



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110167964 B

(45) 授权公告日 2023.12.01

(21) 申请号 201780081998.4

A61K 39/00 (2006.01)

(22) 申请日 2017.11.02

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

WO 2017021450 A1, 2017.02.09

申请公布号 CN 110167964 A

US 2013302318 A1, 2013.11.14

(43) 申请公布日 2019.08.23

WO 2015112900 A1, 2015.07.30

(30) 优先权数据

CN 103118706 A, 2013.05.22

16196874.8 2016.11.02 EP

WO 2016020332 A1, 2016.02.11

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

WO 2012066058 A1, 2012.05.24

2019.07.02

EP 3023437 A1, 2016.05.25

(86) PCT国际申请的申请数据

EP 2982692 A1, 2016.02.10

PCT/EP2017/078109 2017.11.02

CN 103608039 A, 2014.02.26

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 104169300 A, 2014.11.26

W02018/083204 EN 2018.05.11

WO 2016020309 A1, 2016.02.11

(73) 专利权人 百时美施贵宝公司

CN 104968682 A, 2015.10.07

地址 美国新泽西州

CN 108350073 A, 2018.07.31

(72) 发明人 M.D.武 K.施特赖因 B.D.L.派瓦

CN 106661120 A, 2017.05.10

J.F.桑米格尔伊兹凯多

刘海玲等.多发性骨髓瘤T细胞免疫治疗.

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

《现代肿瘤医学》.2016, (第18期),

专利代理人 初明明 黄登高

Erin W.Meermeier等.Tumor Burden

(51) Int.Cl.

Limits Bispecific Antibody Efficacy

C07K 16/28 (2006.01)

through T-cell Exhaustion Averted by

C07K 16/46 (2006.01)

Concurrent Cytotoxic Therapy.《Blood

Cancer Discov》.2021,

B. 审查员 梁艳莉

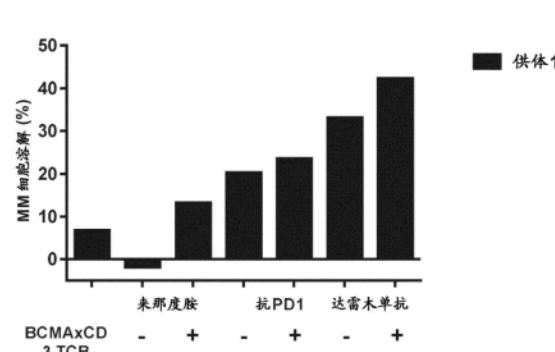
权利要求书3页 说明书90页

序列表31页 附图33页

(54) 发明名称

B.

组合用于治疗多发性骨髓瘤的针对BCMA和CD3的双特异性抗体和免疫药物



(57) 摘要

本发明涉及组合用于治疗多发性骨髓瘤的特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)和人CD3 ε(CD3)的双特异性抗体以及免疫治疗药物。

1. 双特异性抗体和免疫治疗药物在制备用于治疗多发性骨髓瘤的药物中的用途,所述双特异性抗体包含特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ 的第二结合部分,所述免疫治疗药物选自由沙利度胺、来那度胺、泊马度胺、CC-122、CC-220、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组,其中所述第一结合部分包含:

i) 包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH区,和包含SEQ ID NO:27的CDR1L区、SEQ ID NO:28的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL区;

ii) 包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH区,和包含SEQ ID NO:25的CDR1L区、SEQ ID NO:26的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL区;或

iii) 包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH区,和包含SEQ ID NO:23的CDR1L区、SEQ ID NO:24的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL区;并且

其中所述第二结合部分包含:包含SEQ ID NO:1的CDR1H、SEQ ID NO:2的CDR2H、SEQ ID NO:3的CDR3H的可变结构域VH,和包含SEQ ID NO:4的CDR1L、SEQ ID NO:5的CDR2L和SEQ ID NO:6的CDR3L的可变结构域VL。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述免疫治疗药物选自由以下组成的组:达雷木单抗、伊沙妥昔单抗、MOR202、Ab79、Ab19、派姆单抗、匹地利珠单抗、纳武单抗、MEDI-0680、PDR001、REGN2810、兰布罗利珠单抗、MDX-1106、BGB-108、h409A11、h409A16、h409A17、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗和MDX-1105。

3. 一种用于在患有多发性骨髓瘤疾病的患者中实现多发性骨髓瘤细胞溶解的治疗剂组合,其中所述治疗剂组合包含治疗有效量的:

a) 双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ 的第二结合部分,以及

b) 免疫治疗药物,所述免疫治疗药物选自由沙利度胺、来那度胺、泊马度胺、CC-122、CC-220、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组,

其中所述第一结合部分包含:

i) 包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH区,和包含SEQ ID NO:27的CDR1L区、SEQ ID NO:28的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL区;

ii) 包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH区,和包含SEQ ID NO:25的CDR1L区、SEQ ID NO:26的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL区;或

iii) 包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH区,和包含SEQ ID NO:23的CDR1L区、SEQ ID NO:24的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL区;并且

其中所述第二结合部分包含:包含SEQ ID NO:1的CDR1H、SEQ ID NO:2的CDR2H、SEQ ID NO:3的CDR3H的可变结构域VH,和包含SEQ ID NO:4的CDR1L、SEQ ID NO:5的CDR2L和SEQ ID

NO:6的CDR3L的可变结构域VL。

4. 根据权利要求3所述的治疗剂组合,其中所述免疫治疗药物选自由以下组成的组:达雷木单抗、伊沙妥昔单抗、MOR202、Ab79、Ab19、派姆单抗、匹地利珠单抗、纳武单抗、MEDI-0680、PDR001、REGN2810、兰布罗利珠单抗、MDX-1106、BGB-108、h409A11、h409A16、h409A17、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗以及MDX-1105。

5. 一种制品,包含:

a) 在药学上可接受的载体中的双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ 的第二结合部分,其中所述第一结合部分包含:

i) 包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH区,和包含SEQ ID NO:27的CDR1L区、SEQ ID NO:28的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL区;

ii) 包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH区,和包含SEQ ID NO:25的CDR1L区、SEQ ID NO:26的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL区;或

iii) 包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH区,和包含SEQ ID NO:23的CDR1L区、SEQ ID NO:24的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL区;并且

其中所述第二结合部分包含:包含SEQ ID NO:1的CDR1H、SEQ ID NO:2的CDR2H、SEQ ID NO:3的CDR3H的可变结构域VH,和包含SEQ ID NO:4的CDR1L、SEQ ID NO:5的CDR2L和SEQ ID NO:6的CDR3L的可变结构域VL;

b) 免疫治疗药物,所述免疫治疗药物选自由沙利度胺、来那度胺、泊马度胺、CC-122、CC-220、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组;和

c) 药学上可接受的载体和用于将所述双特异性抗体和所述免疫治疗药物组合施用至需要治疗多发性骨髓瘤的受试者的说明书。

6. 根据权利要求5所述的制品,其中所述免疫治疗药物选自由以下组成的组:达雷木单抗、伊沙妥昔单抗、MOR202、Ab79、Ab19、派姆单抗、匹地利珠单抗、纳武单抗、MEDI-0680、PDR001、REGN2810、兰布罗利珠单抗、MDX-1106、BGB-108、h409A11、h409A16、h409A17、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗以及MDX-1105。

7. 一种用于制造药物的方法,其中所述方法包括:

(I) 使用治疗有效量的:

a) 双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ 的第二结合部分,其中所述第一结合部分包含:

i) 包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH区,和包含SEQ ID NO:27的CDR1L区、SEQ ID NO:28的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL区;

ii) 包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH区,和包含SEQ ID NO:25的CDR1L区、SEQ ID NO:26的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL区;或

iii) 包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH区,和包含SEQ ID NO:23的CDR1L区、SEQ ID NO:24的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL区;并且

其中所述第二结合部分包含:包含SEQ ID NO:1的CDR1H、SEQ ID NO:2的CDR2H、SEQ ID NO:3的CDR3H的可变结构域VH,和包含SEQ ID NO:4的CDR1L、SEQ ID NO:5的CDR2L和SEQ ID NO:6的CDR3L的可变结构域VL;以及

b) 免疫治疗药物,所述免疫治疗药物选自由沙利度胺、来那度胺、泊马度胺、CC-122、CC-220、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组;以及

(II) 将所述双特异性抗体和所述免疫治疗药物组合在药学上可接受的载体中。

8. 根据权利要求7所述的用于制造药物的方法,其中所述免疫治疗药物选自由以下组成的组:达雷木单抗、伊沙妥昔单抗、MOR202、Ab79、Ab19、派姆单抗、匹地利珠单抗、纳武单抗、MEDI-0680、PDR001、REGN2810、兰布罗利珠单抗、MDX-1106、BGB-108、h409A11、h409A16、h409A17、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗以及MDX-1105。

9. 根据权利要求1或2所述的用途、根据权利要求3或4所述的治疗剂组合、根据权利要求5或6所述的制品或根据权利要求7或8所述的用于制造药物的方法,其中所述双特异性抗体的所述第一结合部分包含:包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH区,和包含SEQ ID NO:27的CDR1L区、SEQ ID NO:28的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL区。

10. 根据权利要求1或2所述的用途、根据权利要求3或4所述的治疗剂组合、根据权利要求5或6所述的制品或根据权利要求7或8所述的用于制造药物的方法,其中所述双特异性抗体的所述第一结合部分包含:包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH区,和包含SEQ ID NO:25的CDR1L区、SEQ ID NO:26的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL区。

11. 根据权利要求1或2所述的用途、根据权利要求3或4所述的治疗剂组合、根据权利要求5或6所述的制品或根据权利要求7或8所述的用于制造药物的方法,其中所述双特异性抗体的所述第一结合部分包含:包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH区,和包含SEQ ID NO:23的CDR1L区、SEQ ID NO:24的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL区。

12. 根据权利要求1所述的用途、根据权利要求3所述的治疗剂组合、根据权利要求5所述的制品或根据权利要求7所述的用于制造药物的方法,其中所述双特异性抗体的所述第一结合部分包含:包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH区,和包含SEQ ID NO:27的CDR1L区、SEQ ID NO:28的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL区;并且所述免疫治疗药物是CC-220或来那度胺。

13. 根据权利要求12所述的用途、根据权利要求12所述的治疗剂组合、根据权利要求12所述的制品或根据权利要求12所述的用于制造药物的方法,其中所述双特异性抗体包含由以下多肽组成的重链和轻链组:SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和两个拷贝的SEQ ID NO:57。

14. 根据权利要求1、2、12或13中任一项所述的用途,其中所述双特异性抗体经由皮下施用。

组合用于治疗多发性骨髓瘤的针对BCMA和CD3的双特异性抗体和免疫药物

[0001] 本发明涉及一种组合用于治疗多发性骨髓瘤的特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)和人CD3 ϵ (CD3)的双特异性抗体以及免疫治疗药物。

[0002] 发明背景

[0003] 人B细胞成熟抗原,也称为BCMA、TR17_人、TNFRSF17(UniProt Q02223)是肿瘤坏死受体超家族的成员,其优先在分化的浆细胞中表达的(Laab i等人1992;Madry等人1998)。BCMA是非糖基化的III型跨膜蛋白,其参与B细胞成熟、生长和存活。BCMA是TNF超家族的两种配体的受体:APRIL(增殖诱导配体),其是BCMA的高亲和力配体;和B细胞活化因子BAFF,其是BCMA的低亲和力配体(THANK、B1yS、B淋巴细胞刺激因子、TALL-1和zTNF4)。APRIL和BAFF显示结构相似性和重叠、但不同的受体结合特异性。负调控因子TACI也结合至BAFF和APRIL。APRIL和BAFF与BCMA和/或TACI的配位结合活化转录因子NF- κ B并增加促存活Bcl-2家族成员(例如Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、Mcl-1、A1)的表达和促凋亡因子(例如Bid、Bad、Bik、Bim等)的下调,从而抑制细胞凋亡并促进存活。这种组合作用促进B细胞分化、增殖、存活和抗体产生(如Rickert RC等人,Immunol Rev(2011)244(1):115-133中所综述)。

[0004] 针对BCMA的抗体描述于例如Gras M-P.等人Int Immunol.7(1995)1093-1106、W0200124811、W0200124812、W02010104949和W02012163805中。例如在W02002066516和W02010104949中提及了针对BCMA的抗体及其用于治疗淋巴瘤和多发性骨髓瘤的用途。W02013154760和W02015052538涉及包含BCMA识别部分和T细胞活化部分的嵌合抗原受体(CAR)。Ryan, MC等人,Mol.Cancer Ther.6(2007)3009-3018涉及具有配体阻断活性的抗BCMA抗体,所述抗BCMA抗体可作为裸抗体或作为抗体-药物缀合物促进多发性骨髓瘤(MM)细胞系的细胞毒性。Ryan表明SG1(一种抑制性BCMA抗体)在体外以剂量依赖性方式阻断核因子- κ B的APRIL依赖性活化。Ryan还提及抗体SG2,其非显著地抑制APRIL与BCMA的结合。

[0005] 最近已经开发了多种重组双特异性抗体形式,例如,通过融合例如IgG抗体形式和单链结构域(参见例如Kontermann RE,mAbs 4:2,(2012)1-16)。其中可变结构域VL和VH或恒定结构域CL和CH1被彼此置换的双特异性抗体描述于W02009080251和W02009080252中。

[0006] 避免错配副产物问题的方法(其被称为“旋钮入孔”)旨在通过将突变引入CH3结构域来修饰接触界面而进行两条不同的抗体重链的强制配对。在一条链上,庞大的氨基酸被具有短侧链的氨基酸置换以产生‘孔’。相反,具有大侧链的氨基酸被引入另一个CH3结构域以产生‘旋钮’。通过共表达这两条重链(和两条相同的轻链,其对于两条重链必须是适当的),观察到异二聚体形成(‘旋钮-孔’)对比同二聚体形成(‘孔-孔’或‘旋钮-旋钮’)的高产量(Ridgway JB,Presta LG,Carter P.Protein Eng.9,617-621(1996);和W01996027011)。通过使用噬菌体展示方法重塑两个CH3结构域的相互作用表面和引入二硫桥以使异二聚体稳定,可进一步增加异二聚体的百分比(Merchant A.M,等人,Nature Biotech 16(1998)677-681;Atwell S,Ridgway JB,Wellis JA,Carter P.,J Mol.Biol 270(1997)26-35)。用于旋钮入孔技术的新方法在例如EP 1870459A1中描述。尽管这种形式看起来非常有吸引力,但目前不可获得用于描述临床进展的数据。这种策略的一个重要限制因素是两种亲本抗体

的轻链必须相同以防止错配和形成无活性分子。因此,这种技术不适合于从针对第一和第二靶标的两种抗体开始容易地开发针对两种靶标的重组双特异性抗体,因为这些抗体的重链和/或相同的轻链必须进行优化。Xie,Z.,等人,J Immunol.Methods 286(2005) 95-101提及及使用scFv与Fc部分的旋钮入孔技术的组合的双特异性抗体的形式。

[0007] T淋巴细胞的TCR/CD3复合物由在细胞表面共表达的TCR α (α)/ β (β)或TCR γ (γ)/ δ (δ)异二聚体组成,具有CD3标记的 γ (γ)、 δ (δ)、 ϵ (ϵ)、 ζ (ζ)和 η (η)的不变亚基。人CD3 ϵ 在UniProt P07766(CD3E_人)下描述。

[0008] 现有技术中描述的抗CD3 ϵ 抗体是SP34(Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137;1097-1100)。SP34与灵长类动物和人CD3反应。SP34可从Pharmingen获得。现有技术中描述的另一种抗CD3抗体是UCHT-1(参见W02000041474)。现有技术中描述的另一种抗CD3抗体是BC-3(Fred Hutchinson Cancer Research Institute;用于GvHD的I/II期试验,Anasetti等人,Transplantation 54:844(1992))。SP34与UCHT-1和BC-3的不同之处在于SP-34识别仅存在于CD3的 ϵ 链上的表位(参见Salmeron等人,(1991) J. Immunol. 147: 3047),而UCHT-1和BC-3识别由 ϵ 和 γ 链贡献的表位。其它抗CD3抗体描述于W02008119565、W02008119566、W02008119567、W02010037836、W02010037837、W02010037838和US8236308(W02007042261)中。另一种抗CD3抗体的CDR、VH和VL序列在SEQ ID NO:7和8中示出。

[0009] 针对CD3和BCMA的双特异性抗体在W02007117600、W02009132058、W02012066058和W02012143498中提及。针对BCMA的抗体的CAR化合物在W02013154760、W02013154760和W02014140248中提及。

[0010] 单克隆抗体的细胞介导的效应子功能(如抗体依赖性细胞毒性(ADCC))可通过在Asn297处工程化它们的寡糖组合物来增强,如Umaña,P.,等人,Nature Biotechnol.17(1999) 176-180;和US6602684中所描述。W01999054342、W02004065540、W02007031875和W02007039818,Hristodorov D,Fischer R,Linden L.,Mol Biotechnol.2012年10月25日(电子版)还涉及抗体的糖基化工程化以增强Fc介导的细胞毒性。

[0011] 铰链区和CH2结构域中的若干氨基酸残基也影响单克隆抗体的细胞介导的效应子功能(Eur.J.Immunol.,23,1098(1993),Immunology,86,319(1995),Chemical Immunology,65,88(1997)]Chemical Immunology,65,88(1997)]。因此,此类氨基酸的修饰可增强细胞介导的效应子功能。用于增加细胞介导的效应子功能的此类抗体修饰在EP1931709、W0200042072中提及,并且在Fc部分中包含氨基酸位置234、235、236、239、267、268、293、295、324、327、328、330和332处的取代。用于增加细胞介导的效应子功能的其它抗体修饰在EP1697415中提及,并且包括用带电荷的氨基酸、极性氨基酸或非极性氨基酸进行EU氨基酸位置277、289、306、344或378的氨基酸置换。

[0012] 抗体形式和双特异性和多特异性抗体的形式也是pepbodies(W0200244215)、新颖抗原受体(“NAR”)(W02003014161)、双抗体-双抗体二聚体“TandAb”(W02003048209)、聚环氧烷修饰的scFv(US7150872)、人源化免抗体(W02005016950)、合成免疫球蛋白结构域(W02006072620)、共价双抗体(W02006113665)、柔性抗体(W02003025018)、结构域抗体、dAb(W02004058822)、疫苗体(W02004076489)、具有新世界灵长类动物框架的抗体(W02007019620)、具有可裂解接头的抗体-药物缀合物(W02009117531)、除去铰链区的IgG4抗体(W02010063785)、具有IgG4样CH3结构域的双特异性抗体(W02008119353)、骆驼科抗体

(US6838254)、纳米抗体(US7655759)、CAT双抗体(US5837242)、针对靶抗原和CD3的双特异性(scFv)₂(US7235641)、sIgA p1抗体(US6303341)、微型抗体(US5837821)、IgNAR(US2009148438)、具有修饰的铰链和Fc区的抗体(US2008227958、US20080181890)、三功能抗体(US5273743)、triomab(US6551592)、特洛伊体(troybody)(US6294654)。

[0013] WO2014122143公开了抗人BCMA抗体,其特征在于如与在无APRIL的情况下所述抗体与人BCMA的结合相比,所述抗体的结合在ELISA测定中作为405nm处的OD测量的不通过100ng/ml APRIL降低超过20%;与单独APRIL相比,所述抗体不会改变APRIL依赖性NF-κB活化超过20%;并且与没有所述抗体相比,在没有APRIL的情况下所述抗体不会改变NF-κB活化超过20%。WO2014122144公开了特异性地结合至两种靶标人CD3ε和人BCMA的双特异性抗体,包括WO2014122143的抗人BCMA抗体。具有独特性质、尤其是关于其作为双特异性T细胞结合剂的治疗用途的抗人BCMA抗体是抗体83A10,其特征在于包含SEQ ID NO:15的CDR1H、SEQ ID NO:16的CDR2H、SEQ ID NO:17的CDR3H、SEQ ID NO:18的CDR1L、SEQ ID NO:19的CDR3L以及SEQ ID NO:20的CDR3L作为CDR区,也公开于WO2014122143和WO2014122144中。

[0014] 沙利度胺化合物是2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2,3-二氢-1H-异吲哚-1,3-二酮及其衍生物,如来那度胺、泊马度胺、CC122(CAS登记号1398053-45-6)或CC-220(CAS登记号1323403-33-3)。沙利度胺用于治疗多发性骨髓瘤的用途在Hidemitsu T等人,Blood 96(2000),2943-2950中描述。

[0015] 抗CD38抗体例是例如达雷木单抗(daratumumab)(US20150246123)、伊沙妥昔单抗(isatuximab)(US8877899)、MOR202(WO 2012041800)以及AB19和AB79(US8362211)。抗CD38抗体还在WO2006099875、WO2011154453、WO2014068114和WO2007042309中提及。抗CD38单克隆抗体在治疗多发性骨髓瘤中的用途例如由Lokhorst HM; N Engl J Med (2015) 373 1207-19论述。

[0016] 抗PD-1抗体是例如派姆单抗(Keytruda®,MK-3475)、纳武单抗、匹地利珠单抗、兰布罗利珠单抗(lambrolizumab)、MEDI-0680、PDR001和REGN2810。抗PD-1抗体描述于例如WO200815671、WO2013173223、WO2015026634、US7521051、US8008449、US8354509、WO2009114335、WO2015026634、WO2008156712、WO2015026634、WO2003099196、WO2009101611、WO2010/027423、WO2010/027827、WO2010/027828、WO2008/156712和WO2008/156712中。

[0017] 抗PD-L1抗体是例如阿特珠单抗、MDX-1105、德瓦鲁单抗和阿维鲁单抗。抗PD-L1抗体例如描述于WO2015026634、WO2013/019906、WO2010077634、US8383796、WO2010077634、WO2007005874和WO2016007235中。

[0018] WO2012066058概括地提及也与一种或多种另外的治疗剂组合的针对BCMA和CD3的双特异性剂。列举了许多此类剂,并且除了别的以外还提及沙利度胺衍生物,如来那度胺。WO2012143498还概括地提及用于治疗或改善多发性骨髓瘤的抗BCMA抗体疗法以及抗CD20抗体和/或抗CD38抗体和/或抗CS1抗体疗法。WO2016087531公开了针对BCMA和CD3的双特异性抗体以及T细胞增殖疗法的用途,是指诱导T细胞的增殖或扩增的治疗性治疗或生物治疗,如检查点抑制剂(例如抗-PD-1、抗PD-L1)。WO2016014565涉及对BCMA具有特异性的嵌合抗原受体(CAR),并且通常涉及结合至PD-1、PD-L1、PD-L2或CTLA4的抗体或抗体片段。

[0019] 本发明的双特异性抗体和相应的抗BCMA抗体公开于现在未决的EP15179549.9和

PCT/EP2016/068549中,其特此以引用的方式整体并入。

发明内容

[0020] 本发明包括一种组合用于治疗多发性骨髓瘤的特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)和人CD3 ϵ (CD3)的双特异性抗体以及选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组的免疫治疗药物。

[0021] 在一个实施方案中,本发明包括组合用于治疗多发性骨髓瘤的

[0022] a) 双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ (CD3)的第二结合部分,以及

[0023] b) 免疫治疗药物,所述免疫治疗药物选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗抗体以及抗PD-L1抗体组成的组,

[0024] 其特征在于所述第一结合部分包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:

[0025] i) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,

[0026] ii) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,或

[0027] iii) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。

[0028] 在一个实施方案中,本发明包括一种治疗多发性骨髓瘤的方法,其特征在于向需要这种治疗的患者施用

[0029] a) 双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ (CD3)的第二结合部分,以及

[0030] b) 免疫治疗药物,所述免疫治疗药物选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组,

[0031] 其特征在于所述第一结合部分包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:

[0032] i) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,

[0033] ii) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,或

[0034] iii) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。

[0035] 所述双特异性抗体和免疫治疗药物以治疗有效量使用。

[0036] 在一个实施方案中,本发明包括一种用于在患有多发性骨髓瘤疾病的患者中实现多发性骨髓瘤细胞溶解的治疗组合,其特征在于包含:

[0037] a) 双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ (CD3)的第二结合部分,以及

[0038] b) 免疫治疗药物,所述免疫治疗药物选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组,

[0039] 其特征在于所述第一结合部分包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:

- [0040] i) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区，
[0041] ii) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,或
[0042] iii) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。
[0043] 所述双特异性抗体和免疫治疗药物以治疗有效量使用。
[0044] 在一个实施方案中,本发明包括一种制品,其特征在于包括:
[0045] a)在药学上可接受的载体中的双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ (CD3)的第二结合部分,其特征在于所述第一结合部分包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:
[0046] i) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,
[0047] ii) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,或
[0048] iii) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区,
[0049] b)免疫治疗药物,所述免疫治疗药物选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组,
[0050] c)药学上可接受的载体和用于将所述双特异性抗体和所述免疫治疗药物组合施用至需要治疗多发性骨髓瘤的受试者的说明书。
[0051] 所述双特异性抗体和免疫治疗药物以治疗有效量使用。
[0052] 在一个实施方案中,本发明包括一种用于制造药物的方法,其特征在于使用
[0053] a)双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ (CD3)的第二结合部分,其特征在于所述第一结合部分包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:
[0054] i) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,
[0055] ii) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,或
[0056] iii) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区,
[0057] b)免疫治疗药物,所述免疫治疗药物选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组,
[0058] c)将所述双特异性抗体和所述免疫治疗药物组合在药学上可接受的载体中。
[0059] 所述双特异性抗体和免疫治疗药物以治疗有效量使用。
[0060] 本文所述的双特异性抗体和免疫治疗药物用于
[0061] a)根据本发明的组合用于治疗多发性骨髓瘤中,
[0062] b)根据本发明的治疗多发性骨髓瘤的方法中,
[0063] c)根据本发明的用于在患有多发性骨髓瘤疾病的患者中实现多发性骨髓瘤细胞溶解的治疗组合中,
[0064] d)根据本发明的制品中,以及
[0065] e)根据本发明的用于制造药物的方法中。
[0066] 在一个实施方案中,本发明包括,所述免疫治疗药物是选自由以下组成的组的抗

CD38抗体：达雷木单抗、伊沙妥昔单抗(SAR650984)、MOR202、Ab79(Takeda)和Ab19(Takeda)。

[0067] 在一个实施方案中，本发明包括，所述免疫治疗药物是选自由以下组成的组的沙利度胺化合物：沙利度胺、来那度胺、CC-122、CC-220和泊马度胺。

[0068] 在一个实施方案中，本发明包括，所述免疫治疗药物是选自由以下组成的组的抗PD1抗体：派姆单抗、匹地利珠单抗、纳武单抗、MEDI-0680、PDR001、REGN2810、兰布罗利珠单抗、MDX-1106、BGB-108、h409A11、h409A16和h409A17。

[0069] 在一个实施方案中，本发明包括，所述免疫治疗药物是选自由以下组成的组的抗PD-L1抗体：阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、阿特珠单抗和MDX-1105。

[0070] 在一个实施方案中，本发明包括，所述免疫治疗药物是来那度胺，并且所述第一结合部分的特征在于包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区，所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合：

[0071] a) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区，或

[0072] b) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。

[0073] 在一个实施方案中，本发明包括，所述免疫治疗药物是CC-122或CC-220，并且所述第一结合部分的特征在于包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区，所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合：

[0074] a) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区，或

[0075] b) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。

[0076] 在一个实施方案中，本发明包括，所述免疫治疗药物是达雷木单抗，并且所述第一结合部分的特征在于包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区，所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合：

[0077] a) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区，或

[0078] b) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。

[0079] 在一个实施方案中，本发明包括，所述免疫治疗药物是派姆单抗，并且所述第一结合部分的特征在于包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区，所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合：

[0080] a) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区，或

[0081] b) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。

[0082] 在一个实施方案中，本发明包括，所述免疫治疗药物是来那度胺，并且所述第一结合部分的特征在于包含SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:13的VL区或SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:14的VL区。

[0083] 在一个实施方案中，本发明包括，所述免疫治疗药物是CC-122或CC-220，并且所述第一结合部分的特征在于包含SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:13的VL区或SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:14的VL区。

[0084] 在一个实施方案中,本发明包括,所述免疫治疗药物是达雷木单抗,并且所述第一结合部分的特征在于包含SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:13的VL区或SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:14的VL区。

[0085] 在一个实施方案中,本发明包括,所述免疫治疗药物是派姆单抗,并且所述第一结合部分的特征在于包含SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:13的VL区或SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:14的VL区。

[0086] 根据本发明的第一结合部分包含与抗体83A10相同的CDR区作为CDR3H和CDR3L区(对于抗体83A10,参见本文后面的表1A和1B)。

[0087] 在一个实施方案中,根据本发明的第一结合部分包含与抗体83A10相同的CDR区作为CDR3H和CDR3L区,但与抗体83A10相比,对于杀死患者骨髓抽吸物中的MM细胞,显示出特别有效和高效的优点。

[0088] 在本发明的一个实施方案中,所述第一结合部分的特征在于包含SEQ ID NO:17的CDR3H区和SEQ ID NO:20的CDR3L区以及选自以下的组的CDR1H、CDR2H、CDR1L区和CDR2L区组合:

[0089] a) SEQ ID NO:21的CDR1H区和SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,

[0090] b) SEQ ID NO:21的CDR1H区和SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,

[0091] c) SEQ ID NO:21的CDR1H区和SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区,

[0092] d) SEQ ID NO:29的CDR1H区和SEQ ID NO:30的CDR2H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区和SEQ ID NO:32的CDR2L区,

[0093] e) SEQ ID NO:34的CDR1H区和SEQ ID NO:35的CDR2H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区和SEQ ID NO:32的CDR2L区,以及

[0094] f) SEQ ID NO:36的CDR1H区和SEQ ID NO:37的CDR2H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区和SEQ ID NO:32的CDR2L区。

[0095] 在本发明的一个实施方案中,所述第一结合部分的特征在于包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:

[0096] a) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,

[0097] b) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,或

[0098] c) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。在本发明的一个实施方案中,所述第一结合部分的特征在于包含选自由SEQ ID NO:12、13和14的VL区组成的组的VL区,其中氨基酸49选自氨基酸酪氨酸(Y)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)和组氨酸(H)的组。在一个实施方案中,氨基酸49是SEQ ID NO:12内的E、SEQ ID NO:13内的S或SEQ ID NO:14内的H。

[0099] 在本发明的一个实施方案中,所述第一结合部分的特征在于包含选自由SEQ ID NO:12、13和14的VL区组成的组的VL区,其中氨基酸74是苏氨酸(T)或丙氨酸(A)。在一个实施方案中,氨基酸74是SEQ ID NO:14内的A。

[0100] 在本发明的一个实施方案中,所述第一结合部分包含与抗体83A10相同的CDR区作

为CDR3H、CDR1L、CDR2L和CDR3L区。本发明包括特异性地结合至BCMA的单克隆抗体，其特征在于包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:17的CDR3H区，所述VL区包含SEQ ID NO:31的CDR1L区、SEQ ID NO:32的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区以及选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合：

- [0101] a) SEQ ID NO:29的CDR1H区和SEQ ID NO:30的CDR2H区，
- [0102] b) SEQ ID NO:34的CDR1H区和SEQ ID NO:35的CDR2H区，或
- [0103] c) SEQ ID NO:36的CDR1H区和SEQ ID NO:37的CDR2H区。

[0104] 在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含SEQ ID NO:12的VL区和选自包括SEQ ID NO:38、39和40的VH区的组的VH区。在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含SEQ ID NO:12的VL区，其中氨基酸49选自氨基酸酪氨酸(Y)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)和组氨酸(H)的组。在一个实施方案中，氨基酸49是E。

[0105] 在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含SEQ ID NO:10的VH区作为VH区。在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含选自由SEQ ID NO:12、13和14的VL区组成的组的VL区作为VL区。在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含SEQ ID NO:10的VH区作为VH区和SEQ ID NO:12的VL区作为VL区。在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含SEQ ID NO:10的VH区作为VH区和SEQ ID NO:13的VL区作为VL区。在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含SEQ ID NO:10的VH区作为VH区和SEQ ID NO:14的VL区作为VL区。

[0106] 在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含选自由以下组成的组的VH区作为VH区：SEQ ID NO:38、39和40。在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含SEQ ID NO:38的VH区作为VH区和SEQ ID NO:12的VL区作为VL区。在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含SEQ ID NO:39的VH区作为VH区和SEQ ID NO:12的VL区作为VL区。在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含SEQ ID NO:40的VH区作为VH区和SEQ ID NO:12的VL区作为VL区。

[0107] 在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征进一步在于它还特异性地结合至食蟹猴BCMA。在一个实施方案中，本发明的抗体关于与BCMA的结合显示在1.5与5或1.5与10或1.5与16之间的食蟹猴/人亲和力差距(表5)。

[0108] 在本发明的一个实施方案中，所述双特异性抗体的特征在于其还特异性地结合至食蟹猴CD3。在一个实施方案中，所述双特异性抗BCMA/抗CD3抗体显示在1.25与5之间或在0.8与1.0之间的Mab CD3的食蟹猴/人差距。

[0109] 在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分是具有Fc部分或没有Fc部分的抗体，包括多特异性抗体、双特异性抗体、单链可变片段(scFv)(如双特异性T细胞衔接器、双抗体或串联scFv)、抗体模拟物如DARPin、裸单特异性抗体或抗体药物缀合物。在一个实施方案中，多特异性抗体、双特异性抗体、双特异性T细胞衔接器、双抗体或串联scFv特异性地结合至BCMA和CD3。

[0110] 基于第一结合部分，有可能产生针对BCMA的抗体-药物缀合物和呈有或无现有技术中已知的Fc部分的不同形式的针对BCMA和CD3的多特异性或双特异性抗体(参见例如上文“发明背景”中)、单链可变片段(scFv)如双特异性T细胞衔接器、双抗体、串联scFv和抗体模拟物如DARPin，它们全部也是本发明的实施方案。双特异性抗体形式是现有技术中是众

所周知的，并且例如还描述于Kontermann RE, mAbs 4:2 1-16 (2012); Holliger P., Hudson PJ, Nature Biotech. 23 (2005) 1126-1136 和 Chan AC, Carter PJ, Nature Reviews Immunology 10, 301-316 (2010) 以及 Cuesta AM 等人, Trends Biotech 28 (2011) 355-362 中。

[0111] 在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含 SEQ ID NO:10 的 VH 区作为 BCMA VH。

[0112] 在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于 BCMA VL 选自由 SEQ ID NO:12、13 和 14 的 VL 区组成的组。在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含 SEQ ID NO:10 的 VH 区作为 BCMA VH 区和 SEQ ID NO:12 的 VL 区作为 VL 区。在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含 SEQ ID NO:10 的 VH 区作为 BCMA VH 和 SEQ ID NO:13 的 VL 区作为 VL 区。在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含 SEQ ID NO:10 的 VH 区作为 BCMA VH 和 SEQ ID NO:14 的 VL 区作为 VL 区。

[0113] 在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含选自由 SEQ ID NO:12、13 和 14 的 VL 区组成的组的 VL 区，其中氨基酸 49 选自氨基酸酪氨酸 (Y)、谷氨酸 (E)、丝氨酸 (S) 和 组氨酸 (H) 的组。在一个实施方案中，氨基酸 49 是 E (SEQ ID NO:12)、S (SEQ ID NO:13) 或 H (SEQ ID NO:14)。在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含选自由 SEQ ID NO:12、13 和 14 的 VL 区组成的组的 VL 区，其中氨基酸 74 是苏氨酸 (T) 或丙氨酸 (A)。在一个实施方案中，氨基酸 74 是 SEQ ID NO:14 内的 A。

[0114] 在本发明的一个实施方案中，所述第一结合部分的特征在于包含 BCMA VH，所述 BCMA VH 包含 SEQ ID NO:17 的 CDR3H 区；以及 BCMA VL，所述 BCMA VL 包含 SEQ ID NO:31 的 CDR1L 区、SEQ ID NO:32 的 CDR2L 区和 SEQ ID NO:20 的 CDR3L 区以及选自以下的组的 CDR1L 区和 CDR2L 区组合：

[0115] a) SEQ ID NO:29 的 CDR1H 区和 SEQ ID NO:30 的 CDR2H 区，

[0116] b) SEQ ID NO:34 的 CDR1H 区和 SEQ ID NO:35 的 CDR2H 区，或

[0117] c) SEQ ID NO:36 的 CDR1H 区和 SEQ ID NO:37 的 CDR2H 区。

[0118] 针对 BCMA 和 CD3 的双特异性抗体在一个实施方案中特征在于包含：

[0119] a) 特异性地结合至所述靶标 CD3 和 BCMA 中的一者的抗体的轻链和重链；以及

[0120] b) 特异性地结合至所述靶标中的另一者的抗体的轻链和重链，其中可变结构域 VL 和 VH 或恒定结构域 CL 和 CH1 彼此置换。

[0121] 在一个实施方案中，所述抗 CD3 抗体部分的 VH 结构域连接至所述抗 BCMA 抗体部分的 CH1 或 CL 结构域。在一个实施方案中，所述抗 CD3 抗体部分的 VL 结构域连接至所述抗 BCMA 抗体部分的 CH1 或 CL 结构域。

[0122] 在一个实施方案中，所述双特异性抗体包含抗 CD3 抗体部分的不超过一个 Fab 片段、抗 BCMA 抗体部分的不超过两个 Fab 片段和不超过一个 Fc 部分（在一个实施方案中是人 Fc 部分）。在一个实施方案中，所述抗 CD3 抗体部分的不超过一个 Fab 片段和所述抗 BCMA 抗体部分的不超过一个 Fab 片段连接至 Fc 部分，并且经由一个或多个 Fab 片段的 C-末端结合至铰链区而进行连接。在一个实施方案中，所述抗 BCMA 抗体部分的第二 Fab 片段经由其 C-末端连接至抗 CD3 抗体部分的 Fab 片段的 N-末端或连接至 Fc 部分的铰链区并且因此在所述 Fc 部分与所述抗 CD3 抗体部分之间。优选的双特异性抗体在图 1 至 3 中示出。

- [0123] 尤其优选的是仅包含指定的Fab片段和Fc部分的双特异性抗体,有或无“aa取代”:
- [0124] Fab BCMA-Fc-Fab CD3(双特异性形式图1A或1B),
- [0125] Fab BCMA-Fc-Fab CD3-Fab BCMA(双特异性形式图2A或2B),
- [0126] Fab BCMA-Fc-Fab BCMA-Fab CD3(双特异性形式图2C或2D),
- [0127] Fc-Fab CD3-Fab BCMA(双特异性形式图3A或3B),
- [0128] Fc-Fab BCMA-Fab CD3(双特异性形式图3C或3D)。
- [0129] 如图1至3中所示,“Fab BCMA-Fc”、“Fab BCMA-Fc-Fab CD3”和“Fab BCMA-Fc-Fab CD3”意指一个或多个Fab片段经由它的(它们的)C-末端结合至Fc片段的N-末端。“Fab CD3-Fab BCMA”意指Fab CD3片段以其N-末端结合至Fab BCMA片段的C-末端。“Fab BCMA-Fab CD3”意指Fab BCMA片段以其N-末端结合至Fab CD3片段的C-末端。
- [0130] 在一个实施方案中,所述双特异性抗体包含所述抗BCMA抗体的第二Fab片段,所述第二Fab片段以其C-末端连接至所述双特异性抗体的CD3抗体部分的N-末端。在一个实施方案中,所述第一抗CD3抗体部分的VL结构域连接至所述第二抗BCMA抗体的CH1或CL结构域。
- [0131] 在一个实施方案中,所述双特异性抗体包含所述抗BCMA抗体的第二Fab片段,所述第二Fab片段以其C-末端连接至Fc部分(如所述抗BCMA抗体的第一Fab片段)并且以其N-末端连接至所述CD3抗体部分的C-末端。在一个实施方案中,所述抗CD3抗体部分的CH1结构域连接至所述第二抗BCMA抗体部分的VH结构域。
- [0132] 在一个实施方案中,所述双特异性抗体包含Fc部分,所述Fc部分以其N-末端连接至所述CD3抗体Fab片段的C-末端。在一个实施方案中,所述双特异性抗体包含Fc部分,所述Fc部分以其第一N-末端连接至所述CD3抗体Fab片段的C-末端;以及所述抗BCMA抗体的第二Fab片段,所述第二Fab片段以其C-末端连接至所述Fc部分的第二N-末端。在一个实施方案中,所述CD3抗体Fab片段的CL结构域连接至Fc部分的铰链区。在一个实施方案中,所述BCMA抗体Fab片段的CH1结构域连接至Fc部分的铰链区。
- [0133] 根据现有技术,通过使用适当的接头来将所述Fab片段连接在一起。在一个实施方案中,使用(Gly₄-Ser₁)₃接头(Desplancq DK等人,Protein Eng.1994年8月;7(8):1027-33和Mack M.等人,PNAS 1995年7月18日第92卷第15期7021-7025)。由于接头是肽接头,所以这种共价结合通常通过生物化学重组方式进行,使用编码相应Fab片段的VL和/或VH结构域的核酸,所述接头并且如果适当是Fc部分链。
- [0134] 在本发明的一个实施方案中,针对BCMA和CD3的双特异性抗体的特征在于,所述抗CD3抗体部分的可变结构域VH(进一步称为“CD3 VH”)包含SEQ ID NO:1、2和3的重链CDR分别作为重链CDR1H、CDR2H和CDR3H,并且所述抗CD3抗体部分的可变结构域VL(进一步称为“CD3VL”)包含SEQ ID NO:4、5和6的轻链CDR分别作为轻链CDR1L、CDR2L和CDR3L。
- [0135] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体的特征在于所述抗CD3 ϵ 抗体部分的可变结构域是SEQ ID NO:7和8。
- [0136] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体的特征在于,所述抗CD3抗体部分(所述双特异性抗体的第二结合部分)在其N-末端连接至所述抗BCMA抗体部分(所述双特异性抗体的第一结合部分)的C-末端,并且所述抗CD3抗体部分的可变结构域VL和VH或恒定结构域CL和CH1彼此置换。
- [0137] 在一个实施方案中,所述抗CD3抗体部分的VH结构域连接至所述抗BCMA抗体部分

的CH1或CL结构域。在一个实施方案中,所述抗CD3抗体部分的VL结构域连接至所述抗BCMA抗体部分的CH1或CL结构域。

[0138] 在一个实施方案中,这种抗体部分是相应抗体的Fab片段。

[0139] 在本发明的另一个实施方案中,所述双特异性抗体(其中抗CD3抗体部分或抗BCMA抗体部分的轻链和相应重链中的可变结构域VL和VH彼此置换)的特征在于包含所述抗CD3抗体部分或所述抗BCMA抗体部分的恒定结构域CL,其中位置124处的氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)(根据Kabat编号)取代,并且在相应的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸和位置213处的氨基酸独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)取代。在一个实施方案中,所述抗体对于CD3结合是单价的。在一个实施方案中,除了在恒定结构域CL中的位置124处的氨基酸置换外,位置123处的氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)取代(进一步称为“电荷变体交换”)。在一个实施方案中,所述抗体对于CD3结合是单价的,并且氨基酸124是K,氨基酸147是E,氨基酸213是E,并且氨基酸123是R。在一个实施方案中,所述双特异性抗体再次另外包含相同的抗BCMA结合部分(在一个实施方案中为Fab片段)。这也意味着,如果第一抗BCMA结合部分包含电荷变体交换,则第二抗BCMA结合部分包含相同的电荷变体交换。(所有氨基酸编号都是根据Kabat)。

[0140] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体的特征在于包含

[0141] a)特异性地结合至BCMA的第一抗体的第一轻链和第一重链;以及

[0142] b)特异性地结合至CD3的第二抗体的第二轻链和第二重链,并且其中所述第二抗体的第二轻链和第二重链中的可变结构域VL和VH彼此置换;并且

[0143] c)其中在a)的第一轻链的恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)(根据Kabat编号)取代,并且其中在a)的第一重链的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸和位置213处的氨基酸独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)(根据Kabat编号)取代(参见例如图1A、2A、2C、3A、3C)。

[0144] 在一个实施方案中,前一段落中描述的所述双特异性抗体进一步特征在于,所述双特异性抗体另外包含所述第一抗体的Fab片段(也进一步命名为“BCMA-Fab”),并且在所述BCMA-Fab的恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)(根据Kabat编号)取代,并且其中在所述BCMA-Fab的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸和位置213处的氨基酸独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)(根据Kabat编号)取代(参见例如图2A、2C)。

[0145] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体的特征在于包含

[0146] a)特异性地结合至BCMA的第一抗体的第一轻链和第一重链;以及

[0147] b)特异性地结合至CD3的第二抗体的第二轻链和第二重链,并且其中所述第二抗体的第二轻链和第二重链中的可变结构域VL和VH彼此置换;并且其中

[0148] c)在b)的第二轻链的恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)(根据Kabat编号)取代,并且其中在b)的第二重链的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸和位置213处的氨基酸独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)(根据Kabat编号)取代。

[0149] 在一个实施方案中,除了第一或第二轻链的恒定结构域CL中的位置124处的氨基酸置换外,位置123处的氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)取代。

[0150] 在一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸被赖氨酸(K)取代,在恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸和位置213处的氨基酸被谷氨酸(E)取代。在一个实施方案中,另外在恒定结构域CL中,位置123处的氨基酸被精氨酸(R)取代。

[0151] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体由特异性地结合至CD3的抗体的一个Fab片段(进一步还命名为“CD3-Fab”)和抗BCMA抗体的一个Fab片段(进一步还命名为“BCMA-Fab”)以及Fc部分组成,其中所述CD3-Fab和所述BCMA-Fab经由它们的C-末端连接至所述Fc部分的铰链区。所述CD3-Fab和BCMA-Fab包含aa取代,并且所述CD3-Fab包含交叉(crossover)(图1A和1B)。

[0152] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体由一个CD3-Fab和一个BCMA-Fab以及Fc部分以及第二BCMA-Fab组成,其中所述CD3-Fab和所述BCMA-Fab经由它们的C-末端连接至所述Fc部分的铰链区,所述第二BCMA-Fab以其C-末端连接至所述CD3-Fab的N-末端。所述CD3-Fab包含交叉,并且所述CD3-Fab或两个BCMA-Fab包含aa取代(图2A和2B)。特别优选的是包含BCMA-Fab-Fc-CD3-Fab-BCMA-Fab的双特异性抗体,其中两个BCMA-Fab包含aa取代,并且CD3-Fab包含VL/VH交叉(图2A)。特别优选的是由BCMA-Fab-Fc-CD3-Fab-BCMA-Fab组成的双特异性抗体,其中两个BCMA-Fab包含取代Q124K、E123R、K147E和K213E,并且CD3-Fab包含VL/VH交叉。特别优选的是,两个BCMA-Fab均包含抗体21、22或42的CDR作为CDR,或抗体21、22或42的VH/VL作为VH/VL(对于抗体21、22和42,参见本文中稍后的表1A和1B)

[0153] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体由两个BCMA-Fab和Fc部分组成,其中一个BCMA-Fab和CD3 Fab经由它们的C-末端连接至所述Fc部分的铰链区,并且第二BCMA-Fab以其C-末端连接至所述CD3-Fab的N-末端。所述CD3-Fab包含交叉,并且所述CD3-Fab或两个BCMA-Fab包含aa取代(图2A和2B)。

[0154] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体由两个BCMA-Fab和Fc部分以及CD3-Fab组成,其中所述BCMA-Fab经由它们的C-末端连接至所述Fc部分的铰链区,所述CD3-Fab以其C-末端连接至一个BCMA-Fab的N-末端。所述CD3-Fab包含交叉,并且所述CD3-Fab或两个BCMA-Fab包含aa取代(图2C和2D)。

[0155] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体由一个CD3-Fab和BCMA-Fab组成,所述CD3-Fab经由其C-末端连接至所述Fc部分的铰链区,所述BCMA-Fab以其C-末端连接至所述CD3-Fab的N-末端。所述CD3-Fab包含交叉,并且所述CD3-Fab或所述BCMA-Fab包含aa取代(图1A和1B)。

[0156] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体由一个CD3-Fab和BCMA-Fab组成,所述CD3-Fab经由其C-末端连接至所述Fc部分的铰链区,所述BCMA-Fab以其C-末端连接至所述CD3-Fab的N-末端。所述CD3-Fab包含交叉,并且所述CD3-Fab或所述BCMA-Fab包含aa取代(图3A和3B)。

[0157] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体由一个BCMA-Fab和CD3-Fab组成,所述BCMA-Fab经由其C-末端连接至所述Fc部分的铰链区,所述CD3-Fab以其C-末端连接至所述BCMA-Fab的N-末端。所述CD3-Fab包含交叉,并且所述CD3-Fab或所述BCMA-Fab包含aa取代(图3C和3D)。

[0158] 根据现有技术,通过使用适当的接头来将所述Fab片段化学连接在一起。在一个实施方案中,使用(Gly4-Ser1)3接头(Desplancq DK等人,Protein Eng.1994年8月;7 (8) :

1027-33和MackM.等人,PNAS 1995年7月18日第92卷第15期7021-7025)。在重链之间进行两个Fab片段之间的键联。因此,第一Fab片段的CH1的C-末端连接至第二Fab片段的VH的N-末端(无交叉)或VL(交叉)。Fab片段与Fc部分之间的键联作为CH1与CH2之间的键联进行。

[0159] 在一个实施方案中,特异性地结合至BCMA的抗体的第一和第二Fab片段源自相同的抗体,并且在一个实施方案中在CDR序列、可变结构域序列VH和VL和/或恒定结构域序列CH1和CL中相同。在一个实施方案中,特异性地结合至BCMA的抗体的第一和第二Fab片段的氨基酸序列是相同的。在一个实施方案中,所述BCMA抗体是包含抗体21、22或42的CDR序列的抗体、包含抗体21、22或42的VH和VL序列的抗体、或包含抗体21、22或42的VH、VL、CH1和CL序列的抗体。

[0160] 在一个实施方案中,所述双特异性抗体包含抗CD3抗体的不超过一个Fab片段、抗BCMA抗体的不超过两个Fab片段和不超过一个Fc部分(在一个实施方案中为人Fc部分)作为Fab片段和Fc部分。在一个实施方案中,抗BCMA抗体的第二Fab片段经由其C-末端连接至抗CD3抗体的Fab片段的N-末端或Fc部分的铰链区。在一个实施方案中,在BCMA-Fab的CH1与CD3-Fab的VL(VL/VH交叉)之间进行键联。

[0161] 在一个实施方案中,特异性地结合至人CD3的抗体部分(在一个实施方案中Fab片段)的特征在于包含可变结构域VH,所述可变结构域VH包含SEQ ID NO:1、2和3的重链CDR分别作为重链CDR1、CDR2和CDR3;以及可变结构域VL,所述可变结构域VL包含SEQ ID NO:4、5和6的轻链CDR分别作为抗CD3 ϵ 抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3(CDR MAB CD3)。在一个实施方案中,特异性地结合至人CD3的抗体部分的特征在于所述可变结构域具有SEQ ID NO:7和8(VHVL MAB CD3)。

[0162] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体特异性地结合至人BCMA和人CD3 ϵ 的细胞外结构域,其特征在于包含选自由以下多肽组成的组的重链和轻链组:

[0163] i) SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51(2x);(抗体21的第一组TCB),

[0164] ii) SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:54(2x)(抗体22的第二组TCB),以及

[0165] iii) SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57(2x)(抗体42的第三组TCB)。

[0166] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体的特征在于一条重链的CH3结构域和另一条重链的CH3结构域各自在包含抗体CH3结构域之间的原始界面的界面处相接;其中改变所述界面以促进所述双特异性抗体的形成,其中所述改变的特征在于:

[0167] a) 改变一条重链的CH3结构域,以使得在与所述双特异性抗体内的另一条重链的CH3结构域的原始界面相接的一条重链的CH3结构域的原始界面内,氨基酸残基被具有较大侧链体积的氨基酸残基置换,从而在一条重链的CH3结构域的界面内产生突起,所述突起可定位在所述另一条重链的CH3结构域的界面内的腔中,并且

[0168] b) 改变所述另一条重链的CH3结构域,以使得在与所述双特异性抗体内的第一CH3结构域的原始界面相接的第二CH3结构域的原始界面内,氨基酸残基被具有较小侧链体积的氨基酸残基置换,从而在第二CH3结构域的界面内产生腔,所述第一CH3结构域的界面内的突起可定位在所述腔内。

[0169] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体的特征在于,所述具有较大侧链体积的氨基酸残基选自由以下组成的组:精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

[0170] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体的特征在于,所述具有较小侧链体积的氨基酸残基选自由以下组成的组:丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、缬氨酸(V)。

[0171] 在一个实施方案中,这种双特异性抗体的特征在于,通过在每个CH3结构域的相应位置中引入半胱氨酸(C)作为氨基酸来进一步改变两个CH3结构域。

[0172] 在一个实施方案中,这种双特异性抗体的特征在于,两条重链的恒定重链结构域CH3中的一个被恒定重链结构域CH1置换;并且另一个恒定重链结构域CH3被恒定轻链结构域CL置换。

[0173] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体包含修饰的Fc部分,使用具有亲本Fc部分作为对照的相同抗体在相同条件下相对于对照,所述双特异性抗体通过ADCC在100nM的所述抗体的浓度下24小时后诱导表达BCMA的细胞的制剂的20%或更多细胞的细胞死亡。这种抗体在一个实施方案中是裸抗体。

[0174] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体是在Asn297处岩藻糖的量为寡糖(糖)的总量的60%或更少的抗体(参见例如US20120315268)。

[0175] 在一个实施方案中,所述Fc部分包含在人Fc部分中引入并在SEQ ID NO:55和56中公开的氨基酸取代。

[0176] 本发明的另一个实施方案是组合用于治疗多发性骨髓瘤的嵌合抗原受体(CAR)或抗BCMA抗体的相应CAR T细胞以及选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组的免疫治疗药物。在这种实施方案中,所述抗BCMA抗体由第一结合部分的单链VH和VL结构域和CD3- ζ 跨膜和胞内结构域(endodomain)组成。优选地,CD3 ζ 结构域经由间隔区与所述VL结构域的C-末端连接,并且所述VL结构域的N末端经由间隔区连接至所述VH结构域的C末端。BCMA抗体的嵌合抗原受体、有用的跨膜结构域和胞内结构域以及用于产生的方法描述于例如Ramadoss NS.等人,J. Am. Chem. Soc. J., DOI: 10.1021/jacs.5b01876 (2015); Carpenter RO等人,Clin.Cancer.Res.DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-2422 (2013); WO2015052538以及WO2013154760中。

[0177] 在本发明的一个实施方案中,第一结合部分是如本文所述的Mab21、Mab22、Mab42、Mab27、Mab33和Mab39(对于抗体Mab 21、22、42、27、33、39,参见本文中后面的表1A和1B)的CDR序列和/或VH/VL序列以及所描述的CL和CH1序列作为抗原结合片段,尤其是Fab片段。在一个实施方案中,所述双特异性抗体包含Fc部分或不包含Fc部分,尤其是2+1形式,并且所述双特异性抗体的重链和轻链尤其如表1A中所描述。

[0178] 抗BCMA抗体以双特异性形式、尤其是2+1形式在以10nM与1fM之间(包括端值)的浓度48小时处理后将多发性骨髓瘤MM骨髓抽吸物中的人恶性浆细胞消减至至少80%。已经在1-3轮中用1-50nM cyno BCMA淘选抗体83A10的可变重链(VH)和可变轻链(VL)噬菌体展示文库(VH文库、VL文库)并且选择具有作为此类双特异性T细胞结合剂的此类性质的可变轻链和可变重链中表征了抗BCMA抗体。优选淘选进行3轮,使用50nM cynoBCMA用于第1轮、25nM cyBCMA用于第2轮并且10nM cyBCMA用于第3轮。优选地,所述文库在轻链CDR1和CDR2或重链CDR1和CDR2中随机化。优选地鉴定轻链和重链,所述轻链和重链各自作为另外包含抗体83A10的相应VH或VL的Fab片段以50pM至5nM的Kd结合至huBCMA并且以0.1nM至20nM的

Kd结合至cyno BCMA。优选地,双特异性形式是图2A的形式,包含CD3 Fab的相应恒定结构域VL和VH彼此置换以及在两个BCMA Fab内,CH1结构域中的氨基酸交换K213E和K147E以及CL结构域中的氨基酸交换E123R和Q124K。

[0179] 如本文提及的双特异性抗体可通过以下步骤来制备:

- [0180] a) 用以下载体转化宿主细胞;
 - [0181] b) 包含编码所述抗体分子的轻链和重链的核酸分子的载体,
 - [0182] c) 在允许合成所述抗体分子的条件下培养所述宿主细胞;以及
 - [0183] d) 从所述培养物中回收所述抗体分子。
- [0184] 如本文提及的双特异性抗体可通过以下步骤来制备:
- [0185] e) 用以下载体转化宿主细胞;
 - [0186] f) 包含编码特异性地结合至第一靶标的抗体的轻链和重链的核酸分子的载体
 - [0187] g) 包含编码特异性地结合至第二靶标的抗体的轻链和重链的核酸分子的载体,其中所述可变结构域VL和VH或恒定结构域CL和CH1彼此置换;
 - [0188] h) 在允许合成所述抗体分子的条件下培养所述宿主细胞;以及
 - [0189] i) 从所述培养物中回收所述抗体分子。

[0190] 本发明的另一个实施方案是一种药物组合物,所述药物组合物包含组合用于治疗多发性骨髓瘤的特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)和人CD3 ϵ (CD3)的双特异性抗体以及选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组的免疫治疗药物,和药学上可接受的赋形剂。

[0191] 本发明的另一个实施方案是一种用作药物的药物组合物,所述药物组合物包含组合用于治疗多发性骨髓瘤的特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)和人CD3 ϵ (CD3)的双特异性抗体以及选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组的免疫治疗药物。

[0192] 本发明的另一个实施方案是一种药物组合物,所述药物组合物包含组合用于治疗多发性骨髓瘤的特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)和人CD3 ϵ (CD3)的双特异性抗体以及选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组的免疫治疗药物,其特征在于所述第一结合部分包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:

- [0193] i) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,
- [0194] ii) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,或
- [0195] iii) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。本发明的另一个实施方案是一种药物组合物,所述药物组合物包含组合用作治疗多发性骨髓瘤的药物的特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ (CD3)的第二结合部分以及选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组的免疫治疗药物。

[0196] 在一个实施方案中,用于组合使用的根据本发明的双特异性抗体(其包含特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ (CD3)的第二结合部分)以及选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1

抗体组成的组的免疫治疗药物可用于治疗诸如多发性骨髓瘤MM的浆细胞病症或如下文所述的表达BCMA的其它浆细胞病症。MM是浆细胞恶性肿瘤,其特征在于骨髓隔室中的异常浆细胞的单克隆扩增和累积。MM还涉及具有相同IgG基因重排和体细胞超突变的循环克隆浆细胞。MM起源于一种称为意义不明的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)的无症状、癌前疾患,其特征在于骨髓浆细胞和单克隆蛋白的低水平。MM细胞以低速率增殖。MM由多个结构染色体变化(例如不平衡易位)的逐渐发生引起。MM涉及恶性浆细胞和骨髓微环境(例如正常骨髓基质细胞)的相互作用。活动性MM的临床体征包括单克隆抗体刺突、过度拥挤骨髓的浆细胞、溶骨性病变和由破骨细胞的过度刺激引起的骨破坏(Dimopoulos&Terpos, Ann Oncol 2010; 21 suppl 7: vii143-150)。涉及浆细胞、即表达BCMA的另一种浆细胞病症是系统性红斑狼疮(SLE),也称为狼疮。SLE是可影响身体的任何部位并以免疫系统攻击身体自身的细胞和组织、从而导致慢性炎症和组织损伤为代表的全身性自身免疫性疾病。它是一种III型超敏反应,其中抗体-免疫复合物沉淀并引起进一步免疫应答(Inaki&Lee, Nat Rev Rheumatol 2010; 6: 326-337)。其它浆细胞病症是浆细胞白血病和AL-淀粉样变性(还参见实施例19和20)。在所有这些浆细胞病症中,预期根据本发明的抗体对浆细胞/恶性浆细胞的消减对于患有这种疾病的患者是有益的。

[0197] 本发明的另一个实施方案是双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ (CD3)的第二结合部分以及选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组的免疫治疗药物,所述双特异性抗体和免疫治疗药物组合用作药物。优选地,所述第一结合部分的特征在于,所述第一结合部分包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:

[0198] i) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,

[0199] ii) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,或

[0200] iii) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。

[0201] 本发明的另一个实施方案是一种用作药物的药物组合物,所述药物组合物包含双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ (CD3)的第二结合部分以及选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组的免疫治疗药物。优选地,所述第一结合部分的特征在于,所述第一结合部分包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:

[0202] i) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,

[0203] ii) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,或

[0204] iii) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。

[0205] 本发明的另一个实施方案是一种用作药物的药物组合物,所述药物组合物包含具有增加的效应子功能的所述双特异性抗体以及选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组的免疫治疗药物。优选地,所述第一结合部分的特征在于,所述第一结合部分包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H

区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:

- [0206] i) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,
- [0207] ii) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,或
- [0208] iii) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。

[0209] 本发明的另一个实施方案是一种用作药物的药物组合物,所述药物组合物包含具有降低的效应子功能的所述双特异性抗体以及选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组的免疫治疗药物。优选地,所述第一结合部分的特征在于,所述第一结合部分包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:

- [0210] i) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,
- [0211] ii) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,或
- [0212] iii) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。

[0213] 本发明的另一个实施方案是一种用作药物的药物组合物,所述药物组合物包含作为双抗体的所述双特异性抗体以及选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组的免疫治疗药物。优选地,所述第一结合部分的特征在于,所述第一结合部分包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:

- [0214] i) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,
- [0215] ii) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,或
- [0216] iii) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。

[0217] 在一个实施方案中,所述双特异性抗体和所述选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组的免疫治疗药物在一个实施方案中经由皮下施用一周施用一次或两次(例如在一个实施方案中,以0.1至2.5、优选至25mg/m²/周、优选至250mg/m²/周的剂量范围)。由于双特异性抗体的优异细胞毒性活性,所以与常规单特异性抗体或不是T细胞双特异性的常规双特异性抗体(即不结合至一个臂上的CD3)相比,它们可至少以相同(或甚至更低)的临床剂量范围大小施用。设想对于双特异性抗体和选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组的免疫治疗药物,皮下施用优选在临床环境中(例如在0.1-250mg/m²/周的剂量范围内)。此外,在具有高水平的血清APRIL和BAFF(例如多发性骨髓瘤患者)的患者中,可能不需要增加双特异性抗体的剂量,因为它可能不受配体竞争的影响。相比之下,在那些患者中可能需要增加其它配体阻断/竞争抗BCMA抗体的剂量。所述双特异性抗体的另一个优点是约4至12天的消除半衰期,其允许至少一次或两次/周施用。

[0218] 在一个实施方案中,所述双特异性抗体是具有允许通过静脉内途径、但优选经由皮下施用进行一周一次/两次治疗的性质的抗体(例如在200-2000mg/m²/周范围内的剂量持续4周)。可以设想,对于双特异性抗体,皮下施用在临床环境中是可能的和优选的(例如在200-2000mg/m²/周的剂量范围内,取决于疾病适应症)。此外,在具有高水平的血清APRIL和

BAFF(例如多发性骨髓瘤患者)的患者中,可能不需要增加双特异性抗体(例如非配体阻断/竞争抗体)的剂量,因为它可能不受配体竞争的影响。相比之下,在那些患者中可能需要增加其它配体阻断/竞争抗BCMA抗体的剂量,从而使得皮下施用在技术上更具挑战性(例如药物)。双特异性抗体的另一个优点是基于包含Fc部分,其与4至12天的消除半衰期相关并且允许至少一次或两次/周施用。

附图说明

[0219] 图1. 双特异性二价抗体仅包含Fab片段(对CD3和BCMA具有特异性)和所指定的Fc部分:(A) Fab BCMA (RK/EE) -Fc-Fab CD3; (B) Fab BCMA-Fc-Fab CD3 (RK/EE)。在CL-CH1中引入RK/EE的aa取代以减少产生中的LC错配/副产物。所述Fab CD3包含VL-VH交叉以减少LC错配和副产物。

[0220] 图2. 优选的双特异性三价抗体仅包含Fab片段(对CD3和BCMA具有特异性)和所指定的Fc部分:(A) Fab BCMA (RK/EE) -Fc-Fab CD3-Fab BCMA (RK/EE); (B) Fab BCMA-Fc-Fab CD3 (RK/EE) -Fab BCMA; (C) Fab BCMA (RK/EE) -Fc-Fab BCMA (RK/EE) -Fab CD3; (D) Fab BCMA-Fc-Fab BCMA-Fab CD3 (RK/EE)。在CL-CH1中引入RK/EE的aa取代以减少产生中的LC错配/副产物。优选地,所述Fab CD3包含VL-VH交叉以减少LC错配和副产物。优选地,Fab CD3和Fab BCMA用柔性接头彼此连接。

[0221] 图3. 双特异性二价抗体仅包含Fab片段(对CD3和BCMA具有特异性)和所指定的Fc部分:(A) Fc-Fab CD3-Fab BCMA (RK/EE); (B) Fc-Fab CD3 (RK/EE) -Fab BCMA; (C) Fc-Fab BCMA (RK/EE) -Fab CD3; (D) Fc-Fab BCMA-Fab CD3 (RK/EE)。优选地,所述Fab CD3包含VL-VH交叉以减少LC错配和副产物。Fab CD3和Fab BCMA用柔性接头彼此连接。

[0222] 图4. 如通过LDH释放测量的由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体(BCMAxCD3-TCB)诱导的H929 MM细胞的重定向的T细胞溶解。与83A10-TCBcv(空心圆圈,虚线)相比,由21-TCBcv(实心圆圈)、22-TCBcv(实心三角形)、42-TCBcv(实心正方形)诱导的H929 MM细胞的溶解的浓度反应曲线。关于术语TCB或TCBcv的定义,参见上文。在实验中使用的TCBcv(其结果在图4至16和19至21中示出)具有图2A中所示的形式(cv表示电荷变体aa取代)。对于所有抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体,存在H929细胞的浓度依赖性杀死,而在对照-TCB情况下未观察到杀死。用PBMC供体1(A)、供体3(B)、供体4(C)、供体5(D),使用10个PBMC与1个MM细胞的效应细胞与肿瘤靶细胞(E:T)比率进行实验(参见实施例8)。

[0223] 图5. 如通过LDH释放测量的由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的L363 MM细胞的重定向的T细胞溶解。与83A10-TCBcv(空心圆圈,虚线)相比,由21-TCBcv(实心圆圈)、22-TCBcv(实心三角形)、42-TCBcv(实心正方形)诱导的L363 MM细胞的溶解的浓度反应曲线。对于所有抗-BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体,观察到L363细胞的浓度依赖性杀死,而在对照-TCB情况下未观察到杀死。用PBMC供体1(A)、供体2(B)、供体3(C)、供体4(D)、供体5(E),使用10个PBMC与1个MM细胞的E:T比率进行实验(参见实施例9)。

[0224] 图6. 如通过LDH释放测量的由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的RPMI-8226 MM细胞的重定向的T细胞溶解。与83A10-TCBcv(空心圆圈,虚线)相比,由21-TCBcv(实心圆圈)、22-TCBcv(实心三角形)、42-TCBcv(实心正方形)诱导的RPMI-8226MM细胞的溶解的浓度反应曲线。对于所有抗-BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体,观察到RPMI-8226细胞的

浓度依赖性杀死,而在对照-TCB情况下未观察到杀死。用PBMC供体2(A)、供体3(B)、供体4(C)、供体5(D),使用10个PBMC与1个MM细胞的E:T比率进行实验(参见实施例10)。

[0225] 图7.如通过流式细胞术测量的由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的JJN-3 MM细胞的重定向的T细胞溶解。与83A10-TCBcv(空心圆圈,虚线)相比,22-TCBcv(实心三角形)、42-TCBcv(实心正方形)对JJN-3 MM细胞的浓度依赖性杀死。测定膜联蛋白-V阳性JJN-3细胞(A,C)和肿瘤细胞溶解(B,D)的百分比并作图。如下测定由特定浓度的抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的JJN-3细胞的溶解百分比:在给定TCB浓度下膜联蛋白-V阴性JJN-3细胞的绝对计数并将其从没有TCB的膜联蛋白-V阴性JJN-3细胞的绝对计数中减去;除以没有TCB的膜联蛋白-V阴性JJN-3细胞的绝对计数。用2个PBMC供体进行实验:供体1(A,B)和供体2(C,D),使用10个PBMC与1个MM细胞的E:T比率(参见实施例11)。

[0226] 图8.如通过多参数流式细胞术测量的通过抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的在自体骨髓湿润性T细胞(患者的全骨髓抽吸物)存在下,多发性骨髓瘤患者骨髓骨髓瘤浆细胞的重定向的T细胞溶解。测定膜联蛋白-V阳性骨髓瘤浆细胞的百分比并针对TCB浓度作图。观察到患者骨髓瘤浆细胞的浓度依赖性和特异性溶解,而基于8色多参数组未观察到T细胞、B细胞和NK细胞的溶解。在所测试的TCB抗体的最高浓度下,用对照-TCB未诱导骨髓瘤浆细胞的细胞死亡。与83A10-TCBcv(A)相比,42-TCBcv(B)和22-TCBcv(C)更有效地诱导患者骨髓骨髓瘤浆细胞的杀死(参见实施例13)。

[0227] 图9.如通过流式细胞术测量的通过抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的在自体骨髓湿润性T细胞(患者的全骨髓抽吸物)存在下,多发性骨髓瘤患者骨髓骨髓瘤浆细胞的重定向的T细胞溶解。测定膜联蛋白-V阴性骨髓瘤浆细胞的百分比并针对TCB浓度作图。观察到患者骨髓瘤浆细胞的浓度依赖性和特异性溶解,而未观察到非恶性骨髓细胞的溶解(数据未示出)。在所测试的TCB抗体的最高浓度下,用对照-TCB未观察到骨髓瘤浆细胞的细胞死亡的诱导(数据未示出)。与83A10-TCBcv相比,如通过活(膜联蛋白-V阴性)骨髓瘤浆细胞的浓度依赖性减少所反映,42-TCBcv和22-TCBcv更有效诱导患者骨髓髓细胞浆细胞的杀死。患者001(A)和患者007(B)中的代表性实验(参见实施例13)。

[0228] 图10.如通过流式细胞术测量的通过抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的在自体骨髓湿润性T细胞存在下,多发性骨髓瘤患者骨髓骨髓瘤浆细胞的重定向的T细胞溶解。测定碘化丙啶阴性骨髓瘤浆细胞的百分比,并将活骨髓浆细胞相对于培养基对照(MC)的百分比针对TCB浓度作图。观察到患者骨髓瘤浆细胞的浓度依赖性和特异性溶解(A-G),而未观察到骨髓微环境(BMME)的溶解(H)。在所测试的TCB抗体的最高浓度下,用对照-TCB未观察到骨髓瘤浆细胞的细胞死亡的诱导。与83A10-TCBcv相比,如通过活(碘化丙啶阴性)骨髓瘤浆细胞的浓度依赖性减少所反映,42-TCBcv和22-TCBcv更有效诱导患者骨髓髓细胞浆细胞的杀死。如果其相应的统计检验的P值<5%(*)<1%(**)或<0.1%(***)^{***},则认为作用是统计上显著的。使用从患者1(A)、患者2(B)、患者3(C)、患者4(D)、患者5(E)、患者6(F)和患者7(G,H)收集的骨髓抽吸物样品进行实验(参见实施例13)。

[0229] 图11.如通过多参数流式细胞术(8色染色组)测量的通过抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的在骨髓浆细胞(患者全骨髓抽吸物)存在下,骨髓瘤患者骨髓T细胞的活化。在83A10-TCBcv(A)、42-TCBcv(B)和22-TCBcv(C)之间比较T细胞活化的程度(参见实施例14)。

[0230] 图12.在用0.003、0.03和0.1mg/kg的83A10-TCBcv在食蟹猴中单次静脉内注射(IV)后,从血清样品(具有实线的实心符号)和骨髓样品(具有虚线的空心符号)测量的83A10-TCBcv的浓度。在给药前和给药后30分钟、90分钟、180分钟、7小时、24小时、48小时、96小时、168小时、336小时、504小时进行血清样品收集。在给药前以及给药后96小时和336小时收集骨髓样品(参见实施例16)。

[0231] 图13.在单次IV注射83A10-TCBcv(0.003、0.03和0.3mg/kg)后在食蟹猴中观察到的外周T细胞再分布。动物A和B、C和D以及E和F分别接受0.003、0.03和0.3mg/kg的83A10-TCBcv的IV注射。将绝对血液T细胞计数(每 μ L血液的CD2+细胞)针对治疗后的时间作图(参见实施例16)。

[0232] 图14.如通过多参数流式细胞术测量的单次IV注射83A10-TCBcv(0.3mg/kg)后在食蟹猴中观察到的血浆细胞的减少。基于6色染色组鉴定浆细胞(PC),并且测量PC相对于淋巴细胞的百分比并以等高线图作图(A)。将食蟹猴中用83A10-TCBcv 0.3mg/kg处理后的血浆细胞消减的动力学(B)作图(参见实施例16)。

[0233] 图15.使用PBMC-人源化NOG小鼠,在H929人骨髓瘤异种移植物模型中由83A10-TCBcv抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的抗肿瘤活性。免疫缺陷型NOD/Shi-scid IL2r γ (缺失)(NOG)在第0天(d0)接受人多发性骨髓瘤H929细胞作为皮下(SC)注射到右背侧腹中。在第15天(d15),NOG小鼠接受单次腹膜内(IP)注射人PBMC。然后将小鼠小心地随机分入不同的处理组和对照组(n=9只/组),并进行统计检验以测试组之间的同质性。实验组是对照未处理组、对照-TCB处理组、83A10-TCBcv 2.6nM/kg处理组和**BCMA50-BiTETR**(BCMAxCD3(scFv)₂)2.6nM/kg处理组。通过尾静脉注射给予的抗体处理在第19天(d19),即在SC注射H929肿瘤细胞后19天开始。TCB抗体处理时间表包括每周一次IV施用达3周(即总计3次注射TCB抗体)。在研究期间通过卡尺测量肿瘤体积(TV),并通过TV的组间比较评价进展。TV(mm³)针对肿瘤注射后天数作图。在d19(处理的第一天),平均肿瘤体积对于媒介物处理的对照组(A)达到300±161mm³,对于2.6nM/kg对照-TCB处理的组(A)达到315±148mm³,对于2.6nM/kg 83A10-TCBcv组(B)达到293±135mm³,并且对于2.6nM/kg BCMA50-BiTETR组(C)达到307±138mm³。将每个实验组的每只单独小鼠的TV针对肿瘤注射后天数作图:(A)对照组,包括媒介物对照(实线)和对照-TCB(虚线),(B)83A10-TCBcv(2.6nM/kg)组和(C)BCMA50-BiTETR(2.6nM/kg)。黑色箭头显示通过IV注射给予的TCB处理。在83A10-TCBcv(2.6nM/kg)组中,9只小鼠中的6只(67%)的肿瘤消退甚至低于在d19(即第一次TCB处理)记录的TV以下,并且维持肿瘤消退直到研究终止。83A10-TCBcv(2.6nM/kg)处理组中未能显示肿瘤消退的3只小鼠在d19时的TV分别等于376、402和522mm³。相比之下,以每周一次时间表用等摩尔剂量的**BCMA50-BiTETR**(2.6nM/kg)处理3周的9只小鼠中没有一只(0%)的肿瘤在任何时间点消退(参见实施例17)。

[0234] 图16.计算d19至d43的肿瘤生长百分比(TG),并在83A10-TCBcv(2.6nM/kg)组与**BCMA50-BiTETR**(2.6nM/kg)之间进行比较。通过计算TG(%)=100x(分析组的中值TV)/(对照媒介物处理组的中值TV)来确定定义为TG(%)的肿瘤生长百分比。出于道德原因,当TV达到至少2000mm³时,对小鼠实施安乐死。TG(%)在83A10-TCBcv(2.6nM/kg)组中一致地且显著地降低,并且当与**BCMA50-BiTETR**(2.6nM/kg)相比时TG(%)总是较低(参见实施

例17)。

[0235] 图17. 选自ELISA的70个克隆的表面等离子体共振(SPR)。所有实验均在25下使用PBST作为运行缓冲液(10mM PBS, pH 7.4和0.005% (v/v) Tween®20)与配备有GLC和GLM传感器芯片和偶联试剂的ProteOn XPR36生物传感器进行。在GLM芯片上以30μl/分钟进行固定化。使用标准胺偶联程序将pAb(山羊)抗hu IgG,F(ab)2特异性Ab(Jackson)在垂直方向上偶联:将所有六个配体通道用EDC(200mM)与磺基-NHS(50mM)的混合物活化5分钟。在表面活化后,立即将pAb(山羊)抗hu IgG F(ab)2特异性抗体(50μg/ml, 10mM乙酸钠, pH5)注射到所有六个通道中5分钟。最后,将通道用5分钟注射1M乙醇胺-HCl(pH8.5)封闭。最终固定水平在所有通道上相似,在11000至11500RU的范围内。通过沿着五个单独的整个水平通道(30 μl/分钟)同时注射5分钟来从大肠杆菌上清液中捕获Fab变体,并产生在200至900RU范围内的水平,这取决于上清液中Fab的浓度;沿着第六通道注射条件培养基以出于双重参考目的提供‘在线’空白。通过沿垂直通道注射人和cyno BCMA(50、10、2、0.4、0.08、0nM、50μl/分钟)持续3分钟来进行一次性动力学测量。监测解离5分钟。在ProteOn Manager v.2.1中分析动力学数据。反应点数据的处理涉及使用在线缓冲液空白应用间隔点参考和双重参考步骤(Myszka, 1999)。将来自重复一次性注射的处理数据拟合至简单1:1朗缪尔结合模型而无质量转运(0'Shanness等, 1993)。

[0236] 图18. 如通过流式细胞术测量的BCMA抗体对HEK-huBCMA细胞的结合亲和力。抗BCMA抗体用作第一抗体,然后使用第二PE标记的抗人Fc作为检测抗体。发现抗体Mab 21、Mab 22、Mab 27、Mab 39和Mab 42与HEK细胞上的huBCMA的结合不显著优于Mab 83A10与huBCMA-HEK细胞的结合。

[0237] 图19. 在食蟹猴中单次IV或SC注射后,在血清和骨髓中测量的42-TCBcv的浓度。动物接受单次IV或SC注射42-TCBcv,并且经由外周静脉收集每个时间点的血液样品用于在给药前、给药后30分钟、90分钟、180分钟、7小时、24小时、48小时、96小时、168小时、336小时、504小时的PK评价。使血液样品在室温下在管中凝结60分钟以用于血清分离。通过离心使凝块沉淀。将所得血清直接储存在-80直到进一步分析。还在给药前、给药后96小时和336小时在麻醉/镇痛处理下,在股骨处收集骨髓样品用于PK评价。使骨髓样品在室温下在管中凝结60分钟以用于血清分离。通过离心使凝块沉淀。将所得骨髓直接储存在-80直到进一步分析。进行PK数据分析和评价。使用Watson包(v 7.4, Thermo Fisher Scientific Waltman, MA, USA)或Phoenix WinNonlin系统(v.6.3, Certara Company, USA)进行标准非房室分析。多发性骨髓瘤患者骨髓抽吸物中42-TCBcv的有效浓度范围对应于10pm至10nM(灰色区域)。括号内的浓度以nM计。

[0238] 图20. 如通过流式细胞术测量的通过抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的在自体T细胞或骨髓浸润性T细胞存在下,浆细胞白血病患者骨髓白血病细胞的重定向的T细胞溶解。测定碘化丙啶阴性骨髓瘤浆细胞的百分比,并将活骨髓浆细胞白血病细胞相对于培养基对照(MC)的百分比针对TCB浓度作图。观察到患者浆细胞白血病细胞的浓度依赖性和特异性溶解(A,B),而未观察到骨髓微环境(BMME)的溶解(数据未示出)。在所测试的TCB抗体的最高浓度下,用对照-TCB未观察到骨髓瘤浆细胞的细胞死亡的诱导。如通过活(碘化丙啶阴性)骨髓瘤浆细胞的浓度依赖性减少所反映,42-TCBcv非常有效地诱导患者骨髓浆细胞白血病细胞的杀死。如果其相应的统计检验的P值<5% (*)、<1% (**) 或<0.1% (***) ,

则认为作用是统计上显著的。所述图示出从患者1(A)和患者2(B)的骨髓样品获得的结果(还参见实施例20)。

[0239] 图21.如通过流式细胞术测量的通过抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体与沙利度胺衍生物(来那度胺)或免疫治疗衍生物(抗PD1和抗CD38抗体)的组合诱导的H929 MM细胞的重定向的T细胞溶解。将H929 MM细胞与人白细胞(n=1或5)共培养并激发至次优浓度的单独抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体A) 83A10-TCCv(10pM)或B) 42-TCBcv(10pM)与次优浓度的来那度胺(1μM)、抗PD-1(10μg/ml)和抗CD38达雷木单抗(10μg/ml)的组合。将抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体83A10-TCBcv(n=5)与来那度胺或抗CD38达雷木单抗组合显著地使它们的抗MM功效分别增加4倍和2.5倍(A)。将42-TCBcv(n=1)与来那度胺或达雷木单抗组合也使它们的杀死MM细胞系的抗MM功效增加(B)。

具体实施方式

[0240] 如本文所用的术语“BCMA、靶BCMA、人BCMA”涉及人B细胞成熟抗原，也称为BCMA；TR17_人、TNFRSF17(UniProt Q02223)，其是优先在分化的浆细胞中表达的肿瘤坏死受体超家族的成员。BCMA的细胞外结构域根据UniProt由氨基酸1-54(或5-51)组成。如本文所用的术语“针对BCMA的抗体、抗BCMA抗体”涉及特异性地结合至BCMA的细胞外结构域的抗体。

[0241] “特异性地结合至BCMA或结合至BCMA”是指能够以足够的亲和力结合至靶BCMA、以使得所述抗体可用作靶向BCMA的治疗剂的抗体。在一些实施方案中,如例如通过表面等离子体共振(SPR),例如Biacore®、酶联免疫吸附(ELISA)或流式细胞术(FACS)所测量,抗BCMA抗体与不相关的非BCMA蛋白的结合程度比抗体与BCMA的结合低约10倍、优选>100倍。在一个实施方案中,结合至BCMA的抗体具有 10^{-8} M或更低、优选 10^{-8} M至 10^{-13} M、优选 10^{-9} M至 10^{-13} M的解离常数(Kd)。在一个实施方案中,所述抗BCMA抗体结合至BCMA的表位,所述表位在来自不同物种的BCMA中、优选在人和食蟹猴中是保守的,并且另外优选还结合至小鼠和大鼠BCMA。“特异性地结合至CD3和BCMA的双特异性抗体、针对CD3和BCMA的双特异性抗体”是指针对结合至两种靶标的相应定义。特异性地结合至BCMA(或BCMA和CD3)的抗体不结合至其它人抗原。因此,在ELISA中,此类不相关靶标的OD值将等于或低于特定测定的检测限的OD值,优选>0.3ng/mL,或等于或低于没有板结合的BCMA或具有未转染的HEK293细胞的对照样品的OD值。

[0242] 优选地,所述抗BCMA抗体特异性地结合至由人BCMA和非人哺乳动物来源的BCMA、优选来自食蟹猴、小鼠和/或大鼠的BCMA组成的BCMA组。“食蟹猴/人差距”是指亲和比KD食蟹猴BCMA[M]/KD人BCMA[M](细节参见实施例3)。如本文所用的“Mab CD3的食蟹猴/人差距”是指亲和比KD食蟹猴CD3[M]/KD人CD3[M]。在一个实施方案中,本发明的双特异性抗BCMA/抗CD3抗体显示在1.25与5之间或在0.8与1.0之间的Mab CD3的食蟹猴/人差距。在一个实施方案中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于其还特异性地结合至食蟹猴CD3。在一个实施方案中,本发明的双特异性抗BCMA/抗CD3抗体显示在1.25与5之间或在0.8与1.0之间的Mab CD3的食蟹猴/人差距。优选地,对于抗BCMA-和抗CD3抗体,食蟹猴/人差距在相同的范围内。

[0243] 如本文所用的术语“APRIL”涉及重组、截短的鼠APRIL(氨基酸106-241;NP_076006)。APRIL可如Ryan,2007(Mol Cancer Ther;6(11):3009-18)中所描述来产生。

[0244] 如本文所用的术语“BAFF”涉及重组、截短的人BAFF(UniProt Q9Y275(TN13B_人) , 其可如Gordon, 2003 (Biochemistry;42(20):5977-5983) 中所描述来产生。优选地, 根据本发明使用His标记的BAFF。优选地, 通过以下方式来产生His标记的BAFF: 将编码BAFF残基82-285的DNA片段克隆到表达载体中, 产生与N-末端His-标签、随后凝血酶裂解位点的融合体, 表达所述载体并用凝血酶裂解回收的蛋白质。

[0245] 使用板结合的BCMA通过ELISA分析抗BCMA抗体与人BCMA的结合。对于此测定, 使用优选1.5 μ g/mL的量的板结合的BCMA以及浓度范围为0.1pM至200nM的抗BCMA抗体。

[0246] 如本文所用的术语“NF- κ B”涉及重组NF- κ B p50(登录号(P19838))。NF- κ B活性可通过NCI-H929 MM细胞(CRL-9068TM)的提取物的DNA结合ELISA来测量。未处理或用0.1 μ g/mL TNF- α 处理的NCI-H929 MM细胞、1000ng/mL热处理的HT-截短的BAFF、1000ng/mL截短的BAFF、0.1pM至200nM同种型对照以及有或无0.1pM至200nM抗BCMA抗体孵育20分钟。可使用功能性ELISA测定NF- κ B活性, 所述功能性ELISA检测来自与NF- κ B共有序列结合的p65的化学发光信号(US6150090)。

[0247] 如本文所用的术语“其它靶标”优选意指CD3 ϵ 。术语“第一靶标和第二靶标”意指CD3作为第一靶标并且BCMA作为第二靶标或意指BCMA作为第一靶标并且CD3作为第二靶标。

[0248] 如本文所用的术语“CD3 ϵ 或CD3”涉及UniProt P07766(CD3E_人)下描述的人CD3 ϵ 。术语“针对CD3 ϵ 的抗体、抗CD3 ϵ 抗体”涉及特异性地结合至CD3 ϵ 的抗体。在一个实施方案中, 所述抗体包含可变结构域VH, 所述可变结构域VH包含SEQ ID NO:1、2和3的重链CDR分别作为重链CDR1H、CDR2H和CDR3H; 以及可变结构域VL, 所述可变结构域VL包含SEQ ID NO:4、5和6的轻链CDR分别作为轻链CDR1L、CDR2L和CDR3L。在一个实施方案中, 所述抗体包含SEQ ID NO:7(VH)和SEQ ID NO:8(VL)的可变结构域。

[0249] 如本文所用的术语“抗CD38抗体”涉及特异性地结合至人CD38的抗体。在本发明的一个实施方案中, 所述抗CD38抗体是达雷木单抗(US20150246123)。在本发明的一个实施方案中, 所述抗CD38抗体是伊沙妥昔单抗(SAR650984, US8877899)。在本发明的一个实施方案中, 所述抗CD38抗体是MOR202(WO 2012041800)。在本发明的一个实施方案中, 所述抗CD38抗体是Ab79(US8362211)。在本发明的一个实施方案中, 所述抗CD38抗体是Ab19(US8362211)。这种抗CD38抗体的剂量根据现有技术执行并在相应的处方信息中描述。例如达雷木单抗剂量通常是16mg/kg(www.ema.europa.eu)。

[0250] 如本文所用的术语“沙利度胺化合物”或“沙利度胺和免疫治疗衍生物”涉及2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2,3-二氢-1H-异吲哚-1,3-二酮及其免疫治疗衍生物。在本发明的一个实施方案中, 沙利度胺化合物选自由以下组成的组: 但不限于沙利度胺(CAS登记号50-35-1)、来那度胺(CAS登记号191732-72-6)、泊马度胺(CAS登记号19171-19-8)、CC122(CAS登记号1398053-45-6)和CC-220(CAS登记号1323403-33-3)和相应的盐(优选HC1盐1:1)。CC-122的化学式是2,6-哌啶二酮, 3-(5-氨基-2-甲基-4-氧代-3(4H-喹唑啉基)盐酸盐(1:1), 并且CC-220的化学式是2,6-哌啶二酮, 3-[1,3-二氢-4-[[4-(4-吗啉基甲基)苯基]甲氧基]-1-氧代-2H-异吲哚-2-基]-, (3S)-盐酸盐(1:1)。制备CC-220的方法描述于例如US 20110196150中, 其全部内容以引用的方式并入本文。

[0251] 沙利度胺(thalidomide)化合物的剂量根据现有技术执行并在相应的处方信息中描述。例如Revlimid®(来那度胺)剂量通常是在重复28天周期的1-21天每天一次口服25mg

(www.revlimid.com) ,并且用于治疗多发性骨髓瘤的**POMALYST®** (泊马度胺) 剂量通常是在重复28天周期的第1-21天每天口服4mg (www.celgene.com) 。在一个实施方案中,3-(5-氨基-2-甲基-4-氧代-4H-喹唑啉-3-基) -哌啶-2,6-二酮以每天约5至约50mg的量施用。
[0252] 在一个实施方案中,CC-122和CC-220以每天约5至约25mg的量施用。在另一个实施方案中,CC-122和CC-220以每天约5、10、15、25、30或50mg的量施用。在另一个实施方案中,每天施用10或25mg的CC-122和CC-220。在一个实施方案中,CC-122和CC-220每天施用两次。
[0253] 如本文所用的术语“抗PD-1抗体”涉及特异性地结合至人PD-1的抗体。此类抗体例如描述于W02015026634 (MK-3475,派姆单抗) 、US7521051、US8008449和US8354509中。派姆单抗(**Keytruda®**,MK-3475) 也描述于W0 2009/114335;Poole,R.M.Drugs (2014) 74:1973; Seiwert,T.,等人,J.Clin.Oncol.32,5s (增刊;摘要6011) 中。在本发明的一个实施方案中,PD-1抗体是MK-3475 (WHO Drug Information,第27卷,第2期,第161-162页(2013)) 并且其包含W0 2015026634的图6中所示的重链和轻链氨基酸序列。派姆单抗的氨基酸序列描述于W02008156712 (轻链CDR SEQ ID NO:15、16和17以及重链CDR SEQ ID NOS:18、19和20) 。在本发明的一个实施方案中,PD-1抗体是纳武单抗 (BMS-936558,MDX 1106;WHO Drug Information,第27卷,第1期,第68-69页(2013),W02006/121168,氨基酸序列在W0 2015026634中示出) 。在本发明的一个实施方案中,PD-1抗体是匹地利珠单抗 (CT-011,也称为hBAT或hBAT-1;氨基酸序列参见W02003/099196;W0 2009/101611;Fried I.等人;Neuro Oncol (2014) 16 (增刊5) :v111-v112.) 。在本发明的一个实施方案中,PD-1抗体是MEDI-0680 (AMP-514,W02010/027423,W02010/027827,W02010/027828,Hamid O.等人;J Clin Oncol 33,2015 (增刊;摘要TPS3087)) 。在本发明的一个实施方案中,PD-1抗体是PDR001 (NaingA.等人;J Clin Oncol 34,2016 (增刊;摘要3060)) 。在本发明的一个实施方案中,PD-1抗体是REGN2810 (Papadopoulos KP等人;J Clin Oncol 34,2016 (增刊;摘要3024)) 。在本发明的一个实施方案中,PD-1抗体是兰布罗利珠单抗 (W02008/156712) 。在本发明的一个实施方案中,PD-1抗体是h409A11、h409A16或h409A17,其描述于W02008/156712中。这种抗PD-1抗体的剂量根据现有技术执行并在相应的处方信息中描述。例如**Keytruda®**通常以每三周2mg/kg体重的浓度施用 (<http://ec.europa.eu/health/documents>) 。

[0254] 如本文所用的术语“抗PD-L1抗体”涉及特异性地结合至人PD-L1的抗体。此类抗体例如描述于W02015026634、W02013/019906、W02010/077634和US8383796中。在本发明的一个实施方案中,PD-L1抗体是MPDL3280A (阿特珠单抗, YW243.55.S70,W02010/077634, McDermott DF.等人,JCO 2016年3月10日,第34卷第8期833-842) 。在本发明的一个实施方案中,PD-L1抗体是MDX-1105 (BMS-936559,W02007/005874,Patrick A.Ott PA等人,DOI: 10.1158/1078-0432,Clinical Cancer Research-13-0143) 。在本发明的一个实施方案中,PD-L1抗体是MEDI4736 (德瓦鲁单抗,W0 2016/040238,Gilbert J.等人,Journal for ImmunoTherapy of Cancer 20153 (增刊2) :P152) 。在本发明的一个实施方案中,PD-L1抗体是MSB001071 8C (阿维鲁单抗,Disis ML.等人,Journal of Clinical Oncology,第33卷,第15期_增刊(5月20日增刊) ,2015:5509) 。在本发明的一个实施方案中,PD-L1抗体是包含SEQ ID NO:16的VH序列和SEQ ID NO:17的VL序列的抗PD-L1抗体,如W02016007235中所描述。这种抗PD-L1抗体的剂量根据现有技术执行并在相应的处方信息中描述。例如阿特珠单抗通常以1200mg的浓度作为每3周静脉内输注60分钟施用 (www.accessdata.fda.gov) 。

[0255] 如本文所用的术语“抗体”是指单克隆抗体。抗体由两对“轻链”(LC)和“重链”(HC)组成(这种轻链(LC)/重链对在本文中缩写为LC/HC)。此类抗体的轻链和重链是由若干结构域组成的多肽。每条重链包含重链可变区(文中缩写为HCVR或VH)和重链恒定区。重链恒定区包含重链恒定结构域CH1、CH2和CH3(抗体类别IgA、IgD和IgG)和任选的重链恒定结构域CH4(抗体类别IgE和IgM)。每条轻链包含轻链可变结构域VL和轻链恒定结构域CL。可变结构域VH和VL可进一步细分为散布有称为框架区(FR)的较保守区域的高变区,称为互补决定区(CDR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,其按以下顺序从氨基末端至羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的“恒定结构域”不直接参与抗体与靶标的结合,但表现出各种效应子功能。如本文所用的术语“抗体”是指还包含至少为分别与抗原CD3和BCMA的特异性结合所需的抗体部分。因此,如果所述抗体部分包含在根据本发明的双特异性抗体中,则这种抗体(或抗体部分)在一个实施方案中可以是Fab片段。根据本发明的抗体还可以是Fab'、F(ab')₂、scFv、二-scFv或双特异性T细胞衔接器(BiTE)。

[0256] 术语“抗体”包括例如小鼠抗体、人抗体、嵌合抗体、人源化抗体和遗传工程化的抗体(变体或突变型抗体),只要它们的特征性质得以保留即可。特别优选的是人或人源化抗体,尤其是作为重组人或人源化抗体。其它实施方案是异种特异性抗体(双特异性、三特异性等)和其它缀合物,例如,与细胞毒性小分子的缀合物。

[0257] 如本文所用的术语“双特异性抗体”在一个实施方案中是指其中两对重链和轻链(HC/LC)中的一对特异性地结合至CD3并且另一对特异性地结合至BCMA的抗体。所述术语还指根据现有技术的其它形式的双特异性抗体,在一个实施方案中是指双特异性单链抗体。

[0258] 如本文所用的术语“TCB”是指特异性地结合至BCMA和CD3的双特异性抗体。如通过SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47(2x)和SEQ ID NO:48的其重链和轻链组合所指定,并且如图2A所示和EP14179705中所描述,如本文所用的术语“83A10-TCBcv”是指特异性地结合至BCMA和CD3的双特异性抗体。如本文所用的术语“21-TCBcv、22-TCBcv、42-TCBcv”是指如通过SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51(2x)的其重链和轻链组合指定的Mab21、如通过SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:54(2x)的其重链和轻链组合指定的Mab22和如通过SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57-(2x)的其重链和轻链组合指定的Mab42的相应双特异性抗体。

[0259] 如本文所用的术语“裸抗体”是指特异性地结合至BCMA、包含Fc部分并且不与治疗剂、例如细胞毒剂或放射性标记缀合的抗体。如本文所用的术语“缀合的抗体、药物缀合物”是指特异性地结合至BCMA并且与治疗剂、例如细胞毒剂或放射性标记缀合的抗体。

[0260] 如本文所用的术语“双特异性单链抗体”是指在一个实施方案中包含两个结合结构域的单个多肽链,一个结合结构域特异性地结合至BCMA,并且另一个结合结构域在一个实施方案中特异性地结合至CD3。每个结合结构域包含来自抗体重链的一个可变区(“VH区”),其中第一结合结构域的VH区特异性地结合至CD3分子,并且第二结合结构域的VH区特异性地结合至BCMA。两个结合结构域任选地通过短多肽间隔区彼此连接。多肽间隔区的非限制性实例是G1y-Gly-Gly-G1y-Ser(G-G-G-G-S)及其重复序列。每个结合结构域可另外包含来自抗体轻链的一个可变区(“VL区”)、经由多肽接头彼此连接的第一和第二结合结构域中的每个内的VH区和VL区,所述多肽接头足够长以允许第一结合结构域的VH区和VL区以及

第二结合结构域的VH区和VL区彼此配对,以使得它们一起能够特异性地结合至相应的第一结合结构域和第二结合结构域(参见例如EP0623679)。双特异性单链抗体还例如在Choi BD等人,Expert Opin Biol Ther. 2011 Jul;11 (7) : 843-53和Wolf E.等人,Drug Discov Today. 2005年9月15日;10 (18) : 1237-44中提及。

[0261] 如本文所用的术语“双抗体”是指小的二价和双特异性抗体片段,其包含与通过肽接头连接的同一多肽链(VH-VL)上的轻链可变结构域(VL)连接的重(VH)链可变结构域,所述肽接头太短而不允许同一链上的两个结构域之间的配对(Kipriyanov, Int. J. Cancer 77 (1998), 763-772)。这迫使与另一条链的互补结构域配对并促进二聚体分子与两个功能性抗原结合位点的组装。为了构建本发明的双特异性双抗体,将抗CD3抗体和抗BCMA抗体的V结构域融合以产生两条链VH(CD3)-VL(BCMA)、VH(BCMA)-VL(CD3)。每条链本身不能结合至相应的抗原,但在与另一条链配对时重新产生抗CD3抗体和抗BCMA抗体的功能性抗原结合位点。在重链可变结构域与轻链可变结构域之间具有接头的两个scFv分子(所述接头对于分子内二聚化来说太短)被共表达并自组装以形成具有位于相对端处的两个结合位点的双特异性分子。举例来说,分别编码BCMA和CD3的结合域的可变区可通过PCR从如所述获得的DNA构建体扩增,以使得它们可被克隆到如pHOG的载体中,如Kipriyanov等人,J. Immunol, Methods, 200, 69-77 (1997a) 中所描述。然后将两个scFv构建体以所需的取向组合在一个表达载体中,由此缩短VH-VL接头以防止所述链向后折叠到自身上。DNA区段通过终止密码子和核糖体结合位点(RBS)分开。RBS允许mRNA作为双顺反子信息转录,其由核糖体翻译成非共价相互作用以形成双抗体分子的两种蛋白质。与其它抗体片段一样,双抗体具有以下优点:它们可以功能形式且以高产量(高达Ig/1)在细菌(大肠杆菌)和酵母(巴斯德毕赤酵母)中表达。

[0262] 如本文所用的术语“串联scFv”是指单链Fv分子(即通过分别免疫球蛋白重链和轻链可变结构域VH和VL的缩合形成的分子),如例如在WO 03/025018和WO 03/048209中所描述。被称为**TandAbs®**的此类Fv分子包含四个抗体可变结构域,其中(i)所述四个可变结构域中的前两个或最后两个通过以取向VH/VL或VL/VH形成抗原结合scFv而在同一链内彼此分子内结合,(ii)其它两个结构域与另一条链的相应VH或VL结构域分子间结合以形成抗原结合VH/VL对。在优选的实施方案中,如WO 03/025018中所提及,这种Fv分子的单体包含至少四个可变结构域,其中一个单体的两个相邻结构域形成抗原结合VH-VL或VL-VH scFv单元。

[0263] 如本文所用的术语“DARPin”是指如例如在US 2009082274中描述的双特异性锚蛋白重复分子。这些分子源自天然锚蛋白,其可在人基因组中发现,并且是最丰富类型的结合蛋白之一。DARPin文库模块由天然锚蛋白重复蛋白序列定义,使用229个锚蛋白重复序列进行初始设计,并且另外2200个用于后续精制。这些模块充当DARPin文库的构建块。库模块类似于人基因组序列。DARPin由4至6个模块组成。因为每个模块是大约3.5kDa,所以平均DARPin的大小是16-21kDa。结合剂的选择通过核糖体展示完成,其完全不含细胞并且描述于He M和Taussig MJ., Biochem Soc Trans. 2007, 11月; 35 (Pt 5) : 962-5中。

[0264] 术语“T细胞双特异性衔接器”是由约55千道尔顿的单个肽链上的不同抗体的两个单链可变片段(scFv)或来自四种不同基因的氨基酸序列组成的融合蛋白。所述scFv中的一个经由CD3受体结合至T细胞,并且另一个结合至BCMA。

[0265] 存在五种类型的哺乳动物抗体重链,其由希腊字母表示: α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ (Janeway CA, Jr等人 (2001) . Immunobiology. 第5版, Garland Publishing)。存在的重链类型定义抗体类别;这些链分别在IgA、IgD、IgE、IgG和IgM抗体中发现 (Rhoades RA, Pflanzer RG (2002) . Human Physiology, 第4版, Thomson Learning)。不同的重链在大小和组成上不同; α 和 γ 含有大约450个氨基酸,而 μ 和 ϵ 具有大约550个氨基酸。

[0266] 每条重链具有两个区,恒定区和可变区。恒定区在相同同种型的所有抗体中均是相同的,但是在不同同种型的抗体中是不同的。重链 γ 、 α 和 δ 具有由三个恒定结构域CH1、CH2和CH3(在一条线上)组成的恒定区,和用于增加柔性的铰链区 (Woof J, Burton D Nat Rev Immunol 4 (2004) 89-99);重链 μ 和 ϵ 具有由四个恒定结构域CH1、CH2、CH3和CH4组成的恒定区 (Janeway CA, Jr等人 (2001) . Immunobiology. 第5版, Garland Publishing)。重链的可变区在由不同B细胞产生的抗体中不同,但对于由单个B细胞或单独B细胞产生的所有抗体而言是相同的。每条重链的可变区是大约110个氨基酸长并且由单个抗体结构域组成。

[0267] 在哺乳动物中,仅存在两种类型的轻链,其被称为 λ (λ) 和 κ (κ)。轻链具有两个连续结构域:一个恒定结构域CL和一个可变结构域VL。轻链的近似长度是211至217个氨基酸。在一个实施方案中,轻链是 κ (κ)轻链,并且在一个实施方案中恒定结构域CL源自 κ (κ)轻链(恒定结构域CK)。

[0268] 如本文所用的“aa取代”是指独立氨基酸取代,在恒定结构域CH1中位置147和213处的氨基酸被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)取代,并且在恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)取代。在一个实施方案中,另外在恒定结构域CL中,位置123处的氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)取代。在一个实施方案中,氨基酸124是K,氨基酸147是E,氨基酸213是E,并且氨基酸123是R。aa取代在CD3 Fab中或在一个或两个BCMAFab中。作为电荷变体的针对BCMA和CD3的双特异性抗体描述于以引用的方式公开的EP14179705中(进一步称为“电荷变体和电荷变体交换”)。

[0269] 本文中的所有氨基酸编号均根据Kabat (Kabat, E.A. 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242)。

[0270] 如本文所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单氨基酸组成的抗体分子制品。

[0271] 根据本发明的“抗体”可具有任何类别(例如IgA、IgD、IgE、IgG和IgM, 优选IgG或IgE)或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2, 优选IgG1), 其中根据本发明的二价双特异性抗体所来源的两种抗体具有相同亚类的Fc部分(例如IgG1、IgG4等, 优选IgG1), 优选具有相同同种异型(例如高加索人)。

[0272] “抗体的Fc部分”是本领域技术人员熟知的术语,并且基于抗体的木瓜蛋白酶裂解来定义。在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体含有在一个实施方案中源自人来源的Fc部分并且优选人恒定区的所有其它部分作为Fc部分。抗体的Fc部分直接参与补体活化、C1q结合、C3活化和Fc受体结合。虽然抗体对补体系统的影响取决于某些条件,但与C1q的结合由Fc部分中的限定结合位点引起。此类结合位点是现有技术中已知的并且例如由以下描述:Lukas, T.J., 等人, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., 和Cebra, J.J., Mo I. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., 等人, Nature 288 (1980) 338-344;

Thommesen, J.E., 等人, Mol Immunol 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., 等人, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., 等人, J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., 等人, Immunology 86 (1995) 319-324; 以及 EP 0 307 434。

[0273] 此类结合位点例如是L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331和P329(根据Kabat的EU索引编号)。亚类IgG1、IgG2和IgG3的抗体通常显示补体活化、C1q结合和C3活化,而IgG4不活化补体系统、不结合C1q并且不活化C3。在一个实施方案中,Fc部分是人Fc部分。

[0274] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体包含野生型人IgG Fc区的Fc变体,所述Fc变体包含在位置Pro329处的氨基酸取代和至少一个另外的氨基酸取代,其中残基是根据Kabat的EU索引编号,并且其中与包含野生型IgG Fc区的抗体相比,所述抗体表现出对人Fc γ RIII A和/或Fc γ RII A和/或Fc γ RI的降低的亲和力,并且其中由所述抗体诱导的ADCC被降低至由包含野生型人IgG Fc区的抗体诱导的ADCC的至少20%。在一个具体实施方案中,所述双特异性抗体中野生型人Fc区的Pro329被甘氨酸或精氨酸或足够大以破坏Fc/Fc γ 受体界面内的脯氨酸夹心的氨基酸残基取代,所述脯氨酸夹心在Fc的脯氨酸329与Fc γ RIII的色氨酸残基Trp87和Tip110之间形成Sondermann等人:Nature 406, 267-273 (2000年7月20日))。在本发明的另一方面,Fc变体中的至少一个另外的氨基酸取代是S228P、E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S,并且在另一个实施方案中,所述至少一个另外的氨基酸取代是人IgG1 Fc区的L234A和L235A或人IgG4 Fc区的S228P和L235E。此类Fc变体在WO2012130831中详细描述。

[0275] 如本文所用的“效应子功能”是指由抗体Fc区与Fc受体或配体的相互作用产生的生物化学事件。效应子功能包括但不限于ADCC、ADCP和CDC。如本文所用的“效应细胞”是指表达一种或多种Fc受体并介导一种或多种效应子功能的免疫系统的细胞。效应细胞包括但不限于单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、血小板、B细胞、大颗粒淋巴细胞、朗格汉斯细胞、自然杀伤(NK)细胞和 $\gamma\delta$ T细胞,并且可来自任何生物体,包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔和猴。本文中的“文库”是指呈任何形式的一组Fc变体,包括但不限于核酸或氨基酸序列的列表、可变位置处的核酸或氨基酸取代的列表、包含编码文库序列的核酸的物理文库或包含呈纯化或未纯化形式的Fc变体蛋白的物理文库。

[0276] 如本文所用的“Fc γ 受体”或“Fc γ R”是指结合IgG抗体Fc区并基本上由Fc γ R基因编码的蛋白质家族的任何成员。在人中,这一家族包括但不限于Fc γ RI(CD64),包括同工型Fc γ RIa、Fc γ RIb和Fc γ RIc;Fc γ RII(CD32),包括同工型Fc γ RIIa(包括同种异型H131和R131)、Fc γ RIIb(包括Fc γ RIIb-1和Fc γ RIIb-2)以及Fc γ RIIc;和Fc γ RIII(CD16),包括同工型Fc γ RIIIa(包括同种异型V158和F158)以及Fc γ RIIIb(包括同种异型Fc γ RIIIb-NA1和Fc γ RIIIb-NA2)(Jefferis等人,2002, Immunol Lett 82:57-65),以及任何未发现的人Fc γ R或Fc γ R同工型或同种异型。Fc γ R可来自任何生物体,包括但不限于:人、小鼠、大鼠、兔和猴。小鼠Fc γ R包括但不限于:Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)、Fc γ RIII(CD16)和Fc γ RIII-2(CD16-2),以及任何未发现的小鼠Fc γ R或Fc γ R同工型或同种异型。

[0277] 如本文所用的“具有增加的效应子功能的Fc变体”是指通过至少一种氨基酸修饰而不同于亲本Fc序列的Fc序列、或涉及增加效应子功能的其它修饰如在例如Asn279处的糖基化的修正的Fc序列。此类修饰在例如以下中提及:Duncan等人,1988, Nature 332:563-564;Lund等人,1991, J Immunol 147:2657-2662;Lund等人,1992, Mol Immunol 29:53-59;

Alegre等人,1994,Transplantation 57:1537-1543;Hutchins等人,1995,Proc Natl Acad Sci U S A 92:11980-11984;Jefferis等人,1995,//77muno/Lett 44:111-117;Lund等人,1995,Faseb J 9:115-119;Jefferis等人,1996,Immunol Lett 54:101-104;Lund等人,1996,J Immunol 157:4963-4969;Armour等人,1999,Eur J Immunol 29:2613-2624;Idusogie等人,2000,J Immunol 164:4178-4184;Reddy等人,2000,J Immunol 164:1925-1933;Xu等人,2000,Cell Immunol 200:16-26;Idusogie等人,2001,J Immunol 166:2571-2575;Shields等人,2001,J Biol Chem 276:6591-6604;Jefferis等人,2002,Immunol Lett 82:57-65;Presta等人,2002,Biochem Soc Trans 30:487-490;US5624821;US5885573;US6194551;W0200042072;W0199958572。根据本发明,此类Fc修饰还包括Fc部分的工程化的糖型。如本文所用的“工程化的糖型”意指共价连接至Fc多肽的碳水化合物组合物,其中所述碳水化合物组合物在化学上不同于亲本Fc多肽的碳水化合物组合物。工程化的糖型可通过任何方法来产生:例如,通过使用工程化或变体表达菌株、通过与一种或多种酶(例如,D1-4-N-乙酰葡萄糖胺转移酶III(GnTIII))进行共表达、通过在各种生物体或来自各种生物体的细胞系中表达Fc多肽或通过在所述Fc多肽已被表达之后修饰一种或多种碳水化合物。用于产生工程化的糖型的方法是本领域中已知的,并且在以下中提及:Umana等人,1999,Nat Biotechnol 17:176-180;Davies等人,2001,Biotechnol Bioeng 74:288-294;Shields等人,2002,J Biol Chem 277:26733-26740;Shinkawa等人,2003,J Biol Chem 278:3466-3473)US6602684;W0200061739;W0200129246;W0200231140;W0200230954;PotelligentTM技术(Biowa,Inc.,Princeton,N.J.);GlycoMAbTM糖基化工程化技术(GLYCART biotechnology AG,Zurich,Switzerland)。工程化的糖型通常是指与亲本Fc多肽不同的碳水化合物或寡糖组合物。

[0278] 在本发明的一个实施方案中,所述双特异性抗体包含具有增加的效应子功能的Fc变体,其显示出对Fc γ 受体III(Fc γ RIII,CD16a)的高结合亲和力。对Fc γ RIII的高结合亲和力表示结合对于CD16a/F158相对于作为在CHO宿主细胞(如CHO DG44或CHO K1细胞)中表达的参考的亲本抗体(95%岩藻糖基化)增强至少10倍,或/和结合对于CD16a/V158相对于使用固定化的CD16a在100nM的抗体浓度下通过表面等离子体共振(SPR)测量的亲本抗体增强至少20倍。Fc γ RIII结合可通过根据现有技术的方法增加,例如通过修饰Fc部分的氨基酸序列或抗体的Fc部分的糖基化(参见例如EP2235061)。Mori,K等人,Cytotechnology 55(2007)109和Satoh M,等人,Expert Opin Biol Ther.6(2006)1161-1173涉及用于产生非岩藻糖基化抗体的FUT8(α -1,6-岩藻糖基转移酶)基因敲除CHO系。

[0279] 术语“嵌合抗体”是指通常通过重组DNA技术制备的包含来自一种来源或物种的可变区(即结合区)和至少一部分源自不同来源或物种的恒定区的单克隆抗体。包含鼠可变区和人恒定区的嵌合抗体是优选的。本发明涵盖的其它优选形式的“嵌合抗体”是其中恒定区已经从原始抗体的恒定区修饰或改变以产生根据本发明的性质的那些,特别是关于C1q结合和/或Fc受体(FcR)结合的性质。此类嵌合抗体也称为“类别转变抗体”。嵌合抗体是表达的免疫球蛋白基因的产物,所述基因包含编码免疫球蛋白可变区的DNA区段和编码免疫球蛋白恒定区的DNA区段。用于产生嵌合抗体的方法涉及本领域中熟知的常规重组DNA和基因转染技术。参见例如,Morrison,S.L.,等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81(1984)6851-6855;美国专利号5,202,238和5,204,244。

[0280] 术语“人源化抗体”是指其中框架区或互补决定区(CDR)已被修饰为包含相较于亲本免疫球蛋白的特异性，具有不同特异性的免疫球蛋白的CDR的抗体。在一个优选的实施方案中，将鼠CDR移植到人抗体的框架区中以制备“人源化抗体”。参见例如，Riechmann,L.,等人，Nature 332(1988) 323-327；和Neuberger,M.S.,等人，Nature 314(1985) 268-270。本发明涵盖的其它形式的“人源化抗体”是其中恒定区已经从原始抗体的恒定区另外修饰或改变以产生根据本发明的性质的那些，特别是关于C1q结合和/或Fc受体(FcR)结合的性质。

[0281] 如本文所用，术语“人抗体”意图包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。人抗体是现有技术中熟知的(van Dijk,M.A.,和van deWinkel,J.G., Curr.Opin.Chem.Biol.5(2001) 368-374)。人抗体也可在转基因动物(例如小鼠)中产生，所述转基因动物在免疫后能够在不存在内源性免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的全谱或选择。人种系免疫球蛋白基因阵列在这种种系突变型小鼠中的转移将导致产生人抗体(参见例如，Jakobovits,A.,等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA90(1993) 2551-2555；Jakobovits,A.,等人，Nature 362(1993) 255-258；Bruggemann,M.,等人，Year Immunol.7 (1993) 33-40)。人抗体也可在噬菌体展示文库中产生(Hoogenboom,H.R.,和Winter,G., J.Mol.Biol.227(1992) 381-388；Marks,J.D.,等人，J.Mol.Biol.222(1991) 581-597)。Cole等人和Boerner等人的技术也可用于制备人单克隆抗体(Cole等人，Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,第77页(1985)；和Boerner,P.,等人，J.Immunol.147(1991) 86-95)。如关于根据本发明的嵌合和人源化抗体已经提及的，如本文所用的术语“人抗体”还包含在恒定区中进行修饰以产生根据本发明的性质的此类抗体，尤其是关于C1q结合和/或FcR结合的性质，例如通过“类别转变”，即Fc部分的改变或突变(例如从IgG1至IgG4和/或IgG1/IgG4突变)。

[0282] 如本文所用的术语“重组人抗体”意图包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的所有人抗体，如从诸如NS0或CHO细胞的宿主细胞或从对于人免疫球蛋白基因为转基因的动物(例如小鼠)分离的抗体或使用转染至宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体。此类重组人抗体具有重排形式的可变区和恒定区。所述重组人抗体已经受体内体细胞超突变。因此，所述重组抗体的VH区和VL区的氨基酸序列是尽管源自且相关于人种系VH和VL序列，但可能不天然体内存在于人抗体种系谱系内的序列。

[0283] 如本文所用的“可变结构域”(轻链的可变结构域(VL)、重链的可变区(VH))表示直接参与结合抗体的一对轻链和重链中的每一个。可变人轻链和重链的结构域具有相同的一般结构，并且每个结构域包含通过三个“高变区”(或互补决定区，CDR)连接的序列广泛保守的四个框架(FR)区。框架区采用 β -折叠构象，并且CDR可形成连接 β -折叠结构的环。每条链中的CDR通过框架区保持处于其三维结构，并且与来自另一条链的CDR一起形成结合位点。抗体重链和轻链CDR3区在抗体的结合特异性/亲和力中起特别重要的作用，并且因此提供了本发明的另一个目的。“包含VH区和VL区的结合部分”是指这些区是所述BCMA或CD3结合部分的相应VH和VL区。

[0284] 术语“高变区”或“抗体的靶标结合部分”当在本文中使用时是指抗体的负责靶标结合的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基。“框架”或“FR”区是除如本文所定义的高变区残基以外的那些可变结构域残基。因此，抗体的轻链和重链从N-末端至C-末端包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。每条链上的CDR通过此类

框架氨基酸分开。特别地,重链的CDR3是对靶标结合贡献最大的区域。CDR和FR区根据Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)的标准定义来确定。如本文所用的术语“CDR1H、CDR2H和CDR3H”是指位于可变结构域VH中的重链的相应CDR。如本文所用的术语“CDR1L、CDR2L和CDR3L”是指位于可变结构域VL中的轻链的相应CDR。

[0285] 重链结构域CH3被其置换的恒定重链结构域CH1可具有任何Ig类别(例如IgA、IgD、IgE、IgG和IgM)或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。重链结构域CH3被其置换的恒定轻链结构域CL可以是 λ (λ)或 κ (κ)类型,优选 κ (κ)类型。

[0286] 如本文所用的术语“靶标”或“靶分子”可互换使用并且是指人BCMA。关于双特异性抗体,所述术语是指BCMA和第二靶标。优选地,关于双特异性抗体,所述术语是指BCMA和CD3。

[0287] 术语“表位”包括能够特异性结合至抗体的任何多肽决定簇。在某些实施方案中,表位决定簇包括如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基的分子的化学活性表面集合,并且在某些实施方案中可具有特定三维结构特征和/或特定电荷特征。表位是靶标中由抗体结合的区域。

[0288] 通常,存编在码抗体的轻链和重链的两种载体。关于双特异性抗体,存在编码所述特异性地结合至第一靶标的抗体的轻链和重链的两种载体,以及编码所述特异性地结合至第二靶标的抗体的轻链和重链的另外两种载体。两种载体中的一种编码相应的轻链,并且两种载体中的另一种编码相应的重链。然而,在用于制备抗体的另一种方法中,编码特异性地结合至第一靶标的抗体的轻链和重链的仅一种第一载体和编码特异性地结合至第二靶标的抗体的轻链和重链的仅一种第二载体可用于转化宿主细胞。

[0289] 如本文所用的术语“核酸或核酸分子”意图包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链的或双链的,但优选地是双链DNA。

[0290] 如本文使用,表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换地使用,并且全部这些名称均包括子代。因此,词语“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞以及源自其的培养物,而不考虑转移次数。还应理解,由于有意或无意的突变,所有子代的DNA含量可能不完全相同。包括了与经过筛选于初始转化细胞具有相同功能或生物活性的变体子代。如果意图不同的名称,则它将从上下文清楚。

[0291] 如本文所用的术语“转化”是指载体/核酸转移到宿主细胞中的过程。如果使用无强大细胞壁屏障的细胞作为宿主细胞,则例如通过如由Graham和Van der Eh,Virology 52(1978) 546ff所描述的磷酸钙沉淀法进行转染。然而,也可使用用于将DNA引入细胞的其它方法,例如通过核注射或通过原生质体融合。如果使用原核细胞或含有实质细胞壁构造的细胞,则如由Cohen SN,等人,PNAS 1972,69(8):2110-2114所描述例如一种转染方法是使用氯化钙的钙处理。

[0292] 使用转化重组产生抗体是现有技术中熟知的,并且描述于例如以下的综述文章中:Makrides,S.C,Protein Expr.Purif.17(1999) 183-202;Geisse,S.,等人,Protein Expr.Purif.8(1996) 271-282;Kaufman,RJ.,MoI.Biotechnol.16(2000) 151-161;Werner,R.G.,等人,Arzneimittelforschung 48(1998) 870-880以及US6331415和US4816567。

[0293] 如本文所用,“表达”是指核酸被转录成mRNA的过程和/或是指所转录的mRNA(还称

为转录物)随后被翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。转录物和编码的多肽被统称为基因产物。如果多核苷酸源自基因组DNA，则真核细胞中的表达可包括mRNA的剪接。

[0294] “载体”是将插入的核酸分子转移至宿主细胞中和/或在宿主细胞之间转移插入的核酸分子的核酸分子，特别是自我复制。所述术语包括主要起将DNA或RNA插入细胞中(例如，染色体整合)的作用的载体、主要起复制DNA或RNA的作用的复制载体、和起转录和/或翻译DNA或RNA的作用的表达载体。还包括提供多于一种如所描述的功能的载体。

[0295] “表达载体”是在引入到适当宿主细胞中时可转录且翻译成多肽的多核苷酸。“表达系统”通常是指包含可起产生所需表达产物的作用的表达载体的合适的宿主细胞。

[0296] 抗体优选地通过重组方法产生。此类方法是现有技术中广泛已知的且包括在原核和真核细胞中进行蛋白质表达，并随后分离抗体多肽且通常纯化至药学上可接受的纯度。对于蛋白质表达，通过标准方法将编码轻链和重链或其片段的核酸插入表达载体中。在适当的原核或真核宿主细胞(如CHO细胞、NS0细胞、SP2/0细胞、HEK293细胞、COS细胞、酵母或大肠杆菌细胞)中进行表达，且从所述细胞(溶解后的上清液或细胞)回收抗体。所述双特异性抗体可存在于全细胞中、细胞溶解产物中、或部分纯化或基本上纯形式中。通过标准技术进行纯化以消除其它细胞组分或其它污染物，例如其它细胞核酸或蛋白质，所述标准技术包括碱性/SDS处理柱色谱法和本领域中熟知的其它技术。参见Ausubel,F.,等人,编辑, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。

[0297] NS0细胞中的表达由例如以下描述:Barnes,L.M.,等人,Cytotechnology 32 (2000) 109-123;和Barnes,L.M.,等人,Biotech.Bioeng.73(2001) 261-270。瞬时表达由例如Durocher,Y.,等人,Nucl.Acids.Res.30(2002)E9描述。可变结构域的克隆由以下描述:Orlandi,R.,等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86 (1989) 3833-3837;Carter,P.,等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89 (1992) 4285-4289;和Norderhaug,L.,等人,J.Immunol.Methods 204(1997) 77-87。优选的瞬时表达系统(HEK293)由Schlaeger,E.-J., 和Christensen,K.,在Cytotechnology 30 (1999) 71-83且由Schlaeger,E.-J.,在J.Immunol.Methods 194 (1996) 191-199中描述。

[0298] 适于原核生物的控制序列例如包括启动子，任选地包括操纵子序列，和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、增强子和聚腺苷酸化信号。

[0299] 抗体通过常规免疫球蛋白纯化程序，例如像蛋白质A-琼脂糖、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱从培养基分离。编码单克隆抗体的DNA或RNA易于使用常规程序分离和测序。杂交瘤细胞可充当这种DNA和RNA的来源。一旦分离，可将DNA插入表达载体中，接着将所述表达载体转染至不会以其它方式产生免疫球蛋白的宿主细胞(如HEK 293细胞、CHO细胞或骨髓瘤细胞)中，在宿主细胞中获得重组单克隆抗体的合成。

[0300] 通过将适当核苷酸变化引入抗体DNA中或通过核苷酸合成来制备抗体的氨基酸序列变异体(或突变体)。然而，此类修饰仅在非常有限的范围内进行，例如如上所述。例如，所述修饰不会改变上述抗体特征，如IgG同种型和靶标结合，但可提高重组产生的产率、蛋白稳定性或促进纯化。

[0301] 在本发明的一个实施方案中，代替双特异性抗体，使用嵌合抗原受体(CAR)，其中所述CAR包含针对BCMA的抗原识别部分、跨膜部分和T细胞活化部分，其特征在于所述抗原

识别部分是根据本发明的抗体(在此不是双特异性抗体)。然后通常通过使用包含编码所述CAR的序列的载体(优选逆转录病毒载体)将这种CAR转移到免疫效应细胞中,针对其在本文中使用术语“CART细胞”。然后将此类CAR T细胞与所述免疫治疗药物组合使用。

[0302] 编码的抗体也可以是如所指定的抗原结合片段。此类“BCMA CAR”的结构和产生例如描述于WO2013154760、WO2015052538、WO2015090229和WO2015092024中。

[0303] 在一个实施方案中,代替双特异性抗体,使用嵌合抗原受体(CAR)或相应的CART细胞,其包含:

[0304] (i) B细胞成熟抗原(BCMA)识别部分;

[0305] (ii) 间隔区结构域;以及

[0306] (ii) 跨膜结构域;以及

[0307] (iii) 细胞内T细胞信号传导结构域,

[0308] 其特征在于所述BCMA识别部分是特异性地结合至BCMA的单克隆抗体,其特征在于包含SEQ ID NO:17的CDR3H区和SEQ ID NO:20的CDR3L区以及选自以下的组的CDR1H、CDR2H、CDR1L区和CDR2L区组合:

[0309] a) SEQ ID NO:21的CDR1H区和SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,

[0310] b) SEQ ID NO:21的CDR1H区和SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,

[0311] c) SEQ ID NO:21的CDR1H区和SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区,

[0312] d) SEQ ID NO:29的CDR1H区和SEQ ID NO:30的CDR2H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区和SEQ ID NO:32的CDR2L区,

[0313] e) SEQ ID NO:34的CDR1H区和SEQ ID NO:35的CDR2H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区和SEQ ID NO:32的CDR2L区,以及

[0314] f) SEQ ID NO:36的CDR1H区和SEQ ID NO:37的CDR2H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区和SEQ ID NO:32的CDR2L区。

[0315] T细胞活化部分可以是源自或获自任何合适的分子的任何合适的部分。在一个实施方案中,例如,T细胞活化部分包含跨膜结构域。跨膜结构域可以是源自或获自本领域中已知的任何分子的任何跨膜结构域。例如,跨膜结构域可获自或源自CD8a分子或CD28分子。CD8是跨膜糖蛋白,其充当T细胞受体(TCR)的共受体,并且主要在细胞毒性T细胞的表面上表达。最常见的CD8形式作为由CD8 α 和CD8 β 链组成的二聚体存在。CD28在T细胞上表达,并提供T细胞活化所需的共刺激信号。CD28是CD80(B7.1)和CD86(B7.2)的受体。在一个优选的实施方案中,CD8 α 和CD28是人的。除跨膜结构域外,T细胞活化部分还包含细胞内(即细胞质)T细胞信号传导结构域。细胞间T细胞信号传导结构域可获自或源自CD28分子、CD3 ζ 分子或其修饰型式、人Fc受体 γ (FcR γ)链、CD27分子、OX40分子、4-1BB分子或本领域中已知的其它细胞内信号传导分子。如上所述,CD28是T细胞共刺激中重要的T细胞标志物。CD3 ζ 与TCR结合以产生信号并含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。4-1BB(也称为CD137)将有效的共刺激信号传递至T细胞,从而促进分化并增强T淋巴细胞的长期存活。在一个实施方案中,CD28、CD3 ζ 、4-1BB、OX40和CD27是人的。

- [0316] 这种CAR或相应的CART细胞与本文所述的免疫治疗药物一起用于
- [0317] a) 根据本发明的组合用于治疗多发性骨髓瘤中，
- [0318] b) 根据本发明的治疗多发性骨髓瘤的方法中，
- [0319] c) 根据本发明的用于在患有多发性骨髓瘤疾病的患者中实现多发性骨髓瘤细胞溶解的治疗组合中，
- [0320] d) 根据本发明的制品中，以及
- [0321] e) 根据本发明的用于制造药物的方法中。
- [0322] T细胞双特异性 (TCB) 结合剂在细胞杀死中具有非常高的浓度/肿瘤细胞-受体-占据依赖性效力(例如在亚或低皮摩尔范围内的体外细胞杀死测定中的EC₅₀; Dreier等人Int J Cancer 2002), T细胞双特异性结合剂 (TCB) 以比常规单特异性抗体低得多的剂量给予。例如,博纳吐单抗(CD19xCD3)以5至15 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ /天(即仅0.35至0.105 mg/m^2 /周)的连续静脉内剂量给予用于治疗急性淋巴细胞白血病或60 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ /天用于治疗非霍奇金淋巴瘤,并且在这些剂量下的血清浓度在0.5至4ng/ml的范围内(Klinger等人,Blood 2012; Topp等人,J Clin Oncol 2011; Goebeler等人Ann Oncol 2011)。因为低剂量的TCB可在患者中发挥高功效,所以设想对于双特异性抗体和药物,皮下施用在临床环境中是可能的和优选的(优选地在0.1至2.5、优选25 mg/m^2 /周、优选250 mg/m^2 /周的剂量范围内)。即使在这些低浓度/剂量/受体占有率下,TCB也可引起相当大的不良事件(Klinger等人,Blood 2012)。因此,控制肿瘤细胞占有率/覆盖率至关重要。在具有高且可变水平的血清APRIL和BAFF的患者(例如多发性骨髓瘤患者,Moreaux等人2004; Blood 103 (8) :3148-3157)中,与肿瘤细胞结合的TCB的数量和肿瘤细胞占有率可分别受APRIL/BAFF相当大地影响。但是通过使用本发明中使用的所述抗体,分别功效/安全性的肿瘤细胞占有率,可能不需要增加根据本发明的抗体的剂量,因为所述抗体可能不受APRIL/BAFF配体竞争的影响。双特异性抗体的另一个优点是基于包含Fc部分,其与需要通过患者携带的泵静脉内且连续给予的不含Fc部分的TCB(例如博纳吐单抗)相比,使消除半衰期延长至约4至12天并且允许至少一次或两次/周施用。
- [0323] 与83A10-TCBcv相比,已经在若干研究中研究了双特异性抗体的生物学性质。在H929 MM细胞系上测量了例如相较于83A10-TCBcv,抗BCMA/抗CD3 TCB抗体21-TCBcv、22-TCBcv、42-TCBcv的诱导T细胞重定向的细胞毒性的效力(实施例8,表12,图4)。研究了本发明中使用的抗体,并且分析表明H929细胞的浓度依赖性杀死和EC50值据发现分别高于针对83A10-TCBcv所测定的EC50值;从而表明双特异性抗体诱导杀死H929 MM细胞的效力低于作为TCB的Mab 83A10。出人意料地,当在RPMI -8226 MM细胞系以及还有JJN-3细胞系(分别实施例10和11,表13和14和15,图6和7)上测量T细胞重定向的细胞毒性时观察到转换:所述双特异性抗体显示出较低的EC50,并且因此比83A10-TCBcv更高的效力。令发明者惊讶的是,所述双特异性抗体与从MM患者中新鲜采集的骨髓抽吸物中的83A10TCBcv直接比较显示若干优点(注意:为了得到最佳可能的比较,在所有骨髓抽吸物中,总是所有T细胞双特异性(TCB)抗体已在相同浓度下进行测试);
- [0324] -骨髓瘤细胞的杀死效力更高,即已经在比83A10-TCBcv更低浓度下杀死的%相同,相应地杀死的浓度反应曲线向左移动(实施例13,表18、19和20,图8、9和10)。已经在双特异性抗体的1nM浓度下,在七种不同的患者骨髓吸出物中,相对于碘化丙啶阴性的活多发性骨髓瘤癌细胞对照的减少在77.1%与100%之间。使用1nM 83A10-TCBcv,在相同的七份

骨髓抽吸物中,实现了仅37.1%至98.3%的减少(表20和21)。

[0325] -与83A10-TCBcv相比更高的最大杀死在与用于双特异性抗体的七(7)份骨髓抽吸物的相同实验中在所测试的最高浓度(10nM)下实现(表20和21)。

[0326] -如果使用22-TCBcv/42-TCBcv,则83A10-TCBcv的无反应者可转为反应者:在其中未观察到对83A10-TCBcv的杀死反应的两(2)份骨髓患者样品中,使用根据本发明的抗体作为TCB可发现出人意料的杀死(图9A和9B)。

[0327] 本发明中使用的BCMAxCD3 TCB结合至人和食蟹猴(cyno) BCMA以及小鼠和大鼠的BCMA,如果CD3结合剂也结合至食蟹猴CD3则适合于食蟹猴中的毒理学检查,或者如果CD3结合剂还结合至小鼠/大鼠BCMA,则适合于小鼠/大鼠中的毒理学检查。出人意料地,对cyno BCMA的结合亲和力非常接近于对人BCMA的结合亲和力。SPR已用于测量对人和cyno BCMA的结合亲和力(实施例2,表4)。通过将对cyno BCMA的亲和力除以对人BCMA的亲和力来从测量的亲和力数据计算Cyno/人差距(对cyno与人BCMA的亲和力的比率,KD)(实施例3,表5)。对于83A10,发现15.3的cyno/人差距(即对cyno BCMA的结合亲和力比对人BCMA的结合亲和力低15.3倍)。令本发明人惊讶的是,双特异性抗体显示在15.4与1.7之间的cyno/人差距,其与83A10相似或大部分更有利cyno/人差距(表5)。因为BCMAxCD3 TCB中使用的CD3结合剂与食蟹猴CD3交叉反应,所以可从食蟹猴获得药代动力学和药效学研究(参见实施例16)。此外,在食蟹猴中的毒理学研究预示对人中的药理学和毒理学作用,并且与食蟹猴的交叉反应性特征对患者有益。本发明中使用的BCMA抗体也结合至鼠BCMA(例如通过SPR测量的克隆22和42的Kd为0.9nM和2.5nM),参见实施例1.1.1A.4中的表2D)。BCMAxCD3 TCB的CD3结合剂不与鼠CD3交叉反应。

[0328] 总之,用于杀死表达低BCMA的MM细胞系如RPMI-8226和JJN-3、并且特别是用于杀死患者骨髓抽吸物中的MM细胞的效力和功效优点以及此外对BCMA的结合亲和力的非常有利的cyno/人差距使得本发明中使用的抗体和相应的TCB本质上是有希望的治疗MM患者的药剂。此外,本发明中使用的抗BCMAxCD3 TCBcv具有作为83A10-TCBcv的有利性质,如长消除半衰期、每周一次施用(静脉内,皮下)的功效、低或无聚集倾向并且可以纯度高和高产率制造。

[0329] 表1A:抗体序列

SEQ ID NO:	名称	aa 序列
[0330]	1 CD3 CDR1H	TYAMN
	2 CD3 CDR2H	RIRSKYNNYATYYADSVKG
	3 CD3 CDR3H	HGNFGNSYVSWFAY
	4 CD3 CDR1L	GSSTGAVTTSNYAN
	5 CD3 CDR2L	GTNKRAP
	6 CD3 CDR3L	ALWYSNLWV
	7 CD3 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVR QAPGKGLEWVSIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGQGTLVTVSS
	8 CD3 VL	QAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWV QEKGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
	9 83A10 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGFWDYWGQGTLV TVSS
	10 Mab21 VH Mab22 VH Mab42 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVR QAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGFWDYWGQGTLVT VSS
	11 83A10 VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK

	Mab21 VL Mab27 VL Mab33 VL Mab39 VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSEYYLAWYQQ KPGQAPRLLIEHASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK
13	Mab22 VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYYLAWYQQ KPGQAPRLLISGAGSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK
14	Mab42 VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQ KPGQAPRLLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLAISRLE PEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK
15	83A10 CDR1H	SYAMS
16	83A10 CDR2H	AISGGGSTYYADSVKG
[0331]	83A10 CDR3H Mab21 CDR3H Mab22 CDR3H Mab42 CDR3H Mab27 CDR3H Mab33 CDR3H Mab39 CDR3H	VLGWFDY
	83A10 CDR1L	RASQSVSSSYLAW
	83A10 CDR2L	YGASSRAT
	83A10 CDR3L Mab21 CDR3L Mab22 CDR3L Mab42 CDR3L	QQYGYPPDFT
	Mab21 CDR1H Mab22 CDR1H	DNAMG

	Mab42 CDR1H	
22	Mab21 CDR2H Mab22 CDR2H Mab42 CDR2H	AISGPGSSTYYADSVKG
23	Mab21 CDR1L	RASQSVSEYYLAW
24	Mab21 CDR2L	EHASTRAT
25	Mab22 CDR1L	RASQSVSSYYLAW
26	Mab22 CDR2L	SGAGSRAT
27	Mab42 CDR1L	RASQSVSDEYLSW
28	Mab42 CDR2L	HSASTRAT
29	Mab27 CDR1H	SAPMG
30	Mab27 CDR2H	AISYIGHTYYADSVKG
31	Mab27 CDR1L Mab33 CDR1L Mab39 CDR1L	RASQSVSEYYLA
32	Mab27 CDR2L Mab33 CDR2L Mab39 CDR2L	HASTRAT
33	Mab27 CDR3L Mab33 CDR3L Mab39 CDR3L	QQYGYPPDFT
34	Mab33 CDR1H	TNAMG

	35	Mab33 CDR2H	AINRGFGSTYYADSVKG
	36	Mab39 CDR1H	QNAMG
	37	Mab39 CDR2H	AISPTGFSTYYADSVKG
[0333]	38	Mab27 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSAPMGWVR QAPGKGLEWVSAISYIGHTYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVTVSS
	39	Mab33 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYTNAMGWVR QAPGKGLEWVSAINRGFGSTYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVTVSS
	40	Mab39 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTQNAMGWVR QAPGKGLEWVSAISPTGFSTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVT VSS
	41	83A10 BCMA CH1 Mab21 BCMA CH1 Mab22 BCMA CH1 Mab42 BCMA CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVEDYFPEPV TWSNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYLSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
	42	83A10 BCMA CL Mab21 BCMA CL Mab22 BCMA CL Mab42 BCMA CL	RTVAAPSVFIFPPSDRK LKSGTASVVCLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	43	CD3 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPV TWSNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYLSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
	44	CD3 CL	ASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	45	83A10 旋钮 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVEDYFPEP

[0334]

		VTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKDEKVEPKSCDGCGGGGGGGGG SQAVVTQEPSTVSPGGTVTLCGSSTGAVTSNYANW VQEKGPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
46	83A10 孔 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEP VTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGVF FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
47	83A10 LC	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGYPPDFTEFGQGQTKVEIKRTVAAPS FPPSDRKLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
48	CD3 LC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVR QAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWQGQGTLTVSSASVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
49	Mab21 旋 钮 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVR QAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPV TVWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL

[0335]

		GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGSGGGSGGGGS QAVVTQEPLTVSPGGTVTLCGSSTGAVTSNYANWV QEKGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIASKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
50	Mab21 孔 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVR QAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIASKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
51	Mab21 LC	EIVLTQSPGTLSSLPGERATLSCRASQSVSEYYLAWYQQ KPGQAPRLLIEHASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFI FPPSDRKLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
52	Mab22 旋 钮 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVR QAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGSGGGSGGGGS QAVVTQEPLTVSPGGTVTLCGSSTGAVTSNYANWV QEKGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN

		WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	Mab22 孔 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVEDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYLSLSSVTV PSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	Mab22 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYYLAWYQQ KPGQAPRLLISGAGSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
55	Mab42 旋 钮 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVEDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYLSLSSVTV PSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDG GGGGGGGSGS QA VVTQEPLTVSPGGTVTLCGSSTGA VTTSNYANW VQEPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SG AQP EDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWN SGALTSGVHTFP AVLQSSGLYLSLSSVTV PSSL GTQTYI CNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF N WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
56	Mab42 孔 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVT

[0337]

		VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAPLQSSGLYSLSSVTPSSL GTQTYICNVNKHPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
57	Mab42 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQ KPGQAPRLLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLAISRLE PEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDRKLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0338] 注释:SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:33是相同的

[0339] 表1B:抗体序列(短列表)

[0340]

	SEQ ID NO:								
CD3 抗体	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3L	
	7	8	1	2	3	4	5	6	
BCMA 抗体	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3L	
83A10	9	11	15	16	17	18	19	20	
Mab21	10	12	21	22	17	23	24	20	
Mab22	10	13	21	22	17	25	26	20	
Mab42	10	14	21	22	17	27	28	20	
Mab27	38	12	29	30	17	31	32	33	
Mab33	39	12	34	35	17	31	32	33	
Mab39	40	12	36	37	17	31	32	33	

[0341]

表2A:另外的构建体

[0342]

	SEQ ID NO:			
片段/构建体	83A10	Mab21	Mab22	Mab42
BCMA CH1	41	41	41	41
BCMA CL	42	42	42	42
CD3 CH1	43	43	43	43
CD3 CL	44	44	44	44

[0343]

表2B:另外的构建体

	SEQ ID NO:				
	83A10	Mab21	Mab22	Mab42	
[0344]	BCMA VH_CH1cv x CD3 VL_CH1 Fc 旋钮 LALA PG (旋钮 HC)	45	49	52	55
	BCMAcv HC 孔 LALA PG (孔 HC)	46	50	53	56
	BCMAcv hum IgG1 LC (BCMA LC)	47	51	54	57
	CD3 VH_CL (CD3 LC)	48	48	48	48

[0345] 为了制备以下含(2+1)Fc的抗BCMA/抗CD3 TCB, 使用以上表2B中提及的相应构建体/序列ID:

[0346] 83A10-TCBcv:45、46、47(x2)、48(图2A)

[0347] 21-TCBcv:48、49、50、51(x2)(图2A)

[0348] 22-TCBcv:48、52、53、54(x2)(图2A)

[0349] 42-TCBcv:48、55、56、57(x2)(图2A)

[0350] 在以下列举本发明的具体实施方案:

[0351] I. 一种组合用于治疗多发性骨髓瘤的双特异性抗体和免疫治疗药物, 所述双特异性抗体包含特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ (CD3)的第二结合部分, 所述免疫治疗药物选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组, 其特征在于所述第一结合部分包含VH区和VL区, 所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区, 所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:

[0352] i) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,

[0353] ii) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区, 或

[0354] iii) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。

[0355] II. 根据实施方案I的组合用于治疗多发性骨髓瘤的双特异性抗体和免疫治疗药物, 其特征在于所述免疫治疗药物选自由以下组成的组: 达雷木单抗、伊沙妥昔单抗、MOR202、Ab79、Ab19、沙利度胺、来那度胺、泊马度胺、派姆单抗、匹地利珠单抗、纳武单抗、MEDI-0680、PDR001、REGN2810、兰布罗利珠单抗、MDX-1106、BGB-108、h409A11、h409A16、h409A17以及阿特珠单抗。

[0356] III. 一种治疗多发性骨髓瘤的方法, 其特征在于向需要这种治疗的患者施用

[0357] a) 双特异性抗体, 所述双特异性抗体包含特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ (CD3)的第二结合部分, 以及

[0358] b) 免疫治疗药物, 所述免疫治疗药物选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组,

[0359] 其特征在于所述第一结合部分包含VH区和VL区, 所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区, 所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:

[0360] i) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,

[0361] ii) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区, 或

[0362] iii) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。

[0363] 所述双特异性抗体和免疫治疗药物以治疗有效量使用。

[0364] IV. 根据实施方案III的方法,其特征在于所述免疫治疗药物选自由以下组成的组:达雷木单抗、伊沙妥昔单抗、MOR202、Ab79、Ab19、沙利度胺、来那度胺、泊马度胺、派姆单抗、匹地利珠单抗、纳武单抗、MEDI-0680、PDR001、REGN2810、兰布罗利珠单抗、MDX-1106、BGB-108、h409A11、h409A16、h409A17以及阿特珠单抗。

[0365] V. 一种用于在患有多发性骨髓瘤疾病的患者中实现多发性骨髓瘤细胞溶解的治疗组合,其特征在于包含:

[0366] a) 双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ (CD3)的第二结合部分,以及

[0367] b) 免疫治疗药物,所述免疫治疗药物选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组,

[0368] 其特征在于所述第一结合部分包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:

[0369] i) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,

[0370] ii) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,或

[0371] iii) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。

[0372] 所述双特异性抗体和免疫治疗药物以治疗有效量使用。

[0373] VI. 根据实施方案V的治疗组合,其特征在于所述免疫治疗药物选自由以下组成的组:达雷木单抗、伊沙妥昔单抗、MOR202、Ab79、Ab19、沙利度胺、来那度胺、泊马度胺、CC-122、CC-220、派姆单抗、匹地利珠单抗、纳武单抗、MEDI-0680、PDR001、REGN2810、兰布罗利珠单抗、MDX-1106、BGB-108、h409A11、h409A16、h409A17、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗以及MDX-1105。

[0374] VII. 一种制品,其特征在于包括:

[0375] a) 在药学上可接受的载体中的双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ (CD3)的第二结合部分,其特征在于所述第一结合部分包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:

[0376] i) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,

[0377] ii) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,或

[0378] iii) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区,

[0379] b) 免疫治疗药物,所述免疫治疗药物选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组,

[0380] c) 药学上可接受的载体和用于将所述双特异性抗体和所述免疫治疗药物组合施用至需要治疗多发性骨髓瘤的受试者的说明书。

[0381] VIII. 根据实施方案VII的制品,其特征在于所述免疫治疗药物选自由以下组成的组:达雷木单抗、伊沙妥昔单抗、MOR202、Ab79、Ab19、沙利度胺、来那度胺、泊马度胺、CC-

122、CC-220、派姆单抗、匹地利珠单抗、纳武单抗、MEDI-0680、PDR001、REGN2810、兰布罗利珠单抗、MDX-1106、BGB-108、h409A11、h409A16、h409A17、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗以及MDX-1105。

[0382] IX. 一种用于制造药物的方法,其特征在于使用

[0383] a) 双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性地结合至人B细胞成熟抗原(BCMA)的第一结合部分和特异性地结合至人CD3 ϵ (CD3)的第二结合部分,其特征在于所述第一结合部分包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:

[0384] i) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,

[0385] ii) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,或

[0386] iii) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区,

[0387] b) 免疫治疗药物,所述免疫治疗药物选自由沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体组成的组,

[0388] c) 将所述双特异性抗体和所述免疫治疗药物组合在药学上可接受的载体中。

[0389] 所述双特异性抗体和免疫治疗药物以治疗有效量使用。

[0390] X. 根据实施方案IX的用于制造药物的方法,其特征在于所述免疫治疗药物选自由以下组成的组:达雷木单抗、伊沙妥昔单抗、MOR202、Ab79、Ab19、沙利度胺、来那度胺、泊马度胺、CC-122、CC-220、派姆单抗、匹地利珠单抗、纳武单抗、MEDI-0680、PDR001、REGN2810、兰布罗利珠单抗、MDX-1106、BGB-108、h409A11、h409A16、h409A17、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗以及MDX-1105。

[0391] 在以下列出了根据本发明的第一结合部分的具体实施方案:

[0392] 1. 一种特异性地结合至BCMA的单克隆抗体,其特征在于包含SEQ ID NO:17的CDR3H区和SEQ ID NO:20的CDR3L区以及选自以下的组的CDR1H、CDR2H、CDR1L区和CDR2L区组合:

[0393] a) SEQ ID NO:21的CDR1H区和SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,

[0394] b) SEQ ID NO:21的CDR1H区和SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,

[0395] c) SEQ ID NO:21的CDR1H区和SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区,

[0396] d) SEQ ID NO:29的CDR1H区和SEQ ID NO:30的CDR2H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区和SEQ ID NO:32的CDR2L区,

[0397] e) SEQ ID NO:34的CDR1H区和SEQ ID NO:35的CDR2H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区和SEQ ID NO:32的CDR2L区,以及

[0398] f) SEQ ID NO:36的CDR1H区和SEQ ID NO:37的CDR2H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区和SEQ ID NO:32的CDR2L区。

[0399] 2. 一种特异性地结合至BCMA的单克隆抗体,其特征在于包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述

VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合：

- [0400] a) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区，
- [0401] b) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区，或
- [0402] c) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。

[0403] 3.根据实施方案1或2的抗体,其特征在于包含选自由SEQ ID NO:12、13和14的VL区组成的组的VL区作为VL区。

[0404] 4.根据实施方案1至3中任一项的抗体,其特征在于包含SEQ ID NO:10的VH区作为VH区和SEQ ID NO:12的VL区作为VL区。

[0405] 5.根据实施方案1至3中任一项的抗体,其特征在于包含SEQ ID NO:10的VH区作为VH区和SEQ ID NO:13的VL区作为VL区。

[0406] 6.根据实施方案1至3中任一项的抗体,其特征在于包含SEQ ID NO:10的VH区作为VH区和SEQ ID NO:14的VL区作为VL区。

[0407] 7.根据实施方案1或2的抗体,其特征在于所述VL区的氨基酸49选自由以下组成的组:氨基酸酪氨酸(Y)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)和组氨酸(H)。

[0408] 8.根据实施方案7的抗体,其特征在于所述VL区的氨基酸74是苏氨酸(T)或丙氨酸(A)。

[0409] 9.一种特异性地结合至BCMA的单克隆抗体,其特征在于包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:31的CDR1L区、SEQ ID NO:32的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区以及选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合:

- [0410] a) SEQ ID NO:29的CDR1H区和SEQ ID NO:30的CDR2H区，
- [0411] b) SEQ ID NO:34的CDR1H区和SEQ ID NO:35的CDR2H区，或
- [0412] c) SEQ ID NO:36的CDR1H区和SEQ ID NO:37的CDR2H区。

[0413] 10.根据实施方案9的抗体,其特征在于包含SEQ ID NO:12的VL区和选自包括SEQ ID NO:38、39和40的VH区的组的VH区。

[0414] 11.根据实施方案9或10的抗体,其特征在于所述VL区的氨基酸49选自由以下组成的组:氨基酸酪氨酸(Y)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)和组氨酸(H)。

[0415] 12.根据实施方案9或10的抗体,其特征在于所述VL区的氨基酸74是苏氨酸(T)或丙氨酸(A)。

[0416] 13.根据实施方案1至12中任一项的抗体,其特征在于其还特异性地结合至食蟹猴BCMA并且包含特异性地结合至CD3 ϵ 的额外Fab片段。

[0417] 14.根据实施方案1至13中任一项所述的抗体,其特征在于是具有Fc或没有Fc部分的抗体。

[0418] 在以下列出根据本发明的双特异性抗体的具体实施方案:

[0419] 15.一种特异性地结合至BCMA和CD3 ϵ 的双特异性抗体,其特征在于包含SEQ ID NO:17的CDR3H区和SEQ ID NO:20的CDR3L区以及选自以下的组的CDR1H、CDR2H、CDR1L区和CDR2L区组合:

[0420] a) SEQ ID NO:21的CDR1H区和SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区，

[0421] b) SEQ ID NO:21的CDR1H区和SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:25的CDR1L区

和SEQ ID NO:26的CDR2L区，

[0422] c) SEQ ID NO:21的CDR1H区和SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区，

[0423] d) SEQ ID NO:29的CDR1H区和SEQ ID NO:30的CDR2H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区和SEQ ID NO:32的CDR2L区，

[0424] e) SEQ ID NO:34的CDR1H区和SEQ ID NO:35的CDR2H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区和SEQ ID NO:32的CDR2L区，以及

[0425] f) SEQ ID NO:36的CDR1H区和SEQ ID NO:37的CDR2H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区和SEQ ID NO:32的CDR2L区。

[0426] 16.一种特异性地结合至两种靶标的双特异性抗体，所述靶标是人BCMA(进一步命名为“BCMA”)和人CD3ε(进一步命名为“CD3”)的细胞外结构域，其特征在于包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区，所述VL区包含SEQ ID NO:20的CDR3L区和选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合：

[0427] a) SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区，

[0428] b) SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区，或

[0429] c) SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区。

[0430] 17.根据实施方案15或16的双特异性抗体，其特征在于包含SEQ ID NO:10的VH区作为VH区。

[0431] 18.根据实施方案15至16中任一项的双特异性抗体，其特征在于所述BCMA VL选自由SEQ ID NO:12、13和14的VL区组成的组。

[0432] 19.根据实施方案14至18中任一项的双特异性抗体，其特征在于包含SEQ ID NO:10的VH区作为BCMA VH区和SEQ ID NO:12的VL区作为VL区、或SEQ ID NO:10的VH区作为BCMA VH和SEQ ID NO:13的VL区作为VL区、或SEQ ID NO:10的VH区作为BCMA VH和SEQ ID NO:14的VL区作为VL区。

[0433] 20.根据实施方案15或19中任一项的双特异性抗体，其特征在于所述VL区的氨基酸49选自由以下组成的组：氨基酸酪氨酸(Y)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)和组氨酸(H)。

[0434] 21.根据实施方案15至20中任一项的双特异性抗体，其特征在于所述VL区的氨基酸74)是苏氨酸(T)或丙氨酸(A)。

[0435] 22.一种特异性地结合至BCMA和CD3的双特异性抗体，其特征在于包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:17的CDR3H区，所述VL区包含SEQ ID NO:31的CDR1L区、SEQ ID NO:32的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区以及选自以下的组的CDR1L区和CDR2L区组合：

[0436] a) SEQ ID NO:29的CDR1H区和SEQ ID NO:30的CDR2H区，

[0437] b) SEQ ID NO:34的CDR1H区和SEQ ID NO:35的CDR2H区，或

[0438] c) SEQ ID NO:36的CDR1H区和SEQ ID NO:37的CDR2H区。

[0439] 23.根据实施方案22的双特异性抗体，其特征在于包含SEQ ID NO:12的VL区和选自包括SEQ ID NO:38、39和40的VH区的组的VH区。

[0440] 24.根据实施方案22或23的双特异性抗体，其特征在于所述VL区的氨基酸49选自由以下组成的组：氨基酸酪氨酸(Y)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)和组氨酸(H)。

[0441] 25.根据实施方案22至24中任一项的双特异性抗体,其特征在于所述VL区的氨基酸74是苏氨酸(T)或丙氨酸(A)。

[0442] 26.根据实施方案15至25中任一项的双特异性抗体,其特征在于包含根据本发明的抗BCMA抗体和抗CD3抗体,其中

[0443] a)根据实施方案1至7中任一项的抗体的轻链和重链;以及

[0444] b)特异性地结合至CD3的抗体的轻链和重链,其中所述可变结构域VL和VH或所述恒定结构域CL和CH1彼此置换。

[0445] 27.根据实施方案15至26中任一项的双特异性抗体,其特征在于包含抗CD3抗体部分的不超过一个Fab片段、抗BCMA抗体部分的不超过两个Fab片段和不超过一个Fc部分。

[0446] 28.根据实施方案15至27中任一项的双特异性抗体,其特征在于包含Fc部分,所述Fc部分以其N-末端连接至所述CD3抗体Fab片段的C-末端和所述BCMA抗体Fab片段之一的C-末端。

[0447] 29.根据实施方案15-28中任一项的双特异性抗体,其特征在于包含所述抗BCMA抗体(BCMA抗体部分)的第二Fab片段,所述第二Fab片段以其C-末端连接至所述双特异性抗体的所述抗CD3抗体(CD3抗体部分)的所述Fab片段的N-末端。

[0448] 30.根据实施方案29的双特异性抗体,其特征在于所述抗CD3抗体Fab片段的所述VL结构域连接至所述第二抗BCMA抗体Fab片段的所述CH1结构域。

[0449] 31.根据实施方案15至30中任一项的双特异性抗体,其特征在于所述抗CD3抗体部分的可变结构域VH(进一步称为“CD3 VH”)包含SEQ ID NO:1、2和3的重链CDR分别作为重链CDR1、CDR2和CDR3,并且所述抗CD3抗体部分的可变结构域VL(进一步称为“CD3 VL”)包含SEQ ID NO:4、5和6的轻链CDR分别作为轻链CDR1、CDR2和CDR3。

[0450] 32.根据实施方案15至31中任一项的双特异性抗体,其特征在于所述抗CD3 ϵ 抗体部分的可变结构域是SEQ ID NO:7和8。

[0451] 33.一种特异性地结合至两种靶标的双特异性抗体,所述靶标是人BCMA和人CD3 ϵ 的细胞外结构域,其特征在于包含

[0452] a)根据权利要求1至7中任一项的第一抗体的第一轻链和第一重链;以及

[0453] b)特异性地结合至CD3的第二抗体的第二轻链和第二重链,并且其中所述第二抗体的第二轻链和第二重链中的可变结构域VL和VH彼此置换;并且

[0454] c)其中在a)的第一轻链的恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)(根据Kabat编号)取代,并且其中在a)的第一重链的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸和位置213处的氨基酸独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)(根据Kabat编号)取代(参见例如图1A、2A、2C、3A、3C)。

[0455] 34.根据权利要求33的特异性地双特异性抗体,其特征在于另外包含所述第一抗体的Fab片段(也进一步命名为“BCMA-Fab”),并且在所述BCMA-Fab的恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)(根据Kabat编号)取代,并且其中在所述BCMA-Fab的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸和位置213处的氨基酸独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)(根据Kabat编号)取代(参见例如图2A、2C)。

[0456] 35.一种特异性地结合至两种靶标的双特异性抗体,所述靶标是人BCMA和人CD3 ϵ 的细胞外结构域,其特征在于包含

- [0457] a) 根据权利要求1至7中任一项的第一抗体的第一轻链和第一重链;以及
- [0458] b) 特异性地结合至CD3的第二抗体的第二轻链和第二重链,并且其中所述第二抗体的第二轻链和第二重链中的可变结构域VL和VH彼此置换;并且其中
- [0459] c) 在b) 的第二轻链的恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H) (根据Kabat编号)取代,并且其中在b) 的第二重链的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸和位置213处的氨基酸独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D) (根据Kabat编号)取代。
- [0460] 36.一种特异性地结合至两种靶标的双特异性抗体,所述靶标是人BCMA和人CD3 ϵ 的细胞外结构域,其特征在于包含选自由以下多肽组成的组的重链和轻链组:
- [0461] i) SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51 (2x); (抗体21的第一组TCB),
- [0462] ii) SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:54 (2x) (抗体22的第2组TCB),以及
- [0463] iii) SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57 (2x) (抗体42的第3组TCB)。
- [0464] 37.一种嵌合抗原受体(CAR)或相应的CART细胞,其包含:针对BCMA的抗原识别部分和T细胞活化部分,其特征在于所述抗原识别部分是根据实施方案1至14中任一项的单克隆抗体或抗体片段。
- [0465] 38.根据实施方案37的嵌合抗原受体(CAR)或相应的CAR T细胞,其特征在于包含:
- [0466] (i) B细胞成熟抗原(BCMA)识别部分;
- [0467] (ii) 间隔区结构域;以及
- [0468] (iii) 跨膜结构域;以及
- [0469] (iv) 细胞内T细胞信号传导结构域。
- [0470] 39.根据实施方案37或38的嵌合抗原受体(CAR)或相应的CAR T细胞,其特征在于所述抗原识别部分是特异性地结合至BCMA的单克隆抗体或抗体片段,其特征在于包含SEQ ID NO:17的CDR3H区和SEQ ID NO:20的CDR3L区以及选自以下的组的CDR1H、CDR2H、CDR1L区和CDR2L区组合:
- [0471] a) SEQ ID NO:21的CDR1H区和SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:23的CDR1L区和SEQ ID NO:24的CDR2L区,
- [0472] b) SEQ ID NO:21的CDR1H区和SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:25的CDR1L区和SEQ ID NO:26的CDR2L区,
- [0473] c) SEQ ID NO:21的CDR1H区和SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:27的CDR1L区和SEQ ID NO:28的CDR2L区,
- [0474] d) SEQ ID NO:29的CDR1H区和SEQ ID NO:30的CDR2H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区和SEQ ID NO:32的CDR2L区,
- [0475] e) SEQ ID NO:34的CDR1H区和SEQ ID NO:35的CDR2H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区和SEQ ID NO:32的CDR2L区,以及
- [0476] f) SEQ ID NO:36的CDR1H区和SEQ ID NO:37的CDR2H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区和SEQ ID NO:32的CDR2L区。

[0477] 在一个实施方案中,如与在无APRIL的情况下所述抗体与人BCMA的结合相比,所述双特异性抗体的结合在ELISA测定中作为405nm处的OD测量的不通过100ng/ml APRIL降低超过20%;与APRIL相比,不会改变APRIL依赖性NF- κ B活化超过20%;并且与没有所述抗体相比,在没有APRIL的情况下不会改变NF- κ B活化超过20%。

[0478] 在一个实施方案中,相较于在没有APRIL的情况下所述抗体与人BCMA的结合,在6.25nM的浓度中双特异性抗体的结合不通过140ng/ml鼠APRIL降低超过10%,优选在ELISA测定中作为450nm处的OD测量的不降低超过1%。相较于在没有APRIL的情况下所述抗体与人BCMA的结合,所述抗体在50nM浓度下的结合不通过140ng/ml鼠APRIL降低超过10%,在ELISA测定中作为450nm处的OD测量的。

[0479] 在一个实施方案中,与在分别无APRIL或BAFF的情况下所述抗体与人BCMA的结合相比,所述抗体的结合不通过100ng/ml APRIL降低并且在ELISA测定中作为405nm处的OD测量的不通过100ng/ml BAFF降低超过20%;与单独APRIL相比,所述抗体不会改变APRIL依赖性NF- κ B活化超过20%;与单独BAFF相比,不会改变BAFF依赖性NF- κ B活化超过20%;并且与没有所述抗体相比,在没有BAFF和APRIL的情况下不会改变NF- κ B活化超过20%。

[0480] 在一个实施方案中,所述抗体与人BCMA的结合在所述ELISA中测量的不通过100ng/ml APRIL降低超过15%,在所述ELISA中测量的不通过1000ng/ml APRIL降低超过20%,并且在所述ELISA中测量的不通过1000ng/ml APRIL降低超过15%。

[0481] 在一个实施方案中,所述抗体与人BCMA的结合在所述ELISA中测量的不通过100ng/ml APRIL降低并且不通过100ng/ml BAFF降低超过15%,在所述ELISA中测量的不通过1000ng/ml APRIL降低并且不通过1000ng/ml BAFF降低超过20%,在所述ELISA中测量的不通过1000ng/ml APRIL降低并且不通过1000ng/ml BAFF降低超过15%

[0482] 在一个实施方案中,所述双特异性抗体不改变APRIL依赖性NF- κ B活化超过15%、不改变BAFF依赖性NF- κ B活化超过15%,并且在没有APRIL和BAFF的情况下不改变NF- κ B活化超过15%。

[0483] 在一个实施方案中,与在分别没有APRIL或BAFF的情况下所述抗体与NCI-H929细胞的结合相比,所述抗体与BCMA的结合不通过APRIL降低、不通过BAFF降低超过25%、不超过20%并且不超过10%,在存在或不存在浓度为2.5 μ g/ml的APRIL或对应地BAFF的情况下,以5nM、优选50nM和140nM的浓度作为所述抗体结合至NCI-H929细胞(ATCC®CRL-9068™)测量的。

[0484] 在一个实施方案中,提供以下实施例、序列表和图以帮助理解本发明,本发明的真正范围在随附权利要求书中阐述。应理解,可在阐述的程序中进行修改,而不背离本发明的精神。

[0485] 材料和一般方法

[0486] 重组DNA技术

[0487] 如Sambrook,J.等人,Molecular cloning:A laboratory manual;Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989中所描述,使用标准方法来操作DNA。根据制造商的说明书使用分子生物学试剂。关于人免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列的一般信息在以下中给出:Kabat,E.A.等人,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,NIH Publication第91期-3242。根据Kabat,E.A.,等人,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991) 对抗体链的氨基酸进行编号和引用。

[0488] 基因合成

[0489] a) 从通过化学合成制备的寡核苷酸制备所需的基因区段。通过寡核苷酸的退火和连接(包括PCR扩增)且随后经由指定的限制性位点,例如KpnI/Sad或AscI/PacI克隆到基于pPCRScript (Stratagene) 的pGA4克隆载体中来组装600-1800bp长的基因区段(其侧翼为单一的限制性核酸内切酶裂解位点)。通过DNA测序确认亚克隆的基因片段的DNA序列。根据Geneart (Regensburg, Germany) 的给定说明单对基因合成片段进行排序。

[0490] b) 需要的所需基因区段通过PCR使用适当的模板产生,或者由Geneart AG (Regensburg, Germany) 通过自动基因合成从合成寡核苷酸和PCR产物合成。将侧翼为单一限制性核酸内切酶裂解位点的基因区段克隆到标准表达载体中或克隆到测序载体中用于进一步分析。使用可商购的质粒纯化试剂盒从转化的细菌中纯化质粒DNA。通过UV光谱法测定质粒浓度。通过DNA测序确认亚克隆的基因片段的DNA序列。基因区段被设计为具有合适的限制性位点以允许亚克隆到相应的表达载体中。如果需要,蛋白质编码基因被设计成具有编码前导肽的5'-端DNA序列,所述前导肽靶向蛋白质以在真核细胞中分泌。

[0491] DNA序列测定

[0492] 通过双链测序测定DNA序列。

[0493] DNA和蛋白质序列分析以及序列数据管理

[0494] 克隆管理器 (Scientific&Educational Software) 软件包9.2版用于序列映射、分析、注释和说明。

[0495] 表达载体

[0496] a) 通过PCR和/或基因合成产生包含如下所述的所描述抗体链的融合基因,并且通过连接相应的核酸区段(例如使用独特的限制性位点)连接在相应的载体中用已知的重组方法和技术进行组装。通过DNA测序验证亚克隆的核酸序列。对于瞬时转染,通过质粒制备从转化的大肠杆菌培养物(Nucleobond AX, Macherey-Nagel) 制备更大量的质粒。

[0497] b) 为了产生抗BCMA抗体表达载体,将重链和轻链DNA序列的可变区与预先插入到针对在哺乳动物细胞系中表达优化的相应通用接受者表达载体中的人IgG1恒定重链或hum IgG1恒定轻链同框亚克隆。抗体表达由嵌合MPSV启动子驱动,所述嵌合MPSV启动子包含CMV增强子和MPSV启动子、随后5'UTR、内含子和IgκMAR元件。转录通过CDS的3'端的合成聚A信号序列终止。所有载体都携带编码前导肽的5'-端DNA序列,所述前导肽靶向蛋白质以在真核细胞中分泌。此外,每个载体含有EBV OriP序列,以用于表达EBV EBNA的细胞中的附加型质粒复制。

[0498] c) 为了产生BCMAxCD3双特异性抗体载体,IgG1来源的双特异性分子至少由能够特异性地结合至两种不同抗原决定簇CD3和BCMA的两个抗原结合部分组成。所述抗原结合部分是由重链和轻链组成的Fab片段,所述重链和轻链各自包含可变区和恒定区。至少一个Fab片段是“Crossfab”片段,其中交换VH和VL。Fab片段内VH和VL的交换确保具有不同特异性的Fab片段不具有相同的结构域布置。双特异性分子设计对于CD3是单价的并且对于BCMA是二价的,其中一个Fab片段与内部CrossFab (2+1) 的N-末端融合。双特异性分子含有Fc部

分,以使分子具有长半衰期。图2中给出构建体的示意图;所述构建体的优选序列在SEQ ID NO 39至52中示出。通过使用基于聚合物的溶液共转染用哺乳动物表达载体悬浮生长的HEK293 EBNA细胞来产生分子。为了制备2+1 CrossFab-IgG构建体,用相应的表达载体以1:2:1:1的比率(“载体Fc (旋钮)”：“载体轻链”：“载体轻链CrossFab”：“载体重链-CrossFab”)转染细胞。

[0499] 细胞培养技术

[0500] 如Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. 和 Yamada, K.M. (编辑), John Wiley&Sons, Inc 中所描述使用标准细胞培养技术。

[0501] HEK293细胞中的瞬时表达 (HEK293-EBNA系统)

[0502] 通过使用基于聚合物的溶液在悬浮培养的HEK293-EBNA细胞中瞬时共转染相应的哺乳动物表达载体来表达双特异性抗体。在转染前一天,将HEK293-EBNA细胞以1.5Mio活细胞/mL接种在补充有6mM L-谷氨酰胺的Ex-细胞培养基中。对于每mL的最终产生体积,将2.0Mio活细胞离心(在210x g下5分钟)。吸出上清液,并将细胞重悬浮于100μL的CD CHO培养基中。通过在100μL的CD CHO培养基中混合1μg的DNA(重链:经修饰的重链:轻链:经修饰的轻链比率=1:1:2:1)来制备每mL最终产生体积的DNA。在添加0.27μL的基于聚合物的溶液(1mg/mL)后,将混合物涡旋15秒并在室温下静置10分钟。在10分钟后,将重悬浮的细胞和基于DNA/聚合物的溶液混合物放在一起,且然后转移到适当的容器中,将容器置于振荡装置(37, 5% CO₂)中。在3小时孵育时间后,对于每mL的最终产生体积添加800μL补充有6mM L-谷氨酰胺、1.25mM丙戌酸和12.5%Pepsoy (50g/L)的Ex-细胞培养基。在24小时后,对于每mL的最终产生体积添加70μL的进料溶液。在7天后或当细胞活力等于或低于70%时,通过离心和无菌过滤将细胞与上清液分离。通过亲和步骤和一个或两个精处理步骤(是阳离子交换色谱法和尺寸排阻色谱法)来纯化抗体。在需要时,使用另外的精处理步骤。通过使用基于聚合物的溶液共转染HEK293-EBNA细胞与哺乳动物表达载体,在悬浮液中产生重组抗BCMA人抗体和双特异性抗体。根据形式,用两种或四种载体转染细胞。对于人IgG1,一种质粒编码重链,并且另一种质粒编码轻链。对于双特异性抗体,共转染四种质粒。其中两个编码两条不同的重链,并且另外两个编码两个相同的轻链。在转染前一天,将HEK293-EBNA细胞以1.5Mio活细胞/mL接种在补充有6mM L-谷氨酰胺的F17培养基中。

[0503] 蛋白质测定

[0504] 使用0.1%抗体溶液的吸光度的理论值,通过测量280nm处的吸光度来确定抗体浓度。此值是基于氨基酸序列并通过GPMAW软件(Lighthouse data)计算。

[0505] SDS-PAGE

[0506] 根据制造商的说明书使用 NuPAGE® 预制凝胶系统 (Invitrogen)。特别地,使用10%或4% -12% NuPAGE® Novex® Bis-TRIS预制凝胶 (pH 6.4) 和 NuPAGE® MES (还原凝胶,含NuPAGE® 抗氧化剂运行缓冲液添加剂) 或MOPS (非还原凝胶) 运行缓冲液。

[0507] 蛋白质纯化

[0508] 通过蛋白A亲和色谱法

[0509] 对于亲和步骤,将上清液负载到用6CV 20mM磷酸钠、20mM柠檬酸钠 (pH 7.5) 平衡

的蛋白A柱(HiTrap蛋白A FF, 5mL, GE Healthcare)上。在用相同缓冲液的洗涤步骤后,通过用20mM磷酸钠、100mM氯化钠、100mM甘氨酸(pH 3.0)逐步洗脱从柱上洗脱抗体。将具有所需抗体的级分立即用0.5M磷酸钠(pH8.0)(1:10)中和,合并并通过离心浓缩。将浓缩物无菌过滤并通过阳离子交换色谱法和/或尺寸排阻色谱法进一步处理。

[0510] 通过阳离子交换色谱法

[0511] 对于阳离子交换色谱步骤,将浓缩的蛋白质用用于亲和步骤的洗脱缓冲液1:10稀释,并负载到阳离子交换柱(Poros 50HS, Applied Biosystems)上。在使用平衡缓冲液和洗涤缓冲液(分别为20mM磷酸钠、20mM柠檬酸钠、20mM TRIS(pH 5.0)和20mM磷酸钠、20mM柠檬酸钠、20mM TRIS、100mM氯化钠(pH 5.0))的两个洗涤步骤后,用使用20mM磷酸钠、20mM柠檬酸钠、20mM TRIS、100mM氯化钠(pH 8.5)的梯度洗脱蛋白质。将含有所需抗体的级分合并,通过离心浓缩,无菌过滤并通过尺寸排阻步骤进一步处理。

[0512] 通过分析型尺寸排阻色谱法

[0513] 对于尺寸排阻步骤,将浓缩的蛋白质注入XK16/60 HiLoad Superdex 200柱(GE Healthcare)中,有或没有Tween20的20mM组氨酸、140mM氯化钠(pH 6.0)作为配制缓冲液。将含有单体的级分合并,通过离心浓缩并无菌过滤到无菌小瓶中。

[0514] 纯度和单体含量的测量

[0515] 通过CE-SDS(Caliper LabChip GXII系统(Caliper Life Sciences))和HPLC(TSKgel G3000 SW XL分析型尺寸排阻柱(Tosoh))在25mM磷酸钾、125mM氯化钠、200mM L-精氨酸单盐酸盐、0.02% (w/v) 叠氮化钠(pH 6.7)的缓冲液中测定最终蛋白质制剂的纯度和单体含量。

[0516] 通过LC-MS分析进行分子量确认

[0517] 去糖基化

[0518] 为了确认分子的均匀制剂,通过LC-MS分析对最终的蛋白质溶液进行分析。为了消除由碳水化合物引入的异质性,用PNGaseF(ProZyme)处理构建体。因此,通过向浓度为0.5mg/ml的20μg蛋白质添加2μl 2M Tris来将蛋白质溶液的pH调节至pH7.0。添加0.8μg PNGaseF并在37下孵育12小时。

[0519] LC-MS分析-在线检测

[0520] LC-MS方法在与TOF 6441质谱仪(Agilent)耦合的Agilent HPLC 1200上进行。色谱分离在Macherey Nagel Polystyrene柱上进行;RP1000-8(8μm粒度,4.6x 250mm;目录号719510)。洗脱液A是5%乙腈和0.05% (v/v) 甲酸的水溶液,洗脱液B是95%乙腈、5%水和0.05%甲酸。流速是1ml/分钟,分离在40和6μg (15μl) 通过如前所述的处理获得的蛋白质样品下进行。

时间(分钟)	B%
0.5	15
10	60
12.5	100
14.5	100
14.6	15
16	15

[0522]	16.1	100
--------	------	-----

[0523] 在最初4分钟内,将洗脱液引导至废物中以保护质谱仪免受盐污染。ESI-源以121/分钟的干燥气流、350的温度和60psi的喷雾器压力运行。使用380V的裂解电压和正离子模式的质量范围700至3200m/z获得MS谱。通过仪器软件从4至17分钟获取MS数据。

[0524] 从血液中分离人PBMC

[0525] 外周血单核细胞(PBMC)通过Histopaque密度离心从局部血库或从来自健康人供体的新鲜血液获得的富集的淋巴细胞制剂(血沉棕黄层)制备。简言之,用无菌PBS稀释血液并小心地在Histopaque梯度(Sigma, H8889)上分层。在室温下以450x g离心30分钟(关闭制动器)后,丢弃含有间期的PBMC以上的血浆部分。将PBMC转移到新的50ml Falcon管中,并用PBS填充管至50ml的总体积。将混合物在室温下以400x g离心10分钟(打开制动器)。丢弃上清液,并用无菌PBS洗涤PBMC团块两次(在4下以350x g离心步骤10分钟)。将所得PBMC群体自动计数(ViCe11)并储存在含有10%FCS和1%L-丙氨酸-L-谷氨酰胺(Biochrom,K0302)的RPMI1640培养基中,37、5%CO₂的培养箱中直至测定开始。

[0526] 从肝素化血液中分离原代食蟹猴PBMC

[0527] 通过密度离心从来自健康食蟹猴供体的新鲜血液制备外周血单核细胞(PBMC),如下:用无菌PBS将肝素化血液1:3稀释,并且用无菌PBS将Lymphoprep培养基(Axon Lab#1114545)稀释至90%。将两体积的稀释血液在一个体积的稀释密度梯度上分层,并在室温下通过在没有制动的情况下以520x g离心30分钟来分离PBMC级分。将PBMC条带转移到新鲜50ml Falcon管中,并通过在4下以400x g离心10分钟用无菌PBS洗涤。进行一次低速离心以除去血小板(150x g,4下15分钟),并且自动计数所得PBMC群体(ViCe11)并立即用于进一步测定。

[0528] 实施例

[0529] 实施例1:抗BCMA抗体的产生

[0530] 实施例1.1:抗原和工具试剂的产生

[0531] 实施例1.1.1:重组的可溶性人BCMA细胞外结构域

[0532] 用作噬菌体展示选择的抗原的人、食蟹猴和鼠BCMA的细胞外结构域在HEK EBNA细胞中瞬时表达为N-末端单体Fc-融合体,并且经由在位于携带受体链(Fc旋钮链)的Fc部分的C-末端的avi标签识别序列处的BirA生物素连接酶的共表达在体内位点特异性地生物素化。人和食蟹猴BCMA的细胞外结构域分别包含甲硫氨酸4至天冬酰胺53和甲硫氨酸4至天冬酰胺52。这些在N-末端与人IgG1的铰链融合,从而使得能够通过旋钮入孔技术与未融合的人IgG1 Fc部分(孔链)异二聚化。

[0533] 实施例1.1.1A:通过成熟产生抗BCMA抗体

[0534] 1.1.1A.1文库和选择

[0535] 基于抗体83A10构建两个文库。这些文库分别在轻链的CDR1和CDR2(83A10 L1/L2)或重链的CDR1和CDR2(83A10 H1/H2)中随机化。通过扩增和组装的2个后续步骤构建这些文库中的每一个。最终组装产物已经消化了用于83A10 L1/L2文库的NcoI/BsiWI、用于83A10 H1/H2文库的MunI和NheI以及基于克隆83A10的质粒制剂的类似处理的受体载体。将以下量的消化的随机化(部分)V-结构域和消化的受体载体连接用于相应的文库(μ g V-结构域/ μ g载体):a.m.83A10 L1/L2文库(3/10)、83A10 H1/H2文库(3/10)、83A10 L1/L2和83A10 H1/

H2文库的纯化连接物分别合并,并用于对2个文库中的每一个进行15次大肠杆菌TG1细胞转化,以获得 2.44×10^{10} 的最终文库大小(对于83A10 L1/L2文库)以及 1.4×10^{10} 的最终文库大小(对于a.m.83A10 H1/H2文库)。拯救并纯化展示这些Fab文库的噬菌粒颗粒。

[0536] 1.1.1A.2克隆的选择

[0537] 针对人或cyno B细胞成熟抗原(BCMA)的胞外结构域进行选择,将其克隆到Fc和avi-标签的上游。在选择之前,将Fc消减剂以500nM的浓度包被到中性抗生物素蛋白板上。根据以下模式进行选择:

[0538] 1) 将文库.83A10 L1/L2文库或83A10 H1/H2文库的大约 10^{12} 个噬菌粒颗粒与固定化的Fc消减剂结合1小时,2) 将文库.83A10 L1/L2文库或83A10 H1/H2文库的未结合的噬菌粒颗粒转移至50nM、25nM、10nM或2nM人或cyno BCMA(取决于文库和选择轮次)持续20分钟,3) 添加磁性链霉抗生物素蛋白珠10分钟,4) 使用 $10 \times 1\text{ml}$ PBS/Tween® 20和 $10 \times 1\text{ml}$ PBS洗涤磁性链霉抗生物素蛋白珠,5) 通过添加 1ml 100mM TEA(三乙胺)10分钟洗脱噬菌体颗粒,并且通过添加500ul 1M Tris®/HCl(pH 7.4)中和,以及6) 再感染对数期大肠杆菌TG1细胞,感染辅助噬菌体VCSM13和噬菌粒颗粒的随后PEG/NaCl沉淀将用于随后的选择轮次。

[0539] 选择已经进行了3轮,并且对于2个文库中的每一个单独地在5个流线中调整条件。详细地,选择参数是:

[0540] 流线1(对于第1轮50nM huBCMA,对于第2轮25nM cynoBCMA,对于第3轮10nM huBCMA),流线2(对于第1轮50nM huBCMA,对于第2轮10nM huBCMA,并且对于第3轮2nM huBCMA),流线3(对于第1轮50nM huBCMA,对于第2轮25nM huBCMA,对于第3轮10nM cynoBCMA),流线4(对于第1轮50nM huBCMA,对于第2轮25nM cynoBCMA,对于第3轮10nM cynoBCMA),流线5(对于第1轮50nM cynoBCMA,对于第2轮25nM cynoBCMA,并且对于第3轮10nM cynoBCMA)。

[0541] Mab 21、Mab 22、Mab 33和Mab 42 BCMA抗体的重链源自仅使用cynoBCMA的流线5。

[0542] 1.1.1A.3筛选方法

[0543] 将单个克隆细菌表达为96孔形式中的1ml培养物,并通过ELISA对上清液进行筛选。对于人和cyno BCMA,特异性结合剂被定义为高于5x背景的信号,并且对于Fc消减剂,特异性结合剂被定义为低于3x背景的信号。将中性抗生物素蛋白96孔条板用10nM huBCMA、10nM cyBCMA或50nM Fc-消减剂包被,然后添加含有Fab的细菌上清液,并通过使用抗Flag/HRP第二抗体经由其Flag标签检测特异性结合Fab。将ELISA阳性克隆细菌表达为96孔形式中的1ml培养物,并对上清液进行动力学筛选实验ProteOn。鉴定了500个阳性克隆,它们中的大多数具有相似的亲和力。

[0544] 1.1.1A.4具有可溶性Fab和IgG的表面等离子体共振筛选

[0545] 通过SPR进一步测试70个克隆。所有实验均在25下使用PBST作为运行缓冲液(10mM PBS(pH 7.4)和0.005% (v/v) Tween® 20)进行。配备有GLC和GLM传感器芯片和偶联剂(10mM乙酸钠(pH4.5)、碘基-N-羟基琥珀酰亚胺、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐[EDC]和乙醇胺)的ProteOn XPR36生物传感器是购自BioRad Inc. (Hercules, CA)。在GLM芯片上以 $30\mu\text{l}/\text{分钟}$ 进行固定化。使用标准胺偶联程序将pAb(山羊)抗hu IgG/F(ab)2特异性Ab(Jackson)在垂直方向上偶联:将所有六个配体通道用EDC(200mM)与碘基-NHS(50mM)的混合物活化5分钟。在表面活化后,立即将pAb(山羊)抗hu IgG F(ab)2特异性抗体

(50 μ g/ml, 10mM乙酸钠(pH5))注射到所有六个通道中5分钟。最后,将通道用5分钟注射1M乙醇胺-HCl (pH8.5)封闭。最终固定水平在所有通道上相似,在11000至11500RU的范围内。通过沿着五个单独的整个水平通道(30 μ l/分钟)同时注射5分钟来从大肠杆菌上清液中捕获Fab变体,并产生在200至900RU范围内的水平,这取决于上清液中Fab的浓度;沿着第六通道注射条件培养基以出于双重参考目的提供‘在线’空白。通过沿垂直通道注射人、cyno和小鼠BCMA(50、10、2、0.4、0.08、0nM、50 μ l/分钟)持续3分钟来进行一次性动力学测量。监测解离5分钟。在ProteOn Manager v.2.1中分析动力学数据。反应点数据的处理涉及使用在线缓冲液空白应用间隔点参考和双重参考步骤(Myszka, 1999)。将来自重复一次性注射的处理数据拟合至简单1:1朗缪尔结合模型而无质量转运(O'Shannessy等人, 1993)。

[0546] 为了从6孔形式的HEK产生的上清液中测量IgG,通过沿着五个单独的整个水平通道(30 μ l/分钟)同时注射5分钟来从HEK293上清液中捕获IgG变体,并产生在200至400RU范围内的水平;沿着第六通道注射条件培养基以出于双重参考目的提供‘在线’空白。通过沿垂直通道注射人、cyno和小鼠BCMA(25、5、1、0.2、0.04、0nM、50 μ l/分钟)持续3分钟来进行一次性动力学测量。监测解离5分钟。如上所述分析动力学数据。OSK测量结果总结在表2D中;i/m,不确定的测量结果。发现对huBCMA的亲和力在约50pm至5nM之间。发现对cynoBCMA的亲和力在约2nM至20nM之间(几个克隆落在所述范围之外,参见图17)。

[0547] 1.1.1A5.HC和LC克隆的进一步选择

[0548] 由于他们的经验,发明人基于它们与huBCMA、cynoBCMA、鼠BCMA的结合性质和在不同测定中测量的比率,在这70个克隆中选择出了另外27个克隆。在这些克隆中,选择4VH和9VL克隆,这产生34种VH/VL组合。测量对HEK-huBCMA细胞的结合亲和力(图18和表2E)。发现抗体Mab 21、Mab 22、Mab 27、Mab 39和Mab 42与HEK细胞上的huBCMA的结合不显著优于Mab 83A10与huBCMA-HEK细胞的结合。然而,选择Mab21、Mab22、Mab27、Mab33、Mab39和Mab42,因为它们的总体性质(如对huBCMA、cynoBCMA的亲和力),通过流式细胞术作为双特异性抗体与BCMA阳性多发性骨髓瘤细胞系H929、L363和RPMI - 8226的结合,骨髓瘤细胞H929、L363和RPMI - 8226的杀伤效力,来自患者骨髓抽吸物的活骨髓瘤浆细胞的杀伤效力,以及在食蟹猴中的药代动力学(PK)和药效学(BCMA阳性细胞的杀死)数据。

[0549] 表2C:抗体与流线的关系

Mab 编号	源自文库 2 (HC)	克隆 HC	源自文库 1 (LC)	克隆 LC
Mab 21	流线 5	5F04	流线 1	1D04
Mab 22	流线 5	5F04	流线 1	1C05
Mab 27	流线 1	1A08	流线 1	1D04
Mab 33	流线 5	5D03	流线 1	1D04
Mab 39	流线 2	2E12	流线 1	1D04
Mab 42	流线 5	5F04	流线 5	5A11

[0550] [0551] 表2D:对人、食蟹猴和小鼠BCMA的一次性动力学亲和力测量

Mab 编号	VH	VL	KD	KD	KD
			huBCMA	cyBCMA	muBCMA
[0552]	83A10	pCON1532	pCON1080	1.5E-09	1.4E-08
	Mab 21	pCON1531	pCON1522	2.8E-11	5.1E-11
	Mab 22	pCON1531	pCON1521	4.8E-11	i/m
	Mab 27	pCON1520	pCON1522	3.9E-13	1.0E-10
	Mab 33	pCON1530	pCON1522	1.7E-11	3.4E-11
	Mab 39	pCON1524	pCON1522	6.2E-11	2.7E-10
	Mab 42	pCON1531	pCON1527	2.3E-10	3.9E-10
[0553]	表2E: IgG变体在HEK-huBCMA细胞上的结合				

Mab 编号	VH	VL	结合 EC50 [nM]	结合 EC50 [μg/mL]
83A10	P CON1532	P CON1080	2.4	0.34
[0554]	Mab 14	P CON1530	1.47	0.21
	Mab 21	p CON1531	2.46	0.35
	Mab 22	P CON1531	2.08	0.30
	Mab 23	P CON1531	4.97	0.71
	Mab 27	P CON1520	10.57	1.52
	Mab 28	P CON1520	11.34	1.63
	Mab 30	p CON1530	10.35	1.49
	Mab 31	p CON1530	1.34	0.19
	Mab 33	p COM1530	1.18	0.17

Mab 34	p CON1530	P CON1521	1.24	0.18
Mab 35	p CON1530	P CON1519	1.63	0.23
Mab 39	P CON1524	P CON1522	1.73	0.25
Mab 42	p CON1531	p CON1527	2.10	0.30
Mab 44	P CON1520	p CON1527	1.55	0.22

[0556] 实施例1.2:作为工具的表达BCMA的细胞

[0557] 实施例1.2.1:在其表面上表达BCMA的人骨髓瘤细胞系和细胞表面上BCMA受体数量的定量

[0558] 通过流式细胞术评估五种人骨髓瘤细胞系 (NCI-H929、RPMI-8226、U266B1、L-363 和JJN-3) 上的BCMA表达。NCI-H929细胞 ((H929) ATCC® CRL-9068™) 在含有10% -20% 热灭活FCS并且可含有2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠和50μM巯基乙醇的80% -90% RPMI 1640 中培养。将RPMI-8226细胞 ((RPMI) ATCC® CCL-155™) 在含有90% RPMI 1640和10% 热灭活的FCS的培养基中培养。将U266B1 ((U266) ATCC® TIB-196™) 细胞在RPMI-1640培养基中培养,所述培养基被改良为含有2mM L-谷氨酰胺、10mM HEPES、1mM丙酮酸钠、4500mg/L葡萄糖和1500mg/L碳酸氢钠以及15% 热灭活的FCS。L-363细胞系 (Leibniz Institute DSMZ-德国微生物和细胞培养物保藏;DSMZ编号ACC 49) 在85% RPMI 1640和15% 热灭活的FCS中培养。将JJN-3细胞系 (DSMZ编号ACC 541) 在40% 杜氏MEM+40% 伊格尔氏MDM+20% 热灭活的

FBS中培养。简言之,收获细胞,洗涤,对活力计数,以50,000个细胞/孔重悬浮于96孔圆底板,并在4与抗人BCMA抗体(Abcam, #ab54834, 小鼠IgG1)以10 μ g/ml孵育30分钟(以防止内化)。小鼠IgG1用作同种型对照(BD Biosciences, #554121)。然后将细胞离心(在350x g下5分钟),洗涤两次并与FITC缀合的抗小鼠第二抗体一起在4孵育30分钟。在孵育时间结束时,将细胞离心(在350x g下5分钟),用FACS缓冲液洗涤两次,重悬浮于100ul FACS缓冲液中,并在运行FACS Diva软件的CantoII装置上分析。通过QIFIKIT分析(Dako, #K0078, 按照制造商的说明书)评估H929、RPMI-8226和U266B1骨髓瘤细胞系的表面膜上BCMA受体数量的相对定量。H929细胞以最高密度表达人BCMA,比其它骨髓瘤细胞系高达5-6倍。与表达中/低BCMA的骨髓瘤细胞的U266和L363相比,H929被认为是表达高BCMA的骨髓瘤细胞系,RPMI-8226是表达低BCMA的骨髓瘤细胞,并且JJN-3是表达非常低BCMA的骨髓瘤细胞。表3总结每个实验中人多发性骨髓瘤细胞系的细胞表面上的相对BCMA受体数量(n=5)。

[0559] 表3:H929、L363、RPMI-8226、U266B1和JJN-3人骨髓瘤细胞系的膜表面上的BCMA受体数量的定量

人骨髓瘤细胞系	特异性抗原结合能力(SABC)				
	实验 1	实验 2	实验 3	实验 4	实验 5
H929	19357	54981	44800	100353	98050
L363	16,970	/	11300	11228	/
U266(B1)	/	12852	11757	/	9030
RPMI-8226	1165	5461	/	11361	2072
JJN-3	/	/	/	/	650

[0560] [0561] 实施例2:BCMA结合测定:表面等离子体共振

[0562] 如下通过表面等离子共振(SPR)评估抗BCMA抗体与重组BCMA的结合。所有SPR实验均在Biacore T200上在25下进行,其中HBS-EP作为运行缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005% 表面活性剂P20,Biacore, Freiburg/Germany)。测定抗BCMA抗体与重组BCMA Fc(kih)(人和食蟹猴)之间的相互作用的亲合力。按照说明书(Biacore, Freiburg/Germany)将生物素化的重组人和食蟹猴BCMA Fc(kih)直接偶联在SA芯片上。固定水平在200至700RU的范围内。抗BCMA抗体以2倍浓度范围(1.95至500nM)通过,流速为30 μ L/分钟,在120秒内通过流动池。监测解离180秒。通过减去在参考流动池上获得的反应来校正体积折射率差异。在此,如标准胺偶联试剂盒中所描述,将抗BCMA抗体在先前活化和失活的空表面上飞行。使用Biacore T200评价软件(vAA, Biacore AB, Uppsala/Sweden)导出表观动力学常数,以通过数值积分拟合1:1朗缪尔结合的速率方程,尽管为了比较目的相互作用的二价性。还测定了抗BCMA抗体与重组人BCMA Fc(kih)之间的相互作用的亲和力。使用标准胺偶联试剂盒(Biacore, Freiburg/Germany)将抗人Fab抗体(GE Healthcare)直接偶联在pH 5.0的CM5芯片上。固定水平是约6500RU。以25nM捕获抗BCMA抗体90秒。使重组人BCMA Fc(kih)以4倍浓度范围(1.95至500nM)通过,流速为30 μ L/分钟,在120秒内通过流动池。监测解离120秒。通过减去在参考流动池上获得的反应来校正体积折射率差异。在此,重组BCMA在具有固定化的抗人Fab抗体的表面上飞行,但是在其上注射了HBS-EP而不是抗BCMA抗体。使用Biacore T100评价软件(vAA, Biacore AB, Uppsala/Sweden)导出动力学常数,以通过数值积分拟合1:1朗缪尔结合的速率方程(表4)。

[0563] 表4.通过拟合1:1朗缪尔结合的速率方程确定的亲和常数

配体	分析物	Kon[1/Ms]	Koff[1/s]	KD[M]
83A10 IgG	huBCMA Fc(kih)	5.07E+05	2.92E-03	5.76E-09
	cynoBCMA Fc(kih)	2.29E+05	2.03E-02	8.86E-08
Mab 21 IgG	huBCMA Fc(kih)	8.51E+05	4.39E-05	5.16E-11
	cynoBCMA Fc(kih)	4.91E+05	2.35E-04	4.78E-10
Mab 22 IgG	huBCMA Fc(kih)	8.14E+05	5.15E-05	6.33E-11
	cynoBCMA Fc(kih)	4.54E+05	4.42E-04	9.74E-10
Mab 42 IgG	huBCMA Fc(kih)	8.03E+05	2.98E-04	3.71E-10
	cynoBCMA Fc(kih)	7.07E+05	4.53E-04	6.41E-10
Mab 27 IgG	huBCMA Fc(kih)	3.59E+05	5.93E-05	1.65E-10
	cynoBCMA Fc(kih)	2.16E+05	4.55E-04	2.11E-09
Mab 33 IgG	huBCMA Fc(kih)	2.00E+05	3.55E-05	1.78E-10
	cynoBCMA Fc(kih)	1.32E+05	9.76E-05	7.39E-10
Mab 39 IgG	huBCMA Fc(kih)	3.61E+05	5.58E-05	1.55E-10
	cynoBCMA Fc(kih)	2.15E+05	4.67E-04	2.17E-09

[0565] 实施例3:人/食蟹猴(hu/cyno) 亲和力差距

[0566] 基于实施例2中描述的亲和力值,比较抗BCMA抗体对人BCMA与食蟹猴BCMA的亲和力,并计算cyno/hu亲和力比(差距)值(表5)。亲和性cyno/hu差距计算为抗体对食蟹猴BCMA的亲和力除以对人BCMA的亲和力,并且意味着与结合至食蟹猴BCMA相比,BCMA抗体结合以x倍结合亲和力结合至人BCMA,其中x=cyno/hu差距值。结果在表5中示出。

[0567] 表5:抗BCMA抗体对人BCMA与食蟹猴BCMA的亲和力和hu/cyno差距值

α-BCMA IgG	K_D 人 BCMA [M]	KD 食蟹猴 BCMA [M]	亲 和 力 cyno/hu 差距
83A10	5.76E-09	8.86E-08	15.3
Mab 21	5.16E-11	4.78E-10	9.3
Mab 22	6.33E-11	9.74E-10	15.4
Mab 42	3.71E-10	6.41E-10	1.7
Mab 27	1.65E-10	2.11E-09	12.7
Mab 33	1.78E-10	7.39E-10	4.2
Mab 39	1.55E-10	2.17E-09	14

[0569] 实施例4:抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体的产生

[0570] 根据以引用的方式并入的W02014/122144产生抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体。

[0571] 实施例4.1:抗CD3抗体

[0572] 如本文所用的术语“CD3ε或CD3”涉及UniProt P07766(CD3E_人)下描述的人CD3ε。术语“针对CD3的抗体、抗CD3抗体”涉及与CD3ε结合的抗体。优选地,所述抗体包含可变结构域VH,所述可变结构域VH包含SEQ ID NO:1、2和3的重链CDR分别作为重链CDR1、CDR2和CDR3;以及可变结构域VL,所述可变结构域VL包含SEQ ID NO:4、5和6的轻链CDR分别作为轻链CDR1、CDR2和CDR3。优选地,所述抗体包含SEQ ID NO:7(VH)和SEQ ID NO:8(VL)的可变结

构域。如上所述的抗CD3抗体用于产生用于以下实施例中的T细胞双特异性抗体。

[0573] 实施例4.2:含Fc 2+1形式的抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体的产生

[0574] 编码相应抗BCMA IgG1抗体的完整重链和轻链的cDNA以及抗CD3 VH和VL cDNA用作起始材料。对于每种双特异性抗体,涉及四条蛋白质链,所述四条蛋白质链分别包含相应抗BCMA抗体的重链和轻链以及上述抗CD3抗体的重链和轻链。为了使具有错配的重链(例如具有抗CD3抗体的两条重链)的副产物的形成最小化,如W02009080251和W02009080252中所描述,使用携带“旋钮入孔突变”和工程化的二硫键的突变的异二聚体Fc区。为了使具有错配的轻链(例如具有抗BCMA抗体的两条轻链)的副产物的形成最小化,使用W02009080251和W02009080252中描述的方法,将CH1 x恒定κ交叉用于所述抗CD3抗体的重链和轻链。

[0575] a) 具有2+1形式的抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体,即对于BCMA为二价且对于CD3为单价的双特异性(Fab)₂x(Fab)抗体将具有关于效力、功效和安全性的可预测性的优点,因为它将优先结合至肿瘤靶BCMA并避免CD3抗体沉降,因此药物暴露集中于肿瘤的可能性更高。

[0576] 对于先前选择的人BCMA抗体,产生2+1形式的双特异性抗BCMA/抗CD3 T细胞(即,对于BCMA为二价且对于具有Fc的CD3为单价的双特异性(Fab)₂x(Fab)抗体。编码相应抗BCMA IgG1抗体的完整Fab(重链VH和CH1结构域加上轻链VL和CL结构域)的cDNA以及抗CD3 VH和VL cDNA用作起始材料。对于每种双特异性抗体,涉及具有Fc区的四条蛋白质链,所述四条蛋白质链分别包含相应抗BCMA抗体的重链和轻链以及上述抗CD3抗体的重链和轻链。

[0577] 简言之,每种双特异性抗体通过同时共转染四种哺乳动物表达载体来产生,所述哺乳动物表达载体分别编码:a) 相应BCMA抗体的完整轻链cDNA,b) 通过标准分子生物学方法如剪接-重叠-延伸PCR产生的融合cDNA,其编码由(按N-至C-末端顺序)分泌前导序列、上述相应的抗BCMA抗体的Fab(VH,接着是CH1结构域)、具有序列Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser的柔性甘氨酸(Gly)-丝氨酸(Ser)接头、上述相应抗BCMA抗体的Fab(VH,接着是CH1结构域)、具有序列Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser的柔性甘氨酸(Gly)-丝氨酸(Ser)接头、上述抗CD3抗体的VH和人轻链cDNA的恒定κ结构域组成的融合蛋白,c) 通过标准分子生物学方法如剪接-重叠-延伸PC产生的融合cDNA,其编码由(按N-至C-末端顺序)分泌前导序列、上述抗CD3抗体的VL、人IgG1 cDNA的恒定CH1结构域组成的融合蛋白。使用上述用于产生人或人源化IgG1抗体的方法共同转染哺乳动物细胞和抗体产生和纯化,所述方法具有一种修改:对于抗体的纯化,第一个捕获步骤不是使用蛋白A进行的,而是使用填充有结合至人κ轻链恒定区的树脂如KappaSelect (GE Healthcare Life Sciences)的亲和色谱柱进行的。此外,可包括二硫化物以增加稳定性和产率以及形成离子桥的额外残基并增加异二聚化产率(EP 1870459A1)。

[0578] 为了产生BCMAxCD3双特异性抗体载体,IgG1来源的双特异性分子至少由能够特异地结合至两种不同抗原决定簇CD3和BCMA的两个抗原结合部分组成。所述抗原结合部分是由重链和轻链组成的Fab片段,所述重链和轻链各自包含可变区和恒定区。至少一个Fab片段是“Crossfab”片段,其中交换Fab重链和轻链的恒定结构域。Fab片段内重链和轻链恒定结构域的交换确保具有不同特异性的Fab片段不具有相同的结构域布置,并且因此不与轻链交换。双特异性分子设计对于CD3是单价的并且对于BCMA是二价的,其中一个Fab片段与内部CrossFab(2+1)的N-末端融合。双特异性分子含有Fc部分以具有更长的半衰期。图1-

3中给出构建体的示意图；优选构建体的序列在表2A中示出。通过使用基于聚合物的溶液共转染用哺乳动物表达载体悬浮生长的HEK293 EBNA细胞来产生分子。为了制备2+1 CrossFab-IgG构建体，用相应的表达载体以1:2:1:1的比率（“载体Fc(旋钮)”：“载体轻链”：“载体轻链CrossFab”：“载体重链-CrossFab”）转染细胞。

[0579] 实施例4.3：用于比较的抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体的产生

[0580] BCMA50-sc(Fv)₂（也称为 BCMA50-BiT[®]）抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体和所用的氨基酸序列的产生是根据W02013072406和W02013072415。

[0581] 实施例5：具有电荷变体的抗BCMA/抗CD3含Fc(2+1)的T细胞双特异性抗体的制备和纯化

[0582] 根据以引用的方式并入的W02014/122144产生并纯化抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体。

[0583] 为了产生双特异性抗体，通过使用基于聚合物的溶液在悬浮培养的HEK293-EBNA细胞中瞬时共转染相应的哺乳动物表达载体来表达双特异性抗体。在转染前一天，将HEK293-EBNA细胞以1.5Mio活细胞/mL接种在补充有6mM L-谷氨酰胺的Ex-细胞培养基中。对于每mL的最终产生体积，将2.0Mio活细胞离心（在210x g下5分钟）。吸出上清液，并将细胞重悬浮于100μL的CD CHO培养基中。通过在100μL的CD CHO培养基中混合1μg的DNA（重链：经修饰的重链：轻链：经修饰的轻链比率=1:1:2:1）来制备每mL最终产生体积的DNA。在添加0.27μL的基于聚合物的溶液（1mg/mL）后，将混合物涡旋15秒并在室温下静置10分钟。在10分钟后，将重悬浮的细胞和基于DNA/聚合物的溶液混合物放在一起，且然后转移到适当的容器中，将容器置于振荡装置（37,5%CO₂）中。在3小时孵育时间后，对于每mL的最终产生体积添加800μL补充有6mM L-谷氨酰胺、1.25mM丙戊酸和12.5%Pepsoy（50g/L）的Ex-细胞培养基。在24小时后，对于每mL的最终产生体积添加70μL的进料溶液。在7天后或当细胞活力等于或低于70%时，通过离心和无菌过滤将细胞与上清液分离。通过亲和步骤和一个或两个精处理步骤（是阳离子交换色谱法和尺寸排阻色谱法）来纯化抗体。在需要时，使用另外的精处理步骤。

[0584] 对于亲和步骤，将上清液负载到用6CV 20mM磷酸钠、20mM柠檬酸钠（pH 7.5）平衡的蛋白A柱（HiTrap蛋白A FF, 5mL, GE Healthcare）上。在用相同缓冲液的洗涤步骤后，通过用20mM磷酸钠、100mM氯化钠、100mM甘氨酸（pH 3.0）逐步洗脱从柱上洗脱抗体。将具有所需抗体的级分立即用0.5M磷酸钠（pH8.0）（1:10）中和，合并并通过离心浓缩。将浓缩物无菌过滤并通过阳离子交换色谱法和/或尺寸排阻色谱法进一步处理。

[0585] 对于阳离子交换色谱步骤，将浓缩的蛋白质用用于亲和步骤的洗脱缓冲液1:10稀释，并负载到阳离子交换柱（Poros 50HS, Applied Biosystems）上。在使用平衡缓冲液和洗涤缓冲液（分别为20mM磷酸钠、20mM柠檬酸钠、20mM TRIS（pH 5.0）和20mM磷酸钠、20mM柠檬酸钠、20mM TRIS、100mM氯化钠（pH 5.0））的两个洗涤步骤后，用使用20mM磷酸钠、20mM柠檬酸钠、20mM TRIS、100mM氯化钠（pH 8.5）的梯度洗脱蛋白质。将含有所需抗体的级分合并，通过离心浓缩，无菌过滤并通过尺寸排阻步骤进一步处理。

[0586] 对于尺寸排阻步骤，将浓缩的蛋白质注入XK16/60 HiLoad Superdex 200柱（GE Healthcare）中，有或没有Tween20的20mM组氨酸、140mM氯化钠（pH 6.0）作为配制缓冲液。将含有单体的级分合并，通过离心浓缩并无菌过滤到无菌小瓶中。

[0587] 使用0.1%抗体溶液的吸光度的理论值,通过测量280nm处的吸光度来确定抗体浓度。此值是基于氨基酸序列并通过GPM AW软件(Lighthouse data)计算。

[0588] 通过CE-SDS(Caliper LabChip GXII系统(Caliper Life Sciences))和HPLC(TSKgel G3000 SW XL分析型尺寸排阻柱(Tosoh))在25mM磷酸钾、125mM氯化钠、200mM L-精氨酸单盐酸盐、0.02% (w/v) 叠氮化钠(pH 6.7) 缓冲液中测定最终蛋白质制剂的纯度和单体含量。

[0589] 为了验证最终蛋白质制剂的分子量并确认分子最终蛋白质溶液的均匀制剂,使用液相色谱-质谱(LC-MS)。首先进行去糖基化步骤。为了消除由碳水化合物引入的异质性,用PNGaseF(ProZyme)处理构建体。因此,通过向浓度为0.5mg/ml的20 μ g蛋白质添加2 μ l 2M Tris来将蛋白质溶液的pH调节至pH7.0。添加0.8 μ g PNGaseF并在37下孵育12小时。然后进行LC-MS在线检测。LC-MS方法在与TOF 6441质谱仪(Agilent)耦合的Agilent HPLC 1200上进行。色谱分离在Macherey Nagel Polyesterene柱上进行;RP1000-8(8 μ m粒度,4.6x 250mm;目录号719510)。洗脱液A是5%乙腈和0.05% (v/v) 甲酸的水溶液,洗脱液B是95%乙腈、5%水和0.05% 甲酸。流速是1ml/分钟,分离在40和6 μ g (15 μ l) 通过如前所述的处理获得的蛋白质样品进行。

[0590] 在最初4分钟期间,将洗脱液引导至废物中以保护质谱仪免受盐污染。ESI-源以121/分钟的干燥气流、350°C的温度和60psi的喷雾器压力运行。使用380V的裂解电压和正离子模式的质量范围700至3200m/z获得MS谱。通过仪器软件从4至17分钟获取MS数据。

[0591] EP14179705的图10(以引用的方式并入)描绘在用于83A10-TCB和83A10-TCBcv抗体纯化的不同方法后最终蛋白质制剂的CE-SDS(非还原)图。应用于83A10-TCB抗体的蛋白A(PA)亲和色谱和尺寸排阻色谱(SEC)纯化步骤产生<30%的纯度和82.8%的单体含量(A)。当将另外的纯化步骤(包括阳离子交换色谱(cIE)和最终尺寸排阻色谱(re-SEC)步骤)应用于(A)中的最终蛋白质制剂时,纯度增加至93.4%,但单体含量保持相同并且产量显著降低至0.42mg/L。然而,当特异性电荷修饰应用于83A10抗BCMA Fab CL-CH1(即83A10-TCBcv抗体)时,已经能够观察到TCB分子的优异产生/纯化概况(如通过95.3%的纯度、100%的单体含量和达3.3mg/L的产量所表明),即使当PA+cIE+SEC纯化步骤应用于(C)时,与生产/纯化概况显示产量低7.9倍且单体含量低17.2%的(B)相比,虽然包括额外的再SEC纯化步骤。

[0592] 然后进行头对头产生运行以比较83A10-TCB与83A10-TCBcv抗体的产生/纯化概况,以进一步评价应用于抗体的CL-CH1电荷修饰的优点。83A10-TCB和83A10-TCBcv分子两者均具有如图2a中描述的分子形式。如图11所示,并排测量83A10-TCB和83A10-TCBcv抗体的性质,并在每个纯化步骤后进行比较:1)仅PA亲和色谱(A,B),2)PA亲和色谱、然后SEC(C,D),以及3)PA亲和色谱、然后SEC、然后cIE和再SEC(E,F)。在用于83A10-TCB和83A10-TCBcv抗体的对应纯化方法后,最终蛋白质溶液的CE-SDS(非还原)图示于EP14179705的图11中(以引用的方式并入)。如EP14179705的图11A和11B(以引用的方式并入)所示,在仅通过PA亲和色谱法纯化后已经观察到将电荷变体应用于TCB抗体的改进。在这种头对头研究中,应用于83A10-TCB抗体的PA亲和色谱纯化步骤产生61.3%的纯度、26.2mg/L的产量和63.7%的单体含量(11A)。相比之下,当通过PA亲和色谱纯化83A10-TCBcv抗体时,所有性质均得到改进,具有81.0%的更好纯度、51.5mg/L的更好产量和68.2%的单体含量(11B)。当另外的SEC纯化步骤应用于最终蛋白质制剂时,如在EP14179705的图12A和12B(以引用的方式并

入)中所见,与83A10-TCBcv相比(分别达91.0%和83.9%的提高的纯度和单体含量以及10.3mg/L的产量(D)),83A10-TCB获得69.5%的纯度、14.1mg/L的产量和74.7%的单体含量(C)。尽管在此特定实验中83A10-TCBcv的产量略低于(即少27%)83A10-TCB,但83A10-TCBcv的正确分子的百分比比83A10-TCB好得多,如通过LC-MS所测量分别是90%对比40%-60%。在第三头对头比较中,将来自EP14179705的图11C和11D(以引用的方式并入)的83A10-TCB和83A10-TCBcv最终蛋白质制剂与仅在PA亲和色谱纯化步骤之后来自另一纯化批次(相同生产)的约1L(等体积)的相应最终蛋白质制剂合并。然后通过cIEX和SEC纯化方法进一步纯化合并的蛋白质制剂。如EP14179705的图11E和11F(以引用的方式并入)中所描绘的,当与不带电荷变体的TCB抗体相比时,始终观察到具有电荷变体的TCB抗体的产生/纯化概况的改进。在若干纯化方法步骤(即PA+/-SEC+cIEX+SEC)用于纯化83A10-TCB抗体后,仅达到43.1%纯度并且可实现98.3%的单体含量,但不利于产量,产量降低至0.43mg/L。通过LC-MS测量的正确分子的百分比仍然较差,为60%-70%。最后,最终蛋白质制剂的质量对于体外使用是不可接受的。形成鲜明对比的是,当对83A10-TCBcv抗体应用相同的多个纯化步骤时,达到96.2%的纯度和98.9%的单体含量以及如通过LC-MS所测量的95%的正确分子。然而,在cIEX纯化步骤后,产量也大大降低至0.64mg/L。结果表明,只有在两个标准纯化步骤即PA亲和色谱和SEC(EP14179705的图11D)后,83A10-TCBcv抗体才可实现更好的纯度、更高的单体含量、更高的正确分子百分比和更高的产量,而即使当应用另外的纯化步骤时(EP14179705的图11E),此类性质也不能在83A10-TCB情况下实现。

[0593] EP14179705的表12(以引用的方式并入)总结与PA纯化步骤后的83A10-TCVcv相比的83A10-TCB的性质。EP14179705的表13(以引用的方式并入)总结在PA和SEC纯化步骤后与83A10-TCVcv相比的83A10-TCB的性质。EP14179705的表14(以引用的方式并入)总结在PA和SEC加单独PA、然后cIEX和re-SEC纯化步骤后,与83A10-TCVcv相比的83A10-TCB的性质。对于EP14179705的表12至14(以引用的方式并入),如在83A10-TCB与83A10-TCVcv之间比较,粗体值突出显示了优异的性质。除了一个例外(即产量,相应量参见EP14179705的表13(以引用的方式并入)),其可能不具有代表性,由3个头对头比较实验得到的所有生产/纯化参数和值与83A10-TCB相比对于83A10-TCBcv是优异的。总体结果清楚地表明,通过对TCB抗体应用CL-CH1电荷修饰可实现产生/纯化特征的优点,并且仅需要两个纯化步骤(即PA亲和色谱和SEC)来实现具有非常良好的可开发性的已经高质量的蛋白质制剂。基于83A10-TCBcv的改进的产生/纯化性质,以与83A10-TCBcv类似的方式产生了具有电荷变体的21-TCBcv、22-TCBcv、27-TCBcv、33-TCBcv、39-TCBcv和42-TCBcv。

[0594] 表6:蛋白A亲和色谱纯化步骤后抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体的产生/纯化概况

[0595]

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
纯度(%)	61.3	81.0
产量(mg/L)	26.2	51.5
量(mg)	24.3	50.2
单体(%)	63.7	68.2
通过LC-MS正确分子(%)	未检测到	未检测到

[0596] 表7:蛋白A亲和色谱和尺寸排阻色谱纯化步骤后抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗

体的产生/纯化概况

[0597]

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
纯度(%)	69.5	91.0
产量(mg/L)	14.1	10.3
量(mg)	13.1	10.0
单体(%)	74.7	83.9
通过LC-MS正确分子(%)	40-60	90

[0598] 表8:1.a)蛋白A亲和色谱和尺寸排阻色谱和1.b)蛋白A亲和色谱仅合并在一起、然后2)阳离子交换色谱和3)最终尺寸排阻色谱纯化步骤后抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体的产生/纯化概况

[0599]

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
纯度(%)	43.1	96.2
产量(mg/L)	0.43	0.64
量(mg)	0.73	1.27
单体(%)	98.3	98.9
通过LC-MS正确分子(%)	60-70%	>95%

[0600] 实施例6:抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体与BCMA阳性多发性骨髓瘤细胞系的结合(流式细胞术)

[0601] 通过流式细胞术分析抗BCMA/抗CD3 TCB抗体(21-TCBcv、22-TCBcv、42-TCBcv、83A10-TCBcv)与表达BCMA的H929、L363和RPMI-8226细胞上的人BCMA的结合。MKN45(不表达BCMA的人胃腺癌细胞系)用作阴性对照。简言之,收获培养的细胞,计数并使用ViCe11评价细胞活力。然后在含BSA的FACS染色缓冲液(BD Biosciences)中将活细胞调节至 2×10^6 个细胞/ml。将100μl的这种细胞悬浮液进一步每孔等分到圆底96孔板中,并与30μl的抗BCMA抗体或相应的IgG对照在4℃孵育30分钟。滴定所有抗BCMA/抗CD3TCB抗体(和TCB对照),并在1-300nM之间的最终浓度范围内进行分析。然后将细胞离心(5分钟,350x g),用120μl/孔FACS染色缓冲液(BD Biosciences)洗涤,重悬浮并在4℃下与荧光染料缀合的PE-缀合的AffiniPure F(ab')2片段山羊抗人IgG Fc片段特异性(Jackson Immuno Research Lab; 109-116-170)一起孵育另外30分钟。然后将细胞用染色缓冲液(BD Biosciences)洗涤两次,使用每孔100ul BD固定缓冲液(#BD Biosciences,554655)在4℃固定20分钟,重悬浮于120μl FACS缓冲液中并使用BD FACS CantoII进行分析。适用时,使用Prism GraphPad(LaJolla, CA, USA)计算EC50,并且表示达到抗BCMA/抗CD3 TCB抗体与H929细胞、L363细胞和RPMI-8226细胞的结合的最大结合的50%所需的抗体浓度的EC50值分别总结于表8、表9和表10中。星号表示通过Prism软件外推和计算的估计的EC50值。不能估计21-TCBcv与L363细胞的结合和22-TCBcv与RPMI-8226细胞的结合的EC50值。

[0602] 表8:抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体与H929多发性骨髓瘤细胞的结合的EC50值

[0603]

估计的EC50	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
nM	12.0	11.0	7.9	13.6

μg/ml	1.725	1.589	1.142	1.956
--------------	-------	-------	-------	-------

[0604] 表9:抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体与L363多发性骨髓瘤细胞的结合的EC50值

[0605]	估计的 EC50	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
	nM	17.4	/	30.0	3.8

[0606]	μg/ml	2.507	/	4.328	0.5534
--------	--------------	-------	---	-------	--------

[0607] 表10:抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体与RPMI-8226多发性骨髓瘤细胞的结合的EC50值

[0608]	估计的EC50	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
	nM	~ 188428*	6.8	/	13.2
	μg/ml	~ 27151*	0.9817	/	1.907

[0609] 实施例7:抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体与CD3阳性T细胞和BCMA阳性多发性骨髓瘤细胞系结合后,活化的T细胞的细胞因子产生(细胞因子释放测定CBA分析)

[0610] 分析抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体在存在或不存在表达人BCMA的人骨髓瘤细胞(RPMI-8226、JJN-3)的情况下从头诱导T细胞介导的细胞因子产生的能力。简言之,从血沉棕黄层分离人PBMC,并将每孔30万个细胞铺板到圆底96孔板中。或者,深孔96孔板的每个孔铺板280μl来自健康供体的全血。添加BCMA阳性肿瘤靶细胞以获得10:1的最终E:T比率。添加抗BCMA/抗CD3 TCB抗体和对照,最终浓度为0.1pM-10nM。在37、5%CO₂下孵育达24小时后,将测定板以350x g离心5分钟,并将上清液转移到新的深孔96孔板中用于后续分析。根据制造商的说明书,使用人Th1/Th2细胞因子试剂盒II(BD #551809)或以下CBA Flex Set的组合在FACS CantoII上进行CBA分析:人颗粒酶B(BD #560304)、人IFN-γ Flex Set(BD #558269)、人TNF-α Flex Set(BD #558273)、人IL-10 Flex Set(BD #558274)、人IL-6 Flex Set(BD #558276)、人IL-4 Flex Set(BD #558272)、人IL-2 Flex Set(BD #558270)。表13显示83A10-TCBcv诱导细胞因子产生和丝氨酸蛋白酶颗粒酶B(细胞毒性T细胞功能的标志物)的浓度依赖性增加。表11显示每抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体浓度的EC50值和分泌的细胞因子/蛋白酶的量。

[0611] 表11.在RPMI-8226细胞存在下由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的细胞因子和蛋白酶的分泌

细胞因子 /蛋白酶	EC50 (nM)	83A10-TCBcv 浓度(nM)						
		0.00064	0.0032	0.016	0.08	0.4	2	10
TNF-α (pg/mL)	0.52	-6.95	-6.49	-0.65	46.72	161.24	315.11	371.47
IL-10 (pg/mL)	0.30	-9.21	1.95	25.17	125.82	401.42	602.64	680.05
颗粒酶 B (pg/mL)	0.34	220.54	331.55	889.13	5855.02	15862.84	21270.43	27120.52

[0613] 实施例8:由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的高表达BCMA的H929骨髓瘤细胞的重定向的T细胞细胞毒性(比色LDH释放测定)

[0614] 分析抗BCMA/抗CD3 TCB抗体在经由抗原结合部分结合至细胞上的BCMA来交联构建体后在高表达BCMA的MM细胞中诱导T细胞介导的细胞凋亡的潜力。简言之,用细胞解离缓冲液收获人高表达BCMA的H929多发性骨髓瘤靶细胞,洗涤并重悬浮于补充有10%胎牛血清(Invitrogen)的 RPMI 中。将大约30,000个细胞/孔铺板在圆底96孔板中,并添加相应的构建体稀释液以达到所需的最终浓度(一式三份);最终浓度范围为0.1pM至10nM。为了进行适当的比较,将所有TCB构建体和对照调整至相同的摩尔浓度。将人PBMC(效应细胞)添加至孔中以获得10:1的最终E:T比率,对应于1个肿瘤靶细胞大约3至5个T细胞的E:T比率。阴性对照组仅由效应细胞或靶细胞代表。为了标准化,通过将靶细胞与最终浓度为1% Triton X-100一起孵育从而诱导细胞死亡来确定H929MM靶细胞的最大溶解(=100%)。最小溶解(=0%)由仅与效应细胞共孵育的靶细胞(即没有任何T细胞双特异性抗体)代表。在37、5% CO₂孵育20-24小时或48小时后,然后用LDH检测试剂盒(Roche Applied Science)按照制造商的说明书测量从凋亡/坏死的MM靶细胞到上清液中的LDH释放。在浓度反应曲线中将LDH释放的百分比针对抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体的浓度作图。使用Prism软件(GraphPad)测量EC50值,并确定为导致50%最大LDH释放的TCB抗体浓度。如图4所示,如通过LDH释放所测量,所有抗BCMA/抗CD3 TCB抗体(21-、22-、42-和83A10-TCBcv)诱导BCMA阳性H929骨髓瘤细胞的浓度依赖性杀死。H929细胞的溶解是特异性的,因为即使在所测试的最高浓度下,不结合至BCMA阳性靶细胞、但仅结合至T细胞上的CD3的对照-TCB抗体也不诱导LDH释放。表12总结由抗BCMA/抗CD3 TCB抗体诱导的高表达BCMA的H929细胞的重定向的T细胞杀死的EC50值。

[0615] 表12:由抗BCMA/抗CD3 TCB抗体诱导的H929细胞的重定向的T细胞杀死的EC50值

抗 BCMA/抗 CD3 TCB 抗体	EC50 (pM)					
	供体 1	供体 2	供体 3	供体 4	供体 5	供体 6
21-TCBcv	97.1	/	42.1	53.9	38.7	/
22-TCBcv	53.2	/	42.2	23.2	28.9	/
42-TCBcv	9.7	/	11.7	7.2	6.8	/
83A10-TCBcv	3.9	/	8.5	5.0	4.3	1.5

[0616] [0617] 实施例9:由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的中度/低表达BCMA的L363骨髓瘤细胞的重定向的T细胞细胞毒性(LDH释放测定)

[0618] 还分析抗BCMA/抗CD3 TCB抗体在经由抗原结合部分结合至细胞上的BCMA的结合来交联构建体后在中度/低表达BCMA的MM细胞中诱导T细胞介导的细胞凋亡的能力。简言之,用细胞解离缓冲液收获人中度/低表达BCMA的L363多发性骨髓瘤靶细胞,洗涤并重悬浮于补充有10%胎牛血清(Invitrogen)的 RPMI 中。将大约30,000个细胞/孔铺板在圆底96孔板中,并添加相应的构建体稀释液以达到所需的最终浓度(一式三份);最终浓度范围为0.1pM至10nM。为了进行适当的比较,将所有TCB构建体和对照调整至相同的摩尔浓度。将人PBMC(效应细胞)添加至孔中以获得10:1的最终E:T比率,对应于1个肿瘤靶细胞大约3至5个T细胞的E:T比率。阴性对照组仅由效应细胞或靶细胞代表。为了标准化,通过将靶细胞与最终浓度为1% Triton X-100一起孵育从而诱导细胞死亡来确定MM靶细胞的最大溶解(=100%)。最小溶解(=0%)由仅与效应细胞共孵育的靶细胞(即没有任何T细胞双特异性抗体)代表。在37、5% CO₂孵育20-24小时后,然后用LDH检测试剂盒(Roche Applied Science)

按照制造商的说明书测量从凋亡/坏死的MM靶细胞到上清液中的LDH释放。在浓度反应曲线中将LDH释放的百分比针对抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体的浓度作图。使用Prism软件(GraphPad) 测量EC50值,并确定为导致50%最大LDH释放的TCB抗体浓度。如图5所示,如通过LDH释放所测量,所有抗BCMA/抗CD3 TCB抗体(21-、22-、42-和83A10-TCBcv)诱导BCMA阳性L363骨髓瘤细胞的浓度依赖性杀死。L363细胞的溶解是特异性的,因为即使在所测试的最高浓度下,不结合至BCMA阳性靶细胞、但仅结合至T细胞上的CD3的对照-TCB抗体也不诱导LDH释放。表13总结由抗BCMA/抗CD3 TCB抗体诱导的中度/低表达BCMA的L363细胞的重定向的T细胞杀死的EC50值。

[0619] 表13:由抗BCMA/抗CD3 TCB抗体诱导的L363细胞的重定向的T细胞杀死的EC50值

抗 BCMA/抗 CD3 TCB 抗体	EC50 (pM)				
	供体 1	供体 2	供体 3	供体 4	供体 5
21-TCBcv	83.6	38.4	18.9	19.1	46.4
22-TCBcv	97.5	27.7	16.5	14.6	56.0
42-TCBcv	15.5	16.7	5.2	2.2	10.6
83A10-TCBcv	16.8	47.8	28.4	12.6	39.0

[0620] [0621] 实施例10:由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的中度/低表达BCMA的RPMI -8226骨髓瘤细胞的重定向的T细胞细胞毒性(LDH释放测定)

[0622] 分析抗BCMA/抗CD3 TCB抗体在经由抗原结合部分结合至细胞上的BCMA来交联构建体后在中度/低表达BCMA的MM细胞中诱导T细胞介导的细胞凋亡的能力。简言之,用细胞解离缓冲液收获人中度/低表达BCMA的L363多发性骨髓瘤靶细胞,洗涤并重悬浮于补充有10%胎牛血清(Invitrogen)的RPMI中。将大约30,000个细胞/孔铺板在圆底96孔板中,并添加相应的构建体稀释液以达到所需的最终浓度(一式三份);最终浓度范围为0.1pM至10nM。为了进行适当的比较,将所有TCB构建体和对照调整至相同的摩尔浓度。将人PBMC(效应细胞)添加至孔中以获得10:1的最终E:T比率,对应于1个肿瘤靶细胞大约3至5个T细胞的E:T比率。阴性对照组仅由效应细胞或靶细胞代表。为了标准化,通过将靶细胞与最终浓度为1% Triton X-100一起孵育从而诱导细胞死亡来确定MM靶细胞的最大溶解(=100%)。最小溶解(=0%)由仅与效应细胞共孵育的靶细胞(即没有任何T细胞双特异性抗体)代表。在37.5%CO₂孵育20-24小时后,然后用LDH检测试剂盒(Roche Applied Science)按照制造商的说明书测量从凋亡/坏死的MM靶细胞到上清液中的LDH释放。在浓度反应曲线中将LDH释放的百分比针对抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体的浓度作图。使用Prism软件(GraphPad) 测量EC50值,并确定为导致50%最大LDH释放的TCB抗体浓度。如图6所示,如通过LDH释放所测量,所有抗BCMA/抗CD3 TCB抗体(21-、22-、42-和83A10-TCBcv)诱导BCMA阳性RPMI -8226骨髓瘤细胞的浓度依赖性杀死。RPMI -8226细胞的溶解是特异性的,因为即使在所测试的最高浓度下,不结合至BCMA阳性靶细胞、但仅结合至T细胞上的CD3的对照-TCB抗体也不诱导LDH释放。表13总结由抗BCMA/抗CD3 TCB抗体诱导的中度/低表达BCMA的RPMI -8226细胞的重定向的T细胞杀死的EC50值。

[0623] 表13:由抗BCMA/抗CD3 TCB抗体诱导的RPMI -8226细胞的重定向的T细胞杀死的EC50值

抗 BCMA/抗 CD3 TCB 抗体	EC50 (pM)				
	供体 1	供体 2	供体 3	供体 4	供体 5
21-TCBcv	/	41.3	8.8	4.0	8.4
22-TCBcv	/	47.6	7.6	3.2	5.5
42-TCBcv	/	382.8	18.7	3.5	1.5
83A10-TCBcv	/	620.5	229.3	35.0	64.9

[0625] 实施例11:由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的低表达BCMA的JJN-3骨髓瘤细胞的重定向的T细胞细胞毒性(流式细胞术和LDH释放)

[0626] 分析抗BCMA/抗CD3 TCB抗体在经由抗原结合部分结合至细胞上的BCMA来交联构建体后在低表达BCMA的MM细胞中诱导T细胞介导的细胞凋亡的能力。简言之,用细胞解离缓冲液收获人低表达BCMA的JJN-3多发性骨髓瘤靶细胞,洗涤并重悬浮于补充有10%胎牛血清(Invitrogen)的RPMI中。将大约30,000个细胞/孔铺板在圆底96孔板中,并添加相应的构建体稀释液以达到所需的最终浓度(一式三份);最终浓度范围为0.1pM至10nM。为了进行适当的比较,将所有TCB构建体和对照调整至相同的摩尔浓度。将人PBMC(效应细胞)添加至孔中以获得10:1的最终E:T比率,对应于1个肿瘤靶细胞大约3至5个T细胞的E:T比率。阴性对照组仅由效应细胞或靶细胞代表。为了标准化,通过将靶细胞与最终浓度为1% Triton X-100一起孵育从而诱导细胞死亡来确定MM靶细胞的最大溶解(=100%)。最小溶解(=0%)由仅与效应细胞共孵育的靶细胞(即没有任何T细胞双特异性抗体)代表。i) 在37.5%CO₂下孵育48小时后,收集培养的骨髓瘤细胞,洗涤并用荧光染料缀合的抗体和膜联蛋白-V染色以测定凋亡骨髓瘤细胞。染色组包括CD138-APCC750/CD38-FITC/CD5-BV510/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/膜联蛋白-V-PerCP-Cy5.5。所使用的荧光染料标记的抗体购自BD Biosciences(San Jose, CA)和Caltag Laboratories(San Francisco CA)。使用多色流式细胞仪和安装的软件(例如,运行FACS Diva软件的CantoII装置或使用CellQUEST软件的FACSCalibur流式细胞仪)进行采集。Paint-A-Gate PRO程序(BD Biosciences)用于数据分析。在JJN-3细胞上测量膜联蛋白-V,并将膜联蛋白-v阳性JJN-3细胞的百分比针对抗BCMA/抗CD3T细胞双特异性抗体的浓度作图。还通过以下方式测定由特定浓度的抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的JJN-3细胞的溶解百分比:在给定TCB浓度下测量膜联蛋白-V阴性JJN-3细胞的绝对计数并将其从没有TCB的膜联蛋白-V阴性JJN-3细胞的绝对计数中减去;除以没有TCB的膜联蛋白-V阴性JJN-3细胞的绝对计数。图7示出,如通过流式细胞术所测量,抗BCMA/抗CD3 TCB抗体(22-、42-和83A10-TCBcv)诱导低表达BCMA的JJN-3骨髓瘤细胞的浓度依赖性杀死。JJN-3细胞的溶解是特异性的,因为即使在所测试的最高浓度下,不结合至BCMA阳性靶细胞、但仅结合至T细胞上的CD3的对照-TCB抗体也不诱导膜联蛋白-v阳性JJN-3细胞或JJN-3细胞溶解的增加。表14和表15分别总结膜联蛋白-v阳性JJN-3细胞的百分比和由抗BCMA/抗CD3 TCB抗体诱导的JJN-3细胞的溶解百分比。

[0627] 在37.5%CO₂下孵育20-24小时或48小时后也进行LDH的检测。然后用LDH检测试剂盒(Roche Applied Science)按照制造商的说明书测量从凋亡/坏死的JJN-3 MM靶细胞到上清液中的LDH释放。在浓度反应曲线中将LDH释放的百分比针对抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体的浓度作图。使用Prism软件(GraphPad)测量EC50值,并确定为导致50%最大LDH释放的TCB抗体浓度。

[0628] 表14.由抗BCMA/抗CD3 TCB抗体诱导的低表达BCMA的JJN-3细胞的重定向的T细胞杀死:膜联蛋白-V阳性细胞的百分比

实验 1							
膜联蛋白-V 阳性 JJN-3 细胞(%)	抗 BCMA/抗 CD3 TCB 浓度(pM)						
	10000	1000	100	10	1	0.1	0
83A10-TCBcv	16.78	10.21	9.12	11.11	11.36	8.14	9.6
42-TCBcv	24.83	16.84	8.62	12.3	11.9	/	9.6
22-TCBcv	22.95	26.15	12.48	13.29	9.3	12.48	9.6
对照-TCB	8.84	/	/	/	/	/	/

实验 2							
膜联蛋白-V 阳性 JJN-3 细胞(%)	抗 BCMA/抗 CD3 TCB 浓度(pM)						
	10000	1000	100	10	1	0.1	0
83A10-TCBcv	22.86	17.53	16.5	15.94	14.32	13.07	10.74
42-TCBcv	26.88	21.68	14.42	13.6	13.47	12.75	10.74
22-TCBcv	29.72	26.97	18.35	15.94	15	14.8	10.74
对照-TCB	12.82	/	/	/	/	/	/

[0629] [0630] 表15.由抗BCMA/抗CD3 TCB抗体诱导的低表达BCMA的JJN-3细胞的重定向的T细胞杀死:JJN-3细胞的溶解百分比

实验 1							
JJN-3 细胞的 溶解(%)	抗 BCMA/抗 CD3 TCB 浓度(pM)						
	10000	1000	100	10	1	0.1	0
83A10-TCBcv	70.30	26.66	18.43	41.88	24.42	-14.45	0.00
42-TCBcv	92.92	84.02	41.87	38.96	40.29	/	0.00
22-TCBcv	88.02	90.54	56.26	73.56	-4.29	26.28	0.00
对照-TCB	-6.55	/	/	/	/	/	/

实验 2							
JJN-3 细胞的 溶解(%)	抗 BCMA/抗 CD3 TCB 浓度(pM)						
	10000	1000	100	10	1	0.1	0
83A10-TCBcv	51.18	25.30	20.12	39.58	-1.88	22.28	0.00
42-TCBcv	90.37	81.12	55.32	39.44	34.94	17.62	0.00
22-TCBcv	91.21	94.12	53.03	41.66	24.36	36.47	0.00
对照-TCB	4.18	/	/	/	/	/	/

[0631] [0632] 实施例12:来自多发性骨髓瘤患者的骨髓骨髓瘤浆细胞中的BCMA表达

[0633] 表达目标肿瘤靶标的人细胞系是用于测量在T细胞存在下诱导肿瘤细胞细胞毒性的TCB抗体效力和测定EC50值以及用于TCB分子的排序的非常有用和实用的工具。然而,尽管是易于获得和实践的,但是人骨髓瘤细胞系具有不代表多发性骨髓瘤的异质性的警告,多发性骨髓瘤是特征在于分子水平上的显著异质性的一种非常复杂的疾病。此外,骨髓瘤细胞系不表达具有相同强度和密度的BCMA受体,因为一些细胞比其它细胞更强地表达BCMA(例如H929细胞对比RPMI -8226细胞),并且也可在不同的患者中观察到在细胞水平下的这种异质性。在与多发性骨髓瘤的主要主张领袖的学术合作中,正在研究患者样品中BCMA表

达和密度的测定以及临床患者样品中抗BCMA/抗CD3 TCB抗体的评价。根据当地伦理委员会指南和赫尔辛基宣言，在获得知情同意后，从多发性骨髓瘤患者收集血液和骨髓抽吸物。

[0634] a) 通过多参数流式细胞术检测的BCMA表达(平均荧光强度)

[0635] 为了确定骨髓骨髓瘤细胞上BCMA受体的表达，使用新鲜分离的全骨髓抽吸物进行免疫表型分析。将红细胞溶解的K₃-EDTA(乙二胺四乙酸)抗凝全骨髓样品用于免疫表型分析。将每管总计 2×10^6 个细胞染色，溶解，且然后使用直接免疫荧光技术和多色染色进行洗涤，其目的在于特异性鉴定和免疫表型表征被鉴定为CD138⁺CD38⁺CD45⁺CD19⁻CD56⁺的恶性浆细胞。然后使用一组荧光染料缀合的抗体对细胞进行染色，所述荧光染料缀合的抗体至少包括CD38-FITC/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/BCMA-APC。所使用的荧光染料标记的抗体购自BD Biosciences(San Jose, CA) 和 Caltag Laboratories(San Francisco CA)。在免疫表型分析中使用内部APC缀合的抗人BCMA抗体。使用多色流式细胞仪和安装的软件(例如，运行FACS Diva软件的CantoII装置或使用CellQUEST软件的FACSCalibur流式细胞仪)进行采集。Paint-A-Gate PRO程序(BD Biosciences)用于数据分析。测量在恶性浆细胞群体上检测的BCMA表达，并测定平均荧光强度(MFI)值并在骨髓瘤患者中进行比较。

[0636] 表16. 如通过多参数流式细胞术所检测的患者骨髓骨髓瘤细胞中的BCMA表达(平均荧光强度)

[0637]

患者 N°	MFI_{BCMA}
P1	2863
P2	3528
P3	602
P4	389
P5	955
P6	1475
P7	282
P8	1621
P9	116
P10	125
P11	1495
P12	2451
P13	398
P14	2040
P15	678

[0638]

P16	945
P17	1672
P18	1491
P19	2198
P20	1058
P21	3594
P22	615
P23	159

[0639] b) BCMA特异性抗原结合能力的测定(定量流式细胞术分析)

[0640] Qifikit (Dako) 方法用于定量患者骨髓骨髓瘤浆细胞的细胞表面上的BCMA特异性抗原结合能力(SABC)。将从全骨髓抽吸物分离的骨髓瘤浆细胞用在FACS缓冲液(PBS, 0.1% BSA) 中稀释的50 μ l小鼠抗人BCMA IgG (BioLegend#357502) 或小鼠 IgG2a同种型对照(BioLegend#401501) 染色至最终浓度25 μ g/ml (或在饱和浓度下), 并在4下在黑暗中进行染色30分钟。接下来, 将100 μ l装置或校准珠添加在单独的孔中, 并且用FACS缓冲液洗涤细胞以及珠两次。将细胞和珠重悬浮于25 μ l FACS缓冲液中, 所述缓冲液含有由Qifikit提供的荧光素缀合的抗小鼠第二抗体(在饱和浓度下)。将细胞和珠在4下在黑暗中染色45分钟。洗涤细胞一次, 并将所有样品重悬浮于100 μ l FACS缓冲液中。立即在多色流式细胞仪和安装的软件(例如, 运行FACS Diva软件的CantoII装置或使用CellQUEST软件的FACSCalibur流式细胞仪)上对样品进行分析。

[0641] 表17. 如通过定量流式细胞术分析所测量的患者骨髓骨髓瘤浆细胞上的BCMA特异性抗原结合能力

[0642]

患者 N°	SABC _{BCMA}
P1	n/a
P2	n/a
P3	679
P4	145
P5	957
P6	969
P7	554

[0643]	P8	4479
	P9	350
	P10	414
	P11	2756
	P12	2911
	P13	1267
	P14	3453
	P15	1006
	P16	1097
	P17	1622
	P18	429
	P19	1684
	P20	383
	P21	1602
	P22	799
	P23	204

[0644] 实施例13:通过抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的在自体骨髓浸润性T细胞存在下骨髓患者骨髓瘤浆细胞的重定向的T细胞毒性(多参数流式细胞术)

[0645] 在多发性骨髓瘤的TCB抗体候选物的临床前评价期间最有意义和最关键的体外表征之一是TCB分子是否能够活化患者的T细胞并诱导来自患者骨髓的原发性骨髓瘤浆细胞的重定向的T细胞杀死。为了评价抗BCMA/抗CD3 TCB抗体诱导骨髓骨髓瘤浆细胞的重定向的T细胞杀死的效果,将来自多发性骨髓瘤患者的全骨髓抽吸物收集在EDTA包被的管中并立即用于细胞培养测定。测定并通过流式细胞术测量整个骨髓样品中存在的效应细胞与肿瘤细胞的比率(E:T比率)。简言之,将200μl骨髓样品转移到96深孔板中。在无菌培养基中制备抗BCMA/抗CD3 TCB抗体和对照抗体稀释液,并将10μl制剂添加至相应孔中,最终浓度在0.1pM至30nM的范围内。通过轻轻摇动混合骨髓-抗体悬浮液,然后在37、5%CO₂下孵育48小时,用石蜡膜密封。在孵育期后,将基于抗体组制备的20μl相应FACS抗体溶液添加到96-U底板中,所述抗体组包括CD138-APCC750/CD38-FITC/CD5-BV510/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/BCMA-APC/膜联蛋白-V-PerCP-Cy5.5。荧光染料标记的抗体购自BD Biosciences(San Jose, CA)和Caltag Laboratories(San Francisco CA),并使用内部APC缀合的抗人BCMA抗体。然后将样品在室温下在黑暗中孵育15分钟,并使用多色流式细胞仪进行采集和分析。通过评价在骨髓瘤细胞群体CD138⁺CD38⁺CD45⁺CD19⁻CD56⁺上门控的膜联蛋白-V阳性表达来确定骨髓瘤细胞的细胞死亡。然后确定骨髓瘤细胞死亡的百分比。还通过以下方式测定由特定浓度的抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的患者骨髓骨髓瘤浆细胞的溶解百分比:在给定TCB浓度下测量膜联蛋白-V阴性骨髓瘤浆细胞的绝对计数并将其从没有TCB的膜联蛋白-V阴性骨髓瘤浆细胞的绝对计数中减去;除以没有TCB的膜联蛋白-V-阴性骨髓瘤浆细胞的绝对计数。为了验证抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体的特异性,还在其它骨髓细胞类型如T细胞、B细胞和NK细胞中测量了膜联蛋白-V表达。如图8所示,存在患者骨髓瘤浆细胞的浓度依赖性和特异性溶解,而未观察到T细胞、B细胞和NK细胞的溶解。此外,仅结合至CD3、但不结合至BCMA的对照-TCB在最高浓度的TCB抗体下不诱导骨髓

瘤浆细胞的细胞死亡。如表18所示,与83A10-TCBcv的29.31%相比,在最高浓度(30nM)下膜联蛋白-V阳性患者骨髓骨髓瘤细胞的百分比分别达到42-TCBcv和22-TCBcv的52.54%和55.72%,从而得出结论42-TCBcv和22-TCBcv比83A10-TCBcv更有效诱导患者骨髓骨髓瘤浆细胞的杀死。

[0646] 表18.来自由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的患者骨髓抽吸物的膜联蛋白-V阳性骨髓瘤浆细胞的百分比。

膜联蛋白-V 阳性骨髓瘤浆细胞(%)	抗 BCMA/抗 CD3 T 细胞双特异性抗体浓度(pM)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	29.31	30.95	23.14	15.74	16.76	13.11
42-TCBcv	52.54	39.87	29.96	10.51	19.6	13.11
22-TCBcv	55.72	51.71	31.01	14.81	14.19	13.11
对照-TCB	15.18	10.93	/	/	/	/

[0648] 在来自5名不同MM患者的骨髓抽吸物的另一项研究中,通过在膜联蛋白-V阴性细胞群体上闩控来确定活骨髓瘤浆细胞的百分比,并针对抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体的浓度作图。测量EC50值并确定为导致50%最大活骨髓瘤浆细胞的TCB抗体浓度。EMAX(%)被确定为在相应抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体存在下活骨髓瘤浆细胞的最大值。在大多数5名骨髓瘤患者骨髓抽吸物样品中,83A10-TCBcv在诱导骨髓瘤浆细胞的溶解中的效力远低于22-TCBcv和42-TCBcv(表26;图9示出5名患者中的2名的示例浓度反应曲线)。与83A10-TCBcv仅1/5患者样品相比,在用22-TCBcv或42-TCBcv处理的5/5患者样品中观察到活骨髓瘤细胞的浓度依赖性减少。表19显示83A10-TCBcv与22-TCBcv和42-TCBcv的比较以及抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体对骨髓骨髓瘤浆细胞的活力的影响。结果清楚地表明,如通过相应患者样品中22-TCBcv和42-TCBcv对比83A10-TCBcv的较低EMAX(%)值所证实,使用22-TCBcv和42-TCBcv在4/5患者样品中存在较少的活骨髓骨髓瘤浆细胞(即骨髓骨髓瘤浆细胞更多溶解)。观察到患者骨髓瘤浆细胞的浓度依赖性和特异性溶解,而未观察到非恶性骨髓细胞的溶解(数据未示出)。

[0649] 表19.在抗-BCMA/抗-CD3 T细胞双特异性抗体存在下,关于来自患者骨髓抽吸物的膜联蛋白-V阴性的活骨髓瘤浆细胞的EMAX(%)值。

骨髓抽吸物患者样品 (研究 2)	83A10-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
	EMAX (%)		
患者 001	100	7.6	22.6
患者 003	54.3	38.9	44.6
患者 004	100	66.6	53.9
患者 006	81.8	65.9	73.5
患者 007	81.8	48.6	72.8

[0651] 在与83A10-TCBcv相比较的本发明中使用的新的抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体的进一步研究中,将7份新鲜采集的患者全骨髓样品/抽吸物用CD138磁性微珠(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)染色,通过autoMACS细胞分离柱,并且将收集的级分与通常>4%骨髓瘤浆细胞的足够剩余数量的MM浆细胞一起用于进一步的实验。在24孔板

中,孵育500,000个细胞/孔并培养48小时。将抗BCMA/抗CD3 TCB抗体和对照抗体稀释液添加至相应孔中,最终TCB浓度为0.1.pM至10nM。每个剂量点一式三份进行。使用流式细胞术(FACSCalibur;Becton Dickinson)通过碘化丙啶/CD138-FITC双重染色研究浆细胞和骨髓微环境细胞的活力。使用FACSDiva Software(Becton Dickinson)进行数据分析。如图10中所示,条形图示出对一式三份相应培养基对照(MC)的平均值标准化的平均值。对于统计分析,使用单侧t检验。参考培养基对照分别以百分比给出在10nM(IMAX10)的浓度下对MM浆细胞生长的最大抑制和在1nM(IMAX1)下测量的抑制。还描绘了与培养基对照相比,对照-TCB抗体(10nM)的最大抑制。使用R 3.1.19和Bioconductor 2.1310进行计算,但是用于计算IMAX值(Microsoft Excel®;Microsoft Office Professional 2013)。如果其相应的统计检验的P值<5% (*)、<1% (**) 或<0.1% (***) ,则认为作用是统计上显著的。如图10A-10G所示,结果清楚地表明,与83A10-TCBcv相比,使用22-TCBcv和42-TCBcv在7/7患者样品中存在较少的活骨髓骨髓瘤浆细胞(即骨髓骨髓瘤浆细胞更多溶解)。表20显示相对于培养基对照,来自由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的患者骨髓抽吸物的活骨髓瘤浆细胞的百分比。表21显示IMAX10和IMAX1值。结果表明22-TCBcv和42-TCBcv明显比83A10-TCBcv更有效地诱导患者骨髓骨髓瘤浆细胞的杀死。尽管由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导并在所有骨髓患者样品中观察到的骨髓浆细胞(BMPC)的特异性溶解,但骨髓微环境(BMME)在相应样品中未受影响(图10H,代表7个患者样品)。

[0652] 表20.来自由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的患者骨髓抽吸物的碘化丙啶阴性的活骨髓瘤浆细胞的相对百分比。

[0653]

患者样品 1 号/活骨	抗 BCMA/抗 CD3 T 细胞双特异性抗体浓度(nM)
-------------	-------------------------------

髓瘤浆细胞(%)	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	181.3	106.3	31.3	9.4
42-TCVcv	81.3	15.6	9.4	9.4
22-TCVcv	37.5	6.3	6.3	9.4
Ctrl-TCB	/	/	/	162.5
患者样品 2 号/活骨髓瘤浆细胞(%)	抗 BCMA/抗 CD3 T 细胞双特异性抗体浓度(nM)			
髓瘤浆细胞(%)	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	89.5	31.6	5.3	0
42-TCVcv	42.1	10.5	0	0
22-TCVcv	15.8	5.3	0	0
Ctrl-TCB	/	/	/	94.7
患者样品 3 号/活骨髓瘤浆细胞(%)	抗 BCMA/抗 CD3 T 细胞双特异性抗体浓度(nM)			
髓瘤浆细胞(%)	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	76.7	35.0	1.7	0
42-TCVcv	13.3	0	0	0
22-TCVcv	3.3	0	0	0
Ctrl-TCB	/	/	/	86.7
患者样品 4 号/活骨髓瘤浆细胞(%)	抗 BCMA/抗 CD3 T 细胞双特异性抗体浓度(nM)			
髓瘤浆细胞(%)	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	93.9	51.5	9.1	6.1
42-TCVcv	9.1	0	0	0
22-TCVcv	15.2	15.2	0	0
Ctrl-TCB	/	/	/	127.3
患者样品 5 号/活骨髓瘤浆细胞(%)	抗 BCMA/抗 CD3 T 细胞双特异性抗体浓度(nM)			
髓瘤浆细胞(%)	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	100	91.4	62.9	20.0
42-TCVcv	71.4	34.3	22.9	11.4
22-TCVcv	20.0	22.9	14.3	11.4
Ctrl-TCB	/	/	/	85.7
患者样品 6 号/活骨髓瘤浆细胞(%)	抗 BCMA/抗 CD3 T 细胞双特异性抗体浓度(nM)			
髓瘤浆细胞(%)	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	55.6	22.2	6.7	4.4
42-TCVcv	35.6	6.7	4.4	4.4
22-TCVcv	24.4	3.3	8.9	2.2
Ctrl-TCB	/	/	/	117.8
患者样品 7 号/活骨髓瘤浆细胞(%)	抗 BCMA/抗 CD3 T 细胞双特异性抗体浓度(nM)			
髓瘤浆细胞(%)	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	84.4	82.6	46.8	19.3
42-TCVcv	67.0	33.9	12.8	5.5
22-TCVcv	24.4	3.3	8.9	2.2
Ctrl-TCB	/	/	/	106.4

[0654]

[0655] 表21. 基于在抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体存在下来自患者骨髓抽吸物的碘化丙啶阴性的活骨髓瘤浆细胞, 关于在10nM IMAX10下MM浆细胞生长的最大抑制和在1nM

IMAX1下的抑制的IMAX10和IMAX1值。

患 者 样 品 编 号	83A10-TCBcv		42-TCBcv		22-TCBcv		Ctrl-TCB
	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	IMAX10 (%)
[0656]	1	90.6	68.8	90.6	90.6	93.8	-62.5
	3	100	94.7	100	100	100	5.3
	4	100	98.3	100	100	100	13.3
	5	93.9	90.9	100	100	100	-27.3
	6	80.0	37.1	88.6	77.1	88.6	85.7
	7	95.6	93.3	95.6	95.6	97.8	91.1
	8	80.7	53.2	94.5	87.2	97.2	97.2
							-6.4

[0657] 实施例14:由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的患者骨髓T细胞的T细胞活化(多参数流式细胞术)

[0658] 为了评价抗BCMA/抗CD3 TCB抗体是否诱导骨髓瘤患者CD4⁺和CD8⁺T细胞(即骨髓浸润性T细胞(MIL))的活化,将来自相应的处理组、未处理组和对照组的样品在孵育48小时后还用基于抗体组制备的FACS抗体溶液染色,所述抗体组包括八种标志物:CD8/CD69/TIM-3/CD16/CD25/CD4/HLA-DR/PD-1。然后将样品在室温下在黑暗中孵育15分钟,并使用多色流式细胞仪进行采集和分析。通过评价CD4⁺和CD8⁺T细胞群体上门控的CD25、CD69和/或HLA-DR阳性表达来确定T细胞活化。然后测量T细胞活化的百分比。图11显示来自多发性骨髓瘤患者的骨髓浸润性CD4⁺和CD8⁺T细胞上CD69和CD25的浓度依赖性上调。表22总结由抗BCMA/抗CD3 TCB抗体诱导的CD4⁺和CD8⁺T细胞上CD69和CD25表达的增加;来自一名患者的数据。

[0659] 表22:在患者骨髓骨髓瘤浆细胞存在下由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的骨髓瘤患者自体T细胞的T细胞活化

0660] CD69+ / CD4 T 细胞(%)	抗 BCMA/抗 CD3 T 细胞双特异性抗体浓度(pM)
---------------------------	-------------------------------

	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	21.8	14.93	1.80	0.93	1.02	0.85
42-TCBcv	29.6	24.8	1.90	1.57	0.94	0.85
22-TCBcv	34.99	30.72	3.62	1.69	2.31	0.85
对照-TCB	0.7	0.62	/	/	/	/
CD69+ / CD8 T 细胞(%)	抗 BCMA/抗 CD3 T 细胞双特异性抗体浓度(pM)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	25.50	22.07	8.330	5.60	5.14	5.30
42-TCBcv	23.61	24.22	11.125	9.26	6.28	5.30
22-TCBcv	25.48	28.14	11.460	6.64	14.08	5.30
对照-TCB	5.71	4.93	/	/	/	/
CD25+ / CD4 T 细胞(%)	抗 BCMA/抗 CD3 T 细胞双特异性抗体浓度(pM)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	17.47	12.86	5.18	4.58	4.07	7.5
42-TCBcv	8.65	7.42	3.51	2.71	2.81	7.5
22-TCBcv	12.34	11.52	5.23	4.89	4.90	7.5
对照-TCB	6.90	6.50	/	/	/	/
CD25+ / CD8 T 细胞(%)	抗 BCMA/抗 CD3 T 细胞双特异性抗体浓度(pM)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	9.79	6.560	0.42	0.13	0.12	0.12
42-TCBcv	2.20	2.231	0.42	0.14	0.08	0.12
22-TCBcv	3.57	4.110	0.65	0.10	0.08	0.12
对照-TCB	0.09	0.100	/	/	/	/

[0661] [0662] 实施例15:由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的患者骨髓T细胞的T细胞功能(细胞因子产生)增加(基于多重珠的免疫测定/流式细胞术)

[0663] 为了评价抗BCMA/抗CD3 TCB抗体(83A10-TCBcv、22-TCBcv和42-TCBcv)是否诱导T细胞活化和增加的骨髓瘤患者骨髓浸润性CD4⁺和CD8⁺T细胞功能,在孵育48小时从相应处理组、未处理组和对照组的培养物收集上清液,然后测量细胞因子和丝氨酸蛋白酶的含量。根据制造商的说明书,使用人Th1/Th2细胞因子试剂盒II(BD #551809)或以下CBA Flex Set的组合在多色流式细胞仪上进行细胞因子珠阵列(CBA)分析:人颗粒酶B(BD #560304)、人IFN- γ Flex Set(BD #558269)、人TNF- α Flex Set(BD #558273)、人IL-10 Flex Set(BD #558274)、人IL-6 Flex Set(BD #558276)、人IL-4 Flex Set(BD #558272)、人IL-2 Flex Set(BD #558270)。

[0664] [0665] 实施例16:食蟹猴中的药代动力学/药效学(PK/PD)研究

[0665] 抗BCMA/抗CD3 TCBcv抗体可具有优于其它双特异性抗体如(scFV)₂(例如W02013072415和W02013072406中描述的BCMAxCD3双特异性T细胞衔接器 BiTE®)的明显优点是与需要经由患者携带的泵进行治疗施用持续数周至数月的(scFV)₂的非常短的消除半衰期(例如1至4小时)相比,更长的消除半衰期/更低的体内清除率,其可允许一周两次或一次IV或SC施用(Topp等人J Clin Oncol 2011;29(18):2493-8)。一周两次或一次施用对患者来说将更方便,并且风险更低(例如泵故障、导管问题等)。

[0666] a) 为了验证体内抗BCMA/抗CD3 83A10-TCBcv抗体的消除半衰期/清除率,在经验丰富的AAALAC认证的CRO进行用抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体(83A10-TCBcv、22-TCBcv和42-TCBcv)的单剂量药代动力学(PK)药效学(PD)研究。约2岁且体重约3kg的生物医学上首次用于实验的成年食蟹猴适应环境至少40天,并根据体重、临床观察结果和临床病理学检查进行选择。通过个体纹身和彩色编码的笼卡识别动物。所有动物程序(包括圈养、健康监测、约束、给药等)和道德修订都是根据实施用于生物医学研究的动物保护指令的现行国家立法执行的。基于最近的测试前体重将动物随机分配至处理组。在排除具有不可接受的测试前结果的动物后,经设计以实现相对于测试前体重平衡的Pristima[®]系统中包含的计算机程序用于将动物从两个体重极限中排除,并将剩余动物随机分配至处理组。将动物分配至利用0.003、0.03、和0.3mg/kg的83A10-TCBcv的三个处理组(n=2只动物,即每组1只雌性和1只雄性)。动物接受单次静脉内注射83A10-TCBcv并且根据以下收集时间表和程序经由外周静脉收集以下每个时间点的至少0.8mL血液样品用于PK评价:给药前、给药后30分钟、90分钟、180分钟、7小时、24小时、48小时、96小时、168小时、336小时、504小时。使血液样品在室温下在管中凝结60分钟以用于血清分离。通过离心(至少10分钟,1200g,+4)使凝块沉淀。将所得血清(约300μL)直接储存在-80直到进一步分析。根据以下收集时间表,在麻醉/镇痛处理下在股骨处收集骨髓样品用于PK评价:给药前、给药后96小时和336小时。使骨髓样品在室温下在管中凝结60分钟以用于血清分离。通过离心(至少10分钟,1200g,+4)使凝块沉淀。将所得骨髓(约1mL)直接储存在-80直到进一步分析。进行PK数据分析和评价。使用Watson包(v 7.4,Thermo Fisher Scientific Waltman,MA,USA)或Phoenix WinNonlin系统(v.6.3,Certara Company,USA)进行标准非房室分析。如图12和表23所示,通过ELISA从IV注射后的不同时间点收集的血清样品测量83A10-TCBcv的血清浓度。表24显示如通过ELISA所测量的每个处理组的骨髓中83A10-TCBcv的浓度(BLQ表示低于定量水平)。

[0667] 可从图12、表23和表24中获取与双特异性抗体的潜在临床应用相关的若干信息:

[0668] -在来自MM患者的骨髓抽吸物中,本发明中使用的1nM或10nM TCB的浓度诱导MM浆细胞的显著或甚至完全杀死;在0.03mg/kg剂量下在注射间隔时间168小时(7天),已经达到在大约1nM与4nM之间的血浆浓度,从而表明每周一次大约0.03mg/kg剂量的疗法可能是可行的(200ng/ml对应于大约1nM)

[0669] -图12表明在所研究的剂量范围内,PK主要是剂量线性的;这意味着浓度与剂量成正比;临床治疗的有用属性

[0670] -MM是主要位于骨髓中的疾病;在骨髓中检测到的83A10-TCBcv的浓度接近血清浓度(表24),例如在注射后96小时已经测量到大约1和2nM的骨髓浓度;这些是本发明中使用的TCB浓度,在所述浓度下在从MM患者中新鲜取得的骨髓抽吸物中观察到MM浆细胞的显著杀死;从而再次证明诸如每周一次的方便给药间隔的可能性

[0671] -在注射后24与504小时之间,消除大部分为一阶,消除半衰期为大约6至8天,再次表明例如每周一次给药的可能性

[0672] 表23. 食蟹猴中IV处理后83A10-TCBcv的血清浓度

83A10-TCBcv						
浓 度 (ng/mL)	0.003 mg/kg IV		0.03 mg/kg IV		0.3 mg/kg IV	
	A	B	C	D	E	F
[0673]	给药前	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	30分钟	75.69	74.99	668.66	796.54	17207.20
	90分钟	70.92	74.56	951.81	628.72	12831.54
	180分钟	76.54	62.55	981.42	722.27	10653.28
	7小时	53.17	77.39	700.67	972.38	8204.77
	24小时	33.16	50.41	358.90	532.11	4609.28
	48小时	26.05	37.40	279.80	433.30	3546.09
	96小时	17.28	19.52	226.01	429.80	1959.96
	168小时	17.33	15.87	55.58	365.67	1918.06
	336小时	11.21	4.43	102.94	153.54	1102.96
	504小时	4.33	BLQ	43.99	130.14	952.03
						377.04

[0674] 表24. 食蟹猴中单次IV处理后83A10-TCBcv的骨髓浓度

浓 度 (ng/mL)	0.003 mg/kg		0.03 mg/kg		0.3 mg/kg	
	A	B	C	D	E	F
[0675]	给药前	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	96小时	25.07	37.15	179.87	469.08	3432.54
	336小时	9.92	6.90	59.39	47.22	1987.48
						850.87

[0676] 药效学(PD)测量:将血液样品(时间点:给药前,给药后24、48、96、168、336、504小时)和骨髓样品(时间点:给药前,给药后96和336小时)收集在含有7.5%K3 EDTA的管中用于通过流式细胞术进行PD评价以评价作为单剂量静脉内给予的83A10-TCBcv对血液和骨髓浆细胞、B细胞和T细胞的作用。应用表面标志物的“溶解和洗涤”直接免疫荧光染色方法。简言之,将100μL的血液或骨髓与两种抗体混合物(包括CD45/CD2/CD16/CD20/CD27/CD38或CD45/CD2/CD16/CD4/CD25/CD8)在黑暗中在+4°C孵育30分钟。为了溶解红细胞,将2mL溶解缓冲液添加至样品中并在室温下在黑暗中孵育15分钟。通过离心收集细胞并用染色缓冲液(PBS 2%胎牛血清)洗涤。将染色的样品冷藏保存,避光,直到在同一天用细胞计数器采集。用配备有488和635激光线BD FACS Canto II的Becton Dickinson流式细胞仪进行FACS数据采集。BD FACSDiva软件用于数据收集和分析。基于由血液学分析仪(ADVIA™ 120, Siemens)获得的WBC计数,使用双平台进行绝对细胞数计数。如图13所示,如通过循环细胞计数的减少所示,在接受83A10-TCBcv的单剂量IV处理的所有动物中观察到外周T细胞再分布。如图14A所示,在已经用83A10-TCBcv 0.3mg/kg处理后24小时,在处理的动物中观察到血浆细胞(BCMA阳性细胞)减少,而总B细胞(BCMA阴性细胞)没有减少。图14b示出在食蟹猴中用83A10-TCBcv 0.3mg/kg处理后血液中浆细胞减少的动力学。

[0677] 还处理血液样品用于根据以下收集时间表进行血浆收集用于细胞因子分析(IL-1b、IL-2、IL-6、IL-10、TNF-α和IFN-γ):给药前、给药后30分钟、90分钟、180分钟、7小时、24小时、48小时、96小时、168小时。将血液样品置于保持在冰水浴中的塑料管中,然后离心(至少10分钟,1200g,+4)。将所得血浆直接储存在-80直到分析。使用基于Multiplex珠的细胞

因子免疫测定(Luminex Technology)进行细胞因子分析。使用Bio-Plex Manager 4.1软件(Bio-Rad)分析数据:使用五参数逻辑回归模型(5PL)。

[0678] b) 在进一步的研究中,用42-TCBcv或22-TCBcv处理食蟹猴。动物(n=2只/组)接受单次IV(0.01、0.1和1.0mg/kg)或SC(0.01和0.1mg/kg)注射42-TCBcv或单次IV注射22-TCBcv(0.1mg/kg)。按照确定的收集时间表在时间点收集血液和骨髓样品,并相应地进行处理以进行PK和PD测量(免疫表型分析和细胞因子产生)。

[0679] 动物接受单次IV或SC注射42-TCBcv或22-TCBcv(仅IV),并且根据以下收集时间表和程序,经由外周静脉收集以下每个时间点的血液样品进行PK评价:给药前、给药后30分钟、90分钟、180分钟、7小时、24小时、48小时、96小时、168小时、336小时、504小时。使血液样品在室温下在管中凝结60分钟以用于血清分离。通过离心(至少10分钟,1200g,+4)使凝块沉淀。将所得血清(约300μL)直接储存在-80直到进一步分析。根据以下收集时间表,还在麻醉/镇痛处理下在股骨处收集骨髓样品用于PK评价:给药前、给药后96小时和336小时。使骨髓样品在室温下在管中凝结60分钟以用于血清分离。通过离心(至少10分钟,1200g,+4)使凝块沉淀。将所得骨髓(约1mL)直接储存在-80直到进一步分析。进行PK数据分析和评价。使用Watson包(v 7.4,Thermo Fisher Scientific Waltman,MA,USA)或Phoenix WinNonlin系统(v.6.3,Certara Company,USA)进行标准非房室分析。如图19和表24A-D所示,通过ELISA从IV或SC注射后的不同时间点收集的血清和骨髓样品测量42-TCBcv的浓度。多发性骨髓瘤患者骨髓抽吸物中42-TCBcv的有效浓度范围对应于10pm至10nM(灰色区域)。括号内的浓度以nM计。BLQ,低于定量水平;i/m,不确定的测量值。

[0680] 表24A.食蟹猴中IV处理后42-TCBcv的血清浓度

42-TCBcv						
浓 度 (ng/mL)	0.01 mg/kg IV		0.1 mg/kg IV		1.0 mg/kg IV	
	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
给药前	BLQ	BLQ	i/m	BLQ	BLQ	BLQ
30 分钟	468.57	613.44	4720.33	4506.64	41939.31	32677.23
90 分钟	333.09	427.16	4284.66	3214.61	30889.73	103925.73
180 分钟	392.37	422.36	4336.89	2865.36	29201.69	36157.78
7 小时	421.96	356.34	4028.47	3070.84	25064.81	29962.62
24 小时	242.64	305.74	2996.24	2321.66	19365.86	23656.65
48 小时	i/m	192.97	2595.62	1781.91	20539.59	13523.68
96 小时	128.50	148.02	2153.34	1277.02	13147.09	12755.58
168 小时	51.13	72.64	1388.24	948.31	6189.79	3952.05
336 小时	27.68	13.03	195.51	190.87	5337.85	54.15
504 小时	18.17	8.04	275.93	13.96	3678.69	37.88

[0682] 表24B.食蟹猴中单次IV处理后42-TCBcv的骨髓浓度

42-TCBcv						
浓 度 (ng/mL)	0.01 mg/kg IV		0.1 mg/kg IV		1.0 mg/kg IV	
	雌性	雄性	雌性	雄性	雄性	雌性
给药前	BLQ	BLQ	406.99	BLQ	BLQ	BLQ
96 小时	54.39	130.03	956.56	1022.87	4089.88	4339.33

[0684]	336 小时	27.23	18.49	227.20	170.34	3705.74	62.44
--------	--------	-------	-------	--------	--------	---------	-------

[0685] 表24C. 食蟹猴中SC处理后42-TCBcv的血清浓度

42-TCBcv				
浓 度 (ng/mL)	0.01 mg/kg SC		0.1 mg/kg SC	
	雄性	雌性	雄性	雌性
给药前	4.76	12.41	BLQ	BLQ
30 分钟	8.25	12.51	25.11	14.62
90 分钟	16.38	22.71	140.73	145.39
180 分钟	23.75	48.51	334.95	269.66
7 小时	37.46	63.48	836.86	565.10
24 小时	68.15	115.31	2100.42	904.22
48 小时	116.63	118.03	1956.60	1111.06
96 小时	150.77	120.62	1810.13	1817.52
168 小时	106.28	98.64	1192.65	1653.26
336 小时	67.02	46.21	482.39	571.04
504 小时	25.69	31.99	4.08	83.91

[0687] 表24D. 食蟹猴中单次SC处理后42-TCBcv的骨髓浓度

42-TCBcv				
浓 度 (ng/mL)	0.01 mg/kg SC		0.1 mg/kg SC	
	雌性	雄性	雌性	雄性
给药前	5.59	10.70	BLQ	BLQ
96 小时	109.88	73.93	1064.66	1066.79
336 小时	29.35	48.78	518.40	906.48

[0689] 来自表24A和24C的结果表明适合于用42-TCBcv每周一次或甚至每两周一次处理的有吸引力的血清浓度曲线。测定IV和SC施用后血清浓度的曲线下面积AUC, AUC值的比较显示SC注射42-TCBcv的高生物利用度接近100%。此外,结果表明骨髓中42-TCBcv的浓度与42-TCBcv血清浓度非常相似。血清中的42-TCBcv浓度可很好地代表骨髓中即在骨髓瘤肿瘤细胞富集的主要位置处可用的42-TCBcv的浓度。

[0690] 药效学(PD)测量值是证实PK测量值的有价值的信息。进行进一步PD分析。来自血液的食蟹猴CD20⁺B细胞也在细胞表面表达BCMA,并且比血液中的浆细胞显著更频繁(绝对计数更高)。使用血液B细胞消减作为抗BCMA/抗CD3 TCBcv抗体的可靠药效学效应,并比较83A10-TCBcv、42-TCBcv和22-TCBcv之间的体内功效。基于由用血液学分析仪获得并在以下时间点测量的流式细胞术和WBC计数组成的双平台计算绝对B细胞计数:给药前,在10分钟IV输注后24小时、48小时、96小时和196小时。B细胞消减的百分比计算如下:

$$\text{消减百分比} = \frac{[\text{给药前的绝对B细胞计数}] - [\text{时间点的绝对B细胞计数}]}{[\text{给药前的绝对B细胞计数}]} * 100$$

[0692] 表24E:抗BCMA/抗CD3 TCBcv抗体的药效学效应:B细胞消减

IV 注射后时间 (小时)	相对于给药前的 B 细胞消减(%)		
	83A10-TCBcv 0.3 mg/kg (n=2)	42-TCBcv 0.1 mg/kg (n=2)	22-TCBcv 0.1 mg/kg (n=2)
[0693]	24 小时	19.9 ± 0.21	91.4 ± 3.8
	48 小时	11.9 ± 17.6	88.8 ± 3.9
	96 小时	5.0 ± 10.8	93.0 ± 7.2
	168 小时	-0.23 ± 61.4	96.6 ± 3.5
[0694] 在单剂量IV注射后,42-TCBcv和22-TCBcv比83A10-TCBcv更有效地诱导食蟹猴中表达BCMA的B细胞的消减(参见表24E)。由于三种分子共享相同的分子结构和CD3结合剂,因此食蟹猴中功效的差异可能主要归因于相应的BCMA抗体。			
[0695] 为了证实IV注射后食蟹猴中表达BCMA的B细胞的消减是抗BCMA/抗CD3TCBcv抗体的机械药效学作用的结果,在IV注射后4天(96小时)和3周(336小时)在富集BCMA阳性细胞(即靶细胞)的骨髓中测量到活化的CD8 ⁺ 细胞毒性T细胞(即效应细胞)的增加。绝对CD8 ⁺ CD25 ⁺ 活化的T细胞计数是基于由血细胞分析仪获得的流式细胞术和WBC计数组成的双平台计算的			
[0696] 表24F:抗BCMA/抗CD3 TCBcv抗体的药效学效应:CD8 ⁺ CD25 ⁺ 活化的T细胞增加			
[0697]	IV 注射后时间 (小时)	相对于给药前, CD8 ⁺ CD25 ⁺ 活化的 T 细胞的增加(%)	
	96 小时	83A10-TCBcv 0.3 mg/kg (n=2)	42-TCBcv 0.1 mg/kg (n=2)
	336 小时	284 ± 244 %	585 ± 496 %
		-0.9 ± 1.3%	1449 ± 1715 %
[0698] 在单剂量IV注射后42-TCBcv和22-TCBcv比83A10-TCBcv更有效地诱导食蟹猴中的T细胞活化(参见表24F)。由于三种分子共享相同的分子结构和CD3结合剂,因此食蟹猴中药效学效应的差异可能主要归因于相应的BCMA抗体。结果表明,骨髓和血液中BCMA阳性B细胞的消减很可能是由抗BCMA/抗CD3 TCBcv抗体诱导的细胞毒性T细胞活化的结果。			
[0699] 实施例17:使用PBMC-人源化NOG小鼠在H929人骨髓瘤异种移植物模型中由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的抗肿瘤活性			
[0700] 具有长消除半衰期的含Fc的抗BCMA/抗CD3 TCBcv抗体可比基于(scFv) ₂ 的双特异性抗体(如按每周一次时间表以等摩尔剂量给予的BCMA50-BiT [®])更有效。在PBMC-人源化NOG小鼠的H929人骨髓瘤异种移植物模型中比较和评估83A10-TCBcv和BCMA50-BiT [®] (如WO2013072415和WO2013072406中所描述)的体内作用.NOG小鼠适于人源化小鼠模型,因为它们完全缺乏包括驻留NK细胞群体的免疫细胞,并且因此更容易许人异种细胞的肿瘤移植(Ito等人Curr Top Microbiol Immunol 2008;324:53-76)。简言之,在研究的第0天(d0),将在含有50:50基质胶(BD Biosciences,France)的100μL RPMI 1640培养基中的5x10 ⁶ 个人骨髓瘤细胞系NCI-H929(NCI-H929,ATCC® CRL-9068 TM)皮下(SC)注射到8-10周龄的免疫缺陷型NOD/Shi-scid IL2r γ (缺失)(NOG)雌性小鼠的右背侧腹中(Taconic,Ry,Danemark)。在H929肿瘤细胞SC植入之前二十四至72小时,所有小鼠接受用 γ -源(1.44Gy, ⁶⁰ Co,BioMep,Bretenières,France)全身照射。在第15天(d15),NOG小鼠接受			

单次腹膜内 (IP) 注射 2×10^7 个人PBMC (在 $500 \mu\text{L}$ pH 7.4的PBS 1X中)。通过免疫表型分析(流式细胞术)进行人PBMC的表征。然后使用Vivomanager®软件(Biosystemes, Couteron, France)将小鼠小心地随机分入不同的处理组和对照组($n=9$ 只/组),并进行统计学检验(方差分析)以测试组之间的同质性。抗体处理开始于第19天(d19),即SC注射H929肿瘤细胞后19天,当肿瘤体积在所有小鼠中达到至少 $100-150 \text{mm}^3$ 时,媒介物处理的对照组的平均肿瘤体积为 $300 \pm 161 \text{mm}^3$, 2.6nM/kg 对照-TCB处理组为 $315 \pm 148 \text{mm}^3$, 2.6nM/kg 83A10-TCBcv组为 $293 \pm 135 \text{mm}^3$,并且 2.6nM/kg BCMA50- (scFv)₂(BCMA50-BiT®)组为 $307 \pm 138 \text{mm}^3$ 。TCB抗体处理时间表是基于先前用83A10-TCBcv获得的药代动力学结果,并且包括每周一次IV施用达3周(即总计3次注射TCB抗体)。用人PBMC(d19)重建宿主小鼠后4天,经由尾静脉注射给予第一剂的抗BCMA/抗CD3 83A10-TCBcv抗体(2.6nM/kg ,对应地 0.5mg/kg)。在用83A10-TCBcv和对照-TCBcv处理的所有组的小鼠中在每次处理前1小时、在第二次处理前2小时和终止时通过颈静脉/下颌静脉穿刺(在麻醉下)收集血液样品。立即将血液样品转移到含有凝块活化剂的管(T MG管,樱桃红顶, Capiject®, Terumo®)中。将管在室温下放置30分钟以允许凝结。然后将管以 $1,300 \text{g}$ 离心5分钟以进行凝块/血清分离。制备血清等分试样,在液氮中快速冷冻并储存在-80直到进一步分析。在研究期间通过卡尺测量肿瘤体积(TV),并通过TV的组间比较评价进展。通过计算 $\text{TG} (\%) = 100 \times (\text{分析组的中值TV}) / (\text{对照媒介物处理组的中值TV})$ 来确定定义为TG(%)的肿瘤生长百分比。出于道德原因,当TV达到至少 2000mm^3 时,对小鼠实施安乐死。图15示出每个实验组的每只单独小鼠的TV:(A)对照组,包括媒介物对照(实线)和对照-TCB(虚线),(B) 83A10-TCBcv(2.6nM/kg)组和(C) BCMA50-BiT®(2.6nM/kg)。在83A10-TCBcv(2.6nM/kg)组中,9只小鼠中的6只(67%)的肿瘤消退甚至低于在d19(即第一次TCB处理)记录的TV,并且维持肿瘤消退直到研究终止。83A10-TCBcv(2.6nM/kg)处理组中未能显示肿瘤消退的3只小鼠在d19时的TV分别等于376、402和 522mm^3 。相比之下,以每周一次时间表用等摩尔剂量的BCMA50-BiT®(2.6nM/kg)处理3周的9只小鼠中没有一只(0%)的肿瘤在任何时间点消退。表25显示所有实验组中肿瘤体积随时间推移的进展。计算d19至d43的肿瘤生长百分比(TG),并在83A10-TCBcv(2.6nM/kg)组与BCMA50-BiT®(2.6nM/kg)之间进行比较(图16)。结果证明,TG(%)在83A10-TCBcv(2.6nM/kg)组中一致地且显著地降低,并且当与BCMA50-BiT®(2.6nM/kg)相比时TG(%)总是较低。表26显示第19至43天的中值肿瘤体积(TV)和肿瘤生长百分比(TG(%))。总体结果清楚地证明,当以每周一次时间表持续3周以等摩尔剂量给予处理时,83A10-TCBcv在体内诱导抗肿瘤活性方面优于BCMA50-BiT®。

[0701] 表25. 来自对照媒介物组的小鼠和用等摩尔剂量的对照-TCB、83A10-TCBcv和BCMA50- (scFv)₂(BCMA50-BiT®)处理的小鼠中肿瘤体积随时间推移的进展

肿瘤体 积(mm^3)	对照媒介物组 A										平均值	SD
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9			
[0702]	第 5 天	95	58	63	71	63	68	67	65	36	65	15
	第 8 天	70	61	71	70	56	68	74	70	49	66	8
	第 12 天	66	65	53	50	57	58	60	59	56	58	5
	第 15 天	101	95	131	80	61	65	89	37	161	91	37
	第 19 天	333	327	566	123	197	191	444	92	427	300	161
	第 23 天	565	481	1105	470	310	309	517	281	581	513	249
	第 27 天	1071	877	1989	823	560	675	1089	530	870	943	440
	第 30 天	1870	1129	x	419.2	867	1060	1368	673	1331	1090	450
	第 34 天	x	1653		507	1056	1521	1805	1008	2042	1370	535
	第 37 天		2140		2043	1309	2017	2394	1267	x	1862	464
	第 40 天		x		x	1592	x	x	1346		1469	174
	第 43 天				1548				1994		1771	314
	第 47 天				x				x			
	第 51 天											
[0703] 肿瘤体 2.6 nM/kg 对照 TCB 组 B												
积(mm^3)	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8.	B9	平均值	SD	
[0704]	第 5 天	68	65	84	83	46	63	73	74	67	69	11
	第 8 天	55	64	54	73	60	103	56	55	76	66	16
	第 12 天	45	92	73	76	83	78	103	69	76	77	16
	第 15 天	72	169	64	99	69	150	223	115	88	117	54
	第 19 天	257	334	71	318	268	460	602	236	285	315	148
	第 23 天	430	773	95	444	553	738	808	381	461	520	227
	第 27 天	924	1252	232	780	768	1009	915	606	630	791	289
	第 30 天	1191	1714	326	867	1230	1349	1118	817	783	1044	398
	第 34 天	1684	x	592	1466	1660	1954	1765	1180	576	1359	529
	第 37 天	2522		597	1735	1105	x	x	1402	861	1370	691
	第 40 天	x		978	2388	1952			2277	1365	1792	604
	第 43 天			1302	x	x			x	1895	1599	419
	第 47 天			2346						2373	2359	19
	第 51 天		x						x			

肿瘤体积(mm^3)	2.6 nM/kg 83A10-TCBcv 组 C									平均值	SD
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9		
第 5 天	78	79	55	77	53	47	39	53	60	60	15
第 8 天	69	37	67	75	62	59	59	77	75	64	12
第 12 天	58	61	60	69	48	59	46	63	87	61	12
第 15 天	136	41	61	138	48	57	76	71	217	94	58
第 19 天	376	151	238	522	154	133	377	287	402	293	135
第 23 天	656	322	375	847	311	249	642	395	681	498	210
第 27 天	1119	376	443	1400	253	253	678	371	1166	673	441
第 30 天	1607	187	260	1975	88	113	219	191	1590	692	783
第 34 天	2143	68	100	x	34	54	63	53	2429	618	1033
第 37 天	x	41	44		43	34	34	35	x	38	5
第 40 天		64	40		43	38	32	39		43	11
第 43 天		40	43		33	24	32	25		33	8
第 47 天		14	21		16	12	19	14		16	3
第 51 天		15	30		20	20	15	18		20	6

肿瘤体积(mm^3)	2.6 nM/kg BCMA50-(scFv) ₂ (BCMA50-BiTET®)组 D									平均值	SD
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9		
第 5 天	75	92	78	86	57	91	74	58	62	75	13
第 8 天	51	87	61	99	70	88	90	73	71	77	15
第 12 天	70	73	63	76	84	76	85	58	113	78	16
第 15 天	142	72	61	128	87	77	121	60	188	104	44
第 19 天	232	212	81	474	303	260	360	304	539	307	138
第 23 天	560	483	121	811	665	408	654	457	1115	586	278

第 27 天	827	879	216	1224	1092	732	886	908	1526	921	359
第 30 天	1026	1414	227	1476	1373	1256	1210	1228	2433	1294	567
第 34 天	1368	1855	418	2185	1734	1936	1465	1645	x	1576	535
第 37 天	1691	2754	599		2542		2102	2062		1958	765
第 40 天	2764	x	706		x		x	x		1735	1455
第 43 天	x		807							807	n/a
第 47 天			x								
第 51 天											

[0708] 表26. 第19至43天的中值肿瘤体积(TV)和肿瘤生长百分比(TG(%)) : 83A10-TCBcv 与BCMA50-BiTET®相比。

肿瘤生长抑制 TG _{inh} (%)	媒介物处理的对照		83A10-TCBcv 2.6 nM/kg		BCMA50-BiT® 2.6 nM/kg		对照-TCB 2.6 nM/kg		
	中值 TV	TG (%)	中值 TV	TG(%)	中值 TV	TG (%)	中值 TV	TG (%)	
[0709]	第 19 天	327	100	287	87.8	303	92.7	285	87.2
	第 23 天	481	100	395	82.1	560	116.4	461	95.8
	第 27 天	870	100	443	50.9	886	101.8	780	89.7
	第 30 天	1094.5	100	219	20.0	1256	114.8	1118	102.1
	第 34 天	1521	100	65.5	4.3	1689.5	111.1	1563	102.8
	第 37 天	2030	100	38	1.9	2082	102.6	1253.5	61.7
	第 40 天	1469	100	39.5	2.7	1735	118.1	1952	132.9
	第 43 天	1771	100	32.5	1.8	807	45.6	1598.5	90.3
	第 47 天	/	/	15	/	/	/	2359.5	/
	第 51 天	/	/	19	/	/	/	/	/

[0710] 实施例19:如通过流式细胞术测量的由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的在自体T细胞存在下,来自患有浆细胞白血病(PCL)的患者的外周血单核细胞或骨髓抽吸物的浆细胞的重定向的T细胞细胞毒性

[0711] 浆细胞白血病(PCL)是起源于新形成或临幊上预先存在的多发性骨髓瘤(MM)的骨髓瘤的白血病变体。目前可用的治疗相当有限,并且主要包括MM药物和化学疗法的组合。到目前为止,还没有明确注册这种高度侵袭性和致命疾病的疗法。BCMA在正常浆细胞的存活中起重要作用,并且抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体可用于患有所述疾病的患者的浆细胞白血病治疗。使用Ficoll或其它类似方法通过密度梯度分离来自浆细胞白血病患者的新鲜取得的外周血单核细胞(PBMC)(在高白细胞计数下含有>80%浆细胞)并与0.1pM至30nM的抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体浓度或对照抗体一起在37在潮湿的空气氛围中孵育24小时和48小时。来自浆细胞白血病患者的全骨髓抽吸物也可用作样品。每个剂量点一式三份进行。使用Diva软件(BD),通过FACSCalibur上的整个群体和CD138阳性细胞的膜联蛋白/碘化丙啶染色来确定细胞凋亡。使用流式细胞术(FACSCalibur;Becton Dickinson)通过碘化丙啶/CD138-FITC双重染色来研究浆细胞和PBMC全群体的活力。使用FACSDiva Software(Becton Dickinson)进行数据分析。平均值根据一式三份相应培养基对照(MC)的平均值进行标准化。对于统计分析,使用单侧t检验。参考培养基对照分别以百分比给出在10nM(IMAX10)的浓度下对PCL细胞生长的最大抑制和在1nM(IMAX1)下测量的抑制。还测量了与培养基对照相比,对照-TCB抗体(10或30nM)的最大抑制。使用R 3.1.19和Bioconductor 2.1310进行计算,但是用于计算IMAX值(Microsoft Excel®;Microsoft Office Professional 2013)。如果其相应的统计检验的P值<5%(*)<1%(**)或<0.1%(***) ,则认为作用是统计上显著的。还测量了来自浆细胞白血病患者样品的PBMC CD138⁺浆细胞上的BCMA表达,并且测定了效应细胞与肿瘤细胞(E:T)比率。如图20所示,结果清楚地表明,与培养基对照相比,在两份浆细胞白血病患者样品中,在使用42-TCBcv的情况下活骨髓浆细胞白血病细胞显著减少(即骨髓浆细胞白血病细胞更多溶解)。表27显示相对于培养基对照,来自由10nM(IMAX10)和1nM(IMAX1)抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的患者骨髓抽吸物或外周血的浆细胞白血病细胞的最大抑制百分比。结果表明42-TCBcv非常有

效地诱导患者骨髓浆细胞白血病细胞的杀死。尽管由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导并在骨髓样品(PCL患者1)中观察到的骨髓浆细胞白血病细胞的特异性溶解,但骨髓微环境(BMME)在相应样品中未受影响(数据未示出)。

[0712] 通过使用EM901杀死PCL患者中的恶性浆细胞是有效的。但至少在以10nM的最高浓度测试的两个患者样品中的一个中,杀死仅略高于50%。使用EM901与沙利度胺或PD-1或PD-L1抗体或抗CD38抗体的组合的实验将显示此类组合的潜在益处,例如,在例如EM901的10nM或其它浓度下杀死%更高

[0713] 表27.基于在抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体存在下来自患者骨髓抽吸物的碘化丙啶阴性的活浆细胞白血病细胞,关于在10nM(IMAX10)下浆细胞白血病浆细胞生长的最大抑制和在1nM(IMAX1)下的抑制的IMAX10和IMAX1值。

患者样品编号	42-TCBcv		Ctrl-TCB
	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	IMAX10 (%)
1	99.6	88.2	-2.7
2	约 60.0	约 40.0	约 8.0

[0714] [0715] 实施例20:如通过流式细胞术测量的由抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体诱导的在自体T细胞存在下来自AL淀粉样变性患者的骨髓浆细胞的重定向的T细胞细胞毒性

[0716] AL淀粉样变性是由骨髓病症引起的罕见疾病,其通常影响50-80岁的人并且三分之二的患者是男性。AL淀粉样变性通过浆细胞异常产生抗体/免疫球蛋白反映。在AL淀粉样变性中,抗体的轻链(LC)错误折叠,并且异常LC错误折叠蛋白质结果是淀粉样蛋白的形成。这些错误折叠的淀粉样蛋白沉积在组织、神经和器官中和周围。当淀粉样蛋白在器官、神经或组织中累积时,它逐渐引起损伤并影响它们的功能。AL淀粉样变性患者通常具有多于一个器官受影响。由于BCMA在正常浆细胞的存活中起重要作用,因此评价抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体在杀死AL淀粉样变性中的浆细胞中的作用是非常合理的。使新鲜取得的AL淀粉样变性患者全骨髓样品/抽吸物直接暴露于抗BCMA/抗CD3 TCB抗体或用CD138磁性微珠(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)染色,通过autoMACS细胞分离柱,并且收集具有通常>4%的足够剩余数量的AL淀粉样变性浆细胞的分级用于进一步实验。在24孔板中,孵育500,000个细胞/孔并培养48小时。将抗BCMA/抗CD3 TCB抗体和对照抗体稀释液添加至相应孔中,最终TCB浓度为0.1pM至30nM。每个剂量点一式三份进行。使用流式细胞术(FACSCalibur;Becton Dickinson)通过碘化丙啶/CD138-FITC双重染色研究浆细胞和骨髓微环境细胞的活力。使用FACSDiva Software (Becton Dickinson)进行数据分析。此外,还在相同的实验设置中测试EM901与沙利度胺或抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体或抗CD38抗体的组合。将测试各种浓度的EM901以及组合配偶体。

[0717] 平均值根据一式三份相应培养基对照(MC)的平均值进行标准化。对于统计分析,使用单侧t检验。参考培养基对照分别以百分比给出在10nM(IMAX10)的浓度下对PCL细胞生长的最大抑制和在1nM(IMAX1)下测量的抑制。还测量了与培养基对照相比,对照-TCB抗体(10或30nM)的最大抑制。从组合获得的结果也确定相同的值,例如,在x nM的例如来那度胺等存在下在例如10nM EM9091下的最大抑制。使用R 3.1.19和Bioconductor 2.1310进行计算,但是用于计算IMAX值(Microsoft Excel®;Microsoft Office Professional 2013)。如果其相应的统计检验的P值<5% (*)、<1% (**) 或<0.1% (***) ,则认为作用是统计上显著

的。还测量了来自AL淀粉样变性患者样品的骨髓CD138⁺浆细胞上的BCMA表达，并且测定了效应细胞与肿瘤细胞(E:T)比率。

[0718] 实施例21：抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体与免疫治疗药物的组合使用

[0719] 将抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体(即83A10-TCBcv或42-TCBcv)与代表不同类型的免疫疗法的三种药物组合：来那度胺、抗PD-1抗体和抗CD38抗体达雷木单抗。将H929 MM细胞与来自健康供体(n=1或5)的人白细胞在补充有10%FBS、0.5%庆大霉素和1%L-谷氨酰胺的RPMI-1640培养基中在37℃湿润的5%CO₂孵育箱中共培养，并且激发至次优浓度的单独83A10-TCBcv(10pM)(n=5)或42-TCBcv(10pM)(n=1)，或与来那度胺(1μM)、抗PD-1抗体(10μg/ml)和抗CD38抗体达雷木单抗(10μg/ml)组合。如图21A所示，将83A10-TCBcv与来那度胺或达雷木单抗组合使它们的抗MM功效分别显著增加4倍和2.5倍。图21B和表28显示当来自一个健康供体的H929细胞和白细胞暴露于42-TCBcv(10pM)与来那度胺(1μM)、抗PD-1抗体(10μg/ml)和抗CD38抗体达雷木单抗(10μg/ml)的组合持续48小时培养时MM细胞溶解的百分比。将42-TCBcv与来那度胺或达雷木单抗组合也使它们的杀死MM细胞系的抗MM功效增加。

[0720] 表28. 单独或与来那度胺、抗PD-1抗体或抗CD38抗体达雷木单抗组合使用抗BCMA/抗CD3 TCB情况下的MM细胞溶解：供体1的实施例。

供体 1		
单独 42-TCBcv (10 pM)	6.74%	
42-TCBcv 的组合：	无 TCB	具有 TCB
达雷木单抗(10 μg/ml)	33.06%	42.29%
来那度胺(1 μM)	-1.78%	13.27%
抗 PD-1	20.26%	23.56%

[0721] [0722] 实施例22：抗BCMA/抗CD3 T细胞双特异性抗体与抗PD-1或抗PD-L1抗体的体内组合使用

[0723] 抗BCMA/抗CD3 TCB与阻断PD-1/PD-L1途径(抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)并抑制在PD-L1与T细胞上的其受体PD-1接合后T细胞应答的下调的抗体的相加或协同组合可在体内环境如MM异种移植物模型或MM小鼠模型中而不是体外最佳地观察到。简言之，在研究的第0天(d0)，将在含有50:50基质胶(BD Biosciences)的100μL RPMI 1640培养基中的5x10⁶个人骨髓瘤细胞系NCI-H929(NCI-H929, ATCC® CRL-9068™)皮下(SC)注射到8-10周龄的免疫缺陷型NOD/Shi-scid IL2r γ(缺失)(NOG)雌性小鼠的右背侧腹中(Taconic, Ry, Denmark)。在第15天(d15)，NOG小鼠接受单次腹膜内(IP)注射2x10⁷个人PBMC(在500μL pH 7.4的PBS 1X中)。通过免疫表型分析(流式细胞术)进行人PBMC的表征。然后将小鼠小心地随机分入不同的处理组和对照组(n=9只/组)，并进行统计检验(方差分析)以测试组之间的同质性。当肿瘤体积在所有小鼠中达到至少100-150mm³时，抗体处理在第19天(d19)开始，即SC注射H929肿瘤细胞后19天。TCB抗体处理时间表是基于先前用抗BCMA/抗CD3 TCB获得的药代动力学结果，并且包括每周一次IV施用达3周(即总计3次注射TCB抗体)。用人PBMC(d19)重建宿主小鼠后2至4天，经由尾静脉注射单独或与每周一次(剂量1至10mg/kg)给予的抗PD-L1抗体组合给予抗BCMA/抗CD3抗体的第一每周剂量(剂量0.1至0.5mg/kg)。在研究期间通过卡尺测量肿瘤体积(TV)，并通过TV的组间比较评价进展。通过计算TG(%) =

100x(分析组的中值TV) / (对照媒介物处理组的中值TV) 来确定定义为TG(%) 的肿瘤生长百分比。

序列表

<110> ENGMAB SARL

<120> 组合用于治疗多发性骨髓瘤的针对 BCMA 和 CD3 的双特异性抗体和免疫药物

<130> P48249W0

<150> EP16196874.8

<151> 2016-11-02

<160> 57

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 1

Thr Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 2

[0001] <211> 19

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 2

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 3

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 4

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1	5	10
---	---	----

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 5
 Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 6
 Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
 1 5

<210> 7
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

[0002] <400> 7
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 8
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 8
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

<210> 9

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 可变区 VH

<400> 9

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 [0003] 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 可变区 VH

<400> 10

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn

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

<210> 11

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 可变区 VL 83A10

<400> 11

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
15		

[0004] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

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

<210> 12

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 可变区 VL

<400> 12

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
15		

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Glu Tyr		
20	25	30

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

<210> 13

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 可变区 VL Mab22

<400> 13

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 [0005] 35 40 45
 Ile Ser Gly Ala Gly Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 14

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 可变区 VL Mab42

<400> 14

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

50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ala Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>
 <223> 83A10 CDR1H

<400> 15
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

[0006] <220>
 <223> 83A10 CDR2H

<400> 16
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>
 <223> CDRH3

<400> 17
 Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> 83A10 CDR1L

<400> 18

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

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> 83A10 CDR2L

<400> 19

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

[0007] <220>

<223> CDRL3

<400> 20

Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Asp Phe Thr
1 5 10

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CDR1H

<400> 21

Asp Asn Ala Met Gly
1 5

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CDR2H

<400> 22

Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Mab21 CDR1L

<400> 23

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

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Mab21 CDR2L

[0008]

<400> 24

Glu His Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Mab22 CDR1L

<400> 25

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

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Mab22 CDR2L

<400> 26

Ser Gly Ala Gly Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Mab42 CDR1L

<400> 27
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Glu Tyr Leu Ser Trp
1 5 10

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Mab42 CDR2L

<400> 28
[0009] His Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Mab27 CDR1H

<400> 29
Ser Ala Pro Met Gly
1 5

<210> 30
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Mab27 CDR2H

<400> 30
Ala Ile Ser Tyr Ile Gly His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CDR1L

<400> 31

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Glu Tyr Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CDR2L

<400> 32

His Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

[0010] <210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CDR3L

<400> 33

Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Asp Phe Thr

1 5 10

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Mab33 CDR1H

<400> 34

Thr Asn Ala Met Gly

1 5

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Mab33 CDR2H

<400> 35

Ala Ile Asn Arg Phe Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Mab39 CDR1H

<400> 36

Gln Asn Ala Met Gly

1 5

[0011] <210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Mab39 CDR2H

<400> 37

Ala Ile Ser Pro Thr Gly Phe Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 38

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Mab27 VH

<400> 38

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ala

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

<210> 39

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Mab33 VH

<400> 39

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
15		

[0012] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Tyr Thr Asn

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

<210> 40

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Mab39 VH

<400> 40

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
15		

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

<210> 41

<211> 103

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CH1 结构域

<400> 41

[0013] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 100

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL 结构域

<400> 42

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg
 1 5 10 15
 Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

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

<210> 43

<211> 103

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD3 CH1

<400> 43

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

[0014] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 100

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD3 CL

<400> 44

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

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 45

<211> 671

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 83A10 钮 HC

<400> 45

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0015] 50 55 60Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu
 180 185 190Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly
 210 215 220Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu
 225 230 235 240Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr
 245 250 255

Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro

	260	265	270
Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro			
275	280	285	
Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala			
290	295	300	
Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys			
305	310	315	320
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu			
325	330	335	
Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu			
340	345	350	
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys			
355	360	365	
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
370	375	380	
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
385	390	395	400
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
405	410	415	
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
420	425	430	
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
435	440	445	
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val			
450	455	460	
[0016] Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
465	470	475	480
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
485	490	495	
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
500	505	510	
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
515	520	525	
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
530	535	540	
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile			
545	550	555	560
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro			
565	570	575	
Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu			
580	585	590	
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn			
595	600	605	
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser			
610	615	620	
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg			
625	630	635	640
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu			
645	650	655	
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
660	665	670	

<210> 46
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 83A10 孔 HC

<400> 46
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 [0017] Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325	330	335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro		
340	345	350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val		
355	360	365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395
Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
405	410	415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
420	425	430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445
<210> 47		
<211> 216		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		

<220>
<223> 83A10 LC

<400> 47

[0018] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 48
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> CD3 LC

<400> 48

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0019] 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val
 115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 49
 <211> 671
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> Mab21 钮 HC

<400> 49

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

[0020] Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly
 210 215 220

Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu
 225 230 235 240

Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr
 245 250 255

Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro
 260 265 270

Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
 275 280 285

Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala
 290 295 300

Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys
 305 310 315 320

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 325 330 335

Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 340 345 350

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 370 375 380

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 385 390 395 400

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 405 410 415
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 420 425 430
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 435 440 445
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 450 455 460
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 465 470 475 480
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 485 490 495
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 500 505 510
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 515 520 525
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 530 535 540
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 545 550 555 560
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 565 570 575
 Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
 580 585 590
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 [0021] 595 600 605
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 610 615 620
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 625 630 635 640
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 645 650 655
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 660 665 670

<210> 50
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> Mab21 孔 HC

<400> 50
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
	65	70	75
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
	85	90	95
	Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
	100	105	110
	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		
	115	120	125
	Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu		
	130	135	140
	Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
	145	150	155
	Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		160
	165	170	175
	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu		
	180	185	190
	Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
	195	200	205
	Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
	210	215	220
	Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe		
	225	230	235
	Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
	245	250	255
[0022]	Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
	260	265	270
	Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
	275	280	285
	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
	290	295	300
	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
	305	310	315
	Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
	325	330	335
	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro		
	340	345	350
	Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val		
	355	360	365
	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
	370	375	380
	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
	385	390	395
	Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
	405	410	415
	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
	420	425	430
	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	435	440	445

<210> 51

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Mab21 LC

<400> 51

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Glu Tyr
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Glu His Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
 85 90 95

Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys
 115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140

[0023] Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 52

<211> 671

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Mab22 钮 HC

<400> 52

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

	35	40	45
Ser Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
100	105	110	
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala			
115	120	125	
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu			
130	135	140	
Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly			
145	150	155	160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
165	170	175	
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
180	185	190	
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr			
195	200	205	
Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly			
210	215	220	
Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu			
225	230	235	240
[0024] Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr			
245	250	255	
Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro			
260	265	270	
Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro			
275	280	285	
Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala			
290	295	300	
Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys			
305	310	315	320
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu			
325	330	335	
Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu			
340	345	350	
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys			
355	360	365	
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
370	375	380	
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
385	390	395	400
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
405	410	415	
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
420	425	430	
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
435	440	445	

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 450 455 460
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 465 470 475 480
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 485 490 495
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 500 505 510
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 515 520 525
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 530 535 540
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 545 550 555 560
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 565 570 575
 Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
 580 585 590
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 595 600 605
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 610 615 620
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 625 630 635 640
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 645 650 655
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 660 665 670

[0025]

<210> 53
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> Mab22 孔 HC

<400> 53
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

	100	105	110
	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		
	115	120	125
	Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu		
	130	135	140
	Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
	145	150	155
	Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
	165	170	175
	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu		
	180	185	190
	Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
	195	200	205
	Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
	210	215	220
	Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe		
	225	230	235
	Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
	245	250	255
	Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
	260	265	270
	Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
	275	280	285
	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
	290	295	300
[0026]	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
	305	310	315
	Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
	325	330	335
	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro		
	340	345	350
	Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val		
	355	360	365
	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
	370	375	380
	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
	385	390	395
	Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
	405	410	415
	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
	420	425	430
	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	435	440	445

<210> 54

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Mab22 LC

<400> 54

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Ser Gly Ala Gly Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
 85 90 95

Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys
 115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140

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

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

[0027]

<210> 55

<211> 671

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Mab42 钮 HC

<400> 55

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

	85	90	95
Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
100	105	110	
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala			
115	120	125	
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu			
130	135	140	
Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly			
145	150	155	160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
165	170	175	
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu			
180	185	190	
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr			
195	200	205	
Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly			
210	215	220	
Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu			
225	230	235	240
Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr			
245	250	255	
Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro			
260	265	270	
Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro			
275	280	285	
[0028] Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala			
290	295	300	
Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys			
305	310	315	320
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu			
325	330	335	
Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu			
340	345	350	
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys			
355	360	365	
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
370	375	380	
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
385	390	395	400
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
405	410	415	
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
420	425	430	
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
435	440	445	
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val			
450	455	460	
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
465	470	475	480
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
485	490	495	

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 500 505 510
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 515 520 525
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 530 535 540
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 545 550 555 560
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 565 570 575
 Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
 580 585 590
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 595 600 605
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 610 615 620
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 625 630 635 640
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 645 650 655
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 660 665 670

<210> 56

<211> 446

[0029] <212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Mab42 孔 HC

<400> 56

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

145	150	155	160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
165	170	175	
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
180	185	190	
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr			
195	200	205	
Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr			
210	215	220	
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe			
225	230	235	240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro			
245	250	255	
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val			
260	265	270	
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr			
275	280	285	
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val			
290	295	300	
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys			
305	310	315	320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser			
325	330	335	
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro			
340	345	350	
[0030] Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val			
355	360	365	
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly			
370	375	380	
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp			
385	390	395	400
Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp			
405	410	415	
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His			
420	425	430	
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
435	440	445	

<210> 57

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Mab42 LC

<400> 57

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Glu			
20	25	30	

Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile His Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ala Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys
 115 120 125
 [0031] Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

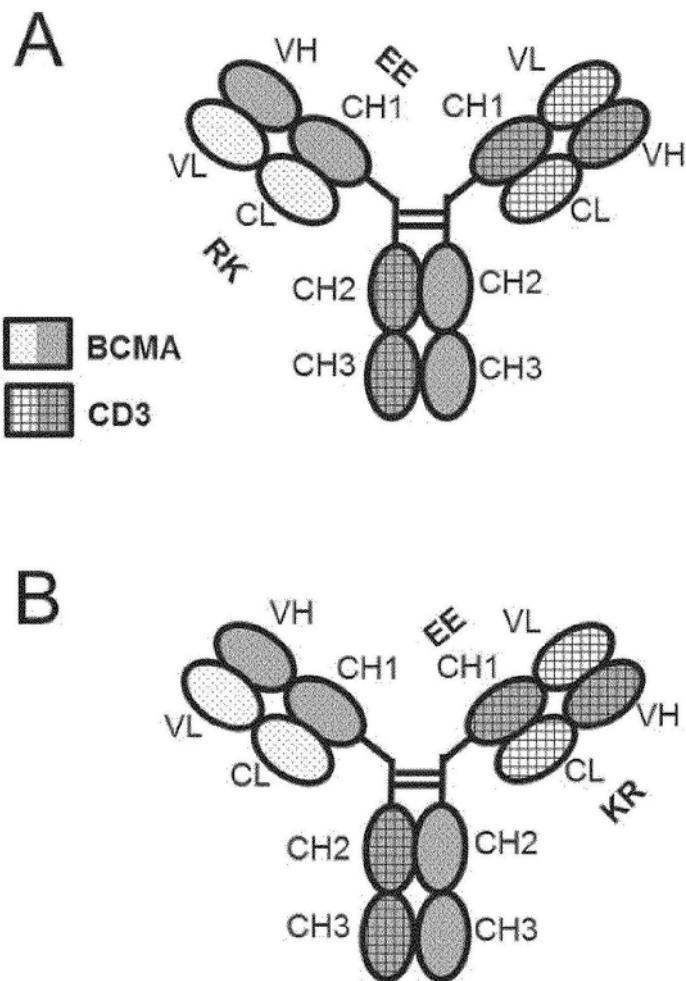


图1

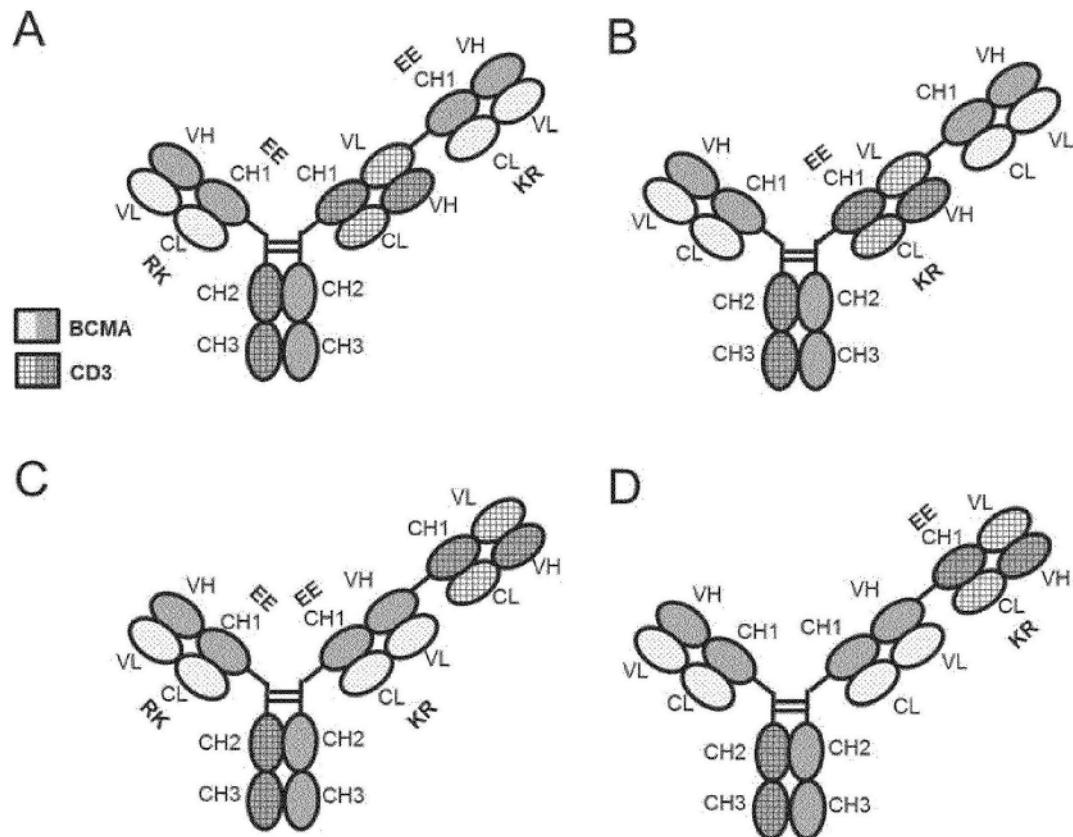


图2

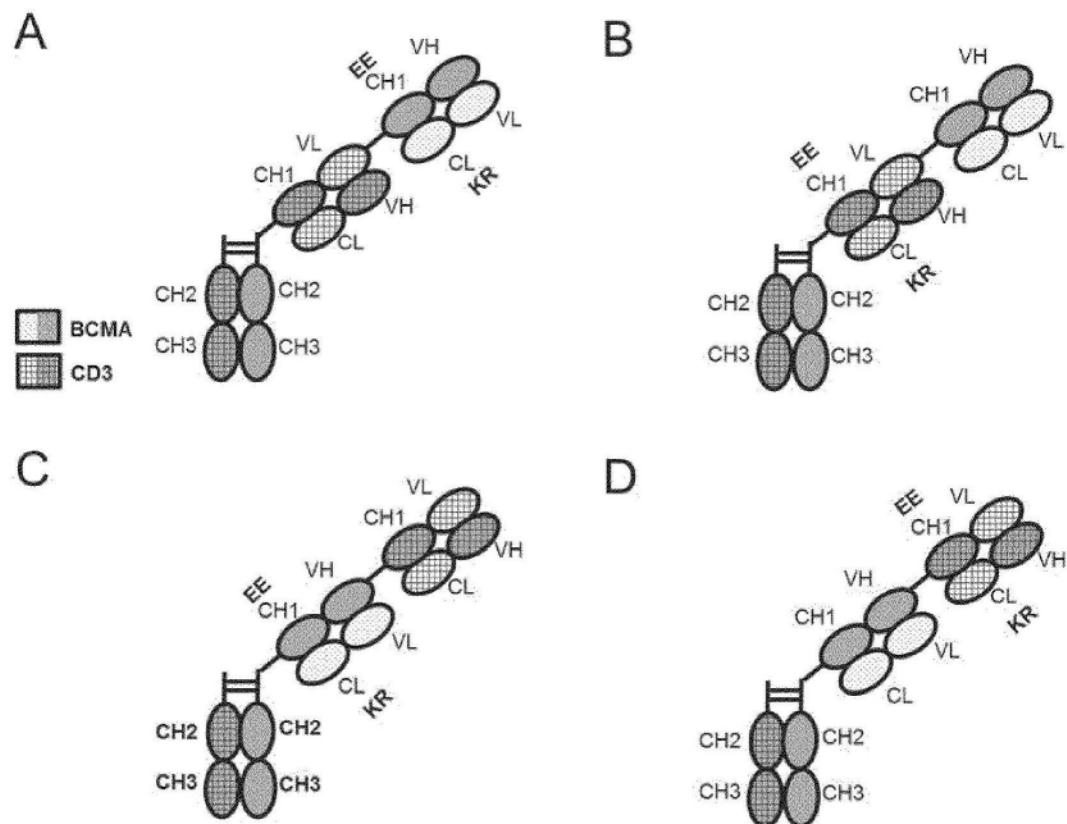


图3

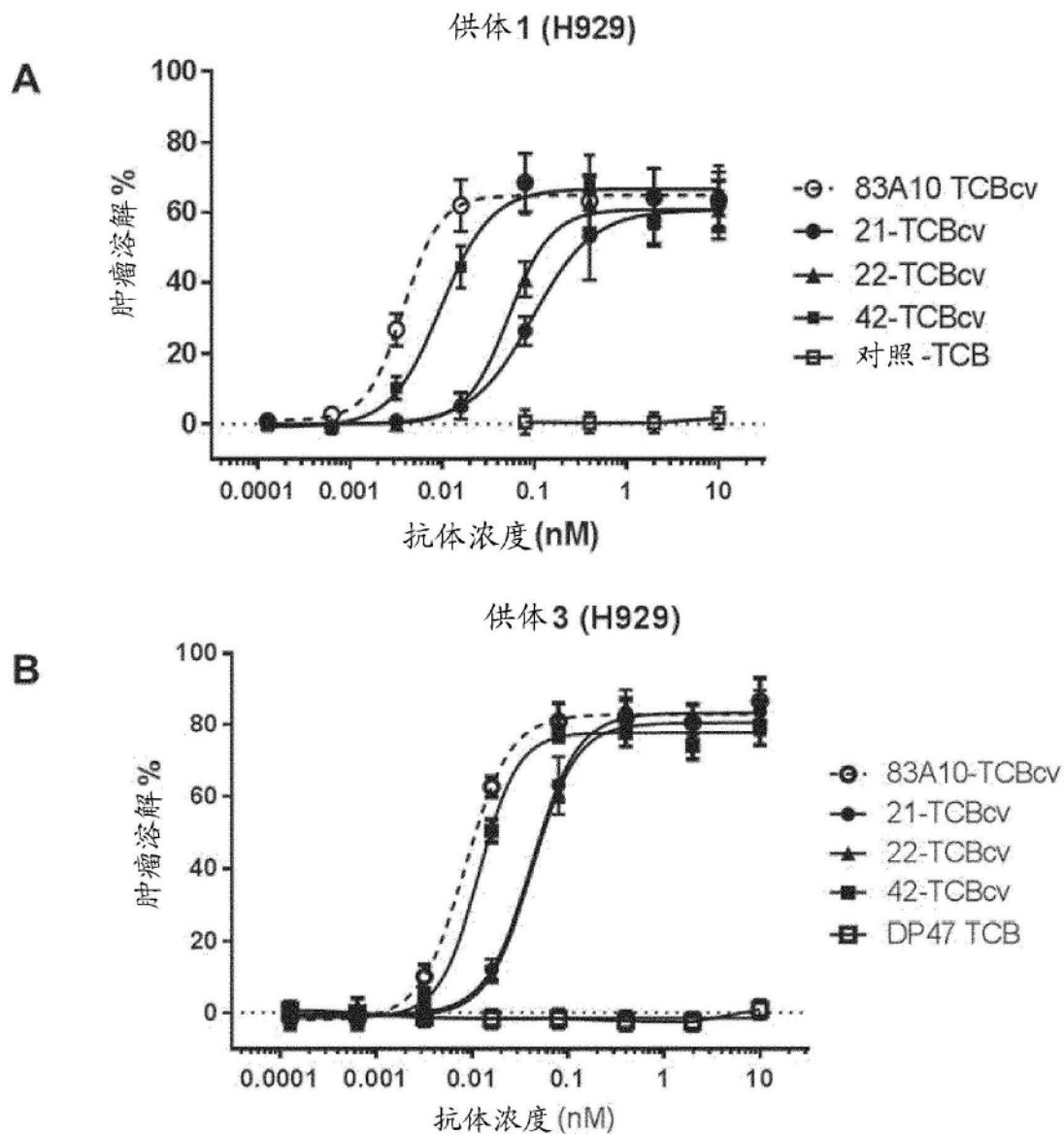


图4

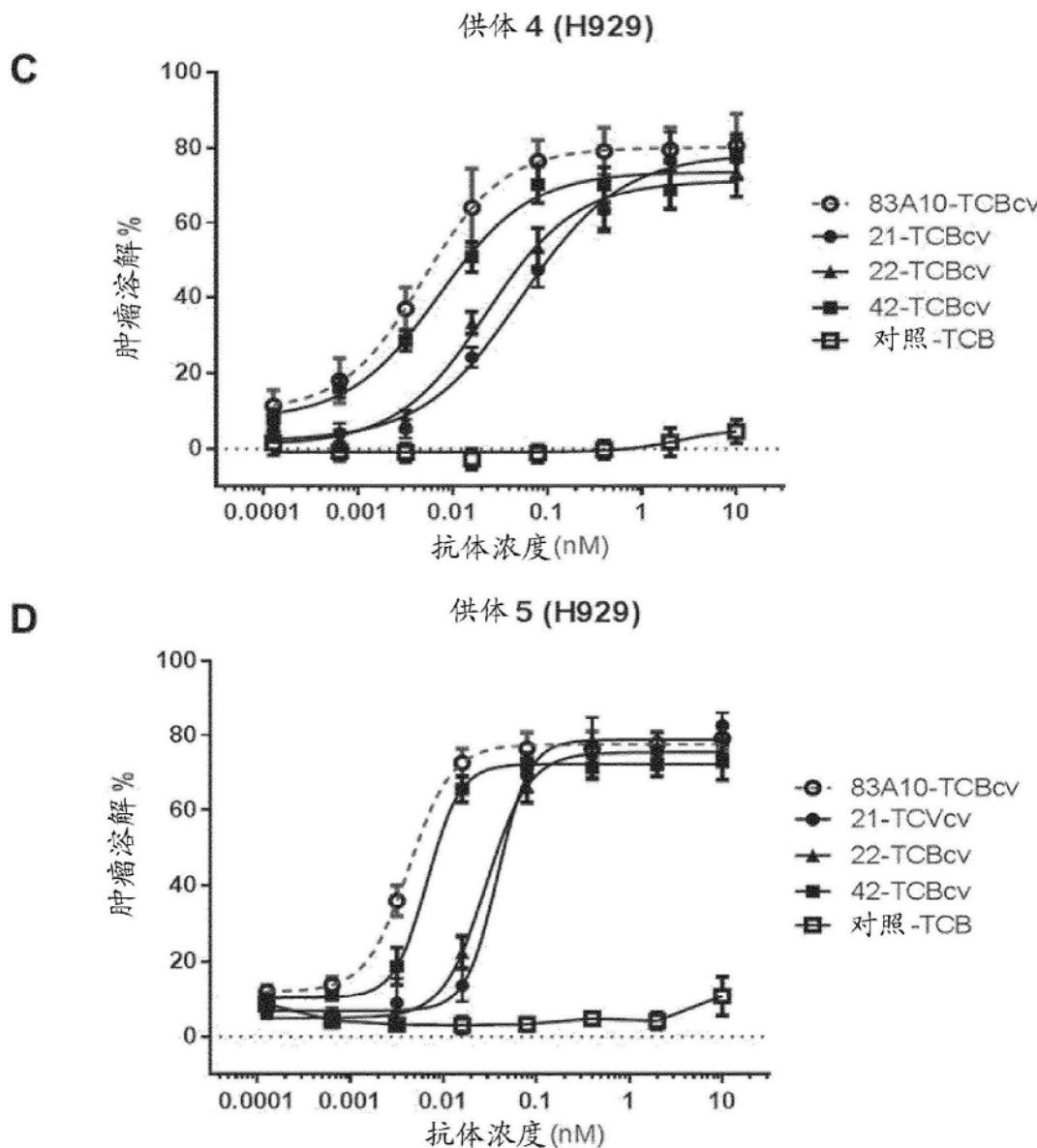


图4(续)

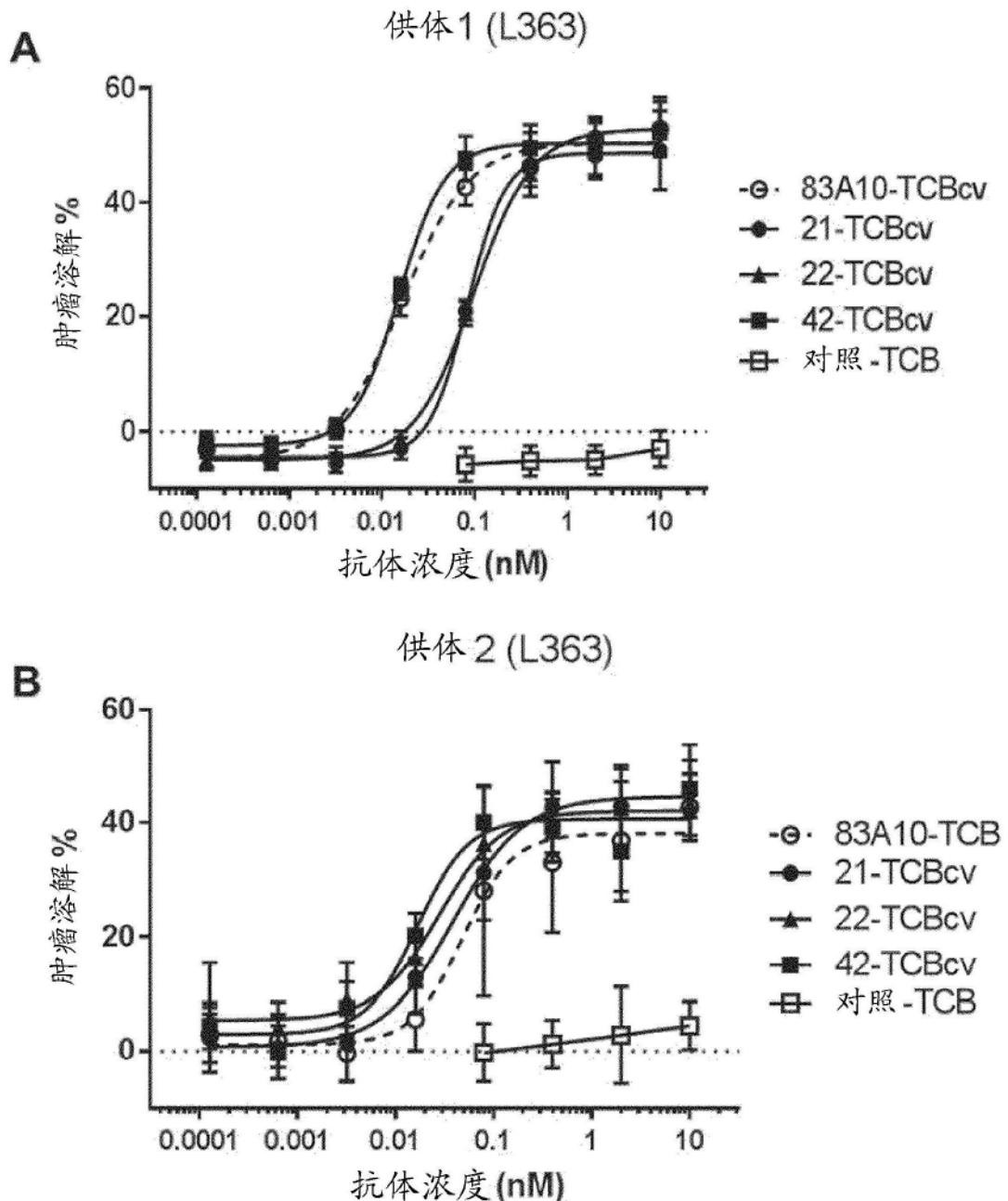


图5

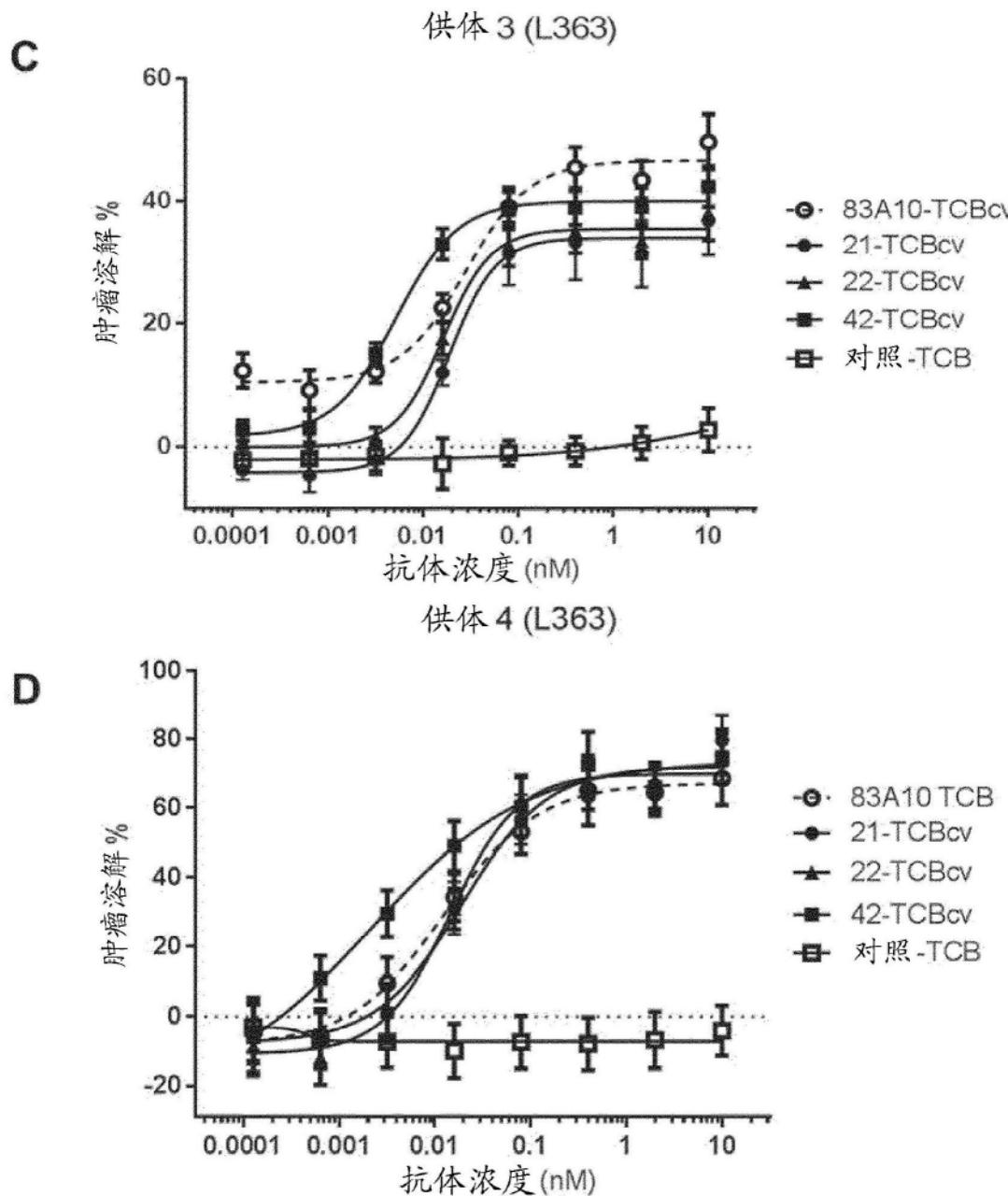


图5(续)

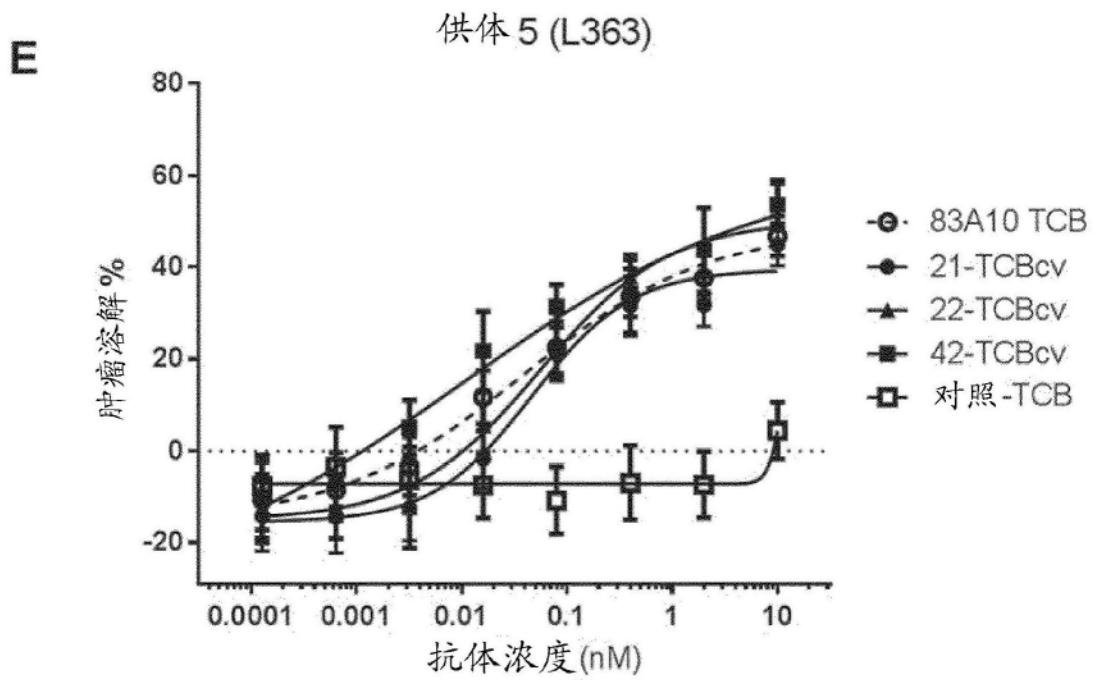


图5 (续)

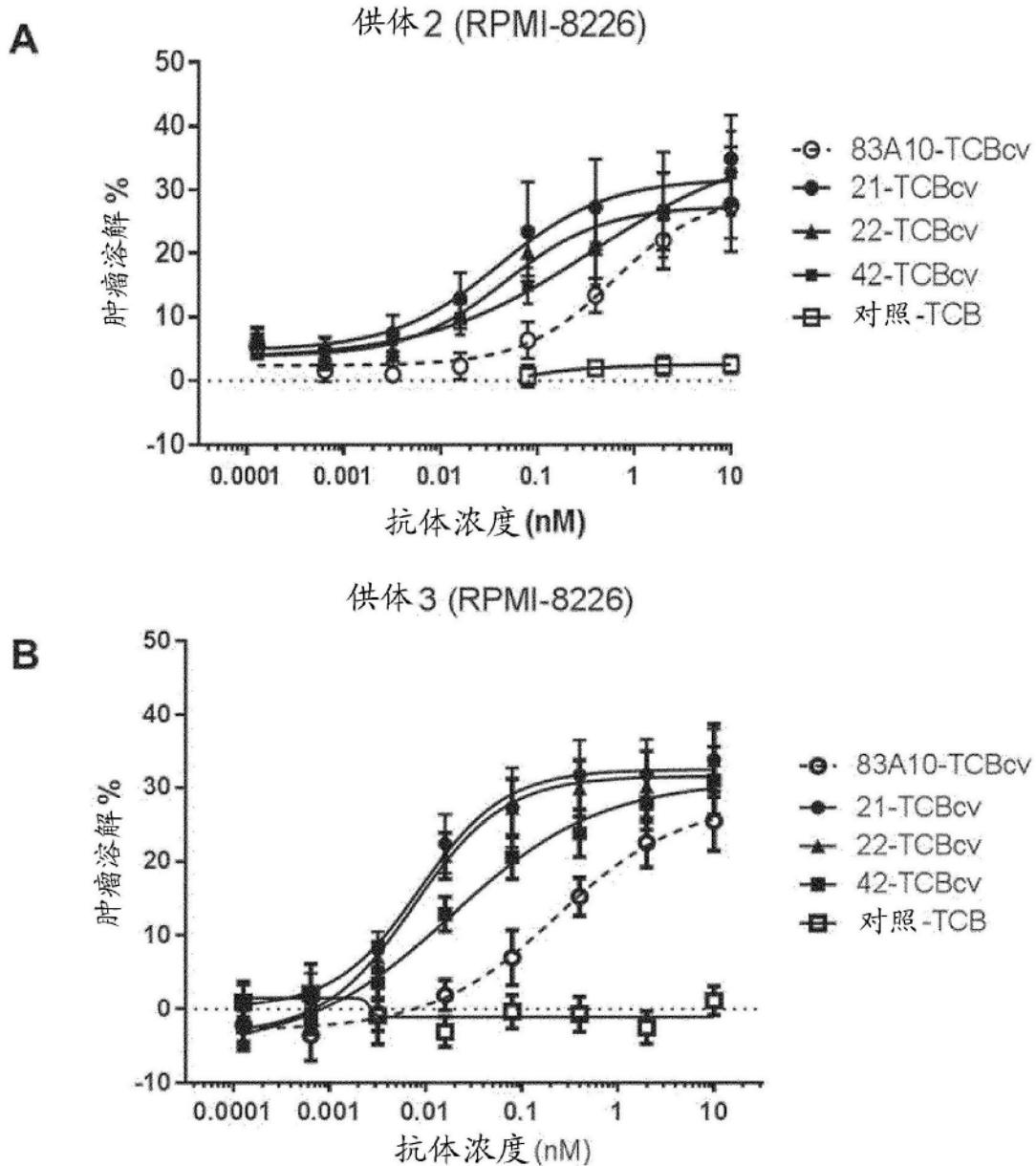
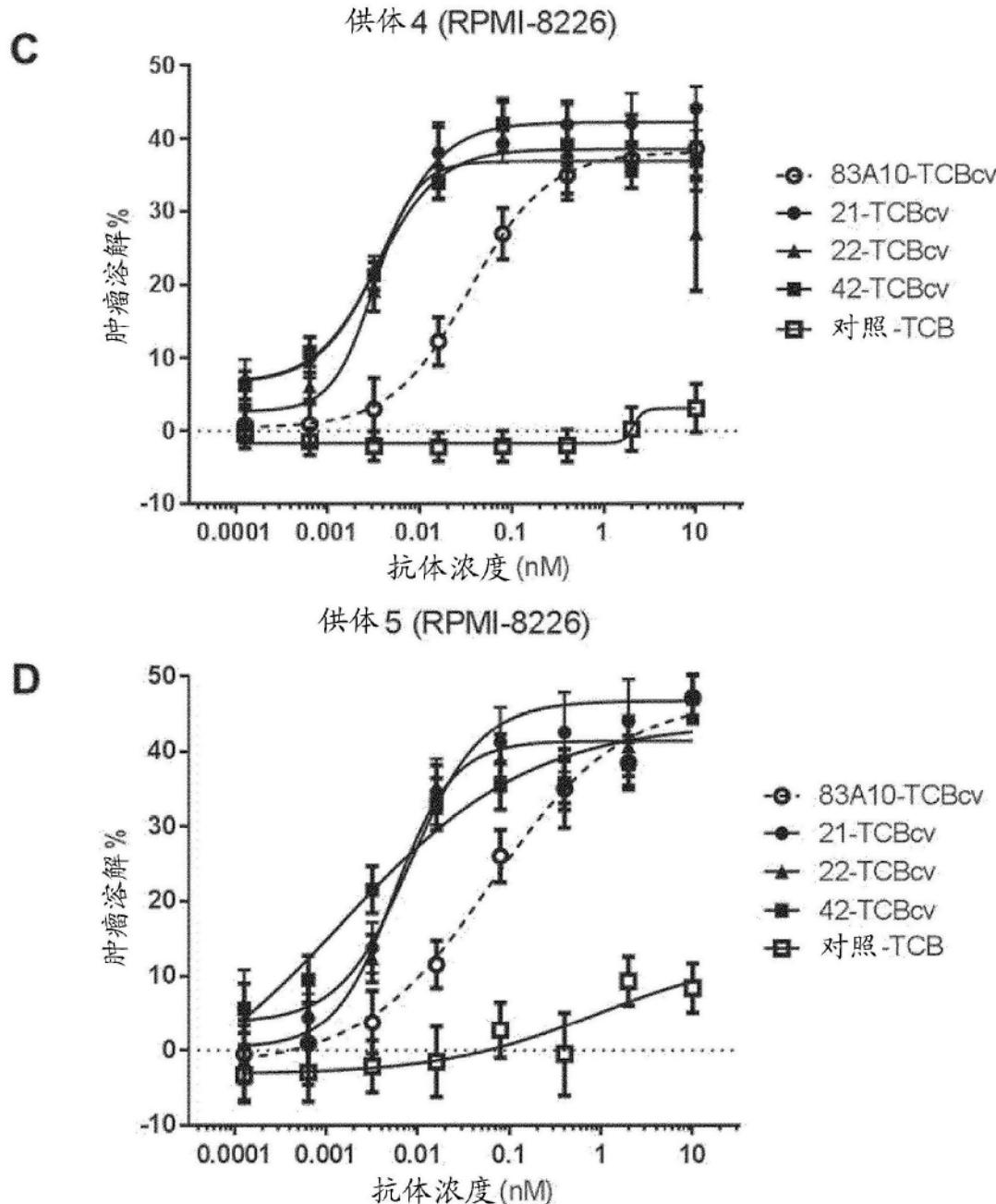


图6



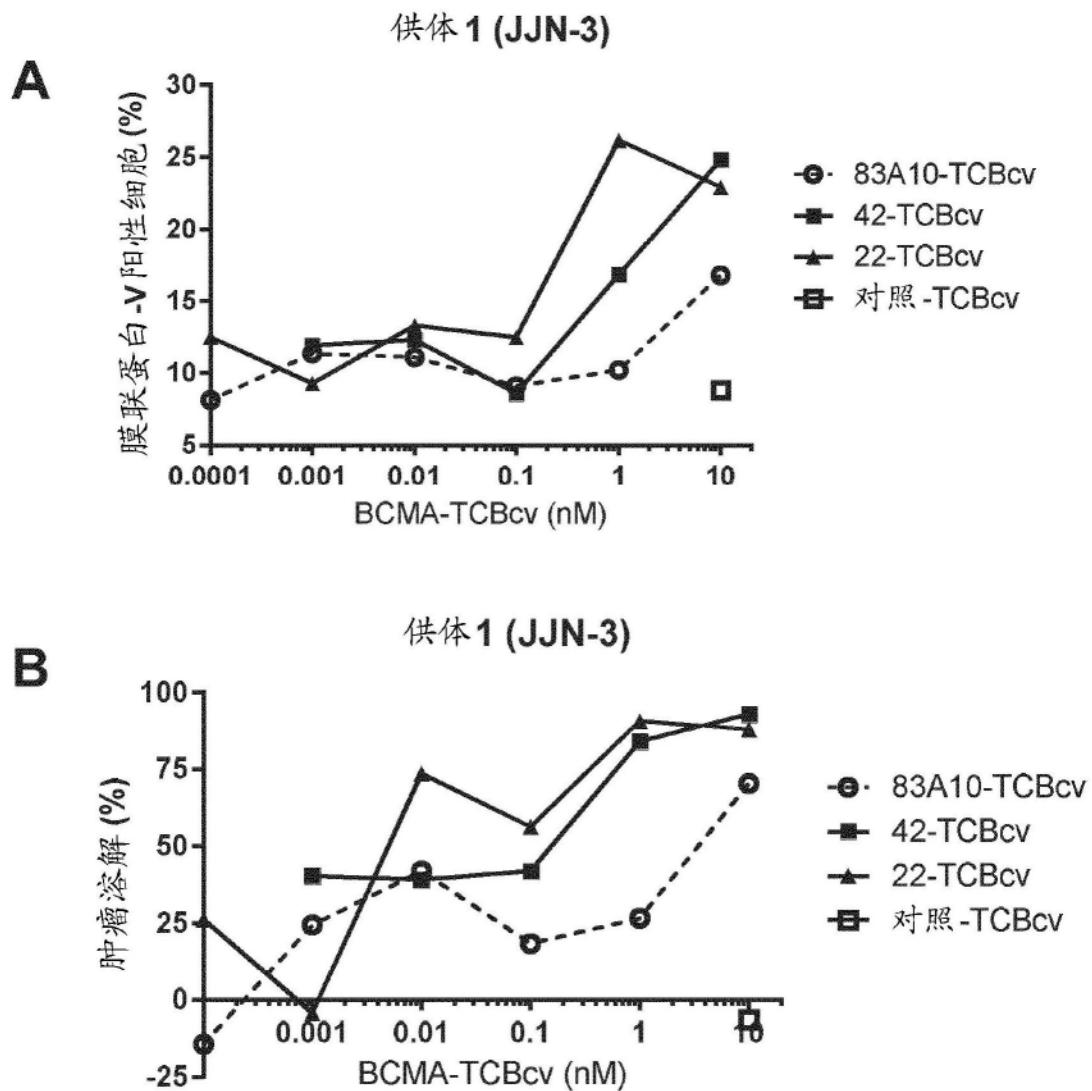
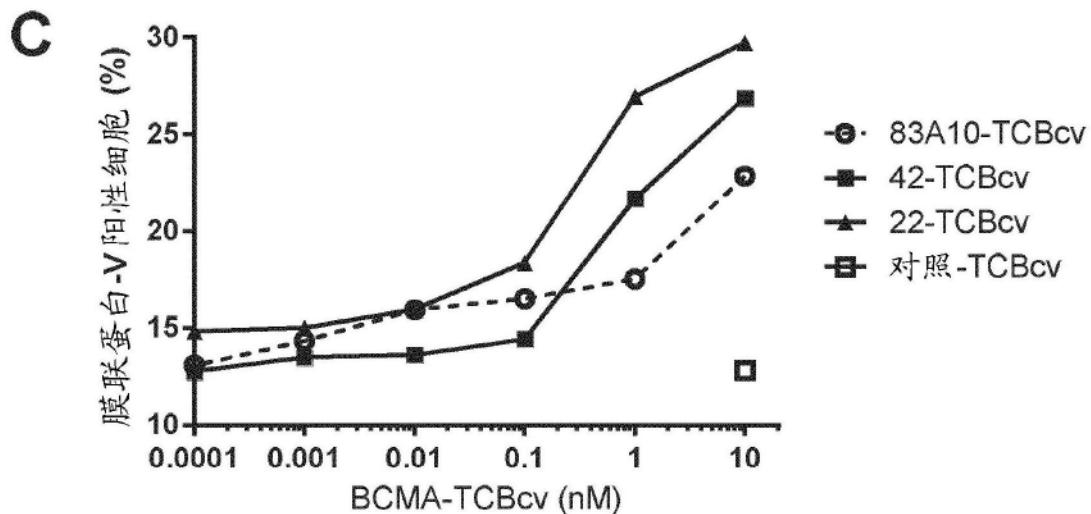


图7

供体 2 (JJN-3)



供体 2 (JJN-3)

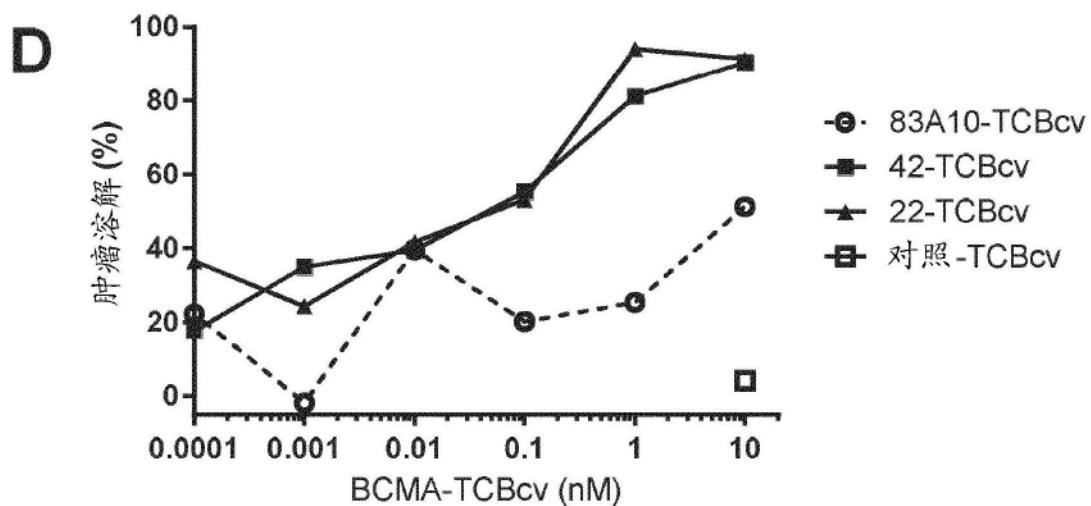


图7 (续)

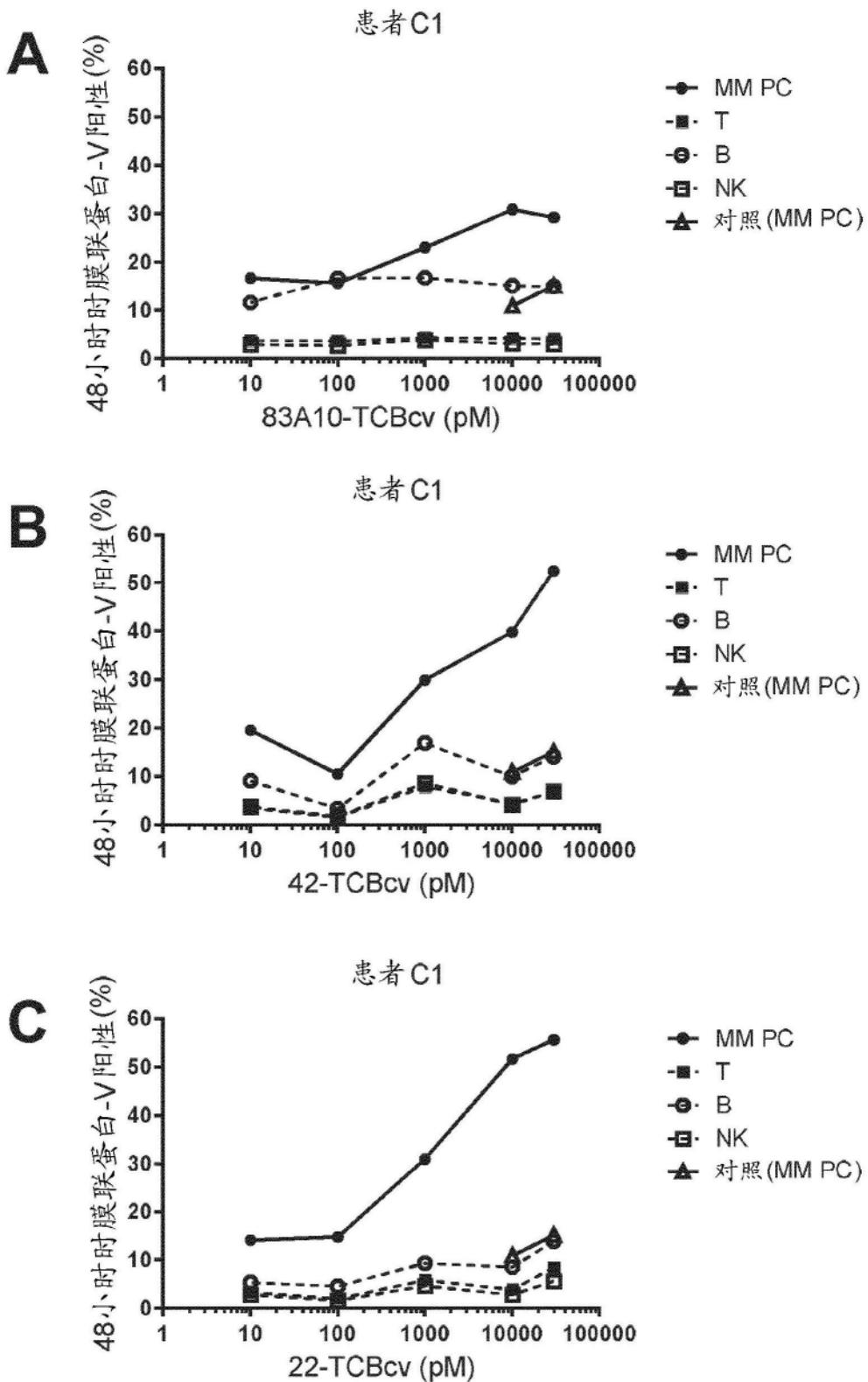
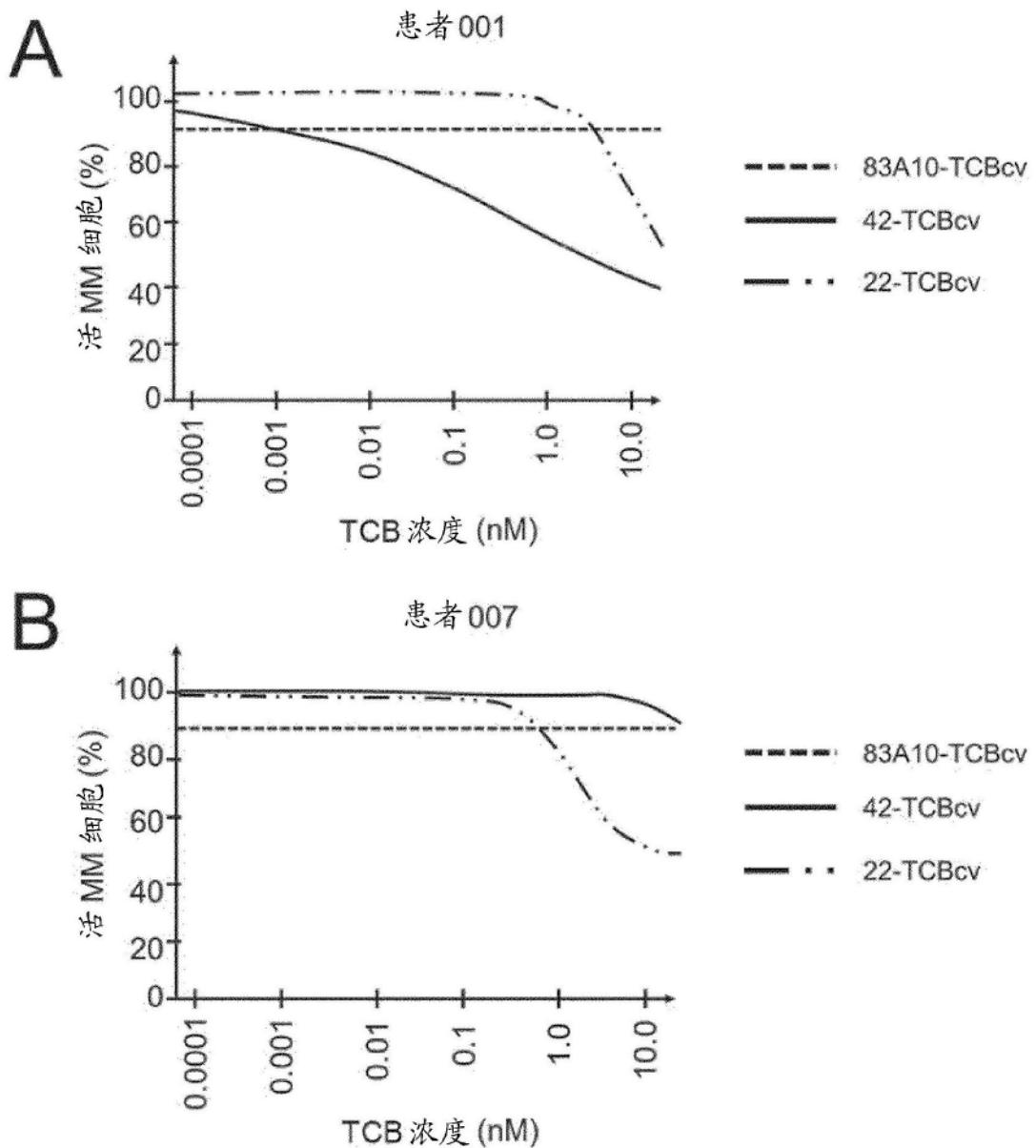
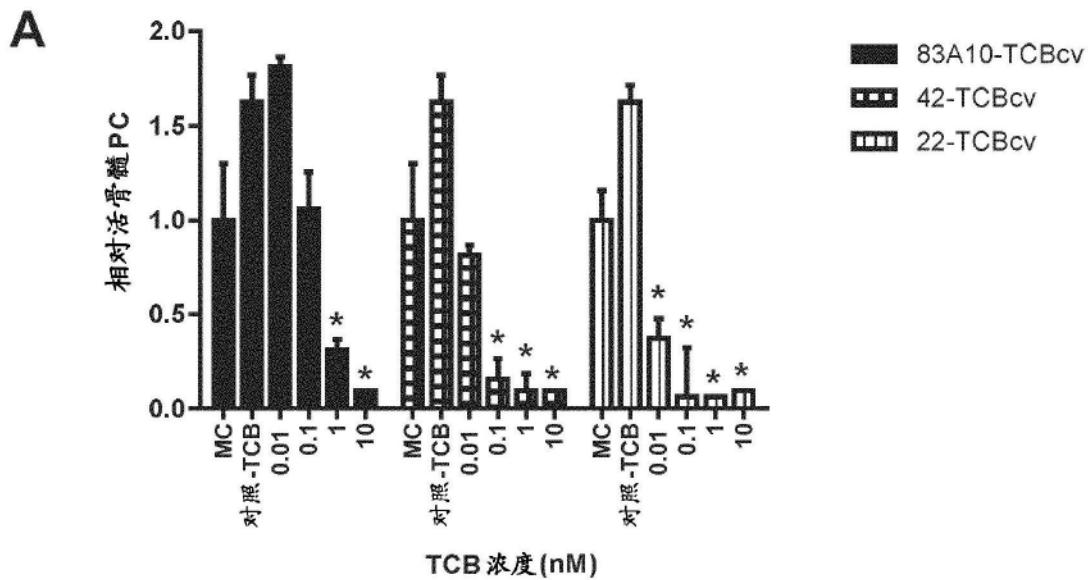


图8



患者1



患者2

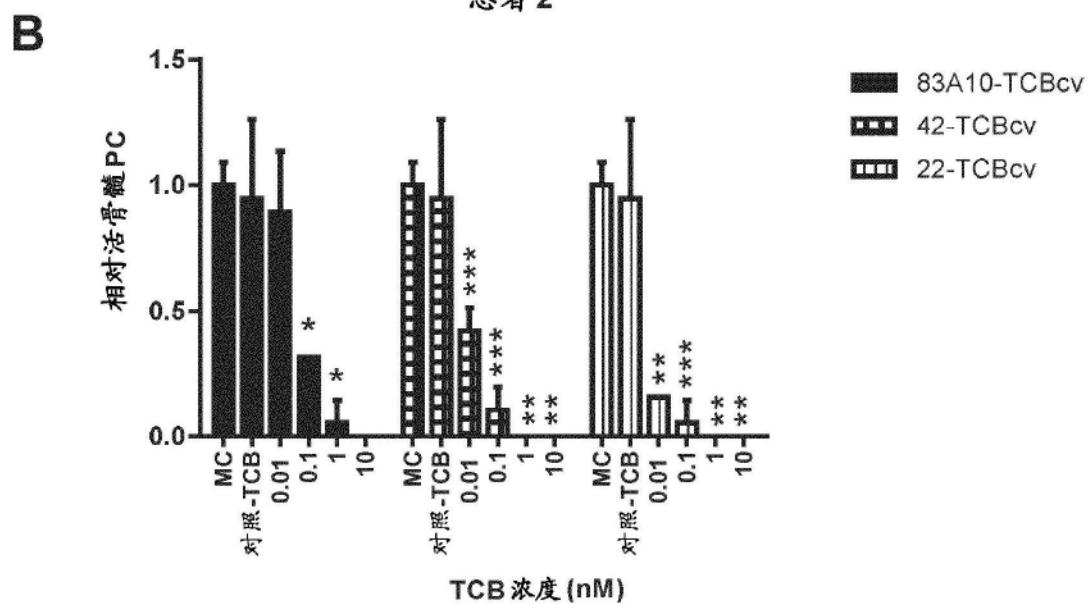


图10

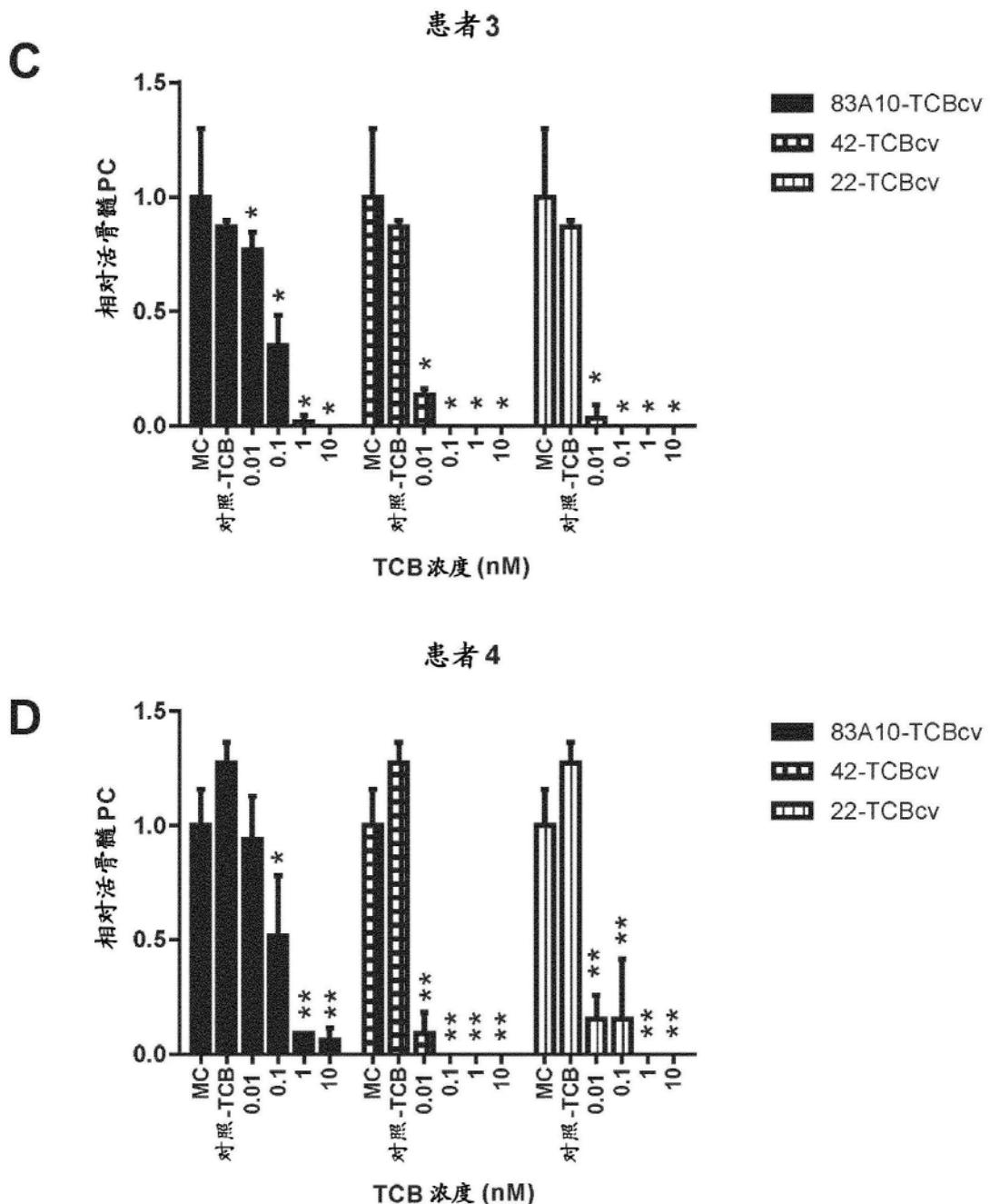


图10(续)

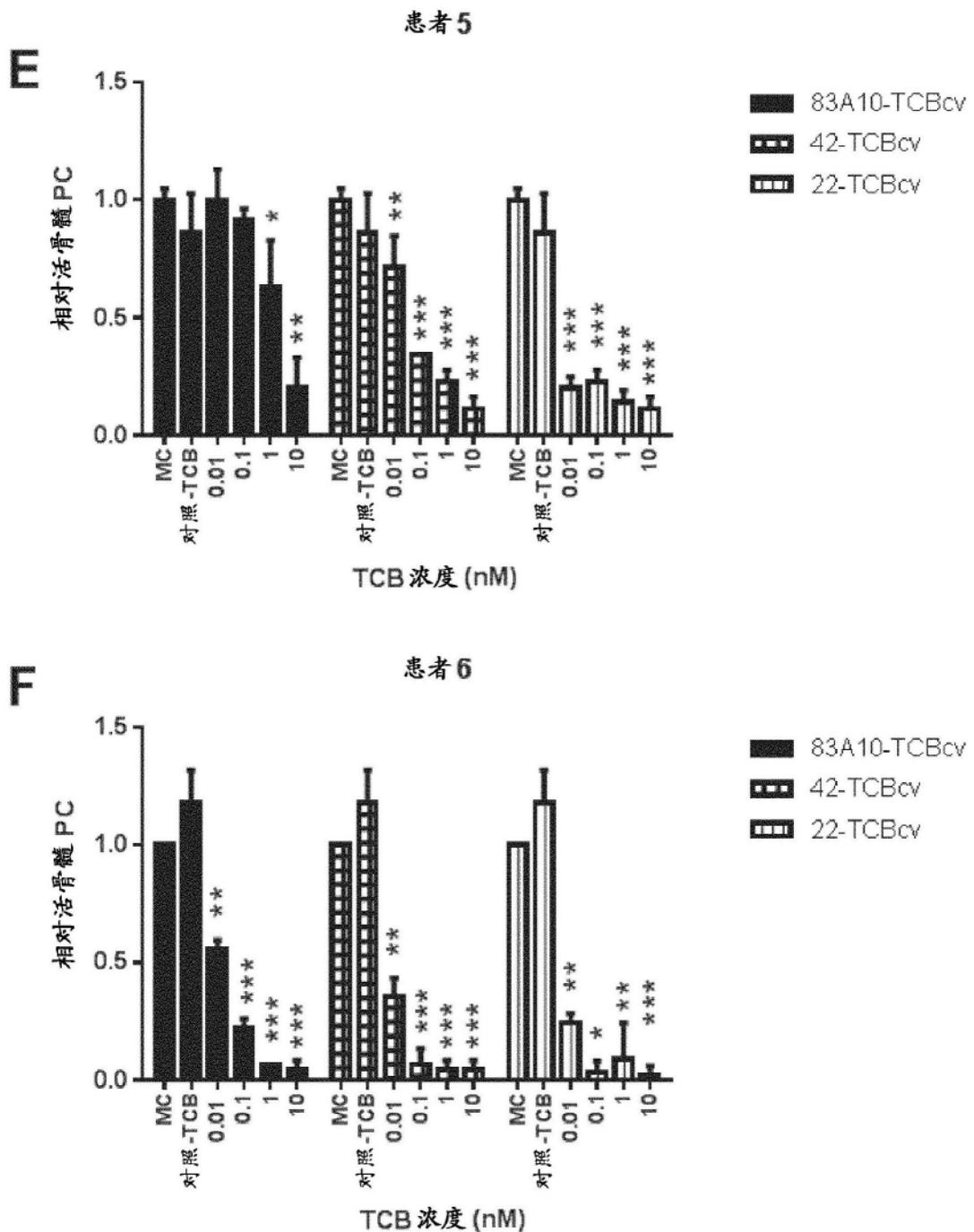


图10(续)

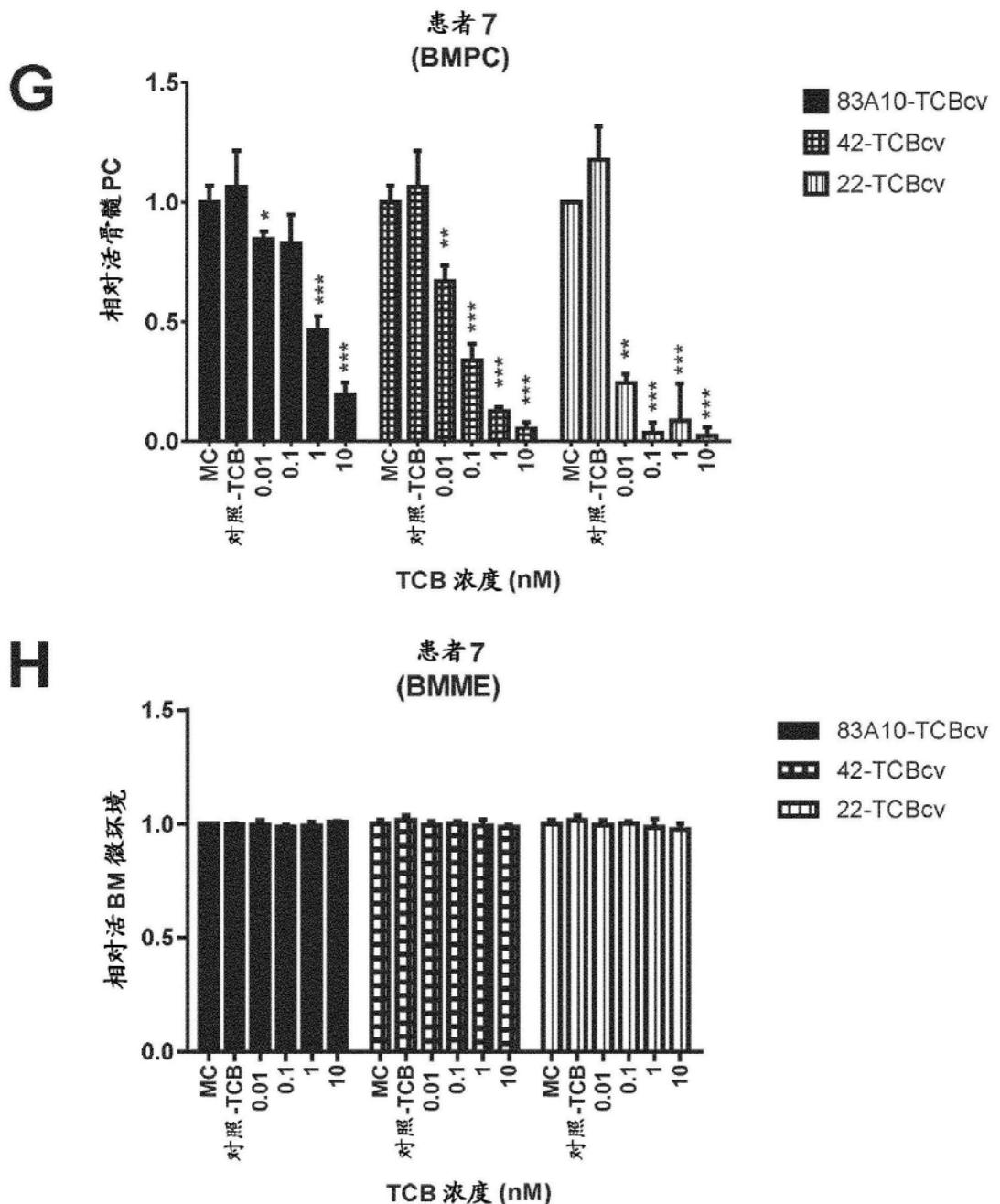


图10(续)

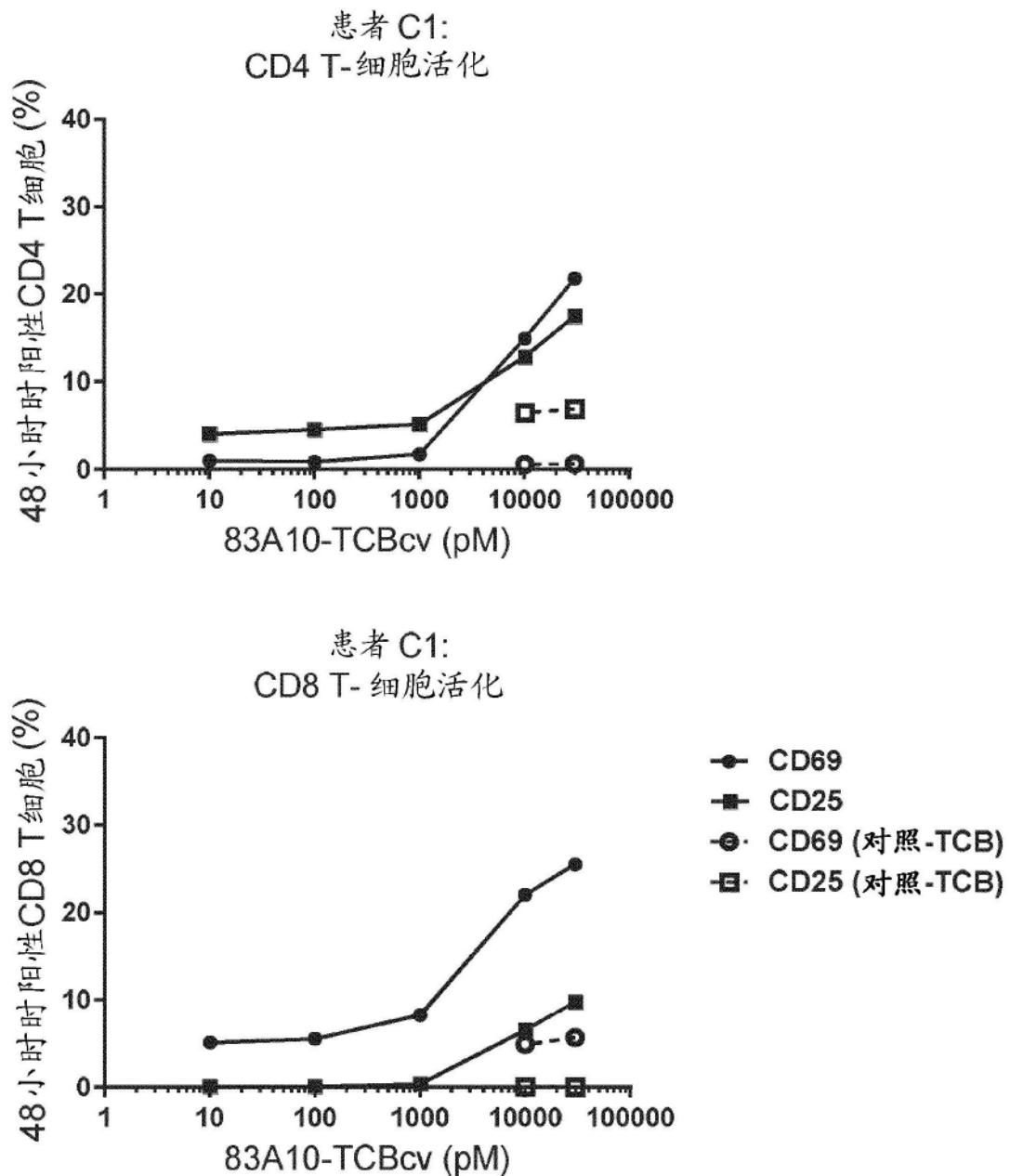
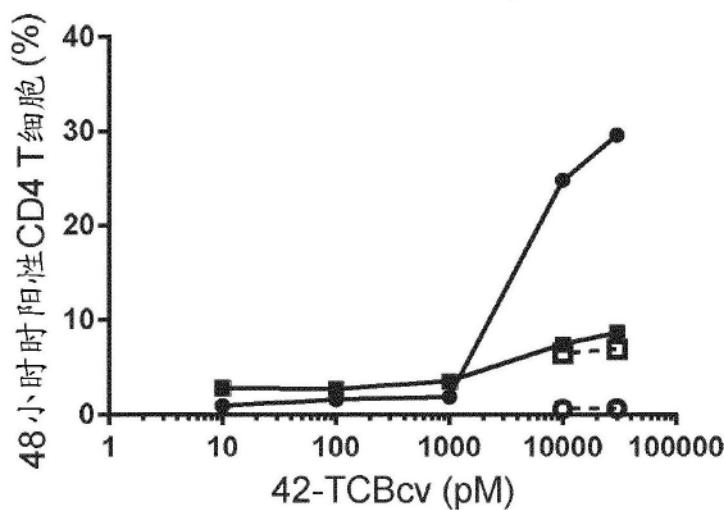


图11A

患者 C1:
CD4 T- 细胞活化



患者 C1:
CD8 T- 细胞活化

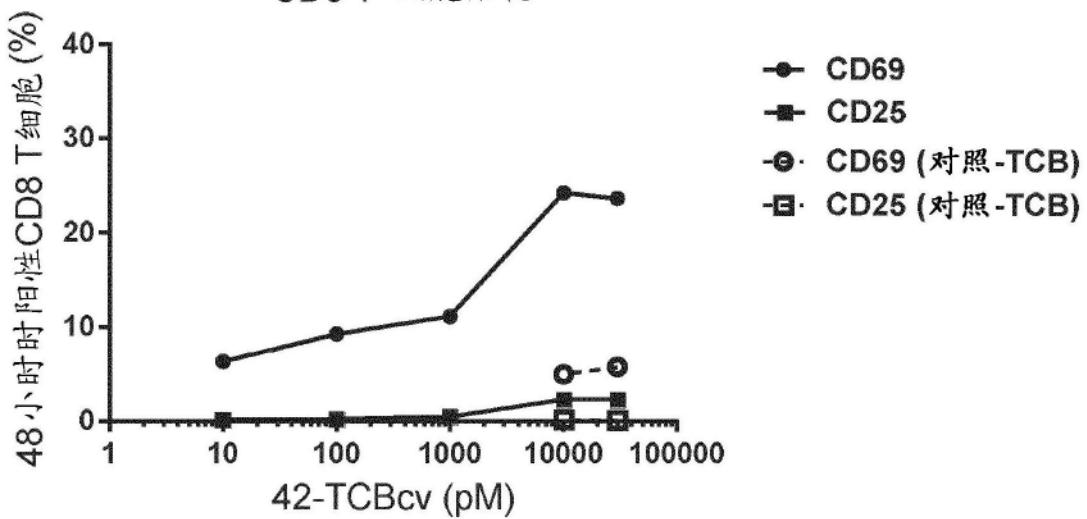
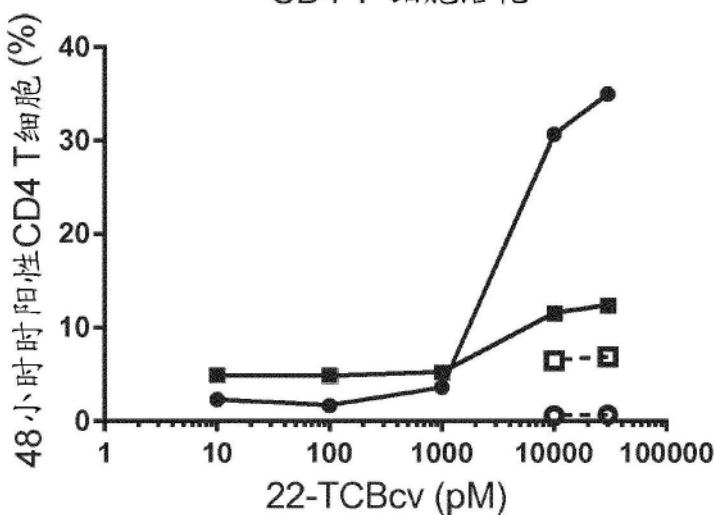


图11B

患者 C1:
CD4 T- 细胞活化



患者 C1:
CD8 T- 细胞活化

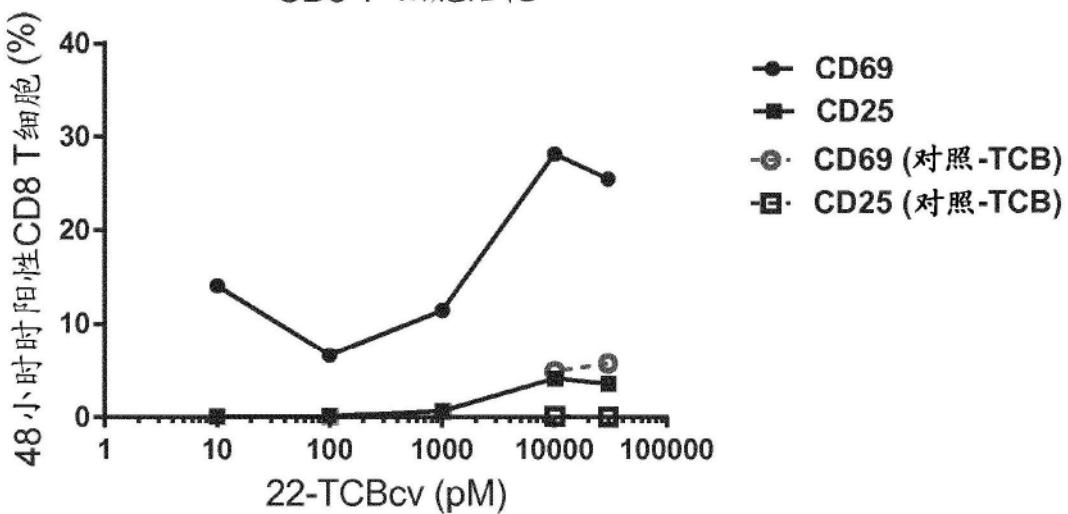


图11C

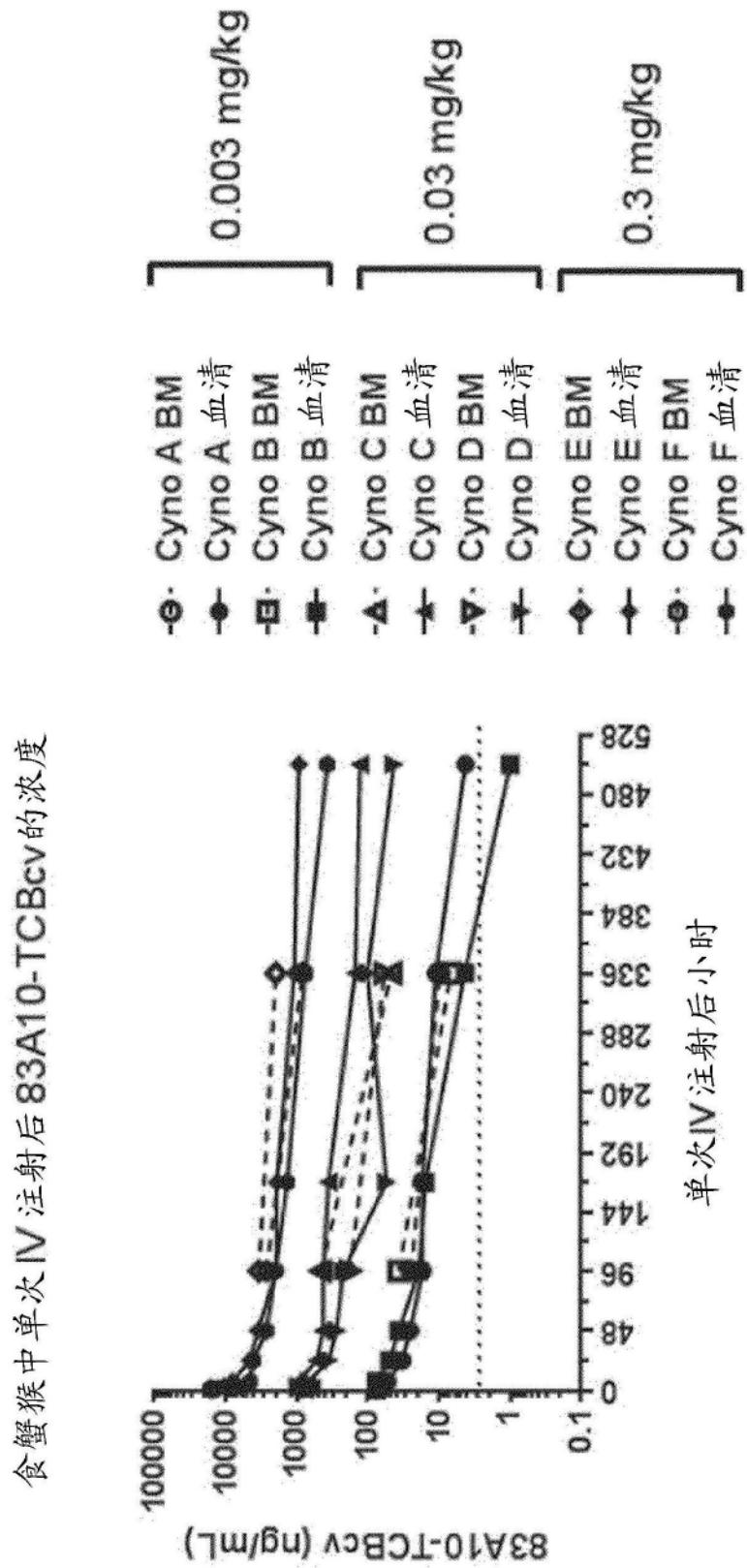


图12

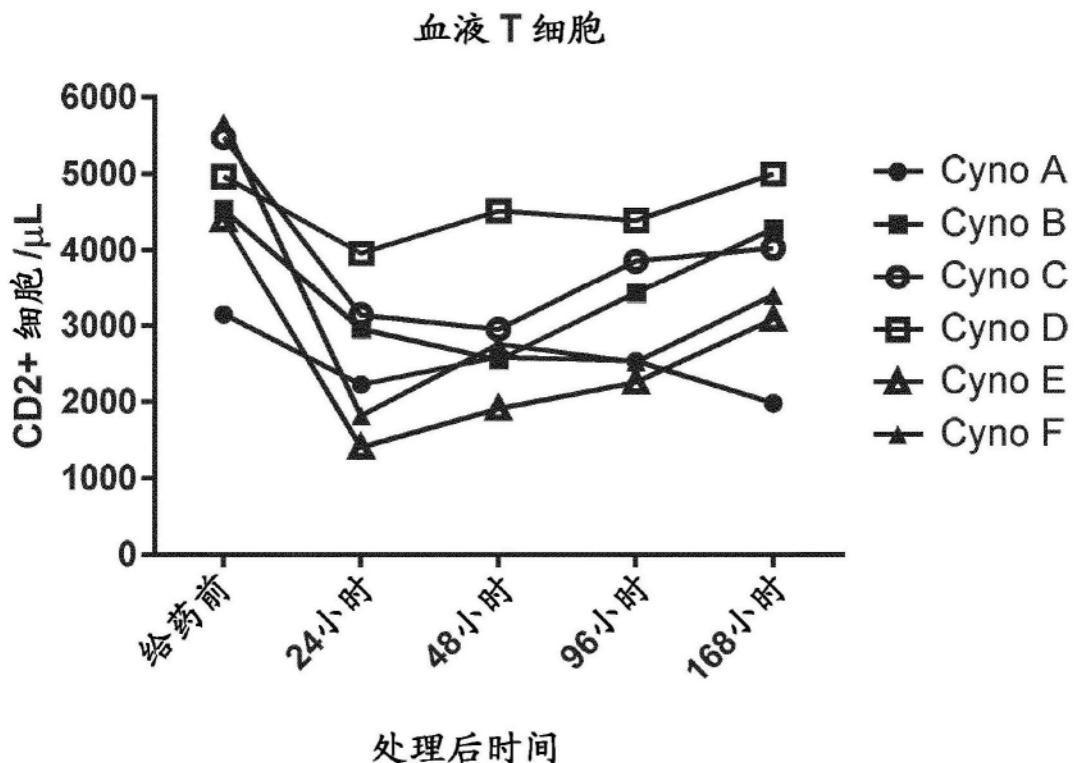


图13

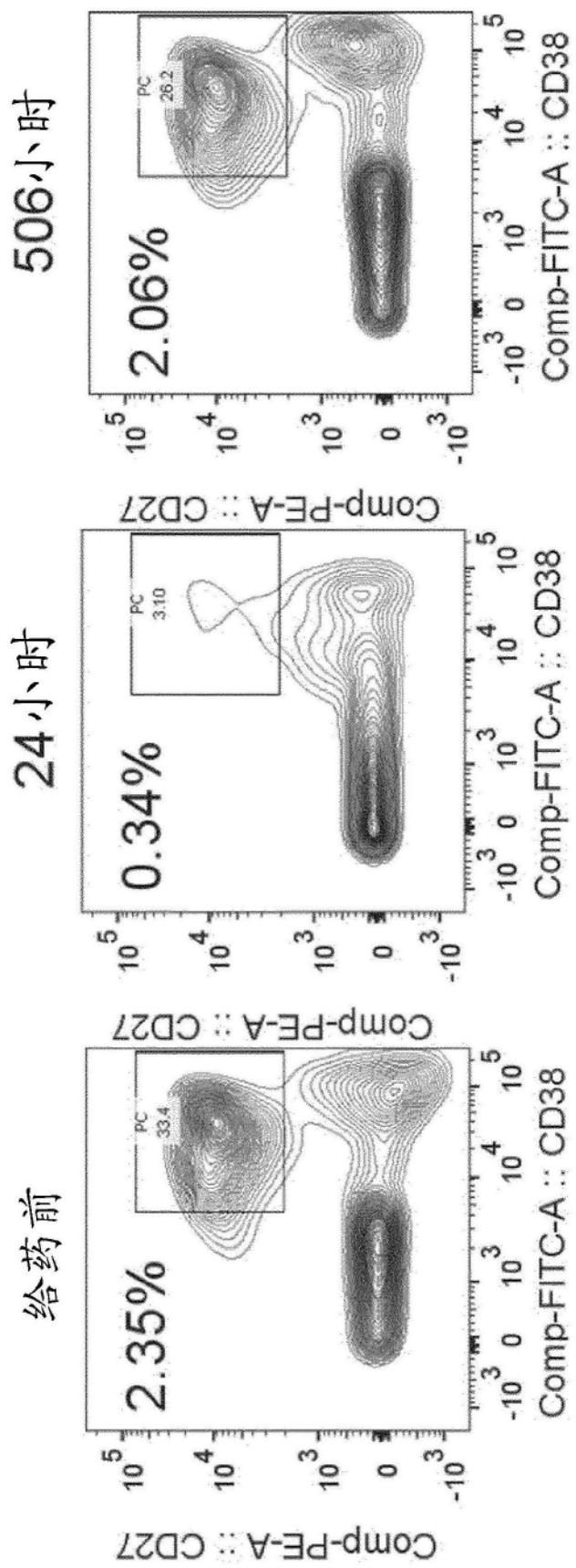


图14A

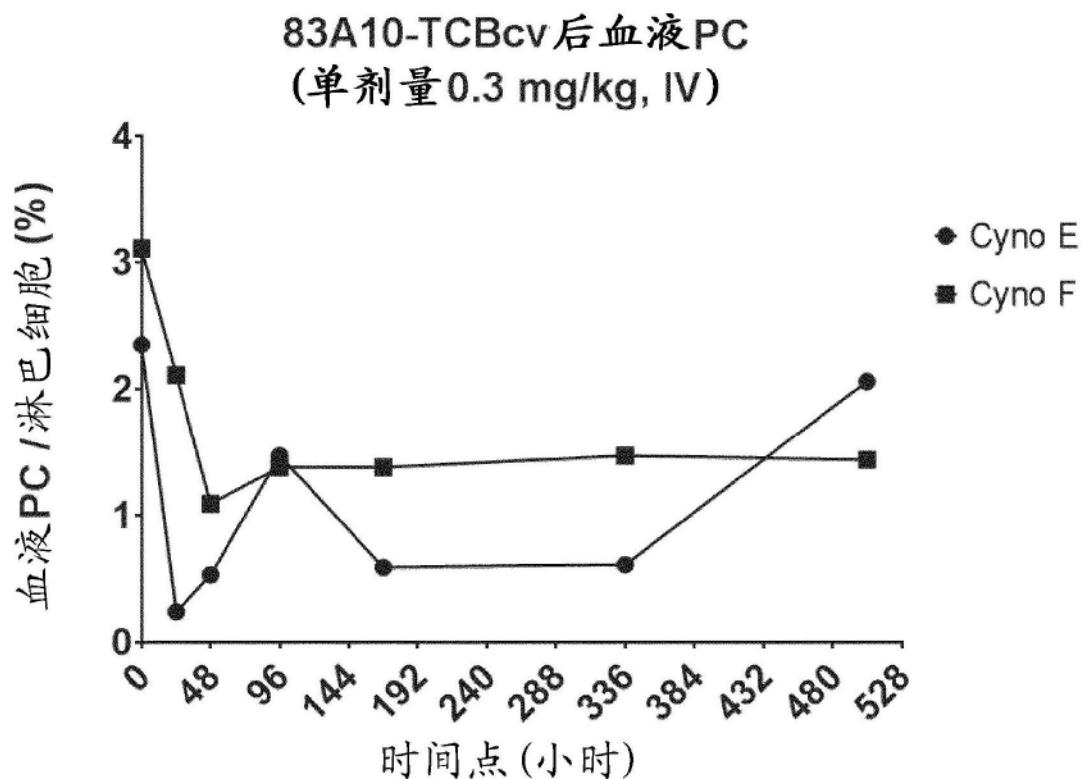


图14B

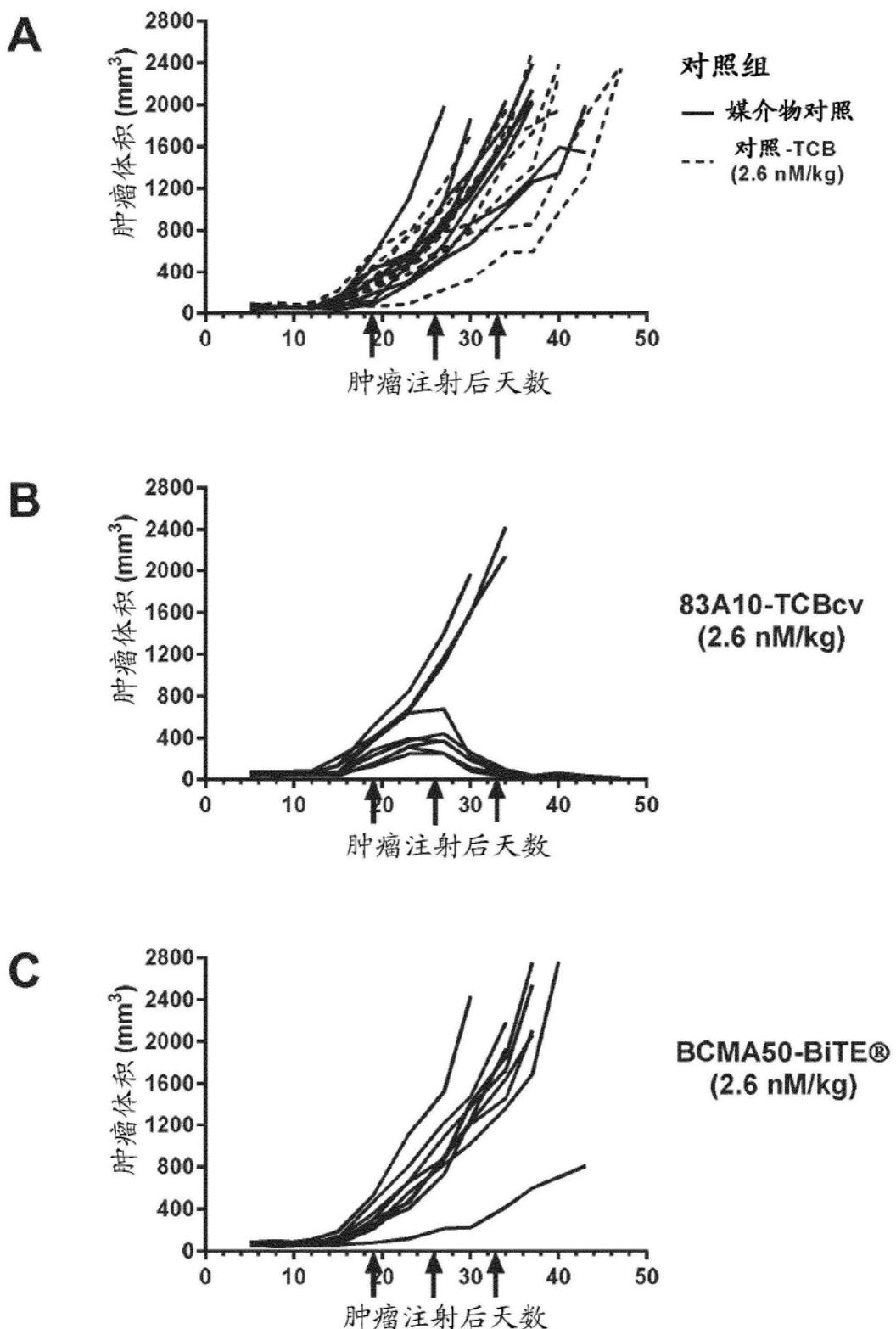


图15

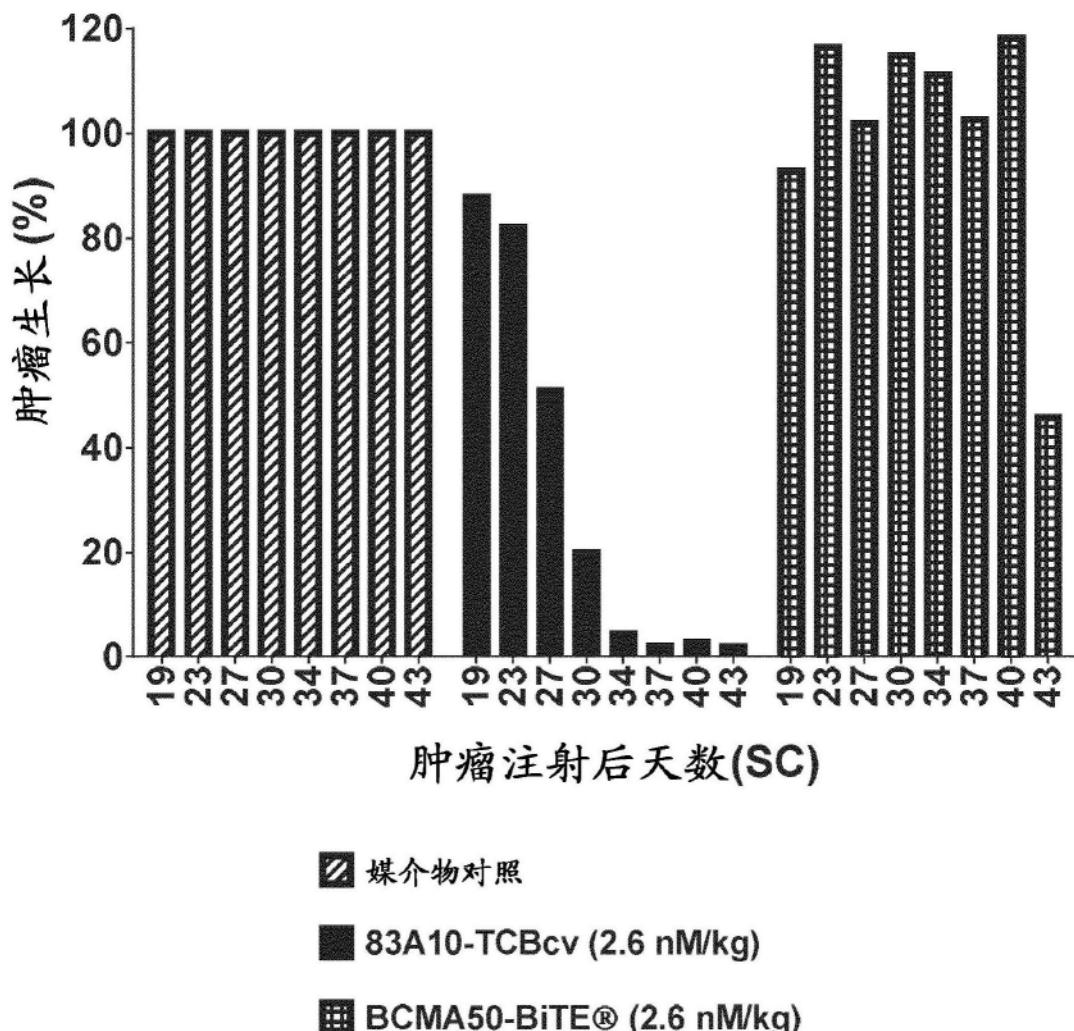


图16

A

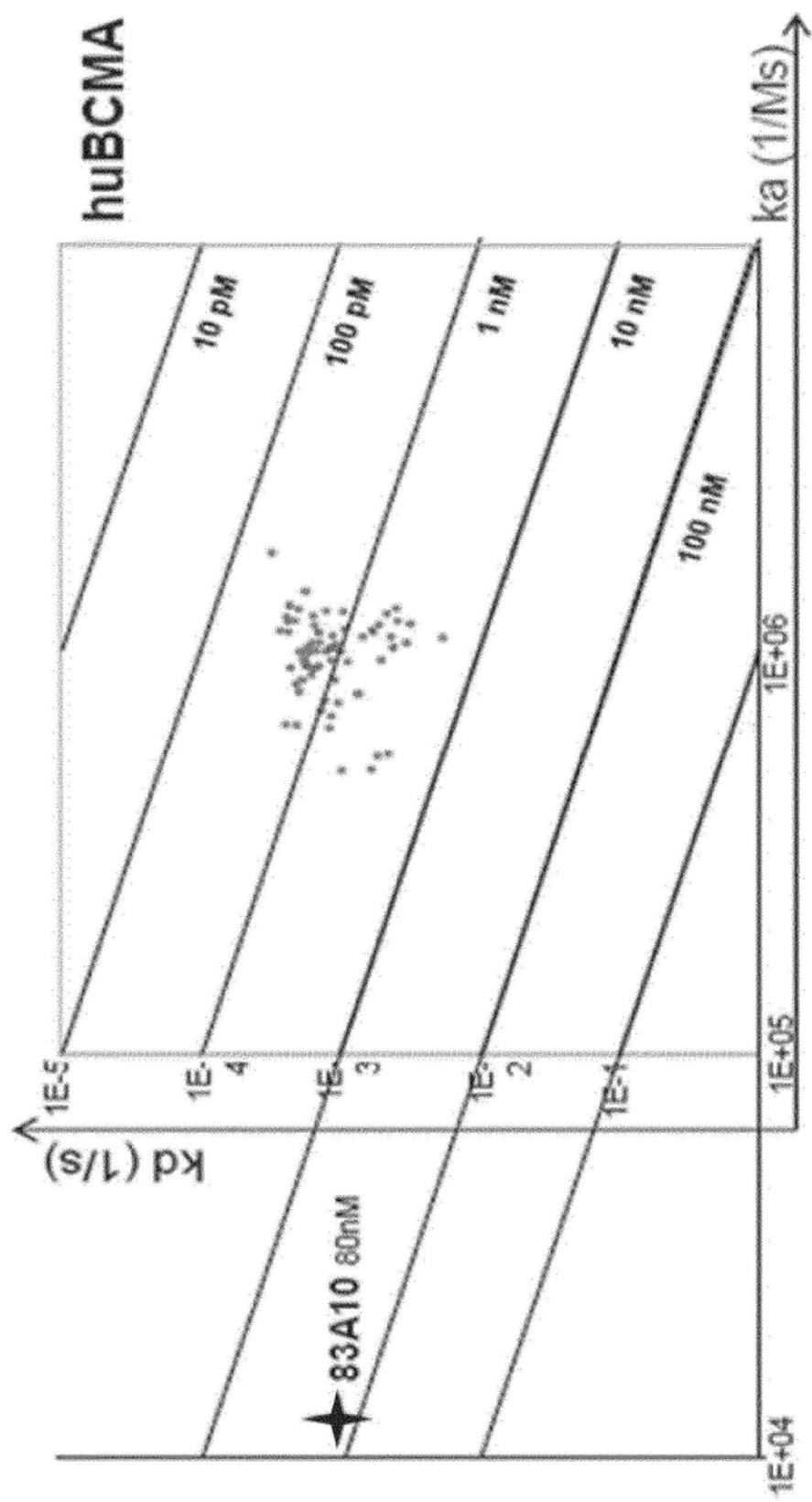


图17

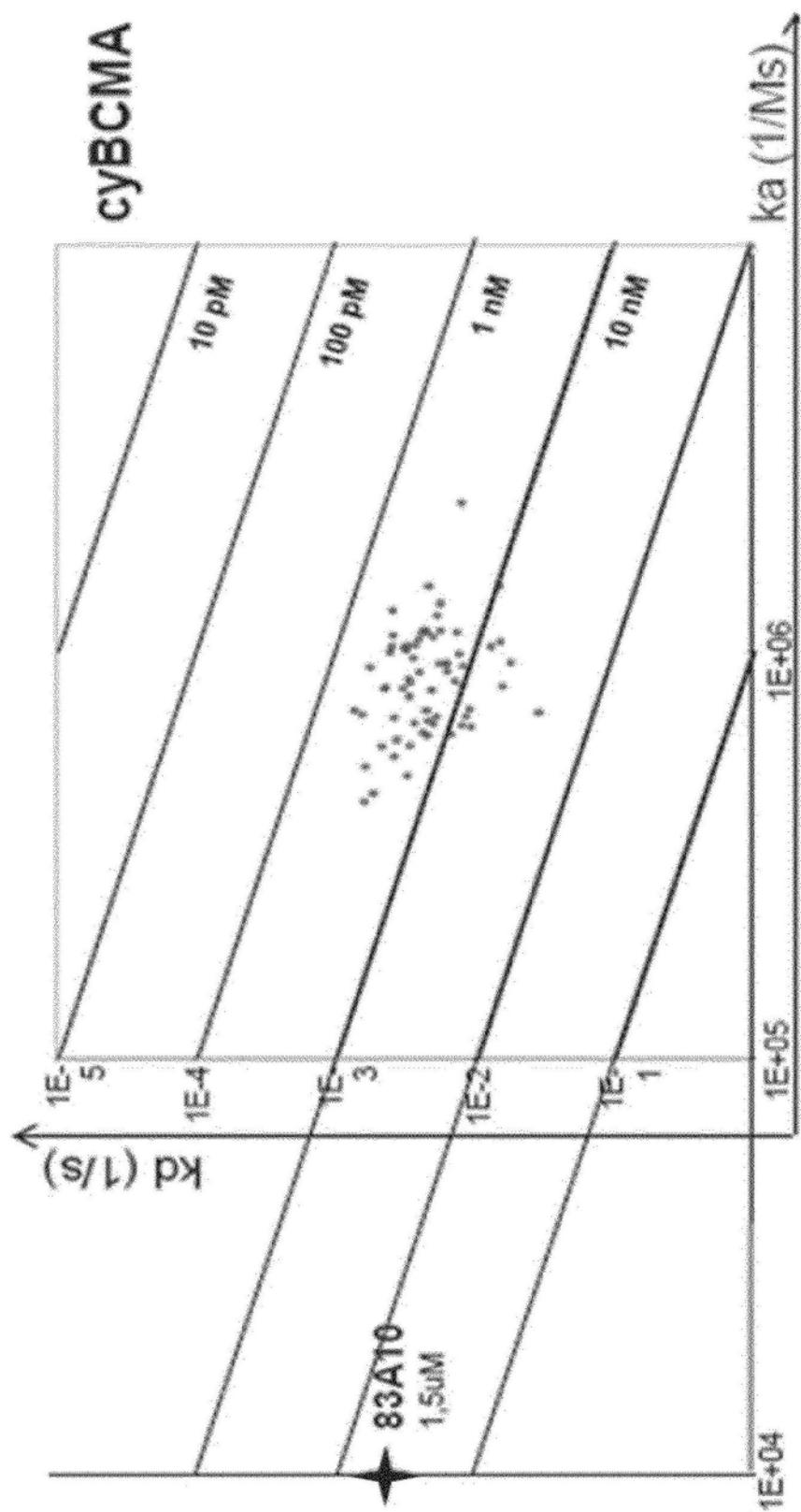
B

图17

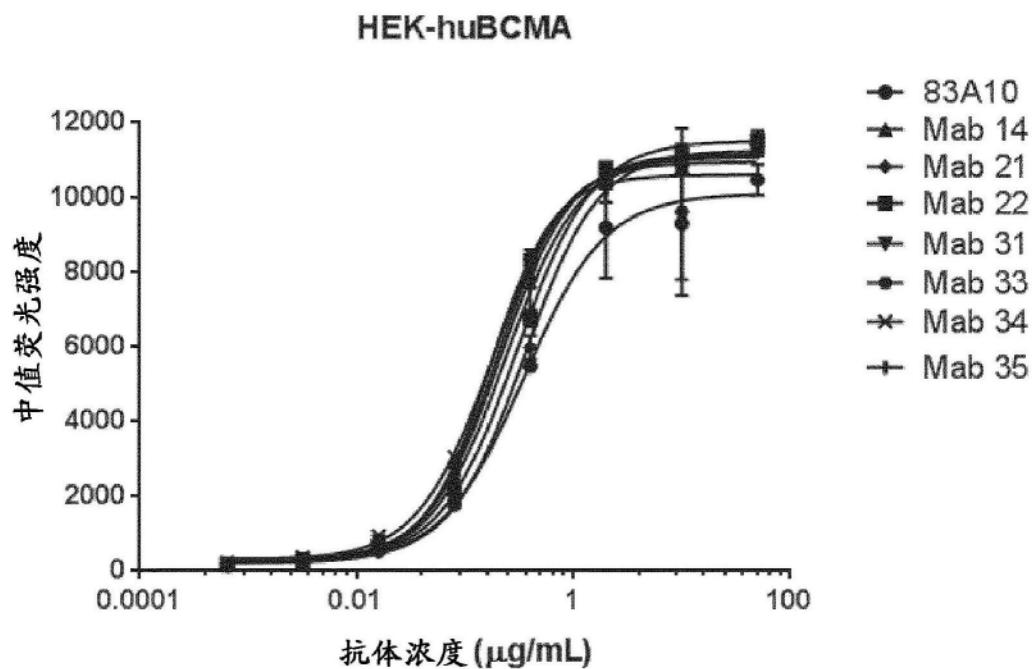
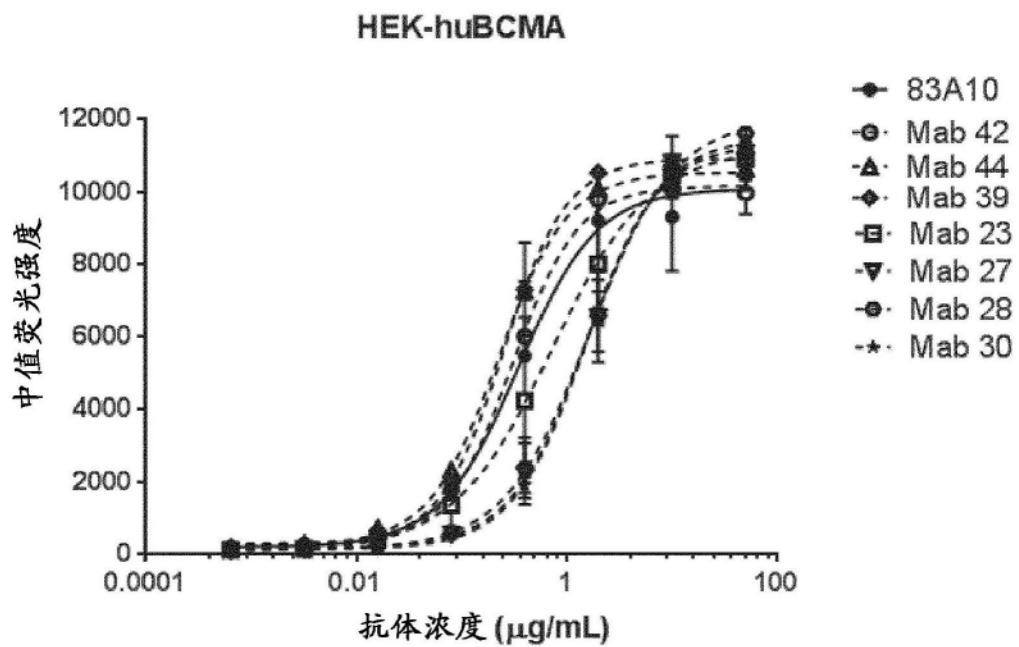
A**B**

图18

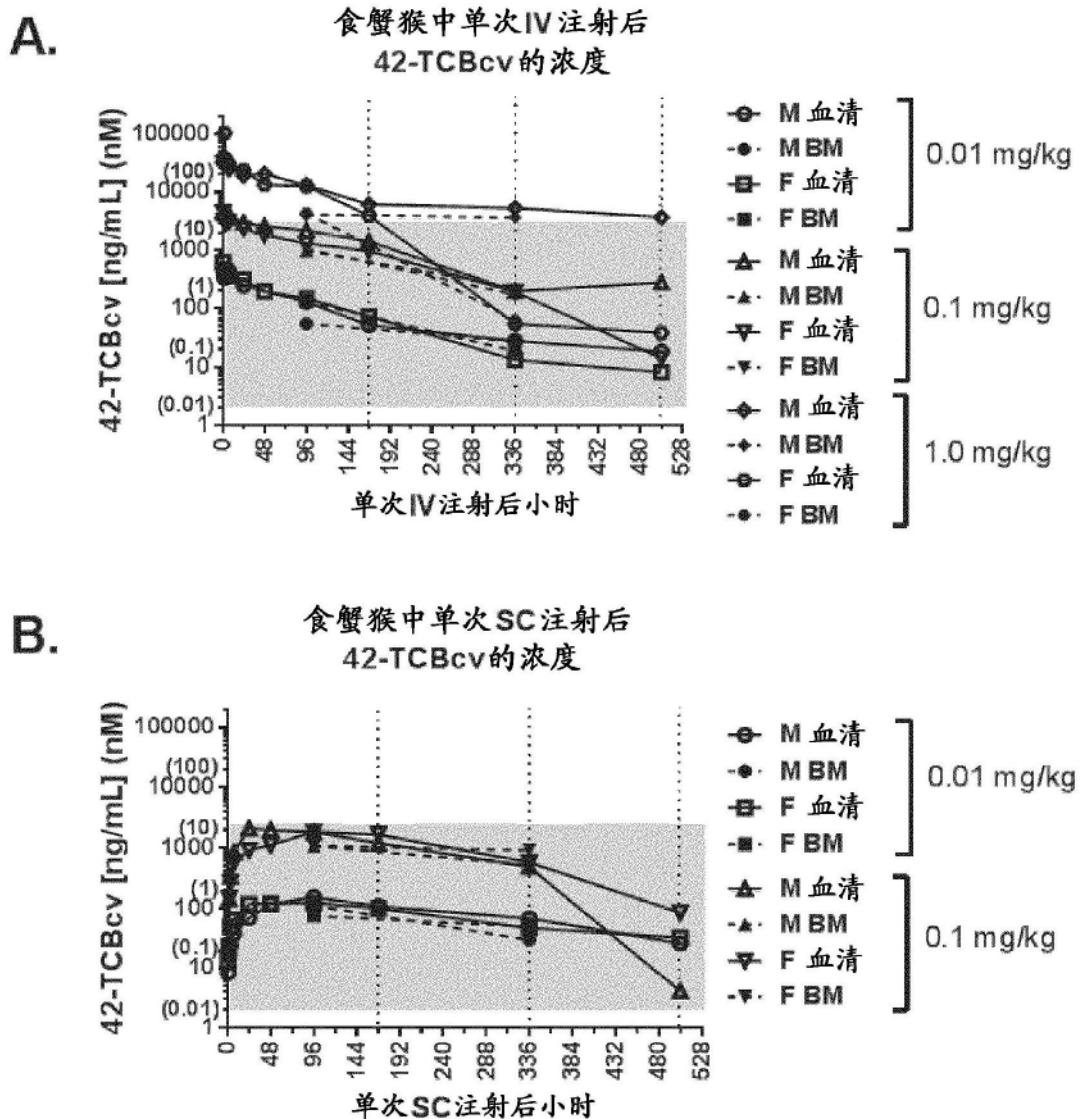


图19

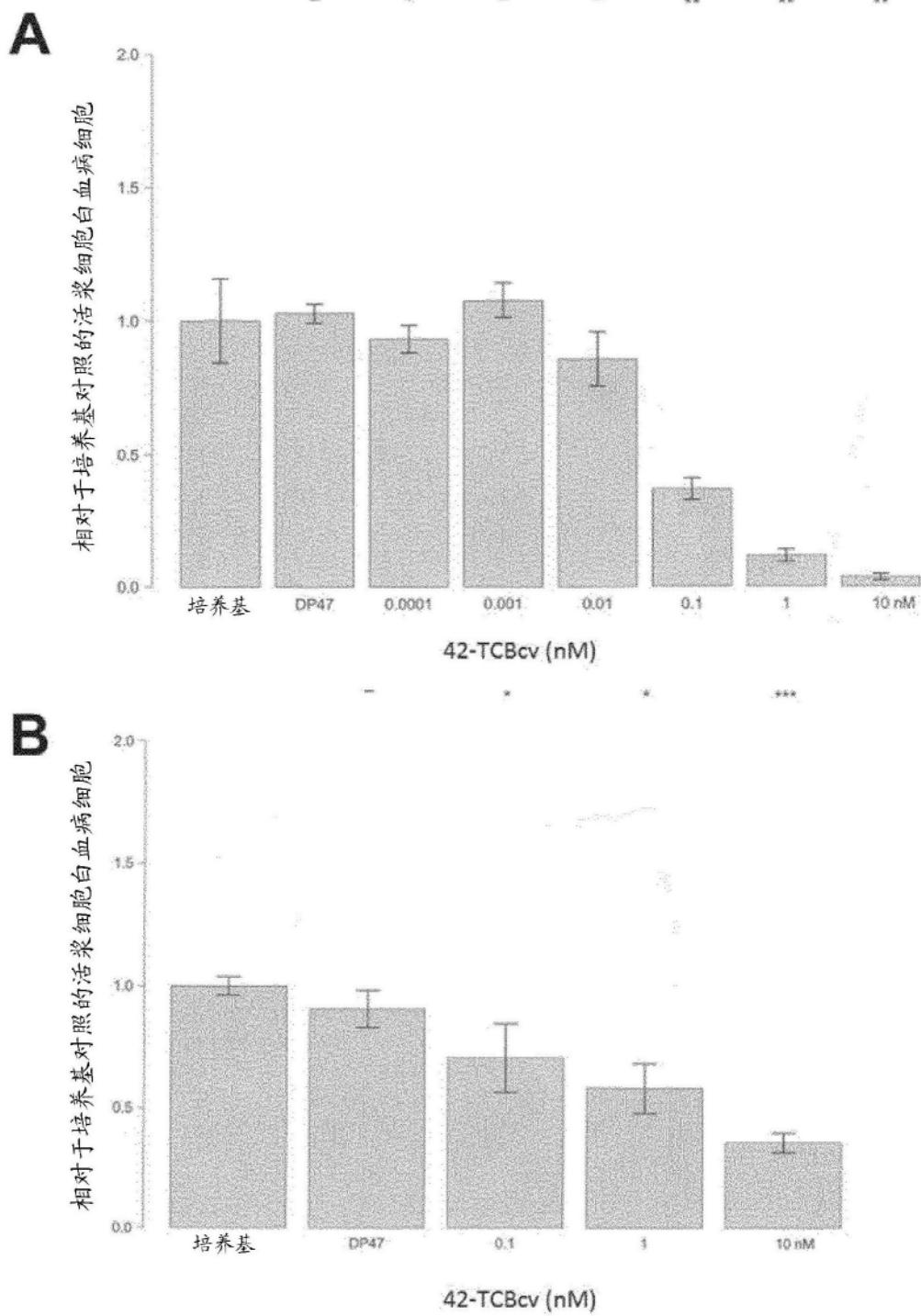


图20

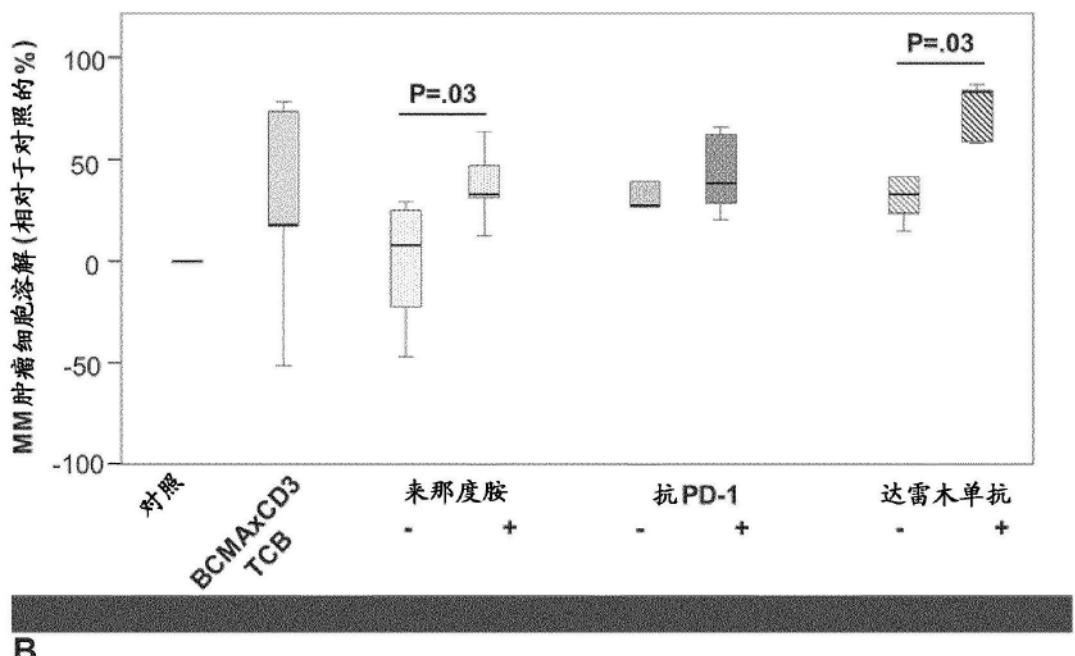
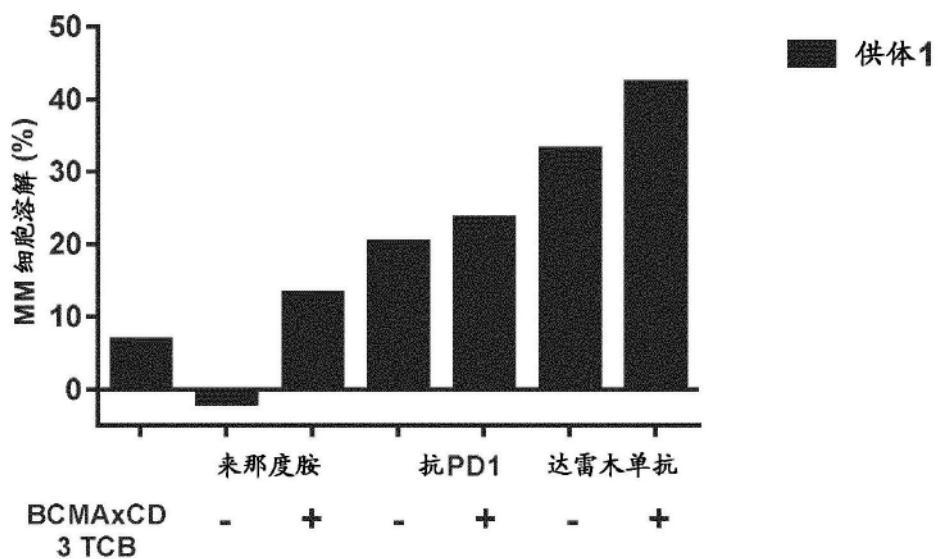
A.**B.**

图21