(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112423785 B
(45)授权公告日 2025.03.04

(21)申请号 201980047976.5
(22)申请日 2019.07.18
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112423785 A
(43)申请公布日 2021.02.26
(30)优先权数据
62/700,596 2018.07.19 US
62/750,968 2018.10.26 US
62/793,645 2019.01.17 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.01.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/042447 2019.07.18
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/018820 EN 2020.01.23

(73)专利权人 瑞泽恩制药公司
地址 美国纽约州
(72)发明人 E·史密斯 K·奥尔森
F·德尔菲诺 D·迪利洛
J·基什纳 O·辛谢科娃 章乾
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 张莉 黄革生

(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
(56)对比文件
US 2017051068 A1,2017.02.23
审查员 李雪莹

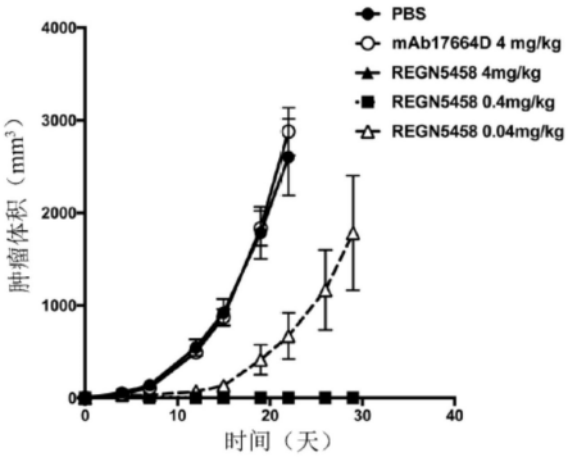
权利要求书4页 说明书71页
序列表39页 附图4页

(54)发明名称

双特异性抗BCMAx抗CD3抗体及其用途

(57)摘要

B细胞成熟抗原(BCMA)在恶性浆细胞上表达。本发明提供结合BCMA及CD3两者并在表达BCMA的肿瘤细胞存在下经由CD3复合物活化T细胞的新颖双特异性抗体(bsAb)。在某些实施例中,本发明的双特异性抗原结合分子能够抑制表达BCMA的肿瘤生长。本发明的双特异性抗原结合分子适用于治疗其中经上调或诱导的靶向BCMA的免疫反应为所期望的和/或在治疗上有益的疾病及病症。举例来说,本发明的双特异性抗体适用于治疗各种癌症,包含多发性骨髓瘤。



CN 112423785 B

1. 一种经分离双特异性抗原结合分子,其结合人B细胞成熟抗原(BCMA)和人CD3,其中所述双特异性抗原结合分子包括:

(a)特异性结合人BCMA的第一抗原结合域,其中所述第一抗原结合结构域包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR),其中所述HCVR包含分别由SEQ ID NO: 68、70、72的氨基酸序列组成的HCDR1、HCDR2、HCDR3域,且所述LCVR包含分别由SEQ ID NO: 84、86、88的氨基酸序列组成的LCDR1、LCDR2、LCDR3域;及

(b)特异性结合人CD3的第二抗原结合域,其中所述第二抗原结合结构域包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR),其中所述HCVR包含分别由SEQ ID NO: 92、94、96的氨基酸序列组成的HCDR1、HCDR2、HCDR3域,且所述LCVR包含分别由SEQ ID NO: 84、86、88的氨基酸序列组成的LCDR1、LCDR2、LCDR3域。

2.一种经分离双特异性抗原结合分子,其结合人B细胞成熟抗原(BCMA)和人CD3,其中所述双特异性抗原结合分子包括:

(a)特异性结合人BCMA的第一抗原结合域,其中所述第一抗原结合结构域包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR),其中所述HCVR包含分别由SEQ ID NO: 68、70、72的氨基酸序列组成的HCDR1、HCDR2、HCDR3域,且所述LCVR包含分别由SEQ ID NO: 84、86、88的氨基酸序列组成的LCDR1、LCDR2、LCDR3域;及

(b)特异性结合人CD3的第二抗原结合域,其中所述第二抗原结合结构域包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR),其中所述HCVR包含分别由SEQ ID NO: 100、102、104的氨基酸序列组成的HCDR1、HCDR2、HCDR3域,且所述LCVR包含分别由SEQ ID NO: 84、86、88的氨基酸序列组成的LCDR1、LCDR2、LCDR3域。

3.根据权利要求1所述的经分离双特异性抗原结合分子,其中:

(a)所述第一抗原结合域包含SEQ ID NO: 66的氨基酸序列的HCVR以及SEQ ID NO: 82的氨基酸序列的LCVR;及

(b)所述第二抗原结合域包含SEQ ID NO: 90的氨基酸序列的HCVR以及SEQ ID NO: 82的氨基酸序列的LCVR。

4.根据权利要求2所述的经分离双特异性抗原结合分子,其包括:

(a)所述第一抗原结合域包含SEQ ID NO: 66的氨基酸序列的HCVR以及SEQ ID NO: 82的氨基酸序列的LCVR;及

(b)所述第二抗原结合域包含SEQ ID NO: 98的氨基酸序列的HCVR以及SEQ ID NO: 82的氨基酸序列的LCVR。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的经分离双特异性抗原结合分子,其为双特异性抗体。

6.根据权利要求5所述的经分离双特异性抗原结合分子,其中所述双特异性抗体包括人类IgG重链恒定区。

7.根据权利要求5所述的经分离双特异性抗原结合分子,其中所述双特异性抗体包括嵌合铰链,所述嵌合铰链相对于相同同型的野生型铰链减少Fcγ受体结合。

8.根据权利要求6所述的经分离双特异性抗原结合分子,其中所述人类IgG重链恒定区为同型IgG1。

9.根据权利要求6所述的经分离双特异性抗原结合分子,其中所述人类IgG重链恒定区

为同型IgG4。

10.一种医药组合物,其包括根据权利要求1至9中任一项所述的双特异性抗原结合分子及药学上可接受的载剂或稀释剂。

11.一种核酸分子,其包括编码根据权利要求1至9中任一项所述的双特异性抗原结合分子的核苷酸序列。

12.一种表达载体,其包括根据权利要求11所述的核酸分子。

13.一种宿主细胞,其包括根据权利要求1至9中任一项所述的双特异性抗原结合分子、根据权利要求11所述的核酸分子或根据权利要求12所述的表达载体。

14.编码结合人B细胞成熟抗原(BCMA)和人CD3的双特异性抗原结合分子的一组核酸分子,其中所述的一组核酸分子包含:

(a)编码重链可变(HCVR)的第一核酸分子,其中所述HCVR包含分别由SEQ ID NO: 68、70、72的氨基酸序列组成的HCDR1、HCDR2、HCDR3域;

(b)编码HCVR的第二核酸分子,其中所述HCVR包含分别由SEQ ID NO: 92、94、96的氨基酸序列组成的HCDR1、HCDR2、HCDR3域;以及

(c)编码轻链可变区(LCVR)的第三核酸分子,其中所述LCVR包含分别由SEQ ID NO: 84、86、88的氨基酸序列组成的LCDR1、LCDR2、LCDR3域,

其中所述第一核酸分子编码的HCVR与第三核酸分子编码的LCVR配对形成特异性结合人BCMA的抗原结合结构域;且所述第二核酸分子编码的HCVR与第三核酸分子编码的LCVR配对形成特异性结合人CD3的抗原结合结构域。

15.根据权利要求14所述的一组核酸分子,其中:

(a) 所述第一核酸分子编码由SEQ ID NO: 66的氨基酸序列组成的HCVR;

(b) 所述第二核酸分子编码由SEQ ID NO: 90的氨基酸序列组成的HCVR;以及

(c) 所述第三核酸分子编码由SEQ ID NO: 82的氨基酸序列组成的LCVR。

16.根据权利要求14所述的一组核酸分子,其中所述双特异性抗原结合分子是双特异性抗体,所述第一核酸分子编码第一重链,所述第二核酸分子编码第二重链,且所述第三核酸分子编码轻链。

17.根据权利要求16所述的一组核酸分子,其中所述第一重链、所述第二重链、或所述第一重链和第二重链两者包含人IgG重链恒定区。

18.根据权利要求17所述的一组核酸分子,其中所述第一重链、所述第二重链、或所述第一重链和第二重链两者包含人IgG1重链恒定区。

19.根据权利要求17所述的一组核酸分子,其中所述第一重链、所述第二重链、或所述第一重链和第二重链两者包含人IgG4重链恒定区。

20.根据权利要求15所述的一组核酸分子,其中所述第一核酸分子包含SEQ ID NO: 65的核苷酸序列。

21.根据权利要求15所述的一组核酸分子,其中所述第二核酸分子包含SEQ ID NO: 89的核苷酸序列。

22.根据权利要求15所述的一组核酸分子,其中所述第三核酸分子包含SEQ ID NO: 81的核苷酸序列。

23.编码结合人B细胞成熟抗原(BCMA)和人CD3的双特异性抗原结合分子的一组核酸分

子,其中所述的一组核酸分子包含:

(a)编码HCVR的第一核酸分子,其中所述HCVR包含分别由SEQ ID NO: 68、70、72的氨基酸序列组成的HCDR1、HCDR2、HCDR3域;

(b)编码HCVR的第二核酸分子,其中所述HCVR包含分别由SEQ ID NO: 100、102、104的氨基酸序列组成的HCDR1、HCDR2、HCDR3域;以及

(c)编码LCVR的第三核酸分子,其中所述LCVR包含分别由SEQ ID NO: 84、86、88的氨基酸序列组成的LCDR1、LCDR2、LCDR3域,

其中所述第一核酸分子编码的HCVR与第三核酸分子编码的LCVR配对形成特异性结合人BCMA的抗原结合结构域;且所述第二核酸分子编码的HCVR与第三核酸分子编码的LCVR配对形成特异性结合人CD3的抗原结合结构域。

24.根据权利要求23所述的一组核酸分子,其中:

(a) 所述第一核酸分子编码由SEQ ID NO: 66的氨基酸序列组成的HCVR;

(b) 所述第二核酸分子编码由SEQ ID NO: 98的氨基酸序列组成的HCVR;以及

(c) 所述第三核酸分子编码由SEQ ID NO: 82的氨基酸序列组成的LCVR。

25.根据权利要求23所述的一组核酸分子,其中所述双特异性抗原结合分子是双特异性抗体,所述第一核酸分子编码第一重链,所述第二核酸分子编码第二重链,且所述第三核酸分子编码轻链。

26.根据权利要求25所述的一组核酸分子,其中所述第一重链、所述第二重链、或所述第一重链和第二重链两者包含人IgG重链恒定区。

27.根据权利要求26所述的一组核酸分子,其中所述第一重链、所述第二重链、或所述第一重链和第二重链两者包含人IgG1重链恒定区。

28.根据权利要求26所述的一组核酸分子,其中所述第一重链、所述第二重链、或所述第一重链和第二重链两者包含人IgG4重链恒定区。

29.根据权利要求24所述的一组核酸分子,其中所述第一核酸分子包含SEQ ID NO: 65的核苷酸序列。

30.根据权利要求24所述的一组核酸分子,其中所述第二核酸分子包含SEQ ID NO: 97的核苷酸序列。

31.根据权利要求24所述的一组核酸分子,其中所述第三核酸分子包含SEQ ID NO: 81的核苷酸序列。

32.编码结合人B细胞成熟抗原(BCMA)和人CD3的双特异性抗体的一组核酸分子,其中所述的一组核酸分子包含:

(a)编码第一重链的第一核酸分子,其中所述第一重链包含由SEQ ID NO: 66的氨基酸序列组成的HCVR;

(b)编码第二重链的第二核酸分子,其中所述第二重链包含由SEQ ID NO: 90的氨基酸序列组成的HCVR;

(c)编码轻链的第三核酸分子,其中所述轻链包含由SEQ ID NO: 82的氨基酸序列组成的LCVR,

其中所述第一核酸分子编码的第一重链的HCVR与第三核酸分子编码的轻链的LCVR配对形成特异性结合人BCMA的抗原结合结构域;且所述第二核酸分子编码的第二重链的HCVR

与第三核酸分子编码的轻链的LCVR配对形成特异性结合人CD3的抗原结合结构域。

33.编码结合人B细胞成熟抗原(BCMA)和人CD3的双特异性抗体的一组核酸分子,其中所述的一组核酸分子包含:

(a)编码第一重链的第一核酸分子,其中所述第一重链包含由SEQ ID NO: 66的氨基酸序列组成的HCVR;

(b)编码第二重链的第二核酸分子,其中所述第二重链包含由SEQ ID NO: 98的氨基酸序列组成的HCVR;

(c)编码轻链的第三核酸分子,其中所述轻链包含由SEQ ID NO: 82的氨基酸序列组成的LCVR,

其中所述第一核酸分子编码的第一重链的HCVR与第三核酸分子编码的轻链的LCVR配对形成特异性结合人BCMA的抗原结合结构域;且所述第二核酸分子编码的第二重链的HCVR与第三核酸分子编码的轻链的LCVR配对形成特异性结合人CD3的抗原结合结构域。

34.包含根据权利要求14-22中任一项所述的一组核酸分子的表达载体或一组表达载体。

35.包含根据权利要求34所述的表达载体或一组表达载体的宿主细胞。

36.包含根据权利要求32所述的一组核酸分子的宿主细胞。

37.包含根据权利要求23-31中任一项所述的一组核酸分子的表达载体或一组表达载体。

38.包含根据权利要求37所述的表达载体或一组表达载体的宿主细胞。

39.包含根据权利要求33所述的一组核酸分子的宿主细胞。

40.根据权利要求1至9中任一项所述的经分离双特异性抗原结合分子或根据权利要求10所述的医药组合物在制备用于治疗表达B细胞成熟抗原(BCMA)的多发性骨髓瘤的药物中的用途。

41.根据权利要求40所述的用途,其中所述药物与第二治疗剂或治疗方案组合施用。

42.根据权利要求41所述的用途,其中所述第二治疗剂或治疗方案包括化学治疗药物、免疫调节剂、蛋白酶体抑制剂、组蛋白去乙酰基酶抑制剂、放射疗法、干细胞移植、与不同肿瘤细胞表面抗原及T细胞或免疫细胞抗原相互作用的不同双特异性抗体、抗体药物缀合物、PD-1、PD-L1或CTLA-4检查点抑制剂或其组合。

43.根据权利要求41的用途,其中所述第二治疗剂或治疗方案包括DNA烷基化剂。

44.根据权利要求1至9中任一项所述的经分离双特异性抗原结合分子或根据权利要求10所述的医药组合物在制备与抗PD-1抗体或其抗原结合片段组合用于治疗表达BCMA的多发性骨髓瘤的药物中的用途。

45.根据权利要求44所述的用途,其中所述抗PD-1抗体或抗原结合片段为抗PD-1抗体。

46.根据权利要求45所述的用途,其中所述抗PD-1抗体为赛咪单抗。

双特异性抗BCMAx抗CD3抗体及其用途

[0001] 参考序列表

[0002] 本申请以引用的方式并入在2019年7月8日创建并含有63,211字节的以计算机可读形式提交为文件10452WO01-Sequence的序列表。

技术领域

[0003] 本发明涉及对B细胞成熟抗原(BCMA)具有特异性的抗体及其抗原结合片段及其使用方法。本发明包含结合BCMA及CD3的双特异性抗原结合分子(例如双特异性抗体)及其使用方法。

背景技术

[0004] B细胞成熟抗原(BCMA)(也称为TNFRSF17或CD269)为缺乏信号肽并含有富含半胱氨酸的细胞外域的第III型跨膜蛋白。BCMA与密切相关的蛋白质一起在不同发育阶段促进B细胞存活。BCMA仅在B细胞谱系细胞中表达,尤其在生发中心的滤泡间区以及在成浆细胞及分化的浆细胞上。BCMA在浆细胞分化期间经选择性诱导,并且为骨髓中长期存活浆细胞的最佳存活所需。在多发性骨髓瘤中,BCMA在恶性浆细胞上以较高水平广泛表达,并且BCMA表达随着从正常细胞向活性多发性骨髓瘤的进展而增加。BCMA还在其它B细胞恶性肿瘤中表达,包含瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenström's macroglobulinemia)、伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma)及弥漫性大B细胞淋巴瘤(Diffuse Large B-Cell Lymphoma)。Tai等人,《免疫疗法(Immunotherapy)》,7(11):1187-1199,2015。

[0005] CD3为在T细胞上表达与T细胞受体复合物(TCR)相关联的均二聚或异二聚抗原并且为T细胞活化所需。功能性CD3由四个不同链中的两个的二聚结合物形成:ε、ζ、δ及γ。CD3二聚排列包含γ/ε、δ/ε及ζ/ζ。已展示对抗CD3的抗体在T细胞上聚集CD3,从而以类似于通过肽负载MHC分子参与TCR的方式引起T细胞活化。因此,已提出抗CD3抗体用于涉及T细胞活化的治疗目的。此外,已提出能够结合CD3及靶抗原的双特异性抗体用于涉及靶向对表达靶抗原的组织及细胞的T细胞免疫反应的治疗用途。

[0006] 靶向BCMA的抗原结合分子(包含结合BCMA及CD3的双特异性抗原结合分子)将在需要表达BCMA的细胞的特异性靶向及T细胞介导杀伤的治疗设定中有用。

发明内容

[0007] 在一个方面,本发明提供经分离双特异性抗原结合分子,其包括:(a)特异性结合目标肿瘤细胞上的人类B细胞成熟抗原(BCMA)的第一抗原结合域,如通过体外FACS结合分析所测量EC_{50}低于约100nM;及(b)特异性结合人类CD3的第二抗原结合域(D2),如通过体外FACS结合分析所测量EC_{50}低于约10^{-6}M。

[0008] 在一些情况下,双特异性抗原结合分子体外活化T细胞,EC_{50}低于约10^{-9}M。在一些情况下,双特异性抗原结合分子体外介导表达BCMA的肿瘤细胞系的T细胞杀伤,EC_{50}低于约10^{-9}M。在一些情况下,双特异性抗原结合分子体外介导表达BCMA的原代骨髓瘤细胞的自体T

细胞杀伤,EC_{50}低于约10^{-8}M。在一些实施例中,双特异性抗原结合分子与如SEQ ID NO:115中所示的BCMA的氨基酸残基1至43相互作用。

[0009] 在一些情况下,靶肿瘤细胞为浆细胞。在一些情况下,靶肿瘤细胞来自患有多发性骨髓瘤或另一B细胞病症的患者,所述B细胞病症部分特征在于具有表达BCMA的B细胞。在一些情况下,双特异性抗原结合分子以约0.04mg/kg至约4.0mg/kg的剂量抑制表达BCMA的肿瘤细胞的增殖。在一些情况下,剂量为0.04mg/kg、0.4mg/kg或4mg/kg。在一些实施例中,每周至少两次向有需要的患者给予剂量持续至少七个剂量。在一些情况下,双特异性抗原结合分子抑制BCMA+肿瘤细胞的增殖,所述肿瘤细胞选自由骨髓瘤细胞、淋巴瘤细胞及白血病细胞组成的群组。在一些情况下,双特异性抗原结合分子抑制BCMA+肿瘤细胞的增殖,所述肿瘤细胞选自由H929细胞、MOLP-8细胞及OPM细胞组成的群组。

[0010] 在一些情况下,双特异性抗原结合分子与食蟹猕猴BCMA交叉反应。在一些情况下,双特异性抗原结合分子不与食蟹猕猴BCMA交叉反应。

[0011] 在一些实施例中,经分离双特异性抗原结合分子包括第一抗原结合域,所述第一抗原结合域包括:(a)含于包括SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)内的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2及HCDR3)(b)含于包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)内的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2及LCDR3)。在一些情况下,经分离双特异性抗原结合分子包括有包括SEQ ID NO:68的氨基酸序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:70的氨基酸序列的HCDR2及包括SEQ ID NO:72的氨基酸序列的HCDR3。在一些情况下,经分离双特异性抗原结合分子包括有包括SEQ ID NO:84的氨基酸序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:86的氨基酸序列的LCDR2及包括SEQ ID NO:88的氨基酸序列的LCDR3。在一些情况下,第一抗原结合域包括有包括SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HCVR以及包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的LCVR。

[0012] 在一些实施例中,经分离双特异性抗原结合分子包括第二抗原结合域,所述第二抗原结合域包括:(a)含于包括SEQ ID NO:90或SEQ ID NO:98的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)内的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2及HCDR3);及(b)含于包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)内的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2及LCDR3)。在一些情况下,第二抗原结合域包括:(a)包括SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:100的氨基酸序列的HCDR1;(b)包括SEQ ID NO:94或SEQ ID NO:102的氨基酸序列的HCDR2;及(c)包括SEQ ID NO:96或SEQ ID NO:104的氨基酸序列的HCDR3。在一些情况下,第二抗原结合域包括有包括SEQ ID NO:84的氨基酸序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:86的氨基酸序列的LCDR2及包括SEQ ID NO:88的氨基酸序列的LCDR3。在一些情况下,第二抗原结合域包括:(a)分别包括SEQ ID NO:92、94、96的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3域;及分别包括SEQ ID NO:84、86、88的氨基酸序列的LCDR1、LCDR2、LCDR3域;或(b)分别包括SEQ ID NO:100、102、104的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3域;及分别包括SEQ ID NO:84、86、88的氨基酸序列的LCDR1、LCDR2、LCDR3域。在一些情况下,第二抗原结合域包括:(a)包括SEQ ID NO:90的氨基酸序列的HCVR以及包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的LCVR;或(b)包括SEQ ID NO:98的氨基酸序列的HCVR以及包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的LCVR。

[0013] 在另一方面,本发明提供经分离双特异性抗原结合分子,其包括:(a)第一抗原结合域,其包括有分别包括SEQ ID NO:68、70、72的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3域以及

分别包括SEQ ID NO:84、86、88的氨基酸序列的LCDR1、LCDR2、LCDR3域;及(b)第二抗原结合域,其包括有分别包括SEQ ID NO:92、94、96的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3域以及分别包括SEQ ID NO:84、86、88的氨基酸序列的LCDR1、LCDR2、LCDR3域。在一些情况下,经分离双特异性抗原结合分子包括:(a)第一抗原结合域,其包括有包括SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HCVR以及包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的LCVR;及(b)第二抗原结合域,其包括有包括SEQ ID NO:90的氨基酸序列的HCVR以及包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的LCVR。

[0014] 在另一方面,本发明提供经分离双特异性抗原结合分子,其包括:(a)第一抗原结合域,其包括有分别包括SEQ ID NO:68、70、72的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3域以及分别包括SEQ ID NO:84、86、88的氨基酸序列的LCDR1、LCDR2、LCDR3域;及(b)第二抗原结合域,其包括有分别包括SEQ ID NO:100、102、104的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3域以及分别包括SEQ ID NO:84、86、88的氨基酸序列的LCDR1、LCDR2、LCDR3域。在一些情况下,经分离双特异性抗原结合分子包括:(a)第一抗原结合域,其包括有包括SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HCVR以及包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的LCVR;及(b)第二抗原结合域,其包括有包括SEQ ID NO:98的氨基酸序列的HCVR以及包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的LCVR。

[0015] 在另一方面,本发明提供经分离双特异性抗原结合分子,其包括:(a)第一抗原结合域,其特异性结合人类BCMA并包括有包括选自由SEQ ID NO:2、18、34、50、66、122及124组成的群组的氨基酸序列的HCVR的CDR以及包括选自由SEQ ID NO:10、26、42、58、74、82、123及125组成的群组的氨基酸序列的LCVR的CDR;及(b)第二抗原结合域,其特异性结合人类CD3。在一些情况下,第一抗原结合域包括来自选自由SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、122/123、124/125、2/82、18/82、34/82、50/82、66/82、122/82及124/82组成的群组的HCVR/LCVR氨基酸序列对的CDR。在一些情况下,第一抗原结合域包括HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3域,分别选自由SEQ ID NO:4-6-8-12-14-16、20-22-24-28-30-32、36-38-40-44-46-48、52-54-56-60-62-64、68-70-72-76-78-80、4-6-8-84-86-88、20-22-24-84-86-88、36-38-40-84-86-88、52-54-56-84-86-88及68-70-72-84-86-88组成的群组。在一些情况下,第一抗原结合域包括选自由SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、122/123、124/125、2/82、18/82、34/82、50/82、66/82、122/82及124/82组成的群组的HCVR/LCVR氨基酸序列对。在一些情况下,第二抗原结合域包括选自由SEQ ID NO:90/82及98/82组成的群组的HCVR/LCVR氨基酸序列对的CDR。

[0016] 在另一方面,本发明提供竞争结合BCMA或结合BCMA上的与参考抗体相同的表位的经分离双特异性抗原结合分子,其中所述参考抗体包括第一抗原结合域及第二抗原结合域,所述第一抗原结合域包括有包括SEQ ID NO:66/82的氨基酸序列的HCVR/LCVR对,所述第二抗原结合域包括有包括SEQ ID NO:90/82或SEQ ID NO:98/82的氨基酸序列的HCVR/LCVR对。

[0017] 在另一方面,本发明提供竞争结合人类CD3或结合人类CD3上的与参考抗体相同的表位的经分离双特异性抗原结合分子,其中所述参考抗体包括第一抗原结合域及第二抗原结合域,所述第一抗原结合域包括有包括SEQ ID NO:66/82的氨基酸序列的HCVR/LCVR对,所述第二抗原结合域包括有包括SEQ ID NO:90/82或SEQ ID NO:98/82的氨基酸序列的HCVR/LCVR对。

[0018] 上文或本文所论述的任何双特异性抗原结合分子可为双特异性抗体。在一些情况

下,双特异性抗体包括人类IgG重链恒定区。在一些情况下,人类IgG重链恒定区为同型IgG1。在一些情况下,人类IgG重链恒定区为同型IgG4。在各种实施例中,双特异性抗体包括嵌合铰链,所述嵌合铰链相对于相同同型的野生型铰链减少Fc γ 受体结合。

[0019] 在另一方面,本发明提供一种包括上文或本文所论述的双特异性抗原结合分子(例如双特异性抗体)及药学上可接受的载剂或稀释剂的医药组合物。

[0020] 在另一方面,本发明提供一种包括编码上文或本文所论述的双特异性抗原结合分子(例如双特异性抗体)的核苷酸序列的核酸分子。

[0021] 在另一方面,本发明提供一种包括上文所论述的核酸分子的表达载体。

[0022] 在另一方面,本发明提供一种包括上文所论述的表达载体的宿主细胞。

[0023] 在另一方面,本发明提供一种抑制个体的浆细胞肿瘤的生长的方法,其包括向个体给予如上文或本文所论述的经分离双特异性抗原结合分子或包括双特异性抗原结合分子的医药组合物。在一些情况下,浆细胞肿瘤为多发性骨髓瘤。在一些情况下,所述方法进一步包括给予第二治疗剂或治疗方案。在一些实施例中,第二治疗剂包括抗肿瘤剂(例如化学治疗剂,包含美法仑(melphalan)、长春新碱(vincristine)(安可平(Oncovin))、环磷酰胺(cyclophosphamide)(癌得星(Cytoxan))、依托泊苷(etoposide)(VP-16)、小红莓(doxorubicin)(阿德力霉素(Adriamycin))、小红莓脂质体(liposomal doxorubicin)(多希(Doxil))、苯达莫司汀(bendamustine)(特瑞达(Treanda))或任何其它已知在治疗个体的浆细胞肿瘤中有效的化学治疗剂)。在一些实施例中,第二治疗剂包括类固醇。在一些实施例中,第二治疗剂包括靶向疗法,包含沙利度胺(thalidomide)、来那度胺(enalidomide)及硼替佐米(bortezomib),所述疗法为批准用于治疗新诊断患者的疗法。来那度胺、泊马度胺(pomalidomide)、硼替佐米、卡非佐米(carfilzomib)、帕比司他(panobinostat)、依萨佐米(ixazomib)、埃罗妥珠单抗(elotuzumab)及达雷木单抗(daratumumab)为有效治疗复发性骨髓瘤的第二治疗剂的实例。在某些实施例中第二治疗剂为包括放射疗法或干细胞移植的方案。在某些实施例中,第二治疗剂可为免疫调节剂。在某些实施例中,第二治疗剂可为蛋白酶体抑制剂,包含硼替佐米(万珂(Velcade))、卡非佐米(凯普罗里斯(Kyprolis))、依萨佐米(恩莱瑞(Ninlaro))。在某些实施例中第二治疗剂可为组蛋白去乙酰基酶抑制剂,如帕比司他(法瑞达克(Farydak))。在某些实施例中,第二治疗剂可为单克隆抗体、抗体药物缀合物、与抗肿瘤剂缀合的双特异性抗体、检查点抑制剂或其组合。

[0024] 在另一方面,本发明提供一种治疗患有多发性骨髓瘤或患有另一表达BCMA的B细胞恶性肿瘤的患者的方法,其中所述方法包括向个体给予如上文或本文所论述的经分离双特异性抗原结合分子或包括双特异性抗原结合分子的医药组合物。在一些情况下,表达BCMA的B细胞恶性肿瘤选自由以下组成的群组:瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、伯基特氏淋巴瘤及弥漫性大B细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(Non-Hodgkin's lymphoma)、慢性淋巴球性白血病、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤及霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)。在一些情况下,所述方法进一步包括给予第二治疗剂。在一些实施例中,第二治疗剂包括抗肿瘤剂(化学治疗剂)、DNA烷基化剂、免疫调节剂、蛋白酶体抑制剂、组蛋白去乙酰基酶抑制剂放射疗法、干细胞移植、与在肿瘤细胞表面上表达的抗原相互作用的单克隆抗体、除本文所描述的那些单克隆抗体以外的单克隆抗体(其可与浆细胞表面上的不同抗原相互作用)、双特异性抗体(其具有一个结合肿瘤细胞表面上的抗原的臂

及另一结合T细胞上的抗原的臂)、抗体药物缀合物、与抗肿瘤剂缀合的双特异性抗体、检查点抑制剂(例如靶向PD-1或CTLA-4的检查点抑制剂)或其组合。在某些实施例中,检查点抑制剂可选自PD-1抑制剂,如派姆单抗(pembrolizumab)(克珠达(Keytruda))、纳武单抗(nivolumab)(欧狄沃(Opdivo))或赛咪单抗(cemiplimab)(REGN2810)。在某些实施例中,检查点抑制剂可选自PD-L1抑制剂,如阿特珠单抗(atezolizumab)(特森催克(Tecentriq))、阿维鲁单抗(avelumab)(巴文西亚(Bavencio))或德瓦鲁单抗(Durvalumab)(英菲尼(Imfinzi))。在某些实施例中,检查点抑制剂可选自CTLA-4抑制剂,如伊匹单抗(ipilimumab)(易沃伊(Yervoy))。可与本发明抗体结合使用的其它组合为上文所述。

[0025] 在另一方面,本发明提供一种治疗患有表达BCMA的肿瘤的方法,其中所述方法包括向个体给予如上文或本文所论述的经分离双特异性抗原结合分子或包括其的医药组合物与抗PD-1抗体或其抗原结合片段的组合。在一些情况下,抗PD-1抗体或抗原结合片段为抗PD-1抗体。在一些实施例中,抗PD-1抗体为赛咪单抗(cemiplimab)(REGN2810)。在各种实施例中,抗BCMA x抗CD3双特异性抗原结合分子(例如双特异性抗体)与抗PD-1抗体或抗原结合片段(例如抗PD-1抗体)的组合在治疗表达BCMA的肿瘤中产生协同疗效。

[0026] 在另一方面,本发明提供上文或本文所论述的双特异性抗原结合分子或上文或本文所论述的医药组合物的用途,其用于治疗与BCMA的表达有关的疾病或病症。在一些情况下,疾病或病症为癌症。在一些实施例中,癌症为多发性骨髓瘤。在一些情况下,疾病或病症为卡斯特莱曼病(Castleman disease)。在一些情况下,抗原结合分子用于与抗PD-1抗体或其抗原结合片段组合使用,任选地其中抗PD-1抗体为赛咪单抗(REGN2810)。

[0027] 本发明进一步包含上文或本文所论述的双特异性抗原结合分子的用途,用于制造用以治疗与BCMA的表达有关的疾病或病症的药剂。在一些情况下,疾病或病症为癌症。在一些实施例中,癌症为多发性骨髓瘤。

[0028] 在各种实施例中,上文或本文所论述的实施例的任何特征或组成部分可组合,并且所述组合涵盖于本发明的范围内。上文或本文所论述的任何具体值可与上文或本文所论述的另一相关值组合以叙述具有代表范围的上端及下端值的范围,并且所述范围涵盖于本发明的范围内。

[0029] 其它实施例将由随后实施方式的综述变得显而易见。

附图说明

[0030] 图1及图2分别说明利用抗BCMA x抗CD3双特异性抗体REGN5458及REGN5459的表达BCMA的NCI-H929人类多发性骨髓瘤肿瘤细胞的体内预防性剂量依赖性肿瘤抑制。NCI-H929细胞表达高水平的BCMA。

[0031] 图3及图4分别说明利用抗BCMA x抗CD3双特异性抗体REGN5458及REGN5459的已建立的表达BCMA的NCI-H929人类多发性骨髓瘤肿瘤细胞的体内治疗剂量依赖性肿瘤抑制。NCI-H929细胞表达高水平的BCMA。

[0032] 图5及图6分别说明利用抗BCMA x抗CD3双特异性抗体REGN5458及REGN5459的表达BCMA的MOLP-8人类多发性骨髓瘤肿瘤细胞的体内预防性剂量依赖性肿瘤抑制。MOLP-8细胞表达中等水平的BCMA。

[0033] 图7说明相对于对照通过抗BCMA x抗CD3双特异性抗体REGN5458及REGN5459体内

治疗性降低表达BCMA的OPM-2人类多发性骨髓瘤肿瘤细胞的已建立的肿瘤负荷。OPM-2细胞表达低水平的BCMA。

具体实施方式

[0034] 在描述本发明之前,应理解本发明不限于所描述的特定方法及实验条件,因而方法及条件可改变。还应理解,本文所用的术语仅用于描述特定实施例的目的,并且并不意图为限制性的,因为本发明的范围将仅由所附权利要求书限制。

[0035] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术及科学术语具有与本发明所属领域的一般技术人员通常所理解相同的含义。如本文所用,当关于特定叙述数值使用时,术语"约"意指值可在叙述值不超过1%的范围内变化。举例来说,如本文所用,表述"约100"包含99及101以及其间的所有值(例如99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0036] 尽管类似或等效于本文所描述的方法及材料的任何方法及材料可用于本发明的实践或测试中,但现描述优选方法及材料。本说明书中提及的所有专利、申请及非专利公开均以全文引用的方式并入本文中。

[0037] 定义

[0038] 如本文所用,表述"CD3"指代作为多分子T细胞受体(TCR)的部分在T细胞上表达的抗原,并且其由均二聚体或杂二聚体组成,所述均二聚体或杂二聚体由以下四个受体链中的两个的缔合形成:CD3-ε、CD3-δ、CD3-ζ及CD3-γ。人类CD3-ε包括如SEQ ID NO:116中所示的氨基酸序列;人类CD3-δ包括如SEQ ID NO:117中所示的氨基酸序列;人类CD3-ζ包括如SEQ ID NO:118中所示的氨基酸序列;及CD3-γ包括如SEQ ID NO:119中所示的氨基酸序列。除非明确指定为来自非人类物种,否则本文中对蛋白、多肽及蛋白片段的所有参考都意图指对应蛋白、多肽或蛋白片段的人类版本。因此,除非指定为来自非人类物种,例如"小鼠CD3"、"猴CD3"等,否则表述"CD3"意指人类CD3。

[0039] 如本文所用,"结合CD3的抗体"或"抗CD3抗体"包含特异性识别单一CD3亚单元(例如ε、δ、γ或ζ)的抗体及其抗原结合片段以及特异性识别两个CD3亚单元的二聚复合物(例如γ/ε、δ/ε及ζ/ζCD3二聚体)的抗体及其抗原结合片段。本发明抗体及抗原结合片段可结合可溶性CD3和/或细胞表面表达的CD3。可溶性CD3包含天然CD3蛋白以及重组CD3蛋白变异体,如例如单体及二聚CD3构建体,其缺少跨膜域或以其它方式与细胞膜无关。

[0040] 如本文所用,表述"细胞表面表达的CD3"意指在体外或体内细胞的表面上表达的一种或多种CD3蛋白,从而CD3蛋白的至少一部分暴露于细胞膜的细胞外侧面并且可接近抗体的抗原结合部分。"细胞表面表达的CD3"包含在细胞膜中的功能性T细胞受体情形内所含的CD3蛋白。表述"细胞表面表达的CD3"包含在细胞表面上作为均二聚体或杂二聚体(例如γ/ε、δ/ε及ζ/ζCD3二聚体)的部分表达的CD3蛋白。表述"细胞表面表达的CD3"还包含在细胞表面上由自身表达(无其它CD3链类型)的CD3链(例如CD3-ε、CD3-δ或CD3-γ)。"细胞表面表达的CD3"可包括在通常表达CD3蛋白的细胞表面上表达的CD3蛋白质或由其组成。或者,"细胞表面表达的CD3"可包括在细胞的表面上表达的CD3蛋白质或由其组成,所述细胞通常不在其表面上表达人类CD3但已经人工工程改造以在其表面上表达CD3。

[0041] 如本文所用,表述"BCMA"指代B细胞成熟抗原。BCMA(也称为TNFRSF17及CD269)为在恶性浆细胞上表达的细胞表面蛋白并在调节B细胞成熟及分化成产生免疫球蛋白的浆细

胞中起中心作用。人类BCMA的氨基酸序列展示于SEQ ID NO:115中,并且也可见于GenBank登录号NP_001183.2中。

[0042] 如本文所用,“结合BCMA的抗体”或“抗BCMA抗体”包含特异性识别BCMA的抗体及其抗原结合片段。

[0043] 术语“抗原结合分子”包含抗体及抗体的抗原结合片段,包含例如双特异性抗体。

[0044] 如本文所用,术语“抗体”意指包括至少一个特异性结合特定抗原(例如BCMA或CD3)或与特定抗原相互作用的互补决定区(CDR)的任何抗原结合分子或分子复合物。术语“抗体”包含包括通过双硫键互连的四个多肽链(两个重(H)链及两个轻(L)链)的免疫球蛋白分子以及其多聚体(例如IgM)。术语“抗体”还包含由通过双硫键互连的四个多肽链(两个重(H)链及两个轻(L)链)组成的免疫球蛋白分子。各重链包括重链可变区(本文中缩写为HCVR或V_H)及重链恒定区。重链恒定区包括三个域,C_H1、C_H2及C_H3。各轻链包括轻链可变区(本文中缩写为LCVR或V_L)及轻链恒定区。轻链恒定区包括一个域(C_L1)。V_H及V_L区可进一步细分成高变区,称为互补决定区(CDR),穿插有称为框架区(FR)的更保守区。各V_H及V_L由从氨基端至羧基端按以下顺序排列的三个CDR及四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的不同实施例中,抗BCMA抗体或抗CD3抗体(或其抗原结合部分)的FR可与人类生殖系序列一致或可经天然或人工修饰。氨基酸共同序列可基于两个或更多个CDR的并列分析定义。

[0045] 如本文所用,术语“抗体”还包含完整抗体分子的抗原结合片段。如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”及类似术语包含特异性结合抗原以形成复合物的任何天然存在、以酶方式可获得、合成或经基因工程改造的多肽或醣蛋白。抗体的抗原结合片段可例如使用任何适合的标准技术由完整抗体分子衍生,所述标准技术如蛋白水解消化或涉及操纵及表达编码抗体可变域及任选的恒定域的DNA的重组基因工程改造技术。所述DNA为已知的和/或易于从例如商业来源、DNA库(包含例如噬菌体-抗体库)购得或可合成。DNA可以化学方式或通过使用分子生物学技术定序及操纵,例如将一个或多个可变域和/或恒定域配置成适合配置,或引入密码子,产生半胱氨酸残基,修饰、添加或删除氨基酸等。

[0046] 抗原结合片段的非限制性实例包含:(i)Fab片段;(ii)F(ab')2片段;(iii)Fd片段;(iv)Fv片段;(v)单链Fv(scFv)分子;(vi)dAb片段;及(vii)由模拟抗体(例如经分离互补决定区(CDR),如CDR3肽)或受限FR3-CDR3-FR4肽的高变区的氨基酸残基组成。其它经工程改造的分子,如域特异性抗体、单域抗体、域缺失抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、微型抗体、纳米抗体(例如单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小模块免疫药物(SMIP)及鲨鱼可变IgNAR域还涵盖在如本文所用的表述“抗原结合片段”内。

[0047] 抗体的抗原结合片段将通常包括至少一个可变域。可变域可具有任何尺寸或氨基酸组成并且一般将包括至少一个与一个或多个框架序列相邻或同框的CDR。在具有与V_L域相关联的V_H域的抗原结合片段中,V_H和V_L域可以任何适合的配置相对于彼此定位。举例来说,可变区可为二聚的并且含有V_H-V_H、V_H-V_L或V_L-V_L二聚体。或者,抗体的抗原结合片段可含有单体V_H或V_L域。

[0048] 在某些实施例中,抗体的抗原结合片段可含有至少一个共价连接至至少一个恒定

域的可变域。可发现于本发明抗体的抗原结合片段内的可变域及恒定域的非限制性示例性配置包含:(i)V_H-C_H1;(ii)V_H-C_H2;(iii)V_H-C_H3;(iv)V_H-C_H1-C_H2;(v)V_H-C_H1-C_H2-C_H3;(vi)V_H-C_H2-C_H3;(vii)V_H-C_L;(viii)V_L-C_H1;(ix)V_L-C_H2;(x)V_L-C_H3;(xi)V_L-C_H1-C_H2;(xii)V_L-C_H1-C_H2-C_H3;(xiii)V_L-C_H2-C_H3;及(xiv)V_L-C_L。在可变域及恒定域的任何配置(包含以上列出的任何示例性配置)中,可变域及恒定域可直接彼此连接或可通过完整或部分铰链区或连接区连接。铰链区可由至少2个(例如5、10、15、20、40、60或更多个)氨基酸组成,其产生单一多肽分子中相邻可变域和/或恒定域之间的柔性或半柔性连接。此外,本发明抗体的抗原结合片段可包括以上列出的任何可变域及恒定域配置的均二聚体或杂二聚体(或其它多聚体),所述可变域及恒定域配置与彼此和/或与一个或多个单体V_H或V_L域非共价缔合(例如通过双硫键(S))。

[0049] 如同完整抗体分子,抗原结合片段可为单特异性或多特异性的(例如双特异性的)。抗体的多特异性抗原结合片段将通常包括至少两个不同可变域,其中各可变域能够特异性结合单独抗原或相同抗原上的不同表位。任何多特异性抗体型式,包含本文所公开的示例性双特异性抗体型式可使用所属领域中可用的常规技术而经调适用于本发明抗体的抗原结合片段的情形下。

[0050] 本发明抗体可经由补体依赖性细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)起作用。“补体依赖性细胞毒性”(CDC)指代在补体存在下,表达抗原的细胞由本发明抗体裂解。“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”(ADCC)指代细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞及巨噬细胞)识别靶细胞上的结合的抗体并且由此引起靶细胞的裂解。可使用所属领域中熟知并且可用的分析测量CDC及ADCC。(参见例如美国专利第5,500,362号及第5,821,337号,以及Clynes等人,(1998)《美国科学院院报(Proc.Natl.Acad.Sci.)》(USA)95:652-656)。抗体的恒定区在抗体固定补体及介导细胞依赖性细胞毒性的能力中至关重要。因此,可基于是否需要抗体介导细胞毒性来选择抗体的同型。

[0051] 在本发明的某些实施例中,本发明的抗BCMA单特异性抗体或抗BCMA x抗CD3双特异性抗体为人类抗体。如本文所用,术语“人类抗体”意图包含具有衍生自人类生殖系免疫球蛋白序列的可变区及恒定区的抗体。本发明的人类抗体可包含不由人类生殖系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外无规或位点特异性突变诱发或通过体内体细胞突变引入的突变),例如在CDR并且尤其CDR3中。然而,如本文所用,术语“人类抗体”并不意图包含其中衍生自另一哺乳动物物种(如小鼠)的生殖系的CDR序列已移植至人类框架序列上的抗体。

[0052] 在一些实施例中,本发明抗体可为重组人类抗体。如本文所用,术语“重组人类抗体”意图包含通过重组方式制备、表达、形成或分离的所有人类抗体,如使用转染至宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体(下文进一步描述),从重组、组合人类抗体库分离的抗体(下文进一步描述),从为人类免疫球蛋白基因的转基因的动物(例如小鼠)分离的抗体(参见例如Taylor等人(1992)《核酸研究(Nucl.Acids Res.)》20:6287-6295);或通过涉及将人类免疫球蛋白基因序列拼接至其它DNA序列的任何其它方式制备、表达、形成或分离的抗体。所述重组人类抗体具有衍生自人类生殖系免疫球蛋白序列的可变区及恒定区。然而,在某些实施例中,所述重组人类抗体经受体外突变诱发(或当使用人类Ig序列的动物转基因

时为体内体细胞突变诱发),并且因此重组抗体的V_H及V_L区的氨基酸序列为虽然衍生自并与人类生殖系V_H及V_L序列相关但可不天然存在于体内人类抗体生殖系谱内的序列。

[0053] 人类抗体可以两种与铰链异质性相关的形式存在。在一种形式中,免疫球蛋白分子包括约150至160kDa的稳定四链构建体,其中二聚体通过链间重链双硫键保持在一起。在第二形式中,二聚体不经由链间双硫键连接并且形成由共价偶联轻链及重链构成的约75至80kDa的分子(半抗体)。这些形式已极难分开,即使在亲和纯化之后也如此。

[0054] 第二形式在各种完整IgG同型中的出现频率归因于(但不限于)与抗体的铰链区同型有关的结构差异。人类lgG4铰链的铰链区中的单一氨基酸取代可使第二形式的出现显著减少(Angal等人(1993)《分子免疫学(Molecular Immunology)》30:105)至通常使用人类lgG1铰链观察的水平。本发明涵盖在铰链、C_H2或C_H3区中具有一个或多个突变的抗体,其可为合乎需要的(例如在生产中)以提高所需抗体形式的产率。

[0055] 本发明抗体可为经分离抗体。如本文所用,“经分离抗体”意指经鉴别并且从其天然环境的至少一种组分分离和/或回收的抗体。举例来说,出于本发明的目的从生物体的至少一种组分、或从其中抗体天然存在或天然产生的组织或细胞分离或移出的抗体为“经分离抗体”。经分离抗体还包含重组细胞内的原位抗体。经分离抗体为已经受至少一个纯化或分离步骤的抗体。根据某些实施例,经分离抗体可基本上不含其它细胞材料和/或化学物质。

[0056] 本发明还包含结合BCMA的单臂抗体。如本文所用,“单臂抗体”意指包括单个抗体重链及单个抗体轻链的抗原结合分子。本发明的单臂抗体可包括如表1中所示的任何HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列。

[0057] 与衍生出抗体的对应生殖系序列相比,本文所公开的抗BCMA或抗BCMA x抗CD3抗体可在重链及轻链可变域的框架区和/或CDR区中包括一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。所述突变可容易地通过比较本文所公开的氨基酸序列与购自例如公共抗体序列数据库的生殖系序列来确定。本发明包含衍生自本文所公开的任何氨基酸序列的抗体及其抗原结合片段,其中一个或多个框架区和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变成衍生出抗体的生殖系序列的对应残基或突变成另一人类生殖系序列的对应残基或突变成对应生殖系残基的保守氨基酸取代(所述序列变化在本文中统称为“生殖系突变”)。所属领域的一般技术人员从本文所公开的重链及轻链可变区序列开始,可容易地产生许多包括一个或多个个别生殖系突变或其组合的抗体及抗原结合片段。在某些实施例中,V_H和/或V_L域内的所有框架和/或CDR残基全部突变回衍生出抗体的原始生殖系序列中所发现的残基。在其它实施例中,仅某些残基突变回原始生殖系序列,例如仅FR1的前8个氨基酸内或FR4的后8个氨基酸内所发现的突变残基,或仅CDR1、CDR2或CDR3内所发现的突变残基。在其它实施例中,框架和/或CDR残基中的一个或多个突变成不同生殖系序列(即不同于最初衍生出抗体的生殖系序列的生殖系序列)的对应残基。此外,本发明抗体可在框架区和/或CDR区内含有两个或更多个生殖系突变的任何组合,例如其中某些个别残基突变成特定生殖系序列的对应残基,而不同于原始生殖系序列的某些其它残基维持不变或突变成不同生殖系序列的对应残基。在获得后,可容易地测试含有一个或多个生殖系突变的抗体及抗原结合片段的一种或多种所期望的特性,如提高的结合特异性、增加的结合亲和力、提高或增强的拮抗或促效生物特性(视具体情况)、降低的免疫原性等。以此一般方式获得的抗体及抗原结合片段涵盖于本

发明内。

[0058] 本发明还包含抗BCMA或抗BCMA x抗CD3抗体,其包括本文所公开的任何HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的具有一个或多个保守取代的变异体。举例来说,本发明包含具有HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的抗BCMA或抗BCMA x抗CD3抗体,所述氨基酸序列相对于在本文表1及表3中所示的任何HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列或WO 2014/047231或WO 2017/053856(其各自以引用的方式并入本文中)中所公开的抗CD3抗体具有例如10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少等的保守氨基酸取代。

[0059] 术语“表位”指代与称为互补位的抗体分子的可变区中的特异性抗原结合位点相互作用的抗原决定子。单一抗原可具有超过一个表位。因此,不同抗体可结合抗原上的不同区域并且可具有不同生物作用。表位可为构形或线性的。构形表位通过来自线性多肽链的不同链段的空间并列氨基酸产生。线性表位为由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情形下,表位可包含抗原上的醣类、磷酰基或磺酰基部分。

[0060] 当提及核酸或其片段时,术语“大体一致”或“大体上一致”指示当与经另一核酸(或其互补股)的适当核苷酸插入或缺失最佳比对时,在至少约95%,并且更优选至少约96%、97%、98%或99%的核苷酸碱基中存在核苷酸序列一致性,如通过如下文所论述的序列一致性的任何熟知算法(如FASTA、BLAST或Gap)所测量。在某些情况下,与参考核酸分子大体一致的核酸分子可编码具有与由参考核酸分子所编码的多肽相同或大体上类似的氨基酸序列的多肽。

[0061] 如应用于多肽,术语“大体类似性”或“大体上类似”意指两个肽序列在如通过程序GAP或BESTFIT使用默认空位权重最佳比对时,具有至少95%序列一致性,甚至更优选至少98%或99%序列一致性。优选地,不一致的残基位置的差异在于保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是其中一个氨基酸残基经另一具有带有类似化学特性(例如电荷或疏水性)的侧链(R基团)的氨基酸残基取代的取代。一般来说,保守氨基酸取代不会大体上改变蛋白的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代与彼此不同的情况下,可上调序列一致性或类似性程度百分比以针对取代的保守性质加以校正。进行这一调节的方式为所属领域的技术人员所熟知。参见例如Pearson(1994)《分子生物学方法(Methods Mol.Biol.)》24:307-331,其以引用的方式并入本文中。具有带有类似化学特性的侧链的氨基酸群组的实例包含(1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸及异亮氨酸;(2)脂肪族羟基侧链:丝氨酸及苏氨酸;(3)含酰胺侧链:天冬酰胺及谷氨酰胺;(4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸及色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸及组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸及谷氨酸,及(7)含硫侧链为半胱氨酸及甲硫氨酸。优选保守氨基酸取代群组为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸及天冬酰胺-谷氨酰胺。可替代地,保守替代为在Gonnet等人(1992)《科学(Science)》256:1443-1445(其以引用的方式并入本文中)中所公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化。“适度保守”替代为在PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0062] 多肽的序列类似性(也称为序列一致性)通常使用序列分析软件来测量。蛋白分析软件使用分配至各种取代、缺失及其它修饰(包含保守氨基酸取代)的类似性测量来匹配类似序列。举例来说,GCG软件含有如Gap及Bestfit的程序,其可在默认参数下使用以测定密切相关的多肽(如来自生物体的不同物种的同源多肽)之间或野生型蛋白与其突变蛋白之

间的序列同源性或序列一致性。参见例如GCG 6.1版。多肽序列还可使用FASTA(GCG 6.1版中的程序)使用默认或推荐参数进行比较。FASTA(例如FASTA2及FASTA3)提供查询序列与检索序列之间的最佳重叠区的比对及序列一致性百分比(Pearson(2000),见上文)。当比较本发明的序列与含有大量来自不同生物体的序列的数据库时,另一优选算法为使用默认参数的计算机程序BLAST,尤其BLASTP或TBLASTN。参见例如Altschul等人(1990)《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》215:403-410及Altschul等人(1997)《核酸研究》25:3389-402,其各自以引用的方式并入本文中。

[0063] 生殖系突变

[0064] 与衍生出抗体的对应生殖系序列相比,本文所公开的抗CD3抗体可在重链可变域的框架区和/或CDR区中包括一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。

[0065] 本发明还包含衍生自本文所公开的任何氨基酸序列的抗体及其抗原结合片段,其中一个或多个框架区和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变成衍生出抗体的生殖系序列的对应残基或突变成另一人类生殖系序列的对应残基或突变成对应生殖系残基的保守氨基酸取代(所述序列变化在本文中统称为“生殖系突变”),并且具有与CD3抗原的弱或不可检测结合。

[0066] 此外,本发明抗体可在框架区和/或CDR区内含有两个或更多个生殖系突变的任何组合,例如其中某些个别残基突变成特定生殖系序列的对应残基,而不同于原始生殖系序列的某些其它残基维持不变或突变成不同生殖系序列的对应残基。在获得之后,可以测试含有一个或多个生殖系突变的抗体及抗原结合片段的一种或多种所期望的特性,如提高的结合特异性、弱或降低的结合亲和力、提高或增强的药物动力学特性、降低的免疫原性等。以此一般方式在本发明的引导的情况下获得的抗体及抗原结合片段涵盖在本发明内。

[0067] 本发明还包含抗原结合分子,其包括具有与本文所公开的任何HCVR和/或CDR氨基酸序列大体上一致的HCVR和/或CDR氨基酸序列的抗原结合域,同时维持或提高所需的与CD3抗原的弱亲和力。当提及氨基酸序列时,术语“大体一致”或“大体上一致”意指两个氨基酸序列在最佳比对(如通过程序GAP或BESTFIT使用默认空位权重)时,具有至少95%序列一致性,甚至更优选至少98%或99%序列一致性。优选地,不一致的残基位置的差异在于保守氨基酸取代。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代与彼此不同的情况下,可上调序列一致性或类似性程度百分比以针对取代的保守性质加以校正。进行这一调节的方式为所属领域的技术人员所熟知。参见例如Pearson(1994)《分子生物学方法》24:307-331。

[0068] 多肽的序列类似性(也称为序列一致性)通常使用序列分析软件来测量。蛋白分析软件使用分配至各种取代、缺失及其它修饰(包含保守氨基酸取代)的类似性测量来匹配类似序列。举例来说,GCG软件含有如Gap及Bestfit的程序,其可在默认参数下使用以测定密切相关的多肽(如来自生物体的不同物种的同源多肽)之间或野生型蛋白与其突变蛋白之间的序列同源性或序列一致性。参见例如GCG 6.1版。多肽序列还可使用FASTA(GCG 6.1版中的程序)使用默认或推荐参数进行比较。FASTA(例如FASTA2及FASTA3)提供查询序列与检索序列之间的最佳重叠区的比对及序列一致性百分比(Pearson(2000),见上文)。当比较本发明的序列与含有大量来自不同生物体的序列的数据库时,另一优选算法为使用默认参数的计算机程序BLAST,尤其BLASTP或TBLASTN。参见例如Altschul等人(1990)《分子生物学杂志》215:403-410及Altschul等人(1997)《核酸研究》25:3389-402。

[0069] 抗体的结合特性

[0070] 如本文所用,在抗体、免疫球蛋白、抗体结合片段或含Fc蛋白与例如预定抗原(如细胞表面蛋白或其片段)结合的情形下,术语“结合”通常指代最少两个实体或分子结构之间的相互相用或缔合,如抗体-抗原相互作用。

[0071] 举例来说,当通过例如表面等离子共振(SPR)技术在BIAcore 3000仪器中使用抗原作为配体并且抗体、Ig、抗体结合片段或含Fc蛋白作为分析物(或抗配体)测定时,结合亲和力通常对应于约10^{-7}M或更小、如约10^{-8}M或更小、如约10^{-9}M或更小的K_D值。还常规使用基于细胞的结合策略,如荧光活化细胞分选(FACS)结合分析,并且FACS数据很好地与如放射性配体竞争结合及SPR的其它方法相关(Benedict,CA,《免疫学方法杂志(J Immunol Methods.)》1997,201(2):223-31;Geuijen,CA等人《免疫学方法杂志》2005,302(1-2):68-77)。

[0072] 因此,本发明抗体或抗原结合蛋白结合预定抗原或细胞表面分子(受体),所述预定抗原或细胞表面分子具有对应于比其结合非特异性抗原(例如BSA、酪蛋白)的亲和力低至少十倍的K_D值的亲和力。根据本发明,对应于等于或低于比非特异性抗原低十倍的K_D值的抗体亲和力可视为不可检测结合,然而此类抗体可与第二抗原结合臂配对以产生本发明的双特异性抗体。

[0073] 术语“K_D”(M)指代特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数,或与抗原结合的抗体或抗体结合片段的解离平衡常数。K_D与结合亲和力之间存在反比关系,因此K_D值越小,亲和力越高,即越强。因此,术语“更高亲和力”或“更强亲和力”涉及更高的形成相互作用的能力并且因此更小的K_D值,并且相反地术语“更低亲和力”或“更弱亲和力”涉及更低的形成相互作用的能力并且因此更大的K_D值。在一些情况下,特定分子(例如抗体)与其相互作用搭配物分子(例如抗原X)的相比于所述分子与另一相互作用搭配物分子(例如抗原Y)的结合亲和力更高的结合亲和力可表示为结合率,所述结合率通过将更大K_D值(更低或更弱亲和力)除以更小K_D(较高或较强的亲和力)来确定,例如视具体情况表示为5倍或10倍更大的结合亲和力。

[0074] 术语“k_d”(sec^{-1}或1/s)指代特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数或抗体或抗体结合片段的解离速率常数。所述值也称为k_{off}值。

[0075] 术语“k_a”($M^{-1}\times sec^{-1}$或1/M)指代特定抗体-抗原相互作用的缔合速率常数,或抗体或抗体结合片段的缔合速率常数。

[0076] 术语“K_A”(M^{-1}或1/M)指代特定抗体-抗原相互作用的缔合平衡常数或抗体或抗体结合片段的缔合平衡常数。通过将k_a除以k_d获得缔合平衡常数。

[0077] 术语“EC50”或“EC_{50}”指代半最大有效浓度,其包含在指定暴露时间之后诱导基线与最大值之间的一半反应的抗体浓度。EC_{50}基本上代表观察到抗体的最大作用的50%的抗体浓度。在某些实施例中,EC_{50}值等于本发明抗体产生与表达CD3的细胞或肿瘤相关抗原(例如BCMA)的半最大结合的浓度,如由例如FACS结合分析所测定。因此,在增加的EC_{50}或半最大有效浓度值下观察到减小或较弱的结合。

[0078] 在一个实施例中,降低的结合可定义为能够与半最大量的靶细胞结合的增加的EC_{50}抗体浓度。

[0079] 在另一实施例中,EC_{50}值代表通过T细胞细胞毒活性引发靶细胞的半最大消耗的本

发明抗体的浓度。因此,在降低的EC_{50}或半最大有效浓度值下观察到提高的细胞毒性活性(例如T细胞介导的肿瘤细胞杀伤)。

[0080] 双特异性抗原结合分子

[0081] 本发明抗体可为单特异性、双特异性或多特异性。多特异性抗体可对一种靶多肽的不同表位具有特异性或可含有对超过一种靶多肽具有特异性的抗原结合域。参见例如Tutt等人,1991,《免疫学杂志(J.Immunol.)》147:60-69;Kufer等人,2004,《生物技术趋势(Trends Biotechnol.)》22:238-244。本发明的抗BCMA单特异性抗体或抗BCMA x抗CD3双特异性抗体可与另一功能性分子(例如另一肽或蛋白)连接或共表达。举例来说,抗体或其片段可功能性连接(例如通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或以其它方式)至一个或多个其它分子实体,如另一抗体或抗体片段以产生具有第二或其它结合特异性的双特异性或多特异性抗体。

[0082] 本文中使用表述"抗CD3抗体"或"抗BCMA抗体"意图包含单特异性抗CD3或抗BCMA抗体以及包括CD3结合臂及BCMA结合臂的双特异性抗体。因此,本发明包含双特异性抗体,其中免疫球蛋白的一个臂结合人类CD3,并且免疫球蛋白的另一臂对人类BCMA具有特异性。CD3结合臂可包括如本文表3中所示的任何HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列或WO 2014/047231或WO 2017/053856中所公开的抗CD3抗体。

[0083] 在某些实施例中,CD3结合臂结合人类CD3并且诱导人类T细胞活化。在某些实施例中,CD3结合臂微弱结合人类CD3并且诱导人类T细胞活化。在其它实施例中,在双特异性或多特异性抗体的情形下,CD3结合臂微弱结合人类CD3并且诱导表达肿瘤相关抗原的细胞杀伤。在其它实施例中,CD3结合臂与人类及食蟹猕猴(猴子)CD3微弱结合或缔合,然而结合相互作用不可通过所属领域中已知的体外分析检测。BCMA结合臂可包括如本文表1中所示的任何HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列。

[0084] 根据某些示例性实施例,本发明包含特异性结合CD3及BCMA的双特异性抗原结合分子。所述分子在本文中可称为例如"抗BCMA x抗CD3"或"抗CD3/抗BCMA"或"抗CD3 x BCMA"或"CD3 x BCMA"双特异性分子或其它类似术语(例如抗BCMA/抗CD3)。

[0085] 如本文所用,除非指定为来自非人类物种(例如"小鼠BCMA""猴子BCMA"等)否则术语"BCMA"指代人类BCMA蛋白。人类BCMA蛋白具有展示于SEQ ID NO:115中的氨基酸序列。

[0086] 前述特异性结合CD3及BCMA的双特异性抗原结合分子可包括抗CD3抗原结合分子,所述抗CD3抗原结合分子以微弱结合亲和力结合CD3,如展现如通过体外亲和力结合分析所测量大于约40nM的K_D。

[0087] 如本文所用,表述"抗原结合分子"意指包括或由至少一个互补决定区(CDR)组成的蛋白、多肽或分子复合物,所述互补决定区单独或与一个或多个其它CDR和/或框架区(FR)组合特异性结合特定抗原。在某些实施例中,抗原结合分子为抗体或抗体的片段,如本文中其它地方所定义的那些术语。

[0088] 如本文所用,表述"双特异性抗原结合分子"意指包括至少第一抗原结合域及第二抗原结合域的蛋白、多肽或分子复合物。双特异性抗原结合分子内的各抗原结合域包括至少一个CDR,所述CDR单独、或与一个或多个其它CDR和/或FR组合特异性结合特定抗原。在本发明的情形下,第一抗原结合域特异性结合第一抗原(例如BCMA)并且第二抗原结合域特异性结合第二不同抗原(例如CD3)。

[0089] 在本发明的某些示例性实施例中,双特异性抗原结合分子为双特异性抗体。双特异性抗体的各抗原结合域包括重链可变域(HCVR)及轻链可变域(LCVR)。在包括第一及第二抗原结合域的双特异性抗原结合分子(例如双特异性抗体)的情形下,第一抗原结合域的CDR可以前缀"D1"指定并且第二抗原结合域的CDR可以前缀"D2"指定。因此,第一抗原结合域的CDR在本文中可称为D1-HCDR1、D1-HCDR2及D1-HCDR3;并且第二抗原结合域的CDR在本文中可称为D2-HCDR1、D2-HCDR2及D2-HCDR3。

[0090] 在某些示例性实施例中,经分离双特异性抗原结合分子包括第一抗原结合域,所述第一抗原结合域包括:(a)含于包括SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)内的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2及HCDR3);及(b)含于包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)内的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2及LCDR3)。在一些情况下,经分离双特异性抗原结合分子包括有包括SEQ ID NO:68的氨基酸序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:70的氨基酸序列的HCDR2及包括SEQ ID NO:72的氨基酸序列的HCDR3。在一些情况下,经分离双特异性抗原结合分子包括有包括SEQ ID NO:84的氨基酸序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:86的氨基酸序列的LCDR2及包括SEQ ID NO:88的氨基酸序列的LCDR3。在一些情况下,第一抗原结合域包括有包括SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HCVR以及包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的LCVR。

[0091] 在某些示例性实施例中,经分离双特异性抗原结合分子包括第二抗原结合域,所述第二抗原结合域包括:(a)含于包括SEQ ID NO:90或SEQ ID NO:98的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)内的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2及HCDR3);及(b)含于包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)内的轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2及LCDR3)。在一些情况下,第二抗原结合域包括:(a)包括SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:100的氨基酸序列的HCDR1;(b)包括SEQ ID NO:94或SEQ ID NO:102的氨基酸序列的HCDR2;及(c)包括SEQ ID NO:96或SEQ ID NO:104的氨基酸序列的HCDR3。在一些情况下,第二抗原结合域包括有包括SEQ ID NO:84的氨基酸序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:86的氨基酸序列的LCDR2及包括SEQ ID NO:88的氨基酸序列的LCDR3。在一些情况下,第二抗原结合域包括:(a)分别包括SEQ ID NO:92、94、96的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3域;及分别包括SEQ ID NO:84、86、88的氨基酸序列的LCDR1、LCDR2、LCDR3域;或(b)分别包括SEQ ID NO:100、102、104的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3域;及分别包括SEQ ID NO:84、86、88的氨基酸序列的LCDR1、LCDR2、LCDR3域。在一些情况下,第二抗原结合域包括:(a)包括SEQ ID NO:90的氨基酸序列的HCVR以及包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的LCVR;或(b)包括SEQ ID NO:98的氨基酸序列的HCVR以及包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的LCVR。

[0092] 在某些示例性实施例中,经分离双特异性抗原结合分子包括:(a)第一抗原结合域,其包括分别包括SEQ ID NO:68、70、72的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3域以及分别包括SEQ ID NO:84、86、88的氨基酸序列的LCDR1、LCDR2、LCDR3域;及(b)第二抗原结合域,其包括分别包括SEQ ID NO:92、94、96的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3域以及分别包括SEQ ID NO:84、86、88的氨基酸序列的LCDR1、LCDR2、LCDR3域。在一些情况下,经分离双特异性抗原结合分子包括:(a)第一抗原结合域,其包括有包括SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HCVR以及包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的LCVR;及(b)第二抗原结合域,其包括有包括SEQ ID NO:90的氨基酸序列的HCVR以及包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的LCVR。

[0093] 在某些示例性实施例中,经分离双特异性抗原结合分子包括:(a)第一抗原结合域,其包括分别包括SEQ ID NO:68、70、72的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3域以及分别包括SEQ ID NO:84、86、88的氨基酸序列的LCDR1、LCDR2、LCDR3域;及(b)第二抗原结合域,其包括分别包括SEQ ID NO:100、102、104的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3域以及分别包括SEQ ID NO:84、86、88的氨基酸序列的LCDR1、LCDR2、LCDR3域。在一些情况下,经分离双特异性抗原结合分子包括:(a)第一抗原结合域,其包括有包括SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HCVR以及包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的LCVR;及(b)第二抗原结合域,其包括有包括SEQ ID NO:98的氨基酸序列的HCVR以及包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列的LCVR。

[0094] 在某些示例性实施例中,经分离双特异性抗原结合分子包括:(a)第一抗原结合域,其特异性结合人类BCMA并包括有包括选自由SEQ ID NO:2、18、34、50、66、122及124组成的群组的氨基酸序列的HCVR的CDR以及包括选自由SEQ ID NO:10、26、42、58、74、82、123及125组成的群组的氨基酸序列的LCVR的CDR;及(b)第二抗原结合域,其特异性结合人类CD3。在一些情况下,第一抗原结合域包括来自选自由SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、122/123、124/125、2/82、18/82、34/82、50/82、66/82、122/82及124/82组成的群组的HCVR/LCVR氨基酸序列对的CDR。在一些情况下,第一抗原结合域包括HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3域,分别选自由SEQ ID NO:4-6-8-12-14-16、20-22-24-28-30-32、36-38-40-44-46-48、52-54-56-60-62-64、68-70-72-76-78-80、4-6-8-84-86-88、20-22-24-84-86-88、36-38-40-84-86-88、52-54-56-84-86-88及68-70-72-84-86-88组成的群组。在一些情况下,第一抗原结合域包括选自由SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、122/123、124/125、2/82、18/82、34/82、50/82、66/82、122/82及124/82组成的群组的HCVR/LCVR氨基酸序列对。在一些情况下,第二抗原结合域包括选自由SEQ ID NO:90/82及98/82组成的群组的HCVR/LCVR氨基酸序列对的CDR。

[0095] 在某些示例性实施例中,经分离双特异性抗原结合分子竞争结合BCMA或结合BCMA上的与参考抗体相同的表位,其中所述参考抗体包括第一抗原结合域及第二抗原结合域,所述第一抗原结合域包括有包括SEQ ID NO:66/82的氨基酸序列的HCVR/LCVR对,所述第二抗原结合域包括有包括SEQ ID NO:90/82或SEQ ID NO:98/82的氨基酸序列的HCVR/LCVR对。

[0096] 在某些示例性实施例中,经分离双特异性抗原结合分子竞争结合人类CD3或结合人类CD3上的与参考抗体相同的表位,其中所述参考抗体包括第一抗原结合域及第二抗原结合域,所述第一抗原结合域包括有包括SEQ ID NO:66/82的氨基酸序列的HCVR/LCVR对,所述第二抗原结合域包括有包括SEQ ID NO:90/82或SEQ ID NO:98/82的氨基酸序列的HCVR/LCVR对。

[0097] 上文或本文所论述的双特异性抗原结合分子可为双特异性抗体。在一些情况下,双特异性抗体包括人类IgG重链恒定区。在一些情况下,人类IgG重链恒定区为同型IgG1。在一些情况下,人类IgG重链恒定区为同型IgG4。在各种实施例中,双特异性抗体包括嵌合铰链,所述嵌合铰链相对于相同同型的野生型铰链减少Fcγ受体结合。

[0098] 第一抗原结合域及第二抗原结合域可直接或间接彼此连接以形成本发明的双特异性抗原结合分子。或者,第一抗原结合域及第二抗原结合域各自连接至单独多聚化域。一个多聚化域与另一多聚化域的缔合促进两个抗原结合域之间的缔合,从而形成双特异性抗

原结合分子。如本文所用,“多聚化域”为能够与具有相同或相似结构或构造的第二多聚化域缔合的任何大分子、蛋白、多肽、肽或氨基酸。举例来说,多聚化域可为包括免疫球蛋白C_H3域的多肽。多聚化组分的非限制性实例为免疫球蛋白的Fc部分(包括C_H2-C_H3域),例如选自同型IgG1、IgG2、IgG3及IgG4以及各同型群组内的任何异型的IgG的Fc域。

[0099] 本发明的双特异性抗原结合分子将通常包括两个多聚化域,例如两个各自独立地为单独抗体重链的部分的Fc域。第一及第二多聚化域可具有相同IgG同型,如例如IgG1/IgG1、IgG2/IgG2、IgG4/IgG4。或者,第一及第二多聚化域可具有不同IgG同型,如例如IgG1/IgG2、IgG1/IgG4、IgG2/IgG4等。

[0100] 在某些实施例中,多聚化域为含有至少一个半胱氨酸残基长度为1至约200个氨基酸的Fc片段或氨基酸序列。在其它实施例中,多聚化域为半胱氨酸残基或含半胱氨酸的短肽。其它多聚化域包含肽或多肽,所述肽或多肽包括或由亮氨酸拉链、螺旋环圈基序或卷曲螺旋基序组成。

[0101] 任何双特异性抗体型式或技术均可用于制得本发明的双特异性抗原结合分子。举例来说,具有第一抗原结合特异性的抗体或其片段可功能性地连接(例如通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或以其它方式)至一个或多个其它分子实体(如具有第二抗原结合特异性的另一抗体或抗体片段)以产生双特异性抗原结合分子。可用于本发明的情形下的具体示例性双特异性型式包含但不限于例如基于scFv的或双功能抗体双特异性型式、IgG-scFv融合物、双重可变域(DVD)-Ig、四源杂交瘤(Quadroma)、臼包杵、常见轻链(例如具有臼包杵的常见轻链等)、互换Mab、互换Fab、(SEED)体、亮氨酸拉链、Duobody、IgG1/IgG2、双重作用Fab(DAF)-IgG及Mab^2双特异性型式(关于前述型式的综述,参见例如Klein等人2012,mAbs 4:6,1-11及其中所引用的参考文献)。

[0102] 在本发明的双特异性抗原结合分子的情形下,与Fc域的野生型、天然存在版本相比,多聚化域(例如Fc域)可包括一个或多个氨基酸变化(例如插入、缺失或取代)。举例来说,本发明包含包括Fc域中的一个或多个修饰的双特异性抗原结合分子,所述修饰产生具有经修饰的Fc与FcRn之间的结合相互作用(例如增强或减弱)的经修饰Fc域。在一个实施例中,双特异性抗原结合分子包括C_H2或C_H3区中的修饰,其中所述修饰增强酸性环境中(例如在pH在约5.5至约6.0范围内的核内体中)Fc域与FcRn的亲和力。所述Fc修饰的非限制性实例包含例如位置250(例如E或Q);250及428(例如L或F);252(例如L/Y/F/W或T)、254(例如S或T)及256(例如S/R/Q/E/D或T)处的修饰;或位置428和/或433(例如L/R/S/P/Q或K)和/或434(例如H/F或Y)处的修饰;或位置250和/或428处的修饰;或位置307或308(例如308F、V308F)及434处的修饰。在一个实施例中,修饰包括428L(例如M428L)及434S(例如N434S)修饰;428L、259I(例如V259I)及308F(例如V308F)修饰;433K(例如H433K)及434(例如434Y)修饰;252、254及256(例如252Y、254T及256E)修饰;250Q及428L修饰(例如T250Q及M428L);及307和/或308修饰(例如308F或308P)。

[0103] 本发明还包含包括第一C_H3域及第二Ig C_H3域的双特异性抗原结合分子,其中第一及第二Ig C_H3域彼此相差至少一个氨基酸,并且其中与缺乏氨基酸差异的双特异性抗体相比至少一个氨基酸差异减弱双特异性抗体与蛋白A的结合。在一个实施例中,第一Ig C_H3域结合蛋白A并且第二Ig C_H3域含有减小或破坏蛋白A结合的突变,如H95R修饰(由IMGT外显子编号;H435R,由EU编号)。第二C_H3可进一步包括Y96F修饰(由IMGT;Y436F,由EU)。参见例

如美国专利第8,586,713号。可发现于第二C_H3内的进一步修饰在IgG1抗体的情形下包含:D16E、L18M、N44S、K52N、V57M及V82I(由IMGT;D356E、L358M、N384S、K392N、V397M及V422I,由EU);在IgG2抗体的情形下包含:N44S、K52N及V82I(IMGT;N384S、K392N及V422I,由EU);及在IgG4抗体的情形下包含:Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q及V82I(由IMGT;Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q及V422I,由EU)。

[0104] 在某些实施例中,Fc域可为衍生自超过一种免疫球蛋白同型的嵌合、组合Fc序列。举例来说,嵌合Fc域可包括衍生自人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4C_H2区的部分或所有C_H2序列以及衍生自人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4的部分或所有C_H3序列。嵌合Fc域还可含有嵌合铰链区。举例来说,嵌合铰链可包括衍生自人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4铰链区的“上铰链”序列,与衍生自人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4铰链区的“下铰链”序列组合。可包含于本文所列举的任何抗原结合分子中的嵌合Fc域的特定实例包括(从N端至C端):[IgG4 C_H1]-[IgG4上铰链]-[IgG2下铰链]-[IgG4 CH2]-[IgG4 CH3]。可包含于本文所列举的任何抗原结合分子中的嵌合Fc域的另一实例包括(从N端至C端):[IgG1 C_H1]-[IgG1上铰链]-[IgG2下铰链]-[IgG4 CH2]-[IgG1 CH3]。可包含于本发明的任何抗原结合分子中的嵌合Fc域的这些及其它实例描述于2014年8月28日公开的美国公开2014/0243504中,所述公开以其全文并入本文中。具有这些通用结构配置的嵌合Fc域及其变体可具有经更改的Fc受体结合,其转而影响Fc效应功能。

[0105] 序列变体

[0106] 与衍生出个别抗原结合域的对应生殖系序列相比,本发明抗体及双特异性抗原结合分子可在重链及轻链可变域的框架区和/或CDR区中包括一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。所述突变可容易地通过比较本文所公开的氨基酸序列与购自例如公共抗体序列数据库的生殖系序列来确定。本发明的抗原结合分子可包括衍生自本文所公开的任何示例性氨基酸序列的抗原结合域,其中一个或多个框架区和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变成衍生出抗体的生殖系序列的对应残基或突变成另一人类生殖系序列的对应残基或突变成对应生殖系残基的保守氨基酸取代(所述序列变化在本文中统称为“生殖系突变”)。所属领域的一般技术人员从本文所公开的重链及轻链可变区序列开始,可容易地产生许多包括一个或多个个别生殖系突变或其组合的抗体及抗原结合片段。在某些实施例中,V_H和/或V_L域内的所有框架和/或CDR残基突变回在最初衍生出抗原结合域的原始生殖系序列中发现的残基。在其它实施例中,仅某些残基突变回原始生殖系序列,例如仅FR1的前8个氨基酸内或FR4的后8个氨基酸内所发现的突变残基,或仅CDR1、CDR2或CDR3内所发现的突变残基。在其它实施例中,框架和/或CDR残基中的一个或多个突变成不同生殖系序列(即与最初衍生出抗原结合域的生殖系序列不同的生殖系序列)的对应残基。此外,抗原结合域可在框架区和/或CDR区内含有两个或更多个生殖系突变的任何组合,例如其中某些个别残基突变成特定生殖系序列的对应残基,而不同于原始生殖系序列的某些其它残基维持不变或突变成不同生殖系序列的对应残基。在获得之后,可以容易地测试含有一个或多个生殖系突变的抗原结合域的一种或多种所期望的特性,如提高的结合特异性、增加的结合亲和力、提高或增强的拮抗性或促效生物特性(视具体情况)、降低的免疫原性等。以此一般方式获得的包括一个或多个抗原结合域的双特异性抗原结合分子涵盖于本发明内。

[0107] pH依赖性结合

[0108] 本发明包含抗BCMA抗体及抗BCMA x抗CD3双特异性抗原结合分子,具有pH依赖性结合特征。举例来说,相比于中性pH,本发明的抗BCMA抗体在酸性pH下可展现减弱的与BCMA的结合。或者,相比于中性pH,本发明的抗BCMA抗体在酸性pH下可展现增强的与BCMA的结合。表述"酸性pH"包含低于约6.2的pH值,例如约6.0、5.95、5.9、5.85、5.8、5.75、5.7、5.65、5.6、5.55、5.5、5.45、5.4、5.35、5.3、5.25、5.2、5.15、5.1、5.05、5.0或更低。如本文所用,表述"中性pH"意指约7.0至约7.4的pH。表述"中性pH"包含约7.0、7.05、7.1、7.15、7.2、7.25、7.3、7.35及7.4的pH值。

[0109] 在某些情况下,"相比于中性pH在酸性pH下减弱的结合"根据在酸性pH下抗体与其抗原结合的K_D值与中性pH下抗体与其抗原结合的K_D值的比率(或反过来)表述。举例来说,出于本发明的目的如果抗体或其抗原结合片段展现约3.0或更大的酸性/中性K_D比率,那么抗体或其抗原结合片段可视为展现"相比于中性pH在酸性pH下减弱的与BCMA的结合"。在某些示例性实施例中,本发明抗体或抗原结合片段的酸性/中性K_D比率可为约3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、20.0、25.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0、100.0或更大。

[0110] 具有pH依赖性结合特征的抗体可例如通过筛选相比于中性pH在酸性pH下与特定抗体的结合减弱(或增强)的抗体群体来获得。另外,在氨基酸水平下抗原结合域的修饰可产生具有pH依赖性特征的抗体。举例来说,通过用组氨酸残基取代抗原结合域(例如在CDR内)的一个或多个氨基酸可获得相对于中性pH在酸性pH下抗原结合减弱的抗体。

[0111] 包括Fc变异体的抗体

[0112] 根据本发明的某些实施例,提供抗BCMA抗体及抗BCMA x抗CD3双特异性抗原结合分子,其包括Fc域,所述Fc域包括一个或多个增强或减轻抗体与FcRn受体的结合(例如相比于中性pH值,在酸性pH值下)的突变。举例来说,本发明包含在Fc域的C_H2或C_H3区中包括突变的抗体,其中突变增加酸性环境(例如其中pH在约5.5至约6.0范围内的核内体)中Fc域与FcRn的亲和力。所述突变可导致当向动物给予时,抗体的血清半衰期增加。所述Fc修饰的非限制性实例包含例如位置250(例如E或Q);250及428(例如L或F);252(例如L/Y/F/W或T)、254(例如S或T)及256(例如S/R/Q/E/D或T)处的修饰;或位置428和/或433(例如H/L/R/S/P/Q或K)和/或434(例如H/F或Y)处的修饰;或位置250和/或428处的修饰;或位置307或308(例如308F、V308F)及434处的修饰。在一个实施例中,修饰包括428L(例如M428L)及434S(例如N434S)修饰;428L、259I(例如V259I)及308F(例如V308F)修饰;433K(例如H433K)及434(例如434Y)修饰;252、254及256(例如252Y、254T及256E)修饰;250Q及428L修饰(例如T250Q及M428L);及307和/或308修饰(例如308F或308P)。

[0113] 举例来说,本发明包含抗BCMA抗体及抗BCMA x抗CD3双特异性抗原结合分子,其包括Fc域,所述Fc域包括一个或多个选自由以下组成的群组的突变对或群组:250Q及248L(例如T250Q及M248L);252Y、254T及256E(例如M252Y、S254T及T256E);428L及434S(例如M428L及N434S);及433K及434F(例如H433K及N434F)。前述Fc域突变及本文所公开的抗体可变域内的其它突变的所有可能的组合涵盖于本发明范围内。

[0114] 抗体及双特异性抗原结合分子的生物学特征

[0115] 本发明包含以高亲和力(例如或亚纳摩尔K_D值)结合人类BCMA的抗体及其抗原结合片段。

[0116] 根据某些实施例,本发明包含结合人类BCMA(例如在25℃下)的抗体及抗体的抗原结合片段,其中如通过表面等离子共振(例如使用如本文实例4中所定义的分析型式)所测量K_D为低于约5nM。在某些实施例中,本发明抗体或抗原结合片段结合BCMA,其中如通过表面等离子共振(例如使用如本文实例4中所定义的分析型式或大体上类似的分析)所测量K_D为低于约20nM、低于约10nM、低于约8nM、低于约7nM、低于约6nM、低于约5nM、低于约4nM、低于约3nM、低于约2nM、低于约1nM、低于约800pM、低于约700pM、低于约500pM、低于约400pM、低于约300pM、低于约200pM、低于约100pM、低于约50pM或低于约25pM。本发明包含双特异性抗原结合分子,例如结合人类BCMA(其中K_D为低于约25pM)及结合猴子BCMA(其中如通过表面等离子共振(例如使用如本文实例4中所定义的分析型式或大体上类似的分析)所测量K_D为低于约170pM)的双特异性抗体。

[0117] 本发明还包含结合BCMA的抗体及其抗原结合片段,其中如在25℃下通过表面等离子共振(例如使用如本文实例4中所定义的分析型式或大体上类似的分析)所测量解离半衰期(t1/2)为大于约10分钟或大于约125分钟。在某些实施例中,本发明抗体或抗原结合片段结合BCMA,其中如在25℃下通过表面等离子共振(例如使用如本文实例4中所定义的分析型式或大体上类似的分析)所测量t1/2为大于约3分钟、大于约4分钟、大于约10分钟、大于约20分钟、大于约30分钟、大于约40分钟、大于约50分钟、大于约60分钟、大于约70分钟、大于约80分钟、大于约90分钟、大于100约分钟、大于约110分钟或大于约120分钟。本发明包含双特异性抗原结合分子,例如结合BCMA的双特异性抗体,其中如在25℃下通过表面等离子共振(例如使用如本文实例4中所定义的分析型式或大体上类似的分析)所测量t1/2为大于约10分钟。

[0118] 本发明还包含如由如实例6中所示的FACS结合分析或大体上类似的分析所确定与表达内源性BCMA(例如NCI-H929、MOLP-8或OMP-2)的人类细胞系特异性结合的抗体及其抗原结合片段。

[0119] 本发明还包含抗BCMA x抗CD3双特异性抗原结合分子,其展现一个或多个选自由以下组成的群组的特征:(a)压制带有人类多发性骨髓瘤异种移植的免疫功能不全小鼠的肿瘤生长;(b)压制带有人类多发性骨髓瘤异种移植的免疫功能不全小鼠的已建立的肿瘤的肿瘤生长(参见例如实例10至15);及(c)压制经工程改造以在表达人类CD3的免疫活性小鼠中表达人类BCMA的异体同质黑色素瘤及结肠癌瘤细胞的肿瘤生长。

[0120] 本发明包含以高亲和力结合人类CD3的抗体及其抗原结合片段。本发明还包含以中等或低亲和力(取决于所期望的治疗情形及特定靶向特性)结合人类CD3的抗体及其抗原结合片段。在一些情况下,低亲和力包含以大于300nM、大于500nM或大于1μM的K_D或EC_{50}(例如在表面等离子共振分析中所测量)结合CD3的抗体。本发明还包含以不可测量亲和力结合人类CD3的抗体及其抗原结合片段。举例来说,在双特异性抗原结合分子的情形下,其中一个臂结合CD3并且另一臂结合靶抗原(例如BCMA),可能期望靶抗原结合臂以高亲和力结合靶抗原,而抗CD3臂仅以中等或低亲和力或无亲和力结合CD3。以此方式,可以实现抗原结合分子优选靶向表达靶抗原的细胞,同时避免一般/未靶向的CD3结合及随之而来的与其相关的不利副作用。

[0121] 本发明包含双特异性抗原结合分子(例如双特异性抗体),其能够同时与人类CD3及人类BCMA结合。与表达CD3的细胞相互作用的结合臂可具有微弱到不可检测的结合,如在

适合的体外结合分析中所测量。双特异性抗原结合分子结合表达CD3和/或BCMA的细胞的程度可通过荧光活化细胞分选(FACS)评估,如本文实例5及实例6中所说明。

[0122] 举例来说,本发明包含抗体、其抗原结合片段及双特异性抗体,其特异性结合表达CD3但不表达BCMA(例如Jurkat)的人类T细胞系和/或表达BCMA的细胞。

[0123] 本发明包含抗体、其抗原结合片段及双特异性抗体,其以微弱(即低)或甚至不可检测的亲和力结合人类CD3。

[0124] 本发明包含抗体、其抗原结合片段及双特异性抗体,其以微弱(即低)或甚至不可检测的亲和力结合猴子(即食蟹猕猴)CD3。

[0125] 本发明包含抗体、其抗原结合片段及双特异性抗体,其结合人类CD3并且诱导T细胞活化。

[0126] 本发明包含抗BCMA x抗CD3双特异性抗原结合分子,其能够消耗或减少个体的表达肿瘤抗原的细胞(参见例如实例8至16或大体上类似的分析)。举例来说,根据某些实施例,提供抗BCMA x抗CD3双特异性抗原结合分子,其中向个体单次给予或多次给予0.04mg/kg、0.4mg/kg或4mg/kg的双特异性抗原结合分子引起个体的表达BCMA的细胞的数目减少(例如压制或抑制个体的肿瘤生长)。

[0127] 表位定位及相关技术

[0128] 本发明的抗原结合分子所结合的CD3和/或BCMA上的表位可由CD3或BCMA蛋白的3个或更多个(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个)氨基酸的单一连续序列组成。或者,表位可由CD3或BCMA的多个非连续氨基酸(或氨基酸序列)组成。本发明抗体可与含于单一CD3链(例如CD3-ε、CD3-δ或CD3-γ)内的氨基酸相互作用或可与两个或更多个不同CD3链上的氨基酸相互作用。如本文所用,术语“表位”指代与称为互补位的抗体分子的可变区中的特异性抗原结合位点相互作用的抗原决定子。单一抗原可具有超过一个表位。因此,不同抗体可结合抗原上的不同区域并且可具有不同生物作用。表位可为构形或线性的。构形表位通过来自线性多肽链的不同链段的空间并列氨基酸产生。线性表位为由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情形下,表位可包含抗原上的醣类、磷酰基或磺酰基部分。

[0129] 所属领域的一般技术人员已知的各种技术可用于确定抗体的抗原结合域是否“与多肽或蛋白内的一个或多个氨基酸相互作用”。示例性技术包含例如常规交叉阻断分析,如所描述的Antibodies、Harlow及Lane(纽约冷泉港的冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harb.,NY));丙氨酸扫描突变分析;肽墨点分析(Reineke,2004,《分子生物学方法》248:443-463)及肽裂解分析。另外,可采用如表位切除、表位提取及抗原化学修饰的方法(Tomer 2000《蛋白科学(Protein Science)》9:487-496)。另一可用于鉴别与抗体的抗原结合域相互作用的多肽内的氨基酸的方法为通过质谱检测的氢/氘交换。一般来说,氢/氘交换方法涉及氘标记所关注的蛋白,接着使抗体与氘标记蛋白结合。随后,将蛋白/抗体复合物转移到水中以允许氢-氘交换在除由抗体保护的残基(其保持经氘标记)以外的所有残基处发生。在抗体解离之后,对靶蛋白进行蛋白酶裂解及质谱分析,借此显露对应于与抗体相互作用的具体氨基酸的氘标记残基。参见例如Ehring(1999)《分析生物化学(Analytical Biochemistry)》267(2):252-259;Engen及Smith(2001)《分析化学(Anal.Chem.)》73:256A-265A。抗原/抗体复合物的X射线结晶还可用于表位定位目的。

[0130] 本发明进一步包含抗BCMA抗体,其结合与本文所描述的任何具体示例性抗体(例如包括如本文表1中所示的任何氨基酸序列的抗体)相同的表位。同样地,本发明还包含抗BCMA抗体,其与本文所描述的任何具体示例性抗体(例如包括如本文表1中所示的任何氨基酸序列的抗体)竞争结合BCMA。

[0131] 本发明还包含双特异性抗原结合分子,其包括以低或不可检测结合亲和力特异性结合人类CD3和/或食蟹猕猴CD3的第二抗原结合域及特异性结合人类BCMA的第二抗原结合域,其中第二抗原结合域结合CD3上与本文所描述的任何具体示例性CD3特异性抗原结合域相同的表位,和/或其中第二抗原结合域结合BCMA上与本文所描述的任何具体示例性BCMA特异性抗原结合域相同的表位。

[0132] 同样地,本发明还包含双特异性抗原结合分子,其包括特异性结合人类BCMA的第一抗原结合域及特异性结合人类CD3的第二抗原结合域,其中第一抗原结合域与本文所描述的任何具体示例性BCMA特异性抗原结合域竞争结合BCMA,和/或其中第二抗原结合域与本文所描述的任何具体示例性CD3特异性抗原结合域竞争结合CD3。

[0133] 通过使用所属领域中已知的常规方法可容易地确定特定抗原结合分子(例如抗体)或其抗原结合域是否结合与本发明的参考抗原结合分子相同的表位或竞争结合。举例来说,为确定测试抗体是否结合BCMA(或CD3)上与本发明的参考双特异性抗原结合分子相同的表位,首先使参考双特异性分子结合BCMA蛋白(或CD3蛋白)。随后,评估测试抗体结合BCMA(或CD3)分子的能力。如果在与参考双特异性抗原结合分子饱和结合后测试抗体能够结合BCMA(或CD3),那么可推断测试抗体结合相比于参考双特异性抗原结合分子不同的BCMA(或CD3)的表位。另一方面,如果测试抗体不能够在与参考双特异性抗原结合分子饱和结合后结合BCMA(或CD3)分子,那么测试抗体可结合与由本发明的参考双特异性抗原结合分子所结合的表位相同的BCMA(或CD3)的表位。随后可进行其它常规实验(例如肽突变及结合分析)以确认所观察到的测试抗体的结合不足实际上是否是因结合与参考双特异性抗原结合分子相同的表位所致,或是否空间阻断(或另一现象)造成所观察到的结合不足。此种实验可使用ELISA、RIA、Biacore、流式细胞测量术或所属领域中可用的任何其它定量或定性抗体结合分析来进行。根据本发明的某些实施例,如果如在竞争性结合分析(参见例如Junghans等人,《癌症研究(Cancer Res.)》1990:50:1495-1502)中所测量,例如1、5、10、20或100倍过量的一种抗原结合蛋白抑制另一抗原结合蛋白的结合至少50%,但优选地75%、90%或甚至99%,那么两个抗原结合蛋白结合相同(或重叠)表位。或者,如果抗原中基本上所有减少或消除一种抗原结合蛋白的结合的氨基酸突变减少或消除另一抗原结合蛋白的结合,那么认为两个抗原结合蛋白结合相同表位。如果仅减少或消除一种抗原结合蛋白的结合的氨基酸突变的子集减少或消除另一抗原结合蛋白的结合,那么认为两个抗原结合蛋白具有“重叠表位”。

[0134] 为确定抗体或其抗原结合域是否与参考抗原结合分子竞争结合,在以下两个方向进行上述结合方法:在第一方向,在饱和条件下使参考抗原结合分子结合BCMA蛋白(或CD3蛋白),随后评估测试抗体与BCMA(或CD3)分子的结合。在第二方向,在饱和条件下使测试抗体结合BCMA(或CD3)分子,随后评估参考抗原结合分子与BCMA(或CD3)分子的结合。如果在两个方向中,仅第一(饱和)抗原结合分子能够结合于BCMA(或CD3)分子,那么推断测试抗体与参考抗原结合分子竞争结合BCMA(或CD3)。如所属领域的一般技术人员应了解,与参考抗

原结合分子竞争结合的抗体可能未必结合与参考抗体相同的表位,但可通过结合重叠或相邻表位而空间上阻断参考抗体的结合。

[0135] 抗原结合域的制备及双特异性分子的构建

[0136] 对特定抗原具有特异性的抗原结合域可通过所属领域中已知的任何抗体生产技术制备。在获得之后,对两个不同抗原(例如CD3及BCMA)具有特异性的两个不同抗原结合域可使用常规方法适当地相对于彼此排列以产生本发明的双特异性抗原结合分子。(本文中其它地方提供可用于构建本发明的双特异性抗原结合分子的示例性双特异性抗体型式的论述)。在某些实施例中,本发明的多特异性抗原结合分子的个别组分(例如重链及轻链)中的一个或多个衍生自嵌合、人类化或完全人类抗体。用于制备所述抗体的方法为所属领域中熟知的。举例来说,本发明的双特异性抗原结合分子的重链和/或轻链中的一个或多个可使用VELOCIMMUNE™技术制备。使用VELOCIMMUNE™技术(或任何其它人类抗体生产技术),初始分离特定抗原(例如CD3或BCMA)的高亲和力嵌合抗体,其具有人类可变区及小鼠恒定区。针对所期望的特征(包含亲和力、选择性、表位等)表征及选择抗体。用所期望的人类恒定区替代小鼠恒定区以产生可并入本发明的双特异性抗原结合分子中的完全人类重链和/或轻链。

[0137] 经基因工程改造的动物可用以制得人类双特异性抗原结合分子。举例来说,可使用不能重排并且表达内源性小鼠免疫球蛋白轻链可变序列的经基因修饰小鼠,其中小鼠仅表达一或两个由可操作地连接于内源性小鼠κ基因座处的小鼠κ恒定基因的人类免疫球蛋白序列编码的人类轻链可变域。所述经基因修饰小鼠可用于产生包括两个不同重链的完全人类双特异性抗原结合分子,所述重链与包括衍生自两个不同人类轻链可变区基因区段中的一者的可变域的一致轻链缔合。(参见例如US 2011/0195454)。完全人类指代包括由DNA编码的氨基酸序列的抗体、或其抗原结合片段或免疫球蛋白域,所述DNA衍生自在抗体或其抗原结合片段或免疫球蛋白域的各多肽的全部长度上的人类序列。在一些情况下,完全人类序列衍生自对于人类为内源性的蛋白。在其它情况下,完全人类蛋白或蛋白序列包括其中各组分序列衍生自人类序列的嵌合序列。尽管未受任何一个理论限制,但例如相比于任何野生型人类免疫球蛋白区或域,嵌合蛋白或嵌合序列一般经设计以将组分序列的接合点中的免疫原性表位的产生减到最少。

[0138] 生物等效物

[0139] 本发明涵盖具有不同于本文所公开的示例性分子的那些氨基酸序列的氨基酸序列但保留结合CD3和/或BCMA的能力的抗原结合分子。当与亲本序列比较时,所述变异分子可包括氨基酸的一个或多个添加、缺失或取代,但展现与所描述的双特异性抗原结合分子的生物活性基本上等效的生物活性。

[0140] 本发明包含抗原结合分子,其为本文所列举的任何示例性抗原结合分子的生物等效物。举例来说,如果两个抗原结合蛋白或抗体为当在类似实验条件下以单次剂量或多次剂量以相同摩尔剂量给予时其吸收速率及程度不展示显著差异的医药等效物或医药替代物,那么将所述两个抗原结合蛋白或抗体视为生物等效。如果一些抗原结合蛋白质在其吸收程度上而非其吸收速率上等效,那么将其视为等效物或医药替代物,并且又可将其视为生物等效的,因为吸收速率中的所述差异为故意的并且反映在标记中,对于在例如长期使用方面达到有效主体药物浓度非必要的,并且对于所研究的特定药品来说被视为医学上无

关紧要的。

[0141] 在一个实施例中,如果两个抗原结合蛋白在安全性、纯度及效价方面不存在临床上有意义的差异,那么其为生物等效的。

[0142] 在一个实施例中,如果患者可在参考产品与生物产品之间切换一或多次,相比于无所述切换的持续疗法不存在预期的副作用(包含免疫原性的临床显著变化或有效性减弱)风险增加,那么两个抗原结合蛋白为生物等效。

[0143] 在一个实施例中,如果两个抗原结合蛋白均针对使用条件通过常用机制或作用机制起作用,至所述机制所已知的程度,那么其为生物等效的。

[0144] 生物等效性可通过体内及体外方法证实。生物等效性测量包含例如(a)人类或其它哺乳动物中的体内测试,其中随时间而变测量血液、血浆、血清或其它生物流体中抗体或其代谢物的浓度;(b)与人类体内生物可用性数据相关并且合理地预测人类体内生物可用性数据的体外测试;(c)人类或其它哺乳动物中的体内测试,其中随时间而变测量抗体(或其靶)的适当急性药理学作用;及(d)建立抗原结合蛋白的安全性、功效或生物可用性或生物等效性的经良好控制的临床试验。

[0145] 本文所列举的示例性双特异性抗原结合分子的生物等效变异体可通过例如进行残基或序列的各种取代或删除对于生物活性来说非必需的末端或内部残基或序列来构建。举例来说,对于生物活性来说非必需的半胱氨酸残基可删除或用其它氨基酸替代以防止在复性后形成不必要或不恰当的分子内双硫桥键。在其它情形中,生物等效抗原结合蛋白可包含本文所列举的示例性双特异性抗原结合分子的变异体,所述变异体包括修饰分子的醣基化特征的氨基酸变化,例如消除或去除醣基化的突变。

[0146] 物种选择性及物种交叉反应性

[0147] 根据本发明的某些实施例,提供结合人类CD3而非来自其它物种的CD3的抗原结合分子。还提供结合人类BCMA而非来自其它物种的BCMA的抗原结合分子。本发明还包含结合人类CD3及来自一种或多种非人类物种的CD3的抗原结合分子;和/或结合人类BCMA及来自一种或多种非人类物种的BCMA的抗原结合分子。

[0148] 根据本发明的某些示例性实施例,提供抗原结合分子,其结合人类CD3和/或人类BCMA并且可视具体情况结合或不结合以下中的一种或多种:小鼠、大鼠、天竺鼠、仓鼠、沙鼠、猪、猫、狗、兔、山羊、绵羊、牛、马、骆驼、食蟹猕猴、狨猴、恒河猴或黑猩猩CD3和/或BCMA。举例来说,在本发明的特定示例性实施例中,提供包括结合人类BCMA及食蟹猕猴BCMA的第一抗原结合域以及特异性结合人类CD3的第二抗原结合域的双特异性抗原结合分子或包括结合人类BCMA及食蟹猕猴BCMA的第一抗原结合域以及特异性结合人类CD3的第二抗原结合域的双特异性抗原结合分子。

[0149] 治疗性调配物及给药

[0150] 本发明提供医药组合物,其包括本发明的抗原结合分子。本发明的医药组合物用适合的载剂、赋形剂及提供提高的转移、递送、耐受性及类似性质的其它试剂调配。可于所有医药化学家已知的处方集中查询众多适当调配物:《雷明顿氏医药科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司(Mack Publishing Company,Easton,PA)。这些调配物包含例如粉剂、糊剂、软膏、凝胶剂、蜡、油、脂质、含有囊泡的脂质(阳离子型或阴离子型)(如LIPOFECTIN™,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公

司(Life Technologies,Carlsbad,CA))、DNA缀合物、无水吸收糊剂、水包油及油包水乳液、聚乙二醇乳液(具有各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶及含有聚乙二醇的半固体混合物。还参见Powell等人“用于肠胃外配制物的赋形剂的概要(Compendium of excipients for parenteral formulations)”PDA(1998)《药学科学技术杂志(J Pharm Sci Technol)》52:238-311。

[0151] 向患者给予的抗原结合分子的剂量可视患者的年龄及身材、靶向疾病、病况、给予途径等而变化。优选剂量通常根据体重或体表面积计算。当本发明的双特异性抗原结合分子用于成年患者的治疗目的时,宜静脉内给予本发明的双特异性抗原结合分子,通常以约0.01至约20mg/kg体重、更优选约0.02至约7、约0.03到约5或约0.05至约3mg/kg体重的单次剂量。视病况的严重度而定,可调整治疗的频率及持续时间。给予双特异性抗原结合分子的有效剂量及时程可凭经验确定;举例来说,患者进展可通过周期性评估监测,并且相应地调整剂量。此外,可使用所属领域中熟知的方法(例如Mordenti等人,1991,《医药研究(Pharmaceut.Res.)》8:1351)进行剂量的种间按比例调整。。

[0152] 各种递送系统为已知的并且可用以给予本发明的医药组合物,例如囊封于脂质体中、微粒、微胶囊、能够表达突变病毒的重组细胞、受体介导的内吞作用(参见例如Wu等人,1987,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》262:4429-4432)。引入方法包含但不限于皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外及经口途径。组合物可通过任何便利途径给予,例如通过输液或快速注射、通过经由上皮或黏膜皮肤内层(例如口腔黏膜、直肠及肠道黏膜等)吸收,并且可与其它生物活性剂一起给予。可全身性或局部给予。

[0153] 可用标准针及注射器皮下或静脉内递送本发明的医药组合物。此外,就皮下递送来说,笔式递送装置易于应用于递送本发明的医药组合物。此类笔式递送装置可为可再用的或抛弃式的。可再用的笔式递送装置一般利用含有医药组合物的可更换套筒。在套筒内的所有医药组合物已给予并且套筒为空后,空套筒可容易地丢弃并且用含有医药组合物的新套筒替换。随后可再使用笔式递送装置。在抛弃式笔式递送装置中,不存在可替换套筒。确切地说,抛弃式笔式递送装置预填充有保存于装置内的储集层中的医药组合物。在清空储集层的医药组合物后,丢弃整个装置。

[0154] 许多可再用笔式及自动注射递送装置应用于本发明的医药组合物的皮下递送中。仅举几例,实例包含但不限于AUTOPEN™(英国伍德斯托克的欧曼福德公司(Owen Mumford,Inc.,Woodstock,UK));DISETRONIC™笔(瑞士布格多夫(Bergdorf,Switzerland)的Disetronic Medical Systems);HUMALOG MIX75/25™笔、HUMALOG™笔、HUMALIN 70/30™笔(印第安纳州印第安纳波利斯的礼来公司(Eli Lilly and Co.,Indianapolis,IN));NOVOPEN™I、II及III(丹麦哥本哈根的诺和诺德(Novo Nordisk,Copenhagen,Denmark));NOVOPEN JUNIOR™(丹麦哥本哈根的诺和诺德);BD™笔(新泽西州富兰克林湖的碧迪医疗(Becton Dickinson,Franklin Lakes,NJ));OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™及OPTICLIK™(德国法兰克福的赛诺菲-安万特(sanofi-aventis,Frankfurt,Germany))。仅举几例,应用于皮下递送本发明的医药组合物的抛弃式笔式递送装置的实例包含但不限于SOLOSTAR™笔(赛诺菲-安万特)、FLEXPEN™(诺和诺德)及KWIKPEN™(礼来公司)、SURECLICK™自动注射器(加利福尼亚州绍曾德奥克斯的安进(Amgen,Thousand Oaks,CA))、PENLET™(德国斯图加特(Stuttgart,Germany)的Haselmeier)、EPIPEN(Dey,L.P.)及HUMIRA™笔(阿波特

公园IL的雅培(Abbott Labs,Abbott Park IL))。

[0155] 在某些情形下,医药组合物可在控制释放系统中递送。在一个实施例中,可使用泵(参见Langer,见上文;Sefton 1987《生物医学工程的关键参考(CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.)》14:201)。在另一实施例中,可使用聚合材料;参见《控制释放的医药应用(Medical Applications of Controlled Release)》,Langer及Wise(编),1974,佛罗里达州博卡拉顿的CRC出版社(CRC Pres.,Boca Raton,Florida)。在又一实施例中,可将控制释放系统接近组合物的标靶置放,因此仅需要全身性剂量的一部分(参见例如Goodson,1984,《控制释放的医药应用》中,见上文,第2卷,第115-138页)。其它控制释放系统论述于Langer,1990,《科学(Science)》249:1527-1533的综述中。

[0156] 可注射制剂可包含用于静脉内、皮下、皮内及肌肉内注射;滴液输液等的剂型。这些可注射制剂可通过众所周知的方法制备。举例来说,可注射制剂可例如通过将上文所描述的抗体或其盐溶解、悬浮或乳化于常规地用于注射的无菌水性介质或油性介质中来制备。作为用于注射的水性介质,例如生理盐水、含有葡萄糖及其它辅助剂的等渗溶液等,其可与适当的增溶剂(如醇(例如乙醇)、多元醇(例如丙二醇、聚乙二醇)、非离子型表面活性剂[例如聚山梨醇酯80、HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧化乙烯(50mol)加合物)]等)组合使用。作为油性介质,采用例如芝麻油、大豆油等,其可与增溶剂(如苯甲酸苯甲酯、苯甲醇等)组合使用。由此制备的注射液优选填充于适当的安瓿中。

[0157] 有利地,将上文所描述的用于经口或肠胃外用途的医药组合物制备成呈适合于配合活性成分的剂量的单位剂量的剂型。单位剂量中的所述剂型包含例如锭剂、丸剂、胶囊、注射剂(安瓿)、栓剂等。前述抗体的含量一般为约5至约500mg/剂型/单位剂量;尤其在注射剂型中,优选地前述抗体的含量为约5至约100mg并且对于其它剂型为约10至约250mg。

[0158] 抗原结合分子的治疗性用途

[0159] 本发明包含方法,所述方法包括向有需要的个体给予包括抗BCMA抗体或其抗原结合片段或特异性结合CD3及BCMA的双特异性抗原结合分子的治疗性组合物。治疗性组合物可包括如本文所公开的任何抗体或双特异性抗原结合分子及药学上可接受的载剂或稀释剂。如本文所用,表述“有需要的个体”意指展现癌症的一种或多种症状或标志的人类或非人类动物(例如表达肿瘤或患有本文下文提及的任何癌症的个体)或将另外受益于BCMA活性的抑制或减少或BCMA+细胞(例如多发性骨髓瘤细胞)的消耗的个体。

[0160] 本发明抗体及双特异性抗原结合分子(及包含其的治疗性组合物)尤其适用于治疗其中免疫反应的刺激、活化和/或靶向将为有益的任何疾病或病症。确切地说,本发明的抗BCMA抗体或抗BCMA x抗CD3双特异性抗原结合分子可用于治疗预防和/或减缓与BCMA表达或活性或BCMA+细胞的增殖有关或由其介导的任何疾病或病症。实现本发明的治疗方法的作用机制包含在效应细胞存在下(例如)通过CDC、细胞凋亡、ADCC、噬菌作用或通过这些机制中的两种或更多种的组合杀伤表达BCMA的细胞。可使用本发明的双特异性抗原结合分子抑制或杀伤的表达BCMA的细胞包含例如多发性骨髓瘤细胞。

[0161] 本发明的抗原结合分子可用以治疗与BCMA表达相关的疾病或病症,包含例如包含多发性骨髓瘤的癌症或其它B细胞或浆细胞癌症,如瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、伯基特淋巴瘤及弥漫性大B细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴球性白血病、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤及霍奇金氏淋巴瘤。根据本发明的某些实

施例,抗BCMA抗体或抗BCMA x抗CD3双特异性抗体适用于治疗罹患多发性骨髓瘤的患者。根据本发明的其它相关实施例,提供包括向罹患多发性骨髓瘤的患者给予如本文所公开的抗BCMA抗体或抗BCMA x抗CD3双特异性抗原结合分子的方法。所属领域中已知的分析/诊断性方法(如肿瘤扫描等)可用以确定患者是否携带多发性骨髓瘤或另一B细胞谱系癌症。

[0162] 本发明还包含用于治疗个体的残余癌症的方法。如本文所用,术语"残余癌症"意指在用抗癌疗法治疗后,个体中存在或存留一种或多种癌细胞。

[0163] 根据某些方面,本发明提供用于治疗与BCMA表达相关联的疾病或病症(例如多发性骨髓瘤)的方法,其包括在个体已确定具有多发性骨髓瘤之后向个体给予本文其它地方所描述的一种或多种抗BCMA或双特异性抗原结合分子。举例来说,本发明包含用于治疗多发性骨髓瘤的方法,其包括在个体已接收其它免疫疗法或化学疗法之后1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周或4周、2个月、4个月、6个月、8个月、1年或更长时间向患者给予抗BCMA抗体或抗BCMA x抗CD3双特异性抗原结合分子。

[0164] 组合疗法及调配物

[0165] 本发明提供包括给予医药组合物的方法,所述医药组合物包括本文所描述的任何示例性抗体及双特异性抗原结合分子与一种或多种其它治疗剂的组合。可与本发明的抗原结合分子组合或与组合给予的示例性其它治疗剂包含例如抗肿瘤剂(例如化学治疗剂,包含美法仑、长春新碱(安可平)、环磷酰胺(癌得星)、依托泊苷(VP-16)、小红莓(阿德力霉素)、小红莓脂质体(多希)、苯达莫司汀(特瑞达)或任何其它已知在治疗个体的浆细胞肿瘤中有效的化学治疗剂)。在一些实施例中,第二治疗剂包括类固醇。在一些实施例中,第二治疗剂包括靶向疗法,包含沙利度胺、来那度胺及硼替佐米,所述疗法为批准用于治疗新诊断患者的疗法。来那度胺、泊马度胺、硼替佐米、卡非佐米、帕比司他、依萨佐米、埃罗妥珠单抗及达雷木单抗为有效治疗复发性骨髓瘤的第二治疗剂的实例。在某些实施例中第二治疗剂为包括放射疗法或干细胞移植的方案。在某些实施例中,第二治疗剂可为免疫调节剂。在某些实施例中,第二治疗剂可为蛋白酶体抑制剂,包含硼替佐米(万珂)、卡非佐米(凯普罗里斯)、依萨佐米(恩莱瑞)。在某些实施例中第二治疗剂可为组蛋白去乙酰基酶抑制剂,如帕比司他(法瑞达克)。在某些实施例中,第二治疗剂可为单克隆抗体、抗体药物缀合物、与抗肿瘤剂缀合的双特异性抗体、检查点抑制剂或其组合。可有利地与本发明的抗原结合分子组合给予的其它试剂包含细胞介素抑制剂,包含小分子细胞介素抑制剂及结合细胞介素(如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18)或其相应受体的抗体。还可给予本发明的医药组合物(例如包括如本文所公开的抗BCMA x抗CD3双特异性抗原结合分子的医药组合物)作为包括一种或多种治疗组合的治疗方案的部分,所述治疗组合选自除本文所描述的那些单克隆抗体以外的单克隆抗体(其可与浆细胞表面上的不同抗原相互作用)、双特异性抗体(其具有一个结合肿瘤细胞表面上的抗原的臂及另一结合T细胞上的抗原的臂)、抗体药物缀合物、与抗肿瘤剂缀合的双特异性抗体、检查点抑制剂(例如靶向PD-1或CTLA-4的检查点抑制剂)或其组合。在某些实施例中,检查点抑制剂可选自PD-1抑制剂,如派姆单抗(克珠达)、纳武单抗(欧狄沃)或赛咪单抗(REGN2810)。在某些实施例中,检查点抑制剂可选自PD-L1抑制剂,如阿特珠单抗(特森催克)、阿维鲁单抗(巴文西亚)或德瓦鲁单抗(英菲尼)。在某些实施例中,检查点抑制剂可选自CTLA-4抑制剂,如伊匹单抗(易沃伊)。可与本发明抗体结合使用的其它组合为上文所述。

[0166] 本发明还包含治疗组合,其包括本文中提及的任何抗原结合分子及以下中的一种或多种抑制剂:VEGF、Ang2、DLL4、EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EGFRvIII、cMet、IGF1R、B-raf、PDGFR-α、PDGFR-β、FOLH1(PSMA)、PRLR、STEAP1、STEAP2、TMPRSS2、MSLN、CA9、尿溶蛋白或前述细胞介素中的任一种,其中抑制剂为适体、反义分子、核糖核酸酶、siRNA、肽体、纳米抗体或抗体片段(例如Fab片段;F(ab')$_2$片段;Fd片段;Fv片段;scFv;dAb片段;或其它经工程改造的分子,如双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、微型抗体及最小识别单位)。本发明的抗原结合分子还可与抗病毒剂、抗生素、镇痛剂、皮质类固醇和/或NSAID组合给予和/或共调配。本发明的抗原结合分子还可作为还包含放射治疗和/或常规化学疗法的治疗方案的部分给予。

[0167] 其它治疗活性组分可在即将给予本发明的抗原结合分子之前、与给予本发明的抗原结合分子同时或在给予本发明的抗原结合分子之后不久给予;(出于本发明的目的,所述给药方案视为"与其它治疗活性组分组合"给予抗原结合分子)。

[0168] 本发明包含医药组合物,其中本发明的抗原结合分子与如本文其它地方所描述的一种或多种其它治疗活性组分共调配。

[0169] 给药方案

[0170] 根据本发明的某些实施例,可在限定时程内向个体给予多个剂量的抗原结合分子(例如抗BCMA抗体或特异性结合BCMA及CD3的双特异性抗原结合分子)。根据本发明的这一方面的方法包括向个体依序给予多个剂量的本发明的抗原结合分子。如本文所用,"依序给予"意指各剂量的抗原结合分子是在不同时间点向个体给予,例如在由预定间隔(例如小时、天、周或月)分隔开的不同天。本发明包含方法,其包括向患者依序给予单一初始剂量的抗原结合分子,接着给予一个或多个第二剂量的抗原结合分子,并且任选地接着给予一个或多个第三剂量的抗原结合分子。

[0171] 术语"初始剂量"、"第二剂量"及"第三剂量"指代给予本发明的抗原结合分子的时间顺序。因此,"初始剂量"为在治疗方案开始时给予的剂量(也称为"基线剂量");"第二剂量"为在初始剂量之后给予的剂量;及"第三剂量"为在第二剂量之后给予的剂量。初始、第二及第三剂量均可含有相同量的抗原结合分子,但一般可在给予频率方面彼此不同。然而,在某些实施例中,初始、第二和/或第三剂量中所含的抗原结合分子的量在治疗时程期间彼此不同(例如视需要上调或下调)。在某些实施例中,在治疗方案开始时给予两个或更多个(例如2、3、4或5个)剂量作为"起始剂量(loading dose)",接着在较低频率基础上给予后续剂量(例如"维持剂量")。

[0172] 在本发明一个示例性实施例中,各第二和/或第三剂量在前一剂量之后1至26(例如1、1$^1/_2$、2、2$^1/_2$、3、3$^1/_2$、4、4$^1/_2$、5、5$^1/_2$、6、6$^1/_2$、7、7$^1/_2$、8、8$^1/_2$、9、9$^1/_2$、10、10$^1/_2$、11、11$^1/_2$、12、12$^1/_2$、13、13$^1/_2$、14、14$^1/_2$、15、15$^1/_2$、16、16$^1/_2$、17、17$^1/_2$、18、18$^1/_2$、19、19$^1/_2$、20、20$^1/_2$、21、21$^1/_2$、22、22$^1/_2$、23、23$^1/_2$、24、24$^1/_2$、25、25$^1/_2$、26、26$^1/_2$或更多)周给予。如本文所用,词组"前一剂量"意指在多次给予的顺序中,在给予顺序中的下一剂量之前向患者给予的抗原结合分子的剂量,而无插入剂量。

[0173] 根据本发明的这一方面的方法可包括向患者给予任何数量的第二和/或第三剂量的抗原结合分子(例如抗BCMA抗体或特异性结合BCMA及CD3的双特异性抗原结合分子)。举例来说,在某些实施例中,仅向患者给予单一第二剂量。在其它实施例中,向患者给予两个

或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8或更多个)第二剂量。同样地,在某些实施例中,仅向患者给予单一第三剂量。在其它实施例中,向患者给予两个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8或更多个)第三剂量。

[0174] 在涉及多个第二剂量的实施例中,各第二剂量可以与其它第二剂量相同的频率给予。举例来说,各第二剂量可在前一剂量之后1至2周向患者给予。类似地,在涉及多个第三剂量的实施例中,各第三剂量可以与其它第三剂量相同的频率给予。举例来说,各第三剂量可在前一剂量之后2至4周向患者给予。或者,向患者给予第二和/或第三剂量的频率可在治疗方案时程内变化。给予频率也可在治疗时程期间在临床检查之后由医师视个别患者的需要来调整。

[0175] 抗体的诊断性用途

[0176] 本发明的抗BCMA抗体还可用于检测和/或测量样品中的BCMA或表达BCMA的细胞(例如)用于诊断性目的。举例来说,抗BCMA抗体或其片段可用以诊断特征为BCMA的异常表达(例如过度表达、低表达、缺乏表达等)的病况或疾病。BCMA的示例性诊断性分析可包括例如使获自患者的样品与本发明的抗BCMA抗体接触,其中抗BCMA抗体用可检测标记或报告分子标记。或者,未标记的抗BCMA抗体可与自身可检测地标记的二级抗体组合用于诊断性应用。可检测标记或报告分子可为放射性同位素,如^{3}H、^{14}C、^{32}P、^{35}S或^{125}I;荧光或化学发光部分,如异硫氰酸荧光素或若丹明(rhodamine);或酶,如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化酶或荧光素酶。本发明的抗BCMA抗体的另一示例性诊断性用途包含用于个体的肿瘤细胞的非侵袭性鉴别及追踪(例如正电子发射断层摄影术(PET)成像)目的的^{89}Zr标记(如^{89}Zr-去铁胺标记)抗体。(参见例如Tavare,R.等人《癌症研究》2016年1月1日;76(1):73-82;及Azad,BB.等人肿瘤标靶(Oncotarget)》2016年3月15日;7(11):12344-58)。可用于检测或测量样品中的BCMA的具体示例性分析包含酶联结免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)及荧光活化细胞分选(FACS)。

[0177] 可用于根据本发明的BCMA诊断性分析中的样品包含可获自在正常或病理病况下含有可检测量的BCMA蛋白或其片段的患者的任何组织或流体样品。一般来说,将测量获自健康患者(例如未罹患异常BCMA水平或活性相关的疾病或病况的患者)的特定样品中的BCMA水平以初始建立BCMA的基线或标准水平。可随后将这一BCMA基线水平对照获自疑似患有BCMA相关疾病(例如含有表达BCMA的细胞的肿瘤)或病况的个体的样品中所测量的BCMA水平比较。

[0178] 实例

[0179] 提出以下实例以便为所属领域的一般技术人员提供如何制得及使用本发明的方法及组合物的完整公开内容及描述,并且以下实例并不意图限制本发明人视作其发明的范围。已努力确保关于所用数量(例如量、温度等)的准确度,但应考虑一些实验性误差及偏差。除非另外指明,否则份为重量份,分子量为平均分子量,温度以摄氏度计,并且压力为大气压或接近大气压。

[0180] 实例1:产生抗BCMA抗体

[0181] 抗BCMA抗体通过用人类BCMA抗原(例如hBCMA,SEQ ID NO:115)使经基因修饰小鼠免疫或通过用人类BCMA抗原使包括编码人类免疫球蛋白重链及κ轻链可变区的DNA的经工程改造小鼠免疫来获得。

[0182] 免疫后,从各小鼠采集脾细胞并将其(1)与小鼠骨髓瘤细胞融合以保留其成活力并且形成融合瘤细胞并筛选BCMA特异性或(2)使用人类BCMA片段作为结合并鉴别反应性抗体(抗原阳性B细胞)的分选试剂分选B细胞(如US 2007/0280945A1中所描述)。

[0183] 初始分离具有人类可变区及小鼠恒定区的BCMA的嵌合抗体。针对所期望的特征(包含亲和力、选择性等)表征及选择抗体。如果需要,用所期望的人类恒定区(例如野生型或经修饰的IgG1或IgG4恒定区)替代小鼠恒定区以产生完全人类抗BCMA抗体。虽然所选恒定区可根据具体用途而改变,但高亲和力抗原结合及靶特异性特征存在于可变区中。

[0184] 抗BCMA抗体的重链及轻链可变区氨基酸及核酸序列:表1列举本发明的选定抗BCMA抗体的重链及轻链可变区以及CDR的氨基酸序列标识符。对应核酸序列标识符列举于表2中。

[0185] 表1:氨基酸序列标识符

[0186]

	SEQ ID NO:							
抗体名称	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb16711	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb16716	18	20	22	24	26	28	30	32
mAb16732	34	36	38	40	42	44	46	48
mAb16747	50	52	54	56	58	60	62	64
mAb21581	66	68	70	72	74	76	78	80
mAb21587	122				123			
mAb21589	124				125			

[0187] 表2:核酸序列标识符

[0188]

	SEQ ID NO:							
抗体名称	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb16711	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb16716	17	19	21	23	25	27	29	31
mAb16732	33	35	37	39	41	43	45	47
mAb16747	49	51	53	55	57	59	61	63
mAb21581	65	67	69	71	73	75	77	79

[0189] 实例2:产生抗CD3抗体

[0190] 如WO 2017/053856(其以引用的方式并入本文中)中所描述产生抗CD3抗体。两种所述抗CD3抗体选自根据本发明的双特异性抗BCMA x抗CD3抗体的产物。表3列举选定抗CD3抗体的重链及轻链可变区以及CDR的氨基酸序列标识符。对应核酸序列标识符列举于表4中。用于制备根据本发明的双特异性抗体的其它抗CD3抗体可见于例如WO 2014/047231。

[0191] 表3:氨基酸序列标识符

[0192]

	SEQ ID NO:							
抗体名称	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb7221G	90	92	94	96	82	84	86	88
mAb7221G20	98	100	102	104	82	84	86	88

[0193] 表4:核酸序列标识符

[0194]

	SEQ ID NO:							
抗体名称	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb7221G	89	91	93	95	81	83	85	87
mAb7221G20	97	99	101	103	81	83	85	87

[0195] 实例3:产生结合BCMA及CD3的双特异性抗体

[0196] 本发明提供结合CD3及BCMA的双特异性抗原结合分子;所述双特异性抗原结合分子在本文中也称为“抗BCMA x抗CD3或抗CD3 x BCMA或抗BCMA x抗CD3双特异性分子”。抗BCMA x抗CD3双特异性分子的抗BCMA部分适用于靶向表达BCMA(也称为CD269)的肿瘤细胞,并且双特异性分子的抗CD3部分适用于活化T细胞。肿瘤细胞上的BCMA及T细胞上的CD3的同时结合有助于通过经活化的T细胞定向杀伤(细胞裂解)靶肿瘤细胞。

[0197] 使用标准方法构建包括抗BCMA特异性结合域及抗CD3特异性结合域的双特异性抗体,其中抗BCMA抗原结合域及抗CD3抗原结合域各自包括与共同LCVR配对的不同、相异的HCVR。在示例性双特异性抗体中,利用来自抗CD3抗体的重链、来自抗BCMA抗体的重链及来自抗CD3抗体的共同轻链来构建分子(10082)。在其它情况下,可利用来自抗CD3抗体的重链、来自抗BCMA抗体的重链及已知与多种重链臂有效混杂或配对的抗体轻链来构建双特异性抗体。

[0198] 表5:抗BCMA x抗CD3双特异性抗体的组成部分的概述

[0199]

双特异性抗体标识符	抗 BCMA 抗原结合域 *重链可变区*	抗 CD3 抗原结合域 *重链可变区*	共同 轻链可变区
bsAb25441D9 (也称为 REGN5458)	mAb21581	mAb7221G	mAb7221G
bsAb25442D (也称为 REGN5459)	mAb21581	mAb7221G20	mAb7221G20

[0200] 表6展示本文所例示的双特异性抗BCMA x抗CD3抗体的氨基酸序列标识符。

[0201] 表6:抗BCMA x抗CD3双特异性抗体的氨基酸序列

[0202]

双特异性抗体标识符	抗 BCMA 第一抗原结合域				抗 CD3 第二抗原结合域				共同 轻链可变区			
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
bsAb25441D (REGN5458)	66	68	70	72	90	92	94	96	82	84	86	88
bsAb25442D (REGN5459)	66	68	70	72	98	100	102	104	82	84	86	88

[0203] 实例4:表面等离子共振所推导出的抗BCMA抗体及抗BCMA x抗CD3双特异性抗体的结合亲和力及动力学常数

[0204] 使用实时表面等离子共振生物传感器使用Biacore 4000仪器测定hBCMA.mmh(SEQ ID NO:106)结合经纯化的抗BCMA mAb及抗BCMA x抗CD3双特异性mAb的平衡解离常数(K_D值)。通过与单株小鼠抗人类Fc抗体(GE,#BR-1008-39)胺偶联以捕获经纯化的抗BCMA mAb及抗BCMA x抗CD3双特异性mAb来衍生CM5 Biacore传感器表面。所有Biacore结合研究均在由0.01M HEPES pH 7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.05%v/v表面活性剂P20组成的缓冲液(HBS-ET操作缓冲液)中进行。对于单体亲和力,制备于HBS-ET操作缓冲液(在90至1.11nM范围内,3倍稀释)中的不同浓度的用C-末端myc-myc-六组氨酸标签表示的人类BCMA(人类BCMA-MMH;SEQ ID NO:106)或用C-末端myc-myc-六组氨酸标签表示的猴子BCMA(猴子BCMA-MMH;SEQ ID NO:110)的细胞外域。对于二聚亲和力,制备于HBS-ET操作缓冲液(在30至0.37nM范围内,3倍稀释)中的不同浓度的用C-末端mFc标签表示的人类BCMA(人类BCMA-

MFC;SEQ ID NO:108)、用C-末端mFc标签表示的猴子BCMA(猴子BCMA-MFC;SEQ ID NO:112)的细胞外域或制备30nM用C-末端mFc标签表示的BCMA(小鼠BCMA-MFC;SEQ ID NO:114)。随后在所捕获的抗BCMA及抗BCMA x抗CD3双特异性mAb表面上以30μL/分钟的流动速率注射抗原样品。监测抗体-试剂缔合5分钟,同时监测HBS-ET操作缓冲液中的解离10分钟。所有结合动力学实验均在25℃下进行。动力学缔合(k_a)及解离(k_d)速率常数通过使用Scrubber 2.0c曲线拟合软件拟合实时传感器图谱至1:1结合模型来确定。结合解离平衡常数(K_D)及解离半衰期(t1/2)自动力学速率常数计算如下:

[0205] $$K_D\ (\mathrm{M}) = \frac{kd}{ka}, \text{及} t½\ (\text{分钟}) = \frac{\ln(2)}{60 \times kd}$$

[0206] 如表7中所示,在25℃下,本发明的所有抗BCMA抗体均结合人类BCMA-MMH,K_D值在1.06nM至3.56nM范围内。如表8中所示,在25℃下,本发明的所有抗BCMA抗体均结合人类BCMA-MFC,K_D值在22.3pM至103pM范围内。如表9中所示,在25℃下,本发明的两个抗BCMA抗体结合猴子BCMA-MMH,K_D值在38.8nM至49.92nM范围内。如表10中所示,在25℃下,本发明的四个抗BCMA抗体结合猴子BCMA-MFC,K_D值在148pM至14.7nM范围内。如表11中所示,在25℃下,本发明的四个抗BCMA抗体结合小鼠BCMA-MFC,K_D值在677pM至18.8nM范围内。

[0207] 表7:在25℃下抗BCMA单克隆抗体结合人类BCMA-MMH的结合动力学参数

[0208]

REGN#	Ab PID#	mAb 捕获(RU)	90 nM hBCMA.mmh 结合(RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (分钟)
REGN5458	bsAb25441D	437.5±1.1	19.9	8.27E+05	8.74E-04	1.06E-09	13.2
REGN5459	bsAb25442D	384.8±1.4	17.0	7.30E+05	1.01E-03	1.38E-09	11.5
	mAb16711	275.0±2.8	22.2	2.01E+06	3.47E-03	1.73E-09	3.3
	mAb16716	310.3±2.2	26.4	8.41E+05	2.99E-03	3.56E-09	3.9
REGN4514	mAb16732	284.1±0.9	25.3	1.06E+06	2.85E-03	2.69E-09	4.1
REGN4515	mAb16747	332.5±0.9	31.4	8.69E+05	2.47E-03	2.84E-09	4.7

[0209] 表8:在25℃下抗BCMA单克隆抗体结合人类BCMA-MFC的结合动力学参数

REGN#	Ab PID#	mAb 捕获(RU)	30 nM hBCMA.mFc 结合(RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (分钟)
REGN5458	bsAb25441D	437.9±0.1	106.8	4.48E+05	≤1E-5	2.23E-11	≤1155
REGN5459	bsAb25442D	385.2±0.1	96.8	4.49E+05	≤1E-5	2.23E-11	≤1155
	mAb16711	268.9±1.4	113.5	1.85E+06	1.90E-04	1.03E-10	60.8
	mAb16716	303.4±1.2	120.3	8.62E+05	8.35E-05	9.68E-11	138.4
REGN4514	mAb16732	282.3±1.0	124.1	1.07E+06	4.53E-05	4.22E-11	255.2
REGN4515	mAb16747	327.3±1.5	146.0	1.41E+06	8.95E-05	6.33E-11	129.0

[0210] 表9:在25℃下抗BCMA单克隆抗体结合猴子BCMA-MMH的结合动力学参数

REGN#	Ab PID#	mAb 捕获(RU)	90 nM mfBCMA.mmh 结合(RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (分钟)
REGN5458	bsAb25441D	438.2±0.9	14.8	1.82E+05	9.09E-03	4.99E-08	1.3
REGN5459	bsAb25442D	384.6±1.4	12.7	2.23E+05	8.64E-03	3.88E-08	1.3
	mAb16711	263.5±1.7	-0.5	NB	NB	NB	NB
	mAb16716	301.8±0.5	0.8	NB	NB	NB	NB
REGN4514	mAb16732	279.1±0.8	1.1	NB	NB	NB	NB
REGN4515	mAb16747	326.2±0.5	1.9	NB	NB	NB	NB

[0211] 表10:在25℃下抗BCMA单克隆抗体结合猴子BCMA-MFC的结合动力学参数

REGN#	Ab PID#	mAb 捕获（RU）	30 nM mfBCMA.mFc 结合（RU）	ka（1/Ms）	kd（1/s）	KD（M）	t1/2(分钟)
REGN5458	bsAb25441D	437.9±1.1	107.7	5.28E+05	8.80E-05	1.67E-10	131.2
REGN5459	bsAb25442D	386.2±0.22	97.0	4.82E+05	7.15E-05	1.48E-10	161.6
	mAb16711	259.4±1.4	0.9	NB	NB	NB	NB
	mAb16716	300.8±0.6	3.2	IC	IC	IC	IC
REGN4514	mAb16732	276.9±1.1	40.3	4.92E+05	7.24E-03	1.47E-08	1.6
REGN4515	mAb16747	324.4±0.7	101.3	2.13E + 06	7.16E-03	3.37E-09	1.6

[0212] 表11:在25℃下抗BCMA单克隆抗体结合小鼠BCMA-MFC的结合动力学参数

REGN#	Ab PID#	mAb 捕获(RU)	30 nM mBCMA.mFc 结合（RU）	ka（1/Ms）	kd（1/s）	KD（M）	t1/2（分钟）
REGN5458	bsAb25441D	438.8	2.7	NB	NB	NB	NB
REGN5459	bsAb25442D	383.9	2.4	NB	NB	NB	NB
	mAb16711	257.0	90.0	1.07E+06	1.10E-03	1.02E-09	10.5
	mAb16716	300.0	33.4	2.05E+05	3.85E-03	1.88E-08	3.0
REGN4514	mAb16732	276.1	109.6	3.97E+05	2.69E-04	6.77E-10	43.0
REGN4515	mAb16747	323.1	107.6	9.47E+05	4.18E-03	4.42E-09	2.8

[0213] 实例5:抗BCMA x抗CD3双特异性抗体与表达人类及食蟹猕猴CD3的细胞的FACS结合

[0214] 利用流动式细胞测量分析以测定BCMA x CD3双特异性抗体与人类及食蟹猕猴CD3(Jurkat细胞、经mfCD3工程改造的Jurkat细胞、原代人类CD8+及食蟹猕猴CD8+T细胞)的结合。简单地说,在FACS洗液存在下在冰上将1e05个细胞/孔与封闭液(PBS+1％经过滤FBS+5％小鼠血清)以及BCMA x CD3及对照抗体的连续稀释液一起培育30分钟。在培育之后,将细胞用冷FACS洗液(PBS+1％经过滤FBS)洗涤两次并且经结合的抗体通过在冰上与Alexa647-缀合抗人类二级抗体一起再培育30分钟来检测。不含抗体或仅含二级抗体的孔用作对照。为了检测猴子及人类T细胞,将CD4、CD8及CD16的人类及食蟹猕猴交叉反应性抗体的混合物添加到抗人类二级抗体。在培育之后,将细胞洗涤,再悬浮于200μL含有1％经过滤FBS的冷PBS中并通过流式细胞测量术在BD FACS Canto II上分析。通过FSC-H通过FSC-A选择单重峰事件接着侧面及正向散射以选择存活事件来门控细胞。对于猴子T细胞,进行CD8+/CD16-细胞上的其它门控。

[0215] 使用Prism软件中的4参数非线性回归分析计算FACS结合的EC50值。

[0216] Jurkat细胞为表达人类CD3的T细胞成淋巴细胞细胞系。REGN5458结合Jurkat细胞及原代人类CD8+T细胞上的人类CD3,中值EC50分别为1.50×10^{-8}M及3.20×10^{-8}M。REGN5459与人类CD3的结合较弱,与Jurkat细胞的中值EC50为5.58×10^{-7}M并且与原代人类CD8+T细胞的中值EC50为4.71×10^{-6}M。利用CRISPR/Cas9技术,将Jurkat细胞系工程改造成表达食蟹猕猴CD3ε及CD3δ链而非人类型式。REGN5458与经mfCD3工程改造的Jurkat细胞系的结合的中值EC50为1.51×10^{-8}M,并且与原代食蟹猕猴CD8+T细胞的结合的中值EC50为4.66×10^{-8}M。REGN5459不与表达mfCD3的细胞结合。

[0217] 对于阴性同型对照抗体(指定mAb15260)在任何细胞系上均未观察到结合。

[0218] 表12:结合表达CD3的细胞:中值EC50

[0219]

	Jurkat-hCD3		Jurkat-mfCD3		人类 CD8+ T 细胞		Mf（食蟹猕猴）CD8+ T 细胞	
REGN	EC50 [M]	n	EC50 [M]	n	EC50 [M]	n	EC50 [M]	n
REGN5458	1.50E-08	5	1.51E-08	2	3.20E-08	1	4.66E-08	1
REGN5459	5.58E-07	5	未结合	2	4.71E-06	1	未结合	1

[0220] 实例6:FACS结合分析评估细胞表面抗原结合力

[0221] 经由流式细胞测量术测定抗BCMA x CD3抗体、mAb25442D结合BCMA阳性多发性骨髓瘤(NCI-H929、MM.1S、OPM-2及RPMI-8226)、BCMA阳性淋巴瘤(Raji及Daudi)及BCMA阴性(HEK293)细胞的表面的能力。使用细胞解离缓冲液(密理博(Millipore),Cat#S-004-C)从烧瓶采集细胞并在96孔V型底培养板中将细胞接种于染色缓冲液(PBS,不含钙及镁(Irving 9240)+2%FBS(ATCC 30-2020))中,密度为500,000个细胞每孔。在4℃下用Alexa647缀合抗BCMA x CD3抗体(mAb25442D-A647)或具有与无关肿瘤靶向臂配对的相同CD3结合臂的Alexa 647缀合同型对照(同型-A647)的两倍连续稀释液将细胞染色30分钟。将细胞用染色缓冲液洗涤两次并根据制造商说明用LIVE/DEAD™可固定绿色死细胞染色试剂盒(英杰(Invitrogen),L34970)标记以区分活细胞与死细胞。随后洗涤细胞并在4℃下使用稀释于PBS中的BD Cytofix(BD,Cat#554655)的50%溶液固定25分钟。使样品在Accuri C6流式细胞仪(BD Biosciences)上流动并在Flowjo 10.2(Tree Star)中分析。在门控活细胞及单细胞之后,测定平均荧光强度(MFI),在Graphpad Prism中使用四参数逻辑方程式在10点反应曲线上绘制MFI值以计算EC_{50}。各剂量-反应曲线的零条件还包含于分析中作为两倍连续稀释的延续并表示为最低剂量。通过获取mAb25442D-A647 MFI与同型-A647 MFI的比率确定信号噪声比(S/N)。(表13)。mAb25442D-A647 S/N范围为2至470并且EC_{50}值范围为27至83nM。在HEK293细胞上未观察到可检测结合。

[0222] 表13:与细胞的结合

[0223]

细胞系	mAb25442D-A647 S/N.	mAb25442D-A647 EC_{50}（nM）
NCI-H929	470	79
MM.1S	43	83
OPM-2	19	57
RPMI-8226	9	27
Daudi	3	ND
Raji	2	ND
HEK293	1	ND

[0224] ND＝由于非S形曲线而未确定

[0225] 实例7:在表达BCMA的细胞存在下经由双特异性抗BCMA x抗CD3抗体的T细胞活化

[0226] 在Jurkat/NFATLuc报告子生物分析中利用若干具有不同BCMA表面表达水平的细胞系评估抗BCMA x抗CD3双特异性抗体的活性。使Jurkat细胞经工程改造以表达NFAT-荧光素酶报告子(Jurkat/NFATLuc.3C7)并将50,000个Jurkat报告细胞与50,000个BCMA阳性(Daudi、MM1-S、NCI-H929、OPM-2、RPMI-8226、MOLP-8或Raji)或BCMA阴性(HEK293)细胞在Thermo Nunclonδ96白色微孔培养板孔中(Thermo Scientific,Cat#136102)于50ul分析培

养基(RPMI培养基,含10％FBS及1％P/S/G)中组合。将BCMA x CD3双特异性抗体(mAb25441D或mAb25442D)或二价抗BCMA抗体(mAb21581)的三倍连续稀释液立即添加于50uL分析缓冲液中。将培养板轻轻搅动并在37℃、5％CO_2培育箱中培育4至6小时。使用Promega One-Glo(Cat#E6130)及Perkin Elmer Envision读板仪测定NFAT-荧光素酶活性。在GraphPad Prism中使用四参数逻辑方程式在12点反应曲线上绘制RLU以计算EC_{50}值。各剂量-反应曲线的无抗体治疗条件还包含于分析中作为三倍连续稀释的延续并且表示为最低剂量。通过获取曲线上的最高RLU与最低RLU的比率确定信号噪声比(S:N)。

[0227] 在表达BCMA的细胞存在下mAb25441D活化Jurkat/NFATLuc细胞,其中EC50在0.61nM至2.1nM范围内并且S:N在8至123范围内。在表达BCMA的细胞存在下mAb25442D活化Jurkat/NFATLuc细胞,其中EC50在2.6nM至11nM范围内并且S:N在7至120范围内。具有较高亲和力CD3结合臂的BCMA x CD3双特异性mAb25441D始终比具有较低亲和力CD3结合臂的mAb25442D更有效;然而,两种双特异性抗体的S:N类似。在HEK293细胞存在下两种抗体皆不活化Jurkat/NFATLuc细胞,并且对照双特异性抗体未显著增加任何测试细胞系的Jurkat报告子活性。结果展示于下表14A及14B中。

[0228] 表14A:T细胞的活化

[0229]

	Daudi		MM1-S		NCI-H929		OPM-2	
抗体	EC50	S:N	EC50	S:N	EC50	S:N	EC50	S:N
bsAb25441D	2.1E-9	43	1.2E-9	165	6.8E-10	39	6.6E-10	8
bsAb25442D	7.9E-9	25	4.4E-9	120	2.7E-9	32	2.6E-9	7
mAb21581	ND	1	ND	1	ND	1	ND	1

[0230] 表14B:T细胞的活化

[0231]

	RPMI-8226		MOLP-8		Raji		HEK293	
抗体	EC50	S:N	EC50	S:N	EC50	S:N	EC50	S:N
bsAb25441D	6.1E-10	55	1.4E-9	32	1.6E-9	123	ND	1
bsAb25442D	2.6E-9	42	1.1E-8	31	7.4E-9	78	ND	1
mAb21581	ND	1	ND	1	ND	1	ND	1

[0232] 实例8:基于FACS的细胞毒性分析评估在抗BCMA x抗CD3双特异性抗体存在下T细胞介导的表达BCMA的多发性骨髓瘤细胞的杀伤

[0233] 在一组多发性骨髓瘤细胞系上使用Quantum Simply Cellular抗人类IgG试剂盒并按照制造商的说明(Bangs Laboratories)测定市售抗人类BCMA抗体(克隆19F2)的抗体结合能力(ABC)。

[0234] 简单地说,在4℃下与APC缀合抗hBCMA-19F2抗体的滴定一起培育多发性骨髓瘤(MM)细胞系(H929、MM1S、U266、MOLP8及RPMI8226)及Quantum Simply Cellular珠粒30分钟。在培育之后,将细胞及珠粒洗涤三次,再悬浮于200μL含有1％经过滤FBS的冷PBS中并通过流式细胞测量术分析。使用QuickCal®模板(Bangs Labs),自通过处于饱和状态的珠粒群体的通道强度所产生的标准曲线内插各细胞系的饱和水平的抗BCMA 19F2的ABC。

[0235] 通过流式细胞测量术测定由休眠人类或食蟹猕猴T细胞所致的表达BCMA的靶细胞的杀伤。简单地说,将人类或食蟹猕猴外周血液单核细胞(PBMC)以1×10^6个细胞/mL接种于补充RPMI(人类)或X-Vivo(食蟹猕猴)的培养基中并在37℃下培育整夜以便通过消耗黏附巨噬细胞、树突状细胞及一些单核细胞来富集淋巴细胞。次日,将表达BCMA的靶细胞用1μM的紫细胞追踪(Violet CellTrace)标记并在37℃下使其与黏附细胞耗尽的PBMC(效应/靶

细胞4:1比率)及BCMA x CD3双特异性或对照抗体的连续稀释液共培育。在48至72小时之后,将细胞从细胞培养板移出,用表型分型抗体及活/死细胞活力染料混合物染色并通过FACS分析。为了定量孔中存在的活靶细胞的数目在临采集之前将20μl CountBright绝对计数珠粒添加到孔中。为了杀伤特异性的评估,在经紫细胞追踪器标记的群体上门控细胞。靶细胞的存活百分比计算如下:靶存活=(R_1/R_2)×100,其中R_1=在效应细胞及抗体存在下存活靶细胞的绝对数,及R_2=仅存活靶细胞的数量(在无效应细胞或测试抗体的情况下培养)。

[0236] 将人类CD8+T细胞门控为CD45+/CD14-/CD4-/CD8+。将食蟹猕猴CD8+T细胞门控为CD45+/CD20-/CD14-/CD4-/CD8+T细胞,将活化报告为在总体CD8+T细胞中CD25+或CD69+T细胞的百分比。

[0237] 使用Prism软件中的4参数非线性回归分析计算靶细胞存活及T细胞活化的EC50值。

[0238] 测试抗BCMA x抗CD3双特异性抗体的活化休眠人类及食蟹猕猴T细胞以杀伤一组具有不同表面BCMA水平的表达BCMA的细胞的能力。在休眠人类T细胞作为效应细胞的情况下,REGN5458介导的5种不同BCMA细胞系的杀伤具有在7.07×10^{-10}M至3.45×10^{-11}M范围内的EC_{50}值。REGN5459展示上述5种细胞系的杀伤具有在1.66×10^{-9}M至1.06×10^{-10}M范围内的EC50值。如通过CD8+T细胞上的CD25上调所测量,T细胞活化的EC_{50}类似于杀伤EC_{50}。在1臂CD3同型对照mAb17664D存在下观察到适当T细胞活化,但仅对于U266细胞系来说。对于所测试的同型对照未观察到细胞毒性。

[0239] 仅在MM细胞系H929上测试由食蟹猕猴T细胞介导的BCMA x CD3杀伤。由REGN5458及REGN5459介导的细胞毒性的EC_{50}分别为2.34×10^{-11}及6.92×10^{-11}。在人类或食蟹猕猴效应细胞情况下对于同型对照抗体mAb15260未观察到细胞毒性或T细胞活化。结果展示于下表15A、15B及16中。

[0240] 表15A:中值EC_{50},人类效应细胞

[0241]

	H929(40000 ABC)			MM1S(18000 ABC)			U266(13000 ABC)		
REGN#	n	%存活率	%T活化	n	%存活率	%T活化	n	%存活率	%T活化
REGN5458	3	1.03E-10	2.11E-10	2	6.46E-11	7.06E-11	1	3.28E-10	1.07E-10
REGN5459	4	3.01E-10	3.00E-10	2	2.88E-10	4.58E-10	1	1.66E-09	4.69E-10

[0242] 表15B:中值EC_{50},人类效应细胞

[0243]

	RPMI8226(10000 ABC)			Molp8(2000 ABC)		
REGN#	n	%存活率	%T活化	n	%存活率	%T活化
REGN5458	1	3.45E-11	6.49E-11	2	7.07E-10	1.10E-9
REGN5459	1	1.06E-10	7.50E-10	3	1.36E-09	6.47E-9

[0244] 表16:中值EC_{50},食蟹猕猴效应细胞

[0245]

	H929		
REGN#	n	%存活率	%T活化
REGN5458	4	2.34E-11	6.83E-11
REGN5459	4	6.92E-11	1.58E-10

[0246] 实例9:在抗BCMA x抗CD3双特异性抗体存在下自体T细胞介导的原代多发性骨髓瘤母细胞的杀伤的FACS细胞毒性分析

[0247] 为了通过流式细胞测量术监测多发性骨髓瘤细胞的特异性杀伤,将来自多发性骨髓瘤患者的骨髓单核细胞(BMMC)接种于人类基质细胞(HS5)上并在37℃下静置整夜。分开地,将匹配患者外周血液单核细胞(PBMC)解冻并在37℃下在补充RPMI培养基中以1×10^6个细胞/mL培养整夜以便通过消耗黏附细胞富集淋巴细胞。次日,将BMMC与基质细胞(HS5)上的黏附细胞耗尽的未处理PBMC及BCMA x CD3双特异性或1臂CD3同型对照(起始浓度66.7nM)的连续10x稀释液在37℃下共培育。在第3、4或7天从细胞培养板移出细胞并通过FACS分析。为了评估杀伤的特异性,将多发性骨髓瘤细胞门控为单一活的CD90阴性(排除基质细胞)、CD2阴性、CD56阳性。除MM455之外在大部分样品中CD45在多发性骨髓瘤细胞上较低。报告活靶细胞的百分比用于如下计算经调整的存活率:经调整的存活率=(R1/R2)×100,其中R1=在抗体存在下%活靶细胞,及R2=在无测试抗体存在下%活靶细胞。

[0248] 将T细胞门控为CD2阳性、CD56阴性及CD4或CD8阳性。将T细胞活化报告为在总体CD4或CD8 T细胞中CD25+CD4或CD8 T细胞的百分比。

[0249] 测试BCMA x CD3双特异性抗体的通过自体供体PBMC再导引原代多发性骨髓瘤母细胞的杀伤的能力。原代MM母细胞的最大BCMA x CD3介导的细胞毒性范围为52%至96%,对于REGN5458来说EC50在9.89×10^{-11}M至3.67×10^{-9}M范围内对于REGN5459来说EC50在4.96×10^{-10}M至7.94×10^{-8}M范围内。通过评估CD8+T细胞上CD25的上调测量T细胞活化。T细胞活化的EC50范围为3.23×10^{-9}至1.69×10^{-10}。对于1臂CD3(无靶结合)同型对照观察到适当细胞毒性及T细胞活化。结果展示于下表17A及17B中。

[0250] 表17A:MM%裂解

[0251]

样品 ID	疾病阶段	E:T 比率	处理时长	在 66 nM REGN5458 下% MM 裂解	在 66 nM REGN5459 下% MM 裂解	在 66 nM 同型下% MM 裂解
MM2	新诊断的	1.4	7 天	88	85	27.5
MM369	新诊断的	0.3	3 天	96	94	0
MM453	新诊断的	2.4	3 天	82	80	40
MM455	进展,经治疗的	0.4	3 天	63	52	24

[0252] 表17B:MM裂解EC50及T细胞活化

[0253]

样品 ID	疾病阶段	E:T 比率	处理时长	MM 裂解 EC50 REGN5458	MM 裂解 EC50 REGN5459	CD25 上调 EC50 REGN5456	CD25 上调 EC50 REGN5456
MM2	新诊断的	1.4	7 天	7.47E-10	7.24E-09	尚未完成	尚未完成
MM369	新诊断的	0.3	3 天	1.07E-10	4.96E-10	1.69E-10	2.03E-10
MM453	新诊断的	2.4	3 天	9.89E-11	1.19E-09	1.71E-10	3.23E-9
MM455	进展,经治疗的	0.4	3 天	3.67E-09	7.94E-08	2.06E-10	1.16E-9

[0254] 实例10:抗BCMA x抗CD3双特异性抗体在异基因型肿瘤模型中防止体内表达BCMA的肿瘤(NCI-H929)生长

[0255] 为测定BCMA x CD3双特异性抗体(Ab)的体内功效,进行异基因型肿瘤研究。对免疫缺陷NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)小鼠皮下植入10×10^6个表达BCMA的NCI-H929多发性骨髓瘤细胞与0.5×10^6个从正常供体分离的人类外周血液单核细胞(PBMC)的混合物。立即以4mg/kg的剂量向小鼠(n=7个每组)给予PBS媒剂对照、无关抗Fel D1二价同型对照Ab(REGN2759)、CD3结合对照双特异性Ab(mAb17664D)、BCMA x CD3(G;REGN5458)双特异

性Ab或BCMA x CD3(G20;REGN5459)双特异性Ab。每周两次向小鼠给予Ab持续总共三周,并在40天内评估肿瘤生长。虽然在经媒剂、同型对照及CD3结合对照处理的小鼠中$BCMA^+$肿瘤类似地生长,但所测试的BCMA x CD3 Ab均防止体内肿瘤生长。

[0256] 同基因型肿瘤的植入及测量:对NSG小鼠植入10×10^6个表达BCMA的NCI-H929多发性骨髓瘤细胞与0.5×10^6个来源于正常供体的PBMC的混合物。立即以4mg/kg的剂量向小鼠(n=7个每组)给予PBS媒剂对照、无关抗Fel D1二价同型对照Ab(REGN2759)、CD3结合对照双特异性Ab(mAb17664D)、BCMA x CD3(G;REGN5458)双特异性Ab或BCMA x CD3(G20;REGN5459)双特异性Ab。每周两次向小鼠给予Ab持续总共三周。在实验持续时间每周两次用卡尺测量肿瘤生长。在肿瘤植入之后第40天处死小鼠。

[0257] 同基因型肿瘤生长及抑制的计算:为了通过外部卡尺测定肿瘤体积,测定最大纵向直径(长度以mm计)及最大横向直径(宽度以mm计)。基于卡尺测量的肿瘤体积通过下式计算:体积(mm^3)=(长度×宽度^2)/2。

[0258] BCMA x CD3双特异性Ab防止异基因型肿瘤模型中$BCMA^+$NCI-H929肿瘤的体内生长。结果展示于下表18中。

[0259] 表18:各个时间点的平均肿瘤尺寸

[0260]

抗体(4 mg/kg)	**第4天的平均肿瘤尺寸(mm^3)±SEM**
PBS(媒剂对照)	67.1±5.9
REGN2759(同型对照)	62.6±3.7
mAb17664D(CD3结合对照)	76.1±7.6
REGN5458(BCMA x CD3-G)	39.5±9.1
REGN5459(BCMA x CD3-G20)	26.5±6.2

[0261]

抗体(4 mg/kg)	**第7天的平均肿瘤尺寸(mm^3)±SEM**
PBS(媒剂对照)	123.0±25.2
REGN2759(同型对照)	109.7±20.3
mAb17664D(CD3结合对照)	182.0±19.4
REGN5458(BCMA x CD3-G)	0±0
REGN5459(BCMA x CD3-G20)	0±0

[0262]

抗体(4 mg/kg)	**第11天的肿瘤平均尺寸(mm^3)±SEM**
PBS(媒剂对照)	361.5±35.7
REGN2759(同型对照)	415.3±11.4
mAb17664D(CD3结合对照)	449.6±46.6
REGN5458(BCMA x CD3-G)	0±0
REGN5459(BCMA x CD3-G20)	0±0

[0263]

抗体（4 mg/kg）	第 14 天的平均肿瘤尺寸（mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	581.4 ± 57.9
REGN2759（同型对照）	734.3 ± 41.8
mAb17664D（CD3 结合对照）	741.2 ± 56.0
REGN5458（BCMA x CD3-G）	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）	0 ± 0

[0264]

抗体（4 mg/kg）	第 18 天的平均肿瘤尺寸（mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	1033.4 ± 143.7
REGN2759（同型对照）	1586.1 ± 101.4
mAb17664D（CD3 结合对照）	1511.4 ± 80.7
REGN5458（BCMA x CD3-G）	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）	0 ± 0

[0265]

抗体（4 mg/kg）	第 21 天的平均肿瘤尺寸（mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	1730.9 ± 244.8
REGN2759（同型对照）	2554.7 ± 148.8
mAb17664D（CD3 结合对照）	2474.0 ± 132.6
REGN5458（BCMA x CD3-G）	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）	0 ± 0

[0266]

抗体（4 mg/kg）	第 28 天的平均肿瘤尺寸（mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	安乐死-未测量
REGN2759（同型对照）	安乐死-未测量
mAb17664D（CD3 结合对照）	安乐死-未测量
REGN5458（BCMA x CD3-G）	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）	0 ± 0

[0267]

抗体（4 mg/kg）	第 40 天的平均肿瘤尺寸（mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	安乐死-未测量
REGN2759（同型对照）	安乐死-未测量
mAb17664D（CD3 结合对照）	安乐死-未测量
REGN5458（BCMA x CD3-G）	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）	0 ± 0

[0268] 实例11:抗BCMA x抗CD3双特异性抗体在异基因型体内肿瘤模型中以剂量依赖性方式防止表达BCMA的肿瘤(NCI-H929)生长

[0269] 为测定抗BCMA x抗CD3双特异性抗体(Ab)的体内功效,进行异基因型肿瘤研究。对免疫缺陷NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)小鼠皮下植入10×10^{6}个表达BCMA的NCI-H929人类多发性骨髓瘤肿瘤细胞与0.5×10^{6}个从正常健康供体分离的人类外周血液单核

细胞(PBMC)的混合物。随后立即向小鼠(n＝7个每组)给予PBS媒剂对照;剂量为4mg/kg的CD3结合对照双特异性Ab(G;mAb17664D);剂量为4mg/kg的CD3结合对照双特异性Ab(G20;REGN4460);剂量为4mg/kg、0.4mg/kg或0.04mg/kg的BCMA x CD3(G;REGN5458)双特异性Ab;或剂量为4mg/kg、0.4mg/kg或0.04mg/kg的BCMA x CD3(G20;REGN5459)双特异性Ab。每周两次向小鼠给予这些Ab,总共七个剂量,并在60天内评估肿瘤生长。虽然在经媒剂及CD3结合对照处理的小鼠中$BCMA^{+}$NCI-H929肿瘤类似地生长,但所测试的抗BCMA x抗CD3 Ab均以剂量依赖性方式防止体内肿瘤的生长。

[0270] 异基因型肿瘤的植入及测量:对NSG小鼠皮下植入10×10^{6}个表达BCMA的NCI-H929多发性骨髓瘤细胞与0.5×10^{6}个来源于正常健康供体的PBMC的混合物。立即向小鼠(n＝7个每组)给予PBS媒剂对照、CD3结合对照双特异性Ab(G;mAb17664D)、CD3结合对照双特异性Ab(G20;REGN4460)、BCMA x CD3(G;REGN5458)双特异性Ab或BCMA x CD3(G20;REGN5459)双特异性Ab。mAb17664D及REGN4460以4mg/kg给药,而REGN5458及REGN5459以4mg/kg、0.4mg/kg或0.04mg/kg给予。每周两次向小鼠给予Ab,总共七个剂量。在实验持续时间每周两次用卡尺测量肿瘤生长。

[0271] 异基因型肿瘤生长及抑制的计算:为了通过外部卡尺测定肿瘤体积,测定最大纵向直径(长度以mm计)及最大横向直径(宽度以mm计)。基于卡尺测量的肿瘤体积通过下式计算:体积(mm^{3})＝(长度×宽度^{2})/2。

[0272] 在这一异基因型体内肿瘤模型中BCMA x CD3双特异性Ab以剂量依赖性方式防止$BCMA^{+}$NCI-H929肿瘤的生长。结果展示于下表19中,并在图1及图2中说明。

[0273] 表19:各个时间点的平均肿瘤尺寸

[0274]

抗体 处理	第4天的平均肿瘤尺寸 (mm^{3})±SEM
PBS(媒剂对照)	60.1±7.9
mAb17664D(CD3结合对照-G)-4 mg/kg	42.5±4.7
REGN4460(CD3结合对照-G20)-4 mg/kg	52.0±5.9
REGN5458(BCMA x CD3-G)-4 mg/kg	18.0±1.2
REGN5458(BCMA x CD3-G)-0.4 mg/kg	31.9±2.0
REGN5458(BCMA x CD3-G)-0.04 mg/kg	32.0±2.9
REGN5459(BCMA x CD3-G20)-4 mg/kg	21.8±3.4
REGN5459(BCMA x CD3-G20)-0.4 mg/kg	19.6±4.4
REGN5459(BCMA x CD3-G20)-0.04 mg/kg	33.0±4.4

[0275]

抗体 处理	第 7 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	138.2 ± 25.1
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	108.6 ± 17.8
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	132.4 ± 21.1
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	1.3 ± 1.3
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	11.3 ± 3.0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	30.8 ± 5.5
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	8.0 ± 4.3
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	7.3 ± 3.6
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	8.4 ± 4.0

[0276]

抗体 处理	第 12 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	545.4 ± 88.7
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	493.4 ± 67.5
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	616.2 ± 84.4
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	1.6 ± 1.6
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	71.5 ± 22.4
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	1.7 ± 1.7
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	0 ± 0

[0277]

抗体 处理	第 15 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	921.4 ± 147.5
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	874.8 ± 86.6
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	1190.7 ± 91.2
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	133.4 ± 50.9
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	7.9 ± 7.9

[0278]

抗体 处理	第 19 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	1785.3 ± 282.2
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	1833.4 ± 186.6
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	2336.5 ± 188.3
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	413.7 ± 162.7
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	23.1 ± 23.1

[0279]

抗体 处理	第 22 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	2601.5 ± 414.5
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	2878.5 ± 257.6
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	3374.3 ± 267.2
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	669.4 ± 248.5
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	69.5 ± 69.5

[0280]

抗体 处理	第 26 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	1167.0 ± 431.7
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	156.7 ± 156.7

[0281]

抗体 处理	第 29 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	1781.8 ± 620.7
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	226.6 ± 226.6

[0282]

抗体 处理	第 34 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	动物安乐死
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	动物安乐死

[0283]

抗体 处理	第 39 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	动物安乐死
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	动物安乐死

[0284]

抗体 处理	第 42 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	动物安乐死
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	动物安乐死

[0285]

抗体 处理	第 46 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	动物安乐死
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	动物安乐死

[0286]

抗体 处理	第 55 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	动物安乐死
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	动物安乐死

[0287]

抗体 处理	第 60 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	动物安乐死
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	动物安乐死

[0288] 实例12:抗BCMA x抗CD3双特异性抗体在异基因型体内肿瘤模型中以剂量依赖性方式减小已建立的表达BCMA的肿瘤(NCI-H929)的尺寸并防止其生长

[0289] 为测定抗BCMA x抗CD3双特异性抗体(Ab)的体内功效,进行异基因型肿瘤研究。对免疫缺陷NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)小鼠皮下植入10×10^{6}个表达BCMA的NCI-H929人类多发性骨髓瘤肿瘤细胞与0.5×10^{6}个从正常健康供体分离的人类外周血液单核细胞(PBMC)的混合物。使肿瘤生长并建立5天直到其尺寸大致为70mm^3。随后在第5天向小鼠(n＝7至8个每组)给予PBS媒剂对照;剂量为4mg/kg的CD3结合对照双特异性Ab(G;mAb17664D);剂量为4mg/kg的CD3结合对照双特异性Ab(G20;REGN4460);剂量为4mg/kg、0.4mg/kg或0.04mg/kg的BCMA x CD3(G;REGN5458)双特异性Ab;或剂量为4mg/kg、0.4mg/kg或0.04mg/kg的BCMA x CD3(G20;REGN5459)双特异性Ab。每周两次向小鼠给予这些Ab,总共七个剂量,并在55天内评估肿瘤生长。虽然在经媒剂及CD3结合对照处理的小鼠中BCMA$^+$NCI-H929肿瘤类似地生长,但所测试的抗BCMA x抗CD3 Ab均以剂量依赖性方式体内收缩已建立的肿瘤并防止肿瘤的生长。

[0290] 异基因型肿瘤的植入及测量:对NSG小鼠皮下植入10×10^{6}个表达BCMA的NCI-H929多发性骨髓瘤细胞与0.5×10^{6}个来源于正常健康供体的PBMC的混合物。使肿瘤生长并建立5天直到其尺寸大致为70mm^3。随后在第5天向小鼠(n＝7至8个每组)给予PBS媒剂对照、CD3结合对照双特异性Ab(G;mAb17664D)、CD3结合对照双特异性Ab(G20;REGN4460)、BCMA x CD3(G;REGN5458)双特异性Ab或BCMA x CD3(G20;REGN5459)双特异性Ab。mAb17664D及REGN4460以4mg/kg给药,而REGN5458及REGN5459以4mg/kg、0.4mg/kg或0.04mg/kg给予。每周两次向小鼠给予Ab,总共七个剂量。在实验持续时间每周两次用卡尺测量肿瘤生长。

[0291] 异基因型肿瘤生长及抑制的计算:为了通过外部卡尺测定肿瘤体积,测定最大纵向直径(长度以mm计)及最大横向直径(宽度以mm计)。基于卡尺测量的肿瘤体积通过下式计算:体积(mm^3)＝(长度×宽度^2)/2。

[0292] 在此异基因型体内肿瘤模型中抗BCMA x抗CD3双特异性抗体以剂量依赖性方式减小已建立的BCMA$^+$NCI-H929肿瘤的尺寸并防止其生长。结果展示于下表20中,并在图3及4中说明。

[0293] 表20:各个时间点的平均肿瘤尺寸

[0294]

抗体 处理	第 5 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	61.5 ± 6.4
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	63.7 ± 5.4
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	62.6 ± 3.6
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	71.9 ± 10.3
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	69.3 ± 7.3
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	58.1 ± 5.6
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	61.8 ± 5.2
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	69.5 ± 4.1
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	74.9 ± 6.4

[0295]

抗体 处理	第 8 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	124.3 ± 17.3
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	145.3 ± 22.0
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	170.7 ± 15.5
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	64.7 ± 16.4
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	120.3 ± 16.3
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	130.3 ± 16.7
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	45.8 ± 9.8
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	171.9 ± 23.2
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	152.3 ± 20.0

[0296]

抗体 处理	第 12 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	565.7 ± 64.7
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	585.0 ± 64.4
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	706.8 ± 46.3
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	19.5 ± 10.9
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	262.7 ± 61.6
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	525.9 ± 71.5
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	11.5 ± 8.9
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	233.8 ± 63.5
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	462.5 ± 57.7

[0297]

抗体 处理	第 15 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	1150.4 ± 105.7
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	1041.4 ± 101.3
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	1298.4 ± 71.0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	25.6 ± 19.2
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	476.2 ± 133.5
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	1031.2 ± 164.3
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	327.2 ± 135.6
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	1094.2 ± 78.9

[0298]

抗体 处理	第 19 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	2621.3 ± 190.9
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	2557.5 ± 241.1
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	3383.3 ± 183.1
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	40.6 ± 32.8
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	1347.5 ± 334.7
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	2467.5 ± 370.0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	606.2 ± 288.8
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	2412.5 ± 184.6

[0299]

抗体 处理	第 22 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	3717.9 ± 214.5
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	3688.9 ± 272.0
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	4492.2 ± 344.0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	78.3 ± 60.8
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	2068.5 ± 465.0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	3745.7 ± 541.2
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	815.4 ± 387.1
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	3285.9 ± 227.3

[0300]

抗体 处理	第 27 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	252.3 ± 185.1
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	3463.9 ± 1025.0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	1589.1 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	1849.9 ± 903.1
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	动物安乐死

[0301]

抗体 处理	第 30 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	411.3 ± 307.2
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	2144.2 ± 2144.2
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	2886.5 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	661.8 ± 490.1
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	动物安乐死

[0302]

抗体 处理	第 35 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	633.5 ± 473.5
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	动物安乐死
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	996.8 ± 771.0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	动物安乐死

[0303]

抗体 处理	第 40 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	369.5 ± 369.5
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	动物安乐死
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	375.6 ± 375.6
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	动物安乐死

[0304]

抗体 处理	第 55 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	动物安乐死
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	动物安乐死

[0305] 实例13:抗BCMA x抗CD3双特异性抗体在异基因型体内肿瘤模型中以剂量依赖性方式防止表达BCMA的肿瘤(MOLP-8)生长

[0306] 为测定抗BCMA x抗CD3双特异性抗体(Ab)的体内功效,进行异基因型肿瘤研究。对免疫缺陷NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)小鼠皮下植入5×10^{6}个表达BCMA的MOLP-8人类多发性骨髓瘤肿瘤细胞与1×10^{6}个从正常健康供体分离的人类外周血液单核细胞(PBMC)的混合物。随后立即向小鼠(n=7个每组)给予PBS媒剂对照;剂量为4mg/kg的CD3结合对照双特异性Ab(G;mAb17664D);剂量为4mg/kg的CD3结合对照双特异性Ab(G20;REGN4460);剂量为4mg/kg、0.4mg/kg或0.04mg/kg的BCMA x CD3(G;REGN5458)双特异性Ab;或剂量为4mg/kg、0.4mg/kg或0.04mg/kg的BCMA x CD3(G20;REGN5459)双特异性Ab。每周两次向小鼠给予这些Ab,总共七个剂量,并在56天内评估肿瘤生长。虽然在经媒剂及CD3结合对照处理的小鼠中BCMA$^+$MOLP-8肿瘤类似地生长,但所测试的BCMA x CD3 Ab均以剂量依赖性方式体内防止肿瘤的生长。

[0307] 异基因型肿瘤的植入及测量:对NSG小鼠皮下植入5×10^{6}个表达BCMA的MOLP-8多发性骨髓瘤细胞与1×10^{6}个来源于正常健康供体的PBMC的混合物。立即向小鼠(n=7个每组)给予PBS媒剂对照、CD3结合对照双特异性Ab(G;mAb17664D)、CD3结合对照双特异性Ab(G20;REGN4460)、BCMA x CD3(G;REGN5458)双特异性Ab或BCMA x CD3(G20;REGN5459)双特异性Ab。mAb17664D及REGN4460以4mg/kg给药,而REGN5458及REGN5459以4mg/kg、0.4mg/kg或0.04mg/kg给予。每周两次向小鼠给予Ab,总共七个剂量。在实验持续时间每周两次通过

卡尺测量肿瘤生长。

[0308] 异基因型肿瘤生长及抑制的计算:为了通过外部卡尺测定肿瘤体积,测定最大纵向直径(长度以mm计)及最大横向直径(宽度以mm计)。基于卡尺测量的肿瘤体积通过下式计算:体积(mm^3)=(长度×宽度^2)/2。

[0309] 在此异基因型体内肿瘤模型中抗BCMA x抗CD3双特异性抗体以剂量依赖性方式防止$BCMA^+$MOLP-8肿瘤的生长。结果展示于下表21中,并在图5及6中说明。

[0310] 表21:各个时间点的平均肿瘤尺寸

[0311]

抗体 处理	第 3 天的平均肿瘤尺寸 (mm^3) ±SEM
PBS（媒剂对照）	10.3 ± 3.0
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	11.6 ± 2.0
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	14.1 ± 3.9
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	12.5 ± 1.3
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	13.5 ± 1.5
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	9.3 ± 2.4
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	12.9 ± 1.3
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	14.0 ± 1.6
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	11.7 ± 2.1

[0312]

抗体 处理	第 7 天的平均肿瘤尺寸 (mm^3) ±SEM
PBS（媒剂对照）	73.4 ± 13.5
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	50.0 ± 6.6
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	45.7 ± 6.1
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	1.0 1.0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	18.3 ± 5.0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0.6 ± 0.6
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	37.0 ± 5.7

[0313]

抗体 处理	第 10 天的平均肿瘤尺寸 (mm^3) ±SEM
PBS（媒剂对照）	249.9 ± 47.6
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	125.0 ± 6.8
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	173.9 ± 99
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	73.9 ± 25.7
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	104 ± 23.0

[0314]

抗体 处理	第 14 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	677.0 ± 62.7
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	530.0 ± 44.6
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	549.1 ± 59.2
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	255.4 ± 79.7
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	356.7 ± 84.6

[0315]

抗体 处理	第 17 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	1349.5 ± 149.7
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	935.3 ± 71.3
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	1027.1 ± 86.6
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	14.5 ± 7.3
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	1.7 ± 1.7
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	494.3 ± 144.3
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	645.6 ± 140.9

[0316]

抗体 处理	第 21 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	2990.9 ± 291.7
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	2249.6 ± 113.5
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	2473.4 ± 170.3
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	102.7 ± 66.2
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	5.3 ± 5.3
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	1373.0 ± 366.6
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	1442.4 ± 310.7

[0317]

抗体 处理	第 23 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	4155.1 ± 401.8
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	3288.4 ± 204.6
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	3592.7 ± 224.2
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	193.3 ± 117.7
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	9.7 ± 9.7
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	1882.3 ± 551.5
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	2124.4 ± 444.1

[0318]

抗体 处理	第 28 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	627.4 ± 318.1
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	47.4 ± 47.4
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	2542.5 ± 613.3
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	1.9 ± 1.9
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	1939.3 ± 840.6

[0319]

抗体 处理	第 31 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	1018.5 ± 498.3
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	104.7 ± 92.6
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	2906.1 ± 532.6
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	3.8 ± 3.0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	2688.7 ± 1176.6

[0320]

抗体 处理	第 35 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	1342.9 ± 629.6
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	375.1 ± 307.5
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	3538.0 ± 0.0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	9.3 ± 7.5
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	612.1 ± 0

[0321]

抗体 处理	第 42 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	2363.0 ± 890.2
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	968.8 ± 689.2
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	动物安乐死
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	12.8 ± 12.8
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	动物安乐死

[0322]

抗体 处理	第 49 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3 结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	1683.5 ± 1683.5
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	无记录
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	动物安乐死
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	无记录
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	无记录
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	动物安乐死

[0323]

抗体 处理	第56天的平均肿瘤尺寸 (mm^3) ±SEM
PBS（媒剂对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN4460（CD3结合对照-G20）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	3108.1 ± 3108.1
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	1742.4 ± 635.2
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	动物安乐死
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 4 mg/kg	17.2 ± 17.2
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.04 mg/kg	动物安乐死

[0324] 实例14:在异基因型体内肿瘤模型中抗BCMA x抗CD3双特异性抗体推迟表达BCMA的肿瘤(MOLP-8)的生长

[0325] 为测定抗BCMA x抗CD3双特异性抗体(Ab)的体内功效,进行异基因型肿瘤研究。在第11天,对免疫缺陷NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)小鼠腹膜内注射4×10^{6}个来自正常健康供体的人类外周血液单核细胞(PBMC)。在第0天,向小鼠静脉内给予2×10^{6}个经工程改造以还表达萤火虫荧光素酶的BCMA$^+$MOLP-8人类多发性骨髓瘤肿瘤细胞(MOLP-8荧光素酶细胞)。随后立即向小鼠(n=5个每组)给予剂量为4mg/kg的CD3结合对照双特异性Ab(G;mAb17664D)或剂量为4mg/kg的BCMA x CD3(G;REGN5458)双特异性Ab。在第3天及第7天向小鼠给予两次以上这些Ab,总共三个剂量。通过测量麻醉动物中的肿瘤生物发光(BLI)在48天内评估肿瘤生长。作为阳性对照,向一组小鼠(n=5)仅提供MOLP-8荧光素酶细胞,而无PBMC或抗体。为了测量背景BLI水平,一组小鼠(n=5)未经处理并且未接受肿瘤、PBMC或抗体。虽然在经CD3结合对照处理小鼠中BCMA$^+$MOLP-8荧光素酶肿瘤逐渐生长,但用REGN5458处理的BCMA x CD3 Ab推迟体内肿瘤的生长。

[0326] 异基因型肿瘤的植入及测量:在第11天,对免疫缺陷NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)小鼠腹膜内注射5×10^{6}个来自正常健康供体的人类PBMC。在第0天,向小鼠静脉内给予2×10^{6}个BCMA$^+$MOLP-8荧光素酶细胞.随后立即向小鼠(n=5个每组)给予剂量为4mg/kg的CD3结合对照双特异性Ab(G;mAb17664D)或剂量为4mg/kg的BCMA x CD3(G;REGN5458)双特异性Ab。在第3天及第7天向小鼠给予两次以上这些Ab,总共三个剂量。通过测量麻醉动物中的肿瘤BLI在48天内评估肿瘤生长。作为阳性对照,向一组小鼠(n=5)仅提供MOLP-8荧光素酶细胞,而无PBMC或抗体。为了测量背景BLI水平,一组小鼠(n=5)未经处理并且未接受肿瘤、PBMC或抗体。

[0327] 异基因型肿瘤生长的测量:将BLI成像用于测量肿瘤负荷。对小鼠IP注射150mg/kg的悬浮于PBS中的荧光素酶底物D-荧光素。在此注射之后五分钟,使用Xenogen IVIS系统在异氟醚麻醉下进行小鼠的BLI成像。在D处的视野、1.5cm的对象高度及具有自动曝光时间的中等合并水平情况下通过Living Image软件进行图像采集。使用Living Image软件提取BLI信号:在每个肿瘤块周围绘制关注区并将光子强度记录为p/s/cm2/sr。

[0328] 在此异基因型体内肿瘤模型中抗BCMA x抗CD3双特异性抗体REGN5458推迟BCMA$^+$MOLP-8荧光素酶肿瘤的生长。结果展示于下表22中。

[0329] 表22:各个时间点的平均肿瘤尺寸(以辐射率计)

[0330]

抗体 处理	植入后 8 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	4.93E+05 ± 1.66E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	5.73E+05 ± 5.27E+04
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	6.08E+05 ± 5.16E+04
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	5.66E+05 ± 1.97E+04

[0331]

抗体 处理	植入后 15 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	5.37E+05 ± 1.46E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	1.24E+06 ± 9.67E+04
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	1.61E+06 ± 9.64E+04
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	5.28E+05 ± 4.13E+04

[0332]

抗体 处理	植入后 22 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	7.00E+05 ± 1.03E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	1.23E+07 ± 1.02E+06
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	1.98E+07 ± 8.86E+06
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	1.08E+06 ± 1.71E+05

[0333]

抗体 处理	植入后 24 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	5.24E+05 ± 1.86E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	1.56E+07 ± 1.29E+06
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	5.26E+07 ± 1.91E+07
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	1.02E+06 ± 1.99E+05

[0334]

抗体 处理	植入后 28 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	7.09E+05 ± 2.28E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	3.01E+07 ± 4.78E+06
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	5.69E+07 ± 2.77E+07
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	3.56E+06 ± 6.34E+05

[0335]

抗体 处理	植入后 30 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	6.44E+05 ± 4.56E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	6.92E+06 ± 1.40E+06

[0336]

抗体 处理	植入后 34 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	7.78E+05 ± 3.02E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	2.65E+07 ± 1.36E+07

[0337]

抗体 处理	植入后 37 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	7.59E+05 ± 2.96E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	4.52E+07 ± 1.40E+07

[0338]

抗体 处理	植入后 43 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	6.26E+05 ± 4.18E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	1.06E+08 ± 3.43E+07

[0339]

抗体 处理	植入后 48 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	8.24E+05 ± 1.73E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 4 mg/kg	3.22E+08 ± 1.27E+08

[0340] 实例15:抗BCMA x抗CD3双特异性抗体使体内肿瘤(OPM-2)负担降低到背景水平

[0341] 为测定抗BCMA x抗CD3双特异性抗体(Ab)的体内功效,进行异基因型肿瘤研究。在第0天,向免疫缺陷NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)小鼠静脉内给予2×10^{6}个经工程改造以还表达萤火虫荧光素酶的BCMA$^+$OPM-2人类多发性骨髓瘤肿瘤细胞(OPM-2荧光素酶细胞)。在第10天,对小鼠腹膜内注射4×10^{6}个来自正常健康供体的人类外周血液单核细胞(PBMC)。在第21天,向小鼠(n＝5个每组)给予剂量为0.4mg/kg的CD3结合对照双特异性Ab(G;mAb17664D)、0.4mg/kg的BCMA x CD3(G;REGN5458)双特异性Ab或0.4mg/kg的BCMA x CD3(G20;REGN5459)双特异性Ab。在第25天及第28天向小鼠给予两次以上这些Ab,总共三个剂量。通过测量麻醉动物中的肿瘤生物发光(BLI)在第61天评估肿瘤生长。作为阳性对照,向一组小鼠(n＝5)仅提供OPM-2荧光素酶细胞,而无PBMC或抗体。为了测量背景BLI水平,一组小鼠(n＝5)未经处理并且未接受肿瘤、PBMC或抗体。虽然在经CD3结合对照处理的小鼠中BCMA$^+$OPM-2荧光素酶肿瘤逐渐生长,但在大部分动物中用REGN5458及REGN5459处理的BCMA x CD3 Ab使肿瘤负担降低到背景水平。

[0342] 异基因型肿瘤的植入及测量:在第0天向免疫缺陷NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)小鼠静脉内给予2×10^{6}个经工程改造以还表达萤火虫荧光素酶的BCMA$^+$OPM-2人类多发性骨髓瘤肿瘤细胞(OPM-2荧光素酶细胞)。在第10天,对小鼠腹膜内注射4×10^{6}个来自正常健康供体的人类外周血液单核细胞(PBMC)。在第21天,向小鼠(n=5个每组)给予剂量为0.4mg/kg的CD3结合对照双特异性Ab(G;mAb17664D)、0.4mg/kg的BCMA x CD3(G;REGN5458)双特异性Ab或0.4mg/kg的BCMA x CD3(G20;REGN5459)双特异性Ab。在第25天及第28天向小鼠给予两次以上这些Ab,总共三个剂量。通过测量麻醉动物中的肿瘤生物发光(BLI)在第61天评估肿瘤生长。作为阳性对照,向一组小鼠(n=5)仅提供OPM-2荧光素酶细胞,而无PBMC或抗体。为了测量背景BLI水平,一组小鼠(n=5)未经处理并且未接受肿瘤、PBMC或抗体。

[0343] 异基因型肿瘤生长的测量:将BLI成像用于测量肿瘤负荷。对小鼠IP注射150mg/kg的悬浮于PBS中的荧光素酶底物D-荧光素。在此注射之后五分钟,使用Xenogen IVIS系统在异氟醚麻醉下进行小鼠的BLI成像。在D处的视野、1.5cm的对象高度及具有自动曝光时间的中等合并水平情况下通过Living Image软件进行图像采集。使用Living Image软件提取BLI信号:在每个肿瘤块周围绘制关注区并将光子强度记录为p/s/cm2/sr。

[0344] 虽然在经CD3结合对照处理的小鼠中BCMA$^+$OPM-2荧光素酶肿瘤逐渐生长,但在大部分动物中用REGN5458及REGN5459处理的BCMA x CD3 Ab使肿瘤负担降低到背景水平。结果展示于下表23中,并在图7中说明。

[0345] 表23:各个时间点的平均肿瘤尺寸(以辐射率计)

[0346]

抗体 处理	植入后 5 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	6.22E+05 ± 2.77E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	5.62E+05 ± 2.75E+04
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	5.73E+05 ± 3.02E+04
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	5.87E+05 ± 2.40E+04
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	5.09E+05 ± 3.56E+04

[0347]

抗体 处理	植入后 11 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	6.90E+05 ± 3.64E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	6.22E+05 ± 3.34E+04
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	6.25E+05 ± 3.80E+04
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	6.19E+05 ± 4.39E+04
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	6.45E+05 ± 2.39E+04

[0348]

抗体 处理	植入后 20 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	7.59E+05 ± 5.82E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	2.32E+06 ± 2.94E+05
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	2.36E+06 ± 5.46E+05
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	1.81E+06 ± 2.37E+05
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	2.13E+06 ± 1.69E+05

[0349]

抗体 处理	植入后 26 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	5.51E+05 ± 2.51E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	5.96E+06 ± 8.74E+05
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	6.05E+06 ± 1.32E+06
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	1.73E+06 ± 8.69E+05
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	1.28E+06 ± 7.36E+05

[0350]

抗体 处理	植入后 31 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	6.62E+05 ± 3.35E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	1.58E+07 ± 4.84E+06
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	1.35E+07 ± 2.35E+06
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	3.50E+06 ± 2.42E+06
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	1.98E+06 ± 1.36E+06

[0351]

抗体 处理	植入后 34 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	4.57E+05 ± 1.04E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	3.36E+07 ± 1.27E+07
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	2.35E+07 ± 5.72E+06
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	4.85E+06 ± 3.24E+06
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	4.24E+06 ± 3.69E+06

[0352]

抗体 处理	植入后 38 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	6.60E+05 ± 3.13E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	3.91E+07 ± 6.87E+06
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	4.84E+07 ± 1.65E+07
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	5.30E+06 ± 3.44E+06
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	3.21E+06 ± 2.52E+06

[0353]

抗体 处理	植入后 40 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	5.39E+05 ± 9.67E+03
无 PBMC/抗体（阳性对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	5.06E+06 ± 3.36E+06
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	3.84E+06 ± 3.34E+06

[0354]

抗体 处理	植入后 47 天的辐射率 \[p/s/cm²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	7.73E+05 ± 1.91E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	7.76E+05 ± 7.85E+04
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	7.34E+05 ± 2.62E+04

[0355]

抗体 处理	植入后 54 天的辐射率 \[p/s/cm2²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	7.49E+05 ± 1.95E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	5.78E+05 ± 1.15E+05
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	6.41E+05 ± 5.96E+04

[0356]

抗体 处理	植入后 61 天的辐射率 \[p/s/cm2²/sr]（平均值± SEM）
无肿瘤（背景 BLI）	6.18E+05 ± 2.77E+04
无 PBMC/抗体（阳性对照）	动物安乐死
mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	动物安乐死
REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	5.23E+05 ± 4.10E+04
REGN5459（BCMA x CD3-G20）- 0.4 mg/kg	6.03E+05 ± 5.29E+04

[0357] 实例16:BCMA x CD3双特异性抗体以剂量依赖性方式压制体内异体同质肿瘤的生长

[0358] 为测定抗BCMA x抗CD3双特异性抗体(Ab)的体内功效,在表达人类CD3的小鼠中进行异体同质肿瘤研究。对表达人类CD3deg而非鼠类CD3deg的C57BL/6小鼠(CD3人类化小鼠)皮下植入0.5×10^6个已经工程改造以表达全长人类BCMA的B16黑素瘤细胞(B16/BCMA细胞)或1×10^6个已经工程改造以表达全长人类BCMA的MC38结肠癌瘤细胞(MC38/BCMA)。随后立即向小鼠(n=7个每组)给予剂量为0.4mg/kg的CD3结合对照双特异性Ab(G;mAb17664D)或剂量为0.4mg/kg或0.04mg/kg的BCMA x CD3(G;REGN5458)双特异性Ab。在第4天及第7天向小鼠给予这些Ab两次以上,总共三个剂量,并在实验期间评估肿瘤生长。虽然B16/BCMA肿瘤及MC38/BCMA肿瘤在经CD3结合对照处理的小鼠中生长,但BCMA x CD3 REGN5458能够以剂量依赖性方式体内压制两种肿瘤系的生长。

[0359] 异体同质肿瘤的植入及测量:对表达人类CD3deg而非鼠类CD3deg的C57BL/6小鼠(CD3人类化小鼠)皮下植入0.5×10^6个已经工程改造以表达全长人类BCMA的B16F10黑素瘤细胞(B16/BCMA细胞)或1×10^6个已经工程改造以表达全长人类BCMA的MC38结肠癌瘤细胞(MC38/BCMA)。随后立即向小鼠(n=7个每组)给予剂量为0.4mg/kg的CD3结合对照双特异性Ab(G;mAb17664D)或剂量为0.4mg/kg或0.04mg/kg的BCMA x CD3(G;REGN5458)双特异性Ab。在第4天及第7天向小鼠给予这些Ab两次以上,总共三个剂量,并在实验期间评估肿瘤生长。

[0360] 异体同质肿瘤生长及抑制的计算:为了通过外部卡尺测定肿瘤体积,测定最大纵向直径(长度以mm计)及最大横向直径(宽度以mm计)。基于卡尺测量的肿瘤体积通过下式计算:体积(mm^3)=(长度×宽度^2)/2。

[0361] 虽然B16/BCMA肿瘤及MC38/BCMA肿瘤在经CD3结合对照处理的小鼠中生长,但BCMA x CD3 REGN5458能够以剂量依赖性方式体内压制两种肿瘤系的生长。结果展示于下表24中。

[0362] 表24:各个时间点的平均肿瘤尺寸

[0363]

抗体 处理	第 5 天的平均肿瘤尺寸（mm^3）±SEM
B16/BCMA 肿瘤 mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	25.6 ± 2.7
B16/BCMA 肿瘤 REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0.0 ± 0.0
B16/BCMA 肿瘤 REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	3.3 ± 2.2
MC38/BCMA 肿瘤 mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	29.3 ± 4.4
MC38/BCMA 肿瘤 REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	1.4 ± 1.4
MC38/BCMA 肿瘤 REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	11.9 ± 2.9

[0364]

抗体 处理	第 10 天的平均肿瘤尺寸（mm^3）±SEM
B16/BCMA 肿瘤 mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	179.2 ± 30.6
B16/BCMA 肿瘤 REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0.0 ± 0.0
B16/BCMA 肿瘤 REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	15.4 ± 12.5
MC38/BCMA 肿瘤 mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	123.1 ± 14.6
MC38/BCMA 肿瘤 REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	0.0 ± 0.0
MC38/BCMA 肿瘤 REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	66.7 ± 22.5

[0365]

抗体 处理	第 14 天的平均肿瘤尺寸（mm^3）±SEM
B16/BCMA 肿瘤 mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	763.1 ± 156.2
B16/BCMA 肿瘤 REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	8.1 ± 4.4
B16/BCMA 肿瘤 REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	81.4 ± 49.2
MC38/BCMA 肿瘤 mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	477.1 ± 77.1
MC38/BCMA 肿瘤 REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	2.9 ± 2.9
MC38/BCMA 肿瘤 REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	273.3 ± 115.3

[0366]

抗体 处理	第18天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
B16/BCMA 肿瘤 mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	2068.9 ±357.7
B16/BCMA 肿瘤 REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	47.1 ± 17.0
B16/BCMA 肿瘤 REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	127.2 ± 63.9
MC38/BCMA 肿瘤 mAb17664D（CD3 结合对照-G）- 0.4 mg/kg	1432.5 ± 231.6
MC38/BCMA 肿瘤 REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.4 mg/kg	7.5 ± 7.5
MC38/BCMA 肿瘤 REGN5458（BCMA x CD3-G）- 0.04 mg/kg	641.5 ± 309.8

[0367] 实例17:通过氢氘交换进行的REGN5458结合BCMA的表位定位

[0368] 进行H/D交换表位定位质谱(HDX-MS)以测定与REGN5458(BCMA x CD3双特异性抗体)相互作用的BCMA的氨基酸残基(重组人类BCMA,SEQ ID NO:115的氨基酸序列)。H/D交换方法的一般描述阐述于例如Ehring(1999)《分析生物化学》267(2):252-259;及Engen及Smith(2001)《分析化学》73:256A-265A中。

[0369] 在集成式HDX/MS平台上进行HDX-MS实验,所述平台由以下组成:用于氘标记及淬灭的Leaptec HDX PAL系统、用于样品消化及负载的Waters Acquity M-Class(Auxiliary溶剂管理器)、用于分析型梯度的Waters Acquity M-Class(μBinary溶剂管理器)及用于肽质量测量的Thermo Q Exactive HF质谱仪。

[0370] 将标记溶液制备成pD 7.0的于D_2O中的PBS缓冲液(10mM磷酸盐缓冲液、140mM NaCl及3mM KCl,等效于在25℃下pH 7.4)。对于氘标记,在20℃下针对各个时间点重复两次(例如非氘化对照＝0秒;氘标记持续5分钟及10分钟)用90μL D_2O标记溶液培育10μL的hBCMA.hFc(REGN2746,54.5μM;SEQ ID NO:120或hBCMA.hFc以1:2摩尔比(Ag-Ab复合物)与REGN5458预混合)。通过添加100μL的预冷却淬灭缓冲液(0.5M TCEP-HCl、8M脲及1％甲酸)到各样品在20℃下培育5分钟来淬灭氘化反应。随后将经淬灭样品注射到Waters HDX Manager中以用于在线胃蛋白酶/蛋白酶XIII消化。将经消化肽通过C8管柱(1.0mm×50mm,NovaBioassays)用13分钟梯度10％至32％B(移动相A:0.5％于水中的甲酸,移动相B:0.1％于乙腈中的甲酸)来分开。通过Q Exactive HF质谱在LC-MS/MS或LC-MS模式中分析所洗脱的肽。

[0371] 针对包含BCMA及其随机序列的数据库使用Byonic搜索引擎(Protein Metrics)搜索非氘化BCMA样品的LC-MS/MS数据。使用非特异性酶促消化及人类醣基化作为共享可变修饰将检索参数(在ELN中)设定为默认值。随后将经鉴别的肽的列表导入到HDX Workbench软件(3.3版)中以计算通过LC-MS从所有氘化样品检测到的每种肽的氘吸收。对于给定的肽,将每个时间点的质心质量(强度加权平均质量)用于计算氘吸收(D)及氘吸收百分比(％D):

[0372]

$$\text{氘吸收（D-吸收）} = \text{平均质量（氘化）-平均质量（非氘化）}$$

$$\text{氘吸收百分比（\%D）} = \frac{\text{肽在每个时间点的 D-吸收}\times 100\%}{\text{肽的最大 D-吸收（定义于 ELN 中）}}$$

[0373] 从单独hBCMA.hFc及与REGN5458样品复合的hBCMA.hFc鉴别出总共8种来自hBCMA.hFc的肽,代表hBCMA的100％序列覆盖度。所有肽的平均标准偏差(SD)评估为1.4％(详细计算定义于ELN及Pascal,BD等人(2012)《美国质谱学会杂志(Journal of the American Society for Mass Spectrometry)》23(9):1512-1521中)。因此,任何展现高于4.2％(平均SD的3倍)的差异性D-吸收百分比值的肽定义为显著受保护。对于hBCMA.hFc,对应于SEQ ID NO:106(MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNA;SEQ ID NO:121)的氨基酸1至43的肽显著由REGN5458保护。使用hBCMA.mmH(REGN2744,SEQ ID NO:106的氨基酸序列)证实这些残基由REGN5458保护。

[0374] 表25:在结合REGN5458后选定BCMA.hFc肽具有显著保护作用

[0375]

BCMA 残基	5 分钟			10 分钟			-hFc
	REGN2746	REGN2746 + REGN5458		REGN2746	REGN2746 + REGN5458		
	质心 MH^+	质心 MH^+	ΔD	质心 MH^+	质心 MH^+	ΔD	Δ%D
1-28	3217.16	3212.39	-4.77	3218.05	3212.62	-5.43	-25.2
4-26	2582.03	2577.26	-4.77	2582.71	2577.45	-5.26	-31
27-43	1921.75	1920.69	-1.06	1922.1	1920.83	-1.27	-11.1

[0376] 实例18:在与抗BCMA抗体一起培育整夜的后多发性骨髓瘤细胞系上的BCMA x CD3双特异性抗体及其它BCMA抗体的FACS结合分析

[0377] 利用流动式细胞测量分析以测定多发性骨髓瘤细胞系与抗BCMA抗体一起培育整夜对表面BCMA水平的影响。将MM细胞系(H929、Molp8、U266及MM1.S)洗涤两次并在37℃下在含有66.7或667nM抗BCMA抗体、DAPT(γ-分泌酶抑制剂)的R10培养基(RPMI+10％FBS+pen/strep/glut)或单独培养基中培养。在18小时之后,将孔用冷FACS洗液(PBS+1％经过滤FBS)洗涤并在冰上再悬浮于667nM的于冷染色缓冲液(Miltenyi 130-091-221)中的相同抗BCMA抗体中30分钟。在培育之后,将细胞用冷FACS洗液(PBS+1％经过滤FBS)洗涤两次并且经结合的抗体通过在冰上与适当的抗人类二级抗体(抗hIgG或抗HIS)一起再培育30至45分钟来检测。在培育之后,将细胞洗涤,再悬浮于200μL含有1％经过滤FBS的冷PBS中并通过流式细胞测量术在BD FACS Canto II上分析。通过将先前在BCMA ab或DAPT中培育整夜的染色细胞的MFI除以仅在培养基中培育整夜的染色细胞的MFI来计算染色的增加倍数。

[0378] BCMA通过酶γ-分泌酶从细胞表面快速分裂。与γ-分泌酶抑制剂(如DAPT)一起培育整夜防止导致细胞表面上的BCMA水平增加的BCMA裂解。表26至29报告与仅在培养基中培育的细胞相比在抗BCMA抗体或DAPT中培育整夜的细胞上BCMA的中值荧光强度(MFI)的增加倍数。观察到与DAPT一起培育整夜通过抗BCMA抗体(BCMA x CD3双特异性R5458、亲本BCMA抗体mAb15281及其它内部BCMA抗体)使H929、Molp8、U266及MM.1S上所检测到的BCMA水平分别增加2.3至4倍、2.4至8.6倍、5.3至9.0倍及11.9倍。

[0379] 值得重视地,还观察到将MM细胞系与66.7或667nM REGN5458或亲本二价抗BCMA抗体mAb21581一起培育整夜类似地使得通过FACS所检测的表面BCMA水平增加,表明抗BCMA抗

体的结合防止BCMA通过γ-分泌酶裂解。抗体诱导的表面BCMA的增加因细胞系而不同,与H929或U266相比Molp8及MM1S细胞上的增加倍数更大。所述现象不限于REGN5458,因为其也在其它内部BCMA抗体观察到。

[0380] 表26:相比于仅在培养基中培育的细胞(NCI-H929)的MFI变化倍数

[0381]

NCI-H929		67 nM		667 nM		DAPT	
		平均值	n	平均值	n	平均值	n
mAb21581	aBCMA（R5458 的亲本）	1.2	5	1.4	3	3.5	6
REGN5458	BCMA x CD3	2.0	3	3.0	1	4.0	3
mAb16749	aBCMA	1.0	2	0.8	1	2.3	3
mAb16711	aBCMA	2.8	2	2.1	1	3.8	3
mAb16747	aBCMA	1.8	2	2.1	1	3.9	3
REGN960	scFv IsoC	1.0	2	1.1	1	1.1	3
mAb11810	IgG1 IsoC	1.0	2	1.0	1	1.1	3
mAb11810	IgG4s IsoC	1.3	2	1.0	1	1.1	3

[0382] 表27:相比于仅在培养基中培育的细胞(Molp8)的MFI变化倍数

[0383]

Molp8		67 nM		667 nM		DAPT	
		平均值	n	平均值	n	平均值	n
mAb21581	aBCMA（R5458 的亲本）	2.3	5	3.7	3	6.3	6
REGN5458	BCMA x CD3	2.3	3	4.5	1	8.6	3
mAb16749	aBCMA	1.1	2	3.4	1	4.0	3
mAb16711	aBCMA	3.5	2	3.0	1	5.1	3
mAb16747	aBCMA	2.2	2	0.6	1	6.2	3
REGN960	scFv IsoC	1.1	2	1.0	1	1.0	3
mAb11810	IgG1 IsoC	1.0	2	1.3	1	1.1	3
mAb11810	IgG4s IsoC	0.9	2	1.2	1	1.0	3

[0384] 表28:相比于仅在培养基中培育的细胞(U266)的MFI变化倍数

[0385]

U266		67 nM		667 nM		DAPT	
		平均值	n	平均值	n	平均值	n
mAb21581	aBCMA（R5458 的亲本）	1.8	2	2.3	1	6.7	6
REGN5458	BCMA x CD3	1.4	2	2.3	1	9.0	3
mAb16749	aBCMA	1.3	2	1.2	1	5.3	3
mAb16711	aBCMA	2.2	2	2.2	1	7.2	3
mAb16747	aBCMA	1.5	2	1.7	1	8.3	3
REGN960	scFv IsoC	1.0	2	1.0	1	1.0	3
mAb11810	IgG1 IsoC	1.0	2	1.1	1	1.1	3
mAb11810	IgG4s IsoC	1.1	2	1.1	1	1.4	3

[0386] 表29:相比于仅在培养基中培育的细胞(MM1S)的MFI变化倍数

[0387]

MM1S		67 nM		667 nM		DAPT	
		平均值	n	平均值	n	平均值	n
mAb21581	aBCMA（R5458 的亲本）	7.3	2	7.0	2	11.9	2

[0388] 实例19:在BCMA x CD3双特异性抗体存在下人类及食蟹猕猴浆细胞的自体T细胞介导的杀伤

[0389] 通过流式细胞测量术评估通过非刺激性自体T细胞特异性杀伤富集的$CD138^+$人类或食蟹猕猴浆细胞。在收集后24小时内提供人类或食蟹猕猴骨髓抽出物及血液。根据制造商的说明使用EasySep人类$CD138^+$阳性选择试剂盒通过阳性选择从骨髓富集$CD138^+$浆细胞。通过密度分离来分离来自全血的PBMC。用1μM的Vybrant CFDA-SE荧光追踪染料标记PBMC。在标记之后,在37℃下将1×10^4个富集的$CD138^+$浆细胞以10:1的E:T比率与经Vybrant

CFDA-SE标记的PBMC及REGN5458、CD3结合对照bsAb或BCMA结合对照mAb的连续稀释液一起接种于圆底96孔培养板、完整培养基中72小时。在培养结束时,通过流式细胞测量术利用可固定的LIVE/DEAD染料及浆细胞特异性细胞表面标志物分析存活的$CD138^+$浆细胞。将成活百分比归一化至对照条件(在仅PBMC存在下的浆细胞)。通过流式细胞测量术评估T细胞活化。活化报告为表达CD25的$CD2^+/CD4^+$或$CD2^+/CD8^+/CD16^-$T细胞的百分比。将T细胞活化百分比归一化至对照条件(在仅PBMC存在下的浆细胞)。

[0390] 体外研究评估REGN5458或阴性对照(BCMA结合对照mAb或CD3结合对照bsAb)对原代人类及食蟹猕猴T细胞活化及自体浆细胞细胞毒性的影响。每种供体的细胞毒性及T细胞活化百分比的EC_{50}值概述于表30中。

[0391] REGN5458在自体T细胞存在下以浓度依赖性方式介导来自供体1及2的原代人类浆细胞的细胞毒性,EC_{50}值分别为42.8pM及191pM,并且分别产生91%及89%的最大细胞毒性百分比。同时,REGN5458在来自供体1及2的人类浆细胞存在下以浓度依赖性方式介导T细胞活化,$CD8^+$T细胞活化的EC_{50}值分别为214pM及860pM,并且最大$CD8^+$T细胞活化百分比分别为2%及36%。在纳摩尔浓度的CD3结合对照下观察到两种供体中浆细胞的细胞毒性及仅供体2中$CD8^+$T细胞活化增加。在BCMA结合对照情况下在所测试的任何浓度下在任一供体中均未观察到对细胞毒性或T细胞活化的影响。

[0392] REGN5458以浓度依赖性方式介导两种供体中的原代食蟹猕猴浆细胞的细胞毒性;计算出供体1的EC_{50}为1.31nM,但不能确定供体2的EC_{50}。在两种供体中,REGN5458处理使得浆细胞的细胞毒性增加(供体1及2的最大细胞毒性百分比分别为94%及91%)。同时,REGN5458在来自供体1及2的食蟹猕猴浆细胞存在下以浓度依赖性方式介导T细胞活化,$CD4^+$T细胞活化的EC_{50}值分别为28.1nM及18.1nM,并且$CD8^+$T细胞活化的EC_{50}值分别为22.4nM及76.7nM。对于供体1及2,所得$CD4^+$T细胞的最大T细胞活化百分比分别为9%及16%,并且$CD8^+$T细胞的最大T细胞活化百分比分别为12%及17%。

[0393] 在BCMA结合对照情况下在所测试的任何浓度下在所评估的任一细胞系中均未观察到靶细胞杀伤。在CD3结合对照情况下在纳摩尔浓度下观察到在来自供体2的浆细胞存在下的一些靶细胞杀伤及T细胞活化。

[0394] 表30:每种供体的细胞毒性及T细胞活化百分比的EC_{50}值

[0395]

细胞系		细胞毒性杀伤		T细胞活化(%CD25上调)			
				$CD4^+$ T细胞		$CD8^+$ T细胞	
效应细胞	靶细胞	EC_{50}(M)	最大%细胞毒性	EC_{50}(M)	%活化	EC_{50} (M)	%活化
原代人类T细胞[a]	人类供体1浆细胞	4.28×10^{-11}	91	NR	NR	2.14×10^{-10}	2
	人类供体2浆细胞	1.91×10^{-10}	89	NR	NR	8.60×10^{-10}	36
原代食蟹猕猴T细胞[a]	食蟹猕猴供体1浆细胞	1.31×10^{-9}	94	2.81×10^{-8}	9	2.24×10^{-8}	12
	食蟹猴捐献者2浆细胞	ND	91	~1.81×10^{-8}	16	7.67×10^{-8}	17

[0396] [a]测试每种供体的自体浆细胞。

[0397] 实例20:抗BCMA x抗CD3双特异性抗体与抗PD-1抗体协同作用以增强体内抗肿瘤

功效

[0398] 为确定BCMA x CD3双特异性抗体(Ab)是否与PD-1阻断协同作用以提供优良体内抗肿瘤功效,在表达人类CD3的小鼠中进行异体同质肿瘤研究。结果证实组合REGN5458加PD-1阻断提供比单独REGN5458或PD-1阻断优良的抗肿瘤功效。

[0399] 异体同质肿瘤的植入及测量:对表达人类CD3deg而非鼠类CD3deg的C57BL/6小鼠(CD3人类化小鼠)皮下植入1×10^6个已经工程改造以表达全长人类BCMA的MC38结肠癌瘤细胞(MC38/BCMA)。使肿瘤建立3天,此时向小鼠(n=6或7个每组)给予剂量为0.4mg/kg的CD3结合对照双特异性Ab(G;H4sH17664D)或剂量为0.04mg/kg或0.24mg/kg的BCMA x CD3(G;REGN5458)双特异性Ab以及4mg/kg的代替抗小鼠PD-1抗体(克隆RPM1-14)或4mg/kg的同型对照Ab(克隆2A3)。具体处理组展示于下表31中。

[0400] 表31:处理组

[0401]

组	双特异性处理	抗体	n
1	H4SH17664D(0.24mg/kg)	同型(4mg/kg)	7
2	H4SH17664D(0.24mg/kg)	RPM1-14(4mg/kg)	7
3	REGN5458(0.04mg/kg)	同型(4mg/kg)	7
4	REGN5458(0.04mg/kg)	RPM1-14(4mg/kg)	7
5	REGN5458(0.24mg/kg)	同型(4mg/kg)	6
6	REGN5458(0.24mg/kg)	RPM1-14(4mg/kg)	6

[0402] 在第7天及第11天向小鼠给予这些Ab两次以上,总共三个剂量,并在实验期间评估肿瘤生长。

[0403] 异体同质肿瘤生长及抑制的计算:为了通过外部卡尺测定肿瘤体积,测定最大纵向直径(长度以mm计)及最大横向直径(宽度以mm计)。基于卡尺测量的肿瘤体积通过下式计算:体积(mm^3)=(长度×宽度^2)/2。

[0404] 结果证实组合REGN5458加PD-1阻断提供比单独REGN5458或PD-1阻断优良的抗肿瘤功效。确切地说,结果证实在第24天(收集所有处理组的数据的最后一天)BCMA x CD3双特异性抗体与抗PD-1抗体的组合在抑制肿瘤生长中产生统计学上显著的协同治疗作用(表32,0.04mg/kg的BCMA x CD3及4mg/kg的抗PD-1)。在第24天使用双向ANOVA测试,在(i)REGN5458(0.04mg/kg)+同型与REGN5458(0.04mg/kg)+抗PD-1抗体的组合(第3组对比第4组);(ii)REGN5458(0.24mg/kg)+同型与REGN5458(0.24mg/kg)+抗PD-1抗体的组合(第5组对比第6组);(iii)抗PD-1与REGN5458(0.04mg/kg)+抗PD-1抗体的组合(第2组对比第6组)之间$p<0.0001$。在第24天使用双向ANOVA测试,在抗PD-1与REGN5458(0.04mg/kg)+抗PD-1抗体的组合(第2组对比第4组)之间$p=0.0005$。在此实验中与PD-1阻断组合增加BCMA x CD3双特异性抗体(0.24mg/kg)的剂量产生类似于较低双特异性抗体剂量加PD-1阻断的肿瘤抑制。证实与较低剂量双特异性抗体协同为有利的,因为使用较低剂量减小任何不利副作用的风险。类似地,BCMA x CD3双特异性抗体与抗PD-1抗体的组合在实验结束时(第28天)在两种剂量的双特异性抗体(0.04mg/kg及0.24mg/kg)下均展示出对无肿瘤小鼠的数量的协同治疗作用,如表33中所示。

[0405] 表32:各个时间点的平均肿瘤尺寸

[0406]

抗体 处理	第 3 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	16.30±1.50 n = 7
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	14.34 ± 1.17 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	15.62 ± 1.61 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	19.20 ± 2.94 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	13.13 ± 3.12 n = 6
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	20.41 ± 3.15 n = 6

[0407]

抗体 处理	第 7 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	55.78±6.61 n = 7
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	43.59 ± 8.32 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	37.98 ± 3.93 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	30.30 ± 6.47 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	29.27 ± 5.00 n = 6
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	29.18 ± 3.65 n = 6

[0408]

抗体 处理	第 11 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	145.74±21.37 n = 7
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	45.33 ± 11.46 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	112.53 ± 17.39 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	8.81 ± 0.88 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	36.63 ± 14.89 n = 6
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	12.99 ± 4.35 n = 6

[0409]

抗体 处理	第 14 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	414.28±46.72 n = 7
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	49.50 ± 17.02 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	438.16 ± 59.56 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	6.86 ± 3.90 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	224.33 ± 47.04 n = 6
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	22.75 ± 17.62 n = 6

[0410]

抗体 处理	第 18 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	1035.43±123.41 n = 6
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	100.83 ± 41.62 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	1040.12 ± 61.95 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	7.81 ± 7.81 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	515.15 ± 115.38 n = 6
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	57.79 ± 43.62 n = 6

[0411]

抗体 处理	第 21 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	1834.87±639.56 n = 2
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	208.29 ± 91.80 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	2133.12 ± 129.26 n = 6
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	21.13 ± 21.13 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	1225.47 ± 289.39 n = 6
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	113.69 ± 85.39 n = 6

[0412]

抗体 处理	第 24 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	2358.81±0.00 n = 1
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	534.03 ± 205.49 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	3648.37 ± 536.71 n = 3
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	53.52 ± 53.52 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	1493.26 ± 973.01 n = 2
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	54.29 ± 54.29 n = 5

[0413]

抗体 处理	第 28 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	所有动物安乐死 n = 0
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	1196.57 ± 467.34 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	所有动物安乐死 n = 0
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	141.68 ± 141.68 n = 7
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	1371.17 ± 0.00 n = 1
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	104.44 ± 104.44 n = 5

[0414] 表33:实验结束时的无肿瘤小鼠

[0415]

抗体 处理	实验结束时（第 28 天）无肿瘤小鼠的数量
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	0/7
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	2/7
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	0/7
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	6/7
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	0/6
BCMA x CD3 REGN5458（0.24 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	4/6

[0416] 实例21:抗BCMA x抗CD3双特异性抗体与抗PD-1抗体协同作用以增强体内抗肿瘤

功效

[0417] 在第二实验中获得类似结果,与上文实例20中所论述一致,不同之处在于每组小鼠的数量＝10,并且BCMA x CD3 REGN5458的较高剂量为0.4mg/kg。第二实验的具体处理组展示于下表34中。

[0418] 表34:处理组

[0419]

组	双特异性处理	抗体	n
1	H4SH17664D(0.4mg/kg)	同型(4mg/kg)	10
2	H4SH17664D(0.4mg/kg)	RPM1-14(4mg/kg)	10
3	REGN5458(0.04mg/kg)	同型(4mg/kg)	10
4	REGN5458(0.04mg/kg)	RPM1-14(4mg/kg)	10
5	REGN5458(0.4mg/kg)	同型(4mg/kg)	10
6	REGN5458(0.4mg/kg)	RPM1-14(4mg/kg)	10

[0420] 结果证实组合REGN5458加PD-1阻断提供比单独REGN5458或PD-1阻断优良的抗肿瘤功效。确切地说,结果证实在第21天(收集所有处理组的数据的最后一天)BCMA x CD3双特异性抗体与抗PD-1抗体的组合在抑制肿瘤生长中产生协同治疗作用(表35,0.04mg/kg的BCMA x CD3及4mg/kg的抗PD-1)。在第21天使用双向ANOVA测试,在(i)REGN5458(0.04mg/kg)+同型与REGN5458(0.04mg/kg)+抗PD-1抗体的组合(第3组对比第4组);(ii)抗PD-1与REGN5458(0.04mg/kg)+抗PD-1抗体的组合(第2组对比第4组);(iii)抗PD-1与REGN5458(0.4mg/kg)+抗PD-1抗体的组合(第2组对比第6组)之间$p<0.0001$。如上文实例20中所论述,在此实验中与PD-1阻断组合增加BCMA x CD3双特异性抗体(0.4mg/kg)的剂量产生类似于较低双特异性抗体剂量与PD-1阻断组合的肿瘤抑制。证实与较低剂量双特异性抗体协同为有利的,因为使用较低剂量减小任何不利副作用的风险。类似地,BCMA x CD3双特异性抗体与抗PD-1抗体的组合在实验结束时(第25天)在两种剂量的双特异性抗体(0.04mg/kg及0.4mg/kg)下均展示出对无肿瘤小鼠的数量的协同治疗作用,如表36中所示。

[0421] 表35:各个时间点的平均肿瘤尺寸

[0422]

抗体 处理	**第 3 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM**
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.4 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	9.85±0.61 n = 10
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.4 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	13.44±1.44 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	12.41±2.56 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	9.73±1.25 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.4 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	11.22±0.68 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.4 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	9.59±1.78 n = 10

[0423]

抗体 处理	第 6 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.4 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	40.43±4.07 n = 10
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.4 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	44.52±2.80 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	38.79±3.52 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	36.42±3.51 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.4 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	16.11±1.27 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.4 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	24.34±1.86 n = 10

[0424]

抗体 处理	第 10 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.4 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	149.41 ± 17.08 n = 10
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.4 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	107.34 ± 13.73 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	116.32±19.99 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	23.48±3.24 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.4 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	24.27±6.74 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.4 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	3.60±1.92 n = 10

[0425]

抗体 处理	第 13 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.4 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	386.55 ± 48.49 n = 10
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.4 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	186.87±41.06 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	319.91±53.05 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	10.60±2.34 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.4 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	50.93±20.00 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.4 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	0.74±0.74 n = 10

[0426]

抗体 处理	第 18 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.4 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	1809.29±242.64 n = 9
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.4 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	688.52±152.20 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	1314.27±211.22 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	6.28±4.55 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.4 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	248.51±107.21 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.4 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	3.93±2.67 n = 10

[0427]

抗体 处理	第 21 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.4 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	3094.87±482.38 n = 8
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.4 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	1425.22±338.49 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	2446.35±395.48 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	15.03±10.35 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.4 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	453.43±174.75 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.4 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	9.34±7.59 n = 10

[0428]

抗体 处理	第 25 天的平均肿瘤尺寸 （mm^3）±SEM
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.4 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	动物安乐死 n = 0
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.4 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	1918.27±571.19 n = 6
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	2411.64±451.96 n = 3
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	38.96±21.47 n = 10
BCMA x CD3 REGN5458（0.4 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	661.70±331.60 n = 8
BCMA x CD3 REGN5458（0.4 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	32.02±24.67 n = 10

[0429] 表36:实验结束时的无肿瘤小鼠

[0430]

抗体 处理	实验结束时（第 25 天）无肿瘤小鼠的数量
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.4 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	0/10
CD3 结合对照 H4SH17664D（0.4 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	1/10
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	0/10
BCMA x CD3 REGN5458（0.04 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	7/10
BCMA x CD3 REGN5458（0.4 mg/kg） +同型（4 mg/kg）	2/10
BCMA x CD3 REGN5458（0.4 mg/kg） + PD-1 阻断 RPM1-14（4 mg/kg）	8/10

[0431] 本发明的范围不受本文所描述的具体实施例限制。实际上，根据前述描述，除本文所描述的修改以外，本发明的各种修改对所属领域的技术人员来说将变得显而易见。所述修改意图属于所附权利要求书的范围内。

序列表

<110> 再生元制药公司（Regeneron Pharmaceuticals, Inc.）
<120> 双特异性抗 BCMA x 抗 CD3 抗体及其用途
<130> 10452W001
<150> 62/700,596
<151> 2018-07-19
<150> 62/750,968
<151> 2018-10-26
<150> 62/793,645
<151> 2019-01-17
<160> 125
<170> FastSEQ，适用 Windows 版本 4.0
<210> 1
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 1

[0001]

```
caggtgcagc tggtggagtc ggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctatggca ttcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atattacatg atggaagtag taactactat 180
gcagagtccg tgaagggccg attcatcatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctctat attactgtac gaaaaggtat 300
tcagaagcag ctggcccaaa ttggttcgac ccctggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctca                                                          366
```

<210> 2
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 2

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
            20                  25                  30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Val Ile Leu His Asp Gly Ser Ser Asn Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Ile 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 Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Lys Arg Tyr Ser Glu Ala Ala Gly Pro Asn Trp Phe Asp Pro Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 3
ggattcacct tcagtaccta tggc 24

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 4
Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly
1 5

[0002]

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 5
atattacatg atggaagtag taac 24

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 6
Ile Leu His Asp Gly Ser Ser Asn
1 5

<210> 7
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 7
acgaaaaggt attcagaagc agctggccca aattggttcg acccc 45
<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 8
Thr Lys Arg Tyr Ser Glu Ala Ala Gly Pro Asn Trp Phe Asp Pro
1 5 10 15
<210> 9
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 9

[0003]

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtcg gggaattagc agctggttag cctggtatca gcagaagcca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatccatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg ctacttacta ttgtcaacag gctatcagtt tcccattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321
<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 10
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
His 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 Ala Ile Ser Phe Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 11

cggggaatta gcagctgg 18

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 12

Arg Gly Ile Ser Ser Trp

1 5

[0004]

<210> 13

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 13

gctgcatcc 9

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 14

Ala Ala Ser

1

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 15
caacaggcta tcagtttccc attcact 27
<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 16
Gln Gln Ala Ile Ser Phe Pro Phe Thr
1 5
<210> 17
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 17
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgtca tgagttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gactggagtg ggtctcagct attattggta gtggtggtag cacatattac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagagcc 300
ggggataact ggaactggtt cgacccctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360
<210> 18
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 18
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Val Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ile 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 Arg Ala Gly Asp Asn Trp Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln

[0005]

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 19
ggattcacct ttagcagcta tgtc 24
<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 20
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val
1 5
<210> 21
<211> 24
[0006] <212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 21
attattggta gtggtggtag caca 24

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 22
Ile Ile Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5
<210> 23
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成

<400> 23
gcgaaaagag ccggggataa ctggaactgg ttcgacccc 39
<210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 24
Ala Lys Arg Ala Gly Asp Asn Trp Asn Trp Phe Asp Pro
1 5 10
<210> 25
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 25

[0007]

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctttaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggtattagc agctggttag cctggtatca gcggaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tggggcggat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaaaagtg tcccattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321
<210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 26
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Arg 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 Ala 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 Ala Lys Ser Val Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 27
cagggtatta gcagctgg 18
<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 28
Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5
<210> 29
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列
[0008]
<220>
<223> 合成
<400> 29
gctgcatcc 9
<210> 30
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 30
Ala Ala Ser
1
<210> 31
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 31
caacaggcta aaagtgtccc attcact 27
<210> 32

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 32
Gln Gln Ala Lys Ser Val Pro Phe Thr
 1   5
<210> 33
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 33
gaagtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120
ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt atcagttgga atagtggtaa catgggatat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgttc 240
ctgcaaatgc acagtttgag agctgaggac acggcctttt attactgtgc aaaagtccgt 300
ctaactgcct ttgacttttg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc a   351

[0009]

<210> 34
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 34
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20   25   30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asn Met Gly Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
65   70   75   80
Leu Gln Met His Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Lys Val Arg Leu Thr Ala Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100   105   110
Val Thr Val Ser Ser
        115

<210> 35
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 35
ggattcacct ttgatgatta tgcc 24
<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 36
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
1 5
<210> 37
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
[0010] <220>
<223> 合成
<400> 37
atcagttgga atagtggtaa catg 24
<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 38
Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asn Met
1 5
<210> 39
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 39
gcaaaagtcc gtctaactgc ctttgacttt 30
<210> 40

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 40
Ala Lys Val Arg Leu Thr Ala Phe Asp Phe
1 5 10
<210> 41
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 41
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc ggacaagtca gagcattggc aactatttaa attggtttca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct catctatact gcatccagtt tgcagaatgg agtcccatca 180
aggttcactg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaggattttg taatttacta ctgtcaacag agtttcagta ccccgtatac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

[0011]

<210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 42
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 Thr Ser Gln Ser Ile Gly Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr 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 Val Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Ser Thr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
<210> 43
<211> 18

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 43
cagagcattg gcaactat 18
<210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 44
Gln Ser Ile Gly Asn Tyr
1 5
<210> 45
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 45

[0012]

actgcatcc 9
<210> 46
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 46
Thr Ala Ser
1
<210> 47
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 47
caacagagtt tcagtacccc gtatact 27
<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 48
Gln Gln Ser Phe Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5
<210> 49
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 49
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tcagctggat ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagttcta gtggtagttc cataaagtac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctcactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gagagaggga 300
gggaactacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354
<210> 50
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列
[0013]
<220>
<223> 合成
<400> 50
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys 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
Tyr Ile Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ile Lys Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Gly Asn Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 51
<211> 24
<212> DNA

[0014]

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 51
ggattcacct tcagtgacta ctac 24
<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 52
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
1 5
<210> 53
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 53
attagttcta gtggtagttc cata 24
<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 54
Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ile
1 5
<210> 55
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 55
gcgagagagg gagggaacta cggtatggac gtc 33
<210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成
<400> 56
Ala Arg Glu Gly Gly Asn Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10
<210> 57
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 57
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggtattaac aactggttag tctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcaaccagct tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtgggtc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctcccac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321
<210> 58
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
[0015]
<220>
<223> 合成
<400> 58
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp
20 25 30
Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Thr 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 Ala Asn Ser Phe Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
<210> 59
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

[0016]

<223> 合成
<400> 59
cagggtatta acaactgg 18
<210> 60
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 60
Gln Gly Ile Asn Asn Trp
1 5
<210> 61
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 61
gctgcaacc 9
<210> 62
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 62
Ala Ala Thr
1
<210> 63
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 63
caacaggcta acagtttccc tcccact 27
<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 64

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 65
<211> 375
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 65

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt aacttttgga tgacctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac atgaaccaag atggaagtga gaaatactat 180
gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagag ctcactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgg 300
gaatattgta ttagtaccag ctgctatgat gactttgact actggggcca gggaaccctg 360
gtcaccgtct cctca 375

<210> 66
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成

[0017]

<400> 66

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

<210> 67
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成
<400> 67
ggattcacct ttagtaactt ttgg 24
<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 68
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Trp
1 5
<210> 69
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 69
atgaaccaag atggaagtga gaaa 24
<210> 70
<211> 8
[0018]
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 70
Met Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys
1 5
<210> 71
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 71
gcgagagatc gggaatattg tattagtacc agctgctatg atgactttga ctac 54
<210> 72
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 72

Ala Arg Asp Arg Glu Tyr Cys Ile Ser Thr Ser Cys Tyr Asp Asp Phe
1 5 10 15
Asp Tyr

<210> 73
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 73
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcatagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324
<210> 74
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
[0019] <223> 合成
<400> 74
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 His 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 Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105
<210> 75
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成

<400> 75
cagagcatta gcagctat 18
<210> 76
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 76
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5
<210> 77
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 77
gctgcatcc 9
<210> 78
<211> 3
<212> PRT
[0020] <213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 78
Ala Ala Ser
1
<210> 79
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 79
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc 30
<210> 80
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 80
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr

1 5 10

<210> 81
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 81
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324
<210> 82
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 82

[0021]

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 Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 83
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 83
cagagcatta gcagctat 18
<210> 84

[0022]

<210> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 84
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5
<210> 85
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 85
gctgcatcc 9
<210> 86
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 86
Ala Ala Ser
1
<210> 87
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 87
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc 30
<210> 88
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 88
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10
<210> 89
<211> 372

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 89
gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60
agttgcgcag ctagtgggtt tacattcgac gattacagca tgcattgggt gaggcaagct 120
cctggtaaag gattggaatg ggttagcggg atatcatgga actcaggaag caagggatac 180
gccgacagcg tgaaaggccg atttacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240
cttcaaatga actctcttag ggcagaagac acagcattgt attattgcgc aaaatacggc 300
agtggttatg gcaagtttta tcattatgga ctggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360
acagtgagta gc 372
<210> 90
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 90
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Leu Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 91
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 91
gggtttacat tcgacgatta cagc 24
<210> 92

[0023]

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 92
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ser
1 5
<210> 93
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 93
atatcatgga actcaggaag caag 24
<210> 94
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
[0024] <223> 合成
<400> 94
Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys
1 5
<210> 95
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 95
gcaaaatacg gcagtggtta tggcaagttt tatcattatg gactggacgt g 51
<210> 96
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 96
Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Leu Asp
1 5 10 15
Val

<210> 97
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 97
gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60
agttgcgcag ctagtgggtt tacattcgac gattacagca tgcattgggt gaggcaagct 120
cctggtaaag gattggaatg ggttagcggg atatcatgga actcaggaag catcggatac 180
gccgacagcg tgaaaggccg atttacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240
cttcaaatga actctcttag ggcagaagac acagcattgt attattgcgc aaaatacggc 300
agtggttatg gcaagtttta ttattatgga atggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360
acagtgagta gc 372
<210> 98
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 98

[0025]

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

<210> 99
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 99

[0026]

gggtttacat tcgacgatta cagc 24

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 100

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ser

1 5

<210> 101

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 101

atatcatgga actcaggaag catc 24

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 102

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile

1 5

<210> 103

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 103

gcaaaatacg gcagtggtta tggcaagttt tattattatg gaatggacgt g 51

<210> 104

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 104

Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 105
<211> 249
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> hBCMA 胞外 mmh
<400> 105
atgttgcaga tggctgggca gtgctcccaa aatgaatatt ttgacagttt gttgcatgct 60
tgcatacctt gtcaacttcg atgttcttct aatactcctc ctctaacatg tcagcgttat 120
tgtaatgcaa gtgtgaccaa ttcagtgaaa ggaacgaatg cggaacaaaa actcatctca 180
gaagaggatc tgggtggaga acaaaaactc atctcagaag aggatctgca ccatcaccat 240
caccattga 249
<210> 106
<211> 82
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hBCMA 胞外 mmh
<400> 106

[0027]

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

<210> 107
<211> 864
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> hBCMA 胞外 mFc
<400> 107
atgttgcaga tggctgggca gtgctcccaa aatgaatatt ttgacagttt gttgcatgct 60
tgcatacctt gtcaacttcg atgttcttct aatactcctc ctctaacatg tcagcgttat 120
tgtaatgcaa gtgtgaccaa ttcagtgaaa ggaacgaatg cggagcccag agggcccaca 180
atcaagccct gtcctccatg caaatgccca gcacctaacc tcttgggtgg accatccgtc 240

ttcatcttcc ctccaaagat caaggatgta ctcatgatct ccctgagccc catagtcaca 300
tgtgtggtgg tggatgtgag cgaggatgac ccagatgtcc agatcagctg gtttgtgaac 360
aacgtggaag tacacacagc tcagacacaa acccatagag aggattacaa cagtactctc 420
cgggtggtca gtgccctccc catccagcac caggactgga tgagtggcaa ggagttcaaa 480
tgcaaggtca acaacaaaga cctcccagcg cccatcgaga gaaccatctc aaaacccaaa 540
gggtcagtaa gagctccaca ggtatatgtc ttgcctccac cagaagaaga gatgactaag 600
aaacaggtca ctctgacctg catggtcaca gacttcatgc ctgaagacat ttacgtggag 660
tggaccaaca acgggaaaac agagctaaac tacaagaaca ctgaaccagt cctggactct 720
gatggttctt acttcatgta cagcaagctg agagtggaaa agaagaactg ggtggaaaga 780
aatagctact cctgttcagt ggtccacgag ggtctgcaca atcaccacac gactaagagc 840
ttctcccgga ctccgggtaa atga 864

<210> 108
<211> 287
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hBCMA 胞外 mFc
<400> 108

[0028]

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15
Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
20 25 30
Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
35 40 45
Val Lys Gly Thr Asn Ala Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys
50 55 60
Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
65 70 75 80
Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser
85 90 95
Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp
100 105 110
Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln
115 120 125
Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser
130 135 140
Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
145 150 155 160
Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile
165 170 175
Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro
180 185 190
Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met
195 200 205

Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn
210 215 220
Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser
225 230 235 240
Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn
245 250 255
Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu
260 265 270
His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
275 280 285

<210> 109
<211> 246
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> mfBCMA 胞外 mmh
<400> 109

[0029]

atgttgcaga tggctcggca gtgctcccaa aatgaatatt ttgacagttt gttgcatgat 60
tgcaaacctt gtcaacttcg atgttctagt actcctcctc taacatgtca gcgttattgc 120
aatgcaagta tgaccaattc agtgaaagga atgaatgcgg aacaaaaact catctcagaa 180
gaggatctgg gtggagaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgcacca tcaccatcac 240
cattga 246

<210> 110
<211> 81
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> mfBCMA 胞外 mmh
<400> 110

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

<210> 111
<211> 861
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> mfBCMA 胞外 mFc
<400> 111
atgttgcaga tggctcggca gtgctcccaa aatgaatatt ttgacagttt gttgcatgat 60
tgcaaacctt gtcaacttcg atgttctagt actcctcctc taacatgtca gcgttattgc 120
aatgcaagta tgaccaattc agtgaaagga atgaatgcgg agcccagagg gcccacaatc 180
aagccctgtc ctccatgcaa atgcccagca cctaacctct tgggtggacc atccgtcttc 240
atcttccctc caaagatcaa ggatgtactc atgatctccc tgagccccat agtcacatgt 300
gtggtggtgg atgtgagcga ggatgaccca gatgtccaga tcagctggtt tgtgaacaac 360
gtggaagtac acacagctca gacacaaacc catagagagg attacaacag tactctccgg 420
gtggtcagtg ccctccccat ccagcaccag gactggatga gtggcaagga gttcaaatgc 480
aaggtcaaca acaaagacct cccagcgccc atcgagagaa ccatctcaaa acccaaaggg 540
tcagtaagag ctccacaggt atatgtcttg cctccaccag aagaagagat gactaagaaa 600
caggtcactc tgacctgcat ggtcacagac ttcatgcctg aagacattta cgtggagtgg 660
accaacaacg ggaaaacaga gctaaactac aagaacactg aaccagtcct ggactctgat 720
ggttcttact tcatgtacag caagctgaga gtggaaaaga agaactgggt ggaaagaaat 780
agctactcct gttcagtggt ccacgagggt ctgcacaatc accacacgac taagagcttc 840
tcccggactc cgggtaaatg a 861
<210> 112
<211> 286
<212> PRT

[0030]

<213> 人工序列
<220>
<223> mfBCMA 胞外 mFc
<400> 112

Met	Leu	Gln	Met	Ala	Arg	Gln	Cys	Ser	Gln	Asn	Glu	Tyr	Phe	Asp	Ser
1				5				10				15			
Leu	Leu	His	Asp	Cys	Lys	Pro	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Ser	Ser	Thr	Pro
			20					25				30			
Pro	Leu	Thr	Cys	Gln	Arg	Tyr	Cys	Asn	Ala	Ser	Met	Thr	Asn	Ser	Val
		35					40				45				
Lys	Gly	Met	Asn	Ala	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro
	50					55					60				
Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
65					70					75					80
Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro
				85					90				95		
Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val
			100					105				110			
Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr
		115					120				125				
Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala
	130					135					140				

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys
145 150 155 160
Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser
165 170 175
Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro
180 185 190
Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val
195 200 205
Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly
210 215 220
Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp
225 230 235 240
Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp
245 250 255
Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His
260 265 270
Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
275 280 285

[0031]

<210> 113
<211> 849
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 具有小鼠 Fc 的小鼠 BCMA 胞外域
<400> 113
atggcgcaac agtgtttcca cagtgaatat tttgacagtc tgctgcatgc ttgcaaaccg 60
tgtcacttgc gatgttccaa ccctcctgca acctgtcagc cttactgtga tccaagcgtg 120
accagttcag tgaaagggac gtacacggag cccagagggc ccacaatcaa gccctgtcct 180
ccatgcaaat gcccagcacc taacctcttg ggtggaccat ccgtcttcat cttcctcca 240
aagatcaagg atgtactcat gatctccctg agccccatag tcacatgtgt ggtggtggat 300
gtgagcgagg atgacccaga tgtccagatc agctggtttg tgaacaacgt ggaagtacac 360
acagctcaga cacaaaccca tagagaggat tacaacagta ctctccgggt ggtcagtgcc 420
ctccccatcc agcaccagga ctggatgagt ggcaaggagt tcaaatgcaa ggtcaacaac 480
aaagacctcc cagcgcccat cgagagaacc atctcaaaac ccaaagggtc agtaagagct 540
ccacaggtat atgtcttgcc tccaccagaa gaagagatga ctaagaaaca ggtcactctg 600
acctgcatgg tcacagactt catgcctgaa gacatttacg tggagtggac caacaacggg 660
aaaacagagc taaactacaa gaacactgaa ccagtcctgg actctgatgg ttcttacttc 720
atgtacagca agctgagagt ggaaaagaag aactgggtgg aaagaaatag ctactcctgt 780
tcagtggtcc acgagggtct gcacaatcac cacacgacta agagcttctc ccggactccg 840
ggtaaatga 849
<210> 114
<211> 282
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 具有小鼠 Fc 的小鼠 BCMA 胞外域
<400> 114

[0032]

```
Met Ala Gln Gln Cys Phe His Ser Glu Tyr Phe Asp Ser Leu Leu His
 1               5                  10                  15
Ala Cys Lys Pro Cys His Leu Arg Cys Ser Asn Pro Pro Ala Thr Cys
            20                  25                  30
Gln Pro Tyr Cys Asp Pro Ser Val Thr Ser Ser Val Lys Gly Thr Tyr
        35                  40                  45
Thr Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
    50                  55                  60
Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
65                  70                  75                  80
Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
                85                  90                  95
Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
            100                 105                 110
Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
        115                 120                 125
Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
    130                 135                 140
His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
145                 150                 155                 160
Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
                165                 170                 175
Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
            180                 185                 190
Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
        195                 200                 205
Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
    210                 215                 220
Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
225                 230                 235                 240
Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
                245                 250                 255
Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
            260                 265                 270
Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
        275                 280
```

<210> 115
<211> 184
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人类BCMA（TNFRSF17）蛋白NP_001183.2
<400> 115
Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15
Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
20 25 30
Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
35 40 45
Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu
50 55 60
Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile
65 70 75 80
Asn Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu
85 90 95
Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu
100 105 110
Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys
115 120 125
Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe
130 135 140
[0033] Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys
145 150 155 160
Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu
165 170 175
Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
180
<210> 116
<211> 207
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类CD3 ε 蛋白（>NP_000724.1 T细胞表面醣蛋白CD3 ε 链前体
<400> 116
Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15
Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30
Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45
Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60
Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95
Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110
Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125
Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
130 135 140
Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160
Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175
Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190
Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 117
<211> 171
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类CD3 δ 蛋白 (>NP_000723.1 T细胞表面醣蛋白CD3 δ 链同种型A前体

[0034]

<400> 117
Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15
Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
20 25 30
Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
35 40 45
Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
50 55 60
Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys
85 90 95
Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val
100 105 110
Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His
115 120 125
Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg
130 135 140
Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr
145 150 155 160
Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys

165 170

<210> 118
<211> 164
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类CD3 ζ 蛋白 (>NP_932170.1 T细胞表面醣蛋白CD3 ζ 链同种型1前体
<400> 118

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15
Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
20 25 30
Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala
35 40 45
Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
50 55 60
Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65 70 75 80
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95
Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
100 105 110
Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
115 120 125
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
130 135 140
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
145 150 155 160
Leu Pro Pro Arg

[0035]

<210> 119
<211> 182
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类CD3 γ 蛋白 (>NP_000064.1 T细胞表面醣蛋白CD3 γ 链前体
<400> 119

Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu
1 5 10 15
Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys
20 25 30
Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala
35 40 45
Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe

50 55 60

Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp
65 70 75 80

Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro
85 90 95

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala
100 105 110

Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val
115 120 125

Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln
130 135 140

Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
145 150 155 160

Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
165 170 175

Asn Gln Leu Arg Arg Asn
180

<210> 120
<211> 281
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

[0036]

<223> 人类 BCMA 胞外 hFc 蛋白
<400> 120

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15

Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
20 25 30

Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
35 40 45

Val Lys Gly Thr Asn Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
50 55 60

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
65 70 75 80

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
85 90 95

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
100 105 110

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
115 120 125

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
130 135 140

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
145 150 155 160

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
165 170 175
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
180 185 190
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
195 200 205
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
210 215 220
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
225 230 235 240
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
245 250 255
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
260 265 270
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275 280

<210> 121
<211> 43
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类 BCMA 的肽 1 至 43

[0037]

<400> 121
Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15
Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
20 25 30
Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala
35 40

<210> 122
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 21587N VH
<400> 122
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Tyr Tyr
20 25 30
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Ala Thr Ser Arg Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Thr Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Phe Ala Glu Tyr Cys Gly Gly Asn Ile Cys Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 123
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 21587N VL（CDR3 中的非生殖系 Cys）
<400> 123

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

[0038]

<210> 124
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 21589N VH
<400> 124

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Ile Asn 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 Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Gly Ser Thr Thr Thr Thr 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 Thr Val Tyr Asp Leu Asn Ser Lys Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr
100 105 110
Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 125
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 21589N VL
<400> 125

[0039]

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

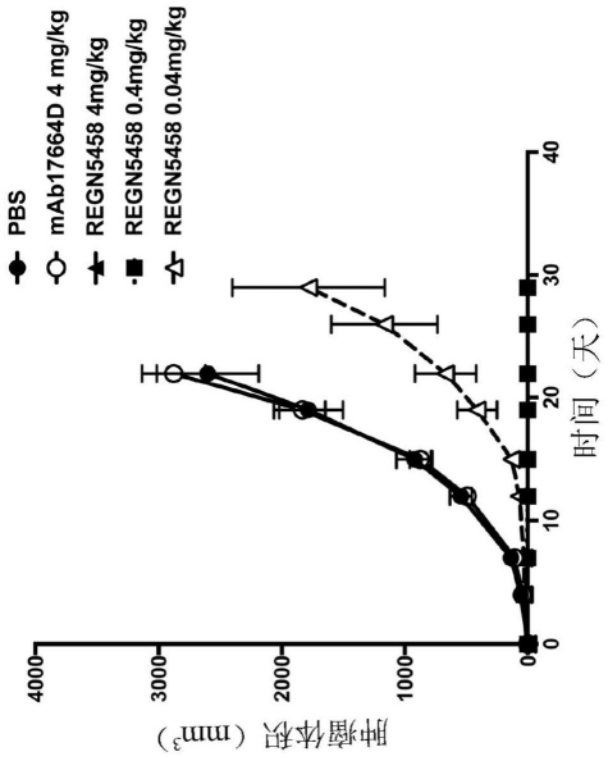

PBS
mAb17664D 4 mg/kg
REGN5458 4mg/kg
REGN5458 0.4mg/kg
REGN5458 0.04mg/kg
肿瘤体积（mm³）
时间（天）
0
1000
2000
3000
4000
0
10
20
30
40

图1

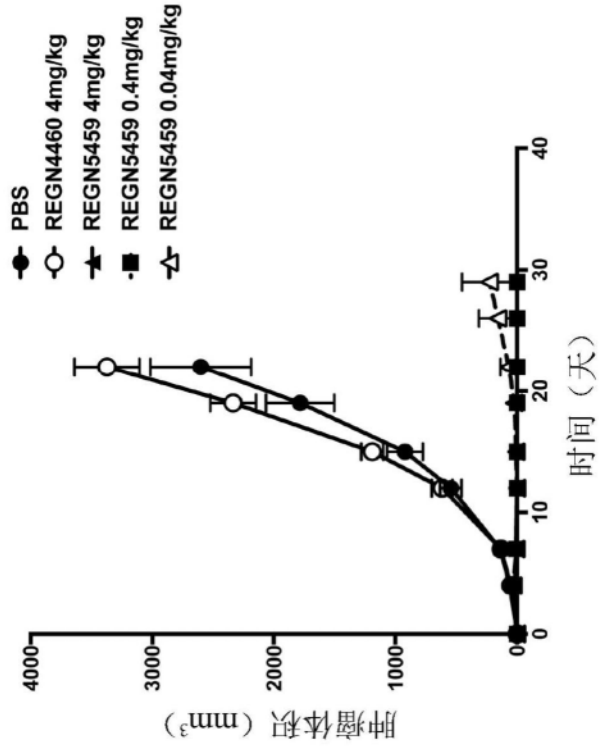

PBS
REGN4460 4mg/kg
REGN5459 4mg/kg
REGN5459 0.4mg/kg
REGN5459 0.04mg/kg
肿瘤体积（mm³）
时间（天）
0
1000
2000
3000
4000
0
10
20
30
40

图2

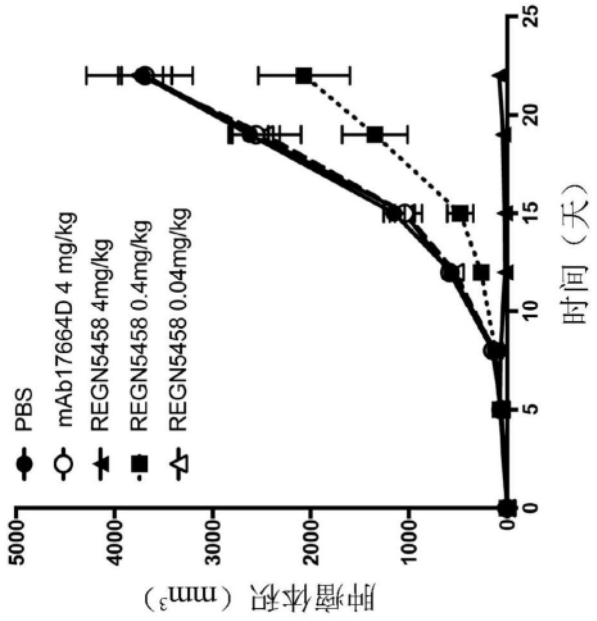

肿瘤体积（mm³）
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
25
时间（天）
PBS
mAb17664D 4 mg/kg
REGN5458 4mg/kg
REGN5458 0.4mg/kg
REGN5458 0.04mg/kg

图3

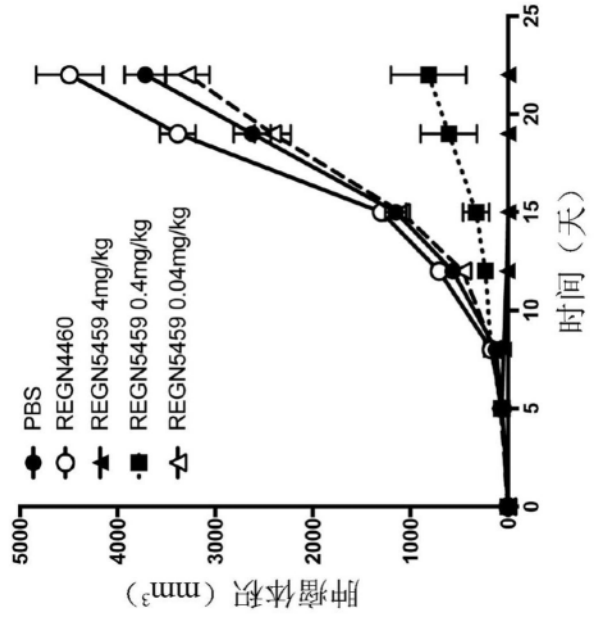

肿瘤体积（mm³）
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
25
时间（天）
PBS
REGN4460
REGN5459 4mg/kg
REGN5459 0.4mg/kg
REGN5459 0.04mg/kg

图4

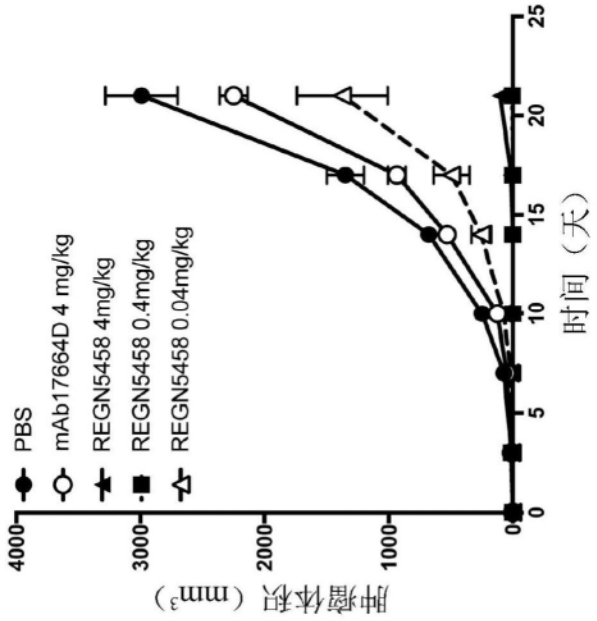

PBS
mAb17664D 4 mg/kg
REGN5458 4mg/kg
REGN5458 0.4mg/kg
REGN5458 0.04mg/kg
肿瘤体积（mm³）
时间（天）
0
1000
2000
3000
4000
0
5
10
15
20
25

图5

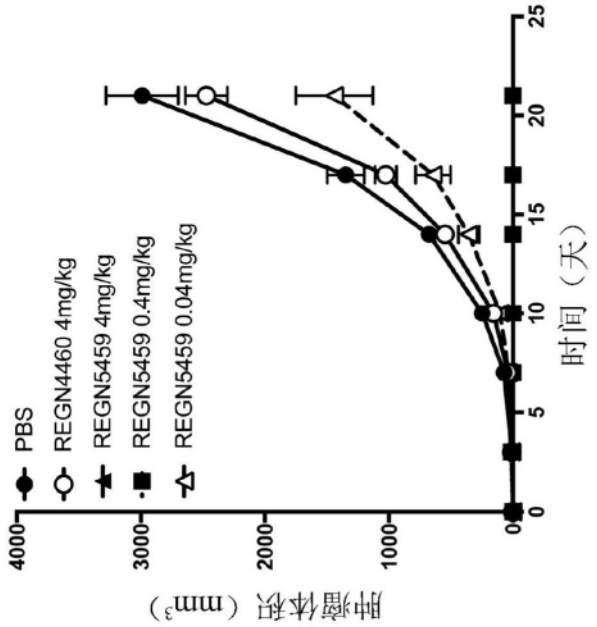

PBS
REGN4460 4mg/kg
REGN5459 4mg/kg
REGN5459 0.4mg/kg
REGN5459 0.04mg/kg
肿瘤体积（mm³）
时间（天）
0
1000
2000
3000
4000
0
5
10
15
20
25

图6

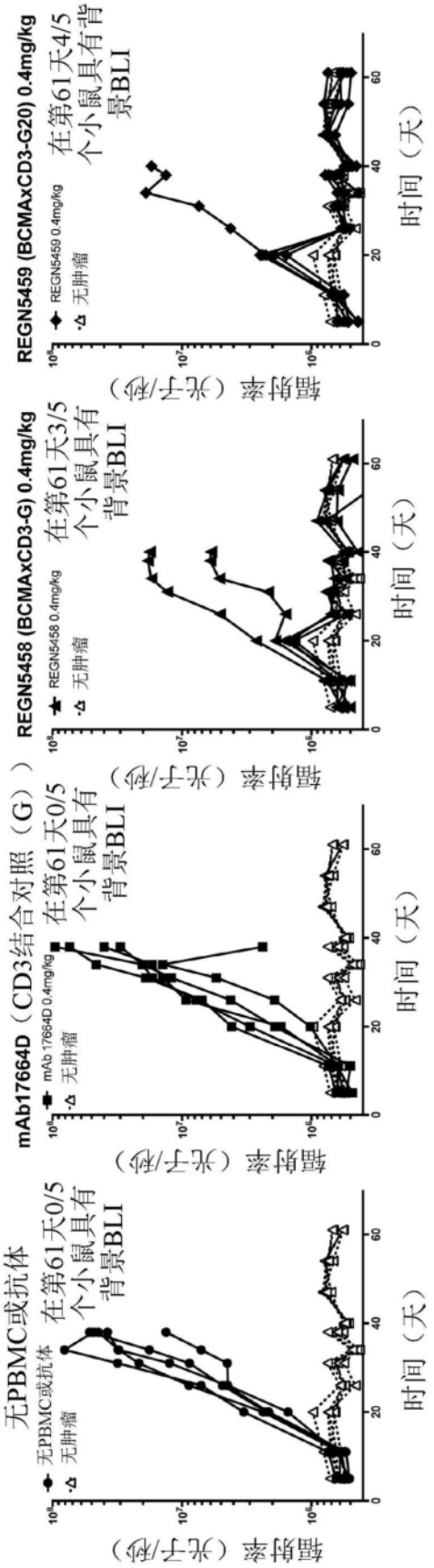

无PBMC或抗体
在第61天0/5个小鼠具有背景BLI
无PBMC或抗体
无肿瘤
mAb17664D（CD3结合对照（G））
在第61天0/5个小鼠具有背景BLI
mAb 17664D 0.4mg/kg
无肿瘤
REGN5458 (BCMAxCD3-G) 0.4mg/kg
在第61天3/5个小鼠具有背景BLI
REGN5458 0.4mg/kg
无肿瘤
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) 0.4mg/kg
在第61天4/5个小鼠具有背景BLI
REGN5459 0.4mg/kg
无肿瘤
辐射率（光子/秒）
时间（天）

图7