(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118667021 A
(43)申请公布日 2024.09.20

(21)申请号 202410853420.8
(22)申请日 2018.09.18
(30)优先权数据
62/560,143 2017.09.18 US
(62)分案原申请数据
201880073220.3 2018.09.18
(71)申请人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国
(72)发明人 D·康克林 D·斯拉蒙
N·奥布赖恩 M·帕拉佐洛
E·冯尤伊
(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277
专利代理师 李茂家 闫俊萍
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)

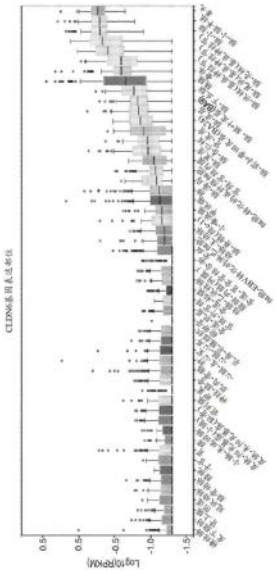
权利要求书3页 说明书65页
序列表（电子公布） 附图24页

(54)发明名称

紧密连接蛋白6抗体和治疗癌症的方法

(57)摘要

本发明涉及紧密连接蛋白6抗体和治疗癌症的方法。本公开提供了与紧密连接蛋白-6(CLDN6)结合的抗原结合蛋白。在各个方面,所述抗原结合蛋白与CLDN6的胞外结构域的胞外环2(EL2)结合。本文还提供了相关多肽、核酸、载体、宿主细胞和缀合物。此外,提供了包含此类实体的试剂盒和药物组合物。还提供了制备抗原结合蛋白的方法和治疗患有癌症的受试者的方法。



CN 118667021 A

1.一种与人紧密连接蛋白6(CLDN 6)蛋白结合的抗原结合蛋白,其选自由以下组成的组:

a.一种抗原结合蛋白,其具有:

i.来自包括氨基酸序列SEQ ID NO:387的重链可变区的CDRs1-3;和/或

ii.来自包括氨基酸序列SEQ ID NO:389的轻链可变区的CDRs1-3;

b.一种抗原结合蛋白,其具有:

i.来自包括氨基酸序列SEQ ID NO:422的重链可变区的CDRs1-3;和/或

ii.来自包括氨基酸序列SEQ ID NO:389的轻链可变区的CDRs1-3;

c.一种抗原结合蛋白,其具有:

i.来自包括氨基酸序列SEQ ID NO:385的重链可变区的CDRs1-3;和/或

ii.来自包括氨基酸序列SEQ ID NO:389的轻链可变区的CDRs1-3;

d.一种抗原结合蛋白,其具有:

i.来自包括氨基酸序列SEQ ID NO:386的重链可变区的CDRs1-3;和/或

ii.来自包括氨基酸序列SEQ ID NO:389的轻链可变区的CDRs1-3。

2.如权利要求1所述的抗原结合蛋白,其中,在a)中,

i.HC CDR1由GFTFSNYW组成;

ii.HC CDR2由IRLKSDNYAT组成;

iii.HC CDR3由NDGPPSGS组成;

iv.LC CDR1由ENIYSY组成;

v.LC CDR2由NAK组成;和

vi.LC CDR3由QHHYTVPWT组成。

3.如权利要求1所述的抗原结合蛋白,其中,在b)中,

i.HC CDR1由GFTFSNYW组成;

ii.HC CDR2由IRLKSDNYAT组成;

vii.HC CDR3由NDGPPSGA组成;

viii.LC CDR1由ENIYSY组成;

ix.LC CDR2由NAK组成;和

x.LC CDR3由QHHYTVPWT组成。

4.如权利要求1所述的抗原结合蛋白,其中,在c)中,

i.HC CDR1由GFTFSNYW组成;

ii.HC CDR2由IRLKSDNYAT组成;

xi.HC CDR3由NDGPPSGC组成;

xii.LC CDR1由ENIYSY组成;

xiii.LC CDR2由NAK组成;和

xiv.LC CDR3由QHHYTVPWT组成。

5.如权利要求1所述的抗原结合蛋白,其中,在d)中,

i.HC CDR1由GFTFSNYW组成;

ii.HC CDR2由IRLKSDNYAT组成;

xv.HC CDR3由NDGPPSGY组成;

xvi.LC CDR1由ENIYSY组成;

xvii.LC CDR2由NAK组成;和

xviii.LC CDR3由QHHYTVPWT组成。

6.一种结合紧密连接蛋白6的抗原结合蛋白,其包括:

i.HC CDR1,所述HC CDR1具有序列GFTFSNYW,

ii.HC CDR2,所述HC CDR2具有序列IRLKSDNYAT,

iii.HC CDR3,所述HC CDR3具有序列NDGPPSGT;

iv.LC CDR1,所述LC CDR1具有序列ENIYSY,

v.LC CDR2,所述LC CDR2具有序列NAK,和

vi.LC CDR3,所述LC CDR3具有序列QHHYTVPWT。

7.如权利要求1至6任一项所述的抗原结合蛋白,其中,所述抗原结合蛋白为抗体或抗体的抗原结合片段。

8.如权利要求7所述的抗原结合蛋白,其中,所述抗原结合片段为选自由scFv、$F(ab')_2$、Fab、和Fv组成的组。

9.如权利要求1至6任一项所述的抗原结合蛋白,其中,所述抗原结合蛋白为单克隆抗体。

10.如权利要求1至6任一项所述的抗原结合蛋白,其中,所述抗原结合蛋白为人抗体、嵌合抗体或者人源化抗体。

11.如权利要求1或2所述的抗原结合蛋白,其中,所述抗原结合蛋白包括SEQ ID NO:387中列出的重链可变结构域氨基酸序列和SEQ ID NO:389中列出的轻链可变结构域氨基酸序列。

12.如权利要求11所述的抗原结合蛋白,其中,所述抗原结合蛋白为抗体或抗体的抗原结合片段。

13.如权利要求11所述的抗原结合蛋白,其中,所述抗原结合蛋白为单克隆抗体。

14.如权利要求11所述的抗原结合蛋白,其中,所述抗原结合蛋白为人抗体、嵌合抗体或着人源化抗体。

15.一种缀合物,其包含如权利要求1至6任一项所述的抗原结合蛋白和细胞毒性剂或化疗剂。

16.如权利要求15所述的缀合物,其进一步包含接头。

17.如权利要求16所述的缀合物,其中,所述接头为可裂解的接头。

18.如权利要求15所述的缀合物,其中,所述化疗剂为抗有丝分裂药。

19.如权利要求15或18所述的缀合物,其中,所述化疗剂为单甲基奥瑞司他汀E(MMAE)。

20.一种融合蛋白,其包含如权利要求1至6任一项所述的抗原结合蛋白。

21.一种融合蛋白,其包含如权利要求15所述的抗原结合蛋白。

22.一种核酸,其包含编码如权利要求1至6任一项所述的抗原结合蛋白,或者包含如权利要求1至6任一项所述的抗原结合蛋白的融合蛋白的核苷酸序列。

23.一种核酸,其包含编码如权利要求11所述的抗原结合蛋白,或者包含如权利要求11所述的抗原结合蛋白的融合蛋白的核苷酸序列。

24.一种载体,其包含如权利要求22所述的核酸。

25.一种载体,其包含如权利要求23所述的核酸。

26.一种宿主细胞,其包含如权利要求22所述的核酸。

27.一种宿主细胞,其包含如权利要求23所述的核酸。

28.一种产生与紧密连接蛋白6(CLDN6)蛋白结合的抗原结合蛋白的方法,其包括(i)在细胞培养基中培养如权利要求26或27所述的宿主细胞,以及(ii)从所述细胞培养基收获所述抗原结合蛋白。

29.一种产生包括与紧密连接蛋白6(CLDN6)蛋白结合的抗原结合蛋白的融合蛋白的方法,其包括(i)在细胞培养基中培养如权利要求26或27所述的宿主细胞,以及(ii)从所述细胞培养基收获所述融合蛋白。

30.一种产生药物组合物的方法,其包括组合如权利要求1至14中任一项所述的抗原结合蛋白、如权利要求15至19中任一项所述的缀合物、如权利要求20或21所述的融合蛋白、如权利要求22或23所述的核酸、如权利要求24或25所述的载体、如权利要求26或27所述的宿主细胞或它们的组合以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。

31.一种药物组合物,其包括如权利要求1至14中任一项所述的抗原结合蛋白、如权利要求15至19中任一项所述的缀合物、如权利要求20或21所述的融合蛋白、如权利要求22或23所述的核酸、如权利要求24或25所述的载体、如权利要求26或27所述的宿主细胞或它们的组合以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。

32.权利要求31所述的药物组合物在制造用于治疗表达CLDN6的癌症的药物中的用途。

33.如权利要求32所述的用途,其中,所述药物用于预防受试者中的癌症复发。

34.如权利要求32所述的用途,其中,所述表达CLDN6的癌症是CLDN6的低过表达者。

35.如权利要求32所述的用途,其中,所述药物诱导肿瘤细胞的凋亡。

36.如权利要求32所述的用途,其中,所述药物诱导表达CLDN6的细胞的凋亡。

37.用于治疗表达CLDN6的癌症的如权利要求31所述的药物组合物。

38.如权利要求37所述的药物组合物,其中,所述药物组合物用于预防受试者中的癌症复发。

39.如权利要求37所述的药物组合物,其中,所述表达CLDN6的癌症是CLDN6的低过表达者。

40.如权利要求37所述的药物组合物,其中,所述药物组合物诱导肿瘤细胞的凋亡。

41.如权利要求37所述的药物组合物,其中,所述药物组合物诱导表达CLDN6的细胞的凋亡。

42.一种抑制肿瘤生长的体外或离体方法,其包括以有效抑制肿瘤生长的量使癌细胞与如权利要求31所述的药物组合物接触。

43.一种检测样品中的紧密连接蛋白6(CLDN6)的方法,其包括使所述样品与如权利要求1至14中任一项所述的抗原结合蛋白、如权利要求15或19所述的缀合物、如权利要求20或21所述的融合蛋白接触,并测定包含与CLDN6结合的所述抗原结合蛋白、所述缀合物或所述融合蛋白的免疫复合物。

紧密连接蛋白6抗体和治疗癌症的方法

[0001] 本申请是中国专利申请201880073220.3的分案申请,原申请201880073220.3的申请日为2018年09月18日,其名称为“紧密连接蛋白6抗体和治疗癌症的方法”。

[0002] 以引用方式并入电子提交的材料

[0003] 全文以引用方式并入的是同时随同提交并标识如下的计算机可读核苷酸/氨基酸序列表:创建于2018年9月18日的命名为“51836_SeqListing.txt”的315,776字节的ASCII(文本)文件。

背景技术

[0004] 抗体由于其特异性靶向细胞、细菌、病毒或毒素上不同抗原的能力而构成了以有限副作用为特征的强效治疗剂。1986年,第一种治疗性单克隆抗体Orthoclone OKT3被引入市场。从那时起,这类生物制药产品已显著增长。2014年底,四十七种单克隆抗体产品已在美国或欧洲获得批准以用于治疗多种疾病,包括癌症和炎性、心血管、呼吸道和感染性疾病。

[0005] 美国食品和药物管理局目前批准了十二种以上的单克隆抗体来治疗癌症。这些剂中有指示用于慢性淋巴细胞白血病(CLL)的阿仑单抗(Campath®)和用于治疗乳腺癌的曲妥珠单抗(Herceptin®)。一些抗体用化疗药物标记,包括例如本妥昔单抗-维多汀(brentuximab vedotin)(Adcetris®)和Ado-曲妥珠单抗emtansine(Kadcyla®)。其他抗体产品诸如博纳吐单抗(blinatumomab)(Blincyto)被设计为识别并结合两种不同的抗原。尽管此类抗体产品可商购获得,但目前的癌症发病率和癌症死亡人数仍然很高。据报道,每年每100,000名男性和女性中癌症发病率大于450,并且每年每100,000名男性和女性中癌症死亡率仅超过170。

发明内容

[0006] 本文提供了与紧密连接蛋白-6(CLDN6)结合的抗原结合蛋白。在各个方面,本公开的抗原结合蛋白与人CLDN6结合并且任选地与小鼠CLDN6结合。在各个方面,抗原结合蛋白与CLDN6的胞外结构域(ECD)结合。在各种情况下,抗原结合蛋白与CLDN6的ECD的胞外环2(EL2)结合。在各个方面,抗原结合蛋白与EL2结合并且不与CLDN6的ECD的胞外环1(EL1)结合。在各种情况下,抗原结合蛋白与人紧密连接蛋白家族的另外成员包括例如紧密连接蛋白-3(CLDN3)、紧密连接蛋白-4(CLDN4)和紧密连接蛋白-9(CLDN9)结合。在各种情况下,抗原结合蛋白与CLDN6以及CLDN4和CLDN9中的至少一者结合。在各种情况下,抗原结合蛋白与CLDN6结合并且不与紧密连接蛋白家族的任何其他成员结合。在各个方面,抗原结合蛋白与人卵巢癌细胞(例如,OVCA429细胞)内源性表达的CLDN6结合,并且在使用OVCA429细胞的FACS亲和力测定中表现出小于约1200nM的IC50。在各种情况下,本公开的抗原结合蛋白在没有任何其他部分附着于抗原结合蛋白的情况下抑制受试者(例如人)中的肿瘤生长。在各种情况下,未缀合至异源部分(例如,未缀合至任何化疗剂、药物或毒性部分)的抗原结合蛋白抑制受试者(例如,人)中的肿瘤生长。

[0007] 在各个方面,抗原结合蛋白与人癌细胞表达的CLDN6结合。在各个方面,抗原结合蛋白抑制人CLDN6与参考抗CLDN6抗体之间的结合相互作用。不受特定理论的束缚,本文提供的抗原结合蛋白的抑制作用允许此类实体可用于减少肿瘤生长和治疗患有肿瘤或癌症的受试者的方法中。如本文进一步讨论的,在各个方面,抗原结合蛋白为抗体、其抗原结合抗体片段或抗体蛋白产物。

[0008] 本公开还提供了包含特定组的氨基酸序列中的至少3、4、5个或所有氨基酸序列的抗原结合蛋白。在各个方面,抗原结合蛋白包含本文所公开的CLDN6抗体的至少3、4、5或6个互补决定区(CDR)氨基酸序列。

[0009] 本公开还提供了包含如本文详述的氨基酸序列的抗原结合蛋白。在各个方面,如本文进一步所述,抗原结合蛋白包含表A、表A1、表B、表B1、表C或表D或它们的组合中所列的SEQ ID NO:的氨基酸序列。

[0010] 本文还提供了相关多肽、核酸、载体、宿主细胞和缀合物。还考虑了包含此类实体的试剂盒和药物组合物。

[0011] 还提供了制备抗原结合蛋白的方法。在各个实施方案中,该方法包括培养包含编码如本文所述的抗原结合蛋白或多肽的核酸的宿主细胞,以便表达该抗原结合蛋白或多肽。

[0012] 本文另外提供了治疗患有癌症的受试者的方法。在各个实施方案中,该方法包括以有效治疗受试者的癌症的量向受试者施用本公开的药物组合物。

[0013] 还提供了治疗患有表达CLDN6的癌症的受试者的方法,该方法包括向受试者施用本文所述的药物组合物。还考虑了抑制受试者中肿瘤生长的方法,该方法包括向受试者施用本文所述的药物组合物。

[0014] 一种减小受试者中肿瘤大小或预防受试者中癌症复发的方法,该方法包括向受试者施用本文所述的药物组合物。

[0015] 本文还提供了一种治疗被诊断为CLDN6低过表达者的受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用本文所述的药物组合物。

[0016] 在各个实施方案中,施用诱导肿瘤细胞(例如表达CLDN6的细胞)的凋亡。在各个实施方案中,施用诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)、肿瘤坏死和细胞死亡或耗竭、和/或肿瘤细胞粘附的破坏,每一种都导致肿瘤消退或肿瘤生长减慢。

附图说明

[0017] 图1表示正常(非癌)组织中CLDN6表达的图。

[0018] 图2表示如通过Agilent44K方法确定的癌细胞系中CLDN6表达的图。

[0019] 图3表示如通过RNASeq确定的癌细胞系中CLDN6表达的图。

[0020] 图4表示描述在不同细胞模型中CLDN6-GFP定位的一组荧光图像。

[0021] 图5表示人CLDN6、人CLDN3、人CLDN4、人CLDN9和小鼠CLDN6的序列比对。示出了EL1和EL2的序列。

[0022] 图6A表示用对照IgG2抗体、AB3、参考Ab1、参考Ab2、参考Ab3、AB2和AB3处理后携带子宫内膜肿瘤的小鼠中肿瘤的肿瘤体积(mm^3)随时间(天)变化的图。图6B表示用对照IgG2

抗体、AB3、参考Ab1、参考Ab2、参考Ab3、AB2或AB3处理的携带子宫内膜肿瘤的小鼠中肿瘤14天的肿瘤体积(mm^3)平均变化图。

[0023] 图7A表示用对照IgG2抗体、AB3、参考Ab1、参考Ab2和AB3处理后携带膀胱肿瘤的小鼠中肿瘤的肿瘤体积(mm^3)随时间(天)变化的图。图7B表示用对照IgG2抗体、AB3、参考Ab1、参考Ab2或AB3处理的携带膀胱肿瘤的小鼠中肿瘤35天的肿瘤体积(mm^3)平均变化图。

[0024] 图8A表示用对照IgG2抗体、AB3、参考Ab1、AB2和AB3处理后携带卵巢肿瘤的小鼠中肿瘤的肿瘤体积(mm^3)随时间(天)变化的图。图8B表示用对照IgG2抗体、AB3、参考Ab1、AB2或AB3处理的携带卵巢肿瘤的小鼠中肿瘤20天的肿瘤体积(mm^3)平均变化图。

[0025] 图9A表示用对照IgG2抗体、AB3、参考Ab1、参考Ab2、参考Ab3和AB3处理后携带黑素瘤肿瘤的小鼠中肿瘤的肿瘤体积(mm^3)随时间(天)变化的图。图9B表示用对照IgG2抗体、AB3、参考Ab1、参考Ab2、参考Ab3或AB3处理的携带黑素瘤肿瘤的小鼠中肿瘤21天的肿瘤体积(mm^3)平均变化图。

[0026] 图10A表示相对于用对照抗体处理的小鼠在用AB3处理的荷瘤小鼠中实现的肿瘤生长抑制%的图。图10B表示蛋白质印迹的图像,其显示CLDN6样子宫内膜癌细胞系(ARK2)、膀胱癌细胞系(UMUC4)、卵巢癌细胞系(OV90)和黑素瘤细胞系(M202)以及对照细胞的不同水平。α-微管蛋白的水平大致相同,表明蛋白质载荷相等。

[0027] 图11表示用媒介物对照、对照抗体、参考Ab1、参考Ab2、参考Ab3和AB3处理的荷瘤小鼠的体重变化%随时间(天)变化的图。

[0028] 图12A表示用媒介物对照、对照IgG2抗体、AB3、参考Ab1或所示抗CLDN6抗体之一处理后携带卵巢肿瘤的小鼠中肿瘤的肿瘤体积(mm^3)随时间(天)变化的图。图12B表示用媒介物对照、对照IgG2抗体、AB3、参考抗体Ab1或所示抗CLDN6抗体之一处理的携带卵巢肿瘤小鼠中肿瘤28天的肿瘤体积(mm^3)平均变化图。

[0029] 图13表示用媒介物对照、对照抗体、参考Ab1和所示抗CLDN6抗体处理的荷瘤小鼠的体重变化%随时间(天)变化的图。

[0030] 图14表示本发明的几种抗CLDN6抗体以及参考Ab1和参考2的一系列剂量反应曲线。小鼠IgG用作对照。

[0031] 图15A表示用媒介物对照、对照IgG抗体、小鼠形式的AB3、第一人源化形式的AB3和第二人源化形式的AB3处理的携带膀胱肿瘤的小鼠中肿瘤35天的肿瘤体积(mm^3)平均变化图。图15B表示图15A中每个组的肿瘤体积(mm^3)变化的图。

[0032] 图16A表示用媒介物对照、对照IgG抗体、小鼠形式的AB3、第一人源化形式的AB3和第二人源化形式的AB3处理的携带膀胱肿瘤的小鼠中肿瘤35天的肿瘤体积(mm^3)平均变化图。在该实验中还测试了两种对照抗体(一种小鼠抗体和一种嵌合抗体)。图16B表示图16A中每个组的肿瘤体积(mm^3)变化的图。

[0033] 图17A表示用媒介物对照、对照IgG抗体、小鼠形式的AB1和人源化形式的AB1处理的携带膀胱肿瘤的小鼠中肿瘤35天的肿瘤体积(mm^3)平均变化图。图17B表示图17A中每个组的肿瘤体积(mm^3)变化的图。

[0034] 图18A表示用媒介物对照、对照IgG抗体、小鼠形式的AB4和人源化形式的AB4处理的携带膀胱肿瘤的小鼠中肿瘤35天的肿瘤体积(mm^3)平均变化图。图18B表示图18A中每个组的肿瘤体积(mm^3)变化的图。

[0035] 图19A表示用媒介物对照、对照IgG抗体、小鼠形式的AB3、嵌合形式的AB3、第一人源化形式的AB3、第二人源化形式的AB3、小鼠形式的Ab1、人源化形式的AB1、小鼠形式的AB4、人源化形式的AB4处理的携带膀胱肿瘤的小鼠中肿瘤35天的肿瘤体积(mm^3)平均变化图,并且在本实验中还测试了四种对照抗体(一种抗体具有小鼠形式或嵌合形式,并且一种抗体具有小鼠或人形式)。图19B表示图19A中每个组的肿瘤体积(mm^3)变化的图。

[0036] 图20表示在如图19A所述处理的携带膀胱肿瘤的小鼠中肿瘤在第55天的肿瘤体积(mm^3)平均变化图。

[0037] 图21表示如图19A所述处理32天的经处理荷瘤小鼠的体重变化%的图。

具体实施方式

[0038] 紧密连接蛋白家族

[0039] 紧密连接,也称为闭合连接或小带闭合,是位于两个相邻细胞之间的脊椎动物结构,其调节细胞旁通透性并维持上皮和内皮细胞片层中的细胞极性。紧密连接蛋白(CLDN)基因家族编码膜蛋白,该蛋白为紧密连接的重要组成部分。CLDN蛋白包含四个跨膜(TM)螺旋(TM1、TM2、TM3和TM4)和两个胞外环(EL1和EL2)。相邻细胞的CLDN蛋白的胞外环彼此相互作用以封闭细胞片层并调节管腔与基底外侧空间之间的细胞旁转运。

[0040] CLDN蛋白在各种人类疾病和病理中起作用。例如,CLDN1基因中的突变已显示导致皮肤逐渐剥落以及胆管阻塞。CLDN16基因的突变体引起镁消耗障碍。CLDN19突变可导致眼部病症,例如黄斑缺损和近视,而CLDN14突变可导致非综合征性隐性耳聋。已知CLDN3和CLDN4为肠道中产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)肠毒素的表面受体,并且CLDN1、CLDN6和CLDN9为丙型肝炎病毒(HCV)进入的共受体。已显示几种CLDN蛋白在癌症中异常表达。例如,CLDN1在乳腺癌和结肠癌中被下调,而CLDN3和CLDN4在多种癌症中被高度上调。

[0041] 紧密连接蛋白-6(CLDN6)为CLDN家族的成员。编码人CLDN6蛋白的基因位于人16号染色体的p臂16p13.3处,并且在黑猩猩、恒河猴、狗、牛、小鼠、大鼠、斑马鱼和蛙中为保守的。CLDN6通常在人中表达为220个氨基酸的前体蛋白;它的前21个氨基酸构成信号肽。CLDN6前体蛋白的氨基酸序列可在国家生物技术信息中心(NCBI)网站上以NCBI参考序列NP_067018.2公开获得,并且在本文中提供为SEQ ID NO:1。SEQ ID NO:1的位置143的氨基酸为Ile。在一些情况下,由于编码CLDN6的DNA序列中的单核苷酸多态性(SNP),位置143的氨基酸为Val。在位置143具有Val的人CLDN6的氨基酸序列在本文中提供为SEQ ID NO:178。

[0042] 抗原结合蛋白

[0043] 本文提供了与紧密连接蛋白-6(CLDN6)结合的抗原结合蛋白。本公开的抗原结合蛋白可采取本领域已知的多种形式的抗原结合蛋白中的任一者。在各个实施方案中,本公开的抗原结合蛋白采取抗体或抗原结合抗体片段或抗体蛋白产物的形式。

[0044] 在本公开的各个实施方案中,抗原结合蛋白包含抗体、基本上由抗体组成或由抗体组成。如本文所用,术语“抗体”是指包含重链和轻链并且包含可变区和恒定区的具有常规免疫球蛋白型式的蛋白质。例如,抗体可以是IgG,其为两对相同多肽链的“Y形”结构,每对具有一个“轻”链(通常具有约25kDa的分子量)和一个“重”链(通常具有约50-70kDa的分子量)。抗体具有可变区和恒定区。在IgG型式中,可变区通常为约100至110个或更多个氨基酸,包含三个互补决定区(CDR),主要负责抗原识别,并且在结合不同抗原的其他抗体之间

基本上不同。恒定区允许抗体募集免疫系统的细胞和分子。可变区由每条轻链和重链的N-末端区组成,而恒定区由每条重链和轻链的C-末端部分组成。(Janeway等人,“Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes”,Immunobiology:The Immune Systemin Health and Disease,第4版,Elsevier Science Ltd./Garland出版,(1999))。

[0045] 抗体CDR的一般结构和性质已在本领域中描述。简而言之,在抗体支架中,CDR被嵌入重链和轻链可变区的框架内,在那里它们构成主要负责抗原结合和识别的区域。可变区通常在构架区(由Kabat等人,1991命名为构架区1-4、FR1、FR2、FR3和FR4;还参见Chothia和Lesk,1987,J.Mol.Biol.196:901-917)内包含至少三个重链或轻链CDR(Kabat等人,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,Public Health Service N.I.H.,Bethesda,Md.;还参见Chothia和Lesk,1987,出处同上;Chothia等人,1989,Nature 342:877-883)。

[0046] 抗体可包含本领域已知的任何恒定区。人轻链分为κ和λ轻链。重链分为μ、δ、γ、α或ε,并分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。IgG具有几个亚类,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。IgM具有亚类,包括但不限于IgM1和IgM2。本公开的实施方案包括所有此类类别或同种型的抗体。轻链恒定区可以是例如κ或λ型轻链恒定区,例如人κ或λ型轻链恒定区。重链恒定区可以是例如α-、δ-、ε-、γ-或μ-型重链恒定区,例如人α-、δ-、ε-、γ-或μ-型重链恒定区。因此,在各个实施方案中,抗体为同种型IgA、IgD、IgE、IgG或IgM的抗体,包括IgG1、IgG2、IgG3或IgG4中的任一者。在各个方面,该抗体包含相对于天然存在的对应物包含一个或多个氨基酸修饰以便改善半衰期/稳定性或使抗体更适合于表达/可制造性的恒定区。在各种情况下,抗体包含恒定区,其中存在于天然存在的对应物中的C-末端Lys残基被移除或剪切。

[0047] 抗体可以是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体包含与由哺乳动物(例如小鼠、兔、山羊、马、鸡、仓鼠、人等)产生的天然存在的抗体基本上相似的序列。在这方面,抗体可被认为是哺乳动物抗体,例如,小鼠抗体、兔抗体、山羊抗体、马抗体、鸡抗体、仓鼠抗体、人抗体等。在某些方面,抗原结合蛋白为抗体,例如人抗体。在某些方面,抗原结合蛋白为嵌合抗体或人源化抗体。术语“嵌合抗体”是指含有来自两种或更多种不同抗体的结构域的抗体。嵌合抗体可例如含有来自一个物种的恒定结构域和来自第二物种的可变结构域,或更一般地,可含有来自至少两个物种的氨基酸序列的片段。嵌合抗体还可含有相同物种内的两种或更多种不同抗体的结构域。当相对于抗体使用时,术语“人源化”是指具有至少一个来自非人来源的CDR区的抗体,其被工程改造为具有比原始来源抗体更类似于真实人抗体的结构和免疫功能。例如,人源化可涉及将来自非人抗体(例如小鼠抗体)的CDR移植到人抗体中。人源化还可涉及选择氨基酸取代以使非人序列与人序列更相似。包括人抗体重链和轻链恒定区的序列信息的信息可通过Uniprot数据库以及抗体工程改造和生产领域中众所周知的其他数据库公开获得。例如,IgG2恒定区可从Uniprot数据库以Uniprot编号P01859获得,其以引用方式并入本文。

[0048] 抗体可被酶(例如木瓜蛋白酶和胃蛋白酶)切割成片段。木瓜蛋白酶切割抗体以产生两个Fab片段和单个Fc片段。胃蛋白酶切割抗体以产生$F(ab')_2$片段和pFc′片段。在本公开的各个方面中,本公开的抗原结合蛋白为抗体的抗原结合片段(又名抗原结合抗体片段、

抗原结合片段、抗原结合部分)。在各种情况下,抗原结合抗体片段为Fab片段或$F(ab')_2$片段。

[0049] 已利用抗体的体系结构来创建越来越多的替代抗体型式,这些型式跨越至少约12至150kDa的分子量范围,并且具有从单体(n=1)到二聚(n=2)、三聚(n=3)、四聚(n=4)和可能更高的化合价(n)范围;此类替代抗体型式在本文中被称为"抗体蛋白产物"。抗体蛋白产物包括基于完整抗体结构的那些和模拟保留完整抗原结合能力的抗体片段的那些,例如scFv、Fabs和VHH/VH(下文讨论)。保留其完整抗原结合位点的最小抗原结合片段为Fv片段,它完全由可变(V)区组成。使用可溶的柔性氨基酸肽接头将V区连接到scFv(单链片段可变)片段以稳定分子,或将恒定(C)结构域添加到V区以生成Fab片段[片段,抗原结合]。scFv和Fab片段均可在宿主细胞(例如原核宿主细胞)中容易地产生。其他抗体蛋白产物包括二硫键稳定的scFv(ds-scFv)、单链Fab(scFab)以及二聚和多聚抗体型式(如二抗体、三抗体和四抗体),或包含由连接到寡聚化结构域的scFv组成的不同型式的微抗体(miniAb)。最小的片段为骆驼重链抗体的VHH/VH以及单结构域抗体(sdAb)。最常用于创建新抗体型式的构件为单链可变(V)结构域抗体片段(scFv),其包含来自通过约15个氨基酸残基的肽接头连接的重链和轻链的V结构域(VH和VL结构域)。肽体或肽-Fc融合体为又一种抗体蛋白质产物。肽体的结构由移植到Fc结构域上的生物活性肽组成。肽体在本领域中有充分的描述。参见例如,Shimamoto等人,mAbs 4(5):586-591(2012)。

[0050] 其他抗体蛋白产物包括单链抗体(SCA)、双抗体、三抗体、四抗体、双特异性或三特异性抗体等。双特异性抗体可分为五个主要类别:BsIgG、附加IgG、双特异性抗体(BsAb)片段、双特异性融合蛋白和BsAb缀合物。参见例如,Spiess等人,Molecular Immunology 67(2)Part A:97-106(2015)。

[0051] 在各种方面,本公开的抗原结合蛋白包含这些抗体蛋白产物中的任一者、基本上由其组成、或由其组成。在各个方面,本公开的抗原结合蛋白包含scFv、Fab VHH/VH、Fv片段、ds-scFv、scFab、二聚抗体、多聚抗体(例如,双抗体、三抗体、四抗体)、miniAb、骆驼重链抗体的肽体VHH/VH、sdAb、双抗体、三抗体、四抗体、双特异性或三特异性抗体、BsIgG、附加IgG、BsAb片段、双特异性融合蛋白和BsAb缀合物中的任一者,基本上由其组成,或由其组成。

[0052] 在各种情况下,本公开的抗原结合蛋白为单体形式或聚合、寡聚或多聚形式的抗体蛋白质产物。在其中抗体包含两个或更多个不同的抗原结合区片段的某些实施方案中,取决于被抗体识别和结合的不同表位的数量,抗体被认为是双特异性的、三特异性的或多特异性的,或二价的、三价的或多价的。

[0053] 在各个实施方案中,抗CLDN6抗体或其抗体变体选自由以下组成的组:人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、重组抗体、抗原结合抗体片段、单链抗体、单体抗体、双抗体、三抗体、四抗体、Fab片段、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体和IgG4抗体。

[0054] 在各个方面,本公开的抗原结合蛋白与治疗剂连接。如下所述,治疗剂可以是本领域已知的任何治疗剂,包括但不限于化疗剂、细胞因子和生长因子、细胞毒性剂等。参见下文的"缀合物"。

[0055] CLDN6和表位

[0056] 本公开的抗原结合蛋白与CLDN6结合。在各个方面,CLDN6为具有以下氨基酸序列

的人CLDN6：

MASAGMQILGVVLTLLGWVNGLVSCALPMWKVTAFIGNSIV
VAQVVWEGLWMSCVVQSTGQMQCKVYDSLLALPQDLQAARAL
CVIALLVALFGLLVYLAGAKCTTCVEEKDSKARLVLTSGIVFVISG
VLTLIPVCWTAHAXIRDFYNPLVAEAQKRELGASLYLGWAASGL
LLLGGGLLCCTCPSGGSQGPSHYMARYSTSAPAISRGPSEYPTKN YV (SEQ ID NO:202)，其中X为Ile或Val。

[0057] 在各个方面，人CLDN6包含SEQ ID NO:1、178和200-202中任一者的氨基酸序列。

[0058] 在各个方面，本公开的抗原结合蛋白与CLDN6的氨基酸序列内的表位结合。在各个方面，CLDN6为人CLDN6，并且本公开的抗原结合蛋白与人CLDN6的氨基酸序列(例如，SEQ ID NO:1、178和200-202)内的表位结合。“表位”是指由抗原结合蛋白结合的CLDN6的区域或CLDN6内部的区域。在一些实施方案中，表位是线性表位。“线性表位”是指CLDN6的区域或CLDN6内部的区域，其由抗原结合蛋白结合并且该区域由CLDN6的氨基酸序列的连续氨基酸组成。线性表位的氨基酸在CLDN6的一级结构中彼此相邻。因此，线性表位为抗原(即CLDN6)的氨基酸序列的片段或部分。在其他各个实施方案中，表位为构象或结构表位。“构象表位”或“结构表位”是指由仅当CLDN6处于其适当折叠状态时彼此紧邻的氨基酸组成的表位。与线性表位不同，构象或结构表位的氨基酸在CLDN6一级结构(即氨基酸序列)中彼此不相邻。构象或结构表位不是由抗原(CLDN6)氨基酸序列的连续氨基酸组成。

[0059] 在各个方面，表位位于CLDN6(例如人CLDN6)的胞外结构域(ECD)内。在各个方面，抗原结合蛋白与CLDN6的ECD的具有氨基酸序列WTAHAIIRDFYNPLVAEAQKREL(SEQ ID NO:2)胞外环2(EL2)结合。在各个方面，抗原结合蛋白结合的表位在SEQ ID NO:2内。在各个方面，本公开的抗原结合蛋白与SEQ ID NO:2的N-末端部分(例如TAHAIIRDFYNPL(SEQ ID NO:3))结合。在各个方面，本公开的抗原结合蛋白与SEQ ID NO:2的C-末端部分(例如LVAEAQKREL(SEQ ID NO:4))结合。在各种情况下，本公开的抗原结合蛋白与CLDN6的EL2结合，但不与胞外环1(EL1)结合。在各个方面，本公开的抗原结合蛋白所结合的一个或多个表位不同于由包含含有序列SEQ ID NO:185的轻链可变区和含有序列SEQ ID NO:186的重链可变区的抗CLDN6抗体所结合的表位。在各个方面，本公开的抗原结合蛋白所结合的一个或多个表位不同于由包含含有序列SEQ ID NO:181的轻链可变区和含有序列SEQ ID NO:182的重链可变区的抗CLDN6抗体所结合的表位。

[0060] 在各个方面，抗原结合蛋白与人CLDN6和非人CLDN6结合。在各种情况下，非人CLDN6为黑猩猩、恒河猴、狗、牛、小鼠、大鼠、斑马鱼或蛙的CLDN6。在各种情况下，抗原结合蛋白与人CLDN6和小鼠CLDN6结合。

[0061] 亲和力和亲合力

[0062] 本文提供的抗原结合蛋白以非共价且可逆方式与CLDN6结合。在各个实施方案中，抗原结合蛋白与CLDN6的结合强度可根据其亲和力(抗原结合蛋白的结合位点与表位之间的相互作用强度的量度)来描述。在各个方面，本文提供的抗原结合蛋白对CLDN6具有高亲和力，因此与低亲和力抗原结合蛋白相比，将在更短的时间段内结合更大量的CLDN6。在各

个方面,抗原结合蛋白具有为至少10^5mol^{-1}、至少10^6mol^{-1}、至少10^7mol^{-1}、至少10^8mol^{-1}、至少10^9mol^{-1}、或至少$10^{10}mol^{-1}$、或至少$10^{10}mol^{-1}$、至少$10^{10}mol^{-1}$的平衡缔合常数K_A。如本领域普通技术人员所理解的,K_A可受包括pH、温度和缓冲液组成的因素影响。

[0063] 在各个实施方案中,抗原结合蛋白与CLDN6的结合强度可根据其敏感性来描述。K_D为抗原结合蛋白与CLDN6之间的平衡解离常数,即k_{off}/k_{on}的比率。K_D和K_A成反比。K_D值与抗原结合蛋白的浓度(特定实验所需的抗原结合蛋白的量)有关,因此K_D值越低(浓度越低),抗原结合蛋白的亲和力越高。在各个方面,抗原结合蛋白与CLDN6的结合强度可根据K_D来描述。在各个方面,本文提供的抗原结合蛋白的K_D为约10^{-1}、约10^{-2}、约10^{-3}、约10^{-4}、约10^{-5}、约10^{-6}或更低。在各个方面,本文提供的抗原结合蛋白的K_D为微摩尔、纳摩尔、皮摩尔或飞摩尔。在各个方面,本文提供的抗原结合蛋白的K_D在约10^{-4}至10^{-6}、或10^{-7}至10^{-9}、或10^{-10}至10^{-12}、或10^{-13}至10^{-15}的范围内。在各个方面,本文提供的抗原结合蛋白的K_D在约1.0x 10^{-12}M至约1.0x 10^{-8}M的范围内。在各个方面,抗原结合蛋白的K_D在约1.0x 10^{-11}M至约1.0x 10^{-9}M的范围内。

[0064] 在各个方面,使用基于流式细胞术或荧光激活细胞分选(FACS)的测定来测量或分级抗原结合蛋白的亲和力。基于流式细胞术的结合测定在本领域中是已知的。参见例如Cedeno-Arias等人,Sci Pharm79(3):569-581(2011);Rathanaswami等人,Analytical Biochem 373:52-60(2008);以及Geuijen等人,J Immunol Methods 302(1-2):68-77(2005)。在各个方面,使用如Trikha等人,Int J Cancer 110:326-335(2004)和Tam等人,Circulation 98(11):1085-1091(1998)以及下文所述的竞争测定测量或分级抗原结合蛋白的亲和力。参见以下标题为"竞争测定"的章节。在Trikh等人中,使用表达抗原的细胞进行放射性测定。用悬浮液中的细胞测量^{125}I-标记的抗原结合蛋白(例如抗体)与细胞表面抗原的结合。在各个方面,CLDN6抗体的相对亲和力经由基于FACS的测定来确定,其中将不同浓度的缀合至荧光团的CLDN6抗体与表达CLDN6的细胞一起温育,并测定发射的荧光(其为抗体-抗原结合的直接量度)。绘制每种剂量或浓度的荧光曲线。最大值是荧光达到稳定或达到最大值(即发生结合饱和时)的最低浓度。最大值的一半被认为是EC50或IC50,并且具有最低EC50/IC50的抗体被认为相对于以相同方式测试的其他抗体具有最高的亲和力。此类测定在本文实施例5中描述。

[0065] 在各个方面,如在竞争性结合抑制测定中所确定的,IC_{50}值近似于抗原结合蛋白的K_D。在各种情况下,如下所述,竞争测定是用参考抗体、荧光团缀合的二抗和表达CLDN6的细胞进行的基于FACS的测定。在各个方面,对细胞进行基因工程改造以过表达CLDN6。在一些方面,细胞是用病毒载体转导以表达CLDN6的HEK293T细胞。在替代方面,细胞内源性表达CLDN6。在进行基于FACS的测定之前,在一些方面中,将内源性表达CLDN6的细胞预先确定为低CLDN6表达细胞或高CLDN6表达细胞。在一些方面,细胞是癌细胞或肿瘤细胞。在各个方面,细胞是来自细胞系的细胞,例如卵巢细胞系、子宫内膜细胞系、膀胱细胞系、肺细胞系、胃肠(GI)细胞系、肝细胞系、肺细胞系等。在各个方面,内源性表达CLDN6的细胞选自由以下组成的组:OVCA429卵巢细胞、ARK2子宫内膜细胞、OAW28卵巢细胞、UMUC-4膀胱细胞、PEO14卵巢细胞、OV177卵巢细胞、H1693肺细胞、MKN7上GI细胞、OV-90卵巢细胞、HUH-7肝细胞、JHOS-4卵巢细胞、H1435肺细胞和NUGC3上GI细胞。在各个方面,抗原结合蛋白抑制由细胞表达的人CLDN6与参考抗体之间的结合相互作用,已知该参考抗体结合CLDN6但不是本公开的

抗原结合蛋白。在各种情况下,本公开的抗原结合蛋白与参考抗体竞争结合人CLDN6,并由此减少与参考抗体结合的人CLDN6的量,如通过体外竞争性结合测定所确定的。在各个方面,本公开的抗原结合蛋白抑制人CLDN6与参考抗体之间的结合相互作用,并且该抑制由IC_{50}表征。在各个方面,抗原结合蛋白表现出抑制人CLDN6与参考抗体之间的结合相互作用的小于约2500nM的IC_{50}。在各个方面,抗原结合蛋白表现出小于约2000nM、小于约1500nM、小于约1000nM、小于约900nM、小于约800nM、小于约700nM、小于约600nM、小于约500nM、小于约400nM、小于约300nM、小于约200nM或小于约100nM的IC_{50}。在各个方面,抗原结合蛋白表现出小于约90nM、小于约80nM、小于约70nM、小于约60nM、小于约50nM、小于约40nM、小于小于约30nM、小于约20nM或小于约10nM的IC_{50}。在各种情况下,本公开的抗原结合蛋白与已知结合CLDN6的参考抗体(该参考抗体不同于本公开的任何抗原结合蛋白)竞争结合CLDN6。参见竞争测定下的进一步描述。

[0066] 亲合力给出了抗体-抗原复合物的总体强度的量度。它取决于三个主要参数:抗原结合蛋白对表位的亲和力、抗原结合蛋白和CLDN6两者的效价以及相互作用的部分的结构排列。抗原结合蛋白的效价(抗原结合位点的数目)越大,它可结合的抗原(CLDN6)的量越大。在各个方面,抗原结合蛋白对CLDN6具有强亲合力。在各个方面,抗原结合蛋白是多价的。在各个方面,抗原结合蛋白是二价的。在各种情况下,抗原抗原结合蛋白是单价的。

[0067] 交叉反应性

[0068] 在各个实施方案中,本公开的抗原结合蛋白与CLDN6结合且不与CLDN家族的任何其他成员结合,例如不与CLDN家族的任何其他成员交叉反应。在各种情况下,本公开的抗原结合蛋白是CLDN-6特异性的。在各个实施方案中,本公开的抗原结合蛋白对CLDN6的选择性是该抗原结合蛋白对CLDN3、CLDN4、CLDN9或它们的组合的选择性的至少10倍、5倍、4倍、3倍、2倍。在各个实施方案中,本公开的抗原结合蛋白对CLDN6的选择性是该抗原结合蛋白对CLDN3、CLDN4和CLDN9中的每一者的选择性的至少10倍、5倍、4倍、3倍、2倍。选择性可基于抗原结合蛋白对CLDN6或CLDN家族成员所表现出的K_D,其中K_D可通过本领域已知的技术例如表面等离子体共振、基于FACS的亲和力测定来确定。

[0069] 在各个方面,本公开的抗原结合蛋白与CLDN6结合且不与紧密连接蛋白3(CLDN3)、紧密连接蛋白4(CLDN4)和紧密连接蛋白9(CLDN9)中的任一者结合。在各个方面,抗原结合蛋白不与CLDN3、CLDN4和CLDN9中的任一者结合,并且在用内源性表达CLDN6的OVCA429细胞的基于FACS的测定中表现出小于约1200nM(例如,小于约1000nM、小于约750nM、小于约500nM、小于约250nM)的IC_{50}。在各个方面,抗原结合蛋白不与CLDN3、CLDN4和CLDN9中的任一者结合,并且在用内源性表达CLDN6的OVCA429细胞实现50%结合饱和度时的浓度小于约1200nM(例如,小于约1000nM、小于约750nM、小于约500nM、小于约250nM)。在各个方面,抗原结合蛋白对CLDN 6的选择性是对CLDN3、CLDN4和CLDN9的选择性的至少5倍,并且在用内源性表达CLDN6的OVCA429细胞实现50%结合饱和度时的浓度小于约1200nM(例如,小于约1000nM、小于约750nM、小于约500nM、小于约250nM)。在各个方面,抗原结合蛋白对CLDN6人工和内源性模型表现出小于约1200nM(例如,小于约1000nM、小于约750nM、小于约500nM、小于约250nM)的IC50,并且表现出将CLDN6 IC50与CLDN3、CLDN4和/或CLDN9分开的大于约5倍的比率。在各种情况下,抗原结合蛋白对CLDN6表现出小于约1200nM(例如,小于约1000nM、小于约750nM、小于约500nM、小于约250nM)的IC50,并且对CLDN3、CLDN4和CLDN9中的任一者

表现出是该IC50至少5倍的IC50。

[0070] 在各个实施方案中,本公开的抗原结合蛋白结合CLDN6并与CLDN家族的至少一个其他成员交叉反应(例如结合)。在各个方面,本公开的抗原结合蛋白与CLDN6以及CLDN3、CLDN4和CLDN9中的一者或多者结合。在各个方面,本公开的抗原结合蛋白与CLDN6和CLDN4或CLDN9结合,但不与CLDN3结合。在各种情况下,本公开的抗原结合蛋白与CLDN6和CLDN4结合,但既不与CLDN3结合也不与CLDN9结合。在各种情况下,本公开的抗原结合蛋白与CLDN6和CLDN9结合,但不与CLDN3或CLDN4结合。

[0071] 竞争测定

[0072] 在各个实施方案中,抗原结合蛋白抑制人CLDN6与参考抗体之间的结合相互作用,已知该参考抗体结合CLDN6但不是本公开的抗原结合蛋白。在各种情况下,本公开的抗原结合蛋白与参考抗体竞争结合人CLDN6,并由此减少与参考抗体结合的人CLDN6的量,如通过体外竞争性结合测定所确定的。在各个实施方案中,参考抗体与人CLDN6的胞外结构域的氨基酸序列内(任选地EL2或EL1内)的表位结合。在各个方面,参考抗体包含由SEQ ID NO:179编码的轻链可变序列和由SEQ ID NO:180编码的重链可变序列。在各个方面,参考抗体包含SEQ ID NO:181的轻链可变序列和SEQ ID NO:182的重链可变序列。在各个方面,本公开的抗原结合蛋白抑制人CLDN6与参考抗体之间的结合相互作用,并且该抑制由IC_{50}表征。在各个方面,抗原结合蛋白表现出抑制人CLDN6与参考抗体之间的结合相互作用的小于约2500nM的IC_{50}。在各个方面,抗原结合蛋白表现出小于约2000nM、小于约1500nM、小于约1000nM、小于约900nM、小于约800nM、小于约700nM、小于约600nM、小于约500nM、小于约400nM、小于约300nM、小于约200nM或小于约100nM的IC_{50}。在各个方面,抗原结合蛋白表现出小于约90nM、小于约80nM、小于约70nM、小于约60nM、小于约50nM、小于约40nM、小于约30nM、小于约20nM或小于约10nM的IC_{50}。

[0073] 在各种情况下,本公开的抗原结合蛋白与参考抗体竞争结合人CLDN6,并由此减少与参考抗体结合的人CLDN6的量,如通过体外竞争性结合测定所确定的。在各个方面,体外竞争性结合测定是基于FACS的测定,其中在不存在或存在特定量的本公开的抗原结合蛋白的情况下测量与参考抗体的Fc结合的荧光团缀合的二抗的荧光。此种基于FACS的测定在本文的实施例中描述。在各个方面,用参考抗体、荧光团缀合的二抗和表达CLDN6的细胞进行基于FACS的测定。在各个方面,对细胞进行基因工程改造以过表达CLDN6。在一些方面,细胞是用病毒载体转导以表达CLDN6的HEK293T细胞。在替代方面,细胞内源性表达CLDN6。在进行基于FACS的测定之前,在一些方面中,将内源性表达CLDN6的细胞预先确定为低CLDN6表达细胞或高CLDN6表达细胞。在一些方面,细胞是癌细胞或肿瘤细胞。在各个方面,细胞是来自细胞系的细胞,所述细胞系例如卵巢细胞系、子宫内膜细胞系、膀胱细胞系、肺细胞系、胃肠(GI)细胞系、肝细胞系、肺细胞系等。在各个方面,内源性表达CLDN6的细胞选自由以下组成的组:OVCA429卵巢细胞、ARK2子宫内膜细胞、OAW28卵巢细胞、UMUC-4膀胱细胞、PEO14卵巢细胞、OV177卵巢细胞、H1693肺细胞、MKN7上GI细胞、OV-90卵巢细胞、HUH-7肝细胞、JHOS-4卵巢细胞、H1435肺细胞和NUGC3上GI细胞。在各种情况下,本公开的抗原结合蛋白以高亲和力结合由ARK2细胞、OVCA429细胞、LS513细胞或MCF7细胞中的一者或多者内源性表达的CLDN6。在各个方面,抗原结合蛋白表现出小于约3000nM的IC_{50},如使用ARK2细胞、OVCA429细胞、LS513细胞或MCF7细胞中的一者或多者在基于FACS的竞争性结合抑制测定中所确定的。

在各个方面,抗原结合蛋白表现出小于约2500nM、小于约2000nM、小于约1750nM、小于约1500nM、小于约1250nM、小于约1000nM、小于约750nM或小于约500nM的IC_{50},如使用ARK2细胞、OVCA429细胞、LS513细胞或MCF7细胞中的一者或多者在基于FACS的竞争性结合抑制测定中所确定的。在各个方面,抗原结合蛋白表现出小于约400nM、小于约300nM、小于约200nM、小于约100nM、小于约75nM、小于约50nM、小于约25nM或小于约10nM的IC_{50},如使用ARK2细胞、OVCA429细胞、LS513细胞或MCF7细胞中的一者或多者在基于FACS的竞争性结合抑制测定中所确定的。

[0074] 测试抗体与第二抗体竞争结合抗原或其表位的能力的其他结合测定(例如,竞争性结合测定或竞争测定)在本领域中是已知的。参见例如,Trikha等人,Int J Cancer 110:326-335(2004);Tam等人,Circulation 98(11):1085-1091(1998);美国专利申请公开号US20140178905;Chand等人,Biologicals 46:168-171(2017);Liu等人,Anal Biochem 525:89-91(2017);以及Goolia等人,J Vet Diagn Invest 29(2):250-253(2017)。同样,比较两种抗体的其他方法在本领域中是已知的,并且包括例如表面等离子体共振(SPR)。SPR可用于确定抗体和第二抗体的结合常数,并且可比较这两个结合常数。

[0075] 抗体产生方法和相关方法

[0076] 制备抗原结合蛋白(例如抗体、抗原结合抗体片段和抗体蛋白产物)的合适方法在本领域中是已知的。例如,用于产生抗体的标准杂交瘤方法描述于例如,Harlow和Lane(编辑),Antibodies:A Laboratory Manual,CSH Press(1988)以及CA.Janeway等人(编辑),Immunobiology,第5版,Garland Publishing,New York,NY(2001)。本文在实施例中提供了制备本公开的CLDN6单克隆抗体的不同方法。

[0077] 根据宿主物种,可使用各种佐剂来增加免疫应答,从而导致宿主产生更多的抗体。此类佐剂包括但不限于弗氏佐剂、矿物凝胶(诸如氢氧化铝)和表面活性物质(诸如溶血卵磷脂、普朗尼克多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、匙孔血蓝蛋白和二硝基苯酚)。BCG(卡介苗)和短小棒状杆菌是潜在有用的人佐剂。

[0078] 抗体产生的其他方法汇总于表1中。

[0079] 表1

[0080]

技术	各种参考文献
EBV-杂交瘤方法和噬菌体载体表达系统	Haskard 和 Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67 (1984), Roder 等人, Methods Enzymol., 121, 140-67 (1986), 以及 Huse 等人, Science, 246, 1275-81 (1989))。
非人动物中产生抗体的方法	美国专利 5,545,806、5,569,825 和 5,714,352, 以及美国专利申请公开号 2002/0197266
诱导淋巴细胞群的体内产生或通过筛选重组免疫球蛋白文库或高特异性结合试剂组	Orlandi 等人 (Proc Natl Acad Sci 86: 3833-3837; 1989), 以及 Winter G 和 Milstein C (Nature 349: 293-299, 1991)。
生产重组蛋白的方法	Protein production and purification" Nat Methods 5(2): 135-146 (2008)。
噬菌体展示	Janeway 等人, 出处同上, Huse 等人, 出处同上, 以及美国专利 6,265,150)。相关方法也在美国专利号 5,403,484、美国专利号 5,571,698、美国专利号 5,837,500、美国专利号 5,702,892 中有所描述。美国专利号 5,780,279、美国专利号 5,821,047、美国专利号 5,824,520、美国专利号 5,855,885、美国专利号 5,858,657、美国专利号 5,871,907、美国专利号 5,969,108、美国专利号 6,057,098 和美国专利号 6,225,447 中描述的技术
抗体可由转基因小鼠产生	美国专利号 5,545,806 和 5,569,825, 以及 Janeway 等人, 出处同上。

[0081] 无论抗体如何产生,测试抗体与CLDN6表位结合的能力的方法在本领域中是已知的,并且包括任何抗体-抗原结合测定,例如放射免疫测定(RIA)、ELISA、蛋白质印迹、免疫沉淀、SPR和竞争性抑制测定(参见例如Janeway等人、下文和美国专利申请公开号2002/0197266以及有关竞争测定的以上章节)。

[0082] 序列/结构

[0083] 本文提供了抗原结合蛋白,该抗原结合蛋白包含:(a)表A中列出的重链(HC)互补决定区(CDR)1氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:11、17、23、29、35、41、47、53、59、65、71、77、83、89、95、101、107、113、119、125和131、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%(例如,至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%)序列同一性的变体序列;(b)表A中列出的HC CDR2氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、72、78、84、90、86、102、108、114、120、126和132、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%(例如,至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%)序列同一性的变体序列;(c)表A中列出的HC CDR3氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:13、19、25、31、37、43、49、55、61、67、73、79、85、91、97、103、109、115、121、127和133、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%(例如,至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%)序列同一性的变体序列;(d)表A中列出的轻链(LC)CDR1氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:8、14、20、32、38、44、

50、56、62、68、74、80、86、92、98、104、110、116、122和128、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)序列同一性的变体序列;(e)表A中列出的LC CDR2氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:9、15、21、27、33、39、45、51、57、63、69、75、81、87、93、99、105、111、117、123和129、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)序列同一性的变体序列;(f)表A中列出的LC CDR3氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:10、16、22、28、34、40、46、52、58、64、70、76、82、88、94、100、106、112、118、124和130、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)序列同一性的变体序列;或(g)(a)-(f)中任何两者或多者的组合。

[0084] 表A

[0085]

	LC CDR1	LC CDR2	LC CDR3	HC CDR1	HC CDR2	HC CDR3
AB1	8	9	10	11	12	13
AB2	14	15	16	17	18	19
AB3	20	21	22	23	24	25
AB4	26	27	28	29	30	31
AB5	32	33	34	35	36	37
AB6	38	39	40	41	42	43
AB7	44	45	46	47	48	49
AB8	50	51	52	53	54	55
AB9	56	57	58	59	60	61
AB10	62	63	64	65	66	67
AB11	68	69	70	71	72	73
AB12	74	75	76	77	78	79
AB13	80	81	82	83	84	85
AB14	86	87	88	89	90	91
AB15	92	93	94	95	96	97
AB16	98	99	100	101	102	103
AB17	104	105	106	107	108	109
AB18	110	111	112	113	114	115
AB19	116	117	118	119	120	121
AB20	122	123	124	125	126	127
AB21	128	129	130	131	132	133

[0086] 在各个方面,抗原结合蛋白包含表A中列出的LC CDR1氨基酸序列、LC CDR2氨基酸序列和LC CDR3氨基酸序列以及表A中列出的HC CDR氨基酸序列中的至少1个或2个。在各个方面,抗原结合蛋白包含表A中列出的HC CDR1氨基酸序列、HC CDR2氨基酸序列和HC CDR3氨基酸序列以及表A中列出的LC CDR氨基酸序列中的至少1个或2个。

[0087] 在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含由表A的单行中的SEQ ID NO:指定的氨基酸序列中的至少3、4或5个。在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含由表A的单行的SEQ ID NO:指定的LC CDR氨基酸序列中的每一个和由表A的单行中的SEQ ID NO:指定的HC CDR氨基酸序列中的至少1或2个。在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含由表A的单行的SEQ ID NO:指定的HC CDR氨基酸序列中的每一个和由表A的单行的SEQ ID NO:指定的LC CDR氨基

酸序列中的至少1或2个。在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含由表A的单行的SEQ ID NO:指定的CDR氨基酸序列中的所有6个。在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含选自由以下组成的组的六个CDR氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:74-79;(b)SEQ ID NO:50-55;(c)SEQ ID NO:122-127;(d)SEQ ID NO:26-31;(e)SEQ ID NO:128-133;(f)SEQ ID NO:38-43;(g)SEQ ID NO:62-67;(h)SEQ ID NO:80-85;(i)SEQ ID NO:44-49;(j)SEQ ID NO:86-91;(k)SEQ ID NO:104-109;(l)SEQ ID NO:56-61;(m)SEQ ID NO:32-37;(n)SEQ ID NO:110-115;(o)SEQ ID NO:98-103;(p)SEQ ID NO:92-97;(q)SEQ ID NO:116-121;(r)SEQ ID NO:8-13;(s)SEQ ID NO:68-73;(t)SEQ ID NO:14-19;和(u)SEQ ID NO:20-25。

[0088] 在各种情况下,表A的氨基酸序列被至少一个或多个(例如,至少2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)插入的氨基酸分开。在各种情况下,LC CDR1与LC CDR2的序列之间存在约10至约20个氨基酸,并且LC CDR2与LC CDR3的序列之间存在约25至约40个氨基酸。在各种情况下,LC CDR1与LC CDR2的序列之间存在约14至约16个氨基酸,并且LC CDR2与LC CDR3的序列之间存在约30至约35个氨基酸。在各种情况下,HC CDR1与HC CDR2的序列之间存在约10至约20个氨基酸,并且HC CDR2与HC CDR3的序列之间存在约25至约40个氨基酸。在各种情况下,HC CDR1与HC CDR2的序列之间存在约14至约16个氨基酸,并且HC CDR2与HC CDR3的序列之间存在约30至约35个氨基酸。

[0089] 在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含(a)表B中列出的重链可变区氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、171、173和175、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%(例如,至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%)序列同一性的变体序列;或(b)表B中列出的轻链可变区氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174和176、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%(例如,至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%)序列同一性的变体序列;或(c)(a)和(b)两者。

[0090] 表B

[0091]

	轻链可变区	重链可变区
AB1	134	135
AB2	136	137
AB3	138	139
AB4	140	141
AB5	142	143
AB6	144	145
AB7	146	147
AB8	148	149
AB9	150	151
AB10	152	153
AB11	154	155
AB12	156	157
AB13	158	159

AB14	160	161
AB15	162	163
AB16	164	165
AB17	166	167
AB18	168	169
AB19	170	171
AB20	172	173
AB21	174	175

[0092] 在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含选自由以下组成的组的一对氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:156和157;(b)SEQ ID NO:148和149;(c)SEQ ID NO:172和173;(d)SEQ ID NO:140和141;(e)SEQ ID NO:174和175;(f)SEQ ID NO:144和145;(g)SEQ ID NO:152和153;(h)SEQ ID NO:158和159;(i)SEQ ID NO:146和147;(j)SEQ ID NO:160和161;(k)SEQ ID NO:166和167;(l)SEQ ID NO:150和151;(m)SEQ ID NO:142和143;(n)SEQ ID NO:168和169;(o)SEQ ID NO:164和165;(p)SEQ ID NO:162和163;(q)SEQ ID NO:170和171;(r)SEQ ID NO:134和135;(s)SEQ ID NO:154和155;(t)SEQ ID NO:136和137;以及(u)SEQ ID NO:138和139。

[0093] 在各个方面,抗原结合蛋白不包含由序列SEQ ID NO:179和180编码的一对氨基酸序列。在各个方面,抗原结合蛋白不包含SEQ ID NO:181和182的一对氨基酸序列。在各个方面,抗原结合蛋白不包含由序列SEQ ID NO:183和184编码的一对氨基酸序列。在各个方面,抗原结合蛋白不包含SEQ ID NO:185和186的一对氨基酸序列。

[0094] 在各个方面,抗原结合蛋白包含与上述氨基酸序列相似的氨基酸序列,但抗原结合蛋白基本上保留其生物学功能,例如其与人CLDN6结合、减少肿瘤生长、治疗癌症的能力。

[0095] 在各个方面,抗原结合蛋白包含相对于上述一个或多个氨基酸序列仅相差1、2、3、4、5、6个或更多个氨基酸的氨基酸序列。在各个方面,抗原结合蛋白包含所述序列的变体序列,该变体序列相对于所述序列仅相差一个或两个氨基酸。在各个方面,抗原结合蛋白包含发生在CDR之外的一个或多个氨基酸取代,例如,发生在重链或轻链的一个或多个构架区内的一个或多个氨基酸取代。在各个方面,抗原结合蛋白包含一个或多个氨基酸取代,但该抗原结合蛋白保留六个CDR的氨基酸序列。在各个方面,抗原结合蛋白包含相对于上述氨基酸序列仅具有1、2、3、4、5、6个或更多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。如本文所用,术语“保守氨基酸取代”是指一种氨基酸被具有类似性质(例如,大小、电荷、疏水性、亲水性和/或芳香性)的另一种氨基酸取代,并且包括在以下五组之一内的交换:

[0096] I.小的脂肪族、非极性或弱极性残基:

[0097] Ala、Ser、Thr、Pro、Gly;

[0098] II.极性、带负电荷的残基及其酰胺和酯:

[0099] Asp、Asn、Glu、Gln、磺基丙氨酸和同型磺基丙氨酸;

[0100] III.极性、带正电荷的残基:

[0101] His、Arg、Lys;鸟氨酸(Orn)

[0102] IV.大的脂肪族、非极性残基:

[0103] Met、Leu、Ile、Val、Cys、正亮氨酸(Nle)、同型半胱氨酸

[0104] V.大的芳族残基:

[0105] Phe、Tyr、Trp、乙酰苯丙氨酸

[0106] 在各个方面,保守氨基酸取代是在以下氨基酸组之一内的交换:

[0107] I.脂族氨基酸:Gly、Ala、Val、Leu、Ile

[0108] II.包含侧链羟基的非芳族氨基酸:Serc、Thr

[0109] III.包含硫侧链的氨基酸:Cys、Met

[0110] IV:包含侧链芳环的氨基酸:Phe、Tyr、Trp

[0111] V:酸性氨基酸:Glu;Asp

[0112] VI:碱性氨基酸:Arg;Lys

[0113] VII:包含侧链酰胺的氨基酸:Gln、Asn

[0114] VIII:包含侧链咪唑的氨基酸:His、α-二甲基咪唑乙酸(DMIA)

[0115] IX:亚氨基酸:Pro、4-羟基-Pro、4-氨基-Pro

[0116] 在各个方面,抗原结合蛋白包含与上述氨基酸序列具有大于或约30%、大于或约50%、或大于或约70%的序列同一性的氨基酸序列。在各个方面,抗原结合蛋白包含与上述氨基酸序列具有至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%或具有大于90%的序列同一性的氨基酸序列。在各个方面,抗原结合蛋白包含沿上述氨基酸序列的全长具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%或具有大于90%的序列同一性的氨基酸序列。在各个方面,抗原结合蛋白包含沿上述氨基酸序列的全长具有至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的氨基酸序列。

[0117] 在各个方面,抗原结合蛋白包含所述序列的变体序列,所述变体序列相对于上述序列具有至少或约70%序列同一性。在各个方面,抗原结合蛋白包含所述序列的变体序列,所述变体序列相对于上述序列具有至少或约80%序列同一性。在各个方面,抗原结合蛋白包含所述序列的变体序列,所述变体序列相对于上述序列具有至少或约90%序列同一性。在各个方面,抗原结合蛋白包含所述序列的变体序列,所述变体序列相对于上述序列具有至少或约95%序列同一性。

[0118] 在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含表A的单行中的SEQ ID NO的一、二、三、四或五个序列和与SEQ ID NO:8-133中的任一者具有至少或约70%(例如,至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%)序列同一性的至少一个变体序列。在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含选自以下的一组序列中的一、二、三、四或五个序列:(a)SEQ ID NO:74-79;(b)SEQ ID NO:50-55;(c)SEQ ID NO:122-127;(d)SEQ ID NO:26-31;(e)SEQ ID NO:128-133;(f)SEQ ID NO:38-43;(g)SEQ ID NO:62-67;(h)SEQ ID NO:80-85;(i)SEQ ID NO:44-49;(j)SEQ ID NO:86-91;(k)SEQ ID NO:104-109;(l)SEQ ID NO:56-61;(m)SEQ ID NO:32-37;(n)SEQ ID NO:110-115;(o)SEQ ID NO:98-103;(p)SEQ ID NO:92-97;(q)SEQ ID NO:116-121;(r)SEQ ID NO:8-13;(s)SEQ ID NO:68-73;(t)SEQ ID NO:14-19;和(u)SEQ ID NO:20-25,其中抗原结合蛋白还包含与该组序列中的至少一者具有至少或约70%(例如,至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%)序列同一性的变体序列。例如,在各个方面,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:74-79中的四个序列,即SEQ ID NO:74-77,其中抗原结合蛋白包含两个变体序列:一个变体序列与SEQ ID NO:78具有至少或约70%(例如,至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%)的序列同一性并且另一变体序列与SEQ ID

NO:79具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)的序列同一性。

[0119] 在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:134-175中的任一者具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)序列同一性的一对变体序列。在各种情况下,抗原结合蛋白包含与以下项具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)序列同一性的一对变体序列:(a)SEQ ID NO:156和157;(b)SEQ ID NO:148和149;(c)SEQ ID NO:172和173;(d)SEQ ID NO:140和141;(e)SEQ ID NO:174和175;(f)SEQ ID NO:144和145;(g)SEQ ID NO:152和153;(h)SEQ ID NO:158和159;(i)SEQ ID NO:146和147;(j)SEQ ID NO:160和161;(k)SEQ ID NO:166和167;(l)SEQ ID NO:150和151;(m)SEQ ID NO:142和143;(n)SEQ ID NO:168和169;(o)SEQ ID NO:164和165;(p)SEQ ID NO:162和163;(q)SEQ ID NO:170和171;(r)SEQ ID NO:134和135;(s)SEQ ID NO:154和155;(t)SEQ ID NO:136和137;以及(u)SEQ ID NO:138和139。在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含一对序列:表B的一个序列和另一序列,该另一序列为与SEQ ID NO:134-175中的任一者具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)序列同一性的变体序列。在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含一对序列:选自以下项的一个序列:(a)SEQ ID NO:156和157;(b)SEQ ID NO:148和149;(c)SEQ ID NO:172和173;(d)SEQ ID NO:140和141;(e)SEQ ID NO:174和175;(f)SEQ ID NO:144和145;(g)SEQ ID NO:152和153;(h)SEQ ID NO:158和159;(i)SEQ ID NO:146和147;(j)SEQ ID NO:160和161;(k)SEQ ID NO:166和167;(l)SEQ ID NO:150和151;(m)SEQ ID NO:142和143;(n)SEQ ID NO:168和169;(o)SEQ ID NO:164和165;(p)SEQ ID NO:162和163;(q)SEQ ID NO:170和171;(r)SEQ ID NO:134和135;(s)SEQ ID NO:154和155;(t)SEQ ID NO:136和137;以及(u)SEQ ID NO:138和139,以及另一序列,该另一序列为与(a)-(u)的序列具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)序列同一性的变体序列。例如,在各个方面,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:134的序列,并且抗原结合蛋白还包含与SEQ ID NO 135具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)序列同一性的变体序列。

[0120] 在各种情况下,抗原结合蛋白包含具有一个或多个氨基酸取代的上述氨基酸序列的氨基酸序列,以减少或消除反应性氨基酸,从而减少或防止不希望的侧链反应。例如,抗原结合蛋白包含上述氨基酸序列的具有以下一者或多者的氨基酸序列:(i)Trp残基被His、Tyr或Phe取代;(ii)Asn残基被Gln、Ser、Ala或Asp取代;(iii)紧邻出现在Pro残基之前的Asp残基被Ala、Ser或Glu取代;(iv)Asn残基被Gln、Ser或Ala取代;和/或(v)Cys残基被Tyr、Ser或Ala取代。在各个方面,抗原结合蛋白包含上述氨基酸序列的具有这种氨基酸取代的氨基酸序列,该氨基酸取代基于SHM事件或基于大量其他类似抗体序列的统计学分析被预测具有更高的结合亲和力、更高的稳定性或其他积极属性。在一些方面,抗原结合蛋白包含(a)表A1中列出的HC CDR1氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:452、455、461、465、71和472、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)序列同一性的变体序列;(b)表A1中列出的HC CDR2氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:475、456、462、466、468和473、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约

90％、至少约95％)序列同一性的变体序列;(c)表A1中列出的HC CDR3氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:453、457、463、467、469和474、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)序列同一性的变体序列;(d)表A1中列出的LC CDR1氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:449、476、458、464、68和470、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)序列同一性的变体序列;(e)表A1中列出的LC CDR2氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:450、477、459、57、69和471、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)序列同一性的变体序列;(f)表A1中列出的LC CDR3氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:451、454、460、58、70和112、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)序列同一性的变体序列,或(g)(a)-(f)中的任何两者或多者的组合。

[0121] 表A1

[0122]

	LC CDR1	LC CDR2	LC CDR3	HC CDR1	HC CDR2	HC CDR3
AB1*	449	450	451	452	475	453
AB3*	476	477	454	455	456	457
AB4*	458	459	460	461	462	463
AB9*	464	57	58	465	466	467
AB11*	68	69	70	71	468	469
AB18*	470	471	112	472	473	474

[0123] 在一些方面,HC CDR1包含SEQ ID NO:452的紧邻N-末端的Gly,并且任选地,在一些方面,HC CDR1包含SEQ 452的紧邻C-末端的MX,其中X为H、N或S。在各个方面,HC CDR3包含SEQ ID NO:453的紧邻N-末端的Ala。在各个方面,LC CDR1还包含SEQ ID NO:449的紧邻N-末端的TAS和任选地SEQ ID NO:449的紧邻C-末端的XH,其中X为H、S、Y或Q。在一些方面,如下所述,SEQ ID NO:449的第一氨基酸为S或Q。在一些方面,如下所述,SEQ ID NO:451的第一氨基酸为S或Q。

[0124] 在各个方面,HC CDR1包含SEQ ID NO:455的紧邻N-末端的Gly,并且任选地,在各个方面,HC CDR1包含SEQ ID NO:455的紧邻C-末端的MX,其中X为N、S或H。在一些方面,HC CDR2包含SEQ ID NO:SEQ ID NO:456的紧邻N-末端的Gln和任选地SEQ ID NO:456的紧邻C-末端的H。在各个方面,LC CDR1包含SEQ ID NO:476的紧邻N-末端的RIS,并且任选地包含SEQ ID NO:476的紧邻C-末端的LA。在各个方面,LC CDR2包含SEQ ID NO:477的紧邻C-末端的XLVE,其中X为I或S。

[0125] 在各个方面,HC CDR1包含SEQ ID NO:461的紧邻C-末端的MH。在各个方面,HC CDR2包含SEQ ID NO:462的紧邻N-末端的Tyr,并且任选地包含SEQ ID NO:462的紧邻C-末端的TH。在示例性方面,HC CDR3不包括SEQ ID NO:463的前两个氨基酸。在各个方面,LC CDR1包含SEQ ID NO:458的紧邻N-末端的RSS和任选地SEQ ID NO:458的紧邻C-末端的LN。在各个方面,LC CDR2包含SEQ ID NO:459的紧邻C-末端的XRFS,其中X为Q、S、A或D。

[0126] 在各个方面,HC CDR1包含SEQ ID NO:465的紧邻C-末端的MH。在各个方面,HC

CDR2包含SEQ ID NO:466的紧邻N-末端的YI,并且任选地包含SEQ ID NO:466的紧邻C-末端的Xaa,其中Xaa为N、S、Q或A。在各个方面,LC CDR1包含SEQ ID NO:464的紧邻N-末端的LAS和任选地SEQ ID NO:464的紧邻C-末端的LA。在各个方面,LC CDR2包含SEQ ID NO:57的紧邻C-末端的SLAD。

[0127] 在各个方面,HC CDR1包含SEQ ID NO:71的紧邻C-末端的MH。在各个方面,HC CDR2包含SEQ ID NO:468的紧邻N-末端的Tyr,并且任选地包含SEQ ID NO:468的紧邻C-末端的IY。在各个方面,LC CDR1包含SEQ ID NO:68的紧邻N-末端的RAS和任选地SEQ ID NO:68的紧邻C-末端的SYIH。在各个方面,LC CDR2包含SEQ ID NO:69的紧邻C-末端的XLES,其中X为N、Q、S、A或D。

[0128] 在各个方面,LC CDR1包含SEQ ID NO:470的紧邻N-末端的KSS和SEQ 470的紧邻C-末端的YLA。在各个方面,LC CDR2包含SEQ ID NO:471的紧邻C-末端的TRES。在各个方面,HC CDR1包含SEQ ID NO:472的紧邻C-末端的MN。在各个方面,HC CDR2包含SEQ 473的紧邻N-末端的Xaa,其中Xaa为N、Q、S或A;和任选地SEQ 473的紧邻C-末端的Thr。

[0129] 在各个方面,抗原结合蛋白包含表A1中列出的LC CDR1氨基酸序列、LC CDR2氨基酸序列和LC CDR3氨基酸序列以及表A1中列出的HC CDR氨基酸序列中的至少1个或2个。在各个方面,抗原结合蛋白包含表A1中列出的HC CDR1氨基酸序列、HC CDR2氨基酸序列和HC CDR3氨基酸序列以及表A1中列出的LC CDR氨基酸序列中的至少1个或2个。

[0130] 在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含由表A1的单行中的SEQ ID NO:指定的氨基酸序列中的至少3、4或5个。在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含由表A1的单行的SEQ ID NO:指定的LC CDR氨基酸序列中的每一个和由表A1的单行的SEQ ID NO:指定的HC CDR氨基酸序列中的至少1个或2个。在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含由表A1的单行的SEQ ID NO:指定的HC CDR氨基酸序列中的每一个和由表A1的单行的SEQ ID NO:指定的LC CDR氨基酸序列中的至少1或2个。在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含由表A1的单行的SEQ ID NO:指定的CDR氨基酸序列中的所有6个。在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含选自由以下组成的组的六个CDR氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:449-453和475;(b)SEQ ID NO:476-477、454-457;(c)SEQ ID NO:458-463;(d)SEQ ID NO:57、58、464-467;(e)SEQ ID NO:68-71和468-469;以及(f)SEQ ID NO:112和470-474。

[0131] 在各种情况下,表A1的氨基酸序列被至少一个或多个(例如,至少2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)插入的氨基酸分开。在各种情况下,LC CDR1与LC CDR2的序列之间存在约10至约20个氨基酸,并且LC CDR2与LC CDR3的序列之间存在约25至约40个氨基酸。在各种情况下,LC CDR1与LC CDR2的序列之间存在约14至约16个氨基酸,并且LC CDR2与LC CDR3的序列之间存在约30至约35个氨基酸。在各种情况下,HC CDR1与HC CDR2的序列之间存在约10至约20个氨基酸,并且HC CDR2与HC CDR3的序列之间存在约25至约40个氨基酸。在各种情况下,HC CDR1与HC CDR2的序列之间存在约14至约16个氨基酸,并且HC CDR2与HC CDR3的序列之间存在约30至约35个氨基酸。

[0132] 在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含(a)表B1中列出的重链可变区氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:478、480、482、484、486和488、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%(例如,至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%)序列同一性的变体序列;或(b)表B1中列出的轻链可变区氨基酸序列或选自由以下组

成的组的序列:SEQ ID NO:479、481、483、485、487和489、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)序列同一性的变体序列;或(c)(a)和(b)两者。

[0133] 表B1

[0134]

	HC可变区	LC可变区
AB1*	478	479
AB3*	480	481
AB4*	482	483
AB9*	488	489
AB11*	486	487
AB18*	484	485

[0135] 在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含选自由以下组成的组的一对氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:478和479;(b)SEQ ID NO:480和481;(c)SEQ ID NO:482和483;(d)SEQ ID NO:484和485;(e)SEQ ID NO:486和487;以及(f)SEQ ID NO:488和489。在各个方面,抗原结合蛋白包含与具有表B1中所列的SEQ ID NO:的序列的变体序列,所述变体序列仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)序列同一性,其中该一个或多个不同的氨基酸出现在下述“人源化抗体”中的位置。

[0136] 人源化抗体

[0137] 在各个方面,抗原结合蛋白为表A、表A1、表B或表B1中所述的抗原结合蛋白的人源化形式。

[0138] 人源化AB1

[0139] 在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB1的人源化形式,其在重链可变区中的一个或多个以下位置具有一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个)氨基酸取代:5、8、11、12、13、20、31、33、35、38、40、48、50、55、57、59、61、65、66、67、68、70、72、74、76、79、80、82、87、90、91、98、101和116。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:428的氨基酸序列。在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB1的人源化形式,其在重链可变区中的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个)以下位置具有一个或多个氨基酸取代:20、31、35、48、50、59、67、70、74、79、98、101。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:429的氨基酸序列。在各个方面,上述位置处的氨基酸选自根据下表的氨基酸:

[0140]

位置	*氨基酸*	*位置*	*氨基酸*	*位置*	*氨基酸*
5	Q、V	8	A、G	11	L、V
12	A、K	13	R、K	20	M、V
31	S、T、V、D	33	Y、T	35	H、N、S
38	K、R	40	R、A	48	I、M
50	F、V、T、Y、I	55	G、S	57	S、Y
59	D、E、N、	61	N、A	65	K、Q

[0141]

	S				
66	D、G	67	R、Q、N、K	68	T、V
70	L、M	72	R、A	74	K、T
		79	V、D、S、A	82	Q、E
87	T、R	91	S、T	98	N、Q、H、D、R
101	Y	76	ST	116	A、S

[0142] 在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB1的人源化形式,其在轻链可变区中的一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40或41个)以下位置具有一个或多个氨基酸取代:1、3、4、9、10、11、15、17、21、24、27、29、32、34、35、43、44、48、51、52、53、54、55、56、61、67、71、72、73、79、80、81、84、90、92、93、94、95、96、101、107。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:430的氨基酸序列。在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB1的人源化形式,其在轻链可变区中的一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13个)以下位置具有一个或多个氨基酸取代:4、21、32、34、48、51、53、61、67、79、84、91和93。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:431的氨基酸序列。在各个方面,上述位置处的氨基酸选自根据下表的氨基酸:

[0143]

位置	*氨基酸*	*位置*	*氨基酸*	*位置*	*氨基酸*
1	Q、D	3	V、Q	4	L、M
9	A、S	10	I、S	11	M、L
15	L、V	17	E、D	21	M、I
24	T、R	27	S、Q	32	T、V、F、D、S
34	F、L	35	H、S、Y、Q、N	43	S、K
44	S、A	48	W、L	51	S、T、Q、A
52	T、A	53	S、T、D、	54	N、S

[0144]

			Q		
		56	A、Q	61	R、Q、S、D
67	A、S、T、G	71	S、D	72	Y、F
73	S、T	79	M、L	80	E、Q
81	A、P	84	A、F	90	H、Q
91	Q、H、S	93	H、Q、S、Y	94	R、S
97	L、P	101	A、Q	107	L、I
29	V、I	92	Y、S	95	S、T

[0145] 人源化AB3

[0146] 在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB3的人源化形式,其在重链可变区中的一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32或33个)以下位置具有一个或多个氨基酸取代:3、5、18、19、23、31、33、35、40、42、49、50、52、53、54、55、56、57、58、59、61、64、76、79、80、81、87、94、95、99、106、112、114。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:432的氨基酸序列。在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB3的人源化形式,其在重链可变区中的一个或多个(例如1、2、3、4、5、6或7个)以下位置具有一个或多个氨基酸取代:31、35、50、55、79、99、106。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:433的氨基酸序列。在各个方面,上述位置处的氨基酸选自根据下表的氨基酸:

[0147]

位置	*氨基酸*	*位置*	*氨基酸*	*位置*	*氨基酸*
3	K、Q	5	E、L	18	M、L
19	K、R	23	V、A	31	N、S、R
33	W、A	35	N、S、H	40	S、A
42	E、G	49	A、S	50	Q、S、N、H、A
		52	R、S	53	L、G
54	K、S	55	S、N、T、A、G	56	D、G
				59	A、S

[0148]

61	H、Y	64	E、D	76	D、N
79	R、N、Q、D、S	80	S、T	81	V、L
87	N、S	94	G、A	95	T、V、I
99	N、D、T、K、A	106	C、Y、A、S、T	112	T、L
114	I、T				

[0149] 在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB3的人源化形式,其在轻链可变区中的一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29个)以下位置具有一个或多个氨基酸取代:9、17、18、25、27、28、30、34、40、43、45、48、50、52、53、55、56、70、72、74、76、84、85、90、91、93、94、97和100。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:434的氨基酸序列。在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB3的人源化形式,其在轻链可变区中的一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8或9个)以下位置具有一个或多个氨基酸取代:25、34、48、53、55、84、85、90和93。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:435的氨基酸序列。在各个方面,上述位置处的氨基酸选自根据下表的氨基酸:

[0150]

位置	氨基酸	位置	氨基酸	位置	氨基酸
9	A、S	17	E、D	18	T、R
25	I、V、L、T、A	34	A、S、N	40	Q、P
43	S、A	45	Q、K	48	V、I
53	I、V、L、T、S	55	V、T、L、A、Q	70	Q、D
72	S、T	74	K、T	76	N、S
84	G、A	85	N、Q、S、T	90	H、Q、S、T
93	T、S、N、G	100	G、Q	27	E、Q
28	N、S	30	Y、S	50	N、A
52	K、S	56	E、S	91	H、S
94	V、T	97	T、P		

[0151] 人源化AB4

[0152] 在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB4的人源化形式,其在重链可变区中的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35或36个)以下位置具有一个或多个氨基酸取代:5、11、12、13、20、29、31、33、37、38、40、45、48、50、55、56、57、59、61、62、65、66、67、68、70、72、74、76、79、82、84、87、91、97、101、117。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:436的氨基酸序列。在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB4的人源化形式,其在重链可变区中的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个)以下位置具有一个或多个氨基酸取代:20、29、31、37、45、48、56、59、61、62、65、66、68、70、74、79、84、97和101。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:437的氨基酸序列。在各个方面,上述位置处的氨基酸选自根据下表的氨基酸:

[0153]

位置	氨基酸	位置	氨基酸	位置	氨基酸
5	Q、V	11	L、V	12	A、K
13	R、K	20	M、V	33	T、Y
37	I、V、F、Y	38	K、R	40	R、A
45	Q、L、V、T、N	48	I、M	50	Y、I
55	S、G	56	T、G、S、V、D	57	Y、S
59	H、K、S、Q、N	61	I、A、N、F、Y、V	62	K、Q
65	K、Q	66	D、G	67	K、R
68	A、V	70	L、M	72	A、R
74	T、K	76	S、T	79	A、V
82	Q、E	84	R、S、Q、D	87	T、R
91	S、T	97	S、A、T、V	101	L、V、F
117	A、S	29	F、Y、S、	31	S、T、Y、

[0154]

		T		D

[0155] 在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB4的人源化形式,其在轻链可变区中的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24个)以下位置具有一个或多个氨基酸取代:7、14、17、18、31、33、39、41、42、44、50、51、55、57、60、81、88、92、94、95、96、99、100、105。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:438的氨基酸序列。在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB4的人源化形式,其在轻链可变区中的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6或7个)以下位置具有一个或多个氨基酸取代:33、39、55、57、81、95和96。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:439的氨基酸序列。在各个方面,上述位置处的氨基酸选自根据下表的氨基酸:

[0156]

位置	氨基酸	位置	氨基酸	位置	氨基酸
7	T、S	14	S、T	17	D、Q
18	Q、P	31	Y、H	33	D、N、E、Q
39	H、N、Q、D	41	F、Y	42	L、Q
44	K、R	50	K、R	51	R、L
55	K、R、Q	57	S、T、V	60	D、F
81	R、S、N、D	88	L、V	92	F、Y
94	M、S	95	Q、H、T	96	S、T、G、D
99	W、V	105	G、Q		

[0157] 人源化AB18

[0158] 在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB18的人源化形式,其在重链可变区中的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个)以下位置:5、9、11、12、20、38、40、41、43、44、48、61、65、67、68、70、72、74、76、79、82、84、87、91和116(任选地,一个或多个(例如1、2、3、4或5个)以下位置:20、48、68、70、79)具有一个或多个氨基酸取代。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:440或441的氨基酸序列。在各个方面,上述位置处的氨基酸选自根据下表的氨基酸:

[0159]

位置	氨基酸	位置氨基酸	位置	氨基酸
5	K、V	9P、A	11	L、V
12	E、K	20I、V	38	K、R
40	S、A	41N、P	43	K、Q
44	S、G	48I、V、M	61	N、A
65	T、Q	67K、R	68	A、V
70	L、M	72V、R	74	K、T
76	S、T	79A、V	82	Q、E
84	K、S	87T、R	91	S、T
116	S、L			

[0160] 在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB18的人源化形式,其在轻链可变区中的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个)以下位置:1、3、9、15、18、19、21、22、49、51、69、93、84、78、105和111(任选地,一个或多个(例如,1、2或3个)以下位置:19、21或84)具有一个或多个氨基酸取代。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:442或443的氨基酸序列。在各个方面,上述位置处的氨基酸选自根据下表的氨基酸:

[0161]

位置	氨基酸	位置氨基酸	位置	氨基酸
1	N、D	3M、V	9	S、D
15	A、L	18K、R	19	V、A
21	M、I	22S、N	49	S、P
51	R、K	69T、S	83	N、S
84	V、L	89L、V	105	A、Q
111	L、I			

[0162] 人源化AB9

[0163] 在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB9的人源化形式,其在重链可变区中的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29个)以下位置具有一个或多个氨基酸取代:1、5、9、11、12、20、38、40、41、43、44、48、61、63、65、67、69、70、72、73、74、76、79、84、87、91、93、112和113。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:444的氨基酸序列。在各个方面,上述位置处的氨基酸选自根据下表的氨基酸:

[0164]

位置	氨基酸	位置氨基酸	位置	氨基酸

1	E、Q	5Q、V	9	P、A
11	L、V	12V、K	20	M、V
38	KR,	40S、A	41	H、P
43	KQ	44S、G	48	I、M
61	N、A	63N、K	65	K、Q
67	K、R	69A、V	70	L、M
72	V、R	73N、D	74	K、T
76	S、T	79A、V	84	R、S
87	T、R	91S、T	93	A、V
112	T、L	113L、V		

[0165] 在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB9的人源化形式,其在轻链可变区中的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个)以下位置具有一个或多个氨基酸取代:9、11、15、17、18、43、45、70、72、73、74、80、84、85和100。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:445的氨基酸序列。在各个方面,上述位置处的氨基酸选自根据下表的氨基酸:

[0166]

位置	氨基酸	位置氨基酸	位置	氨基酸
9	A、S	11Q、L	15	L、V
17	E、D	18S、R	43	S、A
45	Q、K	70R、D	72	S、T
73	F、L	74K、R	80	A、P
84	V、A	85S、T	100	G、Q

[0167] 人源化AB11

[0168] 在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB11的人源化形式,其在重链可变区中的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个)以下位置具有一个或多个氨基酸取代:1、15、18、19、42、49、63、75、76、78、80、84、88和93。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:446的氨基酸序列。在各个方面,上述位置处的氨基酸选自根据下表的氨基酸:

[0169]

位置	氨基酸	位置氨基酸	位置	氨基酸
1	D、E	15R、G	18	R、L
19	K、R	42E、G	49	A、S
63	T、S	75P、A	76	T、K
78	T、S	80F、Y	84	T、N
88	S、A	93M、V		

[0170] 在各个方面,抗原结合蛋白为表B或表B1中列出的AB11的人源化形式,其在轻链可变区中的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个)以下位置:4、9、17、22、64、78、80、81、82、83、84、87、89、104和110(任选地,一个或多个以下位置:4、82、110)具有一个或多个氨基酸取代。在各种情况下,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:447或448的氨基酸序列。在各个方面,上述位置处的氨基酸选自根据下表的氨基酸:

[0171]

位置	氨基酸	位置氨基酸	位置	氨基酸
4	L、M	9A、D	17	Q、E
22	S、N	64A、D	78	N、T
80	H、S	81P、S	82	V、L
83	E、Q	84E、A	87	A、V
89	T、V	104A、Q	110	L、I

[0172] 在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含(a)表C中列出的重链可变区氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:376-379、384-387、391-396、403-408、412、413、416-419和422-427、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%、或约80%、或约85%、或约90%或约95%序列同一性的变体序列;或(b)表C中列出的轻链可变区氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:380-383、388-390、397-402、409-411、414、415、420和421、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%、或约80%、或约85%、或约90%或约95%序列同一性的变体序列;或(c)(a)和(b)两者。

[0173] 表C

[0174]

	人源化轻链可变区	人源化重链可变区
AB1	380、381、382、383	376、377、378、379
AB3	388、389、390	384、385、386、387、422
AB4	397、398、399、400、401、402	391、392、392、394、395、396、423、424、425、426、427
AB9	409、410、411,	403、404、405、406、407、408
AB11	414、415	412、413
AB18	420、421	416、417、418、419

[0175] 在各个实施方案中,人源化抗原结合蛋白包含表D中所示的一对氨基酸序列。

[0176] 表D

[0177]

人源化 AB	HC	LC
1-1	376	380
1-2	377	380
1-3	377	381
1-4	377	382
1-5	377	383
1-6	378	381
1-7	378	382
1-8	378	383
1-9	379	381
1-10	379	382
1-11	379	383
3-1	384	388
3-2	385	388
3-3	385	389
3-4	386	388
3-5	386	389

[0178]

人源化 AB	HC	LC
3-6	387	388
3-7	387	389
3-9	422	389
4-1	391	397
4-2	392	397
4-3	392	398
4-4	393	398
4-5	394	398
4-6	395	398
4-7	396	398
4-8	423	398
4-9	424	398
4-10	425	398
4-11	426	398
4-12	427	398
9-1	403	409
9-2	404	409
9-3	405	410
9-4	405	411
9-5	406	410
9-6	406	411
9-7	407	410
9-8	407	411
9-9	408	410
9-10	408	411
11-1	412	414
11-2	413	414
11-3	413	415
18-1	416	420
18-2	417	420
18-3	417	420
18-4	417	421
18-5	418	420
18-6	418	421
18-7	419	420
18-8	419	421

[0179] 在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含一对变体序列,每个变体序列与表C中所列的SEQ ID NO具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)的序列同一性。在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含一对序列:选自表C中所列的SEQ ID NO:的一个序列以及为与具有表D中所列的SEQ ID NO:表C中所列的SEQ ID NO:的序列具有至少或约70％(例如,至少约80％,至少约85％,至少约90％,至少约95％)序列同一性的变体序列的另一序列。

[0180] 在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含一对序列:选自表D中所列的SEQ ID NO:的一个序列以及为与具有表D中所列的SEQ ID NO:的序列具有至少或约70％(例如,至少约

80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)序列同一性的变体序列的另一序列。例如,在各个方面,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:419的序列,并且抗原结合蛋白还包含与SEQ ID NO 421具有至少或约70％(例如,至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％)序列同一性的变体序列。

[0181] 核酸

[0182] 本公开还提供了包含编码本公开的抗原结合蛋白的核苷酸序列的核酸。如本文所用的“核酸”包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”,并且通常是指可以是单链或双链的、合成的或从天然来源获得(例如分离和/或纯化)的DNA或RNA的聚合物或其修饰形式,其可包含天然、非天然或改变的核苷酸,并且其可包含天然、非天然或改变的核苷酸间键(诸如氨基磷酸酯键或硫代磷酸酯键),而不是在未修饰寡核苷酸的核苷酸之间存在的磷酸二酯。核酸可包含编码本公开的任何抗原结合蛋白的任何核苷酸序列。在各个方面,核酸包含编码抗原结合蛋白的核苷酸序列,该抗原结合蛋白包含(a)表A或表A1中列出的重链(HC)互补决定区(CDR)1氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:11、17、23、29、35、41、47、53、59、65、71、77、83、89、95、101、107、113、119、125、131、452、455、461、465和472、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70％(例如,至少或约80％、至少或约85％、至少或约90％、至少或约95％)序列同一性的变体序列;(b)表A或表A1中列出的HC CDR2氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、72、78、84、90、86、102、108、114、120、126、132、475、456、462、466、468和473;或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70％(例如,至少或约80％、至少或约85％、至少或约90％、至少或约95％)序列同一性的变体序列;(c)表A或表A1中列出的HC CDR3氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:13、19、25、31、37、43、49、55、61、67、73、79、85、91、97、103、109、115、121、127、133、453、457、463、467、469和474;或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70％(例如、至少或约80％、至少或约85％、至少或约90％、至少或约95％)序列同一性的变体序列;(d)表A或表A1中列出的轻链(LC)CDR1氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:8、14、20、32、38、44、50、56、62、68、74、80、86、92、98、104、110、116、122、128、449、476、458、464和470;或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70％(例如,至少或约80％、至少或约85％、至少或约90％、至少或约95％)序列同一性的变体序列;(e)表A或表A1中列出的LC CDR2氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:9、15、21、27、33、39、45、51、57、63、69、75、81、87、93、99、105、111、117、123、129、450、477、459和471;或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70％(例如,至少或约80％、至少或约85％、至少或约90％、至少或约95％)序列同一性的变体序列;(f)表A中列出的LC CDR3氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:10、16、22、28、34、40、46、52、58、64、70、76、82、88、94、100、106、112、118、124、130、451、454和460、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70％(例如,至少或约80％、至少或约85％、至少或约90％、至少或约95％)序列同一性的其变体序列;或(g)(a)-(f)中任何两者或多者的组合。在各个方面,核酸包含编码抗原结合蛋白的核苷酸序列,该抗原结合蛋白包含表A或表A1中列出的LC CDR1氨基酸序列、LC CDR2氨基酸序列和LC CDR3氨基酸序列以及表A或表A1中列出的HC CDR氨基酸序列中的至少1个或2个。在各个方面,核酸包含编码抗原结合蛋白的核苷酸序列,该抗原结合蛋白包含表A或表A1中列出的HC CDR1氨基酸序列、HC CDR2氨基酸序列和HC CDR3氨基酸序列

以及表A或表A1中列出的LC CDR氨基酸序列中的至少1个或2个。在各个实施方案中,核酸包含编码抗原结合蛋白的核苷酸序列,该抗原结合蛋白包含:(a)由表A或表A1的单行中的SEQ ID NO:指定的氨基酸序列中的至少3、4或5个,(b)由表A或表A1的单行的SEQ ID NO:指定的LC CDR氨基酸序列中的每一个和由表A或表A1的单行中的SEQ ID NO:指定的HC CDR氨基酸序列中的至少1或2个,(c)由表A或表A1的单行的SEQ ID NO:指定的HC CDR氨基酸序列中的每一个和由表A或表A1的单行的SEQ ID NO:指定的LC CDR氨基酸序列中的至少1或2个,(d)由表A的单行的SEQ ID NO:指定的CDR氨基酸序列中的所有6个,和/或(e)选自由以下组成的组的六个CDR氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:74-79;(b)SEQ ID NO:50-55;(c)SEQ ID NO:122-127;(d)SEQ ID NO:26-31;(e)SEQ ID NO:128-133;(f)SEQ ID NO:38-43;(g)SEQ ID NO:62-67;(h)SEQ ID NO:80-85;(i)SEQ ID NO:44-49;(j)SEQ ID NO:86-91;(k)SEQ ID NO:104-109;(l)SEQ ID NO:56-61;(m)SEQ ID NO:32-37;(n)SEQ ID NO:110-115;(o)SEQ ID NO:98-103;(p)SEQ ID NO:92-97;(q)SEQ ID NO:116-121;(r)SEQ ID NO:8-13;(s)SEQ ID NO:68-73;(t)SEQ ID NO:14-19;(u)SEQ ID NO:20-25,(v)SEQ ID NO:449-453和475;(w)SEQ ID NO:476-477、454-457;(x)SEQ ID NO:458-463;(y)SEQ ID NO:57、58、464-467;(z)SEQ ID NO:68-71和468-469;以及(aa)SEQ ID NO:112和470-474。在各个实施方案中,核酸包含编码抗原结合蛋白的核苷酸序列,该抗原结合蛋白包含(a)表B或表B1中列出的重链可变区氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、171、173、175、478、480、482、484、486和488、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%(例如,至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%)序列同一性的变体序列;或(b)表B或表B1中列出的轻链可变区氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174、176、479、481、483、485、487和489、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%(例如,至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%)序列同一性的变体序列;或(c)(a)和(b)两者。在各个实施方案中,核酸包含编码抗原结合蛋白的核苷酸序列,该抗原结合蛋白包含选自由以下组成的组的一对氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:156和157;(b)SEQ ID NO:148和149;(c)SEQ ID NO:172和173;(d)SEQ ID NO:140和141;(e)SEQ ID NO:174和175;(f)SEQ ID NO:144和145;(g)SEQ ID NO:152和153;(h)SEQ ID NO:158和159;(i)SEQ ID NO:146和147;(j)SEQ ID NO:160和161;(k)SEQ ID NO:166和167;(l)SEQ ID NO:150和151;(m)SEQ ID NO:142和143;(n)SEQ ID NO:168和169;(o)SEQ ID NO:164和165;(p)SEQ ID NO:162和163;(q)SEQ ID NO:170和171;(r)SEQ ID NO:134和135;(s)SEQ ID NO:154和155;(t)SEQ ID NO:136和137;以及(u)SEQ ID NO:138和139。在各个实施方案中,核酸包含编码抗原结合蛋白的核苷酸序列,该抗原结合蛋白包含选自由表D中所列的对组成的组的一对氨基酸序列。在各个方面,核酸包含核苷酸序列,该核苷酸序列包含SEQ ID NO:208-375中的任何一者或多者的序列。在一些实施方案中,核酸不包含任何插入、缺失、倒位和/或取代。在其他实施方案中,核酸包含一个或多个插入、缺失、倒位和/或取代。

[0183] 在一些方面,本公开的核酸是重组的。如本文所用,术语“重组”是指(i)通过将天然或合成核酸片段与可在活细胞中复制的核酸分子连接而在活细胞外构建的分子,或(ii)由上述(i)中所述的那些分子复制得到的分子。出于本文的目的,复制可以是体外复制或体

内复制。

[0184] 在一些方面,使用本领域已知的方法基于化学合成和/或酶促连接反应来构建核酸。参见,例如,Sambrook等人,出处同上;以及Ausubel等人,出处同上。例如,核酸可使用天然存在的核苷酸或各种被设计用于增加分子的生物稳定性或增加杂交时形成的双链体的物理稳定性的修饰核苷酸(例如,硫代磷酸衍生物和吖啶取代的核苷酸)化学合成。可用于生成核酸的经修饰的核苷酸的示例包括但不限于5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧羟基甲基)尿嘧啶、5-羧甲基氨甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧甲基氨甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、β-D-半乳糖基Q核苷(beta-D-galactosylqueosine)、肌苷、N^6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N-取代腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨甲基-2-硫尿嘧啶、β-D-甘露糖基Q核苷(beta-D-mannosylqueosine)、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基代-N^6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧乙酸(v)、怀丁氧苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、Q核苷(queosine)、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。替代地,本公开的一种或多种核酸可从公司诸如Macromolecular Resources(Fort Collins,CO)和Synthegen(Houston,TX)购买。

[0185] 载体

[0186] 在一些方面,本公开的核酸被掺入载体中。在这方面,本公开提供了包含任何当前公开的核酸的载体。在各个方面,载体是重组表达载体。出于本文的目的,术语"重组表达载体"是指经遗传修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,当该构建体包含编码mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列并且该载体在足以使mRNA、蛋白质、多肽或肽在细胞内表达的条件下与细胞接触时,该构建体允许通过宿主细胞表达mRNA、蛋白质、多肽或肽。本公开的载体整体上不是天然存在的。然而,载体的部分可以是天然存在的。当前公开的载体可包含任何类型的核苷酸,包括但不限于DNA和RNA,其可以是单链或双链的、合成的或部分地从天然来源获得的,并且其可包含天然的、非天然的或改变的核苷酸。载体可包含天然存在的或非天然存在的核苷酸间键,或这两种类型的键。在一些方面,改变的核苷酸或非天然存在的核苷酸间键不阻碍载体的转录或复制。

[0187] 本公开的载体可以是任何合适的载体,并且可用于转导、转化或转染任何合适的宿主。合适的载体包括设计用于繁殖和扩增、或用于表达、或两者的那些,诸如质粒和病毒。载体可以是基于质粒的表达载体。在各个方面,载体选自由以下组成的组:pUC系列(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列(Stratagene,LaJoIIa,CA)、pET系列(Novagen,Madison,WI)、pGEX系列(Pharmacia Biotech,Uppsala,Sweden)和pEX系列(Clontech,Palo Alto,CA)。也可使用噬菌体载体,诸如λGTIO、λGTl 1、λZapII(Stratagene)、λEMBL4和λNMl 149。植物表达载体的实例包括pBIOl、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。动物表达载体的实例包括pEUK-Cl、pMAM和pMAMneo(Clontech)。在一些方面,载体是病毒载体,例如逆转录病毒载体。在各个方面,载体是腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、单纯疱疹病毒(HSV)载体、水泡性口炎病毒(VSV)载体、牛痘病毒载体或慢病毒载体。参见例如Howarth等人,Cell Biol.Toxicol.26(1):1-20(2010)。

在各个方面,载体是感染节肢动物(例如昆虫)的杆状病毒载体。在各个方面,杆状病毒载体是苜蓿银纹夜蛾多核病毒(AcMNPV)或家蚕核型多角体病毒(BmNPV)。参见例如Khan,Adv Pharm Bull3(2):257-263(2013);Miller,Bioessays 11(4):91-96(1989);Atkinson等人,Pestic Sci 28:215-224(1990)。

[0188] 可使用例如在Sambrook等人(出处同上)和Ausubel等人(出处同上)中描述的标准重组DNA技术来制备本公开的载体。可制备环状或线性表达载体的构建体,以含有在原核或真核宿主细胞中起作用的复制系统。复制系统可以衍生自例如CoIE1、2μ质粒、λ、SV40、牛乳头瘤病毒等。

[0189] 在一些方面,载体包含调节序列,诸如转录和翻译起始和终止密码子,其对于载体将被引入的宿主类型(例如,细菌、真菌、植物或动物)是特异的,视情况而定并且考虑载体是基于DNA的还是基于RNA的。

[0190] 载体可包括允许选择转化或转染的宿主的一个或多个标记基因。标记基因包括杀生物剂抗性(例如,对抗生素,重金属等的抗性)、在营养缺陷型宿主中互补以提供原养型等。用于当前公开的表达载体的合适的标记基因包括例如新霉素/G418抗性基因、潮霉素抗性基因、组氨醇抗性基因、四环素抗性基因和氨苄青霉素抗性基因。

[0191] 载体可包含与编码多肽的核苷酸序列(包括其功能部分和功能变体)或与编码多肽的核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列可操作地连接的天然或规范性启动子。启动子的选择(例如强、弱、可诱导、组织特异性和发育特异性)在本领域技术人员的普通技术范围内。类似地,核苷酸序列与启动子的组合也在本领域技术人员的技术范围内。启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,例如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子和在鼠干细胞病毒的长末端重复序列中发现的启动子。

[0192] 宿主细胞

[0193] 本文提供了包含本公开的核酸或载体的宿主细胞。如本文所用,术语“宿主细胞”是指可包含当前公开的载体并且能够产生由核酸编码的表达产物(例如,mRNA、蛋白质)的任何类型的细胞。在一些方面,宿主细胞是贴壁细胞或悬浮细胞,即在悬浮液中生长的细胞。在各个方面,宿主细胞是培养的细胞或原代细胞,即直接从生物体(例如人)分离的细胞。宿主细胞可以是任何细胞类型,可源自任何类型的组织,并且可具有任何发育阶段。

[0194] 在各个方面,抗原结合蛋白是糖基化蛋白,并且宿主细胞是糖基化感受态细胞。在各个方面,糖基化感受态细胞是真核细胞,包括但不限于酵母细胞、丝状真菌细胞、原生动物细胞、藻类细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。此类宿主细胞在本领域中有所描述。参见例如,Frenzel等人,Front Immunol 4:217(2013)。在各个方面,真核细胞是哺乳动物细胞。在各个方面,哺乳动物细胞是非人哺乳动物细胞。在一些方面,细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞及其衍生物(例如CHO-K1、CHO pro-3)、小鼠骨髓瘤细胞(例如NS0、GS-NS0、Sp2/0)、经工程改造成二氢叶酸还原酶(DHFR)活性缺陷的细胞(例如,DUKX-X11、DG44)、人胚肾293(HEK293)细胞或其衍生物(例如,HEK293T、HEK293-EBNA)、绿色非洲猴肾细胞(例如,COS细胞、VERO细胞)、人宫颈癌细胞(例如,HeLa)、人骨肉瘤上皮细胞U2-OS、腺癌性人肺泡基底上皮细胞A549、人纤维肉瘤细胞HT1080、小鼠脑肿瘤细胞CAD、胚胎癌细胞P19、小鼠胚胎成纤维细胞NIH 3T3、小鼠成纤维细胞L929、小鼠成神经细胞瘤细胞N2a、人乳腺癌细胞MCF-7、成视网膜细胞瘤细胞Y79、人成视网膜细胞瘤细胞SO-Rb50、人肝癌细胞Hep G2、小鼠B骨髓瘤

细胞J558L或小仓鼠肾(BHK)细胞(Gaillet等人2007;Khan,Adv Pharm Bull 3(2):257-263(2013))。

[0195] 为了扩增或复制载体,在一些方面,宿主细胞是原核细胞,例如,细菌细胞。

[0196] 本公开还提供了包含至少一种本文所述的宿主细胞的细胞群。在一些方面,细胞群是包含宿主细胞以及至少一种其他细胞的异质群体,该宿主细胞包含所述载体,该至少一种其他细胞不包含任何载体。替代地,在一些方面,细胞群是基本上同质的群体,其中该群体主要包含宿主细胞,该宿主细胞包含载体(例如,基本上由其组成)。在一些方面,群体是细胞的克隆群体,其中群体的所有细胞是包含载体的单一宿主细胞的克隆,使得群体的所有细胞包含载体。在本公开的各个实施方案中,细胞群是包含宿主细胞的克隆群体,该宿主细胞包含如本文所述的载体。

[0197] 制造方法

[0198] 本文还提供了产生与CLDN6结合的抗原结合蛋白的方法。在各个实施方案中,该方法包括在细胞培养基中培养包含核酸的宿主细胞,该核酸包含编码如本文所述的抗原结合蛋白的核苷酸序列,并从细胞培养基收获抗原结合蛋白。宿主细胞可以是本文所述的任何宿主细胞。在各个方面,宿主细胞选自由以下组成的组:CHO细胞、NS0细胞、COS细胞、VERO细胞和BHK细胞。在各个方面,培养宿主细胞的步骤包括在生长培养基中培养宿主细胞以支持宿主细胞的生长和扩增。在各个方面,生长培养基以及时的方式增加细胞密度、培养物活力和生产率。在各个方面,生长培养基包含氨基酸、维生素、无机盐、葡萄糖和血清作为生长因子、激素和附着因子的来源。在各个方面,生长培养基是由氨基酸、维生素、微量元素、无机盐、脂质和胰岛素或胰岛素样生长因子组成的完全化学成分确定的培养基。除了营养物之外,生长培养基还帮助维持pH和克分子渗透压浓度。几种生长培养基是可商购的并且在本领域中有所描述。参见例如,Arora,“Cell Culture Media:A Review”MATER METHODS 3:175(2013)。

[0199] 在各个方面,该方法包括在进料培养基中培养宿主细胞。在各个方面,该方法包括以进料分批模式在进料培养基中培养。重组蛋白生产的方法在本领域中是已知的。参见例如,Li等人,“Cell culture processes for monoclonal antibody production”MAbs 2(5):466-477(2010)。

[0200] 制备抗原结合蛋白的方法可包括用于从细胞培养物或其上清液中纯化蛋白质并优选地回收经纯化的蛋白质的一个或多个步骤。在各个方面,该方法包括一个或多个色谱步骤,例如亲和色谱(例如,蛋白A亲和色谱)、离子交换色谱、疏水相互作用色谱。在各个方面,该方法包括使用蛋白A亲和色谱树脂纯化蛋白质。

[0201] 在各个实施方案中,该方法还包括用于配制经纯化的蛋白质等的步骤,从而获得包含经纯化的蛋白质的制剂。这些步骤在Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing,编辑Jameel和Hershenson,John Wiley&Sons,Inc.(Hoboken,NJ),2010中有所描述。

[0202] 在各个方面,与多肽连接的抗原结合蛋白以及抗原结合蛋白是融合蛋白的一部分。因此,本公开还提供了产生包含与CLDN6结合的抗原结合蛋白的融合蛋白的方法。在各个实施方案中,该方法包括在细胞培养基中培养包含核酸的宿主细胞,该核酸包含编码如本文所述的融合蛋白的核苷酸序列,并从细胞培养基中收获融合蛋白。

[0203] 缀合物

[0204] 本公开还提供了与第二部分(例如,异源部分、缀合部分)附着、连接或缀合的抗原结合蛋白。因此,本公开提供了包含抗原结合蛋白和异源部分的缀合物。如本文所用,术语“异源部分”与“缀合部分”同义,并且是指不同于本公开的抗原结合蛋白的任何分子(化学或生化的、天然存在或非编码的)。各种异源部分包括但不限于聚合物、碳水化合物、脂质、核酸、寡核苷酸、DNA或RNA、氨基酸、肽、多肽、蛋白质、治疗剂(例如,细胞毒性剂、细胞因子)或诊断剂。

[0205] 在一些实施方案中,异源部分是聚合物。聚合物可以是支链的或非支链的。聚合物可具有任何分子量。在一些实施方案中,聚合物具有在约2kDa至约100kDa之间的平均分子量(术语“约”表示在水溶性聚合物的制备中,一些分子将比所述分子量大,一些分子将比所述分子量小)。在一些方面,聚合物的平均分子量介于约5kDa和约50kDa之间、介于约12kDa和约40kDa之间、或介于约20kDa和约35kDa之间。

[0206] 在一些实施方案中,聚合物被修饰以具有单个反应性基团,诸如用于酰化的活性酯或用于烷基化的醛,使得可控制聚合度。在一些实施方案中,聚合物是水溶性的,使得其所附着的蛋白质在水性环境(诸如生理环境)中不沉淀。在一些实施方案中,当例如组合物用于治疗用途时,聚合物是药学上可接受的。另外,在一些方面,聚合物是聚合物的混合物,例如共聚物、嵌段共聚物。

[0207] 在一些实施方案中,聚合物选自由以下组成的组:聚酰胺;聚碳酸酯;聚亚烷基及其衍生物,包括聚亚烷基二醇、聚环氧烷、聚亚烷基对苯二甲酸酯;丙烯酸和甲基丙烯酸酯的聚合物,包括聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)和聚(丙烯酸十八烷基酯);聚乙烯聚合物,包括聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚卤乙烯、聚(乙酸乙烯酯)和聚乙烯吡咯烷酮;聚乙交酯、聚硅氧烷、聚氨酯及其共聚物;纤维素,包括烷基纤维素、羟烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丁基甲基纤维素、醋酸纤维素、丙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、邻苯二甲酸乙酸纤维素、羧乙基纤维素、三乙酸纤维素、硫酸纤维素钠盐;聚丙烯;聚乙烯,包括聚(乙二醇)、聚(环氧乙烷)和聚(对苯二甲酸乙二酯);以及聚苯乙烯。

[0208] 用于本文的特别优选的水溶性聚合物是聚乙二醇(PEG)。如本文所用,聚乙二醇意指涵盖可用于衍生化其他蛋白质的任何形式的PEG,例如单-(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇。PEG是直链或支链的中性聚醚,可以宽范围的分子量获得,并且可溶于水和大多数有机溶剂。

[0209] 在一些实施方案中,异源部分是碳水化合物。在一些实施方案中,碳水化合物是单糖(例如葡萄糖、半乳糖、果糖)、二糖(例如蔗糖、乳糖、麦芽糖)、寡糖(例如棉子糖、水苏糖)、多糖(淀粉、淀粉酶、支链淀粉、纤维素、甲壳质、胼胝质、昆布多糖、木聚糖、甘露聚糖、岩藻依聚糖、半乳甘露聚糖。

[0210] 在一些实施方案中,异源部分是脂质。在一些实施方案中,脂质是脂肪酸、类二十烷酸、前列腺素、白三烯、血栓烷、N-酰基乙醇胺)、甘油脂(例如单-、二-、三-取代甘油)、甘油磷脂(例如磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸)、鞘脂(例如鞘氨醇、

神经酰胺)、固醇脂(例如类固醇、胆固醇)、异戊烯醇脂、糖脂或聚酮、油、蜡、胆固醇、固醇、脂溶性维生素、甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、磷脂。

[0211] 在一些实施方案中,异源部分是治疗剂。治疗剂可以是本领域已知的任何治疗剂。本文考虑的治疗剂的示例包括但不限于天然酶、源自天然来源的蛋白、重组蛋白、天然肽、合成肽、环肽、抗体、受体激动剂、细胞毒性剂、免疫球蛋白、β-肾上腺素能阻断剂、钙通道阻滞剂、冠状血管扩张剂、强心苷、抗心律失常药、抗心律不整剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、利尿剂、正性肌力药、胆固醇和甘油三酯降低剂、胆汁酸螯合剂、贝特类、3-羟基-3-甲基戊二酸(HMG)-辅酶A还原酶抑制剂、烟酸衍生物、抗肾上腺素能剂、α-肾上腺素能阻断剂、中枢性作用的抗肾上腺素能剂、血管扩张药、保钾剂、噻嗪及相关药物、血管紧张素II受体拮抗剂、外周血管扩张药、抗雄激素、雌激素、抗生素、类维生素A、胰岛素及类似物、α-葡萄糖苷酶抑制剂、双胍类、氯茴苯酸类、磺酰脲类、噻唑烷二酮、雄激素、孕激素、骨代谢调节剂、垂体前叶激素、下丘脑激素、垂体后叶激素、促性腺激素、促性腺激素释放激素拮抗剂、排卵刺激剂、选择性雌激素受体调节剂、抗甲状腺剂、甲状腺激素、容积形成剂、轻泻剂、抗蠕虫药、菌群改良剂、肠道吸附剂、肠道抗感染药、抗食欲药、抗恶病质药、抗暴食症药、食欲抑制剂、抗肥胖药、抗酸药、上胃肠道药、抗胆碱能药、氨基水杨酸衍生物、生物反应调节剂、皮质类固醇、解痉药、5-HT_4部分激动剂、抗组胺药、大麻素类、多巴胺拮抗剂、血清素拮抗剂、细胞保护剂、组胺H2-受体拮抗剂、粘膜保护剂、质子泵抑制剂、幽门螺杆菌根除疗法、促红细胞生成素刺激剂、造血剂、贫血剂、肝素、抗纤溶药、止血药、凝血因子、腺苷二磷酸抑制剂、糖蛋白受体抑制剂、纤维蛋白原-血小板结合抑制剂、血栓烷-A_2抑制剂、纤溶酶原激活剂、抗血栓形成剂、糖皮质激素、盐皮质激素、皮质类固醇、选择性免疫抑制剂、抗真菌剂、预防性治疗药物、艾滋病相关感染、巨细胞病毒、非核苷类逆转录酶抑制剂、核苷类似物逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、贫血、卡波西肉瘤、氨基糖苷类、碳青霉烯类、头孢菌素、糖肽、林可酰胺类、大环内酯类、恶唑烷酮类、青霉素、链阳菌素、磺酰胺类、甲氧苄啶及衍生物、四环素类、驱虫药、阿米巴霉素、双胍、金鸡纳生物碱、叶酸拮抗剂、喹啉衍生物、卡氏肺孢子虫疗法、酰肼、咪唑、三唑、硝基咪唑、环胺、神经氨酸酶抑制剂、核苷、磷酸盐结合剂、胆碱酯酶抑制剂、辅助疗法、巴比妥类药物及衍生物、苯二氮卓类、γ-氨基丁酸衍生物、乙内酰脲衍生物、亚氨基二苯乙烯衍生物、琥珀酰亚胺衍生物、抗惊厥药、麦角生物碱、抗米格列制剂(antimigrane preparations)、生物反应调节剂、氨基甲酸酯、三环衍生物、去极化剂、非去极化剂、神经肌肉麻痹剂、CNS刺激剂、多巴胺能试剂、单胺氧化酶抑制剂、COMT抑制剂、烷基磺酸盐、乙烯亚胺、咪唑并四嗪、氮芥类似物、亚硝基脲、含铂化合物、抗代谢物、嘌呤类似物、嘧啶类似物、脲衍生物、蒽环霉素、放线菌素、喜树碱衍生物、表鬼臼毒素、紫杉烷类、长春花生物碱及类似物、抗雄激素、抗雌激素、非甾族芳香酶抑制剂、蛋白激酶抑制剂、抗肿瘤药、氮杂螺癸烷二酮衍生物、抗焦虑药、刺激剂、单胺再摄取抑制剂、选择性血清素再摄取抑制剂、抗抑郁药、苯并异恶唑衍生物、丁苯酮衍生物、二苯并二氮杂卓衍生物、二苯并硫氮杂蒽衍生物、二苯基丁基哌啶衍生物、吩噻嗪类、噻吩并苯并二氮杂卓衍生物、噻吨衍生物、变应原性提取物、非甾体类药物、白三烯受体拮抗剂、黄嘌呤、内皮素受体拮抗剂、前列腺素、肺表面活性剂、粘液溶解剂、抗有丝分裂药、尿酸排泄剂、黄嘌呤氧化酶抑制剂、磷酸二酯酶抑制剂、甲胺盐、硝基呋喃衍生物、喹诺酮、平滑肌松弛剂、拟副交感神经药、卤代烃、氨基苯甲酸酯、酰胺(例如利多卡因、盐酸阿替卡因、盐酸布比卡因)、解热药、催眠药和镇静药、环

吡咯烷酮、吡唑并嘧啶、非甾体类抗炎药、阿片类药物、对氨基苯酚衍生物、醇脱氢酶抑制剂、肝素拮抗剂、吸附剂、催吐药、阿片类药物拮抗剂、胆碱酯酶再活化剂、烟碱替代疗法、维生素A类似物和拮抗剂、维生素B类似物和拮抗剂、维生素C类似物和拮抗剂、维生素D类似物和拮抗剂、维生素E类似物和拮抗剂、维生素K类似物和拮抗剂。

[0212] 本公开的抗原结合蛋白可与有效抑制肿瘤转移的一种或多种细胞因子和生长因子缀合,并且其中该细胞因子或生长因子已显示出对至少一种细胞群具有抗增殖作用。此类细胞因子、淋巴因子、生长因子或其他造血因子包括但不限于:M-CSF、GM-CSF、TNF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IFN、TNFα、TNF1、TNF2、G-CSF、Meg-CSF、GM-CSF、血小板生成素、干细胞因子和促红细胞生成素。用于本文的另外的生长因子包括血管生成素、骨形态发生蛋白-1、骨形态发生蛋白-2、骨形态发生蛋白-3、骨形态发生蛋白-4、骨形态发生蛋白-5、骨形态发生蛋白-6、骨形态发生蛋白-7、骨形态发生蛋白-8、骨形态发生蛋白-9、骨形态发生蛋白-10、骨形态发生蛋白-11、骨形态发生蛋白-12、骨形态发生蛋白-13、骨形态发生蛋白-14、骨形态发生蛋白-15、骨形态发生蛋白受体IA、骨形态发生蛋白受体IB、脑源性神经营养因子、睫状神经营养因子、睫状神经营养因子受体α、细胞因子诱导的嗜中性粒细胞趋化因子1、细胞因子诱导的嗜中性粒细胞趋化因子2α、细胞因子诱导的嗜中性粒细胞趋化因子2β、β内皮细胞生长因子、内皮素1、上皮源性嗜中性粒细胞引诱剂、神经胶质细胞系源性嗜中性粒细胞因子受体α1、神经胶质细胞系源性嗜中性粒细胞因子受体α2、生长相关蛋白、生长相关蛋白α、生长相关蛋白β、生长相关蛋白γ、肝素结合表皮生长因子、肝细胞生长因子、肝细胞生长因子受体、胰岛素样生长因子I、胰岛素样生长因子受体、胰岛素样生长因子II、胰岛素样生长因子结合蛋白、角化细胞生长因子、白血病抑制因子、白血病抑制因子受体α、神经生长因子、神经生长因子受体、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4、前B细胞生长刺激因子、干细胞因子、干细胞因子受体、转化生长因子α、转化生长因子β、转化生长因子β1、转化生长因子β1.2、转化生长因子β2、转化生长因子β3、转化生长因子β5、潜在转化生长因子β1、转化生长因子β结合蛋白I、转化生长因子β结合蛋白II、转化生长因子β结合蛋白III、肿瘤坏死因子受体I型、肿瘤坏死因子受体II型、尿激酶型纤溶酶原活化因子受体以及它们的嵌合蛋白和生物活性或免疫学活性片段。

[0213] 在一些实施方案中,缀合物包含如本文所述的抗原结合蛋白和细胞毒性剂。细胞毒性剂是对细胞有毒性的任何(化学或生化)分子。在一些方面,当细胞毒性剂与本公开的抗原结合蛋白缀合时,获得的结果是协同的。就是说,抗原结合蛋白和细胞毒性剂组合疗法的效果是协同的,即,该效果大于各自的相加个体效果所期望的效果。因此,可减少细胞毒性剂的剂量,并因此伴随降低毒性问题和其他副作用的风险。在一些实施方案中,细胞毒性剂是化学治疗剂。化疗剂在本领域中是已知的,包括但不限于铂配位化合物、拓扑异构酶抑制剂、抗生素、抗有丝分裂生物碱和二氟核苷,如美国专利号6,630,124中所述。

[0214] 在一些实施方案中,化疗剂是铂配位化合物。术语“铂配位化合物”是指任何以离子形式提供铂的抑制肿瘤细胞生长的铂配位化合物。在一些实施方案中,顺铂是用于本公开的组合物和方法中的铂配位化合物。在一些实施方案中,化疗剂是拓扑异构酶抑制剂。在一些方面,拓扑异构酶抑制剂是喜树碱或喜树碱类似物。在本公开的其他实施方案中,化疗剂是抗生素化合物。合适的抗生素包括但不限于阿霉素、丝裂霉素、博来霉素、柔红霉素和

链脲霉素。在一些实施方案中,化疗剂是抗有丝分裂生物碱。通常,抗有丝分裂生物碱可从长春花中提取,并且已经显示出作为抗癌化疗剂是有效的。在本公开的其他实施方案中,化疗剂是二氟核苷。2'-脱氧-2',2'-二氟核苷在本领域中已知具有抗病毒活性。此类化合物在美国专利号4,526,988和4,808614中公开和教导。欧洲专利申请公开184,365公开了这些相同的二氟核苷具有溶瘤活性。

[0215] 本公开还提供了包含与多肽连接的本公开的抗原结合蛋白的缀合物,使得该缀合物是融合蛋白。因此,本公开提供了包含与多肽连接的本公开的抗原结合蛋白的融合蛋白。在各个实施方案中,多肽是诊断标记,例如荧光蛋白(诸如绿色荧光蛋白),或其他标签,例如Myc标签。在各个方面,多肽是细胞因子、淋巴因子、生长因子或上文所列的其他造血因子中的一种。

[0216] 接头

[0217] 在一些实施方案中,缀合物直接连接到异源部分。在替代的实施方案中,缀合物包含将本公开的化合物连接到异源部分的接头。在一些方面,接头包含1至约60、或1至30个原子或更长、2至5个原子、2至10个原子、5至10个原子、或10至20个原子长的原子链。在一些实施方案中,链原子全部是碳原子。在一些实施方案中,接头的主链中的链原子选自由C、O、N和S组成的组。链原子和接头可根据它们的预期溶解度(亲水性)进行选择,以便提供更可溶的缀合物。在一些实施方案中,接头提供易于被靶组织或器官或细胞中发现的酶或其他催化剂或水解条件裂解的官能团。在一些实施方案中,接头的长度足够长以减少空间位阻的可能性。在一些实施方案中,接头是氨基酸或肽基接头。此类肽基接头可以是任何长度。各种接头的长度为约1至50个氨基酸,长度为5至50、3至5、5至10、5至15或10至30个氨基酸。

[0218] 组合物、药物组合物和制剂

[0219] 本文提供了包含如当前公开的抗原结合蛋白、核酸、载体、宿主细胞或缀合物的组合物。在一些方面,组合物包含呈分离和/或纯化形式的抗原结合蛋白。在一些方面,组合物包含本公开的单一类型(例如,结构)的抗原结合蛋白或包含本公开的两种或更多种抗原结合蛋白的组合,其中该组合包含两种或更多种不同类型(例如,结构)的抗原结合蛋白。

[0220] 在一些方面,组合物包含例如经由在某些温度(例如室温)下稳定抗原结合蛋白、增加保存期限、减少降解(例如氧化蛋白酶介导的降解)、增加抗原结合蛋白的半衰期等来增强抗原结合蛋白的化学-物理特征的剂。在一些方面,组合物包含本文公开的任何试、剂作为异源部分或缀合部分,任选地与本公开的抗原结合蛋白混合或与抗原结合蛋白缀合。

[0221] 在本公开的各个方面,组合物另外包含药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。在一些实施方案中,将如当前公开的抗原结合蛋白、核酸、载体、宿主细胞或缀合物(下文称为"活性剂")配制成包含活性剂以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂的药物组合物。在这方面,本公开还提供了包含旨在施用于受试者(例如哺乳动物)的活性剂的药物组合物。

[0222] 在一些实施方案中,活性剂以适于向患者施用的纯度水平存在于药物组合物中。在一些实施方案中,活性剂具有至少约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的纯度水平,以及药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂。在一些实施方案中,组合物包含浓度为约0.001至约30.0mg/ml的活性剂。

[0223] 在各个方面,药物组合物包含药学上可接受的载剂。如本文所用,术语"药学上可接受的载剂"包括任何标准的药物载剂,诸如磷酸盐缓冲盐溶液、水、乳液(例如油/水或水/

油乳液)以及各种类型的润湿剂。该术语还涵盖由美国联邦政府管理机构批准或在美国药典中列出的用于动物(包括人)的任何剂。

[0224] 药物组合物可包含任何药学上可接受的成分,包括例如酸化剂、添加剂、吸附剂、气溶胶推进剂、空气置换剂、碱化剂、抗结块剂、抗凝剂、抗微生物防腐剂、抗氧化剂、防腐剂、碱、粘合剂、缓冲剂、螯合剂、包衣剂、着色剂、干燥剂、洗涤剂、稀释剂、消毒剂、崩解剂、分散剂、溶出增强剂、染料、软化剂、乳化剂、乳液稳定剂、填充剂、成膜剂、增味剂、调味剂、流动增强剂、胶凝剂、制粒剂、湿润剂、润滑剂、粘膜粘合剂、软膏基质、软膏、油质媒介物、有机基质、锭剂基质、颜料、增塑剂、抛光剂、防腐剂、螯合剂、皮肤渗透剂、增溶剂、溶剂、稳定剂、栓剂基质、表面活性剂(surface active agent)、表面活性剂(surfactant)、悬浮剂、甜味剂、治疗剂、增稠剂、张力剂、毒性剂、增粘剂、吸水剂、水混溶性助溶剂、水软化剂或润湿剂。参见例如,Handbook of Pharmaceutical Excipients,第三版,A.H.Kibbe(Pharmaceutical Press,London,UK,2000),其全文以引用方式并入。Remington's Pharmaceutical Sciences,第十六版,E.W.Martin(Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1980),其全文以引用方式并入。

[0225] 在各个方面,药物组合物包含在所用剂量和浓度下对接受者无毒的制剂材料。在具体的实施方案中,药物组合物包含活性剂和一种或多种药学上可接受的盐、多元醇、表面活性剂、渗透平衡剂、张力剂、抗氧化剂、抗生素、抗真菌剂、填充剂、冻干保护剂、消泡剂、螯合剂、防腐剂、着色剂、止痛药或另外的药剂。在各个方面,任选地除一种或多种赋形剂之外,药物组合物包含一种或多种多元醇和/或一种或多种表面活性剂,包括但不限于药学上可接受的盐、渗透平衡剂(张力剂)、抗氧化剂、抗生素、抗真菌剂、填充剂、冻干保护剂、消泡剂、螯合剂、防腐剂、着色剂和止痛药。

[0226] 在某些实施方案中,药物组合物可包含用于改变、维持或保留例如组合物的pH、克分子渗透压浓度、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、吸收或渗透的制剂材料。在此类实施方案中,合适的制剂材料包括但不限于氨基酸(诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);抗微生物剂;抗氧化剂(诸如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲剂(诸如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸);填充剂(诸如甘露醇或甘氨酸);螯合剂(诸如乙二胺四乙酸(EDTA));络合剂(诸如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、β-环糊精或羟丙基-β-环糊精);填料;单糖;二糖;和其他碳水化合物(诸如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白质(诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂、调味剂和稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物(诸如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;成盐抗衡离子(诸如钠);防腐剂(诸如苯扎氯胺、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸或过氧化氢);溶剂(诸如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(诸如甘露醇或山梨醇);悬浮剂;表面活性剂或润湿剂(诸如普朗尼克(pluronics)、PEG、脱水山梨糖醇酯、聚山梨醇酯(诸如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯)、triton、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、四丁酚醛);稳定性增强剂(诸如蔗糖或山梨糖醇);张力增强剂(诸如碱金属卤化物,优选氯化钠或氯化钾,甘露糖醇山梨醇);递送媒介物;稀释剂;赋形剂和/或药物佐剂。参见,REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,第18版,(A.R.Genrmo编辑),1990,Mack Publishing Company。

[0227] 药物组合物可被配制为实现生理相容的pH。在一些实施方案中,药物组合物的pH

可例如介于约4或约5和约8.0、或约4.5和约7.5、或约5.0至约7.5之间。在各个实施方案中，药物组合物的pH介于5.5和7.5之间。

[0228] 本公开提供了用于产生药物组合物的方法。在各个方面，该方法包括将抗原结合蛋白、缀合物、融合蛋白、核酸、载体、宿主细胞或它们的组合与药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂组合。

[0229] 施用途径

[0230] 关于本公开，可经由任何合适的施用途径将活性剂或包含活性剂的药物组合物施用于受试者。例如，可经由肠胃外、鼻、口、肺、局部、阴道或直肠施用将活性剂施用于受试者。以下关于施用途径的讨论仅用于举例说明各个实施方案，而不应解释为以任何方式限制范围。

[0231] 适于肠胃外施用的制剂包括：水性和非水性的等渗无菌注射溶液，其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质；以及水性和非水性的无菌悬浮液，其可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。术语“肠胃外”是指不通过消化道，而是通过一些其他途径，诸如皮下、肌内、脊柱内或静脉内。本公开的活性剂可在添加或不添加药学上可接受的表面活性剂(诸如皂或洗涤剂)、悬浮剂(诸如果胶、卡波姆、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素)或乳化剂和其他药物佐剂的情况下与生理上可接受的稀释剂在药物载剂中一起施用，该药物载体诸如无菌液体或液体混合物，包括水、盐水、右旋糖水溶液和相关的糖溶液、醇(诸如乙醇或十六烷醇)、二醇(诸如丙二醇或聚乙二醇)、二甲基亚砜、甘油、缩酮(诸如2,2-二甲基-153-二氧戊环-4-甲醇)、醚、聚(乙二醇)400、油、脂肪酸、脂肪酸酯、或甘油酯、或乙酰化脂肪酸甘油酯。

[0232] 可用于肠胃外制剂的油包括石油、动物油、植物油或合成油。油的具体示例包括花生油、大豆油、芝麻油、棉籽油、玉米油、橄榄油、矿脂和矿物油。用于肠胃外制剂的合适的脂肪酸包括油酸、硬脂酸和异硬脂酸。油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯是合适的脂肪酸酯的实例。

[0233] 用于肠胃外制剂的合适的皂包括脂肪碱金属盐、铵盐和三乙醇胺盐，并且合适的洗涤剂包括(a)阳离子洗涤剂，例如二甲基二烷基卤化铵和烷基吡啶鎓卤化物，(b)阴离子洗涤剂，例如烷基、芳基和烯烃磺酸盐，烷基、烯烃、醚和甘油单酯硫酸盐，以及磺基琥珀酸盐，(c)非离子洗涤剂，例如脂肪胺氧化物、脂肪酸链烷醇酰胺和聚氧乙烯聚丙烯共聚物，(d)两性洗涤剂，例如烷基-β-氨基丙酸盐和2-烷基-咪唑啉季铵盐，以及(e)它们的混合物。

[0234] 在一些实施方案中，肠胃外制剂在溶液中包含按重量计约0.5％至约25％的本公开的活性剂。可使用防腐剂和缓冲剂。为了最小化或消除注射部位的刺激，此类组合物可包含一种或多种亲水-亲脂平衡值(HLB)为约12至约17的非离子表面活性剂。在这类制剂中的表面活性剂的量通常为按重量计约5％至约15％。合适的表面活性剂包括聚乙二醇脱水山梨糖醇脂肪酸酯(诸如脱水山梨糖醇单油酸酯)以及通过环氧丙烷与丙二醇的缩合形成的环氧乙烷与疏水性碱的高分子量加合物。在一些方面，肠胃外制剂存在于单位剂量或多剂量密封容器(诸如安瓿和小瓶)中，并且可在冷冻干燥(冻干)条件下储存，仅需要在使用前即刻添加无菌液体赋形剂(例如水)用于注射。在一些方面，临时注射溶液和悬浮液由前述类型的无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0235] 可注射制剂是根据本公开的。对于可注射组合物的有效药物载剂的要求是本领域普通技术人员众所周知的(参见例如，Pharmaceutics and Pharmacy Practice，

J.B.Lippincott Company,Philadelphia,PA,Banker和Chalmers编辑,第238-250页(1982),以及ASHP Handbook on Injectable Drugs,Toissel,第4版,第622-630页(1986))。

[0236] 剂量

[0237] 据信本公开的活性剂可用于抑制肿瘤生长的方法以及如本文进一步描述的其他方法,包括治疗或预防癌症的方法。出于本公开的目的,所施用的活性剂的量或剂量应足以在合理的时间范围内在受试者或动物中实现例如治疗或预防响应。例如,本公开的活性剂的剂量应足以在从施用时间起约1至4分钟、1至4小时、或1至4周或更长(例如5至20周或更多周)的时间段内治疗如本文所述的癌症。在某些实施方案中,时间段可甚至更长。剂量将由特定活性剂的功效和动物(例如,人)的状况以及待治疗动物(例如,人)的体重确定。

[0238] 用于确定施用剂量的许多测定在本领域中是已知的。出于本文的目的,可使用一种测定来确定待施用于哺乳动物的起始剂量,该测定包括在一组哺乳动物中比较将给定剂量的本公开的活性剂施用于哺乳动物后癌症被治疗的程度,该一组哺乳动物中的每组被给予不同剂量的活性剂。在施用一定剂量后癌症被治疗的程度可由例如在小鼠异种移植模型中用活性剂实现的肿瘤消退程度来表示。测定肿瘤消退的方法在本领域中是已知的,并且本文在实施例中有所描述。

[0239] 本公开的活性剂的剂量还将由可能伴随本公开的特定活性剂的施用的任何不良副作用的存在、性质和程度来确定。通常,主治医师将考虑多种因素(诸如年龄、体重、一般健康状况、饮食、性别、待施用的本公开的活性剂、施用途径和被治疗的病症的严重程度)来决定治疗每个个体患者所用的本公开的活性剂的剂量。以举例的方式而非旨在限制本公开,本公开的活性剂的剂量可为约0.0001至约1g/kg被治疗受试者的体重/天、约0.0001至约0.001g/kg体重/天、或约0.01mg至约1g/kg体重/天。

[0240] 控释制剂

[0241] 在一些实施方案中,本文所述的活性剂可被改性为贮库(depot)形式,使得本公开的活性剂释放到其所施用的身体中的方式在时间和体内的位置方面受到控制(参见例如,美国专利号4,450,150)。本公开的活性剂的贮库形式可以是例如包含活性剂和多孔或非多孔材料(诸如聚合物)的可植入组合物,其中活性剂被材料包封或扩散遍及材料和/或非多孔材料的降解。然后将贮库植入受试者体内的期望位置,并且以预定速率从植入物中释放活性剂。

[0242] 在某些方面,包含活性剂的药物组合物被改性为具有任何类型的体内释放曲线。在一些方面,药物组合物是立即释放、控制释放、持续释放、延长释放、延迟释放或双相释放制剂。配制用于控制释放的肽的方法在本领域中是已知的。参见例如,Qian等人,J Pharm 374:46-52(2009),以及国际专利申请公开号WO 2008/130158、WO2004/033036、WO2000/032218和WO 1999/040942。

[0243] 本发明的组合物还可包含例如胶束或脂质体或一些其他的包封形式,或可以延长释放的形式施用以提供延长的储存和/或递送效果。

[0244] 用途

[0245] 本公开的抗原结合蛋白可用于抑制肿瘤生长。不受特定理论的约束,本文提供的抗原结合蛋白的抑制作用允许此类实体可用于治疗癌症的方法中。

[0246] 因此,本文提供了抑制受试者中肿瘤生长的方法和减小受试者中肿瘤大小的方法。在各个实施方案中,这些方法包括以有效抑制受试者中的肿瘤生长或减小受试者中的肿瘤大小的量向受试者施用本公开的药物组合物。在各个方面,抑制卵巢肿瘤、黑素瘤肿瘤、膀胱肿瘤或子宫内膜肿瘤的生长。在各个方面,卵巢肿瘤、黑素瘤肿瘤、膀胱肿瘤或子宫内膜肿瘤的大小减小。

[0247] 如本文所用,术语“抑制”或“减小”以及由此衍生的词可能不是100%或完全抑制或减小。相反,本领域普通技术人员认识到存在具有潜在益处或治疗效果的不同程度的抑制或减小。在这方面,本公开的抗原结合蛋白可抑制肿瘤生长或将肿瘤大小减小至任何量或水平。在各个实施方案中,由本公开的方法提供的抑制是至少或约10%的抑制(例如,至少或约20%的抑制、至少或约30%的抑制、至少或约40%的抑制、至少或约50%的抑制、至少或约60%的抑制、至少或约70%的抑制、至少或约80%的抑制、至少或约90%的抑制、至少或约95%的抑制、至少或约98%的抑制)。在各个实施方案中,由本公开的方法提供的减小是至少或约10%的减小(例如,至少或约20%的减小、至少或约30%的减小、至少或约40%的减小、至少或约50%的减小、至少或约60%的减小、至少或约70%的减小、至少或约80%的减小、至少或约90%的减小、至少或约95%的减小、至少或约98%的减小)。

[0248] 本文另外提供了治疗患有癌症(例如表达CLDN6的癌症)的受试者的方法。在各个实施方案中,该方法包括以有效治疗受试者中的癌症的量向受试者施用本公开的药物组合物。

[0249] 出于本文的目的,本文所公开的方法的癌症可以是任何癌症,例如,由异常和不受控制的细胞分裂引起的可通过淋巴系统或血流扩散到身体的其他部分的任何恶性生长或肿瘤。在一些方面,癌症是选自由以下组成的组的癌症:急性淋巴细胞癌,急性髓性白血病,肺泡横纹肌肉瘤,骨癌,脑癌,乳腺癌,肛门、肛管或肛门直肠的癌症,眼癌,肝内胆管癌,关节癌,颈部、胆囊或胸膜的癌症,鼻、鼻腔或中耳的癌症,口腔癌,外阴癌,慢性淋巴细胞白血病,慢性髓细胞癌,结肠癌,食道癌,宫颈癌,胃肠类癌,霍奇金淋巴瘤,下咽癌,肾癌,喉癌,肝癌,肺癌,恶性间皮瘤,黑素瘤,多发性骨髓瘤,鼻咽癌,非霍奇金淋巴瘤,卵巢癌,胰腺癌,腹膜、网膜和肠系膜癌症,咽癌,前列腺癌,直肠癌,肾癌(例如肾细胞癌(RCC)),小肠癌,软组织癌,胃癌,睾丸癌,甲状腺癌,输尿管癌和膀胱癌。在特定方面,癌症选自由以下组成的组:头颈癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌和食管癌、胰腺癌、胃肠癌、胃癌、乳腺癌、子宫内膜癌和结肠直肠癌、肝细胞癌、成胶质细胞瘤、膀胱癌、肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC)、支气管肺泡癌)。在各个方面,癌症是卵巢癌、黑素瘤、膀胱癌、肺癌、肝癌、子宫内膜癌。在各个方面,癌症是特征在于CLDN6的中等至高表达的任何癌症。参见例如图1至图3。在各个方面,癌症是急性髓性白血病、大B细胞淋巴瘤、胃癌、前列腺癌、黑素瘤、结肠癌、直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、肝癌、乳腺癌、肾透明细胞癌、头颈癌、肉瘤、肾嫌色细胞癌、低级神经胶质瘤、肾上腺皮质癌、成胶质细胞瘤、肾乳头状细胞癌、肺鳞状细胞癌、甲状腺癌、肺腺癌、胰腺癌、子宫内膜样癌、子宫癌肉瘤或卵巢癌。在各个方面,癌症选自卵巢癌、子宫内膜样癌、子宫癌、肺癌、胃癌、乳腺癌、头颈鳞状细胞癌(HNSCC)、宫颈癌和膀胱癌。

[0250] 如本文所用,术语“治疗”以及与之相关的词不一定意味100%或完全治疗。相反,本领域普通技术人员认识到存在具有潜在益处或治疗效果的不同程度的治疗。在这方面,本公开的治疗癌症的方法可提供任何量或任何水平的治疗。此外,由本公开的方法提供的

治疗可包括治疗所治疗的癌症的一种或多种病症或症状或体征。此外,由本公开的方法提供的治疗可涵盖减缓癌症的进展。例如,这些方法可通过增强T细胞活性或针对癌症的免疫应答、减少肿瘤或癌症生长、减少肿瘤细胞转移、增加肿瘤或癌细胞的细胞死亡等来治疗癌症。在各个方面,这些方法通过将癌症的发作或复发延迟至少1天、2天、4天、6天、8天、10天、15天、30天、两个月、3个月、4个月、6个月、1年、2年、3年、4年或更长来进行治疗。在各个方面,这些方法通过增加受试者的存活来进行治疗。

[0251] 本公开的抗原结合蛋白还可用于检测样品中的CLDN6或诊断CLDN6阳性癌症。因此,本公开提供了检测样品中的紧密连接蛋白6(CLDN6)的方法。在各个实施方案中,该方法包括使样品与如本文所述的抗原结合蛋白、缀合物或融合蛋白接触,并测定包含与CLDN6结合的抗原结合蛋白、缀合物或融合蛋白的免疫复合物。本公开还提供了诊断受试者中的紧密连接蛋白6(CLDN6)阳性癌症的方法。在各个实施方案中,该方法包括使包含从受试者获得的细胞或组织的生物样品与如本文所述的抗原结合蛋白、缀合物或融合蛋白接触,并测定包含与CLDN6结合的抗原结合蛋白、缀合物或融合蛋白的免疫复合物。

[0252] 受试者

[0253] 在本公开的一些实施方案中,受试者是哺乳动物,包括但不限于:啮齿目哺乳动物,诸如小鼠和仓鼠;以及兔形目哺乳动物,诸如兔;食肉目哺乳动物,包括猫科(猫)和犬科(狗);偶蹄目哺乳动物,包括牛科(牛)和猪科(猪),或奇蹄目哺乳动物,包括马科(马)。在一些方面,哺乳动物是灵长目、Ceboids或Simoids(猴)或类人目(人和猿)。在一些方面,哺乳动物是人。

[0254] 试剂盒

[0255] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合蛋白在试剂盒中提供。在各个方面,试剂盒包含作为单位剂量的一种或多种抗原结合蛋白。出于本文的目的,“单位剂量”是指分散在合适载剂中的离散量。在各个方面,单位剂量是足以为受试者提供期望作用例如抑制肿瘤生长、减小肿瘤大小、治疗癌症的量。因此,本文提供了包含任选地以单位剂量提供的本公开的抗原结合蛋白的试剂盒。在各个方面,试剂盒包含若干单位剂量,例如一周或一月供应的单位剂量,任选地,其中每一者为单独包装的或以其他方式与其他单位剂量分开。在一些实施方案中,试剂盒/单位剂量的组分与用于向患者施用的说明书一起包装。在一些实施方案中,试剂盒包含一个或多个用于向患者施用的装置,例如针和注射器等。在一些方面,本公开的抗原结合蛋白、其药学上可接受的盐、包含抗原结合蛋白的缀合物或包含抗原结合蛋白的多聚体或二聚体以即用型形式预包装,例如注射器、静脉内袋等。在一些方面,试剂盒还包含其他治疗剂或诊断剂或药学上可接受的载剂(例如,溶剂、缓冲液、稀释剂等),包括本文所述的那些中的任一种。在特定方面,试剂盒包含本公开的抗原结合蛋白以及用于化学疗法或放射疗法的剂(例如治疗剂)。

[0256] 各个实施方案

[0257] 在本公开的各个实施方案中,抗原结合蛋白与人紧密连接蛋白6(CLDN6)蛋白(SEQ ID NO:200)结合,其中(a)抗原结合蛋白与CLDN6的胞外结构域(ECD)的胞外环2(EL2)结合,而不与CLDN6的ECD的胞外环1(EL1)结合;或(b)不与紧密连接蛋白3(CLDN3)、紧密连接蛋白4(CLDN4)和紧密连接蛋白9(CLDN9)中的任一者结合,并以小于约1200nM抑制参考抗体与OVCA429细胞内源性表达的CLDN6的结合;或(c)它们的组合。在各种情况下,抗原结合蛋白

与氨基酸序列WTAHAIIRDFYNPLVAEAQKREL(SEQ ID NO:2)内的表位结合,或与CLDN 6的氨基酸序列TAHAIIRDFYNPL(SEQ ID NO:3)或LVAEAQKREL(SEQ ID NO:4)结合。在各个方面,抗原结合蛋白不与紧密连接蛋白3(CLDN3)、紧密连接蛋白4(CLDN4)和紧密连接蛋白9(CLDN9)中的任一者或多者结合。在各种情况下,抗原结合蛋白不与CLDN3结合。在各种情况下,抗原结合蛋白与CLDN6、CLDN4和CLDN9结合,但不与CLDN3结合。在各种情况下,抗原结合蛋白与CLDN6和CLDN4结合,但不与CLDN3或CLDN9结合。在各个方面,抗原结合蛋白与CLDN6和CLDN9结合,但不与CLDN3或CLDN4结合。

[0258] 在各种情况下,本公开的抗原结合蛋白以小于约1200nM抑制参考抗体与OVCA429细胞内源性表达的CLDN6的结合,并且参考抗体包含SEQ ID NO:181的轻链可变序列和SEQ ID NO:182的重链可变序列、或SEQ ID NO:185的轻链可变序列和SEQ ID NO:186的重链可变序列。在各个方面,本公开的抗原结合蛋白以小于约1000nM或小于750nM(例如,小于约500nM、小于约250nM、小于约100nM)抑制参考抗体与OVCA429细胞内源性表达的CLDN6的结合,并且参考抗体包含SEQ ID NO:181的轻链可变序列和SEQ ID NO:182的重链可变序列、或SEQ ID NO:185的轻链可变序列和SEQ ID NO:186的重链可变序列。

[0259] 在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含(a)表A或表A1中列出的重链CDR1氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:11、17、23、29、35、41、47、53、59、65、71、77、83、89、95、101、107、113、119、125、131、452、455、461、465和472、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%(例如,至少或约85%、至少或约90%)序列同一性的变体序列;(b)表A或表A1中列出的重链CDR2氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、72、78、84、90、86、102、108、114、120、126、132、475、456、462、466、468和473、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%(例如,至少或约85%、至少或约90%)序列同一性的变体序列;(c)表A或表A1中列出的重链CDR3氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:13、19、25、31、37、43、49、55、61、67、73、79、85、91、97、103、109、115、121、127、133、453、457、463、467、469和474、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%(例如,至少或约85%、至少或约90%)序列同一性的变体序列;(d)表A或表A1中列出的轻链CDR1氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:8、14、20、32、38、44、50、56、62、68、74、80、86、92、98、104、110、116、122、128、449、476、458、464和470、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%(例如,至少或约85%、至少或约90%)序列同一性的变体序列;(e)表A或表A1中列出的轻链CDR2氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:9、15、21、27、33、39、45、51、57、63、69、75、81、87、93、99、105、111、117、123、129、450、477、459和471、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%(例如,至少或约85%、至少或约90%)序列同一性的变体序列;(f)表A或表A1中列出的轻链CDR3氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:10、16、22、28、34、40、46、52、58、64、70、76、82、88、94、100、106、112、118、124、130、451、454和460、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%(例如,至少或约85%、至少或约90%)序列同一性的变体序列;(g)(a)-(f)中任何两者或多者的组合。

[0260] 在各个方面,抗原结合蛋白包含表A或表A1中列出的轻链CDR1氨基酸序列、轻链CDR2氨基酸序列和轻链CDR3氨基酸序列以及表A或表A1中列出的重链CDR氨基酸序列中的1个或2个。在一些情况下,抗原结合蛋白包含表A或表A1中列出的重链CDR1氨基酸序列、重链

CDR2氨基酸序列和重链CDR3氨基酸序列以及表A或表A1中列出的轻链CDR氨基酸序列中的1个或2个。在各个方面,抗原结合蛋白包含选自由以下组成的组的六个CDR氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:74-79;(b)SEQ ID NO:50-55;(c)SEQ ID NO:122-127;(d)SEQ ID NO:26-31;(e)SEQ ID NO:128-133;(f)SEQ ID NO:38-43;(g)SEQ ID NO:62-67;(h)SEQ ID NO:80-85;(i)SEQ ID NO:44-49;(j)SEQ ID NO:86-91;(k)SEQ ID NO:104-109;(l)SEQ ID NO:56-61;(m)SEQ ID NO:32-37;(n)SEQ ID NO:110-115;(o)SEQ ID NO:98-103;(p)SEQ ID NO:92-97;(q)SEQ ID NO:116-121;(r)SEQ ID NO:8-13;(t)SEQ ID NO:68-73;(u)SEQ ID NO:14-19;(v)SEQ ID NO:20-25,(v)SEQ ID NO:449-453和475;(w)SEQ ID NO:476-477、454-457,(x)SEQ ID NO:458-463;(y)SEQ ID NO:57、58、464-467;(z)SEQ ID NO:68-71和468-469;以及(aa)SEQ ID NO:112和470-474。在各个方面,抗原结合蛋白包含(a)表B中列出的重链可变区氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、171、173和175、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%(例如,至少或约85%、至少或约90%)序列同一性的变体序列;(b)表B中列出的轻链可变区氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174和176、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%(例如,至少或约85%、至少或约90%)序列同一性的变体序列;或(a)和(b)两者。在各个方面,抗原结合蛋白包含选自由以下组成的组的一对氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:156和157;(b)SEQ ID NO:148和149;(c)SEQ ID NO:172和173;(d)SEQ ID NO:140和141;(e)SEQ ID NO:174和175;(f)SEQ ID NO:144和145;(g)SEQ ID NO:152和153;(h)SEQ ID NO:158和159;(i)SEQ ID NO:146和147;(j)SEQ ID NO:160和161;(k)SEQ ID NO:166和167;(l)SEQ ID NO:150和151;(m)SEQ ID NO:142和143;(n)SEQ ID NO:168和169;(o)SEQ ID NO:164和165;(p)SEQ ID NO:162和163;(q)SEQ ID NO:170和171;(r)SEQ ID NO:134和135;(s)SEQ ID NO:154和155;(t)SEQ ID NO:136和137;以及(u)SEQ ID NO:138和139。

[0261] 在各个实施方案中,抗原结合蛋白包含(a)表B1或表C中列出的重链可变区氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:376-379、384-387、391-396、403-408、412、413、416-419、422-427、478、480、482、484、486和488、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%、或约80%、或约90%、或约95%序列同一性的变体序列;(b)表B1或表C中列出的轻链可变区氨基酸序列或选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:380-383、388-390、397-402、409-411、414、415、420、421和479、481、483、485、487和489、或其仅相差一个或两个氨基酸或具有至少或约70%、或约80%、或约90%或约95%序列同一性的变体序列;或(c)(a)和(b)两者。在各个方面,抗原结合蛋白包含表D中所列的一对氨基酸序列。

[0262] 本公开提供了一种抗原结合蛋白,其包含:(A)HC CDR1,其包含氨基酸序列YTFTXYT(SEQ ID NO:452),其中X为T、V、D或S,任选地包含氨基酸序列YTFTTYT(SEQ ID NO:11);(B)HC CDR2,其包含氨基酸序列IXPSSGYT(SEQ ID NO:475),其中X为Q、S、A或N,任选地包含氨基酸序列INPSSGYT(SEQ ID NO:12);(C)HC CDR3,其包含氨基酸序列AXGDYYVAY(SEQ ID NO:453),其中X为N、Q、H或D,任选地包含氨基酸序列ANGDYYVAY(SEQ ID NO:13);(D)LC CDR1,其包含氨基酸序列SSVSSXY(SEQ ID NO:449),其中X为T、V、F或D,任选地包含氨基酸序列SSVSSTY(SEQ ID NO:8);(E)LC CDR2,其包含氨基酸序列XTX(SEQ ID NO:450),其中位

置1的X为S、T、Q或A并且位置3的X为S、T、D或Q,任选地包含氨基酸序列STS(SEQ ID NO:9);以及(F)LC CDR3,其包含氨基酸序列HXYXRSPLT(SEQ ID NO:451),其中位置2的X为Q、H或S并且位置4的X为H、Y、Q或S,任选地包含氨基酸序列HQYHRSPLT(SEQ ID NO:10)。

[0263] 一种抗原结合蛋白,其包含:(A)HC CDR1,其包含氨基酸序列FTFSXYX(SEQ ID NO:455),其中位置5的X为N、S、R、Q或A并且位置7的X为W、H、Y、F,任选地包含氨基酸序列FTFSNYW(SEQ ID NO:23);(B)HC CDR2,其包含氨基酸序列IRLKXDXYAT(SEQ ID NO:456),其中位置5的X为S、N、A或T并且位置7的X为Q、S、A、N,任选地包含氨基酸序列IRLKSDNYAT(SEQ ID NO:24);(C)HC CDR3,其包含氨基酸序列XDGPPSGX(SEQ ID NO:457),其中位置1的X为N、D或T并且位置8的X为S、T、A、C或Y,任选地包含氨基酸序列NDGPPSGC(SEQ ID NO:25);(D)LC CDR1,其包含氨基酸序列EXIYSY(SEQ ID NO:476),其中X为Q、S、A、D或N,任选地包含氨基酸序列ENIYSY(SEQ ID NO:20);(E)LC CDR2,其包含氨基酸序列XAK(SEQ ID NO:477),其中位置1的X为Q、S、A、D或N,任选地包含氨基酸序列NAK(SEQ ID NO:21);以及(F)LC CDR3,其包含氨基酸序列QXHYXVPWT(SEQ ID NO:454),其中位置2的X为H、Q、S或T并且位置5的X为T、S、N或G,任选地包含氨基酸序列QHHYTVPWT(SEQ ID NO:22)。

[0264] 一种抗原结合蛋白,其包含:(A)HC CDR1,其包含氨基酸序列YTXTXYT(SEQ ID NO:461),其中位置3的X为F、Y、S或T并且位置5的X为S、T、Y或D,任选地包含氨基酸序列YTFTSYT(SEQ ID NO:29);(B)HC CDR2,其包含氨基酸序列IXPSSXYT(SEQ ID NO:462),其中位置2的X为Q、S、A或N并且位置6的X为T、S、V、D或G,任选地包含氨基酸序列INPSSTYT(SEQ ID NO:30);(C)HC CDR3,其包含氨基酸序列XRGEXGGFAY(SEQ ID NO:463),其中位置1的X为S、A、T或V并且位置5的X为L、V或F,任选地包含氨基酸序列SRGELGGFAY(SEQ ID NO:31);(D)LC CDR1,其包含氨基酸序列QSLVHSXGXTY(SEQ ID NO:458),其中位置7的X为D、N、E、Q、S或A并且位置9的X为Q、S、A、D或N,任选地包含氨基酸序列QSLVHSDGNTY(SEQ ID NO:26);(E)LC CDR2,其包含氨基酸序列XVX(SEQ ID NO:459),其中位置1的X为K、Q或R并且位置3的X为S、T或V,任选地包含氨基酸序列KVS(SEQ ID NO:27);以及(F)LC CDR3,其包含氨基酸序列SXXTHVPYT(SEQ ID NO:460),其中位置2的X为Q、H或T并且位置3的X为S、G、T或D,任选地包含氨基酸序列SQSTHVPYT(SEQ ID NO:28)。

[0265] 在各个方面,本公开的抗原结合蛋白为抗体,例如单克隆抗体。在各种情况下,抗原结合蛋白为IgG。在各个方面,抗原结合蛋白在软琼脂3D增殖测定中抑制至少约50%的集落生长或抑制在注射人癌细胞的异种移植小鼠中的肿瘤生长。在各个方面,抗原结合蛋白抑制注射了卵巢癌细胞、黑素瘤癌细胞、膀胱癌细胞或子宫内膜癌细胞的异种移植小鼠中的肿瘤生长。在各种情况下,抗原结合蛋白抑制注射了卵巢癌细胞、膀胱癌细胞或子宫内膜癌细胞的异种移植小鼠中至少50%的肿瘤生长。

[0266] 本公开提供了包含本文所述的抗原结合蛋白和异源部分的缀合物。本公开还提供了包含本文所述的抗原结合蛋白的融合蛋白。本公开还提供了包含编码本公开的抗原结合蛋白、缀合物或融合蛋白的核苷酸序列的核酸。本公开提供了包含核酸的载体,该核酸包含编码本公开的抗原结合蛋白、缀合物或融合蛋白的核苷酸序列。本公开另外提供了包含本公开的核酸或载体的宿主细胞。

[0267] 本公开提供了产生与紧密连接蛋白6(CLDN6)蛋白结合的抗原结合蛋白的方法,该方法包括(i)在细胞培养基中培养本公开的宿主细胞,其中该宿主细胞包含核酸,该核酸包

含编码前述权利要求中任一项所述的抗原结合蛋白的核苷酸序列,以及(ii)从细胞培养基中收获抗原结合蛋白。另外,提供了产生包含与紧密连接蛋白6(CLDN6)蛋白结合的抗原结合蛋白的融合蛋白的方法,该方法包括(i)在细胞培养基中培养本公开的宿主细胞,其中该宿主细胞包含核酸,该核酸包含编码本公开的融合蛋白的核苷酸序列,以及(ii)从细胞培养基中收获融合蛋白。

[0268] 本公开还提供了产生药物组合物的方法,该方法包括组合本公开的抗原结合蛋白、缀合物、融合蛋白、核酸、载体、宿主细胞或它们的组合以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。还提供了包含本公开的抗原结合蛋白、缀合物、融合蛋白、核酸、载体、宿主细胞或它们的组合以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂的药物组合物。

[0269] 本文提供了治疗患有表达CLDN6的癌症的受试者的方法,该方法包括以有效治疗癌症的量向受试者施用本文所述的药物组合物。还提供了抑制受试者中肿瘤生长的方法,该方法包括以有效抑制肿瘤生长的量向受试者施用本文所述的药物组合物。本公开提供了减小受试者中肿瘤大小的方法,该方法包括以有效减小肿瘤大小的量向受试者施用本文所述的药物组合物。还提供了预防受试者中癌症复发的方法,该方法包括以有效预防癌症复发的量向受试者施用本文所述的药物组合物。

[0270] 本公开提供了检测样品中的紧密连接蛋白6(CLDN6)的方法,该方法包括使样品与本公开的抗原结合蛋白、缀合物或融合蛋白接触,并测定包含与CLDN6结合的抗原结合蛋白、缀合物或融合蛋白的免疫复合物。本文还提供了诊断受试者的紧密连接蛋白6(CLDN6)阳性癌症的方法,该方法包括使包含从受试者获得的细胞或组织的生物样品与本公开的抗原结合蛋白、缀合物或融合蛋白接触,并测定包含与CLDN6结合的抗原结合蛋白、缀合物或融合蛋白的免疫复合物。

[0271] 本公开还提供了治疗被诊断为CLDN6低过表达的受试者的癌症的方法。在各个实施方案中,该方法包括以有效预防癌症复发的量向受试者施用当前公开的药物组合物。在一些方面,施用诱导肿瘤细胞的凋亡,任选地,施用诱导表达CLDN6的细胞的凋亡。在各个方面,受试者患有肿瘤,并且肿瘤被半定量地分类为四个组之一:高表达者、中等表达者、低表达者和不表达者。在各种情况下,高表达者被定义为CLDN6 RNA大于12log个片段/千碱基对(FPKM),其中CLDN6RNA通过RNASeq来测量,或如通过免疫组织化学(IHC)测量的CLDN6蛋白水平大于3+。在各种情况下,中等表达者被定义为CLDN6 RNA大于10log个FPKM,其中CLDN6 RNA通过RNASeq来测量,或通过IHC测量的CLDN6蛋白水平大于2+。在各种情况下,低表达者被定义为CLDN6 RNA大于6log个FPKM,其中CLDN6RNA通过RNASeq来测量,或通过IHC测量的CLDN6蛋白水平大于1+。在各种情况下,不表达者被定义为CLDN6 RNA小于6log个FPKM,其中CLDN6 RNA通过RNASeq来测量,或CLDN6蛋白水平低于IHC检测极限。在各个方面,患有所述肿瘤的受试者同样被描述为CLDN6的高表达者、中等表达者、低表达者或不表达者。

[0272] 给出以下实施例仅用于举例说明本公开,而不以任何方式限制其范围。

[0273] 实施例

[0274] 实施例1

[0275] 本实施例说明了不同细胞和组织来源中CLDN6 RNA水平的分析。

[0276] 为了建立CLDN6在不同来源材料中表达的基线,测定了患者样品、正常组织和由转化肿瘤研究实验室(TORL)创建的细胞系中CLDN6表达的表达水平。

[0277] 使用国家癌症研究所(NCI)管理的癌症基因组图谱(TCGA)数据库中包含的信息来测量患者样品中CLDN6 RNA的水平。使用由共同基金维护的基因型-组织表达(GTEX)数据库中的信息来测量正常组织中的CLDN6水平。对来自GTEX数据库的组织的分析显示,CLDN6在各种部位均可检测到,包括脑、垂体、胰腺、肾、肺、甲状腺和宫颈以及其他组织(图1)。

[0278] 使用Agilent 44K微阵列(4x44K阵列芯片,Agilent Technologies,Santa Clara,CA)和RNA测序(RNA-seq)测定测量TORL癌细胞系中的CLDN6表达水平。RNASeq由BGI Americas(Cambridge,MA)使用其"定量用RNASeq"服务进行。如图2和图3所示,尽管在乳腺癌、肾癌、结肠癌、肉瘤和肝癌细胞中可检测到CLDN6的表达水平,但卵巢癌、头颈癌、肺癌和膀胱癌细胞的CLDN6表达水平最高。

[0279] 实施例2

[0280] 本实施例说明了经工程改造以过表达CLDN6的细胞的产生。

[0281] 生成了经工程改造以过表达CLDN6的模型。这些模型用于确定实施例5中所述的CLDN6抗体的功效。简而言之,将编码CLDN6的核苷酸序列工程改造到具有CMV启动子和脑心肌炎病毒(EMCV)的减毒内部核糖体进入位点(IRES)的双顺反子载体中。IRES位于目的基因(GOI)cDNA(CLDN6)与嘌呤霉素cDNA之间。土拨鼠转录后调控元件(WPRE)位于嘌呤霉素cDNA的下游。该载体还表达GFP标记序列或MycDDK标签。包含GFP的表达载体的序列在本文中以SEQ ID NO:189提供。

[0282] 将表达载体病毒转导到HEK293T细胞(用于筛选目的)和NIH3T3细胞(用于免疫)中。基于在含嘌呤霉素(1μg/ml)的培养基中的存活选择阳性转导细胞。将阳性细胞亚克隆以获得CLDN6过表达细胞的稳定、均一的克隆群体。

[0283] 使用参考CLDN6单克隆抗体(mAb)在BD Biosciences Accuri™流式细胞仪(San Jose,CA)上通过流式细胞术确认亚克隆CLDN6的表达。二抗和缀合物:Alexa Fluor®647山羊抗小鼠IgG(最小x反应性)抗体(Biolegend,San Diego,CA;目录号405322)用于检测参考CLDN6mAb与亚克隆表达的CLDN6之间的结合活性。

[0284] 通过使用Cellavista®成像系统(Synentec(Mountain View,CA)和表达CLDN6-绿色荧光蛋白(GFP)融合蛋白的细胞,通过荧光显微镜确定CLDN6的细胞定位。如图4所示,在细胞膜中检测到GFP的荧光,证明CLDN6位于细胞膜上。

[0285] 实施例3

[0286] 本实施例说明了参考抗体和对照抗体的产生。

[0287] 通过将抗体重链可变区和轻链可变区克隆到ExpiCHO™表达系统(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA)中以产生重组小鼠IgG2A嵌合抗体,来制备基准(参考)CLDN6特异性抗体和对照抗体。将这些抗体与实施例5中所述的新生成的CLDN6特异性抗体一起进行测试。

[0288] 简而言之,根据制造商的方案,使用ExpiCHO™表达系统(目录号A29133,ThermoFisher Scientific,USA)转染包含对照和基准抗体序列的质粒。转染后第1天,将细胞在37℃和8% CO_2下培养,然后在试剂盒中提供的培养基中于32℃和5% CO_2下培养。通过以1,000g离心10分钟,然后以5,000g离心30分钟使ExpiCHO™培养基澄清,从而纯化抗体。然后使用0.45μm过滤器,随后使用0.22μm过滤器过滤上清液。随后,根据制造商的方案,使用蛋白A/G树脂(Life Technologies,Carlsbad,CA;目录号20424)对上清液进行亲和纯化。在

ELISA纯化之前,粗略测定培养基中的抗体滴度,以确保所加载的培养基的量占据小于80%的树脂结合能力。温育后,将树脂用PBS洗涤,并用洗脱缓冲液(Life Technologies,目录号21004)洗脱。通过添加pH8.0的Tris缓冲液,立即将洗脱级分调节至生理pH。随后使用Amicon Ultra-15离心过滤器装置(Life Technologies,目录号UFC900324)在PBS缓冲液中对经纯化的抗体进行缓冲液交换和蛋白质浓缩。抗体浓度通过BCA蛋白测定来确定。进行SDS-PAGE和考马斯染色以测试抗体纯度。将经纯化的蛋白质等分并在-80℃下长期储存或在4℃下保存以供立即使用。

[0289] 通过SDS-PAGE,接着在非还原对还原条件下进行考马斯染色,验证抗体的完整性;在非还原条件下,一个主要的条带在150kDa附近,而在还原条件下,观察到两个条带,50kDa和25kDa。

[0290] 以基本相同的方式产生对具有序列相似性(图5)的其他CLDN家族成员(即CLDN3、CLDN4和CLDN9)特异性的抗体,不同之处在于质粒中所含的抗体序列为对CLDN3、CLDN4或CLDN9特异性的抗体序列。

[0291] 实施例4

[0292] 本实施例说明了具有高内源性CLDN6表达的细胞系的表征。

[0293] 通过FACS和蛋白质印迹分析一组癌细胞系的CLDN6内源性表达。简而言之,通过FACS使用过表达CLDN6的细胞(例如,实施例2中描述的过表达CLDN6的HEK293T细胞)和如实施例1中测定的以高或低水平内源性表达CLDN6的细胞系验证抗体与靶标的结合。将表达CLDN6的细胞与参考或对照抗体(实施例3中所述)在冰上温育30分钟,洗涤后,与Alexa Fluor®647缀合的山羊抗小鼠IgG(最小x反应性)抗体(Biolegne目录号405322)在冰上温育30分钟。通过BD Biosciences Accuri™流式细胞仪(San Jose,CA)读取荧光。

[0294] 用参考和对照抗体在硝酸纤维素上进行蛋白质印迹。简而言之,将来自细胞裂解物的样品煮沸以使蛋白质含量变性。SDS-PAGE(SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)用于根据多肽的长度分离变性的蛋白质。然后将分离的蛋白质从丙烯酰胺凝胶转移到硝酸纤维素膜上。使用2%的牛血清白蛋白(BSA)溶液封闭膜,从而使非特异性抗体结合最小化。将膜与参考或对照抗体一起温育。膜用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的二抗染色,该二抗识别参考抗体或对照抗体,并且经由化学发光检测二抗。

[0295] 过表达系用于验证对照和参考抗体,并且一旦经验证,就使用对照和参考抗体来表征该内源性细胞系。这些测定中包括过表达CLDN6的细胞作为阳性对照。

[0296] FACS测定显示,除了子宫内膜癌细胞系、膀胱癌细胞系、肺癌细胞系和上消化道癌细胞系外,还有四个卵巢癌细胞系在表面以高水平表达CLDN6。还通过蛋白质印迹检测到高水平的CLDN6表达。如通过蛋白质印迹所检测的,另外两种卵巢癌细胞系、另外的肝癌细胞系、另外的肺癌细胞系和另外的上消化道癌细胞系显示出在表面上以中等水平表达CLDN6。子宫内膜肿瘤细胞和膀胱肿瘤细胞也表达高水平的CLDN6作为体内异种移植物。表2汇总了被测试癌细胞系的CLDN6的内源性表达水平。

[0297] 表2

[0298]

细胞_系_名称	主要组织学	CLDN6 RNASeq	组	通过FACS的表面表达	通过WB的蛋白质表达(细胞系)	通过WB的蛋白表达(异种移植物)	致瘤性亚Q	致瘤性IP(裸)	致瘤性IP(SCID)
OVCA429	卵巢	393.99	阳性对照	++++	++++		否	缓慢	TBD
ARK2	子宫内膜	335.06	阳性对照	++++	++++	+++	是		
OAW28	卵巢	273.78	阳性对照	++++	++++		否	TBD	TBD
UMUC-4	膀胱	242.93	阳性对照	++++	++++	++	是	缓慢	TBD
PEO14	卵巢	196.63	阳性对照	++++	+++		否	TBD	TBD
OV177	卵巢	195.53	阳性对照	++++	+		否	TBD	TBD
H1693	肺	184.12	阳性对照	++++	+++		TBD		
MKN7	上消化道	118.6	阳性对照	+++	++		TBD		
OV-90	卵巢	108.23	阳性对照	++	++	+	是		

[0299]

HUH-7	肝	93.52	阳性对照	++	+		是		
JHOS-4	卵巢	69.3	阳性对照	++	+		否	TBD	TBD
H1435	肺	42.8	阳性对照	++	+/-		TBD		
NUGC 3	上消化道	41.11	阳性对照	++	++	+	是		
RMG-1	卵巢	0.63	阴性对照	-	-	-	是	TBD	TBD
COLO704	卵巢	0.44	阴性对照	-	-	-	是	TBD	TBD
MCF-7	乳房	0	阴性对照	-	-	-	是		
LS513	结肠	0	阴性对照	-	-	-	是		
M202	黑素瘤	0	阴性对照	-	-	-	是		
M275	黑素瘤	0	阴性对照	-	-		是		
KOC-7C	卵巢	0	阴性对照	-	-	-	是	是	TBD

[0300] 实施例5

[0301] 本实施例说明了免疫小鼠以产生CLDN6特异性抗体。

[0302] 通过用三种不同肽免疫原的混合物按照Fred Hutchinson癌症研究中心的技术免疫Balb/c和CD1小鼠来产生CLDN6-特异性抗体。这三种肽跨越CLDN6胞外结构域的第二环(即,EL2)。这些肽包括全长的EL2,跨越EL2的前(N-末端)一半的肽和跨越EL2的后(C-末端)一半的肽。表3提供了三种肽的序列。

[0303] 表3

[0304]

肽免疫原	EL2	SEQ ID NO:
Ac-CWTAHAIIRDFYNPLVAEAQKREL-酰胺	全长EL2	2
Ac-CTAHAIIRDFYNPL-酰胺	N-末端一半	3
Ac-LVAEAQKRELGC-酰胺	C-末端一半	4

[0305] 还用包含人CLDN6-myc-DDK表达载体的质粒,用过表达全长CLDN6的3T3细胞免疫小鼠。

[0306] 从经免疫的小鼠中收获脾细胞,并通过BTX电融合(BTX,Holliston,MA)与骨髓瘤细胞系融合以生成杂交细胞。生成了7680种原代杂交细胞培养物,并在384孔板中培养。通过使用表达三种不同肽靶标的珠粒的珠粒阵列评估抗体结合肽的能力。将1920种潜在的阳性抗体重新排列到96孔板中,再通过流式细胞术针对内源性和人工细胞系模型进行筛选。

[0307] 然后通过流式细胞术对与靶区域具有序列相似性的蛋白质(例如,其他CLDN蛋白质)的内源性和人工模型反筛选阳性杂交细胞上清液。从二次筛选和反筛选中,选择约20种CLDN6-特异性抗体用于另外的研究。将这些抗体亚克隆,并确定可变的重链和轻链序列。参见表B和序列表。

[0308] 使用ExpiCHO™表达将CLDN6抗体型式化为全长IgG抗体。将抗体的重链和轻链可变区克隆到抗体表达载体中,该抗体表达载体在实验室中基于pcDNA™3.4-TOPO®载体(目录号:A14697,ThermoFisher Scientific,USA)进行工程改造,并通过(根据试剂盒(ExpiCHO™表达系统,目录号:A29133,ThermoFisher Scientific,USA)中提供的方案)转染到CHO细胞中。纯化抗体,并通过FACS测定抗体与CLDN6和抗体IC50的细胞表面结合,其中CLDN6抗体按照制造商的方案与Alexa Fluor®647NHS酯(琥珀酰亚胺酯)(目录号A20106,ThermoFisher Scientific)直接缀合。在150,000个细胞系统中,以50μl的体积从0.32nM至1000nM(连续稀释度1:5,6个点)测试CLDN6抗体。

[0309] 表达CLDN6的细胞被用于FACS测定中,以确定CLDN6抗体与细胞表面上的CLDN6结合以及与其他CLDN家族成员交叉反应的能力。将经工程改造以表达与GFP融合的人CLDN6、与GFP融合的小鼠CLDN6、CLDN9-GFP、CLDN4-GFP或CLDN3-GFP或单独GFP(不含CLDN6)的HEK293 T细胞用作CLDN6表达的人工模型。ARK2、OVCA429、LS513和MCF7细胞用作CLDN6表达的内源性模型以及用于CLDN3/4表达的模型。

[0310] 对于每种测试的细胞类型和每种mAb,通过EDTA(而不是胰蛋白酶)将细胞从培养瓶表面分离,以保护细胞表面蛋白。然后将分离的细胞与Alexa Fluor®-标记的CLDN6 mAb以预定浓度在黑暗中于冰上温育30分钟。CLDN6 mAb直接用Alexa Fluor®647NHS酯(琥珀酰亚胺酯)标记。洗涤后,通过BD Accuri™流式细胞仪C6读取细胞,以检测通道FL4H中抗体-抗原蛋白的结合。在不同浓度下测试每种抗体以建立剂量-荧光曲线。使用在线可获得的

Very Simple IC50工具包,基于FL4H(以活单线态细胞设门)的值计算抗体的EC50/IC50(最大值的一半时的抗体浓度),该工具包允许对生物剂量-反应数据作图并拟合成曲线类型以得到EC50/IC50。最大值是荧光最大化的最低抗体浓度。还筛选了抗体与其他CLDN蛋白(诸如CLDN9、CLDN3和CLDN4)交叉反应的能力。这些值用于确定测试的抗体组中每种抗体的相对亲和力。使用相似的方法获得交叉反应性数据,但细胞对于CLDN6、CLDN3、CLDN4和CLDN9具有不同的表达谱。

[0311] 以这种方式确定的相对亲和力数据和交叉反应性数据列于表4和表5中。

[0312] 表4

[0313]

AB#	等级	HEK293T-CLDN6-mGFP 人工 CLDN6+	HEK293T-CLDN6-mGFP 人工 CLDN6+ (小鼠)	HEK293T CLDN9-mGFP 人工 CLDN9+	HEK293T CLDN4-mGFP 人工 CLDN4+	HEK293T CLDN3-mGFP 人工 CLDN3+	HEK293T-mGFP 亲本
1	1	109	72	2765	5000	5000	5000
2	2	182	5000	5000	5000	5000	5000
3	3	604	2487	5000	5000	5000	5000
4	4	17	5000	1860	739	5000	5000
5	5	10	11	25	5000	5000	5000
6	6	1427	2222	2769	26	5000	5000
7	7	579	1548	1938	2088	5000	5000
8	8	1918	5000	2769	5000	5000	5000
9	9	2671	5000	5000	5000	5000	5000
10	10	2757	5000	246	5000	5000	5000
11	11	1696.29	2375	5000	2238	5000	5000
12	负数	5000	5000	2468	2087	5000	5000
13	负数	5000	5000	5000	5000	5000	5000
14	负数	5000	5000	5000	5000	5000	5000
16	负数	5000	5000	5000	5000	5000	5000
17	负数	2,645.95	5000	5000	5000	5000	5000
18	负数	5000	5000	5000	5000	5000	5000
15	负数	5000	5000	5000	5000	5000	5000
19	负数	5000	5000	5000	5000	5000	5000
参	0	122	46	5000	5000	5000	5000

[0314]

考Ab2							
参考Ab1	0	57	651	2943	5000	5000	5000

[0315] AB#对应于表A和表B中所列的AB#。

[0316] 表5

[0317]

AB #	ARK2 内源性 CLDN6+	OVCA429 内源性 CLDN6+	LS513 内源性 CLDN3/4+	MCF7 内源性 CLDN3/4+
1	105	84	5000	5000
2	1365	912	5000	5000
3	1653	1096	5000	5000
4	48	168	730	653
5	8	5	781	1485
6	765	394	133	1135
7	353	531	635	979
8	1136	1090	1126	1063
9	1140	1165	1040	5000
10	2143	2473	1947	5000
11	362.81	834.65	492.567	427.031
12	1297	2294	2266	5000
13	1147	2287	1594	5000
14	1304	1661	1161	546
16	5000	5000	5000	5000
17	5000	5000	5000	5000
18	1,354.80	2,435.18	5000	5000
15	5000	5000	5000	5000
19	5000	5000	5000	5000
参考Ab2	1115	1283	2222	5000
参考Ab1	162	62	5000	5000

[0318] AB#对应于表A和表B中所列的AB#。

[0319] 实施例6本实施例说明了嵌合小鼠IgG mAb的表征。

[0320] 进行软琼脂3D增殖测定和异种移植物结合测定以进一步表征实施例5中所述的mAb。简而言之,将在1x RPMI培养基中的0.6%SeaPlaque琼脂糖中含有10,000个细胞的250μL顶层混合物铺在48孔板的每孔的1x RPMI培养基中的0.6% SeaPlaque琼脂糖的250uL固化底层的顶部。将含有1x RPMI培养基的250uL液体进料层置于固化顶层上方。使用或不使用曲妥珠单抗、Cldn6 mAb或小鼠IgG2a对照制备软琼脂测定的所有三层,起始浓度为150ng/mL(1uM),终止浓度为1.5ng/mL,以1:10稀释。每种测试条件一式两份进行。使细胞形成集落3周,然后用0.05%中性红染色,并在EVOS XL倒置光学显微镜上成像。经处理的细胞

系与对照相比,集落数减少≥20%被认为是敏感的。

[0321] 如表6所示,当用所示抗体处理时,许多细胞系表现出集落数减少。

[0322] 表6

[0323]

	体外 3D 活性
参考 Ab1**	70%
参考 Ab2**	50%
AB1	50%
AB2	50%
AB3	50%
AB4	70%
AB5	70%
AB6	70%
AB7	50%
AB8	0%
AB9	0%
AB10	50%
AB11	50%
AB12	0%
AB13	50%
AB14	0%
AB19	50%
AB16	25%
AB17	0%

[0324]

AB18	0%
AB19	0%

[0325] 在注射了人癌细胞系的异种移植小鼠中进行体内结合研究。简而言之,在六周龄的CD-1无胸腺裸鼠(Charles River Laboratories)中建立人癌细胞系的异种移植模型。对于皮下注射每种细胞系遵循以下条件:ARK2 0.75×10^7,UMUC4 1.0×10^7,OV90 1.0×10^7和M202 0.5×10^7细胞,均含有50%基质胶(BD Biosciences)。注射足够数量的小鼠以实现每个处理组8只小鼠。当肿瘤达到150至300mm^3的平均大小时,将小鼠随机分到处理组中。对于处理,将每种治疗性抗体(AB3、AB2、参考Ab1、参考Ab2、参考Ab3(曲妥珠单抗)和非靶向IgG2对照)在无菌盐水中稀释至1mg/ml的工作浓度用于静脉内尾静脉(IV)注射。对于M202研究,在第一个每周循环的5天给药、2天停药时间表中,通过PO以1.0mg/kg(10% Cremaphor,10% PEG400)给予曲美替尼(DMSO溶剂化物,MedChem Express),然后在剩余的两周给药中降低至0.5mg/kg。每周用测径器测量肿瘤异种移植物三次,并且通过乘以高度×宽度×长度来确定以mm^3为单位的肿瘤体积。将小鼠处理2-7周。在研究结束时,使动物安乐死,切除肿瘤组织并将其分开以作为速冻或福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织储存,以用于生物标记分析。所有动物工作均根据IACUC和加利福尼亚大学洛杉矶分校动物研究委员会批准的方案进行。使用得自StudyDirector(San Francisco,CA)的StudyLog软件分析数据。结果表示为每组的平均体积。误差条表示平均值的标准误差(SE)。

[0326] 异种移植测定的结果示于图6至图10中。如图6A和图6B所示,在携带子宫内膜肿瘤的小鼠中,相对于对照IgG2抗体,AB2和AB3中的每一个在第14天引起肿瘤体积的实质平均变化。如图7A和图7B所示,在携带膀胱肿瘤的小鼠中,相对于对照IgG2抗体,AB3在第35天引起肿瘤体积的实质平均变化。图8A和图8B显示,在携带卵巢肿瘤的小鼠中,相对于对照IgG2抗体,AB2和AB3中的每一个在第20天引起肿瘤体积的实质平均变化。图9A和图9B表明,AB3以CLDN-特异性方式起作用,因为图9A和图9B中使用的模型不表达CLDN6、CLDN3、CLDN4和CLDN9中的任何一者,因此被用作阴性对照。图9A和图9B的数据还表明,AB3具有比参考Ab1和参考Ab2低的脱靶活性。图10A汇总了图6至图9的结果。如图10A所示,AB3显著降低了携带子宫内膜、膀胱和卵巢肿瘤的小鼠的肿瘤生长,这些肿瘤均表达CLDN6,但没有降低携带不表达CLDN6的黑素瘤肿瘤的小鼠的肿瘤生长(图10B)。如图11所示,处理期间小鼠体重的平均链没有显著变化,表明处理的安全性。

[0327] 在人卵巢癌细胞系OV90的异种移植模型中进行第二组实验。给小鼠注射实施例5中所述的10种mAbs之一或对照抗体(小鼠IgG2a抗体,参考CLDN6 ab)或PBS媒介物对照。每组8只小鼠,每只动物每4天静脉内注射10mg/kg抗体。如图12A和图12B所示,实施例5中所述的几种抗体减小了携带卵巢肿瘤的小鼠的肿瘤体积。尽管所测试的所有抗体相对于媒介物对照均减小了肿瘤体积,其中表现最好的是AB3、AB4、AB7和AB10。如图13所示,用AB3、AB4、AB7或AB10处理的动物的体重没有明显变化,表明它们的安全性。

[0328] 实施例7

[0329] 本实施例说明了嵌合小鼠IgG mAb的进一步表征。

[0330] 进行内化定量测定。简而言之,由参考抗体Ab1、AB3或AB4结合触发的CLDN6蛋白内在化的研究用阳性对照进行,该阳性对照是普遍表达的转铁蛋白受体(TfR),其是已知的在抗体结合后被内化的细胞表面受体。

[0331] TfR和CLDN6抗体用Texas Red™-X琥珀酰亚胺酯(混合异构体,目录号T6134,ThermoFisher Scientific)标记。在抗体处理前一天,将细胞接种在μ-载玻片8孔室(目录号80826,ibidi Cells In Focus Inc.)中,以使细胞附着并生长。将细胞与标记的抗体在冰上在黑暗中温育30分钟。然后,在内化之前,通过Echo实验室荧光显微镜读取包含CLDN6或TfR标记细胞的室以收集图像。然后将该室在37℃下温育40分钟以允许内化过程,并通过Echo实验室荧光显微镜再次收集图像。与参考Ab1引起的结果相比,AB3和AB4引起更大程度的CLDN6内化(数据未示出)。

[0332] 实施例8

[0333] 本实施例说明了嵌合小鼠IgG mAb的进一步表征。

[0334] 用实施例5中所述的选择抗体如下进行二维(2D)增殖测定:将细胞以每孔5,000至20,000个细胞一式两份地接种在24孔板中。第二天,将细胞用六种1-5稀释的mAb(以100nM的曲妥珠单抗、Cldn6mAb或小鼠IgG2A对照开始)和固定浓度的1ng/μL单甲基奥瑞司他汀E(MMAE)-缀合的抗小鼠二抗(Moradec,LLC)处理以生成剂量反应曲线。在第1天、抗体处理当天和之后的第6天对未处理的细胞孔进行定量,以确定细胞生长的范围。在第6天对用mAbs处理的孔进行定量,并将每种处理条件下的生长确定为相对于未处理细胞生长的标准化百分比。在Z1粒子计数器(Beckman Coulter,Inc)上进行定量。

[0335] 结果示于图14中。AB2、AB3、AB4和AB5在抑制增殖方面表现出最大的功效。这些抗

体中每一种的IC50介于0.1nM和1nM之间。AB7、AB10、AB11和AB15中的每一个在此测定中也都表现出抑制增殖的能力,尽管程度不及AB2、AB3、AB4和AB5。

[0336] 实施例9

[0337] 本实施例说明了本公开的抗体的人源化。

[0338] 选择表A中所列的抗体亚组用于人源化分析。将AB1、AB3、AB4、AB9、AB11和AB18抗体的重链可变(VH)和轻链可变(VL)序列与来自人VH基因和人VLκ基因的已知人种系序列文库进行比较(IMGT®the international ImMunoGeneTics informationsystem® www.imgt.org;创始人和总监:Marie-Paule Lefranc,Montpellier,France);所用数据库为IMGT人VH基因(F+ORF,273种系序列)和IMGT人VLκ基因(F+ORF,74种系序列)。受体人种系选自与亲本抗体序列最接近的那些。

[0339] 表7提供了每种抗体的每个VH和VL的有关被选作受体序列的人种系序列和所选择的人重链连接区(J基因)的信息。连接区(J基因)选自*IMGT®*the international ImMunoGeneTics information *system®*www.imgt.org(创始人和总监:Marie-Paule Lefranc,Montpellier,France)编译的人连接区序列。

[0340] 表7

[0341]

	人 HC 种系	人 HC 连接区 (J 基因)	人 LC 种系	人 LC 连接区 (J 基因)
AB1	IGHV1-46(等位基因 1)	IGHJ4(等位基因 1)	IGLV1-39(等位基因 1)	IGKJ2(等位基因 1)
AB3	IGHV3-23(等位基因 1)	IGHJ4(等位基因 1)	IGLV1-39(等位基因 1)	IGKJ2(等位基因 1)
AB4	IGHV1-46(等位基因 1)	IGHJ4(等位基因 1)	IGLV2-30(等位基因 1)	IGKJ2(等位基因 1)
AB9	IGHV1-46(等位基因 1)	IGHJ4(等位基因 1)	IGLV1-39(等位基因 1)	IGKJ2(等位基因 1)
AB11	IGHV3-48(等位基因 1)	IGHJ4(等位基因 1)	IGLV4-1(等位基因 1)	IGKJ2(等位基因 1)
AB18	IGHV1-46(等位基因 1)	IGHJ4(等位基因 1)	IGLV4-1(等位基因 1)	IGKJ2(等位基因 1)

[0342] CDR是根据AbM定义来定义的(有关比较CDR定义的表,参见Andrew C.R.Martin博士的网站www.bioinf.org.uk/abs/)。

[0343] 可能需要将人种系框架(即,VH和VL中的非CDR残基)位置改变为相应的亲本鼠序列以优化人源化抗体的结合。人源化抗体的形式的序列提供为SEQ ID NO:376-421。

[0344] 对于AB1,基于序列和构象,确定HC的CDR2的Asn52(顺序编号)和LC中CDR2的Asn54中的每一个具有低的脱酰胺潜力。

[0345] 对于AB3,基于序列和构象,确定HC的CDR1的Asn31(顺序编号)、HC的CDR2的Asn57、LC的CDR1的Asn28和LC的CDR2的Asn50中的每一个具有低的脱酰胺潜力。确定HC的CDR1的Trp33可能暴露于溶剂,并且具有氧化潜力,尤其是在应激条件下。在HC的CDR3中,确定在CDR中存在游离的Cys106,这在制造抗体时可能会出现问题,因为它很可能暴露于溶剂。建

议将该Cys残基改变为Tyr、Ser或Ala。测试了这些经改变的抗体结合的维持。LC的CDR2的Ile53被确定为暴露于溶剂,并且可导致非特异性结合。提议将该Ile残基改变为Ser。测试了这种经改变的抗体结合的维持。

[0346] 对于AB4,基于序列和构象,确定HC的CDR2的Asn52(顺序编号)和LC的CDR2的Asn58具有低的脱酰胺潜力。LC的CDR1中的DGNT序列被确定为有问题的,因为它被确定具有较高的异天冬氨酸形成潜力(在DG序列处)和脱酰胺潜力(在NT序列处)。建议对该序列进行改变。

[0347] 对于AB9,基于序列和构象,HC的CDR1中的Asn33(顺序编号)以及HC的CDR2中的Asn52和Asn59被确定具有低的脱酰胺潜力。基于序列和构象确定Asn54具有中等脱酰胺潜力。确定HC的CDR2中的NGG序列具有脱酰胺随后形成异天冬氨酸的高/中等潜力。因此,建议改变该氨基酸序列。当制造抗体时,HC的CDR3中的游离Cys106可能是有问题的,因为它被确定为可能暴露于溶剂。提议将该Cys残基改变为Tyr、Ser或Ala。测试了这些经改变的抗体结合的维持。HC的CDR1中的Arg28在人抗体中并不常见。将该残基改变为Thr并测试结合的维持。对于AB 9,LC的CDR1中的Trp32(顺序编号)被确定为可能暴露于溶剂,并且可能经历氧化,尤其是在应激条件下。相同CDR的Leu24在人抗体中并不常见。将该残基改变为Arg并测试结合的维持。

[0348] 对于AB11,确定HC的CDR2中的Asp54-Ser55(顺序编号)具有低的异天冬氨酸形成潜力。基于序列和构象,确定LC的CDR2中的Asn57具有低的脱酰胺潜力。

[0349] 对于AB18,基于序列和构象,确定HC的CDR1中的Asn33和CDR-H2 Asn50(顺序编号)具有低的脱酰胺潜力。在HC的CDR2中,确定Asp-Pro(DP)序列具有在酸性条件下经历断裂的可能性。在VL结构域中,基于序列和构象,确定LC的CDR1中的Asn34和Asn37具有低的脱酰胺潜力。在LC的CDR3中,确定Trp56可能暴露于溶剂,并且可能经历氧化,尤其是在应激条件下。

[0350] 表8示出了用于组合人源化VH和VL的方案。如果没有人源化形式与嵌合mAb等效。优选的对以粗体下划线文本示出。

[0351] 表8

[0352]

亲本	人源化 Ab #	VH (SEQ ID NO:)	VL (SEQ ID NO:)
AB1	AB1-1	376	380
	AB1-2	377	380
	AB1-3	377	**381**
	AB1-4	377	**382**
	AB1-5	377	**383**
	AB1-6	**378**	**381**
AB3	AB3-1	384	h21G5-L1(任选)
	AB3-2	**385**	**388**
	AB3-3	**385**	**389**
	AB3-4	**386**	**388**
	AB3-5	**386**	**389**
	AB3-6	387	388
	AB3-7	387	389
AB4	AB4-1	391	397
	AB4-2	392	397
	AB4-3	**392**	**398**
	AB4-4	**393**	**398**
	AB4-5	**394**	**398**
	AB4-6	395	**398**
	AB4-7	396	**398**
AB9	AB9-1	403	409
	AB9-2	404	409
	AB9-3	**405**	**410**
	AB9-4	**405**	**411**
	AB9-5	406	410

[0353]

	AB9-6	406	411
	AB9-7	407	410
	AB9-8	407	411
	AB9-9	408	410
	AB9-10	408	411
AB11	AB11-1	412	414
	AB11-2	**413**	**414**
	AB11-3	**413**	**415**
AB18	AB18-1	416	420
	AB18-2	417	420
	AB18-3	417	420
	AB18-4	417	421
	AB18-5	418	420
	AB18-6	418	421
	AB18-7	419	420

[0354] 表8中所述的人源化抗体的构建和表达基本上如实施例5所述。FACS测定基本上如实施例5所述进行,以确定人源化抗体的相对抗原结合强度。测试了两种剂量(1.5μg或0.3μg)的人源化抗体与由经工程改造的293T克隆表达的人CLDN6或鼠类CLDN6蛋白的结合。测定

的结果提供于表9中。

[0355] 表9

[0356]

人源化 Ab 命名	人 CLDN6 (1.5μg Ab)	人 CLDN6 (0.3μg Ab)	小鼠 CLDN6
仅第二 Ab	768.07	768.07	1061.72
64A-chim	224297.77	124463.44	170906.13
h64A	233932.53	93415.06	188577.77
SC27-108-chim	320381.33	150854.98	284326.77
AB1-Chim	364416.49	311923.02	513665.18
AB1-3	142182.2	141773.57	89292.21
AB1-4	197142.08	101763.71	75860.6
AB1-5	213233.57	137828.05	128498.45
AB1-6	227152.34	119699.97	77561.34
AB1-7	207009.91	79207.94	99740.72
AB1-8	209971.67	98785.97	121717.49
AB1-11	112923.25	64892.04	101386.62
AB3-chim	459373.03	267327.83	67927.47
AB3-2	395813.97	309318.89	31741.02
AB3-3	339510.79	250519.45	23038.44
AB3-4	55845.14	11641.7	1521.79
AB3-5	48550.83	13335.93	783.28
AB3-7	169209.42	105881.93	56071.82
AB3-8	151519.51	108419.64	21509.63
AB4-chim	326603.58	176289.63	3639.29
AB4-3	47760.08	14309.78	671.08
AB4-4	48975.26	14081.47	741.03
AB4-5	43385.34	16765.44	2003.95
AB4-6	29243.78	10841.68	14205.6
AB4-7	33342.17	19215.28	6635.91
AB4-8	77642.77	49310.15	4703.98
AB4-9	56854.11	37231.13	1778.41
AB4-10	77159.9	50809.2	2647.29
AB4-11	61204.92	37798.69	1227.86
AB4-12	86189.87	71121.12	1133.16
AB18-chim	135142.76	73775.39	57373.94
AB18-3	58948.59	30357.27	2512.77
AB18-4	54378.24	32424.7	4294.94
AB18-5	51871.17	29448.66	8191.13
AB18-6	58464.54	26883.47	3680.42
AB9-chim	72036.29	46694.71	6745.58
AB9-3	24649.43	9504.6	3175.17
AB9-4	34309.83	15331.51	1709.25
AB11-chim	3491.4	1671.35	5490.52
AB11-2	2557.3	1289.17	7160.15
AB11-3	2364.44	1009.7	5521.52

[0357]

[0358] 还进行了FACS测定以确定人源化抗体(1.5μg或0.3μg下)用于与由如所示癌细胞系表达的CLDN6结合的相对抗原结合强度。测定的结果提供于表10中。仅第二Ab被用作阴性对照。64A-chim、h64A和SC27-108-chim用作参考抗体。对应的亲本抗体(人源化之前的抗体)用作对照并用“chim”命名。

[0359] 表10

[0360]

人源化 Ab 命名	OVCA429 1.5μg	ARK2 1.5μg	ARK2 0.3μg	M202 1.5μg	M202 0.3μg
仅第二 Ab	885.77	1351.21	1351.21	638.83	638.83
64A-chim	140378.55	80449.93	66518.52	1456.2	628.72
h64A	161168.87	69118.48	90346.66	3093.69	2467.63
SC27-108-chim	54987.78	25522.86	62410.85	2293.1	742.74
AB1-Chim	176836.16	51913.52	58762.01	23377.33	9426.64
AB1-3	27535.69	10776.6	2829.25	1225.78	694.08
AB1-4	34551.99	10039.46	3641.11	970.7	697.98
AB1-5	54331.07	22353.67	7494.86	869.06	684.3
AB1-6	29949.91	7743.19	2816.15	880.4	1423.53

[0361]

AB1-7	44711.89	11224.28	4443.54	876.24	611.15
AB1-8	65974.83	17642.9	5805.35	583.54	1886.84
AB1-11	未测试	97659.62	53926.71	5079.26	978.76
AB3-chim	138190.1	29114.68	17055.33	1120.39	843.5
AB3-2	85941.69	33618.84	14656.49	1483.17	727.98
AB3-3	88679.61	54901.39	1156.25	801.56	749.95
AB3-4	2955.8	1459.46	1315.36	839.75	563.41
AB3-5	2951.18	2909.74	1275.51	713.46	611.66
AB3-7	未测试	90420.04	35995.73	7841	1742.34
AB3-8	未测试	23259.52	11856.48	1903.05	952.71
AB4-chim	64796.15	38447.83	19142.38	1343.31	1007.71
AB4-3	1155.95	1522.98	1192.96	708.25	984.95
AB4-4	1203.16	1398.82	1048.05	899.25	618.43
AB4-5	1351.27	1198.66	966.62	1203.98	653.41
AB4-6	未测试	9842.52	3303.34	2520.88	1281.68
AB4-7	未测试	7563.59	2765.93	3322.65	1444.19
AB4-8	未测试	7313.46	3118.74	1495.74	974.83
AB4-9	未测试	7787.35	3058.96	1179.5	825.33
AB4-10	未测试	20227.28	7212.1	1392.45	546.63
AB4-11	未测试	9167.61	6392.04	895.77	549.19
AB4-12	未测试	24221.65	9690.02	2015.4	1506.93
AB18-chim	25521.37	9149.19	3442.7	1048.6	895.4
AB18-3	2703.41	1210.4	1079.32	684.33	592.8
AB18-4	3220.08	1379.11	1134.22	1231.31	762.51
AB18-5	4273.83	1330.44	1313.83	1001.99	594.43
AB18-6	6753.92	1936.48	1393.53	914.2	865.43
AB9-chim	3569.69	4487.55	3508.75	1331.44	680.03
AB9-3	1257.3	1471.97	1139.54	1659.76	1111.31
AB9-4	1110.93	1553.6	1116.78	1149.55	625.38
AB11-chim	2440.63	1260.97	1315.28	973.48	610.05
AB11-2	2694.81	1937.51	1400.43	1766.07	872.68
AB11-3	2201.32	1541.47	1320.38	1134.3	940.92

[0362] “chim”是抗体的前人源化形式。

[0363] 基于体外抗原结合数据,选择了三种人源化抗体用于进一步的测试和开发。抗体源自AB1、AB3和AB4。

[0364] 基本上如实施例6所述,在注射了膀胱癌细胞系UMUC4的异种移植小鼠中进行AB1、AB3和AB4的人源化形式的体内结合研究。简而言之,在六周龄的CD-1无胸腺裸鼠(Charles River Laboratories)中建立UMUC4的异种移植模型。在肿瘤达到150至300mm^3的平均大小后,将小鼠随机分到处理组中。将人源化抗体在无菌盐水中稀释至1mg/ml的工作浓度,用于静脉内尾静脉(IV)注射。每周用测径器测量肿瘤异种移植物三次,并且通过乘以高度×宽度×长度来确定以mm^3为单位的肿瘤体积。将小鼠处理2-7周。在研究结束时,使动物安乐死,切除肿瘤组织并将其分开以作为速冻或福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织储存,以用于生物标记分析。

[0365] 异种移植测定的结果示于图15至图21中。图15示出了两种形式的人源化AB3(AB3-2和AB3-4)的异种移植测定结果,其中处理涉及以Q4D施用10mg/kg。对照包括媒介物对照(PBS)、人IgG(10mg/kg Q4D)和鼠形式的AB3(10mg/kg Q4D)。如该图所示,人源化AB3-4在35天的处理期内表现出肿瘤体积的减小。图16示出了与图15所示实验相同处理的异种移植测定结果,不同之处在于进行了另外两个对照(64A MSE及其嵌合形式(64A-CHIM))。如图15一样,图16示出了用人源化AB3-4处理后肿瘤体积的显著减小。

[0366] 图17示出了人源化AB1-5的异种移植测定结果。对照包括媒介物对照(PBS)、人IgG(10mg/kg Q4D)和鼠形式的AB1(10mg/kg Q4D)。如图17所示,用人源化AB1-5处理的小鼠表现出肿瘤体积的显著减小。

[0367] 图18示出了人源化AB4-3的异种移植测定结果。对照包括媒介物对照(PBS)、人IgG(10mg/kg Q4D)和鼠形式的AB4(10mg/kg Q4D)。用人源化AB4-3处理的小鼠没有表现出肿瘤体积的显著减小。

[0368] 图19至图21表明了异种移植测定的结果,其中测试了图15至图18的所有4种人源化抗体。小鼠和嵌合形式的参考CLDN6抗体用作对照。如图19所示,用人源化AB3-4和AB1-5处理的小鼠表现出肿瘤体积的减小。图20表明了在55天的时间过程中的肿瘤体积。测定中小鼠的体重如图21所示。

[0369] 实施例10

[0370] 用不同的AB1、AB3和AB4序列进行计算机分析。特别地,对于每种抗体,比对(a)原始亲本克隆、(b)最接近的小鼠种系序列、(c)最接近的人种系序列和(d)人源化序列的序列。用星号标记被认为已经历亲和力成熟的氨基酸,而用#号标记根据抗体数据库信息与该位置处的氨基酸不同的氨基酸。每个序列的CDR用方框标出。基于该分析,将制备具有表10中所列的序列的几种人源化抗体。

[0371] 表10

[0372]

亲本克隆	共有序列HC	共有序列LC
AB1	422	423
AB3	424	425
AB4	426	427

[0373] 基本上如实施例5所述制备具有由这些共有序列限定的序列的多重抗体,并经由FACS体外测试抗原结合(基本上如实施例5所述)和体内测试减小小鼠中肿瘤体积的能力(基本上如实施例6所述)。

[0374] 本文所引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利,均以引用方式在此并入,其程度如同每篇参考文献单独且具体地指示为以引用方式并入本文并在此全文阐述一样。

[0375] 在描述本公开的上下文中(特别是在下面的权利要求书的上下文中)所使用的术语“一个”、“一个”和“所述”以及类似的指示物应理解为覆盖单数形式和复数形式两者,除非本文另外指明或明显与上下文矛盾。除非另有说明,否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应被理解为开放式术语(即,意味着“包括,但不限于”)。

[0376] 除非本文另有说明,否则本文中对数值范围的叙述仅旨在用作分别指代落在该范围内的每个单独值和每个端点的简写方法,并且每个单独值和端点都被并入说明书中,如

同其在本文中被单独列举一样。

[0377] 除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,否则本文所述的所有方法可以任何合适的顺序进行。除非另外要求,否则本文提供的任何和所有实例或各种语言(例如“诸如”)的使用仅旨在更好地阐明本公开,并且不对本公开的范围构成限制。说明书中的任何语言都不应被解释为指示任何未要求保护的要素对于本公开的实践是必要的。

[0378] 本文描述了本公开的优选实施方案,包括发明人已知的用于执行本公开的最佳模式。在阅读前述描述后,那些优选实施方案的变型对于本领域普通技术人员而言将变得显而易见。发明人期望技术人员适当地采用这些变型,并且发明人希望本公开以不同于本文具体描述的方式实施。因此,本公开包括适用法律所允许的所附权利要求中叙述的主题的所有修改和等同物。此外,除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,否则本公开涵盖上述元素以其所有可能变化形式的任何组合。

[0379] 序列:

[0380] 以下序列是要求本申请优先权的母案PCT申请PCT/US2018/051610提交的序列表的txt副本的一部分。这些序列的长度小于4个氨基酸或10个碱基对,不符合ST.26第7条关于长度的要求。因此,从序列表的XML副本中省略了这些序列,并将这些序列撰写到说明书中。

[0381] SEQ ID NO:9Ser Thr Ser

[0382] SEQ ID NO:15Asn Ala Lys

[0383] SEQ ID NO:21Asn Ala Lys

[0384] SEQ ID NO:27Lys Val Ser

[0385] SEQ ID NO:33Lys Val Ser

[0386] SEQ ID NO:39Trp Ala Ser

[0387] SEQ ID NO:45Ser Thr Ser

[0388] SEQ ID NO:51Lys Val Ser

[0389] SEQ ID NO:57Ala Ala Ala

[0390] SEQ ID NO:63Lys Val Ser

[0391] SEQ ID NO:69 Leu Ala Ser

[0392] SEQ ID NO:75 Ser Thr Ser

[0393] SEQ ID NO:81 Arg Thr Ser

[0394] SEQ ID NO:87 Ala Ala Ser

[0395] SEQ ID NO:93 Trp Ala Ser

[0396] SEQ ID NO:99 Ala Ala Ser

[0397] SEQ ID NO:105 Ser Thr Ser

[0398] SEQ ID NO:111 Trp Ala Ser

[0399] SEQ ID NO:117 Trp Ala Ser

[0400] SEQ ID NO:123 Lys Val Ser

[0401] SEQ ID NO:129 Ser Thr Ser

[0402] SEQ ID NO:209 agcacatcc

[0403] SEQ ID NO:215 aatgcaaaa

[0404] SEQ ID NO:221 aatgcaaaa

[0405] SEQ ID NO:227 aaagtttcc

[0406] SEQ ID NO:233 aaagtttcc

[0407] SEQ ID NO:239 tgggcatcc

[0408] SEQ ID NO:245 agcacatcc

[0409] SEQ ID NO:251 aaagtttcc

[0410] SEQ ID NO:257 gctgcagcc

[0411] SEQ ID NO:263 aaagtttcc

[0412] SEQ ID NO:269 cttgcatcc

[0413] SEQ ID NO:275 tccacatcc

[0414] SEQ ID NO:281 aggacatcc

[0415] SEQ ID NO:287 gctgcatcc

[0416] SEQ ID NO:293 tgggcatcc

[0417] SEQ ID NO:299 gctgcatcc

[0418] SEQ ID NO:305 agcacatcc

[0419] SEQ ID NO:311 tgggcatcc

[0420] SEQ ID NO:317 tgggcatcc

[0421] SEQ ID NO:323aaagtttcc

[0422] SEQ ID NO:329tccacatcc

[0423] SEQ ID NO:450Xaa Thr Xaa;其中,在第1位的Xaa为S、T、Q或A,以及在第3位的Xaa为S、T、D或Q。

[0424] SEQ ID NO:459Xaa Val Xaa;其中,在第1位的Xaa为K、Q或R,以及在第3位的Xaa为S、T或V。

[0425] SEQ ID NO:471Xaa Ala Ser;其中,在第1位的Xaa为H、Y、F或W。SEQ ID NO:477Xaa Ala Lys;其中在第1位的Xaa为Q、S、A、D或N。

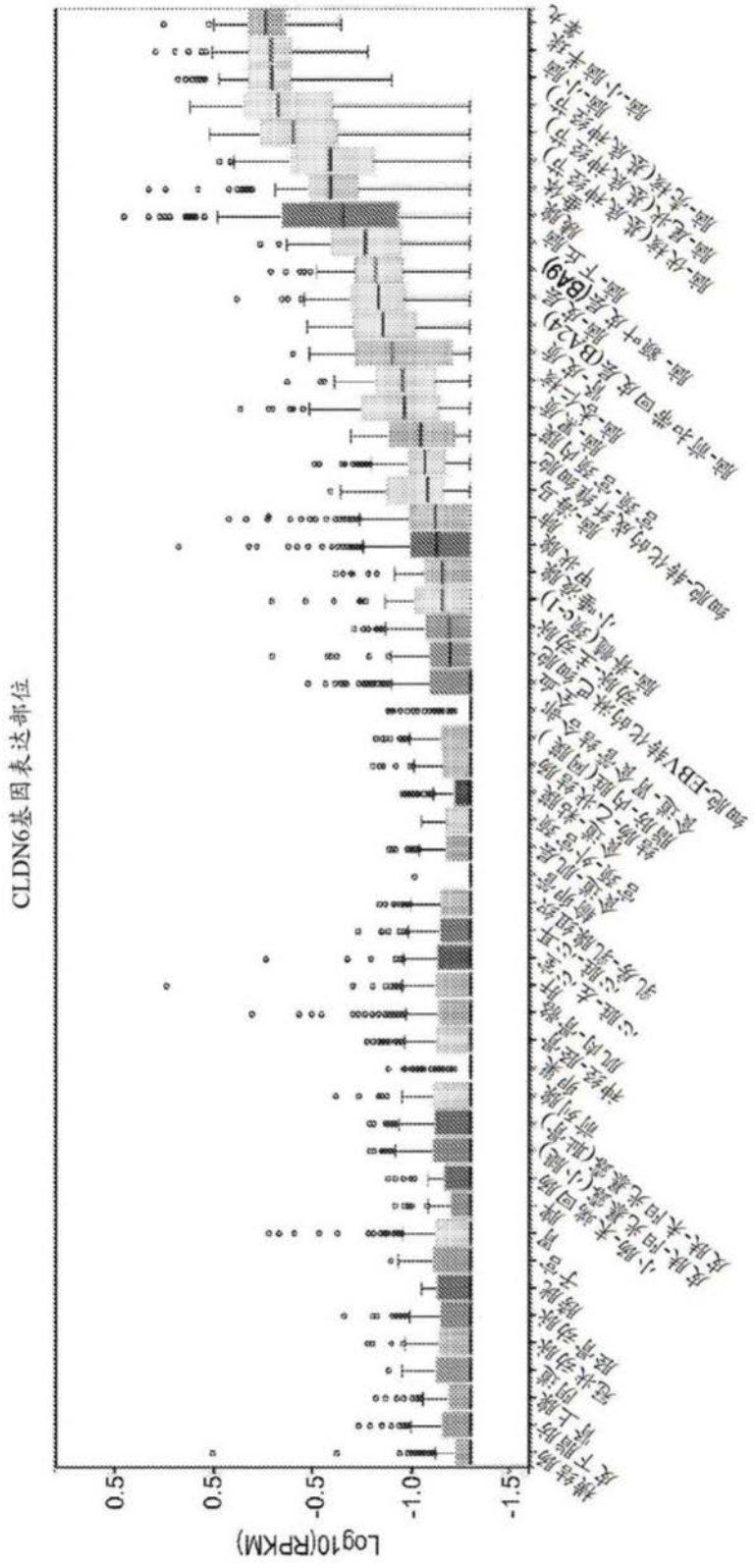


图1

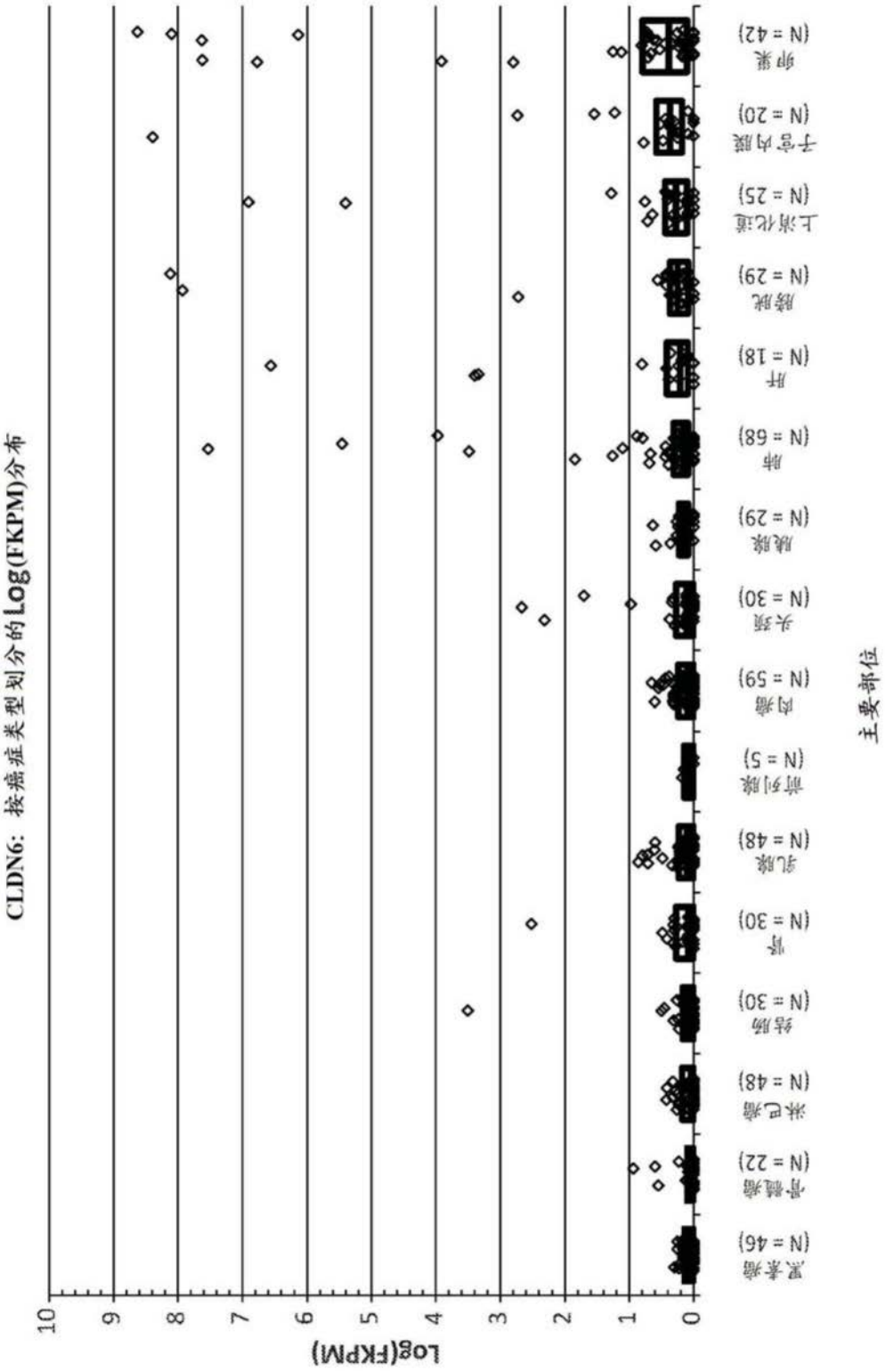

CLDN6：按癌症类型划分的Log(FKPM)分布
Log(FKPM)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
黑素瘤 (N = 46)
骨肉瘤 (N = 22)
淋巴瘤 (N = 48)
结肠 (N = 30)
肾 (N = 30)
乳腺 (N = 48)
前列腺 (N = 5)
肉瘤 (N = 59)
头颈 (N = 30)
胰腺 (N = 29)
肺 (N = 68)
肝 (N = 18)
膀胱 (N = 29)
上消化道 (N = 25)
子宫内膜 (N = 20)
卵巢 (N = 42)
主要部位

图2

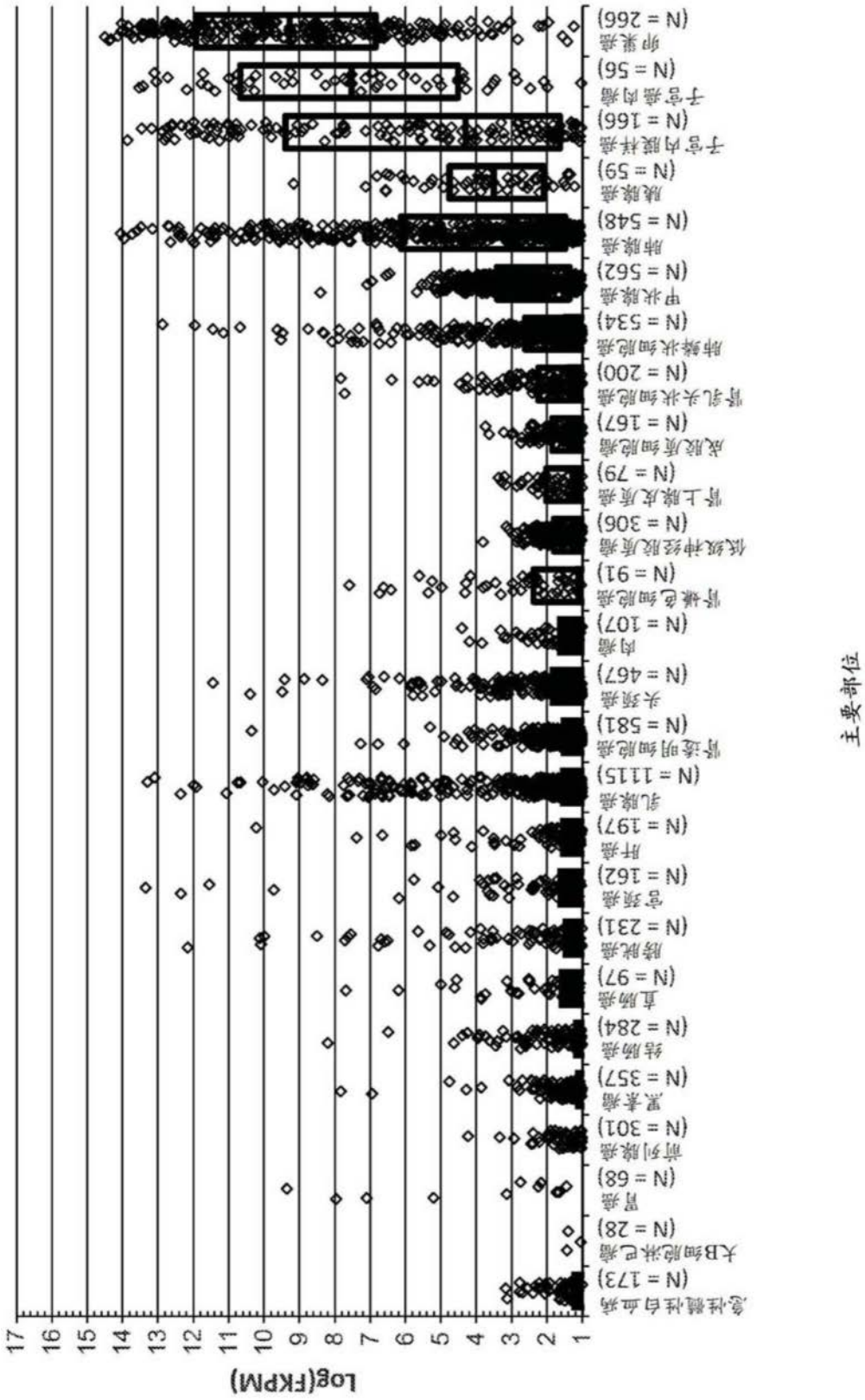

log(FKPM)
主要部位
急性髓性白血病 (N = 173)
大B细胞淋巴瘤 (N = 28)
胃癌 (N = 68)
前列腺癌 (N = 301)
黑素瘤 (N = 357)
结肠癌 (N = 284)
直肠癌 (N = 97)
膀胱癌 (N = 231)
食管癌 (N = 162)
肝癌 (N = 197)
乳腺癌 (N = 1115)
肾透明细胞癌 (N = 581)
头颈癌 (N = 467)
肉瘤 (N = 107)
肾嫌色细胞癌 (N = 91)
低级神经胶质瘤 (N = 306)
肾上腺皮质癌 (N = 79)
成胶质细胞瘤 (N = 167)
肾乳头状细胞癌 (N = 200)
肺腺状细胞癌 (N = 534)
甲状腺癌 (N = 562)
肺腺癌 (N = 548)
胰腺癌 (N = 59)
子宫内膜样癌 (N = 166)
子宫癌肉瘤 (N = 56)
卵巢癌 (N = 266)

图3

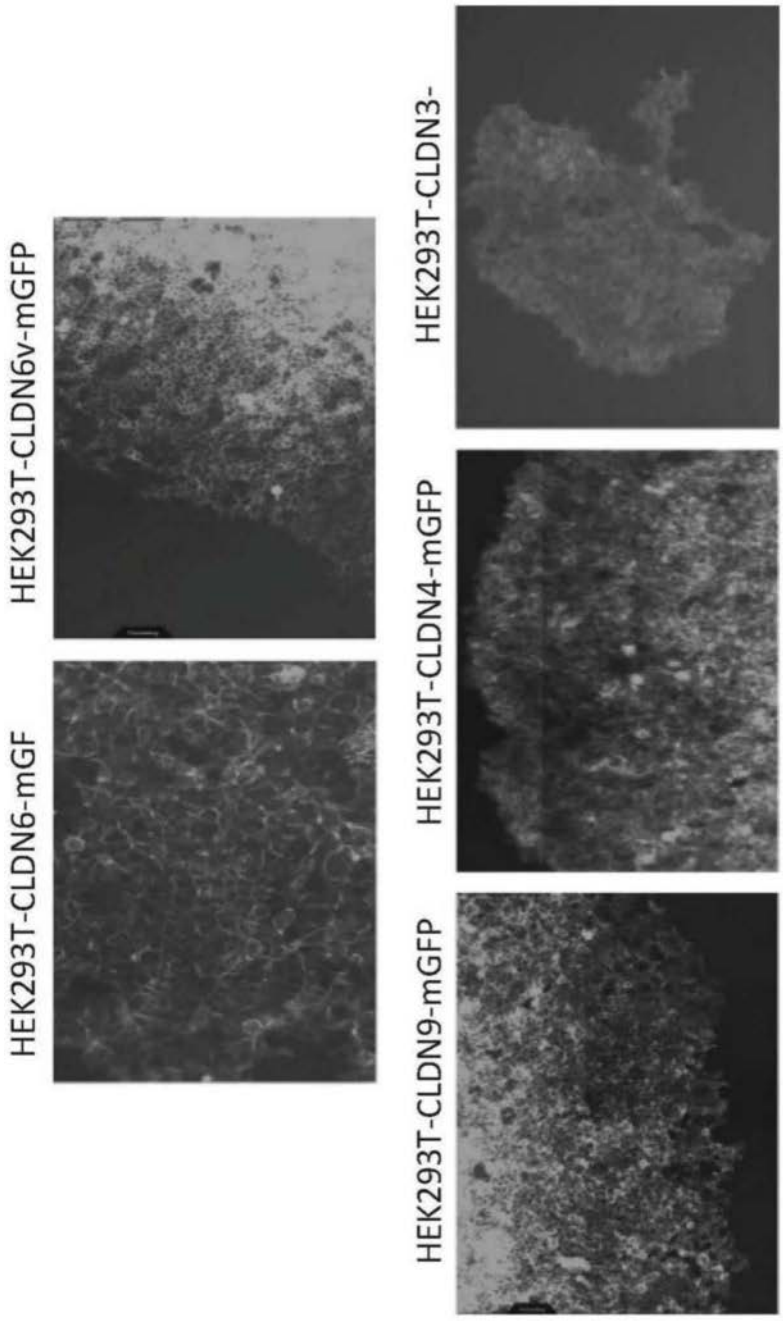

HEK293T-CLDN6v-mGFP
HEK293T-CLDN6-mGF
HEK293T-CLDN3-
HEK293T-CLDN4-mGFP
HEK293T-CLDN9-mGFP

图4

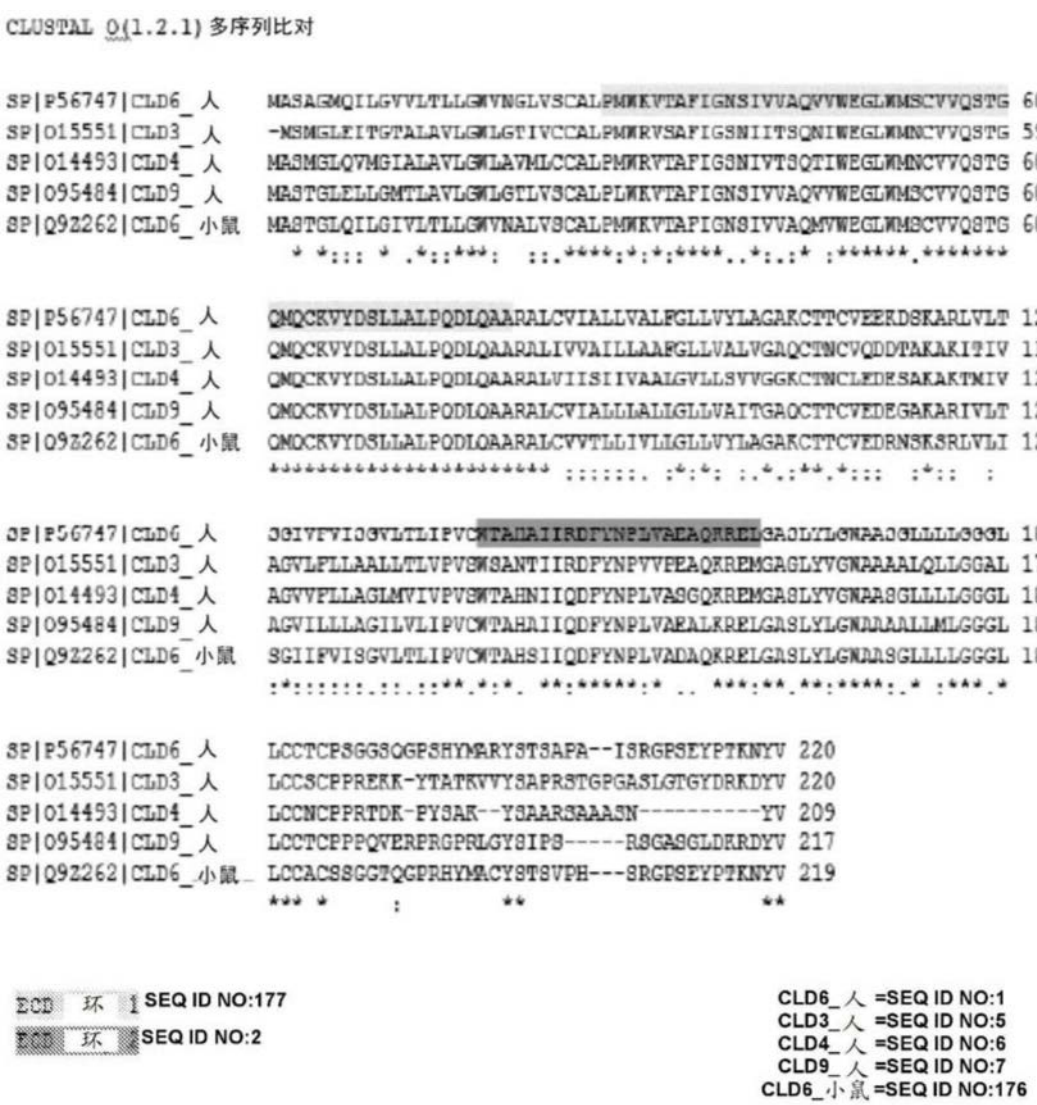

CLUSTAL O(1.2.1) 多序列比对
SP|P56747|CLD6_人
SP|O15551|CLD3_人
SP|O14493|CLD4_人
SP|O95484|CLD9_人
SP|Q92262|CLD6_小鼠
ECD 环 1 SEQ ID NO:177
ECD 环 2 SEQ ID NO:2
CLD6_人 =SEQ ID NO:1
CLD3_人 =SEQ ID NO:5
CLD4_人 =SEQ ID NO:6
CLD9_人 =SEQ ID NO:7
CLD6_小鼠 =SEQ ID NO:176

图5

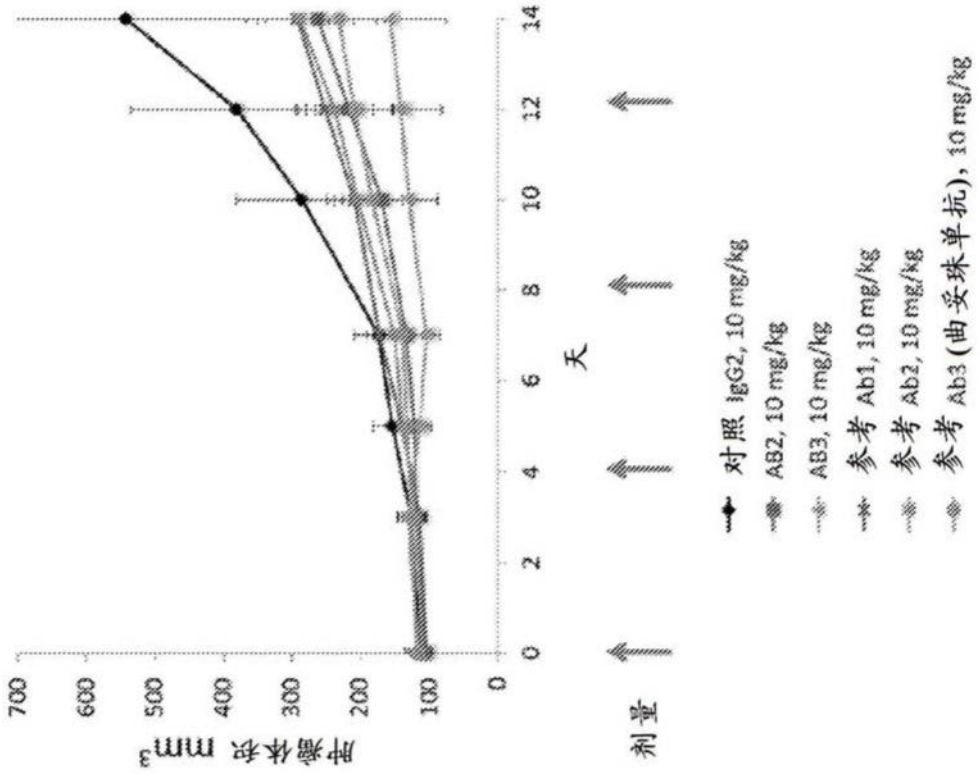

肿瘤体积 mm3
700
600
500
400
300
200
100
0
0
2
4
6
8
10
12
14
天
剂量
对照 IgG2, 10 mg/kg
AB2, 10 mg/kg
AB3, 10 mg/kg
参考 Ab1, 10 mg/kg
参考 Ab2, 10 mg/kg
参考 Ab3 (曲妥珠单抗), 10 mg/kg

图6A

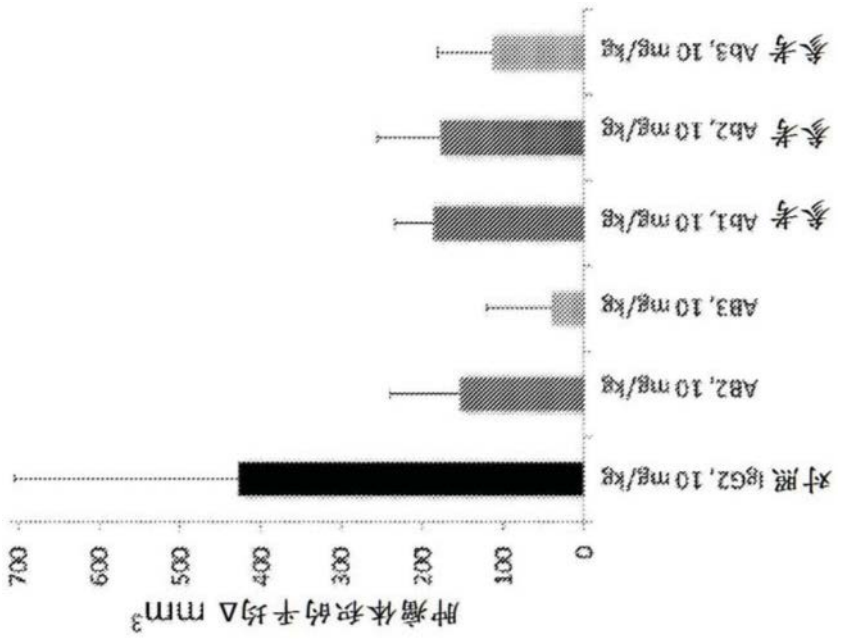

肿瘤体积的平均Δ mm3
700
600
500
400
300
200
100
0
对照 IgG2, 10 mg/kg
AB2, 10 mg/kg
AB3, 10 mg/kg
参考 Ab1, 10 mg/kg
参考 Ab2, 10 mg/kg
参考 Ab3, 10 mg/kg

图6B

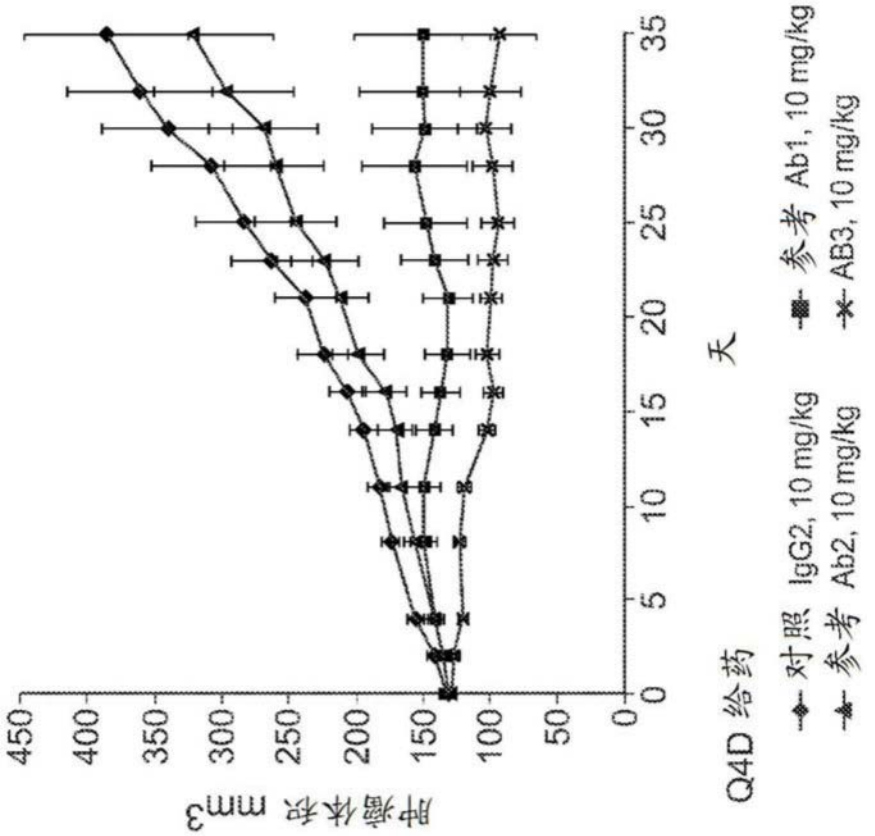

肿瘤体积 mm3
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Q4D 给药
天
对照 IgG2, 10 mg/kg
参考 Ab1, 10 mg/kg
参考 Ab2, 10 mg/kg
AB3, 10 mg/kg

图7A

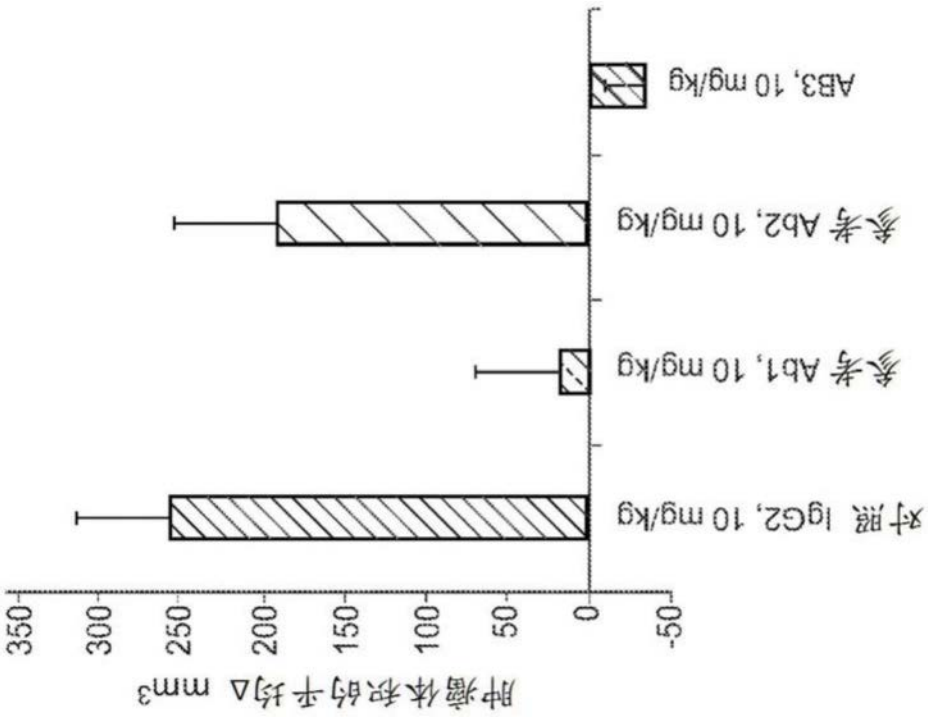

肿瘤体积的平均Δ mm3
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
对照 IgG2, 10 mg/kg
参考 Ab1, 10 mg/kg
参考 Ab2, 10 mg/kg
AB3, 10 mg/kg

图7B

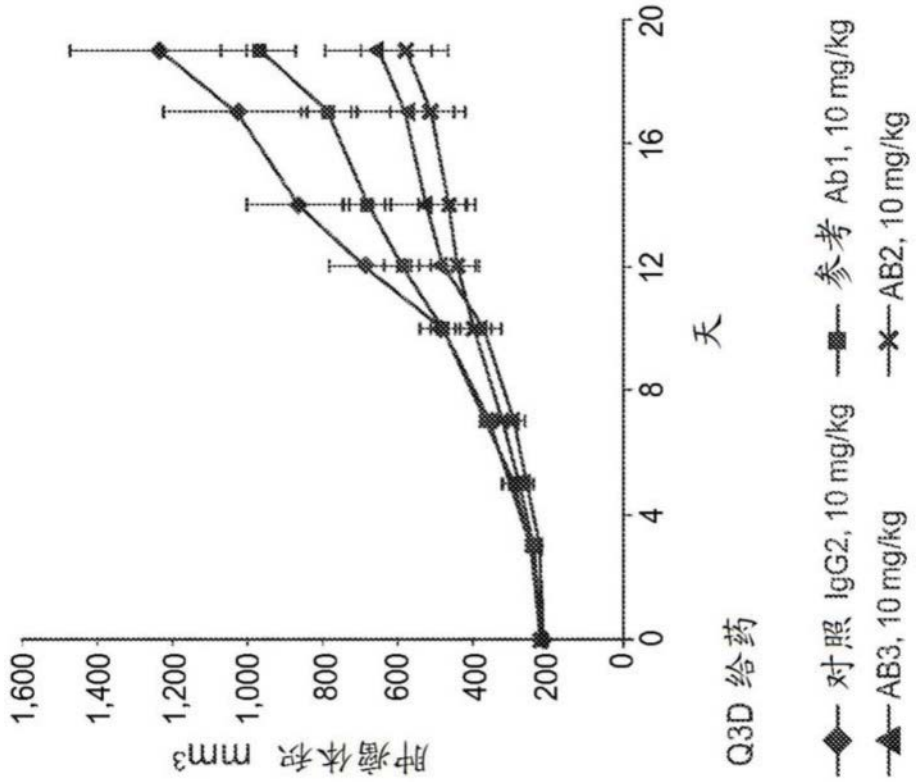

肿瘤体积 mm3
1,600
1,400
1,200
1,000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
天
Q3D 给药
对照 IgG2, 10 mg/kg
参考 Ab1, 10 mg/kg
AB3, 10 mg/kg
AB2, 10 mg/kg

图8A

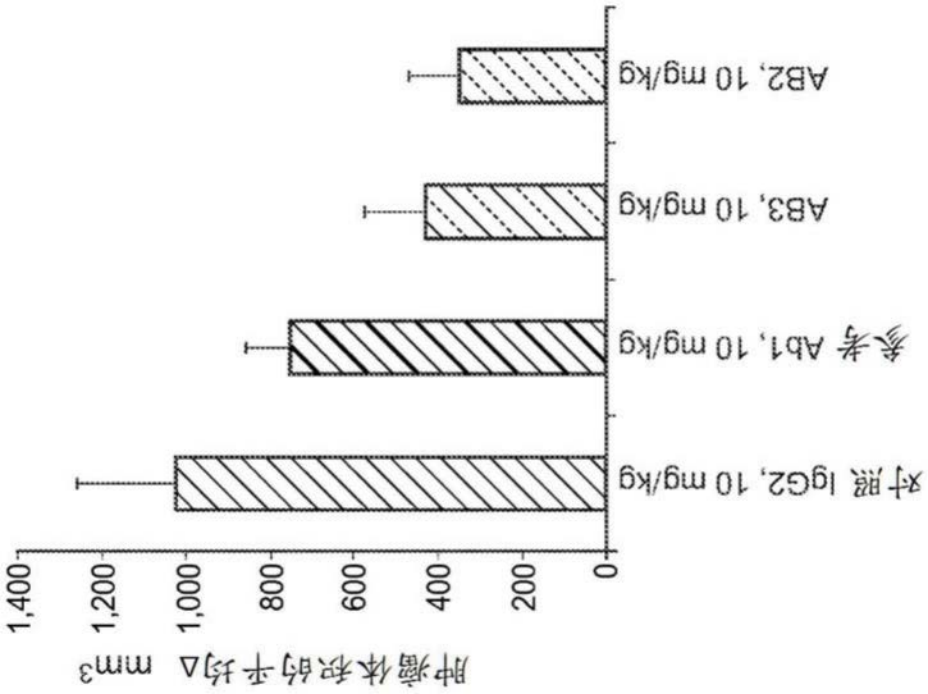

肿瘤体积的平均Δ mm3
1,400
1,200
1,000
800
600
400
200
0
对照 IgG2, 10 mg/kg
参考 Ab1, 10 mg/kg
AB3, 10 mg/kg
AB2, 10 mg/kg

图8B

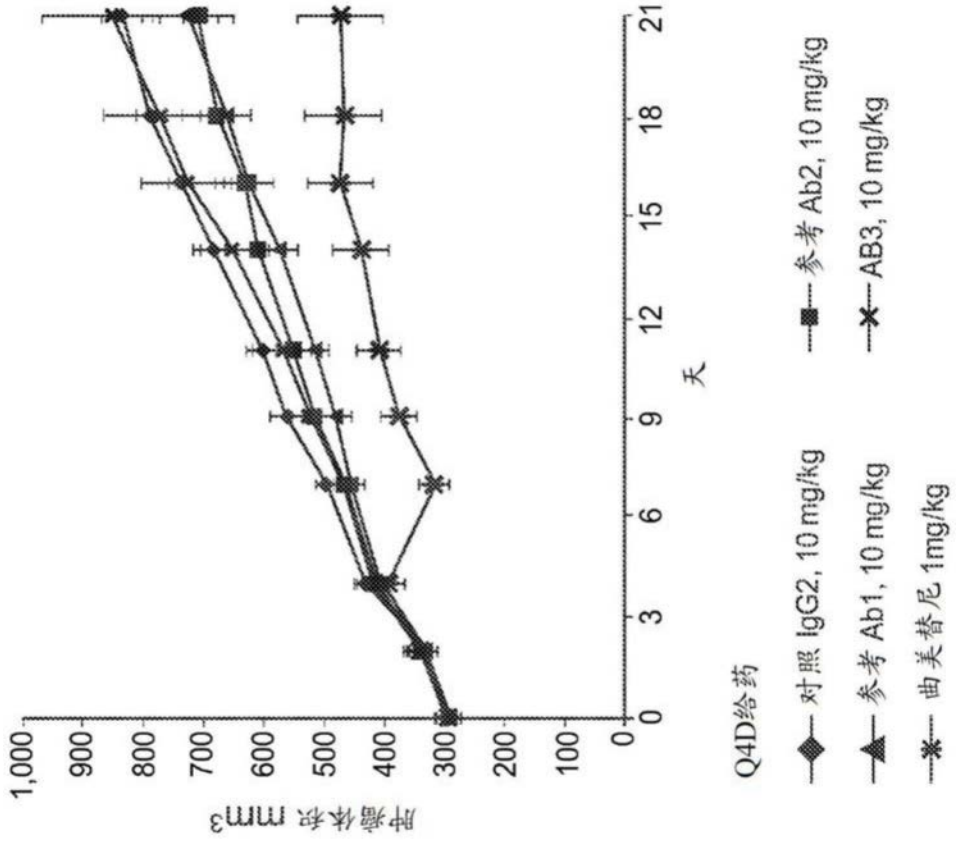

肿瘤体积 mm3
1,000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
3
6
9
12
15
18
21
天
Q4D给药
对照 IgG2, 10 mg/kg
参考 Ab1, 10 mg/kg
曲美替尼 1mg/kg
参考 Ab2, 10 mg/kg
AB3, 10 mg/kg

图9A

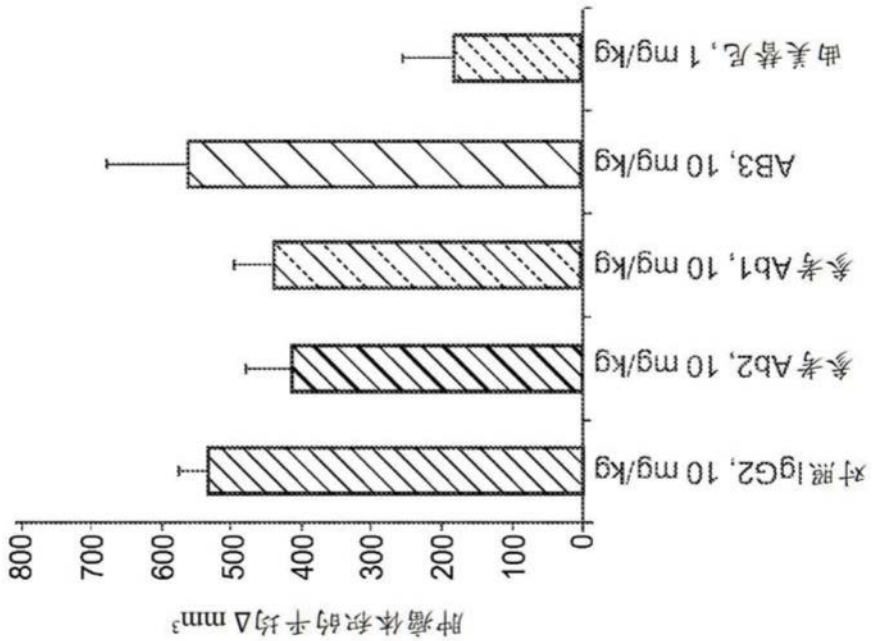

肿瘤体积的平均Δ mm3
800
700
600
500
400
300
200
100
0
对照IgG2, 10 mg/kg
参考Ab2, 10 mg/kg
参考Ab1, 10 mg/kg
AB3, 10 mg/kg
曲美替尼, 1 mg/kg

图9B

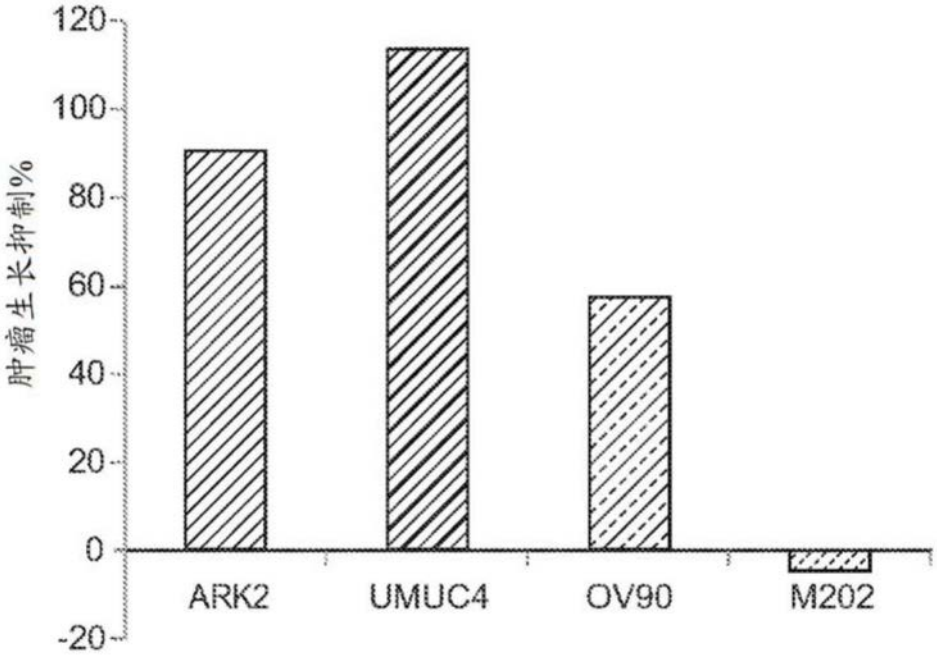

120
100
80
60
40
20
0
-20
肿瘤生长抑制%
ARK2
UMUC4
OV90
M202

图10A

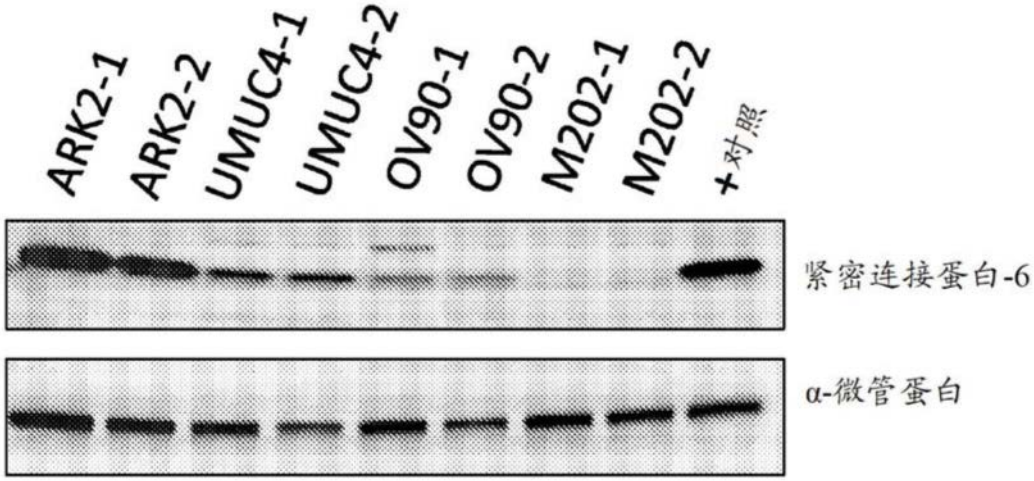

ARK2-1
ARK2-2
UMUC4-1
UMUC4-2
OV90-1
OV90-2
M202-1
M202-2
+对照
紧密连接蛋白-6
α-微管蛋白

图10B

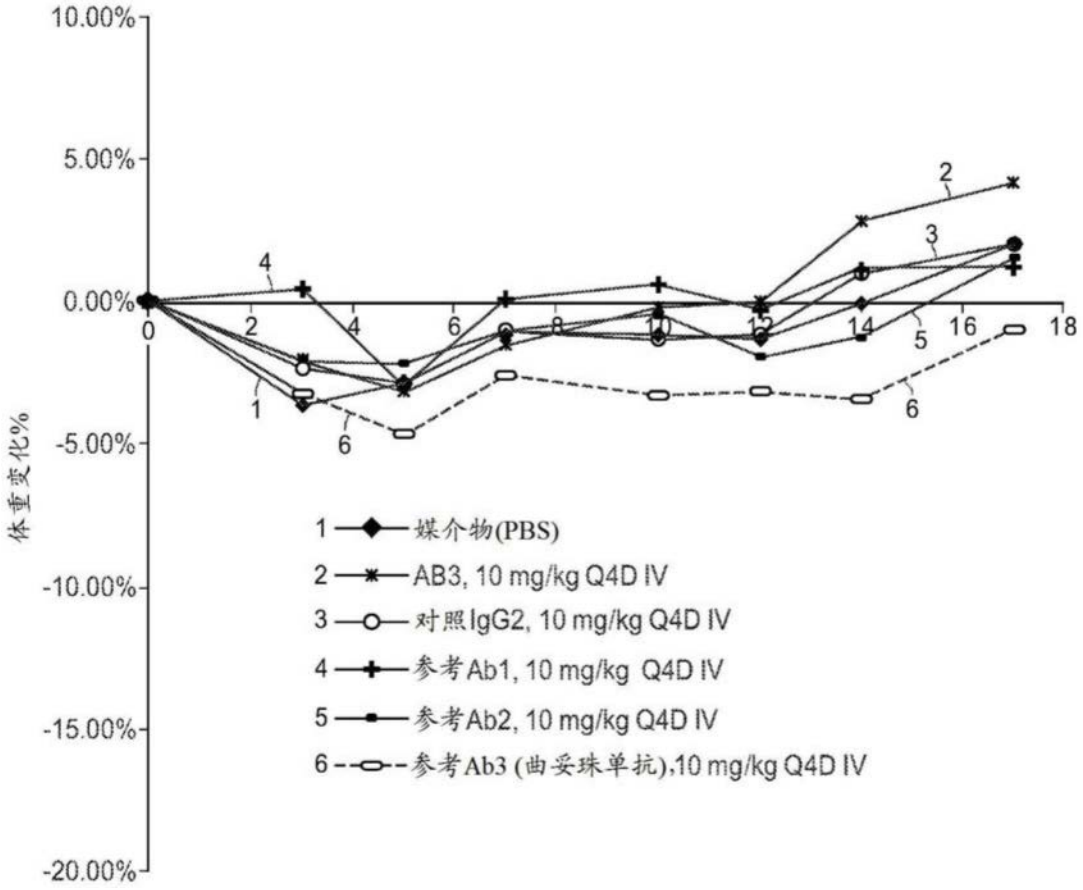

10.00%
5.00%
0.00%
-5.00%
-10.00%
-15.00%
-20.00%
体重变化%
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
1 媒介物(PBS)
2 AB3, 10 mg/kg Q4D IV
3 对照IgG2, 10 mg/kg Q4D IV
4 参考Ab1, 10 mg/kg Q4D IV
5 参考Ab2, 10 mg/kg Q4D IV
6 参考Ab3 (曲妥珠单抗),10 mg/kg Q4D IV

图11

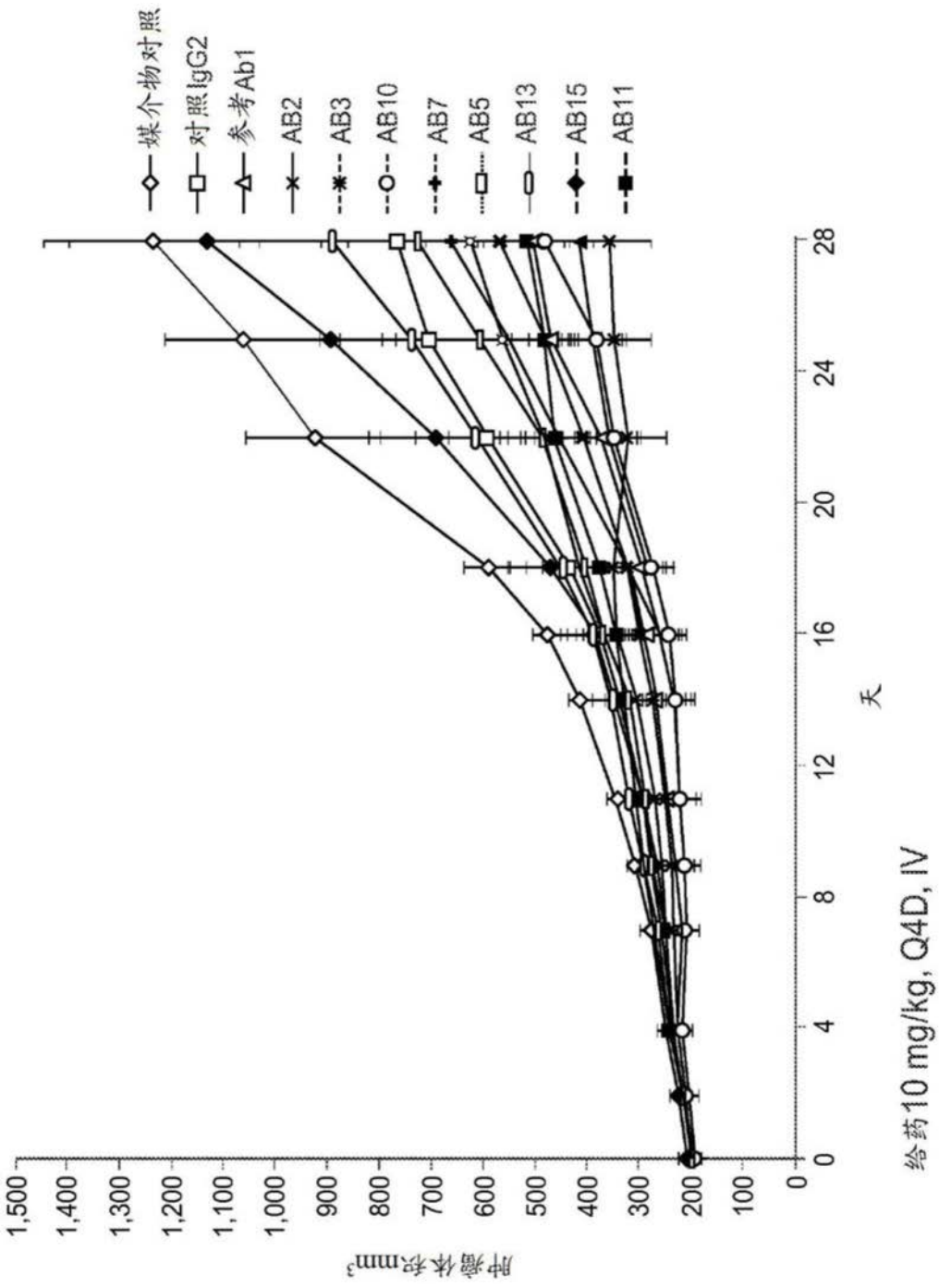

媒介物对照
对照IgG2
参考Ab1
AB2
AB3
AB10
AB7
AB5
AB13
AB15
AB11
肿瘤体积mm3
1,500
1,400
1,300
1,200
1,100
1,000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
4
8
12
16
20
24
28
天
给药10 mg/kg, Q4D, IV

图12A

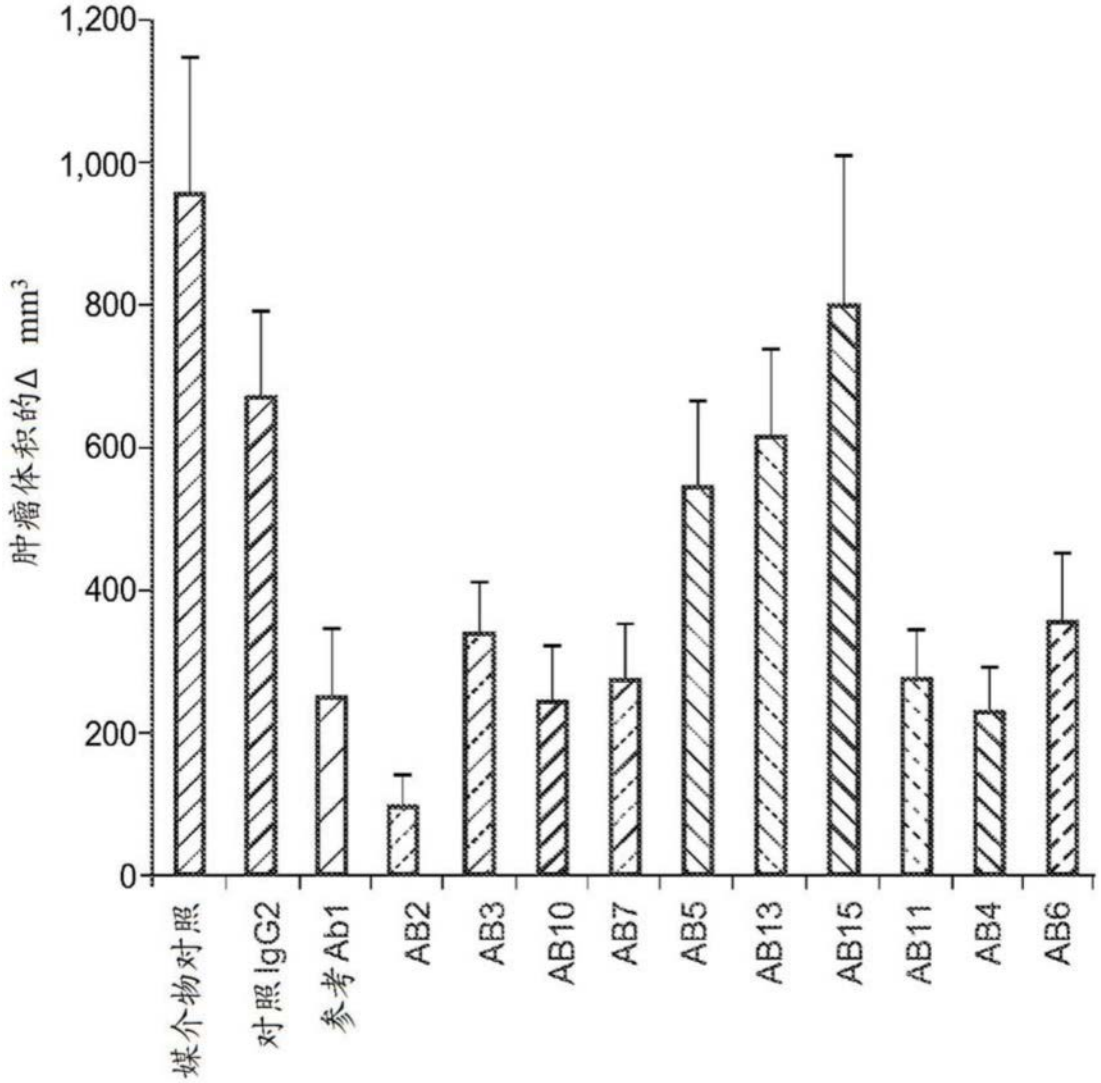

1,200
1,000
800
600
400
200
0
肿瘤体积的Δ mm³
媒介物对照
对照IgG2
参考Ab1
AB2
AB3
AB10
AB7
AB5
AB13
AB15
AB11
AB4
AB6

图12B

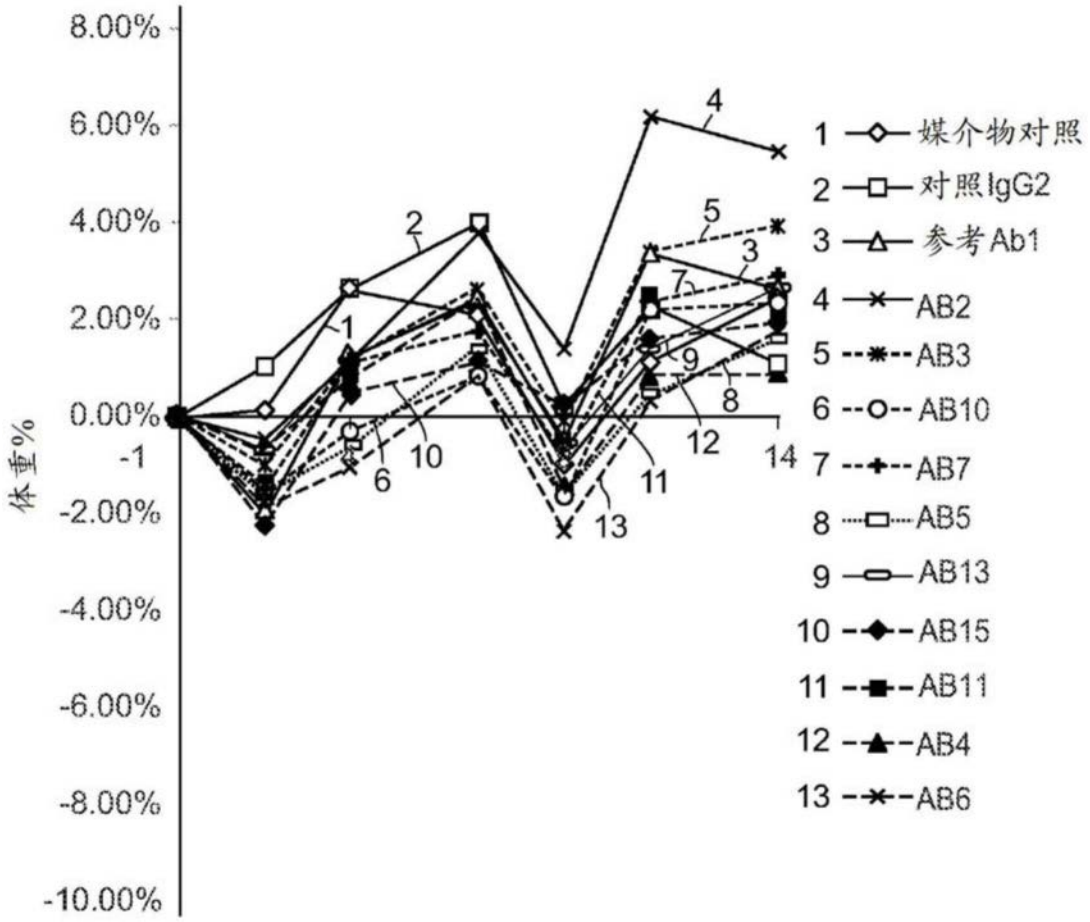

8.00%
6.00%
4.00%
2.00%
0.00%
-1
-2.00%
-4.00%
-6.00%
-8.00%
-10.00%
体重%
1 媒介物对照
2 对照IgG2
3 参考Ab1
4 AB2
5 AB3
6 AB10
7 AB7
8 AB5
9 AB13
10 AB15
11 AB11
12 AB4
13 AB6
14

图13

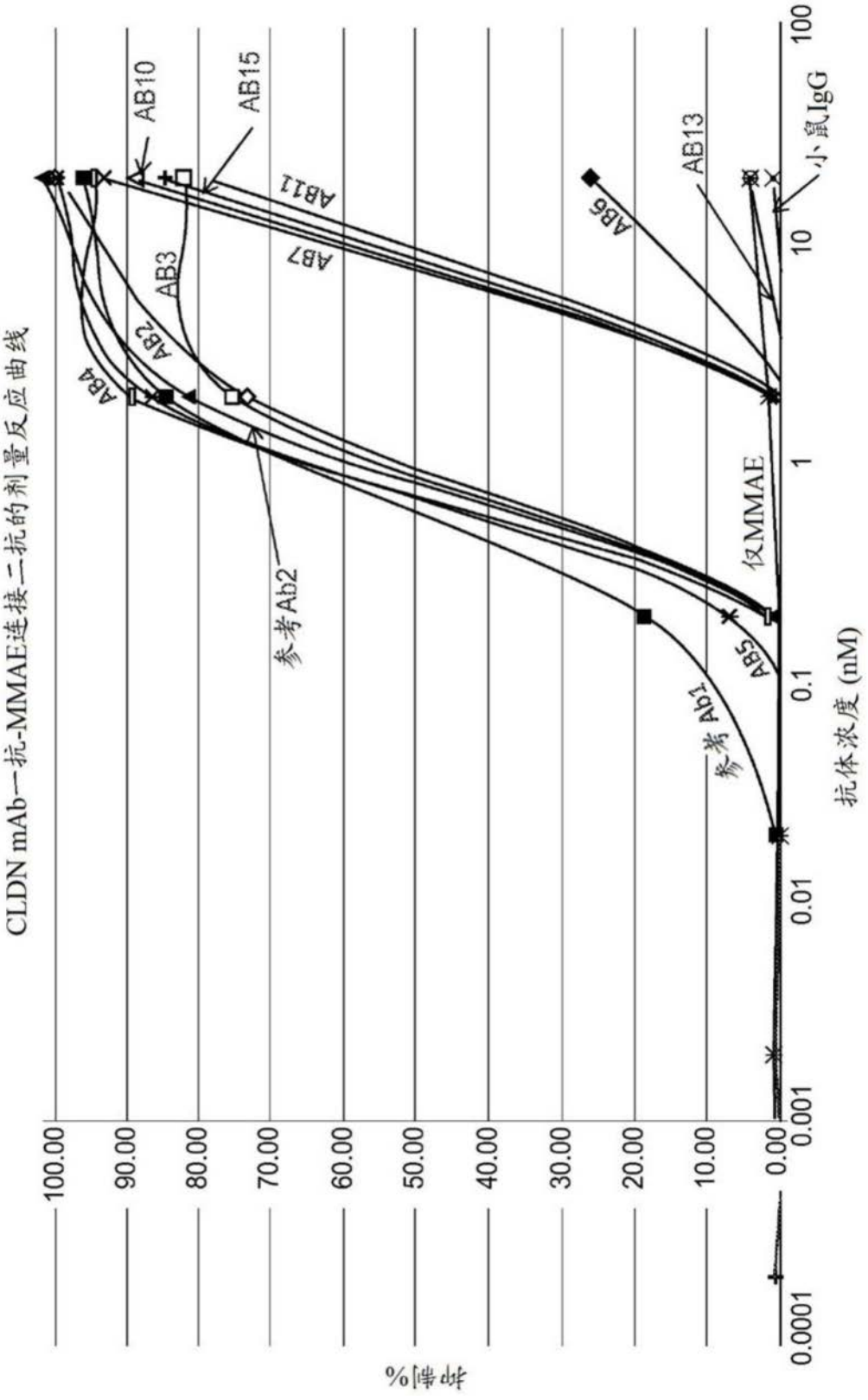

CLDN mAb—抗-MMAE连接二抗的剂量反应曲线
抑制%
抗体浓度 (nM)
100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
AB10
AB15
AB11
AB7
AB6
AB13
小鼠IgG
AB3
AB2
AB4
参考Ab2
仅MMAE
AB5
参考Ab1

图14

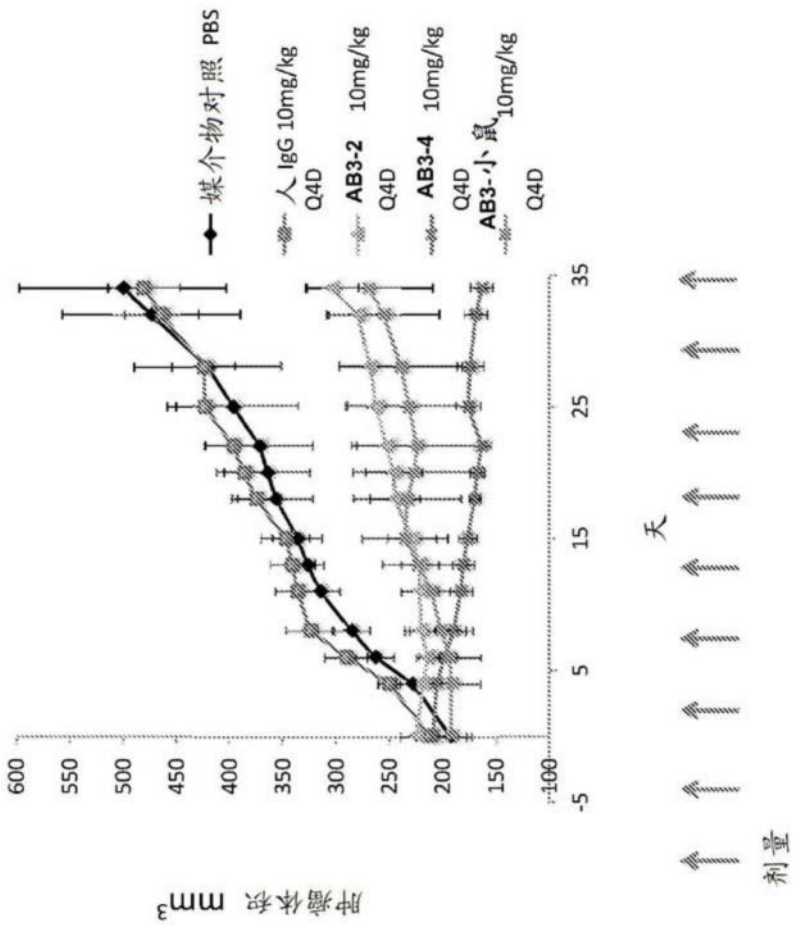

媒介物对照 PBS
人 IgG 10mg/kg Q4D
AB3-2 10mg/kg Q4D
AB3-4 10mg/kg Q4D
AB3-小鼠 10mg/kg Q4D
肿瘤体积 mm³
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
-5
5
15
25
35
天
剂量

图15A

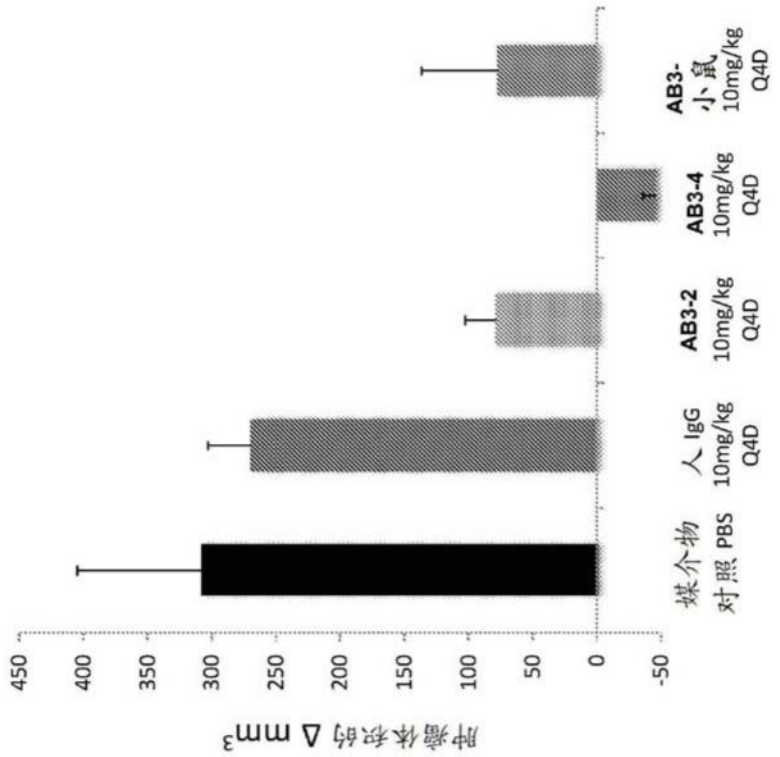

肿瘤体积的 Δ mm³
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
媒介物
对照 PBS
人 IgG
10mg/kg
Q4D
AB3-2
10mg/kg
Q4D
AB3-4
10mg/kg
Q4D
AB3-
小鼠
10mg/kg
Q4D

图15B

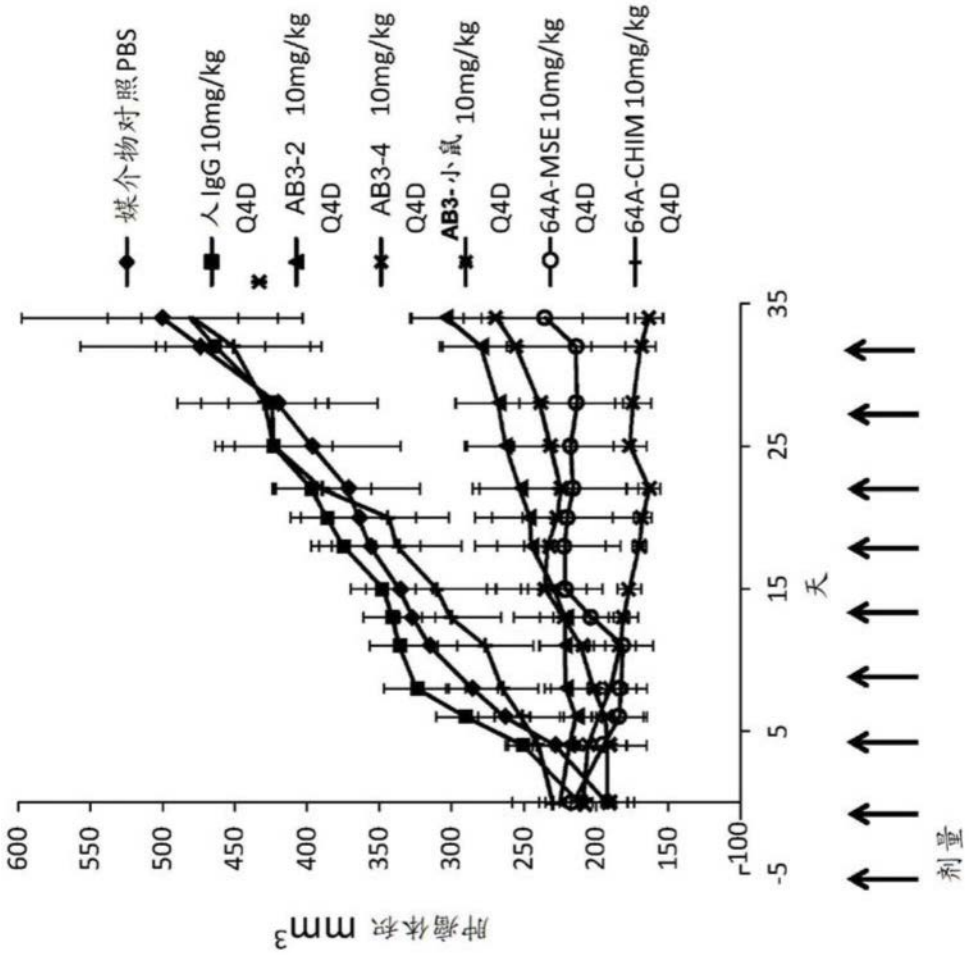

媒介物对照 PBS
人 IgG 10mg/kg Q4D
AB3-2 10mg/kg Q4D
AB3-4 10mg/kg Q4D
AB3-小鼠 10mg/kg Q4D
64A-MSE 10mg/kg Q4D
64A-CHIM 10mg/kg Q4D
肿瘤体积 mm3
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
-5
5
15
25
35
天
剂量

图16A

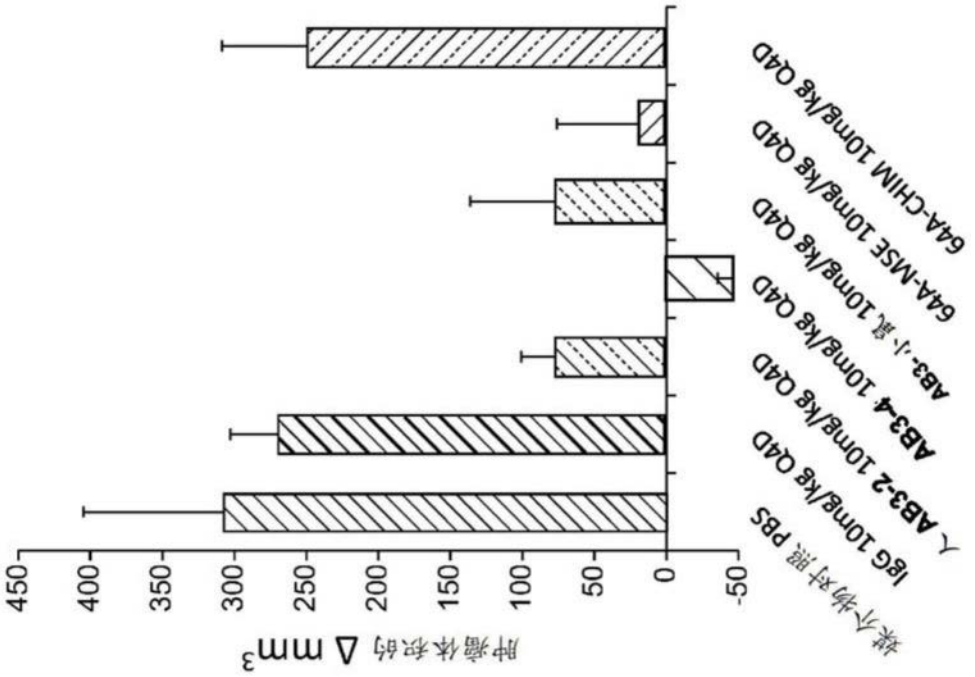

媒介物对照 PBS
IgG 10mg/kg Q4D
AB3-2 10mg/kg Q4D
AB3-4 10mg/kg Q4D
AB3-小鼠 10mg/kg Q4D
64A-MSE 10mg/kg Q4D
64A-CHIM 10mg/kg Q4D
肿瘤体积的 Δ mm³
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
-50

图16B

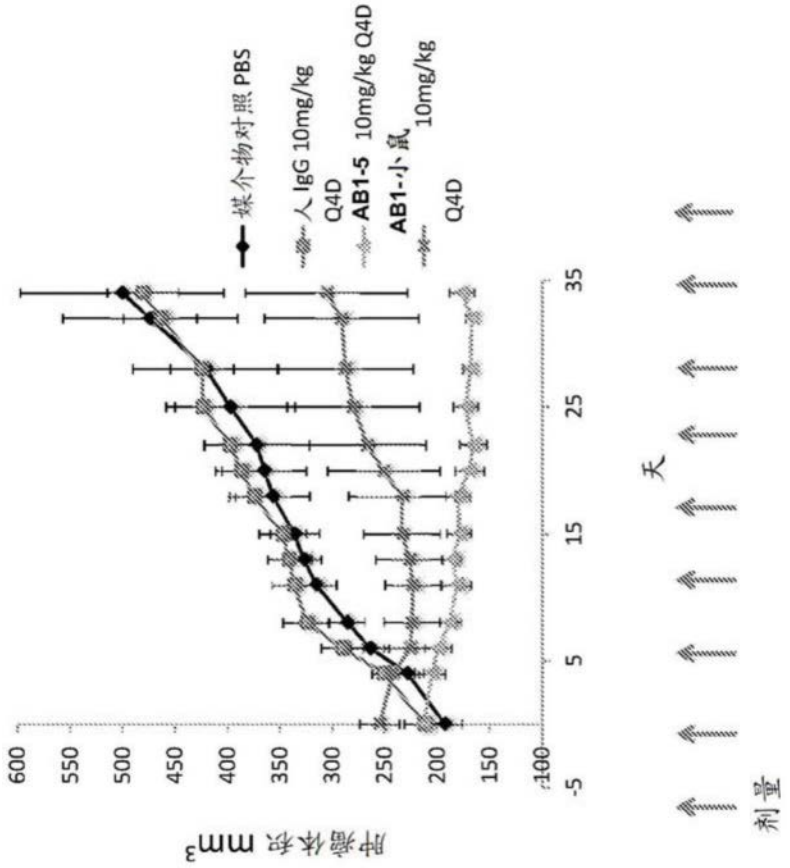

媒介物对照 PBS
人 IgG 10mg/kg Q4D
AB1-5 10mg/kg Q4D
AB1-小鼠 10mg/kg Q4D
肿瘤体积 mm³
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
-5
5
15
25
35
天
剂量

图17A

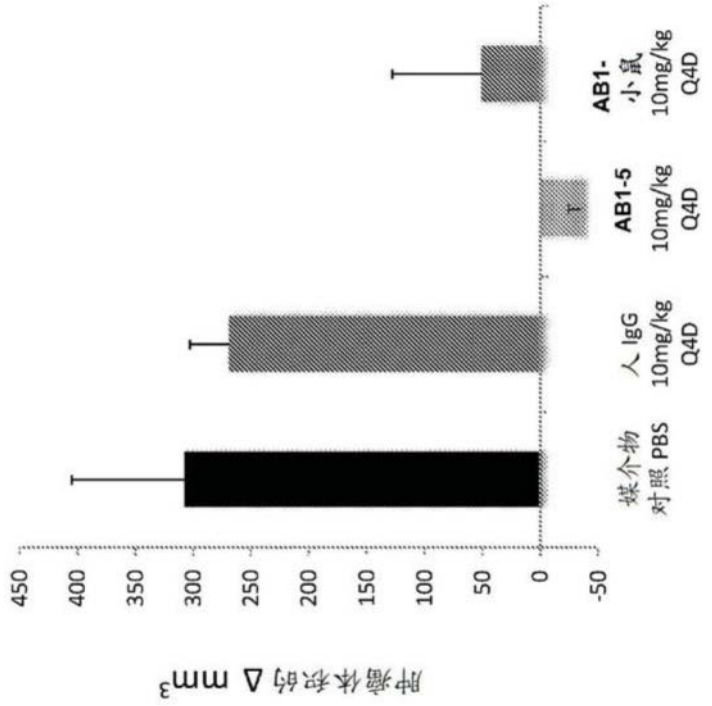

肿瘤体积的 Δ mm³
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
媒介物
对照 PBS
人 IgG
10mg/kg
Q4D
AB1-5
10mg/kg
Q4D
AB1-
小鼠
10mg/kg
Q4D

图17B

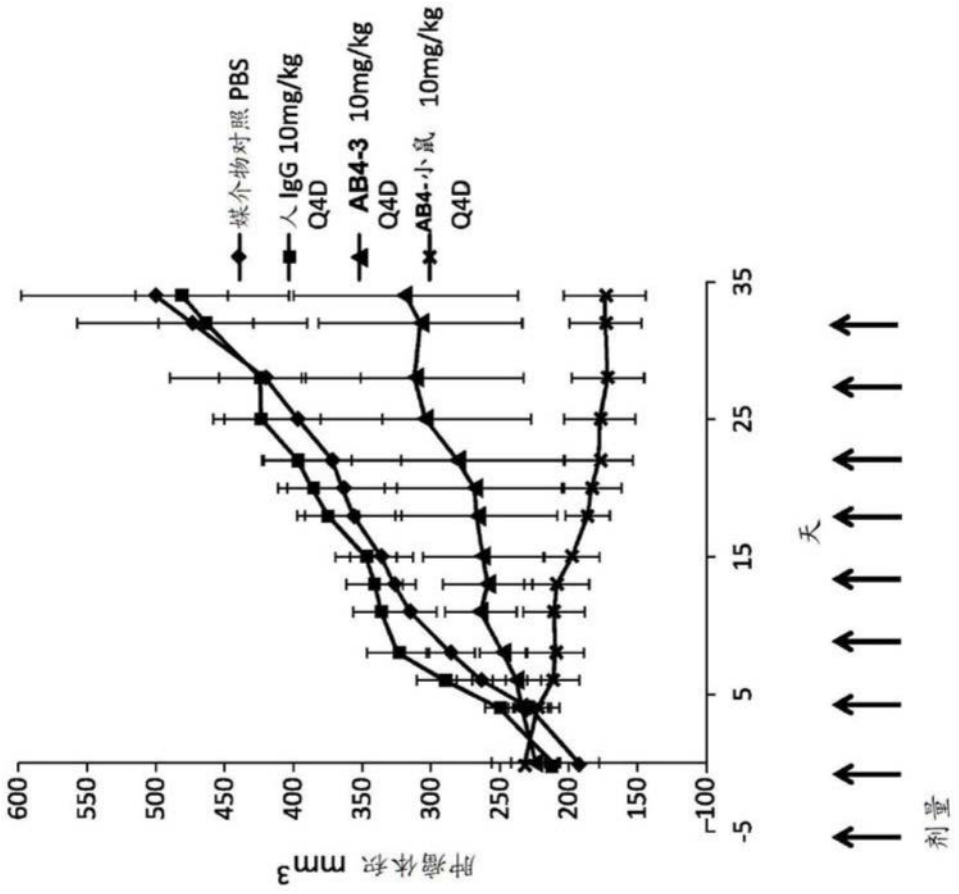

肿瘤体积 mm³
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
-100
-5
5
15
25
35
天
剂量
媒介物对照 PBS
人 IgG 10mg/kg
Q4D
AB4-3 10mg/kg
Q4D
AB4-小鼠 10mg/kg
Q4D

图18A

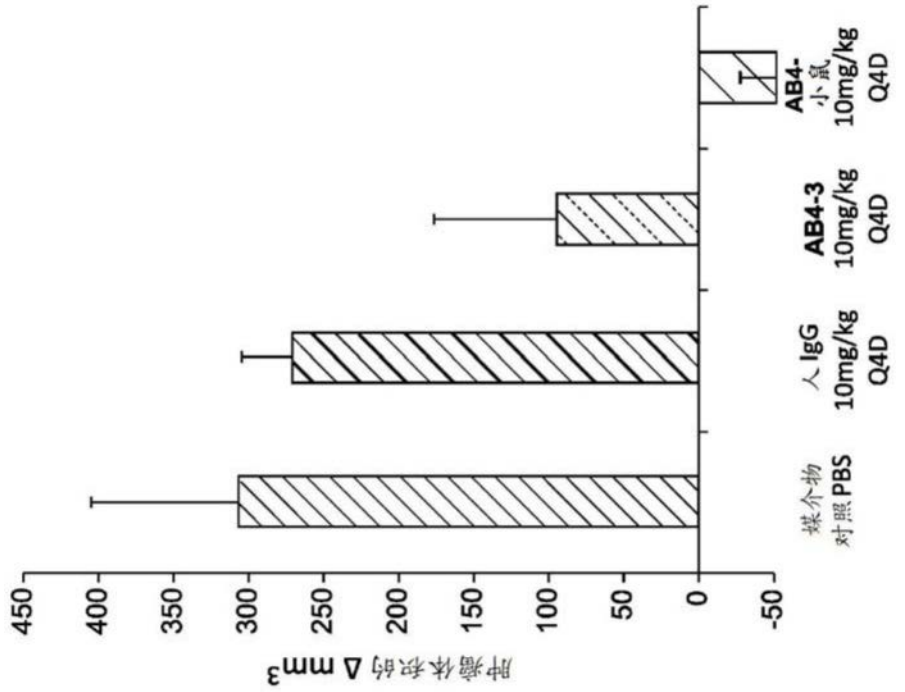

肿瘤体积的 Δ mm3
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
媒介物
对照PBS
人 IgG
10mg/kg
Q4D
AB4-3
10mg/kg
Q4D
AB4-
小鼠
10mg/kg
Q4D

图18B

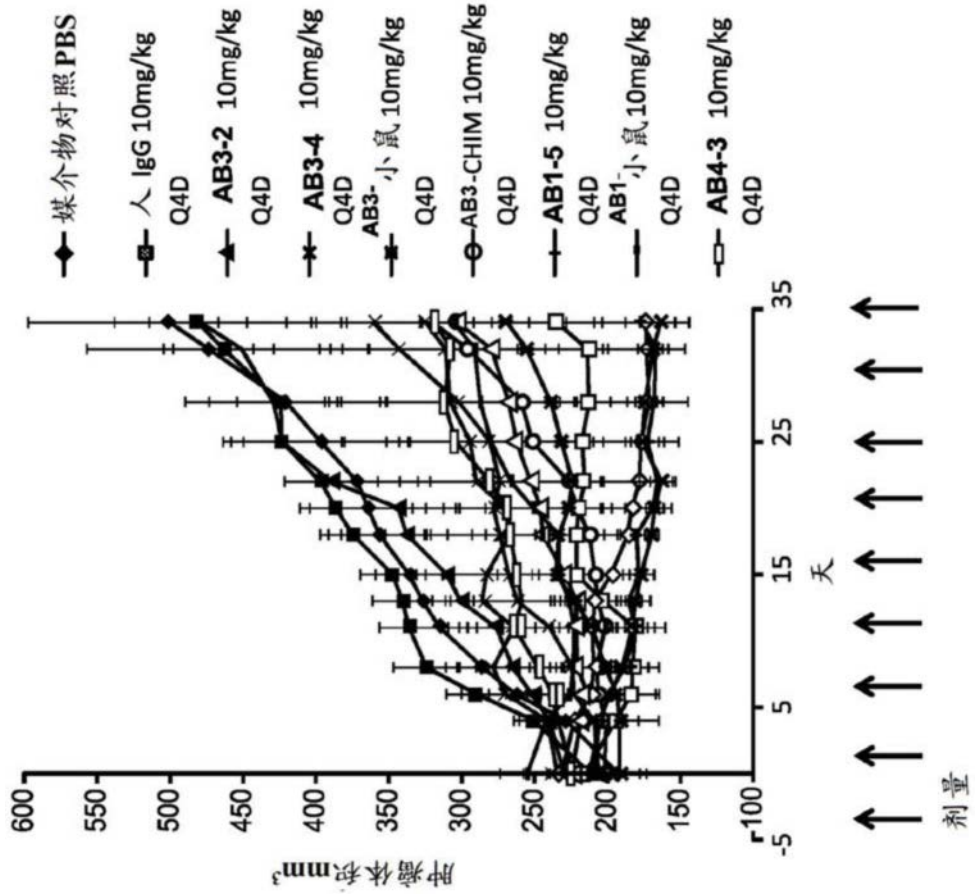

媒介物对照PBS
人 IgG 10mg/kg
Q4D
AB3-2 10mg/kg
Q4D
AB3-4 10mg/kg
Q4D
AB3-小鼠 10mg/kg
Q4D
AB3-CHIM 10mg/kg
Q4D
AB1-5 10mg/kg
Q4D
AB1-小鼠 10mg/kg
Q4D
AB4-3 10mg/kg
Q4D
肿瘤体积mm3
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
-5
5
15
25
35
天
剂量

图19A

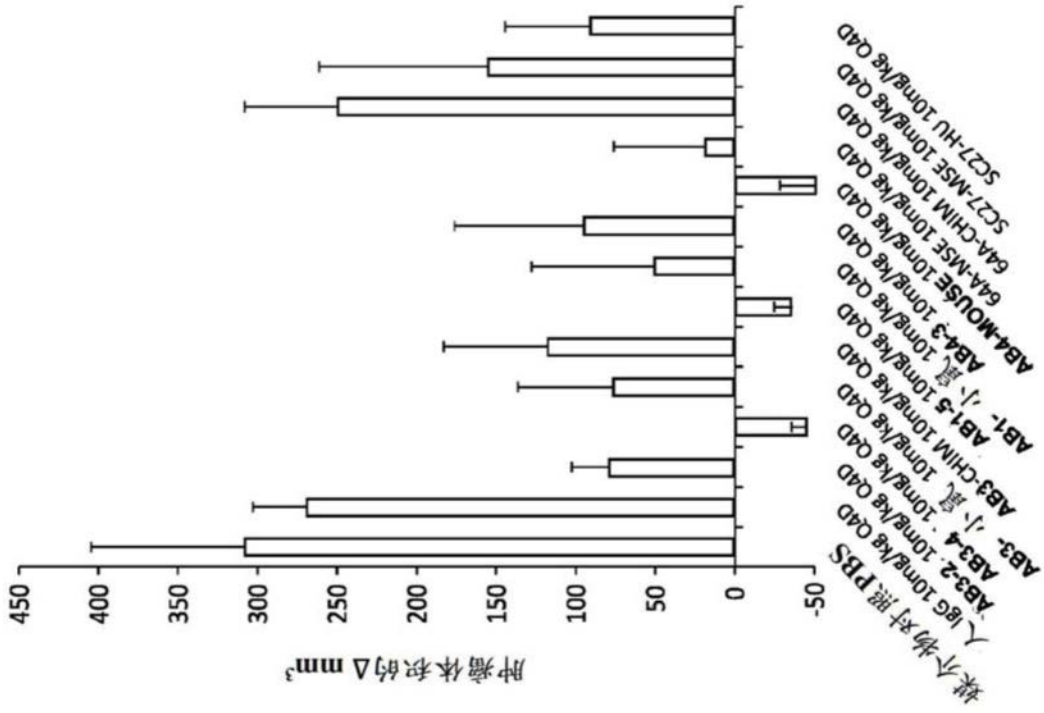

肿瘤体积的Δ mm³
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
媒介物对照 PBS
人IgG 10mg/kg Q4D
AB3-2 10mg/kg Q4D
AB3-4 10mg/kg Q4D
AB3-CHIM 10mg/kg Q4D
AB1-5 10mg/kg Q4D
AB1- 小鼠 10mg/kg Q4D
AB4-3 10mg/kg Q4D
AB4-MOUSE 10mg/kg Q4D
6A4-MSE 10mg/kg Q4D
6A4-CHIM 10mg/kg Q4D
SC27-MSE 10mg/kg Q4D
SC27-HU 10mg/kg Q4D

图19B

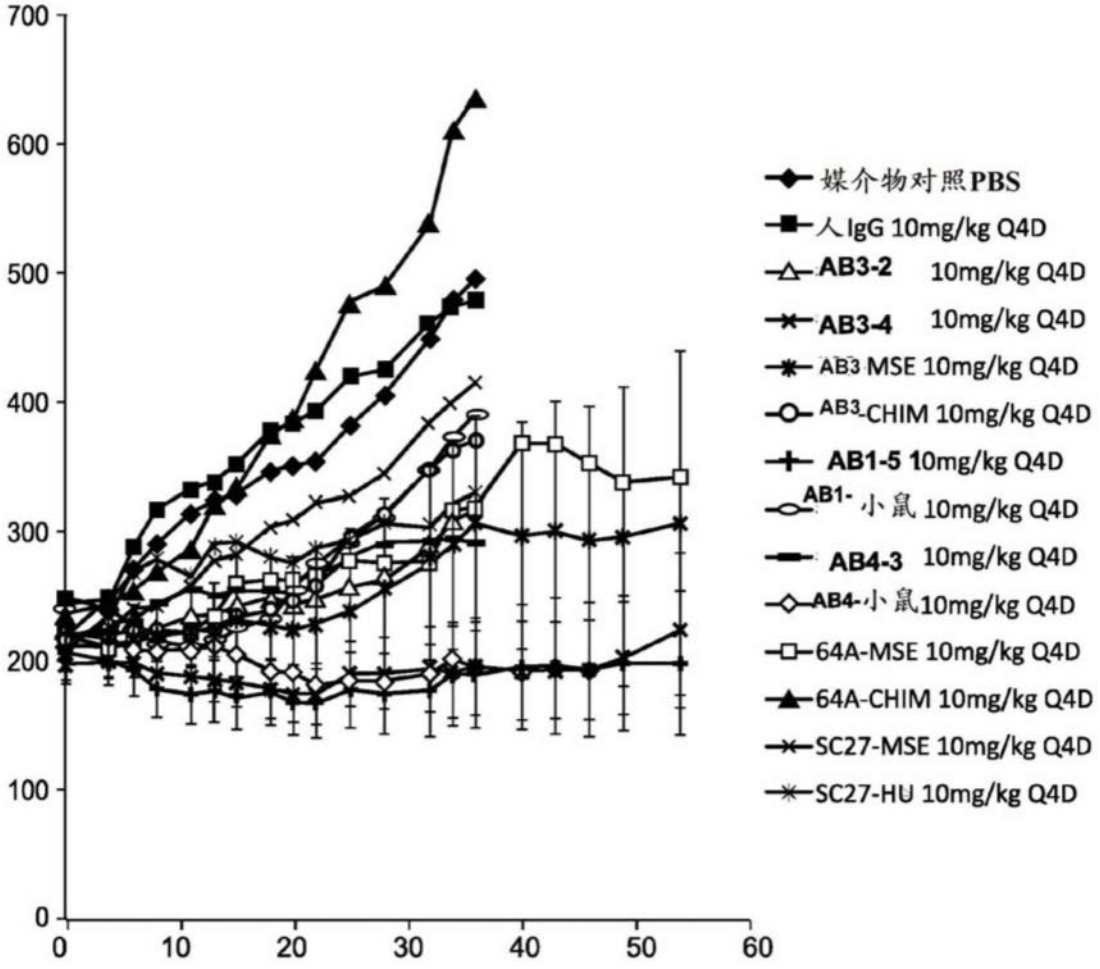

700
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
60
媒介物对照PBS
人IgG 10mg/kg Q4D
AB3-2 10mg/kg Q4D
AB3-4 10mg/kg Q4D
AB3 MSE 10mg/kg Q4D
AB3-CHIM 10mg/kg Q4D
AB1-5 10mg/kg Q4D
AB1-小鼠 10mg/kg Q4D
AB4-3 10mg/kg Q4D
AB4-小鼠10mg/kg Q4D
64A-MSE 10mg/kg Q4D
64A-CHIM 10mg/kg Q4D
SC27-MSE 10mg/kg Q4D
SC27-HU 10mg/kg Q4D

图20

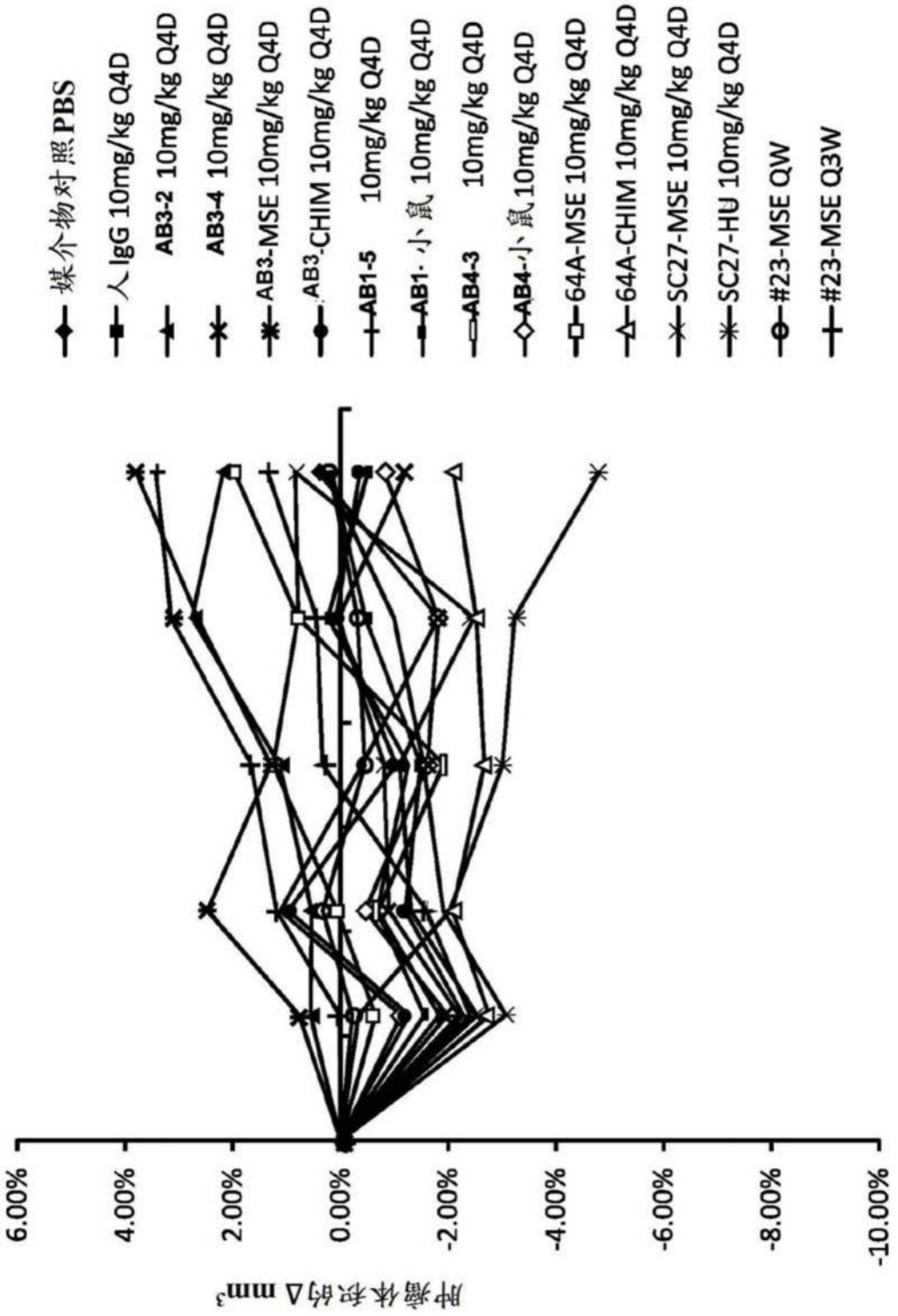

媒介物对照PBS
人IgG 10mg/kg Q4D
AB3-2 10mg/kg Q4D
AB3-4 10mg/kg Q4D
AB3-MSE 10mg/kg Q4D
AB3-CHIM 10mg/kg Q4D
AB1-5 10mg/kg Q4D
AB1-小鼠 10mg/kg Q4D
AB4-3 10mg/kg Q4D
AB4-小鼠10mg/kg Q4D
64A-MSE 10mg/kg Q4D
64A-CHIM 10mg/kg Q4D
SC27-MSE 10mg/kg Q4D
SC27-HU 10mg/kg Q4D
#23-MSE QW
#23-MSE Q3W
6.00%
4.00%
2.00%
0.00%
-2.00%
-4.00%
-6.00%
-8.00%
-10.00%
肿瘤体积的Δ mm³

图21