常综合征、慢性骨髓单核细胞性白血病、慢性骨髓性白血病的骨髓母细胞急变期(myeloid blast crisis)和ALL。

[0268] 在某些实施方案中,可以根据在癌细胞表面上表达的特定抗原的存在来表征待治疗的癌症。在某些实施方案中,除BCMA之外,癌细胞可以表达以下中的一种或多种:CD2、CD19、CD20、CD30、CD38、CD40、CD52、CD70、EGFR/ERBB1、IGF1R、HER3/ERBB3、HER4/ERBB4、MUC1、cMET、SLAMF7、PSCA、MICA、MICB、TRAILR1、TRAILR2、MAGE-A3、B7.1、B7.2、CTLA4和PD1。

[0269] 在某些实施方案中,除CD33之外,癌细胞可以表达以下中的一种或多种:CD2、CD19、CD20、CD30、CD38、CD40、CD52、CD70、EGFR/ERBB1、IGF1R、HER3/ERBB3、HER4/ERBB4、MUC1、TROP2、cMET、SLAMF7、PSCA、MICA、MICB、TRAILR1、TRAILR2、MAGE-A3、B7.1、B7.2、CTLA4和PD1。

[0270] 在某些实施方案中,除HER2之外,癌细胞可以表达以下中的一种或多种:CD2、CD19、CD20、CD30、CD38、CD40、CD52、CD70、EGFR/ERBB1、IGF1R、HER3/ERBB3、HER4/ERBB4、MUC1、cMET、SLAMF7、PSCA、MICA、MICB、TRAILR1、TRAILR2、MAGE-A3、B7.1、B7.2、CTLA4和PD1。

[0271] 在某些实施方案中,可以根据癌细胞表面上MHC对特定TAA肽的呈递来表征待治疗的癌症。可以加工成TCR可靶向的TAA肽的蛋白质的非限制性实例包括组织分化抗原(例如,MART-1、gp100、CEA、CD19和酪氨酸酶)、肿瘤种系抗原(例如,NY-ESO-1、MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A12、MAGE-C2、BAGE1、GAGE1、CTAG1、CTAG2、XAGE-1B和SSX2)、癌细胞过表达的正常蛋白(例如,hTERT、EGFR、ERBB2、WT1、MUC1和间皮素)、病毒蛋白(例如,HPV、EBV和MCC)以及肿瘤特异性突变抗原。在某些实施方案中,癌细胞包含由HLA-A\*02:01:48呈递的具有SEQ ID NO:425的氨基酸序列的ELAVL4肽。在某些实施方案中,癌细胞包含由HLA-A\*02:01:48呈递的具有SEQ ID NO:426的氨基酸序列的胰岛素肽。在某些实施方案中,癌细胞包含由HLA-A\*02:01:48呈递的具有SEQ ID NO:340的氨基酸序列的hTERT肽。在某些实施方案中,癌细胞包含由HLA-A\*02呈递的具有SEQ ID NO:341的氨基酸序列的ERBB2肽。在某些实施方案中,癌细胞包含由HLA-A\*02呈递的具有SEQ ID NO:342的氨基酸序列的WT1肽。在某些实施方案中,癌细胞包含由HLA-A1呈递的具有SEQ ID NO:343的氨基酸序列的MAGE-A3肽。在某些实施方案中,癌细胞包含由HLA-A2呈递的具有SEQ ID NO:344的氨基酸序列的MART1肽。在某些实施方案中,癌细胞包含由HLA-A2呈递的具有SEQ ID NO:346的氨基酸序列的BIRC5肽。在某些实施方案中,癌细胞包含由HLA-A2呈递的具有SEQ ID NO:347的氨基酸序列的PRAME肽。在某些实施方案中,癌细胞包含由HLA-A2呈递的具有SEQ ID NO:348的氨基酸序列的NY-ESO-1肽。在某些实施方案中,癌细胞包含由HLA-A2呈递的具有SEQ ID NO:345的氨基酸序列的SSX2肽。

[0272] III.组合疗法

[0273] 本发明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来治疗癌症。

[0274] 可作为组合疗法的一部分用于治疗癌症的示例性治疗剂包括,例如,辐射、丝裂霉

素、维甲酸、苯达莫司汀(ribomustin)、吉西他滨(gemcitabine)、长春新碱(vincristine)、依托泊苷(etoposide)、克拉屈滨(cladribine)、二溴甘露醇(mitobronitol)、甲氨蝶呤(methotrexate)、多柔比星(doxorubicin)、卡波醌(carboquone)、喷司他丁(pentostatin)、硝氨吖啶(nitracrine)、净司他丁(zinostatin)、西曲瑞克(cetrorelix)、来曲唑(letrozole)、雷替曲塞(raltitrexed)、道诺霉素(daunorubicin)、法屈唑(fadroazole)、福莫司汀(fotemustine)、胸腺法新(thymalfasin)、索布佐生(sobuzoxane)、奈达铂(nedaplatin)、阿糖胞苷、比卡鲁胺(bicalutamide)、长春瑞滨(vinorelbine)、维司力农(vesnarinone)、氨鲁米特(aminoglutethimide)、安吖啶(amsacrine)、丙谷胺(proglumide)、依利醋铵(elliptinium acetate)、酮舍林(ketanserin)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依曲替酯(etretinate)、异维甲酸(isotretinoin)、链脲菌素(streptozocin)、尼莫司汀(nimustine)、长春地辛(vindesine)、氟他米特(flutamide)、氟他胺(drogenil)、布缩宫素(butocin)、卡莫氟(carmofur)、雷佐生(razoxane)、裂皱菌素(sizofilan)、卡铂(carboplatin)、二溴卫矛醇(mitolactol)、替加氟(tegafur)、异环磷酰胺(ifosfamide)、泼尼莫司汀(prednimustine)、必医你舒(picibanil)、左旋咪唑(levamisole)、替尼泊苷(teniposide)、英丙舒凡(improsulfan)、依诺他滨(enocitabine)、麦角乙脲(lisuride)、羟甲烯龙(oxymetholone)、他莫昔芬(tamoxifen)、黄体酮、美雄烷(mepitiostane)、环硫雄醇(epitiostanol)、福美司坦(formestane)、干扰素 $\alpha$ 、干扰素 $2\alpha$ 、干扰素 $\beta$ 、干扰素 $\gamma$ 、集落刺激因子1、集落刺激因子2、地尼白介素-白喉毒素连接物(denileukin diftitox)、白介素2、促黄体激素释放因子以及可表现出与其同源受体的不同结合和增加或减少的血清半衰期的上述药剂的变型。

[0275] 可作为组合疗法的一部分用于治疗癌症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抑制剂伊匹木单抗(ipilimumab)已被美国食品和药物管理局批准用于治疗黑素瘤。

[0276] 可作为组合疗法的一部分用于治疗癌症的其他药剂是靶向非检查点靶标的单克隆抗体药剂(例如,赫赛汀(herceptin))和非细胞毒性剂(例如,酪氨酸激酶抑制剂)。

[0277] 其他类别的抗癌剂包括,例如：(i) 选自ALK抑制剂、ATR抑制剂、A2A拮抗剂、碱基切除修复抑制剂、Bcr-Ab1酪氨酸激酶抑制剂、布鲁顿(Bruton's)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、刺猬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抑制剂以及WEE1抑制剂的抑制剂；(ii) OX40、CD137、CD40、GITR、CD27、HVEM、TNFRSF25或ICOS的激动剂；以及(iii) 选自IL-12、IL-15、GM-CSF和G-CSF的细胞因子。

[0278] 本发明的蛋白质也可以用作手术切除原发病灶的助剂。

[0279] 可选择多特异性结合蛋白和另外的治疗剂的量以及施用的相对定时,以便实现期望的组合治疗效果。例如,当向需要这种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任何顺序,例如依序、共同、一起、同时等施用。此外,例如,多特异性结合蛋白可在一种或多种另外的治疗剂发挥其预防或治疗作用的时间期间施用,或反之亦然。

[0280] IV. 药物组合物

[0281] 本公开的特征还在于包含治疗有效量的本文所述的多特异性结合蛋白的药物组合物/制剂。

[0282] 所述组合物可以被配制用于多种药物递送体系。一种或多种生理上可接受的赋形剂或载体也可以包括在组合物中以用于适当配制。用于本公开的合适制剂见于Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 第17版, 1985。关于药物递送方法的简要综述,参见,例如,Langer (Science 249:1527-1533, 1990)。

[0283] 本公开的静脉内药物递送制剂可包含在袋、笔或注射器中。在某些实施方案中,袋可连接至包括管和/或针头的通道。在某些实施方案中,制剂可以是冻干制剂或液体制剂。在某些实施方案中,制剂可冷冻干燥(冻干)并包含在约12-60个小瓶中。在某些实施方案中,可将制剂冷冻干燥,并且45mg冷冻干燥的制剂可包含在一个小瓶中。在某些实施方案中,约40mg-约100mg的冷冻干燥的制剂可包含在一个小瓶中。在某些实施方案中,将来自12、27或45个小瓶的冷冻干燥的制剂组合以获得治疗剂量的呈静脉内药物制剂形式的蛋白质。在某些实施方案中,制剂可以是液体制剂并且以约250mg/小瓶至约1000mg/小瓶储存。在某些实施方案中,制剂可以是液体制剂并且以约600mg/小瓶储存。在某些实施方案中,制剂可以是液体制剂并且以约250mg/小瓶储存。

[0284] 本公开的蛋白质可以液体含水药物制剂的形式存在,其在缓冲溶液中包括治疗有效量的蛋白质,从而形成制剂。

[0285] 这些组合物可通过常规灭菌技术来灭菌,或可进行无菌过滤。可将所得水溶液包装以用于原样使用,或冻干,在施用之前,将冻干的制剂与无菌含水载剂组合。制剂的pH通常将在3与11之间,更优选在5与9之间或在6与8之间,并且最优选在7与8之间,诸如7至7.5。可将固体形式的所得组合物以多个单剂量单位包装,每个单位包含固定量的一种或多种上述药剂。固体形式的组合物也可以包装在容器中以灵活取量。

[0286] 在某些实施方案中,本公开提供了一种具有延长保质期的制剂,其包括与甘露糖醇、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、聚山梨酸酯80、水和氢氧化钠组合的本公开的蛋白质。

[0287] 在某些实施方案中,制备在pH缓冲溶液中包括本公开的蛋白质的含水制剂。本发明的缓冲液可具有在约4至约8,例如,约4.5至约6.0,或约4.8至约5.5范围内的pH,或可具有约5.0至约5.2的pH。上述pH值中间的范围也旨在成为本公开的一部分。例如,旨在包括使用任何上述值的组合作为上限和/或下限的值的范围。将把pH控制在此范围内的缓冲液的实例包括乙酸盐(例如,乙酸钠)、琥珀酸盐(诸如琥珀酸钠)、葡糖酸盐、组氨酸、柠檬酸盐以及其他有机酸缓冲液。

[0288] 在某些实施方案中,制剂包括包含柠檬酸盐和磷酸盐的缓冲体系,以将pH维持在约4至约8的范围内。在某些实施方案中,pH范围可为约4.5至约6.0,或约pH 4.8至约5.5,或在约5.0至约5.2的pH范围内。在某些实施方案中,缓冲体系包括柠檬酸一水合物、柠檬酸钠、磷酸二钠二水合物和/或磷酸二氢钠二水合物。在某些实施方案中,缓冲体系包括约

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的磷酸二钠二水合物(例如,1.53mg/ml)、约0.9mg/ml的磷酸二氢钠二水合物(例如,0.86)以及约6.2mg/ml的氯化钠(例如,6.165mg/ml)。在某些实施方案中,缓冲体系包括1-1.5mg/ml的柠檬酸、0.25至0.5mg/ml的柠檬酸钠、1.25至1.75mg/ml的磷酸二钠二水合物、0.7至1.1mg/ml的磷酸二氢钠二水合物,以及6.0至6.4mg/ml的氯化钠。在某些实施方案中,用氢氧化钠调节制剂的pH。

[0289] 在制剂中还可包括多元醇,其用作张力调节剂(tonicifier)并可使抗体稳定。多元醇以相对于制剂的期望等张性可变化的量添加到制剂中。在某些实施方案中,含水制剂可以是等张的。还可相对于多元醇的分子量改变多元醇的添加量。例如,与二糖(诸如海藻糖)相比,可添加较少量的单糖(例如,甘露糖醇)。在某些实施方案中,可在制剂中用作张度剂的多元醇是甘露糖醇。在某些实施方案中,甘露糖醇浓度可为约5至约20mg/ml。在某些实施方案中,甘露糖醇的浓度可为约7.5至15mg/ml。在某些实施方案中,甘露糖醇的浓度可为约10-14mg/ml。在某些实施方案中,甘露糖醇的浓度可为约12mg/ml。在某些实施方案中,多元醇山梨糖醇可包括在制剂中。

[0290] 也可将去污剂或表面活性剂添加到制剂中。示例性去污剂包括非离子型去污剂,诸如聚山梨酸酯(例如,聚山梨酸酯20、80等)或泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆188)。去污剂的添加量使得其减少所配制抗体的聚集和/或最小化制剂中的颗粒形成和/或减少吸附。在某些实施方案中,制剂可包括为聚山梨酸酯的表面活性剂。在某些实施方案中,制剂可包含去污剂聚山梨酸酯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)。在某些实施方案中,制剂可包含在约0.1mg/mL与约10mg/mL之间,或在约0.5mg/mL与约5mg/mL之间的聚山梨酸酯80。在某些实施方案中,可在制剂中添加约0.1%的聚山梨酸酯80。

[0291] 在实施方案中,本公开的蛋白质产物被配制为液体制剂。液体制剂可以10mg/mL的浓度存在于USP/Ph Eur I型50R小瓶中,所述小瓶用橡胶塞封闭并用铝卷边密封盖(crimp seal closure)密封。塞子可由符合USP和Ph Eur的弹性体制成。在某些实施方案中,小瓶可填充有61.2mL的蛋白质产品溶液,以允许60mL的可提取体积。在某些实施方案中,液体制剂可用0.9%盐水溶液稀释。

[0292] 在某些实施方案中,本公开的蛋白质的液体制剂可与稳定水平的糖组合制备成10mg/mL浓度的溶液。在某些实施方案中,液体制剂可在含水载剂中制备。在某些实施方案中,可以不大于可能导致对于静脉内施用不期望或不适合的粘度的量添加稳定剂。在某些实施方案中,糖可以是二糖,例如蔗糖。在某些实施方案中,液体制剂还可包括缓冲剂、表面活性剂和防腐剂中的一种或多种。

[0293] 在某些实施方案中,液体制剂的pH可通过添加药学上可接受的酸和/或碱来设定。在某些实施方案中,药学上可接受的酸可以是盐酸。在某些实施方案中,碱可以是氢氧化钠。

[0294] 除聚集之外,脱氨基(deamidation)是肽和蛋白质的常见产物变化,其可发生在发酵、收获/细胞澄清、纯化、药物物质/药物产品储存期间以及样品分析期间。脱氨基是蛋白质损失NH<sub>3</sub>,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亲本肽的质量

降低17道尔顿。随后的水解导致质量增加18道尔顿。琥珀酰亚胺中间体由于在含水条件下的不稳定性而难以分离。因此，脱氨基通常可检测为质量增加1道尔顿。天冬酰胺的脱氨基产生天冬氨酸或异天冬氨酸。影响脱氨基的速率的参数包括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氨基速率。蛋白质序列中Asn之后的Gly和Ser导致对脱氨基具有更高敏感性。

[0295] 在某些实施方案中，本公开的蛋白质的液体制剂可在防止蛋白质产物脱氨基的pH和湿度条件下保存。

[0296] 本文感兴趣的含水载剂是药学上可接受的载剂(对人施用安全且无毒)并且对液体制剂的制备有用。例示性载剂包括无菌注射用水(SWFI)、抑菌注射用水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如，磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或右旋糖溶液。

[0297] 可将防腐剂任选地添加到本文的制剂中以减少细菌作用。防腐剂的添加可以例如促进多用途(多剂量)制剂的生产。

[0298] 在特定情况下，诸如当患者在移植后在医院中通过IV途径接受所有药物时，静脉内(IV)制剂可以是优选的施用途径。在某些实施方案中，液体制剂在施用前用0.9%氯化钠溶液稀释。在某些实施方案中，用于注射的稀释药物产品是等张的并且适于通过静脉内输注进行施用。

[0299] 在某些实施方案中，可以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，并且衍生自具有“碱形成”金属或胺的各种已知酸(无机和有机)。在某些实施方案中，缓冲液可以是磷酸盐缓冲液。在某些实施方案中，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、钾或铵离子可以充当抗衡离子。

[0300] 可将防腐剂任选地添加到本文的制剂中以减少细菌作用。防腐剂的添加可以例如促进多用途(多剂量)制剂的生产。

[0301] 本文感兴趣的含水载剂是药学上可接受的载剂(对人施用安全且无毒)并且对液体制剂的制备有用。例示性载剂包括无菌注射用水(SWFI)、抑菌注射用水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如，磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或右旋糖溶液。

[0302] 本公开的蛋白质可以包括蛋白质和冻干保护剂的冻干制剂的形式存在。冻干保护剂可以是糖，例如二糖。在某些实施方案中，冻干保护剂可以是蔗糖或麦芽糖。冻干制剂还可包括缓冲剂、表面活性剂、填充剂和/或防腐剂中的一种或多种。

[0303] 可用于稳定冻干药物产品的蔗糖或麦芽糖的量可以是至少1:2的蛋白质与蔗糖或麦芽糖的重量比。在某些实施方案中，蛋白质与蔗糖或麦芽糖的重量比可为1:2至1:5。

[0304] 在某些实施方案中，可通过添加药学上可接受的酸和/或碱来设定冻干之前制剂的pH。在某些实施方案中，药学上可接受的酸可以是盐酸。在某些实施方案中，药学上可接受的碱可以是氢氧化钠。

[0305] 在冻干之前，可将包含本公开的蛋白质的溶液的pH调节在6至8之间。在某些实施方案中，冻干药物产品的pH范围可以是7至8。

[0306] 在某些实施方案中，可以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，并且衍生自具有“碱形成”金属或胺的各种已知酸(无机和有机)。在某些实施方案中，缓冲液可以是磷酸盐缓冲液。在某些实施方案中，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、钾或铵离子可以充当抗衡离子。

[0307] 在某些实施方案中,可添加“填充剂”。“填充剂(bulking agent)”是这样的化合物,其增加冻干混合物的质量并且有助于冻干饼的物理结构(例如,促进产生基本上均匀的冻干饼,以维持开孔结构)。例示性填充剂包括甘露糖醇、甘氨酸、聚乙二醇和山梨糖醇。本发明的冻干制剂可包含此类填充剂。

[0308] 可将防腐剂任选地添加到本文的制剂中以减少细菌作用。防腐剂的添加可以例如促进多用途(多剂量)制剂的生产。

[0309] 在某些实施方案中,冻干药物产品可以用含水载剂构制。本文感兴趣的含水载剂是药学上可接受的载剂(例如,对人施用安全且无毒)并且可用于在冻干后制备液体制剂。例示性稀释剂包括无菌注射用水(SWFI)、抑菌注射用水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或右旋糖溶液。

[0310] 在某些实施方案中，将本公开的冻干药物产品用无菌注射用水，USP (SWFI) 或 0.9% 氯化钠注射液，USP 重构。在重构期间，冻干粉末溶解成溶液。

[0311] 在某些实施方案中，将本公开的冻干蛋白产物构制到约4.5mL注射用水中，并用0.9%盐水溶液(氯化钠溶液)稀释。

[0312] 本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可有所变化,以便获得对于特定患者、组合物和施用模式有效实现期望治疗反应而对患者无毒的活性成分的量。

[0313] 对于各个患者,特定剂量可以是统一剂量,例如50-5000mg蛋白质。可替代地,患者的剂量可以根据患者的近似体重或表面积进行调整。确定适当剂量的其他因素可以包括待治疗或预防的疾病或病状、疾病的严重程度、施用途径,以及患者的年龄、性别和医疗状况。确定适当的治疗剂量所必需的计算的进一步精细改进是本领域技术人员常规进行的,尤其是根据本文公开的剂量信息和测定。剂量也可以通过使用与适当的剂量-反应数据结合使用的用于确定剂量的已知测定来确定。可以在监测疾病进展时调节个体患者的剂量。可以测量患者的可靶向构建体或复合物的血液水平,以查看是否需要调节剂量以达到或维持有效浓度。药物基因组学可用于确定哪种可靶向构建体和/或复合物及其剂量对于给定个体最可能有效(Schmitz等.,*Clinica Chimica Acta* 308:43-53,2001;Steimer等.,*Clinica Chimica Acta* 308:33-41,2001)。

[0314] 一般来讲,基于体重的剂量为约0.01μg至约100mg/kg体重,诸如约0.01μg至约100mg/kg体重、约0.01μg至约50mg/kg体重、约0.01μg至约10mg/kg体重、约0.01μg至约1mg/kg体重、约0.01μg至约100μg/kg体重、约0.01μg至约50μg/kg体重、约0.01μg至约10μg/kg体重、约0.01μg至约1μg/kg体重、约0.01μg至约0.1μg/kg体重、约0.1μg至约100mg/kg体重、约0.1μg至约50mg/kg体重、约0.1μg至约10mg/kg体重、约0.1μg至约1mg/kg体重、约0.1μg至约100μg/kg体重、约0.1μg至约10μg/kg体重、约0.1μg至约1μg/kg体重、约1μg至约100mg/kg体重、约1μg至约50mg/kg体重、约1μg至约10mg/kg体重、约1μg至约1mg/kg体重、约1μg至约100μg/kg体重、约1μg至约50μg/kg体重、约1μg至约10μg/kg体重、约10μg至约100mg/kg体重、约10μg至约50mg/kg体重、约10μg至约10mg/kg体重、约10μg至约1mg/kg体重、约10μg至约100μg/kg体重、约10μg至约50μg/kg体重、约50μg至约100mg/kg体重、约50μg至约50mg/kg体重、约50μg至约10mg/kg体重、约50μg至约1mg/kg体重、约50μg至约100μg/kg体重、约100μg至约100mg/kg体重、约100μg至约50mg/kg体重、约100μg至约10mg/kg体重、约100μg至约1mg/kg体重、约1mg至约100mg/kg体重、约1mg至约50mg/kg体重、约1mg至约10mg/kg体重、约10mg至

约100mg/kg体重、约10mg至约50mg/kg体重、约50mg至约100mg/kg体重。

[0315] 剂量可每天、每周、每月或每年给予一次或多次,或甚至每2至20年给予一次。本领域的普通技术人员可以基于所测得的可靶向构建体或复合物在体液或组织中的滞留时间和浓度容易地估算出给药的重复率。本发明的施用可以是静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、胸膜内、鞘内、腔内、通过导管灌注或通过病灶内直接注射。可每天施用一次或多次、每周施用一次或多次、每月施用一次或多次,以及每年施用一次或多次。

[0316] 以上说明描述了本发明的多个方面和实施方案。本专利申请具体涵盖所述方面和实施方案的所有组合和排列。

[0317] 实施例

[0318] 现已大体上描述本发明,参考以下实施例将更容易理解本发明,所述实施例仅出于说明本发明的某些方面和实施方案的目的被包括在内并且不旨在限制本发明。

[0319] 实施例1-F3-TriNKET和F3'-TriNKET的纯化

[0320] 按照用于纯化治疗性单克隆抗体的步骤纯化F3-TriNKET和F3'-TriNKET蛋白。简单来说,纯化方法包括蛋白A纯化(实现约80-90%单体),以及随后的Poros HS CIEX盐步骤洗脱(实现约97-99%单体)。对于临床制造过程,可以添加使用Q Cepharose或QMustang(流通模式)(以实现约99%单体)的附加纯化步骤,以进一步减少全细胞蛋白(WCP)和CHO DNA。

[0321] 纯化的F3'-TriNKET具有高热稳定性(DSC),类似于治疗性单克隆抗体。并且含有突变Fc的F3'-TrinKET的稳定性接近于IgG1 Fc。参见以下表13。

[0322] 表13

	<b>分子</b>	<b>Tm<sub>1</sub> (°C)</b>	<b>Tm<sub>2</sub> (°C)</b>	<b>Tm<sub>3</sub> (°C)</b>
[0323]	赫塞汀	72.4	83.6	
	F3'-TriNKET	73.2	79.0	86.7

[0324] 实施例2-F3'-TriNKET持续至少4周是稳定的

[0325] 在37°C下进行的加速稳定性研究中,发现F3'-TriNKET经4周保持稳定。参见图3A-3C。

[0326] 纯化的F3'-TriNKET在低pH保持期间是稳定的。将20mg/mL的纯化蛋白在甘氨酸中于pH 3.0下孵育2小时。图4示出纯化的F3'-TriNKET在低pH保持期间是稳定的。

[0327] 纯化的F3'-TriNKET在5个冻-融循环后是稳定的。图5A和图5B示出无论pH如何,纯化的F3'-TriNKET在5个冻-融循环后都是稳定的(图5A示出在PBS中的冻-融循环,并且图5B示出在pH 5.5的柠檬酸盐中的冻-融循环)。

[0328] 纯化的F3'-TriNKET在强制降解研究中是稳定的。图6示出其中F3'-TriNKET保持稳定的强制降解条件的条形图。

[0329] 实施例3-评估TriNKET与表达人癌抗原的细胞的结合

[0330] 使用表达目标癌抗原的人癌细胞系评估TriNKET的肿瘤抗原结合。使用人AML细胞系Molm-13评估F3'-TriNKET-CD33与CD33表达细胞的结合。使用HER2+Colo-201细胞系评估F3'-TriNKET-HER2与HER2表达细胞的结合。将F3'-TriNKET-HER2和F3'-TriNKET-CD33稀释,并与相应细胞一起孵育。使用荧光团缀合的抗人IgG二抗分别检测F3'-TriNKET-HER2与HER2表达细胞以及F3'-TriNKET-CD33与CD33表达细胞的结合。通过流式细胞术分析细胞,分别将对HER2和CD33表达细胞的结合MFI针对二抗对照归一化,以获得相对于背景的倍数

(fold over background) 值。

[0331] 实施例4-原代人NK细胞的细胞毒性测定

[0332] 使用密度梯度离心从人外周血血沉棕黄层中分离出外周血单核细胞(PBMC)。将分离的PBMC洗涤并制备以用于NK细胞分离。使用负选择技术,用磁珠分离NK细胞,分离的NK细胞的纯度通常>90% CD3-CD56+。使分离的NK细胞静息(rest)过夜,并且第二天用于细胞毒性测定。

[0333] DELFIA细胞毒性测定:

[0334] 从培养物中收获表达目标靶标的人癌细胞系,用PBS洗涤细胞,并以 $10^6/\text{mL}$ 重悬于生长培养基中,以用BATDA试剂(Perkin Elmer AD0116)进行标记。按照制造商的说明标记靶细胞。标记后,将细胞用PBS洗涤3x,并以 $0.5\text{-}1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 重悬于培养基中。为了制备背景孔,将标记细胞的等分试样暂放一边,并将细胞从培养基中离心出来。小心地将 $100\mu\text{l}$ 培养基一式三份添加到孔中,以免干扰沉淀的细胞。将 $100\mu\text{l}$  BATDA标记的细胞添加到96孔板的每个孔中。保存孔以用于从靶细胞的自发释放,并通过添加1% Triton-X制备孔以用于靶细胞的最大裂解。将针对目标肿瘤靶标的单克隆抗体或TriNKET在培养基中稀释,向每个孔中添加 $50\mu\text{l}$ 稀释的mAb或TriNKET。从培养物中收获静息和/或激活的NK细胞,洗涤细胞,并根据期望的E:T比以 $10^5\text{-}2.0 \times 10^6/\text{mL}$ 重悬于培养基中。将 $50\mu\text{l}$  NK细胞添加到板的每个孔中,以得到 $200\mu\text{l}$ 的总培养体积。将板在 $37^\circ\text{C}$ 与5%  $\text{CO}_2$ 下孵育2-3小时,然后对测定显影。

[0335] 培养2-3小时后,将板从培养箱中移出,并通过以200g离心5分钟沉淀细胞。将 $20\mu\text{l}$ 培养上清液转移至制造商提供的干净微板中,并向每个孔中添加 $200\mu\text{l}$ 室温铕溶液。使板避光,并在板振荡器上以250rpm孵育15分钟。使用Victor 3或SpectraMax i3X仪器读板。特异性裂解%计算如下:特异性裂解% = ((实验释放 - 自发释放) / (最大释放 - 自发释放)) \* 100%。

[0336] 流式细胞术细胞毒性测定

[0337] 从培养物中收获嘌呤霉素选择后的表达BCMA并被转导以稳定表达NucLight Green(Essen BioScience 4475)的人癌细胞系,离心,并以 $10^5/\text{mL}$ 重悬于培养基中。将 $100\mu\text{l}$ 靶细胞添加到96孔板的每个孔中。将针对BCMA的TriNKET在培养基中稀释,并且将各 $50\mu\text{l}$ 添加到重复孔中。从培养物中收获静息过夜的纯化的人NK,洗涤,并以 $4 \times 10^5/\text{mL}$ 重悬于培养基中。对于2:1的E:T比,将 $50\mu\text{l}$  NK细胞添加到所有孔中,仅靶标的对照除外,所述对照接受 $100\mu\text{l}$ 培养基。将板在 $37^\circ\text{C}$ 与5%  $\text{CO}_2$ 下孵育30小时。

[0338] 共培养后,将细胞染色、固定并通过流式细胞术进行分析。检测到在FITC通道中具有强烈偏移的其余靶细胞,其中通过活力染色排除死细胞。输出绿色事件的数量,并通过与仅靶标的对照样品进行比较来计算杀伤%。计数珠粒被包括在内,以确保记录的体积相当。

[0339] 实施例5-F3' TriNKET与表达肿瘤抗原的细胞的结合

[0340] 图7示出F3' -TriNKET-HER2或曲妥珠单抗与HER2+Colo-201细胞的结合。F3' -TriNKET-HER2以更高的最大相对于背景的倍数结合Colo-201细胞,但具有略微降低的EC<sub>50</sub>结合值。

[0341] 图8示出F3' -TriNKET-CD33或CD33单克隆抗体与在Molm-13细胞上表达的CD33的结合。与CD33 mAb相比,F3' -TriNKET以类似的最大相对于背景的倍数和EC<sub>50</sub>结合值结合Molm-13细胞。

[0342] 实施例6-F3' -TriNKET介导针对HER2+和CD33+靶细胞的NK细胞毒性：

[0343] 图9和图10分别示出F3' -TriNKET-HER2介导的针对HER2低表达细胞系786-0和HER2高表达细胞系SkBr-3的细胞毒性。F3' -TriNKET-HER2为诱导NK介导的针对HER2低表达和HER2高表达细胞系的细胞毒性均提供了有效的EC<sub>50</sub>值。对于HER2高表达和低表达细胞，与曲妥珠单抗相比，F3' -TriNKET-HER2提供了更大的最大特异性裂解和更有效的EC<sub>50</sub>值。

[0344] 图11和图12分别示出F3' -TriNKET-CD33介导的针对两种CD33阳性人细胞系EOL-1和THP-1的细胞毒性。CD33单克隆抗体能够增加EOL-1靶细胞的NK细胞裂解(图11)，但是发现它对高FcR的THP-1细胞系无效(图12)。F3' -TriNKET-CD33为诱导NK介导的针对THP-1和EOL-1靶细胞的细胞毒性提供了次纳摩尔EC<sub>50</sub>值。

[0345] 实施例7-F4-TriNKET介导NK细胞毒性

[0346] 本实施例描述了靶标癌细胞的NK细胞杀伤的二价F4形式TriNKET介导的增强的效力。本实施例描述了二价F4形式TriNKET与靶细胞的结合。本实施例描述了二价F4形式TriNKET在稳定和维持BCMA在细胞表面上的高细胞表面表达中的作用。本实施例描述了二价F4形式TriNKET与其靶标的亲合力改善了TriNKET与靶抗原结合的亲和力，这实际上稳定了高水平的靶抗原在细胞表面上的表达和维持。

[0347] 通过F4-TriNKET实现的BCMA表面稳定

[0348] 将BCMA阳性的KMS12-PE骨髓瘤细胞与10μg/mL F4-TriNKET或单克隆抗体(EM-901)一起孵育，将样品分成三份，将每份样品等分试样在冰上放置20分钟、在37℃下放置2小时或在37℃下放置24小时。孵育期后，洗涤细胞并使用抗人IgG二抗检测结合的F4-TriNKET。染色后，将细胞固定并储存在4℃，在研究结束时分析所有样品。

[0349] 评估F4-TriNKET与表达人癌抗原的细胞的结合

[0350] 使用表达BCMA的人癌细胞系评估F4-TriNKET的肿瘤抗原结合(例如，A49-F4-TriNKET-BCMA，来自克隆ADI-27749的NKG2D结合结构域和衍生自EM-901的BCMA结合结构域)。使用以比KMS12-PE骨髓瘤细胞更高的水平表达BCMA的人多发性骨髓瘤细胞系MM.1R评估TriNKET与表达高水平BCMA的细胞的结合。将F4-TriNKET稀释，并与MM.1R细胞一起孵育。使用荧光团缀合的抗人IgG二抗检测F4-TriNKET的结合。通过流式细胞术分析细胞，将对表达BCMA的细胞的结合MFI针对二抗对照归一化，以获得相对于背景的倍数值。

[0351] 原代人NK细胞的细胞毒性测定

[0352] 使用密度梯度离心从人外周血血沉棕黄层中分离出外周血单核细胞(PBMC)。将分离的PBMC洗涤并制备以用于NK细胞分离。使用负选择技术，用磁珠分离NK细胞，分离的NK细胞的纯度通常>90% CD3-CD56+。将分离的NK细胞静息过夜，并且第二天用于细胞毒性测定。

[0353] DELFIA细胞毒性测定：从培养物中收获表达目标靶标的人癌细胞系，用PBS洗涤细胞，并以10<sup>6</sup>/mL重悬于生长培养基中，以用BATDA试剂(Perkin Elmer AD0116)进行标记。按照制造商的说明标记靶细胞。标记后，将细胞用PBS洗涤3x，并以0.5-1.0x10<sup>5</sup>/mL重悬于培养基中。为了制备背景孔，将标记细胞的等分试样暂放一边，并将细胞从培养基中离心出来。小心地将100μl培养基一式三份添加到孔中，以免干扰沉淀的细胞。将100μl BATDA标记的细胞添加到96孔板的每个孔中。保存孔以用于从靶细胞的自发释放，并通过添加1% Triton-X制备孔以用于靶细胞的最大裂解。将针对目标肿瘤靶标的单克隆抗体或TriNKET

在培养基中稀释,向每个孔中添加50 $\mu$ l稀释的mAb或TriNKET。从培养物中收获静息和/或激活的NK细胞,洗涤细胞,并根据期望的E:T比以10<sup>5</sup>-2.0x10<sup>6</sup>/mL重悬于培养基中。将50 $\mu$ l NK细胞添加到板的每个孔中,以得到200 $\mu$ l的总培养体积。将板在37°C与5% CO<sub>2</sub>下孵育2-3小时,然后对测定显影。培养2-3小时后,将板从培养箱中移出,并通过以200g离心5分钟沉淀细胞。将20 $\mu$ l培养上清液转移至制造商提供的干净微板中,并向每个孔中添加200 $\mu$ l室温铕溶液。使板避光,并在板振荡器上以250rpm孵育15分钟。使用Victor 3或SpectraMax i3X仪器读板。特异性裂解%计算如下:特异性裂解% = ((实验释放-自发释放) / (最大释放-自发释放))\*100%。

[0354] F4-TriNKET介导的NK细胞毒性

[0355] 对F4-TriNKET介导的BCMA阳性骨髓瘤细胞的裂解进行测定。图19示出F4-TriNKET介导的静息的人NK效应细胞对BCMA阳性KMS12-PE骨髓瘤细胞的裂解。图20示出F4-TriNKET介导的静息的人NK效应细胞对BCMA阳性MM.1R骨髓瘤细胞的裂解。EM-901单克隆抗体在两个实验中均用作对照。在图19中,使用KMS12-PE细胞(低BCMA表达)作为靶细胞;在图20中,使用MM.1R(高BCMA表达)作为靶细胞。对于相应的高表达和低表达BCMA的细胞MM.1R和KMS12-PE,F4-TriNKET具有次纳摩尔EC<sub>50</sub>值。与BCMA单克隆抗体EM-901相比,F4-TriNKET提供了针对两种细胞系的更大的最大特异性裂解和效力。

[0356] 图21示出F4-TriNKET(A49-F4-TriNKET-BCMA)、duobody-TriNKET(A49-DB-TriNKET-BCMA)或BCMA单克隆抗体(EM-901)与MM.1R骨髓瘤细胞的结合。所有这三种蛋白质都能够以剂量反应方式与MM.1R细胞上表达的BCMA结合。与一价结合子相比,亲合(avid)结合子能够以略微降低的最大相对于背景的倍数结合,但是亲合结合提供了提高的EC<sub>50</sub>结合值。

[0357] F4-TriNKET稳定表面BCMA

[0358] 图22示出在持续指示时间的孵育后,用F4-TriNKET或BCMA单克隆抗体(EM-901)对表面BCMA的染色。孵育后,BCMA mAb(EM-901)和F4-TriNKET都能快速稳定表面BCMA。BCMA mAb(EM-901)和F4-TriNKET能够在24小时的时期内维持增加的BCMA表面表达。

[0359] 图23示出在与F4-TriNKET或BCMA单克隆抗体(EM-901)一起孵育后,KMS12-PE细胞上的表面BCMA的稳定。在暴露于F4-TriNKET或mAb(EM-901)之后,细胞表面上BCMA的初始稳定迅速发生。由F4-TriNKET和单克隆抗体(EM-901)提供的亲和结合维持比一价BCMA结合持续更长时间的高表面BCMA,如通过使用duobody-TriNKET的情况下在24小时处表面BCMA表达的下降所表明。

[0360] F4-TriNKET介导大量的长期细胞毒性

[0361] 流式细胞术细胞毒性测定:从培养物中收获嘌呤霉素选择后的表达BCMA并被转导以稳定表达NucLight Green(Essen BioScience4475)的人癌细胞系,离心,并以10<sup>5</sup>/mL重悬于培养基中。将100 $\mu$ l靶细胞添加到96孔板的每个孔中。将针对BCMA的TriNKET在培养基中稀释,并且将各50 $\mu$ l添加到重复孔中。从培养物中收获静息过夜的纯化的人NK,洗涤,并以4×10<sup>5</sup>/mL重悬于培养基中。对于2:1的E:T比,将50 $\mu$ l NK细胞添加到所有孔中,仅靶标的对照除外,所述对照接受100 $\mu$ l培养基。将板在37°C与5% CO<sub>2</sub>下孵育30小时。

[0362] 共培养后,将细胞染色、固定并通过流式细胞术进行分析。检测到在FITC通道中具有强烈偏移的其余靶细胞,其中通过活力染色排除死细胞。输出绿色事件的数量,并通过与

仅靶标的对照样品进行比较来计算杀伤%。计数珠粒被包括在内,以确保记录的体积相当。

[0363] F4-TriNKET介导大量的长期细胞毒性

[0364] 图24和图25示出在30小时后,在F4-或DB-TriNKET的存在下,利用2:1的E:T比时BCMA阳性靶细胞系的人NK细胞裂解。图24示出KMS12-PE细胞(低BCMA表达)的杀伤高于无蛋白对照的杀伤,而在图25中,使用MM.1S细胞(更高的BCMA表达)作为靶细胞。与一价duobody-TriNKET相比,F4-TriNKET在所有测试浓度下均表现出BCMA高表达和低表达细胞系的杀伤增加。

[0365] 以引用的方式并入

[0366] 本文引用的每一个专利文献和科技文章的全部公开内容出于全部目的以引用的方式并入。

[0367] 等效方案

[0368] 在不脱离本发明的精神或基本特征的情况下,本发明可以其他具体形式来实施。因此,前述实施方案在所有方面都应被视为说明性的,而非是对本文描述的本发明的限制。因此,本发明的范围是由随附权利要求而非由上述描述所指示,并且属于权利要求的等效性含义和范围内的所有变化都意图包括在本文中。

靶向NK  
细胞的Fab  
靶向肿瘤的  
scFV

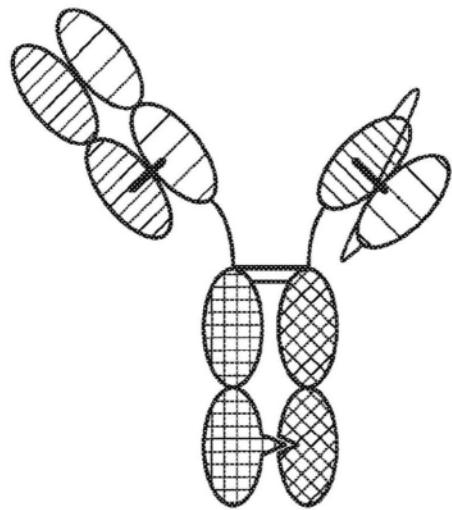


图1A

靶向肿瘤的Fab  
靶向NK细胞的scFV

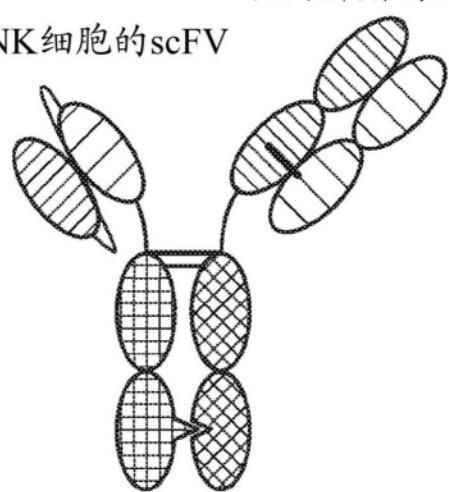


图1B

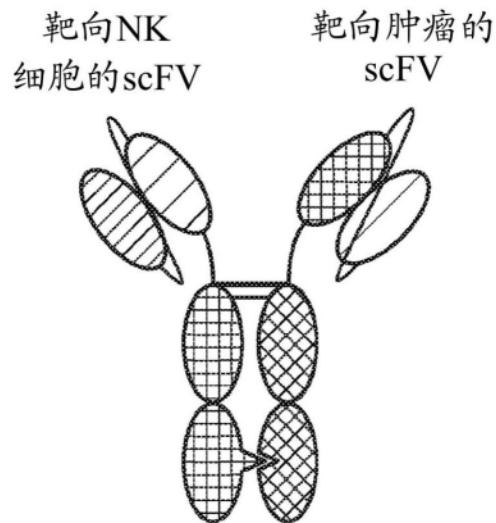


图1C

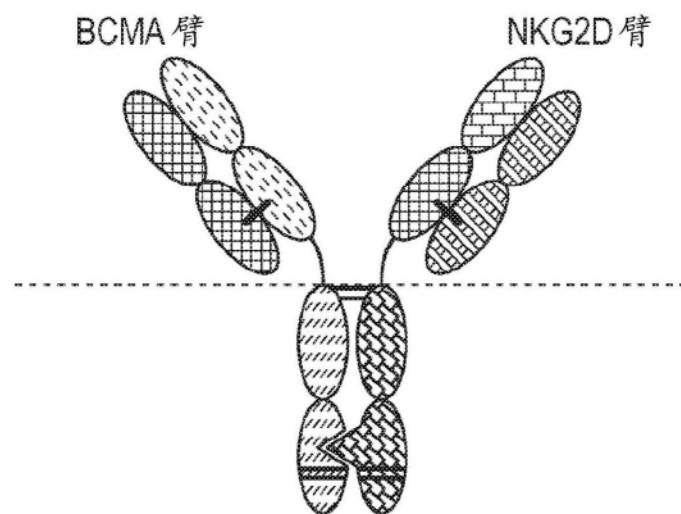
Duobody (DB) TriNKT

图2A

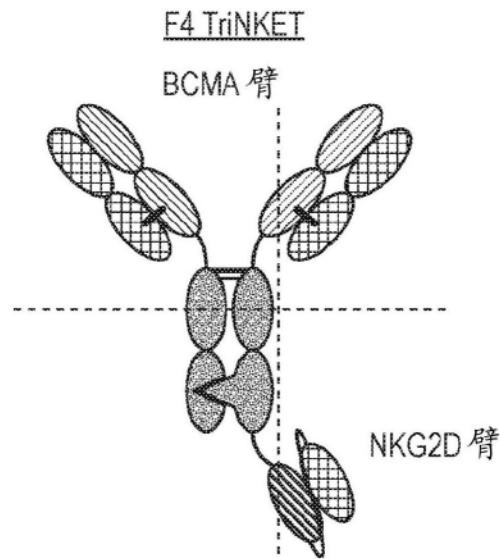


图2B

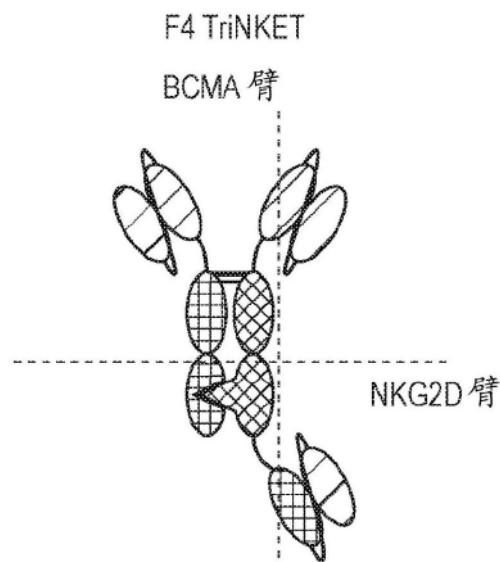


图2C

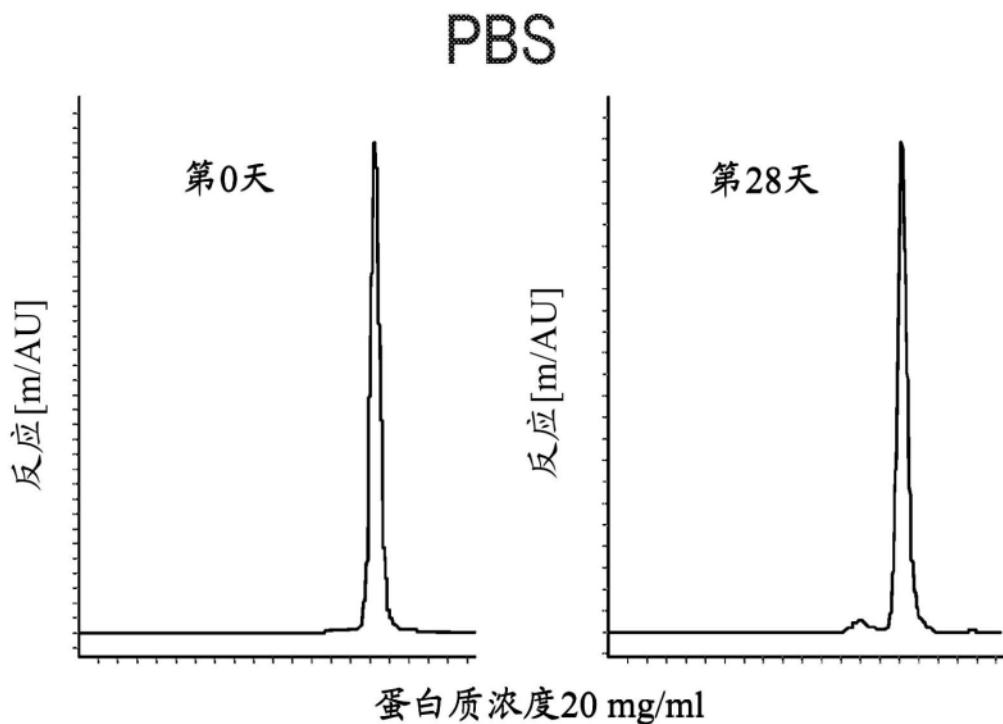


图3A

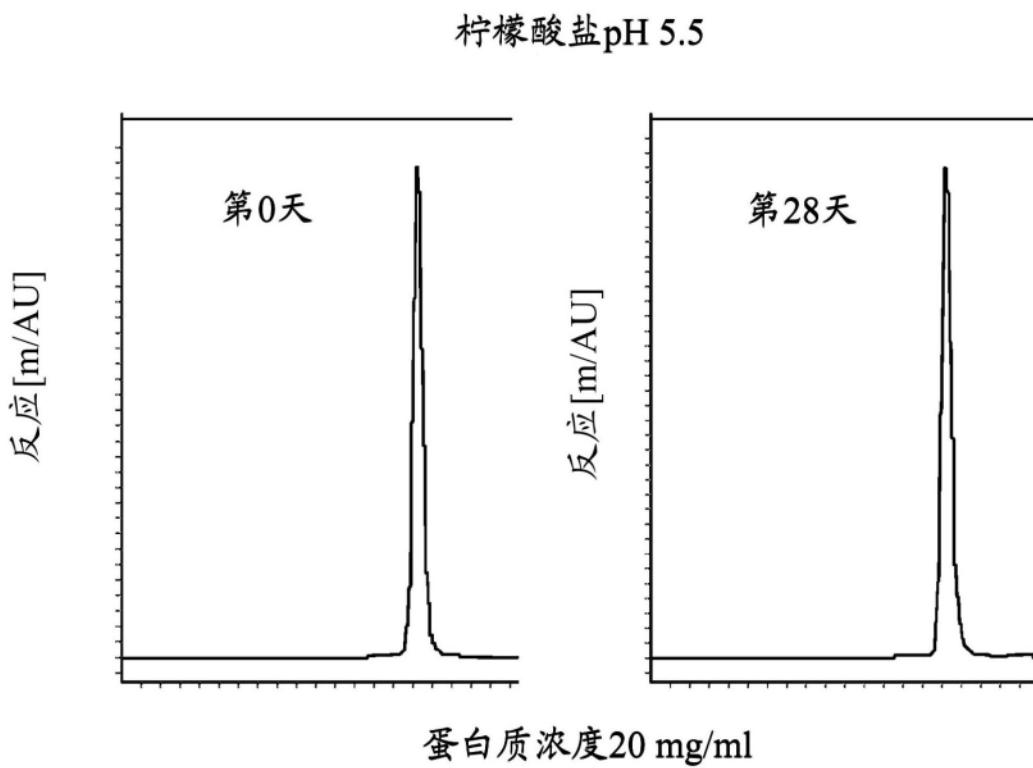


图3B

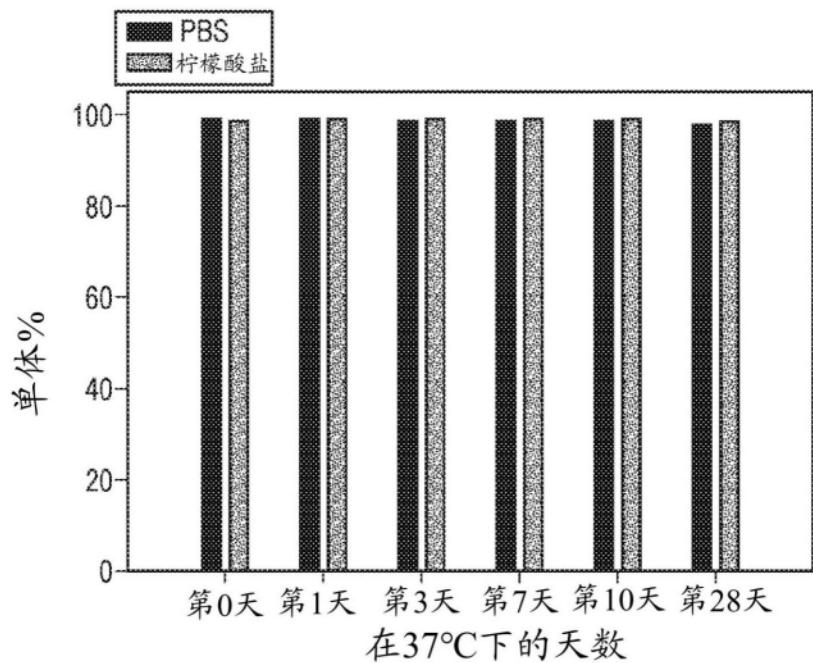


图3C

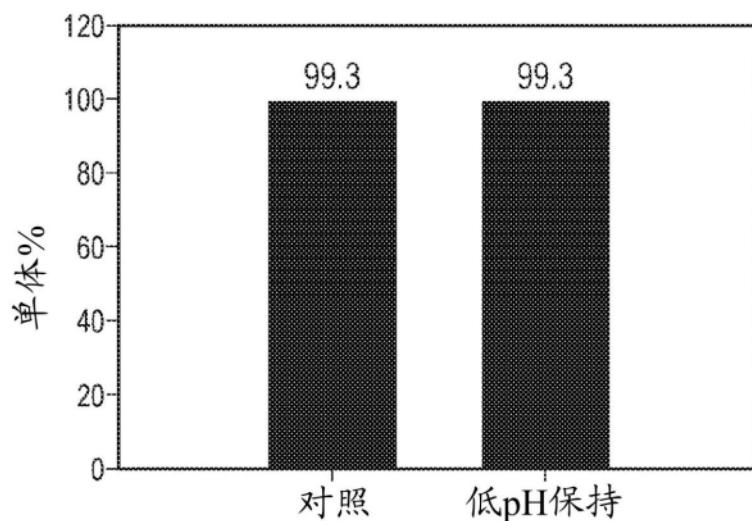


图4

## PBS

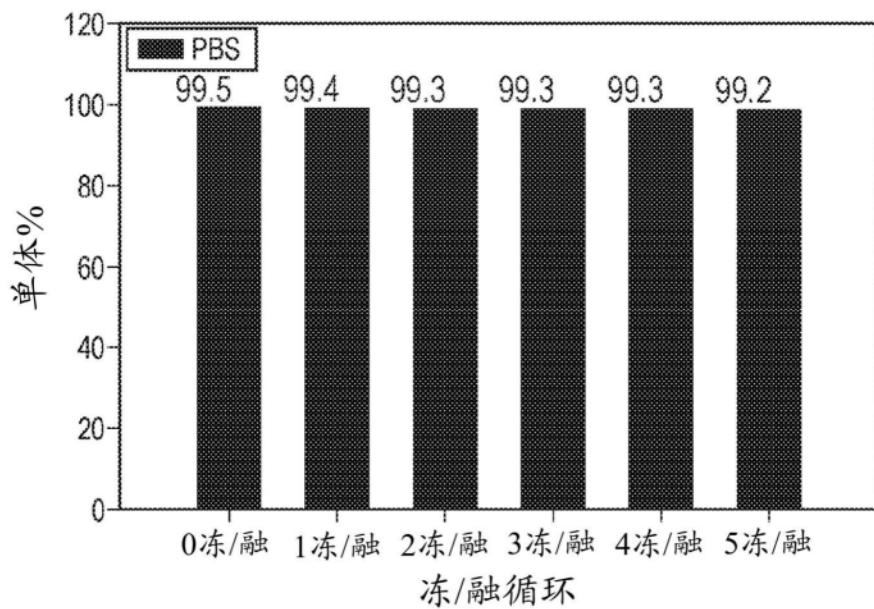


图5A

## 柠檬酸盐pH 5.5

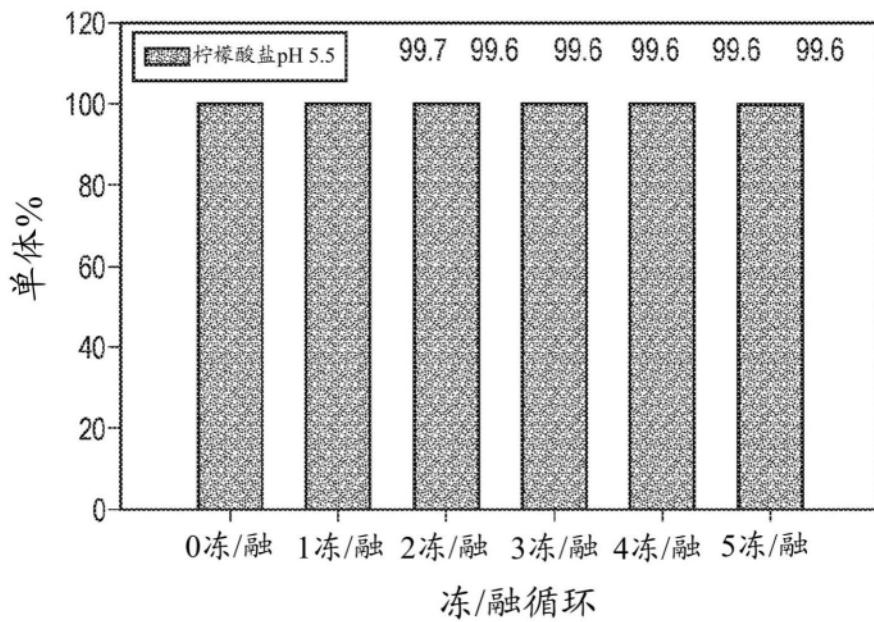


图5B

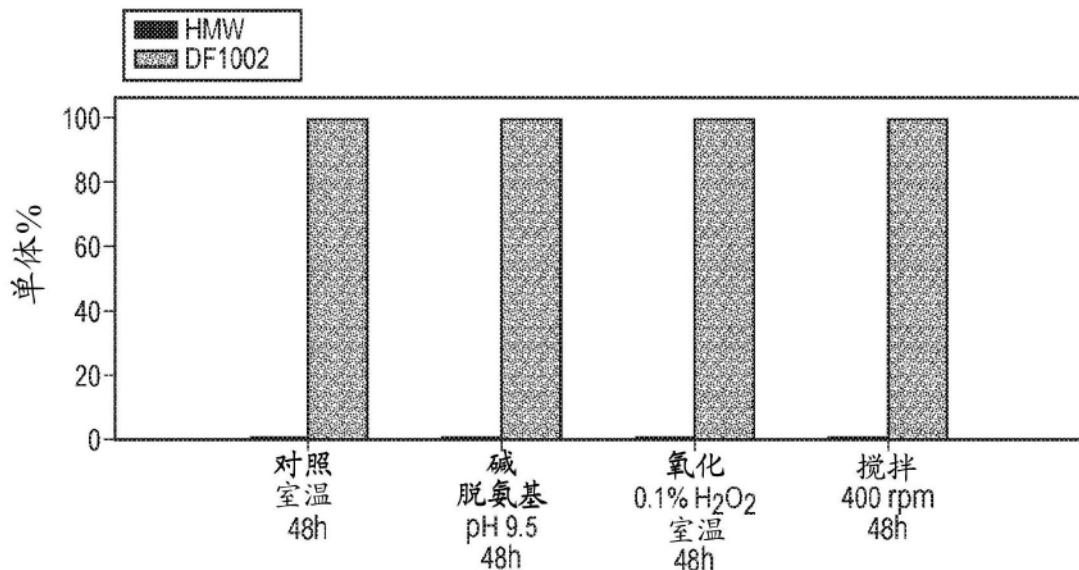


图6

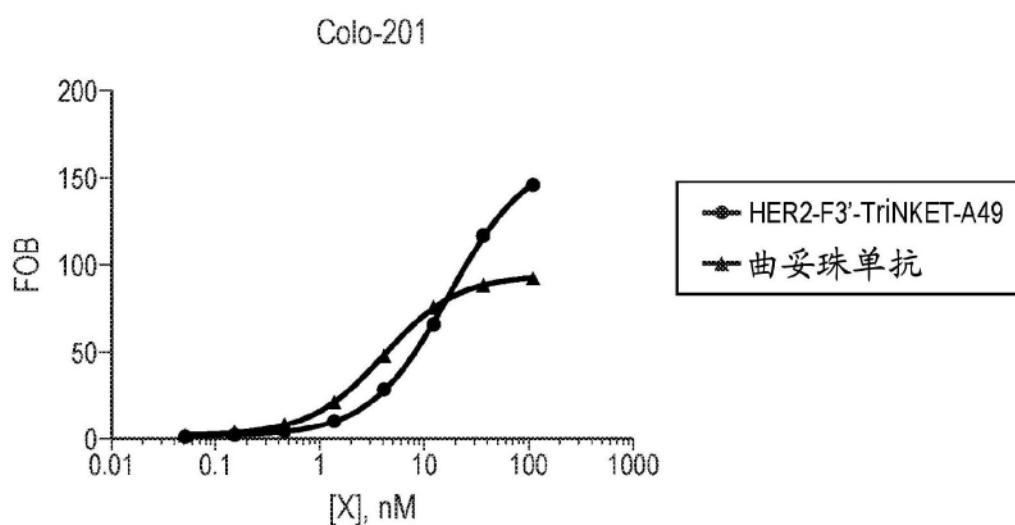


图7

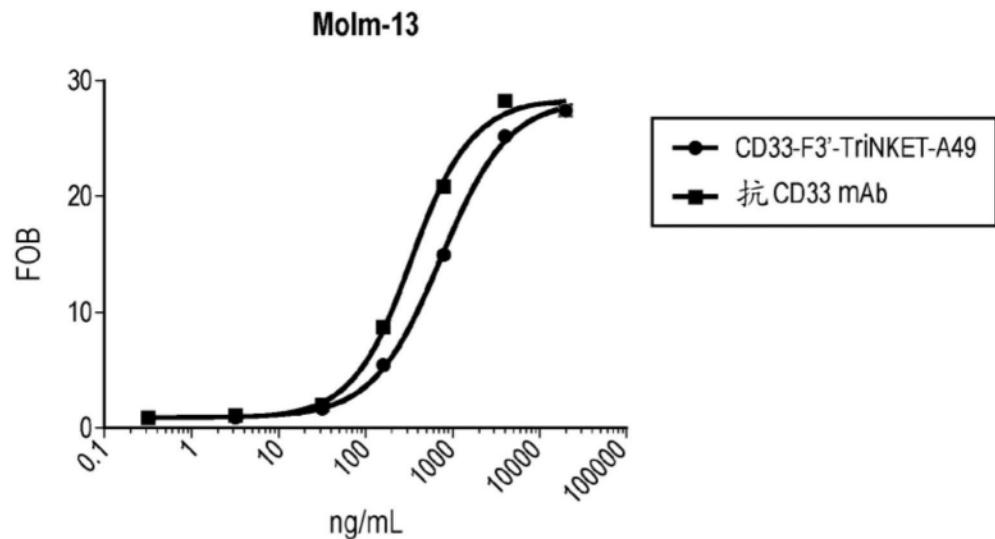


图8

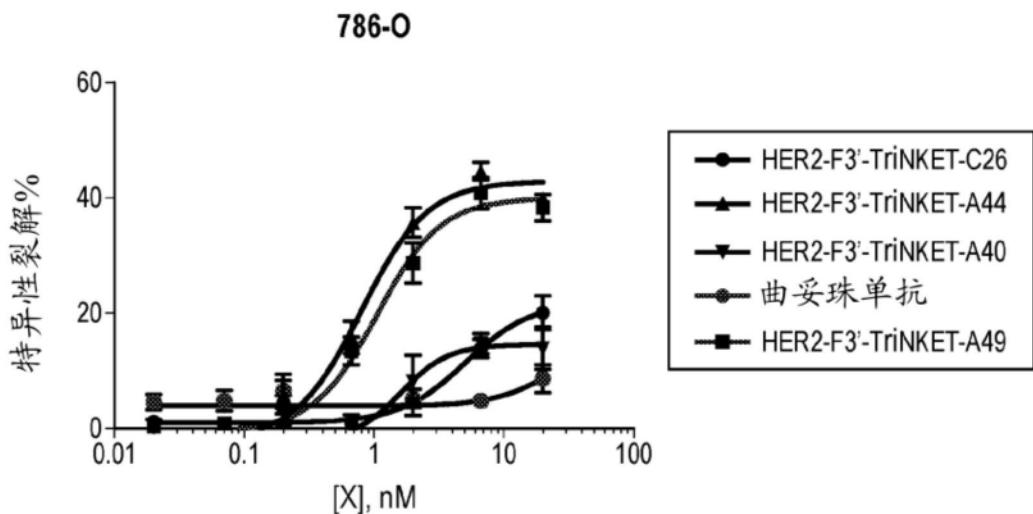


图9

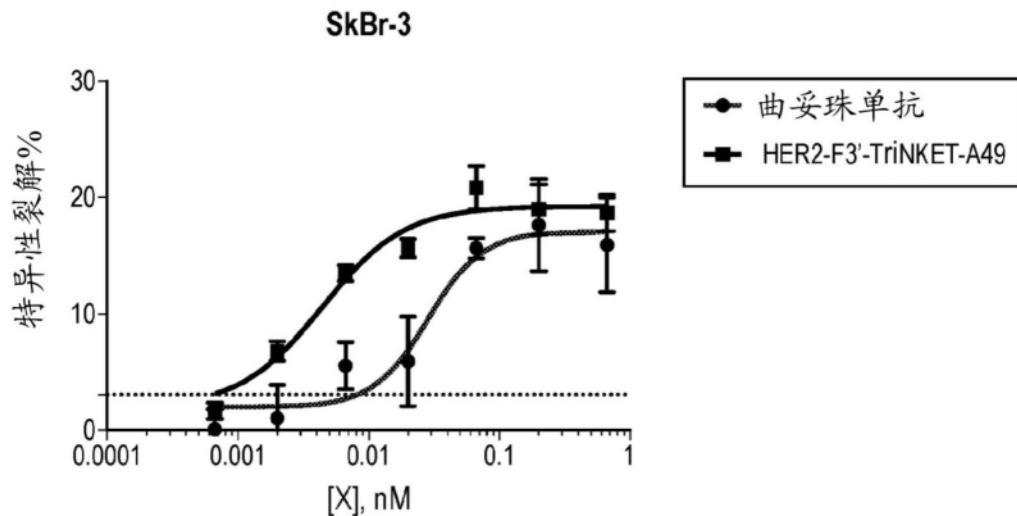


图10

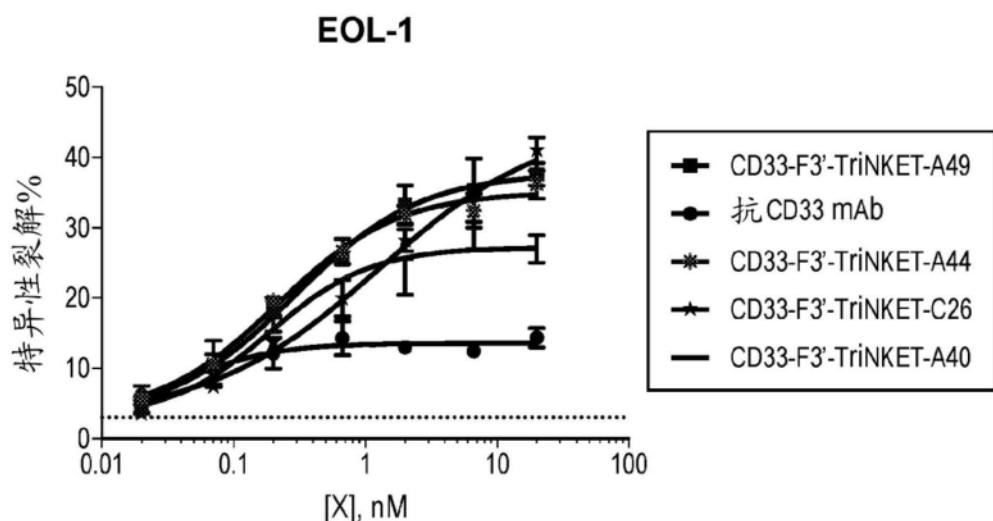


图11

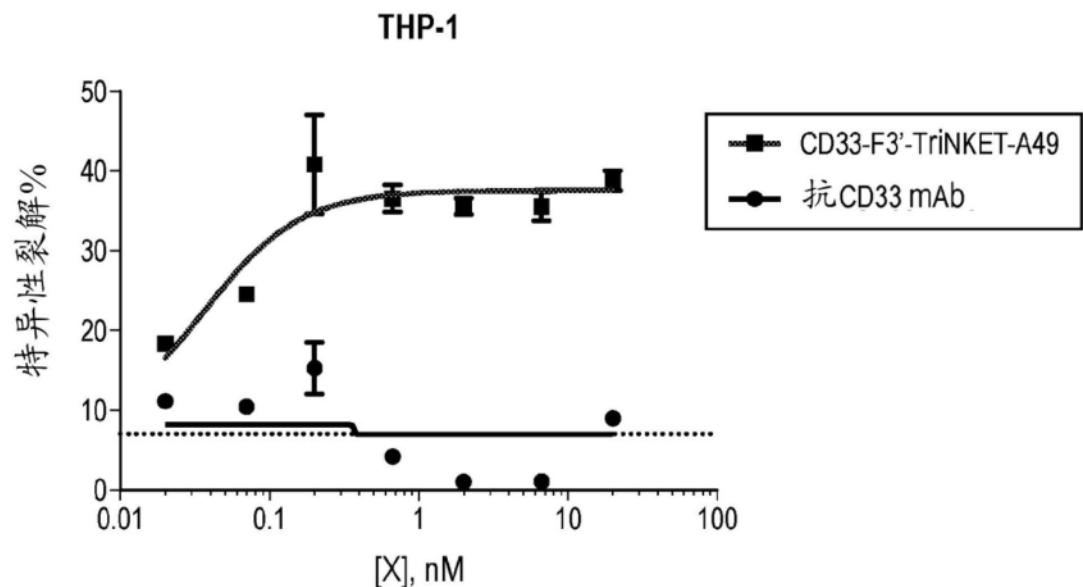


图12

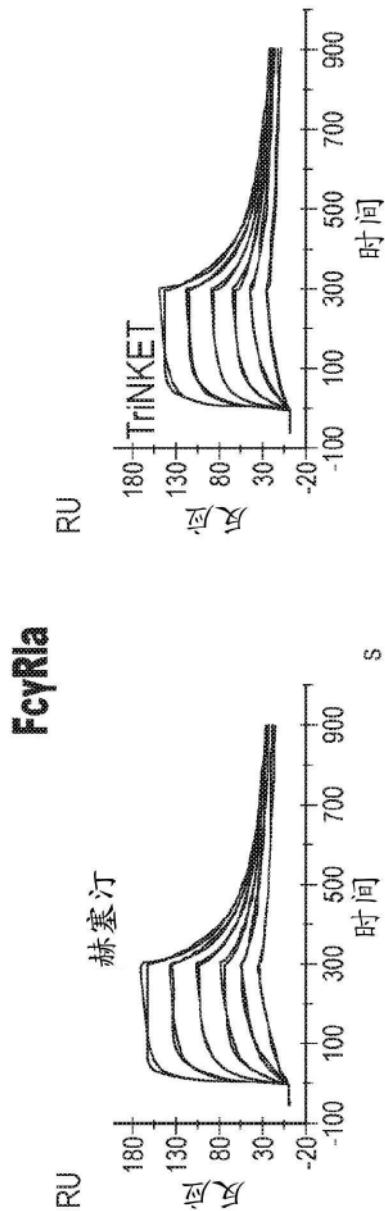


图13A

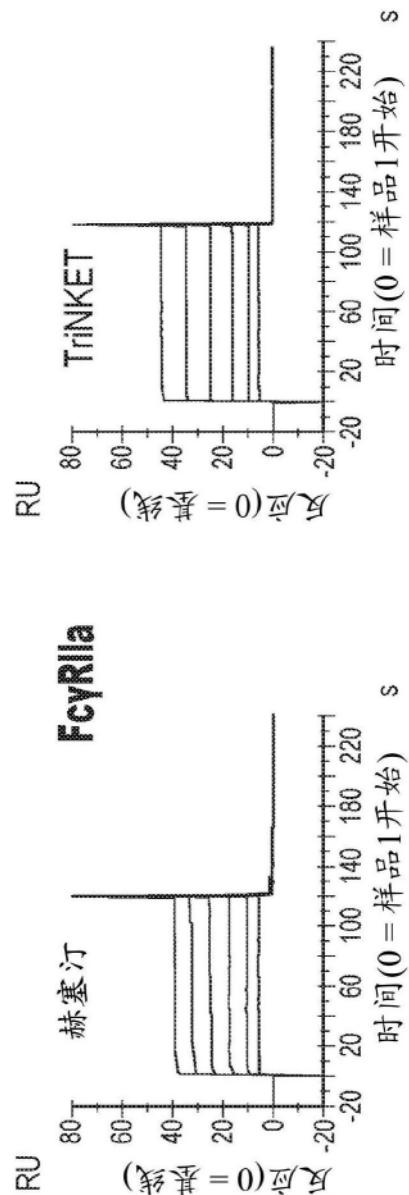


图13B

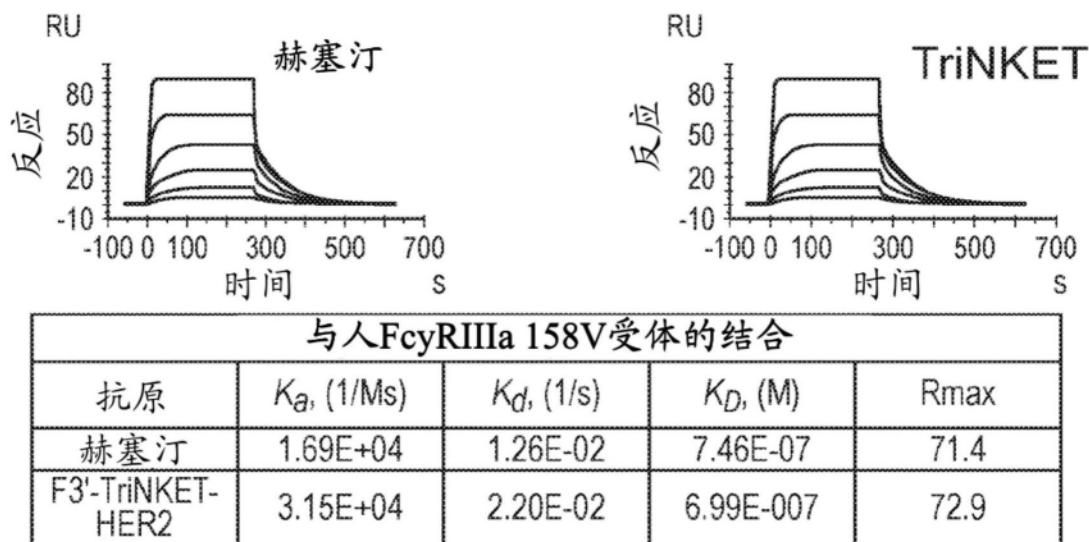


图13C

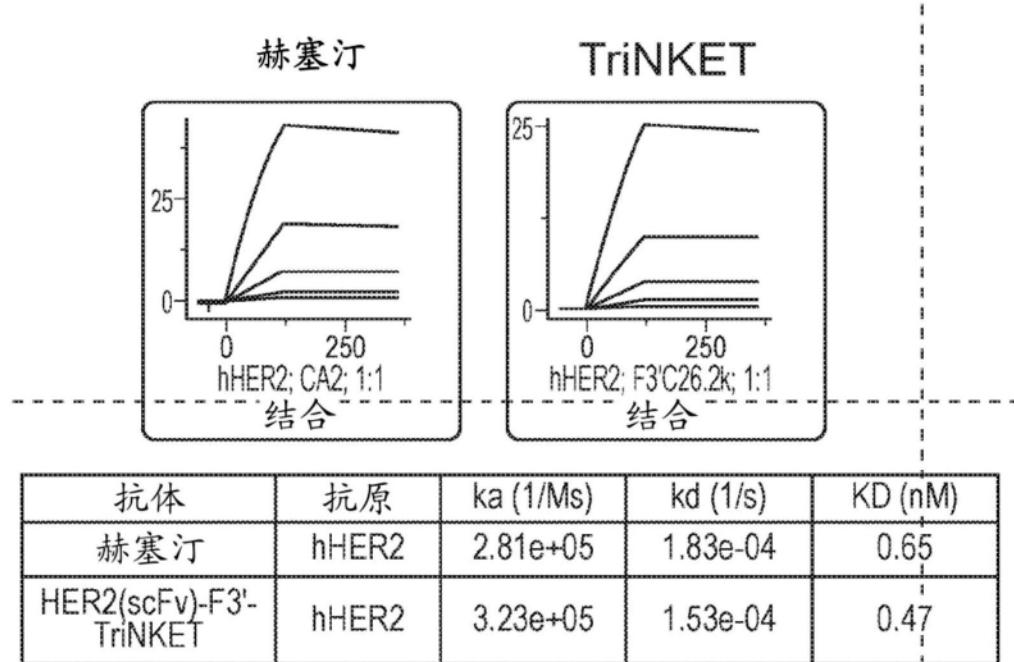


图14A

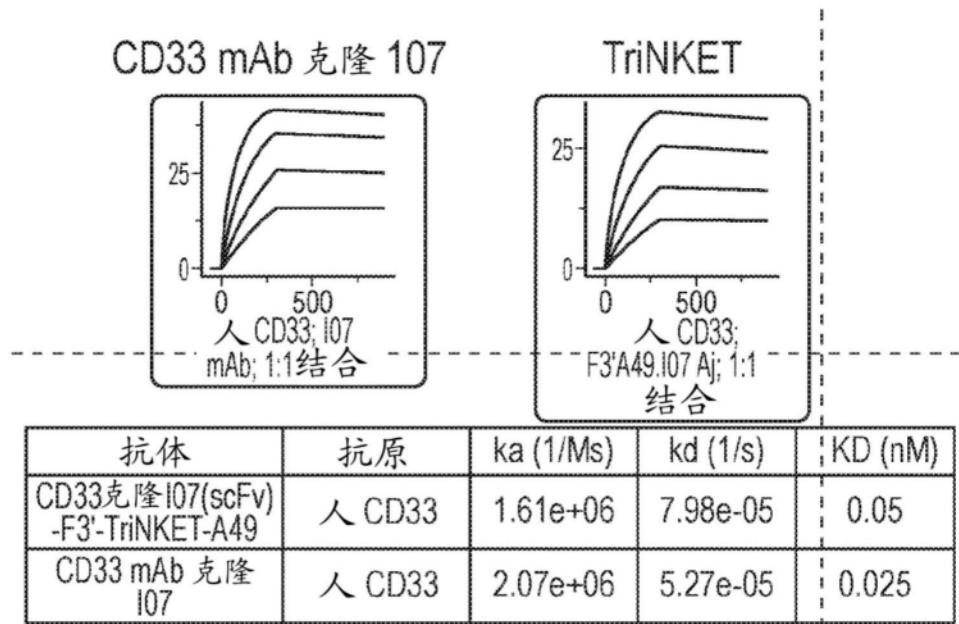


图14B

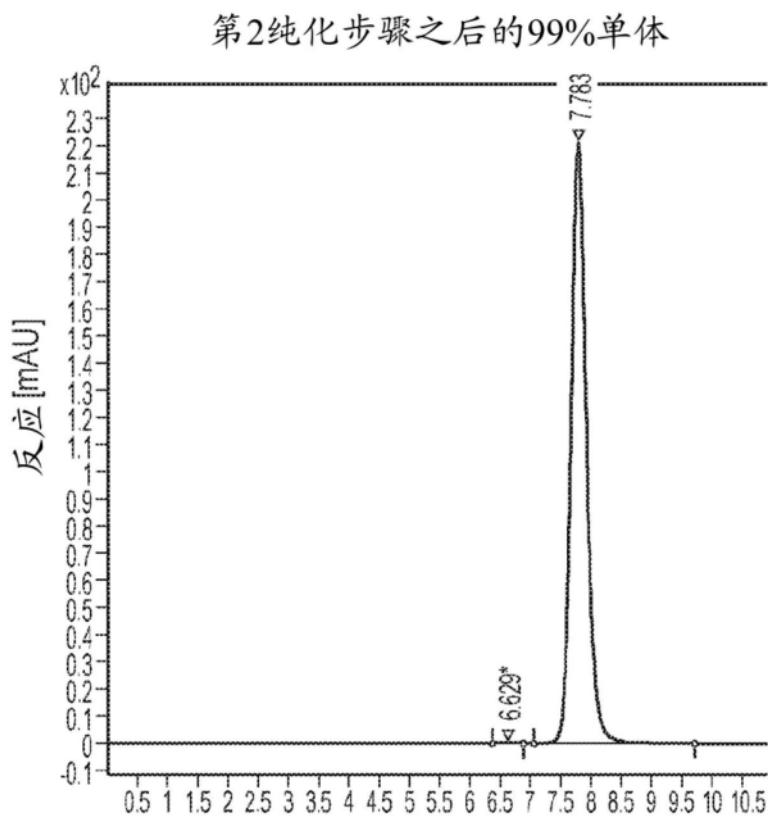


图15

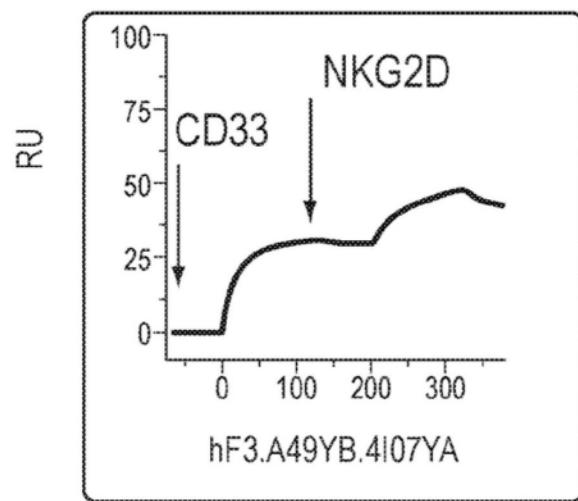


图16

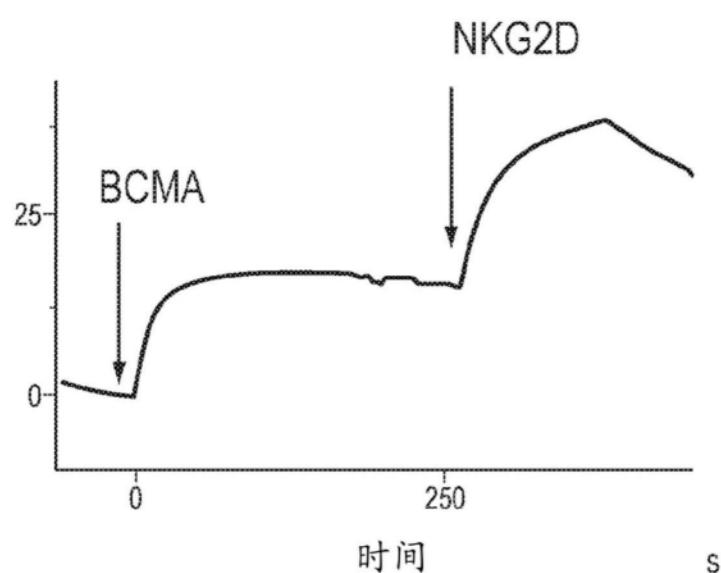


图17

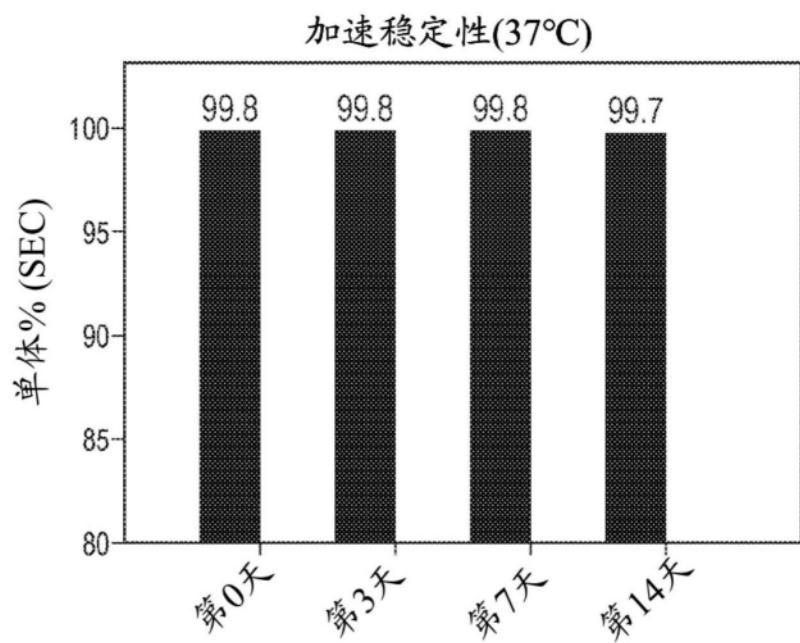


图18A

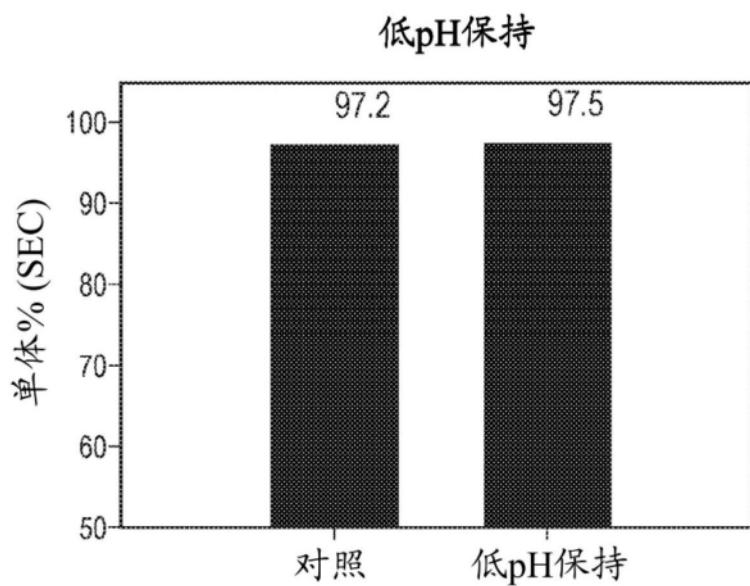


图18B

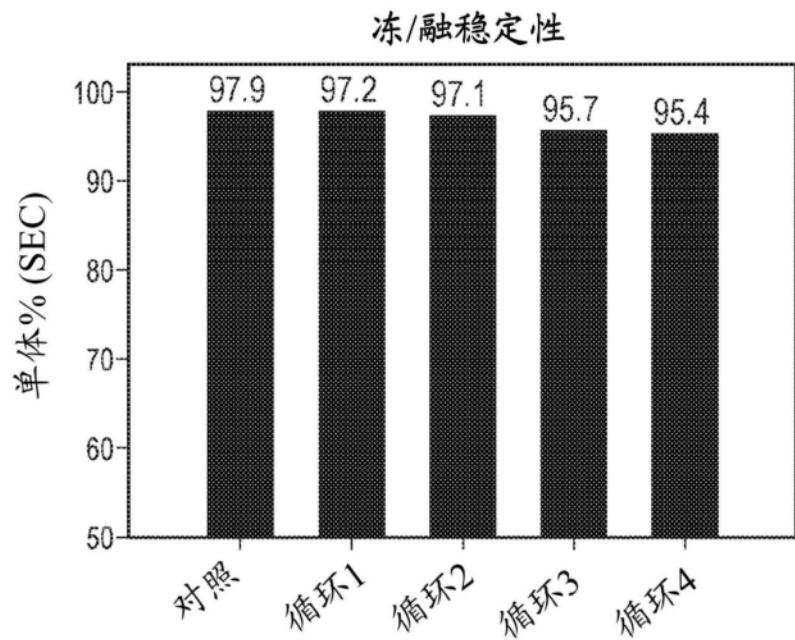


图18C

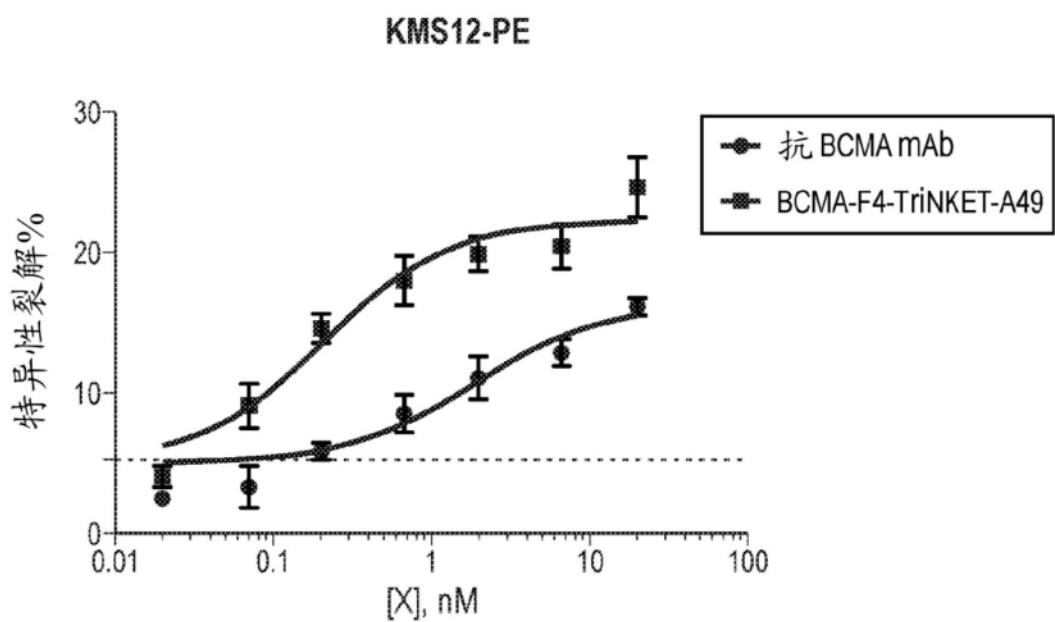


图19

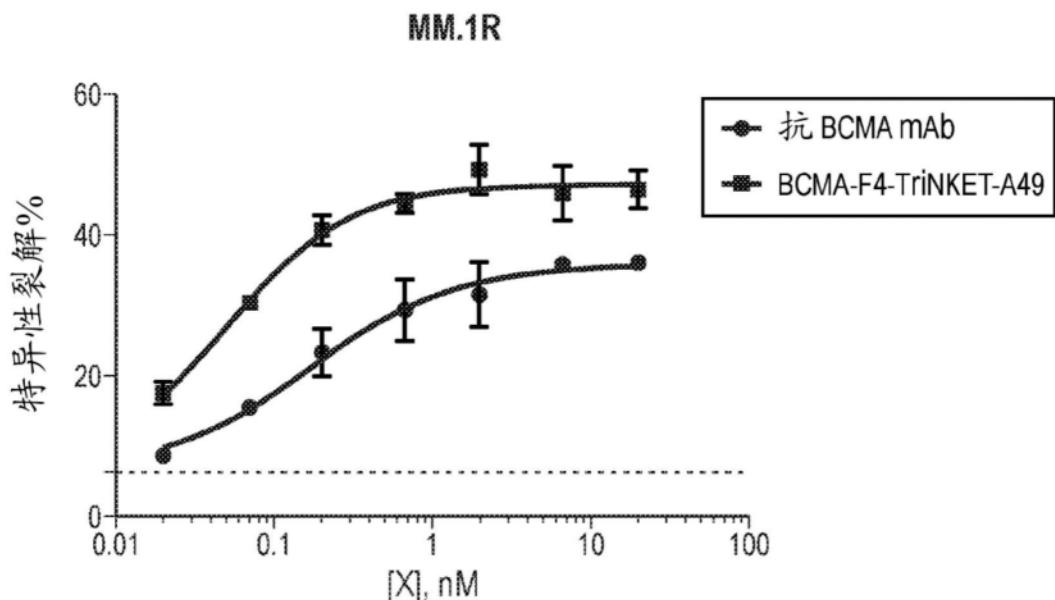


图20

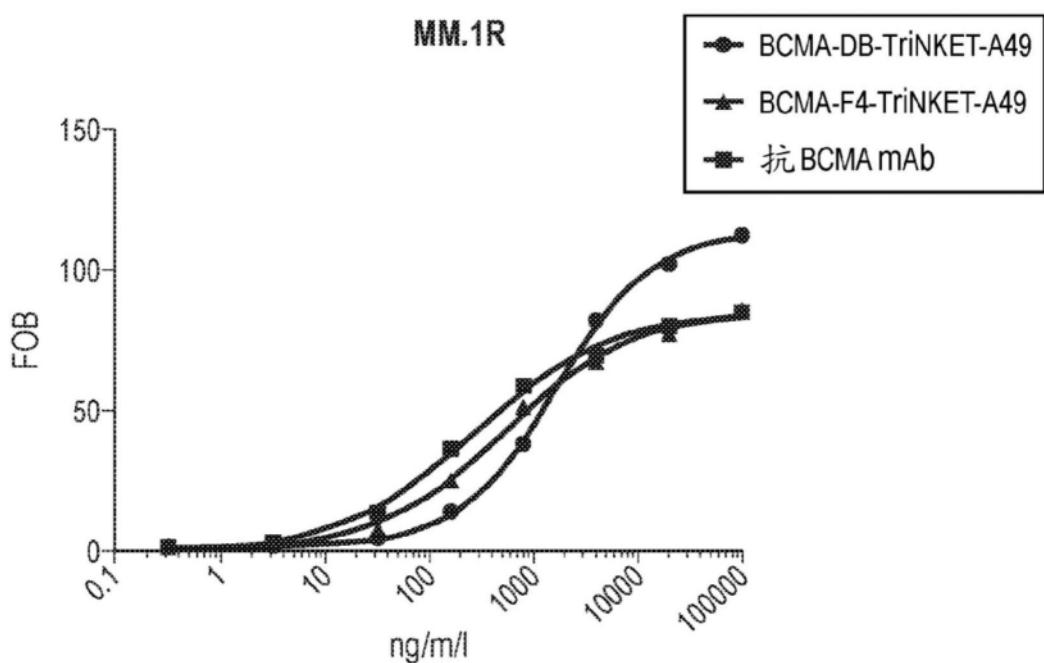


图21

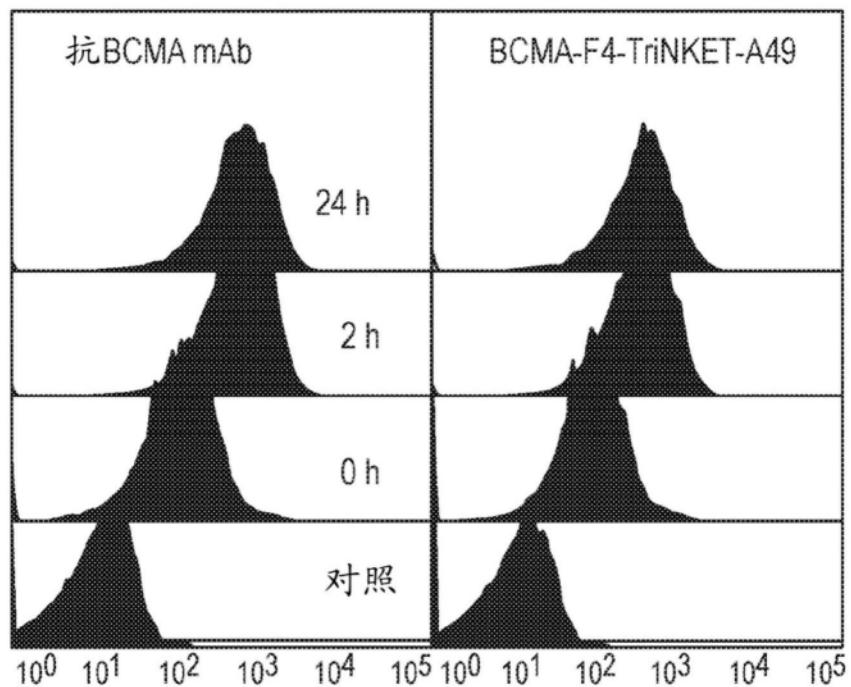


图22

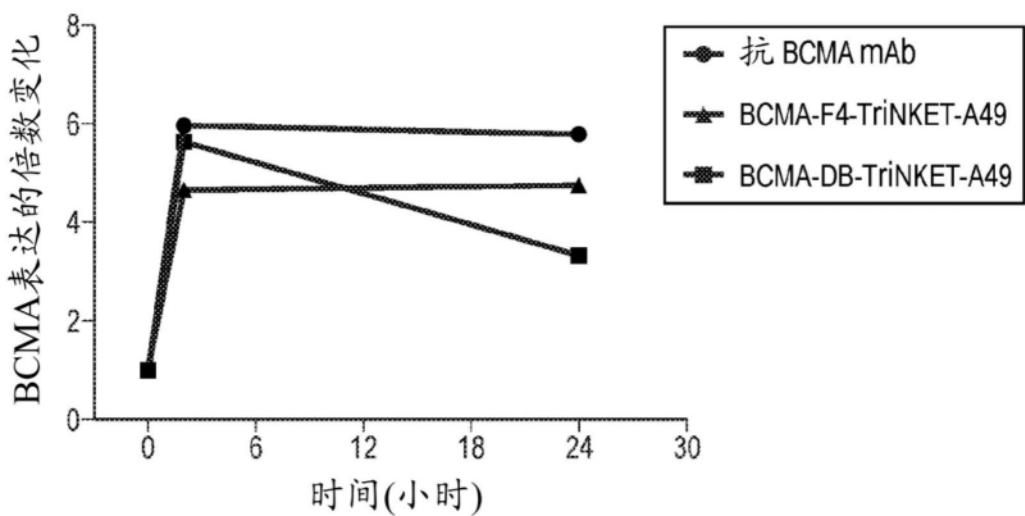


图23

KMS12-PE

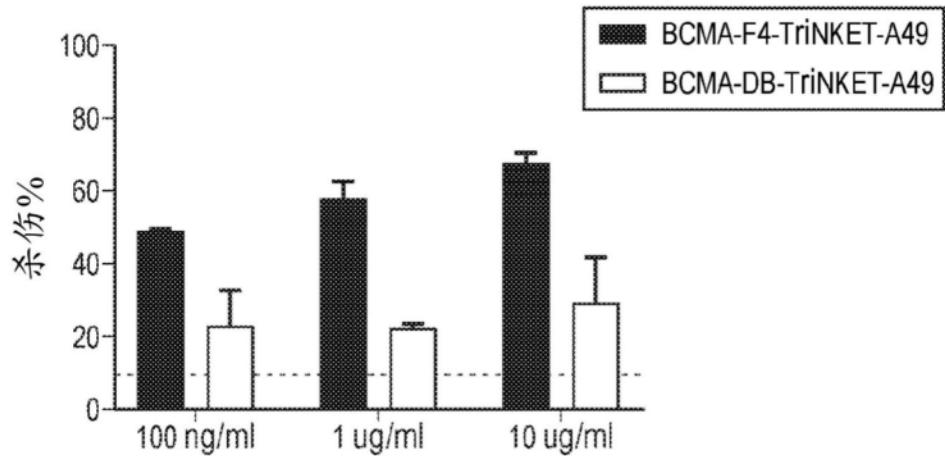


图24

MM.1S

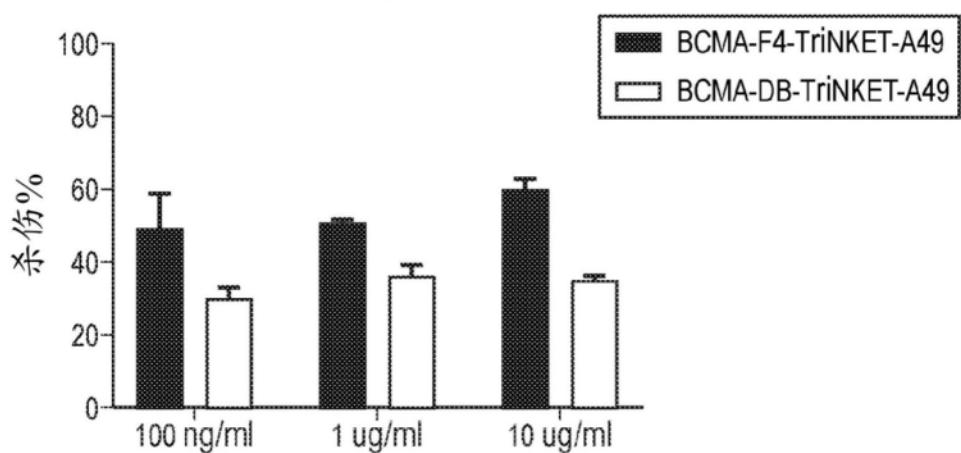


图25