(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116284402 A
(43)申请公布日 2023.06.23

(21)申请号 202310141159.4

(22)申请日 2017.12.21

(30)优先权数据
62/437,588 2016.12.21 US

(62)分案原申请数据
201780079499.1 2017.12.21

(71)申请人 特尼奥生物股份有限公司
地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 S·F·奥尔德雷 N·特林克林
K·E·哈里斯 K·党 W·范肖滕

(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 张小勇

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)

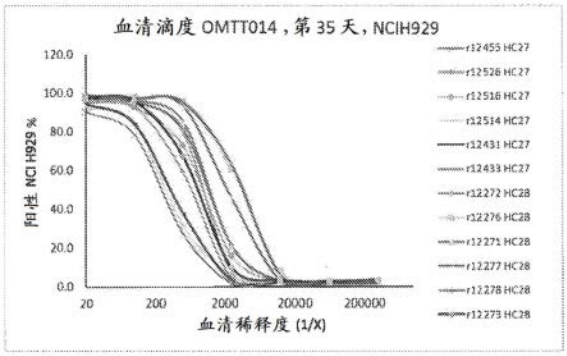
权利要求书2页 说明书16页
序列表（电子公布） 附图5页

(54)发明名称

仅有重链的抗BCMA抗体

(57)摘要

本发明涉及的是仅有重链的抗BCMA抗体(HCAb)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),以及它们用于治疗以BCMA表达为特征的B细胞病症的用途。



CN 116284402 A

1.一种与人B细胞成熟抗原(BCMA)结合的仅有重链的抗体,所述抗体包含含有以下序列的重链可变区:

(a)选自SEQ ID NO:1至4的CDR1序列;和

(b)选自SEQ ID NO:5至18的CDR2序列;和

(c)包含SEQ ID NO:19的序列的CDR3序列。

2.如权利要求1所述的仅有重链的抗体,其中所述CDR1、CDR2和CDR3序列存在于人框架中。

3.如权利要求1所述的仅有重链的抗体,所述抗体还包含不存在CH1序列的重链恒定区序列。

4.如权利要求1-3中任一项所述的仅有重链的抗体,所述抗体包含选自由SEQ ID NO:20至53组成的组的重链可变区序列。

5.一种与人B细胞成熟抗原(BCMA)结合的仅有重链的抗体,所述抗体包含在人VH框架中包含以下序列的重链可变区:

(a)包含下式的CDR1序列:

G F T F X1 X2 Y A(SEQ ID NO:55)

其中

X1为S或T;以及

X2为S、N或R;以及

(b)包含下式的CDR2序列:

X3 X4 X5 X6 G X7 X8 X9(SEQ ID NO:56)

其中

X3为I或L;

X4为S、T、I或V;

X5为G或E;

X6为S、G、N或D;

X7为G、D或A;

X8为S、T或N;

X9为T或S,以及

(c)包含SEQ ID NO:19的序列的CDR3序列。

6.如权利要求5所述的仅有重链的抗体,所述抗体包含在人VH框架中包含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区,其中所述CDR序列选自由SEQ ID NO:1-19和54组成的组。

7.如权利要求5所述的仅有重链的抗体,所述抗体包含在人VH框架中包含以下序列的重链可变区:

(a)包含SEQ ID NO:1的CDR1序列、包含SEQ ID NO:8的CDR2序列;和包含SEQ ID NO:19的CDR3序列;或

(b)包含SEQ ID NO:3的CDR1序列、包含SEQ ID NO:7的CDR2序列;和包含SEQ ID NO:19的CDR3序列。

8.如权利要求1-7中任一项所述的仅有重链的抗体,所述抗体是多特异性的。

9.如权利要求8所述的仅有重链的抗体,所述抗体是双特异性的。

10.如权利要求9所述的仅有重链的抗体,所述抗体对两种不同的BCMA蛋白具有结合亲和力。

11.如权利要求9所述的仅有重链的抗体,所述抗体对同一BCMA蛋白上的两个不同表位具有结合亲和力。

12.如权利要求8所述的仅有重链的抗体,所述抗体对效应细胞具有结合亲和力。

13.如权利要求8所述的仅有重链的抗体,所述抗体对T细胞抗原具有结合亲和力。

14.如权利要求13所述的仅有重链的抗体,所述抗体对CD3具有结合亲和力。

15.如权利要求1至11中任一项所述的仅有重链的抗体,所述抗体呈CAR-T形式。

16.一种药物组合物,其包含如权利要求1至15中任一项所述的仅有重链的抗体。

17.如权利要求1至15中任一项所述的仅有重链的抗体用于制备用于治疗个体中以BCMA异常表达为特征的B细胞病症的用途。

18.如权利要求17所述的用途,其中所述个体是人。

19.如权利要求17或18所述的用途,其中所述B细胞病症是多发性骨髓瘤。

20.如权利要求17或18所述的用途,其中所述B细胞病症是系统性红斑狼疮。

21.一种多核苷酸,其编码如权利要求1至15中任一项所述的抗体。

22.一种载体,其包含如权利要求21所述的多核苷酸。

23.一种细胞,其包含如权利要求22所述的载体。

24.一种产生如权利要求1至15中任一项所述的仅有重链的抗体的方法,其包括在允许所述蛋白质表达的条件下生长根据权利要求23的细胞,并从所述细胞中分离所述抗体。

25.一种制备如权利要求1至15中任一项所述的仅有重链的抗体的方法,其包括用BCMA免疫接种UniRat动物并鉴定结合BCMA的重链序列。

仅有重链的抗BCMA抗体

[0001] 本申请是CN201780079499.1的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2016年12月21日提交的美国临时专利申请序列第62/437,588号的提交日期的优先权权益,所述美国临时专利申请序列的公开内容通过引用整体并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包含序列表,该序列表已经以XML格式电子提交,并且在此通过引用整体并入。

发明领域

[0006] 本发明涉及仅有重链的抗BCMA抗体(HCAb)。本发明还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)以及它们用于治疗以BCMA表达为特征的B细胞病症的用途。

[0007] 发明背景

[0008] B细胞成熟抗原(BCMA)

[0009] BCMA,也称为肿瘤坏死因子超家族成员17(TNFRSF17)(UniProt Q02223),是仅在浆细胞和浆母细胞上表达的细胞表面受体。BCMA是以下物质的的受体:肿瘤坏死因子(TNF)超家族中两种配体:APRIL(增殖诱导配体,也称为TNFSF13;TALL-2和TRDL-1;BCMA的高亲和力配体)和B细胞活化因子(BAFF)(也称为BLyS;TALL-1;THANK;zTNF4;TNFSF20;和D8Ertd387e;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也在人多发性骨髓瘤(MM)中的恶性浆细胞上高度表达。结合至BCMA的抗体描述于例如Gras等,1995,Int.Immunol.7:1093-1106、WO200124811和WO200124812中。与TACI交叉反应的抗BCMA抗体描述于WO2002/066516中。针对BCMA和CD3的双特异性抗体描述于例如US 2013/0156769 A1和US 2015/0376287 A1中。已报道抗BCMA抗体-MMAE或-MMAF缀合物选择性地诱导多发性骨髓瘤细胞的杀伤(Tai等,Blood 2014,123(20):3128-38)。Ali等,Blood2016,128(13):1688-700报道了在临床试验(#NCT02215967)中靶向BCMA的嵌合抗原受体(CAR)T细胞导致人患者中多发性骨髓瘤的缓解。

[0010] 仅有重链的抗体

[0011] 在常规IgG抗体中,重链和轻链的缔合部分由轻链恒定区和重链CH1恒定区之间的疏水相互作用导致。在重链框架2(FR2)和框架4(FR4)区域中存在另外的残基,其也对重链与轻链之间的这种疏水相互作用作出贡献。

[0012] 然而,已知骆驼科动物(包括骆驼、单峰驼和美洲驼的胼足亚目)的血清含有仅由成对的H链(仅有重链的抗体或HCAb)组成的主要类型的抗体。骆驼科(单峰驼(Camelus dromedarius)、双峰驼(Camelus bactrianus)、大羊驼(Lama glama)、原驼(Lama guanaco)、美洲羊驼(Lama alpaca)和骆马(Lama vicugna))的HCAb具有独特的结构,其由单个可变结构域(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HCAb缺乏恒定区(CH1)的第一结构域,所述第一结构域存在于

基因组中,但在mRNA加工过程中被剪接掉。缺少CH1结构域解释了HCAb中不存在轻链,因为该结构域是轻链恒定结构域的锚定位置。此类HCAb天然进化以通过来自常规抗体的3个CDR或其片段赋予抗原结合特异性和高亲和力(Muyldermans,2001;J Biotechnol 74:277-302;Revets等,2005;Expert Opin Biol Ther 5:111-124)。软骨鱼,诸如鲨鱼,也进化出独特类型的免疫球蛋白(称为IgNAR),其缺乏轻链多肽链并且完全由重链组成。可通过分子工程化操纵IgNAR分子以产生单个重链多肽(vNAR)的可变结构域(Nuttall等,Eur.J.Biochem.270,3543-3554(2003);Nuttall等,Function and Bioinformatics 55,187-197(2004);Dooley等,Molecular Immunology 40,25-33(2003))。

[0013] 在20世纪60年代确定了缺乏轻链的仅有重链的抗体结合抗原的能力(Jaton等(1968)Biochemistry,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,(1990)Cell,60,781-790证明从重排的小鼠μ基因中去除CH1结构域导致在哺乳动物细胞培养物中产生缺乏轻链的仅有重链的抗体。产生的抗体保留VH结合特异性和效应子功能。

[0014] 通过免疫接种可针对多种抗原产生具有高特异性和亲和力的重链抗体(van der Linden等,Biochim.Biophys.Acta.1431,37-46(1999)),并且可容易地克隆VHH部分以及使其在酵母中表达(Frenken,L.G.J.等,J.Biotechnol.78,11-21(2000))。它们的表达水平、溶解度和稳定性显著高于经典F(ab)或Fv片段的那些表达水平、溶解度和稳定性(Ghahroudi,M.A.等FEBS Lett.414,521-526(1997))。

[0015] 其中λ(兰姆达)轻(L)链基因座和/或λ及κ(卡帕)L链基因座已被功能性沉默的小鼠以及由此类小鼠产生的抗体描述于美国专利第7,541,513号和第8,367,888号中。例如,在例如WO2006008548;美国申请公开第20100122358号;Nguyent等,2003,Immunology;109(1),93-101;Brüggemann等,Crit.Rev.Immunol.;2006,26(5):377-90;和Zou等,2007,J Exp Med;204(13):3271-3283中报道了在小鼠和大鼠中重组产生仅有重链的抗体。在Geurts等,2009,Science,325(5939):433中描述了经由锌指核酸酶的胚胎显微注射产生敲除大鼠。在美国专利第8,883,150号和第9,365,655号中描述了可溶性仅有重链的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动物。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,2011,Experimental Cell Research 317:2630-2641和Jamnani等,2014,Biochim Biophys Acta,1840:378-386中。

发明内容

[0016] 本发明涉及抗BCMA抗体。

[0017] 在一个方面,本发明涉及与人B细胞成熟抗原(BCMA)结合的仅有重链的抗体,其包含含有以下序列的重链可变区:

[0018] (a)与SEQ ID NO:1至4的任何序列具有至少95%序列同一性的CDR1;和/或

[0019] (b)与SEQ ID NO:5至18和54的任何序列具有至少95%序列同一性的CDR2;和/或

[0020] (c)与SEQ ID NO:19具有至少95%序列同一性的CDR3。

[0021] 在一个实施方案中,CDR1、CDR2和CDR3序列存在于人框架中。

[0022] 在另一个实施方案中,仅有重链的抗BCMA抗体还包含不存在CH1序列的重链恒定区序列。

[0023] 在另一个实施方案中,仅有重链的抗体包含:

[0024] (a)选自由SEQ ID NO:1至4组成的组的序列;和/或

[0025] (b)选自由SEQ ID NO:5至18和54组成的组的CDR2序列;和/或

[0026] (c)SEQ ID NO:19的CDR3。

[0027] 在另外的实施方案中,仅有重链的抗BCMA抗体包含:

[0028] (a)选自由SEQ ID NO:1至4组成的组的CDR1序列;和

[0029] (b)选自由SEQ ID NO:5至18和54组成的组的CDR2序列;和

[0030] (c)SEQ ID NO:19的CDR3。

[0031] 在仍然另外的实施方案中,仅有重链的抗BCMA抗体包含与SEQ ID NO:20至53的任何序列具有至少95%序列同一性的重链可变区。

[0032] 在另一个实施方案中,仅有重链的抗BCMA抗体包含选自由SEQ ID NO:20至53组成的组的重链可变区序列。

[0033] 在另一方面,本发明涉及与人B细胞成熟抗原(BCMA)结合的仅有重链的抗体,其包含在人VH框架中包含以下序列的重链可变区:

[0034] (a)下式的CDR1序列:

[0035] G F T F X1 X2 Y A(SEQ ID NO:55)

[0036] 其中

[0037] X1为S或T;以及

[0038] X2为S、N或R;以及

[0039] (b)下式的CDR2序列:

[0040] X3 X4 X5 X6 G X7 X8 X9(SEQ ID NO:56)

[0041] 其中

[0042] X3为I或L;

[0043] X4为S、T、I或V;

[0044] X5为G或E;

[0045] X6为S、G、N或D;

[0046] X7为G、D或A;

[0047] X8为S、T或N;

[0048] X9为T或S,以及

[0049] (c)SEQ ID NO:19的CDR3序列。

[0050] 在另外的方面,本发明涉及与人B细胞成熟抗原(BCMA)结合的仅有重链的抗体,其包含在人VH框架中包含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区,其中所述CDR序列是与选自由SEQ ID NO:1-19和54组成的组的CDR序列具有至少95%同一性的序列。

[0051] 在一个实施方案中,此类抗体包含在人VH框架中包含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区,其中所述CDR序列选自由SEQ ID NO:1-19和54组成的组。

[0052] 在另外的方面,本发明涉及与人B细胞成熟抗原(BCMA)结合的仅有重链的抗体,其包含在人VH框架中包含以下序列的重链可变区:

[0053] (a)SEQ ID NO:1的CDR1、SEQ ID NO:5的CDR2;和SEQ IDNO:19的CDR3;以及

[0054] (b)SEQ ID NO:2的CDR1、SEQ ID NO:54的CDR2;和SEQ IDNO:19的CDR3。

[0055] 在一个实施方案中,仅有重链的抗体是多特异性的,诸如双特异性的。

[0056] 在另一个实施方案中,仅有重链的抗体对两种不同的BCMA蛋白具有结合亲和力。

[0057] 在另一个实施方案中,仅有重链的抗体对同一BCMA蛋白上的两个不同表位具有结合亲和力。

[0058] 在另外的实施方案中,仅有重链的抗体对效应细胞具有结合亲和力。

[0059] 在仍然另外的实施方案中,仅有重链的抗体对T细胞抗原具有结合亲和力。

[0060] 在另一个实施方案中,仅有重链的抗体对CD3具有结合亲和力。

[0061] 在不同的方面,上文所述的仅有重链的抗体呈CAR-T形式。

[0062] 在另外的方面,本发明涉及包含本文的仅有重链的抗BCMA抗体的药物组合物。

[0063] 在仍然另外的方面,本发明涉及用于治疗以BCMA表达为特征的B细胞病症的方法,该方法包括向患有此种病症的受试者施用本文的仅有重链的抗BCMA抗体,或者包含此类抗体的药物组合物。

[0064] 在各种实施方案中,B细胞病症可以是例如多发性骨髓瘤或系统性红斑狼疮。

[0065] 在另外的方面,本发明涉及编码本文的仅有重链的抗BCMA抗体的多核苷酸。

[0066] 在仍然另外的方面,本发明涉及包含编码本文的仅有重链的抗BCMA抗体的多核苷酸的载体。

[0067] 在另一方面,本发明涉及细胞,其包含编码本文的仅有重链的抗BCMA抗体的多核苷酸或含有此类多核苷酸的载体。

[0068] 在另一个方面,本发明涉及产生本文抗体的方法,其包括在允许表达抗体的条件下培养如上文所述的细胞,并从细胞中分离抗体。

[0069] 另一方面,本发明涉及制备如本文所述的仅有重链的抗BCMA抗体的方法,其包括用BCMA免疫接种UniRat动物并鉴定结合BCMA的重链序列。

[0070] 在本公开的其余部分(包括实施例)中将进一步解释这些和其它方面。

附图说明

[0071] 图1显示本发明的34种仅有重链的抗BCMA抗体的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列。

[0072] 图2显示本发明的34种仅有重链的抗BCMA抗体的重链可变区序列。

[0073] 图3:在HEK 293细胞中表达的34种仅有重链的抗BCMA抗体的抗体结合活性的热图概述。红色表示强结合,而蓝色表示弱结合或负结合结果。对所有34种抗体进行细胞结合测定,并显示所述抗体结合H929细胞。测试编码VH序列308607或VH序列308915的两种抗体与未标记的人BCMA ECD片段和两种脱靶蛋白对照(包括人IgG1和杆状病毒蛋白提取物(BVP))以及BCMA+MM细胞系RPMI8226的结合。还评估了两种UniAb在重组蛋白ELISA样式测定中阻断APRIL(配体)/BCMA(受体)结合的能力。

[0074] 图4:针对免疫原以及其它中靶和脱靶蛋白的血清结合活性。在标准ELISA测定中测定来自一个亚组的动物的d35血清的单一1:500稀释物对一系列蛋白质的结合活性。中靶蛋白包括人BCMA Fc区(huBCMA-Fc)、与人Fc序列融合的cyno BCMA ECD(cyBCMA),以及来自两种其它来源(大肠杆菌(E.coli)和小麦胚芽)的不具有Fc融合的huBCMA。人血清白蛋白和人IgG1用于评估脱靶反应性。

[0075] 图5:针对BCMA+细胞系(NCI-H929)的血清结合活性。使用缀合有PE的抗大鼠IgG2a

抗体，通过流式细胞术测试血清与NCI-H929细胞的结合来评估滴度。评估显示显著染色的NCI-H929细胞的百分比。

[0076] 图6：包含人VH细胞外结合结构域的代表性CAR-T构建体。

[0077] 优选实施方案的详述

[0078] 除非另有说明，否则本发明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，所述技术在本领域技术人员的能力范围内。此类技术在诸如以下文献中进行了充分解释："Molecular Cloning:A Laboratory Manual"，第二版(Sambrook等，1989)；"Oligonucleotide Synthesis"(M.J.Gait，编辑，1984)；"Animal Cell Culture"(R.I.Freshney，编辑，1987)；"Methods in Enzymology"(Academic Press,Inc.)；"Current Protocols in Molecular Biology"(F.M.Ausubel等，编辑，1987以及定期更新)；"PCR:The Polymerase Chain Reaction"，(Mullis等，编辑，1994)；"A Practical Guide to Molecular Cloning"(Perbal Bernard V.,1988)；"Phage Display:ALaboratory Manual"(Barbas等，2001)；Harlow,Lane和Harlow,Using Antibodies:A Laboratory Manual:Portable Protocol No.I,Cold Spring Harbor Laboratory(1998)；和Harlow和Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory;(1988)。

[0079] 在提供数值范围的情况下，应理解的是，该范围的上限和下限之间的每个居间数值(至下限单位的十分之一，除非本文另外清楚地规定)以及所述范围内的任意其它所述或居间的数值都包括在本发明中。这些较小范围的上限和下限可独立地包括在该较小的范围内，并且也包括在本发明中，服从于所述范围内的任何特别排除的限值。当所述范围包括上下限值之一或两者时，排除那些所包括的界限之一或两者的范围也包括在本发明中。

[0080] 除非另有说明，否则本文的抗体残基根据Kabat编号系统(例如，Kabat等，Sequences of Immunological Interest.第五版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))编号。

[0081] 在以下描述中，列出了许多具体细节以提供对本发明的更充分的理解。但是，本领域技术人员显而易见的是在没有一个或多个这些具体细节的前提下也可实施本发明。在其它情况下，并没有对本领域技术人员熟知的特征和熟知的程序进行描述，以避免使本发明不清楚。

[0082] 贯穿本公开内容引用的所有参考文献，包括专利申请和出版物，均通过引用整体并入本文。

[0083] I.定义

[0084] "包含"是指组合物/方法/试剂盒中需要所列举的元素，但可以包括其它元素以形成权利要求范围内的组合物/方法/试剂盒等。

[0085] "基本上由.....组成"是指针对特定材料或步骤所描述的组合物或方法的范围的限制，其不会实质上影响本发明的一种或多种基本和新颖的特征。

[0086] "由...组成"是指从组合物、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。

[0087] 如本文中所用，术语"单克隆抗体"是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体，即，除了可能以少量存在的可能的天然发生的突变之外，构成群体的各个抗体是相同的。单克

隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原部位的。此外,与通常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。

[0088] 术语“仅有重链的抗体”、“重链抗体”和“HCAb”可互换使用,并且在最广泛的意义上,是指缺乏常规抗体轻链的抗体。由于同型二聚体HCAb缺乏轻链并因而缺乏VL结构域,因此抗原被一个单一结构域(即重链抗体的重链的可变结构域(VH))识别。该术语具体包括但不限于在不存在CH1结构域的情况下包含VH抗原结合结构域以及CH2和CH3恒定结构域的同型二聚体抗体;此类抗体的功能性(抗原结合)变体、可溶性VH变体、Ig-NAR(其包含一个可变结构域(V-NAR)的同二聚体和五个C样恒定结构域(C-NAR)及其功能片段);和可溶性单结构域抗体(sdAb)。在一个实施方案中,仅有重链的抗体由可变区抗原结合结构域组成,所述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组成。在一个实施方案中,仅有重链的抗体由抗原结合结构域、至少部分铰链区以及CH2和CH3结构域组成。在另一个实施方案中,仅有重链的抗体由抗原结合结构域、至少部分铰链区和CH2结构域组成。在另外的实施方案中,仅有重链的抗体由抗原结合结构域、至少部分铰链区和CH3结构域组成。其中CH2和/或CH3结构域被截短的仅有重链的抗体也包括在本文中。在另外的实施方案中,重链由抗原结合结构域和至少一个CH(CH1、CH2、CH3或CH4)结构域组成,但没有铰链区。仅有重链的抗体可呈二聚体形式,其中两条重链通过二硫键键合,否则彼此共价或非共价连接。仅有重链的抗体可以属于IgG亚类,但属于其它亚类的抗体,诸如IgM、IgA、IgD和IgE亚类,也包括在本文中。在特定的实施方案中,重链抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型,特别是IgG1亚型。在一个实施方案中,本文的仅有重链的抗体用作嵌合抗原受体(CAR)的结合(靶向)结构域。

[0089] 与抗体一起使用的术语“可变的”是指抗体可变结构域的某些部分在抗体之间在序列上广泛不同并且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性的事实。然而,变异性不是均匀地分布在抗体的可变结构域中。其集中在轻链和重链可变区中称为高变区的三个区段中。可变结构域的更高保守部分称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含通过三个高变区连接的四个FR(主要采用β-折叠构型),所述高变区形成连接β-折叠结构的环,并且在一些情况下形成β-折叠结构的一部分。每条链中的高变区通过FR紧密地保持在一起,并且与来自另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合部位的形成(参见Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出各种效应子功能,诸如抗体参与抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)。

[0090] 当在本文中使用时,术语“高变区”是指抗体的负责抗原结合的氨基酸残基。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,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))和/或来自重链可变结构域中的“高变环”残基26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)的那些残基;Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。

[0091] “框架区”或“FR”残基是除本文定义的高变区残基之外的那些可变结构域残基。

[0092] 本文显示了示例性CDR指定,然而本领域技术人员将理解,CDR的许多定义通常在

使用中,包括Kabat定义(参见“Zhao等A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions.”Mol Immunol.2010;47:694-700),其基于序列可变性并且是最常用的。Chothia定义基于结构环区域的位置(Chothia等,“Conformations of immunoglobulin hypervariable regions.”Nature.1989;342:877-883)。感兴趣的备选CDR定义包括但不限于以下所公开的那些:Honegger,“Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool.”J Mol Biol.2001;309:657-670;Ofran等“Automated identification of complementarity determining regions(CDRs)reveals peculiar characteristics of CDRs and B cell epitopes.”J Immunol.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.”J Mol Recognit.2004;17:132-143;以及Padlan等“Identification of specificity-determining residues in antibodies.”Faseb J.1995;9:133-139.,所述文献中的每一篇明确地通过引用并入本文。

[0093] “分离的”抗体是已从其天然环境的组分中鉴定和分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染组分是会干扰抗体的诊断或治疗用途的物质,并且可包括酶、激素和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选实施方案中,抗体将被纯化至(1)如通过Lowry方法所测定的至少大于95重量%的抗体,最优选大于99重量%的抗体,(2)至足以获得通过使用旋转杯测序仪测定的N末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,或(3)至使用考马斯蓝染色或优选银染色在还原或非还原条件下通过SDS-PAGE测定的均一性。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成分将不存在。然而,通常,通过至少一个纯化步骤制备分离的抗体。

[0094] 本发明的抗体包括多特异性抗体。多特异性抗体具有不止一种结合特异性。术语“多特异性”具体地包括“双特异性”和“三特异性”,以及高级独立特异性结合亲和力,诸如高级多表位特异性,以及四价抗体和抗体片段。“多特异性”抗体具体地包括包含不同结合实体的组合的抗体以及包含不止一种相同结合实体的抗体。术语“多特异性抗体”、“多特异性单链抗体”和“多特异性HCAb”在本文中以最广义使用,并涵盖具有不止一种结合特异性的所有抗体。

[0095] 如本文中所用,术语“价”是指抗体分子中指定数目的结合部位。

[0096] “多价”抗体具有两个或更多个结合部位。因此,术语“二价”、“三价”和“四价”分别指存在两个结合部位、三个结合部位和四个结合部位。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、四价或另外地多价的。

[0097] 许多种方法和蛋白质构型是已知的并用于制备双特异性单克隆抗体(BsMAB)、三特异性抗体等。

[0098] 术语“双特异性三链抗体样分子”或“TCA”在本文中用于指包含三个多肽亚基、基本上由所述三个多肽亚基组成或由所述三个多肽亚基组成的抗体样分子,其中两个亚基包含单克隆抗体的一条重链和一条轻链或包含抗原结合区和至少一个CH结构域的此类抗体链的功能性抗原结合片段组成、基本上由其组成或由其组成。该重链/轻链对对第一抗原具

有结合特异性。第三多肽亚基包含仅有重链的抗体、基本上由所述抗体组成或由所述抗体组成，所述抗体包含不存在CH1结构域的包含CH2和/或CH3和/或CH4结构域的Fc部分，以及结合第二抗原的表位或第一抗原的不同表位的抗原结合结构域，其中此类结合结构域源自抗体重链或轻链的可变区或与所述可变区具有序列同一性。此类可变区的部分可由V_H和/或V_L基因区段、D和J_H基因区段或J_L基因区段编码。可变区可由重排的V_HDJ_H、V_LDJ_H、V_HJ_L或V_LJ_L基因区段编码。TCA蛋白质利用如上文所定义的仅有重链的抗体。

[0099] 本文在最广泛的意义上使用术语“嵌合抗原受体”或“CAR”来指工程化受体，其将所需的结合特异性(例如单克隆抗体的抗原结合区或其它配体)移植到跨膜和细胞内信号传导结构域。通常，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)。(JNatl Cancer Inst,2015;108(7):dvj439;和Jackson等,Nature Reviews Clinical Oncology,2016;13:370-383.)。图6中显示了包含人VH细胞外结合结构域的代表性CAR-T构建体。

[0100] “人独特型”意指免疫球蛋白重链和/或轻链可变区中存在于人抗体上的多肽序列表位。如本文中所用，术语“人独特型”包括天然存在的人抗体序列以及与天然存在的人抗体中发现的多肽基本上相同的合成序列。“基本上”意指氨基酸序列同一性程度为至少约85％-95％。优选地，氨基酸序列同一性程度大于90％，更优选大于95％。

[0101] “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区的转基因抗体和人独特型抗体。可从已被工程化以产生此类嵌合抗体的本发明的动物中分离此类免疫球蛋白。

[0102] 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；Fc受体结合；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；吞噬；细胞表面受体(例如B细胞受体；BCR)的下调等。

[0103] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”是指其中表达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)识别在靶细胞上的结合抗体，随后引起靶细胞裂解的细胞介导的反应。介导ADCC的原代细胞NK细胞仅表达FcγRIII，而单核细胞表达FcγRI、FcγRII和FcγRIII。在Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol 9:457-92(1991)的第464页上的表3中概述了造血细胞上的FcR表达。为了评估目标分子的ADCC活性，可以进行体外ADCC测定，诸如美国专利第5,500,362号或第5,821,337号中描述的测定。用于此类测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。可选地或另外地，可以例如在动物模型诸如Clynes等PNAS(USA)95:652-656(1998)中公开的动物模型中体内评估目标分子的ADCC活性。

[0104] “人效应细胞”是表达一种或多种FcR并执行效应子功能的白细胞。优选地，所述细胞至少表达FcγRIII并执行ADCC效应子功能。介导ADCC的人白细胞的实例包括外周血单核细胞(PBMC)、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞和嗜中性粒细胞；其中PBMC和NK细胞是优选的。可从其天然来源，例如，从如本文所述的血液或PBMC分离所述效应子细胞。

[0105] “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)的结合

而启始。为了评估补体激活，可进行例如如Gazzano-Santoro等，J.Immunol.Methods 202:163(1996)中所述的CDC测定。

[0106] “结合亲和力”是指分子(例如抗体)的单个结合部位与其结合配偶体(例如，抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明，否则如本文中所用，“结合亲和力”是指内在结合亲和力，其反映结合对的成员(例如，抗体和抗原)之间的1:1相互作用。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可由解离常数(Kd)表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法测量。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并且倾向于易于解离，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。

[0107] 如本文中所用，“Kd”或“Kd值”是指以动力学模式使用Octet QK384仪(Fortebio Inc.,Menlo Park,CA)通过生物双层干涉测量法测定的解离常数。例如，向抗小鼠Fc传感器装载小鼠-Fc融合抗原，然后将其浸入含有抗体的孔中以测量浓度依赖性结合率(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。(关于进一步的细节参见Concepcion,J等，Comb Chem High Throughput Screen,12(8),791-800,2009)。

[0108] “表位”是单个抗体分子所结合的抗原分子表面上的部位。通常，抗原具有几个或许多不同的表位并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。

[0109] “表位作图”是鉴定抗体在其靶抗原上的结合部位或表位的过程。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连续的氨基酸序列形成。构象表位由在蛋白质序列中是不连续的，但在蛋白质折叠成其三维结构时聚集在一起的氨基酸形成。

[0110] “多表位特异性”是指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。

[0111] 当抗体与参考抗体识别相同或空间上重叠的表位时，所述抗体与参考抗体结合“基本上相同的表位”。用于确定两个表位是否与相同或空间上重叠的表位结合的最广泛使用和快速的方法是竞争测定，其可使用标记的抗原或标记的抗体以所有数量的不同形式配置。通常，将抗原固定在96孔板上，并使用放射性标记物或酶标记物测量未标记的抗体阻断标记的抗体的结合的能力。

[0112] 术语“治疗”、“医治”等在本文中通常用于指获得所需的药理学和/或生理学作用。就完全或部分预防疾病或其症状而言，该效果可以是预防性的和/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。如本文中所用，“治疗”涵盖对哺乳动物疾病的任何治疗，包括：(a)预防疾病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发生；(b)抑制疾病，即阻止其发展；或(c)缓解疾病，即引起疾病的消退。治疗剂可以在疾病或损伤发作之前、期间或之后施用。其中治疗稳定或减少患者的不良临床症状的正在进行的疾病的治疗特别令人感兴趣。期望在受累组织中完全丧失功能之前进行此种治疗。主题疗法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。

[0113] “治疗有效量”旨在用于赋予受试者治疗益处所必需的活性剂的量。例如，“治疗有效量”是诱发、改善或以其它方式引起与疾病相关的病理症状、疾病进展或生理状况的改善或提高对病症的抗性的量。

[0114] 术语“受试者”、“个体”和“患者”在本文中可互换地用于指就治疗而进行评估和/

或被治疗的哺乳动物。在一个实施方案中，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、具有病原体感染的个体等。受试者可以是人，但也包括其它哺乳动物，特别是可用作人疾病的实验室模型的那些哺乳动物，例如，小鼠、大鼠等。

[0115] II.详细说明

[0116] 抗BCMA抗体

[0117] 本发明提供了与人BCMA结合的密切相关的仅有重链的抗体家族。该家族的抗体包含一组如本文所定义并示于图1中的CDR序列，并且通过图2中所示的SEQ ID NO 20至53的提供的重链可变区(VH)序列举例说明。抗体家族提供促成作为一种或多种临床治疗剂的应用的许多有益处。抗体包括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。

[0118] 合适的抗体可选自本文提供用于开发和治疗或其它用途(包括但不限于作为双特异性或三特异性抗体，或CAR-T结构的一部分的用途)的抗体。可以使用本领域已知的方法(诸如Biacore测量)来测定候选蛋白质的亲和力。抗体家族的成员对BCMA可具有亲和力，其中Kd为约10^{-6}至约10^{-11}，包括但不限于：约10^{-6}至约10^{-10}；约10^{-6}至约10^{-9}；约10^{-6}至约10^{-8}；约10^{-8}至约10^{-11}；约10^{-8}至约10^{-10}；约10^{-8}至约10^{-9}；约10^{-9}至约10^{-11}；约10^{-9}至约10^{-10}；或这些范围内的任何值。可以通过用于调节例如阻断BCMA生物活性的生物学评估(包括体外试验、临床前模型和临床试验，以及潜在毒性的评估)来确认亲和力选择。

[0119] 本文中抗体家族的成员不与食蟹猴的BCMA蛋白交叉反应，但如果需要可被工程化以提供交叉反应性。

[0120] 本文中的BCMA特异性抗体家族包含VH结构域，其在人VH框架中包含CDR1、CDR2和CDR3序列。作为一个实例，CDR序列可位于SEQ ID NO:20-53中所示的所提供的示例性可变区序列的大致氨基酸残基26-35、53-59和98-117(分别对应于CDR1、CDR2和CDR3)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序列可处于不同的位置，尽管通常序列的顺序将保持相同。

[0121] 本发明的抗体共享SEQ ID NO:19的CDR3氨基酸序列。本发明的抗BCMA抗体的CDR1和CDR2序列可以包括在以下结构式中，其中X表示可变氨基酸，其可以是如下所示的特定氨基酸。

[0122] CDR1

[0123] G F T F X1 X2 Y A(SEQ ID NO:55)

[0124] 其中

[0125] X1为S或T；

[0126] X2为S、N或R

[0127] CDR2

[0128] X3 X4 X5 X6 G X7 X8 X9(SEQ ID NO:56)

[0129] 其中

[0130] X3为I或L；

[0131] X4为S、T、I或V；

[0132] X5为G或E；

[0133] X6为S、G、N或D；

[0134] X7为G、D或A；

[0135] X8为S、T或N；

[0136] X9为T或S.

[0137] 代表性CDR1、CDR2和CDR3序列示于图1中。

[0138] 在一些实施方案中，本发明的抗BCMA抗体包含SEQ ID NO:1、2、3或4的CDR1序列。在特定实施方案中，CDR1序列是SEQ IDNO:1或SEQ ID NO:2。

[0139] 在一些其它实施方案中，本发明的抗BCMA抗体包含SEQ IDNO:5-18和54中的任一个的CDR2序列。在特定实施方案中，CDR2序列是SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:54。

[0140] 在另一个实施方案中，本发明的抗BCMA抗体包含SEQ ID NO:1的CDR1序列、SEQ ID NO:5的CDR2序列和SEQ ID NO:19的CDR3序列。

[0141] 在另外的实施方案中，本发明的抗BCMA抗体包含SEQ ID NO:2的CDR1序列、SEQ ID NO:54的CDR2序列和SEQ ID NO:19的CDR3序列。

[0142] 在另外的实施方案中，本发明的抗BCMA抗体包含SEQ ID NO:20至53的重链氨基酸序列中的任一个序列(图2)。

[0143] 在一些实施方案中，本发明的CDR序列包含相对于SEQ ID NO:1至19和54中的任一个中的CDR1、CDR2和/或CDR3序列或CDR1、CDR2和CDR3序列的组的一个、两个、三个或更多个氨基酸取代(图1)。在一些实施方案中，所述一个或多个氨基酸取代是相对于上文提供的式的CDR1的氨基酸位置5和6中的一个或多个取代，和/或CDR2的1-4和6-8的氨基酸位置中的一个或多个取代。在一些实施方案中，本文的抗-BCMA抗体的CDR序列具有相对于SEQ ID NO:1至19和54(图1)中任一个中的CDR1、CDR2和/或CDR3序列或CDR1、CDR2和CDR3序列的组具有至少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％同一性的序列。在一些其它实施方案中，本文中的仅有单链的抗-BCMA抗体将包含与图2中所示的重链可变区序列具有至少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％同一性的重链可变区。

[0144] 在一些实施方案中，提供了双特异性或多特异性抗体(其可具有本文所论述的任何构型)，包括但不限于三链双特异性抗体。双特异性抗体至少包含对除BCMA外的蛋白质具有特异性的抗体的重链可变区。

[0145] 当本发明的蛋白质是双特异性抗体时，一个结合部分对人BCMA具有特异性，而另一个臂可以对靶细胞、肿瘤相关抗原、靶向抗原(例如整联蛋白等)、病原体抗原、检查点蛋白等具有特异性。靶细胞具体地包括癌细胞，诸如血液肿瘤，例如B细胞肿瘤。

[0146] 各种形式的双特异性抗体在本发明的范围内，包括但不限于单链多肽，双链多肽，三链多肽，四链多肽及其多倍。本文中的双特异性抗体具体地包括与BCMA(其在浆细胞(PC)和多发性骨髓瘤(MM)上选择性表达)和CD3结合的T细胞双特异性抗体(抗BCMA×抗CD3抗体)上选择性表达。此类抗体诱导高效的T细胞介导的携带BCMA的细胞的杀伤。

[0147] 药物组合物

[0148] 本发明的另一方面是提供包含与合适的药学上可接受的载体的混合的一种或多种本发明的抗体的药物组合物。本文中使用的药学上可接受的载体是示例性但不限于佐剂、固体载体、水、缓冲剂或本领域中用于保持治疗组分的其它载体，或其组合。

[0149] 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体、赋形剂或稳定剂(参见,例如Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编辑(1980))混合来将根据本发明使用的抗体的药物组合物制备成诸如冻干制剂或水溶液形式以用于储存。可接受的稀释剂、载体、赋形剂和稳定剂在所使用剂量和浓度下对接受者无毒性,并且包括:诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸的缓冲剂;包括抗坏血酸和甲硫氨酸的抗氧化剂;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六烃季铵;氯化苯甲烃铵、氯化苄乙氧铵;苯酚、丁醇或苄醇;诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯的对羟基苯甲酸烷基酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;及间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白的蛋白质;诸如聚乙烯吡咯烷酮的亲水性聚合物;诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸的氨基酸;单糖、二糖及其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;诸如EDTA的螯合剂;诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇的糖类;诸如钠的成盐抗衡离子;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)的非离子表面活性剂。

[0150] 例如,在美国专利第9,034,324号中公开了抗BCMA抗体制剂。类似的制剂可用于本发明的蛋白质。

[0151] 使用方法

[0152] 本文中的药物组合物可用于治疗以BCMA表达为特征的B细胞相关病症。

[0153] 此类与B细胞相关的疾病包括B细胞和浆细胞恶性肿瘤和自身免疫疾病,包括但不限于浆细胞瘤、霍奇金淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、小无裂解性细胞淋巴瘤、地方性伯基特淋巴瘤、散发性伯基特淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、结外粘膜相关淋巴组织淋巴瘤、结节性单核细胞样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、不确定恶性潜能的B细胞增殖、淋巴瘤样肉芽肿病、移植后淋巴增生性障碍、免疫调节疾病、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、南美锥虫病、格雷夫斯氏病、韦格纳肉芽肿病、多结节性动脉炎、斯耶格伦氏综合征、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、古德帕斯丘综合征、川崎病、自身免疫性溶血性贫血以及快速进展性肾小球肾炎、重链疾病、原发性或免疫细胞相关淀粉样变性或单克隆丙种球蛋白病。

[0154] 以BCMA表达为特征的浆细胞病症包括多发性骨髓瘤(MM)。MM是B细胞恶性肿瘤,其特征在于骨髓隔室中的异常浆细胞的单克隆扩增和积累。目前治疗MM的疗法经常导致缓解,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背景中存在免疫介导的骨髓瘤细胞消除;然而,这种方法的毒性很高,很少有患者得到治愈。尽管一些单克隆抗体已在临床前研究和早期临床试验中显示出治疗MM的前景,但任何针对MM的单克隆抗体疗法的一致临床疗效尚未得到最终证实。因此非常需要新的疗法,包括针对MM的免疫疗法(参见,例如Carpenter等,Cliln Cancer Res2013,19(8):2048-2060)。

[0155] 涉及浆细胞(即表达BCMA)的另一种B细胞病症是系统性红斑狼疮(SLE),也称为狼疮。SLE是一种全身性自身免疫性疾病,其可影响身体的任何部位,并用攻击身体自身的细胞和组织,导致慢性炎症和组织损伤的免疫系统表示。其为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 Rheumatol2010;6:326-337)。

[0156] 本发明的抗体可用于开发用于治疗MM、SLE和以BCMA表达为特征的其它B细胞疾病(诸如上面列出的那些)的治疗剂。

[0157] 在一个实施方案中,本文中的抗体可呈仅有重链的抗BCMA抗体-CAR结构(即仅有重链的抗BCMA抗体-CAR转导的T细胞结构)的形式。

[0158] 用于治疗疾病的本发明组合物的有效剂量根据许多不同因素而变化,所述因素包括施用方式、靶位点、患者的生理状态、患者是人还是动物、施用的其它药物以及治疗是预防性的还是治疗性的。通常,患者是人,但也可治疗非人哺乳动物,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。可以滴定治疗剂量以优化安全性和功效。

[0159] 剂量水平可以由普通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,根据需要修改受试者对疗法的反应。可与载体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特定的施用方式而变化。剂量单位形式通常含有约1mg至约500mg活性成分。

[0160] 在一些实施方案中,所述药剂的治疗剂量可在约0.0001至100mg/kg的宿主体重,更常见地0.01至5mg/kg的宿主体重的范围内。例如,剂量可以是1mg/kg的体重或10mg/kg的体重或在1-10mg/kg的范围内。示例性治疗方案需要每两周施用一次或每月施用一次或每3至6个月施用一次。通常在多重情况下施用本发明的治疗性实体。单剂量之间的间隔可以是每周、每月或每年。如通过测量患者中治疗性实体的血液水平所指示的,间隔也可以是无规律的。或者,可将本发明的治疗性实体作为持续释放制剂施用,在该情况下需要较低频率的施用。剂量和频率根据患者中多肽的半衰期而变化。

[0161] 通常,将组合物制备成可注射的,制备为液体溶液或混悬液;也可以制备适于在注射前溶解或悬浮在液体媒介物中的固体形式。如上所述,还可以乳化制剂或将其包封在脂质体或微粒(诸如聚丙交酯、聚乙交酯或共聚物)中,以增强佐剂效果。Langer,Science 249:1527,1990和Hanes,Advanced Drug Delivery Reviews 28:97-119,1997。本发明的药剂可以以长效注射剂或植入制剂的形式施用,可以以诸如允许持续或脉冲释放活性成分的方式配制其。通常将药物组合物配制成无菌的、基本上等渗的并且完全遵从美国食品和药物管理局的所有优质生产规范(Good Manufacturing Practice)(GMP)条例。

[0162] 本文所述的抗体和抗体结构的毒性可通过细胞培养物或实验动物中的标准药学方法,例如通过测定LD_{50}(对50%群体致死的剂量)或LD_{100}(对100%群体致死的剂量)来测定。毒性与治疗效果之间的剂量比是治疗指数。从这些细胞培养测定和动物研究获得的数据可用于配制对在人中使用无毒的剂量范围。本文所述抗体的剂量优选在包括有效剂量且几乎没有毒性或没有毒性的循环浓度范围内。剂量可根据所用的剂型和所用的给药途径在此范围内变化。确切的制剂、施用途径和剂量可以由个体医生根据患者的状况选择。

[0163] 用于施用的组合物通常包含溶解在药学上可接受的载体(优选含水载体)中的抗体或其它消融剂。可以使用各种含水载体,例如缓冲盐水等。这些溶液是无菌的并且通常没有不希望的物质。这些组合物可以通过常规的熟知的灭菌技术来灭菌。该组合物可含有接近生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,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。这些制剂中活性剂的浓度可以广泛变化,并且

将根据所选择的特定施用方式和患者的需要,主要基于流体体积、粘度、体重等来选择(例如,Remington's Pharmaceutical Science(第15版,1980)和Goodman&Gillman,The Pharmacological Basis of Therapeutics(Hardman等,编辑,1996))。

[0164] 包含本发明的活性剂及其制剂和使用说明书的试剂盒也在本发明的范围内。所述试剂盒还可含有至少一种另外的试剂,例如,化学治疗药物等。试剂盒通常包括指示试剂盒内容物的预期用途的标签。术语标签包括在试剂盒上提供或与套件一起提供或者以其它方式随试剂盒附带的任何书写或记录材料。

[0165] 现在充分描述了本发明,对于本领域普通技术人员显而易见的是,在不脱离本发明的精神或范围的情况下,可以进行各种改变和修改。

实施例

[0166] 实施例1

[0167] 表达仅有重链的抗体的遗传工程大鼠

[0168] 构建'人-大鼠'IgH基因座并组装在若干部分中。这涉及修饰大鼠C区基因并将其连接在人J_H下游,随后在上游添加人V_H6-D区段区域。然后将具有单独的人V_H基因簇的两个BAC[BAC6和BAC3]与称为Georg的BAC共注射,编码包含人V_H6、所有D、所有J_H和经修饰的大鼠Cγ2a/1/2b(ΔC_H1)的组装和修饰区域。

[0169] 产生携带呈未重排构型的人工重链免疫球蛋白基因座的转基因大鼠。IgG2a(ΔC_H1).、igG1(ΔC_H1).、IgG2b(ΔC_H1)基因缺乏C_H1区段。恒定区基因IgE、IgA和3'增强子包含在Georg BAC中。转基因大鼠的RT-PCR和血清分析(ELISA)揭示了转基因免疫球蛋白基因座的生产性重排和各种同种型的仅有重链的抗体在血清中的表达。将转基因大鼠与先前在美国专利公开2009/0098134A1中描述的具有突变的内源重链和轻链基因座的大鼠杂交。对此类动物的分析证明了大鼠免疫球蛋白重链和轻链表达的失活以及具有由人V、D和J基因编码的可变区的重链抗体的高水平表达。转基因大鼠的免疫接种导致产生抗原特异性重链抗体的高滴度血清响应。这些表达具有人VDJ区域的重链抗体的转基因大鼠被称为UniRat。

[0170] 实施例2

[0171] 免疫接种

[0172] 利用BCMA的重组细胞外结构域进行免疫接种。

[0173] 用重组人BCMA蛋白免疫接种12只UniRat动物(6只HC27,6只HC28)。根据标准方案使用Titermax/铝胶佐剂免疫动物。BCMA的重组细胞外结构域购自R&D Systems并将其用无菌盐水稀释并与佐剂合并。将免疫原与Titermax和铝胶佐剂合并。在左腿和右腿中施用利用Titermax中的免疫原的第一免疫接种(初免)。随后的加强免疫在铝胶存在的情况下进行,并且在收获前三天用PBS中的免疫原进行加强。在最终出血时从大鼠收集血清以测定血清滴度。

[0174] 血清滴度结果

[0175] 血清滴度概要信息示于图4和5中。对于一半的动物,通过ELISA分别测试针对真核细胞中产生的huBCMA+Fc蛋白和cynoBCMA+Fc蛋白以及来自大肠杆菌和小麦胚芽的两种人BCMA蛋白测试单一1:500血清滴度稀释物的结合活性。另外,针对两种脱靶蛋白、HSA和人IgG1测试血清样品。另外,测定来自所有12只动物的血清与NCI-H929细胞(BCMA+,λ-)的结

合。

[0176] 在这组动物中,我们观察到至NCI-H929细胞(BCMA+,λ-)的血清反应性水平的显著扩散。这些结果的相关性得到针对一个亚组的动物产生的ELISA结合数据证实。对于许多动物观察到一些一般的Fc特异性反应性,但看起来最有希望的那些动物也在针对来自替代来源(大肠杆菌、小麦胚芽)的未标记的人BCMA的测定中显示高表观滴度,表明显著的BCMA ECD-特异性结合活性。与cynoBCMA+Fc蛋白结合的阳性信号可以反映与也包含在人免疫原上的分子的ECD或Fc部分的结合。在这两种测定类型中,在免疫接种前从这些动物中获取的血清的分析未显示与免疫原或脱靶蛋白的反应性。

[0177] 实施例3

[0178] 基因组装、表达和结合测定

[0179] 选择309种编码在淋巴结细胞中高度表达的仅有重链的抗体的cDNA用于基因组装并克隆到表达载体中。随后,将这309种重链序列在HEK细胞中表达为仅有UniAb重链的抗体(缺失CH1,无轻链)。包括测试的34个VH区的氨基酸序列的结合结果可在BCMA_FAM2_DATA中找到。

[0180] 在标准ELISA测定中测试两种抗体的上清液与人BCMA的结合。使用从Abcam获得的人BCMA ECD(ab50089)通过ELISA测定与重组BCMA蛋白的结合。将浓度为2μg/mL的BCMA ECD蛋白用于捕获50ng/mL的UniAb。用缀合有山羊抗人IgG HRP的抗体(ThermoFisher 31413)检测UniAb的结合。将所有抗体在含有0.05%Tween-20和1%干奶粉的1X TBS中稀释。

[0181] 如上所述(其中进行了使用1X PBS和1%干奶粉作为稀释剂的改进),通过ELISA进行与杆状病毒蛋白质提取物(BVP)的脱靶结合。BVP提取物获自INSERM(Nantes,France)。与杆状病毒颗粒的结合(在我们的测定中超过本底的5倍)被认为表明与人组织的低亲和力相互作用,这与人和猴中抗体的半衰期缩短相关(Hotzel等,mAbs 4:6,第753-760页,2012)。使用UniAb捕获人IgG1κ,随后用缀合有山羊抗人κHRP的抗体(Southern Biotech 2060-05)检测κ链来通过ELISA评估人IgG1的脱靶结合。

[0182] 还通过流式细胞术测试所有抗体的上清液与RPMI-8226细胞(BCMA+,λ+)和H929细胞(BCMA+,λ-)的结合。使用来自EMD Millipore的Guava easyCyte 8HT仪通过流式细胞术测量样品,并使用guavaSoft进行分析。用缀合至PE的山羊抗人IgG $F(ab')_2$(Southern Biotech 2042-09)检测结合的抗体。将所有抗体在含有1% BSA的PBS中稀释。通过与利用人IgG1同种型对照的染色相比确定阳性染色。NCI-H929和RPMI-8226细胞系是表达人BCMA的人多发性骨髓瘤细胞系,其获自美国典型培养物保藏中心(ATCC)并根据ATCC推荐进行培养。

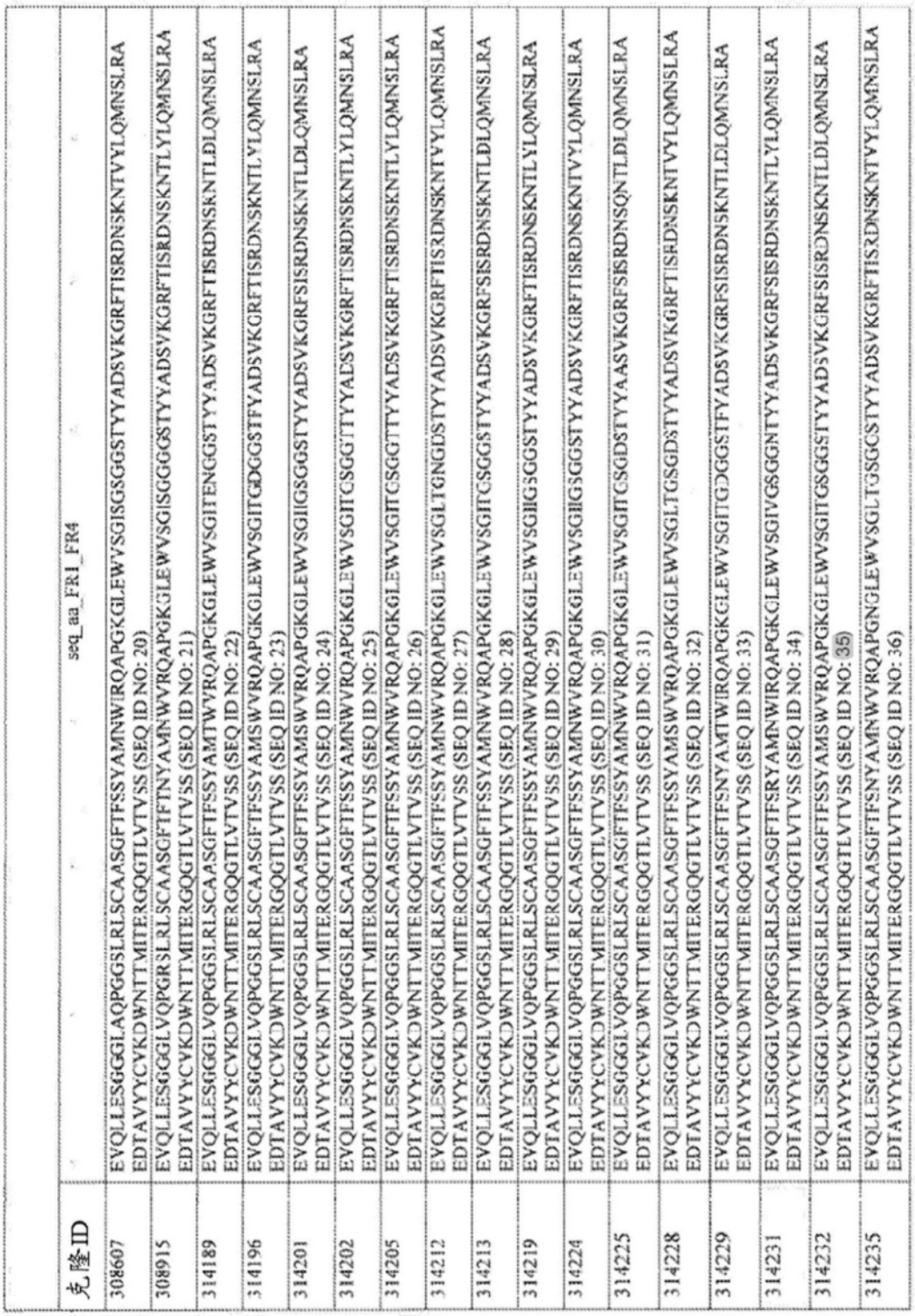
[0183] 还评价了两种UniAb在重组蛋白ELISA样式测定中阻断APRIL(配体)/BCMA(受体)结合的能力。为了评价BCMA与APRIL之间的受体/配体相互作用的阻断,将重组人BCMA(Sino Biological 10620-H03H)直接包被在板上,然后用每种UniAb的稀释系列孵育。然后将HA标记的重组APRIL蛋白(RnD Systems 5860-AP-010)与BCMA/抗体复合物一起孵育,并使用缀合至HRP的鸡抗-HA抗体(Abcam ab1190)检测APRIL与BCMA的结合。RnD系统抗BCMA抗体(AF193)用作BCMA/APRIL阻断的阳性对照。

[0184] 对完整杆状病毒颗粒(BVP)进行另外的脱靶结合测定,尽管所测试的UniAb均未显示阳性结合。

[0185] 虽然本文已经显示和描述了本发明的优选实施方案，但是对于本领域技术人员显而易见的是，这些实施方案仅以举例的方式提供。在不脱离本发明的情况下，本领域技术人员现在将想到许多变化、改变和替换。应该理解的是，本文所述的本发明实施方案的各种替代方案可用于实施本发明。以下权利要求旨在限定本发明的范围，并且由此覆盖这些权利要求及其等同物范围内的方法和结构。

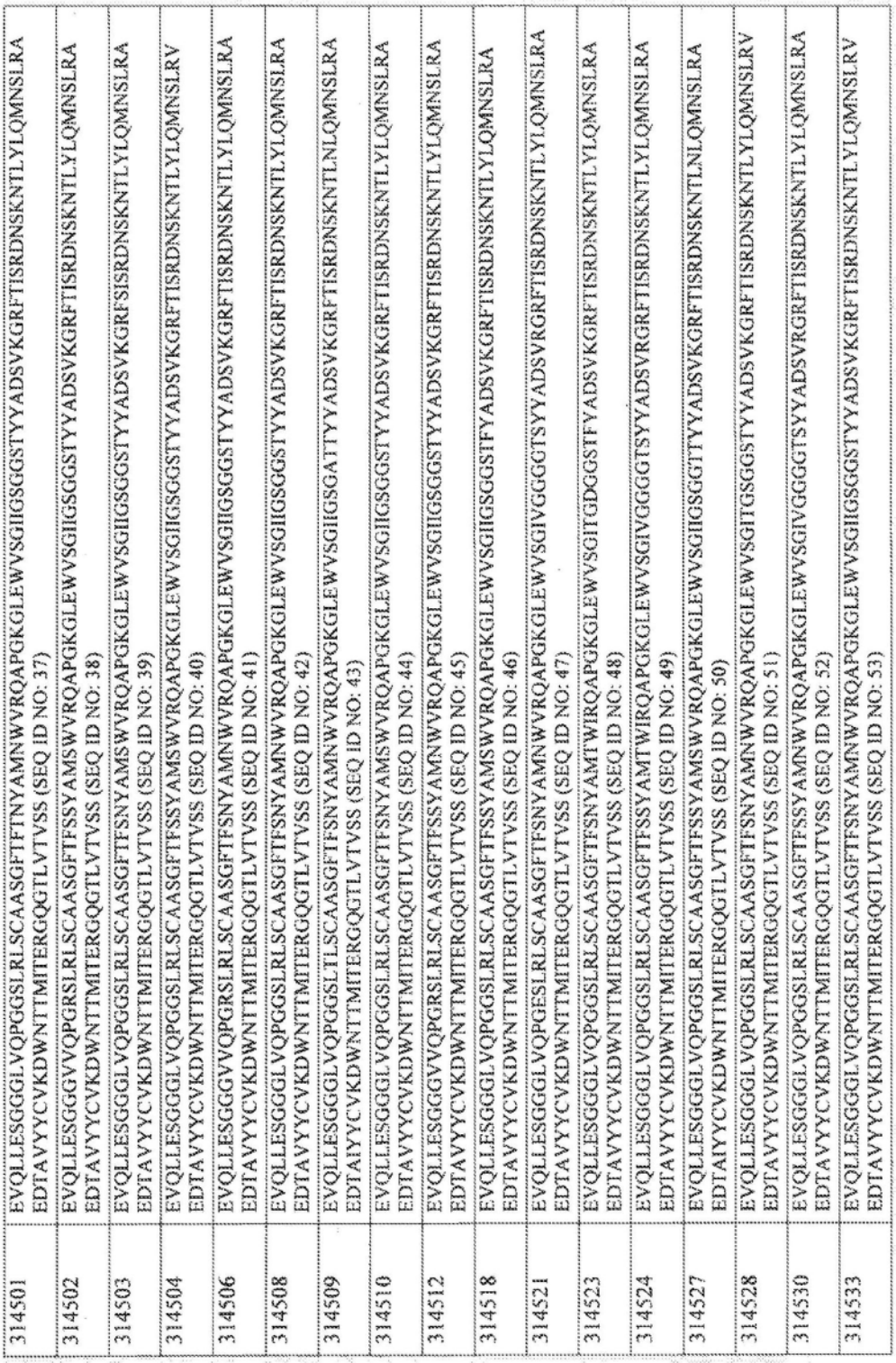
克隆ID	MFI/本底 (H929细胞结合)	seq_aa_CDR1	seq_aa_CDR2	seq_aa_CDR3
308607	558.6	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	ISGSGGST (SEQ ID NO: 5)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
308915	284.8	GFTFTNYA (SEQ ID NO: 2)	ISGGGGST (SEQ ID NO: 54)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314189	123.5	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	ITENGGST (SEQ ID NO: 6)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314196	133.6	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	ITGDGGST (SEQ ID NO: 7)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314201	76.9	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	IGSGGGST (SEQ ID NO: 8)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314202	193.1	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	IGSGGGST (SEQ ID NO: 8)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314205	102.8	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	ITGSGGTT (SEQ ID NO: 9)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314212	125.9	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	LTGNGDST (SEQ ID NO: 10)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314213	135.2	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	ITGSGGST (SEQ ID NO: 11)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314219	166.9	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	IGSGGGST (SEQ ID NO: 8)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314224	175.8	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	IGSGGGST (SEQ ID NO: 8)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314225	148.9	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	ITGSGDST (SEQ ID NO: 12)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314228	99.1	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	LTGSGDST (SEQ ID NO: 13)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314229	124.2	GFTFSNYA (SEQ ID NO: 3)	ITGDGGST (SEQ ID NO: 7)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314231	157.3	GFTFSRYA (SEQ ID NO: 4)	IVGSGGNT (SEQ ID NO: 14)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314232	79.0	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	ITGSGGST (SEQ ID NO: 11)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314235	128.3	GFTFSNYA (SEQ ID NO: 3)	LTGSGGST (SEQ ID NO: 15)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314501	251.1	GFTFTNYA (SEQ ID NO: 2)	IGSGGST (SEQ ID NO: 8)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314502	169.7	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	IGSGGST (SEQ ID NO: 8)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314503	183.3	GFTFSNYA (SEQ ID NO: 3)	IGSGGST (SEQ ID NO: 8)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314504	176.8	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	IGSGGST (SEQ ID NO: 8)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314506	243.1	GFTFSNYA (SEQ ID NO: 3)	IGSGGST (SEQ ID NO: 8)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314508	209.0	GFTFSNYA (SEQ ID NO: 3)	IGSGGST (SEQ ID NO: 8)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314509	241.5	GFTFSNYA (SEQ ID NO: 3)	IGSGATT (SEQ ID NO: 16)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314510	171.1	GFTFSNYA (SEQ ID NO: 3)	IGSGGST (SEQ ID NO: 8)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314512	213.8	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	IGSGGST (SEQ ID NO: 8)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314518	182.9	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	IGSGGST (SEQ ID NO: 8)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314521	234.8	GFTFSNYA (SEQ ID NO: 3)	IVGGGGTS (SEQ ID NO: 17)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314523	195.1	GFTFSNYA (SEQ ID NO: 3)	ITGDGGST (SEQ ID NO: 7)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314524	82.9	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	IVGGGGTS (SEQ ID NO: 17)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314527	134.3	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	IGSGGTT (SEQ ID NO: 18)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314528	154.8	GFTFSNYA (SEQ ID NO: 3)	ITGSGGST (SEQ ID NO: 11)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314530	222.3	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	IVGGGGTS (SEQ ID NO: 17)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)
314533	205.3	GFTFSNYA (SEQ ID NO: 3)	IGSGGST (SEQ ID NO: 8)	VKDWNTTMITE (SEQ ID NO: 19)

图1



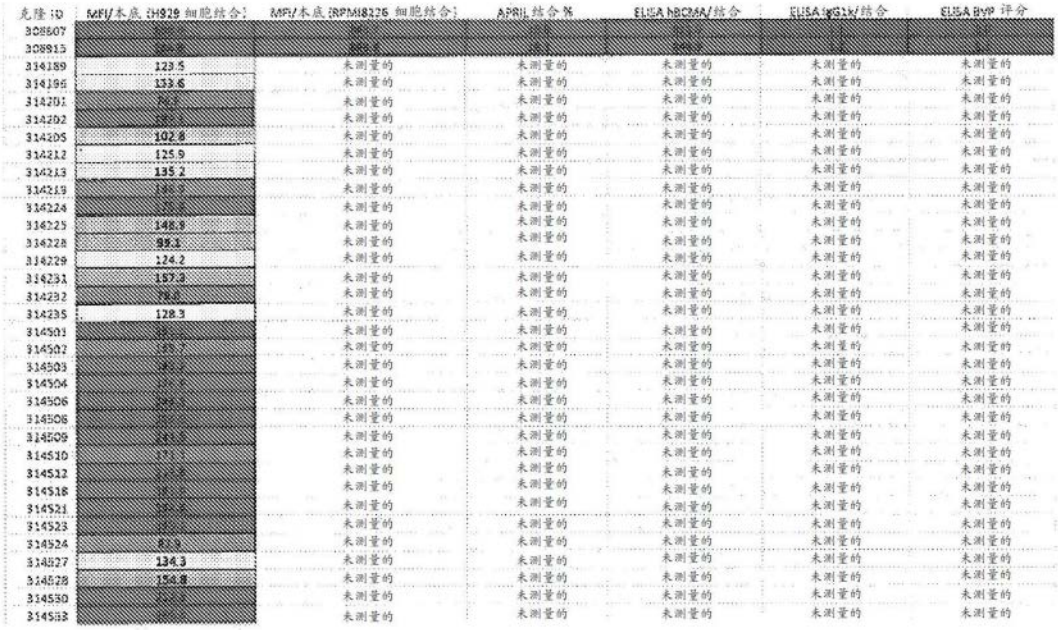
克隆ID	seq_aa_FR1_FR4
308607	EVQLLESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWIRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 20)
308915	EVQLLESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFTNYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 21)
314189	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSGITENGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLDLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 22)
314196	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGDGGSTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 23)
314201	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIIGSGGSTYYADSVKGRFSISRDNSKNTLDLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 24)
314202	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 25)
314205	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 26)
314212	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSGLTGNGDSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 27)
314213	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFSISRDNSKNTLDLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 28)
314219	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSGIIGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 29)
314224	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSGIIGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 30)
314225	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSGITGSGDSTYYAASVKGRFSISRDNSQNTLDLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 31)
314228	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGLTGSGDSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 32)
314229	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMTWIRQAPGKGLEWVSGITGDGGSTFYADSVKGRFSISRDNSKNTLDLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 33)
314231	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMNWIRQAPGKGLEWVSGIVGSGGNTYYADSVKGRFSISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 34)
314232	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFSISRDNSKNTLDLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 35)
314235	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGNGLEWVSGLTGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 36)

图2



314501	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYAMNWVRQAPGKGLEWVSGIIGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 37)
314502	EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIIGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 38)
314503	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIIGSGGSTYYADSVKGRFSISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 39)
314504	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIIGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRV EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 40)
314506	EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVSGIIGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41)
314508	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVSGIIGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 42)
314509	EVQLLESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVSGIIGSGATTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLNLQMNSLRA EDTAIYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 43)
314510	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIIGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 44)
314512	EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSGIIGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 45)
314518	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIIGSGGSTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 46)
314521	EVQLLESGGGLVQPGESLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVSGIVGGGGTSYYADSVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 47)
314523	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMTWIRQAPGKGLEWVSGITGDGGSTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 48)
314524	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWIRQAPGKGLEWVSGIVGGGGTSYYADSVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 49)
314527	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIIGSGGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLNLQMNSLRA EDTAIYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 50)
314528	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRV EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 51)
314530	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSGIVGGGGTSYYADSVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 52)
314533	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVSGIIGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRV EDTAVYYCVKDWNTTMITERGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 53)

图2(续)



克隆 ID	MFI/本底 (H929 细胞结合)	MFI/本底 (RPMI8226 细胞结合)	APRIL 结合 %	ELISA huBCMA/结合	ELISA IgG1κ/结合	ELISA BVP 评分
308607	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
308813	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
314189	123.5	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314196	133.6	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314201	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314202	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314205	102.8	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314212	125.9	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314213	135.2	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314219	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314224	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314225	148.9	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314228	99.1	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314229	124.2	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314231	157.3	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314232	78.8	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314235	128.3	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314501	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314502	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314503	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314504	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314506	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314508	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314509	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314510	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314512	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314518	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314521	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314523	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314524	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314527	134.3	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314528	154.8	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314530	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的
314533	[illegible]	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的	未测量的

图3

第 35 天血清 - ELISA 测试 (来自 6/12 动物的测试)

测定的 d35 血清的 1:500 稀释物

信号/H.S.A，针对每只动物调整

huBCMA-Fc	CyBCMA	huBCMA 大肠杆菌片段	huBCMA 全小麦胚芽	hu IgG1κ	H.S.A	动物
325	296	501	245	188	[illegible]	r12431 (HC27)
281	226	417	247	207	[illegible]	r12455 (HC27)
262	267	418	245	303	[illegible]	r12514 (HC27)
314	306	519	444	74	[illegible]	r12271 (HC28)
260	290	421	413	296	[illegible]	r12276 (HC28)
594	476	976	933	176	[illegible]	r12278 (HC28)
1382	29	1787	1467	4	[illegible]	r12516 (HC27)
67	61	53	47	47	[illegible]	山羊抗 huBCMA

图4

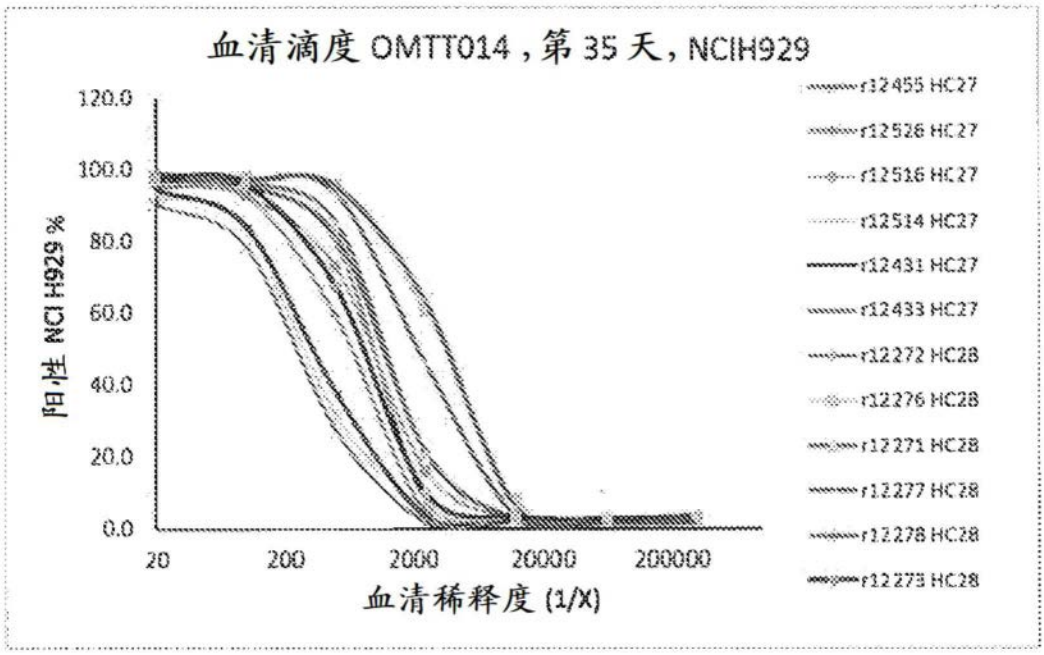

血清滴度 OMTT014，第 35 天，NCIH929
% 杀伤 NCIH929
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
20
200
2000
20000
200000
血清稀释度 (1/X)
r12455 HC27
r12526 HC27
r12516 HC27
r12514 HC27
r12431 HC27
r12433 HC27
r12272 HC28
r12276 HC28
r12271 HC28
r12277 HC28
r12278 HC28
r12273 HC28

图5


A) scFv CAR-T 构建体
细胞外
结构域
scFv 抗原结合
结构域
细胞内
结构域
T 细胞受体
信号传导
结构域
B) 人 VH CAR-T 构建体
细胞外
结构域
人 VH
抗原结合
结构域
细胞内
结构域
T 细胞受体
信号传导
结构域

图6