(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117801115 A
(43)申请公布日 2024.04.02

(21)申请号 202311818773.6

(22)申请日 2021.09.17

(30)优先权数据
2020-157873 2020.09.18 JP

(62)分案原申请数据
202180061976.8 2021.09.17

(71)申请人 中外制药株式会社
地址 日本国东京都

(72)发明人 井川佑理 大仓有生 沟吕木晓彦

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 高丽娜 张莹

(51)Int.Cl.
C07K 16/46(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 1/00(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
A61P 37/08(2006.01)

权利要求书13页 说明书118页
序列表（电子公布） 附图41页

(54)发明名称

抗-HLA-DQ2.5抗体及其在治疗乳糜泻中的用途

(57)摘要

本发明涉及抗HLA-DQ2.5抗体及其在治疗乳糜泻中的用途。本发明提供了经修饰的抗HLA-DQ2.5抗体。本发明的抗HLA-DQ2.5抗体对由HLA-DQ2.5和谷蛋白肽形成的复合物具有结合活性，但对由HLA-DQ2.5和非相关肽形成的复合物实质上不具有结合活性。此外，本发明的抗体显示出对经由谷蛋白肽的T细胞活化具有抑制作用。

CN 117801115 A

1.多特异性抗原结合分子,其包含:

(i)第一抗原结合部分,其具有对以与谷蛋白肽的复合物形式的HLA-DQ2.5的结合活性;和

(ii)第二抗原结合部分,其具有对以与谷蛋白肽的复合物形式的HLA-DQ2.5的结合活性;

其中所述抗原结合分子结合两种或更多种HLA-DQ2.5和谷蛋白肽的复合物,

其中由所述第一抗原结合部分结合的复合物中的至少一种谷蛋白肽不同于由所述第二抗原结合部分结合的复合物中的至少一种谷蛋白肽;和

其中所述抗原结合分子对HLA-DQ2.5阳性PBMC B细胞和表达HLA-DQ2.5的Ba/F3细胞之一或两者实质上没有结合活性,

其中所述抗原结合分子是人源化的,并且

其中所述多特异性抗原结合分子中的第一抗原结合部分和/或第二抗原结合部分的重链和/或轻链中的一个或多个氨基酸被改变。

2.权利要求1所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述抗原结合分子实质上不具有对表达HLA-DQ2.2的Ba/F3细胞的结合活性。

3.权利要求1或2所述的多特异性抗原结合分子,其中所述谷蛋白肽是与乳糜泻相关的免疫显性肽。

4.权利要求1至3中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中所述谷蛋白肽选自由以下各项组成的组:33聚体麦醇溶蛋白肽,α1麦醇溶蛋白肽,α2麦醇溶蛋白肽,γ1麦醇溶蛋白肽,γ2麦醇溶蛋白肽,ω1麦醇溶蛋白肽,ω2麦醇溶蛋白肽,BC大麦醇溶蛋白肽,α3麦醇溶蛋白肽,α1b麦醇溶蛋白肽,γ4a麦醇溶蛋白肽,γ4b麦醇溶蛋白肽,燕麦蛋白1肽,燕麦蛋白2肽,燕麦蛋白3肽,大麦醇溶蛋白1肽,大麦醇溶蛋白2肽,裸麦醇溶蛋白1肽,裸麦醇溶蛋白2肽和26聚体麦醇溶蛋白肽。

5.权利要求1至4中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其对于以与非相关肽的复合物形式的HLA-DQ2.5实质上不具有结合活性,其中,所述非相关肽是选自由以下组成的组中的至少一种肽:CLIP肽、乙型肝炎病毒1肽、沙门氏菌肽、牛分枝杆菌肽和甲状腺过氧化物酶肽。

6.权利要求1至5中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其对HLA-DP、HLA-DR、HLA-DQ5.1、HLA-DQ6.3、HLA-DQ7.3、HLA-DQ7.5和HLA-DQ8实质上不具有结合活性。

7.权利要求1至6中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其阻断(i)HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物与HLA-DQ2.5/谷蛋白肽限制性CD4+T细胞之间的相互作用;和/或(ii)HLA-DQ2.2/谷蛋白肽复合物与HLA-DQ2.2/谷蛋白肽限制性CD4+T细胞之间的相互作用。

8.权利要求7所述的多特异性抗原结合分子,其中所述谷蛋白肽选自由以下各项组成的组:α1麦醇溶蛋白肽、α1b麦醇溶蛋白肽、α2麦醇溶蛋白肽、ω1麦醇溶蛋白肽、ω2麦醇溶蛋白肽、γ1麦醇溶蛋白肽、γ2麦醇溶蛋白肽、γ3麦醇溶蛋白肽、γ4a麦醇溶蛋白肽、γ4d麦醇溶蛋白肽和BC大麦醇溶蛋白肽。

9.权利要求1至8中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,与所述人源化和改变之前相比,所述抗原结合分子具有增强的对由HLA-DQ2.5与谷蛋白肽形成的复合物的结合活性。

10.权利要求1至9中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中与所述人源化和改变之前相比,所述抗原结合分子具有增强的针对谷蛋白肽的交叉反应性。

11.权利要求1至10中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述抗原结合分子的重链和轻链中选自由下述(a)至(d)所示的氨基酸残基组组成的组的一组、两组、三组或全部氨基酸残基为相互静电排斥的氨基酸残基:

(a)重链恒定区(CH1)中根据EU编号位置175处的氨基酸残基和轻链恒定区(CL)中根据Kabat编号位置131处的氨基酸残基,

(b)CH1中根据EU编号位置175处的氨基酸残基,和CL中根据Kabat编号位置160处的氨基酸残基,

(c)CH1中根据EU编号位置175处的氨基酸残基,以及CL中根据Kabat编号位置131和160处的氨基酸残基,

(d)CH1中根据EU编号位置147和175处的氨基酸残基,以及CL中根据Kabat编号位置131和160处的氨基酸残基。

12.权利要求11所述的多特异性抗原结合分子,其中,形成重链可变区和轻链可变区之间的界面的2个或更多个氨基酸残基是相互静电排斥的氨基酸残基。

13.权利要求12所述的多特异性抗原结合分子,其中所述相互静电排斥的氨基酸残基是选自以下(a)和(b)的氨基酸残基组的一组或两组氨基酸残基:

(a)重链可变区中根据Kabat编号位置39处的氨基酸残基和轻链可变区中根据Kabat编号位置38处的氨基酸残基,

(b)重链可变区中根据Kabat编号位置45处的氨基酸残基和轻链可变区中根据Kabat编号位置44处的氨基酸残基。

14.权利要求11至13中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述相互静电排斥的氨基酸残基选自包含在以下(X)或(Y)的任意一组中的氨基酸残基:

(X)谷氨酸(E)、天冬氨酸(D),

(Y)赖氨酸(K)、精氨酸(R)、组氨酸(H)。

15.权利要求11至14中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其还包含与天然人IgG1 Fc结构域相比表现出对人Fcγ受体的降低的结合亲和力的Fc结构域。

16.权利要求15所述的多特异性抗原结合分子,其中所述Fc结构域包含第235位的Arg和第236位的Arg,

其中所述氨基酸位置根据EU编号进行编号。

17.权利要求15或16所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述Fc结构域由能够稳定缔合的第一Fc区亚基和第二Fc区亚基构成。

18.权利要求17所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述Fc结构域包含以下(e1)或(e2):

(e1)包含第349位的Cys,第366位的Ser,第368位的Ala和第407位的Val的第一Fc区亚基,以及包含第354位的Cys和第366位的Trp的第二Fc区;

(e2)包含第439位的Glu的第一Fc区亚基,和包含第356位的Lys的第二Fc区,

其中所述氨基酸位置根据EU编号进行编号。

19.权利要求15至18中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,与天然的人IgG1

Fc结构域相比,所述Fc结构域对人FcRn进一步表型出更强的FcRn结合亲和力。

20.权利要求18所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第一和/或Fc区亚基包含第428位的Leu、第434位的Ala、第438位的Arg和第440位的Glu,

其中所述氨基酸位置根据EU编号进行编号。

21.权利要求1至20中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述多特异性抗原结合分子对谷蛋白肽自身实质上不具有结合活性。

22.权利要求1至10中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中所述多特异性抗原结合分子包含以下(i)至(xii)的氨基酸残基中的一个或多个:

(i)重链恒定区中第175位(EU编号)的谷氨酸或赖氨酸;

(ii)重链恒定区中第147位(EU编号)的谷氨酸;

(iii)轻链恒定区第131位(Kabat编号)的谷氨酸或赖氨酸;

(iv)轻链恒定区第160位(Kabat编号)的谷氨酸或赖氨酸;

(v)重链恒定区第235位(EU编号)的精氨酸;

(vi)重链恒定区第236位(EU编号)的精氨酸;

(vii)重链恒定区第356位(EU编号)的赖氨酸;

(viii)重链恒定区第428位(EU编号)的亮氨酸;

(ix)重链恒定区第434位(EU编号)的丙氨酸;

(x)重链恒定区第438位(EU编号)的精氨酸;

(xi)重链恒定区第439位(EU编号)的谷氨酸;

(xii)重链恒定区第440位(EU编号)的谷氨酸。

23.多特异性抗原结合分子,其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分;

其中所述第一抗原结合部分包含以下(a1)至(a3)中的任一项:

(a1)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;

(a2)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;和

(a3)与(a1)或(a2)中所述的第一抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列,和与(a1)或(a2)中所述的第二抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列。

24.权利要求23所述的多特异性抗原结合分子,

其中所述第二抗原结合部分包含以下(b1)至(b8)中的任一项:

(b1)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:138的CDR1,SEQ ID NO:139的CDR2,SEQ ID NO:140的CDR3;

(b2)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

(b3)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:144的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:145的CDR2,SEQ ID NO:146的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

(b4)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:147的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:148的CDR2,SEQ ID NO:149的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

(b5)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:153的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:154的CDR2,SEQ ID NO:155的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

(b6)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:156的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:157的CDR2,SEQ ID NO:158的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

(b7)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:159的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:160的CDR2,SEQ ID NO:161的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;和

(b8)与(b1)至(b7)中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列,以及与(b1)至(b7)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第四氨基酸序列。

25.多特异性抗原结合分子,其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分,

其中所述第二抗原结合部分包含以下(b1)至(b8)中的任一项:

(b1)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:138的CDR1,SEQ ID NO:139的CDR2,SEQ ID NO:140的CDR3;

(b2)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

(b3)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:144的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:145的CDR2,SEQ ID NO:146的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

(b4)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:147的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:148的CDR2,SEQ ID NO:149的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

(b5)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:153的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:154的CDR2,SEQ ID NO:155的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

(b6)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:156的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:157的CDR2,SEQ ID NO:158的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

(b7)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:159的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:160的

CDR2,SEQ ID NO:161的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;和

(b8)与(b1)至(b7)中任一项所述的第一抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列,以及与(b1)至(b7)中任一项所述的第二抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列。

26.多特异性抗原结合分子,其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分;

其中所述第一抗原结合部分包含以下(c1)至(c3)中的任一项:

(c1)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;

(c2)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;和

(c3)与(c1)或(c2)中所述的第一抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列,和与(c1)或(c2)中所述的第二抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列,

其中所述第二抗原结合部分包含以下(d1)至(d8)中的任一项:

(d1)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:138的CDR1,SEQ ID NO:139的CDR2,SEQ ID NO:140的CDR3;

(d2)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

(d3)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:144的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:145的CDR2,SEQ ID NO:146的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

(d4)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:147的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:148的CDR2,SEQ ID NO:149的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

(d5)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:153的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:154的CDR2,SEQ ID NO:155的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

(d6)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:156的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:157的CDR2,SEQ ID NO:158的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

(d7)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:159的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:160的CDR2,SEQ ID NO:161的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;和

(d8)与(d1)至(d7)中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、

90％或95％序列同一性的第三氨基酸序列,以及与(d1)至(d7)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第四氨基酸序列。

27.多特异性抗原结合分子,其包含含有第一和第二抗体可变区的第一抗原结合部分和含有第三和第四抗体可变区的第二抗原结合部分,其中所述多特异性抗原结合分子包含以下(1)至(15)的任一个:

(1)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:138的CDR1,SEQ ID NO:139的CDR2,SEQ ID NO:140的CDR3;

(2)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

(3)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:144的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:145的CDR2,SEQ ID NO:146的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

(4)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:147的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:148的CDR2,SEQ ID NO:149的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

(5)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:153的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:154的CDR2,SEQ ID NO:155的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

(6)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:156的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:157的CDR2,SEQ ID NO:158的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

(7)第一抗体可变区,其包括SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:159的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:160的CDR2,SEQ ID NO:161的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID

NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;和

(8)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:138的CDR1,SEQ ID NO:139的CDR2,SEQ ID NO:140的CDR3;

(9)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

(10)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:144的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:145的CDR2,SEQ ID NO:146的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

(11)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:147的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:148的CDR2,SEQ ID NO:149的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

(12)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:153的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:154的CDR2,SEQ ID NO:155的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

(13)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:156的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:157的CDR2,SEQ ID NO:158的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

(14)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:159的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:160的CDR2,SEQ ID NO:161的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;和

(15)与(1)至(14)中任一项所述的第一抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第二抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列;与(1)至(14)

中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第三氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第四氨基酸序列。

28.权利要求23至27中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第一和/或第二抗原结合部分中包含的抗体可变区包含人抗体框架或人源化抗体框架。

29.多特异性抗原结合分子,其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分;

其中所述第一抗原结合部分包含以下(e1)至(e3)中的任一项:

(e1)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区,和包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;

(e2)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区,和包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;和

(e3)与(e1)或(e2)中所述的第一抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第一氨基酸序列,和与(e1)或(e2)中所述的第二抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第二氨基酸序列。

30.权利要求29所述的多特异性抗原结合分子,其中所述第二抗原结合部分包含以下(f1)至(f8)中的任一项:

(f1)包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(f2)包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(f3)包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(f4)包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(f5)包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(f6)包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(f7)包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;和

(f8)与(f1)至(f7)中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第三氨基酸序列,以及与(f1)至(f7)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第四氨基酸序列。

31.多特异性抗原结合分子,其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分;

其中所述第一抗原结合部分包含以下(e1)至(e3)中的任一项:

(e1)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区,和包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;

(e2)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区,和包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;和

(e3)与(e1)或(e2)中所述的第一抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第一氨基酸序列,和与(e1)或(e2)中所述的第二抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第二氨基酸序列,和

其中所述第二抗原结合部分包含以下(f1)至(f8)中的任一项:

(f1)包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(f2)包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(f3)包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(f4)包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(f5)包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(f6)包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(f7)包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;和

(f8)与(f1)至(f7)中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第三氨基酸序列,以及与(f1)至(f7)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第四氨基酸序列。

32.多特异性抗原结合分子,其包含含有第一和第二抗体可变区的第一抗原结合部分和含有第三和第四抗体可变区的第二抗原结合部分,其中所述多特异性抗原结合分子包含以下(1)至(15)的任一个:

(1)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(2)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;和包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(3)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(4)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(5)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(6)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的第三抗体可变区;包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(7)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(8)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(9)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;和包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(10)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(11)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(12)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(13)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(14)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

(15)与(1)或(14)所述的第一抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列;与(1)或(14)所述的第二抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第四氨基酸序列。

33.多特异性抗原结合分子,其包含选自由以下(A1)至(A3)组成的组的两条多肽链的组合:

(A1)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链;

(A2)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链;和

(A3)与(A1)或(A2)所述的第一重链序列具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第一氨基酸序列,和与(A1)或(A2)所述的第一轻链序列具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第二氨基酸序列。

34.权利要求33所述的多特异性抗原结合分子,其进一步包含选自由以下(B1)至(B8)组成的组的两条多肽链的组合:

(B1)包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的第二轻链;

(B2)包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

(B3)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

(B4)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

(B5)包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

(B6)包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

(B7)包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;和

(B8)与(B1)至(B7)中任一项所述的第二重链序列具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第三氨基酸序列,以及与(B1)至(B7)中任一项所述的第二轻链序列具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第四氨基酸序列。

35.多特异性抗原结合分子,其包含选自由以下(1)至(15)组成的组的四条多肽链的组合:

(1)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的第二轻链;

(2)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

(3)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

(4)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

(5)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

(6)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的第二轻链;

(7)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

(8)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

(9)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

(10)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

(11)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

(12)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

(13)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

(14)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;和

(15)与(1)至(14)中任一项所述的第一重链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第一轻链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第二重链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列;和与(1)至(14)中任一项所述的第二轻链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第四氨基酸序列。

36.以下(i)至(iii)中任一项的组合:

(i)含有权利要求23的(a1)至(a3)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子,以及含有权利要求24的(b1)至(b8)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子;

(ii)含有权利要求29的(e1)至(e3)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子,以及含有权利要求30的(f1)至(f8)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子;和

(iii)含有权利要求33的(A1)至(A3)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子,

以及含有权利要求34的(B1)至(B8)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子。

37.核酸,其编码权利要求1至35中任一项所述的多特异性抗原结合分子。

38.载体,其包含权利要求37所述的核酸。

39.细胞,其包含权利要求37所述的核酸或权利要求38所述的载体。

40.制备多特异性抗原结合分子的方法,其包括培养权利要求39所述的细胞以便制备多特异性抗原结合分子。

41.权利要求40所述的方法,其还包括从所述细胞的培养物中回收所述多特异性抗原结合分子。

42.药物组合物,其包含权利要求1至35中任一项所述的多特异性抗原结合分子或权利要求36所述的组合,以及药学上可接受的载体。

43.权利要求42所述的组合物,其是用于治疗和/或预防乳糜泻的药物组合物。

44.权利要求1至35中任一项所述的多特异性抗原结合分子或权利要求36所述的组合在制备药物中的用途。

45.权利要求44所述的用途,其中所述药物是用于治疗和/或预防乳糜泻的药物。

46.治疗患有乳糜泻的个体的方法,包括向所述个体施用有效量的权利要求1至35中任一项所述的多特异性抗原结合分子或权利要求36所述的组合。

47.用于治疗和/或预防乳糜泻的试剂盒,其至少包含权利要求1至35中任一项所述的多特异性抗原结合分子或权利要求36所述的组合,以及使用说明。

抗-HLA-DQ2.5抗体及其在治疗乳糜泻中的用途

[0001] 本申请是国际申请日为2021年9月17日、国际申请号为PCT/JP2021/034240于2023年3月9日进入中国国家阶段、申请号202180061976.8、发明名称“抗-HLA-DQ2.5抗体及其在治疗乳糜泻中的用途”的申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及抗HLA-DQ2.5抗体及其在治疗乳糜泻中的用途。

背景技术

[0003] 乳糜泻是一种自身免疫性病症,其中摄入谷蛋白对遗传敏感患者的小肠造成损害(NPL 1至5)。约1%的西方人群,即美国和欧盟的800万人被认为患有乳糜泻;然而,自从自20世纪40年代认识该疾病以来,尚未取得显著的治疗进展。

[0004] 属于主要组织相容性复合体(MHC)II类的人白细胞抗原(HLA)包括HLA-DR、HLA-DP和HLA-DQ分子,如HLA-DQ2.5同工型(下文称为“HLA-DQ2.5”),其在细胞表面形成由α和β链组成的异二聚体。大多数(>90%)的乳糜泻患者具有HLA-DQ2.5单倍型等位基因(NPL 6)。据认为,该同工型对谷蛋白肽具有更强的亲和力。与其它同工型一样,HLA-DQ2.5将源自外源的经加工的抗原呈递给T细胞上的T细胞受体(TCR)。在乳糜泻患者中消化富含谷蛋白的食物(例如面包)的结果是,形成免疫原性的谷蛋白肽(例如麦醇溶蛋白肽)(NPL 2)。该肽通过小肠上皮运输到固有层中,并通过组织转谷氨酰胺酶如转谷氨酰胺酶2(TG2)脱酰胺。脱酰胺的麦醇溶蛋白肽由抗原呈递细胞(APC)加工,所述抗原呈递细胞将它们负载在HLA-DQ2.5上。负载的肽被呈递至HLA-DQ2.5限制性T细胞,并激活先天和适应性免疫应答。这引起小肠粘膜的炎性损伤和包括各种类型的胃肠道紊乱、营养缺乏和全身症状的症状(NPL8、9和10)。据报道,抗HLA DQ中和抗体抑制来自乳糜泻患者的T细胞的谷蛋白肽依赖性活化。(NPL7)

[0005] 目前可行的乳糜泻的治疗是终生坚持无谷蛋白饮食(GFD)。然而,实际上,即使用GFD也难以完全消除谷蛋白暴露。这些患者的可耐受谷蛋白剂量仅为约10至50mg/天(NPL 11)。在GFD生产中可广泛发生交叉污染,即使在对GFD顺从性好的患者中,微量的谷蛋白也会引起乳糜泻症状。在存在这种无意的谷蛋白暴露风险的情况下,需要对GFD进行辅助治疗。

[0006] 引文列表

[0007] 非专利文献

[0008] [NPL 1]N Engl J Med 2007;357:1731-1743

[0009] [NPL 2]J Biomed Sci.2012;19(1):88

[0010] [NPL 3]N Engl J Med 2003;348:2517-2524

[0011] [NPL 4]Gut 2003;52:960-965

[0012] [NPL 5]Dig Dis Sci 2004;49:1479-1484

[0013] [NPL 6]Gastroenterology 2011;141:610-620

[0014] [NPL 7]Gut 2005;54:1217-1223

[0015] [NPL 8]Gastroenterology 2014;146:1649-58

[0016] [NPL 9]Nutrients 2013Oct 5(10):3975-3992

[0017] [NPL 10]J Clin Invest.2007;117(1):41-49

[0018] [NPL 11]Am J Clin Nutr 2007;85:160-6

[0019] 发明概述

[0020] 技术问题

[0021] 在上述需要辅助疗法的情况下,本发明提供抗HLA-DQ2.5抗原结合分子。

[0022] 解决问题的方案

[0023] 本发明的抗原结合分子已被改变并且可以结合两种或更多种由HLA-DQ2.5和谷蛋白肽形成的复合物。

[0024] 更具体地,本发明提供以下内容:

[0025] [1]多特异性抗原结合分子,其包含:

[0026] (i)第一抗原结合部分,其具有对以与谷蛋白肽的复合物形式的HLA-DQ2.5的结合活性;和

[0027] (ii)第二抗原结合部分,其具有对以与谷蛋白肽的复合物形式的HLA-DQ2.5的结合活性;

[0028] 其中所述抗原结合分子结合两种或更多种HLA-DQ2.5和谷蛋白肽的复合物,

[0029] 其中由所述第一抗原结合部分结合的复合物中的至少一种谷蛋白肽不同于由所述第二抗原结合部分结合的复合物中的至少一种谷蛋白肽;和

[0030] 其中所述抗原结合分子对HLA-DQ2.5阳性PBMC B细胞和表达HLA-DQ2.5的Ba/F3细胞之一或两者实质上没有结合活性,

[0031] 其中所述抗原结合分子是人源化的,并且

[0032] 其中所述多特异性抗原结合分子中的第一抗原结合部分和/或第二抗原结合部分的重链和/或轻链中的一个或多个氨基酸被改变。

[0033] [1a][1]所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述抗原结合分子实质上不具有对表达HLA-DQ2.2的Ba/F3细胞的结合活性。

[0034] [1-1][1]或[1a]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述多特异性抗原结合分子中的第一抗原结合部分和/或第二抗原结合部分的重链和/或轻链中的一个或多个氨基酸被置换。

[0035] [1-2][1-1]所述的多特异性抗原结合分子,其包含重链可变区中的至少一个氨基酸置换;重链恒定区中的至少一个氨基酸置换;轻链可变区中的至少一个氨基酸置换;和轻链恒定区中的至少一个氨基酸置换。

[0036] [2][1]至[1-2]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中所述谷蛋白肽是与乳糜泻相关的免疫显性肽。

[0037] [3][1]至[2]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中所述谷蛋白肽选自由以下各项组成的组:33聚体麦醇溶蛋白肽,α1麦醇溶蛋白肽,α2麦醇溶蛋白肽,γ1麦醇溶蛋白肽,γ2麦醇溶蛋白肽,ω1麦醇溶蛋白肽,ω2麦醇溶蛋白肽,BC大麦醇溶蛋白肽,α3麦醇溶蛋白肽,α1b麦醇溶蛋白肽,γ4a麦醇溶蛋白肽,γ4b麦醇溶蛋白肽,燕麦蛋白1肽,燕麦蛋

白2肽,燕麦蛋白3肽,大麦醇溶蛋白1肽,大麦醇溶蛋白2肽,裸麦醇溶蛋白1肽,裸麦醇溶蛋白2肽和26聚体麦醇溶蛋白肽。

[0038] [3-1][1]至[2]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述谷蛋白肽为以下各项中的一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种、13种、14种、15种、16种、17种、18种、19种或全部:33聚体麦醇溶蛋白肽,α1麦醇溶蛋白肽,α2麦醇溶蛋白肽,γ1麦醇溶蛋白肽,γ2麦醇溶蛋白肽,ω1麦醇溶蛋白肽,ω2麦醇溶蛋白肽,BC大麦醇溶蛋白肽,α3麦醇溶蛋白肽,α1b麦醇溶蛋白肽,γ4a麦醇溶蛋白肽,γ4b麦醇溶蛋白肽,燕麦蛋白1肽,燕麦蛋白2肽,燕麦蛋白3肽,大麦醇溶蛋白1肽,大麦醇溶蛋白2肽,裸麦醇溶蛋白1肽,裸麦醇溶蛋白2肽和26聚体麦醇溶蛋白肽。

[0039] [3-2][1]至[2]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中所述谷蛋白肽选自由以下各项组成的组:33聚体麦醇溶蛋白肽,α1麦醇溶蛋白肽,α2麦醇溶蛋白肽,γ1麦醇溶蛋白肽,ω1麦醇溶蛋白肽,ω2麦醇溶蛋白肽,BC大麦醇溶蛋白肽,α3麦醇溶蛋白肽,α1b麦醇溶蛋白肽,γ4a麦醇溶蛋白肽,γ4b麦醇溶蛋白肽,燕麦蛋白1肽,燕麦蛋白2肽,燕麦蛋白3肽,大麦醇溶蛋白1肽,大麦醇溶蛋白2肽,裸麦醇溶蛋白1肽,裸麦醇溶蛋白2肽和26聚体麦醇溶蛋白肽。

[0040] [3-3][1]至[2]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述谷蛋白肽为以下各项中的一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种、13种、14种、15种、16种、17种、18种或全部:33聚体麦醇溶蛋白肽,α1麦醇溶蛋白肽,α2麦醇溶蛋白肽,γ1麦醇溶蛋白肽,ω1麦醇溶蛋白肽,ω2麦醇溶蛋白肽,BC大麦醇溶蛋白肽,α3麦醇溶蛋白肽,α1b麦醇溶蛋白肽,γ4a麦醇溶蛋白肽,γ4b麦醇溶蛋白肽,燕麦蛋白1肽,燕麦蛋白2肽,燕麦蛋白3肽,大麦醇溶蛋白1肽,大麦醇溶蛋白2肽,裸麦醇溶蛋白1肽,裸麦醇溶蛋白2肽和26聚体麦醇溶蛋白肽。

[0041] [4][1]至[3-3]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其对于以与非相关肽的复合物形式的HLA-DQ2.5实质上不具有结合活性,其中,所述非相关肽是选自由以下组成的组中的至少一种肽:CLIP肽、乙型肝炎病毒1肽、沙门氏菌肽、牛分枝杆菌肽和甲状腺过氧化物酶肽。

[0042] [4-1][1]至[3-3]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其对于以与非相关肽的复合物形式的HLA-DQ2.5实质上不具有结合活性,其中,所述非相关肽是以下各项中的全部:CLIP肽、乙型肝炎病毒1肽、沙门氏菌肽、牛分枝杆菌肽和甲状腺过氧化物酶肽。

[0043] [5][1]至[4-1]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其对HLA-DP、HLA-DR、HLA-DQ5.1、HLA-DQ6.3、HLA-DQ7.3、HLA-DQ7.5和HLA-DQ8实质上不具有结合活性。

[0044] [6][1]至[5]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其阻断(i)HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物与HLA-DQ2.5/谷蛋白肽限制性CD4+T细胞之间的相互作用;和/或(ii)HLA-DQ2.2/谷蛋白肽复合物与HLA-DQ2.2/谷蛋白肽限制性CD4+T细胞之间的相互作用。

[0045] [6-2][6]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述谷蛋白肽选自由以下各项组成的组:α1麦醇溶蛋白肽、α1b麦醇溶蛋白肽、α2麦醇溶蛋白肽、ω1麦醇溶蛋白肽、ω2麦醇溶蛋白肽、γ1麦醇溶蛋白肽、γ2麦醇溶蛋白肽、γ3麦醇溶蛋白肽、γ4a麦醇溶蛋白肽、γ4d麦醇溶蛋白肽和BC大麦醇溶蛋白肽。

[0046] [7][1]至[6-2]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,与所述人源化和改

变之前相比,所述抗原结合分子与由HLA-DQ2.5与谷蛋白肽形成的复合物的结合活性增强。

[0047] [8][1]至[7]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中与所述人源化和改变之前相比,所述抗原结合分子具有增强的针对谷蛋白肽的交叉反应性。

[0048] [8-1][8]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述谷蛋白肽是ω2麦醇溶蛋白肽、BC大麦醇溶蛋白肽、γ1麦醇溶蛋白肽、γ2麦醇溶蛋白肽、γ4a麦醇溶蛋白肽和γ4d麦醇溶蛋白肽。

[0049] [9][1]至[8-1]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述抗原结合分子的重链和轻链中选自由下述(a)至(d)所示的氨基酸残基组组成的组的一组、两组、三组或全部氨基酸残基为相互静电排斥的氨基酸残基:

[0050] (a)重链恒定区(CH1)中根据EU编号位置175处的氨基酸残基和轻链恒定区(CL)中根据Kabat编号位置131处的氨基酸残基,

[0051] (b)CH1中根据EU编号位置175处的氨基酸残基,和CL中根据Kabat编号位置160处的氨基酸残基,

[0052] (c)CH1中根据EU编号位置175处的氨基酸残基,以及CL中根据Kabat编号位置131和160处的氨基酸残基,

[0053] (d)CH1中根据EU编号位置147和175处的氨基酸残基,以及CL中根据Kabat编号位置131和160处的氨基酸残基。

[0054] [10][9]所述的多特异性抗原结合分子,其中,形成重链可变区和轻链可变区之间的界面的2个或更多个氨基酸残基是相互静电排斥的氨基酸残基。

[0055] [11][10]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述相互静电排斥的氨基酸残基是选自由以下(a)和(b)的氨基酸残基组组成的组的一组或两组氨基酸残基:

[0056] (a)重链可变区中根据Kabat编号位置39处的氨基酸残基和轻链可变区中根据Kabat编号位置38处的氨基酸残基,

[0057] (b)重链可变区中根据Kabat编号位置45处的氨基酸残基和轻链可变区中根据Kabat编号位置44处的氨基酸残基。

[0058] [12][9]至[11]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述相互静电排斥的氨基酸残基选自包含在以下(X)或(Y)的任意一组中的氨基酸残基:

[0059] (X)谷氨酸(E)、天冬氨酸(D),

[0060] (Y)赖氨酸(K)、精氨酸(R)、组氨酸(H)。

[0061] [13][9]至[12]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其还包含与天然人IgG1 Fc结构域相比表现出对人Fcγ受体的降低的结合亲和力的Fc结构域。

[0062] [14][13]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述Fc结构域包含第235位的Arg和第236位的Arg,

[0063] 其中所述氨基酸位置根据EU编号进行编号。

[0064] [15][13]或[14]所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述Fc结构域由能够稳定缔合的第一Fc区亚基和第二Fc区亚基构成。

[0065] [16][15]所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述Fc结构域包含以下(e1)或(e2):

[0066] (e1)包含第349位的Cys,第366位的Ser,第368位的Ala和第407位的Val的第一Fc

区亚基,以及包含第354位的Cys和第366位的Trp的第二Fc区;

[0067] (e2)包含第439位的Glu的第一Fc区亚基,和包含第356位的Lys的第二Fc区,

[0068] 其中所述氨基酸位置根据EU编号进行编号。

[0069] [17][13]至[16]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,与天然的人IgG1 Fc结构域相比,所述Fc结构域对人FcRn进一步展示出更强的FcRn结合亲和力。

[0070] [18][16]所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第一和/或第二Fc区亚基包含第428位的Leu、第434位的Ala、第438位的Arg和第440位的Glu,

[0071] 其中所述氨基酸位置根据EU编号进行编号。

[0072] [19][1]至[8]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中所述多特异性抗原结合分子包含以下(i)至(xii)的氨基酸残基中的一个或多个:

[0073] (i)重链恒定区中第175位(EU编号)的谷氨酸或赖氨酸;

[0074] (ii)重链恒定区中第147位(EU编号)的谷氨酸;

[0075] (iii)轻链恒定区第131位(Kabat编号)的谷氨酸或赖氨酸;

[0076] (iv)轻链恒定区第160位(Kabat编号)的谷氨酸或赖氨酸;

[0077] (v)重链恒定区第235位(EU编号)的精氨酸;

[0078] (vi)重链恒定区第236位(EU编号)的精氨酸;

[0079] (vii)重链恒定区第356位(EU编号)的赖氨酸;

[0080] (viii)重链恒定区第428位(EU编号)的亮氨酸;

[0081] (ix)重链恒定区第434位(EU编号)的丙氨酸;

[0082] (x)重链恒定区第438位(EU编号)的精氨酸;

[0083] (xi)重链恒定区第439位(EU编号)的谷氨酸;

[0084] (xii)重链恒定区第440位(EU编号)的谷氨酸。

[0085] [19-1][19]所述的多特异性抗原结合分子,其为双特异性抗体,其包含:

[0086] 第一重链,其包含第175位(EU编号)的赖氨酸、第235位(EU编号)的精氨酸、第236位(EU编号)的精氨酸、第428位(EU编号)的亮氨酸、第434位(EU编号)的丙氨酸、第438位(EU编号)的精氨酸、第439位(EU编号)的谷氨酸和第440位(EU编号)的谷氨酸;

[0087] 第一轻链,其包含第131位(Kabat编号)的谷氨酸和第160位(Kabat编号)的谷氨酸;

[0088] 第二重链,其包含第147位(EU编号)的谷氨酸、第175位(EU编号)的谷氨酸、第235位(EU编号)的精氨酸、第236位(EU编号)的精氨酸、第356位(EU编号)的赖氨酸、第428位(EU编号)的亮氨酸、第434位(EU编号)的丙氨酸、第438位(EU编号)的精氨酸和第440位(EU编号)的谷氨酸;和

[0089] 第二条轻链,其包含第131位(Kabat编号)的赖氨酸和第160位(Kabat编号)的赖氨酸。

[0090] [19-2][19-1]所述的多特异性抗原结合分子,其中:

[0091] 所述第一重链还包含第419位(EU编号)的谷氨酸和第445位(EU编号)的脯氨酸,以及第446和447位(EU编号)的氨基酸缺失;和

[0092] 所述第二重链还包含第196位(EU编号)的赖氨酸、第445位(EU编号)的脯氨酸以及第446和447位(EU编号)的氨基酸缺失。

[0093] [19-3][19-1]或[19-2]所述的多特异性抗原结合分子,其中:

[0094] 所述第一重链还包含第16位(Kabat编号)的甘氨酸,第32位(Kabat编号)的丙氨酸,第61位(Kabat编号)的赖氨酸,第35a位(Kabat编号)的缬氨酸,第50位(Kabat编号)的丙氨酸,第64位(Kabat编号)的谷氨酸,第73位(Kabat编号)的苏氨酸,第95位(Kabat编号)的谷氨酸,和第102位(Kabat编号)的缬氨酸;

[0095] 第一轻链还包含第28位(Kabat编号)的谷氨酸,第55位(Kabat编号)的酪氨酸,第56位(Kabat编号)的谷氨酸或酪氨酸,第92位(Kabat编号)的谷氨酸,第94位(Kabat编号)的缬氨酸,和第95a位(Kabat编号)的丙氨酸;

[0096] 第二重链还包含第28位(Kabat编号)的谷氨酸、第30位(Kabat编号)的丙氨酸或谷氨酸、第31位(Kabat编号)的谷氨酸、第32位(Kabat编号)的色氨酸、第34位(Kabat编号)的苯丙氨酸、第35位(Kabat编号)的甲硫氨酸、第35a位(Kabat编号)的丝氨酸、第50位(Kabat编号)的丝氨酸、第61位(Kabat编号)的谷氨酸或甘氨酸、第64位(Kabat编号)的谷氨酸,以及第65位(Kabat编号)的谷氨酸;和

[0097] 第二轻链还包含第25位(Kabat编号)的苏氨酸、第54位(Kabat编号)的赖氨酸、第56位(Kabat编号)的谷氨酸、第67位(Kabat编号)的亮氨酸、第79位(Kabat编号)的谷氨酰胺,和第94位(Kabat编号)的赖氨酸。

[0098] [19a][1]至[19-3]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述多特异性抗原结合分子对谷蛋白肽自身实质上不具有结合活性。

[0099] [20]多特异性抗原结合分子,其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分;

[0100] 其中所述第一抗原结合部分包含以下(a1)至(a3)中的任一项:

[0101] (a1)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;

[0102] (a2)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;和

[0103] (a3)与(a1)或(a2)中所述的第一抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列,和与(a1)或(a2)中所述的第二抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列。

[0104] [21][20]所述的多特异性抗原结合分子,

[0105] 其中所述第二抗原结合部分包含以下(b1)至(b8)中的任一项:

[0106] (b1)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:138的CDR1,SEQ ID NO:139的CDR2,SEQ ID NO:140的CDR3;

[0107] (b2)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0108] (b3)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:144的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:145的CDR2,SEQ ID NO:146的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,

SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0109] (b4)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:147的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:148的CDR2,SEQ ID NO:149的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0110] (b5)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:153的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:154的CDR2,SEQ ID NO:155的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0111] (b6)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:156的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:157的CDR2,SEQ ID NO:158的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0112] (b7)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:159的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:160的CDR2,SEQ ID NO:161的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;和

[0113] (b8)与(b1)至(b7)中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列,以及与(b1)至(b7)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第四氨基酸序列。

[0114] [21-2]多特异性抗原结合分子,其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分,

[0115] 其中所述第二抗原结合部分包含以下(b1)至(b8)中的任一项:

[0116] (b1)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:138的CDR1,SEQ ID NO:139的CDR2,SEQ ID NO:140的CDR3;

[0117] (b2)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0118] (b3)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:144的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:145的CDR2,SEQ ID NO:146的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0119] (b4)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:147的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:148的CDR2,SEQ ID NO:149的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0120] (b5)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:153的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:154的CDR2,SEQ ID NO:155的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0121] (b6)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:156的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:157的CDR2,SEQ ID NO:158的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0122] (b7)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:159的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:160的CDR2,SEQ ID NO:161的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;和

[0123] (b8)与(b1)至(b7)中任一项所述的第一抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第一氨基酸序列,以及与(b1)至(b7)中任一项所述的第二抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第二氨基酸序列。

[0124] [22]多特异性抗原结合分子,其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分;

[0125] 其中所述第一抗原结合部分包含以下(c1)至(c3)中的任一项:

[0126] (c1)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;

[0127] (c2)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;和

[0128] (c3)与(c1)或(c2)中所述的第一抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第一氨基酸序列,和与(c1)或(c2)中所述的第二抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第二氨基酸序列,

[0129] 其中所述第二抗原结合部分包含以下(d1)至(d8)中的任一项:

[0130] (d1)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:138的CDR1,SEQ ID NO:139的CDR2,SEQ ID NO:140的CDR3;

[0131] (d2)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0132] (d3)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:144的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:145的CDR2,SEQ ID NO:146的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0133] (d4)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:147的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:148的CDR2,SEQ ID NO:149的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0134] (d5)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:153的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:154的CDR2,SEQ ID NO:155的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0135] (d6)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:156的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:157的CDR2,SEQ ID NO:158的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0136] (d7)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:159的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:160的CDR2,SEQ ID NO:161的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;和

[0137] (d8)与(d1)至(d7)中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第三氨基酸序列,以及与(d1)至(d7)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第四氨基酸序列。

[0138] [22-2]多特异性抗原结合,其包含含有第一和第二抗体可变区的第一抗原结合部分和含有第三和第四抗体可变区的第二抗原结合部分,其中所述多特异性抗原结合分子包含以下(1)至(15)的任一个:

[0139] (1)第一抗体可变区,其包括SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:138的CDR1,SEQ ID NO:139的CDR2,SEQ ID NO:140的CDR3;

[0140] (2)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0141] (3)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:144的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:145的CDR2,SEQ ID NO:146的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0142] (4)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:147的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:148的CDR2,SEQ ID NO:149的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0143] (5)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:153的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:154的CDR2,SEQ ID NO:155的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0144] (6)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:156的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:157的CDR2,SEQ ID NO:158的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0145] (7)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:159的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:160的CDR2,SEQ ID NO:161的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;和

[0146] (8)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165

的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:138的CDR1,SEQ ID NO:139的CDR2,SEQ ID NO:140的CDR3;

[0147] (9)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0148] (10)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:144的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:145的CDR2,SEQ ID NO:146的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0149] (11)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:147的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:148的CDR2,SEQ ID NO:149的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0150] (12)第一抗体可变区,其包括SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:153的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:154的CDR2,SEQ ID NO:155的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0151] (13)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:156的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:157的CDR2,SEQ ID NO:158的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0152] (14)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:159的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:160的CDR2,SEQ ID NO:161的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;和

[0153] (15)与(1)至(14)中任一项所述的第一抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第二抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70%、

75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第四氨基酸序列。

[0154] [23][20]至[22-2]中任一项所述的多特异性抗原结合分子,其中,所述第一和/或第二抗原结合部分中包含的抗体可变区包含人抗体框架或人源化抗体框架。

[0155] [24]多特异性抗原结合分子,其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分;

[0156] 其中所述第一抗原结合部分包含以下(e1)至(e3)中的任一项:

[0157] (e1)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区,和包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;

[0158] (e2)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区,和包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;和

[0159] (e3)与(e1)或(e2)中所述的第一抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第一氨基酸序列,和与(e1)或(e2)中所述的第二抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第二氨基酸序列。

[0160] [25][24]所述的多特异性抗原结合分子,其中所述第二抗原结合部分包含以下(f1)至(f8)中的任一项:

[0161] (f1)包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0162] (f2)包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0163] (f3)包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0164] (f4)包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0165] (f5)包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0166] (f6)包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0167] (f7)包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;和

[0168] (f8)与(f1)至(f7)中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第三氨基酸序列,以及与(f1)至(f7)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第四氨基酸序列。

[0169] [26]多特异性抗原结合分子,其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分;

[0170] 其中所述第一抗原结合部分包含以下(e1)至(e3)中的任一项:

[0171] (e1)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区,和包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;

[0172] (e2)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区,和包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;和

[0173] (e3)与(e1)或(e2)中所述的第一抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第一氨基酸序列,和与(e1)或(e2)中所述的第二抗体可变区具有

至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第二氨基酸序列,和

[0174] 其中所述第二抗原结合部分包含以下(f1)至(f8)中的任一项:

[0175] (f1)包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0176] (f2)包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0177] (f3)包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0178] (f4)包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0179] (f5)包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0180] (f6)包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0181] (f7)包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;和

[0182] (f8)与(f1)至(f7)中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第三氨基酸序列,以及与(f1)至(f7)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第四氨基酸序列。

[0183] [26-2]多特异性抗原结合分子,其包含含有第一和第二抗体可变区的第一抗原结合部分和含有第三和第四抗体可变区的第二抗原结合部分,其中所述多特异性抗原结合分子包含以下(1)至(15)的任一个:

[0184] (1)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0185] (2)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;和包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0186] (3)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0187] (4)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0188] (5)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0189] (6)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的第三抗体可变区;包含SEQ

ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0190] (7)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0191] (8)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0192] (9)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;和包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0193] (10)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0194] (11)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0195] (12)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0196] (13)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0197] (14)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0198] (15)与(1)至(14)中任一项所述的第一抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第二抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第四氨基酸序列。

[0199] [27]多特异性抗原结合分子,其包含选自由以下(A1)至(A3)组成的组的两条多肽链的组合:

[0200] (A1)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链;

[0201] (A2)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链;和

[0202] (A3)与(A1)或(A2)所述的第一重链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列,和与(A1)或(A2)所述的第一轻链序列具有至少70%、

75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第二氨基酸序列。

[0203] [27-2]多特异性抗原结合分子,其包含选自由以下(A1)至(A3)组成的组的两条多肽链的组合:

[0204] (A1)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第一重链和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链;

[0205] (A2)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的第一重链和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链;和

[0206] (A3)与(A1)或(A2)所述的第一重链序列具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第一氨基酸序列,和与(A1)或(A2)所述的第一轻链序列具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第二氨基酸序列。

[0207] [28][27]或[27-2]所述的多特异性抗原结合分子,其进一步包含选自由以下(B1)至(B8)组成的组的两条多肽链的组合:

[0208] (B1)包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的第二轻链;

[0209] (B2)包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0210] (B3)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0211] (B4)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0212] (B5)包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0213] (B6)包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0214] (B7)包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;和

[0215] (B8)与(B1)至(B7)中任一项所述的第二重链序列具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第三氨基酸序列,以及与(B1)至(B7)中任一项所述的第二轻链序列具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第四氨基酸序列。

[0216] [28-2][27]或[27-2]所述的多特异性抗原结合分子,其进一步包含选自由以下(B1)至(B8)组成的组的两条多肽链的组合:

[0217] (B1)包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的第二轻链;

[0218] (B2)包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0219] (B3)包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0220] (B4)包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0221] (B5)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0222] (B6)包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0223] (B7)包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;和

[0224] (B8)与(B1)至(B7)中任一项所述的第二重链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列,以及与(B1)至(B7)中任一项所述的第二轻链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第四氨基酸序列。

[0225] [29]多特异性抗原结合分子,其包含选自由以下(1)至(15)组成的组的四条多肽链的组合:

[0226] (1)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的第二轻链;

[0227] (2)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0228] (3)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0229] (4)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0230] (5)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0231] (6)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的第二轻链;

[0232] (7)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0233] (8)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0234] (9)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0235] (10)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸

序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0236] (11)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0237] (12)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0238] (13)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0239] (14)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;和

[0240] (15)与(1)至(14)中任一项所述的第一重链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第一轻链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第二重链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列;和与(1)至(14)中任一项所述的第二轻链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第四氨基酸序列。

[0241] [29-2]多特异性抗原结合分子,其包含选自由以下(1)至(15)组成的组的四条多肽链的组合:

[0242] (1)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的第二轻链;

[0243] (2)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0244] (3)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0245] (4)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0246] (5)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0247] (6)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:55

的氨基酸序列的第二轻链;

[0248] (7)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0249] (8)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0250] (9)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0251] (10)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0252] (11)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0253] (12)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0254] (13)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0255] (14)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;和

[0256] (15)与(1)至(14)中任一项所述的第一重链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第一轻链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第二重链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列;和与(1)至(14)中任一项所述的第二轻链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第四氨基酸序列。

[0257] [29a]以下(i)至(iii)中任一项的组合:

[0258] (i)含有[20]的(a1)至(a3)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子,以及含有[21]的(b1)至(b8)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子;

[0259] (ii)含有[24]的(e1)至(e3)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子,以及含有[25]的(f1)至(f8)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子;和

[0260] (iii)含有[27]或[27-2]的(A1)至(A3)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子,以及含有[28]或[28-2]的(B1)至(B8)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子。

[0261] [30]核酸,其编码[1]至[29]中任一项所述的多特异性抗原结合分子。

[0262] [31]载体,其包含[30]所述的核酸。

[0263] [32]细胞,其包含[30]所述的核酸或[31]所述的载体。

[0264] [33]制备多特异性抗原结合分子的方法,其包括培养[32]所述的细胞以便制备多特异性抗原结合分子。

[0265] [34][33]所述的方法,其还包括从所述细胞的培养物中回收所述多特异性抗原结合分子。

[0266] [35]药物组合物,其包含[1]至[29]中任一项所述的多特异性抗原结合分子或[29a]所述的组合,以及药学上可接受的载体。

[0267] [36][35]所述的组合物,其是用于治疗和/或预防乳糜泻的药物组合物。

[0268] [37][1]至[29]中任一项所述的多特异性抗原结合分子或[29a]所述的组合在制备药物中的用途。

[0269] [38][37]所述的用途,其中所述药物是用于治疗和/或预防乳糜泻的药物。

[0270] [39]治疗患有乳糜泻的个体的方法,其包括向所述个体施用有效量的[1]至[29]中任一项所述的多特异性抗原结合分子或[29a]所述的组合。

[0271] [40]用于治疗和/或预防乳糜泻的试剂盒,其至少包含[1]至[29]中任一项所述的多特异性抗原结合分子或[29a]所述的组合,以及使用说明。

[0272] 附图简述

[0273] [图1-1]图1-1显示了抗HLA-DQ抗体(变体DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6)对表达HLAII类的Ba/F3细胞系的结合的结果(所有抗体均以0.05微克(μg)/mL测试,并且对照DQN0139bb(DQN0139bb-SG181)(WO2018/155692)和IC17dK以1μg/mL进行测试)。在谷蛋白肽的指定名称中,“a”、“g”和“w”分别表示“α”、“γ”和“ω”。

[0274] [图1-2]图1-2显示了抗HLA-DQ抗体(变体DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6)对表达HLA II类的Ba/F3细胞系的结合的结果(所有抗体均以0.05μg/mL测试,并且对照DQN0139bb和IC17dK以1μg/mL进行测试)。

[0275] [图1-3]图1-3显示了抗HLA-DQ抗体(变体DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6)对表达HLA II类的Ba/F3细胞系的结合的结果(所有抗体均以0.05μg/mL测试,并且对照DQN0139bb和IC17dK以1μg/mL进行测试)。

[0276] [图1-4]图1-4显示了抗HLA-DQ抗体(变体DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6)对表达HLA II类的Ba/F3细胞系的结合的结果(所有抗体均以0.05μg/mL测试,并且对照DQN0139bb和IC17dK以1μg/mL进行测试)。

[0277] [图1-5]图1-5显示了抗HLA-DQ抗体(变体DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6)对表达HLA II类的Ba/F3细胞系的结合的结果(所有抗体均以0.05μg/mL测试,并且对照DQN0139bb和IC17dK以1μg/mL进行测试)。

[0278] [图1-6]图1-6显示了抗HLA-DQ抗体(变体DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6)对表达HLA II类的Ba/F3细胞系的结合的结果(所有抗体均以0.05μg/mL测试,并且对照DQN0139bb和IC17dK以1μg/mL进行测试)。

[0279] [图1-7]图1-7显示了抗HLA-DQ抗体(变体DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6)对表达HLAII类的Ba/F3细胞系的结合的结果(所有抗体均以0.05μg/mL测试,并

且对照DQN0139bb和IC17dK以1μg/mL进行测试)。

[0280] [图1-8]图1-8显示了抗HLA-DQ抗体(变体DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6)对表达HLA II类的Ba/F3细胞系的结合的结果(所有抗体均以0.05μg/mL测试,并且对照DQN0139bb和IC17dK以1μg/mL进行测试)。

[0281] [图1-9]图1-9显示了抗HLA-DQ抗体(变体DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6)对表达HLAII类的Ba/F3细胞系的结合的结果(所有抗体均以0.05μg/mL测试,并且对照DQN0139bb和IC17dK以1μg/mL进行测试)。

[0282] [图1-10]图1-10显示了抗HLA-DQ抗体(变体DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6)对表达HLAII类的Ba/F3细胞系的结合的结果(所有抗体均以0.05μg/mL测试,并且对照DQN0139bb和IC17dK以1μg/mL进行测试)。

[0283] [图1-11]图1-11显示了抗HLA-DQ抗体(变体DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1521/L0605-F6)对表达HLAII类的Ba/F3细胞系的结合的结果(抗体以0.05μg/mL进行测试,并且对照DQN0139bb和IC17dK以1μg/mL进行测试;(#)对于HLA-DQ2.5和HLA-DQ2.5/hCLIP,抗体以0.313μg/mL进行测试,并且对照DQN0139bb和IC17dK以20μg/mL进行测试)。

[0284] [图1-12]图1-12显示了抗HLA-DQ抗体(变体DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1353/L0681-F6)对表达HLA II类的Ba/F3细胞系的结合的结果(抗体以0.05μg/mL进行测试,并且对照DQN0139bb和IC17dK以1μg/mL进行测试;(#)对于HLA-DQ2.5和HLA-DQ2.5/hCLIP,抗体以0.313μg/mL进行测试,并且对照DQN0139bb和IC17dK以20μg/mL进行测试)。

[0285] [图1-13]图1-13显示了抗HLA-DQ抗体(变体DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1255/L0605-F6)对表达HLA II类的Ba/F3细胞系的结合的结果(抗体以0.05μg/mL进行测试,并且对照DQN0139bb和IC17dK以1μg/mL进行测试;(#)对于HLA-DQ2.5和HLA-DQ2.5/hCLIP,抗体以0.313μg/mL进行测试,并且对照DQN0139bb和IC17dK以20μg/mL进行测试)。

[0286] [图1-14]图1-14显示了抗HLA-DQ抗体(变体)对HLA-DP、DR、DQ5.1和DQ6.3的结合的结果(所有抗体均以0.05μg/mL进行测试,并且对照DQN0139bb和IC17dK以1μg/mL进行测试)。

[0287] [图1-15]图1-15显示了DQN0139bb对表达HLAII类的Ba/F3细胞系的结合的结果(对照DQN0139bb以1μg/mL进行测试)。

[0288] [图1-16]图1-16显示了IC17dK对表达HLA II类的Ba/F3细胞系的结果(对照IC17dK以1μg/mL进行测试)。

[0289] [图2]图2显示抗体对PBMC衍生的CD19+B细胞的结合的结果(抗体以0.05μg/mL进行测试,并且对照DQN0139bb和IC17dK以1μg/mL进行测试;(#)对于HLA-DQ2.5和HLA-DQ2.5-CLIP,抗体以0.313μg/mL进行测试;并且对照DQN0139bb和IC17dK以20μg/mL进行测试)。

[0290] [图3-1]图3-1显示了抗HLADQ抗体对HLA-DQ2.5/α1麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0291] [图3-2]图3-2显示了抗HLADQ抗体对HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0292] [图3-3]图3-3显示了抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/α1b麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0293] [图3-4]图3-4显示了抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/ω1麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0294] [图3-5]图3-5显示了抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/ω2麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0295] [图3-6]图3-6显示了抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0296] [图3-7]图3-7显示了抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/γ1麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0297] [图3-8]图3-8显示了抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0298] [图3-9]图3-9显示了抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/γ3麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0299] [图3-10]图3-10显示了抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/γ4a麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0300] [图4-1]图4-1显示了抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/α1麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0301] [图4-2]图4-2显示了抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0302] [图4-3]图4-3显示了抗HLADQ抗体对HLA-DQ2.5/α1b麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0303] [图4-4]图4-4显示了抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/ω1麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0304] [图4-5]图4-5显示了抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/ω2麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0305] [图4-6]图4-6显示了抗HLADQ抗体对HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0306] [图4-7]图4-7显示了抗HLADQ抗体对HLA-DQ2.5/γ1麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0307] [图4-8]图4-8显示了抗HLADQ抗体对HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0308] [图4-9]图4-9显示了抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/γ3麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0309] [图4-10]图4-10显示了抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/γ4a麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0310] [图5-1]图5-1显示了33聚体麦醇溶蛋白介导的HLA-DQ2.2/α1a麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化。

[0311] [图5-2]图5-2显示了33聚体麦醇溶蛋白介导的HLA-DQ2.2/α2麦醇溶蛋白依赖性

Jurkat T细胞活化。

[0312] [图5-3]图5-3显示了抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.2/α1a麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

[0313] [图5-4]图5-4显示了抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.2/α2麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化的抑制效果。

具体实施方式

[0314] 本文所描述或参考的技术和程序是本领域技术人员通常理解并通常使用常规方法来使用的,所述常规方法是例如在以下中描述的广泛利用的方法学:Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual第3版(2001)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编著,(2003));the series Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.):PCR 2:A Practical Approach(M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor编著(1995)),Harlow和Lane,编著(1988)Antibodies,A Laboratory Manual,and Animal Cell Culture(R.I.Freshney,编著(1987));Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait,编著,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis,编著,1998)Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney),编著,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather and P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell,编著,1993-8)J.Wiley and Sons;Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell,编著);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos,编著,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人,编著,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人,编著,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley和Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:A Practical Approach(D.Catty.,编著,IRL Press,1988-1989);Monoclonal Antibodies:APractical Approach(P.Shepherd and C.Dean编著.,Oxford University Press,2000);Using Antibodies:A Laboratory Manual(E.Harlow和D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra,编著,Harwood Academic Publishers,1995);以及Cancer:Principles and Practice of Oncology(V.T.DeVita等人,编著,J.B.Lippincott Company,1993)。

[0315] 用于本文目的的“受体人框架”是包含源自人免疫球蛋白框架或人共有框架的轻链可变结构域(VL)框架或重链可变结构域(VH)框架的氨基酸序列的框架,如以下所限定。“源自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可包含其相同的氨基酸序列,或其可含有氨基酸序列变化。在一些实施方案中,氨基酸变化的数目是10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、或2个或更少。在一些实施方案中,VL受体人框架的序列与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列相同。

[0316] “亲和力”是指分子(例如,抗体)的单结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,否则如本文所用的,“结合亲和力”是指固

有结合亲和力,其反映结合对成员(例如,抗体和抗原)之间的1:1相互作用。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以由解离常数(Kd)代表。亲和力可以通过本领域已知的常规方法测量,所述方法包括本文所描述的那些。以下描述用于测量结合亲和力的具体的说明性和示例性实施方案。

[0317] "亲和力成熟"抗体指在一个或更多个高变区(HVR)中具有一个或更多个改变的抗体,与不具有这种改变的亲本抗体相比,这种改变导致抗体对抗原的亲和力的提高。

[0318] 术语"抗原结合部分"或"抗原结合结构域"是指抗体的一部分,其包含与抗原的部分或全部特异性结合并互补的区域。抗原结合部分/结构域可以由例如一个或多个抗体可变结构域(也称为抗体可变区)提供。优选地,抗原结合部分/结构域包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)两者。

[0319] 术语"抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)"是指能够以足够亲和力结合HLA-DQ2.5或由HLA-DQ2.5和谷蛋白肽形成的一种或多种复合物的抗原结合分子(抗体),使得该抗体可用作靶向HLA-DQ2.5的诊断剂和/或治疗剂。在一个实施方案中,抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)与无关抗原的结合程度小于该抗体与HLA-DQ2.5或HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物结合的约10%,如通过例如放射免疫测定法(RIA)所测量的。在某些实施方案中,对HLA-DQ2.5或HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物具有"结合活性"的抗体具有1微摩尔(μM)或更小,100nM或更小,10nM或更小,1nM或更小,0.1nM或更小,0.01nM或更小,或0.001nM或更小(例如10^{-8}M或更小,例如10^{-8}M至10^{-13}M,例如10^{-9}M至10^{-13}M)的解离常数(Kd)。

[0320] 如本文所用,术语"抗原结合分子"是指包含抗原结合位点的任何分子或对抗原具有结合活性的任何分子,并且还可以指诸如具有大约五个氨基酸或更多的长度的肽或蛋白质的分子。肽和蛋白质不限于来自生物体的那些,例如,它们可以是由人工设计的序列产生的多肽。它们也可以是天然存在的多肽、合成多肽、重组多肽等中的任一种。包含已知稳定构象结构如α/β桶作为支架并且其中分子的一部分被制成抗原结合位点的支架分子,也是本文所述的抗原结合分子的一个实施方案。在一些实施方案中,"抗原结合分子"是抗体。本文的术语"抗原结合分子"或"抗体"以最广义使用,并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们展示出所需的抗原结合活性即可。在一些实施方案中,抗体是多特异性抗体。在一些实施方案中,抗体是双特异性抗体。

[0321] "抗体片段"是指除完整抗体之外的分子,其包含完整抗体的部分,该完整抗体的部分结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')$_2$;双抗体、线性抗体、单链抗体分子(例如scFv)、由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0322] 与参比抗体"结合相同表位的抗体"是指这样的抗体,所述抗体在竞争测定中阻断参比抗体与其抗原结合50%或更多,并且相反地,参比抗体在竞争测定中阻断所述抗体与其抗原结合50%或更多。本文提供了示例性竞争测定法。

[0323] "自身免疫性疾病"是指由个体自身组织引起的和针对个体自身组织的非恶性疾病或病症。本文的自身免疫性疾病特别地排除恶性或癌性疾病或病况,尤其排除B细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、多毛细胞白血病和慢性成髓细胞性白血病。自身免疫性疾病或病症的实例包括但不限于乳糜泻、炎性反应,例如炎性皮肤疾病(包括银屑病和皮炎(例如特应性皮炎));系统性硬皮病和硬化症;与炎性肠病(例如克

罗恩疾病和溃疡性结肠炎)相关的反应;呼吸窘迫综合征(包括成人呼吸窘迫综合征;ARDS);皮炎;脑膜炎;脑炎;葡萄膜炎;结肠炎;肾小球肾炎;过敏性病况,例如湿疹和哮喘以及涉及T细胞浸润和慢性炎症反应的其它病况;动脉粥样硬化;白细胞粘附缺陷;类风湿性关节炎;系统性红斑狼疮(SLE)(包括但不限于狼疮肾炎、皮肤性狼疮);糖尿病(例如I型糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病);多发性硬化;雷诺综合征;自身免疫性甲状腺炎;桥本甲状腺炎;变应性脑脊髓炎;干燥综合征;青少年型糖尿病;和与由通常在结核病、结节病、多肌炎、肉芽肿病和血管炎中发现的细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应相关的免疫反应;恶性贫血(爱迪生氏疾病);涉及白细胞渗出的疾病;中枢神经系统(CNS)炎性疾病;多器官损伤综合征;溶血性贫血(包括但不限于冷球蛋白血症或库姆斯阳性贫血);重症肌无力;抗原-抗体复合物介导的疾病;抗肾小球基底膜疾病;抗磷脂综合征;过敏性神经炎(allergic neuritis);格雷夫斯病;朗伯-伊顿肌无力综合征;大疱性类天疱疮(pemphigoid bullous);天疱疮;自身免疫性多内分泌腺疾病(autoimmune polyendocrinopathies);莱特氏病;僵人综合征;眼—口—生殖器三联综合征;巨细胞动脉炎;免疫复合物肾炎;IgA肾病;IgM多发性神经病;免疫性血小板减少性紫癜(ITP)或自身免疫性血小板减少症。

[0324] 术语“乳糜泻”是指遗传性自身免疫性疾病,其是由食物中所含的谷蛋白的摄入(ingenstion)引起小肠损害所致的。乳糜泻的症状包括但不限于胃肠道紊乱如腹痛、腹泻和胃食管反流、维生素缺乏、矿物质缺乏、中枢神经系统(CNS)症状如疲劳和焦虑抑郁、骨症状如骨软化症和骨质疏松症、皮肤症状如皮肤炎症、血液症状如贫血和淋巴细胞减少症、和其它症状如不育、性腺机能减退和儿童发育不全和身材矮小。

[0325] 术语“嵌合”抗体指这样的抗体,其中重链和/或轻链的一部分来源于特定来源或物种,而重链和/或轻链的剩余部分来源于不同来源或物种。

[0326] 抗体的“类别”是指其重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。抗体主要分为五类:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的一些可以进一步分成亚类(同种型),例如IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1和IgA_2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为α、δ、ε、γ和μ。

[0327] 试剂(例如,药物制剂)的“有效量”是指实现所需的治疗或预防结果所必要的剂量和时间的有效量。

[0328] 在本文中,术语“Fc区”用于限定含有恒定区的至少一部分的免疫球蛋白重链的C末端区。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基末端。然而,Fc区的C-末端赖氨酸(Lys447)或甘氨酸-赖氨酸(残基446-447)可以存在或不存在。除非本文另有说明,否则Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号是根据EU编号系统(也称为EU索引)进行的,如在Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述。

[0329] “框架”或“FR”是指除高变区(HVR)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列通常以以下顺序出现在VH(或VL)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0330] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用,用于指这样的抗

体,所述抗体具有与天然抗体结构基本上相似的结构或具有含有本文所限定的Fc区的重链。

[0331] 在本文中,术语“谷蛋白”统指在小麦和其它相关谷物中发现的称为醇溶谷蛋白的储存蛋白的合成物(composite)。在肠腔中,谷蛋白被降解成所谓的谷蛋白肽。谷蛋白肽包括但不限于来自小麦的麦醇溶蛋白、来自大麦的大麦醇溶蛋白、来自黑麦的裸麦醇溶蛋白和来自燕麦的燕麦蛋白。

[0332] 在乳糜泻中,谷蛋白肽是引起疾病的T细胞识别的抗原肽。同时,免疫显性(immune dominance)是免疫应答主要由相对少量的抗原肽触发的现象。这种抗原肽可称为“免疫显性肽”。在乳糜泻中,这种免疫显性肽包括例如α1麦醇溶蛋白(其也称为“α1a麦醇溶蛋白”)和α2麦醇溶蛋白(两者都包括在33聚体麦醇溶蛋白的序列中)和ω1麦醇溶蛋白、ω2麦醇溶蛋白和BC大麦醇溶蛋白(总计5种肽)(Science Translational Medicine,2010年7月21日:第2卷,第41期,第41ra51页)。或者,免疫显性肽包括α1麦醇溶蛋白、α2麦醇溶蛋白、ω1麦醇溶蛋白、ω2麦醇溶蛋白、BC大麦醇溶蛋白、γ1麦醇溶蛋白和γ2麦醇溶蛋白(总计7种肽),但不限于此。在本文中,此类免疫显性肽可称为“与乳糜泻相关的免疫显性肽”。只要它们与乳糜泻显性相关,肽的类型和总数没有特别限制。

[0333] 如本文所用的,短语“实质上无结合活性”是指抗体以包括非特异性或背景结合但不包括特异性结合的结合水平结合至不感兴趣抗原的活性。换句话说,这种抗体对不感兴趣的抗原“不具有特异性/显著的结合活性”。特异性可以通过本说明书中提及的或本领域已知的任何方法测量。上述非特异性或背景结合的水平可以是零,或者可以不是零而是接近零,或者可以非常低到足以在技术上被本领域技术人员忽略。例如,当技术人员在合适的结合测定中不能检测或观察到抗体与不感兴趣的抗原之间结合的任何显著的(或相对强的)信号时,可以说抗体对不感兴趣的抗原“实质上不具有结合活性”或“不具有特异性/显著的结合活性”。或者,“实质上无结合活性”或“无特异性/显著的结合活性”可被改述为(对不感兴趣的抗原)“无特异性地/显著地/实质上结合”。有时,短语“无结合活性”与本领域中的短语“实质上无结合活性”或“无特异性/显著的结合活性”具有基本上相同的含义。

[0334] 在本文中,“HLA-DR/DP”是指“HLA-DR和HLA-DP”或“HLA-DR或HLA-DP”。这些HLA是由人MHC II类基因座上的相应单倍型等位基因编码的MHC II类分子。“HLA-DQ”总称HLA-DQ同工型,包括HLA-DQ2.5、HLA-DQ7.5、HLA-DQ5.1、HLA-DQ6.3、HLA-DQ7.3和HLA-DQ8。在本发明中,除HLA-DQ2.5外,HLA-DQ分子包括但不限于已知亚型(同工型)的HLA-DQ分子,例如HLA-DQ2.2,HLA-DQ2.3,HLA-DQ4.3,HLA-DQ4.4,HLA-DQ5.1,HLA-DQ5.2,HLA-DQ5.3,HLA-DQ5.4,HLA-DQ6.1,HLA-DQ6.2,HLA-DQ6.3,HLA-DQ6.4,HLA-DQ6.9,HLA-DQ7.2,HLA-DQ7.3,HLA-DQ7.4,HLA-DQ7.5,HLA-DQ7.6,HLA-DQ8,HLA-DQ9.2和HLA-DQ9.3。类似地,“HLA-DR(DP)”是指HLA-DR(DP)同工型。

[0335] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且是指其中已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,其包括原代转化的细胞和来源于其的后代,而不考虑传代的次数。后代在核酸内容物上可能与亲本细胞不完全相同,但可包含突变。本文包括具有与在原始转化细胞中筛选或选择的相同的功能或生物活性的突变后代。

[0336] “人抗体”是这样的抗体,其具有的氨基酸序列对应于由人或人细胞产生的抗体或

来源于利用人抗体库或其它人抗体编码序列的非人来源的抗体的氨基酸序列。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0337] “人共有框架”是这样的框架,其代表在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常见的氨基酸残基。术语“人抗体框架”也可用于指框架。通常,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自可变结构域序列的亚组。通常,序列亚组是如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,NIH出版物91-3242,Bethesda MD(1991),卷1-3中的亚组。在一个实施方案中,对于VL,亚组是如上文Kabat等中的亚组κI。在一个实施方案中,对于VH,亚组是如上文Kabat等所述的亚组III。

[0338] “人源化”抗体是指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体将包含基本上全部的至少一个(并且典型地,两个)可变结构域,其中全部或基本上全部的HVR(例如CDR)对应于非人抗体的HVR,并且全部或基本上全部的FR对应于人抗体的FR。人源化抗体可任选地包含源自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体例如非人抗体的“人源化形式”是指已经过人源化的抗体。

[0339] 如本文所用的术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变结构域中序列高变(“互补决定区”或“CDR”)和/或形成结构确定的环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触”)的每个区域。通常,抗体包含六个HVR:VH中的三个(H1,H2,H3)和VL中的三个(L1,L2,L3)。本文中的示例性HVR包括:

[0340] (a)出现在氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)处的高变环(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987));

[0341] (b)出现在氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)处的CDR(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991));

[0342] (c)出现在氨基酸残基27c-36(L1)、46-55(L2)、89-96(L3)、30-35b(H1)、47-58(H2)和93-101(H3)处的抗原接触(MacCallum等人J.Mol.Biol.262:732-745(1996));和

[0343] (d)(a)、(b)和/或(c)的组合,包括HVR氨基酸残基46-56(L2)、47-56(L2)、48-56(L2)、49-56(L2)、26-35(H1)、26-35b(H1)、49-65(H2)、93-102(H3)和94-102(H3)。

[0344] 在一个实施方案中,HVR残基包含说明书中所鉴定的那些。

[0345] 除非另有说明,否则可变结构域中的HVR残基和其他残基(例如FR残基)在本文中根据Kabat等编号,见上文。

[0346] “免疫缀合物”是与一个或更多个异源分子缀合的抗体。

[0347] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于家养动物(例如,牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类动物(例如,人和非人灵长类动物如猴)、兔和啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,个体或受试者是人。

[0348] 在本发明中,当评估抗HLA-DQ2.5抗体与这些HLA-DQ分子的结合时,CLIP肽可以与上述合适的HLA-DQ分子一起使用。

[0349] “分离的”抗体是已经从其天然环境的组分中分离的抗体。在一些实施方案中,抗体被纯化至大于95%或99%的纯度,如由例如电泳(例如SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或层析(例如离子交换或反相HPLC)所确定的。对于用于评估抗体纯度的方法的综述,

参见例如Flatman等,J.Chromatogr.B 848:79-87(2007)。

[0350] “分离的”核酸指已经从其天然环境的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括这样的核酸分子,所述核酸分子被包含在通常含有所述核酸分子的细胞中,但是所述核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置处。

[0351] “编码抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)的分离的核酸”(也简称为“编码抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)的核酸”)是指一个或更多个编码抗体重链和轻链(或其片段)的核酸分子,包括在单个载体或分开的载体中的此类核酸分子,以及存在于宿主细胞中的一个或更多个位置处的此类核酸分子。

[0352] 本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同源的抗体群体获得的抗体,即,构成群体的个体抗体是相同的和/或结合相同的表位,除了可能的变体抗体之外,例如,含有天然存在的突变或在单克隆抗体制备物的制备过程中产生的变体抗体,这种变体通常少量存在。对比于多克隆抗体制备物(通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体),单克隆抗体制备物的各单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。因此,修饰语“单克隆”指示抗体的特征是从基本上同源的抗体群体获得,并且不应解释为需要通过任何特定方法制备抗体。例如,根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法,和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,本文中描述了这样的方法以及其他用于制备单克隆抗体的示例性方法。

[0353] “裸抗体”指不与异源部分或放射性标记缀合的抗体。裸抗体可存在于药物制剂中。

[0354] “天然抗体”指天然存在的具有各种结构的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是大约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由二硫键键合的两条相同的轻链和两条相同的重链组成。从N端到C端,每条重链具有可变区(VH),其也称为可变重结构域或重链可变结构域,之后是三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3)。类似地,从N端到C端,每条轻链具有可变区(VL),其也称为可变轻结构域或轻链可变结构域,之后是恒定轻(CL)结构域。抗体的轻链基于其恒定结构域的氨基酸序列可以被分配为称为κ和λ的两种类型中的一种。

[0355] 术语“核酸分子”或“多核苷酸”包括含有核苷酸聚合物的任何化合物和/或物质。每个核苷酸由碱基,特别是嘌呤或嘧啶碱基(即胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U))、糖(即脱氧核糖或核糖)和磷酸基团组成。通常,核酸分子由碱基序列描述,由此所述碱基代表核酸分子的一级结构(线性结构)。碱基序列通常从5’到3’表示。在本文中,术语核酸分子包括脱氧核糖核酸(DNA)(包括例如互补DNA(cDNA)和基因组DNA),核糖核酸(RNA)(特别是信使RNA (mRNA)),DNA或RNA的合成形式,以及包含两个或多个这些分子的混合聚合物。核酸分子可以是线性的或环状的。此外,术语核酸分子包括有义链和反义链两者,以及单链和双链形式。此外,本文所述的核酸分子可包含天然存在或非天然存在的核苷酸。非天然存在的核苷酸的示例包括具有衍生化糖或磷酸骨架连接或化学修饰残基的修饰的核苷酸碱基。核酸分子还包括适合作为在体外和/或体内(例如在宿主或患者中)直接表达本发明抗体的载体的DNA和RNA分子。这种DNA(例如,cDNA)或RNA(例如,mRNA)载体可以是未修饰的或修饰的。例如,可以对mRNA进行化学修饰以增强RNA载体的稳定性和/或编码分子的表达,从而可以将mRNA注射到受试者内以在体内产生抗体(参见例如Stadler等人,Nature Medicine 2017,2017年6月12日在线公开,doi:10.1038/nm.4356或EP 2 101

823 B1)。

[0356] 相对于参考多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为在将所述序列进行比对并在必要时引入空位以获取最大百分比序列同一性,且不将任何保守置换视为序列同一性的一部分之后,候选序列中的氨基酸残基与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的百分比。用于确定百分比氨基酸序列同一性的比对可以以本领域技术范围内的多种方式实现,例如,使用公众可获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign(DNASTAR)软件或GENETYX(注册商标)(Genetyx有限公司)。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括在被比较序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0357] ALIGN-2序列比较计算机程序的作者是Genentech,Inc.,并且源代码已经与用户文件一起提交于美国版权局,Washington D.C.,20559,其以美国版权注册号TXU510087注册。ALIGN-2程序可从Genentech,Inc.,南旧金山,加利福尼亚州公众获得,或者可从源代码编译。应编译ALIGN-2程序以在UNIX操作系统上使用,包括数字UNIX V4.0D。所有序列比较参数由ALIGN-2程序设定且不会发生变化。在使用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A相对于、和或针对给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(可以备选地表述为给定氨基酸A相对于、和或针对给定氨基酸序列B具有或包括特定%氨基酸序列同一性)计算如下:

[0358] 100乘以分数X/Y

[0359] 其中X是在A和B的该程序比对中通过序列比对程序ALIGN-2评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,并且其中Y是B中氨基酸残基的总数。应当理解,当氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A相对于B的%氨基酸序列同一性将不等于B相对于A的%氨基酸序列同一性。除非另有特别说明,本文所用的所有%氨基酸序列同一性值都是如前一段中所述使用ALIGN-2计算机程序获得的。

[0360] 术语“药物制剂”或“药物组合物”是指这样的制剂,其形式为允许包含在其中的活性成分的生物活性是有效的,并且不包含对将要施用该制剂/组合物的受试者具有不可接受的毒性的其他成分。

[0361] “药学上可接受的载体”是指药物制剂/组合物中除活性成分以外的成分,其对受试者是无毒的。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0362] 除非另有说明,本文所用的术语“HLA-DQ2.5”指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物如灵长类(例如人)和啮齿类(例如小鼠和大鼠))的任何天然HLA-DQ2.5。该术语包括“全长”未加工的HLA-DQ2.5以及来源于细胞中的加工的任何形式的HLA-DQ2.5。该术语还包括HLA-DQ2.5的天然存在的变体,例如剪接变体或等位变体。示例性HLA-DQ2.5的氨基酸序列在Research Collaboratory for Structural Bioinformatics(RCSB)蛋白质数据库(PDB)登录号4OZG和IPD-IMGT/HLA数据库中是公开可获得的。

[0363] 本文中,“TCR”是指“T细胞受体”,其是位于T细胞(例如HLA-DQ2.5限制性CD4+T细胞)表面上的膜蛋白,并识别呈递于包括HLA-DQ2.5的MHC分子上的抗原片段(例如谷蛋白肽)。

[0364] 如本文所用,“治疗”(及其语法上的变体如“治疗(treat)”或“进行治疗(treating)”)是指试图改变被治疗个体的自然过程的临床干预,并且可以为了预防或在临床病理学过程期间进行。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、

减弱疾病的任何直接或间接的病理后果、防止转移、降低疾病进展速率、改善或减轻疾病状态、以及缓解或改善预后。在一些实施方案中,本发明的抗体用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0365] 术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL)通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个保守框架区(FR)和三个高变区(HVR)。(参见,例如Kindt等人Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman和Co.,第91页(2007).)单个VH或VL结构域可足以赋予抗原结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可以分别使用来自与所述抗原结合的抗体的VH或VL结构域筛选互补VL或VH结构域的文库来分离。参见,例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0366] 本文所用的术语”载体”是指能够使与其相连的另一核酸增殖的核酸分子。该术语包括作为自我复制的核酸结构的载体以及掺入到已引入该载体的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与它们可操作连接的核酸的表达。这样的载体在本文中称为“表达载体”。

[0367] 氨基酸修饰

[0368] 本发明的抗原结合分子(或抗体)可包含一个或多个修饰。这些修饰包括例如抗体氨基酸序列内的残基的缺失和/或向其中插入和/或对其置换。可以进行缺失、插入和置换的任何组合,以得到最终构建体,条件是最终构建体具有所需特征,例如抗原结合。

[0369] 本发明的抗原结合分子(或抗体)可包含氨基酸置换。保守性置换显示在表1-1的“优选置换”标题下。更多实质性变化在表1-1中“示例性置换”的标题下提供,且如下文关于氨基酸侧链类别进一步所描述的。可以将氨基酸置换引入目的抗体中,并针对所需的活性(例如抗原结合)筛选产物。

[0370] [表1-1]

[0371]

原始残基	示例性置换	优选置换
Ala(A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg(R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn(N)	Gln;His;Asp,Lys;Arg	Gln
Asp(D)	Glu;Asn	Glu
Cys(C)	Ser;Ala	Ser
Gln(Q)	Asn;Glu	Asn
Glu(E)	Asp;Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile(I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸;Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys(K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met(M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe(F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala

Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val;Ser	Ser
Trp(W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val(V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;正亮氨酸	Leu

[0372] 在本文中,作为表示氨基酸改变的表述,可以适当地使用在表示特定位置的数字的前后分别显示改变前后的氨基酸的1个字母或3个字母的代码的表述。例如,当置换抗体可变区中包含的氨基酸时使用的改变N100bL或Asn100bLeu表示在位置100b(根据Kabat编号)用Leu置换Asn。即,数字表示根据Kabat编号的氨基酸位置,数字前写的1个字母或3个字母的氨基酸代码表示置换前的氨基酸,数字后写的1个字母或3个字母的氨基酸代码表示置换后的氨基酸。类似地,当置换抗体恒定区中包含的Fc区的氨基酸时使用的改变P238D或Pro238Asp表明用Asp置换在位置238处(根据EU编号)的Pro。即,数字表示根据EU编号的氨基酸位置,数字前写的1个字母或3个字母的氨基酸代码表示置换前的氨基酸,数字后写的1个字母或3个字母的氨基酸代码表示置换后的氨基酸。

[0373] 多特异性抗原结合分子/抗体

[0374] 术语“多特异性抗原结合分子(抗体)”是指特异性结合多于一种抗原(例如,肽)或表位的抗原结合分子(抗体)。在一些实施方案中,抗原结合分子(抗体)至少具有可以结合一种或多种抗原(例如肽)的第一抗原结合部分/结构域和可以结合一种或多种抗原(例如肽)的第二抗原结合部分/结构域。由第一抗原结合部分/结构域结合的一些或所有抗原可以不同于由第二抗原结合部分/结构域结合的一些或所有抗原。或者,第一抗原结合部分/结构域所结合的一些抗原可以与第二抗原结合部分/结构域所结合的一些抗原相同。

[0375] 在本发明的上下文中,“多特异性抗原结合分子(抗体)”可以特异性结合不同类型的抗原或表位。更具体地说,多特异性抗原结合分子(抗体)是指对至少两种不同类型的抗原或表位具有特异性的分子/抗体,并且除了识别不同抗原的分子/抗体外,还包括识别同一抗原上不同表位的分子/抗体。例如,通常,这样的分子与两种抗原或表位结合(“双特异性抗原结合分子(抗体)”;在本说明书中使用与“双特异性抗原结合分子(抗体)”具有相同的含义),但它们甚至可能对更多的抗原或表位(例如,三种或更多类型的抗原)具有特异性。

[0376] 在本文中,诸如“多特异性”和“双特异性”的术语是指抗原结合结构域/区域的特异性不同于另一抗原结合结构域/区域的特异性。即,该术语意指抗原结合分子具有2种或更多种特异性。例如,在“双特异性”抗原结合分子(抗体)中,第一抗原结合部分/结构域可以结合由HLA-DQ2.5和谷蛋白肽形成的第一组复合物,并且第二抗原结合部分/结构域可以结合部分/结构域可以结合由HLA-DQ2.5和谷蛋白肽形成的第二组复合物。两个组的成员(即复合物)可能重叠但可能不相同。也就是说,一些复合物可能包含在两个组中。术语例如“多特异性”和“双特异性”可以涵盖这种情况。这同样适用于不被第一/第二抗原结合部分/结构域结合的第一和第二组复合物。

[0377] 术语“双特异性”是指抗原结合分子能够特异性结合至少两个不同的抗原决定簇。本发明的“多特异性抗原结合分子”的优选实施方案的示例包括多特异性抗体。当具有降低的Fcγ受体结合活性的Fc区用作多特异性抗体Fc区时,可以适当地使用源自多特异性抗体

的Fc区。双特异性抗体特别优选作为本发明的多特异性抗体。在这种情况下,双特异性抗体是具有两种不同特异性的抗体。IgG型双特异性抗体可以从通过融合产生IgG抗体的两种类型的杂交瘤产生的杂交的杂交瘤(四体杂交瘤)中分泌(Milstein等人,Nature(1983)305,537-540)。

[0378] 多特异性抗原结合分子(抗体)可包含至少两个抗原结合部分/结构域。双特异性抗原结合分子(抗体)可以包含第一抗原结合部分/结构域和第二抗原结合部分/结构域。

[0379] 双特异性抗原结合分子(或双特异性抗体)可以包含第一抗原结合部分/结构域和第二抗原结合部分/结构域。第一抗原结合部分/结构域可以包含第一抗体可变区和第二抗体可变区。第一抗体可变区与第二抗体可变区缔合。第一抗体可变区和第二抗体可变区之间的缔合允许第一抗原结合部分/结构域与第一抗原/表位的结合。类似地,第二抗原结合部分/结构域可以包含第三抗体可变区和第四抗体可变区。第三抗体可变区与第四抗体可变区缔合。第三抗体可变区和第四抗体可变区之间的缔合允许第二抗原结合部分/结构域与第二抗原/表位的结合。在一些实施方案中,第一抗体可变区是重链(H-链)可变区(VH)(可称为“第一重链(H-链)可变区(VH)”),并且第二抗体可变区是轻链(L-链)可变区(VL)(可称为“第一轻链(L-链)可变区(VL)”)。在一些实施方案中,第三抗体可变区是重链(H-链)可变区(VH)(可称为“第二重链(H-链)可变区(VH)”),并且第四抗体可变区是轻链(L-链)可变区(VL)(可称为“第二轻链(L-链)可变区(VL)”)。第一重链(H链)可变区(VH)与第一轻链(L链)可变区(VL)缔合以结合第一抗原/表位。第二重链(H链)可变区(VH)与第二轻链(L链)可变区(VL)缔合以结合第二抗原/表位。可变区之间(即,VH和VL之间)的缔合(或者称为“相互作用”)依赖于本领域已知的VH/VL界面上的结构(例如,氨基酸残基)。

[0380] 在本发明中,优选地,双特异性抗原结合分子(抗体)可以结合两种或更多种谷蛋白肽(或由HLA-DQ2.5和谷蛋白肽形成的复合物)。在一些实施方案中,双特异性抗原结合分子(抗体)包含第一抗原结合部分/结构域(其包含第一抗体可变区和第二抗体可变区(同上))以及第二抗原结合部分/结构域(其包含第三抗体可变区和第四抗体可变区(同上)),其中,所述第一抗原结合部分/结构域结合由HLA-DQ2.5和谷蛋白肽形成的一个或多个复合物,所述第二抗原结合部分/结构域结合由HLA-DQ2.5和谷蛋白肽形成的一个或多个复合物。在本文中,优选地,第一抗原结合部分/结构域所结合的复合物中的至少一个谷蛋白肽不同于第二抗原结合部分/结构域所结合的复合物中的至少一个谷蛋白肽。换言之,第一抗原结合部分/结构域所结合的复合物中的谷蛋白肽成员和第二抗原结合部分/结构域所结合的复合物中的谷蛋白肽成员可以重叠但不完全相同。第一/第二抗原结合部分/结构域所结合的复合物中的谷蛋白肽可以选自本文描述的任何谷蛋白肽。优选地,第一/第二抗原结合部分/结构域能够结合一种类型的谷蛋白肽,或两种或更多种类型的谷蛋白肽。

[0381] 在本公开的上下文中,为简单起见,可以使用术语“抗体”而不是也指示“抗原结合分子”。然而,技术人员可以理解,在适用的情况下,术语“抗体”可以被替换为“抗原结合分子”。

[0382] 一方面,本发明部分基于抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)与将谷蛋白肽呈递给T细胞的HLA-DQ2.5的结合。在某些实施方案中,提供了结合HLA-DQ2.5的抗体。

[0383] 一方面,本发明提供了对HLA-DQ2.5或一种或多种由HLA-DQ2.5和谷蛋白肽形成的复合物具有结合活性的抗原结合分子或抗体。在某些实施方案中,抗HLA-DQ2.5抗原结合分

子(抗体)具有下述功能/特征。

[0384] 抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)对以与谷蛋白肽的复合物形式(即HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物)的HLA-DQ2.5具有结合活性。更优选地,抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)对以与谷蛋白肽的复合物形式(即HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物)的HLA-DQ2.5具有特异性结合活性。

[0385] 抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)对非目的抗原例如HLA-DQ5.1/DQ6.3/DQ7.3/DQ7.5/DQ8/DR/DP实质上无结合活性,即抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)不与非目的抗原实质性结合。例如,抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)对HLA-DR/DP不具有特异性结合活性,或对HLA-DR/DP不具有显著的结合活性。也就是说,该抗体不特异性结合HLA-DR/DP或显著结合HLA-DR/DP。同样地,抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)对HLA-DQ分子例如HLA-DQ7.5、HLA-DQ8、HLA-DQ5.1、HLA-DQ6.3和HLA-DQ7.3实质上不具有结合活性,即抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)不实质性结合HLA-DQ分子例如HLA-DQ7.5、HLA-DQ8、HLA-DQ5.1、HLA-DQ6.3和HLA-DQ7.3。换言之,抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)对HLA-DQ分子如HLA-DQ7.5、HLA-DQ8、HLA-DQ5.1、HLA-DQ6.3和HLA-DQ7.3不具有特异性/显著结合活性。即,抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)不特异性/显著结合HLA-DQ分子如HLA-DQ7.5、HLA-DQ8、HLA-DQ5.1、HLA-DQ6.3和HLA-DQ7.3。

[0386] 为了防止对这些非靶标MHC II类分子的任何实质性抑制作用并提高具有HLA-DQ2.5的乳糜泻患者的抗体PK,这些特征("实质上没有结合活性")是优选的。

[0387] "实质上没有结合活性"的特征可以例如使用本文描述的FACS结果来定义。在本文所述的测量条件下,对特定抗原"实质上没有结合活性"的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)的MFI(平均荧光强度)值可以为阴性对照的MFI值的250%或更小,优选200%或更小,更优选150%或更小。

[0388] 在一个方面,对于双特异性抗原结合分子(抗体),在本文所述的测量条件下,当将IC17dK的MFI值设为0%并且DQN0139bb的MFI值设为100%时,对特定抗原"实质上没有结合活性"的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)的MFI值为2%或更低,更优选为1%或更低。DQN0139bb公开于例如WO2018/155692中。

[0389] 抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)对与本文所述的谷蛋白肽复合的HLA-DQ2.5具有结合活性。在本文中,将HLA-DQ2.5分子与谷蛋白肽形成的复合物称为"由HLA-DQ2.5与谷蛋白肽形成的复合物"、"HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物"、或"HLA-DQ2.5/谷蛋白肽"。它也可以重新表述为,例如,"负载有谷蛋白肽的HLA-DQ2.5"、"谷蛋白肽负载的HLA-DQ2.5"、"由谷蛋白肽结合的HLA-DQ2.5"、"以与谷蛋白肽的复合物形式的HLA-DQ2.5",和"HLA-DQ2.5和谷蛋白肽的复合物"。上述措辞(例如,"由HLA-DQ2.5和……[肽]形成的复合物")也适用于肽,例如33聚体麦醇溶蛋白肽、α1麦醇溶蛋白肽(也可称为"α1a麦醇溶蛋白肽")、α2麦醇溶蛋白肽、γ1麦醇溶蛋白肽、γ2麦醇溶蛋白肽、ω1麦醇溶蛋白肽、ω2麦醇溶蛋白肽、BC大麦醇溶蛋白肽、α3麦醇溶蛋白肽、α1b麦醇溶蛋白肽、γ4a麦醇溶蛋白肽、γ4b麦醇溶蛋白肽、燕麦蛋白1肽、燕麦蛋白2肽、燕麦蛋白3肽、大麦醇溶蛋白1肽、大麦醇溶蛋白2肽、裸麦醇溶蛋白1肽、裸麦醇溶蛋白2肽和26聚体麦醇溶蛋白肽、14聚体1肽、CLIP(hCLIP)肽、乙型肝炎病毒1(HBV1)肽、沙门氏菌肽、牛分枝杆菌(M.bovis)肽、甲状腺过氧化物酶(TPO)肽等。

[0390] 同时,抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)对"非相关"肽实质上没有结合活性。在

此,“非相关”肽包括那些已被报道能够呈递于HLA-DQ2.5上但与乳糜泻无关或与本发明无关的肽,即不是上述目的谷蛋白肽的那些肽。例如,非相关肽包括但不限于CLIP(hCLIP)肽、乙型肝炎病毒1(HBV1)肽、沙门氏菌肽、牛分枝杆菌(M.bovis)肽、甲状腺过氧化物酶(TPO)肽等。

[0391] 为了防止对这些非靶标MHC II类分子和以与非相关肽的复合物形式的HLA-DQ2.5产生任何实质性抑制作用,并提高乳糜泻患者的抗体PK,这些特征(“实质上没有结合活性”)是优选的。

[0392] “结合活性”的特征可以例如使用本文描述的FACS结果来定义。在本文所述的测量条件下,对特定抗原具有“结合活性”的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)的MFI(平均荧光强度)值可以为阴性对照的MFI值的300%或更多,优选500%或更多,更优选1000%或更多。

[0393] 在一个方面,对于双特异性抗原结合分子(抗体),在本文所述的测量条件下,当将IC17dK的MFI值设为0%并且DQN0139bb的MFI值设为100%时,对特定抗原具有“结合活性”的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)的MFI值为3%或更大,优选6%或更大,优选10%或更大,更优选20%或更大。

[0394] 当特别提到结合的特异性时,“结合活性”可以改写为“特异性结合活性”。

[0395] 本发明的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)的解离常数(Kd)为5×10^{-7}M或更小,优选4×10^{-7}M或更小,优选3×10^{-7}M或更小,优选2×10^{-7}M或更小,优选1×10^{-7}M或更小,优选9×10^{-8}M或更小,优选8×10^{-8}M或更小,优选7×10^{-8}M或更小,优选6×10^{-8}M或更小,优选5×10^{-8}M或更小,优选4×10^{-8}M或更小,优选3×10^{-8}M或更小,优选2×10^{-8}M或更小,优选1×10^{-8}M或更小,优选9×10^{-9}M或更小,优选8×10^{-9}M或更小,优选7×10^{-9}M或更小,优选6×10^{-9}M或更小,优选5×10^{-9}M或更小,优选4×10^{-9}M或更小,优选3×10^{-9}M或更小,优选2×10^{-9}M或更小,用于结合一个或多个由HLA-DQ2.5和本文所述的谷蛋白肽形成的复合物。

[0396] 本发明的合适的多特异性抗原结合分子包含

[0397] (1)包含抗体可变区的部分/结构域,其对与谷蛋白肽的复合物形式的HLA-DQ2.5具有结合活性;

[0398] (2)包含抗体可变区的部分/结构域,其对与谷蛋白肽的复合物形式的HLA-DQ2.5具有结合活性;和

[0399] (3)包含上述Fcγ受体结合活性降低的但不限于其结构的Fc区的部分/结构域。

[0400] 在本发明中,上述各结构域可以通过肽键直接连接。例如,当使用F(ab')2作为(1)和(2)的包含抗体可变区的结构域,和这些Fc区作为(3)的包含Fcγ受体结合活性降低的Fc区的结构域时,通过将(1)和(2)的包含抗体可变区的结构域与(3)的含包Fc区的结构域经由肽键连接形成的多肽将形成抗体结构。这样的抗体可以通过从上述杂交瘤培养基中纯化来制备,也可以通过从稳定携带编码构成抗体的多肽的多核苷酸的所需宿主细胞的培养基中纯化抗体来制备。

[0401] 包含在对以与谷蛋白肽的复合物形式HLA-DQ2.5具有结合活性的抗体可变区中的本发明的优选抗体H链可变区的实例包括任何一种本文所述的抗体H链可变区,或具有CDR序列的抗体H链可变区,其CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列与本文所述的H链可变区中包含的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列相同,或功能上等同于上述可变区的抗体H链可变区。

[0402] 本发明的优选的具有T细胞受体复合物结合活性的抗体可变区的实例包括对以与

谷蛋白肽的复合物形式的HLA-DQ2.5具有结合活性的抗体可变区。此类抗体可变区中包含的抗体H链可变区的实例包括本文所述的抗体H链可变区,具有CDR序列的抗体H链可变区,其CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列与本文所述的抗体H链可变区中包含的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列相同,和功能上等同于上述可变区的抗体H链可变区。

[0403] 在本发明中,短语"功能上等同"是指当它用作多特异性抗原结合分子时对抗原的结合亲和力是等同的,或者,是指针对表达HLA-DQ2.5/谷蛋白肽的细胞(或包含这些细胞的组织)的中和活性是等同的。结合亲和力和中和活性可以基于本文的描述来测量。用于测量活性的细胞可以是期望的表达HLA-DQ2.5/谷蛋白肽(或包含这些细胞的期望组织),并且可以使用任何合适的细胞系。关于抗体恒定区,该短语可意指Fc γ 受体结合活性的降低是等同的。

[0404] 例如,与本文所述的抗体H链可变区(即原始H链可变区)功能上等同的抗体H链可变区是指该区域与本文所述的与原始H链形成配对的抗体L链组合时具有相同的结合亲和力,或者当用于多特异性抗原结合分子时,该区域对表达HLA-DQ2.5/谷蛋白肽的细胞(或含有这些细胞的组织)具有相同的中和活性。此外,与本文所述的抗体L链可变区(即原始L链可变区)功能上等同的抗体L链可变区是指该区域与本文所述的与原始L链形成配对的抗体H链组合时具有相同的结合亲和力,或者当用于多特异性抗原结合分子时,该区域对表达HLA-DQ2.5/谷蛋白肽的细胞(或含有这些细胞的组织)具有相同的中和活性。

[0405] 术语"等同"不一定意味着相同程度的活性,并且活性可以增强。具体地,对于抗原结合亲和力,实例包括通过与作为对照的抗体可变区的结合亲和力(亲本KD值)比较获得的值(KD值/亲本KD值)为1.5或更小的情况。KD值/亲本KD值的值优选为1.3或更小,更优选为1.2或更小、1.1或更小、1.0或更小、0.9或更小、0.8或更小、0.7或更小、0.6或更小或者0.5或更小。虽然没有下限,但实例包括10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}或10^{-6}。更具体地,在本发明中,KD值/亲本KD值的值优选为10^{-6}至1.5×10^{-0},更优选10^{-6}至10^{-1},甚至更优选10^{-6}至10^{-2},并且仍甚至更优选10^{-6}至10^{-3}。

[0406] 关于包含具有对HLA-DQ2.5/谷蛋白肽的结合活性的抗体可变区的部分/结构域,对HLA-DQ2.5/谷蛋白肽的KD值可以是例如2×10^{-8}M或更小,$1x10^{-8}$M或更小,$9x10^{-9}$M或更小,$8x10^{-9}$M或更小,$7x10^{-9}$M或更小,$6x10^{-9}$M或更小,$5x10^{-9}$M或更小、$4x10^{-9}$M或更小、$3x10^{-9}$M或更小、$2x10^{-9}$M或更小、或$1x10^{-9}$M或更小。

[0407] 在本发明中,"功能上等同"的抗体可变区没有特别限制,只要它们是满足上述条件的抗体H链和/或抗体L链可变区即可。此类抗体可变区的实例包括通过将一个或多个氨基酸(例如,1、2、3、4、5或10个氨基酸)的置换、缺失、添加和/或插入引入到上述表1至3的可变区的氨基酸序列中而产生的区域。本领域技术人员熟知的用于将一个或多个氨基酸置换、缺失、添加和/或插入引入氨基酸序列的方法是将突变引入蛋白质的方法。例如,本领域技术人员可以通过定点诱变等方法对氨基酸序列适当引入突变,制备出与具有上述功能的抗体可变区功能上等同的可变区(Hashimoto-Gotoh,T.,Mizuno,T.,Ogasahara,Y.,和Nakagawa,M.(1995)An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis.Gene 152,271-275;Zoller,M.J.,和Smith,M.(1983)Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNAfragments cloned into M13vectors.Methods Enzymol.100,468-500;Kramer,W.,Drutsa,V.,Jansen,H.W.,

Kramer,B.,Pflugfelder,M.,和Fritz,H.J.(1984)The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction.Nucleic Acids Res.12,9441-9456;Kramer,W.,和Fritz,H.J.(1987)Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNAMethods.Enzymol.154,350-367;和Kunkel,T.A.(1985)Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection.Proc Natl Acad.Sci.U S A.82,488-492)。

[0408] 当改变氨基酸残基时,优选将氨基酸突变成保留氨基酸侧链特性的不同氨基酸。氨基酸侧链特性的实例是:疏水性氨基酸(A、I、L、M、F、P、W、Y和V)、亲水性氨基酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S和T)、含脂肪族侧链的氨基酸(G、A、V、L、I和P)、包含含羟基侧链的氨基酸(S、T和Y),包含含硫原子侧链的氨基酸(C和M),包含含羧酸和酰胺侧链的氨基酸(D,N,E和Q),含碱性侧链的氨基酸(R,K,和H),以及含有芳香族侧链的氨基酸(H、F、Y和W)(氨基酸由括号中的单字母代码表示)。这些组中的每一组内的氨基酸置换称为保守置换。已知含有经修饰的氨基酸序列的多肽(其中给定氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基被缺失、添加和/或被其他氨基酸置换)可以保留原始的生物学活性(Mark,D.F.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA;(1984)81:5662-6;Zoller,M.J.和Smith,M.,Nucleic Acids Res.(1982)10:6487-500;Wang,A.等人,Science(1984)224:1431-3;Dalbadie-McFarland,G.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1982)79:6409-13)。含有此类氨基酸修饰的本发明的可变区与修饰前可变区的CDR序列、FR序列或整个可变区的氨基酸序列具有至少70%、更优选至少75%、甚至更优选至少80%、还更优选至少85%、还更优选至少90%,最优选至少95%的氨基酸序列同一性。在此,序列同一性定义为序列比对并且如有必要适当引入空位以使序列同一性最大化后确定的与H链可变区或L链可变区的原始氨基酸序列中的残基相同的残基百分比。氨基酸序列的同一性可以通过下述方法确定。

[0409] 此外,“功能上等同的抗体可变区”例如可以从在严格条件下与包含编码上述表1至3的可变区的氨基酸序列的核苷酸序列的核酸杂交的核酸获得。用于分离在严格条件下与包含编码可变区氨基酸序列的核苷酸序列的核酸杂交的核酸的严格杂交条件包括例如6M尿素、0.4% SDS、0.5x SSC、和37℃的条件,或具有与其相当的严格性的杂交条件。在更严格的条件下,例如6M尿素、0.4% SDS、0.1x SSC和42摄氏度的条件下,可以预期分离具有更高同源性的核酸。杂交后的洗涤条件是,例如,在60摄氏度下使用0.5x SSC(1x SSC是0.15M NaCl和0.015M柠檬酸钠,pH7.0)和0.1%SDS洗涤,更优选在60摄氏度下使用0.2x SSC和0.1% SDS洗涤,甚至更多优选在62摄氏度下使用0.2x SSC和0.1% SDS洗涤,还甚至更优选在65摄氏度下使用0.2x SSC和0.1% SDS洗涤,还更优选在65摄氏度下使用0.1x SSC和0.1% SDS洗涤。分离的核酸的序列可以通过下述已知方法确定。分离核酸的总核苷酸序列同源性至少为50%或更高,优选为70%或更高,更优选为90%或更高(例如,95%、96%、97%、98%、99%、或更高)序列同一性。

[0410] 在严格条件下与包含编码可变区氨基酸序列的核苷酸序列的核酸杂交的核酸也可以通过使用基因扩增方法如聚合酶链式反应(PCR)代替上述使用杂交技术的方法来分离,其使用基于编码可变区氨基酸序列的核苷酸序列的信息合成的引物。

[0411] 可以使用Karlin和Altschul的算法BLAST(Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1993)90:5873-7)来确定一个核苷酸序列或氨基酸序列与另一个的同一性。基于该算法开发了称为

BLASTN和BLASTX的程序(Altschul等人,J.Mol.Biol.(1990)215:403-10)。为了根据基于BLAST的BLASTN分析核苷酸序列,设置参数,例如,分数＝100和字长＝12。另一方面,用于基于BLAST的BLASTX分析氨基酸序列的参数包括,例如,分数＝50和字长＝3。在使用BLAST和Gapped BLAST程序时,使用每个程序的默认参数。用于此类分析的特定技术是本领域已知的(参见网站National Center for Biotechnology Information(NCBI),Basic Local Alignment Search Tool(BLAST);http://www.ncbi.nlm.nih.gov)。

[0412] 本发明的多特异性抗原结合分子所含的Fc区没有特别限制,只要其是具有Fcγ受体结合活性降低的Fc区即可,本发明的优选Fc区的实例包括本文所述的Fc区部分的组合。

[0413] 本发明的优选多特异性抗原结合分子的实例包括双特异性抗体,其包含对于以与谷蛋白肽的复合物形式的HLA-DQ2.5具有结合活性的第一抗体可变区和对以与谷蛋白肽的复合物形式的HLA-DQ2.5具有结合活性的第二抗体可变区。此类双特异性抗体的实例包括包含本文所述的H链和L链的双特异性抗体,以及结合与上述抗体所结合的表位重叠的表位并且包含Fcγ受体结合活性降低的Fc区的双特异性抗体。

[0414] 抗体是否识别与另一种抗体所识别的表位重叠的表位可以通过两种抗体对该表位的竞争来确认。抗体之间的竞争可以通过竞争性结合测定使用诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、荧光能量转移法(FRET)和荧光微量测定技术(FMAT(注册商标))等手段来评估。与抗原结合的抗体的量与竞争性结合重叠表位的候选竞争抗体(测试抗体)的结合能力间接相关。换句话说,随着针对重叠表位的测试抗体的量或亲和力增加,与抗原结合的抗体的量减少,并且与抗原结合的测试抗体的量增加。具体而言,将适当标记的抗体和待评估的抗体同时添加到抗原中,并且使用标记检测结合的抗体。通过预先标记抗体可以很容易地确定抗原结合抗体的量。该标记没有特别限制,并且标记方法根据使用的测定技术来选择。具体地,标记方法包括荧光标记、放射性标记、酶标记等。

[0415] 例如,将荧光标记的抗体和未标记的抗体或测试抗体同时加入到固定有HLA-DQ2.5/谷蛋白肽的珠子中,并且通过荧光微量检测技术检测标记的抗体。

[0416] 在本文中,“与重叠表位结合的抗体”是指在非标记抗体降低标记抗体结合量50％(IC50)的浓度的通常100倍高、优选80倍高、更优选50倍高、甚至更优选30倍高,还更优选10倍高的浓度下,能够使结合的标记抗体的量减少至少50％的测试抗体。

[0417] 多特异性抗原结合分子(其具有抗体的抗原结合位点,该抗原结合位点与上述抗体所结合的表位重叠的表位结合)可以产生优异的结合活性或中和活性。

[0418] 本发明的多特异性抗原结合分子是通过与在此提及的产生重组抗体的方法相同的技术产生的。

[0419] 在某些实施方案中,如上提供的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)的任何一个或多个氨基酸在任何重链和/或轻链恒定和/或可变区或结构域中被置换。

[0420] 在某些实施方案中,置换是保守置换,如本文所提供的。

[0421] 人抗体

[0422] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是人抗体。可使用本领域中已知的多种技术来制备人抗体。人抗体一般描述于van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)和Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459(2008)中。

[0423] 人抗体可以通过向转基因动物施用免疫原来制备,所述转基因动物已经被改良成

响应抗原攻击产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。这样的动物典型地含有全部或部分人免疫球蛋白基因座,其取代内源性免疫球蛋白基因座,或其存在于染色体外或随机整合到动物的染色体中。在这样的转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座通常已被失活。对于从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见Lonberg,Nat.Biotech.23:1117-1125(2005)。还参见,例如,美国专利号6,075,181和6,150,584,其描述了XENOMOUSE™技术;美国专利号5,770,429,其描述了HUMAB(注册商标)技术;美国专利号7,041,870,其描述了K-M MOUSE(注册商标)技术,以及美国专利申请公开号US 2007/0061900,其描述了VELOCIMOUSE(注册商标)技术。来自由这种动物产生的完整抗体的人可变区可以进一步修饰,例如通过与不同的人恒定区组合。

[0424] 人抗体也可通过基于杂交瘤的方法制备。已经描述了用于制备人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂合骨髓瘤(heteromyeloma)细胞系。(参见,例如,Kozbor J.Immunol.,133:3001(1984);Brodeur等人,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,第51-63页(Marcel Dekker公司,纽约,1987);以及Boerner等,J.Immunol.,147:86(1991)。)经由人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体也描述于Li等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)中。另外的方法包括在例如美国专利号7,189,826(描述了从杂交瘤细胞系制备单克隆人IgM抗体)和Ni,现代免疫学,26(4):265-268(2006)(描述了人-人杂交瘤)中描述的那些。人杂交瘤技术(Trioma技术)也描述于Vollmers和Brandlein,Histology and Histopathology,20(3):927-937(2005)以及Vollmers和Brandlein,Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,27(3):185-91(2005)中。

[0425] 人抗体还可以通过分离选自人源噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列来产生。然后可将这种可变结构域序列与所需的人恒定结构域组合。用于从抗体文库选择人抗体的技术描述如下。

[0426] 嵌合和人源化抗体

[0427] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体在例如美国专利号4,816,567;及Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)中描述。在一个实例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或例如猴的非人灵长类动物的可变区)和人恒定区。在另外的实例中,嵌合抗体是"类别转换"抗体,其中类型或亚类已经从亲本抗体的类型或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0428] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。典型地,将非人抗体人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或更多个可变结构域,其中HVR(例如CDR)(或其部分)源自非人抗体,以及FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体任选地还包含至少部分的人恒定区。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,HVR残基所源自的抗体)的相应残基置换,例如,以恢复或提高抗体特异性或亲和力。

[0429] 人源化抗体及其制备方法被综述于例如Almagro和Fransson,FrontFront.Biosci.13:1619-1633(2008)中,并且进一步描述于例如Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);Queen等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989);美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri等人,

Methods 36:25-34(2005)(描述了特异性决定区(SDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述了“表面重塑(resurfacing)”);Dall'Acqua等人,Methods 36:43-60(2005)(描述了“FR改组”);和Osbourn等人,Methods 36:61-68(2005)和Klimka等人,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述了用于FR改组的“定向选择”方法)中。

[0430] 可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳匹配(best-fit)”方法选择的框架区(参见,例如Sims等人J.Immunol.151:2296(1993));源自特定亚组的轻链可变区或重链可变区的人抗体共有序列的框架区(参见,例如Carter等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);和Presta等J.Immunol.,151:2623(1993));人成熟(体突变)框架区或人种系框架区(参见,例如,Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));和源自筛选FR文库的框架区(参见,例如,Baca等人,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)以及Rosok等人,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0431] 在上述任何实施方案中,抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)是人源化的。在一个实施方案中,抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)包含如以上任何实施方案中的HVR,并且还包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。在另一个实施方案中,抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)包含如任何上述实施方案中的HVR,并且还包含本文所示的FR1、FR2、FR3或FR4序列。此处,“人框架”也可称为“人源化框架”,着重于抗体的人源化。

[0432] 在一些实施方案中,本发明的多特异性抗原结合分子包含:

[0433] (i)第一抗原结合部分,其具有对以与谷蛋白肽的复合物形式的HLA-DQ2.5的结合活性;和

[0434] (ii)第二抗原结合部分,其具有对以与谷蛋白肽的复合物形式的HLA-DQ2.5的结合活性;

[0435] 其中所述抗原结合分子结合两种或更多种HLA-DQ2.5和谷蛋白肽的复合物,

[0436] 其中由所述第一抗原结合部分结合的复合物中的至少一种谷蛋白肽不同于由所述第二抗原结合部分结合的复合物中的至少一种谷蛋白肽;和

[0437] 其中所述抗原结合分子对HLA-DQ2.5阳性PBMC B细胞和表达HLA-DQ2.5或HLA-DQ2.2的Ba/F3细胞之一或两者实质上没有结合活性,

[0438] 其中所述抗原结合分子是人源化的,并且

[0439] 其中所述多特异性抗原结合分子中的第一抗原结合部分和/或第二抗原结合部分的重链和/或轻链恒定和/或可变区中的一个或多个氨基酸被改变。

[0440] 在一些实施方案中,在多特异性抗原结合分子中,所述多特异性抗原结合分子中的第一抗原结合部分和/或第二抗原结合部分的重链和/或轻链中的一个或多个氨基酸被置换。

[0441] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子包含重链可变区中的至少一个氨基酸置换;重链恒定区中的至少一个氨基酸置换;轻链可变区中的至少一个氨基酸置换;和轻链恒定区中的至少一个氨基酸置换。

[0442] 在一些实施方案中,谷蛋白肽是与乳糜泻相关的免疫显性肽。

[0443] 在一些实施方案中,谷蛋白肽选自由以下组成的组:33聚体麦醇溶蛋白肽,α1麦醇溶蛋白肽,α2麦醇溶蛋白肽,γ1麦醇溶蛋白肽,γ2麦醇溶蛋白肽,ω1麦醇溶蛋白肽,ω2麦醇溶蛋白肽,BC大麦醇溶蛋白肽,α3麦醇溶蛋白肽,α1b麦醇溶蛋白肽,γ4a麦醇溶蛋白肽,

γ4b麦醇溶蛋白肽,燕麦蛋白1肽,燕麦蛋白2肽,燕麦蛋白3肽,大麦醇溶蛋白1肽,大麦醇溶蛋白2肽,裸麦醇溶蛋白1肽,裸麦醇溶蛋白2肽和26聚体麦醇溶蛋白肽。

[0444] 在一些实施方案中,所述谷蛋白肽为以下各项中的一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种、13种、14种、15种、16种、17种、18种、19种或全部:33聚体麦醇溶蛋白肽,α1麦醇溶蛋白肽,α2麦醇溶蛋白肽,γ1麦醇溶蛋白肽,γ2麦醇溶蛋白肽,ω1麦醇溶蛋白肽,ω2麦醇溶蛋白肽,BC大麦醇溶蛋白肽,α3麦醇溶蛋白肽,α1b麦醇溶蛋白肽,γ4a麦醇溶蛋白肽,γ4b麦醇溶蛋白肽,燕麦蛋白1肽,燕麦蛋白2肽,燕麦蛋白3肽,大麦醇溶蛋白1肽,大麦醇溶蛋白2肽,裸麦醇溶蛋白1肽,裸麦醇溶蛋白2肽和26聚体麦醇溶蛋白肽。

[0445] 在一些实施方案中,谷蛋白肽选自由以下组成的组:33聚体麦醇溶蛋白肽,α1麦醇溶蛋白肽,α2麦醇溶蛋白肽,γ1麦醇溶蛋白肽,ω1麦醇溶蛋白肽,ω2麦醇溶蛋白肽,BC大麦醇溶蛋白肽,α3麦醇溶蛋白肽,α1b麦醇溶蛋白肽,γ4a麦醇溶蛋白肽,γ4b麦醇溶蛋白肽,燕麦蛋白1肽,燕麦蛋白2肽,燕麦蛋白3肽,大麦醇溶蛋白1肽,大麦醇溶蛋白2肽,裸麦醇溶蛋白1肽,裸麦醇溶蛋白2肽和26聚体麦醇溶蛋白肽。

[0446] 在一些实施方案中,所述谷蛋白肽为以下各项中的一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种、13种、14种、15种、16种、17种、18种或全部:33聚体麦醇溶蛋白肽,α1麦醇溶蛋白肽,α2麦醇溶蛋白肽,γ1麦醇溶蛋白肽,ω1麦醇溶蛋白肽,ω2麦醇溶蛋白肽,BC大麦醇溶蛋白肽,α3麦醇溶蛋白肽,α1b麦醇溶蛋白肽,γ4a麦醇溶蛋白肽,γ4b麦醇溶蛋白肽,燕麦蛋白1肽,燕麦蛋白2肽,燕麦蛋白3肽,大麦醇溶蛋白1肽,大麦醇溶蛋白2肽,裸麦醇溶蛋白1肽,裸麦醇溶蛋白2肽和26聚体麦醇溶蛋白肽。

[0447] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子对谷蛋白肽本身或多种谷蛋白肽它们本身实质上没有结合活性。在本文中,术语“本身”和“它们本身”是指谷蛋白肽不与HLA-DQ2.5形成复合物的状态。

[0448] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子对于以与非相关肽的复合物形式的HLA-DQ2.5实质上不具有结合活性,其中,所述非相关肽是选自由以下组成的组中的至少一种肽:CLIP(hCLIP)肽、乙型肝炎病毒1肽、沙门氏菌肽、牛分枝杆菌肽和甲状腺过氧化物酶肽。

[0449] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子对于以与非相关肽的复合物形式的HLA-DQ2.5实质上不具有结合活性,其中,所述非相关肽是以下各项中的全部:CLIP(hCLIP)肽、乙型肝炎病毒1肽、沙门氏菌肽、牛分枝杆菌肽和甲状腺过氧化物酶肽。

[0450] 在一些实施方案中,与所述人源化和改变之前相比,所述抗原结合分子对由HLA-DQ2.5与谷蛋白肽形成的复合物具有增强的结合活性。在本文中,“增强的结合活性”是指抗原结合分子与HLA-DQ2.5和谷蛋白肽形成的复合物的结合比修饰(即,人源化和改变)前的现有抗体更强。

[0451] 在一些实施方案中,与所述人源化和改变之前相比,抗原结合分子对谷蛋白肽具有增强的交叉反应性。在一些实施方案中,谷蛋白肽是ω2麦醇溶蛋白肽、BC大麦醇溶蛋白肽、γ1麦醇溶蛋白肽、γ2麦醇溶蛋白肽、γ4a麦醇溶蛋白肽和γ4d麦醇溶蛋白肽。在本文中,“对谷蛋白肽的增强的交叉反应性”是指抗原结合分子结合或显示出比修饰(即,人源化和改变)前的现有抗体的针对更多谷蛋白肽的中和活性。

[0452] 另一方面,抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)包含重链可变结构域(VH)序列,其与本文公开的重链可变结构域(VH)序列的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%序列同一性。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH序列包含相对于参考(即原始)序列的置换(例如,保守置换),插入或缺失,但包含该序列的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)保留了结合HLA-DQ2.5的能力。在某些实施方案中,相对于参考(即原始)序列,总共有1至10个氨基酸被置换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR之外的区域(即,在FR中)。任选地,抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)包含本文公开的VH序列或包含其翻译后修饰的序列。在特定的实施方案中,VH包含选自以下的一个、两个或三个HVR:(a)本文公开的HVR-H1,(b)本文公开的HVR-H2,和(c)本文公开的HVR-H3。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化将重链或轻链N末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0453] 本发明的氨基酸序列中包含的氨基酸可以进行翻译后修饰(例如,通过焦谷氨酰化将N-末端谷氨酰胺修饰为焦谷氨酸是本领域技术人员公知的)。当然,这种翻译后修饰的氨基酸包括在本发明的氨基酸序列中。

[0454] 另一方面,提供了抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体),其中该分子/抗体包含轻链可变结构域(VL),其与本文公开的轻链可变结构域(VL)的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%序列同一性。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL序列包含相对于参考(即原始)序列的置换(例如,保守置换),插入或缺失,但包含该序列的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)保留了结合HLA-DQ2.5的能力。在某些实施方案中,相对于参考(即原始)序列,总共有1至10个氨基酸被置换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR之外的区域(即,在FR中)。任选地,抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)包含本文公开的VL序列或包含其翻译后修饰的序列。在特定的实施方案中,VL包含选自(a)本文公开的HVR-L1;(b)本文公开的HVR-L2;(c)本文公开的HVR-L3的一个、两个或三个HVR。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化将重链或轻链N末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0455] 另一方面,提供了抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体),其中该分子/抗体包含如上文提供的任何实施方案中的VH,和如上文提供的任何实施方案中的VL。在一个实施方案中,分子/抗体包含本文公开的VH序列或包含其翻译后修饰的序列,以及本文公开的VL序列或包含其翻译后修饰的序列。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化将重链或轻链N末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0456] 在进一步的方面,本发明提供与本文提供的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)结合相同表位的抗原结合分子(抗体)。例如,在某些实施方案中,提供与本文所述的任何分子/抗体结合相同表位的分子/抗体。在某些实施方案中,提供结合由约8至17个氨基酸组成的HLA-DQ2.5片段内或由HLA-DQ2.5和谷蛋白肽形成的复合物内的表位的分子/抗体。在本文中,谷蛋白肽可以是本文所述的任何谷蛋白肽。

[0457] 另一方面,本发明提供了与另一种抗原结合分子(抗体)竞争结合HLA-DQ2.5或HLA-DQ2.5与谷蛋白肽形成的复合物的抗原结合分子(抗体)。例如,在某些实施方案中,提供与本文所述的任何分子/抗体竞争结合HLA-DQ2.5或由HLA-DQ2.5和谷蛋白肽形成的复合

物的分子/抗体。在本文中,谷蛋白肽可以是本文所述的任何谷蛋白肽。

[0458] 在本发明的另外方面,根据任何上述实施方案的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)是单克隆抗原结合分子(抗体),包括嵌合的、人源化的或人的抗原结合分子(抗体)。在优选的实施方案中,本发明的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)是人源化抗原结合分子(抗体)。在一个实施方案中,抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)是抗体片段,例如Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体或$F(ab')_2$片段。在另一个实施方案中,抗体是全长抗体,例如完整的IgG1抗体或本文所定义的其他抗体类别或同种型。

[0459] 在进一步的方面,根据任何上述实施方案的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)可以单独地或组合地并入在以下描述的任何特征:

[0460] 抗体亲和力

[0461] 在某些实施方案中,本文所提供的抗体具有1微摩尔(μM)或更小,100nM或更小,10nM或更小,1nM或更小,0.1nM或更小,0.01nM或更小,或0.001nM或更小(例如10^{-8}M或更小,例如10^{-8}M至10^{-13}M,例如10^{-9}M至10^{-13}M)的解离常数(Kd)。

[0462] 在一个实施方案中,通过放射性标记的抗原结合测定法(RIA)测量Kd。在一个实施方案中,利用目的抗体的Fab版本及其抗原进行RIA。例如,Fab对抗原的溶液结合亲和力通过以下方式测量:在未标记抗原的滴定系列的存在下,用最小浓度的(^{125}I)标记的抗原平衡Fab,然后用抗Fab抗体包被的平板捕获结合的抗原(参见,例如,Chen等,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了建立测定条件,将MICROTITER(注册商标)多孔板(Thermo Scientific)用在50mM碳酸钠(pH9.6)中的5微克(μg)/ml的捕获抗Fab抗体(Cappel Labs)过夜包被,随后用在PBS中的2%(w/v)牛血清白蛋白在室温(约23℃)封闭二至五小时。在非吸附性平板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM[^{125}I]-抗原与目的Fab的连续稀释物混合(例如,与Presta等,Cancer Res.57:4593-4599(1997)中的抗VEGF抗体Fab-12的评估一致)。然后将目的Fab孵育过夜;然而,孵育可能会持续更长的时间(例如,约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获平板用于在室温下孵育(例如,持续一小时)。然后除去溶液并用PBS中的0.1%聚山梨醇酯20(TWEEN-20(注册商标))洗涤平板八次。当平板已经干燥时,添加150微升(μL)/孔的闪烁体(MICROSCINT-20™;Packard),并将平板在TOPCOUNT™γ计数仪(Packard)上计数十分钟。选择产生小于或等于最大结合的20%的每个Fab的浓度用于竞争性结合测定。

[0463] 根据另一个实施方案,使用BIACORE(注册商标)表面等离振子共振测定法测量Kd。例如,在25℃下利用固定化抗原CM5芯片以约10响应单位(RU)进行使用BIACORE(注册商标)-2000或BIACORE(注册商标)-3000(BIAcore,Inc.,Piscataway,NJ)的测定。在一个实施方案中,根据供应商的说明,将羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片(CM5,BIACORE公司)用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化。将抗原用10mM乙酸钠(pH4.8)稀释至5μg/ml(大约0.2μM),之后以5μL/分钟的流速注射,以获得约10个响应单位(RU)的偶联蛋白。注射抗原后,注射1M乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量,在25℃以约25μl/min的流速,将Fab的两倍连续稀释液(0.78nM至500nM)注射到具有0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN-20™)表面活性剂的PBS(PBST)中。使用简单的一对一朗缪尔(Langmuir)结合模型(BIACORE(注册商标)Evaluation Software版本3.2),通过同时拟合缔合和解离传感图,计算缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。平衡解离常数(Kd)计算为比

率k_{off}/k_{on}。参见,例如,Chen等,J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。如果通过以上表面等离振子共振测定法测量的缔合速率超过$10^6M^{-1}s^{-1}$,则可以通过荧光淬灭技术来确定缔合速率,所述荧光淬灭技术为:如在分光计例如配备有截流装置的分光光度计(Aviv Instruments)或具有搅拌比色皿的8000-系列SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic)中所测量的,在存在增加浓度的抗原的情况下,在25℃,pH7.2,测量PBS中的20nM抗-抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度的增加或减小(激发=295nM;发射=340nM,16nM带通)。

[0464] 抗体片段

[0465] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、$F(ab')_2$、Fv和scFv片段,以及以下描述的其它片段。对于某些抗体片段的综述,请参见Hudson等人Nat.Med.9:129-134(2003)。对于scFv片段的综述,参见,例如,Pluckthun,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,113卷,Rosenburg和Moore编辑,(Springer-Verlag,New York),第269-315页(1994);还参见WO 93/16185;和美国专利号5,571,894和5,587,458。对于包含补救受体(salvage receptor)结合表位残基并具有增加的体内半衰期的Fab和$F(ab')_2$片段的讨论,参见美国专利号5,869,046。

[0466] 双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,双抗体可以是二价的或双特异性的。参见,例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等,Nat.Med.9:129-134(2003);和Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)。三链抗体和四链抗体也描述于Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)中。

[0467] 单结构域抗体是这样的抗体片段,其包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis,Inc,Waltham,MA;参见例如美国专利号6,248,516B1)。

[0468] 如本文所述,抗体片段可通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及由重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)产生。

[0469] Fc区变体

[0470] 在某些实施方案中,可在本文所提供的抗体的Fc区中引入一个或多个氨基酸修饰,以此产生Fc区变体。Fc区变体可包含人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),所述人Fc区序列在一或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如置换)。

[0471] US2005/0014934A1(Hinton等人)中描述具有增加的半衰期及增加的与新生儿Fc受体(FcRn)的结合的抗体,其中FcRn负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))。那些抗体包含具有一个或多个置换的Fc区,所述置换增加Fc区与FcRn的结合。此种Fc变体包括在以下一个或更多个Fc区残基处具有置换的那些:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如,Fc区残基434的置换(美国专利号7,371,826)。还参见Duncan&Winter,Nature 322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;和WO 94/29351,它们涉及Fc区变体的其他实例。

[0472] Fc区

[0473] 本文中的术语"Fc区"或"Fc结构域"用于定义包含至少一部分恒定区的免疫球蛋白重链的C末端区域。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基末端。然而,Fc区的C末端赖氨酸(Lys447)或甘

氨酸-赖氨酸(残基446-447)可以存在或不存在。除非本文另有说明,否则Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号是根据EU编号系统(也称为EU索引)进行的,如在Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述。

[0474] Fc受体

[0475] 术语“Fc受体”或“FcR”是指与抗体的Fc区结合的受体。在一些实施方案中,FcR是天然人FcR。在一些实施方案中,FcR是结合IgG抗体(γ受体)的FcR并包括FcγRI、FcγRII和FcγRIII亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和选择性剪接形式的受体。FcγRII受体包括FcγRIIA(“激活受体”)和FcγRIIB(“抑制受体”),它们具有相似的氨基酸序列,主要区别在于其细胞质结构域。激活受体FcγRIIA在其细胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。抑制受体FcγRIIB在其细胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。(参见,例如,Daeron,Annu.Rev.Immunol.15:203-234(1997))。例如,FcR综述于Ravetch和Kinet,Annu Rev.Immunol 9:457-92(1991);Capel等人,Immunomethods 4:25-34(1994);和de Haas等人,J.Lab Clin.Med.126:330-41(1995)中。其他FcR,包括将来要鉴定的那些,都包含在本文的术语“FcR”中。

[0476] 术语“Fc受体”或“FcR”还包括新生儿受体FcRn,其负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))以及免疫球蛋白稳态的调节。测量与FcRn结合的方法是已知的(参见例如Ghetie和Ward.,Immunol.Today 18(12):592-598(1997);Ghetie等人,Nature Biotechnology,15(7):637-640(1997);Hinton等人,J.Biol.Chem.279(8):6213-6216(2004);WO 2004/92219(Hinton等人)。

[0477] 体内人FcRn的结合和人FcRn高亲和力结合多肽的血浆半衰期可以在例如转基因小鼠或表达人FcRn的转染人细胞系中或在施用具有变体Fc区的多肽的灵长类动物中进行测定。WO 2000/42072(Presta)描述了与FcR结合增加或减少的抗体变体。另见,例如,Shields等人J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。

[0478] Fcγ受体

[0479] Fcγ受体是指能够结合单克隆IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体的Fc结构域的受体,并且包括属于基本上由Fcγ受体基因编码的蛋白质家族的所有成员。在人类中,该家族包括FcγRI(CD64),其包括同工型FcγRIa、FcγRIb和FcγRIc;FcγRII(CD32),其包括同工型FcγRIIa(包括同种异型H131和R131)、FcγRIIb(包括FcγRIIb-1和FcγRIIb-2)和FcγRIIc;和FcγRIII(CD16),其包括同工型FcγRIIIa(包括同种异型V158和F158)和FcγRIIIb(包括同种异型FcγRIIIb-NA1和FcγRIIIb-NA2);以及所有未鉴定的人Fcγ受体、Fcγ受体同工型及其同种异型。然而,Fcγ受体不限于这些实例。不限于此,Fcγ受体包括源自人、小鼠、大鼠、兔和猴的那些。Fcγ受体可以来源于任何生物体。小鼠Fcγ受体包括但不限于FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)、FcγRIII(CD16)和FcγRIII-2(CD16-2),以及所有未鉴定的小鼠Fcγ受体、Fcγ受体同工型及其同种异型。这种优选的Fcγ受体包括例如人FcγRI(CD64)、FcγRIIA(CD32)、FcγRIIB(CD32)、FcγRIIIA(CD16)和/或FcγRIIIB(CD16)。Fcγ受体是否具有与单克隆IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体的Fc结构域的结合活性可以通过ALPHA筛选(放大发光邻近均相测定)、基于表面等离振子共振(SPR)的BIACORE方法和除上

述FACS和ELISA形式外的其他方法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA(2006)103(11),4005-4010)测定。

[0480] 同时,“Fc配体”或“效应配体”是指与抗体Fc结构域结合形成Fc/Fc配体复合物的分子,优选多肽。该分子可以源自任何生物体。Fc配体与Fc的结合优选诱导一种或多种效应子功能。此类Fc配体包括但不限于Fc受体、Fcγ受体、Fcα受体、Fcβ受体、FcRn、Clq和C3、甘露聚糖结合凝集素、甘露糖受体、葡萄球菌蛋白A、葡萄球菌蛋白G和病毒Fcγ受体。Fc配体还包括Fc受体同源物(FcRH)(Davis等人,(2002)Immunological Reviews 190,123-136),它们是与Fcγ受体同源的Fc受体家族。Fc配体还包括与Fc结合的未鉴定的分子。

[0481] Fcγ受体结合活性

[0482] Fc结构域与任何Fcγ受体FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIIA和/或FcγRIIIB的受损结合活性可以通过使用上述FACS和ELISA形式以及ALPHA筛选(放大发光邻近均相测定)(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)和基于表面等离振子共振(SPR)的BIACORE方法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA(2006)103(11),4005-4010)来评估。

[0483] ALPHA筛选是通过ALPHA技术基于下述原理使用两种类型的珠子进行的:供体珠子和受体珠子。只有当连接到供体珠子的分子与连接到受体珠子的分子发生生物学相互作用并且当两个珠子非常靠近时,才会检测到发光信号。在激光束的激发下,供体珠子中的光敏剂将珠子周围的氧转化为激发的单线态氧。当单线态氧在供体珠子周围扩散并到达位于附近的受体珠子时,会诱导受体珠子内的化学发光反应。该反应最终导致光发射。如果与供体珠子连接的分子不与与受体珠子连接的分子相互作用,则供体珠子产生的单线态氧不会到达受体珠子并且不会发生化学发光反应。

[0484] 例如,生物素标记的抗原结合分子或抗体固定在供体珠子上,并且谷胱甘肽S-转移酶(GST)标记的Fcγ受体固定在受体珠子上。在不存在包含竞争性突变Fc结构域的抗原结合分子或抗体的情况下,Fcγ受体与包含野生型Fc结构域的抗原结合分子或抗体相互作用,结果诱导520至620nm的信号。具有未标记的突变Fc结构域的抗原结合分子或抗体与包含野生型Fc结构域的抗原结合分子或抗体竞争与Fcγ受体的相互作用。相对结合亲和力可以通过量化竞争导致的荧光减少来确定。使用磺基-NHS-生物素等将抗原结合分子或抗体(如抗体)生物素化的方法是已知的。将GST标签添加到Fcγ受体的合适方法包括涉及以下的方法:将编码Fcγ受体的多肽与GST框内融合,使用引入了携带该基因的载体的细胞表达融合基因,和然后使用谷胱甘肽柱进行纯化。可以优选地例如通过使用诸如GRAPHPAD PRISM(GraphPad;San Diego)之类的软件基于非线性回归分析拟合至单点竞争模型(one-site competition model)来分析诱导信号。

[0485] 用于观察它们相互作用的物质之一作为配体固定在传感器芯片的金薄层上。当光线照射到传感器芯片的背面,从而在金薄层和玻璃之间的界面发生全反射时,反射光的强度在某个位点会部分减弱(SPR信号)。将用于观察它们相互作用的另一种物质作为分析物注入传感器芯片的表面。当分析物与配体结合时,固定的配体分子的质量增加。这会改变传感器芯片表面上溶剂的折射指数。折射指数的变化导致SPR信号的位置偏移(相反,解离将信号移回原始位置)。在Biacore系统中,将上述位移量(即传感器芯片表面的质量变化)绘制在垂直轴上,因此质量随时间的变化显示为测量数据(传感图)。动力学参数(缔合速率常

数(ka)和解离速率常数(kd))由传感图的曲线确定,并且亲和力(KD)由这两个常数之间的比率确定。在BIACORE方法中优选使用抑制测定。该抑制测定法的实例描述在Proc.Natl.Acad.Sci.USA(2006)103(11),4005-4010中。

[0486] 具有降低的Fcγ受体结合活性的Fc区

[0487] 在本文中,"降低的Fcγ受体结合活性"是指,例如,基于上述分析方法,相比于对照抗原结合分子或抗体的竞争活性,测试抗原结合分子或抗体的竞争活性为50%或更少,优选45%或更少,40%或更少、35%或更少、30%或更少、20%或更少或15%或更少,特别优选10%或更少、9%或更少、8%或更少、7%或更少、6%或更少、5%或更少、4%或更少、3%或更少、2%或更少或1%或更少。

[0488] 包含单克隆IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体的Fc结构域的抗原结合分子或抗体可以适当地用作对照抗原结合分子或抗体。Fc结构域结构显示于RefSeq登录号AAC82527.1、RefSeq登录号AAB59393.1、RefSeq登录号CAA27268.1和RefSeq登录号AAB59394.1中。此外,当包含特定同种型抗体的Fc结构域突变体的抗原结合分子或抗体用作测试物质时,突变体的突变对Fcγ受体结合活性的作用是使用包含相同同种型的Fc结构域的抗原结合分子或抗体作为对照进行评估的。如上所述,适当制备包含其Fcγ受体结合活性已被判断为降低的Fc结构域突变体的抗原结合分子或抗体。

[0489] 此类已知突变体包括例如具有氨基酸231A-238S(EU编号)缺失的突变体(WO 2009/011941),以及突变体C226S、C229S、P238S、(C220S)(J.Rheumatol(2007)34,11);C226S和C229S(Hum.Antibod.Hybridomas(1990)1(1),47-54);C226S、C229S、E233P、L234V和L235A(Blood(2007)109,1185-1192)。

[0490] 具体地,优选的抗原结合分子或抗体包括包含在形成特定同种型抗体的Fc结构域的氨基酸中具有选自以下氨基酸位置处的至少一个氨基酸的突变(例如置换)的Fc结构域的那些:220,226,229,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,264,265,266,267,269,270,295,296,297,298,299,300,325,327,328,329,330,331或332(EU编号)。Fc结构域所起源的抗体的同种型没有特别限制,可以使用源自单克隆IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体的适当的Fc结构域。优选使用源自IgG1抗体的Fc结构域。

[0491] 在本发明中,SG181可用作Fcγ受体沉默的Fc,其减弱Fc与Fcγ受体的结合。在一些实施方案中,SG181.S3n(SEQ ID NO:101)和SG181.S3p(SEQ ID NO:102)可用作重链恒定区序列。这些重链恒定区序列可以包括在本发明的抗原结合分子或抗体中以减少Fcγ受体结合。

[0492] 其他优选的抗原结合分子或抗体包括,例如,包含Fc结构域的那些,其中在形成IgG1抗体Fc结构域的氨基酸中位置233、234、235、236、237、327、330或331(EU编号)处的任何氨基酸被相应的IgG2或IgG4中EU编号中相应位置的氨基酸置换。

[0493] 在一些实施方案中,本发明的多特异性抗原结合分子还包含与天然人IgG1 Fc结构域相比表现出对人Fcγ受体的降低的结合亲和力的Fc结构域。

[0494] 在一些实施方案中,在本发明的多特异性抗原结合分子中,Fc结构域包含第235位的Arg和第236位的Arg,其中氨基酸位置按照EU编号进行编号。

[0495] H链/L链缔合和其他特性的调节

[0496] 本发明的另一实施方案涉及其中重链和轻链的缔合被调节的抗原结合分子,其中

重链和轻链的缔合被调节的抗原结合分子的制造方法,以及调节抗原结合分子中重链和轻链缔合的方法。

[0497] 本发明的抗原结合分子涉及其中重链和轻链的缔合被调节的抗原结合分子,其中构成抗原结合分子的重链和轻链是目的重链和轻链的组合的抗原结合分子,并且其中重链恒定区(CH1)和轻链恒定区(CL)中给定位置的氨基酸残基是相互电排斥的氨基酸残基(具有相同的电荷)。

[0498] 在本发明中,通过将重链和轻链的非期望组合的CH1和CL中给定位置的氨基酸残基变成相互电排斥(即具有相同电荷)的氨基酸残基,利用这种电荷排斥力可以防止重链和轻链的非期望组合的形成,结果可以形成期望的重链和轻链的组合。

[0499] 在本发明中,术语"调节缔合"和"缔合被调节"是指调节以达到期望的缔合条件,更具体地是指调节使得在重链和轻链之间不形成非期望的缔合。

[0500] 在本发明中,术语"界面"泛指缔合(相互作用)产生的缔合界面,并且形成界面的氨基酸残基通常为参与缔合的多肽区域中包含的一个或多个氨基酸残基,并且更优选地是在缔合过程中相互接近并参与相互作用的氨基酸残基。更具体地,该相互作用包括,例如,氨基酸残基在缔合过程中相互靠近以彼此形成氢键、静电相互作用或盐桥的情况。

[0501] 在本发明中,术语"形成界面的氨基酸残基"更具体地指包含在构成界面的多肽区域中的氨基酸残基。例如,构成界面的多肽区域是指负责抗原结合分子(例如抗体)、配体、受体或底物等分子之间的选择性结合的多肽区域。更具体地,在抗原结合分子中,这样的实例包括重链恒定区、重链可变区、轻链恒定区和轻链可变区。

[0502] 在本发明的抗原结合分子的优选实施方案中,抗原结合分子在缔合调节之前在非期望的重链和轻链组合的CH1和CL中给定位置处具有电排斥(其具有相同的电荷)的氨基酸残基。

[0503] 认为通过将上述抗原结合分子中的氨基酸残基修饰为相互电排斥具有相同的电荷)的氨基酸残基,这些氨基酸残基的缔合被电荷的排斥力抑制。

[0504] 因此,在上述抗原结合分子中,修饰的氨基酸残基优选为在形成界面的多肽区域中缔合时互相接近的氨基酸残基。

[0505] 缔合时接近的氨基酸残基可以通过例如分析多肽的三维结构,调查在多肽缔合时形成界面的多肽区域的氨基酸序列来确定。相互接近的界面的氨基酸残基是本发明的抗原结合分子中优选的"修饰"靶标。

[0506] 已知一些氨基酸是带电荷的。通常,已知赖氨酸(K)、精氨酸(R)和组氨酸(H)是具有正电荷的氨基酸(带正电荷氨基酸)。已知天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)等是具有负电荷的氨基酸(带负电荷氨基酸)。此外,丙氨酸(A)、天冬酰胺(N)、半胱氨酸(C)、谷氨酰胺(Q)、甘氨酸(G)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、蛋氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、脯氨酸(P)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)、缬氨酸(V)等已知为不具有电荷的氨基酸,或非极性氨基酸。

[0507] 因此,本发明中的相互电排斥(具有相同电荷)的氨基酸是指:

[0508] (1)其中一个氨基酸是带正电荷的氨基酸,另一个氨基酸也是带正电荷的氨基酸,和

[0509] (2)其中一个氨基酸是带负电荷的氨基酸,另一个氨基酸也是带负电荷的氨基酸。

[0510] 氨基酸修饰的实例包括将不带电荷的氨基酸或非极性氨基酸修饰成带正电荷的

氨基酸,将不带电荷的氨基酸或非极性氨基酸修饰成带负电荷的氨基酸,将带正电荷的氨基酸修饰成带负电荷的氨基酸,以及将带负电荷的氨基酸修饰成带正电荷的氨基酸。此外,将不带电荷的氨基酸或非极性氨基酸修饰成不同的不带电荷或非极性氨基酸,将带正电荷的氨基酸修饰成不同的带正电荷的氨基酸,以及将带负电荷的氨基酸修饰成不同的带负电荷的氨基酸氨基酸也包括在本发明的氨基酸修饰中。

[0511] 本发明中的修饰氨基酸包括在重链和轻链中各进行一个修饰,或对重链和轻链各进行多个修饰。此外,添加到重链和轻链的修饰数目可以相同或不同。

[0512] 本发明中的修饰氨基酸包括在重链或轻链上进行多个修饰成为带正电荷的氨基酸,以及在另一条链上进行多个修饰成为带负电荷的氨基酸。此外,可以在相同的重链或轻链上进行多个修饰成为带正电荷的氨基酸以及多个修饰成为带负电荷的氨基酸。在这些修饰中,也可以将修饰成为不带电荷的氨基酸或非极性氨基酸和对不带电荷的氨基酸或非极性氨基酸的修饰进行适当组合。

[0513] 在本发明的修饰中,例如,其中一条链上的氨基酸可不经修饰而直接使用,在这种情况下,重链和轻链无需同时修饰,仅其中一条链可被修饰。

[0514] 本发明的抗原结合分子的轻链恒定区优选为人轻链恒定区。抗体轻链恒定区的实例包括IgK(κ)、IgL1、IgL2、IgL3、IgL6和IgL7(λ)型恒定区。本发明的抗原结合分子的轻链恒定区没有特别限制;当使用多种类型的轻链时,轻链可以是不同类型的轻链,例如κ和λ。通过遗传多态性获得的几种同种异型序列描述于Sequences of Proteins of Immunological Interest,NIH Publication No.91-3242中作为人IgK(κ)恒定区和人IgL7(λ)恒定区,这些中的任何一个都可以用于本发明。

[0515] 为了改善抗原结合分子的功能或稳定性,可以根据需要对抗体恒定区、特别是重链恒定区进行修饰。用于改善抗原结合分子的功能的修饰的实例包括增强或减弱抗原结合分子与Fcγ受体(“FcγR”)之间的结合的修饰,增强或减弱抗原结合分子和FcRn之间的结合的修饰,增强或减弱抗原结合分子的细胞毒活性(例如ADCC活性和CDC活性)的修饰等。此外,还可以包括改善抗原结合分子的异质性的修饰和改善非免疫原性和/或药代动力学的修饰。

[0516] 此外,由于IgG抗体重链C末端序列的异质性,已报道了通过C末端氨基酸赖氨酸残基的缺失或C末端两个氨基酸甘氨酸和赖氨酸的缺失的C端羧基的酰胺化(Anal.Biochem.2007Jan 1:360(1):75-83)。

[0517] 因此,在本发明中,为了降低重链C末端的异质性,优选使用C末端赖氨酸或C末端赖氨酸和甘氨酸缺失的IgG。

[0518] 由于它们在人体中的抗原性已经减弱,因此当出于治疗目的等对人类施用时,预期使用源自人的序列的嵌合抗体和人源化抗体是有用的。

[0519] 本发明的抗原结合分子的优选实例是具有2种或更多种类型CH1和2种或更多种类型CL的异聚多聚体。该异聚多聚体优选与2种或更多种类型的表位结合,其实例为多特异性抗体。

[0520] 本发明的多特异性抗体的优选实例是双特异性抗体。因此,本发明的抗原结合分子的优选实施方案的实例是由两种类型的重链(第一重链和第二重链)和两种类型的轻链(第一轻链和第二条轻链)组成的双特异性抗体。

[0521] 更准确地描述本发明的抗原结合分子的优选实施方案的“双特异性抗体”,上述“第一重链”是指构成抗体的两条重链(H链)中的一条,并且“第二H链”是指不同于第一H链的另一条H链。即,可以任意地将2条H链中的一条定义为第一H链,并将另一条定义为第二H链。同样地,“第一轻链”是指形成双特异性抗体的两条轻链(L链)中的一条,并且“第二L链”是指与第一L链不同的另一条L链。两条L链中,可以任意定义其中一条为第一L链,并且将另一条定义为第二L链。通常,第一L链和第一H链来源于结合某抗原(或表位)的相同抗体,第二L链和第二H链也来源于结合某抗原(或表位)的相同抗体。在本文中,由第一H链与L链形成的L链-H链对称为第一对,并且第二H链与L链形成的L链-H链对称为第二对。用于产生第二对所来源的抗体的抗原(或表位)优选不同于用于产生第一对所来源的抗体的抗原。更具体地,第一对和第二对识别的抗原可以相同,但优选地,这些对结合不同的抗原(或表位)。在这种情况下,第一对和第二对的H链和L链优选具有彼此不同的氨基酸序列。当第一对和第二对结合不同的表位时,第一对和第二对可识别完全不同的抗原,或者可识别相同抗原上的不同位点(不同的表位)。此外,其中一对可识别抗原,例如蛋白质、肽、基因或糖,另一对可识别细胞毒性物质,例如放射性物质、化学治疗剂或细胞来源的毒素。然而,当希望生产具有由H链和L链的特定组合形成的对的抗体时,那些特定的H链和L链可以任意确定为第一对和第二对。

[0522] 以下以具有两种类型重链恒定区CH1(CH1-A和CH1-B)和两种类型轻链恒定区(CL-A和CL-B)的IgG型双特异性抗体为例进行了更详细的说明;然而,本发明也可以类似地应用于其他抗体。

[0523] 当人们希望获得一种双特异性抗体(该抗体将通过第一CH1-A和第一CL-A识别一个表位,并通过第二CH1-B和第二CL-B与另一个表位结合)时,当表达四种类型的链中的每一种以产生该抗体时,理论上有可能可以产生10种类型的抗体分子。

[0524] 在这种情况下,如果例如调节缔合使得CH1-A和CL-B的缔合和/或CH1-B和CL-A之间的缔合被抑制,则可以优先获得期望的抗体分子。

[0525] 示例是将在CH1-A和CL-B之间形成界面的氨基酸残基修饰成带正电荷的氨基酸残基,并将在CH1-B和CL-A之间形成界面的氨基酸残基修饰成带负电荷的氨基酸残基。由于这些修饰,CH1-A和CL-B之间的非期望缔合受到抑制,因为形成界面的氨基酸残基都带正电荷,并且CH1-B和CL-A之间的缔合也受到抑制,因为形成界面的氨基酸残基都带负电荷。因此,CH1-A和CL-B之间的非期望缔合以及CH1-B和CL-A之间的缔合受到抑制,因为形成界面的氨基酸残基相互具有相同的电荷。作为结果,可以高效地获得CH1-A与CL-A之间具有预期缔合以及CH1-B与CL-B之间具有预期缔合的抗体。此外,由于形成界面的氨基酸残基彼此具有不同类型的电荷,因此促进了CH1-A和CL-A之间的预期缔合;并且CH1-B和CL-B之间的预期缔合也得到促进,因为形成界面的氨基酸残基具有彼此不同类型的电荷。因此,可以有效地获得具有预期缔合的抗体。

[0526] 另一实例是当形成CL-A和CH1-B之间界面的氨基酸残基是相互不带电荷或非极性氨基酸时,将形成CH1-A和CL-B之间界面的氨基酸残基修饰成带正电荷的氨基酸残基。这种修饰的结果是,CH1-A和CL-B之间的非期望缔合受到抑制,因为形成界面的氨基酸残基都带正电荷。另一方面,由于形成界面的氨基酸残基是不相互电排斥的氨基酸,因此CH1-A和CL-A之间的预期缔合以及CH1-B和CL-B之间的预期缔合相比于氨基酸电排斥的情况将更容易

发生。因此,可以有效地获得在CH1-A和CL-A之间具有预期缔合以及在CH1-B和CL-B之间具有预期缔合的抗体。同时,在该实例中,在形成CL-A和CH1-B之间界面的氨基酸残基不是相互不带电荷或非极性氨基酸的情况下,它们可以被修饰以变成相互不带电荷或非极性氨基酸。

[0527] 此外,在另一实例中,当形成CL-B和CH1-B之间界面的氨基酸残基在CH1-B中是不带电荷或非极性氨基酸时,形成CH1-A和CL-A之间界面的氨基酸残基之一被修饰成带正电荷的氨基酸残基,另一个被修饰成带负电荷的氨基酸残基;并且CL-B中形成CL-B和CH1-B之间界面的氨基酸残基被修饰以便具有与CH1-A修饰相同的电荷。作为这种修饰的结果,虽然CH1-A和CL-A之间的预期缔合得到促进,因为形成界面的氨基酸残基是正电荷和负电荷的组合,但CH1-B和CL-B之间的预期缔合不被抑制,因为形成界面的氨基酸残基是不相互电排斥的氨基酸。作为结果,可以高效地获得具有CH1-A与CL-A之间的期望缔合和CH1-B与CL-B之间的期望缔合的抗体。同时,在该实例中,当形成CL-B和CH1-B之间界面的氨基酸残基在CH1-B中不是不带电荷或非极性氨基酸时,它们可以被修饰以变成不带电荷或非极性氨基酸。

[0528] 另外,使用本发明的缔合调节使得抑制CH1(CH1-A和CH1-B)之间的缔合或CL(CL-A和CL-B)之间的缔合成为可能。

[0529] 本领域技术人员将能够适当地确定在需要本发明调节缔合的所需多肽中在CH1和CL界面缔合期间接近的氨基酸残基的类型。

[0530] 此外,本领域技术人员还可以通过使用公共数据库等适当地获得可用作生物体如人、猴、小鼠、兔等的抗体的CH1或CL的序列。更具体而言,CH1或CL的氨基酸序列信息可通过后述实施例中记载的手段取得。

[0531] 例如,关于下述实施例中记载的双特异性抗体,缔合时在CH1和CL的界面靠近(面对或接触)的氨基酸残基的具体实例包括如下所示的组合:

[0532] -CH1中的根据EU编号第175位的谷氨酰胺(Q)和在CL中根据Kabat编号在第160位的面对的(接触的)谷氨酰胺(Q)或谷氨酸(E);

[0533] -CH1中的根据EU编号第175位的谷氨酰胺(Q)和在CL中的根据Kabat编号第131位的面对的(接触的)苏氨酸(T)或丝氨酸(S);

[0534] -CH1中的根据EU编号第175位的谷氨酰胺(Q)和在CL中的根据Kabat编号第131位的面对的(接触的)丝氨酸(S)或苏氨酸(T)和第160位的谷氨酰胺(Q)或谷氨酸(E);和,

[0535] -CH1中的根据EU编号第147位的赖氨酸(K)和第175位的谷氨酰胺(Q),和在CL中的根据Kabat编号第131位的面对的(接触的)丝氨酸(S)或苏氨酸(T)和第160位的谷氨酰胺(Q)或谷氨酸(E)。

[0536] 本发明中的EU编号中记载的编号是根据EU编号(Sequences of proteins of immunological interest,NIH Publication No.91-3242)表示的。在本发明中,短语“根据EU编号在位置X的氨基酸残基”和“根据EU编号在位置X的氨基酸”(其中X为任意数)也可以读作“根据EU编号对应于位置X的氨基酸残基”和“根据EU编号对应于位置X的氨基酸”。如下述的实施例所示,通过修饰这些氨基酸残基并实施本发明的方法,可以优先获得期望的抗原结合分子。

[0537] 在实施方案中,本发明提供了抗原结合分子,其中重链和轻链的缔合被调节,其中

抗原结合分子的重链和轻链中选自由以下(a)至(c)中所示的氨基酸残基组组成的组的一组或两组或更多组氨基酸残基是相互电排斥的氨基酸残基：

[0538] (a)根据EU编号第175位的CH1中所含的氨基酸残基,和根据Kabat编号第160位的CL所含的氨基酸残基；

[0539] (b)根据EU编号第175位的CH1中所含的氨基酸残基,和根据Kabat编号第131位的CL所含的氨基酸残基；

[0540] (c)根据EU编号第147和175位的CH1中所含的氨基酸残基,和根据Kabat编号第131和160位的CL中所含的氨基酸残基;和

[0541] (d)根据EU编号第175位的CH1中所含的氨基酸残基,和根据Kabat编号第131和160位的CL所含的氨基酸残基。

[0542] 在上述抗原结合分子中,“相互电排斥的氨基酸残基”或“具有相同电荷的氨基酸残基”优选选自例如以下(X)或(Y)的组中的任一个所含的氨基酸残基：

[0543] (X)谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)；或者

[0544] (Y)赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)。

[0545] 在上述抗原结合分子中,互相电排斥的氨基酸残基组的具体实例包括以下氨基酸残基组：

[0546] (a)根据EU编号第175位的CH1中所含的氨基酸残基,和根据EU编号第160位的CL中所含的氨基酸残基；

[0547] (b)根据EU编号第175位的CH1中所含的氨基酸残基,和根据Kabat编号第131位的CL中所含的氨基酸残基；

[0548] (c)根据EU编号第147和175位的CH1中所含的氨基酸残基,和根据Kabat编号第131和160位的CL中所含的氨基酸残基；

[0549] (d)根据EU编号第175位的CH1中所含的氨基酸残基,和根据Kabat编号第131和160位的CL中所含的氨基酸残基。

[0550] 在一些实施方案中,在多特异性抗原结合分子中,所述抗原结合分子的重链和轻链中选自由下述(a)至(d)所示的氨基酸残基组组成的组的一组、两组、三组或全部氨基酸残基为相互静电排斥的氨基酸残基：

[0551] (a)重链恒定区(CH1)中根据EU编号位置175处的氨基酸残基和轻链恒定区(CL)中根据Kabat编号位置131处的氨基酸残基,

[0552] (b)CH1中根据EU编号位置175处的氨基酸残基,和CL中根据Kabat编号位置160处的氨基酸残基,

[0553] (c)CH1中根据EU编号位置175处的氨基酸残基,以及CL中根据Kabat编号位置131和160处的氨基酸残基,

[0554] (d)CH1中根据EU编号位置147和175处的氨基酸残基,以及CL中根据Kabat编号位置131和160处的氨基酸残基。

[0555] 本发明提供了抗原结合分子,其中抗原结合分子的重链和轻链中选自由以下(a1)至(c2)中所示的氨基酸残基组组成的组的一组或两组或更多组氨基酸残基是相互电排斥的氨基酸残基：

[0556] (a1)根据EU编号第175位的CH1中所含的氨基酸残基,其为谷氨酸(E)或天冬氨酸

(D),以及根据EU编号第160位的CL所含的氨基酸残基,其为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D);

[0557] (a2)根据EU编号第175位的CH1中所含的氨基酸残基,其为赖氨酸(K)、组氨酸(H)或精氨酸(R),以及根据EU编号第160位的CL所含的氨基酸残基,其为赖氨酸(K)、组氨酸(H)或精氨酸(R);

[0558] (b1)根据EU编号第175位的CH1中所含的氨基酸残基,其为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D),以及根据EU编号第131位的CL所含的氨基酸残基,其为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D);

[0559] (b2)根据EU编号第175位的CH1中所含的氨基酸残基,其为赖氨酸(K)、组氨酸(H)或精氨酸(R),以及根据EU编号第131位的CL所含的氨基酸残基,其为赖氨酸(K)、组氨酸(H)或精氨酸(R);

[0560] (c1)根据EU编号第147和175位的CH1中所含的氨基酸残基,其分别为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D),以及根据EU编号第131和160位的CL所含的氨基酸残基,其分别为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D);

[0561] (c2)根据EU编号第147和175位的CH1中所含的氨基酸残基,其分别为赖氨酸(K)、组氨酸(H)或精氨酸(R),以及根据EU编号第131和160位的CL所含的氨基酸残基,其分别为赖氨酸(K)、组氨酸(H)或精氨酸(R)。

[0562] 在上述抗原结合分子中,互相电排斥的氨基酸残基的具体实例包括以下氨基酸残基:

[0563] (a1)根据EU编号第175位的CH1中所含的氨基酸残基,其为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D),以及根据EU编号第160位的CL所含的氨基酸残基,其为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D);

[0564] (a2)根据EU编号第175位的CH1中所含的氨基酸残基,其为赖氨酸(K)、组氨酸(H)或精氨酸(R),以及根据EU编号第160位的CL所含的氨基酸残基,其为赖氨酸(K)、组氨酸(H)或精氨酸(R);

[0565] (b1)根据EU编号第175位的CH1中所含的氨基酸残基,其为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D),以及根据EU编号第131位的CL所含的氨基酸残基,其为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D);

[0566] (b2)根据EU编号第175位的CH1中所含的氨基酸残基,其为赖氨酸(K)、组氨酸(H)或精氨酸(R),以及根据EU编号第131位的CL所含的氨基酸残基,其为赖氨酸(K)、组氨酸(H)或精氨酸(R);

[0567] (c1)根据EU编号第147和175位的CH1中所含的氨基酸残基,其分别为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D),以及根据EU编号第131和160位的CL所含的氨基酸残基,其分别为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D);

[0568] (c2)根据EU编号第147和175位的CH1中所含的氨基酸残基,其分别为赖氨酸(K)、组氨酸(H)或精氨酸(R),以及根据EU编号第131和160位的CL所含的氨基酸残基,其分别为赖氨酸(K)、组氨酸(H)或精氨酸(R);

[0569] (d1)根据EU编号第175位的CH1中所含的氨基酸残基,其为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D),以及根据EU编号第131和160位的CL所含的氨基酸残基,其分别为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D);

[0570] (d2)根据EU编号第175位的CH1中所含的氨基酸残基,其为赖氨酸(K)、组氨酸(H)或精氨酸(R),以及根据EU编号第131和160位的CL所含的氨基酸残基,其分别为赖氨酸(K)、组氨酸(H)或精氨酸(R)。

[0571] 除此之外,通过在CH1和CL之间的界面引入电荷排斥来抑制非目的CH1/CL缔合的技术(WO2013/065708)可以进一步应用于本发明的抗原结合分子。更具体而言,本发明提供具有CH1和CL的抗原结合分子,其中,选自由以下(a)至(d)所示的氨基酸残基组组成的组中的一组或两组或更多组的氨基酸残基相互电排斥:

[0572] (a)根据EU编号第147位的重链恒定区(CH1)中所含的氨基酸残基,和根据EU编号第160位的轻链恒定区(CL)中所含的氨基酸残基;

[0573] (b)根据EU编号第147位的CH1中所含的氨基酸残基,和根据EU编号第131位的CL中所含的氨基酸残基;

[0574] (c)根据EU编号第175位的CH1中所含的氨基酸残基,和根据EU编号第160位的CL中所含的氨基酸残基;

[0575] (d)根据EU编号第213位的CH1中所含的氨基酸残基,和根据EU编号第123位的CL中所含的氨基酸残基。

[0576] 在重链第二恒定区(CH2)或重链第三恒定区(CH3)的界面引入电排斥以抑制重链之间的非期望缔合的技术,在重链可变区和轻链可变区的界面引入电排斥以抑制重链和轻链之间的非期望缔合的技术,或将重链可变区和轻链可变区界面处形成疏水性核心的氨基酸残基修饰成具有电荷的极性氨基酸以抑制重链和轻链之间的非期望缔合的技术可以进一步应用于本发明的抗原结合分子中(参见WO2006/106905)。

[0577] 在通过在CH2或CH3的界面引入电排斥来抑制重链之间的非期望缔合的技术中,在重链其他恒定区界面处接触的氨基酸残基的实例包括对应于CH3区中位置356(EU编号)和位置439(EU编号),位置357(EU编号)和位置370(EU编号),以及位置399(EU编号)和位置409(EU编号)的区域。对于抗体恒定区的编号,可以参考Kabat等人的出版物(Kabat,E.A.,等人,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,NIH);对于重链恒定区的编号,显示了EU编号。

[0578] 更具体地,例如,在包含两种类型的重链CH3区的抗原结合分子中,第一重链CH3区中的1至3组氨基酸残基(其选自以下(1)至(3)的氨基酸残基组)可以是相互电排斥的:

[0579] (1)根据EU编号第356位和第439位的重链CH3区中所含的氨基酸残基;

[0580] (2)根据EU编号第357位和第370位的重链CH3区中所含的氨基酸残基;和

[0581] (3)根据EU编号第399位和第409位的重链CH3区中所含的氨基酸残基。

[0582] 此外,抗体可以是在第二重链CH3区中具有不同于上述第一重链CH3区的氨基酸残基组的抗体,其中该氨基酸残基组选自上述(1)至(3)所示的氨基酸残基组,并且其中与上述(1)至(3)所示的氨基酸残基组相对应的一组至三组氨基酸残基,其在第一重链CH3区中相互电排斥,不与第一重链CH3区中相应的氨基酸残基发生电排斥。

[0583] 上述(1)至(3)中描述的氨基酸残基在缔合时彼此接近。本领域技术人员将能够使用市售软件通过同源建模等找到对应于期望重链CH3区或重链恒定区的上述(1)至(3)中描述的氨基酸残基的位点,并适当修饰那些位点处的氨基酸残基。

[0584] 在上述抗原结合分子中,“电排斥”、“具有相同的电荷”或“带有相同的电荷”是指例如任意两个或更多个氨基酸残基具有包含在本文提及的(X)和(Y)的任一组中的氨基酸残基。

[0585] 在上述抗原结合分子的优选实施方案中,第一重链CH3区域和第二重链CH3区域可

以通过二硫键交联。

[0586] 在本发明中,进行“修饰”的氨基酸残基不限于上述抗原结合分子可变区或抗体恒定区的氨基酸残基。本领域技术人员将能够使用市售软件通过同源建模等方法找到多肽变体或异聚(heteromeric)多聚体中形成界面的氨基酸残基,并修饰那些位点处的氨基酸残基以调节缔合。同源建模是一种使用市售软件预测蛋白质三维结构的技术。在构建具有未知三维结构的蛋白质结构时,首先寻找已确定具有与该蛋白质高度同源性的三维结构的蛋白质。接下来,使用该三维结构为模板,构建具有未知结构的蛋白质的结构,并通过分子动力学等方法进一步优化结构,以预测未知蛋白质的三维结构。

[0587] 在向重链可变区和轻链可变区的界面引入电排斥以抑制重链和轻链的非期望缔合的技术中,在重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)界面处接触的氨基酸残基的实例包括VH(FR2区)中根据Kabat编号位置39处的谷氨酰胺(Q)和VL(FR2区域)中根据Kabat编号位置38处的面对的(接触的)谷氨酰胺(Q)。此外,优选的实例是VH(FR2)中的根据Kabat编号第45位的亮氨酸(L)和VL(FR2)中的根据Kabat编号第44位的面对的脯氨酸(P)。对于这些位点的编号,参考Kabat等人的出版物(Kabat,E.A.,等人,1991,Sequence of Proteins of Immunological Interest,NIH)。

[0588] 由于已知这些氨基酸残基在人类和小鼠中是高度保守的(J.Mol.Recognit.2003;16:113-120),因此通过修饰与上述氨基酸残基对应的氨基酸残基,抗原结合分子可变区的缔合可以针对实施例中所示以外的抗原结合分子的VH-VL缔合进行调节。

[0589] 在一些实施方案中,在多特异性抗原结合分子中,进一步地,形成重链可变区和轻链可变区之间的界面的2个或更多个氨基酸残基是相互静电排斥的氨基酸残基。

[0590] 具体的实例是抗原结合分子,其中形成VH和VL界面的两个或更多个氨基酸残基是相互电排斥的氨基酸残基。更具体地,实例包括具有选自以下(a)或(b)中所示的氨基酸残基组所组成的组的一组或两组氨基酸残基的抗原结合分子:

[0591] (a)根据Kabat编号第39位的VH中所含的氨基酸残基,和根据Kabat编号第38位的VL中所含的氨基酸残基;或

[0592] (b)根据Kabat编号第45位的VH中所含的氨基酸残基,和根据Kabat编号第44位的VL中所含的氨基酸残基。

[0593] 在一些实施方案中,在多特异性抗原结合分子中,所述相互静电排斥的氨基酸残基是选自以下(a)和(b)的氨基酸残基组所组成组的一组或两组氨基酸残基:

[0594] (a)重链可变区中根据Kabat编号位置39处的氨基酸残基和轻链可变区中根据Kabat编号位置38处的氨基酸残基,

[0595] (b)重链可变区中根据Kabat编号位置45处的氨基酸残基和轻链可变区中根据Kabat编号位置44处的氨基酸残基。

[0596] 上述(a)或(b)中描述的每个氨基酸残基在缔合时相互靠近。本领域技术人员可以使用市售软件通过同源建模等在所需的VH或VL中找到与上述(a)或(b)中描述的氨基酸残基相对应的位点,并对那些位点处的氨基酸残基进行适当修饰。

[0597] 在一些实施方案中,在多特异性抗原结合分子中,相互静电排斥的氨基酸残基选自包含在以下(X)或(Y)的任意一组中的氨基酸残基:

[0598] (X)谷氨酸(E)、天冬氨酸(D),

[0599] (Y)赖氨酸(K)、精氨酸(R)、组氨酸(H)。

[0600] 在将存在于VH和VL界面的形成疏水性核心的氨基酸残基修饰成具有电荷的极性氨基酸以抑制重链和轻链的非期望缔合的技术中,能够在VH和VL的界面处形成疏水性核心的优选氨基酸残基的实例包括VH(FR2)中的根据Kabat编号第45位的亮氨酸(L),以及VL(FR2)中的根据Kabat编号第44位的面对的脯氨酸(P)。对于这些位点的编号,Kabat等人(Kabat,E.A.,等人,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,NIH)用作参考。

[0601] 一般而言,术语"疏水性核心"是指由缔合的多肽内部的疏水性氨基酸侧链组装而形成的部分。疏水性氨基酸的实例包括丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸和缬氨酸。此外,疏水性氨基酸以外的氨基酸残基(例如酪氨酸)可能参与疏水性核心的形成。这种疏水性核心与亲水性表面(其中亲水性氨基酸侧链暴露在外)一起成为促进水溶性多肽缔合的驱动力。当两个不同结构域的疏水性氨基酸存在于分子表面并暴露于水分子时,熵会增加,并且自由能会增加。相应地,两个结构域将相互缔合以降低自由能并变得稳定,并且界面处的疏水性氨基酸将被埋入分子内部以形成疏水性核心。

[0602] 人们认为,当多肽缔合发生时,通过将形成疏水性核心的疏水性氨基酸修饰为具有电荷的极性氨基酸来抑制疏水性核心的形成;因此,多肽缔合被认为受到抑制。

[0603] 通过分析期望抗原结合分子的氨基酸序列,本领域技术人员能够识别疏水性核心的有无、形成位点(区域)等。即,本发明的抗原结合分子是一种抗原结合分子,其特征在于,能够在界面形成疏水性核心的氨基酸残基被修饰为具有电荷的氨基酸残基。更具体而言,实例包括以下(1)或(2)中的任一者所示的氨基酸残基为具有电荷的氨基酸残基的抗原结合分子。以下(1)和(2)所示的氨基酸残基的侧链相互邻近,并且可以形成疏水性核心:

[0604] (1)根据Kabat编号第45位的VH中所含的氨基酸残基;和

[0605] (2)根据Kabat编号第44位的VL中所含的氨基酸残基。

[0606] 上述抗原结合分子中具有电荷的氨基酸残基的优选实例包括谷氨酸(E)、天冬氨酸(D)、赖氨酸(K)、精氨酸(R)和组氨酸(H)。更优选的实例包括谷氨酸(E)和赖氨酸(K)。

[0607] 一般来说,人和小鼠中的以上(1)和(2)中描述的氨基酸残基分别为:

[0608] (1)亮氨酸(L),以及

[0609] (2)脯氨酸(P)。

[0610] 因此,在本发明的优选实施方案中,这些氨基酸残基被修饰(例如用具有电荷的氨基酸置换)。另外,上述(1)和(2)的氨基酸残基的类型并不一定限定于上述氨基酸残基,也可以是与这些氨基酸残基等同的其他氨基酸。

[0611] 其他已知技术可以应用于本发明的抗原结合分子。例如,为了促进第一VH(VH1)和第一VL(VL1)和/或第二VH(VH2)和第二VL(VL2)的缔合,一条H链的可变区中存在的氨基酸侧链可以被更大的侧链(杵)置换,并且存在于另一条H链的相对可变区中的氨基酸侧链可以被更小的侧链(臼)置换,因此杵可以设置在臼内,并且VH1与VL1和/或VH2与VL2的缔合被促进;因此,可以进一步抑制VH1和VL2和/或VH2和VL1的缔合。

[0612] 例如,在人IgG1的情况下,为了使一条H链的CH3区中的氨基酸侧链成为更大的侧链(杵),进行了Y349C和T366W的修饰,并且为了使另一条H链的CH3区中的氨基酸侧链成为更小的侧链,进行了D356C、T336S、L368A和Y407V的修饰。

[0613] 在一些实施方案中,在多特异性抗原结合分子中,Fc结构域由能够稳定缔合的第一Fc区亚基和第二Fc区亚基组成。

[0614] 在一些实施方案中,在多特异性抗原结合分子中,Fc结构域包含以下(e1)或(e2):

[0615] (e1)包含349位的Cys,366位的Ser,368位的Ala和407位的Val的第一Fc区亚基,以及包含354位的Cys和366位的Trp的第二Fc区;

[0616] (e2)包含439位的Glu的第一Fc区亚基,和包含356位的Lys的第二Fc区,

[0617] 其中所述氨基酸位置根据EU编号进行编号。

[0618] 例如,杵臼技术描述于例如US 5731168;US7,695,936;Ridgway等人,Prot Eng 9,617-621(1996)和Carter,J Immunol Meth 248,7-15(2001)中。通常,该方法包括在第一多肽的界面处引入突起(“杵”)和在第二多肽的界面中引入相应的空腔(“臼”),使得突起可以定位在空腔中以便促进异二聚体形成并阻碍同二聚体形成。通过用较大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换来自第一多肽界面的小氨基酸侧链来构建突起。通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换大的氨基酸侧链,在第二个多肽的界面中产生与突起大小相同或相似的补偿空腔。

[0619] 其他已知技术可以应用于本发明的抗原结合分子。靶标抗原结合分子可以通过使用链交换工程化结构域CH3将CH3互补缔合而有效地制备,其中抗原结合分子的一条H链的部分CH3被改变为源自对应于该部分的IgA的序列,并且另一条H链的CH3的互补部分被引入源自对应于该部分的IgA的序列(Protein Engineering Design&Selection,23:195-202,2010)。

[0620] 其他已知技术可以应用于本发明的抗原结合分子。在制备双特异性抗体时,例如可以通过以下制备靶标双特异性抗体:通过对两种类型的H链的可变区中的每一个进行不同的氨基酸修饰来赋予等电点差异,和利用该等电点差异通过离子交换层析进行纯化(WO2007/114325)。

[0621] 将根据EU编号第435位(其是与IgG和蛋白A之间结合相关的位点)的氨基酸残基修饰成与蛋白A具有不同结合强度的氨基酸例如Arg的技术也可以与上述技术组合用于本发明的抗原结合分子。通过使用该技术,可以改变H链和蛋白A之间的相互作用,并且只有异二聚体抗原结合分子可以使用蛋白A柱有效地纯化。该技术也可以单独使用,无需与上述技术组合使用。

[0622] 本发明的修饰可以用于如下抗原结合分子,例如具有如下结构的抗原结合分子,其中,为促进第一VH(VH1)和第一VL(VL1)和/或第二VH(VH2)和第二VL(VL2)的缔合,VH1通过第一CH1连接到Fc区并且VL1连接到第一CL,并且VH2通过第二CL连接到另一个Fc区并且VL2连接到第二CH1(WO 09/80254)。

[0623] 对于本发明的抗原结合分子,可以将上述公知技术中的多种例如两种或更多种组合使用。此外,本发明的抗原结合分子可以基于已经对其进行了上述已知技术的修饰的抗体来制备。

[0624] 另外,本发明提供其中重链与轻链的缔合受到调节的抗原结合分子的制备方法。本发明的制备方法的优选实施方案是其中重链与轻链之间的缔合受到调节的抗原结合分子的制备方法,其包括:

[0625] (1)修饰编码CH1和CL的核酸,使得选自以下(a)至(c)中所示氨基酸残基组所组成

的组的一组或两组或更多组氨基酸残基是相互静电排斥的氨基酸残基：

[0626] (a)重链恒定区(CH1)中根据EU编号位置175处的氨基酸残基和轻链恒定区(CL)中根据Kabat编号位置131处的氨基酸残基，

[0627] (b)CH1中根据EU编号位置175处的氨基酸残基，和CL中根据Kabat编号位置160处的氨基酸残基，

[0628] (c)CH1中根据EU编号位置175处的氨基酸残基，以及CL中根据Kabat编号位置131和160处的氨基酸残基，

[0629] (d)CH1中根据EU编号位置147和175处的氨基酸残基，以及CL中根据Kabat编号位置131和160处的氨基酸残基。

[0630] (2)将修饰的核酸引入宿主细胞，并培养宿主细胞使核酸表达；和

[0631] (3)从宿主细胞的细胞培养物中收集抗原结合分子。

[0632] 另外，本发明涉及一种制备方法，其包含，在上述步骤(1)中，对核酸进行修饰，使得相互电排斥的氨基酸残基选自上述(X)和(Y)的任一组中所含的氨基酸残基。

[0633] 此外，本发明涉及一种制备方法，其包括在上述步骤(1)中修饰核酸，使得形成VH和VL界面的两个或更多个氨基酸残基是相互电排斥的氨基酸残基。优选地，相互电排斥的氨基酸残基是选自例如以下(a)和(b)中所示的氨基酸残基组所组成的组的任意氨基酸残基组：

[0634] (a)根据Kabat编号第39位的VH中所含的氨基酸残基，和根据Kabat编号第38位的VL中所含的氨基酸残基；或

[0635] (b)根据Kabat编号第45位的VH中所含的氨基酸残基，和根据Kabat编号第44位的VL中所含的氨基酸残基。

[0636] 上述相互电排斥的氨基酸残基优选选自上述(X)和(Y)的任意一组中包含的氨基酸残基。

[0637] 此外，本发明提供了调节抗原结合分子的重链和轻链缔合的方法。本发明的用于调节缔合的方法的优选实施方案是用于调节抗原结合分子的重链和轻链缔合的方法，包括修饰核酸使得选自由以下(a)至(c)所示的氨基酸残基组所组成的组的一组或两组或更多组氨基酸残基是相互静电排斥的氨基酸残基：

[0638] (a)重链恒定区(CH1)中根据EU编号位置175处的氨基酸残基和轻链恒定区(CL)中根据EU编号位置131处的氨基酸残基，

[0639] (b)CH1中根据EU编号位置175处的氨基酸残基，和CL中根据EU编号位置160处的氨基酸残基，

[0640] (c)CH1中根据EU编号位置175处的氨基酸残基，以及CL中根据EU编号位置131和160处的氨基酸残基，

[0641] (d)CH1中根据EU编号位置147和175处的氨基酸残基，以及CL中根据EU编号位置131和160处的氨基酸残基。

[0642] 另外，本发明涉及用于调节缔合的方法，其包括，在上述步骤(1)中，对核酸进行修饰，使得相互静电排斥的氨基酸残基选自上述(X)或(Y)的任一组中包含的氨基酸残基。

[0643] 此外，本发明涉及用于调节缔合的方法，其包括，在上述步骤(1)中修饰核酸，使得形成VH-VL界面的两个或更多个氨基酸残基是相互静电排斥的氨基酸残基。此处，相互静电

排斥的氨基酸残基优选为选自由例如以下(a)和(b)所示的氨基酸残基组所组成的组中的任意一组氨基酸残基：

[0644] (a)VH中根据Kabat编号第39位的氨基酸残基,和VL中根据Kabat编号第38位的氨基酸残基,

[0645] (b)VH中根据Kabat编号第45位的氨基酸残基,和VL中根据Kabat编号第44位的氨基酸残基。

[0646] 根据本发明的用于调节缔合的方法,如前所述,可以优先且有效地获得期望的双特异性抗体。即,可以从单体混合物有效地形成双特异性抗体形式的期望的异聚多聚体。

[0647] 本发明上述方法中的短语“修饰核酸”是指修饰核酸使其对应于通过本发明“修饰”引入的氨基酸残基。更具体地说,是指将编码原始(修饰前)氨基酸残基的核酸修饰为编码待通过修饰引入的氨基酸残基的核酸。通常,它是指进行基因操作或突变处理,导致对原始核酸进行至少一个核苷酸插入、缺失或置换,从而形成编码目的氨基酸残基的密码子。更具体地,编码原始氨基酸残基的密码子被编码待通过修饰引入的氨基酸残基的密码子置换。此类核酸修饰可以由本领域技术人员使用已知技术例如定点诱变和PCR诱变适当地进行。此外,本发明提供编码本发明的抗原结合分子的核酸。此外,携带核酸的载体也包括在本发明中。

[0648] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子的Fc结构域由一对多肽链组成,所述多肽链包含免疫球蛋白分子的重链结构域。例如,免疫球蛋白G(IgG)分子的Fc结构域是二聚体,其每个亚基都包含CH2和CH3 IgG重链恒定结构域。Fc结构域的两个亚基能够相互稳定缔合。在一个实施方案中,本文所述的多特异性抗原结合分子包含不超过一个Fc结构域。

[0649] 在本文所述的一个实施方案中,多特异性抗原结合分子的Fc结构域是IgG Fc结构域。在特定实施方案中,Fc结构域是IgG1 Fc结构域。在另一个实施方案中,Fc结构域是IgG1 Fc结构域。在进一步的特定实施方案中,Fc结构域是人IgG1 Fc区。

[0650] 在一些实施方案中,本公开提供了进一步包含Fc结构域的多特异性抗原结合分子,与天然人IgG1 Fc结构域相比,该Fc结构域表现出对人Fcγ受体的降低的结合亲和力,

[0651] 其中,与天然的人IgG1 Fc结构域相比,所述Fc结构域对人FcRn进一步展示出更强的FcRn结合亲和力。

[0652] 在一些实施方案中,本公开提供了进一步包含Fc结构域的多特异性抗原结合分子,与天然人IgG1 Fc结构域相比,该Fc结构域表现出对人Fcγ受体的降低的结合亲和力,

[0653] 其中包含在Fc结构域中的第一和/或第二Fc区亚基包含在位置428的Leu、在位置434的Ala、在位置438的Arg和在位置440的Glu,

[0654] 其中所述氨基酸位置根据EU编号进行编号。

[0655] 在一些实施方案中,在多特异性抗原结合分子中,与天然的人IgG1 Fc结构域相比,所述Fc结构域对人FcRn进一步展示出更强的FcRn结合亲和力。

[0656] 在一些实施方案中,在多特异性抗原结合分子中,第一和/或第二Fc区亚基包含428位的Leu、434位的Ala、438位的Arg和440位的Glu,

[0657] 其中所述氨基酸位置根据EU编号进行编号。

[0658] IgG型双特异性抗体是通过将构成目的IgG的两种类型的L链和H链的基因共计4个基因引入细胞并共表达而分泌的。然而,通过这些方法可以生产的IgG的H链和L链的组合的

数量在理论上是十种组合。因此,难以从十种类型的IgG中纯化包含所需H链和L链组合的IgG。此外,理论上具有期望组合的IgG的分泌量会显著减少,因此需要大规模培养,生产成本会进一步增加。

[0659] 因此,用于促进H链之间以及具有期望组合的L和H链之间缔合的技术可以应用于本发明的多特异性抗原结合分子。

[0660] 例如,通过在抗体H链(CH2或CH3)的第二恒定区或第三恒定区的界面处引入静电排斥来抑制不希望的H链缔合的技术可应用于多特异性抗体缔合(WO2006/106905)。

[0661] 在本发明中,进行修饰的氨基酸残基不限于上述抗体可变区或抗体恒定区的氨基酸残基。本领域技术人员可以使用市售软件通过同源建模等方法鉴定在突变多肽或异源多聚体中形成界面的氨基酸残基;然后可以对这些位置的氨基酸残基进行修饰以调节缔合。

[0662] 其他已知技术也可用于结合本发明的多特异性抗体的缔合。包含不同氨基酸的含有Fc区的多肽可以通过以下有效地相互缔合:用较大的侧链(杵)置换抗体的H链Fc区之一中存在的氨基酸侧链,并用较小的侧链(臼)置换另一条H链的相应Fc区中存在的氨基酸侧链,以允许将杵放置在臼内。杵-入-臼(knob(s)-into-hole(s))方法讨论于本文别处。

[0663] 此外,其他已知技术也可用于形成本发明的多特异性抗体。具有不同序列的多肽的缔合可以通过使用链交换工程化结构域CH3的互补结合来有效诱导,所述链交换工程化结构域CH3是通过将抗体的H链CH3的一部分改变为相应的IgA衍生序列并将相应的IgA衍生序列引入另一条H链CH3的互补部分而产生的(Protein Engineering Design&Selection,23;195-202,2010)。这种已知技术也可用于有效地形成目的多特异性抗体。

[0664] 此外,WO 2011/028952、WO2014/018572和Nat Biotechnol.2014Feb;32(2):191-8中描述了,使用抗体CH1和CL缔合以及VH和VL缔合的抗体生产技术;WO2008/119353和WO2011/131746中描述了,联合使用单独制备的单克隆抗体(Fab臂交换)生产双特异性抗体的技术;WO2012/058768和WO2013/063702中描述了用于调节抗体重链CH3之间的缔合的技术;WO2012/023053中描述了,用于生产由两种类型的轻链和一种类型的重链组成的双特异性抗体的技术;Christoph等人(Nature Biotechnology卷31,p 753-758(2013))描述了,使用两种细菌细胞株生产双特异性抗体的技术,所述细菌细胞株单独表达包含单个H链和单个L链的抗体链之一;并且这些可用于形成多特异性抗体。

[0665] 或者,即使在不能有效地形成目的多特异性抗体的情况下,通过从生成的抗体中分离和纯化目的多特异性抗体,也可以得到本发明的多特异性抗体。例如,已经报道了通过将氨基酸置换引入两条H链的可变区而赋予等电点差异,从而能够通过离子交换色谱法纯化两种类型的同源形式和目的异聚抗体的方法(WO2007114325)。迄今为止,作为纯化异聚抗体的方法,已经报道了使用蛋白A纯化包含与蛋白A结合的小鼠IgG2a H链和不与蛋白A结合的大鼠IgG2b H链的异二聚抗体的方法(WO98050431和WO95033844)。此外,异二聚体抗体可以通过使用H链自行有效纯化,其中所述H链包括用产生不同蛋白A亲和力的氨基酸Tyr、His等置换EU编号位置435和436(其是IgG蛋白A结合位点)的氨基酸残基,或所述H链是根据参考实施例5的方法得到的具有不同蛋白A亲和力的H链以改变每条H链与蛋白A的相互作用,然后使用蛋白A柱纯化。

[0666] 此外,Fc区C末端异质性得到改善的Fc区可以适当地用作本发明的Fc区。更具体地,本发明提供通过从构成源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc区的两个多肽的氨基酸序列中

缺失如EU编号指定的位置446处的甘氨酸和位置447处的赖氨酸而产生的Fc区。

[0667] 可以组合使用这些技术中的多种,例如两种或更多种。此外,这些技术可以适当地分别应用于待缔合的两条H链。此外,这些技术可以与上述对Fcγ受体具有降低的结合活性的Fc区组合使用。此外,本发明的抗原结合分子可以是基于进行了上述修饰的抗原结合分子单独制备的分子以具有相同氨基酸序列。

[0668] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子包含以下(i)至(xii)的一个或多个氨基酸残基:

[0669] (i)重链恒定区中第175位(EU编号)的谷氨酸或赖氨酸;

[0670] (ii)重链恒定区中第147位(EU编号)的谷氨酸;

[0671] (iii)轻链恒定区第131位(Kabat编号)的谷氨酸或赖氨酸;

[0672] (iv)轻链恒定区第160位(Kabat编号)的谷氨酸或赖氨酸;

[0673] (v)重链恒定区第235位(EU编号)的精氨酸;

[0674] (vi)重链恒定区第236位(EU编号)的精氨酸;

[0675] (vii)重链恒定区第356位(EU编号)的赖氨酸;

[0676] (viii)重链恒定区第428位(EU编号)的亮氨酸;

[0677] (ix)重链恒定区第434位(EU编号)的丙氨酸;

[0678] (x)重链恒定区第438位(EU编号)的精氨酸;

[0679] (xi)重链恒定区第439位(EU编号)的谷氨酸;

[0680] (xii)重链恒定区第440位(EU编号)的谷氨酸。

[0681] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子是双特异性抗体,其包含:

[0682] 第一重链,其包含第175位的赖氨酸(EU编号)、第235位的精氨酸(EU编号)、第236位的精氨酸(EU编号)、第428位的亮氨酸(EU编号)、第434位的丙氨酸(EU编号)、第438位的精氨酸(EU编号)、第439位的谷氨酸(EU编号)和第440位的谷氨酸(EU编号);

[0683] 第一轻链,其包含第131位的谷氨酸(Kabat编号)和第160位的谷氨酸(Kabat编号);

[0684] 第二重链,其包含第147位的谷氨酸(EU编号)、第175位的谷氨酸(EU编号)、第235位的精氨酸(EU编号)、第236位的精氨酸(EU编号)、第356位的赖氨酸(EU编号)、第428位的亮氨酸(EU编号)、第434位的丙氨酸(EU编号)、第438位的精氨酸(EU编号)和第440位的谷氨酸(EU编号);和

[0685] 第二轻链,其包含第131位(Kabat编号)的赖氨酸和第160位(Kabat编号)的赖氨酸。

[0686] 在一些实施方案中,在多特异性抗原结合分子中:

[0687] 所述第一重链还包含第419位(EU编号)的谷氨酸和第445位(EU编号)的脯氨酸,以及第446和447位(EU编号)的氨基酸缺失;和

[0688] 所述第二重链还包含第196位(EU编号)的赖氨酸、第445位(EU编号)的脯氨酸以及第446和447位(EU编号)的氨基酸缺失。

[0689] 在一些实施方案中,在多特异性抗原结合分子中:

[0690] 所述第一重链还包含第16位的甘氨酸(Kabat编号),第32位的丙氨酸(Kabat编号),第35a位的缬氨酸(Kabat编号),第50位的丙氨酸(Kabat编号),第61位的赖氨酸(Kabat

编号),第64位的谷氨酸(Kabat编号),第73位的苏氨酸(Kabat编号),第95位的谷氨酸(Kabat编号),和第102位的缬氨酸(Kabat编号);

[0691] 第一轻链还包含第28位的谷氨酸(Kabat编号),第55位的酪氨酸(Kabat编号),第56位的谷氨酸或酪氨酸(Kabat编号),第92位的谷氨酸(Kabat编号),第94位的缬氨酸(Kabat编号),和第95a位的丙氨酸(Kabat编号);

[0692] 第二重链还包含第28位的谷氨酸(Kabat编号),第30位的丙氨酸或谷氨酸(Kabat编号),第31位的谷氨酸(Kabat编号)、第32位的色氨酸(Kabat编号),第34位的苯丙氨酸(Kabat编号),和第35位的甲硫氨酸(Kabat编号),第35a位的丝氨酸(Kabat编号),第50位的丝氨酸(Kabat编号),第61位的谷氨酸或甘氨酸(Kabat编号),第64位的谷氨酸(Kabat编号),以及第65位的谷氨酸(Kabat编号);和

[0693] 第二轻链还包含第25位的苏氨酸(Kabat编号),第54位的赖氨酸(Kabat编号),第56位的谷氨酸(Kabat编号),第67位的亮氨酸(Kabat编号),第79位的谷氨酰胺(Kabat编号),和第94位的赖氨酸(Kabat编号)。

[0694] 来源于文库的抗体

[0695] 本发明的抗体可以通过筛选具有所需一种或多种活性的抗体的组合文库来分离。例如,本领域已知多种方法用于生成噬菌体展示文库,并针对具有所需结合特征的抗体筛选所述文库。此种方法被综述于例如Hoogenboom等人,Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人,编,Human Press,Totowa,NJ,2001)中,并被进一步描述于例如McCafferty等人,Nature 348:552-554;Clackson等,Nature 352:624-628(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Marks和Bradbury,Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo,编,Human Press,Totowa,NJ,2003);Sidhu等,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee等,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004);以及Lee等人,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004)中。

[0696] 在某些噬菌体展示方法中,VH和VL基因库通过聚合酶链式反应(PCR)分别克隆并在噬菌体文库中随机重组,然后可针对抗原结合噬菌体筛选所述噬菌体文库,如在Winter等人,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455(1994)中所述。噬菌体典型地将抗体片段展示为单链Fv(scFv)片段或者是Fab片段。来自经免疫来源的文库提供对免疫原的高亲和力抗体,而不需要构建杂交瘤。备选地,可以(例如,从人)克隆幼稚(naive)库以提供针对广泛的非自身抗原以及自身抗原的单一来源的抗体,而不需要任何免疫,如Griffiths等人,EMBO J,12:725-734(1993)所述。最后,也可通过以下方式合成制备幼稚文库:从干细胞克隆未重排的V基因区段,并使用含有随机序列的PCR引物,以编码高度可变的CDR3区并在体外完成重排,如Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公开包括,例如:美国专利号5,750,373,和美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0697] 在本文中,从人抗体文库分离的抗体或抗体片段被认为是人抗体或人抗体片段。

[0698] 糖基化变体

[0699] 在某些实施方案中,改变本文提供的抗体以增加或减少抗体被糖基化的程度。抗

体糖基化位点的添加或缺失可以通过改变氨基酸序列以便产生或去除一个或更多个糖基化位点方便地实现。

[0700] 当抗体包含Fc区时,可以改变与其附接的碳水化合物。由哺乳动物细胞产生的天然抗体典型地包含支链的、分两支的(biantennary)寡糖,所述寡糖一般通过N-连接与Fc区的CH2结构域的Asn297附接。参见,例如,Wright等人TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可以包括各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰葡糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及附接至分两支的寡糖结构的"茎"中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中,可以对本发明抗体中的寡糖进行修饰,以产生具有某些改善的性质的抗体变体。

[0701] 在一个实施方案中,提供抗体变体,其具有缺乏与Fc区(直接或间接)附接的岩藻糖的碳水化合物结构。例如,在此种抗体中岩藻糖的量可以是1%至80%,1%至65%,5%至65%或20%至40%。岩藻糖的量通过计算相对于与Asn297附接的所有糖结构(例如,复合物、杂合物和高甘露糖结构)的总和的Asn297处的糖链内岩藻糖的平均量来确定,如通过MALDI-TOF质谱法测量的,例如如WO2008/077546中所述。Asn297指位于Fc区中的大约位置297(Fc区残基的EU编号)处的天冬酰胺残基;然而,由于抗体中的微小序列变异,Asn297也可以位于位置297的上游或下游约+/-3个氨基酸处,即在位置294和位置300之间。此种岩藻糖基化变体可具有改善的ADCC功能。参见例如美国专利公开号US 2003/0157108(Presta,L.);US 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。涉及"去岩藻糖基化"或"岩藻糖缺陷型"抗体变体的公开的实例包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够制备去岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括蛋白质岩藻糖基化缺陷型Lec13 CHO细胞(Ripka等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请号US 2003/0157108 A1,Presta,L;以及WO 2004/056312 A1,Adams等人,特别是实施例11),以及敲除细胞系,例如α-1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除的CHO细胞(参见,例如,Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);以及WO2003/085107)。

[0702] 进一步提供具有被二等分的寡糖的抗体变体,例如,其中与抗体Fc区附接的分两支的寡糖被GlcNAc二等分。此种抗体变体可具有减少的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此种抗体变体的实例描述于例如WO2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684(Umana等人);和US2005/0123546(Umana等人)中。还提供在与Fc区附接的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此种抗体变体可具有改善的CDC功能。此种抗体变体描述于例如WO1997/30087(Patel等人);WO 1998/58964(Raju,S.);和WO 1999/22764(Raju,S.)中。

[0703] 在优选的实施方案中,上述抗体可以具有通过二硫键交联的第一H链CH3区和第二H链CH2区。

[0704] 如本文所述制备的多特异性抗原结合分子可以通过本领域已知的技术例如高效液相色谱、离子交换色谱、凝胶电泳、亲和色谱、尺寸排阻色谱等来纯化。用于纯化特定蛋白

质的实际条件将部分取决于诸如净电荷、疏水性、亲水性等因素,并且对于本领域技术人员来说是显而易见的。对于亲和色谱纯化,可以使用与多特异性抗原结合分子结合的抗体、配体、受体或抗原。例如,对于本发明的多特异性抗原结合分子的亲和色谱纯化,可以使用具有蛋白A或蛋白G的基质。顺序蛋白A或G亲和色谱和尺寸排阻色谱可用于分离多特异性抗原结合分子。多特异性抗原结合分子的纯度可以通过多种众所周知的分析方法中的任一种来确定,包括凝胶电泳、高效液相色谱等。

[0705] 半胱氨酸工程改造的抗体变体

[0706] 在某些实施方案中,可能理想的是制备半胱氨酸工程改造的抗体,例如“thioMAb”,其中抗体的一个或更多个残基被半胱氨酸残基置换。在具体的实施方案中,置换的残基出现在抗体的可接近位点处。通过将那些残基置换为半胱氨酸,反应性硫醇基团由此被定位在抗体的可接近位点处,并且可以用于将抗体缀合至其他部分,诸如药物部分或接头-药物部分,以产生免疫缀合物,如本文进一步所描述的。在某些实施方案中,下列残基中的任何一个或更多个可以被半胱氨酸置换:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。半胱氨酸工程改造的抗体可以如例如美国专利号7,521,541中所述生成。

[0707] 抗体衍生物

[0708] 在某些实施方案中,本文提供的抗体可以被进一步修饰以含有本领域已知的且可容易获得的另外的非蛋白质部分。适于抗体衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)和葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性而在生产中可具有优势。聚合物可以具有任何分子量,并且可以是支化的或未支化的。与抗体附接的聚合物的数目可以变化,并且如果附接超过一个聚合物,则它们可以是相同或不同的分子。通常,用于衍生化的聚合物的数目和/或类型可基于以下考虑来确定,包括但不限于,待改善的抗体的特定性质或功能、抗体衍生物是否将用于限定条件下的治疗等。

[0709] 在另一个实施方案中,提供抗体和非蛋白质部分的缀合物,所述非蛋白质部分可通过暴露于辐射而被选择性加热。在一个实施方案中,非蛋白质部分是碳纳米管(Kam等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605(2005))。辐射可以是任何波长,并且包括但不限于这样的波长,所述波长不伤害正常细胞但将非蛋白质部分加热至将接近抗体-非蛋白质部分的细胞杀死的温度。

[0710] 重组方法和组合物

[0711] 抗体可以使用重组方法和组合物来制备,例如,如在美国专利号4,816,567中所述。在一个实施方案中,提供编码本文所描述的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)的分离的核酸。此种核酸可编码包含抗体VL的氨基酸序列和/或包含抗体VH的氨基酸序列(例如,抗体的轻链和/或重链)。在另外的实施方案中,提供一个或更多个包含此种核酸的载体(例如,表达载体)。在另外的实施方案中,提供包含此种核酸的宿主细胞。在一个这样的实施方案中,宿主细胞包含(例如,已经用下列物质转化):(1)包含核酸的载体,所述核酸编码包含

抗体VL的氨基酸序列和包含抗体VH的氨基酸序列,或(2)包含编码包含抗体VL的氨基酸序列的核酸的第一载体,和包含编码包含抗体VH的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一个实施方案中,宿主细胞是真核细胞,例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如Y0、NS0、Sp2/0细胞)。在一个实施方案中,提供制备抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)的方法,其中所述方法包括在适于表达抗体的条件下培养包含编码如上所提供的抗体的核酸的宿主细胞,以及任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体。

[0712] 为了重组制备抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体),将例如如上所述的编码抗体的核酸分离并插入一个或更多个载体中用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此种核酸可以使用常规程序(例如,通过使用能够特异性结合编码抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地分离和测序。

[0713] 用于克隆或表达编码抗体的载体的合适的宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,抗体可以在细菌中制备,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见,例如,美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523。(还参见Charlton,Methods in Molecular Biology,卷248(B.K.C.Lo,编著,Humana Press,Totowa,NJ,2003),第245-254页,描述了抗体片段在大肠杆菌中的表达。)在表达后,抗体可以以可溶级分从细菌细胞糊状物中分离,并且可进一步纯化。

[0714] 除了原核生物外,真核微生物如丝状真菌或酵母是抗体编码载体的合适克隆或表达宿主,包括糖基化途径已“人源化”的真菌和酵母菌株,从而产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见Gerngross,Nat.Biotech.22:1409-1414(2004),和Li等人,Nat.Biotech.24:210-215(2006)。

[0715] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞还源自多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株,其可与昆虫细胞联合使用,特别是用于草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞的转染。

[0716] 植物细胞培养物也可以用作宿主。参见,例如,美国专利号5,959,177,6,040,498,6,420,548,7,125,978和6,417,429(其描述了用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0717] 脊椎动物细胞也可用作宿主。例如,适于悬浮生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其它实例是SV40(COS-7)转化的猴肾CV1细胞系;人胚胎肾细胞系(293或293细胞,如例如Graham等人,J.Gen Virol.36:59(1977)中所述);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠支持(sertoli)细胞(TM4细胞,如例如Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中所述);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);水牛大鼠肝细胞(BRL3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT060562);TRI细胞,如例如Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中所述;MRC5细胞;和FS4细胞。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR-CHO细胞(Urlaub等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));以及骨髓瘤细胞系如Y0、NS0和Sp2/0。对于适用于抗体制备的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见,例如,Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,248卷(B.K.C.Lo,编著,Humana Press,Totowa,NJ),第255-268页(2003)。

[0718] 测定

[0719] 通过本领域已知的多种测定可以鉴定、筛选本文提供的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)或表征其物理/化学性质和/或生物学活性。

[0720] 结合测定和其他测定

[0721] 在一个方面,例如通过已知的方法如ELISA、蛋白质印迹等测试本发明抗体的抗原结合活性。

[0722] 在另一个方面,竞争测定可以用于鉴定与例如任何上述抗体竞争结合HLA-DQ2.5(或HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物)的抗体。在某些实施方案中,此种竞争性抗体结合至与上述抗体所结合的相同的表位(例如,线性或构象表位)。用于将抗体结合的表位作图的详细的示例性方法提供于Methods in Molecular Biology卷66(Humana Press,Totowa,NJ)中的Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols,”中。

[0723] 在示例性竞争测定中,将固定的HLA-DQ2.5(或HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物)在溶液中孵育,该溶液包含第一标记抗体和第二未标记抗体,所述第一标记抗体结合HLA-DQ2.5(或HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物),所述第二未标记抗体正在被测试其与第一抗体竞争结合HLA-DQ2.5(或HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物)的能力。第二抗体可存在于杂交瘤上清液中。作为对照,将固定的HLA-DQ2.5(或HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物)在包含第一标记抗体但不包含第二未标记抗体的溶液中孵育。在允许第一抗体与HLA-DQ2.5(或HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物)结合的条件下孵育后,去除过量的未结合抗体,并测量与固定的HLA-DQ2.5(或HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物)相缔合的标记的量。如果与固定的HLA-DQ2.5(或HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物)相缔合的标记的量在测试样品中相对于对照样品显著减少,则这表明第二抗体与第一抗体竞争结合HLA-DQ2.5(或HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物)。参见Harlow和Lane(1988)Antibodies:ALaboratory Manualch.14(冷泉港实验室,冷泉港,NY)。

[0724] 将动物,例如兔、小鼠、大鼠和其它适于免疫的动物,用抗原(例如HLA-DQ2.5或HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物)进行免疫。可以使用任何方法将抗原制备为重组蛋白,例如,本文所提及的。从经免疫的动物收集含抗体的样品,如血液和脾脏。对于B细胞选择,例如,制备生物素化的抗原,并且抗原结合的B细胞被生物素化的抗原结合,并且将所述细胞进行细胞分选和培养用于选择。细胞与抗原的特异性结合可以通过任何合适的方法如ELISA方法来评价。该方法也可用于评估对不感兴趣的抗原的交叉反应性的缺乏。为了分离或确定所选抗体的序列,例如,从细胞中纯化RNA,并通过RNA的反转录和PCR扩增来制备编码抗体区域的DNA。此外,经克隆的抗体基因可以在合适的细胞中表达,并且可以从培养物上清液中纯化抗体用于进一步分析。

[0725] 为了测试抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)是否结合目的抗原(例如,由HLA-DQ2.5和谷蛋白肽(例如本文所述的那些)形成的复合物),可以使用用于评估结合的任何方法。例如,当使用基于FACS的细胞分选方法时,将表达抗原的细胞与经测试的抗体一起孵育,然后加入针对经测试的抗体(即,一抗)的合适第二抗体并孵育。通过FACS分析,使用例如附接至第二抗体的发色/荧光标记(例如,如本文所提及的),检测抗原和经测试的抗体之间的结合。备选地,可以使用本说明书中“抗体亲和力”中提及的任何测量方法。例如,通过BIACORE表面等离振子共振测定法对Kd的测量可用于评估经测试抗体与本文所提及的目的抗原之间的结合。

[0726] 在某些实施方案中,本发明的方法进一步包括:测试所述抗体针对HLA-DQ2.5(或

HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物)与TCR之间的结合(或HLA-DQ2.5(或HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物)与HLA-DQ2.5限制性CD4+T细胞之间的相互作用)是否具有中和活性;以及选择具有中和活性的抗体。在某些实施方案中,本发明的方法进一步包括:测试所述抗体针对HLA-DQ2.2(或HLA-DQ2.2/谷蛋白肽复合物)与TCR之间的结合(或HLA-DQ2.2(或HLA-DQ2.2/谷蛋白肽复合物)与HLA-DQ2.2限制性CD4+T细胞之间的相互作用)是否具有中和活性;以及选择具有中和活性的抗体。这些步骤可以在谷蛋白肽例如本文所述的那些的存在下进行,即,使用由肽结合的HLA-DQ2.5或HLA-DQ2.2。中和活性可以例如如本文中所提及的进行评估。简言之,适当地制备珠子,例如链霉亲和素包被的黄色颗粒,并将由肽结合的可溶性HLA-DQ加入珠子中以固定在平板上。洗涤并封闭平板,向其中加入抗体并孵育。当评估HLA-DQ2.5(或HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物)与TCR之间的结合时,例如,可以加入D2 TCR四聚体-PE并孵育。基于由HLA-DQ2.5(或HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物)结合的TCR的发色/荧光标记,可以评估两者之间的结合。

[0727] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子阻断HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物与HLA-DQ2.5/谷蛋白肽限制性CD4+T细胞之间的相互作用。在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子阻断HLA-DQ2.2/谷蛋白肽复合物与HLA-DQ2.2/谷蛋白肽限制性CD4+T细胞之间的相互作用。在本文中,谷蛋白肽是被上述任何抗原结合分子/结构域结合的复合物中的肽。

[0728] 在一些实施方案中,谷蛋白肽选自由以下各项组成的组:α1麦醇溶蛋白肽、α1b麦醇溶蛋白肽、α2麦醇溶蛋白肽、ω1麦醇溶蛋白肽、ω2麦醇溶蛋白肽、γ1麦醇溶蛋白肽、γ2麦醇溶蛋白肽、γ3麦醇溶蛋白肽、γ4a麦醇溶蛋白肽、γ4d麦醇溶蛋白肽和BC大麦醇溶蛋白肽。

[0729] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子对HLA-DP,HLA-DR,HLA-DQ5.1,HLA-DQ6.3,HLA-DQ7.3,HLA-DQ7.5,和HLA-DQ8实质上不具有结合活性。

[0730] 在一些实施方案中,本发明的抗原结合分子对由HLA-DQ2.5和谷蛋白肽形成的复合物具有增强的结合活性。在本文中,谷蛋白肽可以是上述任何谷蛋白肽。增强程度可以通过与对由HLA-DQ2.5和无关肽形成的复合物或对无目的复合物的细胞(例如HLA-DQ2.5阳性PBMC B细胞和/或表达HLA-DQ2.5或HLA-DQ2.2的Ba/F3细胞)的结合活性相比较来确定。

[0731] 本发明的双特异性抗体包含第一臂/半抗体的重链和轻链以及第二臂/半抗体的重链和轻链。术语“臂”或“半抗体”是指包含一条重链和一条轻链的抗体的一部分。在一些实施方案中,双特异性抗体包含第一臂/半抗体的VH(重链可变区)和VL(轻链可变区)和第二臂/半抗体的VH和VL。在一些实施方案中,双特异性抗体包含第一臂/半抗体的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3以及第二臂/半抗体的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0732] 在一些实施方案中,对于本发明的双特异性抗体,第一臂/半抗体源自本文所述的DQN0344xx(DQN0344Hx/DQN0344Lx),并且第二臂/半抗体源自本文所述的DQN0385ee(DQN0385He/DQN0385Le)。本发明的双特异性抗体的VH、VL、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3和全长重链(H)和轻链(L)的序列ID号(SEQ ID NO)显示于(以下)表2-3至2-6。

[0733] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含:HCDR1,其包含SEQ ID NO:129或164的序列;HCDR2,其包含SEQ ID NO:130或165的序列;和HCDR3,其包含SEQ ID NO:131或166的序列。

[0734] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含:LCDR1,其包含SEQ ID NO:132或167的序列;LCDR2,其包含SEQ ID NO:133或168的序列;和LCDR3,其包含SEQ ID NO:134或169的序列。

[0735] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:88或89的序列。

[0736] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含重链恒定区,该重链恒定区包含SEQ ID NO:105或162的序列。

[0737] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:90或91的序列。

[0738] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含轻链恒定区,该轻链恒定区包含SEQ ID NO:106的序列。

[0739] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含(全长)重链,该(全长)重链包含SEQ ID NO:41、42、44或45的序列。

[0740] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含(全长)轻链,该(全长)轻链包含SEQ ID NO:43或46的序列。

[0741] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含:HCDR1,其包含SEQ ID NO:135、144、147、153、156或159的序列;HCDR2,其包含SEQ ID NO:136、145、148、154、157或160的序列;HCDR3,其包含SEQ ID NO:137、146、149、155、158或161的序列。

[0742] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含:LCDR1,其包含SEQ ID NO:138、141或150的序列;LCDR2,其包含SEQ ID NO:139、142或151的序列;和LCDR3,其包含SEQ ID NO:140、143或152的序列。

[0743] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:92、93、94、95、96或97的序列。

[0744] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含重链恒定区,该重链恒定区包含SEQ ID NO:104或163的序列。

[0745] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:98、99或100的序列。

[0746] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含轻链恒定区,该轻链恒定区包含SEQ ID NO:107的序列。

[0747] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含(全长)重链,该(全长)重链包含SEQ ID NO:53,54,57,58,59,60,62,63,64,65,66或67的序列。

[0748] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含(全长)轻链,该(全长)轻链包含SEQ ID NO:55、56或61的序列。

[0749] (本发明的双特异性抗体中包含的)臂/半抗体的全长H链和L链的具体序列如表1-2所示。

[0750] [表1-2]

[0751] 双特异性抗体的全长H和L链所述H(或L)链包含(从N末端至C末端))HCDR1,HCDR2,和HCDR3(或LCDR1,LCDR2,和LCDR3),其在本表格中带有下划线。

[0752]

SEQ ID NO:	H/L链；臂	序列
41	DQN0344H0976 /L0591 的H链	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAYWMVW VRQAPGQGLEWMGAVYGGSDTTYYAKWTEGRFTISRD TSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPLNYYYYGELNL WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLKSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPYLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQEGNVFSCSVLHEALHAHYTREELSLSP
42	DQN0344H0976 /L0591 的H链	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAYWMVW VRQAPGQGLEWMGAVYGGSDTTYYAKWTEGRFTISRD TSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPLNYYYYGELNL WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLKSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQEGNVFSCSVLHEALHAHYTREELSLSP
43	DQN0344H0976 /L0591的L链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQATEEIYSGLAWYQQK PGKAPKLLIYYVSTLYEGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQTYEDVSAVTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTAEVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSEESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
44	DQN0344H1013 /L0620 的H链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSAYWMVW VRQAPGQGLEWMGAVYGGSDTTYYAKWTEGRFTISRD TSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPLNYYYYGELNV WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLKSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPYLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQEGNVFSCSVLHEALHAHYTREELSLSP

[0753]

45	DQN0344H1013/L0620的H链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSAYWMVW VRQAPGQGLEWMGAVYGGSDTTYYAKWTEGRFTISRD TSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPLNYYYYGELNV WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLKSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQEGNVFSCSVLHEALHAHYTREELSLSP
46	DQN0344H1013/L0620的L链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQATENIYSGLAWYQQK PGKAPKLLIYYVSTLAYGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQTYEDVSAVTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTAEVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSEESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
53	DQN0385H1270/L0722和 DQN0385H1270/L0681的H链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSEWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGSGSIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPYLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
54	DQN0385H1270/L0722和 DQN0385H1270/L0681的H链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSEWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGSGSIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
55	DQN0385H1270/L0722的L链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQTTQSISSYLNWYQQK PGQPPKLLIYYASTKAEGIPARFSGSGLGTDFTLTISSLQ PEDFAVYYCHYGISKVSFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTAKVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SKESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
56	DQN0385H1270/L0681和	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQTTQSISSYLNWYQQK PGQPPKLLIYYASTKAEGIPARFSGSGLGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCHYGISKVSFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS

[0754]

	DQN0385H1352/L0681的L链	DEQLKSGTAKVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS KESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
57	DQN0385H1352/L0681的H链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFEFSEWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGSGSIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPYLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
58	DQN0385H1352/L0681的H链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFEFSEWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGSGSIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
59	DQN0385H1527/L0605的H链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFASWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGSGSIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPYLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
60	DQN0385H1527/L0605的H链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFASWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGSGSIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP

[0755]

61	DQN0385H1527/L0605和DQN0385H1255/L0605的L链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQTTQSISSYLNWYQQK PGQPPKLLIYYASTKAEGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLE PEDFAVYYCHYGISKVSFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTAKVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SKESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
62	DQN0385H1255/L0605的H链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSEWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGSGSIDYAGWVEERFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPYLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
63	DQN0385H1255/L0605的H链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSEWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGSGSIDYAGWVEERFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
64	DQN0385H1521/L0605的H链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFESWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGSGSIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPYLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
65	DQN0385H1521/L0605的H链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFESWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGSGSIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP

[0756]

		QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
66	DQN0385H1353 /L0681的H链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFAEWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGSGSIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPYLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
67	DQN0385H1353 /L0681的H链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFAEWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGSGSIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP

[0757] 在一些实施方案中,本公开提供了多特异性抗原结合分子,其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分;

[0758] 其中所述第一抗原结合部分包含以下(a1)至(a3)中的任一项:

[0759] (a1)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;

[0760] (a2)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;和

[0761] (a3)与(a1)或(a2)中所述的第一抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列,和与(a1)或(a2)中所述的第二抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列。

[0762] 在一些实施方案中,在包含的多特异性抗原结合分子中,第二抗原结合部分包含以下(b1)至(b8)中的任一项:

[0763] (b1)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:138的CDR1,SEQ ID NO:139的CDR2,SEQ ID NO:140的CDR3;

[0764] (b2)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0765] (b3)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:144的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:145的CDR2,SEQ ID NO:146的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0766] (b4)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:147的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:148的CDR2,SEQ ID NO:149的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0767] (b5)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:153的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:154的CDR2,SEQ ID NO:155的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0768] (b6)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:156的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:157的CDR2,SEQ ID NO:158的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0769] (b7)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:159的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:160的CDR2,SEQ ID NO:161的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ IDNO:143的CDR3;和

[0770] (b8)与(b1)至(b7)中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列,以及与(b1)至(b7)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第四氨基酸序列。

[0771] 在一些实施方案中,本公开提供了多特异性抗原结合分子,其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分;

[0772] 其中所述第一抗原结合部分包含以下(c1)至(c3)中的任一项:

[0773] (c1)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;

[0774] (c2)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;以及第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;和

[0775] (c3)与(c1)或(c2)中所述的第一抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列,和与(c1)或(c2)中所述的第二抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列,

[0776] 其中所述第二抗原结合部分包含以下(d1)至(d8)中的任一项:

[0777] (d1)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:138的CDR1,SEQ ID NO:139的CDR2,SEQ ID NO:140的CDR3;

[0778] (d2)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0779] (d3)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:144的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:145的CDR2,SEQ ID NO:146的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,

SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0780] (d4)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:147的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:148的CDR2,SEQ ID NO:149的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0781] (d5)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:153的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:154的CDR2,SEQ ID NO:155的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0782] (d6)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:156的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:157的CDR2,SEQ ID NO:158的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0783] (d7)第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:159的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:160的CDR2,SEQ ID NO:161的CDR3;以及第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;和

[0784] (d8)与(d1)至(d7)中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列,以及与(d1)至(d7)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第四氨基酸序列。

[0785] 在一些实施方案中,本公开提供了多特异性抗原结合分子,其包含含有第一和第二抗体可变区的第一抗原结合部分和含有第三和第四抗体可变区的第二抗原结合部分,其中所述多特异性抗原结合分子包含以下(1)至(15)中的任一个:

[0786] (1)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;和第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:138的CDR1,SEQ ID NO:139的CDR2,SEQ ID NO:140的CDR3;

[0787] (2)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;和第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0788] (3)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;和第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:144的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:145的CDR2,SEQ ID NO:146的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0789] (4)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;和第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:147的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:148的CDR2,SEQ ID NO:149的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0790] (5)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;和第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:153的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:154的CDR2,SEQ ID NO:155的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0791] (6)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;和第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:156的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:157的CDR2,SEQ ID NO:158的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0792] (7)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:129的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:130的CDR2,SEQ ID NO:131的CDR3;和第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:132的CDR1,SEQ ID NO:133的CDR2,SEQ ID NO:134的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:159的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:160的CDR2,SEQ ID NO:161的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;和

[0793] (8)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;和第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:138的CDR1,SEQ ID NO:139的CDR2,SEQ ID NO:140的CDR3;

[0794] (9)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;和第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:135的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:136的CDR2,SEQ ID NO:137的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0795] (10)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;和第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:144的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:145的CDR2,SEQ ID NO:146的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;

[0796] (11)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;和第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:147的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:148的CDR2,SEQ ID NO:149的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0797] (12)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;和第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:153的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:154的CDR2,SEQ ID NO:155的CDR3;和第四抗体可变区,其包含

SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0798] (13)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;和第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:156的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:157的CDR2,SEQ ID NO:158的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:150的CDR1,SEQ ID NO:151的CDR2,SEQ ID NO:152的CDR3;

[0799] (14)第一抗体可变区,其包含SEQ ID NO:164的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:165的CDR2,SEQ ID NO:166的CDR3;和第二抗体可变区,其包含SEQ ID NO:167的CDR1,SEQ ID NO:168的CDR2,SEQ ID NO:169的CDR3;第三抗体可变区,其包含SEQ ID NO:159的互补决定区(CDR)1,SEQ ID NO:160的CDR2,SEQ ID NO:161的CDR3;和第四抗体可变区,其包含SEQ ID NO:141的CDR1,SEQ ID NO:142的CDR2,SEQ ID NO:143的CDR3;和

[0800] (15)与(1)至(14)中任一项所述的第一抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第二抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第四氨基酸序列。

[0801] 在一些实施方案中,在多特异性抗原结合分子中,所述第一和/或第二抗原结合部分中包含的抗体可变区包含人抗体框架或人源化抗体框架。

[0802] 在一些实施方案中,本公开提供了多特异性抗原结合分子,其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分;

[0803] 其中所述第一抗原结合部分包含以下(e1)至(e3)中的任一项:

[0804] (e1)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区,和包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;

[0805] (e2)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区,和包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;和

[0806] (e3)与(e1)或(e2)中所述的第一抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列,和与(e1)或(e2)中所述的第二抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列。

[0807] 在一些实施方案中,在多特异性抗原结合分子中,第二抗原结合部分包含以下(f1)至(f8)中的任一项:

[0808] (f1)包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0809] (f2)包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0810] (f3)包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0811] (f4)包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0812] (f5)包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0813] (f6)包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0814] (f7)包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;和

[0815] (f8)与(f1)至(f7)中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列,以及与(f1)至(f7)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第四氨基酸序列。

[0816] 在一些实施方案中,本公开提供了多特异性抗原结合分子,其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分;

[0817] 其中所述第一抗原结合部分包含以下(e1)至(e3)中的任一项:

[0818] (e1)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区,和包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;

[0819] (e2)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区,和包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;和

[0820] (e3)与(e1)或(e2)中所述的第一抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列,和与(e1)或(e2)中所述的第二抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列,和

[0821] 其中所述第二抗原结合部分包含以下(f1)至(f8)中的任一项:

[0822] (f1)包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0823] (f2)包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0824] (f3)包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0825] (f4)包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0826] (f5)包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0827] (f6)包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0828] (f7)包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的第三抗体可变区,和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;和

[0829] (f8)与(f1)至(f7)中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列,以及与(f1)至(f7)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第四氨基酸序列。

[0830] 在一些实施方案中,本公开提供了多特异性抗原结合分子,其包含含有第一和第二抗体可变区的第一抗原结合部分和含有第三和第四抗体可变区的第二抗原结合部分,其

中所述多特异性抗原结合分子包含以下(1)至(15)中的任一项：

[0831] (1)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0832] (2)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;和包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0833] (3)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0834] (4)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0835] (5)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0836] (6)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的第三抗体可变区;包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0837] (7)包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0838] (8)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0839] (9)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;和包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0840] (10)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0841] (11)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0842] (12)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0843] (13)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含

SEQ ID NO:100的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0844] (14)包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第一抗体可变区;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第二抗体可变区;包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的第三抗体可变区;和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的第四抗体可变区;

[0845] (15)与(1)至(14)中任一项所述的第一抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第二抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第三抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第四抗体可变区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第四氨基酸序列。

[0846] 在一些实施方案中,本公开提供了多特异性抗原结合分子,其包含选自由以下(A1)至(A3)组成的组的两条多肽链的组合:

[0847] (A1)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链;

[0848] (A2)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链;和

[0849] (A3)与(A1)或(A2)所述的第一重链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列,和与(A1)或(A2)所述的第一轻链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列。

[0850] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子进一步包含选自由以下(B1)至(B8)组成的组的两条多肽链的组合:

[0851] (B1)包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的第二轻链;

[0852] (B2)包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0853] (B3)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0854] (B4)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0855] (B5)包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0856] (B6)包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0857] (B7)包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;和

[0858] (B8)与(B1)至(B7)中任一项所述的第二重链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列,以及与(B1)至(B7)中任一项所述的第二轻链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第四氨基酸序列。

[0859] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子进一步包含选自由以下(B1)至(B8)组

成的组的两条多肽链的组合：

[0860] (B1)包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的第二轻链；

[0861] (B2)包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链；

[0862] (B3)包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链；

[0863] (B4)包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链；

[0864] (B5)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链；

[0865] (B6)包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链；

[0866] (B7)包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;和

[0867] (B8)与(B1)至(B7)中任一项所述的第二重链序列具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第三氨基酸序列,以及与(B1)至(B7)中任一项所述的第二轻链序列具有至少70％、75％、80％、85％、90％或95％序列同一性的第四氨基酸序列。

[0868] 在一些实施方案中,本公开提供了多特异性抗原结合分子,其包含选自由以下(1)至(15)组成的组的四条多肽链的组合：

[0869] (1)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的第二轻链；

[0870] (2)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链；

[0871] (3)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链；

[0872] (4)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链；

[0873] (5)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链；

[0874] (6)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ IDNO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的第二轻链；

[0875] (7)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸

序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0876] (8)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0877] (9)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0878] (10)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0879] (11)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0880] (12)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0881] (13)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0882] (14)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;和

[0883] (15)与(1)至(14)中任一项所述的第一重链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第一轻链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第二重链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列;和与(1)至(14)中任一项所述的第二轻链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第四氨基酸序列。

[0884] 在一些实施方案中,本公开提供了多特异性抗原结合分子,其包含选自由以下(1)至(15)组成的组的四条多肽链的组合:

[0885] (1)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的第二轻链;

[0886] (2)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0887] (3)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56

的氨基酸序列的第二轻链;

[0888] (4)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0889] (5)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0890] (6)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的第二轻链;

[0891] (7)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0892] (8)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0893] (9)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ IDNO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0894] (10)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0895] (11)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0896] (12)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第二轻链;

[0897] (13)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;

[0898] (14)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第一轻链,以及包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第二轻链;和

[0899] (15)与(1)至(14)中任一项所述的第一重链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第一氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第一轻链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第二氨基酸序列;与(1)至(14)中任一项所述的第二重链序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的第三氨基酸序列;和与(1)至(14)中任一项所述的第二轻链序列具有至少70%、75%、80%、

85％、90％或95％序列同一性的第四氨基酸序列。

[0900] 在一些实施例中,本发明提供以下(i)至(iii)中任一项的组合:

[0901] (i)含有以上(a1)至(a3)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子,以及含有以上(b1)至(b8)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子;

[0902] (ii)含有以上(e1)至(e3)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子,以及含有以上(f1)至(f8)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子;和

[0903] (iii)含有以上(A1)至(A3)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子,以及含有以上(B1)至(B8)中任一项所述的序列的多特异性抗原结合分子。

[0904] 在一些实施方案中,本发明的抗原结合分子是双特异性抗原结合分子。

[0905] 在一些实施方案中,双特异性抗原结合分子是双特异性抗体。

[0906] 在一些实施方案中,本公开提供了编码本发明的抗原结合分子的核酸。在一些实施方案中,核酸是分离的核酸。

[0907] 在一些实施方案中,本公开提供包含该核酸的载体。在一些实施方案中,本公开提供其中引入了核酸的载体。

[0908] 在一些实施方案中,本公开提供包含核酸或载体的细胞。在一些实施方案中,细胞是宿主细胞。

[0909] 在一些实施方案中,本公开提供了产生本发明的多特异性抗原结合分子的方法,其包括培养细胞以产生多特异性抗原结合分子。在一些实施方案中,该方法还包括从细胞培养物中回收多特异性抗原结合分子。

[0910] 核酸、载体、细胞和方法可以根据本公开内容和本领域的技术知识适当地制备/实施。

[0911] 免疫缀合物

[0912] 本发明还提供免疫缀合物,其包含与一种或多种细胞毒性剂缀合的本文的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体),所述细胞毒性剂例如化疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如蛋白质毒素,细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素,或其片段)或放射性同位素。

[0913] 在一个实施方案中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体与一种或多种药物缀合,包括但不限于美登素(maytansinoid)(参见美国专利号5,208,020、5,416,064和欧洲专利EP 0 425 235 B1);澳瑞他汀(auristatin),例如单甲基澳瑞他汀药物部分DE和DF(MMAE和MMAF)(参见美国专利号5,635,483和5,780,588以及7,498,298);多拉司他丁(dolastatin);卡奇霉素(calicheamicin)或其衍生物(参见美国专利号5,712,374,5,714,586,5,739,116,5,767,285,5,770,701,5,770,710,5,773,001和5,877,296;Hinman等人,Cancer Res.53:3336-3342(1993);和Lode等人,Cancer Res.58:2925-2928(1998));蒽环类药物,例如道诺霉素或多柔比星(参见Kratz等人,Current Med.Chem.13:477-523(2006);Jeffrey等人,Bioorganic&Med.Chem.Letters 16:358-362(2006);Torgov)等人,Bioconj.Chem.16:717-721(2005);Nagy等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:829-834(2000);Dubowchik等人,Bioorg.&Med.Chem.Letters 12:1529-1532(2002);King等人,J.Med.Chem.45:4336-4343(2002);和美国专利号6,630,579);甲氨蝶呤;长春地辛;紫杉烷,例如多西他赛、紫杉醇、拉洛他赛、替司他赛(tesetaxel)和奥他赛;单端孢霉烯;和CC1065。

[0914] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含与酶促活性毒素或其片段缀合的如本文所述的抗体,所述酶促活性毒素或其片段包括但不限于白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒素(modeccin)A链、α-帚曲霉素(sarcin)、油桐蛋白、石竹蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI,PAPII,和PAP-S)、苦瓜(Momordica charantia)抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草抑制剂、白树毒素、mitogellin、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢霉烯。

[0915] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含与放射性原子缀合以形成放射性缀合物的如本文所述的抗体。多种放射性同位素可用于生产放射性缀合物。实例包括^{211}At、^{131}I、^{125}I、^{90}Y、^{186}Re、^{188}Re、^{153}Sm、^{212}Bi、^{32}P、^{212}Pb和Lu的放射性同位素。当放射性缀合物用于检测时,它可以包含用于闪烁法研究的放射性原子,例如Tc-99m或123I,或用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,MRI)的自旋标记,例如又如碘123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0916] 抗体和细胞毒剂的缀合物可以使用多种双功能蛋白质偶联剂制备,例如3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(SPDP)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)、亚氨基硫杂环戊烷(iminothiolane)(IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(如己二亚氨盐酸二甲酯)、活性酯(如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛类(如戊二醛)、双叠氮化合物(如双(对叠氮苯甲酰基))己二胺)、双重氮衍生物(如双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以如Vitetta等人,Science 238:1098(1987)中所述制备蓖麻蛋白免疫毒素。碳14标记的1-异硫氰基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核素与抗体缀合的示例性螯合剂。参见WO94/11026。接头可以是促进细胞中的细胞毒性药物释放的“可切割接头”。例如,可以使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、光不稳定接头、二甲基接头或含二硫化物接头(Chari等人,Cancer Res.52:127-131(1992);美国专利号5,208,020)。

[0917] 本文中的免疫缀合物或ADC明确考虑但不限于用交联剂制备的此类缀合物,交联剂包括但不限于BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC和磺基-SMPB,以及SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯),其是商业化可获得的(例如,来自Pierce Biotechnology,Inc.,Rockford,IL,USA)。

[0918] 药物组合物/制剂

[0919] 如本文所述的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)的药物组合物/制剂通过将具有所需纯度的此类抗体与一种或多种任选的药学上可接受(Remington’s Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.Ed.(1980)的载体混合以冻干制剂或水溶液的形式来制备。药学上可接受的载体在所采用的剂量和浓度下通常对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲铵氯化物;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯(paraben),例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或

糊精;螯合剂,例如EDTA;糖类,例如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;形成盐的反离子,如钠;金属复合物(例如锌-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,例如聚乙二醇(PEG)。本文示例性的药学上可接受的载体还包括间质药物分散剂,例如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,例如rHuPH20(HYLENEX(注册商标),Baxter International,Inc.)。某些示例性sHASEGP及使用方法,包括rHuPH20,描述于美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中。在一方面中,sHASEGP与一个或多个额外的糖胺聚糖酶(glycosaminoglycanase)如软骨素酶组合。

[0920] 示例性冻干抗体制剂描述于美国专利号6,267,958中。水性抗体制剂包括美国专利号6,171,586和WO2006/044908中描述的那些,后者的制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0921] 根据所治疗的特定适应症所必需的,本文的组合物/制剂还可包含多于一种活性成分,优选具有互补活性且不会相互产生不利影响的活性成分。例如,可能期望进一步提供可与抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)组合的药物。此类活性成分以对预期目的有效的量合适地组合存在。

[0922] 可以将活性成分包裹在例如通过凝聚技术或通过界面聚合所制备的微胶囊(例如,分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中,胶状药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒及纳米胶囊)中,或粗滴乳状液(macroemulsion)中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编著(1980)。

[0923] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,该基质是成型制品的形式,例如薄膜或微胶囊。

[0924] 用于体内施用的组合物/制剂通常是无菌的。无菌性可以容易地实现,例如,通过经由无菌滤膜过滤实现。

[0925] 治疗方法和组合物

[0926] 本文提供的任何抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)均可用于治疗方法。一方面,提供了用作药物的抗HLA-DQ2.55抗原结合分子(抗体)。在进一步的方面,提供了用于治疗乳糜泻的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)。在某些实施方案中,提供了用于治疗方法中的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)。在某些实施方案中,本发明提供用于治疗患有乳糜泻的个体的方法中的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体),所述方法包括向个体施用有效量的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)。在一个这样的实施方案中,该方法进一步包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如下所述。

[0927] 在另一方面,本发明提供了抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)在制造或制备药物中的用途。在一个实施方案中,药物用于治疗乳糜泻。在另一个实施方案中,该药物用于治疗乳糜泻的方法中,该方法包括向患有乳糜泻的个体施用有效量的药物。在一个这样的实施方案中,该方法进一步包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如下所述。

[0928] 在一些实施方案中,本公开提供了本发明的多特异性抗原结合分子在制备药物中的用途。在一些实施方案中,药物是用于治疗和/或预防乳糜泻的药物。

[0929] 在另一方面,本发明提供了治疗乳糜泻的方法。在一个实施方案中,该方法包括向患有乳糜泻的个体施用有效量的抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)。在一个这样的实施方

案中,该方法进一步包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,如下所述。根据任何上述实施方案的“个体”可以是人。

[0930] 在一些实施方案中,本公开提供治疗患有乳糜泻的个体的方法,其包括向个体施用有效量的本发明的多特异性抗原结合分子。在一些实施方案中,本公开提供了本发明的多特异性抗原结合分子用于治疗患有乳糜泻的个体的用途。

[0931] 在进一步的方面,本发明提供包含本文提供的任何抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)的药物组合物/制剂,例如其用于乳糜泻的任何上述治疗方法中。在一个实施方案中,药物组合物/制剂包含本文提供的任何抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)和药学上可接受的载体。在另一个实施方案中,药物组合物/制剂包含本文提供的任何抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)和至少一种另外的治疗剂,例如如下所述。

[0932] 在一些实施方案中,本公开提供了包含本发明的多特异性抗原结合分子和药学上可接受的载体的药物组合物/制剂。在一些实施方案中,组合物/制剂是用于治疗和/或预防乳糜泻的药物组合物/制剂。

[0933] 本发明的抗体可以在治疗中单独使用或与其他药剂组合使用。例如,本发明的抗体可以与至少一种另外的治疗剂共同施用。在某些实施方案中,另外的治疗剂是适合共同施用并且本领域技术人员可获得的任何药剂。

[0934] 本发明的抗体可以在治疗中单独使用或与另一种抗体组合使用。例如,本发明的抗体可以与本发明的至少一种另外的抗体共同施用。在某些实施方案中,这些抗体同时(concurrently)或同时(simultaneously)或随后施用。在某些实施方案中,施用适合共同施用的这些抗体的混合物(mixture)、混合物(cocktail)或组合。这些抗体可以是本文公开的任何抗体。在一些实施方案中,这些抗体是本文公开的两种或更多种同源抗体,例如DQN0344xx和DQN0385ee或DQN0344xx和DQN0385ee的任何优化和/或人源化变体。

[0935] 上面提到的此类联合疗法包括联合施用(其中两种或多种治疗剂包含在相同或分开的制剂中)和分开施用,在这种情况下,本发明的抗体的施用可以发生在施用另外的一种或多种治疗剂之前、同时和/或随后。在一个实施方案中,抗HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)的施用和另外的治疗剂的施用发生在彼此的约一个月内,或约一、二或三周内,或约一、二、三、四、五,或六天内。

[0936] 本发明的抗体(和任何另外的治疗剂)可以通过任何合适的方式施用,包括肠胃外、肺内和鼻内,和(如果需要局部治疗)病灶内施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可以通过任何合适的途径,例如通过注射,例如静脉内或皮下注射,部分取决于施用是短暂的还是长期的。本文考虑了各种给药方案,包括但不限于在不同时间点单次或多次施用、推注(bolus)施用和脉冲输注。

[0937] 本发明的两种或更多种抗体(即本发明的两种或更多种治疗剂)可以在治疗过程中施用。它们可以单独或同时施用。它们可以伴随施用。在伴随施用中,两种或更多种抗体可以同时或分开施用。在某些情况下,可以先施用某种抗体/药剂;并且可以监测症状;并且根据症状,如果需要,可以进一步施用另一种抗体/药剂。或者,本发明的两种或更多种抗体可以包含在组合药物/药剂中。此类组合药物/药剂可如本文所述施用。所包含的每种抗体的剂量/剂量(dose/dosage)可以如本文所述适当地确定。

[0938] 本发明的抗体将以符合良好医学实践的方式配制、给药和施用。在这方面考虑的

因素包括所治疗的特定病症、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床状况、病症的原因、药剂的递送部位、施用方法、施用时间安排,以及医师已知的其他因素。抗体不需要但任选地与一种或多种目前用于预防或治疗所讨论的病症的药剂一起配制。此类其他药剂的有效量取决于制剂中存在的抗体量、病症或治疗的类型以及上文讨论的其他因素。这些通常以与本文所述相同的剂量和施用途径,或本文所述剂量的约1至99%,或以经验/临床确定合适的任何剂量和任何途径使用。

[0939] 对于疾病的预防或治疗,本发明抗体的适当剂量(当单独使用或与一种或多种其他另外的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗的疾病类型、抗体类型、疾病的严重程度和病程,抗体是用于预防还是治疗目的,既往治疗,患者的临床病史和对抗体的反应,以及主治医生的判断力。将抗体一次性或在一系列治疗中适当地施用于患者。取决于疾病的类型和严重程度,大约1μg/kg至15mg/kg(例如0.1mg/kg-10mg/kg)的抗体可以是对患者施用的初始候选剂量,例如,通过一次或多次单独施用,或通过连续输注。取决于上述因素,一种典型的日剂量可能在约1μg/kg至100mg/kg或更多的范围内。对于数天或更长时间的重复施用,取决于病况,治疗通常会持续到发生期望的疾病症状抑制。抗体的一种示例性剂量将在约0.05mg/kg至约10mg/kg的范围内。因此,可以向患者施用约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg(或其任何组合)的一个或多个剂量。这种剂量可以间歇施用,例如每周或每三周(例如,使得患者接受约两至约二十剂,或例如约六剂抗体)。可施用初始较高负荷剂量,随后施用一或多个较低剂量。这种疗法的进展很容易通过常规技术和测定进行监测。

[0940] 应当理解,可以使用本发明的免疫缀合物代替抗-HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)或除抗-HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)之外使用本发明的免疫缀合物进行任何上述制剂或治疗方法。

[0941] 试剂盒/制品

[0942] 在本发明的另一方面,提供了一种含有可用于治疗、预防和/或诊断上述病症的材料的试剂盒或制品。试剂盒或制品包括容器和在容器上的标签或与容器相关联的包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可以由多种材料例如玻璃或塑料形成。容器容纳组合物(该组合物本身或与有效治疗、预防和/或诊断病况的另一种组合物组合),并且可以具有无菌入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可通过皮下注射针刺穿塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性成分是本发明的抗体。标签或包装插页表明该组合物用于治疗所选病况。此外,试剂盒或制品可以包括(a)其中含有组合物的第一容器,其中所述组合物包含本发明的抗体;和(b)其中含有组合物的第二容器,所述组合物含有另外的细胞毒性或其他治疗剂。本发明的该实施方案中的试剂盒或制品可进一步包括包装插页,所述包装插页说明该组合物可用于治疗特定病况。替代地或另外地,试剂盒或制品可以进一步包括第二(或第三)容器,所述第二(或第三)容器包含药学上可接受的缓冲液,例如可抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。它还可以包括从商业和用户的角度所需的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0943] 应当理解,任何试剂盒或制品可包括代替抗-HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)或除抗-HLA-DQ2.5抗原结合分子(抗体)之外的本发明的免疫缀合物。

[0944] 在一些实施方案中,本公开提供了用于治疗和/或预防乳糜泻的试剂盒,其至少包含本发明的多特异性抗原结合分子和使用说明书。

[0945] 抗原结合分子的使用方法

[0946] 本公开的抗原结合分子可以与各种先前存在的医学用途的技术组合。可与本公开的抗原结合分子组合的技术的非限制性实例包括使用病毒载体等将编码抗原结合分子的核酸整合到生物体内并直接表达抗原结合分子的方法。这种病毒载体的实例包括但不限于腺病毒。或者,可以通过例如电穿孔法或直接施用核酸的方法将编码抗原结合分子的核酸直接整合到生物体内,而不使用病毒载体。或者,可以将经基因修饰以分泌/表达抗原结合分子的细胞施用于生物体内,并使抗原结合分子在生物体内连续分泌。

[0947] 尽管为了清楚理解的目的,将通过说明和示例的方式对本发明进行一些详细的描述,但是这些描述和示例不应被解释为限制本发明的范围。本文引用的所有专利和科学文献的公开内容明确地通过引用整体并入。

[0948] 实施例

[0949] 以下是本发明组合物的实例。应当理解,鉴于上面提供的一般性描述,可以实施各种其他实施方案。

[0950] 实施例1

[0951] 重组蛋白的表达和纯化

[0952] 1.1.重组HLA-DQ2.5/33聚体麦醇溶蛋白肽复合物、HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白肽复合物、和HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白肽复合物的表达与纯化

[0953] 重组HLA-DQ2.5/33聚体麦醇溶蛋白肽复合物的表达与纯化

[0954] 用于表达和纯化的序列为:HLA-DQA1*0501(Protein Data Bank登录号4OZG)和HLA-DQB1*0201(Protein Data Bank登录号4OZG),均具有CAMPATH-1H信号序列:MGWSCIILFLVATATGVHS(SEQ ID NO:170)。HLA-DQA1*0501具有C47S突变、GGGG接头(SEQ ID NO:171)和c-fos亮氨酸拉链序列(PNAS,1998年9月29日;95(20):11828-33)和HLA-DQA1*0501的C末端的Flag标签。HLA-DQB1*0201具有33聚体麦醇溶蛋白肽序列:LQLQPFPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF(SEQ ID NO:172),和在HLA-DQB1*0201的N末端的因子X切割接头(Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.2007年12月1日;63(Pt12):1021-1025.),GGGGG接头(SEQ ID NO:173)和c-jun亮氨酸拉链序列(PNAS,1998年9月29日;95(20):11828-33),GGGGG接头(SEQ ID NO:173)和BAP序列(BMC Biotechnol.2008;8:41),HLA-DQB1*0201的C末端的8x His标签。使用FreeStyle293-F细胞系(Thermo Fisher)瞬时表达重组HLA-DQ2.5/33聚体麦醇溶蛋白肽复合物。将表达HLA-DQ2.5/33聚体麦醇溶蛋白肽复合物的条件培养基与固定化金属亲和层析(IMAC)树脂一起孵育,然后用咪唑洗脱。收集含有HLA-DQ2.5/33聚体麦醇溶蛋白肽复合物的级分,然后进行用1x PBS平衡的Superdex 200凝胶过滤柱(GE Healthcare)。然后汇集含有HLA-DQ2.5/33聚体麦醇溶蛋白肽复合物的级分并储存在-80摄氏度(C)。

[0955] 重组HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白肽复合物的表达与纯化

[0956] 用于表达和纯化的序列为:HLA-DQA1*0501(Protein Data Bank登录号4OZG)和HLA-DQB1*0201(Protein Data Bank登录号4OZG),均具有CAMPATH-1H信号序列:MGWSCIILFLVATATGVHS(SEQ ID NO:170)。HLA-DQA1*0501具有C47S突变,3C蛋白酶切割接头:LEVLFQGP(SEQ ID NO:174),和GGGG接头(SEQ ID NO:171)和c-fos亮氨酸拉链序列(PNAS,1998年9月29日;95(20):11828-33)和在HLA-DQA1*0501的C末端的Flag标签。HLA-

DQB1*0201具有γ2麦醇溶蛋白肽序列:IIQPEQPAQLP(SEQ ID NO:175),和在HLA-DQB1*0201的N末端的因子X切割接头(Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.2007年12月1日;63(Pt12):1021-1025.),3C蛋白酶切割接头:LEVLFQGP(SEQ ID NO:174)和c-jun亮氨酸拉链序列(PNAS,1998年9月29日;95(20):11828-33),GGGGG接头(SEQ ID NO:173)和BAP序列(BMC Biotechnol.2008;8:41),HLA-DQB1*0201的C末端的8x His标签。使用FreeStyle293-F细胞系瞬时表达重组HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白肽复合物。将表达HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白肽复合物的条件培养基与IMAC树脂一起孵育,然后用咪唑洗脱。收集含有HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白肽复合物的级分,然后进行用1x PBS平衡的Superdex 200凝胶过滤柱。然后汇集含有HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白肽复合物的级分并储存在-80摄氏度。

[0957] 重组HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白肽复合物的表达与纯化

[0958] 用于表达和纯化的序列为:HLA-DQA1*0501(Protein Data Bank登录号4OZG)和HLA-DQB1*0201(Protein Data Bank登录号4OZG),均具有CAMPATH-1H信号序列:MGWSCIILFLVATATGVHS(SEQ ID NO:170)。HLA-DQA1*0501具有C47S突变,3C蛋白酶切割接头:LEVLFQGP(SEQ ID NO:174),和GGGG接头(SEQ ID NO:171)和c-fos亮氨酸拉链序列(PNAS,1998年9月29日;95(20):11828-33)和在HLA-DQA1*0501的C末端的Flag标签。HLA-DQB1*0201具有BC大麦醇溶蛋白肽序列:EPEQPIPEQPQPYPQQP(SEQ ID NO:176),和在HLA-DQB1*0201的N末端的因子X切割接头(Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.2007年12月1日;63(Pt12):1021-1025.),3C蛋白酶切割接头:LEVLFQGP(SEQ ID NO:174)和c-jun亮氨酸拉链序列(PNAS,1998年9月29日;95(20):11828-33),GGGGG接头(SEQ ID NO:173)和BAP序列(BMC Biotechnol.2008;8:41),HLA-DQB1*0201的C末端的8x His标签。使用FreeStyle293-F细胞系瞬时表达重组HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白肽复合物。将表达HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白肽复合物的条件培养基与IMAC树脂一起孵育,然后用咪唑洗脱。收集含有HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白肽复合物的级分,然后进行用1x PBS平衡的Superdex 200凝胶过滤柱。然后汇集含有HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白肽复合物的级分并储存在-80摄氏度。

[0959] 实施例2

[0960] 2.1表达HLA-DQ2.5、HLA-DQ2.2、HLA-DQ7.5、HLA-DQ8、HLA-DQ5.1、HLA-DQ6.3、HLA-DQ7.3、HLA-DR和HLA-DP的Ba/F3细胞系的建立

[0961] 将HLA-DQA1*0501cDNA(IMGT/HLA登录号HLA00613),HLA-DQA1*0201cDNA(IMGT/HLA登录号HLA00607),HLA-DQA1*0505cDNA(IMGT/HLA登录号HLA00619),HLA-DQA1*0301cDNA(IMGT/HLA登录号HLA00608),HLA-DQA1*0101cDNA(IMGT/HLA登录号HLA00601),HLA-DQA1*0103cDNA(IMGT/HLA登录号HLA00604),HLA-DQA1*0303cDNA (IMGT/HLA登录号HLA00611),HLA-DRA1*0101cDNA (GenBank登录号NM_019111.4),或HLADPA1*0103cDNA(IMGT/HLA登录号HLA00499)插入表达载体pCXND3中(WO2008/156083)

[0962] 将HLA-DQB1*0201cDNA(IMGT/HLA登录号HLA00622),HLA-DQB1*0202cDNA(IMGT/HLA登录号HLA00623),HLA-DQB1*0301cDNA(IMGT/HLA登录号HLA00625),HLA-DQB1*0302cDNA(IMGT/HLA登录号HLA00627),HLA-DQB1*0501cDNA(IMGT/HLA登录号HLA00638),HLA-DQB1*0603cDNA(IMGT/HLA登录号HLA00647),HLA-DRB1*0301cDNA(IMGT/HLA登录号

HLA00671),或HLA-DPB1*0401cDNA(IMGT/HLA登录号HLA00521)插入表达载体pCXZD1中(US/20090324589)。

[0963] 每个线性化的HLA-DQA1*0501-pCXND3和HLA-DQB1*0201-pCXZD1,以及每个线性化的HLA-DQA1*0201-pCXND3和HLA-DQB1*0202-pCXZD1,HLA-DQA1*0505-pCXND3和HLA-DQB1*0301-pCXZD1,

[0964] HLA-DQA1*0301-pCXND3和HLA-DQB1*0302-pCXZD1,

[0965] HLA-DQA1*0101-pCXND3和HLA-DQB1*0501-pCXZD1,

[0966] HLA-DQA1*0103-pCXND3和HLA-DQB1*0603-pCXZD1,

[0967] HLA-DQA1*0303-pCXND3和HLA-DQB1*0301-pCXZD1,

[0968] HLA-DRA1*0101-pCXND3和HLA-DRB1*0301-pCXZD1,

[0969] HLA-DPA1*0103-pCXND3和HLA-DPB1*0401-pCXZD1,

[0970] 通过电穿孔(LONZA,4D-Nucleofector X)同时引入小鼠IL-3依赖性pro-B细胞来源的细胞系Ba/F3中。然后将转染的细胞在含有遗传霉素和博莱霉素(Zeocin)的培养基中培养。培养和扩增的细胞然后检查HLA分子的表达并证实HLA的高表达。

[0971] 建立的各细胞系分别命名为Ba/F3-HLA-DQ2.5(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201), Ba/F3-HLA-DQ2.2(HLA-DQA1*0201,HLA-DQB1*0202) , Ba/F3-HLA-DQ7.5(HLA-DQA1*0505,HLA-DQB1*0301),Ba/F3-HLA-DQ8(HLA-DQA1*0301,HLA-DQB1*0302),Ba/F3-HLA-DQ5.1(HLA-DQA1*0101, HLA-DQB1*0501) ,Ba/F3-HLA-DQ6.3(HLA-DQA1*0103, HLA-DQB1*0603) ,Ba/F3-HLA-DQ7.3(HLA-DQA1*0303, HLA-DQB1*0301) ,Ba/F3-HLA-DR(HLA-DRA1*0101, HLA-DRB1*0301) ,Ba/F3-HLA-DP(HLA-DPA1*0103,HLA-DPB1*0401)。

[0972] 2.2表达HLA-DQ2.5/CLIP肽,HLA-DQ2.5/乙型肝炎病毒肽,HLA-DQ2.5/沙门氏菌肽,HLA-DQ2.5/甲状腺过氧化物酶肽,HLA-DQ2.5/牛分枝杆菌肽,HLA-DQ2.5/α1麦醇溶蛋白肽,HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白肽,HLA-DQ2.5/γ1麦醇溶蛋白肽,HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白肽,HLA-DQ2.5/ω1麦醇溶蛋白肽,HLA-DQ2.5/ω2麦醇溶蛋白肽,HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白肽,HLA-DQ2.5/α3麦醇溶蛋白肽,HLA-DQ2.5/α1b麦醇溶蛋白肽,HLA-DQ2.5/γ4a麦醇溶蛋白肽,HLA-DQ2.5/γ4b麦醇溶蛋白肽,HLA-DQ2.5/燕麦蛋白1肽,HLA-DQ2.5/燕麦蛋白2肽,HLA-DQ2.5/燕麦蛋白3肽,HLA-DQ2.5/大麦醇溶蛋白1肽,HLA-DQ2.5/大麦醇溶蛋白2肽,HLA-DQ2.5/裸麦醇溶蛋白1肽,HLA-DQ2.5/裸麦醇溶蛋白2肽,HLA-DQ2.5/33聚体麦醇溶蛋白肽,HLA-DQ2.5/26聚体麦醇溶蛋白肽的Ba/F3细胞系的建立

[0973] 将HLA-DQA1*0501cDNA(IMGT/HLA登录号HLA00613)插入表达载体pCXND3中(WO2008/156083)。

[0974] 将HLA-DQB1*0201cDNA(IMGT/HLA登录号HLA00622)插入表达载体pCXZD1(US/20090324589)。用于HLA-DQ2.5/每个肽复合物的HLA-DQB1*0201具有每个肽序列和在HLA-DQB1*0201的N末端的因子X切割接头:(Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.2007年12月1日;63(Pt 12):1021-1025.)。特别是每个肽序列,

[0975] KLPKPPKPVSKMRMATPLLMQALPMGALP(SEQ ID NO:177)用于CLIP(hCLIP)肽序列,PDRVHFASPLHVAWR(SEQ ID NO:178)用于乙型肝炎病毒肽序列,MMAWRMMRY(SEQ ID NO:179)用于沙门氏菌肽序列,YIDVWLGGLAENFLPY(SEQ ID NO:180)用于甲状腺过氧化物酶肽序列,KPLLIIAEDVEGEY(SEQ ID NO:181)用于牛分枝杆菌肽序列,QPFPQPELPYP(SEQ ID NO:182)

用于α1麦醇溶蛋白肽序列,FPQPELPYPQP(SEQ ID NO:183)用于α2麦醇溶蛋白肽序列,QPQQSFPEQQQ(SEQ ID NO:184)用于γ1麦醇溶蛋白肽序列,GIIQPEQPAQLP(SEQ ID NO:185)用于对于γ2麦醇溶蛋白肽序列,QPFPQPEQPFP(SEQ ID NO:186)用于ω1麦醇溶蛋白肽序列,FPQPEQPFPWQ(SEQ ID NO:187)用于ω2麦醇溶蛋白肽序列,PQQPIPEQPQPYPQQP(SEQ ID NO:188)用于BC大麦醇溶蛋白肽序列,PFRPEQPYPQP(SEQ ID NO:189)用于α3麦醇溶蛋白肽序列,LPYPQPELPYP(SEQ ID NO:190)用于α1b麦醇溶蛋白肽序列,FSQPEQEFPQP(SEQ ID NO:191)用于γ4a麦醇溶蛋白肽序列,FPQPEQEFPQP(SEQ ID NO:192)用于γ4b麦醇溶蛋白肽序列,QPYPEQEEPFV(SEQ ID NO:193)用于燕麦蛋白1肽序列,QPYPEQEQPFV(SEQ ID NO:194)用于燕麦蛋白2肽序列,QPYPEQEQPIL(SEQ ID NO:195)用于燕麦蛋白3肽序列,PQQPFPQPEQPFRQ(SEQ ID NO:196)用于大麦醇溶蛋白1肽序列,QEFPQPEQPFPQQP(SEQ ID NO:197)用于大麦醇溶蛋白2肽序列,PEQPFPQPEQPFPQ(SEQ ID NO:198)用于裸麦醇溶蛋白1肽序列,QPFPQPEQPFPQSQ(SEQ ID NO:199)用于裸麦醇溶蛋白2肽序列,PQQQTLQPEQPAQLP(SEQ ID NO:200)用于14聚体1肽序列,LQLQPFPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF(SEQ ID NO:201)用于33聚体麦醇溶蛋白肽序列,FLQPEQPFPEQPEQPYPEQPEQPFPQ(SEQ IDNO:202)用于26聚体麦醇溶蛋白肽序列。

[0976] 通过电穿孔(LONZA,4D-Nucleofector X)将每个线性化的HLA-DQA1*0501-pCXND3和HLA-DQB1*0201/每肽-pCXZD1同时引入小鼠IL-3依赖性pro-B细胞来源的细胞系Ba/F3中。然后将转染的细胞在含有遗传霉素和博莱霉素(Zeocin)的培养基中培养。

[0977] 培养和扩增的细胞然后检查HLA-DQ2.5分子的表达并证实HLA-DQ2.5的高表达。建立的各细胞系分别命名为Ba/F3-HLA-DQ2.5/CLIP(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/CLIP肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/HBV1(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/乙型肝炎病毒肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/沙门氏菌(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/沙门氏菌肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/TPO(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/甲状腺过氧化物酶肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/牛分枝杆菌(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/牛分枝杆菌肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/α1麦醇溶蛋白(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/α1麦醇溶蛋白肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/γ1麦醇溶蛋白(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/γ1麦醇溶蛋白肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/ω1麦醇溶蛋白(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/ω1麦醇溶蛋白肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/ω2麦醇溶蛋白(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/ω2麦醇溶蛋白肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/α3麦醇溶蛋白(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/α3麦醇溶蛋白肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/α1b麦醇溶蛋白(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/α1b麦醇溶蛋白肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/γ4a麦醇溶蛋白(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/γ4a麦醇溶蛋白肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/γ4b麦醇溶蛋白(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/γ4b麦醇溶蛋白肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/燕麦蛋白1(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/燕麦蛋白1肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/燕麦蛋白2(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*

0201用于HLA-DQ2.5/燕麦蛋白2肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/燕麦蛋白3(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/燕麦蛋白3肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/大麦醇溶蛋白1(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/大麦醇溶蛋白1肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/大麦醇溶蛋白2(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/大麦醇溶蛋白2肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/裸麦醇溶蛋白1(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/裸麦醇溶蛋白1肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/裸麦醇溶蛋白2(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/裸麦醇溶蛋白2肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/14聚体1(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/14聚体1肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/33聚体麦醇溶蛋白(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/33聚体麦醇溶蛋白肽),Ba/F3-HLA-DQ2.5/26聚体麦醇溶蛋白(HLA-DQA1*0501,HLA-DQB1*0201用于HLA-DQ2.5/26聚体麦醇溶蛋白肽)。

[0978] 实施例3

[0979] 先导抗体鉴定

[0980] 抗DQ2.5先导抗体DQN0344xx(重链:DQN0344Hx,SEQ ID NO:71和轻链:DQN0344Lx,SEQ ID NO:75)和DQN0385ee(重链:DQN0385He,SEQ ID NO:79和轻链:DQN0385Le,SEQ ID NO:83)是根据WO2019069993中描述的程序选择的。

[0981] 人源化

[0982] 尽管DQN0344xx和DQN0385ee对HLA-DQ2.5/谷蛋白肽显示出良好的选择性和交叉反应性,但这些抗体的可变区在兔序列中,因此,由于免疫原性问题,不适用于施用至患者。因此,对这些抗体的可变区进行了人源化。

[0983] 通过将DQN0344Hx和DQN0385He的框架置换为人种系框架(SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6或7作为FR1,SEQ ID NO:9用于DNQ0344Hx和SEQ ID NO:10用于DQN0385He作为FR2,SEQ ID NO:11、12、13、14、15、16或17作为FR3,SEQ ID NO:18用于DNQ0344Hx和SEQ ID NO:19用于DQN0385He作为FR4),设计了49种类型的VH。通过将DQN0344Lx和DQN0385Le的框架置换为人种系框架(SEQ ID NO:20、21、22或23作为FR1,SEQ ID NO:24用于DQN0344Lx和SEQ ID NO:34用于DQN0385Le作为FR2,SEQ ID NO:26、27、28或29作为FR3,SEQ ID NO:30作为FR4),设计了16种类型的VL。将编码DQN0344Hx、DQN0385He和设计的VH的多核苷酸分别克隆到含有编码重链恒定区SG1(SEQ ID NO:31)的多核苷酸的表达载体中。将编码DQN0344Lx、DQN0385Le和设计的VL的多核苷酸分别克隆到含有编码轻链恒定区SK1(SEQ ID NO:32)的多核苷酸的表达载体中。此后,将包含DQN0344Hx或DQN0385He的重链连同各自设计的VH与它们对应的轻链DQN0344Lx、DQN0385Le或各自设计的VL一起瞬时表达到Expi293(Invitrogen)中,然后进行蛋白A纯化。

[0984] 这些抗体针对HLA-DQ2.5/多谷蛋白肽的结合概况通过FCM分析进行评估。每种抗体的结合活性由平均荧光强度值(MFI)表示。将抗体与HLA-DQ2.5-谷蛋白肽-Ba/F3细胞在室温下孵育30分钟,并用FACS缓冲液(2% FBS、2mM EDTA的PBS溶液)洗涤。然后加入山羊F(ab')2抗人IgG、小鼠ads-PE(Southern Biotech,目录号2043-09)并在4℃黑暗中孵育20分钟,随后洗涤。在LSRFortessa X-20(Becton Dickinson)上进行数据采集,然后使用FlowJo软件(Tree Star)和Microsoft Office Excel 2013进行分析。

[0985] 在49种类型设计的VH和16种类型设计的VL中,基于针对HLA-DQ2.5/谷蛋白肽的结合以及抗体表达水平,选择25H和09L(如表2-1所示)作为DQN0344xx中的框架区序列,并命

名为DQN034425(DQN034425H/09L(重链SEQ ID NO:84,轻链SEQ ID NO:85))。然而,与DQN0385ee相比,没有FR组合能够保持对HLA-DQ2.5/谷蛋白肽的结合活性。在不影响对HLA-DQ2.5/谷蛋白肽的结合活性的情况下将DQN0385ee人源化似乎是一个挑战。从产生的众多变体中,最终选择0054H和009L作为DQN0385He和DQN0385Le的FR组合(如表2-1所示),并命名为DQN0385ee0054(DQN0385ee0054H/009L(重链SEQ IDNO:87,轻链SEQ ID NO:86))。

[0986] [表2-1]

[0987] 人源化中选择的FR序列

[0988]

VH或VL的名称	CDR	SEQ ID NO:				
		FR1	FR2	FR3	FR4	全长
DQN034425H	相同于DQN0344Hx	4	9	14	18	84
DQN034409L	相同于DQN0344Lx	20	24	28	30	85
DQN0385ee0054H	相同于DQN0385He	4	33	14	19	87
DQN0385ee009L	相同于DQN0385Le	20	34	28	30	86

[0989] Fab优化

[0990] 为了改善对HLA-DQ2.5/谷蛋白肽的结合亲和力而不增加对HLA-DQ2.5/非相关肽的结合,对CDR和FR的几个位置进行了全面诱变。然后进行多个突变和突变组合以改善多维特性,例如与HLA-DQ2.5/多谷蛋白肽结合的选择性优于非相关肽,以及物理化学特性,例如抗体表达水平和ECM结合,这可能会影响抗体药代动力学(US2014/0080153)。

[0991] 尽管DQN0344xx和DQN0385ee都是人源化的,但位于CDRH1(根据Kabat编号,位置35a,Kabat等人,Sequence of proteins of immunological interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991))和CDRH2(位置50,根据Kabat编号)中的两个半胱氨酸残基,通常在兔抗体序列中发现,可能导致二硫键形成的异质性。因此,进行了将这些半胱氨酸残基置换为其他氨基酸。然而,此类置换(DQN034425H中的C35aV/C50A和DQN0385ee0054H中的C35aS/C50S)显著降低了对HLA-DQ2.5/谷蛋白肽的结合亲和力和/或降低了抗体表达水平。为了改善结合亲和力,将S32A、N73T和D95E引入DQN034425H;将N28E、A55Y、S56E、H92E、I94V和N95aA引入DQN034409L;将S30A、S32W、W34F和S61G引入到DQN0385ee0054H中,并且将A25T、L54K和S67L引入到DQN0385ee009L中。为了改善抗体表达水平,将R16G、S61K、K64E和L102V引入DQN034425H,并将S31E和I35M引入DQN0385ee0054H。此外,为了减少ECM结合和针对HLA-DQ2.5/非相关肽如HLA-DQ2.5/CLIP的结合,将R16G和K64E引入DQN034425H;将S56Y引入DQN034409L;将T28E,S30A,S61E和G65E引入DQN0385ee0054H,并将S56E和Y94K引入DQN0385ee009L。为了降低pI,将S30E、N64E引入DQN0385ee0054H,并且为了减少负电荷,将E79Q引入DQN0385ee009L。

[0992] 所有抗体均通过本领域技术人员已知的方法使用构建的基因在哺乳动物细胞中瞬时表达,并通过本领域技术人员已知的方法纯化。表2-2总结了氨基酸置换的组合。

[0993] (表2-2)引入的突变的汇总

[0994]

H/L	VH名称	氨基酸置换，相比于 DQN03442SH	SEQ ID NO	VL名称	氨基酸置换，相比于 DQN0344091L	SEQ ID NO
DQN0344H0976/L0591	DQN0344H0976	R16G/S32A/C35aV/C50A/S61K/K64E/N73T/D95E	88	DQN0344L0591	N28E/A55Y/S56E/H92E/I94V/E95aA	90
DQN0344H1013/L0620	DQN0344H1013	S32A/C35aV/C50A/S61K/K64E/N73T/D95E/L102V	89	DQN0344L0620	S56Y/H92E/I94V/E95aA	91

H/L	VH名称	氨基酸置换，相比于 DQN0385ee0054H		VL名称	氨基酸置换，相比于 DQN0385ee009L	
DQN0385H1270/L0722	DQN0385H1270	S31E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	92	DQN0385L0722	A25T/L54K/S56E/S67L/E79Q/Y94K	98
DQN0385H1270/L0681	DQN0385H1270	S31E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	92	DQN0385L0681	A25T/L54K/S56E/S67L/Y94K	99
DQN0385H1352/L0681	DQN0385H1352	T28E/S31E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	93	DQN0385L0681	A25T/L54K/S56E/S67L/Y94K	99
DQN0385H1527/L0605	DQN0385H1527	S30A/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	94	DQN0385L0605	A25T/L54K/S56E/Y94K	100
DQN0385H1255/L0605	DQN0385H1255	S31E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61G/N64E/G65E	95	DQN0385L0605	A25T/L54K/S56E/Y94K	100
DQN0385H1270/L0722	DQN0385H1270	S31E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	92	DQN0385L0722	A25T/L54K/S56E/S67L/E79Q/Y94K	98
DQN0385H1521/L0605	DQN0385H1521	S30E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	96	DQN0385L0605	A25T/L54K/S56E/Y94K	100
DQN0385H1270/L0681	DQN0385H1270	S31E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	92	DQN0385L0681	A25T/L54K/S56E/S67L/Y94K	99
DQN0385H1352/L0681	DQN0385H1352	T28E/S31E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	93	DQN0385L0681	A25T/L54K/S56E/S67L/Y94K	99
DQN0385H1353/L0681	DQN0385H1353	S30A/S31E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	97	DQN0385L0681	A25T/L54K/S56E/S67L/Y94K	99

[0995] 双特异性抗体的生成

[0996] 为了进一步扩大肽覆盖,生成了双特异性抗体,这些抗体显示出与多种HLA-

DQ2.5/谷蛋白肽复合物具有广泛的交叉反应性结合。为了生成双特异性抗体,使用了十三种多谷蛋白肽选择性HLA-DQ2.5二价抗体(DQN0344xx,DQN0385ee,DQN034425H/09L,DQN0385ee0054H/009L,DQN0344H0976/L0591,DQN0344H1013/L0620,DQN0385H1270/L0722,DQN0385H1521/L0605,DQN0385H1270/L0681,DQN0385H1352/L0681,DQN0385H1527/L0605,DQN0385H1353/L0681,和DQN0385H1255/L0605)。这些纯化的二价抗体经过Fab臂交换技术(如Igawa等人WO2016/159213中所述)以产生十六种双特异性抗体;

[0997] DQN0344xx//DQN0385ee(DQN0344xx和DQN0385ee的双特异性抗体),DQN034425//DQN0385ee0054(DQN034425H/09L和DQN0385ee0054H/009L的双特异性抗体),DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6(DQN0344H0976/L0591和DQN0385H1270/L0722的双特异性抗体),DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6(DQN0344H0976/L0591和DQN0385H1270/L0681的双特异性抗体),DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6(DQN0344H0976/L0591和DQN0385H1352/L0681的双特异性抗体),DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6(DQN0344H0976/L0591和DQN0385H1527/L0605的双特异性抗体),DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6(DQN0344H0976/L0591和DQN0385H1255/L0605的双特异性抗体),DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6(DQN0344H1013/L0620和DQN0385H1270/L0722的双特异性抗体),DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6(DQN0344H1013/L0620和DQN0385H1521/L0605的双特异性抗体),DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6(DQN0344H1013/L0620和DQN0385H1270/L0681的双特异性抗体),DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6(DQN0344H1013/L0620和DQN0385H1352/L0681的双特异性抗体),DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6

[0998] (DQN0344H1013/L0620和DQN0385H1353/L0681的双特异性抗体),DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1521/L0605-F6

[0999] (DQN0344H0976/L0591和DQN0385H1521/L0605的双特异性抗体),DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1353/L0681-F6

[1000] (DQN0344H0976/L0591和DQN0385H1353/L0681的双特异性抗体),DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1255/L0605-F6

[1001] (DQN0344H1013/L0620和DQN0385H1255/L0605的双特异性抗体),和DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1527/L0605-F6

[1002] (DQN0344H1013/L0620和DQN0385H1527/L0605的双特异性抗体)。产生的双特异性抗体的组合和序列总结在表2-3至2-6中。

[1003] 如上所述,双特异性抗体是通过Fab臂交换技术产生的。或者,它也可以通过将两个不同的重链和两个不同的轻链质粒转染到哺乳动物细胞中来产生。为了有效地获得目的双特异性抗体,CHI-CL结构域界面中存在已知的氨基酸置换和组合,可促进所需的H链-L链缔合(WO2019065795)。上述具有此类恒定区的可变区序列(DQN0344臂的重链恒定区:SEQ ID NO:162,DQN0344臂的轻链恒定区:SEQ ID NO:106,DQN0385臂的重链恒定区:SEQ ID NO:163,DQN0385臂的轻链恒定区:SEQ ID NO:107。全长的SEQ ID NO总结在表2-3至2-6中)已知显示出针对HLA-DQ2.5/多种谷蛋白肽的相似的结合特性。

[1004] [表2-3]

[1005] 双特异性抗体的总结和序列

双特异性抗体名称			DQN0344xx// DQN0385ee	DQN034425// DQN0385ee0054
臂A			DQN0344xx	DQN034425H/09L
臂B			DQN0385ee	DQN0385ee0054H/009L
SEQ ID NO	臂A	HCDR1	68	112
		HCDR2	69	113
		HCDR3	70	114
		H链 VR	71	84
		H链 CR	101	101
		全长 H	35	38
		全长 H (不同的 Fc)	36	39
		LCDR1	72	108
		LCDR2	73	109
		LCDR3	74	110
		L链 VR	75	111
		L链 CR	103	103
		全长 L	37	40
	臂B	HCDR1	76	115
		HCDR2	77	116
		HCDR3	78	117
		H链 VR	79	87
		H链 CR	102	102
		全长 H	47	50
		全长 H (不同的Fc)	48	51
		LCDR1	80	118
		LCDR2	81	119
		LCDR3	82	120
		L链 VR	83	86
		L链 CR	103	103
		全长 L	49	52

[1006] [表2-4]

[1007] 双特异性抗体的总结和序列

双特异性抗体名称			DQN0344 H0976/ L0591// DQN0385 H1270/ L0722-F6	DQN0344 H0976/ L0591// DQN0385 H1270/ L0681-F6	DQN0344 H0976/ L0591// DQN0385 H1352/ L0681-F6	DQN0344 H0976/ L0591// DQN0385 H1527/ L0605-F6	DQN0344 H0976/ L0591// DQN0385 H1255/ L0605-F6
臂 A			DQN0344 H0976/ L0591	DQN0344 H0976/ L0591	DQN0344 H0976/ L0591	DQN0344 H0976/ L0591	DQN0344 H0976/ L0591
臂B			DQN0385 H1270/ L0722	DQN0385 H1270/ L0681	DQN0385 H1352/ L0681	DQN0385 H1527/ L0605	DQN0385 H1255/ L0605
SEQ ID NO	臂 A	HCDR1	129	129	129	129	129
		HCDR2	130	130	130	130	130
		HCDR3	131	131	131	131	131
		H 链 VR	88	88	88	88	88
		H 链 CR	105	105	105	105	105
		全长 H	41	41	41	41	41
		全长 H (不同的 Fc)	42	42	42	42	42
		LCDR1	132	132	132	132	132
		LCDR2	133	133	133	133	133
		LCDR3	134	134	134	134	134
		L 链 VR	90	90	90	90	90
		L 链 CR	106	106	106	106	106
		全长 L	43	43	43	43	43
	臂 B	HCDR1	135	135	144	147	153
		HCDR2	136	136	145	148	154
		HCDR3	137	137	146	149	155
		H 链 VR	92	92	93	94	95
		H 链 CR	104	104	104	104	104
		全长 H	53	53	57	59	62
		全长 H (不同的 Fc)	54	54	58	60	63
		LCDR1	138	141	141	150	150
		LCDR2	139	142	142	151	151
		LCDR3	140	143	143	152	152
		L 链 VR	98	99	99	100	100
		L 链 CR	107	107	107	107	107
		全长 L	55	56	56	61	61

[1008] [表2-5]

[1009] 双特异性抗体的总结和序列

[1010]

双特异性抗体名称			DQN0344 H1013/ L0620// DQN0385 H1270/ L0722-F6	DQN0344 H1013/ L0620// DQN0385 H1521/ L0605-F6	DQN0344 H1013/ L0620// DQN0385 H1270/ L0681-F6	DQN0344 H1013/ L0620// DQN0385 H1352/ L0681-F6	DQN0344 H1013/ L0620// DQN0385 H1353/ L0681-F6
臂 A			DQN0344 H1013/ L0620	DQN0344 H1013/ L0620	DQN0344 H1013/ L0620	DQN0344 H1013/ L0620	DQN0344 H1013/ L0620
臂 B			DQN0385 H1270/ L0722	DQN0385 H1521/ L0605	DQN0385 H1270/ L0681	DQN0385 H1352/ L0681	DQN0385 H1353/ L0681
SEQ ID NO	臂 A	HCDR1	164	164	164	164	164
		HCDR2	165	165	165	165	165
		HCDR3	166	166	166	166	166
		H 链 VR	89	89	89	89	89
		H 链 CR	105	105	105	105	105
		H	44	44	44	44	44
		全长 H (不同的 Fc)	45	45	45	45	45
		LCDR1	167	167	167	167	167
		LCDR2	168	168	168	168	168
		LCDR3	169	169	169	169	169
		L 链 VR	91	91	91	91	91
		L 链 CR	106	106	106	106	106
		全长 L	46	46	46	46	46
	臂 B	HCDR1	135	156	135	144	159
		HCDR2	136	157	136	145	160
		HCDR3	137	158	137	146	161
		H 链 VR	92	96	92	93	97
		H 链 CR	104	104	104	104	104
		全长 H	53	64	53	57	66
		全长 H (不同的 Fc)	54	65	54	58	67
		LCDR1	138	150	141	141	141
		LCDR2	139	151	142	142	142
		LCDR3	140	152	143	143	143
		L 链 VR	98	100	99	99	99
		L 链 CR	107	107	107	107	107
		全长 L	55	61	56	56	56

[1011] [表2-6]

[1012] 双特异性抗体的总结和序列

[1013]

双特异性抗体名称			DQN0344 H0976/ L0591// DQN0385 H1521/ L0605-F6	DQN0344 H0976/ L0591// DQN0385 H1353/ L0681-F6	DQN0344 H1013/ L0620// DQN0385 H1255/ L0605-F6	DQN0344 H1013/ L0620// DQN0385 H1527/ L0605-F6
臂A			DQN0344 H0976/ L0591	DQN0344 H0976/ L0591	DQN0344 H1013/ L0620	DQN0344 H1013/ L0620
臂B			DQN0385 H1521/ L0605	DQN0385 H1353/ L0681	DQN0385 H1255/ L0605	DQN0385 H1527/ L0605
SEQ ID NO	臂A	HCDR1	129	129	164	164
		HCDR2	130	130	165	165
		HCDR3	131	131	166	166
		H链 VR	88	88	89	89
		H链 CR	105	105	105	105
		全长 H	41	41	44	44
		全长 H (不同的Fc)	42	42	45	45
		LCDR1	132	132	167	167
		LCDR2	133	133	168	168
		LCDR3	134	134	169	169
		L链 VR	90	90	91	91
		L链 CR	106	106	106	106
		全长 L	43	43	46	46
	臂B	HCDR1	156	159	153	147
		HCDR2	157	160	154	148
		HCDR3	158	161	155	149
		H链 VR	96	97	95	94
		H链 CR	104	104	104	104
		全长H	64	66	62	59
		全长 H (不同的Fc)	65	67	63	60
		LCDR1	150	141	150	150
		LCDR2	151	142	151	151
		LCDR3	152	143	152	152
		L链 VR	100	99	100	100
		L链 CR	107	107	107	107
		全长 L	61	56	61	61

[1014] 实施例4

[1015] 抗体对II类HLA的结合分析。

[1016] 图1-1至1-16显示了每种抗HLA-DQ抗体与一组以与几种表达肽的Ba/F3细胞系的复合物形式的HLA-DQ的结合,如FACS所确定的。测试了抗HLA-DQ抗体与以下的结合:Ba/F3-HLA-DQ2.5,Ba/F3-HLA-DQ2.2,Ba/F3-HLA-DQ7.5,Ba/F3-HLA-DQ8,Ba/F3-HLA-DQ7.3,Ba/F3-HLA-DQ5.1,Ba/F3-HLA-DQ6.3,Ba/F3-HLA-DR,Ba/F3-HLA-DP,Ba/F3-HLA-DQ2.5/CLIP,Ba/F3-HLA-DQ2.5/HBV1,Ba/F3-HLA-DQ2.5/沙门氏菌,Ba/F3-HLA-DQ2.5/TPO,Ba/F3-HLA-DQ2.5/牛分枝杆菌,Ba/F3-HLA-DQ2.5/α1麦醇溶蛋白,Ba/F3-HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白,Ba/F3-HLA-DQ2.5/γ1麦醇溶蛋白,Ba/F3-HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白,Ba/F3-HLA-DQ2.5/

ω1麦醇溶蛋白,Ba/F3-HLA-DQ2.5/ω2麦醇溶蛋白,Ba/F3-HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白,Ba/F3-HLA-DQ2.5/α3麦醇溶蛋白,Ba/F3-HLA-DQ2.5/α1b麦醇溶蛋白,Ba/F3-HLA-DQ2.5/γ4a麦醇溶蛋白,Ba/F3-HLA-DQ2.5/γ4b麦醇溶蛋白,Ba/F3-HLA-DQ2.5/燕麦蛋白1,Ba/F3-HLA-DQ2.5/燕麦蛋白2,Ba/F3-HLA-DQ2.5/燕麦蛋白3,Ba/F3-HLA-DQ2.5/大麦醇溶蛋白1,Ba/F3-HLA-DQ2.5/大麦醇溶蛋白2,Ba/F3-HLA-DQ2.5/裸麦醇溶蛋白1,Ba/F3-HLA-DQ2.5/裸麦醇溶蛋白2,Ba/F3-HLA-DQ2.5/33聚体麦醇溶蛋白,Ba/F3-HLA-DQ2.5/26聚体麦醇溶蛋白。将50纳克/mL的抗HLA-DQ抗体和1微克/mL的对照DQN0139bb和IC17dK抗体与每个细胞系在室温孵育30分钟。DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1353/L0681-F6和DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1255/L0605-F6除外,其中这些抗HLA-DQ抗体的浓度为313纳克/mL,并且仅对于Ba/F3-HLA-DQ2.5和Ba/F3-HLA-DQ2.5/CLIP各自的对照DQN0139bb和IC17dK抗体为20微克/mL。细胞系在孵育后用FACS缓冲液(2％FBS、2mM EDTA的PBS溶液)洗涤。然后加入山羊F(ab')2抗人IgG,小鼠ads-PE(Southern Biotech,目录号2043-09),并在4℃下孵育20分钟,然后用FACS缓冲液洗涤。在LSRFortessa X-20(Becton Dickinson)上进行数据采集,然后使用FlowJo软件(Tree Star)和Microsoft Office Excel 2013进行分析。通过将IC17dK的MFI值为0％,DQN0139bb的MFI值为100％,确定抗体的％MFI。

[1017] 图1-1至1-13显示了13种双特异性抗HLA-DQ抗体(变体DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1353/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1255/L0605-F6)对Ba/F3细胞系组的结合,如前所述。这13种双特异性抗HLA-DQ抗体仅在HLA-DQ2.5与测试的谷蛋白衍生肽呈复合物形式时才对HLA-DQ2.5具有不同程度的显著结合活性(即33聚体麦醇溶蛋白肽、α1麦醇溶蛋白肽、α2麦醇溶蛋白肽、γ1麦醇溶蛋白肽、γ2麦醇溶蛋白肽、ω1麦醇溶蛋白肽、ω2麦醇溶蛋白肽、BC大麦醇溶蛋白肽、α3麦醇溶蛋白肽、α1b麦醇溶蛋白肽、γ4a麦醇溶蛋白肽、γ4b麦醇溶蛋白肽、燕麦蛋白1肽、燕麦蛋白2肽、燕麦蛋白3肽、大麦醇溶蛋白1肽、大麦醇溶蛋白2肽、裸麦醇溶蛋白1肽、裸麦醇溶蛋白2肽和26聚体麦醇溶蛋白肽)。13种双特异性抗HLA-DQ抗体与γ2麦醇溶蛋白肽的结合是适度的。另一方面,当HLA-DQ2.5以与与谷蛋白肽无关的肽的复合物形式或受到非HLA-DQ2.5单倍型时,13种双特异性抗HLA-DQ抗体对HLA-DQ2.5实质上没有结合活性(包括图1-14)。

[1018] 图1-15和1-16分别是阳性结合对照(DQN0139bb)和阴性结合对照(IC17dK)。

[1019] 实施例5

[1020] 抗体与HLA-DQ2.5+PBMCB细胞的结合分析。

[1021] 图2显示了通过FACS确定的每种抗HLA-DQ抗体与HLA-DQ2.5阳性PBMC-B细胞的结合。

[1022] 添加人FcR阻断剂(Miltenyi,目录号130-059-901)并在4℃孵育10分钟。50纳克/

mL的抗HLA-DQ抗体,和1微克/mL的对照DQN0139bb和IC17dK抗体在室温下与每个细胞系孵育30分钟。DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1353/L0681-F6和DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1255/L0605-F6除外,其中这些抗HLA-DQ抗体以313纳克/mL使用,并且相应的对照DQN0139bb和IC17dK抗体为20微克/mL。细胞在孵育后用FACS缓冲液(2%FBS、2mM EDTA的PBS溶液)洗涤。同时加入生物素缀合的抗人抗体(Chugai,BIO12-deltaGK Ab)和Pacific Blue™抗人CD19抗体小鼠IgG1k(Biolegend,Cat.302232)并在4℃孵育30分钟,然后用FACS缓冲液洗涤。然后加入PE链霉亲和素(Biolegend,目录号405203)并在4℃孵育15分钟,然后用FACS缓冲液洗涤。在LSRFortessa X-20(Becton Dickinson)上进行数据采集,然后使用FlowJo软件(Tree Star)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。以IC17dK的MFI值为0%,DQN0139bb的MFI值为100%,确定抗体的%MFI。

[1023] 图2显示了13种双特异性抗HLA-DQ抗体(变体DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1353/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1255/L0605-F6)对HLA-DQ2.5阳性PBMC-B细胞实质上不结合。

[1024] 实施例6

[1025] 6.1αβTCR KO Jurkat NFAT-Luc细胞系的建立

[1026] 通过电穿孔(LONZA,Nucleofector 2b)将由Cas9和靶向TCR恒定区的单向导RNA组成的核糖核蛋白(RNP)复合物(Takara Bio)(Blood.2018;131:311-22.)引入NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞系(Promega公司,CS176401)。TCRα链和TCRβ链的所有单向导RNA混合并同时引入。引入RNP的细胞在含有潮霉素B的培养基中培养,然后用FACS Aria III(Becton,Dickinson and Company)进行单细胞克隆。然后检查TCRα链和TCRβ链序列并鉴定TCRα链和TCRβ链被敲除的Jurkat NFAT-Luc衍生克隆。建立的克隆被命名为TCR KO Jurkat NFAT-Luc。

[1027] 6.2瞬时表达HLA-DQ2.5/谷蛋白肽限制性TCR的αβTCR KO Jurkat NFAT-Luc细胞系的建立

[1028] TCR氨基酸序列信息获自公开信息,或基于材料转让协议的奥斯陆大学。HLA-DQ2.5/α1麦醇溶蛋白限制性TCR(TCC ID:387.9),HLA-DQ2.5/α1b麦醇溶蛋白限制性TCR(TCC ID:370.2.25),HLA-DQ2.5/ω1麦醇溶蛋白限制性TCR(TCC ID:442D.A.2),HLA-DQ2.5/ω2麦醇溶蛋白限制性TCR(TCC ID:578.42),HLA-DQ2.5/γ1麦醇溶蛋白限制性TCR(TCCID:820.27),HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白限制性TCR(TCC ID:430.1.41),HLA-DQ2.5/γ3麦醇溶蛋白限制性TCR(TCC ID:/.2.23),HLA-DQ2.5/γ4a麦醇溶蛋白限制性TCR(TCC ID:430.1.36),HLA-DQ2.5/γ4d麦醇溶蛋白限制性TCR(TCC ID:430.1.94)的氨基酸序列信息是根据材料转让协议从奥斯陆大学获得的。HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白限制性TCR(DQ2.5/α2

麦醇溶蛋白限制性TCR)的氨基酸序列信息获自Nat Struct Mol Biol.2014;21:480-8,并且HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白限制性TCR(TCCID:1468.2)的氨基酸序列信息获自Eur J Immunol.2020;50:256-269。每个TCRβ链序列通过2A自切割肽序列(P2A,氨基酸序列:GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP,SEQ ID NO:203)与相应的TCRα链序列连接。除了HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白限制性TCR和HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白限制性TCR外,所有TCRα链和TCRβ链都有这些自己的天然信号肽序列。HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白限制性TCR的天然信号序列被Campath信号序列(MGWSCIILFLVATATGVHS,SEQ ID NO:170)替代。Campath信号序列也附接到HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白限制性TCR的N末端。然后将每个密码子优化的TCRβ链-P2A-TCRα链cDNA插入Genscript的表达载体pCXZD1(US/20090324589)。按照SE细胞系4D-NucleofectorTM试剂盒的方案将载体电穿孔到αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2中。

[1029] 6.3抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/α1麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1030] 将50微升IHW09023细胞(International Histocompatibility Working Group,Fred Hutch)($8.0x10^4$细胞/孔)和33聚体麦醇溶蛋白肽(LQLQPFPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF,SEQ ID NO:201,250nM)的混合物分布在96孔板(Corning,3799)。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升α1麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2($2.0x10^4$细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel 2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1031] 如图3-1和表2-7所示,所有测试的抗HLA DQ抗体均以剂量依赖的方式显示出对HLA-DQ2.5/α1麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用。特别地,

[1032] 相比于DQN0344xx,DQN0344xx//DQN0385ee,DQN034425和DQN034425//DQN0385ee0054,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6)显示了对HLA-DQ2.5/α1麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的更强的中和活性。

[1033] 6.4抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1034] 将50微升IHW09023细胞($8.0x10^4$细胞/孔)和33聚体麦醇溶蛋白肽(LQLQPFPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF,SEQ ID NO:201,250nM)的混合物分布在96孔板(Corning,3799)。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升α2麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2($2.0x10^4$细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过

夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel 2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1035] 如图3-2和表2-7所示,所有测试的抗HLA DQ抗体均以剂量依赖的方式显示出对HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用。特别地,

[1036] 相比于DQN0344xx,DQN0344xx//DQN0385ee,DQN034425和DQN034425//DQN0385ee0054,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6)对HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化具有更强的中和活性。

[1037] 6.5抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/α1b麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1038] 将50微升IHW09023细胞($8.0x10^4$细胞/孔)和33聚体麦醇溶蛋白肽(LQLQPFPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF,SEQ ID NO:201,250nM)的混合物分布在96孔板(Corning,3799)。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升α1b麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2($2.0x10^4$细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel 2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1039] 如图3-3和表2-7所示,所有测试的抗HLA DQ抗体均以剂量依赖的方式显示出对HLA-DQ2.5/α1b麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用。特别地,

[1040] 相比于DQN0344xx,DQN0344xx//DQN0385ee,DQN034425和DQN034425//DQN0385ee0054,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6)显示了对HLA-DQ2.5/α1b麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的更强的中和活性。

[1041] 6.6抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/ω1麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑

制作用得到证实。

[1042] 将50微升IHW09023细胞(8.0x10^{4}细胞/孔)和ω1/2麦醇溶蛋白肽(EQPFPQPEQPFPWQP,SEQ ID NO:204,25uM)的混合物分布在96孔板(Corning,3799)。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升ω1麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβ TCR-KO Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1043] 如图3-4和表2-7所示,所有测试的抗HLA DQ抗体均以剂量依赖的方式显示出对HLA-DQ2.5/ω1麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用。特别地,

[1044] 相比于DQN0344xx,DQN0344xx//DQN0385ee,DQN034425和DQN034425//DQN0385ee0054,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6)显示了对HLA-DQ2.5/ω1麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的更强的中和活性。

[1045] 6.7抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/ω2麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1046] 将50微升IHW09023细胞(8.0x10^{4}细胞/孔)和ω1/2麦醇溶蛋白肽(EQPFPQPEQPFPWQP,SEQ ID NO:204,250nM)的混合物分布在96孔板(Corning,3799)。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升ω2麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβ TCR-KO Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1047] 如图3-5和表2-7所示,除DQN0344xx和DQN034425外,所有测试的抗HLA DQ抗体均以剂量依赖的方式显示出对HLA-DQ2.5/ω2麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用。特别地,相比于DQN0344xx,DQN0344xx//DQN0385ee,DQN034425,和DQN034425//DQN0385ee0054,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,

DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6)显示了对HLA-DQ2.5/ω2麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的更强的中和活性。

[1048] 6.8抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1049] 将50微升IHW09023细胞(8.0x10^{4}细胞/孔)和BC大麦醇溶蛋白肽(EPEQPIPEQPQPYPQQ,SEQ ID NO:205,250nM)的混合物分布在96孔板(Corning,3799)。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升BC大麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1050] 如图3-6和表2-7所示,除DQN0344xx和DQN034425外,所有测试的抗HLA DQ抗体均以剂量依赖的方式显示出对HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用。特别地,相比于DQN0344xx,DQN0344xx//DQN0385ee,DQN034425和DQN034425//DQN0385ee0054,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6)显示了对HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的更强的中和活性。

[1051] 6.9抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/γ1麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1052] 将50微升IHW09023细胞(8.0x10^{4}细胞/孔)和γ1麦醇溶蛋白肽(PQQPQQSFPEQEQPA,SEQ ID NO:206,250nM)的混合物分布在96孔板(Corning,3799)。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升γ1麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1053] 如图3-7和表2-7所示,除DQN0344xx和DQN034425外,所有测试的抗HLA DQ抗体均

以剂量依赖的方式显示出对HLA-DQ2.5/γ1麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用。特别地,相比于DQN0344xx,DQN0344xx//DQN0385ee,DQN034425和DQN034425//DQN0385ee0054,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6)显示了对HLA-DQ2.5/γ1麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的更强的中和活性。

[1054] 6.10抗HLADQ抗体对HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1055] 将50微升IHW09023细胞(8.0x10^{4}细胞/孔)和γ2麦醇溶蛋白肽(GQGIIQPEQPAQLIR,SEQ ID NO:207,250nM)的混合物分布在96孔板(Corning,3799)。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升γ2麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1056] 如图3-8和表2-7所示,除DQN0344xx和DQN034425外,所有测试的抗HLA DQ抗体均以剂量依赖的方式显示出对HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用。特别地,相比于DQN0344xx,DQN0344xx//DQN0385ee,DQN034425和DQN034425//DQN0385ee0054,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6)显示了对HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的更强的中和活性。

[1057] 6.11抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/γ3麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1058] 将50微升IHW09023细胞(8.0x10^{4}细胞/孔)和γ3麦醇溶蛋白肽(EQPFPEQPEQPYPEQPEQPFPQP,SEQ ID NO:208,100uM)的混合物分布在96孔板(Corning,3799)。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升γ3麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision

(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100％且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0％时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1059] 如图3-9和表2-7所示,所有测试的抗HLA DQ抗体均以剂量依赖的方式显示出对HLA-DQ2.5/γ3麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用。特别地,

[1060] 相比于DQN0344xx,DQN0344xx//DQN0385ee,DQN034425和DQN034425//DQN0385ee0054,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6)显示了对HLA-DQ2.5/γ3麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的更强的中和活性。

[1061] 6.12抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/γ4a麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1062] 将50微升IHW09023细胞($8.0x10^4$细胞/孔)和γ4a麦醇溶蛋白肽(FSQPEQEFPQPQ,SEQ ID NO:209,25uM)的混合物分布在96孔板(Corning,3799)。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升γ4a麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2($2.0x10^4$细胞/孔)并在37℃,5％ CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100％且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0％时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1063] 如图3-10和表2-7所示,除DQN0344xx,DQN034425和DQN034425//DQN0385ee0054外,所有测试的抗HLA DQ抗体均以剂量依赖的方式显示出对HLA-DQ2.5/γ4a麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用。特别地,

[1064] 相比于DQN0344xx,DQN0344xx//DQN0385ee,DQN034425和DQN034425//DQN0385ee0054,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6)显示了对HLA-DQ2.5/γ4a麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的更强的中和活性。

[1065] 6.13抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/γ4d麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1066] 将50微升IHW09023细胞(8.0x10^{4}细胞/孔)和γ4d麦醇溶蛋白肽(WPQQQPFPQPEQPFCEQPQR,SEQ ID NO:210,100uM)的混合物分布在96孔板(Corning,3799)。然后加入25微升连续稀释的抗HLADQ抗体,最后加入25微升γ4d麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1067] 如表2-7所示,除DQN0344xx,DQN0344xx//DQN0385ee,DQN034425和DQN034425//DQN0385ee0054外,所有测试的抗HLA DQ抗体均以剂量依赖的方式显示出对HLA-DQ2.5/γ4d麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用。

[1068] 如图3-1至3-10和表2-7所示,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6)对所有测试的谷蛋白肽的中和活性均强于DQN0344xx,DQN0344xx//DQN0385ee,DQN034425和DQN034425//DQN0385ee0054。

[1069] 此外,相比于DQN0344xx,DQN0344xx//DQN0385ee,DQN034425和DQN034425//DQN0385ee0054,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6)表现出更广泛的针对谷蛋白肽的中和活性。

[1070] 鉴于表2-7,十种测试的抗HLA-DQ抗体显示出对Jurkat T细胞活化的抑制作用(中和活性),特别是依赖于ω2麦醇溶蛋白肽、BC大麦醇溶蛋白肽、γ1麦醇溶蛋白肽、γ2麦醇溶蛋白肽、γ4a麦醇溶蛋白肽和γ4d麦醇溶蛋白肽。在本发明的修饰之前的现有抗体不显示针对这些谷蛋白肽的中和活性。即,与修饰前相比,在本发明的抗原结合分子中,对谷蛋白肽的交叉反应性提高。

[1071] (表2-7)抗HLA-DQ抗体对HLA-DQ2.5/谷蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的中和活性(抑制作用)

[1072]

抗体名称	IC50 (ng/mL)													
	α1a 麦醇溶蛋白 TCR 250 nM 33聚体麦醇溶蛋白	α2 麦醇溶蛋白 TCR 250 nM 33聚体麦醇溶蛋白	α1b 麦醇溶蛋白 TCR 250 nM 33聚体麦醇溶蛋白	ω1 麦醇溶蛋白 TCR 25 μM ω1/2 麦醇溶蛋白	ω2 麦醇溶蛋白 TCR 250 nM ω1/2 麦醇溶蛋白	BC大麦醇溶蛋白 TCR 250 nM BC 大麦醇溶蛋白	γ1 麦醇溶蛋白 TCR 250 nM γ1_麦醇溶蛋白	γ2 麦醇溶蛋白 TCR 250 nM γ2_麦醇溶蛋白	γ3 麦醇溶蛋白 TCR 100 μM γ3 麦醇溶蛋白	γ4a 麦醇溶蛋白 TCR 25 μM γ4a 麦醇溶蛋白	γ4d 麦醇溶蛋白 TCR 100 μM γ4d_麦醇溶蛋白
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6	0.38	0.31	1.41	2.55	0.26	13.16	0.66	281.04	2.88	726.43	16.31
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6	0.58	0.34	1.36	2.07	0.26	12.03	1.05	181.56	2.40	748.78	11.81
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6	0.29	0.31	1.37	1.48	0.24	10.82	1.11	284.12	2.99	801.85	9.82
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6	0.70	0.51	1.84	3.25	0.30	6.54	0.59	636.88	2.09	1207.42	11.40
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6	0.49	0.56	2.66	2.62	0.25	13.57	0.91	440.28	2.31	1425.94	12.45
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6	0.27	0.33	1.25	2.17	0.22	9.70	1.03	276.71	3.31	1146.02	10.09
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6	0.28	0.33	1.76	1.91	0.19	8.98	0.68	852.68	1.40	1349.11	13.01
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6	0.38	0.33	1.78	2.51	0.20	7.54	1.11	322.12	2.63	1164.09	13.05
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6	0.26	0.38	1.13	1.88	0.27	11.58	1.71	279.48	3.15	1728.33	3.15
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6	0.29	0.34	1.13	1.17	0.17	8.78	0.56	100.28	2.29	1250.38	2.06
DQN0344xx	31.11	3.68	112.82	6.85	>500	>20000	>20000	>20000	3825.09	>20000	>20000
DQN0344xx//DQN0385ee	38.29	2.14	74.59	6.78	3.18	18.40	15.84	>20000	9.94	11216.66	784.22
DQN034425	10.57	1.75	46.36	3.12	>500	>20000	>20000	>20000	3104.55	>20000	>20000
DQN034425//DQN0385ee0054	102.29	6.46	437.53	16.06	16.33	979.74	28.32	>20000	18.65	>20000	>20000

[1073] 实施例7实施例7-1

[1074] 抗HLA-DQ2.5抗体与人HLA-DQ2.5/33聚体麦醇溶蛋白肽复合物、HLA-DQ2.5/γ2麦

醇溶蛋白肽复合物和HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白麦醇溶蛋白肽复合物在pH7.4下结合的亲和力是使用Biacore 8k仪器(GE Healthcare)在37℃确定的。使用胺偶联试剂盒(GE Healthcare),将抗人Fc抗体(GE Healthcare)固定在CM4传感器芯片的所有流通池上。在包含20mMACES、150mM NaCl、0.05％吐温20、0.005％NaN_3的ACES pH 7.4中制备所有抗体和分析物。各抗体都被抗人Fc抗体捕获到传感器表面。抗体捕获水平以200共振单位(RU)为目标。人HLA-DQ2.5/33聚体麦醇溶蛋白肽复合物以12.5至200nM注射,其通过两倍连续稀释,然后进行解离来制备。人HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白肽复合物以25至400nM注射,其通过两倍连续稀释,然后进行解离来制备。人HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白醇溶蛋白肽复合物以25至400nM注射,其通过两倍连续稀释,然后进行解离来制备。每个周期用3M $MgCl_2$再生传感器表面。通过使用Biacore Insigh评估软件(GE Healthcare)处理数据并将其拟合到1:1结合模型来确定结合亲和力。

[1075] 抗HLA-DQ2.5抗体与人HLA-DQ2.5/33聚体麦醇溶蛋白肽复合物、HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白肽复合物和HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白麦醇溶蛋白肽复合物结合的亲和力显示在表3-1中。

[1076] (表3-1)抗HLA-DQ2.5抗体对HLA-DQ2.5/谷蛋白肽复合物的亲和力

抗体名称	HLA-DQ2.5 / 33聚体麦醇溶蛋白肽复合物			HLA-DQ2.5 / γ2 麦醇溶蛋白肽复合物			HLA-DQ2.5 / BC 大麦醇溶蛋白肽复合物		
	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^{-1})	KD (M)	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^{-1})	KD (M)	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^{-1})	KD (M)
DQN0344xx	1.86E+05	1.43E-03	7.71E-09	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0385ee	6.36E+04	3.41E-04	5.36E-09	9.69E+04	1.25E-02	1.29E-07	1.67E+05	6.85E-04	4.10E-09
DQN034425H/09L0012	2.23E+05	1.27E-03	5.70E-09	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0385ee0054H/009L	4.06E+04	6.18E-04	1.52E-08	3.34E+04	4.42E-02	1.32E-06	8.18E+04	1.21E-02	1.48E-07
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6	3.62E+05	1.27E-03	3.50E-09	5.62E+05	4.72E-03	8.39E-09	4.00E+05	2.42E-03	6.06E-09
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6	3.59E+05	1.24E-03	3.46E-09	5.80E+05	4.68E-03	8.06E-09	3.78E+05	2.46E-03	6.52E-09
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6	3.67E+05	1.23E-03	3.35E-09	6.56E+05	6.15E-03	9.37E-09	4.23E+05	2.78E-03	6.57E-09
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6	3.69E+05	1.28E-03	3.48E-09	5.66E+05	8.25E-03	1.46E-08	3.55E+05	2.65E-03	7.46E-09
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6	3.66E+05	1.25E-03	3.41E-09	6.40E+05	7.51E-03	1.17E-08	4.01E+05	3.29E-03	8.20E-09
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6	3.54E+05	1.44E-03	4.09E-09	5.37E+05	4.58E-03	8.54E-09	3.62E+05	2.37E-03	6.53E-09
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6	3.52E+05	1.44E-03	4.08E-09	4.46E+05	8.46E-03	1.90E-08	3.05E+05	2.62E-03	8.59E-09
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6	3.64E+05	1.46E-03	4.02E-09	5.62E+05	4.62E-03	8.22E-09	3.64E+05	2.43E-03	6.67E-09
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6	3.66E+05	1.44E-03	3.93E-09	6.10E+05	5.91E-03	9.69E-09	4.48E+05	2.72E-03	6.06E-09
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6	3.73E+05	1.37E-03	3.69E-09	5.36E+05	3.94E-03	7.36E-09	3.78+E05	2.16E-03	5.71E-09

*N.D.: 未确定的

[1077] 实施例7-2

[1078] 抗HLA-DQ2.5抗体与33聚体麦醇溶蛋白肽在pH 7.4结合的亲和力是在25℃使用Biacore 8k仪器(GE Healthcare)确定的。使用胺偶联试剂盒(GE Healthcare),将抗人Fc

抗体(GE Healthcare)固定在CM4传感器芯片的所有流通池上。在包含20mMACES、150mM NaCl、0.05%吐温20、0.005%NaN_3的ACES pH 7.4中制备所有抗体和分析物。各抗体都被抗人Fc抗体捕获到传感器表面。抗体捕获水平以600共振单位(RU)为目标。33聚体麦醇溶蛋白肽以2.5至40nM注射,其通过两倍连续稀释然后进行解离来制备。每个周期用3M $MgCl_2$再生传感器表面。通过使用Biacore Insigh评估软件(GE Healthcare)处理数据并将其拟合到1:1结合模型来确定结合亲和力。

[1079] 抗HLA-DQ2.5抗体与33聚体麦醇溶蛋白肽的结合亲和力显示于表3-2。除DQN0315hh之外的所有测试抗体均未显示抗体与33聚体麦醇溶蛋白肽本身结合。

[1080] (表3-2)抗HLA-DQ2.5抗体与33聚体麦醇溶蛋白肽的亲和力

[1081]

抗体名称	33聚体麦醇溶蛋白肽		
	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^{-1})	KD (M)
DQN0315hh	6.13E+06	6.15E-04	1.00E-10
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6	N.D.	N.D.	N.D.

*N.D.: 未确定的

[1082] 实施例8

[1083] 8.1α/βTCR KO Jurkat NFAT-Luc细胞系的建立

[1084] 通过电穿孔(LONZA,Nucleofector 2b)将由Cas9和靶向TCR恒定区的单向导RNA组成的核糖核蛋白复合物(Takara Bio)(Blood.2018;131:311-22.)引入NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞系(Promega公司,CS176401)。TCRα链和TCRβ链的所有单向导RNA混合并同时引入。引入RNP的细胞在含有潮霉素B的培养基中培养,然后用FACS Aria III(Becton, Dickinson and Company)进行单细胞克隆。然后检查TCRα链和TCRβ链序列并鉴定TCRα链和TCRβ链被敲除的Jurkat NFAT-Luc衍生克隆。建立的克隆被命名为TCR KO Jurkat NFAT-Luc。

[1085] 8.2瞬时表达HLA-DQ2.5/谷蛋白肽限制性TCR的α/βTCR KO Jurkat NFAT-Luc细胞系的建立

[1086] TCR氨基酸序列信息获自公开信息,或基于材料转让协议的奥斯陆大学。HLA-DQ2.5/α1a麦醇溶蛋白限制性TCR(TCC ID:387.9),HLA-DQ2.5/α1b麦醇溶蛋白限制性TCR(TCC ID:370.2.25),HLA-DQ2.5/ω1麦醇溶蛋白限制性TCR(TCC ID:442D.A.2),HLA-DQ2.5/ω2麦醇溶蛋白限制性TCR(TCC ID:578.42),HLA-DQ2.5/γ1麦醇溶蛋白限制性TCR(TCCID:820.27),HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白限制性TCR(TCC ID:430.1.41),HLA-DQ2.5/γ3麦醇溶蛋白限制性TCR(TCC ID:/.2.23),HLA-DQ2.5/γ4a麦醇溶蛋白限制性TCR(TCC ID:430.1.36),HLA-DQ2.5/γ4d麦醇溶蛋白限制性TCR(TCC ID:430.1.94)的氨基酸序列信息是根据材料转让协议从奥斯陆大学获得的。HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白限制性TCR(HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白限制性TCR)的氨基酸序列信息获自Nat Struct Mol Biol.2014;21:480-8,并且HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白限制性TCR(TCCID:1468.2)的氨基酸序列信息获自Eur J Immunol.2020;50:256-269。每个TCRβ链序列通过2A自切割肽序列(P2A,氨基酸序列:GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPSEQ ID NO:203)与相应的TCRα链序列连接。除了HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白限制性TCR和HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白限制性TCR外,所有TCRα链和TCRβ链都有这些自己的天然信号肽序列。HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白限制性TCR的天然信号序列被Campath信号序列(MGWSCIILFLVATATGVHS SEQ ID NO:170)替代。Campath信号序列也附接到HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白限制性TCR的N末端。然后将每个密码子优化的TCRβ链-P2A-TCRα链cDNA插入Genscript的表达载体pCXZD1(US/20090324589)。按照SE细胞系4D-Nucleofector™试剂盒的方案将载体电穿孔到αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2中。

[1087] 8.3抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/α1a麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1088] 将50微升IHW09023细胞($8.0x10^4$细胞/孔)和33聚体麦醇溶蛋白肽(LQLQPFPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF SEQ ID NO:201,250nM)的混合物分布在96孔板。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升α1a麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2($2.0x10^4$细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel

add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1089] 如图4-1和表4所示,所有测试的抗HLA DQ抗体(DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2)对HLA-DQ2.5/α1a麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化介导浓度依赖性中和作用,IC50值在皮克/mL范围内。

[1090] 8.4抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1091] 将50微升IHW09023细胞(8.0x10^{4}细胞/孔)和33聚体麦醇溶蛋白肽(LQLQPFPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF SEQ ID NO:201,250nM)的混合物分布在96孔板。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升α2麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50uL Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1092] 如图4-2和表4所示,所有测试的抗HLA DQ抗体(DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2)对HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化介导浓度依赖性中和作用,IC50值在皮克/mL范围内。

[1093] 8.5抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/α1b麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1094] 将50微升IHW09023细胞(8.0x10^{4}细胞/孔)和33聚体麦醇溶蛋白肽(LQLQPFPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF SEQ ID NO:201,250nM)的混合物分布在96孔板。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升α1b麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1095] 如图4-3和表4所示,所有测试的抗HLA DQ抗体(DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2)对HLA-DQ2.5/α1b麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化介导浓度依赖性中和作用,IC50值在低纳克/mL范围内。

[1096] 8.6抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/ω1麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1097] 将50微升IHW09023细胞(8.0x10^{4}细胞/孔)和ω1/2麦醇溶蛋白肽(EQPFPQPEQPFPWQP SEQ ID NO:204,25micro M)的混合物分布在96孔板。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升ω1麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel 2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1098] 如图4-4和表4所示,所有测试的抗HLA DQ抗体(DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2)对HLA-DQ2.5/ω1麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化介导浓度依赖性中和作用,IC50值在低纳克/mL范围内。

[1099] 8.7抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/ω2麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1100] 将50微升IHW09023细胞(8.0x10^{4}细胞/孔)和ω1/2麦醇溶蛋白肽(EQPFPQPEQPFPWQP SEQ ID NO:204,250nM)的混合物分布在96孔板。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升ω2麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel 2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1101] 如图4-5和表4所示,所有测试的抗HLA DQ抗体(DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2)对HLA-DQ2.5/ω2麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化介导浓度依赖性中和作用,IC50值在皮克/mL范围内。

[1102] 8.8抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1103] 将50微升IHW09023细胞(8.0x10^{4}细胞/孔)和BC大麦醇溶蛋白肽(EPEQPIPEQPQPYPQQ SEQ ID NO:205,250nM)的混合物分布在96孔板。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升BC大麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel 2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。

抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100％且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0％时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1104] 如图4-6和表4所示,所有测试的抗HLA DQ抗体(DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2)对HLA-DQ2.5/BC大麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化介导浓度依赖性中和作用,IC50值在纳克/mL范围内。

[1105] 8.9抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/γ1麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1106] 将50微升IHW09023细胞(8.0x10^{4}细胞/孔)和γ1麦醇溶蛋白肽(PQQPQQSFPEQEQPA SEQ ID NO:206,250nM)的混合物分布在96孔板。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升γ1麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5％ CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel 2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100％且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0％时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1107] 如图4-7和表4所示,所有测试的抗HLA DQ抗体(DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2)对HLA-DQ2.5/γ1麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化介导浓度依赖性中和作用,IC50值在低纳克/mL范围内。

[1108] 8.10抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1109] 将50微升IHW09023细胞(8.0x10^{4}细胞/孔)和γ2麦醇溶蛋白肽(GQGIIQPEQPAQLIR SEQ ID NO:207,250nM)的混合物分布在96孔板。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升γ2麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5％ CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel 2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100％且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0％时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1110] 如图4-8和表4所示,所有测试的抗HLA DQ抗体(DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2)对HLA-DQ2.5/γ2麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化介导浓度依赖性中和作用,IC50值在纳克/mL范围内。

[1111] 8.11抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/γ3麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1112] 将50微升IHW09023细胞(8.0x10^{4}细胞/孔)和γ/3麦醇溶蛋白肽(EQPFPEQPEQPYPEQPEQPFPQP SEQ ID NO:208,100μM)的混合物分布在96孔板。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升γ3麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1113] 如图4-9和表4所示,所有测试的抗HLA DQ抗体(DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2)对HLA-DQ2.5/γ3麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化介导浓度依赖性中和作用,IC50值在低纳克/mL范围内。

[1114] 8.12抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/γ4a麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1115] 将50微升IHW09023细胞(8.0x10^{4}细胞/孔)和γ4a麦醇溶蛋白肽(FSQPEQEFPQPQ SEQ ID NO:209,25μM)的混合物分布在96孔板。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升γ4a麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel 2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1116] 如图4-10和表4所示,所有测试的抗HLA DQ抗体(DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2)对HLA-DQ2.5/γ4a麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化介导浓度依赖性中和作用,IC50值在低微克/mL至纳克/mL范围内。

[1117] 8.13抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.5/γ4d麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1118] 将50微升IHW09023细胞(8.0x10^{4}细胞/孔)和γ4d麦醇溶蛋白肽(WPQQQPFPQPEQPFCEQPQR SEQ ID NO:210,100μM)的混合物分布在96孔板。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升γ4d麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升

Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Outlook Excel 2013(Microsoft)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1119] 如表4所示,所有测试的抗HLA DQ抗体(DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2)对HLA-DQ2.5/γ4d麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化介导浓度依赖性中和作用,IC50值在纳克/mL范围内。

[1120] [表4]

[1121]

		IC50 (ng/mL)													
	抗体名称	α1a 250 nM	α2 250 nM	α1b 250 nM	α1 25 μM	α2 250 nM	BC 250 nM	γ1 250 nM	γ2 250 nM	γ3 100 μM	γ4a 25 μM	γ4d 100 μM
		33聚体麦醇溶蛋白	33聚体麦醇溶蛋白	33聚体麦醇溶蛋白	α1/2 麦醇溶蛋白	α1/2 麦醇溶蛋白	BC 大麦醇溶蛋白	γ1 麦醇溶蛋白	γ2 麦醇溶蛋白	γ3 麦醇溶蛋白	γ4a 麦醇溶蛋白	γ4d 麦醇溶蛋白
	DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2	0.46	0.29	1.33	1.62	0.18	9.52	1.62	252.22	1.55	636.21	8.69
	DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2	0.60	0.33	1.81	1.96	0.20	11.41	1.90	785.29	1.21	1249.93	9.23
	DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2	0.63	0.53	1.42	3.19	0.49	25.25	5.85	279.61	4.84	1979.98	27.83

[1122] 实施例9

[1123] 9.1瞬时表达HLA-DQ2.5/谷蛋白肽限制性TCR的αβTCR KO Jurkat NFAT-Luc细胞系的建立

[1124] TCR氨基酸序列信息获自公开信息,或基于材料转让协议的奥斯陆大学。HLA-DQ2.5/α1a麦醇溶蛋白限制性TCR(TCC ID:387.9)的氨基酸序列信息是根据材料转让协议从奥斯陆大学获得的。HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白限制性TCR(HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白限制性TCR)的氨基酸序列信息获自Nat Struct Mol Biol.2014;21:480-8。虽然这些TCR是HLA-DQ2.5限制性的,但当HLA-DQ2.2与α1a麦醇溶蛋白、α2麦醇溶蛋白形成复合物形式时,它们对HLA-DQ2.2具有交叉反应(图5-1和5-2).每个TCRβ链序列通过2A自切割肽序列(P2A,氨基酸序列:GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPSEQ ID NO:203)与相应的TCRα链序列连接。HLA-DQ2.5/α1a麦醇溶蛋白限制性TCR的TCRα链和TCRβ链具有这些自身的天然信号肽序列。Campath信号序列(MGWSCIILFLVATATGVHS SEQ ID NO:170)附接在HLA-DQ2.5/α2麦醇溶蛋白限制性TCR的N末端。然后将每个密码子优化的TCRβ链-P2A-TCRα链cDNA插入Genscript的表达载体pCXZD1(US/20090324589)。按照SE细胞系4D-Nucleofector™试剂盒的方案将载体电穿孔到αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2中。

[1125] 9.2HLA-DQ2.2+人血B加强B细胞(Human Blood B Booster B cell,HBBB2.2)的建立

[1126] B细胞分离自HLA-DQ2.2+PBMC(Precision for Medicines)。然后通过使用人血B加强(注册商标)(DENDRITICS)使分离的B细胞永生化。

[1127] 9.3抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.2/α1a麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1128] 将50微升HBBB2.2细胞($8.0x10^4$细胞/孔)和33聚体麦醇溶蛋白肽(LQLQPFPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF SEQ ID NO:201,25μM)的混合物分布在96孔板。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升α1a麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO Jurkat-NFAT-luc2($2.0x10^4$细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Office 365MSO的Microsoft(注册商标)Excel(注册商标)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值

[1129] 如图5-3和表5所示,所有测试的抗HLA DQ抗体(DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2)对HLA-DQ2.2/α1a麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化介导浓度依赖性中和作用,IC50值在低纳克/mL范围内。

[1130] 9.4抗HLA DQ抗体对HLA-DQ2.2/α2麦醇溶蛋白肽依赖性Jurkat T细胞活化的抑制作用得到证实。

[1131] 将50微升HBBB2.2细胞($8.0x10^4$细胞/孔)和33聚体麦醇溶蛋白肽(LQLQPFPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF SEQ ID NO:201,1μM)的混合物分布在96孔板。然后加入25微升连续稀释的抗HLA DQ抗体,最后加入25微升α2麦醇溶蛋白限制性TCR转染的αβTCR-KO

Jurkat-NFAT-luc2(2.0x10^{4}细胞/孔)并在37℃,5% CO2孵育过夜。过夜培养后,收获50微升培养的细胞并重新分配到OptiPlate-96(PerkinElmer,6005299)中。然后加入50微升Bio-Glo(Promega,G7491)并在室温孵育10分钟,并使用Envision(PerkinElmer)测量发光,然后使用Office 365MSO的Microsoft(注册商标)Excel(注册商标)和GraphPad Prism软件(GraphPad)进行分析。抗HLA DQ抗体的抑制作用(%)是在将没有抗体的抗原肽不存在下的孔的平均每秒计数(cps)设为100%且在没有抗体的抗原的存在下的孔的cps设为0%时而确定的。使用XLfit Excel add-in软件(IDBS)确定IC50值。

[1132] 如图5-4和表5所示,所有测试的抗HLA DQ抗体(DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2)对HLA-DQ2.2/α2麦醇溶蛋白依赖性Jurkat T细胞活化介导浓度依赖性中和作用,IC50值在低纳克/mL范围内。

[1133] 如图5-3至5-4和表5所示,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2介导了对HLA-DQ2.2/α1麦醇溶蛋白和α2麦醇溶蛋白的浓度依赖性中和作用。

[1134] 如图4-1至5-4和表4、表5所示,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2介导了对所有测试的谷蛋白表位的浓度依赖性中和作用。另外,如表2-7和表4所示,DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2的中和活性分别与DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6的中和活性可比。

[1135] [表5]

[1136]

	IC50 (ng/mL) _ HLA-DQ2.2	
抗体名称	α1a 麦醇溶蛋白 TCR 25 μM 33聚体麦醇溶蛋白	α2 麦醇溶蛋白 TCR 1 μM 33聚体麦醇溶蛋白
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2	1.72	9.48
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2	1.16	6.51
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2	1.62	4.60

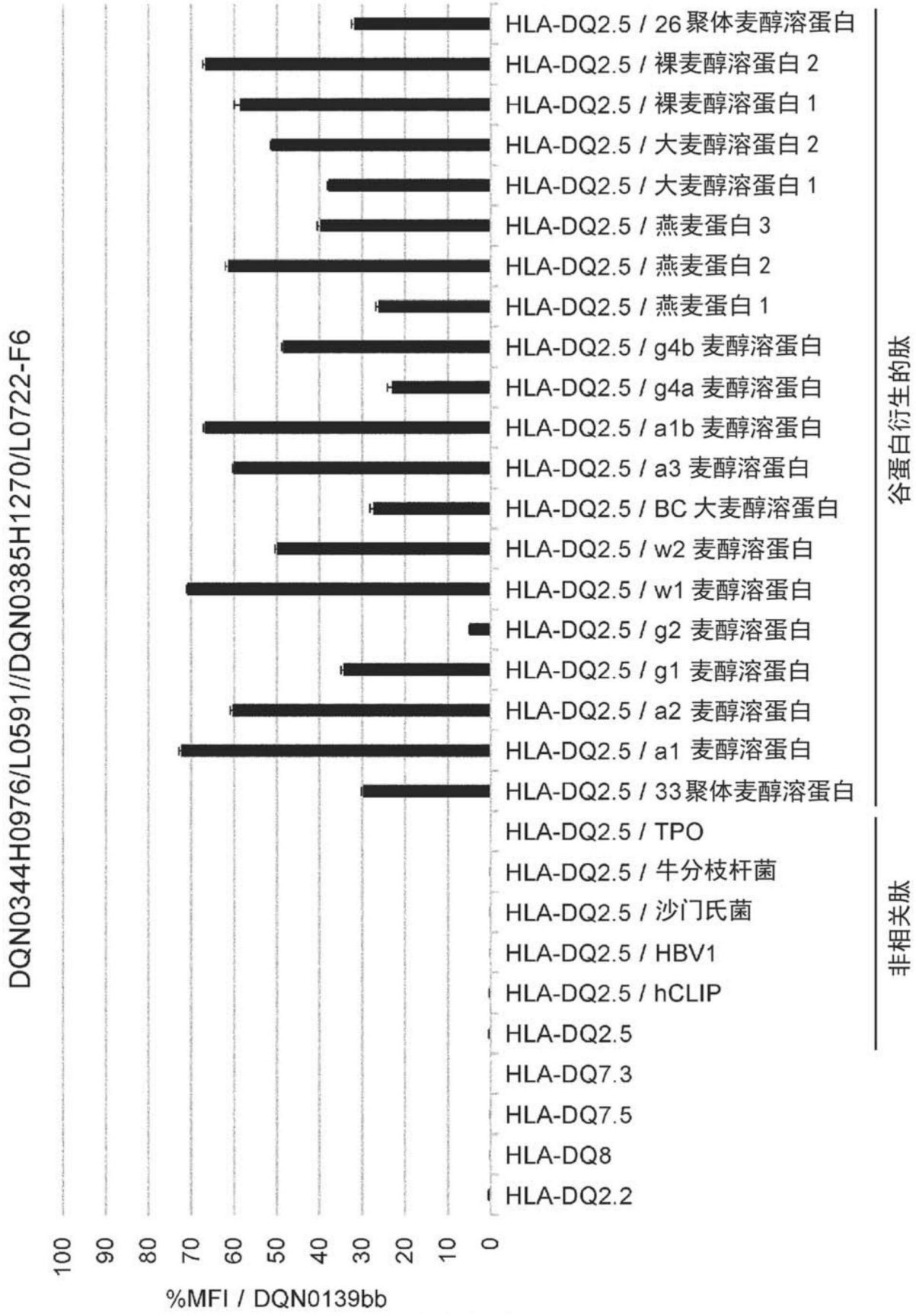

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
HLA-DQ2.5 / 26聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 3
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 1
HLA-DQ2.5 / g4b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g4a 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a3 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / BC 大麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 33聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / TPO
HLA-DQ2.5 / 牛分枝杆菌
HLA-DQ2.5 / 沙门氏菌
HLA-DQ2.5 / HBV1
HLA-DQ2.5 / hCLIP
HLA-DQ2.5
HLA-DQ7.3
HLA-DQ7.5
HLA-DQ8
HLA-DQ2.2
谷蛋白衍生的肽
非相关肽
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
%MFI / DQN0139bb

图1-1

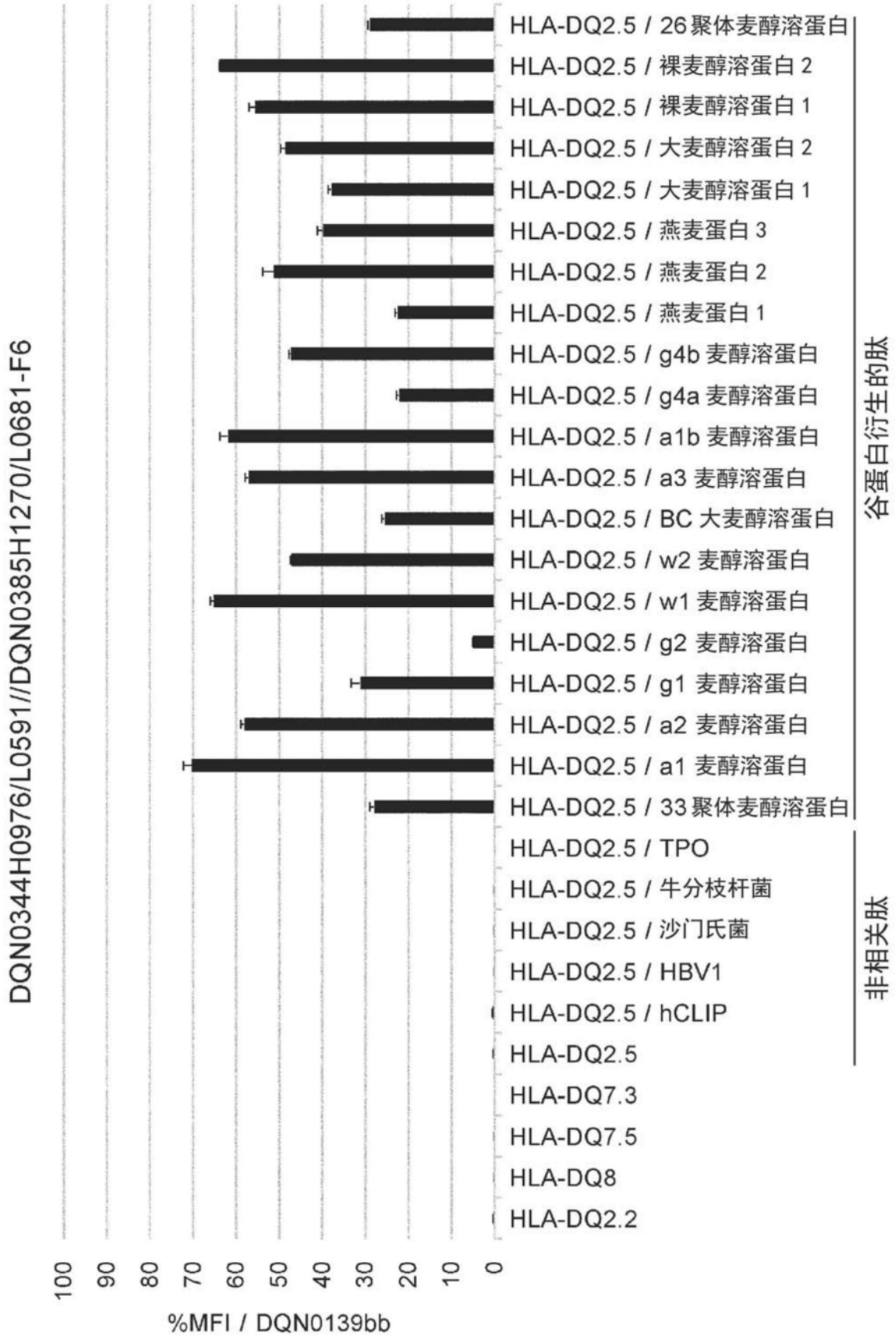

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
HLA-DQ2.5 / 26聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 3
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 1
HLA-DQ2.5 / g4b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g4a 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a3 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / BC 大麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 33聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / TPO
HLA-DQ2.5 / 牛分枝杆菌
HLA-DQ2.5 / 沙门氏菌
HLA-DQ2.5 / HBV1
HLA-DQ2.5 / hCLIP
HLA-DQ2.5
HLA-DQ7.3
HLA-DQ7.5
HLA-DQ8
HLA-DQ2.2
谷蛋白衍生的肽
非相关肽
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
%MFI / DQN0139bb

图1-2

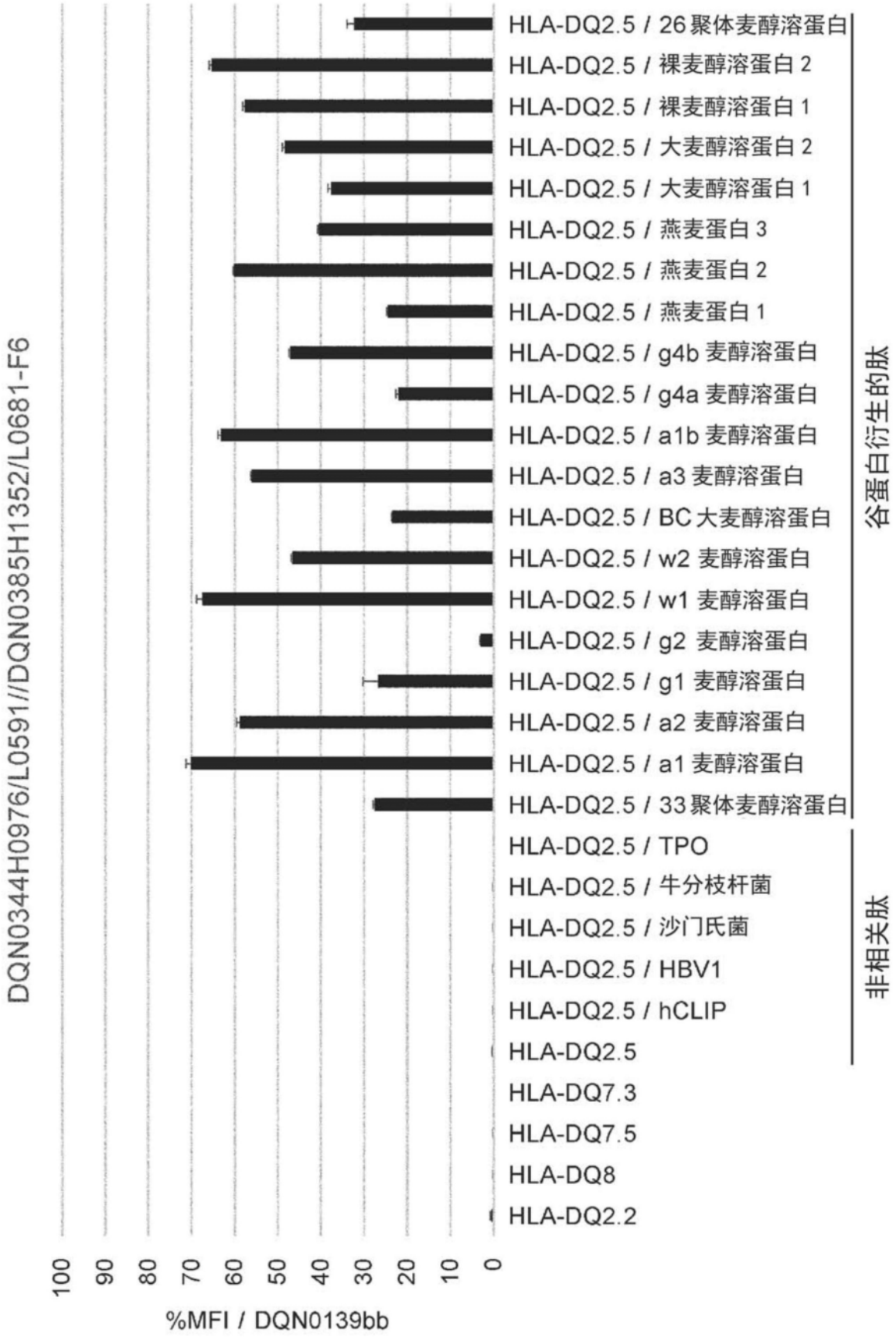

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
HLA-DQ2.5 / 26聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 3
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 1
HLA-DQ2.5 / g4b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g4a 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a3 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / BC 大麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 33聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / TPO
HLA-DQ2.5 / 牛分枝杆菌
HLA-DQ2.5 / 沙门氏菌
HLA-DQ2.5 / HBV1
HLA-DQ2.5 / hCLIP
HLA-DQ2.5
HLA-DQ7.3
HLA-DQ7.5
HLA-DQ8
HLA-DQ2.2
谷蛋白衍生的肽
非相关肽
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
%MFI / DQN0139bb

图1-3

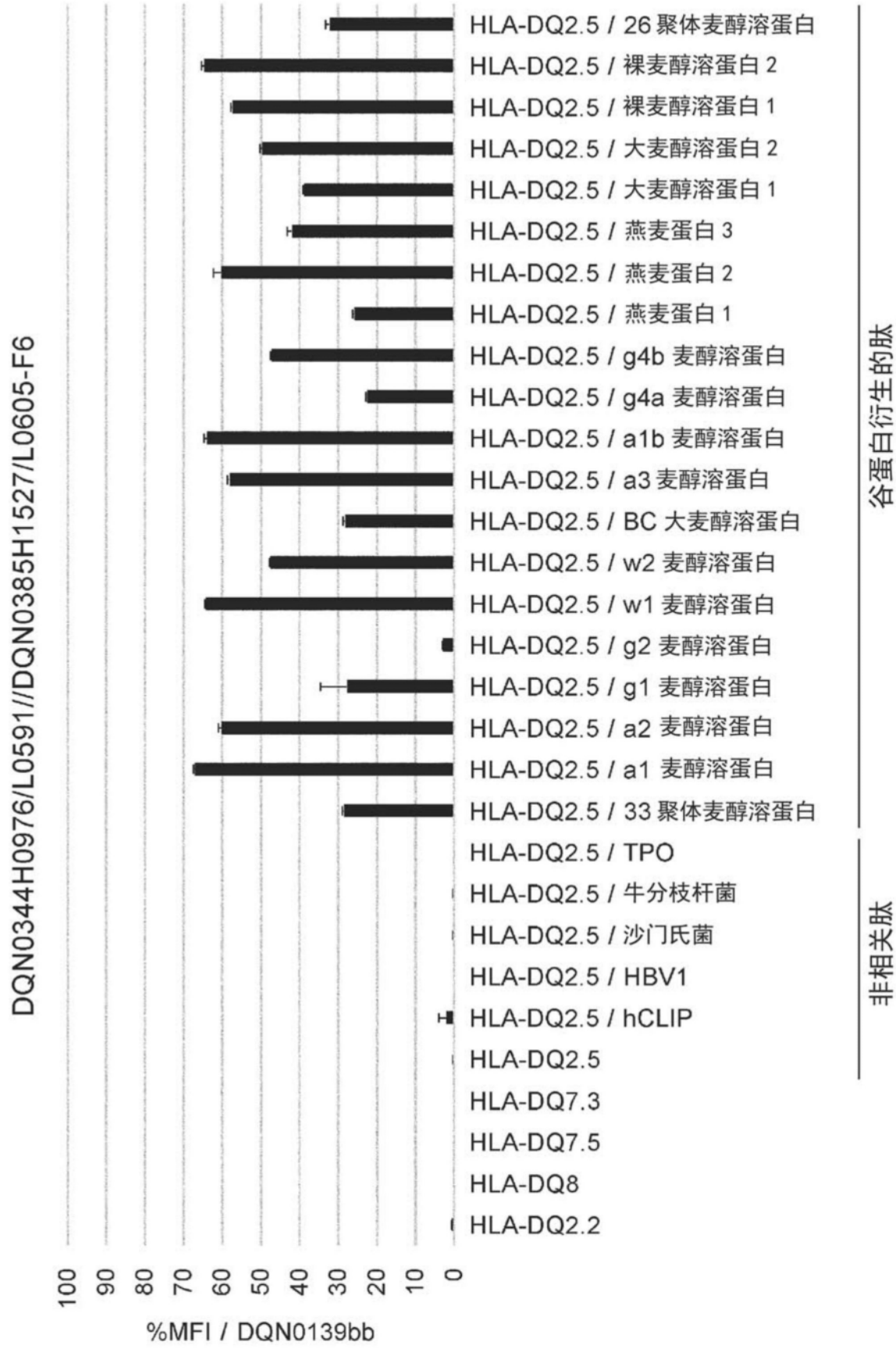

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
HLA-DQ2.5 / 26 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 3
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 1
HLA-DQ2.5 / g4b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g4a 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a3 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / BC 大麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 33 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / TPO
HLA-DQ2.5 / 牛分枝杆菌
HLA-DQ2.5 / 沙门氏菌
HLA-DQ2.5 / HBV1
HLA-DQ2.5 / hCLIP
HLA-DQ2.5
HLA-DQ7.3
HLA-DQ7.5
HLA-DQ8
HLA-DQ2.2
谷蛋白衍生的肽
非相关肽
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
%MFI / DQN0139bb

图1-4

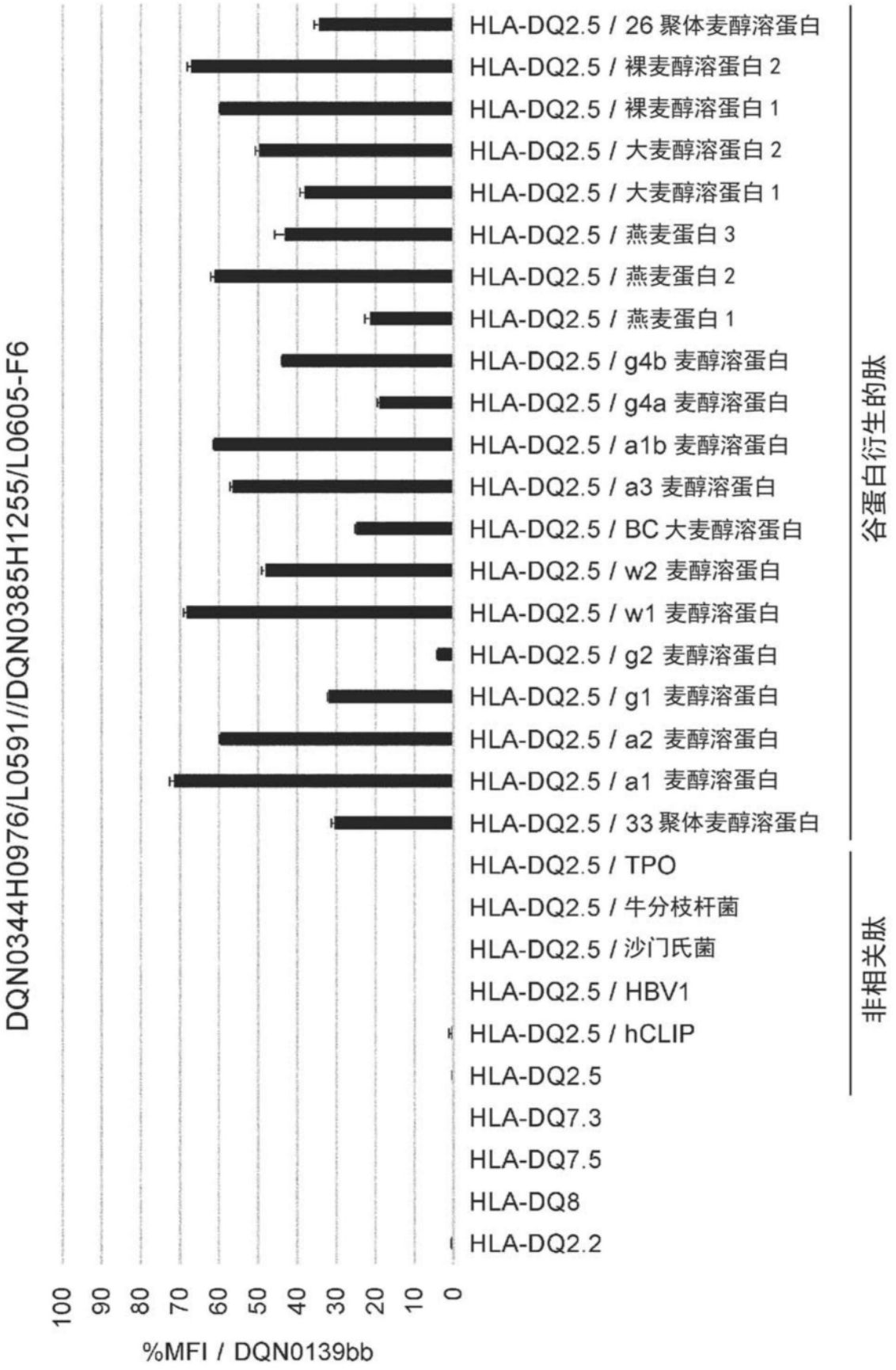

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
HLA-DQ2.5 / 26 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 3
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 1
HLA-DQ2.5 / g4b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g4a 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a3 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / BC 大麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 33 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / TPO
HLA-DQ2.5 / 牛分枝杆菌
HLA-DQ2.5 / 沙门氏菌
HLA-DQ2.5 / HBV1
HLA-DQ2.5 / hCLIP
HLA-DQ2.5
HLA-DQ7.3
HLA-DQ7.5
HLA-DQ8
HLA-DQ2.2
谷蛋白衍生的肽
非相关肽
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
%MFI / DQN0139bb

图1-5

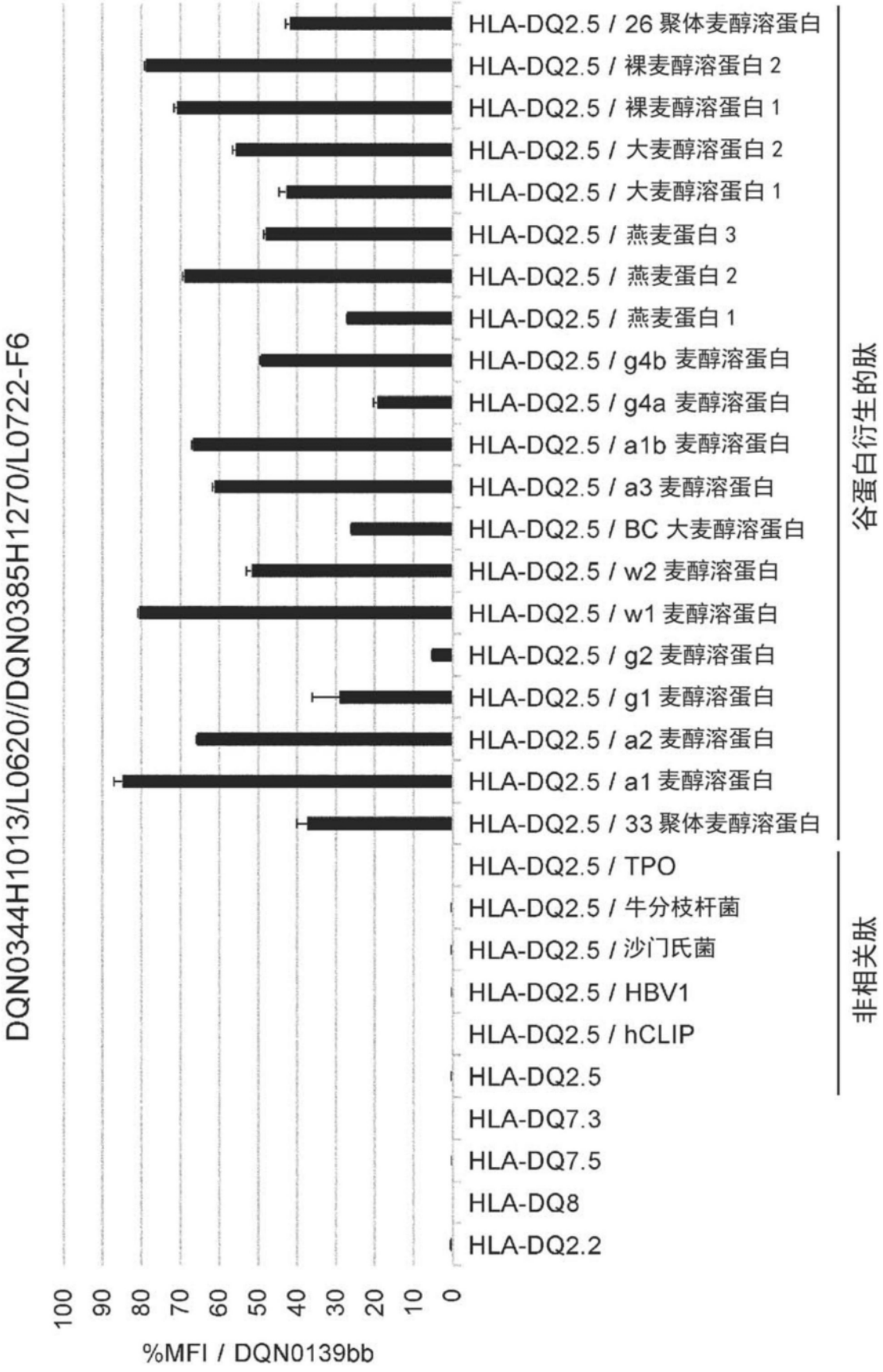

DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
HLA-DQ2.5 / 26 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 3
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 1
HLA-DQ2.5 / g4b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g4a 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a3 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / BC 大麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 33 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / TPO
HLA-DQ2.5 / 牛分枝杆菌
HLA-DQ2.5 / 沙门氏菌
HLA-DQ2.5 / HBV1
HLA-DQ2.5 / hCLIP
HLA-DQ2.5
HLA-DQ7.3
HLA-DQ7.5
HLA-DQ8
HLA-DQ2.2
谷蛋白衍生的肽
非相关肽
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
%MFI / DQN0139bb

图1-6

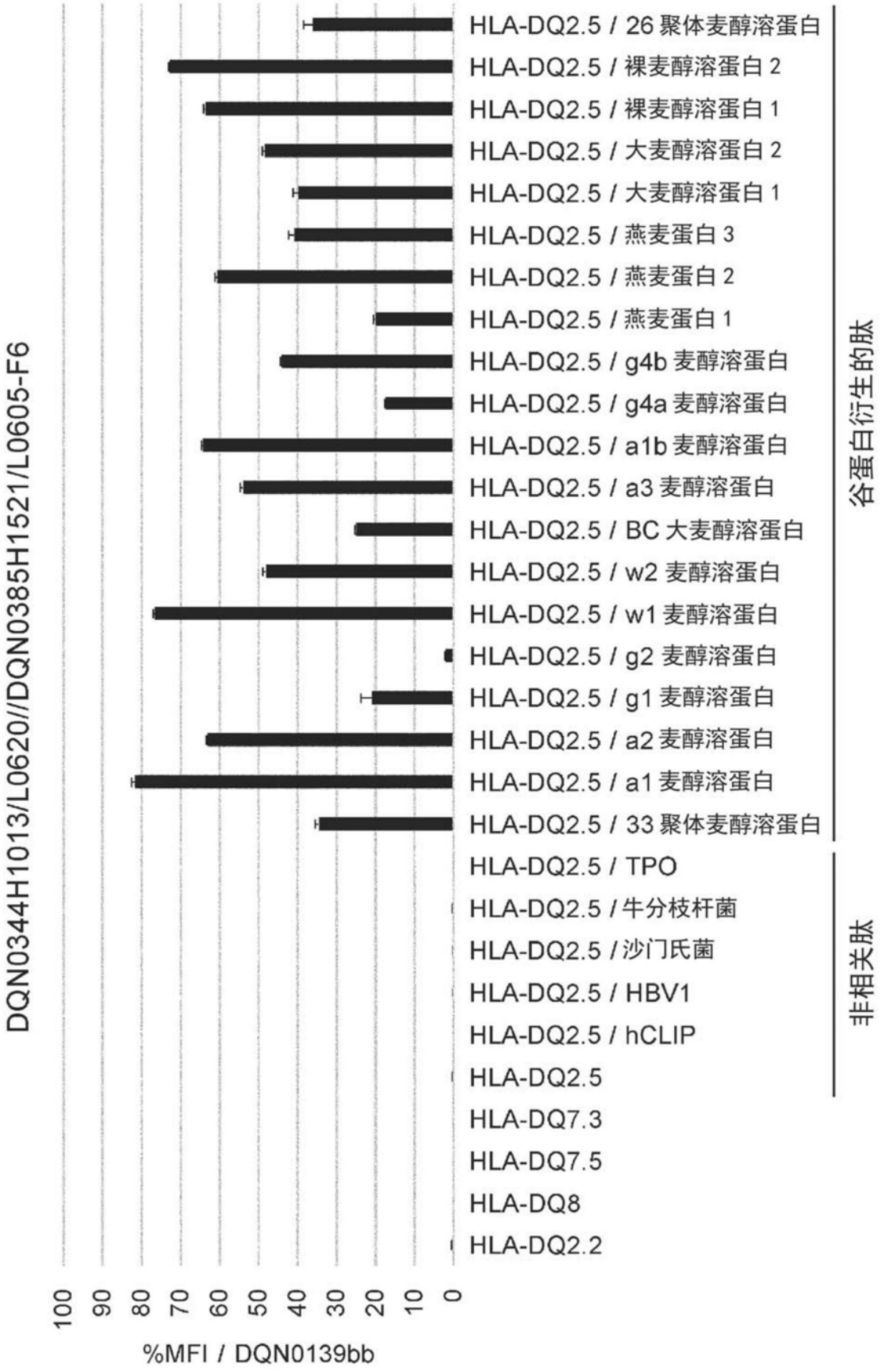

DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
HLA-DQ2.5 / 26 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 3
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 1
HLA-DQ2.5 / g4b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g4a 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a3 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / BC 大麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 33 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / TPO
HLA-DQ2.5 / 牛分枝杆菌
HLA-DQ2.5 / 沙门氏菌
HLA-DQ2.5 / HBV1
HLA-DQ2.5 / hCLIP
HLA-DQ2.5
HLA-DQ7.3
HLA-DQ7.5
HLA-DQ8
HLA-DQ2.2
谷蛋白衍生的肽
非相关肽
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
%MFI / DQN0139bb

图1-7

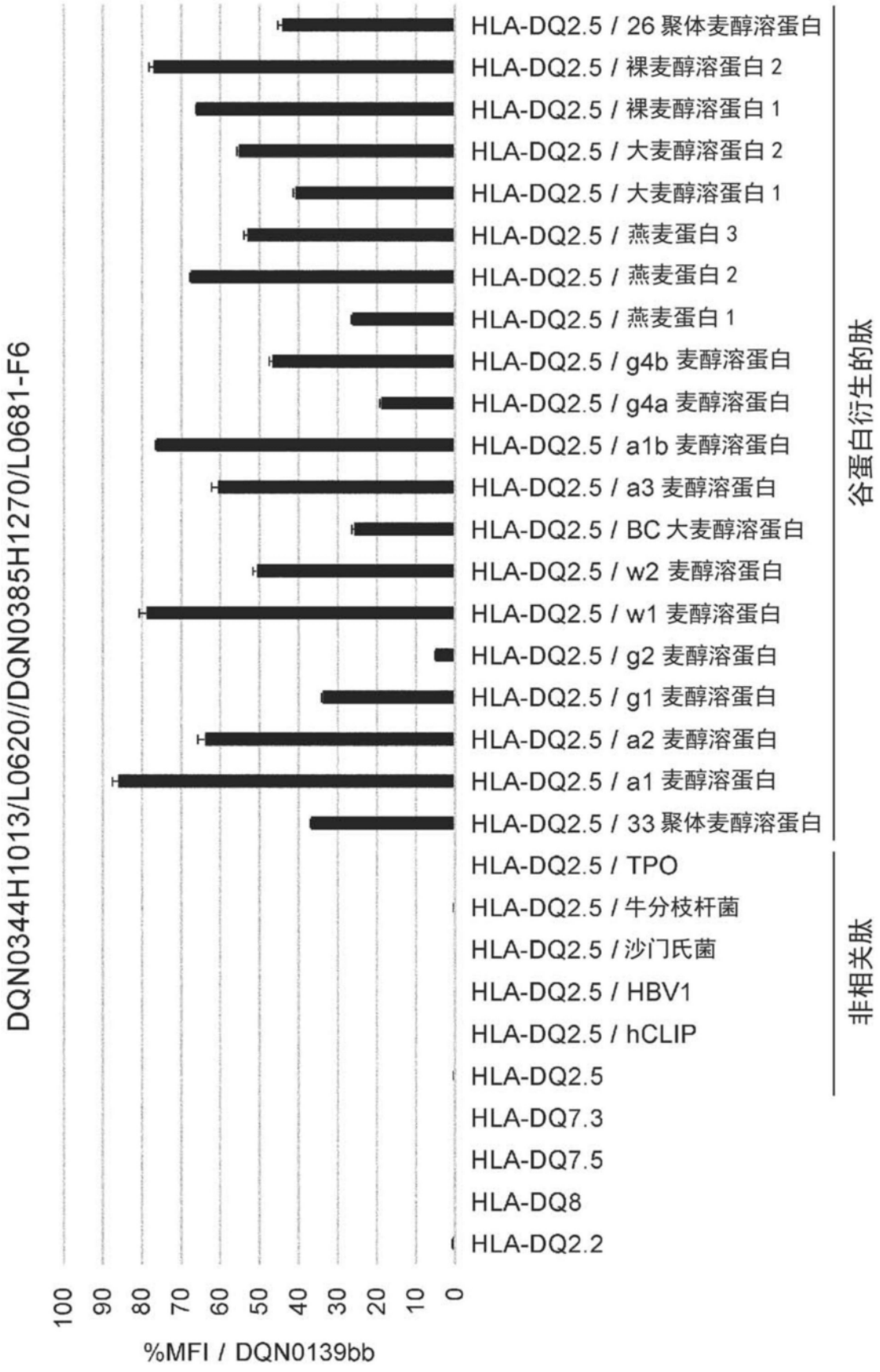

DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
HLA-DQ2.5 / 26 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 3
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 1
HLA-DQ2.5 / g4b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g4a 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a3 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / BC 大麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 33 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / TPO
HLA-DQ2.5 / 牛分枝杆菌
HLA-DQ2.5 / 沙门氏菌
HLA-DQ2.5 / HBV1
HLA-DQ2.5 / hCLIP
HLA-DQ2.5
HLA-DQ7.3
HLA-DQ7.5
HLA-DQ8
HLA-DQ2.2
谷蛋白衍生的肽
非相关肽
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
%MFI / DQN0139bb

图1-8

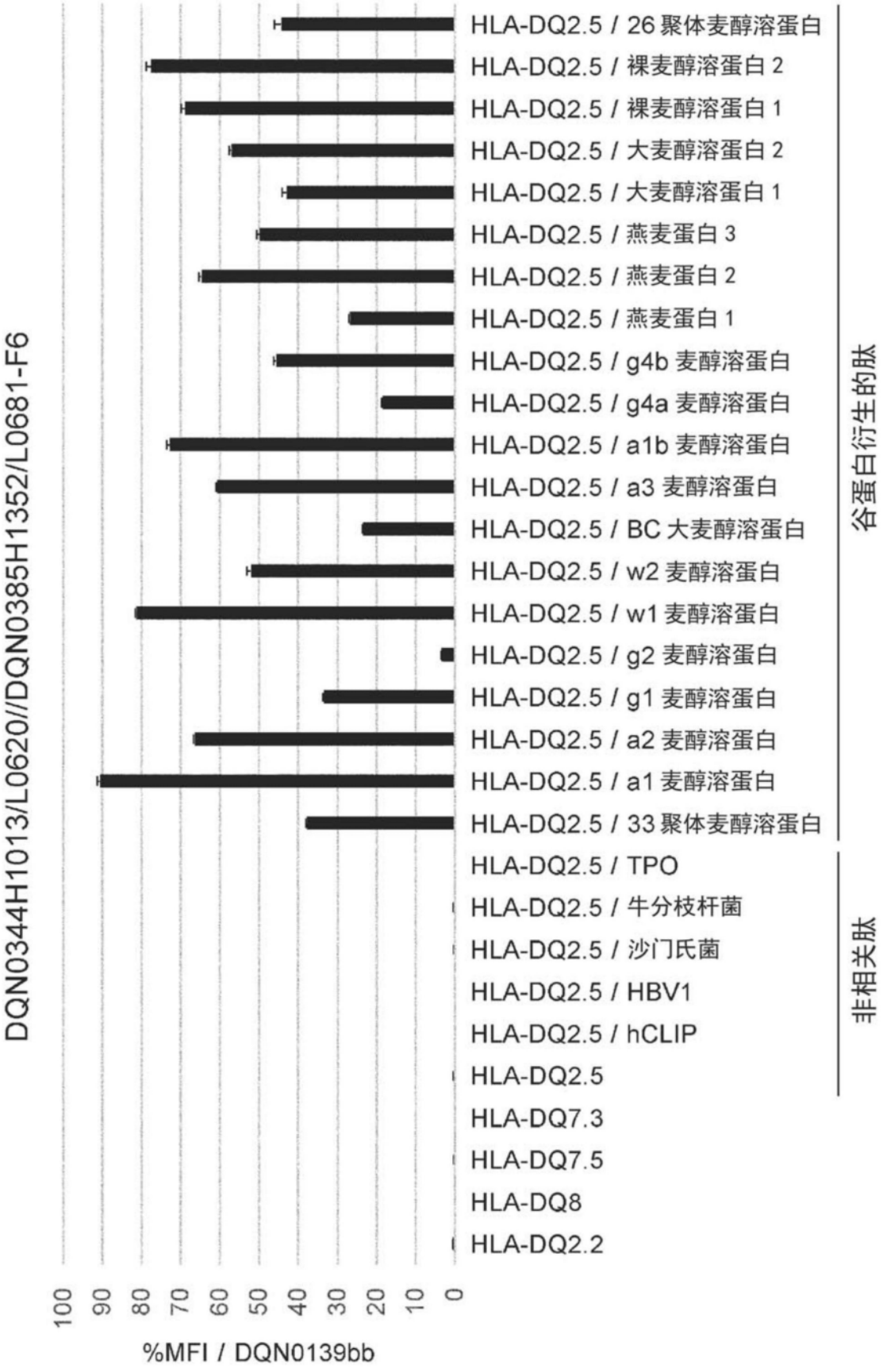

DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
HLA-DQ2.5 / 26 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 3
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 1
HLA-DQ2.5 / g4b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g4a 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a3 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / BC 大麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 33 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / TPO
HLA-DQ2.5 / 牛分枝杆菌
HLA-DQ2.5 / 沙门氏菌
HLA-DQ2.5 / HBV1
HLA-DQ2.5 / hCLIP
HLA-DQ2.5
HLA-DQ7.3
HLA-DQ7.5
HLA-DQ8
HLA-DQ2.2
谷蛋白衍生的肽
非相关肽
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
%MFI / DQN0139bb

图1-9

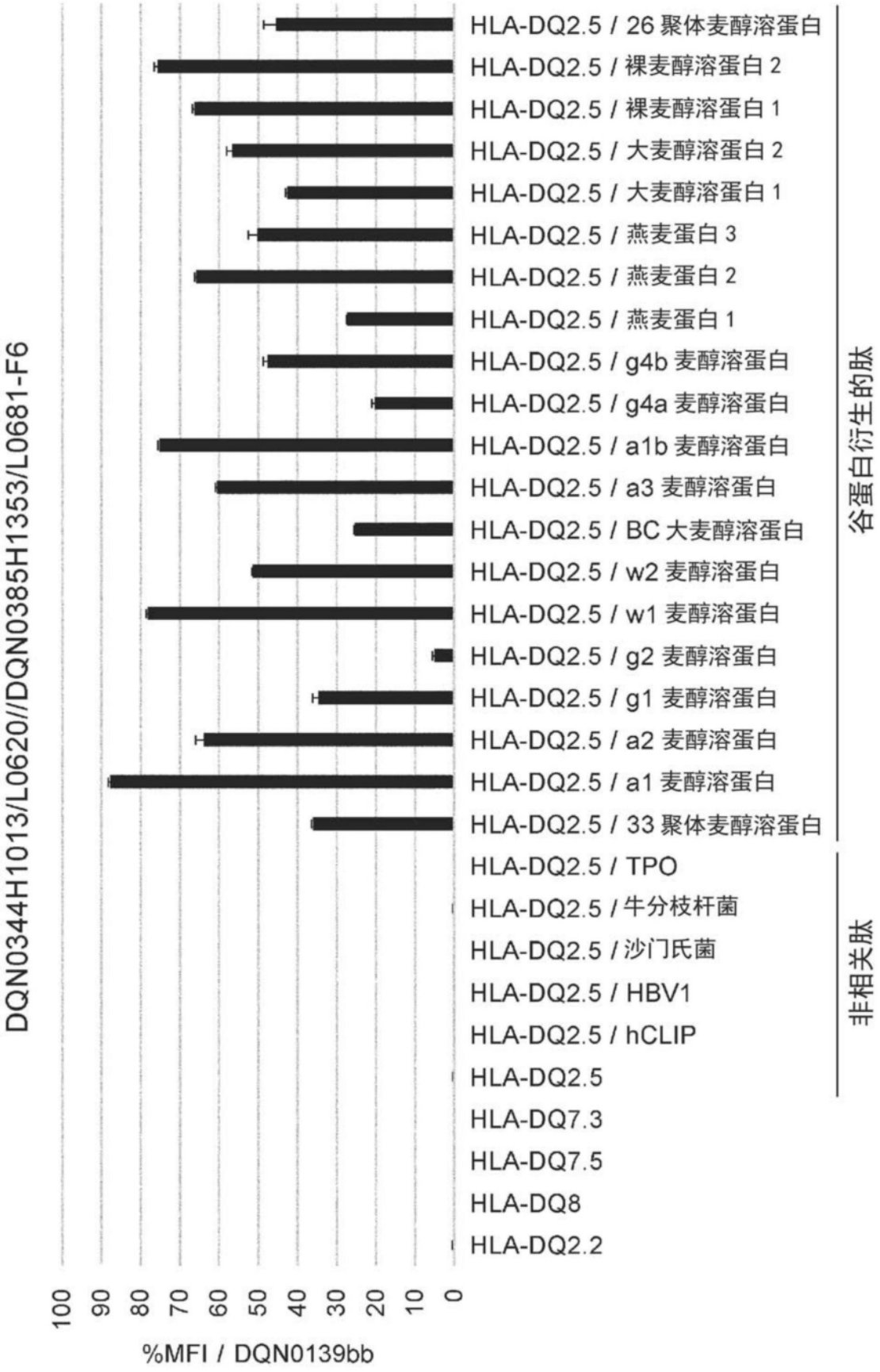

DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
HLA-DQ2.5 / 26 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 3
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 1
HLA-DQ2.5 / g4b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g4a 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a3 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / BC 大麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 33 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / TPO
HLA-DQ2.5 / 牛分枝杆菌
HLA-DQ2.5 / 沙门氏菌
HLA-DQ2.5 / HBV1
HLA-DQ2.5 / hCLIP
HLA-DQ2.5
HLA-DQ7.3
HLA-DQ7.5
HLA-DQ8
HLA-DQ2.2
谷蛋白衍生的肽
非相关肽
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
%MFI / DQN0139bb

图1-10

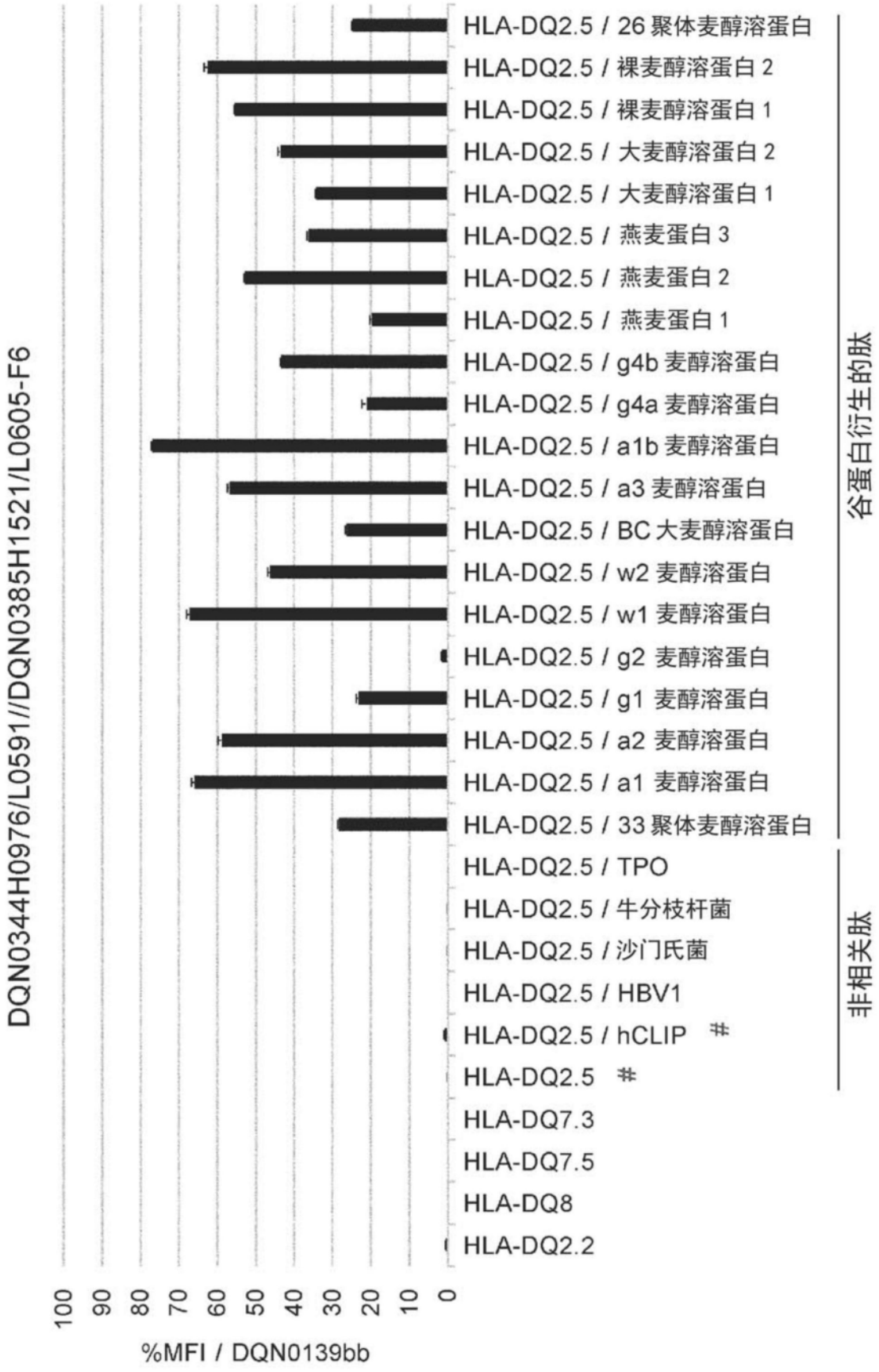

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1521/L0605-F6
HLA-DQ2.5 / 26 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 3
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 1
HLA-DQ2.5 / g4b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g4a 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a3 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / BC 大麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 33 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / TPO
HLA-DQ2.5 / 牛分枝杆菌
HLA-DQ2.5 / 沙门氏菌
HLA-DQ2.5 / HBV1
HLA-DQ2.5 / hCLIP #
HLA-DQ2.5 #
HLA-DQ7.3
HLA-DQ7.5
HLA-DQ8
HLA-DQ2.2
谷蛋白衍生的肽
非相关肽
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
%MFI / DQN0139bb

图1-11

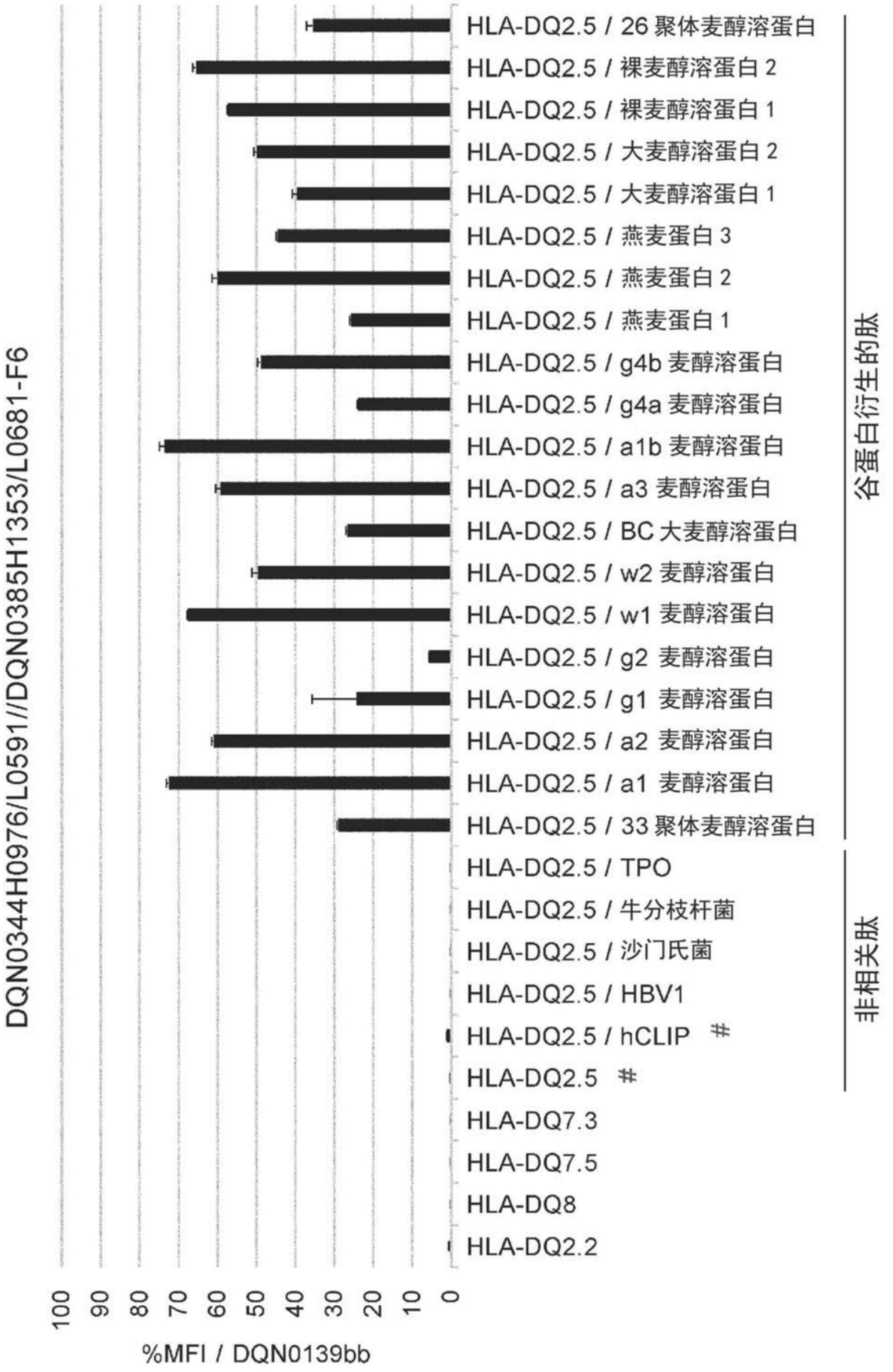

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1353/L0681-F6
HLA-DQ2.5 / 26 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 3
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 1
HLA-DQ2.5 / g4b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g4a 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a3 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / BC 大麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 33 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / TPO
HLA-DQ2.5 / 牛分枝杆菌
HLA-DQ2.5 / 沙门氏菌
HLA-DQ2.5 / HBV1
HLA-DQ2.5 / hCLIP #
HLA-DQ2.5 #
HLA-DQ7.3
HLA-DQ7.5
HLA-DQ8
HLA-DQ2.2
谷蛋白衍生的肽
非相关肽
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
%MFI / DQN0139bb

图1-12

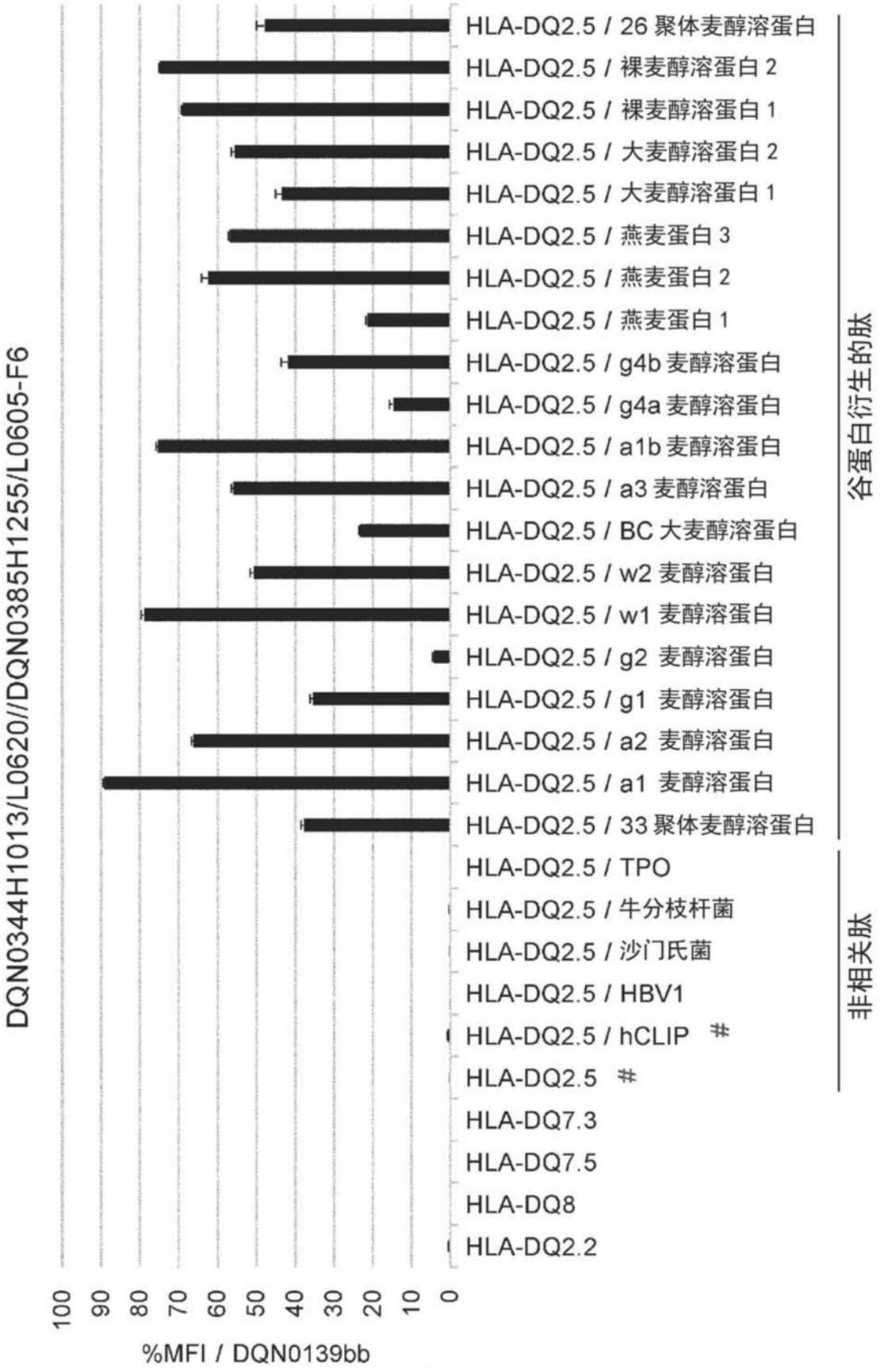

DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1255/L0605-F6
HLA-DQ2.5 / 26 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 3
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 1
HLA-DQ2.5 / g4b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g4a 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a3 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / BC 大麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 33 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / TPO
HLA-DQ2.5 / 牛分枝杆菌
HLA-DQ2.5 / 沙门氏菌
HLA-DQ2.5 / HBV1
HLA-DQ2.5 / hCLIP #
HLA-DQ2.5 #
HLA-DQ7.3
HLA-DQ7.5
HLA-DQ8
HLA-DQ2.2
谷蛋白衍生的肽
非相关肽
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
%MFI / DQN0139bb

图1-13

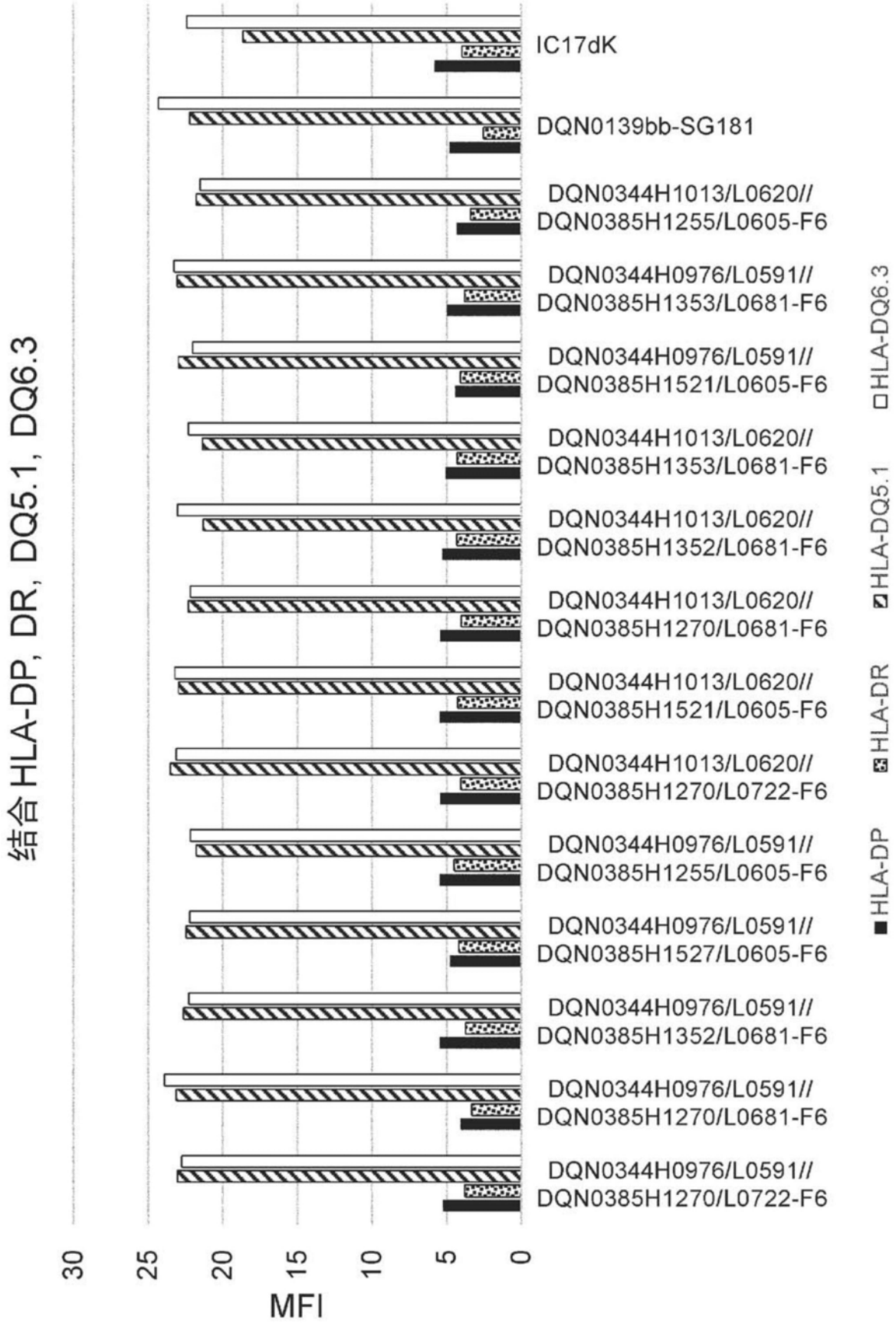

结合HLA-DP, DR, DQ5.1, DQ6.3
MFI
30
25
20
15
10
5
0
IC17dK
DQN0139bb-SG181
DQN0344H1013/L0620//
DQN0385H1255/L0605-F6
DQN0344H0976/L0591//
DQN0385H1353/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//
DQN0385H1521/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//
DQN0385H1353/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//
DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//
DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//
DQN0385H1521/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//
DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H0976/L0591//
DQN0385H1255/L0605-F6
DQN0344H0976/L0591//
DQN0385H1527/L0605-F6
DQN0344H0976/L0591//
DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//
DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//
DQN0385H1270/L0722-F6
HLA-DP
HLA-DR
HLA-DQ5.1
HLA-DQ6.3

图1-14

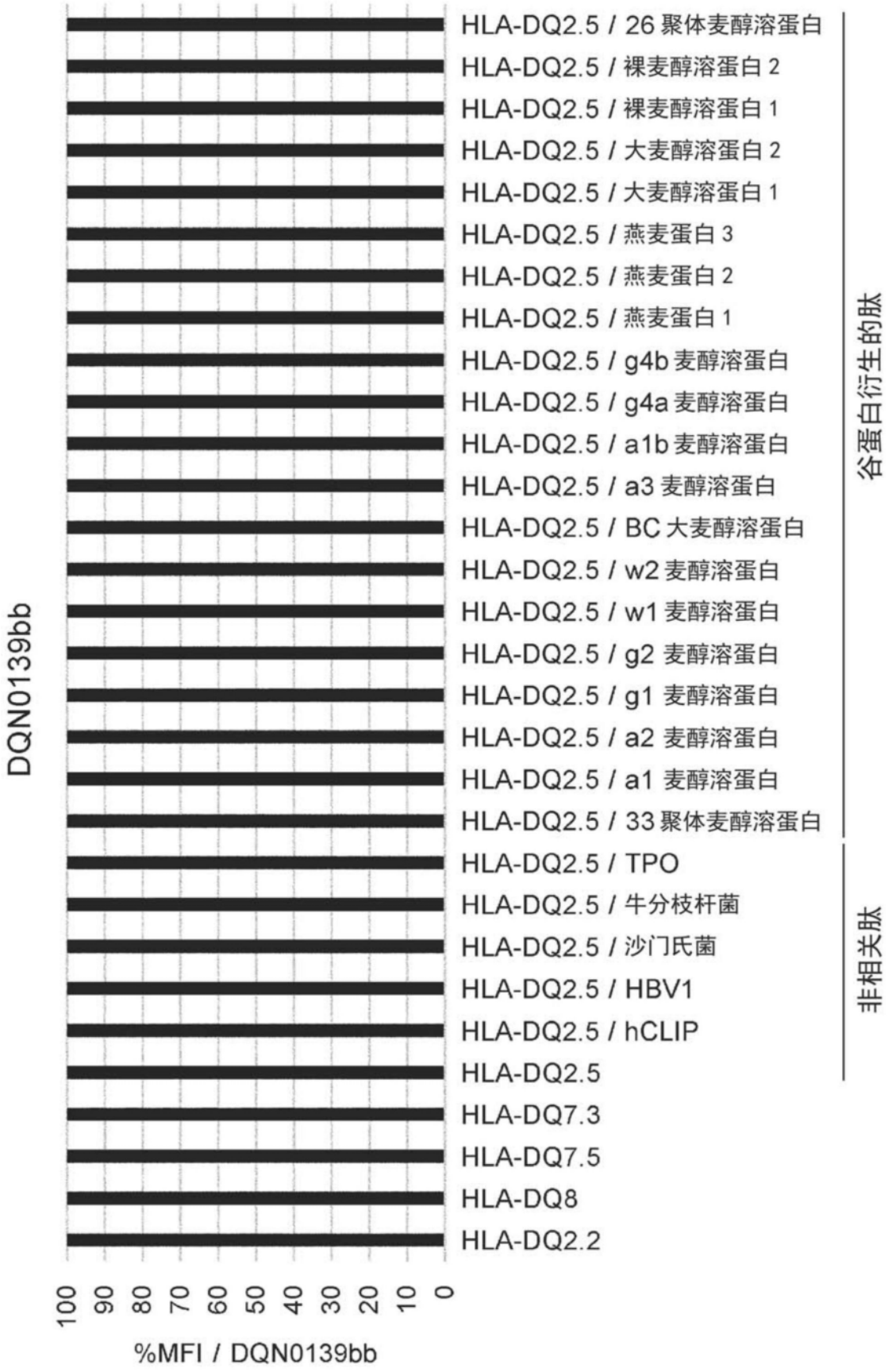

DQN0139bb
HLA-DQ2.5 / 26 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 3
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 1
HLA-DQ2.5 / g4b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g4a 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a3 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / BC 大麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 33 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / TPO
HLA-DQ2.5 / 牛分枝杆菌
HLA-DQ2.5 / 沙门氏菌
HLA-DQ2.5 / HBV1
HLA-DQ2.5 / hCLIP
HLA-DQ2.5
HLA-DQ7.3
HLA-DQ7.5
HLA-DQ8
HLA-DQ2.2
谷蛋白衍生的肽
非相关肽
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
%MFI / DQN0139bb

图1-15

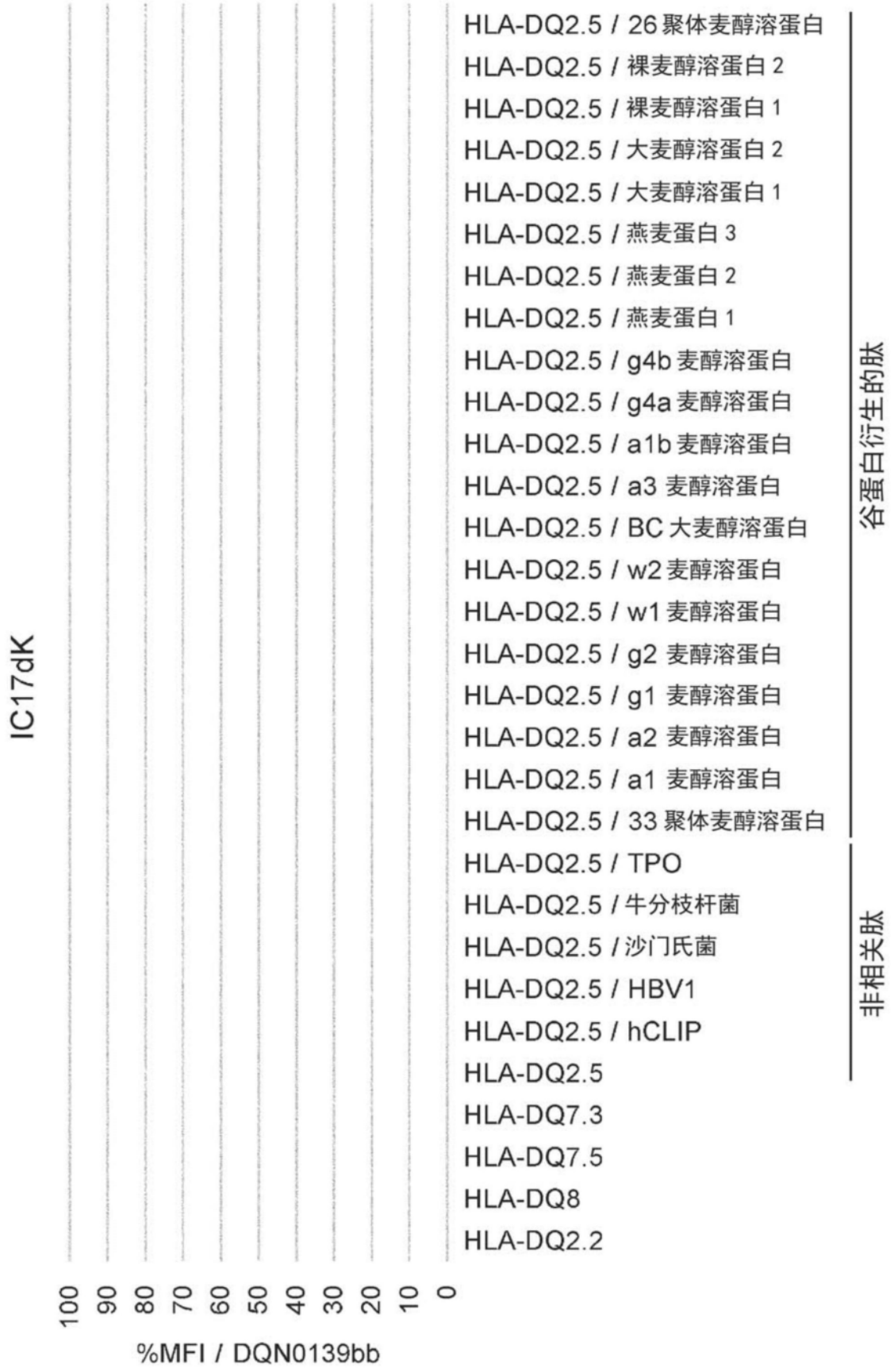

IC17dK
HLA-DQ2.5 / 26聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 裸麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 大麦醇溶蛋白 1
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 3
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 2
HLA-DQ2.5 / 燕麦蛋白 1
HLA-DQ2.5 / g4b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g4a 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1b 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a3 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / BC 大麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / w1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / g1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a2 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / a1 麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / 33 聚体麦醇溶蛋白
HLA-DQ2.5 / TPO
HLA-DQ2.5 / 牛分枝杆菌
HLA-DQ2.5 / 沙门氏菌
HLA-DQ2.5 / HBV1
HLA-DQ2.5 / hCLIP
HLA-DQ2.5
HLA-DQ7.3
HLA-DQ7.5
HLA-DQ8
HLA-DQ2.2
谷蛋白衍生的肽
非相关肽
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
%MFI / DQN0139bb

图1-16


IC17dk
DQN0139bb-SG181
DQN0344H1013/L0620//
DQN0385H1255/L0605-F6
#
DQN0344H0976/L0591//
DQN0385H1353/L0681-F6
#
DQN0344H0976/L0591//
DQN0385H1521/L0605-F6
#
DQN0344H1013/L0620//
DQN0385H1353/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//
DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//
DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//
DQN0385H1521/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//
DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H0976/L0591//
DQN0385H1255/L0605-F6
DQN0344H0976/L0591//
DQN0385H1527/L0605-F6
DQN0344H0976/L0591//
DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//
DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//
DQN0385H1270/L0722-F6
抗体结合 PBMC 衍生的 CD19+ B 细胞
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
%MFI / DQN0139bb

图2

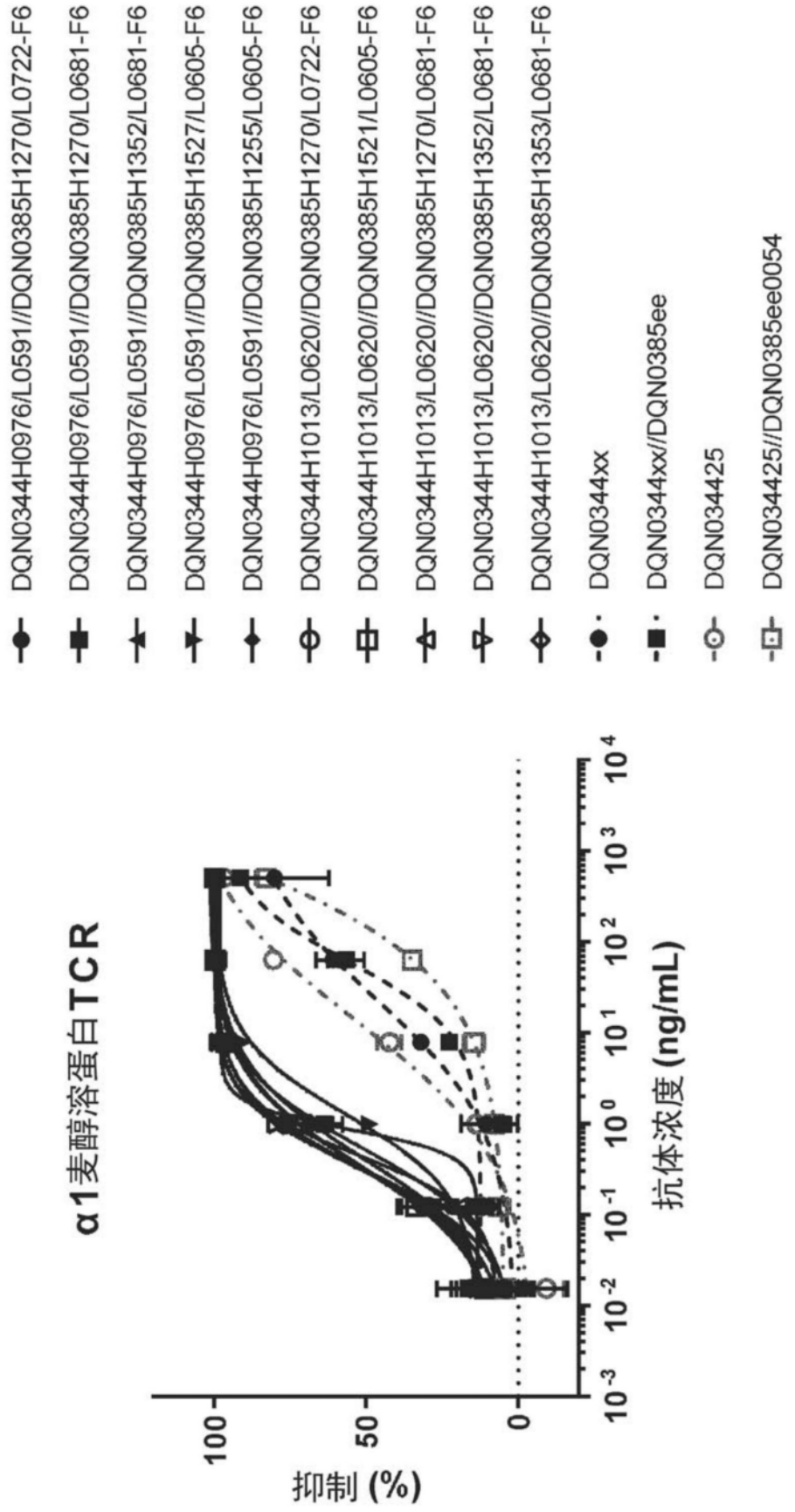

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
DQN0344xx
DQN0344xx//DQN0385ee
DQN034425
DQN034425//DQN0385ee0054
α1麦醇溶蛋白TCR
100
50
0
抑制 (%)
10-3 10-2 10-1 100 101 102 103 104
抗体浓度 (ng/mL)

图3-1

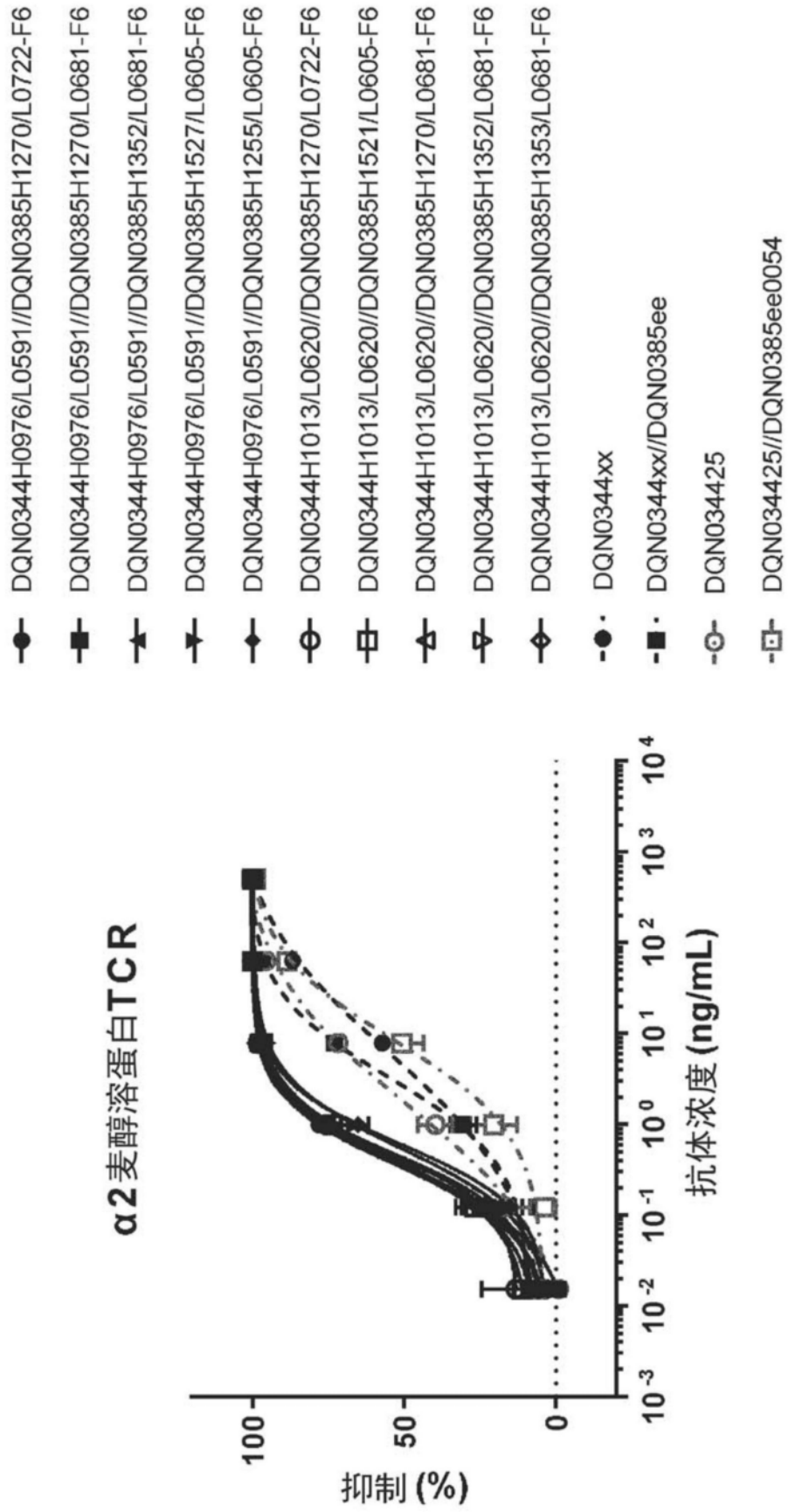

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
DQN0344xx
DQN0344xx//DQN0385ee
DQN034425
DQN034425//DQN0385ee0054
α2麦醇溶蛋白TCR
抑制 (%)
100
50
0
10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3} 10^{4}
抗体浓度 (ng/mL)

图3-2

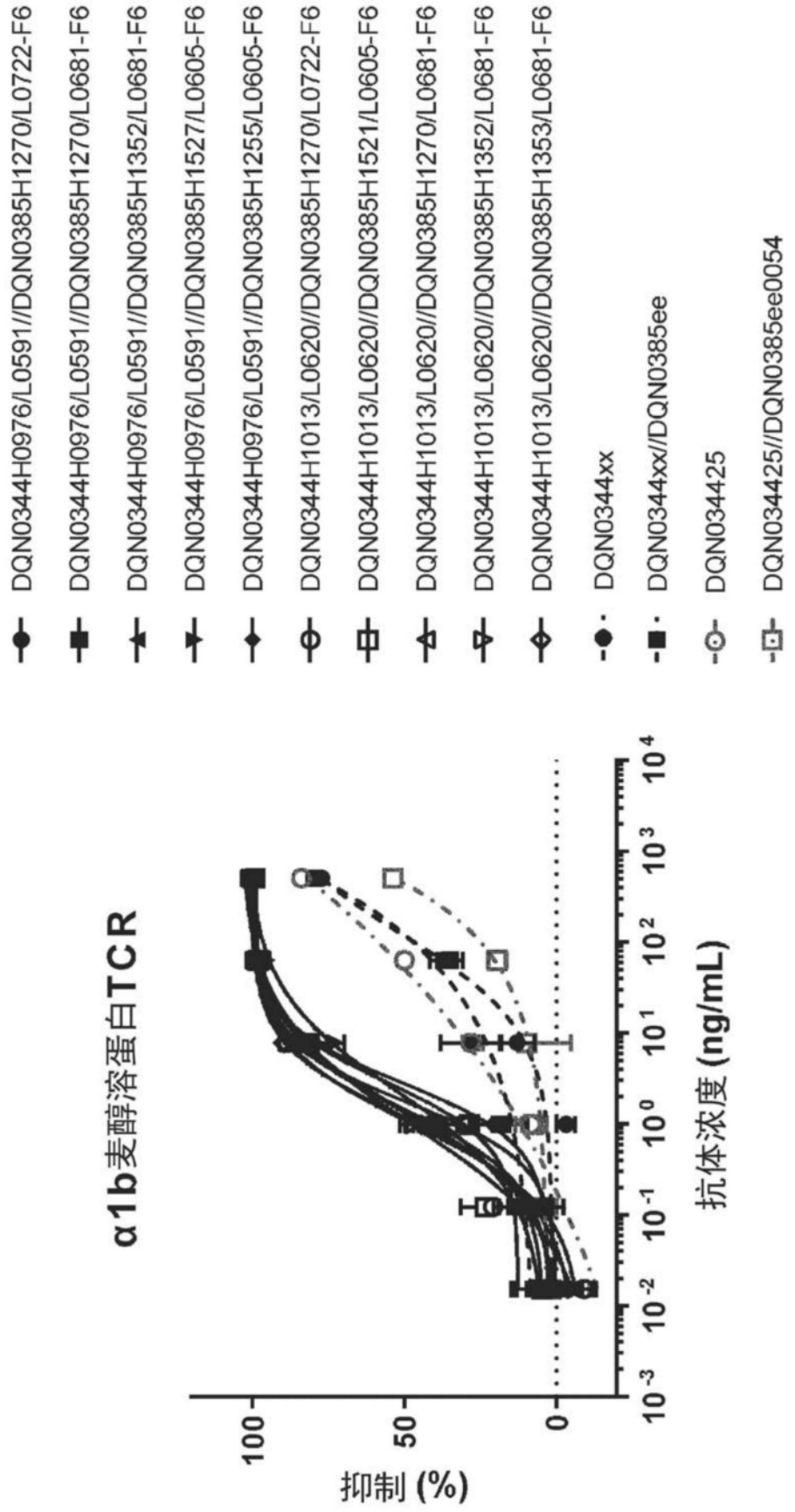

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
DQN0344xx
DQN0344xx//DQN0385ee
DQN034425
DQN034425//DQN0385ee0054
α1b麦醇溶蛋白TCR
抑制 (%)
100
50
0
10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3} 10^{4}
抗体浓度 (ng/mL)

图3-3

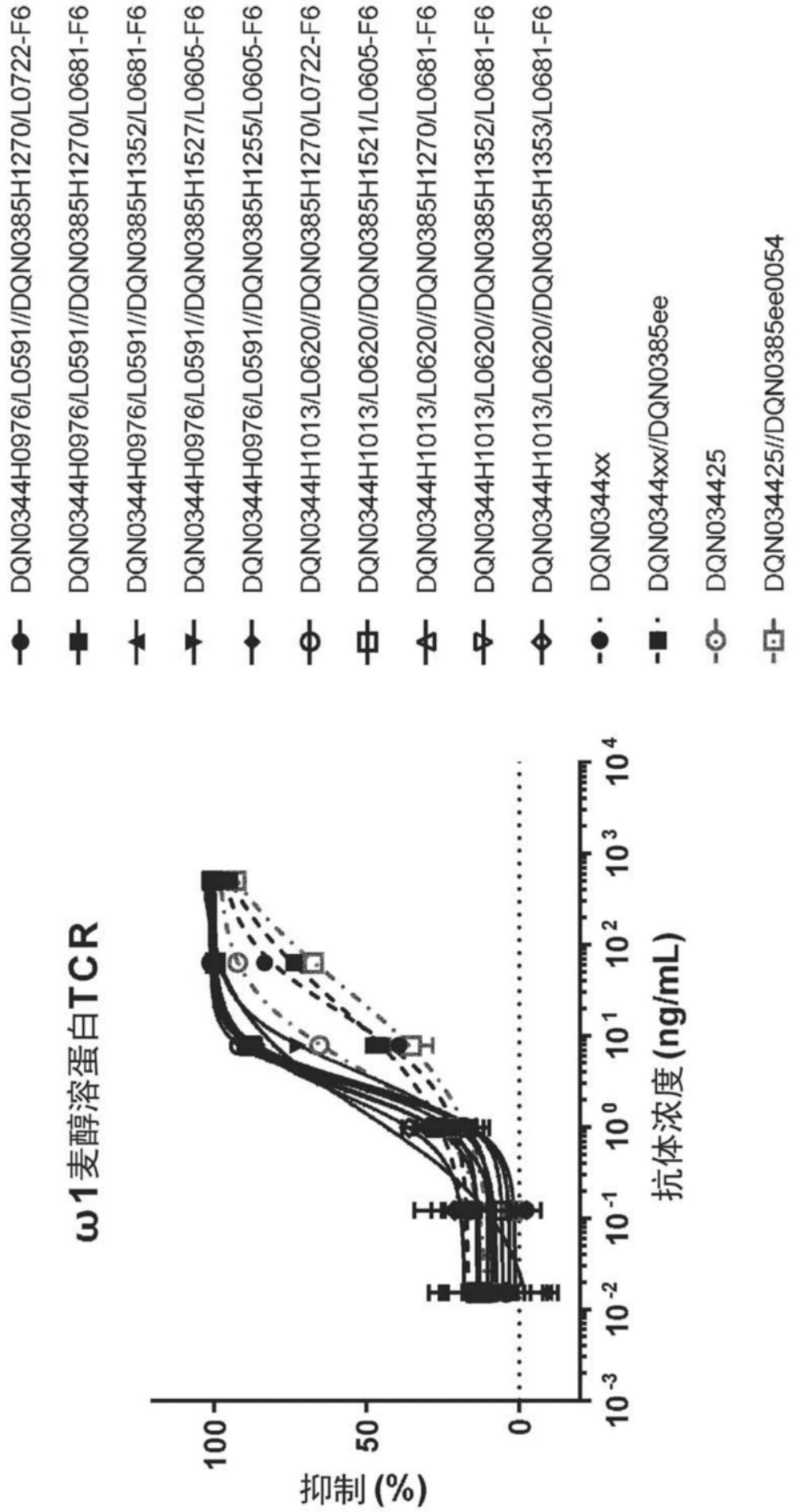

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
DQN0344xx
DQN0344xx//DQN0385ee
DQN034425
DQN034425//DQN0385ee0054
ω1麦醇溶蛋白TCR
抑制 (%)
100
50
0
10-3 10-2 10-1 100 101 102 103 104
抗体浓度 (ng/mL)

图3-4

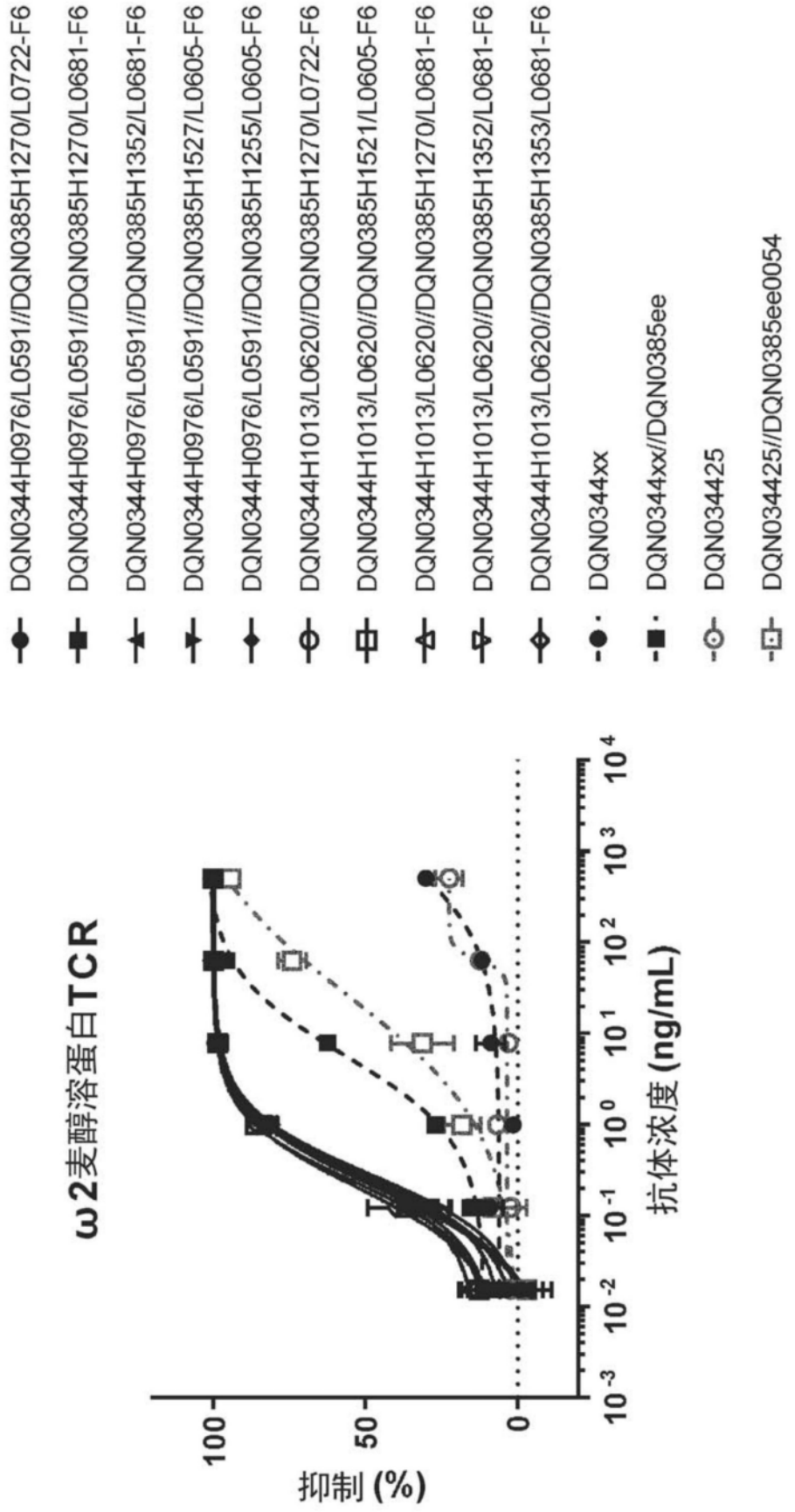

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
DQN0344xx
DQN0344xx//DQN0385ee
DQN034425
DQN034425//DQN0385ee0054
ω2麦醇溶蛋白TCR
100
50
0
抑制 (%)
10-3 10-2 10-1 100 101 102 103 104
抗体浓度 (ng/mL)

图3-5

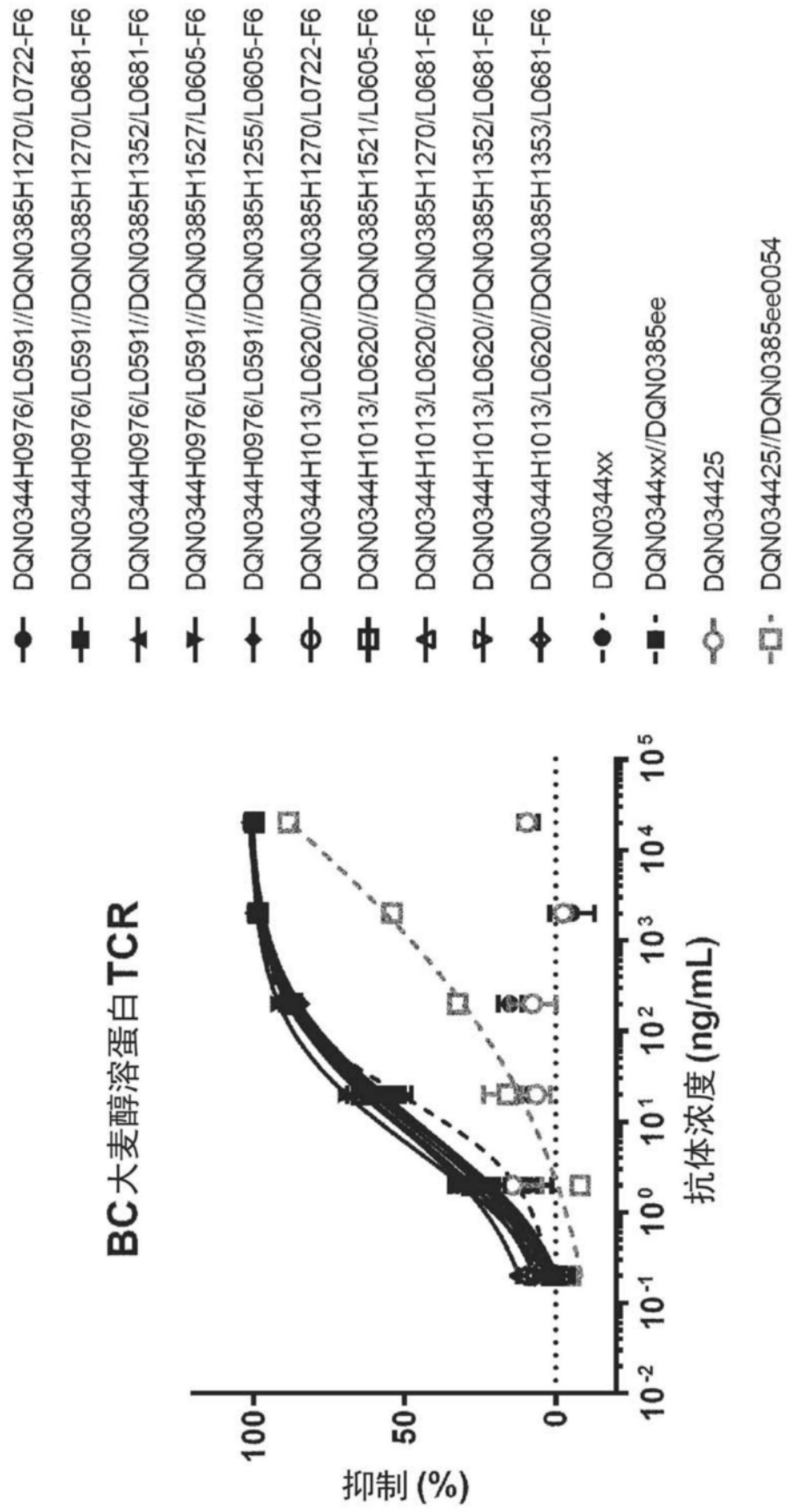

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
DQN0344xx
DQN0344xx//DQN0385ee
DQN034425
DQN034425//DQN0385ee0054
BC大麦醇溶蛋白TCR
抑制 (%)
100
50
0
10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3} 10^{4} 10^{5}
抗体浓度 (ng/mL)

图3-6

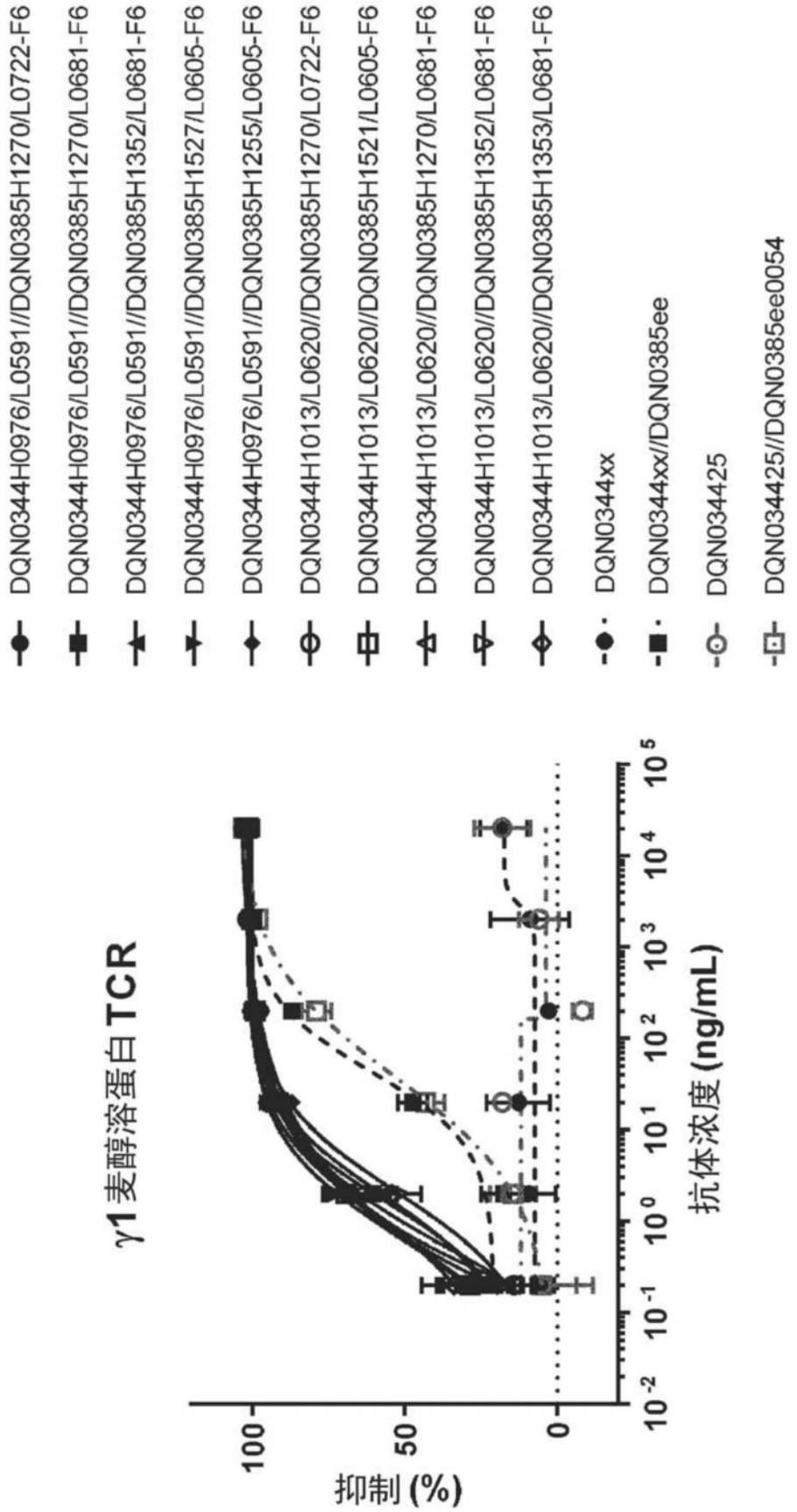

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
DQN0344xx
DQN0344xx//DQN0385ee
DQN034425
DQN034425//DQN0385ee0054
γ1麦醇溶蛋白TCR
抑制 (%)
100
50
0
10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3} 10^{4} 10^{5}
抗体浓度 (ng/mL)

图3-7

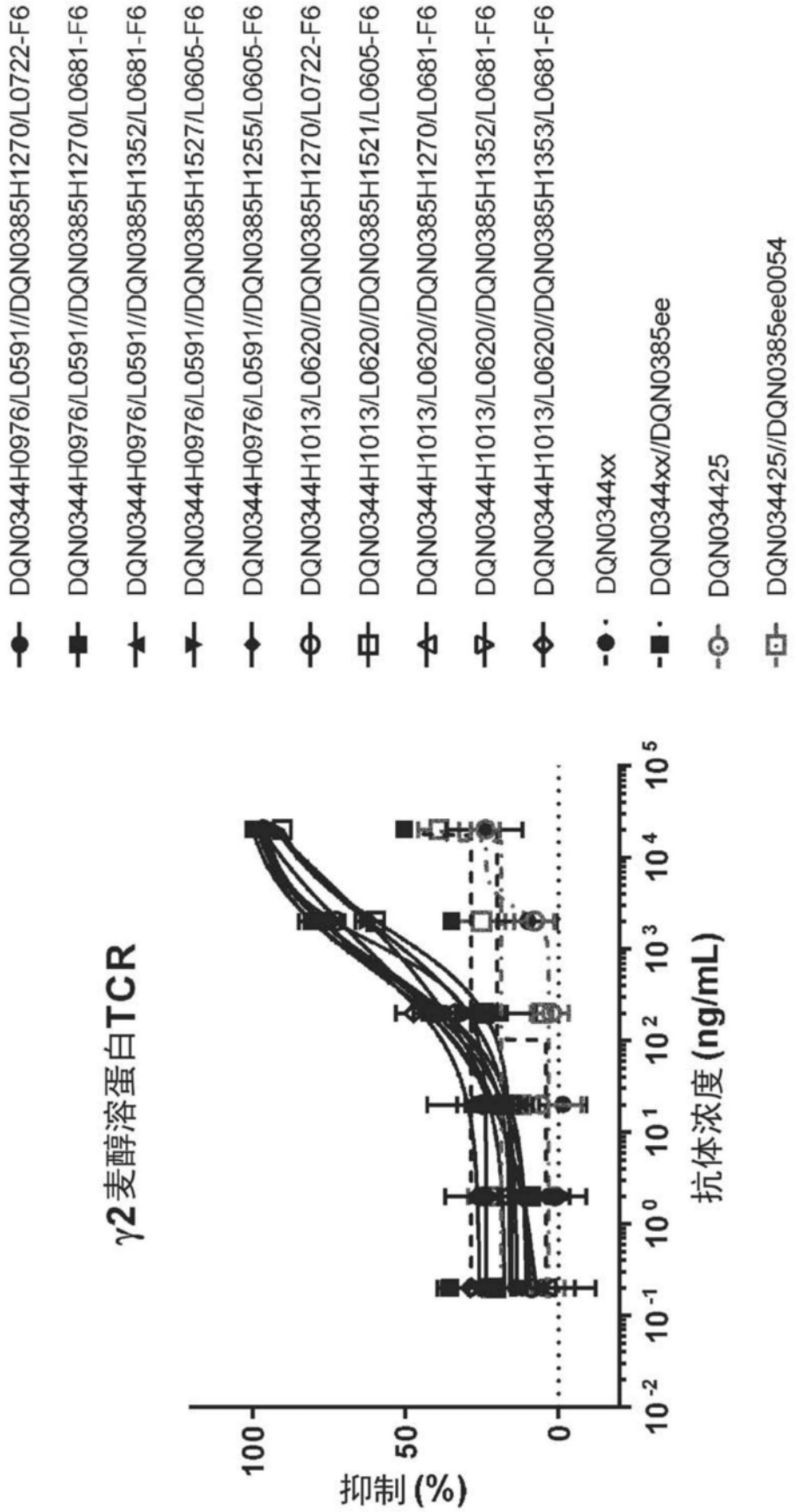

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
DQN0344xx
DQN0344xx//DQN0385ee
DQN034425
DQN034425//DQN0385ee0054
γ2麦醇溶蛋白TCR
抑制 (%)
100
50
0
10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3} 10^{4} 10^{5}
抗体浓度 (ng/mL)

图3-8

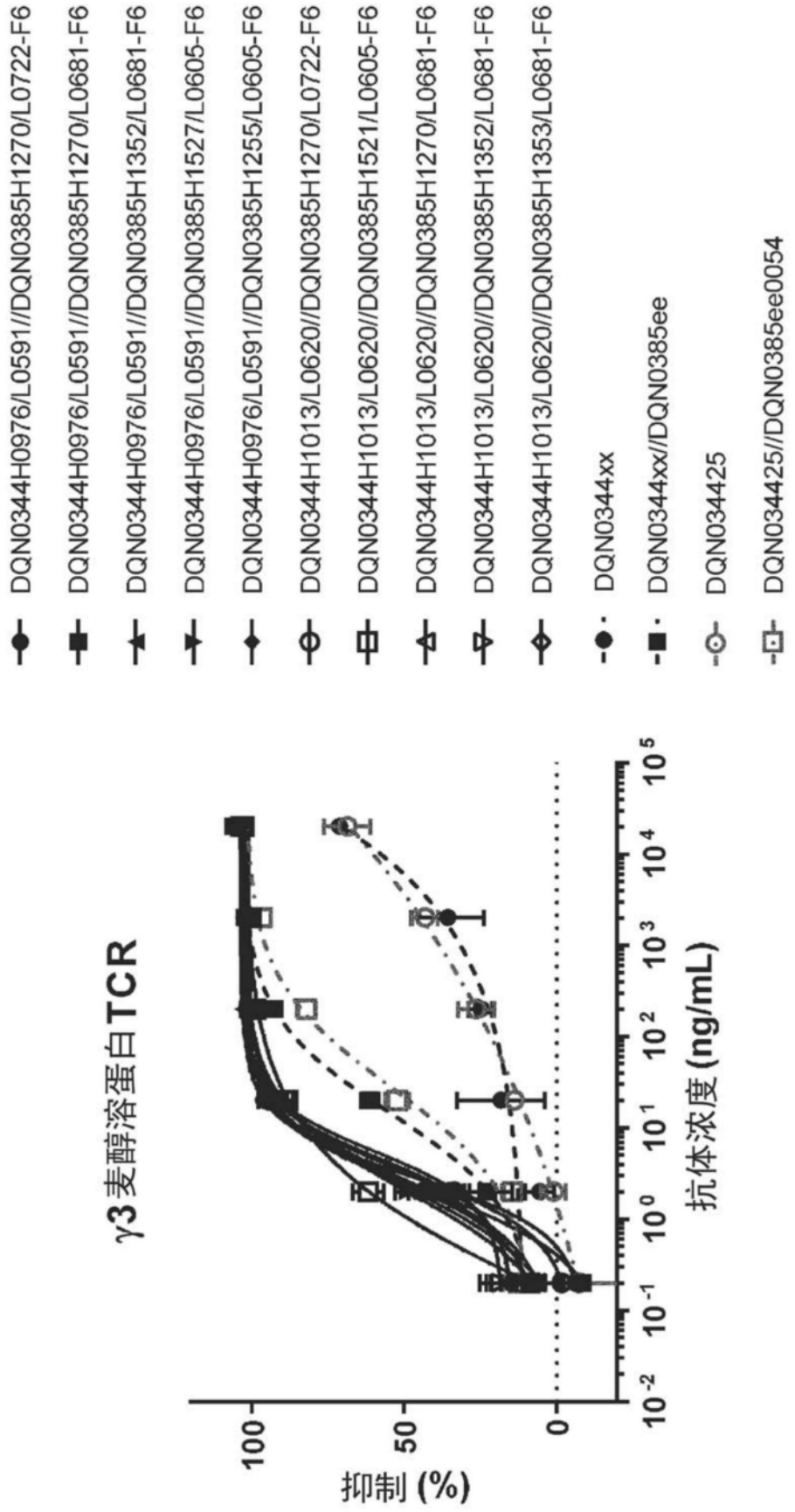

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
DQN0344xx
DQN0344xx//DQN0385ee
DQN034425
DQN034425//DQN0385ee0054
γ3麦醇溶蛋白TCR
抑制 (%)
100
50
0
10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3} 10^{4} 10^{5}
抗体浓度 (ng/mL)

图3-9

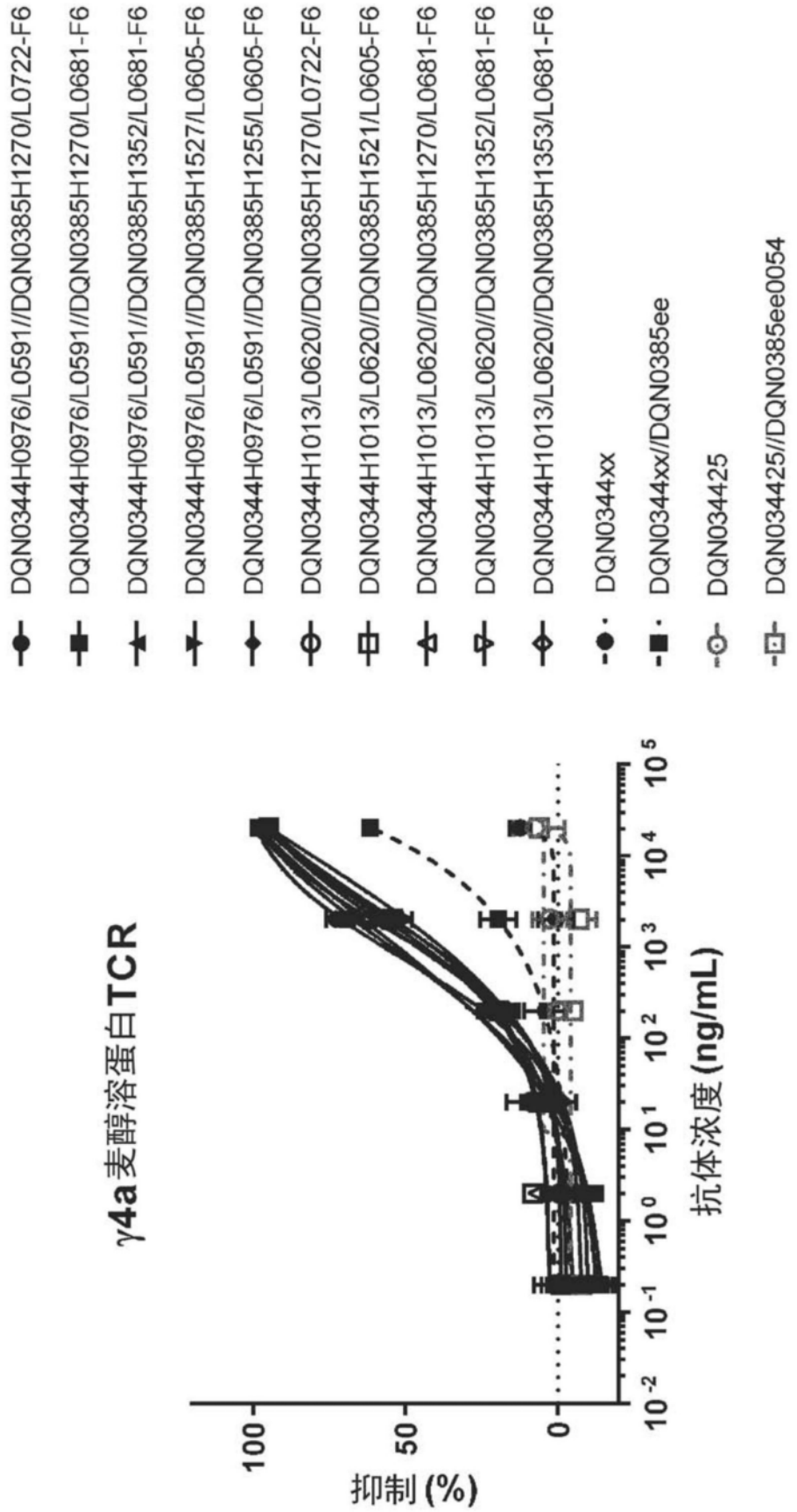

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
DQN0344xx
DQN0344xx//DQN0385ee
DQN034425
DQN034425//DQN0385ee0054
γ4a麦醇溶蛋白TCR
抑制 (%)
100
50
0
10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3} 10^{4} 10^{5}
抗体浓度 (ng/mL)

图3-10

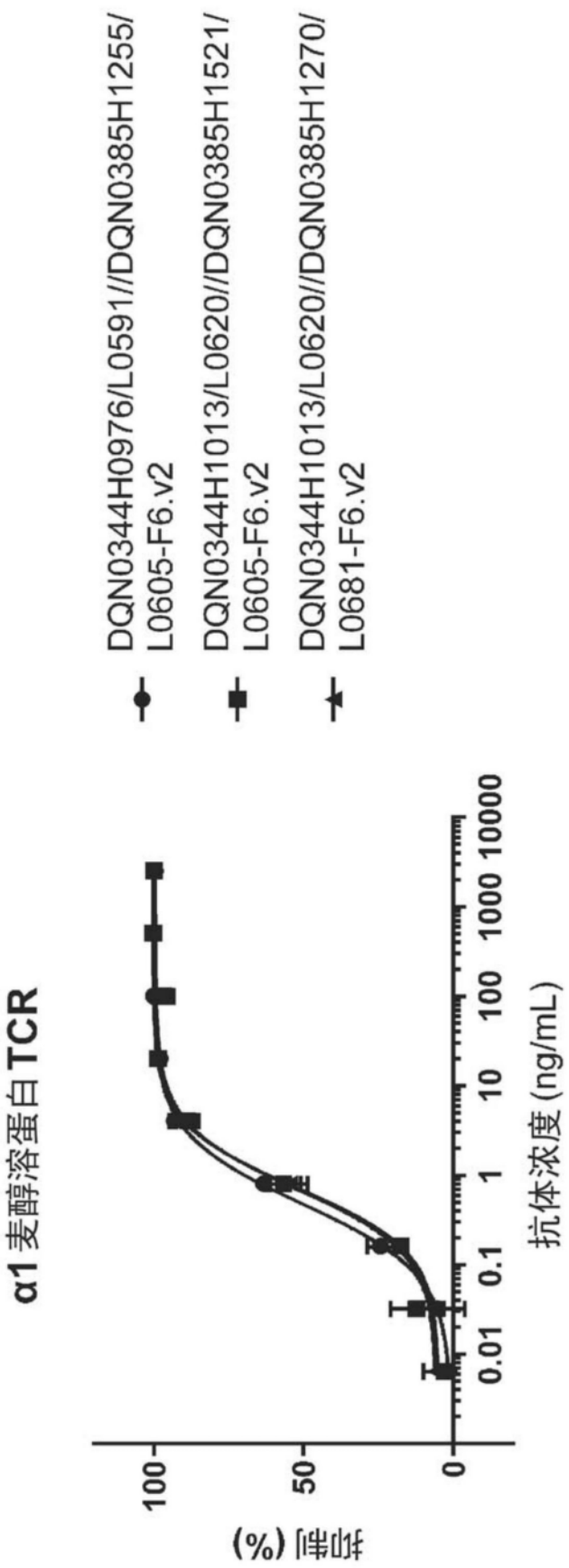

α1麦醇溶蛋白TCR
抑制(%)
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体浓度(ng/mL)
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/
L0681-F6.v2

图4-1

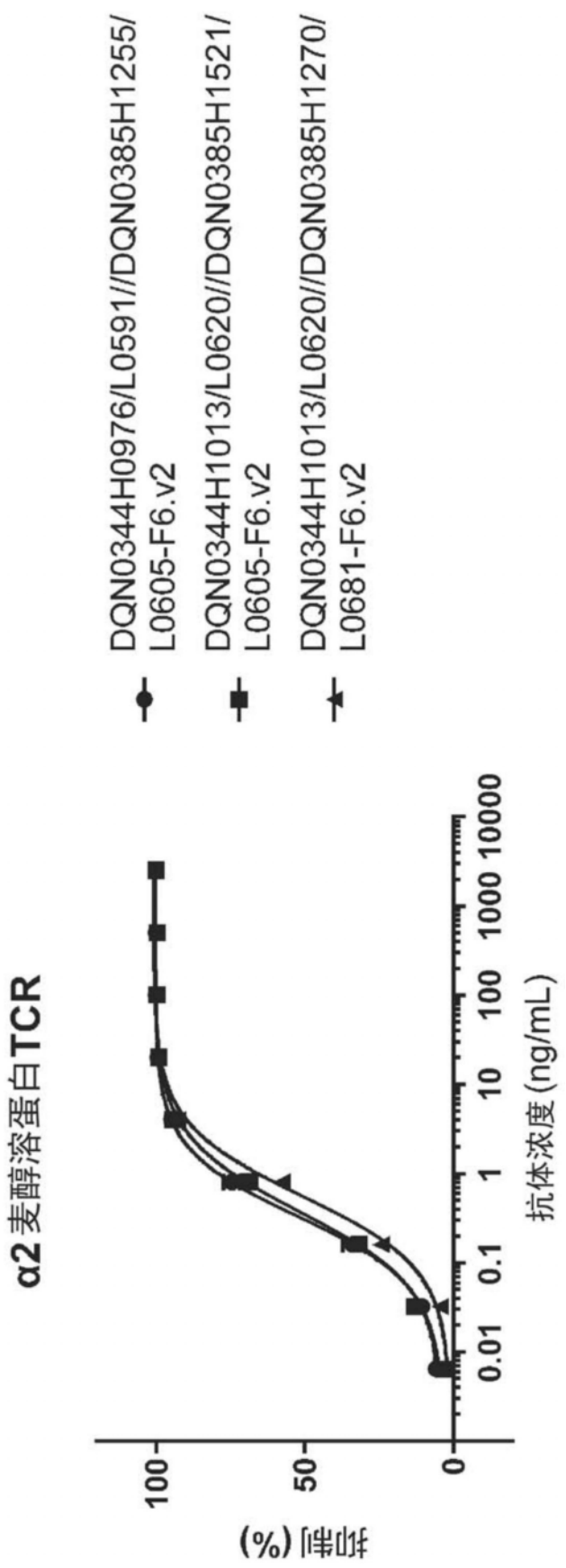

α2 麦醇溶蛋白TCR
抑制 (%)
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体浓度 (ng/mL)
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/
L0681-F6.v2

图4-2

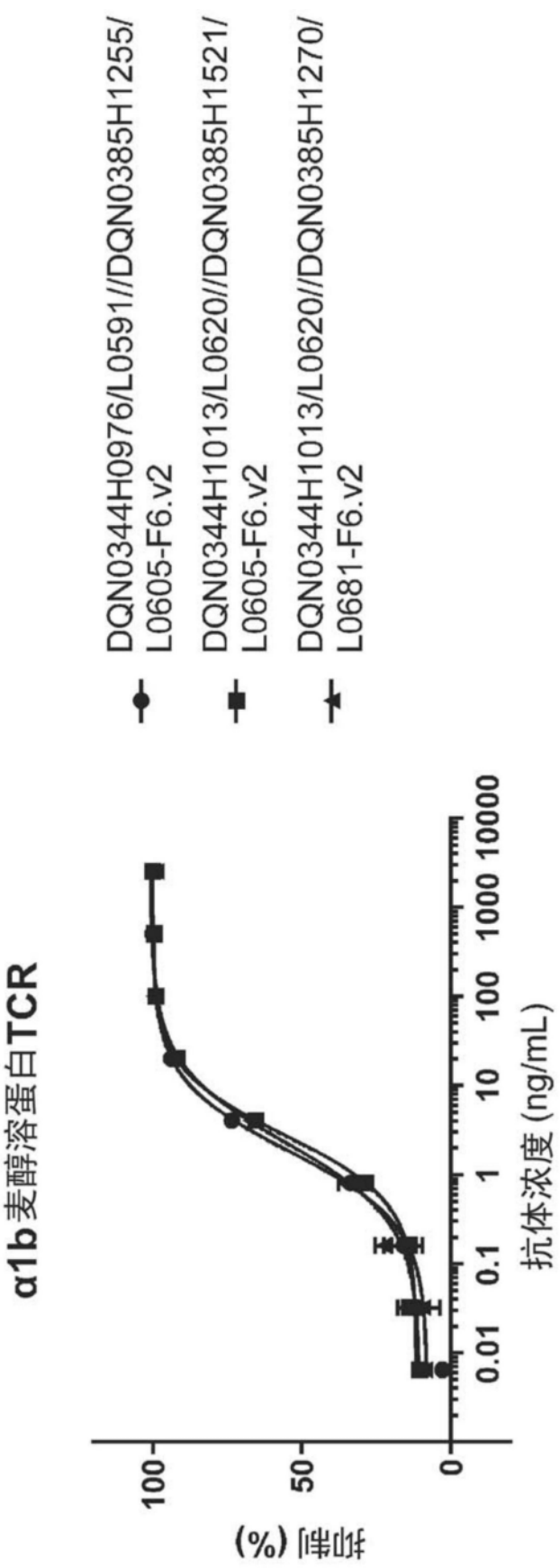

α1b麦醇溶蛋白TCR
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/
L0681-F6.v2
抑制 (%)
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体浓度 (ng/mL)

图4-3

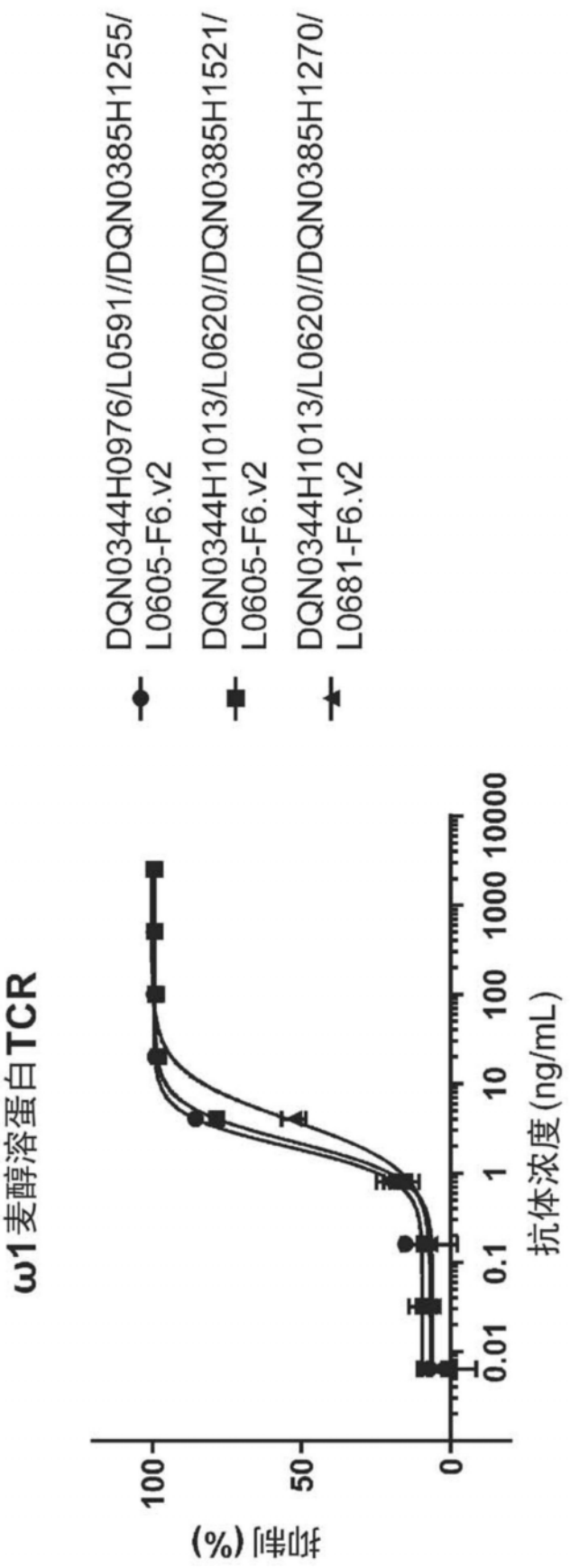

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/
L0681-F6.v2
ω1麦醇溶蛋白TCR
抑制(%)
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体浓度(ng/mL)

图4-4

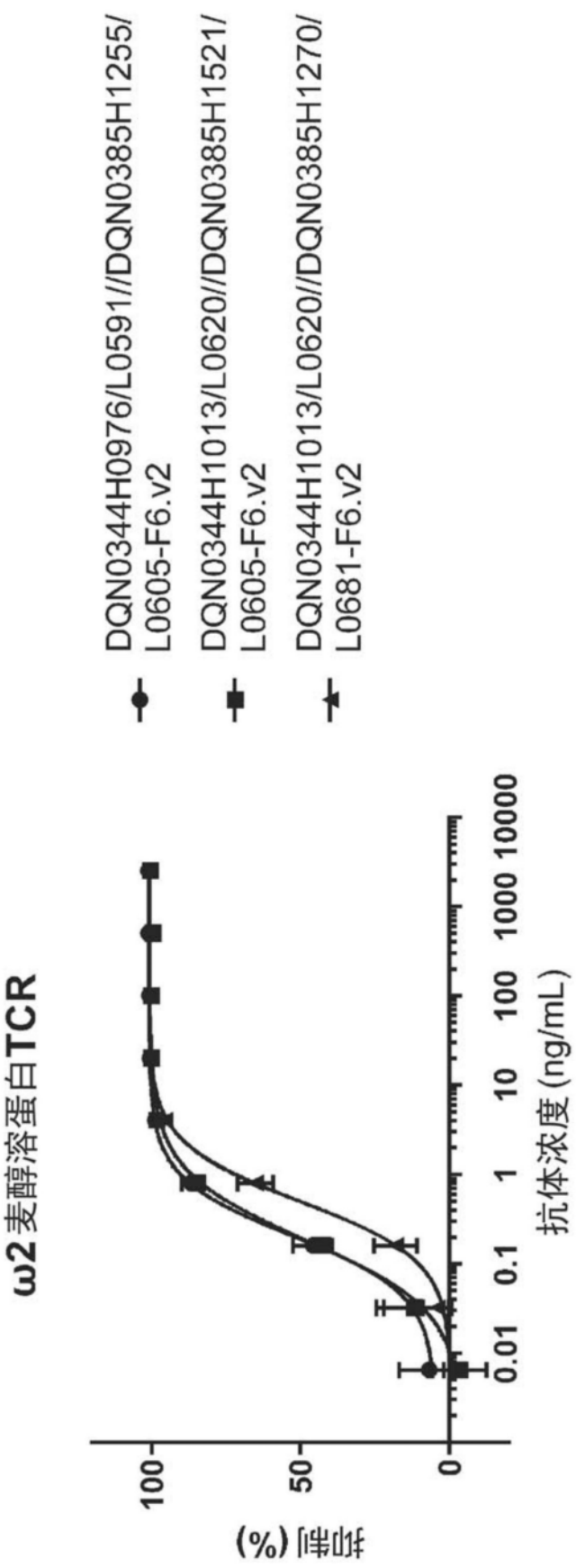

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/
L0681-F6.v2
ω2 麦醇溶蛋白TCR
抑制 (%)
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体浓度 (ng/mL)

图4-5

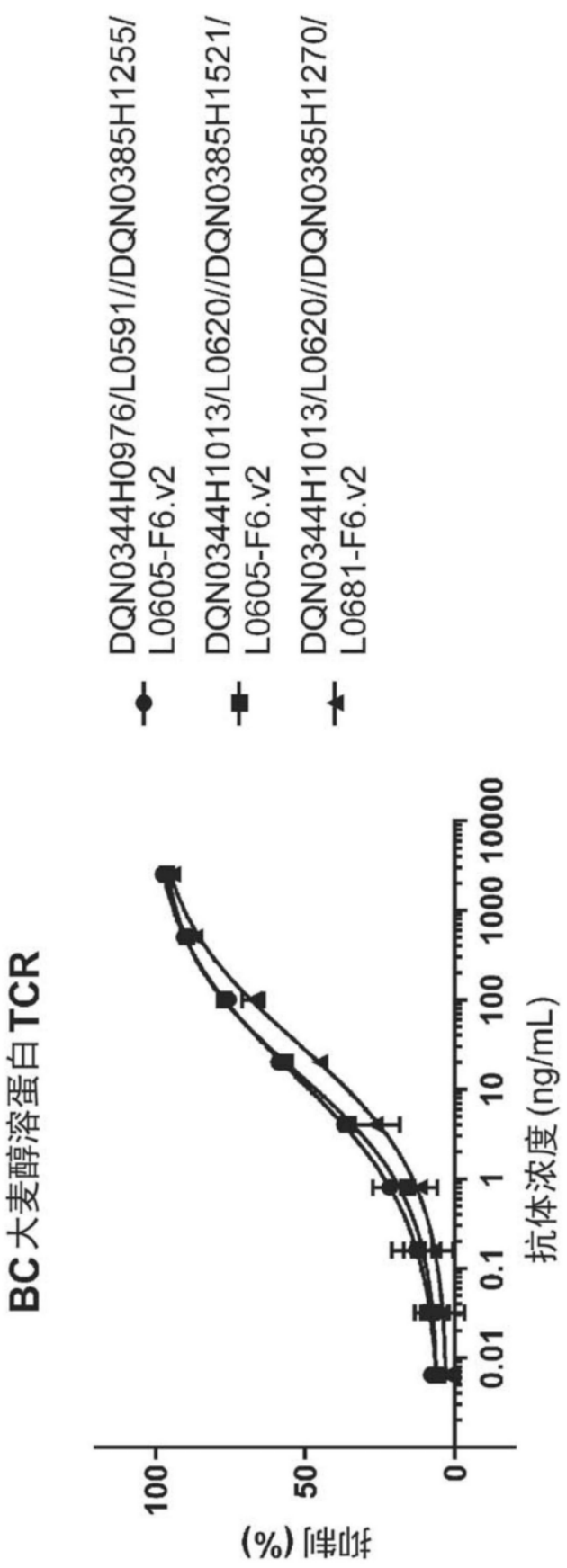

BC大麦醇溶蛋白TCR
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/
L0681-F6.v2
抑制(%)
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体浓度(ng/mL)

图4-6

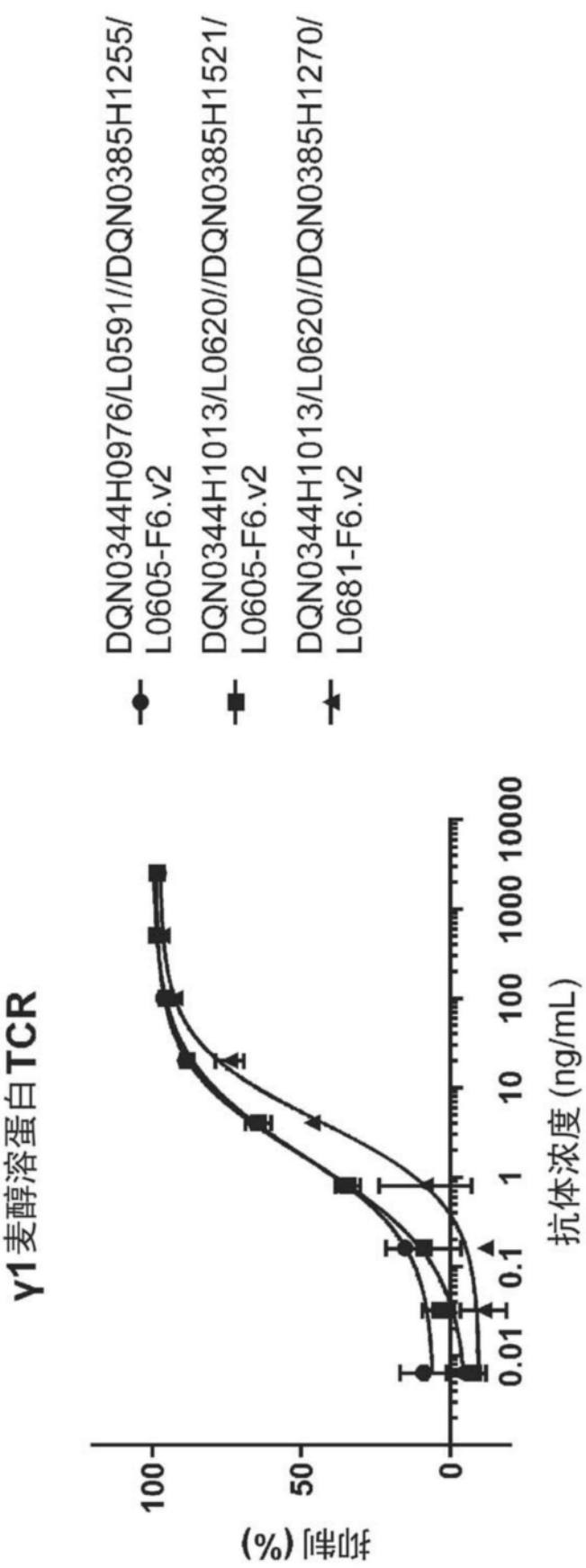

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/
L0681-F6.v2
Y1麦醇溶蛋白TCR
抑制 (%)
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体浓度 (ng/mL)

图4-7

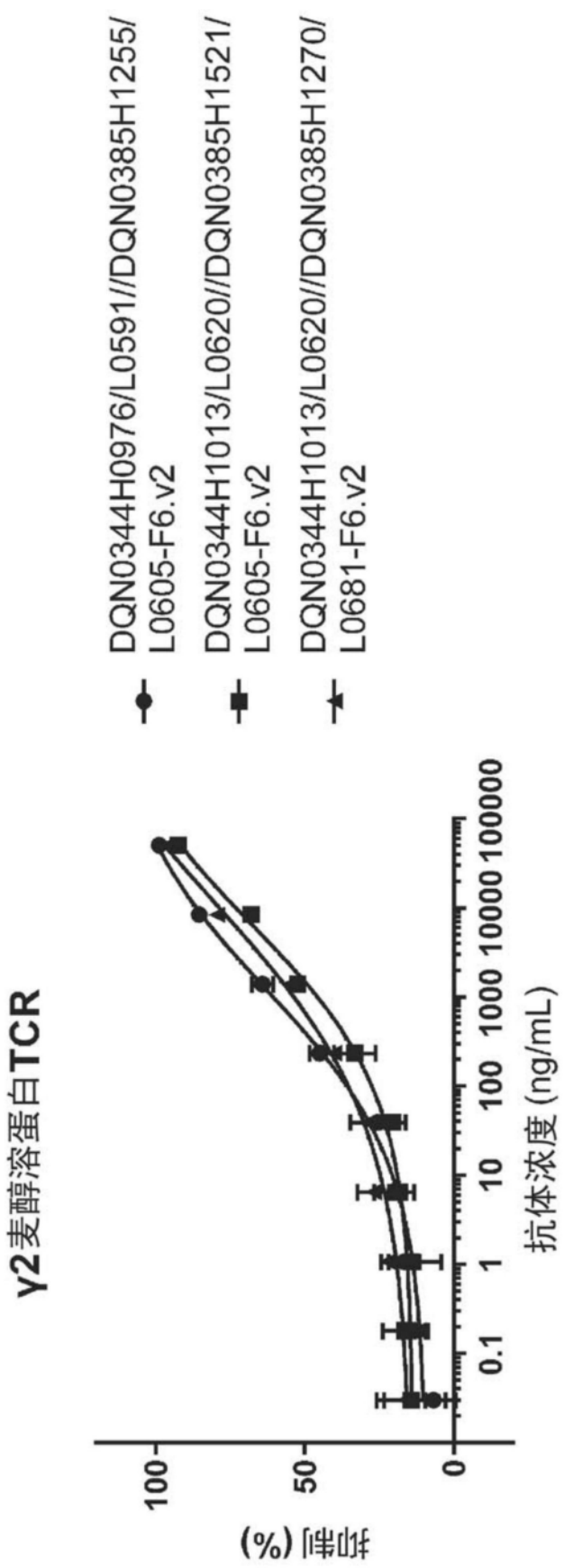

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/
L0681-F6.v2
Y2麦醇溶蛋白TCR
抑制 (%)
100
50
0
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
抗体浓度 (ng/mL)

图4-8

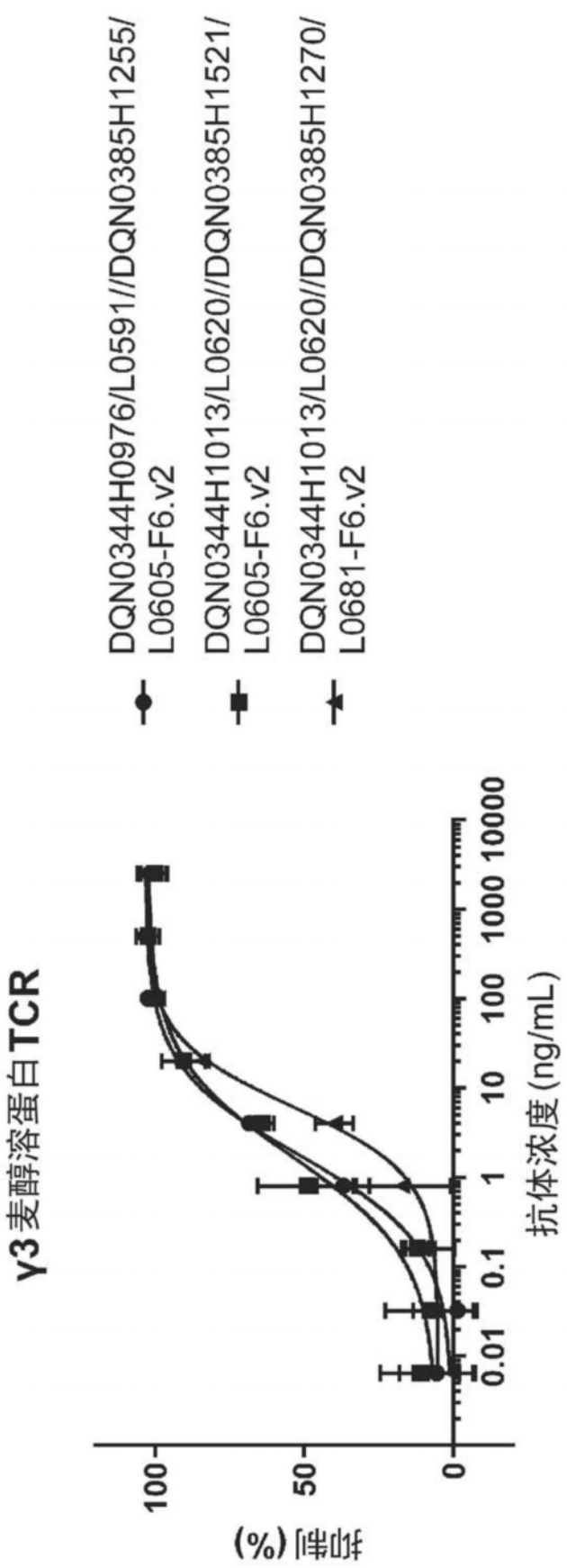

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/
L0681-F6.v2
Y3麦醇溶蛋白TCR
抑制(%)
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体浓度(ng/mL)

图4-9

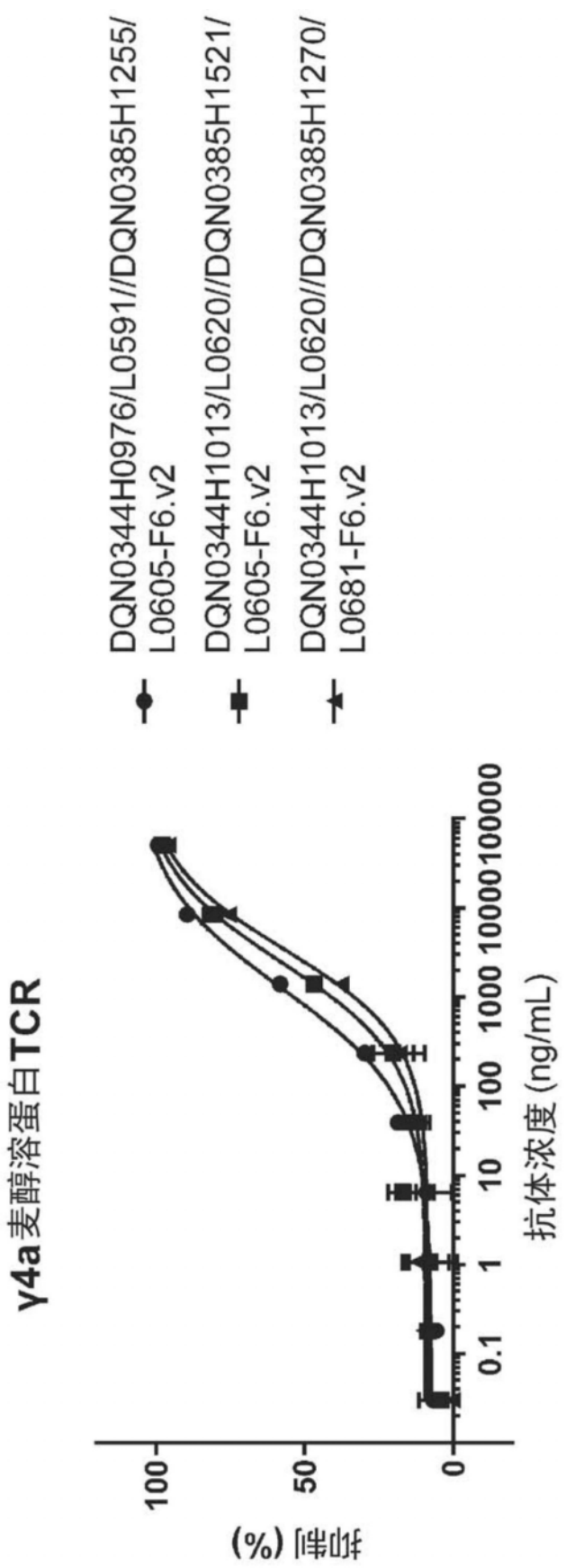

Y4a麦醇溶蛋白TCR
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/
L0681-F6.v2
抑制 (%)
100
50
0
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
抗体浓度 (ng/mL)

图4-10

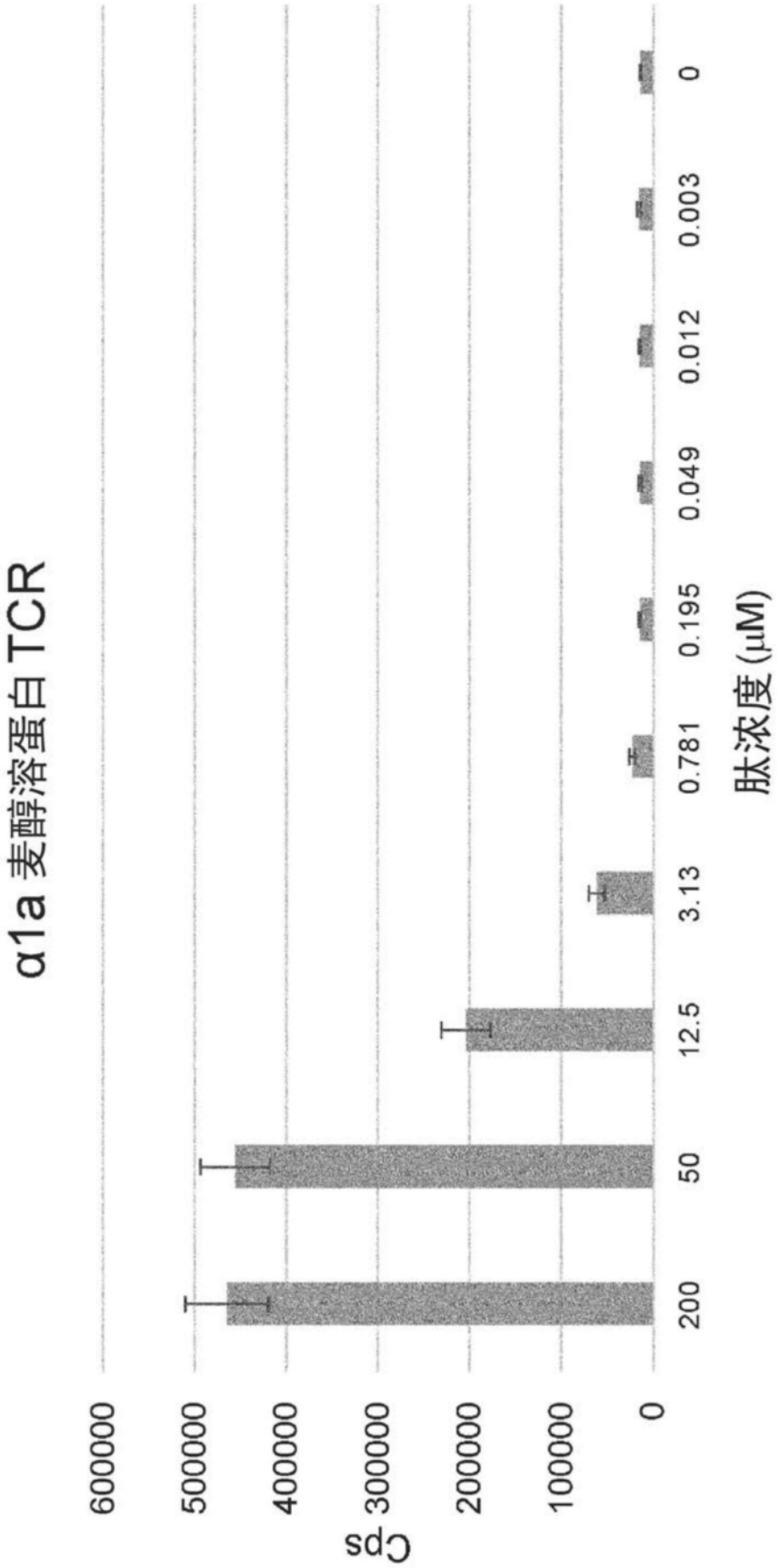

α1a 麦醇溶蛋白 TCR
Cps
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
200
50
12.5
3.13
0.781
0.195
0.049
0.012
0.003
0
肽浓度 (μM)

图5-1

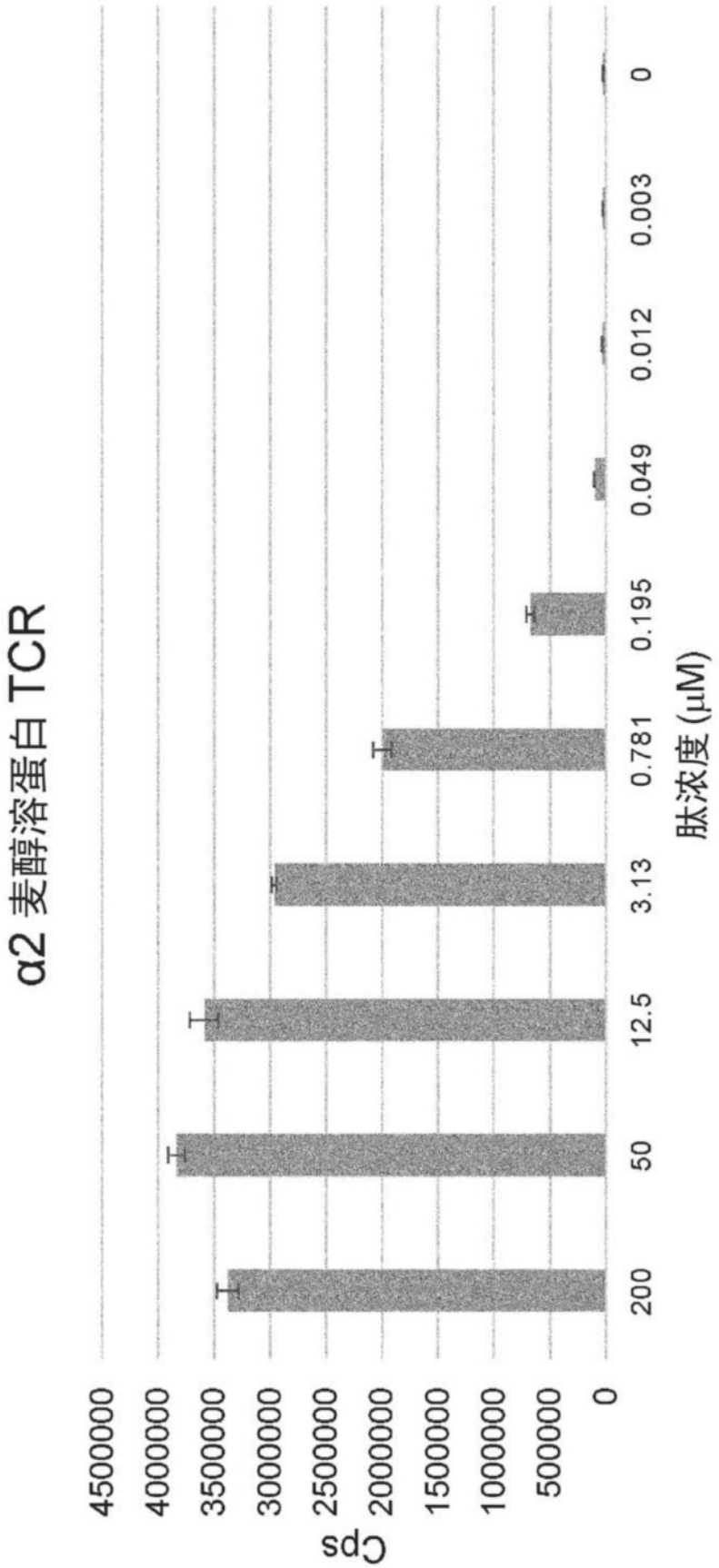

α2 麦醇溶蛋白 TCR
Cps
4500000
4000000
3500000
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
200
50
12.5
3.13
0.781
0.195
0.049
0.012
0.003
0
肽浓度 (μM)

图5-2

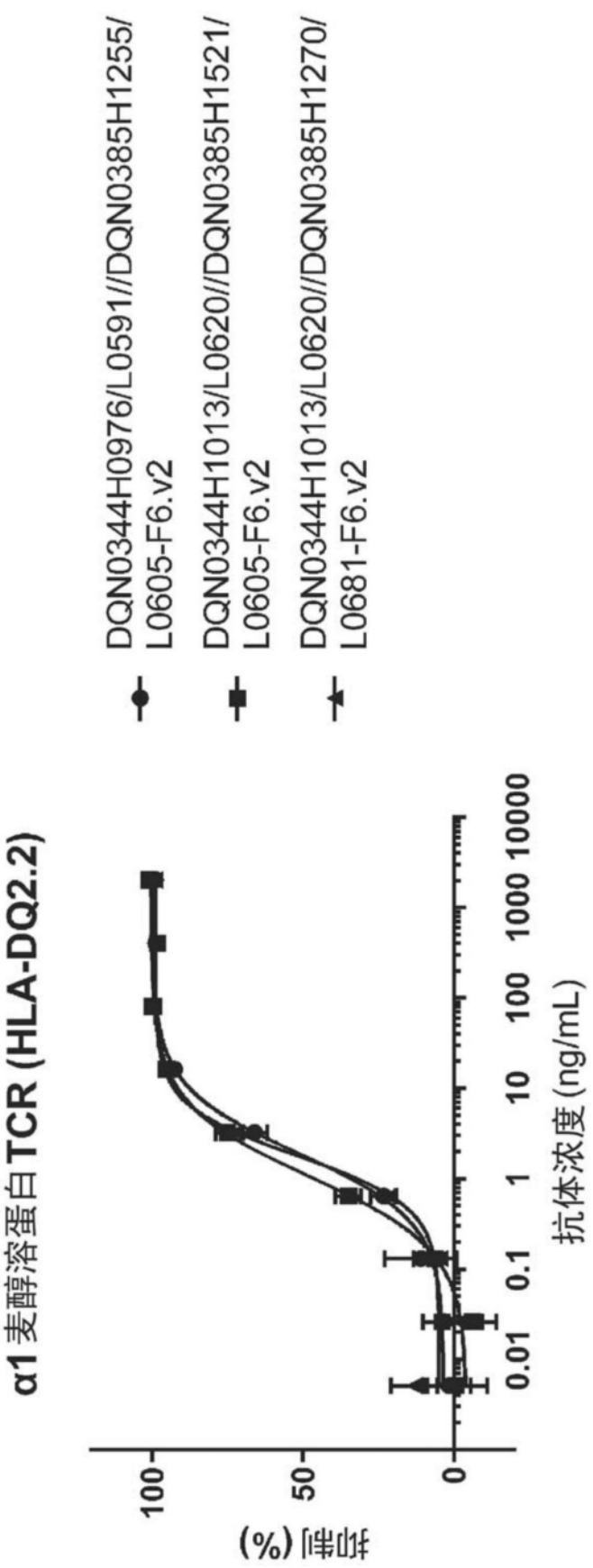

α1麦醇溶蛋白TCR (HLA-DQ2.2)
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/
L0681-F6.v2
抑制 (%)
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体浓度 (ng/mL)

图5-3

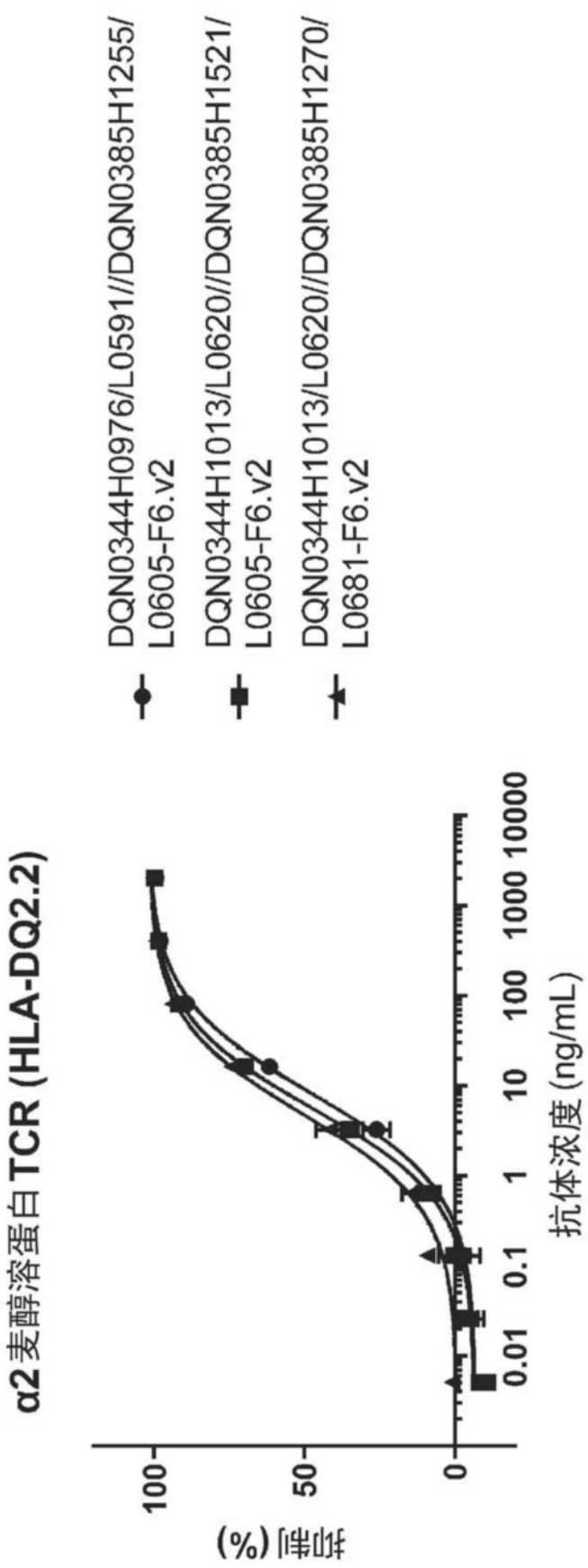

α2麦醇溶蛋白TCR (HLA-DQ2.2)
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/
L0605-F6.v2
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/
L0681-F6.v2
抑制 (%)
100
50
0
0.01 0.1 1 10 100 1000 10000
抗体浓度 (ng/mL)

图5-4