



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117279953 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 22

(21) 申请号 202280028859.6

S · 辛格 D · D · Q · 杨

(22) 申请日 2022.02.15

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(30) 优先权数据

专利代理师 初明明 彭昶

63/149921 2021.02.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2023.10.16

C07K 16/46 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C12N 15/13 (2006.01)

PCT/EP2022/053651 2022.02.15

A61K 39/395 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61P 35/00 (2006.01)

W02022/175255 EN 2022.08.25

A61P 35/02 (2006.01)

(71) 申请人 詹森药业有限公司

地址 比利时贝尔瑟

(72) 发明人 R · M · 阿塔德 S · R · 布罗德

R · 加内桑 L · 卢伊斯特罗

U · 菲利普帕 K · 皮拉里塞蒂

权利要求书8页 说明书143页

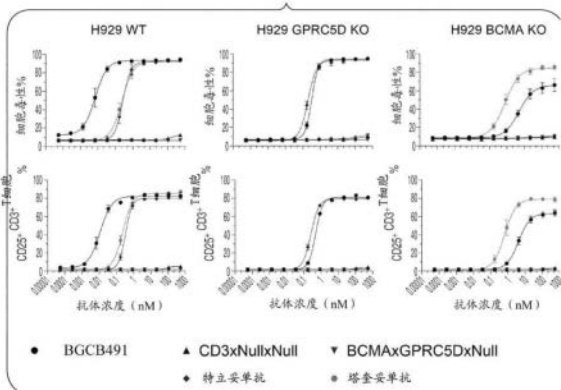
序列表73页 附图70页

(54) 发明名称

靶向BCMA、GPCR5D和CD3的三特异性抗体

(57) 摘要

本文提供了结合至BCMA、GPCR5D和CD3的多特异性抗体及其多特异性抗原结合片段。还描述了能够编码所提供的多特异性抗体或多特异性抗原结合片段的相关多核苷酸、表达所提供的多特异性抗体或多特异性抗原结合片段的细胞、以及相关载体和带可检测标记的多特异性抗体或多特异性抗原结合片段。此外,描述了制备和使用所提供的多特异性抗体和多特异性抗原结合片段的方法。本文进一步提供了结合至BCMA的抗体及其抗原结合片段。还描述了能够编码所提供的BCMA特异性抗体或抗原结合片段的相关多核苷酸、表达所提供的BCMA特异性抗体或抗原结合片段的细胞、以及相关载体和带可检测标记的BCMA特异性抗体或抗原结合片段。此外,描述了制备和使用所提供的BCMA特异性抗体和抗原结合片段的方法。



1. 一种三特异性抗体或其三特异性结合片段, 包含:

(a) 第一抗原结合臂, 所述第一抗原结合臂包含第一重链可变结构域 (VH1) 和第一轻链可变结构域 (VL1);

(b) 第二抗原结合臂, 所述第二抗原结合臂包含第二重链可变结构域 (VH2) 和第二轻链可变结构域 (VL2);

(c) 第三抗原结合臂, 所述第三抗原结合臂包含第三重链可变结构域 (VH3) 和第三轻链可变结构域 (VL3),

其中所述第一抗原结合臂结合至分化簇3 (CD3) 上的表位, 所述第二抗原结合臂结合至G蛋白偶联受体C5家族亚型D (GPC5D) 上的表位, 并且所述第三抗原结合臂结合至B细胞成熟抗原 (BCMA) 上的表位。

2. 根据权利要求1所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中第一抗原结合臂的所述VH1和VL1存在于双体抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、二硫化物稳定的Fv片段(dsFv) 或二硫化物稳定的双体抗体(ds双体抗体) 中, 任选地存在于Fab中。

3. 根据权利要求1或2所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述第二抗原结合臂的所述VH2和VL2存在于双体抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、Fv、Fd、二硫化物稳定的Fv片段(dsFv) 或二硫化物稳定的双体抗体(ds双体抗体) 中, 任选地存在于scFv中。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述第三抗原结合臂的所述VH3和VL3存在于抗体片段、双体抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、二硫化物稳定的Fv片段(dsFv) 或二硫化物稳定的双体抗体(ds双体抗体) 中, 任选地存在于scFv中。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述结合CD3的第一抗原结合臂包含SEQ ID NO:8的重链可变结构域 (VH1) 的重链互补决定区 (HCDR) 1、HCDR2和HCDR3以及SEQ ID NO:7的轻链可变结构域 (VL1) 的轻链互补决定区 (LCDR) 1、LCDR2和LCDR3。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述结合CD3的第一抗原结合臂包含含有GDSVFNNNAWS (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列的HCDR1、含有RTYYRSKWLYD (SEQ ID NO:5) 的氨基酸序列的HCDR2和含有GYSSSFYD (SEQ ID NO:6) 的氨基酸序列的HCDR3; 以及含有TGTSSNIGTYKFVS (SEQ ID NO:1) 的氨基酸序列的LCDR1、含有EVSKRPS (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列的LCDR2和含有VSYAGSGTLL (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列的LCDR3。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述结合CD3的第一抗原结合臂包含SEQ ID NO:8的VH1和SEQ ID NO:7的VL1。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述结合GPC5D的第二抗原结合臂包含SEQ ID NO:16的重链可变结构域 (VH2) 的重链互补决定区 (HCDR) 1、HCDR2和HCDR3以及SEQ ID NO:15的轻链可变结构域 (VL2) 的轻链互补决定区 (LCDR) 1、LCDR2和LCDR3。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述结合GPC5D的第二抗原结合臂包含含有GFSLTNIRMSVS (SEQ ID NO:12) 的氨基酸序列的HCDR1、含有HIFSNDKES (SEQ ID NO:13) 的氨基酸序列的HCDR2和含有MRLPYGMDV (SEQ ID

NO:14)的氨基酸序列的HCDR3;以及含有RSSQSLVHSDGNTYLS (SEQ ID NO:9)的氨基酸序列的LCDR1、含有KISNRFF (SEQ ID NO:10)的氨基酸序列的LCDR2和含有MQATQFPHT (SEQ ID NO:11)的氨基酸序列的LCDR3。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合GPCR5D的第二抗原结合臂包含SEQ ID NO:16的VH2和SEQ ID NO:15的VL2。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合BCMA的第三抗原结合臂包含SEQ ID NO:24的重链可变结构域(VH3)的重链互补决定区(HCDR)1、HCDR2和HCDR3以及SEQ ID NO:23的轻链可变结构域(VL3)的轻链互补决定区(LCDR)1、LCDR2和LCDR3。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合BCMA的第三抗原结合臂包含含有GFTFSSYAMS (SEQ ID NO:20)的氨基酸序列的HCDR1、含有AISGSGGSTY (SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的HCDR2和含有DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO:22)的氨基酸序列的HCDR3;以及含有RASQSISSSFLT (SEQ ID NO:17)的氨基酸序列的LCDR1、含有GASSRAT (SEQ ID NO:18)的氨基酸序列的LCDR2和含有QHYGSSPMYT (SEQ ID NO:19)的氨基酸序列的LCDR3。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合BCMA的第三抗原结合臂包含SEQ ID NO:24的VH3和SEQ ID NO:23的VL3。

14.根据权利要求1至4中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合CD3的第一抗原结合臂包含SEQ ID NO:8的VH1的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及SEQ ID NO:7的VL1的LCDR1、LCDR2和LCDR3;

所述结合GPCR5D的第二抗原结合臂包含SEQ ID NO:16的VH2的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及SEQ ID NO:15的VL2的LCDR1、LCDR2和LCDR3;并且

所述结合BCMA的第三抗原结合臂包含SEQ ID NO:24的VH3的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及SEQ ID NO:23的VL3的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

15.根据权利要求1至4和14中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合CD3的第一抗原结合臂包含分别为SEQ ID NO:4、5、6、1、2、3的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3;

所述结合GPCR5D的第二抗原结合臂包含分别为SEQ ID NO:12、13、14、9、10和11的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3;并且

所述结合BCMA的第三抗原结合臂包含分别为SEQ ID NO:20、21、22、17、18和19的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3。

16.根据权利要求1至4、14和15中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合CD3的第一抗原结合臂包含SEQ ID NO:8的VH1和SEQ ID NO:7的VL1;

所述结合GPCR5D的第二抗原结合臂包含SEQ ID NO:16的VH2和SEQ ID NO:15的VL2;并且

所述结合BCMA的第三抗原结合臂包含SEQ ID NO:24的VH3和SEQ ID NO:23的VL3。

17.根据权利要求1至16中任一项所述的三特异性抗体或其三特异性结合片段,其中所述第一抗原结合臂包含可结晶片段(Fc)结构域,并且所述第二抗原结合臂或所述第三抗原结合臂包含Fc结构域。

18. 根据权利要求17所述的三特异性抗体或其三特异性结合片段, 其中所述Fc结构域包含一个或多个促进所述Fc结构域的异源二聚化的突变。

19. 根据权利要求18所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述突变选自T366S、L368A、T366W和Y407V (EU编号)。

20. 根据权利要求17至19中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述Fc结构域还包含一个或多个减少Fc与Fc γ 受体结合的突变。

21. 根据权利要求20所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述Fc γ 受体是Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIIB。

22. 根据权利要求20或21所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述Fc结构域包含一个或多个选自L234A、L235A和D265S (EU编号) 的突变。

23. 根据权利要求17至22中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述Fc结构域还包含一个或多个减少Fc与蛋白A结合的突变。

24. 根据权利要求23所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述Fc结构域包含突变H435R和/或Y436F (EU编号)。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述第一抗原结合臂特异性地结合至CD3 ϵ 链的残基22-35 (QDGNEEMGGITQTP (SEQ ID NO:161))。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述第一抗原结合臂以约 1×10^{-8} M至 1×10^{-7} M的亲和力特异性地结合至CD3。

27. 根据权利要求26所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述第一抗原结合臂以约 2×10^{-8} M至 4×10^{-8} M的亲和力特异性地结合至CD3。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述第三抗原结合臂特异性地结合BCMA BCMW37链的残基17-26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO:162))。

29. 根据权利要求1至28中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述第三抗原结合臂以约 1×10^{-10} M至 1×10^{-7} M的亲和力特异性地结合至BCMA。

30. 根据权利要求29所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述第三抗原结合臂以约 2×10^{-10} M至 9×10^{-10} M的亲和力特异性地结合至BCMA。

31. 一种三特异性抗体或其三特异性结合片段, 包含结合至分化簇3 (CD3) 上的表位的第一抗原结合臂、结合至G蛋白偶联受体C5家族亚型D (GPC5D) 上的表位的第二抗原结合臂和结合至B细胞成熟抗原 (BCMA) 上的表位的第三抗原结合臂,

其中所述第一抗原结合臂包含重链 (HC1) 多肽和轻链 (LC) 多肽; 并且

其中所述三特异性抗体或其三特异性结合片段包含含有所述第二抗原结合臂和所述第三抗原结合臂的单个多肽。

32. 根据权利要求31所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述第一抗原结合臂的所述HC1包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

33. 根据权利要求32或33所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述第一抗原结合臂的所述LC包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

34. 根据权利要求31至33中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中包含所述第二抗原结合臂和所述第三抗原结合臂的所述多肽包含SEQ ID NO:28的氨基酸序

列。

35. 根据权利要求31所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HC1和含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的LC, 并且包含所述第二抗原结合臂和所述第三抗原结合臂的所述多肽包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

36. 一种三特异性抗体或其三特异性结合片段, 包含结合至分化簇3 (CD3) 上的表位的第一抗原结合臂、结合至G蛋白偶联受体C5家族亚型D (GPC5D) 上的表位的第二抗原结合臂和结合至B细胞成熟抗原 (BCMA) 上的表位的第三抗原结合臂,

其中所述第一抗原结合臂包含重链 (HC1) 多肽和轻链 (LC) 多肽, 其中所述重链 (HC1) 多肽还包含所述第二抗原结合臂,

其中所述三特异性抗体或其所述三特异性结合片段还包含含有所述第三抗原结合臂的单个多肽。

37. 根据权利要求36所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述第一抗原结合臂的所述HC1包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

38. 根据权利要求36或37所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述第一抗原结合臂的所述LC包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

39. 根据权利要求36至38中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中包含所述第三抗原结合臂的所述单个多肽包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列。

40. 根据权利要求36所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HC1和含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的LC, 并且包含所述第三抗原结合臂的所述单个多肽包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列。

41. 根据权利要求1至40中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 (人) 同种型。

42. 根据权利要求1至41中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段是 (人) IgG1同种型。

43. 一种合成多核苷酸, 编码根据权利要求1至42中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段。

44. 一种药物组合物, 包含根据权利要求1至42中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段以及药学上可接受的载体。

45. 根据权利要求44所述的药物组合物, 其中所述药物组合物还包含第二治疗剂。

46. 根据权利要求45所述的药物组合物, 其中所述第二治疗剂包括抗CD38剂、免疫调节酰亚胺药物 (IMiD)、免疫检查点抑制剂、免疫共刺激剂、 γ 分泌酶抑制剂、T细胞增强剂或它们的任何组合。

47. 一种细胞, 表达根据权利要求1至42中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段。

48. 根据权利要求47所述的细胞, 其中所述细胞是杂交瘤。

49. 根据权利要求47或48所述的细胞, 其中所述三特异性抗体是重组产生的。

50. 一种用于治疗有需要的受试者的癌症的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至42中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段或根据

权利要求44至46中任一项所述的药物组合物。

51. 根据权利要求50所述的方法, 其中施用所述三特异性抗体或三特异性结合片段或所述药物组合物足以治疗所述癌症的时间。

52. 一种用于抑制癌细胞的生长或增殖的方法, 所述方法包括向所述细胞施用有效量的根据权利要求1至42中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段或根据权利要求44至46中任一项所述的药物组合物, 其中所述有效量足以抑制所述癌细胞的生长或增殖。

53. 根据权利要求52所述的方法, 其中所述癌细胞在受试者中, 并且将所述三特异性抗体或三特异性结合片段或所述药物组合物施用于所述受试者。

54. 根据权利要求52所述的方法, 其中所述施用是离体进行的。

55. 一种在有需要的受试者中将T细胞重定向至BCMA表达型癌细胞和/或GPCR5D表达型癌细胞的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至42中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段或根据权利要求44至46中任一项所述的药物组合物。

56. 根据权利要求55所述的方法, 其中所述治疗有效量足以引导所述T细胞对所述癌细胞的响应。

57. 根据权利要求50至56中任一项所述的方法, 其中所述癌症是血液学癌症。

58. 根据权利要求57所述的方法, 其中所述血液学癌症是BCMA表达型B细胞癌症和/或GPCR5D表达型B细胞癌症。

59. 根据权利要求58所述的方法, 其中所述BCMA表达型B细胞癌症和/或GPCR5D表达型B细胞癌症是多发性骨髓瘤。

60. 根据权利要求58或59所述的方法, 其中所述BCMA表达型B细胞癌症和/或GPCR5D表达型B细胞癌症是郁积型多发性骨髓瘤(SMM)。

61. 根据权利要求50至60中任一项所述的方法, 其中所述癌症是复发性、难治性或恶性癌症或它们的任何组合。

62. 根据权利要求50至51、53和55至61中任一项所述的方法, 其中所述受试者已接受先前的治疗。

63. 根据权利要求62所述的方法, 其中所述先前的治疗包括蛋白酶体抑制剂、免疫调节药物、CD38抗体、双特异性药剂、CAR-T疗法或它们的任何组合。

64. 根据权利要求50至63中任一项所述的方法, 还包括施用第二治疗剂。

65. 根据权利要求64所述的方法, 其中所述第二治疗剂是化学治疗剂或靶向抗癌疗法。

66. 根据权利要求65所述的方法, 其中所述化学治疗剂是阿糖胞苷、蒽环霉素、组胺二盐酸盐或白介素2(IL-2)。

67. 根据权利要求64所述的方法, 其中所述第二治疗剂是抗CD38剂、免疫调节酰亚胺药物(IMiD)、免疫检查点抑制剂、免疫共刺激剂、 γ 分泌酶抑制剂、T细胞增强剂或它们的任何组合。

68. 根据权利要求50至51、53和55至67中任一项所述的方法, 其中将所述三特异性抗体或三特异性结合片段或所述药物组合物静脉内、肌内、腹膜内和/或皮下施用于所述受试者。

69. 根据权利要求50至51、53和55至68中任一项所述的方法, 其中将所述三特异性抗体

或三特异性结合片段或所述药物组合物皮下施用于所述受试者。

70. 一种用于产生根据权利要求1至42中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段的方法, 其中所述方法包括培养根据权利要求47至49中任一项所述的细胞以及分离所述三特异性抗体或三特异性结合片段。

71. 一种试剂盒, 包括 (i) 根据权利要求1至42中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段和/或根据权利要求43所述的多核苷酸, 以及 (ii) 其包装。

72. 一种结合至BCMA的抗体或其抗原结合片段, 包含: 具有GFTFSSYAMS (SEQ ID NO:20) 的氨基酸序列的重链互补决定区1 (CDR1)、具有AISGSGGSTY (SEQ ID NO:21) 的氨基酸序列的重链CDR2和具有DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO:22) 的氨基酸序列的重链CDR3。

73. 根据权利要求72所述的抗体或抗原结合片段, 还包含: 具有RASQSISSSFLT (SEQ ID NO:17) 的氨基酸序列的轻链互补决定区1 (CDR1)、具有GASSRAT (SEQ ID NO:18) 的氨基酸序列的轻链CDR2和具有QHYGSSPMYT (SEQ ID NO:19) 的氨基酸序列的轻链CDR3。

74. 根据权利要求72或73所述的抗体或抗原结合片段, 包含具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链可变结构域 (VH)。

75. 根据权利要求72至74中任一项所述的抗体或抗原结合片段, 包含具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的轻链可变结构域 (VL)。

76. 根据权利要求72至75中任一项所述的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段特异性地结合BCMABCMW37链的残基17-26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO:162))。

77. 根据权利要求72至76中任一项所述的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段以约 1×10^{-10} M至 1×10^{-7} M的亲和力特异性地结合至BCMA。

78. 根据权利要求77所述的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段以约 2×10^{-10} M至 9×10^{-10} M的亲和力特异性地结合至BCMA。

79. 根据权利要求72至78中任一项所述的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段是人抗体或抗原结合片段。

80. 根据权利要求72至79中任一项所述的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段是重组的。

81. 根据权利要求72至80中任一项所述的抗原结合片段, 其中所述抗原结合片段是Fab片段、Fab2片段或单链抗体。

82. 根据权利要求72至81中任一项所述的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。

83. 根据权利要求72至82中任一项所述的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段是IgG1或IgG4同种型。

84. 一种药物组合物, 包含根据权利要求72至83中任一项所述的抗体或抗原结合片段以及药学上可接受的载体。

85. 根据权利要求84所述的药物组合物, 其中所述药物组合物还包含第二治疗剂。

86. 根据权利要求85所述的药物组合物, 其中所述第二治疗剂包括抗CD38剂、免疫调节酰亚胺药物 (IMiD)、免疫检查点抑制剂、免疫共刺激剂、 γ 分泌酶抑制剂、T细胞增强剂或它们的任何组合。

87. 一种细胞, 表达根据权利要求72至83中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

88. 根据权利要求87所述的细胞,其中所述细胞是杂交瘤。
89. 根据权利要求87所述的细胞,其中所述抗体是重组产生的。
90. 一种用于治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求72至83中任一项所述的抗体或抗原结合片段或根据权利要求84至86中任一项所述的药物组合物。
91. 根据权利要求90所述的方法,其中施用所述抗体或抗原结合片段或所述药物组合物足以治疗所述癌症的时间。
92. 一种用于抑制癌细胞的生长或增殖的方法,所述方法包括向所述细胞施用有效量的根据权利要求72至83中任一项所述的抗体或抗原结合片段或根据权利要求84至86中任一项所述的药物组合物,其中所述有效量足以抑制所述癌细胞的生长或增殖。
93. 根据权利要求92所述的方法,其中所述癌细胞在受试者中,并且将所述抗体或抗原结合片段或所述药物组合物施用于所述受试者。
94. 根据权利要求92所述的方法,其中所述施用是离体进行的。
95. 根据权利要求90至94中任一项所述的方法,其中所述癌症是血液学癌症。
96. 根据权利要求95所述的方法,其中所述血液学癌症是BCMA表达型B细胞癌症。
97. 根据权利要求96所述的方法,其中所述BCMA表达型B细胞癌症是多发性骨髓瘤。
98. 根据权利要求97所述的方法,其中所述BCMA表达型B细胞癌症是郁积型多发性骨髓瘤(SMM)。
99. 根据权利要求90至98中任一项所述的方法,其中所述癌症是复发性、难治性或恶性癌症或它们的任何组合。
100. 根据权利要求90至91、93和95至99中任一项所述的方法,其中所述受试者已接受先前的治疗。
101. 根据权利要求100所述的方法,其中所述先前的治疗包括蛋白酶体抑制剂、免疫调节药物、CD38抗体、双特异性药剂、CAR-T疗法或它们的组合。
102. 根据权利要求90至101中任一项所述的方法,还包括施用第二治疗剂。
103. 根据权利要求102所述的方法,其中所述第二治疗剂是化学治疗剂或靶向抗癌疗法。
104. 根据权利要求103所述的方法,其中所述化学治疗剂是阿糖胞苷、蒽环霉素、组胺二盐酸盐或白介素2(IL-2)。
105. 根据权利要求102所述的方法,其中所述第二治疗剂是抗CD38剂、免疫调节酰亚胺药物(IMiD)、免疫检查点抑制剂、免疫共刺激剂、 γ 分泌酶抑制剂、T细胞增强剂或它们的任何组合。
106. 根据权利要求90至91、93和95至105中任一项所述的方法,其中将所述抗体或抗原结合片段或所述药物组合物静脉内、肌内、腹膜内和/或皮下施用于所述受试者。
107. 根据权利要求90至91、93和95至106中任一项所述的方法,其中将所述抗体或抗原结合片段或所述药物组合物皮下施用于所述受试者。
108. 一种用于产生根据权利要求72至83中任一项所述的抗体或抗原结合片段的方法,其中所述方法包括培养根据权利要求87至89中任一项所述的细胞以及分离所述抗体或抗原结合片段。

109. 一种合成多核苷酸, 编码根据权利要求72至83中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

110. 一种试剂盒, 包括 (i) 根据权利要求72至83中任一项所述的抗体或抗原结合片段和/或根据权利要求109所述的多核苷酸, 以及 (ii) 其包装。

靶向BCMA、GPRC5D和CD3的三特异性抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求提交于2021年2月16日的美国临时申请序列号63/149,921的权益。上述申请的全部内容全文以引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本文提供的公开内容涉及结合B细胞成熟抗原 (BCMA)、G蛋白偶联受体C5家族亚型D (GPRC5D) 和簇决定簇3 (CD3) 的多特异性抗体、结合BCMA的单克隆抗体以及制备和使用所述抗体的方法。

背景技术

[0004] 多发性骨髓瘤 (MM) 是第二常见的血液恶性肿瘤,并且占有癌症死亡的2%。MM是一种异质性疾病,并且主要由染色体易位引起,尤其是t (11;14), t (4;14), t (8;14), del (13), del (17) (Drach等人, (1998) Blood 92 (3):802-809;Gertz等人, (2005) Blood 106 (8):2837-2840;Facon等人, (2001) Blood 97 (6):1566-1571)。由于骨髓浸润、骨破坏、肾衰竭、免疫缺陷以及癌症诊断的心理负担,MM影响的患者可能经历各种疾病相关症状。截至2006年,MM的5年相对存活率约为34%,强调MM是目前尚无治愈选择的难治性疾病。

[0005] B细胞成熟抗原,也称为BCMA、CD269、TNFRSF17 (UniProt Q02223),是优先在分化的浆细胞中表达的肿瘤坏死受体超家族的成员[Laabi等人, (1992) EMBO J 11 (11):3897-3904;Madry等人, (1998) Int Immunol 10 (11):1693-1702]。BCMA是一种非糖基化I型跨膜蛋白,其参与B细胞成熟、生长和存活。BCMA是TNF超家族的两种配体的受体:APRIL (增殖诱导配体,CD256, TNFSF13), BCMA的高亲和力配体,以及B细胞活化因子BAFF (THANK, BlyS, B淋巴细胞刺激因子, TALL-1和zTNF4), BCMA的低亲和力配体。APRIL和BAFF显示出结构相似性以及重叠但不同的受体结合特异性。负调控因子TACI也结合至BAFF和APRIL两者。APRIL和BAFF与BCMA和/或TACI的配位结合激活转录因子NF- κ B并增加促存活Bcl-2家族成员 (例如, Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、Mcl-1、A1) 的表达并下调促凋亡因子 (例如, Bid、Bad、Bik、Bim等) 的表达,从而抑制细胞凋亡并促进存活。该组合作用促进B细胞分化、增殖、存活和抗体产生 (如在Rickert RC等人, Immunol Rev, (2011) 244 (1):115-133中所综述的)。根据这一发现, BCMA还支持恶性人B细胞 (包括多发性骨髓瘤 (MM) 细胞) 的生长和存活。Novak等人发现MM细胞系和新鲜分离的MM细胞在其细胞表面上表达BCMA和TACI蛋白,并且在其细胞表面上具有BAFF-R蛋白的可变表达 (Novak等人, (2004) Blood 103 (2):689-694)。

[0006] 在W02002066516和W02010104949中提到了使用抗-BCMA抗体治疗淋巴瘤和多发性骨髓瘤。例如在如下文献中描述了针对BCMA的抗体:Gras M-P.等人, Int Immunol. 7 (1995) 1093-1106;W0200124811;以及W0200124812。然而,尽管事实是BCMA、BAFF-R和TACI (即属于TNF受体超家族的B细胞受体) 及其配体BAFF和APRIL已经受用于对抗癌症的疗法,但还需要治疗此类医疗病状的其他选择。

[0007] G蛋白偶联受体C5家族亚型D (GPRC5D) 是2001年首次鉴定出的孤儿非典C类GPCR (

Bräuner-Osborne等人BiochimBiophysActa.1518(3):237-248,2001)。GPCR5D及其他5族GPCR通常具有C类受体的较短氨基端结构域,并因此预测在构象上类似于A类受体。在这点上,它们是独特的,与C类GPCR具有序列同源性,并且预测结构拓扑学与A类受体相当。GPCR5D活化的功能结果尚未描述,并且配体仍然未知。其基因具有三个外显子并且位于人的染色体12p13.3上。GPCR5D受体在不同物种间高度保守并且与食蟹猴GPCR5D共享92%的同一性。

[0008] 在W02016090329、W02018017786、W02018147245和W02019154890中提到了抗GPCR5D抗体用于治疗多发性骨髓瘤的用途。然而,尽管GPCR5D是对抗癌症的疗法,但仍需要治疗此类医学病状的其他选择。

[0009] GPCR5DmRNA主要表达于MM患者的所有恶性浆细胞中(Atamaniuk JA等人Eur J Clin Invest 42(9) 953-960;2012;Frigyesi-blood和Cohen等人,Hematology 18(6):348-35;2013)。GPCR5D的表达在患者间有差异并且与浆细胞负荷和遗传畸变如Rb-1缺失密切相关(Atamaniuk JA等人Eur J Clin Invest 42(9) 953-960;2012)。

[0010] 克隆抗性是复发难治性骨髓瘤中的常见机制。靶向多于一种骨髓瘤肿瘤抗原并结合T细胞可能导致有效杀死恶性浆细胞并使微小残留病(MRD)呈阴性。双重BCMA和GPCR5D靶向增强抗体亲合力和效力,在异质性细胞群存在的情况下最大限度地肿瘤根除,防止肿瘤抗原逃逸(例如,捕获不单独表达足够的BCMA或GPCR5D的MM细胞),改善肿瘤功效并且可以减轻细胞因子释放综合征(CRS)的可能性。因此,需要靶向BCMA和GPCR5D两者的治疗性抗体用于治疗多发性骨髓瘤和/或相关医学病状。

发明内容

[0011] 在一个方面,本文提供了结合或特异性地结合至BCMA、GPCR5D和CD3的多特异性抗体及其多特异性抗原结合片段。在一些实施方案中,本文提供了结合或特异性地结合至BCMA、GPCR5D和CD3的三特异性抗体及其三特异性抗原结合片段。还描述了能够编码所提供的BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体或多特异性抗原结合片段的相关多核苷酸、表达所提供的抗体或多特异性抗原结合片段的细胞、以及相关载体和带可检测标记的多特异性抗体或多特异性抗原结合片段。此外,还描述了使用所提供的多特异性抗体的方法。例如,BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体和多特异性抗原结合片段可用于治疗癌症(例如,BCMA和/或GPCR5D表达型癌症);BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体可用于诊断或监测BCMA表达型癌症和/或GPCR5D表达型癌症的进展、消退或稳定性;以用于确定癌症患者是否应该接受治疗;或用于确定受试者是否患有BCMA表达型癌症和/或GPCR5D表达型癌症,并因此可适于用BCMA和/或GPCR5D特异性抗癌治疗剂诸如本文所述的BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体治疗。

[0012] BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体

[0013] 本文描述了结合BCMA、GPCR5D和CD3的分离多特异性抗体(“BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体”)及其多特异性抗原结合片段。

[0014] 在优选的实施方案中,BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体或抗原结合片段是三特异性抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,分离的BCMA×GPCR5D×CD3三特异性抗体或其三特异性结合片段包含:(a)第一抗原结合臂,所述第一抗原结合臂包含第一重链可变结

构域 (VH1) 和第一轻链可变结构域 (VL1); (b) 第二抗原结合臂, 所述第二抗原结合臂包含第二重链可变结构域 (VH2) 和第二轻链可变结构域 (VL2); 以及 (c) 第三抗原结合臂, 所述第三抗原结合臂包含第三重链可变结构域 (VH3) 和第三轻链可变结构域 (VL3)。在一些实施方案中, 第一抗原结合臂结合至 CD3 上的表位, 第二抗原结合臂结合至 GPRC5D 上的表位, 并且第三抗原结合臂结合至 BCMA 上的表位。

[0015] 在一些实施方案中, 三特异性抗体或其三特异性结合片段的第一抗原结合臂包含含有 VH1 的第一重链部分 (HC1) 和含有 VL1 的轻链部分。VH1 和 VL1 形成结合第一抗原的第一抗原结合结构域。三特异性抗体或其三特异性结合片段的第二抗原结合臂包含含有 VH2 的第二重链部分 (HC2)。HC2 的 VH2 形成结合第二抗原的第二抗原结合结构域。HC1 或 HC2 与包含 VH3 的第三抗原结合臂进一步偶联, 该 VH3 形成结合第三抗原的第三抗原结合结构域。HC1 和 HC2 各自任选地包含可结晶片段 (Fc) 结构域, 其中 Fc 结构域包含恒定重链区 2 (CH2) 和 CH3。在一些实施方案中, 第一抗原是分化簇 3 (CD3), 并且第二抗原是 B 细胞成熟抗原 (BCMA), 并且第三抗原是 G 蛋白偶联受体 C5 家族亚型 D (GPRC5D)。在一些实施方案中, 第一抗原是分化簇 3 (CD3), 并且第二抗原是 G 蛋白偶联受体 C5 家族亚型 D (GPRC5D), 并且第三抗原是 B 细胞成熟抗原 (BCMA)。BCMA × GPRC5D × CD3 三特异性抗体或其三特异性结合片段的一些方面在具体实施方式和实施例部分中进一步描述。

[0016] 在一些实施方案中, BCMA 结合臂结合人 BCMA, 但不结合食蟹猴 BCMA。在一些实施方案中, BCMA 结合臂与包含一个或多个来自 BCMA 细胞外结构域 (ECD) 的残基的表位结合。在一些实施方案中, BCMA × GPRC5D × CD3 多特异性抗体的 BCMA 结合臂 (或“BCMA 特异性臂”) 来源于本文所述的 BCMA 抗体 (例如, 来源于具有表 1 所列的 CDR 序列的抗体)。

[0017] 在一些实施方案中, 多特异性抗体的 GPRC5D 特异性臂结合人 GPRC5D, 但不结合食蟹猴 GPRC5D。在一些实施方案中, BCMA × GPRC5D × CD3 多特异性抗体或抗原结合片段的 GPRC5D 特异性臂结合人 GPRC5D 的细胞外结构域。在一些实施方案中, BCMA × GPRC5D × CD3 多特异性抗体的 GPRC5D 结合臂 (或“GPRC5D 特异性臂”) 来源于本文所述的 GPRC5D 抗体 (例如, 来源于具有表 2 所列的 CDR 序列的抗体)。

[0018] 通过 TCR/CD3 复合体将 T 淋巴细胞重定向至表达 BCMA 和/或 GPRC5D 的 MM 细胞代表了一种有吸引力的替代方法。T 淋巴细胞的 TCR/CD3 复合体由在细胞表面共表达的 TCR α/β 或 TCR γ/δ 异二聚体与 CD3 标记的 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 和 η 的不变亚基组成。在一些实施方案中, 本文所述的多特异性抗体或多特异性抗原结合片段结合 CD3 ϵ 。在一些实施方案中, BCMA × GPRC5D × CD3 多特异性抗体的 CD3 结合臂 (或“CD3 特异性臂”) 来源于单克隆抗体 CD3B376。在一些实施方案中, BCMA × GPRC5D × CD3 多特异性抗体的 CD3 结合臂 (或“CD3 特异性臂”) 来源于单克隆抗体 SP34, 一种小鼠 IgG3/ λ 同种型。(K.R. Abhinandan 和 A.C. Martin, 2008 年, Mol. Immunol. 45, 3832-3839)。在一些实施方案中, BCMA × GPRC5D × CD3 多特异性抗体的 CD3 结合臂包含表 3 中描述的重链 CDR 和/或轻链 CDR, 或选自表 3 的任何一个 VH 结构域和/或任何一个 VL 结构域。

[0019] 在一些实施方案中, BCMA × GPRC5D × CD3 多特异性抗体或抗原结合片段的 BCMA 特异性臂、GPRC5D 特异性臂和/或 CD3 特异性臂是 IgG 或其衍生物。人 IgG 类分为四种同种型: IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。它们在 Fc 区的氨基酸序列中共享大于 95% 的同源性, 但显示的主要差别在于铰链区的氨基酸组成和结构。Fc 区介导效应子功能, 诸如抗体依赖性细胞的细

胞毒性 (ADCC) 和补体依赖性细胞毒性 (CDC)。在ADCC中,抗体的Fc区结合至免疫效应细胞(诸如自然杀伤细胞和巨噬细胞)的表面的Fc受体 (Fc γ R),导致靶细胞的吞噬作用或裂解。在CDC中,抗体通过触发细胞表面的补体级联反应来杀伤靶细胞。

[0020] 对于治疗性抗体的许多应用,Fc介导的效应子功能不是作用机制的一部分。这些Fc介导的效应子功能可能是有害的,并可能通过引起机制外毒性而带来安全风险。修饰效应子功能可通过工程化Fc区以减弱其与Fc γ R或补体因子的结合来实现。IgG与活化性Fc γ R (Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIa和Fc γ RIIIb) 和抑制性Fc γ R (Fc γ RIIb) 或补体 (C1q) 的第一组分的结合取决于位于铰链区和CH2结构域中的残基。已经在IgG1、IgG2和IgG4中引入突变以降低或沉默Fc功能。

[0021] 在一个实施方案中,抗体包含具有以下特性中的一者或多者的Fc区:(a) 与亲本Fc相比效应子功能降低;(b) 对Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIb和/或Fc γ RIIIa的亲合力降低,(c) 对Fc γ RI的亲合力降低,(d) 对Fc γ RIIa的亲合力降低,(e) 对Fc γ RIIb的亲合力降低,(f) 对Fc γ RIIIb的亲合力降低或(g) 对Fc γ RIIIa的亲合力降低。

[0022] 在一些实施方案中,衍生多特异性抗体的CD3特异性臂的CD3特异性抗体或抗原结合片段是IgG或其衍生物。在一些实施方案中,衍生多特异性抗体的CD3特异性臂的CD3特异性抗体或抗原结合片段是IgG1或其衍生物。在一些实施方案中,例如,衍生CD3结合臂的CD3特异性IgG1抗体的Fc区在其Fc区中包含L234A、L235A和D265S置换。在一些实施方案中,衍生多特异性抗体的CD3特异性臂的CD3特异性抗体或抗原结合片段是IgG4或其衍生物。在一些实施方案中,例如,衍生CD3结合臂的CD3特异性IgG4抗体的Fc区在其Fc区中包含S228P、L234A、L235A、F405L和R409K置换。在一些实施方案中,衍生多特异性抗体的CD3特异性臂的CD3特异性抗体或抗原结合片段结合原代人T细胞和/或原代食蟹猴T细胞上的CD3 ϵ 。在一些实施方案中,衍生多特异性抗体的CD3特异性臂的CD3特异性抗体或抗原结合片段激活原代人CD4+T细胞和/或原代食蟹猴CD4+T细胞。

[0023] 除所述BCMA $\times$ GPRC5D $\times$ CD3多特异性抗体之外,还提供了能够编码所述BCMA $\times$ GPRC5D $\times$ CD3多特异性抗体的多核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了编码BCMA $\times$ GPRC5D $\times$ CD3三特异性抗体或三特异性结合片段的每个抗原结合臂的重链可变结构域的一个或多个CDR和/或轻链可变结构域的一个或多个CDR的分离的合成多核苷酸。在一些实施方案中,提供了编码BCMA $\times$ GPRC5D $\times$ CD3三特异性抗体或三特异性结合片段的一个或多个重链可变结构域和/或一个或多个轻链可变结构域的分离的合成多核苷酸。在一些实施方案中,提供了编码BCMA $\times$ GPRC5D $\times$ CD3三特异性抗体或三特异性结合片段的第一抗原结合臂、第二抗原结合臂和/或第三抗原结合臂的一条或多条多肽链的分离的合成多核苷酸。还提供了包含所述多核苷酸的载体,以及表达本文提供的BCMA $\times$ GPRC5D $\times$ CD3多特异性抗体的细胞。在另一个实施方案中,提供了表达多特异性抗体或多特异性结合片段的分离细胞。还描述了能够表达所公开的载体的细胞。这些细胞可为哺乳动物细胞(诸如293细胞、293F细胞、CHO细胞)、昆虫细胞(诸如Sf7细胞)、酵母细胞、植物细胞或细菌细胞(诸如大肠杆菌)。所述抗体也可由杂交瘤细胞产生。在一些实施方案中,提供了用于通过培养细胞产生BCMA $\times$ GPRC5D $\times$ CD3三特异性抗体或三特异性结合片段的方法。

[0024] 本文还提供了包含BCMA $\times$ GPRC5D $\times$ CD3多特异性抗体或抗原结合片段的药物组合物以及药学上可接受的载体。

[0025] 使用BCMA×GPC5D×CD3多特异性抗体的方法

[0026] 还公开了使用所述BCMA×GPC5D×CD3多特异性抗体及其多特异性抗原结合片段的方法。例如,BCMA×GPC5D×CD3多特异性抗体及其多特异性抗原结合片段可用于治疗有需要的受试者的GPC5D表达型癌症和/或BCMA表达型癌症。在一些实施方案中,GPC5D表达型癌症和/或BCMA表达型癌症是淋巴瘤,诸如多发性骨髓瘤,包括郁积型多发性骨髓瘤(SMM)。在一些实施方案中,GPC5D表达型癌症和/或BCMA表达型癌症是复发性或难治性形式的淋巴瘤,诸如复发性或难治性形式的多发性骨髓瘤。

[0027] 所述治疗有需要的受试者的GPC5D表达型癌症和/或BCMA表达型癌症的方法包括向受试者施用治疗有效量的所述BCMA×GPC5D×CD3多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段。在一些实施方案中,受治疗者是哺乳动物,优选是人。在优选的实施方案中,提供了通过向有需要的患者施用治疗有效量的BCMA×GPC5D×CD3三特异性抗体或三特异性抗原结合片段足以治疗癌症的时间,从而治疗患有癌症的受试者的方法。

[0028] 本文还提供了用于抑制癌细胞的生长或增殖的方法,该方法通过施用治疗有效量的BCMA×GPC5D×CD3三特异性抗体或三特异性结合片段以抑制癌细胞的生长或增殖。

[0029] 本文还提供了将T细胞重定向至GPC5D表达型癌细胞和/或BCMA表达型癌细胞的方法,该方法通过施用治疗有效量的BCMA×GPC5D×CD3三特异性抗体或三特异性结合片段而将T细胞重定向至癌症。

[0030] 技术人员将理解,使用所述BCMA×GPC5D×CD3多特异性抗体及其多特异性抗原结合片段的方法可以以医用形式(例如以用于治疗如本文所定义的疾病,特别是癌症的BCMA×GPC5D×CD3多特异性抗体和多特异性抗原结合片段的形式)指定。技术人员还将理解,使用所述BCMA×GPC5D×CD3多特异性抗体及其多特异性抗原结合片段的方法可以以所谓的Swiss形式(例如以BCMA×GPC5D×CD3多特异性抗体和多特异性抗原结合片段用于制造用于治疗如本文定义的疾病,特别是癌症的药物的用途的形式)指定。这适用于整个公开内容。

[0031] BCMA×GPC5D×CD3特异性抗体试剂盒

[0032] 本文描述了包括所公开的BCMA×GPC5D×CD3多特异性抗体的试剂盒。所述试剂盒可用于实施使用本文提供的BCMA×GPC5D×CD3多特异性抗体的方法或本领域技术人员已知的其他方法。在一些实施方案中,所述试剂盒可包括本文所述的抗体和用于治疗GPC5D表达型癌症和/或BCMA表达型癌症的试剂。因此,所述试剂盒可包括本文所述的多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段中的一种或多种、以及用于在不使用时盛装抗体或片段的容器和/或抗体或片段的使用说明、附连于固体支持物的抗体或片段和/或如本文所述的抗体或片段的可检测标记形式。

[0033] BCMA特异性抗体

[0034] 本文还提供了结合至BCMA的抗体及其抗原结合片段。本文还描述了能够编码所提供的BCMA特异性抗体和抗原结合片段的相关多核苷酸、表达所提供的抗体和抗原结合片段的细胞以及相关载体和可检测标记的抗体和抗原结合片段。此外,还描述了使用所提供的抗体和抗原结合片段的方法。例如,BCMA特异性抗体和抗原结合片段可用于治疗癌症(例如,BCMA表达型癌症);BCMA特异性抗体和抗原结合片段可用于诊断或监测BCMA表达型癌症的进展、消退或稳定性;以用于确定癌症患者是否应该接受治疗;或用于确定受试者是否患

有BCMA表达型癌症,并因此可适于用BCMA特异性抗癌治疗剂诸如本文所述的针对BCMA和CD3的多特异性抗体治疗。BCMA特异性抗体或抗原结合片段的一些方面在具体实施方式和实施例部分中进一步描述。

[0035] 使用BCMA特异性抗体的方法

[0036] 还公开了使用所述BCMA特异性抗体或抗原结合片段的方法。用于本部分所讨论的方法中的特定抗体包括具有针对表1中的抗体所述的那组CDR的那些抗体(例如,BCMB519)。例如,这些抗体或抗原结合片段可用于治疗癌症,通过干扰BCMA-受体相互作用或其中抗体缀合至毒素,从而将毒素靶向BCMA表达型癌症。此外,这些抗体或抗原结合片段还可用于检测生物样品诸如血液或血清中BCMA的存在;用于定量分析生物样品诸如血液或血清中BCMA的量;用于诊断BCMA表达型癌症;用于确定治疗患有癌症的受治疗者的方法;或用于监测受治疗者中BCMA表达型癌症的进展。在一些实施方案中,BCMA表达型癌症可以是淋巴瘤,诸如多发性骨髓瘤(MM),包括郁积型多发性骨髓瘤(SMM)。在一些实施方案中,BCMA表达型癌症是复发性或难治性形式的淋巴瘤,诸如复发性或难治性形式的多发性骨髓瘤。所述方法可以在受治疗者接受BCMA表达型癌症的治疗,诸如用针对BCMA和CD3的多特异性抗体治疗之前进行。此外,所述方法可以在受治疗者接受BCMA表达型癌症的治疗,诸如用本文所述针对BCMA和CD3的多特异性抗体治疗之后进行。

[0037] 所述检测生物样品中的BCMA的方法包括将生物样品暴露于本文所述的BCMA特异性抗体或抗原结合片段中的一种或多种。

[0038] 所述诊断受治疗者中BCMA表达型癌症的方法还包括将生物样品暴露于本文所述的BCMA特异性抗体或抗原结合片段中的一种或多种;然而,该方法还包括定量存在于样品中的BCMA的量;将存在于样品中的BCMA的量与已知标准品或参照样品进行比较;并确定受试者的BCMA水平是否落入与癌症相关的BCMA水平内。

[0039] 本文还描述了监测受治疗者中BCMA表达型癌症的方法。所述方法包括将生物样品暴露于本文所述的BCMA特异性抗体或抗原结合片段中的一种或多种;定量存在于由抗体或其抗原结合片段结合的样品中的BCMA的量;将存在于样品中的BCMA的量与已知标准品或参照样品或先前从受治疗者中获得的类似样品中的BCMA的量进行比较;以及基于所比较的样品中BCMA的量的差异,确定受治疗者的BCMA水平是否指示癌症进展、消退或稳定疾病。

[0040] 从受治疗者中获得或来源于受治疗者的样品是生物样品,诸如尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞、循环肿瘤细胞、非组织缔合的细胞、组织、手术切除的肿瘤组织、活体组织切片、细针抽吸样品或组织学制备物。

[0041] 可对所述的BCMA特异性抗体或抗原结合片段进行标记以用于所述方法或本领域技术人员已知的其它方法。例如,本文所述的抗体或其抗原结合片段可用放射标记物、荧光标记物、表位标签、生物素、发色团标记物、ECL标记物、酶、钆、¹¹¹In-DOTA、¹¹¹In-二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和 β -半乳糖苷酶,或者聚组氨酸或本领域已知的类似此类标记物进行标记。

[0042] BCMA特异性抗体试剂盒

[0043] 本文描述了包括所公开的BCMA特异性抗体或其抗原结合片段的试剂盒。所述试剂盒可用于实施使用本文提供的BCMA特异性抗体或抗原结合片段的方法或本领域技术人员已知的其他方法。在一些实施方案中,所述试剂盒可包括本文所述的抗体或抗原结合片段

以及用于检测生物样本中是否存在BCMA的药剂。因此,所述试剂盒可包括本文所述的抗体或其抗原结合片段中的一种或多种,以及用于在不使用时盛装抗体或片段的容器、抗体或片段的使用说明、附连于固体支持物的抗体或片段和/或如本文所述的抗体或片段的可检测标记形式。

附图说明

[0044] 图1A至图1B.BGCB463三特异性抗体的描述(图1A)和提出的作用模式(图1B)。

[0045] 图2A至图2D.BGCB463(圆形)或阴性对照B23B251(三角形)均与H929野生型(WT)(图2A)、H929-GPRC5D敲除(KO)(图2B)、H929-BCMA KO(图2C)和H929-GPRC5D/BCMA KO(图2D)细胞以2 μ M的起始浓度在37 $^{\circ}$ C处温育1小时。在用AF647标记的材料进行二次检测后,分析MFI信号以产生EC₅₀和EC₉₀。曲线代表五次独立实验。EC₅₀或EC₉₀值是这些值的平均值。

[0046] 图3A至图3D.BGCB463(圆形)或阴性对照B23B251(三角形)均与MM.1RWT(图3A)、MM.1R-GPRC5DKO(图3B)、MM.1R-BCMAKO(图3C)和MM.1R-GPRC5D/BCMAKO(图3D)细胞以2 μ M的起始浓度在37 $^{\circ}$ C处温育1小时。在用AF647标记的材料进行二次检测后,分析MFI信号以产生EC₅₀和EC₉₀。曲线代表五次独立实验。

[0047] 图4A至图4C.BGCB463(圆形)或阴性对照B23B251(三角形)均与泛T细胞(3个随机供体,图4A至图4C)以2 μ M的起始浓度在37 $^{\circ}$ C处温育1小时。在用AF647标记的材料进行二次检测后,分析MFI信号以产生EC₅₀和EC₉₀。数据代表两次单独的运行,均具有三个供体。

[0048] 图5A至图5C.BGCB463与泛T细胞(3个随机供体,图5A、图5B和图5C)以2 μ M的起始浓度在4 $^{\circ}$ C(圆形)或37 $^{\circ}$ C(三角形)处温育1小时。在用AF647标记的材料进行二次检测后,分析MFI信号以产生EC₅₀。

[0049] 图6A至图6C.用来自3个供体的H929(图6A)、MM.1R(图6B)和泛T(图6C)细胞测试BGCB463.003(圆形)、BGCB463.004(正方形)和阴性对照B23B251(三角形)。分子以2 μ M的起始浓度在37 $^{\circ}$ C处温育1小时。在用AF647标记的材料进行二次检测后,分析MFI信号。

[0050] 图7A至图7D.H929(图7A)、H929-GPRC5D KO(图7B)、H929-BCMA KO(图7C)和H929-GPRC5D/BCMA KO(图7D)细胞均以BGCB463的三个最佳浓度在37 $^{\circ}$ C处温育1小时、3小时、5小时和24小时。然后将细胞洗涤并与AF647-抗人IgG一起在冰上温育30min。读出AF647信号的MFI。

[0051] 图8A至图8D.MM.1RWT(图8A)、MM.1R-GPRC5DKO(图8B)、MM.1R-BCMA KO(图8C)和MM.1R-GPRC5D/BCMA KO(图8D)细胞均以BGCB463的三个最佳浓度在37 $^{\circ}$ C处温育1小时、3小时、5小时和24小时。然后将细胞洗涤并与AF647-抗人IgG一起在冰上温育30min。读出AF647信号的MFI。

[0052] 图9A-E.BGCB463(圆形)或阴性对照B23B251(三角形)均与表达人GPRC5D(图9A)、人BCMA(图9B)、食蟹猴GPRC5D(图9C)或食蟹猴BCMA(图9D)的K562细胞以2 μ M的起始浓度在37 $^{\circ}$ C处温育1小时。在用AF647-抗人IgG进行二次检测后,分析MFI信号以产生EC₅₀和EC₉₀(图9E)。数据代表两次独立实验。

[0053] 图10A至图10B.将起始浓度为10nM的BGCB463(圆形)或阴性对照B23B251(三角形)与表达人或食蟹猴GPRC5D的K562细胞或100nM表达人/食蟹猴BCMA的K562作为靶细胞一起温育。图10A中的人活化和细胞毒性。图10B中的食蟹猴活化和细胞毒性。添加人泛T细胞(1

个供体),其中效应物与靶(E:T)的比率为3:1,并在37℃处温育72小时。使用活/死可固定染料测定细胞毒性,并且使用BV421缀合的抗CD25测量CD25。

[0054] 图11.将H929细胞在培养基(含有10%FBS的RPMI)或含有90%人血清的RPMI存在的情况下用AF647-抗人IgG与浓度渐增的BGCB463或阴性对照B23B251在37℃处温育1小时。BGCB463结合不受血清存在的影响。

[0055] 图12.将T细胞在培养基(含有10%FBS的RPMI)或含有90%人血清的RPMI存在的情况下用AF647-抗人IgG与浓度渐增的BGCB463或阴性对照B23B251在37℃处温育1小时。数据代表在两次实验中测试的三个供体。BGCB463结合不受血清存在的影响。

[0056] 图13A至图13B.H929-GFP细胞与来自3个供体的BGCB463和人泛T细胞以3:1的E:T比率温育,并添加抗CD25-AF647以追踪T细胞活化(图13A)。基于处理的孔与未处理的孔中的GFP信号计算细胞溶解百分比(图13B)。温育持续约140小时,每三小时获取一次图像。

[0057] 图14A至图14F.H929-GFP细胞与BGCB463或B23B251(同种型对照)分子和来自四个供体的人泛T细胞以1:1和5:1的E:T比率温育,并添加抗CD25-AF647以追踪T细胞活化。基于处理的孔与未处理的孔中的GFP信号计算细胞溶解百分比。温育持续约140小时,每三小时获取一次图像。BGCB463,1:1比率,细胞溶解(图14A)。BGCB463,1:1比率,总积分强度(图14B)。BGCB463,5:1比率,细胞溶解(图14C)。BGCB463,5:1比率,总积分强度(图14D)。B23B251,5:1比率,细胞溶解(图14E)。B23B251,5:1比率,总积分强度(图14F)。

[0058] 图15A至图15D.使用患者血清测定可溶性BCMA干扰。供体1(图15A);供体2(图15B);供体3(图15C);和正常血清(图15D)。将具有已知sBCMA水平的患者血清与直接标记的BGCB463-AF647和B23B251-AF647同种型对照在H929细胞上在37℃处温育(90%血清与10%培养基)1小时。将50%和10%的患者血清用正常血清分别稀释至50%和10%的最终浓度。

[0059] 图16.BGCB491三特异性抗体的描述。

[0060] 图17A至图17B.针对BCMA⁺GPRC5D⁺细胞(图17A)和BCMA⁻GPRC5D⁻细胞(图17B)测试了BGCB463、BGCB491和三个对照(BGCB482(CD3xNullxNull)、BGCB483(CD3xNullxBCMA)、BGCB484(CD3xGPRC5DxNull))。3:1的效应物与靶(E:T)比率;n=1个T细胞供体,72小时温育,最高浓度53nM,1-5次稀释。进行细胞毒性和T细胞活化的测试。

[0061] 图18A至图18B.BGCB463和BGCB491在初次温育后72小时和96小时耗竭H929 WT、GPRC5D KO和BCMAKO细胞系(图18A)。E:T比率为3:1,n=5个T细胞供体;72(5)和96(4)小时温育;最高浓度532nM,1-5个稀释梯度。在上述相同的H929WT、GPRC5DKO和BCMAKO细胞中,两种抗体在72小时和96小时均显示增加的T细胞活化(图18B)。

[0062] 图19.用H929、RAMOS和GRANTA-519细胞系对BGCB463和BGCB491进行细胞毒性和T细胞活化测定。E:T为5:1,n=1个T细胞供体;仅72小时温育;53nM的最高浓度;和1-5次稀释。

[0063] 图20.用H929细胞对BGCB463和BGCB491进行细胞毒性和T细胞活化全血测定。E:T为5:1,n=2个全血供体;48小时温育;532nM的最高浓度;和1-5次稀释。

[0064] 图21A至图21B.如果以足够高的剂量给予,则BGCB463在MM.1S和RPMI 8226异种移植小鼠模型中显示出抑制肿瘤生长:在MM.1S模型中给予2ug或10ug(图21A)或在RPMI 8226模型中给予5ug或10ug(图21B)。

[0065] 图22.BGCB463和BGCB491在H929预防性异种移植小鼠模型中显示出抑制肿瘤生

长。与PBS对照相比,0.5ug和5ug剂量均减缓了H929-BCMA KO和H929-GPRC5D KO模型中的肿瘤生长,更高的5ug浓度显示出更好的效果。

[0066] 图23.在1小时、37°C DRC泛T结合测定中测试BGCB463和BGCB491。使用两个人泛T细胞供体,并且测试分子具有2uM起始浓度,具有1:3稀释和11点DRC。

[0067] 图24A至图24D. BGCB463、BGCB491和空白对照在1小时、37°C DRC套件结合测定中针对H929 WT (图24A)、H929-BCMA KO (图24B)、H929-GPRC5D KO (表24C) 和H929-BCMA/GPRC5D双KO (图24D) 细胞进行测试。

[0068] 图25.在37°C温育1小时后,BGCB491在H929 WT、H929-BCMA KO细胞、H929-GPRC5D KO细胞和/或H929-BCMA/GPRC5D双KO细胞上的代表性结合曲线。BGCB491用●表示,并且阴性对照CD3xNu11xNu11 BGCB510用■表示。曲线代表5次独立实验。H929-GPRC5D-KO克隆H15是杂合KO系,2个基因拷贝的分布为30%和61%。H929-BCMA-KO克隆J8是杂合KO系,2个基因拷贝的分布等于50%。

[0069] 图26.在37°C处温育1小时后,BGCB491在7个供体细胞制剂上的原代T细胞结合曲线。MFI,平均荧光强度。

[0070] 图27.用CD3B376xNu11对照抗体(GCDB381)进行代表性生物信息学结合曲线外推。

[0071] 图28A至图28B. BCMA-GPRC5D双阳性和BCMA-GPRC5D双阴性细胞系的BGCB491介导的(图28A)细胞毒性和(图28B) T细胞活化。在来自6个健康供体(供体ID:20063323、20063309、20062062、20063310、20062105和20061963)的泛T细胞和Fc阻断剂(2mg/mL)存在的情况下,以不同浓度(0.00005nM至533.33nM,X轴)添加BGCB491、BCMAxGPRC5DxNu11和CD3xNu11xNu11,并温育72小时。在这些研究中测试了3:1的最佳E:T比率(对于E:T比率评估,参见图33A至图33B)。使用Prism 8通过将单独的4PL模型与观察到的数据拟合来生成曲线图。数据点沿所生成的拟合曲线紧密对准,并且T细胞供体(绘制的6个供体平均值)之间几乎没有观察到变异性。在图28A中,测量靶细胞死亡并在Y轴上以细胞毒性百分比表示。在图28B中,T细胞活化测量为CD25+CD3+T细胞百分比。

[0072] 图29. BGCB491介导的H929 CRISPRKO克隆细胞毒性和T细胞活化。在来自4个健康供体(供体ID:20063323、20063309、20062062和20063310)的泛T细胞和Fc阻断剂(2mg/mL)存在的情况下,以不同浓度(0.00005nM至533.33nM,X轴)添加BGCB491、BCMAxGPRC5DxNu11和CD3xNu11xNu11,并温育72小时。在这些研究中测试了3:1的E:T比率。使用Prism 8通过将单独的4PL模型与观察到的数据拟合来生成曲线图。数据点沿所生成的拟合曲线紧密对准,并且T细胞供体(绘制的4个供体平均值)之间几乎没有观察到变异性。在顶行中测量靶细胞死亡并以细胞毒性百分比表示,并且在底行(Y轴)中显示以表达CD25的CD3+阳性细胞百分比测量的T细胞活化。

[0073] 图30.在掺杂H929MM细胞的全血中BGCB491介导的靶细胞细胞毒性(MABEL测定)。MABEL,最小预期生物效应水平。将BGCB491、BCMAxGPRC5DxNu11和CD3xNu11xNu11在48小时内以5:1的调节过的E:T比率在H929靶骨髓瘤细胞存在的情况下以不同浓度(0.00005nM至533.33nM,X轴)添加到来自7个健康供体(供体ID:10145、10403、10420、10083、10463、10493和10145;T细胞来源)的全血中。使用Prism 8通过将单独的4PL模型与观察到的数据拟合来生成曲线图。数据点沿所生成的拟合曲线紧密对准,并且T细胞供体(绘制的7个供体平均值)之间几乎没有观察到变异性。测量靶细胞死亡并以细胞毒性百分比表示,并且T细胞活

化被测量为CD25+CD3+细胞百分比。在该实验中,测试特立妥单抗(teclistamab)和塔奎妥单抗(talquetamab)作为阳性对照。

[0074] 图31.来自MABEL测定的BGCB491的细胞因子曲线。MSD,中尺度发现。将BGCB491、BCMAxGPRC5DxNu11和CD3xNu11xNu11以不同浓度(0.00005nM至533.33nM,X轴)添加到来自3个健康供体的全血中。收集来自上述细胞毒性实验的H929细胞上清液(图7;3个T细胞供体;供体ID:10083、10463和10493)并使用基于MSD的多重测定(目录号:K15049D)分析细胞因子水平。细胞因子水平测量为pg/mL。使用Prism 8通过将单独的4PL模型与观察到的数据拟合来生成曲线图。数据点沿所生成的拟合曲线紧密对准,并且T细胞供体(绘制的3个供体平均值)之间几乎没有观察到变异性。在该实验中,测试特立妥单抗(teclistamab)和塔奎妥单抗(talquetamab)作为阳性对照。

[0075] 图32. BGCB491对人原代MMCD138+的细胞毒性效力。MNC,单核细胞。来自4名不同骨髓瘤患者的冷冻骨髓来源的单核细胞(MM BM MNC-626、649、652和653)用于评估BGCB491浆细胞耗竭(顶行)和T细胞活化(底行)潜力。将来自正常健康供体(供体ID:20063309)的T细胞外源性添加到患者BM MNC样品(E:T比率为1:1)中,并与BGCB491、CD3xNu11xNu11、特立妥单抗或塔奎妥单抗(0.00005nM至533.33nM,X轴)温育48小时。观察到响应于BGCB491治疗,活的浆细胞(CD138+)的损失以及T细胞上的CD25的同时上调。在供体之间观察到总初始血浆细胞计数的变异性。列出了单独的靶受体密度值和靶阳性群体的百分比。

[0076] 图33A至图33B. BGCB491在不同E:T比率和温育时间处的细胞毒性潜力(H929细胞系)。(图33A) BGCB491、BCMAxGPRC5DxNu11和CD3xNu11xNu11在来自1个健康供体(供体ID:20063323)的泛T细胞存在的情况下以4种不同的E:T比率(5:1、3:1、1:1和0.5:1)测试72小时。(图33B)使用4个不同的T细胞供体(供体ID:20062105、20063309、20061963和20063310)以3:1和1:1的E:T比率在不同时间点(24小时-圆形、48小时-向上三角形、72小时-向下三角形、96小时-六边形、120小时-菱形、144小时-星形和168小时-正方形)测试BGCB491。测量靶细胞死亡和T细胞活化,并表示为细胞毒性百分比和CD25+CD3+T细胞百分比。使用Prism 8通过将单独的4PL模型与观察到的数据拟合来生成曲线图。数据点沿所生成的拟合曲线紧密对准,并且T细胞供体(绘制的绘制(图33A)1个供体和(图33B)4个供体平均值)之间几乎没有观察到变异性。

[0077] 图34A至图34C. BGCB491在不存在靶细胞的情况下对T细胞活化的影响。使用(图34A)6个正常健康供体T细胞(供体ID:20063323、20063309、20062062、20063310、20062105和20061963)或(图34B)6个正常供体全血样品(供体ID:10274、10402、10427、10470、10500和10509)进行T细胞活化测定。(图34C)测量各种亚群的非特异性细胞毒性。在(图34A)72小时和(图34B、图34C)48小时内以不同浓度(0.00005nM至533.33nM,X轴)添加BGCB491、BCMAxGPRC5DxNu11和CD3xNu11xNu11。

[0078] 图35. BGCB491、特立妥单抗和塔奎妥单抗在T细胞人源化NSG小鼠中的皮下(SC)RPMI 8226异种移植物中的抗肿瘤功效(研究A)。KO,敲除;NSG,非肥胖糖尿病(NOD)重症联合免疫缺陷(scid) γ 或NOD.CgPrkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ;PBS,磷酸盐缓冲盐水;SEM,平均值的标准误差。将携带建立的SC RPMI 8226肿瘤的T细胞人源化NSG小鼠腹膜内(IP)给予0.1mg/kg、0.4mg/kg、1mg/kg和2.5mg/kg的BGCB491。特立妥单抗以0.4mg/kg、1mg/kg和2.5mg/kg IP给药。塔奎妥单抗以2.5mg/kg IP给药。在第19、21、25、28、31、34、38和41天(由

X轴下的黑线指示)施用治疗。每周测量两次肿瘤体积,并且结果表示为每组的平均肿瘤体积 $\pm$ SEM。以图形方式表示每组的数据,其中至少70%的动物仍在研究中。

[0079] 图36.BGCB491、特立妥单抗和塔奎妥单抗在T细胞人源化NSG小鼠中的皮下(SC)H929-BCMA-KO和H929-GPRC5D-KO异种移植物中的抗肿瘤功效(研究B)。KO,敲除;NSG,非肥胖糖尿病(NOD)重症联合免疫缺陷(scid) γ 或NOD.Cg Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ;PBS,磷酸盐缓冲盐水;SEM,平均值的标准误差。将携带H929-BCMA-KO(左侧腹)和H929-GPRC5D-KO(右侧腹)肿瘤的T细胞人源化NSG小鼠腹膜内(IP)给予0.025mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg和0.5mg/kg的BGCB491。特立妥单抗和塔奎妥单抗以0.1mg/kg和0.25mg/kg IP给药。在第1、5、9、13、16、19和22天(由X轴下的黑线指示)施用治疗。每周测量两次肿瘤体积,并且结果表示为每组的平均肿瘤体积 $\pm$ SEM。以图形方式表示每组的数据,其中至少70%的动物仍在研究中。

[0080] 图37至图38.在雌性食蟹猴(图37)和预测模型(图38)中单次静脉内(IV)0.5mg/kg剂量后的个体BGCB491血清浓度-时间曲线。BQL,低于定量限。图中未显示浓度低于最低可定量浓度的数据点。

[0081] 图39A至图39B.在雄性小型猪和模型预测中,单次剂量BGCB491后的平均(SD)BGCB491浓度-时间曲线。BQL,低于定量限;SD,标准偏差。图中未显示浓度低于最低可定量浓度的数据点。第1组:剂量=0.01mg/kg,皮下(SC)施用。第2组:剂量=0.1mg/kg,SC。第3组:剂量=0.1mg/kg,IV。

[0082] 图40.BGCB463在H929WT和MM.1RWT细胞系上在整个24小时37℃温育的动力学结合曲线。MFI:平均荧光强度。

[0083] 图41.BGCB491与表达内源性BCMA-GPRC5D的细胞系的结合。Geo,几何形的。BGCB491、BCMAxGPRC5DxNu11和CD3xNu11xNu11以不同浓度(0.096nM至1,000nM,X轴)添加,并在37℃处温育1小时。使用Prism8通过将单独的4PL模型与观察到的数据拟合来生成曲线图。结合强度表示为几何平均值(Y轴)。

[0084] 图42.以(图42A)1:1和(图42B)1:3E:T比率使用来自3个T供体的T细胞对BGCB491和CD3B2271(空白对照)的动力学细胞毒性和T细胞活化。Incucyte上的CD25测量结果是T细胞计数和CD25表达(总积分强度)的量度。CD25是T细胞活化的后期标记物,通常在活化后24小时可检测到,并在约96小时达到峰值。就时间而言,其不一定与细胞毒性一致。基于处理的孔与未处理的孔中的绿荧光蛋白(GFP)信号计算细胞溶解百分比。

[0085] 图43.BGCB491和CD3B2271(空白对照)在72小时、93小时和120小时时间点以1:1效应物与靶(E:T)比率的细胞溶解百分比和T细胞活化。

[0086] 图44.BGCB491和CD3B2271(空白对照)在72小时、93小时和120小时时间点以1:3E:T比率的细胞溶解百分比和T细胞活化。

[0087] 图45.JNJ-79635322、特立妥单抗和塔奎妥单抗在T细胞人源化NSG小鼠中的皮下MM.1S异种移植物中的抗肿瘤功效(研究C)。NSG,非肥胖糖尿病(NOD)重症联合免疫缺陷(scid) γ 或NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ;PBS,磷酸盐缓冲盐水;SEM,平均值的标准误差。将携带建立的SC MM.1S肿瘤的T细胞人源化NSG小鼠IP给予0.025mg/kg、0.1mg/kg、0.5mg/kg和1mg/kg的BGCB491。塔奎妥单抗以0.025mg/kg和0.1mg/kg IP给药。特立妥单抗以0.1mg/kg和0.5mg/kg IP给药,在第15、19、22、26、30、34和37天(由X轴下的黑线指示)施

用治疗。每周测量两次肿瘤体积,并且结果表示为每组的平均肿瘤体积 $\pm$ SEM。以图形方式表示每组的数据,其中至少70%的动物仍在研究中。治疗后对动物进行监测,直到出现移植物抗宿主病(GvHD)相关发病的迹象,此时对动物实施安乐死,并且研究在第51天结束。

[0088] 图46A至图46B. BCMA先导物(BCMB519)显示出与具有理想scFv生物物理特性的特立妥单抗相当的结合和细胞毒性。

[0089] 图47. GPRC5d先导物(GC5B680)与具有理想scFv生物物理特性的塔奎妥单抗相比显示出特异性和改善的结合。

具体实施方式

[0090] 定义

[0091] 与说明书的各方面相关的各种术语在说明书和权利要求书中通篇使用。除非另外指明,否则此类术语被赋予本领域的普通含义。其他具体定义的术语应按照与本文所提供的定义相符的方式理解。

[0092] 如本说明书和所附权利要求中所用,除非内容另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代。因此,例如,对“一个细胞”的提及包括两个或更多个细胞的组合等等。

[0093] 如本文所用,术语“约”在涉及可测量值诸如量、时距等时,意指涵盖与指定值至多 $\pm 10\%$ 的变化,因为这类变化适合执行本发明所公开的方法。除非另外指明,否则说明书和权利要求书中使用的表示成分的量、特性诸如分子量、反应条件等的所有数字在所有情况下均应理解为被术语“约”修饰。因此,除非有相反的说明,否则在下述说明书和所附权利要求书中列出的数值参数均为近似值,这些近似值可根据本发明寻求获得的期望特性而变化。在最低程度上且不试图将等同原则的应用限制到权利要求书的保护范围的前提下,至少应当根据所报告的数值的有效数位并通过应用惯常的四舍五入法来解释每一个数值参数。

[0094] 尽管用以阐明本发明之宽范围的数值范围和参数是近似的,但在具体的实施例中提出的数值却是尽可能精确地报告的。然而,任何数值均固有地包含某些误差,所述误差必然会由存在于其各自测试测量法中的标准偏差产生。

[0095] “分离”意指生物组分(诸如核酸、肽或蛋白质)已经与组分天然存在的生物体的其它生物组分(即其它染色体和染色体外DNA和RNA以及蛋白质)基本上分离、分开得到或从其中纯化出来。因此,已经“分离的”核酸、肽和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白质。“分离的”核酸、肽和蛋白质可为组合物的一部分,并且如果这样的组合物不是核酸、肽或蛋白质自身环境的一部分,则仍然是分离的。该术语还包括通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸、肽和蛋白质以及化学合成的核酸。如本文所用,“分离的”抗体或抗原结合片段旨在意指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体或抗原结合片段的抗体或抗原结合片段(例如,特异性地结合至BCMA的分离的抗体基本上不含特异性地结合除BCMA以外的抗原的抗体)。然而,特异性地结合至BCMA或GPRC5D的表位、同种型或变体的分离抗体可与其他相关抗原,例如来自其他物种(诸如BCMA或GPRC5D物种同源物)的抗原具有交叉反应性。

[0096] 同义地称为“核酸分子”、“核苷酸”或“核酸”的“多核苷酸”是指任何多核糖核苷酸

或多脱氧核糖核苷酸,其可为未修饰的RNA或DNA或者修饰的RNA或DNA。“多核苷酸”包括但不限于单链和双链的DNA、为单链区和双链区的混合物的DNA、单链和双链的RNA以及为单链区和双链区的混合物的RNA、包含可为单链或更典型地为双链或者为单链区和双链区的混合物的DNA和RNA的杂合分子。此外,“多核苷酸”是指包含RNA或DNA或RNA和DNA两者的三链区。术语多核苷酸还包括含有一个或多个修饰的碱基的DNA或RNA,以及具有出于稳定性或其它原因而被修饰的主链的DNA或RNA。“修饰的”碱基包括例如三苯甲基化的碱基和稀有碱基诸如肌苷。可对DNA和RNA进行多种修饰;因此,“多核苷酸”包括通常天然存在的多核苷酸的化学修饰、酶修饰或代谢修饰形式,以及病毒和细胞特有的DNA和RNA的化学形式。“多核苷酸”也包括相对短的核酸链,通常被称为寡核苷酸。

[0097] “基本上相同”的含义可根据使用该术语的上下文而不同。由于重链和轻链以及编码它们的基因之间可能存在的天然序列变异,预期在氨基酸序列或编码本文所述的抗体或抗原结合片段的基因内发现一定程度的变异,而对其独特的结合特性(例如,特异性和亲和力)产生的影响很小或无影响。此类预期部分归因于遗传密码的简并性以及保守氨基酸序列变异的成功进化,但这不会明显改变所编码蛋白质的性质。因此,在核酸序列的上下文中,“基本上相同”意指两个或更多个序列之间具有至少65%的同一性。优选地,该术语是指两个或更多个序列之间具有至少70%的同一性,更优选至少75%的同一性,更优选至少80%的同一性,更优选至少85%的同一性,更优选至少90%的同一性,更优选至少91%的同一性,更优选至少92%的同一性,更优选至少93%的同一性,更优选至少94%的同一性,更优选至少95%的同一性,更优选至少96%的同一性,更优选至少97%的同一性,更优选至少98%的同一性,以及更优选至少99%或更高的同一性。两个序列之间的百分比同一性是序列所共有的相同位置数目的函数(即,同源性% = 相同位置的数目/位置总数 × 100),考虑到空位的数目和每个空位的长度,需要引入这些参数用于两个序列的最佳比对。两个核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同一性可例如使用E. Meyers和W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988) 的算法(该算法已经并入ALIGN程序(版本2.0)中),使用PAM120加权残基表、空位长度罚分12和空位罚分4来确定。此外,两个氨基酸序列之间的百分比同一性可使用Needleman和Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970) 的算法来确定。

[0098] 在蛋白质的氨基酸序列内可能发生的对蛋白质功能没有实质性影响的变异程度远低于核酸序列的变异程度,因为相同的简并性原则不适用于氨基酸序列。因此,在抗体或抗原结合片段的上下文中,“基本上相同”意指与所述抗体或抗原结合片段具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的抗体或抗原结合片段。其他实施方案包括具有框架、支架或其他非结合区的抗体或抗原结合片段,其不与本文所述的抗体和抗原结合片段具有显著的同一性,但确实并入一个或多个CDR或赋予与本文所述的此类序列具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的结合所需的其他序列。

[0099] “克隆”是来源于单细胞或共同祖细胞通过有丝分裂产生的细胞群。“细胞系”是能够在体外稳定生长许多代的原代细胞的克隆。在本文提供的一些示例中,通过用DNA转染细胞来转化细胞。

[0100] 术语“表达”和“产生”在本文中同义使用,并且是指基因产物的生物合成。这些术语涵盖基因到RNA的转录。这些术语还涵盖RNA到一个或多个多肽的翻译,并且还涵盖所有

天然存在的转录后和翻译后修饰。抗体或其抗原结合片段的表达或产生可在细胞的细胞质内,或者在胞外环境中诸如细胞培养物的生长培养基中。

[0101] 术语“治疗”(“treating”或“treatment”)是指在减轻或改善损伤、病变或病症方面取得的任何成功或成功迹象,包括任何客观或主观参数,诸如症状减轻、缓解、削弱或使患者更能耐受病症,减缓退变或衰退速率,使退变终点衰竭程度降低,改善受治疗者的身体或心理健康,或延长存活时间。可通过客观或主观参数评估治疗;包括体格检查、神经学检查或精神评价的结果。

[0102] “有效量”或“治疗有效量”是指在所需剂量和时间段内有效实现所需治疗结果的量。BCMA×GPCR5D×CD3抗体的治疗有效量可根据因素诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及抗体在个体中引发所需响应的能力而变化。治疗有效量也是其中抗体或抗体部分的治疗有益效应远远超过任何毒性或有害效应的量。

[0103] 除非另有说明,否则“抗体”是指包括各种单体、聚合和嵌合形式的免疫球蛋白的所有同种型(IgG、IgA、IgE、IgM、IgD和IgY)。术语“抗体”具体地涵盖多克隆抗体、单克隆抗体(mAb)和抗体样多肽,诸如嵌合抗体和人源化抗体。

[0104] 术语“抗原结合臂”是指抗体的一部分,其包括结合至抗原(例如,BCMA、GPCR5D或CD3)的抗原结合结构域,并且任选地包括一个或多个其他抗体区(例如,Fc结构域)。

[0105] 术语“抗原结合片段”是指含有抗原结合结构域的抗原结合臂的片段。抗原结合片段包括通过任何已知技术诸如酶切割、肽合成和重组技术提供的那些。一些抗原结合片段由完整抗体的保留亲本抗体分子的抗原结合特异性的部分组成。例如,抗原结合片段可包含已知结合特定抗原的抗体的至少一个可变区(重链可变区或轻链可变区)或者一个或多个CDR。合适的抗原结合片段的示例包括但不限于双体抗体和单链分子以及Fab、F(ab')₂、Fc、Fab_c和Fv分子;单链(Sc)抗体;单个抗体轻链;单个抗体重链;抗体链或CDR与其他蛋白质之间的嵌合融合体;蛋白质支架;重链单体或二聚体;轻链单体或二聚体;由一条重链和一条轻链组成的二聚体;由VL、VH、CL和CH1域组成的单价片段;或如W02007059782中所述的单价抗体;包含由铰链区的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;基本上由VH和CH1域组成的Fd片段;基本上由抗体的单臂的VL域和VH域组成的Fv片段;基本上由VH域组成的dAb片段(Ward等人,Nature 341,544-546(1989)),并且也被称为域抗体(Holt等人,Trends Biotechnol.,2003年11月,21(11):484-90);羊驼或纳米抗体(Revetts等人,Expert Opin Biol Ther.,2005年1月,5(1):111-24);分离互补决定区(CDR)等;以及由抗体片段形成的三特异性抗体。所有抗体同种型均可用于产生抗原结合片段。另外,抗原结合片段可包括非抗体蛋白质性框架,其可成功地以赋予感兴趣的给定抗原(诸如蛋白质支架)亲和力的取向并入多肽区段。抗原结合片段可重组产生或通过对完整抗体的酶切割或化学切割产生。短语“抗体或其抗原结合片段”可用于表示给定的抗原结合片段并入该短语中提及的抗体的一个或多个氨基酸区段。

[0106] 术语“抗原结合结构域”是指对特定抗原表现出结合亲和力的抗原结合臂的蛋白质结构。该蛋白质结构由抗原结合结构域的互补决定区(CDR)介导。

[0107] 术语“CDR”是指互补决定区(CDR),其中三个构成轻链可变区(CDRL1、CDRL2和CDRL3)的结合特征,三个构成重链可变区(CDRH1、CDRH2和CDRH3)的结合特征。CDR有助于抗体分子的功能活性,并且由包含支架或框架区的氨基酸序列分开。确切定义的CDR边界和长

度受限于不同的分类和编号系统。因此,在本文中可通过Kabat、Chothia、AbM、contact或任何其他边界定义来引用CDR。尽管边界不同,但这些系统中的每一个在可变序列内构成所谓的“高变区”的方面具有一定程度的重叠。因此,根据这些系统的CDR定义可在长度和相对于相邻框架区域的边界区域方面不同。参见例如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, NIH出版物号91-3242(1991); Chothia等人, “Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins”, *J.Mol.Biol.* 196: 901 (1987); 以及MacCallum等人, “Antibody-Antigen Interactions: Contact Analysis and Binding Site Topography”, *J.Mol.Biol.* 262: 732 (1996)); 这些文献中的每一篇全文据此均以引用方式并入。

[0108] 通常, CDR形成可被分类为规范结构的环状结构。术语“规范结构”是指抗原结合(CDR)环所采用的主链构象。从比较结构研究中, 已发现六个抗原结合环中有五个仅具有受限的可用构象库。每个规范结构可由多肽主链的扭转角来表征。因此, 抗体之间的对应环可具有非常相似的三维结构, 尽管环的大部分区域具有高氨基酸序列可变性(Chothia等人, “Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins”, *J.Mol.Biol.* 196: 901 (1987); Chothia等人, “Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions”, *I* 342: 877 (1989); Martin和Thornton, “Structural Families in Loops of Homologous Proteins: Automatic Classification, Modelling and Application to Antibodies”, *J.Mol.Biol.* 263: 800 (1996); 这些文献中的每一篇全文均以引用方式并入)。此外, 采用的环状结构与其周围的氨基酸序列之间存在关系。特定规范类的构象由环的长度以及位于环内以及保守框架内(即, 环外部)关键位置的氨基酸残基确定。因此, 可基于这些关键氨基酸残基是否存在来进行对特定规范类的分配。

[0109] 术语“多肽”可与术语“蛋白质”互换使用, 并且从其最广泛的意义上讲, 是指两个或更多个亚基氨基酸、氨基酸类似物或模拟肽物的化合物。亚基可由肽键连接。在另一实施方案中, 亚基可由其它键连接, 例如, 酯、醚等。如本文所用, 术语“氨基酸”是指天然和/或非天然氨基酸或者合成的氨基酸, 包括甘氨酸以及D光学异构体和L光学异构体、氨基酸类似物和模拟肽物。在肽链短的情况下, 通常将三个或更多个氨基酸的肽称为寡肽。如果肽链较长, 所述肽通常称为多肽或蛋白质。如本文所用, 术语“Fc”是指抗体的可结晶片段结构域, 其包含两个恒定重链(CH)区CH₂和CH₃。在本文中, Fc区的氨基酸残基通常根据EU编号方案进行编号(Edelman, G.M. 等人, *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969). PMID: 5257969)。这些残基可根据本领域技术人员容易理解的替代编号方案诸如IMGT和Kabat (Kabat, E.A. 等人, *Sequences of proteins of immunological interest*. 第5版-US Department of Health and Human Services, NIH出版物n°91-3242, 第662, 680, 689页, (1991)) 编号来容易地分配。例如, 根据EU编号的L234也可根据Kabat表示为L247。

[0110] 当在抗体或抗体片段的上下文中使用时, “特异性结合”或“特异地结合”或其衍生术语表示经由由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因的片段编码的结构域结合感兴趣的蛋白质的一个或多个表位, 而不优先结合含有混合分子群的样本中的其它分子。通常, 抗体与同源抗原结合的K_d小于约1×10⁻⁸M, 其为通过表面等离子共振测定或细胞结合测定测得。短语诸如“[抗原]特异性”抗体(例如, BCMA特异性抗体)意在表达所述抗体特异性地结合所述抗原。在本文中使用术语“结合”的情况下, 其旨在涵盖“特异性地结合”并且这些术语可

根据需要互换。

[0111] 如本文所用,术语“嵌合”是指抗体或其抗原结合片段的至少一个可变域的至少某些部分来源于非人哺乳动物、啮齿动物或爬行动物的抗体氨基酸序列,而抗体或其抗原结合片段的其余部分来源于人。

[0112] “载体”是复制子,诸如质粒、噬菌体、粘粒或病毒,其中可以可操作地插入另一核酸区段以引起该区段的复制或表达。

[0113] 如本文所用,术语“宿主细胞”可为任何类型的细胞,例如,原代细胞、培养中的细胞或来自细胞系的细胞。在具体的实施方案中,术语“宿主细胞”是指用核酸分子转染的细胞和此类细胞的后代或潜在后代。此类细胞的后代可与用核酸分子转染的亲本细胞不同,例如,由于可在后代中发生的突变或环境影响或者由于核酸分子整合到宿主细胞基因组中。术语“表达”和“产生”在本文中同义使用,并且是指基因产物的生物合成。这些术语涵盖基因到RNA的转录。这些术语还涵盖RNA到一个或多个多肽的翻译,并且还涵盖所有天然存在的转录后和翻译后修饰。

[0114] 术语“受治疗者”是指人和非人动物,包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物诸如非人灵长类动物、小鼠、兔、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。在所述方法的许多实施方案中,受治疗者是人。

[0115] 如本文所用,术语“重定向”或“重新定向”是指BCMA×GPCR5D×CD3抗体使T细胞的活性由其固有同源特异性有效地向抗GPCR5D表达型细胞和/或BCMA表达型细胞的反应性交换的能力。

[0116] 如本文所用,术语“样品”是指与受治疗者分离的类似流体、细胞或组织(例如,手术切除的肿瘤组织、活体组织切片,包括细针抽吸组织)以及存在于受治疗者中的流体、细胞或组织的集合。在一些实施方案中,样品是生物流体。生物流体通常是在生理温度下的液体,并且可包括存在于受治疗者或生物来源中,从受治疗者或生物来源中抽取、表达或以其它方式提取的天然存在的流体。某些生物流体来源于特定组织、器官或局部区域,并且某些其它生物流体可更全身性或系统性地位于受治疗者或生物来源中。生物流体的示例包括血液,血清和浆膜液,血浆,淋巴液,尿液,唾液,囊液,泪液,粪便,痰,分泌组织和器官的粘膜分泌物,阴道分泌物,腹水诸如与非实体肿瘤相关的那些,胸膜、心包、腹膜、腹部和其它体腔的流体,通过支气管灌洗收集的流体等。生物流体还可包括与受治疗者或生物来源接触的液体溶液,例如细胞和器官培养基,包括细胞或器官条件培养基、灌洗液等。如本文所用,术语“样品”涵盖从受治疗者中取出的物质或存在于受治疗者中的物质。本发明的相关方面可根据需要基于分离的样品在体外进行。

[0117] “已知标准品”可为具有已知量或已知浓度的GPCR5D和/或BCMA的溶液,其中所述溶液可为天然存在的溶液,诸如来自已知患有早期、中度、晚期、进行性或静态癌症的患者的样品;或者所述溶液可为合成溶液,诸如其中稀释了已知量的GPCR5D和/或BCMA的缓冲水溶液。本文所述的已知标准品可包括从受试者中分离的GPCR5D和/或BCMA、重组或纯化的GPCR5D和/或BCMA蛋白质或与疾病病状相关的GPCR5D和/或BCMA浓度值。

[0118] 如本文所用,术语“B细胞成熟抗原”和“BCMA”包括人B细胞成熟抗原,也称为BCMA、CD269和TNFRSF17(UniProtQ02223),是优先在分化的浆细胞中表达的肿瘤坏死受体超家族的成员。人BCMA的细胞外结构域根据UniProt由第1-54位(或第5-51位)氨基酸组成。如本文

所用,术语“抗BCMA的抗体、抗BCMA抗体”涉及特异性地结合至BCMA的抗体。

[0119] 术语“G蛋白偶联受体C5家族亚型D”和“GPCR5D”特别包括人GPCR5D蛋白,例如,如GenBank登录号BC069341、NCBI参考序列:NP_061124.1和UniProtKB/Swiss-Prot登录号Q9NZD1中所述(还参见Brauner-Osborne,H等人,2001,Biochim.Biophys.Acta 1518,237-248)。

[0120] 术语“簇决定簇3”和“CD3”包括人CD3蛋白质多亚基复合体。CD3蛋白质多亚基复合体由6个不同的多肽链构成。这些多肽链包括CD3 γ 链(SwissProt P09693)、CD3 δ 链(SwissProt P04234)、两条CD3 ϵ 链(SwissProtP07766)和一条CD3 ζ 链同源二聚体(SwissProt20963),并且该复合体与T细胞受体 α 和 β 链缔合。除非另有说明,否则术语“CD3”包括由细胞(包括T细胞)天然表达或者能够在用编码那些多肽的基因或cDNA转染的细胞上表达的任何CD3变体、同种型和物种同源物。

[0121] “BCMA $\times$ GPCR5D $\times$ CD3抗体”是多特异性抗体,任选为三特异性抗体,其包含三个不同的抗原结合臂,其中一个抗原结合臂结合至抗原BCMA,其中一个抗原结合臂结合至抗原GPCR5D,并且其中一个抗原结合臂结合至CD3。“BCMA $\times$ CD3抗体”是多特异性抗体,任选为双特异性抗体,其包含两个不同的抗原结合臂,其中一个抗原结合臂结合至抗原BCMA,并且其中另一个抗原结合臂结合至CD3。“GPCR5D $\times$ CD3抗体”是多特异性抗体,任选为双特异性抗体,其包含两个不同的抗原结合臂,其中一个抗原结合臂结合至抗原GPCR5D,并且其中另一个抗原结合臂结合至CD3。术语“多特异性抗体”在本文中以最广泛的含义使用,并且具体涵盖具有多表位特异性的抗体。多特异性抗体包括但不限于包含重链可变结构域(V_H)和轻链可变结构域(V_L)的抗体,其中 V_HV_L 单元具有多表位特异性;具有两个或更多个 V_L 和 V_H 结构域的抗体,其中每个 V_HV_L 单元结合至不同表位;具有两个或更多个单可变结构域的抗体,其中每个单可变结构域结合至不同表位;全长抗体;和包含一个或多个抗体片段的抗体以及包含已经共价或非共价连接的抗体片段的抗体。

[0122] 多特异性抗体可为双特异性抗体、三特异性抗体、双体抗体或类似分子(关于双体的描述,参见例如PNAS USA 90(14),6444-8(1993))。除BCMA或GPCR5D的一部分之外,本文提供的双特异性抗体、三特异性抗体、双体抗体等可结合任何合适的靶。术语“双特异性抗体”应理解为具有由不同抗体序列限定的两个不同抗原结合臂的抗体。术语“三特异性抗体”应理解为具有由不同抗体序列限定的三个不同抗原结合臂的抗体。这能够被理解为不同的靶结合,但也包括结合至一个靶中的不同表位。

[0123] “参照样品”是可与另一个样品诸如测试样品进行比较以表征所比较样品的样品。参照样品将具有一些特征属性,作为与测试样品进行比较的基础。例如,参照样品可用作指示受试者患有癌症的GPCR5D或BCMA水平的基准。参照样品不一定必须与测试样品并行分析,因此,在一些情况下,参照样品可为先前确定用于表征给定条件的数值或范围,诸如指示受试者患有癌症的GPCR5D或BCMA水平。该术语还包括已知与生理状态或疾病病症(诸如GPCR5D或BCMA表达型癌症)相关但具有未知量的GPCR5D或BCMA的用于比较目的样品。

[0124] “复发”是指在先前用治疗剂治疗之后改善一段时间之后疾病或疾病的迹象和症状的再现。

[0125] “难治性”是指对治疗无响应的疾病。难治性疾病可在治疗之前或开始时对治疗具有抗性,或者难治性疾病可在治疗期间变得具有抗性。

[0126] 如在GPCR5D表达型癌症和/或BCMA表达型癌症的进展的上下文中使用的术语“进展”包括癌症从不太严重状态到较严重状态的变化。这可包括肿瘤的数量或严重性、癌细胞转移程度、癌症生长或扩散的速度等增大。例如,“结肠癌的进展”包括此类癌症从不太严重状态到较严重状态的进展,诸如从I期到II期、从II期到III期等的进展。

[0127] 如在GPCR5D表达型癌症和/或BCMA表达型癌症的消退的上下文中使用的术语“消退”包括癌症从较严重状态到不太严重状态的变化。这可包括肿瘤的数量或严重性、癌细胞转移程度、癌症生长或扩散的速度等减小。例如,“结肠癌的消退”包括此类癌症从较严重状态到不太严重状态的消退,诸如从III期到II期、从II期到I期等的进展。

[0128] 如在稳定的GPCR5D表达型癌症和/或BCMA表达型癌症的上下文中使用的术语“稳定”旨在描述疾病病症在临床相关时间段内未或尚未出现显著变化以被认为是进展性癌症或消退性癌症。

[0129] 本文所述的实施方案并不限于特定的方法、试剂、化合物、组合物或生物系统,这些方法、试剂、化合物、组合物或生物系统当然能够变化。

[0130] 多特异性抗体

[0131] 本文提供了结合至BCMA、GPCR5D和CD3的多特异性抗体及其三特异性结合片段。与仅靶向这些靶中的一个或两个靶的抗体相比,此类抗体或抗体片段可允许更特异性地靶向特定的细胞亚群。

[0132] 这可以通过例如制备包含结合至CD3的第一抗原结合臂、结合至GPCR5D的第二抗原结合臂和结合至BCMA的第三抗原结合臂的分子来实现。抗原结合臂可采取允许靶的特异性识别的任何形式,例如结合臂可为或可包含重链可变结构域、Fv(重链可变结构域和轻链可变结构域的组合物)、单链Fv(scFv)、Fab、基于III型纤连蛋白结构域的结合结构域(诸如来自纤连蛋白或基于来自纤连蛋白的III型结构域的共有序列,或来自腱生蛋白或基于来自腱生蛋白的III型结构域的共有序列,诸如来自Janssen Biotech有限公司的Centyrin分子,参见例如W02010/051274和W02010/093627)。在某些实施方案中,三特异性抗体包含三个抗原结合臂。在一些实施方案中,三特异性抗体由抗体(例如,以IgG形式)构成,附加抗原结合臂(例如呈单链可变片段形式)与该抗体融合,例如,与抗体的重链之一或轻链之一的N末端或C末端融合。

[0133] 因此,提供了包含分别结合BCMA、GPCR5D和CD3的三种不同抗原结合臂的三特异性分子。

[0134] 在一些实施方案中,BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体包含

[0135] (a) 第一抗原结合臂,所述第一抗原结合臂包含第一重链可变结构域(VH1)和第一轻链可变结构域(VL1);

[0136] (b) 第二抗原结合臂,所述第二抗原结合臂包含第二重链可变结构域(VH2)和第二轻链可变结构域(VL2);以及

[0137] (c) 第三抗原结合臂,所述第三抗原结合臂包含第三重链可变结构域(VH3)和第三轻链可变结构域(VL3)。

[0138] 在一些实施方案中,第一抗原结合臂结合至CD3上的表位,第二抗原结合臂结合至GPCR5D上的表位,并且第三抗原结合臂结合至BCMA上的表位。

[0139] 在一些实施方案中,结合CD3的第一抗原结合臂包含SEQ ID NO:8的VH1的HCDR 1、

HCDR2和HCDR3。在一些实施方案中,结合CD3的第一抗原结合臂包含SEQ ID NO:7的VL1的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一些实施方案中,结合CD3的第一抗原结合臂包含含有GDSVFNNNAWS (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列的HCDR1、含有RTYYRSKWLYD (SEQ ID NO:5) 的氨基酸序列的HCDR2和含有GYSSSFYD (SEQ ID NO:6) 的氨基酸序列的HCDR3。在一些实施方案中,结合CD3的第一抗原结合臂包含含有TGTSSNIGTYKFVS (SEQ ID NO:1) 的氨基酸序列的LCDR1、含有EVSKRPS (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列的LCDR2和含有VSYAGSGTLL (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列的LCDR3。在一些实施方案中,结合CD3的第一抗原结合臂包含SEQ ID NO:8的VH1。在一些实施方案中,结合CD3的第一抗原结合臂包含SEQ ID NO:7的VL1。

[0140] 在一些实施方案中,结合GPC5D的第二抗原结合臂包含SEQ ID NO:16的VH2的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施方案中,结合GPC5D的第二抗原结合臂包含SEQ ID NO:15的VL2的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一些实施方案中,结合GPC5D的第二抗原结合臂包含含有GFSLTNIRMSVS (SEQ ID NO:12) 的氨基酸序列的HCDR1、含有HIFSNDKES (SEQ ID NO:13) 的氨基酸序列的HCDR2和含有MRLPYGMDV (SEQ ID NO:14) 的氨基酸序列的HCDR3。在一些实施方案中,结合GPC5D的第二抗原结合臂包含含有RSSQSLVHSDGNTYLS (SEQ ID NO:9) 的氨基酸序列的LCDR1、含有KISNRFF (SEQ ID NO:10) 的氨基酸序列的LCDR2和含有MQATQFPHT (SEQ ID NO:11) 的氨基酸序列的LCDR3。在一些实施方案中,结合GPC5D的第二抗原结合臂包含SEQ ID NO:16的VH1。在一些实施方案中,结合GPC5D的第二抗原结合臂包含SEQ ID NO:15的VL1。

[0141] 在一些实施方案中,结合BCMA的第三抗原结合臂包含SEQ ID NO:24的VH3的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施方案中,结合BCMA的第三抗原结合臂包含SEQ ID NO:23的VL3的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一些实施方案中,结合BCMA的第三抗原结合臂包含含有GFTFSSYAMS (SEQ ID NO:20) 的氨基酸序列的HCDR1、含有AISGSGGSTY (SEQ ID NO:21) 的氨基酸序列的HCDR2和含有DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO:22) 的氨基酸序列的HCDR3;以及含有RASQSISSSFLT (SEQ ID NO:17) 的氨基酸序列的LCDR1。在一些实施方案中,结合BCMA的第三抗原结合臂包含含有GASSRAT (SEQ ID NO:18) 的氨基酸序列的LCDR2和含有QHYGSSPMYT (SEQ ID NO:19) 的氨基酸序列的LCDR3。在一些实施方案中,结合BCMA的第三抗原结合臂包含SEQ ID NO:24的VH1。在一些实施方案中,结合BCMA的第三抗原结合臂包含SEQ ID NO:23的VL1。

[0142] 在一些实施方案中,结合至CD3表位的抗原结合臂的VH1和VL1存在于双体抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、二硫化物稳定的Fv片段(dsFv)或二硫化物稳定的双体抗体(ds双体抗体)中。

[0143] 在一些实施方案中,结合至GPC5D表位的抗原结合臂的VH2和VL2存在于双体抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、二硫化物稳定的Fv片段(dsFv)或二硫化物稳定的双体抗体(ds双体抗体)中。

[0144] 在一些实施方案中,结合至BCMA表位的抗原结合臂的VH3和VL3存在于双体抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、二硫化物稳定的Fv片段(dsFv)或二硫化物稳定的双体抗体(ds双体抗体)中。

[0145] 在一些实施方案中,BCMA×GPC5D×CD3多特异性抗体的第一抗原结合臂包含含有VH1的第一重链部分(HC1)和含有VL1的轻链部分(LC),其中VH1和VL1配对以形成结合第

一抗原的第一抗原结合结构域。在一些实施方案中,HC1从N末端到C末端包含VH1、第一重链恒定结构域(CH1)和第一Fc结构域。在一些实施方案中,HC1的VH1和CH1与LC一起形成片段抗原结合(Fab)结构域。

[0146] 在一些实施方案中,第一抗原结合臂的VH1经由第一Fc结构域与第三抗原结合臂的VH3偶联。在一些实施方案中,第一抗原结合臂的第一Fc结构域经由第一接头(L1)与第三抗原结合臂偶联,从而形成偶联的第一抗原结合臂和第三抗原结合臂。偶联的第一抗原结合臂和第三抗原结合臂从N末端到C末端可包含第一抗原结合臂、第一接头和第三抗原结合臂的VH1、CH1结构域和Fc结构域。在一些实施方案中,第三抗原结合臂是由第三抗原结合臂的VH3和VL3形成的单链可变片段(scFv)。

[0147] 在一些实施方案中,BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体的第二抗原结合臂包含第二重链部分(HC2),该第二重链部分包含形成结合第二抗原的第二抗原结合结构域的第二重链可变结构域(VH2)。在一些实施方案中,第二结合臂从N末端到C末端包含由VH2和VL2形成的单链可变片段(scFv),和第二Fc结构域。

[0148] 在一些实施方案中,第二抗原结合臂的VH2经由第二Fc结构域与第三抗原结合臂的VH3偶联。在一些实施方案中,第二抗原结合臂的第二Fc结构域经由接头与第三抗原结合臂偶联,从而形成偶联的第二抗原结合臂和第三抗原结合臂。偶联的第二抗原结合臂和第三抗原结合臂从N末端到C末端可包含第二抗原结合结构域、第二Fc结构域、第一接头和第三抗原结合臂。在一些实施方案中,第三抗原结合臂是由第三抗原结合臂的VH3和VL3形成的单链可变片段(scFv)。

[0149] 在优选的实施方案中,BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体是包含CD3特异性臂的三特异性抗体,该CD3特异性臂包含含有VH1的第一重链部分(HC1)和含有VL1的轻链部分(LC)。VH1和VL1结构域配对以形成结合CD3的第一抗原结合结构域。三特异性抗体的第二抗原结合臂包含具有形成结合第二抗原的第二抗原结合结构域的VH2的第二重链部分(HC2)。CD3特异性结合臂的HC1或第二抗原结合臂的HC2与包含形成结合第三抗原的第三抗原结合结构域的VH3结构域的第三抗原结合臂偶联。在一些实施方案中,第二抗原结合臂是BCMA,并且第三抗原结合臂是GPCR5D。在一些实施方案中,第二抗原结合臂是GPCR5D,并且第三抗原结合臂是BCMA。

[0150] 在一个实施方案中,BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体是包含CD3特异性结合臂的三特异性抗体,该CD3特异性结合臂包含具有VH1的HC1和具有VL1的LC。VH1和VL1配对以形成结合CD3的第一CD3特异性抗原结合结构域。第二抗原结合臂包含形成结合GPCR5D的第二抗原结合结构域的VH2和VL2。第三抗原结合臂与第二抗原结合臂偶联并包含形成结合BCMA的第三抗原结合结构域的VH3和VL3。

[0151] 在一个实施方案中,BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体是包含CD3特异性结合臂的三特异性抗体,该CD3特异性结合臂包含具有VH1的HC1和具有VL1的LC。VH1和VL1配对以形成结合CD3的第一CD3特异性抗原结合结构域。第二抗原结合臂包含形成结合BCMA的第二抗原结合结构域的VH2和VL2。第三抗原结合臂与第二抗原结合臂偶联并包含形成结合GPCR5D的第三抗原结合结构域的VH3和VL3。

[0152] 在一个实施方案中,BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体是包含CD3特异性结合臂的三特异性抗体,该CD3特异性结合臂包含具有VH1的HC1和具有VL1的LC。VH1和VL1配对以形成结合CD3的第一CD3特异性抗原结合结构域。第二抗原结合臂包含形成结合GPCR5D的第二

抗原结合结构域的VH2和VL2。第三抗原结合臂与第一CD3特异性抗原结合臂偶联并包含形成结合BCMA的第三抗原结合结构域的VH3和VL3。

[0153] 在一个实施方案中,BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体是包含CD3特异性结合臂的三特异性抗体,该CD3特异性结合臂包含具有VH1的HC1和具有VL1的LC。VH1和VL1配对以形成结合CD3的第一CD3特异性抗原结合结构域。第二抗原结合臂包含形成结合BCMA的第二抗原结合结构域的VH2和VL2。第三抗原结合臂与第一CD3特异性抗原结合臂偶联并包含形成结合GPCR5D的第三抗原结合结构域的VH3和VL3。

[0154] 在一些实施方案中,第一抗原结合臂的具有VH1结构域的HC1和具有VL1结构域的LC形成包含第一抗原结合结构域的抗原结合片段(Fab)。在一些实施方案中,第二抗原结合臂的VH2和VL2形成包含第二抗原结合结构域的单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,第三抗原结合臂的VH3和VL3形成包含第三抗原结合结构域的单链可变片段(scFv)。

[0155] 在一个实施方案中,CD3结合臂包含抗原结合片段(Fab),BCMA结合臂包含单链可变片段(scFv),并且GPCR5D结合臂包含单链可变片段(scFv)。

[0156] 在一个实施方案中,CD3结合臂包含单链可变片段(scFv),BCMA结合臂包含抗原结合片段(Fab),并且GPCR5D结合臂包含单链可变片段(scFv)。

[0157] 在一个实施方案中,CD3结合臂包含单链可变片段(scFv),BCMA结合臂包含单链可变片段(scFv),并且GPCR5D结合臂包含抗原结合片段(Fab)。

[0158] 在一些实施方案中,三特异性抗体的CD3结合臂包含HC1和LC。HC1可包含恒定重链区(CH1、CH2和CH3)和VH1。LC可包含VL1。VH1和VL1组合以形成CD3抗原结合结构域。

[0159] 在一些实施方案中,三特异性抗体的GPCR5D结合臂包含HC2。HC2可包含恒定重链区(CH2和CH3)和在CH2区的N末端处附接的单链可变片段(scFv),其中scFv包含GPCR5D抗原结合结构域。

[0160] 在一些实施方案中,三特异性抗体还包含与GPCR5D结合臂的CH3区的C末端附接以形成GPCR5D/BCMA结合臂的BCMA抗原结合臂。在一些实施方案中,BCMA抗原结合臂包含第二单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,GPCR5D/BCMA臂可具有以下结构:含有GPCR5D结合结构域的scFv、CH2和CH3区、含有BCMA结合结构域的scFv。

[0161] 在一些实施方案中,三特异性抗体的CD3结合臂包含HC1和LC。HC1可包含恒定重链区(CH1、CH2和CH3)和VH1。LC可包含VL1。VH1和VL1组合以形成CD3抗原结合结构域。

[0162] 在一些实施方案中,三特异性抗体的BCMA结合臂包含HC2。HC2可包含恒定重链区(CH2和CH3)和在CH2区的N末端处附接的单链可变片段(scFv),其中scFv包含BCMA抗原结合结构域。

[0163] 在一些实施方案中,三特异性抗体还包含与CD3结合臂的CH3区的C末端附接以形成CD3/GPCR5D结合臂的GPCR5D抗原结合臂。在一些实施方案中,BCMA抗原结合臂包含第二单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,CD3/GPCR5D臂可具有以下结构:含有CD3结合结构域的Fab、CH2和CH3区、含有GPCR5D结合结构域的scFv。

[0164] 在一些实施方案中,本发明的多特异性抗体包括具有全长抗体结构的抗体。如本文所用,“全长抗体”是指具有两条全长抗体重链和两条全长抗体轻链的抗体。全长抗体重链(HC)包含重链可变结构域VH和重链恒定结构域CH1、CH2和CH3。全长抗体轻链(LC)包含轻链可变结构域VL和轻链恒定结构域CL。全长抗体可在一条或两条重链中缺少C末端赖氨酸

(K)。术语“Fab臂”或“半分子”是指结合抗原的一个重链-轻链对。在一些实施方案中,抗原结合结构域之一是基于非抗体的结合结构域,例如基于3型纤连蛋白结构域的结合结构域,例如Centyrin。

[0165] BCMA结合臂

[0166] 本文所述的BCMA×GPC5D×CD3多特异性抗体包含对BCMA具有特异性的抗原结合臂。在一些实施方案中,BCMA结合臂结合人BCMA。在一些实施方案中,BCMA结合臂结合人BCMA和食蟹猴BCMA。在一些实施方案中,BCMA结合臂结合人BCMA,但不结合食蟹猴BCMA。在一些实施方案中,BCMA结合臂与包含一个或多个来自BCMA细胞外结构域(ECD)的残基的表位结合。在一些实施方案中,BCMA结合臂结合至BCMA BCMW37链的残基17-26(LLHACIPCQL (SEQ ID NO:162))。

[0167] BCMA结合臂可以以 5×10^{-7} M或更小,诸如 1×10^{-7} M或更小、 5×10^{-8} M或更小、 1×10^{-8} M或更小、 5×10^{-9} M或更小、 1×10^{-9} M或 5×10^{-10} M或更小的亲和力结合至BCMA。在一个实施方案中,BCMA结合臂以约 1×10^{-10} M至 1×10^{-7} M的亲和力结合至BCMA。在一个实施方案中,BCMA结合臂以约 1×10^{-10} M、约 2×10^{-10} M、约 3×10^{-10} M、约 4×10^{-10} M、约 5×10^{-10} M、约 6×10^{-10} M、约 7×10^{-10} M、约 8×10^{-10} M、约 9×10^{-10} M、约 1×10^{-9} M、约 2×10^{-9} M、约 3×10^{-9} M、约 4×10^{-9} M、约 5×10^{-9} M、约 6×10^{-9} M、约 7×10^{-9} M、约 8×10^{-9} M或约 9×10^{-9} M的亲和力结合至BCMA。在一个实施方案中,BCMA结合臂以约 1×10^{-10} M至 5×10^{-10} M、约 1×10^{-10} M至 8×10^{-10} M、约 2×10^{-10} M至 9×10^{-10} M、约 3×10^{-10} M至 10×10^{-10} M、约 4×10^{-10} M至 10×10^{-10} M或约 5×10^{-10} M至 10×10^{-10} M的亲和力结合至BCMA。在一个实施方案中,BCMA结合臂以约 8.4×10^{-10} M的亲和力结合至BCMA,如通过表面等离子共振(SPR)测定所确定的。在一个实施方案中,BCMA结合臂以约 2.1×10^{-10} M的亲和力结合至BCMA,如通过表面等离子共振(SPR)测定所确定的。

[0168] 表1提供了本文所述的一些BCMA特异性抗体的示例的汇总:

[0169] 表1. 针对人BCMA生成的示例性mAb的CDR序列

[0170]

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
----	---------	---------	---------	---------	---------	---------

[0171]

BCMB519	GFTFSSY AMS (SEQ ID NO 20)	AISGSGGS TY (SEQ ID NO 21)	DEGYSSG HYYGMD V (SEQ ID NO 22)	RASQSISS SFLT (SEQ ID NO 17)	GASSRAT (SEQ ID NO 18)	QHYGSSP MYT (SEQ ID NO 19)
BCMB69	SGSYFWG (SEQ ID NO 32)	SIYYSGIT YYNPSLK S (SEQ ID NO 33)	HDGAVA GLFDY (SEQ ID NO 34)	GGNNIGS KSVH (SEQ ID NO 39)	DDSDRPS (SEQ ID NO 40)	QVWDSSS DHVV (SEQ ID NO 41)
BCMB117	SGSYFWG (SEQ ID NO 32)	SIYYSGIT YYNPSLK S (SEQ ID NO 33)	HDGAVA GLFDY (SEQ ID NO 34)	GGNNIGS KSVH (SEQ ID NO 39)	DDSDRPS (SEQ ID NO 40)	QVWDSSS DHVV (SEQ ID NO 41)
BCMB123	SSSYFWG (SEQ ID NO 38)	SIYYSGIT YYNPSLK S (SEQ ID NO 33)	HDGAVA GLFDY (SEQ ID NO 34)	GGNNIGS KSVH (SEQ ID NO 39)	DDSDRPS (SEQ ID NO 40)	QVWDSSS DHVV (SEQ ID NO 41)
BCMB128	SGSYFWG (SEQ ID NO 32)	SIYYSGIT YYNPSLK S (SEQ ID NO 33)	HDGATAG LFDY (SEQ ID NO 37)	GGNNIGS KSVH (SEQ ID NO 39)	DDSDRPS (SEQ ID NO 40)	QVWDSSS DHVV (SEQ ID NO 41)
BCMB129	SGSYFWG (SEQ ID NO 32)	SIYYSGIT YYNPSLK S (SEQ ID NO 36)	HDGAVA GLFDY (SEQ ID NO 34)	GGNNIGS KSVH (SEQ ID NO 39)	DDSDRPS (SEQ ID NO 40)	QVWDSSS DHVV (SEQ ID NO 41)
BCMB176	SSSYFWG (SEQ ID NO 38)	SIYYSGIT YYNPSLK S (SEQ ID NO 33)	HDGATAG LFDY (SEQ ID NO 37)	GGNNIGS KSVH (SEQ ID NO 39)	DDSDRPS (SEQ ID NO 40)	QVWDSSS DHVV (SEQ ID NO 41)
BCMB177	SSSYFWG (SEQ ID NO 38)	SIYYSGRT YYNPSLK S (SEQ ID NO 164)	HDGATAG LFDY (SEQ ID NO 37)	GGNNIGS KSVH (SEQ ID NO 39)	DDSDRPS (SEQ ID NO 40)	QVWDSSS DHVV (SEQ ID NO 41)

[0172] 一些BCMA特异性抗体或抗原结合片段的特征可以在例如美国专利10,072,088中找到,该专利的内容全文以引用方式并入本文。

[0173] 在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有表1中所述抗体中的任一个抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3的重链可变结构域。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有表1中所述抗体中的任一个抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变区。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有表1中所述抗体中的任一个抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3的重链可变结构域和含有表1中所述抗体中的任一个抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变区。在一些实施方案中,BCMA结合臂与包含含有表1中所述抗体中的任一个抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3的重链以及含有表1中所述抗体中的任一个抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3的轻链的抗体或抗原结合竞争结合至BCMA。

[0174] 在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有表1中所述抗体中的任一个抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3的重链。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有表1中所述抗体中的任一个抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3的轻链。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有表1中所述抗体中的任一个抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3的重链和含有表1中所述抗体中的任一个抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3的轻链。

[0175] 在一些实施方案中,BCMA结合臂包含克隆BCMB519、BCMB69、BCMB117、BCMB123、

BCMB128、BCMB129、BCMB176或BCMB177的重链CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含克隆BCMB519、BCMB69、BCMB117、BCMB123、BCMB128、BCMB129、BCMB176或BCMB177的重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3。在一个实施方案中,BCMA结合臂包含克隆BCMB519的重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3。

[0176] 在一些实施方案中,BCMA结合臂包含来源于如表1中所述的抗体克隆的重链可变结构域。在一些示例性实施方案中,BCMA结合臂包含来源于如表1中所述的抗体克隆的重链可变结构域和轻链可变结构域。在一些示例性实施方案中,BCMA结合臂包含克隆BCMB519、BCMB69、BCMB117、BCMB123、BCMB128、BCMB129、BCMB176或BCMB177的重链可变结构域和轻链可变结构域。在一个实施方案中,BCMA结合臂包含克隆BCMB519的重链可变结构域和轻链可变结构域。

[0177] 在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有SEQ ID NO:20的重链CDR1、含有SEQ ID NO:21的重链CDR2和含有SEQ ID NO:22的重链CDR3。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有SEQ ID NO:20的重链CDR1、含有SEQ ID NO:21的重链CDR2、含有SEQ ID NO:22的重链CDR3、含有SEQ ID NO:17的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:18的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:19的轻链CDR3。BCMA结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:24基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:24基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:23基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0178] 在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有SEQ ID NO:32的重链CDR1、含有SEQ ID NO:33的重链CDR2和含有SEQ ID NO:34的重链CDR3。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有SEQ ID NO:32的重链CDR1、含有SEQ ID NO:33的重链CDR2、含有SEQ ID NO:34的重链CDR3、含有SEQ ID NO:39的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:40的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:41的轻链CDR3。BCMA结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:42基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:42基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:48基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0179] 在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有SEQ ID NO:38的重链CDR1、含有SEQ ID NO:33的重链CDR2和含有SEQ ID NO:34的重链CDR3。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有SEQ ID NO:38的重链CDR1、含有SEQ ID NO:33的重链CDR2、含有SEQ ID NO:34的重链CDR3、含有SEQ ID NO:39的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:40的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:41的轻链CDR3。BCMA结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:43基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:43基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:48基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0180] 在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有SEQ ID NO:32的重链CDR1、含有SEQ ID NO:33的重链CDR2和含有SEQ ID NO:37的重链CDR3。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有SEQ ID NO:32的重链CDR1、含有SEQ ID NO:33的重链CDR2、含有SEQ ID NO:37的重链CDR3、含有SEQ ID NO:39的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:40的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:41的轻链CDR3。BCMA结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含与SEQ ID

NO:44基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:44基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:48基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0181] 在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有SEQ ID NO:32的重链CDR1、含有SEQ ID NO:36的重链CDR2和含有SEQ ID NO:34的重链CDR3。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有SEQ ID NO:32的重链CDR1、含有SEQ ID NO:36的重链CDR2、含有SEQ ID NO:34的重链CDR3、含有SEQ ID NO:39的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:40的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:41的轻链CDR3。BCMA结合臂包含人框架序列。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:45基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:45基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:48基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0182] 在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有SEQ ID NO:38的重链CDR1、含有SEQ ID NO:33的重链CDR2和含有SEQ ID NO:37的重链CDR3。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有SEQ ID NO:38的重链CDR1、含有SEQ ID NO:33的重链CDR2、含有SEQ ID NO:37的重链CDR3、含有SEQ ID NO:39的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:40的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:41的轻链CDR3。BCMA结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:46基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:46基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:48基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0183] 在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有SEQ ID NO:38的重链CDR1、含有SEQ ID NO:164的重链CDR2和含有SEQ ID NO:37的重链CDR3。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有SEQ ID NO:38的重链CDR1、含有SEQ ID NO:164的重链CDR2、含有SEQ ID NO:37的重链CDR3、含有SEQ ID NO:39的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:40的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:41的轻链CDR3。BCMA结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:47基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:47基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:48基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0184] BCMA结合臂可通过重组方式来源于任何物种。例如,BCMA抗原结合臂可来源于小鼠、大鼠、山羊、马、猪、牛、鸡、兔、羊驼、驴、人或其嵌合型式。为适于施用于人,非人源抗原结合片段可在施用于人类患者时被基因或结构改变成抗原性较低。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含嵌合的抗原结合片段。

[0185] 在一些实施方案中,BCMA结合臂包含人源化抗原结合片段。人源化抗原结合片段可来源于含有来源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(诸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他抗原结合亚序列)。在很大程度上,人源化抗体或抗原结合片段是人免疫球蛋白(受体抗体)或抗原结合片段,其中受体的互补决定区(CDR)中的残基由具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠或兔的CDR中的残基替换。一般来讲,人源化抗体抗原结合片段将包含基本上所有的至少一个,并且一般是两个可变结构域,其中所有或基本上所有的CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些CDR区,并且所有或基本上所有的框架区是人免疫球蛋白序列的那些框架区。人源化抗

体抗原结合片段可包含免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分。

[0186] GPRC5D结合臂

[0187] 本文所述的BCMA×GPRC5D×CD3多特异性抗体包含对GPRC5D具有特异性的抗原结合臂。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂结合人GPRC5D。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂结合人GPRC5D和食蟹猴GPRC5D,优选结合其细胞外结构域。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂结合人GPRC5D,但不结合食蟹猴GPRC5D。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂结合至具有SEQ ID NO:116的氨基酸序列的多肽的一个或多个残基。

[0188] 表2提供了本文所述的一些GPRC5D特异性抗体的示例的汇总:

[0189] 表2. 针对人GPRC5D生成的示例性mAb的CDR序列

[0190]

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B680						

[0191]

	GFSLTNIR MSVS (SEQ ID NO:12)	HIFSNDEK S (SEQ ID NO:13)	MRLPYGM DV (SEQ ID NO:14)	RSSQSLVH SDGNTYLS (SEQ ID NO:9)	KISNRFF (SEQ ID NO:10)	MQATQ FPHT (SEQ ID NO:11)
GC5B81	SYAIS (SEQ ID NO 49)	GIPIFGTA NYAQKFQ G (SEQ ID NO 53)	ESRWRGY KLD (SEQ ID NO 57)	RASQSISS YLN (SEQ ID NO 61)	AASSLQS (SEQ ID NO 64)	QQSYST PLT (SEQ ID NO 67)
GC5B465 GC5B597 GC5B598	NYWMS (SEQ ID NO 50)	GISYSGGS KYYASSV KG (SEQ ID NO 54)	AAFDGRR AVRLD (SEQ ID NO 58)	RASQSISS YLN (SEQ ID NO 61)	AASSLQS (SEQ ID NO 64)	QQSYST PLT (SEQ ID NO 67)
GC5B483 GC5B599	SYFIG (SEQ ID NO 51)	IIYPGKSDT RYSPSFQG (SEQ ID NO 55)	VYSFGGR HKALFDY (SEQ ID NO 59)	RASQSVSS YLA (SEQ ID NO 62)	DASNRAT (SEQ ID NO 65)	QQRSN WPLT (SEQ ID NO 68)
GC5B596	GYTMN (SEQ ID NO 52)	LINPYNSD TNYAQKL QG (SEQ ID NO 56)	VALRVAL DY (SEQ ID NO 60)	KASQNVA THVG (SEQ ID NO 63)	SASYRYS (SEQ ID NO 66)	QQYNR YPYT (SEQ ID NO 69)
GC5B382	DYGMH (SEQ ID NO 70)	AIKYSOGGS TYYADSV KG (SEQ ID NO 77)	RAESGPGL DY (SEQ ID NO 84)	KSSQSVLY SSNNKNYL A (SEQ ID NO 91)	WASTRES (SEQ ID NO 93)	QQYYS TPLT (SEQ ID NO 95)
GC5B379	NYWMS (SEQ ID NO 50)	GISYSGGS KYYADSV KG (SEQ ID NO 78)	AAWDFGR RAVRLDY (SEQ ID NO 85)	RASQSISS YLN (SEQ ID NO 61)	AASSLQS (SEQ ID NO 64)	QQSYST PLT (SEQ ID NO 67)
GC5B373	SYWIG (SEQ ID NO 71)	IIYPGDSDT RYSPSFQG (SEQ ID NO 79)	IGFYGRSF RIFDY (SEQ ID NO 86)	RASQSVSS YLA (SEQ ID NO 62)	DASNRAT (SEQ ID NO 65)	QQRSN WPLT (SEQ ID NO 68)
GC5B376	SYWIG (SEQ ID NO 71)	IIYPGDSDT RYSPSFQG (SEQ ID NO 79)	VYSFGGR HKALFDY (SEQ ID NO 59)	RASQSVSS YLA (SEQ ID NO 62)	DASNRAT (SEQ ID NO 65)	QQRSN WPLT (SEQ ID NO 68)
GC5B385	GYAMS (SEQ ID NO 72)	AISGSGGS TYYADSV KG (SEQ ID NO 80)	VDRSFGSR RYTLDY (SEQ ID NO 87)	RASQSVSS YLA (SEQ ID NO 62)	DASNRAT (SEQ ID NO 65)	QQRSN WPLT (SEQ ID NO 68)

[0192]

GC5B370	SYGIS (SEQ ID NO 73)	GIPIFGNIN YAQKFQG (SEQ ID NO 81)	VSRRFKRF AYYFDY (SEQ ID NO 88)	KSSQSVLY SSNNKNYL A (SEQ ID NO 91)	WASTRES (SEQ ID NO 93)	QQYYSTPLT (SEQ ID NO 95)
GC5B602	GYSFTGYT MN (SEQ ID NO 74)	LINPYNGD TN (SEQ ID NO 82)	VALRVAL DY (SEQ ID NO 60)	KASQNVA THVG (SEQ ID NO 63)	SASYRYS (SEQ ID NO 66)	QQYNRY PYT (SEQ ID NO 69)
GC5B603	SYAMS (SEQ ID NO 75)	AISGSGGS TYYADSV KG (SEQ ID NO 80)	SNFLPVVF DY (SEQ ID NO 89)	RASQSVRK SLA (SEQ ID NO 92)	TASNRAT (SEQ ID NO 94)	QQYFR APIT (SEQ ID NO 96)
GC5B601	GFSLTSYN VH (SEQ ID NO 76)	VIWAGGST NYNSALM S (SEQ ID NO 83)	DGIRLRFA Y (SEQ ID NO 90)	KASQNVA THVG (SEQ ID NO 63)	SASYRYS (SEQ ID NO 66)	QQYNRY PYT (SEQ ID NO 69)

[0193] 一些GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段的特征可以在例如美国专利号10,562,968、美国公开申请US2020/0231686中找到,该文献中的每一者的内容全文以引用方式并入本文。

[0194] 在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含含有表2中所述抗体中的任一个抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含含有表2中所述抗体中的任一个抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变结构域。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含含有表2中所述抗体中的任一个抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3的重链可变结构域和含有表2中所述抗体中的任一个抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变结构域。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂与包含含有表2中所述抗体中的任一个抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3的重链以及含有表2中所述抗体中的任一个抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3的轻链的抗体或抗原结合竞争结合至GPCR5D。

[0195] 在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含含有表2中所述抗体中的任一个抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3的重链。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含含有表2中所述抗体中的任一个抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3的轻链。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含含有表2中所述抗体中的任一个抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3的重链和含有表2中所述抗体中的任一个抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3的轻链。

[0196] 在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含来源于如表2中所述的抗体克隆的重链CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含来源于如表2中所述的抗体克隆的轻链CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含来源于如表2中所述的抗体克隆的重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含克隆GC5B680、GC5B81、GC5B465、GS5B483、GC5B596、GC5B382、GC5B379、GC5B373、GC5B376、GC5B385、GC5B370、GC5B602、GC5B603、GC5B599、GC5B601、GC5B598或GC5B597的重链CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含克隆GC5B680、GC5B81、GC5B465、GS5B483、GC5B596、GC5B382、GC5B379、GC5B373、GC5B376、GC5B385、GC5B370、GC5B602、GC5B603、GC5B599、GC5B601、GC5B598或GC5B597的重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链

CDR1、CDR2和CDR3。在一个实施方案中,GPRC5D结合臂包含克隆GC5B680的重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3。

[0197] 在一些示例性实施方案中,GPRC5D结合臂包含来源于如表2中所述的抗体克隆的重链可变结构域。在一些示例性实施方案中,GPRC5D结合臂包含来源于如表2中所述的抗体克隆的重链可变结构域和轻链可变结构域。在一些示例性实施方案中,GPRC5D结合臂包含克隆GC5B680、GC5B81、GC5B465、GS5B483、GC5B596、GC5B382、GC5B379、GC5B373、GC5B376、GC5B385、GC5B370、GC5B602、GC5B603、GC5B599、GC5B601、GC5B598或GC5B597的重链可变结构域和轻链可变结构域。在一个实施方案中,GPRC5D结合臂包含克隆GC5B680的重链可变结构域和轻链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体克隆可以以28nM或更小的EC₅₀体外诱导ADCC。

[0198] 在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:12的重链CDR1、含有SEQ ID NO:13的重链CDR2和含有SEQ ID NO:14的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:12的重链CDR1、含有SEQ ID NO:13的重链CDR2、含有SEQ ID NO:14的重链CDR3、含有SEQ ID NO:9的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:10的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:11的轻链CDR3。GPRC5D结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含与SEQ ID NO:16基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含与SEQ ID NO:16基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:15基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0199] 在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:49的重链CDR1、含有SEQ ID NO:53的重链CDR2和含有SEQ ID NO:57的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:49的重链CDR1、含有SEQ ID NO:53的重链CDR2、含有SEQ ID NO:57的重链CDR3、含有SEQ ID NO:61的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:64的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:67的轻链CDR3。GPRC5D结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含与SEQ ID NO:97基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含与SEQ ID NO:97基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:101基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0200] 在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:50的重链CDR1、含有SEQ ID NO:54的重链CDR2和含有SEQ ID NO:58的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:50的重链CDR1、含有SEQ ID NO:54的重链CDR2、含有SEQ ID NO:58的重链CDR3、含有SEQ ID NO:61的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:64的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:67的轻链CDR3。GPRC5D结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含与SEQ ID NO:98基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含与SEQ ID NO:98基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:101基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0201] 在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:51的重链CDR1、含有SEQ ID NO:55的重链CDR2和含有SEQ ID NO:59的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:51的重链CDR1、含有SEQ ID NO:55的重链CDR2、含有SEQ ID NO:59的重链CDR3、含有SEQ ID NO:62的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:65的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:68的轻链CDR3。GPRC5D结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包

含与SEQ ID NO:99基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含与SEQ ID NO:99基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:102基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0202] 在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:52的重链CDR1、含有SEQ ID NO:56的重链CDR2和含有SEQ ID NO:60的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:52的重链CDR1、含有SEQ ID NO:56的重链CDR2、含有SEQ ID NO:60的重链CDR3、含有SEQ ID NO:63的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:66的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:69的轻链CDR3。GPRC5D结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含与SEQ ID NO:100基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含与SEQ ID NO:100基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:103基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0203] 在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:70的重链CDR1、含有SEQ ID NO:77的重链CDR2和含有SEQ ID NO:84的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:70的重链CDR1、含有SEQ ID NO:77的重链CDR2、含有SEQ ID NO:84的重链CDR3、含有SEQ ID NO:91的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:93的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:95的轻链CDR3。GPRC5D结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含与SEQ ID NO:104基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含与SEQ ID NO:104基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:113基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0204] 在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:50的重链CDR1、含有SEQ ID NO:78的重链CDR2和含有SEQ ID NO:85的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:50的重链CDR1、含有SEQ ID NO:78的重链CDR2、含有SEQ ID NO:85的重链CDR3、含有SEQ ID NO:61的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:64的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:67的轻链CDR3。GPRC5D结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含与SEQ ID NO:105基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含与SEQ ID NO:105基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:101基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0205] 在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:71的重链CDR1、含有SEQ ID NO:79的重链CDR2和含有SEQ ID NO:86的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:71的重链CDR1、含有SEQ ID NO:79的重链CDR2、含有SEQ ID NO:86的重链CDR3、含有SEQ ID NO:62的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:65的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:68的轻链CDR3。GPRC5D结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含与SEQ ID NO:106基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含与SEQ ID NO:106基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:102基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0206] 在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:71的重链CDR1、含有SEQ ID NO:79的重链CDR2和含有SEQ ID NO:59的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含含有SEQ ID NO:71的重链CDR1、含有SEQ ID NO:79的重链CDR2、含有SEQ ID NO:59的重链CDR3、含有SEQ ID NO:62的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:65的轻链CDR2和含有SEQ ID

N0:68的轻链CDR3。GPCR5D结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含与SEQ ID N0:107基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含与SEQ ID N0:107基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID N0:102基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0207] 在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含含有SEQ ID N0:72的重链CDR1、含有SEQ ID N0:80的重链CDR2和含有SEQ ID N0:87的重链CDR3。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含含有SEQ ID N0:72的重链CDR1、含有SEQ ID N0:80的重链CDR2、含有SEQ ID N0:87的重链CDR3、含有SEQ ID N0:62的轻链CDR1、含有SEQ ID N0:65的轻链CDR2和含有SEQ ID N0:68的轻链CDR3。GPCR5D结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含与SEQ ID N0:108基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含与SEQ ID N0:108基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID N0:102基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0208] 在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含含有SEQ ID N0:73的重链CDR1、含有SEQ ID N0:81的重链CDR2和含有SEQ ID N0:88的重链CDR3。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含含有SEQ ID N0:73的重链CDR1、含有SEQ ID N0:81的重链CDR2、含有SEQ ID N0:88的重链CDR3、含有SEQ ID N0:91的轻链CDR1、含有SEQ ID N0:93的轻链CDR2和含有SEQ ID N0:95的轻链CDR3。GPCR5D结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含与SEQ ID N0:109基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含与SEQ ID N0:109基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID N0:113基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0209] 在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含含有SEQ ID N0:74的重链CDR1、含有SEQ ID N0:82的重链CDR2和含有SEQ ID N0:60的重链CDR3。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含含有SEQ ID N0:74的重链CDR1、含有SEQ ID N0:82的重链CDR2、含有SEQ ID N0:60的重链CDR3、含有SEQ ID N0:63的轻链CDR1、含有SEQ ID N0:66的轻链CDR2和含有SEQ ID N0:69的轻链CDR3。GPCR5D结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含与SEQ ID N0:110基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含与SEQ ID N0:110基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID N0:103基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0210] 在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含含有SEQ ID N0:75的重链CDR1、含有SEQ ID N0:80的重链CDR2和含有SEQ ID N0:89的重链CDR3。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含含有SEQ ID N0:75的重链CDR1、含有SEQ ID N0:80的重链CDR2、含有SEQ ID N0:89的重链CDR3、含有SEQ ID N0:92的轻链CDR1、含有SEQ ID N0:94的轻链CDR2和含有SEQ ID N0:96的轻链CDR3。GPCR5D结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含与SEQ ID N0:111基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含与SEQ ID N0:111基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID N0:114基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0211] 在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含含有SEQ ID N0:76的重链CDR1、含有SEQ ID N0:83的重链CDR2和含有SEQ ID N0:90的重链CDR3。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含含有SEQ ID N0:76的重链CDR1、含有SEQ ID N0:83的重链CDR2、含有SEQ ID N0:90的

重链CDR3、含有SEQ ID NO:63的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:66的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:69的轻链CDR3。GPCR5D结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含与SEQ ID NO:112基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含与SEQ ID NO:112基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:115基本上相同或相同的轻链可变结构域。

[0212] GPCR5D结合臂可通过重组方式来源于任何物种。例如,GPCR5D抗原结合臂可来源于小鼠、大鼠、山羊、马、猪、牛、鸡、兔、羊驼、驴、人或其嵌合型式。为适于施用于人,非人源抗原结合片段可在施用于人类患者时被基因或结构改变成抗原性较低。在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含嵌合的抗原结合片段。

[0213] 在一些实施方案中,GPCR5D结合臂包含人源化抗原结合片段。人源化抗原结合片段可来源于含有来源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(诸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他抗原结合亚序列)。在很大程度上,人源化抗体或抗原结合片段是人免疫球蛋白(受体抗体)或抗原结合片段,其中受体的互补决定区(CDR)中的残基由具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠或兔的CDR中的残基替换。一般来讲,人源化抗体抗原结合片段将包含基本上所有的至少一个,并且一般是两个可变结构域,其中所有或基本上所有的CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些CDR区,并且所有或基本上所有的框架区是人免疫球蛋白序列的那些框架区。人源化抗体抗原结合片段可包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分。

[0214] CD3结合臂

[0215] 本文所述的BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体包含结合CD3的抗原结合臂。在一些实施方案中,CD3结合臂结合人CD3。在一些优选的实施方案中,BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体的CD3特异性臂来源于结合并激活人原代T细胞和/或食蟹猴原代T细胞的CD3特异性抗体。在一些实施方案中,CD3结合臂结合至CD3ε的N末端处的表位。在一些实施方案中,CD3结合臂结合至CD3εδ链的残基22-35(QDGNEEMGGITQTP(SEQ ID NO:161))。

[0216] CD3结合臂可以以 5×10^{-7} M或更小,诸如 1×10^{-7} M或更小、 5×10^{-8} M或更小、 1×10^{-8} M或更小、 5×10^{-9} M或更小或 1×10^{-9} M或更小的亲和力结合至CD3。在一些实施方案中,CD3结合臂以约 1×10^{-8} M、约 2×10^{-8} M、约 3×10^{-8} M、约 4×10^{-8} M、约 5×10^{-8} M、约 6×10^{-8} M、约 7×10^{-8} M、约 8×10^{-8} M、约 9×10^{-8} M或约 1×10^{-8} M的亲和力结合至CD3。在一些实施方案中,CD3结合臂以约 1×10^{-8} M至约 3×10^{-8} M、约 2×10^{-8} M至约 4×10^{-8} M、约 1×10^{-8} M至约 5×10^{-8} M、约 2×10^{-8} M至约 6×10^{-8} M或约 3×10^{-8} M至约 8×10^{-8} M的亲和力结合至CD3。在一个实施方案中,CD3结合臂以约 2.5×10^{-8} M的亲和力结合至CD3。在一个实施方案中,CD3结合臂以约 3.1×10^{-8} M的亲和力结合至CD3。在一些实施方案中,通过表面等离子共振(SPR)测定来测定CD3结合亲和力。

[0217] 人CD3ε以UniProt P07766描述(CD3E_HUMAN)。现有技术中所述的抗CD3ε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购自Pharmingen。现有技术中所述的另一种抗CD3抗体是UCHT-1(参见W02000041474)。现有技术中所述的另一种抗CD3抗体是BC-3(Fred Hutchinson Cancer Research Institute;用于GvHD的I/II期试验,Anasetti等人,Transplantation, 54:844

(1992))。SP34与UCHT-1和BC-3的不同之处在于,SP-34识别仅存在于CD3的 ϵ 链上的表位(参见Salmeron等人,(1991)J.Immunol.147:3047),而UCHT-1和BC-3识别由 ϵ 链和 γ 链二者贡献的表位。在W02008119565、W02008119566、W02008119567、W02010037836、W02010037837和W02010037838中提到了具有与抗体SP34相同序列的抗体的序列。在US8236308 (W02007042261)中提到了与抗体SP34的VH具有96%同一性的序列。

[0218] 在一些实施方案中,CD3结合臂接触包含CD3 ϵ 的六个N末端氨基酸的表位。在一些实施方案中,多特异性抗体的CD3特异性结合臂来源于小鼠单克隆抗体SP34,一种小鼠IgG3/ λ 同种型。在一些实施方案中,CD3结合臂包含抗体SP34的CDR。此类CD3结合臂可以以 5×10^{-7} M或更小,诸如 1×10^{-7} M或更小、 5×10^{-8} M或更小、 1×10^{-8} M或更小、 5×10^{-9} M或更小或 1×10^{-9} M或更小的亲和力结合至CD3。CD3特异性结合臂可为小鼠单克隆抗体SP34的臂的人源化型式。人框架适应(HFA)可用于人源化从其衍生CD3特异性臂的抗CD3抗体。

[0219] 表3提供了本文所述的一些CD3特异性抗体的示例的汇总:

[0220] 表3. 示例性CD3特异性抗体和抗原结合片段的重链和轻链

[0221]

	重链	轻链
CD3B376	CDR 1: GDSVFNNNAAWS (SEQ ID NO: 4)	CDR 1: TGTSSNIGTYKFVS (SEQ ID NO: 1)
	CDR 2: RTYYRSKWLYD (SEQ ID NO: 5)	CDR 2: EVSKRPS (SEQ ID NO: 2)
	CDR 3: GYSSSFYD (SEQ ID NO: 6)	CDR 3: VSYAGSGTLL (SEQ ID NO: 3)
	VH: QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVFN NNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWLY DYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTP EDTALYYCARGYSSSFYDWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 8)	VL: QSALTQPASVSGSPGQSITISC TGTSSNIGTYKFVSWYQQHPD KAPKVLLYEVS KRPSGVSSRF SGSKSGNTASLTISGLQAEDQ ADYHCVSYAGSGTLLFGGGT KLTVL (SEQ ID NO: 7)
	重链: QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVFN NNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWLY DYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTP EDTALYYCARGYSSSFYDWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVSVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 26)	轻链: QSALTQPASVSGSPGQSITISC TGTSSNIGTYKFVSWYQQHPD KAPKVLLYEVS KRPSGVSSRF SGSKSGNTASLTISGLQAEDQ ADYHCVSYAGSGTLLFGGGT KLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS EELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTT PSKQSNKYAASSYLSTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECS (SEQ ID NO: 27)

[0222]	CD3B219	CDR 1: TYAMN (SEQ ID NO: 117)	CDR 1: RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 122)
		CDR 2: RIRSKYNNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 118)	CDR 2: GTNKRAP (SEQ ID NO: 123)
		CDR 3: HGNGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 119)	CDR 3: ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 124)
		VH: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNT YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYA TYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLK TEDTAVYYCARHGNGNSYVSWFAYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 120)	VL: QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CRSSTGAVTTSNYANWVQK PGQAPRGLIGGTNKRAPGTPA RFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVL (SEQ ID NO: 125)
		重链: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNT YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYA TYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLK TEDTAVYYCARHGNGNSYVSWFAYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRW QEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 121)	轻链: QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CRSSTGAVTTSNYANWVQK PGQAPRGLIGGTNKRAPGTPA RFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLT EQWKSIRSYSCQVTHEGSTV EKTVAPECS (SEQ ID NO: 126)

[0223] 一些CD3特异性抗体或抗原结合片段的特征可以在例如美国专利号10,562,968和10,072,088、美国公开申请US2019/0382481中找到,该文献中的每一者的内容全文以引用方式并入本文。

[0224] 在一些实施方案中,CD3结合臂包含含有表3中所述抗体中的任一个抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3的重链可变结构域。在一些实施方案中,CD3结合臂包含含有表3中所述抗体中的任一个抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变结构域。在一些实施方案中,CD3结合臂包含含有表3中所述抗体中的任一个抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3的重链可变结构域和含有表3中所述抗体中的任一个抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变结构域。在一些实施方案中,CD3结合臂与包含含有表3中所述抗体中的任一个抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3的重链以及含有表3中所述抗体中的任一个抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3的轻链的抗体或抗原结合竞争结合至CD3。

[0225] 在一些实施方案中,CD3结合臂包含含有表3中所述抗体中的任一个抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3的重链。在一些实施方案中,CD3结合臂包含含有表3中所述抗体中的任一个抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3的轻链。在一些实施方案中,CD3结合臂包含含有表3中所述抗体中的任一个抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3的重链和含有表3中所述抗体中的任一个抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3的轻链。

[0226] 在一些实施方案中,CD3结合臂包含表3中所述抗体中的任一个抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,CD3结合臂包含表3中所述抗体中的任一个抗体的轻链

CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,CD3结合臂包含含有表3中所述抗体中的任一个抗体的CDR1、CDR2和CDR3的重链和含有表3中所述抗体中的任一个抗体的CDR1、CDR2和CDR3的轻链。在多特异性抗体的一些实施方案中,CD3结合臂包含选自表3的重链和轻链对。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含克隆CD3B376的重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D结合臂包含克隆CD3B219的重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3。

[0227] 在一些实施方案中,CD3结合臂包含含有SEQ ID NO:4的重链CDR1、含有SEQ ID NO:5的重链CDR2和含有SEQ ID NO:6的重链CDR3。在一些实施方案中,CD3结合臂包含含有SEQ ID NO:4的重链CDR1、含有SEQ ID NO:5的重链CDR2、含有SEQ ID NO:6的重链CDR3、含有SEQ ID NO:1的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:2的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:3的轻链CDR3。CD3结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,CD3结合臂包含与SEQ ID NO:8基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,CD3结合臂包含与SEQ ID NO:8基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:7基本上相同或相同的轻链可变结构域。在一些实施方案中,CD3结合臂包含与SEQ ID NO:26基本上相同或相同的重链。在一些实施方案中,CD3结合臂包含与SEQ ID NO:26基本上相同或相同的重链和与SEQ ID NO:27基本上相同或相同的轻链。

[0228] 在一些实施方案中,CD3结合臂包含含有SEQ ID NO:117的重链CDR1、含有SEQ ID NO:118的重链CDR2和含有SEQ ID NO:119的重链CDR3。在一些实施方案中,CD3结合臂包含含有SEQ ID NO:117的重链CDR1、含有SEQ ID NO:118的重链CDR2、含有SEQ ID NO:119的重链CDR3、含有SEQ ID NO:123的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:124的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:125的轻链CDR3。CD3结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,CD3结合臂包含与SEQ ID NO:120基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,CD3结合臂包含与SEQ ID NO:120基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:125基本上相同或相同的轻链可变结构域。在一些实施方案中,CD3结合臂包含与SEQ ID NO:121基本上相同或相同的重链。在一些实施方案中,CD3结合臂包含与SEQ ID NO:121基本上相同或相同的重链和与SEQ ID NO:126基本上相同或相同的轻链。

[0229] 在一些实施方案中,重链和/或轻链的CDR来源于已知的抗CD3抗体,例如,莫罗单抗(muromonab)-CD3(OKT3)、奥昔组单抗(otelixizumab)(TRX4)、替利组单抗(teplizumab)(MGA031)、维西珠单抗(visilizumab)(Nuvion)、TR-66或X35-3、VIT3、BMA030(BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F1 11-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1和WT-31。

[0230] 在一些实施方案中,CD3结合臂为IgG或其衍生物。在一些实施方案中,CD3结合臂为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在其中CD3结合臂具有IgG4同种型的一些实施方案中,所述结合臂在其Fc区中含有S228P、L234A、L235A、F405L和R409K置换。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段结合原代人T细胞上的CD3 ϵ 。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段结合原代食蟹猴T细胞上的CD3 ϵ 。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段结合原代人和食蟹猴T细胞上的CD3 ϵ 。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段激活原代人CD3+T细胞。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段激活原代食蟹猴CD4+T细胞。

[0231] 在一些实施方案中,本文所述的三特异性抗体可采用本领域针对三特异性抗体已经描述的任何形式。在一些实施方案中,基于双特异性抗体形式构建本文所述的三特异性抗体。这可以通过向双特异性抗体添加第三抗原结合臂来实现。不同形式的双特异性抗体已有所描述,并且最近由Chames和Baty在Curr Opin Drug Disc Dev, 2009年,第12卷,第276页中进行了综述。在一些实施方案中,三特异性抗体包括双特异性抗体,其为通过受控Fab臂交换获得的双体抗体、交叉体或双特异性抗体,如本公开中所述的那些。

[0232] 在一些实施方案中,三特异性抗体包括具有互补CH3结构域以强制发生异源二聚化的IgG样分子;重组IgG样双靶向分子,其中该分子的两侧各自含有至少两种不同抗体的Fab片段的一部分或Fab片段;IgG融合分子,其中全长IgG抗体与额外的Fab片段或Fab片段的部分融合;Fc融合分子,其中单链Fv分子或稳定的双体抗体与重链恒定结构域、Fc区或其部分融合;Fab融合分子,其中不同的Fab片段融合在一起;基于ScFv和双体抗体的重链抗体(例如结构域抗体、纳米抗体),其中不同的单链Fv分子或不同的双体抗体或不同的重链抗体(例如结构域抗体、纳米抗体)彼此融合或与另一蛋白质或载剂分子融合。

[0233] 在一些实施方案中,具有互补CH3结构域分子的IgG样分子包括Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech)、杵臼结构(Knobs-into-Holes)抗体(Genentech)、CrossMAbs (Roche)和静电配对体(electrostatically-matched) (Amgen)、LUZ-Y (Genentech)、链交换工程化结构域体(Strand Exchange Engineered Domain body) (SEEDbody) (EMD Serono)、Biclonic (Merus)、DuoBody (Genmab A/S)和其他非对称突变(例如,Zymeworks)。

[0234] 在一些实施方案中,重组IgG样双靶向分子包括双重靶向(DT)-Ig (GSK/Domantis)、二合一抗体(Genentech)、交联MAbs (Karmanos Cancer Center)、mAb2 (F-Star)和CovX体(CovX/Pfizer)。

[0235] 在一些实施方案中,IgG融合分子包括双重可变结构域(DVD)-Ig (Abbott)、IgG样双特异性抗体(InnClone/Eli Lilly)、Ts2Ab (MedImmune/AZ)和BsAb (Zymogenetics)、HERCULES (Biogen Idec)以及TvAb (Roche)。

[0236] 在一些实施方案中,Fc融合分子包括ScFv/Fc融合体(Academic Institution)、SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS)、双亲和性再靶向技术(Fc-DART) (MacroGenics)以及Dual (ScFv).sub.2-Fab (中国国家抗体医药研究中心(National Research Center for Antibody Medicine--China))。

[0237] 在一些实施方案中,Fab融合双特异性抗体包括F(ab)2 (Medarex/AMGEN)、Dual-Action或Bis-Fab (Genentech)、Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics)、二价双特异性抗体(Biotecnol)和Fab-Fv (UCB-Celltech)。基于ScFv的、基于双体抗体的结构域抗体包括但不限于双特异性T细胞衔接器(BiTE) (Micromet)、串联双体抗体(Tandab) (Affimed)、双亲和性再靶向分子(DART) (MacroGenics)、单链双体抗体(Academic)、TCR样抗体(AIT, ReceptorLogics)、人血清白蛋白ScFv融合体(Merrimack)和COMBODY (Epigen Biotech)、双靶向纳米抗体(Ablynx)、仅双重靶向重链结构域抗体。

[0238] 本公开的全长三特异性抗体可例如使用两个单特异性二价抗体之间的Fab臂交换(或半分子交换)通过下列方式产生:在每个半分子中的重链CH3交界处引入置换以促成两个在体外无细胞环境中或使用共表达而具有不同特异性的抗体半分子的异源二聚体形成。

Fab臂交换反应是二硫键异构化反应和CH3结构域解离-缔合的结果。亲本单特异性抗体的铰链区中的重链二硫键减少。亲本单特异性抗体之一的所得游离半胱氨酸与第二亲本单特异性抗体分子的半胱氨酸残基形成重链间二硫键,同时亲本抗体的CH3结构域通过解离-缔合而释放和重新形成。可将Fab臂的CH3结构域改造成促成异源二聚化而非同源二聚化。所得产物是具有两个Fab臂或半分子的双特异性抗体,这两个Fab臂或半分子各自结合不同的表位,例如BCMA(或GPC5D)上的表位和CD3上的表位。然后可将第三抗原结合臂引入到双特异性抗体,例如引入到可结合至第三表位的第一重链或第二重链的C末端,例如GPC5D(或BCMA)。

[0239] 如本文所用,“同源二聚化”是指具有相同CH3氨基酸序列的两条重链的相互作用。如本文所用,“同源二聚体”是指具有含有相同CH3氨基酸序列的两条重链的抗体。

[0240] 如本文所用,“异源二聚化”是指具有不同CH3氨基酸序列的两条重链的相互作用。如本文所用,“异源二聚体”是指具有含有不同CH3氨基酸序列的两条重链的抗体。

[0241] “钮扣”技术(参见,例如PCT国际公布W02006/028936)可用于产生全长三特异性抗体。简而言之,在人IgG中形成CH3结构域的交界的选定氨基酸可在影响CH3结构域相互作用的位置处突变,从而促进异源二聚体形成。将具有小侧链(白)的氨基酸引入到结合第一抗原的抗体的重链中,并且将具有大侧链(杵)的氨基酸引入到结合第二抗原的抗体的重链中。在两种抗体共表达后,由于具有“扣”的重链与具有“钮”的重链的优先相互作用而形成异源二聚体。形成杵白结构的示例性CH3置换对(表示为第一重链的第一CH3结构域中的修饰位置/第二重链的第二CH3结构域中的修饰位置)是:T366Y/F405A、T366W/F405W、F405W/Y407A、T394W/Y407T、T394S/Y407A、T366W/T394S、F405W/T394S和T366W/T366S_L368A_Y407V。

[0242] 在本文所述的三特异性抗体或三特异性结合片段的一些实施方案中,Fc结构域中的一者包含突变T366S、L368A和Y407V,并且另一个Fc结构域包含突变T366W。在一些实施方案中,第一抗原结合臂(例如,CD3结合臂)的第一重链部分(HC1)的Fc结构域包含突变T366S、L368A和Y407V,并且第二抗原结合臂和/或第三抗原结合臂(例如,GPC5D/BCMA结合臂或BCMA结合臂)的第二重链部分(HC2)的Fc结构域包含突变T366W。在一些实施方案中,第二抗原结合臂和/或第三抗原结合臂(例如,GPC5D/BCMA结合臂或BCMA结合臂)的HC2的Fc结构域包含突变T366S、L368A和Y407V,并且第一抗原结合臂(例如,CD3结合臂)的HC1的Fc结构域包含突变T366W。

[0243] 还可使用其他策略,诸如通过在一个CH3表面置换带正电荷的残基并在第二CH3表面置换带负电荷的残基使用静电相互作用促进重链异源二聚化,如美国专利公布US2010/0015133;美国专利公布US2009/0182127;美国专利公布US2010/028637或美国专利公布US2011/0123532中所述。在其它技术中,可通过下面的置换(表示为第一重链的第一CH3结构域中的修饰位置/第二重链的第二CH3结构域中的修饰位置)促进异源二聚化:L351Y_F405AY407V/T394W、T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V、T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V、L351Y_Y407A/T366A_K409F、L351Y_Y407A/T366VK409FY407A/T366A_K409F或T350V_L351Y_F405AY407V/T350V_T366L_K392L_T394W,如美国专利公布US2012/0149876或美国专利公布US2013/0195849(Zymeworks)中所述。

[0244] 除上述方法之外,本发明的三特异性抗体还可在体外无细胞环境中通过下列方式

产生：在两种单特异性同源二聚抗体的CH3区中引入非对称突变，并且在还原条件下由两种亲本单特异性同源二聚抗体形成三特异性异源二聚抗体，从而允许根据国际专利公布W02011/131746中所述的方法进行二硫键异构化。在所述方法中，将第一单特异性二价抗体（例如，抗GPCR5D抗体）和第二单特异性二价抗体（例如，抗CD3抗体）改造为在CH3结构域处具有促进异源二聚体稳定性的某些置换；将这些抗体在足以使铰链区中的半胱氨酸发生二硫键异构化的还原条件下一起温育；从而通过Fab臂交换生成三特异性抗体。温育条件最佳可恢复到非还原条件。可使用的示例性还原剂为2-巯基乙胺（2-MEA）、二硫苏糖醇（DTT）、二硫赤藓糖醇（DTE）、谷胱甘肽、三（2-羧乙基）膦（TCEP）、L-半胱氨酸和 β -巯基乙醇，优选为选自2-巯基乙胺、二硫苏糖醇和三（2-羧乙基）膦的还原剂。例如，可使用如下条件：在至少25mM 2-MEA的存在下或至少0.5mM二硫苏糖醇的存在下，在5-8的pH例如pH7.0或pH7.4，至少20℃的温度下，温育至少90分钟。

[0245] 在一些实施方案中，三特异性抗体或抗原结合片段为IgG或其衍生物。人IgG类分为四种同种型：IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。它们在Fc区的氨基酸序列中共享大于95%的同源性，但显示的主要差别在于铰链区的氨基酸组成和结构。Fc区介导效应子功能，诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性（ADCC）和补体依赖性细胞毒性（CDC）。在ADCC中，抗体的Fc区结合至免疫效应细胞（诸如自然杀伤细胞和巨噬细胞）的表面的Fc受体（Fc γ R），导致靶细胞的吞噬作用或裂解。在CDC中，抗体通过触发细胞表面的补体级联反应来杀伤靶细胞。本文所述的抗体包括具有与任何IgG同种型组合的可变结构域的所述特征的抗体，包括其中Fc序列已经被修饰以实现不同效应子功能的修饰型式。

[0246] 对于治疗性抗体的许多应用，Fc介导的效应子功能不是作用机制的一部分。这些Fc介导的效应子功能可能是有害的，并可能通过引起机制外毒性而带来安全风险。修饰效应子功能可通过工程化Fc区以减弱其与Fc γ R或补体因子的结合来实现。IgG与活化性Fc γ R（Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIa和Fc γ RIIb）和抑制性Fc γ R（Fc γ RIIb）或补体（C1q）的第一组分的结合取决于位于铰链区和CH2结构域中的残基。已经在IgG1、IgG2和IgG4中引入突变以降低或沉默Fc功能。本文所述的抗体可包括这些修饰形式。

[0247] 在一个实施方案中，抗体包含具有以下特性中的一者或多者的Fc区：(a) 与亲本Fc相比效应子功能降低；(b) 对Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIb和/或Fc γ RIIIa的亲合力降低，(c) 对Fc γ RI的亲合力降低，(d) 对Fc γ RIIa的亲合力降低，(e) 对Fc γ RIIb的亲合力降低，(f) 对Fc γ RIIIb的亲合力降低或(g) 对Fc γ RIIIa的亲合力降低。

[0248] 在一些实施方案中，抗体或抗原结合片段是IgG或其衍生物，例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4同种型。在其中抗体具有IgG1同种型的一些实施方案中，所述抗体在其Fc区中含有L234A、L235A、D265S和/或K409R置换。在其中抗体具有IgG4同种型的一些实施方案中，该抗体在其Fc区中含有S228P、L234A和L235A置换。本文所述的抗体可包括这些修饰形式。

[0249] 在一些实施方案中，本文所述的多特异性抗体的Fc结构域各自包含一个或多个选自L234A、L235A和D265S的突变。在一些实施方案中，HC1和HC2的Fc结构域各自包含突变L234A、L235A和D265S。

[0250] 在一些实施方案中，本文所述的多特异性抗体的重链部分之一的Fc结构域还包含一个或多个减少Fc与蛋白A结合的突变。在一些实施方案中，重链部分之一的Fc结构域包含突变H435R和/或Y436F。在一些实施方案中，第二抗原结合臂和/或第三抗原结合臂（例如，

GPRC5D/BCMA结合臂,或BCMA结合臂)的HC2的Fc结构域包含突变H435R和/或Y436F。

[0251] 在各种实施方案中,第三抗原结合臂经由接头可操作地连接至第一抗原结合臂或第二抗原结合臂的Fc结构域。在一些实施方案中,接头是肽接头并且可以包含任何天然存在的氨基酸。可以被包含到接头中的示例性氨基酸为Gly、Ser、Pro、Thr、Glu、Lys、Arg、Ile、Leu、His和The。接头的长度应当足以使第三抗原结合臂和第一抗原结合臂或第二抗原结合臂以相对于彼此形成正确构象,从而使得它们保持期望的活性(诸如结合至第三抗原(例如,BCMA或GPRC5D))的方式连接。

[0252] 在本文所述的三特异性抗体的一些实施方案中,HC1从N末端到C末端包含第一抗原结合臂的VH1、CH1结构域、Fc结构域、接头和第三抗原结合臂。

[0253] 在本文所述的三特异性抗体的一些实施方案中,HC2从N末端到C末端包含第二抗原结合臂、Fc结构域、接头和第三抗原结合臂。

[0254] 在各种实施方案中,用于本文所述的多特异性抗体的scFv从N末端到C末端包含VH、接头和VL(VH-L-VL)或VL、接头和VH(VL-L-VH)。在一些实施方案中,scFv从N末端到C末端包含VL、接头和VH(VL-L-VH)。在一些实施方案中,scFv从N末端到C末端包含VH、接头和VL(VH-L-VL)。

[0255] 接头的长度可以为约5个至50个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为约10个至40个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为约10个至35个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为约10个至30个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为约10个至25个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为约10个至20个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为约15个至20个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为6个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为7个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为8个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为9个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为10个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为11个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为12个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为13个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为14个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为15个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为16个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为17个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为18个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为19个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为20个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为21个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为22个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为23个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为24个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为25个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为26个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为27个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为28个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为29个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为30个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为31个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为32个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为33个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为34个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为35个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为36个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为37个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为38个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为39个氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为40个氨基酸。可以使用的示例性接头为富含Gly的接头、含有Gly和Ser的接头、含有Gly和Ala的接头、含有Ala和Ser的接头,以及其他柔

性接头。

[0256] 其他接头序列可以包括源自任何免疫球蛋白重链或轻链同种型的免疫球蛋白铰链区、CL或CH1的部分。可使用的示例性接头示于表4中。附加的接头描述于例如国际专利公布W02019/060695中。

[0257] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列。

[0258] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:163的氨基酸序列。

[0259] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列。

[0260] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列。

[0261] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列。

[0262] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列。

[0263] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列。

[0264] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列。

[0265] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列。

[0266] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列。

[0267] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列。

[0268] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列。

[0269] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列。

[0270] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列。

[0271] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列。

[0272] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列。

[0273] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列。

[0274] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列。

[0275] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列。

[0276] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列。

[0277] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列。

[0278] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列。

[0279] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:147的氨基酸序列。

[0280] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:148的氨基酸序列。

[0281] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列。

[0282] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:150的氨基酸序列。

[0283] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:151的氨基酸序列。

[0284] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:152的氨基酸序列。

[0285] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:153的氨基酸序列。

[0286] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:154的氨基酸序列。

[0287] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:155的氨基酸序列。

[0288] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:156的氨基酸序列。

[0289] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:157的氨基酸序列。

[0290] 表4. 示例性接头序列

接头名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
接头 1	GGSEGKSSGSGSESKSTGGS	25
接头 2	GGGSGGGS	127
接头 3	GGGSGGGSGGGS	128
接头 4	GGGSGGGSGGGSGGGS	129
接头 5	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS	130
接头 6	GGGGSGGGGSGGGGS	131
接头 7	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	163
接头 8	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	132
接头 9	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	133
接头 10	IRPRAIGGSKPRVA	134
接头 11	GKGGSGKGGSGKGGS	135
接头 12	GGKGS GGKGS GGKGS	136
接头 13	GGGKSGGGKSGGGKS	137
接头 14	GKGKSGKGKSGKGKS	138
接头 15	GGGKSGGKGS KGGS	139
接头 16	GKPGSGKPGSGKPGS	140
接头 17	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	141
接头 18	GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS	142
接头 19	STAGDTHLGGEDFD	143
接头 20	GEGGSGEGGSGEGGS	144
接头 21	GGEGSGEGSGEGGS	145
接头 22	GEGESGEGESGEGES	146
接头 23	GGGESGEGSGEGGS	147
接头 24	GEGESGEGESGEGESGEGES	148
接头 25	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	149
接头 26	PRGASKSGSASQTGSAPGS	150
接头 27	GTAAAGAGAAGGAAAGAAG	151
接头 28	GTSGSSGSGSGGSGSGGGG	152
接头 29	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	153
接头 30	GSGS	154
接头 31	APAPAPAPAP	155
接头 32	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP	156
接头 33	AEAAAKEAAAKEAAAAKEAAAAKEAAAAKAAA	157

[0293] 在一个实施方案中,BCMA×GPC5D×CD3三特异性抗体的HC1包含与SEQ ID NO:26基本上相同或相同的氨基酸序列。

[0294] 在一个实施方案中,BCMA×GPC5D×CD3三特异性抗体的LC包含与SEQ ID NO:27基本上相同或相同的氨基酸序列。

[0295] 在一个实施方案中,BCMA×GPCR5D×CD3三特异性抗体的GPCR5D/BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:28基本上相同或相同的氨基酸序列。

[0296] 在一个实施方案中,BCMA×GPC5D×CD3三特异性抗体的CD3/GPC5D偶联的HC1包含与SEQ ID NO:29基本上相同或相同的氨基酸序列。

[0297] 在一个实施方案中,BCMA×GPC5D×CD3三特异性抗体的LC包含与SEQ ID NO:30基本上相同或相同的氨基酸序列。

[0298] 在一个实施方案中,BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:31基本上相同或相同的氨基酸序列。

[0299] 在一个实施方案中,本文提供了分离的三特异性抗体或其三特异性结合片段,包含:

[0300] a) 包含重链(HC1)和轻链(LC)的CD3结合臂;以及

[0301] b) GPRC5D/BCMA结合臂,

[0302] 其中HC1包含与SEQ ID NO:26基本上相同或相同的氨基酸序列,LC包含与SEQ ID NO:27基本上相同或相同的氨基酸序列,并且GPRC5D/BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:28基本上相同或相同的氨基酸序列。

[0303] 在一个实施方案中,本文提供了分离的三特异性抗体或其三特异性结合片段,包含:

[0304] a) 包含重链(HC1)和轻链(LC)的CD3结合臂;以及

[0305] b) GPRC5D/BCMA结合臂,

[0306] 其中HC1包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列,LC包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列,并且GPRC5D/BCMA结合臂包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

[0307] 在一个实施方案中,本文提供了分离的三特异性抗体或其三特异性结合片段,包含:

[0308] a) 包含重链(HC1)和轻链(LC)的CD3结合臂,其中HC1还包含

[0309] GPRC5D结合臂;以及

[0310] b) BCMA结合臂,

[0311] 其中HC1包含与SEQ ID NO:29基本上相同或相同的氨基酸序列,LC包含与SEQ ID NO:30基本上相同或相同的氨基酸序列,并且BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:31基本上相同或相同的氨基酸序列。

[0312] 在一个实施方案中,本文提供了分离的三特异性抗体或其三特异性结合片段,包含:

[0313] a) 包含重链(HC1)和轻链(LC)的CD3结合臂,其中HC1还包含

[0314] GPRC5D结合臂;以及

[0315] b) BCMA结合臂,

[0316] 其中HC1包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列,LC包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列,并且BCMA结合臂包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列。

[0317] 在一个实施方案中,BCMA×GPRC5D×CD3三特异性抗体是BGCB463。

[0318] 在一个实施方案中,BCMA×GPRC5D×CD3三特异性抗体是BGCB491。

[0319] 除所述BCMA×GPRC5D×CD3多特异性抗体或抗原结合片段之外,还提供了能够编码所述BCMA×GPRC5D×CD3多特异性抗体或抗原结合片段的多核苷酸序列。还提供了包含所述多核苷酸的载体,以及表达本文提供的BCMA×GPRC5D×CD3多特异性抗体或抗原结合片段的细胞。还描述了能够表达所公开的载体的细胞。这些细胞可为哺乳动物细胞(诸如293F细胞、CHO细胞)、昆虫细胞(诸如Sf7细胞)、酵母细胞、植物细胞或细菌细胞(诸如大肠杆菌)。所述抗体也可由杂交瘤细胞产生。所述抗体也可以是重组产生的。

[0320] 编码重组抗原结合蛋白的多核苷酸也在本公开的范围内。在一些实施方案中,所

述多核苷酸(及其编码的肽)包含前导序列。可采用本领域已知的任何前导序列。前导序列可包含但不限于限制性位点或翻译起始位点。

[0321] 本文所述的BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体或抗原结合片段包括这样的变体:其具有保留所述BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体或抗原结合片段的生物特性(例如结合亲和力或免疫效应活性)的单个或多个氨基酸置换、缺失或添加。在本发明的上下文中,除非另有说明,否则以下符号用于描述突变;i)给定位置处氨基酸的置换被书写为例如K409R,其意指409位的赖氨酸被精氨酸置换;以及ii)对于特定变体,使用特定的三字母或单字母代码(包括代码Xaa和X)指示任何氨基酸残基。因此,精氨酸置换409位的赖氨酸表示为:K409R,或者任何氨基酸残基置换409位的赖氨酸表示为K409X。在409位的赖氨酸缺失的情况下,用K409*表示。技术人员可制备具有单个或多个氨基酸置换、缺失或添加的变体。

[0322] 这些变体可包括:(a)其中一个或多个氨基酸残基被保守或非保守氨基酸置换的变体,(b)其中一个或多个氨基酸添加到多肽或从多肽缺失的变体,(c)其中一个或多个氨基酸包括取代基的变体,以及(d)其中多肽与另一种肽或多肽(诸如融合配偶体、蛋白质标签或其它化学部分)融合的变体,其可赋予多肽有用的特性,诸如例如抗体的表位、多组氨酸序列、生物素部分等。本文所述的抗体或抗原结合片段可包括这样的变体:其中来自一个物种的氨基酸残基在保守位置或非保守位置处置换为另一物种中的对应残基。在其它实施方案中,非保守位置处的氨基酸残基被保守或非保守残基置换。得到这些变体的技术,包括基因技术(缺失、突变等)、化学技术和酶技术,是本领域普通技术人员已知的。

[0323] 本文所述的BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体或抗原结合片段可包括若干抗体同种型,诸如IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在一些实施方案中,抗体同种型为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型,优选为IgG1或IgG4同种型。抗体或其抗原结合片段的特异性主要是由CDR的氨基酸序列和排列决定的。因此,一种同种型的CDR可转变为另一种同种型而不改变抗原特异性。或者,已经建立技术使杂交瘤从产生一种抗体同种型转换到产生另一种同种型(同种型转换)而不改变抗原特异性。因此,这类抗体同种型在所述抗体或抗原结合片段的范围内。

[0324] 本文所述的BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体或抗原结合片段对于APRIL结合可具有至少5.9nM的 IC_{50} 值。所述BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体或抗原结合片段的 IC_{50} 可通过本领域已知的多种方法诸如基于ELISA的方法或流式细胞术(FACS)来测定。用于通过ELISA测量 IC_{50} 的测定在存在和不存在BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体或抗原结合片段的情况下具有板结合的BCMA,并使用不同浓度的APRIL。阻断APRIL与BCMA结合的BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体或抗原结合片段是“阻断如通过ELISA所测量的APRIL”。

[0325] 还提供了包含本文所述的多核苷酸的载体。载体可为表达载体。因此,预期包含编码感兴趣多肽的序列的重组表达载体也在本公开的范围。表达载体可含有一个或多个附加的序列,诸如但不限于调控序列(如启动子、增强子)、选择标记和聚腺苷酸化信号。用于转化多种宿主细胞的载体是熟知的,并且包括但不限于质粒、噬菌粒、粘粒、杆状病毒、杆粒、细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)以及其它细菌、酵母和病毒载体。

[0326] 本说明书范围内的重组表达载体包括合成的、基因组或cDNA衍生的核酸片段,这些片段编码可操作地连接至合适的调控元件的至少一种重组蛋白。此类调节元件可包含转录启动子、编码合适的mRNA核糖体结合位点的序列以及控制转录和翻译的终止的序列。表达载体,特别是哺乳动物表达载体还可包含一个或多个非转录元件,诸如复制起点、连接到

待表达的基因的合适启动子和增强子、其它5'或3'侧翼非转录序列、5'或3'非翻译序列(诸如必需的核糖体结合位点)、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点或转录终止序列。也可并入赋予在宿主中复制能力的复制起点。

[0327] 用于转化脊椎动物细胞的表达载体中的转录和翻译控制序列可由病毒源提供。示例性载体可如Okayama和Berg, 3Mol. Cell. Biol. 280 (1983) 所述进行构建。

[0328] 在一些实施方案中, 将多特异性抗体编码序列或抗原结合片段编码序列置于强效组成型启动子(诸如用于以下基因的启动子: 次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HPRT)、腺苷脱氨酶、丙酮酸激酶、 β -肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸等)的控制下。此外, 许多病毒启动子在真核细胞中组成性地发挥功能, 并适合与所述实施方案一起使用。这类病毒启动子包括但不限于细胞巨化病毒 (CMV) 立即早期启动子、SV40的早期和晚期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV) 启动子、马罗尼白血病病毒的长末端重复序列 (LTR)、人免疫缺陷病毒 (HIV)、EB病毒 (EBV)、劳氏肉瘤病毒 (RSV) 和其他逆转录病毒, 以及单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子。在一个实施方案中, 将BCMA $\times$ GPRC5D $\times$ CD3多特异性抗体或其抗原结合片段编码序列置于诱导型启动子(诸如, 金属硫蛋白启动子、四环素诱导型启动子、多西环素诱导型启动子、含有一种或多种干扰素刺激的响应元件 (ISRE) (诸如蛋白激酶R 2', 5'-寡腺苷酸合成酶、Mx基因、ADAR1等)的启动子)的控制下。

[0329] 本文所述的载体可含有一个或多个内部核糖体进入位点 (IRES)。IRES序列包含在融合载体中可能有利于增强一些蛋白质的表达。在一些实施方案中, 载体系统将包括一个或多个聚腺苷酸化位点(例如, SV40), 这些位点可在任何上述核酸序列的上游或下游。载体组分可连续地连接, 或以提供用于表达基因产物的最佳间距的方式(即通过在ORF之间引入“间隔区”核苷酸)排列, 或以另一种方式定位。调控元件诸如IRES基序也可被布置成提供用于表达的最佳间距。

[0330] 载体可包含本领域熟知的选择标记。选择标记包括阳性选择标记和阴性选择标记, 例如抗生素抗性基因(例如新霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、卡那霉素抗性基因、四环素抗性基因、青霉素抗性基因、嘌呤霉素抗性基因、杀稻瘟菌素抗性基因)、谷氨酰胺合成酶基因、HSV-TK、用于更昔洛韦选择的HSV-TK衍生物或用于6-甲基嘌呤选择的细菌嘌呤核苷磷酸化酶基因(Gadi等人, 7Gene Ther. 1738-1743 (2000))。编码选择标记或克隆位点的核酸序列可在编码感兴趣的多肽或克隆位点的核酸序列的上游或下游。

[0331] 本文所述的载体可用于用编码所述抗体或抗原结合片段的基因转化各种细胞。例如, 该载体可用于产生BCMA $\times$ GPRC5D $\times$ CD3多特异性抗体或产生抗原结合片段的细胞。因此, 另一方面的特征是用包含编码结合BCMA、GPRC5D和CD3的抗体或其抗原结合片段(诸如本文所描述和例示的抗体或抗原结合片段)的核酸序列的载体转化的宿主细胞。

[0332] 本领域已知用于将外来基因引入细胞中的多种技术, 并且出于实施所述方法的目的, 这些技术可用于根据本文所描述和例示的各种实施方案构建重组细胞。所使用应当使得异源基因序列向宿主细胞稳定转移, 以致异源基因序列是可遗传的并且可由细胞子代表达, 从而受体细胞的必要发育和生理功能不被破坏。可使用的技术包括但不限于染色体转移(例如细胞融合、染色体介导的基因转移、微细胞介导的基因转移)、物理方法(例如转染、原生质球融合、显微注射、电穿孔、脂质体载体)、病毒载体转移(例如, 重组DNA病毒、重组RNA病毒)等(描述于Cline, 29Pharmac. Ther. 69-92 (1985) 中)。也可使用磷酸钙沉

淀和聚乙二醇 (PEG) 诱导的细菌原生质体与哺乳动物细胞的融合来转化细胞。

[0333] 适用于表达本文所述的BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体或抗原结合片段的细胞优选为真核细胞,更优选为植物、啮齿动物或人来源的细胞,例如但不限于NS0、CHO、CHOK1、perC.6、Tk-ts13、BHK、HEK293细胞、COS-7、T98G、CV-1/EBNA、L细胞、C127、3T3、HeLa、NS1、Sp2/0骨髓瘤细胞和BHK细胞系等。此外,可使用杂交瘤细胞完成抗体的表达。用于产生杂交瘤的方法是本领域中已良好建立的。

[0334] 可选择或筛选用本文所述的表达载体转化的细胞用于本文所述的抗体或抗原结合片段的重组表达。扩增和筛选重组阳性细胞,筛选表现出所需表型(诸如高水平表达、增强的生长特性或例如由于蛋白质修饰或改变的翻译后修饰产生具有所需生化特征的蛋白质的能力)的亚克隆。这些表型可能是由于给定亚克隆的固有性质或由于突变造成的。突变可通过使用化学品、UV波长光、辐射、病毒、插入诱变剂、DNA错配修复的抑制或这些方法的组合来实现。

[0335] 治疗组合物和使用多特异性抗体及其多特异性抗原结合片段进行治疗的方法

[0336] 上文所述的多特异性抗体,例如上文所述的BCMA×GPCR5D×CD3三特异性抗体可用于治疗中。具体地讲,多特异性抗体可用于治疗癌症。本文还提供了用于治疗哺乳动物中过度增殖性障碍的治疗组合物,该组合物包含治疗有效量的本文所述的多特异性抗体或多特异性抗原结合片段和药学上可接受的载体。在优选的实施方案中,多特异性抗体为如本文所述的BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段,以及更优选为如本文所述的BCMA×GPCR5D×CD3三特异性抗体或其BCMA×GPCR5D×CD3三特异性抗原结合片段。在一个实施方案中,所述药物组合物用于治疗GPCR5D表达型癌症和/或BCMA表达型癌症,包括(但不限于)以下癌症:GPCR5D和/或BCMA表达型B细胞癌症,诸如多发性骨髓瘤(MM),包括郁积型多发性骨髓瘤(SMM);以及其中表达GPCR5D和/或BCMA的其他尚待确定的癌症。在一些实施方案中,GPCR5D表达型癌症和/或BCMA表达型癌症是复发性或难治性形式的淋巴瘤,诸如复发性或难治性形式的多发性骨髓瘤。可用于治疗癌症(诸如血液学癌症,包括上文所述的特定癌症)的特定三特异性抗体包括抗体BGCB463和BGCB491。

[0337] 在一些实施方案中,BCMA×GPCR5D×CD3三特异性抗体或其结合片段用于治疗R/R多发性骨髓瘤。

[0338] 在一些实施方案中,接受BCMA×GPCR5D×CD3三特异性抗体或其结合片段的受试者已经接受了先前的治疗。例如,受试者可能已经接受一种或多种用于治疗多发性骨髓瘤的治疗剂,诸如蛋白酶体抑制剂(PI)(例如,马里佐米(Marizomib)(沙酚酰胺(salinosporamide A))、卡非佐米(Carfilzomib)、艾莎佐米(Ixazomib))、免疫调节药物(IMiD)、双特异性药剂、CAR-T疗法和/或抗CD38抗体。

[0339] 本文提供的药物组合物包含:a)有效量的本发明的多特异性抗体或抗体片段,以及b)药学上可接受的载体,其可为惰性或生理活性载体。在优选的实施方案中,多特异性抗体为如本文所述的BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段,以及更优选为如本文所述的BCMA×GPCR5D×CD3三特异性抗体或其BCMA×GPCR5D×CD3三特异性抗原结合片段。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂等。合适的载体、稀释剂和/或赋形剂的示例包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等以及它们的任意组合中的一者或多者。在许多

情况下,优选的是组合物中包含等渗剂,诸如糖、多元醇或氯化钠。具体地,合适的载体的相关示例包括:(1)pH为约7.4、含或不含约1mg/mL至25mg/mL人血清白蛋白的杜氏磷酸盐缓冲盐水,(2)0.9%盐水(0.9%w/v氯化钠(NaCl)),以及(3)5%(w/v)右旋糖;并且还可含有抗氧化剂诸如色胺和稳定剂诸如Tween 20[®]。

[0340] 本文的组合物还可含有对所治疗的特定障碍必需的另外治疗剂。优选的是,多特异性抗体或抗体片段和补充活性化合物将具有不会对彼此产生不利影响的互补活性。在一些实施方案中,另外的治疗剂为阿糖胞苷、蒽环霉素、组胺二盐酸盐或白介素2。在一些实施方案中,另外的治疗剂为化学治疗剂、抗CD38剂、免疫调节酰亚胺药物(IMiD)、免疫检查点抑制剂、免疫共刺激剂、 γ 分泌酶抑制剂、T细胞增强剂或它们的任何组合。在一些实施方案中,另外的治疗剂为抗CD38剂,诸如抗CD38抗体(例如,达雷妥尤单抗(Daratumumab))。在一些实施方案中,另外的治疗剂为免疫调节酰亚胺药物(IMiD),诸如来那度胺(lenalidomide)和泊马度胺(pomalidomide)。在一些实施方案中,另外的治疗剂为免疫检查点抑制剂,诸如具有Ig和ITIM结构域的抗PD-1和抗T细胞免疫受体(TIGIT)。在一些实施方案中,另外的治疗剂为免疫共刺激剂,诸如靶向CD137的药剂(例如,CD137共刺激双特异性抗体)。在一些实施方案中,另外的治疗剂为T细胞增强剂,诸如IL-2添加。

[0341] 本发明的组合物可具有多种形式。这些形式包括例如液体、半固体和固体剂型,但优选的形式取决于预期的施用模式和治疗应用。典型的优选组合物为可注射或可输注溶液的形式。优选的施用方式为肠胃外施用(例如静脉内施用、肌内施用、腹膜内施用、皮下施用)。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物通过推注静脉内施用或通过在规定时间内连续输注施用。在另一个优选的实施方案中,这些组合物通过肌内、皮下、关节内、滑膜内、肿瘤内、肿瘤周围、病灶内或病灶周围途径注射,以发挥局部以及全身治疗效果。

[0342] 用于肠胃外施用的无菌组合物可通过下列方式制备:将所需量的本发明的抗体、抗体片段或抗体缀合物掺入合适的溶剂中,然后通过微滤技术进行灭菌。可使用水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等以及它们的组合作为溶剂或媒介物。在许多情况下,优选的是组合物中包含等渗剂,诸如糖、多元醇或氯化钠。这些组合物还可含有辅助剂,尤其是润湿剂、等渗剂、乳化剂、分散剂和稳定剂。用于肠胃外施用的无菌组合物也可制备成无菌固体组合物的形式,其在使用时可溶解于无菌水或任何其它可注射的无菌介质中。

[0343] 多特异性抗体或抗体片段也可口服施用。作为用于口服施用的固体组合物,可使用片剂、丸剂、粉剂(明胶胶囊、小药囊)或颗粒剂。在这些组合物中,根据本发明的活性成分与一种或多种惰性稀释剂(诸如淀粉、纤维素、蔗糖、乳糖或二氧化硅)在氩气流下混合。这些组合物还可包含除稀释剂之外的物质,例如一种或多种润滑剂(诸如硬脂酸镁或滑石)、着色剂、包衣(糖衣片)或釉料。

[0344] 作为用于口服施用的液体组合物,可使用含有惰性稀释剂(诸如水、乙醇、甘油、植物油或石蜡油)的药学上可接受的溶液、混悬剂、乳剂、糖浆剂和酏剂。这些组合物可包含除稀释剂之外的物质,例如润湿、增甜、增稠、矫味或稳定产品。

[0345] 这些物质的剂量取决于期望的效应、治疗持续时间和所用的施用途径;对于成人来说,通常每日口服5mg和1000mg之间的这些物质,单位剂量在1mg至250mg活性物质范围内。一般来讲,医生将根据年龄、体重和待治疗的受治疗者特有的任何其它因素来确定合适的剂量。

[0346] 本文还提供了通过向有需要的患者施用结合所述GPRC5D和/或BCMA并能够募集T细胞来杀伤所述GPRC5D和/或BCMA+细胞(即T细胞重定向)的多特异性抗体来杀伤GPRC5D和/或BCMA+细胞的方法。本发明的多特异性抗体或抗体片段中的任一种可以治疗方式使用。例如,在一个实施方案中,BCMA×GPRC5D×CD3多特异性抗体可以治疗方式用于治疗受试者的癌症。

[0347] 在一个优选的实施方案中,本发明的多特异性抗体或抗体片段用于治疗哺乳动物中的过度增殖性障碍。在一个更优选的实施方案中,含有本发明的多特异性抗体或抗体片段的上文所公开的药物组合物之一用于治疗哺乳动物中的过度增殖性障碍。在一个实施方案中,该障碍是癌症。具体地讲,该癌症是GPRC5D表达型癌症和/或BCMA表达型癌症,包括(但不限于)以下癌症:GPRC5D和/或BCMA表达型B细胞癌症,诸如多发性骨髓瘤(MM),包括郁积型多发性骨髓瘤(SMM);以及其中表达GPRC5D和/或BCMA的其他尚待确定的癌症。在一些实施方案中,GPRC5D表达型癌症和/或BCMA表达型癌症是复发性或难治性形式的淋巴瘤,诸如复发性或难治性形式的多发性骨髓瘤。在优选的实施方案中,多特异性抗体为如本文所述的BCMA×GPRC5D×CD3多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段,以及更优选为如本文所述的BCMA×GPRC5D×CD3三特异性抗体或其BCMA×GPRC5D×CD3三特异性抗原结合片段。

[0348] 因此,本发明的药物组合物可用于治疗或预防多种癌症或病症,这些癌症或病症包括(但不限于)以下:GPRC5D表达型癌症和/或BCMA表达型癌症,包括(但不限于)以下癌症:GPRC5D和/或BCMA表达型B细胞/浆细胞癌症,诸如急性多发性骨髓瘤(MM)或癌变前骨髓瘤如MGUS(意义不明的单克隆丙球蛋白)和SMM(郁积型多发性骨髓瘤)以及浆细胞瘤;以及其中表达GPRC5D和/或BCMA的其他尚待确定的癌症,或其他浆细胞病症诸如淀粉样变性和狼疮。在一些实施方案中,GPRC5D表达型癌症和/或BCMA表达型癌症是复发性或难治性形式的淋巴瘤,诸如复发性或难治性形式的多发性骨髓瘤。

[0349] 类似地,本文还提供了用于抑制所选细胞群的生长的方法,该方法包括在外周血单核细胞(PBMC)的存在下使GPRC5D和/或BCMA表达型靶细胞或含有此类靶细胞的组织与有效量的本发明的多特异性抗体或抗体片段单独接触,或使GPRC5D和/或BCMA表达型靶细胞或含有此类靶细胞的组织接触有效量的本发明的多特异性抗体或抗体片段与其他细胞毒性剂或治疗剂的组合。阻断配体(APIL、BAFF等)与BCMA和GPRC5D结合的BCMA×GPRC5D×CD3抗体可以阻断BCMA和GPRC5D介导的信号转导并导致靶细胞的抑制或细胞死亡。在优选的实施方案中,多特异性抗体为如本文所述的BCMA×GPRC5D×CD3多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段,以及更优选为如本文所述的BCMA×GPRC5D×CD3三特异性抗体或其BCMA×GPRC5D×CD3三特异性抗原结合片段。

[0350] 在一些实施方案中,本文所述的涉及施用多特异性抗体或包含该多特异性抗体的药物组合物的方法还涉及施用另一种治疗剂。合适的其他治疗剂包括但不限于抗CD38剂、免疫调节酰亚胺药物(IMiD)、免疫检查点抑制剂、免疫共刺激剂、 γ 分泌酶抑制剂、T细胞增强剂(例如,IL-2添加)、托珠单抗(tocilizumab)或它们的任何组合。在一些实施方案中,另外的治疗剂为抗CD38剂,诸如抗CD38抗体(例如,达雷妥尤单抗(Daratumumab))。在一些实施方案中,另外的治疗剂为免疫调节酰亚胺药物(IMiD),诸如来那度胺(lenalidomide)和泊马度胺(pomalidomide)。在一些实施方案中,另外的治疗剂为免疫检查点抑制剂,诸如具有Ig和ITIM结构域的抗PD-1和抗T细胞免疫受体(TIGIT)。在一些实施方案中,另外的治疗

剂为免疫共刺激剂,诸如靶向CD137的药剂(例如,CD137共刺激双特异性抗体)。在T细胞重定向抗体(如本文所述的BCMA×GPC5D×CD3三特异性抗体)的存在下使用具有条件激动作用的低亲和力CD137结合物可以增强抗肿瘤活性并可能改善T细胞持久性。在一些实施方案中,另外的治疗剂为阿糖胞苷、蒽环霉素、组胺二盐酸盐或白介素2。在一些实施方案中,另外的治疗剂为化学治疗剂。用于抑制所选细胞群的生长的方法可以在体外、体内或离体执行。

[0351] 体外使用的示例包括在移植到同一患者中之前处理自体骨髓以杀伤患病细胞或恶性细胞;并预防移植物抗宿主病(GVHD);处理细胞培养物以杀伤除不表达靶抗原的所需变体之外的所有细胞;或杀伤表达不期望抗原的变体。本领域的普通技术人员易于确定非临床体外使用的条件。

[0352] 临床离体使用的示例是在癌症治疗中在自体移植之前除去骨髓中的肿瘤细胞。处理可按照下列步骤进行。从患者或其它个体中采集骨髓,然后在含有向其中加入本发明的细胞毒性剂的血清的培养基中温育。浓度范围为约10 μ M至1 μ M,在约37 $^{\circ}$ C处温育约30分钟至约48小时。本领域的普通技术人员易于确定浓度和温育时间的确切条件,即剂量。温育后,用含有血清的培养基洗涤骨髓细胞,并且将这些骨髓细胞根据已知方法通过静脉内输注返回患者身上。在患者接受其它治疗(诸如在骨髓采集时间和处理过的细胞再输注时间之间的消融化疗或全身放疗的过程)的情况下,使用标准医疗设备将处理过的骨髓细胞冷冻保存在液氮中。

[0353] 对于临床体内使用,将治疗有效量的多特异性抗体或抗原结合片段施用于有需要的受试者。例如,BCMA×GPC5D×CD3多特异性抗体及其多特异性抗原结合片段可用于治疗有需要的受试者的GPC5D表达型癌症和/或BCMA表达型癌症。在一些实施方案中,GPC5D表达型癌症和/或BCMA表达型癌症是B细胞癌症,诸如多发性骨髓瘤(MM),包括郁积型多发性骨髓瘤(SMM)。在一些实施方案中,GPC5D表达型癌症和/或BCMA表达型癌症是复发性或难治性形式的淋巴瘤,诸如复发性或难治性形式的多发性骨髓瘤。在优选的实施方案中,多特异性抗体为如本文所述的BCMA×GPC5D×CD3多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段,以及更优选为如本文所述的BCMA×GPC5D×CD3三特异性抗体或其BCMA×GPC5D×CD3三特异性抗原结合片段。在一些实施方案中,受治疗者是哺乳动物,优选是人。在一些实施方案中,多特异性抗体或抗原结合片段将以经测试其无菌性的溶液形式施用。

[0354] 调节上述治疗方法和用途中的剂量方案以提供最佳的期望响应(例如治疗响应)。例如,可施用单次推注,可随着时间推移施用若干分份剂量,或如由治疗情况的紧急指示可按比例减少或增加剂量。肠胃外组合物可配制成为易于施用且剂量一致的剂量单位形式。

[0355] 多特异性抗体和片段的有效剂量和剂量方案取决于待治疗的疾病或病症,并且可由本领域技术人员确定。本发明的化合物的治疗有效量的示例性、非限制性范围为约0.001mg/kg-10mg/kg,诸如约0.001mg/kg-5mg/kg(例如约0.001mg/kg-2mg/kg),诸如约0.001mg/kg-1mg/kg,例如约0.001mg/kg、约0.01mg/kg、约0.1mg/kg、约1mg/kg或约10mg/kg。

[0356] 本领域中具有普通技能的医师、药剂师或兽医可容易地确定和开出所需药物组合物的有效量。例如,医师或兽医开始在药物组合物中采用的多特异性抗体或片段的剂量的水平可以低于为了达到期望的治疗效果所需的水平,然后逐渐增加剂量直至达到所需的效

果。通常,本发明的多特异性抗体的合适日剂量将是有效产生治疗效果的最低剂量的化合物的量。施用可例如肠胃外施用,诸如静脉内、肌内、瘤内(例如,骨髓)或皮下。在一个实施方案中,多特异性抗体或片段可通过以 mg/m^2 计算的每周剂量输注来施用。根据下式:剂量(mg/kg) $\times$ 体重(例如,50 kg -100 kg),此类剂量可例如基于上文提供的 mg/kg 剂量。这样的施用可重复如1至8次,诸如3至5次。可通过在2至24小时(诸如2至12小时)的时间段内连续输注进行施用。在一个实施方案中,多特异性抗体或片段可通过长时间(诸如多于24小时)的缓慢连续输注来施用,以便减少毒副作用。

[0357] 在一个实施方案中,多特异性抗体或片段可以作为固定剂量计算的每周剂量方式施用多达八次,诸如当每周施用一次时为四至六次。这样的方案可根据需要例如在六个月或十二个月后重复一次或多次。此类固定剂量可例如基于上文提供的 mg/kg 剂量,其中体重估计为50 kg -100 kg 。可通过测量本发明的多特异性抗体在通过例如取出生物样品施用时在血液中的量并且使用靶向本发明的多特异性抗体的GPCR5D和/或BCMA抗原结合臂的抗独特型抗体来测定或调节剂量。

[0358] 在一个实施方案中,多特异性抗体或片段可通过维持疗法施用,诸如例如每周一次,持续六个月或更长时间。

[0359] 还可预防性地施用多特异性抗体或片段,以便降低罹患癌症的风险、延迟癌症进展中事件的发作和/或在癌症缓解后降低复发的风险。

[0360] 如本文所述的多特异性抗体及其片段还可以组合疗法施用,即与待治疗的疾病或病症相关的其它治疗剂组合。因此,在一个实施方案中,含抗体的药物用于与一种或多种另外的治疗剂组合,该另外的治疗剂诸如化学治疗剂、抗CD38剂、免疫调节酰亚胺药物(IMiD)、免疫检查点抑制剂、免疫共刺激剂、 γ 分泌酶抑制剂、T细胞增强剂(例如,IL-2添加)或它们的任何组合。在一些实施方案中,另外的治疗剂为抗CD38剂,诸如抗CD38抗体(例如,达雷妥尤单抗(Daratumumab))。在一些实施方案中,另外的治疗剂为免疫调节酰亚胺药物(IMiD),诸如来那度胺(lenalidomide)和泊马度胺(pomalidomide)。在一些实施方案中,另外的治疗剂为免疫检查点抑制剂,诸如具有Ig和ITIM结构域的抗PD-1和抗T细胞免疫受体(TIGIT)。在一些实施方案中,另外的治疗剂为免疫共刺激剂,诸如靶向CD137的药剂(例如,CD137共刺激双特异性抗体)。在一些实施方案中,其他治疗剂为阿糖胞苷、蒽环霉素、组胺二盐酸盐或白介素2。此类组合施用可以任何顺序同时、分开或顺序进行。对于同时施用,这些治疗剂可作为一种组合物施用或作为单独的组合物施用,视情况而定。

[0361] 在一个实施方案中,提供了一种用于治疗受试者中涉及表达GPCR5D和/或BCMA的细胞的病症的方法,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的多特异性抗体或片段(诸如本文所述的BCMA $\times$ GPCR5D $\times$ CD3多特异性抗体)以及放射疗法。在一个实施方案中,提供了一种用于治疗或预防癌症的方法,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的多特异性抗体或片段(诸如本文所述的BCMA $\times$ GPCR5D $\times$ CD3抗体)以及放射疗法。放射疗法可包括辐射或向患者施用相关放射性药物。辐射源可在被治疗患者的外部或内部(辐射治疗可例如体外放射治疗(EBRT)或短距离放射治疗(BT)的形式)。可用于实施此类方法的放射性元素包括例如镭-223、铯-137、铪-192、钨-241、金-198、钴-57、铜-67、镓-67、碘-123、碘-131、镓-225和铟-111。

[0362] 试剂盒

[0363] 本文还提供了试剂盒,该试剂盒包括例如所述的多特异性抗体或其抗原结合片段以及使用所述抗体或片段杀伤特定类型细胞的说明书。在优选的实施方案中,多特异性抗体为如本文所述的BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段,以及更优选为如本文所述的BCMA×GPCR5D×CD3三特异性抗体或其BCMA×GPCR5D×CD3三特异性抗原结合片段。说明书可包括在体外、体内或离体使用多特异性抗体或其抗原结合片段的说明。

[0364] 通常,试剂盒将具有包含多特异性抗体或其抗原结合片段的隔室。多特异性抗体或其抗原结合片段可为冻干形式、液体形式或适于包括在试剂盒中的其它形式。试剂盒也可包括实施试剂盒中说明书上所述方法所需的其它元件,例如用于复原冻干粉末的无菌溶液、用于在施用于患者之前与多特异性抗体或其抗原结合片段组合的其它试剂以及有助于向患者施用多特异性抗体或其抗原结合片段的工具。

[0365] 诊断用途

[0366] 本文所述的多特异性抗体和片段也可用于诊断目的。因此,还提供了包含如本文定义的多特异性抗体或片段的诊断组合物及其用途。在优选的实施方案中,多特异性抗体为如本文所述的BCMA×GPCR5D×CD3多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段,以及更优选为如本文所述的BCMA×GPCR5D×CD3三特异性抗体或其BCMA×GPCR5D×CD3三特异性抗原结合片段。在一个实施方案中,本发明提供了用于诊断癌症的试剂盒,该试剂盒包括容纳BCMA×GPCR5D×CD3三特异性抗体和用于检测抗体与GPCR5D和/或BCMA的结合的一种或多种试剂的容器。试剂可包括例如荧光标签、酶标签或其它可检测标签。试剂还可包括用于酶反应的二级或三级抗体或试剂,其中酶反应生成能够可视化的产物。例如,本文所述的多特异性抗体或其抗原结合片段可用放射标记物、荧光标记物、表位标签、生物素、发色团标记物、ECL标记物、酶、钆、¹¹¹In-DOTA、¹¹¹In-二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和β-半乳糖苷酶,或者聚组氨酸或本领域已知的类似此类标记物进行标记。

[0367] BCMA特异性抗体

[0368] 本文描述了特异于BCMA的分离的抗体和抗原结合片段。在一些实施方案中,BCMA特异性抗体和抗原结合片段结合人BCMA。BCMA特异性抗体分子的一般结构可包括抗原结合结构域,其包含重链和轻链;以及Fc结构域,其发挥多种功能(包括补体固定和结合抗体受体)。

[0369] 在一些实施方案中,提供了BCMA特异性抗体或其抗原结合片段,它们包含含有表1中所述抗体中的任一个抗体(例如,BCMB519)的CDR1、CDR2和CDR3的重链。在一些实施方案中,提供了BCMA特异性抗体或其抗原结合片段,它们包含含有表1中所述抗体中的任一个抗体(例如,BCMB519)的CDR1、CDR2和CDR3的重链以及含有表1中所述抗体中的任一个抗体(例如,BCMB519)的CDR1、CDR2和CDR3的轻链。

[0370] 在一些实施方案中,BCMA特异性抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:20的重链CDR1、含有SEQ ID NO:21的重链CDR2和含有SEQ ID NO:22的重链CDR3。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含含有SEQ ID NO:20的重链CDR1、含有SEQ ID NO:21的重链CDR2、含有SEQ ID NO:22的重链CDR3、含有SEQ ID NO:17的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:18的轻链CDR2和含有SEQ ID NO:19的轻链CDR3。BCMA结合臂可包含人框架序列。在一些实施方案中,BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:24基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,

BCMA结合臂包含与SEQ ID NO:24基本上相同或相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:23基本上相同或相同的轻链可变结构域。本段中所讨论的抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域适于包含在多特异性(例如,双特异性或三特异性)构建体中,其中一个臂是抗BCMA臂。本文提供了本段中所讨论的包含BCMA特异性抗体或其抗原结合片段的示例性三特异性构建体。

[0371] 在一些实施方案中,BCMA特异性抗体和抗原结合片段结合人BCMA和食蟹猴BCMA。在一些实施方案中,BCMA特异性抗体和抗原结合片段结合人BCMA,但不结合食蟹猴BCMA。在一些实施方案中,BCMA特异性抗体和抗原结合片段与包含来自BCMA细胞外结构域(ECD)的一个或多个残基的表位结合。在一些实施方案中,BCMA特异性抗体或抗原结合片段结合至BCMA BCMW37链的残基17-26(LLHACIPCQL(SEQ ID NO:162))。此类BCMA特异性抗体或抗原结合片段可以以 5×10^{-7} M或更小,诸如 1×10^{-7} M或更小、 5×10^{-8} M或更小、 1×10^{-8} M或更小、 5×10^{-9} M或更小、 1×10^{-9} M或 5×10^{-10} M或更小的亲和力结合至BCMA。在一个实施方案中,BCMA特异性抗体或抗原结合片段以约 1×10^{-10} M至 1×10^{-9} M的亲和力结合至BCMA。在一个实施方案中,BCMA结合臂以约 1×10^{-10} M、约 2×10^{-10} M、约 3×10^{-10} M、约 4×10^{-10} M、约 5×10^{-10} M、约 6×10^{-10} M、约 7×10^{-10} M、约 8×10^{-10} M、约 9×10^{-10} M或约 1×10^{-9} M的亲和力结合至BCMA。在一个实施方案中,BCMA特异性抗体或抗原结合片段以约 8.4×10^{-10} M的亲和力结合至BCMA,如通过表面等离子共振(SPR)测定所确定的。在一个实施方案中,BCMA特异性抗体或抗原结合片段以约 2.1×10^{-10} M的亲和力结合至BCMA,如通过表面等离子共振(SPR)测定所确定的。

[0372] 人IgG类分为四种同种型:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。它们在Fc区的氨基酸序列中共享大于95%的同源性,但显示的主要差别在于铰链区的氨基酸组成和结构。Fc区介导效应子功能,诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。在ADCC中,抗体的Fc区结合至免疫效应细胞(诸如自然杀伤细胞和巨噬细胞)的表面上的Fc受体(Fc γ R),导致靶细胞的吞噬作用或裂解。在CDC中,抗体通过触发细胞表面的补体级联反应来杀伤靶细胞。本文所述的抗体包括具有与任何IgG同种型组合的可变结构域的所述特征的抗体,包括其中Fc序列已经被修饰以实现不同效应子功能的修饰型式。

[0373] 对于治疗性抗体的许多应用,Fc介导的效应子功能不是作用机制的一部分。这些Fc介导的效应子功能可能是有害的,并可能通过引起机制外毒性而带来安全风险。修饰效应子功能可通过工程化Fc区以减弱其与Fc γ R或补体因子的结合来实现。IgG与活化性Fc γ R(Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIa和Fc γ RIIb)和抑制性Fc γ R(Fc γ RIIb)或补体(C1q)的第一组分的结合取决于位于铰链区和CH2结构域中的残基。已经在IgG1、IgG2和IgG4中引入突变以降低或沉默Fc功能。本文所述的抗体可包括这些修饰形式。

[0374] 在一个实施方案中,抗体包含具有以下特性中的一者或多者的Fc区:(a)与亲本Fc相比效应子功能降低;(b)对Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIb和/或Fc γ RIIIa的亲和力降低,(c)对Fc γ RI的亲和力降低,(d)对Fc γ RIIa的亲和力降低,(e)对Fc γ RIIb的亲和力降低,(f)对Fc γ RIIIb的亲和力降低或(g)对Fc γ RIIIa的亲和力降低。

[0375] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是IgG或其衍生物,例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4同种型。在其中抗体具有IgG1同种型的一些实施方案中,所述抗体在其Fc区中含有L234A、L235A、D265S和/或K409R置换。在其中抗体具有IgG4同种型的一些实施方案中,所述抗体在其Fc区中含有K409R、S228P、L234A和L235A置换。本文所述的抗体可包括这些修饰形

式。

[0376] 在一些实施方案中,所述抗体可以能够以低纳摩尔的 IC_{50} 抑制APRIL结合,如通过ELISA所测定。在一些实施方案中,所述抗体可以能够以低微摩尔的 IC_{50} 抑制BAFF结合,如通过ELISA所测定。

[0377] 在一些实施方案中,所述抗体结合至BCMA阳性多发性骨髓瘤细胞系。

[0378] 除所述BCMA特异性抗体和抗原结合片段之外,还提供了能够编码所述抗体和抗原结合片段的多核苷酸序列。还提供了包含所述多核苷酸的载体,以及表达本文提供的BCMA特异性抗体或抗原结合片段的细胞。还描述了能够表达所公开的载体的细胞。这些细胞可为哺乳动物细胞(诸如293细胞、293F细胞、CHO细胞)、昆虫细胞(诸如Sf7细胞)、酵母细胞、植物细胞或细菌细胞(诸如大肠杆菌)。所述抗体也可由杂交瘤细胞产生。

[0379] 所述BCMA特异性抗体或抗原结合片段包括所有同种型IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,以及四链免疫球蛋白结构的合成多聚体。所述抗体或抗原结合片段也包括通常存在于母鸡或火鸡血清和母鸡或火鸡蛋黄中的IgY同种型。

[0380] BCMA特异性抗体和抗原结合片段可通过重组方式来源于任何物种。例如,抗体或抗原结合片段可为小鼠、大鼠、山羊、马、猪、牛、鸡、兔、羊驼、驴、骆驼、人或其嵌合型式。为适于施用于人,非人源抗体或抗原结合片段可在施用于人类患者时被基因或结构改变成抗原性较低。

[0381] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是嵌合的。如本文所用,术语“嵌合”是指抗体或其抗原结合片段的至少一个可变域的至少某些部分来源于非人哺乳动物、啮齿动物或爬行动物的抗体氨基酸序列,而抗体或其抗原结合片段的其余部分来源于人。

[0382] 在一些实施方案中,抗体是人源化抗体。人源化抗体可为含有来源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(诸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其它抗原结合亚序列)。在很大程度上,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中受体的互补决定区(CDR)中的残基由具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠或兔的CDR中的残基替换。一般来讲,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个,并且一般是两个可变域,其中所有或基本上所有的CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些CDR区,并且所有或基本上所有的框架区是人免疫球蛋白序列的那些框架区。人源化抗体可包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分。

[0383] 本文所述的抗体或抗原结合片段能够以多种形式存在,但将包含表1所示的抗体CDR中的一者或多者(例如,BCMB519)。

[0384] 本文描述了结合至BCMA的重组抗体和抗原结合片段。在一些实施方案中,BCMA特异性抗体或抗原结合片段为人IgG或其衍生物。虽然本文例示的BCMA特异性抗体或抗原结合片段是人的,但是所例示的抗体或抗原结合片段也可以是嵌合的。

[0385] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是IgG或其衍生物,例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4同种型。在其中抗体是IgG1同种型的一些实施方案中,抗体包含IgG1 Fc区(SEQ ID NO:158)。

[0386] SEQ ID NO:158

[0387] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV

TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0388] 在其中抗体是IgG1同种型的一些实施方案中,所述抗体在其Fc区(SEQ ID NO: 159)中包含L234A、L235A和D265S置换(加下划线)。

[0389] SEQ ID NO:159

[0390] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0391] 在其中抗体是IgG4同种型的一些实施方案中,所述抗体在其Fc区(SEQ ID NO: 160)中包含S228P、L234A和L235A置换(加下划线)。

[0392] SEQ ID NO:160ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0393] 由上述段落中讨论的CDR和/或可变结构域序列限定的BCMA特异性抗体可包含这些IgGFc区。

[0394] 还公开了编码结合至BCMA的抗体或抗原结合片段的分离的合成多核苷酸。能够编码本文提供的可变结构域区段的分离多核苷酸可包括在相同或不同的载体上以产生抗体或抗原结合片段。

[0395] 编码重组抗原结合蛋白的多核苷酸也在本公开的范围。在一些实施方案中,所述多核苷酸(及其编码的肽)包含前导序列。可采用本领域已知的任何前导序列。前导序列可包含但不限于限制性位点或翻译起始位点。

[0396] 本文所述的BCMA特异性抗体或抗原结合片段包括这样的变体:其具有保留所述BCMA特异性抗体或抗原结合片段的生物特性(例如结合亲和力或免疫效应活性)的单个或多个氨基酸置换、缺失或添加。在本发明的上下文中,除非另有说明,否则以下符号用于描述突变;i) 给定位置处氨基酸的置换被书写为例如K409R,其意指409位的赖氨酸被精氨酸置换;以及ii) 对于特定变体,使用特定的三字母或单字母代码(包括代码Xaa和X)指示任何氨基酸残基。因此,精氨酸置换409位的赖氨酸表示为:K409R,或者任何氨基酸残基置换409位的赖氨酸表示为K409X。在409位的赖氨酸缺失的情况下,用K409*表示。技术人员可制备具有单个或多个氨基酸置换、缺失或添加的变体。

[0397] 这些变体可包括:(a) 其中一个或多个氨基酸残基被保守或非保守氨基酸置换的变体,(b) 其中一个或多个氨基酸添加到多肽或从多肽缺失的变体,(c) 其中一个或多个氨基酸包括取代基的变体,以及(d) 其中多肽与另一种肽或多肽(诸如融合配偶体、蛋白质标签或其它化学部分)融合的变体,其可赋予多肽有用的特性,诸如例如抗体的表位、多组氨

酸序列、生物素部分等。本文所述的抗体或抗原结合片段可包括这样的变体：其中来自一个物种的氨基酸残基在保守位置或非保守位置处置换为另一物种中的对应残基。在其它实施方案中，非保守位置处的氨基酸残基被保守或非保守残基置换。得到这些变体的技术，包括基因技术（缺失、突变等）、化学技术和酶技术，是本领域普通技术人员已知的。

[0398] 本文所述的BCMA特异性抗体或抗原结合片段可包括若干抗体同种型，诸如，IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在一些实施方案中，抗体同种型为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型，优选为IgG1或IgG4同种型。抗体或其抗原结合片段的特异性主要是由CDR的氨基酸序列和排列决定的。因此，一种同种型的CDR可转变为另一种同种型而不改变抗原特异性。或者，已经建立技术使杂交瘤从产生一种抗体同种型转换到产生另一种同种型（同种型转换）而不改变抗原特异性。因此，这类抗体同种型在所述抗体或抗原结合片段的范围内。

[0399] 本文所述的BCMA特异性抗体或抗原结合片段对于APRIL结合可具有低纳摩尔的 IC_{50} 值。所述BCMA特异性抗体或抗原结合片段的 IC_{50} 可通过本领域已知的多种方法诸如基于ELISA的方法或流式细胞术（FACS）来测定。用于通过ELISA测量 IC_{50} 的测定在存在和不存在BCMA特异性抗体的情况下具有板结合的BCMA，并使用不同浓度的APRIL。阻断APRIL与BCMA结合的BCMA抗体是“阻断如通过ELISA所测量的APRIL”。

[0400] 还提供了包含本文所述的多核苷酸的载体。载体可为表达载体。因此，预期包含编码感兴趣多肽的序列的重组表达载体也在本公开的范围。表达载体可含有一个或多个附加的序列，诸如但不限于调控序列（如启动子、增强子）、选择标记和聚腺苷酸化信号。用于转化多种宿主细胞的载体是熟知的，并且包括但不限于质粒、噬菌粒、粘粒、杆状病毒、杆粒、细菌人工染色体（BAC）、酵母人工染色体（YAC）以及其它细菌、酵母和病毒载体。

[0401] 本说明书范围内的重组表达载体包括合成的、基因组或cDNA衍生的核酸片段，这些片段编码可操作地连接至合适的调控元件的至少一种重组蛋白。此类调节元件可包含转录启动子、编码合适的mRNA核糖体结合位点的序列以及控制转录和翻译的终止的序列。表达载体，特别是哺乳动物表达载体还可包含一个或多个非转录元件，诸如复制起点、连接到待表达的基因的合适启动子和增强子、其它5'或3'侧翼非转录序列、5'或3'非翻译序列（诸如必需的核糖体结合位点）、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点或转录终止序列。也可并入赋予在宿主中复制能力的复制起点。

[0402] 用于转化脊椎动物细胞的表达载体中的转录和翻译控制序列可由病毒源提供。示例性载体可如Okayama和Berg, 3Mol. Cell. Biol. 280 (1983) 所述进行构建。

[0403] 在一些实施方案中，将抗体编码序列或抗原结合片段编码序列置于强效组成型启动子（诸如用于以下基因的启动子：次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶（HPRT）、腺苷脱氨酶、丙酮酸激酶、 β -肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸等）的控制下。此外，许多病毒启动子在真核细胞中组成性地发挥功能，并适合与所述实施方案一起使用。这类病毒启动子包括但不限于细胞巨化病毒（CMV）立即早期启动子、SV40的早期和晚期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒（MMTV）启动子、马罗尼白血病病毒的长末端重复序列（LTR）、人免疫缺陷病毒（HIV）、EB病毒（EBV）、劳氏肉瘤病毒（RSV）和其他逆转录病毒，以及单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子。在一个实施方案中，将BCMA特异性抗体或其抗原结合片段编码序列置于诱导型启动子（诸如，金属硫蛋白启动子、四环素诱导型启动子、多西环素诱导型启动子、含有一种或多种干扰素刺激的响应元件（ISRE）（诸如蛋白激酶R 2', 5'-寡核苷酸合成酶、Mx基因、ADAR1等）

的启动子)的控制下。

[0404] 本文所述的载体可含有一个或多个内部核糖体进入位点(IRES)。IRES序列包含在融合载体中可能有利于增强一些蛋白质的表达。在一些实施方案中,载体系统将包括一个或多个聚腺苷酸化位点(例如,SV40),这些位点可在任何上述核酸序列的上游或下游。载体组分可连续地连接,或以提供用于表达基因产物的最佳间距的方式(即通过在ORF之间引入“间隔区”核苷酸)排列,或以另一种方式定位。调控元件诸如IRES基序也可被布置成提供用于表达的最佳间距。

[0405] 载体可包含本领域熟知的选择标记。选择标记包括阳性选择标记和阴性选择标记,例如抗生素抗性基因(例如新霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、卡那霉素抗性基因、四环素抗性基因、青霉素抗性基因、嘌呤霉素抗性基因、杀稻瘟菌素抗性基因)、谷氨酰胺合成酶基因、HSV-TK、用于更昔洛韦选择的HSV-TK衍生物或用于6-甲基嘌呤选择的细菌嘌呤核苷磷酸化酶基因(Gadi等人,7Gene Ther.1738-1743(2000))。编码选择标记或克隆位点的核酸序列可在编码感兴趣的多肽或克隆位点的核酸序列的上游或下游。

[0406] 本文所述的载体可用于用编码所述抗体或抗原结合片段的基因转化各种细胞。例如,该载体可用于产生BCMA特异性抗体或产生抗原结合片段的细胞。因此,另一方面的特征是用包含编码结合BCMA的抗体或其抗原结合片段(诸如本文所述和例示的抗体或抗原结合片段)的核酸序列的载体转化的宿主细胞。

[0407] 本领域已知用于将外来基因引入细胞中的多种技术,并且出于实施所述方法的目的,这些技术可用于根据本文所描述和例示的各种实施方案构建重组细胞。所使用的方法应当使得异源基因序列向宿主细胞稳定转移,以致异源基因序列是可遗传的并且可由细胞子代表达,从而受体细胞的必要发育和生理功能不被破坏。可使用的技术包括但不限于染色体转移(例如细胞融合、染色体介导的基因转移、微细胞介导的基因转移)、物理方法(例如转染、原生质球融合、显微注射、电穿孔、脂质体载体)、病毒载体转移(例如,重组DNA病毒、重组RNA病毒)等(描述于Cline,29Pharmac.Ther.69-92(1985)中)。也可使用磷酸钙沉淀和聚乙二醇(PEG)诱导的细菌原生质体与哺乳动物细胞的融合来转化细胞。

[0408] 适用于表达本文所述的BCMA特异性抗体或抗原结合片段的细胞优选为真核细胞,更优选为植物、啮齿动物或人来源的细胞,例如但不限于NS0、CHO、CHOK1、perC.6、Tk-ts13、BHK、HEK293细胞、COS-7、T98G、CV-1/EBNA、L细胞、C127、3T3、HeLa、NS1、Sp2/0骨髓瘤细胞和BHK细胞系等。此外,可使用杂交瘤细胞完成抗体的表达。用于产生杂交瘤的方法是本领域中已良好建立的。

[0409] 可选择或筛选用本文所述的表达载体转化的细胞用于本文所述的抗体或抗原结合片段的重组表达。扩增和筛选重组阳性细胞,筛选表现出所需表型(诸如高水平表达、增强的生长特性或例如由于蛋白质修饰或改变的翻译后修饰产生具有所需生化特征的蛋白质的能力)的亚克隆。这些表型可能是由于给定亚克隆的固有性质或由于突变造成的。突变可通过使用化学品、UV波长光、辐射、病毒、插入诱变剂、DNA错配修复的抑制或这些方法的组合来实现。

[0410] 使用BCMA特异性抗体进行治疗的方法

[0411] 本文提供了在治疗中使用的BCMA特异性抗体或其抗原结合片段。具体地讲,这些抗体或抗原结合片段可用于治疗癌症,诸如BCMA表达型癌症,或其他BCMA表达型病症。因

此,本发明提供了治疗癌症的方法,该方法包括施用如本文所述的抗体,诸如BCMA特异性抗体或抗原结合片段。例如,该用途可通过干扰BCMA-受体相互作用或其中抗体缀合到毒素,从而将毒素靶向BCMA表达型癌症。在一些实施方案中,BCMA表达型癌症或病症包括淋巴瘤,诸如多发性骨髓瘤(MM),包括郁积型多发性骨髓瘤(SMM),或淀粉样变性、浆细胞白血病和狼疮。在一些实施方案中,BCMA表达型癌症是复发性或难治性形式的淋巴瘤,诸如复发性或难治性形式的多发性骨髓瘤。用于这些方法的抗体包括上文所述的那些抗体,例如,具有表1所述特征的BCMA特异性抗体或抗原结合片段(例如,BCMB519),例如在这些抗体的进一步论述中的CDR或可变结构域序列。

[0412] 在本文所述的一些实施方案中,BCMA特异性抗体的免疫效应子特性可通过本领域技术人员已知的和本文所述的技术经由Fc修饰得到增强或沉默。例如,Fc效应子功能诸如C1q结合、补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)、细胞表面受体(例如B细胞受体;BCR)的下调等,可通过修饰促成这些活性的Fc中的残基来提供和/或控制。

[0413] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指细胞介导的反应,在这个反应过程中,表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上的结合抗体并随后致使靶细胞裂解。

[0414] 单克隆抗体诱导ADCC的能力可通过改造其寡糖组分来增强。人IgG1或IgG3在Asn297处被熟知的双分枝G0、G0F、G1、G1F、G2或G2F形式的大多数聚糖N-糖基化。未工程化的CHO细胞所产生的抗体通常具有约至少85%的聚糖岩藻糖含量。从连接到Fc区的双分枝复合物型低聚糖去除核心岩藻糖,可经由改善的Fc γ R IIIa结合来增强抗体的ADCC,而不会改变抗原结合或CDC活性。此类mAb可使用所报告的能引起具有双分枝复合物型Fc低聚糖的相对较高去岩藻糖基化抗体的成功表达的不同方法实现,诸如控制培养物渗透压(Konno等人,Cytotechnology,64:249-65,2012),应用变体CHO细胞系Lec13作为宿主细胞系(Shields等人,J Biol Chem,277:26733-26740,2002),应用变体CHO细胞系EB66作为宿主细胞系(Olivier等人,MAbs,2(4),2010;印刷出版前的电子版;PMID:20562582),应用大鼠杂交瘤细胞系YB2/0作为宿主细胞系(Shinkawa等人,J Biol Chem,278:3466-3473;2003),引入特异性针对 α 1,6-岩藻糖基转移酶(FUT8)基因的小干扰RNA(Mori等人,Biotechnol Bioeng,88:901-908,2004),或共表达 β -1,4-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶III和高尔基体 α -甘露糖苷酶II或强效 α -甘露糖苷酶I抑制剂,几夫碱(Ferrara等人,JBiol Chem,281:5032-5036,2006;Ferrara等人,Biotechnol Bioeng,93:851-861,2006;Xhou等人,Biotechnol Bioeng 99:652-65,2008)。

[0415] 在本文所述的一些实施方案中,也可通过抗体Fc中的某些置换来增强由BCMA抗体引发的ADCC。示例性置换为例如在氨基酸位置256、290、298、312、356、330、333、334、360、378或430(根据EU索引对残基进行编号)处的置换,如美国专利6,737,056中有所描述。

[0416] 检测BCMA的方法

[0417] 本文提供了用于通过使样本与本文所述的抗体或其抗原结合片段接触来检测生物样本中的BCMA的方法。如本文所述,样本可来源于尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞、循环肿瘤细胞、非组织缔合的细胞(即游离细胞)、组织(例如手术切除的肿瘤组织、活体组织切片,包括细针抽吸组织)、组织学制备物等。在一些实施方案中,所述方法包括通

过使样本与本文所述的任何BCMA特异性抗体或其抗原结合片段接触来检测生物样本中的BCMA。

[0418] 在一些实施方案中,样本可与本文所述的BCMA特异性抗体或抗原结合片段中的多于一种接触。例如,样本可与第一BCMA特异性抗体或其抗原结合片段接触,然后与第二BCMA特异性抗体或其抗原结合片段接触,其中第一抗体或抗原结合片段和第二抗体或抗原结合片段不是相同的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,第一抗体或其抗原结合片段在接触样本之前可附连至表面,诸如多孔板、芯片或类似的底物上。在其它实施方案中,第一抗体或其抗原结合片段在接触样本之前完全可不附连或连接至任何物体。

[0419] 可对所述BCMA特异性抗体和抗原结合片段进行可检测地标记。在一些实施方案中,通过本文所述的方法,标记的抗体和抗原结合片段可有利于检测BCMA。许多这样的标记是本领域技术人员容易知晓的。例如,合适的标记包括但不限于认为其限于放射标记、荧光标记、表位标签、生物素、发色团标记、ECL标记或酶。更具体地,所述标记包括钆、¹¹¹In-DOTA、¹¹¹In-二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和 β -半乳糖苷酶、聚组氨酸(HIS标签)、吖啶染料、花青染料、荧光酮染料、噁嗪染料、菲啶染料、罗丹明染料、Alexafluor®染料等。

[0420] 所述BCMA特异性抗体和抗原结合片段可用于多种测定中,以检测生物样本中的BCMA。一些合适的测定包括但不限于认为其限于蛋白质印迹分析、放射性免疫测定、表面等离子共振、免疫荧光测定、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散、电化学发光(ECL)免疫测定、免疫组织化学、荧光激活细胞分选(FACS)或ELISA测定。

[0421] 在本文所述的一些实施方案中,受治疗者中BCMA表达型癌细胞的检测可用于确定受治疗者是否可用针对BCMA的治疗剂进行治疗。

[0422] BCMA以可检测的水平存在于血液和血清样品中。因此,本文提供了用于通过使样本与结合BCMA的抗体或其抗原结合片段接触来检测来源于血液的样品(诸如血清样品)中的BCMA的方法。血液样品或其衍生物可被稀释、分馏或以其它方式处理以得到可对其执行所述方法的样品。在一些实施方案中,可以通过本领域已知的任意数量的测定检测血液样品或其衍生物中的BCMA,这些测定诸如但不限于蛋白质印迹分析、放射性免疫测定、表面等离子共振、免疫荧光测定、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散、电化学发光(ECL)免疫测定、免疫组织化学、荧光激活细胞分选(FACS)或ELISA测定。在一些实施方案中,该方法是体外方法。

[0423] 诊断癌症或病症的方法

[0424] 本文提供了用于诊断受试者中BCMA表达型癌症或病症的方法。在一些实施方案中,BCMA表达型癌症或病症包括淋巴瘤,诸如多发性骨髓瘤(MM),包括郁积型多发性骨髓瘤(SMM),或淀粉样变性、浆细胞白血病和狼疮。在一些实施方案中,如上文所述,检测生物样品诸如血液样品或血清样品中的BCMA提供了诊断从其取得样品的受治疗者中癌症的能力。或者,在一些实施方案中,其它样品诸如组织学样品、细针抽吸样品、切除的肿瘤组织、循环细胞、循环肿瘤细胞等也可用于评估从其取得样品的受治疗者是否患有癌症。在一些实施方案中,可能已经知道从其取得样品的受治疗者患有癌症,但是可能尚未诊断出受治疗者所患癌症的类型或者初步诊断结果可能不清楚,因此检测获自受治疗者的生物样品中的BCMA可实现或明确癌症的诊断。例如,可能已知受治疗者患有癌症,但是可能不知道或可能

不清楚受治疗者所患癌症是否是BCMA表达型的。

[0425] 在一些实施方案中,所述方法涉及通过测定来源于受试者的生物样品中存在的BCMA的量来评估受试者是否患有BCMA表达型癌症或病症;并且将所观测到的BCMA的量与对照或参照样品种中的BCMA的量进行比较,其中来源于受试者的样品中BCMA的量与对照或参照样品种中BCMA的量之间的差值指示受试者患有BCMA表达型癌症或病症。在另一个实施方案中,可将所观测到的获自受治疗者的生物样品中BCMA的量与已知与癌症的某些形式或阶段相关的BCMA水平进行比较,从而确定受治疗者所患癌症的形式或阶段。在一些实施方案中,通过使样品与结合BCMA的抗体或其抗原结合片段(诸如本文所述的BCMA特异性抗体)接触来评估来源于受试者的样品中BCMA的量。评估其中BCMA的存在的样品可来源于尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞、循环肿瘤细胞、非组织缔合的细胞(即游离细胞)、组织(例如手术切除的肿瘤组织、活体组织切片,包括细针抽吸组织)、组织学制备物等。在一些实施方案中,BCMA表达型癌症或病症包括血液学癌症,诸如多发性骨髓瘤(MM),包括郁积型多发性骨髓瘤(SMM),或淀粉样变性、浆细胞白血病和狼疮。在一些实施方案中,BCMA表达型癌症是复发性或难治性形式的淋巴瘤,诸如复发性或难治性形式的多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,受治疗者是人。

[0426] 在一些实施方案中,诊断BCMA表达型癌症或病症的方法将涉及:使受试者的生物样品与BCMA特异性抗体或其抗原结合片段(诸如可来源于表1中提供的抗体和片段的那些(例如,BCMB519))接触;定量分析由抗体或其抗原结合片段结合的样品中存在的BCMA的量;将样品中存在的BCMA的量与已知标准品或参照样品种进行比较;并确定受试者的BCMA水平是否落入与癌症或病症相关的BCMA水平内。在另外的实施方案中,诊断方法之后可为施用或给出BCMA特异性治疗的附加步骤。在另一个实施方案中,诊断方法之后可为传送测定结果以便于治疗癌症或病症的附加步骤。在一些实施方案中,BCMA特异性治疗可针对BCMA表达型癌症或病症,诸如本文所述的BCMA×CD3多特异性抗体。

[0427] 在一些实施方案中,所述方法涉及通过测定获自受试者的血液或血清样品中存在的BCMA的量来评估受试者是否患有BCMA表达型癌症或病症;并且将所观测到的BCMA的量与对照或参照样品种中的BCMA的量进行比较,其中来源于受试者的样品中BCMA的量与对照或参照样品种中BCMA的量之间的差值指示受试者患有BCMA表达型癌症或病症。

[0428] 在一些实施方案中,对照或参照样品种可来源于不患有BCMA表达型癌症或病症的受试者。在一些实施方案中,对照或参照样品种可来源于患有BCMA表达型癌症或病症的受试者。在其中对照或参照样品种来源于不患有BCMA表达型癌症或病症的受试者的一些实施方案中,观察到的测试样品中存在的BCMA的量相对于观察到的对照或参照样品种中BCMA的量有所增加,指示所评估的受试者患有BCMA表达型癌症或病症。在其中对照样品来源于不患有BCMA表达型癌症或病症的受试者的一些实施方案中,观察到的测试样品中存在的BCMA的量相对于观察到的对照或参照样品种中BCMA的量有所减少或近似,指示所评估的受试者不患有BCMA表达型癌症或病症。在其中对照或参照样品种来源于患有BCMA表达型癌症或病症的受试者的一些实施方案中,观察到的测试样品中存在的BCMA的量相对于观察到的对照或参照样品种中BCMA的量近似,指示所评估的受试者患有BCMA表达型癌症或病症。在其中对照样品或参照样品种来源于患有BCMA表达型癌症或病症的受试者的一些实施方案中,观察到的测试样品中存在的BCMA的量相对于观察到的对照或参照样品种中BCMA的量有所减少,指示所评估的受试

者不患有BCMA表达型癌症或病症。

[0429] 在一些实施方案中,通过使样品与结合BCMA的抗体或其抗原结合片段(诸如本文所述的抗体)接触来评估来源于受试者的样品中BCMA的量。评估其中BCMA的存在的样品可来源于血液样品、血清样品、循环细胞、循环肿瘤细胞、非组织缔合的细胞(即游离细胞)、组织(例如手术切除的肿瘤组织、活体组织切片,包括细针抽吸组织)、组织学制备物等。

[0430] 在各个方面,通过使样品与结合BCMA的抗体或其抗原结合片段接触来测定BCMA的量。在一些实施方案中,样品可与结合BCMA的抗体或其抗原结合片段中的多于一种类型接触。在一些实施方案中,样品可与结合BCMA的第一抗体或其抗原结合片段接触,然后与结合BCMA的第二抗体或其抗原结合片段接触。BCMA特异性抗体或抗原结合片段,诸如本文所述的那些可用于这种功能中。

[0431] 可以使用BCMA特异性抗体和抗原结合片段的各种组合来提供“第一”和“第二”抗体或抗原结合片段以实施所述诊断方法。在一些实施方案中,BCMA表达型癌症或病症包括淋巴瘤,诸如多发性骨髓瘤(MM),包括郁积型多发性骨髓瘤(SMM)。在一些实施方案中,BCMA表达型癌症是复发性或难治性形式的淋巴瘤,诸如复发性或难治性形式的多发性骨髓瘤。

[0432] 在某些实施方案中,通过蛋白质印迹分析、放射性免疫测定、免疫荧光测定、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散、电化学发光(ECL)免疫测定、免疫组织化学、荧光激活细胞分选(FACS)或ELISA测定来测定BCMA的量。

[0433] 在所述诊断方法的各种实施方案中,使用了对照样品或参照样品。该样品可为确保所用测定正常工作的阳性或阴性测定对照样;例如,该性质的测定对照样通常可用于免疫组织化学测定中。或者,该样品可以是来自健康受治疗者的生物样品中BCMA量的标准化参照样品。在一些实施方案中,可以将测试受试者的所观测到的BCMA水平与在来自已知患有BCMA表达型癌症或病症的受试者的样品中所观测到的BCMA水平进行比较。在一些实施方案中,对照受试者可能患有感兴趣的特定癌症或病症。在一些实施方案中,已知对照受治疗者患有早期癌症,其可能是或可能不是BCMA表达型癌症。在一些实施方案中,已知对照受治疗者患有中期癌症,其可能是或可能不是BCMA表达型癌症。在一些实施方案中,已知对照受治疗者患有晚期癌症,其可能是或可能不是BCMA表达型癌症。

[0434] 在一些实施方案中,用于诊断癌症或病症的方法是体外方法。

[0435] 监测癌症或病症的方法

[0436] 本文提供了用于监测受试者中BCMA表达型癌症或病症的方法。在一些实施方案中,BCMA表达型癌症或病症包括淋巴瘤,诸如多发性骨髓瘤(MM),包括郁积型多发性骨髓瘤(SMM),或淀粉样变性、浆细胞白血病和狼疮。在一些实施方案中,BCMA表达型癌症是复发性或难治性形式的淋巴瘤,诸如复发性或难治性形式的多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,所述方法涉及通过测定来源于受试者的测试样品中存在的BCMA的量来评估BCMA表达型癌症或病症是否正在进展、消退或保持稳定;并且将所观测到的BCMA的量与在较早时间点以类似方式获自受治疗者的生物样品中BCMA的量进行比较,其中测试样品与较早样品中BCMA的量之间的差值提供了癌症是否正在进展、消退或保持稳定的指示。就这一点而言,测试样品中BCMA的量相对于所观测到的较早样品中的量有所增加可指示BCMA表达型癌症或病症的进展。相反,测试样品中BCMA的量相对于所观测到的较早样品中的量有所减少可指示BCMA表达型癌症或病症的消退。

[0437] 因此,测试样品中BCMA的量相对于所观测到的较早样品中的量差别不明显可指示BCMA表达型癌症或病症处于稳定疾病状态。在一些实施方案中,通过使样品与结合BCMA的抗体或其抗体片段(诸如本文所述的抗体)接触来评估来源于受试者的生物样品中BCMA的量。评估其中BCMA的存在的样品可来源于尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞、循环肿瘤细胞、非组织缔合的细胞(即游离细胞)、组织(例如手术切除的肿瘤组织、活体组织切片,包括细针抽吸组织)、组织学制备物等。在一些实施方案中,受治疗者是人。

[0438] 在一些实施方案中,监测BCMA表达型癌症或病症的方法将涉及:使受试者的生物样品与BCMA特异性抗体或其抗原结合片段(诸如可来源于表1中所提供的抗体和片段的那些(例如,BCMB519))接触;定量分析样品中存在的BCMA的量;将样品中存在的BCMA的量与在较早时间点以类似方式获自相同受试者的生物样品中所测定的BCMA的量进行比较;并确定受治疗者的BCMA水平是否随时间变化。测试样品中BCMA的量相对于所观测到的较早样品中的量有所增加可指示癌症的进展。相反,测试样品中BCMA的量相对于所观测到的较早样品中的量有所减少可指示BCMA表达型癌症或病症的消退。因此,测试样品中BCMA的量相对于所观测到的较早样品中的量差别不明显可指示BCMA表达型癌症或病症处于稳定疾病状态。在一些实施方案中,样品的BCMA水平可以单独与已知标准品或参照样品进行比较,或者样品的BCMA水平除与所观测到的在较早时间点评估的样品中的BCMA水平进行比较之外,也可以与已知标准品或参照样品进行比较。在另外的实施方案中,诊断方法之后可为施用BCMA特异性治疗的附加步骤。在一些实施方案中,BCMA特异性治疗可针对BCMA表达型癌症或病症,诸如本文所述的BCMA×CD3多特异性抗体。

[0439] 在各个方面,通过使样品与结合BCMA的抗体或其抗原结合片段接触来测定BCMA的量。在一些实施方案中,样品可与结合BCMA的抗体或其抗原结合片段中的多于一种类型接触。在一些实施方案中,样品可与结合BCMA的第一抗体或其抗原结合片段接触,然后与结合BCMA的第二抗体或其抗原结合片段接触。抗体诸如本文所述的那些可用于该功能中。

[0440] 能够使用表1中所述的抗体和抗原结合片段的各种组合来提供“第一”和“第二”抗体或抗原结合片段以实施所述的监测方法。在一些实施方案中,BCMA表达型癌症或病症包括血液学癌症,诸如急性骨髓性白血病(AML)或淋巴瘤(例如,多发性骨髓瘤(MM)、郁积型多发性骨髓瘤(SMM)),或淀粉样变性、浆细胞白血病和狼疮。

[0441] 在某些实施方案中,通过蛋白质印迹分析、放射性免疫测定、免疫荧光测定、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散、电化学发光(ECL)免疫测定、免疫组织化学、荧光激活细胞分选(FACS)或ELISA测定来测定BCMA的量。在一些实施方案中,该方法是体外方法。

[0442] 用于检测BCMA的试剂盒

[0443] 本文提供了用于检测生物样本中的BCMA的试剂盒。这些试剂盒包括本文所述的BCMA特异性抗体或其抗原结合片段中的一种或多种,以及试剂盒的使用说明。

[0444] 所提供的BCMA特异性抗体或抗原结合片段可为溶液;被冻干;附连到底物、载体或板;或被可检测地标记。

[0445] 所述试剂盒还可包括用于实施本文所述方法的附加组分。举例来说,试剂盒可包括用于从受试者获得样本的装置、对照或参照样本(例如来自患有进展缓慢的癌症的受试者和/或不患癌症的受试者的样本)、一个或多个样本室和/或描述本发明方法的性能的说明确明材料、以及组织特异性对照或标准品。

[0446] 用于确定BCMA的水平的装置还可包括例如在用于确定BCMA水平的测定中使用的缓冲液或其他试剂。说明书可为例如用于执行测定的印刷说明书和/或用于评价BCMA的表达水平的说明书。

[0447] 所述试剂盒还可包括用于从受治疗者分离出样本的装置。这些装置可包括可用于从受治疗者中获得流体或组织的设备或试剂中的一项或多项。用于从受治疗者中获得样本的装置还可包括用于从血液样本中分离出血液组分诸如血清的装置。优选的是,将试剂盒设计成与人类受治疗者一起使用。

[0448] 实施方案

[0449] 本文所提供的公开还提供了以下非限制性实施方案。

[0450] 实施方案1.一种三特异性抗体或其三特异性结合片段,包含:

[0451] (a) 第一抗原结合臂,所述第一抗原结合臂包含第一重链可变结构域(VH1)和第一轻链可变结构域(VL1);

[0452] (b) 第二抗原结合臂,所述第二抗原结合臂包含第二重链可变结构域(VH2)和第二轻链可变结构域(VL2);

[0453] (c) 第三抗原结合臂,所述第三抗原结合臂包含第三重链可变结构域(VH3)和第三轻链可变结构域(VL3),

[0454] 其中所述第一抗原结合臂结合至分化簇3(CD3)上的表位,所述第二抗原结合臂结合至G蛋白偶联受体C5家族亚型D(GPRC5D)上的表位,并且所述第三抗原结合臂结合至B细胞成熟抗原(BCMA)上的表位。

[0455] 实施方案2.根据实施方案1所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中第一抗原结合臂的所述VH1和VL1存在于双体抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、二硫化物稳定的Fv片段(dsFv)或二硫化物稳定的双体抗体(ds双体抗体)中,任选地存在于Fab中。

[0456] 实施方案3.根据实施方案1或2所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第二抗原结合臂的所述VH2和VL2存在于双体抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、Fv、Fd、二硫化物稳定的Fv片段(dsFv)或二硫化物稳定的双体抗体(ds双体抗体)中,任选地存在于scFv中。

[0457] 实施方案4.根据实施方案1至3中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第三抗原结合臂的所述VH3和VL3存在于抗体片段、双体抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、二硫化物稳定的Fv片段(dsFv)或二硫化物稳定的双体抗体(ds双体抗体)中,任选地存在于scFv中。

[0458] 实施方案5.根据实施方案1至4中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合CD3的第一抗原结合臂包含SEQ ID NO:8的重链可变结构域(VH1)的重链互补决定区(HCDR1)、HCDR2和HCDR3以及SEQ ID NO:7的轻链可变结构域(VL1)的轻链互补决定区(LCDR1)、LCDR2和LCDR3。

[0459] 实施方案6.根据实施方案1至5中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合CD3的第一抗原结合臂包含含有GDSVFNNNAWS(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HCDR1、含有RTYYRSKWLYD(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HCDR2和含有GYSSSFYD(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HCDR3;以及含有TGTSSNIGTYKFVS(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列的LCDR1、含有EVSKRPS(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的LCDR2和含有VSYAGSGTLL(SEQ ID NO:

3)的氨基酸序列的LCDR3。

[0460] 实施方案7.根据实施方案1至6中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合CD3的第一抗原结合臂包含SEQ ID NO:8的VH1和SEQ ID NO:7的VL1。

[0461] 实施方案8.根据实施方案1至7中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合GPC5D的第二抗原结合臂包含SEQ ID NO:16的重链可变结构域(VH2)的重链互补决定区(HCDR1)、HCDR2和HCDR3以及SEQ ID NO:15的轻链可变结构域(VL2)的轻链互补决定区(LCDR1)、LCDR2和LCDR3。

[0462] 实施方案9.根据实施方案1至8中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合GPC5D的第二抗原结合臂包含含有GFSLTNIRMSVS(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列的HCDR1、含有HIFSNDEKS(SEQ ID NO:13)的氨基酸序列的HCDR2和含有MRLPYGMDV(SEQ ID NO:14)的氨基酸序列的HCDR3;以及含有RSSQSLVHSDGNTYLS(SEQ ID NO:9)的氨基酸序列的LCDR1、含有KISNRFF(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列的LCDR2和含有MQATQFPHT(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列的LCDR3。

[0463] 实施方案10.根据实施方案1至9中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合GPC5D的第二抗原结合臂包含SEQ ID NO:16的VH2和SEQ ID NO:15的VL2。

[0464] 实施方案11.根据实施方案1至10中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合BCMA的第三抗原结合臂包含SEQ ID NO:24的重链可变结构域(VH3)的重链互补决定区(HCDR1)、HCDR2和HCDR3以及SEQ ID NO:23的轻链可变结构域(VL3)的轻链互补决定区(LCDR1)、LCDR2和LCDR3。

[0465] 实施方案12.根据实施方案1至11中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合BCMA的第三抗原结合臂包含含有GFTFSSYAMS(SEQ ID NO:20)的氨基酸序列的HCDR1、含有AISGSGGSTY(SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的HCDR2和含有DEGYSSGHYYGMDV(SEQ ID NO:22)的氨基酸序列的HCDR3;以及含有RASQSISSSFLT(SEQ ID NO:17)的氨基酸序列的LCDR1、含有GASSRAT(SEQ ID NO:18)的氨基酸序列的LCDR2和含有QHYGSSPMYT(SEQ ID NO:19)的氨基酸序列的LCDR3。

[0466] 实施方案13.根据实施方案1至12中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合BCMA的第三抗原结合臂包含SEQ ID NO:24的VH3和SEQ ID NO:23的VL3。

[0467] 实施方案14.根据实施方案1至4中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合CD3的第一抗原结合臂包含SEQ ID NO:8的VH1的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及SEQ ID NO:7的VL1的LCDR1、LCDR2和LCDR3;

[0468] 所述结合GPC5D的第二抗原结合臂包含SEQ ID NO:16的VH2的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及SEQ ID NO:15的VL2的LCDR1、LCDR2和LCDR3;并且

[0469] 所述结合BCMA的第三抗原结合臂包含SEQ ID NO:24的VH3的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及SEQ ID NO:23的VL3的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0470] 实施方案15.根据实施方案1至4和14中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合CD3的第一抗原结合臂包含分别为SEQ ID NO:4、5、6、1、2、3的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3;

[0471] 所述结合GPC5D的第二抗原结合臂包含分别为SEQ ID NO:12、13、14、9、10和11的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3;并且

[0472] 所述结合BCMA的第三抗原结合臂包含分别为SEQ ID NO:20、21、22、17、18和19的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0473] 实施方案16.根据实施方案1至4、14和15中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合CD3的第一抗原结合臂包含SEQ ID NO:8的VH1和SEQ ID NO:7的VL1;

[0474] 所述结合GPC5D的第二抗原结合臂包含SEQ ID NO:16的VH2和SEQ ID NO:15的VL2;并且

[0475] 所述结合BCMA的第三抗原结合臂包含SEQ ID NO:24的VH3和SEQ ID NO:23的VL3。

[0476] 实施方案17.根据实施方案1至16中任一项所述的三特异性抗体或其三特异性结合片段,所述第一抗原结合臂包含可结晶片段(Fc)结构域,并且所述第二抗原结合臂或所述第三抗原结合臂包含Fc结构域。

[0477] 实施方案18.根据实施方案17所述的三特异性抗体或其三特异性结合片段,其中所述Fc结构域包含一个或多个促进所述Fc结构域的异源二聚化的突变。

[0478] 实施方案19.根据实施方案18所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述突变选自T366S、L368A、T366W和Y407V(EU编号)。

[0479] 实施方案20.根据实施方案17至19中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述Fc结构域还包含一个或多个减少Fc与Fc γ 受体结合的突变。

[0480] 实施方案21.根据实施方案20所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述Fc γ 受体是Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIIB。

[0481] 实施方案22.根据实施方案20或21所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述Fc结构域包含一个或多个选自L234A、L235A和D265S(EU编号)的突变。

[0482] 实施方案23.根据实施方案17至22中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述Fc结构域还包含一个或多个减少Fc与蛋白A结合的突变。

[0483] 实施方案24.根据实施方案23所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述Fc结构域包含突变H435R和/或Y436F(EU编号)。

[0484] 实施方案25.根据实施方案1至24中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第一抗原结合臂特异性地结合至CD3 ϵ 链的残基22-35(QDGNEEMGGITQTP(SEQ ID NO:161))。

[0485] 实施方案26.根据实施方案1至25中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第一抗原结合臂以约 1×10^{-8} M至 1×10^{-7} M的亲和力特异性地结合至CD3。

[0486] 实施方案27.根据实施方案26所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第一抗原结合臂以约 2×10^{-8} M至 4×10^{-8} M的亲和力特异性地结合至CD3。

[0487] 实施方案28.根据实施方案1至27中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第三抗原结合臂特异性地结合BCMA BCMW37链的残基17-26(LLHACIPCQL(SEQ ID NO:162))。

[0488] 实施方案29.根据实施方案1至28中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第三抗原结合臂以约 1×10^{-10} M至 1×10^{-7} M的亲和力特异性地结合至BCMA。

[0489] 实施方案30.根据实施方案29所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第三抗原结合臂以约 2×10^{-10} M至 9×10^{-10} M的亲合力特异性地结合至BCMA。

[0490] 实施方案31.一种三特异性抗体或三特异性结合片段,包含结合至分化簇3 (CD3) 上的表位的第一抗原结合臂、结合至G蛋白偶联受体C5家族亚型D (GPCR5D) 上的表位的第二抗原结合臂和结合至B细胞成熟抗原 (BCMA) 上的表位的第三抗原结合臂,

[0491] 其中所述第一抗原结合臂包含重链 (HC1) 多肽和轻链 (LC) 多肽;并且

[0492] 其中所述三特异性抗体或其三特异性结合片段包含含有所述第二抗原结合臂和所述第三抗原结合臂的单个多肽。

[0493] 实施方案32.根据实施方案31所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第一抗原结合臂的所述HC1包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0494] 实施方案33.根据实施方案32所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第一抗原结合臂的所述LC包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

[0495] 实施方案34.根据实施方案32或33所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中包含所述第二抗原结合臂和所述第三抗原结合臂的所述多肽包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

[0496] 实施方案35.根据实施方案31所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HC1和含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的LC,并且包含所述第二抗原结合臂和所述第三抗原结合臂的所述多肽包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

[0497] 实施方案36.一种三特异性抗体或三特异性结合片段,包含结合至分化簇3 (CD3) 上的表位的第一抗原结合臂、结合至G蛋白偶联受体C5家族亚型D (GPCR5D) 上的表位的第二抗原结合臂和结合至B细胞成熟抗原 (BCMA) 上的表位的第三抗原结合臂,

[0498] 其中所述第一抗原结合臂包含重链 (HC1) 多肽和轻链 (LC) 多肽,其中所述重链 (HC1) 多肽还包含所述第二抗原结合臂,

[0499] 其中所述三特异性抗体或其三特异性结合片段还包含含有所述第三抗原结合臂的单个多肽。

[0500] 实施方案37.根据实施方案36所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第一抗原结合臂的所述HC1包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

[0501] 实施方案38.根据实施方案36或37所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第一抗原结合臂的所述LC包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0502] 实施方案39.根据实施方案36至38中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中包含所述第三抗原结合臂的所述单个多肽包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列。

[0503] 实施方案40.根据实施方案36所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第一抗原结合臂包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HC1和含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的LC,并且包含所述第三抗原结合臂的所述单个多肽包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列。

[0504] 实施方案41.根据实施方案1至40中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。

[0505] 实施方案42.根据实施方案1至41中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合

片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是IgG1同种型。

[0506] 实施方案43.一种合成多核苷酸,编码根据实施方案1至42中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段。

[0507] 实施方案44.一种药物组合物,包含根据实施方案1至42中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段以及药学上可接受的载体。

[0508] 实施方案45.根据实施方案44所述的药物组合物,其中所述药物组合物还包含第二治疗剂。

[0509] 实施方案46.根据实施方案45所述的药物组合物,其中所述第二治疗剂包括抗CD38剂、免疫调节酰亚胺药物(IMiD)、免疫检查点抑制剂、免疫共刺激剂、 γ 分泌酶抑制剂、T细胞增强剂或它们的任何组合。

[0510] 实施方案47.一种细胞,表达根据实施方案1至42中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段。

[0511] 实施方案48.根据实施方案47所述的细胞,其中所述细胞是杂交瘤。

[0512] 实施方案49.根据实施方案47所述的细胞,其中所述三特异性抗体是重组产生的。

[0513] 实施方案50.一种用于治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据实施方案1至42中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段或根据实施方案43至46中任一项所述的药物组合物。

[0514] 实施方案51.根据实施方案50所述的方法,其中施用所述三特异性抗体或三特异性结合片段或所述药物组合物足以治疗所述癌症的时间。

[0515] 实施方案52.一种用于抑制癌细胞的生长或增殖的方法,所述方法包括向所述细胞施用有效量的根据实施方案1至42中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段或根据实施方案43至46中任一项所述的药物组合物,其中所述有效量足以抑制所述癌细胞的生长或增殖。

[0516] 实施方案53.根据实施方案52所述的方法,其中所述癌细胞在受试者中,并且将所述三特异性抗体或三特异性结合片段或所述药物组合物施用于所述受试者。

[0517] 实施方案54.根据实施方案52所述的方法,其中所述施用是离体进行的。

[0518] 实施方案55.一种在有需要的受试者中将T细胞重定向至BCMA表达型癌细胞和/或GPCR5D表达型癌细胞的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据实施方案1至42中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段或根据实施方案43至46中任一项所述的药物组合物。

[0519] 实施方案56.根据实施方案55所述的方法,其中所述治疗有效量足以引导所述T细胞对所述癌细胞的响应。

[0520] 实施方案57.根据实施方案50至56中任一项所述的方法,其中所述癌症是血液学癌症。

[0521] 实施方案58.根据实施方案57所述的方法,其中所述血液学癌症是BCMA表达型B细胞癌症和/或GPCR5D表达型B细胞癌症。

[0522] 实施方案59.根据实施方案58所述的方法,其中所述BCMA表达型B细胞癌症和/或GPCR5D表达型B细胞癌症是多发性骨髓瘤。

[0523] 实施方案60.根据实施方案59所述的方法,其中所述BCMA表达型B细胞癌症和/或

GPRC5D表达型B细胞癌症是郁积型多发性骨髓瘤(SMM)。

[0524] 实施方案61.根据实施方案50至60中任一项所述的方法,其中所述癌症是复发性、难治性或恶性癌症或它们的任何组合。

[0525] 实施方案62.根据实施方案50至51、53和55至61中任一项所述的方法,其中所述受试者已接受先前的治疗。

[0526] 实施方案63.根据实施方案62所述的方法,所述先前的治疗包括蛋白酶体抑制剂、免疫调节药物、CD38抗体、双特异性药剂、CAR-T疗法或它们的组合。

[0527] 实施方案64.根据实施方案50至63中任一项所述的方法,还包括施用第二治疗剂。

[0528] 实施方案65.根据实施方案64所述的方法,其中所述第二治疗剂是化学治疗剂或靶向抗癌疗法。

[0529] 实施方案66.根据实施方案65所述的方法,其中所述化学治疗剂是阿糖胞苷、蒽环霉素、组胺二盐酸盐或白介素2(IL-2)。

[0530] 实施方案67.根据实施方案64所述的方法,其中所述第二治疗剂是抗CD38剂、免疫调节酰亚胺药物(IMiD)、免疫检查点抑制剂、免疫共刺激剂、 γ 分泌酶抑制剂、T细胞增强剂或它们的任何组合。

[0531] 实施方案68.根据实施方案50至51、53和55至67中任一项所述的方法,其中将所述三特异性抗体或三特异性结合片段或所述药物组合物静脉内、肌内、腹膜内和/或皮下施用于所述受试者。

[0532] 实施方案69.根据实施方案50至51、53和55至68中任一项所述的方法,其中将所述三特异性抗体或三特异性结合片段或所述药物组合物皮下施用于所述受试者。

[0533] 实施方案70.一种用于产生根据实施方案1至42中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段的方法,其中所述方法包括培养根据实施方案47至49中任一项所述的细胞以及分离所述三特异性抗体或三特异性结合片段。

[0534] 实施方案71.一种试剂盒,包括(i)根据实施方案1至42中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段和/或根据实施方案43所述的多核苷酸,以及(ii)其包装。

[0535] 实施方案72.一种结合至BCMA的抗体或其抗原结合片段,包含:具有GFTFSSYAMS (SEQ ID NO:20)的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR1)、具有AISGSGGSTY (SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的重链CDR2和具有DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO:22)的氨基酸序列的重链CDR3。

[0536] 实施方案73.根据实施方案72所述的抗体或抗原结合片段,还包含:具有RASQSISSSFLT (SEQ ID NO:17)的氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR1)、具有GASSRAT (SEQ ID NO:18)的氨基酸序列的轻链CDR2和具有QHYGSSPMYT (SEQ ID NO:19)的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0537] 实施方案74.根据实施方案72或73所述的抗体或抗原结合片段,包含具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链可变结构域(VH)。

[0538] 实施方案75.根据实施方案72至74中任一项所述的抗体或抗原结合片段,包含具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的轻链可变结构域(VL)。

[0539] 实施方案76.根据实施方案72至75中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段特异性地结合BCMABCMW37链的残基17-26(LLHACIPCQL (SEQ ID NO:

162))。

[0540] 实施方案77.根据实施方案72至76中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段以约 1×10^{-10} M至 1×10^{-7} M的亲和力特异性地结合至BCMA。

[0541] 实施方案78.根据实施方案77所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段以约 2×10^{-10} M至 9×10^{-10} M的亲和力特异性地结合至BCMA。

[0542] 实施方案79.根据实施方案72至78中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是人抗体或抗原结合片段。

[0543] 实施方案80.根据实施方案72至79中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是重组的。

[0544] 实施方案81.根据实施方案72至80中任一项所述的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是Fab片段、Fab2片段或单链抗体。

[0545] 实施方案82.根据实施方案72至81中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。

[0546] 实施方案83.根据实施方案72至82中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是IgG1或IgG4同种型。

[0547] 实施方案84.一种药物组合物,包含根据实施方案72至83中任一项所述的抗体或抗原结合片段以及药学上可接受的载体。

[0548] 实施方案85.根据实施方案84所述的药物组合物,其中所述药物组合物还包含第二治疗剂。

[0549] 实施方案86.根据实施方案85所述的药物组合物,其中所述第二治疗剂包括抗CD38剂、免疫调节酰亚胺药物(IMiD)、免疫检查点抑制剂、免疫共刺激剂、 γ 分泌酶抑制剂、T细胞增强剂或它们的任何组合。

[0550] 实施方案87.一种细胞,表达根据实施方案72至83中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

[0551] 实施方案88.根据实施方案87所述的细胞,其中所述细胞是杂交瘤。

[0552] 实施方案89.根据实施方案87所述的细胞,其中所述抗体是重组产生的。

[0553] 实施方案90.一种用于治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据实施方案72至83中任一项所述的抗体或抗原结合片段或根据实施方案84至86中任一项所述的药物组合物。

[0554] 实施方案91.根据实施方案90所述的方法,其中施用所述抗体或抗原结合片段或所述药物组合物足以治疗所述癌症的时间。

[0555] 实施方案92.一种用于抑制癌细胞的生长或增殖的方法,所述方法包括向所述细胞施用有效量的根据实施方案72至83中任一项所述的抗体或抗原结合片段或根据实施方案84至86中任一项所述的药物组合物,其中所述有效量足以抑制所述癌细胞的生长或增殖。

[0556] 实施方案93.根据实施方案92所述的方法,其中所述癌细胞在受试者中,并且将所述抗体或抗原结合片段或所述药物组合物施用于所述受试者。

[0557] 实施方案94.根据实施方案92所述的方法,其中所述施用是离体进行的。

[0558] 实施方案95.根据实施方案90至94中任一项所述的方法,其中所述癌症是血液学

癌症。

[0559] 实施方案96.根据实施方案95所述的方法,其中所述血液学癌症是BCMA表达型B细胞癌症。

[0560] 实施方案97.根据实施方案96所述的方法,其中所述BCMA表达型B细胞癌症是多发性骨髓瘤。

[0561] 实施方案98.根据实施方案97所述的方法,其中所述BCMA表达型B细胞癌症是郁积型多发性骨髓瘤(SMM)。

[0562] 实施方案99.根据实施方案90至98中任一项所述的方法,其中所述癌症是复发性、难治性或恶性癌症或它们的任何组合。

[0563] 实施方案100.根据实施方案90至91、93和95至99中任一项所述的方法,其中所述受试者已接受先前的治疗。

[0564] 实施方案101.根据实施方案100所述的方法,所述先前的治疗包括蛋白酶体抑制剂、免疫调节药物、CD38抗体、双特异性药剂、CAR-T疗法或它们的组合。

[0565] 实施方案102.根据实施方案90至101中任一项所述的方法,还包括施用第二治疗剂。

[0566] 实施方案103.根据实施方案102所述的方法,其中所述第二治疗剂是化学治疗剂或靶向抗癌疗法。

[0567] 实施方案104.根据实施方案103所述的方法,其中所述化学治疗剂是阿糖胞苷、蒽环霉素、组胺二盐酸盐或白介素2(IL-2)。

[0568] 实施方案105.根据实施方案104所述的方法,其中所述第二治疗剂是抗CD38剂、免疫调节酰亚胺药物(IMiD)、免疫检查点抑制剂、免疫共刺激剂、 γ 分泌酶抑制剂、T细胞增强剂或它们的任何组合。

[0569] 实施方案106.根据实施方案90至91、93和95至105中任一项所述的方法,其中将所述抗体或抗原结合片段或所述药物组合物静脉内、肌内、腹膜内和/或皮下施用于所述受试者。

[0570] 实施方案107.根据实施方案90至91、93和95至106中任一项所述的方法,其中将所述抗体或抗原结合片段或所述药物组合物皮下施用于所述受试者。

[0571] 实施方案108.一种用于产生根据实施方案72至83中任一项所述的抗体或抗原结合片段的方法,其中所述方法包括培养根据实施方案87至89中任一项所述的细胞以及分离所述抗体或抗原结合片段。

[0572] 实施方案109.一种合成多核苷酸,编码根据实施方案72至83中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

[0573] 实施方案110.一种试剂盒,包括(i)根据实施方案72至83中任一项所述的抗体或抗原结合片段和/或根据实施方案109所述的多核苷酸,以及(ii)其包装。

[0574] 实施方案111.一种三特异性抗体或其三特异性结合片段,包含:

[0575] a) 第一重链部分(HC1),所述第一重链部分包含第一重链可变结构域(VH);

[0576] b) 轻链部分(LC),所述轻链部分包含轻链可变结构域(VL);以及

[0577] c) 第二重链部分(HC2),所述第二重链部分包含第二VH结构域,其中

[0578] (i) 所述HC1 VH结构域和所述LCVL结构域形成结合第一抗原的第一抗原结合位

点,

[0579] (ii)所述HC2 VH结构域形成结合第二抗原的第二抗原结合位点,

[0580] (iii)所述HC1或所述HC2还包含形成结合第三抗原的第三抗原结合位点的第三VH结构域,

[0581] (iv)所述HC1和HC2各自任选地包含含有CH2-CH3结构域的可结晶片段(Fc)结构域;并且

[0582] 其中所述第一抗原是分化簇3(CD3),并且

[0583] (v)所述第二抗原是B细胞成熟抗原(BCMA),并且所述第三抗原是G蛋白偶联受体C5家族亚型D(GPRC5D);或者

[0584] (vi)所述第二抗原是G蛋白偶联受体C5家族亚型D(GPRC5D),并且所述第三抗原是B细胞成熟抗原(BCMA)。

[0585] 实施方案112.根据实施方案111所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC2包含形成结合所述第三抗原的所述第三抗原结合位点的所述第三VH结构域。

[0586] 实施方案113.根据实施方案112所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC2从N末端到C末端包含形成所述第二抗原结合位点的所述第二VH结构域、Fc结构域、第一接头(L1)和形成所述第三抗原结合位点的所述第三VH结构域。

[0587] 实施方案114.根据实施方案111至113中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC2包含形成所述结合GPRC5D的第二抗原结合位点的所述第二VH结构域,并且所述HC2还包含形成所述结合BCMA的第三抗原结合位点的所述第三VH结构域。

[0588] 实施方案115.根据实施方案111所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC1包含形成结合所述第三抗原的所述第三抗原结合位点的所述第三VH结构域。

[0589] 实施方案116.根据实施方案115所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC1从N末端到C末端包含形成所述第一抗原结合位点的所述第一VH、CH1结构域、Fc结构域、第一接头(L1)和形成所述第三抗原结合位点的所述第三VH结构域。

[0590] 实施方案117.根据实施方案111、115和116中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC2包含形成所述结合BCMA的第二抗原结合位点的所述第二VH结构域,并且所述HC1还包含形成所述结合GPRC5D的第三抗原结合位点的所述第三VH结构域。

[0591] 实施方案118.根据实施方案111至117中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC1 VH和LC VL形成所述第一抗原结合位点,包含含有所述第一抗原结合位点的抗原结合片段(Fab)。

[0592] 实施方案119.根据实施方案111至118中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC2 VH形成包含所述第二抗原结合位点的单链可变片段(scFv)。

[0593] 实施方案120.根据实施方案111至119中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第三VH形成包含所述第三抗原结合位点的单链可变片段(scFv)。

[0594] 实施方案121.根据实施方案111至120中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中HC1和HC2的所述Fc结构域包含一个或多个促进异源二聚化的不同突变。

[0595] 实施方案122.根据实施方案121所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC1的所述Fc结构域包含突变T366S、L368A和Y407V(EU编号)并且所述HC2的所述Fc结构域包含突变T366W(EU编号)。

[0596] 实施方案123.根据实施方案121所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC2的所述Fc结构域包含突变T366S、L368A和Y407V(EU编号)并且所述HC1的所述Fc结构域包含突变T366W(EU编号)。

[0597] 实施方案124.根据实施方案111至123中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中HC1和/或HC2的所述Fc结构域还包含一个或多个减少Fc与Fc γ 受体结合的突变。

[0598] 实施方案125.根据实施方案124所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述Fc γ 受体是Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIIB。

[0599] 实施方案126.根据实施方案124或125所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中HC1和/或HC2的所述Fc结构域各自包含一个或多个选自L234A、L235A和D265S(EU编号)的突变。

[0600] 实施方案127.根据实施方案126所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中HC1和HC2的所述Fc结构域各自包含突变L234A、L235A和D265S(EU编号)。

[0601] 实施方案128.根据实施方案111至127中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中HC1或HC2的所述Fc结构域还包含一个或多个减少Fc与蛋白A结合的突变。

[0602] 实施方案129.根据实施方案128所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中HC1或HC2的所述Fc结构域包含突变H435R和/或Y436F(EU编号)。

[0603] 实施方案130.根据实施方案129所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中HC1的所述Fc结构域包含突变H435R和Y436F(EU编号)。

[0604] 实施方案131.根据实施方案113至114和116至130中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第一接头(L1)包含SEQ ID NO:25、127-157和163的氨基酸序列中的任一者。

[0605] 实施方案132.根据实施方案131中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第一接头(L1)包含GGSEGKSSGSGSESKSTGGS(SEQ ID NO:25)或GGGSGGGGSGGGGSGGGG((G4S)₄,SEQ ID NO:163)的氨基酸序列。

[0606] 实施方案133.根据实施方案111至132中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合CD3的第一抗原结合位点包含:包含GDSVFNNAAWS(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR1)、包含RTYYRSKWLYD(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的重链CDR2和包含GYSSSFYD(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的重链CDR3。

[0607] 实施方案134.根据实施方案111至133中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合CD3的第一抗原结合位点包含:包含TGTSSNIGTYKFVS(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR1)、包含EVSKRPS(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的轻链CDR2和包含VSYAGSGTLL(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0608] 实施方案135.根据实施方案111至134中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合CD3的第一抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变结构域(VH)。

[0609] 实施方案136.根据实施方案111至135中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合CD3的第一抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变结构域(VL)。

[0610] 实施方案137.根据实施方案111至136中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合GPC5D的第二抗原结合位点或第三抗原结合位点包含:包含GFSLTNIRMSVS (SEQ ID NO:12)的氨基酸序列的重链互补决定区1 (CDR1)、包含HIFSNDKES (SEQ ID NO:13)的氨基酸序列的重链CDR2和包含MRLPYGMDV (SEQ ID NO:14)的氨基酸序列的重链CDR3。

[0611] 实施方案138.根据实施方案111至137中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合GPC5D的第二抗原结合位点或第三抗原结合位点包含:包含RSSQLVHSDGNTYLS (SEQ ID NO:9)的氨基酸序列的轻链互补决定区1 (CDR1)、包含KISNRFF (SEQ ID NO:10)的氨基酸序列的轻链CDR2和包含MQATQFPHT (SEQ ID NO:11)的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0612] 实施方案139.根据实施方案111至138中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合GPC5D的第二抗原结合位点或第三抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的重链可变结构域 (VH)。

[0613] 实施方案140.根据实施方案111至139中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合GPC5D的第二抗原结合位点或第三抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的轻链可变结构域 (VL)。

[0614] 实施方案141.根据实施方案111至140中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合BCMA的第二抗原结合位点或第三抗原结合位点包含:包含GFTFSSYAMS (SEQ ID NO:20)的氨基酸序列的重链互补决定区1 (CDR1)、包含AISGSGGSTY (SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的重链CDR2和包含DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO:22)的氨基酸序列的重链CDR3。

[0615] 实施方案142.根据实施方案111至141中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合BCMA的第二抗原结合位点或第三抗原结合位点包含:包含RASQSISSSFLT (SEQ ID NO:17)的氨基酸序列的轻链互补决定区1 (CDR1)、包含GASSRAT (SEQ ID NO:18)的氨基酸序列的轻链CDR2和包含QHYGSSPMYT (SEQ ID NO:19)的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0616] 实施方案143.根据实施方案111至142中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合BCMA的第二抗原结合位点或第三抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链可变结构域 (VH)。

[0617] 实施方案144.根据实施方案111至143中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述结合BCMA的第二抗原结合位点或第三抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的轻链可变结构域 (VL)。

[0618] 实施方案145.根据实施方案119至144中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述scFv从N末端到C末端包含VH、第二接头 (L2) 和VL (VH-L2-VL);或VL、L2和VH (VL-L2-VH)。

[0619] 实施方案146.根据实施方案119至145中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述scFv从N末端到C末端包含VL、L2和VH (VL-L2-VH)。

[0620] 实施方案147.根据实施方案145或146所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第二接头 (L2) 包含SEQ ID NO:25、127-157和163的氨基酸序列中的任一者。

[0621] 实施方案148.根据实施方案145至147中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述L2包含GGSEGKSSGSGSESKSTGGS (SEQ ID NO:25)的氨基酸序列。

[0622] 实施方案149.根据实施方案111至148中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述第一抗原结合位点特异性地结合至CD3 ϵ 链的残基22-35 (QDGNEEMGGITQTP (SEQ ID NO:161))。

[0623] 实施方案150.根据实施方案111至149中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述第一抗原结合位点以约 1×10^{-8} M至 1×10^{-7} M的亲和力特异性地结合至CD3。

[0624] 实施方案151.根据实施方案150所述的抗体或抗原结合片段,其中所述第一抗原结合位点以约 2×10^{-8} M至 4×10^{-8} M的亲和力特异性地结合至CD3。

[0625] 实施方案152.根据实施方案111至151中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述第二抗原结合位点或第三抗原结合位点特异性地结合BCMA BCMW37链的残基17-26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO:162))。

[0626] 实施方案153.根据实施方案152所述的抗体或抗原结合片段,其中所述第二抗原结合位点或第三抗原结合位点以约 1×10^{-10} M至 1×10^{-7} M的亲和力特异性结合至BCMA。

[0627] 实施方案154.根据实施方案153所述的抗体或抗原结合片段,其中所述第二抗原结合位点或第三抗原结合位点以约 2×10^{-10} M至 9×10^{-10} M的亲和力特异性地结合至BCMA。

[0628] 实施方案155.根据实施方案111至154中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。

[0629] 实施方案156.根据实施方案111至155中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是IgG1同种型。

[0630] 实施方案157.根据实施方案111所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC1包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0631] 实施方案158.根据实施方案111或157所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述LC包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

[0632] 实施方案159.根据实施方案111、157或158所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC2包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

[0633] 实施方案160.根据实施方案111所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC1包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

[0634] 实施方案161.根据实施方案111或160所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述LC包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0635] 实施方案162.根据实施方案111、160或161所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC2包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列。

[0636] 本发明还可以由以下编号的条款限定。

[0637] 条款1.一种三特异性抗体或其三特异性结合片段,包含:

[0638] a) 第一重链(HC1);

[0639] b) 轻链(LC);以及

[0640] c) 第二重链(HC2),其中

[0641] (i) 所述HC1和所述LC形成特异性地结合第一抗原的第一抗原结合位点,

[0642] (ii) 所述HC2包含特异性地结合第二抗原的第二抗原结合位点,

- [0643] (iii) 所述HC1或所述HC2还包含特异性地结合第三抗原的第三抗原结合位点,
- [0644] (iv) 所述HC1和HC2各自包含含有CH2-CH3结构域的可结晶片段 (Fc) 结构域; 并且
- [0645] 其中所述第一抗原是分化簇3 (CD3), 并且
- [0646] (v) 所述第二抗原是B细胞成熟抗原 (BCMA), 并且所述第三抗原是G蛋白偶联受体C5家族亚型D (GPCR5D); 或者
- [0647] (vi) 所述第二抗原是G蛋白偶联受体C5家族亚型D (GPCR5D), 并且所述第三抗原是B细胞成熟抗原 (BCMA)。
- [0648] 条款2. 根据条款1所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述HC2包含特异性地结合所述第三抗原的所述第三抗原结合位点。
- [0649] 条款3. 根据条款2所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述HC2从N末端到C末端包含所述第二抗原结合位点、所述Fc结构域、接头和所述第三抗原结合位点。
- [0650] 条款4. 根据条款1至3中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述HC2包含特异性地结合GPCR5D的第二抗原结合位点, 并且所述HC2还包含特异性地结合BCMA的第三抗原结合位点。
- [0651] 条款5. 根据条款1所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述HC1包含特异性地结合所述第三抗原的所述第三抗原结合位点。
- [0652] 条款6. 根据条款5所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述HC1从N末端到C末端包含与所述第一抗原结合位点相关的重链可变结构域 (VH)、CH1结构域、所述Fc结构域、接头和所述第三抗原结合位点。
- [0653] 条款7. 根据条款1、5和6中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述HC2包含特异性地结合BCMA的第二抗原结合位点, 并且所述HC1还包含特异性地结合GPCR5D的第三抗原结合位点。
- [0654] 条款8. 根据条款1至7中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述第一抗原结合位点包含抗原结合片段 (Fab)。
- [0655] 条款9. 根据条款1至8中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述第二抗原结合位点包含单链可变片段 (scFv)。
- [0656] 条款10. 根据条款1至9中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述第三抗原结合位点包含单链可变片段 (scFv)。
- [0657] 条款11. 根据条款1至10中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中HC1和HC2的所述Fc结构域包含一个或多个促进异源二聚化的不同突变。
- [0658] 条款12. 根据条款11所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述HC1的所述Fc结构域包含突变T366S、L368A和Y407V (EU编号) 并且所述HC2的所述Fc结构域包含突变T366W (EU编号)。
- [0659] 条款13. 根据条款11所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述HC2的所述Fc结构域包含突变T366S、L368A和Y407V (EU编号) 并且所述HC1的所述Fc结构域包含突变T366W (EU编号)。
- [0660] 条款14. 根据条款1至13中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中HC1和/或HC2的所述Fc结构域还包含一个或多个减少Fc与Fc γ 受体结合的突变。
- [0661] 条款15. 根据条款14所述的三特异性抗体或三特异性结合片段, 其中所述Fc γ 受

体是FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIIA和/或FcγRIIIB。

[0662] 条款16.根据条款14或15所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中HC1和/或HC2的所述Fc结构域各自包含一个或多个选自L234A、L235A和D265S(EU编号)的突变。

[0663] 条款17.根据条款16所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中HC1和HC2的所述Fc结构域各自包含突变L234A、L235A和D265S(EU编号)。

[0664] 条款18.根据条款1至17中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中HC1或HC2的所述Fc结构域还包含一个或多个减少Fc与蛋白A结合的突变。

[0665] 条款19.根据条款18所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中HC1或HC2的所述Fc结构域包含突变H435R和/或Y436F(EU编号)。

[0666] 条款20.根据条款19所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中HC1的所述Fc结构域包含突变H435R和Y436F(EU编号)。

[0667] 条款21.根据条款3和5至18中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述接头包含GGSEKSSSGSGSESKSTGG(S) (SEQ ID NO:25) 或GGGGSGGGSGGGSGGGGS((G4S)₄, SEQ ID NO:163)的氨基酸序列。

[0668] 条款22.根据条款1至21中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合CD3的第一抗原结合位点包含:包含GDSVFNNAAWS(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR1)、包含RTYYRSKWLYD(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的重链CDR2和包含GYSSSFDY(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的重链CDR3。

[0669] 条款23.根据条款1至22中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合CD3的第一抗原结合位点包含:包含TGTSSNIGTYKFVS(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR1)、包含EVSKRPS(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的轻链CDR2和包含VSYAGSGTLL(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0670] 条款24.根据条款1至23中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合CD3的第一抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变结构域(VH)。

[0671] 条款25.根据条款1至24中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合CD3的第一抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变结构域(VL)。

[0672] 条款26.根据条款1至25中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合GPC5D的第二抗原结合位点或第三抗原结合位点包含:包含GFSLTNIRMSVS(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR1)、包含HIFSNDKES(SEQ ID NO:13)的氨基酸序列的重链CDR2和包含MRLPYGMDV(SEQ ID NO:14)的氨基酸序列的重链CDR3。

[0673] 条款27.根据条款1至26中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合GPC5D的第二抗原结合位点或第三抗原结合位点包含:包含RSSQSLVHSDGNTYLS(SEQ ID NO:9)的氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR1)、包含KISNRFF(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列的轻链CDR2和包含MQATQFPHT(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0674] 条款28.根据条款1至27中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中

所述特异性地结合GPC5D的第二抗原结合位点或第三抗原结合位点包含含有SEQ ID NO: 16的氨基酸序列的重链可变结构域(VH)。

[0675] 条款29.根据条款1至28中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合GPC5D的第二抗原结合位点或第三抗原结合位点包含含有SEQ ID NO: 15的氨基酸序列的轻链可变结构域(VL)。

[0676] 条款30.根据条款1至29中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合BCMA的第二抗原结合位点或第三抗原结合位点包含:包含GFTFSSYAMS (SEQ ID NO:20)的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR1)、包含AISGSGGSTY (SEQ ID NO: 21)的氨基酸序列的重链CDR2和包含DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO:22)的氨基酸序列的重链CDR3。

[0677] 条款31.根据条款1至30中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合BCMA的第二抗原结合位点或第三抗原结合位点包含:包含RASQSISSSFLT (SEQ ID NO:17)的氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR1)、包含GASSRAT (SEQ ID NO:18)的氨基酸序列的轻链CDR2和包含QHYGSSPMYT (SEQ ID NO:19)的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0678] 条款32.根据条款1至31中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合BCMA的第二抗原结合位点或第三抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链可变结构域(VH)。

[0679] 条款33.根据条款1至32中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合BCMA的第二抗原结合位点或第三抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的轻链可变结构域(VL)。

[0680] 条款34.根据条款1至33中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第一抗原结合位点特异性地结合至CD3 ϵ 链的残基22-35(QDGNEEMGGITQTP (SEQ ID NO: 160))。

[0681] 条款35.根据条款34所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第一抗原结合位点以约 2.5×10^{-8} M的亲合力特异性地结合至CD3。

[0682] 条款36.根据条款34所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第一抗原结合位点以约 3.1×10^{-8} M的亲合力特异性地结合至CD3。

[0683] 条款37.根据条款1至36中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第二抗原结合位点或第三抗原结合位点特异性地结合BCMA BCMW37链的残基17-26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO:161))。

[0684] 条款38.根据条款37所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第二抗原结合位点或第三抗原结合位点以约 2.1×10^{-10} M的亲合力特异性地结合至BCMA。

[0685] 条款39.根据条款37所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第二抗原结合位点或第三抗原结合位点以约 8.4×10^{-10} M的亲合力特异性地结合至BCMA。

[0686] 条款40.根据条款1至39中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段具有IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。

[0687] 条款41.根据条款1至40中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其为IgG1同种型。

[0688] 条款42.根据条款1所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC1包含

SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0689] 条款43.根据条款1或42所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述LC包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

[0690] 条款44.根据条款1、42或43所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC2包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

[0691] 条款45.根据条款1所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC1包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

[0692] 条款46.根据条款1或45所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述LC包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0693] 条款47.根据条款1、45或46所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述HC2包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列。

[0694] 条款48.一种三特异性抗体或其三特异性结合片段,包含:

[0695] a) 特异性地结合CD3的第一抗原结合位点,

[0696] b) 特异性地结合GPC5D的第二抗原结合位点,以及

[0697] c) 特异性地结合BCMA的第三抗原结合位点。

[0698] 条款49.根据条款48所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合CD3的第一抗原结合位点包含:包含GDSVFNNNAWS (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列的重链互补决定区1 (CDR1)、包含RTYYRSKWLYD (SEQ ID NO:5) 的氨基酸序列的重链CDR2和包含GYSSFDY (SEQ ID NO:6) 的氨基酸序列的重链CDR3。

[0699] 条款50.根据条款48或49所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合CD3的第一抗原结合位点包含:包含TGTSSNIGTYKFVS (SEQ ID NO:1) 的氨基酸序列的轻链互补决定区1 (CDR1)、包含EVSKRPS (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列的轻链CDR2和包含VSYAGSGTLL (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0700] 条款51.根据条款48至50中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合CD3的第一抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变结构域 (VH)。

[0701] 条款52.根据条款48至51中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合CD3的第一抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变结构域 (VL)。

[0702] 条款53.根据条款48至52中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合GPC5D的第二抗原结合位点包含:包含GFSLTNIRMSVS (SEQ ID NO:12) 的氨基酸序列的重链互补决定区1 (CDR1)、包含HIFSNDEKS (SEQ ID NO:13) 的氨基酸序列的重链CDR2和包含MRLPYGMDV (SEQ ID NO:14) 的氨基酸序列的重链CDR3。

[0703] 条款54.根据条款48至53中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合GPC5D的第二抗原结合位点包含:包含RSSQSLVHSDGNTYLS (SEQ ID NO:9) 的氨基酸序列的轻链互补决定区1 (CDR1)、包含KISNRFF (SEQ ID NO:10) 的氨基酸序列的轻链CDR2和包含MQATQFPHT (SEQ ID NO:11) 的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0704] 条款55.根据条款48至54中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合GPC5D的第二抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的

重链可变结构域 (VH)。

[0705] 条款56.根据条款48至55中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合GPCR5D的第二抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的轻链可变结构域 (VL)。

[0706] 条款57.根据条款48至56中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合BCMA的第三抗原结合位点包含:包含GFTFSSYAMS (SEQ ID NO:20)的氨基酸序列的重链互补决定区1 (CDR1)、包含AISGSGGSTY (SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的重链CDR2和包含DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO:22)的氨基酸序列的重链CDR3。

[0707] 条款58.根据条款48至57中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合BCMA的第三抗原结合位点包含:包含RASQSISSSFLT (SEQ ID NO:17)的氨基酸序列的轻链互补决定区1 (CDR1)、包含GASSRAT (SEQ ID NO:18)的氨基酸序列的轻链CDR2和包含QHYGSSPMYT (SEQ ID NO:19)的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0708] 条款59.根据条款48至58中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合BCMA的第三抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链可变结构域 (VH)。

[0709] 条款60.根据条款48至59中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述特异性地结合BCMA的第三抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的轻链可变结构域 (VL)。

[0710] 条款61.根据条款48至60中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第一抗原结合位点特异性地结合至CD3 ϵ 链的残基22-35 (QDGNEEMGGITQTP (SEQ ID NO:160))。

[0711] 条款62.根据条款61所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第一抗原结合位点以约 2.5×10^{-8} M的亲和力特异性地结合至CD3。

[0712] 条款63.根据条款61所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第一抗原结合位点以约 3.1×10^{-8} M的亲和力特异性地结合至CD3。

[0713] 条款64.根据条款48至63中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第三抗原结合位点特异性地结合BCMABCMW37链的残基17-26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO:161))。

[0714] 条款65.根据条款64所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第三抗原结合位点以约 2.1×10^{-10} M的亲和力特异性地结合至BCMA。

[0715] 条款66.根据条款64所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述第三抗原结合位点以约 8.4×10^{-10} M的亲和力特异性地结合至BCMA。

[0716] 条款67.根据条款48至66中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段具有IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。

[0717] 条款68.根据条款48至67中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段,其为IgG1同种型。

[0718] 条款69.一种三特异性抗体或其三特异性结合片段,包含:

[0719] a) 第一重链 (HC1);

[0720] b) 轻链 (LC);以及

- [0721] c) 第二重链 (HC2) ,
- [0722] 其中HC1包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列,LC包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列,并且HC2包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。
- [0723] 条款70.一种三特异性抗体或其三特异性结合片段,包含:
- [0724] a) 第一重链 (HC1) ;
- [0725] b) 轻链 (LC) ;以及
- [0726] c) 第二重链 (HC2) ,
- [0727] 其中HC1包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列,LC包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列,并且HC2包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列。
- [0728] 条款71.一种药物组合物,包含根据条款1至70中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段以及药学上可接受的载体。
- [0729] 条款72.一种细胞,表达根据条款1至70中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段。
- [0730] 条款73.根据条款72所述的细胞,其中所述细胞是杂交瘤。
- [0731] 条款74.根据条款72所述的细胞,其中所述三特异性抗体是重组产生的。
- [0732] 条款75.一种用于治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据条款1至70中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段或根据条款71所述的药物组合物。
- [0733] 条款76.根据条款75所述的方法,其中施用所述三特异性抗体或三特异性结合片段或所述药物组合物足以治疗所述癌症的时间。
- [0734] 条款77.一种用于抑制癌细胞的生长或增殖的方法,所述方法包括向所述细胞施用有效量的根据条款1至70中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段或根据条款71所述的药物组合物,其中所述有效量足以抑制所述癌细胞的生长或增殖。
- [0735] 条款78.根据条款77所述的方法,其中所述癌细胞在受试者中,并且将所述三特异性抗体或三特异性结合片段或所述药物组合物施用于所述受试者。
- [0736] 条款79.根据条款77所述的方法,其中所述施用是离体进行的。
- [0737] 条款80.一种在有需要的受试者中将T细胞重定向至BCMA表达型癌细胞和/或GPCR5D表达型癌细胞的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据条款1至70中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段或根据条款71所述的药物组合物。
- [0738] 条款81.根据条款80所述的方法,其中所述治疗有效量足以引导所述T细胞对所述癌细胞的响应。
- [0739] 条款82.根据条款75至81中任一项所述的方法,其中所述癌症是血液学癌症。
- [0740] 条款83.根据条款82所述的方法,其中所述血液学癌症是BCMA表达型B细胞癌症和/或GPCR5D表达型B细胞癌症。
- [0741] 条款84.根据条款83所述的方法,其中所述BCMA表达型B细胞癌症和/或GPCR5D表达型B细胞癌症是多发性骨髓瘤。
- [0742] 条款85.根据条款75至84中任一项所述的方法,还包括施用第二治疗剂。
- [0743] 条款86.根据条款85所述的方法,其中所述第二治疗剂是化学治疗剂或靶向抗癌疗法。

[0744] 条款87.根据条款86所述的方法,其中所述化学治疗剂是阿糖胞苷、蒽环霉素、组胺二盐酸盐或白介素2(IL-2)。

[0745] 条款88.一种用于产生根据条款1至70中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段的方法,其中所述方法包括培养根据条款72至74中任一项所述的细胞以及分离所述三特异性抗体或三特异性结合片段。

[0746] 条款89.一种合成多核苷酸,编码根据条款1至70中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段的HC1、LC和/或HC2。

[0747] 条款90.一种试剂盒,包括(i)根据条款1至70中任一项所述的三特异性抗体或三特异性结合片段和/或根据条款89所述的多核苷酸,以及(ii)其包装。

[0748] 条款91.一种特异性地结合至BCMA的抗体或其抗原结合片段,包含:具有GFTFSSYAMS (SEQ ID NO:20)的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR1)、具有AISGSGGSTY (SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的重链CDR2和具有DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO:22)的氨基酸序列的重链CDR3。

[0749] 条款92.根据条款91所述的抗体或抗原结合片段,还包含:具有RASQSISSSFLT (SEQ ID NO:17)的氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR1)、具有GASSRAT (SEQ ID NO:18)的氨基酸序列的轻链CDR2和具有QHYGSSPMYT (SEQ ID NO:19)的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0750] 条款93.根据条款91或92所述的抗体或抗原结合片段,包含具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链可变结构域(VH)。

[0751] 条款94.根据条款91至93中任一项所述的抗体或抗原结合片段,包含具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的轻链可变结构域(VL)。

[0752] 条款95.根据条款91至94中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段特异性地结合BCMA BCMW37链的残基17-26(LLHACIPCQL (SEQ ID NO:161))。

[0753] 条款96.根据条款95所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段以约 2.1×10^{-10} M的亲和力特异性地结合至BCMA。

[0754] 条款97.根据条款95所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段以约 8.4×10^{-10} M的亲和力特异性地结合至BCMA。

[0755] 条款98.根据条款91至97中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是人抗体或抗原结合片段。

[0756] 条款99.根据条款91至98中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是重组的。

[0757] 条款100.根据条款91至99中任一项所述的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是Fab片段、Fab2片段或单链抗体。

[0758] 条款101.根据条款91至100中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段具有IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。

[0759] 条款102.根据条款91至101中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其为IgG1或IgG4同种型。

[0760] 条款103.一种药物组合物,包含根据条款91至102中任一项所述的抗体或抗原结合片段以及药学上可接受的载体。

[0761] 条款104.一种细胞,表达根据条款91至102中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

- [0762] 条款105.根据条款104所述的细胞,其中所述细胞是杂交瘤。
- [0763] 条款106.根据条款104所述的细胞,其中所述抗体是重组产生的。
- [0764] 条款107.一种用于治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据条款91至102中任一项所述的抗体或抗原结合片段或根据条款103所述的药物组合物。
- [0765] 条款108.根据条款107所述的方法,其中施用所述抗体或抗原结合片段或所述药物组合物足以治疗所述癌症的时间。
- [0766] 条款109.一种用于抑制癌细胞的生长或增殖的方法,所述方法包括向所述细胞施用有效量的根据条款91至102中任一项所述的抗体或抗原结合片段或根据条款103所述的药物组合物,其中所述有效量足以抑制所述癌细胞的生长或增殖。
- [0767] 条款110.根据条款109所述的方法,其中所述癌细胞在受试者中,并且将所述抗体或抗原结合片段或所述药物组合物施用于所述受试者。
- [0768] 条款111.根据条款109所述的方法,其中所述施用是离体进行的。
- [0769] 条款112.根据条款107至111中任一项所述的方法,其中所述癌症是血液学癌症。
- [0770] 条款113.根据条款112所述的方法,其中所述血液学癌症是BCMA表达型B细胞癌症。
- [0771] 条款114.根据条款113所述的方法,其中所述BCMA表达型B细胞癌症是多发性骨髓瘤。
- [0772] 条款115.根据条款107至114中任一项所述的方法,还包括施用第二治疗剂。
- [0773] 条款116.根据条款115所述的方法,其中所述第二治疗剂是化学治疗剂或靶向抗癌疗法。
- [0774] 条款117.根据条款116所述的方法,其中所述化学治疗剂是阿糖胞苷、蒽环霉素、组胺二盐酸盐或白介素2(IL-2)。
- [0775] 条款118.一种用于产生根据条款91至102中任一项所述的抗体或抗原结合片段的方法,其中所述方法包括培养根据条款104至106中任一项所述的细胞以及分离所述抗体或抗原结合片段。
- [0776] 条款119.一种合成多核苷酸,编码根据条款91至102中任一项所述的抗体或抗原结合片段。
- [0777] 条款120.一种试剂盒,包括(i)根据条款91至102中任一项所述的抗体或抗原结合片段和/或根据条款119所述的多核苷酸,以及(ii)其包装。
- [0778] 实施例
- [0779] 提供了以下实施例以补充现有公开并提供对本文所述主题的更好理解。不应将这些实施例视为限制所描述的主题。而应当理解,本文所述的实施例和实施方案只是为了进行示意性的说明,根据其的各种变型或改变对于本领域技术人员将是显而易见的并且包括在本发明真实范围内,并可在不脱离本发明真实范围的情况下进行各种变型或改变。
- [0780] 实施例1:靶验证
- [0781] 开发BCMA×GPRC5D×CD3三特异性抗体的科学原理是从MM患者的骨髓和其他器官中有效地根除恶性克隆浆细胞。这是通过施用三特异性抗体来实现的,该三特异性抗体可同时结合至在效应T细胞上表达的TCR共受体CD3ε并结合至在B细胞谱系细胞(主要是浆母

细胞和成熟浆细胞)上表达的靶蛋白GPCR5D和BCMA(8)。通过使T细胞和癌细胞接近,BCMA $\times$ GPCR5D $\times$ CD3三特异性抗体促进T细胞的活化,随后通过分泌的穿孔素和储存在CTL的分泌囊泡中的各种粒酶介导癌细胞裂解(图1B)。

[0782] 这些方法的机制优点包括它们将CD3+T细胞吸引到紧密接近浆细胞的能力,而不考虑TCR特异性或对抗原呈递细胞表面上的主要组织相容性复合体(MHC)I类分子的依赖性进行活化,从而通过下调MHC类分子来规避已知的基于MoR至T细胞的疗法。

[0783] 靶选择/验证

[0784] T细胞介导的治疗方法的潜在成功依赖于肿瘤细胞表面上特异性发现的抗原的存在。在最常见的浆细胞标记物中,BCMA和GPCR5D表现出选择性表达模式,并且已经针对两种靶建立了临床概念验证(PoC)。

[0785] BCMA(也称为CD269;基因名称TNFRSF17)是专门在B细胞谱系细胞上表达,在B细胞成熟中发挥关键作用并在浆细胞分化期间被选择性诱导的20kDa的I型膜蛋白(9,10)。BCMA结合2个配体:APRIL(CD256)和BAFF(CD257;11)。BCMA受体是具有54个氨基酸的细胞外结构域的184个氨基酸的蛋白质。除了在细胞表面上表达之外,BCMA在跨膜结构域处被 γ 分泌酶活性切割,产生约6kDa可溶性BCMA蛋白片段(12)。在MM患者血清样品中测量高水平的可溶性BCMA(13)并与血浆细胞计数相关(14)。 γ 分泌酶的抑制导致人原代B细胞(12)和MM细胞系和骨髓单核细胞(13)中BCMA表面蛋白表达的显著增加。BCMA已经被确定为MM中的有效靶,有几种批准的治疗剂(15-17)。

[0786] GPCR5D是基于序列同源性评分分类为C型G蛋白偶联受体(GPCR)的7-跨膜受体蛋白。GPCR5D是配体和信号传导机制尚待鉴定的孤儿受体。GPCR5D受体是具有典型7-跨膜结构的354个氨基酸的蛋白质,与其他家族成员不同,具有短的27个氨基酸的N末端(18)。GPCR5D mRNA主要在具有浆细胞表型的细胞中表达,并且也在来自患有MM的受试者的所有恶性浆细胞中表达(19-23)。患有MM的受试者中的GPCR5D表达水平与浆细胞负荷和遗传畸变诸如Rb-1缺失良好地相关(19)。

[0787] 靶表达

[0788] BCMA和GPCR5D mRNA和蛋白质表达限于有限的细胞类型。BCMA在成熟B细胞和浆细胞上表达,而GPCR5D表达进一步仅限于免疫细胞上的浆细胞表型。除了免疫细胞表达外,GPCR5D mRNA还在硬角质化组织中表达。来自骨髓瘤患者的骨髓CD138⁺细胞上的GPCR5DmRNA水平与正常健康受试者CD138⁺细胞相比升高,并且BCMA的高mRNA水平主要限于成熟B细胞,包括浆细胞(10,13,19,21-26)。通过免疫组织化学(IHC)染色,主要在浆细胞中发现正常组织中的BCMA(13,25)和GPCR5D(19,21,22)蛋白表达。另外,在硬角质化组织诸如毛囊中也检测到GPCR5D表达(27)。MM患者骨髓单核细胞在BCMA和GPCR5D表达方面表现出克隆异质性(21,22)。详细的靶表达概况在实施例2中描述。

[0789] 重要的是,BCMA和GPCR5D在MM来源的CD138⁺骨髓细胞上的选择性表达以及它们对在靶/脱肿瘤毒性的低风险将它们指定为T细胞介导的疗法的潜在靶(10,13,20-22)。

[0790] 实施例2:BGCB463三特异性抗体的分子设计、序列和结构

[0791] BGCB463是免疫球蛋白(Ig)G1三特异性抗体,其可同时或单独结合至T淋巴细胞(T细胞)上的分化簇3受体复合体(CD3 ϵ)的 ϵ 亚基,和肿瘤细胞上的GPCR5D(G蛋白偶联受体C5家族亚型D)和BCMA(B细胞成熟抗原,TNFRSF17)。抗体在恒定区(Fc)中具有L234A、L235A和

D265S (根据EU编号) 的突变以消除与Fc受体的相互作用, 并且已经使用杵臼平台突变增强异源二聚化。抗CD3 ϵ “臼”链还包含“RF”突变 (H435R、Y436F; 根据EU编号) 以破坏单体和同源二聚化的臼链的蛋白A结合。该分子包含“臼, RF”链上的抗CD3 ϵ Fab区和“杵”链上的抗GPCR5D scFv v区。开发三特异性抗体以评估靶向GPCR5D和BCMA和CD3的双重肿瘤对T细胞重定向的治疗潜力。图1A中描绘了BGCB463的例证。

[0792] 通过抗CD3重链 (HC) A和轻链 (LC) 与抗GPCR5D、抗BCMA重链B的共表达来产生三特异性BGCB463抗体。通过用重组体CD3 ϵ 蛋白使转基因人源化大鼠 [OmniRat (OMT™)] 免疫来发现抗CD3可变区。以BGCB463为特征的抗GPCR5D可变区 (VR000038761) 来源于通过用编码GPCR5D的DNA使转基因人源化小鼠 [Ablexis] 免疫而发现的mAb GC5B680。亲本v区 (VR000029832) 在HC框架3区中含有“NSS”基序, 该基序存在N-连接糖基化的风险且代表来自IGHV2-26*01种系的突变。将该位点突变回种系序列“STS”以消除N-连接糖基化的风险, 并且这种变化导致最终的可变区VR000038761。以BGCB463为特征的抗BCMA可变区 (VR000003260) 来源于通过用重组BCMA蛋白使转基因人源化小鼠 [Ablexis] 免疫而发现的mAb BCMB519。没有对该v区进行进一步的修改。抗GPCR5D区和抗BCMA v区两者在最终分子中被格式化为单链片段可变区 (scFv)。

[0793] 由BGCB463的cDNA序列推导并通过肽作图和质谱确认的BGCB463重链和轻链的氨基酸序列如下所示 (表5)。每条链中根据ABM编号定义的3个互补决定区 (CDR) 加粗和加下划线。BGCB463重链1的位置1处的Gln残基、BGCB463轻链的位置1处的Gln残基和BGCB463重链2的位置1处的Asp构成成熟链的N末端。包含BGCB463 IgG1 AAS的两条重链具有以下点突变: L234A、L235A和D265S。来自BGCB463的重链1具有“臼”突变: T366S、L368A、Y407V和RF突变: H435R、Y436F, 而重链2具有“杵”突变: T366W。杵臼突变促进Fc的异源二聚化。“RF”突变破坏与蛋白A的结合。Fc γ R受体沉默 (AAS) 的突变和杵臼突变在下文的序列中加下划线。

[0794] 表5. BGCB463的氨基酸序列

区域	AA 序列			SEQ ID NO.
轻链 1	QSALTQPASV	SGSPGQSITI	SCTGTSSNIG	27
	<u>TYKFVSWYQQ</u>	HPDKAPKVLL	<u>YEVS</u> KRPSGV	
	SSRFSGSKSG	NTASLTISGL	QAEDQADYHC	
	<u>VSYAGSGTLL</u>	FGGGTKLTVL	GQPKAAPSVT	
	LFPPSSEELQ	ANKATLVCLI	SDFYPGAVTV	
	AWKADSSPVK	AGVETTPPSK	QSNNKYAASS	
	YLSLTPEQWK	SHRSYSCQVT	HEGSTVEKTV	
	APTECS			
重链 1	QVQLQQSGPR	LVRPSQTL ~~SL~~	TCAISGDSVF	26
	<u>NNNAAWSWIR</u>	QSPSRGLEWL	<u>GRTYYRSKWL</u>	
	<u>YDYAVSVKSR</u>	ITVNPDTSRN	QFTLQLNSVT	
	PEDTALYYCA	<u>RGYSSSF</u> DYW	GQGT ~~LV~~ TVSS	
	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	
	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	
	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS	
	NTKVDKKVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPEAAGG	
	PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVSVS	
	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN	
	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	
	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSREE	
	MTKNQVSL ~~SC~~	<u>AVKGF</u> YPSDI	AVEWESNGQP	

[0796]

	ENNYKTTTPPV	LDSDGSFFLV	SKLTVDKSRW	
	QQGNVFSCSV	MHEALHNRFT	QKSLSLSPGK	
重链 2	DIVMTQTPLS	SPVTLGQPAS	ISCRSSQSLV	28
	HSDGNTYLSW	LQQRPGQPPR	LLIYKISNRF	
	FGVPDRFSGS	GAGTDFTLKI	SRVEAEDVGV	
	YYCMQATQFP	HTFGQGTKLE	IKGGSEGKSS	
	GSGSESKSTG	GSQVTLKESG	PVLVKPTETL	
	TLTCTVSGFS	LTNIRMSVSW	IRQPPGKALE	
	WLAHIFSND	KSYSTSLKSR	LTISRDTSKS	
	QVVLTLTNVD	PVDATATYYCA	RMRLPYGMDV	
	WGQGTTVTVS	SEPKSSDKTH	TCPPCPAPEA	
	AGGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	
	SVSHEDPEVK	FNWYVDGVEV	HNAKTKPREE	
	QYNSTYRVVS	VLTVLHQDWL	NGKEYKCKVS	
	NKALPAPIEK	TISKAKGQPR	EPQVYTLPPS	
	REEMTKNQVS	LWCLVKGFYP	SDIAVEWESN	
	GQPENNYKTT	PPVLDSGDSF	FLYSKLTVDK	
	SRWQQGNVFS	CSVMHEALHN	HYTQKSLSLS	
	PGKGGSEGKS	SGSGSESKST	GGSEIVLTQS	
	PGTSLSPGE	RATLSCRASQ	SISSSFLTWY	
	QQKPGQAPRL	LIYGASSRAT	GIPDRFSGGG	
	SGTDFTLTIS	RLEPEDFAVY	YCQHYGSSPM	
	YTFGQGTKLE	IKGGSEGKSS	GSGSESKSTG	
	GSEVQLLESG	GGLVQPGGSL	RLSCAASGFT	
	FSSYAMSWVR	QAPGKGLEWV	SAISGSGGST	
	YYADSVKGRF	TISRDNSKNT	LYLQMNSLRA	
	EDTAVYYCAK	DEGYSSGHYY	GMDVWGQGT	
	VTVSS			

[0797] 实施例3:BGCB463三特异性抗体的免疫原性风险评估

[0798] 使用来自EpiVax Epimatrix insilico免疫原性预测程序的T调控(T_{reg})调整的评分来分析三特异性抗体序列的潜在免疫原性(表6)。EpiVax程序以计算方式计算与每个“超型”内最常见HLA分子的结合潜力。该报告提供了代表全世界>90%人口的结果,而不需要单独测试每个单倍型。通过聚集给定蛋白质序列内所含的所有预测的T细胞表位的EpiMatrix评分并调整预期的T细胞表位含量和蛋白质长度来计算EpiVax评分。EpiVax评分解释如下: EpiVax评分<-20是“理想的”;EpiVax评分从-20至+20是“可接受的”;并且EpiVax分数>+20是“不可接受的”。

[0799] 表6:BGCB463的免疫原性评估

[0800]

BGCB463 链信息	可变区的氨基酸序列	SEQ ID NO.	EpiVax 评分	EpiVax 评分 解释
----------------	-----------	---------------	--------------	-----------------

[0801]

轻链 1 (CD3B376) VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTG TSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPK VLLYEVS KRPSGVSSRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDQADYHCVSY AGSGTLLFGGGTKLTVL	7	-44.88	理想的
重链 1 (CD3B376) VH	QVQLQQSGPRLV RPSQTLSTLCA ISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRG LEWLGRITYYRSKWLYDYAVSV KSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTP EDTALYYCARGYSSSFYDWGQG TLVTVSS	8	+65.28	不可接受的
重链 2 N 末端 scFv (GC5B680 N68S, S69T) VL	DIVMTQTPLSSPVT LGQPASISCR SSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPG QPPRLIYKISNRFFGVPDRFSGS GAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQATQFPHTFGQG TKLEIK	15	-3.12	可接受的
重链 2 N 末端 scFv (GC5B680 N68S, S69T) VH	QVT LKESGPVLVKPTETLT LTCT VSGFSLTNIRMSVSWIRQPPGKA LEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLT ISRDTSKSQVVLTLTNVDPVDTA TYYCARMRLPYGMDVWGQGTT VTVSS	16	-11.65	可接受的
重链 2 C 末端 scFv (BCMB519) VL	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCR ASQSISSSFLTWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGGGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSS PMYTFGQG TKLEIK	23	-52.88	理想的
重链 2 C 末端 scFv (BCMB519) VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKDEGYSSGHYYGMDV WGQGTTVTVSS	24	-54.35	理想的

[0802] 实施例4: BGCB463三特异性抗体的结合表征

[0803] 第1部分. 材料和方法

[0804] 细胞系

[0805] 评估GPC5D和BCMA结合表征的细胞系是多发性骨髓瘤衍生的H929和MM.1R。另外, 产生CRISPR敲除的H929套件 (H929-GPRC5D-KO单克隆系D11)、H929-BCMA-KO和H929-GPRC5D/BCMA-KO。类似的MM.1R敲除也被开发用于评估GPC5D和BCMA结合。所有系来源于内部 (ABS) 并用完全RPMI培养基培养, 该培养基由RPMI 1640培养基、GlutaMAX™补充剂、HEPES、热灭活 (HI) FBS、非必需氨基酸 (NEAA)、丙酮酸钠和2-ME (均为ThermoFisher) 构成。

[0806] 使用过表达人GPC5D (单克隆H1B5) 和人BCMA (单克隆H1/B5) 的K562单克隆细胞系。另外, 使用表达食蟹猴GPC5D (单克隆M1C11) 和食蟹猴BCMA的K562-Fluc-GFP细胞。两种细胞系保持在IMDM、10% FBS、2mM谷氨酰胺和2mg/mL G418 (均为ThermoFisher) 中。

[0807] 通过FACS的细胞结合

[0808] BGCB463.003和BGCB463.004或B23B251 (IgG1-AAS的同种型对照) 用作未标记的分子或直接缀合至AlexaFluor647。BGCB463.003通过瞬时转染表达, 而BGCB463.004从稳定的转染池中表达。

[0809] 为了使BGCB463与人和食蟹猴泛T细胞结合,选择三个人供体(Hemacare),快速解冻,重悬浮,并以 1×10^6 个细胞/mL等分到96孔板中。然后洗涤细胞,必要时阻断Fc(Innovex),并用活性染料(Invitrogen)染色。将BGCB463及其对应的同种型(B23B251)在完全培养基中稀释至 $2\mu\text{M}$ 的起始浓度,并进行一式两份的1:3连续稀释以获得剂量响应曲线。将细胞与分子在 4°C 后 37°C 处温育1小时。必要时,也如上所述进行与90%人血清(Sigma)的温育。

[0810] 为了确定来自可溶性BCMA(sBCMA)的潜在干扰,从BDS(1池)获得具有已知浓度的患者血清,并与BGCB463和H929细胞一起温育。对于温育,用正常血清稀释患者血清以测定sBCMA,同时保持90%总人血清。

[0811] 利用ForeCyt软件,对单线态活细胞群进行设门,并计算每个样品的AlexaFluor 647通道的中值荧光强度(MFI)。原始数据被导出到Excel(Office365,Microsoft)中,在那里对重复数据进行平均,并在Prism软件(8.0版,Graphpad)中进行进一步分析。当需要时,减去同种型背景。在本文中,计算每个供体的每个分子的剂量响应曲线图和 EC_{50} 。最后,计算每个相应物种的所有三个供体的平均值,以获得该物种的平均 EC_{50} 。

[0812] 时程结合

[0813] 评估GPRC5D和BCMA时程动力学结合的细胞系是上述H929和MM.1R KO套件。基于1小时 37°C 结合的剂量响应曲线,以不同的最终浓度对BGCB463与上述细胞系的结合进行FACS分析,使得至少一个浓度接近 EC_{50} 。选择具有5倍差异的三个最终浓度,均进行1小时、3小时、5小时和24小时温育。在 37°C 的完全RPMI中评估BGCB463结合。

[0814] 首先将BGCB463或伴随的B23B251同种型对照以2X浓度在完全RPMI中稀释,并在 37°C 处温育。接下来,使用Vi-Cell XR(Beckman Coulter)收获细胞并进行计数,然后添加到主深孔板中以便在每个时间点产生约 $1\text{E}5$ 个细胞。在每个时间点,取出细胞并转移到含有冷FACS缓冲液(含有0.2%BSA(BD)+2mM EDTA(ThermoFisher)的染色缓冲液)的圆底96孔板中。接下来将板通过离心(1200RPM,5min)洗涤三次至四次,随后抽吸缓冲液。用FACS缓冲液再洗涤两次后,用Alexa Fluor 647山羊抗人IgG1(H+L)(Jackson Immuno)在冰上对细胞染色30分钟。温育后,将细胞用冷FACS缓冲液再洗涤三次,然后重悬于含有Sytox Green的FACS缓冲液中以标记所有死细胞(ThermoFisher)。然后在染色后三小时内将板在Intellicyt iQue ScreenerPlus(Sartorius)上运行。

[0815] 使用Incucyte活细胞成像的T细胞活化和杀伤测定

[0816] 为了确定测试分子对T细胞活化和肿瘤细胞杀伤潜力的影响,使用Incucyte实时成像系统(Sartorius)。内部产生的H929-Fluc-GFP细胞系用作人供体泛T细胞(Hemacare)的靶细胞。在几个实验中,以1:1、3:1和5:1的T细胞与靶的比率在96孔板中建立测定。以40nM或10nM的起始浓度添加测试分子(BGCB463和B23B251),并在完全培养基中以1:4连续稀释。所有分子最少一式两份地进行测试。用抗人CD25-Alexa Fluor 647(Biolegend)监测T细胞活化状态的检测。将板中的细胞对温度标准化,然后将其放置到 37°C 培养箱内所含的Incucyte(S3型)活细胞成像系统中。在约5天内,每3小时捕获一次该阶段的每个孔、绿色通道和红色通道中的四个图像。使用样品图像,在Incucyte分析软件(Sartorius,v.2019B Rev2)中创建分析定义,以生成绿色(靶细胞)通道中的对象的计数和红色(活化的T细胞)通道的计数或总积分强度。

[0817] 使用由Incucyte软件分析产生的来自绿色通道(靶细胞)的原始计数,使用关于导出到Excel (Microsoft,Office 365)的原始数据的以下公式,相对于对应板上所有未处理的孔的平均值计算每个浓度和时间点处的靶细胞溶解百分比: $(100 - (\text{GPC5D测试浓度}/\text{未处理的平均值}) \times 100)$ 。为了实现自动化,使用Data Sciences开发的Shiny应用程序对原始数据进行转换和传输,以快速计算数据并将其传输到Prism软件中,在该软件中呈现数据的图形表示。一旦传输到Prism软件(Graphpad Software,v.8.0.0)中,就对数据进行作图,并且计算平均值的标准误差以及细胞溶解和T细胞活化随时间推移的曲线。对于T细胞活化,使用来自红色通道(CD25-AF647)平行测定的原始计数或总积分强度,并在Prism软件中进一步作图以产生剂量响应和活化图。

[0818] 第2部分.结果

[0819] T细胞和细胞系剂量响应性结合

[0820] 首先,通过在37℃处使用4参数拟合1小时测量剂量响应曲线的有效浓度(EC)范围来确定三特异性分子的GPC5D和BCMA结合臂的基于FACS的结合。这使用H929细胞套件(WT、GPC5D-KO、BCMA-KO和GPC5D/BCMA KO)和类似的MM.1R套件来评估。基于细胞的EC₅₀对于WT H929为约13nM(图2A至图2D,表7)以及对于WT MM.1R为约2.4nM(图3A至图3D,表8)。当EC₅₀和Bmax在测试靶结合臂的单价结合的GPC5D-KO和BCMA-KO系中均降低时,观察到明显的亲合力影响(表7)。接下来,使用来自三个随机供体的纯化的泛T细胞测定CD3结合Fab臂的基于细胞的EC₅₀。如图4A至图4C所示,CD3B376 (BGCB463)臂的基于细胞的EC₅₀为约329nM(表9)。接下来,在4℃处评估剂量响应性结合,以消除任何潜在的生物效应。如图5A至图5C中所示,与37℃相比,4℃处的结合更强(50nM-100nM),这可指示内在化。另外,将两个表达批次的BGCB463(来自瞬时转染的BGCB463.003和来自稳定转染池的BGCB463.004)与H929、MM.1R和泛T细胞的结合进行直接比较,并且没有注意到差异(图6A至图6C)。

[0821] 表7:H929套件基于细胞的有效浓度

[0822]	EC ₅₀ (nM)	H929	H929 GPC5D KO	H929 BCMA KO	EC ₉₀ (nM)	H929	H929 GPC5D KO	H929 BCMA KO
	运行 1	14.0	106.4	195.4	运行 1	240.1	722.6	1861.4
	运行 2	8.3	63.9	128.8	运行 2	356.2	200.3	871.8
	运行 3	28.7	220.8	65.2	运行 3	45776.5	1996.4	1237.5
	运行 4	无拟合	无拟合	无拟合	运行 4	无拟合	无拟合	无拟合
	运行 5	2.4	456.8	48.8	运行 5	9450.2	4130.3	281.2
[0823]	平均值	13.3	212.0	109.5	平均值	13955.7	1762.4	1063.0

[0824] 表8:MM.1R套件基于细胞的有效浓度

[0825]	EC ₅₀ (nM)	MM.1R	MM.1R GPC5D KO	MM.1R BCMA KO	EC ₉₀ (nM)	MM.1R	MM.1R GPC5D KO	MM.1R BCMA KO
	运行 1	3.2	无拟合	无拟合	运行 1	128.1	无拟合	无拟合
	运行 2	1.2	无拟合	16.6	运行 2	13.9	无拟合	198.7
	运行 3	3.4	141.6	35.3	运行 3	75.5	2070.4	969.9
	运行 4	1.6	489.9	7.2	运行 4	8.6	8298.7	38.2
	平均值	2.4	315.8	19.7	平均值	56.5	5184.5	402.2

[0826] 表9:基于T细胞的有效浓度

[0827]	EC ₅₀ (nM)	供体 1	供体 2	供体 3	EC ₉₀ (nM)	供体 1	供体 2	供体 3
	运行 1	769.8	572.5	548.9	运行 1	10735.6	7046.4	6008.2
	运行 2	无拟合	无拟合	无拟合	运行 2	无拟合	无拟合	无拟合
	运行 3	293.1	261.9	359.9	运行 3	2864.8	2267.3	4148.3
	运行 4	209.9	192.1	254.8	运行 4	1698.0	1418.4	2173.5
	运行 5	102.6	132.4	250.7	运行 5	493	860	2600
	平均值	343.9	289.7	353.6	平均值	3947.9	2898.0	3732.5
	总 AVE	329.1			总 AVE	3526.1		

[0828] 时程结合

[0829] 接下来,通过评估H929和MM.1R细胞套件上的时程动力学FACS结合来确定BGCB463的表面稳定性。如图7A至图7D所示,结合动力学在H929细胞上在24小时时段内是稳定的。另外,与在单个K0中评估的单价结合臂相比,三特异性分子的二价结合具有更强的信号,这与上述相似,与可能的亲和力效应一致。这些结果在MM.1R套件中得到回应(图8A至图8D)。

[0830] 物种/直系同源交叉反应性

[0831] 还使用基于FACS的细胞结合在37℃处1小时对两个靶结合scFv臂对食蟹猴的交叉反应性进行分析。为此,使用稳定表达人和食蟹猴GPCR5D或BCMA的K562细胞。如图9A至图9E所示,GC5B680 scFv臂的基于细胞的EC₅₀对于人GPCR5D为约30nM,而对于食蟹猴GPCR5D,在约400nM时弱约10倍。相反,BCMB519 scFv臂的基于细胞的EC₅₀对于人BCMA为约145nM,而直至2μM都没有可检测的与食蟹猴BCMA的结合。

[0832] 为了进一步确定食蟹猴交叉反应性,还将用于结合的K562细胞用于与人泛T细胞的细胞毒性。如图10A和图10B所示,与人GPCR5D相比,对食蟹猴GPCR5D较弱的结合与较弱的细胞毒性和表达食蟹猴GPCR5D的K562的对应较低的T细胞活化相关。在人和食蟹猴BCMA中观察到类似的模式,然而,对食蟹猴BCMA基本上没有T细胞响应。

[0833] 90%人血清中的结合

[0834] 为了更好地理解体内结合,在90%人血清存在的情况下在37℃处评估结合1小时。用H929细胞测试GPCR5D和BCMA结合scFv臂(图11),同时用人泛T细胞测试CD3结合Fab(图12)。在两种类型中,BGCB463结合不受血清存在的影响。

[0835] 时程细胞毒性

[0836] 为了评估体外杀伤动力学,利用Incucyte(基于图像的平台)来获取动力学杀伤数据。与标准的基于FACS的终点测定相比,随时间推移跟踪靶细胞杀伤和T细胞活化给出更详细和定性的细胞毒性活性读数。如图13A和图13B中所示,除了在3:1E:T比率处测试的最低浓度(1pM)之外,BGCB463在所有浓度处在约72小时时达到显著的最大杀伤。为了扩展这些数据,还测试了5:1E:T和1:1E:T比率(图14A至图14F)。在5:1E:T处,所有测试浓度在48小时-72小时时达到最大杀伤,其中达到最大杀伤的时间与浓度呈负相关。在1:1E:T处,所有浓度也获得最大杀伤,但在稍后时间点,具有相同的浓度依赖性。

[0837] 使用患者血清的sBCMA结合干涉

[0838] 评估可溶性BCMA(sBCMA)的潜在干扰对于支持建模和MABEL剂量预测是必要的。选择患者血清作为可溶性BCMA的生理来源,并通过在正常血清中稀释进行测定。如图15A至图

15D所示,即使613ng/mL的最高水平也不会影响BGCB463与H929细胞的结合。这是所有具有不同水平的sBCMA的患者血清的情况。

[0839] 第3部分. 讨论和结论

[0840] 给定组的时程结合的目的是确定该分子是否在给定时间内在细胞表面上稳定,但需要注意的是,该方法不能辨别内在化与表面染色。BGCB463在H929和MM.1R KO细胞套件上测试的所有浓度处保持稳定或增加的信号。因此,BGCB463稳定地存在于血液细胞靶的表面上。

[0841] 还测量了BGCB463对食蟹猴BCMA和GPRC5D的交叉反应性。与人相比,GPRC5D对cyno的结合弱约10倍,这与细胞毒性相对应。另一方面,BCMA结合直至2 μ M都没有交叉反应,这与观察到的无功能活性相关。

[0842] 利用时程细胞毒性来评估杀伤动力学并给出BGCB463如何介导T细胞重定向的更详细视图。观察到接近最大细胞溶解的杀伤,时间取决于分子的浓度和E:T比率。

[0843] 由于BCMA以可溶形式存在并且其在患者中升高,因此评估在具有不同sBCMA水平的患者血清存在的情况下的结合是至关重要的。数据表明,sBCMA不干扰BGCB463与H929细胞上的表面BCMA的结合。

[0844] 实施例5:BGCB463三特异性抗体的生物物理评估

[0845] 对BGCB463进行一系列生物物理评估,包括结合、蛋白质表征、2周高浓度稳定性以及化学和物理稳定性。评估列表及其结果的列在表10中示出。

[0846] 表10:BGCB463的生物物理评估和结果

mAb TMP 特征	结果	注释
人 CD3 臂的结合亲和力 (SPR)	KD = 3.1E-8M 抗原: 重组 CD3 $\delta\epsilon$ 异源二聚体构建体	N/A
人 BCMA 臂的结合亲和力 (SPR)	KD = 8.4E-10M 抗原: BCMW37	N/A
[0847] Fc γ 受体结合 (SPR)	与人 Fc γ R1、Fc γ RIIIa V158、Fc γ RIIIa F158、Fc γ RIIa 或 Fc γ RIIb 没有可测量的结合。 与食蟹猴 Fc γ R1、Fc γ RIII、Fc γ RIIa 或 Fc γ RIIb 没有可测量的结合	沉默 Fc 设计确认
FcRn 结合 (SPR)	pH 6.0: hFcRn KD = 954nM cyFcRn KD = 826nM 相对于 pH 6.0, 在 pH 7.4 处解离更快	N/A
血清干扰	50%人血清中的缔合速率没有显著变化	N/A

[0848]

(八位位组)	k_a 缓冲液/ k_a 血清 = 1.6 - BCMA k_a 缓冲液/ k_a 血清 = 1.0 - CD3	
GPRC5D 结合表位	未确定	N/A
CD3 结合表位	包含 CD3 $\epsilon\delta$ 链的残基 22-35 (QDGNEEMGGITQTP (SEQ ID NO: 161)) 的线性表位	通过 HDX-MS 确定 针对 CD3 $\epsilon\gamma$ 的亲本 抗体 CD3B376 的表 位序列
BCMA 结合表位	包含 BCMA BCMW37 链的残基 17-26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO: 162)) 的线性表位	HDX-MS 数据显示 残基 17-18 和 21-26 受 BGCB465 保 护。
完整的 Abs 质量, 释放 (质谱)	156,431.5Da	N/A
糖形概况 (质谱)	具有主要糖形 G0F/G0F 的典型 IgG1 概 况	N/A
同源二聚体的水平 (质谱)	没有检测到 HD1 和 HD2	N/A
其他产物相关杂质的水 平 (质谱)	在 AA 486 - 495 之间对 HC2 (BCMA scFv) 的轻微剪切。CD3 LC 和 CD3 臂的组合 VH+CH1 (pQ1-S222) 的少 量损失。	N/A
N-连接 gly (非 Fc) (质谱)	没有预测到或观察到	N/A
O-连接 gly 位点 (质谱)	没有观察到	N/A
糖化 (相对丰度%) (质谱)	HC1 (CD3) - 9.5%, LC1 (CD3) - 6.4%, HC2 (GPRC5D×BCMA) - 7.5%	糖化值表示由于由 非零基线引起的过 度估计的上限
游离 Cys (质谱)	没有预测到或观察到	N/A
N 末端延伸/截短 (质谱)	没有观察到	N/A
构象稳定性 (DSC)	T _{m1} = 63.2°C T _{m2} = 68.0°C T _{m3} = 72.2°C	在 pH 6.5 的 10mM 组氨酸中测量
纯度% (2 步纯化) (AUC)	96.39% 单体	在 10mM 组氨酸 pH 6.4 中测量
血清稳定性 (SEC-FDS)	在人血清中在 t ₀ 时聚集增加 3.7%, 在 人血清中在 37°C 处 2 天后聚集增加 1.2%。	使用 Alexa488 标记 的 GPRC5D×CD3 通过尺寸排阻色谱 法评估
IgG 相互作用	没有观察到 IgG 相互作用	N/A

[0849]

(SPR)		
非特异性结合	没有观察到非特异性结合	N/A
等电点 (cIEF)	pI = 9.51 酸性/主/碱性峰面积%: 44.8/54.9/0.3	N/A
相对疏水性 (aHIC)	具有宽峰的低表面疏水性 (疏水性指数 < 0.6)	N/A
粘度	5.48cP	在 pH 6.5 的 10mM 组氨酸中以 150mg/mL 测定
在 pH 6.5 的组氨酸缓冲液中的浓度和回收率%	将样品浓缩至 176.5mg/mL, 回收率为 89.4%	N/A
单体% (初始) (AUC)	96.6%	在 pH 6.5 的组氨酸中测定
单体% 2 周, 4°C (AUC)	84.7%	在 pH 6.5 的组氨酸中测定
单体% 2 周, 40°C (AUC)	66.3%	在 pH 6.5 的组氨酸中测定
强制降解后的完整 MS (质谱)	所有应激样品均符合预期质量。 高 pH 应激导致 BCMA scFv 轻微剪切以及 CD3 LC 的少量损失。 化学氧化处理导致在 HC2 (scFv) 臂上多达 3 次氧化和在 CD3 HC 上多达 2 次氧化。	无
强制降解后的尺寸 (aSEC)	生理 (2 周, 37°C) 和氧化应激后的样品保持 >98% 的单体; pH 8.5、5 和 3.5 应激后的样品显示 89%-91% 的单体; 在 40°C 处 2 周后的高浓度样品显示仅 63% 单体的 HMW 的显著增加。	随时间推移, 在高浓度处聚集的增加是明显的, 并且需要后续制剂研究以减轻聚集倾向
纯度强制降解 (R 和 NR GXII)	NR GXII: 除生理 (2 周, 37°C) (97%)、高浓度 40°C 2 周 (95.9%) 和高 pH (76.1%) 样品外, 所有应激样品保持 ≥99% 的单体。 还原型 GXII: 除 40°C 2 周 (97.9%) 和高 pH (89.7%) 外, 所有应激样品保持 ≥99% 的单体。	无
强制降解后的结合亲和力 (SPR)	在所有测试的应激条件下保留对 CD3 的亲和力。 在所有测试的应激条件下, 对 BCMA 的亲和力在 KD 和活性物质 % 的误差范围内。	N/A

[0850]	基础氧化水平	在 M94 (GC5B680 scFv LCDR3) 中为 6.8% 在 M232 (GC5B680 scFv HCDR3) 中为 4.7% 对于所有其他 CDR 残基, <1%	无
	Met/Trp (氧化应激时的变化)	在 M94 (GC5B680 scFv LCDR3) 中为 68.1% 在 M232 (GC5B680 scFv HCDR3) 中为 15.1% 在 M600 (BCMB519 scFv LCDR3) 中为 67.9%	无
	基础脱酰胺水平	在 CDR 中<1%	无
	脱酰胺位点 (应激时的变化)	没有显著变化	无
	基础异构化水平	在 CDR 中<1%	无
	异构化位点 (应激时的变化)	HC-CDR1 CD3B2186 中的 20% D27 异构化	注意: 所有 CD3B376 候选物观察到在 pH 应激下的 D27 异构化, 并且被认为不影响活性。

[0851] 实施例6: BGCB491三特异性抗体的分子设计、序列和结构

[0852] BGCB491是免疫球蛋白 (Ig) G1三特异性抗体,其可同时或独立地结合至T淋巴细胞 (T细胞) 上的分化簇3受体复合体 (CD3 ϵ) (Uniprot ID: P07766) 的 ϵ 亚基,和肿瘤细胞上的 GPRC5D (G蛋白偶联受体C5家族亚型D, Uniprot ID: Q9NZD1) 和BCMA (B细胞成熟抗原, TNFRSF17, Uniprot ID: Q02223)。抗体在恒定区 (Fc) 中具有L234A、L235A和D265S的突变以消除与Fc受体的相互作用,并且使用杵臼平台突变增强异源二聚化¹。抗CD3 ϵ “臼”链还具有“RF”突变 (H435R、Y436F) 以破坏单体和同源二聚化的臼链的蛋白A结合²。该分子包含“臼, RF”链上的抗CD3 ϵ Fab区和融合到C末端上的抗GPRC5D scFv ν 区。“杵”链具有抗BCMA scFv。开发三特异性抗体以评估靶向GPRC5D和BCMA和CD3的双重肿瘤对T细胞重定向的治疗潜力。图16中描绘了BGCB491的例证。

[0853] 通过融合到C末端抗GPRC5D scFv的抗CD3重链 (HC) A和抗CD3轻链 (LC) 与含有重链B的融合到“杵”的抗BCMA scFv的共表达来产生三特异性BGCB491抗体。通过用重组CD3 ϵ 蛋白使转基因人源化大鼠 [OmniRat (OMTTM)] 免疫来发现抗CD3可变区 (VR000017350)。以BGCB491为特征的抗GPRC5d可变区 (VR000038761) 来源于通过用编码GPRC5d的DNA使转基因人源化小鼠 [Ablexis] 免疫而发现的mAb GC5B680。亲本 ν 区 (VR000029832) 在HC框架3区中含有“NSS”基序,该基序存在N-连接糖基化的风险且代表来自IGHV2-26*01种系的突变。将该位点突变回种系序列“STS”以消除N-连接糖基化的风险,并且这种变化导致最终的可变区VR000038761。以BGCB491为特征的抗BCMA可变区 (VR000003260) 来源于通过用重组BCMA蛋白使转基因人源化小鼠 [Ablexis] 免疫而发现的mAb BCMB519。没有对该 ν 区进行进一步的修改。抗GPRC5D区和抗BCMA ν 区两者在最终分子中被格式化为单链片段可变区 (scFv)。

[0854] 由BGCB491的cDNA序列 (SEQ ID No: 165、166和167) 推导并通过肽作图和质谱确认的BGCB491重链和轻链的氨基酸序列如下所示 (表11)。每条链中根据ABM编号定义的3个互

补决定区 (CDR) 加粗和加下划线。BGCB491重链1的位置1处的Gln残基、BGCB491轻链的位置1处的Gln残基和BGCB491重链2的位置1处的Glu残基构成成熟链的N末端。包含BGCB491 IgG1 AAS的两条重链具有以下点突变:L234A、L235A和D265S。来自BGCB491的重链1具有“臼”突变:T366S、L368A、Y407V和RF突变:H435R、Y436F,而重链2具有“杵”突变:T366W。杵臼突变促进Fc的异源二聚化³。“RF”突变破坏与蛋白A的结合。Fc γ R受体沉默 (AAS) 的突变和杵臼突变在下文的序列中加下划线。

[0855] 表11.BGCB491的氨基酸序列

[0856]

区域	AA 序列			SEQ ID NO.
轻链 1	QSALTQPASV <u>TYKFVSWYQQ</u> SSRFSGSKSG <u>VSYAGSGTLL</u> LFPPSSEELQ AWKADSSPVK YLSLTPEQWK APTECS	SGSPGQSITI HPDKAPKVLL NTASLTISGL FGGGTKLTVL ANKATLVCLI AGVETTTPSK SHRSYSCQVT	<u>SCTGTSSNIG</u> <u>YEVSKRPSGV</u> QAEDQADYHC GQPKAAPSVT SDFYPGAVTV QSNNKYAASS HEGSTVEKTV	30
重链 1	QVQLQQSGPR <u>NNNAAWSWIR</u>	LVRPSQTL QSPSRGLEWL	<u>TCAISGDSVF</u> <u>GRTYYRSKWL</u>	29

[0857]	YDYAVSVKSR PEDTALYYCA ASTKGPSVFP DYFPEPVTVS GLYSLSSVVT NTKVDKKVEP PSVFLFPPKP HEDPEVKFNW STYRVVSVLT LPAPIEKTIS MTKNQVSLSC ENNYKTTPPV QQGNVFSCSV GGGSGGGGS SPVTLGQPAS LQQRPGQPPR GAGTDFTLKI HTFGQGKLE GSQVTLKESG LTNIRMSVSW KSYSTSLKSR PVDATYYCA S	ITVNPDTSRN RGYSSSFDYW LAPSSKSTSG WNSGALTSGV VPSSSLGTQT KSCDKTHTCP KDTLMIS RTP YVDGVEVHNA VLHQDWLNGK KAKGQPREPQ AVKGFYPSDI LDSDGSFFLV MHEALHNRFT GGGSGGGGS ISCRSSQSLV LLIYKISNRF SRVEAEDVGV IKGGSEKSS PVLVKPTETL IRQPPGKALE LTISRDTSKS RMRLPYGMDV	QFTLQLNSVT GQGT LVT VSS GTAALGCLVK HTFPAVLQSS YICNVNHKPS PCPAPEAAGG EVT CVVVSVS KTKPREEQYN EYKCKVSNKA VYTLPPSREE AVEWESNGQP SKLTVDKSRW QKSLSLSPGK DIVMTQTPLS HSDGNTYLSW FGVPDRFSGS YYCMQATQFP GSGSESKSTG TLTCTVSGFS WLAHIFSND QVVLTLTNVD WGQGT TVTVS	
	重链 2 EIVLTQSPGT SSFLT WYQQK DRFSGGSGT HYGSSPMYTF SESKSTGGSE CAASGFTFSS SGSGGSTYYA QMNSLRAEDT VWGQGT TVTV AAGGPSVFLF VSVSHEDPEV EQYNSTYRVV SNKALPAPIE SREEMTKNQV NGQPENNYKT KSRWQQGNVF SPGK	LSLSPGERAT PGQAPRLLIY DFTLTISRLE GQGKLEIKG VQLLES GGGL YAMSWVRQAP DSVKGRFTIS AVYYCAKDEG SSEPKSSDKT PPKPKDTLMI KFNWYVDGVE SVLTVLHQDW KTISKAKGQP SLWCLVKGFY TPPVLDSGGS SCSVMHEALH	LSCRASQSI GASSRATGIP PEDFAVYYCQ GSEGKSSGSG VQPGGSLRLS GKGLEWVSAI RDNSKNTLYL YSSGHYYGMD HTCPPCPAPE SRTPEVTCVV VHNAKTKPRE LNGKEYKCKV REPQVYTLPP PSDIAVEWES FFLYSKLTVD NHYTQKSLSL	31

[0858] 实施例7: BGCB491三特异性抗体的免疫原性风险评估

[0859] 使用来自EpiVax Epimatrix insilico免疫原性预测程序的T调控(T_{reg})调整的评分来分析三特异性抗体序列的潜在免疫原性⁴(表12)。EpiVax程序以计算方式计算与每个“超型”内最常见HLA分子的结合潜力。该报告提供了代表全世界>90%人口的结果,而不需要单独测试每个单倍型。通过聚集给定蛋白质序列内所含的所有预测的T细胞表位的EpiMatrix评分并调整预期的T细胞表位含量和蛋白质长度来计算EpiVax评分。EpiVax评分解释如下: EpiVax评分<-20是“理想的”; EpiVax评分从-20至+20是“可接受的”; 并且EpiVax分数>+20是“不可接受的”。

[0860] 表12: BGCB491的免疫原性评估

[0861]	BGCB491 链信息	可变区的氨基酸序列	SEQ ID NO.	EpiVax 评分	EpiVax 评分 解释
	轻链 1 (CD3B376) VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS NIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLYE VSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISG LQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGG TKLTVL	7	-44.88	理想的
	重链 1 (CD3B376) VH	QVQLQQSGPRLVLRPSQTLTLTCAISG DSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLG RTYYRSKWLYDYAVSVKSRITVNP TSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCAR GYSSSFYWGQGTLVTVSS	8	+65.28	不可接受的
	重链 2 N 末端 scFv (GC5B680 N68S, S69T) VL	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQ SLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLI YKISNRFFGVDPDRFSGSGAGTDFTLKI SRVEAEDVGYYCMQATQFPHTFGQ GTKLEIK	15	-3.12	可接受的
	重链 2 N 末端 scFv (GC5B680 N68S, S69T) VH	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSG FSLTNIRMSVSWIRQPPGKALEWLAH IFSNDKSYSTSLKSRLTISRDTSKSQ VVLTLTNVDPVDTATYYCARMRLPY GMDVWGQGTTVTVSS	16	-11.65	可接受的
	重链 2 C 末端 scFv (BCMB519) VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQ SISSSFLTWYQQKPGQAPRLLIYGASS RATGIPDRFSGGGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQHYGSSPMYTFGQGTKL EIK	23	-52.88	理想的
	重链 2 C 末端 scFv (BCMB519) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKD EGYSSGHYYGMDVWGQGTTVTVSS	24	-54.35	理想的

[0862] 实施例8:三特异性抗体比较研究

[0863] 在一系列以下研究中测试如上所述的BGCB463和BGCB491。

[0864] 三特异性抗体仅介导靶阳性细胞的杀伤

[0865] 针对BCMA⁺GPRC5D⁺细胞(图17A)和BCMA⁻GPRC5D⁻细胞(图17B)测试了BGCB463、BGCB491和三个对照(BGCB4821(CD3xNu11xNu11)、BGCB483(CD3xNu11xBCMA)、BGCB484(CD3xGPRC5DxNu11))。3:1的效应物与靶(E:T)比率;n=1个T细胞供体,72小时温育,最高浓度53nM,1-5次稀释。进行细胞毒性和T细胞活化的测试。结果表明,BGCB463和BGCB491仅介导BCMA⁺GPRC5D⁺细胞的杀伤(如图17A所示),而BCMA⁻GPRC5D⁻细胞未受影响(如图17B所示)。

[0866] 三特异性抗体在耗竭克隆(CRISPR)细胞系中有活性

[0867] BGCB463和BGCB491在初次温育后72小时和96小时耗竭H929WT、GPRC5D KO和BCMAKO细胞系(图18A)。E:T比率为3:1,n=5个T细胞供体;72(5)和96(4)小时温育;最高浓度532mM,1-5个稀释梯度。EC₅₀值在下表13中示出。

[0868] 表13:用BGCB463和BGCB491进行72/96小时细胞毒性测试的EC₅₀值

[0869]	温育时间	BGCB463	BGCB491	细胞类型
	72 小时	细胞毒性		
	EC ₅₀ 值 (nM)	0.007	0.006	H929 WT
		2.055	0.322	H929-GPRC5D KO
		0.539	4.517	H929-BCMA KO
	96 小时			
	EC ₅₀ 值 (nM)	0.003	0.003	H929 WT
		1.580	0.226	H929-GPRC5D KO
		0.269	2.759	H929-BCMA KO

[0870] BGCB463和BGCB491在耗竭CRISPR细胞的同时也触发T细胞活化。在上述相同的H929 WT、GPRC5D KO和BCMA KO细胞中,两种抗体在72小时和96小时后均显示增加的T细胞活化(图18B和表14)。

[0871] 表14:用BGCB463和BGCB491进行72/96小时T细胞测试的EC₅₀值

[0872]	温育时间	BGCB463	BGCB491	细胞类型
	72 小时	T 细胞活化		
	EC ₅₀ 值 (nM)	0.009	0.011	H929 WT
		3.139	0.520	H929-GPRC5D KO
		0.517	3.110	H929-BCMA KO
	96 小时			
	EC ₅₀ 值 (nM)	0.007	0.009	H929 WT
		3.507	0.480	H929-GPRC5D KO
		0.445	3.458	H929-BCMA KO

[0873] 三特异性抗体可耗竭淋巴瘤(仅BCMA)细胞系

[0874] 用H929、RAMOS和GRANTA-519细胞系对BGCB463和BGCB491进行细胞毒性和T细胞活化测定。结果显示两种抗体确实耗竭RAMOS和GRANTA-519系,尽管需要更高浓度的两种抗体(图19,表15中的EC₅₀值)。E:T为5:1,n=1个T细胞供体;仅72小时温育;53nM的最高浓度;和1-5次稀释。

[0875] 表15:用BGCB463和BGCB491进行淋巴瘤细胞系耗竭的EC₅₀值

[0876]		BGCB463	BGCB491	细胞系
		细胞毒性		
	EC ₅₀ 值 (nM)	0.004	0.005	H929 WT
		n/a	2.813	Ramos
		80.980	8.584	Granta-519
		T 细胞活化		
	EC ₅₀ 值 (nM)	0.012	0.022	H929 WT
		17.580	1.387	Ramos
		3.300	1.644	Granta-519

[0877] 三特异性抗体在全血测定中耗竭靶阳性细胞

[0878] 用H292细胞对BGCB463和BGCB491进行细胞毒性和T细胞活化全血测定。结果显示细胞毒性和T细胞活化(图20和表16中的EC50值)。E:T为5:1,n=2个全血供体;48小时温育;

532nM的最高浓度;和1-5次稀释。

[0879] 表16:用BGCB463和BGCB491进行全血细胞耗竭的EC值

EC 值 (nM)	BGCB463	BGCB491
	细胞毒性	
EC ₂₀	0.159	0.084
EC ₅₀	0.574	0.648
EC ₉₀	4.412	16.380
EC 值 (nM)	T 细胞活化	
	BGCB463	BGCB491
EC ₂₀	0.044	0.027
EC ₅₀	0.297	0.544
EC ₉₀	6.199	63.160

[0881] 三特异性抗体在小鼠中抑制肿瘤生长

[0882] 如果以足够高的剂量给予,则BGCB463在MM.1S和RPMI 8226异种移植小鼠模型中显示出抑制肿瘤生长:在MM.1S模型中给予2μg或10μg (图21A) 或在RPMI 8226模型中给予5μg或10μg (图21B)。与对照条件相比,肿瘤停止生长或显示生长减少。

[0883] 另外,BGCB463和BGCB491两者在H929预防性异种移植小鼠模型中显示出抑制肿瘤生长。与PBS对照相比,0.5μg和5μg剂量均减缓了H929-BCMA KO和H929-GPRC5D KO模型中的肿瘤生长,更高的5μg浓度显示出更好的效果 (图22)。

[0884] DRC泛T结合

[0885] 在1小时、37℃DRC泛T结合测定中测试BGCB463和BGCB491。使用两个人泛T细胞供体,并且测试分子具有2uM起始浓度,具有1:3稀释和11点DRC。经由Alexa Fluor® 647AffiniPure山羊抗人IgG (H+L) 进行二次检测。使用Intellicyte Ique Screener plus进行FACS。结果在图23中示出,BGCB491具有0.1903的EC₅₀和188194的上限,以及BGCB463具有0.1258的EC₅₀和303269的上限。所展示的EC₅₀值在CD3结合臂的预期参数内。

[0886] DRCH929套件结合

[0887] BGCB463和BGCB491在1小时、37℃DRC套件结合测定中针对H929 WT、H929 BCMA-KO、H929 GPRC5D-KO和H929 BCMA/GPRC5D双KO细胞进行测试。结果在图24A至图24D中示出,全部具有空白对照 (BGCB510)。EC值在表17中示出。结果表明,与BGCB463相比,BGCB491具有增加的BCMA介导的结合和减少的GPRC5D介导的结合。

[0888] 表17:BGCB463和BGCB491在H929套件结合中的EC值 (uM)

	BGCB463	BGCB491
	<i>H929 WT</i>	
EC ₅₀	n/a	0.270
EC ₉₀	n/a	25.049
	<i>H929 BCMA-KO</i>	
EC ₅₀	11.7	3.183
EC ₉₀	n/a	n/a
	<i>H929 GPRC5D-KO</i>	
EC ₅₀	0.504	0.210
EC ₉₀	8.385	3.896

[0890] 三特异性抗体分析研究

[0891] 下表18提供了对BGCB463和BGCB491的各种分析。

[0892] 表18:BGCB463和BGCB491三特异性抗体的分析概述

[0893]

分析	BGCB463	BGCB491
纯度 (AUC) (3步纯化后)	96.4%单体	98.9%单体
构象稳定性 (DSC, 组氨酸, pH 6.5)	Tms = 63°C, 68°C, 72°C	Tms = 63°C, 68°C, 72°C
测量的 pI (cIEF)	pI: 9.51	pI: 9.56
通过 aHIC 的相对疏水性	中等疏水性	相对低的疏水性 (HI = 0.38)
PTM 分析 (LC-MS)	<10% CDR PTM	<5% CDR PTM
结合亲和力 (SPR)	KD: CD3 (31.3 ± 8.7nM); BCMA (844 ± 128pM)	KD: BCMA (2.12E-10M); CD3 (2.51E-08M)
血清干扰 (八位位组)	未受影响的结合	未受影响的结合
血清稳定性 (SEC-FDS, 稳定批次)	在 37°C 处温育 7 天后 HMW 增加约 12%	在 37°C 处温育 7 天后 HMW 增加约 5%
非特异性结合 (SPR)	无	无
浓度	约 180mg/mL, 89%回收率, 97%单体	约 180mg/mL, 91%回收率, 97.5%单体
150mg/mL 时的粘度	5.48cP	6.3cP
HCLF: 在 4°C 和 40°C 处 2 周后的单体% (AUC)	在 4°C 和 40°C 处 2 周后, 180mg/mL 处的聚集增加至 15%和 34%	在 40°C 处 2 周后, 180mg/mL 处的聚集增加至 36%和 34%, 在 4°C 处 HMW 没有增加

[0894]	生理应激: 37℃, 2mg/mL, PBS pH7.4		无物理/化学/亲和力变化	HMW 没有增加, LMW 显著增加 (SEC 增加 15%, GXII 增加约 18%); 与 CD3 的结合活性降低 18%, BCMA 结合未受影响
	PTM 诱导应激	pH 8.5, 1 周, 40℃	20% D27 异构化 (CD3, HCDR1), 结合未受影响; 在其他 CDR 残基中 <10%脱酰胺/异构化	约 12% D27 异构化 (CD3, HCDR1); LMW 增加 (SEC 增加约 15%, GXII 增加约 20%); 结合未受影响
		pH 5, 1 周, 40℃	CDR PTM 没有增加	没有显著变化
		pH 3.5, 6h, 室温	CDR PTM 没有增加	没有显著变化
		化学氧化	68% M94 氧化 15% M232 氧化 68% M600; CD3 未受影响, 具有 2 倍释放的 BCMA 结合	97% M94 氧化 (GC5B680, LCDR3); 99% M600 (BCMB519 LCDR3); CD3 结合未受影响, BCMA 结合亲和力略有影响 (释放约 2 倍-3 倍)
		金属氧化	CDR PTM 没有增加	没有显著变化

[0895] 实施例9:BGCB491三特异性抗体的生物物理评估

[0896] 表19A提供了BGCB491的重组抗原结合、物种交叉反应性、表位鉴定、Fc受体结合和生物物理内在特性属性。表19B提供了BGCB491的附加特征。

[0897] 表19A:BGCB491的生物物理评估和结果的列表

mAb TMP 特征	结果	注释
	结合	
[0898] 人 CD3 臂的结合亲和力 (SPR)	$K_D = 2.5 \times 10^{-8} M$	抗原: 重组 CD3 $\epsilon\gamma$ 异源二聚体构建体 (CD3W200)

[0899]

mAb TMP 特征	结果	注释
人 BCMA 和 GPRC5D 臂的结合亲和力 (SPR)	人 BCMA: $K_D = 2.1 \times 10^{-10} \text{M}$; 抗原: BCMW37。 人 GPRC5D: 由于缺乏针对该跨膜靶的代表性可溶性试剂, 因此没有 SPR 数据可用于 GPRC5D。改为在 H929-BCMA-KO 细胞上使用基于细胞的方法评估亲和力结合 (参见实施例 11)	使用 BCMW37 抗原的亲本 BCMA 结合: $K_D = 2.8 \times 10^{-10} \text{M}$, 作为 scFv; $EC_{50} = 2.3 \text{nM}$ - 3.2nM , 作为结合至 H929 和 MM.1R 细胞的 scFv; 结合至 H929 和 MM.1R 细胞的亲本 GPRC5D: $EC_{50} = 6 \text{nM}$ - 24nM , 作为 Fab
BCMB519 scFv 与食蟹猴 BCMA (SPR) 的交叉反应性	最高 300nM 下无/低结合	从含有 BCMB601 scFv 的 BCMB519 收集结合数据
Fcγ 受体结合 (SPR)	没有显著的结合	如对 hIgG1-AAS 沉默框架所预期的
FcRn 结合 (SPR)	pH 6.0: hFcRn $K_D = 485 \text{nM}$; cyFcRn $K_D = 314 \text{nM}$	在 pH 7.4 处快速解离
血清干扰 (八位位组)	k_a 缓冲液/ k_a 血清 <2.0	在 50% 人血清中与 bt-BCMA 和 bt-CD3 的缔合速率没有显著变化。由于缺乏代表性可溶性试剂, 因此未测定 GPRC5D。
GPRC5D 结合表位	未确定	N/A
CD3 结合表位	包含 CD3ε 链 (P07766, CD3E_人) 的残基 22-35 (QDGNEEMGGITQTP (SEQ ID NO: 161)) 的线性表位	通过 HDX-MS 确定针对 CD3W220 的亲本抗体 CD3B376 的表位序列
BCMA 结合表位	包含 BCMA BCMW37 的残基 17-26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO: 162)) 的线性表位	HDX-MS 数据显示 BCMW37 的残基 17-18 和 21-26 受 BGCB465 保护 (含有相同的抗 BCMA scFv)
蛋白质表征		
完整的 Abs 质量, 释放 (MS)	155,978.8Da	N/A
糖形概况 (MS)	具有主要糖形 G0F/G0F 的典型 IgG1 概况	N/A
同源二聚体的水平 (MS)	没有检测到 HD1 和 HD2	N/A
其他产物相关杂质的水平 (MS)	没有观察到	N/A

[0900]

mAb TMP 特征	结果	注释
N-连接 gly (非 Fc) (MS)	没有预测到或观察到	N/A
O-连接 gly 位点 (MS)	没有观察到	N/A
糖化 (相对丰度%) (MS)	HC1 (CD3), 16.7%; LC1 (CD3), 5.4%; HC2 (GPC5D×BCMA), 8.1%	糖化值表示由于由非零基线引起的过度估计的上限
游离 Cys (MS)	没有预测到或观察到	N/A
N 末端延伸/截短 (MS)	没有观察到	N/A
构象稳定性 (DSC)	$T_{m1} = 62.9^{\circ}\text{C}$; $T_{m2} = 68.3^{\circ}\text{C}$; $T_{m3} = 71.9^{\circ}\text{C}$	在 pH 6.5 的 10mM 组氨酸中测量; T_{m1} 由 CD376-Fab 结构域贡献; T_{m2} 由该分子的几个部分贡献; T_{m3} 由 CH3 结构域贡献
纯度% (2 步纯化) (AUC)	98.9% 单体	在 pH 6.5 的 10mM L-组氨酸中测量
血清稳定性 (SEC-FDS)	在 37°C 处温育 7 天后 HMW 增加约 5%	使用 Alexa488 标记的 BCMA×GPC5D×CD3 三特异性通过 SEC 进行评估
非特异性结合	没有观察到非特异性结合	N/A
等电点 (cIEF)	pI = 9.56; 酸性/主/碱性峰面积%: 46/54/0	N/A
相对疏水性 (aHIC)	低疏水性 (疏水性指数 0.38), 但峰宽且拖尾	N/A
粘度	6.3cP	在 pH 6.5 的 10mM L-组氨酸中以 150mg/mL 测定
2 周高浓度稳定性 (4°C 和 40°C, 靶 150mg/mL)		
在 pH 6.5 的 L-组氨酸缓冲液中的浓度和回收率%	将样品浓缩至 183.5mg/mL, 回收率为 91%	N/A
单体% (初始) (AUC)	97.5%	在 pH 6.5 的 10mM L-组氨酸中测定
单体%, 2 周, 4°C (AUC)	95.4%	在 pH 6.5 的 10mM L-组氨酸中测定
单体%, 2 周, 40°C (AUC)	62.8%	在 pH 6.5 的 10mM L-组氨酸中测定
化学 (PTM) 和物理稳定性		

[0901]

mAb TMP 特征	结果	注释
强制降解后的完整 MS (MS)	化学氧化处理导致每个 HC 发生 4 次氧化。在生理应激下，从所有结构域观察到片段。脱酰胺应激主要产生来自 GPRC5D 的片段，尽管也观察到来自 BCMA scFv 的 2 个片段。	N/A
强制降解后的尺寸 (aSEC)	完整单体%: 释放= 100.0; * 生理= 96.0; 热= 63.7; pH 8.5 = 83.2; pH 5.0 = 99.3; pH 3.5 = 100.0; Chem Ox = 98.5; 金属 Ox = 97.6	随时间推移，在 40℃ 的高浓度处聚集的增加是明显的，并且需要后续制剂研究以减轻聚集倾向。在 pH 8.5 和生理应激后观察到剪切。
纯度强制降解 (R 和 NR GXII)	完整 NR GXII%: 释放= 100; 生理= 82; 热= 99; pH 8.5 = 82; pH 5.0 = 99; pH 3.5 = 100; Chem Ox = 100; 金属 Ox = 100	在 pH 8.5 和生理应激后观察到剪切。
强制降解后的 CD3 结合 (SPR)	亲和力 (M) / 活性%: 释放= 2.51×10^{-8} / 100; 生理= 1.93×10^{-8} / 82; 热= 2.58×10^{-8} / 100; pH 8.5 = 2.16×10^{-8} / 93; pH 5.0 = 2.26×10^{-8} / 88; pH 3.5 = 2.17×10^{-8} / 94; Chem Ox = 2.27×10^{-8} / 93; 金属 Ox = 2.33×10^{-8} / 98	在所有测试的应激条件下保留对 CD3 的亲和力。在 pH 8.5 应激后活性物质%的减少。
强制降解后的 BCMA 结合 (SPR)	亲和力 (M) / 活性%: 释放= 2.12×10^{-10} / 100; 生理= 1.43×10^{-10} / 110; 热= 2.81×10^{-10} / 137; pH 8.5 = 1.60×10^{-10} / 114; pH 5.0 = 2.07×10^{-10} / 154; pH 3.5 = 1.75×10^{-10} / 116; Chem Ox = 5.37×10^{-11} / 131; 金属 Ox = 2.15×10^{-10} / 110	N/A

[0902]

mAb TMP 特征	结果	注释
基础氧化水平	在 M94 (GC5B680 scFv LCDR3) 中为 2.4%; 在 M166 (GC5B680 scFv HCDR1) 中为 1.3%; 在 M232 (GC5B680 scFv HCDR3) 中为 1.9%; 在 M600 (BCMB519 scFv LCDR3) 中为 4.4%	N/A
Met/Trp (氧化应激时的变化)	在 M94 (GC5B680 scFv LCDR3) 中为 96.9%; 在 M166 (GC5B680 scFv HCDR1) 中为 14.0%; 在 M232 (GC5B680 scFv HCDR3) 中为 14.3%; 在 M600 (BCMB519 scFv LCDR3) 中为 99.2%	N/A
基础脱酰胺水平	在 CDR 中<1%	N/A
脱酰胺位点 (应激时的变化)	没有显著变化	N/A
基础异构化水平	在 CDR 中<1%	N/A
异构化位点 (应激时的变化)	CD3B376 HCDR1 中的 11.7% D27 异构化; BCMB519 scFv LCDR3 中的 5.3% D731 异构化	注意: 在所有 CD3B376 候选物中观察到在 pH 应激下的 D27 异构化, 并且被认为不影响活性。

[0903] AAS, L234A、L235A和D265S; Ab, 抗体; aHIC, 分析型疏水相互作用色谱法; aSEC, 分析型尺寸排阻色谱法; AUC, 分析型超速离心; bt, 生物素化的; CDR, 互补决定区; Chem Ox, 化学氧化; cIEF, 毛细管等电聚焦; cy或cyno, 食蟹猴; Cys, 半胱氨酸, DSC, 差示扫描量热法; EC₅₀, 50%有效浓度; Fab, 抗原结合片段; Fc, 可结晶片段; FcRn, 新生儿Fc受体; FDS, 荧光检测系统; gly, 糖基化; h, 人; HC, 重链; HCDR, 重链互补决定区; HD, 同源二聚体; HDX, 氢氘交换; HMW, 较高分子量; Ig, 免疫球蛋白; k_a, 缔合常数; K_p, 平衡解离常数; LC, 轻链; LCDR, 轻链互补决定区; mAb, 单克隆抗体; Met, 甲硫氨酸; 金属Ox, 用金属氧化; MS, 质谱; N/A, 未评估; NME, 新分子实体; NR GXII, 非还原型毛细管电泳; PBS, 磷酸盐缓冲盐水; pI, 等电点; PS20, 聚山梨醇酯20; ref, 参考; RGXII, 还原型毛细管电泳; scFv, 单链可变片段; SEC, 尺寸排阻色谱法; SPR, 表面等离子共振; T_m, 熔融温度; TMP, 目标医学产品; Trp, 色氨酸。

[0904] 表19B: BGCB491中结合臂的附加特征

[0905]

先导物参数		特性
BCMA: BCMB519	亲和力	$K_D = 0.28\text{nM}$, 作为 scFv (SPR) $EC_{50} = 2.3\text{nM}-3.2\text{nM}$, 作为 scFv (H929 和 MM.1R)
	表位	线性表位 a.a.17-26 (LLHACIPCQL)
	功能	阻断 BAFF 和 APRIL 的结合 [#] 无激动活性 [#]
GPRC5D: GC5B680	亲和力	$EC_{50} = 6\text{nM}-24\text{nM}$, 作为 Fab (H929 和 MM.1R)
CD3: CD3B376	亲和力	$EC_{50} = 3.4\mu\text{M}^*$ (T 细胞)
	表位	CD3ε 链的 N 末端表位 a.a.22-35 (QDGNEEMGGITQTP)
脱靶概况	Retrogenix	CLEAN, 无脱靶命中 (BCMA 和 GPRC5D 结合物)

[0906] *T细胞:在测试的最高 $2\mu\text{M}$ 浓度处,由于不饱和结合曲线,基于固定点外推测定的 EC_{50}

[0907] 实施例10:BGCB491的靶臂和CD3臂结合表征

[0908] BGCB491的内源性肿瘤细胞系结合

[0909] 流式细胞术用于评估BGCB491的BCMA和GPRC5D臂在体外的结合。在 37°C 温育1小时后,对一组H929-WT、H929-BCMA-KO、H929-GPRC5D-KO和H929-BCMA/GPRC5D-KO细胞系测试BGCB491和同种型对照。

[0910] BGCB491示出了对WT以及每个敲除(KO)系的特异性结合,证实了每个单独的靶结合臂的结合(图25,表20)。

[0911] 表20:来自5个独立实验的BGCB491的H929 WT和KO套件结合的 EC_x 值

[0912]

	运行 1	运行 2	运行 3	运行 4	运行 5	中值
H929-WT						
EC_{20} (nM)	15	NFC	N/A	4	8	8
EC_{50} (nM)	270	NFC	N/A	34	66	66

[0913]	EC ₉₀ (nM)	25,000	NFC	N/A	878	1,912	1,912
	H929-BCMA-KO (GPCR5D 臂)						
	EC ₂₀ (nM)	NFC	19	NFC	NFC	NFC	NFC
	EC ₅₀ (nM)	NFC	66	NFC	NFC	NFC	NFC
	EC ₉₀ (nM)	NFC	489	NFC	NFC	NFC	NFC
	H929-GPCR5D-KO (BCMA 臂)						
	EC ₂₀ (nM)	33	17	23	10	12	17
	EC ₅₀ (nM)	210	54	224	50	53	54
	EC ₉₀ (nM)	3,900	345	7,900	645	535	645

[0914] EC_x, x%有效浓度;KO,敲除;Med,中值;N/A,未评估;NFC,非完全曲线;WT,野生型。

[0915] 对三特异性抗体BGCB491进行24小时动力学结合实验。流式细胞术用于评估H929 WT和MM.1R WT细胞系在50nM、10nM、2nM处在整个24小时37℃温育内的结合动力学(参见图40)。如图40所示,在24小时时段内,在两种细胞系上观察到稳定的结合曲线。

[0916] BGCB491的原代T细胞结合

[0917] 流式细胞术用于评估BGCB491与来自7个不同健康人的CD3⁺泛T细胞的CD3臂(即,CD3B376)结合。由于在1小时时缺乏饱和和动力学,不能确定CD3B376的基于细胞的EC₅₀(图26)。使用CD3B376xNu11对照抗体(即,GCDB381)分子进行生物信息学外推法(图27),其在2μM最高浓度剂量响应内饱和,以限制非线性回归曲线的顶部,从而生成能够估计EC_x值(表21)的完整曲线。

[0918] 表21:基于来自生物信息学外推的固定饱和点估计BGCB491与T细胞结合的EC_x值

[0919]	供体	估计的 EC ₂₀ (μM)	95%置信区间	估计的 EC ₅₀ (μM)	95%置信区间
	D203727	0.222	(0.193, 0.255)	3.37	(3.01, 3.77)
	D316144	0.279	(0.237, 0.329)	4.99	(4.26, 5.85)
	D327645	0.188	(0.153, 0.230)	3.36	(2.86, 3.94)
[0920]	中值	0.222		3.37	

[0921] EC_x, x%有效浓度;D,供体。

[0922] 尽管使用了弱CD3结合臂,但BGCB491在3个泛T细胞供体上对Incucyte进行的动力学细胞毒性测定中,在120小时内,以1:1和1:3的E:T比率显示出强大的亚皮摩尔效力和最大细胞毒性。在时程细胞毒性测定中,Incucyte S3用于评估BGCB491在3个泛T细胞供体的H929-GFP细胞中在120小时内的动力学靶细胞毒性和T细胞活化曲线。除了以1:3的E:T比率(图42)测试的最低浓度(10pM)外,BGCB491在所有浓度处在约72小时时达到显著的最大细胞毒性。从动力学图中,对于1:1的E:T比率(图43)和1:3的E:T比率(图44),提取了在72小时、93小时和120小时时间点的细胞溶解百分比和T细胞活化的信息。BGCB491在两种E:T比率中都显示出强大的亚皮摩尔杀伤效力(表22)。在实施例12中说明更深入的细胞毒性表

征。

[0923] 表22:在动力学杀伤测定中来源于H929-GFP细胞溶解百分比的平均EC_x值

	E:T 1:1		E:T 1:3	
	72 小时		93 小时	
[0924]	EC ₂₀ (pM)	2.1	1.1	
	EC ₅₀ (pM)	12.7	6.3	
	EC ₉₀ (pM)	212.6	93	
	93 小时		120 小时	
	72 小时		93 小时	
[0924]	EC ₂₀ (pM)	0.7	1.6	
	EC ₅₀ (pM)	0.9	5.5	
	EC ₉₀ (pM)	1.4	39	
	120 小时			
[0924]	EC ₂₀ (pM)	0.4	2.3	
	EC ₅₀ (pM)	0.7	5.2	
	EC ₉₀ (pM)	1.8	18.9	

[0925] EC_x, x%有效浓度;E:T,效应物与靶的比率;GFP,绿荧光蛋白。

[0926] 总之,BGCB491是靶向具有1个结合臂的TCRC3D和具有剩余2个结合结构域的肿瘤细胞表面抗原BCMA或GPCR5D的全人三特异性mAb。BGCB491显示出可接受的内在生物物理特性,并与所有测试的表达BCMA、GPCR5D和双BCMA-GPCR5D的细胞系结合。

[0927] 实施例11:治疗药理学

[0928] 第1部分.体外研究

[0929] BCMA和GPCR5D受体蛋白在测试细胞系中的表面表达和密度

[0930] 使用藻红蛋白(PE)标记的商业BCMA抗体和内部GPCR5D抗体,通过荧光激活细胞分选(FACS)对4个双靶(即,BCMA-GPCR5D)阳性细胞系(即,MM.1S、H929、JIM-3和OPM-2)和2个双靶阴性细胞系(即MV-4-11和OCI-AML-3)的亚群的蛋白质表达进行表征。与同种型对照相比,所有靶阳性细胞系的表达模式都有显著变化,而靶阴性细胞系未能显示任何表达(表23)。选择这6种在其表面上具有不同水平的靶蛋白表达的细胞系用于进一步的体外和体内功能测定。

[0931] 表23:测试细胞系中BCMA和GPCR5D受体密度的汇总

	细胞系	GPCR5D (测定- 1)	GPCR5D (测定- 2)	GPCR5D (平均 值)	BCMA (测定- 1)	BCMA (测定- 2)	BCMA (平 均值)
[0932]	MM.1S	2,091	4,899	3,495	1,870	2,237	2,053
	H929	2,443	1,995	2,219	6,955	6,908	6,932
	OPM-2	12,109	8,159	10,134	5,703	4,411	5,057
	JIM-3	1,438	1,528	1,483	922	1,533	1,228
	MV-4-11	37	92	64	72	52	62
	OCI-AML-3	19	67	43	89	85	87

[0933] 使用QuantiBRITE试剂盒在靶阳性细胞和靶阴性细胞上定量的靶受体密度。上文列出的单个值和2个单独实验的平均值。

[0934] BGCB491与表达内源性BCMA-GPCR5D的细胞系的结合

[0935] 接下来,通过应用流式细胞术方法测定BGCB491 (BCMA×GPCR5D×CD3三特异性

mAb) 结合曲线。BGCB491和BCMAxGPRC5DxNu11对照抗体以剂量依赖性方式结合至表达BCMA-GPRC5D的MM细胞 (EC_{50} 值:MM.1S, 33.39nM; H929, 185.50nM; JIM-3, 78.45nM; OPM-2, 10.07nM; 图41), 而CD3xNu11xNu11对照抗体显示在这些细胞上没有显著的结合。测试的抗体中没有一个是与双靶阴性细胞系MV-4-11和OCI-AML-3结合, 表明BGCB491特异性。

[0936] BGCB491介导的MM细胞系的T细胞依赖性细胞毒性和T细胞活化

[0937] 使用基于FACS的方法, T细胞介导的细胞毒性测定用于评估BGCB491的体外细胞毒性和T细胞活化潜力。使用来自6个健康供体的泛T细胞 ($CD3^+$) 对各种细胞系 (BCMA-GPRC5D双阳性: MM.1S、H929、JIM-3、OPM-2; 和BCMA-GPRC5D双阴性: MV-4-11和OCI-AML-3) 测试BGCB491。因为Fc受体在一些测试的细胞上表达, 所以在测定中添加2mg/mL的Fc阻断剂。另外, BCMAxGPRC5DxNu11和CD3xNu11xNu11用作阴性对照。BGCB491在温育72小时后在体外有效地杀死BCMA-GPRC5D双阳性细胞系 (图28A, 表24)。发现BGCB491是一种有效的三特异性抗体, 如通过 $CD3^+CD25^+$ 活T细胞在所有双靶阳性细胞系中所测量, 细胞毒性的 EC_{50} 值范围为0.002nM至0.312nM, 以及T细胞活化的 EC_{50} 值范围为0.008nM至1.070nM。如预期的那样, 仅用双靶阳性细胞观察到伴随的T细胞活化 (图28B, 表24)。当用双靶阴性细胞系MV-4-11和OCI-AML-3测试时, BGCB491没有诱导细胞毒性或T细胞活化, 证明了细胞毒性特异性。除了MM.1S细胞系外, BCMAxGPRC5DxNu11和CD3xNu11xNu11对照没有显示出显著的细胞毒性, 其中CD3xNu11xNu11抗体在高浓度 (>100nM) 时显示出一些活性。

[0938] 表24: 使用来自多个健康供体的T细胞的细胞毒性和T细胞活化的 EC_x 值的汇总

	MM.1S	H929	JIM-3	OPM-2	MV-4-11	OCI-AML-3
	细胞毒性					
[0939] EC_{20} (nM)	0.001	0.002	0.094	0.009	NA	NA
EC_{50} (nM)	0.002	0.005	0.312	0.019	NA	NA
EC_{90} (nM)	0.012	0.015	2.078	0.058	NA	NA
最大细胞毒性 (%)	92.580	94.470	61.220	81.320	NA	NA
	CD3 T 细胞活化					
EC_{20} (nM)	0.002	0.002	0.242	0.006	NA	NA
EC_{50} (nM)	0.010	0.008	1.070	0.062	NA	NA
EC_{90} (nM)	0.145	0.057	11.303	2.726	NA	NA
[0940] 最大活化 (%)	75.030	85.900	30.850	45.950	NA	NA

[0941] EC_x , x%有效浓度; NA, 无活性。

[0942] 显示了每个细胞系的来自6个T细胞供体的细胞毒性和T细胞活化的平均 EC_x 值。 EC_x 值是以供体作为随机效应从4PL模型事后估计的。使用delta方法计算95%置信区间。非线性混合效应R软件包用于模型拟合。

[0943] H929 CRISPR敲除细胞产生和靶表达

[0944] BCMA和GPRC5D受体蛋白在CRISPR敲除H929细胞系中的表达和密度

[0945] 接下来, 为了评估BGCB491杀死单靶表达细胞的潜力, 在细胞毒性测定中使用H929成簇的规律间隔的短回文重复序列 (CRISPR) KO细胞系 (即, H929-BCMA-KO和H929-GPRC5D-KO)。如图25的图例中所述, 对这些细胞进行序列确认, 并使用PE标记的商业BCMA抗体和内

部PE标记的GPCR5D抗体通过FACS对蛋白质表达进行表征。表达谱表明在H929-BCMA-KO细胞系中BCMA表达的完全敲除和在H929-GPCR5D-KO细胞系中GPCR5D表达的完全敲除。

[0946] BGCB491介导的H929 CRISPR KO克隆细胞系的细胞毒性和T细胞活化

[0947] 接下来,使用来自4个健康供体的泛T细胞 (CD3⁺) 在CRISPRKO和野生型 (WT) 细胞系 (即,H929-WT、H929-GPCR5D-KO和H929-BCMA-KO) 上测试BGCB491抗体,以使用基于FACS的方案评估其克隆耗竭潜力。另外,BCMAxGPCR5DxNu11和CD3xNu11xNu11用作阴性对照。BGCB491有效地杀死所有3种细胞系 (即,H929-WT、H929-GPCR5D-KO和H929-BCMA-KO) ,并在温育72小时后体外活化T细胞 (图29)。由于亲合力,与单靶表达CRISPR KO细胞系相比,BGCB491在双靶表达H929-WT细胞中表现出显著的效力。BCMAxGPCR5DxNu11和CD3xNu11xNu11没有显示出显著的细胞毒性或T细胞活化。使用4个不同健康T细胞供体的平均EC₅₀值汇编在表25A中。特立妥单抗 (BCMA×CD3双特异性抗体) 和塔奎妥单抗 (GPCR5D×CD3双特异性抗体) 用作阳性对照并如预期的那样表现。表25B显示了H929细胞的每个细胞的受体密度值。

[0948] 表25A:使用CRISPR KO H929细胞的细胞毒性和T细胞活化的BGCB491 EC₅₀值的汇总

估计值	BGCB491	CD3xNullxNu11	BCMAxGPCR5DxNull	特立妥单抗	塔奎妥单抗
细胞毒性					
H929-WT					
EC ₅₀ (nM)	0.007	NA	NA	0.275	0.243
最大细胞毒性 (%)	93.012	NA	NA	92.072	92.741
H929-GPCR5D-KO					
EC ₅₀ (nM)	0.330	NA	NA	0.198	NA
最大细胞毒性 (%)	94.243	NA	NA	93.017	NA
H929-BCMA-KO					
EC ₅₀ (nM)	4.789	NA	NA	NA	0.761
最大细胞毒性 (%)	65.822	NA	NA	NA	84.664
CD3 T 细胞活化					
H929-WT					
EC ₅₀ (nM)	0.011	NA	NA	0.334	0.233
最大细胞毒性 (%)	82.147	NA	NA	80.196	85.399
H929-GPCR5D-KO					
EC ₅₀ (nM)	0.487	NA	NA	0.253	NA
最大细胞毒性 (%)	81.084	NA	NA	79.450	NA
H929-BCMA-KO					
EC ₅₀ (nM)	4.131	NA	NA	NA	0.633
最大细胞毒性 (%)	63.379	NA	NA	NA	78.888

[0950] CRISPR,成簇的规律间隔的短回文重复序列;EC₅₀,50%有效浓度;E:T,效应物与靶;Fc,可结晶片段;KO,敲除;NA,无活性。

[0951] 显示了每个细胞系 (H929-WT、H929-GPRC5D-KO和H929-BCMA-KO) 的来自4个T细胞供体的细胞毒性和T细胞活化的平均 EC_{50} 值。 EC_{50} 值是以供体作为随机效应从4PL模型事后估计的。使用delta方法计算95%置信区间。非线性混合效应R软件包用于模型拟合。特立妥单抗和塔奎妥单抗用作阳性对照。

[0952] 表25B:H929细胞的受体密度

[0953]	细胞		H929-WT	H929-GPRC5D-KO	H929-BCMA-KO
	受体密度	BCMA	5381	3926	1
		GPRC5D	1574	19	957

[0954] BGCB491对掺入健康人全血中的双靶阳性H929细胞的细胞毒和T细胞活化潜力(MABEL测定)

[0955] MABEL测定用于表征BGCB491在更具生理相关性的环境中的作用。这里,将双靶阳性H929细胞添加到人健康全血中以建立细胞毒性、T细胞活化和细胞因子参数。H929细胞系是基于其在人全血环境中48小时的相容性而选择的。BGCB491在温育48小时后在该共培养的全血测定中有效地杀死双靶阳性H929细胞并活化T细胞(图30)。当使用来自7个不同健康供体的全血进行测试时,BGCB491的细胞毒性的平均 EC_{50} 值为0.274nM以及 $CD3^+$ T细胞活化的平均 EC_{50} 值为0.376nM(表26)。BCMAxGPRC5DxNull和 $CD3$ xNullxNull没有显示出显著的细胞毒性或T细胞活化。使用来自3个不同全血供体的基于10-plex中尺度发现(MSD)的方案对细胞因子进行定量(图31,表27)。阳性对照特立妥单抗和塔奎妥单抗显示出比活性。

[0956] 表26:用于MABEL测定的细胞毒性和T细胞活化 EC_x 值(nM)

[0957]		BGCB491	CD3x Nullx Null	BCMAx GPRC5D x Null	特立妥单抗	塔奎妥单抗
		细胞毒性				
	EC_{20}	0.063 (0.027, 0.146)	NA	NA	1.273 (0.715, 2.268)	1.272 (0.843, 1.919)
	EC_{30}	0.112 (0.049, 0.253)	NA	NA	1.549 (0.877, 2.733)	1.744 (1.186, 2.566)
	EC_{50}	0.274 (0.123, 0.612)	NA	NA	2.106 (1.196, 3.707)	2.866 (1.978, 4.151)
	EC_{90}	2.804 (1.142, 6.883)	NA	NA	4.675 (2.513, 8.699)	10.379 (6.471, 16.646)
	最大值	49.765 (41.946, 57.583)	NA	NA	50.309 (41.780, 58.837)	44.761 (35.940, 53.582)
[0957]		$CD3^+$ T 细胞活化				
	EC_{20}	0.042 (0.018, 0.098)	NA	NA	1.043 (0.692, 1.574)	0.677 (0.436, 1.050)

[0958]	EC ₃₀	0.098 (0.043, 0.223)	NA	NA	1.378 (0.926, 2.051)	0.927 (0.624, 1.377)
	EC ₅₀	0.376 (0.168, 0.839)	NA	NA	2.135 (1.446, 3.152)	1.521 (1.052, 2.199)
	EC ₉₀	12.150 (4.684, 31.514)	NA	NA	6.641 (4.249, 10.378)	5.491 (3.196, 9.436)
	最大值	43.685 (34.087, 53.282)	NA	NA	37.993 (31.416, 44.570)	40.780 (33.202, 48.357)
	CD4 ⁺ T 细胞活化					
	EC ₂₀	0.031 (0.013, 0.071)	NA	NA	0.830 (0.529, 1.302)	0.585 (0.370, 0.924)
	EC ₃₀	0.069 (0.030, 0.156)	NA	NA	1.124 (0.733, 1.725)	0.812 (0.540, 1.220)
	EC ₅₀	0.248 (0.110, 0.556)	NA	NA	1.814 (1.199, 2.744)	1.361 (0.934, 1.982)
	EC ₉₀	6.820 (2.815, 16.522)	NA	NA	6.263 (3.781, 10.375)	5.191 (2.921, 9.224)
	最大值	52.423 (44.614, 60.232)	NA	NA	48.005 (41.702, 54.308)	52.079 (45.784, 58.374)
	CD8 ⁺ T 细胞活化					
	EC ₂₀	0.034 (0.016, 0.071)	NA	NA	0.903 (0.632, 1.291)	0.506 (0.337, 0.760)
	EC ₃₀	0.068 (0.034, 0.138)	NA	NA	1.189 (0.840, 1.683)	0.693 (0.472, 1.018)
	EC ₅₀	0.206 (0.105, 0.406)	NA	NA	1.831 (1.300, 2.577)	1.137 (0.784, 1.648)
	EC ₉₀	3.674 (1.550, 8.708)	NA	NA	5.610 (3.837, 8.201)	4.102 (2.585, 6.508)
	最大值	61.800 (51.931, 71.669)	NA	NA	63.628 (57.194, 70.062)	66.038 (59.506, 72.571)

[0959] EC_x, x%有效浓度;E:T,效应物与靶;MABEL,最小预期生物效应水平;Max,最大值;NA,无活性。

[0960] 将BGCB491在靶细胞(H929)存在的情况下以各种浓度添加到全血中并温育48小时。将靶细胞以5:1的最佳E:T比率掺入全血中。使用7个健康人供体全血样品(供体ID:10145、10403、10420、10083、10463、10493和10145)进行该研究。EC_x值是以供体作为随机效应从4PL模型事后估计的。使用delta方法计算95%置信区间(在括号之间表示)。非线性混合效应R软件包用于模型拟合。最大细胞毒性/活化值是百分比。

[0961] 表27:用于MABEL测定的单个细胞因子EC₅₀值。

细胞 因子	BGCB491		特立妥单抗		塔奎妥单抗		
	EC ₅₀ (nM)	Max (95% CI) (pg/mL)	EC ₅₀ (n M)	Max (95% CI) (pg/mL)	EC ₅₀ (nM)	Max (95% CI) (pg/mL)	
[0962]	INF- γ	0.172	24,856.5	0.99 4	32,357.6	2.144	35,384.7
	TNF- α	0.398	886.8	1.72 1	819.9	3.474	935.7
	IL-1 β	0.156	36.5	1.62 1	35.1	1.336	30.2
	IL-2	0.585	1,385.4	1.40 9	1,270.2	3.911	1,725.4
	IL-4	0.156	14.4	1.52 9	15.1	1.408	11.9
	IL-6	0.104	572.3	1.23 5	549.8	1.209	440.7
	IL-10	0.924	472.6	7.69 4	495.6	1.2	365.8
	IL-13	0.254	144.4	0.76 9	146.3	0.832	145.7

[0963] 95%CI,95%置信区间;EC₅₀,50%有效浓度;IL,白介素;IFN,干扰素;MABEL,最小预期生物效应水平;Max,最大浓度;MSD,中尺度发现;TNF,肿瘤坏死因子。

[0964] 收集来自上述细胞毒性实验(图30,3个T细胞供体)的H929细胞上清液,并使用基于MSD的多重测定法(目录号:K15049D)分析细胞因子水平。最大细胞因子水平表示为pg/mL(括号之间为95%置信区间)。

[0965] BGCB491介导的MM患者骨髓CD138⁺细胞的细胞毒性

[0966] 为了评估BGCB491在来自MM患者的原代样品中的效力,使用来自4名不同MM患者的冷冻骨髓单核细胞和来自健康供体的T细胞在细胞毒性测定中测试了该三特异性mAb。将等量的外源性T细胞和骨髓单核细胞(即,100,000;E:T比率=1:1)混合并与BGCB491、CD3xNu11xNu11、特立妥单抗或塔奎妥单抗温育48小时。使用基于流式细胞术的方法测量抗体介导的浆细胞耗竭和T细胞活化潜力。在与健康正常T细胞共培养48小时后,BGCB491以剂量依赖性方式诱导所有患者样品的CD138⁺浆细胞耗竭(图32)。如预期的那样,T细胞活化数据与细胞毒性数据良好地相关。该数据证实,在离体共培养测定中,BGCB491对原代MM骨髓细胞具有细胞毒性。浆细胞耗竭和T细胞活化的供体特异性EC_x值列在表28中。在3个样品中测试了CD3xNu11xNu11对照抗体,该样品具有足够的细胞用于所有4个分子,并在较高浓度(>1nM)处显示出一些最小的非特异性浆细胞耗竭和T细胞活化。特立妥单抗和塔奎妥单抗用作阳性对照并如预期的那样表现。

[0967] 表28:使用原代MM骨髓单核细胞的细胞毒性和T细胞活化的BGCB491 EC_x值的汇总

EC _x	细胞毒性			T 细胞活化		
	BGCB491	特立妥单抗	塔奎妥单抗	BGCB491	特立妥单抗	塔奎妥单抗
BM MNC ID 编号 626						
EC ₂₀ (nM)	0.281	0.164	0.080	0.062	0.196	0.081
EC ₃₀ (nM)	0.598	0.242	0.169	0.139	0.320	0.126
EC ₅₀ (nM)	1.961	0.443	0.545	0.488	0.689	0.255
EC ₉₀ (nM)	42.630	2.138	11.300	12.760	5.047	1.582
BM MNC ID 编号 649						
EC ₂₀ (nM)	0.345	0.111	0.387	0.005	0.090	0.068
EC ₃₀ (nM)	0.650	0.200	0.713	0.028	0.201	0.118
EC ₅₀ (nM)	1.762	0.506	1.858	0.381	0.712	0.278
EC ₉₀ (nM)	23.400	5.599	22.310	330.900	19.050	2.586
BM MNC ID 编号 652						
EC ₂₀ (nM)	0.073	约 0.6316	0.304	0.005	0.106	0.015
EC ₃₀ (nM)	0.108	约 0.7015	0.482	0.009	0.137	0.024
EC ₅₀ (nM)	0.202	约 0.7440	0.990	0.019	0.204	0.051
EC ₉₀ (nM)	1.017	约 0.9663	6.421	0.153	0.576	0.334
BM MNC ID 编号 653						
EC ₂₀ (nM)	0.071	0.114	0.203	0.013	0.033	0.028
EC ₃₀ (nM)	0.145	0.223	0.482	0.030	0.064	0.058
EC ₅₀ (nM)	0.446	0.641	1.877	0.120	0.179	0.181
EC ₉₀ (nM)	8.183	9.900	63.680	4.355	2.627	3.407
平均值						
EC ₂₀ (nM)	0.192	0.130	0.244	0.021	0.106	0.048
EC ₃₀ (nM)	0.375	0.222	0.461	0.051	0.180	0.082
EC ₅₀ (nM)	1.093	0.530	1.317	0.252	0.446	0.191
EC ₉₀ (nM)	18.808	5.879	25.928	87.042	6.825	1.977

[0970] BM,骨髓;EC_x,x%有效浓度;E:T,效应物与靶;MM,多发性骨髓瘤;MNC,单核细胞。

[0971] 将BGCB491在健康T细胞存在的情况下以1:1的E:T比率以不同浓度添加到MM BM MNC中,并温育48小时。使用4个MM患者骨髓样品(供体ID:MMBMMNC-626、649、652和653)进行该研究。在该实验中,使用特立妥单抗和塔奎妥单抗作为阳性对照。EC_x值是以供体作为随

机效应从4PL模型事后估计的。使用delta方法计算95%置信区间。非线性混合效应R软件包用于模型拟合。

[0972] BGCB491在不同E:T比率和温育时间处的细胞毒性潜力

[0973] 此外,使用T细胞介导的细胞毒性测定测试了BGCB491靶细胞的细胞毒性潜力,该测定具有几种E:T比率和不同的温育时间,以了解其在临床环境中耗竭骨髓瘤细胞的能力。作为测试细胞系,将H929细胞在BGCB491、BCMAxGPRC5DxNu11和CD3xNu11xNu11存在的情况下与T细胞(供体ID:20063323)混合以获得5:1、3:1、1:1和0.5:1的E:T比率,并进行72小时的温育。对于时程实验,选择3:1和1:1的E:T比率在温育24、48、72、96、120、144和168小时进行测试。在H929细胞中,BCMA和GPRC5D的每个细胞的受体密度分别为5381和1574。BGCB491在所有用细胞毒性和T细胞活化的可比EC₅₀值测试的E:T比率处有效地杀死H929细胞(图33A,表29)。BGCB491从测试的最早时间点(24小时)开始引发靶细胞细胞毒性,并且其效力和功效随时间增加直至72小时温育,在温育时其几乎达到平台期(图33B)。BGCB491在所有测试时间点有效地杀死H929细胞,细胞毒性的EC₅₀值范围在0.001nM至0.022nM之间,以及T细胞活化的EC₅₀值范围在0.005nM至0.067nM之间(3:1E:T比率)。对于1:1E:T比率测定,细胞毒性的EC₅₀值范围在0.004nM至0.025nM之间,以及T细胞活化的EC₅₀值范围在0.006nM至0.083nM之间(图33B,表30)。该数据表明三特异性mAbBGCB491是非常有效的,并且可以在T细胞计数有限的情况下受益。然而,在0.5:1的较低E:T比率处,最大细胞毒性百分比比72小时温育测定中测试的其他条件下低得多(约20%)。在这些较低的T细胞计数下,观察较长的温育时间是否可以改善最大细胞毒性将是令人感兴趣的。在单独的研究中,BGCB491显示与来自多个供体的表达CD3的原代人T细胞的可测量的低亲和力结合(图26),H929细胞在1:1和1:3的E:T比率处均具有强大的细胞毒性(图43、图44)。

[0974] 表29:在E:T比率测定中细胞毒性和T细胞活化的BGCB491 EC_x值的汇总

	E:T 比率	EC _x	细胞毒性	CD3 ⁺ T 细胞活化
[0975]	5:1	EC ₂₀ (nM)	0.007	0.008
		EC ₅₀ (nM)	0.014	0.022
		EC ₉₀ (nM)	0.040	0.097
	3:1	EC ₂₀ (nM)	0.006	0.005
		EC ₅₀ (nM)	0.023	0.027
		EC ₉₀ (nM)	0.192	0.343
	1:1	EC ₂₀ (nM)	0.008	0.004
		EC ₅₀ (nM)	0.038	0.031
		EC ₉₀ (nM)	0.445	0.993
	0.5:1	EC ₂₀ (nM)	0.013	0.005
		EC ₅₀ (nM)	0.088	0.033
		EC ₉₀ (nM)	1.919	0.662

[0976] CD,分化簇;EC_x,x%有效浓度;E:T,效应物与靶。

[0977] BGCB491在来自1个健康供体(供体ID:20063323)的泛T细胞存在的条件下以不同的E:T比率(5:1、3:1、1:1和0.5:1)测试72小时。测量靶细胞死亡和T细胞活化,并表示为细胞毒性百分比和CD25⁺CD3⁺T细胞百分比。EC_x值是以供体作为随机效应从4PL模型事后估计的。使用delta方法计算95%置信区间。非线性混合效应R软件包用于模型拟合。

[0978] 表30:在时程测定中细胞毒性和T细胞活化的BGCB491 EC_x值的汇总

[0979]

终点	EC _x	温育时间（小时）						
		24	48	72	96	120	144	168
E:T 比率 3:1								
细胞毒性	EC ₂₀ (nM)	0.005	0.002	0.001	0.001	0	0.001	0.001
	EC ₅₀ (nM)	0.022	0.006	0.002	0.001	0.001	0.002	0.001
	EC ₉₀ (nM)	0.258	0.033	0.007	0.004	0.005	0.004	0.003
CD3 ⁺ T 细胞活化	EC ₂₀ (nM)	0.011	0.004	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001
	EC ₅₀ (nM)	0.067	0.015	0.007	0.006	0.005	0.01	0.008
	EC ₉₀ (nM)	1.255	0.121	0.064	0.087	0.102	0.307	0.385
E:T 比率 1:1								
细胞毒性	EC ₂₀ (nM)	0.004	0.003	0.002	0.001	0.002	0.003	0.003
	EC ₅₀ (nM)	0.019	0.025	0.007	0.004	0.004	0.006	0.006
	EC ₉₀ (nM)	0.224	0.585	0.039	0.017	0.013	0.017	0.019
CD3 ⁺ T 细胞活化	EC ₂₀ (nM)	0.008	0.004	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003
	EC ₅₀ (nM)	0.083	0.024	0.009	0.006	0.006	0.009	0.01
	EC ₉₀ (nM)	3.117	0.448	0.086	0.047	0.04	0.056	0.066

[0980] CD, 分化簇; EC_x, x% 有效浓度; E:T, 效应物与靶。

[0981] 对于时程测定, 使用4个不同的T细胞供体 (供体ID: 20062105、20063309、20061963和20063310) 以3:1和1:1的E:T比率在不同时间点 (24小时、48小时、72小时、96小时、120小时、144小时和168小时) 测试BGCB491。测量靶细胞死亡和T细胞活化, 并表示为细胞毒性百分比和CD25⁺CD3⁺T细胞百分比。EC_x值是以供体作为随机效应从4PL模型事后估计的。使用delta方法计算95%置信区间。非线性混合效应R软件包用于模型拟合。

[0982] BGCB491在不存在靶细胞的情况下对T细胞活化的影响

[0983] 为了评估BGCB491是否在不存在靶结合的情况下促进不想要的T细胞活化, 测试了BGCB491在T细胞活化测定中的作用。在第一项研究中, 将6个正常健康供体T细胞样品在不同浓度的BGCB491存在的情况下温育72小时 (图34A)。在第二项研究中, 使用更具生理相关性的测定形式, 其中BCMA-GPRC5D阳性细胞在健康人全血中不存在, 并且在此将BGCB491以不同浓度添加到6个正常健康供体全血样品中48小时 (图34B)。然后通过流式细胞术对CD25阳性CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺T细胞或各种血细胞 (图34C; 中性粒细胞、单核细胞、B细胞、NK细胞、浆母细胞) 的细胞死亡百分比进行评分来测量T细胞活化和细胞毒性作用。在不存在表达BCMA-GPRC5D的靶细胞的情况下, BGCB491对T细胞的活化或对非特异性细胞死亡没有显著影响 (图34B和C)。在浓度>10nM时观察到最小的T细胞活化。

[0984] 第2部分. 体内研究

[0985] 在RPMI 8226 (研究A) 和H929-CRISPR-KO (研究B) 人MM异种移植物中评估BGCB491的抗肿瘤功效。为了提供用于移植人肿瘤和人T细胞的合适宿主,将雌性NSG (即,非肥胖糖尿病[NOD]重症联合免疫缺陷[scid] γ 或NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) 小鼠用于两项研究。

[0986] 在研究A中,小鼠在第0天SC植入RPMI 8226细胞。在肿瘤细胞移植后第18天腹膜内(IP) 移植人泛T细胞。从第19天开始IP施用媒介物、BGCB491、特立妥单抗或塔奎妥单抗的治疗,并且每周持续两次,共8次治疗。研究B作为预防研究在第-1天IP注射人扩增的泛T细胞进行。在第0天,在NSG小鼠的左侧腹SC植入H929-BCMA-KO细胞,同时在右侧腹SC植入H929-GPRC5D-KO细胞。在第1天开始用媒介物 (即,磷酸盐缓冲盐水[PBS])、BGCB491、特立妥单抗和塔奎妥单抗治疗,并且每周施用两次,共7次治疗。

[0987] 在研究A (回归模型) 中,在第38天计算RPMI 8226异种移植物的 Δ 肿瘤生长抑制(TGI) 百分比,此时>70%的媒介物治疗的对照动物仍在研究中。在RPMI 8226细胞中,BCMA和GPRC5D的每个细胞的受体密度分别为2317和486。用0.4mg/kg (对于20克小鼠相当于约8 μ g)、1mg/kg (20 μ g/小鼠) 和2.5mg/kg (50 μ g/小鼠) 的BGCB491观察到统计学显著的 Δ TGI,分别导致90.5%、106.2%和111.2%的 Δ TGI值 (对于所有组与媒介物对照, $p < 0.05$) (图35)。0.1mg/kg (2 μ g/小鼠) 的最低剂量导致38.4% Δ TGI ($p = 0.035$),这被认为是无效的。与PBS处理的对照小鼠相比,特立妥单抗抑制肿瘤生长,分别地 Δ TGI在0.4mg/kg处为85%, Δ TGI在1mg/kg处为105.6%以及 Δ TGI在2.5mg/kg处为111.9%,而以2.5mg/kg给予的塔奎妥单抗抑制RPMI 8226肿瘤生长,为77.2% Δ TGI (对于所有组与PBS处理的对照, $p < 0.05$)。

[0988] 在RPMI 8226模型中,BGCB491介导的肿瘤消退在治疗停止后持续观察超过2周。在第60天 (即最后一次给药后19天) 评估与初始肿瘤负荷相比的肿瘤消退百分比 (TR)。用1mg/kg和2.5mg/kg的BGCB491观察到肿瘤消退,导致TR值分别为80.27% ($p < 0.0001$) 和100% ($p < 0.0001$)。0.4mg/kg剂量在第60天具有28.7% TR,但没有统计学显著性。同样,特立妥单抗在1mg/kg时引发的TR为68.88% ($p = 0.0025$),在2.5mg/kg时引发的TR为100% ($p < 0.0001$)。在72小时温育测定中使用RPMI 8226细胞的体外测试中,BGCB491显示出与单独的特立妥单抗或塔奎妥单抗相比类似的细胞毒性曲线,没有累加效应。

[0989] 在研究B (预防性模型) 中,在肿瘤植入后第22天计算TGI百分比,此时>70%的动物仍在研究中。与PBS处理的对照相比,用0.1mg/kg、0.25mg/kg和0.5mg/kg的BGCB491观察到针对BCMA-KO肿瘤的统计学上显著的TGI,分别导致89.2%、91.1%和83.6%的TGI (所有 p 值 < 0.05 ;图36)。特立妥单抗在两个测试的剂量水平 (0.1mg/kg, 17.2% TGI;和0.25mg/kg, 19.9% TGI) 处均无功效,而塔奎妥单抗在0.1mg/kg和0.25mg/kg剂量水平处均100%抑制肿瘤生长 ($p < 0.05$)。针对GPRC5D-KO肿瘤,BGCB491治疗在0.1mg/kg、0.25mg/kg和0.5mg/kg剂量水平处产生100% TGI的显著功效 (对于所有组, $p < 0.05$)。0.025mg/kg剂量具有22.09% TGI的较小效果,其不被认为是生物学显著的 (34)。特立妥单抗在0.1mg/kg和0.25mg/kg两种剂量水平处均以100% TGI抑制H929-GPRC5D-KO肿瘤生长 ($p < 0.05$),塔奎妥单抗没有效果。在H929 BCMA-KO细胞中,BCMA和GPRC5D的每个细胞的受体密度分别为1和957。在H929GPRC5D-KO细胞中,BCMA和GPRC5D的每个细胞的受体密度分别为3926和19。

[0990] 治疗后对动物进行监测,直到出现移植物抗宿主病 (GvHD) 相关发病的迹象,此时对动物实施安乐死,并且研究结束。

[0991] 总之,三特异性mAb BGCB491在许多MM细胞系中表现出功效,并且能够耗竭表达单靶或双靶的克隆群体。BGCB491还能够在如全血测定的更生理的环境中杀死靶表达细胞。重要的是,BGCB491能够以剂量依赖性方式耗竭MM患者浆细胞。BGCB491功效也反映在体内小鼠异种移植模型中肿瘤生长的显著减少中。最后,没有非特异性T细胞活化或靶阴性细胞的细胞毒性。这些结果表明BGCB491在治疗MM患者中可能具有显著的治疗潜力。

[0992] 在进一步的体内研究中,在MM.1S(研究C)人MM异种移植瘤中评估BGCB491的抗肿瘤功效。为了提供用于移植人肿瘤和人T细胞的合适宿主,将雌性NSG(即,非肥胖糖尿病[NOD]重症联合免疫缺陷[scid] γ 或NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ)小鼠用于该研究。

[0993] 在研究C中,小鼠在第0天SC植入MM.1S细胞。在肿瘤细胞移植后第13天腹膜内(IP)移植人扩增的泛T细胞,并且从第15天开始IP施用媒介物、BGCB491、特立妥单抗或塔奎妥单抗的治疗,并且每周持续两次,共7次治疗。

[0994] 在肿瘤植入后第34天计算肿瘤生长抑制(TGI)百分比,此时>70%的动物仍在研究中。与PBS处理的对照相比,用0.025mg/kg、0.1mg/kg、0.5mg/kg和1mg/kg的BGCB491观察到针对MM.1S肿瘤的统计学上显著的TGI,分别导致66.9%、91.2%、99.7%和100%的TGI(所有p值<0.05;图45)。特立妥单抗在两个测试的剂量水平(0.1mg/kg,73.7%TGI;和0.5mg/kg,92.3%TGI(p<0.05)处抑制肿瘤生长。塔奎妥单抗是有效的,TGI在0.025mg/kg处为90.9%以及在0.1mg/kg处为99.4%(p<0.05)。

[0995] 治疗停止后2周内BGCB491介导的肿瘤消退。在第51天(最后一次给药后14天)评估与初始肿瘤负荷相比的肿瘤消退百分比(TR)。用0.5mg/kg和1mg/kg的BGCB491观察到肿瘤消退,导致各自100%的TR值(8个建立的肿瘤的完全消退中的8个)。0.4mg/kg剂量在第60天具有28.7%TR,但没有统计学显著性。特立妥单抗没有引起任何肿瘤消退,但0.1mg/kg的塔奎妥单抗导致建立的MM.1S肿瘤的100%TR。

[0996] 实施例12:治疗剂对人和其他物种的亲合力

[0997] CD3结合臂(即,CD3B376)结合至食蟹猴CD3。简而言之,在将人和食蟹猴外周血单核细胞(PBMC)与GCDB381(即,二价IgG1-AAS抗体中的CD3B376Fab)、CD3B891(即,CD3B376xNu11、IgG1-AAS双特异性抗体)或空白对照温育后,通过流式细胞术测量结合。

[0998] BCMA(BCMB601,含有BCMB519 scFv)结合臂不结合至食蟹猴BCMA(表19A)。

[0999] 作为BGCB463分子的一部分,评估GPCR5D(即,GC5B680)和BCMA结合臂对食蟹猴的交叉反应性,该分子使用与BGCB491相同的结合臂。使用基于FACS的细胞与稳定表达人或食蟹猴GPCR5D或BCMA的K562在37℃处结合1小时,对两个靶结合scFv臂对食蟹猴的交叉反应性进行分析。GC5B680 scFv臂的基于细胞的EC₅₀值针对表达人GPCR5D的细胞为约30nM,以及对表达食蟹猴GPCR5D的细胞弱约10倍(约400nM)。相反,BCMB519 scFv臂的基于细胞的EC₅₀值对于人BCMA为约145nM,而直至2μM都没有可检测的与食蟹猴BCMA的结合。

[1000] 实施例13:脱靶毒性评估

[1001] 分别使用RetrogenixTM细胞微阵列(未观察到脱靶倾向)和功能选择性TAA⁻细胞系测定来评估由于脱靶结合或与肿瘤-抗原-结合臂相关的功能活性引起的潜在风险。

[1002] BGCB491的CD3臂的选择性通过在不存在靶表达细胞的情况下缺乏细胞毒性和T细胞活化来证明(图34A至图34C;参见实施例12)。

[1003] GPCR5D脱靶结合评估

[1004] GPRC5D结合物(GC5B1257.001,抗GPRC5D GC5B680 scFv-Fc)在筛选与单独表达5,868个全长人质膜和细胞表面束缚的人分泌蛋白(包括所有已知的G蛋白偶联受体C5家族亚型D[GPRC5]家族成员)和371个异源二聚体的文库的固定HEK293细胞的结合时,被确定为与其原代靶GPRC5D特异性结合。没有鉴定出脱靶相互作用,证明了BGCB491中含有的GPRC5D结合结构域的靶特异性。

[1005] BCMA脱靶结合评估

[1006] BCMA结合物(BCMB601.001,抗BCMA BCMB519 scFv-Fc)在筛选与单独表达5,475个全长人质膜和细胞表面束缚的人分泌蛋白和371个异源二聚体的文库的固定HEK293细胞的结合时,被确定为与其原代靶BCMA(TNFRSF17)特异性结合。没有鉴定出脱靶相互作用,证明了BGCB491中含有的BCMA结合结构域的靶特异性。

[1007] 肿瘤相关抗原阴性细胞系中的功能选择性

[1008] BGCB491的抗原特异性在体外功能测定中使用一组5种癌细胞系来进一步表征,该癌细胞系缺乏GPRC5D、BCMA和CD3的表达(如通过流式细胞术所证实),但通过转录组学预测表达>50%的已知细胞表面蛋白。在与健康供体来源的T细胞的共培养研究中,当将BGCB491添加到与表达GPRC5D和BCMA的靶细胞(即,H929细胞)的共培养物中时,评估其对粒酶B、干扰素(IFN)- γ 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 和白介素(IL)-2的抗体依赖性、T细胞介导的细胞因子释放的诱导。这些数据可以支持BGCB491对GPRC5D和BCMA的抗原特异性。

[1009] 实施例14:局部耐受性

[1010] 在PK研究中评估在用0.1mg/kg或0.01mg/kg BGCB491 SC在2mL至2.5mL中分别以0.05mg/mL和0.5mg/mL处理的小型猪的皮肤反应(参见实施例16中的哥廷根小型猪药代动力学)。没有观察到皮肤反应。

[1011] 实施例15:临床前物种中的药代动力学

[1012] 小鼠药代动力学

[1013] 在以0.5mg/kg和0.1mg/kg单次IV注射后,在NSGMM.1S异种移植小鼠模型中对BGCB491的血清和肿瘤PK特性进行表征。

[1014] 食蟹猴药代动力学

[1015] 在雌性食蟹猴(n=3)中进行单剂量非GLP PK研究后,对BGCB491的PK特性进行表征。BGCB491以0.5mg/kg(10mM组氨酸,pH 6.5)的剂量水平IV施用于食蟹猴。来自MSD的合格电化学发光免疫测定(ECLIA)用于定量总BGCB491的浓度。通过最大血清浓度($C_{\text{最大}}$)和1次给药间隔的血清浓度与时间曲线下面积(AUC)评估的BGCB491全身药物暴露量在表31中示出,并且BGCB491血清浓度在图37中说明。

[1016] 表31:在食蟹猴(第2组;n=3只/组)中单次IV给予0.5mg/kg后的单个和平均(SD)总BGCB491 PK参数估计

	ID	$C_{\text{最大}}$	AUC _{最后}	AUC _{无穷大}	CL	V_z	$T_{1/2}$
[1017]							

	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g} \cdot \text{天} / \text{mL}$)	($\mu\text{g} \cdot \text{天} / \text{mL}$)	($\text{mL/天} / \text{kg}$)	(mL/kg)	(天)
2501	9.39	35.61	35.81	13.96	74.51	3.70
2502	8.49	32.73	32.95	15.17	137.01	6.26
[1018] 2503	9.22	47.95	48.74	10.26	126.52	8.55
平均值	9.03	38.76	39.17	13.13	112.68	6.17
SD	0.48	8.08	8.41	2.56	33.47	2.43

[1019] $\text{AUC}_{\text{无穷大}}$, 外推至无穷大的血清浓度-时间曲线下面积; $\text{AUC}_{\text{最后}}$, 截至最后一个采样点的血清浓度-时间曲线下面积; CL, 全身清除率; $C_{\text{最大}}$, 最大血清浓度; IV, 静脉注射; PK, 药代动力学; SD: 标准偏差; $T_{1/2}$, 终末相消除半衰期; V_z , 总全身清除率。

[1020] 哥廷根小型猪药代动力学

[1021] 在雄性哥廷根小型猪 ($n=4$ 只/组) 中进行单剂量非GLPPK研究后, 对BGCB491的PK特性进行表征。BGCB491以0.1mg/kg的剂量水平IV施用于小型猪或以0.1mg/kg或0.01mg/kg的剂量水平SC施用于小型猪 (10mM组氨酸, pH6.5)。来自MSD的合格ECLIA用于定量总BGCB491的浓度。小型猪PK研究用于估计BGCB491的吸收速率 (k_a) 和SC生物可利用率 (F) 参数。药物暴露量 ($C_{\text{最大}}$ 和 $\text{AUC}_{\text{无穷大}}$) 在0.01mg/kg至0.1mg/kg的剂量范围内以近似剂量比例的方式随剂量增加。通过 $C_{\text{最大}}$ 和1次给药间隔的AUC评估的BGCB491全身药物暴露量在表32中示出, 并且BGCB491血清浓度在图39A中说明。

[1022] 表32: 在雄性小型猪 ($n=4$ 只/组) 中单剂量BGCB491后的单个和平均 (SD) 总BGCB491 PK参数估计

ID	$C_{\text{最大}}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$T_{\text{最大}}^a$ (天)	$\text{AUC}_{\text{最后}}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{天} / \text{mL}$)	$\text{AUC}_{\text{无穷大}}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{天} / \text{mL}$)	CL ($\text{mL/天} / \text{kg}$)	V_z (mL/kg)	$T_{1/2}$ (天)
第1组: 0.01mg/kg SC							
1001	0.0512	2.00	0.9688	1.3280	-	-	15.80
1002	0.0515	0.25	0.3699	0.5884	-	-	6.73
1003	0.0473	3.00	0.5145	1.0341	-	-	12.54
1004	0.0587	1.00	0.5769	0.9630	-	-	10.12

	平均值	0.0522	1.50	0.6075	0.9784	-	-	11.30
	SD	0.0047	0.25-3.00	0.2560	0.3042	-	-	3.83
	第 2 组: 0.1mg/kg SC							
	2001	0.6308	2.00	10.1287	13.5595	-	-	15.22
	2002	0.6264	2.00	7.1009	9.1614	-	-	8.23
	2003	0.4533	7.00	5.4560	7.9707	-	-	9.52
	2004	0.4717	4.00	5.9607	11.4536	-	-	14.90
	平均值	0.5455	3.00	7.1616	10.5363	-	-	11.97
	SD	0.0962	2.00-7.00	2.0943	2.4802	-	-	3.61
	第 3 组: 0.1mg/kg IV							
	3001	1.6311	-	6.1690	8.5061	11.7563	97.0290	5.72
	3002	1.8074	-	13.3265	20.4865	4.8813	154.0263	21.87
	3003	1.8519	-	6.7074	9.8693	10.1324	95.3027	6.52
	3004	1.6333	-	11.7039	16.0389	6.2348	148.9873	16.56
	平均值	1.7309	-	9.4767	13.7252	8.2512	123.8363	12.67
	SD	0.1154	-	3.5773	5.5730	3.2273	32.0250	7.87

[1025] AUC_{∞} , 外推至无穷大的血清浓度-时间曲线下面积; AUC_{last} , 截至最后一个采样点的血清浓度-时间曲线下面积; CL, 全身清除率; C_{max} , 最大血清浓度; IV, 静脉注射; PK, 药代动力学; SD: 标准偏差; $T_{1/2}$, 终末相消除半衰期; T_{max} , 达到最大血清浓度的时间; V_z , 总全身清除率。

[1026] 所有动物的外推 $AUC > 20\%$ 。

[1027] ^a呈现了 T_{max} 的中值和范围。

[1028] 参考文献

[1029] 1Ridgway, J.B., Presta, L.G. & Carter, P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng 9, 617-621, doi:10.1093/protein/9.7.617 (1996).

[1030] 2Tustian, A.D., Endicott, C., Adams, B., Mattila, J. & Bak, H. Development of purification processes for fully human bispecific antibodies based upon modification of protein A binding avidity. MAbs 8, 828-838, doi:10.1080/19420862.2016.1160192 (2016).

[1031] 3Von Kreudenstein, T.S. 等人 Improving biophysical properties of a bispecific antibody scaffold to aid developability: quality by molecular design. MAbs 5, 646-654, doi:10.4161/mabs.25632 (2013).

[1032] 4De Groot, A.S. & Martin, W. Reducing risk, improving outcomes: bioengineering less immunogenic protein therapeutics. Clinical immunology 131, 189-201, doi:10.1016/j.clim.2009.01.009 (2009).

[1033] 5. Usmani SZ, Berdeja JG, Truppel-Hartmann A 等人 KarMMa-4: Idecabtagene vicleucel (ide-cel, bb2121), a BCMA-directed CAR T-cell therapy in high-risk newly diagnosed multiple myeloma. J Clin Oncol. 2021; 39(15_增刊): TPS8053. doi:

10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.TPS8053

[1034] 6.Berdeja JG,Krishnan AY,Oriol A等人Updated results of a phase 1, first-in-human study of talquetamab,a G protein-coupled receptor family C group 5member D(GPRC5D)x CD3 bispecific antibody,in relapsed/refractory multiple myeloma(MM).J Clin Oncol.2021;39(15_增刊):8008.doi:10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.8008

[1035] 7.Usmani SZ,Berdeja JG,Madduri D等人Ciltacabtagene autoleucel,a B-cell maturation antigen(BCMA)-directed chimeric antigen receptor T-cell(CAR-T)therapy,in relapsed/refractory multiple myeloma(R/RMM):updated results from CARTITUDE-1.J Clin Oncol.2021;39(15_增刊):8005.doi:10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.8005

[1036] 8.Maus MV,June CH.Zoom Zoom:racing CARs for multiple myeloma.Clin Cancer Res.2013;19(8):1917-1919.doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0168

[1037] 9.Darce JR,Arendt BK,Chang SK,Jelinek DF.Divergent effects of BAFF on human memory B cell differentiation into Ig-secreting cells.J Immunol.2007;178(9):5612-5622.doi:10.4049/jimmunol.178.9.5612

[1038] 10.Tai YT,Anderson KC.Targeting B-cell maturation antigen in multiple myeloma.Immunotherapy.2015;7(11):1187-1199.doi:10.2217/imt.15.77

[1039] 11.Patel DR,Wallweber HJ,Yin J等人Engineering an APRIL-specific B cell maturation antigen.J Biol Chem.2004;279(16):16727-16735.doi:10.1074/jbc.M312316200

[1040] 12.Laurent SA,HoffmannFS,KuhnPH等人 γ -Secretase directly sheds the survival receptor BCMA from plasma cells.Nat Commun.2015;6:7333.发布于2015年6月11日.doi:10.1038/ncomms8333

[1041] 13.Pillariseti K,Powers G,Luistro L等人Teclistamab is an active T cell-redirecting bispecific antibody against B-cell maturation antigen for multiple myeloma,Blood Adv.2020;4(18):4538-4549.doi:10.1182/bloodadvances.2020002393

[1042] 14.Sanchez E,Li M,Kitto A等人Serum B-cell maturation antigen is elevated in multiple myeloma and correlates with disease status and survival.Br J Haematol.2012;158(6):727-738.doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09241.x

[1043] 15.Huehls AM,Coupet TA,Sentman CL.Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy.Immunol Cell Biol.2015;93(3):290-296.doi:10.1038/icb.2014.93

[1044] 16.Strohl WR,Naso M.Bispecific T-cell redirection versus chimeric antigen receptor(CAR)-T cells as approaches to kill cancer cells.Antibodies (Basel).2019;8(3):41.发布于2019年7月3日.doi:10.3390/antib8030041

[1045] 17.ShahN,ChariA,ScottE,MezziK,Usmani SZ.B-cellmaturation antigen

(BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches. *Leukemia*. 2020; 34(4): 985-1005. doi:10.1038/s41375-020-0734-z

[1046] 18. **Bräuner**-Osborne H, Jensen AA, Sheppard PO, Brodin B, Krogsgaard-Larsen P, O'Hara P. Cloning and characterization of a human orphan family C G-protein coupled receptor GPRC5D. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1518(3): 237-248. doi:10.1016/s0167-4781(01)00197-x

[1047] 19. Atamaniuk J, Gleiss A, Porpaczy E 等人 Overexpression of G protein-coupled receptor 5D in the bone marrow is associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma. *Eur J Clin Invest*. 2012; 42(9): 953-960. doi:10.1111/j.1365-2362.2012.02679.x

[1048] 20. Frigyesi I, Adolfsson J, Ali M 等人 Robust isolation of malignant plasma cells in multiple myeloma. *Blood*. 2014; 123(9): 1336-1340.

[1049] doi:10.1182/blood-2013-09-529800

[1050] 21. Smith EL, Harrington K, Staehr M 等人 GPRC5D is a target for the immunotherapy of multiple myeloma with rationally designed CAR T cells. *Sci Transl Med*. 2019; 11(485): eaau7746. doi:10.1126/scitranslmed.aau7746

[1051] 22. Pillarisetti K, Edavettal S, **Mendonça** M 等人 A T-cell-redirecting bispecific G-protein-coupled receptor class 5 member D x CD3 antibody to treat multiple myeloma. *Blood*. 2020; 135(15): 1232-1243. doi:10.1182/blood.2019003342

[1052] 23. Verkleij CPM, Broekmans MEC, van Duin M 等人 Preclinical activity and determinants of response of the GPRC5D x CD3 bispecific antibody talquetamab in multiple myeloma. *Blood Adv*. 2021; 5(8): 2196-2215.

[1053] doi:10.1182/bloodadvances.2020003805

[1054] 24. Kodama T, Kochi Y, Nakai W 等人 Anti-GPRC5D/CD3 bispecific T-cell-redirecting antibody for the treatment of multiple myeloma. *Mol Cancer Ther*. 2019; 18(9): 1555-1564. doi:10.1158/1535-7163.MCT-18-1216

[1055] 25. Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S 等人 B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2013; 19(8): 2048-2060. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2422

[1056] 26. Seckinger A, Delgado JA, Moser S 等人 Target Expression, Generation, Preclinical Activity, and Pharmacokinetics of the BCMA-T Cell Bispecific Antibody EM801 for Multiple Myeloma Treatment. *Cancer Cell*. 2017; 31(3): 396-410. doi:10.1016/j.ccell.2017.02.002

[1057] 27. Inoue S, Nambu T, Shimomura T. The RAIG family member, GPRC5D, is associated with hard-keratinized structures. *J Invest Dermatol*. 2004; 122(3): 565-573. doi:10.1046/j.0022-202X.2004.12628.x

[1058] 28. Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B 等人 Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood*. 2011; 117(18): 4691-4695. doi:10.1182/blood-

2010-10-299487

[1059] 29.Rodriguez-Abreu D,Bordoni A,Zucca E.Epidemiology of hematological malignancies.*Ann Oncol.*2007;18增刊1:i3-i8.doi:10.1093/annonc/mdl443

[1060] 30.Michels TC,Petersen KE.Multiple myeloma:diagnosis and treatment.*Am Fam Physician.*2017;95(6):373-383.

[1061] 31.Gandhi UH,Cornell RF,Lakshman A等人Outcomes of patients with multiple myeloma refractory to CD38-targeted monoclonal antibody therapy.*Leukemia.*2019;33(9):2266-2275.doi:10.1038/s41375-019-0435-7

[1062] 32.Dimopoulos MA,San-Miguel J,Belch A等人Daratumumab plus lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma:updated analysis of POLLUX.*Haematologica.*2018;103(12):2088-2096.doi:10.3324/haematol.2018.194282

[1063] 33.Kumar SK,Callander NS,Adekola K等人Multiple Myeloma,Version 3.2021,NCCN clinical practice guidelines in oncology.*J Natl Compr Canc Netw.*2020;18(12):1685-1717.发布于2020年12月2日.doi:10.6004/jnccn.2020.0057

[1064] 34.Johnson JI,Decker S,Zaharevitz D等人Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials.*Br J Cancer.*2001;84(10):1424-1431.doi:10.1054/bjoc.2001.1796

[1065] 35.Chiu A,Xu W,He B等人Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL.*Blood.*2007;109(2):729-739.doi:10.1182/blood-2006-04-015958

[1066] 36.Avery DT,Kalled SL,Ellyard JI等人BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells[发布的更正出现在J Clin Invest.2004年4月;113(7):1069中].*J Clin Invest.*2003;112(2):286-297.doi:10.1172/JCI18025

[1067] 37.O'Connor BP,Raman VS,Erickson LD等人BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells.*J Exp Med.*2004;199(1):91-98.doi:10.1084/jem.20031330

[1068] 38.Bu DX,Singh R,Choi EE等人Pre-clinical validation of B cell maturation antigen(BCMA) as a target for T cell immunotherapy of multiple myeloma.*Oncotarget.*2018;9(40):25764-25780.发布于2018年5月25日.doi:10.18632/oncotarget.25359

[1069] 39.Carpenter RO,Evbuomwan MO,Pittaluga S等人B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma.*Clin Cancer Res.*2013;19(8):2048-2060.doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2422

[1070] 40.Laabi Y,Gras MP,Carbonnel F等人A new gene,BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma.*EMBO J.*1992;11(11):3897-3904.

[1071] 41.Laabi Y,Gras MP,Brouet JC,Berger R,Larsen CJ,Tsapis A.The BCMA

gene,preferentially expressed during B lymphoid maturation,is bidirectionally transcribed.Nucleic Acids Res.1994;22(7):1147-1154.doi:10.1093/nar/22.7.1147

[1072] 42.Kalled SL.The role ofBAFF in immune function and implications for autoimmunity.Immunol Rev.2005;204:43-54.doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00219.x

[1073] 43.Ng LG,Sutherland AP,Newton R等人B cell-activating factor belonging to the TNF family(BAFF)-R is the principal BAFF receptorfacilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells.J Immunol.2004;173(2):807-817.doi:10.4049/jimmunol.173.2.807

[1074] 44.Venkateshaiah SU,Bam R,Li X,Khan S,Ling W,Randal SS,Yaccoby S.GPRC5D is a cell surface plasma cell marker whose expression is high in myeloma cells and reduced following coculture with osteoclasts.Blood.2013;122(21):3099.doi:10.1182/blood.V122.21.3099.3099

[1075] 45.Kamperschroer C,Shenton J,Lebrec H,Leighton JK,Moore PA,Thomas O.Summary of a workshop on preclinical and translational safety assessment of CD3 bispecifics.J Immunotoxicol.2020;17(1):67-85.doi:10.1080/1547691X.2020.1729902

[1076] 46.Li J,Piskol R,YbarraR等人CD3 bispecific antibody-induced cytokine release is dispensable for cytotoxic T cell activity.Sci Transl Med.2019;11(508):eaax8861.doi:10.1126/scitranslmed.aax8861

[1077] 47.Leong SR,Sukumaran S,Hristopoulos M等人An anti-CD3/anti-CLL-1bispecific antibody for the treatment of acute myeloid leukemia.Blood.2017;129(5):609-618.doi:10.1182/blood-2016-08-735365

[1078] 48.Singh A,Dees S,Grewal IS.Overcoming the challenges associated with CD3+T-cell redirection in cancer.Br J Cancer.2021;124(6):1037-1048.doi:10.1038/s41416-020-01225-5

[1079] 49.Jain T,Litzow MR.Management of toxicities associated with novel immunotherapy agents in acute lymphoblastic leukemia.Ther Adv Hematol.2020;11:2040620719899897.发布于2020年1月20日.doi:10.1177/2040620719899897

[1080] 50.Ling J,Zhou H,Jiao Q,Davis HM.Interspecies scaling of therapeutic monoclonal antibodies:initial look.J ClinPharmacol.2009;49(12):1382-1402.doi:10.1177/0091270009337134

[1081] 51.Woo S,Jusko WJ.Interspecies comparisons of pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin Drug Metab Dispos.2007;35(9):1672-1678.doi:10.1124/dmd.107.015248

[1082] 52.Li J,Stagg NJ,Johnston J等人Membrane-proximal epitope facilitates efficient T cell synapse formation by anti-FcRH5/CD3 and is a requirement for myeloma cell killing.Cancer Cell.2017;31(3):383-395.doi:10.1016/j.ccell.2017.02.001

[1083] 53.ClinicalTrials.gov.NCT02879695:Blinatumomab and nivolumab with or

without ipilimumab in treating patients with poor-risk relapsed or refractory CD19+precursor B-lymphoblastic leukemia.<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02879695>.Accessed:23June 2021.

[1084] 54.Guillerey C,Nakamura K,Pichler AC等人Chemotherapy followed by anti-CD137 mAb immunotherapy improves disease control in a mouse myeloma model.JCI Insight.2019;5 (14):e125932.发布于2019年6月13日。doi:10.1172/jci.insight.125932

[1085] 本文引用的所有专利、已公布的专利申请和参考文献的教导内容全文以引用方式并入。

[1086] 虽然已经具体示出和描述了示例的实施方案,但是本领域的技术人员应当理解,在不脱离所附权利要求书所涵盖的实施方案的范围的前提下,可以在其中进行形式和细节上的各种改变。

序列列表SEQ ID NO: 1 CD3B376 LCDR1

TGTSSNIGTYKFVS

SEQ ID NO: 2 CD3B376 LCDR2

EVSKRPS

SEQ ID NO: 3 CD3B376 LCDR3

VSYAGSGTLL

SEQ ID NO: 4 CD3B376 HCDR1

GDSVFNNNAAWS

SEQ ID NO: 5 CD3B376 HCDR2

RTYYRSKWLYD

SEQ ID NO: 6 CD3B376 HCDR3

GYSSSFYD

SEQ ID NO: 7 CD3B376 VL

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLY

[1087] EVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLF
GGGTKLTVL

SEQ ID NO: 8 CD3B376 VH

QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWL

GRYYRSKWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYC

ARGYSSSFYDWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 9 GC5B680 LCDR1

RSSQSLVHSDGNTYLS

SEQ ID NO: 10 GC5B680 LCDR2

KISNRFF

SEQ ID NO: 11 GC5B680 LCDR3

MQATQFPHT

SEQ ID NO: 12 GC5B680 HCDR1

GFSLTNIRMSVS

SEQ ID NO: 13 GC5B680 HCDR2

HIFSNDEKS

SEQ ID NO: 14 GC5B680 HCDR3

MRLPYGMDV

SEQ ID NO: 15 GC5B680 VL

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRL
LIYKISNRFFGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATQFPH
TFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 16 GC5B680 VH

QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTNIRMSVSWIRQPPGKALEWL
AHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISRDTSKSQVVLTLTNVDPVDTATYYCARM
RLPYGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 17 BCMB519 LCDR1

RASQSISSSFLT

SEQ ID NO: 18 BCMB519 LCDR2

GASSRAT

SEQ ID NO: 19 BCMB519 LCDR3

[1088] QHYGSSPMYT

SEQ ID NO: 20 BCMB519 HCDR1

GFTFSSYAMS

SEQ ID NO: 21 BCMB519 HCDR2

AISGSGGSTY

SEQ ID NO: 22 BCMB519 HCDR3

DEGYSSGHYYGMDV

SEQ ID NO: 23 BCMB519 VL

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSSFLTWYQQKPGQAPRLLIYGA
SSRATGIPDRFSGGGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPMYTFGQG
TKLEIK

SEQ ID NO: 24 BCMB519 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
DEGYSSGHYYGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 25 接头

GGSEGKSSGSGSESKSTGGS

SEQ ID NO: 26 BGCB463 重链 1

QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWL
GRYYRSKWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYC
ARGYSSSFYDWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYPFEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVTVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTSCAVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFQKSL
LSPGK

SEQ ID NO: 27 BGCB463 轻链 1

[1089] QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLY
EVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLF
GGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA
WKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT
HEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 28 BGCB463 重链 2

DIVMTQTPLSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRL
LIYKISNRFFGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATQFPH
TFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVTLKESGPVLVKPTETLTL
TCTVSGFSLTNIRMSVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTIS
RDTSKSQVVLTLTNVDPVDTATYYCARMRLPYGMDVWGQGTTVTVSSE
PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVSVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LWCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSEGKSSGSGSESK
STGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSSFLTWYQQKPGQAPRL
LIYGASSRATGIPDRFSGGGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPMY

TFGQGTKLEIKGGSEGKSSSGSGSESKSTGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLR
LSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDEGYSSGHYYGMDVWGQ
GTTVTVSS

SEQ ID NO: 29 BGCB491 重链 1

QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWL
GRYYRSKWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYC
ARGYSSSFDFYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVTVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFTQKSLS
LSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRS
[1090] SQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKISNRFFGVDPDRFSGSGAGTDF
TLKISRVEAEDVGVYYCMQATQFPHFTGQGTKLEIKGGSEGKSSSGSGSES
KSTGGSQVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTNIRMSVSWIRQPPGK
ALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISRDTSKSQVVLTLTNVDPVDTATY
YCARMLRPGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 30 BGCB491 轻链

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLY
EVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLF
GGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA
WKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT
HEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 31 BGCB491 重链 2

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSSFLTWYQQKPGQAPRLLIYGA
SSRATGIPDRFSGGGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPMYTFGQG
TKLEIKGGSEGKSSSGSGSESKSTGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN

SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDEGYSSGHYYGMDVWGQGTTVTV
SSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
SVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 32 BCMA CDR

SGSYFWG

SEQ ID NO: 33 BCMA CDR

SIYYSGITYYNPSLKS

SEQ ID NO: 34 BCMA CDR

HDGAVAGLFDY

SEQ ID NO: 35 BCMA CDR

SSSYWG

SEQ ID NO: 36 BCMA CDR

[1091] SIYYSGSTYYNPSLKS

SEQ ID NO: 37 BCMA CDR

HDGATAGLFDY

SEQ ID NO: 38 BCMA CDR

SSSYFWG

SEQ ID NO: 39 BCMA CDR

GGNNIGSKSVH

SEQ ID NO: 40 BCMA CDR

DDSDRPS

SEQ ID NO: 41 BCMA CDR

QVWDSSSDHVV

SEQ ID NO: 42 BCMA VH

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIG

SIYYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDG

AVAGLFDYWGQGTTLVTVSSA

SEQ ID NO: 43 BCMA VH

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIG
SIYYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDG
AVAGLFDYWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO: 44 BCMA VH

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIG
SIYYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDG
ATAGLFDYWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO: 45 BCMA VH

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIG
SIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHD
GAVAGLFDYWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO: 46 BCMA VH

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIG
SIYYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDG
ATAGLFDYWGQGTLVTVSSA

[1092] SEQ ID NO: 47 BCMA VH

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIG
SIYYSGRTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHD
GATAGLFDYWGQGTLVTVSSA

SEQ ID NO: 48 BCMA VL

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYD
DSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVF
GGGTKLTVL

SEQ ID NO: 49 GPRC5D CDR

SYAIS

SEQ ID NO: 50 GPRC5D CDR

NYWMS

SEQ ID NO: 51 GPRC5D CDR

SYFIG

SEQ ID NO: 52 GPRC5D CDR

GYTMN

SEQ ID NO: 53 GPRC5D CDR

GIIPIFGTANYAQKFQG

SEQ ID NO: 54 GPRC5D CDR

GISYSGGSKYYASSVKG

SEQ ID NO: 55 GPRC5D CDR

IIYPGKSDTRYSPSFQG

SEQ ID NO: 56 GPRC5D CDR

LINPYNSDTNYAQKLQG

SEQ ID NO: 57 GPRC5D CDR

ESRWRGYKLD

SEQ ID NO: 58 GPRC5D CDR

AAFDGRRRAVRLD

SEQ ID NO: 59 GPRC5D CDR

VYSFGGRHKALFDY

SEQ ID NO: 60 GPRC5D CDR

[1093] VALRVALDY

SEQ ID NO: 61 GPRC5D CDR

RASQSISSYLN

SEQ ID NO: 62 GPRC5D CDR

RASQSVSSYLA

SEQ ID NO: 63 GPRC5D CDR

KASQNVATHVG

SEQ ID NO: 64 GPRC5D CDR

AASSLQS

SEQ ID NO: 65 GPRC5D CDR

DASNRAT

SEQ ID NO: 66 GPRC5D CDR

SASYRYS

SEQ ID NO: 67 GPRC5D CDR

QQSYSTPLT

SEQ ID NO: 68 GPRC5D CDR

QQRSNWPLT

SEQ ID NO: 69 GPRC5D CDR

QQYNRYPYT

SEQ ID NO: 70 GPRC5D CDR

DYGMH

SEQ ID NO: 71 GPRC5D CDR

SYWIG

SEQ ID NO: 72 GPRC5D CDR

GYAMS

SEQ ID NO: 73 GPRC5D CDR

SYGIS

SEQ ID NO: 74 GPRC5D CDR

GYSFTGYTMN

SEQ ID NO: 75 GPRC5D CDR

SYAMS

[1094] SEQ ID NO: 76 GPRC5D CDR

GFSLTSYNVH

SEQ ID NO: 77 GPRC5D CDR

AIKYSGGSTYYADSVKG

SEQ ID NO: 78 GPRC5D CDR

GISYSGGSKYYADSVKG

SEQ ID NO: 79 GPRC5D CDR

IIYPGDS DTRYSPSFQG

SEQ ID NO: 80 GPRC5D CDR

AISGSGGSTYYADSVKG

SEQ ID NO: 81 GPRC5D CDR

GIPIFGNINYAQKFQG

SEQ ID NO: 82 GPRC5D CDR

LINPYNGDTN

SEQ ID NO: 83 GPRC5D CDR

VIWAGGSTNYNSALMS

SEQ ID NO: 84 GPRC5D CDR
RAESGPGLDY

SEQ ID NO: 85 GPRC5D CDR
AAWDFGRRAVRLDY

SEQ ID NO: 86 GPRC5D CDR
IGFYGRSFRIFDY

SEQ ID NO: 87 GPRC5D CDR
VDRSFGRSRYTLDY

SEQ ID NO: 88 GPRC5D CDR
VSRRFKRFAYYFDY

SEQ ID NO: 89 GPRC5D CDR
SNFLPVVFDY

SEQ ID NO: 90 GPRC5D CDR
DGIRLRFAY

SEQ ID NO: 91 GPRC5D CDR

[1095] KSSQSVLYSSNNKNYLA

SEQ ID NO: 92 GPRC5D CDR
RASQSVRKSLA

SEQ ID NO: 93 GPRC5D CDR
WASTRES

SEQ ID NO: 94 GPRC5D CDR
TASN RAT

SEQ ID NO: 95 GPRC5D CDR
QQYYSTPLT

SEQ ID NO: 96 GPRC5D CDR
QQYFRAPIT

SEQ ID NO: 97 GPRC5D VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM
GGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARE
SRWRGYKLDYWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 98 GPRC5D VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWV
SGISYSGGSKYYASSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
KAAFDGRRVRLDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 99 GPRC5D VH

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYFIGWVRQMPGKGLEWMG
IIPGKSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARV
YSFGGRHKALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 100 GPRC5D VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEW
MGLINPYNSDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYY
CARVALRVALDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 101 GPRC5D VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA
SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTK
VEIK

[1096] SEQ ID NO: 102 GPRC5D VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDA
SNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGT
KVEIK

SEQ ID NO: 103 GPRC5D VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQNVATHVGWYQQKPGKAPKRLIY
SASYRYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCQQYNRYPTFGQ
GTKLEIK

SEQ ID NO: 104 GPRC5D VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWV
SAIKYSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
KRAESGPGLDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 105 GPRC5D VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWV
SGISYSGGSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
KAAWDFGRRVRLDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 106 GPRC5D VH

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWM
GIIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARI
GFYGRSFRIFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 107 GPRC5D VH

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWM
GIIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCAR
VYSFGGRHKALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 108 GPRC5D VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWV
SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
KVDRSFGRSRYTL DYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 109 GPRC5D VH

[1097]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWM
GGIIPFGNINYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARV
SRRFKRFAYYFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 110 GPRC5D VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEW
MGLINPYNGDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYY
CARVALRVALDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 111 GPRC5D VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
SNFLPVVFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 112 GPRC5D VH

QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTSYNVHWIRQPPGKALEWLAV
IWAGGSTNYNSALMSRLTISKDTSKSQVVL TMTNMRAEDTATYYCARD
GIRLRFAYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 113 GPRC5D VL

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQP
PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYYS
TPLTFGQGKVEIK

SEQ ID NO: 114 GPRC5D VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRKSLAWYQQKPGQAPRLLIYTA
SNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQYFRAPITFGQGTK
VEIKK

SEQ ID NO: 115 GPRC5D VL

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVATHVGWYQQKPGQAPRLLIYS
ASYRYSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNRYPTYTFGQG
TKLEIK

SEQ ID NO: 116 GPRC5D

MYKDCIESTGDYFLLCDAEGPWGIILESLAILGIVVTILLLLAFLFLMRKIQ
DCSQWNVLPTQLLFLLSVLGLFGLAFAFIIELNQQTAPVRYFLFGVLFALC
FSCLLAHASNLVKLVRGCVSFSWTTILCIAIGCSLLQIIATEYVTLIMTRG
MMFVNMTPCQLNVDFVLLVYVFLMALTFVSKATFCGPCENWKQHG
RLIFITVLFSSIIWVWVISMILLRGNPQFQRQPQWDDPVVCIALVTNAWVFL
LLYIVPELCILYRSCRQECPLQGNACPVTAHQHSFQVENQELSRARDSDG
AEEDVALTSYGTPIQPQTVDPTQECFIPQAKLSPQQDAGGV

SEQ ID NO: 117 CD3 CDR 1

TYAMN

SEQ ID NO: 118 CD3 CDR 2

RIRSKYNNYATYYAASVKG

SEQ ID NO: 119 CD3 CDR 3

HGNFGNSYVSWFAY

SEQ ID NO: 120 CD3 VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWV
ARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYY
CARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 121 CD3 重链

[1098]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWV
ARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYY
CARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSLGK

SEQ ID NO: 122 CD3 CDR 1

RSSTGAVTTSNYAN

SEQ ID NO: 123 CD3 CDR 2

GTNKRAP

SEQ ID NO: 124 CD3 CDR 3

[1099] ALWYSNLWV

SEQ ID NO: 125 CD3 VL

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGL
IGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLW
VFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 126 CD3 轻链

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGL
IGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLW
VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT
VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ
VTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 127 接头

GGGSGGGS

SEQ ID NO: 128 接头

GGGSGGGS

SEQ ID NO: 129 接头

GGGSGGGSGGGSGGGS

SEQ ID NO: 130 接头

GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS

SEQ ID NO: 131 接头

GGGGSGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 132 接头

GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 133 接头

GSTSGSGKPGSGEGSTKG

SEQ ID NO: 134 接头

IRPRAIGGSKPRVA

SEQ ID NO: 135 接头

GKGGSGKGGSGKGGGS

SEQ ID NO: 136 接头

GGKGS GGKGS GGKGS

[1100]

SEQ ID NO: 137 接头

GGGKSGGGKSGGGKS

SEQ ID NO: 138 接头

GKGKSGKGKSGKGKS

SEQ ID NO: 139 接头

GGGKSGGKGS GGKGGGS

SEQ ID NO: 140 接头

GKPGSGKPGSGKPGS

SEQ ID NO: 141 接头

GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS

SEQ ID NO: 142 接头

GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS

SEQ ID NO: 143 接头

STAGDTHLGGEDFD

SEQ ID NO: 144 接头

GEGGSGEGGSGEGGS

SEQ ID NO: 145 接头

GGEGSGGEGSGGEGS

SEQ ID NO: 146 接头

GEGESGEGESGEGES

SEQ ID NO: 147 接头

GGGESGGEGSGEGGS

SEQ ID NO: 148 接头

GEGESGEGESGEGESGEGES

SEQ ID NO: 149 接头

GSTSGSGKPGSGEGSTKG

SEQ ID NO: 150 接头

PRGASKSGSASQTGSAPGS

SEQ ID NO: 151 接头

GTAAAGAGAAGGAAAGAAG

SEQ ID NO: 152 接头

[1101] GTSGSSGSGSGSGSGGGG

SEQ ID NO: 153 接头

GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS

SEQ ID NO: 154 接头

GSGS

SEQ ID NO: 155 接头

APAPAPAPAP

SEQ ID NO: 156 接头

APAPAPAPAPAPAPAPAP

SEQ ID NO: 157 接头

AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKAAA

SEQ ID NO: 158 Ig1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV

HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP

KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH

EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN

GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 159 Ig1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVSVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 160 Ig4

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES
KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVDVSQEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1102]

SEQ ID NO: 161 CD3 表位

QDGNEEMGGITQTP

SEQ ID NO: 162 BCMA 表位

LLHACIPCQL

SEQ ID NO: 163 接头

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 164 BCMA CDR

SIYYSGRTYYNPSLKS

SEQ ID NO: 165 BGCB491 重链 1 基因的核苷酸序列，其中信号肽编码区加下划线。

ATGGCCAGGAAGTCCGCTCTGCTCGCTCTGGCACTTCTGCTTCTGGGA
TTTGGACCTGCTTGGGCTCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCCCTAGA

[1103]

CTCGTGCGGCCTTCCCAGACCCTGTCTCTGACCTGTGCCATCTCCGGC
GACTCCGTGTTCAACAACAACGCCGCCTGGTCCTGGATCCGGCAGTCT
CCATCTCGCGGTCTGGAGTGGCTCGGTTCGCACCTACTACCGCTCTAAA
TGGCTGTACGACTACGCCGTGTCCGTGAAGTCCCGGATCACCGTGAAC
CCTGACACCTCCCGGAACCAGTTCACCCTGCAGCTGAACTCCGTGACC
CCTGAGGACACCGCCCTGTACTACTGCGCCAGAGGCTACTCCTCCTCC
TTCGACTATTGGGGCCAAGGCACCCTCGTGACCGTGTCTCTGCCTCC
ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACC
TCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC
GAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG
CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT
CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG
TTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAG
CACCTGAAGCCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCTAAAC
CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG
TGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC
ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTGCAAC
AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGG
AGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTCTCTGCGCCGTCAAAGGCTTC
TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGG
GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCGGT
TCACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAAGGAGGCGGAGGA
TCTGGCGGAGGTGGAAGTGGCGGAGGCGGTTCTGGTGGTGGTGGATC
TGACATCGTGATGACCCAGACACCTCTGAGCAGCCCCGTTACATTGGG
CCAGCCTGCCTCCATCTCCTGCAGATCCTCTCAGTCCCTGGTGCCTCT

GACGGCAACACCTACCTCTCTTGGCTGCAGCAGAGGCCTGGACAGCC
TCCTAGACTGCTGATCTACAAGATCTCCAACCGGTTCTTCGGCGTGCC
CGACAGATTTTCTGGATCTGGCGCTGGCACCGACTTCACCCTGAAGAT
TTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGTATGCAGG
CCACACAGTTCCTCACACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCA
AGGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAA
GTCCACCGGCGGAAGCCAAGTGACCCTGAAAGAAAGCGGCCCTGTGC
TGGTCAAGCCCACCGAAACACTGACCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCT
TCTCCCTGACCAATATCCGGATGTCCGTGTCCTGGATCAGACAGCCTC
CTGGCAAGGCTCTGGAATGGCTGGCCCACATCTTCTCCAACGACGAG
AAGTCCTACTCCACCAGCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCTCCAGAGAC
ACCTCCAAGTCTCAGGTGGTGCTGACACTGACCAACGTGGACCCTGTG
GATACCGCCACCTACTACTGCGCCAGAATGAGACTGCCCTACGGCAT
GGATGTGTGGGGCCAGGGAACAACCGTGACCGTTTCTTCT

[1104]

SEQ ID NO: 166 BGC491 轻链基因的核苷酸序列，其中信号肽编码区加下划线。

ATGGCTAGATCCGCACTGCTCATTCTGGCTCTGCTTCTGCTTGGACTGT
TCTCTCCTGGAGCATGGGGACAGTCTGCTCTGACCCAGCCTGCCTCCG
TGTCTGGCTCTCCCGGCCAGTCCATCACCATCAGCTGTACCGGCACCT
CCTCCAACATCGGCACCTACAAGTTCGTGTCCTGGTATCAGCAACACC
CCGACAAGGCCCCCAAAGTGCTGCTGTACGAGGTGTCCAAGCGGCCC
TCTGGCGTGTCTCCAGATTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCAACACCGCC
TCCCTGACCATCAGCGGACTGCAGGCTGAGGACCAGGCCGACTACCA
CTGTGTGTCCTACGCTGGCTCTGGCACCCCTGCTGTTTGGCGGAGGCAC
CAAGCTGACTGTCCTGGGTCAGCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCT
GTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGT
GTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAA
GGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTCGAAACCACCACACCCT
CCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTG
ACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCAC

GCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTT
CA

SEQ ID NO: 167 BGCB491 重链 2 基因的核苷酸序列, 其中信号肽编码区加
下划线。

ATGGCCAGGAAGTCCGCTCTGCTCGCTCTGGCACTTCTGCTTCTGGGA
TTTGGACCTGCTTGGGCTGAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGGCACA
CTGTCACTGTCTCCAGGCGAGAGAGCTACCCTGTCCTGTAGAGCCAGC
CAGTCTATCTCCTCCTCCTTCCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGA
CAGGCCCCCTCGGCTGTTGATCTACGGTGCTTCTTCCAGAGCCACAGGC
ATCCCTGACAGATTCTCTGGCGGGCGGATCTGGCACCGACTTCACCCTG
ACAATCTCCCGGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAG
CACTACGGCAGCAGCCCCATGTACACATTTGGCCAGGGCACCAAGCT
GGAAATCAAGGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCG
AAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTTTCAGCTGCTGGAATCTGGC
GGAGGATTGGTTCAGCCTGGCGGTTCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCT
[1105] TCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGCTATGTCCTGGGTCCGACAGGCT
CCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCTCTGGCTCTGGCGGC
AGCACCTACTACGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCG
GGACA ACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAG
CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCTAAGGACGAGGGCTACTCC
TCCGGCCACTACTACGGAATGGATGTGTGGGGCCAGGGCACACAGT
GACAGTCTCTTCTGAGCCCAAATCTAGCGACAAA ACTCACACATGCCC
ACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT
CCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
CACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT
CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
AGGTGTCGAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC
ATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGG

TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
[1106] CGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
ATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT
GCACAACCACTACACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA

<110> JANSSEN PHARMACEUTICA NV

<120> 靶向BCMA、GPC5D和CD3的三特异性抗体

<130> PRD4124W0PCT1

<140>

<141>

<150> 63/149,921

<151> 2021-02-16

<160> 167

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 1

Thr Gly Thr Ser Ser Asn Ile Gly Thr Tyr Lys Phe Val Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 2

Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 3

Val Ser Tyr Ala Gly Ser Gly Thr Leu Leu

1	5	10
---	---	----

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 4
Gly Asp Ser Val Phe Asn Asn Asn Ala Ala Trp Ser
1 5 10
<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 5
Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Leu Tyr Asp
1 5 10
<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 6
Gly Tyr Ser Ser Ser Phe Asp Tyr
1 5
<210> 7
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”
<400> 7

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

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 8

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

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 9

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser

1 5 10 15

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 10

Lys Ile Ser Asn Arg Phe Phe

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 11

Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro His Thr

1 5

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 12

Gly Phe Ser Leu Thr Asn Ile Arg Met Ser Val Ser

1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 13

His Ile Phe Ser Asn Asp Glu Lys Ser

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 14

Met Arg Leu Pro Tyr Gly Met Asp Val

1 5

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 15

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro

35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Phe Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala 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
Thr Gln Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	

<210> 16

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 16

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Ile
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Asn Asp Glu Lys Ser Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Leu Thr Asn Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Met Arg Leu Pro Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 17

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser Phe Leu Thr
1 5 10

<210> 18

<211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 18
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5
<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 19
Gln His Tyr Gly Ser Ser Pro Met Tyr Thr
1 5 10
<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 20
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5 10
<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 21
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
1 5 10
<210> 22

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 22

Asp Glu Gly Tyr Ser Ser Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 23

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 23

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 Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Phe Leu Thr 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 Gly 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 His Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 24

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<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 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 Asp Glu Gly Tyr Ser Ser Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 25

Gly Gly Ser Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser
 1 5 10 15
 Thr Gly Gly Ser
 20

<210> 26

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 26

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Arg Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Phe Asn Asn

20	25	30
Asn Ala Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Leu Tyr Asp Tyr Ala		
50	55	60
Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Val Asn Pro Asp Thr Ser Arg Asn		
65	70	75
Gln Phe Thr Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Leu		
85	90	95
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Ser Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly		
225	230	235
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ser Val Ser His Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
325	330	335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 27
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 源
 <223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"
 <400> 27
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asn Ile Gly Thr Tyr
 20 25 30
 Lys Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Asp Lys Ala Pro Lys Val
 35 40 45
 Leu Leu Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Gln Ala Asp Tyr His Cys Val Ser Tyr Ala Gly Ser
 85 90 95
 Gly Thr Leu Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu

115	120	125
Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr	Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr	
130	135	140
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys		
145	150	155
Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr		
165	170	175
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His		
180	185	190
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys		
195	200	205
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
210	215	
<210> 28		
<211> 755		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 源		
<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”		
<400> 28		
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly		
1	5	10
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser		
20	25	30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro		
35	40	45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Phe Gly Val Pro		
50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65	70	75
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala		
85	90	95
Thr Gln Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	110
Gly Gly Ser Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser		
115	120	125
Thr Gly Gly Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val		
130	135	140

Lys	Pro	Thr	Glu	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser
145					150				155						160
Leu	Thr	Asn	Ile	Arg	Met	Ser	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly
				165					170						175
Lys	Ala	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Phe	Ser	Asn	Asp	Glu	Lys	Ser
			180					185					190		
Tyr	Ser	Thr	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser
		195					200					205			
Lys	Ser	Gln	Val	Val	Leu	Thr	Leu	Thr	Asn	Val	Asp	Pro	Val	Asp	Thr
		210				215					220				
Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Met	Arg	Leu	Pro	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
225				230					235						240
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser
				245					250						255
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly
			260					265					270		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
		275						280					285		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Ser	Val	Ser	His
		290					295						300		
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
305					310				315						320
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
				325					330						335
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
			340					345					350		
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
		355						360					365		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
		370				375					380				
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
385					390				395						400
Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
				405					410						415
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
			420					425					430		
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
		435					440					445			
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met

450	455	460
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
465	470	475
Pro Gly Lys Gly Gly Ser Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu		480
	485	490
Ser Lys Ser Thr Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly		495
	500	505
Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala		510
	515	520
Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser Phe Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro		525
530	535	540
Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr		
545	550	555
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr		
	565	570
Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys		575
	580	585
Gln His Tyr Gly Ser Ser Pro Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys		
595	600	605
Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser		
610	615	620
Glu Ser Lys Ser Thr Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly		
625	630	635
Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala		
	645	650
Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala		655
	660	665
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly		670
	675	680
Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg		685
690	695	700
Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala		
705	710	715
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Glu Gly Tyr Ser Ser		720
	725	730
Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr		735
	740	745
Val Ser Ser		750
755		

<210> 29

<211> 721

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 29

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
1				5				10						15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Val	Phe	Asn	Asn
			20					25					30		
Asn	Ala	Ala	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Lys	Trp	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Ala
	50					55				60					
Val	Ser	Val	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	Val	Asn	Pro	Asp	Thr	Ser	Arg	Asn
65					70					75				80	
Gln	Phe	Thr	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu
			85						90					95	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Tyr	Ser	Ser	Ser	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
			115					120					125		
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
		130					135					140			
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
145					150					155				160	
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
			165						170					175	
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
			180					185					190		
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
		195						200					205		
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
		210					215					220			
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly
225					230					235				240	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile

				245					250					255			
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Ser	Val	Ser	His	Glu		
				260					265					270			
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His		
				275					280					285			
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg		
				290					295					300			
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys		
305									310					315			320
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu		
				325					330					335			
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr		
				340					345					350			
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu		
				355					360					365			
Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp		
				370					375					380			
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val		
385									390					395			400
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp		
				405					410					415			
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His		
				420					425					430			
Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro		
				435					440					445			
Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
				450					455					460			
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser		
465									470					475			480
Ser	Pro	Val	Thr	Leu	Gly	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser		
				485					490					495			
Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser	Asp	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Ser	Trp	Leu	Gln		
				500					505					510			
Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Ile	Ser	Asn		
				515					520					525			
Arg	Phe	Phe	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Thr		
				530					535					540			
Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val		
545									550					555			560

Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly
 565 570 575
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser
 580 585 590
 Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr Gly Gly Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu
 595 600 605
 Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu Thr Leu Thr Leu Thr Cys
 610 615 620
 Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Ile Arg Met Ser Val Ser Trp
 625 630 635 640
 Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Phe
 645 650 655
 Ser Asn Asp Glu Lys Ser Tyr Ser Thr Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr
 660 665 670
 Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr Leu Thr Asn
 675 680 685
 Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Arg Leu
 690 695 700
 Pro Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 705 710 715 720
 Ser
 <210> 30
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 源
 <223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”
 <400> 30
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asn Ile Gly Thr Tyr
 20 25 30
 Lys Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Asp Lys Ala Pro Lys Val
 35 40 45
 Leu Leu Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Gln Ala Asp Tyr His Cys Val Ser Tyr Ala Gly Ser
 85 90 95
 Gly Thr Leu Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125
 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160
 Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175
 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190
 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 31

<211> 484

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<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 Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Phe Leu Thr 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 Gly 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 His Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser

	100		105		110
Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr Gly Gly					
115		120		125	
Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly					
130		135		140	
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser					
145		150		155	160
Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp					
	165		170		175
Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser					
180		185		190	
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu					
195		200		205	
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr					
210		215		220	
Cys Ala Lys Asp Glu Gly Tyr Ser Ser Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp					
225		230		235	240
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser					
	245		250		255
Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala					
260		265		270	
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu					
275		280		285	
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ser Val Ser					
290		295		300	
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu					
305		310		315	320
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr					
	325		330		335
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn					
340		345		350	
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro					
355		360		365	
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln					
370		375		380	
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val					
385		390		395	400
Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val					
	405		410		415

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 420 425 430
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 435 440 445
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 450 455 460
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 465 470 475 480
 Ser Pro Gly Lys
 <210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 源
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <400> 32
 Ser Gly Ser Tyr Phe Trp Gly
 1 5
 <210> 33
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 源
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <400> 33
 Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 源
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <400> 34
 His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 35

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 36

Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 37

His Asp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 38

Ser Ser Ser Tyr Phe Trp Gly

1 5
<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 39
Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
1 5 10
<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 40
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5
<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 41
Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val
1 5 10
<210> 42
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"
<400> 42

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

<210> 43

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 43

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

Trp	Ile	Gly	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
50							55					60			
Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
65						70				75				80	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	His	Asp	Gly	Ala	Val	Ala	Gly	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala						
		115					120								

<210> 46

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 46

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

<210> 47

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 47

```

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

```

<210> 48

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 48

```

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

```

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

<210> 49
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 49
Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5
<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 50
Asn Tyr Trp Met Ser
1 5
<210> 51
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 51
Ser Tyr Phe Ile Gly
1 5
<210> 52
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 52

Gly Tyr Thr Met Asn

1 5

<210> 53

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 53

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 54

Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Lys Tyr Tyr Ala Ser Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 55

Ile Ile Tyr Pro Gly Lys Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 56

Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 57

Glu Ser Arg Trp Arg Gly Tyr Lys Leu Asp

1 5 10

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 58

Ala Ala Phe Asp Phe Gly Arg Arg Ala Val Arg Leu Asp

1 5 10

<210> 59

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 59

Val Tyr Ser Phe Gly Gly Arg His Lys Ala Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 60

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 60
Val Ala Leu Arg Val Ala Leu Asp Tyr
1 5
<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 61
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 62
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 62
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 63
Lys Ala Ser Gln Asn Val Ala Thr His Val Gly
1 5 10

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 64
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5
<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 65
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5
<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 66
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5
<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 67
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5
<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 68
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5
<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 69
Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr
1 5
<210> 70
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 70
Asp Tyr Gly Met His
1 5
<210> 71
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 71

Ser Tyr Trp Ile Gly

1 5

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 72

Gly Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 73

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 73

Ser Tyr Gly Ile Ser

1 5

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 74

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn

1 5 10

<210> 75

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 75

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 76

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Asn Val His

1 5 10

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 77

Ala Ile Lys Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 78

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 78

Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 79

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 79

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 80

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 80

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 81

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 81

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Asn Ile Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 82

Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn

1 5 10

<210> 83

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 83

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser

1 5 10 15

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 84

Arg Ala Glu Ser Gly Pro Gly Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 85

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 85

Ala Ala Trp Asp Phe Gly Arg Arg Ala Val Arg Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 86

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 86

Ile Gly Phe Tyr Gly Arg Ser Phe Arg Ile Phe Asp Tyr

1	5	10
---	---	----

<210> 87
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 87
Val Asp Arg Ser Phe Gly Arg Ser Arg Tyr Thr Leu Asp Tyr
1 5 10
<210> 88
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 88
Val Ser Arg Arg Phe Lys Arg Phe Ala Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 89
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 89
Ser Asn Phe Leu Pro Val Val Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 90

Asp Gly Ile Arg Leu Arg Phe Ala Tyr

1 5

<210> 91

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 91

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 92

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 92

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Lys Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 93

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 93

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 94

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 94

Thr Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 95

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 96

Gln Gln Tyr Phe Arg Ala Pro Ile Thr

1 5

<210> 97

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 97

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Glu Ser Arg Trp Arg Gly Tyr Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	

<210> 98

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 98

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Lys Tyr Tyr Ala Ser 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 Ala Ala Phe Asp Phe Gly Arg Arg Ala Val Arg Leu Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 99

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 99

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		
Phe	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Lys	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	Val	Tyr	Ser	Phe	Gly	Gly	Arg	His	Lys	Ala	Leu	Phe	Asp	Tyr
			100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
			115					120							

<210> 100

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 100

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

100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 101		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 源		
<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"		
<400> 101		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1 5 10 15		
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr		
20 25 30		
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35 40 45		
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50 55 60		
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65 70 75 80		
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu		
85 90 95		
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100 105		
<210> 102		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 源		
<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"		
<400> 102		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1 5 10 15		
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr		
20 25 30		
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
35 40 45		

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 103

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 103

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

<210> 104

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 104

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 Asp Tyr			
	20	25	30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ser Ala Ile Lys Tyr 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 Arg Ala Glu Ser Gly Pro Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115		

<210> 105

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 105

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr			
	20	25	30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Lys 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 Ala Ala Trp Asp Phe Gly Arg Arg Ala Val Arg Leu Asp Tyr			
	100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	

<210> 106

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 106

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	Ile	Gly	Phe	Tyr	Gly	Arg	Ser	Phe	Arg	Ile	Phe	Asp	Tyr	Trp
		100					105					110			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120								

<210> 107

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 107

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

〈221〉 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 109

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

<210> 110

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 110

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

100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 111		
<211> 119		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 源		
<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"		
<400> 111		
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 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 Asn Phe Leu Pro Val Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
100 105 110		
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 112		
<211> 117		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 源		
<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"		
<400> 112		
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu		
1 5 10 15		
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr		
20 25 30		

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

<210> 113

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 113

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

Lys

<210> 114

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 114

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

<210> 115

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 115

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

100	105
<210> 116	
<211> 345	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 源	
<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"	
<400> 116	
Met Tyr Lys Asp Cys Ile Glu Ser Thr Gly Asp Tyr Phe Leu Leu Cys	
1 5 10 15	
Asp Ala Glu Gly Pro Trp Gly Ile Ile Leu Glu Ser Leu Ala Ile Leu	
20 25 30	
Gly Ile Val Val Thr Ile Leu Leu Leu Leu Ala Phe Leu Phe Leu Met	
35 40 45	
Arg Lys Ile Gln Asp Cys Ser Gln Trp Asn Val Leu Pro Thr Gln Leu	
50 55 60	
Leu Phe Leu Leu Ser Val Leu Gly Leu Phe Gly Leu Ala Phe Ala Phe	
65 70 75 80	
Ile Ile Glu Leu Asn Gln Gln Thr Ala Pro Val Arg Tyr Phe Leu Phe	
85 90 95	
Gly Val Leu Phe Ala Leu Cys Phe Ser Cys Leu Leu Ala His Ala Ser	
100 105 110	
Asn Leu Val Lys Leu Val Arg Gly Cys Val Ser Phe Ser Trp Thr Thr	
115 120 125	
Ile Leu Cys Ile Ala Ile Gly Cys Ser Leu Leu Gln Ile Ile Ile Ala	
130 135 140	
Thr Glu Tyr Val Thr Leu Ile Met Thr Arg Gly Met Met Phe Val Asn	
145 150 155 160	
Met Thr Pro Cys Gln Leu Asn Val Asp Phe Val Val Leu Leu Val Tyr	
165 170 175	
Val Leu Phe Leu Met Ala Leu Thr Phe Phe Val Ser Lys Ala Thr Phe	
180 185 190	
Cys Gly Pro Cys Glu Asn Trp Lys Gln His Gly Arg Leu Ile Phe Ile	
195 200 205	
Thr Val Leu Phe Ser Ile Ile Ile Trp Val Val Trp Ile Ser Met Leu	
210 215 220	
Leu Arg Gly Asn Pro Gln Phe Gln Arg Gln Pro Gln Trp Asp Asp Pro	
225 230 235 240	

Val Val Cys Ile Ala Leu Val Thr Asn Ala Trp Val Phe Leu Leu Leu
245 250 255
Tyr Ile Val Pro Glu Leu Cys Ile Leu Tyr Arg Ser Cys Arg Gln Glu
260 265 270
Cys Pro Leu Gln Gly Asn Ala Cys Pro Val Thr Ala Tyr Gln His Ser
275 280 285
Phe Gln Val Glu Asn Gln Glu Leu Ser Arg Ala Arg Asp Ser Asp Gly
290 295 300
Ala Glu Glu Asp Val Ala Leu Thr Ser Tyr Gly Thr Pro Ile Gln Pro
305 310 315 320
Gln Thr Val Asp Pro Thr Gln Glu Cys Phe Ile Pro Gln Ala Lys Leu
325 330 335
Ser Pro Gln Gln Asp Ala Gly Gly Val
340 345

<210> 117

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 117

Thr Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 118

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 118

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 119

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 119

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 120

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 120

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr 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 Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 121

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 121

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr 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 Ala			
50	55	60	
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser			
65	70	75	80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
85	90	95	
Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe			
100	105	110	
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr			
115	120	125	
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser			
130	135	140	
Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu			
145	150	155	160
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His			
165	170	175	
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser			
180	185	190	
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys			
195	200	205	
Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu			
210	215	220	
Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala			
225	230	235	240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
245	250	255	
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
260	265	270	
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
275	280	285	
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr			
290	295	300	
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
305	310	315	320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Gly Lys
450

<210> 122

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 122

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

<210> 123

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 123

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 124

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 125

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 125

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 Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg 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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 126

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 126

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 Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser	
	20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly	
	35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg 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
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro	
	100 105 110
Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu	
	115 120 125
Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro	
	130 135 140
Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala	
145	150 155 160
Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala	
	165 170 175
Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg	
	180 185 190
Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr	
	195 200 205
Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser	
	210 215
<210> 127	
<211> 8	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 源	
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"	
<400> 127	
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	
1	5
<210> 128	

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 128

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 129

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 129

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 130

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 130

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 131

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 131

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 132

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 132

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 133

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 133

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 134

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 134

Ile Arg Pro Arg Ala Ile Gly Gly Ser Lys Pro Arg Val Ala
1 5 10

<210> 135

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 135

Gly Lys Gly Gly Ser Gly Lys Gly Gly Ser Gly Lys Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 136

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 136

Gly Gly Lys Gly Ser Gly Gly Lys Gly Ser Gly Gly Lys Gly Ser
1 5 10 15

<210> 137

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 137

Gly Gly Gly Lys Ser Gly Gly Gly Lys Ser Gly Gly Gly Lys Ser
1 5 10 15

<210> 138

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 138

Gly Lys Gly Lys Ser Gly Lys Gly Lys Ser Gly Lys Gly Lys Ser
1 5 10 15

<210> 139

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 139

Gly Gly Gly Lys Ser Gly Gly Lys Gly Ser Gly Lys Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 140

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 140

Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

<210> 141

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 141

Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly

1 5 10 15

Lys Pro Gly Ser

20

<210> 142

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 142

Gly Lys Gly Lys Ser Gly Lys Gly Lys Ser Gly Lys Gly Lys Ser Gly

1 5 10 15

Lys Gly Lys Ser

20

<210> 143

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 143

Ser Thr Ala Gly Asp Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe Asp

1

5

10

<210> 144

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 144

Gly Glu Gly Gly Ser Gly Glu Gly Gly Ser Gly Glu Gly Gly Ser

1

5

10

15

<210> 145

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 145

Gly Gly Glu Gly Ser Gly Gly Glu Gly Ser Gly Gly Glu Gly Ser

1

5

10

15

<210> 146

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 146

Gly Glu Gly Glu Ser Gly Glu Gly Glu Ser Gly Glu Gly Glu Ser

1 5 10 15

<210> 147

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 147

Gly Gly Gly Glu Ser Gly Gly Glu Gly Ser Gly Glu Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 148

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 148

Gly Glu Gly Glu Ser Gly Glu Gly Glu Ser Gly Glu Gly Glu Ser Gly

1 5 10 15

Glu Gly Glu Ser

20

<210> 149

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 149

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 150

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 150

Pro Arg Gly Ala Ser Lys Ser Gly Ser Ala Ser Gln Thr Gly Ser Ala

1 5 10 15

Pro Gly Ser

<210> 151

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 151

Gly Thr Ala Ala Ala Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Gly

1 5 10 15

Ala Ala Gly

<210> 152

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 152

Gly Thr Ser Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly

<210> 153

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 153

Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly

1	5	10	15
Lys Pro Gly Ser			
20			
<210> 154			
<211> 4			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 源			
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”			
<400> 154			
Gly Ser Gly Ser			
1			
<210> 155			
<211> 10			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 源			
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”			
<400> 155			
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro			
1	5	10	
<210> 156			
<211> 20			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 源			
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”			
<400> 156			
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro			
1	5	10	15
Ala Pro Ala Pro			
20			
<210> 157			
<211> 32			
<212> PRT			
<213> 人工序列			

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 157

Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala
1					5					10					15
Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala
					20					25					30

<210> 158

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 158

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1					5					10					15
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
					20					25					30
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
					35					40					45
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
					50					55					60
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
					85					90					95
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
					100					105					110
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
					115					120					125
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
					130					135					140
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
					165					170					175
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu

180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
225	230	235
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330	

<210> 159

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 159

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
1	5	10
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
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
85	90	95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
100	105	110
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Ser Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
225	230	235
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330	

<210> 160

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 160

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1	5	10	15
Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr			
65	70	75	80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
85	90	95	
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
100	105	110	
Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
115	120	125	
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
130	135	140	
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
145	150	155	160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe			
165	170	175	
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
180	185	190	
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu			
195	200	205	
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
210	215	220	
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys			
225	230	235	240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
245	250	255	
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
260	265	270	
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
275	280	285	
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser			
290	295	300	
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
305	310	315	320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 161

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 161

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro

1 5 10

<210> 162

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 162

Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu

1 5 10

<210> 163

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 163

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 164

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 164

Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 165

<211> 2229

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多核苷酸"

<400> 165

atggccagga agtccgctct gctcgtcttg gcatttctgc ttctgggatt tggacctgct	60
tgggctcagg tgcagctgca gcagtctggc cctagactcg tgcggccttc ccagaccctg	120
tctctgacct gtgccatctc cggcgactcc gtgttcaaca acaacgccgc ctggctcctgg	180
atccggcagt ctccatctcg cggctctggag tggctcggtc gcacctacta ccgctctaaa	240
tggctgtacg actacgccgt gtccgtgaag tcccggatca ccgtgaacce tgacacctcc	300
cggaaccagt tcacctgca gctgaactcc gtgacctcg aggacaccgc cctgtactac	360
tgcgccagag gctactcctc ctcttcgac tattggggcc aaggcaccct cgtgacctg	420
tcctctgcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc	480
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg	540
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccggc tgtcctacag	600
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgacctgc cctccagcag cttgggcacc	660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt	720
gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaagccgcc	780
gggggaccgt cagtcttcct cttccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccg	840
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtgagc gtgagccacg aagacctga ggtcaagtcc	900
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag	960
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	1020
ggcaaggagt acaagtcaa ggtgtcgaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc	1080
atctccaaag ccaaaggga gccccgagaa ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg	1140
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg tcctgcgccg tcaaaggctt ctatcccagc	1200
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa gaccacgcct	1260
cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctgtagca agctcaccgt ggacaagagc	1320
agatggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccgg	1380
ttcacgcaga agtctctctc cctgtctccg ggaaaaggag gcggaggatc tggcggaggt	1440
ggaagtggcg gaggcggttc tgggtggtgg ggatctgaca tcgtgatgac ccagacacct	1500
ctgagcagcc ccgttacatt gggccagcct gcctccatct cctgcagatc ctctcagtcc	1560
ctggtgcaact ctgacggcaa cactacctc tcttggtgc agcagaggcc tggacagcct	1620
cctagactgc tgatctacaa gatctccaac cggttcttcg gcgtgcccga cagattttct	1680
ggatctggcg ctggcaccga cttaccctg aagatttcca gagtggaagc cgaggacgtg	1740
ggcgtgtact actgtatgca ggccacacag ttccctcaca cctttggcca gggcaccaag	1800
ctggaaatca agggcggatc tgagggaag tccagcggct ccggcagcga aagcaagtcc	1860
accggcggaa gccaaagtac cctgaaagaa agcggccctg tgctggtcaa gccaccgaa	1920

acactgaccc tgacctgtac cgtgtccggc ttctccctga ccaatatccg gatgtccgtg	1980
tcctggatca gacagcctcc tggcaaggct ctggaatggc tggcccacat cttctccaac	2040
gacgagaagt cctactccac cagcctgaag tcccggctga ccatctccag agacacctcc	2100
aagtctcagg tgggtctgac actgaccaac gtggaccctg tggataccgc cacctactac	2160
tgcgccagaa tgagactgcc ctacggcatg gatgtgtggg gccagggaac aaccgtgacc	2220
gtttcttct	2229

<210> 166

<211> 717

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多核苷酸"

<400> 166

atggctagat ccgcactgct cattctgget ctgcttctgc ttggactgtt ctctcctgga	60
gcatggggac agtctgctct gaccagcct gcctccgtgt ctggctctcc cggccagtcc	120
atcaccatca gctgtaccgg cacctcctcc aacatcgga cctacaagtt cgtgtcctgg	180
tatcagcaac accccgacaa ggccccaaa gtgctgctgt acgaggtgtc caagcggccc	240
tctggcgtgt cctccagatt ctccggctcc aagtctggca acaccgcctc cctgaccatc	300
agcggactgc aggctgagga ccaggccgac taccactgtg tgtcctacgc tggctctggc	360
accctgctgt ttggcggagg caccaagctg actgtcctgg gtcagcccaa ggctgcaccc	420
agtgtcactc tgttcccgcc ctctctgag gagcttcaag ccaacaaggc cacactggtg	480
tgtctcataa gtgacttcta cccgggagcc gtgacagtgg cctggaaggc cgatagcagc	540
cccgtcaagg cgggagtcga aaccaccaca ccctccaaac aaagcaacaa caagtacgcg	600
gccagcagct atctgagcct gacgcctgag cagtgggaagt cccacagaag ctacagctgc	660
caggtcacgc atgaaggag caccgtggag aagacagtgg cccctacaga atgttca	717

<210> 167

<211> 1518

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多核苷酸"

<400> 167

atggccagga agtccgctct gctcgtcttg gcacttctgc ttctgggatt tggacctgct	60
tgggctgaga tcgtgctgac ccagtctcct ggcacactgt cactgtctcc aggcgagaga	120
gctaccctgt cctgtagagc cagccagtct atctctcct ccttctgac ctggtatcag	180
cagaagcctg gacaggcccc tcggctgttg atctacggtg cttcttccag agccacaggc	240
atccctgaca gattctcttg cggcggatct ggcaccgact tcaccctgac aatctcccgg	300

ctggaacctg aggacttcgc cgtgtactac tgccagcact acggcagcag ccccatgtac	360
acatttggcc agggcaccaa gctggaaatc aagggcggat ctgagggaaa gtccagcggc	420
tccggcagcg aaagcaagtc caccggcgga agcgaggttc agctgctgga atctggcgga	480
ggattggttc agcctggcgg ttctctgaga ctgtcttggt ccgcttccgg cttcaccttc	540
tccagctacg ctatgtcctg ggtccgacag gtcctggca aaggactgga atgggtgtcc	600
gccatctctg gctctggcgg cagcacctac tacgccgatt ctgtgaaggg cagattcacc	660
atcagccggg acaactccaa gaacaccctg tacctgcaga tgaactccct gagagccgag	720
gacaccgccg tgtactactg tgctaaggac gagggtact cctccggcca ctactacgga	780
atggatgtgt ggggccaggg caccacagt acagtctctt ctgagcccaa atctagcgac	840
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagccg ccggggggacc gtcagtcttc	900
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc	960
gtggtggtga gcgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	1020
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	1080
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	1140
aaggtgtcga acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg	1200
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac	1260
caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatcca gcgacatcgc cgtggagtgg	1320
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac	1380
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcagatggca gcagggaac	1440
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagtctctc	1500
tcctgtctc cgggaaaa	1518

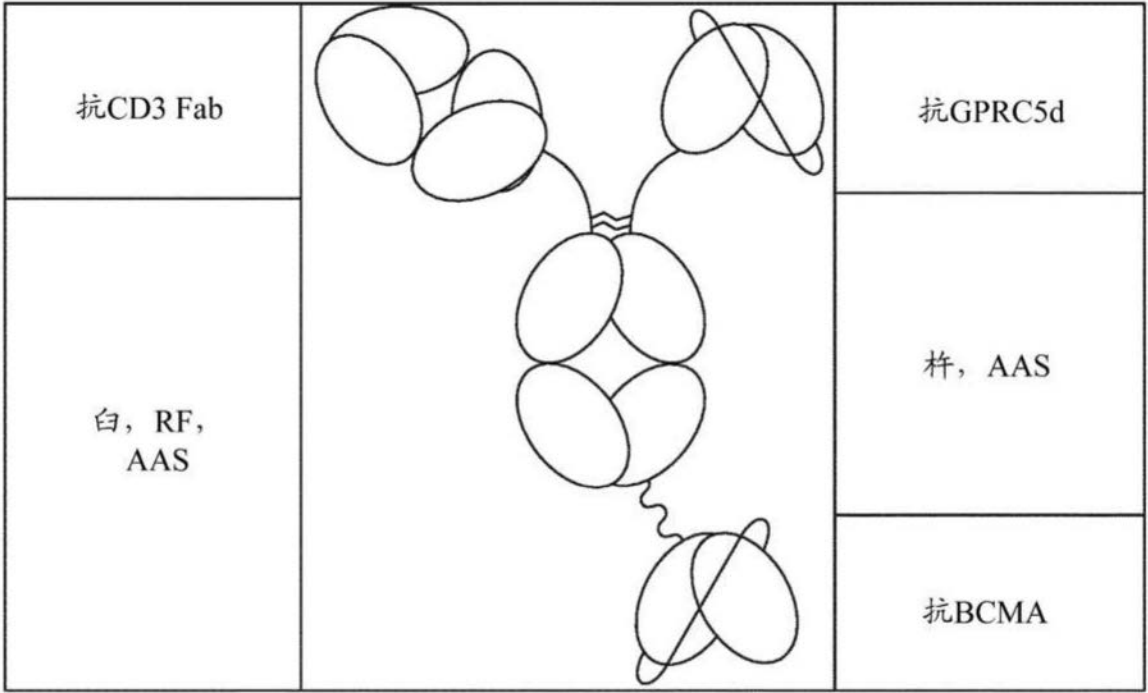


图1A

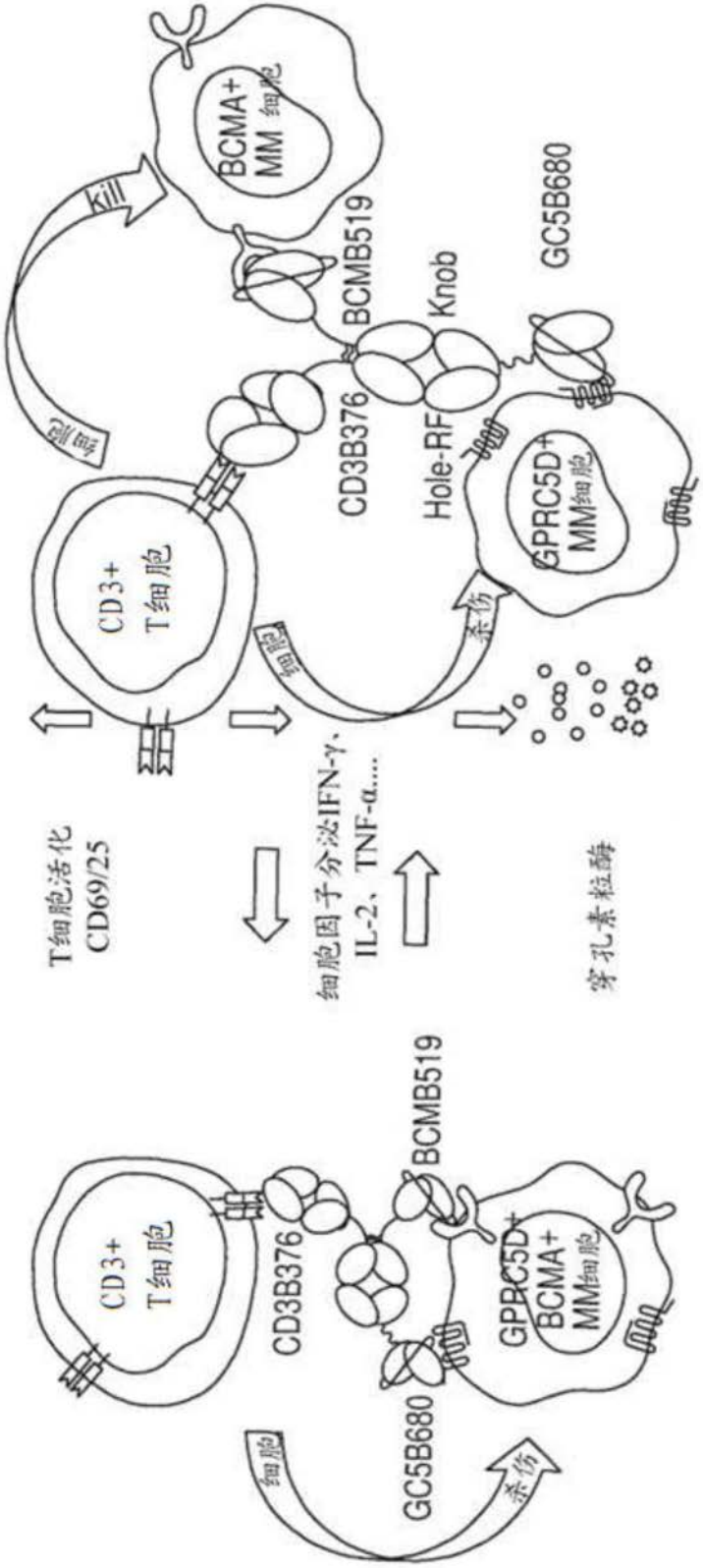


图1B

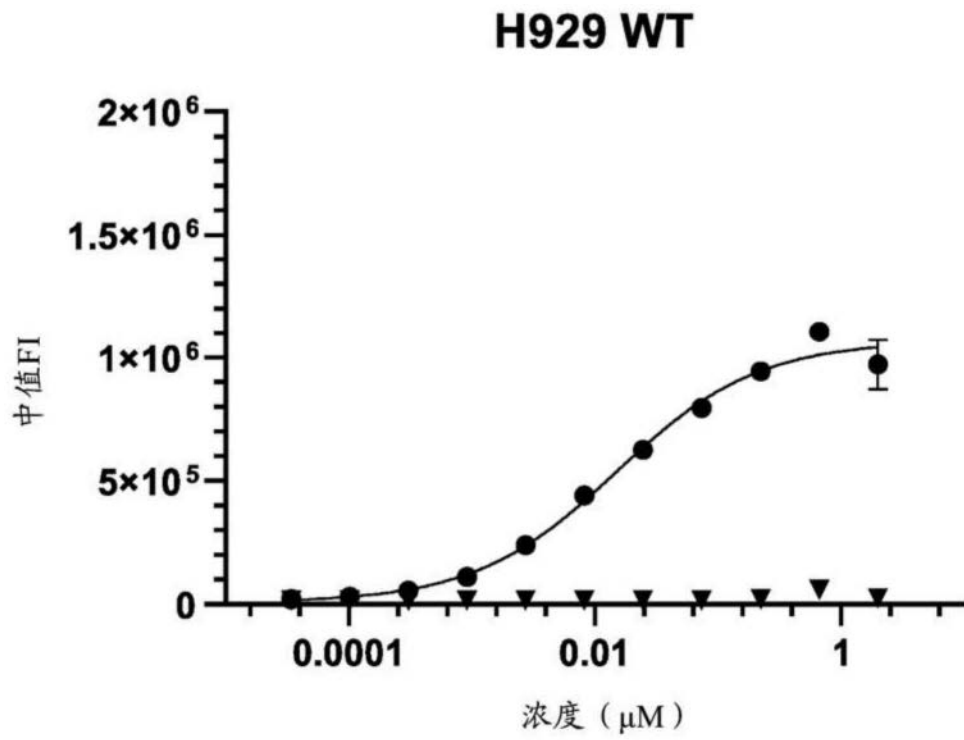


图2A

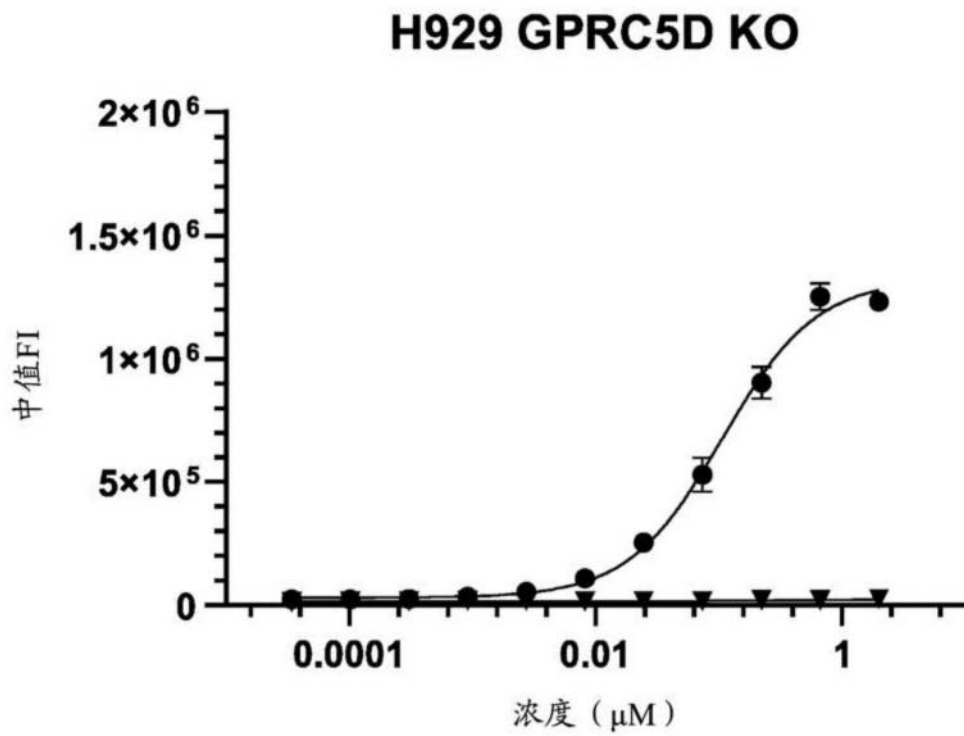


图2B

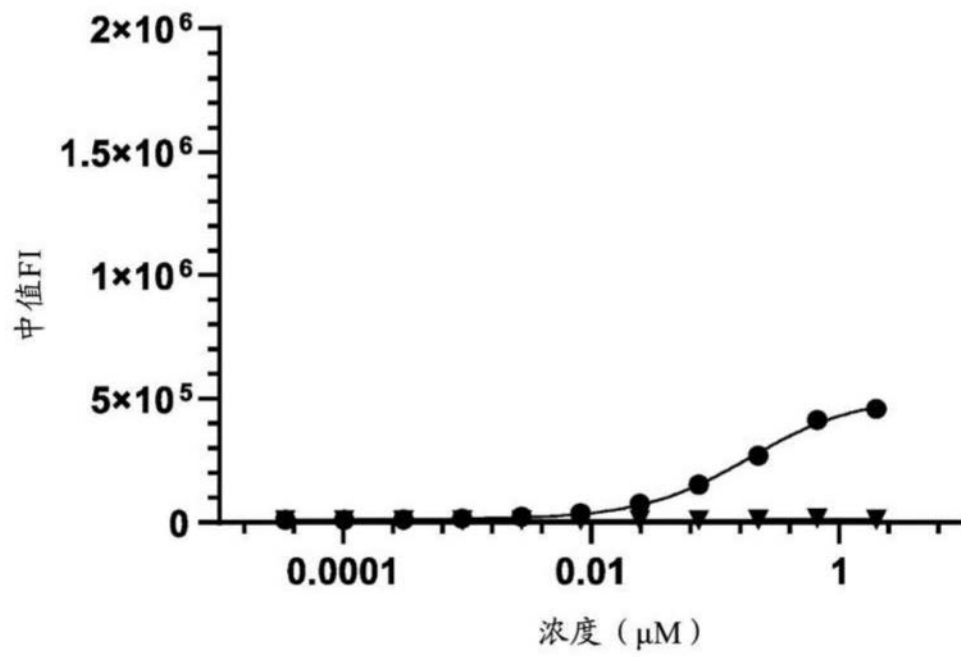
H929 BCMA KO

图2C

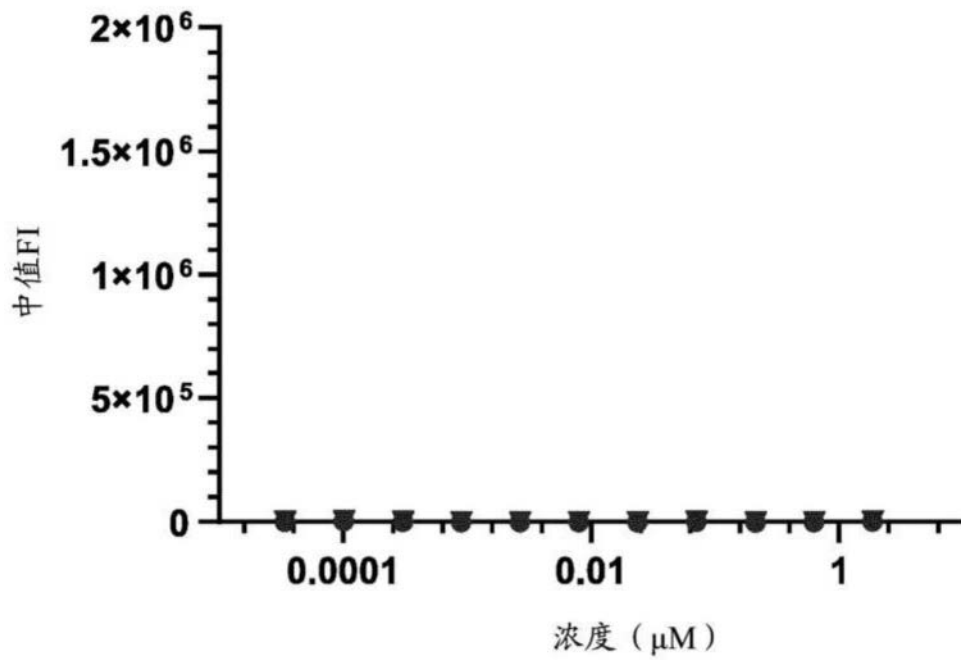
H929 GPRC5D/BCMA-KO

图2D

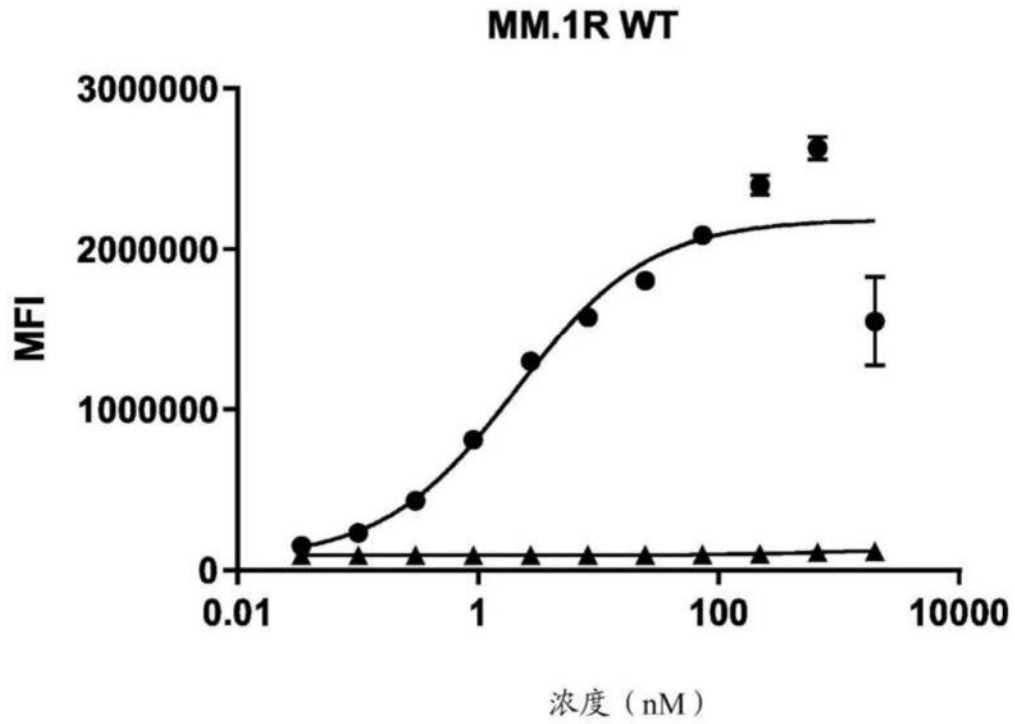


图3A

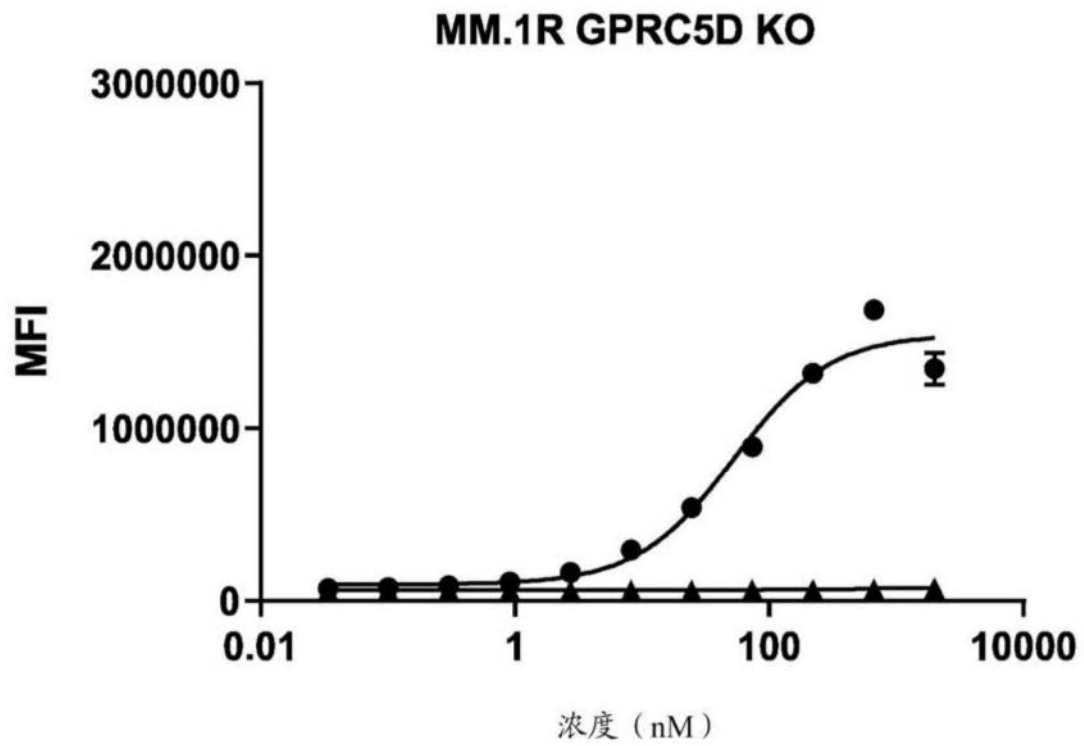


图3B

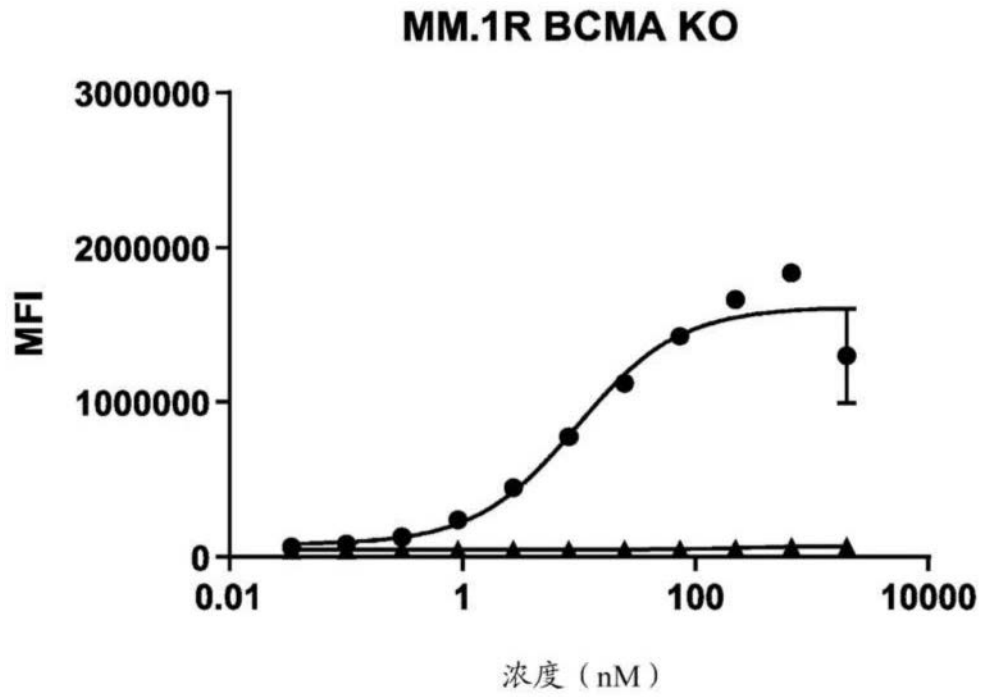


图3C

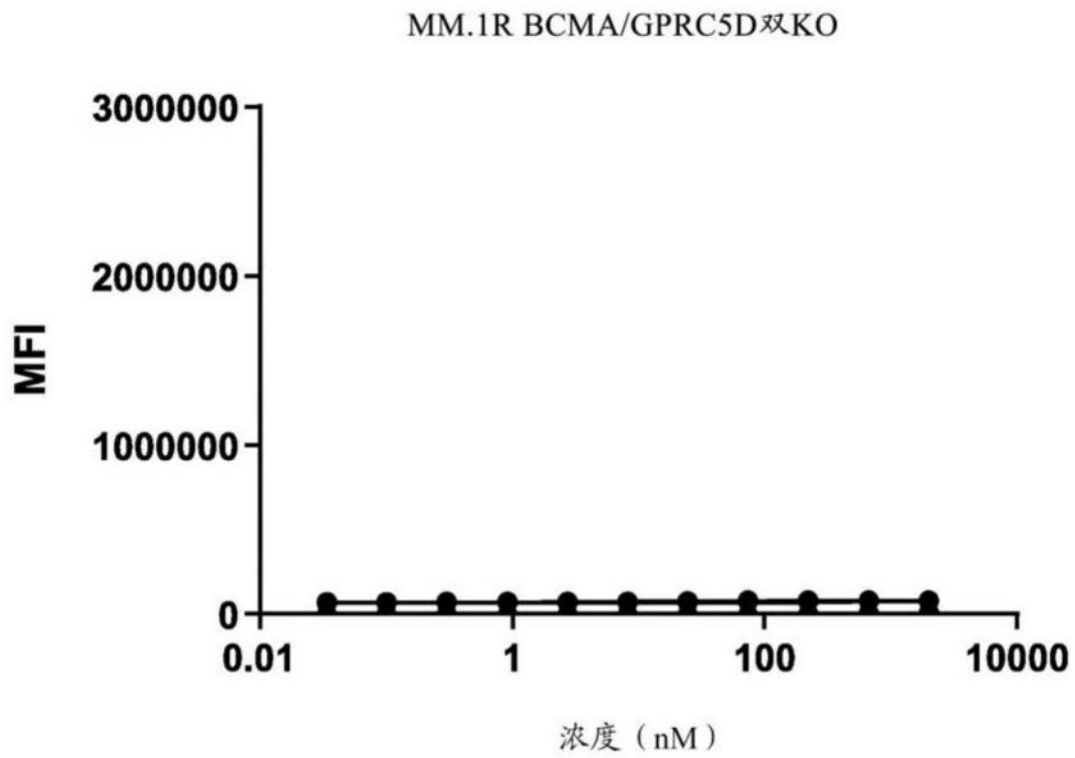


图3D

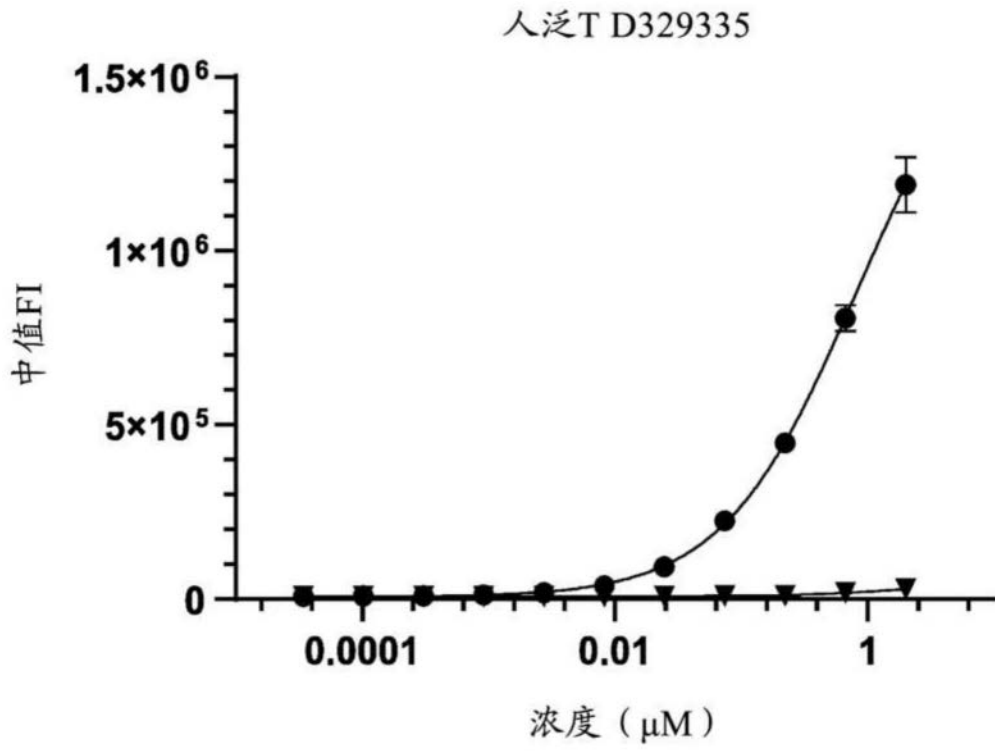


图4A

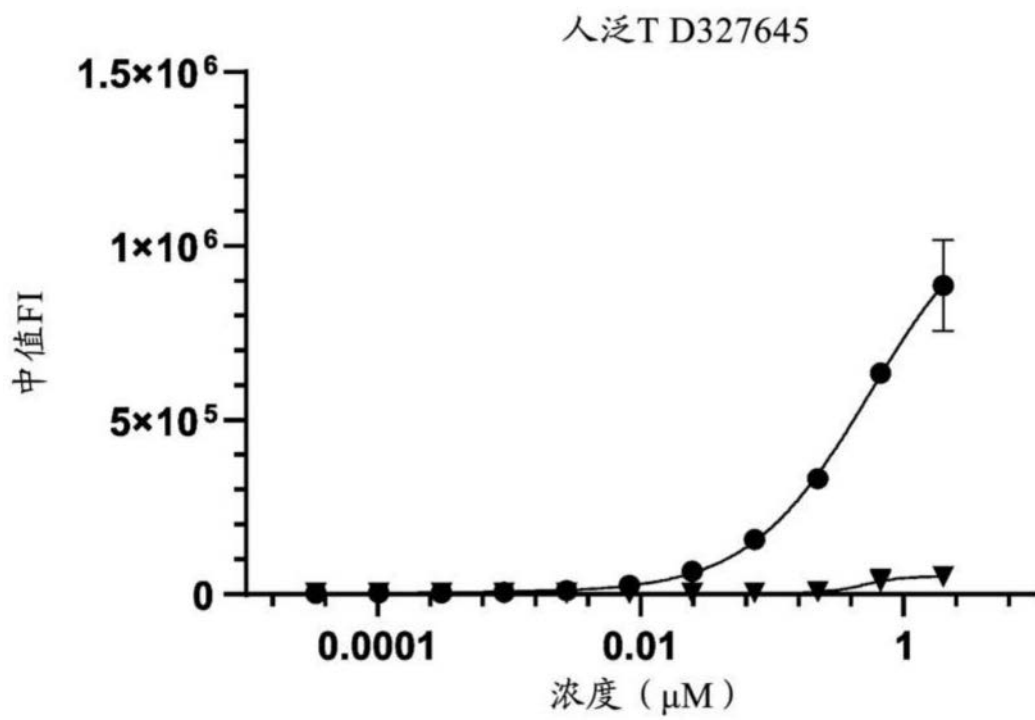


图4B

人泛T D326589

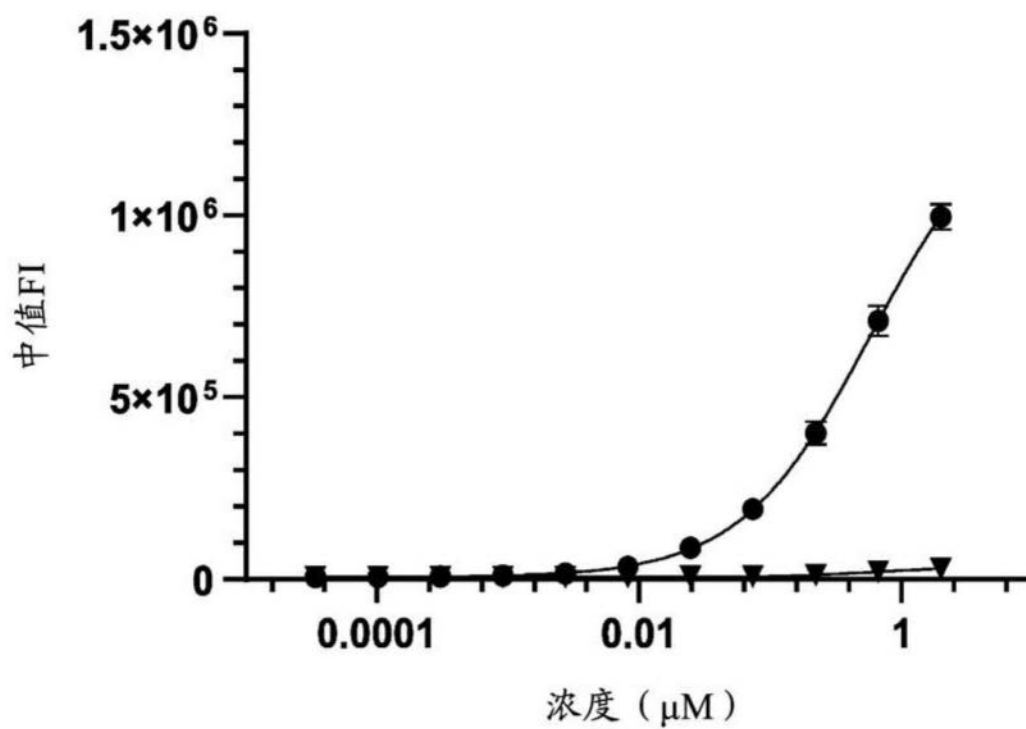


图4C

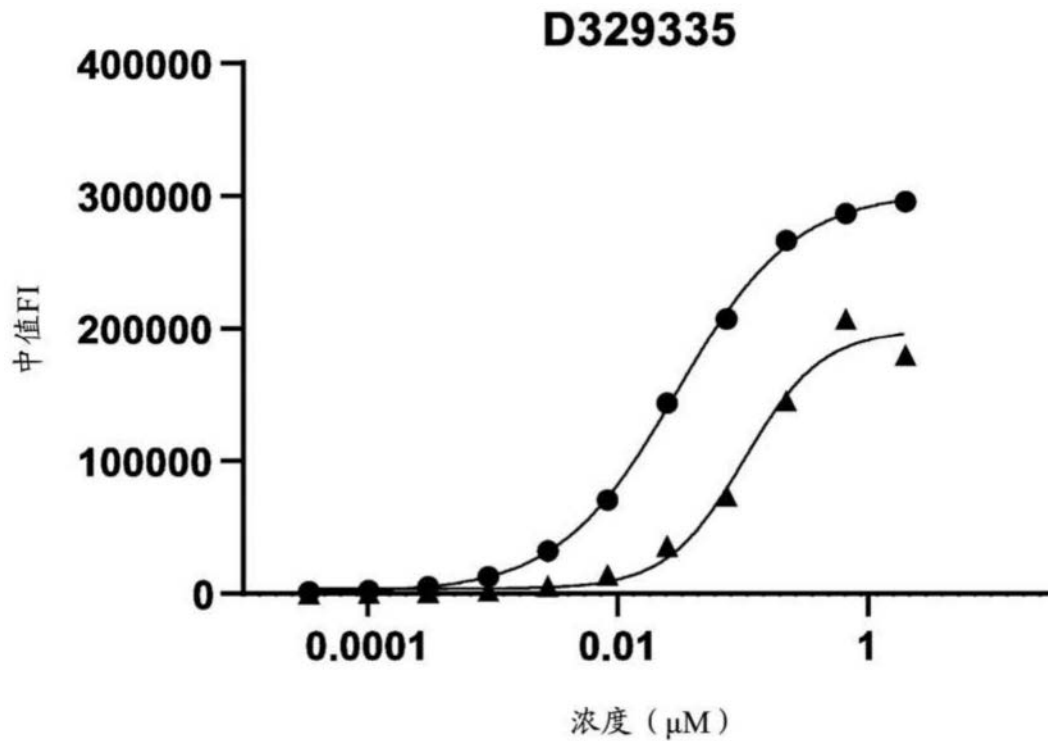


图5A

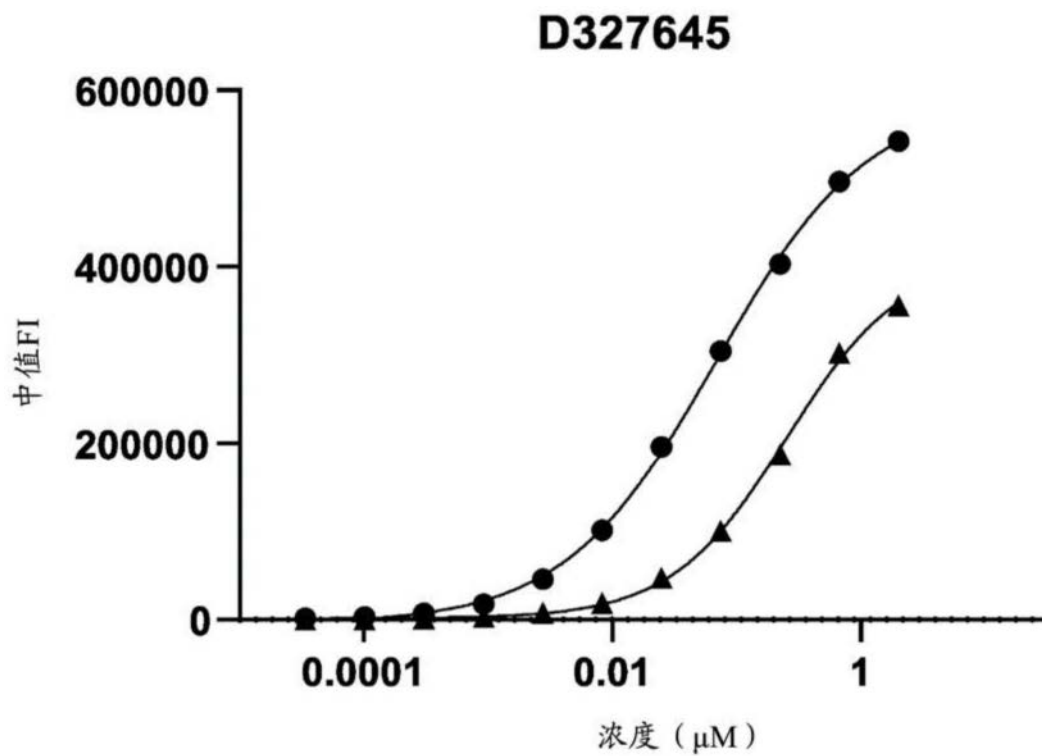


图5B

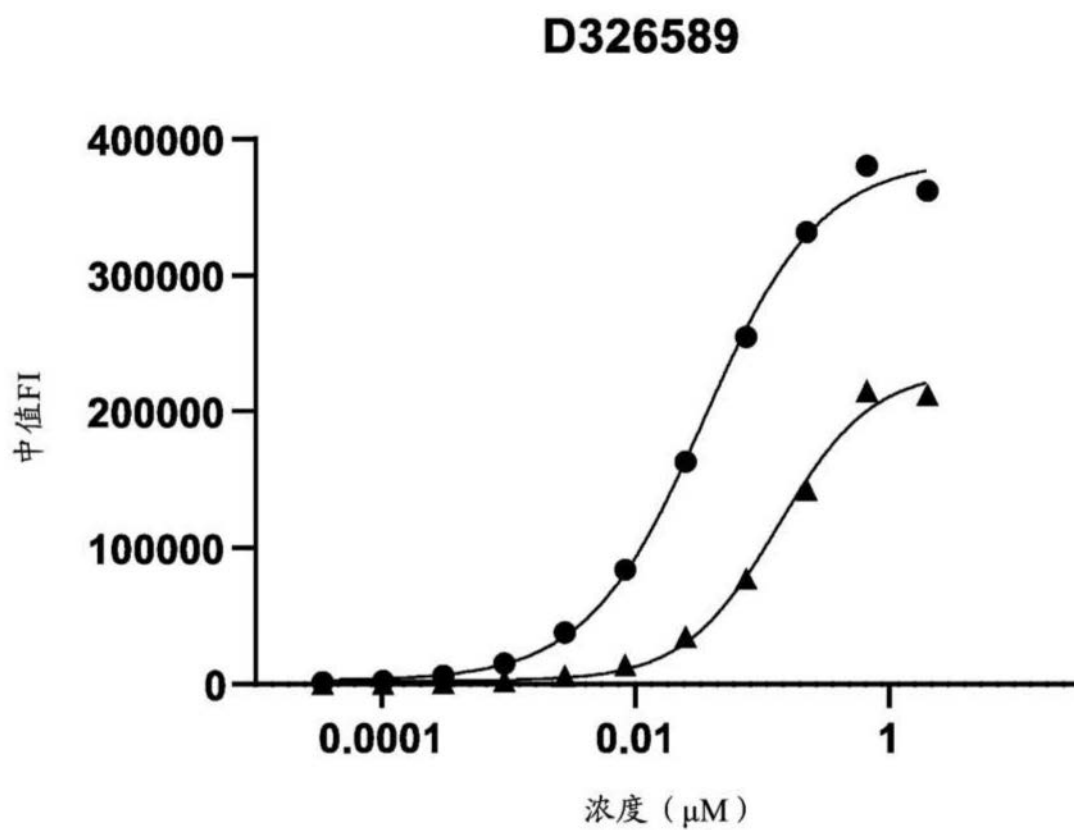


图5C

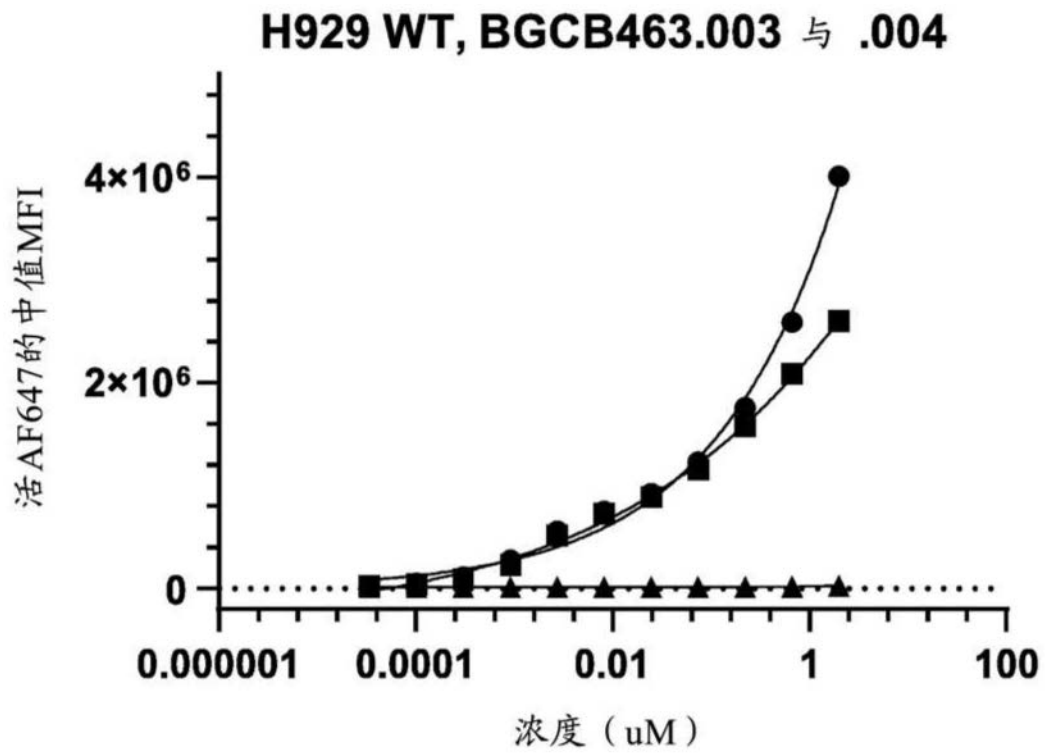


图6A

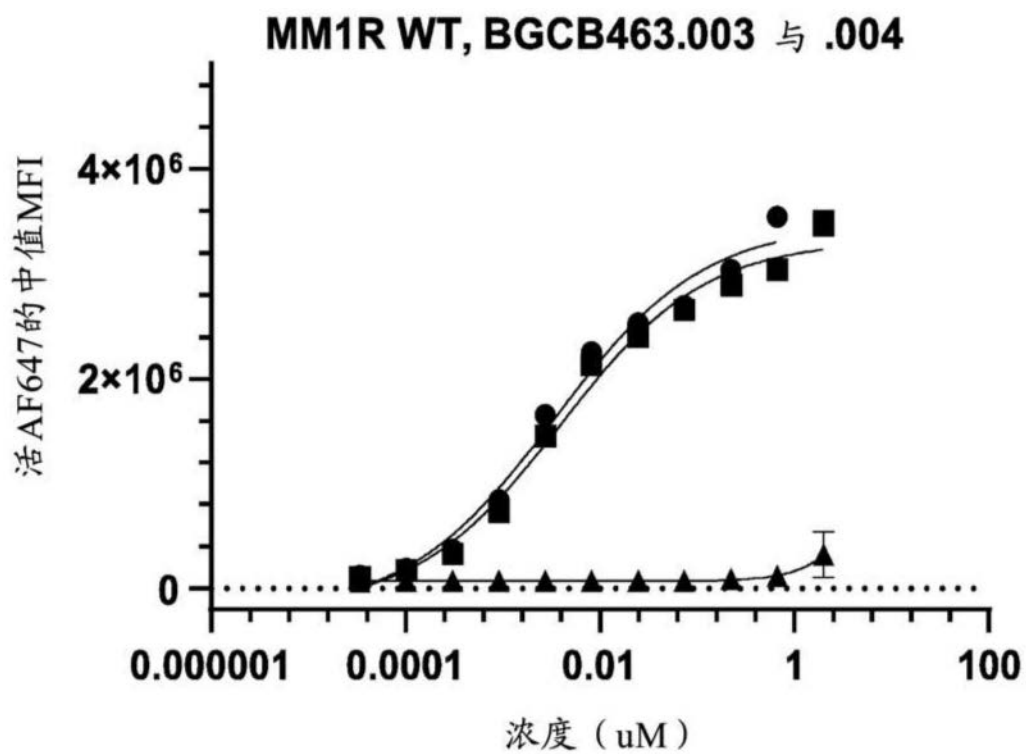


图6B

泛T供体D329335

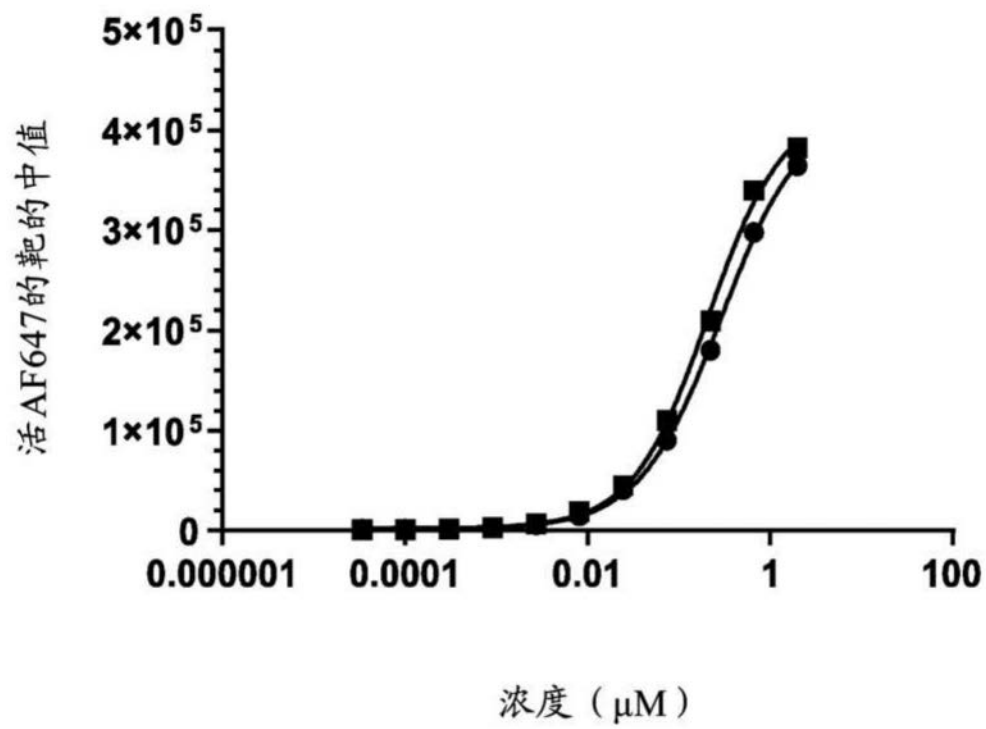


图6C

H929 WT

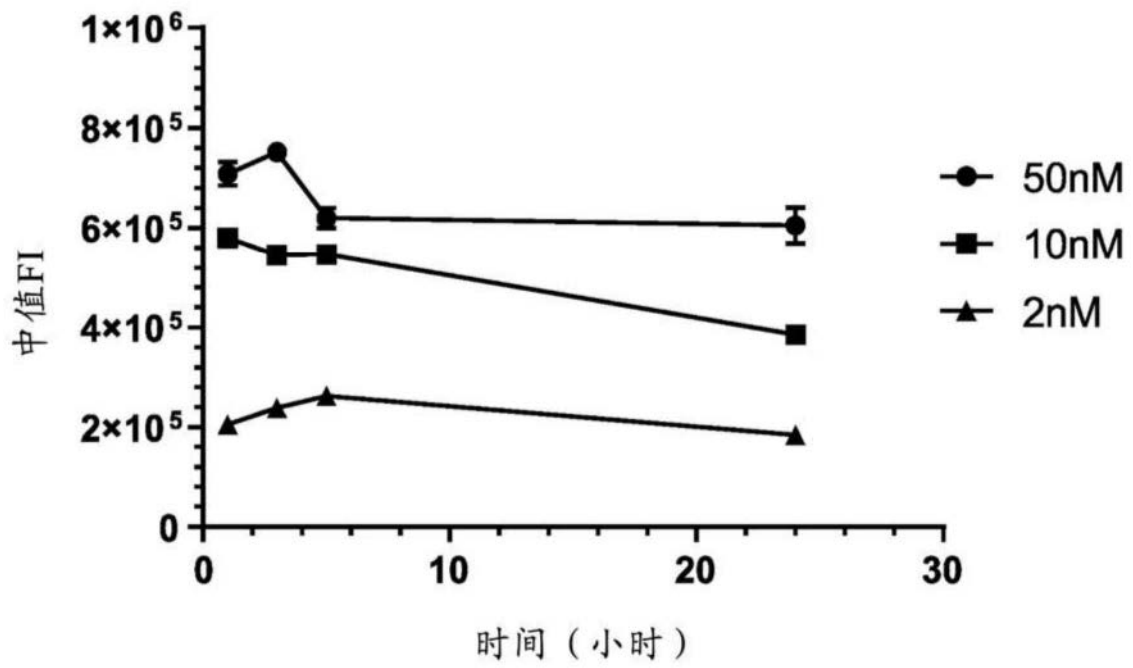


图7A

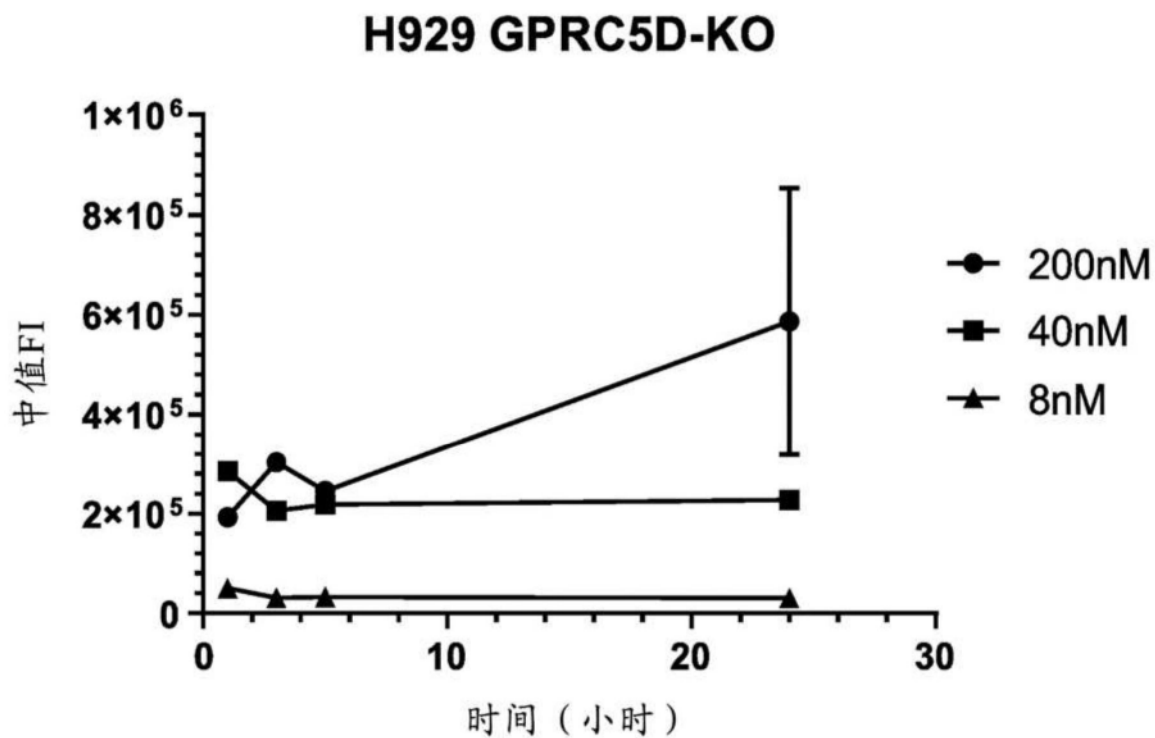


图7B

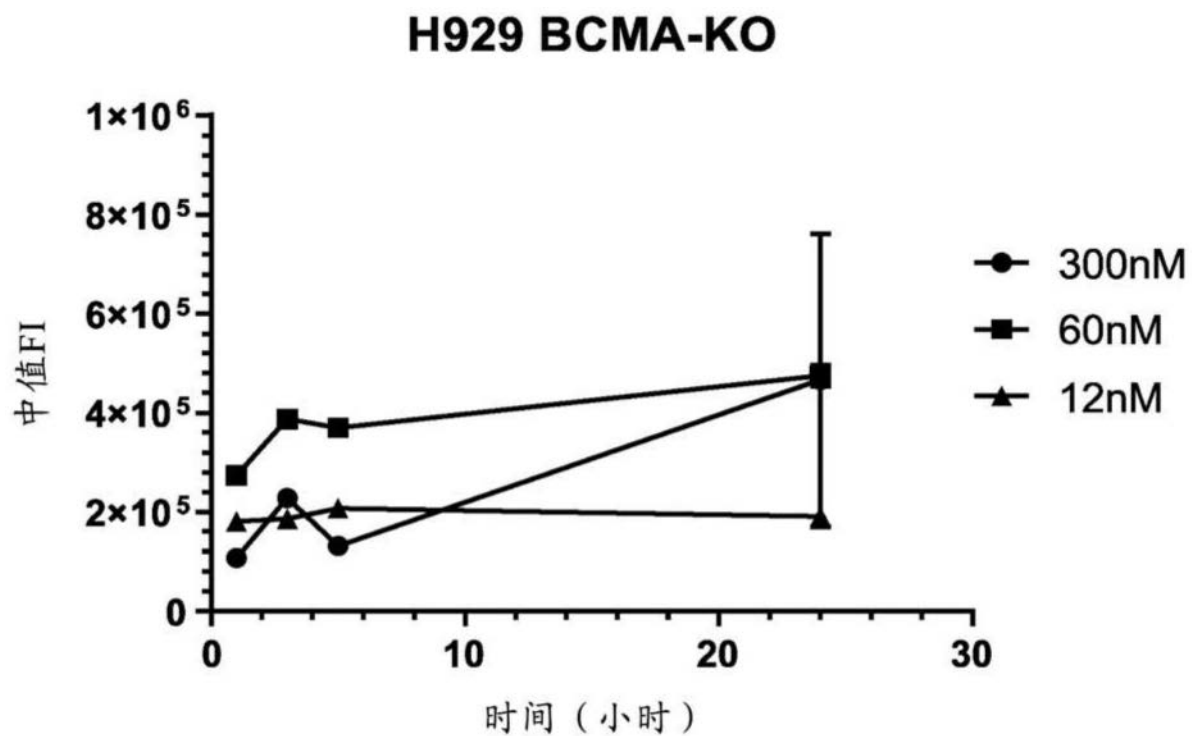


图7C

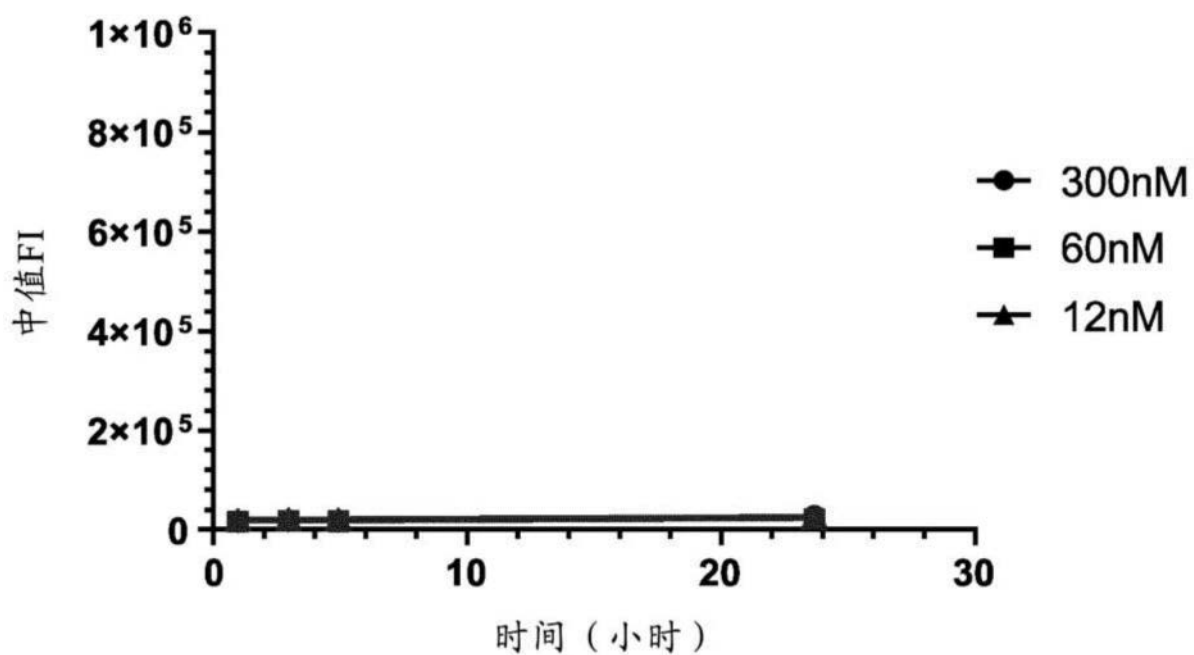
H929 GPRC5D/BCMA-KO

图7D

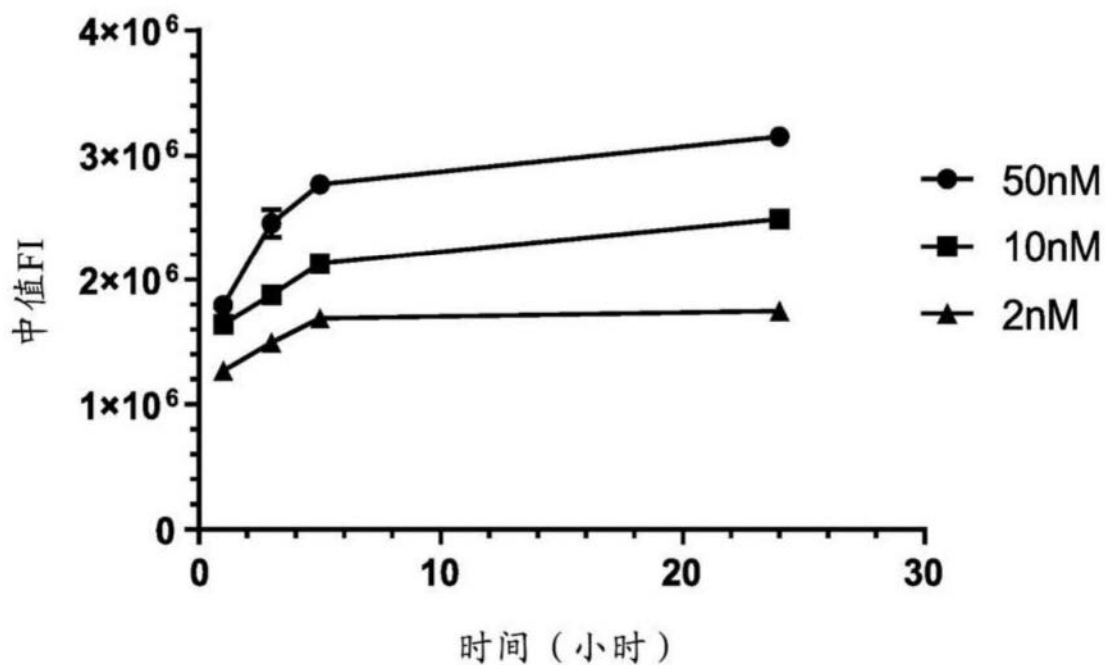
MM1R WT

图8A

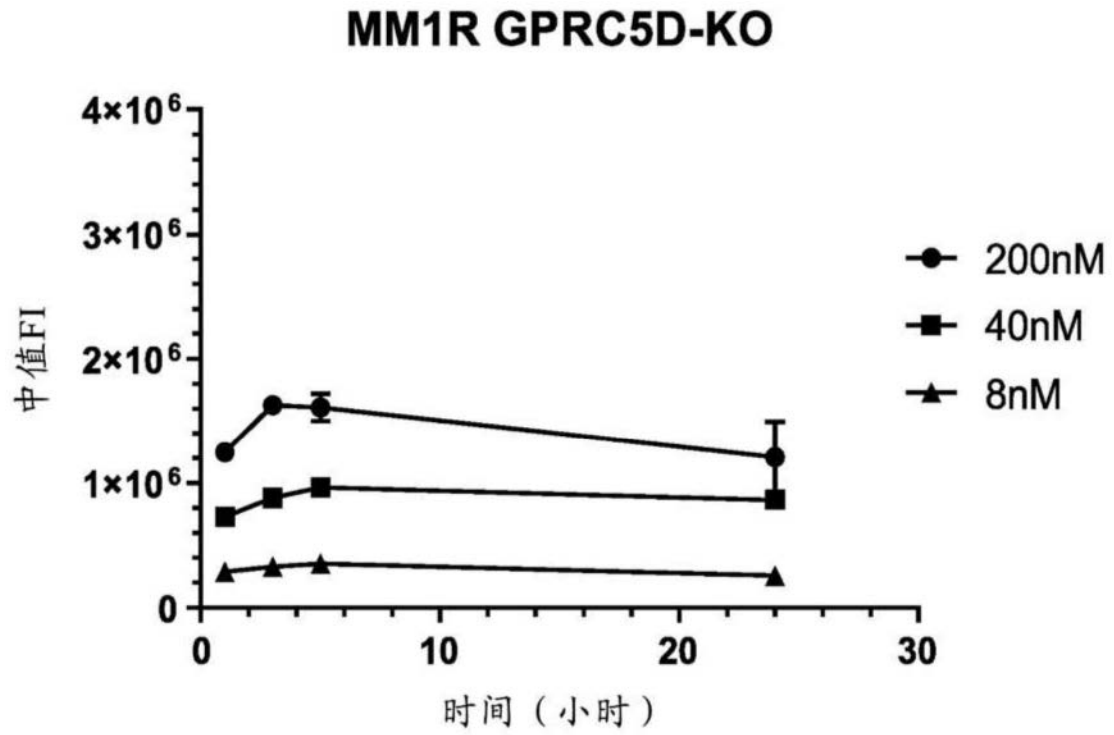


图8B

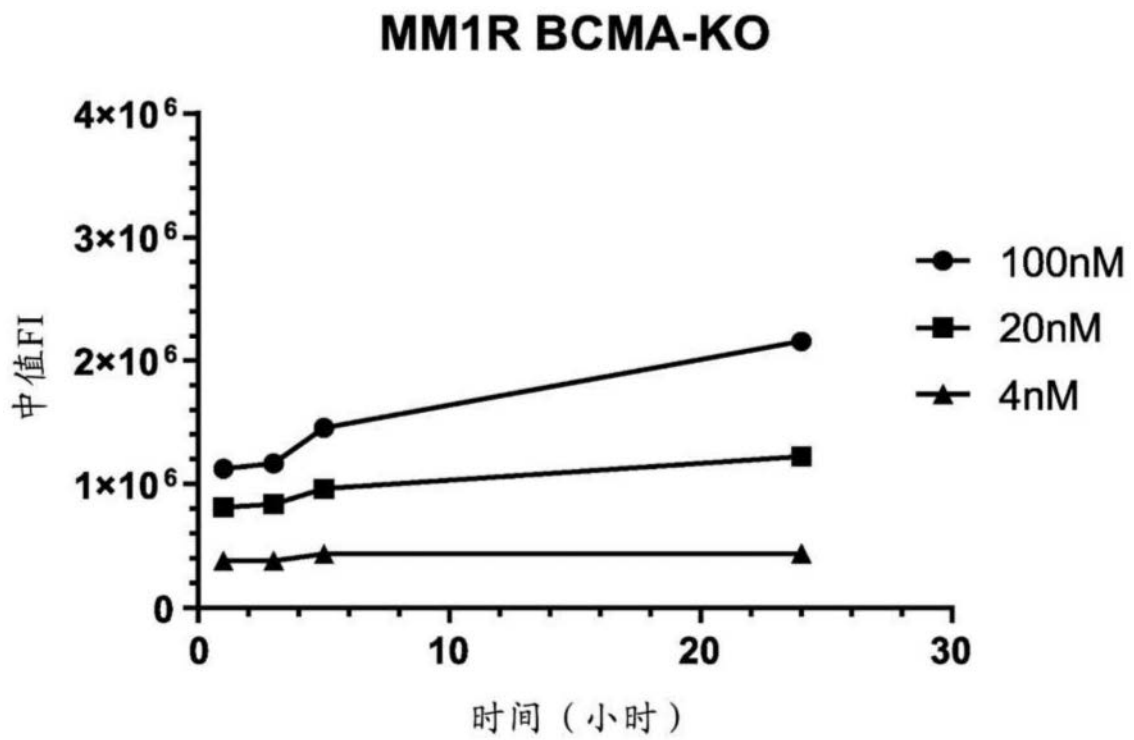


图8C

MM1R GPRC5D/BCMA-KO

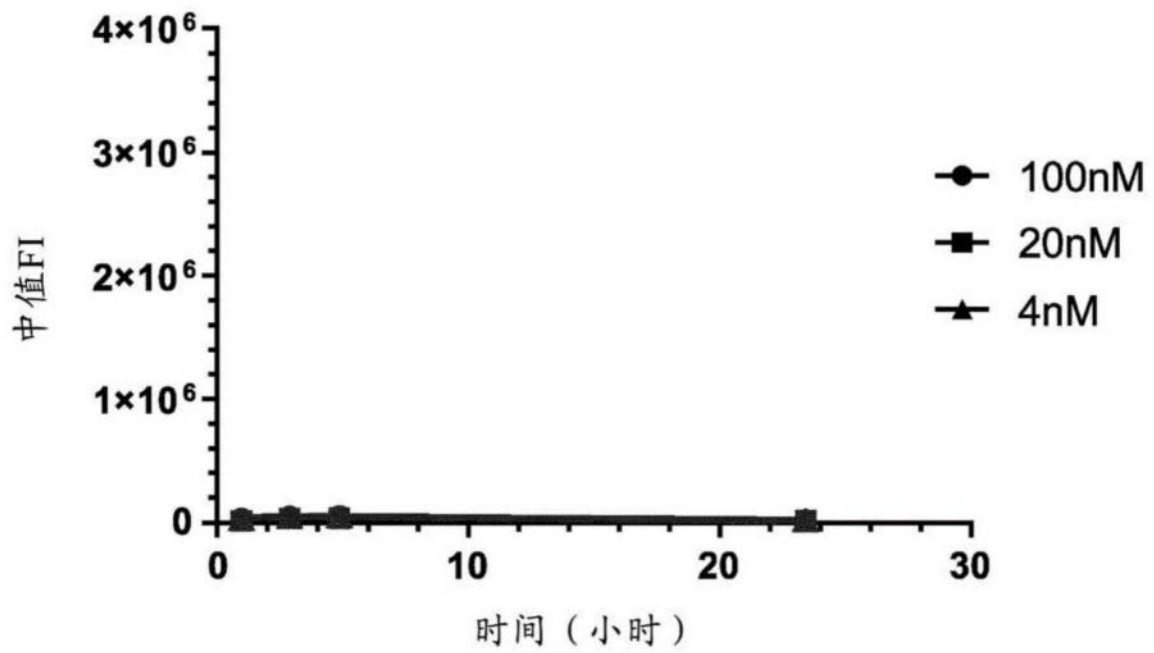


图8D

K562-人GPRC5D

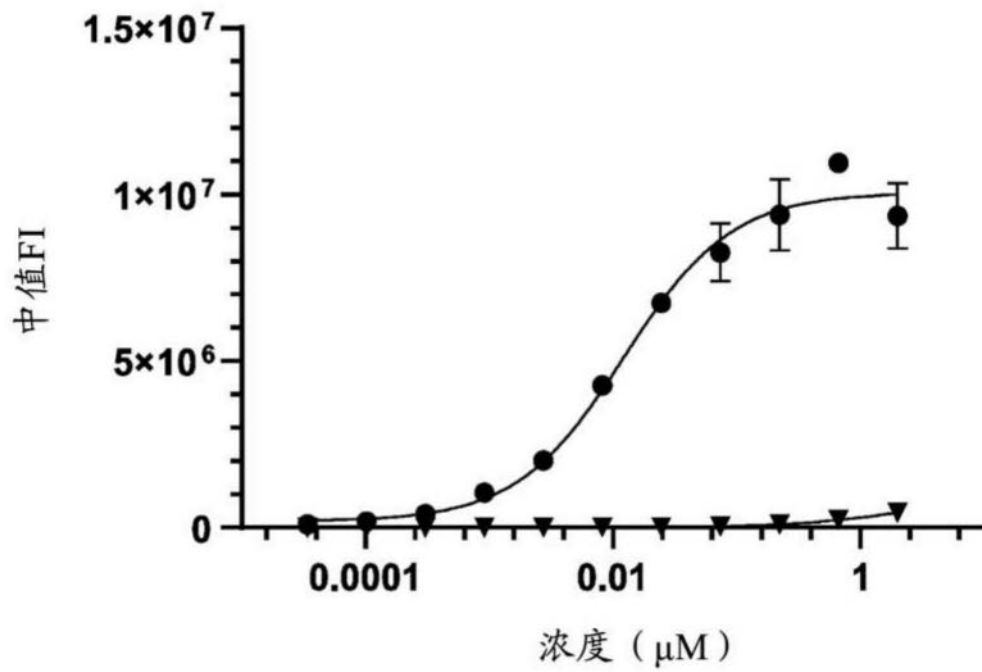


图9A

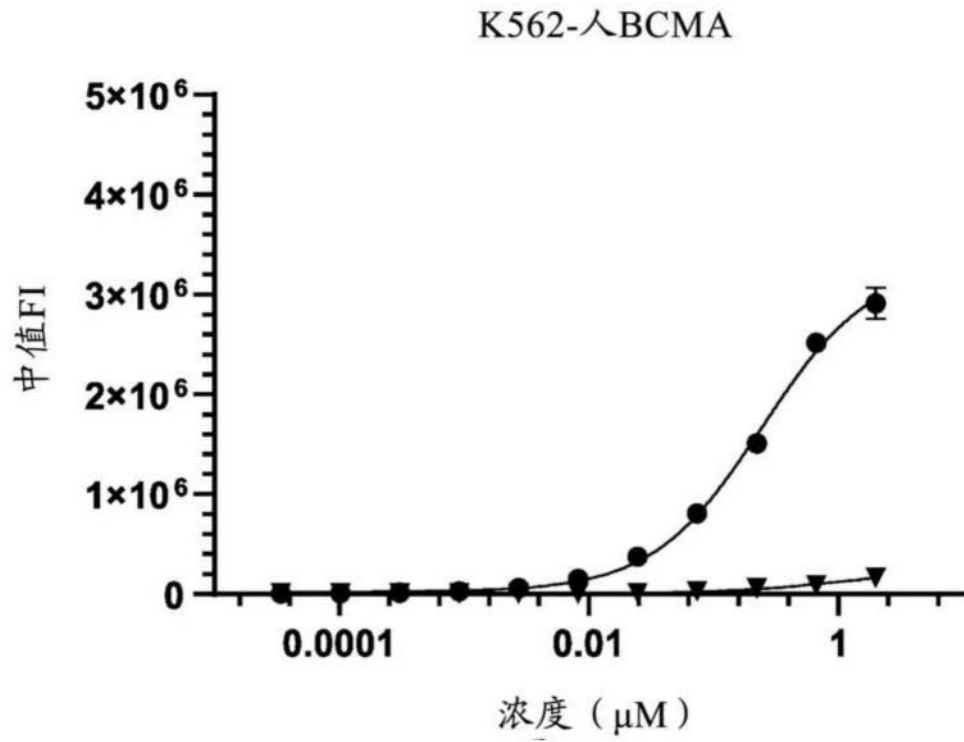


图9B

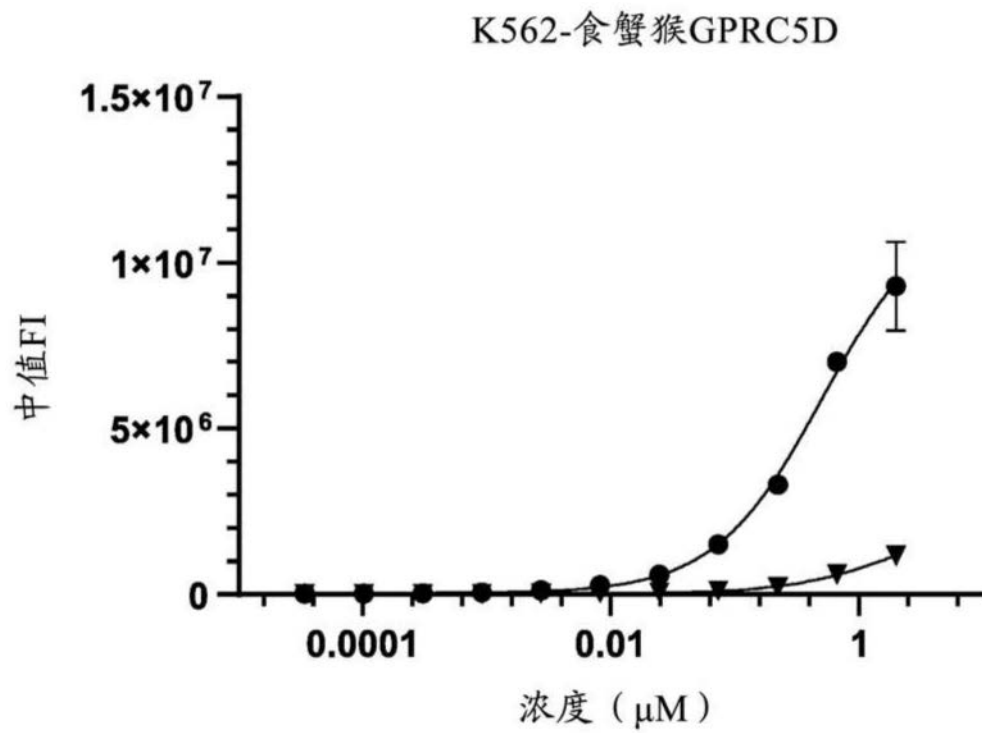


图9C

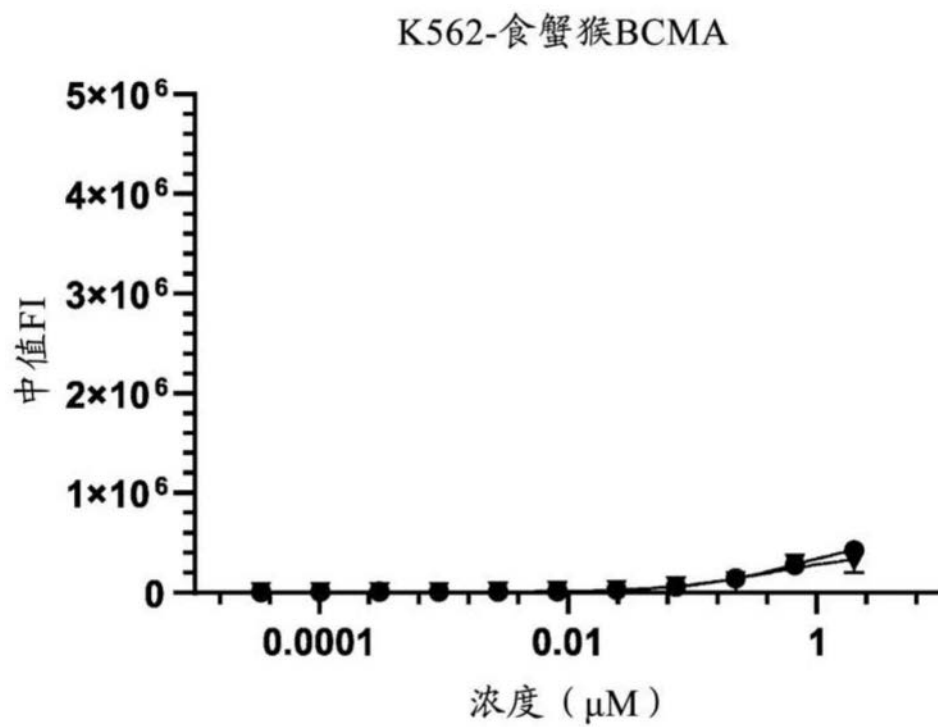


图9D

	BGCB463 EC50 (nM) 运行1	BGCB463 EC50 (nM) 运行2	EC50 AVE	BGCB463 EC90 (nM) 运行1	BGCB463 EC90 (nM) 运行2	EC90 AVE
人 GPC5D	12.5	49.7	31.1	142.6	208.7	175.7
食蟹猴 GPC5D	435.1	309.7	372.4	2989.8	2058.6	2524.2
人 BCMA	248.0	45.8	146.9	2333.8	192.5	1263.2
食蟹猴 BCMA	无拟合	无拟合	无拟合	无拟合	无拟合	无拟合

图9E

图10A

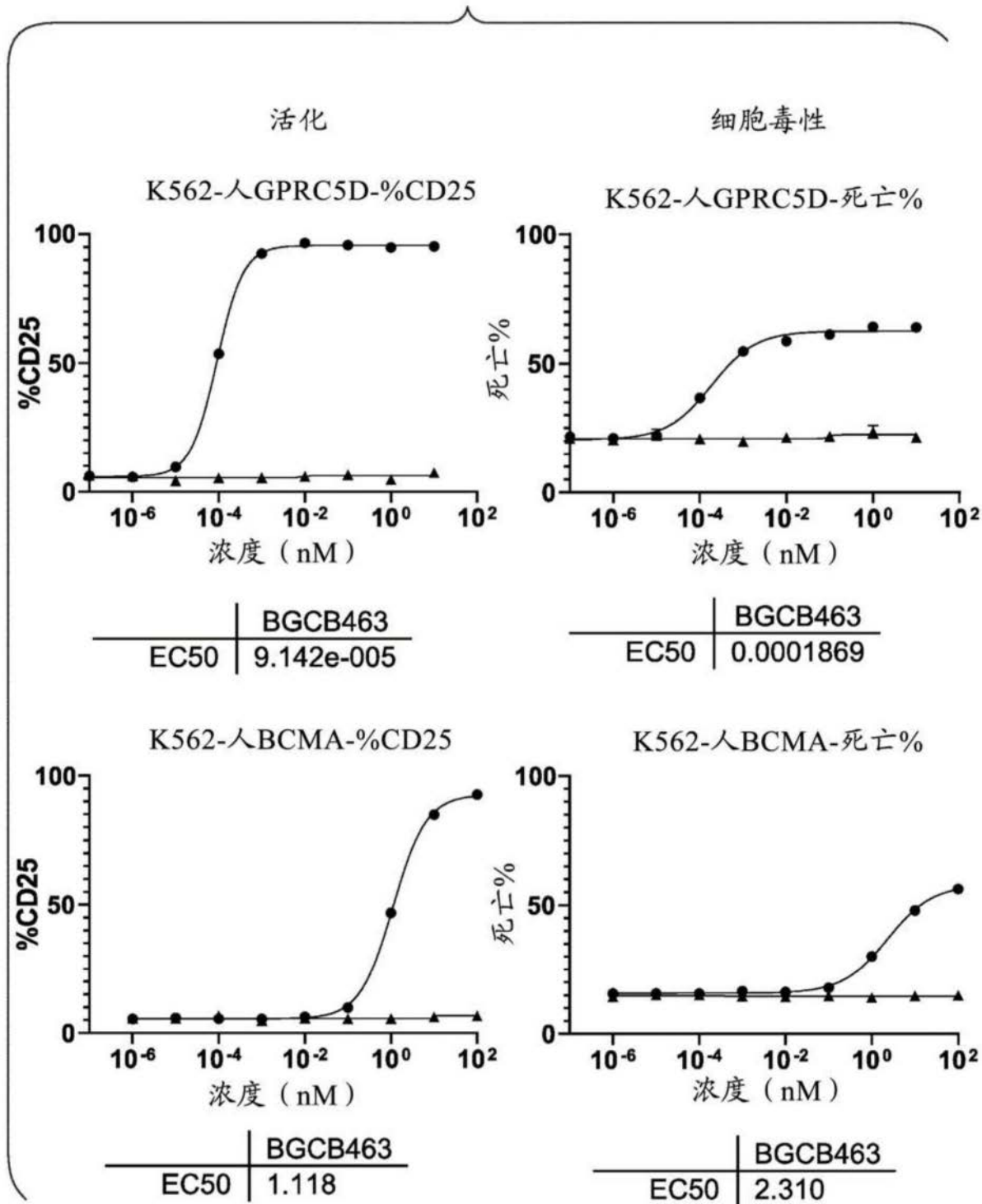


图10A

图10B

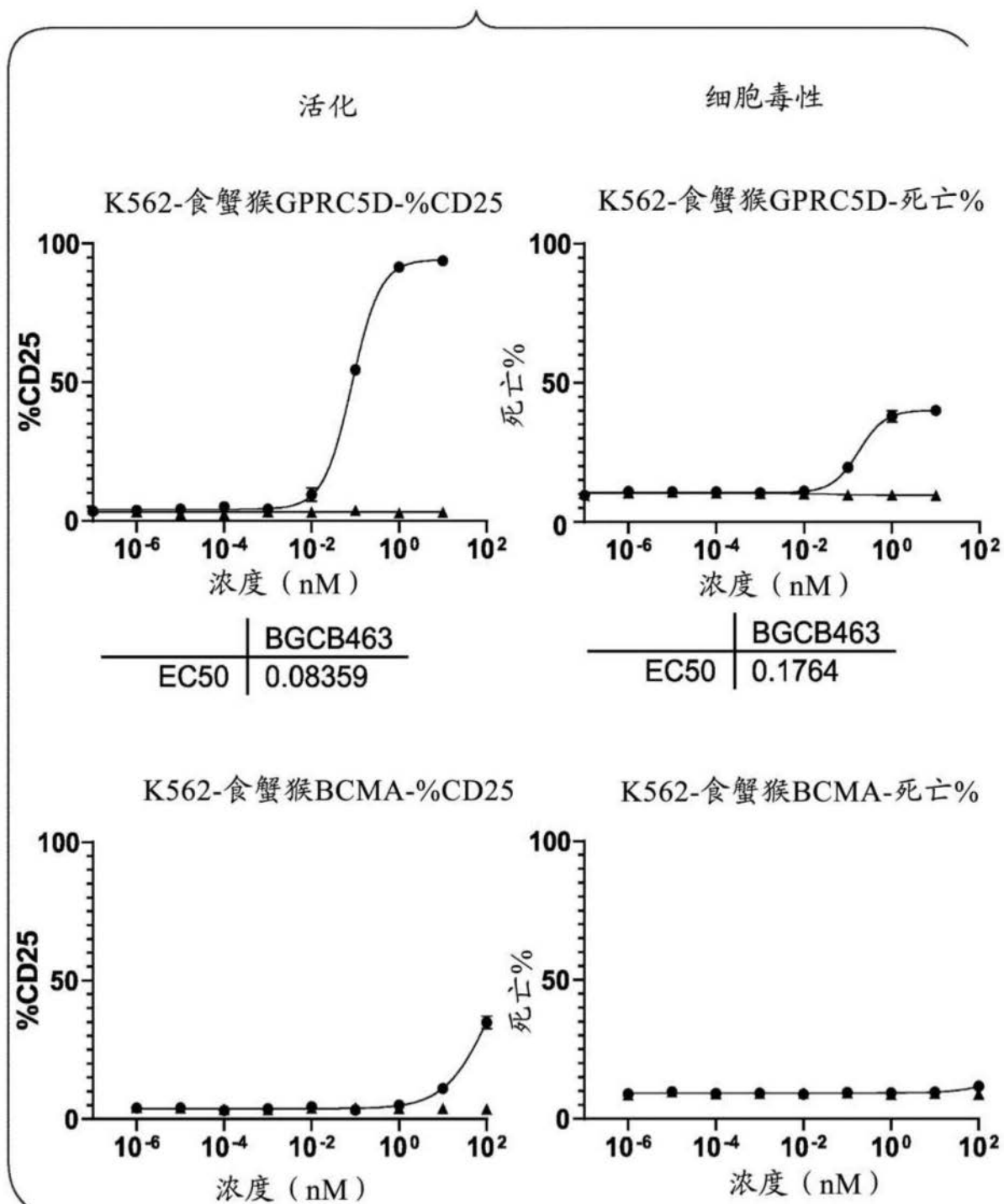


图10B

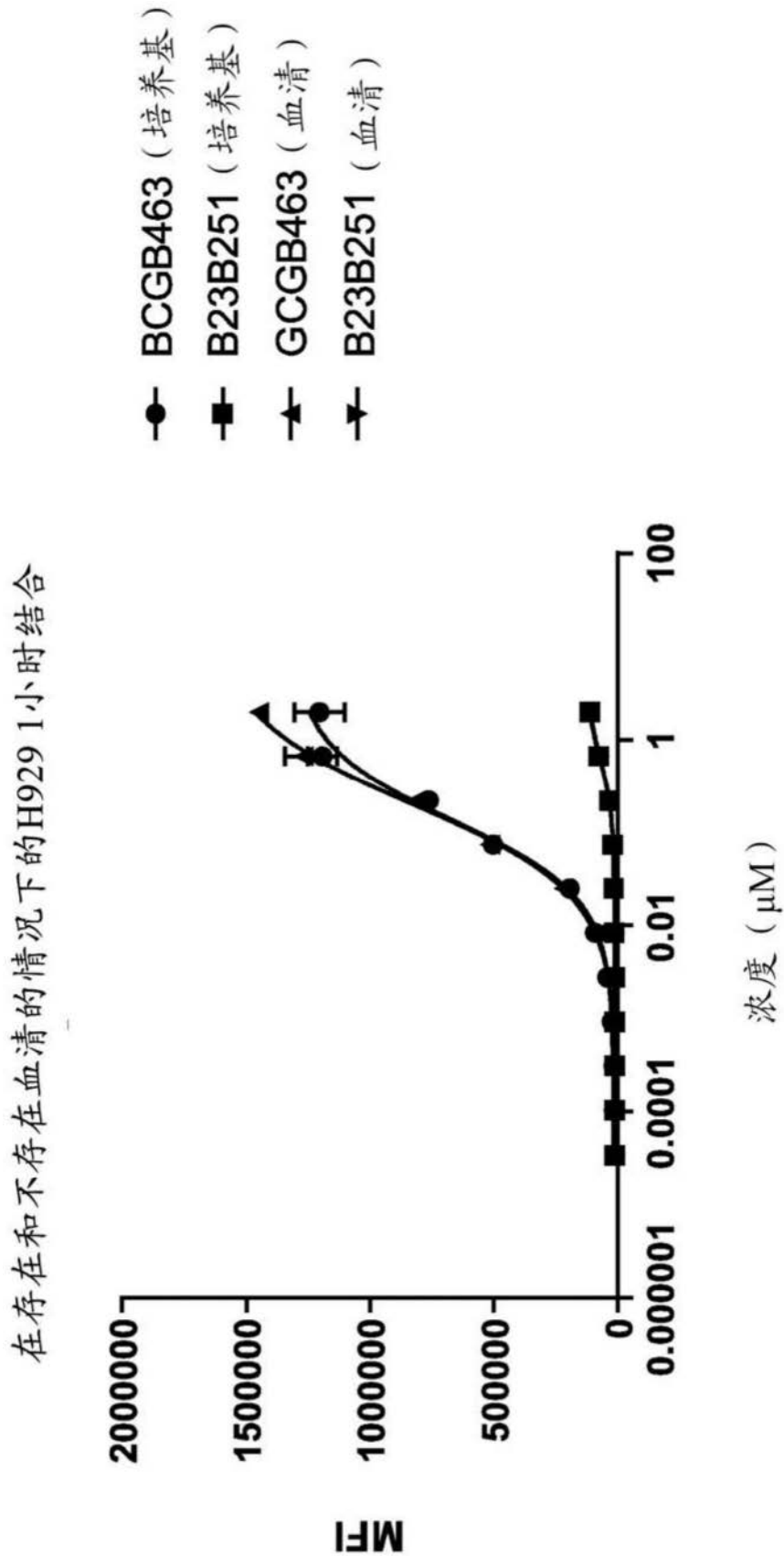


图11

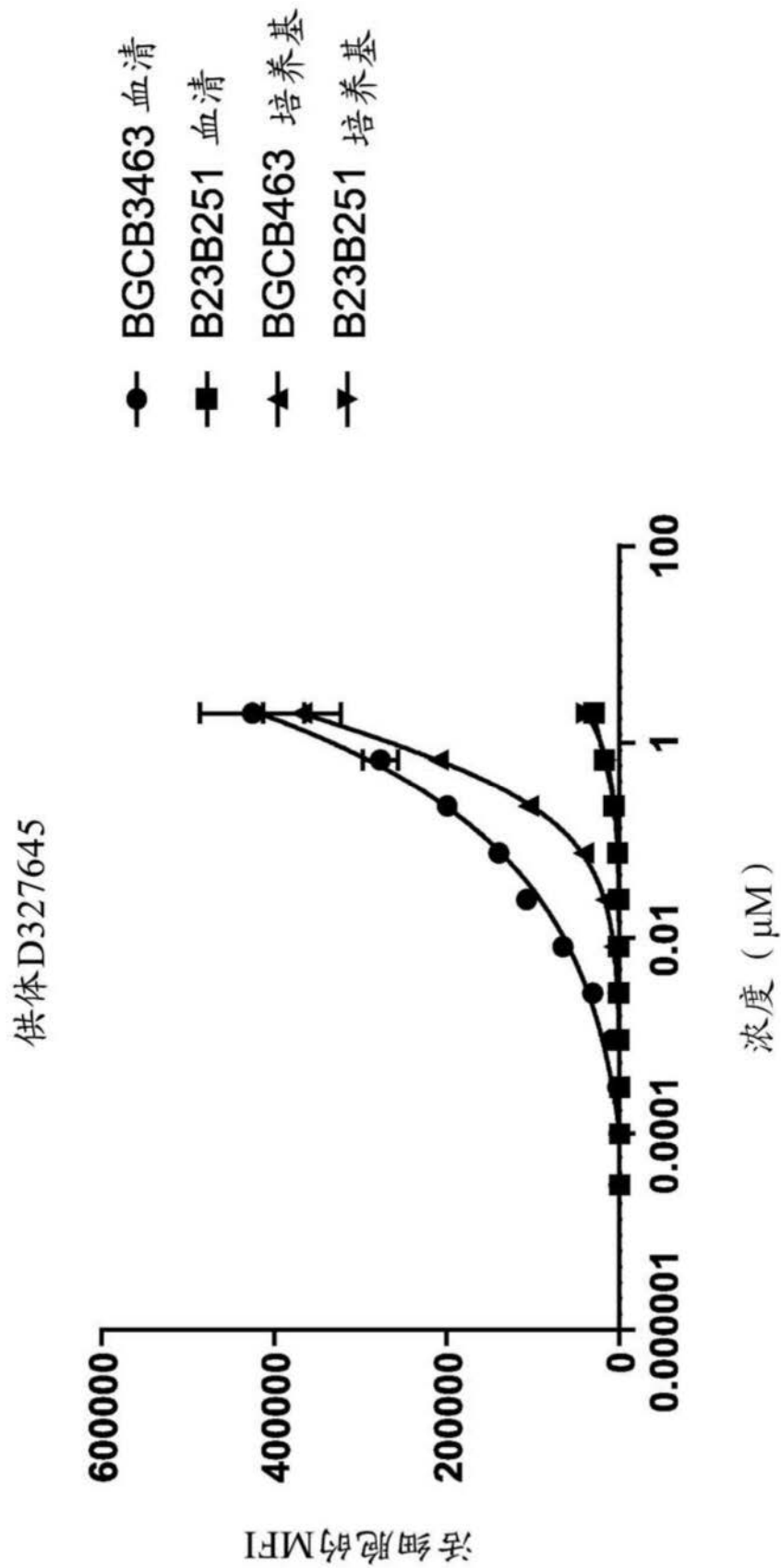


图12

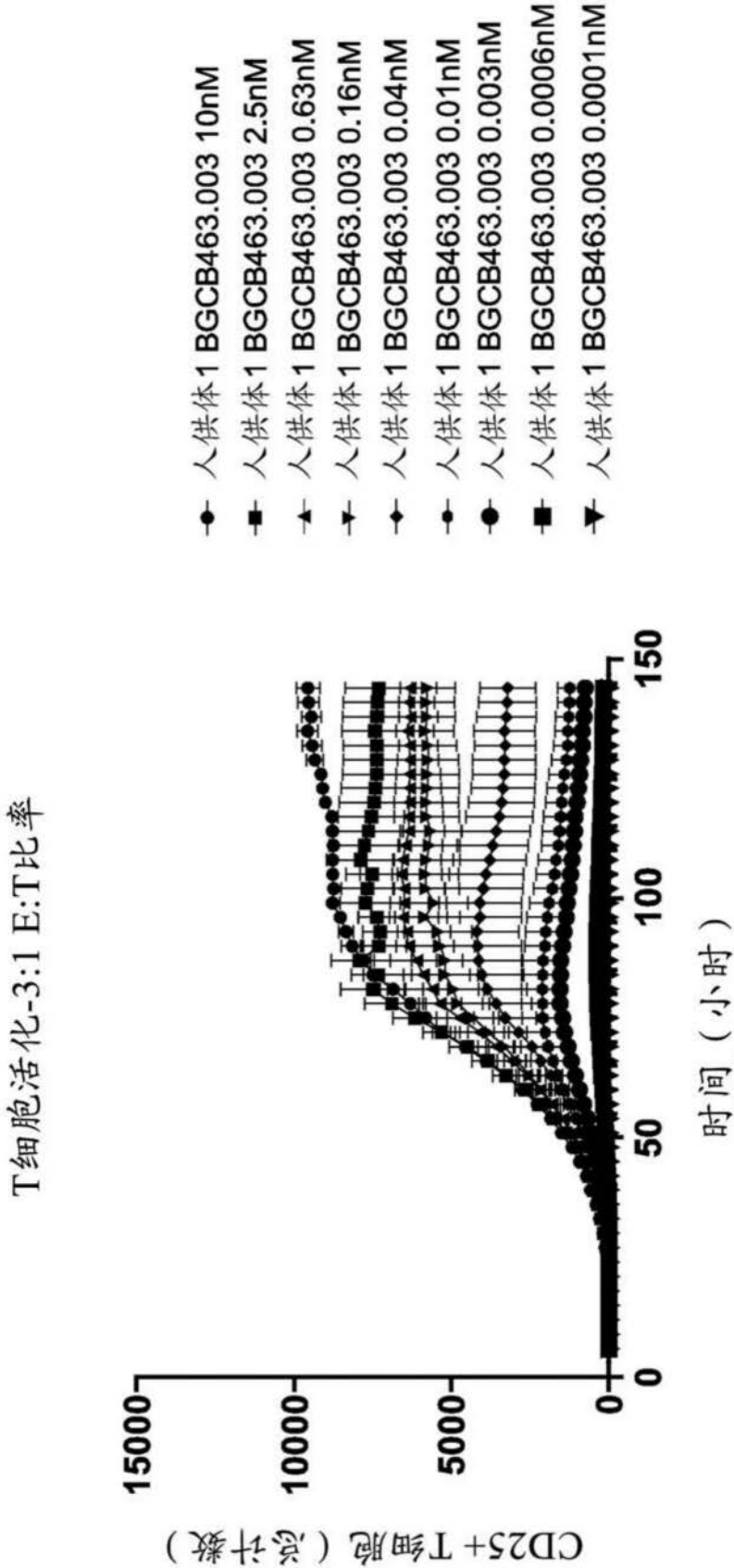


图13A

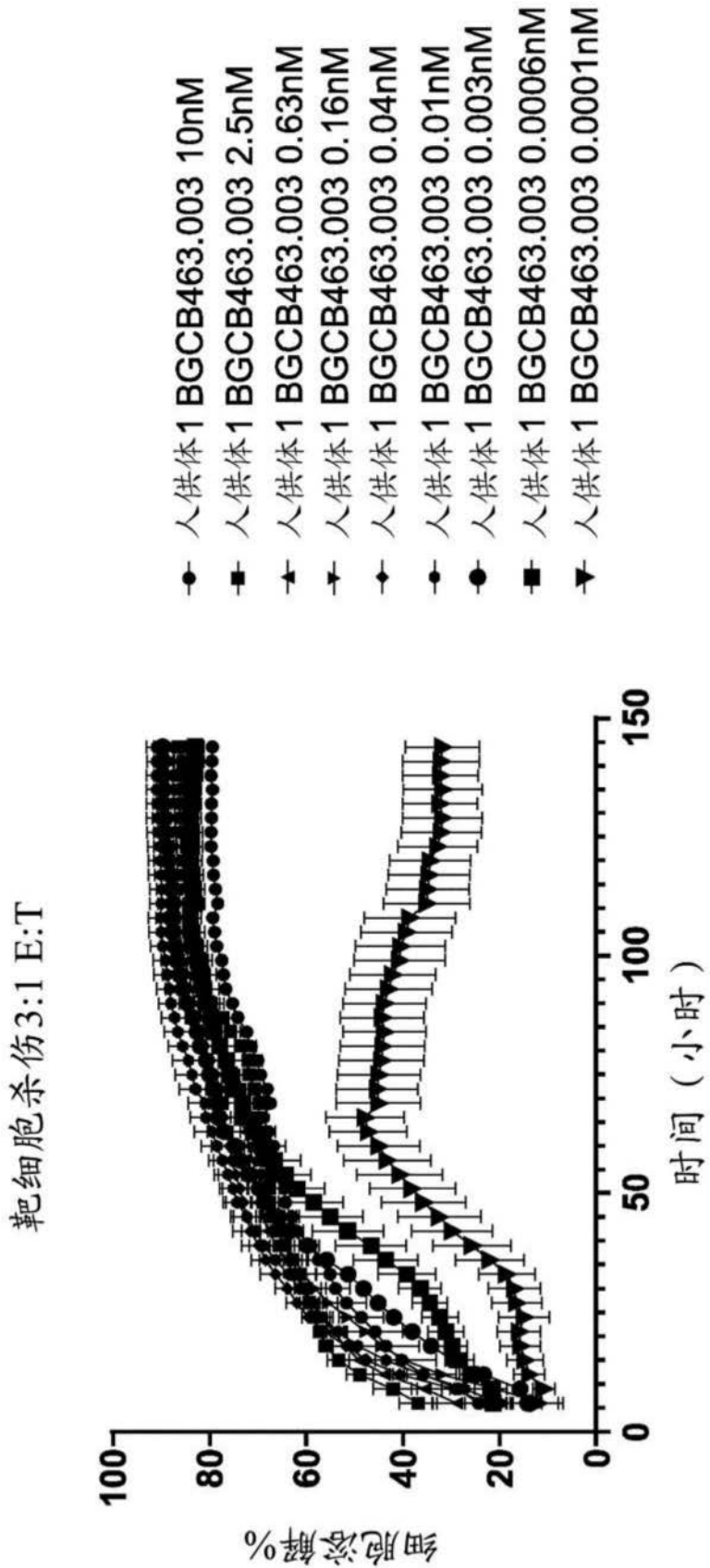


图13B

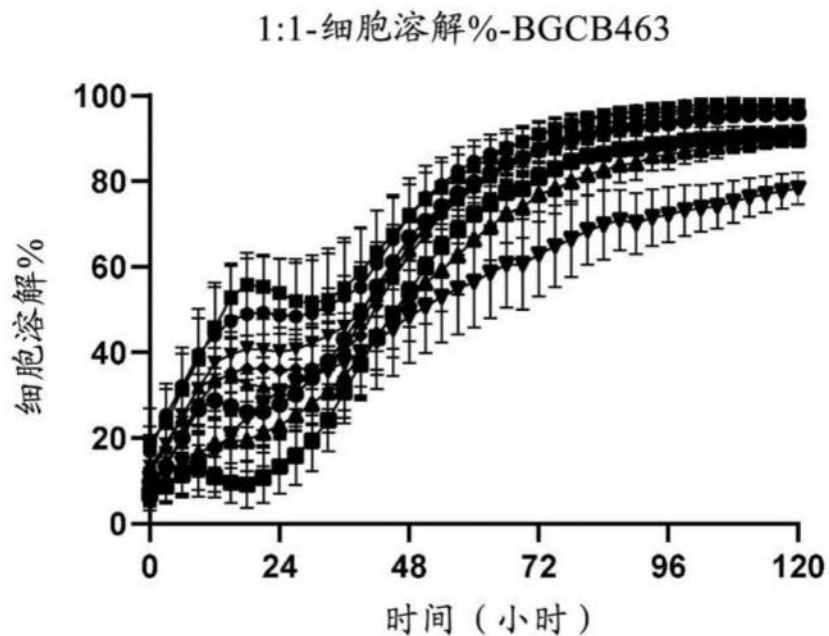


图14A

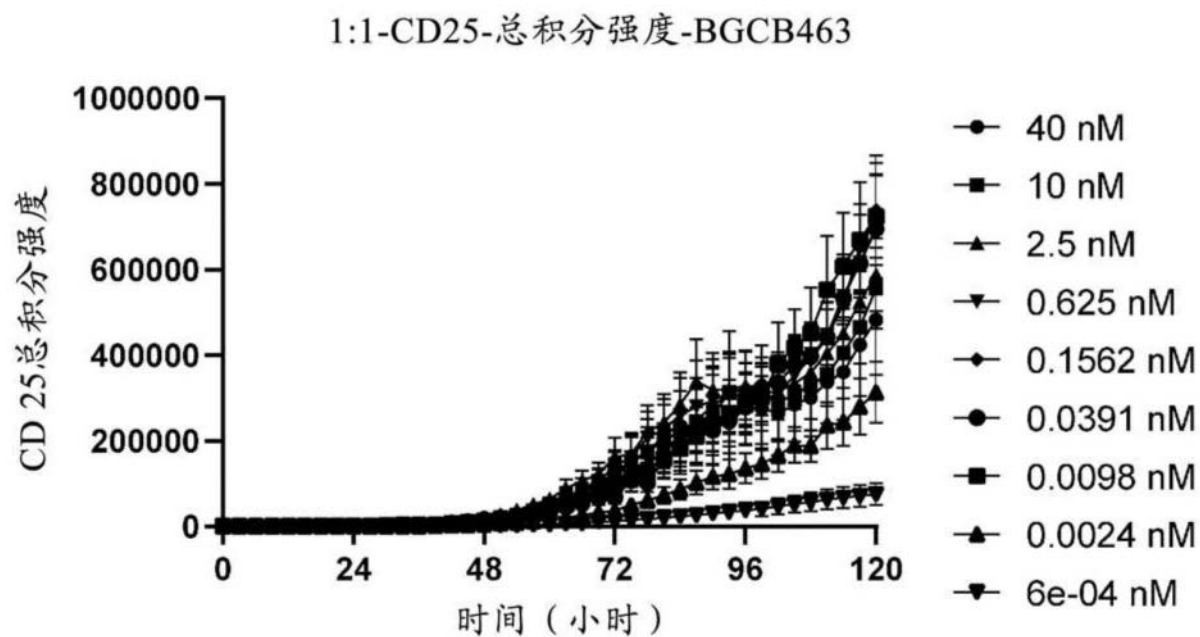


图14B

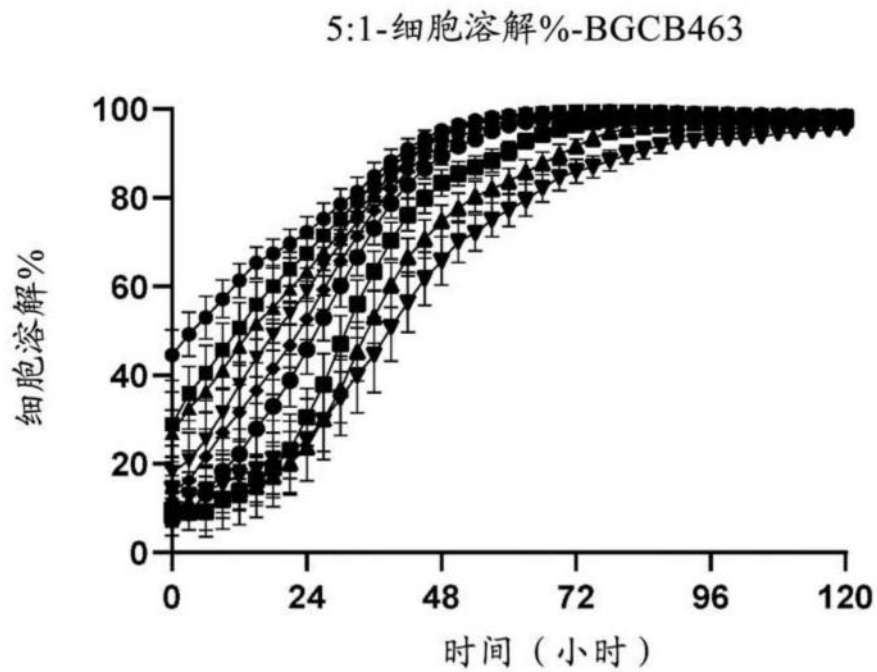


图14C

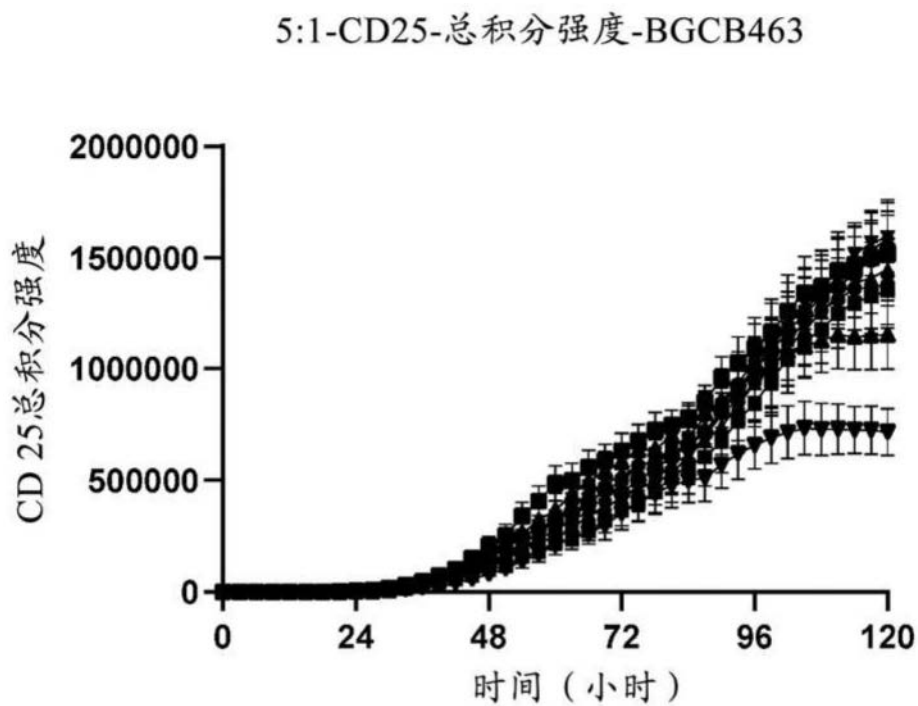


图14D

5:1-细胞裂解%-同种型 (B23B251)

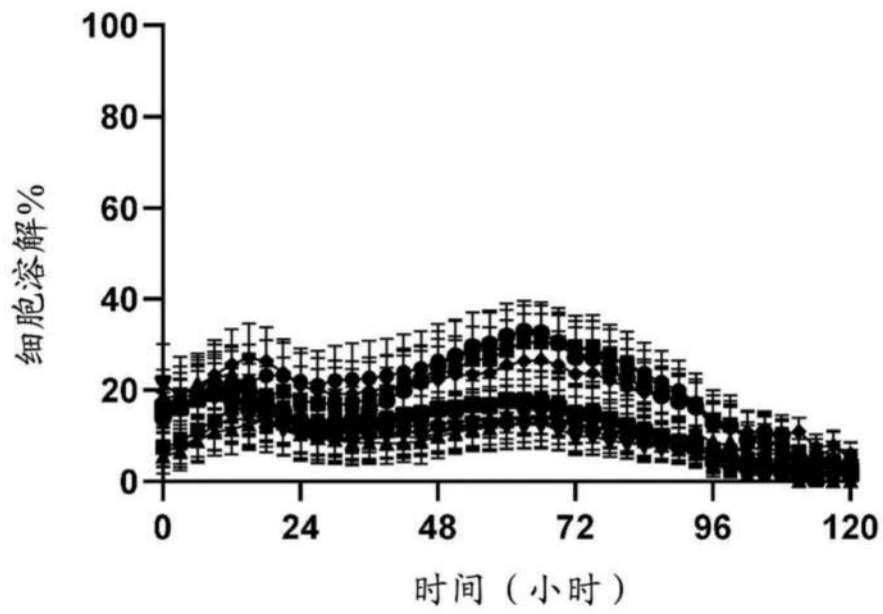


图14E

5:1-CD25-总积分强度-同种型 (B23B251)

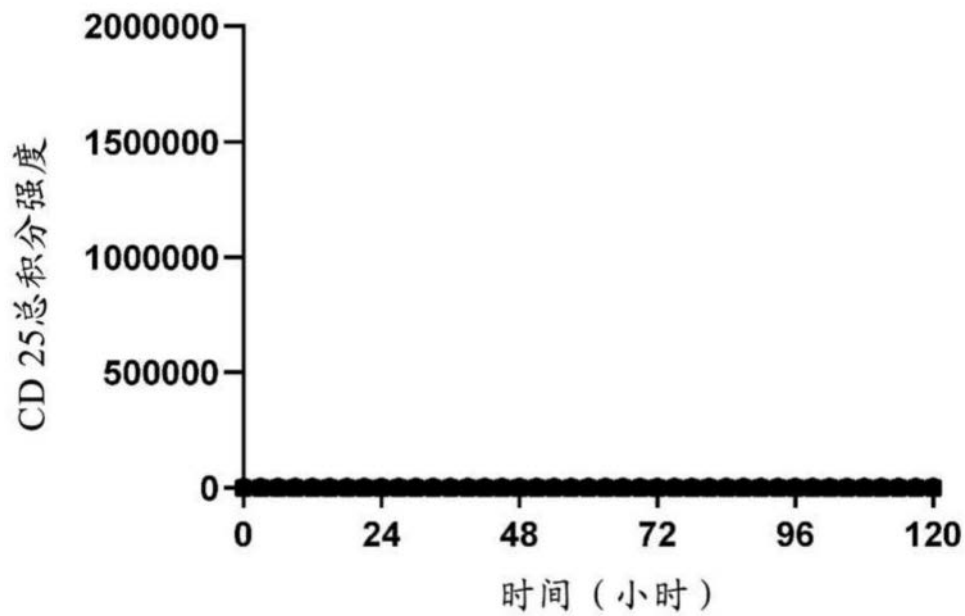


图14F

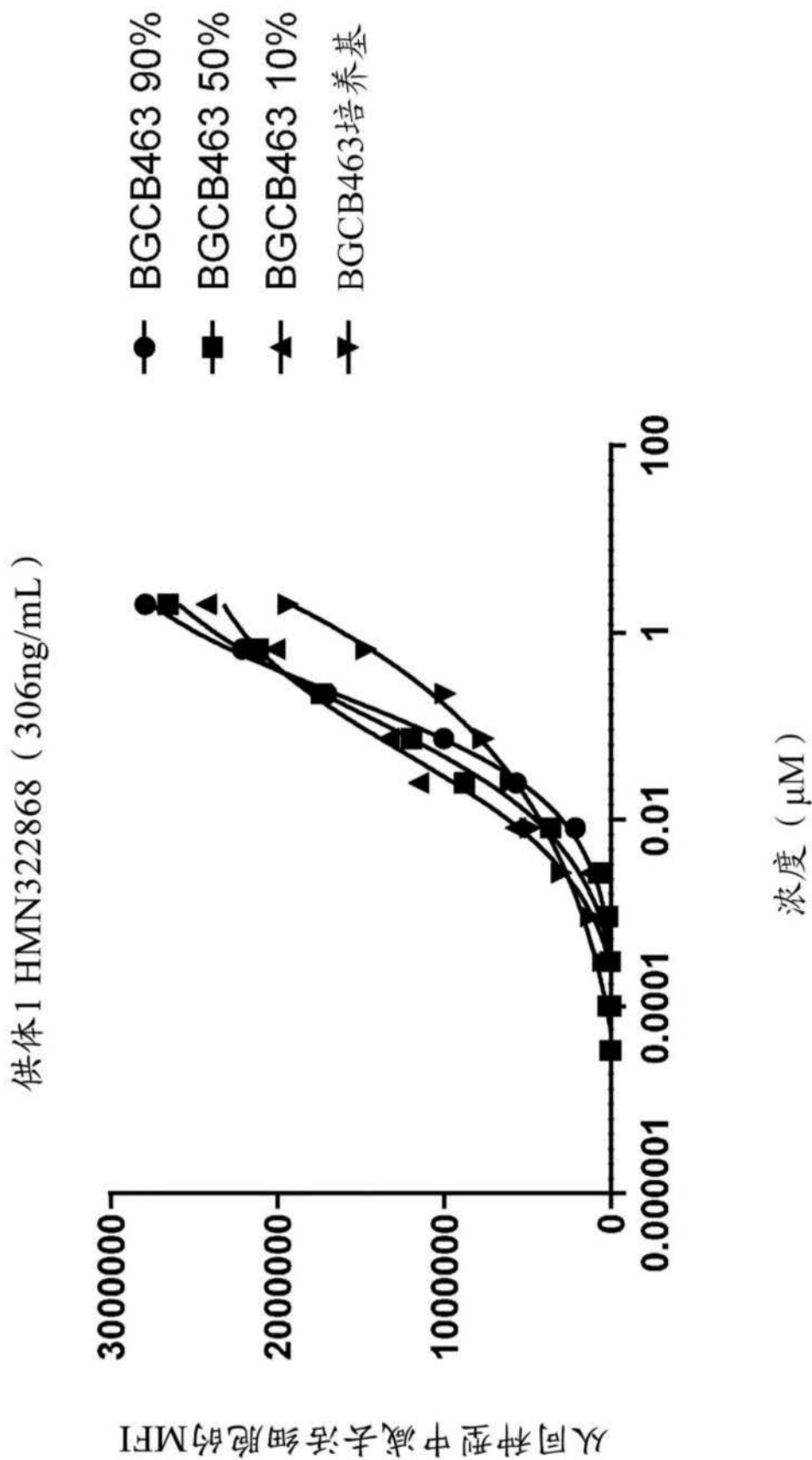


图15A

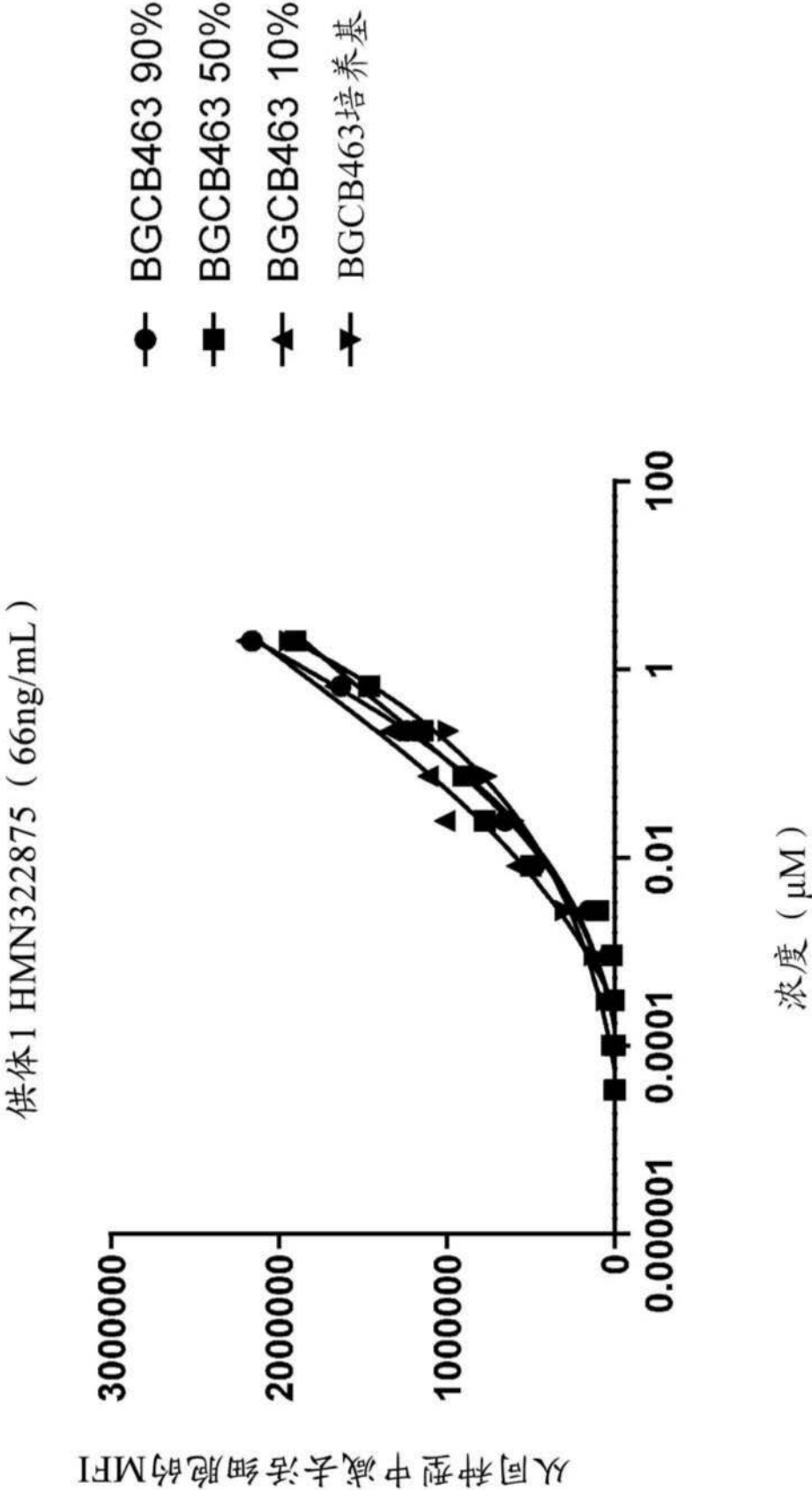


图15B

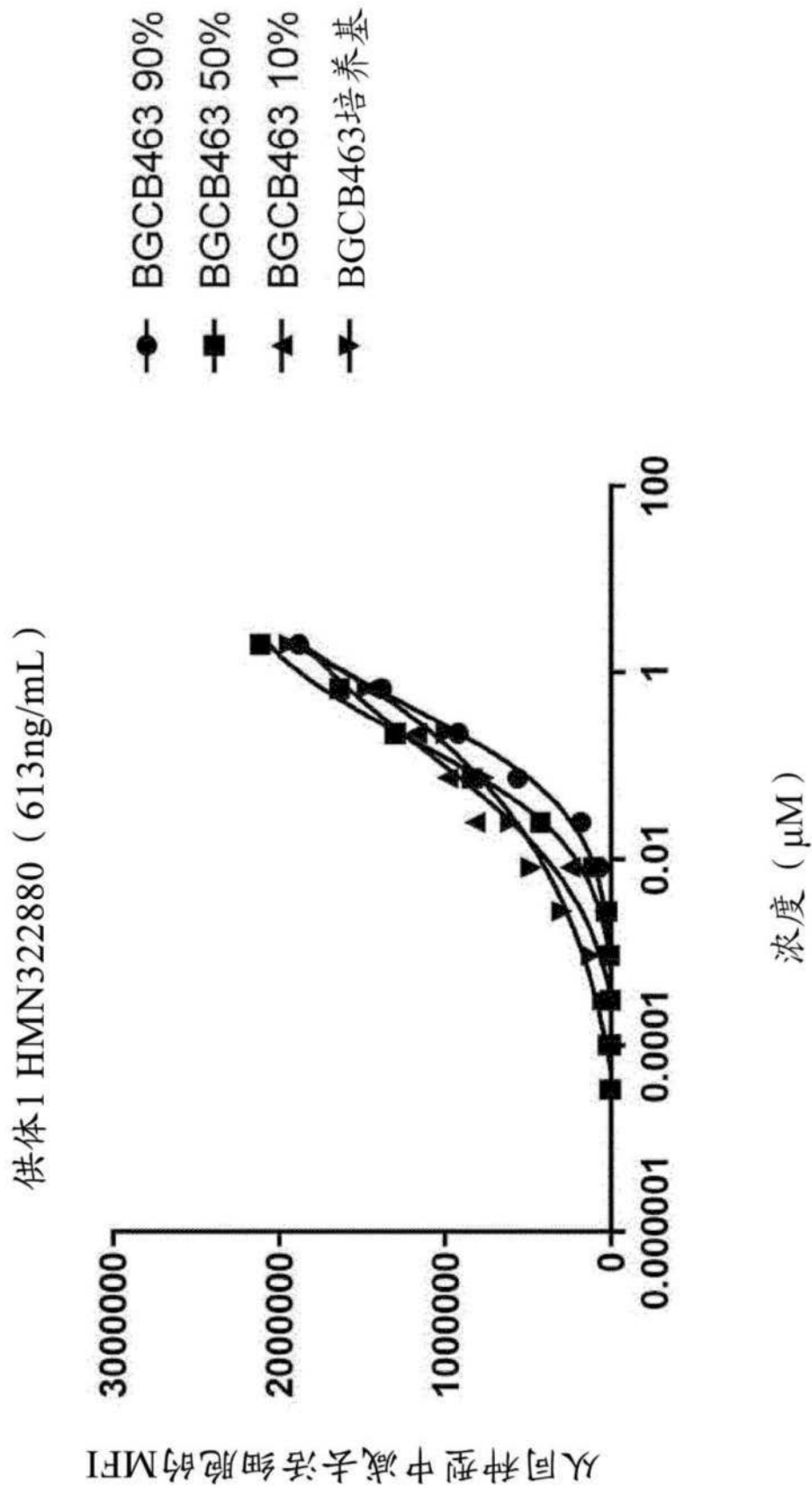


图15C

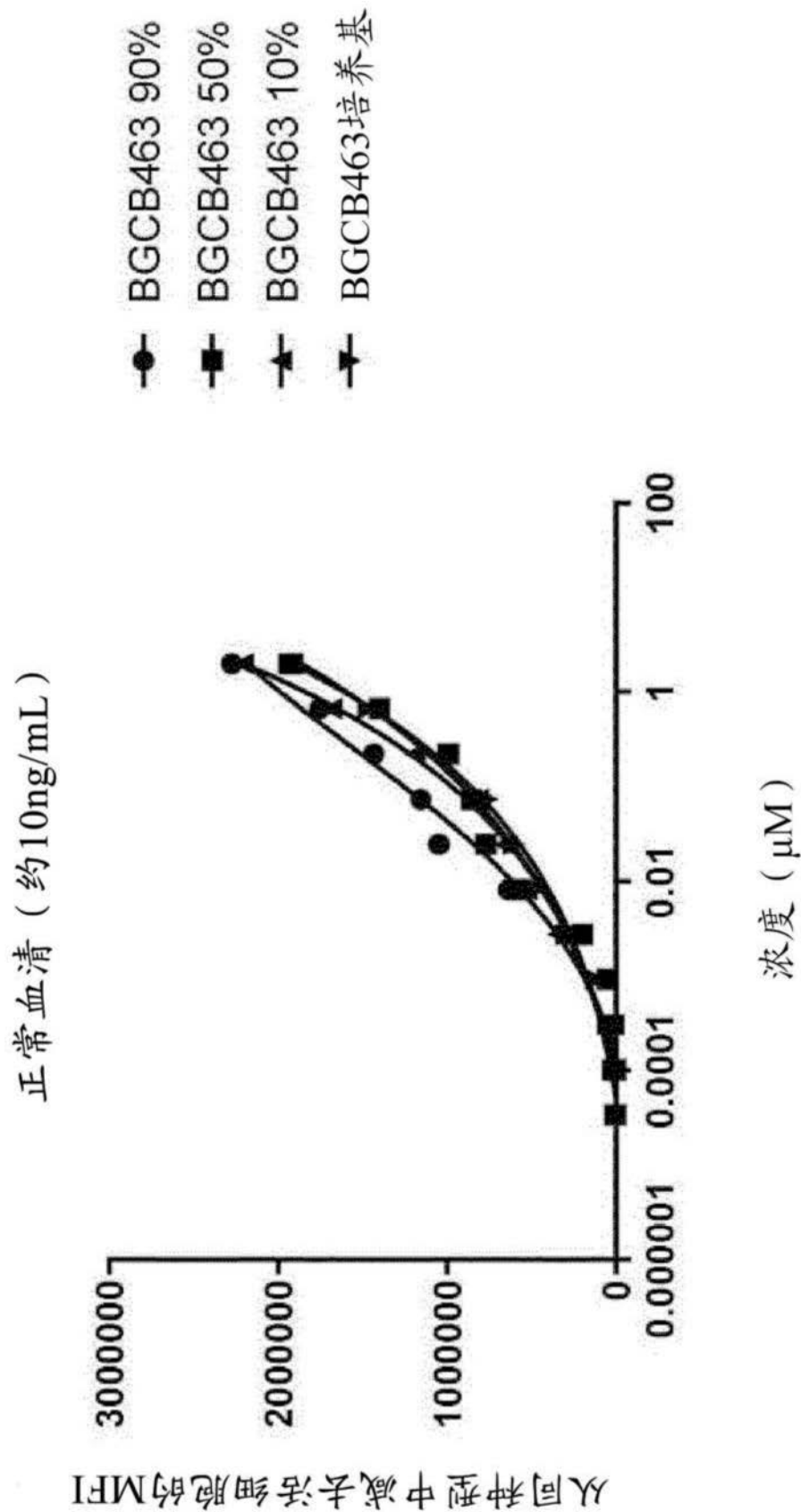


图15D

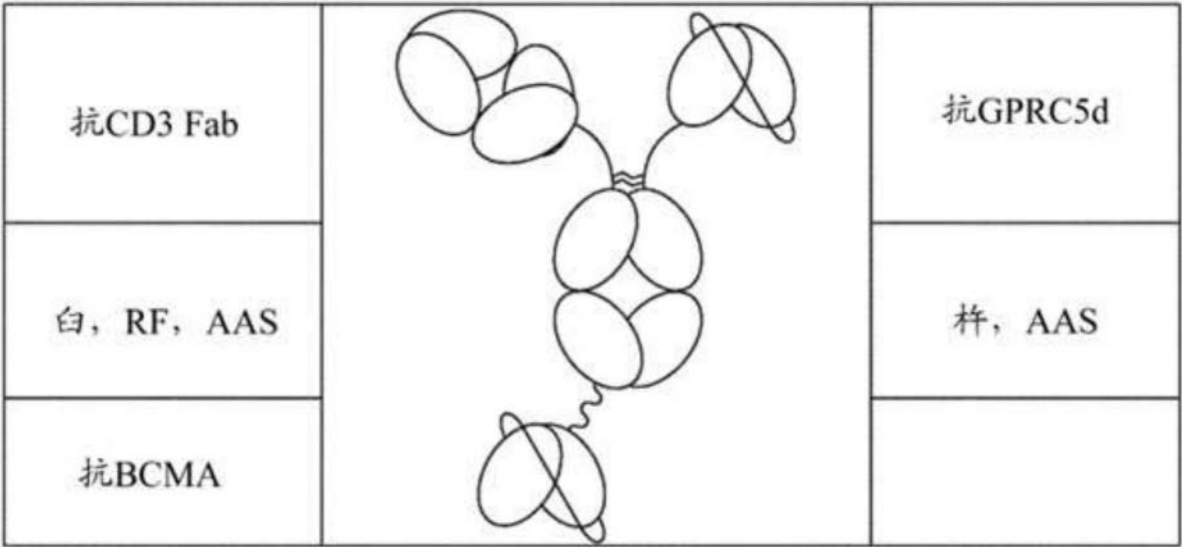


图16

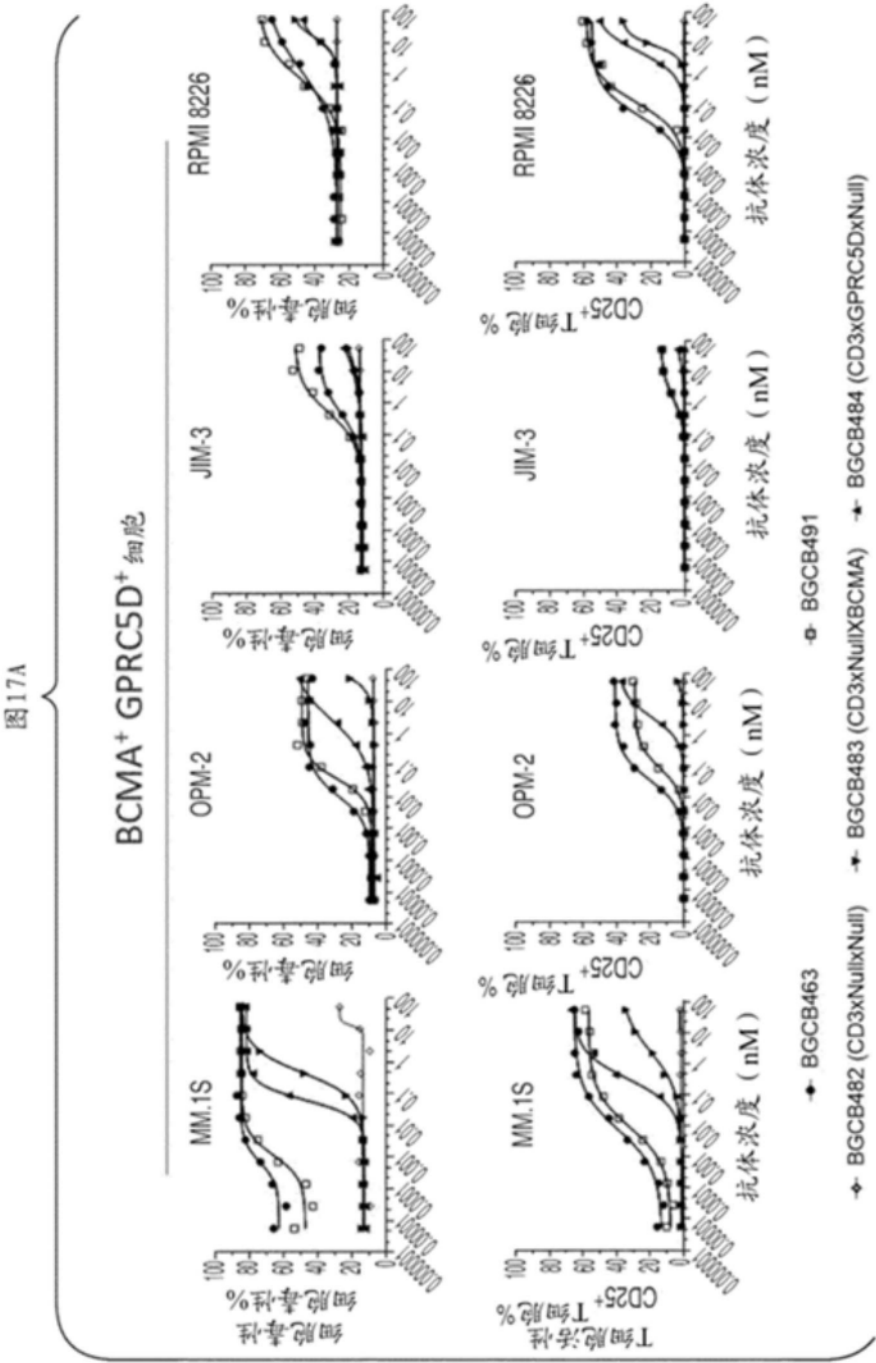


图17A

图17B

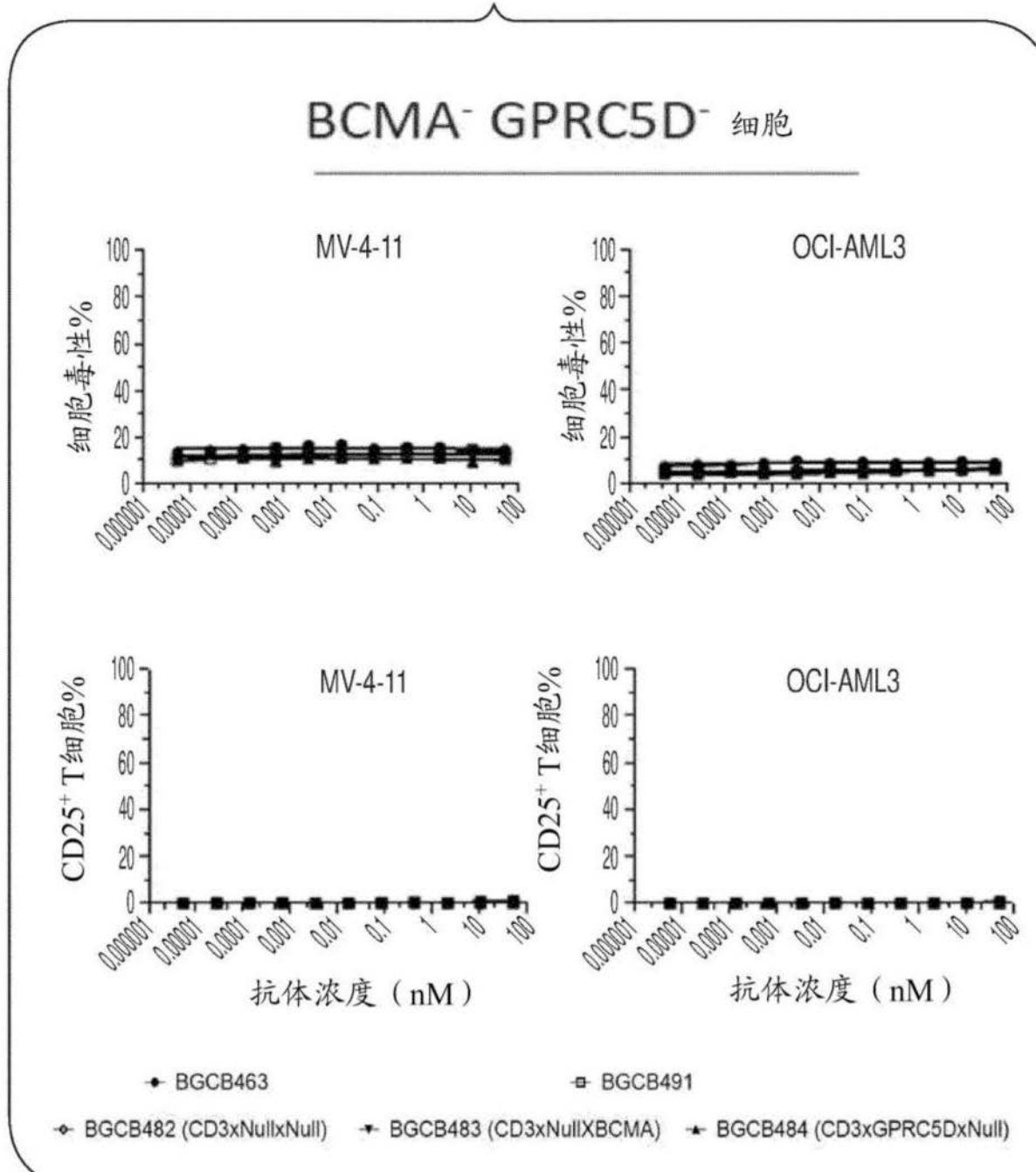


图17B

图18A

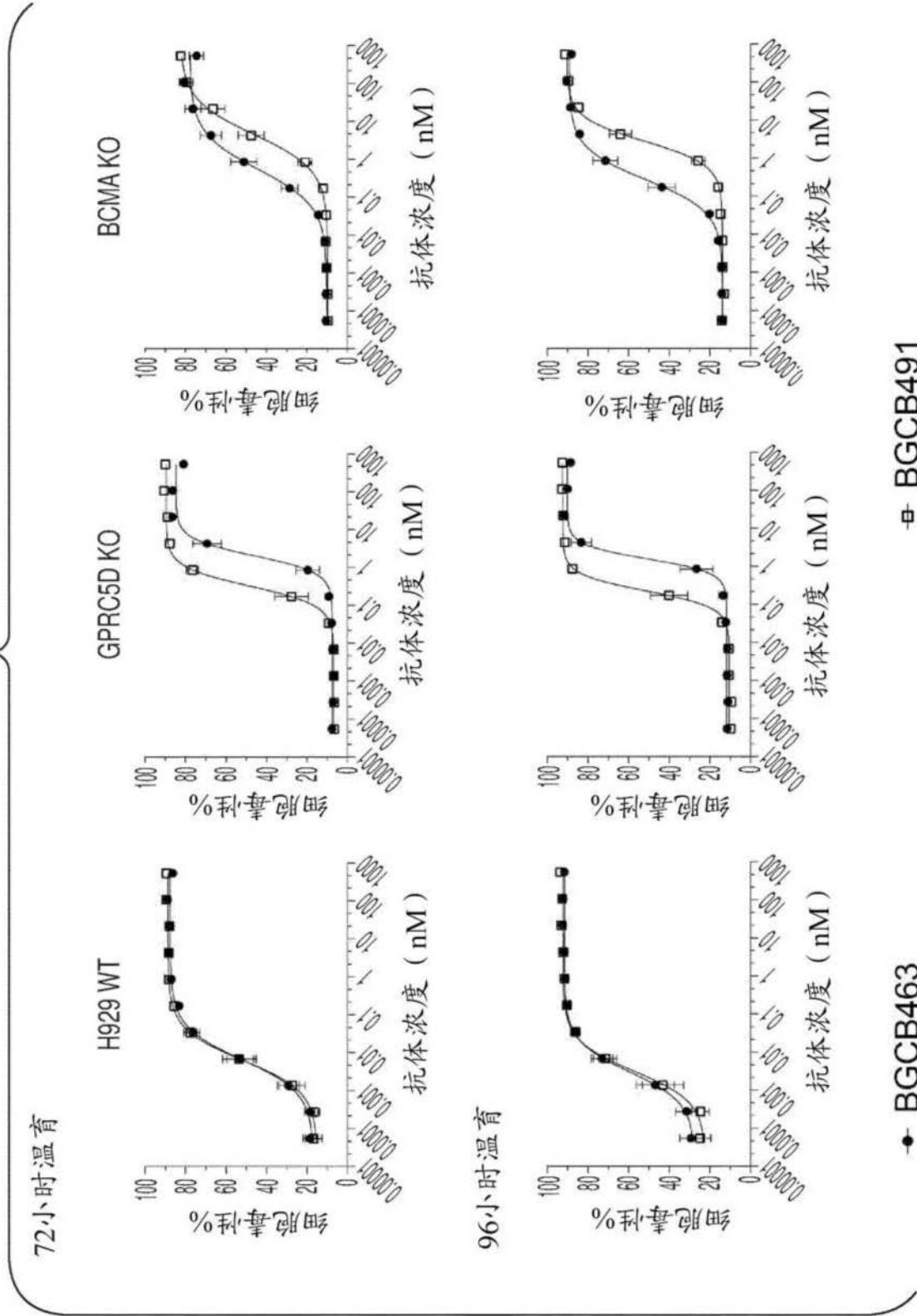


图18A

图18B

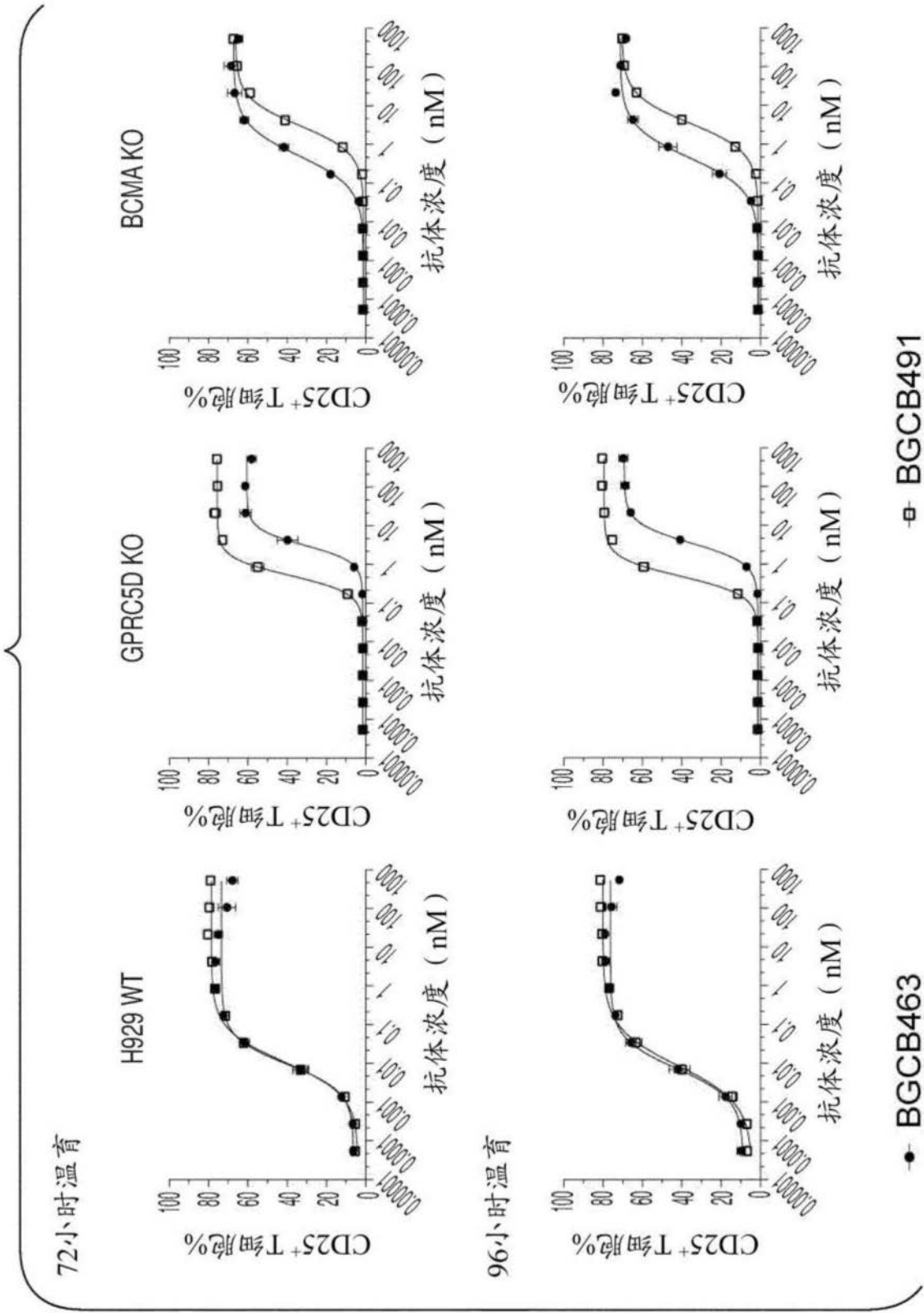


图18B

图19

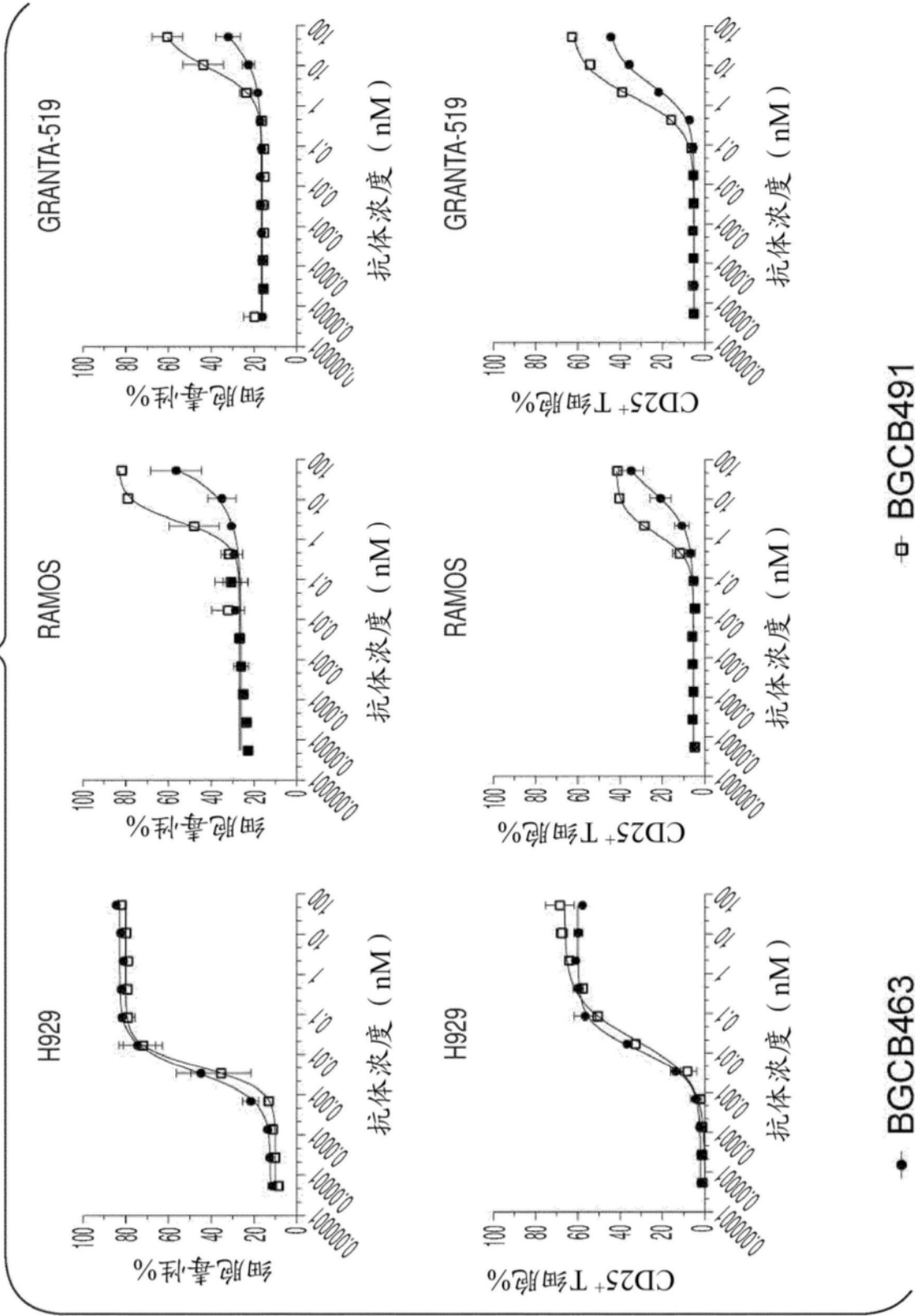


图19

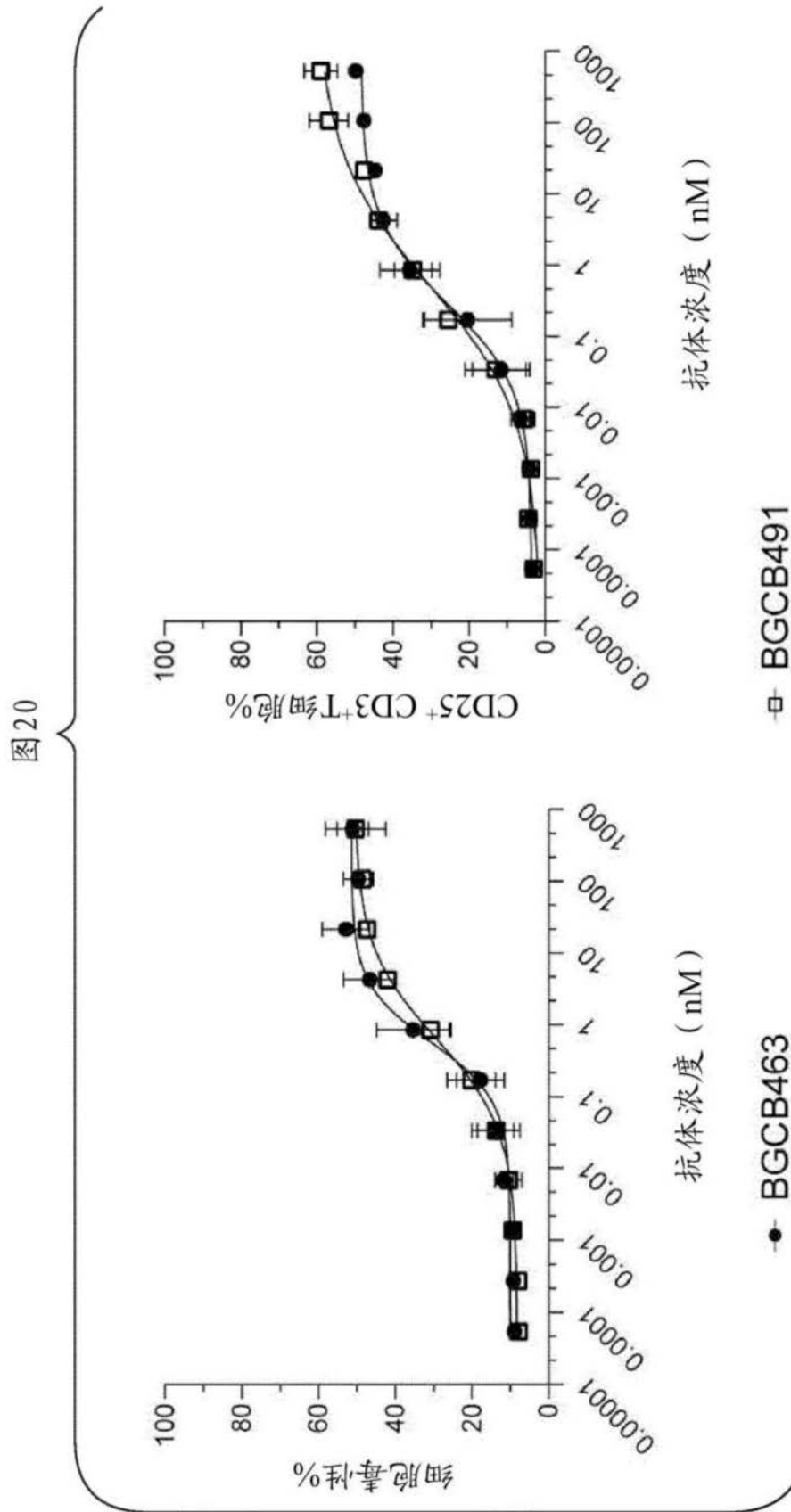


图20

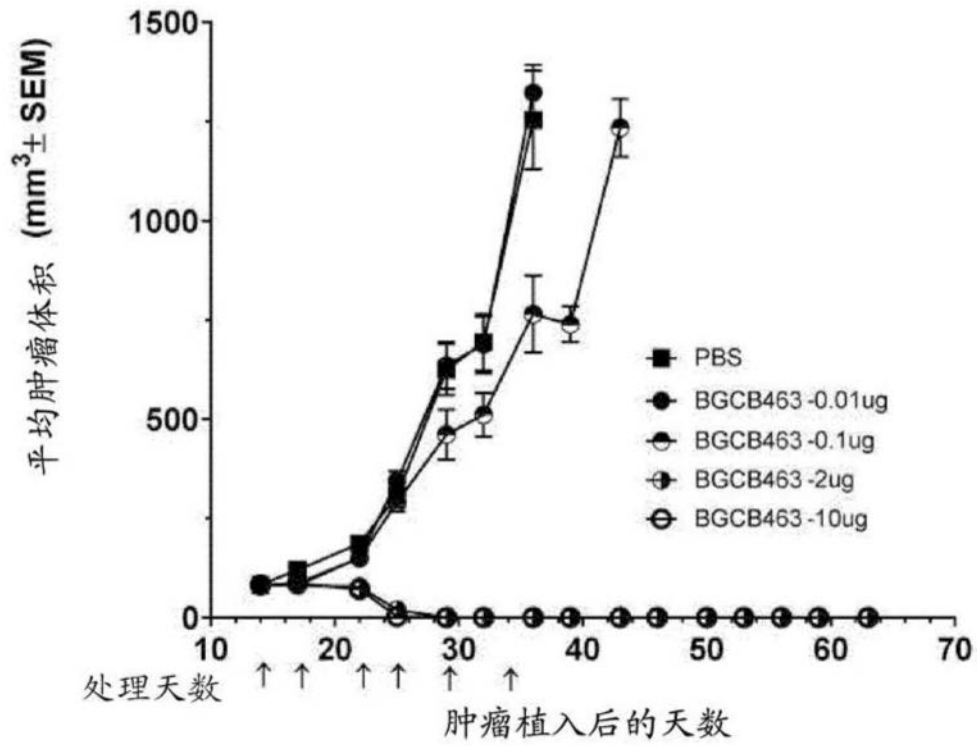


图21A

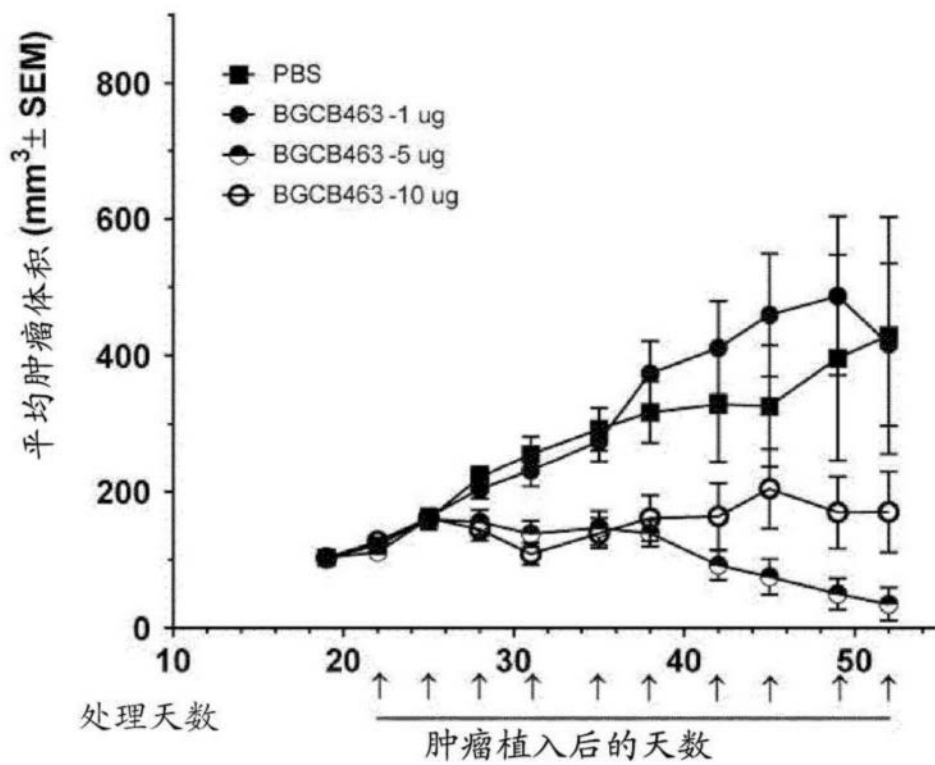


图21B

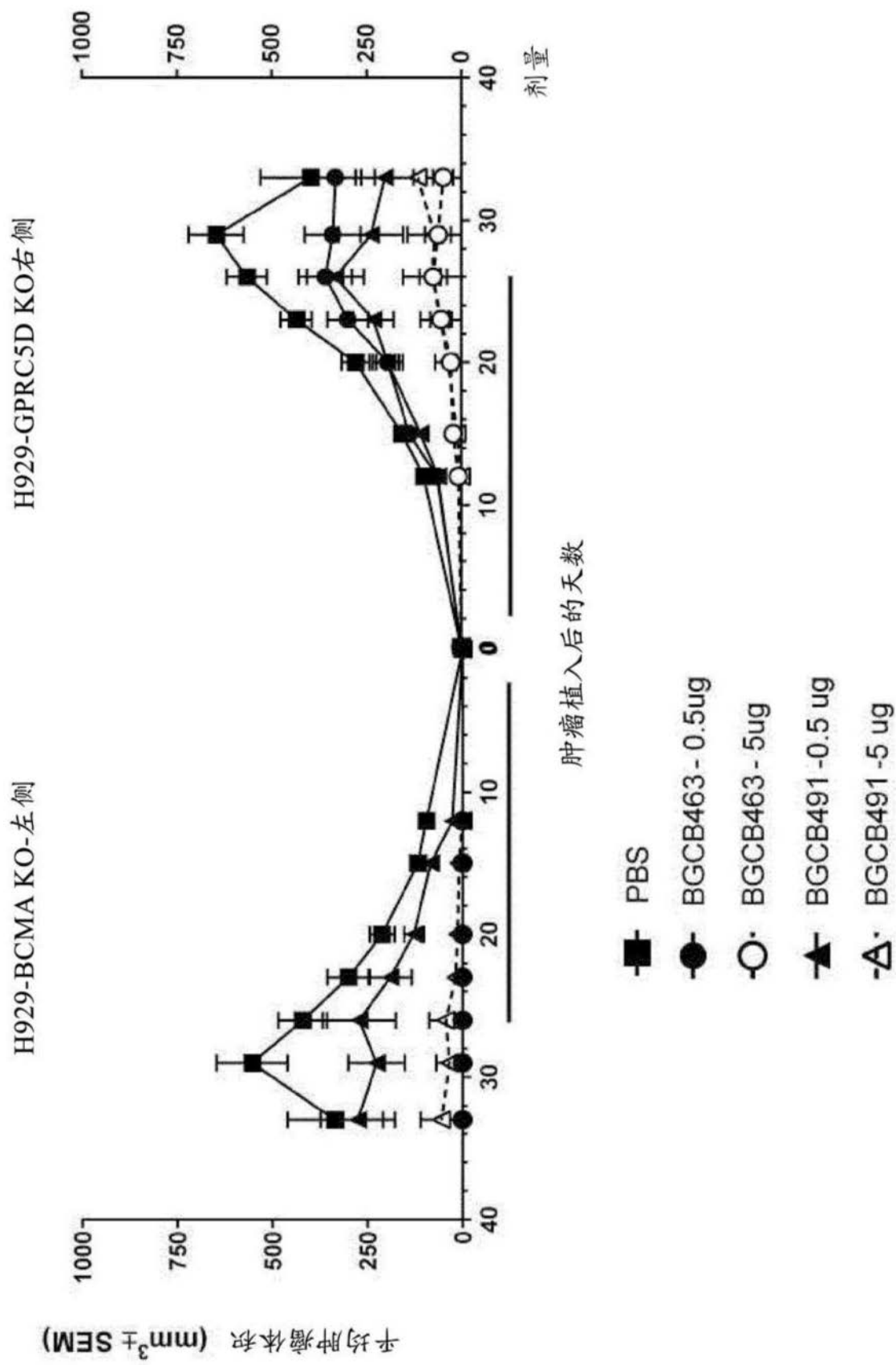


图22

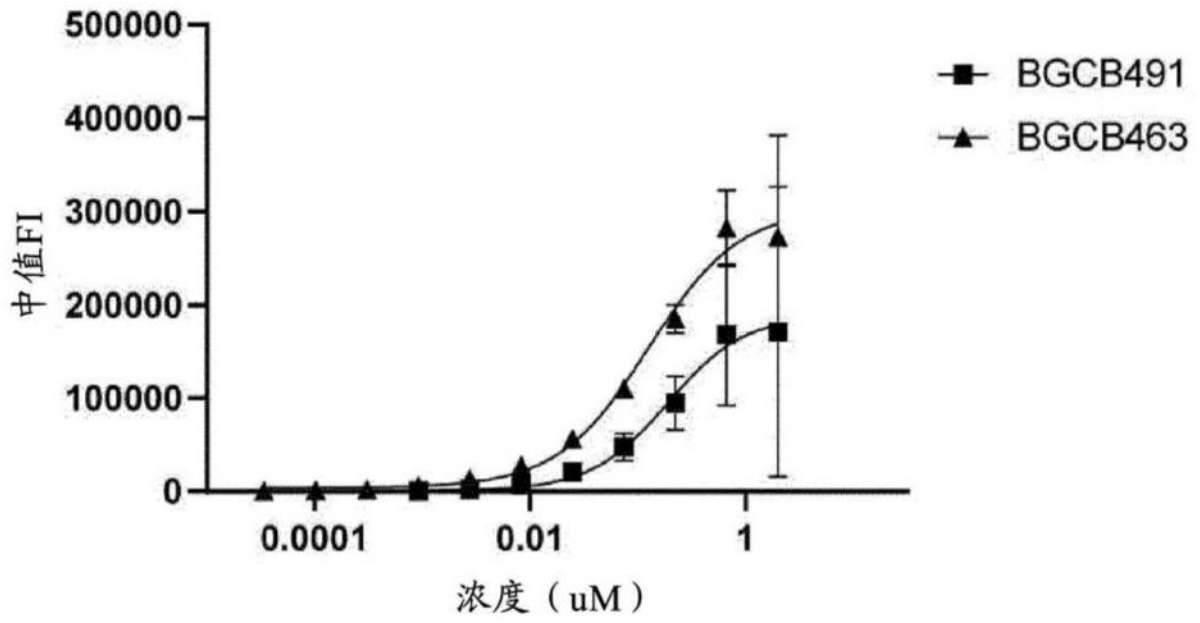


图23

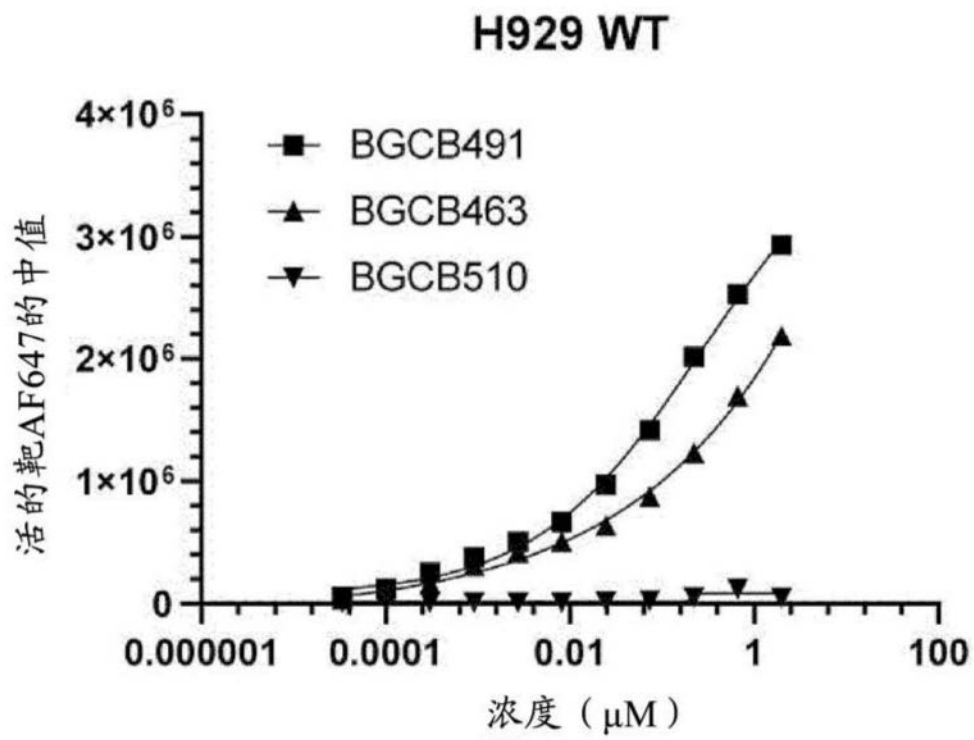


图24A

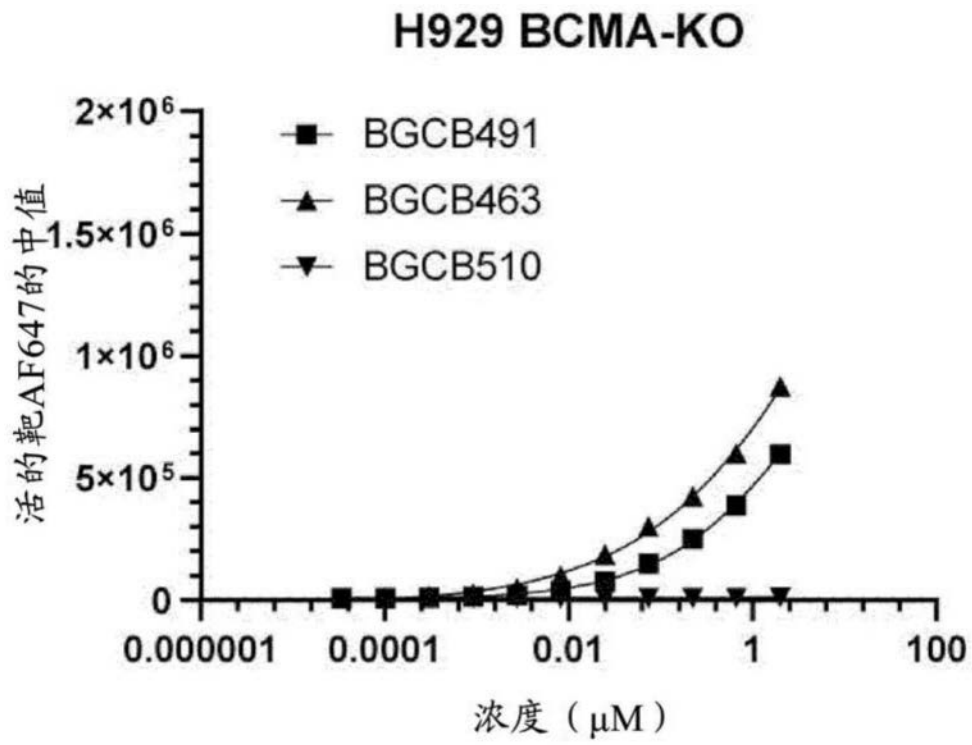


图24B

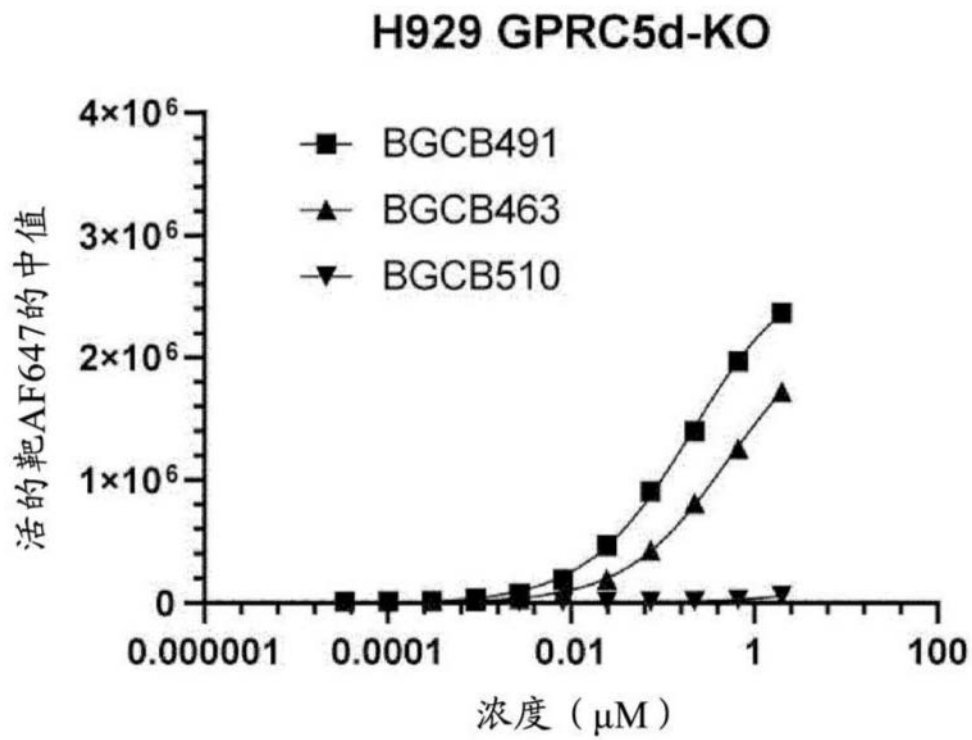


图24C

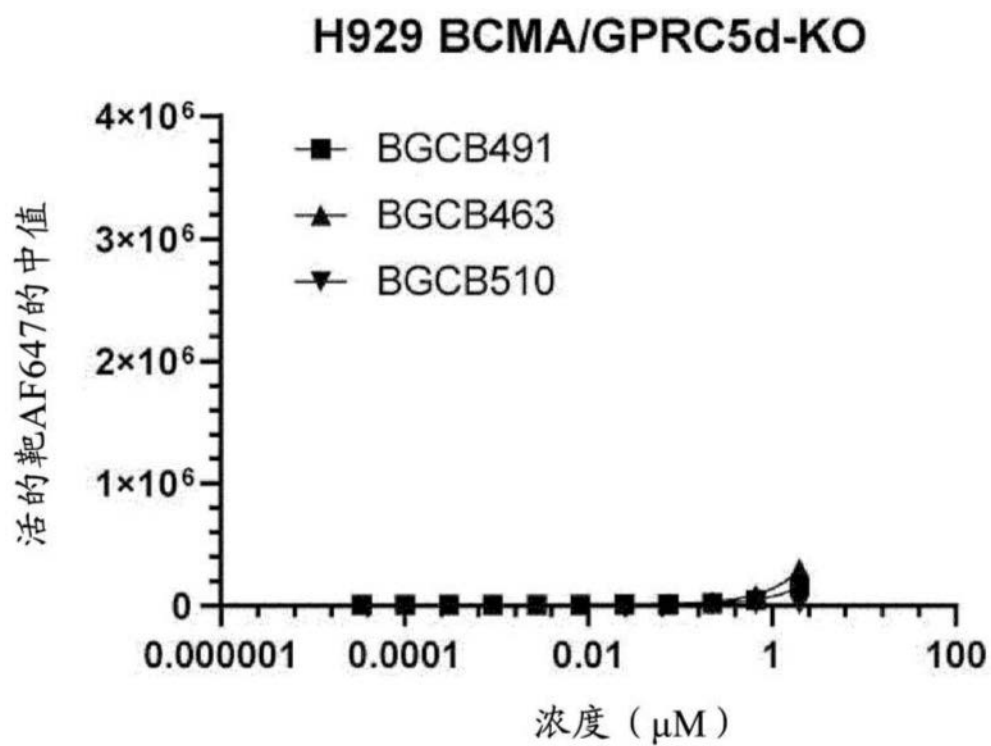


图24D

图25

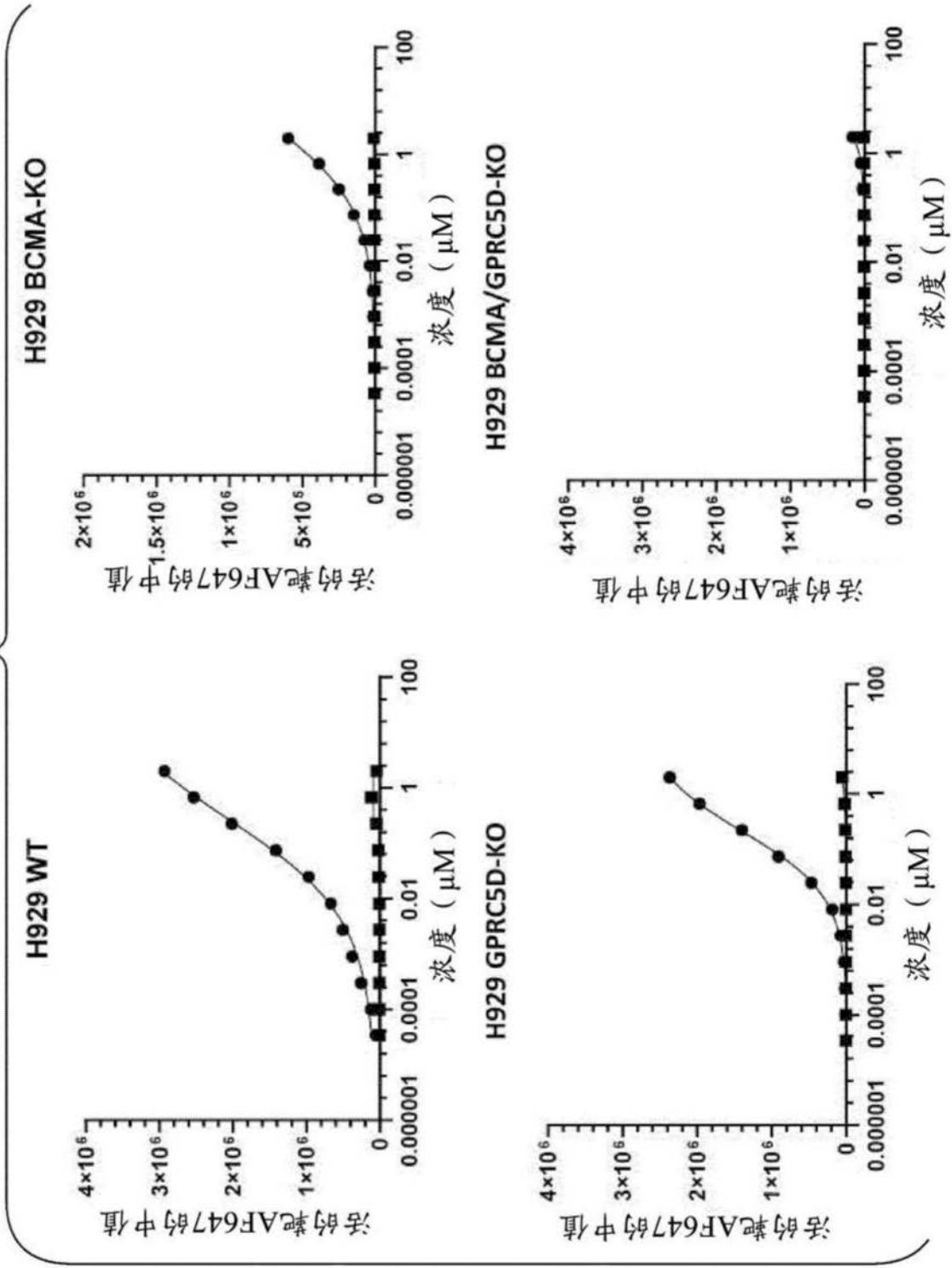


图25

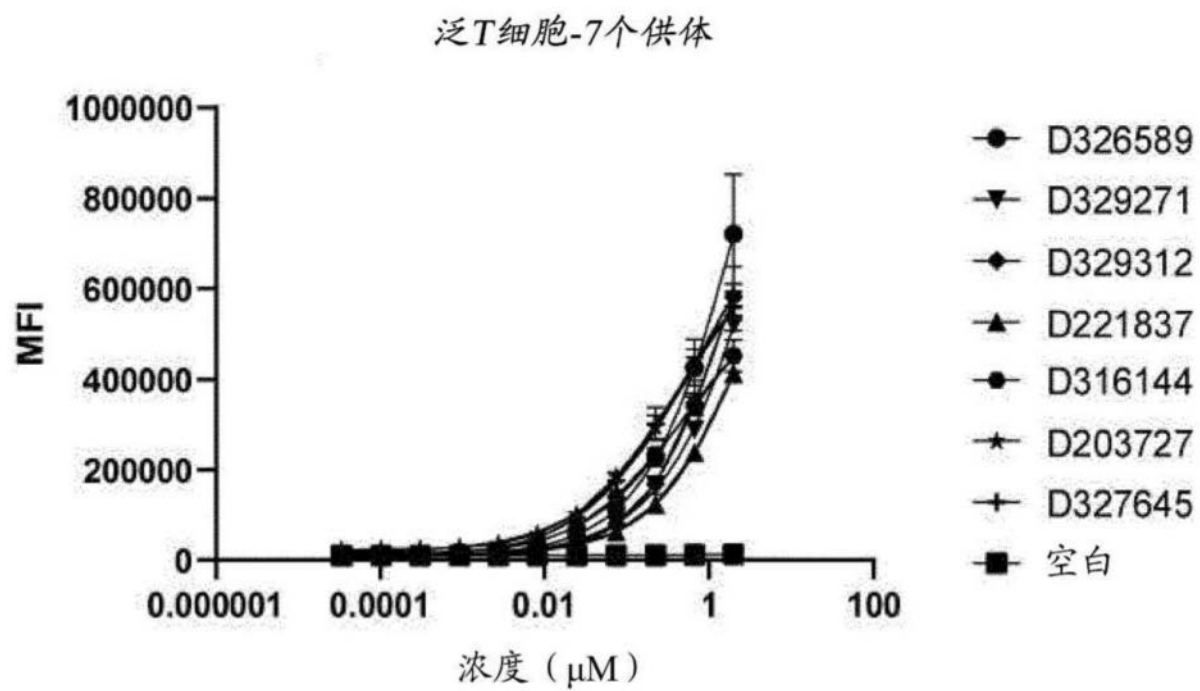


图26

图 27

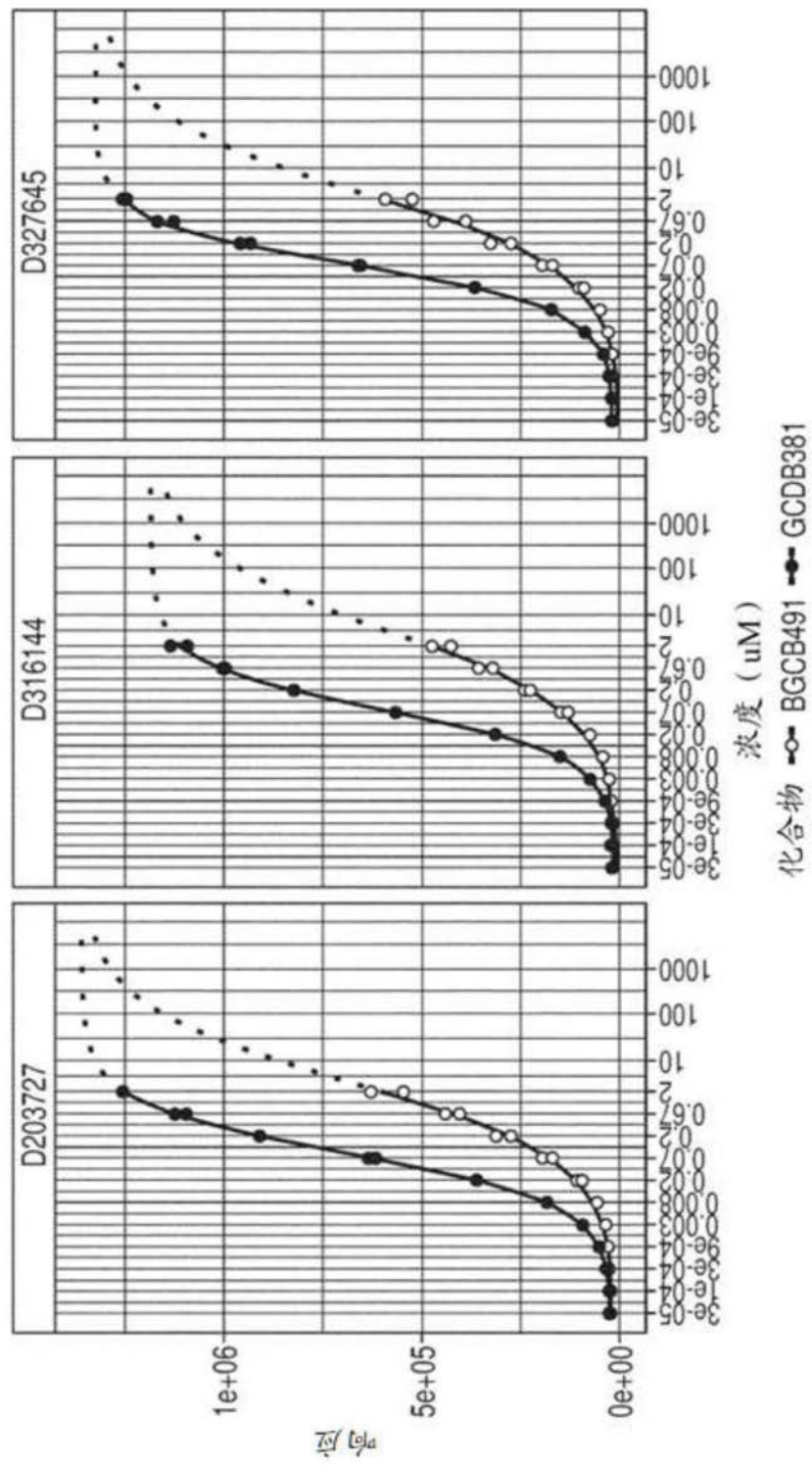


图27

图 28A

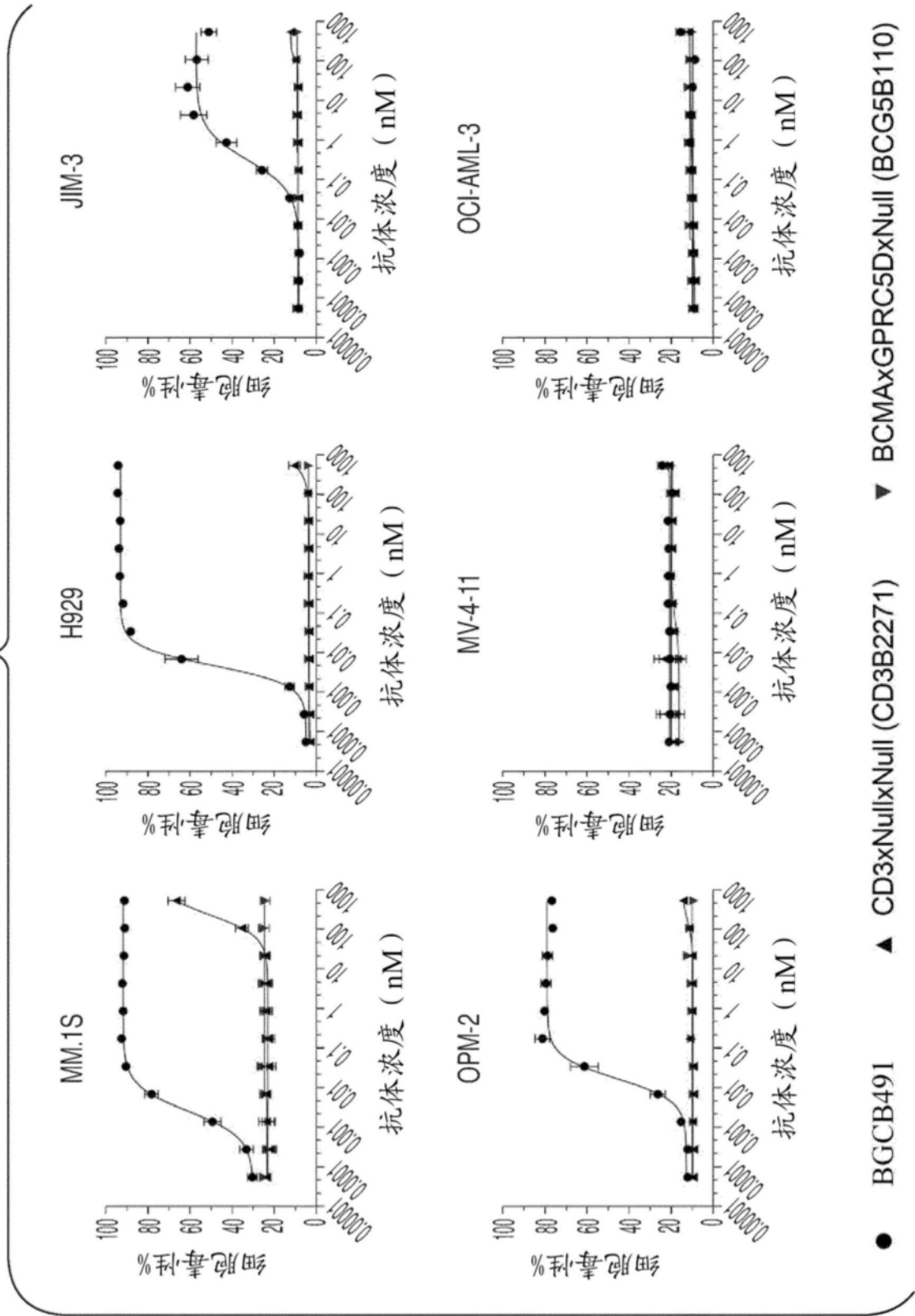


图28A

图 28B

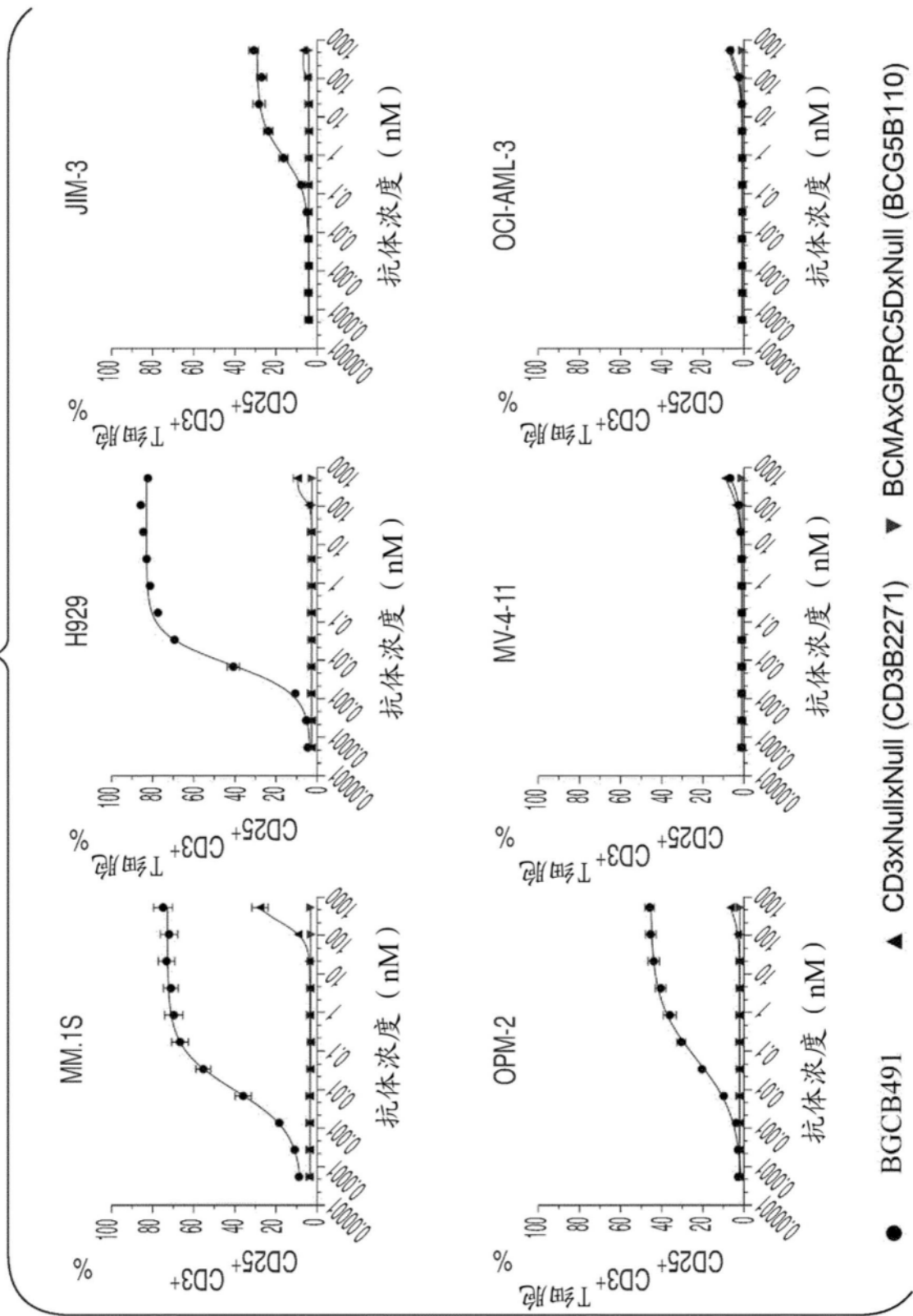


图28B

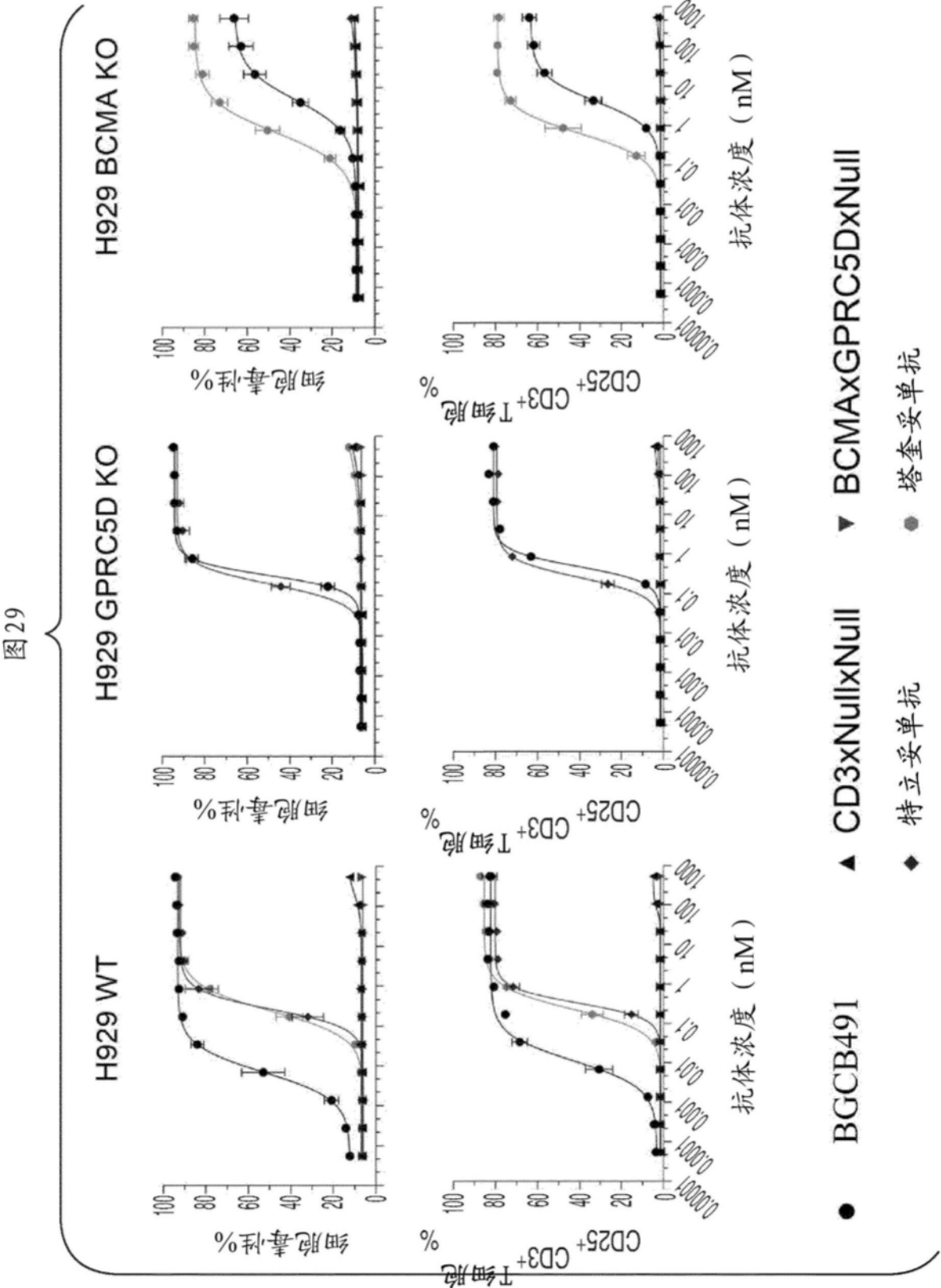


图29

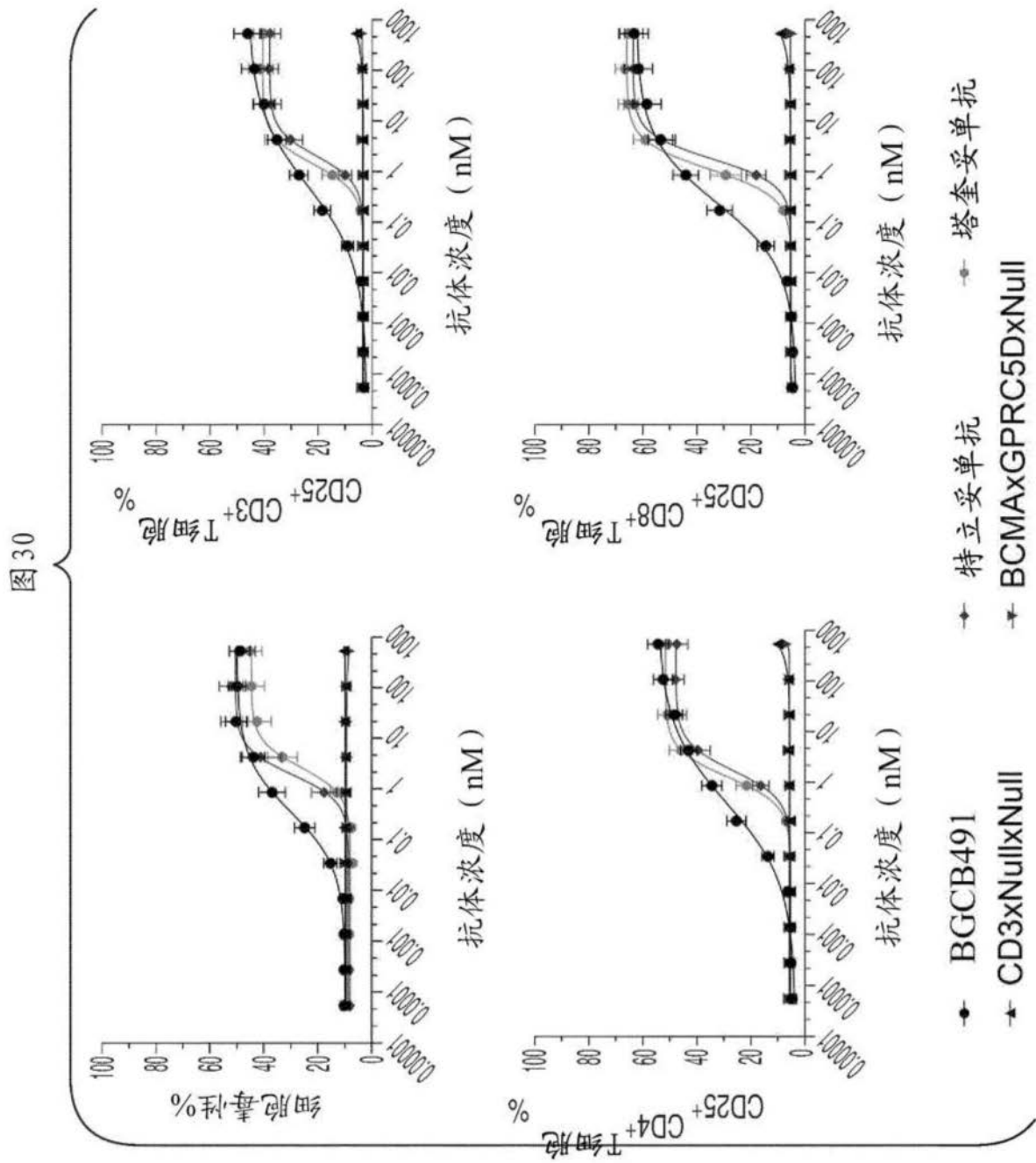


图30

图 31

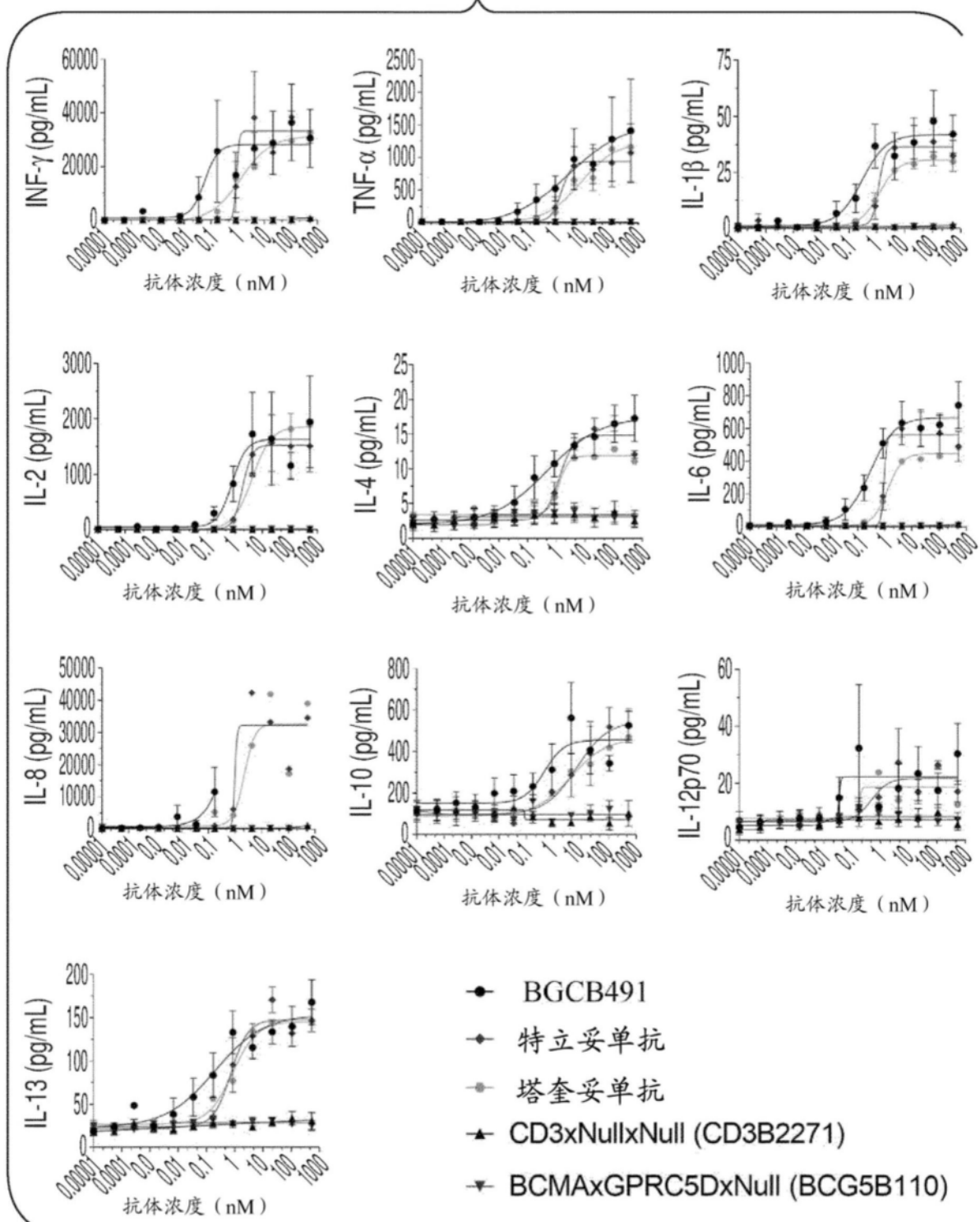


图31

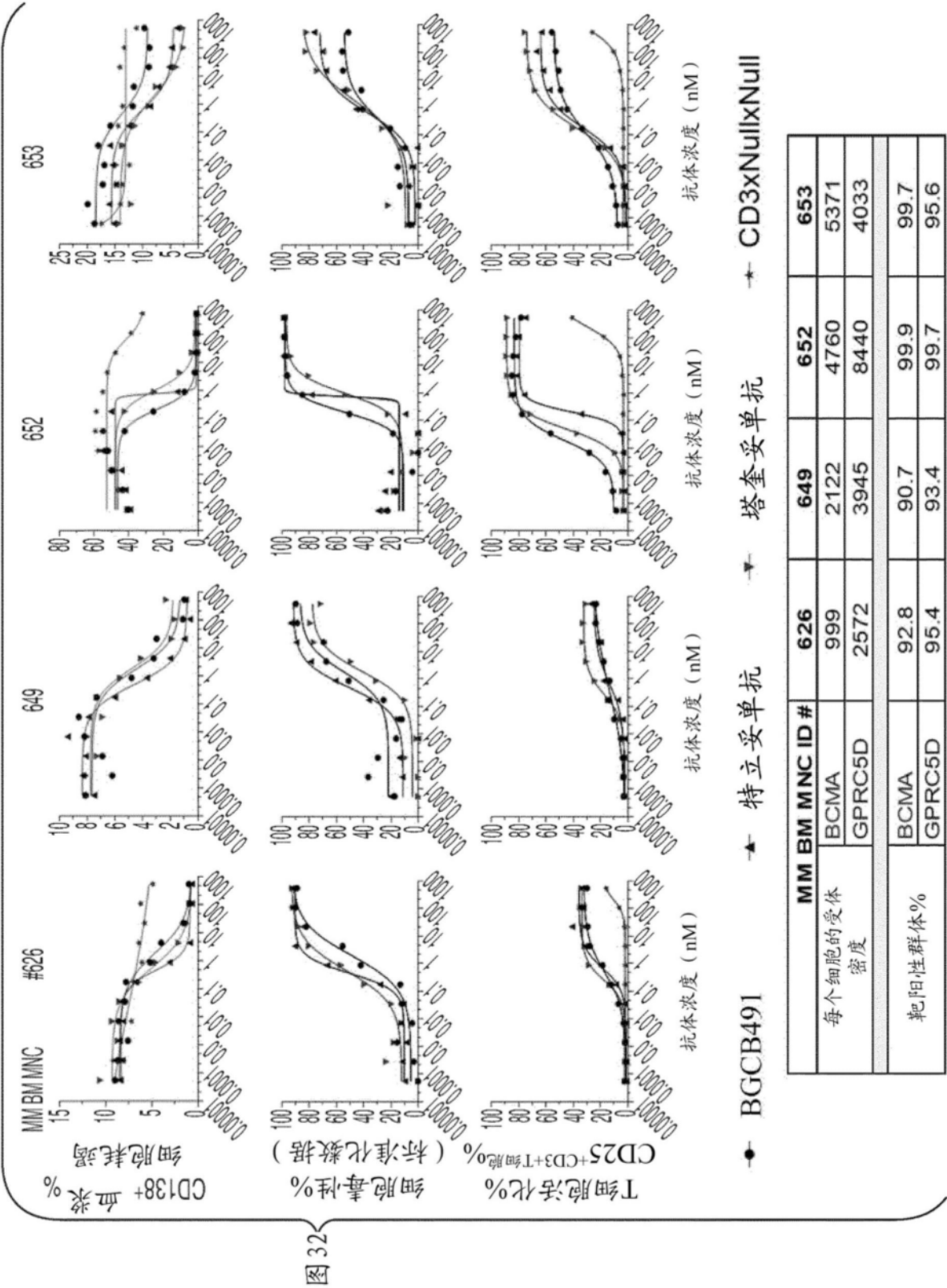


图32

图 33A

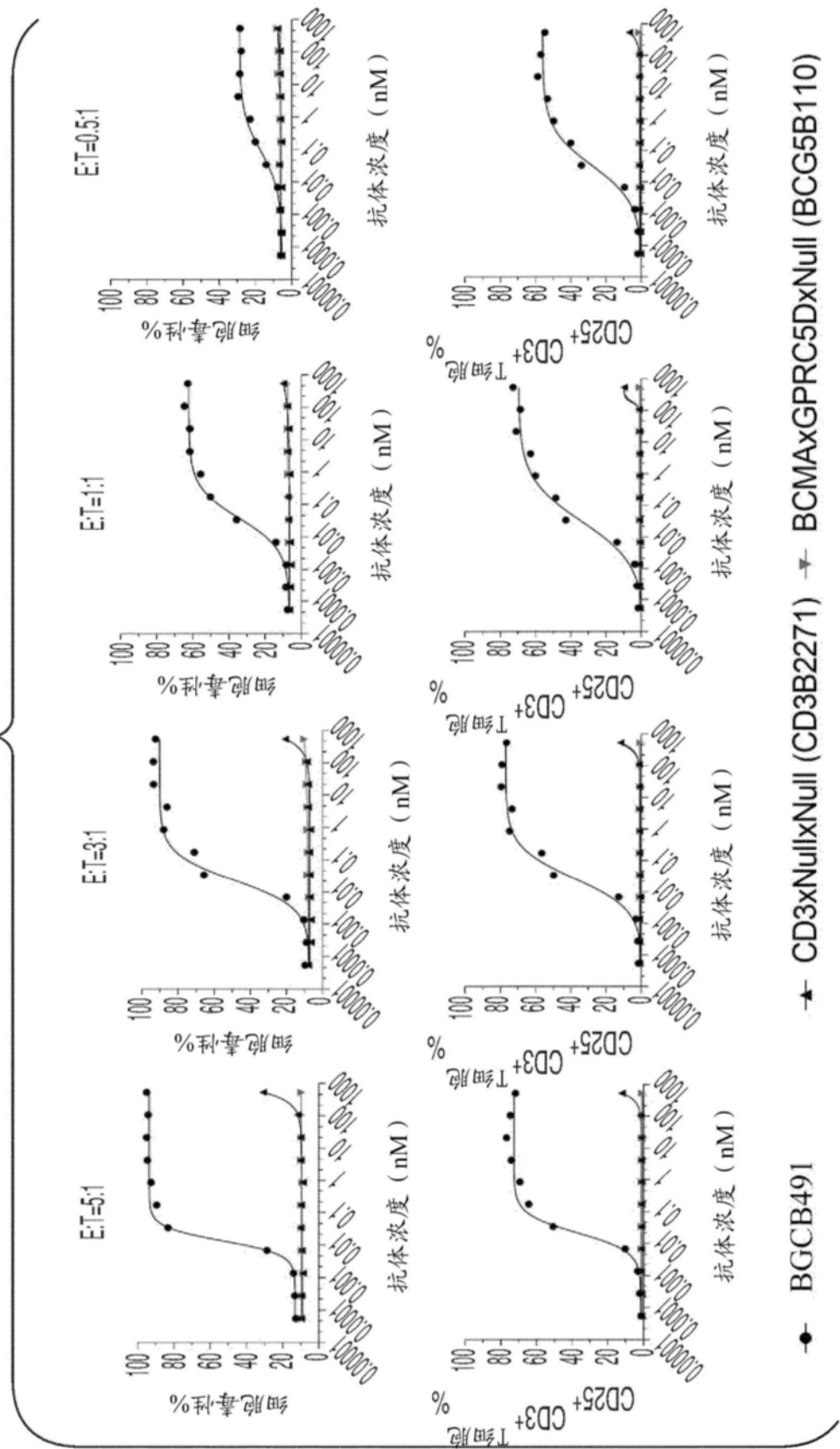


图33A

图 33B

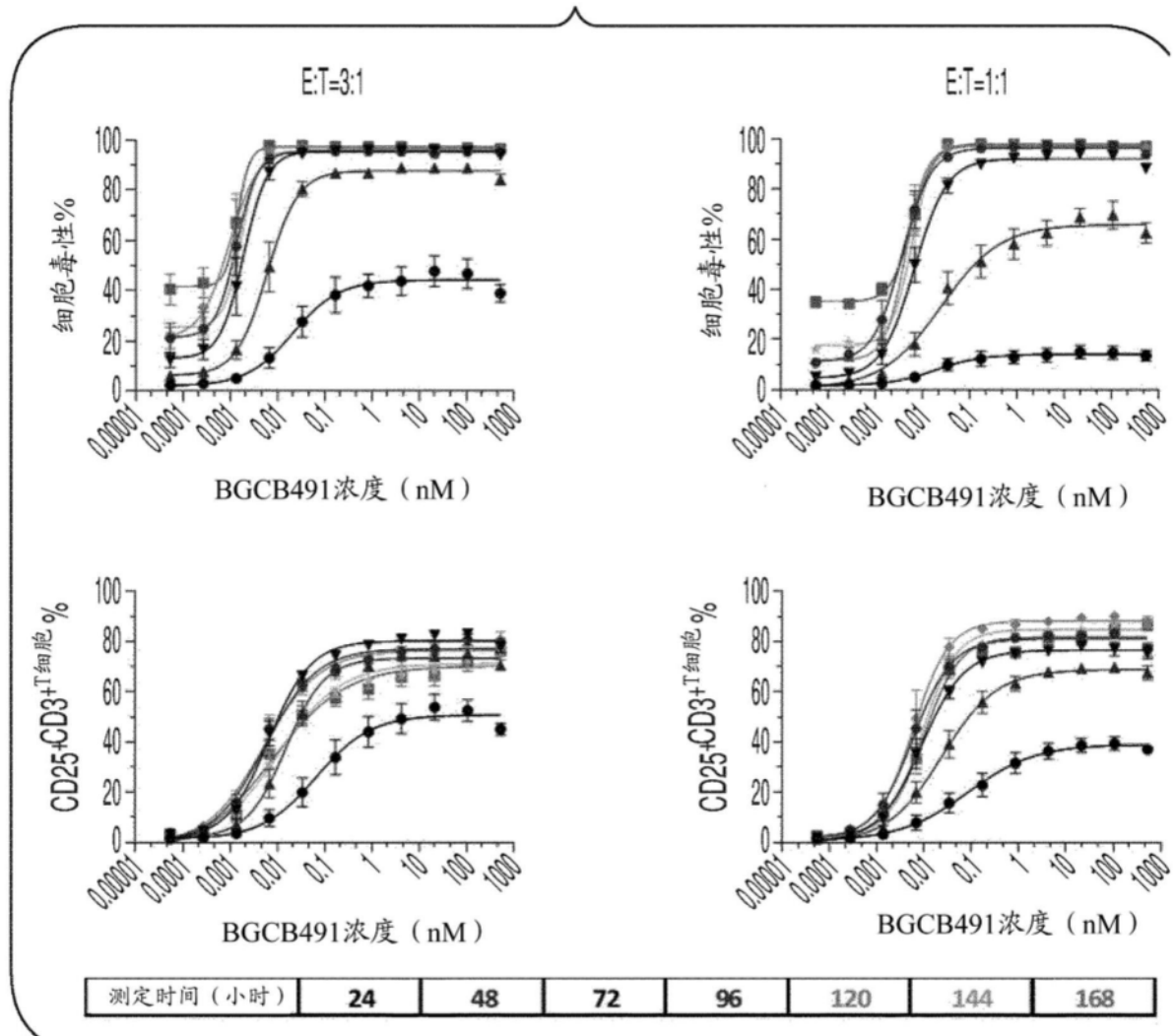


图33B

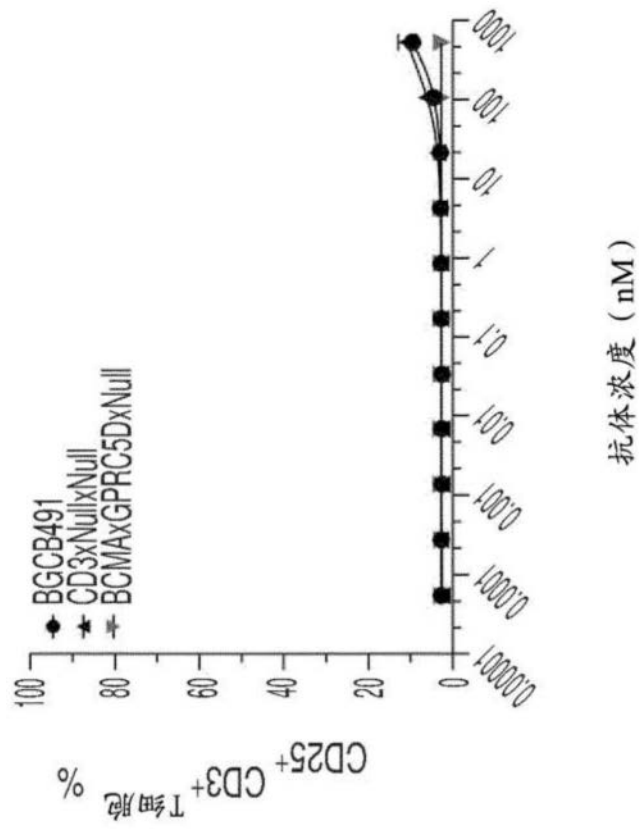


图34A

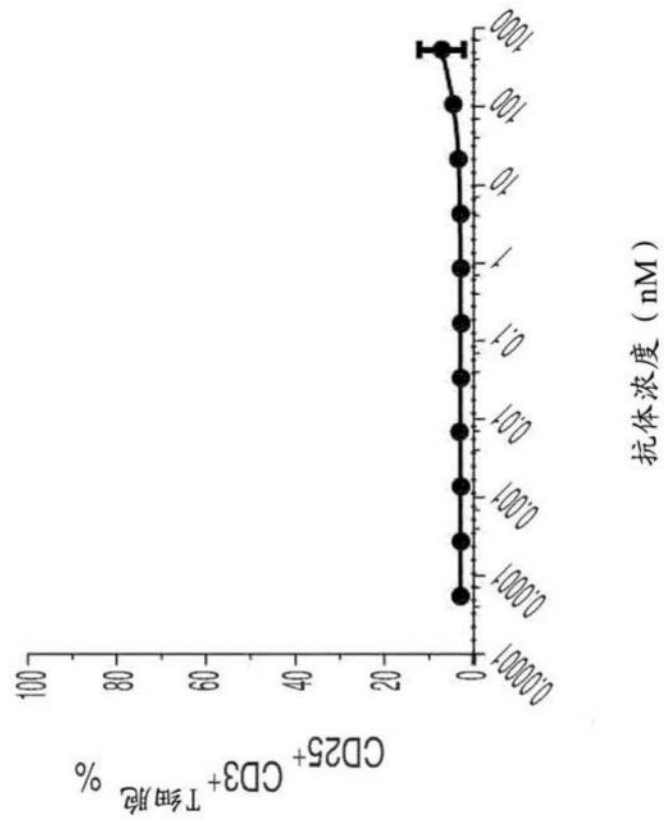


图34B

图 34C

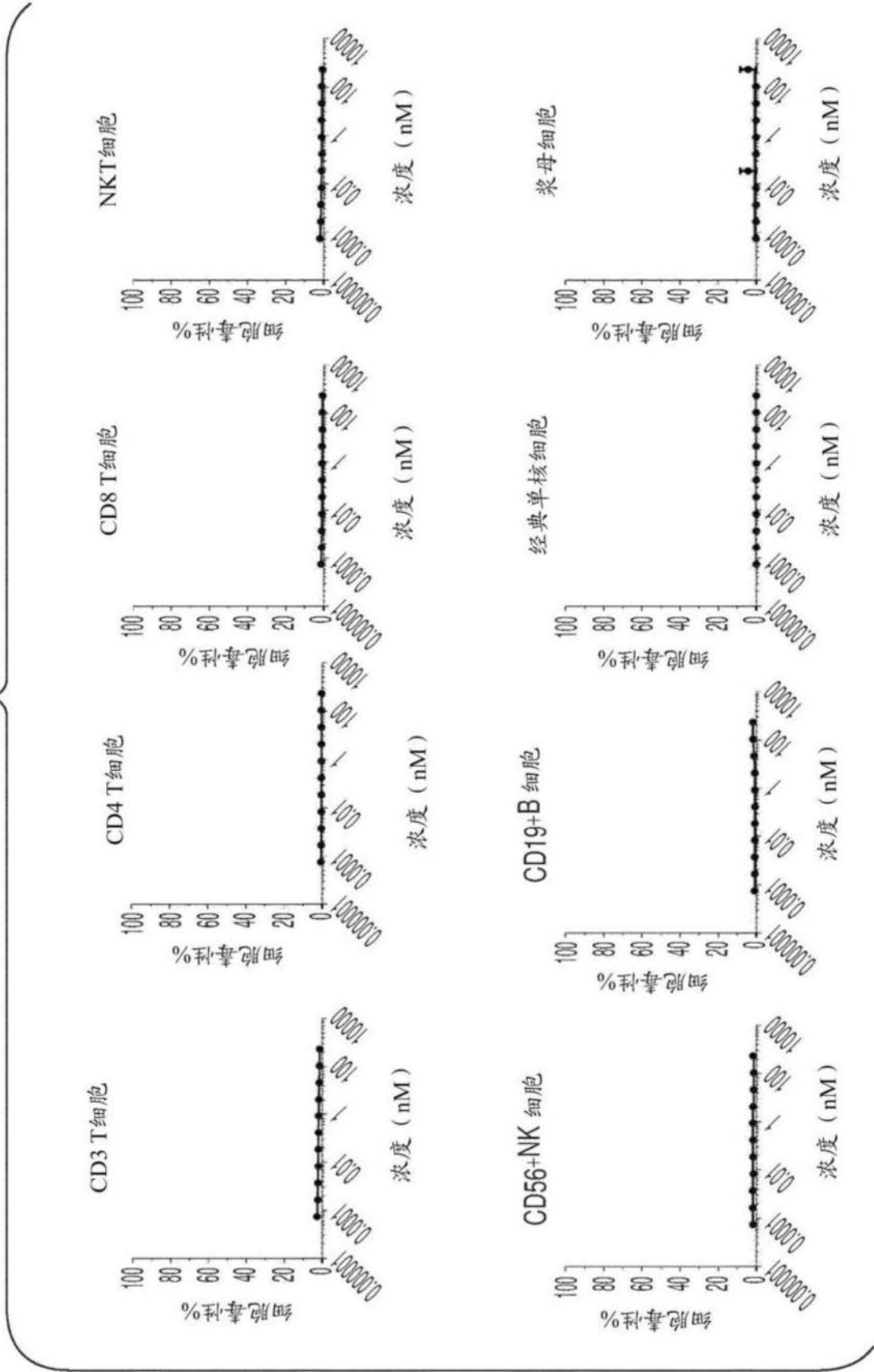


图34C

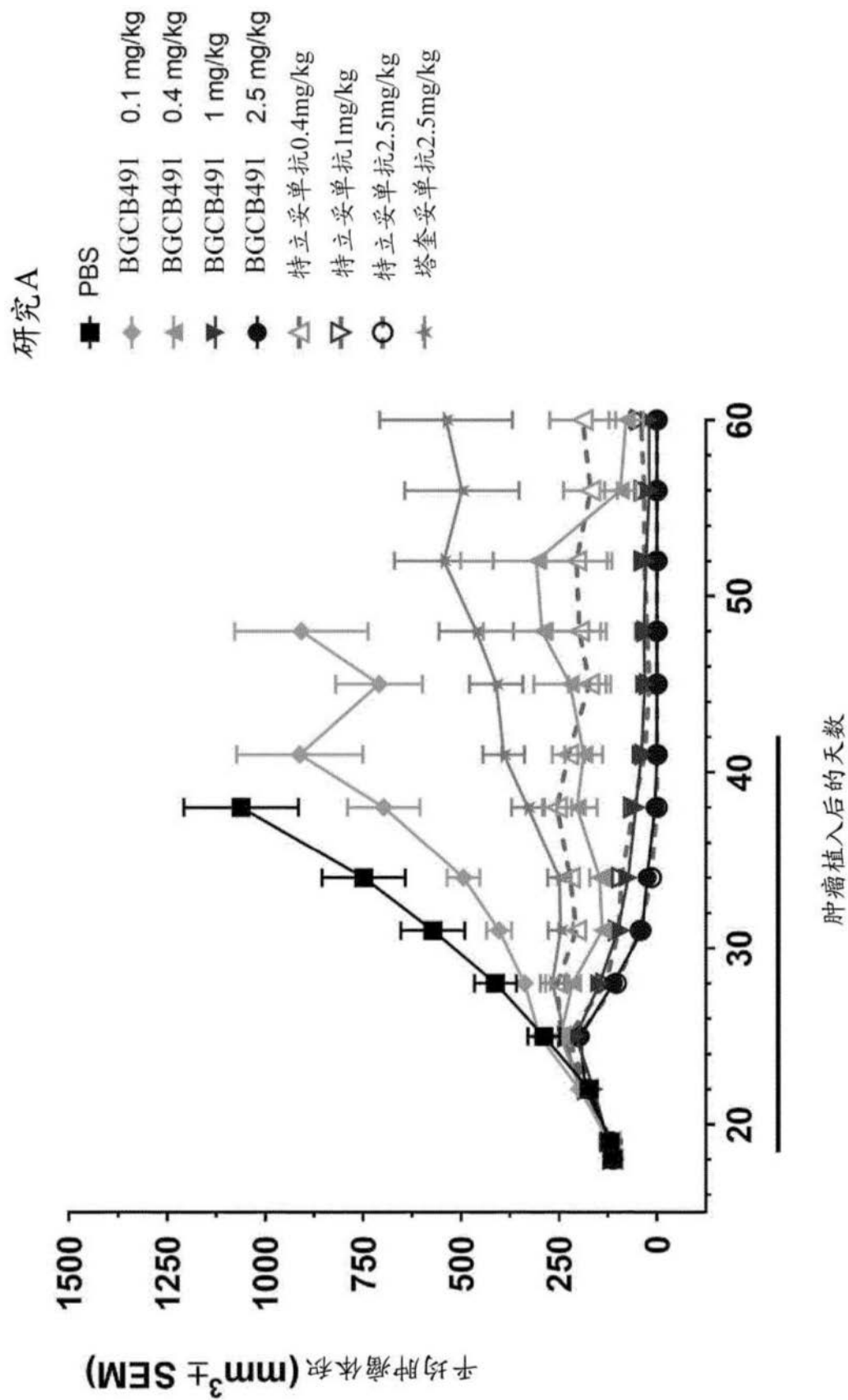


图35

图 36

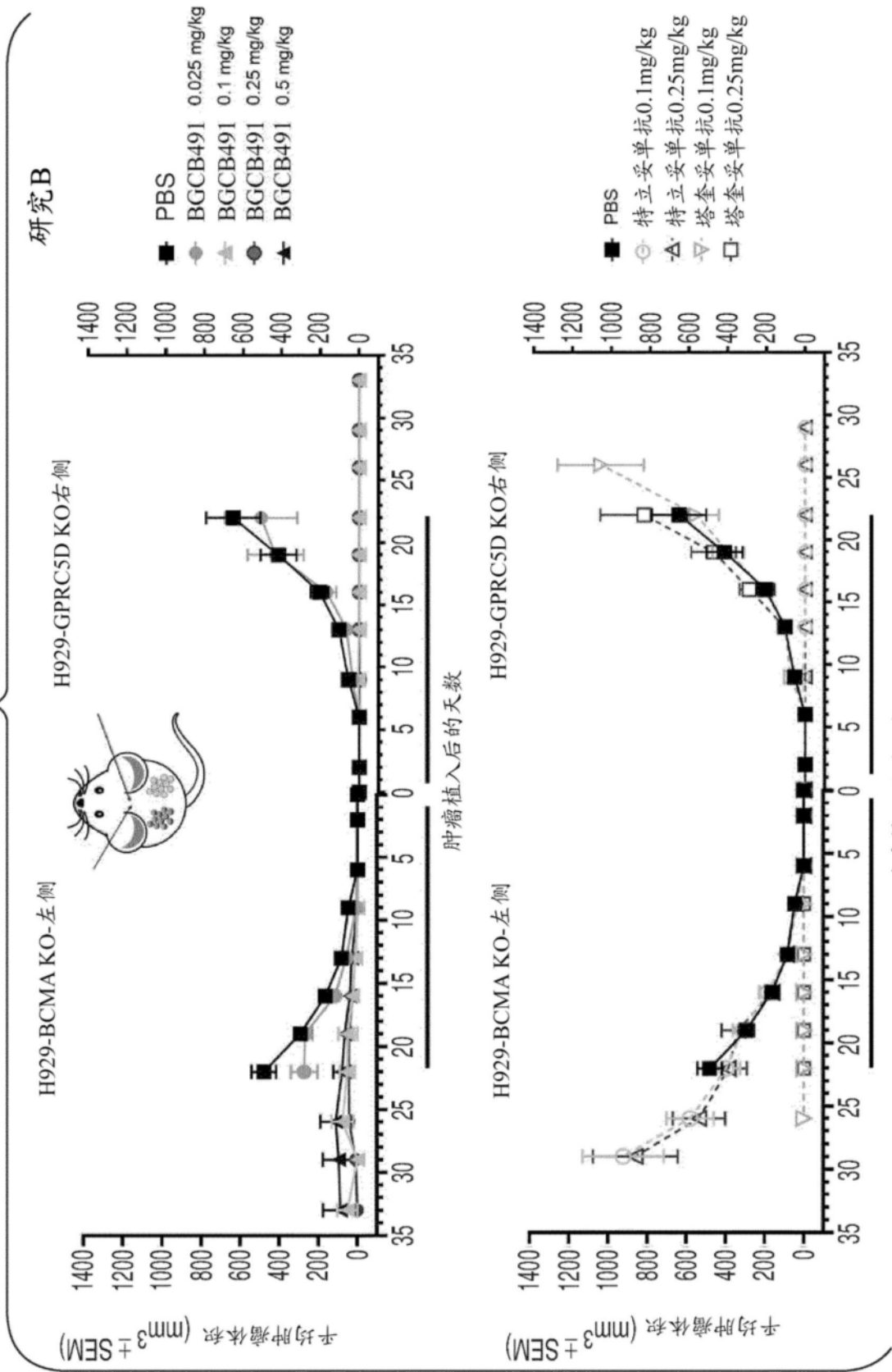


图36

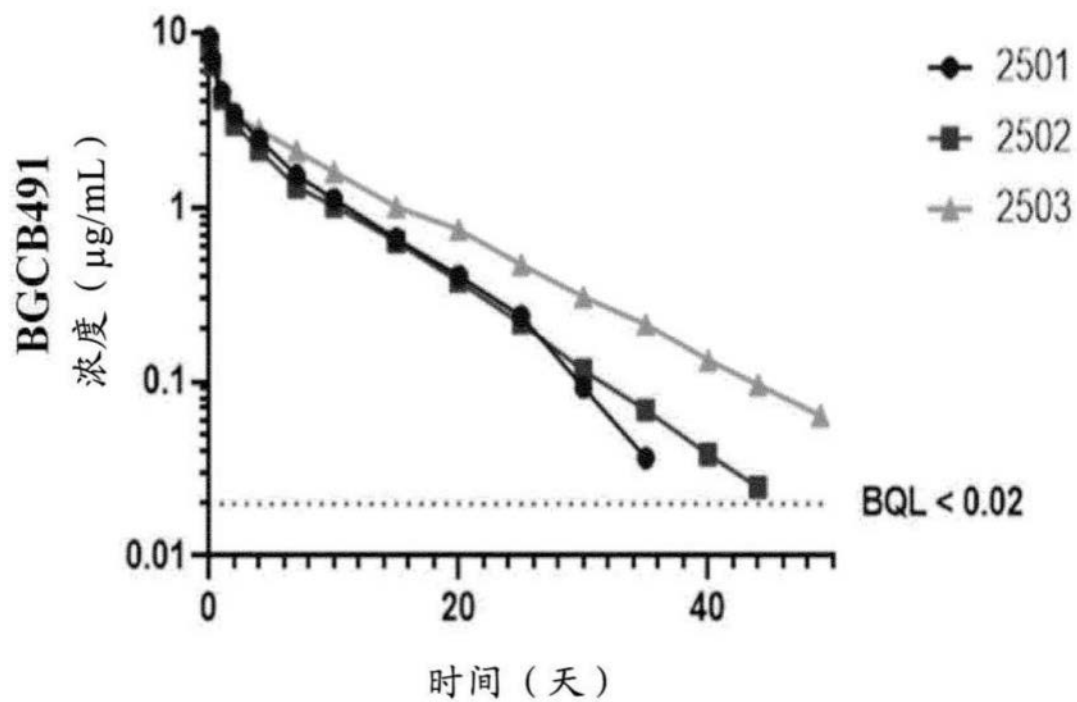


图37

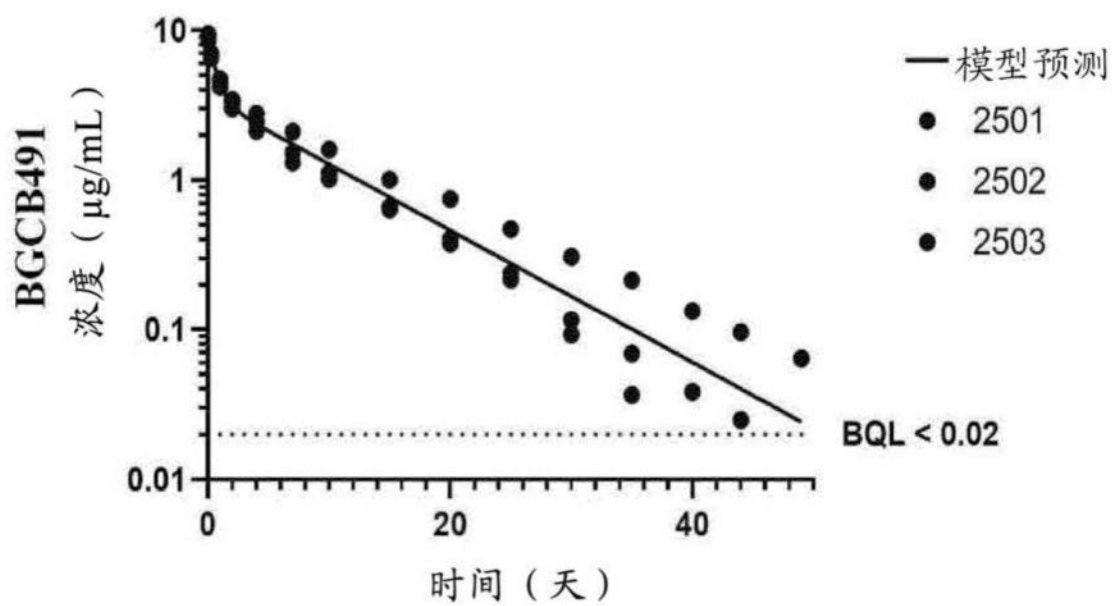


图38

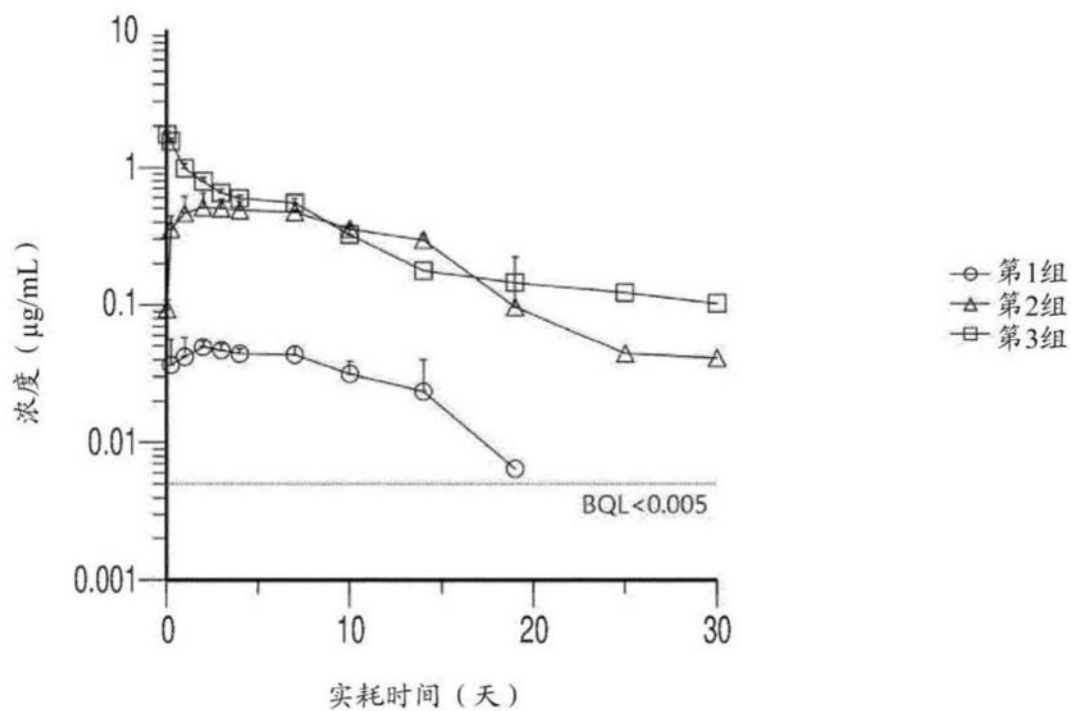


图39A

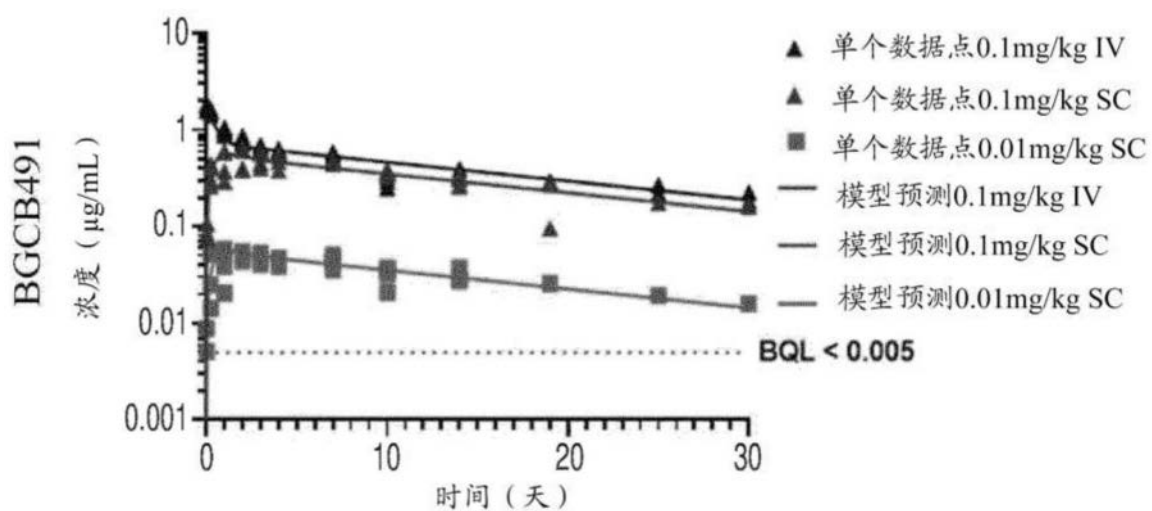


图39B

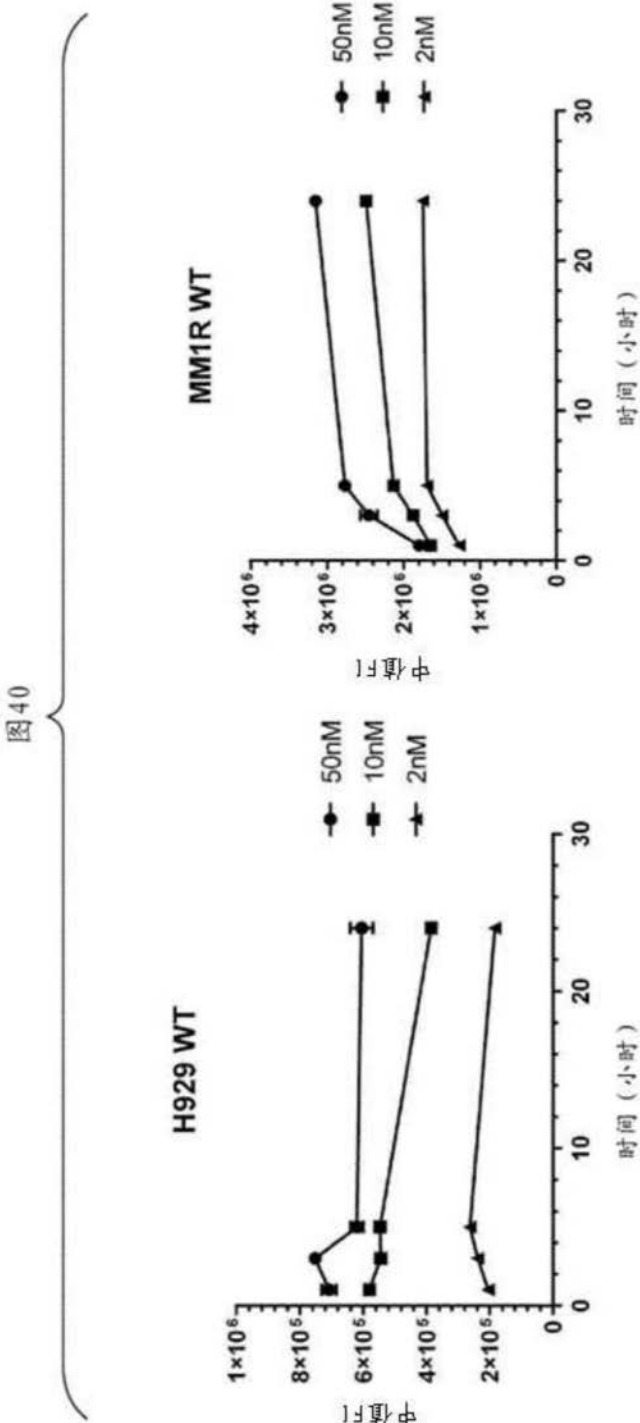


图40

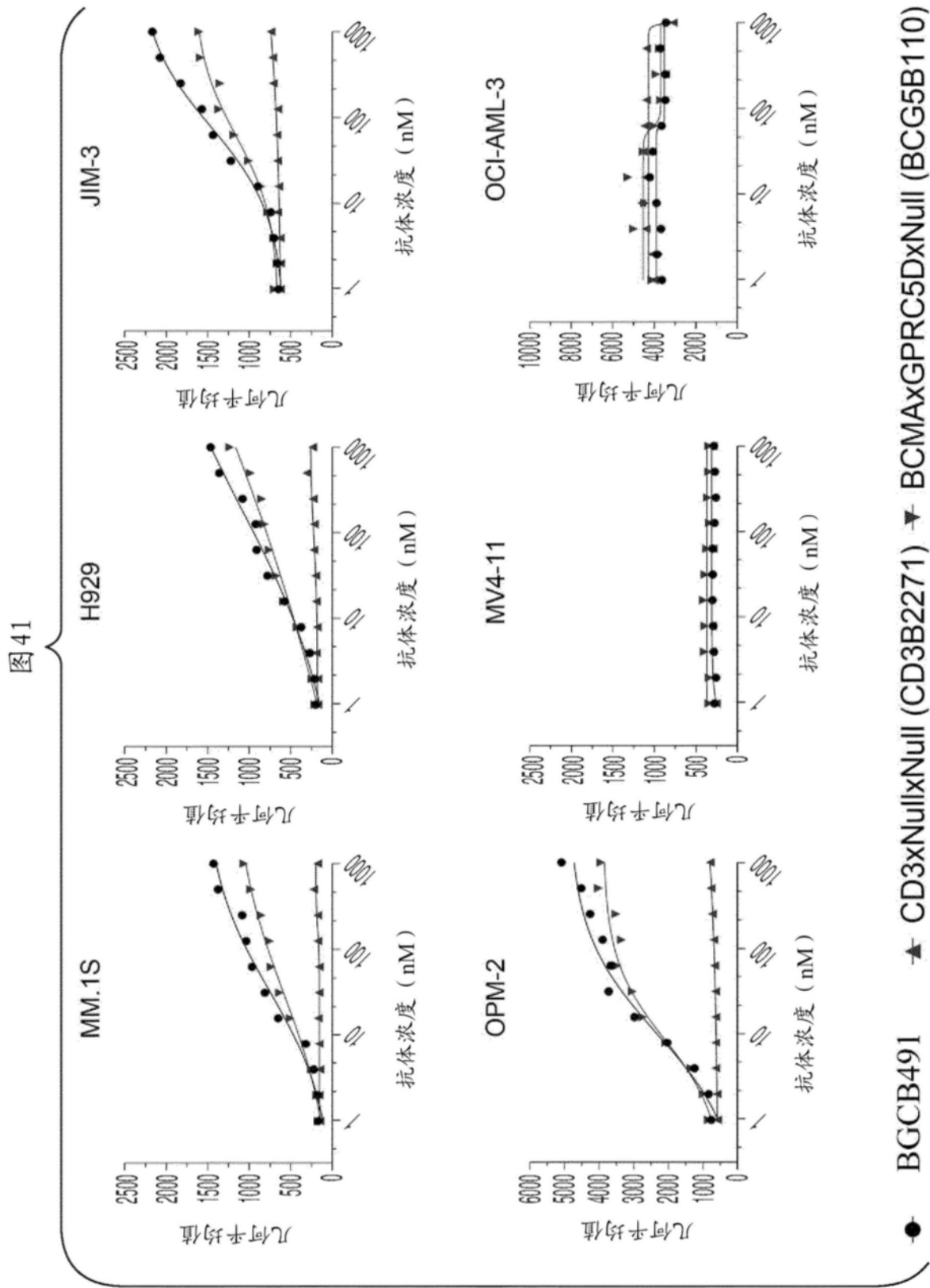


图41

图 42

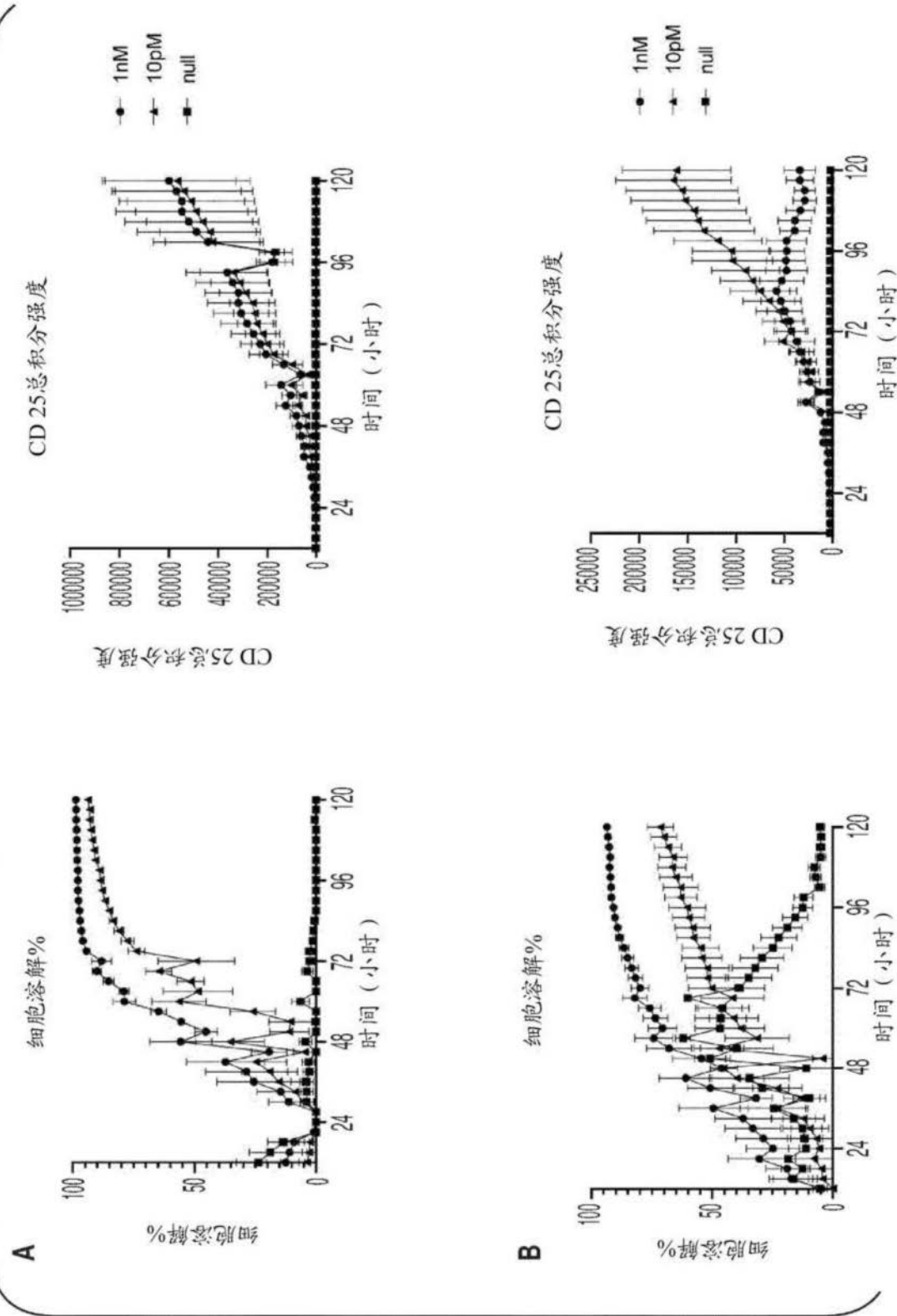


图42

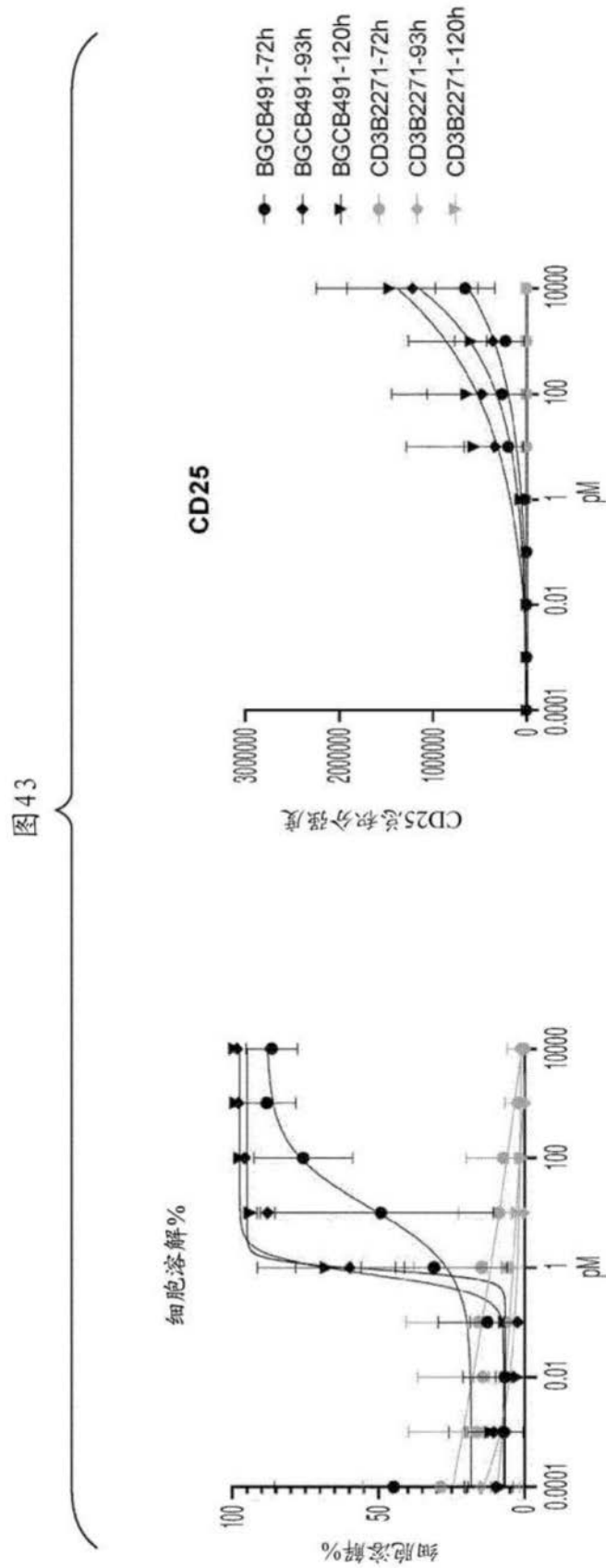


图43

图 44

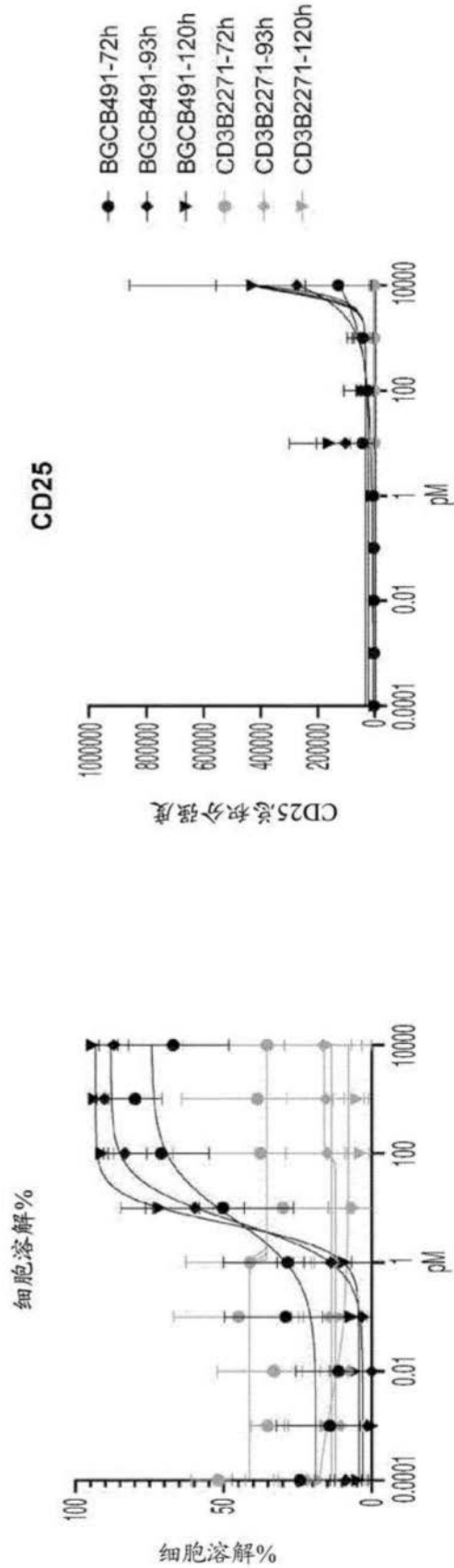


图44

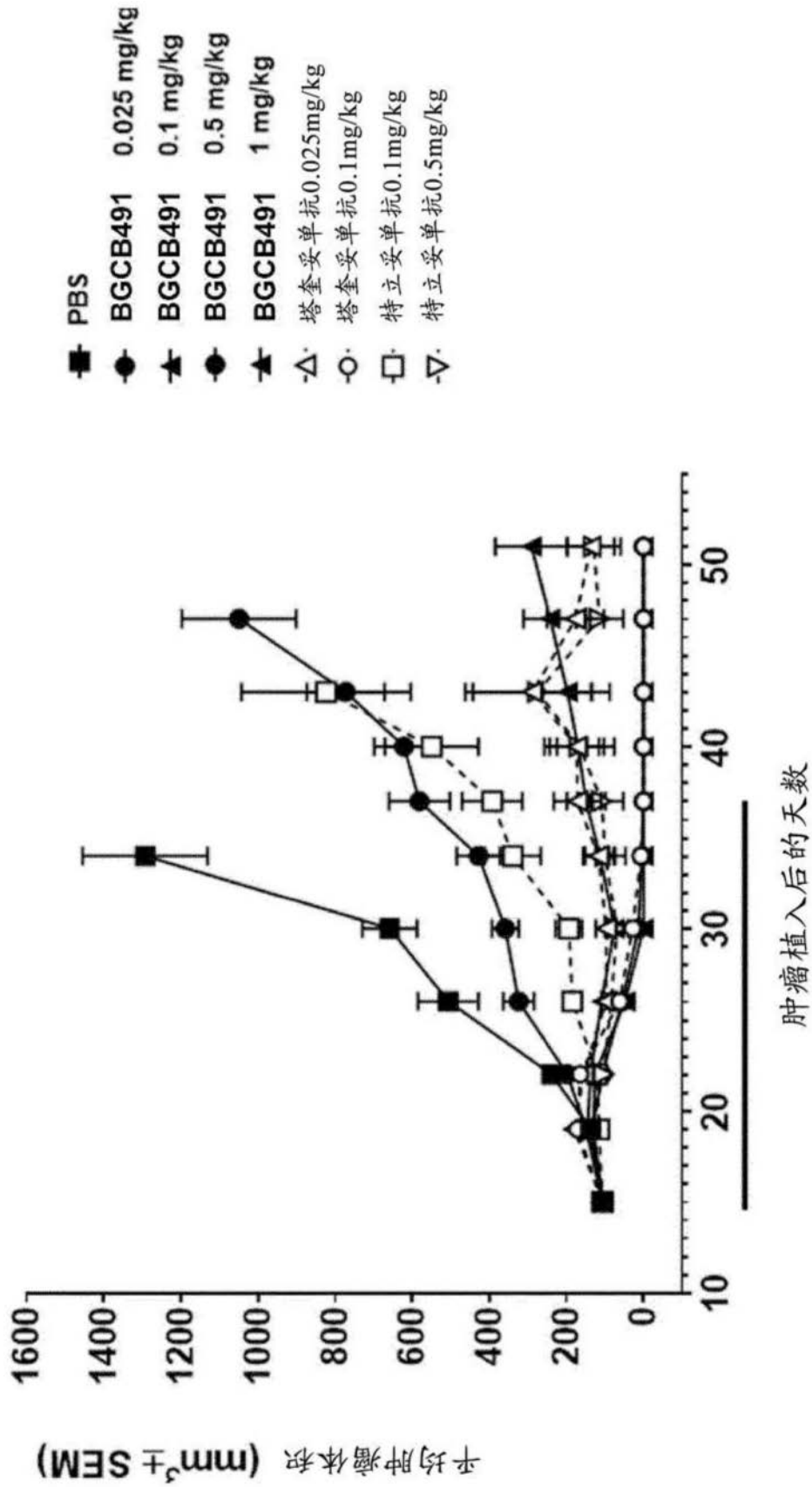


图45

ID	描述	scFv适合度 在65℃处的结合%	人 BCMA KD (M)	食蟹猴 BCMA KD (M)	H929, 1小时, 37℃		ML1R, 1小时, 37℃	scFv Tm		NSB
					EC50 (nM)	EC90 (nM)		EC90 (nM)	°C	
BCMB601	BCMB519_L-H scFv	116%	2.80E-10	N.B	3.2	19	2.3	19	69	多面 无

图46A

化合物ID	描述	CD3臂	BCMA臂			肿瘤细胞死亡%		
			克隆	来源	EC50 (nM)	pM EC50	最大杀伤%	pM EC90
GCDB147	BCMB519 scFv x CDB376 Fab	CD3B376	BCMB519	Ablexis	3.4	115	92	214

图46B

结合物 ID	细胞结合 (在 37℃ 处1小时)	动力学 结合	细胞结合 (在 37℃ 处1小时)	食蟹猴交叉 反应性	自身相互 作用	疏水性	NSBscFv Tm	Tm
	EC50(nM)	(37deg)	Bmax	折叠移位	(AC-SINS)	(aHIC)	多面	°C
GC5B680 N68S, S69T	6-24	增加	+++	无差异	低	低	无	71 (scFv)
GC5B596 (第1 代DuoBody 亲本)	弱	稳定的	弱	不发生交叉 反应	高	低	无	68 (Tm1)

图47