



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116472049 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 21

(21) 申请号 202180052312.5

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2021.06.30

专利代理师 黄登高 梅黎

(30) 优先权数据

63/046477 2020.06.30 US

(51) Int.Cl.

A61K 35/17 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.02.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/039961 2021.06.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/006316 EN 2022.01.06

(71) 申请人 特尼奥生物股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 N·特林克林 K·哈里斯

H·马利克 U·谢伦伯格

O·瓦法 S·福斯奥尔德雷德

权利要求书7页 说明书30页 附图12页

(54) 发明名称

与BCMA结合的多特异性抗体

(57) 摘要

披露了与BCMA结合的多特异性人重链抗体(例如,UniAbs™),以及制备此类抗体的方法,包含此类抗体的组合物,包括药物组合物,及其治疗特征在于BCMA的表达的障碍的用途。

名称	CDR1	CDR2	CDR3
BCMA仅重链 CDR序列	GFTFSSNA (SEQ ID NO: 1)	ISGSGDYT (SEQ ID NO: 2)	AKEVPGGPLVDFDS (SEQ ID NO: 3)
La蛋白, v. 1, 重链CDR序列	GYTFTHYY (SEQ ID NO: 4)	VNPSNGGT (SEQ ID NO: 5)	ARSEYDYGLGFAY (SEQ ID NO: 6)
La蛋白, v. 2, 重链CDR序列	GYAFTHYY (SEQ ID NO: 7)	VNPSNGGT (SEQ ID NO: 5)	TRSEYDYGLGFAY (SEQ ID NO: 8)
La蛋白轻链CDR序列	QSLLSRTPKNY (SEQ ID NO: 9)	WAS (SEQ ID NO: 10)	KQSYNLLT (SEQ ID NO: 11)

1. 一种与BCMA结合的多特异性抗体,其包含具有可变区的第一结合单元,该可变区包含与SEQ ID NO:3具有至少85%序列同一性的CDR3序列。

2. 一种与BCMA结合的多特异性抗体,其包含具有可变区的第一结合单元,该可变区包含CDR1序列、CDR2序列、和CDR3序列,其中这些组合的CDR1、CDR2和CDR3序列与组合的SEQ ID NO:1-3具有至少85%序列同一性。

3. 一种与BCMA结合的多特异性抗体,其包含具有可变区的第一结合单元,该可变区包含:

包含SEQ ID NO:1的序列的CDR1序列;

包含SEQ ID NO:2的序列的CDR2序列;以及

包含SEQ ID NO:3的序列的CDR3序列。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的多特异性抗体,其中这些CDR1、CDR2和CDR3序列存在于人VH框架中。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的多特异性抗体,其中该可变区是仅重链可变区。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的多特异性抗体,其中该可变区包含与SEQ ID NO:12具有至少95%序列同一性的序列。

7. 如权利要求6所述的多特异性抗体,其中该可变区包含具有SEQ ID NO:12的序列。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的多特异性抗体,其中该可变区呈单价或二价构型。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的多特异性抗体,其进一步包含重链恒定区序列,CH1序列不存在。

10. 如权利要求9所述的多特异性抗体,其中该重链恒定区序列包含CH2结构域和CH3结构域,但不包含CH1结构域。

11. 如权利要求10所述的多特异性抗体,其中该CH2结构域包含野生型人IgG4 CH2结构域的序列(SEQ ID NO:36)。

12. 如权利要求10所述的多特异性抗体,其中该CH2结构域包含变体人IgG4 CH2结构域,该结构域包含F234A突变、L235A突变、或F234A突变和L235A突变两者。

13. 如权利要求10所述的多特异性抗体,其中该CH3结构域包含野生型人IgG4 CH3结构域的序列(SEQ ID NO:38)。

14. 如权利要求10所述的多特异性抗体,其中该CH3结构域包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366W突变(SEQ ID NO:39)。

15. 如权利要求10所述的多特异性抗体,其中该CH3结构域包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366S突变、L368A突变、和Y407V突变(SEQ ID NO:40)。

16. 如权利要求10所述的多特异性抗体,其进一步包含位于该仅重链可变区与该CH2结构域之间的铰链区序列。

17. 如权利要求16所述的多特异性抗体,其中该铰链区序列包含野生型人IgG4铰链区的序列(SEQ ID NO:32)。

18. 如权利要求16所述的多特异性抗体,其中该铰链区序列包含变体人IgG4铰链区序列,该序列包含S228P突变(SEQ ID NO:33)。

19. 如权利要求18所述的多特异性抗体,其进一步包含变体人IgG4 CH2结构域,该结构域包含F234A突变和L235A突变。

20. 如权利要求19所述的多特异性抗体,其进一步包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366W突变。

21. 如权利要求19所述的多特异性抗体,其进一步包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366S突变、L368A突变、和Y407V突变。

22. 如权利要求1-21中任一项所述的多特异性抗体,其进一步包含与La蛋白结合的第二结合单元。

23. 如权利要求22所述的多特异性抗体,其中该第二结合单元包含:

(a) 重链可变区,该重链可变区包含:

(i) 包含SEQ ID NO:4或7的序列中任一者的CDR1序列;和

(ii) 包含SEQ ID NO:5的序列的CDR2序列;以及

(iii) 包含SEQ ID NO:6或8的序列中任一者的CDR3序列;和

(b) 轻链可变区,该轻链可变区包含:

(i) 包含SEQ ID NO:9的序列的CDR1序列;和

(ii) 包含SEQ ID NO:10的序列的CDR2序列;以及

(iii) 包含SEQ ID NO:11的序列的CDR3序列。

24. 如权利要求23所述的多特异性抗体,其中该第二结合单元的重链可变区包含:

(i) 包含SEQ ID NO:4的序列的CDR1序列、包含SEQ IDNO:5的序列的CDR2序列、和包含SEQ ID NO:6的序列的CDR3序列;或

(i) 包含SEQ ID NO:7的序列的CDR1序列、包含SEQ IDNO:5的序列的CDR2序列、和包含SEQ ID NO:8的序列的CDR3序列。

25. 如权利要求23-24中任一项所述的多特异性抗体,其中该第二结合单元的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3序列存在于人VH框架中。

26. 如权利要求23-25中任一项所述的多特异性抗体,其中该第二结合单元的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3序列存在于人VL框架中。

27. 如权利要求26所述的多特异性抗体,其中该人VL框架是人V κ 框架。

28. 如权利要求26所述的多特异性抗体,其中该人VL框架是人V λ 框架。

29. 如权利要求22-28中任一项所述的多特异性抗体,其中该第二结合单元包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含与SEQ ID NO:14具有至少95%序列同一性的序列,该轻链可变区包含与SEQ ID NO:16具有至少95%序列同一性的序列。

30. 如权利要求29所述的多特异性抗体,其中该第二结合单元包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:14的序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:16的序列。

31. 如权利要求22-28中任一项所述的多特异性抗体,其中该第二结合单元包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含与SEQ ID NO:15具有至少95%序列同一性的序列,该轻链可变区包含与SEQ ID NO:17具有至少95%序列同一性的序列。

32. 如权利要求31所述的多特异性抗体,其中该第二结合单元包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:15的序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:17的序列。

33. 如权利要求23-32中任一项所述的多特异性抗体,其中该第二结合单元的重链可变区和轻链可变区在该多特异性抗体的共同多肽亚基上,并且通过接头序列连接。

34. 如权利要求23-32中任一项所述的多特异性抗体,其中该第二结合单元的重链可变

区和轻链可变区在该多特异性抗体的不同多肽亚基上。

35. 如权利要求22-34中任一项所述的多特异性抗体,其中该第二结合单元进一步包含重链恒定区。

36. 如权利要求35所述的多特异性抗体,其中该重链恒定区包含CH1结构域、铰链区、CH2结构域、和CH3结构域。

37. 如权利要求36所述的多特异性抗体,其中该CH2结构域包含野生型人IgG4 CH2结构域的序列(SEQ ID NO:36)。

38. 如权利要求36所述的多特异性抗体,其中该CH2结构域包含变体人IgG4 CH2结构域,该结构域包含F234A突变、L235A突变、或F234A突变和L235A突变两者。

39. 如权利要求36所述的多特异性抗体,其中该CH3结构域包含野生型人IgG4 CH3结构域的序列(SEQ ID NO:38)。

40. 如权利要求36所述的多特异性抗体,其中该CH3结构域包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366W突变(SEQ ID NO:39)。

41. 如权利要求36所述的多特异性抗体,其中该CH3结构域包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366S突变、L368A突变、和Y407V突变(SEQ ID NO:40)。

42. 如权利要求36所述的多特异性抗体,其中该铰链区包含野生型人IgG4铰链区的序列(SEQ ID NO:32)。

43. 如权利要求36所述的多特异性抗体,其中该铰链区包含变体人IgG4铰链区序列,该序列包含S228P突变(SEQ ID NO:33)。

44. 如权利要求43所述的多特异性抗体,其进一步包含变体人IgG4 CH2结构域,该结构域包含F234A突变和L235A突变。

45. 如权利要求44所述的多特异性抗体,其进一步包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366W突变。

46. 如权利要求44所述的多特异性抗体,其进一步包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366S突变、L368A突变、和Y407V突变。

47. 如权利要求22-46中任一项所述的多特异性抗体,其中该第二结合单元进一步包含轻链恒定区。

48. 如权利要求47所述的多特异性抗体,其中该轻链恒定区包含人V κ 恒定区序列。

49. 如权利要求47所述的多特异性抗体,其中该轻链恒定区包含人V λ 恒定区序列。

50. 如权利要求1-49中任一项所述的多特异性抗体,其是双特异性抗体。

51. 一种多特异性抗体,其包含:

(a) 与La蛋白结合的第一结合单元,该第一结合单元包含:

(i) 重链可变区,该重链可变区包含:在人VH框架中的SEQ ID NO:4或7的CDR1序列、SEQ ID NO:5的CDR2序列、和SEQ IDNO:6或8的CDR3序列;和

(ii) 轻链可变区,该轻链可变区包含:在人VL框架中的SEQ ID NO:9的CDR1序列、SEQ ID NO:10的CDR2序列、和SEQ ID NO:11的CDR3序列;以及

(b) 与BCMA结合的第二结合单元,该第二结合单元包含:

(i) 抗BCMA仅重链抗体的抗原结合结构域,该抗原结合结构域包含在人VH框架中的SEQ ID NO:1的CDR1序列、SEQ ID NO:2的CDR2序列、和SEQ ID NO:3的CDR3序列,其中该抗BCMA

仅重链抗体的抗原结合结构域呈单价或二价构型。

52. 如权利要求51所述的多特异性抗体,其中该第一结合单元的重链可变区和轻链可变区在该多特异性抗体的共同多肽亚基上,并且通过接头序列连接。

53. 如权利要求51所述的多特异性抗体,其中该第一结合单元的重链可变区和轻链可变区在该多特异性抗体的不同多肽亚基上。

54. 如权利要求51-53中任一项所述的多特异性抗体,其中该第一结合单元的重链可变区包含:

(i) SEQ ID NO:4的CDR1序列、SEQ ID NO:5的CDR2序列、和SEQ ID NO:6的CDR3序列;或

(ii) SEQ ID NO:7的CDR1序列、SEQ ID NO:5的CDR2序列、和SEQ ID NO:8的CDR3序列。

55. 如权利要求51-54中任一项所述的多特异性抗体,其中该人VL框架是人V κ 框架。

56. 如权利要求51-54中任一项所述的多特异性抗体,其中该人VL框架是人V λ 框架。

57. 如权利要求51-56中任一项所述的多特异性抗体,其中该第一结合单元的重链可变区包含与SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15具有至少95%同一性的序列。

58. 如权利要求57所述的多特异性抗体,其中该第一结合单元的重链可变区包含SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15的序列。

59. 如权利要求51-58中任一项所述的多特异性抗体,其中该第一结合单元的轻链可变区包含与SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17具有至少95%同一性的序列。

60. 如权利要求59所述的多特异性抗体,其中该第一结合单元的轻链可变区包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17的序列。

61. 如权利要求51-60中任一项所述的多特异性抗体,其中该抗BCMA仅重链抗体的抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:12的序列具有至少95%同一性的可变区序列。

62. 如权利要求61所述的多特异性抗体,其中该抗BCMA仅重链抗体的抗原结合结构域包含具有SEQ ID NO:12的序列的可变区序列。

63. 如权利要求51-62中任一项所述的多特异性抗体,其中该抗BCMA仅重链抗体的抗原结合结构域呈二价构型,并且包含接头序列。

64. 如权利要求63所述的多特异性抗体,其中该接头序列包含G4S接头序列。

65. 如权利要求51-64中任一项所述的多特异性抗体,其中该第一结合单元进一步包含重链恒定区。

66. 如权利要求65所述的多特异性抗体,其中该重链恒定区包含CH1结构域、铰链区、CH2结构域、和CH3结构域。

67. 如权利要求66所述的多特异性抗体,其中该CH2结构域包含野生型人IgG4 CH2结构域的序列(SEQ ID NO:36)。

68. 如权利要求66所述的多特异性抗体,其中该CH2结构域包含变体人IgG4 CH2结构域,该结构域包含F234A突变、L235A突变、或F234A突变和L235A突变两者。

69. 如权利要求66所述的多特异性抗体,其中该CH3结构域包含野生型人IgG4 CH3结构域的序列(SEQ ID NO:38)。

70. 如权利要求66所述的多特异性抗体,其中该CH3结构域包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366W突变(SEQ ID NO:39)。

71. 如权利要求66所述的多特异性抗体,其中该CH3结构域包含变体人IgG4 CH3结构

域,该结构域包含T366S突变、L368A突变、和Y407V突变(SEQ ID NO:40)。

72.如权利要求66所述的多特异性抗体,其中该铰链区包含野生型人IgG4铰链区的序列(SEQ ID NO:32)。

73.如权利要求66所述的多特异性抗体,其中该铰链区包含变体人IgG4铰链区序列,该序列包含S228P突变(SEQ ID NO:33)。

74.如权利要求73所述的多特异性抗体,其进一步包含变体人IgG4 CH2结构域,该结构域包含F234A突变和L235A突变。

75.如权利要求74所述的多特异性抗体,其进一步包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366W突变。

76.如权利要求74所述的多特异性抗体,其进一步包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366S突变、L368A突变、和Y407V突变。

77.如权利要求51-76中任一项所述的多特异性抗体,其中该第一结合单元进一步包含轻链恒定区。

78.如权利要求77所述的多特异性抗体,其中该轻链恒定区包含人V_K恒定区序列。

79.如权利要求77所述的多特异性抗体,其中该轻链恒定区包含人V_L恒定区序列。

80.如权利要求51-79中任一项所述的多特异性抗体,其中该第二结合单元进一步包含重链恒定区序列,CH1序列不存在。

81.如权利要求80所述的多特异性抗体,其中该重链恒定区序列包含CH2结构域和CH3结构域,但不包含CH1结构域。

82.如权利要求81所述的多特异性抗体,其中该CH2结构域包含野生型人IgG4 CH2结构域的序列(SEQ ID NO:36)。

83.如权利要求81所述的多特异性抗体,其中该CH2结构域包含变体人IgG4 CH2结构域,该结构域包含F234A突变、L235A突变、或F234A突变和L235A突变两者。

84.如权利要求81所述的多特异性抗体,其中该CH3结构域包含野生型人IgG4 CH3结构域的序列(SEQ ID NO:38)。

85.如权利要求81所述的多特异性抗体,其中该CH3结构域包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366W突变(SEQ ID NO:39)。

86.如权利要求81所述的多特异性抗体,其中该CH3结构域包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366S突变、L368A突变、和Y407V突变(SEQ ID NO:40)。

87.如权利要求81所述的多特异性抗体,其中该铰链区包含野生型人IgG4铰链区的序列(SEQ ID NO:32)。

88.如权利要求81所述的多特异性抗体,其中该铰链区包含变体人IgG4铰链区序列,该序列包含S228P突变(SEQ ID NO:33)。

89.如权利要求88所述的多特异性抗体,其进一步包含变体人IgG4 CH2结构域,该结构域包含F234A突变和L235A突变。

90.如权利要求89所述的多特异性抗体,其进一步包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366W突变。

91.如权利要求89所述的多特异性抗体,其进一步包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366S突变、L368A突变、和Y407V突变。

92. 如权利要求51-91中任一项所述的多特异性抗体,其是双特异性抗体。
93. 一种与BCMA和La蛋白结合的双特异性三链抗体样分子,其包含:
- (a) 包含SEQ ID NO:18的序列的第一重链多肽亚基;
 - (b) 包含SEQ ID NO:24的序列的第二重链多肽亚基;以及
 - (c) 包含SEQ ID NO:20的序列的第一轻链多肽亚基。
94. 一种与BCMA和La蛋白结合的双特异性三链抗体样分子,其包含:
- (a) 包含SEQ ID NO:18的序列的第一重链多肽亚基;
 - (b) 包含SEQ ID NO:26的序列的第二重链多肽亚基;以及
 - (c) 包含SEQ ID NO:20的序列的第一轻链多肽亚基。
95. 一种与BCMA和La蛋白结合的双特异性三链抗体样分子,其包含:
- (a) 包含SEQ ID NO:21的序列的第一重链多肽亚基;
 - (b) 包含SEQ ID NO:24的序列的第二重链多肽亚基;以及
 - (c) 包含SEQ ID NO:23的序列的第一轻链多肽亚基。
96. 一种与BCMA和La蛋白结合的双特异性三链抗体样分子,其包含:
- (a) 包含SEQ ID NO:21的序列的第一重链多肽亚基;
 - (b) 包含SEQ ID NO:26的序列的第二重链多肽亚基;以及
 - (c) 包含SEQ ID NO:23的序列的第一轻链多肽亚基。
97. 一种与BCMA和La蛋白结合的双特异性三链抗体样分子,其包含:
- (a) 包含SEQ ID NO:19的序列的第一重链多肽亚基;
 - (b) 包含SEQ ID NO:25的序列的第二重链多肽亚基;以及
 - (c) 包含SEQ ID NO:20的序列的第一轻链多肽亚基。
98. 一种与BCMA和La蛋白结合的双特异性三链抗体样分子,其包含:
- (a) 包含SEQ ID NO:19的序列的第一重链多肽亚基;
 - (b) 包含SEQ ID NO:27的序列的第二重链多肽亚基;以及
 - (c) 包含SEQ ID NO:20的序列的第一轻链多肽亚基。
99. 一种与BCMA和La蛋白结合的双特异性三链抗体样分子,其包含:
- (a) 包含SEQ ID NO:22的序列的第一重链多肽亚基;
 - (b) 包含SEQ ID NO:25的序列的第二重链多肽亚基;以及
 - (c) 包含SEQ ID NO:23的序列的第一轻链多肽亚基。
100. 一种与BCMA和La蛋白结合的双特异性三链抗体样分子,其包含:
- (a) 包含SEQ ID NO:22的序列的第一重链多肽亚基;
 - (b) 包含SEQ ID NO:27的序列的第二重链多肽亚基;以及
 - (c) 包含SEQ ID NO:23的序列的第一轻链多肽亚基。
101. 一种药物组合物,其包含如权利要求1至100中任一项所述的抗体。
102. 一种用于治疗特征在于BCMA的表达的B细胞障碍的方法,其包括向患有所述障碍的受试者施用如权利要求1至100中任一项所述的抗体或如权利要求101所述的药物组合物。
103. 如权利要求1至100中任一项所述的抗体在制备用于治疗特征在于BCMA的表达的B细胞障碍的药物中的用途。

104. 如权利要求1至100中任一项所述的抗体,其用于在治疗特征在于BCMA的表达的B细胞障碍中使用。

105. 如权利要求102-104中任一项所述的方法、用途或抗体,其中该障碍是多发性骨髓瘤(MM)。

106. 如权利要求102-104中任一项所述的方法、用途或抗体,其中该障碍是自身免疫性障碍。

107. 如权利要求106所述的方法、用途或抗体,其中该自身免疫性障碍是系统性红斑狼疮(SLE)。

108. 如权利要求106所述的方法、用途或抗体,其中该自身免疫性障碍是类风湿性关节炎(RA)。

109. 如权利要求106所述的方法、用途或抗体,其中该自身免疫性障碍是多发性硬化(MS)。

110. 一种多核苷酸,其编码如权利要求1至100中任一项所述的抗体。

111. 一种载体,其包含如权利要求110所述的多核苷酸。

112. 一种细胞,其包含如权利要求111所述的载体。

113. 一种产生如权利要求1至100中任一项所述的抗体的方法,其包括在允许该抗体表达的条件下生长如权利要求112所述的细胞,以及从该细胞中分离该抗体。

114. 一种制备如权利要求1至100中任一项所述的抗体的方法,其包括用BCMA对UniRat动物进行免疫,以及鉴定BCMA结合重链序列。

115. 一种治疗方法,其包括向有需要的个体施用有效剂量的如权利要求1至100中任一项所述的抗体,或如权利要求101所述的药物组合物。

与BCMA结合的多特异性抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年6月30日提交的美国临时专利申请序列号63/046,477的提交日期的优先权益,该临时专利申请的披露内容通过援引以其全文并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及与BCMA结合的多特异性人重链抗体(例如,UniAbs™)。本发明进一步涉及制备此类抗体的方法,包含此类抗体的组合物,包括药物组合物,及其治疗特征在于BCMA的表达的障碍的用途。

背景技术

[0004] B细胞成熟抗原(BCMA)

[0005] BCMA,也被称为肿瘤坏死因子超家族成员17(TNFRSF17)(UniProt Q02223),是一种仅在浆细胞和浆母细胞上表达的细胞表面受体。BCMA是肿瘤坏死因子(TNF)超家族中两种配体的受体:APRIL(增殖诱导配体,也被称为TNFSF13;TALL-2和TRDL-1;BCMA的高亲和力配体)和B细胞激活因子(BAFF)(也被称为BLyS;TALL-1;THANK;zTNF4;TNFSF20;和D8Ert387e;BCMA的低亲和力配体)。APRIL和BAFF是结合BCMA并促进浆细胞存活的生长因子。BCMA在人多发性骨髓瘤(MM)的恶性浆细胞上也高度表达。与BCMA结合的抗体描述于例如Gras等人,1995,Int.Immunol.[国际免疫学]7:1093-1106、WO 200124811和WO 200124812中。与TACI交叉反应的抗BCMA抗体描述于WO 2002/066516中。针对BCMA和CD3的双特异性抗体描述于例如US 2013/0156769 A1和US2015/0376287A1中。据报告,抗BCMA抗体-MMAE或-MMAF缀合物选择性诱导多发性骨髓瘤细胞的杀伤(Tai等人,Blood[血液]2014,123(20):3128-38)。Ali等人,Blood[血液]2016,128(13):1688-700报告了在临床试验(#NCT02215967)中,靶向BCMA的嵌合抗原受体(CAR)T细胞使得人患者中的多发性骨髓瘤得以缓解。

[0006] 重链抗体

[0007] 在常规IgG抗体中,重链和轻链的缔合部分是由于轻链恒定区与重链的CH1恒定结构域之间的疏水性相互作用。重链框架2(FR2)和框架4(FR4)区中存在额外的残基,这也有助于重链与轻链之间的疏水性相互作用。

[0008] 然而,已知骆驼科(包括骆驼、单峰骆驼和美洲驼的胼足亚目)的血清含有一种主要类型的抗体,其仅由成对的H链构成(仅重链抗体或UniAbs™)。骆驼科(单峰驼(Camelus dromedarius)、双峰驼(Camelus bactrianus)、驼羊(Lama glama)、原驼(Lama guanaco)、羊驼(Lama alpaca)和小羊驼(Lama vicugna))的UniAbs™具有独特的结构,由单个可变结构域(VHH)、铰链区和两个恒定结构域(CH2和CH3)组成,它们与经典抗体的CH2和CH3结构域高度同源。这些UniAbs™缺乏存在于基因组中的恒定区的第一结构域(CH1),但在mRNA加工期间被剪接掉。CH1结构域的缺失解释了UniAbs™中轻链的缺失,因为此结构域是轻链的恒定结构域的锚定位置。此类UniAbs™自然进化为通过来自常规抗体或其片段的三种CDR而赋

予抗原结合特异性和高亲和力(Muyldermans,2001;J Biotechnol[生物技术期刊]74:277-302;Revets等人,2005;Expert Opin Biol Ther[生物治疗专家观点]5:111-124)。软骨鱼类,诸如鲨鱼也进化出一种独特的免疫球蛋白,被称为IgNAR,它缺乏轻多肽链,并且完全由重链构成。IgNAR分子可以通过分子工程化以产生单个重链多肽(vNAR)的可变结构域来操纵(Nuttall等人Eur.J.Biochem.[欧洲生物化学杂志]270,3543-3554(2003);Nuttall等人Function and Bioinformatics[功能与生物信息学]55,187-197(2004);Dooley等人,Molecular Immunology[分子免疫学]40,25-33(2003))。

[0009] 没有轻链的仅重链抗体结合抗原的能力是在20世纪60年代建立的(Jaton等人(1968)Biochemistry[生物化学],7,4185-4195)。与轻链物理分离的重链免疫球蛋白相对于四聚体抗体保留了80%的抗原结合活性。Sitia等人(1990)Cell[细胞],60,781-790证明了从重排的小鼠 μ 基因中去除CH1结构域导致在哺乳动物细胞培养中产生没有轻链的仅重链抗体。所产生的抗体保留了VH结合特异性和效应子功能。

[0010] 通过免疫可以产生针对多种抗原具有高特异性和亲和力的重链抗体(van der Linden,R.H.等人Biochim.Biophys.Acta.[生物化学与生物物理学报]1431,37-46(1999)),并且可以在酵母中容易地克隆并表达VHH部分(Frenken,L.G.J.等人J.Biotechnol.[生物技术期刊]78,11-21(2000))。它们的表达水平、溶解性和稳定性显著高于经典F(ab)或Fv片段(Ghahroudi,M.A.等人FEBS Lett.[欧洲生物化学学会联合会快报]414,521-526(1997))。

[0011] 其中 λ (lambda)轻(L)链基因座和/或 λ 和 κ (kappa)L链基因座已被功能沉默的小鼠以及由此类小鼠产生的抗体描述于美国专利号7,541,513和8,367,888中。例如,例如在以下中已经报告了在小鼠和大鼠中重组产生仅重链抗体:WO 2006008548;美国专利公布号20100122358;Nguyen等人,2003,Immunology[免疫学];109(1),93-101;Brüggemann等人,Crit.Rev.Immunol.[免疫学评论综述];2006,26(5):377-90;以及Zou等人,2007,J Exp Med[实验医学杂志];204(13):3271-3283。通过锌指核酸酶的胚胎显微注射产生敲除大鼠描述于Geurts等人,2009,Science[科学],325(5939):433中。可溶性仅重链抗体和包含产生此类抗体的异源重链基因座的转基因啮齿类动物描述于美国专利号8,883,150和9,365,655中。包含单结构域抗体作为结合(靶向)结构域的CAR-T结构描述于例如Iri-Sofla等人,2011,Experimental Cell Research[实验细胞研究]317:2630-2641和Jamnani等人,2014,Biochim Biophys Acta[生物化学与生物物理学报],1840:378-386中。

发明内容

[0012] 本发明的各方面涉及与BCMA结合的抗体,诸如重链抗体,包括但不限于UniAbs™。本发明的另外方面涉及制备此类抗体的方法,包含此类抗体的组合物,及其在治疗特征在于BCMA的表达的B细胞障碍中的用途。

[0013] 本发明的各方面包括与BCMA结合的多特异性抗体,其包含具有可变区的第一结合单元,该可变区包含与SEQ ID NO:3具有至少85%序列同一性的CDR3序列。

[0014] 本发明的各方面包括与BCMA结合的多特异性抗体,其包含具有可变区的第一结合单元,该可变区包含CDR1序列、CDR2序列、和CDR3序列,其中这些组合的CDR1、CDR2和CDR3序列与组合的SEQ ID NO:1-3具有至少85%序列同一性。

[0015] 本发明的各方面包括与BCMA结合的多特异性抗体,其包含具有可变区的第一结合单元,该可变区包含:包含SEQ ID NO:1的序列的CDR1序列;包含SEQ ID NO:2的序列的CDR2序列;以及包含SEQ ID NO:3的序列的CDR3序列。

[0016] 在一些实施例中,这些CDR1、CDR2和CDR3序列存在于人VH框架中。在一些实施例中,该可变区是仅重链可变区。在一些实施例中,该可变区包含与SEQ ID NO:12具有至少95%序列同一性的序列。在一些实施例中,该可变区包含具有SEQ ID NO:12的序列。在一些实施例中,该可变区呈单价或二价构型。

[0017] 在一些实施例中,多特异性抗体进一步包含重链恒定区序列,CH1序列不存在。在一些实施例中,重链恒定区序列包含CH2结构域和CH3结构域,但不包含CH1结构域。在一些实施例中,该CH2结构域包含野生型人IgG4 CH2结构域的序列(SEQ ID NO:36)。

[0018] 在一些实施例中,该CH2结构域包含变体人IgG4 CH2结构域,该结构域包含F234A突变、L235A突变、或F234A突变和L235A突变两者。在一些实施例中,该CH3结构域包含野生型人IgG4 CH3结构域的序列(SEQ ID NO:38)。在一些实施例中,该CH3结构域包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366W突变(SEQ ID NO:39)。在一些实施例中,该CH3结构域包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366S突变、L368A突变、和Y407V突变(SEQ ID NO:40)。

[0019] 在一些实施例中,多特异性抗体进一步包含位于该仅重链可变区与该CH2结构域之间的铰链区序列。在一些实施例中,该铰链区序列包含野生型人IgG4铰链区的序列(SEQ ID NO:32)。在一些实施例中,该铰链区序列包含变体人IgG4铰链区序列,该序列包含S228P突变(SEQ ID NO:33)。

[0020] 在一些实施例中,多特异性抗体进一步包含变体人IgG4 CH2结构域,该结构域包含F234A突变和L235A突变。在一些实施例中,多特异性抗体进一步包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366W突变。在一些实施例中,多特异性抗体进一步包含变体人IgG4CH3结构域,该结构域包含T366S突变、L368A突变、和Y407V突变。

[0021] 在一些实施例中,多特异性抗体进一步包含与La蛋白结合的第二结合单元。在一些实施例中,该第二结合单元包含:(a)重链可变区,该重链可变区包含:(i)包含SEQ ID NO:4或7的序列中任一者的CDR1序列;和(ii)包含SEQ ID NO:5的序列的CDR2序列;以及(iii)包含SEQ ID NO:6或8的序列中任一者的CDR3序列;和(b)轻链可变区,该轻链可变区包含:(i)包含SEQ ID NO:9的序列的CDR1序列;和(ii)包含SEQ ID NO:10的序列的CDR2序列;以及(iii)包含SEQ ID NO:11的序列的CDR3序列。

[0022] 在一些实施例中,该第二结合单元的重链可变区包含:(i)包含SEQ ID NO:4的序列的CDR1序列、包含SEQ ID NO:5的序列的CDR2序列、和包含SEQ ID NO:6的序列的CDR3序列;或(ii)包含SEQ ID NO:7的序列的CDR1序列、包含SEQ ID NO:5的序列的CDR2序列、和包含SEQ ID NO:8的序列的CDR3序列。

[0023] 在一些实施例中,该第二结合单元的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3序列存在于人VH框架中。在一些实施例中,该第二结合单元的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3序列存在于人VL框架中。在一些实施例中,该人VL框架是人V_K框架。在一些实施例中,该人VL框架是人V_λ框架。

[0024] 在一些实施例中,该第二结合单元包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区

包含与SEQ ID NO:14具有至少95%序列同一性的序列,该轻链可变区包含与SEQ ID NO:16具有至少95%序列同一性的序列。在一些实施例中,该第二结合单元包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:14的序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:16的序列。在一些实施例中,该第二结合单元包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含与SEQ ID NO:15具有至少95%序列同一性的序列,该轻链可变区包含与SEQ ID NO:17具有至少95%序列同一性的序列。在一些实施例中,该第二结合单元包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:15的序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:17的序列。

[0025] 在一些实施例中,该第二结合单元的重链可变区和轻链可变区在该多特异性抗体的共同多肽亚基上,并且通过接头序列连接。在一些实施例中,该第二结合单元的重链可变区和轻链可变区在该多特异性抗体的不同多肽亚基上。

[0026] 在一些实施例中,该第二结合单元进一步包含重链恒定区。在一些实施例中,该重链恒定区包含CH1结构域、铰链区、CH2结构域、和CH3结构域。在一些实施例中,该CH2结构域包含野生型人IgG4CH2结构域的序列(SEQ ID NO:36)。在一些实施例中,该CH2结构域包含变体人IgG4 CH2结构域,该结构域包含F234A突变、L235A突变、或F234A突变和L235A突变两者。在一些实施例中,该CH3结构域包含野生型人IgG4 CH3结构域的序列(SEQ ID NO:38)。在一些实施例中,该CH3结构域包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366W突变(SEQ ID NO:39)。在一些实施例中,该CH3结构域包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366S突变、L368A突变、和Y407V突变(SEQ ID NO:40)。在一些实施例中,该铰链区包含野生型人IgG4铰链区的序列(SEQ ID NO:32)。在一些实施例中,该铰链区包含变体人IgG4铰链区序列,该序列包含S228P突变(SEQ ID NO:33)。

[0027] 在一些实施例中,多特异性抗体进一步包含变体人IgG4 CH2结构域,该结构域包含F234A突变和L235A突变。在一些实施例中,多特异性抗体进一步包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366W突变。在一些实施例中,多特异性抗体进一步包含变体人IgG4CH3结构域,该结构域包含T366S突变、L368A突变、和Y407V突变。

[0028] 在一些实施例中,该第二结合单元进一步包含轻链恒定区。在一些实施例中,轻链恒定区包含人V_k恒定区序列。在一些实施例中,轻链恒定区包含人V_λ恒定区序列。在一些实施例中,该多特异性抗体是双特异性抗体。

[0029] 本发明的各方面包括多特异性抗体,其包含:(a)与La蛋白结合的第一结合单元,该第一结合单元包含:(i)重链可变区,该重链可变区包含:在人VH框架中的SEQ ID NO:4或7的CDR1序列、SEQ ID NO:5的CDR2序列、和SEQ ID NO:6或8的CDR3序列;和(ii)轻链可变区,该轻链可变区包含:在人VL框架中的SEQ ID NO:9的CDR1序列、SEQ ID NO:10的CDR2序列、和SEQ ID NO:11的CDR3序列;以及(b)与BCMA结合的第二结合单元,该第二结合单元包含:(i)抗BCMA仅重链抗体的抗原结合结构域,该抗原结合结构域包含在人VH框架中的SEQ ID NO:1的CDR1序列、SEQ ID NO:2的CDR2序列、和SEQ ID NO:3的CDR3序列,其中该抗BCMA仅重链抗体的抗原结合结构域呈单价或二价构型。

[0030] 在一些实施例中,该第一结合单元的重链可变区和轻链可变区在该多特异性抗体的共同多肽亚基上,并且通过接头序列连接。在一些实施例中,该第一结合单元的重链可变区和轻链可变区在该多特异性抗体的不同多肽亚基上。

[0031] 在一些实施例中,该第一结合单元的重链可变区包含:(i)SEQ ID NO:4的CDR1序

列、SEQ ID NO:5的CDR2序列、和SEQ ID NO:6的CDR3序列;或(ii)SEQ ID NO:7的CDR1序列、SEQ ID NO:5的CDR2序列、和SEQ ID NO:8的CDR3序列。在一些实施例中,该人VL框架是人V κ 框架。在一些实施例中,该人VL框架是人V λ 框架。在一些实施例中,该第一结合单元的重链可变区包含与SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15具有至少95%同一性的序列。在一些实施例中,该第一结合单元的重链可变区包含SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15的序列。在一些实施例中,该第一结合单元的轻链可变区包含与SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17具有至少95%同一性的序列。在一些实施例中,该第一结合单元的轻链可变区包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17的序列。在一些实施例中,该抗BCMA仅重链抗体的抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:12的序列具有至少95%同一性的可变区序列。在一些实施例中,该抗BCMA仅重链抗体的抗原结合结构域包含具有SEQ ID NO:12的序列的可变区序列。

[0032] 在一些实施例中,该抗BCMA仅重链抗体的抗原结合结构域呈二价构型,并且包含接头序列。在一些实施例中,该接头序列包含G4S接头序列。

[0033] 在一些实施例中,该第一结合单元进一步包含重链恒定区。在一些实施例中,该重链恒定区包含CH1结构域、铰链区、CH2结构域、和CH3结构域。在一些实施例中,该CH2结构域包含野生型人IgG4CH2结构域的序列(SEQ ID NO:36)。在一些实施例中,该CH2结构域包含变体人IgG4 CH2结构域,该结构域包含F234A突变、L235A突变、或F234A突变和L235A突变两者。在一些实施例中,该CH3结构域包含野生型人IgG4 CH3结构域的序列(SEQ ID NO:38)。在一些实施例中,该CH3结构域包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366W突变(SEQ ID NO:39)。在一些实施例中,该CH3结构域包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366S突变、L368A突变、和Y407V突变(SEQ ID NO:40)。在一些实施例中,该铰链区包含野生型人IgG4铰链区的序列(SEQ ID NO:32)。在一些实施例中,该铰链区包含变体人IgG4铰链区序列,该序列包含S228P突变(SEQ ID NO:33)。

[0034] 在一些实施例中,多特异性抗体进一步包含变体人IgG4 CH2结构域,该结构域包含F234A突变和L235A突变。在一些实施例中,多特异性抗体进一步包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366W突变。在一些实施例中,多特异性抗体进一步包含变体人IgG4CH3结构域,该结构域包含T366S突变、L368A突变、和Y407V突变。

[0035] 在一些实施例中,该第一结合单元进一步包含轻链恒定区。在一些实施例中,轻链恒定区包含人V κ 恒定区序列。在一些实施例中,轻链恒定区包含人V λ 恒定区序列。

[0036] 在一些实施例中,该第二结合单元进一步包含重链恒定区序列,CH1序列不存在。在一些实施例中,该重链恒定区序列包含CH2结构域和CH3结构域,但不包含CH1结构域。在一些实施例中,该CH2结构域包含野生型人IgG4 CH2结构域的序列(SEQ ID NO:36)。在一些实施例中,该CH2结构域包含变体人IgG4 CH2结构域,该结构域包含F234A突变、L235A突变、或F234A突变和L235A突变两者。在一些实施例中,该CH3结构域包含野生型人IgG4 CH3结构域的序列(SEQ ID NO:38)。在一些实施例中,该CH3结构域包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366W突变(SEQ ID NO:39)。在一些实施例中,该CH3结构域包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366S突变、L368A突变、和Y407V突变(SEQ ID NO:40)。在一些实施例中,该铰链区包含野生型人IgG4铰链区的序列(SEQ ID NO:32)。在一些实施例中,该铰链区包含变体人IgG4铰链区序列,该序列包含S228P突变(SEQ ID NO:33)。

[0037] 在一些实施例中,多特异性抗体进一步包含变体人IgG4 CH2结构域,该结构域包

含F234A突变和L235A突变。在一些实施例中,多特异性抗体进一步包含变体人IgG4 CH3结构域,该结构域包含T366W突变。在一些实施例中,多特异性抗体进一步包含变体人IgG4CH3结构域,该结构域包含T366S突变、L368A突变、和Y407V突变。在一些实施例中,该多特异性抗体是双特异性抗体。

[0038] 本发明的各方面包括与BCMA和La蛋白结合的双特异性三链抗体样分子,其包含:(a)包含SEQ ID NO:18的序列的第一重链多肽亚基;(b)包含SEQ ID NO:24的序列的第二重链多肽亚基;以及(c)包含SEQ ID NO:20的序列的第一轻链多肽亚基。

[0039] 本发明的各方面包括与BCMA和La蛋白结合的双特异性三链抗体样分子,其包含:(a)包含SEQ ID NO:18的序列的第一重链多肽亚基;(b)包含SEQ ID NO:26的序列的第二重链多肽亚基;以及(c)包含SEQ ID NO:20的序列的第一轻链多肽亚基。

[0040] 本发明的各方面包括与BCMA和La蛋白结合的双特异性三链抗体样分子,其包含:(a)包含SEQ ID NO:21的序列的第一重链多肽亚基;(b)包含SEQ ID NO:24的序列的第二重链多肽亚基;以及(c)包含SEQ ID NO:23的序列的第一轻链多肽亚基。

[0041] 本发明的各方面包括与BCMA和La蛋白结合的双特异性三链抗体样分子,其包含:(a)包含SEQ ID NO:21的序列的第一重链多肽亚基;(b)包含SEQ ID NO:26的序列的第二重链多肽亚基;以及(c)包含SEQ ID NO:23的序列的第一轻链多肽亚基。

[0042] 本发明的各方面包括与BCMA和La蛋白结合的双特异性三链抗体样分子,其包含:(a)包含SEQ ID NO:19的序列的第一重链多肽亚基;(b)包含SEQ ID NO:25的序列的第二重链多肽亚基;以及(c)包含SEQ ID NO:20的序列的第一轻链多肽亚基。

[0043] 本发明的各方面包括与BCMA和La蛋白结合的双特异性三链抗体样分子,其包含:(a)包含SEQ ID NO:19的序列的第一重链多肽亚基;(b)包含SEQ ID NO:27的序列的第二重链多肽亚基;以及(c)包含SEQ ID NO:20的序列的第一轻链多肽亚基。

[0044] 本发明的各方面包括与BCMA和La蛋白结合的双特异性三链抗体样分子,其包含:(a)包含SEQ ID NO:22的序列的第一重链多肽亚基;(b)包含SEQ ID NO:25的序列的第二重链多肽亚基;以及(c)包含SEQ ID NO:23的序列的第一轻链多肽亚基。

[0045] 本发明的各方面包括与BCMA和La蛋白结合的双特异性三链抗体样分子,其包含:(a)包含SEQ ID NO:22的序列的第一重链多肽亚基;(b)包含SEQ ID NO:27的序列的第二重链多肽亚基;以及(c)包含SEQ ID NO:23的序列的第一轻链多肽亚基。

[0046] 本发明的各方面包括包含如本文所述的抗体的药物组合物。

[0047] 本发明的各方面包括用于治疗特征在于BCMA的表达的B细胞障碍的方法,其包括向患有所述障碍的受试者施用如本文所述的抗体或药物组合物。

[0048] 本发明的各方面包括如本文所述的抗体在制备用于治疗特征在于BCMA的表达的B细胞障碍的药物中的用途。

[0049] 本发明的各方面包括一种如本文所述的抗体,其用于在治疗特征在于BCMA的表达的B细胞障碍中使用。

[0050] 在一些实施例中,该障碍是多发性骨髓瘤(MM)。在一些实施例中,该障碍是自身免疫性障碍。在一些实施例中,该自身免疫性障碍是系统性红斑狼疮(SLE)。在一些实施例中,该自身免疫性障碍是类风湿性关节炎(RA)。在一个实施例中,该自身免疫性障碍是多发性硬化(MS)。

[0051] 本发明的各方面包括一种编码如本文所述的多核苷酸的抗体的多核苷酸。包含如本文所述的多核苷酸的载体,以及一种包含如本文所述的载体的细胞。

[0052] 本发明的各方面包括产生如本文所述的抗体的方法,其包括在允许该抗体表达的条件下生长如本文所述的细胞,以及从该细胞中分离该抗体。

[0053] 本发明的各方面包括制备如本文所述的抗体的方法,其包括用BCMA对UniRat动物进行免疫,以及鉴定BCMA结合重链序列。

[0054] 本发明的各方面包括治疗方法,其包括向有需要的个体施用有效剂量的如本文所述的抗体或药物组合物。

[0055] 这些和另外的方面将在本披露的其余部分(包括实例)中进一步解释。

附图说明

[0056] 图1-6是提供指示蛋白质的氨基酸序列的表。

[0057] 图7,分图A是包含三个多肽亚基的三链抗体样分子的示意图。第一结合单元由第一轻链多肽亚基和第一重链多肽亚基形成。第二重链多肽包含呈二价构型的仅重链可变区结构域,其提供第二结合单元。

[0058] 图7,分图B是包含三个多肽亚基的三链抗体样分子的示意图。第一结合单元由第一轻链多肽亚基和第一重链多肽亚基形成。第二重链多肽包含呈单价构型的仅重链可变区结构域,其提供第二结合单元。

[0059] 图8,分图A是包含如本文所述的抗BCMA细胞外结合结构域的CAR-T结构的示意图。

[0060] 图8,分图B是示出包含如本文所述的抗BCMA细胞外结合结构域的CAR构建体的抗原特异性结合和激活的图,在指示的细胞系中测试。

[0061] 图9,分图A是示出与MM1.S细胞结合的测试抗体的平均荧光强度(MFI)的图。

[0062] 图9,分图B是示出与H929细胞结合的测试抗体的平均荧光强度(MFI)的图。

[0063] 图10,分图A是示出指示在BCMA激动剂APRIL存在的情况下抗X**BCMA_F7E与BCMA结合的A450-A570值的图。

[0064] 图10,分图B是示出指示在BCMA激动剂APRIL存在的情况下抗X**BCMA_F7E_F7E与BCMA结合的A450-A570值的图。

[0065] 图10,分图C是示出指示在BCMA激动剂APRIL存在的情况下抗X**GP120_F8A与BCMA结合的A450-A570值的图。

具体实施方式

[0066] 除非另外指示,否则本披露的实践将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学、和免疫学的常规技术,这些技术都在本领域的技术范围内。此类技术在文献中有充分说明,诸如“Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册]”,第二版(Sambrook等人,1989);“Oligonucleotide Synthesis[寡核苷酸合成]”(M.J.Gait编辑,1984);“Animal Cell Culture[动物细胞培养]”(R.I.Freshney编辑,1987);“Methods in Enzymology[酶学方法]”(美国学术出版社(Academic Press,Inc.));“Current Protocols in Molecular Biology[最新分子生物学实验方法汇编]”(F.M.Ausubel等人编辑,1987,以及定期更新);“PCR:The Polymerase Chain Reaction

[PCR:聚合酶链式反应]”,(Mullis等人编辑,1994);“A Practical Guide to Molecular Cloning[分子克隆实用指南]”(Perbal Bernard V.,1988);“Phage Display:A Laboratory Manual[噬菌体展示:实验室手册]”(Barbas等人,2001);Harlow,Lane和Harlow,Using Antibodies:A Laboratory Manual:Portable Protocol No.I[使用抗体:实验室手册:I号便携式方案],冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory)(1998);以及Harlow和Lane,Antibodies:A Laboratory Manual[抗体:实验室手册],冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory);(1988)。

[0067] 在提供值范围的情况下,应当理解,在该范围的上限和下限之间的每个中间值(除非上下文另外明确说明,至下限单位的十分之一),以及在所述范围内的任何其他所述或中间值都包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在较小范围内,也包括在本发明内,受制于所述范围内任何特别排除的限制。在所述范围包括一个或两个限制的情况下,排除那些包括的限制中的任一个或两个的范围也包括在本发明中。

[0068] 除非另外指示,否则本文中的抗体残基根据Kabat编号系统进行编号(例如,Kabat等人,Sequences of Immunological Interest.[具有免疫学意义的序列]第5版美国公共卫生署,美国国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州(Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.)(1991))。

[0069] 在以下描述中,列出多个具体细节来提供对本发明的更完全理解。然而,对于本领域技术人员而言明显的是,本发明可以在没有一个是或多个这些具体细节的情况下实践。在其他情况下,本领域技术人员熟知的熟知特征和程序尚未被描述,以避免使本发明模糊。

[0070] 本披露引用的所有参考文献(包括专利申请和出版物)均通过援引以其全文并入本文。

[0071] I. 定义

[0072] “包含(comprising)”意指所列举的元素是组合物/方法/试剂盒中需要的,但也可以包括其他元素以形成权利要求范围内的组合物/方法/试剂盒等。

[0073] “基本上由…组成(consisting essentially of)”意指将所描述的组合物或方法的范围限制到不对主题发明的一个或多个基本和新颖特征产生实质性影响的指定材料或步骤。

[0074] “由…组成(consisting of)”意指从组合物、方法、或试剂盒中排除权利要求中未指定的任何元素、步骤、或成分。

[0075] 本文中的抗体残基根据Kabat编号系统和EU编号系统进行编号。在提及可变区中的残基时,通常使用Kabat编号系统(大约重链的残基1-113)(例如,Kabat等人,Sequences of Immunological Interest.[具有免疫学意义的序列]第5版美国公共卫生署,美国国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州(Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.)(1991))。在提及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时,通常使用“EU编号系统”或“EU索引”(例如,Kabat等人,同上中报告的EU索引)。“如Kabat中的EU索引”是指人IgG1 EU抗体的残基编号。除非本文另外说明,否则提及抗体的可变结构域中的残基号意指通过Kabat编号系统进行的残基编号。除非本文另外说明,否则提及抗体的恒定结构域中的残基号意指通过EU编号系统进行的残基编号。

[0076] 抗体,也被称为免疫球蛋白,通常包含至少一条重链和一条轻链,其中重链和轻链

的氨基末端结构域在序列上是可变的,因此通常被称为可变区结构域,或可变重(VH)或可变轻(VL)结构域。这两个结构域通常缔合以形成特异性结合区,尽管正如在此将要讨论的,特异性结合也可以用仅重链可变序列获得,并且本领域已知并使用各种非天然构型的抗体。

[0077] “功能性”或“生物活性”抗体或抗原结合分子(包括本文所述的仅重链抗体和多特异性(例如,双特异性)三链抗体样分子(TCA))是能够在结构、调节、生物化学或生物物理事件中发挥其一种或多种天然活性的分子。例如,功能性抗体或其他结合分子(例如,TCA)可以具有特异性结合抗原的能力,并且结合可以进而引发或改变细胞或分子事件,诸如信号转导或酶活性。功能性抗体或其他结合分子(例如,TCA)也可以阻断受体的配体激活或充当激动剂或拮抗剂。抗体或其他结合分子(例如,TCA)发挥其一种或多种天然活性的能力取决于若干因素,包括多肽链的适当折叠和组装。

[0078] 本文中的术语“抗体”以最广泛意义使用,并且具体涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、单体、二聚体、多聚体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、仅重链抗体、三链抗体、三链抗体样分子(TCA)、单链Fv(scFv)、纳米抗体等,并且还包括抗体片段,只要它们表现出所需的生物活性即可(Miller等人(2003) *Jour. of Immunology*[免疫学杂志]170:4854-4861)。抗体可以是鼠抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、或来源于其他物种的抗体。

[0079] 术语抗体可以是指全长重链、全长轻链、完整免疫球蛋白分子、或任何这些多肽亚基的免疫活性部分,即包含抗原结合位点的多肽,该抗原结合位点免疫特异性结合感兴趣的靶标或其部分的抗原,此类靶标包括但不限于癌细胞,或产生与自身免疫性疾病相关联的自身免疫性抗体的细胞。本文披露的免疫球蛋白可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、和IgA)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类的免疫球蛋白分子,包括具有改变的Fc部分的工程化亚类,这些亚类提供降低或增强的效应细胞活性。主题抗体的轻链可以是 κ 轻链(Vkappa)或 λ 轻链(Vlambda)。免疫球蛋白可以来源于任何物种。在一方面,免疫球蛋白大部分来自人类。

[0080] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指从基本上同源的抗体群获得的一种抗体,即,构成该群体的个别抗体除以微量存在的可能天然存在的突变外是一致的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原性位点。此外,与典型地包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。根据本发明的单克隆抗体可以通过首先由Kohler等人(1975) *Nature*[自然]256:495描述的杂交瘤方法制备,并且还可以经由例如重组蛋白生产方法(参见例如,美国专利号4,816,567)制备。

[0081] 如与抗体结合使用的术语“可变的”是指以下事实:抗体可变结构域的某些部分在抗体之间在序列上差异很大,并且用于每种特定抗体针对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性在整个抗体的可变结构域中并不均匀分布。在轻链可变结构域和重链可变结构域两者中,该可变性集中在被称为高变区的三个区段中。可变结构域的更高度保守的部分被称为框架区(FR)。天然的重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR,其主要采用 β -片层构型,通过三个高变区连接,这三个高变区形成环,这些环连接 β -片层结构并且在一些情况下形成 β -片层结构的一部分。每条链中的高变区通过FR紧密靠近地保持在一起,并且与来自另一条链的高变区一起有助于抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*[具有免疫学意义的蛋白质的序列],第5版,美

国公共卫生署,美国国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州(1991))。恒定结构域并不直接涉及抗体与抗原的结合,但是表现出不同效应子功能,诸如抗体参与抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0082] 当本文使用时,术语“高变区”是指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如,重链可变结构域中的残基31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白质的序列],第5版美国公共卫生署,美国国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州(1991))和/或来自“高变环”的那些残基(重链可变结构域中的残基26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3);Chothia和Lesk J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196:901-917(1987))。

[0083] 术语“CDR”及其复数“CDRs”是指其中三个构成轻链可变区(CDRL1、CDRL2和CDRL3)的结合特征和三个构成重链可变区(CDRH1、CDRH2和CDRH3)的结合特征的互补决定区(CDR)。CDR有助于抗体分子的功能活性,并且通过包含支架或框架区的氨基酸序列来分离。准确定义的CDR边界和长度受制于不同的分类和编号系统。

[0084] 本文示出了示例性CDR名称,然而,本领域技术人员将理解,CDR的许多定义是常用的,包括Kabat定义(参见“Zhao等人Agermline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions.[一种用于确定抗体互补性决定区的基于种系知识的计算方法]”Mol Immunol.[分子免疫学]2010;47:694-700),其是基于序列可变性并且是最常用的。Chothia定义是基于结构环区的位置(Chothia等人“Conformations of immunoglobulin hypervariable regions.[免疫球蛋白高变区的构象]”Nature.[自然]1989;342:877-883)。替代性的感兴趣的CDR定义包括但不限于由以下披露的那些:Honegger,“Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool.[免疫球蛋白可变结构域的又一种编号方案:自动建模和分析工具]”J Mol Biol.[分子生物学杂志]2001;309:657-670;Ofra等人“Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B cell epitopes.[互补决定区(CDR)的自动鉴定揭示了CDR和B细胞表位的特殊特征]”J Immunol.[免疫学杂志]2008;181:6230-6235;Almagro“Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size:implications for the rational design of antibody repertoires.[鉴定识别不同大小抗原的抗体的特异性决定残基的差异:对抗体库的合理设计的影响]”J Mol Recognit.[分子识别期刊]2004;17:132-143;以及Padlan等人“Identification of specificity-determining residues in antibodies.[抗体中特异性决定残基的鉴定]”Faseb J.[美国实验生物学会联合会杂志]1995;9:133-139.,其中的每一个具体地通过援引并入本文。

[0085] 在一个特定实施例中,“CDR”意指抗体的互补决定区,如在Lefranc,MP等人,IMGT, the international ImMunoGeneTics database[IMGT,国际免疫遗传学数据库],Nucleic Acids Res.[核酸研究],27:209-212(1999)中定义的。

[0086] “框架区”或“FR”残基是除如本文定义的高变区/CDR残基之外的那些可变结构域

残基。

[0087] 术语“仅重链抗体”和“重链抗体”在本文中可互换使用,并且在最广泛的意义上是指缺乏常规抗体的轻链的抗体。这些术语具体地包括但不限于在CH1结构域不存在的情况下包含VH抗原结合结构域以及CH2和CH3恒定结构域的同源二聚体抗体;此类抗体的功能性(抗原结合)变体、可溶性VH变体、包含一个可变结构域(V-NAR)和五个C样恒定结构域(C-NAR)的同源二聚体的Ig-NAR及其功能性片段;以及可溶性单结构域抗体(sUniDabs™)。在一个实施例中,仅重链抗体由可变区抗原结合结构域构成,该可变区抗原结合结构域由框架1、CDR1、框架2、CDR2、框架3、CDR3、和框架4构成。在另一个实施例中,仅重链抗体由抗原结合结构域、铰链区的至少一部分以及CH2和CH3结构域构成,CH1结构域不存在。在另一个实施例中,仅重链抗体由抗原结合结构域、铰链区的至少一部分、和CH2结构域构成。在另一个实施例中,仅重链抗体由抗原结合结构域、铰链区的至少一部分、和CH3结构域构成。本文还包括CH2和/或CH3结构域被截短的仅重链抗体。在另一个实施例中,仅重链抗体由抗原结合结构域和至少一个CH(CH1、CH2、CH3、或CH4)结构域构成,但没有铰链区。在另一个实施例中,仅重链抗体由抗原结合结构域、至少一个CH(CH1、CH2、CH3、或CH4)结构域、和铰链区的至少一部分构成。仅重链抗体可以呈二聚体的形式,其中两条重链彼此以二硫键或其他方式共价或非共价附接。仅重链抗体可以属于IgG亚类,但属于其他亚类(诸如IgM、IgA、IgD和IgE亚类)的抗体也包括在本文中。在一个特定实施例中,重链抗体属于IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4亚型,特别是IgG1或IgG4亚型。在一个实施例中,重链抗体属于IgG4亚型,其中一个或多个CH结构域被修饰以改变抗体的效应子功能。在一个实施例中,重链抗体属于IgG1亚型,其中一个或多个CH结构域被修饰以改变抗体的效应子功能。本文进一步描述了改变效应子功能的CH结构域的修饰。重链抗体的非限制性实例例如在WO 2018/039180中进行了描述,该文献的披露内容通过援引以其全文并入本文。

[0088] 在一些实施例中,本文中的抗体(例如,仅重链抗体)被用作嵌合抗原受体(CAR)的结合(靶向)结构域。该定义具体地包括通过人免疫球蛋白转基因大鼠(UniRat™)产生的人仅重链抗体,被称为UniAbs™。UniAbs™的可变区(VH)被称为UniDabs™,并且是多功能构建块,其可以与Fc区或血清白蛋白连接,用于开发具有多特异性、增加效力和延长半衰期的新颖治疗剂。因为同源二聚体UniAbs™缺乏轻链,并且因此缺乏VL结构域,所以抗原被单个结构域,即重链抗体(VH或VHH)的重链的可变结构域(抗原结合结构域)识别。在一些实施例中,本文中的抗体是多特异性的(例如,双特异性的),包含对感兴趣的第一抗原(例如,靶细胞上的抗原,例如BCMA)具有结合亲和力的第一结合单元和对感兴趣的第二抗原(例如,通用嵌合抗原受体(CAR)复合物上的抗原)具有结合亲和力的第二结合单元。由此,在一些实施例中,本文所述的抗体可以通过提供与特定抗原靶标(例如,BCMA)的结合亲和力来使通用CAR复合物功能化。

[0089] 如本文所用的“完整抗体链”是包含全长可变区和全长恒定区(Fc)的抗体链。完整“常规”抗体包含完整轻链和完整重链,以及用于分泌IgG的轻链恒定结构域(CL)和重链恒定结构域、CH1、铰链、CH2和CH3。其他同种型,诸如IgM或IgA可以具有不同的CH结构域。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如,人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。完整抗体可以具有一个或多个“效应子功能”,其是指可归因于抗体的Fc恒定区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的那些生物活性。抗体效应子功能的实例包括C1q结合;补体

依赖性细胞毒性;Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;以及细胞表面受体的下调。恒定区变体包括改变效应子谱、与Fc受体的结合等的那些变体。

[0090] 取决于它们的重链的Fc(恒定结构域)的氨基酸序列,抗体和各种抗原结合蛋白可以作为不同的类别提供。重链Fc区有五大类别:IgA、IgD、IgE、IgG、和IgM,并且这些中的几种可以进一步分为“亚类”(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、和IgA2。对应于不同类别的抗体的Fc恒定结构域可以分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、和 μ 。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。Ig形式包括铰链修饰或无铰链形式(Roux等人(1998) *J. Immunol.* [免疫学杂志]161:4083-4090;Lund等人(2000) *Eur. J. Biochem.* [欧洲生物化学杂志]267:7246-7256;US 2005/0048572;US 2004/0229310)。基于它们的恒定结构域的氨基酸序列,可以将来自任何脊椎动物物种的轻链分配到两种类型(被称为 κ (kappa)和 λ (lambda))之一。根据本发明的实施例的抗体可以包含 κ 轻链序列或 λ 轻链序列。

[0091] “功能性Fc区”具有天然序列Fc区的“效应子功能”。效应子功能的非限制性实例包括C1q结合;CDC;Fc受体结合;ADCC;ADCP;细胞表面受体(例如,B细胞受体)的下调等。此类效应子功能通常需要Fc区与受体,例如Fc γ RI;Fc γ RIIA;Fc γ RIIB1;Fc γ RIIB2;Fc γ RIIIA;Fc γ RIIIB受体以及低亲和力FcRn受体相互作用;并且可以使用本领域已知的各种测定来评估。“死亡”或“沉默”Fc是已经突变以保留关于例如延长血清半衰期的活性,但不激活高亲和力Fc受体,或对Fc受体的亲和力降低的Fc。

[0092] “天然序列Fc区”包含与在自然界中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括例如天然序列人IgG1 Fc区(非A和A同种异型);天然序列人IgG2 Fc区;天然序列人IgG3 Fc区;和天然序列人IgG4 Fc区,以及其天然存在的变体。

[0093] 由于至少一个氨基酸修饰,优选地一个或多个氨基酸取代,“变体Fc区”包含与天然序列Fc区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。优选地,变体Fc区与天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区相比在天然序列Fc区中或在亲本多肽的Fc区中具有至少一个氨基酸取代,例如从约一个至约十个氨基酸取代,并且优选地从约一个至约五个氨基酸取代。本文中的变体Fc区优选地与天然序列Fc区和/或与亲本多肽的Fc区具有至少约80%同源性,并且最优选地与其具有至少约90%同源性,更优选地与其具有至少约95%同源性。

[0094] 变体Fc序列可以在CH2区中包含三个氨基酸取代,以减少在EU索引位置234、235、和237处的Fc γ RI结合(参见Duncan等人,(1988) *Nature* [自然]332:563)。EU索引位置330和331处补体C1q结合位点中的两个氨基酸取代减少了补体固定(参见Tao等人,*J. Exp. Med.* [实验医学杂志]178:661(1993)以及Canfield和Morrison,*J. Exp. Med.* [实验医学杂志]173:1483(1991))。在位置233-236处取代为人IgG1或IgG2残基和在位置327、330和331处取代为人IgG4残基极大地减少了ADCC和CDC(参见例如,Armour KL.等人,1999 *Eur J Immunol.* [欧洲免疫学杂志]29(8):2613-24;以及Shields RL.等人,2001 *J Biol Chem.* [生物化学杂志]276(9):6591-604)。人IgG4 Fc氨基酸序列(UniProtKB号P01861)在本文中被提供为SEQ ID NO:28。沉默IgG1例如在以下中描述:Boesch, A.W.等人,“Highly parallel characterization of IgG Fc binding interactions.[IgG Fc结合相互作用的高度平行表征]” *MAbs*, 2014.6(4):第915-27页,该文献的披露内容通过援引以其全文并入本文。

[0095] 其他Fc变体是可能的,包括但不限于能够形成二硫键的区域被删除,或者某些氨

氨基酸残基在天然Fc的N末端消除,或者向其中添加甲硫氨酸残基的Fc变体。因此,在一些实施例中,结合化合物的一个或多个Fc部分可以在铰链区中包含一个或多个突变以消除二硫键合。在又一个实施例中,Fc的铰链区可以被完全去除。在又一个实施例中,结合化合物可以包含Fc变体。

[0096] 进一步,可以构建Fc变体以通过取代(突变)、删除或添加氨基酸残基来去除或实质上减少效应子功能,以影响补体结合或Fc受体结合。例如但不限于,缺失可以发生在补体结合位点,诸如C1q结合位点中。用于制备免疫球蛋白Fc片段的此类序列衍生物的技术在国际专利公布号W0 97/34631和W0 96/32478中披露。此外,Fc结构域可以通过磷酸化、硫酸化、酰化、糖基化、甲基化、法呢基化、乙酰化、酰胺化等进行修饰。

[0097] 在一些实施例中,抗体包含野生型人IgG4的铰链区序列(SEQ ID NO:32)。在一些实施例中,抗体包含变体人IgG4铰链区序列,该序列包含突变S228P(SEQ ID NO:33)。

[0098] 在一些实施例中,抗体包含野生型人IgG4 CH2结构域序列(SEQ ID NO:36)。在一些实施例中,抗体包含变体人IgG4 CH2结构域,该结构域包含F234A突变、L235A突变、或F234A突变和L235A突变两者(SEQ ID NO:37)。

[0099] 在一些实施例中,抗体包含野生型人IgG4 CH3结构域序列(SEQ ID NO:38)。在一些实施例中,抗体包含变体人IgG4 CH3结构域序列,该序列包含T366W突变(SEQ ID NO:39),在本文中可以任选地被称为IgG4 CH3杵序列(knob sequence)。在一些实施例中,抗体包含变体人IgG4 CH3结构域序列,该序列包含T366S突变、L368A突变、和Y407V突变(SEQ ID NO:40),在本文中可以任选地被称为IgG4 CH3臼序列(hole sequence)。本文所述的IgG4 CH3突变可以以任何合适的方式利用,以便在抗体二聚体中第一单体的第一重链恒定区上放置一个“杵”,并且在抗体二聚体中第二单体的第二重链恒定区上放置一个“臼”,从而促进抗体中所需一对重链多肽亚基的适当配对(异源二聚化)。

[0100] 以上鉴定的铰链区、CH2结构域、和CH3结构域突变可以以任何组合并入本发明的抗体中。在一些实施例中,抗体包含具有变体人IgG4 Fc区的重链多肽亚基,该变体人IgG4 Fc区包含S228P突变、F234A突变、L235A突变、和T366W突变(杵)。在一些实施例中,抗体包含具有变体人IgG4 Fc区的重链多肽亚基,该变体人IgG4 Fc区包含S228P突变、F234A突变、L235A突变、T366S突变、L368A突变、和Y407V突变(臼)。

[0101] 术语“包含Fc区的抗体”是指包含Fc区的抗体。Fc区的C末端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)可以例如在抗体纯化期间或通过编码抗体的核酸的重组工程化被去除。因此,具有根据本发明的Fc区的抗体可以包括具有或没有K447的抗体。

[0102] 本发明的各方面包括具有多特异性构型的结合化合物,其包括但不限于双特异性、三特异性等。各种方法和蛋白质构型是已知的并且用于双特异性单克隆抗体(BsMAB)、三特异性抗体等。

[0103] 本发明的各方面包括包含呈单价或二价构型的仅重链可变区的抗体。如本文所用,如参考仅重链可变区结构域使用的术语“单价构型”意味着仅存在一个仅重链可变区结构域,具有单个结合位点(参见图7,分图B)。相比之下,如参考仅重链可变区结构域使用的术语“二价构型”意味着存在两个仅重链可变区结构域(各自具有单个结合位点),并且通过接头序列连接(参见图7,分图A)。接头序列的非限制性实例在本文中进一步讨论,并且包括但不限于具有各种长度的GS接头序列。当仅重链可变区呈二价构型时,两个仅重链可变区

结构域中的每一个对于相同抗原或对于不同抗原(例如,对于相同蛋白质上的不同表位;对于两个不同的蛋白质等)可以具有结合亲和力。然而,除非另外特别说明,否则表示为呈“二价构型”的仅重链可变区被理解为包含两个相同的仅重链可变区结构域,通过接头序列连接,其中两个相同的仅重链可变区结构域中的每一个对于相同的靶表位具有结合亲和力。

[0104] 通过重组融合两个或更多个抗体的可变结构域,已经开发了用于产生多价人工抗体的各种方法。在一些实施例中,多肽上的第一和第二抗原结合结构域通过多肽接头连接。这种多肽接头的非限制性实例是GS接头,其氨基酸序列为四个甘氨酸残基,接着一个丝氨酸残基,并且其中该序列重复n次,其中n是范围为从1到约10的整数,诸如2、3、4、5、6、7、8、或9。此类接头的非限制性实例包括GGGS(SEQ ID NO:34) (n=1) 和GGGSGGGGS(SEQ ID NO:35) (n=2)。在一些实施例中,第一仅重链可变区结构域和第二仅重链可变区结构域在抗体的同一重链多肽亚基上彼此连接,以形成仅重链可变区结构域的二价构型。在一些实施例中,重链可变区和轻链可变区在抗体的同一重链多肽亚基上彼此连接(即,设置在抗体的共同多肽亚基上),以形成重链和轻链可变区结构域的scFv构型。在一些实施例中,重链可变区和轻链可变区驻留在抗体的不同多肽亚基上,以形成具有重链可变区和轻链可变区的传统抗体构型的结合单元。也可以使用其他合适的接头,并且描述于例如Chen等人, *Adv Drug Deliv Rev.* [高级药物递送综述]2013年10月15日;65(10):1357-69中,该文献的披露内容通过援引以其全文并入本文。

[0105] 术语“三链抗体样分子”或“TCA”在本文中用于指抗体样分子,其包含三个多肽亚基、基本上由其组成、或由其组成,其中两个包含单克隆抗体的一条重链和一条轻链、基本上由其组成、或由其组成,或由此类抗体链的功能性抗原结合片段组成,该功能性抗原结合片段包含抗原结合区和至少一个CH结构域。此重链/轻链对对于第一抗原具有结合特异性。第三多肽亚基包含具有Fc部分的仅重链抗体、基本上由其组成、或由其组成,该Fc部分包含CH2和/或CH3和/或CH4结构域,CH1结构域不存在,以及一个或多个结合第二抗原表位或第一抗原的不同表位的抗原结合结构域(例如,两个抗原结合结构域),其中这种结合结构域来源于抗体重链或轻链的可变区或与其具有序列同一性。这种可变区的一部分可以由 V_H 和/或 V_L 基因片段、D和 J_H 基因片段、或 J_L 基因片段编码。可变区可以由重排的 V_HDJ_H 、 V_LDJ_H 、 V_HJ_L 、或 V_LJ_L 基因片段编码。TCA蛋白利用如上定义的仅重链抗体。

[0106] TCA结合化合物利用“仅重链抗体”或“重链抗体”或“重链多肽”,如本文所用,其是指包含重链恒定区CH2和/或CH3和/或CH4,但没有CH1结构域的单链抗体。在一个实施例中,重链抗体由抗原结合结构域、铰链区的至少一部分以及CH2和CH3结构域构成。在另一个实施例中,重链抗体由抗原结合结构域、铰链区的至少一部分和CH2结构域构成。在另一个实施例中,重链抗体由抗原结合结构域、铰链区的至少一部分和CH3结构域构成。本文还包括CH2和/或CH3结构域被截短的重链抗体。在另一个实施例中,重链由抗原结合结构域和至少一个CH(CH1、CH2、CH3、或CH4)结构域构成,但没有铰链区。仅重链抗体可以呈二聚体的形式,其中两条重链彼此以二硫键或其他方式共价或非共价附接,并且可以任选地包括在两个或更多个CH结构域之间的不对称界面,以有利于多肽链之间的适当配对。重链抗体可以属于IgG亚类,但属于其他亚类(诸如IgM、IgA、IgD和IgE亚类)的抗体也包括在本文中。在一个特定实施例中,重链抗体属于IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4亚型,特别是IgG1亚型或IgG4亚型。TCA结合化合物的非限制性实例例如在WO 2017/223111和WO 2018/052503中进行了描

述,这些文献的披露内容通过援引以其全文并入本文。

[0107] 重链抗体占骆驼科动物(例如,骆驼和美洲驼)产生的IgG抗体的约四分之一(Hamers-Casterman C.等人Nature.[自然]363,446-448(1993))。这些抗体由两条重链形成,但没有轻链。因此,可变抗原结合部分被称为VHH结构域,并且它代表最小的天然存在的、完整的抗原结合位点,长度只有大约120个氨基酸(Desmyter,A.等人J.Biol.Chem.[生物化学杂志]276,26285-26290(2001))。通过免疫可以产生针对多种抗原具有高特异性和亲和力的重链抗体(van der Linden,R.H.等人Biochim.Biophys.Acta.[生物化学与生物物理学报]1431,37-46(1999)),并且可以在酵母中容易地克隆并表达VHH部分(Frenken,L.G.J.等人J.Biotechnol.[生物技术期刊]78,11-21(2000))。它们的表达水平、溶解性和稳定性显著高于经典F(ab)或Fv片段(Ghahroudi,M.A.等人FEBS Lett.[欧洲生物化学学会联合会快报]414,521-526(1997))。还显示鲨鱼在其抗体中具有单个VH样结构域,被称为VNAR。(Nuttall等人Eur.J.Biochem.[欧洲生物化学杂志]270,3543-3554(2003);Nuttall等人Function and Bioinformatics[功能与生物信息学]55,187-197(2004);Dooley等人,Molecular Immunology[分子免疫学]40,25-33(2003))。

[0108] 如本文所用的术语“BCMA”涉及人B细胞成熟抗原,也被称为BCMA、CD269、和TNFRSF17(UniProt Q02223),它是肿瘤坏死受体超家族的成员,优先在分化的浆细胞中表达。根据UniProt,人BCMA的细胞外结构域由氨基酸1-54(或5-51)组成。术语“BCMA”包括任何人或非人动物物种的BCMA蛋白,并且具体地包括人BCMA以及非人动物的BCMA。

[0109] 术语“抗BCMA仅重链抗体”和“BCMA仅重链抗体”在本文中用于是指如上定义的仅重链抗体,其与BCMA免疫特异性结合。如本文所用的术语“人BCMA”包括人BCMA(UniProt Q02223)的任何变体、亚型和物种同源物,无论其来源或制备方式如何。因此,“人BCMA”包括由细胞天然表达的人BCMA和在用人BCMA基因转染的细胞上表达的BCMA。

[0110] 术语“抗BCMA仅重链抗体”、“BCMA仅重链抗体”、“抗BCMA重链抗体”和“BCMA重链抗体”在本文中可互换使用,是指如上定义的仅重链抗体,与BCMA免疫特异性结合,包括人BCMA,如上所定义。该定义包括但不限于由转基因动物(诸如表达人免疫球蛋白的转基因大鼠或转基因小鼠,包括产生人抗BCMA UniAb™抗体的UniRats™,如上所定义)产生的人重链抗体。

[0111] 关于参考多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”定义为在用以实现最大百分比序列同一性并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分而比对序列和引入缺口(如果需要)之后,候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可以以本领域技术范围内的各种方式实现,例如使用公众可用的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括为了在被比较的序列的全长上实现最大比对所需要的任何算法。然而,出于本文的目的,%氨基酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序ALIGN-2生成的。

[0112] “分离的”抗体是已经从其天然环境的组分鉴定并且分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染组分是会干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质,并且可以包括酶、激素和其他蛋白或非蛋白溶质。在优选的实施例中,抗体将被纯化(1)至通过劳里法确定的大于95%重量、并且最优选大于99%重量的抗体,(2)至足以获得通过使用转杯式测序仪发现的N末

端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,或(3)至通过SDS-PAGE在还原或非还原条件下使用考马斯蓝或优选银染法发现的均质性。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为抗体的天然环境的至少一种组分将不存在。然而,通常的是,通过至少一个纯化步骤制备分离的抗体。

[0113] 本发明的抗体包括多特异性抗体。多特异性抗体具有多于一种结合特异性。术语“多特异性”具体地包括“双特异性”和“三特异性”,以及高阶独立特异性结合亲和力,诸如高阶多表位特异性,以及四价抗体和抗体片段。术语“多特异性抗体”、“多特异性仅重链抗体”、“多特异性重链抗体”、“多特异性UniAbTM”和“多特异性结合化合物”在本文中以最广泛的意义使用,并且涵盖具有多于一种结合特异性的所有抗体。本发明的多特异性抗BCMA抗体具体地包括与BCMA蛋白(诸如人BCMA)上的单个表位和与不同蛋白质(例如像CD3蛋白)上的一个表位免疫特异性结合的抗体。本发明的多特异性抗BCMA抗体具体地包括与BCMA蛋白(诸如人BCMA)上的两个或更多个非重叠表位免疫特异性结合的抗体。本发明的多特异性抗BCMA抗体具体地还包括与BCMA蛋白(诸如人BCMA)上的一个表位和与不同蛋白质(例如像人La蛋白)上的一个表位免疫特异性结合的抗体。本发明的多特异性抗BCMA抗体具体地还包括与BCMA蛋白(诸如人BCMA蛋白)上的两个或更多个非重叠或部分重叠表位和与不同蛋白质(例如像人La蛋白)上的一个表位免疫特异性结合的抗体。

[0114] 本发明的抗体包括单特异性抗体,具有一种结合特异性。单特异性抗体具体地包括具有单一结合特异性的抗体,以及包含具有相同结合特异性的多于一个结合单元的抗体。术语“单特异性抗体”、“单特异性仅重链抗体”、“单特异性重链抗体”、和“单特异性UniAbTM”在本文中以最广泛的意义使用,并且涵盖具有一种结合特异性的所有抗体。本发明的单特异性重链抗BCMA抗体具体地包括与BCMA蛋白(诸如人BCMA)上的一个表位免疫特异性结合的抗体(单价和单特异性)。本发明的单特异性重链抗BCMA抗体具体地还包括具有多于一个结合单元的抗体(例如,多价抗体),这些结合单元与BCMA蛋白(诸如人BCMA)上的一个表位免疫特异性结合。例如,根据本发明的实施例的单特异性抗体可以包含仅重链可变区,该仅重链可变区包含两个仅重链抗原结合结构域(即,呈串联构型的抗BCMA仅重链可变区),其中两个抗原结合结构域中的每一个均与BCMA蛋白上的相同表位结合(即,二价和单特异性)。

[0115] “表位”是单个抗体分子所结合的抗原分子表面上的位点。通常,抗原具有若干或许多不同的表位,并且与许多不同的抗体反应。该术语具体地包括线性表位和构象表位。

[0116] “表位作图”是鉴定抗体在其靶抗原上的结合位点或表位的过程。抗体表位可以是线性表位或构象表位。线性表位由蛋白质中的连续氨基酸序列形成。构象表位由蛋白质序列中不连续的氨基酸形成,但在蛋白质折叠成其三维结构时将它们聚集在一起。

[0117] “多表位特异性”是指与相同或不同靶标上的两个或更多个不同表位特异性结合的能力。如上说明,本发明具体地包括具有多表位特异性的抗BCMA重链抗体,即与BCMA蛋白(诸如人BCMA)上的一个或多个非重叠表位结合的抗BCMA重链抗体;以及与BCMA蛋白上的一个或多个表位和与不同蛋白质(例如像人La蛋白)上的一个表位结合的抗BCMA重链抗体。术语抗原的“非重叠表位”或“非竞争性表位”在本文中定义为意指被一对抗原特异性抗体的一个成员识别但不被另一个成员识别的表位。靶向多特异性抗体上的相同抗原、识别非重叠表位的成对抗体或抗原结合区不竞争与此抗原的结合,并且能够同时结合此抗原。

[0118] 当两种抗体识别相同或空间重叠的表位时,抗体将与参考抗体结合“基本上相同的表位”。用于确定两个表位是否与相同或空间重叠的表位结合的最广泛使用和最快速的方法是竞争测定,其可以使用标记抗原或标记抗体以所有数量的不同形式进行配置。通常,将抗原固定在96孔板上,并且使用放射性或酶标记测量未标记抗体阻断标记抗体结合的能力。

[0119] 如本文所用的术语“价”是指抗体分子中指定数量的结合位点。

[0120] “单价”抗体具有一个结合位点。因此,单价抗体也是单特异性的。

[0121] “多价”抗体具有两个或更多个结合位点。因此,术语“二价”、“三价”、“和”“四价”分别是指存在两个结合位点、三个结合位点、和四个结合位点。因此,根据本发明的双特异性抗体至少是二价的,并且可以是三价的、四价的、或其他多价的。根据本发明的实施例的二价抗体对于同一表位(即,二价、单互补位)或对于两个不同表位(即,二价、双互补位)可以具有两个结合位点。

[0122] 各种方法和蛋白质构型是已知的并且用于制备双特异性单克隆抗体(BsMAB)、三特异性抗体等。

[0123] 术语“嵌合抗原受体”或“CAR”在本文中以最广泛的意义使用,是指工程化受体,其将所需的结合特异性(例如,单克隆抗体或其他配体的抗原结合区)移植到跨膜和细胞内信号传导结构域。典型地,受体用于将单克隆抗体的特异性移植到T细胞上以产生嵌合抗原受体(CAR)。(J Natl Cancer Inst[美国国立癌症研究所杂志],2015;108(7):dvj439;和Jackson等人,Nature Reviews Clinical Oncology[自然评论·临床肿瘤学],2016;13:370-383)。CAR-T细胞是经过基因工程化以产生用于在免疫疗法中使用的人工T细胞受体的T细胞。在一个实施例中,“CAR-T细胞”是指表达编码一个或多个嵌合抗原受体的转基因的治疗性T细胞,这些嵌合抗原受体至少由细胞外结构域、跨膜结构域、和至少一个胞质结构域组成。

[0124] 术语“人抗体”在本文中用于包括具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本文中的人抗体可以包含并非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,在体外通过随机或位点特异性诱变引入的突变或在体内通过体细胞突变引入的突变)。术语“人抗体”具体地包括具有人重链可变区序列的仅重链抗体,由转基因动物(诸如转基因大鼠或小鼠)产生,特别是由UniRatsTM产生的UniAbsTM,如上所定义。

[0125] “嵌合抗体”或“嵌合免疫球蛋白”意指包含来自至少两个不同Ig基因座的氨基酸序列的免疫球蛋白分子,例如,包含由人Ig基因座编码的部分和由大鼠Ig基因座编码的部分的转基因抗体。嵌合抗体包括具有非人Fc区或人工Fc区以及人独特型的转基因抗体。此类免疫球蛋白可以从本发明的动物中分离,这些动物已被工程化以产生此类嵌合抗体。

[0126] 如本文所用,术语“效应细胞”是指参与免疫应答的效应阶段而非免疫应答的认知和激活阶段的免疫细胞。一些效应细胞表达特定的Fc受体并执行特定的免疫功能。在一些实施例中,效应细胞诸如自然杀伤细胞能够诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。例如,表达FcR的单核细胞和巨噬细胞参与靶细胞的特异性杀伤,并将抗原呈递给免疫系统的其他组分,或与呈递抗原的细胞结合。在一些实施例中,效应细胞可以吞噬靶抗原或靶细胞。

[0127] “人效应细胞”是表达受体诸如T细胞受体或FcR并执行效应子功能的白细胞。优选地,这些细胞至少表达Fc γ RIII并执行ADCC效应子功能。介导ADCC的人白细胞的实例包括

自然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞和嗜中性粒细胞,其中NK细胞是优选的。效应细胞可以从其自然来源中分离,例如,从如本文所述的血液或PBMC中分离。

[0128] 术语“免疫细胞”在本文中以最广泛的意义使用,包括但不限于骨髓或淋巴来源的细胞,例如淋巴细胞(诸如B细胞和T细胞,包括溶细胞性T细胞(CTL))、杀伤细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、多形核细胞,诸如嗜中性粒细胞、粒细胞、肥大细胞、和嗜碱性粒细胞。

[0129] “抗体效应子功能”是指可归因于抗体的Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的那些生物活性。抗体效应子功能的实例包括C1q结合;补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如,B细胞受体;BCR)的下调等。

[0130] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”是指细胞介导的反应,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、和巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体并且随后引起靶细胞的裂解。用于介导ADCC的原代细胞,NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达在Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol[免疫学年评]9:457-92(1991)的第464页上的表3中总结。为了评估感兴趣的分子的ADCC活性,可以进行体外ADCC测定,诸如美国专利号5,500,362或5,821,337中描述的测定。用于此类测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外,可以在体内,例如在动物模型(诸如Clynes等人,PNAS(USA)[美国国家科学院院刊]95:652-656(1998)中披露的动物模型)中对感兴趣的分子的ADCC活性进行评估。

[0131] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指分子在补体存在的情况下裂解靶标的能力。补体激活途径是通过补体系统的第一组分(C1q)与和同源抗原复合的分子(例如,抗体)结合而启动的。为了评估补体激活,可以进行CDC测定(例如,如Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods[免疫学方法杂志]202:163(1996)中所述)。

[0132] “结合亲和力”是指分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指示,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,抗体与抗原)之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以表示为解离常数(Kd)。亲和力可以通过本领域已知的常见方法测量。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并且倾向于容易解离,而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并且倾向于保持结合。

[0133] 如本文所用,“Kd”或“Kd值”是指在动力学模式中使用Octet QK384仪器(艾瑞生物公司,门洛帕克,加利福尼亚州(Fortebio Inc.,Menlo Park,CA))通过生物层干涉技术确定的解离常数。例如,向抗小鼠Fc传感器加载小鼠Fc融合抗原,并且然后浸入含有抗体的孔中以测量浓度依赖性缔合速率(kon)。在最后步骤中测量抗体解离速率(koff),其中将传感器浸入仅含有缓冲液的孔中。Kd是koff/kon的比率。(关于更多细节,参见Concepcion,J等人,Comb Chem High Throughput Screen[组合化学与高通量筛选],12(8),791-800,2009)。

[0134] 如本文所用,术语“特异性相互作用”、“特异性结合(specifically binding)”或“特异性结合(specifically bind(s))”意指结合结构域对特定靶蛋白或抗原表现出可观

的亲合力,并且通常与非靶蛋白或抗原不表现出显著的反应性。“可观的亲合力”包括以约 10^{-6} M(KD)或更强的亲合力结合。优选地,当结合亲合力是约 10^{-12} 至 10^{-8} M、 10^{-12} 至 10^{-9} M、 10^{-12} 至 10^{-10} M、 10^{-11} 至 10^{-8} M,优选地约 10^{-11} 至 10^{-9} M时,将结合视为特异性的。结合结构域是否与靶蛋白或抗原特异性反应或结合尤其可以通过以下方式容易地测试:将所述结合结构域与靶蛋白或抗原的反应和所述结合结构域与非靶蛋白或抗原的反应进行比较。优选地,本发明的结合结构域基本上不与非靶蛋白或抗原结合或不能与其结合。

[0135] 术语“基本上不结合”或“不能结合”意指本发明的结合结构域不与非靶蛋白或抗原结合,即与非靶蛋白或抗原不显示超过30%、优选不超过20%、更优选不超过10%、特别优选不超过9%、8%、7%、6%或5%的反应性,由此将与靶蛋白或抗原的结合分别设定为100%。

[0136] 术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等在本文中通常用于意指获得所需的药理学和/或生理学作用。作用就完全或部分预防疾病或其症状而言可以是预防性的和/或就部分或完全治愈疾病和/或可归因于疾病的不良作用而言可以是治疗性的。如本文所用的“治疗”涵盖哺乳动物的疾病的任何治疗,并且包括:(a)防止疾病发生在可能易患该疾病但尚未被诊断为患有该疾病的受试者中;(b)抑制该疾病,即阻止其发展;或者(c)缓解该疾病,即引起疾病消退。治疗剂可以在疾病或损伤发作之前、期间或之后施用。对正在发生的疾病的治疗是特别令人感兴趣的,其中该治疗稳定或减少患者的不希望临床症状。这种治疗希望在受影响组织完全丧失功能之前进行。主题治疗可以在疾病的症状阶段期间施用,并且在一些情况下在疾病的症状阶段之后施用。

[0137] “治疗有效量”旨在用于向受试者赋予治疗益处所必需的活性剂的量。例如,“治疗有效量”是诱导、减轻或以其他方式改善与疾病相关联的病理症状、疾病进展或生理状况或提高对障碍的抵抗力的量。

[0138] 本发明上下文中的术语“B细胞肿瘤”或“成熟B细胞肿瘤”包括但不限于所有淋巴细胞白血病和淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞性白血病、幼淋巴细胞白血病、前体B淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病、小淋巴细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞淋巴瘤、B细胞慢性淋巴细胞白血病、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、多发性骨髓瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞肿瘤(诸如浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤)、单克隆免疫球蛋白沉积病、重链病、MALT淋巴瘤、结内边缘B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、毛细胞白血病、原发性渗出性淋巴瘤和AIDS相关非霍奇金淋巴瘤。

[0139] 术语“特征在于BCMA的表达”广义上是指其中BCMA表达与疾病或障碍所特有的一种或多种病理过程相关联或涉及该一种或多种病理过程的任何疾病或障碍。此类障碍包括但不限B细胞肿瘤。

[0140] 术语“受试者”、“个体”和“患者”在本文中可互换使用,是指正在评估治疗和/或正在治疗的哺乳动物。在一个实施例中,该哺乳动物是人。术语“受试者”、“个体”和“患者”包括但不限于患有癌症的个体、患有自身免疫性疾病的个体、患有病原体感染的个体等。受试者可以是人,但也包括其他哺乳动物,特别是可用作人类疾病的实验室模型的那些哺乳动物,例如小鼠、大鼠等。

[0141] 术语“药物配制品”是指呈使得活性成分的生物活性有效的形式,并且不含对该配制品所施用的受试者具有不可接受的毒性的额外组分的制剂。此类配制品是无菌的。“药理学上可接受的”赋形剂(媒介物、添加剂)是可以合理地施用于主题哺乳动物以提供有效剂量的所采用的活性成分的那些赋形剂。

[0142] “无菌”配制品是无菌的或基本上不含所有活微生物及其孢子。“冷冻”配制品是处于低于0°C的温度下的配制品。

[0143] “稳定的”配制品是在储存之后,其中的蛋白质基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物活性的配制品。优选地,配制品在储存之后基本上保留其物理和化学稳定性以及生物活性。储存期通常基于配制品的预期保质期来选择。用于测量蛋白质稳定性的各种分析技术在本领域中是可用的,并且在以下进行综述:例如Peptide and Protein Drug Delivery[肽和蛋白质药物递送],247-301.Vincent Lee编辑,Marcel Dekker公司,纽约,纽约州(Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.) 出版(1991)以及Jones. A. Adv. Drug Delivery Rev. [高级药物递送综述]10:29-90(1993)。可以在选定的温度下在选定的时间段内测量稳定性。稳定性可以通过各种不同的方式定性和/或定量评价,包括评价聚集体形成(例如,使用尺寸排阻色谱法、测量浊度、和/或通过目视检查);使用阳离子交换色谱法、图像毛细管等电聚焦(icIEF)或毛细管区带电泳评价电荷异质性;氨基末端或羧基末端序列分析;质谱分析;比较还原抗体和完整抗体的SDS-PAGE分析;肽图(例如,胰蛋白酶或LYS-C)分析;评价抗体的生物活性或抗原结合功能;等。不稳定性可以涉及以下中的一种或多种:聚集、脱酰胺(例如,Asn脱酰胺)、氧化(例如,Met氧化)、异构化(例如,Asp异构化)、剪切/水解/片段化(例如,铰链区片段化)、琥珀酰亚胺形成、不成对的半胱氨酸、N末端延伸、C末端加工、糖基化差异等。

[0144] II. 详细描述

[0145] 抗BCMA抗体

[0146] 本发明提供了与人BCMA结合的抗体,包括但不限于仅重链抗体(UniAb)。本发明的抗BCMA UniAb包含一组如本文定义和图1所示的CDR序列,并且通过所提供的SEQ ID NO:12的重链可变区(VH)序列例示,该序列在图2中列出。这些抗体提供了许多益处,有助于作为一种或多种临床治疗剂使用。这些抗体包含具有一系列结合亲和力的成员,从而允许选择具有所需结合亲和力的特定序列。

[0147] 本文提供的抗BCMA抗体不与食蟹猴的BCMA蛋白发生交叉反应,但可以被工程化为提供与食蟹猴的BCMA蛋白或与任何其他动物物种的BCMA(如果需要)的交叉反应性。

[0148] 在一些实施例中,本文中的抗BCMA UniAb抗体包含VH结构域,该结构域包含在人VH框架中的CDR1、CDR2和CDR3序列。作为实例,CDR序列可以位于SEQ ID NO:12中列出的提供的示例性可变区序列的CDR1、CDR2和CDR3的相应氨基酸残基26-35;53-59;和98-117附近的区域中。本领域技术人员将理解,如果选择不同的框架序列,则CDR序列可能处于不同的位置中,尽管通常序列的顺序将保持不变。

[0149] 在一些实施例中,抗BCMA抗体包含可变区,该可变区包含在SEQ ID NO:1的序列中包含两个或更少氨基酸取代的CDR1序列,和/或在SEQ ID NO:2的序列中包含两个或更少取代的CDR2序列,和/或在SEQ ID NO:3的序列中包含两个或更少取代的CDR3序列。

[0150] 在一些实施例中,抗BCMA抗体包含可变区,该可变区包含在SEQ ID NO:1的序列中

包含两个或更少取代的CDR1序列,和在SEQ ID NO:2的序列中包含两个或更少取代的CDR2序列,和在SEQ ID NO:3的序列中包含两个或更少取代的CDR3序列。

[0151] 在一些实施例中,抗BCMA抗体包含可变区,该可变区包含SEQ ID NO:1的CDR1序列、SEQ ID NO:2的CDR2序列和SEQ ID NO:3的CDR3序列。

[0152] 在一些实施例中,抗BCMA抗体包含仅重链可变区,该仅重链可变区包含SEQ ID NO 1、2和3的相应CDR1、CDR2和CDR3序列。在一些实施例中,抗BCMA抗体包含呈单价或二价构型的仅重链可变区。

[0153] 在另外的实施例中,本发明的抗BCMA抗体包含呈单价或二价构型的SEQ ID NO:12的重链可变区氨基酸序列(图2)。

[0154] 在一些实施例中,抗BCMA抗体优选包含CDR序列并且与BCMA结合,该CDR序列相对于在SEQ ID NO:1-3中的任一个中的CDR1、CDR2和/或CDR3序列(图1)包含两个或更少氨基酸取代。在一些实施例中,抗BCMA抗体优选包含重链可变区序列并且与BCMA结合,该重链可变区序列与图2所示的重链可变区序列(SEQ ID NO:12)具有至少80%同一性、至少85%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性、至少98%同一性、或至少99%同一性。

[0155] 在一些实施例中,抗BCMA抗体优选包含重链可变结构域(VH)并且与BCMA结合,其中CDR3序列在氨基酸水平下与SEQ ID NO:3具有大于或等于80%,诸如至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%的序列同一性。

[0156] 在一些实施例中,抗BCMA抗体优选包含重链可变结构域(VH)并且与BCMA结合,其中整组CDR 1、2和3(组合)在氨基酸水平下与SEQ ID NO:1-3的CDR 1、2和3(组合)具有大于或等于百分之八十五(85%)的序列同一性。

[0157] 本发明提供了与人BCMA以及人La蛋白结合的多特异性抗体。本发明的多特异性抗体可以包含与BCMA结合的第一结合单元和与人La蛋白结合的第二结合单元。在一些实施例中,与人La蛋白结合的结合单元包含一组如本文定义和图1所示的CDR序列,并且通过所提供的SEQ ID NO:14-15的重链可变区(VH)序列和SEQ ID NO:16和17的轻链可变区(VL)序列例示,在图3中列出。在一些实施例中,与人La蛋白结合的抗体与包含氨基酸序列KPLPEVTDEY(SEQ ID NO:42)的表位结合。在一些实施例中,与人La蛋白结合的抗体与包含氨基酸序列VEKEALKKIIEDQQESLNKW(SEQ ID NO:43)的表位结合。与人La蛋白结合的抗体描述于例如WO 2016030414、US 20200181228、US 20200131262、和US 20170240612中,这些文献的披露内容通过援引以其全文并入本文。

[0158] 本文所述的抗体提供了许多益处,有助于作为一种或多种临床治疗剂使用。这些抗体包含具有一系列结合亲和力的成员,从而允许选择具有所需结合亲和力的特定序列。

[0159] 可以从本文提供的抗体中选择合适的抗体用于开发和治疗或其他用途,包括但不限于用作双特异性或三特异性抗体,或CAR-T结构的一部分。

[0160] 候选蛋白质的亲和力的确定可以使用本领域已知的方法进行,诸如Biacore测量。主题抗体对于人La蛋白可以具有亲和力,Kd为从约 10^{-6} 至大约 10^{-11} ,包括但不限于:从约 10^{-6} 至大约 10^{-10} ;从约 10^{-6} 至大约 10^{-9} ;从约 10^{-6} 至大约 10^{-8} ;从约 10^{-8} 至大约 10^{-11} ;从约 10^{-8} 至大约 10^{-10} ;从约 10^{-8} 至大约 10^{-9} ;从约 10^{-9} 至大约 10^{-11} ;从约 10^{-9} 至大约 10^{-10} ;或这些范围内的任何值。亲和力选择可以通过生物学评估来确认,以调节,例如增加所需活性(例如,通用CAR结构与主题多特异性抗体的结合单元之间的所需结合亲和力),包括体外测定、临床前模

型、和临床试验以及潜在毒性的评估。

[0161] 在一些实施例中,主题抗体的抗人La蛋白结合单元包含VH结构域和VL结构域,该VH结构域包含在人VH框架中的CDR1、CDR2和CDR3序列,该VL结构域包含在人VL框架(例如,人V_κ框架或人V_λ框架)中的CDR1、CDR2和CDR3序列。作为实例,CDR序列可以位于SEQ ID NO:14-17中列出的提供的示例性可变区序列的CDR1、CDR2和CDR3的相应氨基酸残基26-35;53-59;和98-117附近的区域中。本领域技术人员将理解,如果选择不同的框架序列,则CDR序列可能处于不同的位置中,尽管通常序列的顺序将保持不变。

[0162] 在一些实施例中,主题抗体的抗人La蛋白结合单元包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含在SEQ ID NO:4或7的序列中的任一个中包含两个或更少取代的CDR1序列,和/或在SEQ ID NO:5的序列中包含两个或更少取代的CDR2序列,和/或在SEQ ID NO:6或8的序列中的任一个中包含两个或更少取代的CDR3序列,该轻链可变区包含在SEQ ID NO:9的序列中包含两个或更少取代的CDR1序列,和/或在SEQ ID NO:10的序列中包含两个或更少取代的CDR2序列,和/或在SEQ ID NO:11的序列中包含两个或更少取代的CDR3序列。

[0163] 在一些实施例中,主题抗体的抗人La蛋白结合单元包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含在SEQ ID NO:4或7的序列中的任一个中包含两个或更少取代的CDR1序列,和在SEQ ID NO:5的序列中包含两个或更少取代的CDR2序列,和在SEQ ID NO:6或8的序列中的任一个中包含两个或更少取代的CDR3序列,该轻链可变区包含在SEQ ID NO:9的序列中包含两个或更少取代的CDR1序列,和在SEQ ID NO:10的序列中包含两个或更少取代的CDR2序列,和在SEQ ID NO:11的序列中包含两个或更少取代的CDR3序列。

[0164] 在一个实施例中,本发明的抗体的抗人La蛋白结合单元包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:4的CDR1序列;SEQ ID NO:5的CDR2序列和SEQ ID NO:6的CDR3序列,该轻链包含SEQ ID NO:9的CDR1序列、SEQ ID NO:10的CDR2序列和SEQ ID NO:11的CDR3序列。在一个实施例中,本发明的抗体的抗人La蛋白结合单元包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:7的CDR1序列;SEQ ID NO:5的CDR2序列和SEQ ID NO:8的CDR3序列,该轻链包含SEQ ID NO:9的CDR1序列、SEQ ID NO:10的CDR2序列和SEQ ID NO:11的CDR3序列。

[0165] 在另外的实施例中,本发明的抗体的抗人La蛋白结合单元包含SEQ ID NO:14的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:16的轻链可变区序列。在一些实施例中,本发明的抗体的抗人La蛋白结合单元包含SEQ ID NO:15的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:17的轻链可变区序列。

[0166] 在一些实施例中,本发明的抗体的抗人La蛋白结合单元中的重链CDR序列相对于SEQ ID NO:4-8中的任一个中的CDR1、CDR2和/或CDR3序列(图1)包含两个或更少氨基酸取代。在一些实施例中,本发明的抗体的抗人La蛋白结合单元将包含重链可变区序列,该重链可变区序列与图3所示的重链可变区序列(SEQ ID NO:14和15)具有至少85%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性、至少98%同一性、或至少99%同一性。

[0167] 在一些实施例中,本发明的抗体的抗人La蛋白结合单元中的轻链CDR序列相对于SEQ ID NO:9-11中的任一个中的CDR1、CDR2和/或CDR3序列(图1)包含两个或更少氨基酸取代。在一些实施例中,本发明的抗体的抗人La蛋白结合单元将包含轻链可变区序列,该轻链可变区序列与图3所示的轻链可变区序列(SEQ ID NO:16和17)具有至少85%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性、至少98%同一性、或至少99%同一性。

[0168] 在一些实施例中,提供了多特异性(例如,双特异性)抗体,其可以具有本文讨论的构型中的任一种,包括但不限于三链双特异性抗体或三链双特异性抗体样分子(双特异性TCA)。双特异性抗体至少包含对于除BCMA以外的蛋白质具有特异性的抗体的重链可变区。

[0169] 在本发明的蛋白质是双特异性抗体的情况下,一个结合单元对于人BCMA具有特异性,而另一个结合单元可以对于靶细胞(例如,效应细胞,例如T细胞)、肿瘤相关抗原、靶向抗原(例如,整合素等)、病原体抗原、检查点蛋白、通用CAR结构上的蛋白质等具有特异性。靶细胞具体地包括癌细胞,诸如血液肿瘤,例如B细胞肿瘤,如下所讨论。在一些实施例中,双特异性抗体包含与BCMA结合的第一结合单元和与人La蛋白结合的第二结合单元。

[0170] 各种形式的多特异性抗体都在本发明的范围内,包括但不限于单链多肽、二链多肽、三链多肽、四链多肽、及其多种。本文中的多特异性(例如,双特异性)抗体具体地包括与BCMA和CD3结合的T细胞双特异性抗体(抗BCMA×抗CD3抗体),该BCMA在浆细胞(PC)和多发性骨髓瘤(MM)细胞上选择性表达。本文中的多特异性(例如,双特异性)抗体具体地还包括与BCMA和通用CAR结构上的抗原结合的通用CAR双特异性抗体(抗BCMA×抗La蛋白抗体),该BCMA在浆细胞(PC)和多发性骨髓瘤(MM)细胞上选择性表达。此类抗体诱导表达BCMA的细胞的强力T细胞或CAR T细胞介导的杀伤,并且可以用于治疗肿瘤,特别是血液肿瘤,诸如B细胞肿瘤,如下所讨论,以及特征在于存在自反应性浆细胞的自身免疫性障碍,其也在本文中进一步讨论。

[0171] 针对CD3和BCMA的双特异性抗体描述于例如WO 2007117600、WO 2009132058、WO 2012066058、WO 2012143498、WO 2013072406、WO 2013072415、和WO 2014122144、以及US 20170051068中。包含人La蛋白的通用嵌合抗原受体描述于例如WO 2016030414中,该申请的披露内容通过援引以其全文并入本文。

[0172] 抗体的制备

[0173] 本发明的多特异性抗体可以通过本领域已知的方法制备。在一个优选实施例中,本文中的抗体由转基因动物(包括转基因小鼠和大鼠,优选大鼠)产生,其中内源性免疫球蛋白基因被敲除或无效。在一个优选实施例中,本文中的抗体在UniRat™中产生。UniRats™的内源性免疫球蛋白基因被沉默,并且使用人免疫球蛋白重链转座点来表达多样化的自然优化的全人源HCAb库。虽然大鼠中的内源性免疫球蛋白基因座可以使用多种技术来敲除或沉默,但在UniRat™中,使用锌指(内)核酸酶(ZNF)技术来灭活内源性大鼠重链J基因座、轻链Cκ基因座和轻链Cλ基因座。用于微注射到卵母细胞中的ZNF构建体可以产生IgH和IgL敲除(KO)系。关于细节,参见例如Geurts等人,2009,Science[科学]325:433。Ig重链敲除大鼠的表征已经由Menoret等人,2010,Eur. J. Immunol. [欧洲免疫学杂志]40:2932-2941报告。ZNF技术的优点是,非同源末端连接经由高达若干kb的缺失使基因或基因座沉默也可以为同源整合提供靶位点(Cui等人,2011,Nat Biotechnol[自然-生物技术]29:64-67)。UniRat™中产生的人重链抗体被称为UniAbs™,并且可以结合常规抗体无法攻击的表位。它们的高特异性、亲和力和小尺寸使其成为单特异性和多特异性应用的理想选择。

[0174] 除UniAbs™之外,本文具体地包括缺乏骆驼科VHH框架和突变的仅重链抗体及其功能性VH区。例如,此类仅重链抗体可以在转基因大鼠或小鼠中产生,其包含例如在WO 2006/008548中描述的完全人仅重链基因座,但是也可以使用其他转基因哺乳动物,诸如兔、豚鼠、大鼠,大鼠和小鼠是优选的。仅重链抗体,包括其VHH或VH功能性片段,也可以通过重组

DNA技术,通过在合适的真核或原核宿主中表达编码核酸来产生,该宿主例如包括哺乳动物细胞(例如,CHO细胞)、大肠杆菌或酵母。

[0175] 仅重链抗体的结构域结合了抗体和小分子药物的优点:可以是单价的或多价的;具有低毒性;并且对于制造是成本有效的。由于其尺寸较小,这些结构域易于施用,包括口服或局部施用,其特征在于高稳定性,包括胃肠道稳定性;并且它们的半衰期可以根据所需的用途或适应症进行定制。另外,HCAb的VH和VHH结构域可以以成本有效的方式制造。

[0176] 在一个特定实施例中,本发明的重链抗体,包括UniAbs™,在FR4区的第一位置(根据Kabat编号系统的氨基酸位置101)处的天然氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代,该另一个氨基酸残基能够在此位置处破坏包含天然氨基酸或与天然氨基酸残基缔合的表面暴露的疏水贴剂。此类疏水贴剂通常埋在与抗体轻链恒定区的界面中,但在HCAb中暴露在表面,并且至少部分地用于HCAb的不需要的聚集和轻链缔合。经取代的氨基酸残基优选是带电的,并且更优选带正电荷,诸如赖氨酸(Lys,K)、精氨酸(Arg,R)或组氨酸(His,H),优选精氨酸(R)。在一个优选实施例中,来源于转基因动物的仅重链抗体在位置101处含有Trp至Arg突变。所得的HCAb优选在聚集不存在的情况下在生理条件下具有高抗原结合亲和力和溶解性。

[0177] 作为本发明的一部分,鉴定了具有来自UniRat™动物的独特序列的人抗BCMA重链抗体(UniAb™),这些抗体在ELISA蛋白和细胞结合测定中结合人BCMA。所鉴定的重链可变区(VH)序列(参见例如图2)对于人BCMA蛋白结合和/或与BCMA+细胞的结合呈阳性,并且对于与不表达BCMA的细胞的结合全部呈阴性。

[0178] 与BCMA蛋白上的非重叠表位结合的重链抗体(例如,UniAbs™)可以通过竞争结合测定来鉴定,诸如酶联免疫测定(ELISA测定)或流式细胞术竞争结合测定。例如,可以使用与靶抗原结合的已知抗体与感兴趣的抗体之间的竞争。通过使用这种方法,可以将一组抗体分为与参考抗体竞争的抗体和与参考抗体竞争的抗体。非竞争抗体被鉴定为与不同表位结合,该不同表位不与参考抗体所结合的表位重叠。通常,将一种抗体固定,结合抗原,并且在ELISA测定中测试被标记的(例如,生物素化)第二抗体,以确定其结合捕获的抗原的能力。这也可以通过使用表面等离子体共振(SPR)平台,包括ProteOn XPR36(伯乐公司(BioRad,Inc))、Biacore 2000和Biacore T200(GE医疗生命科学部(GE Healthcare Life Sciences))和MX96 SPR成像仪(Ibis技术私人有限公司(Ibis technologies B.V.))以及在生物层干涉技术平台,诸如Octet Red384和Octet HTX(颇尔公司(ForteBio,Pall Inc))上实现。关于更多细节,参见本文中的实例。

[0179] 典型地,如果抗体导致参考抗体与靶抗原的结合减少约15%-100%(如通过标准技术,诸如通过以上所述的竞争结合测定确定),则该抗体与参考抗体“竞争”。在各种实施例中,相对抑制是至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或更高。

[0180] 药物组合物

[0181] 本发明的另一方面提供了药物组合物,其包含一种或多种本发明的抗体与合适的药学上可接受的载剂的混合物。如本文所用的药学上可接受的载剂是示例性的,但不限于佐剂、固体载剂、水、缓冲液、或本领域用于容纳治疗组分的其他载剂、或其组合。

[0182] 通过将具有所需纯度的蛋白质与任选的药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂(参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition[雷明顿药物科学第16版],Osol,A.编辑(1980))混合来制备根据本发明使用的抗体的药物组合物,诸如呈冻干配制品或水溶液的形式。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者是无毒的,并且包括缓冲液(诸如磷酸盐、柠檬酸盐)和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化六甲铵;苯扎氯铵,苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质(诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);亲水聚合物(诸如聚乙烯吡咯烷酮);氨基酸(诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、或赖氨酸);单糖、二糖和其他碳水化合物(包括葡萄糖、甘露糖、或糊精);螯合剂(诸如EDTA);糖(诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇);成盐平衡离子,诸如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白质络合物);和/或非离子型表面活性剂(诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG))。

[0183] 用于肠胃外施用的药物组合物优选是无菌且基本上等渗的,并在良好生产规范(GMP)条件下制造。药物组合物可以呈单位剂型(即,用于单次施用的剂量)提供。配制品取决于所选的施用途径。本文中的抗体可以通过静脉内注射或输注或皮下施用。对于注射施用,本文中的抗体可以在水溶液,优选在生理相容的缓冲液中配制,以减少注射部位的不适。该溶液可以含有如上所讨论的载剂、赋形剂、或稳定剂。可替代地,抗体可以呈冻干形式,以供在使用之前用合适的媒介物(例如,无菌无热原水)构造。

[0184] 抗BCMA抗体配制品例如在美国专利号9,034,324中披露。类似的配制品可以用于本发明的蛋白质。皮下抗体配制品描述于例如US 20160355591和US 20160166689中。

[0185] 使用方法

[0186] 本文中的抗体和药物组合物可以用于治疗B细胞相关障碍,包括特征在于BCMA的表达或过表达的B细胞和浆细胞恶性肿瘤以及自身免疫性障碍。

[0187] 此类B细胞相关障碍包括B细胞和浆细胞恶性肿瘤以及自身免疫性障碍,包括但不限于浆细胞瘤、霍奇金淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、小无裂细胞淋巴瘤、地方性伯基特淋巴瘤、散发性伯基特淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、结外黏膜相关淋巴组织淋巴瘤、结内单核细胞样B细胞淋巴瘤、脾淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、大细胞淋巴瘤、弥漫性混合细胞淋巴瘤、免疫母细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、肺B细胞血管中心性淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、恶性潜力不确定的B细胞增殖、淋巴瘤样肉芽肿病、移植后淋巴组织增生性疾病、免疫调节障碍、类风湿性关节炎、重症肌无力、特发性血小板减少性紫癜、抗磷脂综合征、恰加斯病(Chagas' disease)、格雷夫斯病(Grave's disease)、韦氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、结节性多动脉炎、干燥综合征(Sjogren's syndrome)、寻常型天疱疮、硬皮病、多发性硬化、抗磷脂综合征、ANCA相关性血管炎、Goodpasture疾病、川崎病、自身免疫性溶血性贫血和急进性肾小球肾炎、重链病、原发性或免疫细胞相关性淀粉样变性、或单克隆丙种球蛋白病。

[0188] 特征在于BCMA的表达的浆细胞障碍包括多发性骨髓瘤(MM)。MM是一种B细胞恶性肿瘤,其特征在于骨髓室中异常浆细胞的单克隆扩增和积累。当前针对MM的治疗经常会导致缓解,但几乎所有患者最终都会复发并死亡。有大量证据表明,在同种异体造血干细胞移植的情况下,骨髓瘤细胞发生免疫介导的消除;然而,这种方法的毒性很高,并且很少有患

者被治愈。虽然一些单克隆抗体在临床前研究和早期临床试验中显示出治疗MM的前景,但尚未最终证明任何单克隆抗体疗法对于MM具有持续的临床功效。因此,对MM的新疗法(包括免疫疗法)的需求很大(参见例如Carpenter等人,Clin Cancer Res[临床癌症研究]2013,19(8):2048-2060)。

[0189] 通过其增殖诱导配体APRIL过表达或激活BCMA已知可促进体内人多发性骨髓瘤(MM)进展。还已经显示BCMA促进小鼠中携带p53突变的异种移植MM细胞的体内生长。由于APRIL/BCMA途径的活性经由肿瘤细胞与其支持骨髓微环境之间的双向相互作用在MM发病机制和耐药性中起核心作用,因此BCMA已被鉴定为治疗MM的靶标。关于另外的细节,参见例如Yu-Tsu Tai等人,Blood[血液]2016;127(25):3225-3236。

[0190] 另一种涉及表达BCMA的浆细胞的B细胞障碍是系统性红斑狼疮(SLE),也被称为狼疮。SLE是一种全身性自身免疫性疾病,其可以影响身体的任何部位,并且表现为免疫系统攻击人体自身的细胞和组织,从而导致慢性炎症和组织损伤。这是一种III型超敏反应,其中抗体免疫复合物沉淀并引起进一步的免疫应答(Inaki和Lee,Nat Rev Rheumatol[自然综述:风湿病学]2010;6:326-337)。

[0191] 本发明的抗BCMA仅重链抗体(UniAbs)可以用于开发用于治疗MM、SLE和其他特征在于BCMA的表达的B细胞障碍或浆细胞障碍(诸如以上列出的那些)的治疗剂。特别地,本发明的抗BCMA仅重链抗体(UniAbs)是单独或与其他MM治疗组合的用于治疗MM的候选物。

[0192] 在一个实施例中,本文中的抗体可以呈仅重链抗BCMA抗体-CAR结构,即仅重链抗BCMA抗体-CAR转导T细胞结构的形式。对于BCMA具有抗原特异性的CAR及其使用方法描述于例如WO 2019/006072中,该文献的披露内容通过援引以其全文并入本文。

[0193] 在一些实施例中,本文中的抗体是多特异性的(例如,双特异性的),其包含对于BCMA具有结合亲和力的第一结合单元和对于La蛋白(其存在于效应细胞(例如,T细胞)上的通用嵌合抗原受体(CAR)复合物上)具有结合亲和力的第二结合单元。因此,本发明的多特异性抗体可以用于通过经由第一结合单元与通用CAR复合物结合,并经由第二结合单元提供与BCMA的结合亲和力来使通用CAR复合物功能化。该方法可以进一步涉及治疗有需要的受试者的特征在于BCMA的表达的疾病或障碍,该方法通过以下进行:施用有效量的细胞疗法,该细胞疗法包括包含使用本发明的多特异性抗体功能化以与BCMA结合的通用CAR复合物的多个细胞,并且从而治疗该受试者的疾病或障碍。

[0194] 本发明的组合物用于治疗疾病的有效剂量根据许多不同的因素而变化,包括施用手段、靶部位、患者的生理状态、患者是人还是动物、施用的其他药物、以及治疗是预防性的还是治疗性的。通常,患者是人,但是也可以治疗非人哺乳动物,例如,伴侣动物诸如狗、猫、马等,实验室哺乳动物诸如兔、小鼠、大鼠等等。可以调整治疗剂量以优化安全性和有效性。

[0195] 剂量水平可以由一般熟练的临床医生容易地确定,并且可以根据需要进行修改,例如,根据修改受试者对于疗法的应答的需要。可以与载剂材料组合以产生单一剂型的活性成分的量根据所治疗的宿主和具体施用模式而变化。剂量单位形式通常含有从约1mg至约500mg之间的活性成分。

[0196] 在一些实施例中,该药剂的治疗剂量的范围可以从约0.0001至100mg/kg,并且更通常0.01至5mg/kg宿主体重。例如,剂量可以是1mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg的范围内。示例性治疗方案需要每两周一次或每月一次或每3至6个月施用一次。本发明

的治疗实体通常在多个场合施用。单个剂量之间的间隔可以是每周、每月或每年。间隔也可以是不规则的,如通过测量治疗实体在患者中的血液水平所指示。可替代地,本发明的治疗实体可以作为缓释配制品施用,在这种情况下需要较少的施用频率。剂量和频率根据多肽在患者中的半衰期而变化。

[0197] 典型地,将组合物制备为注射剂,作为液体溶液或悬浮液;也可以制备适用于在注射之前溶解或悬浮在液体媒介物中的固体形式。本文中的药物组合物适用于直接或在固体(例如,冻干)组合物重构之后静脉内或皮下施用。该制剂还可以乳化或包封在脂质体或微颗粒(诸如聚丙交酯、聚乙交酯或共聚物)中以增强佐剂作用,如上所讨论的。Langer, Science[科学]249:1527,1990以及Hanes,Advanced Drug Delivery Reviews[高级药物递送综述]28:97-119,1997。本发明的药剂可以以贮库型注射剂或植入物制剂的形式施用,该形式可以以允许活性成分持续或脉动释放的方式配制。药物组合物通常被配制为无菌的、基本上等渗的,并且完全符合美国食品和药物管理局的所有良好生产规范(GMP)法规。

[0198] 可以在细胞培养物或实验动物中通过标准药理学程序,例如通过确定LD50(对群体的50%致死的剂量)和LD100(对群体的100%致死的剂量)来确定本文所述的抗体和抗体结构的毒性。毒性与治疗作用之间的剂量比是治疗指数。可以在配制对于在人类中使用无毒的剂量范围中使用由这些细胞培养测定和动物研究获得的数据。本文所述的抗体的剂量优选在包括有效剂量而具有很小或没有毒性的一系列循环浓度内。该剂量可以根据所采用的剂型和所利用的施用途径在这个范围内变化。确切配制、施用途径和剂量可以由个别医师根据患者的状况来选择。

[0199] 用于施用的组合物通常包含溶解在药学上可接受的载剂(优选水性载剂)中的抗体或其他烧蚀剂。可以使用多种水性载剂,例如缓冲盐水等。这些溶液是无菌的,并且通常不含不希望物质。这些组合物可以通过常规、熟知的灭菌技术来灭菌。这些组合物可以含有药学上可接受的辅助物质,如近似生理条件所需的辅助物质,诸如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些配制品中活性剂的浓度可以变化很大,并且将主要根据所选择的特定施用模式和患者的需要,基于流体体积、粘度、体重等进行选择(例如,Remington's Pharmaceutical Science[雷明顿药物科学](第15版,1980)和Goodman和Gillman,The Pharmacological Basis of Therapeutics[治疗学的药理学基础](Hardman等人编辑,1996))。

[0200] 包括本发明的活性剂及其配制品以及使用说明书的试剂盒也在本发明的范围内。试剂盒还可以含有至少一种额外试剂,例如化疗药物等。试剂盒典型地包括指示试剂盒的内容物的预期用途的标签。术语标签包括在试剂盒上或与试剂盒一起提供或以其他方式随附试剂盒的任何文字或记录材料。

[0201] 现在正在充分描述本发明,对于本领域普通技术人员而言明显的是,可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下进行各种变化和修改。

[0202] 实例

[0203] 提供以下实例来说明某些实施例,并且不被解释为以任何方式限制本披露的范围。

[0204] 实例1:通过人肿瘤细胞系进行的CAR-T介导的T细胞激活

[0205] 通过用抗BCMA CAR和6x NFAT TK纳米萤光素酶报告基因转染Jurkat T淋巴细胞

来测量CAR-T细胞活性。将转染的Jurkat细胞与BCMA阳性NCI-H929、U266、和Daudi或BCMA阴性K562共培养24小时。使用Promega Nano-Glo萤光素酶测定系统(目录#N1110)测量萤光素酶活性,并且将数据归一化至含有CAR转染的Jurkat和BCMA阴性K562细胞系的共培养物。使用非配对双尾t检验确定统计显著性。

[0206] 结果在图8,分图B中提供。

[0207] 图8,分图A是包含抗BCMA细胞外结合结构域的CAR-T结构的示意图,该细胞外结合结构域包含SEQ ID NO:12的VH序列(克隆ID号:316302)。图8,分图B是描绘用T细胞信号传导的NFAT萤光素酶报告基因和抗BCMA 316302CAR以及NCI-H929(*p=0.04)、U266(**p=0.0008)、和Daudi(*p=0.03)细胞转染的Jurkat细胞的T细胞活性的图。这些结果证明了T细胞激活对BCMA靶标结合具有特异性,因为BCMA CAR Jurkat细胞与BCMA阴性K562细胞系的共培养物不产生可观的萤光素酶报告基因信号。此外,将用报告基因但没有CAR转染的Jurkat细胞与BCMA阳性NCI-H929、U266、和Daudi细胞一起温育也不产生可观的萤光素酶报告基因信号。

[0208] 实例2:抗体与BCMA表达细胞结合

[0209] 通过流式细胞术评估抗体与表达BCMA的MM1.S和H929细胞的结合。测试抗体包括与La蛋白(本文命名为“抗X”)和BCMA(本文命名为“BCMA_F7E”)结合的双特异性构建体。如本文其他地方所述,根据本发明的实施例的双特异性构建体可以包含BCMA结合结构域,该结构域呈二价形式,如图7,分图A,右侧中所描绘;在本文中也被称为“BCMA_F7E_F7E”;或呈单价形式,如图7,分图B,右侧中所描绘;在本文中也被称为“BCMA_F7E”。

[0210] 用以下构建体进行结合实验:抗X**BCMA_F7E,一种具有靶向BCMA的单价臂(包含SEQ ID NO:12)和La蛋白结合臂的双特异性抗体;抗X**BCMA_F7E_F7E,一种具有靶向BCMA的二价臂(包含SEQ ID NO:12,呈二价构型)和La蛋白结合臂的双特异性抗体;抗X**GP120_F8A,一种包含La蛋白结合臂和与GP120结合的臂的双特异性阴性对照抗体。简而言之,将300,000-500,000个细胞以0.5 μ l/测试在150 μ l的FACS缓冲液(1X PBS,2% FBS,1mM EDTA)中与如表1中列出的测试抗体和商业抗BCMA抗体(百进生物科技公司(Biolegend),19F2)共温育。随后将细胞洗涤两次并与抗IgG(PE)二级抗体一起温育。另外两次洗涤之后,在Cytoflex仪器(贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter))上处理细胞并使用FlowJo软件包进行分析。表1、图9,分图A、以及图9,分图B示出了MM1.S和H929细胞中抗IgG4二级抗体的平均荧光强度(MFI)。

[0211] 表1. 抗IgG4二级抗体的平均荧光强度(MFI)。

细胞类型	测试抗体	抗 X**	抗 X**	抗 X**
	(ng/ml)	BCMA_F7E	BCMA_F7E_F7E	GP120_F8A
[0212] H929	200.000	14,064	52,932	5,616
	100.000	7,562	20,874	5,403
	50.000	6,070	10,927	5,239
	25.000	5,479	6,614	5,067
	12.500	5,186	5,682	4,988
	6.250	5,241	5,220	4,983

细胞类型	测试抗体 (ng/ml)	抗 X** BCMA_F7E	抗 X** BCMA_F7E_F7E	抗 X** GP120_F8A
		3.130	5,168	5,141
1.560		5,096	5,057	4,946
0.781		5,056	5,023	4,874
0.391		5,027	5,036	4,918
0.195		5,031	5,008	4,917
0.098		5,061	5,067	4,897
0.000		4,997		
[0213] MM1.S	200.000	3,183	7,339	1,994
	100.000	2,444	4,135	2,013
	50.000	2,176	2,928	2,010
	25.000	2,129	2,345	2,007
	12.500	2,120	2,176	2,003
	6.250	2,134	2,108	1,957
	3.130	2,107	2,073	1,998
	1.560	2,109	2,027	1,992
	0.781	2,064	2,010	1,997
	0.391	2,073	2,032	2,018
	0.195	2,072	2,009	1,976
	0.098	2,036	1,965	2,016
	0.000	2,991		

[0214] 实例3:用APRIL和测试抗体进行的竞争ELISA

[0215] 在用BCMA的天然激动剂APRIL(也被称为BAFF)进行的竞争ELISA中测试双特异性BCMA结合的亲合力。在此测定中,将与板表面结合的BCMA与测试抗体和APRIL各自在不同浓度下共温育。将透明平底免疫非无菌96孔板(康宁公司(Corning),目录号3455)与每孔10ng重组BCMA(R&D系统公司(R&D Systems),目录号193-BC)在100 μ L PBS中温育过夜。将板洗涤并与1X封闭剂BSA(赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific),目录号37525)一起温育。

[0216] 在表2所述的浓度下将测试抗体和重组APRIL(R&D系统公司,目录号560-AP)与涂覆BCMA的板一起温育。将板洗涤并与小鼠抗人IgG-HRP抗体(南方生物技术公司(Southern Biotech),目录号9200-05)一起温育。将板洗涤并根据制造商的说明书用Pierce TMB底物试剂盒(赛默飞世尔科技公司,目录号34021)进行显影。在15分钟内测量450nm和570nm处的吸光度。表2示出了每个样品的A450-A570值。图10,分图A至分图C是示出了双特异性抗体构建体抗X**BCMA_F7E(分图A)、抗X**BCMA_F7E_F7E(分图B)、和抗X**GP120_F8A(分图C)的A450-A570值的图。更高的A450-A570值指示更多的抗体结合。甚至在与双特异性抗体构建体浓度相比更高的APRIL浓度下,包含呈二价构型的BCMA结合VH序列的抗X**BCMA_F7E_F7E构建体也显示出显著的结合。抗X**BCMA_F7E_F7E构建体显示出比包含呈单价构型的BCMA结合VH序列的抗X**BCMA_F7E双特异性抗体构建体更强的结合。

[0217] 表2. 在BCMA激动剂APRIL存在的情况下指示抗体与BCMA结合的 (A450-A570) 值。

[0218]

样品	抗体 (ng/mL)	APRIL (ng/mL)							
		500.00	250.00	125.00	62.50	31.25	15.63	7.81	0.00
抗 X** BCMA _F7E	200.000	0.4818	0.9693	1.3717	2.0748	2.2860	2.4012	2.5108	2.4362
	20.000	0.1117	0.1479	0.2030	0.3589	0.4181	0.4825	0.4951	0.4656
	2.000	0.0711	0.0837	0.0736	0.0834	0.0875	0.0867	0.0895	0.0894
	0.200	0.0745	0.0615	0.0643	0.0631	0.0620	0.0661	0.0643	0.0708
	0.020	0.0835	0.0617	0.0640	0.0629	0.0622	0.0614	0.0631	0.0630
	0.002	0.0836	0.0647	0.0660	0.0670	0.0580	0.0607	0.0607	0.0616
抗 X** BCMA _F7E _F7E	200.000	1.4064	2.2066	2.2959	2.4405	2.4211	2.3723	2.4742	2.4734
	20.000	0.2533	0.4130	0.6371	0.5369	0.8281	0.7776	0.7889	0.6478
	2.000	0.0732	0.0921	0.1081	0.0980	0.1211	0.1066	0.1078	0.1071
	0.200	0.0603	0.0614	0.0651	0.0595	0.0601	0.0587	0.0577	0.0676
	0.020	0.0631	0.0618	0.0557	0.0577	0.0551	0.0584	0.0578	0.0570
	0.002	0.0617	0.0607	0.0607	0.0569	0.0528	0.0620	0.0602	0.0578
抗 X** GP120 _F8A	200.000	0.0838	0.0682	0.0779	0.0701	0.0700	0.0774	0.0734	0.0755
	20.000	0.0615	0.0603	0.0597	0.0586	0.0623	0.0630	0.0659	0.0687
	2.000	0.0615	0.0591	0.0575	0.0628	0.0575	0.0580	0.0644	0.0656
	0.200	0.0590	0.0615	0.0614	0.0596	0.0589	0.0623	0.0597	0.0679
	0.020	0.0563	0.0600	0.0582	0.0611	0.0591	0.0615	0.0639	0.0639
	0.002	0.0617	0.0644	0.0595	0.0634	0.0600	0.0757	0.0685	0.0669

名称	CDR1	CDR2	CDR3
BCMA仅重链 CDR序列	GFTFSSNA (SEQ ID NO: 1)	ISGSGDYT (SEQ ID NO: 2)	AKEVPGGPLVDFDS (SEQ ID NO: 3)
La蛋白, v. 1, 重链CDR序列	GYTFTHYY (SEQ ID NO: 4)	VNPSNGGT (SEQ ID NO: 5)	ARSEYDYGLGFAY (SEQ ID NO: 6)
La蛋白, v. 2, 重链CDR序列	GYAFTHYY (SEQ ID NO: 7)	VNPSNGGT (SEQ ID NO: 5)	TRSEYDYGLGFAY (SEQ ID NO: 8)
La蛋白轻链CDR 序列	QLLNSRTPKNY (SEQ ID NO: 9)	WAS (SEQ ID NO: 10)	KQSYNLLT (SEQ ID NO: 11)

图1

名称	序列
BCMA VH, 单价	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSSNAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGDYTHYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEVPGGP LVDFDSRGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 12)
BCMA VHH, 二价 ,GS ₂ 接头	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSSNAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGDYTHYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEVPGGP LVDFDSRGQGLVTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS GFTFSSNAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGDYTHYSDSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEVPGGPLVDFDSRGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 13)

图2

名称	序列
La 蛋白 VH, v. 1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHYYIYWVRQAPGQGLEWMGG VNPSNGGTHFNEKFKSRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARSEYD YGLGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHK PSNTKVDKRV (SEQ ID NO: 14)
La 蛋白 VH, v. 2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTHYYIYWVRQAPGQGLEWIGGV NPSNGGTHFNEKFGGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCTRSEYDY GLGFAYASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRV (SEQ ID NO: 15)
La 蛋白 VL, v. 1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTPKKNYLAWYQQKPGQPPKLLI YWASTRKSQVDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLLTFGGGT KVEIK (SEQ ID NO: 16)
La 蛋白 VL, v. 2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTPKKNYLAWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLLTFGQGT KVEIK (SEQ ID NO: 17)

图3

名称	序列
La蛋白, 全长 HC, v. 1, 变体IgG4 (S228P、 F234A、 L235A), 杵 (T366W)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHYYIYWVRQAPGQGLEWM GGVNPSNGGTHFNEKFKSRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCA RSEYDYGLGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSL W CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS LGK (SEQ ID NO: 18)
La蛋白, 全长 HC, v. 1, 变体 IgG4 (S228P、 F234A、 L235A), 白 (T366S、 L368A、 Y407V)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHYYIYWVRQAPGQGLEWM GGVNPSNGGTHFNEKFKSRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCA RSEYDYGLGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSL S CA V KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFL V SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS LGK (SEQ ID NO: 19)
La蛋白, 全长 LC, v. 1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTPKNYLAWYQQKPGQPP KLLIYWASTRKGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCKQSYNL LTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 20)
La蛋白, 全长 HC, v. 2, 变体IgG4 (S228P、 F234A、 L235A), 杵 (T366W)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTHYYIYWVRQAPGQGLEWI GGVNPSNGGTHFNEKFGQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCT RSEYDYGLGFAYASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSL W CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PP VLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 21)

图4

名称	序列
La蛋白, 全长 HC, v. 2, 变体IgG4 (S228P、 F234A、 L235A), 白 (T366S、 L368A、 Y407V)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTHYYIYWVRQAPGQGLEWI GGVNPSNGGTHFNEKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCT RSEYDYGLGFAYASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCP <u>P</u> CPAPE <u>AA</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSL <u>S</u> <u>C</u> <u>A</u> VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL <u>V</u> SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 22)
La蛋白, 全长 LC, v. 2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTPKKNYLAWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCKQSYNLL TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEV THQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 23)

图4续

名称	序列
BCMA单价 HCO HC, 变体 IgG4 (S228P、 F234A、 L235A), 白 (T366S、 L368A、 Y407V)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSSNAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGDYTHYSDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKE VPGGPLVDFDSRGQGT LVTVSSESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL SCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFL V SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK (SEQ ID NO: 24)
BCMA单价 HCO HC, 变体 IgG4 (S228P、 F234A、 L235A), 杵 (T366W)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSSNAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGDYTHYSDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKE VPGGPLVDFDSRGQGT LVTVSSESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL W CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK (SEQ ID NO: 25)
BCMA二价 HCO, GS ₂ 接头, HC, 变体IgG4 (S228P、 F234A、 L235A), 白 (T366S、 L368A、 Y407V)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSSNAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGDYTHYSDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKE VPGGPLVDFDSRGQGT LVTVS SGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCVASGFTFSSNAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGDYTHYSDSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEVPGGPLVDFDSRGQGT LVTVSSESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSL SCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL V SR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 26)
BCMA二价 HCO, GS ₂ 接头, HC, 变体IgG4 (S228P、 F234A、 L235A), 杵 (T366W)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSSNAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGDYTHYSDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKE VPGGPLVDFDSRGQGT LVTVS SGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCVASGFTFSSNAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGDYTHYSDSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEVPGGPLVDFDSRGQGT LVTVSSESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSL W CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 27)

图5

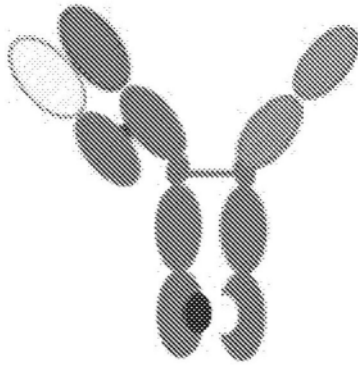
名称	序列
人 IgG4 WT (Fc)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG PPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 28)
人IgG4杆 (T366W, 根据IgG1 编号)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG PPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL W CLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 29)
人IgG4白 (T366S、 L368A、 Y407V, 根据IgG1 编号)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG PPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL S C A VKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL V SRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 30)
人κ轻链恒定 区序列 (Uniprot P01834)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO: 31)
人λ轻链恒定 区序列 (Uniprot P0CG04)	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKA GVETTKPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP TECS (SEQ ID NO: 41)
WT IgG4 HC 铰链	ESKYGPPCPCPA (SEQ ID NO: 32)
HC IgG4 铰链 S228P	ESKYGPPCP P CPA (SEQ ID NO: 33)

图6

名称	序列
GS4 接头	GGGGS (SEQ ID NO: 34)
GS4 ₂ 接头序列	GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 35)
La 蛋白表位1	KPLPEVTDEY (SEQ ID NO: 42)
La 蛋白表位2	VEKEALKKIIEDQQESLNKW (SEQ ID NO: 43)
人 IgG4 CH2 结构域, 野生型	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAK (SEQ ID NO: 36)
人 IgG4 CH2 结构域, 沉默 (F234A、L235A)	APE AA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPSSIEKTISKAK (SEQ ID NO: 37)
人 IgG4 CH3 结构域, 野生型	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKLSLSLGLGK (SEQ ID NO: 38)
人 IgG4 CH3 结构域, 杵 (T366W)	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL W CLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKLSLSLGLGK (SEQ ID NO: 39)
人 IgG4 CH3 结构域, 白 (T366S、L368A、Y407V)	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL SCA VKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFL V SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKLSLSLGLGK (SEQ ID NO: 40)

图6续

A.



B.

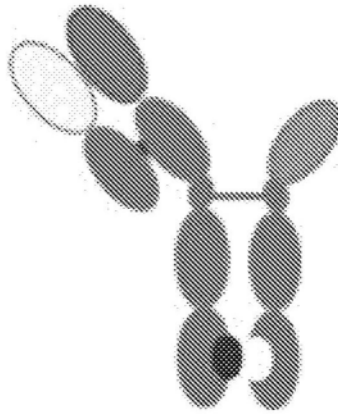
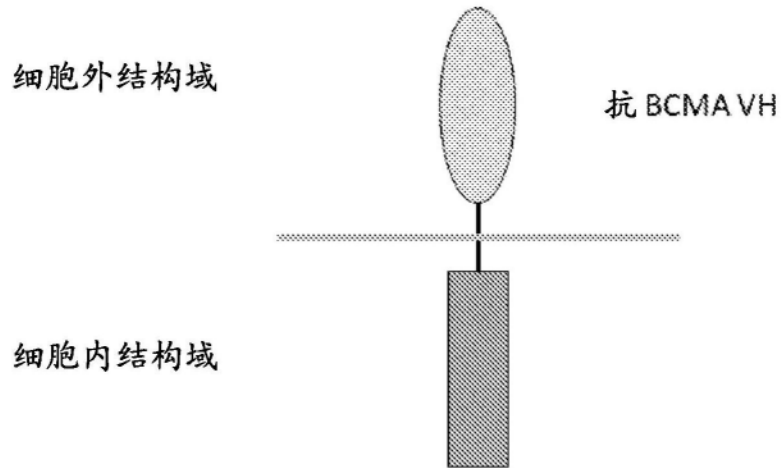


图7

A.



B.

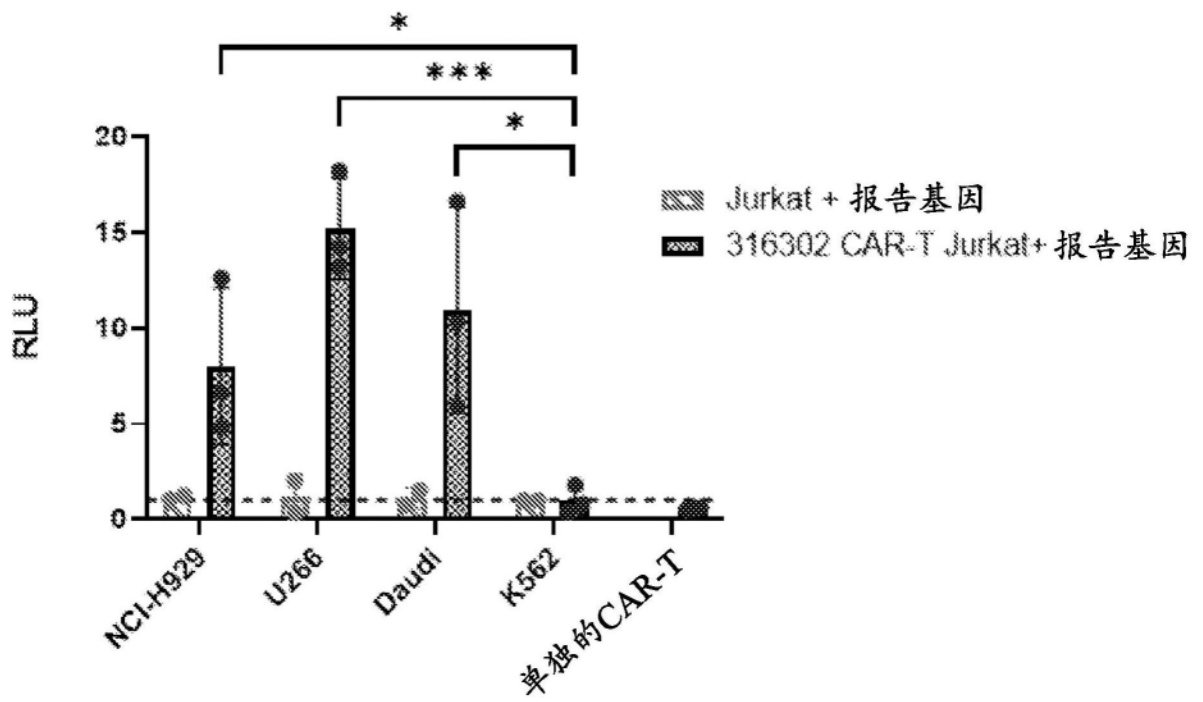
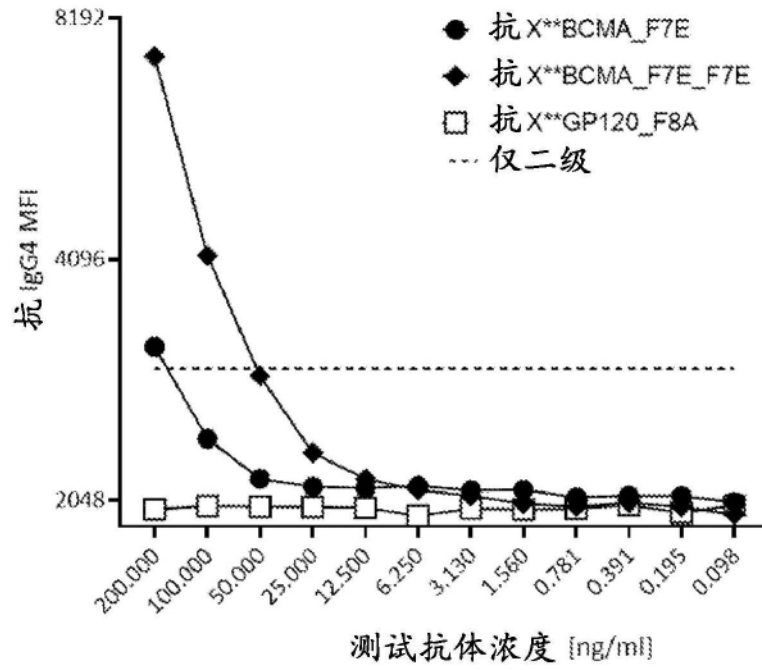


图8

A.



B.

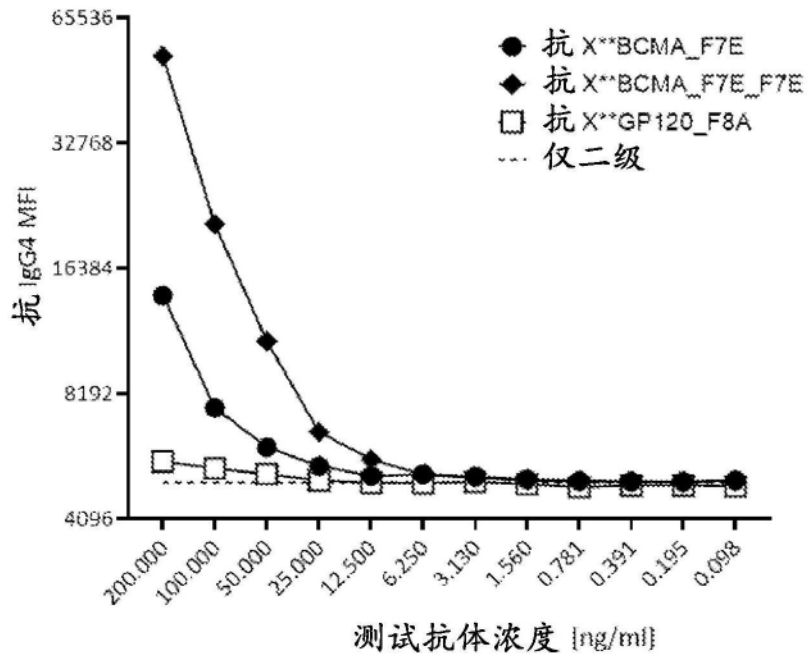
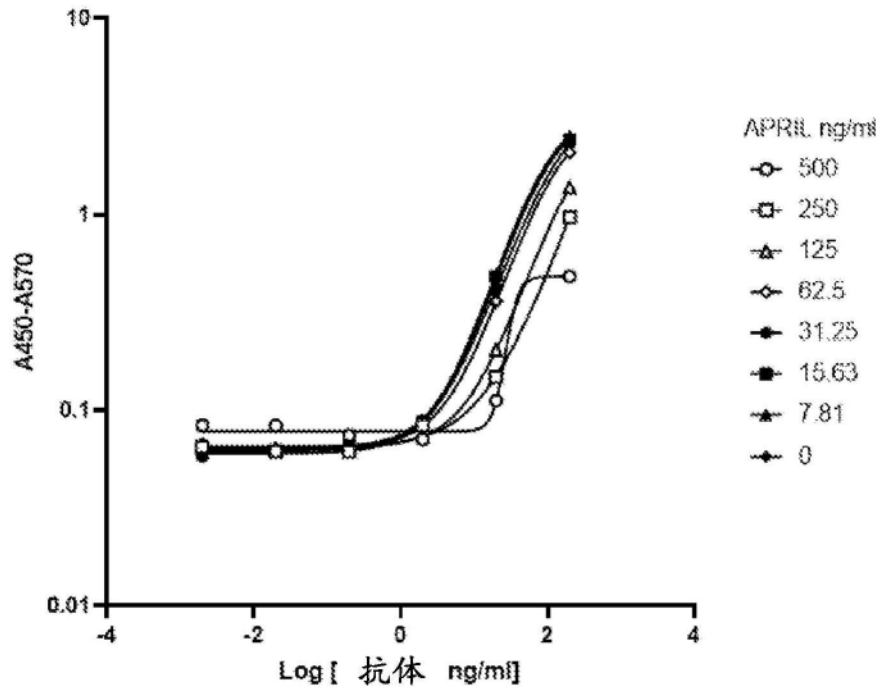


图9

A.



B.

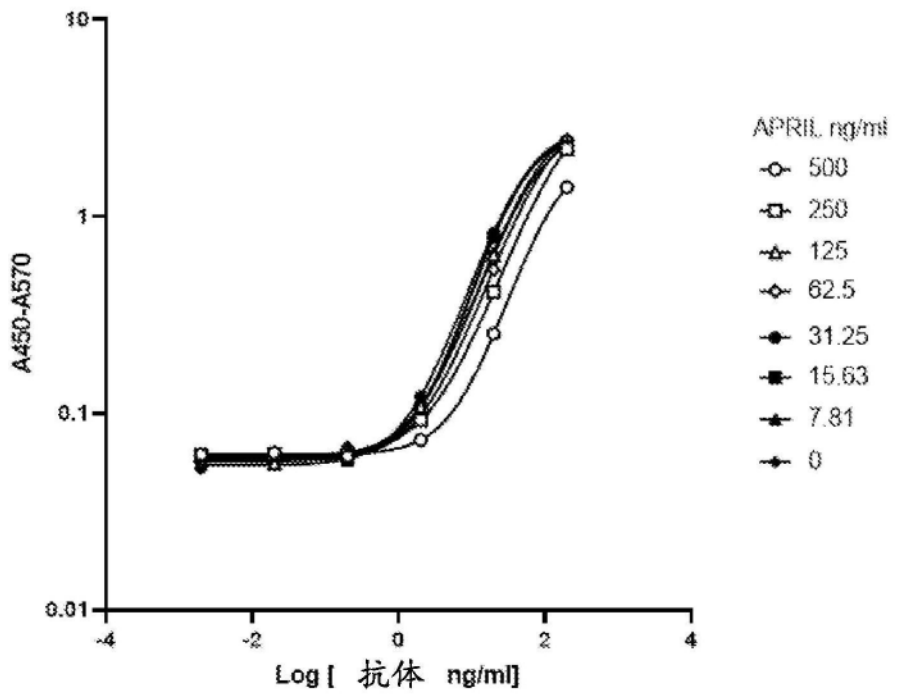


图10

C.

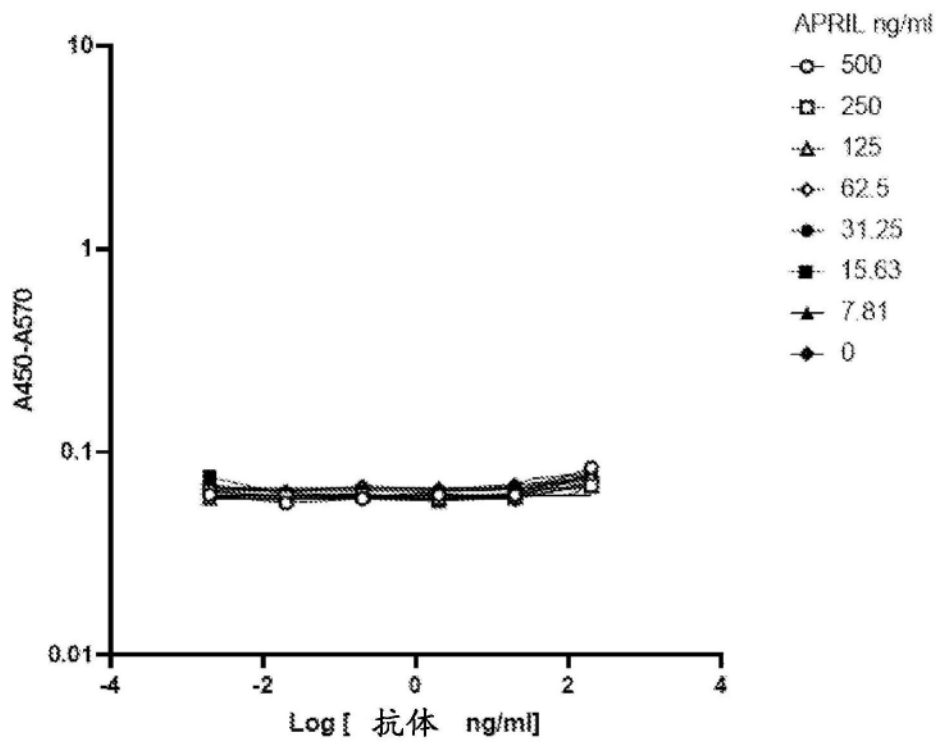


图10续