



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115551539 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 30

(21) 申请号 202180027778.X

J·卡尔维诺 X·靳 J·帕奎特

(22) 申请日 2021.02.11

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(30) 优先权数据

62/975663 2020.02.12 US

专利代理师 李志强 彭昶

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.10.11

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/017665 2021.02.11

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/163329 EN 2021.08.19

(71) 申请人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 K·门萨 R·普伦格 S·罗伊

D·扎勒 J·多维 S·萨恩茨

J·海诺尔特 C·多伊坎

权利要求书3页 说明书79页

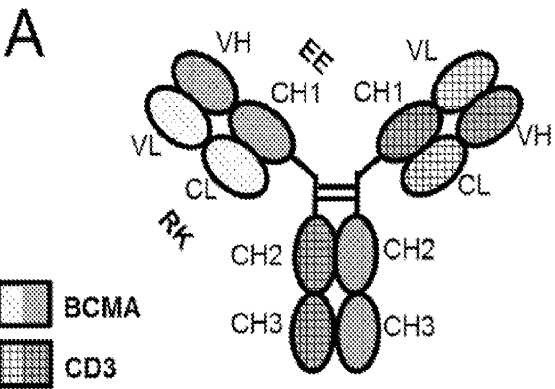
序列表52页 附图36页

(54) 发明名称

自身免疫性病症中的抗BCMA疗法

(57) 摘要

本发明涉及治疗或管理自身免疫性病症,诸如由自身反应性B谱系细胞引起的自身免疫性病症,例如抗中性粒细胞胞浆抗体 (ANCA) 相关性血管炎 (AAV)。



1. 一种治疗或管理自身免疫性病症的方法,所述方法包含向需要此类治疗或管理的患者施用多特异性抗体,其中所述多特异性抗体与B细胞成熟抗原(BCMA)以及促进一种或多种T细胞活化的抗原结合。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述自身免疫性病症是抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关性血管炎(AAV)、类风湿性关节炎(RA)或系统性红斑狼疮(SLE)。

3. 一种治疗或管理抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关性血管炎(AAV)的方法,所述方法包含向需要此类治疗或管理的患者施用多特异性抗体,其中所述多特异性抗体与BCMA以及促进一种或多种T细胞活化的抗原结合。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述促进一种或多种T细胞活化的抗原选自CD3、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR ζ 、ICOS、CD28、CD27、HVEM、LIGHT、CD40、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、SLAM、CD2或CD226,优选地其中所述促进一种或多种T细胞活化的抗原是CD3。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体是与BCMA以及CD3结合的双特异性抗体。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体是双特异性抗体,任选地其中双特异性抗体是包含两个抗BCMA抗体的Fab片段、一个抗CD3抗体的Fab片段和一个Fc部分的三价双特异性抗体,其中所述双特异性抗体是BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab形式的。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其包含选自以下的CDR1H、CDR2H、CDR3H、CDR1L、CDR2L和CDR3L区组合:

(a) SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:27的CDR1L区、SEQ ID NO:28的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区;

(b) SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:25的CDR1L区、SEQ ID NO:26的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区;或

(c) SEQ ID NO:15的CDR1H区、SEQ ID NO:16的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:18的CDR1L区、SEQ ID NO:19的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体包含:

(a) 具有可变区VH和可变区VL的抗BCMA抗体或其抗原结合片段,所述可变区VH包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性或其相同的氨基酸序列,所述可变区VL包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性或其相同的氨基酸序列;

(b) 具有可变区VH和可变区VL的抗BCMA抗体或其抗原结合片段,所述可变区VH包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性或其相同的氨基酸序列,所述可变区VL包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性或其相同的氨基酸序列;或

(c) 具有可变区VH和可变区VL的抗BCMA抗体或其抗原结合片段,所述可变区VH包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性或其相同的氨基酸序列,所述可变区VL包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性或其相同的氨基酸序列。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体包含抗CD3抗体或其抗原结合片段,其包括包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链CDR2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链CDR3、包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链CDR2以及包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链CDR3。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述抗CD3抗体或其抗原结合片段包含可变区VH和可变区VL,所述可变区VH包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性或其相同的氨基酸序列,所述可变区VL包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性或其相同的氨基酸序列。

11. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体包含由以下多肽组成的重链和轻链集合:

- (a) SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和两个拷贝的SEQ ID NO:57;
- (b) SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59和两个拷贝的SEQ ID NO:60;或
- (c) SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62和两个拷贝的SEQ ID NO:63。

12. 权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述自身免疫性疾病选自系统性红斑狼疮、IgA肾病、膜性肾病、重症肌无力、视神经脊髓炎、寻常型天疱疮、抗PAD4激活性类风湿性关节炎、实体器官移植中的致敏/预成抗体、格林-巴利综合征(急性炎性脱髓鞘性多发性神经病- AIDP)、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、免疫性血小板减少性紫癜、类风湿性关节炎和ANCA相关性血管炎(AAV)。

13. 根据权利要求3至12中任一项所述的方法,其中所述AAV包含选自以下的疾病:肉芽肿性多血管炎(GPA)、嗜酸性肉芽肿性多血管炎(EGPA)、显微镜下多血管炎(MPA)和肾限制性ANCA相关性血管炎。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述AAV是肉芽肿性多血管炎(GPA)。

15. 根据权利要求13所述的方法,其中所述AAV是嗜酸性肉芽肿性多血管炎(EGPA)。

16. 根据权利要求13所述的方法,其中所述AAV是显微镜下多血管炎(MPA)。

17. 权利要求13所述的方法,其中所述AAV是肾限制性ANCA相关性血管炎。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的方法,其中所述自身免疫性病症(例如AAV)是难治或复发的。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的方法,其中所述自身免疫性病症(例如AAV)是新近诊断的。

20. 根据权利要求3至16、18或19中任一项所述的方法,其中所述AAV影响选自神经系统、眼、鼻、心脏、肾脏、胃、肠、肺、关节、肌肉和皮肤的一个或多个身体部位。

21. 根据权利要求3至20中任一项所述的方法,其中所述AAV是全身性的,具有危及生命或主要器官的表现的存在。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述患者患有弥漫性肺泡出血(DAH)。

23. 根据权利要求3至20中任一项所述的方法,其中所述AAV是局限性的,不具有危及器官的表现。

24. 权利要求1至23中任一项所述的方法,其中所述患者需要减少浆母细胞。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的方法,其中所述患者处于发生细胞因子释放综

合征的风险中。

26. 权利要求1至25中任一项所述的方法,其中所述患者处于发生感染的风险中。

27. 权利要求1至26中任一项所述的方法,其中所述患者需要诱导缓解。

28. 权利要求1至27中任一项所述的方法,其中所述患者需要维持缓解。

29. 权利要求1至28中任一项所述的方法,其中所述方法导致相对于无治疗或参考治疗,所述患者的浆母细胞减少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%或100%。

30. 权利要求1至29中任一项所述的方法,其中所述方法导致相对于参考治疗,所述患者的细胞因子释放综合征发生率降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%或100%。

31. 权利要求1至30中任一项所述的方法,其中所述方法导致相对于参考治疗,所述患者的感染发生率降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%或100%。

32. 权利要求1至31中任一项所述的方法,其中所述方法导致相对于参考治疗,所述患者的诱导缓解快至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%或100%。

33. 权利要求1至32中任一项所述的方法,其中所述方法导致相对于参考治疗,所述患者的维持缓解长至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%或100%。

34. 权利要求29至33中任一项所述的方法,其中所述参考治疗是用类固醇(例如糖皮质激素)、环磷酰胺、抗CD20单克隆抗体(例如利妥昔单抗)、甲氨蝶呤、硫唑嘌呤、麦考酚酸酯、吗替麦考酚酯、avacopan、抗TNF剂(例如英夫利昔单抗、阿达木单抗、戈利木单抗、依那西普)、抗IL6R抗体(例如托珠单抗、沙立芦单抗)、共刺激阻断剂(例如阿巴西普)、JAK抑制剂(例如托法替尼、巴瑞替尼)和/或贝利木单抗的治疗,优选地其中所述参考治疗是用类固醇、环磷酰胺或利妥昔单抗的治疗。

35. 权利要求1至34中任一项所述的方法,其中所述方法用于诱导缓解。

36. 权利要求1至34中任一项所述的方法,其中所述方法用于维持缓解。

自身免疫性病症中的抗BCMA疗法

[0001] 本申请要求于2020年2月12日提交的美国临时申请号62/975,663的优先权,其整体通过引用并入本文。

[0002] 序列表

本申请将ASCII文本形式的序列表的计算机可读形式(CRF)通过引用以其整体并入。序列表文本文件命名为“14247-482-228_SEQ_LISTING”,其于2021年2月11日创建,且大小为106,995字节。

技术领域

[0003] 本发明涉及治疗或管理自身免疫性病症,诸如由自身反应性B谱系细胞引起的自身免疫性病症,例如抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关性血管炎(AAV)。

背景技术

[0004] 当受试者的免疫系统攻击受试者自身身体的健康组织或器官时,发生自身免疫性病症。在一些情况下,这些病症可以起因于由B谱系细胞(“自身反应性B谱系细胞”) (例如记忆B细胞、浆母细胞和/或浆细胞)对受试者自身组织上的抗原(“自身抗原”)的异常识别。在一些情况下,自身反应性浆母细胞和浆细胞可能产生自身反应性抗体(“自身抗体”),其识别自身抗原和/或攻击表达自身抗原的健康组织或器官。已将系统性红斑狼疮(SLE)描述为典型的自身免疫性病症(Fava, A.和Petri, M. (2019). Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management. Journal of autoimmunity, 96, 1-13)。

[0005] 抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关性血管炎(AAV)是由自身反应性B谱系细胞引起的严重自身免疫性病症,其具有显著的发病率和死亡率。AAV患者在活动性疾病和不同长度的缓解期之间循环。AAV无法治愈,并且50%的患者在活动性疾病期间死亡或遭受严重并发症。AAV的特征在于由ANCA自身抗体介导的小型血管至中型血管的破坏性炎症。

[0006] 自身免疫性病症的现有治疗在诱导或维持缓解方面不一定有效和/或可能具有不期望的副作用。因此,需要用于治疗或管理自身免疫性病症的进一步疗法。

发明内容

[0007] 本发明涉及使用与BCMA以及促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)结合的多特异性(例如双特异性)抗体来治疗或管理患有自身免疫性病症的受试者的方法。

[0008] 在一个方面,本发明提供治疗或管理自身免疫性病症的方法,该方法包含向需要此类治疗或管理的受试者(例如人)施用多特异性(例如双特异性)抗体,其中多特异性抗体与BCMA以及促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)结合。

[0009] 在另一个方面,本发明提供与BCMA以及促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)结合的多特异性(例如双特异性)抗体,用于治疗或管理受试者(例如人)的自身免疫性病症。

[0010] 在优选的实施方案中,自身免疫性病症由B谱系细胞(例如自身反应性B谱系细胞)引起。在优选的实施方案中,B谱系细胞(例如自身反应性B谱系细胞)是记忆B细胞、浆母细胞和/或浆细胞。

[0011] 在一些实施方案中,自身免疫性病症选自系统性红斑狼疮、IgA肾病、IgG4相关疾病、膜性肾病、重症肌无力、视神经脊髓炎、寻常型天疱疮、抗PAD4激活性类风湿性关节炎、实体器官移植中的致敏/预成抗体、格林-巴利综合征(急性炎性脱髓鞘性多发性神经病-AIDP)、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、免疫性血小板减少性紫癜、类风湿性关节炎和ANCA相关性血管炎(AAV)。在优选的实施方案中,自身免疫性病症不是IgG4相关疾病。优选地,自身免疫性病症是ANCA相关性血管炎(AAV)、系统性红斑狼疮(SLE)和/或类风湿性关节炎。在优选的实施方案中,自身免疫性病症是ANCA相关性血管炎(AAV)和/或类风湿性关节炎。

[0012] 在一些实施方案中,自身免疫性病症是新近诊断的(例如新近诊断的AAV、SLE或类风湿性关节炎)。在一些实施方案中,自身免疫性病症是复发或难治的(例如复发性或难治性AAV、SLE或类风湿性关节炎)。

[0013] 在一些实施方案中,AAV包含选自以下的疾病:肉芽肿性多血管炎(GPA)、嗜酸性肉芽肿性多血管炎(EGPA)、显微镜下多血管炎(MPA)和肾限制性ANCA相关性血管炎。在一些实施方案中,AAV是肉芽肿性多血管炎(韦格纳氏肉芽肿)、嗜酸性肉芽肿性多血管炎、显微镜下多血管炎或肾限制性ANCA相关性血管炎。

[0014] 在一些实施方案中,AAV影响选自神经系统、眼、鼻、心脏、肾脏、胃、肠、肺、关节、肌肉和皮肤的患者的一个或多个身体部位。在一些实施方案中,AAV是全身性的,具有危及生命或主要器官的表现的存在,任选地其中患者患有弥漫性肺泡出血(DAH)。在其它实施方案中,AAV是局限性的,不具有危及器官的表现。

[0015] 在一些实施方案中,患者需要减少浆母细胞。在一些实施方案中,患者需要诱导缓解。在一些实施方案中,患者需要维持缓解。在一些实施方案中,该方法导致相对于无治疗或参考治疗,患者的浆母细胞减少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%或100%。

[0016] 在一些实施方案中,患者需要诱导缓解。在一些实施方案中,该方法用于诱导缓解,任选地其中该方法导致相对于参考治疗,患者的诱导缓解快至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%或100%。在其它实施方案中,患者需要维持缓解。在一些实施方案中,该方法用于维持缓解,任选地其中该方法导致相对于参考治疗,患者的维持缓解长至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%或100%。

[0017] 在一些实施方案中,患者处于发生细胞因子释放综合征的风险中。在一些实施方案中,该方法导致相对于参考治疗,患者的细胞因子释放综合征发生率降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%或100%。

[0018] 在一些实施方案中,患者处于发生感染的风险中。在一些实施方案中,该方法导致相对于参考治疗,患者的感染发生率降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%或100%。

[0019] 在一些实施方案中,参考治疗是用类固醇(例如糖皮质激素)、环磷酰胺、抗CD20单克隆抗体(例如利妥昔单抗)、甲氨蝶呤、硫唑嘌呤、麦考酚酸酯、吗替麦考酚酯、avacopan、抗TNF剂(例如英夫利昔单抗、阿达木单抗、戈利木单抗、依那西普)、抗IL6R抗体(例如托珠单抗、沙立芦单抗)、共刺激阻断剂(例如阿巴西普)、JAK抑制剂(例如托法替尼、巴瑞替尼)和/或贝利木单抗的治疗,优选地其中参考治疗是用类固醇、环磷酰胺或利妥昔单抗的治疗。

[0020] 在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其包含选自以下的CDR1H、CDR2H、CDR3H、CDR1L、CDR2L和CDR3L区组合:

a) SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:23的CDR1L区、SEQ ID NO:24的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区;

b) SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:25的CDR1L区、SEQ ID NO:26的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区;

c) SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:27的CDR1L区、SEQ ID NO:28的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区;

d) SEQ ID NO:29的CDR1H区、SEQ ID NO:30的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区、SEQ ID NO:32的CDR2L区和SEQ ID NO:33的CDR3L区;

e) SEQ ID NO:34的CDR1H区、SEQ ID NO:35的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区、SEQ ID NO:32的CDR2L区和SEQ ID NO:33的CDR3L区;

f) SEQ ID NO:36的CDR1H区、SEQ ID NO:37的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区、SEQ ID NO:32的CDR2L区和SEQ ID NO:33的CDR3L区;和

g) SEQ ID NO:15的CDR1H区、SEQ ID NO:16的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:18的CDR1L区、SEQ ID NO:19的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区。

[0021] 在特别优选的实施方案中,抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:27的CDR1L区、SEQ ID NO:28的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区。

[0022] 在一些实施方案中,抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含选自以下的VH和VL:

a) SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:12的VL区,

b) SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:13的VL区,

c) SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:14的VL区,

d) SEQ ID NO:38的VH区和SEQ ID NO:12的VL区,

e) SEQ ID NO:39的VH区和SEQ ID NO:12的VL区,

f) SEQ ID NO:40的VH区和SEQ ID NO:12的VL区,或

g) SEQ ID NO:9的VH区和SEQ ID NO:11的VL区。

[0023] 在一些实施方案中,抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含:

a) 包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性或其相同的氨基酸序列的可变区VH,以及包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性或其相同的氨基酸序列的可变区VL;

b) 包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少

99%同一性或其相同的氨基酸序列的可变区VH,以及包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性或其相同的氨基酸序列的可变区VL;或

c) 包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性或其相同的氨基酸序列的可变区VH,以及包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性或其相同的氨基酸序列的可变区VL。

[0024] 在特别优选的实施方案中,抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:14的VL区。

[0025] 在一些实施方案中,促进一种或多种T细胞活化的抗原选自CD3、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR ζ 、ICOS、CD28、CD27、HVEM、LIGHT、CD40、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、SLAM、CD2或CD226。在优选的实施方案中,促进一种或多种T细胞活化的抗原是CD3。

[0026] 在优选的实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗CD3抗体或其抗原结合片段,其包含可变结构域VH和可变结构域VL,所述可变结构域VH包含分别作为重链CDR1H、CDR2H和CDR3H的SEQ ID NO:1、2和3的重链CDR,所述可变结构域VL包含分别作为轻链CDR1L、CDR2L和CDR3L的SEQ ID NO:4、5和6的轻链CDR。在一些实施方案中,抗CD3抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:7的VH区和SEQ ID NO:8的VL区。

[0027] 在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗CD3抗体或其抗原结合片段,其包含可变区VH和可变区VL,所述可变区VH包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性或其相同的氨基酸序列,所述可变区VL包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性或其相同的氨基酸序列。

[0028] 在特别优选的实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段(其包含SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:14的VL区)以及抗CD3抗体或其抗原结合片段(其包含SEQ ID NO:7的VH区和SEQ ID NO:8的VL区)。

[0029] 在一些实施方案中,多特异性抗体是双特异性抗体。在优选的实施方案中,多特异性抗体是与BCMA以及CD3结合的双特异性抗体。在一些实施方案中,双特异性抗体是二价的(例如1+1形式)。在一些实施方案中,二价双特异性抗体具有以下形式:CD3 Fab - BCMA Fab (即当不存在Fc时)。备选地,二价双特异性抗体可以具有以下形式:Fc - CD3 Fab - BCMA Fab、Fc - BCMA Fab - CD3 Fab或BCMA Fab - Fc - CD3 Fab (即当存在Fc时)。在优选的实施方案中,二价双特异性抗体具有BCMA Fab - Fc - CD3 Fab形式。在一些实施方案中,双特异性抗体是三价的(例如2+1形式)。在优选的实施方案中,双特异性抗体是三价的,并且包含两个抗BCMA抗体的Fab片段、一个抗CD3抗体的Fab片段和一个Fc部分。在一些实施方案中,三价双特异性抗体具有以下形式:CD3 Fab - BCMA Fab - BCMA Fab或BCMA Fab - CD3 Fab - BCMA Fab (即当不存在Fc时)。备选地,三价双特异性抗体可以具有以下形式:BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab、BCMA Fab - Fc - BCMA Fab - CD3 Fab或CD3 Fab - Fc - BCMA Fab - BCMA Fab (即当存在Fc时)。在优选的实施方案中,三价双特异性抗体具有BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab形式。

[0030] 在一些实施方案中,抗CD3 Fab包含轻链和重链,其中轻链是包含可变结构域VH和

恒定结构域CL的交换(crossover)轻链,并且其中重链是包含可变结构域VL和恒定结构域CH1的交换重链。

[0031] 在一些实施方案中,抗BCMA Fab片段的CH1结构域包含氨基酸修饰K147E/D和K213E/D(根据EU编号进行编号)以及包含具有氨基酸修饰E123K/R/H和Q124K/R/H(根据Kabat进行编号)的CL结构域的相应免疫球蛋白轻链。

[0032] 在备选实施方案中,抗BCMA Fab片段的CH1结构域包含氨基酸修饰A141W、L145E、K147T和Q175E(根据EU编号进行编号)或其保守取代,以及包含具有氨基酸修饰F116A、Q124R、L135V和T178R(根据Kabat进行编号)或其保守取代的CL结构域的相应免疫球蛋白轻链。

[0033] 在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体进一步包含Fc。在一些实施方案中,Fc是IgG1 Fc。在一些实施方案中,(例如IgG1) Fc包含第一Fc链和第二Fc链,所述第一Fc链包含第一恒定结构域CH2和CH3,所述第二Fc链包含第二恒定结构域CH2和CH3,其中:

a) 第一CH3结构域包含修饰T366S、L368A和Y407V或其保守取代(根据EU编号进行编号);和

b) 第二CH3结构域包含修饰T366W或其保守取代(根据EU编号进行编号)。

[0034] 在备选实施方案中,(例如IgG1) Fc包含第一Fc链和第二Fc链,所述第一Fc链包含第一恒定结构域CH2和CH3,所述第二Fc链包含第二恒定结构域CH2和CH3,其中:

a) 第一CH3结构域包含修饰T350V、L351Y、F405A和Y407V或其保守取代(根据EU编号进行编号);和

b) 第二CH3结构域包含修饰T350V、T366L、K392L和T394W或其保守取代(根据EU编号进行编号)。

[0035] 在一些实施方案中,(例如IgG1) Fc包含:

a) 修饰L234A、L235A和P329G(根据EU编号进行编号);和/或

b) 修饰D356E和L358M(根据EU编号进行编号)。

[0036] 在进一步的实施方案中,根据本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含以下SEQ ID NO:

i. 83A10-TCBcv: 45, 46, 47 (x2), 48

ii. 21-TCBcv: 49, 50, 51 (x2), 48

iii. 22-TCBcv: 52, 53, 54 (x2), 48

iv. 42-TCBcv: 55, 56, 57 (x2), 48

v. Mab101: 58, 59, 60 (x2), 48

vi. Mab102: 61, 62, 63 (x2), 48

vii. Mab103: 64, 65, 66 (x2), 48

在优选的实施方案中,根据本发明的双特异性抗体是42-TCBcv、Mab101或Mab102。

在特别优选的实施方案中,根据本发明的双特异性抗体是42-TCBcv。

[0037] 本发明的各方面和实施方案在所附权利要求中进行阐述。本文还描述了本发明的这些及其它方面以及实施方案。

附图说明

[0038] 现在将参考附图更详细地描述本发明,在所述附图中:

图1说明用于本发明中的双特异性二价抗体的不同形式,所述双特异性二价抗体包含Fab BCMA- Fc - Fab CD3形式的与T细胞抗原(说明了CD3)以及BCMA结合的Fab片段。CD3 Fab可以包括VH-VL交换型,以减少轻链错配和副产物。可以在CL-CH1中引入氨基酸取代(说明了“RK/EE”),以减少生产中的轻链错配/副产物。CD3 Fab和BCMA Fab可以用柔性接头彼此连接。

[0039] 图2说明用于本发明中的双特异性三价抗体的不同形式,所述双特异性三价抗体包含以下形式的与T细胞抗原(说明了CD3)以及BCMA结合的Fab片段:Fab BCMA - Fc - Fab CD3 - Fab BCMA (A, B);Fab BCMA - Fc - Fab BCMA - Fab CD3 (C, D)。CD3 Fab可以包括VH-VL交换型,以减少轻链错配和副产物。可以在CL-CH1中引入氨基酸取代(说明了“RK/EE”),以减少生产中的轻链错配/副产物。CD3 Fab和BCMA Fab可以用柔性接头彼此连接。

[0040] 图3说明用于本发明中的双特异性二价抗体的另外的形式,所述双特异性二价抗体包含以下形式的与T细胞抗原(说明了CD3)以及BCMA结合的Fab片段:Fc - Fab CD3 - Fab BCMA (A, B);Fc - Fab BCMA - Fab CD3 (C, D)。CD3 Fab可以包括VH-VL交换型,以减少轻链错配和副产物。可以在CL-CH1中引入氨基酸取代(说明了“RK/EE”),以减少生产中的轻链错配/副产物。CD3 Fab和BCMA Fab可以用柔性接头彼此连接。

[0041] 图4说明如通过流式细胞术评估的,与表达BCMA的癌细胞系(JEK0、RPMI-8226和H929)相比,来自四个正常健康志愿者(NHV)的浆母细胞(PB)上的BCMA表达(A)。如通过ELISA评估的,显示了来自NHV (“正常”)、多发性骨髓瘤(“MM”)或ANCA相关性血管炎(“AAV”)患者的血清或血浆样品中的可溶性BCMA水平(B)。

[0042] 图5说明当JEK0细胞与CD3+ T细胞以1:2靶标:效应物(T:E)一起培养,并且用抗BCMA抗CD3双特异性抗体(即BCMA T细胞衔接体(engager)(CC-93269、Mab101或Mab102))处理时,T细胞介导的杀伤(A)和T细胞活化(B)的剂量-反应曲线。通过膜联蛋白V表达来评估T细胞介导的JEK0细胞杀伤,显示了20小时时间点。在24小时时间点,通过流式细胞术分析了T细胞谱系和活化标记物,显示了CD8+ T细胞上的%CD69表达。

[0043] 图6说明当RPMI-8226细胞与NHV PBMC以不同的靶标:效应物(T:E)比率和各种浓度的CC-93269一起共培养时,T细胞介导的杀伤(A)和T细胞活化(B)的剂量-反应曲线。

[0044] 图7说明当来自健康志愿者的外周血单核细胞(PBMC)用各种浓度的BCMA T细胞衔接体(即BCMA TCE (Mab101、CC-93269或Mab102))或对照2+1抗体处理24小时时,浆母细胞杀伤(A)、T细胞活化(C)和细胞因子产生(D)的剂量-反应曲线。代表性的FACS图显示对CD3(-) CD19(+)细胞门控,鉴定为CD20(-) CD27(+)的浆母细胞(B)。浆母细胞杀伤评估为总CD19(+)细胞的百分比(A)。显示了CD8+ T细胞上的%CD69表达(C)。

[0045] 图8说明当来自健康志愿者的PBMC用各种浓度的CC-93269处理24小时时,细胞因子产生(IFN γ 、IL-6、IL-2、IL-10、颗粒酶B和穿孔素)的剂量-反应曲线。

[0046] 图9说明当来自健康志愿者的PBMC用各种浓度的CC-93269处理24小时时的B细胞谱系。具有CD20(+) CD27(-) IgD(+)表达的首次用于实验的B细胞(A)、具有CD20(+) CD27(+) IgD(+)表达的未转换的记忆B细胞(B)以及具有CD20(+) CD27(+) IgD(-)表达的转换的记忆B细胞(C)作为总CD19(+)细胞的百分比给出。

[0047] 图10说明与悬浮于培养基中的PBMC或悬浮于骨髓(BM)上清液中的PBMC相比,当骨髓(BM)单核细胞用CC-93269处理24小时时,浆母细胞杀伤(A)和T细胞活化(B)的剂量-反应曲线。浆母细胞杀伤评估为总CD19(+)细胞的百分比(A)。显示了CD8+ T细胞上的%CD69表达(B)。

[0048] 图11说明当来自AAV患者的PBMC用各种浓度的BCMA TCE (Mab101、CC-93269或Mab102)或对照2+1抗体处理24小时时,浆母细胞杀伤(A)、T细胞活化(C)和细胞因子产生(D)的剂量-反应曲线。代表性的FACS图显示对CD3(-) CD19(+)细胞门控,鉴定为CD20(-) CD27(+)的浆母细胞(B)。浆母细胞杀伤评估为总CD19(+)细胞的百分比(A)。显示了CD8+ T细胞上的%CD69表达(C)。

[0049] 图12说明如通过T细胞谱系(CD4、CD8)和活化标记物(CD69、CD25)的染色评估的,当与BCMA TCE (Mab101 [A]、CC-93269 [B]或Mab102 [C])一起孵育24小时时,来自AAV患者AAV1的PBMC的T细胞活化。显示了CD4+细胞或CD8+细胞上的%CD69或%CD25表达水平。

[0050] 图13说明在与各种浓度的CC-93269 (B、C)或对照2+1抗体(A)一起孵育后,来自AAV患者AAV-5的PBMC的选择性浆母细胞(PB)耗尽,所述AAV-5在5个月前最后一次接受了利妥昔单抗。

[0051] 图14说明在基线时,AAV-2受试者的CD19(+) CD20(-) CD27(+) 浆母细胞靶标(A)和CD4(+)/CD8(+) T细胞(A)。将来自AAV-2的PBMC与各种浓度的BCMA TCE一起孵育,并且在24小时孵育之后,通过流式细胞术评估T细胞活化(C)。

[0052] 图15说明当JEKO-1细胞以不同的T:E比率与CC-93269或对照2+1抗体一起孵育时,T细胞活化的剂量-反应曲线。JEKO-1细胞与PBMC以1:10或1:500的T:E比率一起培养,以分别模拟在多发性骨髓瘤(MM)或AAV中观察到的T:E比率。在24小时孵育之后,洗涤细胞并然后评估CD8(+) T细胞上的CD69 (A)和CD25 (B)表达。

[0053] 图16说明当来自健康志愿者的PBMC在用ODN2006 (CpG, 10 μ g/mL)刺激前与各种浓度的BCMA TCE一起孵育24小时,或用生长因子IL-2 (20 U/ml)、BAFF (200 ng/ml)和IL-21 (100 ng/ml)培养4-7天时的浆母细胞水平(A)和总IgG分泌(B)。

[0054] 图17说明当来自类风湿性关节炎(RA)的PBMC用各种浓度的CC-93269或对照2+1抗体处理24小时时,浆母细胞杀伤(A)、T细胞活化(B)和细胞因子产生(C)的剂量-反应曲线。

[0055] 图18说明在与各种浓度的CC-93269一起孵育24小时后,来自RA的PBMC的B细胞谱系。具有CD20(+) CD27(-) IgD(+) 表达的首次用于实验的B细胞(A)、具有CD20(+) CD27(+) IgD(+) 表达的未转换的记忆B细胞(B)以及具有CD20(+) CD27(+) IgD(-) 表达的转换的记忆B细胞(C)作为总CD19(+)细胞的百分比给出。

[0056] 图19说明在与各种浓度的CC-93269或对照2+1抗体一起孵育后,来自食蟹猕猴的PBMC的选择性IRF4+浆母细胞(PB)耗尽(A),以及最低限度的CD20(+) B细胞耗尽(B)以及活化CD69(+) CD8(+) T细胞频率的最低限度升高(C)。

[0057] 图20说明当来自系统性红斑狼疮(SLE)患者(n=5)的PBMC用各种浓度的CC-93269处理24小时时,浆母细胞杀伤(A)和T细胞活化(B)的剂量-反应曲线。

[0058] 图21说明当来自正常健康志愿者的PBMC用CC-93269处理24小时时,外源可溶性BCMA (sBCMA)对浆母细胞杀伤(A)和T细胞活化(B)的影响。

[0059] 图22说明当来自正常健康志愿者(n=4)或AAV患者(n=2)的全血样品用各种浓度的

CC-93269处理24小时时,T细胞活化(A)和细胞因子产生(B)的剂量-反应曲线。

[0060] 图23说明在实施例18.3.3中指定的条件下贮藏之后,22-TCBcv分子的代表性SEC色谱图叠加。

[0061] 图24说明双特异性抗体Mab101、Mab102、83A10-TCBcv和22-TCBcv的热去折叠。所有双特异性抗体都表现出相似的热去折叠起始温度(~60 °C)。然而,对于包含共同CDR区的Mab101和83A10-TCBcv分子,最大转变的T_{mapp}值高大致5°C。

[0062] 图25说明双特异性抗体Mab101、Mab102、83A10-TCBcv和22-TCBcv的胶体稳定性评估。评估通过PEG 6000沉淀来进行,并且在pH 6缓冲液中进行。包含83A10的CDR区的分子(即Mab101和83A10-TCBcv)需要几乎两倍的PEG 6000,以通过排除体积效应来诱导天然状态沉淀。实线拟合为方程1。

[0063] 图26说明双特异性抗体83A10-TCBcv的代表性单循环动力学SPR传感图。抗体在pH 6下缓冲并在2-8°C下贮藏两周(A),或在pH 8下缓冲并在40°C下贮藏两周(B)。短划线表示贮藏前的非应激样品的10次独立测量的均值,以及虚线指示该均值的3个标准差(SD)。根据方程2,使用落入SD窗口内的应激样品的数据点数量来计算百分比相似性评分。

[0064] 图27是双特异性抗体Mab101、Mab102、83A10-TCBcv和22-TCBcv的序列比对。CDR区是有阴影的,且百分比序列同一性显示于上方。

具体实施方式

[0065] 如本文使用的,冠词“一个(a)”和“一个(an)”可以指冠词的语法对象中的一个或多个(例如至少一个)。

[0066] “约”一般可以意指考虑到测量的性质或精度,所测量的量的可接受误差程度。示例性的误差程度在给定值或值的范围的百分之20 (20%)内,典型地在10%内,且更典型地在5%内。

[0067] 在本文中描述为“包含”一个或多个特征的实施方案也可以被视为“由此类特征组成”和/或“基本上由此类特征组成”的相应实施方案的公开。

[0068] 浓度、量、体积、百分比和其它数值在本文中可以以范围形式呈现。还应理解,此类范围形式仅仅为了方便和简洁起见而使用,并且应该灵活解释为不仅包括明确列举为范围限值的数值,还包括在该范围内所包括的所有单个数值或子范围,就如每个数值和子范围被明确地列举一样。

[0069] 治疗方法

本发明至少部分基于用多特异性(例如双特异性)抗体来治疗或管理患有自身免疫性病症的受试者,所述多特异性抗体与促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)以及BCMA结合。

[0070] 在某些实施方案中,“受试者”或“患者”是人。在一些实施方案中,“受试者”或“患者”小于18岁。在一些实施方案中,“受试者”或“患者”为18岁或更大。在一些实施方案中,受试者需要诱导缓解。在一些实施方案中,受试者需要维持缓解。在一些实施方案中,患者需要减少浆母细胞。

[0071] 如本文使用的,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”等是指获得所期望的药理和/或生理作用。优选地,该作用是治疗性的,即该作用部分或完全

地治愈疾病和/或归因于疾病的不良症状。备选地,药理和/或生理作用可以是预防性的,即该作用完全或部分地预防疾病或其症状。

[0072] 如本文使用的,术语“管理(manage)”、“管理(managing)”或“管理(management)”等是指压制和/或延迟疾病和/或归因于疾病的不良症状的进展和/或恶化。

[0073] 本发明涉及用多特异性(例如双特异性)抗体来治疗或管理自身免疫性病症,所述多特异性抗体与促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)以及BCMA结合。

[0074] 在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体能够选择性地与引起自身免疫性病症的细胞结合,例如与引起自身免疫性病症的表达BCMA的细胞结合。

[0075] 在优选的实施方案中,自身免疫性病症由B谱系细胞(例如表达BCMA的B谱系细胞)引起。在一些实施方案中,B谱系细胞(例如表达BCMA的B谱系细胞)是自身反应性B谱系细胞。在一些实施方案中,B谱系细胞(例如表达BCMA的B谱系细胞)例如通过充当抗原呈递细胞或通过分泌促炎细胞因子来驱动自身免疫。

[0076] 如本文使用的,术语“自身反应性B谱系细胞”是指能够识别受试者自身组织上的抗原(“自身抗原”)的B谱系细胞。自身反应性B谱系细胞可以是抗体分泌细胞和/或可能能够分泌抗体。在一些实施方案中,自身反应性B谱系细胞是浆母细胞、浆细胞、记忆B细胞或其任何组合。在优选的实施方案中,自身反应性B谱系细胞是浆母细胞、浆细胞和记忆B细胞。在特别优选的实施方案中,自身反应性B谱系细胞是浆母细胞。

[0077] 在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体能够选择性地与引起自身免疫性病症的自身反应性B谱系细胞结合。在优选的实施方案中,自身反应性B谱系细胞是表达BCMA的细胞,诸如记忆B细胞、浆母细胞和/或浆细胞。

[0078] 浆母细胞是浆细胞的前体。它们可以通过选自CD19(+)、CD20(-)、CD27(+)、CD38(+)、BCMA(+)、IgD(-)、CD24(-)、SLAMF7(+)和/或CD138(-)的一种或多种标记物的组合进行鉴定。在一些实施方案中,浆母细胞被鉴定为显示BCMA(+)和SLAMF7(+)的细胞,任选地其中该细胞还显示标记物IgD(-)、CD38(+)和/或CD138(-)中的一种或多种。在一些实施方案中,浆母细胞被鉴定为显示CD19(+) CD20(-) CD27(+) BCMA(+) SLAMF7(+) IgD(-) CD38(+) CD138(-)的细胞。在特别优选的实施方案中,浆母细胞被鉴定为显示标记物CD19(+) CD20(-) CD27(+)的细胞,任选地其中该细胞还显示标记物BCMA(+)和/或CD38(+)中的一种或多种。

[0079] 浆细胞是抗体分泌细胞。如本文使用的,术语“浆细胞”可以指短寿命和/或长寿命的浆细胞。它们可以通过选自CD19(+)、CD20(-)、CD27(+)、CD38(+)、BCMA(+)、IgD(-)、CD138(+) CD24(-)和/或SLAMF7(+)的一种或多种标记物的组合进行鉴定。在一些实施方案中,浆细胞被鉴定为显示标记物BCMA(+) SLAMF7(+) CD138(+)的细胞,任选地其中该细胞还显示标记物IgD(-)和/或CD38(+)中的一种或多种。在一些实施方案中,浆细胞被鉴定为显示CD19(+) CD20(-) CD27(+) BCMA(+) SLAMF7(+) IgD(-) CD38(+) CD138(+)的细胞。在特别优选的实施方案中,浆细胞被鉴定为显示标记物CD19(+) CD20(-) CD27(+)的细胞,任选地其中该细胞还显示标记物BCMA(+) CD38(+)和/或CD138(+)中的一种或多种。

[0080] 记忆B细胞是在滤泡外或GC反应中被抗原和辅助T细胞激活的B细胞。它们可以通过选自CD19(+)、CD20(+)、CD27(+)、CD38(-)、BCMA(+/-)、IgD(-)和/或CD24(+)的一种或多种标记物的组合进行鉴定。在一些实施方案中,记忆B细胞被鉴定为显示标记物IgD(-)

CD38 (-) BCMA (+/-) 的细胞。在一些实施方案中,记忆B细胞被鉴定为显示标记物CD19 (+) CD20 (+) CD27 (+) IgD (-) CD38 (-) BCMA (+/-) 的细胞。在特别优选的实施方案中,记忆B细胞被鉴定为显示标记物CD19 (+) CD20 (+) CD27 (+) 的细胞,任选地其中该细胞还显示选自BCMA (+) 和/或CD38 (-) 的一种或多种标记物。

[0081] 本发明人已鉴定了本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以用于治疗或管理患有自身免疫性病症的患者,其中来自患者的血液样品具有比多发性骨髓瘤(MM)患者中的可溶性BCMA量少的可溶性BCMA量,和/或具有与正常健康患者中的可溶性BCMA量可比较的可溶性BCMA量。来自患者的血液样品(例如分离的血清或血浆)中的可溶性BCMA可以通过ELISA,例如使用Ampersand Biosciences (Lake Clear, NY) 的基于珠的免疫测定进行测量。

[0082] 在一些实施方案中,来自患有自身免疫性病症的患者的血液样品具有比患有B细胞恶性肿瘤(例如表达BCMA的癌症)的患者中的可溶性BCMA量少的可溶性BCMA量。在一些实施方案中,来自患有自身免疫性病症的患者的血液样品具有比MM患者中的可溶性BCMA量少的可溶性BCMA量,优选是MM患者中的可溶性BCMA量的约1/1.5、约1/2、约1/2.5、约1/3、约1/3.5、约1/4、约1/4.5、约1/5、约1/5.5或约1/6。在一些实施方案中,如通过ELISA测量的,来自患有自身免疫性病症的患者的血液样品具有小于约150 ng/ml、小于约100 ng/ml、小于约75 ng/ml、小于约50 ng/ml、小于约40 ng/ml、小于约35 ng/ml或小于约30 ng/ml的可溶性BCMA。在一些实施方案中,如通过ELISA测量的,来自患有自身免疫性病症的患者的血液样品具有在正常健康人中的可溶性BCMA量的约40 ng/ml、约30 ng/ml、约20 ng/ml、约15 ng/ml、约10 ng/ml或约5 ng/ml内的可溶性BCMA量。在一些实施方案中,如通过ELISA测量的,来自患有自身免疫性病症的患者的血液样品具有至少5 ng/ml、至少7.5 ng/ml、至少10 ng/ml、至少12.5 ng/ml或至少15 ng/ml的可溶性BCMA量。在一些实施方案中,如通过ELISA测量的,来自患有自身免疫性病症的患者的血液样品具有在约5 ng/ml和50 ng/ml之间、约5 ng/ml和40 ng/ml之间、约5 ng/ml和30 ng/ml之间、约10 ng/ml和50 ng/ml之间、约10 ng/ml和40 ng/ml之间或约10 ng/ml和30 ng/ml之间的可溶性BCMA量。如通过ELISA测量的,来自患者的血液样品(例如分离的血清或血浆)中的可溶性BCMA可以通过Ampersand Biosciences (Lake Clear, NY) 使用基于珠的免疫测定进行测量。本发明人已鉴定了本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以用于治疗或管理患有由浆母细胞和/或浆细胞引起的自身免疫性病症的患者,其中患者具有与正常健康志愿者的浆母细胞BCMA表面受体密度可比较的浆母细胞BCMA表面受体密度。

[0083] 在一些实施方案中,如基于用抗BCMA抗体包被的珠生成的标准曲线,使用流式细胞术系统测量的,需要治疗或管理自身免疫性病症的患者具有小于约10,000个分子、小于约5000个分子、小于约2500个分子或小于约2000个分子的浆母细胞上的BCMA表面受体密度。

[0084] 在一些实施方案中,如基于用抗BCMA抗体包被的珠生成的标准曲线,使用流式细胞术系统测量的,需要治疗或管理自身免疫性病症的患者具有至少约500个分子、至少约700个分子、至少约900个分子或至少约1000个分子的浆母细胞上的BCMA表面受体密度。

[0085] 在一些实施方案中,基于用抗BCMA抗体包被的珠生成的标准曲线,使用流式细胞术系统,需要治疗或管理自身免疫性病症的患者具有在约800个和约2200个分子之间、约

900个和2100个分子之间或约1000个和2000个分子之间的浆母细胞上的BCMA表面受体密度。

[0086] 在一些实施方案中,本发明的用于治疗或管理的方法导致相对于无治疗或参考治疗,患者的浆母细胞减少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%或100%。在优选的实施方案中,本发明的用于治疗或管理的方法导致患者的浆母细胞减少至少75%。在特别优选的实施方案中,本发明的用于治疗或管理的方法导致患者的浆母细胞减少至少90%。

[0087] 在一些实施方案中,本发明的用于治疗或管理的方法导致相对于无治疗或参考治疗,患者的浆细胞减少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%或100%。在优选的实施方案中,本发明的用于治疗或管理的方法导致患者的浆细胞减少至少75%。在特别优选的实施方案中,本发明的用于治疗或管理的方法导致患者的浆细胞减少至少90%。

[0088] 在一些实施方案中,本发明的用于治疗或管理的方法导致相对于无治疗或参考治疗,患者的浆细胞和浆母细胞减少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%或100%。在优选的实施方案中,本发明的用于治疗或管理的方法导致患者的浆细胞和浆母细胞减少至少75%。在特别优选的实施方案中,本发明的用于治疗或管理的方法导致患者的浆细胞和浆母细胞减少至少90%。

[0089] 自身免疫性病症诸如AAV、SLE或RA的现有治疗包括环磷酰胺和/或抗CD20单克隆抗体(例如利妥昔单抗)伴随高剂量的类固醇(例如糖皮质激素)。如本文使用的,术语“参考治疗”(例如用于AAV)优选指用环磷酰胺、利妥昔单抗和/或类固醇的治疗。备选地或另外地,“参考治疗”(例如SLE或RA)是指用抗TNF剂(例如英夫利昔单抗、阿达木单抗、戈利木单抗、依那西普)、抗IL6R抗体(例如托珠单抗、沙立芦单抗)、共刺激阻断剂(例如阿巴西普)、JAK抑制剂(例如托法替尼、巴瑞替尼)和/或贝利木单抗的治疗。另外的治疗包括环磷酰胺、甲氨蝶呤、硫唑嘌呤、麦考酚酸酯、吗替麦考酚酯和/或avacopan。然而,此类现有治疗不一定是有效和/或持久的。此外,它们可能具有不良副作用。

[0090] 不受理论的束缚,预期本发明选择性地耗尽引起自身免疫性病症的B谱系细胞,例如自身反应性B谱系细胞,例如浆母细胞、浆细胞和记忆B细胞。因此,相对于不选择性地耗尽引起自身免疫性病症的B谱系细胞的参考治疗,本发明的用于治疗或管理的方法可导致更快的诱导缓解和/或预期更少的脱靶作用。

[0091] 在一些实施方案中,治疗方法用于诱导缓解。在一些实施方案中,本发明的用于治疗或管理的方法导致相对于参考治疗,患者的诱导缓解快至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%或100%。

[0092] 相对于参考治疗,本发明的用于治疗或管理的方法可以导致更好的维持缓解。例如,在浆母细胞和浆细胞耗尽之后,即使在与用于其再生的生长因子一起孵育后,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体也可以压制和/或延迟来自BCMA阴性前体的浆母细胞和浆细胞的恢复(例如通过FACS和/或IgG分泌测量的)。另外,在浆母细胞和浆细胞耗尽之后,即使在用CpG刺激后,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体也可以压制和/或延迟抗体(例如引起自身免疫性病症的自身抗体)的产生。

[0093] 在一些实施方案中,尽管用IL-2、BAFF和IL-21或CpG (ODN2006) 刺激以诱导浆母

细胞/浆细胞分化,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体仍压制和/或延迟IgG抗体的产生。在用CpG (ODN2006 10 $\mu\text{g/mL}$)、IL-2 (20 U/ml)、BAFF (200 ng/ml)和IL-21 (100 ng/ml)刺激7天之前,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以在用于浆母细胞裂解的EC50浓度下,与分离的外周血单核细胞(PBMC)一起孵育24小时,其后如通过ELISA测量的,IgG浓度可小于约4000 pg/ml、小于约3500 pg/ml、小于约3000 pg/ml、小于约2500 pg/ml或小于约2000 pg/ml。备选地,在用CpG (ODN2006 10 $\mu\text{g/mL}$)、IL-2 (20 U/ml)、BAFF (200 ng/ml)和IL-21 (100 ng/ml)刺激7天之前,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以在用于浆母细胞裂解的EC90浓度下,与分离的外周血单核细胞(PBMC)一起孵育24小时,其后如通过ELISA测量的,IgG浓度可小于约2000 pg/ml、小于约1800 pg/ml、小于约1000 pg/ml或小于约500 pg/ml。

[0094] 在一些实施方案中,治疗方法用于诱导和维持缓解。在一些实施方案中,该方法用于维持缓解。在一些实施方案中,本发明的用于治疗或管理的方法导致相对于参考治疗,患者的维持缓解长至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%或100%。

[0095] 在一些实施方案中,自身免疫性病症是复发或难治的。如本文使用的,术语“复发的”旨在意指在改善期后病症或病症的体征和症状的回归。如本文使用的,术语“难治的”旨在意指特定病症对用特定治疗剂的疗法是有抗性或无反应的。从用特定治疗剂的治疗起始时开始(即对该治疗剂的初始暴露无反应),或者由于在用该治疗剂的第一个治疗期的过程中或在用该治疗剂的后续治疗期期间发展出对该治疗剂的抗性,病症可以对用特定治疗剂的疗法而言是难治的。

[0096] 在一些实施方案中,自身免疫性病症是复发的或对以下而言是难治的:环磷酰胺、抗CD20单克隆抗体(例如利妥昔单抗)、糖皮质激素(例如甲泼尼龙、地塞米松)、抗叶酸剂(例如甲氨蝶呤)、嘌呤合成抑制剂(例如硫唑嘌呤、麦考酚酸酯和/或吗替麦考酚酯)、C5a抑制剂(例如avacopan)、抗CD19抗体、BAFF/APRIL拮抗剂、蛋白酶体抑制剂(例如硼替佐米)、抗CD22单克隆抗体、抗TNF剂(例如英夫利昔单抗、阿达木单抗、戈利木单抗、依那西普)、抗IL6R抗体(例如托珠单抗、沙立芦单抗)、共刺激阻断剂(例如阿巴西普)、JAK抑制剂(例如托法替尼、巴瑞替尼)、贝利木单抗和/或布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)抑制剂。

[0097] 在备选的实施方案中,自身免疫性病症是新近诊断的。

[0098] 适合用本发明的多特异性(例如双特异性)抗体治疗的自身免疫性病症包括但不限于弛缓不能、阿狄森氏病(Addison's disease)、急性炎性脱髓鞘性多发性神经病-AIDP、成人斯蒂尔氏病、无丙种球蛋白血症、斑秃、淀粉样变性、强直性脊柱炎、抗GBM/抗TBM肾炎、抗PAD4激活性类风湿性关节炎、抗磷脂综合征、哮喘、特应性皮炎、自身免疫性血管性水肿、自身免疫性自主神经功能异常、自身免疫性脑脊髓炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳病(AIED)、自身免疫性心肌炎、自身免疫性卵巢炎、自身免疫性睾丸炎、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性视网膜病变、自身免疫性血小板减少症、自身免疫性荨麻疹、轴突和神经元神经病(AMAN)、巴洛病、白塞氏病、良性粘膜类天疱疮、大疱性类天疱疮、卡斯特尔曼病(CD)、乳糜泻、恰加斯病、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、慢性复发性多灶性骨髓炎(CRMO)、查格-施特劳斯综合征(CSS)或嗜酸性肉芽肿(EGPA)、瘢痕性类天疱疮、科根氏综合征、冷凝集素病、先天性心脏传导阻滞、柯萨奇病毒性心肌炎、CREST综合征、克罗恩氏病、

皮炎、疱疹样皮炎、皮肤炎、德维克氏病(视神经脊髓炎)、糖尿病、盘状狼疮、德雷斯勒氏综合征、子宫内膜异位症、嗜酸性粒细胞性食管炎(EoE)、嗜酸性筋膜炎、结节性红斑、原发性混合型冷球蛋白血症、伊文氏综合征、纤维肌痛、纤维化肺泡炎、巨细胞动脉炎(颞动脉炎)、巨细胞心肌炎、古德帕斯彻氏综合征(Goodpasture's syndrome)、肉芽肿性多血管炎、格雷夫斯氏病、格林-巴利综合征、桥本氏病、桥本氏甲状腺炎、自身免疫性溶血性贫血、亨诺-许兰紫癜(HSP)、妊娠疱疹或妊娠性类天疱疮(PG)、化脓性汗腺炎(HS)(反常性痤疮)、低丙种球蛋白血症、特发性膜性肾病、特发性血小板减少性紫癜、IgA肾病、IgG4相关疾病、IgG4相关硬化性疾病、IgG神经病、IgM多发性神经病、免疫性血小板减少性紫癜(ITP)、包涵体肌炎(IBM)、炎性肠病(IBD)、间质性膀胱炎(IC)、幼年型关节炎、幼年型糖尿病(1型糖尿病)、幼年型肌炎(JM)、川崎病、兰伯特-伊顿综合征、白细胞碎裂性血管炎、扁平苔藓、硬化性苔藓、木样结膜炎、线性IgA病(LAD)、狼疮、慢性莱姆病、膜性肾病、梅尼埃氏病、显微镜下多血管炎(MPA)、混合型结缔组织病(MCTD)、莫伦氏溃疡、穆-哈二氏病、多灶性运动神经病(MMN)或MMNCB、多发性硬化、重症肌无力、肌炎、发作性睡症、新生儿狼疮、视神经脊髓炎、嗜中性粒细胞减少症、眼瘢痕性类天疱疮、视神经炎、复发性风湿病(PR)、PANDAS、副肿瘤性小脑变性(PCD)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、帕-罗二氏综合征、睫状体平坦部炎(周边葡萄膜炎)、帕森纳格-特纳综合征、天疱疮、寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、周围神经病变、静脉周围脊髓炎、恶性贫血(PA)、POEMS综合征、结节性多动脉炎、I、II和III型多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎、心肌梗塞后综合征、心包切开后综合征、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、孕酮皮炎、银屑病、银屑病关节炎、单纯红细胞再生障碍(PRCA)、坏疽性脓皮病、雷诺氏综合征、反应性关节炎、反射性交感神经营养不良、复发性多软骨炎、不安腿综合征(RLS)、腹膜后纤维化、风湿热、类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、结节病、施密特综合征、巩膜炎、硬皮病、实体器官移植中的致敏/预成抗体、修格兰氏综合征、精子和睾丸自身免疫、僵人综合征(SPS)、系统性红斑狼疮(SLE)、亚急性细菌性心内膜炎(SBE)、苏萨克氏综合征(Susac's syndrome)、交感性眼炎(SO)、高安氏动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、血小板减少性紫癜、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、托洛萨-亨特综合征(THS)、横贯性脊髓炎、1型糖尿病、溃疡性结肠炎(UC)、未分化型结缔组织病(UCTD)、葡萄膜炎、血管炎、白癜风或伏格特-小柳-原田病和韦格纳氏病。在优选的实施方案中,自身免疫性病症不是IgG4相关疾病。在优选的实施方案中,自身免疫性病症是AAV(例如复发性或难治性AAV)、SLE(例如复发性或难治性SLE)或类风湿性关节炎(例如复发性或难治性类风湿性关节炎)。在特别优选的实施方案中,自身免疫性病症是AAV(例如复发性或难治性AAV)或类风湿性关节炎(例如复发性或难治性类风湿性关节炎)。

[0099] 在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体治疗或管理AAV。在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体治疗或管理类风湿性关节炎。在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体治疗或管理SLE。在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体治疗或管理AAV和类风湿性关节炎。在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体治疗或管理AAV、SLE和类风湿性关节炎。

[0100] 在一个方面,本发明提供治疗或管理AAV的方法,该方法包含向需要此类治疗或管理的受试者(例如人)施用多特异性(例如双特异性)抗体,其中多特异性抗体与BCMA以及促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)结合。

[0101] 在另一个方面,本发明提供与BCMA以及促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)结合的多特异性(例如双特异性)抗体,用于治疗或管理受试者(例如人)的AAV。

[0102] 在一个方面,本发明提供治疗或管理类风湿性关节炎(例如复发性或难治性类风湿性关节炎)的方法,该方法包含向需要此类治疗或管理的受试者(例如人)施用多特异性(例如双特异性)抗体,其中多特异性抗体与BCMA以及促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)结合。

[0103] 在另一个方面,本发明提供与BCMA以及促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)结合的多特异性(例如双特异性)抗体,用于治疗或管理受试者(例如人)的类风湿性关节炎(例如复发性或难治性类风湿性关节炎)。

[0104] 在一个方面,本发明提供治疗或管理SLE(例如复发性或难治性SLE)的方法,该方法包含向需要此类治疗或管理的受试者(例如人)施用多特异性(例如双特异性)抗体,其中多特异性抗体与BCMA以及促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)结合。

[0105] 在另一个方面,本发明提供与BCMA以及促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)结合的多特异性(例如双特异性)抗体,用于治疗或管理受试者(例如人)的SLE(例如复发性或难治性SLE)。

[0106] *T细胞介导的裂解、T细胞活化和细胞因子产生*

本发明的多特异性(例如双特异性)抗体与促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)结合。如本文使用的,术语“T细胞抗原”是指促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)。

[0107] 在优选的实施方案中,T细胞抗原(例如CD3)是人T细胞抗原(例如人CD3)。在优选的实施方案中,T细胞抗原是CD3。

[0108] 因此,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体与T细胞抗原(例如CD3)的结合可以允许将T细胞募集到表达BCMA的细胞,以导致表达BCMA的细胞(例如浆母细胞、浆细胞和/或记忆B细胞)的裂解。因此,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体能够通过将细胞毒性T细胞重定向至表达BCMA的细胞,来诱导表达BCMA的细胞(例如浆母细胞、浆细胞和/或记忆B细胞)的选择性耗尽。

[0109] 本发明人已鉴定了与治疗特征在于高T:E比率的疾病(例如B细胞恶性肿瘤,诸如多发性骨髓瘤)将所需的相比,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以在治疗特征在于低靶标表达BCMA的细胞与效应T细胞比率(T:E比率)的病症(例如自身免疫性病症)中以更低的剂量施用。

[0110] 因此,在一些实施方案中,将本发明的多特异性(例如双特异性)抗体施用给患有自身免疫性病症的受试者,其中个体具有小于约1:15、小于约1:30、小于约1:50、小于约1:100或小于1:500的表达BCMA的细胞与效应T细胞比率。表达BCMA的细胞与效应T细胞比率(T:E比率)可以在来自患有自身免疫性病症的受试者的分离的体液样品中,例如在来自患有自身免疫性病症的受试者的血液样品、骨髓穿刺液或关节液中进行测量。

[0111] 本发明人已鉴定了与治疗B细胞恶性肿瘤(例如表达BCMA的癌症,诸如多发性骨髓瘤)将所需的相比,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以在治疗本文公开的自身免疫性病症(例如由表达BCMA的B谱系细胞引起的自身免疫性病症)中以更低的剂量实现治疗作用。特别地,与裂解多发性骨髓瘤的致病细胞(例如表达BCMA的恶性细胞)所需的剂量相

比,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以以更低的剂量(例如在1/100和1/10之间)实现自身免疫性病症的致病细胞(例如表达BCMA的自身反应性B谱系细胞)的裂解。

[0112] 因此,在一个方面,本发明提供用多特异性(例如双特异性)抗体来治疗或管理自身免疫性病症的方法,所述多特异性抗体与促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)以及BCMA结合,其中治疗包含以在约0.01 mg和约1 mg之间的剂量施用多特异性(例如双特异性)抗体。在其中多特异性(例如双特异性)抗体是本文公开的CC-93269抗体的实施方案中,剂量可以在约0.01 mg和约1 mg之间。

[0113] 在本文公开的任何方面的一些实施方案中,治疗包含多特异性(例如双特异性)抗体的至少一个剂量,例如多特异性(例如双特异性)抗体的至少两个或至少三个剂量。在备选实施方案中,施用多特异性(例如双特异性)抗体的最多三个剂量,例如多特异性(例如双特异性)抗体的最多两个或单个剂量。在优选的实施方案中,施用多特异性(例如双特异性)抗体的单个剂量。

[0114] 在特别优选的实施方案中,治疗包含剂量在约0.01 mg和约1 mg之间的多特异性(例如双特异性)抗体的单个剂量。

[0115] 在一些实施方案中,当与分离的PBMC(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC)一起孵育24小时时,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体实现了浆母细胞裂解,其中本发明的多特异性(例如双特异性)抗体处于低于杀伤表达BCMA的癌细胞(例如JEKO-1细胞系或MM细胞系)所需的浓度下。例如使用重悬于RPMI + 10% HI FBS中的Ficoll梯度,PBMC可以从全血样品中分离。在一些实施方案中,当与全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的全血样品)一起孵育24小时时,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体实现了浆母细胞裂解,其中本发明的多特异性(例如双特异性)抗体处于低于杀伤表达BCMA的癌细胞(例如JEKO-1细胞系或MM细胞系)所需的浓度下。浆母细胞耗尽通过FACS进行测量,由此浆母细胞被鉴定为CD19(+) CD20(-) CD27(+) 细胞。在一些实施方案中,当在小于约1nM、小于约0.8 nM、小于约0.6 nM、小于约0.4 nM、小于约0.3 nM或小于约0.25 nM、小于约0.2 nM、小于约0.1 nM、小于约0.05 nM、小于约0.02 nM、小于约0.01 nM或小于约0.005 nM的50%有效浓度(EC50)下,与分离的PBMC(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC)一起孵育24小时时,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以实现浆母细胞的裂解。在优选的实施方案中,当在约1nM或更低、约0.8 nM或更低、约0.6 nM或更低、约0.4 nM或更低、约0.3 nM或更低、约0.25 nM或更低、约0.02 nM或更低、约0.01 nM或更低、约0.007 nM或更低或约0.005 nM或更低的浓度下,与分离的PBMC(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC)一起孵育24小时时,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体实现了50%浆母细胞的裂解。浆母细胞耗尽通过FACS进行测量,由此浆母细胞被鉴定为CD19(+) CD20(-) CD27(+) 细胞。在一些实施方案中,当在小于约1 nM、小于约0.8 nM、小于约0.6 nM、小于约0.4 nM、小于约0.3 nM、小于约0.2 nM、小于约0.1 nM、小于约0.08 nM或小于约0.06 nM的90%有效浓度(EC90)下,与分离的PBMC(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC)一起孵育24小时时,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以实现浆母细胞的裂解。在优选的实施方案中,当在小于约1 nM、小于约0.8 nM、小于约0.6 nM、小于约0.4 nM、小于约0.3 nM、小于约0.2 nM、小于约0.1 nM、小于约0.08 nM或小于约0.06 nM的浓度下,与分离的PBMC(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC)一起孵育24小时

时,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体实现了90%浆母细胞的裂解。浆母细胞耗尽通过FACS进行测量,由此浆母细胞被鉴定为CD19(+) CD20(-) CD27(+) 细胞。

[0116] 在一些实施方案中,当在小于约1 nM、小于约0.9 nM、小于约0.8 nM、小于约0.7 nM或小于约0.6 nM的99%有效浓度(EC99)下,与分离的PBMC(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC)一起孵育24小时时,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以实现浆母细胞的裂解。在一些实施方案中,当在小于约1 nM、小于约0.9 nM、小于约0.8 nM、小于约0.7 nM或小于约0.6 nM的浓度下,与分离的PBMC(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC)一起孵育24小时时,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体实现了99%浆母细胞的裂解。浆母细胞耗尽通过FACS进行测量,由此浆母细胞被鉴定为CD19(+) CD20(-) CD27(+) 细胞。

[0117] 细胞因子释放综合征(CRS)代表用于治疗癌症(诸如多发性骨髓瘤)的T细胞参与的免疫疗法最频繁的严重不良作用之一(Shimabukuro-Vomhagen, A.等人(2018) Cytokine release syndrome. JImmunother Cancer, 6(1) 56)。不受理论的束缚,CRS可能起因于细胞因子的大量和/或迅速分泌,例如由于免疫效应细胞的活化和/或增殖。在用T细胞参与的免疫疗法治疗多发性骨髓瘤之后,观察到升高的细胞因子水平,诸如IFN γ 、IL-1 β 、IL-6、IL-2、IL-10和/或颗粒酶B。

[0118] 由于自身免疫性病症与甚至在治疗之前都是高的细胞因子水平有关(参见Kunz, M.和Ibrahim, S. (2009) Cytokines and Cytokine Profdes in Human Autoimmune Diseases and Animal Models of Autoimmunity. Mediators of Inflammation, 文章ID 979258; 和Andreakos等人(2002), Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future. Cytokine & Growth Factor Reviews, 第4-5章, 第299-313页),因此T细胞参与的免疫疗法可能被视为无吸引力的自身免疫性病症疗法。然而,本发明人出乎意料地鉴定了本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以针对本发明的自身免疫性病症以治疗有效剂量施用,而无显著的T细胞活化或伴随最低限度的T细胞活化以及无显著的细胞因子产生或伴随最低限度的细胞因子产生。因此,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以治疗或管理本发明的自身免疫性病症,伴随与T细胞活化和/或细胞因子产生有关的不良事件(例如CRS)的最低限度风险。

[0119] 在一个方面,本发明提供用多特异性(例如双特异性)抗体来治疗或管理自身免疫性病症的方法,所述多特异性抗体与促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)以及BCMA结合,其中治疗包含以治疗有效剂量施用多特异性(例如双特异性)抗体,而无显著的T细胞活化或伴随最低限度的T细胞活化。

[0120] 如本文使用的,“无显著的T细胞活化或最低限度的T细胞活化”是指如通过活化标记物CD69的表面表达测量的,高于分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)的基线的活化的T细胞小于20%、小于15%、小于10%或小于5%。优选地,“无显著的T细胞活化或最低限度的T细胞活化”是指如通过活化标记物CD69的表面表达测量的,高于分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)的基线的活化的T细胞小于20%。优选地,针对CD3+ T细胞(例如CD3+ CD4+ T细胞或CD3+ CD8+ T细胞或两者)报告T细胞活化。

[0121] 如本文使用的,活化的T细胞的“基线”(例如表达CD69的CD8(+) T细胞的“基线”)

定义为,在分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)的对照样品中,表达相关活化标记物(例如CD69)的相关T细胞(例如CD8(+) T细胞)的百分比。优选地,对照样品用对照抗CD3抗体,例如对照2+1抗HEL抗CD3抗体处理。优选地,针对CD3+ T细胞(例如CD3+ CD4+ T细胞或CD3+ CD8+ T细胞或两者)报告T细胞活化。在一些实施方案中,当本发明的多特异性(例如双特异性)抗体在用于浆母细胞裂解的50%有效浓度(EC50)下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,不存在显著的T细胞活化或存在最低限度的T细胞活化。T细胞活化可以通过T细胞谱系(CD3、CD4和CD8)和活化标记物(CD69、CD25和CD154)的染色进行测量。优选地,针对CD3+ T细胞(CD3+ CD4+ T细胞或CD3+ CD8+ T细胞或两者)报告T细胞活化。

[0122] 在优选的实施方案中,当本发明的多特异性(例如双特异性)抗体在用于浆母细胞裂解的50%有效浓度(EC50)下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,不存在表达CD69的CD8(+) T细胞的显著增加或存在表达CD69的CD8(+) T细胞的最低限度增加。在优选的实施方案中,当本发明的多特异性(例如双特异性)抗体在用于浆母细胞裂解的50%有效浓度(EC50)下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,存在小于10%、小于5%、小于4%、小于约3%、小于2%或小于1%的表达CD69的CD8(+) T细胞高于基线。在一些实施方案中,当本发明的多特异性(例如双特异性)抗体在用于浆母细胞裂解的50%有效浓度(EC50)下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,不存在高于基线的表达CD69的CD8(+) T细胞频率的增加。

[0123] 在一些实施方案中,当本发明的多特异性(例如双特异性)抗体在用于浆母细胞裂解的50%有效浓度(EC50)下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,存在小于10%、小于5%、小于4%、小于约3%、小于2%或小于1%的表达CD69的CD4(+) T细胞和表达CD69的CD8(+) T细胞高于基线。在一些实施方案中,当本发明的多特异性(例如双特异性)抗体在用于浆母细胞裂解的50%有效浓度(EC50)下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,不存在高于基线的表达CD69的CD4(+) T细胞和表达CD69的CD8(+) T细胞的增加。

[0124] 在一些实施方案中,当本发明的多特异性(例如双特异性)抗体在用于浆母细胞裂解的90%有效浓度(EC90)下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,不存在显著的T细胞活化或存在最低限度的T细胞活化。T细胞活化可以通过T细胞谱系(CD3、CD4和CD8)和活化标记物(CD69、CD25和CD154)的染色进行测量。优选地,针对CD3+ T细胞(CD3+ CD4+ T细胞或CD3+ CD8+ T细胞或两者)报告T细胞活化。在优选的实施方案中,当本发明的多特异性(例如双特异性)抗体在用于浆母细胞裂解的90%有效浓度(EC90)下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,不存在表达CD69的CD8(+) T细胞的显著增加或存在表达CD69的CD8(+) T细胞的最低限度增加。在优选的实施方案中,当本发明的多特异性(例如双特异性)抗体在用于浆母细胞裂解的90%有效浓度(EC90)下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,存在小于20%、小于15%、小于10%、小于5%、小于4%、小于约3%、小于2%或小于1%的表达CD69的

CD8 (+) T细胞高于基线。

[0125] 在一些实施方案中,当本发明的多特异性(例如双特异性)抗体在用于浆母细胞裂解的90%有效浓度(EC90)下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,存在小于20%、小于15%、小于10%、小于5%、小于4%、小于约3%、小于2%或小于1%的表达CD69的CD4 (+) T细胞和表达CD69的CD8 (+) T细胞高于基线。在一些实施方案中,当本发明的多特异性(例如双特异性)抗体在用于浆母细胞裂解的90%有效浓度(EC90)下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,不存在高于基线的表达CD69的CD4 (+) T细胞和表达CD69的CD8 (+) T细胞的增加。

[0126] 在一些实施方案中,当本发明的多特异性(例如双特异性)抗体在用于浆母细胞裂解的99%有效浓度(EC99)下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血PBMC)一起孵育24小时时,存在小于40%、小于30%、小于20%、小于15%、小于10%或小于5%的表达CD69的CD8 (+) T细胞高于基线。优选地,针对CD3+ T细胞(CD3+ CD4+ T细胞或CD3+ CD8+ T细胞或两者)报告T细胞活化。

[0127] 在一些实施方案中,当在其中表达CD69的CD8 (+) T细胞的数量高于基线增加小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%或小于约1%的浓度下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以实现多于40%、多于45%、多于50%、多于55%、多于60%、多于65%、多于70%、多于75%、多于80%、多于85%、多于90%、多于95%或约100%的浆母细胞裂解。

[0128] 在一些实施方案中,当在其中表达CD69的CD8 (+) T细胞的数量高于基线小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%或约1%的浓度下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以实现约50%、约90%或约99%的浆母细胞裂解。在一个方面,本发明提供用多特异性(例如双特异性)抗体来治疗或管理自身免疫性病症的方法,所述多特异性抗体与促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)以及BCMA结合,其中治疗包含以治疗有效剂量施用多特异性(例如双特异性)抗体,而无显著的细胞因子产生或伴随最低限度的细胞因子产生。

[0129] 如本文使用的,“无显著的细胞因子产生或最低限度的细胞因子产生”是指高于分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)的基线小于20 pg/mL、小于10 pg/mL或小于5 pg/mL的细胞因子水平。优选地,“无显著的细胞因子产生或最低限度的细胞因子产生”是指高于供体样品中的基线细胞因子水平小于5 pg/mL的细胞因子水平。可以使用MSD促炎I测定来测量细胞因子水平。

[0130] 如本文使用的,“基线”细胞因子水平(例如IFN γ 的“基线”水平)定义为,分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)的对照样品中的相关细胞因子(例如IFN γ)水平。优选地,对照样品用对照抗CD3抗体,例如对照2+1抗HEL抗CD3抗体处理。可以使用MSD促炎I测定来测量细胞因子水平。

[0131] 在一些实施方案中,当本发明的多特异性(例如双特异性)抗体在用于浆母细胞裂解的50%有效浓度(EC50)下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的

分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,不存在显著的细胞因子产生或存在最低限度的细胞因子产生。使用MSD促炎I测定来测量以下细胞因子的产生:IFN γ 、IL-6、IL-2、IL-10、IL-1 β 、颗粒酶B和/或穿孔素。在一些实施方案中,当本发明的多特异性(例如双特异性)抗体在用于浆母细胞裂解的50%有效浓度(EC50)下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,促炎细胞因子(例如IFN γ 、IL-6、IL-2、IL-10、IL-1 β 、颗粒酶B和/或穿孔素)的水平高于基线小于50 pg/mL、小于20 pg/mL、小于10 pg/mL或小于5 pg/mL。

[0132] 在优选的实施方案中,当本发明的多特异性(例如双特异性)抗体在用于浆母细胞裂解的50%有效浓度(EC50)下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,不存在显著的IFN γ 增加或存在最低限度的IFN γ 增加。在一些实施方案中,当本发明的多特异性(例如双特异性)抗体在用于浆母细胞裂解的50%有效浓度(EC50)下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,IFN γ 水平高于基线小于50 pg/mL、小于20 pg/mL、小于10 pg/mL或小于5 pg/mL。在一些实施方案中,当在其中IFN γ 高于基线增加小于约50 pg/mL、小于约10 pg/mL或小于约5 pg/mL的浓度下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以实现多于40%、多于45%、多于50%、多于55%、多于60%、多于65%、多于70%、多于75%、多于80%、多于85%、多于90%、多于95%或约100%的浆母细胞裂解。

[0133] 考虑到IL-6在驱动CRS中的核心作用(Shimabukuro-Vomhagen, A.等人(2018) Cytokine release syndrome. JImmunother Cancer, 6(1) 56),将抗IL-6受体疗法用于治疗CRS。在一些实施方案中,当本发明的多特异性(例如双特异性)抗体在用于浆母细胞裂解的50%有效浓度(EC50)下,与分离的PBMC或全血(例如来自患有自身免疫性病症的患者的分离的PBMC或全血)一起孵育24小时时,IL-6水平高于基线小于10 pg/mL或小于5 pg/mL。

[0134] 在一个方面,本发明提供用多特异性(例如双特异性)抗体来治疗或管理自身免疫性病症的方法,所述多特异性抗体与促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)以及BCMA结合,其中治疗包含以治疗有效剂量施用多特异性(例如双特异性)抗体,伴随最低限度的CRS。

[0135] 如本文使用的,“最低限度的CRS”是指相对于参考治疗,患者的CTCAE v. 5.0 1级细胞因子释放综合征(CRS)的发生率降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%或100%。优选地,“最低限度的CRS”是指CTCAE v. 5.0 1级CRS。CTCAE v. 5.0 1级CRS由NIH的美国国家癌症研究所(National Cancer Institute)的癌症治疗和诊断分部(Division of Cancer Treatment and Diagnosis) (DCTD)的癌症治疗评估项目(Cancer Therapy Evaluation Program) (CTEP)定义。

[0136] 在一些实施方案中,本发明的用于治疗或管理的方法导致相对于参考治疗,患者的细胞因子释放综合征发生率降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、至少95%或100%。

[0137] 在一些实施方案中,本发明的用于治疗或管理的方法导致相对于参考治疗,患者的感染发生率降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、

75%、80%、85%、90%、至少95%或100%。

[0138] 多特异性抗体

本发明的多特异性(例如双特异性)抗体与BCMA以及促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)特异性结合。术语“针对BCMA以及促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)的抗体”或“与BCMA以及促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)结合的抗体”是指能够以足够的亲和力与BCMA以及促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)结合,使得可用作治疗剂的多特异性(例如双特异性)抗体。这通过制备包含以下的分子来实现:与BCMA结合的第一抗体或抗原结合片段以及促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如CD3)结合的第二抗体或抗原结合片段。此类多特异性抗体可以是三特异性抗体或双特异性抗体。在优选的实施方案中,多特异性抗体是双特异性抗体。

[0139] 如本文使用的,术语“BCMA”涉及人B细胞成熟抗原,也称为BCMA、TR17_HUMAN、TNFRSF17 (UniProt Q02223),其为在分化的浆细胞中优先表达的肿瘤坏死受体超家族的成员。根据UniProt,BCMA的细胞外结构域由氨基酸1-54 (或5-51)组成。如本文使用的,术语“针对BCMA的抗体”、“抗BCMA抗体”或“与BCMA结合的抗体”涉及与BCMA的细胞外结构域特异性结合的抗体。

[0140] 术语“与BCMA特异性结合”是指能够以足够的亲和力与确定的靶标结合使得可用作靶向BCMA的治疗剂的抗体。在一些实施方案中,与BCMA特异性结合的抗体不与其它抗原结合或不以足够的亲和力与其它抗原结合以产生生理作用。

[0141] 在一些实施方案中,如通过例如表面等离子体共振 (SPR) (例如Biacore®)、酶联免疫吸附 (ELISA) 或流式细胞术 (FACS) 测量的,抗BCMA抗体与无关的非BCMA蛋白的结合程度是该抗体与BCMA的结合的约1/10,优选< 1/100。在一个实施方案中,与BCMA结合的抗体具有 10^{-8} M或更小,优选 10^{-8} M至 10^{-13} M,优选 10^{-9} M至 10^{-13} M的解离常数(Kd)。

[0142] 在一个实施方案中,抗BCMA抗体与BCMA的表位结合,所述BCMA的表位在来自不同物种的BCMA中,优选在人和食蟹猴中是保守的,并且另外优选地,还与小鼠和大鼠BCMA结合。

[0143] 优选地,抗BCMA抗体与一组BCMA特异性结合,该组BCMA由人BCMA和非人哺乳动物起源的BCMA,优选来自食蟹猴、小鼠和/或大鼠的BCMA组成。使用板结合的BCMA,通过ELISA分析抗BCMA抗体与人BCMA的结合。对于该测定,使用优选为1.5 μ g/mL的板结合BCMA量以及浓度范围为0.1 pM至200 nM的抗BCMA抗体。

[0144] 本发明的多特异性(例如双特异性)抗体与促进一种或多种T细胞活化的抗原(例如T细胞抗原)结合。在优选的实施方案中,T细胞抗原是人T细胞抗原。促进一种或多种T细胞活化的抗原可以选自CD3、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR ζ 、ICOS、CD28、CD27、HVEM、LIGHT、CD40、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、SLAM、CD2或CD226。在优选的实施方案中,促进一种或多种T细胞活化的抗原是CD3,例如人CD3。因此,在优选的实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体与CD3结合,例如人CD3。

[0145] 术语“CD3”是指人CD3蛋白多亚基复合物。CD3蛋白多亚基复合物由6个不同的多肽链构成。因此,该术语包括一个CD3 γ 链 (SwissProt P09693)、一个CD3 δ 链 (SwissProt P04234)、两个CD3 ϵ 链 (SwissProt P07766) 和一个CD3 ζ 链同二聚体 (SwissProt 20963),并且其与T细胞受体 α 链和 β 链有关。该术语包括“全长”未加工的CD3,以及任何CD3变体、同种

型和物种同源物,其由细胞(包括T细胞)天然表达,或者可以在用编码这些多肽的基因或cDNA转染的细胞上表达。

[0146] 术语“与CD3特异性结合”是指能够以足够的亲和力与确定的靶标结合使得可用作靶向CD3的治疗剂的抗体。在一些实施方案中,与CD3特异性结合的抗体不与其它抗原结合或不以足够的亲和力与其它抗原结合以产生生理作用。

[0147] 本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以通过SPR(例如Biacore®)分析与CD3的结合。在一些实施方案中,如通过表面等离子体共振测定确定的,优选使用Biacore 8K在25°C下测量的,双特异性抗体以约 10^{-7} M或更小的解离常数(K_D)、约 10^{-8} M或更小的 K_D 、约 10^{-9} M或更小的 K_D 、约 10^{-10} M或更小的 K_D 、约 10^{-11} M或更小的 K_D 或约 10^{-12} M或更小的 K_D 与人CD3结合。在优选的实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体以约 10^{-8} M或更小的解离常数(K_D)与人CD3结合。

[0148] 术语“抗体”在本文中包括各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性(例如双特异性)抗体和抗体片段,只要它们表现出所期望的抗原结合活性。

[0149] “重链”包含重链可变区(本文缩写为“VH”)和重链恒定区(本文缩写为“CH”)。重链恒定区包含重链恒定结构域CH1、CH2和CH3(抗体类别IgA、IgD和IgG),以及任选的重链恒定结构域CH4(抗体类别IgE和IgM)。

[0150] “轻链”包含轻链可变结构域(本文缩写为“VL”)和轻链恒定结构域(本文缩写为“CL”)。可变区VH和VL可以进一步细分为散布有称为框架区(FR)的更保守区域的称为互补决定区(CDR)的高变区。每个VH和VL由三个CDR和四个FR构成,从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的“恒定结构域”不直接参与抗体与靶标的结合,而是表现出各种效应功能。

[0151] 抗体与其靶标抗原或表位之间的结合由互补决定区(CDR)介导。CDR是具有高序列可变性的区域,其定位于抗体重链和轻链的可变区内,在其中它们形成抗原结合位点。CDR是抗原特异性的主要决定簇。典型地,抗体重链和轻链各自包含非连续排列的三个CDR。抗体重链和轻链CDR3区在根据本发明的抗体的结合特异性/亲和力中发挥特别重要的作用,并且因此提供了本发明的另一个方面。

[0152] 如本文使用的,术语“抗原结合片段”包括任何天然存在或人工构建的抗原结合多肽的构型,所述抗原结合多肽包含一个、两个或三个轻链CDR和/或一个、两个或三个重链CDR,其中该多肽能够与抗原结合。因此,该术语是指除完整抗体之外的分子,其包含完整抗体的一部分,结合完整抗体与之结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体(diabody);线性抗体(linear antibody);单链抗体分子(例如scFv);以及由抗体片段形成的多特异性(例如双特异性)抗体。

[0153] 术语“Fab片段”和“Fab”在本文中可互换使用,并且含有单个轻链(即恒定结构域CL和VL)和单个重链(即恒定结构域CH1和VH)。Fab片段的轻链不能与另一个轻链形成二硫键。

[0154] “Fab'片段”含有单个轻链和单个重链,但除CH1和VH之外,“Fab'片段”还含有CH1和CH2结构域之间的重链的区域,其为形成链间二硫键所需的。因此,两个“Fab'片段”可以通过形成二硫键而缔合,以形成F(ab')₂分子。

[0155] “F(ab')₂片段”含有两个轻链和两个重链。每个链包括在两个重链之间形成链间

二硫键所必需的恒定区的一部分。

[0156] “Fv片段”仅含有重链和轻链的可变区。它不含恒定区。

[0157] “单结构域抗体”是含有单个抗体结构域单元(例如VH或VL)的抗体片段。

[0158] “单链Fv”(“scFv”)是含有连接在一起以形成单链的抗体的VH和VL结构域的抗体片段。多肽接头通常用于连接scFv的VH和VL结构域。

[0159] “串联scFv”,也称为TandAb[®],是通过用柔性肽接头共价键合串联取向的两个scFv而形成的单链Fv分子。

[0160] “双特异性T细胞衔接体”(BiTE[®])是由单个肽链上的两个单链可变片段(scFv)组成的融合蛋白。scFv的一个通过CD3受体与T细胞结合,而另一个与肿瘤细胞抗原结合。

[0161] “双抗体”是小的二价和双特异性抗体片段,其包含与通过肽接头连接的相同多肽链(VH-VL)上的轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH),所述肽接头太短而不允许在相同链上的两个结构域之间的配对(Kipriyanov, Int. J. Cancer 77 (1998), 763-772)。这迫使与另一个链的互补结构域配对,并且促进具有两个功能性抗原结合位点的二聚体分子的组装。

[0162] “DARPin”是双特异性锚蛋白重复分子。DARPin来源于天然锚蛋白,其可以在人基因组中找到,并且是最丰富的结合蛋白类型之一。DARPin文库模块由天然锚蛋白重复蛋白序列限定,使用229个锚蛋白重复用于初始设计,并且使用另外2200个用于后续精化(refinement)。模块充当DARPin文库的结构单元。文库模块类似人基因组序列。DARPin由4至6个模块构成。因为每个模块为大约3.5 kDa,所以平均DARPin的大小为16-21 kDa。结合剂的选择通过核糖体展示来完成,所述核糖体展示是完全无细胞的,并且在He M.和Taussig MI, Biochem Soc Trans.2007, Nov;35(Pt 5):962-5中进行描述。

[0163] CDR的序列可以通过参考本领域已知的任何编号系统来鉴定,例如Kabat系统(Kabat, E. A.,等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))、Chothia系统(Chothia & Lesk, “Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins,” I Mol. Biol. 196, 901-917 (1987))或IMGT系统(Lefranc等人, “IMGT Unique Numbering for Immunoglobulin and Cell Receptor Variable Domains and Ig superfamily V-like domains,” Dev. Comp. Immunol. 27, 55-77 (2003))。

[0164] 表1:CDR定义

	Kabat	Chothia	IMGT
VH CDR1	31-35	26-32	27-38
VH CDR2	50-65	52-56	56-65
VH CDR3	95-102	95-102	105-117
VL CDR1	24-34	24-34	27-38
VL CDR2	50-56	50-56	56-65
VL CDR3	89-97	89-97	105-117

对于本发明中所论述的重链恒定区氨基酸位置,编号根据Edelman, G.M.,等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85)中首次描述的EU索引。Edelman的EU编号

也载于Kabat等人(1991)(同上)中。因此,在重链的上下文中,术语“如Kabat中所述的EU索引”、“EU索引”、“Kabat的EU索引”或“EU编号”是指如Kabat等人(1991)中所示的,Edelman等人的基于人IgG1 EU抗体的残基编号系统。用于轻链恒定区氨基酸序列的编号系统类似地在Kabat等人(同上)中记载。因此,如本文使用的,“根据Kabat进行编号”是指Kabat等人(同上)中所示的Kabat。

[0165] 本发明的抗体及其抗原结合片段可以通过重组手段来源于任何物种。例如,抗体或抗原结合片段可以是小鼠、大鼠、山羊、马、猪、牛、鸡、兔、骆驼科动物、驴、人或其嵌合形式。为了用于施用给人,非人来源的抗体或抗原结合片段可以在施用给人患者时在遗传或结构上改变成抗原性更弱。

[0166] 特别优选的是人或人源化抗体,尤其是作为重组人或人源化抗体。

[0167] 术语“人源化抗体”是指其中框架或“互补决定区”(CDR)已进行修饰,以包含当与亲本免疫球蛋白CDR相比具有不同特异性的免疫球蛋白CDR的抗体。例如,可以将鼠CDR移植到人抗体的框架区中,以制备“人源化抗体”。参见例如Riechmann, L.,等人, Nature 332 (1988) 323-327; 和Neuberger, M.S.,等人, Nature 314 (1985) 268-270。在一些实施方案中,“人源化抗体”是其中恒定区已从原始抗体的恒定区进行了另外的修饰或改变,以产生根据本发明的抗体的特性,尤其是关于C1q结合和/或Fc受体(FcR)结合的特性的那些。

[0168] 术语“人抗体”是具有氨基酸序列的抗体,所述氨基酸序列对应于由人或人细胞产生的抗体或者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。人抗体的这一定义特别地排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的各种技术(包括噬菌体展示文库)来产生人抗体。

[0169] 术语“嵌合抗体”是指通常通过重组DNA技术制备的抗体,其包含来自一个来源或物种的可变区(即结合区)和来源于不同来源或物种的恒定区的至少一部分。包含鼠可变区和人恒定区的嵌合抗体是优选的。本发明包括的“嵌合抗体”的其它优选形式是其中恒定区已从原始抗体的恒定区进行修饰或改变,以产生根据本发明的抗体的特性,尤其是关于C1q结合和/或Fc受体(FcR)结合的特性的那些。此类嵌合抗体也称为“类别转换抗体”。嵌合抗体是表达的免疫球蛋白基因的产物,所述免疫球蛋白基因包含编码免疫球蛋白可变区的DNA段和编码免疫球蛋白恒定区的DNA段。涉及常规重组DNA和基因转染技术的用于产生嵌合抗体的方法是本领域众所周知的。参见例如Morrison, S.L.,等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855;美国专利号5,202,238和5,204,244。

[0170] 术语“Fc区”和“Fc”在本文中可互换使用,并且是指由两个Fc链形成的天然免疫球蛋白的部分。每个“Fc链”包含恒定结构域CH2和恒定结构域CH3。每个Fc链还可以包含铰链区。天然Fc区是同二聚体。在一些实施方案中,Fc区可以含有修饰以强制Fc异二聚体化。

[0171] 术语“Fc部分”是指本发明的抗体或其抗原结合片段的部分,其对应于Fc区。

[0172] 存在五个主要类别的重链恒定区,其分类为IgA、IgG、IgD、IgE和IgM,各自具有由同种型指定的特征性效应功能。例如,IgG分成称为IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的四个亚类。Ig分子与多个类别的细胞受体相互作用。例如,IgG分子与对抗体的IgG类别特异的三个类别的Fc γ 受体(Fc γ R)(即Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII)相互作用。对IgG与Fc γ R受体的结合重要的序列已报道定位于CH2和CH3结构域中。

[0173] 本发明的抗体或其抗原结合片段可以是任何同种型,即IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,

以及四链免疫球蛋白 (Ig) 结构的合成多聚体。在优选的实施方案中, 抗体或其抗原结合片段是IgG同种型。抗体或抗原结合片段可以是任何IgG亚类, 例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。在优选的实施方案中, 抗体或其抗原结合片段具有IgG1同种型。

[0174] 在一些实施方案中, 抗体包含具有IgG同种型的重链恒定区。在一些实施方案中, 抗体包含具有IgG同种型的重链恒定区的一部分。在一些实施方案中, IgG恒定区或其部分是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4恒定区。优选地, IgG恒定区或其部分是IgG1恒定区。

[0175] 本发明的抗体或其抗原结合片段可以包含 λ 轻链或 κ 轻链。

[0176] 在优选的实施方案中, 抗体或其抗原结合片段包含轻链, 其为 κ 轻链。在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段包含轻链, 其包含轻链恒定区 (CL), 所述轻链恒定区为 κ 恒定区。

[0177] 在一些实施方案中, 抗体包含轻链, 其包含轻链可变区 (VL), 所述轻链可变区为 κ 可变区。优选地, κ 轻链包含VL和CL, 所述VL为 κ VL, 所述CL为 κ CL。

[0178] 备选地, 抗体或其抗原结合片段可以包含轻链, 其为 λ 轻链。在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段包含轻链, 其包含轻链恒定区 (CL), 所述轻链恒定区为 λ 恒定区。在一些实施方案中, 抗体包含轻链, 其包含轻链可变区 (VL), 所述轻链可变区为 λ 可变区。

[0179] 工程化抗体及其抗原结合片段包括其中已对VH和/或VL内的框架残基进行修饰的那些。此类修饰可以改善抗体的特性, 例如降低抗体的免疫原性和/或改善抗体的产生和纯化。

[0180] 本文公开的抗体及其抗原结合片段可以使用本领域已知的常规技术进行进一步修饰, 例如通过单独或组合使用氨基酸缺失、插入、取代、添加和/或重组和/或本领域已知的任何其它修饰。用于在DNA序列中引入此类修饰的方法是本领域技术人员熟知的, 所述DNA序列构成免疫球蛋白链的氨基酸序列的基础。

[0181] 本发明的抗体及其抗原结合片段还包括衍生物, 其进行修饰 (例如通过将任何类型的分子共价连接到抗体上), 使得共价连接不阻止抗体与其表位的结合或以其它方式削弱抗体的生物活性。合适的衍生物的实例包括但不限于岩藻糖基化抗体、糖基化抗体、乙酰化抗体、PEG化抗体、磷酸化抗体和酰胺化抗体。

[0182] 本发明的抗体的氨基酸序列中的微小变化被认为包括在本发明中, 条件是氨基酸序列中的变化维持与如本文任何地方定义的本发明的抗体或其抗原结合片段具有至少75%, 更优选至少80%、至少90%、至少95%, 且最优选至少99%的序列同一性。

[0183] 本发明的抗体可以包括变体, 其中来自一个物种的氨基酸残基在保守或非保守位置处取代另一个物种中的相应残基。在一个实施方案中, 在非保守位置处的氨基酸残基由保守或非保守残基取代。特别地, 考虑保守氨基酸置换。

[0184] “保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基由具有相似侧链的氨基酸残基置换的氨基酸取代。本领域已定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族, 包括碱性侧链 (例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)、酸性侧链 (例如天冬氨酸或谷氨酸)、不带电荷的极性侧链 (例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸或半胱氨酸)、非极性侧链 (例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸或色氨酸)、 β -分支侧链 (例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸) 和芳香族侧链 (例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或组氨酸)。因此, 如果多肽中的一个氨基酸由来自同一侧链家族的另一个氨基酸置换, 则该氨基酸取代被认为是保守

的。在本发明的抗体中包括保守修饰的变体并不排除其它形式的变体,例如多态变体、种间同源物和等位基因。

[0185] “非保守氨基酸取代”包括氨基酸取代,其中(i)具有正电侧链的残基(例如Arg、His或Lys)取代负电残基(例如Glu或Asp)或被其取代,(ii)亲水残基(例如Ser或Thr)取代疏水残基(例如Ala、Leu、Ile、Phe或Val)或被其取代,(iii)半胱氨酸或脯氨酸取代任何其它残基或被其取代,或(iv)具有庞大的疏水或芳香族侧链的残基(例如Val、His、Ile或Trp)取代具有较小侧链(例如Ala或Ser)或没有侧链(例如Gly)的残基或被其取代。

[0186] 抗体形式

多特异性(例如双特异性)抗体的形式是现有技术中已知的。例如,双特异性抗体形式在以下中进行描述:Kontermann RE, mAbs 4:2 1-16 (2012); Holliger P., Hudson PJ, Nature Biotech.23 (2005) 1126- 1136, Chan AC, Carter PJ Nature Reviews Immunology 10, 301-316 (2010)和Cuesta AM等人, Trends Biotech 28 (2011) 355-362。

[0187] 本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以具有任何形式。多特异性(例如双特异性)抗体形式包括例如多价单链抗体、双抗体和三抗体(triobody),和具有另外的抗原结合结构域(例如单链Fv、串联scFv、VH结构域和/或VL结构域、Fab或(Fab)₂)通过一种或多种肽接头与之连接的全长抗体的恒定结构域结构的抗体,以及抗体模拟物诸如DARPin。在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体具有scFv的形式,例如双特异性T细胞衔接体(BITE[®])。在一些实施方案中,本发明的抗体是单链抗体,其包含与BCMA结合的第一结构域、与T细胞抗原(例如CD3)结合的第二结构域和包含两个多肽单体的第三结构域,每个多肽单体包含铰链、CH2结构域和CH3结构域,其中两个多肽单体通过肽接头彼此融合(例如(铰链-CH2-CH3-接头-铰链-CH2-CH3))。

[0188] 抗体的“化合价”表示结合结构域的数量。因此,术语“二价”、“三价”和“多价”分别表示两个结合结构域、三个结合结构域和多个结合结构域的存在。本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以具有多于一个能够与各个靶标抗原结合的结合结构域(即抗体是三价或多价的)。在优选的实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体具有多于一个能够与各个靶标抗原的相同表位结合的结合结构域。在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体具有多于一个能够与各个靶标抗原上的不同表位结合的结合结构域。

[0189] 本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以是二价、三价或四价的。在优选的实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体是三价的,优选地其中三价抗体对于BCMA是二价的。因此,双特异性抗体可以是三价的,其中三价抗体对于BCMA是二价的。

[0190] 多特异性(例如双特异性)抗体可以是来自单个物种的全长的,或者可以是嵌合或人源化的。对于具有多于两个抗原结合结构域的抗体,一些结合结构域可以是相同的,只要蛋白具有针对两种不同抗原的结合结构域。

[0191] 本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以具有双特异性异二聚体形式。在一些实施方案中,双特异性抗体包含两个不同的重链和两个不同的轻链。在其它实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含两个相同的轻链和两个不同的重链。在一些实施方案中,在本发明的多特异性(例如双特异性)抗体中,两对重链和轻链(HC/LC)中的一对与CD3特异性结合,而另一对与BCMA特异性结合。

[0192] 在其中本发明的双特异性抗体是二价的实施方案中,它们可以包含一种抗BCMA抗体和一种抗CD3抗体(在本文中称为“1+1”形式)。

[0193] 在其中BCMA和CD3抗体是Fab的实施方案中,1+1形式的二价双特异性抗体可以具有以下形式:CD3 Fab - BCMA Fab (即当不存在Fc时)。备选地,双特异性抗体可以具有以下形式:Fc - CD3 Fab - BCMA Fab、Fc- BCMA Fab - CD3 Fab或BCMA Fab - Fc - CD3 Fab (即当存在Fc时)。在优选的实施方案中,二价双特异性抗体具有BCMA Fab - Fc - CD3 Fab形式。

[0194] “CD3 Fab - BCMA Fab”意指CD3 Fab通过其N-末端与BCMA Fab的C-末端结合。

[0195] “Fc - BCMA Fab - CD3 Fab”意指BCMA Fab通过其C-末端与Fc的N-末端结合,并且CD3 Fab通过其C-末端与BCMA Fab的N-末端结合。

[0196] “Fc - CD3 Fab - BCMA Fab”意指CD3 Fab通过其C-末端与Fc的N-末端结合,并且BCMA Fab通过其C-末端与CD3 Fab的N-末端结合。

[0197] “BCMA Fab - Fc - CD3 Fab”意指BCMA和CD3 Fab片段通过其C-末端与Fc的N-末端结合。

[0198] 在其中本发明的双特异性抗体是三价的实施方案中,它们可以包含两种抗BCMA抗体和一种抗CD3抗体(在本文中称为“2+1”形式)。

[0199] 在其中BCMA和CD3抗体是Fab的实施方案中,2+1形式的三价双特异性抗体可以具有以下形式:CD3 Fab - BCMA Fab - BCMA Fab或BCMA Fab - CD3 Fab - BCMA Fab (即当不存在Fc时)。备选地,双特异性抗体可以具有以下形式:BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab、BCMA Fab - Fc - BCMA Fab - CD3 Fab或CD3 Fab - Fc - BCMA Fab - BCMA Fab (即当存在Fc时)。在优选的实施方案中,三价双特异性抗体具有BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab形式。

[0200] “CD3 Fab - BCMA Fab - BCMA Fab”意指CD3 Fab通过其C-末端与第一BCMA Fab的N-末端结合,并且第一BCMA Fab通过其C-末端与第二BCMA Fab的N-末端结合。

[0201] “BCMA Fab - CD3 Fab - BCMA Fab”意指第一BCMA Fab通过其C-末端与CD3 Fab的N-末端结合,并且CD3 Fab通过其C-末端与第二BCMA Fab的N-末端结合。

[0202] “BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab”意指第一BCMA Fab和CD3 Fab通过其C-末端与Fc的N-末端结合,并且第二BCMA Fab通过其C-末端与CD3 Fab的N-末端结合。

[0203] “BCMA Fab - Fc - BCMA Fab - CD3 Fab”意指第一BCMA Fab和第二BCMA Fab通过其C-末端与Fc的N-末端结合,并且CD3 Fab通过其C-末端与第二BCMA Fab的N-末端结合。

[0204] “CD3 Fab - Fc - BCMA Fab - BCMA Fab”意指CD3 Fab和第一BCMA Fab通过其C-末端与Fc的N-末端结合,并且第二BCMA Fab通过其C-末端与第一BCMA Fab的N-末端结合。

[0205] 在一些实施方案中,本发明的双特异性抗体可以包含不多于一个与BCMA特异性结合的BCMA Fab,以及不多于一个与CD3特异性结合的CD3 Fab以及不多于一个Fc部分。

[0206] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含不多于一个与CD3特异性结合的CD3 Fab、不多于两个与BCMA特异性结合的BCMA Fab和不多于一个Fc部分。在一些实施方案中,不多于一个CD3 Fab和不多于一个BCMA Fab与Fc部分连接,并且连接通过Fab的C-末端与Fc部分的铰链区的结合来进行。在一些实施方案中,第二BCMA Fab通过其C-末端与CD3 Fab的N-末端或Fc部分的铰链区连接,并且因此在双特异性抗体的Fc部分和CD3 Fab之间。

[0207] 在包含两个BCMA Fab的实施方案中,BCMA Fab优选来源于相同的抗体,并且优选在CDR序列、可变结构域序列VH和VL和/或恒定结构域序列CH1和CL中相同。优选地,两个BCMA Fab的氨基酸序列相同。

[0208] 本发明的双特异性抗体还可以包含scFv代替Fab。因此,在一些实施方案中,双特异性抗体具有上述形式的任何一种,其中每个Fab由相应的scFv替换。

[0209] 根据现有技术,本发明的双特异性抗体的组分(例如Fab片段)可以通过使用适当的接头化学连接在一起。在优选的实施方案中,使用(Gly4-Ser1)₃接头(Desplancq DK等人, Protein Eng. 1994年8月;7(8): 1027-33和MackM.等人, PNAS 1995年7月18日, 第92卷,第15期7021-7025)。如本文使用的,“化学连接”(或“连接”)意指组分通过共价结合进行连接。由于接头是肽接头,因此此类共价结合通常通过生物化学重组手段来进行。例如,如果抗体包含Fc,则可以使用编码各个Fab片段的VL和/或VH结构域、接头和Fc部分链的核酸来进行结合。

[0210] 如果使用接头,则该接头可以具有足以确保第一结构域和第二结构域每个都可以彼此独立地保持其不同的结合特异性的长度和序列。

[0211] 抗体序列

在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其包含选自以下的CDR1H、CDR2H、CDR3H、CDR1L、CDR2L和CDR3L区组合:

a) SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:23的CDR1L区、SEQ ID NO:24的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区;

b) SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:25的CDR1L区、SEQ ID NO:26的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区;

c) SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:27的CDR1L区、SEQ ID NO:28的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区;

d) SEQ ID NO:29的CDR1H区、SEQ ID NO:30的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区、SEQ ID NO:32的CDR2L区和SEQ ID NO:33的CDR3L区;

e) SEQ ID NO:34的CDR1H区、SEQ ID NO:35的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区、SEQ ID NO:32的CDR2L区和SEQ ID NO:33的CDR3L区;

f) SEQ ID NO:36的CDR1H区、SEQ ID NO:37的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区、SEQ ID NO:32的CDR2L区和SEQ ID NO:33的CDR3L区;和

g) SEQ ID NO:15的CDR1H区、SEQ ID NO:16的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:18的CDR1L区、SEQ ID NO:19的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区。

[0212] 在本文公开的任何实施方案中,SEQ ID NO:18的CDR1L区可以用SEQ ID NO:67的CDR1L区替换,并且SEQ ID NO:19的CDR2L区可以用SEQ ID NO:68的CDR2L区替换。因此,在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体可以包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:15的CDR1H区、SEQ ID NO:16的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:67的CDR1L区、SEQ ID NO:68的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区。

[0213] 在本文公开的任何实施方案中,SEQ ID NO:27的CDR1L区可以用SEQ ID NO:71的CDR1L区替换,并且SEQ ID NO:28的CDR2L区可以用SEQ ID NO:72的CDR2L区替换。因此,在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体可以包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段,

其包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:71的CDR1L区、SEQ ID NO:72的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区。

[0214] 在本文公开的任何实施方案中,SEQ ID NO:25的CDR1L区可以用SEQ ID NO:69的CDR1L区替换,并且SEQ ID NO:26的CDR2L区可以用SEQ ID NO:70的CDR2L区替换。因此,在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体可以包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:69的CDR1L区、SEQ ID NO:70的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区。

[0215] 在优选的实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段,包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其包含选自以下的CDR1H、CDR2H、CDR3H、CDR1L、CDR2L和CDR3L区组合:

a) SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:27的CDR1L区、SEQ ID NO:28的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区;

b) SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:25的CDR1L区、SEQ ID NO:26的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区;或

c) SEQ ID NO:15的CDR1H区、SEQ ID NO:16的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:18的CDR1L区、SEQ ID NO:19的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区。

[0216] 在特别优选的实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:27的CDR1L区、SEQ ID NO:28的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区。在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其包含选自以下的VH和VL:

a) SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:12的VL区,

b) SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:13的VL区,

c) SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:14的VL区,

d) SEQ ID NO:38的VH区和SEQ ID NO:12的VL区,

e) SEQ ID NO:39的VH区和SEQ ID NO:12的VL区,

f) SEQ ID NO:40的VH区和SEQ ID NO:12的VL区,或

g) SEQ ID NO:9的VH区和SEQ ID NO:11的VL区。

[0217] 在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其包含选自以下的VH和VL:

a) 包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少75%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性或其相同的氨基酸序列的VH,以及包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%同一性、至少95%同一性或其相同的氨基酸序列的VL;

b) 包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少75%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性或其相同的氨基酸序列的VH,以及包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少75%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性或其相同的氨基酸序列的VL;或

c) 包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少75%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性或其相同的氨基酸序列的VH,以及包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少75%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性或其相同的氨基酸序列的VL。

[0218] 在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其包含选自以下的VH和VL:

- a) SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:13的VL区,
- b) SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:14的VL区,或
- c) SEQ ID NO:9的VH区和SEQ ID NO:11的VL区。

[0219] 在特别优选的实施方案中,抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:14的VL区。

[0220] 在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗CD3抗体或其抗原结合片段。

[0221] 抗CD3抗体的实例包括OKT3、TR66、APA 1/1、SP34、CH2527、WT31、7D6、UCHT-1、Leu-4、BC-3、H2C、HuM291 (维西珠单抗)、Hu291 (PDL)、ChAglyCD3 (奥昔组单抗)、hOKT3 γ 1 (Ala-Ala) (Teplizumab) 和NI-0401 (福雷芦单抗)。

[0222] 产生的首个抗CD3抗体是OKT3 (莫罗单抗CD3),其为与CD3 ϵ 结构域结合的鼠抗体。后续的抗CD3抗体包括人源化或人抗体,以及工程化抗体例如包含修饰的Fc区的抗体。

[0223] 抗CD3抗体可以识别单个多肽链上的表位,例如APA 1/1或SP34 (Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137:1097-1100),或者定位于CD3的两个或更多个亚基上的构象表位,例如WT31、7D6、UCHT-1 (参见W02000041474) 和Leu-4。已使用几种抗CD3抗体进行了临床试验,所述抗CD3抗体包括BC-3 (Anasetti等人, Transplantation 54: 844 (1992) 和H2C (W02008119567A2)。处于临床开发中的抗CD3抗体包括HuM291 (维西珠单抗) (Norman等人, Transplantation. 2000 Dec 27;70(12): 1707-12.)、Hu291 (PDL)、ChAglyCD3 (奥昔组单抗) (H Waldmann)、hOKT3 γ 1 (Ala-Ala) (Teplizumab) (J Bluestone和Johnson and Johnson) 和(NI-0401) 福雷芦单抗。

[0224] 任何抗CD3抗体或其抗原结合片段可以适用于本发明的多特异性(例如双特异性)抗体中。例如,多特异性(例如双特异性)抗体可以包含选自以下的抗CD3抗体:OKT3、TR66、APA 1/1、SP34、CH2527、WT31、7D6、UCHT-1、Leu-4、BC-3、H2C、HuM291 (维西珠单抗)、Hu291 (PDL)、ChAglyCD3 (奥昔组单抗)、hOKT3 γ 1 (Ala-Ala) (Teplizumab) 和NI-0401 (福雷芦单抗)。在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含人源化的SP34抗体或其抗原结合片段。

[0225] 在一些优选的实施方案中,抗CD3抗体或其抗原结合片段可以来源于SP34,并且可以具有与抗体SP34相似的序列以及相同的关于表位结合的特性。

[0226] 在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗CD3抗体或其抗原结合片段,其包含可变结构域VH和可变结构域VL,所述可变结构域VH包含分别作为重链CDR1H、CDR2H和CDR3H的SEQ ID NO:1、2和3的重链CDR,所述可变结构域VL包含分别作为轻链CDR1L、CDR2L和CDR3L的SEQ ID NO:4、5和6的轻链CDR。

[0227] 在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗CD3抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:7 (VH) 和SEQ ID NO:8 (VL) 的可变结构域。在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗CD3抗体或其抗原结合片段,其包含可变区VH和可变区VL,所述可变区VH包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少75%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性或其相同的氨基酸序列,所述可变区VL包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列

具有至少75%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性或其相同的氨基酸序列。

[0228] 在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其包含选自以下的CDR1H、CDR2H、CDR3H、CDR1L、CDR2L和CDR3L区组合:

a) SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:23的CDR1L区、SEQ ID NO:24的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区;

b) SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:25的CDR1L区、SEQ ID NO:26的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区;

c) SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:27的CDR1L区、SEQ ID NO:28的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区;

d) SEQ ID NO:29的CDR1H区、SEQ ID NO:30的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区、SEQ ID NO:32的CDR2L区和SEQ ID NO:33的CDR3L区;

e) SEQ ID NO:34的CDR1H区、SEQ ID NO:35的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区、SEQ ID NO:32的CDR2L区和SEQ ID NO:33的CDR3L区;

f) SEQ ID NO:36的CDR1H区、SEQ ID NO:37的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区、SEQ ID NO:32的CDR2L区和SEQ ID NO:33的CDR3L区;或

g) SEQ ID NO:15的CDR1H区、SEQ ID NO:16的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:18的CDR1L区、SEQ ID NO:19的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区,

以及抗CD3抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:1的CDR1H区、SEQ ID NO:2的CDR2H区、SEQ ID NO:3的CDR3H区、SEQ ID NO:4的CDR1L区、SEQ ID NO:5的CDR2L区和SEQ ID NO:6的CDR3L区。

[0229] 在特别优选的实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含:

抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区和SEQ ID NO:17的CDR3H区,所述VL区包含SEQ ID NO:27的CDR1L区、SEQ ID NO:28的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区;和

抗CD3抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:1的CDR1H区、SEQ ID NO:2的CDR2H区、SEQ ID NO:3的CDR3H区、SEQ ID NO:4的CDR1L区、SEQ ID NO:5的CDR2L区和SEQ ID NO:6的CDR3L区。

[0230] 在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其包含选自以下的VH和VL:

a) SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:12的VL区;

b) SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:13的VL区;

c) SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:14的VL区;

d) SEQ ID NO:38的VH区和SEQ ID NO:12的VL区;

e) SEQ ID NO:39的VH区和SEQ ID NO:12的VL区;

f) SEQ ID NO:40的VH区和SEQ ID NO:12的VL区;或

g) SEQ ID NO:9的VH区和SEQ ID NO:11的VL区,和

抗CD3抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:7的VH区和SEQ ID NO:8的VL区。

[0231] 在特别优选的实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:14的VL区,以及抗CD3抗体或其抗原

结合片段,其包含SEQ ID NO:7的VH区和SEQ ID NO:8的VL区。

[0232] 在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其包含GSK2857916、AMG-420、AMG-701、JNJ-957、JNJ-64007957、PF-06863135、REGN-5458或TNB-383B之一的CDR3H、CDR3L、CDR1H、CDR2H、CDR1L和CDR2L。在一些实施方案中,多特异性(例如双特异性)抗体包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其包含GSK2857916、AMG-420、AMG-701、JNJ-957、JNJ-64007957、PF-06863135、REGN-5458或TNB-383B之一的VH和VL。

[0233] *Fc*

本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以具有Fc或可以不具有Fc。在优选的实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含Fc,优选人Fc。

[0234] 在某些实施方案中,Fc是变体Fc,例如相对于亲本Fc序列(例如随后进行修饰以生成变体的未修饰Fc多肽)已进行修饰(例如通过氨基酸取代、缺失和/或插入),以提供期望的结构特征和/或生物活性的Fc序列。

[0235] 因此,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以包含Fc,其包含一种或多种修饰,所述修饰典型地是为了改变抗体的一种或多种功能特性,诸如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。Fc可以与本发明的抗体中的抗BCMA和/或抗CD3 Fab片段连接。

[0236] Fc的存在具有延长抗体的消除半衰期的优点。本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以在小鼠或食蟹猴,优选食蟹猴中具有长于12小时,优选3天或更长的消除半衰期。在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体具有约1至12天的消除半衰期,其允许至少一次或两次/周的施用。

[0237] *减少的效应功能*

优选地,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含(例如IgG1亚类的)Fc区,其包含修饰以避免FcR和C1q结合并使ADCC/CDC最小化。这提供了以下优点:双特异性抗体单纯地通过效应细胞(例如T细胞)重定向/活化的有力机制来介导其肿瘤细胞杀伤功效。因此,避免了另外的作用机制(诸如对补体系统和表达FcR的效应细胞的影响)并且降低了副作用(诸如输注相关反应)的风险。

[0238] 在优选的实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含IgG,特别是IgG1,包含修饰L234A、L235A和P329G(根据EU编号进行编号)的Fc区。

[0239] *异二聚体化*

本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以是异多聚体抗体。此类异多聚体抗体可以在参与抗体链之间的相互作用的区域中包含修饰,以促进抗体的正确组装。

[0240] 例如,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以包含在CH2和CH3结构域中具有一种或多种修饰的Fc,以强制Fc异二聚体化。备选地或另外地,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以在CH1和CL区中包含修饰,以促进Fab片段的重链和轻链之间的优先配对。

[0241] 存在许多促进异二聚体化的策略。这些策略可以包括将不对称互补修饰引入两个抗体链的每个中,使得两个链彼此相容并因此能够形成异二聚体,但每个链不能与其自身二聚体化。此类修饰可以包括插入、缺失、保守和非保守取代以及重排。

[0242] 可以通过引入带电荷的残基以在第一抗体链和第二抗体链之间产生有利的静电相互作用,来促进异二聚体化。例如,可以将一个或多个带正电荷的氨基酸引入到第一抗体

链内,并且可以将一个或多个带负电荷的氨基酸引入到第二抗体链中的相应位置内。

[0243] 备选地或另外地,可以通过在接触残基之间引入位阻来促进异二聚体化。例如,可以将具有庞大侧链的一个或多个残基引入到第一抗体链内,并且可以将能够容纳庞大侧链的一个或多个残基引入到第二抗体链内。

[0244] 备选地或另外地,可以通过引入对处于链之间的界面处的亲水残基和疏水残基的一种或多种修饰来促进异二聚体化,以使异二聚体形成比同二聚体形成在熵和焓方面更有利。

[0245] 另外的促进异二聚体化的策略是重排抗体链的各部分,使得每个链仅与包含相应重排的链保持相容。例如,CrossMAb技术是基于抗体结构域的交换,以允许正确的链缔合。存在三种主要的CrossMAb形式,这些是:(i) CrossMAb^{Fab},其中VH和VL交换,且CH1和CL交换;(ii) CrossMAb^{VH-VL},其中VH和VL交换;以及(iii) CrossMAb^{CH1-CL},其中CH1和CL交换(Klein等人, 2016. MABS, 8 (6):1010-1020)。

[0246] 在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以包含VH和VL的交换。在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以包含CH1和CL的交换。在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以包含VH和VL的交换以及CH1和CL的交换。

[0247] 在优选的实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含VH和VL的交换。

[0248] 促进异二聚体化的其它方法包括使用链交换工程化结构域(SEED) (Davis等人, 2010. Protein Eng Des Sel, 23 (4); 195- 202)。

[0249] 上述策略的组合可以用于使组装的效率最大化,同时使对抗体稳定性的影响最小化。

[0250] *Fc*异二聚体化

在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以具有异二聚体Fc,例如它们可以包含源自抗BCMA抗体的一个重链和源自抗CD3抗体的一个重链。

[0251] 本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以包含异源二聚体Fc,其包含一种或多种修饰,所述修饰促进第一CH2和/或CH3结构域与第二CH2和/或CH3结构域的缔合。在优选的实施方案中,例如通过产生对CH3结构域的不对称修饰,一种或多种修饰促进第一CH3结构域与第二CH3结构域的缔合。一种或多种修饰可以包含选自以下的修饰:氨基酸插入、缺失、保守和非保守取代以及重排及其组合。

[0252] 典型地,第一CH3结构域和第二CH3结构域均以互补的方式进行工程化,使得每个CH3结构域(或包含其的重链)无法再与其自身同二聚体化,而是被迫与互补的工程化的其它CH3结构域异二聚体化(使得第一CH3结构域和第二CH3结构域异二聚体化,并且在两个第一CH3结构域或两个第二CH3结构域之间没有同二聚体形成)。

[0253] 本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以包含具有一种或多种“旋钮入孔(knob-into-holes)”修饰的Fc,其在例如WO 96/027011、Ridgway, J.B.等人, Protein Eng. 9 (1996) 617-621、Merchant, A.M.等人, Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-68和WO 98/050431中,用几个实例进行了详细描述。

[0254] 在该方法中,对两个CH3结构域的相互作用表面进行改变,以增加含有这两个CH3

结构域的两个Fc链的异二聚体化。(两个Fc链的)两个CH3结构域的一个可以是“旋钮”,而另一个是“孔”。

[0255] 因此,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以包含两个CH3结构域,其中第一Fc链的第一CH3结构域和第二Fc链的第二CH3结构域各自在界面处相遇,所述界面包含抗体CH3结构域之间的原始界面,其中对所述界面进行改变以促进抗体的形成。

[0256] 在一些实施方案中:

(i) 对一个Fc链的CH3结构域进行改变,使得在与另一个Fc链的CH3结构域的原始界面相遇的一个Fc链的CH3结构域的原始界面内,氨基酸残基由具有较大侧链体积的氨基酸残基置换,从而在一个Fc链的CH3结构域的界面内产生突起,所述突起可定位于另一个Fc链的CH3结构域的界面内的空腔中;和

ii) 对另一个Fc链的CH3结构域进行改变,使得在与一个Fc链的CH3结构域的原始界面相遇的另一个Fc链的CH3结构域的原始界面内,氨基酸残基由具有较小侧链体积的氨基酸残基置换,从而在另一个Fc链的CH3结构域的界面内产生空腔,在一个Fc链的CH3结构域的界面内的突起可定位于所述空腔内。

[0257] 优选地,具有较大侧链体积的所述氨基酸残基选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

[0258] 在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含第一CH3结构域,其包含在位置T366、L368和Y407处的修饰,例如T366S、L368A和Y407V(根据EU编号进行编号)。

[0259] 在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含第二CH3结构域,其包含在位置T366处的修饰(“旋钮修饰”),例如T366W(根据EU编号进行编号)。

[0260] 在特别优选的实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含第一CH3结构域和第二CH3结构域,所述第一CH3结构域包含修饰T366S、L368A和Y407V或其保守取代,所述第二CH3结构域包含修饰T366W或其保守取代(根据EU编号进行编号)。

[0261] 在一个实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包括包含表2中所示的修饰的第一CH3结构域以及包含表2中所示的修饰的第二CH3结构域。

[0262] 表2:“旋钮入孔”修饰

第一 CH3 结构域		第二 CH3 结构域	
KABAT	EU 编号	KABAT	EU 编号
T389S L391A Y438V	T366S L368A Y407V	T389W	T366W

本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以包含US 9,562,109和US 9,574,010(通过引用并入本文)中所示的一种或多种修饰。

[0263] 在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含第一CH3结构域,其包含在位置T350、L351、F405和/或Y407处的一种或多种修饰(根据EU编号进行编号),例如T350V、L351Y、F405A和/或Y407V。在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)

抗体包含第一CH3结构域,其包含在位置T350、L351、F405和Y407处的修饰(根据EU编号进行编号),例如T350V、L351Y、F405A和Y407V。

[0264] 在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含第二CH3结构域,其包含在位置T350、T366、K392和/或T394处的一种或多种修饰(根据EU编号进行编号),例如T350V、T366L、K392L和/或T394W。在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含第二CH3结构域,其包含在位置T350、T366、K392和T394处的修饰(根据EU编号进行编号),例如T350V、T366L、K392L和T394W。

[0265] 在优选的实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含第一CH3结构域和第二CH3结构域,所述第一CH3结构域包含在位置T350、L351、F405和/或Y407处的一种或多种修饰(例如T350V、L351Y、F405A和/或Y407V),所述第二CH3结构域包含在位置T350、T366、K392和/或T394处的一种或多种修饰(例如T350V、T366L、K392L和/或T394W)(根据EU编号进行编号)。

[0266] 在特别优选的实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含第一CH3结构域和第二CH3结构域,所述第一CH3结构域包含在位置T350、L351、F405和Y407处的修饰(例如T350V、L351Y、F405A和Y407V),所述第二CH3结构域包含在位置T350、T366、K392和T394处的修饰(例如T350V、T366L、K392L和T394W)(根据EU编号进行编号)。

[0267] 一种或多种修饰可以修饰静电电荷、疏水/亲水相互作用和/或侧链之间的位阻干扰。

[0268] 在特别优选的实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含第一CH3结构域和第二CH3结构域,所述第一CH3结构域包含修饰T350V、L351Y、F405A和Y407V或其保守取代,所述第二CH3结构域包含修饰T350V、T366L、K392L和T394W或其保守取代(根据EU编号进行编号)。

[0269] 在一个实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包括包含表3中所示的修饰的第一CH3结构域以及包含表3中所示的修饰的第二CH3结构域。

[0270] 表3:Fc异二聚体化修饰

第一 CH3 结构域		第二 CH3 结构域	
KABAT	EU 编号	KABAT	EU 编号
T371V	T350V	T371V	T350V
L372Y	L351Y	T389L	T366L
F436A	F405A	K420L	K392L
Y438V	Y407V	T422W	T394W

用于CH3修饰以强制异二聚体化的其它技术被认为是本发明的替代方案,并且在例如W096/27011、W098/050431、EP1870459、W02007/110205、W02007/147901、W02009/089004、W02010/129304、W02011/90754、W02011/143545、W02012/058768、W02013/157954、W02013/157953和W02013/096291中进行描述。

[0271] 在一些实施方案中,根据本发明的双特异性抗体具有IgG2同种型,并且可以使用W02010/129304中描述的异二聚体化方法。

[0272] 其它Fc修饰

在一些实施方案中,本发明的双特异性抗体可以包含Fc,其中通过引入半胱氨酸(C)作为每个CH3结构域的相应位置中的氨基酸来对两个CH3结构域进行改变,使得在两个CH3结构域之间可以形成二硫桥。可以在CH3结构域的一个的位置349处以及另一个CH3结构域的位置354处引入半胱氨酸(根据EU编号进行编号)。

[0273] 优选地,在位置354处引入的半胱氨酸在第一CH3结构域中,并且在位置349处引入的半胱氨酸在第二CH3结构域中(根据EU编号进行编号)。

[0274] Fc可以包含修饰,例如D356E、L358M、N384S、K392N、V397M和V422I(根据EU编号进行编号)。优选地,两个CH3结构域均包含D356E和L358M(根据EU编号进行编号)。

[0275] 轻链和重链异二聚体化

在本发明的多特异性(例如双特异性)抗体中,免疫球蛋白重链和轻链中的一个或多个可以包含一种或多种修饰,例如当重链和轻链共表达或共生产时,能够促进特定重链与特定轻链的优先配对的氨基酸修饰。此类修饰可以在不改变生物特性(诸如与BCMA的结合)的情况下提供显著改善的生产/纯化。特别地,通过引入一种或多种修饰(诸如氨基酸交换)可以显著减少生产中的轻链错配和副产物的形成,并且因此增加产率并促进纯化。

[0276] 一种或多种修饰可以通过引入位阻、用相反电荷取代带电荷的氨基酸和/或通过疏水或亲水相互作用来促进优先的异二聚体配对。在优选的实施方案中,一种或多种修饰通过引入位阻和用相反电荷取代带电荷的氨基酸来促进优先的异二聚体配对。

[0277] 氨基酸交换可以是具有相反电荷的带电荷的氨基酸的取代(例如在CH1/CL界面中),其减少了轻链错配,例如本斯-琼斯(Bence-Jones)型副产物。

[0278] 在优选的实施方案中,帮助轻链和重链异二聚体化的一种或多种修饰是在CDR外部的轻链和重链中的氨基酸修饰。

[0279] 一种或多种修饰可以存在于抗BCMA抗体或其抗原结合片段中。备选地,一种或多种修饰可以存在于抗CD3抗体或其抗原结合片段中。在优选的实施方案中,一种或多种修饰存在于抗BCMA抗体或其抗原结合片段中。

[0280] 在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含免疫球蛋白重链和相应的免疫球蛋白轻链,所述免疫球蛋白重链包含具有氨基酸修饰K147E/D和K213E/D(根据EU编号进行编号)的CH1结构域,所述免疫球蛋白轻链包含具有氨基酸修饰E123K/R/H和Q124K/R/H(根据Kabat进行编号)的CL结构域。优选地,CH1结构域包含氨基酸修饰K147E和K213E(根据EU编号进行编号)或其保守取代,并且相应的CL结构域包含氨基酸修饰E123R和Q124K或其保守取代(根据Kabat进行编号)。此类多特异性(例如双特异性)抗体可以以高产率生产并且可以容易地纯化。

[0281] 在一个实施方案中,表4中描述的氨基酸修饰可以在BCMA抗体或CD3抗体中。

[0282] 在一个实施方案中,本发明的双特异性抗体是二价的,并且包含一个抗BCMA抗体或其抗原结合片段以及一个抗CD3抗体或其抗原结合片段("1+1"形式),其中:

(a) BCMA抗体或其抗原结合片段(例如BCMA Fab)包含具有表4中所示的氨基酸修饰的CH1结构域和具有表4的氨基酸修饰的相应CL结构域;或

(b) CD3抗体或其抗原结合片段(例如CD3 Fab)包含具有表4中所示的氨基酸修饰的CH1结构域和具有表4的氨基酸修饰的相应CL结构域。

[0283] 在一个实施方案中,本发明的双特异性抗体是三价的,并且包含两个抗BCMA抗体

或其抗原结合片段以及一个抗CD3抗体或其抗原结合片段(“2+1”形式),其中:

(a) 一个或两个BCMA抗体或其抗原结合片段(例如BCMA Fab)包含具有表4中所示的氨基酸修饰的CH1结构域和具有表4的氨基酸修饰的相应CL结构域;或

(b) CD3抗体(例如CD3 Fab)包含具有表4中所示的氨基酸修饰的CH1结构域和具有表4的氨基酸修饰的相应CL结构域。

[0284] 特别地,每个BCMA抗体(例如BCMA Fab)可以包含具有表4中所示的氨基酸修饰的CH1结构域和具有氨基酸修饰的相应CL结构域。

[0285] 表4:轻链和重链异二聚体化修饰

CH1 结构域		CL 结构域	
KABAT	EU 编号	KABAT	EU 编号
K145E	K147E	E123R	E123R
K221E	K213E	Q124K	Q124K

在优选的实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含与表2中所示的修饰组合的表4中所示的修饰。因此,在一个实施方案中,本发明的双特异性抗体是二价的,并且包含:

(a) 一个抗BCMA抗体或其抗原结合片段以及一个抗CD3抗体或其抗原结合片段(“1+1”形式),其中 (i) BCMA抗体或其抗原结合片段(例如BCMA Fab)包含CH1结构域和相应的CL结构域,所述CH1结构域包含氨基酸修饰K147E和K213E,所述CL结构域包含氨基酸修饰E123R和Q124K(即表4中所示的修饰),或(ii) CD3抗体或其抗原结合片段(例如CD3 Fab)包含CH1结构域和相应的CL结构域,所述CH1结构域包含氨基酸修饰K147E和K213E,所述CL结构域包含氨基酸修饰E123R和Q124K(即表4中所示的修饰);和

(b) 包含修饰T366S、L368A和Y407V的第一CH3结构域,以及包含修饰T366W(即表2中所示的修饰)的第二CH3结构域。

[0286] 在一个实施方案中,本发明的双特异性抗体是三价的,并且包含:

(a) 两个抗BCMA抗体或其抗原结合片段以及一个抗CD3抗体或其抗原结合片段(“2+1”形式),其中 (i) 一个或两个BCMA抗体或其抗原结合片段(例如BCMA Fabs)包含CH1结构域和相应的CL结构域,所述CH1结构域包含氨基酸修饰K147E和K213E,所述CL结构域包含氨基酸修饰E123R和Q124K(即表4中所示的修饰),或(ii) CD3抗体或其抗原结合片段(例如CD3 Fab)包含CH1结构域和相应的CL结构域,所述CH1结构域包含氨基酸修饰K147E和K213E,所述CL结构域包含氨基酸修饰E123R和Q124K(即表4中所示的修饰);和

(b) 包含修饰T366S、L368A和Y407V的第一CH3结构域,以及包含修饰T366W(即表2中所示的修饰)的第二CH3结构域。

[0287] 特别地,每个BCMA抗体(例如BCMA Fab)可以包含具有表4中所示的氨基酸修饰的CH1结构域和具有表4的氨基酸修饰的相应CL结构域。在优选的实施方案中,第一Fc链在Fc的N-末端处与第一抗BCMA抗体的C-末端结合,而第二Fc链在Fc的N-末端处与抗CD3抗体的C-末端结合。

[0288] 在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含免疫球蛋白重链和相应的免疫球蛋白轻链,所述免疫球蛋白重链包含在位置A141、L145、K147、Q175(根据

EU编号进行编号)中的一个或多个处具有氨基酸修饰的CH1结构域,所述免疫球蛋白轻链包含在位置F116、Q124、L135、T178 (根据Kabat进行编号)中的一个或多个处具有氨基酸修饰的CL结构域。优选地,CH1结构域包含氨基酸修饰A141W、L145E、K147T、Q175E或其保守取代(根据EU编号进行编号),并且相应的CL结构域包含氨基酸修饰F116A、Q124R、L135V、T178R或其保守取代(根据Kabat进行编号)。

[0289] 在一个实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含CH1结构域和相应免疫球蛋白轻链,所述CH1结构域具有表5中所示的氨基酸修饰,所述免疫球蛋白轻链包含具有表5中所示的氨基酸修饰的CL结构域。在其中本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含本发明的抗BCMA抗体或其抗原结合片段以及本发明的抗CD3抗体或其抗原结合片段的实施方案中,表5中所述的氨基酸修饰可以在BCMA抗体或CD3抗体中。

[0290] 在一个实施方案中,本发明的双特异性抗体是二价的,并且包含一个抗BCMA抗体和一个抗CD3抗体("1+1"形式),其中:

(a) BCMA抗体(例如BCMA Fab)包含具有表5中所示的氨基酸修饰的CH1结构域和具有表5的氨基酸修饰的相应CL结构域;或

(b) CD3抗体(例如CD3 Fab)包含具有表5中所示的氨基酸修饰的CH1结构域和具有表5的氨基酸修饰的相应CL结构域。

[0291] 在一个实施方案中,本发明的双特异性抗体是三价的,并且包含两个抗BCMA抗体和一个抗CD3抗体("2+1"形式),其中:

(a) 一个或两个BCMA抗体(例如BCMA Fab)包含具有表5中所示的氨基酸修饰的CH1结构域和具有表5的氨基酸修饰的相应CL结构域;或

(b) CD3抗体(例如CD3 Fab)包含具有表5中所示的氨基酸修饰的CH1结构域和具有表5的氨基酸修饰的相应CL结构域。

[0292] 在特别优选的实施方案中,每个BCMA抗体(例如BCMA Fab)可以包含具有表5中所示的氨基酸修饰的CH1结构域和具有表5的氨基酸修饰的相应CL结构域。

[0293] 表5:轻链和重链异二聚体化修饰

CH1 结构域		CL 结构域	
KABAT	EU 编号	KABAT	EU 编号
A139W	A141W	F116A	F116A
L143E	L145E	Q124R	Q124R
K145T	K147T	L135V	L135V
Q179E	Q175E	T178R	T178R

在优选的实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含与表3中所示的氨基酸修饰组合的表5中所示的氨基酸修饰。因此,在一个实施方案中,本发明的双特异性抗体是二价的,并且包含:

(a) 一个抗BCMA抗体和一个抗CD3抗体("1+1"形式),其中(i) BCMA抗体(例如BCMA Fab)包含CH1结构域和相应的CL结构域,所述CH1结构域包含氨基酸修饰A141W、L145E、K147T和Q175E,所述CL结构域包含氨基酸修饰F116A、Q124R、L135V和T178R(即表5中所示的修饰),或(ii) CD3抗体(例如CD3 Fab)包含CH1结构域和相应的CL结构域,所述CH1结构域包含氨基酸修饰A141W、L145E、K147T和Q175E,所述CL结构域包含氨基酸修饰F116A、

Q124R、L135V和T178R（即表5中所示的修饰）；和

(b) 包含修饰T350V、L351Y、F405A和Y407V的第一CH3结构域，以及包含修饰T350V、T366L、K392L和T394W（即表3中所示的修饰）的第二CH3结构域。

[0294] 在优选的实施方案中，第一Fc链在Fc的N-末端处与抗BCMA抗体的C-末端结合，并且第二Fc链在Fc的N-末端处与抗CD3抗体的C-末端结合。

[0295] 在一个实施方案中，本发明的双特异性抗体是三价的，并且包含：

(a) 两个抗BCMA抗体和一个抗CD3抗体（“2+1”形式），其中 (i) 一个或两个BCMA抗体（例如BCMA Fab）包含CH1结构域和相应的CL结构域，所述CH1结构域包含氨基酸修饰A141W、L145E、K147T和Q175E，所述CL结构域包含氨基酸修饰F116A、Q124R、L135V和T178R（即表5中所示的修饰），或 (ii) CD3抗体（例如CD3 Fab）包含CH1结构域和相应的CL结构域，所述CH1结构域包含氨基酸修饰A141W、L145E、K147T和Q175E，所述CL结构域包含氨基酸修饰F116A、Q124R、L135V和T178R（即表5中所示的修饰）；和

(b) 包含修饰T350V、L351Y、F405A和Y407V的第一CH3结构域，以及包含修饰T350V、T366L、K392L和T394W（即表3中所示的修饰）的第二CH3结构域。

[0296] 特别地，每个BCMA抗体（例如BCMA Fab）包含具有表5中所示的氨基酸修饰的CH1结构域和具有表5的氨基酸修饰的相应CL结构域。在优选的实施方案中，第一Fc链在Fc的N-末端处与第一抗BCMA抗体的C-末端结合，并且第二Fc链在Fc的N-末端处与抗CD3抗体的C-末端结合。

[0297] 备选地，CH1结构域可以包含在位置Q175（根据EU编号进行编号）处的氨基酸修饰，并且相应的CL结构域可以包含在位置F116、Q124、L135、T178（根据Kabat进行编号）中的一个或多个处的氨基酸修饰。CH1结构域可以包含氨基酸修饰Q175K（根据EU编号进行编号）或其保守取代，并且相应的CL结构域可以包含氨基酸修饰F116A、Q124R、L135V、T178R（根据Kabat进行编号）或其保守取代。

[0298] 在备选实施方案中，CH1结构域可以包含在位置Q175（根据EU编号进行编号）处的氨基酸修饰，并且相应的CL结构域可以包含在位置Q124、L135、Q160、T180（根据Kabat进行编号）中的一个或多个处的氨基酸修饰。CH1结构域可以包含氨基酸修饰Q175K（根据EU编号进行编号）或其保守取代，并且相应的CL结构域可以包含氨基酸修饰Q124E、L135W、Q160E和T180E或其保守取代（根据Kabat进行编号）。

[0299] 本发明的多特异性（例如双特异性）抗体可以另外包含在VL区的位置49处的选自氨基酸酪氨酸（Y）、谷氨酸（E）、丝氨酸（S）和组氨酸（H）的氨基酸取代，和/或在VL区的位置74处为苏氨酸（T）或丙氨酸（A）的氨基酸取代。

[0300] 本发明的多特异性（例如双特异性）抗体可以包含CrossMAb技术。CrossMAb技术是基于抗体结构域的交流，以允许正确的链缔合。它用于促进多特异性（例如双特异性）抗体形成。存在三种主要的CrossMAb形式，这些是：(i) CrossMAb^{Fab}，其中VH和VL交换，且CH1和CL交换；(ii) CrossMAb^{VH-VL}，其中VH和VL交换；以及(iii) CrossMAb^{CH1-CL}，其中CH1和CL交换（Klein等人，2016. MABS, 8 (6):1010-1020）。

[0301] CrossMAb技术是现有技术中已知的。其中可变结构域VL和VH或恒定结构域CL和CH1彼此替换的双特异性抗体在W02009080251和W02009080252中进行描述。

[0302] 在本发明的多特异性（例如双特异性）抗体内的抗体或抗原结合片段的一个或多

个中,可变结构域VL和VH或恒定结构域CL和CH1可以彼此替换。在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以包含VH和VL的交换以及CH1和CL的交换。因此,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以包含交换轻链和交换重链。如本文使用的,“交换轻链”是可包含VH-CL、VL-CH1或VH-CH1的轻链。如本文使用的,“交换重链”是可包含VL-CH1、VH-CL或VL-CL的重链。

[0303] 在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含:

- (a) 与CD3特异性结合的抗体的轻链和重链;和
- (b) 与BCMA特异性结合的抗体的轻链和重链,

其中在(i)抗BCMA抗体和/或(ii)抗CD3抗体中,可变结构域VL和VH和/或恒定结构域CL和CH1彼此替换。

[0304] 在一些实施方案中,抗CD3抗体或其抗原结合片段的可变结构域VL和VH或恒定结构域CL和CH1彼此替换。更优选地,抗CD3抗体或其抗原结合片段的可变结构域VL和VH彼此替换。

[0305] 在其中1+1形式的双特异性抗体具有以下形式的实施方案中:CD3 Fab - BCMA Fab (即当不存在Fc时)、Fc - CD3 Fab - BCMA Fab、Fc - BCMA Fab - CD3 Fab或BCMA Fab - Fc - CD3 Fab,双特异性抗体可以包含CrossMab形式,例如CrossMab^{Fab}、CrossMab^{VH-VL}或CrossMab^{CH1-CL}。BCMA Fab可以具有CrossMab形式,例如CrossMab^{Fab}、CrossMab^{VH-VL}或CrossMab^{CH1-CL}。备选地,CD3 Fab可以具有CrossMab形式,例如CrossMab^{Fab}、CrossMab^{VH-VL}或CrossMab^{CH1-CL}。在优选的实施方案中,双特异性抗体的CD3 Fab包含CrossMab^{VH-VL}形式。

[0306] 特别优选具有2+1形式的本发明的双特异性抗体包含CrossMab技术。因此,在其中2+1形式的三价双特异性抗体具有以下形式的实施方案中:CD3 Fab - BCMA Fab - BCMA Fab、BCMA Fab - CD3 Fab - BCMA Fab (即当不存在Fc时)、BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab、BCMA Fab - Fc - BCMA Fab - CD3 Fab或CD3 Fab - Fc - BCMA Fab - BCMA Fab,双特异性抗体可以包含CrossMab形式,例如CrossMab^{Fab}、CrossMab^{VH-VL}或CrossMab^{CH1-CL}。BCMA Fab可以具有CrossMab形式,例如CrossMab^{Fab}、CrossMab^{VH-VL}或CrossMab^{CH1-CL}。备选地,CD3 Fab可以具有CrossMab形式,例如CrossMab^{Fab}、CrossMab^{VH-VL}或CrossMab^{CH1-CL}。在优选的实施方案中,双特异性抗体的CD3 Fab包含CrossMab^{VH-VL}形式。

[0307] 在一些实施方案中,具有1+1形式的本发明的双特异性抗体不包含CrossMab技术,即抗BCMA抗体和抗CD3抗体均不具有彼此替换的可变结构域VL和VH或恒定结构域CL和CH1。

[0308] 示例性实施方案

示例性实施方案在图1-3中进行阐述。

[0309] 在一个实施方案中,根据本发明的双特异性抗体是根据BCMA Fab - Fc - CD3 Fab形式的二价双特异性抗体,其包含一个抗CD3抗体的Fab片段、一个抗BCMA抗体的Fab片段和一个Fc部分。抗BCMA Fab片段包含表4或表5中所示的氨基酸修饰。抗CD3 Fab片段包含轻链和重链,其中轻链是包含可变结构域VH和恒定结构域CL的交换轻链,并且其中重链是包含可变结构域VL和恒定结构域CH1的交换重链。该实施方案在图1A中进行说明,其具有表4中所示的氨基酸修饰。

[0310] 在一个实施方案中,根据本发明的双特异性抗体是根据BCMA Fab - Fc - CD3 Fab形式的二价双特异性抗体,其包含一个抗CD3抗体的Fab片段、一个抗BCMA抗体的Fab片

段和一个Fc部分。抗CD3 Fab片段包含(a)轻链和重链,其中轻链是包含可变结构域VH和恒定结构域CL的交换轻链,并且其中重链是包含可变结构域VL和恒定结构域CH1的交换重链;以及(b)表4或表5中所示的氨基酸修饰。该实施方案在图1B中进行说明,其具有表4中所示的氨基酸修饰。

[0311] 在一个实施方案中,根据本发明的双特异性抗体是根据BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab形式的三价双特异性抗体,其包含一个抗CD3抗体的Fab片段、两个抗BCMA抗体的Fab片段和一个Fc部分。每个抗BCMA Fab片段包含表4或表5中所示的氨基酸修饰。抗CD3 Fab片段包含轻链和重链,其中轻链是包含可变结构域VH和恒定结构域CL的交换轻链,并且其中重链是包含可变结构域VL和恒定结构域CH1的交换重链。该实施方案在图2A中进行说明,其具有表4中所示的氨基酸修饰。

[0312] 在一个实施方案中,根据本发明的双特异性抗体是根据BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab形式的三价双特异性抗体,其包含一个抗CD3抗体的Fab片段、两个抗BCMA抗体的Fab片段和一个Fc部分。抗CD3 Fab片段包含(a)轻链和重链,其中轻链是包含可变结构域VH和恒定结构域CL的交换轻链,并且其中重链是包含可变结构域VL和恒定结构域CH1的交换重链;以及(b)表4或表5中所示的氨基酸修饰。该实施方案在图2B中进行说明,其具有表4中所示的氨基酸修饰。

[0313] 在一个实施方案中,根据本发明的双特异性抗体是根据BCMA Fab - Fc - BCMA Fab - CD3 Fab形式的三价双特异性抗体,其包含一个抗CD3抗体的Fab片段、两个抗BCMA抗体的Fab片段和一个Fc部分。每个抗BCMA Fab片段包含表4或表5中所示的氨基酸修饰。抗CD3 Fab片段包含轻链和重链,其中轻链是包含可变结构域VH和恒定结构域CL的交换轻链,并且其中重链是包含可变结构域VL和恒定结构域CH1的交换重链。该实施方案在图2C中进行说明,其具有表4中所示的氨基酸修饰。

[0314] 在一个实施方案中,根据本发明的双特异性抗体是根据BCMA Fab - Fc - BCMA Fab - CD3 Fab形式的三价双特异性抗体,其包含一个抗CD3抗体的Fab片段、两个抗BCMA抗体的Fab片段和一个Fc部分。抗CD3 Fab片段包含(a)轻链和重链,其中轻链是包含可变结构域VH和恒定结构域CL的交换轻链,并且其中重链是包含可变结构域VL和恒定结构域CH1的交换重链;以及(b)表4或表5中所示的氨基酸修饰。该实施方案在图2D中进行说明,其具有表4中所示的氨基酸修饰。

[0315] 在一个实施方案中,根据本发明的双特异性抗体是根据Fc - CD3 Fab - BCMA Fab形式的二价双特异性抗体,其包含一个抗CD3抗体的Fab片段、一个抗BCMA抗体的Fab片段和一个Fc部分。抗BCMA Fab片段包含表4或表5中所示的氨基酸修饰。抗CD3 Fab片段包含轻链和重链,其中轻链是包含可变结构域VH和恒定结构域CL的交换轻链,并且其中重链是包含可变结构域VL和恒定结构域CH1的交换重链。该实施方案在图3A中进行说明,其具有表4中所示的氨基酸修饰。

[0316] 在一个实施方案中,根据本发明的双特异性抗体是根据Fc - CD3 Fab - BCMA Fab形式的二价双特异性抗体,其包含一个抗CD3抗体的Fab片段、一个抗BCMA抗体的Fab片段和一个Fc部分。抗CD3 Fab片段包含(a)轻链和重链,其中轻链是包含可变结构域VH和恒定结构域CL的交换轻链,并且其中重链是包含可变结构域VL和恒定结构域CH1的交换重链;以及(b)表4或表5中所示的氨基酸修饰。该实施方案在图3B中进行说明,其具有表4中所示

的氨基酸修饰。

[0317] 在一个实施方案中,根据本发明的双特异性抗体是根据Fc - BCMA Fab - CD3 Fab形式的二价双特异性抗体,其包含一个抗CD3抗体的Fab片段、一个抗BCMA抗体的Fab片段和一个Fc部分。抗BCMA Fab片段包含表4或表5中所示的氨基酸修饰。抗CD3 Fab片段包含轻链和重链,其中轻链是包含可变结构域VH和恒定结构域CL的交换轻链,并且其中重链是包含可变结构域VL和恒定结构域CH1的交换重链。该实施方案在图3C中进行说明,其具有表4中所示的氨基酸修饰。

[0318] 在一个实施方案中,根据本发明的双特异性抗体是根据Fc - BCMA Fab - CD3 Fab形式的二价双特异性抗体,其包含一个抗CD3抗体的Fab片段、一个抗BCMA抗体的Fab片段和一个Fc部分。抗CD3 Fab片段包含(a)轻链和重链,其中轻链是包含可变结构域VH和恒定结构域CL的交换轻链,并且其中重链是包含可变结构域VL和恒定结构域CH1的交换重链;以及(b)表4或表5中所示的氨基酸修饰。该实施方案在图3D中进行说明,其具有表4中所示的氨基酸修饰。

[0319] 在一个实施方案中,图2中说明的抗体另外包含表2或表3中所示的修饰。例如,图2中说明的抗体可以包含与表2中所示的修饰组合的表4中所示的修饰。备选地,图2中说明的抗体可以包含与表3中所示的修饰组合的表5中所示的修饰。

[0320] 在一个实施方案中,根据本发明的双特异性抗体是根据BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab形式的三价双特异性抗体,其包含一个抗CD3抗体的Fab片段、两个抗BCMA抗体的Fab片段和一个Fc部分。抗CD3 Fab片段包含轻链和重链,其中轻链是包含可变结构域VH和恒定结构域CL的交换轻链,并且其中重链是包含可变结构域VL和恒定结构域CH1的交换重链。每个抗BCMA Fab片段包含轻链和重链,其中重链包含CH1结构域,所述CH1结构域包含氨基酸修饰K147E和K213E (根据EU编号进行编号),并且其中轻链包含相应的CL结构域,所述CL结构域包含氨基酸修饰E123R和Q124K (根据Kabat进行编号) (即表4中所示的修饰)。Fc部分包含第一Fc链和第二Fc链,其中第一Fc链包含第一恒定结构域CH2和第一恒定结构域CH3,并且第二Fc链包含第二恒定结构域CH2和第二恒定结构域CH3。第一Fc链在Fc的N-末端处与第一抗BCMA Fab的C-末端结合,并且第二Fc链在Fc的N-末端处与抗CD3 Fab的C-末端结合。第一CH3结构域包含修饰T366S、L368A和Y407V (“孔修饰”),并且第二CH3结构域包含修饰T366W (“旋钮修饰”) (根据EU编号进行编号) (即表2中所示的修饰)。此外,两个Fc链进一步包含修饰L234A、L235A和P329G,以及任选的D356E和L358M (根据EU编号进行编号)。任选地,第一CH3结构域进一步包含氨基酸修饰S354C,并且第二CH3结构域进一步包含氨基酸修饰Y349C (根据EU编号进行编号),使得在两个CH3结构域之间形成二硫桥。

[0321] 在另一个实施方案中,根据本发明的双特异性抗体是根据BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab形式的三价双特异性抗体,其包含一个抗CD3抗体的Fab片段、两个抗BCMA抗体的Fab片段和一个Fc部分。抗CD3 Fab片段包含轻链和重链,其中轻链是包含可变结构域VH和恒定结构域CL的交换轻链,并且其中重链是包含可变结构域VL和恒定结构域CH1的交换重链。每个抗BCMA Fab片段包含轻链和重链,其中重链包含CH1结构域,所述CH1结构域包含氨基酸修饰A141W、L145E、K147T和Q175E (根据EU编号进行编号),并且其中轻链包含相应的CL结构域,所述CL结构域包含氨基酸修饰F116A、Q124R、L135V和T178R (根据Kabat编号进行编号) (即表5中所示的修饰)。Fc部分包含第一Fc链和第二Fc链,其中第一Fc链包

含第一恒定结构域CH2和第一恒定结构域CH3,并且第二Fc链包含第二恒定结构域CH2和第二恒定结构域CH3。第一CH3结构域包含修饰T350V、L351Y、F405A和Y407V,并且第二CH3结构域包含修饰T350V、T366L、K392L和T394W (根据EU编号进行编号) (即表3中所示的修饰)。此外,两个Fc链进一步包含修饰L234A、L235A和P329G,以及任选的D356E和L358M (根据EU编号进行编号)。

[0322] 在一些实施方案中,抗BCMA Fab片段包含选自以下的CDR1H、CDR2H、CDR3H、CDR1L、CDR2L和CDR3L区组合:

a) SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:23的CDR1L区、SEQ ID NO:24的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区;

b) SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:25的CDR1L区、SEQ ID NO:26的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区;

c) SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:27的CDR1L区、SEQ ID NO:28的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区;

d) SEQ ID NO:29的CDR1H区、SEQ ID NO:30的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区、SEQ ID NO:32的CDR2L区和SEQ ID NO:33的CDR3L区;

e) SEQ ID NO:34的CDR1H区、SEQ ID NO:35的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区、SEQ ID NO:32的CDR2L区和SEQ ID NO:33的CDR3L区;

f) SEQ ID NO:36的CDR1H区、SEQ ID NO:37的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:31的CDR1L区、SEQ ID NO:32的CDR2L区和SEQ ID NO:33的CDR3L区;和

g) SEQ ID NO:15的CDR1H区、SEQ ID NO:16的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区、SEQ ID NO:18的CDR1L区和SEQ ID NO:19的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区,以及

抗CD3 Fab片段包含SEQ ID NO:1的CDR1H区、SEQ ID NO:2的CDR2H区、SEQ ID NO:3的CDR3H区、SEQ ID NO:4的CDR1L区、SEQ ID NO:5的CDR2L区和SEQ ID NO:6的CDR3L区。

[0323] 在一些实施方案中,抗BCMA Fab片段包含选自以下的VH和VL:

a) SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:12的VL区,

b) SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:13的VL区,

c) SEQ ID NO:10的VH区和SEQ ID NO:14的VL区,

d) SEQ ID NO:38的VH区和SEQ ID NO:12的VL区,

e) SEQ ID NO:39的VH区和SEQ ID NO:12的VL区,

f) SEQ ID NO:40的VH区和SEQ ID NO:12的VL区,或

g) SEQ ID NO:9的VH区和SEQ ID NO:11的VL区;以及

抗CD3 Fab片段包含SEQ ID NO:7的VH区和SEQ ID NO:8的VL区。

[0324] 在进一步的实施方案中,根据本发明的多特异性 (例如双特异性抗体) 包含以下SEQ ID NO (如下表6A、7B和7C中提到的):

83A10-TCBcv:45、46、47 (x2)、48 (图2A)

21-TCBcv:49、50、51 (x2)、48 (图2A)

22-TCBcv:52、53、54 (x2)、48 (图2A)

42-TCBcv:55、56、57 (x2)、48 (图2A)

Mab101:58、59、60 (x2)、48 (图2A,但在CL-CH1中具有替代的氨基酸取代,以减少

轻链错配/副产物:A141W、L145E、K147T、Q175E (“WETE”)和F116A、Q124R、L135V、T178R (“ARVR”),而不是所说明的“RK/EE”取代)

Mab102:61、62、63 (x2)、48 (图2A,但在CL-CH1中具有替代的氨基酸取代,以减少轻链错配/副产物:A141W、L145E、K147T、Q175E (“WETE”)和F116A、Q124R、L135V、T178R (“ARVR”),而不是所说明的“RK/EE”取代)

Mab103:64、65、66 (x2)、48 (图2A,但在CL-CH1中具有替代的氨基酸取代,以减少轻链错配/副产物:A141W、L145E、K147T、Q175E (“WETE”)和F116A、Q124R、L135V、T178R (“ARVR”),而不是所说明的“RK/EE”取代)。

[0325] 如本文使用的,术语“83A10-TCBcv”是指如由其SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47 (2x)和SEQ ID NO:48的重链和轻链组合指定的,以及如图2A中显示且在EP14179705中描述的,与BCMA以及CD3特异性结合的双特异性抗体。

[0326] 如本文使用的,术语“21-TCBcv、22-TCBcv、42-TCBcv”是指:如通过其SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51 (2x)的重链和轻链组合指定的(Mab21)、如通过其SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:54 (2x)的重链和轻链组合指定的(Mab22),以及如通过其SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57- (2x)的重链和轻链组合指定的(Mab42),以及如图2A中显示且在WO 2017/021450中描述的,Mab21、Mab22和Mab42的各自的双特异性抗体。

[0327] 如本文使用的,术语“Mab101”是指如通过其SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:60 (2x)和SEQ ID NO:59的重链和轻链组合所指定的,以及如图2A中显示的(但在CL-CH1中具有替代的氨基酸取代,以减少轻链错配/副产物:A141W、L145E、K147T、Q175E (“WETE”)和F116A、Q124R、L135V、T178R (“ARVR”),而不是所说明的“RK/EE”取代),与BCMA以及CD3特异性结合的双特异性抗体。如本文使用的,术语“Mab102”是指如通过其SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:63 (2x)和SEQ ID NO:62的重链和轻链组合所指定的,以及如图2A中显示的(但在CL-CH1中具有替代的氨基酸取代,以减少轻链错配/副产物:A141W、L145E、K147T、Q175E (“WETE”)和F116A、Q124R、L135V、T178R (“ARVR”),而不是所说明的“RK/EE”取代),与BCMA以及CD3特异性结合的双特异性抗体。如本文使用的,术语“Mab103”是指如通过其SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:66 (2x)和SEQ ID NO:65的重链和轻链组合所指定的,以及如图2A中显示的(但在CL-CH1中具有替代的氨基酸取代,以减少轻链错配/副产物:A141W、L145E、K147T、Q175E (“WETE”)和F116A、Q124R、L135V、T178R (“ARVR”),而不是所说明的“RK/EE”取代),与BCMA以及CD3特异性结合的双特异性抗体。

[0328] 在优选的实施方案中,根据本发明的双特异性抗体是42-TCBcv。如本文使用的,术语“CC-93269”是指双特异性抗体42-TCBcv。

[0329] *具有改善的稳定性的抗体*

本文提供的是针对BCMA和T细胞抗原(例如CD3)的多特异性(例如双特异性)抗体,其具有一种或多种氨基酸修饰,与不含这些修饰的抗体相比,所述氨基酸修饰提供了改善的稳定性(例如改善的生理化学特性)。还提供的是包含所述多特异性抗体的核酸分子、载体、宿主细胞和药物组合物、制备其的方法及其用途,包括治疗方法。

[0330] 在本发明的一个方面,提供与BCMA以及T细胞抗原结合的多特异性抗体,其中多特异性抗体包含(i)抗BCMA抗体或其抗原结合片段;(ii)抗T细胞抗原抗体或其抗原结合片

段;以及(iii)Fc,其中抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含:

a)包含SEQ ID NO:21的CDR1H区、SEQ ID NO:22的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH结构域,以及包含SEQ ID NO:27的CDR1L区、SEQ ID NO:28的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL结构域;

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

c)包含SEQ ID NO:15的CDR1H区、SEQ ID NO:16的CDR2H区、SEQ ID NO:17的CDR3H区的VH结构域,以及包含SEQ ID NO:18的CDR1L区、SEQ ID NO:19的CDR2L区和SEQ ID NO:20的CDR3L区的VL结构域,

其中多特异性抗体包含CH1结构域和CL结构域,其中CH1结构域包含在位置A141、L145、K147和Q175(根据EU编号进行编号)处的氨基酸修饰,并且CL结构域包含在位置F116、Q124、L135和T178(根据Kabat进行编号)处的氨基酸修饰,

并且其中Fc包含第一Fc链和第二Fc链,所述第一Fc链包含第一恒定结构域CH2和CH3,所述第二Fc链包含第二恒定结构域CH2和CH3,其中第一CH3结构域包含在位置T350、L351、F405和Y407(根据EU编号进行编号)处的氨基酸修饰,并且第二CH3结构域包含在位置T350、T366、K392和T394(根据EU编号进行编号)处的氨基酸修饰,任选地其中T细胞抗原是CD3。

[0331] 在一些实施方案中,CH1结构域包含修饰A141W、L145E、K147T和Q175E或其保守取代(根据EU编号进行编号)中的两种或更多种(例如全部),并且其中CL结构域包含修饰F116A、Q124R、L135V和T178R或其保守取代(根据Kabat进行编号)中的两种或更多种(例如全部)。

[0332] 含有氨基酸修饰的CH1结构域和CL结构域可以来自抗BCMA抗体或其抗原结合片段,或者抗T细胞抗原抗体或其抗原结合片段。在优选的实施方案中,抗BCMA抗体或其抗原结合片段包括包含氨基酸修饰的CH1结构域和CL结构域。

[0333] 在一些实施方案中,第一CH3结构域包含修饰T350V、L351Y、F405A和Y407V或其保守取代(根据EU编号进行编号)中的一种或多种;并且第二CH3结构域包含修饰T350V、T366L、K392L和T394W或其保守取代(根据EU编号进行编号)中的一种或多种。在优选的实施方案中,第一CH3结构域包含修饰T350V、L351Y、F405A和Y407V或其保守取代(根据EU编号进行编号);并且第二CH3结构域包含修饰T350V、T366L、K392L和T394W或其保守取代(根据EU编号进行编号)。

[0334] 在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含抗CD3抗体或其抗原结合片段,其中抗CD3抗体的VH结构域包含分别作为CDRH1、CDRH2和CDRH3的SEQ ID NO:1、2和3的CDR,并且抗CD3抗体的VL结构域包含分别作为轻链CDRL1、CDRL2和CDRL3的SEQ ID NO:4、5和6的CDR。

[0335] 在优选的实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含抗CD3抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:7的VH和SEQ ID NO:8的VL。

[0336] 在一些实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体包含IgG1 Fc,并且任选地其中Fc包含:

- a) 修饰L234A、L235A和P329G (根据EU编号进行编号);和/或
- b) 修饰D356E和L358M (根据EU编号进行编号)。

[0337] 在一个实施方案中,本发明的多特异性抗体是双特异性三价抗体,其包含两个抗BCMA抗体的Fab片段和一个抗CD3抗体的Fab片段,任选地其中抗体是BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab形式的。

[0338] 在本发明的一个方面,提供与BCMA以及CD3结合的多特异性抗体,其中多特异性抗体是三价双特异性抗体的形式,其中根据BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab形式,多特异性抗体包含一个抗CD3抗体的Fab片段、两个抗BCMA抗体的Fab片段和一个Fc,并且其中:

a) 抗CD3 Fab片段包含轻链和重链,其中轻链是包含可变结构域VH和恒定结构域CL的交换轻链,并且其中重链是包含可变结构域VL和恒定结构域CH1的交换重链,

b) 每个抗BCMA Fab片段包含轻链和重链,其中轻链包含可变结构域VL和恒定结构域CL,并且重链包含可变结构域VH和恒定结构域CH1,并且其中:

(i) 可变结构域VH分别包含SEQ ID NO: 21、22和17的重链CDR 1-3,并且可变结构域VL分别包含SEQ ID NO: 27、28和20的轻链CDR 1-3;

(ii) 可变结构域VH分别包含SEQ ID NO: 21、22和17的重链CDR 1-3,并且可变结构域VL分别包含SEQ ID NO: 25、26和20的轻链CDR 1-3;或

(iii) 可变结构域VH分别包含SEQ ID NO: 15、16和17的重链CDR 1-3,并且可变结构域VL分别包含SEQ ID NO: 18、19和20的轻链CDR 1-3;

c) 每个抗BCMA Fab片段的CH1结构域包含修饰A141W、L145E、K147T和Q175E或其保守取代(根据EU编号进行编号),并且每个抗BCMA Fab片段的相应CL结构域包含修饰F116A、Q124R、L135V、T178R或其保守取代(根据Kabat编号进行编号),

d) Fc包含第一Fc链和第二Fc链,第一Fc链包含第一恒定结构域CH2和CH3,并且第二Fc链包含第二恒定结构域CH2和CH3,其中第一Fc链在Fc的N-末端处与一个抗BCMA Fab片段的C-末端结合,并且第二Fc链在Fc的N-末端处与抗CD3 Fab片段的C-末端结合,并且其中:

(i) 第一CH3结构域包含修饰T350V、L351Y、F405A和Y407V并且第二CH3结构域包含修饰T350V、T366L、K392L和T394W (根据EU编号进行编号),以及

(ii) 两个Fc链都包含修饰L234A、L235A和P329G,以及任选的修饰D356E和L358M (根据EU编号进行编号)。

[0339] 在本发明的另一个方面,提供与BCMA以及CD3结合的三价双特异性抗体,其中三价双特异性抗体包含以下SEQ ID NO:

- i. Mab101:58、59、48和2x 60。

[0340] ii. Mab102:61、62、48和2x 63。

[0341] iii. Mab103:64、65、48和2x 66。

[0342] 如图2A中显示的,每种分子Mab101、Mab102和Mab103都是2+1双特异性形式的,但在CL-CH1中具有替代的氨基酸取代,以减少轻链错配/副产物:A141W、L145E、K147T、Q175E ("WETE") 和F116A、Q124R、L135V、T178R ("ARVR"),而不是所说明的"RK/EE"取代。

[0343] 在另一个方面,提供包含本发明的多特异性(例如双特异性)抗体和药学上可接受

的赋形剂的药物组合物。在相关的方面,提供包含本发明的三价双特异性抗体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0344] 在另一个方面,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体、本发明的三价双特异性抗体或本发明的药物组合物用作药物。

[0345] 在一个相关的方面,提供治疗受试者的方法,该方法包含向需要此类治疗的受试者(例如人)施用本发明的多特异性(例如双特异性)抗体、本发明的三价双特异性抗体或本发明的药物组合物。

[0346] 在优选的实施方案中,本发明的多特异性(例如双特异性)抗体、本发明的三价双特异性抗体或本发明的药物组合物用于治疗浆细胞病症的药物。在一些实施方案中,浆细胞病症是癌症。在优选的实施方案中,癌症是多发性骨髓瘤或浆细胞白血病。

[0347] 药物组合物

本发明的多特异性(例如双特异性)抗体可以作为药物组合物施用给受试者。因此,本发明还提供包含本发明的多特异性(例如双特异性)抗体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0348] 如本文使用的,术语“药学上可接受的”意指由联邦政府或州政府的监管机构批准,或者在美国药典、欧洲药典或其它一般公认的药典中所列出的用于动物中,并且更特别是用于人中的。

[0349] 本文公开的药物组合物用于但不限于诊断、检测或监测病症、用于预防、治疗、管理或改善病症或其一种或多种症状和/或用于研究中。本文公开的药物组合物可以适合用于兽医用途或人中的药物用途。

[0350] 合适的赋形剂的实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等中的一种或多种,以及其任何组合。在许多情况下,将优选在组合物中包括等渗剂,诸如糖类、多元醇或氯化钠。特别地,合适的赋形剂的有关实例包括:(1) 达尔贝科氏磷酸盐缓冲盐水,pH约7.4,含有或不含有约1 mg/mL至25 mg/mL人血清白蛋白,(2) 0.9%盐水(0.9% w/v氯化钠(NaCl)),以及(3) 5% (w/v) 右旋糖;并且还可以含有抗氧化剂(诸如色胺)和稳定剂(诸如Tween 20®)。

[0351] 本领域的技术人员将理解,用于与本发明的多特异性(例如双特异性)抗体一起使用的一种或多种赋形剂的适当选择将取决于药物组合物所期望的特性。

[0352] 本发明的药物组合物或多特异性(例如双特异性)抗体可以通过任何适当的全身或局部施用途径施用给受试者。例如,施用可以是口服的、含服的、舌下的、眼的、鼻内的、气管内的、肺部的、局部的、透皮的、泌尿生殖道的、直肠的、皮下的、静脉内的、动脉内的、腹膜内的、肌内的、颅内的、鞘内的、硬膜外的、心室内的或肿瘤内的。在一些实施方案中,药物组合物或多特异性(例如双特异性)抗体是静脉内或皮下施用的。在优选的实施方案中,药物组合物或多特异性(例如双特异性)抗体是静脉内施用的。

[0353] 本发明的药物组合物可以配制用于通过任何适当手段的施用,例如通过表皮或透皮贴剂、软膏剂、洗剂、乳膏剂或凝胶剂;通过雾化器、汽化器或吸入器;通过注射或输注;或者以胶囊剂、片剂、在水或非水介质中的液体溶液剂或混悬剂、滴剂、栓剂、灌肠剂、喷雾剂或散剂的形式。在任何给定情况下,用于施用的最合适途径将取决于患者的身体和精神状况、疾病的性质和严重性以及制剂所期望的特性。

[0354] 单一疗法和组合疗法

在一些实施方案中,治疗包含将本发明的多特异性(例如双特异性)抗体作为单一疗法施用给受试者。

[0355] 在一些实施方案中,治疗包含将本发明的多特异性(例如双特异性)抗体作为组合疗法施用给受试者,其中组合疗法包含施用本发明的多特异性(例如双特异性)抗体和一种或多种另外的治疗剂。术语“组合治疗”意指包括将所选的治疗剂施用给单个患者,并且旨在包括其中药剂通过相同或不同的施用途径或者在相同或不同的时间施用的治疗。

[0356] 在一些实施方案中,一种或多种另外的治疗剂选自抗叶酸剂(例如甲氨蝶呤)、嘌呤合成抑制剂(例如硫唑嘌呤、麦考酚酸酯和/或吗替麦考酚酯)、C5a抑制剂(例如avacopan)、抗CD19抗体、抗CD20抗体(例如利妥昔单抗)、类固醇、布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)抑制剂和/或BAFF/APRIL拮抗剂(例如抗BAFF抗体)。

[0357] 本发明人已鉴定了,在诱导缓解和/或维持缓解中对类固醇的需求是最低限度的。因此,在一些实施方案中,一种或多种另外的治疗剂不是类固醇,例如糖皮质激素。

[0358] 在一些实施方案中,一种或多种另外的治疗剂选自沙利度胺及其免疫治疗衍生物、抗CD38抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、 γ 分泌酶抑制剂(GSI)、抗BCMA抗体药物缀合物和抗BCMA CAR T细胞疗法。

[0359] 如本文使用的,术语“抗CD38抗体”涉及与人CD38特异性结合的抗体。在本发明的一个实施方案中,抗CD38抗体是达雷木单抗(US20150246123)。在本发明的一个实施方案中,抗CD38抗体是伊沙妥昔单抗(SAR650984、US8877899)。在本发明的一个实施方案中,抗CD38抗体是MOR202(WO 2012041800)。在本发明的一个实施方案中,抗CD38抗体是Ab79(US8362211)。在本发明的一个实施方案中,抗CD38抗体是Ab19(US8362211)。此类抗CD38抗体的用量根据现有技术来进行,并且在各自的处方信息中进行描述。例如,达雷木单抗用量通常为16 mg/kg (www.ema.europa.eu)。

[0360] 如本文使用的,术语“沙利度胺化合物”或“沙利度胺及免疫治疗衍生物”涉及2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2,3-二氢-1H-异吲哚-1,3-二酮及其免疫治疗衍生物。在本发明的一个实施方案中,沙利度胺化合物选自但不限于沙利度胺(CAS登录号50-35-1)、来那度胺(CAS登录号191732-72-6)、泊马度胺(CAS登录号19171-19-8)、CC122(CAS登录号1398053-45-6)和CC-220(CAS登录号1323403-33-3)以及各自的盐(优选HCl盐1:1)。CC-122的化学式是3-(5-氨基-2-甲基-4-氧代-3-(4H-喹唑啉基))-2,6-哌啶二酮盐酸盐(1:1),并且CC-220的化学式是(3S)-3-[1,3-二氢-4-[[4-(4-吗啉基甲基)苯基]甲氧基]-1-氧代-2H-异吲哚-2-基]-2,6-哌啶二酮盐酸盐(1:1)。制备CC-220的方法在例如US 20110196150中进行描述,其整体通过引用并入本文。

[0361] 沙利度胺化合物的用量根据现有技术来进行,并且在各自的处方信息中进行描述。例如,Revlimid®(来那度胺)用量通常为在重复的28天周期的第1-21天,每天一次口服25 mg (www.revlimid.com),以及用于治疗多发性骨髓瘤的POMALYST®(泊马度胺)用量通常为在重复的28天周期的第1-21天,每天口服服用4 mg (www.celgene.com)。在一个实施方案中,3-(5-氨基-2-甲基-4-氧代-4H-喹唑啉-3-基)-哌啶-2,6-二酮以每天约5 mg至约50 mg的量进行施用。

[0362] 在一个实施方案中,CC-122和CC-220以每天约5 mg至约25 mg的量进行施用。在另

一个实施方案中,CC-122和CC-220以每天约5 mg、10 mg、15 mg、25 mg、30 mg或50 mg的量进行施用。在另一个实施方案中,每天施用10 mg或25 mg的CC-122和CC-220。在一个实施方案中,每天两次施用CC-122和CC-220。

[0363] 如本文使用的,术语“抗PD-1抗体”涉及与人PD-1特异性结合的抗体。此类抗体在例如W02015026634 (MK-3475,帕博利珠单抗)、US7521051、US8008449和US8354509中进行描述。帕博利珠单抗(Keytruda®, MK-3475)也在W0 2009/114335、Poole, R.M. Drugs (2014) 74: 1973; Seiwert, T.,等人, J. Clin. Oncol. 32,5s (附录; 摘要6011)中进行描述。在本发明的一个实施方案中,PD-1抗体是MK-3475 (WHO Drug Information, 第27卷, 第2期, 第161-162页(2013)),并且其包含W0 2015026634的图6中显示的重链和轻链氨基酸序列。帕博利珠单抗的氨基酸序列在W02008156712中进行描述(轻链CDR SEQ ID NO:15、16和17,以及重链CDR SEQ ID NO:18、19和20)。在本发明的一个实施方案中,PD-1抗体是纳武单抗(BMS-936558, MDX1106;WHO Drug Information, 第27卷, 第1期, 第68-69页(2013)、W02006/121168、W0 2015026634中显示的氨基酸序列)。在本发明的一个实施方案中,PD-1抗体是匹地利珠单抗(CT-011,也称为hBAT或hBAT-1;氨基酸序列参见W02003/099196;W0 2009/101611、Fried I. 等人; Neuro Oncol (2014) 16 (附录5): v111-v112.)。在本发明的一个实施方案中,PD-1抗体是MEDI-0680 (AMP-514,W02010/027423、W02010/027827、W02010/027828、Hamid O. 等人; J Clin Oncol 33, 2015 (附录; 摘要TPS3087))。在本发明的一个实施方案中,PD-1抗体是PDR001 (Naing A.等人; J Clin Oncol 34, 2016 (附录; 摘要3060))。在本发明的一个实施方案中,PD-1抗体是REGN2810 (Papadopoulos KP等人; J Clin Oncol 34, 2016 (附录; 摘要3024))。在本发明的一个实施方案中,PD-1抗体是派姆单抗 (lambrolizumab) (W02008/156712)。在本发明的一个实施方案中,PD-1抗体是W02008/156712中描述的h409A11、h409A16或h409A17。此类抗PD-1抗体的用量根据现有技术来进行,并且在各自的处方信息中进行描述。例如,Keytruda® 通常以每三周2 mg/kg体重的浓度进行施用(<http://ec.europa.eu/health/documents>)。

[0364] 如本文使用的,术语“抗PD-L1抗体”涉及与人PD-L1特异性结合的抗体。此类抗体在例如W02015026634、W02013/019906、W02010/077634和US8383796中进行描述。在本发明的一个实施方案中,PD-L1抗体是MPDL3280A (阿特珠单抗,YW243.55.S70、W02010/077634、McDermott DF.等人, JCO 2016年3月10日, 第34卷, 第8期833-842)。在本发明的一个实施方案中,PD-L1抗体是MDX-1105 (BMS-936559,W02007/005874、Patrick A. Ott PA等人, DOI: 10.1158/1078-0432, Clinical Cancer Research-13-0143)。在本发明的一个实施方案中,PD-L1抗体是MEDI4736 (度伐利尤单抗,W0 2016/040238、Gilbert J.等人, Journal for ImmunoTherapy of Cancer 20153 (附录2):P152)。在本发明的一个实施方案中,PD-L1抗体是MSB001071 8C (阿维鲁单抗,Disis ML.等人, Journal of Clinical Oncology, 第33卷, 第15期_附录(5月20日附录), 2015: 5509)。在本发明的一个实施方案中,如W02016007235中描述的,PD-L1抗体是包含SEQ ID NO:16的VH序列和SEQ ID NO:17的VL序列的抗PD-L1抗体。此类抗PD-L1抗体的用量根据现有技术来进行,并且在各自的处方信息中进行描述。例如,阿特珠单抗通常每3周作为60分钟内的静脉内输注以1200 mg的浓度进行施用(www.accessdata.fda.gov)。

[0365] 如本文使用的,术语“ γ 分泌酶”是指表现出 γ 分泌酶活性的任何蛋白或蛋白复合

物,所述 γ 分泌酶活性包括与具有 γ 分泌酶切割序列的底物结合,并且在 γ 分泌酶切割位点处催化 γ 分泌酶切割序列的切割,以产生底物切割产物。在一个实施方案中, γ 分泌酶是包含以下亚基中的一种或多种的蛋白复合物:早老蛋白、呆蛋白、 γ -分泌酶亚基APH-1和 γ -分泌酶亚基PEN-2。

[0366] 如本文使用的,术语“ γ 分泌酶抑制剂”或“GSI”是指能够抑制或减少 γ 分泌酶的表达和/或功能的任何分子。在某些实施方案中,GSI减少 γ 分泌酶的亚基(例如早老蛋白、呆蛋白、APH-1或PEN-2)的表达和/或功能。在该术语内包括“ γ 分泌酶抑制剂”的任何形式,诸如盐、共晶体、结晶形式、前药等。在一些实施方案中,GSI选自抗体或抗原结合片段、小分子、蛋白或肽以及核酸。

[0367] 不良事件

在一些实施方案中,患者发展与多特异性(例如双特异性)抗体施用有关的不良事件或处于发展其的风险中。不良事件可能是细胞因子驱动的毒性(例如细胞因子释放综合征(CRS))、输注相关反应(IRR)、感染、巨噬细胞活化综合征(MAS)、神经系统毒性、严重的肿瘤溶解综合征(TLS)、嗜中性粒细胞减少症、血小板减少症、肝酶升高和/或中枢神经系统(CNS)毒性。在特定实施方案中,不良事件是CRS。

[0368] 在患者发展与多特异性(例如双特异性)抗体施用有关的不良事件或处于发展其的风险中的情况下,治疗可以进一步包含施用能够治疗、预防、延迟、减少或减弱不良事件的发展或发展风险的药剂。可以在用多特异性(例如双特异性)抗体的治疗开始之前(例如作为预防法,以预防或减少不良事件发展的风险)、或在用多特异性(例如双特异性)抗体的治疗期间(例如响应不良事件的发展),将药剂施用给患者。

[0369] 在一些实施方案中,药剂包含类固醇,诸如皮质类固醇。如本文使用的,“皮质类固醇”意指任何天然存在的或合成的类固醇激素,其可以衍生自胆固醇并且特征在于氢化的环戊烷多氢菲环系统。天然存在的皮质类固醇一般由肾上腺皮质产生。合成的皮质类固醇可能是卤化的。活性所需的官能团包括在 $\Delta 4$ 处的双键、C3酮和C20酮。皮质类固醇可能具有糖皮质激素和/或盐皮质激素活性。示例性皮质类固醇的实例包括泼尼松龙、甲泼尼龙、泼尼松、曲安西龙、倍他米松、布地奈德和地塞米松。

[0370] 在一些实施方案中,药剂包含选自GM-CSF、IL-10、IL-10R、IL-6、IL-6受体(IL-6R)、IFN γ 、IFNGR、IL-2、IL-2R/CD25、MCP-1、CCR2、CCR4、MIP1 β 、CCR5、TNF α 、TNFR1、IL-1和IL-1R α /IL-1 β 的细胞因子受体或细胞因子的拮抗剂,其中拮抗剂选自抗体或抗原结合片段、小分子、蛋白或肽以及核酸。拮抗剂可以是抗IL-6抗体和/或抗IL6R抗体。例如,拮抗剂可以选自托珠单抗、司妥昔单抗、克拉扎珠单抗、沙立芦单抗、奥洛组单抗、艾西莫单抗、ALD518/BMS-945429、西鲁库单抗(CNT0136)、CPSI-2634、ARGX-109、仑兹鲁单抗、FE301和FM101。在一些实施方案中,拮抗剂是托珠单抗和/或司妥昔单抗。

[0371] 在一些实施方案中,药剂包含降低调节性T细胞(Treg)群体的分子。降低(例如耗尽)Treg细胞数量的药剂是本领域已知的,并且包括例如CD25耗尽、环磷酰胺施用、抗CTLA4抗体以及调节糖皮质激素诱导的TNLR家族相关基因(GITR)功能。GITR为在活化的T细胞上是上调的TNLR超家族的成员,其增强免疫系统。在一些实施方案中,治疗包含施用环磷酰胺。

[0372] 如上所述,本发明人已观察到在用本发明的双特异性抗体治疗之后没有显著的细

胞因子释放或最低限度的细胞因子释放。因此,在其中不良事件是细胞因子驱动的毒性(例如CRS)的一些实施方案中,治疗不进一步包含施用能够治疗、预防、延迟、减少或减弱不良事件的发展或发展风险的药剂,诸如细胞因子受体或细胞因子的拮抗剂。

[0373] 具体放弃

上述实施方案应理解为说明性实例。设想了进一步的实施方案。应理解,关于任何一个实施方案所述的任何特征可以单独使用,或者与所述其它特征组合使用,并且还可以与任何其它实施方案、或任何其它实施方案的任何组合的一个或多个特征组合使用。此外,还可以采用上文未描述的等价物和修饰,而不脱离所附权利要求中限定的本发明的范围。

[0374] 在本发明的上下文中,本文所述的抗体和方法的其它实例和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。其它实例和变化在如所附权利要求中所述的本发明的范围内。

[0375] 本文引用的所有文件,包括引用文件中呈现的所有数据、表、附图和文本,各自通过引用整体并入本文。

[0376] 表6A:抗体序列

SEQ ID NO:	名称	氨基酸序列
1	CD3 CDR1H	TYAMN
2	CD3 CDR2H	RIRSKYNNYATYYADSVKG
3	CD3 CDR3H	HGNFGNSYVSWFAY
4	CD3 CDR1L	GSSTGAVTTSNYAN
5	CD3 CDR2L	GTNKRAP
6	CD3 CDR3L	ALWYSNLWV
7	CD3 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSS
8	CD3 VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQE KPGQAIFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGA QPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
9	83A10 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGTLLVTVSS
10	Mab21 VH Mab22 VH Mab42 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQ APGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGTLLVTVSS
11	83A10 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK
12	Mab21 VL Mab27 VL Mab33 VL Mab39 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSEYYLAWYQQKP GQAPRLIEHASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK
13	Mab22 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLISGAGSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK
14	Mab42 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQKP GQAPRLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLAISRLEPEDF AVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK
15	83A10 CDR1H	SYAMS
16	83A10 CDR2H	AISGSGGSTYYADSVKG
17	83A10 CDR3H Mab21 CDR3H	VLGWFDY

	Mab22 CDR3H Mab42 CDR3H Mab27 CDR3H Mab33 CDR3H Mab39 CDR3H	
18	83A10 CDR1L	RASQSVSSSYLA
19	83A10 CDR2L	GASSRAT
20	83A10 CDR3L Mab21 CDR3L Mab22 CDR3L Mab42 CDR3L	QQYGYPPDFT
21	Mab21 CDR1H Mab22 CDR1H Mab42 CDR1H	DNAMG
22	Mab21 CDR2H Mab22 CDR2H Mab42 CDR2H	AISGPGSSTYYADSVKG
23	Mab21 CDR1L	RASQSVSEYYLAW
24	Mab21 CDR2L	EHASTRAT
25	Mab22 CDR1L	RASQSVSSYYLA
26	Mab22 CDR2L	GAGSRAT
27	Mab42 CDR1L	RASQSVSDEYLS
28	Mab42 CDR2L	SASTRAT
29	Mab27 CDR1H	SAPMG
30	Mab27 CDR2H	AISYIGHTYYADSVKG
31	Mab27 CDR1L Mab33 CDR1L Mab39 CDR1L	RASQSVSEYYLA
32	Mab27 CDR2L Mab33 CDR2L Mab39 CDR2L	HASTRAT
33	Mab27 CDR3L Mab33 CDR3L Mab39 CDR3L	QQYGYPPDFT
34	Mab33 CDR1H	TNAMG
35	Mab33 CDR2H	AINRFGGSTYYADSVKG
36	Mab39 CDR1H	QNAMG

37	Mab39 CDR2H	AISPTGFSTYYADSVKG
38	Mab27 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAPMGWVRQA PGKGLEWVSAISYIGHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLTVTVSS
39	Mab33 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYTNAMGWVRQ APKGLEWVSAINRFGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLTVTVSS
40	Mab39 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTQNAMGWVRQ APKGLEWVSAISPTGFSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLTVTVSS
41	83A10 BCMA CH1 Mab21 BCMA CH1 Mab22 BCMA CH1 Mab42 BCMA CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
42	83A10 BCMA CL Mab21 BCMA CL Mab22 BCMA CL Mab42 BCMA CL	RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
43	CD3 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
44	CD3 CL	ASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
45	83A10 按钮 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGSGGGGSQAVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEPGQAFRGL IGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYY CALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI

		SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
46	83A10 孔 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
47	83A10 LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDR KLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
48	CD3 LC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
49	Mab21 按钮 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQ APGKGLEWVSAISGPGSSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGSGGGGSQAVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGL IGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYY CALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE

		PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
50	Mab21 孔 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQ APGKGLEWVSAISGPSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
51	Mab21 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSEYYLAWYQQKP GQAPRLIEHA STRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDF AVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDR KLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
52	Mab22 旋钮 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQ APGKGLEWVSAISGPSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGSGGGGSQAVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGL IGGTNKRAPGT PARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYY CALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI

		SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	Mab22 孔 HC	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQ APGKGLEWVSAISGPSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
54	Mab22 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYYLAWYQQKP GQAPRLISGAGSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDR KLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
55	Mab42 旋钮 HC	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQ APGKGLEWVSAISGPSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEPGQAFRGL IGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYY CALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

56	Mab42 孔 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQ APGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
57	Mab42 LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQKP GQAPRLLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLAISRLPEDEF AVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDR KLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
58	Mab101 HC-1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAWLGCEVTDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPVYVYPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
59	Mab101 HC-2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAWLGCEVTDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDDKVEPKSCDGGGSGGGGSQAVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGL IGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYY

		CALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYVLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
60	Mab101 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSAIFPPSDE RLKSGTASVVCVLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSSRLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
61	Mab102 HC-1	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQ APGKGLEWVSAISGPSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGTLLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAWLGCEVTDYFPEPTVSWN SGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVYVPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLD SDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
62	Mab102 HC-2	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQ APGKGLEWVSAISGPSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGTLLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAWLGCEVTDYFPEPTVSWN SGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSAVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQEPGQAFRGL IGGTNKRAPGTARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYY CALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE

		PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYVLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
63	Mab102 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYYLAWYQQKP GQAPRLISGAGSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDF AVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVAIAPPDE RLKSGTASVVCVLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSYSLSSRLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
64	Mab103 HC-1	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQ APGKGLEWVSAISGPSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAWLGCEVTDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYVLPSSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLD SDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
65	Mab103 HC-2	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQ APGKGLEWVSAISGPSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAWLGCEVTDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQEPGQAFRGL IGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYY CALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI

		SKAKGQPREPQVYVLPSPREEMTKNQVSLCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
66	Mab103 LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQKP GQAPRLLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLAISRLPEDEF AVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVAIFPPSDE RLKSGTASVVCVLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSSRLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
67	83A10 CDR1L (SEQ ID NO:18 的替 代)	RASQSVSSSYLAW
68	83A10 CDR2L (SEQ ID NO:19 的替 代)	YGASSRAT
69	Mab22 CDR1L (SEQ ID NO:25 的替 代)	RASQSVSSYYLAW
70	Mab22 CDR2L (SEQ ID NO:26 的替 代)	SGAGSRAT
71	Mab42 CDR1L (SEQ ID NO:27 的替 代)	RASQSVSDEYLSW
72	Mab42 CDR2L (SEQ ID NO:28 的替 代)	HSASTRAT

备注:SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:33是相同的
表6B:抗体序列 (短列表)

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

表7A:另外的构建体

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

表7B:另外的构建体

	SEQ ID NO:			
构建体	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
BCMA VH_CH1cv x CD3 VL_CH1 Fc 旋钮 LALA PG (旋钮 HC)	45	49	52	55
BCMAcv HC 孔 LALA PG (孔 HC)	46	50	53	56
BCMAcv hum IgG1 LC (BCMAcv LC)	47	51	54	57
CD3 VH_CL (CD3 LC)	48	48	48	48

表7C:另外的构建体

构建体	SEQ ID NO:		
	Mab101	Mab102	Mab103
BCMA VH-CH1zw Fc_zwA (HC-1)	58	61	64
BCMA VH-CH1zw x CD3 VL-CH1 Fc_zwB (HC-2)	59	62	65
BCMAzw hum IgG1 LC (BCMA LC)	60	63	66
CD3 VH_CL (CD3 LC)	48	48	48

实施例

[0377] 实施例1:来自正常健康志愿者 (NHV) 和AAV患者的样品中的浆母细胞和浆细胞上的BCMA表面表达以及可溶性BCMA水平

使用Ficoll梯度,从收集自四个正常健康志愿者 (NHV) 的全血中分离外周血单核细胞 (PBMC)。通过流式细胞术评估浆母细胞 (PB) 上的BCMA表达。浆母细胞被鉴定为CD19 (+) CD20 (-) CD27 (+) CD38 (+)。抗BCMA抗体包被的荧光珠用于生成标准曲线,以比较平均荧光强度与BCMA表面受体密度。对表达BCMA的癌细胞系 (JEKO、RPMI-8226和H929) 进行概况分析用于比较 (图4A)。对于所有测试的NHV,BCMA表面表达在来源于NHV的浆母细胞上比在多发性骨髓瘤细胞系RPMI-8226和H929上低得多。

[0378] 通过ELISA评估来自NHV (‘正常’)、多发性骨髓瘤 (‘MM’) 或ANCA相关性血管炎 (‘AAV’) 患者的血清或血浆样品中的可溶性BCMA水平 (图4B)。可溶性BCMA水平在NHV样品中比在MM样品中低得多,反映了当与MM患者相比,NHV中的浆母细胞上BCMA细胞表面表达的水平更低。来自AAV的血清和血浆 (PR3+) 样品两者中的可溶性BCMA水平与NHV样品是可比较的,并且比MM样品中的低得多。鉴于这种相关性,预期AAV中浆母细胞和浆细胞上的BCMA表面表达与NHV中是可比较的。

[0379] 实施例2:T细胞双特异性抗体的产生

产生具有1st BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - 2nd BCMA Fab形式 (在本文中称为“2+1”形式) 的抗BCMA抗CD3双特异性抗体。制备抗BCMA抗CD3双特异性抗体的方法可以在W02017/021450中找到,其通过引用并入本文。

[0380] HD1表示:

- Fc的CH3结构域包含具有氨基酸取代T366W的一个链,以及具有氨基酸取代T366S、L368A和Y407V (如表2中所示) 的一个链;和
- 两个BCMA Fab均包含CH1结构域中的氨基酸取代K147E和K213E,以及CL结构域中的氨基酸取代E123R和Q124K (如表4中所示);

HD2表示:

- Fc的CH2-CH3结构域包含具有氨基酸取代T350V、L351Y、F405A、Y407V的一个链,以及具有氨基酸取代T350V、T366L、K392L、T394W (如表3中所示) 的一个链;
- 两个BCMA Fab均包含CH1结构域中的氨基酸取代A141W、L145E、K147T、Q175E,以及CL结构域中的氨基酸取代F116A、Q124R、L135V、T178R (如表5中所示)

(根据EU编号进行编号的重链恒定区氨基酸位置;根据Kabat进行编号的轻链恒定

区氨基酸位置)。

[0381] 除上述在HD1和HD2下注释的修饰之外,本实施例中的双特异性抗体的Fc还含有氨基酸取代P329G、L234A和L235A (位置根据EU编号进行编号)。

[0382] 本实施例中的双特异性抗体还包含“CrossMAb”技术,其中CD3 Fab的VH和VL进行了交换。

[0383] 在本实施例中产生的抗体的概括在表8中提供。

[0384] 表8:在本实施例中产生的抗BCMA抗CD3双特异性抗体。

双特异性抗体名称	结构
CC-93269	2+1 (BCMA SEQ ID NO:10+14) (CD3 SEQ ID NO:7+8) HD1
Mab101	2+1 (BCMA SEQ ID NO:9+11) (CD3 SEQ ID NO:7+8) HD2
Mab102	2+1 (BCMA SEQ ID NO:10+13) (CD3 SEQ ID NO:7+8) HD2

[0385] 实施例3:剂量依赖性的BCMA T细胞衔接体杀伤表达BCMA的细胞伴随T细胞活化而发生

JEKO细胞

JEKO细胞与CD3+ T细胞(静置过夜)以1:2的靶标:效应物(T:E)比率和各种浓度的抗BCMA抗CD3双特异性抗体(BCMA T细胞衔接体)一起培养。通过在24小时内测量的膜联蛋白V表达(其中每两个小时记录图像)来评估T细胞介导的JEKO细胞杀伤。使用Incucyte ZOOM软件来确定膜联蛋白V+细胞计数。在20小时时间点计算的数据和EC50值显示于图5A和表9中。

[0386] 表9:用BCMA T细胞衔接体杀伤JEKO细胞的EC50

	Mab101	CC-93269	Mab102
JEKO细胞杀伤的EC50 (nM)	5.724	2.791	0.1196

该数据显示,BCMA T细胞衔接体(BCMA TCE)能够以与对于来自正常健康志愿者的浆母细胞的水平可比较的水平杀伤表达BCMA的细胞。

[0387] 在24小时时间点通过流式细胞术分析T细胞活化。洗涤细胞,并然后对T细胞谱系标记物(CD3、CD4和CD8)和活化标记物(CD69、CD25和CD154)进行染色。流式细胞术样品在BD LSRFortessa上进行采集,并使用Treestar FlowJo X软件进行分析。在Incucyte Live Cell Analysis Imaging System上进行细胞成像。使用Graphpad Prism 7软件绘制数据且计算EC50值。

[0388] 图5B显示了如由CD8+ T细胞上的CD69表达表示的T细胞活化。

[0389] 这些数据显示,在用于杀伤JEKO细胞的BCMA T细胞衔接体的50%有效浓度(EC50)下,活化T细胞的频率升高。

[0390] *MM细胞*

多发性骨髓瘤细胞系RPMI-8226与NHV PBMC以不同的靶标:效应物(T:E)比率和各种浓度的CC-93269一起共培养。通过在96小时内测量的膜联蛋白V表达(其中每小时记录图像)来评估T细胞介导的RPMI-8226细胞杀伤。使用Incucyte ZOOM软件来确定膜联蛋白V+细胞计数,25小时和72小时时间点显示于图6A中。

[0391] 在25小时和72小时时间点通过流式细胞术分析T细胞活化。在25小时后,洗涤细胞,并然后对CD8 T细胞谱系和作为T细胞活化的标记物的CD69表达进行染色(图6B)。

[0392] 这些数据显示,显著的T细胞活化在等于或小于用于MM细胞杀伤的剂量的CC-93269剂量下发生。

[0393] 实施例4:剂量依赖性的BCMA T细胞衔接体杀伤来自健康志愿者的浆母细胞伴随最低限度的T细胞活化而发生

使用重悬于RPMI + 10% HI FBS中的Ficoll梯度,从收集自健康志愿者的全血中分离外周血单核细胞(PBMC)。用各种浓度的BCMA TCE或对照2+1抗HEL抗CD3抗体处理PBMC。在24小时孵育之后,评估浆母细胞杀伤、T细胞活化和细胞因子产生。

[0394] 浆母细胞杀伤通过FACS进行评估,由此浆母细胞被鉴定为CD19(+) CD20(-) CD27(+) 细胞,并且作为相对于未处理对照归一化的总CD19(+) 细胞的百分比给出。CD19(+) CD20(-) CD27(+) 细胞被确认为具有另外的已知的浆母细胞标记物:BCMA(+) SLAMF7(+) IgD(-) CD38(+) CD138(-)。图7A是代表性的剂量-反应曲线,且图7B是对CD3(-) CD19(+) 细胞门控的代表性的FACS图。CC-93269在健康志愿者(n=12)中用于浆母细胞杀伤的50%有效浓度(EC50)为0.005 nM。浆母细胞杀伤在低于杀伤表达BCMA的癌细胞系(例如JEKO细胞)所需的BCMA TCE浓度下发生。

[0395] 对于T细胞活化,洗涤细胞,并然后对T细胞谱系(CD3、CD4和CD8)和活化标记物(CD69、CD25和CD154)进行染色。图7C中表示的数据是CD8(+) T细胞上的CD69表达。使用MSD促炎I测定,分析培养上清液的细胞因子产生(IFN γ 、IL-6、IL-2、IL-10、颗粒酶B和穿孔素)(图7D,图8)。图8中的数据是CC-93269的。

[0396] 总之,这些数据显示了在BCMA TCE用于杀伤来自健康志愿者PBMC的浆母细胞的50%有效浓度(EC50)下,活化T细胞频率的最低限度升高(即高于基线小于20%)和最低限度的细胞因子产生(即高于基线小于20 pg/mL)。

[0397] 表10汇总了CC-93269的数据,并且说明在用于浆母细胞耗尽的90%有效浓度(EC90)下活化T细胞频率的最低限度升高。在显著的T细胞活化不存在的情况下,CC-93269在体外显示出来自健康志愿者的PBMC中的浆母细胞的深度耗尽(> 90%)。

[0398] 表10:用CC-93269在来自健康志愿者的PBMC中的浆母细胞杀伤和T细胞活化

	浆母细胞耗尽		在以下情况下的 CD69+ CD8+ T 细胞:	
	EC ₉₀ (nM)	EC ₉₉ (nM)	EC ₉₀ PB 耗尽	EC ₉₉ PB 耗尽
CC-93269 (n=11)	0.054	0.594	基线	适中 (< 5% CD8 ⁺ 细胞)

实施例5:在与CC-93269一起培养后,对来自健康志愿者的PBMC中的其它B细胞群体的影响

对来自实施例4的CC-93269处理的PBMC样品的B细胞谱系标记物(CD20、CD27和IgD)进行染色。记忆B细胞被鉴定为显示标记物CD19(+) CD20(+) CD27(+) 的细胞,并然后用标记物IgD(-) CD38(-) BCMA(+/-)进一步确认。数据在图9A-C中表示,其作为总CD19(+) CD20(+) 细胞的百分比给出。该数据显示,在用于浆母细胞杀伤的90%有效浓度(EC90)下,CC-93269在体外不显著耗尽来自健康志愿者的PBMC中的首次用于实验的、未转换或转换的记忆B细胞群体。

[0399] 实施例6:剂量依赖性BCMA TCE介导的处理的骨髓中的浆母细胞杀伤,伴随最低限度的T细胞活化

使用Ficoll梯度,从健康志愿者的骨髓中分离骨髓(BM)单核细胞,并然后用各种浓度的BCMA TCE或对照2+1抗HEL抗CD3抗体处理。如实施例4中的,在24小时孵育之后,通过流式细胞术评估浆母细胞杀伤(图10A,表11)和T细胞活化(图10B)。将从健康志愿者中分离的PBMC悬浮于培养基或骨髓(BM)上清液中,并然后用BCMA TCE或对照2+1抗HEL抗CD3抗体处理24小时用于比较。

[0400] 表11:用BCMA TCE在骨髓单核细胞中的浆母细胞杀伤

	Mab101	CC-93269	Mab102
BM浆母细胞杀伤的EC50 (nM)	0.2662	0.02012	0.002807

这些数据显示,BCMA TCE在与来自悬浮于培养基中的PBMC的浆母细胞相似的浓度下,诱导来自骨髓的浆母细胞的杀伤,并且伴随最低限度的T细胞活化。该数据是有意义的,因为长寿命的浆母细胞和浆细胞优先在骨髓中发现。

[0401] 实施例7:剂量依赖性BCMA TCE介导的来自AAV的浆母细胞杀伤,伴随最低限度的T细胞活化

使用Ficoll梯度,从收集自AAV患者的全血中分离外周血单核细胞(PBMC),所述AAV患者包括复发的或者对利妥昔单抗、甲氨蝶呤和叶酸而言难治的AAV,并然后用各种浓度的BCMA TCE (CC-93269、Mab101或Mab102) 或对照2+1抗HEL抗CD3抗体处理。在24小时孵育之后,评估浆母细胞杀伤(图11A-11B)、T细胞活化(图11C、12A-12C)和细胞因子产生(图11D)。

[0402] 浆母细胞杀伤通过FACS进行评估,由此浆母细胞被鉴定为CD19(+) CD20(-) CD27(+) 细胞,并且作为相对于未处理对照归一化的总CD19(+) 细胞的百分比给出(图11A)。CD19(+) CD20(-) CD27(+) 细胞被确认为具有另外的已知的浆母细胞标记物:BCMA(+) SLAMF7(+) IgD(-) CD38(+) CD138(-)。图11B是对CD3(-) CD19(+) 细胞门控的代表性的FACS图。CC-93269在AAV中用于浆母细胞杀伤的50%有效浓度(EC50)为0.007 nM。尽管BCMA表达的水平相似,但AAV浆母细胞杀伤在低于杀伤JEKO癌细胞系所需的BCMA TCE浓度下发生。

[0403] 对于T细胞活化,洗涤细胞,并然后对T细胞谱系(CD3、CD4和CD8)和活化标记物(CD69、CD25和CD154)进行染色。图11C中表示的数据是CD8(+) T细胞上的CD69表达。图12A-C中表示的数据是CD4(+) T细胞或CD8(+) T细胞上的CD69或CD25表达水平。

[0404] 使用MSD促炎I测定,分析培养上清液的细胞因子产生(IFN γ 、IL-6、TNF α 、IL-1 β 、颗粒酶A、颗粒酶B和穿孔素)。IFN γ 的数据显示于图11D中。

[0405] 总之,这些数据显示,在BCMA TCE的AAV浆母细胞杀伤有效剂量下,活化T细胞的频率(即高于基线小于20%)和细胞因子产生(即高于基线小于20 pg/mL)均没有值得考虑的升高。

[0406] 表12汇总了来自实施例4和7的数据,突出显示了在没有T细胞活化的情况下用于浆母细胞(PB)杀伤的BCMA TCE浓度的窗口。在此窗口中,不太可能发生与T细胞的活化或过度的细胞因子产生相联系的不良事件,诸如细胞因子释放综合征(CRS)。

[0407] 表12:BCMA TCE实现浆母细胞(PB)杀伤而无T细胞活化的治疗窗口

TCE 治疗	供体	EC ₅₀ PB 杀伤(nM)	EC ₅₀ T 细胞活化(nM)		在杀伤和 T 细胞活化之间的窗口
			CD8 ⁺ , CD69 ⁺ (nM)	IFN γ 分泌 (nM)	
Mab101 (Kd BCMA =1.1 nM)	健康志愿者 (n=2)	0.257 +/- 0.087	>1	>1	≥ 3
	AAV-1 (n=1)	0.236	>1	>1	≥ 4
CC-93269 (Kd BCMA =0.14 nM)	健康志愿者 (n=6)	0.029 +/- 0.029	≥ 0.68 +/- 0.04	≥ 0.92 +/- 0.12	16-22
	AAV-1 (n=1)	0.010	>1	>1	> 100
Mab102 (Kd BCMA =0.06 nM)	健康志愿者 (n=3)	0.007 +/- 0.006	0.63 +/- 0.61	0.91 +/- 1.1	90 - >100
	AAV-1 (n=1)	0.003	0.77	>1	> 100

实施例8:剂量依赖性CC-93269介导的来自用利妥昔单抗治疗的AAV患者的浆母细胞杀伤

通过Ficoll梯度,从AAV患者AAV-5 (其在5个月前最后一次接受了利妥昔单抗)的全血中分离外周血单核细胞(PBMC),并将其重悬于RPMI +10% HI FBS中。PBMC用递增浓度的CC-93269 (图13B-13C) 或对照2+1抗HEL抗CD3抗体(图13A)处理24小时,然后通过流式细胞术进行评估。细胞针对活力和单细胞(singlet)进行门控,以获得活细胞FACS图(图13)。浆母细胞定义为CD19⁺ CD27⁺ CD20⁻。浆母细胞也被确认为CD38⁺、BCMA⁺和CD138⁻ (数据未显示)。从CD19⁺ CD20⁺门,首次用于实验的B细胞定义为CD27⁻ IgD⁺,未转换的记忆B细胞定义为CD27⁺ IgD⁺以及转换的记忆B细胞定义为CD27⁺和IgD⁻。显示了来自正常健康志愿者的代表性点图。在对照中观察到缺乏CD20⁺ B细胞,但CD20⁻ CD27⁺浆母细胞计数较高(图13A),显示利妥昔单抗导致B细胞耗尽而无浆母细胞耗尽。CC-93269在亚纳摩尔浓度下诱导浆母细胞的选择性耗尽,伴随最低限度的B细胞耗尽(图13B)。即使当患者已用免疫抑制剂(例如利妥昔单抗)进行治疗时,CC-93269也迅速耗尽来自AAV患者的PBMC的浆母细胞。

[0408] 实施例9:在靶标不存在的情况下BCMA-TCE不导致AAV患者PBMC中的活化T细胞频率升高

PBMC从AAV患者AAV-2中分离,所述AAV-2先前已用利妥昔单抗、麦考酚酸酯、地塞米松和甲泼尼龙进行治疗。图14A说明显示与AAV-1受试者相比,在基线时AAV-2受试者中缺乏CD19⁺ CD20⁻ CD27⁺浆母细胞和浆细胞靶标的FACS图。图对CD3⁻ CD19⁺细胞

进行门控。图14B说明显示AAV-2受试者中CD4(+)和CD8(+) T细胞的充分存在的FACS图。图对CD3(+)细胞进行门控。

[0409] 来自AAV-2的PBMC用各种浓度的BCMA TCE处理,并且如实施例7中的,在24小时孵育之后,通过流式细胞术评估T细胞活化。图14C说明CD4(+)或CD8(+) T细胞上的CD69(+)或CD25(+)频率。这些数据显示,当靶标浆母细胞/浆细胞不存在时,BCMA-TCE不导致T细胞活化。

[0410] 实施例10:当表达BCMA的癌细胞在与AAV相似的效应物:靶标比率下被杀伤时,T细胞活化更低

JEK0-1细胞(2500个细胞/孔)与PBMC以1:10或1:500的靶标:效应物(T:E)比率培养,以分别模拟在多发性骨髓瘤(MM)或AAV中观察到的T:E比率(BCMA+细胞:T细胞)。在与CC-93269或对照2+1抗HEL抗CD3抗体一起孵育24小时之后,洗涤细胞,并然后评估CD8(+) T细胞上的CD69(图15A)和CD25(图15B)表达。

[0411] 这些数据指示,更大的T:E比率(BCMA+细胞:T细胞)导致更大程度的T细胞活化。值得注意的是,与T:E比率模拟MM患者时相比,当T:E比率与在健康志愿者和AAV患者中发现的表达BCMA的浆母细胞与T细胞的比率相差不大时,活化T细胞的频率更低。

[0412] 实施例11:尽管有适当的浆母细胞/浆细胞生长因子刺激,BCMA-TCE仍消除了产生IgG的浆母细胞和浆细胞再生的能力

使用Ficoll梯度,从收集自健康志愿者的全血中分离外周血单核细胞(PBMC),并且用各种浓度的BCMA TCE(CC-93269、Mab101或Mab102)或对照2+1抗HEL抗CD3抗体处理。患者D214用在用于浆母细胞耗尽的90%有效浓度(EC90)下的BCMA TCE进行治疗。

[0413] 在24小时孵育之后,PBMC用生长因子IL-2(20 U/ml)、BAFF(200 ng/ml)和IL-21(100 ng/ml)培养4-7天,以诱导来自BCMA阴性前体的浆母细胞/浆细胞分化。在此期间,一些培养物还用CpG(ODN2006 10 µg/mL)进行刺激。

[0414] 在培养之后,通过流式细胞术测量浆母细胞和浆细胞(CD19(+) CD20(-) CD27(+))或CD20⁺ B细胞(图16A)。尽管有用于其再生的适当的生长因子,BCMA-TCE仍压制耗尽后的浆母细胞和浆细胞的恢复,特别是在用于浆母细胞杀伤的90%有效浓度(EC90)下。

[0415] 收集培养上清液以通过ELISA测量总IgG分泌(图16B)。尽管有用CpG的刺激,BCMA-TCE仍压制IgG抗体的产生,特别是在用于浆母细胞杀伤的EC90浓度下。这提示IgG自身抗体的产生可以通过将体内的浆母细胞耗尽90%来进行压制。

[0416] 实施例12:剂量依赖性BCMA TCE介导的来自类风湿性关节炎的浆母细胞杀伤,伴随最低限度的T细胞活化

PBMC从类风湿性关节炎(RA)患者中分离,并且用各种浓度的CC-93269处理。如实施例4中的,在24小时孵育之后,通过流式细胞术评估浆母细胞杀伤(图17A)、T细胞活化(图17B)和细胞因子分泌(图17C)。

[0417] CC-93269用于RA中浆母细胞杀伤的50%有效浓度(EC50)为0.001 nM。因此,RA浆母细胞杀伤在低于T细胞活化或细胞因子分泌所需的BCMA TCE浓度下发生。

[0418] 实施例13:在与CC-93269一起培养后,对来自RA患者的PBMC中的其它B细胞群体的影响

对来自实施例12的CC-93269处理的PBMC样品的B细胞谱系标记物(CD20、CD27和

IgD) 进行染色。图18A-C中表示的数据作为总CD19(+) CD20(+) 细胞的百分比给出。数据显示,在用于浆母细胞杀伤的EC90浓度下,CC-93269在体外不显著耗尽来自RA患者的PBMC中的首次用于实验的、未转换或转换的记忆B细胞群体。

[0419] 实施例14:剂量依赖性BCMA TCE介导的来自系统性红斑狼疮患者的浆母细胞杀伤伴随最低限度的T细胞活化而发生

PBMC从系统性红斑狼疮(SLE)患者中分离,并且用各种浓度的CC-93269或对照2+1抗体处理。如实施例4中的,在24小时孵育之后,评估浆母细胞杀伤(图20A)和T细胞活化(图20B)。

[0420] CC-93269用于SLE中的浆母细胞杀伤的50%有效浓度(EC50)为0.01 nM (n=5)。因此,SLE浆母细胞杀伤在低于T细胞活化所需的BCMA TCE浓度下发生。

[0421] 实施例15:在食蟹猕猴中通过CC-93269的浆母细胞的选择性耗尽

从食蟹猕猴的全血中分离PBMC。浆母细胞和CD20(+) B细胞用各种浓度的CC-93269或对照2+1抗HEL抗CD3抗体处理24小时。

[0422] 浆母细胞杀伤通过FACS进行评估,由此浆母细胞被鉴定为CD19(+) IRF4(+),并且作为总CD19(+) 细胞的百分比给出(图19A)。CD20(+) B细胞杀伤也通过FACS进行评估,由此CD19(+) CD20(+) 细胞作为总CD19(+) 细胞的百分比给出(图19B)。IRF4+浆母细胞杀伤在低于杀伤CD20(+) B细胞所需的CC-93269浓度下发生。因此,CC-93269能够选择性地耗尽IRF4+浆母细胞,而无广泛的CD20(+) B细胞耗尽。

[0423] T细胞活化通过FACS进行评估,由此CD69(+) CD8(+) T细胞作为总CD8(+) T细胞的百分比给出(图19C)。

[0424] 总之,这些数据显示了在公认的药代动力学-药效学(PK/PD)模型中,在用于IRF4+浆母细胞耗尽而无CD20(+) B细胞耗尽的CC-93269浓度下,CC-93269对浆母细胞的选择性杀伤以及活化T细胞频率的最低限度升高。它们可以用于预测BCMA-TCE在体内的药理学和毒理学作用。

[0425] 实施例16:外源可溶性BCMA对CC-93269介导的来自健康志愿者的浆母细胞杀伤的影响

从正常健康志愿者中分离PBMC,并且添加各种浓度的外源可溶性BCMA (sBCMA)。选择67.6 ng/mL sBCMA的最大浓度,因为它代表自身免疫患者中的sBCMA水平上限的两倍(数据未显示)。通过Ampersand Biosciences (Lake Clear,NY)的基于珠的免疫测定,来评估来自患有自身免疫性病症的供体患者的血清或血浆中的可溶性BCMA水平。然后,样品用递增浓度(0-50 nM)的CC-93269或对照2+1抗体处理24小时,然后评价浆母细胞杀死(图21A)和T细胞活化(图21B)。

[0426] 浆母细胞杀伤通过FACS进行评估,由此浆母细胞被鉴定为CD19(+) CD20(-) CD27(+) 细胞,并且作为相对于未处理对照归一化的总CD19(+) 细胞的百分比给出(图21A)。即使在自身免疫患者中将会存在的sBCMA浓度以及更高浓度下,在sBCMA存在的情况下的浆母细胞杀伤也在低于杀伤表达BCMA的癌细胞系(例如JEK0细胞)所需的CC-93269浓度下发生。

[0427] 对于T细胞活化,洗涤细胞,并然后对T细胞谱系(CD4和CD8)和活化标记物(CD69、CD25)进行染色。图21B中表示的数据说明CD4(+) T细胞或CD8(+) T细胞上的CD69(+) 频率。

[0428] 表13汇总了CC-93269的数据,并且说明了在BCMA TCE用于来自健康志愿者的PBMC

中的浆母细胞体外耗尽的90%有效浓度 (EC90) 下,在递增sBCMA水平下活化T细胞频率的最低限度升高(即高于基线小于20%)。

[0429] 表13:外源可溶性BCMA对用CC-93269在来自健康志愿者的PBMC中的浆母细胞杀伤和T细胞活化的影响

可 溶 性 BCMA (ng/ml)	浆母细胞耗尽		在以下情况下的 CD69+ CD8+ T 细胞:	
	EC ₅₀ (nM)	EC ₉₀ (nM)	EC ₅₀ PB 耗尽	EC ₉₀ PB 耗尽
0	0.005	0.047	< 20%	< 20%
16.8	0.025	0.225	< 20%	< 20%
33.6	0.130	1.17	< 20%	< 20%
67.6	0.32	2.88	< 20%	< 20%

实施例17:来自健康志愿者和AAV患者的全血样品中最低限度的CC-93269介导的T细胞活化和细胞因子分泌

来自正常健康志愿者 (n=4) 和AAV患者 (n=2) 的全血样品用各种浓度的CC-93269或对照2+1抗体处理。如实施例4中的,在24小时孵育之后,评估T细胞活化。图22A中表示的数据是来自正常健康志愿者 (NHV) 和AAV患者的全血样品中的CD8 (+) T细胞上的CD69表达。

[0430] 使用MSD促炎I测定,分析培养上清液的细胞因子产生 (IFN γ 、IL-1 β 、IL-6、IL-2、IL-10和颗粒酶B) (图22B)。

[0431] 总之,这些数据显示了当来自正常健康志愿者的全血样品用CC-93269处理时,活化T细胞频率的最低限度升高(即高于基线小于20%)和最低限度的细胞因子产生(即高于基线小于20 pg/mL)。

[0432] 实施例18:具有改善的稳定性的抗体

评估了四种BCMAxCD3分子的物理化学特性:Mab101、Mab102、83A10-TCBcv和22-TCBcv。Mab101和83A10-TCBcv包括包含抗体83A10的CDR的BCMA结合结构域,以及Mab102和22-TCBcv包括包含抗体Mab22的CDR的BCMA结合结构域。所有四种变体都共享相同的CD3结合结构域。四种BCMAxCD3分子的序列比对显示于图27中。如图2A中显示的,每种分子为2+1双特异性形式,但在CL-CH1中具有替代的氨基酸取代,以减少轻链错配/副产物:A141W、L145E、K147T、Q175E (“WETE”)和F116A、Q124R、L135V、T178R (“ARVR”),而不是所说明的“RK/EE”取代。

[0433] 术语“HD1”和“HD1平台”在这些实施例中用于指包含“旋钮入孔”突变的双特异性抗体。具体而言,如本文使用的,术语“HD1形式”和“HD1平台”是指BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab形式的双特异性抗体,其中:

(i) 抗CD3 Fab片段包含轻链和重链,其中轻链是包含可变结构域VH和恒定结构域CL的交换轻链,并且其中重链是包含可变结构域VL和恒定结构域CH1的交换重链;

(ii) 抗BCMA Fab包含CL结构域中的氨基酸取代123R和124K,以及相应CH1结构域中的氨基酸取代147E和213E;

(iii) Fc的第一CH3结构域包含修饰T366W,并且Fc的第二CH3结构域包含修饰T366S、L368A和Y407V。

[0434] 术语“HD2形式”和“HD2平台”在这些实施例中用于指包含本发明的异二聚体化突变的双特异性抗体。具体而言,如本文使用的,术语“HD2形式”和“HD2平台”是指BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab形式的双特异性抗体,其中:

(i) 抗CD3 Fab片段包含轻链和重链,其中轻链是包含可变结构域VH和恒定结构域CL的交换轻链,并且其中重链是包含可变结构域VL和恒定结构域CH1的交换重链;

(ii) 抗BCMA Fab包含CH1结构域中的氨基酸取代A141W、L145E、K147T、Q175E,以及相应CL结构域中的氨基酸取代F116A、Q124R、L135V、T178R;

(iii) Fc的第一CH3结构域包含修饰T350V、L351Y、F405A和Y407V,并且Fc的第二CH3结构域包含修饰T350V、T366L、K392L和T394W (根据EU编号进行编号)。

[0435] 如表14中所指示的,双特异性抗体Mab101和Mab102含有本发明的HD2突变,而双特异性抗体83A10-TCBcv和22-TCBcv含有“旋钮入孔”(HD1)突变。“旋钮入孔”修饰在例如W0 96/027011、Ridgway, J.B.等人, Protein Eng. 9 (1996) 617-621、Merchant, A.M.等人, Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-68和W0 98/050431中,用几个实例进行了详细描述。这些修饰由包含修饰T366W (“旋钮修饰”)的第一CH3结构域,以及包含修饰T366S、L368A和Y407V (“孔修饰”)(根据Kabat的EU编号进行编号)的第二CH3结构域组成。

[0436] 表14:抗体

抗体	异二聚体化平台	BCMA结合剂	CD3结合剂
83A10-TCBcv	HD1	83A10	CH2527
22-TCBcv	HD1	Mab22	CH2527
Mab101	HD2	83A10	CH2527
Mab102	HD2	Mab22	CH2527

本发明人已证明如通过表面等离子体共振确定的,与HD1形式的包含相应BCMA结合结构域的双特异性抗体(即83A10-TCBcv和22-TCBcv)的结合能力相比,本发明的形式的双特异性抗体(即Mab101和Mab102)的结合能力受化学应激(即低pH暴露、高pH暴露和叔丁基过氧化物暴露)的影响更小,从而证明了HD2形式有助于稳定性的整体增加。

[0437] 本发明人已进一步证明,HD2形式的使用补偿了起因于Mab22的CDR的物理稳定性减少。具体而言,通过体积排阻色谱(SEC)的蛋白浓度测量显示在振荡和低pH暴露两者之后,HD1双特异性22-TCBcv的蛋白浓度明显减少,这对于HD2平台等价物Mab102并未观察到。因此,在等价Mab102分子中HD2平台的使用减少了Mab22 CDR对抗体稳定性的负面影响。

[0438] 此外,基于对通过多重物理和化学稳定性测定生成的数据的组合分析,来计算每种分子的总体稳定性评分(参见表18)。在该分析中,两种HD2平台分子Mab101和Mab102评分均高于各自的HD1平台等价物83A10-TCBcv和22-TCBcv,这提示两种双特异性分子均是HD2形式更稳定的。

[0439] 实施例18.1:化学稳定性

化学稳定性评估由以下组成:加速天冬氨酸异构化和碎裂反应的低pH保持(在pH 4下),以及加速天冬酰胺的脱酰胺、氧化反应和硫醚形成的高pH保持(在pH 8下)。还将叔丁基过氧化物(TBP)加入pH 6平台缓冲液中,以促进溶剂暴露的甲硫氨酸残基的氧化。

[0440] 用于评估化学稳定性的主要方法是表面等离子体共振 (SPR)，使用本文描述的传感图比较方法，以及体积排阻色谱 (SEC) (例如当化学修饰可能影响物理稳定性或导致低分子量 (LMW) 剪切时)。取决于 SPR 结合结果，对于选定的样品也采用肽图分析。

[0441] 实施例 18.1.1 通过表面等离子体共振分析 BCMA 和 CD3 结合的变化

使用 Biacore T200 系统 (GE Healthcare, Uppsala, 瑞典) 进行 SPR 实验，其中分析区室和样品区室温度分别设定为 25°C 和 7°C。

[0442] 根据制造商的说明书，将抗人 IgG (来自抗人 IgG Capture Kit) 胺偶联到 CM5 芯片的表面。在 60 秒的注射中，在芯片表面上捕获在运行缓冲液中稀释至 1 µg/mL 的分子双特异性抗体。在单循环动力学程序之后，接下来以 30 µL/分钟的流速以逐渐增加的浓度注射抗原五次 (每次注射 30 秒)。对于 BCMA，抗原浓度的范围为 0.08 至 50 nM，且对于 CD3，浓度范围在 12.7 至 1000 nM 之间。在最后一次抗原注射后增加 300 秒的解离时间。在每个实验之后，所有流动池都使用 3M MgCl₂ 的 30 秒注射进行再生。

[0443] 在分析之前，通过首先扣除来自参考流动池的数据，并然后扣除其中注射缓冲液代替抗原的空白循环，数据进行双重参考。使用 Biacore T200 (软件版本 3.0) 实施传感图比较分析。所有数据都对反应进行归一化，其中 100% 反映在注射期间获得的最大结合，并且 0% 反映基线。从每种分子的非应激材料 (标准) 的十个或更多个独立传感图计算均值和 ±3 标准差 (SD) 传感图。为了定量应激样品针对相应的非应激标准的结合相似性，对样品传感图与标准的传感图进行共评估。根据方程 2，基于多少样品数据点落入 ±3 标准差限制之内或之外来计算相似性程度，其中 SSQ 是平方和 (Karlsson, R., Pol, E., 和 Frostell, Å. (2016); Analytical Biochemistry 502, 53-63)。表 15 中给出了用于 SPR 分析的所有材料。

[0444] 表 15: SPR 材料

材料	详情	来源
传感器芯片	S 系列 CM5	GE Healthcare
运行缓冲液	HBS-EP + 缓冲液 (10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM 乙二胺四乙酸 [EDTA] 和 0.05% [v/v] 表面活性剂 P20, pH 7.4)	GE Healthcare
捕获方法	胺偶联	GE Healthcare
捕获溶液	抗人 IgG (Fc)	GE Healthcare
抗体样品	在 1 µg/mL 下的 TPP-2204、2205、2261 和 2253	Celgene
抗原 1	人 BCMA, TPP208 (0.08、0.4、2、10、50 nM)	Celgene
抗原 2	人 CD3ED, TPP401 (12.3、37、111、333、1000 nM)	Celgene

比较在 2 - 8 °C (pH 6) 下和 40 °C (pH 8) 下贮藏 2 周的变体 83A10-TCBcv 的代表性 SPR 传感图分别显示于图 26A 和图 26B 中。

[0445] 方程 2:

相似性评分 = % 限值内的点 + % 限值外的点 × SSQ 限值至均值的距离 / SSQ 样品至均值的距离 (2)

如表 18 中显示的，在除了叔丁基过氧化物暴露之外的所有应激条件下，22-TCBcv (包含 HD1 平台突变) 显示出最大的总体 CD3 和 BCMA 结合减少，并且具有最低的总体化学稳定

性评分。相反,在所有应激条件下,Mab101(包含本发明的HD2平台突变)显示出最小的结合变化。

[0446] 与包含相同CDR区的相应HD1分子相比,包含HD2突变的两种双特异性抗体(即Mab101和Mab102)均具有更大的总体化学稳定性评分,这提示HD2平台有助于抗体的化学稳定性的增加。

[0447] 因此,SPR结合数据提示,与具有HD1突变的包含相应BCMA结合结构域的双特异性抗体(即83A10-TCBcv和22-TCBcv)的结合能力相比,包含HD2突变的双特异性抗体(即Mab101和Mab102)的结合能力受化学应激(即低pH保持、高pH保持和叔丁基过氧化物暴露)的影响更小。因此,这些数据指示,当与包含83A10或Mab22的CDR的CD3xBCMA双特异性抗体结合使用时,本发明的HD2突变改善双特异性抗体的稳定性超过HD1突变。

[0448] 实施例18.1.2还原肽图分析

为了进一步判别双特异性抗体的化学稳定性,对所有四种双特异性抗体进行还原肽图分析。在TBP存在的情况下,分子在pH 8和pH 6下缓冲在40℃下贮藏两周。作为对照,还分析了在2-8℃下贮藏两周的pH 6样品。

[0449] 使用10-kDa MWC0过滤器,将所有样品缓冲液交换为50 mM乙酸盐,pH 5.0缓冲液。接下来,根据制造商建议的AccuMAP方案(Promego, Madison, WI)消化样品。简言之,样品通过GdHCl进行变性,通过TCEP进行还原,并通过碘乙酰胺进行烷基化。通过LysC进行一小时的预消化,接着将GdHCl稀释至小于1 M并添加甲硫氨酸至15 mM的浓度。然后加入胰蛋白酶/LysC混合物用于在37℃下的最后3小时消化。所有步骤都在pH 5下进行。通过加入TFA至2%的最终组成来猝灭消化。

[0450] 将大约30 µg消化的样品注射到与Orbitrap Velos Pro质谱仪(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)串联的Waters CSH C18柱(2.1 x 150 mm,130 Å孔半径,1.7 µm珠直径)上。LC溶剂A是0.1%甲酸(FA)的水溶液,且溶剂B是0.1% FA的ACN溶液。分离梯度从1%B开始,在110分钟内线性增加到27% B,并然后接着是从30%到40% B的5分钟线性梯度。柱温度设定为70℃。质谱以Top-10数据依赖性采集进行采集。MS1在轨道阱中进行,其中分辨率设定为在400 m/z下60,000。在快速扫描设置下在离子阱中分析CID MS/MS。动态排除设定为15秒和10 ppm质量窗口。原始数据通过Protein Metrics Byonic和Byologic软件包进行分析。如下使用XIC强度计算修饰比率:修饰的pep强度/(修饰的pep强度+未修饰的pep强度) x 100%。

[0451] 表10和11分别显示对在BCMA和CD3 CDR内部或附近的残基的修饰。与SPR数据一致,22-TCBcv显示出对在BCMA和CD3 CDR区中的化学修饰,特别是甲硫氨酸和色氨酸氧化的最大倾向。相比之下,在Mab101分子中以更高水平观察到的唯一修饰是在TBP处理之后的BCMA HC和HHC中的M34(表16)。

[0452] 表16:在BCMA CDR附近的修饰

在 BCMA CDR 附近的修饰				修饰比率(%)											
				Mab101			Mab102			83A10-TCBcv			22-TCBcv		
链	残基(s)	修饰(s)	距离	pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP
HC/HHC	M34	Ox	0	0.9	1.0	10.4	1.1	0.9	6.0	0.9	1.1	6.5	1.0	1.0	4.7
HC/HHC	W36	Diox	+1	0.2	0.3	0.3	0.2	0.1	0.2	0.4	0.3	0.3	0.1	0.2	0.2
HC/HHC	M34+W36	Ox+Diox	0,+1	0.4	0.6	1.6	0.3	0.2	0.6	0.1	0.0	0.4	0.2	0.2	0.7
HC/HHC	W47	Diox	-3	0.4	0.5	0.9	1.5	1.1	3.8	0.7	0.6	1.1	1.1	1.4	2.1
HC/HHC	(W102,W106)	Ox	0,+1	0.3	0.3	1.0	0.4	0.2	3.5	0.2	0.3	1.8	0.2	0.3	5.3
LC1	W36	Ox	+1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	1.9	0.1	0.1	0.5	0.2	0.1	3.4
LC1	W36	Diox	+1	0.8	0.9	1.4	1.1	0.8	1.9	1.4	1.1	1.2	1.1	1.2	1.7

0仅一个残基是修饰的

+两个残基以修饰形式一起存在

表17:在CD3 CDR附近的修饰

在 CD3 CDR 附近的修饰				修饰比率(%)											
				Mab101			Mab102			83A10-TCBcv			22-TCBcv		
链	残基(s)	修饰(s)	距离	pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP
HHC	(W323,W327)	Diox	(0,0)	2.7	2.5	10.5	6.9	6.1	25.0	3.0	2.3	24.3	2.1	2.6	26.2
LC2b	M34	Ox	0	0.5	1.2	22.8	0.9	1.0	27.5	1.0	1.9	31.3	0.9	1.1	40.7
LC2b	W36	Diox	+1	-	-	-	0.4	0.6	5.1	-	-	-	0.5	0.0	13.2
LC2b	M34+W36	Ox+Diox	0,+1	0.5	0.6	2.9	1.2	1.1	5.5	0.9	1.2	7.2	1.1	1.3	12.7
LC2b	M34+W36	Ox+Triox	0,+1	0.0	0.0	2.8	0.2	0.2	4.5	0.1	0.0	4.6	0.0	0.0	7.1
LC2b	W47	Ox	-3	0.2	0.3	10.0	0.4	0.2	18.9	0.2	0.4	19.8	0.2	0.2	23.8
LC2b	W47	Diox	-3	3.2	3.5	15.6	7.3	5.5	26.8	5.3	4.5	27.4	5.6	5.3	31.8
LC2b	(N56,N57)	Deamid	(0,0)	0.0	1.2	0.0	0.0	1.7	0.6	0.0	1.6	0.5	0.0	1.2	0.8

0仅一个残基是修饰的

+两个残基以修饰形式一起存在

-在该样品中未鉴定

实施例18.2:物理稳定性

物理稳定性评估由以下组成:通过差示扫描量热法(DSC)测量热稳定性,以及通过在平台pH 6缓冲液中的聚乙二醇(PEG)沉淀测量胶体稳定性。在pH 6平台缓冲液中的振荡和冻融(F/T)应激之后,也对物理稳定性进行了评估。最后,在室温下的短暂低pH保持用于模拟病毒灭活。该处理步骤经常导致构象稳定性较差的蛋白生物制剂的非天然聚集。

[0453] 实施例18.2.1通过差示扫描量热法评估热稳定性

使用NanoAnalyze软件在TA Instruments NanoDSC (New Castle,DE)上进行差示扫描量热法。BCMAxCD3样品在100 mM组氨酸pH 6.0缓冲液中稀释至1 mg/mL (表19)。在分析之前,将样品及其相应的不含蛋白的缓冲液脱气30分钟。将样品和缓冲液以 $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{分钟}^{-1}$ 的速率从 10°C 加热到 100°C 。在采集之后,从每个样品中扣除相应的缓冲液,并且将数据归一化以转换为 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot^{\circ}\text{C}^{-1}$ 。结果报告为第一次去折叠转变起始时的温度($^{\circ}\text{C}$)。

[0454] 如图24中显示的,所有四种分子都具有相似的热去折叠起始温度($\sim 60^{\circ}\text{C}$),然而,在Mab101和83A10-TCBcv分子(包含83A10的BCMA CDR)中,最吸热的结构域的去折叠转变具有高大致 5°C 的 $T_{\text{m}}^{\text{app}}$ 值。

[0455] 实施例18.2.2通过PEG沉淀的胶体稳定性评估

通过PEG 6000沉淀来进行四种BCMAxCD3分子的胶体稳定性评估。通过从40% (w/v) 储备溶液制备160 μL 溶液来进行PEG沉淀实验,所述溶液由在逐渐增加浓度的PEG-6000中通过100 mM组氨酸在pH 6.0下缓冲的1.0 g/mL BCMAxCD3分子组成(表19)。将溶液置于 4°C 下过夜,并然后在25,000 RCF下离心60分钟。然后使用Agilent Cary UV-8454 (Agilent, Palo Alto, CA),通过在280 nm处的吸光度测量上清液中剩余的蛋白的量。将

数据拟合到经验四参数S形方程(方程1),以确定并报告沉淀蛋白起始量的一半所需的PEG-6000的百分比(w/v) (Cm)。参数b、m和r分别表示曲线的基数、最大值和速率。

[0456] 方程1

$$y = b + \left[\frac{m}{\left(1 + \exp\left(\frac{Cm - x}{r} \right) \right)} \right] \quad (1)$$

如图25中显示的,如通过PEG沉淀评估的,Mab102和22-TCBcv (包含Mab22的BCMA CDR) 在平台pH 6组氨酸缓冲液中具有最低的胶体稳定性。Mab101和83A10-TCBcv (包含83A10的BCMA CDR) 需要几乎两倍的PEG,以通过排除体积效应来诱导天然状态沉淀。

[0457] 实施例18.2.3在振荡和冻融之后的物理稳定性的体积排阻色谱评估

在pH 6平台缓冲液中的振荡和冻融(F/T)应激之后,也通过体积排阻色谱来评估物理稳定性。

[0458] 冻融

将400 μ L的每种1 mg/mL BCMAxCD3分子(表19)分配到0.5 mL独立式Fisherbrand螺旋盖冻存管(部件#02-707-357)中,并贮藏于带有管分隔器的单层样品盒中并在-80°C下冷冻。进行了总共五个冻融(F/T)循环,其中每个循环由以下组成:使样品冷冻至少一小时,然后在室温下解冻,并且在下一个F/T循环之前轻轻混合。在第五个F/T循环之后通过SEC分析样品。

[0459] 振荡

将400 μ L的每种1 mg/mL BCMAxCD3分子(表19)转移到1.5 mL标准Eppendorf管(部件# 022364111)中,并置于带有温度控制的VWR微板振荡器上。振荡器设定为在25°C下1500 rpm持续24小时。在振荡后,通过SEC进行分析样品。

[0460] 体积排阻色谱

在配备有单根TSKgel G3000SWxl 7.8 x 300 mm, 5 μ m柱的Agilent 1260 HPLC系统(Agilent, Palo Alto, California)上进行体积排阻色谱(SEC)。流动相由100 mM KH₂P0₄, 250 mM NaCl pH 6.8组成。在25°C下将20微升的每种样品注射到柱上,并以0.5 mL/分钟的流速等度(isocratically)洗脱30分钟。通过在280 nm处的UV检测来监测洗脱,并使用积分曲线的总面积、流速、注射体积、流动池路径长度和每种BCMAxCD3分子的消光系数来计算蛋白浓度。

[0461] 报告了SEC分析的两个值:相对于保持在2-8°C下的pH 6 2周样品,%单体和浓度的降低。该方法通过消除“时间为零”样品以及通过在相同色谱顺序内分析所有样品而使潜在的色谱变化性(诸如柱性能)最小化,降低了所需的时间和材料要求。

[0462] 为了考虑潜在的稀释变化性(以及积分和注射变化性),还制备了来自相同的10 mg/mL标准mAb溶液的十个独立的1:10稀释物,并且在与BCMAxCD3稳定性样品相同的SEC顺序中对其进行分析。单体百分比和浓度的降低分别相对于这些稀释标准品的平均百分比单体(2 σ M)和浓度(2 σ C)的标准差的两倍(2 σ)进行报告。

[0463] 来自SEC评估的结果在表15中提供,并且pH 6 2k 2-8°C (对照)样品和每种应激样品之间的百分比主峰单体和浓度的差异显示于表18中。

[0464] 与SPR数据一致,SEC结果指示,在pH 3保持后在振荡之后,HD1平台分子22-TCBcv存在蛋白浓度的明显减少,这对于其它分子并未观察到。因此,将HD2平台用于等价Mab101分子使Mab22 CDR对稳定性的负面影响最小化。22-TCBcv变体的代表性色谱图显示于图26中。

[0465] 评分

根据指示方法反应的每种物理和化学稳定性的合格标准(表18的浅灰色阴影区域)对分子进行评分,并且基于实验结果(深灰色阴影区域)如何符合这些标准来分配0、1或2的评分。相对于从标准10 mg/mL mAb溶液的十个独立的1:10稀释物确定的平均百分比单体(2σM)和浓度(2σC)的标准差的两倍,来对通过SEC测量的百分比单体和浓度的降低进行评分;对于当前的研究,2σM和2σC分别为0.33和0.14。物理和化学稳定性评分的总和除以其各自的反应数目(对于物理评估为8,且对于化学评估为16),使得物理和化学稳定性评分的范围均为0 - 2。然后,每种变体的总评分为物理和化学稳定性评分的总和,并且因此范围为0 - 4(表18)。表18中的所有反应都相等地加权。

[0466] 表18显示,在物理稳定性评估中,在振荡之后和在pH 3保持后,22-TCBcv分子存在蛋白浓度的明显减少,这对于其它分子并未观察到。

[0467] 22-TCBcv在化学稳定性评估中也表现不如其它分子,其展示出在通过TBP的氧化之后百分比单体的更大损失,以及在低和高pH保持后CD3和BCMA结合的更大损失。与评估的物理稳定性部分一样,Mab101显示出在所有化学应激之后的浓度、百分比单体和结合的最小变化。两种HD2平台分子(即Mab101和Mab102)评分均高于各自的HD1平台等价物(表18)。

[0468] 因此,这些数据明确地证明,对于83A10和Mab22双特异性抗体两者,HD2平台形式产生比HD1平台形式更稳定的分子。

[0469] 表18:BCMAxCD3的物理和化学稳定性评分

物理稳定性方法	评分			Mab101	评分 Mab101	Mab102	评分 Mab102	83A10-TCBcv	评分 83A10-TCBcv	22-TCBcv	评分 22-TCBcv
	0	1	2								
pH 6 DSC 起始 Tm1 (°C)	< 50	50 - 55	> 55	59.30	2	59.20	2	60.00	2	60.10	2
pH 6 PEG-6000 Cm (% w/v)	< 10	10 - 20	> 20	12.20	1	8.60	0	14.40	1	4.10	0
pH 6 -80 °C F/T %主峰 ¹ 的降低	> 5	> 2σM - 5	≤ 2σM	0.37	1	-2.40	2	1.42	1	-1.33	2
pH 6 -80 °C F/T mg/mL的降低	> 2σC	—	≤ 2σC	-0.07	2	0.02	2	-0.01	2	0.01	2
pH 6 RT 振荡%主峰的降低	> 10	5 - 10	< 5	0.02	2	-1.53	2	1.20	2	-1.98	2
pH 6 RT 振荡 mg/mL的降低	> 2σC	—	≤ 2σC	0.03	2	-0.09	2	0.00	2	0.29	0
pH 3, 3 小时%主峰的降低	> 10	5 - 10	< 5	3.40	2	5.32	1	3.09	2	1.47	2
pH 3, 3 小时 mg/mL的降低	> 2σC	—	≤ 2σC	0.04	2	0.07	2	-0.01	2	0.23	0
物理稳定性评分					1.75		1.63		1.75		1.25

化学稳定性方法 ²	评分			Mab10 1	评分 Mab10 1	Mab10 2	评分 Mab10 2	83A10- TCBcv	评分 83A10- TCBcv	22- TCBcv	评分 22- TCBcv
	0	1	2								
pH 6 %主峰的降低	> 10	5 - 10	< 5	-0.22	2	-1.57	2	0.11	2	0.96	2
pH 6 mg/mL 的降低	> 2σC	—	≤ 2σC	0.02	2	0.05	2	0.03	2	0.04	2
pH 6 SPR %相似性- BCMA	< 90	90 -95	> 95	99.99	2	99.44	2	99.96	2	99.85	2
pH 6 SPR %相似性-CD3	< 90	90 -95	> 95	99.96	2	99.95	2	99.90	2	99.50	2
pH 6-TBP %主峰的降低	> 10	5 - 10	< 5	9.12	1	11.62	0	12.40	0	21.03	0
pH 6-TBP mg/mL 的降低	> 2σC	—	≤ 2σC	0.02	2	0.08	2	0.06	2	0.06	2
pH 6-TBP SPR %相似性- BCMA	< 80	80 - 90	> 90	82.50	1	54.00	0	72.00	0	71.93	0
pH 6-TBP SPR %相似性- CD3	< 80	80 - 90	> 90	75.30	0	72.30	0	59.70	0	58.50	0
pH 4 %主峰的降低	> 10	5 - 10	< 5	9.12	1	8.73	1	7.97	1	9.38	1
pH 4 mg/mL 的降低	> 2σC	—	≤ 2σC	-0.06	2	0.07	2	0.04	2	-0.07	2
pH 4 SPR %相似性- BCMA	< 80	80 - 90	> 90	99.99	2	99.98	2	99.42	2	84.76	1
pH 4 SPR %相似性-CD3	< 80	80 - 90	> 90	99.93	2	99.98	2	100	2	99.60	2
pH 8 %主峰的降低	> 10	5 - 10	< 5	7.83	1	9.08	1	8.88	1	9.00	1
pH 8 mg/mL 的降低	> 2σC	—	≤ 2σC	-0.04	2	0.13	2	0.12	2	0.04	2
pH 8 SPR %相似性- BCMA	< 80	80 - 90	> 90	99.92	2	95.70	2	90.80	2	95.81	2
pH 8 SPR %相似性-CD3	< 80	80 - 90	> 90	71.50	0	70.11	0	57.48	0	59.50	0
化学稳定性评分				1.50		1.38		1.38		1.31	
总成药性评分				3.25		3.00		3.13		2.56	

¹ 注意: F/T 的 SEC %主峰单体损失的合格标准比所有其它应激条件的更严格。

² 所有化学稳定性方法的贮藏温度为 40°C。

表19:描述如何配制每种候选物的制剂电子表格。

变体#1	样品 ID:	Mab101		
用于化学稳定性、F/T、DSC 和振荡研究的制剂				
制剂	变体#1 的体积 (mL)	TBP 储 备 液 (μL)	100 mM 缓冲液的 体积(mL)	最终体积 (mL)
pH 6	0.177	—	2.123	2.300
pH 6 TBP	—	3.000	—	0.303
pH 4	0.023	—	0.277	0.300
pH 8	0.023	—	0.277	0.300
pH 3	0.023	—	0.277	0.300
2.3 mL 的 pH 6.0 制剂应该拆分成 5 x 0.3 mL 等分试样和 2 x 0.4 mL 等分试样。3.0 μL 的 0.5 M TBP 应该掺到 0.3 mL 等分试样之一中。0.4 mL 等分试样将用于 F/T 和振荡研究。				

缓冲液交换后的浓度(mg/mL)				13
PEG 沉淀筛选				
% PEG-6000 (w/v)	变 体 #1 的 体 积 (mL)	40 % (w/v) PEG 储 备液体积 (mL)	100 mM His pH 6 体 积 (mL)	最终体 积(mL)
0	12	0	148	160
5	12	20	128	160
10	12	40	108	160
15	12	60	88	160
20	12	80	68	160
25	12	100	48	160
30	12	120	28	160
35	12	140	8	160

变体#2	样品 ID:	Mab102		
用于化学稳定性、F/T、DSC 和振荡研究的制剂				
缓冲液交换后的浓度(mg/mL)				11.9
PEG 沉淀筛选				

制剂	变体#2 的体积 (mL)	TBP 储 备 液 (μL)	100 mM 缓冲液的 体积(mL)	最终体积 (mL)
pH 6	0.193	—	2.107	2.300
pH 6 TBP	—	3.000	—	0.303
pH 4	0.025	—	0.275	0.300
pH 8	0.025	—	0.275	0.300
pH 3	0.025	—	0.275	0.300
2.3 mL 的 pH 6.0 制剂应该拆分成 5 x 0.3 mL 等分试样和 2 x 0.4 mL 等分试样。3.0 μL 的 0.5 M TBP 应该掺到 0.3 mL 等分试样之一中。0.4 mL 等分试样将用于 F/T 和振荡研究。				

变体#3	样品 ID:	83A10-TCBCV
用于化学稳定性、F/T、DSC 和振荡研究的制剂		

制剂	变体#3 的体积 (mL)	TBP 储 备 液 (μL)	100 mM 缓冲液的 体积(mL)	最终体积 (mL)
pH 6	0.180	—	2.120	2.300
pH 6 TBP	—	3.000	—	0.303
pH 4	0.023	—	0.277	0.300
pH 8	0.023	—	0.277	0.300
pH 3	0.023	—	0.277	0.300
2.3 mL 的 pH 6.0 制剂应该拆分成 5 x 0.3 mL 等分试样和 2 x 0.4 mL 等分试样。3.0 μL 的 0.5 M TBP 应该掺到 0.3 mL 等分试样之一中。0.4 mL 等分试样将用于 F/T 和振荡研究。				

变体#4	样品 ID:	22-TCBCV
用于化学稳定性、F/T、DSC 和振荡研究的制剂		

制剂	变体#4 的体积 (mL)	TBP 储 备 液 (μL)	100 mM 缓冲液的 体积(mL)	最终体积 (mL)
pH 6	0.426	—	1.874	2.300
pH 6 TBP	—	3.000	—	0.303
pH 4	0.056	—	0.244	0.300
pH 8	0.056	—	0.244	0.300
pH 3	0.056	—	0.244	0.300
2.3 mL 的 pH 6.0 制剂应该拆分成 5 x 0.3 mL 等分试样和 2 x 0.4 mL 等分试样。3.0 μL 的 0.5 M TBP 应该掺到 0.3 mL 等分试样之一中。0.4 mL 等分试样将用于 F/T 和振荡研究。				

% PEG- 6000 (w/v)	变 体 #2 的 体 积 (mL)	40 % (w/v) PEG 储 备液体积 (mL)	100 mM His pH 6 体 积 (mL)	最终体 积(mL)
0	13	0	147	160
5	13	20	127	160
10	13	40	107	160
15	13	60	87	160
20	13	80	67	160
25	13	100	47	160
30	13	120	27	160
35	13	140	7	160

缓冲液交换后的浓度(mg/mL)				12.8
PEG 沉淀筛选				

% PEG- 6000 (w/v)	变 体 #3 的 体 积 (mL)	40 % (w/v) PEG 储 备液体积 (mL)	100 mM His pH 6 体 积 (mL)	最终体 积(mL)
0	13	0	148	160
5	13	20	128	160
10	13	40	108	160
15	13	60	88	160
20	13	80	68	160
25	13	100	48	160
30	13	120	28	160
35	13	140	8	160

缓冲液交换后的浓度(mg/mL)				5.4
PEG 沉淀筛选				

% PEG- 6000 (w/v)	变 体 #4 的 体 积 (mL)	40 % (w/v) PEG 储 备液体积 (mL)	100 mM His pH 6 体 积 (mL)	最终体 积(mL)
0	30	0	130	160
5	30	20	110	160
10	30	40	90	160
15	30	60	70	160
20	30	80	50	160
25	30	100	30	160
30	30	120	10	160
35	-	-	-	-

样品 ID: Mab101

应激条件	SEC HMW 面积(mAu* 分钟)	SEC 主峰面 积(mAu*分 钟)	SEC LMW 面积(mAu* 分钟)	SEC 总 面积 (mAu* 分钟)	SEC % HM W	SEC %主 峰	SEC % LMW	SEC (mg/ mL)	参数	值	单位
pH 6 2- 8 °C	16.5	2056.8	95.7	2169	0.761	94.82 7	4.412	0.984	消光系数	1.530	mL*mg ⁻¹ *cm ⁻¹
pH 6 40 °C	12.9	2010.8	91.8	2115.5	0.610	95.05 1	4.339	0.960	路径长度	0.6	cm
pH 6-TBP 40 °C	149	1826.6	155.7	2131.3	6.991	85.70 4	7.305	0.967	流速	0.5	mL/分钟
pH 4 40 °C	61.2	1967.4	266.8	2295.4	2.666	85.71 1	11.623	1.042	注射体积	0.020	mL
pH 8 40 °C	107.3	1972.2	187.5	2267	4.733	86.99 6	8.271	1.029			
pH 3 3 小 时 25 °C	74.5	1910.6	104.6	2089.7	3.565	91.42 9	5.006	0.948			
pH 6.0 -80 F/T 5x	25	2197.7	103.9	2326.6	1.075	94.46 0	4.466	1.056			
pH 6.0 RT 振荡	14.4	1986.3	94.4	2095.1	0.687	94.80 7	4.506	0.951			

样品 ID: Mab102

应激条件	SEC HMW 面积(mAu* 分钟)	SEC 主峰面 积(mAu*分 钟)	SEC LMW 面积(mAu* 分钟)	SEC 总 面积 (mAu* 分钟)	SEC % HM W	SEC %主 峰	SEC % LMW	SEC (mg/ mL)	参数	值	单位
pH 6 2- 8 °C	133.8	1995.3	101.8	2230.9	5.998	89.43 9	4.563	1.000	消光系数	1.550	mL*mg ⁻¹ *cm ⁻¹
pH 6 40 °C	123	1923.2	67	2113.2	5.821	91.00 9	3.171	0.947	路径长度	0.6	cm
pH 6-TBP 40 °C	289.5	1592.1	164.3	2045.9	14.15 0	77.81 9	8.031	0.917	流速	0.5	mL/分钟
pH 4 40 °C	142.2	1677.8	258.8	2078.8	6.840	80.71 0	12.449	0.931	注射体积	0.020	mL
pH 8 40 °C	139.8	1555.6	240.3	1935.7	7.222	80.36 4	12.414	0.867			
pH 3 3 小 时 25 °C	216.7	1739.6	111.8	2068.1	10.47 8	84.11 6	5.406	0.927			
pH 6.0 -80 F/T 5x	130.7	2010.3	48	2189	5.971	91.83 6	2.193	0.981			
pH 6.0 RT 振荡	148.6	2204	70.2	2422.8	6.133	90.96 9	2.897	1.085			

样品 ID: 83A10-TCBv

应激条件	SEC HMW 面积(mAu* 分钟)	SEC 主峰面 积(mAu*分 钟)	SEC LMW 面积(mAu* 分钟)	SEC 总 面积 (mAu* 分钟)	SEC % HM W	SEC %主 峰	SEC % LMW	SEC (mg/ mL)	参数	值	单位
pH 6 2- 8 °C	0	2126.5	52.7	2179.2	0.000	97.58 2	2.418	1.029	消光系数	1.470	mL*mg ⁻¹ *cm ⁻¹
pH 6 40 °C	0	2054.6	53.4	2108	0.000	97.46 7	2.533	0.996	路径长度	0.6	cm
pH 6-TBP 40 °C	177	1756.9	128.6	2062.5	8.582	85.18 3	6.235	0.974	流速	0.5	mL/分钟
pH 4 40 °C	0	1875.2	217.3	2092.5	0.000	89.61 5	10.385	0.989	注射体积	0.020	mL
pH 8 40 °C	54.8	1715.4	163.6	1933.8	2.834	88.70 6	8.460	0.914			
pH 3 3 小 时 25 °C	47.35	2069.45	73.3	2190.1	2.162	94.49 1	3.347	1.035			
pH 6.0 -80 F/T 5x	31.3	2118.9	53.3	2203.5	1.420	96.16 1	2.419	1.041			
pH 6.0 RT 振荡	21.3	2103.3	57.6	2182.2	0.976	96.38 4	2.640	1.031			

样品 ID: 22-TCBv

应激条件	SEC HMW 面积(mAu* 分钟)	SEC 主峰面 积(mAu*分 钟)	SEC LMW 面积(mAu* 分钟)	SEC 总 面积 (mAu* 分钟)	SEC % HM W	SEC %主 峰	SEC % LMW	SEC (mg/ mL)	参数	值	单位
pH 6 2- 8 °C	18.1	1907.6	47.2	1972.9	0.917	96.69 0	2.392	0.938	消光系数	1.460	mL*mg ⁻¹ *cm ⁻¹
pH 6 40 °C	14.6	1811	66.2	1891.8	0.772	95.72 9	3.499	0.900	路径长度	0.6	cm
pH 6-TBP 40 °C	297.1	1393	151	1841.1	16.13 7	75.66 1	8.202	0.876	流速	0.5	mL/分钟
pH 4 40 °C	22.7	1844.5	245.3	2112.5	1.075	87.31 4	11.612	1.005	注射体积	0.020	mL
pH 8 40 °C	22.5	1656.8	210	1889.3	1.191	87.69 4	11.115	0.899			
pH 3 3 小 时 25 °C	15.2	1425.4	56.3	1496.9	1.015	95.22 3	3.761	0.712			
pH 6.0 -80 F/T 5x	21.8	1918.7	16.9	1957.4	1.114	98.02 3	0.863	0.931			
pH 6.0 RT 振荡	6.8	1346.3	11.4	1364.5	0.498	98.66 6	0.835	0.649			

<110> Celgene Corporation
 <120> 自身免疫性病症中的抗BCMA疗法
 <130> 14247-482-228
 <140> To be assigned
 <141> On even date herewith
 <150> US 62/975,663
 <151> 2020-02-12
 <160> 72
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)
 <400> 1

Thr Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 2

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

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 3

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

1 5 10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 4

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

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 5

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 6

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 7

<211> 125

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 8

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

<210> 9

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 83A10 VH

<400> 9

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 10

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

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

<210> 12

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Mab21 VL、Mab27 VL、Mab33 VL、Mab39 VL

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Mab22 VL

<400> 13

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

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

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

Ile Ser Gly Ala Gly Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu		
65	70	75
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro		80
85	90	95
Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	
<210> 14		
<211> 109		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Mab42 VL		
<400> 14		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1	5	10
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Glu		15
20	25	30
Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
35	40	45
Ile His Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser		
50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ala Ile Ser Arg Leu Glu		
65	70	75
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro		80
85	90	95
Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	
<210> 15		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 83A10 CDR1H		
<400> 15		
Ser Tyr Ala Met Ser		
1	5	
<210> 16		
<211> 17		

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 83A10 CDR2H

<400> 16

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

1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 83A10 CDR3H、Mab21 CDR3H、Mab22 CDR3H、Mab42 CDR3H、Mab 27 CDR3H、
Mab33 CDR3H、Mab39 CDR3H

<400> 17

Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr

1 5

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 83A10 CDR1L

<400> 18

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

1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 83A10 CDR2L

<400> 19

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 83A10 CDR3L、Mab21 CDR3L、Mab22 CDR3L、Mab42 CDR3L

<400> 20

Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Asp Phe Thr

1 5 10

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Mab21 CDR1H、Mab22 CDR1H、Mab42 CDR1H

<400> 21

Asp Asn Ala Met Gly

1 5

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Mab21 CDR2H、Mab22 CDR2H、Mab42 CDR2H

<400> 22

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

1 5 10 15

Gly

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Mab21 CDR1L

<400> 23

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

1 5 10

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Mab21 CDR2L
<400> 24
Glu His Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5
<210> 25
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Mab22 CDR1L
<400> 25
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Mab22 CDR2L
<400> 26
Gly Ala Gly Ser Arg Ala Thr
1 5
<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Mab42 CDR1L
<400> 27
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Glu Tyr Leu Ser
1 5 10
<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Mab42 CDR2L
<400> 28
Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Mab27 CDR1H

<400> 29

Ser Ala Pro Met Gly

1 5

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Mab27 CDR2H

<400> 30

Ala Ile Ser Tyr Ile Gly His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Mab27 CDR1L、Mab33 CDR1L、Mab39 CDR1L

<400> 31

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

1 5 10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Mab27 CDR2L、Mab33 CDR2L、Mab39 CDR2L

<400> 32

His Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 33

<211> 10

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Mab27 CDR3L、Mab33 CDR3L、Mab39 CDR3L
<400> 33
Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Asp Phe Thr
1 5 10
<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Mab33 CDR1H
<400> 34
Thr Asn Ala Met Gly
1 5
<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Mab33 CDR2H
<400> 35
Ala Ile Asn Arg Phe Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 36
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Mab39 CDR1H
<400> 36
Gln Asn Ala Met Gly
1 5
<210> 37
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> Mab39 CDR2H

<400> 37

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

1 5 10 15

Gly

<210> 38

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Mab27 VH

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Tyr Ile Gly His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 39

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Mab33 VH

<400> 39

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

1 5 10 15

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

			20									25									30							
Ala	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val													
		35								40								45										
Ser	Ala	Ile	Asn	Arg	Phe	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val													
	50								55								60											
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr													
65					70								75								80							
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys													
			85								90								95									
Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val													
		100								105								110										
Thr	Val	Ser	Ser																									
	115																											
<210>	40																											
<211>	116																											
<212>	PRT																											
<213>	人工序列																											
<220>																												
<223>	Mab39 VH																											
<400>	40																											
Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly													
1			5								10								15									
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Gln	Asn													
		20								25								30										
Ala	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val													
		35								40								45										
Ser	Ala	Ile	Ser	Pro	Thr	Gly	Phe	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val													
	50								55								60											
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr													
65					70								75								80							
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys													
			85								90								95									
Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val													
		100								105								110										
Thr	Val	Ser	Ser																									
	115																											
<210>	41																											
<211>	103																											
<212>	PRT																											

<213> 人工序列

<220>

<223> 83A10 BCMA CH1、Mab21 BCMA CH1、Mab22 BCMA CH1、Mab42 BCMA CH1

<400> 41

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

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 83A10 BCMA CL、Mab21 BCMA CL、Mab22 BCMA CL、Mab42 BCMA CL

<400> 42

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

<400> 43

44

98

	85	90	95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
	100	105	
<210> 45			
<211> 671			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 83A10-TCBcv旋钮HC			
<400> 45			
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1 5 10 15			
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
20 25 30			
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35 40 45			
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
50 55 60			
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65 70 75 80			
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85 90 95			
Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
100 105 110			
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala			
115 120 125			
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu			
130 135 140			
Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly			
145 150 155 160			
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
165 170 175			
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
180 185 190			
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr			
195 200 205			
Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly			
210 215 220			
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu			

225	230	235	240
Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr			
	245	250	255
Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro			
	260	265	270
Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro			
	275	280	285
Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala			
	290	295	300
Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys			
305	310	315	320
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu			
	325	330	335
Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu			
	340	345	350
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys			
	355	360	365
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
	370	375	380
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
385	390	395	400
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
	405	410	415
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
	420	425	430
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
	435	440	445
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val			
	450	455	460
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
465	470	475	480
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
	485	490	495
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
	500	505	510
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
	515	520	525
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
	530	535	540

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

<210> 46

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 83A10-TCBcv孔HC

<400> 46

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu		
130	135	140
Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
145	150	155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
165	170	175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
180	185	190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
195	200	205
Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe		
225	230	235 240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
245	250	255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
260	265	270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
275	280	285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
305	310	315 320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
325	330	335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro		
340	345	350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val		
355	360	365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
405	410	415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
420	425	430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		

435	440	445
<210> 47		
<211> 216		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 83A10-TCBcv LC		
<400> 47		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1 5 10 15		
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser		
20 25 30		
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
35 40 45		
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser		
50 55 60		
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu		
65 70 75 80		
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro		
85 90 95		
Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val		
100 105 110		
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys		
115 120 125		
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg		
130 135 140		
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn		
145 150 155 160		
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser		
165 170 175		
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
180 185 190		
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
195 200 205		
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210 215		
<210> 48		
<211> 232		
<212> PRT		

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3 LC

<400> 48

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

<210> 49

<211> 671

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 21-TCBcv旋钮HC

<400> 49

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

290	295	300
Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys		
305	310	315
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu		320
	325	330
Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu		335
	340	345
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys		350
	355	360
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		365
370	375	380
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		385
	390	395
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		400
	405	410
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn		415
	420	425
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His		430
	435	440
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val		445
	450	455
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		460
465	470	475
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		480
	485	490
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		495
	500	505
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		510
	515	520
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		525
	530	535
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		540
545	550	555
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		560
	565	570
Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu		575
	580	585
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		590
595	600	605

Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
610						615				620					
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
625					630					635					640
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
				645						650				655	
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
			660					665					670		
<210>	50														
<211>	446														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	21-TCBcv孔HC														
<400>	50														
Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1			5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Asn
			20					25					30		
Ala	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35				40					45			
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
			50				55					60			
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			100						105				110		
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
			115					120				125			
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
			130				135					140			
Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
145					150					155					160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				165					170					175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
			180						185					190	

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
195	200	205
Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe		
225	230	235 240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
	245	250 255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
	260	265 270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
	275	280 285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
	290	295 300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
305	310	315 320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
	325	330 335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro		
	340	345 350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val		
	355	360 365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
	370	375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
	405	410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
	420	425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	435	440 445
<210>	51	
<211>	216	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	21-TCBcv LC	
<400>	51	

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

<210> 52

<211> 671

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 22-TCBcv旋钮HC

<400> 52

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

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
100	105	110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		
115	120	125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu		
130	135	140
Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
145	150	155
160		
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
165	170	175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
180	185	190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
195	200	205
Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly		
210	215	220
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu		
225	230	235
240		
Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr		
245	250	255
Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro		
260	265	270
Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro		
275	280	285
Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala		
290	295	300
Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys		
305	310	315
320		
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu		
325	330	335
Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu		

340	345	350
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		
370	375	380
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		
385	390	395
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		
405	410	415
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn		
420	425	430
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His		
435	440	445
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val		
450	455	460
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
465	470	475
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
485	490	495
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
500	505	510
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
515	520	525
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
530	535	540
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
545	550	555
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
565	570	575
Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu		
580	585	590
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
595	600	605
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
610	615	620
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
625	630	635
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
645	650	655

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 660 665 670
 <210> 53
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 22-TCBcv孔HC
 <400> 53
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
245	250	255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
260	265	270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
275	280	285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
305	310	315
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
325	330	335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro		
340	345	350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val		
355	360	365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395
Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
405	410	415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
420	425	430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445
<210>	54	
<211>	216	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	22-TCBcv LC	
<400>	54	
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1	5	10
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr		
20	25	30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
35	40	45

Ile Ser Gly Ala Gly Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser		
50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu		
65	70	75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro		
	85	90 95
Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val		
	100	105 110
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys		
	115	120 125
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg		
	130	135 140
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn		
145	150	155 160
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser		
	165	170 175
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
	180	185 190
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
	195	200 205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	
<210>	55	
<211>	671	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	42-TCBcv旋钮HC	
<400>	55	
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn		
	20	25 30
Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35	40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
	50	55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75 80

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			100					105					110		
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
			115				120					125			
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
			130				135					140			
Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
145					150					155					160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				165					170					175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
			180					185					190		
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
			195				200					205			
Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly
			210				215					220			
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu
225					230					235					240
Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Thr
				245					250					255	
Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Glu	Lys	Pro
			260					265					270		
Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro
			275				280					285			
Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala
			290				295				300				
Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys
305				310					315						320
Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu
				325					330					335	
Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
			340					345					350		
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
			355				360						365		
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
			370				375				380				
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser

385	390	395	400
Ser Gly Leu Tyr Ser	Leu Ser Ser Val Val	Thr Val Pro Ser Ser Ser	
	405	410	415
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
	420	425	430
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
	435	440	445
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val			
	450	455	460
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
465	470	475	480
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
	485	490	495
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
	500	505	510
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
	515	520	525
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
	530	535	540
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile			
545	550	555	560
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro			
	565	570	575
Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu			
	580	585	590
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn			
	595	600	605
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser			
	610	615	620
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg			
625	630	635	640
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu			
	645	650	655
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	660	665	670

<210> 56

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 42-TCBcv孔HC

<400> 56

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

Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
290						295					300				
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
305					310					315					320
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
				325					330					335	
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro
			340						345				350		
Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val
		355						360					365		
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
	370					375						380			
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
385					390					395					400
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
				405					410					415	
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
			420						425				430		
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
		435					440					445			
<210>	57														
<211>	216														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	42-TCBcv孔HC														
<400>	57														
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1			5					10						15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Asp	Glu
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	His	Ser	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ala	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65				70					75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Pro
			85						90					95	

Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val		
100	105	110
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys		
115	120	125
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg		
130	135	140
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn		
145	150	155
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser		
165	170	175
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
180	185	190
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
195	200	205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	
<210>	58	
<211>	445	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Mab101 HC-1	
<400>	58	
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
20	25	30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
100	105	110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		
115	120	125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Trp Leu Gly Cys Glu		
130	135	140
Val Thr Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
145	150	155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Glu Ser Ser		
	165	170 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
	180	185 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
	195	200 205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
	210	215 220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe		
225	230	235 240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
	245	250 255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
	260	265 270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
	275	280 285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
	290	295 300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
305	310	315 320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
	325	330 335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Val Tyr Pro Pro		
	340	345 350
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
	355	360 365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
	370	375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395 400
Gly Ser Phe Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
	405	410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
	420	425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		

435	440	445
<210> 59		
<211> 670		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Mab101 HC-2		
<400> 59		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1 5 10 15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
20 25 30		
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35 40 45		
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50 55 60		
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65 70 75 80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
100 105 110		
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		
115 120 125		
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Trp Leu Gly Cys Glu		
130 135 140		
Val Thr Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
145 150 155 160		
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Glu Ser Ser		
165 170 175		
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
180 185 190		
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
195 200 205		
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly		
210 215 220		
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu		
225 230 235 240		
Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr		

				245				250				255			
Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Glu	Lys	Pro
				260				265				270			
Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro
				275				280				285			
Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala
				290				295				300			
Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys
305				310				315				320			
Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu
				325				330				335			
Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
				340				345				350			
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
				355				360				365			
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
				370				375				380			
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
385				390				395				400			
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
				405				410				415			
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
				420				425				430			
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
				435				440				445			
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
				450				455				460			
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
465				470				475				480			
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
				485				490				495			
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
				500				505				510			
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
				515				520				525			
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
				530				535				540			
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
545				550				555				560			

Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro
				565				570				575			
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Leu	Cys	Leu
				580				585				590			
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
				595				600				605			
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				610				615				620			
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
625				630				635				640			
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
				645				650				655			
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
				660				665				670			
<210> 60															
<211> 216															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> Mab101 LC															
<400> 60															
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5				10				15			
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
				20				25				30			
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
35				40				45							
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
50				55				60							
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65				70				75				80			
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Pro
				85				90				95			
Asp	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val
				100				105				110			
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Ala	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Arg	Leu	Lys
115				120				125							
Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Val	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg
130				135				140							

Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn
145					150					155					160
Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser
				165						170					175
Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys
			180							185				190	
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr
		195						200					205		
Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
		210					215								
<210>	61														
<211>	445														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	Mab102 HC-1														
<400>	61														
Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1			5						10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Asn
			20						25					30	
Ala	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
		50					55					60			
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			100						105					110	
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
			115						120					125	
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Trp	Leu	Gly	Cys	Glu
			130						135					140	
Val	Thr	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
145						150					155				160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Glu	Ser	Ser
				165							170				175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
180	185	190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
195	200	205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe		
225	230	235
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
245	250	255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
260	265	270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
275	280	285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
305	310	315
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
325	330	335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Val Tyr Pro Pro		
340	345	350
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
355	360	365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395
Gly Ser Phe Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
405	410	415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
420	425	430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
435	440	445
<210>	62	
<211>	670	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> Mab102 HC-2

<400> 62

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

290	295	300
Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys		
305	310	315
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu		320
	325	330
Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu		335
	340	345
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys		350
	355	360
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		365
370	375	380
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		385
	390	395
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		400
	405	410
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn		415
	420	425
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His		430
	435	440
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val		445
	450	455
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		460
465	470	475
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		480
	485	490
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		495
	500	505
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		510
	515	520
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		525
	530	535
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		540
545	550	555
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro		560
	565	570
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Leu Cys Leu		575
	580	585
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		590
595	600	605

Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
610						615				620					
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
625					630					635					640
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
				645						650					655
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
			660					665					670		
<210>	63														
<211>	216														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	Mab102 LC														
<400>	63														
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1			5					10					15		
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
			35					40					45		
Ile	Ser	Gly	Ala	Gly	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
			50					55				60			
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65						70				75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Pro
						85				90					95
Asp	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val
						100				105					110
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Ala	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Arg	Leu	Lys
						115									120
Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Val	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg
						130									135
Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn
145						150									155
Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser
						165									170
Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys
						180									185
															190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 64
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Mab103 ? HC-1
 <400> 64
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Trp Leu Gly Cys Glu
 130 135 140
 Val Thr Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Glu Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe			
225	230	235	240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro			
	245	250	255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val			
	260	265	270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr			
	275	280	285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val			
	290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys			
305	310	315	320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser			
	325	330	335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Val Tyr Pro Pro			
	340	345	350
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val			
	355	360	365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly			
	370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp			
385	390	395	400
Gly Ser Phe Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp			
	405	410	415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His			
	420	425	430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	435	440	445
<210>	65		
<211>	670		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	Mab103 HC-2		
<400>	65		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn			
	20	25	30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
100	105	110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		
115	120	125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Trp Leu Gly Cys Glu		
130	135	140
Val Thr Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
145	150	155
160		
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Glu Ser Ser		
165	170	175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
180	185	190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
195	200	205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly		
210	215	220
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu		
225	230	235
240		
Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr		
245	250	255
Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro		
260	265	270
Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro		
275	280	285
Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala		
290	295	300
Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys		
305	310	315
320		
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu		
325	330	335
Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu		

340	345	350
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		
370	375	380
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		
385	390	395
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		
405	410	415
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn		
420	425	430
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His		
435	440	445
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val		
450	455	460
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
465	470	475
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
485	490	495
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
500	505	510
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
515	520	525
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
530	535	540
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
545	550	555
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro		
565	570	575
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Leu Cys Leu		
580	585	590
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
595	600	605
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Leu Thr Trp Pro Pro Val Leu Asp Ser		
610	615	620
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
625	630	635
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
645	650	655

His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
			660					665					670		
<210>	66														
<211>	216														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	Mab103 LC														
<400>	66														
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Asp	Glu
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	His	Ser	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ala	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65					70				75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Pro
			85					90					95		
Asp	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val
		100						105					110		
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Ala	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Arg	Leu	Lys
		115					120					125			
Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Val	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg
		130					135					140			
Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn
145					150					155				160	
Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser
			165						170				175		
Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys
			180					185					190		
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr
		195					200						205		
Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
		210					215								
<210>	67														
<211>	13														

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 83A10 CDR1L (SEQ ID NO: 18的替代)
<400> 67
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5 10
<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 83A10 CDR2L (SEQ ID NO: 19的替代)
<400> 68
Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5
<210> 69
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Mab22 CDR1L (SEQ ID NO: 25的替代)
<400> 69
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Tyr Leu Ala Trp
1 5 10
<210> 70
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Mab22 CDR2L (SEQ ID NO: 26的替代)
<400> 70
Ser Gly Ala Gly Ser Arg Ala Thr
1 5
<210> 71
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> Mab42 CDR1L (SEQ ID NO: 27的替代)

<400> 71

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

1 5 10

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Mab42 CDR2L (SEQ ID NO: 28的替代)

<400> 72

His Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

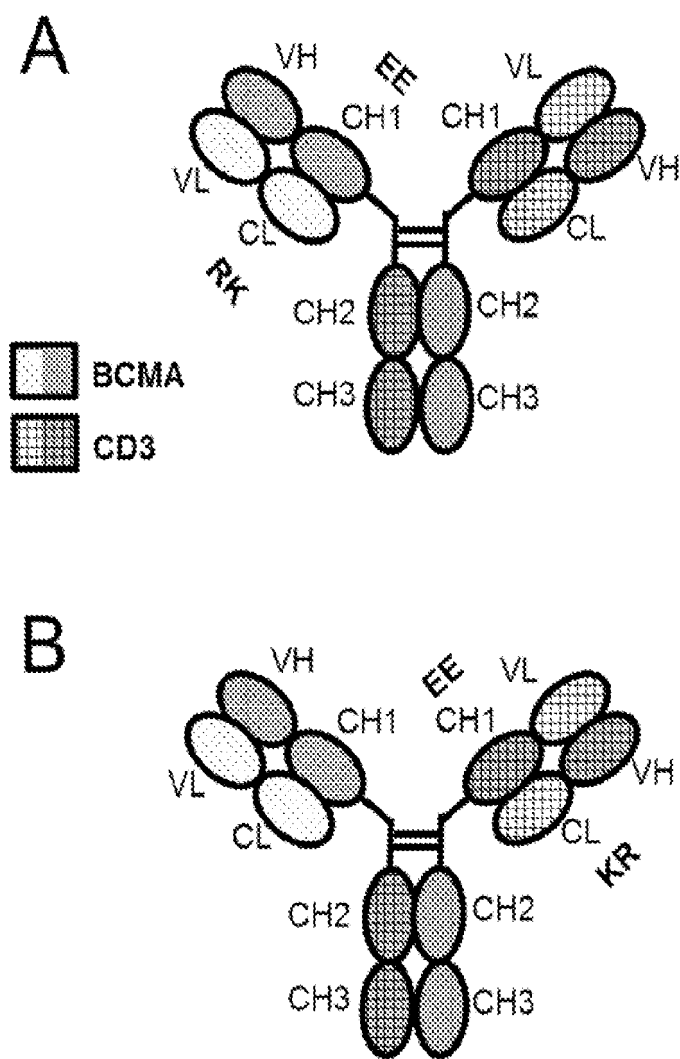


图 1

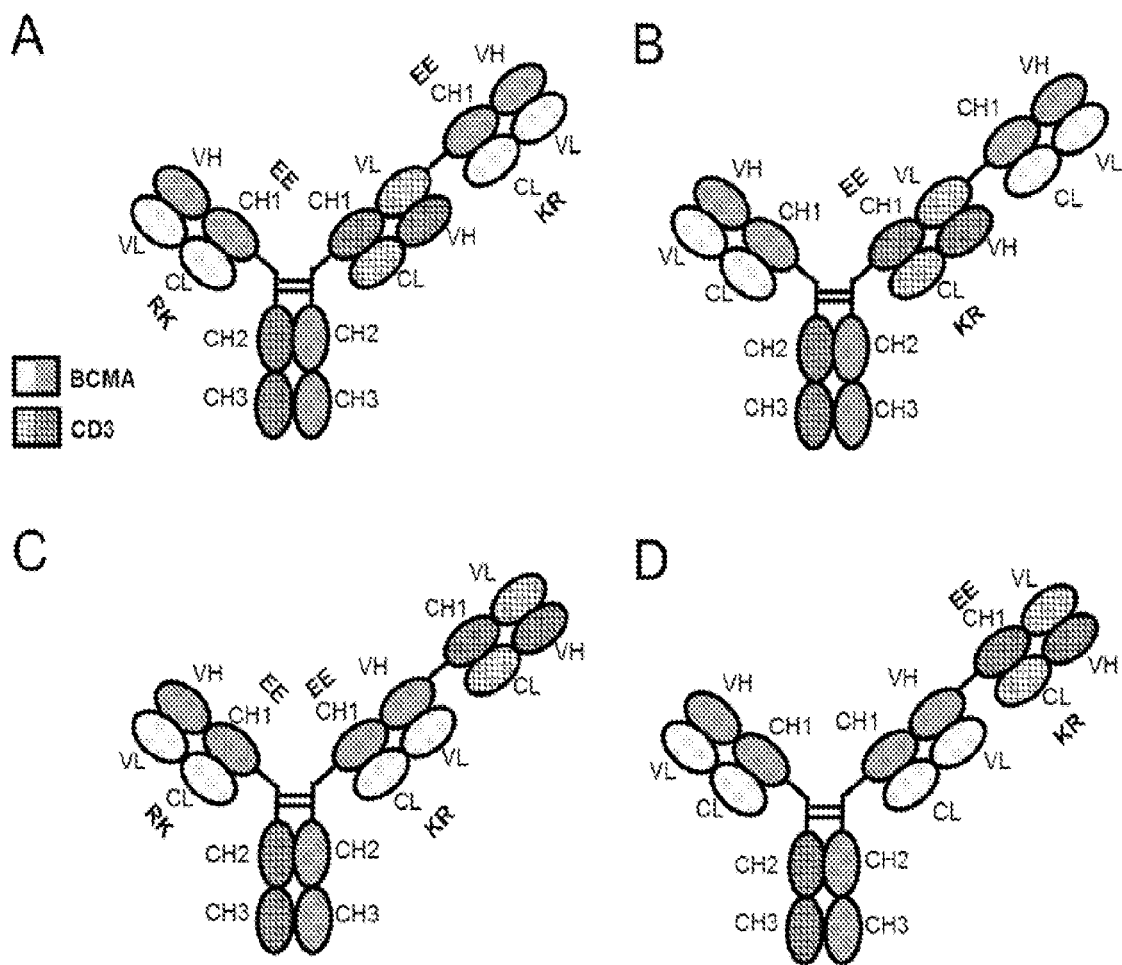


图 2

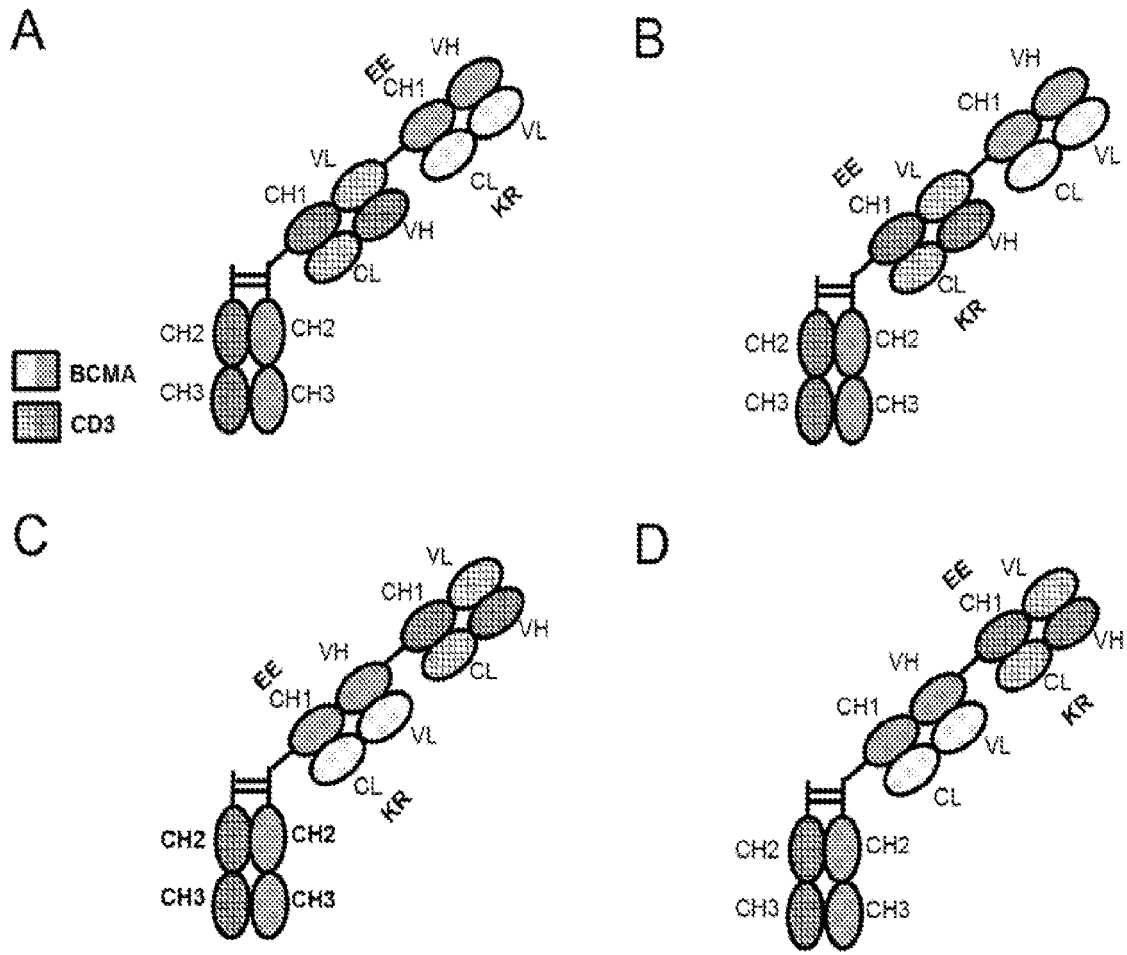


图 3

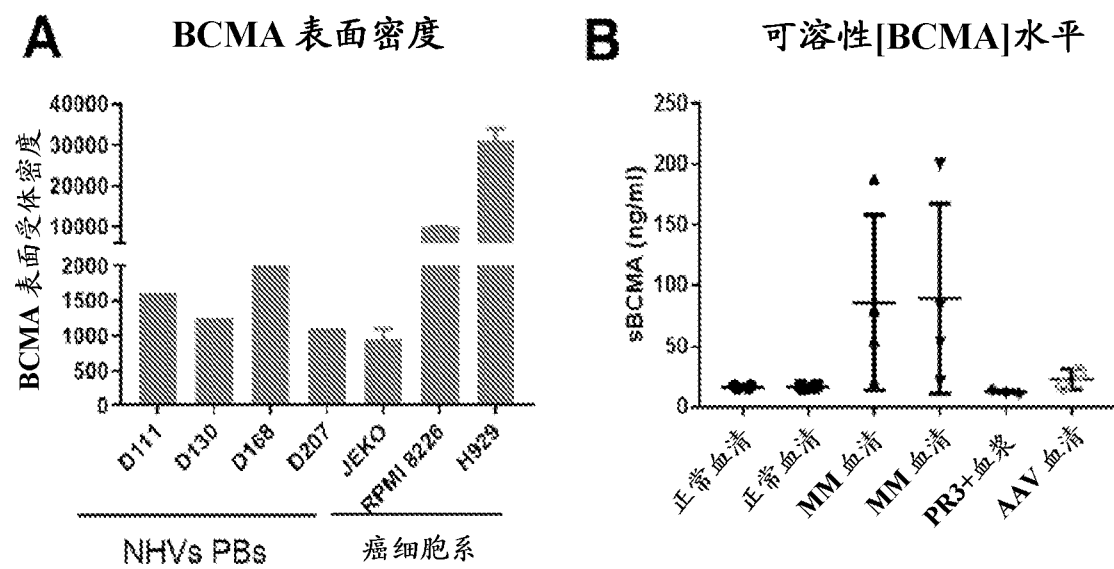
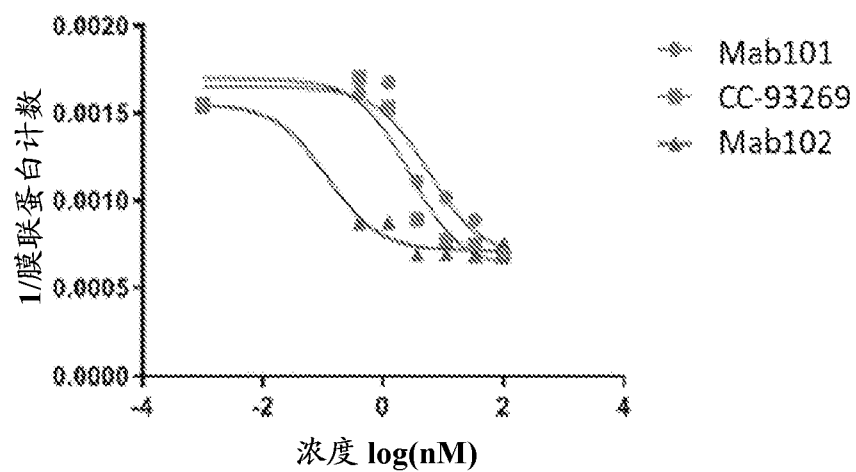


图 4

JEKO 细胞杀伤



T 细胞活化

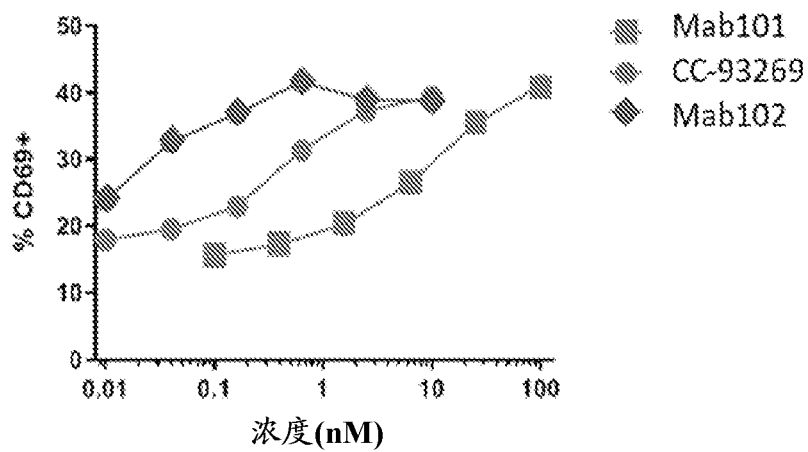


图 5

%活 RPMI8226

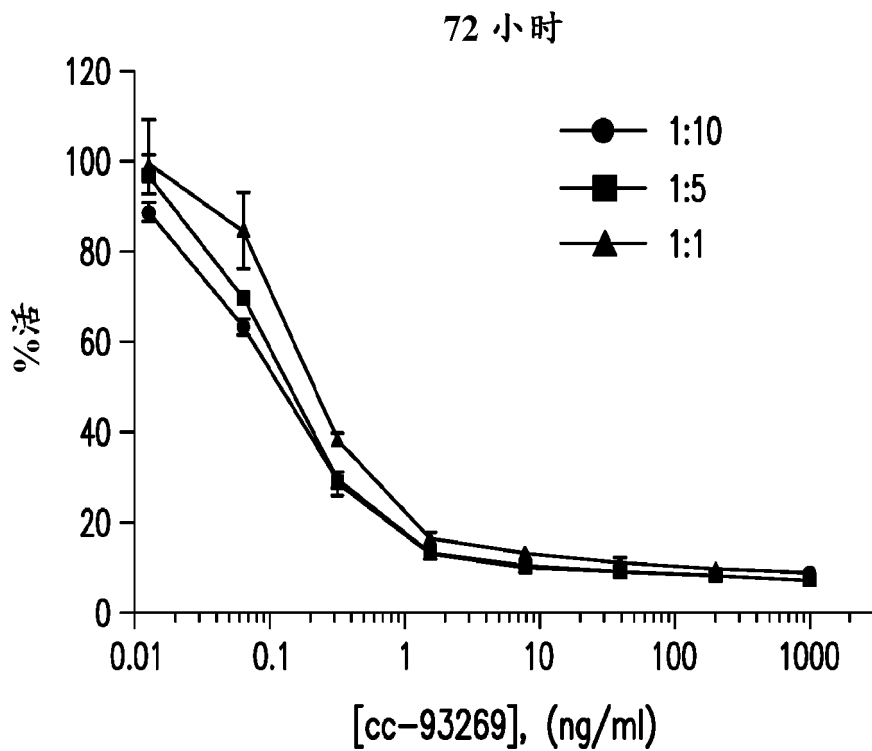
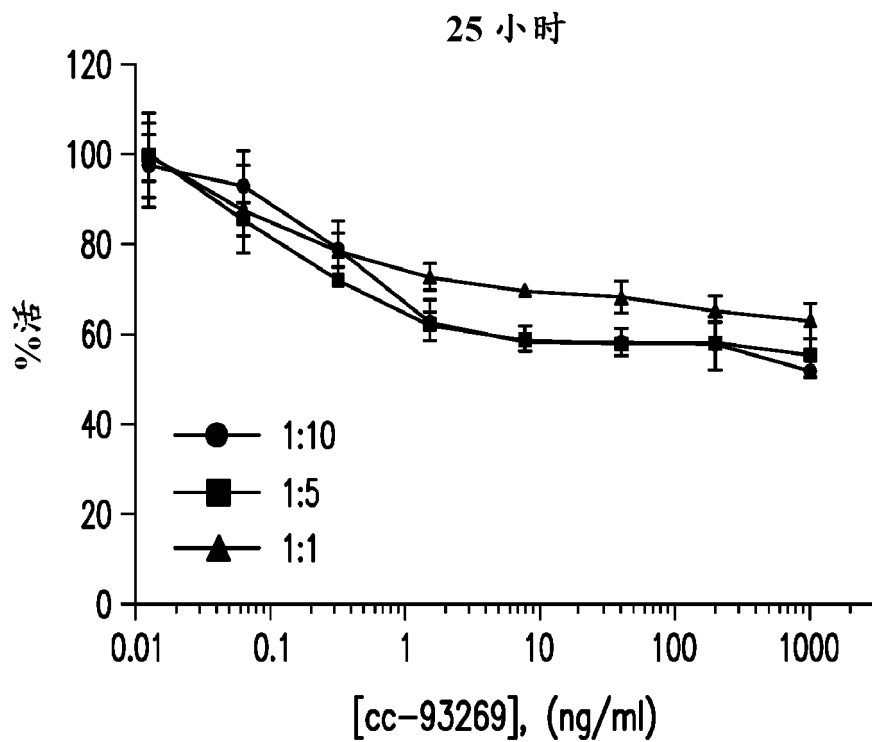
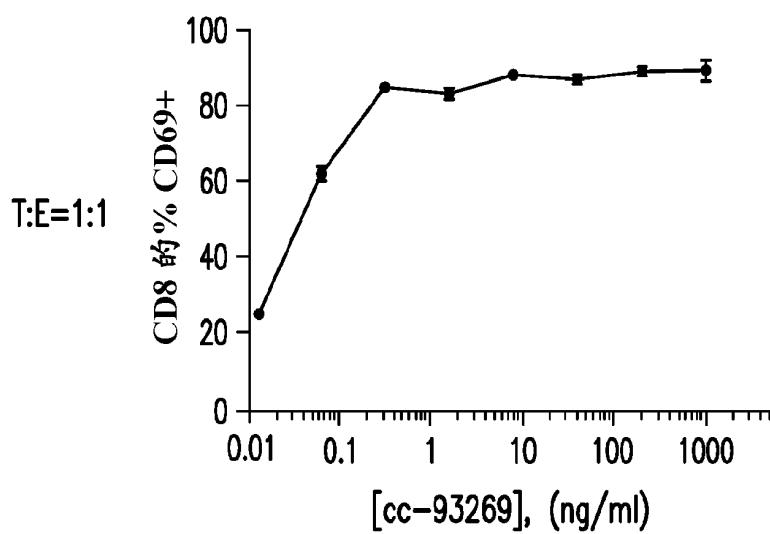
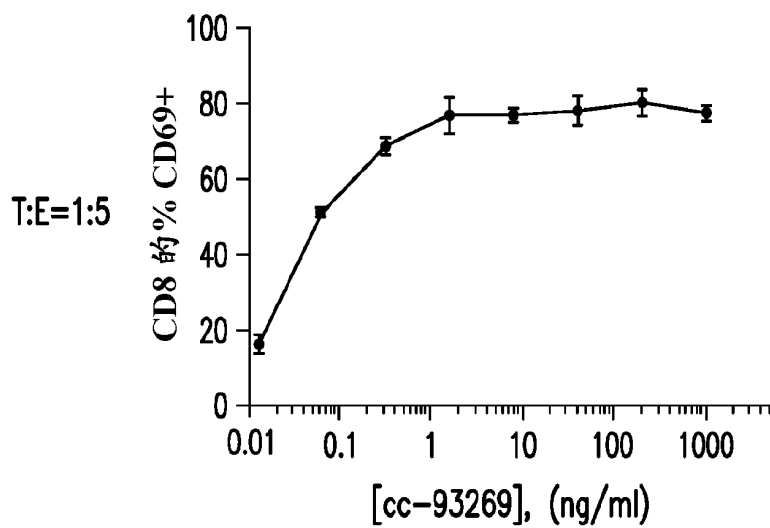
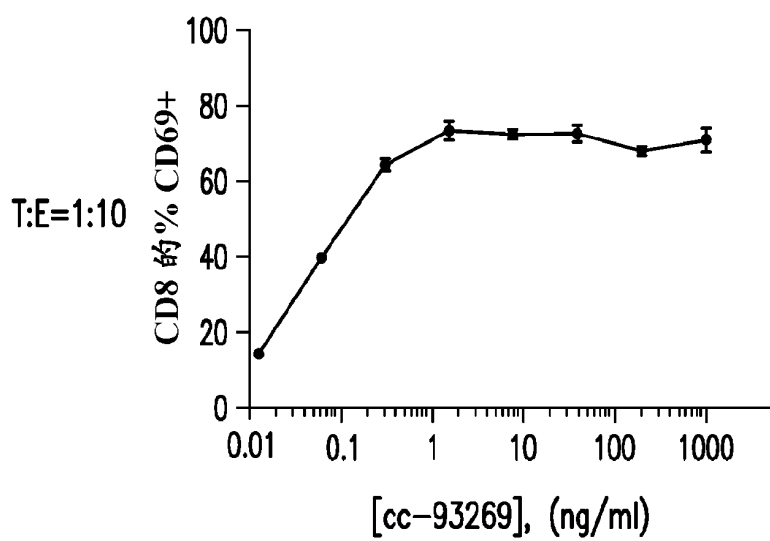


图 6A

% CD69+ CD8 25 小时



6B

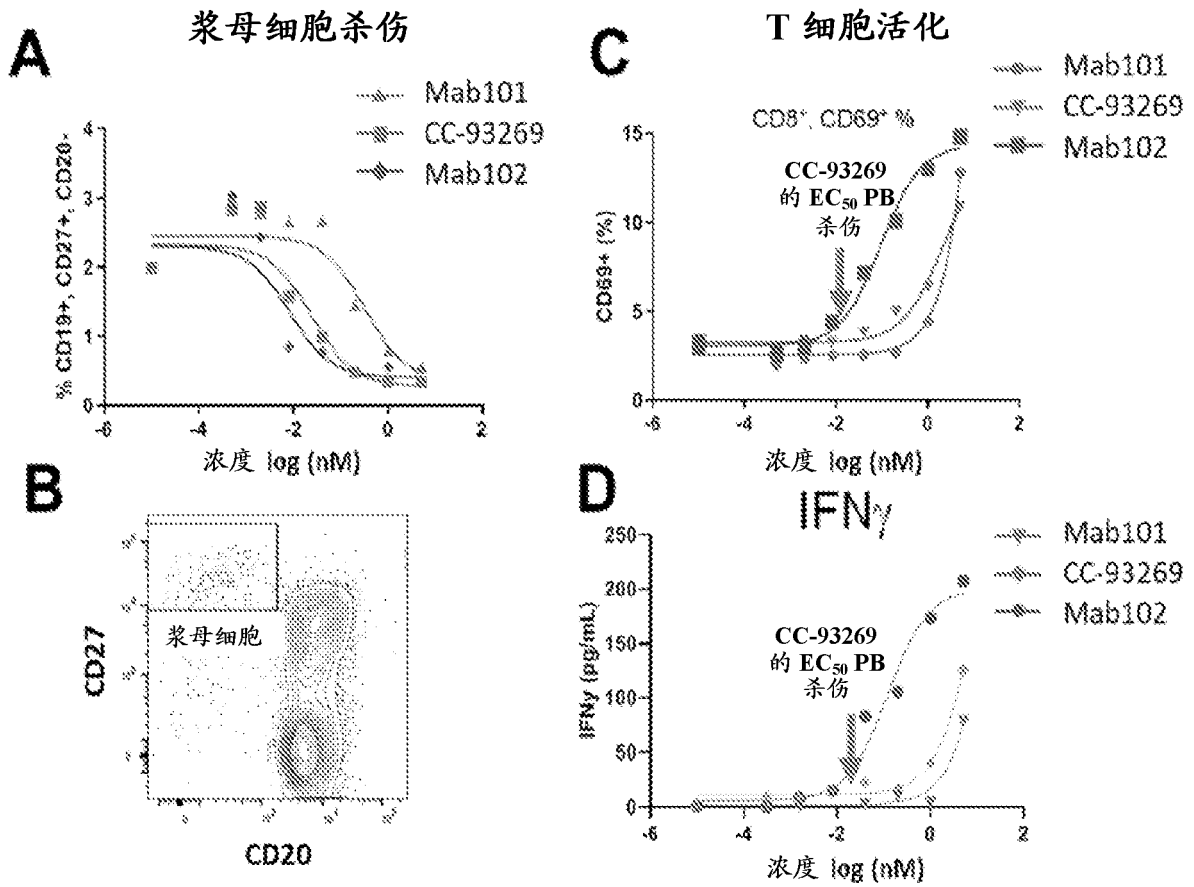


图 7

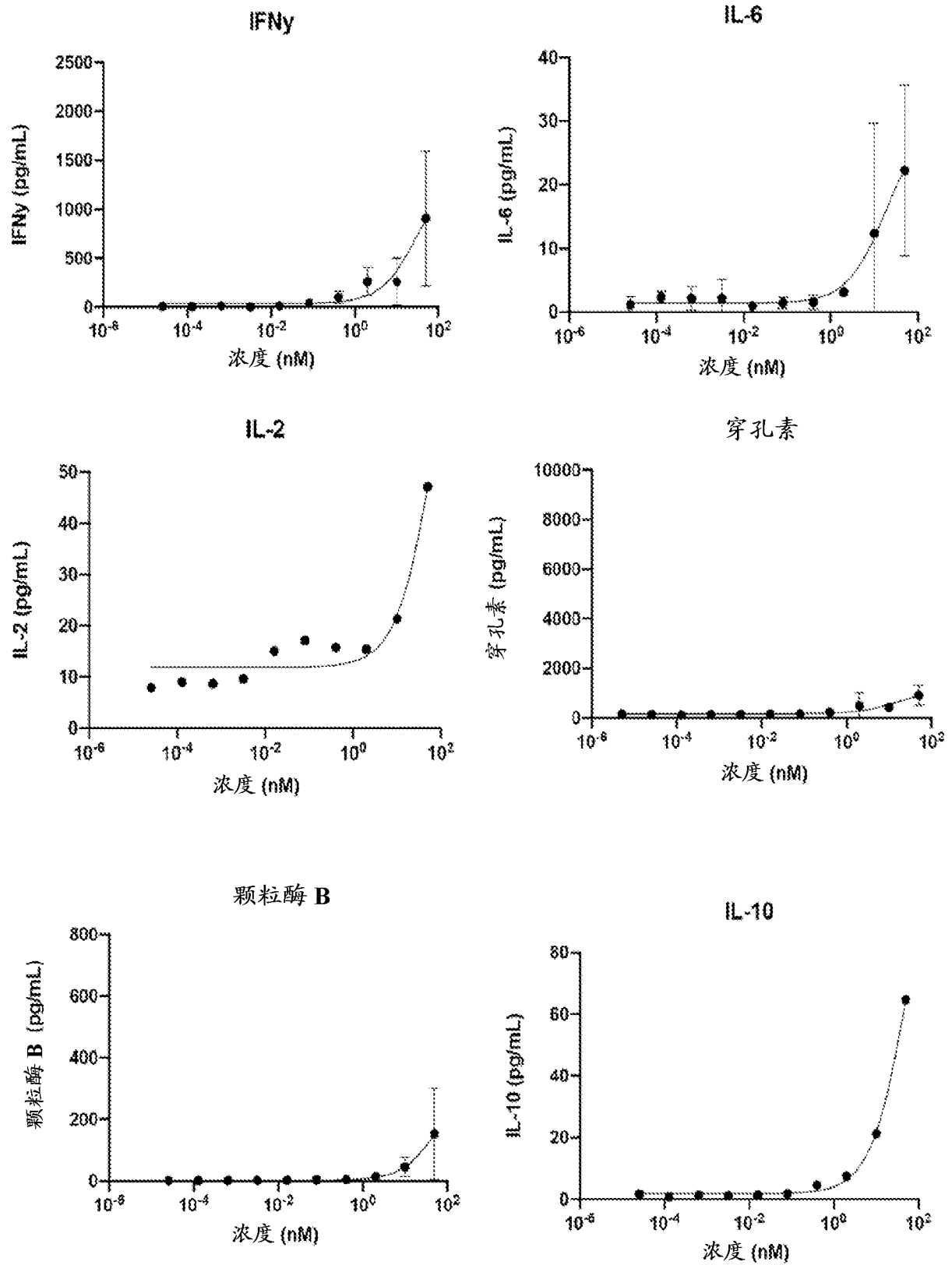


图 8

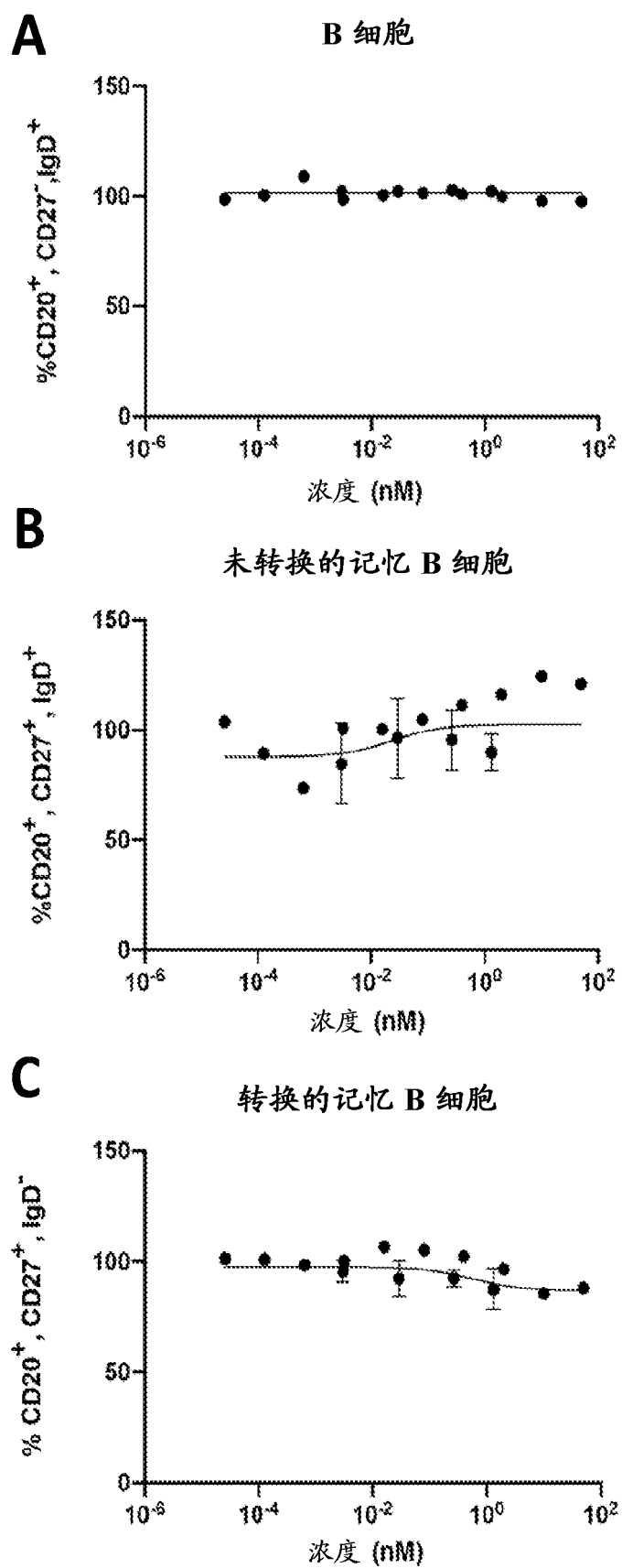


图 9

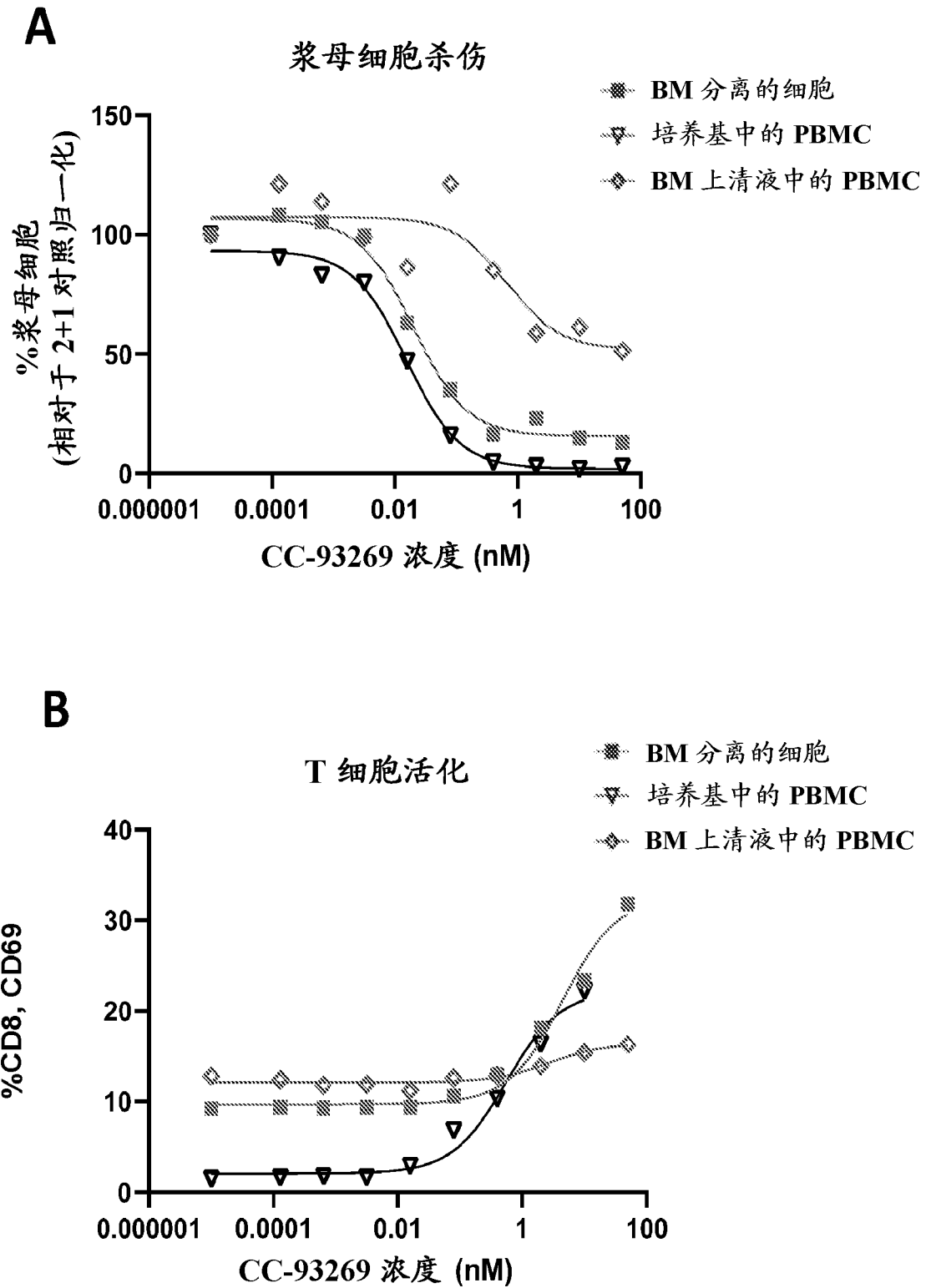


图 10

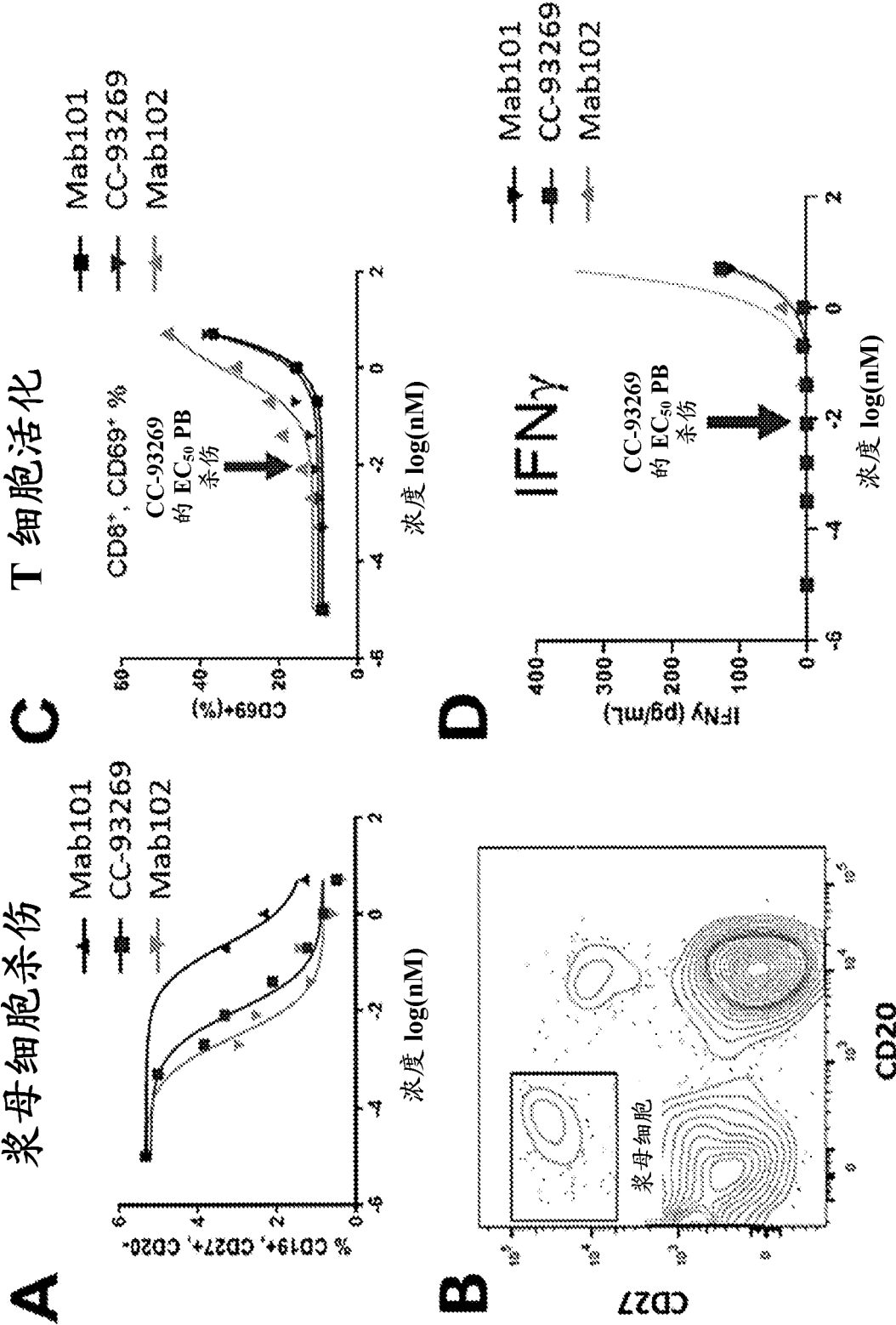
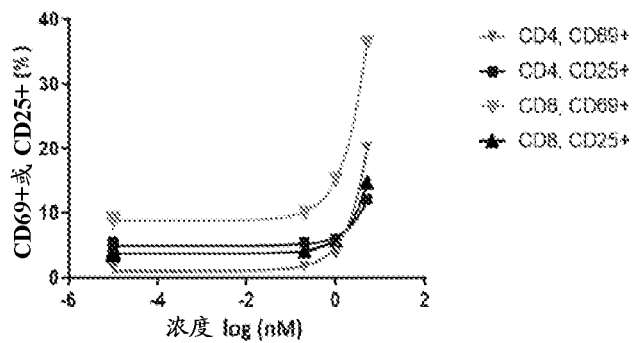


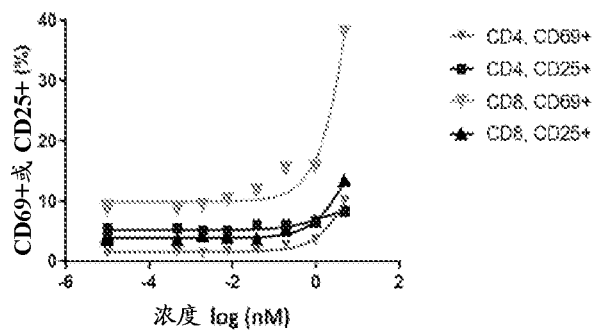
图 11

A

用 Mab101 在 AAV1 中的 T 细胞活化

**B**

用 CC-93269 在 AAV1 中的 T 细胞活化

**C**

用 Mab102 在 AAV1 中的 T 细胞活化

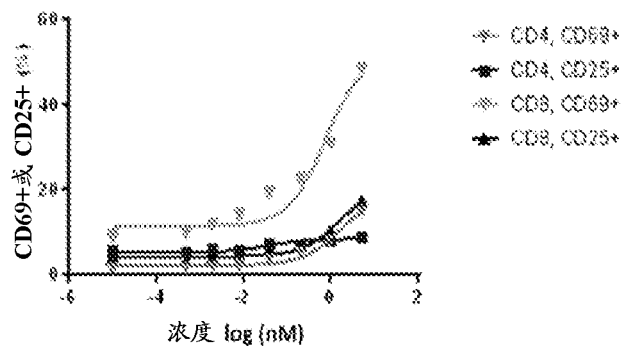


图 12

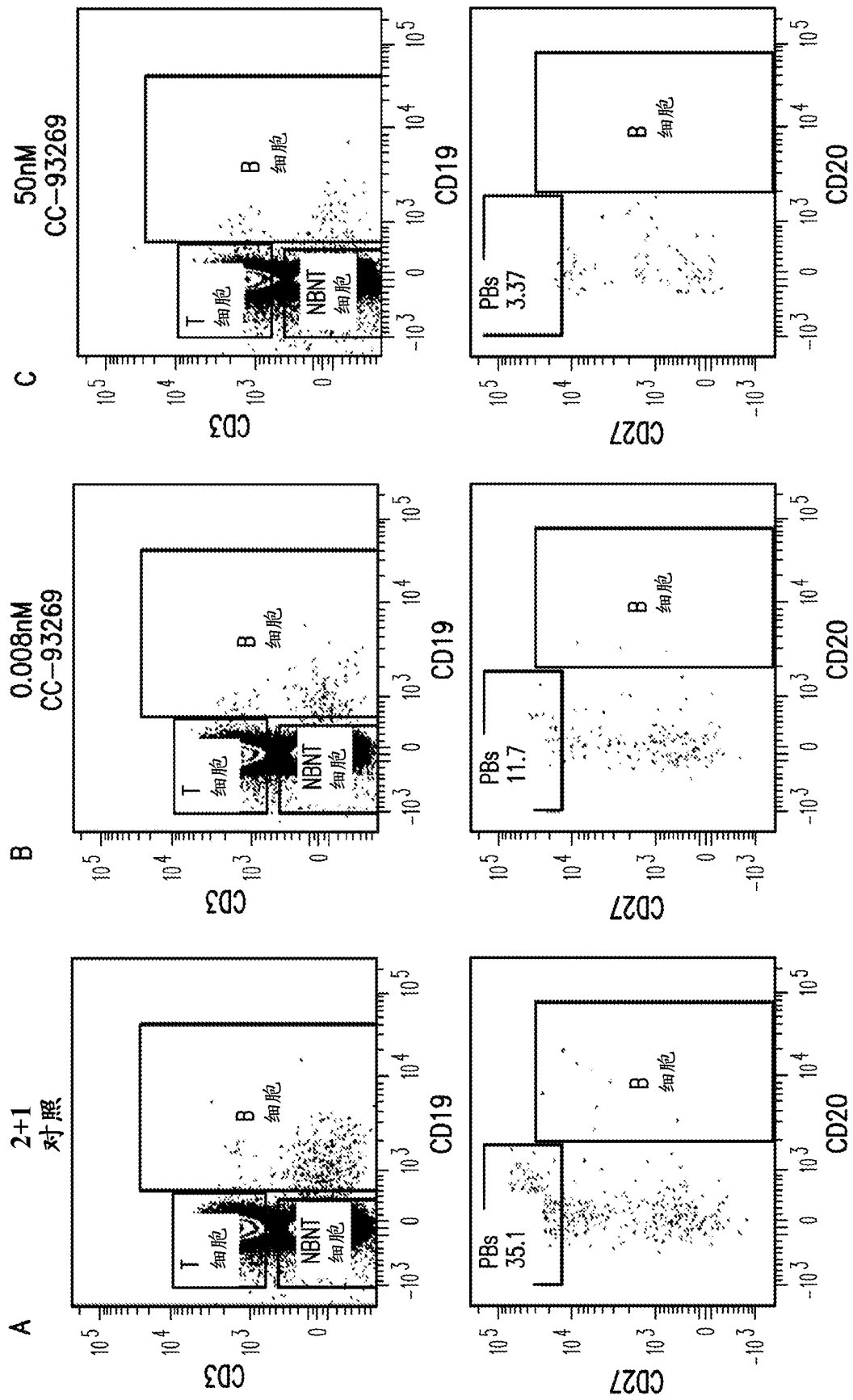


图 13

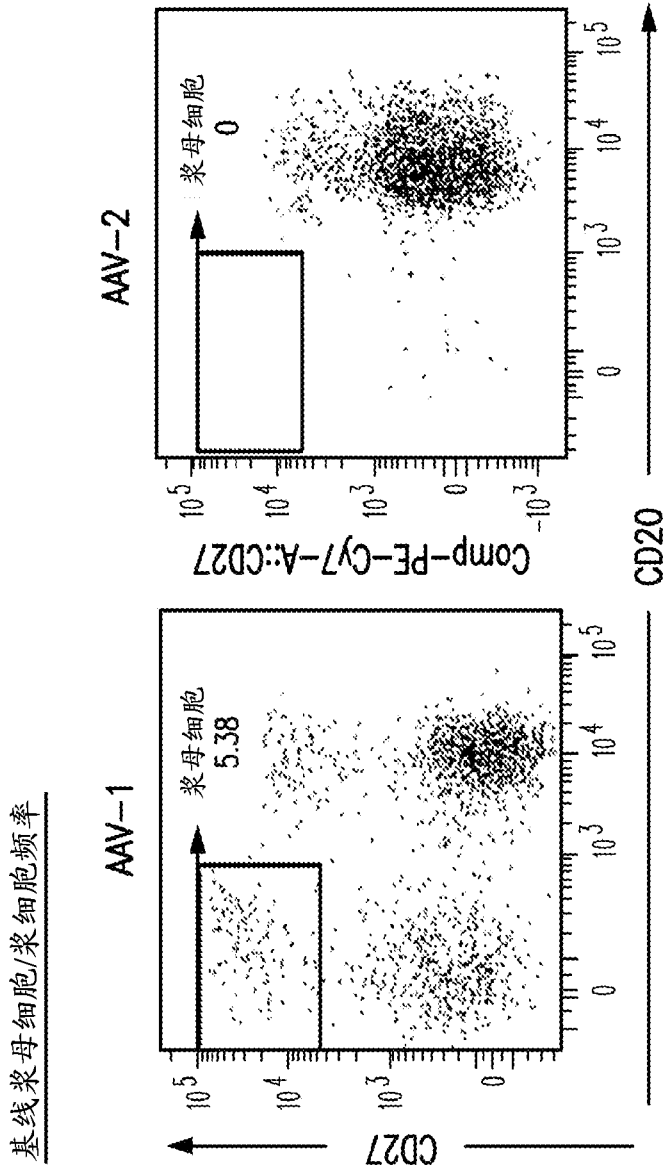


图 14A

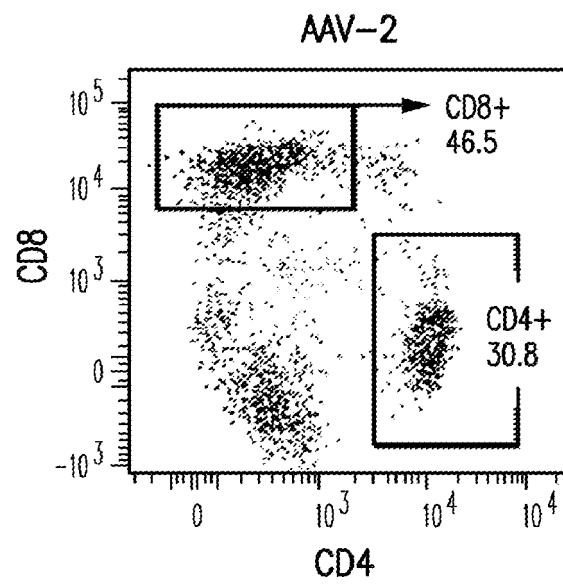
基线 T 细胞

图 14B

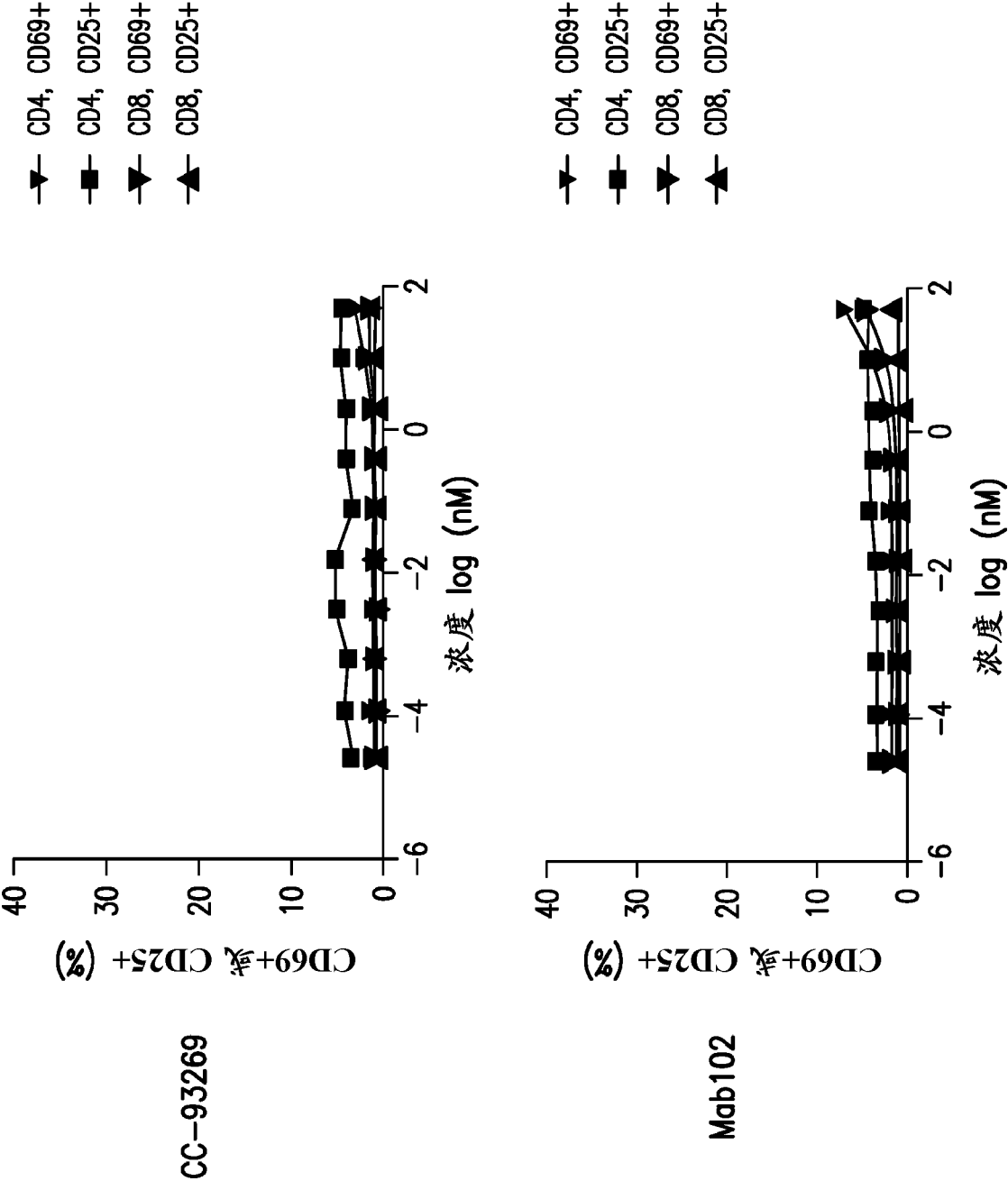


图 14C

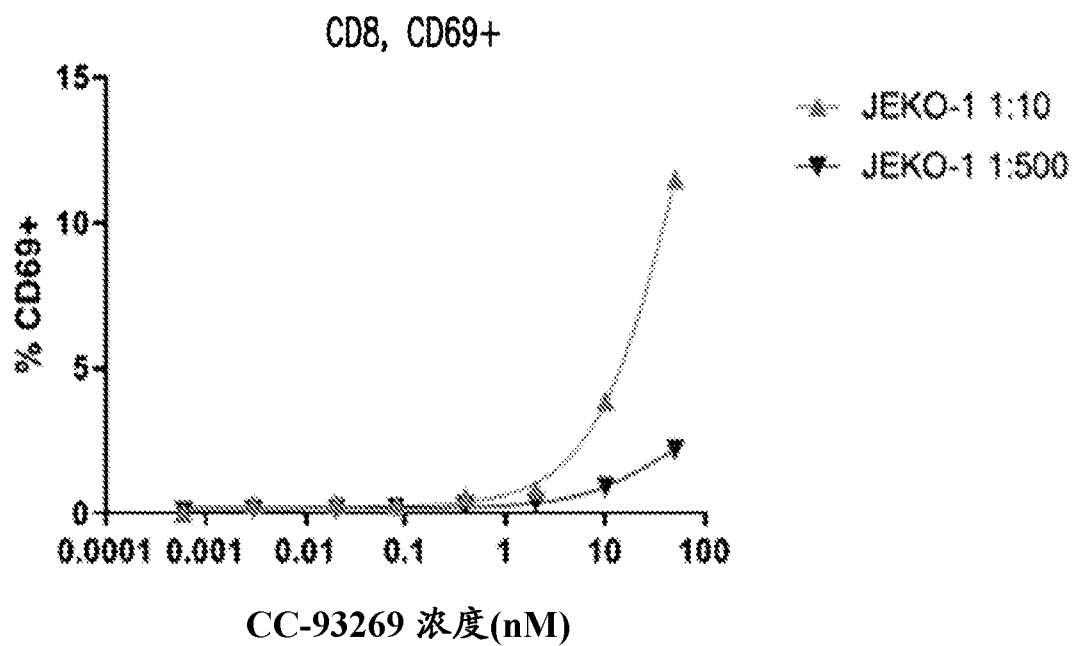
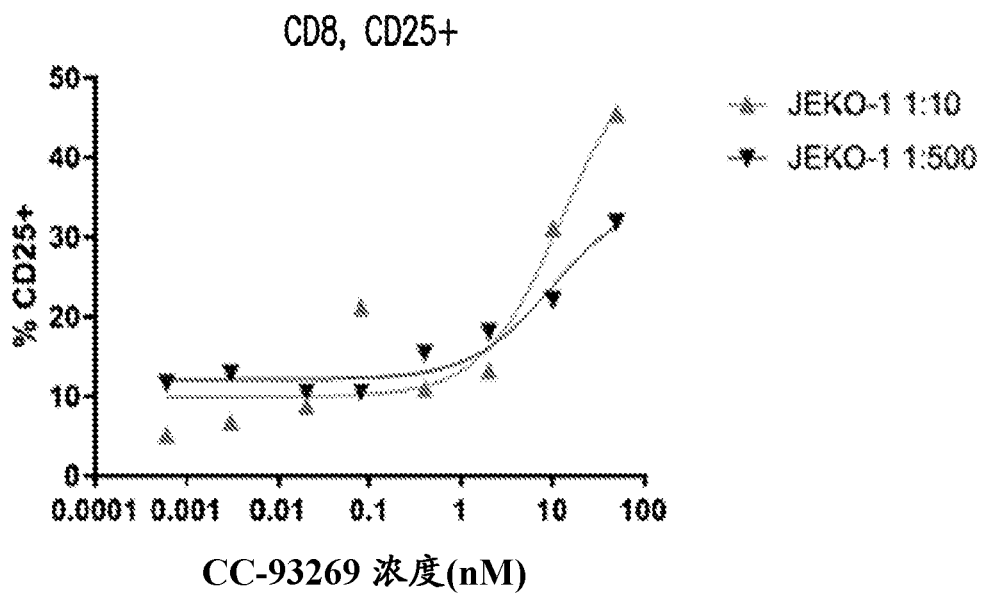
A**B**

图 15

Mab102

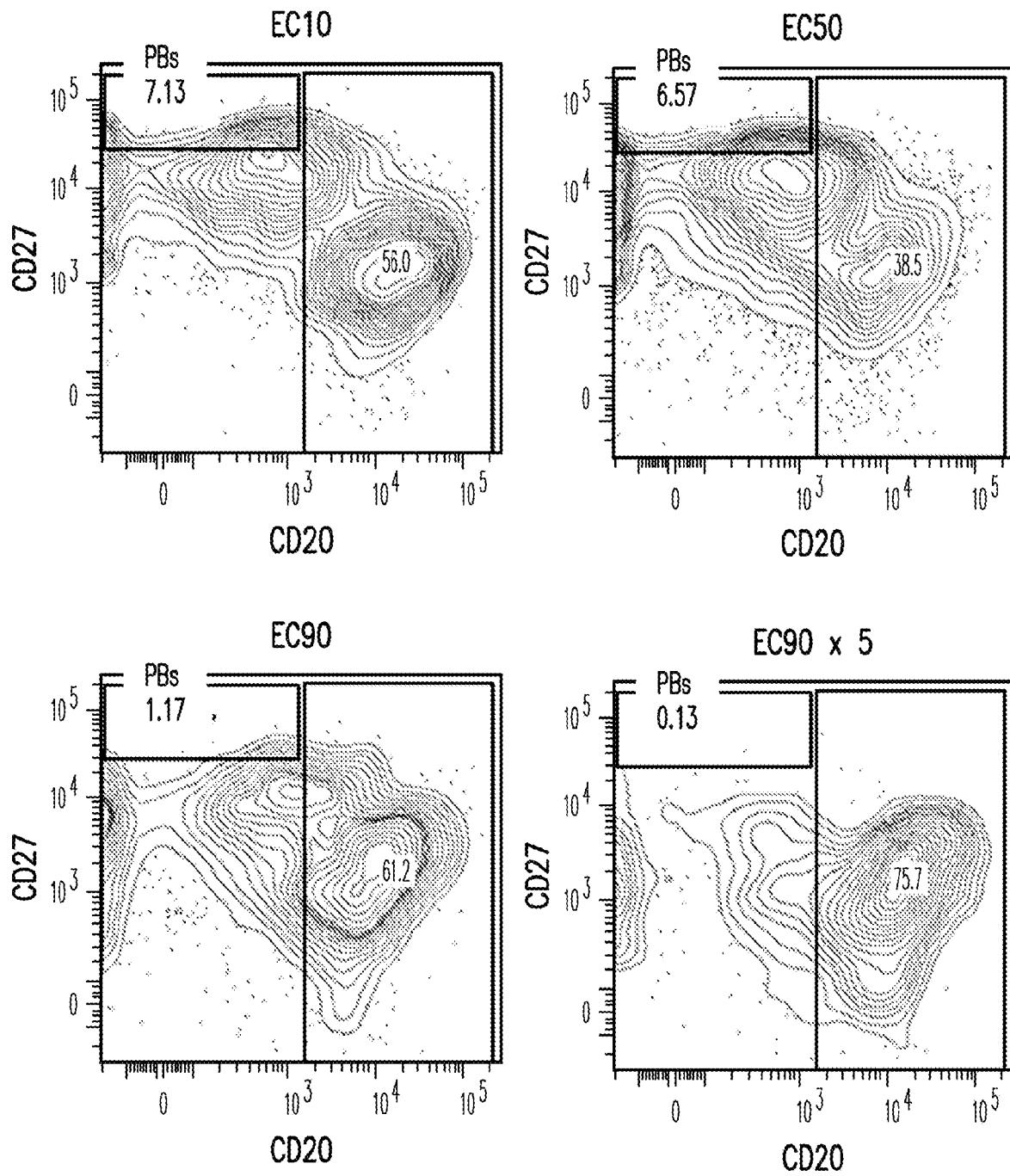


图 16A

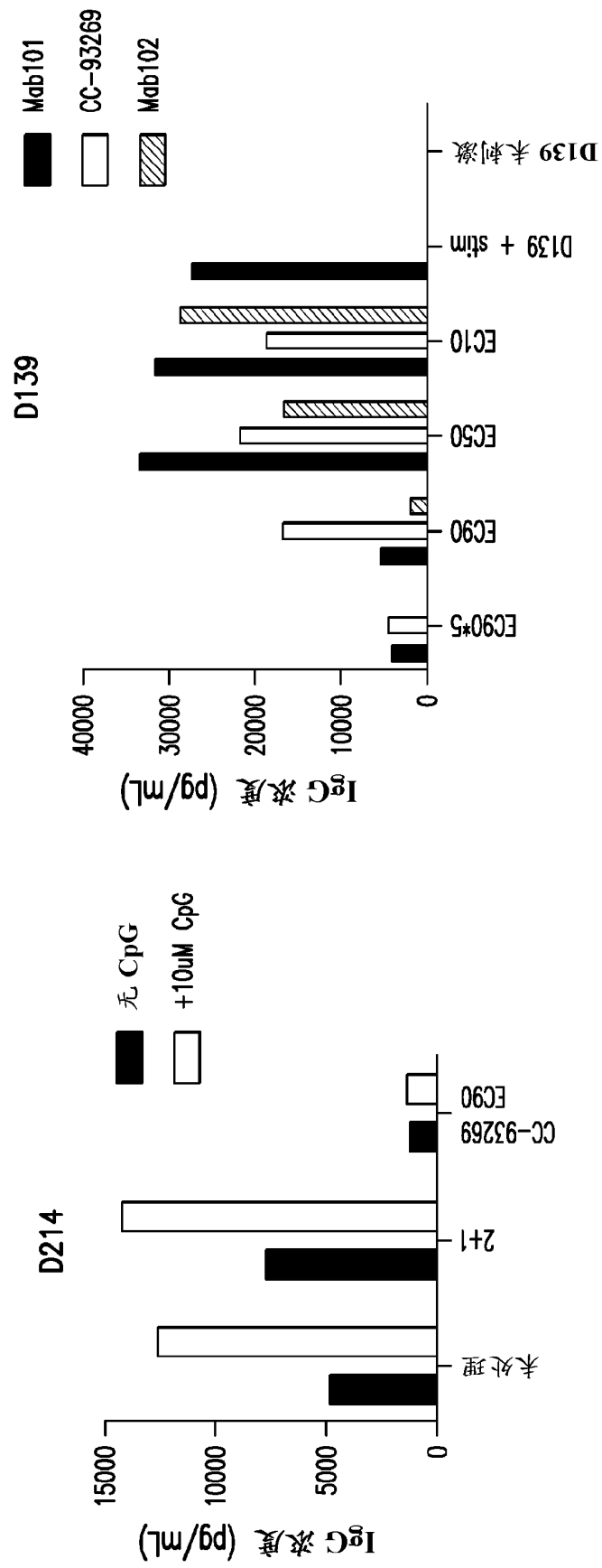


图 16B

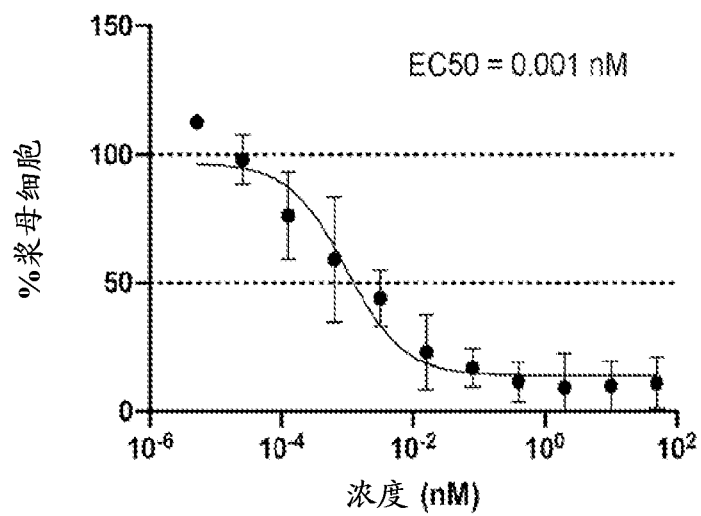
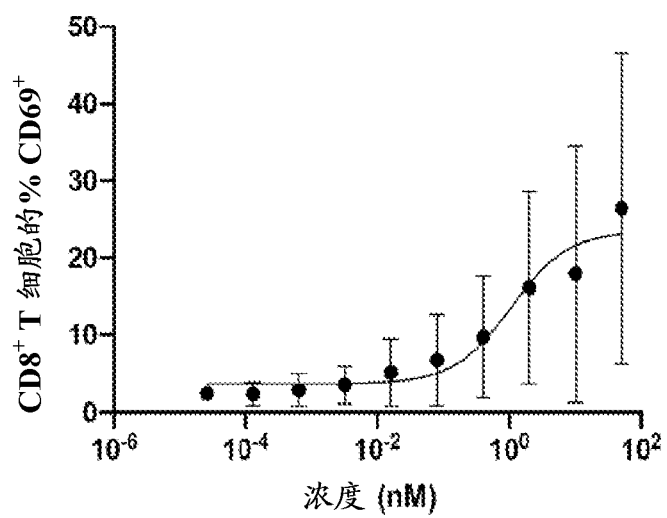
A**浆母细胞杀伤****B****T 细胞活化**

图 17

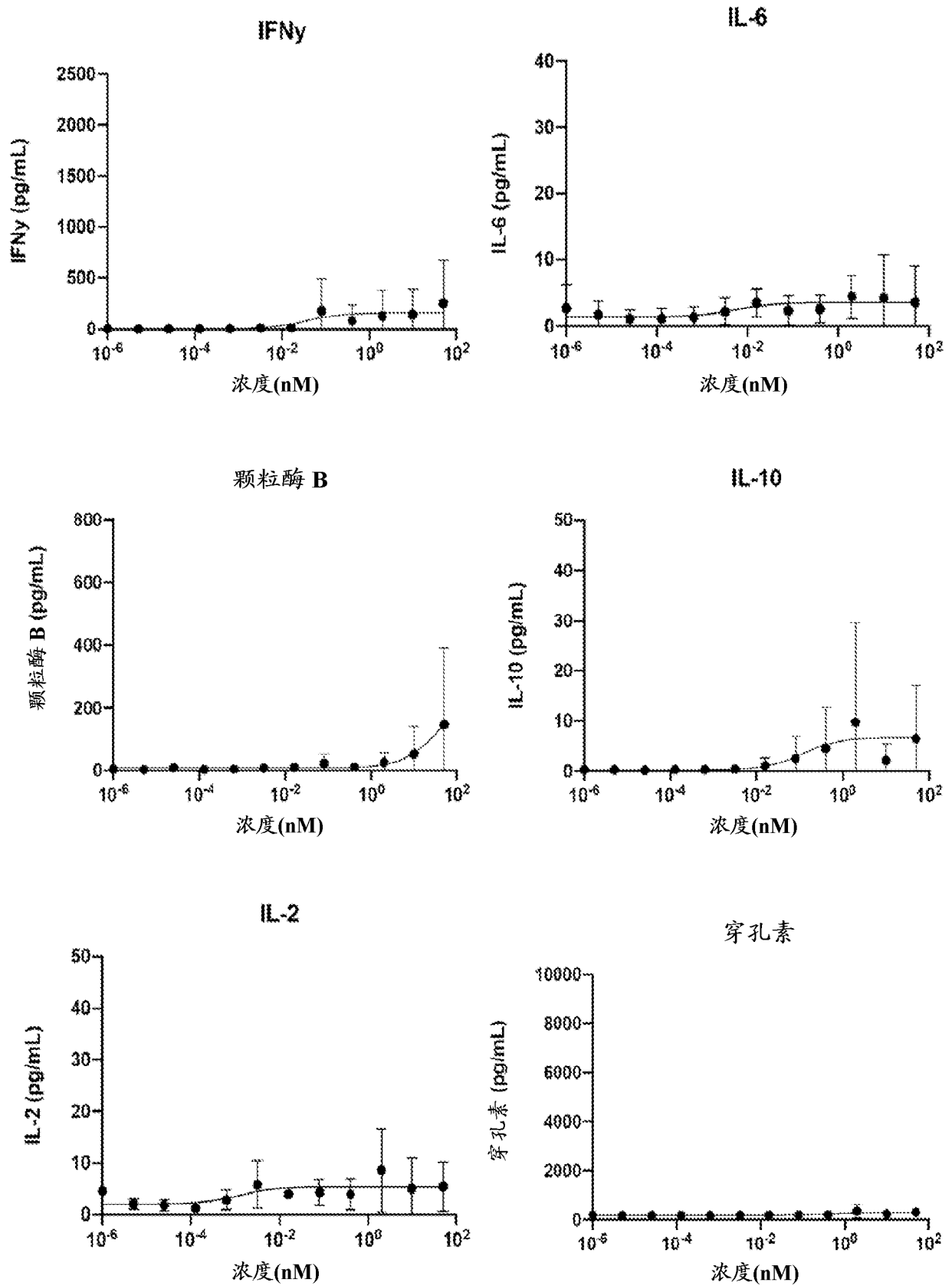


图 17C

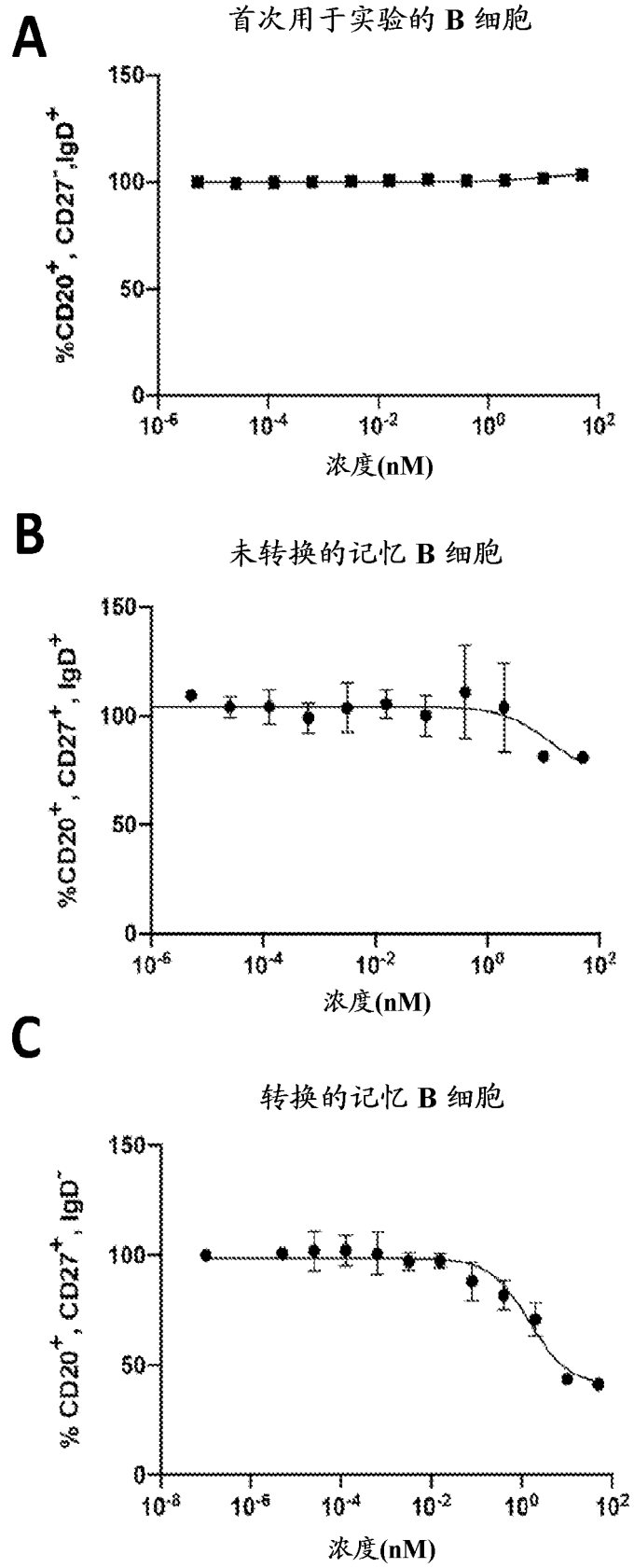


图 18

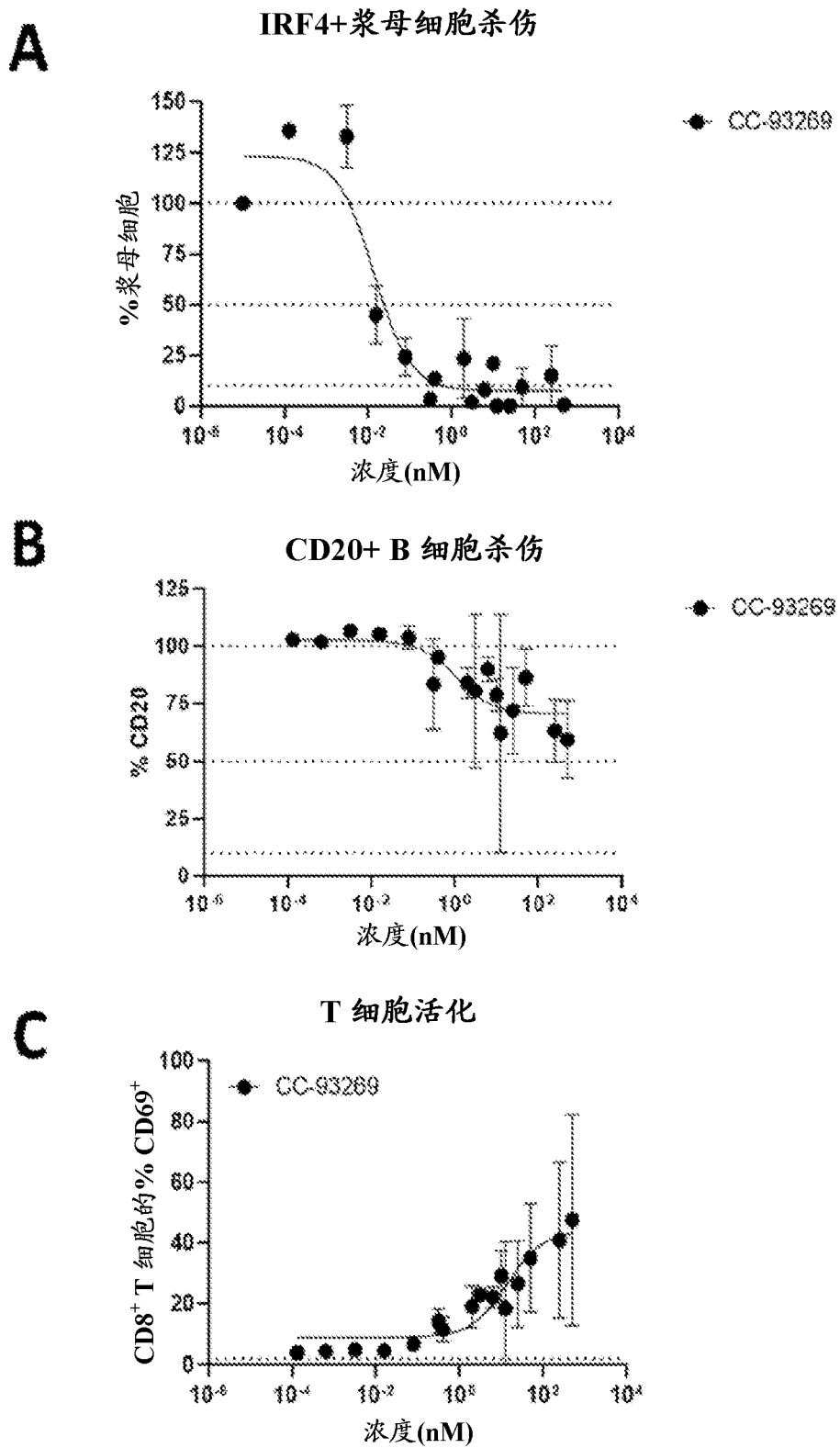


图 19

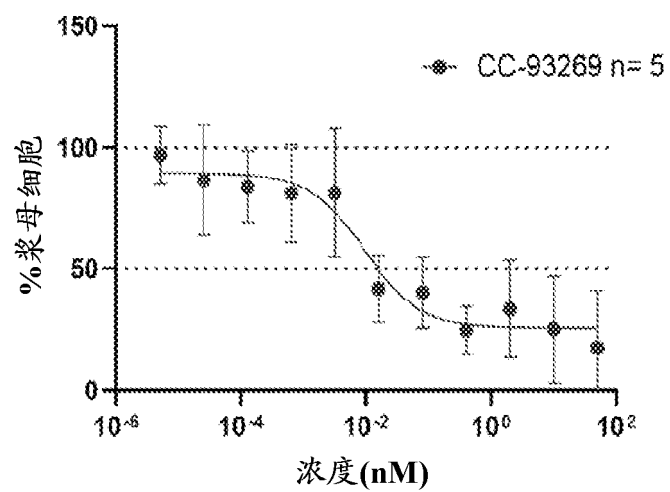
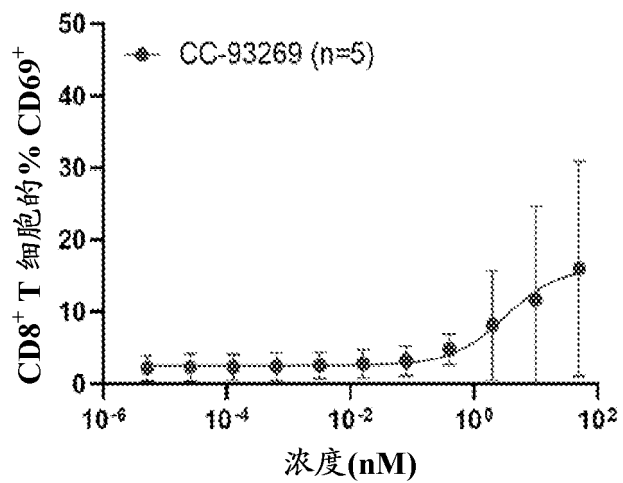
A**浆母细胞杀伤****B****T 细胞活化**

图 20

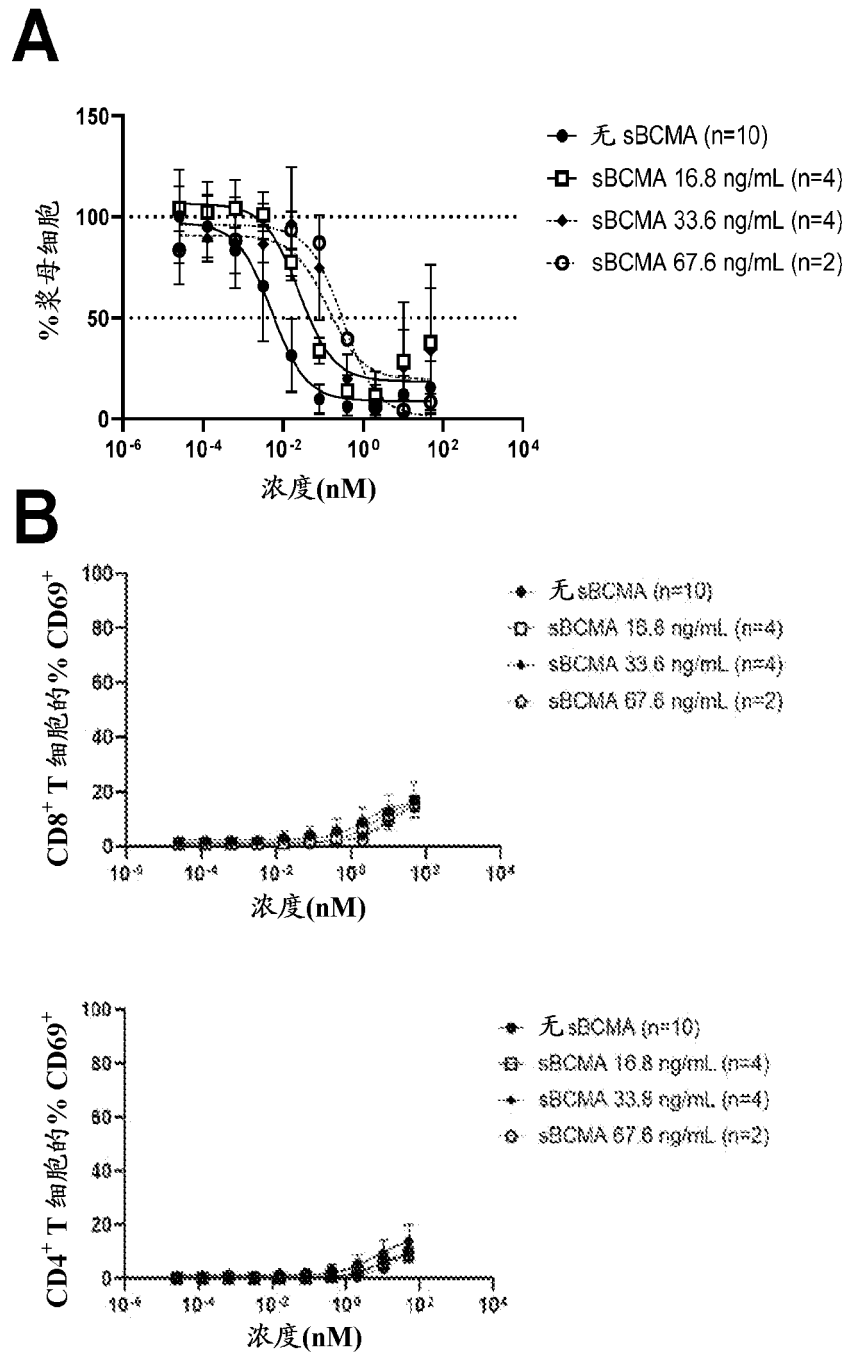


图 21

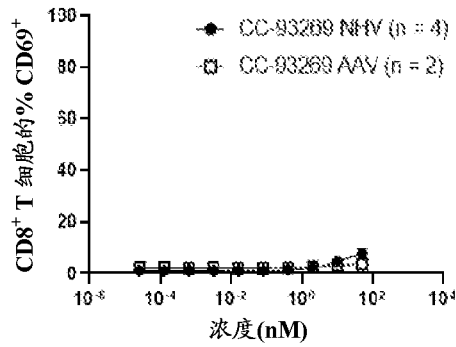
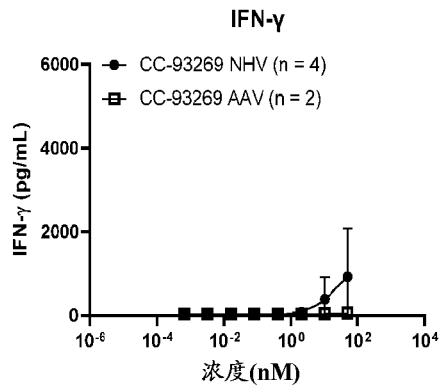
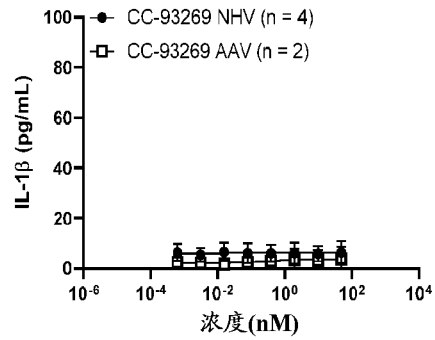
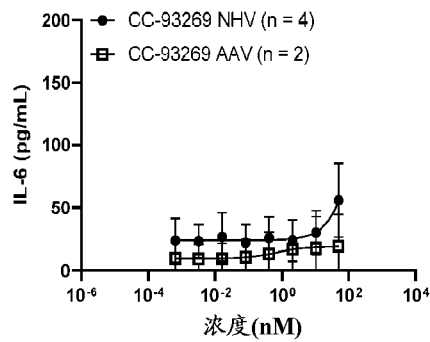
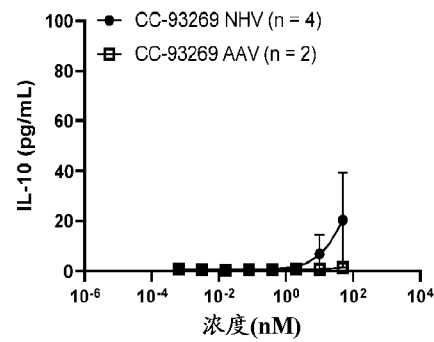
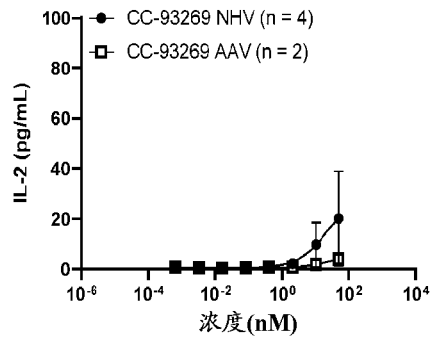
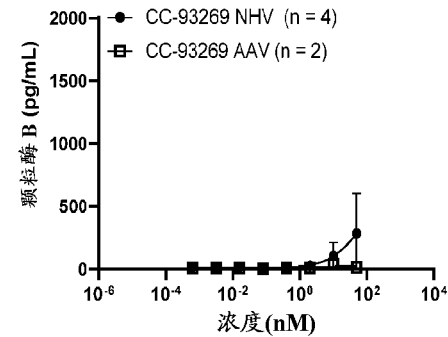
A**CD8⁺ T 细胞活化 (CD69⁺)****B****IL-1β****IL-6****IL-10****IL-2****颗粒酶 B**

图 22

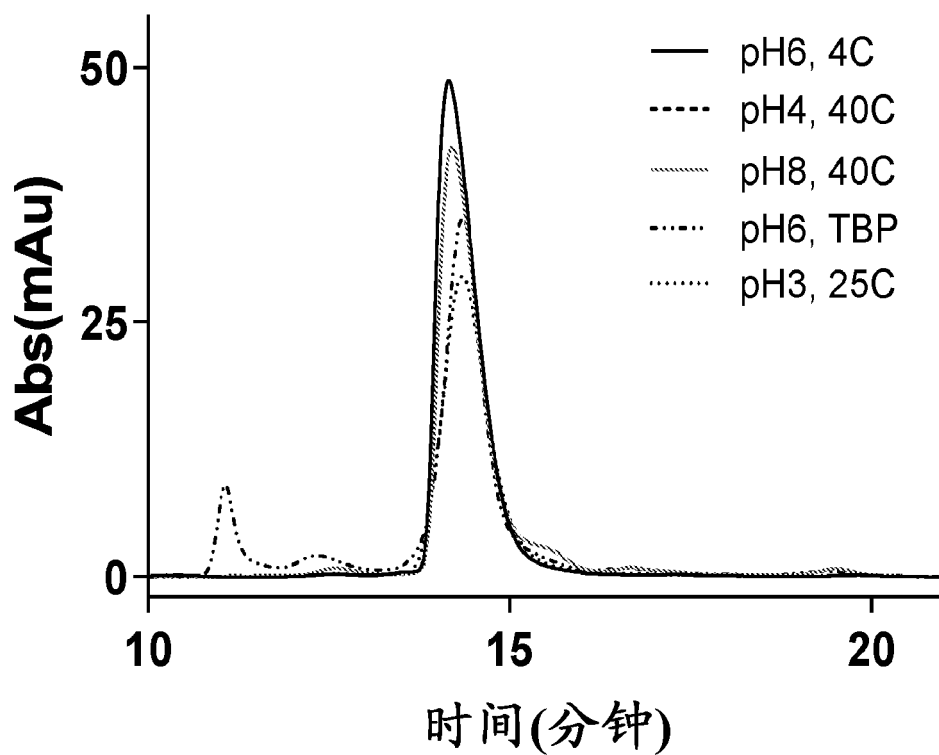
22-TCBcv

图 23

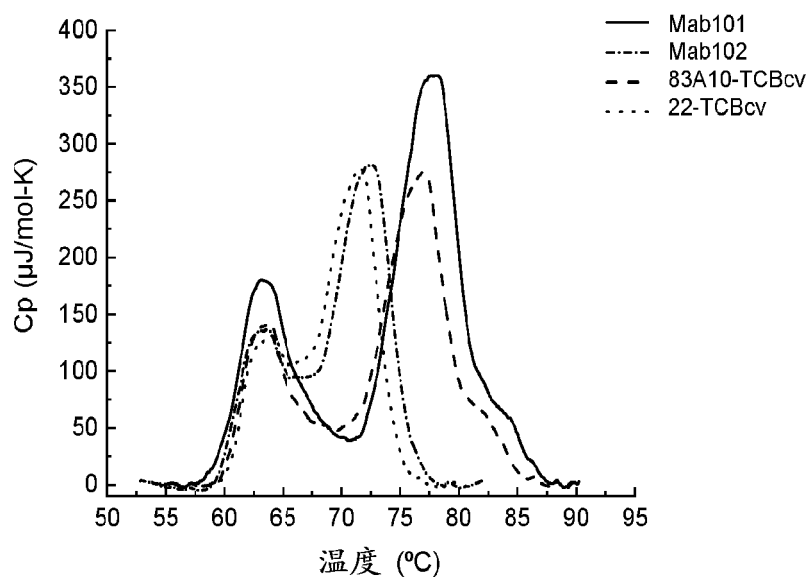


图 24

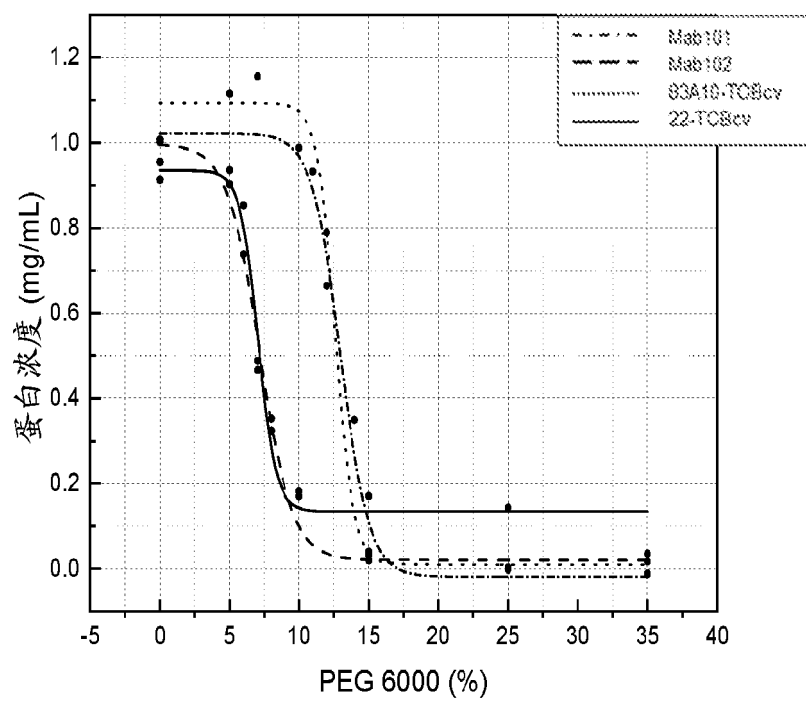


图 25

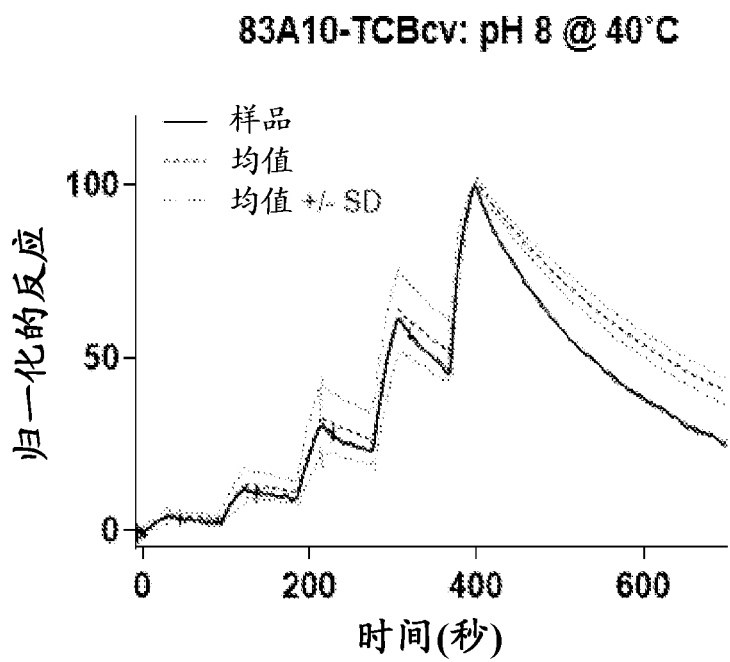
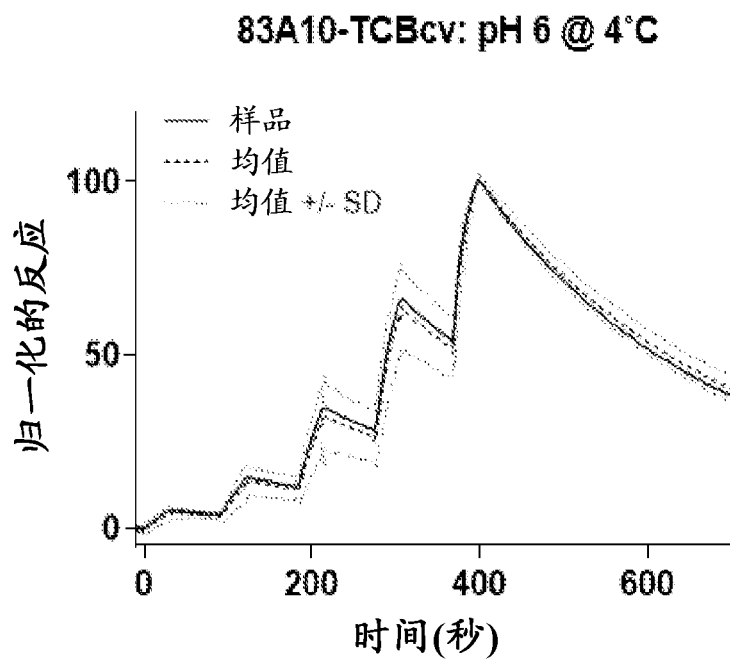


图 26

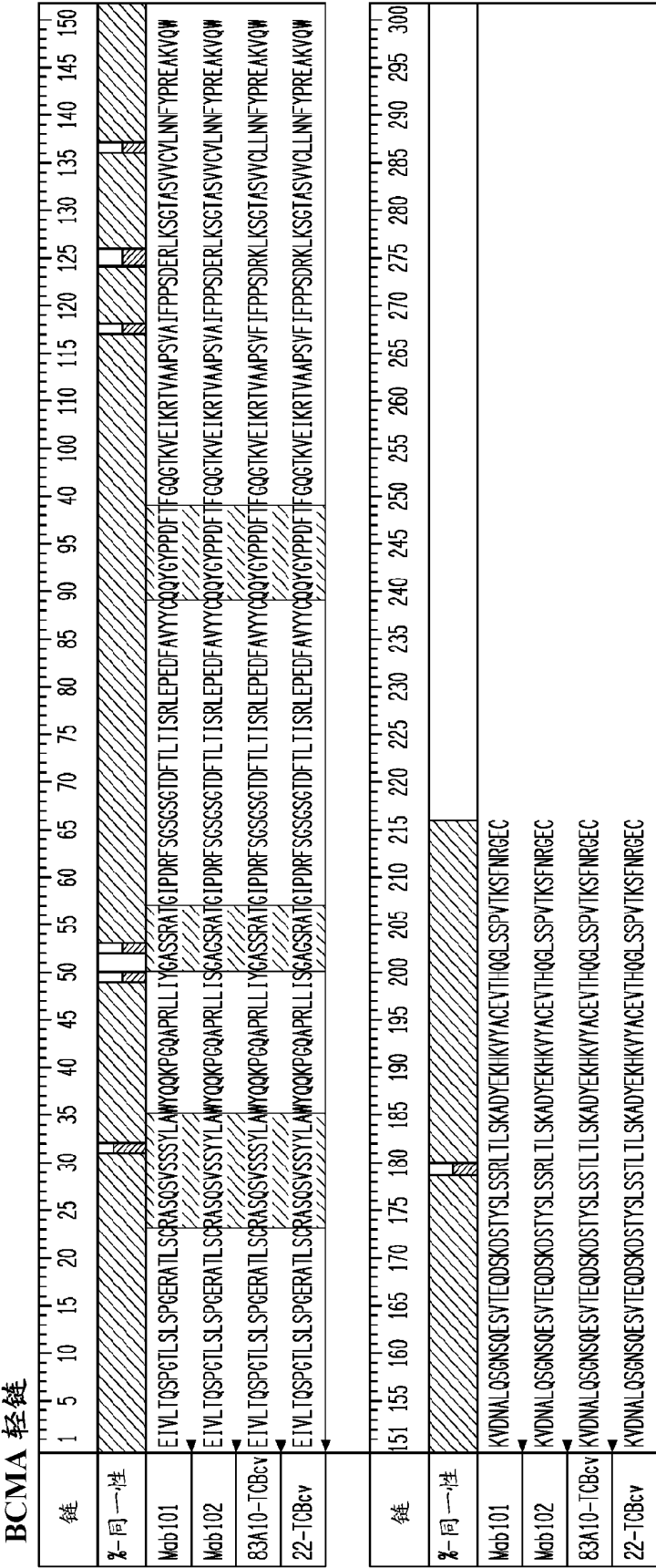


图 27

CD3 轻链

链	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130	135	140	145	150
%-同一性																															
Mab 101	EVQLLESGGGLVQP6GSLRLSCAASGFTFTSTYAMNWVRQAPGKGLIEWSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNGNSTVSWFAYWGQGTLLTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV																														
Mab 102	EVQLLESGGGLVQP6GSLRLSCAASGFTFTSTYAMNWVRQAPGKGLIEWSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNGNSTVSWFAYWGQGTLLTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV																														
83A10-TCBcv	EVQLLESGGGLVQP6GSLRLSCAASGFTFTSTYAMNWVRQAPGKGLIEWSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNGNSTVSWFAYWGQGTLLTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV																														
22-TCBcv	EVQLLESGGGLVQP6GSLRLSCAASGFTFTSTYAMNWVRQAPGKGLIEWSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNGNSTVSWFAYWGQGTLLTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV																														
链	151	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225	230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280	285	290	295	300
%-同一性																															
Mab 101	VCLLNFPREAKYQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC																														
Mab 102	VCLLNFPREAKYQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC																														
83A10-TCBcv	VCLLNFPREAKYQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC																														
22-TCBcv	VCLLNFPREAKYQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC																														
链	301	305	310	315	320	325	330	335	340	345	350																				
%-同一性																															

图 27 续

重链		1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150
链	%-同一性	
Mab101	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIFSSYAMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRONSNTILYLQMSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDMWGQGITLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAMLGCEVDYFP	
Mab102	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIFSDNAMGWVRQAPGKGLEWWSAISGPGSSSTYYADSVKGRFTISRONSNTILYLQMSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDMWGQGITLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAMLGCEVDYFP	
83A10-TCBcv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIFSSYAMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRONSNTILYLQMSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDMWGQGITLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAMLGCEVDYFP	
22-TCBcv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIFSDNAMGWVRQAPGKGLEWWSAISGPGSSSTYYADSVKGRFTISRONSNTILYLQMSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDMWGQGITLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAMLGCEVDYFP	
链		156 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300
链	%-同一性	
Mab101	EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNNHKKPSNTIKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKOTLMSRTPETVTCVVDVSHEDPEWKFNNWVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR	
Mab102	EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNNHKKPSNTIKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKOTLMSRTPETVTCVVDVSHEDPEWKFNNWVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR	
83A10-TCBcv	EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNNHKKPSNTIKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKOTLMSRTPETVTCVVDVSHEDPEWKFNNWVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR	
22-TCBcv	EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNNHKKPSNTIKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKOTLMSRTPETVTCVVDVSHEDPEWKFNNWVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR	

图 27续

重链		301 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450
链		
%-同一性		
Mdb101	↓	VSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALGAPTEKTTISKAKGPQEPQVYPPSPREMITKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFALYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Mdb102	↓	VSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALGAPTEKTTISKAKGPQEPQVYPPSPREMITKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFALYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
83A10-TCBcv	↓	VSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALGAPTEKTTISKAKGPQEPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEMESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFALYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
22-TCBcv	↓	VSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALGAPTEKTTISKAKGPQEPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEMESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFALYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
链		451 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525
%-同一性		

图 27续

重-重链

链	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130	135	140	145	150	155
%-同一性																																
Mab101	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWRQAPCKGLEWYSAISGSGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTILYLQNSLRAEDTAVYYCAKWLGWFDYWCQGGTLVTYSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAMLGCEVTDYFPEPVTY																															
Mab102	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWRQAPCKGLEWYSAISGSGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTILYLQNSLRAEDTAVYYCAKWLGWFDYWCQGGTLVTYSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAMLGCEVTDYFPEPVTY																															
83A10-TCBcv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWRQAPCKGLEWYSAISGSGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTILYLQNSLRAEDTAVYYCAKWLGWFDYWCQGGTLVTYSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAMLGCEVTDYFPEPVTY																															
22-TCBcv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWRQAPCKGLEWYSAISGSGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTILYLQNSLRAEDTAVYYCAKWLGWFDYWCQGGTLVTYSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAMLGCEVTDYFPEPVTY																															
链	156	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225	230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280	285	290	295	300	305	310
%-同一性																																
Mab101	SWNSGALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSVWTPVSSSLGTQTYTCNNHKPSNTKVDKVEPKSCDGGGGSGGGGSGQAVVVTQEPSLTVSPGGTVTLTQCSSTGAVTTSNYANWQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLGGKAAALTLSCA																															
Mab102	SWNSGALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSVWTPVSSSLGTQTYTCNNHKPSNTKVDKVEPKSCDGGGGSGGGGSGQAVVVTQEPSLTVSPGGTVTLTQCSSTGAVTTSNYANWQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLGGKAAALTLSCA																															
83A10-TCBcv	SWNSGALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSVWTPVSSSLGTQTYTCNNHKPSNTKVDKVEPKSCDGGGGSGGGGSGQAVVVTQEPSLTVSPGGTVTLTQCSSTGAVTTSNYANWQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLGGKAAALTLSCA																															
22-TCBcv	SWNSGALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSVWTPVSSSLGTQTYTCNNHKPSNTKVDKVEPKSCDGGGGSGGGGSGQAVVVTQEPSLTVSPGGTVTLTQCSSTGAVTTSNYANWQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLGGKAAALTLSCA																															

图 27续

重-重链

链	311 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465
%-同一性	
Mab101	QPEDEAEYYCALWYSNLWFFGGGCKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLWKDYFPEPTVSNISGALTSGVHIFPAVLQSSGLYSLSSWTVTPSSSLGTQTYICNVNHK ² SNITKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCPAPEANGGPSVF
Mab102	QPEDEAEYYCALWYSNLWFFGGGCKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLWKDYFPEPTVSNISGALTSGVHIFPAVLQSSGLYSLSSWTVTPSSSLGTQTYICNVNHK ² SNITKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCPAPEANGGPSVF
83A10-TCBcv	QPEDEAEYYCALWYSNLWFFGGGCKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLWKDYFPEPTVSNISGALTSGVHIFPAVLQSSGLYSLSSWTVTPSSSLGTQTYICNVNHK ² SNITKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCPAPEANGGPSVF
22-TCBcv	QPEDEAEYYCALWYSNLWFFGGGCKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLWKDYFPEPTVSNISGALTSGVHIFPAVLQSSGLYSLSSWTVTPSSSLGTQTYICNVNHK ² SNITKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCPAPEANGGPSVF
链	466 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620
%-同一性	
Mab101	LFPPKPKDTLMISRTPEVTCYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKTKPREEQYNSTYRWWSVLTVLHQMNLNGKEYCKCKVSKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLWKGFYPSDIAVEMESNGQPENNYLTWPP
Mab102	LFPPKPKDTLMISRTPEVTCYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKTKPREEQYNSTYRWWSVLTVLHQMNLNGKEYCKCKVSKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLWKGFYPSDIAVEMESNGQPENNYLTWPP
83A10-TCBcv	LFPPKPKDTLMISRTPEVTCYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKTKPREEQYNSTYRWWSVLTVLHQMNLNGKEYCKCKVSKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCDELTKNQVSLWCLWKGFYPSDIAVEMESNGQPENNYKTTPP
22-TCBcv	LFPPKPKDTLMISRTPEVTCYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKTKPREEQYNSTYRWWSVLTVLHQMNLNGKEYCKCKVSKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCDELTKNQVSLWCLWKGFYPSDIAVEMESNGQPENNYKTTPP

图 27续

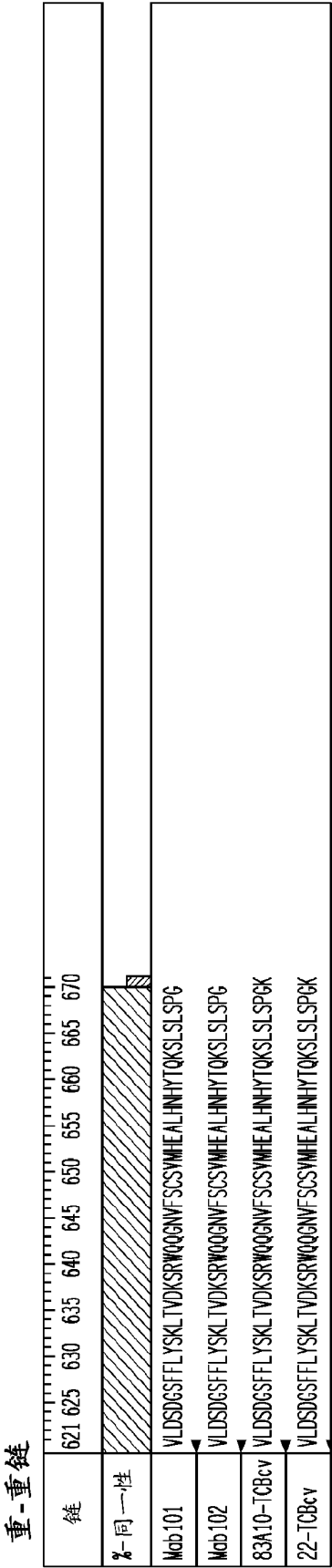


图 27续