



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104968683 B

(45)授权公告日 2020.07.17

(21)申请号 201480007526.0

A.弗赖莫瑟-格伦德肖伯

(22)申请日 2014.02.05

M.巴卡克 T.福蒂 C.克莱因
P.乌马纳 S.莫瑟

(65)同一申请的已公布的文献号

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

申请公布号 CN 104968683 A

代理人 李慧惠 彭昶

(43)申请公布日 2015.10.07

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)

(30)优先权数据

13000571.3 2013.02.05 EP

(56)对比文件

13000570.5 2013.02.05 EP

WO 2012163805 A1, 2012.12.06,
WO 2012066058 A1, 2012.05.24,
Maureen C. Ryan等. Antibody targeting
of B-cell maturation antigen on malignant
plasma cells.《MOLECULAR CANCER
THERAPEUTICS》.2007, 第6卷(第11期), 3009–
3018.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.08.05

审查员 王雨方

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/052189 2014.02.05

权利要求书1页 说明书52页
序列表18页 附图6页

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/122143 EN 2014.08.14

(73)专利权人 英格玛布有限责任公司

地址 瑞士布德里

(72)发明人 M.D.武 K.施特赖因 E.梅斯纳

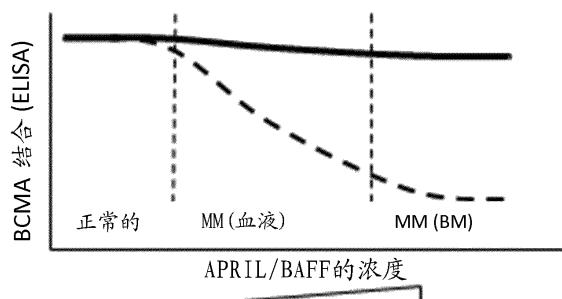
R.霍泽 O.阿斯特

(54)发明名称

用于选择针对BCMA的抗体的方法

(57)摘要

特异性结合人BCMA的抗体用作治疗剂,所述抗体的特征在于所述抗体的结合不被APRIL降低并且不被BAFF降低,所述抗体不改变APRIL依赖性的NF- κ B激活、BAFF依赖性的NF- κ B激活,并且不改变在没有BAFF和APRIL的情况下NF- κ B激活。



1. 特异性结合人B细胞成熟因子抗原(BCMA)的抗体,其中所述抗体的重链包含SEQ ID NO: 39的CDR1H、SEQ ID NO: 49的CDR2H和SEQ ID NO: 59的CDR3H,且所述抗体的轻链包含SEQ ID NO: 69的CDR1L、SEQ ID NO: 79的CDR2L和SEQ ID NO: 89的CDR3L。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体的重链包含SEQ ID NO: 19的VH,且所述抗体的轻链包含SEQ ID NO: 29的VL。

3. 特异性结合BCMA和CD3的双特异性抗体,其中所述双特异性抗体包含根据权利要求1或2所述的特异性结合BCMA的抗体。

4. 根据权利要求3所述的双特异性抗体,其中所述双特异性抗体包含含有重链和轻链的特异性结合CD3的抗体,其中特异性结合BCMA的抗体包含重链和轻链,且其中:

(i) BCMA重链和轻链的可变结构域VL和VH或恒定结构域CL和CH1被彼此替代;或

(ii) CD3重链和轻链的可变结构域VL和VH或恒定结构域CL和CH1被彼此替代。

5. 药物组合物,其包含根据权利要求1或2所述的抗体或根据权利要求3或4所述的双特异性抗体和药学上可接受的赋形剂。

6. 根据权利要求1或2所述的抗体、根据权利要求3或4所述的双特异性抗体或权利要求5的药物组合物在制备药物中的用途。

7. 根据权利要求1或2所述的抗体、根据权利要求3或4所述的双特异性抗体或权利要求5的药物组合物在制备用于治疗浆细胞病症的药物中的用途。

8. 根据权利要求1或2所述的抗体、根据权利要求3或4所述的双特异性抗体或权利要求5的药物组合物在制备用于治疗多发性骨髓瘤的药物中的用途。

9. 根据权利要求1或2所述的抗体、根据权利要求3或4所述的双特异性抗体或权利要求5的药物组合物在制备用于治疗全身性红斑狼疮的药物中的用途。

10. 用于制备根据权利要求1或2所述的抗体的方法,其包括:

a) 用包含编码根据权利要求1或2所述的抗体的轻链和重链的核酸分子的载体转化宿主细胞;

b) 在允许合成所述抗体分子的条件下培养所述宿主细胞;和

c) 从所述培养物回收所述抗体分子。

11. 用于制备根据权利要求3或4所述的双特异性抗体的方法,其包括:

a) 用以下转化宿主细胞:

(i) 包含编码特异性结合第一靶标的抗体的轻链和重链的核酸分子的载体;和

(ii) 包含编码特异性结合第二靶标的抗体的轻链和重链的核酸分子的载体,

其中可变结构域VL和VH或恒定结构域CL和CH1被彼此替代;

b) 在允许合成所述双特异性抗体分子的条件下培养所述宿主细胞;和

c) 从所述培养物回收所述双特异性抗体分子,

其中所述第一靶标是BCMA且所述第二靶标是CD3或所述第一靶标是CD3且所述第二靶标是BCMA。

用于选择针对BCMA的抗体的方法

[0001] 本发明涉及用于选择针对BCMA的抗体的方法、针对BCMA的新抗体及其制造和用途。

[0002] **发明背景**

[0003] 人B细胞成熟靶标,也称为BCMA; TR17_HUMAN, TNFRSF17 (UniProt Q02223),是在分化的浆细胞中优先表达的肿瘤坏死受体超家族的成员[Laabi等1992; Madry等1998]。BCMA是非糖基化的III型跨膜蛋白,其参与B细胞成熟、生长和存活。BCMA是TNF超家族的两个配体的受体:APRIL(诱导增殖的配体),其为BCMA的高亲和力配体,和B细胞激活因子BAFF,其为BCMA的低亲和力配体(THANK、BlyS、B淋巴细胞刺激物、TALL-1和zTNF4)。APRIL和BAFF显示结构相似性和重叠但不同的受体结合特异性。负调节物TACI也结合BAFF和APRIL。APRIL和BAFF与BCMA和/或TACI的协同结合激活转录因子NF- κ B并增加促存活(pro-survival) Bcl-2家族成员(例如Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、Mcl-1、A1)的表达和促凋亡因子(例如Bid、Bad、Bik、Bim等)的下调,因此抑制程序性细胞死亡并促进存活。该组合作用促进B细胞分化、增殖、存活和抗体产生(如综述于Rickert RC等, Immunol Rev (2011) 244 (1): 115-133)。

[0004] 针对BCMA的抗体描述于例如Gras M-P.等Int Immunol. 7 (1995) 1093-1106、W0200124811、W0200124812、W02010104949和W02012163805中。针对BCMA的抗体及其用于治疗淋巴瘤和多发性骨髓瘤的用途例如叙述于W02002066516和W02010104949中。W02013154760涉及包含BCMA识别部分和T-细胞激活部分的嵌合抗原受体。

[0005] Ryan, MC等, Mol.Cancer Ther. 6 (2007) 3009-3018涉及具有配体阻断活性的抗BCMA抗体,其可以作为裸露抗体或抗体-药物缀合物促进多发性骨髓瘤(MM)细胞系的细胞毒性。Ryan显示SG1(抑制性BCMA抗体)在体外以剂量依赖性方式阻断核因子- κ B的APRIL-依赖性激活。Ryan还提及不显著抑制APRIL结合BCMA的抗体SG2。

[0006] 最近过去的几年,例如通过融合例如IgG抗体形式和单链结构域已经开发了多种多样的重组双特异性抗体形式(参见例如Kontermann RE, mAbs 4:2, (2012) 1-16)。其中可变结构域VL和VH或恒定结构域CL和CH1彼此相互替换的双特异性抗体描述于W02009080251和W02009080252中。

[0007] 规避错配副产物问题的方法(称为‘突起-进入-孔(knobs-into-holes)’)目标在于通过向CH3结构域中引入突变以修饰接触界面来迫使两条不同的抗体重链配对。在一条链上,大量氨基酸被具有短侧链的氨基酸替换以产生‘孔’。相反地,将具有大侧链的氨基酸引入到其他CH3结构域中,以产生“突起”。通过共表达这两条重链(和两条相同的轻链,其必须适合于两条重链),观察到异源二聚体形成(‘突起-孔’)相对于同源二聚体形成(‘孔-孔’或‘突起-突起’)的高产量(Ridgway JB, Presta LG, Carter P; 和W01996027011)。可以通过使用噬菌体展示方法重塑两个CH3结构域的相互作用界面并引入二硫键以稳定异源二聚体来进一步增加异源二聚体的百分比(Merchant A.M, 等, Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., J Mol Biol 270 (1997) 26-35)。用于突起-进入-孔技术的新方法描述于例如EP 1870459A1中。尽管该形式看起来非常

有吸引力,但是目前没有描述向临床发展的数据可用。该策略的一个重要限制是两个亲本抗体的轻链必须相同,以防止失活分子的错配和形成。因此,该技术不适合于从针对第一个和第二个靶标的两个抗体开始容易地开发针对两个靶标的重组的双特异性抗体,因为这些抗体的重链和/或相同的轻链必须被优化。Xie, Z., 等, J Immunol Methods 286 (2005) 95-101提及使用scFv的双特异性抗体形式与用于Fc部分的突起-进入-孔技术的组合。

[0008] T淋巴细胞的TCR/CD3复合体由在细胞表面上共表达的TCR α (α) / β (β) 或TCR γ (γ) / δ (δ) 异二聚体与CD3标记的 γ (γ) 、 δ (δ) 、 ϵ (ϵ) 、 ζ (ζ) 和 η (η) 的不变亚基组成。人CD3 ϵ 描述于UniProt P07766 (CD3E_HUMAN) 之下。

[0009] 现有技术中描述的抗CD3 ϵ 抗体是SP34 (Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137; 1097-1100)。SP34与灵长类和人CD3反应。SP34可以从Pharmingen获得。现有技术中描述的其他抗CD3抗体是UCHT-1 (参见W02000041474)。现有技术中描述的其他抗CD3抗体是BC-3 (Fred Hutchinson Cancer Research Institute; 用于GvHD的I/II期试验, Anasetti等, Transplantation 54:844 (1992))。SP34不同于UCHT-1和BC-3,因为SP-34识别仅在CD3的 ϵ 链上存在的表位(参见Salmeron等, (1991) J. Immunol. 147:3047),然而UCHT-1和BC-3 识别 ϵ 和 γ 链贡献的表位。与抗体SP34具有相同序列的抗体序列叙述于 W02008119565、W02008119566、W02008119567、W02010037836、W02010037837 和 W02010037838 中。与抗体SP34的VH具有96%同一性的序列叙述于US8236308 (W02007042261) 中。与SP34具有相同序列的其他抗体的VH和VL序列显示于SEQ ID NO:7和8 中。

[0010] 针对CD3和BCMA的双特异性抗体叙述于W02007117600、W02009132058、W02012066058和W02012143498中。

[0011] 单克隆抗体的细胞介导的效应子功能(像抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC))可以通过在Asn297改造它们的寡糖组分而得以增强,如在Umaña, P., 等, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; 和US6602684中所述。W01999054342、W02004065540、W02007031875和W02007039818、Hristodorov D、Fischer R、Linden L.、Mol Biotechnol. 2012 Oct 25. (Epub) 还提及抗体的糖基化改造以增强Fc介导的细胞的细胞毒性。

[0012] 铰链区和CH2结构域中的若干氨基酸残基也影响单克隆抗体的细胞介导的效应子功能(Eur.J. Immunol., 23, 1098 (1993), Immunology, 86, 319 (1995), Chemical Immunology, 65, 88 (1997)] Chemical Immunology, 65, 88 (1997)]。因而,此类氨基酸的修饰可以增强细胞介导的效应子功能。增加细胞介导的效应子功能的此类抗体修饰叙述于EP1931709、W0200042072中并且在Fc部分中包含氨基酸位置234、235、236、239、267、268、293、295、324、327、328、330和332处的取代。增加细胞介导的效应子功能的其他抗体修饰叙述于EP1697415中并且包含带电荷的氨基酸、极性氨基酸或非极性氨基酸对EU氨基酸位置277、289、306、344或378的氨基酸替换。

[0013] 抗体形式和双特异性和多特异性抗体的形式还是pepbodies (W0200244215)、新抗原受体(“NAR”) (W02003014161)、双抗体-双抗体二聚体“TandAbs” (W02003048209)、聚环氧烷(polyalkylene oxide)修饰的scFv (US7150872)、人源化兔抗体 (W02005016950)、合成的免疫球蛋白结构域 (W02006072620)、共价双抗体 (W02006113665)、flexibodies

(WO2003025018)、结构域抗体、dAb (WO2004058822)、vaccibody (WO2004076489)、具有新世界灵长类构架的抗体 (WO2007019620)、具有可切割接头的抗体-药物缀合物 (WO2009117531)、去除了铰链区的IgG4抗体 (WO2010063785)、具有IgG4样CH3结构域的双特异性抗体 (WO2008119353)、骆驼抗体 (US6838254)、nanobodies (US7655759)、CAT双抗体 (US5837242)、针对靶抗原和CD3的双特异性scFv2 (US7235641)、sIgA plAntibodies (US6303341)、minibodies (US5837821)、IgNAR (US2009148438)、具有修饰的铰链和Fc区的抗体 (US2008227958、US20080181890)、三功能抗体 (US5273743)、triomabs (US6551592)、troybodies (US6294654)。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明包含特异性结合BCMA的单克隆抗体,其特征在于与所述抗体与人BCMA在没有APRIL的情况下结合相比,如在ELISA测定中所测量为450nm处的OD,浓度为6.25nM的所述抗体的结合不被140 ng/ml鼠类APRIL降低多于10%,优选不降低多于1%。优选地,抗体特征在于与所述抗体与人BCMA在没有APRIL的情况下结合相比,如在ELISA测定中所测量为450nm处的OD,浓度为50nM的所述抗体的结合不被140 ng/ml鼠类APRIL降低多于10%。

[0016] 优选地,本发明的抗体特征在于抗BCMA抗体与H929细胞 (ATCC® CRL-9068™) 的结合显示15 nM或更低的EC50值。

[0017] a) 与所述抗体与人BCMA在没有APRIL的情况下结合相比,如在ELISA测定中所测量为405nm处的OD,所述抗体的结合不被100 ng/ml APRIL降低多于20%,

[0018] b) 如与APRIL相比,所述抗体不改变APRIL依赖性的NF-κB激活多于20%,并且

[0019] c) 如与没有所述抗体的情况相比,所述抗体不改变在没有APRIL的情况下NF-κB激活多于20%。

[0020] 本发明涉及特异性结合人BCMA的抗体,其特征在于

[0021] a) 与所述抗体与人BCMA在分别没有APRIL或BAFF的情况下结合相比,如在ELISA测定中所测量为405nm处的OD,所述抗体的结合不被100 ng/ml APRIL降低并且不被100 ng/ml BAFF降低多于20%,

[0022] b) 如与单独APRIL相比,所述抗体不改变APRIL依赖性的NF-κB激活多于20%,

[0023] c) 如与单独BAFF相比,所述抗体不改变BAFF依赖性的NF-κB激活多于20%,并且

[0024] d) 如与没有所述抗体的情况相比,所述抗体不改变在没有BAFF和APRIL的情况下NF-κB激活多于20%。

[0025] 优选地,所述抗体进一步特征在于如在所述ELISA中所测量,所述抗体与人BCMA的结合不被100 ng/ml APRIL降低多于15%。优选地,所述抗体进一步特征在于如在所述ELISA中所测量,所述抗体与人BCMA的结合不被1000 ng/ml APRIL降低多于20%。优选地,所述抗体进一步特征在于如在所述ELISA中所测量,所述抗体与人BCMA的结合不被1000 ng/ml APRIL降低多于15%。

[0026] 优选地,所述抗体进一步特征在于如在所述ELISA中所测量,所述抗体与人BCMA的结合不被100 ng/ml APRIL降低并且不被100 ng/ml BAFF降低多于15%。优选地,所述抗体进一步特征在于如在所述ELISA中所测量,所述抗体与人BCMA的结合不被1000 ng/ml APRIL降低并且不被1000 ng/ml BAFF降低多于20%。优选地,所述抗体进一步特征在于如在所述ELISA中所测量,所述抗体与人BCMA的结合不被1000 ng/ml APRIL降低并且不被1000

ng/ml BAFF降低多于15%。

[0027] 优选地,本发明的抗体不改变APRIL-依赖性NF- κ B激活多于15%。优选地,本发明的抗体不改变BAFF-依赖性NF- κ B激活多于15%。优选地,本发明的抗体不改变在没有APRIL和BAFF的情况下的NF- κ B激活多于15%。

[0028] 优选地,本发明的抗体的特征在于与所述抗体与NCI-H929细胞在分别没有APRIL或BAFF的情况下的结合相比,其与BCMA的结合不被APRIL降低并且优选地不被BAFF降低多于25%,优选地不多于20%,优选地不多于10%,其测量为浓度为5nM,优选50nM,并优选140nM的所述抗体与NCI-H929 细胞(ATCC[®] CRL-9068[™])在存在或不存在浓度为2.5 μ g/ml的APRIL或分别BAFF的情况下的结合。

[0029] 优选地,本发明的抗体进一步特征在于其还特异性结合食蟹猴BCMA。

[0030] 在本发明的其他优选实施方案中,本发明的抗体是具有Fc或不具有Fc的双特异性抗体,包括单链可变片段(scFv),如双特异性T细胞衔接物、双抗体、或串联scFv、抗体模拟物如DARPins、裸露的单特异性抗体或抗体药物缀合物。优选地,双特异性抗体特异性结合BCMA和CD3。

[0031] 本发明进一步涉及用于选择特异性结合人BCMA的抗体的方法,其特征在于如果

[0032] a) 与所述抗体与人BCMA在没有APRIL的情况下的结合相比,如在ELISA测定中所测量为405nm处的OD,所述抗体与人BCMA的结合不被100 ng/ml APRIL降低多于20%,

[0033] b) 如与APRIL相比,所述抗体不改变APRIL依赖性的NF- κ B激活多于20%,并且

[0034] c) 如与没有所述抗体的情况相比,所述抗体不改变在没有APRIL的情况下的NF- κ B激活多于20%,

[0035] 则选择特异性结合人BCMA的抗体。

[0036] 优选地,所述方法的特征在于选择不改变APRIL依赖性的NF- κ B激活多于15%的抗体。优选地,所述方法的特征在于选择不改变在没有APRIL的情况下的NF- κ B激活多于15%的抗体。

[0037] 优选地,方法的特征在于此外,如果与所述抗体与人BCMA在没有APRIL的情况下的结合相比,如在ELISA测定中所测量为405nm处的OD,所述抗体与食蟹猴和人BCMA的结合不被100 ng/ml APRIL降低多于20%,那么选择该抗体。优选地,所述方法的进一步特征在于如在所述ELISA中所测量,如果所述抗体与食蟹猴和人BCMA的结合不被100 ng/ml APRIL降低多于15%,那么选择该抗体。优选地,所述方法的进一步特征在于如在所述ELISA中所测量,如果所述抗体与食蟹猴和人BCMA的结合不被1000 ng/ml APRIL降低并且不被1000 ng/ml降低多于20%,那么选择该抗体。优选地,所述方法的进一步特征在于如在所述ELISA中所测量,如果所述抗体与食蟹猴和人BCMA的结合不被1000 ng/ml APRIL降低多于15%,那么选择该抗体。

[0038] 本发明进一步涉及用于选择特异性结合人BCMA的抗体的方法,其特征在于如果

[0039] a) 与所述抗体与人BCMA在分别没有APRIL或BAFF的情况下的结合相比,如在ELISA测定中所测量为405nm处的OD,所述抗体与人BCMA的结合不被100 ng/ml APRIL降低并且不被100 ng/ml BAFF降低多于20%,

[0040] b) 如与单独APRIL相比,所述抗体不改变APRIL依赖性的NF- κ B激活多于20%,

[0041] c) 如与单独BAFF相比,所述抗体不改变BAFF依赖性的NF- κ B激活多于20%,并且

[0042] d) 如与没有所述抗体的情况相比,所述抗体不改变在没有BAFF和APRIL的情况下NF- κ B激活多于20%,

[0043] 则选择特异性结合人BCMA的抗体。

[0044] 优选地,所述方法的特征在于选择不改变APRIL依赖性的NF- κ B激活多于15%的抗体。优选地,所述方法的特征在于选择不改变BAFF依赖性的NF- κ B激活多于15%的抗体。优选地,所述方法的特征在于选择不改变在没有APRIL和BAFF的情况下NF- κ B激活多于15%的抗体。优选地,所述方法的特征在于选择特异性结合食蟹猴和人BCMA的抗体。

[0045] 优选地,所述方法的特征在于此外,如果与所述抗体与人BCMA在分别没有APRIL或BAFF的情况下结合相比,如在ELISA测定中所测量为405nm处的OD,所述抗体与食蟹猴和人BCMA的结合不被100 ng/ml APRIL降低并且不被100 ng/ml BAFF降低多于20%,那么选择该抗体。优选地,所述方法的进一步特征在于如在所述ELISA中所测量,如果所述抗体与食蟹猴和人BCMA的结合不被100 ng/ml APRIL降低并且不被100 ng/ml BAFF降低多于15%,那么选择该抗体。优选地,所述方法的进一步特征在于如在所述ELISA中所测量,如果所述抗体与食蟹猴和人BCMA的结合不被1000 ng/ml APRIL降低并且不被1000 ng/ml BAFF降低多于20%,那么选择该抗体。优选地,所述方法的进一步特征在于如在所述ELISA中所测量,如果所述抗体与食蟹猴和人BCMA的结合不被1000 ng/ml APRIL降低并且不被1000 ng/ml BAFF降低多于15%,那么选择该抗体。

[0046] 本发明还涉及用于选择特异性结合人BCMA的抗体的方法,其特征在于选择抗体,所述抗体的特征在于与所述抗体与NCI-H929细胞在没有APRIL并优选BAFF的情况下结合相比,其与BCMA的结合不被APRIL降低并且优选地不被BAFF降低多于25%,优选地不多于20%,优选地不多于10%,其测量为浓度为5nM,优选50nM,并优选140nM的所述抗体与NCI-H929 细胞(ATCC ® CRL-9068 ™)在存在或不存在浓度为2.5 μ g/ml的APRIL并优选BAFF的情况下结合。

[0047] 基于本发明,可以产生针对BCMA的本发明的抗体、针对BCMA的抗体-药物缀合物和针对BCMA的双特异性抗体和具有或没有现有技术中已知的Fc部分的不同形式的其他靶标(参见例如上文“发明背景”)、单链可变片段(scFv),如双特异性T细胞衔接物、双抗体、串联scFvs,和抗体模拟物,如DARPins。双特异性抗体形式为现有技术所熟知并且例如还描述于Kontermann RE, mAbs 4:2 1-16 (2012); Holliger P., Hudson PJ, Nature Biotech. 23 (2005) 1126- 1136 和Chan AC, Carter PJ Nature Reviews Immunology 10, 301-316 (2010) 以及Cuesta AM等, Trends Biotech 28 (2011) 355-362中。

[0048] 本发明的其他实施方案是针对两个靶标人CD3 ϵ (进一步还命名为“CD3”)和人BCMA(进一步还命名为“BCMA”)的胞外域的双特异性抗体,其特征在于包含作为针对BCMA的抗体的本发明的抗BCMA抗体。

[0049] 本发明优选涉及针对BCMA和CD3的双特异性抗体,其特征在于

[0050] a) 与所述抗体与人BCMA在没有APRIL的情况下结合相比,如在ELISA测定中所测量为405nm处的OD,所述抗体的结合不被100 ng/ml APRIL降低多于20%,

[0051] b) 如与APRIL相比,所述抗体不改变APRIL依赖性的NF- κ B激活多于20%,并且

[0052] c) 如与没有所述抗体的情况相比,所述抗体不改变在没有APRIL的情况下NF- κ B激活多于20%。

[0053] 本发明优选涉及针对BCMA和CD3的双特异性抗体,其特征在于

[0054] a) 与所述抗体与人BCMA在分别没有APRIL或BAFF的情况下结合相比,如在ELISA测定中所测量为405nm处的OD,所述抗体的结合不被100 ng/ml APRIL降低并且不被100 ng/ml BAFF降低多于20%,

[0055] b) 如与单独APRIL相比,所述抗体不改变APRIL依赖性的NF- κ B激活多于20%,

[0056] c) 如与单独BAFF相比,所述抗体不改变BAFF依赖性的NF- κ B激活多于20%,并且

[0057] d) 如与没有所述抗体的情况相比,所述抗体不改变在没有BAFF和APRIL的情况下NF- κ B激活多于20%。

[0058] 针对BCMA和CD3的双特异性抗体优选特征在于包含本发明的抗BCMA抗体和抗CD3抗体,其中

[0059] a) 抗体的轻链和重链特异性结合所述靶标之一;并且

[0060] b) 抗体的轻链和重链特异性结合所述靶标中的另一个,其中可变结构域VL 和VH 或恒定结构域CL和CH1彼此替换。

[0061] 优选地,所述可变结构域VH包含SEQ ID NO: 1、2和3的重链CDR分别为双特异性抗体的抗CD3 ϵ 抗体部分的重链CDR1、CDR2和CDR3,并且所述可变结构域VL包含SEQ ID NO: 4、5和6的轻链CDR分别为双特异性抗体的抗CD3 ϵ 抗体部分的轻链CDR1、CDR2和CDR3。

[0062] 优选地,本发明的该双特异性抗体特征在于抗CD3 ϵ 抗体部分的可变结构域是SEQ ID NO:7和8。

[0063] 优选地,本发明抗体的特征在于包含可变结构域VH(其包含SEQ ID NO: 37-45、47-55、57-65的重链CDR分别为抗BCMA抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3)和可变结构域VL(其包含SEQ ID NO: 67-75、77-85、87-95的轻链CDR分别为抗BCMA抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3)。优选地,本发明抗体的特征在于分别地,可变结构域VH选自SEQ ID NO: 17-25并且可变结构域VL选自SEQ ID NO: 27 -35。

[0064] 优选地,本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO:37的CDR1H、SEQ ID NO:47的CDR2H、SEQ ID NO:57的CDR3H,和SEQ ID NO:67的CDR1L、SEQ ID NO:77的CDR2L、SEQ ID NO:87的CDR3L。优选地,本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO:38的CDR1H、SEQ ID NO:48的CDR2H、SEQ ID NO:58的CDR3H,和SEQ ID NO:68的CDR1L、SEQ ID NO:78的CDR2L、SEQ ID NO:88的CDR3L。优选地,本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO:39的CDR1H、SEQ ID NO:49的CDR2H、SEQ ID NO:59的CDR3H,和SEQ ID NO:69的CDR1L、SEQ ID NO:79的CDR2L、SEQ ID NO:89的CDR3L。优选地,本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO:40的CDR1H、SEQ ID NO:50的CDR2H、SEQ ID NO:60的CDR3H,和SEQ ID NO:70的CDR1L、SEQ ID NO:80的CDR2L、SEQ ID NO:90的CDR3L。优选地,特异性结合人BCMA的本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO:41的CDR1H、SEQ ID NO:51的CDR2H、SEQ ID NO:61的CDR3H,和SEQ ID NO:71的CDR1L、SEQ ID NO:81的CDR2L、SEQ ID NO:91的CDR3L。优选地,本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO:42的CDR1H、SEQ ID NO:52的CDR2H、SEQ ID NO:62的CDR3H,和SEQ ID NO:72的CDR1L、SEQ ID NO:82的CDR2L、SEQ ID NO:92的CDR3L。优选地,本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO:43的CDR1H、SEQ ID NO:53的CDR2H、SEQ ID NO:63的CDR3H,和SEQ ID NO:73的CDR1L、SEQ ID NO:83的CDR2L、SEQ ID NO:93的CDR3L。优选地,本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO:44的CDR1H、SEQ ID NO:54的CDR2H、SEQ ID NO:64的CDR3H,和SEQ ID NO:74的CDR1L、SEQ ID

NO:84的CDR2L、SEQ ID NO:94的CDR3L。优选地,本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO:45的CDR1H、SEQ ID NO:55的CDR2H、SEQ ID NO:65的CDR3H,和SEQ ID NO:75的CDR1L、SEQ ID NO:85的CDR2L、SEQ ID NO:95的CDR3L。

[0065] 优选地,本发明抗体的特征在于包含选自SEQ ID NO: 17-25的VH和/或包含选自SEQ ID NO: 27 -35的VL。

[0066] 优选地,本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO: 17的VH和SEQ ID NO: 27的VL。优选地,本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO: 18的VH和SEQ ID NO: 28的VL。优选地,本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO: 19的VH和SEQ ID NO: 29的VL。优选地,本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO: 20的VH和SEQ ID NO: 30的VL。优选地,本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO: 21的VH和SEQ ID NO: 31的VL。优选地,本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO: 22的VH和SEQ ID NO: 32的VL。优选地,本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO: 23的VH和SEQ ID NO: 33的VL。优选地,本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO: 24的VH和SEQ ID NO: 34的VL。优选地,本发明抗体的特征在于包含SEQ ID NO: 25的VH和SEQ ID NO: 35的VL。

[0067] 在本发明的其他实施方案中,抗体的特征在于包含SEQ ID NO:46的CDR1H、SEQ ID NO:56的CDR2H、SEQ ID NO:66的CDR3H,和SEQ ID NO:76的CDR1L、SEQ ID NO:86的CDR2L、SEQ ID NO:96的CDR3L。在本发明的其他实施方案中,抗体的特征在于包含SEQ ID NO:26的VH和SEQ ID NO: 36的VL。在ELISA测定中所测量,抗体MAB 13A7的结合被100 ng/ml APRIL降低多于20%。

[0068] 优选地,本发明双特异性抗体的特征在于一条重链的CH3结构域与另一条重链的CH3结构域在包含抗体CH3结构域之间的原始界面的界面处相遇;其中改变所述界面以促进双特异性抗体的形成,其中所述改变的特征在于:

[0069] a) 改变一条重链的CH3结构域,使得在所述双特异抗体,在与另一条重链的CH3结构域的原始界面相遇的一条重链的CH3结构域的原始界面内,氨基酸残基被具有更大侧链体积的氨基酸残基替代,由此在一条重链的CH3结构域的界面内产生突起,所述突起可定位于另一条重链的CH3结构域的界面内的腔中,和

[0070] b) 改变另一条重链的CH3结构域,使得在所述双特异抗体,在与第一个CH3结构域的原始界面相遇的该第二个CH3结构域的原始界面内,氨基酸残基被具有更小侧链体积的氨基酸残基替代,由此在第二个CH3结构域的界面内产生腔,第一个CH3结构域的界面内的突起可定位于所述腔中。

[0071] 优选地,该双特异性抗体的特征在于具有更大侧链体积的所述氨基酸残基选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

[0072] 优选地,该双特异性抗体的特征在于具有更小侧链体积的氨基酸残基选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、缬氨酸(V)。

[0073] 优选地,该双特异性抗体的特征在于通过引入半胱氨酸(C)作为每个CH3结构域的相应位置的氨基酸进一步改变两个CH3结构域。

[0074] 优选地,该双特异性抗体的特征在于两条重链的恒定重链结构域CH3之一被恒定重链结构域CH1替换;并且另一个恒定重链恒定域CH3被恒定轻链结构域CL替换。

[0075] 本发明进一步涉及包含修饰的Fc部分的本发明抗体,相对于相同条件下使用具有

亲本Fc部分的相同抗体作为对照的对照,其在100 nM的所述抗体的浓度下通过ADCC在24小时后诱导表达制剂BCMA的细胞的20%或更多细胞的细胞死亡。该抗体优选为裸露抗体。

[0076] 优选地,本发明抗体是在Asn297处具有寡糖(糖)总量的60%或更少的岩藻糖量的抗体(参见例如US20120315268)。

[0077] 本发明的其他实施方案是制备本发明的抗体的方法,其包括步骤:

[0078] a) 利用以下转化宿主细胞

[0079] b) 包含编码本发明抗体的轻链和重链的核酸分子的载体,

[0080] c) 在允许合成所述抗体分子的条件下培养宿主细胞;和

[0081] d) 从所述培养物中回收所述抗体分子。

[0082] 本发明的其他实施方案是制备本发明的双特异性抗体的方法,其包括步骤:

[0083] e) 利用以下转化宿主细胞

[0084] f) 包含编码特异性结合第一个靶标的抗体的轻链和重链的核酸分子的载体

[0085] g) 包含核酸分子的载体,所述核酸分子编码特异性结合第二个靶标的抗体的轻链和重链,其中可变结构域VL 和VH或恒定结构域CL和CH1彼此替换;

[0086] h) 在允许合成所述抗体分子的条件下培养宿主细胞;和

[0087] i) 从所述培养物中回收所述抗体分子。

[0088] 本发明的其他实施方案是包含这样的载体的宿主细胞,所述载体包含编码本发明抗体的核酸分子。本发明的其他实施方案是这样的宿主细胞,其包含这样的载体,所述载体包含编码特异性结合第一个靶标的抗体的轻链和重链的核酸分子,并且还包含这样的载体,所述载体包含编码特异性结合第二个靶标的抗体的轻链和重链的核酸分子,其中可变结构域VL和VH或恒定结构域CL和CH1彼此替换。

[0089] 本发明的其他优选实施方案是包含本发明的抗体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0090] 本发明的其他优选实施方案是包含本发明的抗体的用作药物的药物组合物。

[0091] 本发明的其他优选实施方案是包含本发明的抗体的在治疗浆细胞病症中用作药物的药物组合物。

[0092] 本发明的其他优选实施方案是包含本发明的抗体的在治疗多发性骨髓瘤中用作药物的药物组合物。

[0093] 本发明的其他优选实施方案是包含本发明的抗体的在治疗全身性红斑狼疮中用作药物的药物组合物。

[0094] 本发明的其他优选实施方案是包含本发明抗体(包括单特异性抗体、ADCC增强的裸露抗体、抗体-药物缀合物或双特异性抗体)的在治疗抗体介导的排斥中用作药物的药物组合物。

[0095] 优选地,本发明的抗体可以用于治疗浆细胞病症,像多发性骨髓瘤MM或表达BCMA的其他B-细胞病症。MM是B-细胞恶性肿瘤,其特征在于骨髓区室中单克隆扩大和异常浆细胞的积累。MM还涉及具有相同IgG基因重排和体细胞高度突变的循环克隆B细胞。MM起源于无症状的恶化前状况,称为未见显著性的单克隆γ球蛋白病(MGUS),其特征在于低水平的骨髓浆细胞和单克隆蛋白。MM细胞以低速率增殖。MM起因于多种结构染色体改变(例如不平衡易位)的渐进性发生。MM涉及恶性浆细胞和骨髓微环境(例如正常骨髓基质细胞)的相互

作用。活跃MM的临床征兆包括单克隆抗体簇(spike)、过度围绕骨髓的浆细胞、起因于破骨细胞过度刺激的溶骨损伤和骨破坏(Dimopoulos & Terpos, Ann Oncol 2010; 21 suppl 7: vii143–150)。涉及浆细胞,即表达BCMA的另一种B细胞病症是全身性红斑狼疮(SLE),也称为狼疮。SLE是全身性自身免疫疾病,其可以影响身体的任何部分并且由攻击身体自身细胞和组织的免疫系统代表,导致慢性炎症和组织损伤。其是III型超敏感反应,其中抗体-免疫复合体沉淀并引起其他免疫反应(Inaki & Lee, Nat Rev Rheumatol 2010; 6:326–337)。本发明的其他实施方案是本发明的抗体用于治疗抗体-介导的同种异体移植物排斥,其涉及浆细胞和同种异体抗体,包括急性和慢性抗体-介导的排斥(AMR)。急性AMR的特征在于移植物异常,其在几天内发生并且是预先形成的或从头形成的供体特异性抗体发展的移植后(post-transplant)的结果。其在约5–7%全部肾移植物中发生并在预先致敏的阳性交叉配血患者中引起20–48%的急性排斥发作(Colvin 和Smith, Nature Rev Immunol 2005; 5 (10) :807–817)。具有急性AMR的患者中的组织病理学经常展现内皮细胞肿胀、肾小球和小管周毛细血管的中性白细胞浸润、纤维蛋白血栓、间质水肿和出血(Trpkov等Transplantation 1996; 61 (11) :1586–1592)。在同种异体移植物活检中,可以利用C4d染色或抗体检测的其他改进方法鉴定AMR。AMR的另一种形式也称为慢性同种异体移植物损伤,其也涉及供体特异性抗体,但在移植后数月,甚至数年内表现出来。其在肾活检上看起来像移植物肾小球病(也称为慢性同种异体移植物肾小球病)并且特征在于血管小球肾小球系膜扩张和毛细管基膜复制(Regele等J Am Soc Nephrol 2002; 13 (9) :2371–2380)。临床表现在患者从早期阶段无症状到晚期阶段具有肾病范围蛋白尿、高血压和同种异体移植物异常中是变化的。疾病进展可以是非常快速的,尤其是进行性急性AMR的进展,导致在数月内移植物衰竭(Fotheringham等Nephron-Clin Pract 2009; 113 (1) : c1–c7)。患者活检中移植物肾小球病的流行性在1年5%到5年20%之间变化(Cosio等Am J Transplant 2008; 8:292–296)。

[0096] 本发明的其他优选实施方案是包含本发明的裸露抗体的用作药物的药物组合物。

[0097] 本发明的其他优选实施方案是包含具有增加的效应子功能的本发明的抗体的用作药物的药物组合物。

[0098] 本发明的其他优选实施方案是包含具有降低的效应子功能的本发明的抗体的用作药物的药物组合物。

[0099] 本发明的其他优选实施方案是包含作为双特异性抗体的本发明的抗体的用作药物的药物组合物。

[0100] 本发明的其他优选实施方案是包含作为与治疗剂,例如细胞毒性剂或放射性标记的缀合物(药物缀合物)的本发明的抗体的用作药物的药物组合物。

[0101] 本发明的其他优选实施方案是包含作为双抗体的本发明的抗体的用作药物的药物组合物。

[0102] 本发明人认识到,本发明的抗体(BCMA Mab),优选Fc糖改造的单特异性抗体(优选裸露抗体)避免MM患者中BCMA Mab根除BCMA阳性肿瘤细胞的效力不被血清中或肿瘤中的APRIL和BAFF的浓度负影响,所述抗体1)不阻断或增加APRIL-依赖性NF- κ B激活,2)不阻断或增加BAFF-依赖性NF- κ B激活,和3)在没有BAFF和APRIL情况下不诱导NF- κ B激活。此外,因为BCMA Mab在没有BAFF 和APRIL的情况下不诱导NF- κ B激活,1)不发生BCMA阳性resp.肿瘤

细胞的激活和存活增加;2)也不发生受体内陷,其可以降低BCMA-Mab的效力。因为抗体的效力一般随着肿瘤占据/抗体浓度而增加,利用针对BCMA的抗体而非本发明的抗BCMA抗体的结果在效力上能具有相当大的患者间差异性(例如整体较小效力)。

[0103] 关于针对BCMA和CD3的双特异性抗体,本发明人认识到针对BCMA并且能够特异性结合激活的T细胞抗原(BCMA-TCB)的双特异性抗体避免BCMA-TCB在MM患者中根除BCMA阳性肿瘤细胞的效力受血清中或肿瘤中的APRIL和BAFF浓度的负面影响(参见图1和2以及图1和2的描述),所述双特异性抗体1)不阻断或增加APRIL-依赖性NF- κ B激活,2)优选不阻断或增加BAFF-依赖性NF- κ B激活,和3)在没有APRIL和优选没有BAFF的情况下不诱导NF- κ B激活。此外,因为BCMA-TCB在没有APRIL和优选没有BAFF的情况下不诱导NF- κ B激活,所以在BCMA-TCB例如通过不结合CD3但仅结合肿瘤细胞,但无论什么原因均不杀死肿瘤细胞的情况下不发生BCMA-阳性resp.肿瘤细胞的激活和存活增加。此外,也不可能发生受体内陷,其可以降低BCMA-TCB的效力。因为抗体的效力一般随着肿瘤占据/TCB的浓度而增加,利用没有本发明的BCMA抗体的BCMA-TCB的结果在效力上具有相当大的患者间差异性(例如整体较小效力,还参见图1和2)。

[0104] 优选地,优选通过皮下施用每周一次或每周两次施用在T细胞双特异性抗体的情况下本发明抗体(例如优选以0.25-2.5,优选至25 mg/m²/周的剂量范围)。由于本发明抗体的优良细胞毒性活性,其可以与常规单特异性抗体或不是T细胞双特异的常规双特异性抗体(即在一条臂上不结合CD3)相比相同程度的临床剂量范围(或甚至更低)施用。设想对于本发明的抗体,临床环境中优选皮下施用(例如1-100 mg/m²/周的剂量范围)。此外,在具有高水平血清APRIL和BAFF的患者(例如多发性骨髓瘤患者)中,其可不需要增加本发明抗体的剂量,因为其可能不受配体竞争影响。相反,可能需要在那些患者中增加其他配体-阻断/竞争性抗BCMA抗体的剂量。本发明抗体的另外优势是消除约1-12天的半衰期,其允许每周至少一次或两次施用。

[0105] 优选地,本发明的抗体在裸露的/未缀合的ADCC增强的单特异性抗体的情况下是具有允许通过静脉途径但优选通过皮下施用每周一次/两次(例如200-2000 mg/周范围的剂量,持续4周)的性质的抗体。由于糖改造的抗体相对于常规抗体的优良ADCC和细胞消耗活性(例如糖改造的抗CD20抗体GA101 在EC₅₀方面对ADCC测定比抗-CD20利妥昔单抗更有效25倍,在绝对的B-细胞消耗方面比其更有效2倍; Mossner等 Blood 2010; 115 (22) : 2293-4402),与常规单特异性抗体相比,至少以相同大小的临床剂量范围(或甚至更低)给出糖改造的抗体。例如,以 375 mg/m²/周缓慢输注给予利妥昔单抗(抗CD20),持续4周或8周用于治疗复发的/顽固的非霍杰金淋巴瘤(RITUXAN® (利妥昔单抗) 全部处方信息, Genentech, Inc., 2012)。因为糖改造的抗体在给定剂量上在患者中可以发挥高效力(Salles等 Blood 2012; 119 (22) : 5126-5132),所以设想对于本发明的抗体,在临床环境中皮下施用是可能的并且优选的(例如在100 - 1000 mg/m²/周的剂量范围内,根据疾病适应症)。此外,在具有高水平血清APRIL和BAFF的患者(例如多发性骨髓瘤患者)中,其不需要增加本发明抗体(例如非配体阻断/竞争性抗体)的剂量,因为其可能不受配体竞争影响。相反,可能需要在那些患者中增加其他配体-阻断/竞争性抗BCMA抗体的剂量,使得皮下施用在技术上更有挑战性(例如药学的)。本发明抗体的另一优势是基于包括Fc部分,其与~12天的消除半衰期相关并允许一周至少一次或两次施用。

[0106] 本发明的其他优选实施方案是包含本发明抗体的诊断组合物。

[0107] 本发明还涉及特异性结合人BCMA的抗体,其特征在于与所述抗体与人BCMA在没有APRIL的情况下结合相比,如在ELISA测定中所测量为405nm处的OD,所述抗体的结合不被100 ng/ml APRIL降低多于20%,如与单独APRIL相比,所述抗体不改变APRIL-依赖性NF- κ B激活多于20%,并且如与没有所述抗体的情况相比所述抗体不改变没有APRIL的情况下NF- κ B激活多于20%。优选地,所述抗体进一步特征在于如在所述ELISA中所测量,所述抗体与人BCMA的结合不被100 ng/ml APRIL降低多于15%。优选地,所述抗体进一步特征在于如在所述ELISA中所测量,所述抗体与人BCMA的结合不被1000 ng/ml APRIL降低多于20%。优选地,所述抗体进一步特征在于如在所述ELISA中所测量,所述抗体与人BCMA的结合不被1000 ng/ml APRIL降低多于15%。

[0108] 优选地,本发明的抗体不改变APRIL-依赖性NF- κ B激活多于15%。优选地,本发明的抗体不改变没有APRIL的NF- κ B激活多于15%。

[0109] 根据本发明,可以在405nm或450nm处测量OD(优选具有相同的相对结果,在没有APRIL或BAFF下进行比较)。根据本发明,可以利用人或鼠类APRIL或BAFF测量OD(优选具有相同的相对结果,在没有APRIL或BAFF下进行比较)。本发明涉及特异性结合人BCMA的抗体。

[0110] 附图描述

[0111] 图1.通过ELISA非配体阻断/非竞争性抗BCMA抗体相对于配体阻断/竞争性抗BCMA抗体;或含有TCB的非配体阻断/非竞争性抗BCMA相对于含有TCB的配体阻断/竞争性抗BCMA在平板结合的BCMA细胞上的优良结合性质。在该图中,渐增的代表在多发性骨髓瘤患者的血液和骨髓中发现的水平的可溶性APRIL或BAFF的浓度(即10、100、1000ng/mL)不改变非配体阻断/非竞争性抗BCMA抗体或含有TCB的非配体阻断/非竞争性抗BCMA与平板结合的BCMA的结合(连续线)。相反,代表在多发性骨髓瘤患者的血液和骨髓中发现的水平的高浓度(即100 ng/mL-1000 ng/mL)可溶性APRIL或BAFF降低配体阻断/竞争性抗BCMA抗体或含有TCB的配体阻断/竞争性抗BCMA与平板结合的BCMA的结合(虚线)。抗BCMA抗体或具有不同性质的含有TCB的抗BCMA的浓度优选为0.1 pM -200 nM范围的浓度,因为附加循环APRIL 或BAFF的水平在 1 ng/mL (健康的正常的)-100 ng/mL (MM, 血液) 范围内和超出该范围 (MM, 骨髓中的肿瘤)。

[0112] 图2.LDH释放测定中含有非配体阻断/非竞争性抗BCMA抗体相对于配体阻断/竞争性抗BCMA抗体的T细胞双特异性抗体介导的表达BCMA的MM细胞在重新指向T细胞的细胞毒性中的优良效能。在该图中,渐增的代表在多发性骨髓瘤患者的血液和骨髓中发现的水平的可溶性APRIL或BAFF的浓度(即10、100、1000ng/mL)不改变对表达BCMA的MM细胞特异的含有非配体阻断/非竞争性抗BCMA抗体的T细胞双特异性抗体的杀伤潜能(连续线)。相反,代表在多发性骨髓瘤患者的血液和骨髓中发现的水平的高浓度(即100 ng/mL-1000ng/mL)可溶性APRIL或BAFF降低对表达BCMA的MM细胞特异的含有配体阻断/竞争性抗BCMA抗体的T细胞双特异性抗体的杀伤潜能(虚线)。含有具有不同性质的抗BCMA抗体的T细胞双特异性的浓度优选为0.1 pM -200 nM的浓度,因为附加循环APRIL 或BAFF的水平在 1 ng/mL (健康的正常的)-100 ng/mL (MM, 血液) 范围内和超出该范围 (MM, 骨髓中的肿瘤)。

[0113] 图3.多发性骨髓瘤细胞系上的BCMA表达。如通过流式细胞术检测的渐增浓度的抗BCMA抗体(0.3-10 μ g/mL)与H929细胞结合后中值荧光强度的增加。

[0114] 图4. BCMA阳性多发性骨髓瘤细胞上抗BCMA抗体的结合。以抗BCMA抗体浓度(0.2-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的函数绘制抗-BCMA IgG克隆的平均荧光强度；(A) H929细胞上的克隆13C2、17A5、83A10，(B) MKN45细胞上的克隆13C2、17A5、83A10，(C) H929细胞上的克隆13A4、13D2、14E1、13A7、14B11，(D) MKN45细胞上的克隆13A4、13D2、14E1、13A7、14B11。

[0115] 图5. 竞争ELISA。显示了在浓度范围鼠类APRIL (1.56 -100 nM) 存在下结合固定的人BCMA的饱和浓度的500或1000 nM的7个所选抗BCMA Fab克隆(13C2、17A5、83A19、13A4、13D2、29B11、13A7)的ELISA结果。在非竞争的情况下，信号在浓度范围跨度内的测定变异性内保持恒定，并且信号在存在鼠类APRIL的情况下与来自其中不加入鼠类APRIL的对照孔的那些信号相当。在竞争的情况下，测量信号的浓度依赖性降低。

[0116] 图6. 通过FACS的结合竞争。通过流式细胞术检测的 Δ -APRIL与抗BCMA抗体的竞争。以H929细胞上的抗BCMA抗体克隆13A4、13D2、14E1、14B11的浓度(1、16和40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的函数检测的以1000 ng/mL浓度使用的 Δ -APRIL (FITC信号)的相对中值荧光强度。将 Δ -APRIL在存在同种型对照的情况下结合后的中值荧光强度设置为1；将其他信号针对它进行归一化。通过抗HA荧光染料缀合的抗体测量在存在抗BCMA抗体的情况下APRIL结合BCMA阳性H929细胞的检测。

[0117] 图7. 通过FACS的结合竞争。通过流式细胞术检测的抗BCMA抗体与 Δ -APRIL的竞争。在不存在或存在 Δ -APRIL 1000 ng/mL的情况下检测的以40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度使用的抗BCMA抗体(Alexa.Fluor 647信号)对RPMI细胞上的抗BCMA抗体克隆13A4、13C7、13D2、14B11、17A5、83A10的相对中值荧光强度。将在不存在 Δ -APRIL的情况下抗BCMA抗体结合后的中值荧光强度设置为1；将在存在 Δ -APRIL的情况下抗BCMA抗体各自的其他信号针对它进行归一化。通过抗人Fc荧光染料缀合的抗体测量在存在 Δ -APRIL的情况下结合BCMA阳性RPMI细胞的抗BCMA抗体的检测。

[0118] 图8. 通过流式细胞术检测的同时孵育后抗BCMA抗体与 Δ -APRIL的竞争。测量(A)在存在或不存在2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Δ -APRIL的情况下浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗BCMA抗体克隆14B11、13D2、13A4、17A5和83A10的平均荧光强度和相对荧光信号(Alexa.Fluor 647信号)或(B)浓度为2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Δ -APRIL的 Δ -APRIL (FITC信号)和抗BCMA抗体克隆83A10 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Alexa.Fluor 647信号)的平均荧光强度和相对荧光信号。将利用FITC缀合的抗人Fc抗体在存在 Δ -APRIL的情况下对抗BCMA抗体的检测针对在不存在 Δ -APRIL的情况下的抗BCMA抗体克隆的信号进行归一化。利用Alexa.Fluor 647-缀合的抗-HA抗体在存在抗BCMA抗体克隆的情况下对 Δ -APRIL的检测针对在存在同种型对照的情况下 Δ -APRIL信号进行归一化。

[0119] 发明详述

[0120] 如本文所用的术语“BCMA, 靶标BCMA, 人BCMA”指人B细胞成熟靶标，也称为BCMA；TR17_HUMAN, TNFRSF17 (UniProt Q02223)，其是在分化的浆细胞中优先表达的肿瘤坏死受体超家族的成员。BCMA的胞外结构域根据UniProt由氨基酸1-54(或5-51)组成。如本文所用的术语“针对BCMA的抗体, 抗BCMA抗体”指特异性结合BCMA的胞外结构域的抗体。

[0121] “特异性结合BCMA”指能够以足够的亲和力结合靶标BCMA从而所述抗体在靶向BCMA中用作治疗剂的抗体。在一些实施方案中，抗BCMA抗体与不相关的非BCMA蛋白的结合程度比例如通过表面等离子共振(SPR)，例如Biacore[®]、酶联免疫吸附剂(ELISA)或流式细

胞术(FACS)测量的抗体与BCMA的结合低约10倍,优选>100倍。优选地,结合BCMA的抗体具有 10^{-8} M或更低,优选 10^{-8} M- 10^{-13} M,优选 10^{-9} M- 10^{-13} M的解离常数(Kd)。优选地,抗BCMA抗体结合在来自不同物种,优选在人和食蟹猴的BCMA之间保守的BCMA的表位。“特异性结合CD3和BCMA的双特异性抗体”指结合两个靶标的各自定义。特异性结合BCMA(或BCMA和CD3)的抗体不结合其他人抗原。因而,在ELISA中,此类不相关靶标的OD值将等于或低于特定测定的检测极限,优选>0.3 ng/mL,或等于或低于没有平板结合的BCMA或具有未转染的HEK293细胞的对照样品的OD值。

[0122] 如本文所用的术语“APRIL”指重组的截短的鼠类APRIL(氨基酸106-241; NP_076006)。可以如Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18) 中所述产生APRIL。

[0123] 如本文所用的术语“BAFF”指重组的截短的人BAFF(UniProt Q9Y275 (TN13B_HUMAN),其可以如Gordon, 2003 (Biochemistry; 42 (20): 5977-5983) 中所述产生。优选地,根据本发明使用His-标签化的BAFF。优选地,通过将编码BAFF残基82-285的DNA片段克隆到表达载体中,产生具有N末端His标签(后接凝血酶切割位点)的融合物,表达所述载体并利用凝血酶切割回收的蛋白来产生His-标签化的BAFF。

[0124] 在存在和不存在APRIL和/或BAFF的情况下使用平板结合的BCMA通过ELISA分析抗BCMA抗体与人BCMA的结合。对于该测定,使用优选1.5 μ g/mL的平板结合的BCMA的量和0.1 pM-200 nM抗BCMA抗体的浓度。根据本发明其BCMA结合不被抑制的BCMA抗体是“在ELISA测定中不抑制APRIL和/或BAFF与人BCMA的结合”的抗BCMA抗体。

[0125] 如本文所用的术语“NF- κ B”指重组NF- κ B p50(检索号(P19838)。通过NCI-H929 MM细胞(CRL-9068TM)的提取物的DNA结合ELISA测量NF- κ B活性。将利用0.1 μ g/mL TNF- α 、1000 ng/mL热处理的HT-截短的-BAFF、1000 ng/mL截短的-BAFF、0.1 pM-200 nM同种型对照,和利用或不利用0.1 pM-200 nM抗-BCMA抗体未处理或处理的NCI-H929 MM细胞孵育20分钟。使用检测来自结合NF- κ B共有序列(US6150090)的p65的化学发光信号的功能ELISA测定NF- κ B活性。

[0126] 认为不阻断APRIL依赖性的NF- κ B激活多于20%并且不降低APRIL依赖性的NF- κ B激活多于20%并且不增加APRIL依赖性的NF- κ B激活多于20%的抗体与没有本发明抗体的APRIL诱导的NF- κ B激活(对照组)相比“不改变APRIL依赖性的NF- κ B激活”多于20%;20%代表实验之间的平均标准变异。优选地,本发明的抗体不改变APRIL-依赖性NF-B激活多于15%。

[0127] 认为不阻断BAFF依赖性的NF- κ B激活多于20%并且不降低BAFF依赖性的NF- κ B激活多于20%并且不增加BAFF依赖性的NF- κ B激活多于20%的抗体与没有本发明抗体的BAFF诱导的NF- κ B激活(对照组)相比“不改变BAFF依赖性的NF- κ B激活”多于20%;20%代表实验之间的平均标准变异。优选地,本发明的抗体不改变BAFF-依赖性NF- κ B激活多于15%。

[0128] 认为在没有APRIL和BAFF的情况下不阻断NF- κ B激活多于20%并且在没有APRIL和BAFF的情况下不降低NF- κ B激活多于20%并且在没有APRIL和BAFF的情况下不增加NF- κ B激活多于20%的抗体与没有本发明抗体的APRIL诱导的NF- κ B激活(对照组)相比“在没有APRIL和BAFF的情况下不改变NF- κ B激活”多于20%;20%代表实验之间的平均标准变异。优选地,本发明的抗体在没有APRIL和BAFF的情况下不改变NF- κ B激活多于15%。

[0129] 同样,如果大量过量使用本发明的抗体,优选所述抗体的高达500 nM或1000 nM结合不被100 ng/ml APRIL并优选不被BAFF降低多于20%并且在具有和没有APRIL,并优选具

有和没有BAFF的情况下不改变APRIL-依赖性NF- κ B激活多于20%。

[0130] 如本文所用的术语“其他靶标”表示优选CD3 ϵ 。术语“第一个靶标和第二个靶标”表示CD3作为第一个靶标和BCMA作为第二个靶标或表示BCMA作为第一个靶标和CD3作为第二个靶标。

[0131] 如本文所用的术语“CD3 ϵ 或CD3”指在UniProt P07766 (CD3E_HUMAN) 之下描述的人CD3 ϵ 。术语“针对CD3 ϵ 的抗体,抗CD3 ϵ 抗体”指特异性结合CD3 ϵ 的抗体。优选地,抗体包含包含SEQ ID NO: 1、2和3的重链CDR分别为重链CDR1、CDR2和CDR3的可变结构域VH和包含SEQ ID NO: 4、5和6的轻链CDR分别为轻链CDR1、CDR2和CDR3的可变结构域VL。优选地,抗体包含SEQ ID NO:7 (VH) 和SEQ ID NO:8 (VL) 的可变结构域。

[0132] 如本文所用的术语“抗体”指单克隆抗体。抗体由两对“轻链”(LC)和“重链”(HC)组成(该轻链(LC)/重链对在本文中缩写为LC/HC)。此类抗体的轻链和重链是由若干结构域组成的多肽。每一重链包含重链可变区(本文缩写为HCVR或VH)和重链恒定区。重链恒定区包含重链恒定域CH1、CH2 和CH3 (抗体种类IgA、IgD和IgG) 和任选地重链恒定域CH4(抗体种类IgE 和IgM)。每一轻链包含轻链可变结构域VL和轻链恒定结构域CL。可变结构域VH和VL可以进一步细分为称为互补性决定区域(CDRs)的高变的区域,其散布于由称为框架区(FR)的更保守的区域。每一VH和VL由三个CDRs和四个FRs构成,从氨基末端向羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的“恒定结构域”不直接参与抗体与靶标的结合,但展示多种效应子功能。

[0133] 术语“抗体”包括例如小鼠抗体、人抗体、嵌合抗体、人源化抗体和遗传改造的抗体(变体或突变抗体),只要它们的特征性能得以保留。尤其优选的是人或人源化抗体,尤其是作为重组人或人源化抗体。

[0134] 如本文所用的术语“双特异性抗体”优选指这样的抗体,其中两对重链和轻链(HC/LC)中的一对特异地结合CD3,而另一对特异地结合BCMA。术语还指现有技术的双特异性抗体的其他形式,优选指双特异性单链抗体。

[0135] 如本文所用的术语“裸露抗体”指特异地结合BCMA的抗体,其包含Fc部分并且不缀合治疗剂,例如细胞毒素剂或放射标记。如本文所用的术语“缀合抗体,药物缀合物”指特异地结合BCMA的抗体,并且缀合治疗剂,例如细胞毒素剂或放射标记。

[0136] 如本文所用的术语“双特异性单链抗体”指优选包含两个结合结构域的单多肽链,一条特异地结合BCMA,而另一条优选特异地结合CD3。每个结合结构域包含来自抗体重链的一个可变区(“VH区”),其中第一个结合结构域的VH区特异地结合CD3分子,而第二个结合结构域的VH区特异地结合BCMA。两个结合结构域任选地通过短多肽间隔物彼此连接。多肽间隔物的非限制性实例是Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G-G-G-G-S) 及其重复。每个结合结构域可以额外包含来自抗体轻链的一个可变区(“VL区”),第一个和第二个结合结构域每一个中的VH区和VL区通过多肽接头彼此连接,所述多肽接头足够长以允许第一个结合结构域的VH区和VL区与第二个结合结构域的VH区和VL区彼此配对,从而它们一起能够特异地结合各自第一个和第二个结合结构域(参见例如EP0623679)。例如还在Choi BD等, Expert Opin Biol Ther. 2011 Jul;11(7):843-53和Wolf E.等, Drug Discov Today. 2005 Sep 15;10(18):1237-44中提及了双特异性单链抗体。

[0137] 如本文所用的术语“双抗体”指小的二价和双特异性抗体片段,其包含在相同的多

肽链(VH-VL)上通过肽接头连接轻链可变结构域(VL)的重(VH)链可变结构域,所述肽接头太短以至于不允许相同链上的两个结构域配对(Kipriyanov, Int. J. Cancer 77 (1998), 763-772)。这迫使与另一条链的互补结构域配对并促进二聚分子与两个功能抗原结合位点装配。为了构建本发明的双特异性双抗体,融合抗CD3抗体和抗BCMA抗体的V结构域以产生两条链VH(CD3)-VL(BCMA), VH(BCMA)-VL(CD3)。每条链本身不能够结合各自的抗原,但是与另一条链配对后重新产生抗CD3抗体和抗BCMA抗体的功能抗原结合位点。共表达两个scFv分子与在重链可变结构域和轻链可变结构域之间太短以至于不能分子内二聚化的接头并且自我装配以形成在相反端具有两个结合位点的双特异性分子。例如,可以通过从如上所述获得的DNA构建体PCR扩增分别编码BCMA和CD3的结合结构域的可变区,从而它们可以被克隆到载体,像pHOG中,如Kipriyanov等, J. Immunol. Methods, 200, 69-77 (1997a) 中所述。然后以预期方向将两个scFv构建体组合在一个表达载体中,由此缩短了VH-VL接头以防止链折叠回到自身上。DNA区段被STOP密码子和核糖体结合位点(RBS)分隔。RBS允许mRNA作为二顺反子信息进行转录,其通过核糖体翻译成非共价相互作用形成双抗体分子的两个蛋白质。双抗体,像其他抗体片段,具有这样的优势,即它们可以在细菌(大肠杆菌(E. coli))和酵母(毕赤酵母(Pichia pastoris))中以功能形式和高产量(高达Ig/1)表达。

[0138] 如本文所用的术语“串联scFVs”指单链Fv分子(即分别通过免疫球蛋白重链和轻链可变结构域,VH和VL结合形成的分子),如例如在WO 03/025018和 WO 03/048209中所述。称为TandAbs®的此类Fv分子包含四个抗体可变结构域,其中(i)四个可变结构域的前两个或后两个通过在定位VH/VL 或VL/VH中形成结合scFv的抗原在相同链内彼此分子内结合,(ii)其他两个结构域与另一条链的相应VH或VL结构域在分子间结合以形成抗原结合VH/VL对。在优选的实施方案中,如在WO 03/025018中所提示,此类Fv分子的单体包含至少四个可变结构域,其中一个单体的两个邻近结构域形成抗原结合VH-VL或VL-VH scFv单位。

[0139] 如本文所用的术语“DARPins”指如例如US 2009082274中所述的双特异性锚蛋白重复序列分子。这些分子来源于天然的锚蛋白,其可以见于人基因组并且是最丰富类型结合蛋白中的一种。通过天然的锚蛋白重复序列蛋白序列,使用229个锚蛋白重复序列用于初始设计,另外2200个锚蛋白重复序列用于后续的细化改进(refinement)来定义DARPin文库模块。所述模块充当用于DARPin文库的结构单元。文库模块与人基因组序列相似。DARPin由4-6个模块构成。因为每个模块大概3.5 kDa,平均DARPin的大小是16-21 kDa。通过核糖体展示完成对结合子的选择,所述核糖体展示是完全无细胞的并且描述于He M和Taussig MJ., Biochem Soc Trans. 2007, Nov;35(Pt 5):962-5中。

[0140] 术语“T细胞双特异性衔接物”是由不同抗体的两个单链可变片段(scFvs),或约55千道尔顿的单肽链上的不同基因的氨基酸序列组成的融合蛋白。scFvs之一通过CD3受体结合T细胞,而另一个结合BCMA。

[0141] 具有希腊字母命名的五种类型的哺乳动物抗体重链:α、δ、ε、γ 和μ (Janeway CA, Jr等 (2001). Immunobiology. 第5版, Garland Publishing)。所存在的重链类型定义了抗体的种类;这些链分别发现于IgA、IgD、IgE、IgG和IgM中(Rhoades RA, Pflanzer RG (2002). Human Physiology, 第4版, Thomson Learning)。不同的重链在大小和组成上不同;α和γ含有大概450个氨基酸,而 μ和ε具有大概550个氨基酸。

[0142] 每条重链具有两个区域,恒定区和可变区。恒定区在相同同种型的所有抗体中均相同,但是在不同同种型的抗体中不同。重链 γ 、 α 和 δ 具有由三个恒定结构域CH1、CH2和CH3(成一条线)构成的恒定区,和铰链区用于附加的柔性(Woof J, Burton D Nat Rev Immunol 4 (2004) 89–99);重链 μ 和 ϵ 具有由四个恒定结构域CH1、CH2、CH3和CH4构成的恒定区(Janeway CA, Jr等 (2001). Immunobiology. 第5版, Garland Publishing)。重链的可变区在不同B细胞产生的抗体中不同,但是对于单个B细胞或B细胞克隆产生的所有抗体是相同的。每条重链的可变区是大概110个氨基酸长并且由单个抗体结构域构成。

[0143] 在哺乳动物中,仅具有两种类型的轻链,其称为 λ (λ)和 κ (κ)。轻链具有两个连续的结构域:一个恒定结构域CL和一个可变结构域VL。轻链的大概长度是211–217个氨基酸。优选地,所述轻链是 κ (κ)轻链,而恒定结构域CL优选来自 κ (κ)轻链(恒定结构域CK)。

[0144] 如本文所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指单一氨基酸组合物的抗体分子制剂。

[0145] 本发明的“抗体”可以是任何种类(例如 IgA、IgD、IgE、IgG和IgM, 优选IgG或IgE), 或亚类(例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2, 优选IgG1), 由此本发明二价双特异性抗体来源的两种抗体具有相同亚类的Fc部分(例如IgG1、IgG4等, 优选IgG1), 优选相同同种异型的Fc部分(例如高加索人(Caucasian))。

[0146] “抗体的Fc部分”是本领域技术人员所熟知并基于抗体的木瓜蛋白酶切割定义的术语。本发明的抗体含有Fc部分,优选来自人来源的Fc部分和优选人恒定区的所有其他部分。抗体的Fc部分直接参与补体激活、C1q结合、C3激活和Fc受体结合。尽管抗体对补体系统的影响依赖于某些条件,但与C1q的结合由Fc部分中确定的结合位点引起。此类结合位点是现有技术中已知的,并且例如由Lukas, T.J., 等, J. Immunol. 127 (1981) 2555–2560; Brunhouse, R., 和Cebra, J.J., MoI. Immunol. 16 (1979) 907–917; Burton, D.R., 等, Nature 288 (1980) 338–344; Thommesen, J.E., 等, MoI. Immunol. 37 (2000) 995–1004; Idusogie, E.E., 等, J. Immunol. 164 (2000) 4178–4184; Hezareh, M., 等, J. Virol. 75 (2001) 12161–12168; Morgan, A., 等, Immunology 86 (1995) 319–324; 和EP 0 307 434所描述。

[0147] 此类结合位点是例如 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331和P329(根据Kabat的EU索引进行编号,参见下文)。亚类IgG1、IgG2和IgG3的抗体一般显示补体激活、C1q结合和C3激活,而IgG4不激活补体系统,不结合C1q并且不激活C3。优选地,Fc部分是人Fc部分。

[0148] 优选地,本发明的抗体包含野生型人IgG Fc区域的Fc变体,所述Fc变体在位置Pro329上包含氨基酸取代和至少一个其他氨基酸取代,其中根据Kabat的EU索引编号残基,并且其中所述抗体与包含野生型IgG Fc区的抗体相比展示对人 Fc γ RIIIA 和/或Fc γ RIIIA和/或Fc γ RI的降低亲和力,并且其中所述抗体诱导的ADCC降低至包含野生型人IgG Fc区的抗体诱导的ADCC的至少20%。在特定的实施方案中,本发明抗体中的野生型人Fc区的Pro329被甘氨酸或精氨酸或足够大以破坏Fc/Fc γ 受体界面内的脯氨酸夹层的氨基酸残基取代,所述受体界面在Fc的脯氨酸329与Fc γ RIIIA的色氨酸残基Trp 87和Tyr 110之间形成(Sondermann等: Nature 406, 267–273 (20 July 2000))。在本发明的其他方面,Fc变体中的至少一个其他氨基酸取代是S228P、E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S,

并且仍然在另一实施方案中,所述至少一个其他氨基酸取代是人IgG1 Fc区的L234A和L235A或人IgG4 Fc区的S228P和L235E。在W02012130831中详细描述了该Fc变体。

[0149] 如本文所用的“效应子功能”表示起因于抗体Fc区与Fc受体或配体的相互作用的生物化学事件。效应子功能包括但不限于ADCC、ADCP和CDC。如本文所用的“效应细胞”表示表达一个或多个Fc受体并介导一种或多种效应子功能的免疫系统的细胞。效应细胞包括但不限于单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树状突细胞、嗜酸性细胞、肥大细胞、血小板、B细胞、大颗粒淋巴细胞、朗格汉斯细胞、自然杀伤(NK)细胞,和 $\gamma\delta$ T细胞,并且可以来自任何生物,包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔和猴。本文的“文库”表示任何形式的一组Fc变体,包括但不限于一系列核酸或氨基酸序列、可变位置上的一系列核酸或氨基酸取代、包含编码文库序列的核酸的物理文库,或包含纯化或未纯化形式的Fc变体蛋白的物理文库。

[0150] 如本文所用的“Fc γ 受体”或“Fc γ R”表示结合IgG抗体Fc区并基本上由Fc γ R基因编码的蛋白家族的任何成员。在人中,该家族包括但不限于Fc γ RI (CD64),包括同种型Fc γ RIa、Fc γ RIb和Fc γ RIc;Fc γ RII (CD32),包括同种型Fc γ RIIa (包括同种异型H131和R131),Fc γ RIIb (包括Fc γ RIIb-1 和Fc γ RIIb-2), 和Fc γ RIIc;和Fc γ RIII (CD16),包括同种型Fc γ RIIIa (包括同种异型V158和F158) 和Fc γ RIIIb (包括同种异型Fc γ RIIIb-NA1和Fc γ RIIIb- NA2) (Jefferis等, 2002, *Immunol Lett* 82:57-65),以及任何未发现的人Fc γ Rs或Fc γ R同种型或同种异型。Fc γ R可以来自任何生物,包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔和猴。小鼠Fc γ Rs包括但不限于Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32)、Fc γ RIII (CD16) 和Fc γ RIII-2 (CD16-2),以及任何未发现的小鼠Fc γ Rs或Fc γ R同种型或同种异型。

[0151] 如本文所用的“具有增加的效应子功能的Fc变体”表示由于至少一个氨基酸修饰而不同于亲本Fc序列或与其他修饰,像在例如Asn279上的糖基化的改变(其增加效应子功能)相关的Fc序列。例如在Duncan等, 1988, *Nature* 332:563-564; Lund等, 1991, *J Immunol* 147:2657-2662; Lund等, 1992, *Mol Immunol* 29:53-59; Alegre等, 1994, *Transplantation* 57:1537-1543; Hutchins等, 1995, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11980-11984; Jefferis等, 1995, *Immuno Lett* 44:111-117; Lund等, 1995, *Faseb J* 9:115-119; Jefferis等, 1996, *Immunol Lett* 54:101-104; Lund等, 1996, *J Immunol* 157:4963- 4969; Armour等, 1999, *Eur J Immunol* 29:2613-2624; Idusogie等, 2000, *J Immunol* 164:4178- 4184; Reddy等, 2000, *J Immunol* 164:1925-1933; Xu等, 2000, *Cell Immunol* 200: 16-26; Idusogie等, 2001, *J Immunol* 166:2571-2575; Shields等, 2001, *J Biol Chem* 276:6591 -6604; Jefferis等, 2002, *Immunol Lett* 82:57-65; Presta等, 2002, *Biochem Soc Trans* 30:487-490; US5624821; US5885573; US6194551; W0200042072; W0199958572中提及了此类修饰。根据本发明,此类Fc修饰还包括Fc部分的改造的糖形式。如本文所用的“改造的糖形式”表示共价连接到Fc多肽上的碳水化合物组合物,其中所述碳水化合物组合物在化学上不同于亲本Fc多肽。可以通过任何方法,例如通过使用改造的或变体表达菌株,通过与一种或多种酶,例如 D1-4-N-乙酰葡萄糖氨基转移酶III (GnTIII) 共表达,通过在多种生物或来自多种生物的细胞系中表达Fc多肽,或通过在已经表达了Fc多肽后修饰碳水化合物来产生改造的糖形式。用于产生改造的糖形式的方法为本领域所知并且在Umana等, 1999, *Nat Biotechnol* 17:176-

180; Davies等, 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields等, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa等, 2003, J Biol Chem 278:3466-3473) US6602684; WO200061739; WO200129246; WO200231140; WO200230954; Potelligent™ 技术 (Biowa, Inc., Princeton, N.J.); GlycoMAb™ 糖基化改造技术 (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland) 中有所提及。改造的糖形式通常涉及不同于亲本Fc多肽的碳水化合物或寡糖组合物。

[0152] 具有增加的效应子功能的包含Fc变体的本发明的抗体显示对Fc γ 受体III (Fc γ RIII, CD 16a) 的高结合亲和力。与Fc γ RIII的高结合亲和力表示对于CD16a/F158, 与作为在CHO宿主细胞, 如CHO DG44或CHO K1细胞中表达的参考的亲本抗体(95%岩藻糖基化)相关, 结合增强了至少10倍, 和/或对于CD16a/V158, 与通过表面等离子共振(SPR)使用固定化的CD 16a, 以100nM的抗体浓度测量的亲本抗体相关, 结合增加了至少20倍。可以通过现有技术的方法, 例如通过修饰Fc部分的氨基酸序列或抗体的Fc部分的糖基化增加Fc γ RIII结合(参见例如EP2235061)。Mori, K等, Cytotechnology 55 (2007) 109和Satoh M, 等, Expert Opin Biol Ther. 6 (2006) 1161-1173涉及FUT8 (α -1,6-岩藻糖基转移酶) 基因敲除CHO系用于产生无岩藻糖基化的(afucosylated) 抗体。

[0153] 术语“嵌合抗体”指这样的抗体, 其包含来自一种来源或物种的可变区, 即结合区, 和来自不同来源或物种的恒定区的至少一部分, 一般通过重组DNA技术制备所述抗体。优选包含鼠类可变区和人恒定区的嵌合抗体。本发明包括的“嵌合抗体”的其他优选形式是那些, 其中恒定区相比初始抗体的恒定区已经被修饰或改变以产生本发明的性质, 特别是关于C1q结合和/或Fc受体(FcR)结合。此类嵌合抗体也称为“类型转换抗体”。嵌合抗体是包含编码免疫球蛋白可变区的DNA区段和编码免疫球蛋白恒定区的DNA区段的表达免疫球蛋白基因的产物。用于产生嵌合抗体的方法包括本领域所熟知的常规重组DNA和基因转染技术。参见, 例如, Morrison, S.L., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; 美国专利号5,202,238和5,204,244。

[0154] 术语“人源化抗体”指这样的抗体, 其中已经修饰了构架区或“互补决定区”(CDR)以与亲本免疫球蛋白的CDR相比包含不同特异性的免疫球蛋白的CDR。在优选的实施方案中, 将鼠类CDR移植到人抗体的构架区中, 以制备“人源化抗体”。参见例如Riechmann, L., 等, Nature 332 (1988) 323-327; 和Neuberger, M.S., 等, Nature 314 (1985) 268-270。本发明包括的“人源化抗体”的其他形式是那些, 其中恒定区相比初始抗体的恒定区已经被额外地修饰或改变以产生本发明的性质, 特别是关于C1q结合和/或Fc受体(FcR)结合。

[0155] 如本文所用, 术语“人抗体”旨在包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。人抗体为现有技术所熟知(van Dijk, M.A., 和van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374)。人抗体还可以在转基因动物(例如小鼠)中产生, 所述转基因动物在免疫后能够在不存在内源免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的全部所有组成成分或选定部分(selection)。在此类种系突变体小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致人抗体的产生(参见例如Jakobovits, A., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., 等, Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., 等, Year Immunol. 7 (1993) 33-40)。人抗体还可以在噬菌体展示文库中产生(Hoogenboom, H.R., 和Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388;

Marks, J.D., 等, J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597。Cole等和Boerner等的技术也可以用于制备人单克隆抗体 (Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 第77页 (1985); 和 Boerner, P., 等, J. Immunol. 147 (1991) 86-95)。如已经对本发明的嵌合和人源化抗体所提及的,如本文中所用的术语“人抗体”还包含这样的抗体,其在恒定区内被修饰以产生本发明的性质,尤其是关于C1q结合和/或FcR结合,例如通过“类型转换”即改变或突变Fc部分(例如自IgG1到IgG4和/或IgG1/IgG4突变)。

[0156] 如本文所用,术语“重组人抗体”旨在包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有人抗体,如分离自宿主细胞,如NS0或CHO细胞或对人免疫球蛋白基因是转基因的动物(例如小鼠)的抗体,或利用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体。此类重组人抗体具有处于重排形式的可变区和恒定区。本发明的重组人抗体已经经历了体内体细胞高度突变。因此,重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是尽管源自并涉及人种系VH和VL序列,但在体内可能不天然存在于人抗体种系所有组成成分中的序列。

[0157] 如本文所用的“可变结构域”(轻链可变结构域(VL),重链的可变区(VH))表示直接参与结合本发明的抗体的每对轻链和重链对。可变人轻链和重链结构域具有相同的一般结构并且每一个结构域包含四个构架(FR)区,其序列很大程度上保守,由三个“高变区”(或互补决定区,CDRs)连接。构架区采用了 β -折叠构象并且CDRs可以形成连接 β -折叠结构的环。每条链中的CDRs通过构架区保持其三维结构并与来自另一条链的CDRs一起形成结合位点。抗体重链和轻链CDR3区在本发明的抗体的结合特异性/亲和力方面起特别重要的作用并因而提供本发明的另一个目标。

[0158] 当用于本文时,术语“高变区”或“抗体的靶标结合部分”指负责靶标结合的抗体的氨基酸残基。高变区包含来自“互补性决定区”或“CDRs”的氨基酸残基。“构架”或“FR”区是除本文中定义的高变区残基之外的那些可变结构域区域。因此,抗体的轻链和重链从N-端到C-端包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。每条链上的CDR被此类构架氨基酸分开。尤其是,重链的CDR3是最有助于靶标结合的区域。根据 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 的标准定义确定CDR和FR区域。

[0159] 重链恒定结构域CH3被其替换的恒定重链结构域CH1可以是任何Ig种类(例如IgA、IgD、IgE、IgG和IgM),或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。

[0160] 重链结构域CH3被其替换的恒定轻链结构域CL可以是 λ (λ)或 κ (κ)类型,优选 κ (κ)类型。

[0161] 如本文所用的术语“靶标”或“靶标分子”可互换使用并指人BCMA。关于双特异性抗体,术语指BCMA和第二个靶标。优选地,关于双特异性抗体,术语指BCMA和CD3。

[0162] 术语“表位”包括能够特异性结合抗体的任何多肽决定簇。在某些实施方案中,表位决定簇包括分子的化学活性表面基团,如氨基酸、糖侧链、磷酰基或磺酰基(sulfonyl),以及在某些实施方案中,可以具有特定的三维结构特征,和/或特定的电荷特性。表位是被抗体结合的靶标区域。

[0163] 一般而言,具有编码本发明抗体的轻链和重链的两个载体。关于双特异性抗体,具有编码特异地结合第一个靶标的所述抗体的轻链和重链的两个载体,和编码特异地结合第二个靶标的所述抗体的轻链和重链的其他两个载体。两个载体之一编码各自的轻链,而两

个载体中的另一个编码各自的重链。然而,在用于制备本发明抗体的备选方法中,仅一个编码特异地结合第一个靶标的抗体的轻链和重链的第一个载体和仅一个编码特异地结合第二个靶标的抗体的轻链和重链的第二个载体可以用于转化宿主细胞。

[0164] 如本文所用的术语“核酸或核酸分子”旨在包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的,但优选为双链DNA。

[0165] 如本文所用,表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用,且全部这些名称都包括子代。因此,词语“转化体”和“转化细胞”包括原代主体细胞和不考虑转化次数的情况下来自其中的培养物。也应理解,由于有意的或无意的突变,所有后代在DNA含量上不可能完全相同。包括如在最初转化的细胞中所筛选具有相同功能或生物活性的变体后代。其中期望不同的指定时,将从上下文中显而易见。

[0166] 如本文所用的术语“转化”指将载体/核酸转移到宿主细胞中的过程。如果没有强大的细胞壁屏障的细胞用作宿主细胞,那么例如通过Graham 和Van der Eh, *Virology* 52 (1978) 546ff描述的磷酸钙沉淀方法进行转染。然而,也可使用用于将DNA导入细胞中的其他方法,例如通过核注射或通过原生质体融合。如果使用原核细胞或含有实质细胞壁结构的细胞,则例如,一种转染方法是如Cohen SN,等, *PNAS* 1972, 69 (8) : 2110-2114所述的使用氯化钙的钙处理。

[0167] 使用转化重组产生抗体为现有技术所熟知并且描述于例如Makrides, S. C, *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S.,等, *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, RJ., MoI. *Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G.,等, *Arzneimittelforschung* 48 (1998) 870-880的综述文章以及US6331415 和US4816567中。

[0168] 如本文所用,“表达”指将核酸转录为mRNA的过程和/或随后将转录的mRNA(也称作转录物)翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。转录物和编码的多肽统称为基因产物。如果多核苷酸来自基因组DNA,那么在真核细胞中的表达可包括mRNA的剪接。

[0169] “载体”是核酸分子,特别是自主复制的,其将插入的核酸分子转移到宿主细胞中和/或在宿主细胞之间转移。该术语包括主要用作将DNA或RNA插入细胞(例如染色体整合)的载体、主要用作复制DNA或RNA的复制载体、和用作DNA或RNA转录和/或翻译的表达载体。还包括提供多于一种所述功能的载体。

[0170] “表达载体”是多核苷酸,其在被引入到适当的宿主细胞时,可以被转录并翻译成多肽。“表达体系”一般指包括可以作用于产生想要的表达产物的表达载体的合适宿主细胞。

[0171] 优选通过重组手段产生本发明的抗体。此类方法为现有技术所广泛熟知并且包括在原核和真核细胞中表达蛋白,随后分离与抗体多肽并且一般地纯化到药学上可接受的纯度。对于蛋白表达,通过标准方法将编码轻链和重链或其片段的核酸插入到表达载体中。在适当的原核或真核宿主细胞,像CHO细胞、NS0细胞、SP2/0细胞、HEK293细胞、COS细胞、酵母或大肠杆菌细胞中进行表达,并且从所述细胞(裂解后的上清液或细胞)中回收抗体。双特异性抗体可以存在于完整细胞中、细胞裂解物中,或是部分纯化的或基本上纯的形式。通过标准技术,包括碱/SDS处理、柱层析法和本领域所熟知的其他技术进行纯化,以消除其他细胞组分或其他污染物,例如其他细胞核酸或蛋白。参见Ausubel, F.,等,编辑, *Current*

Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。

[0172] 由例如Barnes, L.M.,等, Cytotechnology 32 (2000) 109-123;和Barnes, L.M.,等, Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270描述了在NS0细胞中的表达。由例如Durocher, Y.,等, Nucl.Acids.Res.30 (2002) E9描述了瞬时表达。由Orlandi, R.,等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P.,等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89 (1992) 4285-4289;和Norderhaug, L.,等, J. Immunol.Methods 204 (1997) 77-87描述了可变结构域的克隆。由Schlaeger, E.-J.,和Christensen, K.,在Cytotechnology 30 (1999) 71-83中以及Schlaeger, E.-J.,在J. Immunol.Methods 194 (1996) 191-199中描述了优选瞬时表达系统(HEK293)。

[0173] 适合用于原核生物的控制序列,例如包括启动子,任选地操纵子序列,和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、增强子和多腺苷酸化信号。

[0174] 通过常规的免疫球蛋白纯化方法,如例如蛋白A-琼脂糖、羟基磷灰石层析法、凝胶电泳、透析或亲和层析法从培养基中适当地分离抗体。使用常规方法容易地分离编码单克隆抗体的DNA或RNA并进行测序。杂交瘤细胞可以充当此类DNA和RNA的来源。一旦被分离,可以将DNA插入表达载体中,所述表达载体然后被转染到本不产生免疫球蛋白的宿主细胞如HEK293细胞、CHO细胞或骨髓瘤细胞中,以在宿主细胞中获得重组单克隆抗体的合成。

[0175] 本发明抗体的氨基酸序列变体(或突变体)通过将适合的核苷酸变化引入到抗体DNA中,或通过核苷酸合成进行制备。然而,此类修饰可以仅在例如如上述非常有限的范围内进行。例如,修饰不改变上述抗体特征如IgG同种型和靶标结合,但是可以提高重组生产的产率、蛋白稳定性或有利于纯化。

[0176] T细胞双特异性(TCB)结合物在细胞杀伤中具有非常高的浓度/肿瘤-细胞-受体-占据依赖性效力(例如体外细胞杀伤测定中亚皮摩尔或低皮摩尔范围的EC₅₀;Dreier等 Int J Cancer 2002),以比传统单特异性抗体低得多的剂量给出T-细胞双特异性结合物(TCB)。例如,以5-15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{天}$ (即仅0.35 -0.105 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{周}$)的连续静脉剂量给出blinatumomab (CD19xCD3),用于治疗急性淋巴细胞性白血病或以60 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{天}$ 给出用于治疗非霍杰金淋巴瘤,并且这些剂量上的血清浓度在0.5-4 ng/ml范围内(Klinger等, Blood 2012; Topp等, J Clin Oncol 2011; Goebeler等Ann Oncol 2011)。因为低剂量的TCB可以在患者中发挥高效率,设想对于本发明的抗体,临床环境中的皮下施用是可能并优选的(优选0.25 - 2.5 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{周}$ 的剂量范围)。甚至在这些低浓度/剂量/受体占据时,TCB可以引起大量不利的事件(Klinger等, Blood 2012)。因而,控制肿瘤细胞占据/覆盖是至关重要的。在具有高的且可变水平的血清APRIL 和BAFF的患者中(例如多发性骨髓瘤患者,Moreaux等2004; Blood 103 (8) :3148-3157),结合肿瘤细胞resp.肿瘤细胞占据的TCB的数量受APRIL/BAFF非常大的影响。但是通过使用本发明的所述抗体,肿瘤细胞占据分别效率/安全性,可能不需要增加本发明的抗体的剂量,因为所述抗体可能不受APRIL/BAFF配体竞争的影响。本发明抗体的另一优势是基于包括Fc部分,其与没有Fc部分的TCBs(例如blinatumomab,其需要利用患者携带的泵经静脉内并且连续给予)相比,增加~12天的清除半衰期并允许至少一次或两次/周施用。

[0177] 表1

BCMA 抗体	SEQ ID NO:								
	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3L	
[0178]	13C2	17	27	37	47	57	67	77	87
	17A5	18	28	38	48	58	68	78	88
	83A10	19	29	39	49	59	69	79	89
	13A4	20	30	40	50	60	70	80	90
	13D2	21	31	41	51	61	71	81	91
	14B11	22	32	42	52	62	72	82	92
	14E1	23	33	43	53	63	73	83	93
	29B11	24	34	44	54	64	74	84	94
	29F3	25	35	45	55	65	75	85	95
	13A7	26	36	46	56	66	76	86	96

[0179] 提供以下实施例、序列表和图,以帮助理解本发明,其真正范围在所附权利要求中给出。应理解,可以在所示方法中进行修饰,但不背离本发明的精神。

[0180] 材料和一般方法

[0181] 在Kabat, E. A., 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 中给出关于人免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列的一般信息。根据EU编号对抗体链的氨基酸进行编号并参考 (Edelman, G.M., 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991))。

[0182] 重组DNA技术

[0183] 标准方法如Sambrook等, *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所述用于操作DNA。根据生产商的说明书来使用分子生物学试剂。在Kabat, E.A. 等, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, NIH Publication No. 91-3242. *Gene synthesis* 中给出关于人免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列的一般信息。

[0184] 从通过化学合成制成的寡核苷酸制备想要的基因区段。通过寡核苷酸的退火和连接,包括PCR扩增装配侧翼为单一的限制性核酸内切酶切割位点的600 - 1800 bp长基因区段,随后通过指示的限制性位点例如Kpn1/ Sad或Ascl1/Pac1克隆至基于pGA4克隆载体的pPCRSscript (Stratagene) 中。通过DNA测序证实亚克隆的基因片段的DNA序列。根据Geneart (Regensburg, Germany) 的指定规格定购基因合成片段。

[0185] DNA序列测定

[0186] 通过双链测序测定DNA序列。DNA和蛋白序列分析和序列数据管理

[0187] GCG's (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) 软件包版本10.2和

Infomax's Vector NT1 Advance套件版本8.0用于序列产生、作图、分析、注释和举例说明。

[0188] 表达载体

[0189] a) 为了表达质粒的所述抗体变体的表达用于瞬时表达(例如在HEK293 EBNA或HEK293-F中),应用基于具有CMV-Intron A启动子的cDNA组构或具有CMV启动子的基因组组构的细胞。

[0190] 除了抗体表达盒,所述载体还含有:

[0191] -允许该质粒在大肠杆菌中复制的复制起始区,和在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性的 β -内酰胺酶基因。

[0192] 抗体基因的转录单元由以下元件构成:

[0193] -5'末端的唯一限制性位点-来自人巨细胞病毒的立即早期增强子和启动子,

[0194] -在cDNA组构的情况下后面是内含子A序列,

[0195] -人抗体基因的5'-非翻译区,

[0196] -免疫球蛋白重链信号序列,

[0197] -作为cDNA或作为具有免疫球蛋白外显子-内含子组构的基因组组构的人抗体链(野生型或具有结构域交换)

[0198] -具有多腺苷酸化序列的3'非翻译区,和

[0199] -3'末端的唯一限制性位点。

[0200] 通过PCR和/或基因合成产生包含如下文所述的所述抗体链的融合基因并利用已知的重组方法和技术,例如通过使用各载体中的唯一限制性位点连接相应的核酸区段对其进行装配。通过DNA测序验证亚克隆的核酸序列。为了瞬时转染,通过来自转化的大肠杆菌培养物(Nucleobond AX, Macherey-Nagel)的质粒制剂来制备较大量的质粒。

[0201] b) 产生抗体和抗原表达载体

[0202] 框内亚克隆重链和轻链DNA序列的可变区与预先插入到各受体哺乳动物表达载体中的人IgG1恒定重链或人IgG1恒定轻链。通过包含CMV增强子和MPSV启动子后接5' UTR、内含子和 κ MAR元件的嵌合MPSV启动子驱动抗体表达。通过CDS的3'末端的合成polyA信号序列终止转录。所有载体携带编码在真核细胞中将蛋白靶向分泌的前导肽的5' -末端DNA序列。此外,每个载体含有EBV OriP序列用于在EBV EBNA表达细胞中的游离型质粒复制。

[0203] 从具有编码C末端标签的预先插入的DNA序列的哺乳动物抗原表达载体表达已经用于噬菌体展示选择活动并表征所选抗体的结合性质的抗原。Avi标签已经用于各抗原的体内或体外生物素化。为了抗原的纯化和同二聚体化或异二聚体化,将人 IgG1 Fc wt或Fc突起融合到抗原表达盒的C末端。通过包含CMV增强子和MPSV启动子后接5' UTR、内含子和 κ MAR元件的嵌合MPSV启动子驱动抗原表达。通过CDS的3'末端的合成polyA信号序列终止转录。所有载体携带编码在真核细胞中将蛋白靶向分泌的前导肽的5' -末端DNA序列。此外,每个载体含有EBV OriP序列用于在EBV EBNA表达细胞中的游离型质粒复制。

[0204] 细胞培养技术

[0205] 如Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J. S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. 和 Yamada, K.M. (编辑), John Wiley & Sons, Inc. 中所述使用标准的细胞培养技术。

[0206] HEK293细胞中的瞬时表达

[0207] 通过如下所述在贴壁生长的HEK293-EBNA中或在悬浮液中生长的HEK293-F细胞中瞬时共转染各表达质粒来表达双特异性抗体。

[0208] a) HEK293-EBNA系统中的瞬时转染

[0209] 通过在补充有10% Ultra Low IgG FCS (胎牛血清, Gibco)、2 mM L-谷氨酰胺 (Gibco) 和250 μ g/ml 遗传霉素 (Gibco) 的DMEM (Dulbecco's 改良的Eagle's培养基, Gibco) 中培养的贴壁生长的HEK293-EBNA细胞 (人胚肾细胞系293, 表达EB病毒核靶标; 美国典型培养物保藏中心(American type culture collection) 保藏号ATCC # CRL- 10852, Lot. 959 218) 中瞬时共转染各表达质粒(例如编码重链和修饰的重链, 以及相应的轻链和修饰的轻链) 来表达双特异性抗体。为了转染, 以FuGENE™ 试剂(μ l) 与DNA (μ g) 4:1 (范围为3:1-6:1) 的比例使用FuGENE™ 6 Transfection Reagent (Roche Molecular Biochemicals)。

[0210] 使用分别编码(修饰的和野生型)轻链和重链的质粒的1:1(等摩尔) (范围从1:2到2:1) 的摩尔比例从各质粒表达蛋白。利用L-谷氨酰胺ad 4 mM, 葡萄糖 [Sigma] 和NAA [Gibco] 在第3天喂养细胞。从转染后第5天至第11天通过离心收集含有双特异性抗体的细胞培养物上清液并储存在-200C。在Meissner, P. 等, Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203中给出了例如HEK293细胞中的关于人免疫球蛋白的重组表达的一般信息。

[0211] b) HEK293-F系统中的瞬时转染

[0212] 使用HEK293-F系统 (Invitrogen) , 根据制造商说明书, 通过瞬时转染各质粒(例如编码重链和修饰的重链, 以及相应的轻链和修饰的轻链) 来产生双特异性抗体。简言之, 利用四个表达质粒和293fectin或fectin (Invitrogen) 的混合物转染在摇瓶或搅拌发酵罐中无血清 FreeStyle 293表达培养基 (Invitrogen) 中悬浮生长的HEK293-F细胞 (Invitrogen)。对于2 L摇瓶 (Corning) , 将HEK293-F细胞以 1.0×10^6 细胞/mL的密度接种到600 mL中并在120 rpm, 8% CO₂下孵育。第二天, 利用A) 20 mL Opti-MEM (Invitrogen) 与600 μ g 总质粒DNA (1 μ g/mL) (其分别编码等摩尔比例的重链或修饰的重链和相应的轻链) 和B) 20 mL Opti-MEM + 1.2 mL 293 fectin或fectin (2 μ l/mL) 的大概42 mL混合物, 以大概 1.5×10^6 细胞/mL的细胞密度转染细胞。根据葡萄糖消耗, 在发酵过程中添加葡萄糖溶液。5-10天后收集含有分泌的抗体的上清液并从上清液中直接纯化抗体或将上清液冰冻并储存。

[0213] 蛋白测定

[0214] 根据Pace等, Protein Science, 1995, 4, 2411-1423, 使用在氨基酸序列基础上计算的摩尔消光系数测定 280 nm处的光密度 (OD) 来测定纯化的蛋白和衍生物的蛋白浓度。

[0215] 上清液中的抗体浓度测定

[0216] 经利用蛋白A 琼脂糖-珠 (Roche) 的免疫沉淀评估细胞培养物上清液中的抗体和衍生物的浓度。在TBS-NP40 (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40) 中将60 μ L蛋白A琼脂糖珠洗涤三次。随后, 向在TBS-NP40中预先平衡的蛋白A琼脂糖珠中应用1 -15 mL细胞培养物上清液。在室温下孵育1小时后, 将珠在 Ultrafree-MC-过滤柱 (Amicon) 上利用0.5 mL TBS-NP40洗涤一次, 利用0.5 mL 2x磷酸缓冲盐溶液 (2xPBS, Roche) 洗涤两次并利用0.5 mL 100 mM柠檬酸钠pH 5,0简短地洗涤四次。通过加入35 μ l NuPAGE® LDS

样品缓冲液 (Invitrogen) 洗脱结合的抗体。一半的样品分别与NuPAGE® 样品还原剂组合或保持不被还原，并在70°C 加热10分钟。因此，将5-30 μl 应用到4-12% NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen) 上 (MOPS缓冲液用于非还原性SDS-PAGE和具有NuPAGE® 抗氧化剂运行缓冲液添加剂 (Invitrogen) 的MES缓冲液用于还原性SDS-PAGE) 并利用考马斯蓝进行染色。

[0217] 通过亲和HPLC层析定量测量细胞培养物上清液中的抗体和衍生物的浓度。简言之，将含有结合蛋白A的抗体和衍生物的细胞培养物上清液应用到200 mM KH₂PO₄, 100 mM 柠檬酸钠, pH 7.4中的Applied Biosystems Poros A/20柱中并在Agilent HPLC 1100系统上利用200 mM NaCl, 100 mM 柠檬酸, pH 2,5从基质中洗脱。通过UV吸光度和峰面积的整合定量洗脱的蛋白。纯化的标准IgG1抗体充当标准。

[0218] 或者，通过夹层-IgG-ELISA测量细胞培养物上清液中的抗体和衍生物的浓度。简言之，利用以0.1 μg/mL的 100 μL/孔生物素化的抗人IgG捕获分子F(ab')2_{h-Fc γ} BI (Dianova) 在室温下包被StreptaWell High Bind Streptavidin A-96孔微量滴定板 (Roche) 1小时或者在4°C下包被过夜，随后利用200 μL/孔PBS, 0.05% Tween® (PBST, Sigma) 洗涤三次。向孔中加入100 μL/孔含有在PBS (Sigma) 中稀释系列的各抗体的细胞培养物上清液并在微量滴定板振荡器上于室温下孵育1-2小时。利用200 μL/孔PBST将孔洗涤三次，并利用以0.1 μg/mL的100 μL F(ab')2_{h-Fc γ}POD (Dianova) 作为检测抗体，在微量滴定板振荡器上于室温下检测结合的抗体1-2小时。利用200 μL/孔PBST将未结合的检测抗体洗掉三次并通过加入100 μL ABTS/孔检测结合的检测抗体。在Tecan Fluor Spectrometer上，在405 nm的测量波长处(参考波长492 nm) 进行吸光度的测定。

[0219] 蛋白纯化

[0220] 参考标准方案从过滤的细胞培养物上清液纯化蛋白。简言之，将抗体应用到蛋白A琼脂糖柱 (GE healthcare) 上并利用PBS进行洗涤。在pH 2.8下完成抗体的洗脱，随后立即中和样品。在PBS中或在20 mM 组氨酸, 150 mM NaCl pH 6.0中，通过大小排阻层析 (Superdex 200, GE Healthcare) 从单体抗体分离聚集的蛋白。合并单体抗体部分，如果需要使用例如MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO) 离心浓缩器进行浓缩、冷冻并储存在 -20 °C。提供部分样品用于例如通过SDS-PAGE、大小排阻层析或质谱分析法的后续蛋白分析和分析表征。

[0221] SDS-PAGE

[0222] 根据制造商的说明书使用NuPAGE® Pre-Cast凝胶系统 (Invitrogen)。具体而言，使用10%或4-12% NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast凝胶 (pH 6.4) 和NuPAGE® MES (还原性凝胶, NuPAGE® 抗氧化剂运行缓冲液添加剂) 或MOPS (非还原性凝胶) 运行缓冲液。

[0223] 分析性大小排阻层析

[0224] 通过HPLC层析进行大小排阻层析用于测定抗体的聚集和低聚状态。简言之，将蛋白A纯化的抗体应用到Agilent HPLC 1100系统上的300 mM NaCl, 50 mM KH₂PO₄/K₂HP0₄, pH 7.5中的Tosoh TSKgel G3000SW柱上或Dionex HPLC系统上的 2 x PBS中的Superdex 200柱 (GE Healthcare) 上。通过UV吸光度和峰面积的整合定量洗脱的蛋白。BioRad Gel Filtration Standard 151-1901充当标准。

[0225] 质谱分析法

[0226] 通过电喷雾电离质谱分析法 (ESI-MS) 测定并验证交换抗体 (crossover antibodies) 的总去糖基化的质量。简言之, 在 100 mM KH₂PO₄/K₂HP0₄, pH 7 中于 37°C 下利用蛋白浓度高达 2 mg/ml 的 50 μl N-糖苷酶 F (PNGaseF, ProZyme) 将 100 μg 纯化的抗体去糖基化并随后在 Sephadex G25 柱 (GE Healthcare) 上通过 HPLC 去盐。去糖基化并还原后通过 ESI-MS 测定各重链和轻链的质量。简言之, 115 μl 中的 50 μg 抗体与 60 μl 1 M TCEP 和 50 μl 8 M 盐酸胍孵育, 随后脱盐。在装配有 NanoMate® 源的 Q-Star Elite MS 系统上通过 ESI-MS 测定还原的重链和轻链的总质量和质量。

实施例

[0227] 实施例 1-产生抗 BCMA 抗体

[0228] 实施例 1A 产生抗原和工具试剂

[0229] 实施例 1A1. 重组的可溶的人 BCMA 胞外结构域

[0230] a) 如 Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18) 中所述产生重组的可溶的人 BCMA 胞外结构域 (“BCMA ECD”)。简言之, 利用掺入了 BamH1 位点 (粗体, 下划线) 的正向引物 **5-AAGCTTGGATCCCATGTTGCAGATGGCTGGCAGTGCTCC-3 (SEQ ID NO:11)** 和 掺入了终止密码子 (斜体) 和 NotI 位点 (粗体, 下划线) 的反向引物

5-GAATTCGCGCCGCTCATCCTTTCACTGAATTGGTCACACTTGCATTAC-3 (SEQ ID NO:12) , 使用 IMAGE 克隆 687194 (Invitrogen) 作为 PCR 模板扩增人 BCMA 胞外结构域 (ECD; 氨基酸 5-51; NP_001183)。将 PCR 产物克隆到包含谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 的谷胱甘肽 S 转移酶基因上游的表达载体中, 转化到包含在 lacUV5 启动子控制下的 T7 RNA 聚合酶基因的大肠杆菌菌株中, 并在 ÄKTAexplorer (GE Healthcare) 上于 4°C 下纯化诱导的蛋白。在含有蛋白酶抑制剂和溶菌酶的 1:15 w/v 的 B-PER 缓冲液 (Pierce) 中裂解细胞沉淀。利用 1-2 μg/mL DNase I (Sigma) 补充提取物, 搅拌额外的 20 分钟, 并调整至 pH 7.5。在 31,000 × g 离心 20 分钟 (Beckman) 后收集可溶性融合蛋白并装载到利用 B-PER 缓冲液预先平衡的谷胱甘肽 Sepharose 4 FF 柱 (GE Healthcare) 上。利用 4 柱体积 (CV) B-PER 缓冲液 (3 CV 各洗涤缓冲液 1 和 2 (Pierce)) 洗涤柱, 随后利用 5 CV 50 mmol/L Tris (pH 8.0), 0.15 mol/L NaCl 最后洗涤柱。利用 50 mmol/L Tris (pH 8.0) 中 20 mmol/L 还原型谷胱甘肽洗脱 GST-标签化的 BCMA 并使用 3500 MWCO slide-A-lyzer (Pierce) 针对 PBS (pH 7.4) 进行透析。为了去除 GST 标签, 利用 50 mmol/L Tris (pH 8.0), 0.15 mol/L NaCl 中的凝血酶处理 BCMA: GST, 同时结合到谷胱甘肽 Sepharose 上。然后通过苯甲酰胺 Sepharose 柱 (GE Healthcare) 捕获释放的凝血酶。利用 3-5 CV 50 mmol/L Tris (pH 8.0), 0.15 mol/L NaCl 从柱上洗脱 切割了 GST 的 BCMA, 并针对 PBS (pH 7.4) 进行透析。通过使用显色底物 S-2238 (Chromogenix, DiaPharma) 分析部分的凝血酶活性来验证凝血酶去除。通过 A280 测定蛋白浓度。通过 SDS-PAGE 和通过 TSK-Gel G3000SW HPLC 大小排阻层析 (Tosoh Bioscience) 分析所有纯化的蛋白。如上所述使用具有以下修改的相同方法产生 BCMA ECD 的生物素化变体 (“BCMA-ECD-biot”)。通过 PCR 扩增, 在如上所述第一个 PCR 产物的 3' 末端下游框内添加编码 Avi-His 标签的 DNA 序列。然后将该新的第二个 PCR 产物亚克隆至 pGEX4T1 表达载体中, 然后与表达 BirA 酶 (用于 Avi 标签体内生物素化) 的载体一起共转化到细菌中。如上所示为 BCMA-ECD 进行剩余的产生和纯化步骤。

[0231] b) 用作抗原用于噬菌体展示选择的人、食蟹猴和鼠类BCMA的胞外结构域在HEK EBNA细胞中瞬时表达为N-末端的单体Fc-融合体并且通过在定位于携带受体链(Fc突起链)的Fc部分的C末端上的avi标签识别序列上共表达BirA生物素连接酶而在体内被位点特异性地生物素化。人、食蟹猴和鼠类BCMA的胞外结构域分别包含甲硫氨酸4-天冬酰胺53, 甲硫氨酸4-天冬酰胺52, 和丙氨酸2-苏氨酸49。这些在N末端融合到人IgG1的铰链上,使得与未融合的人IgG1 Fc部分(孔链)通过突起-进入-孔技术进行异二聚体化。

[0232] 实施例1A2. 重组的截短的鼠类APRIL

[0233] a) 如Ryan 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18) 中所述产生重组的截短的鼠类APRIL。简言之,从IMAGE克隆5290965 (Invitrogen) 扩增鼠类APRIL (残基106-241; NP_076006) 并克隆至细菌表达载体中,融合到COOH末端上,基因特异性正向引物

5-ACGTTAGATCTCCACTCAGTCCTGCATCTTGTCCAGTTAAC-3 (SEQ ID NO:13) 和反向引物

5-AACGTTGCCCGCTAGTTCACAAACCCCAGG-3 (SEQ ID NO:14) 用于扩增。正向和反向引物中的BglII和NotI位点(粗体,下划线)分别用于克隆所得PCR片段在COOH末端融合到硫氧还蛋白上至细菌表达载体中。将构建体转化到大肠杆菌(Escherichia coli) 菌株K-12中,其在硫氧还蛋白还原酶基因中包含突变,在25℃下培养直至A600 ~0.6,利用1 mmol/L 异丙基-L-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷进行诱导,然后在25℃下培养过夜。重悬浮大肠杆菌细胞沉淀(paste)并在含有完全没有EDTA的蛋白酶抑制剂的1:10 w/v B-PER裂解缓冲液中于4℃下搅拌。然后利用5×贮存缓冲液将混合物稀释至50 mmol/L Tris-HCl、0.4 mol/L NaCl、1% Triton-X100、5%甘油和10 mmol/L咪唑(pH 8-9)的终浓度。利用溶菌酶、DNase I 和2 mmol/L MgCl₂ (Sigma) 补充样品,搅拌30分钟,调整至4 mmol/L EDTA,搅拌20分钟,然后离心以去除细胞碎片。将样品调整至40 mmol/L MgCl₂并在装载到Ni-IMAC柱(GE Healthcare)上之前搅拌30分钟。利用3-5 CV 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中的10 mmol/L咪唑、2-3 CV 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中的0.5% v/v Triton X-100,然后利用5-10 CV 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中的70 mmol/L咪唑连续洗涤柱。利用20 mmol/L Tris-HCl, 5% 甘油(pH 8.0)中70-500 mmol/L咪唑的线性梯度洗脱截短的APRIL。针对含有50 mmol/L咪唑、0.1 mol/L L-Arg、5%甘油、1 mmol/L EDTA (pH 8.0) 的PBS缓冲液透析合并的蛋白部分。分光光度计测量地测定蛋白浓度[ε₂₈₀ (1%) = 0.94]。

[0234] b) 用作噬菌体展示选择和ELISA的工具(竞争者)的重组的截短的鼠类APRIL在HEK EBNA细胞中瞬时表达为N末端单体Fc融合体。鼠类APRIL包含组氨酸106-亮氨酸241。其在N末端融合到人IgG1的铰链上,使得与未融合的人IgG1 Fc部分(孔链)通过突起-进入-孔技术进行异二聚体化。

[0235] 实施例1A3. 重组的截短的人BAFF

[0236] 如Gordon, 2003 (Biochemistry; 42 (20): 5977-5983) 中所述产生重组的截短的人。简言之,将编码BAFF残基82-285的DNA片段克隆至在N末端包含His标签和随后的凝血酶切割位点的pBr322载体中,产生与N末端His标签,随后是凝血酶切割位点的融合体。将包含在lacUV5启动子控制下的T7 RNA聚合酶基因的大肠杆菌菌株在具有50 mg/L羧苄青霉素的LB培养基中于37℃下培养至对数中期,然后在利用1.0 mM IPTG诱导之前冷却至16 °C。在进一步培养12小时后通过离心收集细胞并储存在-80℃。将细胞沉淀重悬浮在50 mM Tris, pH 8.0, 和500 mM NaCl中并在冰上超声。离心后,将上清液装载到 Ni-NTA 琼脂糖

柱 (Qiagen) 上。利用 50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 和 20 mM 咪唑洗涤柱, 然后在具有 250 mM 咪唑的相同缓冲液中利用不连续梯度洗脱。合并含有 BAFF 的部分, 加入凝血酶, 并将样品针对 20 mM Tris, pH 8.0, 和 5 mM CaCl₂ 于 4 °C 下透析过夜。在 monoQ (Pharmacia) 柱上并且最后在 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 和 5 mM MgCl₂ 中的 S-200 大小排阻柱上进一步纯化蛋白。

[0237] 实施例 1B 在其表面上表达人 BCMA 的重组细胞

[0238] 如 Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18) 中所述产生在其表面上表达人 BCMA 的重组细胞 (“HEK293-BCMA 细胞”)。简言之, 使用包括 HindIII 限制性位点 (粗体, 下划线) 和 Kozak 共有序列的正向引物

5- **GAATTCAAAGCTT**GCCACCATGTTGCAGATGGCTGGCAGTGCTCC-3 (SEQ ID NO:15) 和包括 3 终止密码子和 XbaI 限制性位点 (粗体, 下划线) 的反向引物

5-**GAATTCTCTAGATTACCTAGCAGAATTGATTTCTATCTCCGTAGC-3 (SEQ ID NO:16) , 使用 IMAGE 克隆 687194 (Invitrogen) 作为 PCR 模板扩增全长人 BCMA。将扩增产物克隆至大肠杆菌表达载体中, 其包含人巨细胞病毒 (CMV) 立即早期增强子/启动子、多组氨酸 (6xHis), 和线性化的新霉素抗性基因, 并将其转染到人胚肾 293 (HEK293) 细胞中。选择在其表面上表达人 BCMA 的这些细胞, 通过荧光激活的细胞分选分析选择高表达稳定克隆。**

[0239] 实施例 1C 在其表面上表达 BCMA 的人骨髓瘤细胞系

[0240] a) 细胞来源和培养条件。从美国典型培养物保藏中心 (ATCC CRL-9068) 获得人 MM 细胞系 NCI-H929。在补充有 10% 胎牛小牛血清、2 mM L-谷氨酰胺、1 mM 丙酮酸钠的 RPMI 1640 中培养 NCI-H929 细胞。U266B1 (ATCC TIB-196), 在 RPMI 高葡萄糖、10% FCS、1% 谷氨酰胺、1% 丙酮酸钠、10 mM HEPES 中培养的人 B 淋巴细胞骨髓瘤细胞系。RPMI 8226 (ATCC CCL-155), 在 DMEM、10% FCS、1% 谷氨酰胺中培养的人 B 淋巴细胞骨髓瘤细胞系。MKN45 (DSMZ ACC 409), 在含有 10% FCS 和 1% 谷氨酰胺的 DMEM 中培养的人胃腺癌细胞系。通过流式细胞术使用缀合荧光染料的抗人 BCMA 抗体 (BD Biosciences) 验证 MM 细胞系上的 BCMA 表达。

[0241] b) 通过流式细胞术在三个人骨髓瘤细胞系 (H929、RPMI-8226 和 U266B1) 上评估 BCMA 表达。简言之, 收集、洗涤细胞、计数细胞的活力, 将其以 96 孔圆底平板的 50 000 细胞/孔重悬浮并与 10 μg/ml 的抗人 BCMA 抗体 (Abcam, #ab54834, 小鼠 IgG1) 于 4 °C 下孵育 30 分钟 (以防止内化)。小鼠 IgG1 用作同种型对照 (BD Biosciences, #554121)。然后将细胞离心 (在 350 x g 下 5 分钟), 洗涤两次并与 FITC 缀合的抗小鼠二级抗体于 4 °C 下孵育 30 分钟。在孵育结束时, 将细胞离心 (在 350 x g 下 5 分钟), 利用 FACS 缓冲液洗涤两次, 重悬浮在 100 μl FACS 缓冲液中并在 CantoII 设备运行 FACS Diva 软件上进行分析。图 3 显示了渐增浓度的抗 BCMA 抗体结合 H929 细胞后中值荧光强度增加。通过 QFIKIT 分析 (Dako, #K0078, 遵循制造商的说明书) 评估 H929、RPMI-8226 和 U266B1 骨髓瘤细胞系的膜表面上的 BCMA 受体数量的定量。

[0242] 表 2: H929、RPMI-8226 和 U266B1 骨髓瘤细胞系的膜表面上的 BCMA 受体数量的定量

[0243]

骨髓瘤细胞系	BCMA 受体 n°
H929	6085
RPMI-8226	6253

U266 (B1)	2865
-----------	------

[0244] 实施例1D通过免疫获得抗BCMA抗体

[0245] 如Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18) 中所述通过BCMA ECD免疫大鼠产生抗BCMA抗体。简言之,利用缀合钥孔血蓝素的BCMA ECD (氨基酸5-54; NP_001183),使用TiterMax® 佐剂(Sigma)皮下免疫Sprague-Dawley大鼠。利用赖氨酸残基,使用Inject mcKLHV (Pierce) 进行钥孔血蓝素缀合。由于人和小鼠BCMA蛋白之间的高度序列同源性,优选大鼠用于抗体产生。从免疫的脾收集B细胞并使用标准的聚乙二醇融合方案将其融合到P3-X63.Ag8骨髓瘤细胞中 (Goding 1996; Monoclonal antibodies: principles and practice. 第3版 Academic Press)。在补充有10%胎克隆I、4 mmol/L L-谷氨酰胺、10%克隆因子,还包括青霉素、链霉素和1×次黄嘌呤钠、氨基喋呤和胸腺嘧啶核昔的80% Iscove's 改良Dulbecco's培养基中培养杂交瘤。进行ELISA测试以检测杂交瘤培养上清液与BCMA的结合。通过流式细胞术进一步筛选阳性BCMA结合杂交瘤其与BCMA转染子(HEK293-BCMA细胞)的基于细胞的结合。所选杂交瘤进行两轮有限稀释克隆并进一步扩大用于纯化。此外,通过标准方法将来自那些相同所选杂交瘤的抗体转化成具有人恒定区的嵌合抗体。简言之,从来自杂交瘤的mRNA中通过RT-PCR扩增编码重链和轻链可变区的cDNA,然后将其框内连接分别编码人IgG1的重链恒定区和人κ轻链恒定区的cDNA。将这些cDNA克隆至哺乳动物瞬时表达载体中并在大肠杆菌中产生质粒DNA并纯化用于转染。通过标准转染方法(基于磷酸钙的转染)转染HEK293细胞并在7天后,在蛋白A柱上通过亲和层析从培养物上清液中纯化IgG1抗体,随后经过大小排阻层析分离单体抗体部分。

[0246] 实施例1E在体外重组文库中获得抗BCMA抗体

[0247] 实施例1E1. 构建一般Fab文库

[0248] 使用以下V结构域配对在人种系基因基础上构建Fab形式的一般抗体文库:对于DP47-3文库为VH3-23重链和V κ 3-20 κ轻链和对于DP88-3文库为VH1-69重链和V κ 1-17 κ轻链。在轻链(L3)的CDR3和重链(H3)的CDR3中随机化两个文库并通过重叠延伸(SOE) PCR通过剪接从每个文库的3个片段进行装配。片段1包含抗体基因的5'末端(其包括随机化的L3),片段2是横跨L3到H3的中心恒定片段,而片段3包含随机化的H3和抗体基因的3'部分。以下引物组合用于为DP47-3文库产生文库片段:片段1 (LMB3-LibL1b_new)、片段2 (MS63-MS64)、片段3 (Lib2H-fdseqlong)。参见W02012020038的表1。以下引物组合用于为DP88-3文库产生文库片段:片段1 (LMB3-RJH_LIB3)、片段2 (RJH31-RJH32) 和片段3 (LIB88-2-fdseqlong)。参见W02012020038的表3和4。用于产生文库片段的PCR方案包括:在94°C下5分钟的初始变性;94°C下1分钟,58°C下1分钟,和72°C下1分钟,25个循环;和72°C下10分钟末端延伸。对于装配PCR,等摩尔比例的3个片段用作模板。装配PCR方案包括:94°C下3分钟的初始变性;和94°C下30秒钟,58°C下1分钟,和72°C下2分钟,5个循环。在该阶段,加入与片段1-3外侧的序列互补的引物并在72°C末端延伸10分钟之前进行额外的20个循环。装配足够量的全长随机化Fab构建体后,利用NcoI/NotI为DP47-3文库并利用NcoI/NheI为DP88-3文库消化Fab构建体,其与类似处理的受体噬菌粒载体一起。对于DP47-3文库,22.8 μg的Fab文库与16.2 μg噬菌粒载体连接。对于DP88-3文库,30.6 μg的Fab文库与30.6 μg噬菌粒载体连接。分别地,为DP47-3文库使用纯化的连接物用于68个转化,并且为DP88-3文库用于64个转化,以获得最终的DP47-3 和DP88-3文库。通过PEG/NaCl纯化拯救和纯化展示Fab文库

的噬菌粒颗粒以用于选择抗BCMA Fab克隆。

[0249] 实施例1E2.选择抗BCMA Fab克隆

[0250] a) 针对BCMA-ECD-biot进行选择。表达后在体内生物素化抗原。根据以下方案在溶液中进行选择：(i) 文库DP88-3的 $\sim 10^{12}$ 噬菌粒颗粒与100 nM BCMA-ECD-biot在1 ml总体积中结合0.5小时；(ii) 通过添加 5.4×10^7 链霉抗生物素包被的磁珠捕获BCMA-ECD-biot和附着的噬菌体10分钟；(iii) 使用 5×1 ml PBS/Tween[®] 20和 5×1 ml PBS洗涤珠；(iv) 通过添加1 mL 100 mM TEA (三乙胺) 洗脱噬菌体颗粒10分钟并通过加入500 μ L 1M Tris/HCl pH 7.4进行中和；和(v) 重新感染对数期大肠杆菌TG1细胞 (Zymo Research)，利用辅助噬菌体VCSM13 (Stratagene) 进行感染并随后PEG/NaCl沉淀噬菌粒颗粒以用于后续的选择轮次。使用100 nM的恒定BCMA-ECD-biot浓度在3轮内进行选择。在第2轮，在neutravidin平板而非链霉抗生物素珠上进行抗原：噬菌体复合体的捕获。使用以下通过如下ELISA鉴定特定的结合物：在neutravidin平板的每个孔中包被100 μ l的100 nM BCMA-ECD-biot。加入含有Fab的细菌上清液并通过使用抗Flag/HRP二级抗体经其Flag标签检测结合fabs。一旦得到了鉴定，在0.5升培养体积中细菌表达抗BCMA ECD克隆，将其亲和纯化并使用BIACORE[®] 仪器通过SPR分析进一步进行表征。

[0251] b) 通过从合成的Fab文库的噬菌体展示建立抗BCMA Fabs，所述Fab文库由来自不同的V结构域家族的VL和VH配对组成。分别从V_k3_20 / V_H3_23子文库产生克隆13C2、17A5、83A10、13D2、14B11、14E1、29B11和29F3，从V_k2D_28 / V_H5_1子文库产生克隆13A4，和从V_k2D_28 / V_H3_23子文库产生克隆13A7(表3)。这些文库基于在VL(3种不同长度)和VH结构域(6种不同长度)的CDR3中具有序列多样性的完整人构架。

[0252] 表3:抗BCMA克隆和各VL/VH配对

Fab克隆	VL结构域	VH结构域
13C2	V _k 3_20	V _H 3_23
17A5	V _k 3_20	V _H 3_23
83A10	V _k 3_20	V _H 3_23
13A4	V _k 2D_28	V _H 5_1
13D2	V _k 3_20	V _H 3_23
14B11	V _k 3_20	V _H 3_23
14E1	V _k 3_20	V _H 3_23
29B11	V _k 3_20	V _H 3_23
29F3	V _k 3_20	V _H 3_23
13A7	V _k 2D_28	V _H 3_23

[0253] [0254] 根据以下方式在溶液中进行选择轮次(生物淘选)：1. 在10 μ g/ml不相关人IgG包被的免疫管中预清除每个文库集合 $\sim 10^{12}$ 噬菌粒颗粒，以排除识别抗原的Fc部分的抗体文库，2. 将非Fc结合噬菌粒颗粒与100nM生物素化的BCMA在存在100nM不相关非生物素化的Fc突起进入孔构建体的情况下孵育0.5小时，用于在2ml的总体积中进一步排除Fc结合物，3.

通过将淘选反应物分开并转移到neutravidin或链霉抗生物素预先包被的微量滴定板上的16个孔中于振荡器上20分钟来捕获生物素化的BCMA和特异性结合噬菌体,4. 使用平板洗涤器利用PBS/Tween20洗涤各孔10-30次,并利用PBS洗涤10-30次,5. 通过加入230nM鼠类APRIL的任选竞争洗涤步骤,以替换识别天然配体的结合位点的Fab克隆,因此选择APRIL非竞争性噬菌体抗体,6. 通过每孔加入125ul 100mM TEA (三乙胺) 洗脱噬菌体颗粒5-10分钟并通过加入等体积的1M Tris/HCl pH 7.4进行中和,7. 利用洗脱的噬菌体颗粒重新感染对数期大肠杆菌TG1细胞,利用辅助噬菌体VCSM13感染,在振荡器上于30℃下孵育过夜,随后PEG/NaCl沉淀噬菌粒颗粒以用于下一个选择轮次。

[0255] 使用100nM的恒定抗原浓度在3-5轮内进行选择。除了仅人BCMA用作抗原的选择活动外,进行额外的选择活动,其中食蟹猴或鼠类BCMA也与人BCMA以交替方式使用,以选择交叉反应性抗体。此外,作为基于链霉抗生物素平板的捕获的备选,通过向淘选反应中加入 5.4×10^7 链霉抗生物素包被的磁珠进行抗原:噬菌体复合体的捕获,随后使用各磁铁在上述条件下进行洗涤步骤。

[0256] 通过表面等离子共振筛选含有Fab的细胞培养物上清液,使用BioRad's ProteOn XPR36生物传感器鉴定特定的结合物。简言之,利用洗脱的噬菌体颗粒感染对数期的大肠杆菌TG1细胞后,平板培养单菌落形成单位 (cfu) 并挑取用于在96深孔平板中接种1ml表达培养物。在利用8.000 - 10.000 RU山羊抗人IgG, F(ab')2 片段特异性多克隆抗体 (Jackson ImmunoResearch, # 109-005-006) 衍生化的ProteOn GLM芯片上以垂直方向从上清液中捕获fabs。随后,将人、食蟹猴和鼠类BCMA以及不相关的Fc突起进入孔构建体在水平方向上注射为分析物。在0.5升培养体积中细菌表达对BCMA展示显著的结合应答并且不结合抗原的Fc部分的克隆,对其进行亲和纯化并通过SPR分析使用一次注射动力学方案在BioRad's ProteOn XPR36生物传感器上对其进行动力学表征。

[0257] 实施例1F. BCMA结合测定:表面等离子共振

[0258] a) 为了测量BCMA抗体与固定的BCMA的结合亲和力,在Biacore® 3000 仪器 (Pharmacia Biosensor) 上进行表面等离子共振测量。使用制造商提供的胺偶联方案将受体BCMA (BCMA-ECD) 以400共振单位偶联传感器芯片。使用制造商提供的方案将备选的BCMA-ECD-biot也以400共振单位偶联链霉抗生物素-传感器芯片。在所有实验中,流动室1用作参考室。为浓度在0.1 pM-200 nM范围内的Fab溶液记录传感图 (Sensorgrams)。使用非线性回归分析,同时使用制造商的软件计算动力学常数和结合常数。通过标准方法将对BCMA-ECD具有 ≤ 100 nM的单价结合亲和力的Fab克隆转化成IgGs。简言之,编码重链和轻链可变区的cDNA框内连接分别编码人IgG1的重链恒定区和人κ轻链恒定区的cDNA。将这些cDNA克隆至哺乳动物瞬时表达载体中并在大肠杆菌中产生质粒DNA并纯化用于转染。通过标准转染方法(基于磷酸钙的转染)转染HEK293细胞并在7天后,在蛋白A柱上通过亲和层析从培养物上清液中纯化IgG1抗体,随后经过大小排阻层析分离单体抗体部分。

[0259] b) 通过表面等离子共振,使用ProteOn XPR36仪器 (Biorad) 于25℃下用通过neutravidin捕获固定在NLC芯片上的生物素化的人、食蟹猴和鼠类BCMA测量抗BCMA Fab克隆的亲和力 (KD) (表4)。以相似的方式固定不相关的生物素化的Fc突起进入孔构建体作为阴性对照。抗原(配体)的固定:利用PBST (10 mM磷酸盐, 150 mM 氯化钠pH 7.4, 0.005% Tween 20) 将重组抗原稀释至10 ug/ml,然后以垂直方向以40 uL/分钟注射300秒。注射分

析物:对于一次注射动力学测量,将注射方向更换为水平方向,同时沿通道1-5以40u1/分钟注射两倍稀释系列的纯化的Fab(多个浓度范围),其结合时间为200或300秒,解离时间为300秒。沿第六通道注射缓冲液(PBST)以提供“线内”空白用于参考。在 ProteOn Manager v3.1软件中使用简单的一对一 Langmuir结合模型,同时通过拟合结合和解离传感图来计算结合速率常数(kon)和解离速率常数(koff)。平衡解离常数(KD)计算为比值koff/kon。使用10mM甘氨酸-HCl pH 1.5,以100 u1/分钟的流速以水平方向进行再生18秒接触时间。

[0260] 表4:抗BCMA Fab克隆的单价亲和力

Fab克隆	K _D 人 BCMA [nM]	K _D 食蟹猴 BCMA [nM]	K _D 鼠类 BCMA [nM]
13C2	196	-	144
17A5	45	-	74
83A10	76	1510	1130
13A4	1.8	-	-
13D2	86	弱	弱
14B11	383	-	-
14E1	91	弱	弱
29B11	224	-	弱
29F3	87	-	弱
13A7	235	-	-

[0261]

。

[0262] c) 如下通过表面等离子共振(SPR)评估抗BCMA抗体与重组BCMA的结合。在Biacore T200上于25 °C下利用HBS-EP作为运行缓冲液(0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005%表面活性剂P20, Biacore, Freiburg/Germany)进行所有的SPR实验。测定抗BCMA抗体与重组BCMAFc(kih) (人、食蟹猴和鼠类)之间相互作用的亲和力。根据说明书(Biacore, Freiburg/Germany)将生物素化的重组人、食蟹猴和鼠类BCMA Fc(kih)直接偶联到SA芯片上。固定化水平范围在200-700 RU之间。以2倍浓度范围(1.95-500 nM)的抗BCMA抗体以 30 μL/分钟的流速在120秒内通过流动室。监测解离180秒。通过减去在参考流动室上获得的应答校正批量折射指数差异。在本文中,抗BCMA抗体流过之前如标准胺偶联试剂盒中所述活化和失活的空表面。使用 Biacore T200 Evaluation 软件(vAA, Biacore AB, Uppsala/Sweden)衍生表观动力学常数,以通过数字整合为1:1 Langmuir结合拟合速率方程,而不管用于比较目的的相互作用的二价。

[0263] 还测定抗BCMA抗体与重组人BCMA Fc(kih)之间相互作用的亲和力。使用标准的胺偶联试剂盒(Biacore, Freiburg/Germany)将抗人Fab 抗体(GE Healthcare)在pH 5.0下直接偶联在CM5芯片上。固定化水平是约6500 RU。在25 nM捕获抗BCMA抗体90秒。4倍浓度范围(1.95-500 nM)的重组人BCMA Fc(kih)以 30 μL/分钟的流速在120秒内通过流动室。监测解离120秒。通过减去在参考流动室上获得的应答校正批量折射指数差异。在本文中,重组BCMA流过表面,其具有固定化的抗人Fab抗体,但是在其上已经注射了HBS-EP,而非抗BCMA抗体。使用Biacore T100 Evaluation 软件(vAA, Biacore AB, Uppsala/Sweden)衍生动力学常数,以通过数字整合为1:1 Langmuir结合拟合速率方程。还测量83A10抗-BCMA

抗体与重组食蟹猴BCMA Fc (kih) 和鼠类BCMA Fc (kih) 的结合(表6)。

[0264] 表5:通过为1:1 Langmuir结合拟合速率方程来测定亲和力常数

配体	分析物	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)	
13C2 抗-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	2.4E+05	1.1E-02	4.7E-08	
17A5 抗-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	2.2E+05	1.9E-03	8.7E-09	
83A10 抗-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	6.2E+05	2.5E-03	4.1E-09	
29F3 抗-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	3.2E+05	6.8E-03	2.1E-08	
[0265]	13A7 抗-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	8.0E+04	7.9E-03	1.0E-07
	13A4 抗-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	7.2E+04	3.6E-04	5.1E-09
	13D2 抗-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	3.6E+05	9.3E-03	2.6E-08
	14B11 抗-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	1.5E+05	1.6E-02	1.1E-07
	14E1 抗-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	4.0E+05	8.1E-03	2.0E-08
	29B11 抗-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	1.7E+05	6.6E-03	4.0E-08

[0266] 表6:重组BCMA Fc (kih) 与83A10抗-BCMA抗体的结合。a) 食蟹猴BCMA Fc (kih)。b) 鼠类BCMA Fc (kih)

配体	分析物	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)	
[0267]	83A10 抗-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	6.2E+05	2.5E-03	4.1E-09
	83A10 抗-BCMA IgG	cyBCMA Fc(kih)	2.8E+05	2.0E-02	7.2E-08
	83A10 抗-BCMA IgG	muBCMA Fc(kih)	2.0E+05	4.0E-02	2.0E-07

[0268] 实施例1G. BCMA-信号传递测定:NF- κ B激活

[0269] a)如Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18) 中所述, 洗涤NCI-H929细胞并在处理前, 在补充有0.25%胎牛血清的RPMI中孵育24小时。然后不处理或利用0.1 μ g/mL TNF- α , 100 ng/mL, 优选1000 ng/mL 热处理的HT-截短的-APRIL, 100 ng/mL, 优选1000 ng/mL截短的-APRIL, 0.1 pM-200 nM同位素对照, 或0.1 pM -200 nM抗-BCMA抗体处理细胞20分钟。为了评估配体阻断, 利用1000 ng/mL截短的-APRIL处理利用0.1 pM-200 nM抗-BCMA抗体或同种型对照抗体预处理20分钟的细胞。然后收集细胞、洗涤并利用补充有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 1% NP40, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA进行裂解。然后使用TransAM[®] 化学发光测定试剂盒

(Active Motif) 分析蛋白提取物的NF- κ B活性并利用Fusion HT 平板读出器 (Packard Instruments) 进行发光信号读取。

[0270] b) 简言之,使H929细胞在具有0.25 % FCS的RPMI1640中于37℃下,在细胞孵育箱中饥饿24小时。饥饿时间结束时,收集细胞、计数并使用ViCell评估细胞活力。将活细胞在含有BSA的FACS染色缓冲液 (BD Biosciences) 中调整至4 x 10⁶细胞/ml。将30 μ l的该细胞悬浮液进一步每孔等分至圆底96孔板中并与抗BCMA 抗体 (15或50 μ g/ml) 或同种型对照抗体 (10、20和40 μ g/ml) 在细胞孵育箱中预先孵育20分钟。然后利用标签化有血凝素 (HA) (R&D Systems Europe, #7907-AP-010) 的1 μ g/ml重组小鼠 Δ -APRIL于37℃下补充细胞40分钟。在测定中使用热失活的 Δ -APRIL (HI APRIL) 以验证 Δ -APRIL-诱导的NFkB信号的特异性 (通过 Δ -APRIL的处理于60℃下进行热失活1小时)。在孵育结束时,根据Nuclear Extract Kit (Active Motif, # 40410) 的制造商的方案收集、洗涤、裂解和加工细胞。使用TransAm[®] NFkB p65 Chemi 测定试剂盒 (Active Motif, #40097) ,根据制造商的说明书分析蛋白提取物的NF- κ B活性。使用Spectra Max M5发光计 (Molecular Devices) 读取发光信号。

[0271] 实施例1H 筛选抗BCMA抗体以选择其与BCMA的结合不受100 ng/mL,优选1000 ng/mL的APRIL或BAFF影响并且不通过BCMA胞内结构域促进或阻断信号传递的抗体

[0272] 本发明涉及产生抗人BCMA抗体,其1)结合人BCMA,2)与BCMA的结合不受100 ng/mL,优选1000 ng/mL的APRIL和BAFF的影响,3)不阻断或减少>20%,优选>15%或增加>20%,优选>15% APRIL-依赖性NF- κ B激活,4)不阻断或减少>20%,优选>15%或增加>20%,优选>15% BAFF-依赖性NF- κ B激活,5)在没有APRIL或BAFF的情况下,本身不诱导NF- κ B激活。表10显示了用于选择具有想要的新性质的BCMA抗体的筛选范例:非配体结合/阻断,非配体竞争。重要的是,选择其与BCMA的结合不被APRIL或BAFF阻断的抗体。

[0273] 实施例1H1. 在HEK293-BCMA细胞上平板结合的BCMA或BCMA-阳性多发性骨髓瘤细胞系与BCMA的结合 (流式细胞术和ELISA)

[0274] a) 通过流式细胞术分析来自免疫方法和/或来自筛选上述重组体外文库的抗BCMA 抗体在HEK293-BCMA细胞上与人BCMA的结合。简言之,收集培养的细胞、计数并使用锥虫蓝排除方法评估细胞活力。然后将活细胞在含有BSA的FACS染色缓冲液 (BD Biosciences) 中调整至2 x 10⁶细胞/ml。将90 μ l的该细胞悬浮液进一步每孔等分到圆底96孔板中。向含细胞的孔中加入10 μ l抗BCMA抗体或相应的IgG对照以获得0.1 pM-200 nM的终浓度。所有构建体和对照IgG以相同的体积摩尔浓度使用。于4℃下孵育30分钟后,将细胞离心 (5分钟, 350 x g),利用150 μ l/孔FACS染色缓冲液 (BD Biosciences) 洗涤,重悬浮并与 12 μ l/孔荧光染料缀合的AffiniPure F(ab')2片段山羊抗人IgG Fc γ 片段特异的 (Jackson Immuno Research Lab; 工作溶液: 1:20) 于4℃下孵育额外的30分钟。然后利用染色缓冲液 (BD Biosciences) 120 μ l/孔洗涤细胞并通过在350 x g下离心5分钟沉淀下来。使用FACS染色缓冲液150 μ l/孔进行第二个洗涤步骤。将样品重悬浮在200 μ l/孔FACS 染色缓冲液中并使用具有FACSDiva[®] 软件的LSR II 流式细胞仪 (BD Biosciences) 获得并分析所述样品。将平均荧光强度绘制为抗BCMA抗体浓度的函数以获得结合曲线并计算有效的抗体浓度以达到50%的最大结合 (EC₅₀)。选择从该测定中判断为在细胞上结合BCMA的抗BCMA抗体用于下一个筛选步骤,即针对APRIL和BAFF的竞争性BCMA结合测定 (下文的步骤(实施例1H2))。

[0275] 使用Ryan等 (2007) 描述的ELISA方法验证在HEK293-BCMA细胞上显示结合人BCMA的抗体的性质。简言之,利用1.5 μ g/mL的GST-BCMA-ECD包被免疫吸附96孔板,利用PBS + 1% Tween[®] (PBS-T) 进行洗涤,并利用PBS-T 加1%血清白蛋白进行封闭。BCMA包被的平板与杂交瘤培养物上清液于室温下孵育2小时,利用PBS-T洗涤5次,并与过氧化物酶缀合的山羊抗大鼠 IgG孵育。与二级抗体孵育后,洗涤平板,并与3,3,5,5-四甲基联苯胺底物孵育,并利用等体积的1 mol/L H₂SO₄终止。

[0276] b) 通过流式细胞术分析抗-BCMA IgG 抗体(克隆13C2、17A5、83A10、13A4、13D2、14E1、13A7、14B11) 在表达BCMA的H929细胞上与人BCMA的结合。MKN45 (不表达BCMA的人胃腺癌细胞系) 用作阴性对照。简言之,收集培养的细胞、计数并使用ViCell评估细胞活力。然后将活细胞在含有BSA的FACS染色缓冲液(BD Biosciences) 中调整至2 \times 10⁶细胞/ml。将100 μ l该细胞悬浮液进一步每孔等分到圆底96孔板中并与30 μ l抗BCMA抗体或相应的IgG 对照于4°C下孵育30分钟。以终浓度范围0.1 - 40 μ g/ml滴定并分析所有的抗BCMA抗体(和同种型对照)。然后将细胞离心(5分钟, 350 \times g),利用120 μ l/孔FACS染色缓冲液(BD Biosciences) 洗涤,重悬浮并与荧光染料缀合的PE缀合的AffiniPure F(ab')2片段山羊抗人IgG Fc片段特异的(Jackson Immuno Research Lab; 109-116-170) 于4°C下孵育额外的30分钟。然后利用染色缓冲液(BD Biosciences) 将细胞洗涤两次,使用100 μ l BD固定缓冲液/孔 (#BD Biosciences, 554655) 于4°C下固定20分钟,重悬浮于120 μ l FACS缓冲液中并使用BD FACS CantoII进行分析。图4显示了以抗BCMA抗体浓度为函数绘制的抗BCMA IgG 克隆的平均荧光强度; (A) H929细胞上的克隆13C2、17A5、83A10, (B) MKN45细胞上的克隆13C2、17A5、83A10, (C) H929细胞上的克隆13A4、13D2、14E1、13A7、14B11, (D) MKN45细胞上的克隆13A4、13D2、14E1、13A7、14B11。在表7中概述了克隆13C2、17A5、83A10与H929细胞的结合的EC50值(表示达到50%最大结合所需的抗体浓度)。

[0277] 表7:抗BCMA抗体与H929多发性骨髓瘤细胞的结合的EC50值

[0278]

	抗BCMA抗体克隆13C2	抗BCMA抗体克隆83A10	抗BCMA抗体克隆17A5
EC50 (nM)	13.9	12.5	9.0
EC50 (ug/ml)	2.0	1.8	1.3

[0279] 实施例1H2. 100 ng/mL, 优选1000 ng/mL的APRIL或BAFF不改变BCMA抗体结合人BCMA(流式细胞术和ELISA)

[0280] a) 然后通过流式细胞术分析从上述步骤(实施例1H1)选择的抗BCMA抗体在HEK293-BCMA细胞上,在存在或不存在100 ng/mL, 优选1000 ng/mL APRIL或BAFF的情况下与人BCMA的结合。将活的293-BCMA细胞在含有BSA的FACS染色缓冲液(BD Biosciences) 中调整至2 \times 10⁶细胞/ml。将90 μ l的该细胞悬浮液进一步每孔等分到圆底96孔板中。向含细胞的孔中加入10 μ l抗BCMA抗体或相应的IgG对照以获得0.1 pM-200 nM的终浓度。所有构建体和对照IgG以相同的体积摩尔浓度使用。于37°C下孵育30分钟后,在分别存在和不存在100 ng/mL, 优选1000 ng/mL的APRIL和BAFF的情况下,将细胞离心(5分钟, 350 \times g),利用150 μ l/孔FACS染色缓冲液(BD Biosciences) 洗涤,重悬浮并与 12 μ l/孔荧光染料缀合的AffiniPure F(ab')2片段山羊抗人IgG Fc γ 片段特异的(Jackson Immuno Research Lab; 工作溶液: 1:20) 于4°C下孵育额外的30分钟。然后利用染色缓冲液(BD Biosciences) 120 μ l/孔洗涤细胞并通过在350 \times g下离心5分钟沉淀下来。使用FACS染色缓冲液150 μ l/孔进

行第二个洗涤步骤。将样品重悬浮在200 μ l/孔FACS 染色缓冲液中并使用具有FACSDiva[®] 软件的LSR II 流式细胞仪(BD Biosciences)获得并分析所述样品。将平均荧光强度绘制为抗BCMA抗体浓度的函数以获得结合曲线并计算达到50%的最大结合(EC₅₀)的有效抗体浓度。在存在APRIL的情况下完成一个结合曲线,另一个在不存在APRIL的情况下完成,并且对于存在和不存在BAFF完成相同的结合曲线。选择其与BCMA的结合不受100 ng/ml,优选1000 ng/ml的APRIL影响,且也不受100 ng/ml,优选1000 ng/ml的BAFF影响的那些抗体用于下文的下一步。在图1中显示了与配体APRIL和BAFF不竞争结合BCMA的抗体和与这些配体竞争结合BCMA的抗体的代表性结合曲线。

[0281] 使用Ryan等 (2007) 描述的ELISA方法验证在HEK293-BCMA细胞上,在存在100 ng/ml APRIL或BAFF的情况下显示结合人BCMA的抗体的性质。简言之,利用1.5 μ g/ml的GST-BCMA-ECD包被免疫吸附96孔板,利用PBS + 1% Tween[®] (PBS-T) 进行洗涤,并利用PBS-T 加1%血清白蛋白进行封闭。BCMA包被的平板与杂交瘤培养物上清液于室温下孵育2小时,利用PBS-T洗涤5次,并与过氧化物酶缀合的山羊抗大鼠IgG孵育。与二级抗体孵育后,洗涤平板,并与3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物孵育,并利用等体积的1 mol/L H₂SO₄终止。对于基于平板的配体阻断,如上所述利用 1 μ g/ml的GST-BCMA-ECD包被平板。包被的平板与特定浓度的纯化抗体预先孵育,利用PBS-T进行洗涤,然后与3 μ g/ml重组人MegaAPRIL (Alexis Biochemicals)或重组人BAFF (R&D Systems)孵育。使用过氧化物酶缀合的抗FLAG,随后利用如上所述的3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色来检测APRIL或BAFF结合。

[0282] b) 通过ELISA鉴定非APRIL竞争性抗BCMA Fabs或抗体。在存在增加浓度的鼠类APRIL的情况下评估Fabs与固定化的人BCMA的结合。在neutravidin平板上包被25nM生物素化的人BCMA (100ul/well) 并在振荡器上于室温下孵育1小时。加入500nM或1000nM纯化的Fabs以在室温下将包被的人BCMA饱和1小时。利用PBS洗涤平板3次并在PBS缓冲液中使用两倍稀释系列加入8种不同浓度(范围从0-100nM)的鼠类APRIL,并在振荡器上孵育30分钟。利用PBS洗涤平板3次并加入抗FLAG-HRP二级抗体(1:4000),1小时。再次,利用PBS洗涤平板3次并通过加入 100ul/孔BM Blue POD (Roche) 进行显色。通过加入50ul/孔1M H₂S₄终止反应并在450nm (参考于650nm) 处读取OD用于OD450-650的最终读出。在图5中显示了所选Fabs的结果。在表8中概述了在不存在相对于存在50 nM (1000 ng/ml) 或6.25 nM (140 ng/ml) muAPRIL的情况下利用抗BCMA克隆测量的OD值的降低(%)。

[0283] 表8:在不存在相对于存在muAPRIL的情况下测量(450 nm)的OD值的降低

[0284]	muAPRIL (nM 和 ng/mL)	在存在muAPRIL的情况下OD值的降低(↓)						
		抗BCMA抗体克隆						
		13C2	17A5	83A10	13A4	13D2	29B11	13A7
	50 nM / 1000 ng/ml	18.9%	34.5%	6.3%	13.1%	7.3%	67.3%	93.2%
	6.25 nM / 140 ng/ml	没有↓	5.6%	没有↓	7.7%	6.4%	12.1%	31.3%

。

[0285] c) 通过流式细胞术检测的 Δ -APRIL与抗BCMA抗体的竞争。通过在存在渐增浓度的抗BCMA抗体(克隆13C2、17A5、83A10、13A4、13D2、14E1、13A7、14B11)的情况下定量 Δ -APRIL的结合在H929细胞上进行 Δ -APRIL与抗BCMA抗体之间最终竞争的评估。简言之,收集培养

的细胞、计数并使用ViCell评估细胞活力。将活细胞在含有BSA的FACS染色缓冲液(BD Biosciences)中调整至 1×10^6 细胞/ml。将100 μ l该细胞悬浮液进一步每孔等分到圆底96孔板中并与30 μ l抗BCMA抗体或相应的IgG对照于4°C下孵育30分钟。以1、16和40 μ g/ml的终浓度滴定并分析所有的抗BCMA抗体(和同种型对照)。然后将细胞离心(5分钟,350 \times g),利用120 μ l/孔FACS染色缓冲液(BD Biosciences)进行洗涤,重悬浮并与标记有血凝素(HA)(R&D Systems Europe, #7907-AP-010)的1 μ g/ml重组小鼠 Δ -APRIL于4°C下孵育额外的30分钟。然后利用120 μ l/孔FACS缓冲液洗涤细胞一次并与FITC缀合的抗HA抗体(Sigma Aldrich, #H7411)于4°C下孵育30分钟。孵育结束时,利用120 μ l/孔FACS缓冲液洗涤细胞,使用100 μ l BD固定缓冲液/孔(#BD Biosciences, 554655)于4°C下固定20分钟,重悬浮于80 μ l FACS缓冲液中并使用BD FACS Fortessa进行分析。图6显示了在H929细胞上以渐增浓度的抗BCMA抗体克隆13A4、13D2、14E1、13A7、14B11为函数检测的 Δ -APRIL(FITC信号)的相对中值荧光强度。将 Δ -APRIL在存在同种型对照的情况下结合后的中值荧光强度设置为1;将其他信号针对它进行归一化。

[0286] d) 通过流式细胞术检测的抗BCMA抗体与 Δ -APRIL的竞争。通过在存在或不存在 Δ -APRIL的情况下定量抗BCMA抗体(克隆13A4、13C2、13D2、14B11、17A5、83A10)的结合在RPMI细胞上进行 Δ -APRIL与抗BCMA抗体之间最终竞争的评估。简言之,收集培养的细胞、计数并使用ViCell评估细胞活力。将活细胞在含有BSA的FACS染色缓冲液(BD Biosciences)中调整至 1×10^6 细胞/ml。将100 μ l该细胞悬浮液进一步每孔等分到圆底96孔板中并与30 μ l抗BCMA抗体或相应的IgG对照于4°C下孵育20分钟。以40 μ g/ml的终浓度分析所有的抗BCMA抗体和同种型对照。然后将细胞离心(5分钟,350 \times g),利用120 μ l/孔FACS染色缓冲液(BD Biosciences)进行洗涤,重悬浮并与标签化有血凝素(HA)(R&D Systems Europe, #7907-AP-010)的1 μ g/ml重组小鼠 Δ -APRIL于4°C下孵育额外的40分钟。然后利用120 μ l/孔FACS缓冲液洗涤细胞一次并与Alexa Fluor 647缀合的抗人Fc抗体(Jackson Immuno Research Lab, #109-606-008)于4°C下孵育30分钟。孵育结束时,利用120 μ l/孔FACS缓冲液洗涤细胞,使用100 μ l BD固定缓冲液/孔(#BD Biosciences, 554655)于4°C下固定20分钟,重悬浮于80 μ l FACS缓冲液中并使用BD FACS Fortessa进行分析。图7显示了在不存在或存在1000 ng/mL的 Δ -APRIL的情况下检测的RPMI细胞上抗BCMA抗体(Alexa Fluor 647信号)克隆13A4、13C7、13D2、14B11、17A5、83A10的相对均值荧光强度。将在不存在 Δ -APRIL的情况下抗BCMA抗体结合后的中值荧光强度设置为1;将在存在 Δ -APRIL的情况下抗BCMA抗体各自的其他信号针对它进行归一化。

[0287] e) 通过流式细胞术检测的同时孵育后抗BCMA抗体与 Δ -APRIL的竞争。通过在存在或不存在 Δ -APRIL的情况下定量抗BCMA抗体(克隆14B11、13D2、13A4、17A5、83A10)的结合在H929细胞上进行 Δ -APRIL与抗BCMA抗体之间最终竞争的评估。简言之,收集培养的细胞、计数并使用ViCell评估细胞活力。将活细胞在含有BSA的FACS染色缓冲液(BD Biosciences)中调整至 1×10^6 细胞/ml。将100 μ l该细胞悬浮液进一步每孔等分到圆底96孔板中并与30 μ l抗BCMA抗体或相应的IgG对照和30 μ l标记有血凝素(HA)(R&D Systems Europe, #7907-AP-010)的 Δ -APRIL于4°C下孵育40分钟。以终浓度20 μ g/ml分析所有的抗BCMA抗体和同种型对照;以终浓度2.5 μ g/ml分析 Δ -APRIL。然后将细胞离心(5分钟,350 \times g)并利用120 μ l/孔FACS染色缓冲液(BD Biosciences)进行洗涤。然后,细胞与

Alexa.Fluor 647缀合的抗人Fc抗体(Jackson Immuno Research Lab, #109-606-008)和 FITC-缀合的抗-HA抗体 (Sigma Aldrich, #H7411)于4℃下孵育30分钟。孵育结束时,利用120 μ l/孔FACS缓冲液洗涤细胞,使用100 μ l BD固定缓冲液/孔 (#BD Biosciences, 554655)于4℃下固定20分钟,重悬浮于80 μ l FACS缓冲液中并使用BD FACS CantoII进行分析。图8A显示了抗BCMA抗体克隆(Alexa.Fluor 647信号)的平均荧光强度和相对荧光信号并且图8B显示了 Δ -APRIL (FITC信号)和抗抗-BCMA抗体克隆(Alexa.Fluor 647 信号)的平均荧光强度和相对荧光信号。将利用FITC缀合的抗人Fc抗体在存在 Δ -APRIL的情况下对抗BCMA抗体的检测针对在不存在 Δ -APRIL的情况下的抗BCMA抗体克隆的信号进行归一化。利用Alexa.Fluor 647-缀合的抗-HA抗体在存在抗BCMA抗体克隆的情况下对 Δ -APRIL的检测针对在存在同种型对照的情况下 Δ -APRIL信号进行归一化。在表9中概述了如利用荧光染料缀合的抗人Fc抗体检测的在存在 Δ -APRIL (2.5 μ g/mL)的情况下抗BCMA 抗体(20 μ g/mL) 克隆14B11、13D2、13A4、17A5和83A10的结合的降低。

[0288] 表9:在存在APRIL的情况下抗BCMA抗体与H929细胞的结合的降低

[0289]	抗BCMA抗体克隆	在存在APRIL的情况下抗BCMA抗体的结合的降低(↓)
14B11	50%	
13D2	25%	
13A4	25%	
17A5	20%	
83A10	10%	

[0290] 实施例1H3. BCMA抗体不阻断或增加APRIL-依赖性NF- κ B激活

[0291] a) 然后在步骤(实施例1H3)中测试上文步骤(实施例1H2)中选择为非竞争性的抗体(即它们的BCMA结合曲线不受100 ng/mL, 优选1000 ng/mL 的APRIL存在的影响,并且也不受100 ng/mL, 优选1000 ng/mL的BAFF存在的影响)对APRIL、BAFF和BCMA介导的NF- κ B激活的影响。因为APRIL是BCMA的高亲和力配体,首先检查抗BCMA抗体对APRIL信号传递的阻断或激动性质。如Ryan 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18) 中所述,为了验证抗BCMA抗体是否阻断或增加APRIL下游信号传递,洗涤NCI-H929人多发性骨髓瘤(MM) 细胞并在处理前在无血清的RPMI中孵育24小时。然后不处理或利用0.1 μ g/mL TNF- α (用作阳性对照), 100 ng/mL, 优选1000 ng/mL热处理的HT-截短的-APRIL, 100 ng/mL, 优选1000 ng/mL截短的-APRIL, 0.1 pM-200 nM同种型对照,或0.1 pM -200 nM抗-BCMA抗体处理细胞20分钟。为了评估APRIL阻断,利用100 ng/mL, 优选1000 ng/mL截短的-APRIL处理利用0.1 pM-200 nM抗-BCMA抗体或各同种型对照抗体预处理20分钟的细胞。然后收集细胞、洗涤并利用补充有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 1% NP40, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA进行裂解。然后使用TransAM[®] 化学发光测定试剂盒(Active Motif)分析蛋白提取物的NF- κ B活性并利用Fusion HT 平板读出器(Packard Instruments)进行发光信号读取。

[0292] 使用功能性ELISA测定NF- κ B活性,所述功能性ELISA检测来自结合NF- κ B共有序列的p65的化学发光信号,选择这样的抗BCMA抗体,其不改变APRIL介导的下游信号传递和NF- κ B激活(即,在来自单独APRIL处理的NCI-H929 MM细胞的核提取物中通过ELISA检测的平均发光信号与来自利用APRIL和抗-BCMA抗体处理的NCI-H929 MM细胞的核提取物的平均发光

信号是类似的,没有显著降低或增加),用于下文的步骤。

[0293] b) 评估抗BCMA抗体(克隆13C2、17A5、83A10、13A4、13D2、14B11)的结合是否干扰APRIL-诱导的NF κ B激活,其为BCMA下游的已知信号传递途径。简言之,使H929细胞在具有0.25 % FCS的RPMI1640中于37℃下,在细胞孵育箱中饥饿24小时。饥饿时间结束时,收集细胞、计数并使用ViCell评估细胞活力。将活细胞在含有BSA的FACS染色缓冲液(BD Biosciences)中调整至 4×10^6 细胞/ml。将30 μ l的该细胞悬浮液进一步每孔等分至圆底96孔板中并与抗BCMA 抗体(15或50 μ g/ml)或同种型对照抗体(10、20和40 μ g/ml)在细胞孵育箱中预先孵育20分钟。然后利用标签化有血凝素(HA) (R&D Systems Europe, #7907-AP-010)的1 μ g/ml重组小鼠 Δ -APRIL于37℃下补充细胞40分钟。在测定中使用热失活的 Δ -APRIL (HI APRIL)以验证 Δ -APRIL-诱导的NF κ B信号的特异性(通过 Δ -APRIL的处理于60℃下进行热失活1小时)。在孵育结束时,根据Nuclear Extract Kit (Active Motif, #40410)的制造商的方案收集、洗涤、裂解和加工细胞。使用TransAm[®] NfkB p65 Chemi测定试剂盒(Active Motif, #40097),根据制造商的说明书分析蛋白提取物的NF- κ B活性。使用Spectra Max M5发光计(Molecular Devices)读取发光信号。测量使用如上述处理的H929细胞获得的相对发光信号强度。将 Δ -APRIL在存在同种型对照的情况下结合后获得的发光信号设置为1;将其他信号针对它进行归一化。

[0294] 实施例1H4. BCMA抗体不阻断或增加BAFF-依赖性NF- κ B激活

[0295] 然后在步骤(实施例1H3)中测试在上文步骤(实施例1H3)中选择为不阻断并且不增加APRIL-依赖性NF- κ B激活的抗体对BAFF介导的NF- κ B激活的影响。如Ryan 2007, (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18)中所述,为了验证BCMA抗体是否阻断或增加BAFF下游信号传递,导致NF- κ B激活,洗涤NCI-H929 MM细胞(CRL-9068[™])并在处理前在无血清的RPMI培养基中孵育24小时,如Ryan 2007, (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18)中所述,然后不处理或利用0.1 μ g/ml TNF- α , 100 ng/ml, 优选1000 ng/ml热处理的HT-截短的-BAFF, 100 ng/ml, 优选1000 ng/ml截短的-BAFF, 1-0.1 pM-200 nM同种型对照,或0.1 pM -200 nM抗-BCMA抗体处理细胞20分钟。为了评估BAFF阻断,利用1 μ g/ml截短的-BAFF处理利用0.1 pM-200 nM抗-BCMA抗体或各同种型对照抗体预处理20分钟的细胞。然后收集细胞、洗涤并利用补充有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 1% NP40, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA进行裂解。然后使用TransAM[®] 化学发光测定试剂盒(Active Motif)分析蛋白提取物的NF- κ B活性并利用Fusion HT 平板读出器(Packard Instruments)进行发光信号读取。选择不改变BAFF介导的下游信号传递和NF- κ B激活(即,在来自单独BAFF处理的NCI-H929 MM细胞的核提取物中通过ELISA检测的来自结合NF- κ B共有序列的p65的平均发光信号与来自利用BAFF和抗-BCMA抗体处理的NCI-H929 MM细胞的核提取物的平均发光信号是类似的,没有显著降低或增加)的抗BCMA抗体用于下文的步骤。

[0296] 实施例1H5. BCMA抗体自身不诱导NF- κ B激活

[0297] a) 然后在步骤(实施例1H5)中测试在上文步骤(实施例1H4)中选择为不阻断并且不增加BAFF-依赖性NF- κ B激活的抗体其对介导NF- κ B激活的内在激动影响。为了验证BCMA抗体是否是激动的并且本身是否诱导下游信号传递,洗涤NCI-H929细胞并在处理前在无血清的RPMI培养基中孵育24小时。然后不处理或利用0.1 μ g/ml TNF- α , 0.1 pM-200 nM同种

型对照或0.1 pM-200 nM抗BCMA抗体处理细胞20分钟。然后收集细胞,洗涤,并利用补充有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 1% NP40, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA进行裂解。然后使用TransAM® 化学发光测定试剂盒 (Active Motif) 分析蛋白提取物的NF-κB活性并利用Fusion HT 平板读出器 (Packard Instruments) 进行发光信号读取。最后选择不诱导下游信号传递和NF-κB激活(即,在来自单独抗BCMA抗体处理的NCI-H929 MM细胞的核提取物中通过ELISA检测的来自结合NF-κB共有序列的p65的平均发光信号与来自利用同种型对照抗体处理的NCI-H929 MM细胞的核提取物的平均发光信号是类似的,没有显著增加)的抗BCMA抗体用于进一步的生产和体外以及体内表征。它们代表抗BCMA抗体,其是非配体阻断的、非竞争性的和非信号传递的(参见表10)。

[0298] b) 评估抗BCMA抗体(克隆13C2、17A5、83A10、13A4、13D2、14B11)与表达BCMA的H929细胞的结合是否诱导NFκB激活,其为BCMA下游的已知信号传递途径。简言之,使H929细胞在具有0.25 % FCS的RPMI1640中于37°C下,在细胞孵育箱中饥饿24小时。饥饿时间结束时,收集细胞、计数并使用ViCell评估细胞活力。将活细胞在含有BSA的FACS染色缓冲液(BD Biosciences)中调整至 4×10^6 细胞/ml。将30 μl的该细胞悬浮液进一步每孔等分至圆底96孔板中并与30 μl的100 或350 nM (14或50 ug/ml)的抗BCMA 抗体于37°C下孵育20分钟。作为阴性对照,细胞保持不被处理或与相应的IgG同种型对照抗体100 nM (14 ug/ml)于37°C下孵育20分钟。作为阳性对照,细胞与标签化有血凝素(HA) (R&D Systems Europe, #7907-AP-010)的1 ug/ml重组小鼠Δ-APRIL于37°C下孵育20分钟。在孵育结束时,根据Nuclear Extract Kit (Active Motif, # 40410)的制造商的方案收集细胞、洗涤、裂解并加工。使用TransAm® NfkB p65 Chemi测定试剂盒 (Active Motif, #40097),根据制造商的说明书分析蛋白提取物的NF-κB活性。使用Spectra Max M5发光计 (Molecular Devices) 读取发光信号。测量从如上处理的H929细胞获得的相对发光信号强度。将Δ-APRIL在存在同种型对照的情况下结合后获得的发光信号设置为1;将其他信号针对它进行归一化。

[0299] 表10:BCMA抗体选择的筛选范例

[0300]

评估步骤(按年代顺序)	选择标准	技术描述
1) 与BCMA的结合	结合	与平板结合的BCMA细胞的结合 (ELISA)
2) 不被100 ng/mL, 优选1000 ng/mL APRIL或BAFF减少的与BCMA的结合	未减少	不受100 ng/mL, 优选1000 ng/mL APRIL或BAFF影响的与平板结合的BCMA的结合 (ELISA)
3) 不激活 NF-κB 下游信号传递 3.1) 抗 BCMA 抗体阻断或增加 APRIL-依赖性 NF-κB 激活吗? 3.2) 抗 BCMA 抗体阻断或增加 BAFF-依赖性 NF-κB 激活吗? 3.3) 抗 BCMA 抗体自身诱导 NF-κB 激活吗?	所有三种情况下均没有变化	MM细胞系NCI-H929中的APRIL/BAFF依赖性的激活(化学发光ELISA)

[0301] 实施例1H6. BCMA抗体是与食蟹猴交叉反应的

[0302] 还测试了在实施例1中产生的人BCMA抗体其与食蟹猴的交叉反应性和结合食蟹猴浆细胞的能力。简言之,从食蟹猴中收集PBMC和/或骨髓抽吸物并培养细胞、计数并使用锥虫蓝排除方法评估细胞活力。然后将活细胞在含有0.1% BSA的PBS中调整至 2×10^6 细胞/

ml。将90 μ l的该细胞悬浮液进一步每孔等分到圆底96孔板中。向含细胞的孔中加入10 μ l的BCMA抗体或相应的IgG对照以获得0.1 pM-200 nM的终浓度。BCMA抗体和对照IgG以相同的体积摩尔浓度使用。于4℃下孵育30分钟后,将细胞离心(5分钟,350 \times g),利用150 μ l/孔含BSA的FACS染色缓冲液(BD Biosciences)洗涤,重悬浮并与12 μ l/孔荧光染料缀合的抗His抗体(Lucerna)于4℃下孵育额外的30分钟用于检测BCMA抗体。还可以利用荧光染料缀合的CD38、CD19和CD20抗体染色食蟹猴细胞。然后通过加入120 μ l/孔FACS染色缓冲液并在350 \times g下离心5分钟来洗涤细胞。利用150 μ l/孔FACS染色缓冲液进行第二个洗涤步骤。将样品重悬浮在200 μ l/孔FACS染色缓冲液中,使用具有FACSDiva® 软件的LSR II 流式细胞仪(BD Biosciences)获得并分析所述样品。然后评估BCMA抗体与CD38⁺ CD19^{lo} CD20⁻浆细胞的结合,并在CD38⁺ CD19^{lo} CD20⁻浆细胞或总CD19⁺ B细胞上门控测定平均荧光强度并以柱状图或点状图进行绘制。

[0303] 实施例2-产生治疗性抗BCMA抗体,其不阻断配体(APRIL,BAFF)结合并且不通过BCMA胞内结构域促进或阻断信号传递并且其与BCMA的结合不受100 ng/ml,优选1000 ng/ml 的APRIL,或100 ng/ml,优选1000 ng/ml的BAFF影响

[0304] 如果上述步骤(实施例1H6)之后的所选抗体源自从重组抗体库中的体外选择,那么它们已是未缀合的人IgG1抗体。源自免疫的上述步骤(实施例1H6)之后的那些所选抗体是大鼠-人嵌合形式并且然后优选被人源化以能够将它们应用于治疗。在该情况下,通过将那些大鼠可变区的互补决定区转移到人抗体可变区构架中来应用标准的抗体人源化方法。将额外的突变引入到可变区内,需要时,与嵌合的亲本抗体相比可以恢复与BCMA的结合。

[0305] 实施例2A. 产生治疗性抗BCMA抗体

[0306] 为了产生未缀合的IgG1抗体介导的ADCC(例如糖改造的抗体)(参见下文的实施例3A)或缀合抗体递送细胞毒素小分子部分(例如抗体-药物缀合物)(参见下文的实施例4A),细胞分别与4:4:1:1比例的四种质粒共转染,两种质粒用于抗体表达(一种用于表达抗体的重链,另一种用于表达抗体的轻链),一种用于GnTIII表达,一种用于甘露糖苷酶II表达。细胞在T烧瓶中使用补充有10% FCS的DMEM培养基培养为附着的单层培养物,并且当它们在50-80%汇合时进行转染。为了转染T75烧瓶,在转染前24小时,在补充有FCS(最终10% V/V), 250 μ g/ml新霉素的14 ml DMEM培养基中接种800万个细胞,并将细胞置于在具有5% CO₂ 大气的孵育箱中于37℃下过夜。对于待转染的每个T75烧瓶,通过混合在轻链和重链表达载体之间平分的47 μ g总质粒载体DNA、235 μ l的1M CaCl₂溶液,并加水至469 μ l的终体积来制备DNA、CaCl₂和水的溶液。向该溶液中加入 469 μ l的50 mM HEPES、280 mM NaCl、1.5 mM Na₂HP0₄溶液,pH 7.05,立即混合10秒并在室温下保持静止20秒。利用补充有2% FCS的12 ml的DMEM稀释悬浮液并加入到T75中,替换现有的培养基。细胞于37℃下,5% CO₂中孵育约17-20小时,然后用12 ml DMEM, 10% FCS替换培养基。转染后5-7天收集条件性培养基,在1200 rpm下离心5分钟,随后在4000 rpm下第二次离心10分钟并保存在4℃。

[0307] 为了产生T细胞双特异性的抗体(参见下文的实施例5),细胞分别与1:1比例的两种质粒共转染(一种用于表达抗体的重链,另一种用于表达抗体的轻链)。细胞在T烧瓶中使用补充有10% FCS的DMEM培养基培养为贴壁的单层培养物,并且当它们在50-80%汇合时进行转染。为了转染T75烧瓶,在转染前24小时,在补充有FCS(最终10% V/V), 250 μ g/ml新霉素的14 ml DMEM培养基中接种800万个细胞,并将细胞置于在具有5% CO₂ 大气的孵育箱

于37℃下过夜。对于待转染的每个T75烧瓶,通过混合在轻链和重链表达载体之间平分的47 μg总质粒载体DNA、235 μl的1M CaCl₂溶液,并加水至469 μl的终体积来制备DNA、CaCl₂和水的溶液。向该溶液中加入 469 μl的50 mM HEPES、280 mM NaCl、1.5 mM Na₂HP0₄溶液, pH 7.05,立即混合10秒并在室温下保持静止20秒。利用补充有2% FCS的12 ml的DMEM稀释悬浮液并加入到T75中,替换现有的培养基。细胞于37℃下,5% CO₂中孵育约17-20小时,然后用12 ml DMEM, 10% FCS替换培养基。转染后5-7天收集条件性培养基,在1200 rpm下离心5分钟,随后在4000 rpm下第二次离心10分钟并保存在4℃。

[0308] 通过蛋白A亲和层析,随后通过阳离子交换层析和在Superdex 200柱 (Amersham Pharmacia) 上的最终的大小排阻层析步骤将缓冲液交换成磷酸缓冲盐溶液并收集纯的单体IgG1抗体来纯化分泌的抗体。使用分光光度计从280 nm处的吸光度估计抗体浓度。在25 mM磷酸氢二钾、125 mM氯化钠、100 mM甘氨酸溶液 (pH 6.7) 中配制抗体。

[0309] 实施例3. 未缀合的IgG1抗体介导的ADCC

[0310] 实施例3A. Fc改造的IgG1的产生

[0311] 在实施例2A中产生的Fc改造的IgG1抗体不需要额外的步骤并且即可用于步骤实施例3B中的体外测试。

[0312] 实施例3B. 未缀合的IgG1抗体的体外测试:ADCC

[0313] 在细胞测定中测定在实施例2A(参见上文)中针对MM肿瘤细胞(靶标细胞)产生的抗BCMA未缀合IgG1的ADCC能力。人PBMC用作效应细胞并且利用具有柠檬酸钠的细胞制备管 (Vacutainer CPT管, BD), 使用密度梯度离心, 根据制造商的说明书制备所述人PBMC。简言之, 在Vacutainer CPT管中直接收集静脉血。将梯度在400×g下于室温(RT)不中断离心30分钟。收集含有PBMC的界面并利用PBS进行洗涤(来自两个梯度的50 ml/细胞)并通过在300×g下于RT离心10分钟进行收集。利用PBS重悬浮沉淀后, 计数PBMC并通过在200×g下于RT离心10分钟洗涤第二次。然后在适当培养基中重悬浮细胞用于后续程序。

[0314] 用于ADCC测定的效应物与靶标比例对PBMC是25:1。以适当浓度在AIM-V培养基中制备效应细胞, 以加入50 μl/孔圆底96孔板。靶标细胞是在补充有10%胎牛血清的RPMI-1640中生长的表达人BCMA的细胞(例如, NCI-H929)。在PBS中洗涤靶标细胞, 计数并以30万/ml重悬浮在完全RPMI-1640中, 以100 μl/微孔加入30,000个细胞。在完全RPMI-1640中稀释抗体, 在50 μl中加入预先平板培养的靶标细胞, 并允许在室温下结合靶标10分钟。然后加入效应细胞并将平板在含有5% CO₂的潮湿大气中于37℃下孵育4小时。通过使用细胞毒性检测试剂盒 (Roche Diagnostics) 测量从损伤细胞的乳酸脱氢酶(LDH) 释放来评估靶标细胞的杀伤。4小时孵育后, 将平板在800×g下离心。将来自每个孔的100 μl上清液转移到新的透明平底96孔板中。每孔中加入来自试剂盒的100 μl显色底物缓冲液。使用SOFTmax PRO软件 (Molecular Devices) 在ELISA读取器中在490 nm处测定显色反应的V_{max}值。从仅含有靶标和效应细胞但没有抗体的孔中测量自发的LDH释放。从仅含有靶标细胞和1% Triton X-100的孔中测定最大释放。如下计算特异性抗体介导的杀伤的百分比: ((x-SR) / (MR-SR)) * 100, 其中x是特定抗体浓度下V_{max}的均值, SR是自然释放的V_{max}的均值, MR是最大释放的V_{max}的均值。

[0315] 实施例4. 递送细胞毒性小分子部分的缀合抗体

[0316] 实施例4A. 抗体药物-缀合物的产生

[0317] 进一步合成了在步骤实施例2A中产生的介导ADCC的未缀合IgG1抗体。合成马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲酰基-一甲基auristatin F (vcMMAF) 并将其缀合到DTT还原后在上文步骤(e)之后所选的IgG1抗体上的半胱氨酸残基,如先前Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18) 和Doronina 2006 (Bioconjug Chem 17: 144-24) 中所述。

[0318] 实施例4B抗体药物缀合物的体外测试:细胞毒性测定

[0319] 在存在或不存在抗体或抗体-药物缀合物的情况下在圆底96孔板中以5,000/孔平板培养表达BCMA的NCI-H929多发性骨髓瘤靶标细胞并在37°C, 5% CO₂下孵育。在暴露于抗体或抗体-药物缀合物后96小时, 使用发光细胞活力测定 (CellTiter-Glo, Promega) 评估细胞活力。使用Fusion HT平板读取器 (Packard Instruments) 进行发光信号的读取。然后针对平均发光信号将抗体-药物缀合物的浓度绘制为剂量-应答曲线。将IC₅₀值测定为产生未处理对照孔的细胞活力的50%的抗体-药物缀合物浓度 (Prism, GraphPad)。

[0320] 实施例5-抗BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体的产生

[0321] 实施例5A. 抗-CD3抗体的产生

[0322] VH和VL区的下列蛋白序列用于产生如W02007/04 2261中所述的人和食蟹猴交叉反应性CD3ε抗体。

H2C_VH (SEQ ID NO:7):

[0323] EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATY
YADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAWWGQGTLVT
VSS

H2C_VL (SEQ ID NO:8)

[0324] QTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARF
SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL

[0325] 简言之,对于没有Fc的T细胞双特异性(参见下文实施例5B),通过PCR将编码上述序列的寡核苷酸连接在一起以合成编码单链Fv (ScFv) 的基因,其中所述VH和VL序列通过含有丝氨酸和甘氨酸残基的柔性接头连接,如W02007/042261中所述。片段以抗CD3-VL抗CD3 x VH方向连接。这称为抗CD3 ScFv。

[0326] 简言之,对于具有Fc的T细胞双特异性(参见下文的实施例5C),通过PCR将编码上述序列的寡核苷酸连接在一起以合成分别编码抗CD3抗体的VH和VL序列的cDNA。

[0327] 实施例5B. 没有Fc的抗BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体的产生

[0328] 实施例5B1. 抗BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性的产生:两个scFvs融合蛋白

[0329] 实施例5B1a. 抗-BCMA ScFvs的产生

[0330] 为每个抗BCMA-IgG1抗体,即为在上文实施例1的步骤(实施例1H6)之后选择的人IgG1抗体所选抗体和为上文步骤(实施例2)之后产生的人源化IgG1抗体产生编码单链Fv (ScFv) 的cDNA片段,所述抗BCMA-IgG1抗体不阻断配体 (APRIL, BAFF) 结合,也不通过BCMA胞内结构域促进或阻断信号传递,并且其与BCMA的结合不受100 ng/ml优选1000 ng/mL的APRIL或100 ng/ml优选1000 ng/mL的BAFF影响。这通过PCR扩增编码每个抗体的各VH和VL

区的cDNA区段完成。在每种情况下,VH和VL区使用与其中所述相似的引物,通过如WO 2004106383中所公开的18个氨基酸接头连接。以VH抗-BCMA-VL抗-BCMA方向克隆片段。

[0331] 实施例5B1b. VH抗-BCMA-VL抗-BCMA方向构建体的克隆

[0332] 通过框内连接上文步骤(实施例5B1a)中所述的各ScFv的序列与上文步骤(实施例3A)中所述的抗CD3 ScFv的序列为上文步骤(实施例5B1a)中的每一个抗BCMA抗体产生编码抗-CD3 x抗-BCMA双特异性抗体的cDNA。以VH抗-CD3-VL抗CD3 x VH 抗-BCMA-VL抗-BCMA方向完成克隆。向每一个编码抗-CD3 x抗-BCMA双特异性抗体的cDNA框内加入哺乳动物前导肽编码序列并随后将每一个最终构建体亚克隆至哺乳动物表达载体中。使用与上文实施例1中所述IgG1抗体所用相同的载体和转染方法。或者,将编码抗-CD3 x抗-BCMA双特异性抗体的每一个最终构建体(包括前导序列)亚克隆至哺乳动物表达载体pEFDHFR中(如WO20041106383中所述)并且如下文在步骤(实施例5B1c)所述产生双特异性抗体。

[0333] 实施例5B1c双特异性单链结合剂的表达和表征

[0334] 通过DNA测序证实想要的序列后,将5B1b中获得的每一个构建体转染至例如二氢叶酸还原酶阴性CHO细胞中,并且进行表达用于表征,如WO20041106383中所述。例如,为了CD3结合Jurkat细胞(ATCC)和BCMA结合NCI-H929 (ATCC),进行流式细胞术实验。细胞与BCMA/CD3双特异性构建体表达细胞的上清液于4°C下孵育大概1小时,在FACS缓冲液(磷酸缓冲盐溶液,其含有胎牛血清和0.05叠氮化钠)中洗涤2次并且通过整合到表达载体pEFDHFR中的6xHIS标签,使用HIS抗体例如(Dianova)检测结合的构建体。为了检测结合的抗HIS抗体,如上所述洗涤细胞并与例如山羊抗小鼠FITC缀合的抗体(BD 550003)或与抗小鼠PE缀合的抗体(IgG) (Sigma, P8547)孵育并例如在FACS Canto (BD Biosciences)上进行分析。然后在通过两步纯化方法,包括如WO20041106383中所述的固定化的金属亲和层析(IMAC)和凝胶过滤,但使用利用在其表面上表达全长BCMA的DNA构建体转染的CHO细胞系已经纯化了构建体之后使用基于流式细胞术的测定分析了构建体的功能活性。

[0335] 实施例5C具有Fc的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性1+1形式的产生

[0336] 为步骤(实施例1H6)之后所选的人或人源化抗BCMA抗体产生抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性。编码如实施例2中所述的相应抗-BCMA IgG1抗体的全长重链和轻链的cDNA以及如实施例3A中所述的抗CD3 VH和VL cDNA用作起始材料。对于每一个双特异性抗体,涉及四条蛋白链,其分别包含相应抗-BCMA抗体的重链和轻链以及上述抗-CD3抗体的重链和轻链。为了将具有错配的重链(例如具有抗-CD3抗体的两条重链)的副产物的形成最小化,使用突变的异源二聚Fc区,其携带“突起进入孔突变”和改造的二硫键,如WO2009080251和WO2009080252中所述。为了将具有错配的轻链(例如具有抗-CD3抗体的两条轻链)的副产物的形成最小化,使用WO2009080251和WO2009080252中所述的方法将CH1 x恒定κ交叉应用到抗-CD3抗体的重链和轻链。

[0337] 简言之,通过同时共转染四个哺乳动物表达载体产生每一个双特异性抗体,所述哺乳动物表达载体分别编码:a) 相应的BCMA抗体的全长轻链cDNA,b) 相应的BCMA抗体的全长重链cDNA,其在Fc区中携带“孔突变”以产生异源二聚抗体(参见下文细节),c) 通过标准的分子生物学方法,如重叠延伸拼接(splice-overlap-extension) PCR产生融合cDNA,其编码由分泌前导序列、上述抗-CD3抗体的VL和IgG1抗体的人CH1结构域(以N-至C-末端顺序)组成的融合蛋白,和d) 通过标准的分子生物学方法,如重叠延伸拼接PCR产生的融合cDNA,

其编码由分泌前导序列、上述抗-CD3抗体的VH、人轻链cDNA的恒定κ结构域、人IgG1抗体的铰链区，和人CH1抗体的Fc区 (CH2和CH3结构域) (以N-至C-末端顺序) 组成的融合蛋白，其在Fc区中包括“突起突变”(参见下文细节)以产生异源二聚抗体。使用如上所述的方法共转染哺乳动物细胞和抗体产生以及纯化用于产生人或人源化IgG1抗体(参见实施例2)。人IgG1 Fc区中的“突起进入孔突变”由以下组成:T366W, 称为“突起突变”；和T366S、L368A和Y407V, 统称为“孔突变”。此外, 可以包括二硫化物以增加稳定性和产量以及附加残基形成离子桥和增加异源二聚化产量(EP 1870459A1)。

[0338] 实施例6-抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体与BCMA和CD3的同时结合(表面等离子共振)

[0339] 通过表面等离子共振(SPR)技术, 使用Biacore® T100仪器(Biacore AB) , 利用HBS-EP作为运行缓冲液(0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005%表面活性剂P20, Biacore)分析在实施例5中产生的双特异性抗BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体与BCMA和CD3的结合性质。良好建立该系统用于研究分子相互作用。其允许连续实时监测配体/分析物结合, 并因此在多种测定环境中测定结合速率常数(ka)、解离速率常数(kd)和平衡常数(KD)。SPR技术基于对接近金包被的生物传感器芯片表面的折射率的测量。折射率的改变表明固定的配体与在溶液中注射的分析物的相互作用引起的表面的质量改变。如果分子结合表面上的固定配体, 那么质量增加, 在解离的情况下, 质量减小。

[0340] 使用胺偶联化学将捕获的抗His标签抗体固定到CM5生物传感器芯片的表面上。利用0.1 M N-羟基琥珀酰亚胺和0.1 M 3-(N,N-二甲氨基)丙基-N-乙基碳化二亚胺的1:1混合物, 以5 μl/分钟的流速激活流动室, 以10 μg/ml将抗人IgG抗体注射到醋酸钠, pH 5.0中, 其产生大概12000共振单位(RU)的表面密度。以相同的方式, 但是仅利用媒介物缓冲液代替捕获抗体来处理参照对照流动室。注射1 M乙醇胺/HC1 pH 8.5封闭表面。在HBS-P中稀释抗BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体并以5 μl/分钟的流速注射。对于1-100 nM之间浓度的抗体(用于BCMA-ECD结合)和1-200 nM之间浓度的抗体(用于CD3相互作用)的接触时间(结合相)是1分钟。以3.125、6.25、12.5、25、50和100 nM的渐增浓度注射BCMA-ECD, 以0.21、0.62、1.85、5.6、16.7、50、100和200 nM的浓度注射CD3。对于流速为30 μl/分钟的两个分子, 接触时间(结合相)是3分钟, 解离时间(利用运行缓冲液洗涤)是5分钟。所有相互作用均在25°C(标准温度)下进行。以5 μl/分钟的流注射3M氯化镁的再生溶液以在每个结合循环后去除任何非共价结合的蛋白。以每秒一个信号的速率检测信号。以渐增浓度注射样品。测定显示针对接触时间绘制的信号速率(即共振单位)的SPR图。

[0341] 实施例7-抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体与MM细胞上的BCMA或T细胞上的CD3的结合(流式细胞术)

[0342] 也通过流式细胞术分析实施例5中产生的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体其与NCI-H929多发性骨髓瘤细胞上表达的人BCMA或人白血病T细胞Jurkat (ATCC)上表达的人CD3的结合性质。简言之, 收集培养的细胞、计数并使用锥虫蓝排除方法评估细胞活力。然后将活细胞在含有0.1% BSA的PBS中调整至 2×10^6 细胞/ml。将90 μl的该细胞悬浮液进一步每孔等分到圆底96孔板中。向含细胞的孔中加入10 μl的T细胞双特异性抗体或相应的IgG对照以获得0.1 pM-200 nM的终浓度。抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体和对照IgG以相同的体积摩尔浓度使用。于4°C下孵育30分钟后, 将细胞离心(5分钟, 350 x g), 利用150 μ

1/孔含BSA的FACS染色缓冲液(BD Biosciences)洗涤,重悬浮并与 12 μ l/孔荧光染料缀合的抗His抗体(Lucerna)于4℃下孵育额外的30分钟用于检测T细胞双特异性抗体。然后通过加入120 μ l/孔FACS染色缓冲液并在350 \times g下离心5分钟来洗涤细胞。利用150 μ l/孔FACS染色缓冲液进行第二个洗涤步骤。将样品重悬浮在200 μ l/孔FACS染色缓冲液中,使用具有FACSDiva® 软件的LSR II流式细胞仪(BD Biosciences)获得并分析所述样品。评估抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体与MM细胞和T细胞的结合并在表达BCMA的NCI-H929 MM细胞或表达CD3的Jurkat T细胞上测定平均荧光强度并以柱状图或点状图进行绘制。

[0343] 实施例8-衔接抗BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体后T细胞的激活(流式细胞术)

[0344] 还通过流式细胞术分析实施例5中产生的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体其通过评估在存在或不存在表达人BCMA的MM细胞的情况下CD4⁺和CD8⁺ T细胞上早期激活标志物CD69或晚期激活标志物CD25的表面表达来诱导T细胞激活的潜能。简言之,利用Cell Dissociation缓冲液收集表达BCMA的NCI-H929 MM细胞,计数并使用锥虫蓝验证细胞活力。将活细胞在完全RPMI-1640培养基中调整至0.2 \times 10⁶细胞/mL,将100 μ l该细胞悬浮液/孔吸到圆底96孔板中。向含MM细胞的孔中加入50 μ l的T细胞双特异性构建体以获得1 nM的终浓度。将96孔板放置一边并保持在37℃, 5% CO₂下直至进一步的操作。

[0345] 使用具有柠檬酸钠的Cell制备管(Vacutainer CPT管, BD Biosciences),使用密度梯度离心从新鲜血液中分离PBMC。然后使用Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec),根据制造商的说明书分离总的人T细胞。然后将人总T细胞(效应细胞)在完全RPMI-1640培养基中调整至2 \times 10⁶个细胞/mL。在早已含有表达BCMA的MM细胞的测定板中每孔加入50 μ l该细胞悬浮液以获得5:1的最终E:T比例。为了测试仅存在表达BCMA的MM肿瘤靶标细胞的情况下,T细胞双特异性构建体是否能够激活T细胞,也包括含有0.1 pM-200 nM范围终浓度的各双特异性分子与效应细胞,但没有MM肿瘤靶标细胞的孔。在37℃, 5% CO₂下孵育5天后,通过离心(5分钟, 350 \times g)沉淀细胞并利用150 μ l/孔FACS染色缓冲液(BD Biosciences)洗涤两次。利用针对人CD4、CD8、CD69或CD25的所选荧光染料缀合的抗体(BD Biosciences)表面染色效应细胞在FACS染色缓冲液(BD Biosciences)中,根据制造商的方案于4℃下避光进行30分钟。利用150 μ l/孔FACS染色缓冲液洗涤细胞两次,重悬浮于200 μ l/孔FACS染色缓冲液中,并使用补充有FACSDiva® 软件的LSRII流式细胞仪(BD Biosciences)获得并分析。通过测量在CD4⁺和CD8⁺ T细胞群上测定的平均荧光强度测定CD69和CD25激活标志物的表达,如柱状图或点状图中所表示。

[0346] 实施例9-衔接抗BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体后T细胞的增殖(CFSE稀释)

[0347] 还通过流式细胞术分析实施例5中产生的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体其在存在或不存在表达人BCMA的MM细胞的情况下诱导CD8⁺ 或CD4⁺ T细胞增殖的潜能。简言之,利用Cell Dissociation缓冲液收集表达BCMA的NCI-H929 MM细胞,计数并使用锥虫蓝寻找活力。将活的MM细胞在完全RPMI培养基中调整至0.2 \times 10⁶个细胞/mL,将100 μ l该细胞悬浮液/孔吸到圆底96孔板中。向含MM细胞的孔中加入50 μ l的T细胞双特异性构建体以获得0.1 pM-200 nM范围的终浓度。将孔板放置一边并保持在37℃, 5% CO₂下。

[0348] 使用具有柠檬酸钠的Cell制备管(Vacutainer CPT管, BD Biosciences),使用密度梯度离心从新鲜血液中分离PBMC。然后使用Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec),根据制造商的说明书分离总的人T细胞。然后将总T细胞在预热的无血清RPMI (37

℃)中调整至100万个细胞/ml,并利用1 μ M CFSE于室温下避光染色6分钟。然后通过加入补充有 10% FCS和1% GlutaMax的RPMI-1640培养基使染色体积加倍以终止CFSE染色。在室温下进一步孵育20分钟后,利用预热的含血清培养基洗涤细胞三次以去除剩余的CFSE。然后将CFSE染色的总T细胞(效应物)在完全RPMI-1640培养基中调整至2 \times 10⁶个细胞/mL。在早已含有表达BCMA的NCI-H929 MM细胞的测定板中每孔加入50 μ l该细胞悬浮液以获得5:1的最终E:T比例。为了测试仅存在表达BCMA的MM肿瘤靶标细胞的情况下,T细胞双特异性构建体是否能够激活T细胞,也包括含有0.1 pM-200 nM范围浓度的T细胞双特异性抗体与效应细胞,但没有MM肿瘤靶标细胞的孔。在37℃, 5% CO₂下孵育5天后,通过离心(5分钟, 350 \times g)沉淀细胞并利用150 μ l/孔FACS染色缓冲液(BD Biosciences)洗涤两次。利用针对人CD4、CD8或CD25的所选荧光染料缀合的抗体(BD)表面染色效应细胞在FACS染色缓冲液中,根据制造商的方案于4℃下避光进行30分钟。利用150 μ l/孔FACS染色缓冲液洗涤细胞两次,重悬浮于200 μ l/孔FACS染色缓冲液中,并使用补充有FACSDiva® 软件的LSR II流式细胞仪(BD)获得并分析。通过在组(所述孔含有表达BCMA的MM细胞和CFSE染色的T细胞,但没有T细胞双特异性抗体)中远右端未稀释的CFSE峰上门控测定未增殖细胞的百分比,并与其它实验组(孔)进行比较。通过门控所有稀释的CFSE峰,排除远右端峰(如果可观察到)测量增殖细胞的百分比。首先在群体上门控测定CD4⁺和CD8⁺ T细胞的增殖水平,然后进一步看CFSE稀释峰。

[0349] 实施例10-衔接抗BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体后从激活的T细胞产生细胞因子

[0350] 实施例10A干扰素- γ 产生

[0351] 还分析实施例5中产生的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体其在存在或不存在表达人BCMA的MM细胞的情况下诱导T细胞产生干扰素- γ (IFN- γ)的潜能。简言之,利用Cell Dissociation缓冲液收集表达BCMA的NCI-H929 MM细胞,计数并使用锥虫蓝寻找活力。在圆底96孔板中平板培养大概20,000个活细胞/孔并加入各抗体稀释物以获得0.1 pM-200 nM范围的终浓度。调整至相同体积摩尔浓度的抗人BCMA和抗-CD3 IgG用作对照。加入人总T效应细胞以获得5:1的最终E:T比例。在37℃, 5% CO₂下孵育20小时后,通过ELISA,根据制造商的说明书(人IFN- γ ELISA Kit II, BD Biosciences)测量上清液中人IFN- γ 水平。测量在存在抗BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体和表达BCMA的MM细胞的情况下T细胞产生的IFN- γ 的水平并以柱状图进行绘制,并与在存在抗BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体但没有表达BCMA的MM细胞的情况下T细胞产生的IFN- γ 的水平比较。

[0352] 实施例10B细胞因子释放测定(CBA分析)

[0353] 还分析实施例5中产生的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体其在存在或不存在表达人BCMA的MM细胞的情况下诱导T细胞介导的细胞因子产生的潜能。使用具有柠檬酸钠的Cell制备管(Vacutainer CPT管, BD Biosciences),使用密度梯度离心从新鲜血液中分离PBMC,并将30万个细胞/孔的最终细胞浓度平板培养至圆底96孔板中。然后加入表达BCMA的NCI-H929 MM细胞以获得10:1的最终E:T比例,并加入T细胞双特异性构建体和IgG对照以获得0.1 pM-200 nM范围的终浓度,用于在37℃, 5% CO₂下孵育24小时。第二天,将细胞在350 \times g下离心5分钟并将上清液转移到新的深孔96孔板中用于进一步的分析。根据制造商用于LSR II流式细胞仪的说明书,使用人Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD Biosciences),

包括人IL-2、人IL-4、人IL-6、人IL-10、人TNF- α 和人IFN- γ 进行CBA分析。测量在存在抗BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体和表达BCMA的MM细胞的情况下T细胞产生的细胞因子的水平并以柱状图进行绘制，并与在存在抗BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体但没有表达BCMA的MM细胞的情况下T细胞产生的细胞因子的水平比较。

[0354] 实施例11-抗BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体在T细胞上与CD3以及在MM细胞上与BCMA交联后MM细胞的重新指向 (Redirected) 的T细胞毒性

[0355] 还分析实施例5中产生的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体其在构建体通过结合抗原结合部分交联细胞上的BCMA后在表达BCMA的MM细胞中诱导T细胞介导的程序性细胞死亡的潜能。简言之，利用Cell Dissociation缓冲液收集表达人BCMA的NCI-H929多发性骨髓瘤靶标细胞，在补充有10%胎牛血清的RPMI (Invitrogen) 中洗涤并重悬浮。在圆底96孔板中平板培养大概30,000个细胞/孔并为了想要的终浓度(一式三份)；0.1 pM-200 nM范围的终浓度加入构建体的各稀释物。为了适当的比较，将所有T细胞双特异性构建体和对照调整至相同的体积摩尔浓度。向孔中加入人总T细胞(效应物)以获得5:1的最终E:T比例。当人PBMC用作效应细胞时，使用10:1的最终E:T比例。浓度为1 μ g/ml的PHA-L (Sigma) 用作阳性对照用于人T细胞激活。仅由效应物或靶标细胞代表阴性对照组。为了归一化，通过靶标细胞与终浓度1% Triton X-100孵育诱导细胞死亡测定NCI-H929 MM靶标细胞的最大裂解(=100%)。仅由与效应细胞共孵育的靶标细胞代表最小裂解(=0%)，即没有任何T细胞双特异性抗体。在37 $^{\circ}$ C，5% CO₂下孵育20小时后，然后利用LDH检测试剂盒 (Roche Applied Science)，遵循制造商的说明书测量LDH从细胞凋亡的/坏死的MM靶标细胞到上清液中的释放。在浓度-应答曲线中针对抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体的浓度绘制LDH释放的百分比。使用Prism软件 (GraphPad) 测量 IC₅₀值并将其测定为T细胞双特异性抗体的浓度(其导致50%的LDH释放)。

[0356] 实施例12-含有非配体阻断/非竞争性抗-BCMA抗体相对于配体阻断/竞争性抗-BCMA抗体的T细胞双特异性在表达BCMA的MM细胞中的杀伤潜能的比较

[0357] 在某些血液恶性肿瘤，如多发性骨髓瘤中，循环BCMA-配体APRIL和BAFF的水平升高 (Moreaux等2004；Blood 103 (8) :3148-3157)。因此，本发明人认识到血清中高水平的配体可能干扰肿瘤细胞上抗-BCMA抗体与BCMA的结合。相比于健康供体，MM患者中循环APRIL (BCMA的高亲和力配体) 的水平是~100 ng/mL相比于~10 ng/mL。对于BAFF (BCMA的低亲和力配体)，水平与健康供体中的~3 ng/mL相比，可以在1-1000 ng/mL之间波动。接近肿瘤细胞，APRIL/BAFF浓度可以适当地甚至高于在血清中测量的。在某些自身免疫疾病，如全身性红斑狼疮中，循环APRIL的水平也升高，其为~ 85 ng/mL (Koyama等2005；Ann Rheum Dis 64:1065-1067)。

[0358] 也分析了在实施例5中产生的含有非配体阻断/非竞争性抗-BCMA抗体的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体其与含有相同形式的配体阻断/竞争性抗-BCMA抗体的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体相比，在表达BCMA的MM细胞中，在存在升高浓度(即 100 ng/mL-1000 ng/mL)的APRIL或BAFF的情况下，构建体通过结合抗原结合部分交联细胞上的BCMA后诱导T细胞介导的程序性细胞死亡的潜能。

[0359] 如图1中所示，代表在多发性骨髓瘤患者的血液和骨髓中发现的水平的可溶性APRIL或BAFF的渐增浓度(即10、100、1000ng/mL)不改变非配体阻断/非竞争性抗-BCMA抗体

与平板结合的BCMA的结合(连续线)。相反,代表在多发性骨髓瘤患者的血液和骨髓中发现的水平(即100 ng/mL-1000 ng/mL)高浓度的可溶性APRIL或BAFF降低了配体阻断/竞争性抗-BCMA抗体与结合的BCMA的结合(虚线)。

[0360] 如图2中所示,代表在多发性骨髓瘤患者的血液和骨髓中发现的水平的可溶性APRIL或BAFF的渐增浓度(即10、100、1000ng/mL)不改变对表达BCMA的MM细胞特异的含有非配体阻断/非竞争性抗BCMA抗体的T细胞双特异性抗体的杀伤潜能(连续线)。相反,代表在多发性骨髓瘤患者的血液和骨髓中发现的水平的高浓度(即100 ng/mL-1000ng/mL)可溶性APRIL或BAFF降低对表达BCMA的MM细胞特异的含有配体阻断/竞争性抗BCMA抗体的T细胞双特异性抗体的杀伤潜能(虚线)。

[0361] 实施例12A. 在存在 10、100、1000 ng/mL的APRIL或BAFF的情况下具有非配体结合/阻断、非竞争性抗-BCMA抗体的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体与表达BCMA的MM细胞的结合性质

[0362] 通过流式细胞术分析在实施例5中产生的具有非配体结合/阻断、非竞争性抗-BCMA抗体的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体其在存在10、100和1000 ng/mL的APRIL或BAFF的情况下与在NCI-H929多发性骨髓瘤细胞上表达的人BCMA的结合性质。简言之,收集培养的细胞、计数并使用锥虫蓝排除方法评估细胞活力。然后将活细胞在含有0.1% BSA的PBS中调整至 2×10^6 细胞/mL。将90 μ l的该细胞悬浮液进一步每孔等分到圆底96孔板中。向含细胞的孔中加入10 μ l的T细胞双特异性抗体或相应的IgG对照以优选获得0.1 pM-200 nM的终浓度。抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体和对照IgG以相同的体积摩尔浓度使用。于4°C下孵育30分钟后,将细胞离心(5分钟, 350 \times g), 利用150 μ l/孔含BSA的FACS染色缓冲液(BD Biosciences)洗涤, 重悬浮并与 12 μ l/孔荧光染料缀合的抗His抗体(Lucerna)于4°C下孵育额外的30分钟用于检测T细胞双特异性抗体。然后通过加入120 μ l/孔FACS染色缓冲液并在350 \times g下离心5分钟来洗涤细胞。利用150 μ l/孔FACS染色缓冲液进行第二个洗涤步骤。将样品重悬浮在200 μ l/孔FACS染色缓冲液中, 使用具有FACSDiva® 软件的LSR II 流式细胞仪(BD Biosciences)获得并分析所述样品。评估抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体与MM细胞和T细胞的结合并在表达BCMA的NCI-H929 MM细胞上门控测定平均荧光强度并以柱状图或点状图进行绘制。然后在存在0、10、100和1000 ng/mL的APRIL或BAFF的情况下将具有非配体结合/阻断、非竞争性抗-BCMA抗体的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体与MM细胞的结合(例如MFI)与具有配体结合/阻断、竞争性抗-BCMA抗体的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体与MM细胞的结合进行比较。

[0363] 实施例12B. 在存在10、100、1000 ng/mL的APRIL或BAFF的情况下具有非配体结合/阻断、非竞争性抗-BCMA抗体的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体的杀伤性质:表达BCMA的MM细胞的重新指向的T细胞细胞毒性(LDH释放测定)

[0364] 分析了在实施例5中产生的具有非配体结合/阻断、非竞争性抗-BCMA抗体的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体其在表达BCMA的MM细胞中, 在存在或不存在升高浓度(即10、100、1000ng/mL)的APRIL或BAFF的情况下, 构建体通过结合抗原结合部分交联细胞上的BCMA后诱导T细胞介导的程序性细胞死亡的潜能。简言之, 利用Cell Dissociation Buffer收集表达人BCMA的NCI-H929多发性骨髓瘤靶标细胞, 在补充有10%胎牛血清的RPMI (Invitrogen) 中洗涤并重悬浮。在圆底96孔板中平板培养大概30 000个细胞/孔并且为了

0.1 nM -10 nM的1 nM范围的固定浓度优选加入T细胞双特异性抗体的各稀释物(一式三份)。为了适当的比较,将所有T细胞双特异性抗体和对照调整至相同的体积摩尔浓度。向细胞培养物中加入渐增浓度(即10、100、1000 ng/mL)的可溶性人重组APRIL或BAFF。在平板中也包括不加入APRIL或BAFF的孔作为对照。然后向孔中加入人总T细胞(效应物)以获得5:1的最终E:T比例。当人PBMC用作效应细胞时,使用10:1的最终E:T比例。浓度为1 μ g/ml的PHA-L (Sigma)用作阳性对照用于人T细胞激活。仅由效应物或靶标细胞代表阴性对照组。为了归一化,通过靶标细胞与终浓度1% Triton X-100孵育诱导细胞死亡测定NCI-H929 MM靶标细胞的最大裂解(=100%)。仅由与效应细胞共孵育的靶标细胞代表最小裂解(= 0%),即没有任何构建体或抗体。在37°C, 5% CO₂下孵育20小时后,然后利用LDH检测试剂盒(Roche Applied Science),遵循制造商的说明书测量LDH从细胞凋亡的/坏死的MM靶标细胞到上清液中的释放。优选在浓度-应答曲线中以0.1 pM-200 nM浓度范围,将LDH释放的百分比在存在固定浓度的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体的情况下针对APRIL或BAFF的浓度作图。然后使用Prism软件(GraphPad)测量IC₅₀值。然后在存在0、10、100、1000 ng/mL的APRIL或BAFF的情况下将具有非配体结合/阻断、非竞争性抗-BCMA抗体的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体的IC₅₀值与具有配体结合/阻断、竞争性抗-BCMA抗体的抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体的IC₅₀值比较。

[0365] 实施例13-评估抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体在V_k*MYC多发性骨髓瘤小鼠模型中的治疗效力

[0366] 测试鼠类交叉反应性抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体其在V_k*MYC多发性骨髓瘤易感小鼠中预防多发性骨髓瘤的潜能,如Chesi, 2012 (Chesi等2012; Blood 120: 376-385) 中所述。多发性骨髓瘤是涉及骨髓中浆细胞不受控扩张的血液恶性肿瘤。因为BCMA在恶性浆细胞上强表达,我们假设抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体对治疗多发性骨髓瘤有效。V_k*MYC多发性骨髓瘤小鼠模型高度代表人骨髓瘤并且预测临床中所用的药物应答;代表用于测试抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体的临床前概念验证的极好工具。简言之,通过在Mayo Clinic Arizona的学术合作获得的V_k*MYC小鼠与人CD3 ϵ 转基因(huCD3 ϵ Tg)小鼠杂交。来自huCD3 ϵ Tg x V_k*MYC小鼠的T细胞在细胞表面上表达人CD3 ϵ 和小鼠CD3 ϵ ,小鼠因而对抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体作出应答。V_k*MYC小鼠在大概30周龄时开始一律发生单克隆 γ -球蛋白病,其随时间流逝进展缓慢,并且与代表人骨髓瘤的临床征兆,如贫血、骨质疏松症和肾病相关。通过擦伤尾部周期性地给小鼠放血并将血液收集到Microtainer管(BD Biosciences)中,使其在室温下凝固,然后在2,300g下旋转10分钟。在生理盐水缓冲液中以1:2稀释血清,并在QuickGel Chamber装置上使用预铸的QuickGels (Helena Laboratories),根据制造商的说明书进行分析。通过密度计分析测量 γ /白蛋白比例和血清分级。

[0367] 对于治疗研究,登记V_k*MYC小鼠并将其随机分入不同的处理组(n=5-8/组):例如,1)对照IgGs;2)抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体;通过尾静脉由静脉内施用500 μ g/kg/周或10 μ g/小鼠/周;3)在第1、4、8、11天bortezomib 1 mg/kg/腹膜内注射(i.p.),用作护理标准。优选地,抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体的剂量可以是多重的并且在200-1000 μ g/kg/周范围内变化。在每组中,至少三个年老的(>1年) γ /白蛋白比例在0.3-2.0之间的V_k*MYC小鼠对应于如通过密度测定法测量的大概10-70 g/l之间的主要M-spike。在

治疗后第0天和第14天进行血清蛋白电泳 (SPEP) 以测量M-spike中的治疗介导的降低, 其作为肿瘤应答的标志物, 如在临床中完成的。在一些治疗研究中, 登记M-spike大概为10-70 g/1和骨髓浆细胞增多高于5%的移植V_k*MYC小鼠并被分配至不同的处理组中。评估抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体降低M-spike的效力。

[0368] 实施例14-在全身性红斑狼疮的NZB/W狼疮易感小鼠模型中评估治疗效力

[0369] 测试鼠类交叉反应性抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体其在NZB/W易感小鼠(良好建立的模型)中预防全身性红斑狼疮 (SLE) 的潜能 (Hass等2010; J Immunol 184 (9) : 4789-4800)。具有累积证据提示, 自体反应浆细胞在SLE中起重要作用并且利用抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性排除自体反应浆细胞将对SLE患者有益。简言之, NZB和NZW小鼠购买自Jackson Laboratory并与huCD3 ϵ Tg小鼠杂交。NZB x huCD3 ϵ Tg小鼠和NZW x huCD3 ϵ Tg小鼠然后彼此杂交并选择雌性huCD3 ϵ Tg x NZB/W F1小鼠用于以后的研究。利用Albustix试纸 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.) 每隔一周来半定量测试小鼠的蛋白尿并在0-4范围上根据蛋白浓度 (0- \geq 20 g/1) 进行评分。在治疗研究中登记7-8个月龄的huCD3 ϵ Tg x NZB/W F1雌性小鼠并将其随机分入不同的治疗组中 (n=16/组) : 例如, 1) 对照 IgGs; 2) 抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体; 通过尾静脉由静脉内施用500 μ g/kg/周或10 μ g/小鼠/周; 3) 抗-BAFF 20 mg/kg/周, 用作护理标准。优选地, 抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体的剂量可以是多重的并且在200-1000 μ g/kg/周范围内变化。治疗研究开始时的基线蛋白水平在30 -300 mg/dL之间。

[0370] 代表SLE的临床终点由蛋白尿、肾病和表现如肾小球肾炎、血管小球细胞结构和大小增加、高碘酸-Schiff (PAS)-阳性沉积物和如通过ELISA测量的血清中自身抗体如dsDNA、总IgA、IgG和IgM的表现所组成。

[0371] 实施例15-在肾同种异体移植物的急性抗体介导的体液排斥的实验小鼠模型中评估治疗效力

[0372] 测试从实施例2提交的鼠类交叉反应性抗-BCMA抗体, 优选未缀合的IgG1抗体 (实施例3) 和递送细胞毒性小分子部分的缀合抗体 (实施例4) 其在肾同种异体移植物的急性体液排斥的实验小鼠模型中治疗同种异体移植物 (包括浆细胞和同种异体抗体) 的急性抗体介导的体液排斥的潜能, 如在Bickerstaff, 2008 (Bickerstaff等, Am J Pathol 2008; 173 (2) : 347-357) 中所述。

[0373] 实施例15A. 在小鼠中利用皮肤移植预先致敏

[0374] 从Jackson Laboratory获得C57BL/6 (H-2b) 和DBA/2 (H-2d) 成年小鼠。首先利用来自DBA/2供体小鼠的皮肤同种异体移植物预先致敏C57BL/6受体小鼠。简言之, 将全层皮肤同种异体移植物 (~8 x 10 mm) 置于所制备的受体侧面的移植床上并利用5-0丝线 (Ethicon) 缝合在四个角上。然后利用保护绷带覆盖皮肤同种异体移植物7天。预期在移植后第7天发生移植物排斥并通过皮肤移植物的暗着色、结痂 (scabbing) 和坏死变性进行表征。预先致敏的受体小鼠随后接受肾同种异体移植物。

[0375] 实施例15B. 小鼠肾移植

[0376] 来自实施例15A的预先致敏的小鼠用作肾同种异体移植物受体并在治疗研究中被登记并随机分入不同的治疗组 (n=10/组) : 1) 对照 IgGs; 2) 抗-BCMA抗体; 通过尾静脉经静脉施用的20 mg/kg/周或400 μ g/小鼠/周。如Bickerstaff等 (2008) 所述, 利用10-0丝显微血

管缝合(Ethicon)连接并分划肾上腺和睾丸血管来分离来自DBA/2小鼠的供体左肾。利用左肾动脉和静脉在其接合处固定主动脉和下腔静脉。在肾血管下连接主动脉。切断含有左输尿管膀胱连接点的一块膀胱。利用0.2-0.4 ml的冷肝素化林格(Ringer's)乳酸盐原位灌注移植植物。最后,整块收集具有附着到膀胱片上的维管联结和输尿管的肾。预先致敏的C57BL/6小鼠充当肾同种异体移植物的受体。在移植前立即去除受试者的右侧原有的肾。小心地分离肾下主动脉和下腔静脉并交叉夹紧。使用连续10-0缝线进行供体肾静脉和受体下腔静脉之间的端侧吻合。还进行供体主动脉套囊和受体主动脉之间的动脉吻合。肾同种异体移植物的瞬时灌注证明是成功的吻合。然后通过膀胱-膀胱吻合进行尿路重建。在肾移植后第5天去除左边原有的肾。肾种异体移植物存活后是每天检查整体动物健康和测量肌酸酐水平并将其与正常幼稚(naïve)小鼠的水平(例如大概 20 μmol/L)比较。当小鼠显示疾病征兆(例如重量减轻、垂死状态、蜷缩姿势等),并伴随连续两天肌酸酐水平高于~100 μmol/L时认为肾同种异体移植物排斥;然后使受体麻醉并收集肾同种异体移植物用于组织病理学分析。

[0377] 实施例15C. 循环同种异体抗体分析

[0378] 通过血清结合DBA/2脾细胞的能力测定供体反应抗体或同种异体抗体的存在。通过流式细胞术,使用FITC缀合的山羊抗小鼠IgG (γ -链-特异的)、大鼠抗小鼠IgG1、大鼠抗小鼠IgG2a或大鼠抗小鼠IgG2b (BD Biosciences) 检测抗体检测结合。使用DBA/2脾细胞作为用于Ig结合的靶标将抗体结合测量为平均荧光强度。通过取得从五份幼稚的C57BL/6血清的结合获得的MFI值在对照实验中为每个亚型测定背景荧光。阴性染色对照包括脾细胞加每个检测抗体。

序列表

<110> ENGMAB AG

<120> 用于选择针对BCMA的抗体的方法

<130> MAB-PCT

<150> EPEP13000570

<151> 2013-02-05

<150> EPEP13000571

<151> 2013-02-05

<160> 96

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 1

Gly	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Pro	Asn
1				5				10					

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

Gly	Thr	Lys	Phe	Leu	Ala	Pro
1				5		

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	Arg	Trp	Val
1				5				

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4

Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Lys	Tyr	Ala	Met	Asn
1				5				10	

<210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 5

Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5			10						15		

Val Lys Asp

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 6

His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Trp	Ala	Tyr
1				5				10					

<210> 7
<211> 109
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 7
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly
20 25 30
Tyr Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
65 70 75 80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Arg Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 8
<211> 125
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

[0002]

<210> 9
<211> 105
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 9
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
1 5 10 15
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
20 25 30
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
35 40 45
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
50 55 60
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
65 70 75 80
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
85 90 95
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 10
<211> 103
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 10
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser 35 40 45 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 50 55 60 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr 65 70 75 80 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 85 90 95 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys 100	
<210> 11	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<222> 1..39	
<223> /mol 类型="未指定的DNA"	
/注释="引物"	
/生物="人工序列"	
<400> 11	
aagcttggat ccatgttgc gatggctggg cagtgcctcc	39
<210> 12	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<222> 1..49	
<223> /mol 类型="未指定的DNA"	
/注释="引物"	
/生物="人工序列"	
[0003] <400> 12	
gaattcgcgg ccgctcatcc ttcaactgaa ttggcacac ttgcattac	49
<210> 13	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<222> 1..42	
<223> /mol 类型="未指定的DNA"	
/注释="引物"	
/生物="人工序列"	
<400> 13	
acgttagatc tccactcagt cctgcacatcc gttccagttt ac	42
<210> 14	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<222> 1..33	
<223> /mol 类型="未指定的DNA"	
/注释="引物"	
/生物="人工序列"	
<400> 14	
aacgttgcgg ccgcttagttt cacaaccccc agg	33
<210> 15	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>				
<221>	来源			
<222>	1..45			
<223>	/mol_类型="未指定的DNA"			
	/注释="引物"			
	/生物="人工序列"			
<400>	15			
gaattcaagc ttgccacat gttcagatg gctggcagt gctcc				45
<210>	16			
<211>	48			
<212>	DNA			
<213>	人工序列			
<220>				
<221>	来源			
<222>	1..48			
<223>	/mol_类型="未指定的DNA"			
	/注释="引物"			
	/生物="人工序列"			
<400>	16			
gaattctcta gattacctag cagaaattga tttctctatc tccgtage				48
<210>	17			
<211>	118			
<212>	PRT			
<213>	智人 (Homo sapiens)			
<400>	17			
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly				
1 5 10 15				
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr				
20 25 30				
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val				
35 40 45				
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val				
50 55 60				
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr				
65 70 75 80				
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
85 90 95				
Ala Lys Leu Ser Val Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr				
100 105 110				
Leu Val Thr Val Ser Ser				
115				
<210>	18			
<211>	119			
<212>	PRT			
<213>	智人			
<400>	18			
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly				
1 5 10 15				
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr				
20 25 30				
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val				
35 40 45				
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val				
50 55 60				
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr				
65 70 75 80				
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
85 90 95				
Ala Lys Val Ala Pro Tyr Phe Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly				
100 105 110				
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser				
115				
<210>	19			
<211>	116			
<212>	PRT			

<213> 智人

<400> 19
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 20

<211> 116
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 20
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

[0005]

<210> 21
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 21
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Ser Phe Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22

<211> 117
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 22
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20	25	30	
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Lys Val Arg Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
100	105	110	
Val Thr Val Ser Ser			
115			

〈210〉 23
〈211〉 117
〈212〉 PRT
〈213〉 智人

<400> 23									
Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly
1				5				10	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly
				20				25	
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
					35			40	
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr
					50			55	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn
					65			70	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
									85
Ala	Lys	Val	Ser	Ser	Gly	Tyr	Phe	Asp	Tyr
								100	
Val	Thr	Val	Ser	Ser					
					115				

〔0006〕

〈210〉 24
〈211〉 118
〈212〉 PRT
〈213〉 智人

<400> 24
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Ser Phe Trp Gly Ser Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

〈210〉 25
〈211〉 117
〈212〉 PRT
〈213〉 智人

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Asn Phe Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 26
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 26
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Tyr Gly Tyr Ser Ala Ser Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 27
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 27
 [0007] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Arg Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 28
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 28
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Pro Pro
 85 90 95
 Leu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 29
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 29
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 30

<211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 30
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Met Gln Ile Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

[0008]

<210> 31
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 31
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 32

<211> 109
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 32
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Phe Asn Pro Pro
 85 90 95
 Ser Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 33
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 33
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Ala Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 34
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 34
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Pro Pro
 85 90 95
 Leu Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

[0009]

<210> 35
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 35
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Phe Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 36
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 36
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Thr Thr Pro Thr Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 37
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 37
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 38
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 38
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

[0010] <210> 39
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 39
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 40
 Ser Tyr Trp Ile Gly
 1 5

<210> 41
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 41
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 42
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 42
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 43
 <211> 5
 <212> PRT

<213> 智人

<400> 43
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 45
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 46
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 46
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

[0011] <210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 47
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 48
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 50
 Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210> 51
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 51
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 52
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 52
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 53
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 53
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 [0012]

<210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 54
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 55
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 55
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 56
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 56
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 57

<211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 57
 Leu Ser Val Arg Gly Ala Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 58
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 58
 Val Ala Pro Tyr Phe Ala Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 59
 Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 60
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 60
 Asn Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr
 1 5

[0013] <210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 61
 Val Ser Phe Gly Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 62
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 62
 Val Arg Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 63
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 63
 Val Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 64
 Val Ser Phe Trp Gly Ser Leu Val Tyr
 1 5

<210> 65
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 65
 Val Asn Phe Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 66
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 66
 Ser Tyr Gly Tyr Ser Ala Ser Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 67
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 67
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 68
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 68
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

[0014]

<210> 69
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 69
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 70
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 70
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 71
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 71
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 72

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 73
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 73
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 74
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 74
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 75
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 75
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 76
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人

[0015] <400> 76
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 77
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 77
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 78
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 78
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 79
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 79
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 80
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 80
Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 81
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 82
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 82
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 83
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 83
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 84
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

[0016]

<400> 84
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 85
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 85
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 86
Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 87
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 87
Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Arg Val Thr
1 5 10

<210> 88
<211> 10
<212> PRT

<213> 智人

<400> 88
Gln Gln Tyr Gly Asn Pro Pro Leu Tyr Thr
1 5 10

<210> 89
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 89
Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Asp Phe Thr
1 5 10

<210> 90
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 90
Met Gln Ala Met Gln Ile Pro Thr
1 5

<210> 91
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 91
Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Ser Phe Thr
1 5 10

[0017] <210> 92
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 92
Gln Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Ser Ile Thr
1 5 10

<210> 93
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 93
Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Ala Phe Thr
1 5 10

<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 94
Gln Gln Tyr Gly Asn Pro Pro Leu Phe Thr
1 5 10

<210> 95
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 95
Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Phe Phe Thr
1 5 10

<210> 96
<211> 10

<212> PRT
<213> 智人

[0018]

<400> 96
Met Gln Ala Leu Thr Thr Pro Thr Tyr Thr
1 5 10

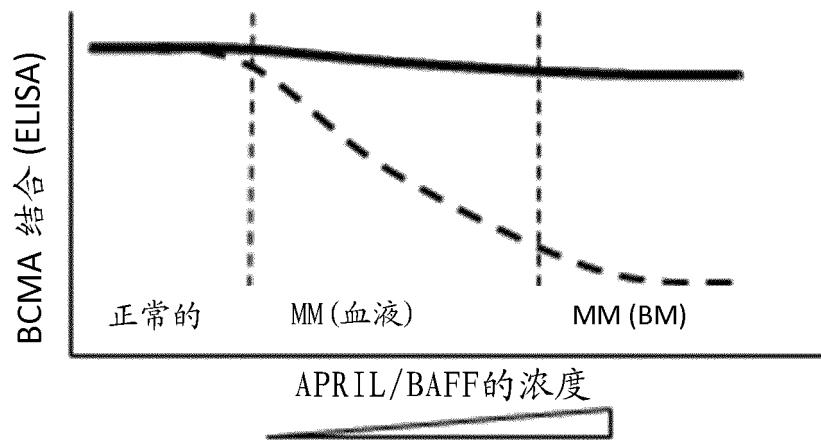


图 1

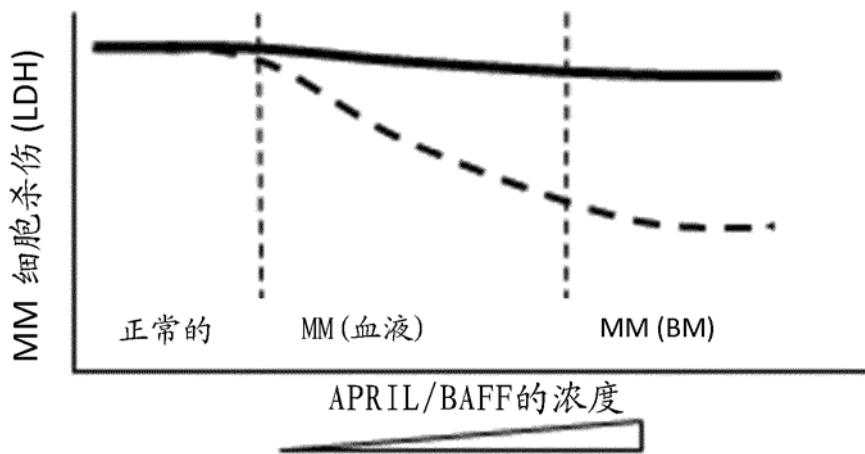
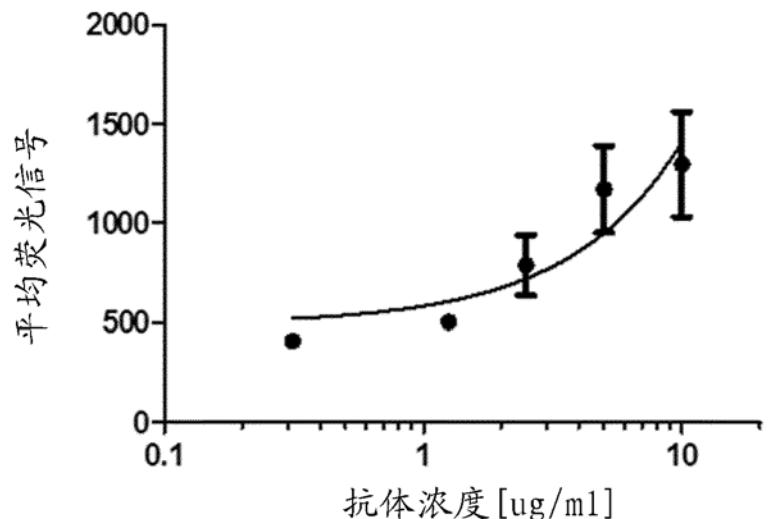


图 2

抗-BCMA抗体滴定



● 抗-BCMA抗体
#ab54834 (Abcam), 对BCMA是小鼠单克隆的

图 3

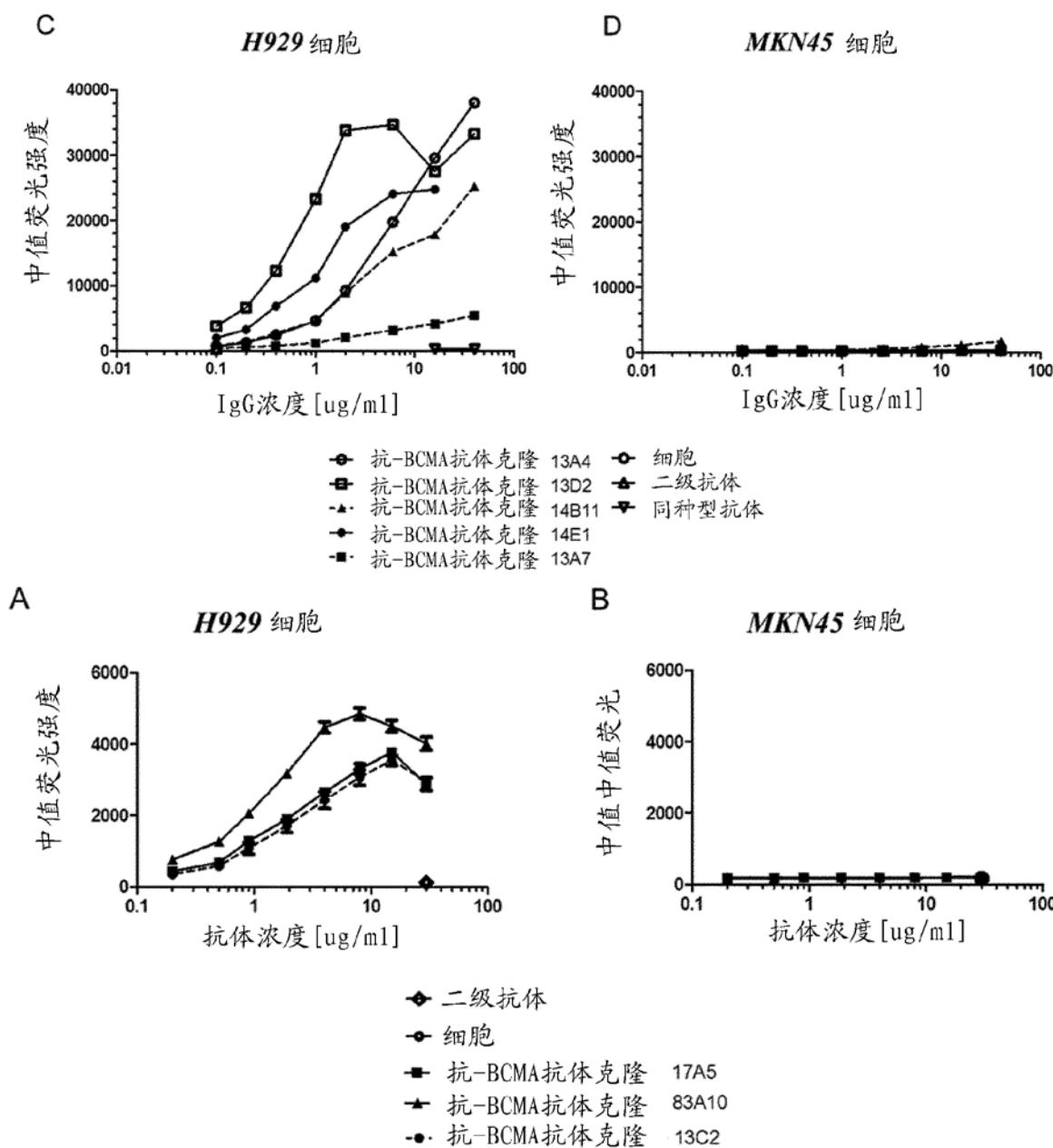


图 4

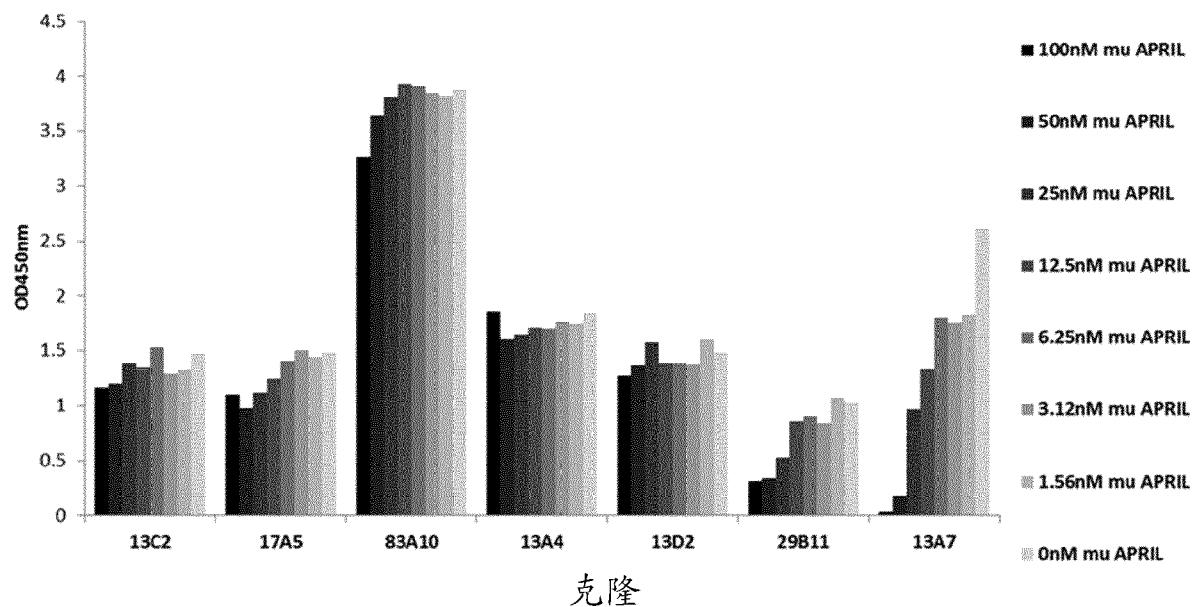


图 5

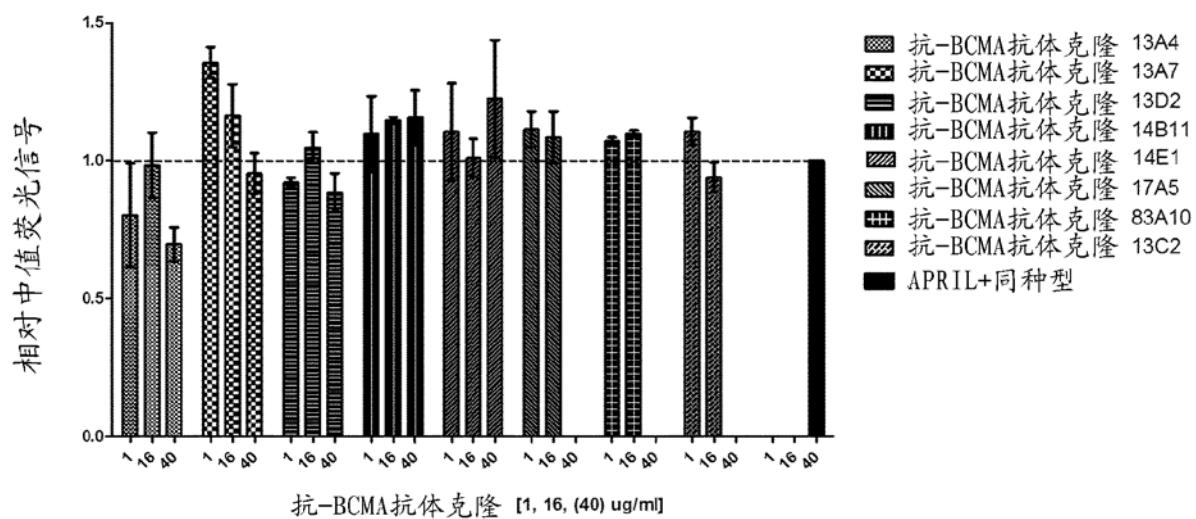


图 6

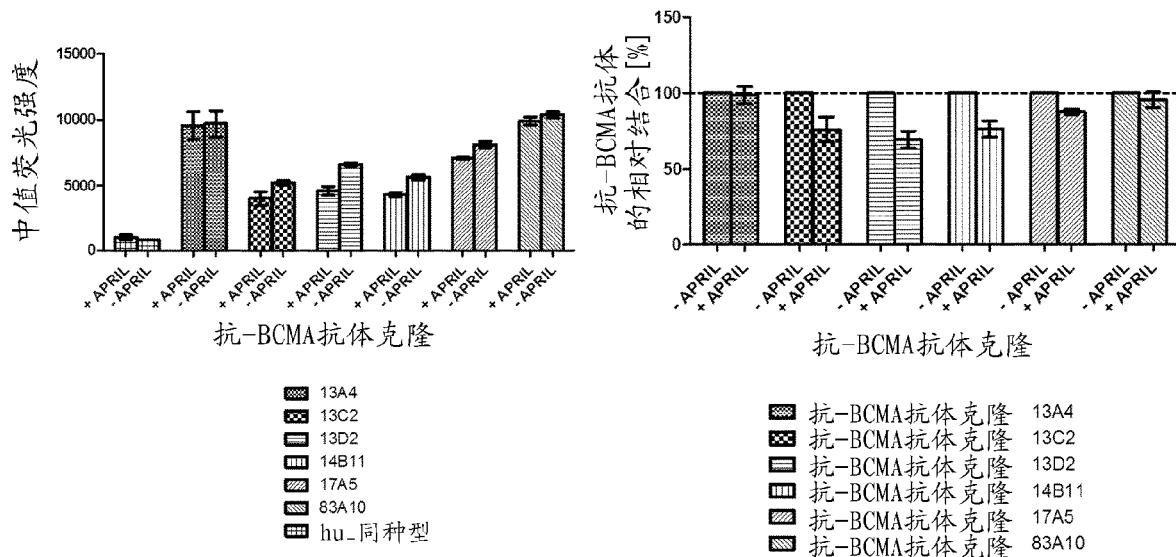


图 7

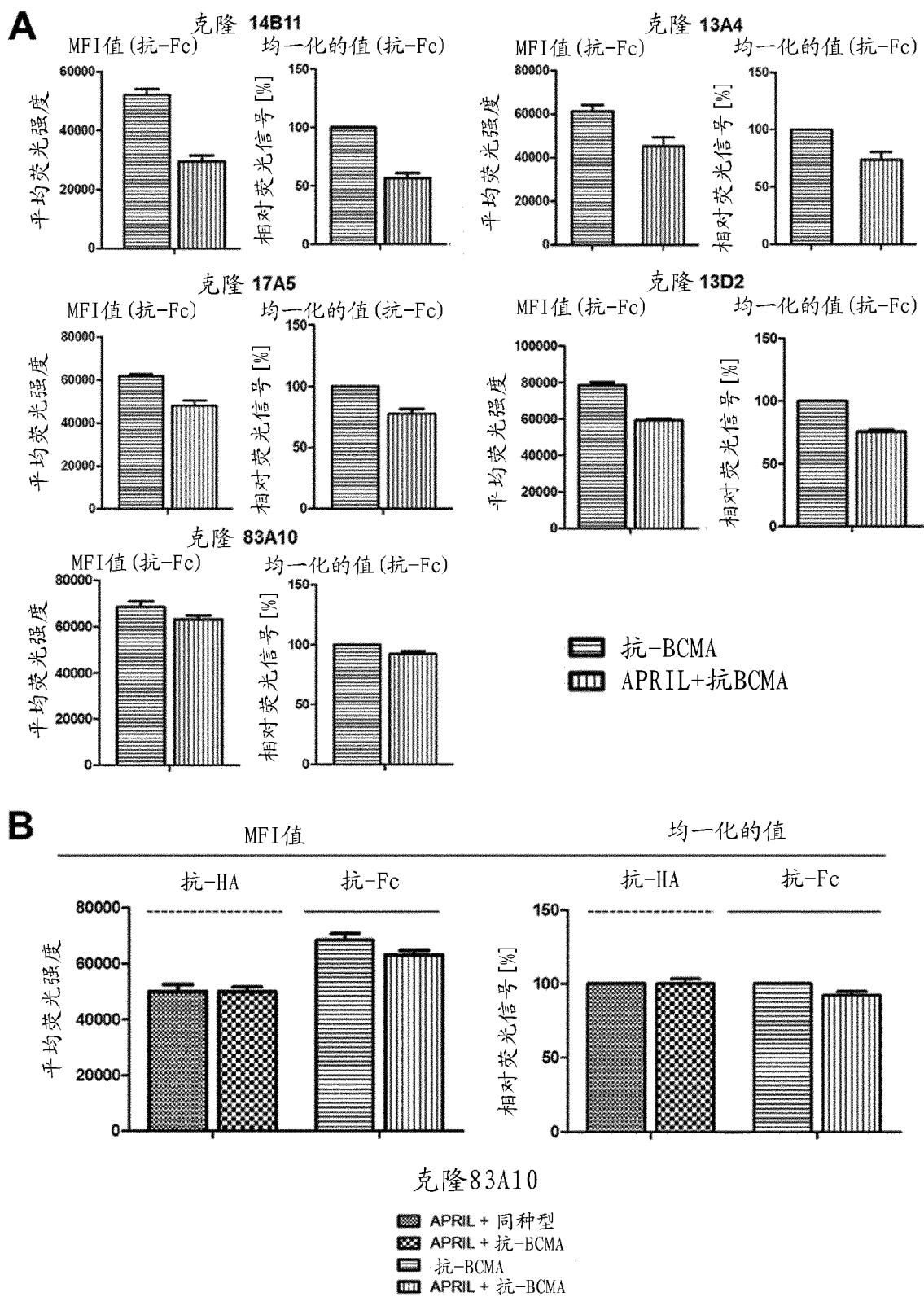


图 8