



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113248611 A

(43)申请公布日 2021.08.13

(21)申请号 202010090567.8

A61P 37/02(2006.01)

(22)申请日 2020.02.13

(71)申请人 湖南华康恒健生物技术有限公司

地址 411101 湖南省湘潭市双拥路9号高新区孵化基地C5栋4楼

(72)发明人 李建良 黄诗亨 张俊霞 田梦
刘正强

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 韦东

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书23页

序列表35页 附图4页

(54)发明名称

抗BCMA抗体、其药物组合物及应用

(57)摘要

本发明提供抗BCMA抗体、其药物组合物及应用。本发明抗BCMA抗体的序列文中所述。本发明的抗BCMA抗体或其抗原结合片段及其药物组合物可用于治疗B细胞相关的疾病。

1. 抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其特征在於,所述抗BCMA抗体含有如SEQ ID NO:1所示的HCDR1、如SEQ ID NO:2所示的HCDR2和如SEQ ID NO:3、4或5所示的HCDR3,和/或含有如SEQ ID NO:6或7所示的LCDR1、如SEQ ID NO:8所示的LCDR2和如SEQ ID NO:9所示的LCDR3。

2. 如权利要求1所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其特征在於,所述抗BCMA抗体含有如SEQ ID NO:12、20、28、36、44、52、60、68、76、84、92或100任一所示的HCDR1,如SEQ ID NO:13、21、29、37、45、53、61、69、77、85、93或101任一所示的HCDR2,和如SEQ ID NO:14、22、30、38、46、54、62、70、78、86、94或102任一所示的HCDR3,和/或含有如SEQ ID NO:15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、95或103任一所示的LCDR1,如SEQ ID NO:16、24、32、40、48、56、64、72、80、88、96或104中任一所示的LCDR2和如SEQ ID NO:17、25、33、41、49、57、65、73、81、89、97或105任一所示的LCDR3。

3. 如权利要求1所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其特征在於,所述抗BCMA抗体含有以下组A到组L中任意一组所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3:

组别	HCDR1	HCDR2	HCDR3
A	12	13	14
B	20	21	22
C	28	29	30
D	36	37	38
E	44	45	46
F	52	53	54
G	60	61	62
H	68	69	70
I	76	77	78
J	84	85	86
K	92	93	94
L	100	101	102

和/或以下组1到组12中任意一组所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3:

组别	LCDR1	LCDR2	LCDR3
1	15	16	17
2	23	24	25
3	31	32	33
4	39	40	41
5	47	48	49
6	55	56	57
7	63	64	65
8	71	72	73
9	79	80	81
10	87	88	89
11	95	96	97
12	103	104	105

4. 如权利要求1所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗BCMA抗体含有以下组a到组l中任意一组所示的HCDR和LCDR:

组别	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
a	12	13	14	15	16	17
b	20	21	22	23	24	25
c	28	29	30	31	32	33
d	36	37	38	39	40	41
e	44	45	46	47	48	49
f	52	53	54	55	56	57
g	60	61	62	63	64	65
h	68	69	70	71	72	73
i	76	77	78	79	80	81
j	84	85	86	87	88	89
k	92	93	94	95	96	97
l	100	101	102	103	104	105

5. 如权利要求1-4中任一项所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗BCMA抗体VH的FR1选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、15H6、18D10、20A2或23C4的FR1,FR2选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、15H6、18D10或20A2的FR2,FR3选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、18D10、20A2、23C4或31F5的FR3,FR4选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、15H6、20A2或31F5的FR4;和/或VL的FR1选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、15H6、18D10或20A2的FR1,FR2选自抗体7E11、8H7、15A7、15H6、20A2、23C4或31F5的FR2,FR3选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、18D10、20A2、23C4、27A7或31F5的FR3,FR4选自抗体7E11、11B10、11G1、15A7、或18D10的FR4;优选地,所述抗BCMA抗体VH和VL的FR区为选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、15H6、18D10、20A2、20A9、23C4、27A7和31F5的任意一个抗体的VH和VL的FR区。

6. 如权利要求1所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗BCMA抗体的VH的氨基酸序列如SEQ ID NO:10、18、26、34、42、50、58、66、74、82、90和98中任一所示,和/或VL的氨基酸序列如SEQ ID NO:11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91和99中任一所示;优选地,所述抗BCMA抗体的VH氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示;或VH氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:34所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:35所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:42所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:43所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:50所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:51所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:58所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:59所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:66所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:67所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:74所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:75所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:82所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:83所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:90所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:91所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:98所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:99所示。

7. 如权利要求1-4中任一项所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗

BCMA抗体为嵌合抗体或完全人抗体;优选为完全人抗体。

8. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物含有权利要求1-7中任一项所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段,和药学上可接受的赋形剂或载剂。

9. 一种核酸分子,选自:

- (1) 编码权利要求1-7中任一项所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列;
- (2) (1)所述多核苷酸序列的互补序列。

10. 权利要求1-7中任一项所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段在制备治疗B细胞相关疾病中的应用;优选地,所述B细胞相关的疾病为B细胞相关的肿瘤或自体免疫疾病。

抗BCMA抗体、其药物组合物及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及抗BCMA抗体、其药物组合物及应用。

背景技术

[0002] B细胞成熟抗原(BCMA)又称CD269,由184个氨基酸残基组成,其胞内区含80个氨基酸残基,胞外区序列只有一个糖类识别结构域为B细胞表面分子。BCMA属于缺少信号肽的I型跨膜信号蛋白,是肿瘤坏死因子受体家族一员,它可分别与B细胞激活因子BAFF或增殖诱导配体(APRIL)两种配体相结合。在正常组织中,BCMA表达于成熟B细胞和浆细胞表面,BCMA基因剔除小鼠免疫系统表现正常,有正常的脾结构,B淋巴细胞的发育正常,但浆细胞数量明显减少,证明BCMA在维持浆细胞的存活中起了重要的作用,其机制主要包括BCMA与BAFF蛋白结合,并上调抗凋亡基因Bcl-2、Mcl-1及Bclw等,维持细胞生长。同样地,该机制也在骨髓瘤细胞中发挥了功能,对骨髓瘤细胞的恶性增生起了重要的促进作用。研究表明,BCMA普遍表达于多发性骨髓瘤细胞系,在多发性骨髓瘤患者中的检测也得到了一致性的结果。Kochenderfer等在已有报道的基础上,联合应用Q-PCR、流式细胞术和免疫组化方法深入研究了BCMA的表达特征,确认BCMA在成熟B细胞、浆细胞之外的正常人体组织无表达,且在CD34+造血细胞中也无表达。

发明内容

[0003] 本发明提供抗BCMA抗体或其抗原结合片段,所述抗BCMA抗体至少含有一个选自以下序列的CDR:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9。

[0004] 在一个或多个实施方案中,所述抗BCMA抗体含有如SEQ ID NO:1所示的HCDR1、如SEQ ID NO:2所示的HCDR2和如SEQ ID NO:3、4或5所示的HCDR3,和/或含有如SEQ ID NO:6或7所示的LCDR1、如SEQ ID NO:8所示的LCDR2和如SEQ ID NO:9所示的LCDR3。

[0005] 在一个或多个实施方案中,所述抗BCMA抗体含有如SEQ ID NO:12、20、28、36、44、52、60、68、76、84、92或100任一所示的HCDR1,如SEQ ID NO:13、21、29、37、45、53、61、69、77、85、93或101任一所示的HCDR2,和如SEQ ID NO:14、22、30、38、46、54、62、70、78、86、94或102任一所示的HCDR3,和/或含有如SEQ ID NO:15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、95或103任一所示的LCDR1,如SEQ ID NO:16、24、32、40、48、56、64、72、80、88、96或104中任一所示的LCDR2和如SEQ ID NO:17、25、33、41、49、57、65、73、81、89、97或105任一所示的LCDR3。

[0006] 在一个或多个实施方案中,所述抗BCMA抗体含有以下组A到组L中任意一组所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3:

[0007]

组别	HCDR1	HCDR2	HCDR3
A	12	13	14
B	20	21	22
C	28	29	30

D	36	37	38
E	44	45	46
F	52	53	54
G	60	61	62
H	68	69	70
I	76	77	78
J	84	85	86
K	92	93	94
L	100	101	102

[0008] 和/或以下组1到组12中任意一组所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3：

组别	LCDR1	LCDR2	LCDR3
1	15	16	17
2	23	24	25
3	31	32	33
4	39	40	41
5	47	48	49
6	55	56	57
7	63	64	65
8	71	72	73
9	79	80	81

[0009]

10	87	88	89
11	95	96	97
12	103	104	105

[0010]

[0011] 在一个或多个实施方案中,所述抗BCMA抗体含有以下组a到组1中任意一组所示的HCDR和LCDR:

[0012]

组别	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
a	12	13	14	15	16	17
b	20	21	22	23	24	25
c	28	29	30	31	32	33
d	36	37	38	39	40	41
e	44	45	46	47	48	49
f	52	53	54	55	56	57
g	60	61	62	63	64	65
h	68	69	70	71	72	73

i	76	77	78	79	80	81
j	84	85	86	87	88	89
k	92	93	94	95	96	97
l	100	101	102	103	104	105

[0013] 在一个或多个实施方案中,所述抗BCMA抗体VH的FR1选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、15H6、18D10、20A2或23C4的FR1,FR2选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、15H6、18D10或20A2的FR2,FR3选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、18D10、20A2、23C4或31F5的FR3,FR4选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、15H6、20A2或31F5的FR4;和/或VL的FR1选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、15H6、18D10或20A2的FR1,FR2选自抗体7E11、8H7、15A7、15H6、20A2、23C4或31F5的FR2,FR3选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、18D10、20A2、23C4、27A7或31F5的FR3,FR4选自抗体7E11、11B10、11G1、15A7、或18D10的FR4。

[0014] 在一个或多个实施方案中,所述抗BCMA抗体VH和VL的FR区为选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、15H6、18D10、20A2、20A9、23C4、27A7和31F5的任意一个抗体的VH和VL的FR区。

[0015] 在一个或多个实施方案中,所述抗BCMA抗体的VH的氨基酸序列如SEQ ID NO:10、18、26、34、42、50、58、66、74、82、90和98中任一所示,和/或VL的氨基酸序列如SEQ ID NO:11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91和99中任一所示。

[0016] 在一个或多个实施方案中,所述抗BCMA抗体的VH氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示;或VH氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:34所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:35所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:42所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:43所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:50所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:51所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:58所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:59所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:66所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:67所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:74所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:75所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:82所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:83所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:90所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:91所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:98所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:99所示。

[0017] 在一个或多个实施方案中,本发明任一实施方案所述的BCMA抗体的重链恒定区序列如SEQ ID NO:106所示,和/或轻链恒定区序列如SEQ ID NO:107所示。

[0018] 在一个或多个实施方案中,本发明任一实施方案所述的抗BCMA抗体为嵌合抗体或完全人抗体;优选为完全人抗体。

[0019] 本发明还提供一种药物组合物,所述药物组合物含有本发明任一实施方案所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段,和药学上可接受的赋形剂或载剂。

[0020] 本发明还提供一种核酸分子,选自:(1)编码本发明任一实施方案所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列;(2)(1)所述多核苷酸序列的互补序列。

[0021] 本发明还提供本发明任一实施方案所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段在制备治疗B细胞相关疾病中的应用;优选地,所述B细胞相关的疾病为B细胞相关的肿瘤或自体免疫疾病。

[0022] 本发明还提供一种治疗或预防B细胞相关疾病的方法,所述方法包括给予需要的患者治疗有效量的本发明任一实施方案所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段,或含有本发明任一实施方案所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段的药物组合物。优选地,所述B细胞相关的疾病为B细胞相关的肿瘤或自体免疫疾病。

附图说明

[0023] 图1显示实施例2动物免疫后血清人BCMA特异性酶联免疫反应检测结果。

[0024] 图2显示实施例5抗人BCMA单克隆抗体结合U266细胞表面表达的BCMA流式分析。

[0025] 图3显示实施例6纯化后的各抗人BCMA单克隆抗体SDS PAGE胶电泳分析。

具体实施方式

[0026] 除非另有定义,本发明的实施将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,这些都在本领域的技术范围内。这些技术在文献中有充分解释,诸如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版(Sambrook等,1989); Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编辑,1984);Animal Cell Culture(R.I.Freshney编辑,1987);Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等编辑,1987版及其定期更新版本);PCR:The Polymerase Chain Reaction(Mullis等编辑,1994);A Practical Guide to Molecular Cloning(Perbal Bernard V.,1988);Phage Display:A Laboratory Manual(Barbas等,2001)。

[0027] BCMA

[0028] 本文中,“BCMA”指结合BAFF和/或APRIL的细胞表面受体或包含BCMA的受体复合物。人BCMA(huBCMA)的氨基酸序列的NCBI登录号为Q02223(GI:313104029)。BCMA蛋白也可包括变体及片段。所述片段包括不具有全部或部分跨膜的胞外结构域,和/或胞内结构域以及胞外结构域的片段。可溶性形式的huBCMA包括保持结合BAFF和/或APRIL的能力的胞外结构域或胞外结构域的片段。“BCMA”也包括BCMA氨基酸序列的翻译后修饰。翻译后修饰包括但不限于N-和O-连接糖基化。

[0029] BCMA的正常组织表达高度局限于B细胞谱系,主要在扁桃体/淋巴结的次级卵泡/胚中心中、在成浆细胞上和在分化的浆细胞上表达。BCMA以比在正常浆细胞中观测到的水平相对较高的水平在恶性浆细胞中表达,尤其在多发性骨髓瘤、冒烟型骨髓瘤和意义未明的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)浆细胞中高表达。BCMA是一种用于治疗表达BCMA的B细胞相关恶性肿瘤的有利靶标,因为其表达高度局限于正常和恶性浆细胞,因此应具有最小的非靶标组织毒性。

[0030] 抗BCMA抗体

[0031] 本发明提供特异性地结合BCMA的抗体。

[0032] 本文中,术语“抗体”包括单克隆抗体(包括全长抗体,其具有免疫球蛋白Fc区),具有多表位特异性的抗体组合物,多特异性抗体(例如,双特异性抗体),双抗体和单链分子,以及抗体片段,尤其是抗原结合片段,例如,Fab,F(ab')₂和Fv)。本文中,术语“免疫球蛋白”(Ig)和“抗体”可互换地使用。

[0033] 基本的4链抗体单元是由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)构成的异四聚体糖蛋白。IgM抗体由5个基本的异四聚体单元及称作J链的另外多肽组成,包含10个抗原结合位点;而IgA抗体包含2-5个基本的4链单元,其可与J链组合聚合形成多价装配物。在IgG的情况下,4链单元通常约150,000道尔顿。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而两条重链通过一个或多个二硫键彼此相连,二硫键的数目取决于重链的同种型。每条重链和轻链还具有间隔规律的链内二硫桥。每条重链在N-末端具有可变结构域(VH),接着是三个(对于每种 α 和 γ 链)和四个(对于 μ 和 ϵ 同种型)恒定结构域(CH)。每条轻链在N-末端具有可变结构域(VL),接着是其另一端的恒定结构域。VL与VH排列在一起,而CL与重链的第一恒定结构域(CH1)排列在一起。特定的氨基酸残基被认为在轻链和重链可变结构域之间形成界面。成对的VH和VL一起形成一个抗原结合位点。关于不同类别抗体的结构和性质,参见如Basic and Clinical Immunology,第八版,Daniel P.Sties,Abba I.Terr和Tristram G.Parsolw编辑,Appleton&Lange,Norwalk,CT,1994,第71页和第6章。来自任何脊椎动物物种的轻链,根据其恒定结构域氨基酸序列,可归入两种称作 κ 和 λ 的截然不同型中的一种。根据其重链恒定结构域(CH)氨基酸序列,免疫球蛋白可归入不同的类或同种型。有五类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,分别具有称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链。根据CH序列和功能的相对较小差异, γ 和 α 类可进一步分为亚类,例如人表达下列亚类:IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。

[0034] 抗体的“可变区”或“可变结构域”是指抗体的重链或轻链的氨基末端结构域。重链和轻链的可变结构域可分别称为“VH”和“VL”。这些结构域通常是抗体的最可变的部分(相对于相同类型的其它抗体)并含有抗原结合位点。

[0035] 术语“可变的”指可变结构域中的某些区段在抗体序列中差异广泛的情况。可变结构域介导抗原结合并限定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,变异性并非均匀分布于可变结构域跨越的全部氨基酸。相反,其集中在三个称为高变区(HVR)的区段(在轻链和重链可变结构域中均有),即分别为重链可变区的HCDR1、HCDR2、HCDR3以及轻链可变区的LCDR1、LCDR2和LCDR3。可变结构域中更为高度保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR区(FR1、FR2、FR3和FR4),它们大多采取 β -折叠构象,通过形成环状连接且在有些情况中形成 β -折叠结构一部分的三个HVR连接。每条链中的HVR通过FR区非常接近的保持在一起,并与另一条链的HVR一起促成抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等,Sequences of Immunological Interest,第五版,国立卫生研究所,Bethesda,MD,1991)。通常,轻链可变区的结构为FR1-LCDR1-FR2-LCDR2-FR3-LCDR3-FR4,重链可变区的结构为FR1-HCDR1-FR2-HCDR2-FR3-HCDR3-FR4。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现出多种效应子功能,如在抗体依赖性细胞介导的细胞毒性中抗体的参与。

[0036] 本文中,术语“单克隆抗体”指从一群基本上同质的抗体中获得的抗体,即除了可能以少量存在的可能的天然出现的突变和/或翻译后修饰(例如异构化、酰胺化)之外,构成群体的各个抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原位点。与多克隆抗体制剂(其典型地包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体)相比,每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除它们的特异性外,单克隆抗体的优势在于它们通过杂交瘤培养合成,未受到其它免疫球蛋白的污染。修饰语“单克隆”表明抗体从基本上同质的抗体群获得的特征,不应解释为要求通过任何特定方法来生产抗体。例如,将根据本发明使用的单克隆抗体可

通过多种技术来生成,包括例如杂交瘤法(例如,Kohler和Milstein,Nature,256:495-97 (1975);Hongo等,Hybridoma,14(3):253-260(1995),Harlow等,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,第二版.1988;Hammerling等,在:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas,563-681,Elsevier,N.Y.,1981)、重组DNA法(例如US 4,816,567)、噬菌体展示技术(例如,Clackson等,Nature,352:624-628 (1991);Marks等,J.Mol.Biol.,222:581-597(1992);Sidhu等,J.Mol.Biol.,338(2):299-310(2004);Lee等,J.Mol.Biol.,340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,101(34):12467-12472(2004);和Lee等J.Immunol.Methods,284(1-2):119-132(2004))、及用于从具有部分或整个人免疫球蛋白基因座或编码人免疫球蛋白序列的基因的动物生成人或人样抗体的技术(例如,W01998/24893;W01996/34096;W01996/33735;W01991/10741;Jakobovits等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551(1993);Jakobovits等,Nature,362:255-258(1993);Bruggemann等,Year in Immunol.,7:33(1993);US 5,545,807;US 5,545,806;US 5,569,825;US 5,625,126;US 5,633,425;和US 5,661,016;Marks等,Bio/Technology,10:779-783(1992);Lonberg等,Nature,368:856-859(1994);Morrison,Nature,368:812-813(1994);Fishwild等,Nature Biotechnol.,14:845-851(1996);Neuberger,Nature Biotechnol.,14:826(1996);和Lonberg和Huszar,Intern.Rev.Immunol.,13:65-93(1995)。

[0037] 术语“全长抗体”、“完整抗体”或“完全抗体”可互换地使用,是指基本上是其完整形式的抗体(与抗体片段相对比)。具体而言,完全抗体包括那些具有重链和轻链包括Fc区的抗体。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如,人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。在一些情况中,完整抗体可具有一种或多种效应子功能。

[0038] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合区和/或可变区。抗体片段优选为抗体的抗原结合片段。抗体片段的例子包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体(参见美国专利5,641,870,实施例2;Zapata等,Protein Eng.,8(10):1057-1062,1995);单链抗体分子;scFv-Fc片段;由抗体片段形成的多特异性抗体;以及通过化学修饰或通过掺入脂质体中应能够增加半衰期的任何片段。用木瓜蛋白酶消化抗体产生称作“Fab”片段的两个相同的抗原结合片段,和一个残余“Fc”片段,其名称反映了它易于结晶的能力。Fab片段由完整轻链及重链可变结构域(VH)和一条重链第一恒定结构域(CH1)组成。每个Fab片段在抗原结合方面是单价的,即其具有单个抗原结合位点。胃蛋白酶处理抗体产生一个较大F(ab')₂片段,它粗略相当于两个通过二硫键相连的Fab片段,具有不同抗原结合活性且仍能够交联抗原。Fab'片段因在CH1结构域的羧基末端增加了一些另外的残基(包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸)而与Fab片段有所不同。F(ab')₂抗体片段最初是作为成对Fab'片段生成的,在Fab'片段之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。Fc片段包含通过二硫键保持在一起的两条重链的羧基末端部分。抗体的效应子功能是由Fc区中的序列决定的,该区还是由在某些类型细胞上发现的Fc受体(FcR)所识别的区。

[0039] “Fv”是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该片段由紧密、非共价结合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成。从这两个结构域的折叠中突出了六个高变环(重链和轻链各3个环),贡献出抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体以抗

原结合特异性。然而,即使是单个可变结构域(或只包含对抗原特异的三个HVR的半个Fv)也具有识别和结合抗原的能力,尽管亲合力低于完整结合位点。

[0040] “单链Fv”也可缩写为“sFv”或“scFv”,是包含抗体VH和VL结构域的连接成一条多肽链的抗体片段。优选的是,sFv多肽在VH和VL结构域之间还包含多肽接头,使得sFv形成期望的抗原结合结构。关于sFv的综述参见The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编辑,Springer-Verlag,New York,pp.269-315(1994)。

[0041] 所述片段的“化学修饰”包括添加聚(亚烷基)二醇如聚乙二醇(“聚乙二醇化,PEG化”),包括Fv、scFv、Fab、F(ab')₂和Fab'的聚乙二醇化片段,即Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEG和Fab'-PEG。这类片段具有EGFR结合活性。

[0042] 优选地,所述抗体片段,尤其是抗原结合片段,由其来源抗体的重链可变区或轻链可变区的部分序列构成或者包含它们,所述部分序列足以保留与其来源抗体相同的结合特异性和充分的亲和力,对于BCMA,优选至少等于其来源抗体亲和力的1/100,在更优选方式中至少等于1/10。这种抗体片段将包含最少5个氨基酸,优选其来源的抗体序列的10、15、25、50和100个连续氨基酸。

[0043] 单克隆抗体在本文中也包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展现出期望的生物学活性(US 4,816,567;Morrison等,Proc.Nat.Acad.Sci.USA,81:6851-6855,1984)。

[0044] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。因此,“人源化抗体”通常指可变结构域构架区与在人抗体中发现的序列交换的非人抗体。通常在人源化抗体中,整个抗体(除CDR以外)由人来源的多核苷酸编码或与这种抗体相同(除CDR以外)。CDR(其中一些或全部由源自非人生物体的核酸编码)被移植到人抗体可变区的β-折叠骨架中以产生抗体,其特异性由被移植的CDR来决定。这类抗体的产生例如在W092/11018;Jones,1986,Nature,321:522-525;Verhoeyen等,1988,Science,239:1534-1536中有描述。人源化抗体也可以使用具有基因工程免疫系统的小鼠而产生(见Roque等,2004,Biotechnol.Prog.,20:639-654)。

[0045] “人抗体”指这样的抗体,其具有与由人生成的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列和/或使用本文所公开的用于生成成人抗体的任何技术产生。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可使用本领域已知的多种技术来生成,包括噬菌体展示文库。这类技术可参见Hoogenboom和Winter,分子生物学杂志,227:381(1991);Marks等,分子生物学杂志,222:581(1991)。可获得的制备人单克隆抗体的方法在Cole等,单克隆抗体和癌症治疗,Alan R.Liss,p.77(1985);Boerner等,免疫学杂志,147(1):86-95(1991)中描述。还参见van Dijk和van de Winkel,现代药学评论,5:368-74(2001)。人抗体可以如下制备,即将抗原施用于转基因动物,其经修饰而应答抗原激发生成此类抗体,但是其内源基因座已经失去能力,例如经免疫的异种移植小鼠(xenomice)(参见例如US 6,075,181和6,150,584,关于XENOMOUSE™技术)。还可参见例如Li等,美国国家科学院学报,103:3557-3562(2006),关于经人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体。

[0046] 本发明的抗BCMA抗体也可以是微型抗体。微型抗体是包含与CH3结构域连接的

scFv的最小化抗体样蛋白(Hu等,1996,Cancer Res.,56:3055-3061)。本发明的抗BCMA抗体还可以是结构域抗体,参见例如US 6,248,516。结构域抗体(dAb)是抗体的功能结合结构域,对应于人抗体dAB的重链(VH)或轻链(VL)的可变区,具有约13kDa的分子量或小于完整抗体的十分之一尺寸。dAb在包括细菌、酵母和哺乳动物细胞系统的多种宿主中充分表达。另外,即使在经受严酷条件,诸如冷冻干燥或热变性后,dAb仍高度稳定且保持活性。参见例如US 6,291,158;US 6,582,915;US 6,593,081;US 6,172,197;US 2004/0110941;EP 0368684;US 6,696,245、W004/058821、W004/003019和W003/002609。

[0047] 本发明抗BCMA抗体的HCDR1可含有GX₁TX₂X₃X₄X₅X₆(SEQ ID NO:1),其中,X₁为F或Y,X₂为F或S,X₃为S、D、T、N或A,X₄为Y、D、S或A,X₅为Y、C或H,X₆为D、A或Y。在一些实施方案中,X₁为F,X₂为F,X₃为A或D,X₄为D,X₅为Y、C或H,X₆为A。在一些实施方案中,X₁为Y,X₂为F,X₃为T,X₄为S或A,X₅为Y,X₆为A或Y。示例性的HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12、20、28、36、44、52、60、68、76、84、92或100任一所示。

[0048] 本发明抗BCMA抗体的HCDR2可含有IX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇(SEQ ID NO:2),其中,X₁为S、N或Y;X₂为W、T、A或P;X₃为N或G;X₄为S或N;X₅为D、G或V;X₆为T、N、S、D或H;X₇为I、M或T。在一些实施方案中,X₁为S,X₂为W,X₃为N,X₄为S,X₅为D或V,X₆为T、N、H或S,X₇为I;优选地,这些实施方案中,X₅为D,X₆为H或N。在一些实施方案中,X₁为N,X₂为T或A,X₃为G,X₄为N,X₅为G,X₆为N,X₇为T或I。示例性的HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13、21、29、37、45、53、61、69、77、85、93或101任一所示。

[0049] 本发明抗BCMA抗体的HCDR3可含有ARGGX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇YYX₈YYMDV(SEQ ID NO:3),其中,X₁为S或R,X₂为I或L,X₃为T或E,X₄为G或L,X₅为N或D,X₆为I或V,X₇为F或Y,X₈为Y或F;在一些实施方案中,X₁为R,X₂为L,X₃为E,X₄为L,X₅为D,X₆为I或V,X₇为Y,X₈为F。在一些实施方案中,本发明抗BCMA抗体的HCDR3可含有X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇FDY(SEQ ID NO:4),其中,X₁为A或T,X₂为K、R或T,X₃为V或IQ,X₄为S、V或A,X₅为G、S或A,X₆为A或S,X₇为V、S、Y或T。在一些实施方案中,本发明抗BCMA抗体的HCDR3可含有AKDIFSPTGDX₁Y(SEQ ID NO:5),其中,X₁为G或D。示例性的HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14、22、30、38、46、54、62、70、78、86、94或102任一所示。

[0050] 本发明抗BCMA抗体的LCDR1可含有QX₁IX₂X₃X₄(SEQ ID NO:6),其中,X₁为S或D,X₂为H、I、S或R,X₃为S、N、S或T,X₄为Y、F或N。在一些实施方案中,X₁为S或D,X₂为I,X₃为S,X₄为S或T,X₅为Y。在一些实施方案中,本发明抗BCMA抗体的LCDR1可含有QSX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈Y(SEQ ID NO:7),其中,X₁为L、V或F,X₂为L或V,X₃为H、Y或S,X₄为S或SS,X₅为N、Q或D,X₆为G或N,X₇为Y、K或N,X₈为N或T。在一些实施方案中,X₁为L或V,X₂为L,X₃为H,X₄为S或SS,X₅为N、Q或D,X₆为G或N,X₇为K,X₈为N。示例性的LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、95或103任一所示。

[0051] 本发明抗BCMA抗体的LCDR2可含有X₁X₂S(SEQ ID NO:8),其中,X₁为L、S、W、G、A或K,X₂为G、A或L。在一些实施方案中,X₁为S、W、G或A,X₂为A。示例性的LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:16、24、32、40、48、56、64、72、80、88、96或104中任一所示。

[0052] 本发明抗BCMA抗体的LCDR3可含有X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉(SEQ ID NO:9),其中,X₁为M、Q或L,X₂为Q、G或H,X₃为A、S、Y、R或H,X₄为L、F、Y、T或N,X₅为Q、S、R、I或H,X₆为T、I、P、V、W或Y,X₇为P或L,X₈为Y、F、L或P,X₉为T或I。在一些实施方案中,X₁为Q,X₂为Q,X₃为S或Y,X₄为F、Y或

S, X₅为S或R, X₆为I或P, X₇为P或L, X₈为Y、L或F, X₉为T。示例性的LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:17、25、33、41、49、57、65、73、81、89、97或105任一所示。

[0053] 在一些实施方案中,本发明的抗BCMA抗体含有如SEQ ID NO:1所示的HCDR1、如SEQ ID NO:2所示的HCDR2和如SEQ ID NO:3、4或5所示的HCDR3,和/或如SEQ ID NO:6或7所示的LCDR1、如SEQ ID NO:8所示的LCDR2和如SEQ ID NO:9所示的LCDR3。优选地,本发明的抗BCMA抗体含有如SEQ ID NO:12、20、28、36、44、52、60、68、76、84、92或100任一所示的HCDR1,如SEQ ID NO:13、21、29、37、45、53、61、69、77、85、93或101任一所示的HCDR2,和如SEQ ID NO:14、22、30、38、46、54、62、70、78、86、94或102任一所示的HCDR3,和/或如SEQ ID NO:15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、95或103任一所示的LCDR1,如SEQ ID NO:16、24、32、40、48、56、64、72、80、88、96或104中任一所示的LCDR2和如SEQ ID NO:17、25、33、41、49、57、65、73、81、89、97或105任一所示的LCDR3。

[0054] 进一步优选地,本发明的抗BCMA抗体含有以下组A到组L中任一组所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3:

组别	HCDR1	HCDR2	HCDR3
A	12	13	14
B	20	21	22
C	28	29	30
D	36	37	38
E	44	45	46

F	52	53	54
G	60	61	62
H	68	69	70
I	76	77	78
J	84	85	86
K	92	93	94
L	100	101	102

[0057] 和/或以下组1到组12中任一组所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3:

组别	LCDR1	LCDR2	LCDR3
1	15	16	17
2	23	24	25
3	31	32	33
4	39	40	41
5	47	48	49
6	55	56	57

7	63	64	65
8	71	72	73
9	79	80	81
10	87	88	89
11	95	96	97
12	103	104	105

[0059] 更优选地,本发明抗BCMA抗体含有以下组a到组l中任一组的HCDR和LCDR:

组别	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
a	12	13	14	15	16	17
b	20	21	22	23	24	25
c	28	29	30	31	32	33
d	36	37	38	39	40	41
e	44	45	46	47	48	49
f	52	53	54	55	56	57
g	60	61	62	63	64	65
h	68	69	70	71	72	73

[0060]

i	76	77	78	79	80	81
j	84	85	86	87	88	89
k	92	93	94	95	96	97
l	100	101	102	103	104	105

[0061]

[0062] 本发明抗BCMA抗体VH的FR1可选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、15H6、18D10、20A2或23C4的FR1,FR2可选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、15H6、18D10或20A2的FR2,FR3可选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、18D10、20A2、23C4或31F5的FR3,FR4可选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、15H6、20A2或31F5的FR4;和/或VL的FR1可选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、15H6、18D10或20A2的FR1,FR2可选自抗体7E11、8H7、15A7、15H6、20A2、23C4或31F5的FR2,FR3可选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、18D10、20A2、23C4、27A7或31F5的FR3,FR4可选自抗体7E11、11B10、11G1、15A7、或18D10的FR4。

[0063] 在优选的实施方案中,本发明抗BCMA抗体VH和VL的FR区为选自抗体7E11、8H7、11B10、11G1、15A7、15H6、18D10、20A2、20A9、23C4、27A7和31F5的任一抗体VH和VL的FR区。进一步优选地,这类抗体的HCDR选自前述组A到组L中的任一组,LCDR选自前述组1到组12中的任一组;更优选地,这类抗体的CDR选自前述组a到组l中的任一组。

[0064] 在一些实施方案中,本发明的抗BCMA抗体的VH的氨基酸序列如SEQ ID NO:10、18、26、34、42、50、58、66、74、82、90和98中任一所示,和/或VL的氨基酸序列如SEQ ID NO:11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91和99中任一所示。优选地,本发明的抗BCMA抗体的VH氨基

酸序列如SEQ ID NO:10所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示;或VH氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:34所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:35所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:42所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:43所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:50所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:51所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:58所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:59所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:66所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:67所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:74所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:75所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:82所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:83所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:90所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:91所示;VH氨基酸序列如SEQ ID NO:98所示,VL氨基酸序列如SEQ ID NO:99所示。

[0065] 在一些实施方案中,本发明抗体的重链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:106所示,和/或轻链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:107所示。

[0066] 本发明的抗体可以是嵌合抗体、人源化抗体或完全人抗体;优选为完全人抗体。应理解,本发明实施例所提供的抗体为完全人抗体。

[0067] 在不实质性影响抗体活性的前提下,本领域技术人员可以对本发明的序列取代、添加和/或缺失一个或更多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个)氨基酸,以获得所述抗体或其功能性片段序列的变体。它们都被视为包括在本发明保护的范围内。如在可变区的FR和/或CDR区中将具有类似性质的氨基酸进行取代。取代优选是保守性取代;可进行保守性取代的氨基酸残基为本领域所周知。在一些实施方案中,本发明所述变体的序列可以与其来源序列有至少有95%、96%、97%、98%或99%的一致性。本发明所述的序列一致性可以使用序列分析软件测量。例如使用缺省参数的计算机程序BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。

[0068] 本发明的抗BCMA抗体可以被修饰以影响功能。本发明包括具有修饰的糖基化模式的抗BCMA抗体。可进行修饰以除去不期望的糖基化位点,或在寡糖链上不存在岩藻糖部分以增强抗体的依赖性细胞毒性(ADCC)功能,或可进行半乳糖基化修饰以改变补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0069] 本发明抗BCMA抗体的通常可具备约 10^{-9} 至约 10^{-13} M的亲和力常数。

[0070] 可采用本领域常规的方法制备本发明的抗BCMA抗体,如本领域熟知的杂交瘤技术。或者,本发明的抗BCMA抗体可在除杂交瘤细胞系以外的细胞系中表达。可用编码本发明抗体的序列转化合适的哺乳动物宿主细胞。转化可采用任何已知的方法进行,例如包括将多核苷酸包装在病毒(或病毒载体中)并用病毒(或载体)转导宿主细胞。所用的转化程序取决于将转化的宿主。用于将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞中的方法为本领域所熟知,包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、将多核苷酸囊封在脂质体中和将DNA直接微注射至核中等。可用作用于表达的宿主的哺乳动物细胞系为本领域所熟知,包括但不限于可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的多种永生化细胞系,包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如,HepG2)等。尤其优选的细胞系通过确定哪些细胞系具有高表达水平并产生具有基本BCMA结合特性的抗体来进行选择。

[0071] 编码抗BCMA抗体的多核苷酸序列

[0072] 本发明提供核酸分子,其包括编码本发明所述抗BCMA抗体的多核苷酸序列。本文提供编码重链可变区、轻链可变区、重链、轻链以及各CDR的多核苷酸序列。

[0073] 本发明的核酸分子包括单链和双链形式的DNA和RNA,以及相应的互补序列。DNA包括例如cDNA、基因组DNA、化学合成的DNA、PCR扩增的DNA及其组合。本发明的核酸分子包括全长基因或cDNA分子及其片段的组合。本发明的核酸优选地源自人来源,但本发明也包括源自非人的核酸。

[0074] 本发明中,分离的核酸分子指独立片段形式或作为较大核酸构建体组分的核酸分子。在一个优选的实施方案中,核酸基本上不含污染性的内源物质。核酸分子优选地源自基本上纯的形式至少分离一次的DNA或RNA且其量或浓度使得能够通过标准生物化学方法来识别、操纵和回收其组分核苷酸序列。所述序列优选地以未受内部非翻译序列或内含子(典型地在真核基因中存在)中断的开放阅读框形式来提供和/或构建。非翻译DNA的序列可存在于开放阅读框的5'或3'处,其同样不影响编码区的操纵或表达。

[0075] 本发明还包括在适度严苛的条件下、优选在高度严苛的条件下与如本文中所述编码抗BCMA抗体的核酸杂交的核酸。影响杂交条件选择的基本参数和关于设计合适条件的指导可参见Sambrook,Fritsch和Maniatis(1989,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,第9章和第11章;和Current Protocols in Molecular Biology,1995,Ausubel等编,John Wiley& Sons,Inc.,章节2.10和6.3-6.4)。

[0076] 如本文中所概述,通常使用盒式诱变或PCR诱变或本领域中熟知的其它技术在编码抗BCMA抗体的DNA中通过核苷酸的位点特异性诱变以产生编码变体的DNA,且此后在细胞培养物中表达重组DNA来制备根据本发明的变体。然而,可以通过使用确定的技术体外合成来制备包含具有多达约100-150个残基的的抗原结合片段。

[0077] 如本领域技术人员将了解,由于遗传密码的简并性,可制得极大量的核酸,它们全部编码本发明的抗BCMA抗体或其抗原结合片段。因此,在已鉴定特定氨基酸序列的情况下,本领域技术人员可通过以不改变编码蛋白质的氨基酸序列的方式简单地修饰一个或多个密码子的序列来制得任何数量的不同的核酸。

[0078] 本发明还提供包含至少一个如上述多核苷酸的质粒、表达载体、转录盒或表达盒形式的表达系统和构建体。另外,本发明提供包含所述表达系统或构建体的宿主细胞。

[0079] 任何宿主细胞中所用的表达载体通常含有用于质粒维系和用于克隆与表达外源性核苷酸序列的序列。所述序列(在某些实施方案中总称为“侧翼序列”)通常包括一个或多个以下核苷酸序列:启动子、一个或多个增强子序列、复制起点、转录终止序列、含有供体和受体剪接位点的完全内含子序列、编码用于多肽分泌的前导序列的序列、核糖体结合位点、聚腺苷酸化序列、用于插入编码将要表达的抗体的核酸的多连接子区和可选标记元件。下文论述每个这些序列。

[0080] 载体可任选地含有“标签”编码序列,即位于抗BCMA抗体编码序列的5'或3'末端的寡核苷酸分子;寡核苷酸序列编码聚组氨酸(诸如6His)或另一种“标签”,诸如FLAG、HA(血球凝集素流感病毒)或myc,它们存在市场上有售的抗体中。此标签在表达多肽时典型地与多肽融合,且可充当用于从宿主细胞亲和纯化或检测抗BCMA抗体的一种方式。亲和纯化例如可通过使用针对此标签的抗体作为亲和力基质的柱色谱法来完成。标签任选地可随

后通过诸如使用某些用于裂解的肽酶的各种方式从经过纯化的BCMA抗BCMA抗体除去。

[0081] 侧翼序列可以是同源的(即,来自与宿主细胞相同的物种和/或菌株)、异源的(即,来自除宿主细胞物种或菌株以外的物种)、杂合的(即,来自一种以上来源的侧翼序列的组合)、合成的或天然的。同样地,侧翼序列的来源可以是任何原核或真核生物体、任何脊椎动物或无脊椎动物生物体或任何植物,条件是侧翼序列在宿主细胞机制中起作用且可由宿主细胞机制活化。

[0082] 复制起点典型地是在市场上购买的那些原核表达载体的一部分,且此起点有助于载体在宿主细胞中扩增。如果选择的载体不含复制起点位点,则可以基于已知的序列来化学合成并连接到载体中。举例来说,来自质粒pBR322(New England Biolabs,Beverly,MA)的复制起点适合于大多数革兰氏阴性细菌,且各种病毒起点(例如,SV40、多瘤病毒、腺病毒、水泡性口炎病毒(VSV)或乳头瘤病毒,诸如HPV或BPV)适用于在哺乳动物细胞中克隆载体。哺乳动物表达载体通常不需要复制起点组分(例如,常常只使用SV40起点,因为它也含有病毒早期启动子)。

[0083] 转录终止序列典型地位于多肽编码区的3'末端,用以终止转录。原核细胞中的转录终止序列通常是富含G-C的片段,接着是多聚胸苷酸序列。

[0084] 可选的标记基因编码对于在选择性培养基中生长的宿主细胞的存活和生长而言必要的一种蛋白质。典型的选择标记基因编码(a)赋予对于抗生素或其它毒素(例如,对于原核宿主细胞而言为氨苄青霉素、四环素或卡那霉素)的抗性;(b)补足细胞的营养缺陷型;或(c)提供无法从复合物或确定的培养基获得的重要营养素的蛋白质。特异性的可选标记是卡那霉素抗性基因、氨苄青霉素抗性基因和四环素抗性基因。有利的是,新霉素抗性基因也可以用于在原核和真核宿主细胞中进行选择。

[0085] 核糖体结合位点对于rnRNA的翻译起始而言通常是必要的而且由Shine-Dalgarno序列(原核生物)或Kozak序列(真核生物)来表征。此元件典型地位于启动子的3'和将要表达的多肽的编码序列的5'。

[0086] 本发明的表达和克隆载体将典型地含有由宿主生物体识别并与编码抗BCMA抗体的分子可操作性连接的启动子。启动子是位于控制结构基因转录的结构基因(通常在约100至1000bp以内)的起始密码子上游的非转录序列。

[0087] 本领域中也熟知与酵母宿主一起使用的合适启动子。酵母增强子有利地与酵母启动子一起使用。熟知与哺乳动物宿主细胞一起使用的合适启动子且包括但不限于由诸如多瘤病毒、鸡痘病毒、腺病毒(诸如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、反转录病毒、B型肝炎病毒和最优选的猿猴病毒40(SV40)的病毒基因组获得的些启动子。其它合适的哺乳动物启动子包括异源哺乳动物启动子,例如热休克启动子和肌动蛋白启动子。

[0088] 可将增强子序列插入载体中以通过高等真核生物增加编码组成本发明的抗BCMA抗体的轻链或重链的DNA的转录。增强子是作用于启动子以增加转录的DNA的顺式作用元件,长度通常约为10-300bp。增强子具有相对的方向和位置独立性,已在转录单元的5'和3'位置处发现增强子。已知可获自哺乳动物基因的若干种增强子序列,例如球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素的增强子序列。然而,典型地使用来自病毒的增强子。本领域中已知的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒增强子和腺病毒增强子是用于活化真核启动子的示例性增强元件。

[0089] 本发明的表达载体可以由起始载体(诸如市售载体)来构建。这类载体可含有或可不含所有所需的侧翼序列。如果本文所述侧翼序列的一个或多个并非已存在于载体中,则其可单独获得并与载体连接。本领域技术人员熟知用于获得各个侧翼序列的方法。

[0090] 在构建载体并将编码包含抗BCMA抗体的轻链、重链或轻链和重链的核酸分子插入载体的适当位点后,可将已完成的载体插入合适的宿主细胞中用于扩增和/或多肽表达。可通过众所周知的方法将抗BCMA抗体的表达载体转化至所选的宿主细胞中,所述方法包括转染、感染、磷酸钙共沉淀、电穿孔、微注射、脂转染、DEAE-葡聚糖介导的转染或其它已知的技术。所选方法部分可随待使用的宿主细胞类型而变化。

[0091] 当培养在适当的条件下培养宿主细胞,使其合成抗BCMA抗体,抗BCMA抗体随后可从培养基收集(如果宿主细胞将其分泌到培养基中)或直接从产生其的宿主细胞中收集(如果不分泌的话)。适当的宿主细胞如前文所述。

[0092] 抗BCMA抗体用于治疗目的的用途

[0093] 本文所述的抗BCMA抗体的所有方面都可用于制备用以治疗本文所述各种病况和疾病的药物,所述病况和疾病尤其病况与表达BCMA的B细胞(尤其是记忆B细胞和血浆B细胞)相关的疾病或病况。这些疾病尤其病况相对高水平地表达BCMA的恶性浆细胞和意义未明的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)浆细胞。在一些实施方案中,所述病况和疾病是B细胞相关癌症,但不限于浆细胞白血病;浆细胞瘤;B细胞幼淋巴细胞白血病;毛细胞白血病;B细胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL);急性骨髓性白血病(AML);慢性骨髓性白血病(CML);急性淋巴细胞白血病(ALL);慢性淋巴细胞白血病(CLL);滤泡性淋巴瘤(包括滤泡性非霍奇金氏淋巴瘤类型);伯基特氏淋巴瘤(地方性伯基特氏淋巴瘤;散发性伯基特氏淋巴瘤);边缘区淋巴瘤(粘膜相关淋巴组织;MALT/MALToma;单核细胞样B细胞淋巴瘤;伴绒毛状淋巴细胞的脾淋巴瘤);套细胞淋巴瘤;大细胞淋巴瘤(弥漫性大细胞;弥漫性混合细胞;免疫母细胞性淋巴瘤;原发性纵隔B细胞淋巴瘤;血管中心性淋巴瘤-肺B细胞);小淋巴细胞淋巴瘤(SLL);前体B-淋巴母细胞淋巴瘤;骨髓性白血病(粒细胞;骨髓性;急性骨髓性白血病;慢性骨髓性白血病;亚急性骨髓性白血病;髓细胞肉瘤;绿色瘤;粒细胞肉瘤;急性早幼粒细胞白血病;急性粒单核细胞白血病);瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症或其它B细胞淋巴瘤。

[0094] 在一些实施方案中,所述病况和疾病是B细胞相关的自体免疫病症,包括但不限于全身性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎(RA)、多发性硬化症(MS)、修格连氏病、免疫介导性血小板减少症、溶血性贫血、大疱性类天疱疮、重症肌无力、I型糖尿病、格雷夫斯病、阿狄森病、落叶型天疱疮、牛皮癣、牛皮癣性关节炎和强直性脊柱炎等。

[0095] 诊断用途、测定和试剂盒

[0096] 本发明的抗BCMA抗体可用于诊断测定,例如结合测定来检测和/或定量在组织(诸如骨髓)或细胞(诸如浆细胞)中表达的BCMA。抗BCMA抗体可用在进一步研究BCMA在疾病中的作用的研究中。抗BCMA抗体可用来进一步研究BCMA在形成均聚和/或异聚受体复合物中的作用和所述BCMA受体复合物在疾病中的作用。

[0097] BCMA的血清含量可以是预后的,而且是一种用来测量肿瘤负荷的新工具(SanchezE等, Serum B-cell maturation antigen is elevated in multiple myeloma and correlates with disease status and survival, Br J Haematology, 158, 727-38 (2012))。本发明的实施方案包括诊断测定和试剂盒以测量可溶性BCMA是肿瘤细胞上的膜

结合BCMA的潜在替代品。

[0098] 本发明的抗BCMA抗体可用于诊断目的,用来检测、诊断或监控与BCMA相关的疾病和/或病况。本发明提供使用本领域技术人员已知的经典免疫组织学方法检测样本中BCMA的存在(例如,Tijssen,1993,Practice and Theory of Enzyme Immunoassays,第15卷,R.H.Burdon和P.H.vanKnippenberg编,Elsevier,Amsterdam;Zola,1987,Monoclonal Antibodies:A Manual of Techniques,第147-158页,CRC Press,Inc.;Jalkanen等人,1985,J.Cell.Biol.,101:976-985;Jalkanen等,1987,J.Cell Biol.,105:3087-3096)。可以体内或体外进行BCMA的检测。适用于检测BCMA的存在的方法实例包括ELISA、FACS、RIA等。

[0099] 对于诊断应用来说,通常用可检测的标记基团来标记抗BCMA抗体。合适的标记基团包括(但不限于)以下:放射性同位素或放射性核素(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、荧光基团(例如,FITC、罗丹明、镧系元素磷光体)、酶促基团(例如,辣根过氧化物酶、 β 根半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光基团、生物素基团或由二级报导体识别的预定多肽表位(例如,亮氨酸拉链对序列、用于二级抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签)。在一些实施方案中,标记基团通过各种长度的间隔子臂与抗BCMA抗体偶合以减小潜在的位阻。用于标记蛋白质的各种方法在本领域中已知且可用来进行本发明。

[0100] 本发明的一个方面提供识别表达BCMA的细胞。在一个具体实施方案中,用标记基团标记抗体并检测经过标记的抗体与BCMA的结合。在另一个具体实施方案中,体内检测抗体与BCMA的结合。在另一个具体实施方案中,使用本领域中已知的技术来分离和测量抗体-BCMA。

[0101] 本发明的另一方面提供检测与本发明的抗体竞争结合BCMA的测试分子的存在。一种所述测定的实例将涉及在存在或不存在测试分子的情形下检测含有一定量BCMA的溶液中的游离抗体的量。游离抗体(即,未结合BCMA的抗体)的量增加将表示测试分子能与该抗体竞争结合BCMA。在一个实施方案中,用标记基团标记抗体。或者,标记测试分子并在存在或不存在抗体的情形下监控游离测试分子的量。

[0102] 药物组合物、施用途径

[0103] 本发明提供药物组合物,其包含治疗有效量的一种或多种本发明的抗BCMA抗体以及药学上可接受的稀释剂、载剂、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂。

[0104] 在某些实施方案中,药物组合物中可接受的稀释剂、载剂、增溶剂、乳化剂、防腐剂 and/或佐剂等优选地在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒。在某些实施方案中,药物组合物可含有用于改善、维持或保留例如组合物的pH、渗透性、粘度、澄清度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸收或渗透的这类物质。这些物质为现有技术已知,例如可参见REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,第18版,A.R.Genrmo编,1990,Mack Publishing Company。可视预期的施用途径、递送方式和所需的剂量来确定最佳的药物组合物。

[0105] 可选择本发明的药物组合物用于肠胃外递送。或者,可选择组合物用于吸入或通过消化道(诸如经口)递送。所述药学上可接受的组合物的制备在本领域的技术内。

[0106] 其它药物组合物将为本领域技术人员显而易见,包括在持续或控制释放递送配制物中包含抗BCMA抗体的配制物。用于配制多种其它持续或可控传递方式的技术(诸如脂质

体载剂、生物易蚀微粒或多孔珠粒和积存注射) 也为本领域技术人员所知。

[0107] 用于体内施用的药物组合物通常以无菌制剂的形式提供。通过经无菌过滤膜过滤来实现灭菌。在组合物冻干时,可在冻干和复水之前或之后使用此方法进行灭菌。用于肠胃外施用的组合物可以冻干形式或在溶液中储存。肠胃外组合物通常放在具有无菌进入孔的容器中,例如具有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液带或小瓶。

[0108] 药物组合物一经配制,就以溶液、悬浮液、凝胶、乳液、固体、晶体或以脱水或冻干粉末的形式储存在无菌小瓶中。所述配制物可储存成即用形式或在施用前复水的形式(例如,冻干)。本发明还提供用于产生单剂量施用单位的试剂盒。本发明的试剂盒可各自含有具有干燥蛋白的第一容器和具有含水配制物的第二容器。在本发明的某些实施方案中,提供含有单腔和多腔预填充注射器(例如,液体注射器和冻干注射器)的试剂盒。

[0109] 本发明也提供通过施用本发明任一实施方案所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段或其药物组合物来治疗患者(尤其是患者的B细胞相关疾病,如B细胞相关癌症以及自体免疫疾病)的方法。

[0110] 本文中,术语“患者”、“受试者”、“个体”、“对象”在本文中可互换使用,包括任何生物体,优选动物,更优选哺乳动物(例如大鼠、小鼠、狗、猫、兔等),且最优选的是人。“治疗”指向受试者采用本文所述治疗方案以达到至少一种阳性治疗效果(比如,癌症细胞数目减少、肿瘤体积减小、癌细胞浸润至周边器官的速率降低或肿瘤转移或肿瘤生长的速率降低)。有效治疗患者的治疗方案可根据多种因素(比如患者的疾病状态、年龄、体重及疗法激发受试者的抗癌反应的能力)而变。

[0111] 将采用的含有本发明抗BCMA抗体或其抗原结合片段的药物组合物的治疗有效量将取决于例如治疗程度和目标。本领域技术人员将了解,用于治疗的适当剂量水平将部分取决于所递送的分子、适应症、施用途径和患者的大小(体重、体表或器官大小)和/或状况(年龄和一般健康状况)而变化。在某些实施方案中,临床医生可滴定剂量并改变施用途径来获得最佳的治疗效果。

[0112] 给药频率将取决于所用配制物中特定抗BCMA抗体的药物动力学参数。临床医生典型地施用组合物直到达到实现所需效果的剂量。组合物因此可作为单次剂量施用,或随时间以作为两次或多次剂量(可含有或不含有相同量的所需分子)施用,或通过植入装置或导管以连续输液的方式施用。

[0113] 药物组合物的施用途径是根据已知方法,例如经口、通过静脉内、腹膜内、脑内(脑实质内)、脑室内、肌肉内、眼内、动脉内、门静脉或病灶内途径注射;通过持续释放系统或通过植入装置。

[0114] 下文将以具体实施例的方式阐述本发明。应理解,这些实施例仅仅是阐述性的,并非意图限制本发明的范围。实施例中所用到的方法和材料,除非另有说明,否则均为本领域常规的材料和方法。

[0115] 实施例1:免疫小鼠使其产生抗人BCMA的单克隆抗体

[0116] 采用表达人BCMA全长蛋白(序列参考Uniprot数据库,编号Q02223)的表达载体pcDNA3.1(+)对6周龄免疫球蛋白人源化小鼠AceMouse进行免疫。第五次加强免疫采用商品化的重组人BCMA抗原蛋白(Fc标签,货号CS79,供应商Novoprotein)和标准弗氏完全佐剂按照25微克人重组BCMA蛋白抗原/小鼠的剂量进行。

[0117] 实施例2:对免疫后的小鼠血清进行酶联免疫反应检测

[0118] 将人重组BCMA抗原蛋白 (Novoprotein, 货号CS79) 用PBS稀释成0.5纳克/微升, 在Maxisorp的96孔平底ELISA板加入100微升/孔抗原, 用保鲜膜密封后置4℃过夜。隔天倾去抗原后, 用PBS (200微升/孔) 洗一遍, 倾去PBS后在吸水纸上拍干并在每孔加入200微升封闭液 (含有10%胎牛血清的PBS) 置室温封闭2小时。封闭结束后倾去封闭液后在吸水纸上拍干。加入100微升稀释液 (含有5%胎牛血清的PBS) 将血清进行浓度梯度稀释, 置室温1小时, 之后倾去样品, 用洗涤液 (含0.05%Tween-20的PBS) 洗3遍液, 最后倾去洗涤液后在吸水纸上拍干。加入100微升稀释液稀释HRP偶联的山羊抗小鼠IgG二抗 (终浓度0.4微克/毫升; 生产商Biologend, 货号405306) 置室温1小时, 之后倾去液体, 用洗涤液洗5遍 (200微升/孔), 最后倾去洗涤液后在吸水纸上拍干。加入50微升/孔TMB-过氧化氢尿素溶液 (生产商Thermo Scientific™, 货号34029) 底物液置室温避光放置3-5分钟, 加入50微升/孔0.25M硫酸终止反应, 之后在多功能酶标仪上检测450nm波长光吸收。结果如图2所示。

[0119] 实施例3:利用电融合技术从免疫后的小鼠脾脏细胞获得杂交瘤细胞

[0120] 提前复苏Ag8小鼠骨髓瘤细胞;融合当天取Ag8小鼠骨髓瘤细胞计数;将免疫成功后的BCMA小鼠脾脏放置运输培养基RPMI1640中并且立刻提取分离脾脏中的细胞计数备用;获取的脾细胞和骨髓瘤细胞分别加入10毫升RPMI 1640洗涤一次后按照取 4×10^7 个脾细胞与 1×10^7 个Ag8小鼠骨髓瘤的比例混合;混合后200G离心5分钟, 弃上清, 用10毫升的融合液洗两遍备用;200G室温离心5分钟, 弃上清并加入2.5毫升电融合缓冲液重悬沉淀;准备一个15毫升离心管, 加入4.8毫升预热的RPMI 1640培养基;将混合细胞悬液加入已经用75%酒精消毒并晾干的CUY497P2电极并采用ECFG21电融合仪 (生产商NEPAGENE, 型号ECFG21) 的标准操作流程进行细胞电融合;融合完成后将细胞吸出并放进之前在培养箱里预热的4.8毫升RPMI1640培养基中;用HAT培养基重悬细胞, 按照 2×10^5 细胞/孔铺96孔平底板;将96孔板放在37℃培养箱静置培养, 每天观察细胞, 第10天, 取上清进行ELISA初筛。

[0121] 实施例4:利用酶联免疫反应筛选抗人BCMA单克隆抗体

[0122] 将BCMA抗原 (Novoprotein cat:CS79) 用PBS稀释成0.5纳克/微升;在Maxisorp的96孔平底ELISA板加入100微升/孔抗原, 用保鲜膜密封后置4℃过夜;隔天倾去抗原后, 用PBS (200微升/孔) 洗一遍, 倾去PBS后在吸水纸上拍干并在每孔加入200微升封闭液置室温封闭2小时;封闭结束后倾去封闭液后在吸水纸上拍干;加入50微升样本 (实施例3中获得的BCMA杂交瘤细胞培养上清), 置室温1小时, 之后倾去样品, 用洗涤液洗3遍液, 最后倾去洗涤液后在吸水纸上拍干;加入50微升用稀释液稀释HRP偶联的山羊抗小鼠IgG二抗置室温1小时, 之后倾去液体, 用洗涤液洗5遍 (200微升/孔), 最后倾去洗涤液后在吸水纸上拍干;加入50微升/孔TMB-过氧化氢尿素溶液底物液置室温避光放置3-5分钟, 加入50微升/孔0.25M硫酸终止反应, 之后在多功能酶标仪上检测450nm波长光吸收。结果如下表1所示。

[0123] 表1

[0124]

克隆号	7E11	8H7	11B10	11G1	15A7	15H6
OD450	2.299	2.706	2.551	2.713	2.117	2.491
克隆号	18D10	20A9	23C4	27A7	31F5	20A2
OD450	2.402	2.2	2.86	2.588	3.003	1.309

[0125] 注:除20A2在实施ELISA筛选时杂交瘤上清稀释倍数为1:100外, 其余克隆ELISA筛

选时杂交瘤上清稀释倍数均为1:50。

[0126] 实施例5:利用流式细胞仪检测抗人BCMA抗体结合U266细胞表面BCMA分析

[0127] 200G离心收集U266细胞下来后用含3%FCS的PBS洗一遍,然后重悬在1.5毫升含3%FCS的PBS中,将细胞加入96孔板中,每孔25微升细胞(2.5×10^5),各加入75微升样本(实施例3中获得的BCMA杂交瘤细胞培养上清),设置阳参孔加入75微升抗BCMA抗体(克隆19F2,生产商Biolegend终浓度1微克/毫升);阴参孔1加入75微升IgG2a isotype对照(克隆MG2a-53,生产商Biolegend,终浓度1微克/毫升);阴参孔2和阴参孔3加入75微升含3%FCS的PBS,置4℃冰箱孵育1小时,之后用含3%FCS的PBS洗两遍;倾去上清后,样品孔、阳参孔、阴参孔1和阴参孔2加入50微升500纳克/毫升浓度的二抗(生产商ebioscience,山羊抗小鼠IgG-PE,货号12-4010-82);阴参孔3只加50微升含3%FCS的PBS,之后将板置4℃冰箱避光孵育30分钟之后用含3%FCS的PBS洗两遍,最后将细胞重悬在50微升含3%FCS的PBS中用流式细胞仪进行检测。结果如图2所示。

[0128] 实施例6:采用rProteinG琼脂糖基质磁性微球从实施例3中所获得的BCMA杂交瘤上清中分析并纯化抗人BCMA单克隆抗体

[0129] 从实施例3所获得的BCMA杂交瘤细胞培养中获得8毫升的杂交瘤上清,加入200微升rProteinG琼脂糖基质磁性微球悬浮液(生产商常州天地人和生物科技有限公司,货号SM004C)后置于翻转混合仪轻轻翻转离心管在室温下均匀振荡1小时;向离心管中加入5倍磁珠体积的洗杂液清洗2次后加入600微升洗脱液,用移液器吹打5次后在室温下置于翻转混合仪轻轻翻转离心管洗脱10分钟,待溶液变澄清后,吸取上清液,收集洗脱组分,即为目标抗原,收集上清液至新的离心管中,并立即加入60微升中和液,将洗脱组分pH调节至7.0-8.0;取少量纯化抗体稀释到200微克/毫升,10微升的抗体溶液加入2.5微升的5×蛋白上样缓冲液(非变性)(生产商Sangon Biotech,货号C506032),混匀后与三预染预染蛋白Marker(生产商Sangon Biotech,货号C510010)分别加入12%Tris-Glycine电泳预制胶(生产商Sangon Biotech,货号C661102)样品孔中,预制胶预先已经置于加满Tris-SDS电泳缓冲液(生产商Sangon Biotech,货号C520001)的电泳槽内,按照预制胶生产标准流程进行电泳,电泳完成后采用通用型蛋白染色液(生产商Sangon Biotech,货号C516024)内染色2小时,之后进行洗脱后扫描图片,结果如图3所示。用于后期功能分析的剩余纯化单克隆抗体保存于-20℃。

[0130] 实施例7:候选抗体序列的获得

[0131] 培养候选杂交瘤细胞,1000rpm离心收集细胞,并以Trizol提取总RNA。以此为模板,合成第一链cDNA后,以第一链cDNA为后续模板扩增杂交瘤细胞所对应的可变区DNA序列(Jones and Bendig,1991)。在50μl反应体系中,分别加入cDNA 1μl,10×PCR缓冲液5μl,上游及下游引物各1μl(25pmol),dNTP 1μl,25mmol PL MgCl₂ 1μl,H₂O 39μl,95℃预变性10min,加Taq酶1μl,进入温度循环,进行PCR扩增。反应条件为94℃变性1min,58℃退火1min,72℃延伸15s,共32个循环,然后72℃保温10min。

[0132] 将扩增产物测序后,得到如下所示的候选杂交瘤的抗体序列:

[0133] 7E11

[0134] VH(SEQ ID NO:10):

[0135] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYDMHWVRQGTGKGLEWVSGIGTSGDTIYPDSVKGRFTI

SRENAKNSLNLQMNSLRDGTAMYYCARGPYYYNSSGYYSYDALDIWGQGTMTVTTS

[0136] VL (SEQ ID NO:11) :

[0137] DIVMTQSPLSLSVTPGEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEGVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIK

[0138] HCDR1:GFTFSYYD (SEQ ID NO:12)

[0139] HCDR2:IGTSGDT (SEQ ID NO:13)

[0140] HCDR3:ARGPYYYNSSGYYSYDALDI (SEQ ID NO:14)

[0141] LCDR1:QSLLSNGYNY (SEQ ID NO:15)

[0142] LCDR2:LGS (SEQ ID NO:16)

[0143] LCDR3:MQALQTPYT (SEQ ID NO:17)

[0144] 8H7

[0145] VH (SEQ ID NO:18) :

[0146] EVQLVESGGGLVQPGRSLRISCSGSGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSDTIAYADSVKGRFT
ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKVSGAVFDYCGQGTQVTVSS

[0147] VL (SEQ ID NO:19) :

[0148] DIQMTQSPSSLSASVKDRVIIITCRASQSIHSYLNWYQQKPKGAPKLLIYSASSLQSGVPSRFRSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSFSIPYTFGQGTKLEIK

[0149] HCDR1:GFTFDDYA (SEQ ID NO:20)

[0150] HCDR2:ISWNSDTI (SEQ ID NO:21)

[0151] HCDR3:AKVSGAVFDY (SEQ ID NO:22)

[0152] LCDR1:QSIHSY (SEQ ID NO:23)

[0153] LCDR2:SAS (SEQ ID NO:24)

[0154] LCDR3:QQSFSIPYT (SEQ ID NO:25)

[0155] 11B10

[0156] VH (SEQ ID NO:26) :

[0157] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINTGNGNTKYSQKFQGRVT
ITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGSITGNIFYYYYYMDVWGKGTTVTVAS

[0158] VL (SEQ ID NO:27) :

[0159] DIVVTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSFSSSNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFS
GSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSIPFTFGPGTKVDIK

[0160] HCDR1:GYTFTSYA (SEQ ID NO:28)

[0161] HCDR2:INTGNGNT (SEQ ID NO:29)

[0162] HCDR3:ARGGSITGNIFYYYYYMDV (SEQ ID NO:30)

[0163] LCDR1:QSFSSSNKNYL (SEQ ID NO:31)

[0164] LCDR2:WAS (SEQ ID NO:32)

[0165] LCDR3:QQYYSIPFT (SEQ ID NO:33)

[0166] 11G1

[0167] VH (SEQ ID NO:34) :

[0168] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCEASGFTFDDYAMHWVRQPPGKGLEWVSGISWNSDNIGYADSVKGRFT

ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKIQSGSSFDYWGQGLVTVSS

[0169] VL (SEQ ID NO:35):

[0170] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIINFLNWFQQKPGKAPKLLIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYCCQQSSSIPLTFGGGKVEIK

[0171] HCDR1:GFTFDDYA (SEQ ID NO:36)

[0172] HCDR2:ISWNSDNI (SEQ ID NO:37)

[0173] HCDR3:AKIQSGSSFDY (SEQ ID NO:38)

[0174] LCDR1:QSIINF (SEQ ID NO:39)

[0175] LCDR2:GAS (SEQ ID NO:40)

[0176] LCDR3:QQSSSIPLT (SEQ ID NO:41)

[0177] 15A7

[0178] VH (SEQ ID NO:42):

[0179] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFDDCAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWNSDTMGYADSVKGRFI
ISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTALYHCTRVRRAAVFDYWGQGLVTVSS

[0180] VL (SEQ ID NO:43):

[0181] DIHMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWFQQKPGKAPTFLIYAASSLQSGVSSRFSGRGSGA
DFTLTISLQPEDFASYFCQQSFSPLYIFGQGTKVEIK

[0182] HCDR1:GFTFDDCA (SEQ ID NO:44)

[0183] HCDR2:ISWNSDTM (SEQ ID NO:45)

[0184] HCDR3:TRVRAAVFDY (SEQ ID NO:46)

[0185] LCDR1:QSISSY (SEQ ID NO:47)

[0186] LCDR2:AAS (SEQ ID NO:48)

[0187] LCDR3:QQSFSPLYI (SEQ ID NO:49)

[0188] 15H6

[0189] VH (SEQ ID NO:50):

[0190] QVQLVQSGAEVKKPGASAKVSKASGYTFTSYAMQWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQGRVT
ITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGRLELDIYYFYMDVWGKGTTVTVSS

[0191] VL (SEQ ID NO:51):

[0192] DIVMSQSPDSLAVSLGERTTINCKSSQSVLHSSQNKNYLAWYQQKPGQPPNPLIHWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYRVPFTFGPGTKVDIK

[0193] HCDR1:GYTFTSYA (SEQ ID NO:52)

[0194] HCDR2:INAGNGNT (SEQ ID NO:53)

[0195] HCDR3:ARGGRLELDIYYFYMDV (SEQ ID NO:54)

[0196] LCDR1:QSVLHSSQNKNY (SEQ ID NO:55)

[0197] LCDR2:WAS (SEQ ID NO:56)

[0198] LCDR3:QQYYRVPFT (SEQ ID NO:57)

[0199] 18D10

[0200] VH (SEQ ID NO:58):

[0201] EVRLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTSNDYAMHWVRQAPGRGLEWVSGISWNSDSIGYADSVKGRFT

ISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCATVVSAYFDYWGQGLVTVSS

[0202] VL (SEQ ID NO:59) :

[0203] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRTSQSISTYLNWYQQKPKGAPKLLIYAASSLKSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYFCQGSYIIPLTFGGGTRVEIK

[0204] HCDR1:GFTSNDYA (SEQ ID NO:60)

[0205] HCDR2:ISWNSDSI (SEQ ID NO:61)

[0206] HCDR3:ATVVSAYFDY (SEQ ID NO:62)

[0207] LCDR1:QSISTY (SEQ ID NO:63)

[0208] LCDR2:AAS (SEQ ID NO:64)

[0209] LCDR3:QGSYIIPLT (SEQ ID NO:65)

[0210] 20A2

[0211] VH (SEQ ID NO:66) :

[0212] QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTAYYLHWVRQSPGHGLEWMGRIYPNSGDTNYAQKFQGRVT
MTRDTSINTAYMELSRLRSDDTALYYCARGFNWNYEGGFDIWGQGTMTVTVSS

[0213] VL (SEQ ID NO:67) :

[0214] DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCRSGQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKLSRDSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRMEAEDVGVYYCMQRTHWPPTFGQGTKVEIK

[0215] HCDR1:GYTFTAYY (SEQ ID NO:68)

[0216] HCDR2:IYPNSGDT (SEQ ID NO:69)

[0217] HCDR3:ARGFNWNYEGGFDI (SEQ ID NO:70)

[0218] LCDR1:QSLVYSDGNTY (SEQ ID NO:71)

[0219] LCDR2:KLS (SEQ ID NO:72)

[0220] LCDR3:MQRTHWPPT (SEQ ID NO:73)

[0221] 20A9

[0222] VH (SEQ ID NO:74) :

[0223] QVQLVQSGAEVKKPGASAKVSKASGYTFTSYAMQWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNIKYSQKFQGRVT
ITRDTASASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGRLELDVYFFYYMDVWGKGTTVTVSS

[0224] VL (SEQ ID NO:75) :

[0225] DIVMSQSPDSLAVSLGERTTINCKSSQSVLHSSQNKNYLAWYQQKPGQPPNPLIHWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYRVPFTFGPGTKVDIK

[0226] HCDR1:GYTFTSYA (SEQ ID NO:76)

[0227] HCDR2:INAGNGNI (SEQ ID NO:77)

[0228] HCDR3:ARGGRLELDVYFFYYMDV (SEQ ID NO:78)

[0229] LCDR1:QSVLHSSQNKNY (SEQ ID NO:79)

[0230] LCDR2:WAS (SEQ ID NO:80)

[0231] LCDR3:QQYYRVPFT (SEQ ID NO:81)

[0232] 23C4

[0233] VH (SEQ ID NO:82) :

[0234] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFADHAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSDHIGYADSVKGRFT

ISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTALYYCAKDIFSPTGDGYWGQGLVTVSS

[0235] VL (SEQ ID NO:83) :

[0236] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNNLGWFQQKPGKTPKRLIYAAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
EFTLIISLQPEDFATYYCLHHSYPPTFGQGTKVEIK

[0237] HCDR1:GFTFADHA (SEQ ID NO:84)

[0238] HCDR2:ISWNSDHI (SEQ ID NO:85)

[0239] HCDR3:AKDIFSPTGDGY (SEQ ID NO:86)

[0240] LCDR1:QDIRNN (SEQ ID NO:87)

[0241] LCDR2:AAS (SEQ ID NO:88)

[0242] LCDR3:LHHSYPPT (SEQ ID NO:89)

[0243] 27A7

[0244] VH (SEQ ID NO:90) :

[0245] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDHAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSVHIGYADSVKGRFT
ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIFSPTGDDYWGQGLVTVSS

[0246] VL (SEQ ID NO:91) :

[0247] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNNLGWFQQKPGKTPKRLIYAAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
EFTLTISLQPEDFATYYCLHHSYPPTFGQGTKVEIK

[0248] HCDR1:GFTFDDHA (SEQ ID NO:92)

[0249] HCDR2:ISWNSVHI (SEQ ID NO:93)

[0250] HCDR3:AKDIFSPTGDDY (SEQ ID NO:94)

[0251] LCDR1:QDIRNN (SEQ ID NO:95)

[0252] LCDR2:AAS (SEQ ID NO:96)

[0253] LCDR3:LHHSYPPT (SEQ ID NO:97)

[0254] 31F5

[0255] VH (SEQ ID NO:98) :

[0256] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSDNIAYADSVKGRFT
ISRDNAENSLYLQMNSLRTEDTAIYYCAKVAATFDYRGQGLVTVSS

[0257] VL (SEQ ID NO:99) :

[0258] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIFAAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYSCQSFIPFTFGPGTKVDIK

[0259] HCDR1:GFTFDDYA (SEQ ID NO:100)

[0260] HCDR2:ISWNSDNI (SEQ ID NO:101)

[0261] HCDR3:AKVAAATFDY (SEQ ID NO:102)

[0262] LCDR1:QSISSY (SEQ ID NO:103)

[0263] LCDR2:AAS (SEQ ID NO:104)

[0264] LCDR3:QSFIPFT (SEQ ID NO:105)

[0265] 上述抗体的重链恒定区序列为:

[0266] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC

VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:106) ;

[0267] 轻链恒定区为:

[0268] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:107) 。

[0269] 实施例8:抗人BCMA单克隆抗体结合人BCMA的亲和力分析

[0270] 该实施例中所采用的试剂盒,耗材以及仪器均采购自GE Healthcare;根据试剂盒中的说明书,将人BCMA抗原(6His标签,货号CC28,供应商Novoprotein)偶联至芯片表面,然后用HBS-EP+缓冲溶液倍比稀释,分别配制不同浓度的待分析抗体,同时设0浓度点和质量控制浓度点;根据Biacore T200的生产标准设置程序,以捕获配体的流通池为检测通道,未捕获的流通池为参比通道,以HBS-EP+缓冲溶液作为流动相,分别注入不同浓度的待分析抗体溶液;使用Biacore T200 Control Software软件采集SPR信号,进而利用Biacore T200 Evaluation分析软件进行数据处理;最后对所得动力学曲线动力学分析或稳态分析,计算Ka,Kd和KD值,结果如下表2所示。

[0271] 表2

[0272]

克隆号	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (pM)	克隆号	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (pM)
20A9	5.726E+5	2.342E-5	40.91	11B10	1.061E+6	2.685E-4	253.10
23C4	4.810E+5	7.015E-5	145.80	11G1	4.715E+5	1.627E-5	34.50
27A7	6.181E+6	7.222E-5	11.69	15A7	4.801E+5	6.021E-5	125.40
31F5	5.764E+5	2.781E-5	48.25	15H6	4.828E+5	4.275E-5	88.54
7E11	5.101E+5	2.572E-5	50.42	18D10	5.095E+5	2.431E-5	47.72
8H7	6.122E+5	1.111E-5	18.14	20A2	8.068E+5	5.294E-5	65.62

<221> MUTAGEN
<222> (2) .. (2)
<223> Xaa为G、A或L
<400> 8
Xaa Xaa Ser
1
<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> MUTAGEN
<222> (1) .. (1)
<223> Xaa为M、Q或L
<220>
<221> MUTAGEN
<222> (2) .. (2)
<223> Xaa为Q、G或H
<220>
<221> MUTAGEN
<222> (3) .. (3)
<223> Xaa为A、S、Y、R或H
<220>
<221> MUTAGEN
<222> (4) .. (4)
<223> Xaa为L、F、Y、T或N
<220>
<221> MUTAGEN
<222> (5) .. (5)
<223> Xaa为Q、S、R、I或H
<220>
<221> MUTAGEN
<222> (6) .. (6)
<223> Xaa为T、I、P、V、W或Y
<220>
<221> MUTAGEN
<222> (7) .. (7)
<223> Xaa为P或L
<220>

<221> MUTAGEN

<222> (8) .. (8)

<223> Xaa为Y、F、L或P

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (9) .. (9)

<223> Xaa为T或I

<400> 9

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 10

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val 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 Tyr Tyr

20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Gly Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Asn Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Gly Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Pro Tyr Tyr Tyr Asn Ser Ser Gly Tyr Tyr Ser Tyr Asp Ala

100 105 110

Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Thr Ser

115 120 125

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 11

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

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

<210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 12
 Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Tyr Asp
 1 5
 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 13
 Ile Gly Thr Ser Gly Asp Thr
 1 5
 <210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 14
 Ala Arg Gly Pro Tyr Tyr Tyr Asn Ser Ser Gly Tyr Tyr Ser Tyr Asp
 1 5 10 15
 Ala Leu Asp Ile
 20
 <210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 19

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

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 20

Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	Ala
1				5			

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 21

Ile	Ser	Trp	Asn	Ser	Asp	Thr	Ile
1				5			

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 22

Ala	Lys	Val	Ser	Gly	Ala	Val	Phe	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 23

Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ala Ser
 115 120 125

<210> 27

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 27

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Phe Leu Ser Ser
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Ile Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110

Lys

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 28

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 29

Ile Asn Thr Gly Asn Gly Asn Thr
 1 5

<210> 30

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 30
 Ala Arg Gly Gly Ser Ile Thr Gly Asn Ile Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Met Asp Val
 <210> 31
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 31
 Gln Ser Phe Leu Ser Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
 1 5 10
 <210> 32
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 32
 Trp Ala Ser
 1
 <210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 33
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Ile Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 34
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 34
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Asp Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 43

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

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 44

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Cys Ala
 1 5

<210> 45

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 45
Ile Ser Trp Asn Ser Asp Thr Met
1 5
<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 46
Thr Arg Val Arg Ala Ala Val Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 47
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 47
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5
<210> 48
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 48
Ala Ala Ser
1
<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 49
Gln Gln Ser Phe Ser Pro Leu Tyr Ile
1 5
<210> 50
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 50

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

<210> 51

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 51

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

Lys

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 52

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Ala

1 5

<210> 53

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 53

Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr

1 5

<210> 54

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 54

Ala Arg Gly Gly Arg Leu Glu Leu Asp Ile Tyr Tyr Tyr Phe Tyr Tyr

1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 55

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 55

Gln Ser Val Leu His Ser Ser Gln Asn Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 56

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 56

Trp Ala Ser

1

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 57

Gln Gln Tyr Tyr Arg Val Pro Phe Thr

1 5
 <210> 58
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 58
 Glu Val Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ser Asn Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Asp Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Val Val Ser Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 59
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 59
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gly Ser Tyr Ile Ile Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 60
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 60
 Gly Phe Thr Ser Asn Asp Tyr Ala
 1 5
 <210> 61
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 61
 Ile Ser Trp Asn Ser Asp Ser Ile
 1 5
 <210> 62
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 62
 Ala Thr Val Val Ser Ala Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 63
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 63
 Gln Ser Ile Ser Thr Tyr
 1 5
 <210> 64
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 64
 Ala Ala Ser
 1
 <210> 65
 <211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 65

Gln Gly Ser Tyr Ile Ile Pro Leu Thr
1 5

<210> 66

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 66

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Asn Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Phe Asn Trp Asn Tyr Glu Gly Gly Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 67

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gly Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Leu Ser Ser Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Lys Leu Ser

1

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 73

Met Gln Arg Thr His Trp Pro Pro Thr

1

5

<210> 74

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 74

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Ala Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Ile Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Arg Gly Gly Arg Leu Glu Leu Asp Val Tyr Tyr Tyr Phe Tyr Tyr

100

105

110

Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

125

<210> 75

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 75

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Arg Thr Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu His Ser

20

25

30

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

Lys

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 76

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Ala

1 5

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 77

Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Ile

1 5

<210> 78

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 78

Ala Arg Gly Gly Arg Leu Glu Leu Asp Val Tyr Tyr Tyr Phe Tyr Tyr

1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 79

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 79

Gln Ser Val Leu His Ser Ser Gln Asn Lys Asn Tyr

<212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 87
 Gln Asp Ile Arg Asn Asn
 1 5
 <210> 88
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 88
 Ala Ala Ser
 1
 <210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 89
 Leu His His Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 90
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 90
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp His
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Val His Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Ile Phe Ser Pro Thr Gly Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 91

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 91

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

<210> 92

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 92

Gly Phe Thr Phe Asp Asp His Ala
 1 5

<210> 93

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 93

Ile Ser Trp Asn Ser Val His Ile
 1 5

<210> 94

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 94

	85	90	95
Ala Lys Val	Ala Ala Ala Thr Phe Asp	Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Leu	
	100	105	110
Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210>	99		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
<400>	99		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr			
	20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45
Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Ser Cys Gln Gln Ser Phe Ser Ile Pro Phe			
	85	90	95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys			
	100	105	
<210>	100		
<211>	8		
<212>	PRT		
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
<400>	100		
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala			
1	5		
<210>	101		
<211>	8		
<212>	PRT		
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
<400>	101		
Ile Ser Trp Asn Ser Asp Asn Ile			
1	5		
<210>	102		

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

<210> 107

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 107

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

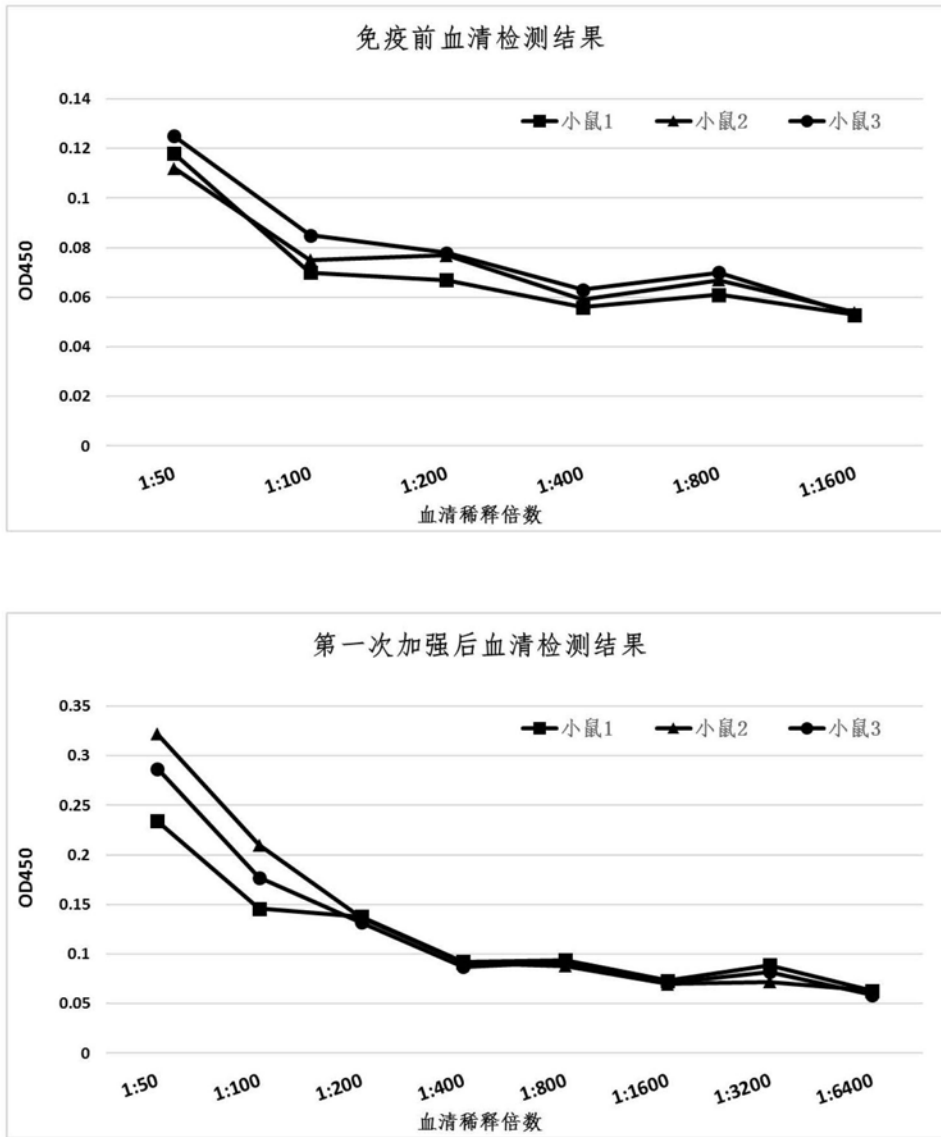


图1

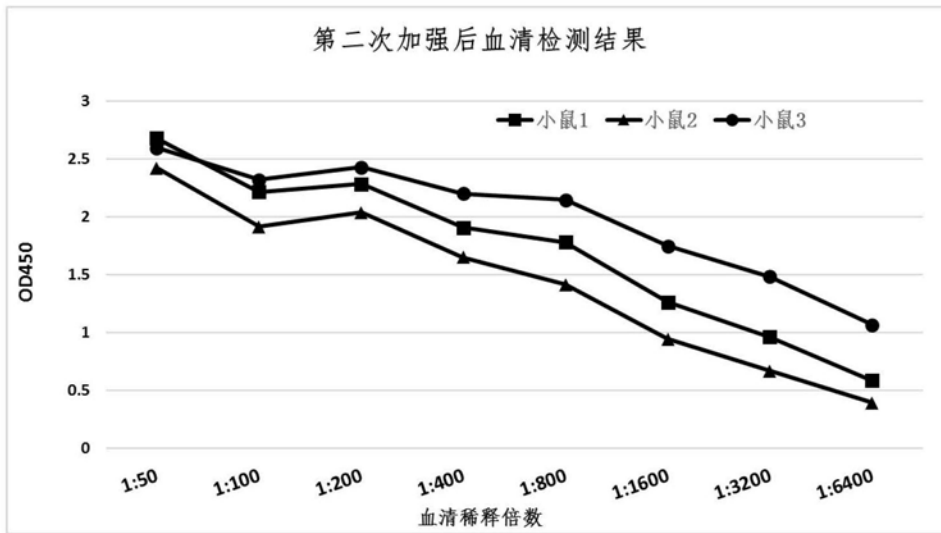
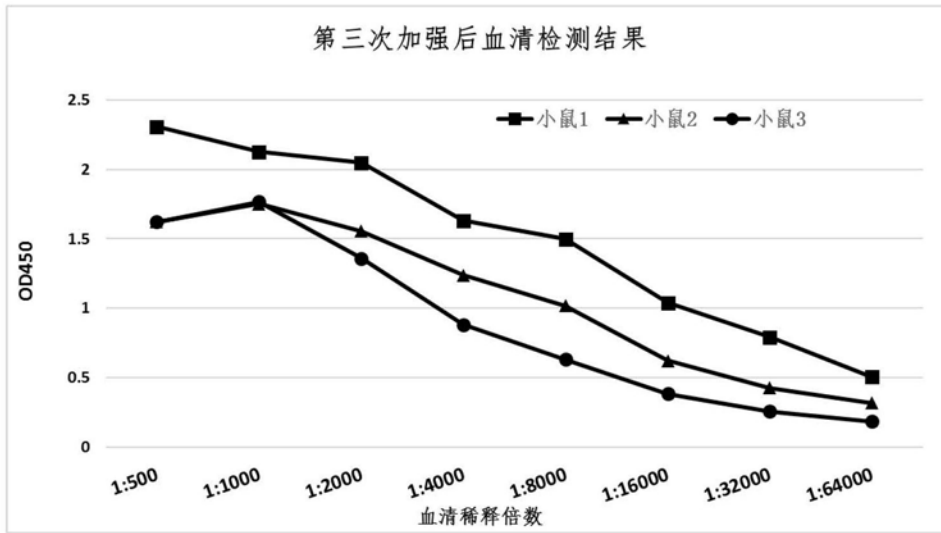


图1 (续)

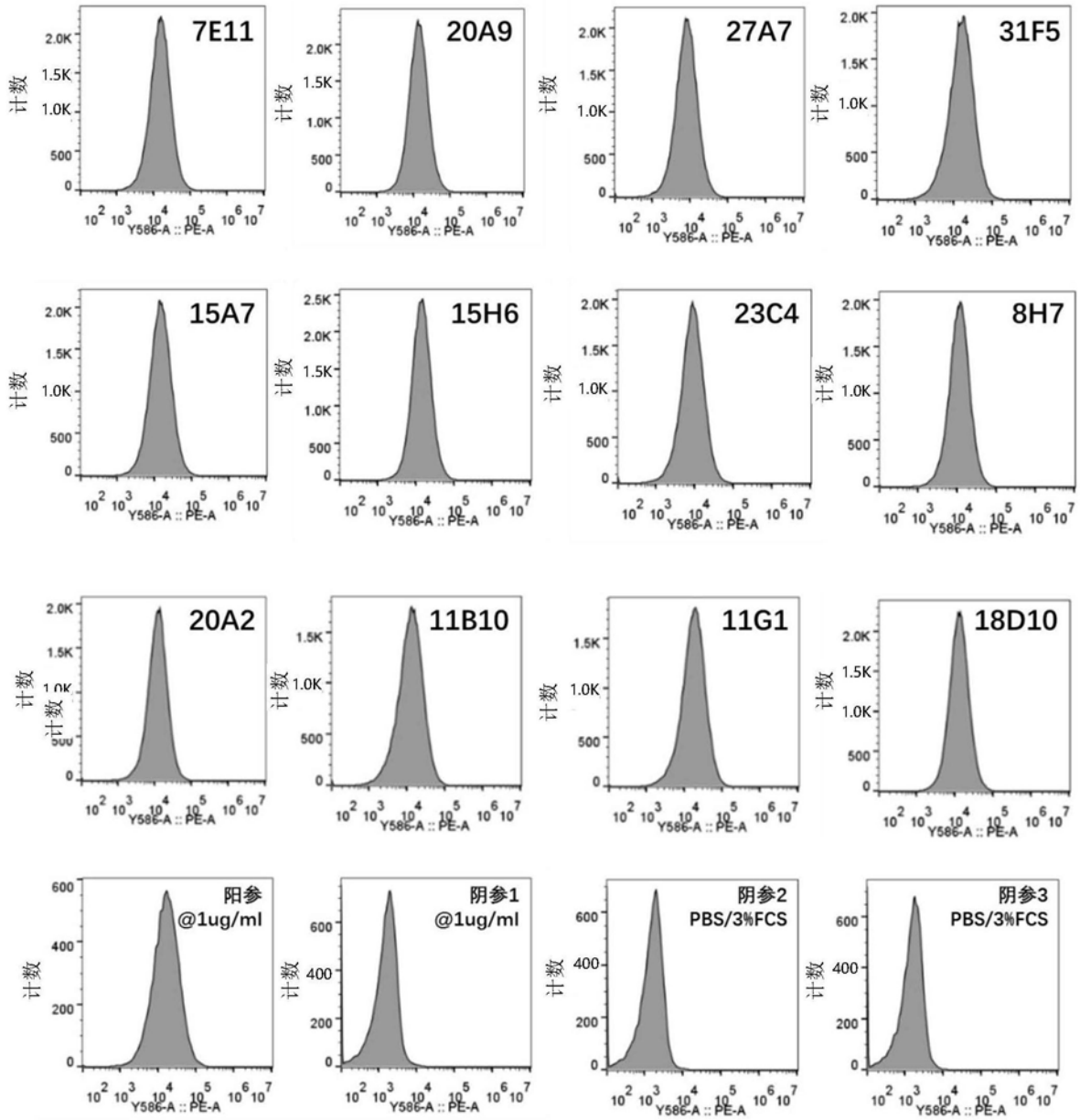


图2

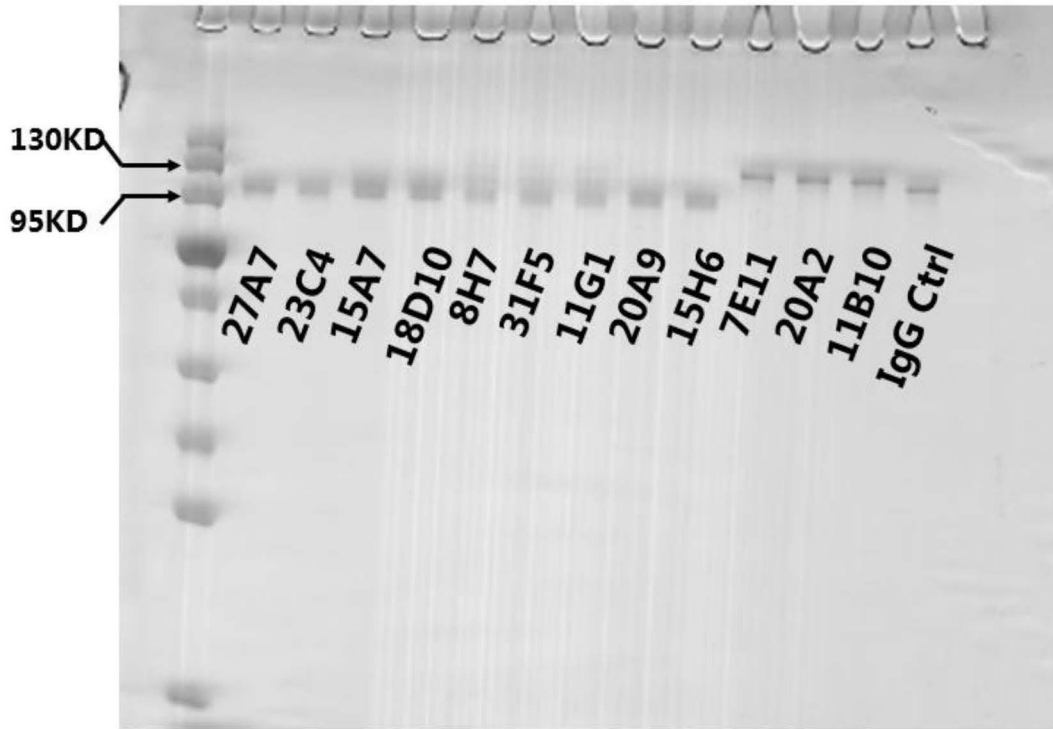


图3