



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119032103 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 26

(21) 申请号 202380031369.6

(22) 申请日 2023.03.02

(30) 优先权数据

63/316140 2022.03.03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/063559 2023.03.02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/168326 EN 2023.09.07

(71) 申请人 布里格姆妇女医院

地址 美国麻萨诸塞州

(72) 发明人 R·S·布伦贝格 Y-H·黄

A·甘地 R·G·E·霍尔加特

A·R·赫恩 S·D·琼斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 肖传馨 彭昶

(51) Int.Cl.

G07K 16/12 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

权利要求书5页 说明书61页

序列表(电子公布) 附图17页

(54) 发明名称

人源化和亲和力成熟的抗CEACAM1抗体及使用
方法

(57) 摘要

本文提供了可用于结合和抑制癌胚抗原相关细胞粘附分子1 (CEACAM1) 的重组抗体及其抗原结合片段。还提供了使用所述公开的CEACAM1抗体及其抗原结合片段减少T细胞耐受性和治疗癌症和感染的方法。

1. 一种结合CEACAM1的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区;

其中所述重链可变区和所述轻链可变区中的每一个包含CDR1、CDR2和CDR3;并且其中:

- a) CDR1H的序列包含序列DYYLY (SEQ ID NO:1);
- b) CDR2H的序列包含序列TISVGGGQTSYADSVKG (SEQ ID NO:2);
- c) CDR3H的序列包含序列GLYYGPSWVAY (SEQ ID NO:3)、ARTYGPWFAY (SEQ ID NO:4) 或ALTYGPAWLAY (SEQ ID NO:5);
- d) CDR1L的序列包含序列KSSQSLLNSANQKNYLA (SEQ ID NO:6);
- e) CDR2L的序列包含序列FASTRES (SEQ ID NO:7);并且
- f) CDR3L的序列包含序列QSHYPFYIT (SEQ ID NO:8) 或QSHFPYPLT (SEQ ID NO:9)。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

- a) CDR3H的序列包含序列GLYYGPSWVAY (SEQ ID NO:3);并且
- b) CDR3L的序列包含序列QSHYPFYIT (SEQ ID NO:8)。

3. 一种结合CEACAM1的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区;

a) 其中所述重链可变区的序列包含与选自由SEQ ID NO:15-17组成的组的序列至少90%同一的序列;并且

b) 其中所述轻链可变区的序列包含与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22至少90%同一的序列。

4. 根据权利要求3所述的抗体或其抗原结合片段;

a) 其中所述重链可变区的序列包含与SEQ ID NO:15的重链可变区氨基酸序列至少90%同一的序列;并且

b) 其中所述轻链可变区的序列包含与SEQ ID NO:21中任一个的轻链可变区氨基酸序列至少90%同一的序列。

5. 根据权利要求3所述的抗体或其抗原结合片段,

a) 其中所述重链可变区的序列包含与选自由SEQ ID NO:15-17组成的组的序列至少95%同一的序列;并且

b) 其中所述轻链可变区的序列包含与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22至少95%同一的序列。

6. 根据权利要求5所述的抗体或其抗原结合片段,

a) 其中所述重链可变区的序列包含与SEQ ID NO:15的重链可变区氨基酸序列至少95%同一的序列;并且

b) 其中所述轻链可变区的序列包含与SEQ ID NO:21中任一个的轻链可变区氨基酸序列至少95%同一的序列。

7. 根据权利要求3所述的抗体或其抗原结合片段,

a) 其中所述重链可变区的序列包含选自由SEQ ID NO:15-17组成的组的序列;并且

b) 其中所述轻链可变区的序列包含SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22。

8. 根据权利要求7所述的抗体或其抗原结合片段,

a) 其中所述重链可变区的序列包含SEQ ID NO:15;并且

- b) 其中所述轻链可变区的序列包含SEQ ID NO:21。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段是嵌合抗体、CDR移植抗体或人源化抗体或其抗原结合片段。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段是多特异性或双特异性抗体或其抗原结合片段。
11. 根据权利要求10所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段是包含结合PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、表皮生长因子受体(EGFR)、CD25、CD19或Fc γ 受体的互补区的双特异性抗体。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段是scFv、Fv、Fab'、Fab、F(ab')₂或双抗体。
13. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段具有同种型IgG4。
14. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段在所述重链的恒定区中含有S241P取代。
15. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段是去糖基化的。
16. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段在所述重链中缺少C末端赖氨酸。
17. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段缀合至细胞毒素、荧光标记和成像剂中的一种或多种。
18. 一种抗体或其抗原结合片段, 其与根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段结合CEACAM1上的相同表位。
19. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段结合CEACAM1的IgV样N结构域。
20. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段不结合CEACAM3、CEACAM5、CEACAM6和CEACAM8中的一个或多个。
21. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段:
- a) 至少部分地结合CEACAM1上的TIM-3结合位点; 且/或
- b) 至少部分地结合CEACAM1上的PD-1结合位点。
22. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段在同二聚化期间至少部分结合CEACAM1上的CEACAM1结合位点。
23. 一种分离的核酸, 其编码根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。
24. 一种载体, 其包含根据权利要求23所述的核酸。
25. 一种分离的细胞, 其包含根据权利要求24所述的载体。
26. 一种细胞, 其表达根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。
27. 一种具有嵌合抗原受体的T细胞, 其包含根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的CDR。

28. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,以及药学上可接受的赋形剂。

29. 一种抑制CEACAM1与CEACAM家族的成员结合的方法,所述方法包括使CEACAM1与根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或与根据权利要求28所述的药物组合物接触。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述CEACAM家族的成员选自由CEACAM1、CEACAM5和CEACAM8组成的组。

31. 根据权利要求29所述的方法,其中所述CEACAM家族的成员是CEACAM1。

32. 一种抑制CEACAM1与TIM家族的成员结合的方法,所述方法包括使CEACAM1与根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或与根据权利要求28所述的药物组合物接触。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述TIM家族的成员是TIM-3。

34. 一种抑制CEACAM1与PD-1结合的方法,所述方法包括使CEACAM1与根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或与根据权利要求28所述的药物组合物接触。

35. 一种抑制CEACAM1与细菌粘附素结合的方法,所述方法包括使CEACAM1与根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或与根据权利要求28所述的药物组合物接触。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述细菌粘附素是幽门螺杆菌粘附素HopQ、淋病奈瑟氏球菌混浊蛋白(Opa)、脑膜炎奈瑟氏球菌Opa、流感嗜血杆菌外膜蛋白(OMP) P1、埃及嗜血杆菌OMP P1或莫拉氏菌属Opa样蛋白(OlpA)、梭杆菌属三聚体自转运蛋白粘附素CbpF、沙门氏菌属粘附素或无乳链球菌粘附素。

37. 一种抑制CEACAM1与白色念珠菌结合的方法,所述方法包括使CEACAM1与根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或与根据权利要求28所述的药物组合物接触。

38. 一种减少表达细菌粘附素的细菌对哺乳动物上皮的定植的方法,所述方法包括使CEACAM1与根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或与根据权利要求28所述的药物组合物接触。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述细菌粘附素是幽门螺杆菌粘附素HopQ、淋病奈瑟氏球菌混浊蛋白(Opa)、脑膜炎奈瑟氏球菌Opa、流感嗜血杆菌OMP P1、埃及嗜血杆菌OMP P1或莫拉氏菌属OlpA、梭杆菌属三聚体自转运蛋白粘附素CbpF、沙门氏菌属粘附素或无乳链球菌粘附素。

40. 一种减少白色念珠菌对哺乳动物上皮的定植的方法,所述方法包括使CEACAM1与根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或与根据权利要求28所述的药物组合物接触。

41. 一种减少T细胞耐受性的方法,所述方法包括使包含T细胞的细胞群体与根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或与根据权利要求28所述的药物组合物接触。

42. 一种增强T细胞扩增的方法,所述方法包括使包含T细胞的细胞群体与根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或与根据权利要求28所述的药物组合物接

触。

43. 一种在有需要的受试者中减少T细胞耐受性的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求28所述的药物组合物。

44. 一种在有需要的受试者中增强T细胞扩增的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求28所述的药物组合物。

45. 一种增强B细胞扩增的方法,所述方法包括使包含T细胞的细胞群体与根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或与根据权利要求28所述的药物组合物接触。

46. 一种在有需要的受试者中增强B细胞扩增的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求28所述的药物组合物。

47. 一种增强单核细胞扩增的方法,所述方法包括使包含T细胞的细胞群体与根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或与根据权利要求28所述的药物组合物接触。

48. 一种在有需要的受试者中增强单核细胞扩增的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求28所述的药物组合物。

49. 一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求28所述的药物组合物。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中所述癌症是黑素瘤、胰腺癌、甲状腺癌、肺癌、结直肠癌、鳞癌、前列腺癌、乳腺癌、膀胱癌或胃癌。

51. 一种在有需要的受试者中减少肿瘤生长的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求28所述的药物组合物。

52. 一种在有需要的受试者中减少肿瘤转移的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求28所述的药物组合物。

53. 一种在有需要的受试者中减少肿瘤相关纤维化的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求28所述的药物组合物。

54. 一种在有需要的受试者中减少肿瘤干性的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求28所述的药物组合物。

55. 一种在有需要的受试者中减少表达细菌粘附素的细菌对受试者的上皮的定植的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求28所述的药物组合物。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中所述细菌粘附素是幽门螺杆菌粘附素HopQ、奈瑟氏球菌混浊蛋白(Opa)、脑膜炎奈瑟氏球菌Opa、流感嗜血杆菌OMP P1、埃及嗜血杆菌OMP P1、莫拉氏菌属O1pA、梭杆菌属三聚体自转运蛋白粘附素CbpF、沙门氏菌属粘附素或无乳链球菌粘附素。

57. 一种在有需要的受试者中减少白色念珠菌对受试者的上皮的定植的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求28所述的药物组合物。

58. 一种在有需要的受试者中减少丝虫对受试者的淋巴系统的侵袭的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求28所述的药物组合物。

59. 根据权利要求58所述的方法,其中所述丝虫是班氏吴策线虫。

60. 一种在有需要的受试者中减少癌细胞对受试者的淋巴系统的侵袭的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求28所述的药物组合物。

61. 根据权利要求43至54中任一项所述的方法,所述方法进一步包括施用检查点抑制剂。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述检查点抑制剂是CTLA-4、PD-1、PD-L1和PD-L2抑制剂。

63. 根据权利要求43至54中任一项所述的方法,所述方法还包括施用LAG3、TIGIT、LAP、Podoplanin、蛋白C受体、ICOS、GITR、CD226和/或CD160的抑制剂中的一种或多种。

64. 根据权利要求43至54中任一项所述的方法,所述方法还包括施用TIM-3抑制剂。

65. 根据权利要求61至64中任一项所述的方法,其中所述另外的抑制剂与所述抗体或抗原结合片段同时或连续施用。

66. 根据权利要求61至64中任一项所述的方法,其中所述另外的抑制剂单独施用或作为与所述抗体或抗原结合片段的混合物施用。

67. 一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求28所述的药物组合物,其中所述受试者对使用检查点抑制剂疗法的疗法具有获得性抗性。

68. 根据权利要求67所述的方法,其中所述受试者对使用PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂或CTLA-4抑制剂中的一种或多种的疗法具有获得性抗性。

人源化和亲和力成熟的抗CEACAM1抗体及使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年3月3日提交的美国临时专利申请号63/316,140的权益,所述申请通过引用整体并入。

技术领域

[0003] 本发明总体上涉及分子生物学和医药领域。更具体地,本发明提供结合CEACAM1的单克隆抗体和抗原结合片段及其治疗组合物,以及使用此类抗体的方法,包括抑制与CEACAM1的同嗜性和异嗜性相互作用,以及用于治疗癌症和感染性疾病的方法。

[0004] 关于联邦政府资助的研究或开发的声明

[0005] 本发明是在政府支持下根据美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的DK51362进行的。政府对本发明享有某些权利。

背景技术

[0006] 癌胚抗原相关细胞粘附分子1 (CEACAM1) 是免疫球蛋白 (Ig) 样跨膜糖蛋白的癌胚抗原 (CEA) 家族的成员。CEACAM家族成员参与细胞间识别并调节细胞过程,其范围从组织结构和新血管形成的成形到胰岛素稳态和T细胞增殖的调节。

[0007] 多种细胞活性已被归因于CEACAM1蛋白,包括在组织三维结构的分化和排列、血管生成、细胞凋亡、肿瘤抑制、转移以及先天性和适应性免疫应答的调节中的作用。此外,几种细胞类型可能表达CEACAM1,包括肿瘤细胞、T细胞、B细胞、自然杀伤 (NK) 细胞和某些巨噬细胞。

[0008] 高CEACAM1表达发生在多种癌症中,诸如黑素瘤、结直肠癌、胃癌、胰腺癌、膀胱癌和甲状腺癌,并且与较差的肿瘤进展、转移和不良临床预后相关。例如,具有高CEACAM1表达的非小细胞肺癌 (NSCLC) 表现出高微血管密度、远端转移和较短的中位总体存活和无进展存活。CEACAM1表达也与胰腺癌的远端转移密切相关。肿瘤上的CEACAM1表达促进CEACAM1介导的T和NK细胞的抑制。因此,抑制CEACAM1活性可以抑制肿瘤细胞转移和癌症干细胞龕的形成。

[0009] CEACAM1也在某些免疫系统细胞中表达并且在免疫抑制和免疫细胞耗竭中发挥作用。例如,肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 和来自胃癌、肺癌、黑素瘤、结直肠癌和神经胶质瘤的其他肿瘤浸润免疫细胞上的高CEACAM1表达与不良预后相关。在T细胞上,CEACAM1表达大部分被排除在静息 (原初) T细胞之外,而蛋白在激活的T细胞上以高水平表达。CEACAM1-L是在大多数T细胞中表达的主要同工型,并且充当下调T细胞激活和抑制T细胞功能的抑制性受体。因此,CEACAM1对T细胞的抑制可恢复T细胞活性并且增加抗肿瘤应答。

[0010] CEACAM1进一步在NK细胞上表达,所述NK细胞是参与先天性免疫的淋巴细胞,其参与病毒感染的早期控制和肿瘤的免疫监视。当NK细胞遇到表达I类主要组织相容性复合物 (MHC) 的细胞时,通过受体-配体相互作用的抑制信号阻止针对这些细胞的免疫应答。然而,当遇到其中I类MHC下调的细胞时,诸如在病毒感染的细胞或癌细胞中,NK细胞由于缺少抑

制信号而被激活,这使得“患病的”细胞容易受到NK细胞介导的杀伤。当CEACAM1存在于NK和黑素瘤细胞的表面上时,CEACAM1:CEACAM1相互作用导致NK介导的杀伤受到抑制,而与I类MHC表达无关。因此,这种同嗜性CEACAM1相互作用的破坏可有益于恢复NK介导的免疫应答。

[0011] 巨噬细胞亚群上的CEACAM1表达进一步与小鼠模型中肿瘤微环境中的纤维化相关。CEACAM1还调节肿瘤微环境诸如血管内皮中的其他基质细胞。因此,抑制CEACAM1与其结合配偶体的相互作用可进一步抑制纤维化和血管生成。

[0012] CEACAM1还通过含有IgV样N结构域的CEACAM1的胞外部分介导细胞间粘附,所述胞外部分参与同嗜性(CEACAM1:CEACAM1)和异嗜性相互作用(例如与CEA、CEACAM5、CEACAM8、含有T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域的3(TIM-3)蛋白和程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)粘附素HopQ、淋病/脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae/meningitidis*)混浊蛋白(OPA)、莫拉氏菌属(*Moraxella sp.*)Opa样蛋白OlpA、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)外膜蛋白(OMP)P1、埃及嗜血杆菌(*Haemophilus aegyptius*)OMP P1、梭杆菌属(*Fusobacterium sp.*)、沙门氏菌属(*Salmonella sp.*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)和白色念珠菌(*Candida albicans*)。TIM-3被鉴定为Th1特异性细胞表面蛋白,其在激活的T细胞、树突细胞和巨噬细胞的亚群以及NK细胞上表达。TIM-3是激活诱导的抑制性分子,其与耐受性有关,并且已显示在慢性病毒感染和癌症中诱导T细胞耗竭。CEACAM1也在激活的T细胞上表达,已显示与TIM-3相互作用,并且这种相互作用对于TIM-3介导的T细胞抑制是重要的。PD-1代表人的主要检查点抑制剂通路。

[0013] 如上所述,CEACAM1还充当粘膜细胞顶膜上的细胞受体,用于与人粘膜以及与真菌病原体(诸如白色念珠菌)相关的多种革兰氏阴性细菌病原体。例如,淋病奈瑟氏球菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、卡他莫拉氏菌(*Moraxella catarrhalis*)、流感嗜血杆菌、埃及嗜血杆菌和致病性大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株具有充分表征的CEACAM1结合粘附素。CEACAM1与细菌粘附素的接合触发细菌胞吞进入上皮细胞和微生物胞吞转运通过完整上皮层,因此允许微生物在粘膜定植期间利用CEACAM1。另外,CEACAM1与流感病毒H5N1和诸如班氏吴策线虫(*Wucheria bancrofti*)的子线虫的感染有关。

发明内容

[0014] 本文提供了结合CEACAM1并阻断CEACAM1与一种或多种结合配偶体的相互作用的抗体及其抗原结合片段。还提供了此类抗体及其抗原结合片段的治疗组合物,以及使用这些抗体的方法。通过阻断CEACAM1与一种或多种结合配偶体的相互作用,所述抗体及其抗原结合片段可用于降低、抑制和/或逆转T细胞耐受性和/或用于增强T细胞扩增。CEACAM1抗体及其抗原结合片段还可用于在有需要的受试者中治疗癌症、减少肿瘤生长、减少肿瘤转移和/或减少癌症干性。CEACAM1抗体及其抗原结合片段也可用于治疗对检查点疗法有抗性的患者。进一步提供了使用CEACAM1抗体及其抗原结合片段来减少表达细菌粘附素的细菌或白色念珠菌对哺乳动物上皮的定植的方法。

[0015] 在一方面,提供了结合CEACAM1的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区;

[0016] 其中所述重链可变区和所述轻链可变区中的每一个包含CDR1、CDR2和CDR3;并且

其中:

[0017] a) CDR1H的序列包含序列DYYLY(SEQ ID NO:1);

[0018] b) CDR2H的序列包含序列TISVGGGQTSYADSVKG(SEQ ID NO:2);

[0019] c) CDR3H的序列包含序列GLYYGPSWVAY(SEQ ID NO:3)、ARTYGPWFAY(SEQ ID NO:4)或ALTYGPAWLAY(SEQ ID NO:5);

[0020] d) CDR1L的序列包含序列KSSQSLNLSANQKNYLA(SEQ ID NO:6);

[0021] e) CDR2L的序列包含序列FASTRES(SEQ ID NO:7);并且

[0022] f) CDR3L的序列包含序列QSHYPFYIT(SEQ ID NO:8)或QSHFPYPLT(SEQ ID NO:9)。

[0023] 在一个实施方案中,CDR3H的序列包含序列GLYYGPSWVAY(SEQ ID NO:3);并且CDR3L的序列包含序列QSHYPFYIT(SEQ ID NO:8)。

[0024] 在一方面,提供了结合CEACAM1的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区的序列包含与选自由SEQ ID NO:15-17组成的组的序列至少90%同一的序列并且其中所述轻链可变区的序列包含与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22至少90%同一的序列。

[0025] 在一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:15的重链可变区氨基酸序列至少90%同一的序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:21中任一个的轻链可变区氨基酸序列至少90%同一的序列。

[0026] 在实施方案中,所述重链可变区包含与选自由SEQ ID NO:15-17组成的组的序列至少95%同一的序列,并且所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22至少95%同一的序列。在一个实施方案中,所述重链可变区的序列包含与SEQ ID NO:15的重链可变区氨基酸序列至少95%同一的序列,并且所述轻链可变区的序列包含与SEQ ID NO:21中任一个的轻链可变区氨基酸序列至少95%同一的序列。

[0027] 在实施方案中,所述重链可变区的序列包含选自由SEQ ID NO:15-17组成的组的序列,并且所述轻链可变区的序列包含SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22。在一个实施方案中,所述重链可变区的序列包含SEQ ID NO:15并且所述轻链可变区的序列包含SEQ ID NO:21。

[0028] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体、CDR移植抗体或人源化抗体或其抗原结合片段。

[0029] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是多特异性或双特异性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是双特异性抗体,其包含结合PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、表皮生长因子受体(EGFR)、CD25、CD19或Fc γ 受体的互补区。

[0030] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是scFv、Fv、Fab'、Fab、F(ab')₂或双抗体。

[0031] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段具有同种型IgG4。

[0032] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段在重链恒定区中含有S241P取代。

[0033] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是去糖基化的。

[0034] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段在重链中缺少C末端赖氨酸。

[0035] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段与细胞毒素、荧光标记和成像剂中的一种或多种缀合。

[0036] 本文提供了与本文公开的抗体或其抗原结合片段结合CEACAM1上的相同表位的抗

体或其抗原结合片段。本文提供了结合CEACAM1的IgV样N结构域的抗体或其抗原结合片段。在实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段不结合CEACAM3、CEACAM5、CEACAM6和CEACAM8中的一个或多个。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段至少部分结合CEACAM1上的TIM-3结合位点且/或至少部分结合CEACAM1上的PD-1结合位点。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段在同二聚化期间至少部分结合CEACAM1上的CEACAM1结合位点。

[0037] 本文提供了编码本文公开的抗体或其抗原结合片段的核酸。在一个实施方案中,所述核酸是分离的核酸。本文提供了包含本文公开的核酸的载体。

[0038] 本文提供了包含本文公开的载体的细胞。在一个实施方案中,所述细胞是分离的细胞。本文提供了表达本文公开的抗体或其抗原结合片段的细胞。本文提供了具有包含本文公开的抗体或其抗原结合片段的CDR的嵌合抗原受体的T细胞。

[0039] 本文提供了包含本文公开的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0040] 本文提供了抑制CEACAM1与CEACAM家族成员结合的方法,所述方法包括使CEACAM1与本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物接触。在一些实施方案中,所述CEACAM家族成员是CEACAM5或CEACAM8。在一个实施方案中,所述CEACAM家族成员是CEACAM1。

[0041] 提供了抑制CEACAM1与TIM家族成员结合的方法,所述方法包括使CEACAM1与本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物接触。在一个实施方案中,所述TIM家族成员是TIM-3。

[0042] 提供了抑制CEACAM1与PD-1结合的方法,所述方法包括使CEACAM1与本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物接触。

[0043] 一种抑制CEACAM1与细菌粘附素结合的方法,所述方法包括使CEACAM1与本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物接触。在实施方案中,所述细菌粘附素是幽门螺杆菌粘附素HopQ、淋病奈瑟氏球菌混浊蛋白(Opa)、脑膜炎奈瑟氏球菌Opa、流感嗜血杆菌外膜蛋白(OMP)P1、埃及嗜血杆菌OMP P1、莫拉氏菌属Opa样蛋白(O1pA)、梭杆菌属三聚体自转运蛋白粘附素CbpF、沙门氏菌属粘附素或无乳链球菌IgI3样 β 蛋白粘附素。

[0044] 提供了抑制CEACAM1与白色念珠菌结合的方法,所述方法包括使CEACAM1与本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物接触。

[0045] 提供了减少表达细菌粘附素的细菌对哺乳动物上皮的定植的方法,所述方法包括使CEACAM1与本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物接触。在实施方案中,所述细菌粘附素是幽门螺杆菌粘附素HopQ、淋病奈瑟氏球菌混浊蛋白(Opa)、脑膜炎奈瑟氏球菌Opa、流感嗜血杆菌OMP P1、埃及嗜血杆菌OMP P1或莫拉氏菌属O1pA、梭杆菌属三聚体自转运蛋白粘附素CbpF、沙门氏菌属粘附素或无乳链球菌IgI3样 β 蛋白粘附素。

[0046] 本文提供了减少白色念珠菌对哺乳动物上皮的定植的方法,所述方法包括使CEACAM1与本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物接触。

[0047] 本文提供了减少T细胞耐受性的方法,所述方法包括使包含T细胞的细胞群体与本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物接触。

[0048] 本文提供了增强T细胞扩增的方法,所述方法包括使包含T细胞的细胞群体与本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物接触。

[0049] 本文提供了在有需要的受试者中减少T细胞耐受性的方法,所述方法包括向受试者施用本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物。

[0050] 本文提供了在有需要的受试者中增强T细胞扩增的方法,所述方法包括向受试者施用本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物。

[0051] 本文提供了在有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括向受试者施用本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物。在实施方案中,所述癌症是黑素瘤、胰腺癌、甲状腺癌、肺癌、结直肠癌、鳞癌、前列腺癌、乳腺癌、膀胱癌或胃癌。

[0052] 本文提供了在有需要的受试者中减少肿瘤生长的方法,所述方法包括向受试者施用本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物。

[0053] 本文提供了在有需要的受试者中减少肿瘤转移的方法,所述方法包括向受试者施用本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物。

[0054] 本文提供了在有需要的受试者中减少肿瘤相关的纤维化的方法,所述方法包括向受试者施用本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物。

[0055] 本文提供了在有需要的受试者中减少癌症干性的方法,所述方法包括向受试者施用本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物。

[0056] 本文提供了在有需要的受试者中减少表达细菌粘附素的细菌对受试者的上皮的定植的方法,所述方法包括向受试者施用本文公开的抗体或其抗原结合片段。在实施方案中,所述细菌粘附素是幽门螺杆菌粘附素HopQ、淋病奈瑟氏球菌混浊蛋白(Opa)、脑膜炎奈瑟氏球菌Opa、流感嗜血杆菌OMP P1、埃及嗜血杆菌OMP P1、莫拉氏菌属O1pA、梭杆菌属三聚体自转运蛋白粘附素CbpF、沙门氏菌属粘附素或无乳链球菌IgI3样 β 蛋白粘附素。

[0057] 本文提供了在有需要的受试者中减少白色念珠菌对受试者的上皮的定植的方法,所述方法包括向受试者施用本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物。

[0058] 本文提供了在有需要的受试者中减少丝虫对受试者的淋巴系统的侵袭的方法,所述方法包括向受试者施用本文公开的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方案中,所述丝虫是班氏吴策线虫。

[0059] 本文提供了在有需要的受试者中减少癌细胞对受试者的淋巴系统的侵袭的方法,所述方法包括向受试者施用本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物。在实施方案中,所述方法进一步包括施用检查点抑制剂。在实施方案中,检查点抑制剂是CTLA-4、PD-1、PD-L1和PD-L2抑制剂。

[0060] 在实施方案中,本文公开的方法进一步包括施用LAG3、TIGIT、LAP、Podoplanin、蛋白C受体、ICOS、GITR、CD226和/或CD160的抑制剂中的一种或多种。在实施方案中,本文公开的方法进一步包括施用TIM-3抑制剂。在实施方案中,另外的抑制剂与抗体或抗原结合片段或药物组合物同时或连续施用。在实施方案中,另外的抑制剂单独施用或作为与本文公开的抗体或其抗原结合片段的混合物施用。

[0061] 提供了治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用本文公开的抗体或其抗原结合片段或本文公开的药物组合物,其中所述受试者对使用检查点抑制剂疗法的疗法具有获得性抗性。在实施方案中,所述受试者对用PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂或CTLA-4抑制剂中的一种或多种的疗法具有获得性抗性。

附图说明

[0062] 图1例示了亲和力成熟文库设计。CDR (如由Kabat定义) 带有下划线。X=靶向诱变的位置。单个位置可含有全部20种氨基酸或其子集。用于诱变的VH CDR3嵌段 (block) CTRGLYYGPAWFAYW (SEQ ID NO:25)。用于诱变的VL CDR3嵌段CQQHYSTPWTF (SEQ ID NO:26)。

[0063] 图2例示了来自periprep结合一级筛选的示例性数据。表示了亲本人源化scFv、无关scFv和仅有培养基的孔。具有至少50%抑制的克隆以箭头表示。

[0064] 图3A、3B、3C、3D和3E示出了在三个浓度 (1.67 μ g/ml、0.062 μ g/ml和0.0069 μ g/ml) 下, 亲本抗体、十二种先导变体 (图3A、3B、3C和3D) 和泛CEACAM抗体D14HD11 (图3E) 结合CEACAM-1/-3/-5和-6 (从左到右) 的交叉反应性ELISA的结果。

[0065] 图4A和4B例示了如通过单循环表面等离子共振确定的抗体He14/L1的特异性。示出了浓度增加 (70至280nM) 的抗体He14/L1 (图4A) 或对照抗体CH14D11 (图4B) 结合hCEACAM1、hCEACAM3、hCEACAM5和hCEACAM6的结合传感图。RU, 共振单位。

[0066] 图5A、5B、5C、5D和5E示出了CEACAM1:He14/L1 Fab复合物的结构。图5A. 具有Fab重链和轻链的复合物 (L、H和C链) 的结构绘制为 α 迹线, 并且抗原绘制为条带。图5B. 复合物中的CEACAM1分子叠加在二聚体中的CEACAM1分子上。股线以粗体标记为A至G。图5C. 示出表位的复合CEACAM1的视图。绘制的分子表面以半透明的浅灰色绘制, 蛋白质骨架绘制为条带, 并且相关侧链绘制为棒状并进行标记。标出了与Fab相互作用的表面区域。图5D. He14/L1与CEACAM1 GFCC'面的整体结合。图5E. He14L1特异性地对接在CEACAM1的两个面上, 并且可能破坏更高阶的CEACAM1结构。除了可能与更高阶结构相关的C'C"DE面之外, GFCC'面是主要的相互作用面。

[0067] 图6例示了所示的CEACAM1抗体VH2/V κ 4 (亲本/亲本)、VH2/L1 (亲本/L1)、He3/L20、He17/L1和He14/L1阻断人CEACAM:人TIM-3相互作用。IgG4=对照抗体。

[0068] 图7示出了T细胞功能体外测定 (增殖测定) 的结果。Ki67表达表示在对派姆单抗 (pembrolizumab) 治疗有抗性的受试者中应答于CEACAM1抗体He3/L20、He14/L1、H17/L1和VH2/L1 (亲本/L1) 的T细胞增殖。

[0069] 图8A和8B示出, 与对照抗体 (图8B) 相比, 用抗体He14/L1处理 (图8A) 导致B细胞 (从164个细胞至347个细胞) 和T细胞 (从394个细胞至913个细胞) 在42小时内扩增, 这表示He14/L1引起B细胞和T细胞的广泛诱导, 这些应答对抗肿瘤活性很重要。

[0070] 图9A、9B和9C例示了由衍生自亲本抗体 (包括He14/L1) 的抗体识别的表位的CEACAM1表达与治疗抗性相关。图9A. 通过Citrus分析鉴定的代表前浆母细胞B细胞的元簇 (通过Citrus C36175、C36194鉴定的元簇) 的CEACAM1表达显示与原初 (N) 肿瘤样品相比, 治疗抗性与针对抗性 (R) 的CEACAM1表达增加相关。CEACAM1表达的中位水平通过ANOVA确定。*, $p < 0.05$ 。图9B. 代表肿瘤相关单核细胞的元簇的CEACAM1表达显示与通过Citrus (C58750、C58749、C58832、C58843、C58885、C58888) 鉴定的元簇中的原初 (N) 肿瘤样品相比, 治疗抗性与针对抗性 (R) 的CEACAM1表达增加相关。CEACAM1表达的中位水平通过ANOVA确定。*, $p < 0.05$ 以及**, $p < 0.01$ 显著性。图9C. 代表功能失调的CD8⁺中央记忆T细胞的元簇的CEACAM1表达显示与通过Citrus (C58736、C58786、C58789) 鉴定的元簇中的原初 (N) 肿瘤样品相比, 治疗抗性与针对抗性 (R) 的CEACAM1表达增加相关。CEACAM1表达的中位水平通过ANOVA确定。*, $p < 0.05$ 显著性。

具体实施方式

[0071] 抗体

[0072] 术语“抗体”以最广泛的含义使用,并且包括单克隆抗体(包括全长或完整的单克隆抗体)、多克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、抗体片段及其抗原结合部分(例如互补位、CDR),只要它们表现出所需的生物活性和特异性即可。

[0073] 如本文所用,“抗体可变结构域”是指包括互补决定区(CDR;即,CDR1、CDR2和CDR3)和框架区(FR)的氨基酸序列的抗体分子的轻链和重链的部分。 V_H 指重链的可变结构域。 V_L 指轻链的可变结构域。指定给CDR和FR的氨基酸位置可以根据Kabat或根据Chothia定义。术语“框架区”(FR)是指除CDR残基以外的那些可变结构域残基。

[0074] 如本文所用,术语“互补决定区”(CDR)是指(通常)参与抗原结合的抗体可变结构域的部分。每个可变结构域通常具有鉴定为CDR1、CDR2和CDR3的三个CDR区。每个CDR可包含来自如例如Kabat定义的CDR的氨基酸残基(即,轻链可变结构域中约残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)以及重链可变结构域中约残基31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987,1991))。每个CDR还可包含来自“高变环”的氨基酸残基(即,轻链可变结构域中约残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)以及重链可变结构域中约残基26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)(Chothia和Lesk 196J.Mol.Biol.901(1987))。在一些情况下,CDR可包含来自根据Kabat定义的CDR区和高变环的氨基酸。Kabat残基名称不总是直接对应于氨基酸残基的线性编号(一级氨基酸序列)。实际的线性氨基酸序列可以含有比严格的Kabat编号中更少或另外的氨基酸,对应于基本可变结构域结构的结构组分(无论是框架还是CDR)的缩短或插入。对于给定的抗体或其抗原结合片段,可以通过将抗体或其抗原结合片段序列中的同源残基与“标准”Kabat编号序列进行比对来确定正确的残基的Kabat编号。可替代地,CDR可根据ImMunoGeneTics(IMG)系统定义(Lefranc,M.-P.等人,Dev.Comp.Immunol.,27,55-77(2003))。

[0075] 在一个实施方案中,本文提供的CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含含有三个CDR的可变重链,其中:

[0076] (i) CDR1H的序列包含序列DYYLY(SEQ ID NO:1);

[0077] (ii) CDR2H的序列包含序列TISVGGGQTSYADSVKG(SEQ ID NO:2);

[0078] (iii) CDR3H的序列包含序列GLYYGPSWVAY(SEQ ID NO:3)、ARTYGPWFAY(SEQ ID NO:4)或ALTYGPAWLAY(SEQ ID NO:5)。

[0079] 在一个实施方案中,本文提供的CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含含有三个CDR的可变重链,其中:

[0080] (i) CDR1H的序列包含序列DYYLY(SEQ ID NO:1);

[0081] (ii) CDR2H的序列包含序列TISVGGGQTSYADSVKG(SEQ ID NO:2);并且

[0082] (iii) CDR3H的序列包含序列GLYYGPSWVAY(SEQ ID NO:3)。

[0083] 在一个实施方案中,本文提供的CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含含有三个CDR的可变重链,其中:

[0084] (i) CDR1H的序列包含序列DYYLY(SEQ ID NO:1);

[0085] (ii) CDR2H的序列包含序列TISVGGGQTSYADSVKG(SEQ ID NO:2);并且

[0086] (iii) CDR3H的序列包含序列ARTYGPWFAY (SEQ ID NO:4)。

[0087] 在一个实施方案中,本文提供的CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含含有三个CDR的可变重链,其中:

[0088] (i) CDR1H的序列包含序列DYYLY (SEQ ID NO:1);

[0089] (ii) CDR2H的序列包含序列TISVGGGQTSYADSVKG (SEQ ID NO:2);并且

[0090] (iii) CDR3H的序列包含序列ALTYGPAWLAY (SEQ ID NO:5)。

[0091] 在一个实施方案中,本文提供的CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含含有三个CDR的可变轻链,其中:

[0092] (i) CDR1L的序列包含序列KSSQSLNLSANQKNYLA (SEQ ID NO:6);

[0093] (ii) CDR2L的序列包含序列FASTRES (SEQ ID NO:7);并且

[0094] (iii) CDR3L的序列包含序列QSHYPFYIT (SEQ ID NO:8) 或QSHFPYPLT (SEQ ID NO:9)。

[0095] 在一个实施方案中,本文提供的CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含含有三个CDR的可变轻链,其中:

[0096] (i) CDR1L的序列包含序列KSSQSLNLSANQKNYLA (SEQ ID NO:6);

[0097] (ii) CDR2L的序列包含序列FASTRES (SEQ ID NO:7);并且

[0098] (iii) CDR3L的序列包含序列QSHYPFYIT (SEQ ID NO:8)。

[0099] 在一个实施方案中,本文提供的CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含含有三个CDR的可变轻链,其中:

[0100] (i) CDR1L的序列包含序列KSSQSLNLSANQKNYLA (SEQ ID NO:6);

[0101] (ii) CDR2L的序列包含序列FASTRES (SEQ ID NO:7);并且

[0102] (iii) CDR3L的序列包含序列QSHFPYPLT (SEQ ID NO:9)。

[0103] 在一个实施方案中,本文提供的CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含六个CDR,其中:

[0104] (i) CDR1H的序列包含序列DYYLY (SEQ ID NO:1);

[0105] (ii) CDR2H的序列包含序列TISVGGGQTSYADSVKG (SEQ ID NO:2);

[0106] (iii) CDR3H的序列包含序列GLYYGPSWVAY (SEQ ID NO:3)、ARTYGPWFAY (SEQ ID NO:4) 或ALTYGPAWLAY (SEQ ID NO:5);

[0107] (iv) CDR1L的序列包含序列KSSQSLNLSANQKNYLA (SEQ ID NO:6);

[0108] (v) CDR2L的序列包含序列FASTRES (SEQ ID NO:7);并且

[0109] (vi) CDR3L的序列包含序列QSHYPFYIT (SEQ ID NO:8) 或QSHFPYPLT (SEQ ID NO:9)。

[0110] 在一个实施方案中,本文提供的CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含六个CDR,其中:

[0111] (i) CDR1H的序列包含序列DYYLY (SEQ ID NO:1);

[0112] (ii) CDR2H的序列包含序列TISVGGGQTSYADSVKG (SEQ ID NO:2);

[0113] (iii) CDR3H的序列包含序列GLYYGPSWVAY (SEQ ID NO:3);

[0114] (iv) CDR1L的序列包含序列KSSQSLNLSANQKNYLA (SEQ ID NO:6);

[0115] (v) CDR2L的序列包含序列FASTRES (SEQ ID NO:7);并且

[0116] (vi) CDR3L的序列包含序列QSHYPFYIT (SEQ ID NO:8)。

[0117] 根据某些实施方案,所考虑的抗体及其抗原结合片段还以用于减少免疫原性的人源化框架为特征。在某些实施方案中,所考虑的抗体或其抗原结合片段的CDR位于从人抗体或其抗原结合片段获得的框架中。在其他实施方案中,所考虑的抗体或其抗原结合片段的表面暴露的框架残基被人抗体或其抗原结合片段的框架残基替换。CDR也可位于与人恒定区连接的鼠或人源化框架中(即嵌合抗体)。在一个优选的实施方案中,所考虑的抗体或其抗原结合片段的CDR位于作为两种或更多种人抗体的复合物的框架中。在此类实施方案中,所考虑的抗体或其抗原结合片段包含两个或更多个序列区段(“复合物”),所述序列区段衍生自无关人抗体的V区,所述V区经选择以维持对于起始前体抗人CEACAM1单克隆抗体的抗原结合重要的单克隆抗体序列,并且已经全部使用“计算机工具”(Holgate和Baker, IDrugs. 2009年四月;12(4):233-7)针对潜在T细胞表位的存在进行过滤。人序列区段与起始抗体V区的所有部分的紧密配合以及在合成抗体或其抗原结合片段之前消除CD4⁺T细胞表位允许此技术避开免疫原性,同时通过先前分析抗原特异性所必需的序列来维持最佳亲和力和特异性(Holgate和Baker, 2009)。

[0118] 本文还提供了包含与SEQ ID NO:10-22中公开的可变重链和可变轻链及其配对相似但不同一的序列的可变重链序列和可变轻链序列及其配对。

[0119] 在一个实施方案中,所述CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含与选自由SEQ ID NO:10-17组成的组的序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中,所述CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含与选自由SEQ ID NO:15-17组成的组的序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。

[0120] 在一些实施方案中,所述CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含选自由SEQ ID NO:10-17组成的组的可变重链氨基酸序列。在一些实施方案中,所述CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含选自由SEQ ID NO:15-17组成的组的可变重链氨基酸序列。

[0121] 在一个实施方案中,所述CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含与选自由SEQ ID NO:18-22组成的组的序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。

[0122] 在一个实施方案中,所述CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。

[0123] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含选自由SEQ ID NO:18-22组成的组的可变轻链氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22的可变轻链氨基酸序列。

[0124] 在一个实施方案中,所述CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含

[0125] (i) 重链可变结构域,所述重链可变结构域包含与选自由SEQ ID NO:10-17组成的组的序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;和

[0126] (ii) 轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含与选自由SEQ ID NO:18-22组成

的组的序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。

[0127] 在一个实施方案中,所述CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含

[0128] (i) 重链可变结构域,所述重链可变结构域包含与选自由SEQ ID NO:15-17组成的组的序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;和

[0129] (ii) 轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。

[0130] 在一个实施方案中,所述CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含

[0131] (i) 重链可变结构域,所述重链可变结构域包含选自由SEQ ID NO:10-17组成的组的序列;和/或

[0132] (ii) 轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含选自由SEQ ID NO:18-22组成的组的序列。

[0133] 在一个实施方案中,所述CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含

[0134] (i) 重链可变结构域,所述重链可变结构域包含选自由SEQ ID NO:15-17组成的组的序列;和/或

[0135] (ii) 轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22。

[0136] 在一个实施方案中,所述CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含

[0137] (i) 重链可变结构域,所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:15至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;和

[0138] (ii) 轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:21至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。

[0139] 在一个实施方案中,所述CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含

[0140] (i) 重链可变结构域,所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:15;和

[0141] (ii) 轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:21。

[0142] 在一个实施方案中,所述CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含

[0143] (i) 重链可变结构域,所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:16至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;和

[0144] (ii) 轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:21至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。

[0145] 在一个实施方案中,所述CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含

[0146] (i) 重链可变结构域,所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:16;和

[0147] (ii) 轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:21。

[0148] 在一个实施方案中,所述CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含

[0149] (i) 重链可变结构域,所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:17至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;和

[0150] (ii) 轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:22至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。

[0151] 在一个实施方案中,所述CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含

[0152] (i) 重链可变结构域,所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:17;和

[0153] (ii) 轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:22。

[0154] 如本文所用,术语“同一性”是指两个核酸分子或多肽之间的序列同一性。同一性可以通过比较出于比较目的而进行比对的每个序列中的位置来确定。例如,当比较的核苷酸序列中的位置被相同的碱基占据时,那么所述分子在该位置是相同的。核酸或氨基酸序列之间的同一性程度是共享位置处的相同或匹配核苷酸或氨基酸的数目的函数。例如,考虑与本文所述的特定多肽具有至少85%、90%、95%、98%或99%同一性且优选表现出基本相同功能的多肽,以及编码此类多肽的多核苷酸。用于确定序列同一性和相似性的方法和计算机程序是可公开获得的,包括但不限于GCG程序包(Devereux等人,Nucleic Acids Research 12:387,1984)、BLASTP、BLASTN、FASTA(Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403(1990)和ALIGN程序(2.0版)。众所周知的Smith Waterman算法也可用于确定相似性。BLAST程序可从NCBI和其他来源公开获得(BLAST Manual,Altschul,等人,NCBI NLM NIH, Bethesda,Md.20894;BLAST 2.0网址<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)。在比较序列时,这些方法考虑了各种取代、缺失和其他修饰。

[0155] 在一个实施方案中,提供的CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含

[0156] (i) 重链可变结构域,所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:15的重链可变结构域序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0157] (ii) 轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:21的重链可变结构域序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;和

[0158] (iii) 六个CDR,其中:

[0159] a. 重链可变区的CDR1序列包含SEQ ID NO:1;

[0160] b. 重链可变区的CDR2序列包含SEQ ID NO:2;

[0161] c. 重链可变区的CDR3序列包含SEQ ID NO:3;

[0162] d. 轻链可变区的CDR1序列包含SEQ ID NO:6;

[0163] e. 轻链可变区的CDR2序列包含SEQ ID NO:7;并且

[0164] f. 轻链可变区的CDR3序列包含SEQ ID NO:8。

[0165] 在一个实施方案中,提供的CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含

[0166] (i) 重链可变结构域,所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:16的重链可变结构域序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0167] (ii) 轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:21的重链可变结构域序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;和

[0168] (iii) 六个CDR,其中:

[0169] a. 重链可变区的CDR1序列包含SEQ ID NO:1;

[0170] b. 重链可变区的CDR2序列包含SEQ ID NO:2;

- [0171] c.重链可变区的CDR3序列包含SEQ ID NO:4;
- [0172] d.轻链可变区的CDR1序列包含SEQ ID NO:6;
- [0173] e.轻链可变区的CDR2序列包含SEQ ID NO:7;并且
- [0174] f.轻链可变区的CDR3序列包含SEQ ID NO:8。
- [0175] 在一个实施方案中,提供的CEACAM1抗体或其抗原结合片段包含
- [0176] (i)重链可变结构域,所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:17的重链可变结构域序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;
- [0177] (ii)轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:22的重链可变结构域序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;和
- [0178] (iii)六个CDR,其中:
- [0179] a.重链可变区的CDR1序列包含SEQ ID NO:1;
- [0180] b.重链可变区的CDR2序列包含SEQ ID NO:2;
- [0181] c.重链可变区的CDR3序列包含SEQ ID NO:5;
- [0182] d.轻链可变区的CDR1序列包含SEQ ID NO:6;
- [0183] e.轻链可变区的CDR2序列包含SEQ ID NO:7;并且
- [0184] f.轻链可变区的CDR3序列包含SEQ ID NO:9。
- [0185] 显然,本文所述的任何框架都可与本文所述的任何CDR和CDR基序组合使用。在一些实施方案中,所述CEACAM1抗体或其抗原结合片段使用了表4中所述的框架。
- [0186] 在本文所述方面的一些实施方案中,考虑了结合本文所述CEACAM1的抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列修饰。抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列变体通过向编码抗体或其抗原结合片段的核酸中引入适当的核苷酸变化或通过肽合成来制备。此类修饰包括,例如,抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列中残基的缺失和/或插入和/或取代。进行缺失、插入和取代的任何组合以得到最终构建体,条件是最终构建体具有所需的特征,例如结合特异性、生物活性的抑制。
- [0187] 一种类型的变体是保守氨基酸取代变体。这些变体在抗体或其抗原结合片段中至少一个氨基酸残基被具有相似侧链特性的不同残基替换。氨基酸可根据其侧链特性的相似性进行分组(参见Lehninger, BIOCHEMISTRY(第2版,Worth Publishers,New York,1975): (1)非极性:Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M);(2)不带电荷极性:Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q);(3)酸性:Asp(D)、Glu(E);(4)碱性:Lys(K)、Arg(R)、His(H)。
- [0188] 因此,保守氨基酸取代的非限制性实例是非极性氨基酸被另一种非极性氨基酸替换。
- [0189] 可替代地,可以基于共同的侧链特性将天然存在的残基进行分组:
- [0190] (1)疏水性:Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Met(M);
- [0191] (2)中性亲水性:Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Asn(N)、Gln(Q);
- [0192] (3)酸性:Asp(D)、Glu(E);
- [0193] (4)碱性:Lys(K)、Arg(R)、His(H);

[0194] (5) 影响链取向的残基:Gly(G)、Pro(P);

[0195] (6) 芳族:Phe(F)、Trp(W)、Tyr(Y)。

[0196] 因此,保守氨基酸取代的非限制性实例是疏水性氨基酸被另一种疏水性氨基酸替换。

[0197] 还考虑氨基酸序列插入,其可以包括长度范围从一个残基到含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰残基的抗体或其抗原结合片段或者与细胞毒性多肽融合的抗体或其抗原结合片段。抗体或其抗原结合片段的其他插入变体包括将抗体或其抗原结合片段的N或C末端与增加抗体或其抗原结合片段的血清半衰期的酶或多肽(例如生物素)融合。

[0198] 不参与维持结合CEACAM1的抗体或其抗原结合片段的正确构象的任何半胱氨酸残基也可以被取代,例如被丝氨酸或丙氨酸取代,以改善分子的氧化稳定性并防止异常交联。

[0199] 相反地,可以将半胱氨酸键添加到抗体或其抗原结合片段以提高其稳定性(特别是在抗体或其抗原结合片段是抗体片段诸如Fv片段的情况下)。

[0200] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段具有改变抗体或其抗原结合片段的原始糖基化模式的氨基酸改变。“改变原始糖基化模式”意指缺失抗体或其抗原结合片段中存在的一个或多个碳水化合物部分,和/或添加抗体或其抗原结合片段中不存在的一个或多个糖基化位点。抗体的糖基化通常是N-连接的或O-连接的。N-连接的是指碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链的连接。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除脯氨酸以外的任何氨基酸)是碳水化合物部分与天冬酰胺侧链酶促连接的识别序列。因此,这些三肽序列中的任一个在多肽中的存在产生了潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化是指糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一种与羟基氨基酸的连接,所述羟基氨基酸最常见的是丝氨酸或苏氨酸,尽管也可以使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。将糖基化位点添加到结合CEACAM1的抗体或其抗原结合片段是通过改变氨基酸序列以使其含有上述三肽序列中的一个或多个来实现的(对于N-连接的糖基化位点)。所述改变也可以通过在原始抗体或其抗原结合片段的序列中添加或取代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行(对于O-连接的糖基化位点)。

[0201] 在一些实施方案中,本文提供的CEACAM1抗体或其抗原结合片段是去糖基化的或非糖基化的。在一些实施方案中,所考虑的CEACAM1抗体或其抗原结合片段在重链中缺少C末端赖氨酸和/或在重链的恒定区中含有S241P取代。在一些实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段在可变轻链的CDR1中缺少糖基化位点。在一些实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段在可变轻链的CDR1中缺少N-X-S/T共有序列。在一些实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段在可变轻链的CDR1的CDR残基26和/或29(Kabat编号)中具有突变。当抗体或其抗原结合片段包含Fc区时,可改变与其连接的碳水化合物。例如,描述了具有成熟碳水化合物结构的抗体,其缺少连接到抗体或其抗原结合片段的Fc区的岩藻糖。参见,例如,美国专利公开号2003/0157108;2004/0093621。在WO 03/011878;美国专利号6,602,684中引用了在连接到抗体或其抗原结合片段的Fc区的碳水化合物中具有二等分N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)的抗体。在WO 97/30087中报道了在连接到抗体或其抗原结合片段的Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体。还参见WO 98/58964;WO 99/22764,其涉及具有连接

到其Fc区的改变的碳水化合物的抗体。

[0202] 在一些实施方案中,可能需要在效应子功能方面修饰本文所述的结合CEACAM1的抗体或其抗原结合片段,例如以增强抗体或其抗原结合片段的抗原依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。这可以通过在抗体或其抗原结合片段的Fc区中引入一个或多个氨基酸取代来实现。可替代地或另外地,可以在Fc区中引入一个或多个半胱氨酸残基,从而允许在此区域中形成链间二硫键。由此产生的同源二聚抗体或其抗原结合片段可具有改善的内化能力和/或增加的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。参见Caron等人,176J. Exp. Med. 1191 (1992); Shopes, 148J. Immunol. 2918 (1992)。如Wolff等人,53Cancer Res. 2560 (1993)所述,也可以使用异双功能交联剂制备具有增强的抗肿瘤活性的同源二聚抗体。可替代地,具有双Fc区的抗体或其抗原结合片段可以被工程化,并因此可以具有增强的补体裂解和ADCC能力。参见Stevenson等人,3Anti-Cancer Drug Design 219 (1989)。

[0203] 在一些实施方案中,本文公开的抗体或其抗原结合片段被修饰以表现出效应功能减少或消除。这可例如通过以下实现:(i)减少或消除抗体的野生型哺乳动物糖基化(例如,通过在不能发生此类糖基化的环境中产生抗体、通过突变一个或多个碳水化合物连接点使得抗体不能被糖基化,或者通过在抗体被糖基化后以化学或酶促方式从抗体中去除一个或多个碳水化合物);(ii)通过减少或消除抗体的Fc受体结合能力(例如,通过突变Fc区、通过在Fc区内缺失或消除Fc区);或(iii)通过利用已知具有最小效应功能或没有效应功能的抗体同种型(即包括但不限于IgG4)。在一些实施方案中,重链恒定区具有一个或多个以下突变:S228P;N297Q;和T299A(根据Kabat编号)。在一些实施方案中,重链恒定区具有一个或多个以下突变:L234A、L235A和P329G(Kabat EU索引编号)。

[0204] 例如,WO 00/42072描述了在人效应细胞存在下具有改善的ADCC功能的抗体,其中所述抗体在其Fc区中包含氨基酸取代。优选地,具有改善的ADCC的抗体或其抗原结合片段在Fc区的位置298、333和/或334处包含取代(残基的Eu编号)。通常,改变的Fc区是包含在这些位置中的一个、两个或三个处的取代或由其组成的人IgG1 Fc区。此类取代任选地与增加C1q结合和/或CDC的取代组合。取代包括IgG1 Fc中的Asn297Ala突变。

[0205] 具有改变的C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)的抗体描述于WO 99/51642,美国专利号6,194,551、6,242,195、6,528,624和6,538,124中。抗体在其Fc区的氨基酸位置270、322、326、327、329、313、333和/或334中的一个或多个处包含氨基酸取代(残基的Eu编号)。

[0206] 在WO 00/42072和美国专利公开号2005/0014934中描述了具有改善的与新生儿Fc受体(FcRn)的结合和增加的半衰期的抗体。这些抗体包含其中具有一个或多个取代的Fc区,所述取代改善Fc区与CEACAM1的结合。例如,Fc区可在位置238、250、256、265、272、286、303、305、307、311、312、314、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、428或434中的一个或多个处具有取代(残基的Eu编号)。具有改善的CEACAM1结合的包含优选Fc区的抗体变体在其Fc区的307、380和434位中的一个、两个或三个处包含氨基酸取代(残基的Eu编号)。在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段具有307/434个突变。还考虑了具有三个或更多个(例如,四个)功能性抗原结合位点的结合CEACAM1的工程化抗体。参见例如美国专利公开号US2002/0004587。

[0207] 抗体片段和类型

[0208] 在本文所述方面的一些实施方案中,CEACAM1抗体片段是Fab片段,其包含轻链的可变(V_L)和恒定(C_L)结构域以及重链的可变结构域(V_H)和第一恒定结构域(C_{H1})或基本上由其组成。

[0209] 在本文所述方面的一些实施方案中,CEACAM1抗体片段是Fab'片段,其是指在 C_{H1} 结构域的C末端具有一个或多个半胱氨酸残基的Fab片段。

[0210] 在本文所述方面的一些实施方案中,CEACAM1抗体片段是包含 V_H 和 C_{H1} 结构域或基本上由其组成的Fd片段。

[0211] 在本文所述方面的一些实施方案中,CEACAM1抗体部分是包含 V_H 和 C_{H1} 结构域以及在 C_{H1} 结构域的C末端的一个或多个半胱氨酸残基的Fd'片段。

[0212] 单链Fv或scFv抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域或基本上由其组成,使得这些结构域存在于单个多肽链中。通常,Fv多肽在 V_H 与 V_L 结构域之间还包含多肽接头,其允许scFv形成用于抗原结合的所需结构。参见,例如,Pluckthun,113Pharmacology Monoclonal Antibodies 269(Rosenburg和Moore,编,Springer-Verlag,New York,1994)。因此,在本文所述方面的一些实施方案中,CEACAM1抗体片段是包含抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域或基本上由其组成的Fv片段。

[0213] 在本文所述方面的一些实施方案中,CEACAM1抗体部分是包含两个抗原结合位点的双抗体,其在同一多肽链中包含连接到轻链可变结构域(V_L)的重链可变结构域(V_H)。

[0214] 在本文所述方面的一些实施方案中,CEACAM1抗体部分是包含 V_H 结构域或基本上由其组成的dAb片段。

[0215] 在本文所述方面的一些实施方案中,CEACAM1抗体部分是F(ab')₂片段,其包含二价片段,所述二价片段包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab'片段。

[0216] 线性抗体是指如Zapata等人,Protein Engin.,8(10):1057-1062(1995)中所述的抗体。简而言之,这些抗体包含一对串联的Fd区段($V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$),其与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性或单特异性的。在本文所述方面的一些实施方案中,CEACAM1抗体片段是包含一对串联Fd片段($V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$)的线性抗体,所述串联Fd片段与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区。

[0217] 已经开发了多种技术,并可将其用于产生抗体片段。传统上,这些片段通过完整抗体的蛋白水解消化获得。参见,例如,Morimoto等人,24J.Biochem.Biophys.Meths.107(1992);Brennan等人,229Science 81(1985)。然而,这些片段现在可以直接由重组宿主细胞产生。例如,可以从本文讨论的抗体噬菌体文库中分离抗体片段。可替代地,Fab'-SH片段可以直接从大肠杆菌中回收并化学偶联以形成F(ab')₂片段(Carter等人,1992)。根据另一种方法,F(ab')₂片段可以直接从重组宿主细胞培养物中分离。制备抗体片段的其他技术对本领域技术人员来说是显而易见的。在其他实施方案中,选择的抗体片段是单链Fv片段(scFv)。参见例如WO 93/16185。

[0218] 在一个实施方案中,抗体是包含结合CEACAM1的互补区和结合PD-1的互补区的双特异性抗体。在一个实施方案中,抗体是包含结合CEACAM1的互补区和结合PD-L1的互补区的双特异性抗体。在一个实施方案中,抗体是包含结合CEACAM1的互补区和结合TIM-3的互补区的双特异性抗体。在一个实施方案中,抗体是包含结合CEACAM1的互补区和结合表皮生

长因子受体 (EGFR) 的互补区的双特异性抗体。在一个实施方案中, 抗体是包含结合CEACAM1的互补区和结合Fc γ 受体的互补区的双特异性抗体。

[0219] 所考虑的抗体或抗原结合片段可具有所有类型的恒定区, 包括IgM、IgG、IgD和IgE, 以及任何同种型, 包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在一个实施方案中, 使用人同种型IgG1。在另一个实施方案中, 使用人同种型IgG4。轻链恒定区可以是 λ 或 κ 。抗体或其抗原结合片段可包含来自一个以上类别或同种型的序列。

[0220] 本文还公开了结合CEACAM1的嵌合抗原受体T细胞 (CAR T细胞)。在一个实施方案中, 将本文公开的抗CEACAM抗体的一个或多个CDR移植到T细胞上的嵌合抗原受体 (CAR) 上。这种遗传修饰的T细胞利用CAR (也称为嵌合T细胞受体) 以人白细胞抗原非依赖性方式靶向在肿瘤细胞上表达的抗原。

[0221] 抗体结合

[0222] 人CEACAM1基因通过可变剪接产生11种同工型。每种同工型在蛋白质的氨基 (N) 末端具有一个可变 (V) 样Ig结构域。除CEACAM1-1L和CEACAM1-1S同工型外, 不同的同工型还具有2或3个恒定C2样Ig结构域。八种CEACAM1同工型通过跨膜结构域锚定到细胞膜, 并且三种CEACAM1同工型 (CEACAM1-4C1-3和-3C2) 缺少跨膜结构域并被分泌。两种同工型 (CEACAM1-3AL和-3AS) 在恒定C2样Ig结构域与跨膜结构域之间具有A1u家族重复序列 (A)。跨膜CEACAM1同工型还具有长 (L) 或短 (S) 胞质结构域, 这通过在信使中包括或排除CEACAM1外显子7来确定。CEACAM1 L胞质结构域具有两个ITIM基序, 这对于CEACAM家族成员中的CEACAM1是独特的。在一方面, 提供了CEACAM1抗体或其抗原结合片段, 包括本文通过其结构特征描述的抗体, 其在CEACAM1的蛋白质的氨基 (N) 末端 (N结构域) 处结合胞外可变 (V) 样Ig结构域, 即CEACAM1的所有同工型共有的结构域, 所述同工型包括CEACAM1同工型1L、1S、3L、3S、4L、4S、3A1、3AS、3、4C1和4C2。在一些实施方案中, 提供的抗体及其抗原结合片段结合人CEACAM1。在一些实施方案中, 提供的抗体及其抗原结合片段结合哺乳动物CEACAM1。CEACAM1的全长形式的序列 (NCBI参考序列NP_001703.2; UNIPROT ID P13688) 提供为SEQ ID NO:23 (信号序列: SEQ ID NO:23的残基1-34; Ig-V N结构域: SEQ ID NO:23的残基35-142。CEACAM1的成熟形式 (无信号序列) 提供为SEQ ID NO:24。

[0223] 如本文所用, 抗体或其抗原结合片段与CEACAM1、CEACAM1上的表位或在下述某些实施方案中CEACAM1上的特定残基的“结合”包括所述抗体或其抗原结合片段与CEACAM1的选择性相互作用。因此, 结合包括例如主要和次要相互作用, 包括氢键、离子相互作用、盐桥以及亲水和疏水相互作用。

[0224] 在某些实施方案中, 本文所述的CEACAM1抗体或其抗原结合片段以 10^{-5} 至 10^{-12} mol/1、 10^{-6} 至 10^{-12} mol/1、 10^{-6} 至 10^{-9} mol/1、 10^{-7} 至 10^{-12} mol/1、 10^{-8} 至 10^{-12} mol/1、 10^{-9} 至 10^{-12} mol/1、 10^{-10} 至 10^{-12} mol/1或 10^{-11} 至 10^{-12} mol/1的 K_D 结合CEACAM1。在其他实施方案中, 本文所述的CEACAM1抗体或其抗原结合片段以 10^{-5} 至 10^{-11} mol/1、 10^{-6} 至 10^{-11} mol/1、 10^{-7} 至 10^{-11} mol/1、 10^{-8} 至 10^{-11} mol/1、 10^{-9} 至 10^{-11} mol/1或 10^{-10} 至 10^{-11} mol/1的 K_D 结合CEACAM1。在其他实施方案中, 本文所述的CEACAM1抗体或其抗原结合片段以 10^{-5} 至 10^{-10} mol/1、 10^{-6} 至 10^{-10} mol/1、 10^{-7} 至 10^{-10} mol/1、 10^{-8} 至 10^{-10} mol/1或 10^{-9} 至 10^{-10} mol/1的 K_D 结合CEACAM1。在其他实施方案中, 本文所述的CEACAM1抗体或其抗原结合片段以 10^{-5} 至 10^{-8} mol/1、 10^{-6} 至 10^{-8} mol/1或 10^{-7} 至 10^{-8} mol/1的 K_D 结合CEACAM1。

[0225] 本文中的术语“特异性”是指抗体或其抗原结合片段(诸如抗CEACAM1抗体或其抗原结合片段)识别CEACAM1内的表位的能力,而与CEACAM1的其他部分仅具有很少或没有可检测的反应性。特异性可通过竞争测定或通过本文所述的表位鉴定/表征技术或本领域已知的其等同物来相对测定。

[0226] 如本文所用,“表位”可由连续氨基酸或通过蛋白质的三级折叠并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而通过三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常在特定空间构象中包括至少3个,更通常至少5个、约9个或约8-10个氨基酸。“表位”包括常规由免疫球蛋白V_H/V_L对结合的结构单位。表位定义了抗体或其抗原结合片段的最小结合位点,并因此代表了抗体或其抗原结合片段的特异性靶标。在单结构域抗体的情况下,表位代表由分离的可变结构域结合的结构单位。

[0227] 在特定的实施方案中,所考虑的抗体或抗原结合片段特异性结合与抗体He14/L1相同的表位。

[0228] 在一方面,本发明提供了抗体和其抗原结合片段,包括本文通过其结构特征描述的抗体,其中所述抗体及其抗原结合片段特异性结合CEACAM1上的同嗜性结合结构域的至少一部分(即参与CEACAM1:CEACAM1同源二聚体形成的CEACAM1蛋白的部分),从而阻断CEACAM1同嗜性相互作用。参与同源二聚化的CEACAM1残基如表1所示。

[0229] 表1.在人CEACAM1野生型二聚体(PDB ID 4QXW)的晶体结构中观察到的相互作用。残基S32、Y34、Q44、Q89、N97和E99的侧链在GFCC'界面处形成氢键网络,其包括S32与L95、Q44与N97和E99与G41之间的另外的侧链与主链骨架相互作用,以及残基F29、V39和I91的疏水相互作用。

[0230]

相互作用编号	hCEACAM1 (A) 残基	hCEACAM1 (B) 残基
1	A:L95	B:S32
2	A:E99	B:G41
3	A:L95	B:Q44
4	A:Y34	B:Q89
5	A:Q89	B:Q89
6	A:Q44	B:N97
7	A:S32	B:N97
8	A:Y34	B:N97
9	A:Q89	B:N97
10	A:S32	B:L95
11	A:G41	B:E99
12	A:Q44	B:L95
13	A:Q89	B:Q89
14	A:Q89	B:Y34
15	A:N97	B:Q44
16	A:N97	B:S32
17	A:N97	B:Y34

[0231] 在一些实施方案中,CEACAM抗体或其抗原结合片段结合CEACAM1的GFCC'面中的残

基,诸如SEQ ID NO:24的F29、Y31、Q44、Y48、T56、Q89、D94、L95和/或N97。

[0232] 在一些实施方案中,CEACAM抗体或其抗原结合片段结合CEACAM1的ABED面中的残基,诸如SEQ ID NO:24的M7、E16、Q27、Y48、Q53、Y68或N70。

[0233] 如本文所用,“阻断”抗体或抗体“拮抗剂”是抑制或减少其结合的抗原的生物活性的抗体。例如,在一些实施方案中,CEACAM1拮抗剂抗体或其抗原结合片段结合CEACAM1并抑制CEACAM1的活性和/或CEACAM1与异源结合配偶体(诸如其他CEACAM蛋白或TIM-3)的结合。活性的抑制和结合的抑制包括部分抑制。本文描述了用于鉴定阻断CEACAM1同嗜性和异嗜性相互作用的CEACAM1抗体的方法,并且所述方法是本领域技术人员已知的。例如,可以使用本领域已知的任何合适的方法鉴定竞争抗体、交叉阻断抗体和被交叉阻断的抗体,所述方法包括竞争ELISA或BIACORE®测定,其中竞争抗体或交叉阻断抗体与人CEACAM1的结合阻止本文公开的抗体的结合,反之亦然。

[0234] 在某些实施方案中,并非所有的CDR都直接参与结合抗原。在一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段的六个CDR中的四个与抗原接触。在一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段的六个CDR中的五个与抗原接触。在一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段的六个CDR中的六个与抗原接触。

[0235] CEACAM家族成员在多种细胞类型(特别是白细胞)上广泛表达,从而影响细胞功能的强度。例如,CEACAM1在上皮细胞、内皮细胞、淋巴细胞和骨髓细胞上表达,CEACAM3在粒细胞和嗜中性粒细胞上表达,CEACAM5在上皮细胞上表达,并且CEACAM6在上皮细胞和粒细胞上表达。然而,CEACAM1的N结构域与CEACAM家族成员3、5和6的N结构域具有约90%相似性,使得难以选择性地靶向CEACAM1。

[0236] 尽管N结构域在CEACAM家族成员中高度相似,但在一些实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合片段,包括本文通过其结构特征描述的抗体,对CEACAM1具有选择性。通过选择性靶向CEACAM1,本发明的实施方案可避免不需要的干扰,例如CEACAM3的广泛激活功能。

[0237] 本文的术语“选择性的”和“选择性”是指抗体或其抗原结合片段(即,CEACAM1抗体或其抗原结合片段)对特定区域、靶标或肽的优先结合;所述区域、靶标或肽通常是CEACAM1中的区域或表位,而不是一种或多种其他生物分子,包括其他CEACAM家族成员。

[0238] 在一些实施方案中,所考虑的CEACAM1抗体或其抗原结合片段不表现出与CEACAM3、CEACAM5、CEACAM6和/或CEACAM8的显著结合。在一些实施方案中,所考虑的CEACAM1抗体或其抗原结合片段不表现出与CEACAM3、CEACAM5、CEACAM6和/或CEACAM8的可检测结合。在一些实施方案中,所考虑的CEACAM1抗体或其抗原结合片段与CEACAM1的结合亲和力是所考虑的CEACAM1抗体或其抗原结合片段与另一靶标或多肽的结合亲和力的至少10倍,诸如至少100倍、和至少1000倍、和至多10,000倍或更强。

[0239] 如本文所用,由抗原与抗原结合蛋白的解离的平衡常数(K_D)表示的“亲和力”是抗原决定簇与抗原结合蛋白(诸如抗体或其抗体片段)上的抗原结合位点之间的结合强度的量度。 K_D 值越小,抗原决定簇与抗原结合分子之间的结合强度越强。可替代地,亲和力也可以表示为亲和力常数(K_A),其为 $1/K_D$ 。如本领域技术人员所清楚的,亲和力可以以本身已知的方式确定,这取决于感兴趣的特定抗原。

[0240] 在一方面,本发明提供了抗体及其抗原结合片段,包括本文通过其结构特征描述

的抗体,其中所述抗体及其抗原结合片段特异性结合CEACAM1上的CEACAM家族的一个或多个其他成员结合位点的至少一部分,从而阻断CEACAM1与CEACAM家族的一个或多个其他成员的相互作用。这些CEACAM家族成员包括但不限于CEACAM5和CEACAM8 (Ramani等人, Anal. Biochem. Jan. 15, 2012; 420(2); 127-38; Scheffrahn等人, J. Immunol. May. 15, 2002; 168(10); 5139-46)。

[0241] 在一方面,本发明提供了抗体及其抗原结合片段,包括本文通过其结构特征描述的抗体,其中所述抗体及其抗原结合片段特异性结合CEACAM1上的TIM家族成员结合位点的至少一部分,从而阻断CEACAM1与TIM家族成员的相互作用。在一些实施方案中,此TIM家族成员是TIM-1、TIM-3或TIM-4。在一些实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段特异性结合SEQ ID NO:17的CEACAM1残基Y34、G41、N42、Q44、Q89、S93、D94、V96和/或N97中的一个或多个,所述残基已表示参与CEACAM1结合TIM-3 (Huang等人, Nature. 2015 Jan 15; 517(7534): 386-90)。

[0242] 在一方面,本发明提供了抗体及其抗原结合片段,包括本文通过其结构特征描述的抗体,其中所述抗体及其抗原结合片段特异性结合CEACAM1上的病原体结合位点的至少一部分,从而阻断CEACAM1与病原体之间的相互作用。

[0243] 在一方面,本发明提供了抗体及其抗原结合片段,包括本文通过其结构特征描述的抗体,其中所述抗体及其抗原结合片段特异性结合CEACAM1上的细菌粘附表面蛋白(粘附素)结合位点的至少一部分,从而阻断CEACAM1与粘附素之间的相互作用。在某些实施方案中,粘附素在结合CEACAM1的致病菌的表面上表达,所述致病菌包括但不限于大肠杆菌,特别是扩散性粘附大肠杆菌(DAEC)、淋病奈瑟氏球菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、共生奈瑟氏球菌(commensal Neisseria)、卡他莫拉氏菌、流感嗜血杆菌、埃及嗜血杆菌、幽门螺杆菌、梭杆菌属、沙门氏菌属和/或无乳链球菌。在一个实施方案中,黏附素是来自无乳链球菌的 β 蛋白。

[0244] 在一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏了CEACAM1与无乳链球菌(B组链球菌)之间的相互作用。在一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏了CEACAM1与来自无乳链球菌的 β 蛋白之间的相互作用。在来自无乳链球菌的 β 蛋白的BIgI结构域和人CEACAM1的晶体结构中观察到的相互作用如表2所示。在一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏了表2中所示的一种或多种相互作用。

[0245] 表2. 来自无乳链球菌的 β 蛋白的BIgI结构域和人CEACAM1 (PDB ID 6V3P)的晶体结构中观察到的相互作用。

[0246]

相互作用	粘附素 (C) 残基	hCEACAM1 (B) 残基
1	C:PHE 41	B:SER 93
2	C:ASP 54	B:TYR 34
3	C:THR 58	B:LEU 95
4	C:TYR 60	B:ASP 94
5	C:VAL 52	B:GLN 44
6	C:ASP 54	B:GLY 41

[0247] 在一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏了CEACAM1与幽门螺杆菌表面上表达的HopQ之间的相互作用。在一个实施方案中,CEACAM1抗体或抗原结合片段特异

性结合CEACAM1残基F29、Y34、N42、Q89和N97中的一个或多个,所述残基已被预测参与CEACAM1结合HopQ。HopQ和hCEACAM1的晶体结构中观察到的相互作用如表3所示。在一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏了表3中所示的一种或多种相互作用。

[0248] 表3. 在HopQ和hCEACAM1 (PDB ID 6AW2) 的晶体结构中观察到的相互作用。

相互作用	HopQ (B)残基	hCEACAM1 (A)残基
1	B:SER 135	A:LEU 95
2	B:THR 136	A:LEU 95
3	B:THR 136	A:LEU 95
4	B:ASN 137	A:ASN 97
5	B:SER 138	A:ASN 97

相互作用	HopQ (B)残基	hCEACAM1 (A)残基
6	B:SER 138	A:ASN 97
7	B:ASN 145	A:VAL 39
8	B:THR 149	A:GLN 89
9	B:ALA 243	A:SER 93
10	B:THR 370	A:ASP 94
11	B:THR 149	A:GLN 44
12	B:ASN 145	A:GLN 89
13	B:SER 135	A:ASN 97
14	B:THR 136	A:ASN 97
15	B:SER 135	A:ASN 97

[0251] 在另一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏了CEACAM1与奈瑟氏球菌属表面上表达的混浊相关(Opa)粘附素蛋白之间的相互作用,所述混浊相关粘附素蛋白包括但不限于Opa₅₂、Opa₆₅、Opa₆₈、Opa₇₀、Opa₇₂、Opa₇₃、Opa₇₄和Opa₇₅。在一个实施方案中,CEACAM1抗体或抗原结合片段特异性结合CEACAM1残基Q44和A49中的一个或多个,这些残基已被预测参与CEACAM1与奈瑟氏球菌Opa蛋白的结合。

[0252] 在另一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏了CEACAM1与莫拉氏菌属表面上表达的Opa样蛋白O1pA之间的相互作用。

[0253] 在一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏了CEACAM1与流感嗜血杆菌OMP P1之间的相互作用。在一个实施方案中,CEACAM1抗体或抗原结合片段特异性结合CEACAM1残基Q44和A49中的一个或多个,所述残基已被预测参与CEACAM1结合流感嗜血杆菌OMP P1。

[0254] 在另一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏了CEACAM1与埃及嗜血杆菌OMP P1之间的相互作用。在一个实施方案中,CEACAM1抗体或抗原结合片段特异性结合CEACAM1残基F29,所述残基已被预测参与CEACAM1结合埃及嗜血杆菌OMP P1。

[0255] 在另一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏了CEACAM1与白色念珠菌之间的相互作用。

[0256] 在另一个实施方案中,本发明提供了使用本文所述的CEACAM1抗体或其抗原结合片段抑制CEACAM1与子线虫结合的方法,所述方法包括使CEACAM1与本文所述的CEACAM1抗体或其抗原结合片段接触。在一个实施方案中,子线虫是班氏吴策线虫。

[0257] 抗体缀合物

[0258] 在本文所述方面的一些实施方案中,结合CEACAM1的抗体或其抗原结合片段缀合至功能部分。可用的功能部分的实例包括但不限于阻断部分、可检测部分、诊断部分、靶向部分和治疗部分。

[0259] 示例性阻断部分包括具有足够空间位阻和/或电荷例如通过阻断糖苷酶糖基化抗体或其抗原结合片段的能力使得糖基化的发生降低的部分。另外地或可替代地,阻断部分可以例如通过抑制Fc区结合受体或补体蛋白的能力来降低效应子功能。优选的阻断部分包括半胱氨酸加合物和PEG部分。

[0260] 在一个优选的实施方案中,阻断部分是半胱氨酸,优选例如在细胞培养物中例如在含Fc的多肽翻译期间或之后与游离半胱氨酸缔合的半胱氨酸。其他阻断半胱氨酸加合物包括胱氨酸、混合二硫化物加合物或二硫键。

[0261] 在另一个优选的实施方案中,阻断部分是聚亚烷基二醇部分,例如PEG部分,并且优选PEG-马来酰亚胺部分。优选的聚乙二醇化部分(或相关聚合物)可以是例如聚乙二醇(“PEG”)、聚丙二醇(“PPG”)、聚氧乙烯化甘油(“POG”)和其他聚氧乙烯化多元醇、聚乙烯醇(“PVA”)和其他聚环氧烷、聚氧乙烯化山梨糖醇或聚氧乙烯化葡萄糖。聚合物可以是均聚物、无规或嵌段共聚物、基于以上列出的单体的三元共聚物,其为直链或支链的、取代或未取代的,只要它具有至少一个活性基部分即可。聚合物部分可具有任何长度或分子量,但这些特征会影响生物特性。在药物应用中特别可用于降低清除率的聚合物平均分子量在2,000至35,000道尔顿的范围内。此外,如果两个基团连接到聚合物,每个末端一个,则聚合物的长度可影响两个基团之间的有效距离和其他空间关系。因此,本领域技术人员可以改变聚合物的长度以优化或赋予所需的生物活性。出于若干原因,PEG可用于生物应用。PEG通常是透明的、无色的、无味的、可溶于水、对热稳定、对许多化学试剂呈惰性、不水解且无毒性。聚乙二醇化可以通过增加分子的表观分子量来改善分子的药代动力学性能。增加的表观分子量降低了皮下或全身施用后从体内的清除率。在许多情况下,聚乙二醇化可以降低抗原性和免疫原性。此外,聚乙二醇化可增加生物活性分子的溶解度。

[0262] 可用于本发明所考虑的方法和抗体及其抗原结合片段的可检测部分的实例包括荧光部分或标记、成像剂、放射性同位素部分、不透射线部分等,例如可检测标记,诸如生物素、荧光团、发色团、自旋共振探针或放射性标记。示例性荧光团包括荧光染料(例如荧光素、罗丹明(rhodamine)等)和其他发光分子(例如鲁米那(luminal))。荧光团可对环境敏感,使得如果其位于修饰蛋白质中的一个或多个残基附近,其荧光就会发生变化(在结合底物(例如丹磺酰探针)后经历结构变化)。示例性放射性标记包括含有具有一个或多个低灵敏度核(^{13}C 、 ^{15}N 、 ^2H 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{99}Tc 、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{111}In 等)的原子的小分子。其他可用的部分是本领域已知的。

[0263] 可用于本发明所考虑的方法和抗体及其抗原结合片段的诊断部分的实例包括适用于揭示疾病或病症存在的可检测部分。通常,诊断部分允许确定与疾病或病症相关的分子(例如靶肽、一种或多种蛋白质)的存在、不存在或水平。此类诊断还适用于预测和/或诊断疾病或病症及其进展。

[0264] 可用于本发明所考虑的方法和抗体及其抗原结合片段的治疗部分的实例包括,例如,抗炎剂、抗癌剂、抗神经变性剂或抗感染剂。功能部分也可具有上述功能中的一个或多个。

[0265] 示例性治疗部分包括具有高能电离辐射的放射性核素,其能够引起核DNA中的多链断裂,并因此适用于诱导(例如癌症的)细胞死亡。示例性高能放射性核素包括:⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、¹²³I、¹¹¹In、¹⁰⁵Rh、¹⁵³Sm、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re和¹⁸⁸Re。这些同位素通常产生具有短路径长度的高能 α 粒子或 β 粒子。此类放射性核素杀死与其紧邻的细胞,例如缀合物已连接或已进入的赘生性细胞。它们对非定位细胞的影响很小或没有影响,并且基本上是非免疫原性的。

[0266] 示例性治疗部分还包括细胞毒性剂,诸如细胞生长抑制剂(例如烷化剂、DNA合成抑制剂、DNA嵌入剂或交联剂,或DNA-RNA转录调节剂)、酶抑制剂、基因调节剂、细胞毒性核苷、微管蛋白结合剂、激素和激素拮抗剂、抗血管生成剂等。

[0267] 示例性治疗部分还包括烷化剂,诸如蒽环类药物家族(例如,阿霉素(adriamycin)、洋红霉素(carminomycin)、环孢菌素-A、氯喹、甲氨蝶呤、光神霉素(mithramycin)、泊非霉素(porfiromycin)、链黑霉素(streptonigrin)、蒽二酮和氮丙啶)。在另一个实施方案中,化疗部分是细胞生长抑制剂,诸如DNA合成抑制剂。DNA合成抑制剂的实例包括但不限于甲氨蝶呤和二氯甲氨蝶呤、3-氨基-1,2,4-苯并三嗪1,4-二氧化物、氨基蝶呤、胞嘧啶 β -D-阿拉伯呋喃糖苷、5-氟-5'-脱氧尿苷、5-氟尿嘧啶、更昔洛韦、羟基脲、放线菌素-D和丝裂霉素C。示例性DNA嵌入剂或交联剂包括但不限于博来霉素、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、顺二氯二氨基铂(II)(顺铂)、美法仑、米托蒽醌和奥沙利铂。

[0268] 示例性治疗部分还包括转录调节剂,诸如放线菌素D、柔红霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、高三尖杉酯碱(homoharringtonine)和伊达比星(idarubicin)。与本发明相容的其他示例性细胞生长抑制剂包括安莎霉素苯醌(ansamycin benzoquinone)、醌类衍生物(例如喹诺酮、染料木素(genistein)、bactacyclin)、白消安(busulfan)、异环磷酰胺、氮芥、三亚胺醌、亚丝醌(diaziquone)、卡波醌、吡啶醌E09、二氮丙啶基苯醌甲基DZQ、三亚乙基磷酰胺和亚硝基脲化合物(例如卡莫司汀、洛莫司汀(lomustine)、司莫司汀(semustine))。

[0269] 示例性治疗部分还包括细胞毒性核苷,例如像阿糖腺苷、阿糖胞苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷、5-氟尿嘧啶、氟达拉滨(fludarabine)、氟尿苷、替加氟(ftorafur)和6-巯基嘌呤;微管蛋白结合剂,诸如紫杉烷类(例如紫杉醇、多西他赛(docetaxel)、紫杉烷)、诺考达唑(nocodazole)、根霉素、多拉司他汀(dolastatin)(例如多拉司他汀10、11或15)、秋水仙碱和类秋水仙碱(colchicinoid)(例如ZD6126)、考布他汀(combretastatin)(例如考布他汀A-4、AVE-6032)和长春花生物碱(例如长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、长春地辛(vindesine)和长春瑞滨(vinorelbine)(诺维本(navelbine)));抗血管生成化合物,诸如血管抑素K1-3、DL- α -二氟甲基-鸟氨酸、内皮抑素、烟曲霉素(fumagillin)、染料木素、米诺环素(minocycline)、星形孢菌素和(±)-沙利度胺(thalidomide)。

[0270] 示例性治疗部分还包括激素和激素拮抗剂,诸如皮质类固醇(例如泼尼松(prednisone))、孕激素(例如羟孕酮或甲羟孕酮)、雌激素(例如己烯雌酚)、抗雌激素(例如他莫昔芬(tamoxifen))、雄激素(例如睾酮)、芳香酶抑制剂(例如氨鲁米特(aminoglutethimide))、17-(烯丙基氨基)-17-去甲氧基格尔德霉素、4-氨基-1,8-萘二甲酰亚胺、芹菜素(apigenin)、布雷菲德菌素A(brefeldin A)、西咪替丁(cimetidine)、二氯亚甲基-二膦酸、亮丙瑞林(leuprolide(leuprorelin))、促黄体激素释放激素、皮斐松

(pifithrin- α)、雷帕霉素(rapamycin)、性激素结合球蛋白和毒胡萝卜素。

[0271] 示例性治疗部分还包括酶抑制剂,诸如S(+)-喜树碱、姜黄素、(-)-鱼藤素、5,6-二氯苯-咪唑1- β -D-呋喃核糖苷、依托泊苷、福美坦、福司曲星、牛奶树碱(hispidin)、2-亚氨基-1-咪唑烷乙酸(环肌酸)、麦维诺素(mevinolin)、曲古抑菌素A、酪氨酸磷酸化抑制剂AG 34和酪氨酸磷酸化抑制剂AG 879。

[0272] 示例性治疗部分还包括基因调节剂,诸如5-氮杂-2'-脱氧胞苷、5-氮杂胞苷、胆钙化固醇(维生素D3)、4-羟基他莫昔芬、褪黑激素、米非司酮、雷洛昔芬、反式-视黄醛(维生素A醛)、视黄酸、维生素A酸、9-顺式-视黄酸、13-顺式-视黄酸、视黄醇(维生素A)、他莫昔芬和曲格列酮。

[0273] 示例性治疗部分还包括细胞毒性剂,例如像蝶啶家族药物、烯二炔类和鬼臼毒素类。这些种类中特别可用的成员包括,例如,甲氨喋呤、鬼臼毒素或鬼臼毒素衍生物,诸如依托泊苷或磷酸依托泊苷、异长春碱、长春地辛、环氧长春碱等。

[0274] 与本文教导相容的再其他细胞毒素包括奥瑞他汀类(auristatin)(例如奥瑞他汀E和单甲基奥瑞他汀E)、卡奇霉素(calicheamicin)、短杆菌肽D、美登木素(maytansanoid)(例如美登素)、新制癌菌素、托泊替康(topotecan)、紫杉烷、细胞松弛素B、溴化乙锭、依米汀(emetine)、替尼泊苷(tenoposide)、秋水仙碱、二羟基蒽二酮、米托蒽醌(mitoxantrone)、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)、嘌呤霉素及其类似物或同系物。

[0275] 用于将此类治疗部分与抗体缀合的技术是众所周知的,参见例如Amon等人,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”,in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy,Reisfeld等人(编),第243-56页(Alan R.Liss,Inc.1985);Hellstrom等人,“Antibodies For Drug Delivery”,in Controlled Drug Delivery(第2版),Robinson等人(编),第623-53页(Marcel Dekker,Inc.1987);Thorpe,“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”,in Monoclonal Antibodies'84:Biological And Clinical Applications,Pinchera等人(编),第475-506页(1985);“Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”,in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy,Baldwin等人(编),第303-16页(Academic Press 1985),以及Thorpe等人,“The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”,Immunol.Rev.,62:119-58(1982)。

[0276] 为了增加含有本文所述氨基酸序列的抗体或多肽的半衰期,可将补救受体结合表位连接到抗体或其抗原结合片段(尤其是抗体片段),如例如美国专利号5,739,277中所述。术语“补救受体结合表位”可指负责增加IgG分子的体内血清半衰期的IgG分子(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的Fc区的表位(例如Ghetie等人,18Ann.Rev.Immunol.739(2000)。在其Fc区中具有取代且血清半衰期增加的抗体也描述于WO 00/42072、WO 02/060919;Shields等人,276J.Biol.Chem.6591(2001);Hinton,279J.Biol.Chem.6213-6216(2004)中。例如,编码补救受体结合表位的核酸分子可以与编码本文所述多肽序列的核酸框内连接,使得由工程化核酸分子表达的融合蛋白包含补救受体结合表位和本文所述的多肽序列。在另一个实施方案中,血清半衰期也可以例如通过连接其他多肽序列而增加。例如,可用于本发明方

法的抗体或其抗原结合片段可连接到结合CEACAM1受体或血清白蛋白结合肽的血清白蛋白或血清白蛋白的一部分,使得血清白蛋白结合抗体或其抗原结合片段,例如WO 01/45746中公开的此类多肽序列。在一个实施方案中,通过这些方法增加Fab的半衰期。关于另外的血清白蛋白结合肽序列,还参见Dennis等人,277J.Biol.Chem.35035(2002)。

[0277] 其他类型的功能部分是本领域已知的,并且可以基于本文包含的教导容易地用于本发明的方法和组合物中。

[0278] 核酸

[0279] 本文还提供了编码CEACAM1抗体及其抗原结合片段的核酸,以及载体、宿主细胞和表达系统。如本文所用,术语“核酸”是指任何长度的核苷酸的聚合形式,核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。因此,此术语包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂交体或者包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然的、化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基的聚合物。

[0280] 编码CEACAM1抗体及其抗原结合片段的核酸可以是,例如,包含单独或组合的那些多核苷酸中的任一种的DNA、cDNA、RNA、合成产生的DNA或RNA或重组产生的嵌合核酸分子。例如,提供了包含编码本文所述的CEACAM1抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列的表达载体,所述多核苷酸序列可操作地连接到适于在真核和/或原核宿主细胞中表达的表达控制序列。

[0281] 术语“载体”是指能够转运与其连接的另一种核酸的核酸分子。“载体”包括但不限于病毒载体、质粒、RNA载体或线性或环状DNA或RNA分子,其可由染色体、非染色体、半合成或合成核酸组成。在一些实施方案中,所使用的载体是能够自主复制(附加型载体)和/或表达与其连接的核酸(表达载体)的载体。大量合适的载体是本领域技术人员已知的并且是可商购获得的。病毒载体包括逆转录病毒、腺病毒、细小病毒(例如,腺相关病毒,AAV)、冠状病毒、负链RNA病毒诸如正粘病毒(例如,流感病毒)、弹状病毒(例如,狂犬病和水泡性口炎病毒)、副粘病毒(例如麻疹和仙台病毒)、正链RNA病毒诸如小核糖核酸病毒和甲病毒、以及双链DNA病毒包括腺病毒、疱疹病毒(例如1型和2型单纯疱疹病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、巨细胞病毒)和痘病毒(例如牛痘、鸡痘和金丝雀痘)。其他病毒包括例如诺沃克病毒、披膜病毒、黄病毒、呼肠孤病毒、乳多空病毒、嗜肝DNA病毒和肝炎病毒。逆转录病毒的实例包括禽类白血病-肉瘤、哺乳动物C型、B型病毒、D型病毒、HTLV-BLV组、慢病毒和泡沫病毒。

[0282] 已经开发了多种表达载体用于在原核细胞(诸如细菌)中和在真核系统(包括但不限于酵母和哺乳动物细胞培养系统)中有效合成抗体及其抗原结合片段。载体可包含染色体、非染色体和合成DNA序列的区段。还提供了包含用于表达预期的CEACAM1抗体或其抗原结合片段的表达载体的细胞。

[0283] 抗体制备和表达系统

[0284] 本发明的抗体或其抗原结合片段通常通过重组表达产生。将编码轻链和重链可变区的核酸(任选地连接到恒定区)插入到表达载体中。轻链和重链可以克隆在相同或不同的表达载体中。编码免疫球蛋白链的DNA区段可操作地连接到表达载体中的控制序列,以确保免疫球蛋白多肽的表达。表达控制序列包括但不限于启动子(例如天然相关或异源启动子)、信号序列、增强子元件和转录终止序列。优选地,表达控制序列是在能够转化或转染真核宿主细胞的载体中的真核启动子系统。一旦载体被整合到合适的宿主中,将宿主维持在

适合高水平表达核苷酸序列以及收集和纯化交叉反应抗体的条件下。

[0285] 这些表达载体通常可作为游离基因体或作为宿主染色体DNA的整体部分在宿主生物体中复制。通常,表达载体包含选择标记(例如氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性 or 新霉素抗性)以允许检测用所需DNA序列转化的那些细胞(参见例如Itakura等人,美国专利号4,704,362)。

[0286] 本发明考虑的抗体和抗原结合片段的表达可以在原核或真核细胞中发生。合适的宿主包括细菌或真核宿主,包括体内或原位的酵母、昆虫、真菌、鸟和哺乳动物细胞或者哺乳动物、昆虫、鸟或酵母来源的宿主细胞。哺乳动物细胞或组织可以是人、灵长类动物、仓鼠、兔、啮齿动物、牛、猪、绵羊、马、山羊、狗或猫来源,但可以使用任何其他哺乳动物细胞。

[0287] 大肠杆菌是一种特别可用于克隆本发明的多核苷酸(例如DNA序列)的原核宿主。其他适用的微生物宿主包括杆菌,诸如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),和其他肠杆菌科,诸如沙门氏菌属、沙雷氏菌属(*Serratia*)和各种假单胞菌(*Pseudomonas*)属物种。

[0288] 其他微生物诸如酵母也可用于表达。酵母属和毕赤酵母属是示例性酵母宿主,其中合适的载体根据需要具有表达控制序列(例如启动子)、复制起点、终止序列等。典型的启动子包括3-磷酸甘油酸激酶和其他糖酵解酶。诱导型酵母启动子尤其包括来自醇脱氢酶、异细胞色素C和负责甲醇、麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

[0289] 此外,通过使用例如酵母泛素水解酶系统,可以实现泛素-跨膜多肽融合蛋白的体内合成。如此产生的融合蛋白可以在体内加工或在体外纯化和加工,从而允许合成具有特定氨基末端序列的本发明的CEACAM1抗体或其抗原结合片段。此外,可以避免与在直接酵母(或细菌)表达中保留起始密码子衍生的甲硫氨酸残基相关的问题。Sabin等人,7Bio/Technol.705(1989);Miller等人,7Bio/Technol.698(1989)。

[0290] 当酵母在富含葡萄糖的培养基中生长时,掺入了大量产生的编码糖酵解酶的活性表达基因的启动子和终止元件的一系列酵母基因表达系统中的任一种都可用于获得本发明的重组CEACAM1抗体或肽。已知的糖酵解基因也可提供非常有效的转录控制信号。例如,可以利用磷酸甘油酸激酶基因的启动子和终止子信号。

[0291] 可以实现在昆虫中产生CEACAM1抗体或其抗原结合片段。例如,通过本领域技术人员已知的方法,用被工程化以表达跨膜多肽的杆状病毒感染昆虫宿主。参见Ausubel等人,1987,1993。

[0292] 除微生物外,哺乳动物组织培养物也可用于表达和产生本发明的抗体或其抗原结合片段(例如,编码免疫球蛋白或其片段的多核苷酸)。参见Winnacker,From Genes to Clones,VCH Publishers,N.Y.,N.Y.(1987)。真核细胞实际上是优选的,因为本领域已经开发了许多能够分泌异源蛋白(例如完整免疫球蛋白)的合适宿主细胞系,并且所述细胞系包括CHO细胞系、各种COS细胞系、HeLa细胞、293细胞、骨髓瘤细胞系、转化的B细胞和杂交瘤。这些细胞的表达载体可包括表达控制序列,诸如复制起点、启动子和增强子(Queen等人,Immunol.Rev.89:49(1986)),以及必要的加工信息位点,诸如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。优选的表达控制序列是衍生自免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒、巨细胞病毒等的启动子。参见Co等人,J.Immunol.148:1149(1992)。

[0293] 可替代地,可以将编码抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列掺入转基因中,用于

导入转基因动物的基因组中,并随后在转基因动物的乳汁中表达(参见,例如,Deboer等人,美国专利号5,741,957,Rosen,美国专利号5,304,489,和Meade等人,美国专利号5,849,992)。合适的转基因包括轻链和/或重链的编码序列,其与来自乳腺特异性基因诸如酪蛋白或 β 乳球蛋白的启动子和增强子可操作地连接。

[0294] 另外,植物已经成为用于重组抗体生产的方便、安全且经济的替代主流表达系统,其基于微生物或动物细胞的大规模培养。抗体或其抗原结合片段可在植物细胞培养物或常规生长的植物中表达。在植物中的表达可以是系统性的、限于亚细胞质体或限于种子(胚乳)。参见,例如,美国专利公开号2003/0167531;美国专利号6,080,560和6,512,162;和WO 0129242。几种植物来源的抗体已经达到发展的成熟阶段,包括临床试验(参见,例如,Bioplex,NC)。

[0295] 含有感兴趣的多核苷酸序列(例如,重链和轻链编码序列和表达控制序列)的载体可以通过众所周知的方法转移到宿主细胞中,这取决于细胞宿主的类型。例如,氯化钙转染通常用于原核细胞,而磷酸钙处理、电穿孔、脂质转染、生物射弹或基于病毒的转染可用于其他细胞宿主。(一般参见Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Press,第2版,1989)。用于转化哺乳动物细胞的其他方法包括使用聚凝胺、原生质体融合、脂质体、电穿孔和显微注射(一般参见Sambrook等人,同上)。为了生产转基因动物,可以将转基因显微注射到受精卵母细胞中,或者可以掺入胚胎干细胞的基因组中,并将此类细胞的细胞核转移到去核卵母细胞中。

[0296] 本发明的抗体及其抗原结合片段可使用单个载体或两种载体表达。当将抗体重链和轻链克隆到单独的表达载体上时,将载体共转染以获得完整免疫球蛋白的表达和组装。一旦表达,本发明的完整抗体、它们的二聚体、单独的轻链和重链或其他免疫球蛋白形式可以根据本领域的标准程序纯化,所述标准程序包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、HPLC纯化、凝胶电泳等(一般参见Scopes,Protein Purification(Springer-Verlag,N.Y.,(1982))。对于药物用途,至少约90%至95%均一性的基本上纯的免疫球蛋白是优选的,并且98%至99%或更高均一性是最优选的。

[0297] 用于调节CEACAM1活性的方法

[0298] 在一方面,本发明提供了使用本文所述的抗体及其抗原结合片段来降低CEACAM1与CEACAM家族的另一成员(包括但不限于CEACAM1、CEACAM5和CEACAM8)之间的相互作用的方法。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段破坏了CEACAM1单体之间的同嗜性相互作用。

[0299] 在另一方面,本发明提供了使用本发明的抗体及其抗原结合片段来降低CEACAM1和TIM家族成员(包括但不限于TIM-1、TIM-3和TIM-4)之间的相互作用的方法。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段破坏CEACAM1与TIM-3之间的异嗜性相互作用。通过使用本发明考虑的抗体及其抗原结合片段破坏CEACAM1与TIM-3之间的相互作用可逆转CEACAM1抑制性功能,同时维持TIM-3激活功能。

[0300] 在另一方面,本发明提供了使用本发明的抗体及其抗原结合片段来降低CEACAM1与PD-1之间相互作用的方法。

[0301] 本发明的实施方案可用于减少免疫抑制,例如T细胞耐受性。“减少”意指与未治疗的对照相比,引起约20%或更高、30%或更高、40%或更高、45%或更高、50%或更高、55%

或更高、60%或更高、65%或更高、70%或更高,或75%、80%、85%、90%、95%或更高的总体降低的能力。免疫抑制可由免疫细胞表面上表达的免疫抑制性受体及其与其配体的相互作用介导。例如,细胞毒性CD8 T细胞可进入“功能耗竭”或“无应答”状态,由此它们表达阻止抗原特异性应答(诸如增殖和细胞因子产生)的抑制性受体。因此,通过抑制此类抑制性受体的活性和/或表达,可以增强或不抑制被阻抑、抑制或无应答的对癌症或肿瘤的免疫应答。此类免疫应答抑制的增强或逆转可导致更高的T细胞活性、应答性和/或关于激活的能力或接受性。

[0302] 测量T细胞活性的方法是本领域已知的。作为非限制性实例,可通过使T细胞与回忆抗原、抗CD3(在不存在共刺激的情况下)和/或离子霉素接触来诱导T细胞耐受性。可监测例如IL-27、LDH-A、RAB10和/或ZAP70(细胞内或分泌的)的水平,例如,以确定T细胞致耐受性的程度(其中IL-2、干扰素- γ 和TNF的水平与增加的T细胞耐受性相关)。还可测量用例如离子霉素预处理的细胞对抗原的应答以确定细胞或细胞群体中T细胞耐受性的程度,例如通过监测分泌的和/或细胞内IL-2和/或TNF- α 的水平(参见例如Macian等人Cell 2002109: 719-731)。经历了适应性耐受性的T细胞的其他特征包括Fyn和ZAP-70/Syk、Cbl-b、GRAIL、Ikaros、CREM(cAMP应答元件调节剂)、B淋巴细胞诱导的成熟蛋白-1(Blimp-1)、PD-1、CD5和SHP2的水平增加;ZAP-70/Syk、LAT、PLCy1/2、ERK、PKC- Θ /IKBA的磷酸化增加;细胞内钙水平的激活增加;组蛋白乙酰化或低乙酰化降低和/或IL-2基因座处的CpG甲基化增加。因此,在一些实施方案中,可测定任何这些参数中的一个或多个以确定本文公开的抑制CEACAM1的抗体或其抗原结合片段是否降低免疫耐受性。T细胞耐受性的减少还可通过检查肿瘤浸润性淋巴细胞或从已建立的肿瘤排出的淋巴结内的T淋巴细胞来评估。例如,此类T细胞通过细胞表面分子(诸如PD-1、TIM-3或LAG-3)的表达以及细胞因子(诸如干扰素- γ)的分泌降低而表现出“耗竭”特征。因此,在存在CEACAM1抗体或其抗原结合片段的情况下T细胞耐受性已减少的证据包括例如相对于在不存在抑制剂的情况下所观察到的T细胞数量增加,所述T细胞具有(a)对肿瘤相关抗原的抗原特异性(例如,如通过含有肿瘤相关肽的主要组织相容性复合物I类或II类四聚体所确定)和(b)分泌高水平干扰素- γ 和细胞溶解性效应分子(诸如粒酶-B)的能力。

[0303] CEACAM1抗体及其抗原结合片段可进一步用于增强T细胞扩增、激活和增殖。

[0304] 在一方面,本发明提供了使用本发明的抗体及其抗原结合片段来降低CEACAM1与细菌粘附素之间相互作用的方法。在一些实施方案中,本发明的抗体及其抗原结合片段有效于减少和/或预防哺乳动物上皮的定植。在一些实施方案中,粘附素由大肠杆菌,特别是扩散性粘附大肠杆菌(DAEC)、淋病奈瑟氏球菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、共生奈瑟氏球菌、卡他莫拉氏菌、流感嗜血杆菌、埃及嗜血杆菌、幽门螺杆菌、梭杆菌属、沙门氏菌属和/或无乳链球菌表达。在一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏了CEACAM1与幽门螺杆菌表面上表达的HopQ之间的相互作用。在一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏了CEACAM1与奈瑟氏球菌属表面上表达的混浊相关(Opa)粘附素蛋白之间的相互作用。在一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏了CEACAM1与之间的相互作用。在一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏了CEACAM1与嗜血杆菌属表面上表达的OMP粘附素蛋白之间的相互作用。在一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏了CEACAM1与之间的相互作用。在一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏

了CEACAM1与无乳链球菌表面上表达的粘附素之间的相互作用。在一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏了CEACAM1与无乳链球菌IgI3样 β 蛋白粘附素之间的相互作用。

[0305] 在一个实施方案中,CEACAM1抗体或其抗原结合片段破坏了CEACAM1与白色念珠菌之间的相互作用。在一个实施方案中,本发明提供了使用本文所述的CEACAM1抗体或其抗原结合片段来抑制CEACAM1与子线虫结合的方法。在一个实施方案中,子线虫是班氏吴策线虫。

[0306] 治疗方法

[0307] 在一方面,本发明提供了CEACAM1抗体及其抗原结合片段,其也可用于治疗有需要的受试者。

[0308] 在本文所述的方法中,将治疗有效量的本文所述的抗体或其抗原结合部分施用于有需要的哺乳动物。尽管本文所述的抗体或其抗原结合部分特别可用于施用于人,但它们也可施用于其他哺乳动物。如本文所用,术语“哺乳动物”旨在包括但不限于人、实验室动物、家养宠物和农场动物。“治疗有效量”意指当本文所述抗体或其抗原结合部分施用于哺乳动物时,有效产生所需治疗效果的量。

[0309] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段结合由耗竭的T细胞或天然杀伤(NK)细胞表达的CEACAM1,从而恢复T细胞和NK细胞活性并导致增加的抗肿瘤应答。在其他方面,抗体或其抗原结合片段结合肿瘤细胞表达的CEACAM1,从而抑制肿瘤细胞转移和癌症干细胞龕的形成。在又一方面,抗体或其抗原结合片段结合肿瘤环境中与纤维化相关的巨噬细胞表达的CEACAM1,从而抑制纤维化。在另一方面,抗体或其抗原结合片段结合肿瘤微环境中其他基质细胞(诸如血管内皮细胞)表达的CEACAM1,从而抑制血管生成。

[0310] 因此,本文还提供了治疗患有癌症或肿瘤的受试者和/或减少肿瘤生长的方法,其包括施用有效量的本文提供的CEACAM1抗体或其抗原结合片段。“减少”包括抑制和/或逆转,并且可以指例如所治疗的病症的症状、转移瘤或微转移瘤的存在或大小、原发性肿瘤的大小、休眠肿瘤的存在或大小。

[0311] 术语“癌症”是指或描述哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长为特征的生理病状。此定义包括良性和恶性癌症,以及休眠肿瘤或微转移瘤。因此,如本文所用,术语“癌症”是指细胞的不受控制的生长,其干扰身体器官和系统(包括癌症干细胞和肿瘤血管龕)的正常功能。患有癌症的受试者是受试者体内存在可客观测量的癌细胞的受试者。此定义包括良性和恶性癌症,以及休眠肿瘤或微转移瘤。从其原始位置转移并接种重要器官的癌症可通过受影响器官的功能退化而最终导致受试者死亡。造血系统癌症,诸如白血病,能够胜过受试者的正常造血区室,从而导致造血功能失败(以贫血、血小板减少症和中性粒细胞减少症的形式),最终导致死亡。

[0312] “受试者”意指哺乳动物,包括但不限于人或非人哺乳动物,诸如牛、马、犬、绵羊或猫等。个体和患者也是本文的受试者。

[0313] 如本文所用,术语“治疗(treat、treated、treating或treatment)”是指治疗性治疗,其中目的是减缓(减轻)不需要的生理病状、病症或疾病,或获得有益或所需的临床结果。对于本发明的目的,有益或所需的临床结果包括但不限于症状的减轻;病状、病症或疾病的程度减弱;病状、病症或疾病的状态稳定(即,不恶化);病状、病症或疾病的发作延迟或

进展减慢;病状、病症或疾病状态的改善;以及病状、病症或疾病的缓解(无论部分或全部)(无论可检测或不可检测)或增强或改善。治疗包括引发临床上显著的反应,而无过度的副作用。治疗还包括与不接受治疗情况下的预期存活期相比存活期延长。术语“预防(prevent)”、“预防(prevention)”等是指在明显的疾病或病症发作之前起作用,以防止疾病或病症发展或使疾病或病症的程度最小化,或减缓其发展过程。

[0314] 本发明的实施方案可用于治疗转移,其涉及癌症从其原发部位扩散到体内其他部位。癌细胞可以脱离原发性肿瘤,渗入淋巴和血管,通过血流循环,并在身体其他地方的正常组织中的远处病灶(转移)中生长。转移可以是局部的或远处的。转移是连续的过程,取决于肿瘤细胞从原发性肿瘤脱落、穿过血流并在远处部位停止。在新的部位,细胞建立血液供应并且可以生长以形成危及生命的肿块。肿瘤细胞内的刺激和抑制分子途径都调节这种行为,并且肿瘤细胞与远处部位的宿主细胞之间的相互作用也是重要的。除监测特定症状外,转移最常通过单独或组合使用磁共振成像(MRI)扫描、计算机断层(CT)扫描、血液和血小板计数、肝功能研究、胸部X射线和骨扫描来检测。

[0315] 还考虑了降低癌症干性的方法,其包括施用本文公开的CEACAM1抗体或其抗原结合片段。癌症干性可以指细胞自我更新和产生另外的表型上不同的细胞类型的能力。癌症干细胞(CSC)是表现出干细胞样特性的癌细胞。CSC通常表现出至少一种癌症标志,并且能够产生至少一种另外的表型上不同的细胞类型。此外,癌症干细胞能够进行不对称和对称复制。应理解,癌症干细胞可由获得干性性状的分化的癌细胞和/或获得与癌细胞相关的表型的干细胞产生。可替代地,癌症干细胞可在肿瘤内重建非基质细胞类型。

[0316] CEACAM1由许多肿瘤类型表达,并且CEACAM1可以调节肿瘤的生长和转移行为。在另一个实施方案中,CEACAM1抑制将减少肿瘤生长和转移。

[0317] 巨噬细胞亚群上的CEACAM1表达与癌发生期间的纤维化相关。在另一个实施方案中,CEACAM1抑制将减少肿瘤相关的纤维化。

[0318] 可通过本发明所考虑的组合物和方法治疗的癌症包括未血管化或尚未实质血管化的肿瘤以及血管化肿瘤。癌症可包括非实体肿瘤(诸如血液肿瘤,例如白血病和淋巴瘤)或可包括实体肿瘤。待治疗的癌症类型包括但不限于良性和恶性肿瘤,以及恶性肿瘤例如肉瘤、癌和黑素瘤。还包括成人肿瘤/癌症和儿科肿瘤/癌症。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更具体实例包括但不限于基底细胞癌、胆道癌;膀胱癌;骨癌;脑和CNS癌;乳腺癌;腹膜癌;宫颈癌;绒毛膜癌;结肠癌和直肠癌;结缔组织癌;消化系统癌;子宫内膜癌;食道癌;眼癌;头颈癌;胃癌(包括胃肠癌);胶质母细胞瘤;肝癌(hepatic carcinoma);肝细胞瘤(hepatoma);上皮内肿瘤;肾癌(kidney or renal cancer);喉癌;白血病;肝癌(liver cancer);肺癌(例如,小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌);淋巴瘤,包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma);黑素瘤;骨髓瘤;神经母细胞瘤;口腔癌(例如唇癌、舌癌、口癌和咽癌);卵巢癌;胰腺癌;前列腺癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤;直肠癌;呼吸系统癌;唾液腺癌;肉瘤;皮肤癌;鳞状细胞癌;胃癌;睾丸癌;甲状腺癌;子宫或子宫内膜癌;泌尿系统癌;外阴癌;外阴肉瘤;以及其他癌和肉瘤;以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL)NHL;中级/滤泡性NHL;中级弥漫性NHL;高级免疫母细胞性NHL;高级淋巴瘤母细胞性NHL;高级小型非裂解细胞NHL;大肿块疾病NHL;套细胞淋巴瘤;AIDS相关淋巴瘤;和

氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia));慢性淋巴细胞白血病(CLL);急性淋巴细胞白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性成髓细胞性白血病;和移植后淋巴组织增生性疾病(PTLD),以及与癥瘕病、水肿(诸如与脑肿瘤相关的水肿)和麦格综合征(Meigs' syndrome)相关的异常血管增生。患者可患有多于一种类型的癌症。

[0319] 包括包含本文所述的抗体及其抗原结合片段的组合物的治疗制剂的癌症治疗方法的功效可通过通常用于评价癌症治疗的各种终点来测量,所述终点包括但不限于肿瘤消退、肿瘤重量或大小缩小、进展时间、存活持续时间、无进展存活、总应答率、应答持续时间和生活质量。在癌症的情况下,治疗有效量的重组CEACAM1抗体或其抗原结合片段可减少癌细胞的数目;减小肿瘤大小;抑制(即,在一定程度上减缓并且优选地阻止)癌细胞浸润到周围器官中;抑制(即,在一定程度上减缓并且优选地阻止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上缓解与所述病症相关的一种或多种症状。在患者具有一种以上类型的癌症的情况下,重组CEACAM1抗体或其抗原结合片段的治疗有效量是有效治疗所述癌症中的至少一种的量。就重组CEACAM1抗体或其抗原结合片段用于防止生长和/或杀死现有癌细胞而言,它可以是细胞抑制性的和/或细胞毒性的。对于癌症疗法,体内功效可例如通过评估存活持续时间、无进展存活持续时间(PFS)、应答率(RR)、应答持续时间和/或生活质量来测量。

[0320] 检查点蛋白与特定配体相互作用,将信号发送到T细胞并切断或抑制T细胞功能。通过在其表面上表达高水平的检查点蛋白,癌细胞可以控制进入肿瘤微环境的T细胞的功能,从而抑制抗癌免疫应答。免疫检查点蛋白程序性死亡-1(PD-1)是由激活的T和B细胞表达的关键免疫检查点受体并且介导免疫抑制。PD-1是CD28受体家族的成员,其包括CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1和BTLA。已经鉴定了PD-1的两种细胞表面糖蛋白配体,程序性死亡配体-1(PD-L1)和程序性死亡配体-2(PD-L2),其在抗原呈递细胞以及许多人类癌症上表达并且已显示在结合PD-1时下调T细胞激活和细胞因子分泌(Freeman等人,2000;Latchman等人,2001)。抑制PD-1/PD-L1相互作用可促进有效的抗肿瘤活性。PD-1抑制剂的实例包括但不限于派姆单抗(MK-3475)、纳武单抗(MDX-1106)、西米普利单抗-rwlc(REGN2810)、匹地利珠单抗(CT-011)、斯巴达珠单抗(PDR001)、tisellizumab(BGB-A317)、PF-06801591、AK105、BCD-100、BI 754091、JS001、LZM009、MEDI0680、MGA012、Sym021、TSR-042。PD-L1抑制剂的实例包括但不限于:阿特殊单抗(MPDL3280A)、德瓦鲁单抗(MEDI4736)、阿维单抗(MSB0010718C)、BGB-A333、CK-301、CS1001、FAZ053、KN035、MDX-1105、MSB2311、SHR-1316。

[0321] 然而,存在大量接受检查点抑制剂疗法的癌症患者群体,其(1)对这种类型的疗法没有应答(先天性或原发性抗性)或(2)最初有应答但最终发展为疾病进展(继发性或获得性抗性)。抗性癌症也可称为难治性癌症。如下文实施例中所示,分离自对PD-1/PD-L1抑制剂具有获得性抗性的患者的肿瘤相关细胞相对于分离自未暴露于PD-1抑制剂的原初患者的肿瘤相关细胞上调CEACAM1表达。当CEACAM1在获得性抗性的情况下表达时,携带CEACAM1的细胞更可能是效应记忆细胞而不是中枢记忆细胞,这与抗性患者中抗癌应答的减少一致。

[0322] 因此,本文还提供了使用CEACAM1抗体及其抗原结合片段(包括但不限于本文提供的特异性CEACAM1抗体及其抗原结合片段)治疗对检查点抑制剂(诸如PD-1、PD-L1和/或CTLA-4的抑制剂)具有抗性的患者的方法。在一些实施方案中,用于治疗对PD-1、PD-L1和/

或CTLA-4的抑制剂具有抗性的患者的CEACAM1抗体是He14/L1。在一些实施方案中,抗性是先天性或原发性抗性。在一些实施方案中,抗性是继发性或获得性抗性。在一些实施方案中,施用的CEACAM1抗体(包括但不限于本文提供的CEACAM1抗体及其抗原结合片段)逆转对检查点抑制剂疗法有抗性的患者中的T细胞耗竭。任何表现出PD-1、PDL-1和/或CTLA-4抗性的癌症都适合用本发明的方法进行治疗。在一些实施方案中,将CEACAM1抗体或抗原结合片段施用于先前未接受检查点抑制剂疗法的患者。

[0323] 在另一方面,本发明提供了本文提供的CEACAM1抗体和抗原结合片段在治疗对使用其他检查点抑制剂的疗法具有抗性的患者中的用途,所述其他检查点抑制剂包括但不限于PD-L2、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、GAL9、LAG3、TIM-3、VISTA、KIR、2B4(属于CD2分子家族并且在所有NK、 $\gamma\delta$ 和记忆CD8⁺($\alpha\beta$) T细胞上表达)、CD160(也称为BY55)、CGEN-15049、CHK1和CHK2激酶、A2aR和各种B-7家族配体(包括但不限于B7-1、B7-2、B7-DC、B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6和B7-H7)。

[0324] 在另一方面,本发明提供了使用本文公开的CEACAM1抗体及其抗原结合片段治疗需要减少和/或预防白色念珠菌和/或表达细菌粘附素的细菌(包括但不限于大肠杆菌,特别是扩散性粘附大肠杆菌(DAEC)、淋病奈瑟氏球菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、共生奈瑟氏球菌、卡他莫拉氏菌、流感嗜血杆菌、埃及嗜血杆菌、幽门螺杆菌、梭杆菌属、沙门氏菌属和/或无乳链球菌)对哺乳动物上皮的定植的受试者的方法。

[0325] 在另一方面,本发明提供了使用本文公开的CEACAM1抗体及其抗原结合片段治疗需要减少和/或预防子线虫(诸如班氏吴策线虫)感染的受试者的方法。在另一方面,本发明提供了使用本文公开的CEACAM1抗体及其抗原结合片段治疗需要减少和/或预防与子线虫(诸如班氏吴策线虫)感染相关的淋巴水肿和/或鞘膜积液发展的受试者的方法。在一个实施方案中,本发明提供了使用本文所述的CEACAM1抗体或其抗原结合片段在有需要的受试者中减少丝虫对受试者的淋巴系统的侵袭的方法。在一个实施方案中,子线虫是班氏吴策线虫。受试者可被一种以上的表达细菌粘附素的细菌、白色念珠菌、流感病毒和/或子线虫感染。

[0326] 在另一个实施方案中,本发明提供了使用本文所述的CEACAM1抗体或其抗原结合片段在有需要的受试者中减少癌细胞对受试者的淋巴系统的侵袭的方法。

[0327] 筛选方法

[0328] 本文还提供了鉴定可能对用本文提供的CEACAM1抗体和抗体片段(包括但不限于He14/L1)的治疗有应答的患者群体的方法。

[0329] 在一些实施方案中,筛选癌症患者的某些细胞类型上的CEACAM1表达,所述细胞类型包括T细胞、NK细胞、B细胞、肿瘤细胞、成纤维细胞或肿瘤微环境中的其他细胞,诸如巨噬细胞。在一些实施方案中,选择与对照相比在某些细胞类型上显示出增加的CEACAM1表达的癌症患者,用于用本文提供的CEACAM1抗体和抗体片段进行治疗。CEACAM1表达的“对照”水平可指不患有癌症的一个或多个个体中的CEACAM1表达的水平。所述水平可以在逐个个体的基础上测量,或者在诸如平均值的聚合基础上测量。在一些实施方案中,来自其病状被监测的相同个体但在不同时间获得的CEACAM1表达的对照水平。在某些实施方案中,“对照”水平可指在较早时间(例如,数周、数月或数年前)从同一患者获得的水平。在一些实施方案中,对照水平在患者接受任何癌症疗法之前从所述患者获得。在一些实施方案中,对照水平

在患者接受检查点抑制剂治疗之前从所述患者获得。

[0330] 在一些实施方案中,针对对检查点抑制剂疗法(包括但不限于用PD-1/PD-L1/CTLA-4抑制剂的疗法)有抗性的患者确定CEACAM1表达。在一些实施方案中,选择对检查点抑制剂疗法具有抗性并且与对照相比在某些细胞类型上显示出增加的CEACAM1表达的患者,用于用本文提供的CEACAM1抗体和抗体片段(包括但不限于He14/L1)治疗。

[0331] 在一些实施方案中,测定患者的人CEACAM1的等位基因变体。基于患者表达的人CEACAM1的等位基因变体,与表达CEACAM1的野生型变体的患者相比,可以向患者施用更多或更少的抗CEACAM1抗体。在一些实施方案中,测定患者中CEACAM1的Y34C、Q44L和/或Q89H等位基因变体的存在。在一些实施方案中,与表达CEACAM1的野生型变体的患者相比,向被发现表达CEACAM1的Y34C、Q44L、A49V和/或Q89H等位基因变体的患者施用更高和/或更频繁剂量的抗CEACAM1抗体。

[0332] 药物组合物

[0333] 在另一方面,本发明提供了药学上可接受的组合物,其包含与一种或多种药学上可接受的赋形剂一起配制的治疗有效量的本文所述的CEACAM1抗体或其抗原结合片段。

[0334] 活性剂的剂量可根据使用原因、个体受试者和施用模式而变化。可以基于受试者的体重、受试者的年龄和健康以及化合物或组合物的耐受性来调整剂量。例如,根据疾病,对于抗体或其抗原结合片段,这可能需要0.1、1.0、3.0、6.0或10.0mg/Kg。对于分子量为150,000g/摩尔的IgG(两个结合位点),这些剂量对应于5L血液体积的约18nM、180nM、540nM、1.08 μ M和1.8 μ M的结合位点。

[0335] 可以根据本领域已知的方法将活性剂和赋形剂配制成组合物和剂型。本发明的药物组合物可以被特别配制成固体或液体形式,包括适于肠胃外施用的那些形式,例如通过皮下、肿瘤内、肌内或静脉内注射,例如作为无菌溶液或悬浮液。

[0336] 包含结合CEACAM1的抗体或其抗原结合片段的治疗组合物可以与一种或多种药学上可接受的赋形剂一起配制,所述药学上可接受的赋形剂可以是药学上可接受的材料、组合物或媒介物,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、载剂、制造助剂(例如润滑剂、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌、或硬脂酸)、溶剂或包封材料,其涉及携带或转运用于向受试者施用的治疗化合物、填充剂、盐、表面活性剂和/或防腐剂。可用作药学上可接受的赋形剂的材料的一些实例包括:糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;明胶;滑石;蜡;油类,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇类,诸如乙二醇和丙二醇;多元醇,诸如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;酯类,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂;水;等渗盐水;pH缓冲溶液;以及药物制剂中使用的其他无毒性相容物质。

[0337] 填充剂是增加药物制剂的质量并有助于冻干形式的制剂的物理结构的化合物。根据本发明合适的填充剂包括甘露糖醇、甘氨酸、聚乙二醇和山梨糖醇。

[0338] 表面活性剂的使用可以减少重构蛋白质的聚集和/或减少重构制剂中颗粒的形成。所加入的表面活性剂的量应能减少重构蛋白质的聚集并使重构后颗粒的形成最小化。根据本发明的合适的表面活性剂包括聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯20或80);泊洛沙姆(例如泊洛沙姆188);Triton;十二烷基硫酸钠(SDS);月桂硫酸钠;辛基糖苷钠;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-或硬脂基-磺基甜菜碱;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-或硬脂基-肌氨酸;亚

油基-、肉豆蔻基-或鲸蜡基-甜菜碱；月桂酰胺基丙基-、椰油酰胺基丙基-、亚油酰胺基丙基-、肉豆蔻酰胺基丙基-、棕榈酰胺基丙基-或异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱(例如月桂酰胺基丙基)；肉豆蔻酰胺基丙基-、棕榈酰胺基丙基-或异硬脂酰胺基丙基-二甲胺；甲基椰油基钠或甲基油基牛磺酸二钠；和聚乙二醇、聚丙二醇、以及乙二醇和丙二醇的共聚物(例如 Pluronic、PF68等)。

[0339] 防腐剂可用于本发明的制剂中。用于本发明制剂的合适的防腐剂包括十八烷基二甲基苄基氯化铵、六甲铵氯化物、苯扎氯铵(烷基苄基-二甲基氯化铵的混合物,其中烷基是长链化合物)和苄素氯铵。其他类型的防腐剂包括芳族醇诸如苯酚、丁基和苄基醇、对羟基苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇和间甲酚。其他合适的赋形剂可以在标准药学教科书中找到,例如“Remington’s Pharmaceutical Sciences”, The Science and Practice of Pharmacy, 第19版 Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1995)。

[0340] 包含抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载剂的组合物可以包含各种浓度的本文所述的CEACAM1抗体或其抗原结合部分。例如,组合物可包含10mg/ml至200mg/ml、25mg/ml至130mg/ml、50mg/ml至125mg/ml、75mg/ml至110mg/ml或80mg/ml至100mg/ml的抗体或其抗原结合片段。组合物还可以包含约10mg/ml、20mg/ml、30mg/ml、40mg/ml、50mg/ml、60mg/ml、70mg/ml、80mg/ml、90mg/ml、100mg/ml、110mg/ml、120mg/ml、130mg/ml、140mg/ml或150mg/ml的抗体或其抗原结合片段。

[0341] 在一些实施方案中,将包含抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载剂的组合物冻干并提供在组合物中,用于在施用前重构。

[0342] 施用方法

[0343] 包含所考虑的抗体或其抗原结合片段的治疗组合物可以以任何方便的方式施用,包括通过注射、输液、植入或移植。本文所述的组合物可以皮下、皮内、瘤内、结内、髓内、肌内、颅内、通过静脉内或淋巴内注射或腹膜内施用于患者。在一个实施方案中,本发明的细胞组合物优选通过静脉内注射施用。

[0344] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段通过静脉内输注施用于哺乳动物,即在一定时间段内将抗体或其抗原结合片段引入哺乳动物的静脉。在某些实施方案中,所述时间段为约5分钟、约10分钟、约30分钟、约1小时、约2小时、约4小时或约8小时。

[0345] 在某些实施方案中,化合物或组合物的剂量每天、每隔一天、每两天、每三天、每周一次、每周两次、每周三次、每两周一次或每月一次施用于受试者。在其他实施方案中,两剂、三剂或四剂化合物或组合物每天、每两天、每三天、每周一次、每两周一次或每月一次施用于受试者。在一些实施方案中,化合物或组合物的剂量施用2天、3天、5天、7天、14天、21天或28天。在某些实施方案中,化合物或组合物的剂量施用1个月、1.5个月、2个月、2.5个月、3个月、4个月、5个月、6个月或更长时间。

[0346] 组合疗法

[0347] 在一方面,本发明提供了与另外的治疗剂一起施用的CEACAM1抗体或其抗原结合片段。此类另外的药剂包括但不限于细胞毒性剂、化疗剂、生长抑制剂、抗炎剂、抗癌剂、抗神经变性剂和抗感染剂。用于此类组合疗法中的药剂可属于一种或多种前述类别。抗体或其抗原结合片段和另外的治疗剂的施用可以是同时或连续的。抗体或其抗原结合片段和另

外的治疗剂的施用可以是分开的或作为混合物。此外,本发明所考虑的治疗方法可涉及与一种或多种癌症疗法组合的治疗,所述癌症疗法选自抗体疗法、化学疗法、细胞因子疗法、树突细胞疗法、基因疗法、激素疗法、激光疗法和放射疗法的组。

[0348] 示例性另外的治疗剂还包括具有高能电离辐射的放射性核素,其能够引起核DNA中的多链断裂,并因此适用于诱导(例如癌症的)细胞死亡。示例性高能放射性核素包括: ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 和 ^{188}Re 。这些同位素通常产生具有短路径长度的高能 α 粒子或 β 粒子。此类放射性核素杀死与其紧邻的细胞,例如缀合物已连接或已进入的赘生性细胞。它们对非定位细胞的影响很小或没有影响,并且基本上是非免疫原性的。

[0349] 示例性另外的治疗剂还包括细胞毒性剂,诸如细胞生长抑制剂(例如烷化剂、DNA合成抑制剂、DNA嵌入剂或交联剂,或DNA-RNA转录调节剂)、酶抑制剂、基因调节剂、细胞毒性核苷、微管蛋白结合剂、激素和激素拮抗剂、抗血管生成剂等。

[0350] 示例性另外的治疗剂还包括烷化剂,诸如蒽环类药物家族(例如,阿霉素、洋红霉素、环孢菌素-A、氯喹、甲氨蝶呤、光神霉素、泊非霉素、链黑霉素、蒽二酮和氮丙啶)。在另一个实施方案中,化疗部分是细胞生长抑制剂,诸如DNA合成抑制剂。DNA合成抑制剂的实例包括但不限于甲氨蝶呤和二氯甲氨蝶呤、3-氨基-1,2,4-苯并三嗪1,4-二氧化物、氨基蝶呤、胞嘧啶 β -D-阿拉伯呋喃糖苷、5-氟-5'-脱氧尿苷、5-氟尿嘧啶、更昔洛韦、羟基脲、放线菌素-D和丝裂霉素C。示例性DNA嵌入剂或交联剂包括但不限于博来霉素、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、顺二氯二氨基铂(II)(顺铂)、美法仑、米托蒽醌和奥沙利铂。

[0351] 示例性另外的治疗剂还包括转录调节剂,诸如放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、高三尖杉酯碱和伊达比星。与本发明相容的其他示例性细胞生长抑制剂包括安莎霉素苯醌、醌类衍生物(例如喹诺酮、染料木素、bactacyclin)、白消安、异环磷酰胺、氮芥、三亚胺醌、亚丝醌、卡波醌、吡啶醌E09、二氮丙啶基苯醌甲基DZQ、三亚乙基磷酰胺和亚硝基脲化合物(例如卡莫司汀、洛莫司汀、司莫司汀)。

[0352] 示例性另外的治疗剂还包括细胞毒性核苷,例如像阿糖腺苷、阿糖胞苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷、5-氟尿嘧啶、氟达拉滨、氟尿苷、替加氟和6-巯基嘌呤;微管蛋白结合剂,诸如紫杉烷类(例如紫杉醇、多西他赛、紫杉烷)、诺考达唑、根霉素、多拉司他汀(例如多拉司他汀10、11或15)、秋水仙碱和类秋水仙碱(例如ZD6126)、考布他汀(例如考布他汀A-4、AVE-6032)和长春花生物碱(例如长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨(诺维本));抗血管生成化合物,诸如血管抑素K1-3、DL- α -二氟甲基-鸟氨酸、内皮抑素、烟曲霉素、染料木素、米诺环素、星形孢菌素和(±)-沙利度胺。

[0353] 示例性另外的治疗剂还包括激素和激素拮抗剂,诸如皮质类固醇(例如泼尼松)、孕激素(例如羟孕酮或甲羟孕酮)、雌激素(例如己烯雌酚)、抗雌激素(例如他莫昔芬)、雄激素(例如睾酮)、芳香酶抑制剂(例如氨鲁米特)、17-(烯丙基氨基)-17-去甲氧基格尔德霉素、4-氨基-1,8-萘二甲酰亚胺、芹菜素、布雷菲德菌素A、西咪替丁、二氯亚甲基-二膦酸、亮丙瑞林、促黄体激素释放激素、皮斐松、雷帕霉素、性激素结合球蛋白和毒胡萝卜素。

[0354] 示例性另外的治疗剂还包括酶抑制剂,诸如S(+)-喜树碱、姜黄素、(-)-鱼藤素、5,6-二氯苯咪唑1- β -D-呋喃核糖苷、依托泊苷、福美坦、福司曲星、牛奶树碱、2-亚氨基-1-咪唑烷乙酸(环肌酸)、麦维诺素、曲古抑菌素A、酪氨酸磷酸化抑制剂AG 34和酪氨酸磷酸化抑

制剂AG 879。

[0355] 示例性另外的治疗剂还包括基因调节剂,诸如5-氮杂-2'-脱氧胞苷、5-氮杂胞苷、胆钙化固醇(维生素D3)、4-羟基他莫昔芬、褪黑激素、米非司酮、雷洛昔芬、反式-视黄醛(维生素A醛)、视黄酸、维生素A酸、9-顺式-视黄酸、13-顺式-视黄酸、视黄醇(维生素A)、他莫昔芬和曲格列酮。

[0356] 示例性另外的治疗剂还包括细胞毒性剂,例如像蝶啶家族药物、烯二炔类和鬼臼毒素类。这些种类中特别可用的成员包括,例如,甲氨喋呤、鬼臼毒素或鬼臼毒素衍生物,诸如依托泊苷或磷酸依托泊苷、异长春碱、长春地辛、环氧长春碱等。

[0357] 与本文教导相容的再其他另外的治疗剂包括奥瑞他汀类(例如奥瑞他汀E和单甲基奥瑞他汀E)、卡奇霉素、短杆菌肽D、美登木素(例如美登素)、新制癌菌素、托泊替康、紫杉烷、细胞松弛素B、溴化乙锭、依米汀、替尼泊苷、秋水仙碱、二羟基蒽二酮、米托蒽醌、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素及其类似物或同系物。

[0358] 在一个实施方案中,CEACAM抗体或其抗原结合片段与作为检查点抑制剂的剂组合施用。此类抑制剂可包括小分子抑制剂或可包括结合并阻断或抑制免疫检查点受体的抗体或其抗原结合片段或者结合并阻断或抑制免疫检查点受体配体的抗体。可被靶向以用于阻断或抑制的说明性检查点分子包括但不限于CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、GAL9、LAG3、TIM-3、VISTA、KIR、2B4(属于CD2家族分子并且在所有NK、 $\gamma\delta$ 和记忆CD8⁺($\alpha\beta$) T细胞上表达)、CD160(也称为BY55)、CGEN-15049、CHK1和CHK2激酶、A2aR和各种B-7家族配体。B7家族配体包括但不限于B7-1、B7-2、B7-DC、B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6和B7-H7。检查点抑制剂包括结合并阻断或抑制CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1、BTLA、HVEM、TIM-3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160和CGEN-15049中的一种或多种的活性的抗体或其抗原结合片段、其他结合蛋白、生物治疗剂或小分子。说明性免疫检查点抑制剂包括曲美木单抗(Tremelimumab)(CTLA-4阻断抗体)、抗OX40和Yervoy/伊匹单抗(ipilimumab)(抗CTLA-4检查点抑制剂)以及上述PD-1和PD-L1抑制剂。检查点蛋白配体包括但不限于PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、CD28、CD86和TIM-3。

[0359] 在一些实施方案中,本文所述的CEACAM1抗体及其抗原结合片段与TIGIT、LAP、Podoplanin、蛋白C受体、ICOS、GITR、CD226或CD160抑制剂一起施用。

[0360] 在一些实施方案中,本文所述的CEACAM1抗体及其抗原结合片段与CTLA-4、PD-1、PD-L1或PD-L2抑制剂一起施用。在一些实施方案中,本文所述的CEACAM1抗体及其抗原结合片段与TIM-3抑制剂一起施用。

[0361] 应当理解,本发明不限于所述的特定分子、组合物、方法或方案,因为这些可以变化。与本文所述的那些类似或等同的任何方法和材料可用于实施或测试本发明的实施方案。还应理解,本说明书中本发明的公开内容包括此类特定特征的所有可能组合。例如,在本发明的特定方面或实施方案或特定权利要求的上下文中公开了特定特征的情况下,所述特征也可以在可能的程度上与本发明的其他特定方面和实施方案组合使用和/或在本发明的其他特定方面和实施方案的上下文中使用,并且通常在本发明中使用。

[0362] 在本文中提及包括两个或更多个定义的步骤的方法的情况下,定义的步骤可以以任何顺序或同时进行(除非上下文排除该可能性),并且所述方法可以包括在任何定义的步骤之前,在两个定义的步骤之间或在所有定义的步骤之后进行的一个或多个其他步骤(除

非上下文排除那些可能性)。

[0363] 所有其他引用的专利和申请通过引用整体并入本文。此外,在通过引用并入本文中的参考文献中的术语的定义和使用与本文中提供的这个术语的定义不一致或相矛盾时,以本文中提供的这个术语的定义为准并且参考文献中的这个术语的定义不再适用。

[0364] 为了便于更好地理解本发明,给出具体实施方案的以下实施例。以下实施例不应理解为限制或限定本发明的整个范围。

[0365] 实施例

[0366] 实施例1:完全人源化CEACAM1抗体的产生

[0367] 1.嵌合抗体的构建

[0368] 鼠抗CEACAM1抗体充当人源化的起点。表达亲本抗体的杂交瘤测序鉴定出单个重链序列和两个 κ 轻链序列。为了确定哪个轻链序列编码CEACAM1结合基序,合成了VH和两个V κ 序列,其具有侧翼限制酶位点以便克隆到IgG4 (S241P) 重链和 κ 轻链的pANT表达载体系统中。使用MluI和HindIII限制位点克隆VH区,并且使用BssHII和BamHI限制位点克隆V κ 区。

[0369] 2.嵌合抗体的表达和纯化

[0370] 使用PEI将IgG4 (S241P) VH与编码嵌合亲本抗体的两种可能的V κ 链的组合瞬时转染到HEK EBNA粘附细胞中,并在转染后孵育7天。VH和V κ 链中的一条的组合未能表达,而与第二条V κ 序列组合的VH产生了显著水平的抗体。在蛋白质A琼脂糖柱上从细胞培养上清液中纯化表达的抗体,将缓冲液更换为PBS pH 7.4,并使用基于预测的氨基酸序列的消光系数($E_{c_{0.1\%}} = 1.53$)以OD 280nm进行量化。

[0371] 3.嵌合抗体结合人CEACAM1的竞争ELISA分析

[0372] 在竞争ELISA测定中评价纯化的嵌合抗体与人CEACAM1的结合。将Nunc Immuno MaxiSorp 96孔平底微量滴定板在4°C下用1xPBS中的1 μ g/ml人GST-CEACAM1预涂覆过夜。第二天,将板在室温下用2% BSA/PBS封闭1小时,然后用PBS/0.05% Tween 20pH7.4洗涤2次。

[0373] 将50 μ g/ml至0.068 μ g/ml的嵌合或无关对照IgG4抗体的4倍稀释系列与恒定浓度的鼠亲本抗体(0.15 μ g/ml最终浓度)预混合,添加到板中并在室温下孵育1小时。3次PBST洗涤后,用抗小鼠-HRP和TMB底物检测鼠抗体的结合。用3M HCl终止反应,在Dynex Technologies MRX TC II读板器上在450nm处读取吸光度。

[0374] 表达的嵌合抗体能够与鼠亲本抗体竞争以结合GST-CEACAM1,从而证实已鉴定出正确的轻链。正如预期的那样,无关的人IgG4没有竞争。嵌合抗体的可变重链(VH₀)和可变轻链(V κ ₀)分别提供为SEQ ID NO:10和18。

[0375] 4.复合人抗体可变区序列的设计

[0376] 使用Swiss PDB产生鼠亲本抗体V区的结构模型,并进行分析以鉴定V区中可能对抗体结合特性至关重要的重要“限制”氨基酸。CDR内含有大多数残基(使用Kabat和Chothia定义)以及几个框架残基被认为是重要的。鼠亲本抗体的VH和V κ 序列含有典型的框架残基,并且CDR 1、2和3基序与许多鼠抗体相当。序列分析还揭示了在原始小鼠杂交瘤轻链CDR1位置27D(Kabat编号)处和重链CDR2位置56处潜在的N连接的糖基化基序。

[0377] 亲本抗体的复合人序列是由几种人抗体产生的,所述人抗体组合在一起产生了与鼠序列中的那些CDR相似或同一的CDR。对于CDR之外且侧接CDR的区域,广泛选择的人序列

区段被鉴定为新的人源化V区的可能组分。

[0378] 5. CD4⁺T细胞表位回避

[0379] 基于结构分析,选择可用于产生人源化变体的一大组初步序列区段,并使用用于计算机分析结合人MHC II类等位基因的肽的iTope™技术(Perry等人2008)以及使用已知抗体序列相关的T细胞表位的TCED™(Bryson等人2010)进行分析。将鉴定为人MHC II类的重要非人种系结合物或对TCED™获得显著命中得分的序列区段丢弃。

[0380] 这得到一组减少的区段,并如上所述再次分析这些区段的组合,以确保区段之间的连接不含有潜在的T细胞表位。将所选择的序列区段组装成完全V区序列,其缺乏重要的T细胞表位。然后选择五条重链(VH1至VH5)和四条优选的轻链(Vκ1至Vκ4)序列进行基因合成、在哺乳动物细胞中表达并测试活性。

[0381] 6. 人源化变体的构建

[0382] 如上述嵌合抗体所述合成了五个人源化VH(VH1至VH5)和四个人源化Vκ序列(Vκ1至Vκ4),并将其克隆到IgG4(S241P)重链和κ轻链的pANT表达载体系统中。参见表4。

[0383] 表4. 选择用于基因合成的重链和轻链。

重链		轻链	
变体	SEQ ID No:	变体	SEQ ID No:
V _H 0	10	V _κ 0	18
V _H 1	11	V _κ 1	
V _H 2	12	V _κ 2	
V _H 3		V _κ 3	
V _H 4		V _κ 4	19
V _H 5			

[0385] 7. 人源化变体的表达和纯化

[0386] 复合IgG4(S241P)VH和Vκ链的所有组合(即总共20对)加上2种对照抗体(嵌合VH(VH0)与变体Vκ1以及变体VH1与嵌合Vκ(Vκ0)),均使用PEI转染方法瞬时转染到HEK EBNA粘附细胞中,并在转染后孵育5-7天。在如上所述的蛋白质A琼脂糖柱柱上从细胞培养上清液中纯化抗体。使用基于预测的氨基酸序列的消光系数通过OD_{280nm}对抗体进行量化。通过SDS-PAGE分析1.5μg的每种抗体,并且观察对应于典型抗体曲线的条带。

[0387] 8. 人源化变体结合CEACAM1的竞争ELISA分析

[0388] 在如上所述的竞争ELISA测定中评估纯化的抗体与人CEACAM1的结合。将每个变体与鼠亲本抗体竞争结合GST-CEACAM1的能力与嵌合抗体(VH0/Vκ0)竞争结合GST-CEACAM1的能力进行比较,所述嵌合抗体包括在每个板上。

[0389] 竞争ELISA数据总结于表5中。变体VH1/Vκ1、VH1/Vκ2、VH1/Vκ3、VH2/Vκ1、VH2/Vκ2和VH2/Vκ3与CEACAM1的结合在嵌合抗体的2倍以内,因此这些变体被带去进行Biacore多循环动力学分析。

[0390] 表5. 复合人抗体变体和对照抗体滴度和结合数据的总结。抗体表达滴度(μg/ml)来自静态HEK EBNA瞬时转染。将竞争测定中获得的IC50值归一化为同一板上测试的嵌合亲本抗体。

变体	平均表达滴度(μg/ml)	平均相对IC50值
嵌合体	9.5	1

VH0/Vκ1	27.1	2.5
VH1/Vκ0	14.7	1.0
VH1/Vκ1	24.4	1.5
VH1/Vκ2	26.5	1.3
VH1/Vκ3	29.4	1.2
VH1/Vκ4	26.1	4.4
VH2/Vκ1	30.6	1.7
VH2/Vκ2	31.9	1.6
VH2/Vκ3	33.4	1.7
VH2/Vκ4	20.3	7.2
VH3/Vκ1	25.6	弱/无结合
VH3/Vκ2	31.9	弱/无结合
VH3/Vκ3	35.3	弱/无结合
VH3/Vκ4	24.3	弱/无结合
VH4/Vκ1	29.8	弱/无结合
VH4/Vκ2	34.8	弱/无结合
VH4/Vκ3	34.3	弱/无结合
VH4/Vκ4	35.2	弱/无结合
VH5/Vκ1	26.0	弱/无结合
VH5/Vκ2	29.2	弱/无结合
VH5/Vκ3	24.8	弱/无结合
VH5/Vκ4	27.0	弱/无结合

[0392] 9. 人源化变体结合CEACAM1的动力学分析

[0393] 作为评估抗体组合和对照抗体与CEACAM1的结合的替代方法,在运行Biacore T200评价软件V2.0.1的Biacore T200上进行动力学分析。所有实验均在25°C下用HBS-P+运行缓冲液(pH 7.4)进行。

[0394] 使用CEACAM1-HIS(Sino Biologicals Inc.)作为分析物进行所有动力学实验。对于所有实验,将抗体固定在S系列蛋白质A传感器芯片表面上。对于动力学实验,需要限制固定/捕获配体的量以避免芯片表面的质量转移效应,并且表面应该理想地具有50-150RU的分析物结合水平(R_{max})。对于所有样品抗体的捕获设定使用CEACAM1分析物的45kDa的MW、150kDa的抗体配体(IgG的估计值)、50RU的 R_{max} 以及因为每个抗体结合2个靶分子的能力而为2的化学计量(S_m)、100RU的靶应答水平。

[0395] 单循环分析

[0396] 为了评估所有Composite Human AntibodyTM变体的结合,在所有瞬时转染的HEK EBNA细胞的上清液上进行了单循环动力学分析。纯化的嵌合抗体和掺入HEK EBNA培养基的纯化嵌合抗体被用作阳性对照。将上清液在HBS-P+中稀释至1μg/mL的浓度(通过IgG定量ELISA确定)。在每个循环开始时,将抗体加载到蛋白质A芯片的Fc2、Fc3和Fc4上,并以8μL/min的流速捕获以得到约100的RU。然后使表面稳定。以38μl/min的流速获得单循环动力学数据以最小化任何潜在的质量转移效应。对嵌合抗体进行多次重复以在动力学循环中检查

表面和分析物的稳定性。从Fc2、Fc3和Fc4的信号中减去来自参考信道Fc1(无抗体)的信号,以校正与参考表面的非特异性结合的差异。使用在各浓度之间没有再生的3.125至50nM CEACAM1的5点2倍稀释范围。监测5次递增浓度的CEACAM1注射的缔合相150秒并在CEACAM1的最后一次注射后,测量单个解离相150秒。使用2次注射10mM甘氨酸-HCL pH 1.5进行蛋白质A的再生,然后是500秒的稳定期。

[0397] 在单循环动力学的原始传感器图中,减去来自每种抗体空白运行(无CEACAM1)的信号以校正表面稳定性的差异。单循环动力学(表6)表明,嵌合抗体与含有VH3、VH4和VH5的人源化变体在缔合和解离速率方面均存在显著的动力学曲线差异。这种动力学的变化与这些变体无法在竞争ELISA中与嵌合抗体有效竞争密切相关。含有Vκ4的抗体变体也无法结合CEACAM1,再次证实了竞争ELISA的结果。

[0398] 表6.如使用Biacore T200确定的非纯化复合人抗体TM变体和对照抗体结合CEACAM1-HIS的单循环动力学数据。通过将测试抗体变体的KD除以加标嵌合亲本抗体的KD来计算与嵌合亲本抗体相比的KD倍数差异。NB表示无结合的变体。

[0399]

变体	K _D (nM)	针对嵌合亲本抗体的相对K _D
纯化的VH0/Vκ0	47.6	1.1
加标的VH0/Vκ0	43.2	1.0
VH0/Vκ1	56.1	1.3
VH1/Vκ0	76.6	1.8
VH1/Vκ1	93.4	2.2
VH1/Vκ2	148.0	3.4
VH1/Vκ3	119.0	2.8
VH1/Vκ4	143.0	3.3
VH2/Vκ1	180.0	4.2
VH2/Vκ2	138.0	3.2
VH2/Vκ3	72.6	1.7
VH2/Vκ4	77.8	1.8
VH3/Vκ1	1500.0	34.7
VH3/Vκ2	265.0	6.1
VH3/Vκ3	13400.0	310.2
VH3/Vκ4	NB	NB
VH4/Vκ1	243.0	5.6
VH4/Vκ2	3950.0	91.4
VH4/Vκ3	7060.0	163.4
VH4/Vκ4	NB	NB
VH5/Vκ1	12100.0	280.1
VH5/Vκ2	12200.0	282.4
VH5/Vκ3	185.0	4.3
VH5/Vκ4	NB	NB

[0400] 多循环分析

[0401] 通过多循环动力学分析测试了竞争ELISA中的6种先导变体 (VH1/V κ 1、VH1/V κ 2、VH1/V κ 3、VH2/V κ 1、VH2/V κ 2和VH2/V κ 3)。

[0402] 对于多循环动力学分析,将纯化的抗体以1 μ g/mL的蛋白质浓度固定在HBS-P+中。在每个循环开始时,在蛋白质A上捕获抗体,以得到约100的RU,并使表面稳定。以35 μ l/min的流速获得动力学数据以最小化任何潜在的质量转移效应。将空白(无CEACAM1)的多次重复和单一浓度的分析物的重复编程到动力学运行中,以便在动力学循环中检查表面和分析物的稳定性。对于动力学分析,选择从100至1.5625nM CEACAM1的2倍稀释系列。最初监测CEACAM1的缔合相180秒。在后续实验中,为了更好地达到稳定状态,使用了更长的缔合时间(275秒)。测量解离相250秒。在每个循环结束时,使用2次注射10mM甘氨酸-HCL pH 1.5进行蛋白质A表面的再生。

[0403] 从Fc2、Fc3和Fc4的信号中减去来自参考信道Fc1的信号以校正与参考表面的非特异性结合的差异,在1对1结合模型中使用全局R_{max}参数。通过将Composite Human Antibody™变体的K_D除以同一芯片上的嵌合亲本抗体的KD来计算与嵌合亲本抗体相比的相对K_D。数据总结在表7中。

[0404] 复合人抗体变体VH1/V κ 1、VH1/V κ 2、VH1/V κ 3、VH2/V κ 1、VH2/V κ 2和VH2/V κ 3表现出与嵌合亲本抗体2倍以内的亲和力。参见表8。

[0405] 表7.如使用Biacore T200确定的六种复合人抗体变体结合CEACAM1-HIS的多循环动力学数据(n=1)。通过将测试的抗体变体的K_D除以每个芯片上测试的嵌合亲本抗体的KD来计算与嵌合亲本抗体相比的K_D的倍数差异。

变体	K _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _d (s ⁻¹)	K _D (nM)	R _{max} (RU)	Chi ² (RU ²)	针对嵌合亲本 抗体的相对 K _D
[0406] VH0/ V κ 0	1.95 x10 ⁵	5.30 x10 ⁻³	27.2	50.3	0.182	1.00
VH1/ V κ 1	1.01 x10 ⁵	3.84 x10 ⁻³	38.1	35.1	0.041	1.40
VH2/ V κ 1	1.56 x10 ⁵	5.20 x10 ⁻³	33.3	34.6	0.045	1.22

VH0/ V κ 0	2.56 x10 ⁵	5.71 x10 ⁻³	22.3	45.6	0.268	1.00
VH1/ V κ 2	1.95 x10 ⁵	5.51 x10 ⁻³	28.3	26.3	0.0641	1.27
VH2/ V κ 2	1.79 x10 ⁵	4.96 x10 ⁻³	27.8	30.1	0.0835	1.25
[0407] VH0/ V κ 0	2.72 x10 ⁵	5.31 x10 ⁻³	19.5	43.9	0.501	1.00
VH1/ V κ 3	2.21 x10 ⁵	5.94 x10 ⁻³	26.8	28.0	0.172	1.37
VH2/ V κ 3	2.11 x10 ⁵	5.88 x10 ⁻³	27.8	28.0	0.170	1.43

[0408] 表8.由如使用Biacore T200确定的多循环动力学获得的6种测试的复合人抗体变体的相对KD值总结。通过将测试的抗体变体的K_D除以每个芯片上测试的嵌合亲本抗体的KD

来计算与嵌合亲本抗体相比的 K_D 的倍数差异。平均相对 K_D 是由两个独立实验确定的。

变体	针对嵌合亲本抗体实验 1 的相对 K_D	针对嵌合亲本抗体实验 2 的相对 K_D	针对嵌合亲本抗体的平均相对 K_D
[0409] VH1/V κ 1	1.50	1.40	1.45
VH1/V κ 2	1.66	1.27	1.46
VH1/V κ 3	1.92	1.37	1.65
VH2/V κ 1	1.39	1.22	1.31
VH2/V κ 2	1.29	1.25	1.27
VH2/V κ 3	1.59	1.43	1.51

[0410] 实施例2:N连接的糖基化位点的去除

[0411] 序列分析揭示了在原始小鼠杂交瘤重链位置N56处和轻链内位置S27 (基于Kabat编号系统编号)处存在潜在的N连接的糖基化基序。这些位点突变以去除N连接的糖基化位点(即N56Q和S27(f)A)。去糖基化的残基以粗体突出显示于表19中。

[0412] 实施例3:分离的复合人抗体变体对CEACAM1的特异性

[0413] 使用分别用表达CEACAM1、CEACAM5和CEACAM6的载体转染的HeLa细胞,通过流式细胞术评估选择的抗体变体的结合选择性。将所得细胞用于流式细胞术实验并在37°C、5.0% CO₂下在补充有10%胎牛血清、青霉素(100U/ml)和双氢链霉素(100 μ g/ml)的Dulbecco改良Eagle培养基中培养。将细胞系用所示抗体染色,然后用对所示抗体同种型具有特异性的荧光染料缀合的单克隆抗体(诸如人IgG4或小鼠IgG1)以及活染料(DAPI)染色。用Cytoflex流式细胞仪(Invitrogen)获得数据并用FlowJo软件(TreeStar,Windows的V7.6.5)分析。

[0414] 选择的CEACAM1抗体的结合特异性如表9所示。

[0415] 表9.使用分别用表达CEACAM1、CEACAM5和CEACAM6的载体转染的HeLa细胞,通过流式细胞术评估选择的抗体变体的结合选择性。所示为表达由所示抗体结合的相应抗原的细胞的相对荧光强度。

变体	CEACAM1	CEACAM5	CEACAM6
VH0/V κ 0	84.2	0.42	2.72
VH1 N56Q/V κ 4 S27(f)A	87.1	0.0622	2.26
VH2 N56Q/V κ 1 S27(f)A	88.7	3.91	13.5
VH2 N56Q/V κ 2 S27(f)A	89.4	3.04	9.5
VH2 N56Q/V κ 3 S27(f)A	79.1	2.19	8.27
VH2 N56Q/V κ 4 S27(f)A	89.3	0	1.31
VH1/V κ 4	81.1	4.47	1.19
hIgG4(阴性对照)	0	0	0.0979

[0417] 实施例4:由抗体治疗诱导的人造血细胞的扩增

[0418] 为了评估选择的抗体刺激CD45⁺人细胞扩增的功效,使用了HuNSG模型(Fisher等人Targeting of 4-1BB by monoclonal antibody PF-05082566enhances T-cell function and promotes anti-tumor activity.Cancer Immunol Immunother.2012Oct; 61(10):1721-33)。

[0419] 为此,从健康志愿者供体收集人全血并分离外周血单核细胞(PBMC)。经由腹膜内

注射将一千万个新鲜分离的人PBMC过继转移到NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) 宿主小鼠中。PBMC注射后十五天,向动物施用单剂量所示人源化抗体(经由腹膜内注射2mg/kg)。5天后,用人CD45抗体对PBMC进行染色以鉴定造血细胞,并经由荧光激活细胞分选(FACS)进行评估。结果总结于表10中。值越低表示细胞内染料稀释度越高,且人CD45⁺细胞的扩增增强。

[0420] 表10. 通过选择的CEACAM1抗体对人CD45⁺细胞进行体内治疗诱导其增殖。值越低表示细胞内染料稀释度越高,这表示人造血CD45⁺细胞扩增。

[0421]	抗体	荧光强度
	hIgG4对照抗体	126,218
	VH0/Vκ0	100,419
	VH2/Vκ4	62,015
	VH1/Vκ4	38,087

[0422] 实施例5: VH2 N56Q/Vκ4S27 (f) A scFv的亲合力成熟

[0423] 1. 噬菌体载体构建和亲本VH2N56Q/Vκ4S27 (f) AscFv的结合测试

[0424] 亲合力成熟的模板是VH2 N56Q/Vκ4S27 (f) A非糖基化人源化抗体。使用重叠PCR将编码起始抗体VH和Vκ的基因转化为scFv形式,其中重链经由15个氨基酸(G₄S)₃接头(SEQ ID NO: 47)连接至轻链。然后使用限制酶NcoI和NotI将scFv序列克隆到噬菌粒载体pANT65中,使得scFv在噬菌体表面上作为基因III融合蛋白展示。此质粒还允许在表达的scFv上表达C末端Flag标签。将克隆的scFv转化到大肠杆菌(TG1)中并通过测序证实所有构建体。

[0425] 制备了展示亲本VH2 N56Q/Vκ4S27 (f) A scFv或无关scFv的M13辅助噬菌体(单价)和超噬菌体(多价),并测试其与CEACAM1 (Sino Biological)的结合。衍生自亲本VH2 N56Q/Vκ4S27 (f) A序列的噬菌体与抗原特异性结合,而与无关的噬菌体没有观察到结合。正如预期的那样,由于噬菌体表面上表现出scFv数量增加,亲本scFv超噬菌体的结合滴度低于亲本M13辅助噬菌体。

[0426] 2. 文库设计

[0427] 抗体内抗原结合的主要决定因素是CDR (Wu和Kabat, 1970)。针对VH CDR3和VκCDR3的靶突变已被证明是通过噬菌体展示提高亲和力的最有效手段之一(例如, Shier等人, 1996)。

[0428] 为了构建亲合力成熟文库,使用半随机密码子将人源化抗体VH CDR3和VκCDR3内的特定氨基酸靶向“热点”诱变。分析可能的接触残基的序列位置(<http://www.bioinf.org.uk/abs/MeanContacts.html>),并在每个块内按顺序排序。此信息与重链和轻链CDR3内任何给定位置的氨基酸优选一起使用(<http://www.abysis.org/>)。在可能的情况下,优先考虑每个块内排序最高的接触残基。

[0429] VH CDR3被鉴定为长度为11个氨基酸(Kabat定义)并被分裂成两个在G99处重叠的文库: 嵌段1 (G95至G99) 和嵌段2 (G99至A101), 每个文库含有所有位置的氨基酸子集。嵌段1中包括位置T93以允许锚定CDR的种系残基中更多的多样性。VκCDR3 (Q90至W96) 被覆盖在单一文库中, 每个位置都包含一组氨基酸。Kabat编号用于所有蛋白质序列坐标。

[0430] 3. 文库构建

[0431] 所有寡核苷酸均按照先前所述设计和合成 (IDT, Integrated DNA

Technologies)。手动混合简并引物以减少合成期间的核苷酸偏差。文库构建的概述如图1所示。

[0432] 含有VH2 N56Q/V κ 4S27(f)A亲本序列且配置为scFv的非表达质粒被设计为含有终止密码子,以防止亲本scFv主导选择(如亲和力成熟程序中经常观察到的那样)。使用Quikchange诱变(Agilent)在每个待随机化的序列区域中将终止密码子置于pANT65中的VH2N56Q/V κ 4 S27(f)A scFv中,使得仅有其中终止密码子已被文库编码的氨基酸替换的突变抗体变体才会表达。通过使用这种方法,未突变的亲本序列将被截断,因此不会显示。

[0433] 对于两个VH CDR3文库(嵌段1和嵌段2),通过使用终止密码子模板进行两次PCR来实现随机化。最初,用随机化的5'文库引物和对V κ 轻链FW4具有特异性的3'引物扩增VH的一部分以及V κ 。在单独的PCR中,用基于重链FW1区的5'引物加上与VH CDR随机化引物的一部分互补的3'引物扩增VH的剩余部分。然后通过退火两个扩增片段并通过使用附加两个用于片段的亚克隆的限制位点(Nco I或Not I)的引物的PCR再扩增scFv来构建全长VH CDR随机化的scFv文库。

[0434] 对于V κ CDR3文库,通过进行两次PCR进行V κ CDR3的随机化。在第一次PCR中,使用随机化的3'引物和含有Nco I限制位点的VH FW1特异性5'引物来扩增大部分scFv基因并将突变引入V κ CDR3中。第二次PCR添加了scFv的剩余部分并附加了限制位点(Not I),用于片段的亚克隆。

[0435] 使用Nco I和Not I消化所有三个文库的纯化的扩增DNA,并连接到相似切割的噬菌粒载体(pANT65)中。将连接的DNA沉淀,重悬于无核酸酶的水中,并通过电穿孔转化到新鲜制备的电感受态TG1细胞中。第二天,计数集落,刮板并制备甘油储液。将文库电穿孔多次以便充分覆盖理论文库多样性。观察到的三个文库中每一个的文库大小如表11所示。在所有情况下,获得4.95倍或更高的覆盖率。对来自三个文库中每一个的单个集落进行测序以证实适当的CDR块已经突变。

[0436] 表11. 所制备的三个CDR文库的理论和观察到的噬菌体文库大小。

	VH CDR3 嵌段1文库	VH CDR3 嵌段2文库	V κ CDR3文库
[0437] 理论多样性(基于文库DNA序列)	2.52×10^7	2.52×10^7	2.83×10^7
[0438] 观察到的集落计数	1.25×10^8	1.79×10^8	2.02×10^8
文库覆盖率	4.95	7.11	7.12

[0439] 4. 文库噬菌体复苏(rescue)

[0440] 使用至少100x观察到的文库多样性的接种物将来自每个文库的细菌接种到150ml 2TYCG (2%) 培养物中。培养物生长至对数中期($OD_{600nm} \approx 0.4$),并且估计细胞总数(基于 OD_{600nm} 为 $1 \approx 5 \times 10^8$ 细胞/ml)。添加超噬菌体并孵育15min(静态),然后以250rpm孵育45min,然后离心,重悬于2TYCK培养基中并在30°C生长过夜。第二天,通过离心回收培养上清液,然后使用3/10体积的冷却的20% PEG/2.5MNaCl沉淀来收获噬菌体。在冰上孵育1小时后,通过离心回收沉淀的噬菌体,并将沉淀重悬于1x PBS pH 7.4中。再离心上清液以去除任何细胞碎片,然后如上所述再沉淀上清液。将沉淀的噬菌体重悬于1x PBS pH 7.4中。为了增加

获得具有增加的亲和力的scFv的机会,由于起始抗体的相对低的亲和力,因此使用多价超噬菌体(M13K07 Δ pIII辅助噬菌体)以20的感染复数用于文库复苏。在第一轮选择之后,由于抗原结合物的预期富集,因此使用感染复数为10的单价M13K07辅助噬菌体(New England BioLab)。

[0441] 5. 亲和力改善的噬菌体选择

[0442] CEACAM1始终被用于阳性选择。使用密切相关的家族成员CEACAM3、CEACAM5和CEACAM6(Sino Biological)以50nM的每种蛋白质的最终浓度进行可溶性去选择,以减少选择具有CEACAM3、CEACAM5和CEACAM6交叉反应性的亲和力成熟的scFv的可能性。这通过在第二轮和第三轮之前去选择在活动期间进行了两次。在整个活动期间,三个文库在所有阶段保持分离。

[0443] 对于选择,用3% BSA/PBS预封闭每个文库,然后将噬菌体与递减浓度的生物素化的可溶性CEACAM1抗原一起孵育至多两小时。孵育后,将链霉亲和素顺磁珠(如上预封闭)添加到每个选择,并颠倒旋转10分钟。链霉亲和素-抗原-噬菌体复合物在每轮连续选择中使用递增次数的PBST洗涤进行洗涤,然后是PBS洗涤,在每个步骤之间用磁体捕获。对于VH B2文库,在第二轮中,由于第一轮输出滴度较低,因此使用更高浓度的CEACAM1来富集选择的噬菌体结合物的数量。仅对于轻链文库,进行了第四轮选择以进一步富集阳性结合噬菌体,因为第三轮输出滴度相对较大。通过添加50mM HCl从珠上洗脱噬菌体,然后通过添加1M Tris-HCl pH 9.0中和溶液。

[0444] 6. 可溶性scFv的表达(periprep)

[0445] 可溶性scFv最初作为粗周质提取物表达和测试。将来自选择输出的单个集落挑入1ml 2TYCG(0.1%)培养基中并通过在37°C下振荡5小时使其生长。通过添加IPTG至1mM的最终浓度来诱导培养物,然后在30°C振荡生长过夜。第二天,将培养物离心并丢弃上清液。将细菌沉淀重悬于TES缓冲液pH 7.4中并在冰上孵育30分钟。然后将板离心,并将含有scFv的上清液转移到新鲜板上用于测定。

[0446] 7. peripreps的高通量竞争筛选

[0447] 在单点竞争测定中筛选来自不同轮次选择的集落的peripreps,以确定其与亲本RSB02 IgG竞争结合CEACAM1的能力。在每个测定板上包括亲本RSB02 scFv和无关scFv用于比较。

[0448] 将Nunc Immuno MaxiSorp 96孔平底微量滴定板用0.0625 μ g/ml的CEACAM1涂覆过夜。随后将板洗涤并用3% BSA/PBS在室温下封闭1小时。使用6% BSA/PBS中的0.246 μ g/mL的VH2 N56Q/Vk4S27(f)A IgG(亲本RSB02 IgG)以1:1稀释周质提取物。然后将稀释的周质提取物添加到封闭的板(每孔100 μ L)中,并在室温下将样品在板上孵育1小时。随后洗涤板,并且用抗人HRP抗体(Sigma,Gillingham,UK)和TMB底物(Invitrogen)检测VH2 N56Q/Vk4S27(f)A IgG的结合。用1M HCl终止反应,在Dynex Technologies MRX TC II读板器上在450nm处读取吸光度,并绘制结合数据。

[0449] 基于竞争ELISA中相对于在同一板上测定的亲本RSB02 scFv的活性,鉴定了改进的克隆。总共分析了所有三个文库中超过7300个peripreps。将阳性命中挑入‘cherry’板中,在竞争ELISA中重新测试以证实结果并进行测序。在VH B1(第3轮后测序的克隆中约41%为单个优势克隆)和VL文库(第3轮和第4轮测序的克隆中约20%为单个优势克隆)中均

鉴定出优势单序列克隆。VL文库似乎含有具有更强抑制能力的scFv,从而导致阳性命中的截止点更高(至少50%抑制)。参见图2。

[0450] 为了选择用于组合产生IgG的先导VH和VL,对阳性命中(来自一级筛选和二级筛选)进行排序,以确定与亲本相比具有最高平均抑制百分比的VH和VL。选择了五个VH B1克隆、三个VH B2克隆和11个VL克隆。在序列分析期间,L4被鉴定为由两个不同序列组成的混合VL克隆。这些被分别克隆以产生克隆L4#1和L4#2,从而导致总共十二个VL克隆被推进。重新格式化后,轻链L4#2随后显示具有与L17相同的序列。最初来自VH B1文库的He3除了含有B1内的变化外,还含有B2中的单个突变。二十个先导克隆及其CDR序列的总结如表12所示。

[0451]

表 12. 使用 CEACAM1 竞争 ELISA 鉴定的 20 种 scFv 变体先导的总结。亲本 CDR 示于表的顶部。亲本序列中靶向的 VHB1 和 B2 以及 Vκ 区以粗体显示。每个克隆的 VHCDR3 B1、VHCDR3 B2 和 VκCDR3 内与亲本序列不同的突变带有下划线。注意: L4#2 和 L17 显示为相同序列。

克隆	文库						VL SEQ ID NO
	VH B1 序列	VH B1 SEQ ID NO	VH B2 序列	VH B2 SEQ ID NO	VL 序列	VL SEQ ID NO	
亲本	CTRGLYYGPAWFAY	27	CTRGLYYGPAWFAY	27	QQHYSTPWT	36	
He3	CTRALTYGPAWLAY	28					
He4	CTRALTYGPAWFAY	29					
He6	CARARTYGPAWFAY	30					
He9	CARAMYYGPAWFAY	31					
He17	CTRARTYGPAWFAY	32					
He1			CTRGLYYGPSWFAY	33			
He13			CTRGLYYGPSWLAY	34			
He14			CTRGLYYGPSWVAY	35			
L1					QSHYPFYTYT	8	
L2					QSHYPFPYTYT	37	
L3					QSHFPFPFT	38	
L4 #1					QSHFPYTYTYT	39	
L4 #2					QSHYPYPT	40	
L5					QSHYPFAFT	41	
L6					QSHYPFSFT	42	
L16					QSHYPYPT	43	
L17					QSHYPYPT	44	
L18					QSHFPYPT	45	
L19					QSHIYPNFT	46	
L20					QSHFPYPLT	9	

[0452] 实施例6:亲和力成熟的完整抗体的构建和测试

[0453] 1.将先导scFv重新格式化为抗体

[0454] 使用引入侧翼限制酶位点的引物对通过scFv筛选鉴定出的二十种变体进行PCR扩增,以克隆到IgG4 S241P pANTVhG4载体和 κ 轻链pANTVK载体中。使用MluI和HindIII限制位点将八种亲和力成熟的VH变体亚克隆到IgG4 S241P pANTVhG4载体中。相似地,使用BssHII和BamHI限制位点将十二种亲和力成熟的V κ 序列亚克隆到 κ 轻链pANTVK载体中。

[0455] 2.将先导20个重新格式化的scFv表达为完整IgG

[0456] 为了表达,将八个先导人源化亲和力成熟的IgG4 VH变体以及亲本人源化重链(VH2 N56Q)与亲本人源化轻链(V κ 4S27(f)A)和12个先导人源化亲和力成熟的 κ 轻链组合,以得到总共117种组合。使用PEI转染方法将这些组合瞬时转染到12孔板中的HEK EBNA粘附细胞(LGC标准)中。转染后七天,收获上清液,将其通过ELISA量化并过滤用于Biacore单循环动力学分析。

[0457] 实施例7:人源化和亲和力成熟的先导IgG结合CEACAM1的单循环动力学分析

[0458] 为了评估人源化亲和力成熟的IgG的结合,使用运行Biacore T200控制软件V2.0.1和Biacore T200评价软件V3.0(Uppsala,Sweden)的Biacore T200对粗上清液进行单循环动力学分析。将抗体在HBS-P+(GE Healthcare)中稀释至1.0 μ g/ml的最终浓度。在每个循环开始时,将抗体加载到蛋白质A芯片(GE Healthcare)的Fc2、Fc3和Fc4上。以10 μ l/min的流速捕获IgG,以得到约100RU的固定化水平(RL)(所计算的结合分析物后获得约50-150RU的Rmax的水平)。然后使表面稳定。使用CEACAM1作为分析物以35 μ l/min的流速获得单循环动力学数据以最小化任何潜在的质量转移效应。用亲本(VH2 N56Q/V κ 4S27(f)A)抗体进行多次重复以检查表面和分析物在动力学循环中的稳定性。从Fc2、Fc3和Fc4的信号中减去来自参考信道Fc1(无抗体)的信号,以校正与参考表面的非特异性结合的差异。使用在各浓度之间没有再生的25nM至100nM CEACAM 1的三点两倍稀释范围。减去来自每种抗体空白运行(无CEACAM1)的信号以校正表面稳定性的差异。每次监测三次递增浓度的CEACAM1注射的解离相200秒并在CEACAM1的最后一次注射后,测量单个解离相300秒。使用两次注射10mM甘氨酸-HCL pH 1.5进行蛋白质A表面的再生,然后是240秒的稳定期。

[0459] 在两次实验中测试了所述117种组合。表13.单循环动力学常数表明所有亲和力成熟的抗体结合CEACAM1。

[0460] 表13.人源化和亲和力成熟的先导IgG结合CEACAM1的单循环动力学分析。对117种人源化和亲和力成熟的变体测试上清液获得的单循环动力学数据,按从最好至最差排序。倍数=优于亲本的倍数。 K_D 以nM为单位。选择用于进一步分析的变体以粗体显示。

[0461]

变体	K _D	倍数	变体	K _D	倍数	变体	K _D	倍数
He9/L4#2	57	9.71	He9/L4 #1	78	2.05	He14/L2	102	1.56
He9/L6	22	7.10	He17/L1	78	2.03	He14/L5	102	1.56
He9/L3	27	5.85	He3/ 亲本 VL	78	2.03	He13/L1 8	103	1.54
He9/L16	32	5.05	He17/L6	79	2.01	亲本 VH/ L4 #1	103	1.54
He9/L17	33	4.88	He17/L5	81	1.97	He17/L1 7	104	1.53
He9/L18	36	4.40	He17/L2	82	1.95	He6/L2	104	1.53
He4/L4#2	127	4.34	He3/L18	82	1.94	He13/L6	105	1.51
He3/L4#2	130	4.24	He6/L18	83	1.92	He13/L1 6	105	1.51
亲本 VH/ L1	41	3.87	He3/L17	83	1.91	He14/L3	107	1.49
He6/L4#2	146	3.78	He4/L4 #1	83	1.91	He13/L1 7	372	1.48
He9/L20	44	3.61	He13/ L4#2	289	1.91	He1/L17	374	1.47
He9/L5	44	3.61	He6/L5	84	1.89	He13/L3	108	1.47
亲本 VH/ L4#2	163	3.38	He3/L2	86	1.85	He13/L2 0	109	1.46
He4/L16	52	3.04	He1/L4#2	301	1.83	He14/L6	111	1.43
He4/L18	55	2.89	He14/L19	87	1.83	He14/L2 0	114	1.39
He4/L3	55	2.87	亲本 VH/ L20	87	1.83	He14/ L4#2	396	1.39
亲本 VH/ L18	56	2.83	He14/亲本 VL	88	1.80	He13/L4 #1	115	1.38
亲本 VH/L6	57	2.81	He1/L5	307	1.80	He1/L6	402	1.37
亲本 VH/	61	2.62	He6/L20	89	1.79	He1/L4 #1	429	1.28

变体	K _D	倍数	变体	K _D	倍数	变体	K _D	倍数
L16								
He3/L1	62	2.57	He6/L6	89	1.78	He6/ 亲本 VL	125	1.27
He4/L17	62	2.55	He4/L19	90	1.77	He13/L1	126	1.26
亲本 VH/ L3	63	2.53	He4/L20	90	1.77	He17/ 亲本 VL	128	1.24
He4/L1	64	2.49	He6/L17	91	1.75	He13/L1 9	129	1.23
亲本 VH/ L5	66	2.42	He14/L18	91	1.75	He17/L1 9	135	1.18
He6/L16	66	2.41	He13/ 亲本 VL	91	1.74	He3/L19	135	1.18
He17/L16	67	2.36	He3/L6	93	1.72	He1/L2	487	1.13
He4/L5	68	2.36	He14/ L4 #1	93	1.70	He4/ 亲本 VL	155	1.03
He9/L1	69	2.32	He14/L16	93	1.70	He6/ L4 #1	155	1.03
He14/L1	69	2.30	He1/L18	326	1.69	He1/ 亲本 VL	544	1.01
He9/L2	70	2.27	He6/L3	94	1.69	He13/L1 7	159	1.00
亲本 VH/ L2	70	2.26	He17/L3	95	1.68	亲本 VH/亲本 VL	159	1.00
He4/L6	72	2.22	He3/L5	95	1.68	亲本 VH/亲本 VL	551	1.00
He3/L16	72	2.22	He13/L5	95	1.68	He3/L3	163	0.98
He3/L20	74	2.15	He14/L17	97	1.64	He1/L1	568	0.97
He17/ L4#2	258	2.14	He17/L18	98	1.62	He17/ L4 #1	165	0.96
He1/L3	263	2.10	He6/L1	98	1.62	He9/L19	193	0.82
He4/L2	76	2.09	He1/L16	341	1.62	He6/L19	237	0.67
He1/L20	264	2.09	He13/L2	98	1.62	He9/ 亲本 VL	262	0.61
亲本 VH/ L17	76	2.08	He17/L20	99	1.61	He1/L19	996	0.55
亲本 VH/ L19	77	2.08	He3/ L4 #1	99	1.61			

[0463] 在分析单循环数据之后,基于亲和力的改善以及动力学曲线中观察到的差异(包括与He3/L20、He17/L1和He17/L16观察到的明显更快的缔合和解离速率),选择了十二种变体。十二种变体包括多个重链和轻链,具有不同倍数的改善,以减轻与其他CEACAM家族成员发生交叉反应性的风险(表13中的粗体)。

[0464] 实施例8:先导抗体的测试

[0465] 1. 先导抗体的表达、纯化和测试

[0466] 使用PEI方法将12个先导组合变体以及亲本IgG(表13中以粗体表示的变体)瞬时转染到三口烧瓶中的HEK EBNA粘附细胞中,并在转染后孵育5-7天。在蛋白质A琼脂糖柱(GE Healthcare)上从细胞培养上清液纯化抗体,将缓冲液更换为PBS pH 7.2,并使用基于预测的氨基酸序列的消光系数通过OD_{280nm}进行量化。通过SDS-PAGE分析2μg的每种减少的抗体,

并且观察到对应于典型抗体曲线的条带。

[0467] 2.12个先导变体结合CEACAM1/-3/-5/-6的交叉反应性ELISA

[0468] 使用亲本IgG进行的结合实验先前已表明与CEACAM1具有特异性结合,并且与CEACAM3/5和6没有交叉反应性。使用结合ELISA测定评估了12种先导变体的CEACAM3/5和6与亲本IgG的交叉反应性。在相同测定中结合CEACAM1被用作阳性对照。使用鼠泛CEACAM抗体D14HD11(Abcam)作为阳性对照,以证实CEACAM1/-3/-5和-6的完整性。

[0469] 将Nunc Immuno MaxiSorp 96孔平底微量滴定板(ThermoFisher)在4℃下用1x PBS中的0.5μg/ml CEACAM1预涂覆过夜。第二天,将板在室温下用2% BSA/PBS封闭1小时,然后用PBS/0.05% Tween20pH 7.4洗涤2次。为了鉴定合适的评估交叉反应性的抗体浓度,产生了亲本IgG和D14HD1的结合曲线。进行三倍稀释系列,从5.0μg/ml开始至0.0069μg/ml;将它们添加到板中并在室温下孵育1小时。3次PBST洗涤后,将含有亲本IgG的孔与山羊抗人IgGκ链-HRP抗体(Merck Millipore)一起孵育。将含有D14HD11的孔与抗小鼠过氧化物酶IgG(Sigma Aldrich)一起孵育,使用TMB底物(Invitrogen)检测结合,并用3M HCl终止反应。在Dynex Technologies MRX TC II读板器上在450nm处读取吸光度并将其用于绘制结合曲线。RSB02亲本抗体和D14HD11均获得了完整的S形曲线。

[0470] 为了测试交叉反应性,选择了三个浓度进行测试,对应于亲本IgG CEACAM1结合产生的结合曲线的高(1.67μg/ml)、中(0.062μg/ml)和低(0.0069μg/ml)点。对1.67μg/ml、0.062μg/ml和0.0069μg/ml的所有12种变体结合CEACAM1/-3/-5和-6进行测试,所有变体均在4℃下以0.5μg/ml以1x PBS涂覆过夜。将1.67μg/ml的亲本IgG结合CEACAM1的吸光度设定为100%结合。然后相对于同一板上1.67μg/ml的亲本IgG的CEACAM1结合的吸光度计算所有变体的CEACAM1/-3/-5和-6结合百分比。12种变体所获得的绘制的结合数据如图3所示。

[0471] 正如预期的那样,RSB02亲本IgG和所有12种测试变体在所有测试浓度下均与CEACAM1结合(图3)。作为阳性对照,对D14HD11进行测试,并且显示其可结合CEACAM1/-3/-5和-6(图3E)。

[0472] 尽管不同CEACAM的N结构域具有高度同源性,但可以观察到这种高度选择性:CEACAM1和CEACAM3的N结构域为88%同一,CEACAM1和CEACAM5的N结构域为89%同一,并且CEACAM1和CEACAM6的N结构域为90%同一,如使用Clustal2.1产生的同一性百分比矩阵所示。参见PCT公开W02020/118295的图13。

[0473] 3.通过单循环动力学对12个先导进行的交叉反应性分析

[0474] 为了进一步评估人源化、亲和力成熟的先导IgG的交叉反应性,使用CEACAM3、5和6以及CEACAM1作为阳性对照进行了单循环Biacore动力学分析。

[0475] 将抗体在HBS-P+中稀释至1.0μg/ml的最终浓度。在每个循环开始时,将抗体加载到蛋白质A芯片的Fc2、Fc3和Fc4上。CEACAM结合后,以10μl/min的流速捕获IgG以得到50-150的R_{max}。用亲本(VH2 N56Q/Vκ4S27(f)A)抗体进行多次重复以检查表面和分析物在动力学循环中的稳定性。从Fc2、Fc3和Fc4的信号中减去来自参考信道Fc1(无抗体)的信号,以校正与参考表面的非特异性结合的差异。使用在各浓度之间没有再生的25nM至200nM CEACAM1/-3/-5/-6的四点两倍稀释范围。减去来自每种抗体空白运行(无CEACAM)的信号以校正表面稳定性的差异。每次监测四次递增浓度的每个CEACAM注射的解离相275秒并在每个CEACAM的最后一次注射后,测量单个解离相250秒。使用两次注射10mM甘氨酸-HCl pH

1.5进行蛋白质A表面的再生,然后是稳定期。

[0476] 使用鼠泛CEACAM抗体D14HD11作为阳性对照,以确定CEACAM1/-3/-5/-6的功能性。使用蛋白质A传感器芯片导致不理想的D14HD11捕获,因此使用了抗小鼠捕获试剂盒(GE Healthcare)并进行了另外的运行。D14HD11在HBS P+中稀释至5 μ g/ml,并以10 μ l/min的流速加载到抗小鼠传感器芯片的Fc2上,以得到每个CEACAM所需的固定水平。从Fc2的信号中减去来自参考信道Fc1(无抗体)的信号,以校正与参考表面的非特异性结合的差异。使用在各浓度之间没有再生的70nM至280nM CEACAM1/-3/-5/-6的三点两倍稀释范围。减去来自每种抗体空白运行(无CEACAM)的信号以校正表面稳定性的差异。每次监测三次递增浓度的CEACAM注射的解离相275秒并在CEACAM的最后一次注射后,测量单个解离相1800秒(30分钟)。使用一次注射10mM甘氨酸-HCL pH 1.7进行抗小鼠传感器表面的再生,然后是稳定期

[0477] 虽然所有测试的变体都与CEACAM1结合,但通过Biacore未观察到与CEACAM3/5/6的结合。这与用亲本IgG观察到的结合一致。D14HD11显示出与所有测试的CEACAM的结合。

[0478] 4.12个先导变体对CEACAM1的多循环动力学

[0479] 使用运行Biacore T200评估软件V3.0.1(Uppsala,Sweden)的Biacore T200仪器对十二种先导抗体进行多循环动力学分析,以建立对CEACAM1的准确亲和力。将纯化的抗体在HBS-P+中稀释至1 μ g/ml的浓度。在每个循环开始时,在蛋白质A表面上捕获每种抗体,以得到约100RU的RL。捕获后,使表面稳定。使用35 μ l/min的流速获得动力学数据以最小化任何潜在的质量转移效应。对于动力学分析,使用了CEACAM1。将空白(CEACAM1)的多次重复和单一浓度的分析物的重复编程到动力学运行中,以便在动力学循环中检查表面和分析物的稳定性。对于动力学分析,选择从200至3.125nM CEACAM1的两倍稀释范围。监测CEACAM1的缔合相275秒,并且测量解离相250秒。在每个循环结束时,使用两次注射10mM甘氨酸-HCL pH 1.5进行蛋白质A表面的再生。

[0480] 从Fc2、Fc3和Fc4的信号中减去来自参考信道Fc1的信号以校正与参考表面的非特异性结合的差异,并在1对1结合模型中使用全局Rmax参数。通过将RSB02亲本的 K_D 除以同一芯片上的人源化和亲和力成熟的变体的 K_D 来计算相对 K_D 。针对CEACAM1与RSB02亲和力成熟的变体的相互作用测量的动力学参数如表14所示。与亲本(VH2 N56Q/V κ 4S27(f)A)相比,所有人源化、亲和力成熟的变体均表现出亲和力的改善。

[0481] 与亲本IgG相比,He3/L20、He17/L1、He17/L16变体表现出显著更快的缔合和解离速率。

[0482] 表14.使用Biacore T200确定的RSB01亲本(VH2 N56Q/V κ 4S27(f)A)和十二条人源化亲和力成熟的先导结合CEACAM1的多循环动力学数据。与亲本(VH2 N56Q/V κ 4S27(f)A)相比的相对 K_D 是通过将亲本的 K_D 除以在同一芯片上测定的亲和力成熟的变体的 K_D 来计算的。*突出显示示出较差1:1拟合的变体,导致 K_D 和相对 K_D 确定不太准确。

变体	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Chi^2	针对亲本的 相对 K_D
[0483] 亲本 (VH2 N56Q/ Vk4 S27(f)A)	8.13×10^4	6.92×10^{-3}	8.52×10^{-8}	0.488	1.00
He3/ L20*	3.06×10^5	7.80×10^{-3}	2.55×10^{-8}	4.51	3.34
He17/ L1*	3.02×10^5	4.09×10^{-3}	1.35×10^{-8}	3.99	6.31

变体	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Chi^2	针对亲本的 相对 K_D
亲本 (VH2 N56Q/ Vk4 S27(f)A)	8.18×10^4	6.98×10^{-3}	8.53×10^{-8}	0.467	1.00
VHp/ L1	3.31×10^4	4.13×10^{-3}	1.25×10^{-7}	0.0692	0.68
He17/ L16*	3.08×10^5	7.95×10^{-3}	2.58×10^{-8}	7.17	3.31
亲本 (VH2 N56Q/ Vk4 S27(f)A)	4.20×10^4	5.15×10^{-3}	1.23×10^{-7}	0.248	1.00
He4/L16	3.75×10^4	1.46×10^{-3}	3.89×10^{-8}	0.474	3.16
He14/ L1*	1.08×10^5	7.24×10^{-3}	6.73×10^{-8}	4.65	1.83
[0484] 亲本 (VH2 N56Q/ Vk4 S27(f)A)	4.02×10^4	5.25×10^{-3}	1.31×10^{-7}	0.327	1.00
He9/ L4 #2	3.86×10^4	1.30×10^{-3}	3.37×10^{-8}	0.685	3.89
He9/L3	4.40×10^4	1.39×10^{-3}	3.16×10^{-8}	1.16	4.15
亲本 (VH2 N56Q/ Vk4 S27(f)A)	3.63×10^4	6.75×10^{-3}	1.86×10^{-7}	0.0496	1.00
VHp/ L18	3.57×10^4	3.62×10^{-3}	1.01×10^{-7}	0.0871	1.84
He9/L17	3.67×10^4	1.50×10^{-3}	4.09×10^{-8}	0.318	4.55
亲本 (VH2 N56Q/ Vk4 S27(f)A)	5.48×10^4	1.04×10^{-2}	1.91×10^{-7}	0.0563	1.00
VHp/ L4 #2	2.98×10^4	4.37×10^{-3}	1.47×10^{-7}	0.0501	1.30
He9/L6	3.81×10^4	1.51×10^{-3}	3.96×10^{-8}	0.347	4.82

[0485] 实施例9:如通过流式细胞术确定的亲和力成熟的CEACAM1抗体的特异性

[0486] 使用分别用表达CEACAM1、CEACAM3、CEACAM5、CEACAM6或CEACAM 8的载体转染的HeLa细胞,通过流式细胞术评估选择的抗体变体的结合选择性。将所得细胞用于流式细胞术实验并在37°C、5.0% CO₂下在补充有10%胎牛血清、青霉素(100U/ml)和双氢链霉素(100μg/ml)的Dulbecco改良Eagle培养基中培养。将细胞系用所示抗体染色,然后用对所示抗体同种型具有特异性的荧光染料缀合的单克隆抗体(诸如人IgG4或小鼠IgG1)以及活染料(DAPI)染色。用Cytoflex流式细胞仪(Invitrogen)获得数据并用FlowJo软件(TreeStar, Windows的V7.6.5)分析。

[0487] 选择的CEACAM1抗体的结合特异性如表15所示。

[0488] 表15. 使用分别用表达无CEACAM(Neo)、CEACAM1(C1)、CEACAM5(C5)、CEACAM6(C6)或CEACAM 8(C8)的载体转染的HeLa细胞,通过流式细胞术评估选择的抗体变体的结合选择性。所示为表达由所示抗体结合的相应抗原的细胞的相对量。*表示用于亲和力成熟的亲本抗体。Co1-1(CEACAM3/5)、9A6(CEACAM6)、T84.1(CEACAM1、3、5)、T84.66(CEACAM5)和80H3(CEACAM 8)是对照抗体。

[0489]

VH	VL	Neo	C1	C3	C5	C6	C8
He3	20		+++				
He4	16		+++		+++	+++	
He9	3		+++		+++	+++	
He9	6		+++		+++	+	
He9	17		+++		+++	++	
He9	L4#2		+++		+++	+++	
He14	1		+++				
VH2 N56Q*	Vk4 S27(f)A		+++				
17	1		+++		+	+	
17	16		+++		+		
VH2 N56Q	1		+++				
VH2 N56Q	4#2		+++		+		
VH2 N56Q	18		+++		+++		
Co1-1			+	+++	+++		
9A6			+			+++	+
T84.1			+++	+++	+++	+++	
T84.66			+		+++	+	+
80H3		+++	+				+++

[0490] 实施例10:如通过表面等离子共振(SPR)确定的亲和力成熟的CEACAM1抗体He14/L1的特异性

[0491] 通过单循环表面等离子共振(SPR)显示抗体He14/L1与hCEACAM1、hCEACAM3、hCEACAM5和hCEACAM6的结合特异性。

[0492] 为了评估He14/L1与hCEACAM1、hCEACAM3、hCEACAM5和hCEACAM6的结合,进行了单循环动力学分析。动力学实验在25℃下于运行Biacore T200控制软件V2.0.1和评价软件V3.0(Cytiva,Uppsala,Sweden)的Biacore T200上进行。使用HBS-P+(Cytiva,Uppsala,Sweden)作为运行缓冲液以及配体和分析物稀释液。在每个循环开始时,抗体被加载到蛋白质A传感器芯片(Cytiva,Uppsala,Sweden)上。考虑到不同的分析物分子量(CEACAM1为100RU,hCEACAM3为375RU,hCEACAM5为71RU,hCEACAM6为150RU),以10 μ l/min的流速捕获IgG至预定的固定水平。然后使表面稳定。使用在各浓度之间没有再生的在运行缓冲液中的70-280nM的抗原的三点两倍稀释范围。每次监测三次递增浓度的抗原注射的缔合相80秒并在抗原的最后一次注射后,测量单个解离相150秒。对小鼠D14HD11(一种抗泛hCEACAM对照抗体)也使用了相似的方法。然而,在这种情况下,使用了固定有抗小鼠捕获试剂(Cytiva,

Uppsala, Sweden) 的CM5芯片, 监测缔合275秒, 并监测解离1800秒。数据被双重引用并减去。

[0493] 如图4所示, 抗体He14/L1结合hCEACAM1具有高度特异性。

[0494] 实施例11: CEACAM抗体和CEACAM1的晶体结构

[0495] 为了精确绘制CEACAM1与人源化、亲和力成熟和非糖基化抗体He14/L1之间的结合界面, 以原子分辨率确定了人CEACAM1与He14/L1 Fab片段复合的晶体结构(表16)。所述共晶体的结构已使用PDB代码7N3W存放在RCSB蛋白质数据库中。

[0496] 表16. He14L1: 人CEACAM1结构(PDB ID 7N3W)的晶体信息、数据收集和细化参数。最外层壳的 α 值在括号中给出。

[0497]	数据收集	
		NYX (NSLS-II)
	d_{\min} (Å)	1.84
	波长(Å)	0.979
	观察次数	630632
	多重性 ^a	6.1(6.3)
	平均(I)/(σ) ^a	11.0 (1.2)
[0498]	完整性(%) ^a	96.7(91.8)
	R_{merge} (%) ^a	0.1084 (1.364)
	$CC_{1/2}$ ^a	0.998 (0.494)
	结构细化	
	布拉格间距(Bragg spacing) (Å)	45.36-1.85
	空间群(Space group)	P2 ₁
	细胞参数: a , b , c	55.14、134.08、86.00 和 $\beta = 92.83$
	R / R_{free} (%)	16.2 / 20.8
	独特反射的数量	103,414
	总原子数量(非 H)	9,348
	蛋白质原子数量(非 H)	8,456
	水域数量	16
	平均 B 因子(Å ²)	41.5
	rmsd 键长(Å)	0.017
rmsd 键角(°)	1.6	
Ramachandran 支持/允许(%)	97/2.8	

[0499] 无标签CEACAM1在大肠杆菌中表达, 在含有精氨酸的缓冲液中重新折叠并纯化。He14/L1 Fab是通过用固定化木瓜蛋白酶树脂消化提供的抗体来制备的, 然后用1ml HiTrap MabSelect SuRe柱(GE Healthcare)进行纯化, 然后进行凝胶过滤层析。在结晶筛选之前将纯化的CEACAM1和Fab以1:1的摩尔比混合。鉴定CEACAM1:He14/L1Fab复合物的初始结晶命中, 并随后进行优化。衍射质量晶体在室温下在含有20% PEG 8000和0.1M HEPES pH 7.5的条件下生长。洗涤过的晶体的SDS-PAGE分析和银染色揭示了所述复合物的所有预期组分。

[0500] CEACAM1:VH14/VL1 Fab复合物的结构确定为1.85 Å分辨率。所述复合物在原始单斜空间群P2₁中结晶, 并在不对称单元中看见所述复合物的两个拷贝。在结构坐标文件

中,链A和L对应于Fab轻链,链B和H对应于Fab重链,并且链C和D对应于CEACAM1分子。所述复合物(链C、L和H)的结构如图5A所示。

[0501] GFCC'面结合

[0502] He14/L1Fab以1:1的化学计量比通过GFCC'界面与晶体不对称单元中存在的CEACAM1对称配偶体结合(图5D)。在此界面中,CEACAM1 GFCC'残基,特别是F29、Q44、T56、Q89和N97,有助于与重链和轻链残基CDR紧密结合(表17),并且CEACAM1的CC'和FG环显示出积极参与复合物的形成。这些GFCC'面残基对于人CEACAM1同源二聚体的形成及其与各种配体(诸如TIM-3、HopQ)的相互作用也很重要。Fab复合物中的CEACAM1与二聚体中的CEACAM1原聚体的叠加在81个对齐的C α 位置上产生0.453Å的均方根偏差。GFCC'结合界面具有0.74的较高的形状互补性得分,并且这是结合的优选面。

[0503] ABED面结合

[0504] He14/L1Fab以1:1的化学计量比与晶体不对称单元中存在的CEACAM1结合(表18)。在复合物形成后,Fab似乎会干扰CEACAM1的结构。具体地说, β 链的C'和C''以及C'至C''环在参与自我缔合的过程中存在显著的结构差异。在复合物中,此受干扰区内的分子内氢键相互作用较少,导致C''链明显变短,并且C'的方向发生偏移,因为二聚体中形成C''链的残基成为延伸环的一部分(图5B)。Fab复合物中的CEACAM1与二聚体中的CEACAM1原聚体的叠加在81个对齐的C α 位置上产生了1.32Å的均方根偏差。如图所示,受干扰的环似乎会干扰二聚化,并且相关表面会因Fab结合而改变。

[0505] CEACAM1上的表位在CEACAM1的分子表面代表中显示(图5C)。在He14/L1 Fab轻链中,CDR1主要与C'链和C'至C''环中的CEACAM1残基相互作用,而CDR3主要与D和E链以及D至E环中的残基相互作用。在Fab重链中,CDR1和CDR2与A链和B链以及相关的互连环相互作用。此外,重链Lys65和CEACAM1 Glu5的侧链之间可能存在弱静电相互作用(相距4.5Å,未绘制)。相互作用表面具有0.58的形状互补性。轻链CDR2和重链CDR3不与CEACAM1相互作用。

[0506] 人CEACAM1同源二聚体的晶体结构(PDB 4QXW)突出显示了GFCC'面在同源二聚体形成中的重要性。此外,ABED面晶体结构(PDB 2GK2)支持ABED面在CEACAM1低聚物形成中作为次级小界面的作用。GFCC'和ABED面结合都存在于He14/L1 CEACAM1复合晶体结构的同一晶格中,表示He14/L1通过GFCC'和ABED面与人CEACAM1表现出独特的双重结合模式(图5E)。

[0507] 表17. He14/L1 Fab残基参与结合CEACAM1的GFCC'面。 $\$$ 相互作用位点位于CEACAM1/CEACAM1结合界面的中心。此表描述了一级和二级氢键和疏水相互作用以及所涉及的残基。*一级氢键相互作用。

CEACAM1 残基	抗体重链残基	抗体轻链残基	氢键(Å)	疏水相互作用(Å)
T56 (OG1)	D31 (OD2) (CDR1)		2.76*	
Q44 (NE2)	Y102 (OH) (CDR3)		3.86*	
Y48 (N)	Y102 (OH) (CDR3)		3.48*	
L95 (O)	Y101 (OH) (CDR3)		2.73*	
Y31 (O)	Y102 (OH) (CDR3)		3.89*	
F29	P104 (CDR3)			芳香族-脯氨酸
F29	Y33 (CDR1)		5.1	
N97	Y101 (CDR3)		4.5	
Q89\$	Y101/Y102 (CDR3)			
D94 (O)		Y38 (OH) (CDR1)	2.78*	
D94 (OD2)		N34 (ND2) (CDR1)	2.91*	
F29		Y98 (CDR3)		芳香族

[0509] 表18.He14/L1 Fab残基参与结合ABED面。标出了所涉及的一级和二级氢(H)键相互作用和残基。*一级氢键相互作用。

CEACAM1 残基	抗体重链	抗体轻链	H 键 (Å)	注释

	残基	残基		
[0511]	M7 (O) (主链氧)	Q57 (NE2) (侧链) (CDR2)	2.78*	CEACAM1 残基 P8 不直接参与结合抗体, 但为 M7-Q57 结合提供了最佳结构构象。
	E16 (OE2) (侧链)	Y33 (OH) (羟基) (CDR1)	3.43*	
	Q26 (侧链)	Q27 (侧链) (CDR1)	4.1	CEACAM1 残基 Q27 不直接参与结合抗体, 但为 Q26-Q27 结合提供了最佳结构构象。
	Y48 (羟基)	S32 (侧链) (CDR1)	4.5	CEACAM1 残基 A49 不直接参与结合抗体, 但为 Y48-S32 结合提供了最佳结构构象。
	Q53 (主链氧)	A33 (主链氧) (CDR1)	3.28	CEACAM1 残基 Q54 不直接参与结合抗体, 但为 Q53-A33 结合提供了最佳结构构象。
	Y68 (OH) (羟基)	Y98 (OH) (羟基) (CDR3)	2.76*	CEACAM1 残基 P69 不直接参与结合抗体, 但为 Y68-Y68 结合提供了最佳结构构象。
	N70 (ND2) (侧链)	P99 (O) (主链) (CDR3)	2.8*	

[0512] 实施例12:CEACAM1抗体阻断CEACAM1:TIM-3相互作用

[0513] 检测选择的CEACAM1抗体减少CEACAM1与TIM-3结合的能力。一式三份进行CEACAM1/TIM-3竞争ELISA研究以确定选择的抗体(浓度范围0-250nM)抑制人TIM-3IgV结构域无标记蛋白和人CEACAM1-GST蛋白结合的能力。将3μg/ml hTIM-3无标签蛋白孵育过夜以涂覆板后,用含有10mM CaCl₂的Tris缓冲盐水缓冲液(TBS-Ca²⁺缓冲液)中的2% BSA洗涤和封闭孔。在浓度范围为0-250nM的抗体存在下,使用4μM hCEACAM1-GST标记蛋白阻断hTIM-3结合hCEACAM1-GST蛋白。人IgG4抗体用作对照(0-250nM)。使用来自Abcam(1:2000)的山羊多克隆抗GST-HSP抗体检测人CEACAM1-GST蛋白,并通过添加TMB溶液(Life technologies)进行了测定。在读板器上在450nm处读取OD值。在Graphpad Prism中绘制数据并确定最佳拟合IC₅₀值。如图6所示,所示CEACAM抗体阻断了CEACAM1:TIM-3异嗜性相互作用。

[0514] 实施例13:CEACAM1抗体逆转衍生自对检查点抑制剂疗法有抗性的患者的肿瘤解离细胞中的T细胞功能

[0515] 为了评估CEACAM1抗体逆转对用检查点抑制剂(诸如PD-1/PD-L1和CTLA-4抑制剂)治疗有抗性的患者中的T细胞耗竭的能力,从患有对派姆单抗(PD-1抑制剂)有继发性抗性的黑素瘤患者(CY123.1)中分离外周血单核细胞(PBMC)。在存在各种浓度(0.3-30nM)的可溶嵌合(亲本)或人源化和亲和力成熟的重链(He3、He17、He14)和/或轻链((L20、L1)变体或hIgG4同种型对照抗体的情况下,将PBMC重悬并在T细胞刺激条件下在200ml完全培养基

(RPMI 1640, Lonza) 中培养, 所述培养基补充有10%胎牛血清 (FCS)、1%谷氨酰胺、100IU/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素 (Life Technologies)、25mM HEPES (Sigma-Aldrich), 一式三份, 使用96孔U底板以 0.5×10^5 细胞/ml的浓度与100IU/ml重组IL-2 (NIH) 和可溶性1mg/ml的CD3 (UCHT1, Abcam)。培养96hr后, 通过三次评估CD3⁺CD8⁺T细胞级分中的细胞内Ki67表达来测量细胞增殖。

[0516] 如图7所示, CEACAM1抗体逆转了PD-1抗性肿瘤中的T细胞耗竭。

[0517] 实施例14: CEACAM1抗体诱导来自转移性黑素瘤的CD45阳性细胞中B细胞和T细胞的诱导

[0518] 检查了CEACAM1抗体He14/L1对来自转移性黑素瘤的CD45阳性细胞的影响。

[0519] 将来自三种转移性黑素瘤 (原初治疗, n=1; 治疗抗性, n=2) 的等量分选CD45阳性细胞在37°C下在培养基中用He14/L1 (5mg/ml) 或人IgG4同种型对照 (5mg/ml) 体外处理42小时, 并进行单细胞测序。简而言之, 按照制造商的方案, 使用10X Genomics Chromium Controller和Chromium Single Cell 5' Library&Gel Bead试剂盒处理细胞。样品在Illumina NovaSeq S2-100仪器上进行测序。使用Cell Ranger管道进行解复用、条形码处理、单细胞5'唯一分子标识符 (UMI)、转录本比对和计数。通过Seurat中的Read10x () 命令函数连续将数据导入R中进行分析。绘制并评估了合并数据集中的细胞计数和每个细胞的UMI/转录本数量 (nUMI), 并应用了质量控制指标。合并数据集并使用典型相关分析建立组间相似的细胞, 并通过应用主要组分分析分数和二维UMAP内元簇的可视化来定义细胞。簇鉴定基于特征基因。这鉴定出了同种型 (IS0) 和He14/L1样品中的元簇 (M2) 内的B细胞和四个元簇 (M0、M20、M23、M25) 内的T细胞。

[0520] 如图8所示, 与对照抗体相比, 用抗体He14/L1处理导致B细胞 (从164个细胞至347个细胞) 和T细胞 (从394个细胞至913个细胞) 在42小时内扩增, 这表示He14/L1引起B细胞和T细胞的广泛诱导, 这些应答对抗肿瘤活性很重要。

[0521] 实施例15: 对治疗有抗性的患者的细胞上的CEACAM1表达

[0522] 检查了从治疗抗性患者和原初患者中分离的肿瘤相关B细胞、肿瘤相关单核细胞和T细胞上的CEACAM1表达。

[0523] 使用Tb159标记的抗人CEACAM1单克隆抗体 (用于产生He14/L1的亲本抗体) 或一组重金属标记的抗体对来自健康供体 (HD, n=5)、原初治疗黑素瘤患者 (PBMC-N, n=5) 和治疗抗性黑素瘤患者 (PBMC-R, n=5) 的外周血单核细胞 (PBMC) 或来自原初治疗黑素瘤 (肿瘤-N, n=9) 或治疗抗性黑素瘤 (肿瘤-R, n=16) 的机械解离转移性肿瘤进行染色, 用于免疫分析 (Maxpar® Direct™ Immune Profiling Assay™)。在CyTOF2质谱流式细胞仪上对染色的细胞进行分析。通过标准方法进行样品采集、使用R进行文件处理以及使用Cytobank进行质谱流式细胞术数据分析, 以通过多重单细胞获得全面的表型分析。进行簇类鉴定、表征和回归 (Citrus) 分析, 以建立标记物与临床表型之间的关联。基于制造商 (Fluidigm) 定义的标记物, 分析了与B细胞、单核细胞和CD8⁺T细胞级分一致的细胞, 以确定由原初治疗和治疗抗性样品中Tb159标记的单克隆亲本抗体检测到的人CEACAM1表达中位水平, 并与Citrus分析鉴定的元簇相关。用Kruskal-Wallis测试和Dunn的多重比较测试进行统计分析。*, p, 0.05, ** p<0.01

[0524] 如图9所示, 与从原初治疗肿瘤样品中分离的细胞相比, 在治疗耐药性肿瘤样品

中,代表肿瘤相关B细胞、单核细胞和CD8⁺T细胞的元簇中的CEACAM1表达增加。

[0525] 表19. 序列概述。

[0526]

SEQ ID NO	专利申请名称	序列
可变重链		
10	嵌合亲本可变重链(VH0)	EVQLVESGGGFVVKPGGSLKLSCAASGFSFSDY YLYWVRQTPEKRLEWVATISVGGGNTSYPDS VKGRFTISRDNKNNLYLQMSSLKSEDTAMY YCTRGLYYGPAWFAYWGQGLTVTSA
11	VH1 (人源化)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFSFSDY YLYWVRQAPGKGLEWVATISVGGGNTSYPD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAM YYCTRGLYYGPAWFAYWGQGLTVTVSS
12	VH2 (人源化)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFSFSDY YLYWVRQAPGKGLEWVATISVGGGNTSYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAM YYCTRGLYYGPAWFAYWGQGLTVTVSS
13	VH1 (人源化, 非糖基化)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFSFSDY YLYWVRQAPGKGLEWVATISVGGGQTSYPD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAM YYCTRGLYYGPAWFAYWGQGLTVTVSS
14	VH2 (人源化, 非糖基化) 非糖基化突变以粗体显示; CDR 带有下划线	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFSFSDY <u>YLYWVRQAPGKGLEWVATISVGGGQTSYAD</u> SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAM YYCTRGLYYGPAWFAYWGQGLTVTVSS
15	He14 (人源化, 亲和力成熟、非	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFSFSDY <u>YLYWVRQAPGKGLEWVATISVGGGQTSYAD</u>

SEQ ID NO	专利申请名称	序列
	糖基化) 非糖基化突变 以粗体显示; CDR 带有下划线	<u>SVKGRFTISRDN</u> SKNTLYLQMN <u>SLRAEDTAM</u> <u>YYCTRGLYYGPSWVAYWGQ</u> GLTVTVSS
16	He17 (人源化、亲和力成熟、非糖基化) 非糖基化突变 以粗体显示; CDR 带有下划线	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDY <u>YLYWVRQAPGKGLEWVATISVGGGQ</u> TSYAD <u>SVKGRFTISRDN</u> SKNTLYLQMN <u>SLRAEDTAM</u> <u>YYCTRARTYGPAWFAYWGQ</u> GLTVTVSS
17	He3 (人源化、亲和力成熟、非糖基化) 非糖基化突变 以粗体显示; CDR 带有下划线	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDY <u>YLYWVRQAPGKGLEWVATISVGGGQ</u> TSYAD <u>SVKGRFTISRDN</u> SKNTLYLQMN <u>SLRAEDTAM</u> <u>YYCTRALTYGPAWLAYWGQ</u> GLTVTVSS
可变轻链		
[0527] 18	嵌合亲本可变轻链(Vκ0)	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNLS SNQKNYLAWFQQTPGQSPKLLVYFASTRESG VPDRFIGSGSGTDFTLTISVKAEDLADYFCQQ HYSTPWTFGGGKLEIK
19	Vκ4 (人源化)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLS NQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQ HYSTPWTFGGGKVEIK
20	Vκ4 (人源化, 非糖基化) 非糖基化突变 以粗体显示; CDR 带有下划线	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLS <u>ANQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTRESG</u> <u>VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQ</u> <u>QH</u> YSTPWTFGGGKVEIK
21	L1 (人源化、亲和力成熟、非糖基化) 非糖基化突变 以粗体显示; CDR 带有下划线	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLS <u>ANQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTRESG</u> <u>VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQ</u> <u>SHYPFY</u> TFGGGKVEIK
22	L20 (人源化、亲和力成熟、非糖	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLS <u>ANQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTRESG</u>

SEQ ID NO	专利申请名称	序列
	基化) 非糖基化突变 以粗体显示; CDR 带有下列 线	VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ <u>SHFPYPLTFGGG</u> TKVEIK
CDRs		
1	He14 CDR1H = He17 CDR1H = He3 CDR1H	DYYLY
2	He14 CDR2H = He17 CDR2H = He3 CDR2H	TISVGGG Q TSYADSVKG
3	He14 CDR3H	GLYYGPSWVAY
4	He17 CDR3H	ARTYGPWFAY
5	He3 CDR3H	ALTYGPWLAY
6	L1 CDR1L = L20 CDR1L	KSSQSLLNSANQKNYLA
7	L1 CDR2L = L20 CDR2L	FASTRES
8	L1 CDR3L	QSHYPFYIT
9	L20 CDR3L	QSHFPYPLT
CEACAM1 序列		
23	CEACAM1 (NCBI 参考序 列 NP_001703.2 ; UNIPROT ID P13688) 信号序列: 残基 1-34 Ig-V N 结构域: 残基 35-142	MGHLSAPLHRVRVPWQGLLLTASLLTFWNPP TTAQLTTESMPFNVAEGKEVLLL VHNLPQQL FGYSWKGERVDG NRQIVGYAIGTQQATPGP ANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVI KSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNSNPV EDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINNQLSPVS PRLQLSNGNRTL TLLSVTRNDTGPYECEIQNP VSANRSDPVT LNVTYGPDTPTISPSDYYRPG ANLSLSCYAASNPPAQYSWLINGTFQQSTQEL FIPNITVNNSGSYTCHANN SVTGCNRTTVKTI VTELSPVVAKPQIKASKTTVTGDKDSVNL TCS TNDTGISIRWFFKNQSLPSSERMKLSQGNTTLS INPVKREDAGTYWCEVFNPI SKNQSDPIMLNV NYNALPQENGLSPGAIAGIVIGVVALVALIAV ALACFLHFGKTGRASDQRDLTEHKPSVSNHT QDHSNDPPNKMNEVTYSTLNFEAQQPTQPTS ASPSLTATEIHYSEVKKQ
24	CEACAM1 的 成熟形式(无信 号序列)	QLTTESMPFNVAEGKEVLLL VHNLPQQLFGY SWYKGERVDG NRQIVGYAIGTQQATPGPANS GRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDL VNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNSNPVEDKD AVAFTCEPETQDTTYLWWINNQLSPVSPRLQL SNGNRTL TLLSVTRNDTGPYECEIQNPVSANR SDPVT LNVTYGPDTPTISPSDYYRPGANLSL CYAASNPPAQYSWLINGTFQQSTQELFIPNITV

[0528]

SEQ ID NO	专利申请名称	序列
[0529]		NNSGSYTCHANNSVTGCNRTTVKTIIVTELSP VVAKPQIKASKTTVTGDKDSVNLTCSTNDTGI SIRWFFKNQSLPSSERMKLSQGNTTLSINPVKR EDAGTYWCEVFNPIKKNQSDPIMLNVNYAL PQENGLSPGAIAGIVIGVVALVALIAVALACFL HFGKTGRASDQRDLTEHKPSVSNHTQDHSND PPNKMNEVTYSTLNFEAQQPTQPTSASPSLTA TEIHYSEVKKQ
其他序列		
25	用于诱变的 VH CDR3 嵌段	CTRGLYYGPAWFAYW
26	用于诱变的 VL CDR 3 嵌段	CQQHYSTPWTF

[0530] 虽然本发明的上述书面说明书使得普通技术人员能够制造和使用目前认为是其最佳模式的那些,但是普通技术人员将理解和领会本文具体实施方案、方法和实施例的变化、组合和等同物的存在。

VH CDR3 嵌段1 (B1) ⁹⁵ CTRGLYGPWFAYW¹⁰²
 --X-XXXXX-----

VH CDR3 嵌段2 (B2) ⁹⁵ CTRGLYGPWFAYW¹⁰²
 -----XXXXXX--

VL CDR3 ⁸⁹ CQQHYSTPWF⁹⁷
 -----XXXXXX--

图1

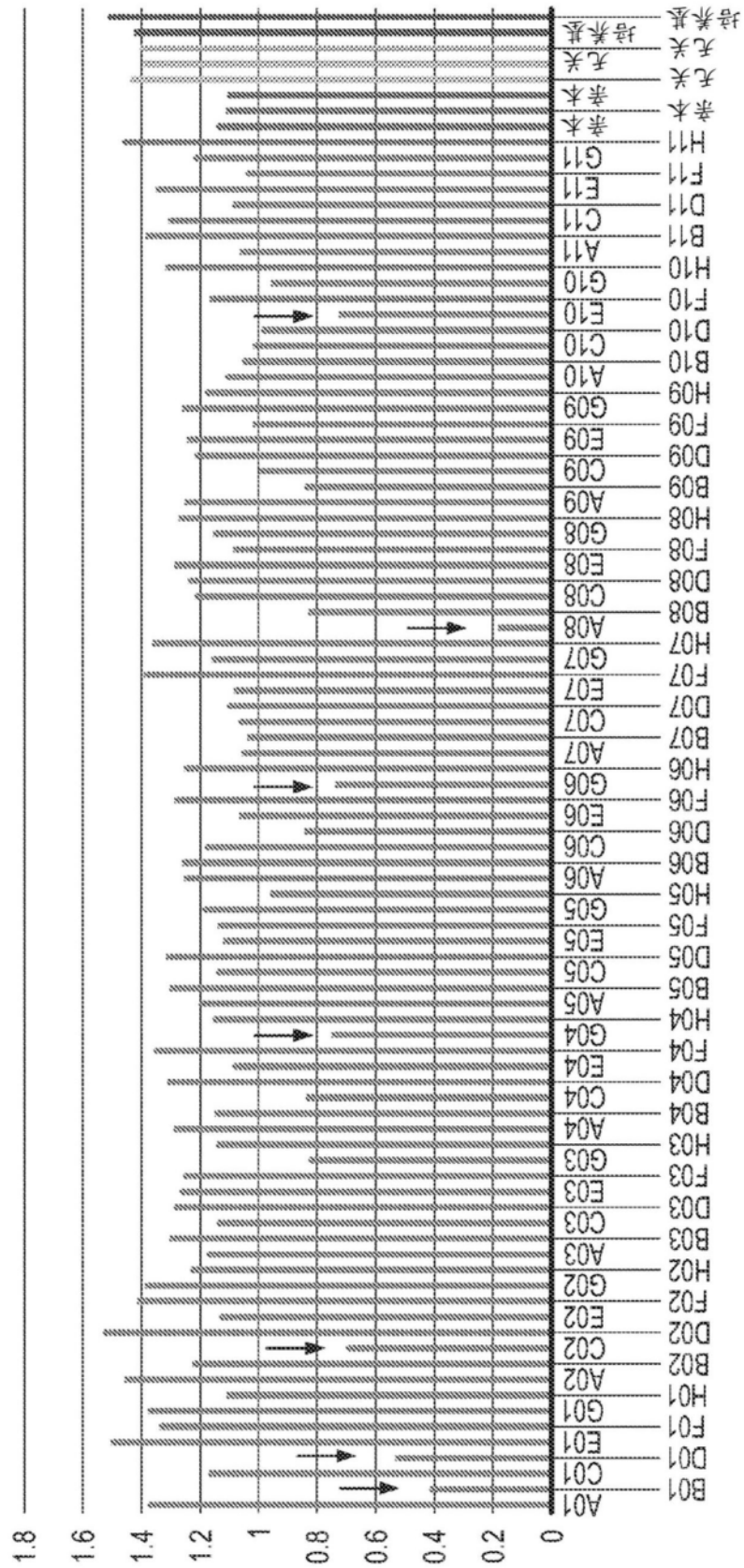


图2

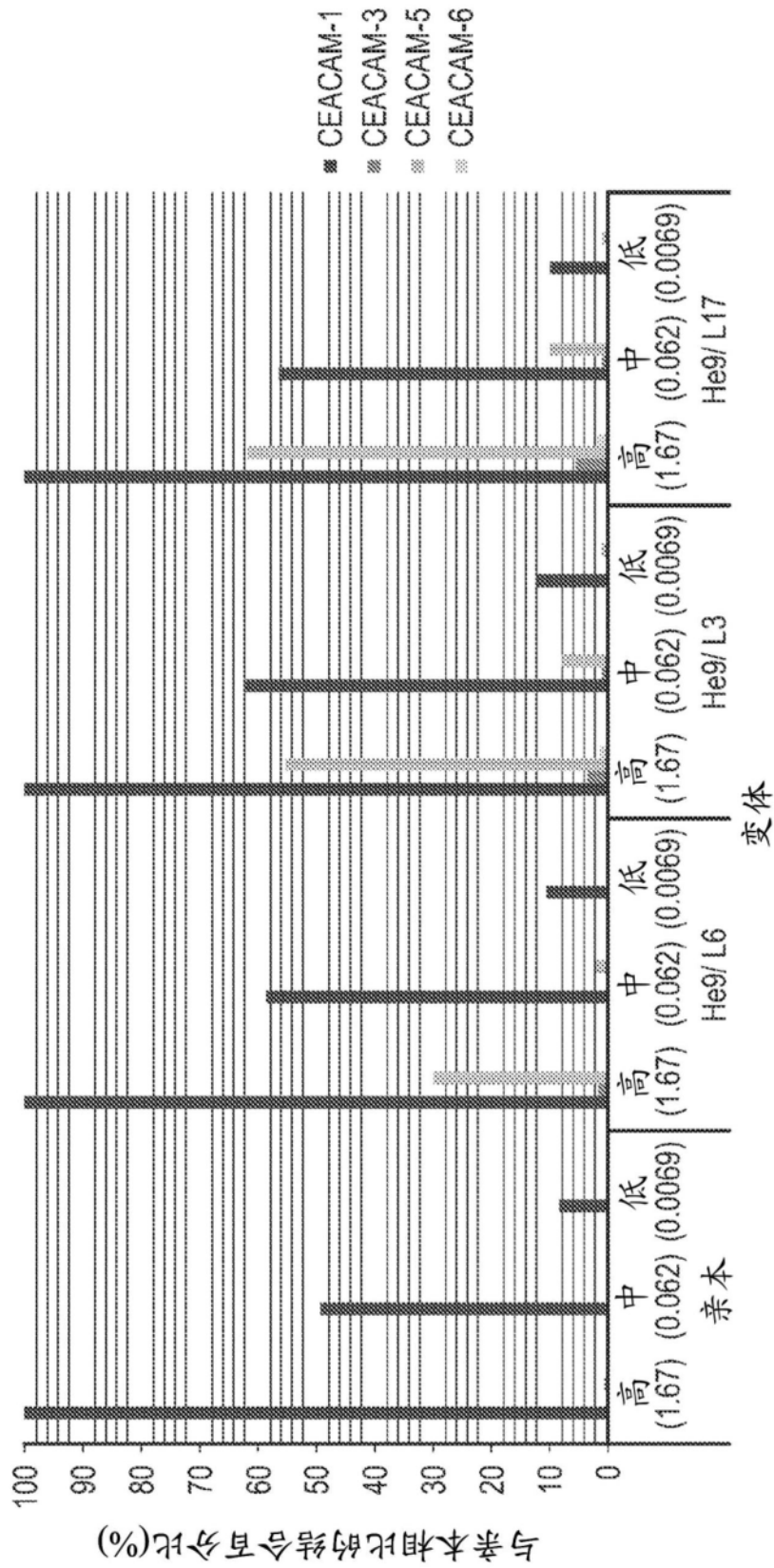


图3A

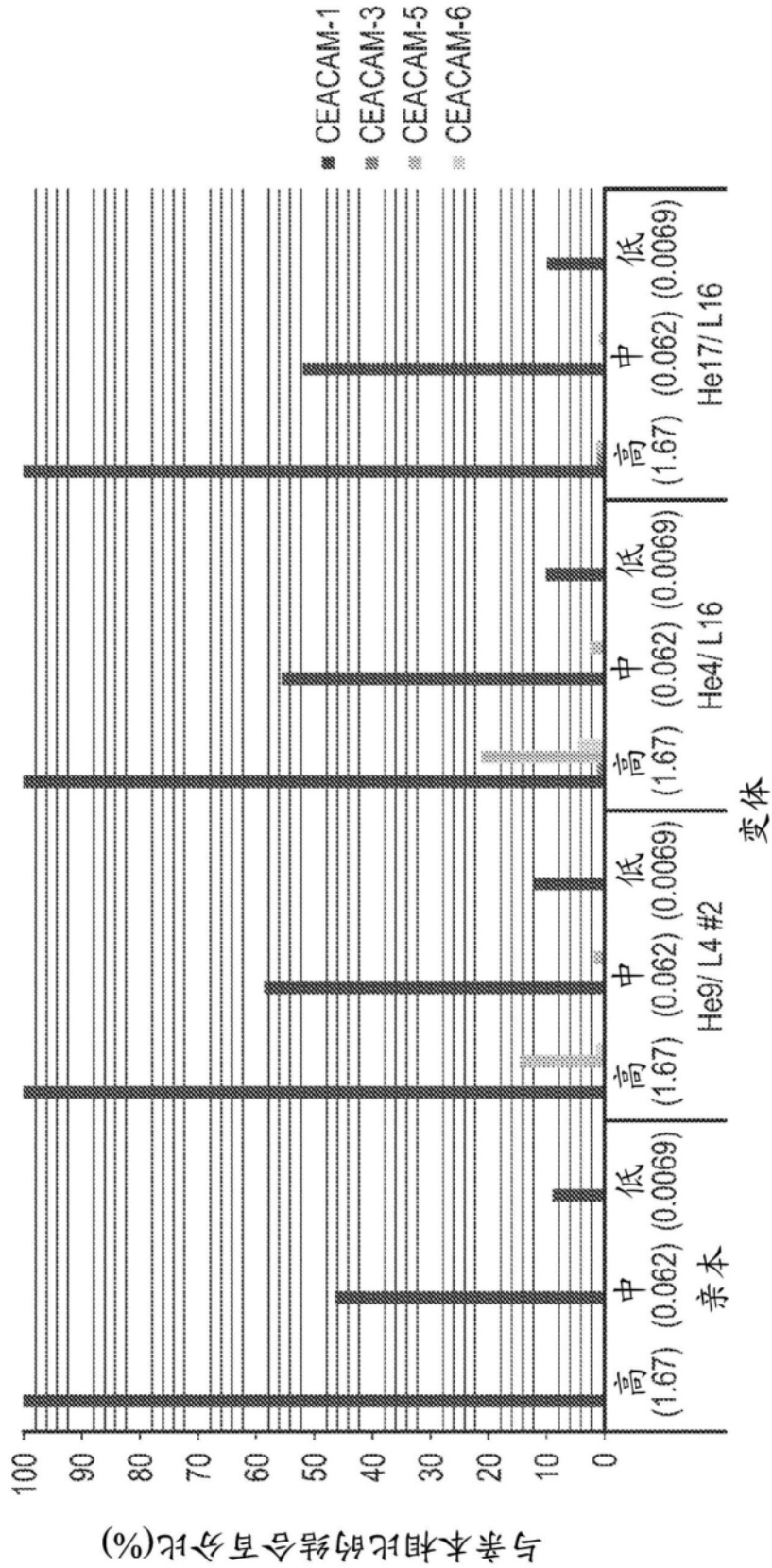


图3B

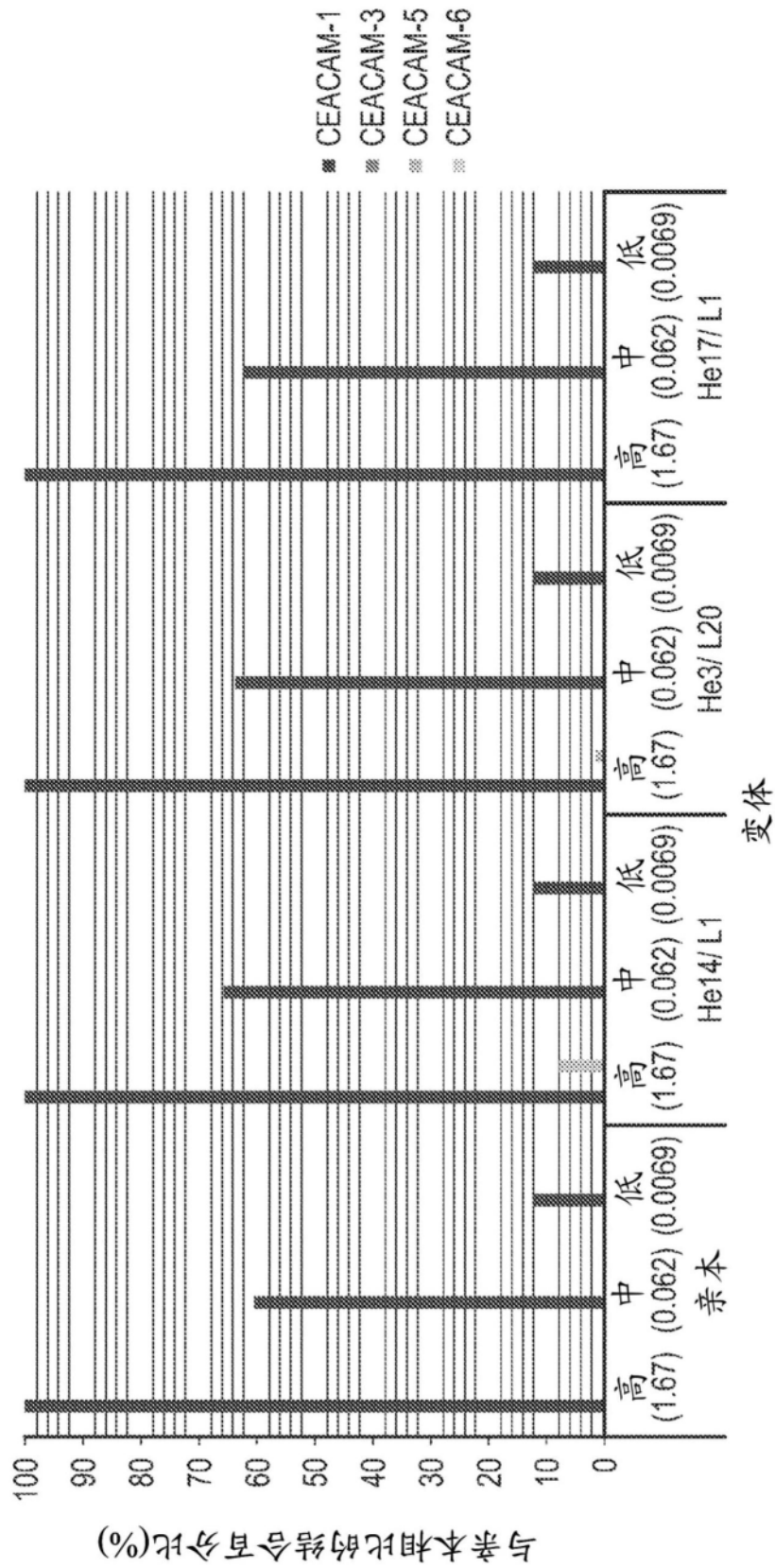


图3C

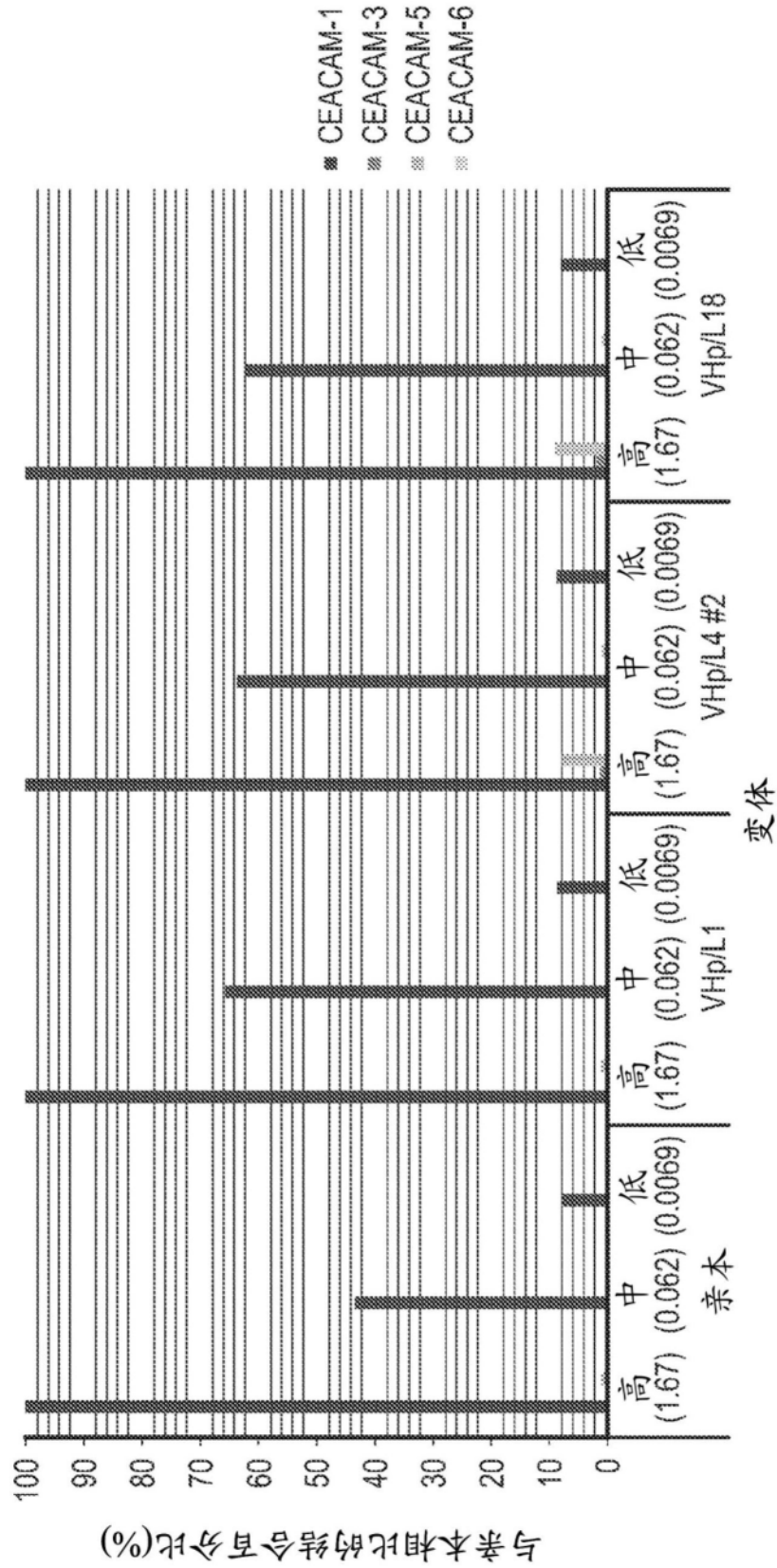


图3D

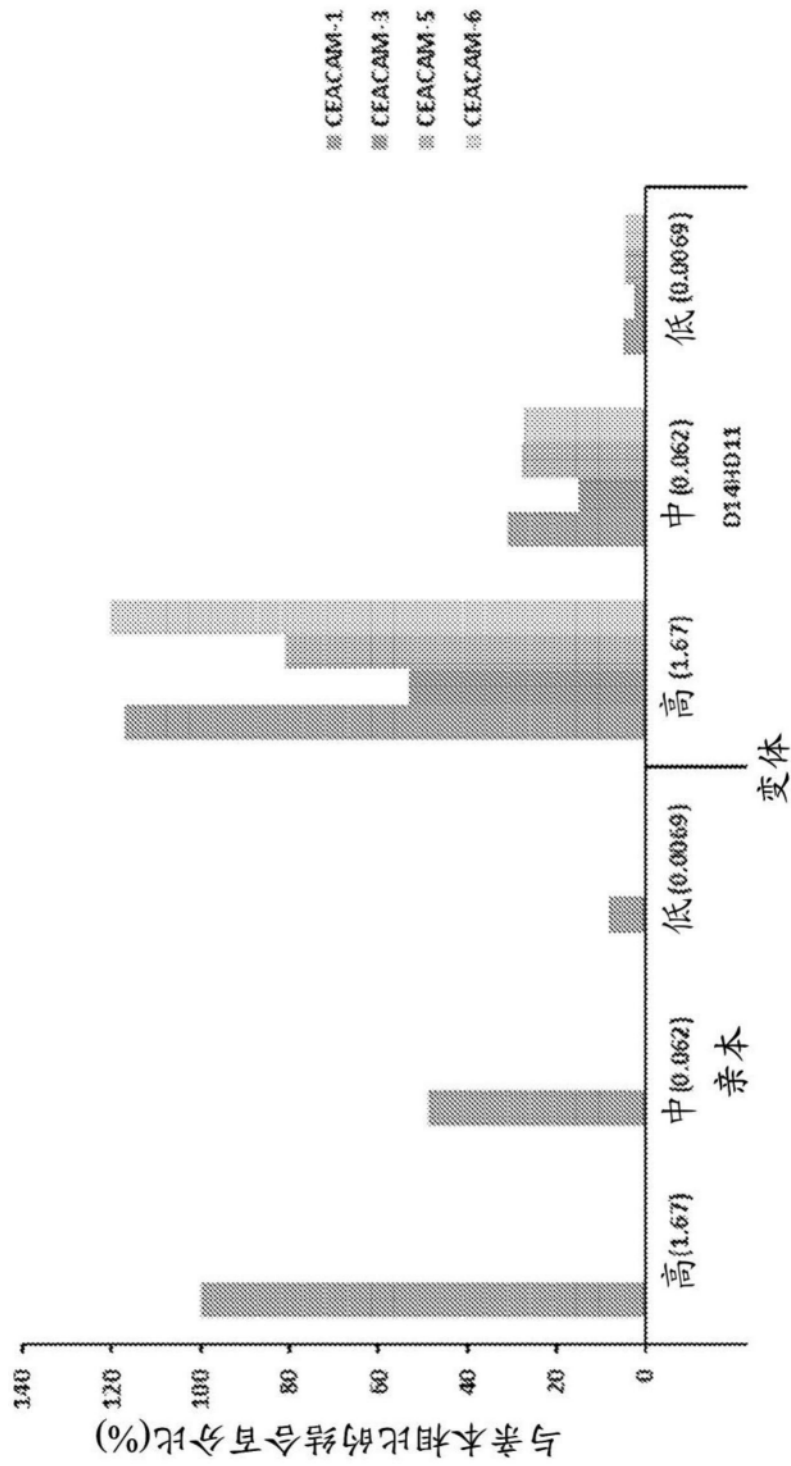


图3E

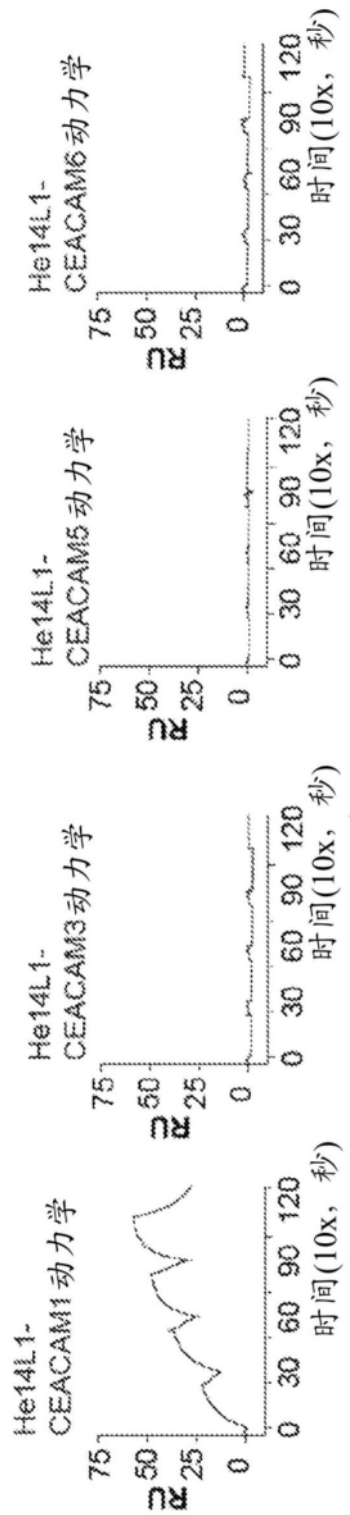


图4A

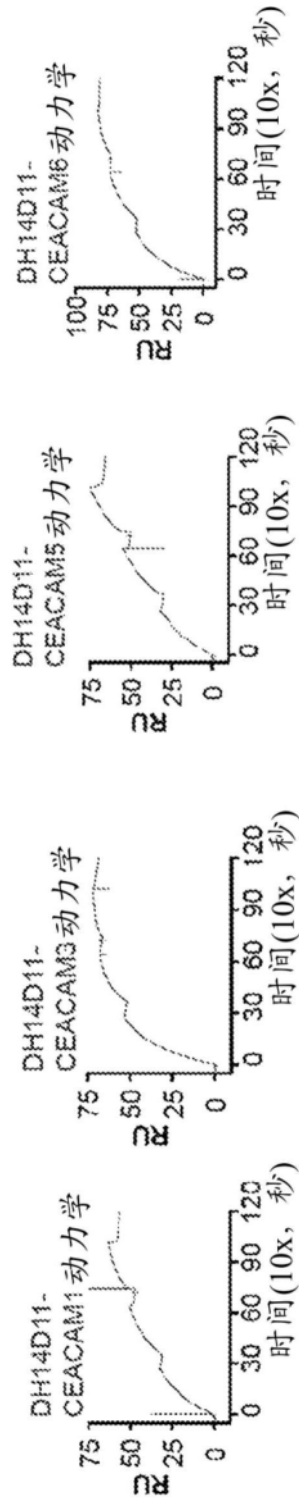


图4B

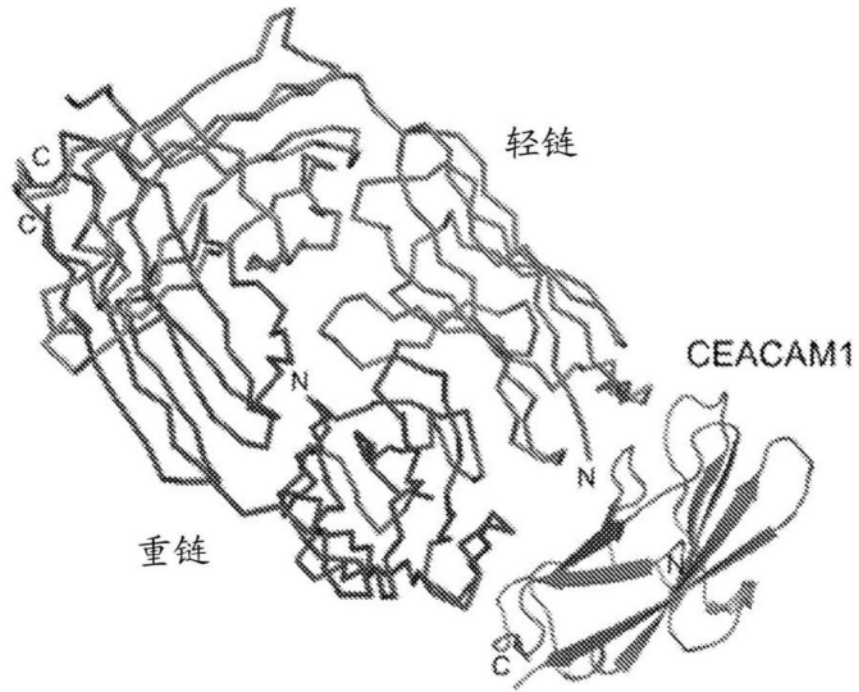


图5A

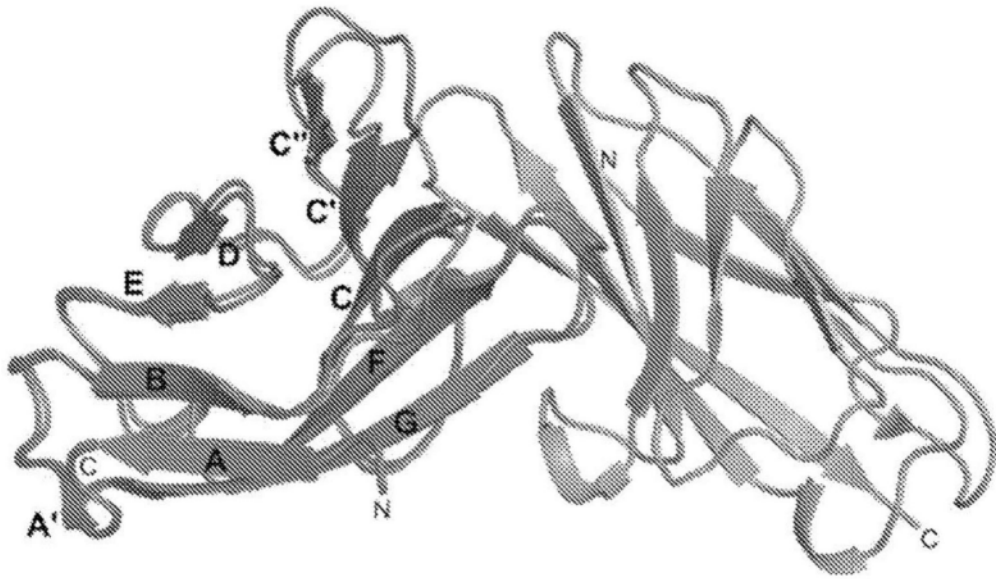


图5B

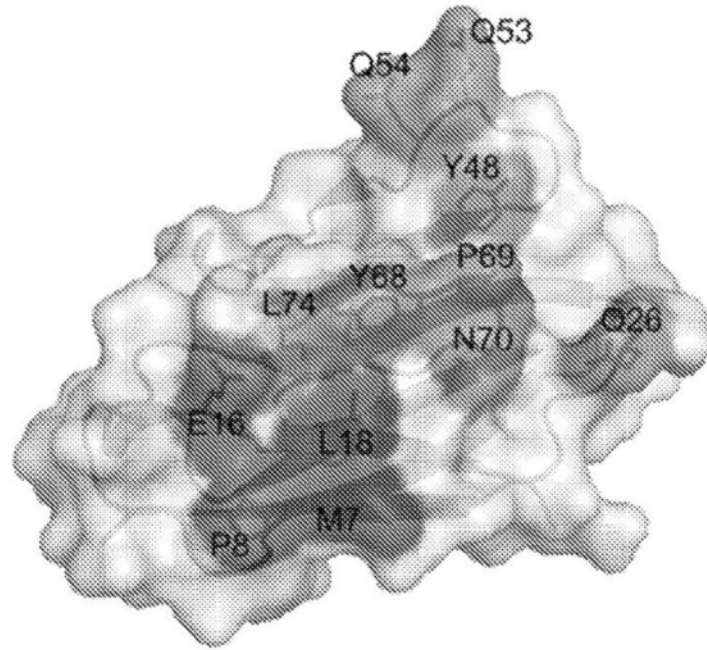


图5C

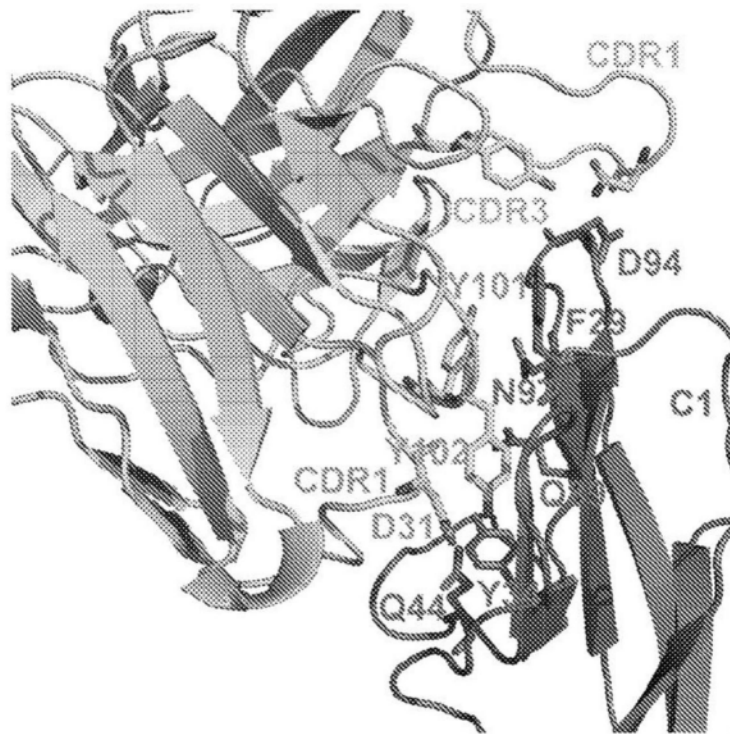


图5D

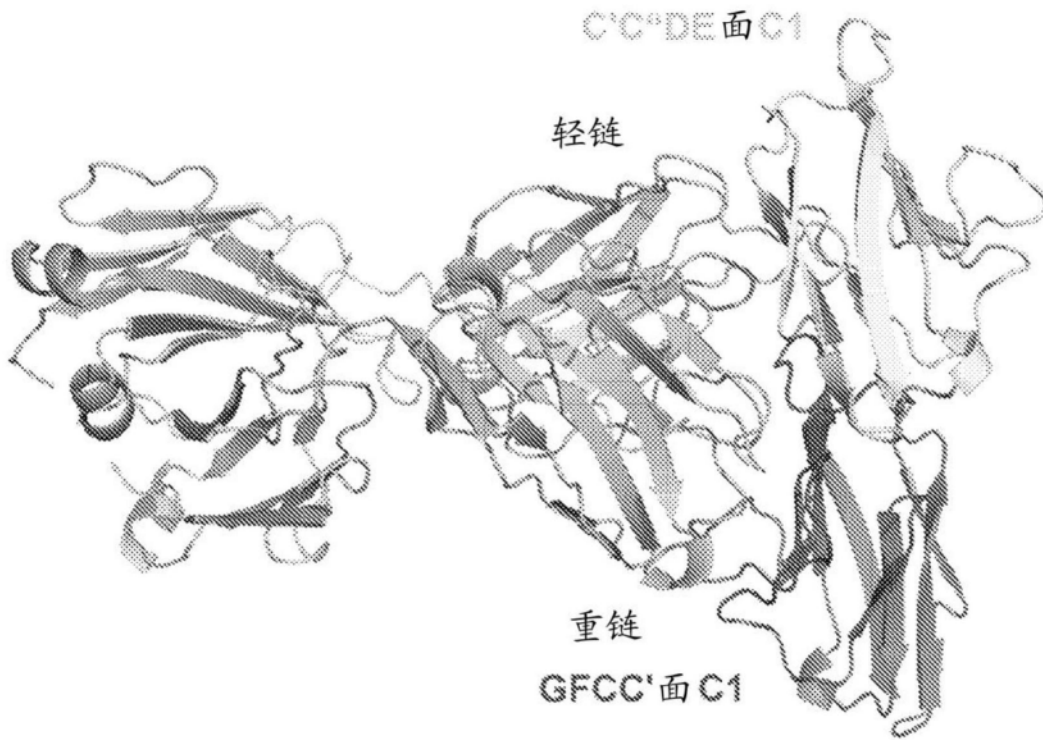


图5E

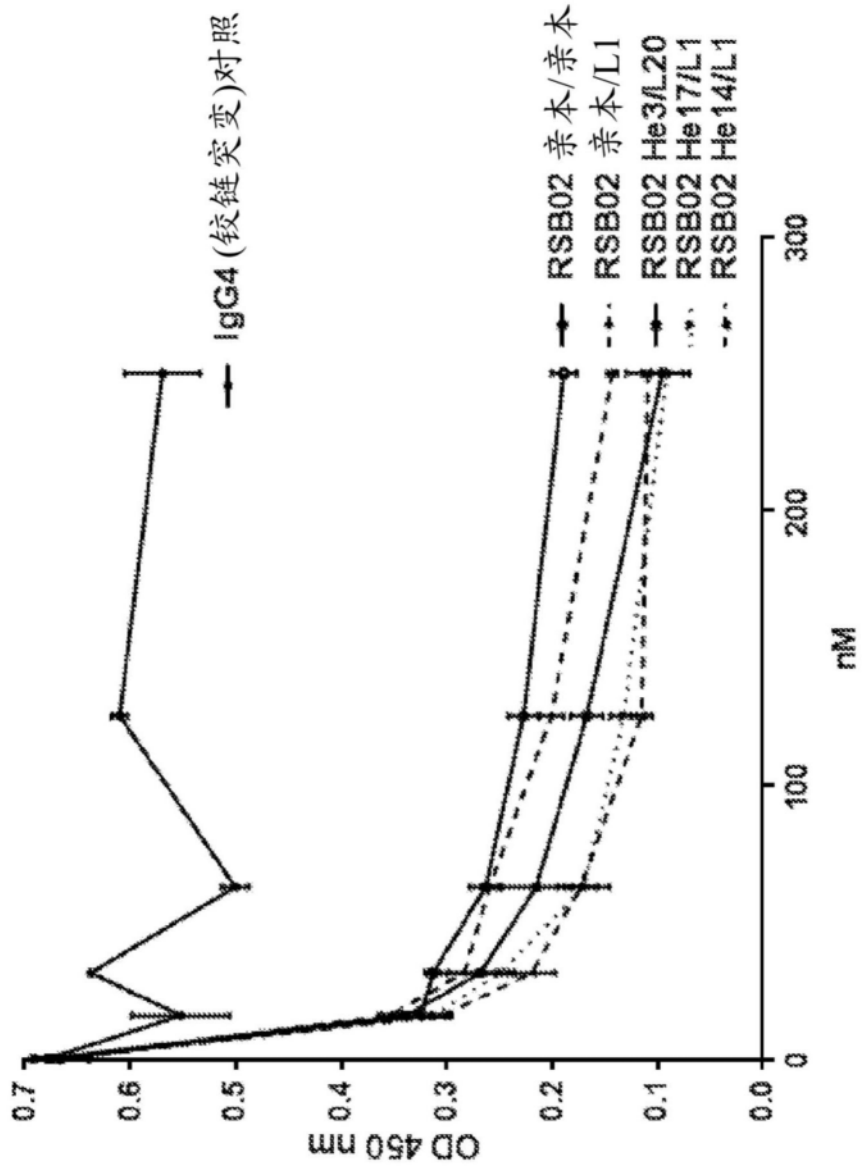


图9

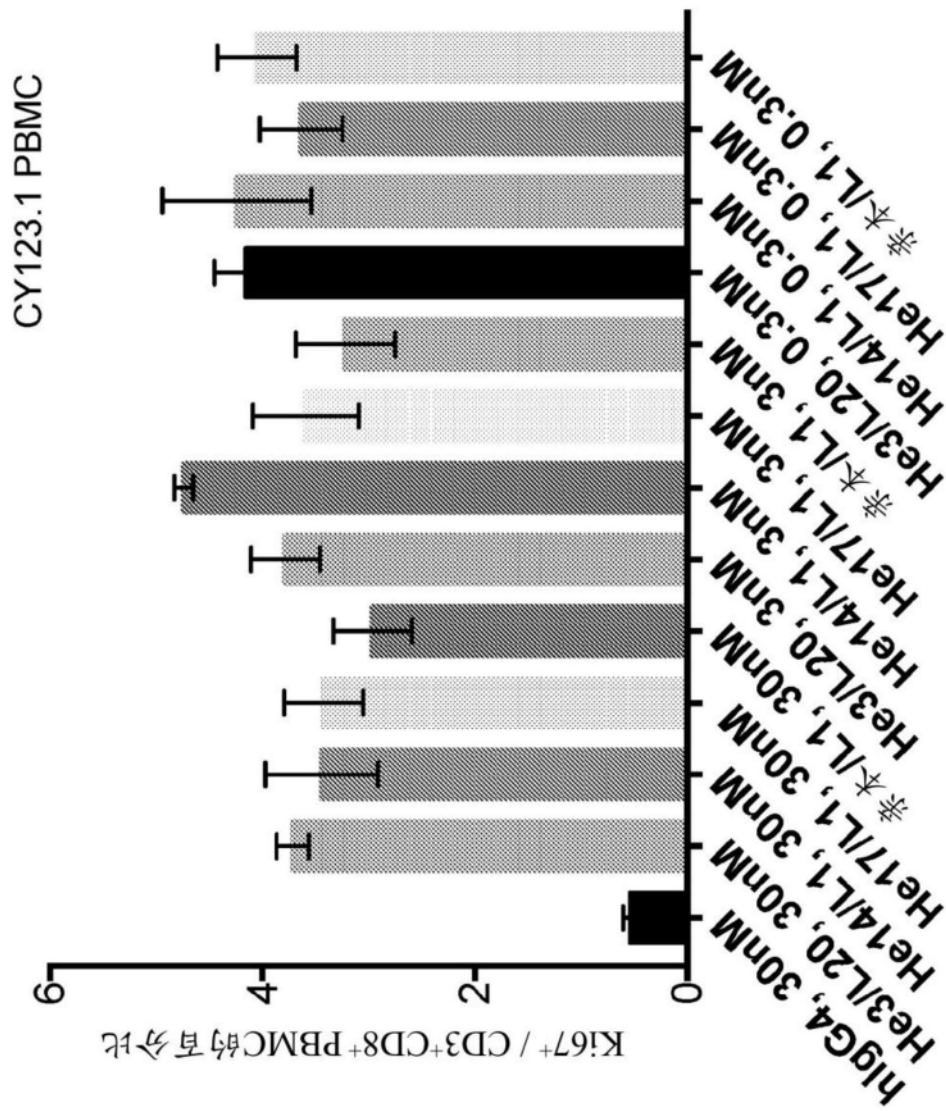


图7

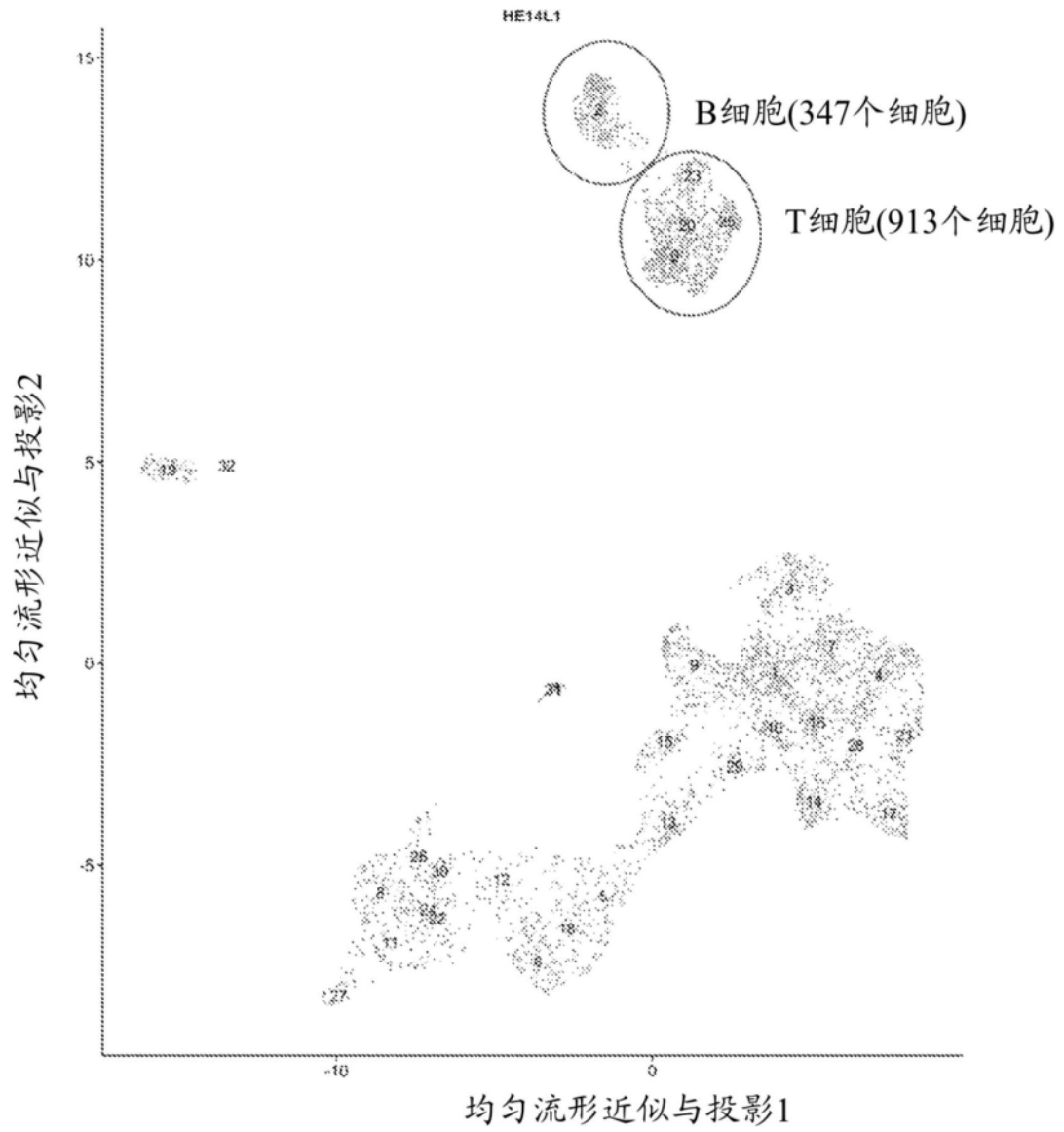


图8A

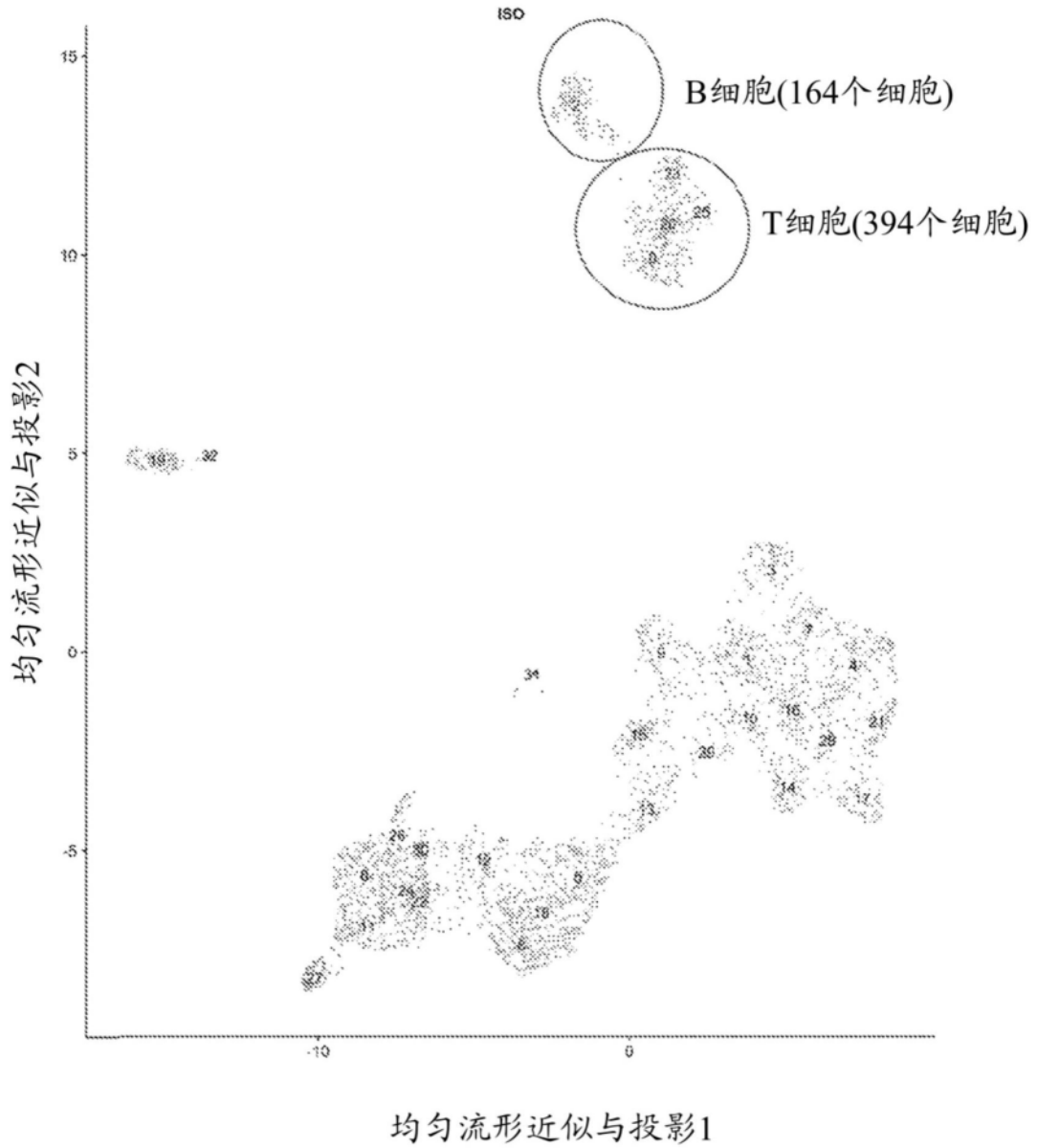


图8B

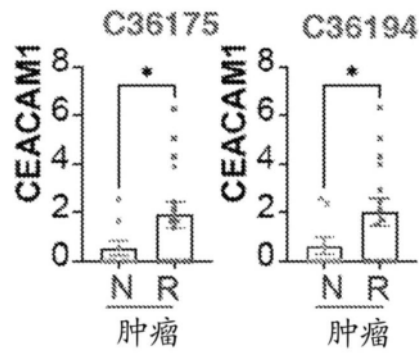


图9A

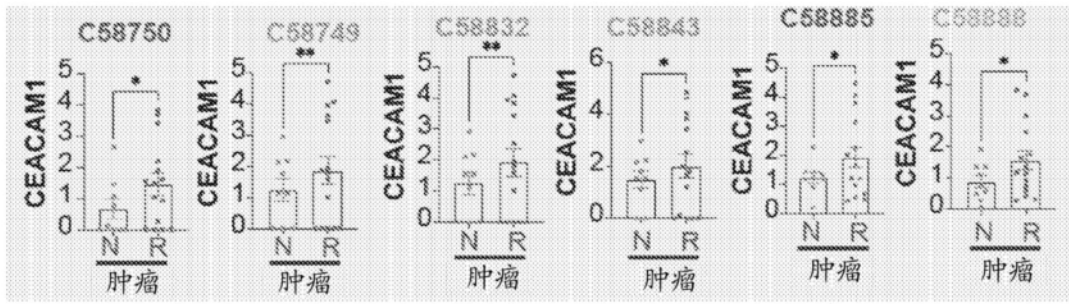


图9B

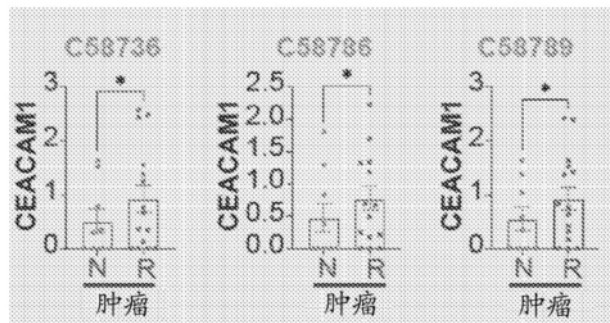


图9C