

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 8 月 2 日 (02.08.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/137609 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 17/08 (2006.01) **A61K 47/60** (2017.01)
C07K 16/46 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
A61K 39/44 (2006.01) **A61P 37/02** (2006.01)
A61K 47/59 (2017.01) **A61P 29/00** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/073785

(22) 国际申请日: 2018 年 1 月 23 日 (23.01.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201710052692.8 2017 年 1 月 24 日 (24.01.2017) CN
201710480066.9 2017 年 6 月 21 日 (21.06.2017) CN

(71) 申请人: 本康生物制药 (深圳) 有限公司
(**BENHEALTH BIOPHARMACEUTIC (SHENZHEN)
CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山
区桃源街道田寮工业 A 区 9 栋二楼东
面, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 于浩洋 (**YU, Haoyang**); 中国广东省深
圳市南山区桃源街道田寮工业 A 区 9 栋二
楼东面, Guangdong 518055 (CN)。王忠 (**WANG,
Zhong**); 中国广东省深圳市南山区桃源街道
田寮工业 A 区 9 栋二楼东面, Guangdong 518055
(CN)。李正成 (**LI, Zhengcheng**); 中国广东省深
圳市南山区桃源街道田寮工业 A 区 9 栋二
楼东面, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 深圳壹舟知识产权代理事务所
(普通合伙) (**SHENZHEN ARK INTELLECTUAL
PROPERTY AGENT LLP**); 中国广东省深圳市
罗湖区爱国路 1058 号金通大厦 B 栋 2011
室, Guangdong 518003 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2(a))。

(54) **Title:** ANTIBODY CONJUGATE, AND RELATED PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND APPLICATION

(54) 发明名称: 抗体偶联物、相关的药物组合物及应用

(57) **Abstract:** The present invention provides a multispecific antibody conjugate (i.e., a bispecific antibody conjugate), and a related composition, therapeutic method and use thereof. The antibody conjugate comprises a multispecific antibody coupled on a nano material, such as a bispecific antibody. The antibody conjugate can be used for regulating immune responses and treating or preventing diseases and disorders (such as cancers, autoimmunity diseases, pathogen infection, or inflammatory diseases).

(57) 摘要: 本发明提供了一种多特异性抗体偶联物 (如双特异性抗体偶联物)、及其相关的组合物、治疗方法和用途。所述抗体偶联物包含偶联于纳米材料上的多特异性抗体, 例如双特异性抗体。所述抗体偶联物可用来调节免疫应答、治疗或预防疾病或病症 (例如癌症、自身免疫病、病原体感染或炎性疾病) 等。



WO 2018/137609 A1

抗体偶联物、相关的药物组合物及应用

技术领域

本发明涉及免疫医学领域，尤其涉及多特异性抗体偶联物，特别是用于诱导对诸如癌症或传染病等疾病的免疫应答的多特异性抗体偶联物。本发明还涉及所述抗体偶联物的相关组合物、使用方法及用途。

发明背景

一些抗体，诸如多特异性抗体(如双特异性抗体)，可与两种或更多种不同抗原结合。已开发了许多重组体策略来合成双特异性抗体，包括单链可变片段(scFv)衍生的形式，诸如双抗体、串联双抗体、BiTe(双特异性 T 细胞衔接体)和 DART(双亲和力再靶向)以及基于免疫球蛋白 G(IgG) 的形式如 Triomab、DVD-Ig(双可变域抗体)和二合一抗体。然而，这样的双特异性抗体可能具有较差的药代动力学和物理性质(诸如免疫原性)。因此，需要能够改善现有技术中的双特异性抗体的替代技术。

发明内容

本文公开了多特异性抗体偶联物。本文所述的多特异性抗体偶联物包含偶联于纳米材料(如纳米微粒)上的多特异性抗体。

所述多特异性抗体优选包含至少一个第一结合部分和至少一个第二结合部分，其中第一结合部分结合细胞毒性效应细胞，优选结合细胞毒性效应细胞上的抗原，所述第二结合部分结合靶细胞，优选结合靶细胞上的抗原。

所述细胞毒性效应细胞可以是细胞毒性细胞。所述细胞毒性细胞可以是白细胞。所述白细胞可以选自巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、NK 细胞、B 细胞和 T 细胞。白细胞可以是 T 细胞。白细胞可以是 NK 细胞。所述白细胞可以是 NK 样 T 细胞，即 NKT 细胞。所述白细胞可以是 NK 细胞和 T 细胞。所述细胞毒性效应细胞包含选自 T 细胞、NK 细胞和 NKT 细胞的细胞。所述细胞毒性效应细胞可以选自 T 细胞、NK 细胞、NKT 细胞和 CIK 细胞。

靶细胞可以是有待清除的细胞，可以是患病细胞或疾病相关细胞。例如，靶细胞可以是癌细胞或肿瘤细胞。靶细胞可以是白血病细胞。靶细胞可以是淋巴细胞。靶细胞可以是转移细胞。靶细胞可进行遗传修饰。靶细胞可包含基因突变。基因突变可包含癌基因突变。基因突变可以是肿瘤抑制基因的突变。基因突变可以是原癌基因的突变。靶细胞可以是炎性疾病和/或自身免疫病相关的细胞。靶细胞可以是受感染细胞。靶细胞可以是病原细胞。

所述多特异性抗体优选是双特异性的。优选所述双特异性抗体的一个结合位点(第一结合位点)针对白细胞上的抗原，且第二结合位点结合于靶细胞(可以是患病细胞或疾病相关细胞或病原体(即微生物))上的抗原。所述多特异性抗体也可以是三特异性的；优选其中至少一个结合位点(第一结合位点)针对白细胞上的抗原，而至少一个第二结合位点结合于靶细胞(可以是患病细胞或疾病相关细胞或病原体(即微生物))上的抗原。

示例性 T 细胞上的抗原选自 CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD69 和 CD90。NK 细胞上表达的示例性抗原选自 CD2、CD8、CD11b、CD16、CD38、CD56、CD57、ADAM17、KIR、KAR、KLR 和 CD137。示例性单核细胞上的抗原选自 CD74、HLA-DR α 链、CD14、CD16、CD64 和 CD89。示例性嗜中性粒细胞上的抗原选自 CEACAM6、CEACAM8、CD16b、CD32a、CD89、CD177、CD11a、CD11b 和 SLC44A2。白细胞上的抗原还可以是检查点抗原，可以选自 LSECtin、CTLA4、PD1、PD-L1、LAG3、B7-H3、B7-H4、KIR 和 TIM3。优选地，T 细胞上的抗原是 CD3、CD4 或 CD8，NK 细胞上的抗原是 CD16 或 CD56。

所述第二结合部分可以结合患病细胞或疾病相关细胞或病原体上的抗原。在某些实施方案中，所述抗体的第二结合部分可以靶向任何类型的肿瘤和任何类型的肿瘤细胞上的抗原。可以靶向的示例性癌症类型包括急性淋巴母细胞性白血病、急性髓性白血病、胆癌、乳腺癌、子宫颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、胃癌、头颈癌、何杰金氏淋巴瘤、肺癌、骨髓甲状腺癌、非何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、肾癌、卵巢癌、胰腺癌、神经胶质瘤、黑素瘤、肝癌、前列腺癌、膀胱癌、神经内分泌癌、胃肠胰肿瘤、外分泌胰腺癌和尤因肉瘤。然而，本领域普通技术人员应认识到，已知肿瘤相关抗原实际上可用于任何类型的癌症。

所述肿瘤细胞或癌细胞上的抗原可以选自：碳酸酐酶 IX、甲胎蛋白、 α -辅肌动蛋白-4、A3、A33 抗体特异性抗原、AFP、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3-抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 α 、结肠特异性抗原-p (CSAp)、CEA (CEACAM5)、CEACAM6、c-met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250 抗原、GAGE、gp100、GROB、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素(HCG)和其亚单位、HER2/neu、HMGB-1、低氧可诱导因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、KC4-抗原、KS-1-抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、胰腺癌粘蛋白、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、PlGF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活蛋白、存活蛋白-2B、TAC、TAG-72、髓生蛋白、TRAIL 受体、TNF- α 、Tn 抗原、汤姆森-弗里德里希抗原、肿瘤坏死抗原、TROP-2、VEGFR、

ED-B 纤连蛋白、WT-1、17-1A-抗原、补体因子 C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标记物、bcl-2、bcl-6、Kras、cMET、致癌基因产物。

所述肿瘤细胞或癌细胞上的抗原也可以选自胆囊收缩素 B 受体、促性腺激素释放激素受体、促生长素抑制素受体 2、avb3 整合蛋白、胃泌素释放肽受体、神经激肽 1 受体、黑皮质素 1 受体、神经降压肽受体、神经肽 Y 受体和 C 型凝集素样分子 1 的细胞表面蛋白。

所述第二结合部分可以结合炎症疾病和/或自身免疫病相关的细胞。所述炎症疾病和/或自身免疫病例如可以选自类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、银屑病、银屑病性关节炎、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、全身性红斑狼疮、青少年糖尿病、自身免疫性葡萄膜炎、多发性硬化、帕金森病、阿耳茨海默氏病和缺血-再灌注损伤（参见 WO2014/180577）。

所述病原体可以选自 HIV 病毒、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、抗甲氧西林性金黄色葡萄球菌 (*Meticillin-resistant Staphylococcus aureus*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*)、肺炎球菌 (*Pneumococcus*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、B 型流感嗜血杆菌 (*Hemophilis influenzae B*)、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、莱姆病螺旋体 (*Lyme disease spirochetes*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、流产布鲁氏菌 (*Brucella abortus*)、狂犬病病毒、流感病毒、巨细胞病毒、I 型单纯疱疹病毒、II 型单纯疱疹病毒、人血清细小样病毒、呼吸道合胞病毒、水痘-带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、麻疹病毒、腺病毒、人 T 细胞白血病病毒、埃-巴二氏病毒、鼠白血病病毒、腮腺炎病毒、水泡性口膜炎病毒、辛德毕斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒、蓝舌病病毒、仙台病毒、猫白血病病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、猿猴病毒 40、小鼠乳腺癌病毒、登革热病毒、风疹病毒、西尼罗河病毒、恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、让氏锥虫 (*Trypanosoma rangeli*)、克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)、罗德西亚锥虫 (*Trypanosoma rhodesiense*)、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、曼森氏裂体吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、日本裂体吸虫 (*Schistosoma japonicum*)、牛巴贝虫 (*Babesia bovis*)、艾美耳球虫 (*Elmeria tenella*)、旋盘尾丝虫 (*Onchocerca volvulus*)、热带利什曼虫 (*Leishmania tropica*)、旋毛虫 (*Trichinella spiralis*)、小泰勒虫 (*Theileria parva*)、泡状带绦虫 (*Taenia hydatigena*)、羊绦虫 (*Taenia ovis*)、牛肉绦虫 (*Taenia saginata*)、细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*)、科氏中殖孔绦虫 (*Mesocostoides corti*)、关节炎支原体 (*Mycoplasma arthritidis*)、鼻支原体 (*M. hyorhinis*)、口腔支原体 (*M. orale*)、精氨酸支原体 (*M. arginini*)、拉氏无胆甾原体 (*Acholeplasma laidlawii*)、唾液支原体 (*M. salivarium*) 和肺炎支原体 (*M. pneumoniae*)。

所使用的抗体可以是鼠类抗体、羊抗体等、嵌合抗体、人源化和人抗体或其片段。

所述抗体也可以是重链抗体（如骆驼抗体）或其片段。所述多特异性抗体可以是各种类型的多特异性抗体，例如可以是单链可变片段(scFv)衍生的形式、包含重链抗体可变区片段的形式、基于免疫球蛋白 G (IgG) 的形式以及上述形式的组合。所述抗体可以包含 scFv 和/或重链抗体可变区片段。

所述纳米材料可以是可药用的纳米材料，优选为生物可降解纳米材料，例如为纳米微粒。所述纳米材料更优选为聚乳酸-羟基乙酸、聚乳酸、聚己内酯、聚丁二醇丁二酸酯、聚苯胺、聚碳酸酯、乙丙交酯共聚物或乙交酯己内酯共聚物中的任意一种或至少两种的混合物，最优选为聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)、聚乳酸(PLA)和/或聚己内酯(PCL)。所述纳米微粒的平均粒径可以例如为大约 10-990nm，例如为约 900nm、约 850nm、约 800nm、约 750nm、约 700nm、约 650nm、约 600nm、约 550nm、约 500nm、约 450nm、约 400nm、约 350nm、约 300nm、约 250nm、约 200nm、约 150nm、约 100nm 或小于 100nm，例如大小为约 90nm、约 80nm、约 70nm、约 60nm、约 50nm、约 40nm、约 30nm、约 20nm 或约 10nm。优选纳米颗粒的平均粒径在 10-500nm 范围内，更优选在 10-300nm 范围内。

本公开还提供药物组合物，其包含本文所公开的多特异性抗体偶联物。所述药物组合物还可以包含白细胞，例如与所述多特异性抗体偶联物相结合的白细胞，所述白细胞优选 T 细胞和/或 NK 细胞。所述药物组合物还可以含有治疗疾病的其他治疗剂。

本公开也提供疾病或病症的治疗方法，其包括给有需要的受治疗者施用所述偶联物或药物组合物。所述治疗方法还可以包括序贯或同时施用治疗所述疾病的其他治疗剂。

本公开还提供所述偶联物和药物组合物在制备用于治疗或预防疾病或病症的药物中的用途。

本公开也涉及用于治疗或预防疾病或病症的所述偶联物和药物组合物。

在某些实施方案中，本文公开的偶联物和药物组合物可以用于治疗癌症，例如本文公开的癌症。示例性癌症类型包括急性淋巴母细胞性白血病、急性髓性白血病、胆癌、乳腺癌、子宫颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、胃癌、头颈癌、何杰金氏淋巴瘤、肺癌、骨髓甲状腺癌、非何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、肾癌、卵巢癌、胰腺癌、神经胶质瘤、黑素瘤、肝癌、前列腺癌、膀胱癌、神经内分泌癌、胃肠胰肿瘤、外分泌胰腺癌和尤文肉瘤。

在其它实施方案中，可以使用本文公开的偶联物或药物组合物治疗感染了诸如细菌、病毒或真菌等致病生物体的受试者。可以治疗的示例性真菌包括小孢子菌、发癣菌、表皮癣菌、申克孢子丝菌、新型隐球菌、粗球孢子菌、荚膜组织胞浆菌、皮炎芽生菌或白色念珠菌。示例性病毒包括人免疫缺陷病毒(HIV)、疱疹病毒、巨细胞病毒、狂犬病病毒、流感病毒、人类乳头状瘤病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、仙台病毒、猫白血病毒、Reo 病毒、脊髓灰质炎病毒、人血清细小样病毒、猿猴病毒 40、呼吸道合胞病毒、小鼠乳腺癌病毒、水痘-带状疱疹病毒、登革热病毒、风疹病毒、麻疹病毒、腺病毒、人类 T 细胞白血病毒白血病毒、埃-巴二氏病毒、鼠类白血病毒白血病毒、腮腺炎病毒、水泡性口膜炎病毒、辛德毕斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒或蓝舌

病病毒。示例性细菌包括炭疽杆菌、无乳链球菌、嗜肺军团菌、酿脓链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟氏菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、肺炎球菌属、B型流感嗜血杆菌、苍白密螺旋体、莱姆病螺旋体、铜绿假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁氏菌、结核分枝杆菌或支原体。

具体而言，本文公开了以下发明：

1. 抗体偶联物，其包含偶联于纳米材料上的多特异性抗体，所述纳米材料优选为生物可降解纳米材料，例如为纳米微粒，所述抗体优选同时结合细胞毒性效应细胞和靶细胞。

2. 根据项 1 所述的抗体偶联物，其中所述抗体包含特异性结合细胞毒性效应细胞的结合部分。

3. 根据项 2 所述的抗体偶联物，其中所述细胞毒性效应细胞包括 T 细胞。

4. 根据项 3 所述的抗体偶联物，其中所述抗体包含特异性结合选自下述抗原的结合部分：

CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD69 和 CD90，所述抗原优选为 CD3。

5. 根据项 2 所述的抗体偶联物，其中所述细胞毒性效应细胞包括 NK 细胞。

6. 根据项 5 所述的抗体偶联物，其中所述抗体包含特异性结合选自下述抗原的结合部分：

CD2、CD8、CD11b、CD16、CD38、CD56、CD57、ADAM17、KIR、KAR、KLR 和 CD137，所述抗原优选选自 CD16 和 CD56。

7. 根据任一前述项所述的抗体偶联物，其中所述抗体包含特异性结合靶细胞的结合部分，所述靶细胞优选为疾病相关细胞。

8. 根据项 7 所述的抗体偶联物，其中所述疾病为肿瘤或癌症。

9. 根据项 8 所述的抗体偶联物，其中所述肿瘤或癌症选自由以下组成的组：

非何杰金氏淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤、B 细胞白血病、T 细胞淋巴瘤、T 细胞白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、伯基特淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤、毛细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、多发性骨髓瘤、神经胶质瘤、华氏巨球蛋白血症、癌瘤、黑素瘤、肉瘤、神经胶质瘤、皮肤癌、口腔癌、胃肠道癌、结肠癌、胃癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、膀胱癌、胰腺癌、骨癌、肝癌、胆囊癌、肾癌、睾丸癌、上皮癌、结直肠癌、胃癌、脑癌、胶质母细胞瘤、胰腺癌、髓样白血病、宫颈癌、甲状腺髓样癌、星形细胞瘤、前列腺癌、膀胱癌、神经内分泌癌、胃肠胰肿瘤、外分泌胰腺癌和尤因肉瘤。

10. 根据项 9 所述的抗体偶联物，其中所述抗体包含特异性结合选自下述抗原的结合部分：

碳酸酐酶 IX、甲胎蛋白、 α -辅肌动蛋白-4、A3、A33 抗体特异性抗原、AFP、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3-抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、

CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 α 、结肠特异性抗原-p (CSAp)、CEA (CEACAM5)、CEACAM6、c-met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250 抗原、GAGE、gp100、GROB、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素(HCG)和其亚单位、HER2/neu、HMGB-1、低氧可诱导因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、KC4-抗原、KS-1-抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、胰腺癌粘蛋白、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、PIGF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活蛋白、存活蛋白-2B、TAC、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL 受体、TNF- α 、Tn 抗原、汤姆森-弗里德里希抗原、肿瘤坏死抗原、TROP-2、VEGFR、ED-B 纤连蛋白、WT-1、17-1A-抗原、补体因子 C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标记物、bcl-2、bcl-6、Kras、cMET、致癌基因产物，所述抗原优选选自 MUC1、CEA、CD19 和 CD20。

11. 根据项 7 所述的抗体偶联物，其中所述靶细胞为炎症疾病和/或自身免疫病相关细胞。

12. 根据项 11 所述的抗体偶联物，其中所述炎症疾病和/或自身免疫病选自由以下组成的组：

类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、银屑病、银屑病性关节炎、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、全身性红斑狼疮、青少年糖尿病、自身免疫性葡萄膜炎、多发性硬化、帕金森病、阿耳茨海默氏病和缺血-再灌注损伤。

13. 根据项 1-12 中任一项所述的抗体偶联物，其中所述抗体选自单链可变片段(scFv)衍生的形式、包含重链抗体可变区片段的形式、基于免疫球蛋白 G(IgG) 的形式以及上述形式的组合。

14. 根据项 13 所述的抗体偶联物，其中所述抗体包含单链可变区片段(scFv)和/或重链抗体可变区片段。

15. 根据任一前述项所述的抗体偶联物，其中所述抗体为双特异性抗体或三特异性抗体，优选为双特异性抗体。

16. 根据项 15 所述的抗体偶联物，其中所述双特异性抗体选自由以下组成的组：双抗体、串联双抗体、BiTe(双特异性 T 细胞衔接体)、DART(双亲和力和再靶向)、Triomab 和 DVD-Ig(双可变域抗体)。

17. 根据项 15 所述的抗体偶联物，其中所述抗体为选自由以下组成的组的抗体形

式：单链双功能抗体(scDb)、串联 scDb(Tandab)、线性二聚 scDb(LD-scDb)、环状二聚 scDb(CD-scDb)、串联二 scFv、串联三 scFv、三功能抗体、双特异性 Fab2、二小型抗体、四功能抗体、scFv-Fc-scFv 融合物、与 Fab 融合的单域抗原结合片段(S-Fab)、串联二 VHH、二双功能抗体、DVD-Ig、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv2-Fc、IgG-scFv 融合物、钮入孔物(KiH)、DNL 复合物和双体，所述 IgG-scFv 融合物优选为 bsAb、Bs1Ab、Bs2Ab、Bs3Ab、Ts1Ab 或 Ts2Ab。

18. 根据项 17 所述的抗体偶联物，其中所述抗体为双特异性 T 细胞衔接体。

19. 根据项 18 所述的抗体偶联物，其中所述抗体为特异性结合 CD3 和特异性结合 CD19 的双特异性 T 细胞衔接体，优选为兰妥莫单抗(blinatumomab)。

20. 根据项 18 所述的抗体偶联物，其中所述抗体为串联二 scFv、S-Fab 或串联二 VHH，优选为包含 SEQ ID NO:1 和 2 所示序列的串联二 VHH。

21. 根据项 13-17 中任一项所述的抗体偶联物，其中所述抗体包含特异性结合 NK 细胞的结合部分。

22. 根据项 21 所述的抗体偶联物，其中所述抗体为同时结合 CD16 和 CEA 的双特异性抗体。

23. 根据项 21 或 22 所述的抗体偶联物，其中所述抗体为串联二 scFv。

24. 根据任一前述项所述的抗体偶联物，其中所述纳米材料为聚乳酸-羟基乙酸、聚乳酸、聚己内酯、聚丁二醇丁二酸酯、聚苯胺、聚碳酸酯、乙丙交酯共聚物和乙交酯己内酯共聚物中的任意一种或至少两种的混合物，最优选为聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)、聚乳酸(PLA)和/或聚己内酯(PCL)。

25. 根据项 24 所述的抗体偶联物，其中纳米微粒的平均直径在 10-990nm 范围内，优选在 10-500nm 范围内，更优选在 10-300nm 范围内，优选平均直径为约 400nm、约 350nm、约 300nm、约 250nm、约 200nm、约 150nm、约 100nm 或小于 100nm，例如为约 90nm、约 80nm、约 70nm、约 60nm、约 50nm、约 40nm、约 30nm、约 20nm 或约 10nm。

26. 药物组合物，其包含项 1-25 中任一项所述的抗体偶联物。

27. 根据项 25 所述的药物组合物，其还包含细胞毒性效应细胞，所述细胞毒性效应细胞优选为白细胞，选自 T 细胞、NK 细胞、NKT 细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞，优选为包含选自 T 细胞和 NK 细胞的细胞毒性效应细胞，所述药物组合物优选用于免疫治疗。

28. 项 1-25 中任一项所述的抗体偶联物或项 26 或 27 所述的药物组合物在制备免疫治疗药物中的用途，所述药物优选用于治疗肿瘤或癌症或者用于治疗炎症疾病和/或自身免疫病。

29. 项 28 所述的用途，其中所述肿瘤或癌症选自：

急性淋巴母细胞性白血病、急性髓性白血病、胆癌、乳腺癌、子宫颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、胃癌、头颈癌、何杰金氏淋巴瘤、肺癌、骨髓甲状腺癌、非何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、肾癌、卵

巢癌、胰腺癌、神经胶质瘤、黑素瘤、肝癌、前列腺癌、膀胱癌、神经内分泌癌、胃肠胰肿瘤、外分泌胰腺癌和尤因肉瘤。

30. 项 28 所述的用途，其中所述炎症疾病和/或自身免疫病选自以下组成的组：

类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、银屑病、银屑病性关节炎、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、全身性红斑狼疮、青少年糖尿病、自身免疫性葡萄膜炎、多发性硬化、帕金森病、阿耳茨海默氏病和缺血-再灌注损伤。

31. 用于治疗肿瘤或癌症或炎症疾病和/或自身免疫病的方法，包括施用项 1-25 中任一项所述的抗体偶联物或项 26 或 27 所述的药物组合物。

32. 根据任一前述项所述的抗体偶联物、药物组合物、用途或方法，其中所述抗体偶联物还包含其他抗体部分，所述其他抗体部分特异性结合细胞毒性效应细胞或靶细胞。

33. 根据任一前述项所述的偶联物、药物组合物、用途或方法，其中所述细胞毒性效应细胞包含选自 T 细胞、NK 细胞和 NKT 细胞的细胞，所述细胞毒性效应细胞优选选自 T 细胞、NK 细胞、NKT 细胞和 CIK 细胞。

34. 根据任一前述项所述的偶联物、药物组合物、用途或方法，其中所述抗体包含特异性结合抗原 CD123 的结合部分。

35. 根据任一前述项所述的偶联物、药物组合物、用途或方法，其中所述抗体包含特异性结合抗原 CD89 的结合部分。

附图简述

图 1 为双特异性抗体 BiTE(CD16-MUC1)的结构示意图。

图 2 显示双特异性抗体 BiTE(CD16-MUC1)的纯化电泳图。

图 3 为双特异性抗体 BiTE(CD16-CEA)的结构示意图。

图 4 显示双特异性抗体 BiTE(CD16-CEA)的表达与纯化。图 4A 显示 Ni-NTA 纯化过程分析；图 4B 显示 Q-sepharose HP 纯化过程分析。

图 5 显示双特异性抗体 BiTE(CD16-MUC1)及抗体偶联物 BiTE(CD16-MUC1)-PLGA 联合 NK 细胞对肺癌细胞 A549（人非小细胞肺癌细胞）的杀伤率。

图 6 显示双特异性抗体 BiTE(CD16-CEA)及抗体偶联物 BiTE(CD16-CEA)-PLGA 联合 NK 细胞对肠癌细胞 HCT116 的杀伤率。

图 7 显示双特异性抗体 CD16-MUC1 BiTE 及抗体偶联物 CD16-MUC1 BiTE+PLGA 联合 NK 细胞对肺癌细胞 A549（人非小细胞肺癌细胞）的杀伤率。

图 8 显示双特异性抗体 BiTE(CD3-MUC1)及抗体偶联物 BiTE(CD3-MUC1)-PLGA 在 37°C 下放置不同时间后联合 NK 细胞对肺癌细胞 A549（人非小细胞肺癌细胞）的杀伤率。

图 9 显示双特异性抗体 CD3-CEA BiTE 及抗体偶联物 CD3-CEA BiTE+PLGA NPs 联合 T 细胞对肺癌细胞 A549（人非小细胞肺癌细胞）的杀伤率。

图 10 显示了用于制备双特异性抗体 CD3-CEA BiTE (即 CEA-S-Fab)的目的片段 HCBF-6 (NcoI-UCHT1-VH-HindIII-CH-XhoI-CEA-Flag) 和 HCBF-6 (NcoI-UCHT1-VH-HindIII-CH-XhoI-CEA-Flag)的序列。

具体实施方案

在描述本发明方法和组合物之前,应当理解,本发明并不局限于所述的特定方法或组合物,因此当然可能会有所不同。还应当理解的是,本文所使用的术语仅用于描述特定的实施方案,并非限制性的。描述实施例是为本领域的普通技术人员提供如何制造和使用本发明的完整的公开内容和描述,并非旨在限制发明人视为其发明的范围,也并非旨在表示下面的实验是进行的全部或仅有的实验。已经努力确保所用数字(例如量、温度等)的准确度,但一些实验误差和偏差应该予以考虑。

除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有如由本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。现在描述一些潜在的和优选的方法和材料,尽管类似或等同于本文描述的任何方法和材料可以用于实施或测试本发明。本文提及的所有出版物在此通过引用并入,以公开和描述与所引用的出版物有关的方法和/或材料。可以理解的是,存在矛盾的情况下,以本公开内容取代所引用的出版物中的任何公开内容。

如在阅读本公开内容时对本领域技术人员显而易见的,每个本文所述和说明的单独的实施方案具有分立的组件和特征,其可容易地与其他若干实施方案中的特征分离或结合,而不脱离本发明的范围或实质。可以按所列举事件的顺序或逻辑上可能的任何其他顺序实施任何列举的方法。

除非另外说明,否则本文和所附权利要求中所用的“一个(种)”意指“一个(种)或多个(种)”。

当提供数值范围时,应当理解,该范围的上限和下限之间的每个中间值(至下限单位的十分之一)也被具体地公开,除非上下文另有明确说明。在所述范围中的任何所述值或中间值之间的各个较小的范围以及在所述范围内的其他所述值或中间值包含在本发明之内。这些较小范围的上限和下限可独立地包含在该范围内或排除在该范围之外,并且服从于所述范围中任何所特定地排除的,其中上下限中任一个或两个或无一个包含在所述较小范围内的每个范围也包含在本发明内。当所述范围包含一个或两个界限,除去任一或两个那些包含在内的界限的范围也包含在本发明中。

本文所使用的“抗体”是指全长(即天然存在的或由正常免疫球蛋白基因片段重排过程形成的)免疫球蛋白分子(例如 IgG 抗体)或免疫球蛋白分子的免疫活性(即特异性结合)部分,如抗体片段。“抗体”包括单克隆抗体、多克隆抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、鼠类抗体、重链抗体(如骆驼抗体)、嵌合抗体、人源化和人抗体等。“重链抗体”是仅含有重链而不含轻链的抗体,例如骆驼抗体、软骨鱼如鲨鱼抗体等等。

“抗体片段”是完整抗体的一部分,诸如 F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv、dAb 等等。无论结构如何,抗体片段结合与全长抗体所识别的相同抗原。举例来说,抗体片段包括由可变区组成的经分离片段,诸如由重链或轻链可变区组成的“Fv”片段或轻链与重链可变区通过肽连接子连接的重链单链多肽分子(“scFv 蛋白”)。“单链抗体”通常缩写

为“scFv”，由包含 V_H 和 V_L 结构域的多肽链组成，所述结构域相互作用以形成抗原结合位点。V_H 和 V_L 结构域通常通过具有 1 至 25 个氨基酸残基的肽连接。抗体片段还包括双功能抗体、三功能抗体和单结构域抗体(dAb)。“抗体片段”也包括重链抗体的片段，如单域抗体(sdAb)或包含可变区的片段。

“多特异性抗体”是可以同时结合至少两个具有不同结构的靶标(例如两个不同的抗原、同一抗原上的两个不同的表位)的抗体。“双特异性抗体”是可以同时结合两个具有不同结构的靶标的抗体。所用的双特异性抗体或多特异性抗体可以已知类型的抗体。例如，所述多特异性抗体(如双特异性抗体)可以是单链可变片段(scFv)衍生的形式、包含重链抗体可变区片段的形式、基于免疫球蛋白 G(IgG) 的形式以及上述形式的组合。所述多特异性抗体(如双特异性抗体)可以是双抗体、串联双抗体、BiTe(双特异性 T 细胞衔接体)、DART(双亲和力再靶向)、Triomab 和 DVD-Ig(双可变域抗体)，可以是单链双功能抗体(single-chain diabody, scDb，例如为双特异性单体 scDb)、串联 scDb (tandem scDb, Tandab)、线性二聚 scDb (linear dimeric scDb, LD-scDb)、环状二聚 scDb (circular dimeric scDb, CD-scDb)、串联二 scFv (tandem di-scFv，例如双特异性 T 细胞衔接体 (BiTE))、串联三 scFv (tandem tri-scFv)、三功能抗体(tri(a)body)、双特异性 Fab2、二小型抗体(di-miniantibody)、四功能抗体(tetrabody)、scFv-Fc-scFv 融合物、与 Fab 融合的单域抗原结合片段(S-Fab)(参见例如 CN106188305A)、二双功能抗体(di-diabody)、DVD-Ig、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv2-Fc、IgG-scFv 融合物、钮入孔物(KiH)、停靠和锁定(Dock and Lock)(DNL))复合物(参见例如 CN101534865A)和双体(DuoBodies)，所述 IgG-scFv 融合物可以为 bsAb、Bs1Ab、Bs2Ab、Bs3Ab、Ts1Ab 或 Ts2Ab。所述多特异性抗体也可以是包含两个或更多个重链抗体可变区的多特异性抗体，如双特异性抗体。

所述多特异性抗体可以包含结合白细胞的第一结合部分和结合疾病相关的或有待清除的细胞(靶细胞)上的抗原的第二结合部分。所述第一结合部分和/或第二结合部分可以具有一种或多种结合特异性。

示例性 T 细胞上的抗原包括 CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD69 和 CD90。对于 NK 细胞，其它示例性抗原可以选自 CD8、CD16、CD56、CD57、ADAM17 和 CD137；对于单核细胞，示例性抗原可以选自 CD74、HLA-DR α 链、CD14、CD16、CD64 和 CD89；而对于嗜中性粒细胞，示例性抗原包括 CEACAM6、CEACAM8、CD16b、CD32a、CD89、CD177、CD11a、CD11b 和 SLC44A2。在优选的实施方案中，针对 NK 的第一结合部分结合于 CD16 或 CD56。如以下所论述，疾病相关抗原，诸如肿瘤相关抗原(TAA)或病原体表达的抗原的许多实例是已知的。优选 TAA 是 MUC1、CD19、CD20、CD33、CD38、EGFR 和 HER2。

在某些实施方案中，靶细胞上的抗原可以是癌细胞受体或癌症相关抗原，特别选自以下的抗原：B 细胞系抗原(CD19、CD20、CD21、CD22、CD23 等)、VEGF、VEGFR、EGFR、癌胚抗原(CEA)、胎盘生长因子(PlGF)、腱生蛋白、HER-2/neu、EGP-1、EGP-2、

CD25、CD30、CD33、CD38、CD40、CD45、CD52、CD74、CD80、CD138、NCA66、CEACAM1、CEACAM6 (癌胚抗原相关细胞粘连分子 6)、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC16、IL-6、甲胎蛋白(AFP)、A3、CA125、结肠特异性抗原-p (CSAp)、叶酸受体、HLA-DR、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、Ia、EL-2、胰岛素样生长因子(IGF)和 IGF 受体、KS-1、Le(y)、MAGE、坏死抗原、PAM-4、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、Pr1、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、S100、T101、TAC、TAG72、TRAIL 受体和碳酸酐酶 IX。

在某些实施方案中，所述靶细胞也可以是炎症疾病和/或自身免疫病相关的细胞。所述炎症疾病和/或自身免疫病例如可以选自由以下组成的组：类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、银屑病、银屑病性关节炎、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、全身性红斑狼疮、青少年糖尿病、自身免疫性葡萄膜炎、多发性硬化、帕金森病、阿耳茨海默氏病和缺血-再灌注损伤。

所述靶细胞也可以是病原体或感染了病原体的细胞。所述病原体例如可以为细菌、病毒或真菌等致病生物体。

可用于要求保护的抗体偶联物中的结合部分优选为抗体或其片段。用于制备实际上针对任何靶抗原的单克隆抗体的技术在本领域中是熟知的。也可以使用已知的和/或市售的抗体。例如，可以使用选自以下的抗体：hR1 (抗 IGF-1R)、hPAM4 (抗粘蛋白)、KC4 (抗粘蛋白)、hA20 (抗 CD20)、hA19 (抗 CD19)、hIMMU31 (抗 AFP)、hLL1 (抗 CD74)、hLL2 (抗 CD22)、RFB4 (抗 CD22)、hMu-9 (抗 CSAp)、hL243 (抗 HLA-DR)、hMN-14 (抗 CEACAM5)、hMN-15 (抗 CEACAM6)、hRS7 (抗 TROP-2)、hMN-3 (抗 CEACAM6)、CC49 (抗 TAG-72)、J591 (抗 PSMA)、D2/B (抗 PSMA)、G250 (抗碳酸酐酶 IX)、英夫利昔单抗(抗 TNF- α)、聚乙二醇化赛妥珠单抗(certolizumab pegol) (抗 TNF- α)、阿达木单抗(抗 TNF- α)、阿仑单抗(抗 CD52)、贝伐单抗(抗 VEGF)、西妥昔单抗(抗 EGFR)、吉姆单抗(抗 CD33)、替伊莫单抗(抗 CD20)、帕尼单抗(panitumumab)(抗 EGFR)、利妥昔单抗(抗 CD20)、托西莫单抗(抗 CD20)、GA101 (抗 CD20)、曲妥单抗(抗 HER2/neu)、帕妥珠单抗、托珠单抗(tocilizumab)(抗 IL-6 受体)、巴利昔单抗(抗 CD25)、达克珠单抗(抗 CD25)、依法利珠单抗(efalizumab) (抗 CD11a)、莫罗单抗(muromonab)-CD3 (抗 CD3 受体)、那他珠单抗(抗 α 4 整合素)、BWA-3 (抗组蛋白 H2A/H4)、LG2-1 (抗组蛋白 H3)、MRA12 (抗组蛋白 H1)、PR1-1 (抗组蛋白 H2B)、LG11-2 (抗组蛋白 H2B)、LG2-2 (抗组蛋白 H2B)、P4/D10 (抗 gp120)和奥玛珠单抗(omalizumab)(抗 IgE)。可以使用上述抗体的片段。

用于治疗例如癌症的示例性抗体包括但不限于 LL1 (抗 CD74)、LL2 或 RFB4 (抗 CD22)、维妥珠单抗(hA20、抗 CD20)、利妥昔单抗(抗 CD20)、奥妥珠单抗(GA101、抗 CD20)、兰利珠单抗(抗 PD1)、尼鲁单抗(抗 PD1)、MK-3475 (抗 PD1)、AMP-224 (抗 PD1)、皮地珠单抗(抗 PD1)、MDX-1105 (抗 PD-L1)、MEDI4736 (抗 PD-L1)、MPDL3280A (抗 PD-L1)、BMS-936559 (抗 PD-L1)、伊匹单抗(抗 CTLA4)、曲维珠单抗(抗 CTLA4)、RS7 (抗上皮糖蛋白-1 (EGP-1, 也称为 TROP-2))、PAM4 或 KC4 (均为抗粘蛋白)、MN-14 (抗

癌胚抗原(CEA, 也称为 CD66e 或 CEACAM5)、MN-15 或 MN-3 (抗 CEACAM6)、Mu-9(抗结肠特异性抗原-p)、Immu 31 (抗甲胎蛋白)、R1 (抗 IGF-1R)、A19 (抗 CD19)、TAG-72 (例如 CC49)、Tn、J591 或 HuJ591 (抗 PSMA (前列腺特异性膜抗原))、AB-PG1-XG1-026 (抗 PSMA 二聚体)、D2/B (抗 PSMA)、G250 (抗碳酸酐酶 IX MAb)、L243 (抗 HLA-DR)、阿仑单抗(抗 CD52)、贝伐单抗(抗 VEGF)、西妥昔单抗(抗 EGFR)、吉姆单抗(抗 CD33)、替伊莫单抗(抗 CD20); 帕尼单抗(抗 EGFR); 托西莫单抗(抗 CD20); PAM4 (又名克里伏单抗, 抗粘蛋白)、BWA-3 (抗组蛋白 H2A/H4)、LG2-1 (抗组蛋白 H3)、MRA12 (抗组蛋白 H1)、PR1-1 (抗组蛋白 H2B)、LG11-2 (抗组蛋白 H2B)、LG2-2 (抗组蛋白 H2B)和曲妥单抗(抗 ErbB2)。此类抗体在本领域中是已知的。

纳米材料

用于偶联第一结合部分(例如抗体或其片段)和第二结合部分(例如抗体或其片段)的纳米材料可以是可药用的纳米材料, 优选为生物可降解纳米材料, 更优选为聚乳酸-羟基乙酸、聚乳酸、聚己内酯、聚丁二醇丁二酸酯、聚苯胺、聚碳酸酯、乙丙交酯共聚物或乙交酯己内酯共聚物中的任意一种或至少两种的混合物, 最优选为聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)、聚乳酸(PLA)和/或聚己内酯(PCL)。这些纳米材料及其制备方法是本领域已知的, 例如可以采用下文描述的方法制备所述纳米材料。

本发明抗体偶联物的制备

以下以包含偶联于纳米微粒的两种抗体的双特异性抗体偶联物为例, 描述本发明的多特异性抗体偶联物的制备方法。所述制备方法包括以下步骤:

(1) 纳米材料的制备、收集和活化;

(2) 将步骤(1)得到的纳米材料与第一抗体部分和第二抗体部分的混合物进行连接。

在步骤(1)中, 所述纳米材料的制备包括: 利用溶剂将纳米材料完全溶解, 搅拌, 加水, 形成均匀的乳浊液。其中所述搅拌可以在 500-20000rpm/min 的转速下进行, 例如转速可以是 500rpm/min、700rpm/min、800rpm/min、1000rpm/min、1100rpm/min、1200rpm/min、1300rpm/min、1400rpm/min、1480rpm/min、1500rpm/min、2000rpm/min、2200rpm/min、2500rpm/min、3000rpm/min、3500rpm/min、4000rpm/min、4200rpm/min、4500rpm/min、5000rpm/min、5500rpm/min、6000rpm/min、6500rpm/min、7000rpm/min、7500rpm/min、8000rpm/min、8500rpm/min、9000rpm/min、9500rpm/min、10000rpm/min、11000rpm/min、12000rpm/min、13000rpm/min、14000rpm/min、15000rpm/min、16000rpm/min、17000rpm/min、18000rpm/min、19000rpm/min 或 20000rpm/min。必要时, 可以采用更高的转速。

优选地, 所述纳米材料为聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)、聚乳酸(PLA)、聚己内酯(PCL)、聚丁二醇丁二酸酯、聚苯胺、聚碳酸酯、乙丙交酯共聚物或乙交酯己内酯共聚物中的任意一种或至少两种的混合物。

优选地, 所述溶剂为丙酮、丁酮、甲醇、乙醇或异丙醇中的任意一种或至少两种的

混合物。

优选地，所述纳米材料的收集包括：通过离心收集制备的纳米材料，然后用去离子水重悬，重复操作 2 次洗涤纳米材料。所述离心可以在 8000-15000rpm/min 的转速下进行，例如转速可以是 8000rpm/min、9000rpm/min、10000rpm/min、11000rpm/min、12000rpm/min、13000rpm/min、14000rpm/min、14500rpm/min、14800rpm/min、15000rpm/min。必要时，可以采用更高的转速。可以采用其他方法收集或进一步纯化纳米材料（纳米微粒）。纳米微粒可以具有如上所述的平均粒径

优选地，所述纳米材料的活化包括：用 1-10mg/mL 的 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐（EDS）和 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）混合溶剂于室温活化纳米材料 0.5-5h。

本发明的步骤（2）中，所述连接包括：活化后的纳米材料通过离心收集，然后用连接反应液洗涤纳米材料 1 次。将需要连接的双特异性抗体（和任选的其他抗体部分等量混合）加入到连接反应液，然后用含有所述双特异性抗体（和任选的其他抗体部分）的连接反应液重悬纳米材料，于室温进行接反应 0.5-5h。反应结束后离心收集纳米材料，用杜氏磷酸盐缓冲溶液洗涤纳米材料 2 次，然后再重悬到杜氏磷酸盐缓冲溶液（D-PBS）中放 4℃ 保存备用。可以采用其他方法进行纳米材料的活化。

本发明抗体偶联物的制备方法例如具体包括以下步骤：

（1）纳米材料的制备：利用丙酮将纳米材料完全溶解至浓度为 5-30mg/mL，按照丙酮和去离子水 1:4 的体积比，在 500-1500rpm/min 磁力搅拌的状态下将纳米材料与丙酮的溶液加入去离子水中，形成均匀的乳浊液，然后继续搅拌至丙酮挥发；

（2）纳米材料的收集：8000-15000rpm/min 离心收集制备的纳米材料，然后用去离子水重悬，重复操作 2 次洗涤纳米材料；也可以进一步纯化纳米材料，以获得适当大小的纳米材料；

（3）纳米材料的活化：利用 1-10mg/mL 的 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和 N-羟基琥珀酰亚胺混合溶剂室温活化纳米材料 0.5-5h；

（4）纳米材料连接抗体：将活化后的纳米材料离心收集，然后用 0.1 M、pH=8.0 的杜氏磷酸盐缓冲溶液洗涤纳米材料 1 次，将需要连接的双特异性抗体（和任选的其他抗体部分等量混合）加入到连接反应液，然后用含有所述双特异性抗体（和任选的其他抗体部分）的连接反应液重悬纳米材料，室温连接反应 0.5-5h，反应结束后离心收集纳米材料，用杜氏磷酸盐缓冲溶液洗涤纳米材料 2 次，然后再重悬到杜氏磷酸盐缓冲溶液中放 4℃ 保存备用。

药物组合物

本发明还涉及包含所述抗体偶联物的药物组合物。所述药物组合物还可以包含白细胞，例如 T 细胞、NK 细胞。

本文的药物组合物可使用一种或多种生理上可接受的载体进行配制，该载体包含促进活性剂进入药学上使用的制剂的过程的赋形剂和助剂。适当的配制依赖于所选的施途径。例如，药物组合物的概述可以在例如以下文献中找到：Ansel 等，

PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 第 5 版 (Lea & Febiger 1990); 和 Gennaro (编), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第 18 版(Mack Publishing Company 1990)和其修订版。本文公开的药物组合物可进一步包含药学上可接受的一种或多种稀释剂、赋形剂或载体。所述药物组合物可包含医药或药物剂、载体、佐剂诸如防腐剂、稳定剂、润湿剂或乳化剂、溶解促进剂、用于调节渗透压的盐和/或缓冲剂。

此外, 该药物组合物还可以含有在治疗上有价值的其他物质, 诸如一种或多种治疗疾病的其他治疗剂。例如, 其他治疗剂可以是用于治疗癌症的其他药剂, 例如环磷酰胺、依托泊苷、卡莫司汀、长春新碱等, 也可以用于用于治疗癌症的抗体、抗体-药物缀合物(ADC)、干扰素和/或检查点抑制子抗体。

治疗性治疗方法

各种实施方案涉及治疗受治疗者(诸如哺乳动物, 包括人、驯养或伴侣宠物, 诸如犬和猫)的疾病或病症(如癌症)的方法, 其包括向受治疗者施用治疗有效量的本文所述的偶联物或药物组合物。

本文所述的抗体偶联物或药物组合物可以经配制, 经皮下或甚至通过其它肠胃外途径, 诸如经静脉内、肌肉内、腹膜内或血管内施用于哺乳动物, 经由例如推注或连续输注用于静脉内施用。优选地, 抗体偶联物或药物组合物输注持续少于约 4 个小时的时间, 且更优选地持续少于约 3 个小时的时间。举例来说, 第一次推注可在 30 分钟, 优选地甚至 15 分钟内输注, 且其余部分在接下来的 2-3 小时内输注。注射制剂可以呈单位剂型提供, 例如, 在安瓿或多剂量容器中, 其中添加防腐剂。组合物可采用诸如于油性或水性媒剂中的混悬液、溶液或乳液的形式, 并且可含有配制剂, 诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。替代地, 活性成分可呈在使用前用合适的媒剂(例如无菌无热原质水)复原的粉末形式。

可以采用额外药学方法来控制治疗性抗体偶联物、药物组合物和/或其他治疗剂的作用持续时间。可以通过使用聚合物以复合或吸附欲施用的药剂来制备控制释放制剂。举例来说, 生物相容性聚合物包括聚(乙烯-乙酸乙烯酯)共聚物基质和硬脂酸二聚体与癸二酸的聚酐共聚物基质。Sherwood 等, Bio/Technology 10: 1446 (1992)。从此类基质释放的速率取决于治疗剂的分子量、基质内的药剂的量, 和分散粒子的大小。Saltzman 等, Biophys. J. 55: 163 (1989); Sherwood 等, 同上。其它固体剂型描述于以下文献中: Ansel 等, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 第 5 版 (Lea & Febiger 1990); 以及 Gennaro (编), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第 18 版(Mack Publishing Company 1990)和其修订版。

更一般来说, 所述的抗体偶联物用于人类的施用剂量将取决于诸如患者年龄、体重、身高、性别、一般医学病状和既往病史的因素而变化。可能需要给接受者提供在约 0.1 μ g/kg-25mg/kg 范围内的作为单次静脉输注的抗体偶联物剂量(以多特异性抗体偶联物中的第一结合部分和第二结合部分的总量计), 但也可以施用更低或更高的剂量, 视情况决定。举例来说, 对于 70 kg 患者, 0.1 μ g/kg -20mg/kg 的剂量是 0.7 μ g -1400 mg。

需要时剂量可以重复,例如每周一次持续 4-10 周、每周一次持续 8 周或每周一次持续 4 周。在维持疗法中,需要时其还可以较低频率给予,诸如每隔一周一次持续若干个月,或者每月或每季度一次持续许多个月。也可以每个疗程连续施用 2 次、3 次、4 次、5 次或 6 次,在连续施用后间隔例如约 10 天、15 天、20 天、25 天、30 天、35 天、40 天、45 天、50、55 天或 60 天或更长时间再进行下一个疗程。

所述的抗体偶联物可以与效应细胞如白细胞(诸如 T 细胞、NK 细胞)一起施用,例如一起静脉回输。当抗体偶联物与效应细胞一起施用,例如每周一次持续 4-10 周、每周一次持续 8 周或每周一次持续 4 周。在维持疗法中,需要时抗体偶联物与效应细胞还可以较低频率给予,诸如每隔一周或数周一次持续若干个月,或者每月或每季度一次持续许多个月。也可以每个疗程连续施用 2 次、3 次、4 次、5 次或 6 次,在连续施用后间隔例如约 10 天、15 天、20 天、25 天、30 天、35 天、40 天、45 天、50、55 天或 60 天或更长时间再进行下一个疗程。

一般来说,其他治疗剂用于人类的施用剂量将取决于诸如患者年龄、体重、身高、性别、一般医学病状和既往病史的因素而变化。可能需要给接受者提供在约 1 mg/kg 至 25 mg/kg 范围内的作为单次静脉输注的抗体偶联物剂量,但也可以施用更低或更高的剂量,视情况决定。举例来说,对于 70 kg 患者,1-20 mg/kg 的剂量是 70-1,400 mg。需要时剂量可以重复,例如每周一次持续 4-10 周、每周一次持续 8 周或每周一次持续 4 周。在维持疗法中,需要时其还可以较低频率给予,诸如每隔一周一次持续若干个月,或者每月或每季度一次持续许多个月。

其他治疗剂可以按照每 2 周或 3 周一个剂量施用,总共重复至少 3 个剂量。或者,所述组合可以每周施用 2 次,持续 4 至 6 周。如果使剂量降至约 200-300 mg/m² (对于 1.7 m 患者是每剂 340 mg,或对于 70 kg 患者是 4.9 mg/kg),则其可每周施用一次或甚至两次持续 4 至 10 周。替代地,给药时程可减少,即,每 2 或 3 周一次持续 2-3 个月。然而已经确定,甚至可通过缓慢 i.v. 输注施用甚至更高的剂量,诸如 20 mg/kg 每周一次或每 2-3 周一次,用于重复给药循环。给药时程可任选地以其它间隔重复,且剂量可在对剂量和时程进行适当调节的情况下通过各种胃肠外途径给予。

在优选的实施方案中,本文所述的抗体偶联物或药物组合物可用于治疗癌症疗法。癌症的实例包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、成胶质细胞瘤、黑素瘤、肉瘤和白血病、骨髓瘤或淋巴恶性疾病。此类癌症的更特定实例如下所述且包括:鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)、尤因氏肉瘤、韦尔姆斯氏肿瘤、星形细胞瘤、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌或胃部癌症(包括胃肠癌)、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、肝细胞癌瘤、神经内分泌肿瘤、甲状腺髓样癌、甲状腺分化癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾脏癌或肾癌、前列腺癌、阴门癌、肛门癌、阴茎癌以及头颈癌。术语“癌症”包括原发性恶性细胞或肿瘤(例如细胞未迁移至受治疗者体内除原始恶性病或肿瘤部位以外的部位的肿瘤)和继发性恶性细胞或肿瘤(例如由转移,即,恶性细胞或肿瘤细胞迁移至与原始肿瘤部位不同的次级部位而产生的肿瘤)。得益

于本发明的治疗方法的癌症涉及表达、过度表达或异常表达 IGF-1R 的细胞。

癌症或恶性病的其它实例包括但不限于：急性儿童成淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、肾上腺皮质癌、成人(原发性)肝细胞癌、成人(原发性)肝癌、成人急性淋巴细胞性白血病、成人急性骨髓性白血病、成人何杰金氏淋巴瘤、成人淋巴细胞性淋巴瘤、成人非何杰金氏淋巴瘤、成人原发性肝癌、成人软组织肉瘤、AIDS 相关性淋巴瘤、AIDS 相关性恶性病、肛门癌、星形细胞瘤、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑干神经胶质瘤、脑瘤、乳腺癌、肾盂和输尿管癌、中枢神经系统(原发性)淋巴瘤、中枢神经系统淋巴瘤、小脑星形细胞瘤、大脑星形细胞瘤、宫颈癌、儿童(原发性)肝细胞癌、儿童(原发性)肝癌、儿童急性成淋巴细胞性白血病、儿童急性骨髓性白血病、儿童脑干神经胶质瘤、儿童小脑星形细胞瘤、儿童大脑星形细胞瘤、儿童颅外胚细胞瘤、儿童何杰金氏病、儿童何杰金氏淋巴瘤、儿童下丘脑和视通路神经胶质瘤、儿童成淋巴细胞性白血病、儿童成神经管细胞瘤、儿童非何杰金氏淋巴瘤、儿童松果体和幕上原始神经外胚层瘤、儿童原发性肝癌、儿童横纹肌肉瘤、儿童软组织肉瘤、儿童视通路和下丘脑神经胶质瘤、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、结肠癌、皮肤 T 细胞淋巴瘤、内分泌胰岛细胞癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、上皮癌、食道癌、尤因氏肉瘤和相关肿瘤、外分泌胰腺癌、颅外胚细胞瘤、性腺外胚细胞瘤、肝外胆管癌、眼癌、女性乳癌、高歇氏病、胆囊癌、胃部癌、胃肠道良性肿瘤、胃肠道肿瘤、胚细胞瘤、妊娠性滋养层细胞瘤、毛细胞白血病、头颈癌、肝细胞癌、何杰金氏淋巴瘤、高丙种球蛋白血症、下咽癌、肠癌、眼内黑素瘤、胰岛细胞癌、胰岛细胞胰腺癌、卡波济氏肉瘤、肾癌、喉癌、唇口腔癌、肝癌、肺癌、淋巴增生性疾病、巨球蛋白血症、男性乳腺癌、恶性间皮瘤、恶性胸腺瘤、成神经管细胞瘤、黑素瘤、间皮瘤、转移性原发灶隐匿性鳞状颈癌、转移性原发性鳞状颈癌、转移性鳞状颈癌、多发性骨髓瘤、多发性骨髓瘤/浆细胞赘瘤、骨髓发育不良综合症、髓细胞性白血病、骨髓性白血病、骨髓增生性疾病、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、非何杰金氏淋巴瘤、非黑素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌、转移性原发灶隐匿性鳞状颈癌、口咽癌、骨肉瘤/恶性纤维肉瘤、骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤、骨肉瘤/骨骼的恶性纤维组织细胞瘤、卵巢上皮癌、卵巢胚细胞瘤、卵巢低恶性潜能肿瘤、胰腺癌、病变蛋白血症、真性红细胞增多症、副甲状腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性肝癌、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌、肾盂和输尿管癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉状瘤病肉瘤、塞扎里综合症、皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状颈癌、胃癌、幕上原始神经外胚层和松果体瘤、T 细胞淋巴瘤、睾丸癌、胸腺瘤、甲状腺癌、肾盂和输尿管的移行迁移细胞癌、移行迁移肾盂和输尿管癌、滋养层细胞瘤、输尿管和肾盂细胞癌、输尿管癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、视通路和下丘脑神经胶质瘤、阴门癌、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、韦尔姆斯氏瘤和位于以上所列出的器官系统中的除赘瘤以外任何其它过度增生性疾病。

本文中所描述和要求保护的抗体偶联物、组合物和方法可用于治疗恶性或恶变前病状和预防进展成赘生性或恶性状态，包括但不限于上文所描述的那些病症。指示此类用

途用于已知或疑似提前进展成赘瘤或癌症的病状，特别是在已发生由增生、化生或最特别的是发育不良组成的非赘生性细胞生长的情况下(关于此类异常生长病状的综述，参见 Robbins 和 Angell, BASIC PATHOLOGY, 第 2 版, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 第 68-79 页(1976))。

发育不良往往是癌症的前兆，并且主要发现于上皮中。它是非赘生性细胞生长的最无序形式，涉及个别细胞一致性和细胞结构定向的丧失。在存在慢性刺激或炎症的情况下，特征性地发生发育不良。可以治疗的发育不良病症包括但不限于：无汗性外胚层发育不良、前面部发育不良、室息性胸廓发育不良、心房-手指发育不良、支气管肺发育不良、大脑发育不良、宫颈发育不良、软骨外胚层发育不良、锁骨颅骨发育不良、先天性外胚层发育不良、颅骨干发育不良、颅腕跗发育不良、颅骨干骺端发育不良、牙本质发育不良、骨干结构不良、外胚层发育不良、牙釉质发育不良、脑性眼球发育不全、偏侧骨骺发育不良、多发性骨骺发育不良、点状骨骺发育不良、上皮异常增生、面指生殖器发育不良、家族性颌骨纤维性发育不良、家族性白色皱褶性发育不良、纤维肌肉发育不良、骨纤维性结构不良、旺盛骨性发育不良、遗传性肾视网膜发育不良、有汗性外胚层发育不良、少汗性外胚层发育不良、淋巴细胞减少性胸腺发育不良、乳腺发育不良、下颌骨颜面发育不良、干骺端发育不良、蒙蒂尼氏发育不良、单骨纤维性骨发育不良、粘液上皮发育不良、多发性骨骺发育不良、眼耳脊椎发育不良、眼齿指发育不良、眼椎骨发育不全、牙源性发育不良、眼下颌骨发育不良、根尖周牙骨质结构不良、多骨纤维性结构不良、假性软骨发育不全性脊椎骨骺发育不良、视网膜发育不良、中隔-眼发育不良、脊椎骨骺发育不良和脑室径向发育不良。

可以治疗的其它赘生前病症包括但不限于良性异常增生性病状(例如良性肿瘤、纤维囊性病状、组织肥大、肠息肉或腺瘤和食道发育不良)、粘膜白斑病、角化病、博文氏病、农夫皮肤、日光性唇炎和日光性角化病。

在优选的实施方案中，使用本发明的方法抑制癌症，特别是上文所列出的癌症的生长、进展和/或转移。

其它过度增生性疾病、病症和/或病状包括但不限于恶性病和相关病症的进展和/或转移，诸如白血病(包括急性白血病(例如急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓细胞性白血病(包括成骨髓细胞性、早幼粒细胞性、骨髓单核细胞性、单核细胞性和红白血病)) and 慢性白血病(例如慢性骨髓细胞性(粒细胞性)白血病和慢性淋巴细胞性白血病))、真性红细胞增多症、淋巴瘤(例如何杰金氏病和非何杰金氏病)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链病和实体肿瘤，包括但不限于肉瘤和癌瘤，诸如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、韦尔姆斯氏瘤、宫颈癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松

果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑脊膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤和成视网膜细胞瘤。

药盒/试剂盒

各种实施方案可涉及含有适合治疗或诊断患者的患病组织的组分的药盒/试剂盒。示例性药盒/试剂盒可以含有如本文中所描述的一种或多种抗体偶联物、药物组合物、白细胞和/或其他治疗剂。如果未配制含有供施用的多种组分的组合物以便经由消化道递送，诸如通过口服递送，则可以包括能够通过一些其它途径递送试剂盒组分的装置。用于诸如肠胃外递送的应用的一种类型装置是注射器，其用于将组合物注入受治疗者体内。还可以使用吸入装置。在某些实施方案中，治疗剂可以呈含有无菌液体制剂或冻干制剂的预填充式注射器或自动注射笔形式提供。

药盒/试剂盒组分可以包装在一起或分隔于两个或更多个容器中。在一些实施方案中，容器可以是含有适合于复原的组合物的无菌冻干制剂的小瓶。药盒/试剂盒还可以含有一种或多种适合于复原和/或稀释其它试剂的缓冲液。可以使用的其它容器包括但不限于袋、盘、盒、管等等。药盒/试剂盒组分可以无菌包装和维持于容器中。可以包括的另一个组件是给药盒/试剂盒使用者的说明书。

实施例

提供以下实施例用于说明本发明，而非限制本发明的权利要求。

实施例 1. 抗 CD16 VHH-抗 MUC1 VHH 双特异性纳米抗体的制备

1. 抗 CD16 VHH-抗 MUC1 VHH 双特异性纳米抗体核苷酸序列的设计和合成

抗 CD16 VHH-抗 MUC1 VHH 双特异性纳米抗体在下文中简称 BiTE(CD16-MUC1)，其中抗 MUC1 VHH 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:1，抗 CD16 VHH 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:2，连接肽的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:3。根据该双特异性抗体的序列和连接形式，重新设计和优化核苷酸序列，并在该序列的 5'端加入 NcoI 酶切位点，在其 3'端加入 Hind III 酶切位点。直接合成 DsbA-anti-MUC1 VHH-GS-anti-CD16 VHH-6His，并通过双酶切连接到载体 pETDuet 中，形成表达质粒。BiTE(CD16-MUC1)的结构示意图如图 1 所示。

2. 载体转化 BL21(DE3)

将质粒转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞株，选取阳性克隆，在含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基(3mL)中 37 $^{\circ}$ C 过夜培养，菌液 5000rpm 常温离心弃上清，所得的大肠杆菌用 Qiagen 公司的质粒提取试剂盒裂解并提取质粒，获得表达载体。

3. BiTE(CD16-MUC1)的表达与纯化

纯化后的 pETDuet-bsAb 表达载体，转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株，选取阳性克隆，在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基(3mL)中 37 $^{\circ}$ C 过夜培养，转移到含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 300mL LB 中，37 $^{\circ}$ C 培养至 OD600 在 0.6-0.8，加入终浓度为 0.05mM 的 IPTG，16 $^{\circ}$ C 诱导 16 小时。4000rpm，离心弃上清，沉淀按照 1:4 的重量体积比加入 20mM Tris-HCl, pH8.0, 25%蔗糖，1mM EDTA 溶液，重悬后冰浴 30min，8500g，4 $^{\circ}$ C 离心 20 分钟，保留上清。沉淀按照 1:5 的重量体积比加入 5mM MgCl₂，1mg/mL 的溶菌酶溶液

重悬，冰浴 20min，8500g，4℃离心 20 分钟，取上清。

结合：合并两次上清，过 2mL Ni-NTA(Qiagen 公司)重力沉降柱。

除杂：依次以 20mL 20mM Tris-HCl pH8.0，15mM 咪唑，1M NaCl 和 20mL 20mM Tris-HCl pH8.0，25mM 咪唑，1M NaCl 进行除杂。

洗脱：依次以 10mL 20mM Tris-HCl pH8.0，50mM 咪唑，0.15M NaCl、10mL 20mM Tris-HCl pH8.0，100mM 咪唑，0.15M NaCl、10mL 20mM Tris-HCl pH8.0，200mM 咪唑，0.15M NaCl、10mL 20mM Tris-HCl pH8.0，500mM 咪唑，0.15M NaCl 进行洗脱。

合并 50mM 咪唑、100mM 咪唑以及 200mM 咪唑洗脱组分，以 20mM PB，pH7.6，10%甘油 4℃透析过夜。

1mL Q-HP 纯化：透析过夜后含目标组分溶液，20000g，4℃离心 20min 后上样，上样流速 1mL/min，收集流穿组分进行超滤浓缩。

实验结果见图 2。

经过体外结合 MUC1 测试（流式细胞术和 Western blot），表明双特异性抗体 BiTE(CD16-MUC1)可特异结合 LS174T、HT29 以及 SKOV3 等细胞表达的 MUC1，而与 CHO、HepG2 中总蛋白无结合（数据未显示）。

实施例 2. 抗 CD16 VHH-抗 CEA VHH 双特异性纳米抗体的制备

抗 CD16 VHH-抗 CEA VHH 双特异性纳米抗体在下文简称 BiTE(CD16-CEA)，其结构示意图见图 3，其中抗 CEA VHH 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:4，抗 CD16 VHH 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:5。根据该双特异性抗体的序列和连接形式，重新设计和优化核苷酸序列，并在该序列的 5'端加入 NcoI 酶切位点，在其 3'端加入 Hind III 酶切位点。直接合成 DsbA-anti-CEA VHH-(GGGGS)3-anti-CD16 VHH-6His，并通过双酶切连接到载体 pETDuet 中，形成 pETDuet-bsAb 表达质粒。

按照实施例 1 所述的方法，进行载体转化和 BiTE(CD16-CEA)的表达与纯化。实验结果见图 4。

经过体外结合 MUC1 测试（流式细胞术和 Western blot），表明双特异性抗体 BiTE(CD16-MUC1)可特异结合 LS174T、HT29 以及 SKOV3-CEA 等细胞表达的 CEA，而与 SKOV3 中总蛋白无结合；阳性对照具有相同的实验结果（数据未显示）。

实施例 3. 双特异性抗体偶联物的制备

制备了分别具有偶联于 PLGA 纳米颗粒的 BiTE(CD16-MUC1)和 BiTE(CD16-CEA)的双特异性抗体偶联物（BiTE(CD16-MUC1)-PLGA 和 BiTE(CD16-CEA)-PLGA）。

双特异性抗体偶联物的具体制备方法如下：

（1）PLGA 纳米颗粒的制备：用丙酮将 PLGA 完全溶解至浓度为 5mg/mL，按照丙酮和去离子水 1:4 的体积比，在 1000rpm/min 磁力搅拌的状态下将 PLGA 与丙酮的溶液加入去离子水中，形成均匀的乳浊液，然后继续搅拌至丙酮挥发；

（2）PLGA 纳米颗粒的收集：以 8000rpm/min 离心 10min 收集制备的较大颗粒的纳米颗粒；再以 15000rpm/min 离心 10min 收集得到较小颗粒的纳米颗粒。弃去较大颗粒的纳米颗粒，较小颗粒的纳米颗粒用去离子水重悬，重复操作 2 次洗涤纳米颗粒。可

以进一步纯化纳米材料，以获得更小的纳米颗粒。使用较小颗粒的纳米颗粒分别进行如下操作：

(3) PLGA 纳米颗粒的活化：用 5mg/mL 的 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐和 N-羟基琥珀酰亚胺混合溶剂于室温下活化 PLGA 纳米颗粒 1h；

(4) PLGA 纳米颗粒连接抗体：活化后的纳米材料通过离心收集，然后用 0.1M、pH=8.0 的杜氏磷酸盐缓冲溶液洗涤纳米材料 1 次。将需要连接的 BiTE(CD16-MUC1) 或 BiTE(CD16-CEA) 加入到连接反应液，然后用含有所述 BiTE 的连接反应液重悬纳米材料，于室温下连接反应进行 0.5h。反应结束后离心收集纳米材料，用杜氏磷酸盐缓冲溶液洗涤纳米材料 2 次，然后再重悬到杜氏磷酸盐缓冲溶液中放 4℃ 保存备用。

实施例 4. 双特异性抗体偶联物对癌细胞的杀伤效力

对实施例 3 中制备的双特异性抗体偶联物杀伤肿瘤细胞的能力进行了评估。

具体而言，于 96 孔板中，以 5000 个靶细胞/孔培养 12h 后，弃原培养基。用无细胞因子的 X-vivo 15 培养基（购于 lonza 公司）调整 NK 细胞（用健康献血者的外周血单核细胞诱导扩增获得）密度，使 100μl 体积 NK 细胞数量为靶细胞 4 倍（效靶比为 4:1）。加 100μl NK 细胞悬液到癌细胞培养板中，并加入 10μl 制备的双特异性抗体偶联物（双特异性抗体偶联物含量为 0.2mg，含有 BiTE 0.2μg）或者双特异性抗体（BiTE(CD16-MUC1) 或 BiTE(CD16-CEA)）（0.2μg），于培养箱中孵育 8h。然后加入 CCK-8 试剂，按照试剂说明进行孵育。用酶标仪检测 450nm 处吸光值。对数据进行分析，按照以下公式计算 DC-CIK 细胞对癌细胞的杀伤率。

$$\text{杀伤率} = [1 - (\text{实验组} - \text{效应对照组}) / (\text{靶对照组} - \text{空白对照组})] \times 100\%$$

其中，空白对照表示加入培养基；靶对照组表示加入靶细胞+培养基；效应对照组表示加入效应细胞+培养基；实验组表示加入效应细胞+靶细胞+培养基+双特异性抗体偶联物。

结果示于表 1 和图 5-6 中。图 5 显示双特异性抗体 BiTE(CD16-MUC1) 及抗体偶联物 BiTE(CD16-MUC1)-PLGA 联合 NK 细胞对肺癌细胞 A549（人非小细胞肺癌细胞）的杀伤率。图 6 显示双特异性抗体 BiTE(CD16-CEA) 及抗体偶联物 BiTE(CD16-CEA)-PLGA 联合 NK 细胞对肠癌细胞 HCT116 的杀伤率。其中对照表示加入效应细胞+靶细胞+培养基；BiTE 表示加入效应细胞+靶细胞+培养基+ BiTE；BiTE-PLGA 表示加入效应细胞+靶细胞+培养基+ BiTE-PLGA（即双特异性抗体偶联物），其中 PLGA 纳米颗粒的平均粒径约为 50 nm。

表 1. 双特异性抗体和双特异性抗体偶联物对肿瘤细胞的杀伤能力比较(效靶比为 4:1)

癌细胞	杀伤率		
	效应对照组 (NK)	实验组	
		BiTE(CD16-MUC1)	BiTE(CD16-MUC1)-PLGA
A549	29.53%	59.53%	93.95%

		BiTE(CD16-CEA)	BiTE(CD16-CEA)-PLGA
HCT116	21.44%	85.42%	95.91%

实施例 5. 双特异性抗体偶联物对癌细胞的杀伤效力

按照实施例 3 的方法, 使用同样的双特异性抗体, 制备了 PLGA 纳米颗粒平均粒径约为 100-150nm 的双特异性抗体偶联物。另外, 使用同样的 PLGA 纳米颗粒制备 Muc1 VHH (其序列示于 SEQ ID NO:1) 偶联物作为对照。

对所制备的双特异性抗体偶联物杀伤肿瘤细胞的能力进行了评估。

具体而言, 于 96 孔板中, 以 5000 个靶细胞/孔培养 12h 后, 弃原培养基。用无细胞因子的 X-vivo 15 培养基 (购于 lonza 公司) 调整 NK 细胞 (用健康献血者的外周血单核细胞诱导扩增获得) 密度, 使 100 μ l 体积 NK 细胞数量为靶细胞 4 倍 (效靶比为 4:1)。加 100 μ l NK 细胞悬液到癌细胞培养板中, 并加入 10 μ l 制备的双特异性抗体偶联物 CD16-MUC1 BiTE+PLGA NPs (偶联物含量为 0.2mg, 含有 CD16-MUC1 BiTE 0.2 μ g) 或者双特异性抗体 (BiTE) (0.2 μ g), 或者加入作为对照的 Muc1+PLGA NPs (偶联物含量为 0.2mg, 含有 Muc1 VHH 0.1 μ g) 或 PLGA 纳米颗粒即 PLGA NPs (0.2mg)。于培养箱中孵育 48h。然后加入 CCK-8 试剂, 按照试剂说明进行孵育。用酶标仪检测 450nm 处吸光值。对数据进行统计分析, 按照以下公式计算 DC-CIK 细胞对癌细胞的杀伤率。

$$\text{杀伤率} = [1 - (\text{实验组} - \text{效应对照组}) / (\text{靶对照组} - \text{空白对照组})] \times 100\%$$

其中, 空白对照表示加入培养基; 靶对照组表示加入靶细胞+培养基; 效应对照组表示加入效应细胞+培养基; 实验组表示加入效应细胞+靶细胞+培养基+双特异性抗体偶联物。

结果示于表 2 和图 7 中。表 2 和图 7 显示双特异性抗体 BiTE 及抗体偶联物 BiTE-PLGA 联合 NK 细胞对肺癌细胞 A549 (人非小细胞肺癌细胞) 的杀伤率。其中对照 (control) 表示加入效应细胞+靶细胞+培养基; MUC1 + PLGA NPs 表示加入效应细胞+靶细胞+培养基+PLGA 纳米颗粒; BiTE 表示加入效应细胞+靶细胞+培养基+双特异性抗体; BiTE-PLGA NPs 表示加入效应细胞+靶细胞+培养基+双特异性抗体偶联物。

表 2. 双特异性抗体或双特异性抗体偶联物对肿瘤细胞 A549 的杀伤能力 (效靶比为 4:1)

实验分组	杀伤率
对照(control)	31.52%
PLGA 纳米颗粒 (PLGA NPs)	32.47%
MUC1 + PLGA NPs	32.50%
CD16-MUC1 BiTE	73.90%
CD16-MUC1 BiTE + PLGA NPs	83.40%

实施例 6. 双特异抗体偶联物的稳定性

在实施例 5 中所述的实验中, 同时对双特异性抗体及其偶联物的稳定性进行了测试。具体而言, 将双特异性抗体(CD16-MUC1 BiTE)及 PLGA 纳米颗粒平均粒径约为 100-150nm 的双特异性抗体偶联物(BiTE-PLGA)在 37 $^{\circ}$ C 下放置数天, 测试在 37 $^{\circ}$ C 下放置不同时间的抗体和抗体偶联物联合 NK 细胞对肺癌细胞 A549 (人非小细胞肺癌细胞)

的杀伤率。稳定性实验结果显示于图 8(三次以上代表性实验结果, 采用 spss 16.0, T 检验, $*p<0.05$, $**p<0.01$)。

图 8 所示结果表明: 在模拟人体温度 37℃的条件下, 经纳米颗粒修饰的双特异性抗体(抗体偶联物)经过 6 天(6d)后其活性仍然存在, 联合 NK 细胞对 A549 的杀伤率达到 56.81%。相比之下, 等量未经修饰的双特性抗体组杀伤率仅为 33.64%, 与不加双特性抗体时杀伤率 31.52%比起来无显著差异, 说明已经失去了活性。因此, 经纳米颗粒修饰后的双特异性抗体明显提高了其稳定性。

实施例 7. 双特异性抗体偶联物联合 T 细胞对癌细胞的杀伤效力

制备了双特异性抗体 CD3-CEA BiTE (即 CEA-S-Fab), 在所述双特异性抗体中, 特异性结合 CD3 的结合部分为抗 CD3 抗体的 Fab 片段, 而特异性结合 CEA 的结合部分为单域抗体部分。

简而言之, 为了构建 CEA-S-Fab, 将抗 CEA 单域抗体经基因工程连接至抗 CD3 VH-CH1 的 C 末端(Behar G 等, Protein Eng Des Sel. 2008; 21(1): 1 – 10)。将目的片段抗 CD3 VH-CH1-CEA VHH (即 HCBF-6(NcoI-UCHT1-VH-HindIII-CH- XhoI-CEA- Flag), 参见图 10)和抗 CD3 VL-CL (即 HCBF-6(NcoI-UCHT1-VH-HindIII-CH- XhoI-CEA- Flag), 参见图 10)分别克隆到载体中, 转化到 BL21(DE3)中进行共表达。CEA-S-Fab 经由抗 CD3 VH-CH1-CEA VHH 与抗 CD3 VL-CL 多肽异二聚化而形成。从细胞周质提取 CEA-S-Fab 并通过 Ni-NTA 琼脂糖亲和纯化 CEA-S-Fab。

为了确定 CEA-S-Fab 是否正确地形成异二聚体, 进行凝胶过滤以分析所纯化的 CEA-S-Fab。经检测, 所纯化的 CEA-S-Fab 的分子量与 CEA-S-Fab 的预期分子量(约 65kD)相应, 表明大多数 CEA-S-Fab 正确地折叠为异二聚体。

按照实施例 3 的方法, 使用所制备的双特异性抗体, 制备了 PLGA 纳米颗粒平均粒径约为 100-150nm 的双特异性抗体偶联物 CD3-CEA BiTE+PLGA NPs。另外, 使用同样的 PLGA 纳米颗粒作为对照, 对所制备的双特异性抗体及双特异性抗体偶联物杀伤肿瘤细胞的能力进行了评估。

具体而言, 于 96 孔板中, 以 5000 个靶细胞每孔培养 12h 后, 弃原培养基, 利用无细胞因子的 X-vivo 15 培养基调整 DC-CIK 细胞(用健康献血者的外周血单核细胞诱导扩增获得)密度, 使 100 μ l 体积 DC-CIK 细胞数量为靶细胞 4 倍(效靶比为 4:1), 加 100 μ l DC-CIK 细胞悬液到癌细胞培养板中, 并加入 10 μ l 制备的双特异性抗体(双特异性抗体用量为 0.28 μ g)或抗体偶联物(含双特异性抗体 0.28 μ g), 培养箱中孵育 8h, 然后加入 CCK-8 试剂, 按照试剂说明进行孵育, 用酶标仪检测 450nm 处吸光值。对数据进行统计分析, 按照以下公式计算 DC-CIK 细胞对肺癌细胞 A549(人非小细胞肺癌细胞)的杀伤率。

$$\text{杀伤率}=[1-(\text{实验组}-\text{效应对照组})/(\text{靶对照组}-\text{空白对照组})]\times 100\%$$

其中, 空白对照表示加入培养基; 靶对照组表示加入靶细胞+培养基; 效应对照组表示加入效应细胞+培养基; 实验组表示效应细胞+靶细胞+培养基+双特异性抗体。

图 9 显示双特异性抗体 BiTE 及抗体偶联物 BiTE-PLGA 联合 T 细胞对的杀伤率。

其中对照 (control) 表示加入效应细胞+靶细胞+培养基; “PLGA” 表示加入效应细胞+靶细胞+培养基+PLGA 纳米颗粒; “CD3-CEA BiTE” 表示加入效应细胞+靶细胞+培养基+双特异性抗体; “CD3-CEA BiTE+PLGA NPs” 表示加入效应细胞+靶细胞+培养基+双特异性抗体偶联物。

图 9 所示的结果表明, 双特异性抗体偶联物联合 T 细胞对癌细胞的杀伤率(75.91%) 高于双特异性抗体本身联合 T 细胞对癌细胞的杀伤率(65.42%)。

本公开提供的实验结果表明: 将双特异性抗体 BiTE 偶联于纳米材料上, 显著提高了 BiTE 联合 NK 细胞对肿瘤细胞或癌细胞的杀伤率。这种效果对于本领域普通技术人员而言是预料不到的技术效果。

尽管不希望受理论的束缚, 但本发明人推测: 相对于未经偶联的双特异性抗体而言, 偶联物因其上偶联了多个双特异性抗体, 与细胞毒性效应细胞和靶细胞的结合更强, 对细胞毒性效应细胞的刺激也可能更强, 导致对靶细胞的杀伤率得以提高。

另外, 实验结果也表明, 将双特异性抗体偶联于纳米材料上, 也显著提高了其稳定性。预计相比于双特异性抗体如 BiTE, 抗体偶联物在体内的半寿期更长, 因而预期双特异性抗体偶联物在动物体内或人体内的效果相比于双特异性抗体更为出色。

* * *

根据本公开内容, 不需要过度实验就可以制备和使用本文中所公开和要求保护的所有偶联物、组合物和方法。尽管已经就优选实施方案描述了组合物和方法, 但本领域技术人员应显而易见, 可在不背离本发明的理念、精神和范围的情况下对本文中所描述的偶联物、组合物和方法以及方法中的步骤或步骤顺序施加变化。更具体地说, 可以用化学上和生理学上相关的某些试剂来替代本文中所描述的试剂, 同时可实现相同或类似的结果。认为对本领域技术人员显而易见的所有此类相似的取代和修改都在如由所附权利要求所限定的本发明精神、范围和理念之内。

权 利 要 求 书

1. 抗体偶联物，其包含偶联于纳米材料上的多特异性抗体，所述纳米材料优选为生物可降解纳米材料，例如为纳米微粒。
2. 根据权利要求 1 所述的抗体偶联物，其中所述多特异性抗体包含特异性结合细胞毒性效应细胞的结合部分。
3. 根据权利要求 2 所述的抗体偶联物，其中所述细胞毒性效应细胞包括 T 细胞和/或 NK 细胞。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的抗体偶联物，其中所述抗体包含特异性结合靶细胞的结合部分，所述靶细胞优选为疾病相关细胞。
5. 根据权利要求 4 所述的抗体偶联物，其中所述疾病为肿瘤或癌症。
6. 根据权利要求 4 所述的抗体偶联物，其中所述疾病为炎症疾病和/或自身免疫病。
7. 根据权利要求 1-6 所述的抗体偶联物，其中所述抗体为双特异性抗体。
8. 根据任一前述权利要求所述的抗体偶联物，其中所述纳米材料为聚乳酸-羟基乙酸、聚乳酸、聚己内酯、聚丁二醇丁二酸酯、聚苯胺、聚碳酸酯、乙丙交酯共聚物和乙交酯己内酯共聚物中的任意一种或至少两种的混合物。
9. 药物组合物，其包含权利要求 1-8 中任一项所述的抗体偶联物。
10. 权利要求 1-8 中任一项所述的抗体偶联物或权利要求 9 所述的药物组合物在制备免疫治疗药物中的用途。

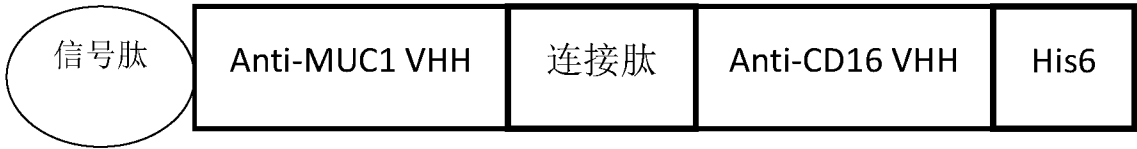


图 1

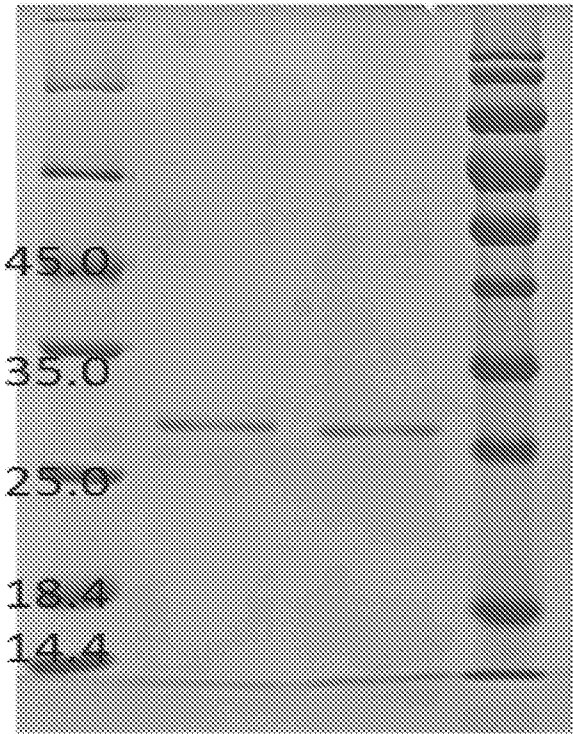


图 2

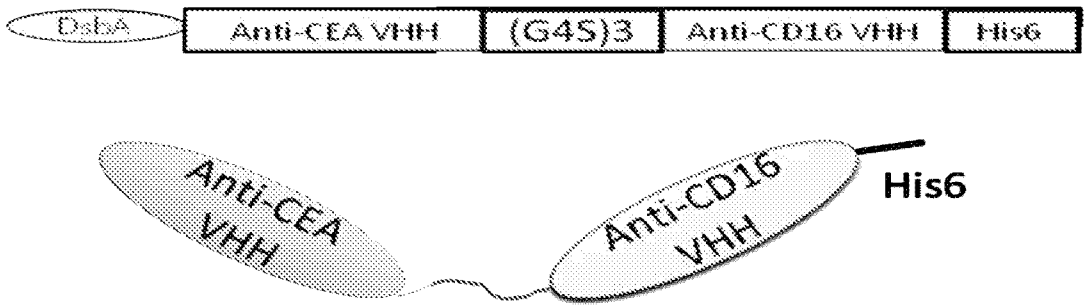


图 3

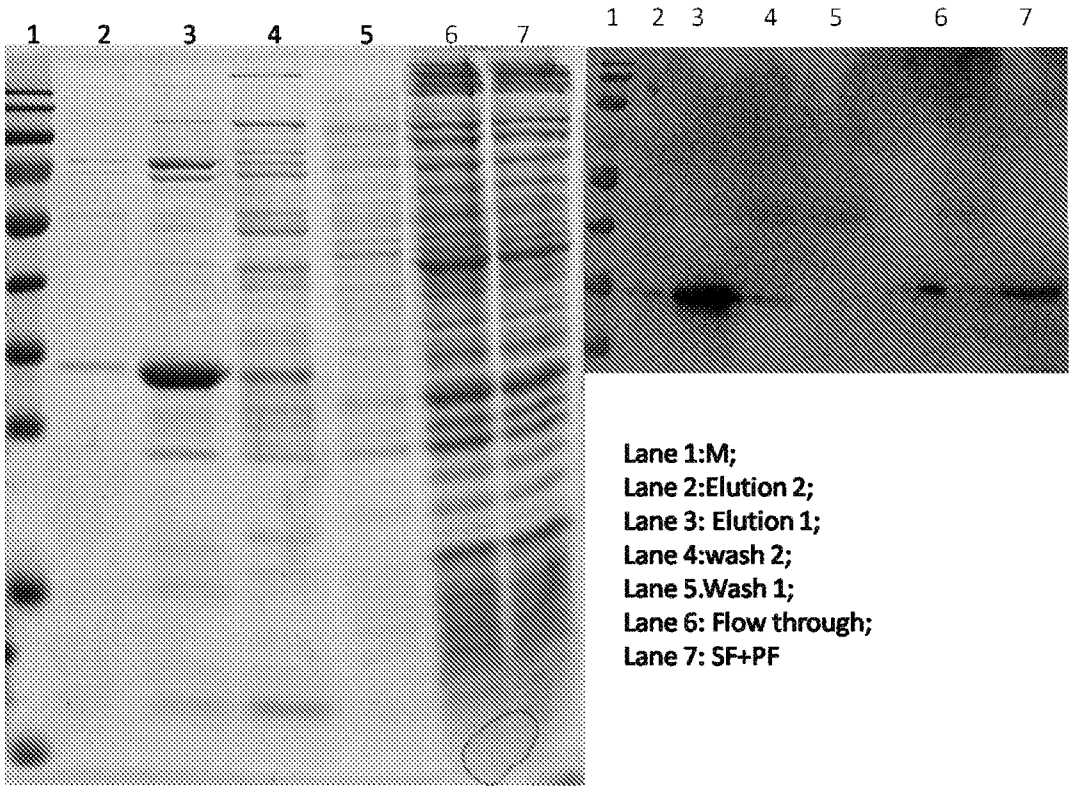


图 4A

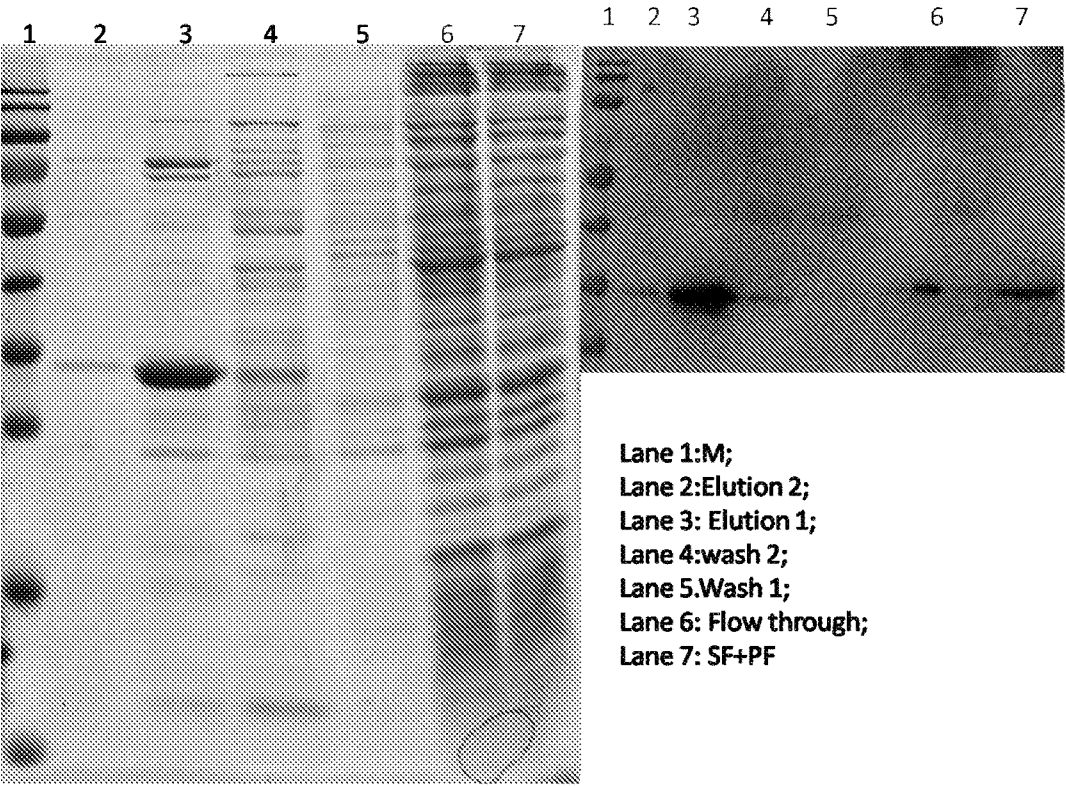


图 4B

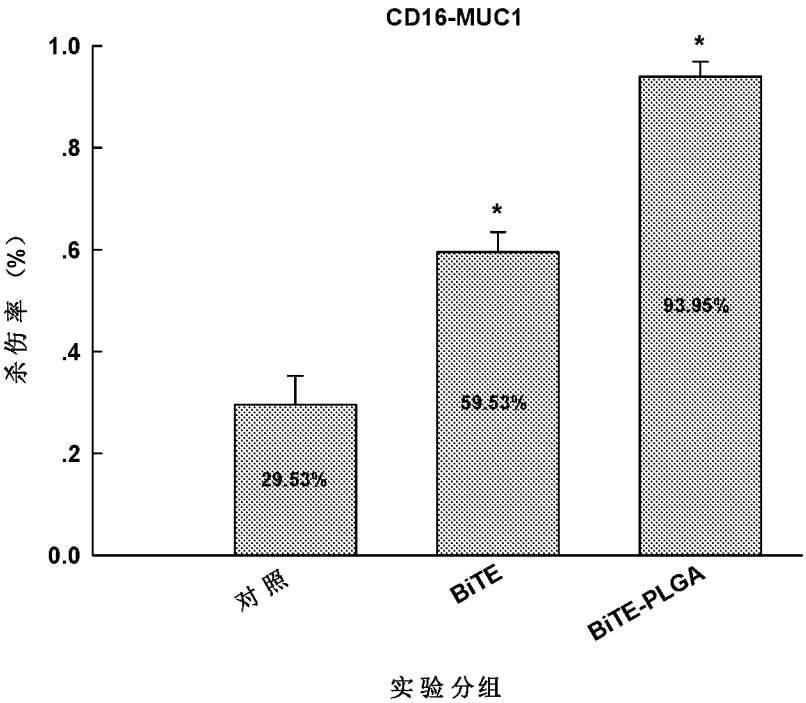
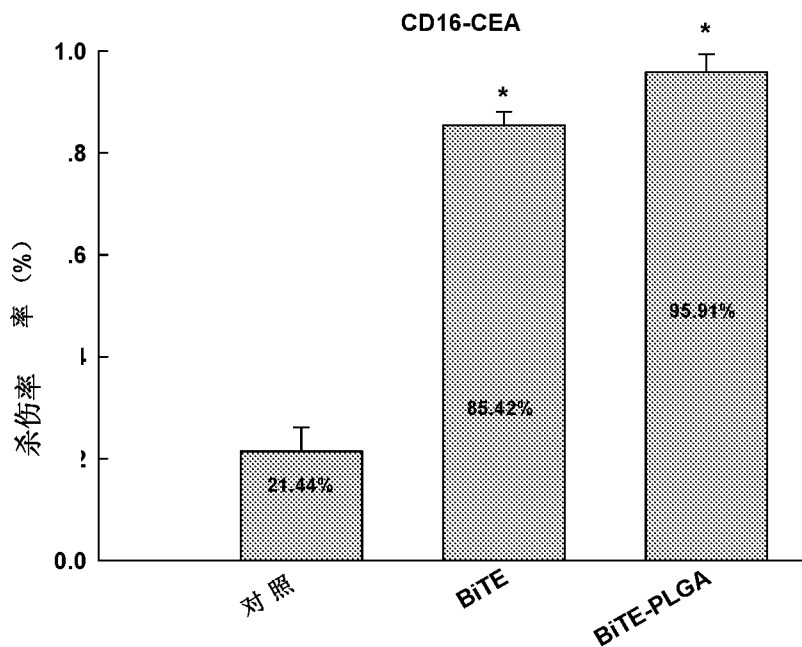
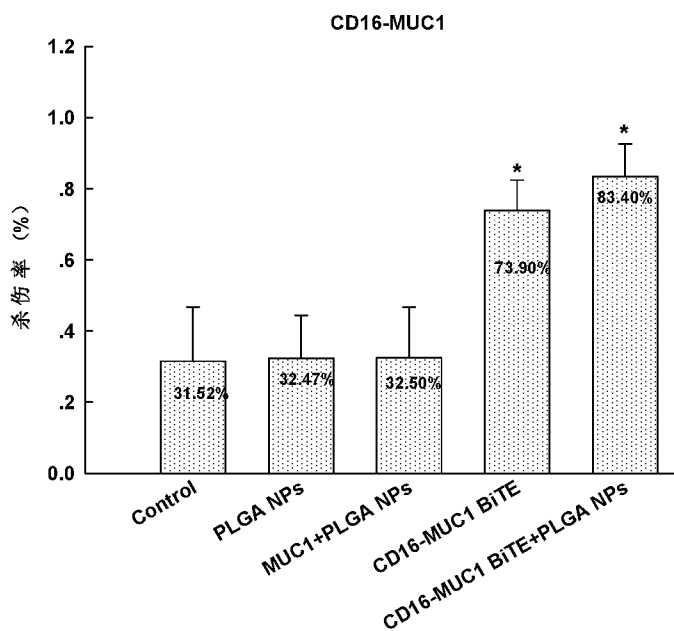


图 5



实验分组

图 6



实验分组

图 7

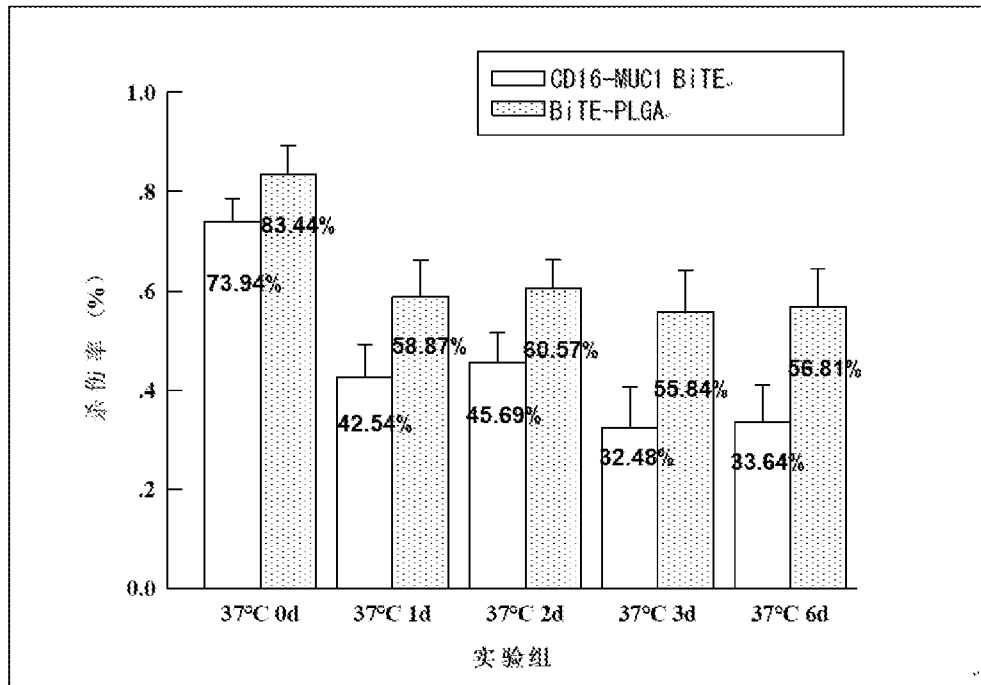


图 8

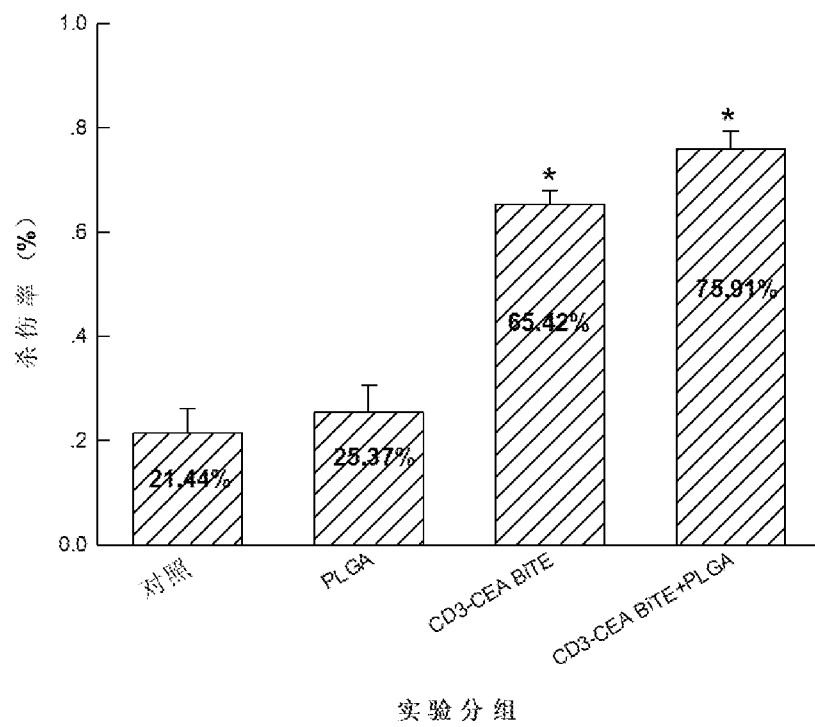


图 9

HCBF-5(NdeI PelB-NcoI- UCHT1-VL-HindIII-CL-BamHI- His8 — TGA XhoI)

AATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTG
GTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATGGGAGACATCCAGATGACCCAGAGCCC
AAGTTCACTGTCCGCTCTGTGGGCGACAGGGTCACAATCACTTGTGCGCTTCCCAGGATATTC
GAAACTATCTGAATTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCCCCCAAGCTGCTGATCTATTACACAT
CTCGGCTGGAGAGTGCGCTGCCCTCACGGTTCAGCGGGTCAGGAAGCGGCACTGACTACACCCT
GACAATTAGCTCCCTGCAGCCAGAGGATTCGCTACCTATTACTGCCAGCAGGGCAACACTCTGC
CCTGGACCTTTGGGCGAGGAACTAAAGTGGAATTAAGAGGACCAAGCTTACGGTGGCTGCACC
ATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT
GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG
GTAAGTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC
CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGGATCCCATCATCACCATCA
CCACCACCATTTGACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAA
AGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAC
GGGTCTTGAGGGTTT

HCBF-6(NcoI-UCHT1-VH-HindIII-CH- XhoI-CEA- Flag)

AATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTG
GTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATGGGAGAAGTCCAGCTGGTCCAGTCCGG
AGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAGGGAGTCTGCGACTGTCCTGTAAGGCCTCCGGATATTCTTTC
ACAGGCTACACTATGAATTGGGTCCGACAGGCTCCAGGCAAAGGACTGGAGTGGGTGGCACTGA
TCAACCCCTTATAAGGGCGTCAGCACATAACAATCAGAAGTTCAAAGACCGGTTCAACATCAGCGTG
GATAAGTCCAAAAACACTGCATATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCAGAAGACACTGCCGTGTA
TACTGCGCCCGGTCCGGCTATTACGGGGACTCTGATTGGTACTTTGATGTCTGGGGACAGGGCA
CCCTGGTGACAGTCTCCTCTAAGCTTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC
TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG
AACCGGTGACGGTGTCGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGT
CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA
CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGA
TCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTCGTGCAGGCGGGGGAATCTCTGACGCTC
TCCTGTACAAGTTCTACACTGACCTTCACTCCGTATCGCATGGCCTGGTACCGCCAGGCTCCAGG
GAAGCAGCGTGATTTAGT

图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/073785

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 17/08 (2006.01) i; C07K 16/46 (2006.01) i; A61K 39/44 (2006.01) i; A61K 47/59 (2017.01) i; A61K 47/60 (2017.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; A61P 37/02 (2006.01) i; A61P 29/00 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRSABS; CNKI; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ELSEVIER; CA and search terms: 抗体, 偶联物, 纳米材料, 生物降解, 聚乳酸-羟基乙酸, 聚乳酸, 聚己内酯, 多特异性抗体, 双特异性抗体, T 细胞, NK 细胞, 肿瘤, 抗原, antibody, conjugate, nanomaterials, nanoparticle, biodegradable, BsAb, PLGA, PLA, PCL, polyspecific antibodies, bispecific antibodies, T cell, NK cell, tumor, antigen 等;

NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT; Genbank; EMBL; STN and searched sequence: SEQ ID NO: 1-5 等

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 2017219974 A1 (BENHEALTH BIOPHARMACEUTICAL (SHENZHEN) CO., LTD.), 28 December 2017 (28.12.2017), see claims 1-15	1-10
X	WO 2016165632 A1 (SHENZHEN ZHONGLIAN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 20 October 2016 (20.10.2016), see the abstract, and claims 1-17	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 21 March 2018	Date of mailing of the international search report 12 April 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer HE, Rui Telephone No. (86-10) 62411106

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/073785

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2017219974 A1	28 December 2017	None	
WO 2016165632 A1	20 October 2016	WO 2016165302 A1	20 October 2016
		CN 107531790 A	02 January 2018
		US 2018021440 A1	25 January 2018
		CN 104829730 A	12 August 2015

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/073785

A. 主题的分类

C07K 17/08(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; A61K 39/44(2006.01)i; A61K 47/59(2017.01)i; A61K 47/60(2017.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CPRSABS; CNKI; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ELSEVIER; CA和检索词: 抗体, 偶联物, 纳米材料, 生物降解, 聚乳酸-羟基乙酸, 聚乳酸, 聚己内酯, 多特异性抗体, 双特异性抗体, T细胞, NK细胞, 肿瘤, 抗原, antibody, conjugate, nanomaterials, nanoparticle, biodegradable, BsAb, PLGA, PLA, PCL, polyspecific antibodies, bispecific antibodies, T cell, NK cell, tumor, antigen等; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL; STN和检索的序列: SEQ ID NO:1-5等

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	WO 2017219974 A1 (本康生物制药深圳有限公司) 2017年 12月 28日 (2017 - 12 - 28) 参见权利要求1-15	1-10
X	WO 2016165632 A1 (深圳市中联生物科技开发有限公司) 2016年 10月 20日 (2016 - 10 - 20) 参见摘要, 权利要求1-17	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2018年 3月 21日

国际检索报告邮寄日期

2018年 4月 12日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

何睿

电话号码 (86-10)62411106

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/073785

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2017219974	A1	2017年 12月 28日	无			
WO	2016165632	A1	2016年 10月 20日	WO	2016165302	A1	2016年 10月 20日
				CN	107531790	A	2018年 1月 2日
				US	2018021440	A1	2018年 1月 25日
				CN	104829730	A	2015年 8月 12日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)