



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113692413 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 23

(21) 申请号 202080025769.2

(22) 申请日 2020.04.01

(30) 优先权数据

62/828,044 2019.04.02 US

62/967,478 2020.01.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.09.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/026261 2020.04.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/206033 EN 2020.10.08

(71) 申请人 肯乔克蒂生物技术股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 W·R·阿拉松 E·M·毕肖普

R·布莱恩特 A·L·布里格斯

S·莫汉蒂 P·D·波那斯 C·谭
翟倩婷

(74) 专利代理机构 北京龙双利达知识产权代理
有限公司 11329

代理人 毛威 肖鹏

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

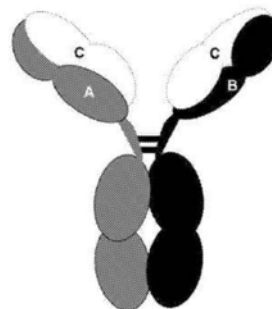
权利要求书17页 说明书93页 附图35页

(54) 发明名称

外排泵-癌症抗原多特异性抗体以及与其相关的组合物、试剂、试剂盒和方法

(57) 摘要

本发明提供了靶向细胞外排泵和癌症相关抗原二者的多特异性抗体,以及包含或编码此类多特异性抗体的药物组合物、核酸、重组表达载体、细胞和试剂盒。还提供了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用靶向细胞外排泵和癌症相关抗原二者的多特异性抗体。还提供了产生所述多特异性抗体的方法以及与其相关的试剂,包括可用于主题方法中的经基因修饰的细胞系以及制备此类经基因修饰的细胞系的方法。



1. 一种结合多药耐药蛋白1 (MDR1) 和肿瘤相关抗原 (TAA) 的双特异性抗体分子, 所述抗体分子包含两条相同的可变轻 (VL) 链、第一可变重 (VH) 链和第二VH链,

其中所述VL链各自包含对于MDR1的抗原结合位点, 所述第一VH链包含针对MDR1的抗原结合位点, 并且所述第二VH链包含针对所述TAA的抗原结合位点, 并且其中所述第二VH链在与所述VL链之一配对时结合所述TAA,

其中所述双特异性抗体与表达MDR1和所述TAA二者的癌细胞结合, 而对表达MDR1和/或所述TAA的非癌细胞显示降低的结合。

2. 根据权利要求1所述的双特异性抗体分子, 其中所述两条VL链的抗原结合位点包含具有以下序列的VL链的轻链CDR 1-3 (LCDR 1-3):

DVLMQTPTVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGX¹TYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:1), 其中X¹是N、Q或S。

3. 根据权利要求2所述的双特异性抗体分子, 其中所述两条VL链包含具有以下序列的VL链的LCDR 1-3:

(i) DVLMQTPTVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:2);

(ii) DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGQTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCFQASHFPRTFGGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3); 或

(iii) DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGSTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCFQASHFPRTFGGQGTKLEIK (SEQ ID NO:4)。

4. 根据权利要求2或3所述的双特异性抗体分子, 其中:

(i) 所述LCDR1包含序列: RSSQSIVHSTGX¹TYLE (SEQ ID NO:5);

(ii) 所述LCDR2包含序列: KISNRF (SEQ ID NO:6); 并且

(iii) 所述LCDR3包含序列: FQASHFPRT (SEQ ID NO:7);

其中X¹是N、Q或S。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述两条VL链是人源化的。

6. 根据权利要求2至5中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述两条VL链包含以下序列或与以下序列至少90%相同的氨基酸:

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:8);

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGQTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCFQASHFPRTFGGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3); 或

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGSTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCFQASHFPRTFGGQGTKLEIK (SEQ ID NO:4)。

7. 根据权利要求6所述的双特异性抗体分子, 其中所述两条VL链包含以下序列或与以下序列至少90%相同的序列:

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:8)。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述第一VH链的抗原结

合位点包含具有以下序列的VH链的重链CDR 1-3 (HCDR1-3) :

EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSCAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGX²TYYPDSVKGRFTVSR
DNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:9), 其中X²是N、Q或S。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述第一VH链的抗原结合位点包含具有以下序列的VH链的HCDR 1-3:

(i) EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSCAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRFT
VSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:10) 或

(ii) EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGQTYYPDSVKGRF
TVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:11) 或

(iii) EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGSTYYPDSVKGR
FTVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:12)。

10. 根据权利要求8或9所述的双特异性抗体分子, 其中:

(i) 所述HCDR1包含序列: RYTMS (SEQ ID NO:13);

(ii) 所述HCDR2包含序列: TISSGGG X²TYYPDSVKG (SEQ ID NO:14); 并且

(iii) 所述HCDR3包含序列: YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15);

其中X²是N、Q或S。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述第一VH链和/或所述第二VH链是人源化的。

12. 根据权利要求8至11中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述第一VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸:

EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRFTVSR
DNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:16);

EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGQTYYPDSVKGRFTVSR
DNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:11); 或

EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGSTYYPDSVKGRFTVSR
DNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:12)。

13. 根据权利要求2至12中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中:

(i) 所述LCDR1包含序列: RSSQSIVHSTGNTYLE (SEQ ID NO:26),

所述LCDR2包含序列: KISNRFS (SEQ ID NO:6), 并且

所述LCDR3包含序列: FQASHFPRT (SEQ ID NO:7); 并且

所述HCDR1包含序列: RYTMS (SEQ ID NO:13),

所述HCDR2包含序列: TISSGGGNTYYPDSVKG (SEQ ID NO:29), 并且

所述HCDR3包含序列: YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15), 或

(ii) 所述LCDR1包含序列: RSSQSIVHSTGQTYLE (SEQ ID NO:27),

所述LCDR2包含序列: KISNRFS (SEQ ID NO:6), 并且

所述LCDR3包含序列: FQASHFPRT (SEQ ID NO:7); 并且

所述HCDR1包含序列: RYTMS (SEQ ID NO:13),

所述HCDR2包含序列: TISSGGGQTYYPDSVKG (SEQ ID NO:30), 并且

所述HCDR3包含序列: YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15), 或

(iii) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGSTYLE (SEQ ID NO:28),
所述LCDR2包含序列:KISNRFS (SEQ ID NO:6), 并且
所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT (SEQ ID NO:7); 并且
所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13),
所述HCDR2包含序列:TISSGGGTYYPDSVKG (SEQ ID NO:31), 并且
所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15), 或
(iv) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE (SEQ ID NO:26),
所述LCDR2包含序列:KISNRFS (SEQ ID NO:6), 并且
所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT (SEQ ID NO:7); 并且
所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13),
所述HCDR2包含序列:TISSGGGQTYYPDSVKG (SEQ ID NO:30), 并且
所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15), 或
(v) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE (SEQ ID NO:26),
所述LCDR2包含序列:KISNRFS (SEQ ID NO:6), 并且
所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT (SEQ ID NO:7); 并且
所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13),
所述HCDR2包含序列:TISSGGGTYYPDSVKG (SEQ ID NO:31), 并且
所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15), 或
(vi) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGQTYLE (SEQ ID NO:27),
所述LCDR2包含序列:KISNRFS (SEQ ID NO:6), 并且
所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT (SEQ ID NO:7); 并且
所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13),
所述HCDR2包含序列:TISSGGGNTYYPDSVKG (SEQ ID NO:29), 并且
所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15), 或
(vii) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGSTYLE (SEQ ID NO:28),
所述LCDR2包含序列:KISNRFS (SEQ ID NO:6), 并且
所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT (SEQ ID NO:7); 并且
所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13),
所述HCDR2包含序列:TISSGGGNTYYPDSVKG (SEQ ID NO:29), 并且
所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15), 或
(viii) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGSTYLE (SEQ ID NO:28),
所述LCDR2包含序列:KISNRFS (SEQ ID NO:6), 并且
所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT (SEQ ID NO:7); 并且
所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13),
所述HCDR2包含序列:TISSGGGQTYYPDSVKG (SEQ ID NO:30), 并且
所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15), 或
(ix) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE (SEQ ID NO:26),
所述LCDR2包含序列:KISNRFS (SEQ ID NO:6), 并且
所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT (SEQ ID NO:7); 并且

所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13),

所述HCDR2包含序列:TISSGGGQTYYPDSVKG (SEQ ID NO:30), 并且

所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15)。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述第二VH链源自结合所述TAA的单特异性抗体分子, 并且其中当与所述轻链之一配对时, 所述双特异性抗体分子对所述TAA的亲和力比所述VH链所来源的单特异性抗体分子对所述TAA的亲和力低至少2倍。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述TAA是CD47。

16. 根据权利要求15所述的双特异性抗体分子, 其中所述第二VH链的抗原结合位点包含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR 1-3:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDTTSYNQKFKDRVTITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:17)。

17. 根据权利要求15或16所述的双特异性抗体分子, 其中所述第二VH链包含含有序列NYNMH (SEQ ID NO:18) 的HCDR1、含有序列TIYPGNDTTSYNQKFKD (SEQ ID NO:19) 的HCDR2以及含有序列GGYRAMDY (SEQ ID NO:20) 的HCDR3。

18. 根据权利要求15至16中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述第二VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDTTSYNQKFKDRVTITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:17),

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYNMHWVRQAPGKGLEWMGTIYPGNDTTSYNQKFKDRVTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:21),

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTNYNMHWVRQMPGKGLEWMGTIYPGNDTTSYNQKFKDQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYRAMDYWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:22), 或

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQGLEWMGTIYPGNDTTSYNQKFKDRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:23)。

19. 根据权利要求1至14中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述TAA是PD-L1。

20. 根据权利要求19所述的双特异性抗体分子, 其中所述第二VH链的抗原结合位点包含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR 1-3:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:32)。

21. 根据权利要求19或20所述的双特异性抗体分子, 其中所述第二VH链的抗原结合位点包含含有序列DSWIH (SEQ ID NO:33) 的HCDR1、含有序列WISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:34) 的HCDR2以及含有序列RHWPGGFDY (SEQ ID NO:35) 的HCDR3。

22. 根据权利要求19至21中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述第二VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:32)。

23. 根据权利要求1至14中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述TAA是EGFR。

24. 根据权利要求23所述的双特异性抗体分子, 其中所述第二VH链的抗原结合位点包

含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR 1-3:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDYNPSLKSRTMS
VDTSKNQFSLKVNSTAAADTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:36)。

25. 根据权利要求23或24所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链的抗原结合位点包含含有序列SGDYYWS (SEQ ID NO:37)的HCDR1、含有序列YIYYSGSTDYNPSLKS (SEQ ID NO:38)的HCDR2以及含有序列VSIFGVGTFDY (SEQ ID NO:39)的HCDR3。

26. 根据权利要求24至25中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDYNPSLKSRTMS
VDTSKNQFSLKVNSTAAADTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:36)。

27. 根据权利要求23所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链的抗原结合位点包含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR 1-3:

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKD
NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:40)。

28. 根据权利要求26或27所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含含有序列NYGVH (SEQ ID NO:41)的HCDR1、含有序列VIWSSGNTDYNTPFTS (SEQ ID NO:42)的HCDR2以及含有序列ALTYDYEFAY (SEQ ID NO:43)的HCDR3。

29. 根据权利要求26至28中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKD
NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:40)。

30. 根据权利要求1所述的双特异性抗体分子,其中所述两条VL链的抗原结合位点包含具有以下序列的VL链的轻链CDR 1-3 (LCDR 1-3):

DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS
GTDFTLKISRLEAEDLGYYCFQGSHFPRTFGGGTRLEIK (SEQ ID NO:25)。

31. 根据权利要求30所述的双特异性抗体分子,其中:

(i) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIHSTGNTYLE (SEQ ID NO:44);

(ii) 所述LCDR2包含序列:KISRLEA (SEQ ID NO:45);并且

(iii) 所述LCDR3包含序列:FQGSHPRT (SEQ ID NO:46)。

32. 根据权利要求30或31所述的双特异性抗体分子,其中所述VL链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS
GTDFTLKISRLEAEDLGYYCFQGSHFPRTFGGGTRLEIK (SEQ ID NO:25)。

33. 根据权利要求30至32中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第一VH链的抗原结合位点包含具有以下序列的VH链的重链CDR 1-3 (HCDR 1-3):

EVILVESGGGLVKPGSLKLSAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDVSKGRFTISR
DNAKNNLYLQMSSLRSEDTALYYCARYRYEAWFASWGQGLTVTVSA。

34. 根据权利要求33所述的双特异性抗体分子,其中:

(i) 所述HCDR1包含序列:SYTMS;

(ii) 所述HCDR2包含序列:TISSGGGNTYYPDSVKG;并且

(iii) 所述HCDR3包含序列:YYRYEAWFAS。

35. 根据权利要求30至34中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第一VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸:

EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSYTMSSWRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGGRFTISR
DNAKNNLYLQMSSLRSEDALYYCARYRYEAWFASWGQGLTVTVSA。

36. 根据权利要求30至32中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第一VH链的抗原结合位点包含具有以下序列的VH链的重链CDR 1-3 (HCDR 1-3):

EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSCAASGFTFSRYTMSSWRQTPEKRLEWVATISSGGGX²TYYPDSVKGGRFTVSR
DNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:9), 其中X²是N、Q或S。

37. 根据权利要求36所述的双特异性抗体分子,其中:

(i) 所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13);

(ii) 所述HCDR2包含序列:TISSGGG X²TYYPDSVKG (SEQ ID NO:14);并且

(iii) 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15);

其中X²是N、Q或S。

38. 根据权利要求36至37中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第一VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸:

EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSSWRQAPGKGLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGGRFTVSR
DNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:16);

EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSSWRQAPGKGLEWVATISSGGGQTYYPDSVKGGRFTVSR
DNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:11);或

EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSSWRQAPGKGLEWVATISSGGGSTYYPDSVKGGRFTVSR
DNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:12)。

39. 根据权利要求1至7中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第一VH链的抗原结合位点包含具有以下序列的VH链的重链CDR 1-3 (HCDR 1-3):

EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSYTMSSWRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGGRFTISR
DNAKNNLYLQMSSLRSEDALYYCARYRYEAWFASWGQGLTVTVSA。

40. 根据权利要求39所述的双特异性抗体分子,其中:

(i) 所述HCDR1包含序列:SYTMS;

(ii) 所述HCDR2包含序列:TISSGGGNTYYPDSVKG;并且

(iii) 所述HCDR3包含序列:YYRYEAWFAS。

41. 根据权利要求39至40中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第一VH链包含以下序列或与以下序列至少90%相同的氨基酸:

EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSYTMSSWRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGGRFTISR
DNAKNNLYLQMSSLRSEDALYYCARYRYEAWFASWGQGLTVTVSA。

42. 根据权利要求30至41中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链源自结合所述TAA的单特异性抗体分子,并且其中当与所述轻链之一配对时,所述双特异性抗体分子对所述TAA的亲和力比所述VH链所来源的单特异性抗体分子对所述TAA的亲和力低至2倍。

43. 根据权利要求30至42中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述TAA是CD47。

44. 根据权利要求43所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR 1-3:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRVITITA
DTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:17)。

45. 根据权利要求44所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含含有序列NYNMH
(SEQ ID NO:18)的HCDR1、含有序列TIYPGNDDTSYNQKFKD (SEQ ID NO:19)的HCDR2以及含有序列GGYRAMDY (SEQ ID NO:20)的HCDR3。

46. 根据权利要求44或45所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含以下氨基酸序列或与以下序列至少90%相同的氨基酸序列:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRVITITA
DTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:17),

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFTNYNMHWVRQAPGKGLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRVITISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:21),

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYFTFTNYNMHWVRQMPGKGLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDQVTISA
DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYRAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:22),或

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYNMHWVRQAPGQGLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRFVFSL
DTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:23)。

47. 根据权利要求30至42中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述TAA是PD-L1。

48. 根据权利要求47所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR 1-3:EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:32)。

49. 根据权利要求47或48所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含含有序列DSWIH (SEQ ID NO:33)的HCDR1、含有序列WISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:34)的HCDR2以及含有序列RHWPGGFDY (SEQ ID NO:35)的HCDR3。

50. 根据权利要求48至49中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISA
DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:32)。

51. 根据权利要求30至42中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述TAA是EGFR。

52. 根据权利要求51所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链的抗原结合位点包含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR 1-3:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDYNPSLKSRTVMS
VDTSKNQFSLKVNSTAAADTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:36)。

53. 根据权利要求52所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含含有序列SGDYYWS (SEQ ID NO:37)的HCDR1、含有序列YIYYSGSTDYNPSLKS (SEQ ID NO:38)的HCDR2以及含有序列VSIFGVGTFDY (SEQ ID NO:39)的HCDR3。

54. 根据权利要求52至53中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含

以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDYNPSLKSRVTMS
VDTSKNQFSLKVNSTAAADTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:36)。

55. 根据权利要求51所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链的抗原结合位点包含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR 1-3:QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWVRQ
SPGKGLEWLGVWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTV
TVSA (SEQ ID NO:40)。

56. 根据权利要求52所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链的抗原结合位点包含含有序列NYGVH (SEQ ID NO:41)的HCDR1、含有序列VIWSSGNTDYNTPFTS (SEQ ID NO:42)的
HCDR2以及含有序列ALTYDYEFAY (SEQ ID NO:43)的HCDR3。

57. 根据权利要求52至53中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVWSSGNTDYNTPFTSRLSINKD
NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:40)。

58. 根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体分子,其中与对表达MDR1或所述TAA的细胞的亲和力相比,所述抗体对表达MDR1和所述TAA二者的细胞的亲和力大于两倍。

59. 根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述抗体能够提高癌细胞对采用化学治疗剂治疗的敏感性,其中当与所述抗体共同施用所述化学治疗剂的半数抑制浓度(IC50)比当与如下抗MDR1抗体15D3共同施用所述化学治疗剂的IC50低至少2倍,所述抗MDR1抗体15D3包含具有以下序列的VH链:

EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSCAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDVSKGRFTVSR
DNAMSSLYLQMSSLRSEDTALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:24); 以及

具有以下序列的VL链:

DVLMQTPTLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS
GTDFTLKISRLEAEDLGYYCFQGSHFPRTFGGGTRLEIK (SEQ ID NO:25), 其中任选地,所述IC50在体外测量。

60. 根据权利要求59所述的双特异性抗体分子,其中所述癌细胞是NALM6 ADR细胞,并且任选地其中所述化学治疗剂包括紫杉醇、秋水仙碱、维拉帕米、长春碱、拓扑替康、阿霉素、柔红霉素、依托泊苷或尼洛替尼。

61. 根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述抗体在与表达MDR1的细胞结合时抑制通过所述MDR1的外排。

62. 根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述抗体与MDR1结合的亲和力比如下抗MDR1抗体15D3与MDR1结合的亲和力低至少2倍,所述抗MDR1抗体15D3包含具有以下序列的VH链:

EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSCAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDVSKGRFTVSR
DNAMSSLYLQMSSLRSEDTALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:24); 以及

具有以下序列的VL链:

DVLMQTPTLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS
GTDFTLKISRLEAEDLGYYCFQGSHFPRTFGGGTRLEIK (SEQ ID NO:25)。

63. 根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述抗体包含Fc结构域, 所述Fc结构域已被修饰以降低或消除所述抗体与一种或多种Fc γ 受体的结合。

64. 根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体分子, 所述双特异性抗体分子用于治疗受试者的癌症的方法中, 所述方法包括向所述受试者施用所述抗体。

65. 根据权利要求64所述的用于所述用途的双特异性抗体分子, 其中所述方法包括将所述抗体与至少一种另外的活性剂组合施用, 其中所述至少一种另外的活性剂包括化学治疗剂、多药耐药转运蛋白的抑制剂、免疫治疗剂或其组合。

66. 根据权利要求65所述的用于所述用途的双特异性抗体分子, 其中所述至少一种另外的活性剂是化学治疗剂, 任选地其中所述化学治疗剂是泰素紫杉醇、长春花生物碱或蒽环类。

67. 一种用于治疗受试者的癌症的方法中的化学治疗剂, 所述方法包括将所述化学治疗剂与权利要求1至63中任一项所述的抗体组合施用至所述受试者, 任选地其中所述化学治疗剂是泰素紫杉醇、长春花生物碱或蒽环类。

68. 根据权利要求67所述的用于所述用途的双特异性抗体分子, 其中所治疗的受试者患有已被确定为对所述化学治疗剂具有耐药性的癌症。

69. 一种治疗受试者的癌症的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1至63中任一项所述的双特异性抗体分子。

70. 根据权利要求69所述的方法, 其中所述方法包括将所述双特异性抗体分子与至少一种另外的活性剂组合施用, 其中所述至少一种另外的活性剂包括化学治疗剂、多药耐药转运蛋白的抑制剂、免疫治疗剂或其组合。

71. 根据权利要求70所述的方法, 其中所述至少一种另外的活性剂是化学治疗剂, 任选地其中所述化学治疗剂是泰素紫杉醇、长春花生物碱或蒽环类。

72. 根据权利要求71所述的方法, 其中所治疗的受试者患有已被确定为对用所述化学治疗剂治疗具有耐药性的癌症, 其中任选地所述化学治疗剂包括紫杉醇、秋水仙碱、维拉帕米、长春碱、拓扑替康、阿霉素、柔红霉素、依托泊苷或尼洛替尼。

73. 一种抗体, 所述抗体包含:

可变轻 (VL) 链, 所述可变轻链包含具有以下序列的VL链的轻链CDR (LCDR):

DVLMQTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGX¹TYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK,

其中X¹是N、Q或S; 以及

可变重 (VH) 链, 所述可变重链包含具有以下序列的VH链的重链CDR (HCDR):

EVKVVESGGVLRPGGSLKLSCAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGX²TYYPDSVKGRFTVSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS,

其中X²是N、Q或S; 或

一种抗体, 所述抗体包含:

可变轻 (VL) 链, 所述可变轻链包含具有以下序列的VL链的轻链CDR (LCDR):

DVLMQTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRLEAEDLGVYYCFQASHFPRTFGGGTRLEIK (SEQ ID NO:25); 以及

可变重 (VH) 链, 所述可变重链包含具有以下序列的VH链的重链CDR (HCDR):

EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRFTISR
DNAKNNLYLQMSSLRSEDALYYCARYRYEAWFASWGQGLTVTVSA。

74. 根据权利要求73所述的抗体, 其中:

所述VL链包含具有以下序列的VL链的LCDR 1-3:

DVLMQTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGS
GTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK; 并且

所述VH链包含具有以下序列的VH链的HCDR 1-3:

EKVVESGGVLVRPGGSLKLSCAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRFTVSR
DNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS, 或

所述VL链包含具有以下序列的VL链的LCDR 1-3:

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGQTYLEWYQQRPGQPPRLIYKISNRFSGVPDRFSGSGA
GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK; 并且

所述VH链包含具有以下序列的VH链的HCDR 1-3:

EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGQTYYPDSVKGRFTVSR
DNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS, 或

所述VL链包含具有以下序列的VL链的LCDR 1-3:

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGSTYLEWYQQRPGQPPRLIYKISNRFSGVPDRFSGSGA
GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK; 并且

所述VH链包含具有以下序列的VH链的LCDR 1-3:

EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGSTYYPDSVKGRFTVSR
DNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS。

75. 根据权利要求74所述的抗体, 其中:

所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE、RSSQSIVHSTGQTYLE或RSSQSIVHSTGSTYLE,

所述LCDR2包含序列:KISNRFS, 并且

所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT。

76. 根据权利要求75所述的抗体, 其中:

(i) 所述HCDR1包含序列:RYTMS;

(ii) 所述HCDR2包含序列:TISSGGG X²TYYPDSVKG; 并且

(iii) 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY;

其中X²是N、Q或S。

77. 根据权利要求74至75中任一项所述的抗体, 其中:

(i) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE,

所述LCDR2包含序列:KISNRFS, 并且

所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT; 并且

所述HCDR1包含序列:RYTMS,

所述HCDR2包含序列:TISSGGGNTYYPDSVKG, 并且

所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY, 或

(ii) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGQTYLE,

所述LCDR2包含序列:KISNRFS, 并且

所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且
所述HCDR1包含序列:RYTMS,
所述HCDR2包含序列:TISSGGGQTYYPDSVKG,并且
所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY,或
(iii) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGSTYLE,
所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且
所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且
所述HCDR1包含序列:RYTMS,
所述HCDR2包含序列:TISSGGGSTYYPDSVKG,并且
所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY,或
(iv) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE,
所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且
所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且
所述HCDR1包含序列:RYTMS,
所述HCDR2包含序列:TISSGGGQTYYPDSVKG,并且
所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY,或
(v) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE,
所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且
所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且
所述HCDR1包含序列:RYTMS,
所述HCDR2包含序列:TISSGGGSTYYPDSVKG,并且
所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY,或
(vi) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGQTYLE,
所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且
所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且
所述HCDR1包含序列:RYTMS,
所述HCDR2包含序列:TISSGGGNTYYPDSVKG,并且
所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY,或
(vii) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGSTYLE,
所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且
所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且
所述HCDR1包含序列:RYTMS,
所述HCDR2包含序列:TISSGGGNTYYPDSVKG,并且
所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY,或
(viii) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGSTYLE,
所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且
所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且
所述HCDR1包含序列:RYTMS,
所述HCDR2包含序列:TISSGGGQTYYPDSVKG,并且

所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY,或
(ix) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE,
所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且
所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且
所述HCDR1包含序列:RYTMS,
所述HCDR2包含序列:TISSGGGQTYYPDSVKG,并且
所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY。

78. 根据权利要求73至77中任一项所述的抗体,其中所述抗体的VL链包含以下氨基酸序列或包含与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

DVLMTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGX¹TYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGS
GTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK,以及

其中所述抗体的VH链包含以下氨基酸序列或包含与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

EKVVESGGVLVRPGGSLKLSAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGX²TYYPDSVKGRFTVSR
DNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS。

79. 根据权利要求73所述的抗体,其中所述抗体包含:

可变轻(VL)链,所述可变轻链包含具有以下序列的VL链的轻链CDR1-3(LCDR):

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSVPDRFSGSGS
GTDFTLKISRLEAEDLGVYYCFQGSHPRTFGGGTRLEIK(SEQ ID NO:25);以及

可变重(VH)链,所述可变重链包含具有以下序列的VH链的重链CDR1-3(HCDR):

EVILVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRFTISR
DNAKNNLYLQMSSLRSEDALYYCARYRYEAWFASWGQGLTVTVSA。

80. 根据权利要求79所述的抗体,其中:

(i) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE(SEQ ID NO:44);

(ii) 所述LCDR2包含序列:KISRLEA(SEQ ID NO:45);并且

(iii) 所述LCDR3包含序列:FQGSHPRT(SEQ ID NO:46);并且

(i) 所述HCDR1包含序列:SYTMS;

(ii) 所述HCDR2包含序列:TISSGGGNTYYPDSVKG;并且

(iii) 所述HCDR3包含序列:YYRYEAWFAS。

81. 根据权利要求79或80所述的抗体,其中所述抗体的VL链包含以下氨基酸序列或包含与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSVPDRFSGSGS
GTDFTLKISRLEAEDLGVYYCFQGSHPRTFGGGTRLEIK(SEQ ID NO:25);并且其中所述抗体的VH链包含以下氨基酸序列或包含与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

EVILVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRFTISR
DNAKNNLYLQMSSLRSEDALYYCARYRYEAWFASWGQGLTVTVSA。

82. 根据权利要求73至81中任一项所述的抗体,其中所述抗体是与MDR-1特异性结合的单特异性二价抗体。

83. 根据权利要求73至81中任一项所述的抗体,其中所述抗体是包含作为共同轻链的

VL链的双特异性抗体。

84. 根据权利要求83所述的抗体,其中所述双特异性抗体包含MDR-1结合结构域和肿瘤相关抗原(TAA)结合结构域,其中所述MDR-1结合结构域和所述TAA结合结构域中的每个包含所述VL链的LCDR 1-3。

85. 根据权利要求84所述的抗体,其中所述TAA是CD47,并且其中所述TAA结合结构域包含具有以下序列的VH链的HCDR 1-3:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDTTSYNQKFKDRVITITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS。

86. 根据权利要求85所述的抗体,其中所述CD47结合结构域的VH链包含含有序列NYNMH的HCDR1、含有序列TIYPGNDTTSYNQKFKD的HCDR2以及含有序列GGYRAMDY的HCDR3。

87. 根据权利要求84所述的抗体,其中所述TAA是PD-L1,并且其中所述PD-L1结合结构域包含具有以下序列的VH链的HCDR 1-3:EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:32)。

88. 根据权利要求87所述的抗体,其中所述PD-L1结合结构域的VH链包含含有序列DSWIH (SEQ ID NO:33)的HCDR1、含有序列WISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:34)的HCDR2以及含有序列RHWPGGFDY (SEQ ID NO:35)的HCDR3。

89. 根据权利要求84所述的抗体,其中所述TAA是EGFR并且其中所述EGFR结合结构域包含具有以下序列的VH链的HCDR:QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKVNSTAAEDTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:36)。

90. 根据权利要求89所述的抗体,其中所述EGFR结合结构域的VH链包含含有序列SGDYYWS (SEQ ID NO:37)的HCDR1、含有序列YIYYSGSTDYNPSLKS (SEQ ID NO:38)的HCDR2以及含有序列VSIFGVGTFDY (SEQ ID NO:39)的HCDR3。

91. 根据权利要求84所述的抗体,其中所述TAA是EGFR并且其中所述EGFR结合结构域包含具有以下序列的VH链的HCDR:QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLVIVSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:40)。

92. 根据权利要求91所述的抗体,其中所述EGFR结合结构域的VH链包含含有序列NYGVH (SEQ ID NO:41)的HCDR1、含有序列VIWGGNTDYNTPFTS (SEQ ID NO:42)的HCDR2以及含有序列ALTYDYEFAY (SEQ ID NO:43)的HCDR3。

93. 一种抗体,所述抗体包含:

可变轻(VL)链,所述可变轻链包含具有以下序列的VL链的轻链CDR (LCDR):

DVLMTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGX¹TYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK,

其中X¹是N、Q或S;或

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRLEAEDLGVYYCFQGSHPRTFGGGTRLEIK (SEQ ID NO:25);以及

可变重(VH)链,所述可变重链包含具有以下序列的VH链的重链CDR (HCDR):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRVITITA
DTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS;或

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISA
DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:32);或

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDYNPSLKSRTVMS
VDTSKNQFSLKVNSTAAADTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:36);或

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKD
NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:40)。

94. 根据权利要求93所述的抗体,其中所述VL链包含:(i)含有序列RSSQSIVHSTGX¹TYLE
(SEQ ID NO:5)的LCDR1;(ii)含有序列KISNRFS (SEQ ID NO:6)的LCDR2;以及(iii)含有序
列FQASHFPRT (SEQ ID NO:7)的LCDR3,其中X¹是N、Q或S并且其中所述VH链包含:

(i)含有序列NYNMH的HCDR1、含有序列TIYPGNDDTSYNQKFKD的HCDR2以及含有序列
GGYRAMDY的HCDR3;或

(ii)含有序列DSWIH (SEQ ID NO:33)的HCDR1、含有序列WISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID
NO:34)的HCDR2以及含有序列RHWPGGFDY (SEQ ID NO:35)的HCDR3;或

(iii)含有序列SGDYYWS (SEQ ID NO:37)的HCDR1、含有序列YIYYSGSTDYNPSLKS (SEQ ID
NO:38)的HCDR2以及含有序列VSIFGVGTFDY (SEQ ID NO:39)的HCDR3;或

(iv)含有序列NYGVH (SEQ ID NO:41)的HCDR1、含有序列VIWSGGNTDYNTPFTS (SEQ ID
NO:42)的HCDR2以及含有序列ALTYDYEFAY (SEQ ID NO:43)的HCDR3。

95. 根据权利要求93所述的抗体,其中所述VL链包含:(i)含有序列RSSQSIVHSTGNTYLE
(SEQ ID NO:44)的LCDR1;(ii)含有序列KISRLEA (SEQ ID NO:45)的LCDR2;以及(iii)含有序
列FQGSHPRT (SEQ ID NO:46)的LCDR3,并且其中所述VH链包含:

含有序列NYNMH的HCDR1、含有序列TIYPGNDDTSYNQKFKD的HCDR2以及含有序列GGYRAMDY
的HCDR3;或

含有序列DSWIH (SEQ ID NO:33)的HCDR1、含有序列WISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:
34)的HCDR2以及含有序列RHWPGGFDY (SEQ ID NO:35)的HCDR3;或

含有序列SGDYYWS (SEQ ID NO:37)的HCDR1、含有序列YIYYSGSTDYNPSLKS (SEQ ID NO:
38)的HCDR2以及含有序列VSIFGVGTFDY (SEQ ID NO:39)的HCDR3;或

含有序列NYGVH (SEQ ID NO:41)的HCDR1、含有序列VIWSGGNTDYNTPFTS (SEQ ID NO:42)
的HCDR2以及含有序列ALTYDYEFAY (SEQ ID NO:43)的HCDR3。

96. 根据权利要求93至95中任一项所述的抗体,其中所述抗体是双特异性抗体。

97. 根据权利要求1至96中任一项所述的抗体,其中所述抗体是人源化抗体或包含人Fc
结构域的嵌合抗体。

98. 根据权利要求97所述的抗体,所述抗体包含免疫球蛋白G1 (IgG1) Fc结构域。

99. 根据权利要求1至98中任一项所述的抗体,其中第一VH链与第一Fc结构域融合,并
且第二VH链与第二Fc结构域融合。

100. 根据权利要求99所述的抗体,其中所述Fc结构域包含经修饰的CH3结构域,所述经
修饰的CH3结构域优先形成包含所述第一VH链和所述第二VH链的异二聚体。

101. 根据权利要求100所述的抗体,其中所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域是人

免疫球蛋白G1 (IgG1) Fc结构域。

102. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含:

根据前述权利要求中任一项所述的抗体; 以及
药学上可接受的赋形剂。

103. 根据权利要求102所述的药物组合物, 所述药物组合物还包含至少一种另外的活性剂。

104. 根据权利要求103所述的药物组合物, 其中所述至少一种另外的活性剂包括化学治疗剂。

105. 根据权利要求104所述的药物组合物, 其中所述化学治疗剂是泰素紫杉醇、长春花生物碱或蒽环类。

106. 根据权利要求103至105中任一项所述的药物组合物, 其中所述至少一种另外的活性剂包括多药耐药转运蛋白的抑制剂。

107. 根据权利要求103所述的药物组合物, 其中所述至少一种另外的活性剂包括免疫治疗剂。

108. 一种或多种核酸, 所述一种或多种核酸包含编码前述权利要求中任一项所述的抗体的一种或多种序列。

109. 根据权利要求108所述的一种或多种核酸, 其中所述一种或多种序列与启动子可操作地连接。

110. 一种或多种重组表达载体, 所述一种或多种重组表达载体包含权利要求108或109所述的一种或多种核酸。

111. 一种用权利要求110所述的一种或多种重组表达载体进行基因修饰的哺乳动物细胞。

112. 根据权利要求111所述的细胞, 其中所述细胞是免疫细胞。

113. 一种试剂盒, 所述试剂盒包含:

根据权利要求1至63和73至101中任一项所述的抗体或编码所述抗体的核酸; 以及
至少一种另外的活性剂。

114. 根据权利要求113所述的试剂盒, 其中所述至少一种另外的活性剂包括化学治疗剂、多药耐药转运蛋白的抑制剂、免疫治疗剂或其组合。

115. 一种杀伤癌细胞的方法, 所述方法包括使所述癌细胞与权利要求1至63和73至101中任一项所述的抗体接触。

116. 根据权利要求115所述的方法, 所述方法包括施用至少一种另外的活性剂。

117. 根据权利要求116所述的方法, 其中所述至少一种另外的活性剂包括化学治疗剂。

118. 根据权利要求116或117所述的方法, 其中与仅接触所述至少一种另外的活性剂相比, 所述方法使对所述癌细胞的杀伤增加至少5%。

119. 根据权利要求115至118中任一项所述的方法, 其中所述癌细胞是耐药性癌细胞。

120. 一种治疗受试者的癌症的方法, 所述方法包括向所述受试者施用权利要求1至63和73至101中任一项所述的抗体或权利要求102至107中任一项所述的药物组合物。

121. 根据权利要求120所述的方法, 其中所述受试者先前已进行针对所述癌症的治疗。

122. 根据权利要求120或121所述的方法, 其中所述癌症是耐药性的或多药耐药性的。

123. 根据权利要求122所述的方法, 其中所述癌症对化学治疗剂具有耐药性。

124. 根据权利要求122所述的方法, 其中所述癌症对免疫治疗剂具有耐药性。

125. 根据权利要求120至122中任一项所述的方法, 其中所述癌症对多药耐药转运蛋白的抑制剂具有耐药性。

126. 根据权利要求120至125中任一项所述的方法, 所述方法还包括向所述受试者施用至少一种另外的活性剂。

127. 根据权利要求126所述的方法, 其中所述至少一种另外的活性剂包括化学治疗剂。

128. 根据权利要求127所述的方法, 其中所述化学治疗剂是泰素紫杉醇、长春花生物碱或蒽环类。

129. 根据权利要求126至128中任一项所述的方法, 其中所述至少一种另外的活性剂包括多药耐药转运蛋白的抑制剂。

130. 根据权利要求126至128中任一项所述的方法, 其中所述至少一种另外的活性剂包括免疫治疗剂。

131. 根据权利要求126至128中任一项所述的方法, 其中与仅用所述至少一种另外的活性剂治疗相比, 所述方法增加所述至少一种另外的活性剂的有效性。

132. 根据权利要求131所述的方法, 其中所述增加的有效性包括癌细胞杀伤增加至少5%。

133. 根据权利要求120至132中任一项所述的方法, 所述方法还包括分析所述癌症的样品以确定所述癌症是否表达高于预定阈值的MDR1、高于预定阈值的肿瘤相关抗原(TAA), 或二者, 其中任选地, 所述TAA包括CD47。

134. 根据权利要求133所述的方法, 其中所述预定阈值对应于由参考细胞表达的MDR1和/或TAA的水平。

135. 根据权利要求134所述的方法, 其中MDR1和/或TAA已经在所述参考细胞中被敲除或敲低。

136. 根据权利要求134或135所述的方法, 其中所述参考细胞是非癌性细胞。

137. 根据权利要求134所述的方法, 其中所述非癌性细胞表达正常水平的MDR1和/或TAA。

138. 根据权利要求120至137中任一项所述的方法, 其中如果所述癌症表达等于或高于所述预定阈值的MDR1和TAA, 则向所述受试者施用所述多特异性抗体, 并且如果所述癌症表达低于所述预定阈值的MDR1或TAA, 则用常规疗法治疗所述受试者而不施用所述多特异性抗体。

139. 一种产生特异性结合表达多药耐药蛋白1(MDR1)和肿瘤相关抗原(TAA)二者的细胞的多特异性抗体的方法, 其中所述TAA任选地包括CD47、PD-L1或EGFR, 所述方法包括:

产生包含MDR1结合结构域和TAA结合结构域的多特异性抗体;

使表达MDR1和TAA的第一细胞与所述多特异性抗体接触;

使表达MDR1或TAA的第二细胞与所述多特异性抗体接触;

将所述多特异性抗体与所述第一细胞的结合和所述多特异性抗体与所述第二细胞的结合进行比较以确定结合特异性比率; 以及

当所述比率高于预定阈值时, 鉴定所述多特异性抗体对所述表达MDR1和TAA二者的细

胞具有特异性。

140. 根据权利要求139所述的方法, 其中所述预定阈值大于2:1。

141. 根据权利要求139或140所述的方法, 其中所述第二细胞表达MDR1而不表达所述TAA, 并且所述方法还包括使表达所述TAA而不表达MDR1的第三细胞与所述多特异性抗体接触。

142. 根据权利要求139或140中任一项所述的方法, 其中所述方法还包括使所述第一细胞、所述第二细胞和/或所述第三细胞与选自单特异性抗MDR1抗体和单特异性抗TAA抗体中的对照抗体接触。

143. 一种经基因修饰的人细胞系, 所述细胞系表达肿瘤相关抗原 (TAA), 其中任选地所述TAA包括白细胞表面抗原CD47; 并且所述细胞系包含外源性核酸, 所述外源性核酸包含用于过表达多药耐药蛋白1 (MDR1) 的编码MDR1的序列。

144. 根据权利要求143所述的细胞系, 其中所述细胞系是肾细胞系。

145. 根据权利要求144所述的细胞系, 其中所述细胞系是HEK 293T细胞系。

146. 一种制备权利要求143至145中任一项所述的细胞系的方法, 所述方法包括在足以将所述外源性核酸引入所述细胞的条件下使表达所述TAA的人细胞与所述外源性核酸接触, 以产生表达所述TAA并稳定过表达MDR1的经基因修饰的人细胞; 以及

在足以产生表达所述TAA和稳定过表达MDR1的经基因修饰的人细胞系的条件下培养所述经基因修饰的人细胞。

外排泵-癌症抗原多特异性抗体以及与其相关的组合物、试剂、试剂盒和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年1月29日提交的美国临时专利申请号62/967,478和2019年4月2日提交的美国临时专利申请号62/828,044的优先权权益,将所述申请通过引用以其整体并入本文。

背景技术

[0003] 耐药性是一种众所周知的当疾病对药物治疗变得耐受时会产生的现象,其在包括肿瘤学在内的各个医学领域都是一个重大且日益严峻的挑战。一些耐药性的方法是特定于疾病的,而其他方法(如在微生物和人耐药性癌症中观察到的药物外排)在进化上是保守的。尽管许多类型的癌症最初对化学疗法敏感,但随着时间的推移,它们可能通过这些机制和其他机制(如促进药物抑制、降解和增强的外排的DNA突变和代谢变化)而产生耐药性。

[0004] 外排泵(EP)是由几乎所有活细胞表达的蛋白质,并且已经进化成从细胞自然外排各种化合物。ATP结合盒(ABC)转运蛋白家族蛋白质的成员是能够使药物外排的EP的例子,并且是健康细胞的质膜上经过充分研究的重要调节剂。尽管转运蛋白的结构因蛋白质而异(例如,人类中有49个已知的ABC家族成员),但它们均按两个不同结构域(即高度保守的核苷酸结合结构域和更可变的跨膜结构域)的存在进行分类。由ATP结合盒亚家族B成员1(ABCB1)基因编码的多药耐药蛋白1是这些转运蛋白中第一个被鉴定出的并且已经进行了广泛的研究。当某些组织(例如,结肠、肝和肾)成为肿瘤性组织时MDR1的正常表达在这些组织中增加,并且响应于采用某些化学治疗剂的治疗而增加的表达证明MDR1过表达的内在和外在机制二者都在起作用。

[0005] EP能够使细胞和肿瘤对化学治疗剂产生耐药性。这种耐药性通常与治疗分子从耐药性细胞的外排增强相关。当这种化学疗法耐药性适用于多于一种化学治疗剂时,其被称为多药耐药性(MDR)。已经开发了靶向和抑制EP的各种小分子抑制剂,但因为各种原因而没有一种在人临床环境中取得成功,所述各种原因包括在不管细胞或其外排泵的功能的情况下它们渗透到并影响体内的所有细胞(包括利用EP外排天然存在的细胞毒素的健康细胞)的趋势。

[0006] 在癌症患者中,在转移性癌细胞群体已通过使用化学疗法被大量杀死并从患者清除的情况下,未响应于再次采用早期疗法的治疗,耐药性癌细胞群体出现和扩散并不少见。在大多数情况下,应用具有不同作用机制的不同药物,直到再次另外出现耐药性细胞群体和/或产生肿瘤。

发明内容

[0007] 提供了可用作靶向MDR1和肿瘤相关抗原(TAA)二者的多特异性抗体的抗MDR1抗体,以及包含或编码此类多特异性抗体的药物组合物、核酸、重组表达载体、细胞和试剂盒。所述多特异性抗体包含含有针对MDR1的抗原结合位点的共同可变轻(VL)链、含有针对MDR1

的抗原结合位点的第一可变重 (VH) 链以及含有针对所述TAA的抗原结合位点的第二VH链。还提供了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用靶向MDR1和TAA二者的多特异性抗体。所述治疗可以涉及单独施用所述多特异性抗体或施用所述多特异性抗体和化学治疗剂。还提供了产生所述多特异性抗体的方法以及与其相关的试剂,包括可用于主题方法中的经基因修饰的细胞系以及制备此类经基因修饰的细胞系的方法。

[0008] 本文提供的双特异性抗体与表达MDR1和所述TAA二者的癌细胞结合,同时显示出降低的与表达MDR1和/或所述TAA的非癌细胞的结合。换句话说,本文提供的双特异性抗体以低亲和力结合至 (1) 其中MDR1表达低或不存在的表达TAA的细胞和 (2) 其中TAA表达低或不存在的表达MDR1的细胞,并且以高亲和力结合至以相对较高水平即高于正常细胞的水平表达MDR1和CD47中的至少一种或二者的癌细胞。

[0009] 本文还公开了与抗MDR1抗体15D3相比对MDR1具有降低的亲和力的抗MDR1抗体和与抗CD47抗体5F9相比对CD47具有降低的亲和力的抗CD47抗体。当共同施用,这些抗体可用于治疗受试者的癌症并提高癌细胞对化学疗法的化学敏感性。

附图说明

[0010] 图1A提供了如本文所述的本公开文本的多特异性抗体的实施方案的示意图描绘。

[0011] 图1B提供了显示图1A中描绘的多特异性抗体的实施方案与表达所述多特异性抗体所靶向的靶标之一或二者的细胞的结合的示意图描绘。

[0012] 图2提供了如本文所述的双特异性单克隆抗体的示意图。

[0013] 图3A-图3F提供了针对Pgp和CD47 (在一些情况下也称为“KT14”) 的标记的单克隆抗体在各种细胞系 (包括如所指示的表达靶标的初始和重组细胞系) 上的结合的FACS分析。

[0014] 图4A-图4B提供了双特异性抗体 (HC-15D3:HC-5F9:LC-MRK16) 与多种试剂细胞系的结合的FACS分析,表明了当两种靶标共同表达时的特异性结合 (例如,293T初始细胞) 以及当仅存在一种靶标时显著降低的结合 (例如,293KT14-KO和KPBI-KD (在本文的一些情况下Pgp也称为“KPBI”))。

[0015] 图5提供了化学敏感性分析,其显示在存在本文所述的各种单价、Fab和双特异性抗体分子的情况下,初始293T和N6ADR细胞系对紫杉醇 (paclitaxel) 的易感性。细胞 (初始293T细胞 (左侧小图) 和N6ADR细胞 (右侧小图)) 显示例如与仅用化学疗法 (“仅化学疗法”) 或化学疗法与其他抗体 (15D3:MRK16 Fab;a15D3:MRK16抗体;aCD47:MRK16抗体;aCD47:MRK16 Fab;和15D3:9F11 Fab) 的组合的治疗相比,在存在15D3.aCD47:MRK16双特异性物的情况下增强的敏感性。图5展示了尽管双特异性抗体对每个单独靶标具有减小的亲和力,但双特异性抗体增强了初始293T细胞和阿霉素耐药性N6ADR细胞的化学敏感性。

[0016] 图6A-图6C提供了图5中提供的数据的再表述,包括初始293T细胞和N6ADR细胞数据的并行拟合曲线 (图6A) 以及对于初始293T细胞 (图6B) 和N6ADR细胞 (图6C) 的原始数据 (左) 和拟合数据 (右) 的并行描绘。

[0017] 图7展示了当15D3.aCD47:MRK16抗体与长春新碱组合使用时所述抗体的药物增敏作用。

[0018] 图8提供了显示如实施例章节所述的所测试的抗体轻链和重链组合的结合和靶细胞杀伤的表。

[0019] 图9显示了在没有化学疗法的情况下所指示的抗体对MES-SA-DX5(子宫肉瘤)肿瘤体积的影响。

[0020] 图10显示了紫杉醇对NALM6细胞的肿瘤生长抑制的影响。

[0021] 图11显示了BisP1.1对紫杉醇耐药性NALM6ADR细胞的肿瘤生长抑制的影响。

[0022] 图12显示了伐司扑达对紫杉醇耐药性NALM6ADR细胞的肿瘤生长抑制的影响。

[0023] 图13显示了BisP1.1对植入了紫杉醇耐药性NALM6ADR细胞的小鼠的体重的影响。

[0024] 图14显示了伐司扑达对植入了紫杉醇耐药性NALM6ADR细胞的小鼠的体重的影响。

[0025] 图15显示了KBisP1.1对植入了紫杉醇耐药性NALM6ADR细胞的小鼠的存活率的影响。

[0026] 图16显示了CD47和ABCB1在A2780ADR细胞的表面上的表达。

[0027] 图17显示了CD47和ABCB1在HeyT30细胞的表面上的表达。

[0028] 图18显示了在使用或未使用紫杉醇的情况下施用KBisP1.1后体内A2780ADR肿瘤体积的减少。

[0029] 图19显示了在使用或未使用紫杉醇的情况下施用KBisP1.1后体内HeyT30肿瘤体积的减少。

[0030] 图20显示了KbisP1.1在体内对N6ADR细胞肿瘤比15D3抗体更有效。

[0031] 图21显示了KbisP1.1在体内使得多药耐药性N6ADR肿瘤对紫杉醇发生的化疗增敏是剂量依赖性的。

[0032] 图22A-图22B显示了与抗CD47 5F9抗体相比之下,KBisP1.1抗体未展现出与人红细胞(RBC)(图22A)和食蟹猴RBC(图22B)的显著结合,并且与抗CD47 5F9抗体(“KT14”)相比之下,包含5F9 HC和MRK16 LC的抗CD47抗体(“KT14_MRK16”)没有与RBC显著结合。

[0033] 图23显示了人源化15D3 VH链序列的比对。

[0034] 图24显示了人源化MRKK16链序列的比对。

[0035] 图25显示了人源化、缄默(muted)的Fc双特异性抗体使得多药耐药性MES-SA-DX5肿瘤发生化疗增敏。

[0036] 图26显示了人源化KBisP1.1抗体在小鼠中使得多药耐药性A2780ADR细胞产生的肿瘤发生化疗增敏。

[0037] 图27A显示了具有N297A取代的KBisP1.1双特异性抗体在小鼠中使得多药耐药性MES-SA/Dx5细胞肿瘤对紫杉醇发生化疗增敏。

[0038] 图27B显示了KBisP1.1 N297A抗体(标记为“N297A”)在体内使得多药耐药性A2780ADR细胞对紫杉醇发生化疗增敏。

[0039] 图28显示了KBisP1.1抗体在体内使得多药耐药性A2780ADR细胞对紫杉醇发生化疗增敏。

[0040] 图29显示了KBisP1.1抗体在体内使得多药耐药性MES-SA/Dx5细胞对紫杉醇发生化疗增敏。

[0041] 图30显示了KBisP1.1双特异性抗体在体内使得紫杉醇耐药性CTG-2616患者来源的乳腺肿瘤发生化疗增敏并导致肿瘤生长抑制。

[0042] 图31提供了通过ELISA测量的所指示的抗体与CD47的结合、通过FACS测量的所指示的抗体与MDR1的结合、通过ELISA测量的所指示的抗体与PD-L1的结合以及通过ELISA或

FACS测量的所指示的抗体与EGFR的结合的总结。

[0043] 图32A显示了使用过表达MDR1的293T细胞测量的所列抗体的MFI。

[0044] 图32B显示了使用过表达EGFR的293T细胞测量的所列抗体的MFI。

[0045] 图32C显示了对于图32B中显示的抗体子集,使用过表达EGFR的293T细胞测量的所列抗体的MFI。

[0046] 定义

[0047] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”包括任何同种型的抗体或免疫球蛋白、保留与抗原的特异性结合的抗体片段(包括但不限于Fab、Fv、scFv和Fd片段)、嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体(包括仅包含重链的抗体(例如VHH骆驼抗体))、双特异性抗体以及包含抗体的抗原结合部分和非抗体蛋白的融合蛋白。抗体可以被可检测地标记,例如用放射性同位素、产生可检测产物的酶、荧光蛋白等标记。抗体可以进一步与其他部分缀合,所述其他部分如特异性结合对的成员,例如生物素(生物素-亲和素特异性结合对的成员)等。抗体还可以与固体支持物(包括但不限于聚苯乙烯板或珠等)结合。所述术语还包括Fab'、Fv、F(ab')₂和或保留与抗原的特异性结合的其他抗体片段、以及单克隆抗体。抗体可以是单价或二价的。本文所用的抗体可以用于测定细胞表面上(例如,在来自患者的细胞样品或组织样品中)的一种或多种靶抗原的表达。

[0048] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,例如完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体(Zapata等人,Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995));单链抗体分子,包括仅包含重链的抗体(例如VHH骆驼抗体);以及由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个称为“Fab”片段的相同抗原结合片段(每个片段具有单个抗原结合位点)和残留的“Fc”片段(这一名称反映了容易结晶的能力)。胃蛋白酶处理产生F(ab')₂片段,其具有两个抗原结合位点并且仍能够使抗原交联。

[0049] “Fv”是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。此区域由紧密非共价缔合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成。在此构型中,每个可变结构域的三个CDR相互作用以将抗原结合位点限定在V_H-V_L二聚体的表面上。这六个CDR共同为抗体赋予抗原结合特异性。然而,即使单个可变结构域(或仅包含对抗原具有特异性的三个CDR的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,并且可以形成抗原结合位点,但其亲和力低于包含每个可变结构域的三个CDR的整个结合位点。

[0050] “Fab”片段也含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH₁)。Fab片段与Fab'片段的不同之处在于在重链CH₁结构域的羧基末端处添加几个残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文中Fab'的名称,其中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基带有游离巯基。F(ab')₂抗体片段最初是作为Fab'片段对产生的,它们之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。

[0051] 来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可以基于其恒定结构域的氨基酸序列而分配至两种明显不同类型(称为κ和λ)之一。免疫球蛋白可以根据其重链的恒定结构域的氨基酸序列而分配至不同类别。存在五个主要免疫球蛋白类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些类别中的若干可以进一步分成亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。

[0052] “单链Fv”、“sFv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域,其中这些结构域存在于单条多肽链中。在一些实施方案中,Fv多肽进一步在 V_H 结构域与 V_L 结构域之间包含使得sFv能够形成抗原结合所需的结构的多肽接头。关于sFv的综述,参见Pluckthun *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*,第113卷,Rosenburg和Moore编辑,Springer-Verlag,New York,第269-315页(1994)。

[0053] 术语“双抗体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,所述片段包含与同一条多肽链(V_H - V_L)中的轻链可变结构域(V_L)连接的重链可变结构域(V_H)。通过使用过短而不允许在同一条链上的两个结构域之间配对的接头,迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。双抗体更全面地描述在例如EP 404,097;WO 93/11161;和Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993)中。

[0054] 如本文所用,术语“亲和力”是指两种药剂的可逆结合的平衡常数,并且表示为解离常数(Kd)。与抗体对不相关的氨基酸序列的亲和力相比,亲和力可以大至少1倍、大至少2倍、大至少3倍、大至少4倍、大至少5倍、大至少6倍、大至少7倍、大至少8倍、大至少9倍、大至少10倍、大至少20倍、大至少30倍、大至少40倍、大至少50倍、大至少60倍、大至少70倍、大至少80倍、大至少90倍、大至少100倍或大至少1000倍或更大。抗体对靶蛋白的亲和力可以是例如约100纳摩尔(nM)至约0.1nM、约100nM至约1皮摩尔(pM)或约100nM至约1飞摩尔(fM)或更高。如本文所用,术语“亲合力”是指在稀释之后,两种或更多种药剂的复合物对解离的抗性。关于抗体和/或抗原结合片段,术语“免疫反应性”和“优先结合”在本文中可互换地使用。

[0055] 术语“结合”是指归因于例如共价、静电、疏水性和离子和/或氢键相互作用(包括诸如盐桥和水桥等相互作用)的在两个分子之间的直接缔合。MDR1特异性抗体与MDR1多肽内的表位特异性结合。非特异性结合将指代亲和力小于约 10^{-7} M的结合,例如亲和力为 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M等的结合。

[0056] 如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”旨在意指在重链多肽和轻链多肽二者的可变区内发现的非连续抗原结合位点。CDR已经通过以下文献进行描述:Kabat等人,J.Biol.Chem.252:6609-6616(1977);Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of proteins of immunological interest”(1991);Chothia等人,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);以及MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996),其中定义包括彼此比较时氨基酸残基的重叠或子集。然而,应用任一定义来指代抗体或移植的抗体或其变体的CDR旨在处于如本文所定义和使用的术语的范围内。包括如通过每个以上引用的参考文献所定义的CDR的氨基酸残基在下表1中列出作为比较。

[0057] 表1:CDR定义

[0058]

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V_H CDR1	31-35	26-32	30-35
V_H CDR2	50-65	53-55	47-58
V_H CDR3	95-102	96-101	93-101
V_L CDR1	24-34	26-32	30-36
V_L CDR2	50-56	50-52	46-55
V_L CDR3	89-97	91-96	89-96

[0059] ¹残基编号遵循Kabat等人(同上)的命名法

[0060] ²残基编号遵循Chothia等人(同上)的命名法

[0061] ³残基编号遵循MacCallum等人(同上)的命名法

[0062] 如本文所用,术语“框架”在关于抗体可变区使用时旨在意指抗体可变区内CDR区外的所有氨基酸残基。可变区框架通常是长度在约100-120个氨基酸之间的不连续氨基酸序列,但旨在仅指CDR外的那些氨基酸。如本文所用,术语“框架区”旨在意指由CDR分隔的框架的每个结构域。VH链可以包含按以下顺序从N末端到C末端排列的三个CDR和四个FR:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。类似地,VL链可以包含按以下顺序从N末端到C末端排列的三个CDR和四个FR:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0063] 如本文所用,术语抗体包括两条重链和两条轻链的四聚体,其中重链和轻链通过例如二硫键互相连接。重链恒定区由三个结构域即CH1、CH2和CH3构成。轻链恒定区由一个结构域即CL构成。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合区。抗体的恒定区通常介导抗体与宿主组织和因子的结合,所述宿主组织和因子包括免疫系统的各种细胞和补体系统的第一组分。术语“抗体”包括类型IgA、IgG、IgE、IgD、IgM及其亚型的免疫球蛋白。在一些实施方案中,主题抗体是IgG同种型,例如IgG1。

[0064] 如本文所用,术语“免疫球蛋白”是指包括基本上由免疫球蛋白基因编码的一种或多种多肽在内的蛋白质。公认的人免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α (IgA1和IgA2)、 γ (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因;以及许多免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白轻链(约25kD或214个氨基酸)由N末端的可变区基因(约110个氨基酸)和C末端的 κ 或 λ 恒定区编码。全长免疫球蛋白重链(约50kD或446个氨基酸)由N末端的可变区基因(约116个氨基酸)和C末端的其他上述恒定区基因之一例如 γ (编码约330个氨基酸)编码。在一些实施方案中,主题抗体包含含有全长免疫球蛋白重链和全长免疫球蛋白轻链的完整免疫球蛋白。

[0065] 术语“抗原结合片段”是指全长抗体的能够与抗原特异性结合的一个或多个片段。结合片段的例子包括(i) Fab片段(包含VL、VH、CL和CH1结构域例如由其组成的单价片段);(ii) F(ab')₂片段(包含通过铰链区处的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段);(iii) Fd片段(包含VH和CH1结构域,例如由其组成);(iv) Fv片段(包含抗体单臂的VH和VL结构域,例如由其组成);(v) dAb片段(包含VH结构域,例如由其组成);(vi) 分离的CDR;(vii) 单链Fv(scFv)(包含使用使得VH和VL结构域配对形成单价分子的重组手段通过合成接头而连接的抗体单臂的VH和VL结构域,例如由其组成);(viii) 双抗体(包含两个scFv,例如由其组成,其中VH和VL结构域连接使得它们未配对形成单价分子;scFv的每一个的VH与另一个scFv的VL结构域配对形成二价分子)。

[0066] 术语“嵌合”抗体是指重链和/或轻链的一部分源自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分源自不同来源或物种的抗体。

[0067] “人抗体”是具有与由人或人细胞产生的或者源自利用人抗体库或其他人抗体编码序列的非人来源的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列的抗体。人抗体的这种定义特别排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0068] “人共有框架”是代表在人免疫球蛋白可变轻链(VL)或可变重链(VH)框架序列的选择中最常出现的氨基酸残基的框架(FR)。通常,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择是从可变结构域序列的亚组进行。通常,序列的亚组是如在Kabat等人,Sequences of Proteins

of Immunological Interest,第五版,NIH Publication 91-3242,Bethesda Md.(1991),第1-3卷中所述的亚组。在一个实施方案中,对于VL,所述亚组是如在Kabat等人(同上)中的亚组 κ I。在一个实施方案中,对于VH,所述亚组是如在Kabat等人(同上)中的亚组III。

[0069] “人源化”抗体是指包含来自非人CDR的氨基酸残基和来自人框架(FR)的氨基酸残基的嵌合抗体。人源化抗体恒定区的至少一部分源自人抗体。在本文公开的抗体分子的优选实施方案中,恒定区来自人IgG抗体,如人IgG1。在优选的实施方案中,本文公开的抗体分子包含含有如本文提供的可变重链区和具有UniProt:P01857-1第1版所示的氨基酸序列序列的人IgG1恒定区的重链。在优选的实施方案中,本文公开的抗体分子包含含有如本文提供的可变轻链区和人轻链恒定区的轻链。在优选的实施方案中,人轻链恒定区是人 κ 轻链恒定区。在某些方面,存在于主题抗体中的人IgG1重链恒定区可以包含突变,例如用于调节Fc功能的取代。例如,可以引入LALAPG效应子功能突变(L234A、L235A和P329G)或N297A突变以降低抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。取代的编号基于EU编号系统。当提及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时,通常使用“EU编号系统”或“EU索引”(例如,Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991)中报道的EU索引)。“如在Kabat中的EU索引”是指人IgG 1EU抗体的残基编号。

[0070] 抗体(例如,非人抗体)的“人源化形式”是指已经经历人源化的抗体。

[0071] 术语“表位”是指由免疫系统,例如由抗体、B细胞或T细胞识别的抗原区域。例如,表位是抗体结合的特定抗原区域。

[0072] “分离的”抗体是已鉴定出并且与其天然环境的组分分离和/或从其天然环境的组分回收的抗体。其天然环境的污染物组分是会干扰抗体的诊断或治疗用途的材料,并且可以包括酶、激素和其他蛋白质或非蛋白质溶质。在一些实施方案中,抗体将被纯化(1)至如通过Lowry方法测定的按重量计大于90%、大于95%或大于98%,例如按重量计大于99%的抗体;(2)至通过使用旋杯式测序仪足以获得N末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或(3)至在还原或非还原条件下使用考马斯蓝或银染试剂通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测得的同质性。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为抗体的天然环境的至少一种组分将不存在。在一些情况下,将通过至少一个纯化步骤来制备分离的抗体。

[0073] 如本文所用的术语“细胞毒性剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或导致细胞死亡或破坏的物质。“化学治疗剂”(也称为“抗肿瘤剂”)可以是用于治疗癌症或其他疾病或障碍的细胞毒性剂。

[0074] 如本文所用,术语“治疗”(“treatment”、“treating”)等是指获得所需的药理和/或生理作用。所述作用就完全或部分预防疾病或其症状而言可以是预防性的和/或就部分或完全治愈疾病和/或可归因于所述疾病的不利影响而言可以是治疗性的。如本文所用,“治疗”涵盖哺乳动物包括人的疾病的任何治疗,并且包括:(a)预防疾病在可能易患疾病但尚未诊断为患有所述疾病的受试者中发生;(b)抑制疾病,即遏止其发展;以及(c)缓解疾病,即导致疾病消退。

[0075] 术语“个体”、“受试者”、“宿主”和“患者”在本文中可互换地使用,是指哺乳动物,包括但不限于鼠(大鼠、小鼠)、非人灵长类动物、人、犬科动物、猫科动物、有蹄类动物(例

如,马、牛、绵羊、猪、山羊)等。

[0076] “治疗有效量”或“有效量”是指当施用至哺乳动物或其他受试者以用于治疗疾病时足以影响对于疾病的这种治疗的靶标特异性抗体的量。“治疗有效量”将根据抗体、疾病及其严重性和待治疗的受试者的年龄、体重等而变化。

[0077] 本文使用的术语“难治性”是指对治疗无反应的疾病或病症。关于癌症,如本文所用的“难治性癌症”是指对治疗无反应的癌症。难治性癌症可能在治疗开始时具有耐药性,或者可能在治疗期间变得具有耐药性。难治性癌症也可以称为耐药性癌症。

[0078] “生物样品”包括从个体获得的各种样品类型,并且可以用于诊断或监测测定。所述定义包括生物来源的血液和其他液体样品、固体组织样品(如活检标本)或组织培养物或由组织培养物得到的细胞及其后代。所述定义还包括在采购后以任何方式进行操作的产品,如通过用试剂处理、增溶或富集某些组分(如多核苷酸)进行操作。术语“生物样品”包括临床样品,并且还包括培养中的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物流体和组织样品。

[0079] 一对序列之间的同一性百分比可以通过以下方法来计算:所述序列对中的匹配数量乘以100并除以比对区域(包括空位)的长度。同一性评分仅计数完美匹配,而不考虑氨基酸之间的相似性程度。在长度中仅包括内部空位,而不包括序列末端的空位。同一性百分比 = (匹配x 100) / 比对区域(具有空位)的长度

[0080] 短语“保守氨基酸取代”是指在以下组内的氨基酸残基的取代:1) L、I、M、V、F; 2) R、K; 3) F、Y、H、W、R; 4) G、A、T、S; 5) Q、N; 以及6) D、E。保守氨基酸取代可以通过将蛋白质中的一个或多个氨基酸用具有相似的酸度、碱度、电荷、极性或侧链大小的侧链的氨基酸替代来保持蛋白质的活性。

[0081] 术语“载体”意指用于将蛋白质编码信息转移至宿主细胞中的任何分子或实体(例如,核酸、质粒、噬菌体或病毒)。

[0082] 术语“表达载体”或“表达构建体”是指适合于宿主细胞转化并且含有如下核酸序列的载体,所述核酸序列指导和/或控制(与宿主细胞结合)与其操作性地连接的一个或多个异源编码区的表达。表达构建体可以包含但不限于如下序列,所述序列影响或控制转录、翻译以及(如果存在内含子的话)影响与其可操作地连接的编码区的RNA剪接。

[0083] 术语“刺激”是指通过刺激分子(例如,TCR/CD3复合物或CAR)与其同源配体(或在CAR的情况下为肿瘤抗原)的结合从而介导信号转导事件(如但不限于经由TCR/CD3复合物的信号转导或经由适当的NK受体或CAR的信号传导结构域的信号转导)而诱导的初级反应。刺激可以介导某些分子表达的改变。

[0084] 术语“刺激分子”是指由免疫细胞(例如,T细胞、NK细胞、B细胞)表达的分子,所述分子提供一个或多个胞质信号传导序列,其针对免疫细胞信号传导途径的至少某个方面以刺激方式调节免疫细胞的激活。在一个方面,所述信号是初级信号,其通过例如TCR/CD3复合物与装载肽的MHC分子的结合而启动,并且其导致介导T细胞应答,包括但不限于增殖、激活、分化等。以刺激方式起作用的初级胞质信号传导序列(也称为“初级信号传导结构域”)可以含有信号传导基序,其被称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM。在本发明中具有特定用途的含有ITAM的胞质信号序列的例子包括但不限于源自CD3 ζ 、共同的FcR γ (FCER1G)、Fc γ RIIa、FcR β (Fc ϵ R1b)、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD79a、CD79b、DAP10和DAP12的那

些。

[0085] 术语“共刺激分子”是指T细胞上的同源结合配偶体,其与共刺激配体特异性结合,从而介导T细胞的共刺激应答,如但不限于增殖。共刺激分子是有助于高效免疫应答的除抗原受体或其配体以外的细胞表面分子。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、BTLA和To11配体受体以及OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 和4-1BB (CD137)。

[0086] 术语“自体的”是指源自同一个体的任何材料,之后要将所述材料重新引入所述个体体内。

[0087] 如本文所用的术语“细胞内信号传导结构域”是指分子的细胞内部分。细胞内信号传导结构域产生促进含有CAR的细胞(例如,CAR-T细胞)的免疫效应子功能的信号。例如在CAR-T细胞中的免疫效应子功能的例子包括溶细胞活性和辅助活性,包括细胞因子的分泌。

[0088] 如本文所用的术语“免疫效应细胞”是指参与免疫应答,例如参与促进免疫效应子应答的细胞。免疫效应细胞的例子包括T细胞(例如, α / β T细胞和 γ / δ T细胞)、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、肥大细胞和髓源性吞噬细胞。

[0089] 对于取代、插入或缺失的指导可以基于来自不同物种的蛋白质的氨基酸序列的比对,或者来自基于具有相同或相似功能的多种蛋白质的共有序列。

具体实施方式

[0090] 提供了可用作靶向MDR1和肿瘤相关抗原(TAA)二者的多特异性抗体的抗MDR1抗体,以及包含或编码此类多特异性抗体的药物组合物、核酸、重组表达载体、细胞和试剂盒。所述多特异性抗体包含含有针对MDR1的抗原结合位点的共同可变轻(VL)链、含有针对MDR1的抗原结合位点的第一可变重(VH)链以及含有针对所述TAA的抗原结合位点的第二VH链。还提供了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用靶向MDR1和TAA二者的多特异性抗体。所述治疗可以涉及单独施用所述多特异性抗体或施用所述多特异性抗体和化学治疗剂。还提供了产生所述多特异性抗体的方法以及与其相关的试剂,包括可用于主题方法中的经基因修饰的细胞系以及制备此类经基因修饰的细胞系的方法。

[0091] 本文提供的双特异性抗体与表达MDR1和所述TAA二者的癌细胞结合,同时显示出降低的与表达MDR1和/或所述TAA的非癌细胞的结合。换句话说,本文提供的双特异性抗体以低亲和力结合至(1)其中MDR1表达低或不存在的表达TAA的细胞和(2)其中TAA表达低或不存在的表达MDR1的细胞,并且以高亲和力结合至以相对较高水平即高于正常细胞的水平表达MDR1和CD47中的至少一种或二者的癌细胞。

[0092] 本文还公开了与抗MDR1抗体15D3相比对MDR1具有降低的亲力的抗MDR1抗体和与抗CD47抗体5F9相比对CD47具有降低的亲力的抗CD47抗体。当共同施用时,这些抗体可用于治疗受试者的癌症并提高癌细胞对化学疗法的化学敏感性。

[0093] 在更详细地描述本发明之前,应理解本发明不限于所描述的特定实施方案,因为此类实施方案当然可以变化。还应理解本文所用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不旨在是限制性的,因为本发明的范围将仅受所随附权利要求的限制。

[0094] 在提供值范围的情况下,应理解除非上下文另有明确规定,否则在该范围的上限值与下限值之间的每个中间值(至下限值的单位的十分之一)以及所陈述的范围内的任何

其他所陈述的或中间值包括在本发明内。这些更小范围的上限值和下限值可以独立地被包括在更小范围内,并且也被涵盖在本发明内,服从于在所陈述的范围内任何确切排除的限值。在所陈述的范围包括一个或两个限值的情况下,排除了那些被包括的任一个或两个限值的范围也被包括在本发明中。

[0095] 某些范围在本文中通过前面带有术语“约”的数值呈现。在本文中使用术语“约”是为了对其后的精确数值以及接近或近似于所述术语后的数值提供文字支持。在确定数字是否接近或近似于具体列举的数字时,接近或近似的未列举的数字可以是在呈现它的上下文中提供具体列举的数字的基本等效形式的数字。

[0096] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科技术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。尽管在本发明的实践或测试中也可以使用与本文所述的方法和材料类似或等效的任何方法和材料,但现在描述代表性的说明性方法和材料。

[0097] 将在本说明书中引用的所有出版物和专利均通过引用并入本文,就好像每个单独的出版物或专利被具体且单独地指出通过引用并入本文,并且通过引用并入本文以公开和描述出版物所引用的相关的方法和/或材料。对任何出版物的引用是针对其在申请日之前的公开,并且不应当被解释为承认本发明不能获得比这种出版物更早的申请日。另外,所提供的出版物的日期可能不同于实际出版日期,实际出版日期可能需要独立确认。

[0098] 应注意,除非上下文另有明确规定,否则如在本文以及在所附权利要求中所用的,单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”以及“所述(the)”包括复数指示物。还应注意,可以起草权利要求以排除任何任选要素。因此,本声明旨在充当结合权利要求要素的叙述使用的诸如“唯一地”、“仅”等排他性术语或使用“否定型”限制的先行基础。

[0099] 在阅读本公开文本之后,如对于本领域技术人员应清楚的是,本文描述和说明的单独实施方案中的每个实施方案具有不连续的组成部分和特征,所述组成部分和特征可以在不偏离本发明的范围或精神的情况下容易地与任何其他若干实施方案的特征分离或组合。可以按所叙述的事件的顺序或按逻辑上可能的任何其他顺序来执行所叙述的任何方法。

[0100] 虽然已经或将会为了语法流畅性而用功能性解释描述所述方法和组合物,但应明确地理解,除非根据35U.S.C. §112(f) 明确地制定,否则权利要求不应被解释为通过构建“手段”或“步骤”限制以任何方式进行必然限制,而应被赋予权利要求所提供的定义的含义和在等同物的司法原则下的等同物的全部范围,并且在根据35U.S.C. §112(f) 明确地制定权利要求的情况下,权利要求应被赋予根据35U.S.C. §112(f) 的全部法定等同物。

[0101] 抗体

[0102] 双特异性抗体

[0103] 本公开文本提供了结合多药耐药蛋白1(MDR1)和肿瘤相关抗原(TAA)的双特异性抗体分子,所述抗体分子包含两条相同的可变轻(VL)链、第一可变重(VH)链和第二VH链,其中所述VL链各自包含针对MDR1的抗原结合位点,所述第一VH链包含针对MDR1的抗原结合位点,并且所述第二VH链包含针对所述TAA的抗原结合位点,并且其中所述第二VH链在与所述轻链之一配对时结合所述TAA。所述双特异性抗体分子与表达MDR1和所述TAA二者的癌细胞结合,同时显示出降低的与表达MDR1和/或所述TAA的非癌细胞的结合。换句话说,本文提供的双特异性抗体以低亲和力结合至(1)其中MDR1表达低或不存在的表达TAA的细胞和(2)其

中TAA表达低或不存在的表达MDR1的细胞,并且以高亲和力结合至以相对较高水平即高于正常细胞的水平表达MDR1和CD47中的至少一种或二者的癌细胞。

[0104] 相对较高水平是指表达为在与癌细胞相同类型的正常细胞中表达水平的至少1.5倍(例如,至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍或更多)。降低的亲和力是指与所述抗体分子与和癌细胞相同类型的正常细胞的结合相比,结合亲和力降低至少10%(例如至少20%、至少30%、至少40%、至少50%或更多)。降低的亲和力还包括缺乏可检测的结合。

[0105] 术语“抗体分子”包括如本文定义的抗体,并且包括其抗原结合片段。在某些方面,所述抗体分子包含两条可变轻(VL)链和两条可变重(VH)链。在某些方面,所述抗体分子还包含重链恒定区和轻链恒定区。所述重链恒定区和轻链恒定区可以来自人抗体,例如人IgG1抗体。人IgG1重链(HC)恒定区可以被修饰以包含降低抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的突变。另外地或可替代地,所述两条VH链可以各自与不同的人IgG1 HC恒定区缀合,其中所述单独的人IgG1 HC恒定区具有有利于在不同的人IgG1 HC恒定区之间形成二聚体的取代。在本文中进一步详细描述了此类HC区。在某些方面,在所述抗体分子是双特异性抗体分子的情况下,人IgG1 HC恒定区中的一个可以包含取代以引入具有带正电的侧链的一个或多个氨基酸,并且另一个人IgG1 HC恒定区可以包含取代以引入具有带负电的侧链的一个或多个氨基酸,从而有利于在两个不同的HC之间形成二聚体。

[0106] 在某些方面,所述两条VL链的抗原结合位点包含具有以下序列的VL链的轻链CDR(LCDR):

[0107] DVLMTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGX¹TYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK,其中X¹是N、Q或S。

[0108] 在某些方面,所述两条VL链包含具有以下序列的VL链的LCDR 1-3:

[0109] (i) DVLMTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK;

[0110] (ii) DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGQTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHFPRTFGGQGTKLEIK;或

[0111] (iii) DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGSTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHFPRTFGGQGTKLEIK。

[0112] 在一些方面,本文所述的抗体不包含(i)含有具有以下序列的VL链的LCDR的两条VL链:

[0113] DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGQTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHFPRTFGGQGTKLEIK;和含有具有以下序列的VH链的HCDR的第一VH链:EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGSTYYPDSVKGRFTVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCARYGAGDAWFAYWGQGTLVTVSS。

[0114] 在某些方面,VL和VH轻链的CDR可以基于Kabat命名法来定义。

[0115] 在某些方面,i)所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGX¹TYLE;(ii)所述LCDR2包含序列:KISNRF;并且(iii)所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;其中X¹是N、Q或S。这些LCDR基于Kabat命名法。

[0116] 在某些方面,所述两条VL链是人源化的。在某些方面,所述两条VL链被人源化以包含来自人抗体的框架区。

[0117] 在某些方面,所述两条VL链包含与以下序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的序列:

[0118] DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFS
GSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCFQASHFPRTFGGQTKLEIK;

[0119] DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFS
GSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCFQASHFPRTFGGQTKLEIK;或

[0120] DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGSTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFS
GSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCFQASHFPRTFGGQTKLEIK。

[0121] 在特定方面,所述双特异性抗体分子包含各自含有以下序列的两条VL链:

[0122] DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFS
GSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCFQASHFPRTFGGQTKLEIK。

[0123] 在某些方面,所述双特异性抗体包含含有如本文所述的VL链和轻链恒定区的轻链。所述轻链恒定区可以是具有UniProtKB/Swiss-Prot:P01834.2所示的氨基酸序列的人免疫球蛋白 κ 链恒定区。

[0124] 在某些方面,所述双特异性抗体分子包含所述第一VH链,其中所述VH链包含具有以下序列的VH链的重链CDR 1-3 (HCDR 1-3):EVKVVESGGVLVRPGSLKLSCAASGFTFSRYTMSWVR
QTPEKRLEWVATISSGGGX²TYYPDSVKGRFTVSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGT
LVTVSS,其中X²是N、Q或S。

[0125] 在某些方面,所述第一VH链包含具有以下序列的VH链的HCDR 1-3: (i) EVKVVESGG
VLVRPGSLKLSCAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPD SVKGRFTVSRDNAMSSLYLQMSS
LRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGT LVTVSS,或(ii) EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMS
WVRQAPGKGLEWVATISSGGGQTYYPDSVKGRFTVSRDNSKNSLYLQMNSLRTE DALYYCARYGAGDAWFAYWGQ
GTLVTVSS,或(iii) EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGSTYY
PDSVKGRFTVSRDNSKNSLYLQMNSLRTE DALYYCARYGAGDAWFAYWGQGT LVTVSS。

[0126] 在某些方面,VH链的HCDR 1-3基于Kabat命名法来定义。

[0127] 在某些方面,所述第一VH链包含:(i) 含有序列RYTMS的HCDR1;(ii) 含有序列
TISSGGGX²TYYPDSVKG的HCDR2;以及(iii) 含有序列YGAGDAWFAY的HCDR3;其中X²是N、Q或S。这
些HCDR基于Kabat命名法。

[0128] 在某些方面,所述第一VH链和/或所述第二VH链是人源化的。在某些方面,所述VH
链被人源化以包含来自人抗体的框架区。

[0129] 在某些方面,所述第一VH链包含序列:

[0130] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGNTYYPD SVKGRF
TVSRDNSKNSLYLQMNSLRTE DALYYCARYGAGDAWFAYWGQGT LVTVSS;

[0131] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGQTYYPDSVKGRF
TVSRDNSKNSLYLQMNSLRTE DALYYCARYGAGDAWFAYWGQGT LVTVSS;或

[0132] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGSTYYPD SVKGRF
TVSRDNSKNSLYLQMNSLRTE DALYYCARYGAGDAWFAYWGQGT LVTVSS。

[0133] 在某些方面,所述第一VH链包含与以下序列至少80%、至少85%、至少90%或至少
95%相同的序列:

[0134] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRF TVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCARYGAGDAWFAYWGQGTLLTVSS;

[0135] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGQTYYPDSVKGRF TVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCARYGAGDAWFAYWGQGTLLTVSS;或

[0136] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGSTYYPDSVKGRF TVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCARYGAGDAWFAYWGQGTLLTVSS。

[0137] 在某些方面,所述双特异性抗体包含含有如本文所述的第一VH链和人IgG1重链恒定区的第一重链。

[0138] 在某些方面,所述双特异性抗体的第二VH链源自结合所述TAA的单特异性抗体分子,并且其中所述双特异性抗体分子对所述TAA的亲和力比所述VH链所来源的单特异性抗体分子对所述TAA的亲和力低至少2倍(例如低至少3倍、低至少4倍、低至少5倍)。使用相同的测定来测量所述双特异性抗体和所述单特异性抗体的亲和力。可以利用用于测量抗体亲和力的任何合适方法。在某些方面,亲和力可以通过计算抗体与抗原的可逆结合的平衡常数来测量,并且表示为解离常数(Kd)。在某些方面,Kd可以通过ELISA来测量。

[0139] 在某些方面,所述双特异性抗体的第二VH链源自结合所述TAA的单特异性抗体分子,并且其中所述双特异性抗体分子对所述TAA的半最大有效浓度(EC50)比所述VH链所来源的单特异性抗体分子对所述TAA的EC50高至少2倍(例如高至少3倍、高至少4倍、高至少5倍)。使用相同的测定来测量所述双特异性抗体和所述单特异性抗体的EC50。可以利用用于测量抗体的EC50的任何合适方法。提供半最大反应(例如,最大荧光强度的一半)的浓度被测量为EC50。

[0140] 测试抗体的EC50可以通过流式细胞术或ELISA来测定。例如,流式细胞术可以涉及使表达抗原(例如人野生型MDR1或突变型MDR1)的细胞与流式细胞术缓冲液中的抗体(其中抗体被连续稀释)接触,以及在室温或4℃下孵育足以使抗体与细胞结合的时间段(例如10min-1h)。孵育后,可以任选地洗涤细胞以去除非特异性结合的抗体和/或可以使细胞与特异性结合至所述测试抗体的荧光标记的二抗接触。孵育后,可以去除荧光标记的二抗并洗涤细胞。可以通过流式细胞术对洗涤的细胞进行分选,并且计数与荧光标记的二抗结合的细胞的数量。提供半最大反应(例如,最大荧光强度的一半)的浓度被测量为EC50。在流式细胞术测定的变型中,细胞可以是过表达MDR1的293T细胞。

[0141] 所述TAA可以是已知在癌细胞中过表达的任何抗原。例如,所述TAA可以是在正常细胞中未以可检测的水平表达并且在癌细胞中表达的抗原,其中所述正常细胞和癌细胞是相同的细胞类型,例如上皮细胞。例如,TAA可以是新抗原,其是由一种或多种肿瘤特异性突变产生的一类肿瘤抗原,与未突变的蛋白质的氨基酸序列相比,所述一种或多种肿瘤特异性突变改变了所编码的蛋白质的氨基酸序列。在其他方面,TAA是在正常细胞中表达而在癌细胞中以较高水平表达的抗原。在某些方面,所述TAA可以是CD47。

[0142] 抗MDR1且抗CD47双特异性抗体

[0143] 在某些方面,所述双特异性抗体分子与CD47结合,并且所述第二VH链包含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR:

[0144] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRV TITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGTLLTVSS。

[0145] 在某些方面,所述第二VH链包含:含有序列NYNMH的HCDR1;含有序列TIYPGNDDTSYNQKFKD的HCDR2;以及含有序列GGYRAMDY的HCDR3。HCDR 1-3基于Kabat命名法来定义。

[0146] 在某些方面,所述第二VH链包含与以下氨基酸序列至少80%相同(例如,至少85%相同、至少90%相同或至少95%相同)的序列:

[0147] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRV
TITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS。

[0148] 在某些方面,所述第二VH链包含氨基酸序列:

[0149] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRV
TITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS。

[0150] 在某些方面,与MDR1和CD47结合的双特异性抗体可以包含具有以下序列的人源化VH链,所述人源化VH链包含针对CD47的抗原结合位点:

[0151] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYNMHWVRQAPGKGLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRV
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS;

[0152] EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTNYNMHWVRQMPGKGLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDQV
TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS;或

[0153] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQGLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRF
VFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS。

[0154] 所述双特异性抗体的另外方面在本申请的其他地方进行了描述,并且包括本文公开的序列的人源化形式的变体和/或在Fc区中的取代以促进在所述第一与第二VH链之间形成异二聚体。

[0155] 抗MDR1且抗PD-L1双特异性抗体

[0156] 在某些方面,所述TAA可以是程序性死亡配体1(PD-L1)。PD-L1也称为分化簇274(CD274)或B7同源物1(B7-H1)。在某些方面,与MDR1和PD-L1结合的双特异性抗体分子包含如在前述章节中描述的共同轻链和第一VH链,并且所述第二VH链包含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR1-3:

[0157] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFT
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS

[0158] 根据Kabat命名法定义的HCDR 1-3是:

[0159] HCDR1:DSWIH

[0160] HCDR2:WISPYGGSTYYADSVKG

[0161] HCDR3:RHWPGGFDY

[0162] 与MDR1和PD-L1结合的双特异性抗体的第二VH链可以具有与以下氨基酸序列至少80%、至少90%、至少95%或100%相同的氨基酸序列:

[0163] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFT
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS

[0164] 与MDR1和PD-L1结合的双特异性抗体的第二VH链可以存在于具有与以下氨基酸序列至少80%、至少90%、至少95%或100%相同的氨基酸序列的重链中:

[0165] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFT

ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0166] 如本文其他地方所述,所述VL链、所述第一VH链和所述第二VH链中的至少一个、两个或全部可以是人源化的。另外,所述VH链的Fc区可以包含取代以增加所述第一与第二VH链之间的异二聚化。在某些方面,所述第一重链可以是人源化的并且包含带电荷对取代K392D和K409D,并且所述第二重链包含带电荷对取代E356K和D399K。

[0167] 抗MDR1且抗EGFR双特异性抗体

[0168] 在某些方面,所述TAA可以是表皮生长因子受体(EGFR)。包含针对EGFR的抗原结合位点的第二VH链的HCDR 1-3可以源自抗EGFR抗体耐昔妥珠单抗(necitumumab)或西妥昔单抗的VH链。耐昔妥珠单抗的重链具有以下序列:

[0169] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKVNSTAAADTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0170] 西妥昔单抗的重链具有以下序列:

[0171] QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0172] 在第一方面,所述抗MDR1抗EGFR双特异性抗体包含如在前述章节中描述的VL和第一VH链,并且所述第二VH链可以包含来自耐昔妥珠单抗的VH区的HCDR。根据Kabat命名法定义的HCDR可以具有以下序列:

[0173] HCDR1:SGDYYWS

[0174] HCDR2:YIYYSGSTDYNPSLKS

[0175] HCDR3:VSIFGVGTFDY

[0176] 在某些方面,所述第二VH链可以具有与以下氨基酸序列至少80%、至少90%、至少95%或100%相同的氨基酸序列:

[0177] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKVNSTAAADTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGTLVTVSS

[0178] 与MDR1和EGFR结合的双特异性抗体的第二VH链可以存在于具有与以下氨基酸序列至少80%、至少90%、至少95%或100%相同的氨基酸序列的重链中:

[0179] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDYNPSLKSRT

TMSVDTSKNQFSLKVNSTAAADTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVLPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0180] 在第二方面,所述抗MDR1抗EGFR双特异性抗体包含如在前述章节中描述的VL和第一VH链,并且所述第二VH链可以包含来自西妥昔单抗的VH区的HCDR。根据Kabat命名法定义的HCDR可以具有以下序列:

[0181] HCDR1:NYGVH

[0182] HCDR2:VIWSSGNTDYNTPTFTS

[0183] HCDR3:ALTYDYEFAY

[0184] 在某些方面,所述第二VH链可以具有与以下氨基酸序列至少80%、至少90%、至少95%或100%相同的氨基酸序列:

[0185] QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFTSRLSI
NKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTLLTVSA

[0186] 与MDR1和EGFR结合的双特异性抗体的第二VH链可以存在于具有与以下氨基酸序列至少80%、至少90%、至少95%或100%相同的氨基酸序列的重链中:

[0187] QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFTSRLSI
NKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0188] 上述抗MDR1抗EGFR双特异性抗体包含与上述抗MDR1抗CD47双特异性抗体和抗MDR1抗PD-L1双特异性抗体相同的VH和VL链的组合,并且可以称为15D3 HC::MRK16 LC::耐昔妥单抗HC和15D3 HC::MRK16LC::西妥昔单抗HC抗体。

[0189] 本文还提供了包含不同的共同VL链和第一VH链的组合但不是如上所述基于MRK16 LC和/或15D3 HC的双特异性抗体分子,所述共同VL链含有针对MDR1的抗原结合位点,所述第一VH链含有针对MDR1的抗原结合位点。

[0190] 在某些方面,抗MDR1抗EGFR双特异性抗体可以具有以下重链和轻链的组合:(i) 15D3 HC::西妥昔单抗HC::15D3 LC;(ii) MRK16 HC::西妥昔单抗HC::15D3 LC;或(iii) MRK16 HC::西妥昔单抗HC::MRK16 LC。

[0191] 所述HCDR和所述LCDR、所述VL和VH区以及所述重链和轻链可以具有与本文提供的序列相同的序列。

[0192] 所述第一HC可以包含带电荷对取代K392D和K409D,并且所述第二重链可以包含带电荷对取代E356K和D399K,反之亦然。

[0193] 在某些方面,本公开文本的双特异性抗体不包括双特异性抗体UIC2 DD HC::西妥昔单抗KK HC::MRK16 LC。该双特异性抗体包含含有抗MDR1抗体UIC2的HCDR 1-3的VH链。然而,该抗体未保留与MDR1的结合,如使用过表达MDR1的293T细胞通过FACS测量的。参见图

31。UIC2 HC的VH链如本文其他地方所提供。

[0194] 在某些方面,所述双特异性抗体包含含有如本文所述的第二VH链和重链恒定区的第二重链。所述重链可以包含人IgG1重链恒定区序列。

[0195] 在某些方面,所述双特异性抗体分子特异性结合表达MDR1和所述TAA二者的细胞,并且与对表达MDR1或所述TAA的细胞的亲和力相比,对表达MDR1和所述TAA二者的细胞的亲和力大于两倍。

[0196] 在某些方面,所述双特异性抗体分子能够提高癌细胞对采用化学治疗剂治疗的敏感性,其中当与所述抗体共同施用所述化学治疗剂的半数抑制浓度(IC50)比当与如下抗MDR1抗体共同施用所述化学治疗剂的IC50低至少2倍(例如低至少3倍、低至少4倍、低至少5倍、低至少10倍、低至少20倍或低至少30倍),所述抗MDR1抗体包含具有以下序列的VH链:

[0197] EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRF TVSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDTALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSA;和具有以下序列的VL链:

[0198] DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIHVSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRLEAEDLGYYCFQGSHPRTFGGGTRLEIK。在某些方面,所述抗MDR1抗体可以是美国专利号5,959,084中描述的15D3抗体。

[0199] 在某些方面,所述双特异性抗体分子与MDR1结合的亲和力比如下抗MDR1抗体与MDR1结合的亲和力低至少2倍(例如低至少3倍、低至少4倍、低至少5倍、低至少10倍、低至少20倍或低至少30倍),所述抗MDR1抗体包含具有以下序列的VH链:

[0200] EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRF TVSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDTALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSA;和具有以下序列的VL链:

[0201] DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIHVSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRLEAEDLGYYCFQGSHPRTFGGGTRLEIK。在某些方面,所述抗MDR1抗体可以是美国专利号5,959,084中描述的15D3抗体。

[0202] 在某些方面,所述双特异性抗体分子在与表达MDR1的细胞结合时抑制通过所述MDR1的外排。抑制可以是与在不存在所述双特异性抗体的情况下通过所述MDR1的外排相比外排减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少50%或更多。

[0203] 在某些方面,所述双特异性抗体分子包含Fc结构域,所述Fc结构域已被修饰以降低或消除所述抗体与一种或多种Fc γ 受体的结合。在某些方面,IgG1 Fc结构域可以具有取代L234A、L235A、P329G和N297A/Q/G中的一种或多种。

[0204] 如上所总结,本公开文本提供了具有靶向细胞外排泵的结构域和靶向癌症相关抗原的结构域的多特异性抗体。包括包含多药耐药蛋白1(MDR1)结合结构域和白细胞表面抗原CD47结合结构域的多特异性抗体。本公开文本的多特异性抗体特异性结合表达MDR1和CD47二者的细胞。

[0205] 因此,本公开文本的多特异性抗体靶向MDR1和CD47二者。MDR1也称为P-糖蛋白1(Pgp),其是由ATP结合盒亚家族B成员1(ABCB1)表达的负责减少多药耐药性细胞中的药物积累的能量依赖性外排泵。CD47也称为整合素相关蛋白(IAP),其是结合膜整合素并且还充当配体血小板反应蛋白-1(TSP-1)和信号调节蛋白 α (SIRP α)的受体并且由CD47基因编码的免疫球蛋白超家族跨膜蛋白。CD47配体结合可以导致抑制吞噬作用,因此作为免疫疗法中

的靶标,掩蔽CD47胞外结构域防止抑制免疫介导的对CD47表达癌细胞的杀伤。

[0206] 在图1A中提供了本公开文本的多特异性抗体的实施方案的示意图描绘。如所描绘的,多特异性抗体100包含MDR1结合结构域101和CD47结合结构域102以及任选的Fc结构域103的全部或部分。如图1B所示,在存在表达MDR1 107但CD47表达低或不存在的细胞104的情况下,多特异性抗体100对所述细胞具有低亲和力。相应地,在存在表达CD47 108但MDR1表达低或不存在的细胞105的情况下,多特异性抗体100对所述细胞具有低亲和力。然而,在存在表达MDR1 107和CD47 108二者的细胞106的情况下,多特异性抗体100对所述细胞具有高亲和力。

[0207] 因此,与仅表达MDR1或CD47的细胞相比,本公开文本的多特异性抗体以更高的亲和力结合表达MDR1和CD47二者的细胞。相应地,例如,与当第一和第二靶标二者均以高于低水平(例如,平均、正常和/或高水平)存在时相比,当存在低水平的相应第二靶标时本公开文本的多特异性抗体以大大降低的亲和力结合。在一些实施方案中,与主题多特异性抗体结合表达MDR1或CD47(或低水平的MDR1或CD47)的细胞的亲和力相比,主题多特异性抗体结合表达MDR1和CD47二者的细胞的亲和力大于两倍,包括例如大于2.5倍、大于3倍、大于4倍、大于5倍、大于6倍、大于7倍、大于8倍、大于9倍、大于10倍或更多。

[0208] 在一些实施方案中,当与表达MDR1的细胞结合时,主题多特异性抗体可以阻止细胞MDR1蛋白起作用。因此,本公开文本的多特异性抗体可以抑制通过所述MDR1蛋白的外排,包括例如其中与在不存在主题多特异性抗体的情况下通过MDR1的外排相比,外排降低5%或更多,包括例如10%或更多、15%或更多、20%或更多、25%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多或者90%或更多。

[0209] 在一些实施方案中,当与表达CD47的细胞结合时,主题多特异性抗体可以阻止细胞CD47蛋白起作用。因此,本公开文本的多特异性抗体可以抑制CD47配体或CD47结合配偶体与CD47的结合,包括例如其中与在不存在主题多特异性抗体的情况下CD47的结合相比,配体/结合配偶体结合降低5%或更多,包括例如10%或更多、15%或更多、20%或更多、25%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多或者90%或更多。

[0210] 本公开文本的多特异性抗体对于MDR1和CD47是至少双特异性的,其中所述抗体的构型可以变化。术语“抗体”是指包含一个或多个(例如,一个或两个)重链可变区(VH)和/或一个或多个(例如,一个或两个)轻链可变区(VL)的蛋白质或者能够结合表位的其子片段。关于本文所述的多特异性抗体,此类抗体能够结合存在于两种不同靶蛋白上的至少两个不同的表位。与主题多特异性抗体结合的不同靶蛋白的数量以及因此不同表位的数量可以变化,并且可以是两个(即,双特异性)、三个(三特异性)、四个或更多个。

[0211] 在一些实施方案中,本公开文本的多特异性抗体可以包含共同轻链。如本文所用,术语“共同轻链”通常将指代使用同一轻链的两个拷贝并掺入所述多特异性抗体中。换句话说,组装的多特异性抗体中的轻链将与MDR1特异性重链缔合,并且同一轻链的第二拷贝将与CD47特异性重链缔合。

[0212] VH和VL区可以进一步细分为具有高变性的区域,称为“互补决定区(CDR)”,散布有更保守的区域,称为“框架区(FR)”。已精确地定义FR和CDR的范围(参见Kabat等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of

Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242; Chothia等人(1987) J.Mol.Biol.196:901-917)。VH可以包含按以下顺序从N末端到C末端排列的三个CDR和四个FR:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。类似地,VL可以包含按以下顺序从N末端到C末端排列的三个CDR和四个FR:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0213] 抗体的VH或VL链还可以包含重链或轻链恒定区的全部或部分,从而分别形成免疫球蛋白重链或轻链。在一个实施方案中,所述抗体是两条重链和两条轻链的四聚体,其中所述重链和轻链通过例如二硫键互相连接。重链恒定区由三个结构域即CH1、CH2和CH3构成。轻链恒定区由一个结构域即CL构成。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合区。抗体的恒定区通常介导抗体与宿主组织和因子的结合,所述宿主组织和因子包括免疫系统的各种细胞和补系统的第一组分。术语“抗体”包括类型IgA、IgG、IgE、IgD、IgM及其亚型的免疫球蛋白。在一些实施方案中,主题抗体是IgG同种型。

[0214] 如本文所用,术语“免疫球蛋白”是指包括基本上由免疫球蛋白基因编码的一种或多种多肽在内的蛋白质。公认的人免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α (IgA1和IgA2)、 γ (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因;以及许多免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白轻链(约25kD或214个氨基酸)由N末端的可变区基因(约110个氨基酸)和C末端的 κ 或 λ 恒定区编码。全长免疫球蛋白重链(约50kD或446个氨基酸)由N末端的可变区基因(约116个氨基酸)和C末端的其他上述恒定区基因之一例如 γ (编码约330个氨基酸)编码。在一些实施方案中,主题抗体包含全长免疫球蛋白重链和全长免疫球蛋白轻链。

[0215] 在一些实施方案中,主题抗体不包含全长免疫球蛋白重链和全长免疫球蛋白轻链,而是包含一条或多条全长免疫球蛋白重链的抗原结合片段和/或全长免疫球蛋白轻链的一个或多个抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗原结合片段包含在单独的多肽链上;在其他实施方案中,所述抗原结合片段包含在单条多肽链内。

[0216] 术语“抗原结合片段”是指全长抗体的能够与如上所述的MDR1或CD47特异性结合的一个或多个片段。结合片段的例子包括(i) Fab片段(包含VL、VH、CL和CH1结构域例如由其组成的单价片段);(ii) F(ab')₂片段(包含通过铰链区处的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段);(iii) Fd片段(包含VH和CH1结构域,例如由其组成);(iv) Fv片段(包含抗体单臂的VH和VL结构域,例如由其组成);(v) dAb片段(包含VH结构域,例如由其组成);(vi) 分离的CDR;(vii) 单链Fv(scFv)(包含使用使得VH和VL结构域配对形成单价分子的重组手段通过合成接头而连接的抗体单臂的VH和VL结构域,例如由其组成);(viii) 双抗体(包含两个scFv,例如由其组成,其中VH和VL结构域连接使得它们未配对形成单价分子;scFv的每一个的VH与另一个scFv的VL结构域配对形成二价分子)。

[0217] 在一些实施方案中,主题抗体是重组或经修饰的抗体,例如嵌合的、人源化的、去免疫化的或体外产生的抗体。如本文所用的术语“重组”或“经修饰的”抗体旨在包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的所有抗体,如(i) 使用转染至宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体;(ii) 从重组的组合抗体文库分离的抗体;(iii) 从对于人免疫球蛋白基因是转基因的动物(例如小鼠)分离的抗体;或(iv) 通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的任何其他手段制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组抗体包括人源化的、CDR移植的、嵌合的、去免疫化的和体外产生的抗体;并且可以任选地包含源自人种系免疫球蛋白序列的恒定区。

[0218] 经修饰的抗体可以包含经修饰的结构域,包括其中任何抗体结构域可以从天然存在的形式修饰而来。在一些实施方案中,经修饰的抗体可以包含经修饰的重链,包括经修饰的Fc结构域、包括经修饰的CH2和/或经修饰的CH3结构域。在一些情况下,经修饰的Fc结构域可以采用静电转向(electrostatic steering)效应,包括但不限于例如通过使用Gunasekaran等人,(2010) Journal of Biological Chemistry 285,19637-19646中描述的程序;将其公开内容通过引用以其整体并入本文。在一些情况下,双特异性抗体通过CH3结构域处的电荷对取代来组装,包括但不限于例如其中一条重链被修饰以含有K392D和K409D取代且另一条重链被修饰以含有E356K和D399K取代。电荷对取代的链可以优先彼此形成异二聚体。氨基酸取代的编号是按照对于HC的EU编号系统。

[0219] 在一些情况下,本公开文本的抗体包含电荷对取代。在一些情况下,本公开文本的抗体不包含电荷对取代。在一些情况下,可以采用促进所需链的优先异二聚体形成的替代手段。

[0220] 在一些情况下,经修饰的重链可以包含杵臼结构(knob-into-hole)修饰。“杵臼结构”氨基酸修饰是在产生多特异性抗体(包括双特异性IgG抗体)时用于重链的异二聚化的抗体工程化中的合理设计策略。例如,在将杵臼结构策略掺入由两种具有不同特异性的单克隆抗体制成的双特异性抗体中时,氨基酸变化被工程化以在单克隆抗体1(mAb1)的重链CH3上产生“杵”并且在单克隆抗体2(mAb2)的重链CH3上产生“臼”。杵可以由大氨基酸(例如像酪氨酸(Y))表示,而臼可以由小氨基酸(如苏氨酸(T))表示。例如,杵臼结构对修饰可以通过在第一CH3结构域中的T22Y取代和在配偶体CH3结构域中的Y86T取代来产生。杵臼结构修饰的例子在以下文献中进行了描述:Carter, J. Immunol. Methods, 248 (1-2): 7-15 (2001); Ridgway, J. B. 等人 Protein Eng. 9 (7): 617-2 (1996); 以及 Merchant, A. M. 等人 Nat. Biotechnol. 16 (7): 677-81 (1998); 将其公开内容以其整体并入本文。在由成对的经杵臼结构修饰的结构域产生的抗体中,所述双特异性异二聚体将通常表示主要部分。

[0221] 如上所总结,本公开文本的多特异性抗体将包含MDR1结合结构域和CD47结合结构域。此类结构域(包括由所述结构域结合的表位、可变区排列和序列等)可以变化。

[0222] 主题MDR1结合结构域特异性结合MDR1的一个或多个表位。因此,所述表位是MDR1表位。与MDR1结合结构域结合的MDR1表位的大小可以变化,包括其中所述MDR1表位由具有MDR1序列的连续延伸段的多肽形成,所述连续延伸段的范围可以是4aa或更少至12aa或更多,包括但不限于例如4aa、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10aa、11aa、12aa、4aa至10aa、5aa至10aa、6aa至10aa、4aa至8aa、5aa至8aa、6aa至8aa等。

[0223] 在一些实施方案中,所述MDR1表位可以由如下多肽形成,所述多肽与以下MDR1序列的连续延伸段具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性,所述MDR1序列包括但不限于例如人MDR1序列:

[0224] MDLEGDRNGGAKKKNF FKLNNKSEKDKKEKKPTVSVFSMFRYSNWLDKLYMVVGTAAIIHGAGLPLMLVFGEMTDIFANAGNLEDLMSNITNRSNDINDTGFFMNLEEDMTRYAYYYSGIGAGVLVAAYIQVSFWCLAAGRQIHKIRKQFFHAIMRQEIGWFDVHDVGELNTRLTDDVSKINEGIGDKIGMFFQSMATFFTGFIVGFTRGWKLTIVILAI SPVLGLSAAVWAKILSSFTDKELLAYAKAGAVAEVLAAIRTVIAFGGQKKELERYNKNLEEAKRIGIKKAITANISIGAALLIYASYALAFWYGTTLVLSGEYSIGQVLTVFFSVLIGAFSVGQASPSIEAFANARGAAYEIFKIIDNK

PSIDSYSKSGHKPDNIKGNLEFRNVHFSYPSRKEVKILKGLNLKVQSGQTVALVGNSGCGKSTTVQLMQRLYDPTE
GMVSVGDQDIRTINVRLREIIGVVSQEPVLFATTIAENIRYGRENVMTMDEIEKAVKEANAYDFIMKLPHKFDTLV
GERGAQLSGGQKQRIAIARALVRNPKILLLDEATSALDTESEAVVQVALDKARKGRTTIVIAHRLSTVRNADVIAG
FDDGVIVEKGNHDELMKEKGIYFKLVTMQTAGNEVELENAADESKSEIDALEMSSNDSRSSLIRKRSTRRSVRGSQ
AQDRKLSTKEALDESIPPVSFWRIMKLNLTWPYFVVGVFCAIINGGLQPAFAIIFSKIIGVFTRIDDPETKRQNS
NLFSLFLALGIIISFITFFLQGFTFGKAGEILTKRLRYMVFRSMLRQDVSWFDDPKNTTGALTTRLANDAAQVKGA
IGSRLAVITQNIANLGTGIIISFIYGWQLTLLLLAIVIPIIAAGVEMKMLSGQALKDKKELEGSGKIAIEAIENF
RTVVSLTQEQKFEHMYAQLQVPYRNSLRKAHIFGITFSFTQAMMYFSYAGCFRFGAYLVAHKLMSFEDVLLVFS
VVFAMAVGQVSSFAPDYAKAKISAAHIIMIIEKTPLIDSYSTEGLMPNTLEGNTFGEVVFNYPTRPDIPVLQGL
SLEVKKGQTLALVGSSGCGKSTVVQLLERFYDPLAGKVLLDGKEIKRLNVQWLRAHLGIVSQEPILFDCSIAENIA
YGDNSRVVSQEEIVRAAKEANIHAFIESLPNKYSTKVGDKGTQLSGGQKQRIAIARALVRQPHILLLDEATSALDT
ESEKVVQEALDKAREGRTCIVIAHRLSTIQNADLIVVFQNGRVKEHGTHQQLLAQKGIYFSMVSVQAGTKRQ;或啮
齿动物MDR1序列,例如像小鼠MDR1序列:

[0225] MEFEENLKGRADKNFSKMGKSKKEKKEKPAVGVFGMFRYADWLDKLCMILGTAAIIHGTLPLLM
LVFGNMTDSFTKAEASILPSITNQSGPNSTLIISNSSLEEEMAIYAYYYTGIGAGVLIVAYIQVSLWCLAAGRQIH
KIRQKFFHAIMNQEIGWFDVHDVGELNTRLTDDVSKINDGIGDKIGMFFQSITTFLAGFIIGFISGWKLTIVILAV
SPLIGLSSALWAKVLTSFTNKELQAYAKAGAVAEVLAAIRTVIAFGGQKQKELERYNKNLEEAKNVGKKAITASI
SIGIAYLLVYASYALAFWYGTSLVLSNEYSIGEVLTVFFSILLGTFSIGHLAPNIEAFANARGAAFEIFKIIDNEP
SIDSFSTKGYPDSIMGNLEFKNVHFNYPSEVQILKGLNLKVQSGQTVALVGNSGCGKSTTVQLMQRLYDPLEG
VVSIDGQDIRTINVRLREIIGVVSQEPVLFATTIAENIRYGRENVMTMDEIEKAVKEANAYDFIMKLPHQFDTLVG
ERGAQLSGGQKQRIAIARALVRNPKILLLDEATSALDTESEAVVQAALDKAREGRTTIVIAHRLSTVRNADVIAGF
DGGVIVEQGNHDELMREKGIYFKLVTMQTRGNEIEPGNNAYGSQSDTDASELTSEESKSPLIRRSIYRSVHRKQDQ
ERRLSMKEAVDEDVPLVSFWRILNLSWVYLLVGVLCAVINGCIQPVFAIVFSRIVGVFSRDDDHETKRQNCNL
FSLFFLVMGLISFVITYFFQGFTFGKAGEILTKRVRYMVFKSMLRQDISWFDDHKNSTGSLTTRLASDASSVKGAMG
ARLAVVTQNVANLGTGVILSLVYGWQLTLLLVIIPLIVLGGIIEMKLLSGQALKDKKQLEISGKIAIEAIENFRT
IVSLTREKQFETMYAQLQVPYRNAMKKAHVFGITFSFTQAMMYFSYAACFRFGAYLVAQQLMTFENVMLVFS
FGAMAAGNTSSAPDYAKAKVSASHIIRIIEKTPEIDSYSTEGLKPTLLEGNVKFNQVFNYPTRPNIPVLQGLSL
EVKKGQTLALVGSSGCGKSTVVQLLERFYDPMAGSVFLDGKEIKQLNVQWLRAHLGIVSQEPILFDCSIAENIAYG
DNSRAVSHEEIVRAAKEANIHQFIDSLPDKYNTRVGDKGTQLSGGQKQRIAIARALVRQPHILLLDEATSALDTES
EKVVQEALDKAREGRTCIVIAHRLSTIQNADLIVVIENGKVKEHGTHQQLLAQKGIYFSMVQAGAKRS;或非人灵
长类动物序列,例如像黑猩猩(Pan troglodytes)(黑猩猩(Chimpanzee))序列:

[0226] MDLEGDRNGGAKKKNFFKLNNKSEKDKKEKKPTVSVFSMFRYSNWLDKLYMVVGTLAAIIHGAGLPLM
MLVFGEMTDIFANAGNLEDLMSNITNRSNDINDTGFFMNLEEDMTRYAYYYSGIGAGVLVAAYIQVSWCLAAGRQI
HKIRKQFFHAIMRQEIGWFDVHDVGELNTRLTDDVSKINEGIGDKIGMFFQSMATFFTGFIVGFTRGWKLTIVILA
ISPVLGLSAAVWAKILSSFTDKELLAYAKAGAVAEVLAAIRTVIAFGGQKQKELERYNKNLEEAKRIGIKKAITAN
ISIGAAFLLIYASYALAFWYGTTLVLSGEYSIGQVLTVFFSVLIGAFSVGQASPSIEAFANARGAAYEIFKIIDNK
PSIDSYSKSGHKPDNIKGNLEFRNVHFSYPSRQVKILKGLNLKVQSGQTVALVGNSGCGKSTTVQLMQRLYDPTE
GMVSVGDQDIRTINVRLREIIGVVSQEPVLFATTIAENIRYGRENVMTMDEIEKAVKEANAYDFIMKLPHKFDTLV
GERGAQLSGGQKQRIAIARALVRNPKILLLDEATSALDTESEAVVQVALDKARKGRTTIVIAHRLSTVRNADVIAG

FDDGVIVEKGNHDELMKEKGIYFKLVTMQTAGNEVELENAADESKSEIDALEMSSNDSRSSLIRKRSTRRSVRGSQ
AQDRKLSTKEALDESIPPVSFWRIMKLNLTWPYFVVGVFCAIINGGLQPAFAIIFSKIIGVFTRIDDPETKRQNS
NLFSLFLVLGIIISFITFFLQGFTFGKAGEILTKRLRYMVFRSMLRQDVSWFDDPKNTTGALTTRLANDAAQVKA
IGSRLAVITQNIANLGTGIIISFIYGWQLTLLLLAIVPIIAIAGVEMKMLSGQALKDKKELEGAGKIASEAIENF
RTVVSLTQEQKFEHMYAQLQVPYRNSLRKAHIFGITFSFTQAMMYFSYAGCFRFGAYLVAHKLSMFEDVLLVFS
VVFAMAVGQVSSFAPDYAKAKISAAHIIMIIEKTPLIDSYSTEGLTPNTLEGNTVFGEVVFNYPTRPDIPVLQGL
SLEVKKGQTLALVGSSGCGKSTVVQLLERFYDPLAGKVLLDGKEIKRLNVQWLAHLGIVSQEPILFDCSIAENIA
YGDNSRVVSQEEIVRAAKEANIHAHIESLPNKYSTRVGDKGTQLSGGQKQRIAIARALVRQPHILLLDEATSALDT
ESEKVVQEALDKAREGRTCIVIAHRLSTIQNADLIVVFQNGRVKEHGTHQQLLAQKGIYFSMVSVQAGTKRQ;或食
蟹猴 (*Macaca fascicularis*) (食蟹猴 (Crab-eating macaque)) 序列:

[0227] MDLEGDRNGGAEEKKNFFKLNNKSKDKKERKPTVSVFSMFRYSNWLKLYMVVGTAAIIHGAGLPLM
MLVFGDMTDTFANAGNLGDLGALLFNNTNSSNITDTPVPMNEEDMTRYAYYYSGIGAGVLVAAYIQVSWCLAAG
RQIHKIRKQFFHAIMRQEIWFVDVHVGELNTRLTDDVSKINEGIGDKIGMFFQSMATFFTGFIVGFTRGWKLTIV
ILAI SPVLGLSAAVWAKILSSFTDKELLAYAKAGAVAEVLAAIRTVIAFGGQKKELERYKNKLEEKAKRIGIKKAI
TANISIGAAFLLIYASYALAFWYGTTLVLSKEYSIGQVLTVFFSVLIGAFSVGQASPSIEAFANARGAAFEIFKII
DNKPSIDSYSGHKKPDNIKGNLEFRNVHFSYPSRKEVKILKGLNLKVQSGQTVALVNSGCGKSTTVQLMQRLYD
PTEGMVSDGQDIRTINVRFLREIIGVVSQEPVLFATTIAENIRYGREDDVTMDEIEKAVKEANAYDFIMKLPQKFD
TLVGERGAQLSGGQKQRIAIARALVRNPKILLLDEATSALDTESEAVVQVALDKARKGRTTIVIAHRLSTVRNADV
IAGFDDGVIVEKGNHDELMKEKGIYFKLVTMQTAGNEIELENAADESKSEIDTLEMSSHDSGSSLIRKRSTRRSVR
GSQGGDRKLSTKEALDESIPPVSFWRIMKLNLTWPYFVVGVFCAIINGGLQPAFAVIFSKIIGIFTRNDDAETKR
QNSNLFSLFLVLGIVSFITFFLQGFTFGKAGEILTKRLRYMVFRSMLRQDVSWFDDPKNTTGALTTRLANDAAQV
KGAIGSRLAIITQNIANLGTGIIISLIYGWQLTLLLLAIVPIIAIAGVEMKMLSGQALKDKKELEGAGKIAEAI
ENFRTVVSLTQEQKFEHMYDQSLQVPYRNSLRKAHIFGITFSFTQAMMYFSYAGCFRFGAYLVAHSLMSFEDVLLV
FSAVVFGAMAVGQVSSFAPDYAKAKVSAHHIMIIEKTPLIDSYSTEGLKPNTEGNVTFNEVVFNYPTRLDIPVL
QGLSLEVKKGQTLALVGSSGCGKSTVVQLLERFYDPLAGKVLLDGKEIKQLNVQWLAHLGIVSQEPILFDCSISE
NIAYGDNSRVVSQEEIVRAAKEANIHAHIESLPNKYSTRVGDKGTQLSGGQKQRIAIARALVRQPHILLLDEATSA
LDTESEKVVQEALDKAREGRTCIVIAHRLSTIQNADLIVVFQNGRVKEHGTHQQLLAQKGIYFSMVSVQAGAKRQ
等。

[0228] 主题MDR1结合结构域展现出与MDR1的高亲和力结合。例如,主题MDR1结合结构域以如下亲和力与MDR1结合:至少约 10^{-7} M、至少约 10^{-8} M、至少约 10^{-9} M、至少约 10^{-10} M、至少约 10^{-11} M或至少约 10^{-12} M、或大于 10^{-12} M。主题MDR1结合结构域以如下亲和力与MDR1上存在的表位结合:从约 10^{-7} M至约 10^{-8} M、从约 10^{-8} M至约 10^{-9} M、从约 10^{-9} M至约 10^{-10} M、从约 10^{-10} M至约 10^{-11} M或从约 10^{-11} M至约 10^{-12} M、或大于 10^{-12} M。

[0229] 主题MDR1结合结构域基本上未展现出与由其他相关的但序列不相似的蛋白质(如相关的但序列不相似的EP)内的氨基酸形成的任何表位的结合。主题MDR1结合结构域与由相关的但序列不相似的蛋白质内的氨基酸形成的表位的任何结合通常是非特异性结合,其亲和力显著低于所述MDR1结合结构域与MDR1上的表位的特异性结合。显著较低的亲和力通常是至少两倍、三倍、五倍、10倍、50倍、100倍、500倍或1000倍低的亲和力。

[0230] 主题MDR1结合结构域可以降低通过MDR1转运蛋白对分子的转运。例如,与在不存

在所述MDR1结合结构域的情况下转运的程度相比,主题MDR1结合结构域可以使转运降低至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或更多。

[0231] 在一些实施方案中,主题抗体包含:可变结构域,所述可变结构域含有:a)重链可变结构域,所述重链可变结构域包含:i.CDR1区,所述CDR1区在氨基酸序列上与RYTMS的重链CDR1区相同或含有RYTMS的重链CDR1区;ii.CDR2区,所述CDR2区在氨基酸序列上与TISSGGGNTYYPDSVKG的重链CDR2区相同或含有TISSGGGNTYYPDSVKG的重链CDR2区;以及iii.CDR3区,所述CDR3区在氨基酸序列上与YGAGDAWFAY的重链CDR3区相同或含有YGAGDAWFAY的重链CDR3区。这些CDR 1-3区是存在于具有以下序列的15D3抗体VH链中的那些:

[0232] EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRFTVSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSA;或具有以下序列的该VH链的人源化形式中的那些:

[0233] EVQLVESGGVTVVQPGGSLRLSAAAGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGX²TYYPDSVKGRFTVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS,其中X²是N、Q或S。这些CDR基于Kabat命名法。

[0234] 在一些实施方案中,主题抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含:具有选自CDR1 (RYTMS)、CDR2 (TISSGGG X²TYYPDSVKG,其中X²是N、Q或S) 和CDR3 (YGAGDAWFAY) 中的一个或多个的氨基酸序列的一个、两个或三个重链CDR;和FR区,其是哺乳动物序列,包括例如啮齿动物、非人灵长类动物和人序列(例如,由相应的重链FR编码序列编码的)。例如,在一些实施方案中,主题抗体包含重链可变区,所述重链可变区按从N末端至C末端的顺序包含:人重链FR1;含有氨基酸序列RYTMS的CDR1;人重链FR2;含有氨基酸序列TISSGGGNTYYPDSVKG的CDR2;人重链FR3;含有氨基酸序列YGAGDAWFAY的CDR3;和人重链FR4。

[0235] 主题抗体可以包含重链可变区,所述重链可变区包含与以下序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多(包括100%)相同的氨基酸序列:

[0236] EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRFTVSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS。主题抗体可以包含重链可变区,所述重链可变区包含具有选自CDR1 (RYTMS)、CDR2 (TISSGGGNTYYPDSVKG) 和CDR3 (YGAGDAWFAY) 中的一个或多个的氨基酸序列的一个、两个或三个重链互补决定区(CDR)。在某些方面,所述VH链被人源化以包含人框架区,并且所述人源化VH链可以包含与以下序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多(包括100%)相同的氨基酸序列:

[0237] EVQLVESGGVTVVQPGGSLRLSAAAGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGX²TYYPDSVKGRFTVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS,其中X²为N、Q或S。

[0238] 主题CD47结合结构域特异性结合CD47的一个或多个表位。因此,所述表位是CD47表位。与CD47结合结构域结合的CD47表位的大小可以变化,包括其中所述CD47表位由具有CD47序列的连续延伸段的多肽形成,所述连续延伸段的范围可以是4aa或更少至12aa或更多,包括但不限于例如4aa、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10aa、11aa、12aa、4aa至10aa、5aa至

10aa、6aa至10aa、4aa至8aa、5aa至8aa、6aa至8aa等。

[0239] 在一些实施方案中,所述CD47表位可以由如下多肽形成,所述多肽与以下CD47序列的连续延伸段具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性,所述CD47序列包括但不限于例如人CD47序列:

[0240] MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTF DGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNENIL IVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQ KTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMNDE;或啮齿动物CD47序列,例如像小鼠CD47序列:MWPLAAALLL GSCCGSAQLLFSNVNSIEFTSCNETVVIPCIVRNVEAQSTEEMFVKWKLNKSIFIIDGKNKSTTTDQNFSAKI SVSDLINGIASLKMDKRDAMVGNYTCEVTELSREGKTVIELKNRTVSWFSPNEKILIVIFPILAILLFWGKFGILT LKYKSSHTNKRIILLVAGLVLTIVVVVGAILLIPGEKPVKNASGLGLIVISTGILILLQYNVFMTAFGMTSFTIA ILITQVLGYVLALVGLCLCIMACEPVHGPLLISGLGIIALAELLGLVYMKFVASNQRTIQPPRNR;或非人灵长类动物序列,例如像苏门答腊猩猩 (*Pongo abelii*) (苏门答腊猩猩 (*Sumatran orangutan*)) 序列:

[0241] MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTF DGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNENIL IVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLIIITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYVVFSTAIGLNSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQ KTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMNDE;或恒河猴 (*Macaca mulatta*) (恒河猴 (*Rhesus macaque*)) 序列:

[0242] MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTF DGALNKSTAPANFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNENIL IVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLMITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQ KTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMNDE等。

[0243] 主题CD47结合结构域展现出与CD47的高亲和力结合。例如,主题CD47结合结构域以如下亲和力与CD47结合:至少约 10^{-7} M、至少约 10^{-8} M、至少约 10^{-9} M、至少约 10^{-10} M、至少约 10^{-11} M或至少约 10^{-12} M、或大于 10^{-12} M。主题CD47结合结构域以如下亲和力与CD47上存在的表位结合:从约 10^{-7} M至约 10^{-8} M、从约 10^{-8} M至约 10^{-9} M、从约 10^{-9} M至约 10^{-10} M、从约 10^{-10} M至约 10^{-11} M或从约 10^{-11} M至约 10^{-12} M、或大于 10^{-12} M。

[0244] 主题CD47结合结构域基本上未展现出与由其他相关的但序列不相似的蛋白质(如相关的但序列不相似的免疫检查点标记物)内的氨基酸形成的任何表位的结合。主题CD47结合结构域与由相关的但序列不相似的蛋白质内的氨基酸形成的表位的任何结合通常是非特异性结合,其亲和力显著低于所述CD47结合结构域与CD47上的表位的特异性结合。显著较低的亲和力通常是至少两倍、三倍、五倍、10倍、50倍、100倍、500倍或1000倍低的亲和力。

[0245] 主题CD47结合结构域可以降低CD47结合配偶体与CD47的结合,所述CD47结合配偶

体包括例如血小板反应蛋白-1 (TSP-1)、信号调节蛋白 α (SIRP α)和整合素(例如,整合素 α vb3)。例如,与在不存在所述CD47结合结构域的情况下结合的程度相比,主题CD47结合结构域可以使CD47结合配偶体的结合降低至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或更多。

[0246] 在一些实施方案中,主题抗体包含:可变结构域,所述可变结构域含有:a)重链可变结构域,所述重链可变结构域包含:i.CDR1区,所述CDR1区在氨基酸序列上与NYNMH的重链CDR1区相同或含有NYNMH的重链CDR1区;ii.CDR2区,所述CDR2区在氨基酸序列上与TIYPGNDDTSYNQKFKD的重链CDR2区相同或含有TIYPGNDDTSYNQKFKD的重链CDR2区;以及iii.CDR3区,所述CDR3区在氨基酸序列上与GGYRAMDY的重链CDR3区相同或含有GGYRAMDY的重链CDR3区。这些CDR 1-3区是存在于具有以下序列的5F9抗体VH链中的那些:

[0247] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRV TITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS。这些CDR基于Kabat命名法。

[0248] 主题抗体可以包含重链可变区,所述重链可变区包含与以下序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多(包括100%)相同的氨基酸序列:

[0249] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRV TITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS。主题抗体可以包含重链可变区,所述重链可变区包含具有选自CDR1 (NYNMH)、CDR2 (TIYPGNDDTSYNQKFKD)和CDR3 (GGYRAMDY)中的一个或多个的氨基酸序列的一个、两个或三个重链互补决定区(CDR)。

[0250] 在一些实施方案中,主题抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含:具有选自CDR1 (NYNMH)、CDR2 (TIYPGNDDTSYNQKFKD)和CDR3 (GGYRAMDY)中的一个或多个的氨基酸序列的一个、两个或三个重链CDR;和FR区,其是哺乳动物(例如,啮齿动物、非人灵长类动物或人)序列(例如,由相应的重链FR编码序列编码的)。例如,在一些实施方案中,主题抗体包含重链可变区,所述重链可变区按从N末端至C末端的顺序包含:人重链FR1;含有氨基酸序列NYNMH的CDR1;人重链FR2;含有氨基酸序列TIYPGNDDTSYNQKFKD的CDR2;人重链FR3;含有氨基酸序列GGYRAMDY的CDR3;和人重链FR4。

[0251] 主题抗体可以包含含有如下氨基酸序列的轻链可变区,所述氨基酸序列与序列DVLMTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK或与具有序列DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGX¹TYLEWYQQRPGQPPRLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK(其中X¹是N、Q或S)的该序列的人源化形式85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多(包括100%)相同。

[0252] 主题抗体可以包含轻链可变区,所述轻链可变区包含具有CDR1 (RSSQSIVHSTGX¹TYLEW)(其中X¹是N、Q或S)、CDR2 (KISNRFSG)和CDR3 (FQASHFPRTF)或CDR1 (RSSQSLLHSDGFDYLNW)、CDR2 (ALSNRASG)和CDR3 (MZALQAPITF)所示的氨基酸序列的轻链CDR。在一些情况下,这种轻链可变区可以用于主题多特异性抗体的共同轻链中。

[0253] 在一些实施方案中,主题抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含具有CDR1 (RSSQSIVHSTGX¹TYLEW)(其中X¹是N、Q或S)、CDR2 (KISNRFSG)和CDR3 (FQASHFPRTF)或CDR1

(RSSQSLHSDGFDYLNW)、CDR2 (ALSNRASG) 和 CDR3 (MZALQAPITF) 所示的氨基酸序列的轻链 CDR; 和 FR 区, 其是哺乳动物 (包括例如啮齿动物、非人灵长类动物或人) 序列 (例如, 由相应的轻链 FR 编码序列编码的)。例如, 在一些实施方案中, 主题抗体包含轻链可变区, 所述轻链可变区按从 N 末端至 C 末端的顺序包含: 人轻链 FR1; 含有氨基酸序列 RSSQSIVHSTG X¹TYLEW (其中 X¹ 是 N、Q 或 S) 的 CDR1; 人轻链 FR2; 含有氨基酸序列 KISNRFSG 的 CDR2; 人轻链 FR3; 含有 FQASHFPRTF 所示的氨基酸序列的 CDR3; 以及人轻链 FR4。

[0254] 在一些实施方案中, 主题抗体包含: 任选的重链 FR1 区; 含有氨基酸序列 RYTMS 的 CDR1; 重链 FR2 区; 含有氨基酸序列 TISSGGG (N/S/Q) TYYPDSVKG 的 CDR2; 重链 FR3 区; 含有氨基酸序列 YGAGDAWFAY 的 CDR3; 和重链 FR4 区; 以及任选的重链 FR1 区; 含有氨基酸序列 NYNMH 的 CDR1; 重链 FR2 区; 含有氨基酸序列 TIYPGNDDTSYNQKFKD 的 CDR2; 重链 FR3 区; 含有氨基酸序列 GGYRAMDY 的 CDR3; 和重链 FR4 区。在这些实施方案中的一些中, 所述 FR 区中的每一个是哺乳动物 FR 区, 包括例如人 FR 区。

[0255] 在一些实施方案中, 主题抗体包含: 如在前述段落中描述的重链序列, 并且还包含: 轻链 FR1 区; 含有氨基酸序列 RSSQSIVHSTGNTYLEW 或 RSSQSLHSDGFDYLNW 的 CDR1; 轻链 FR2 区; 含有氨基酸序列 KISNRFSG 或 ALSNRASG 的 CDR2; 轻链 FR3 区; 含有氨基酸序列 FQASHFPRTF 或 MZALQAPITF 的 CDR3; 任选的轻链 FR4 区。

[0256] 在一些实施方案中, 主题抗体包含具有以下序列的含有电荷间交换 (KK) 修饰的抗 MDR1 重链序列:

[0257] EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGGRF TVSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG; 具有以下序列的含有电荷间交换 (DD) 修饰的抗 CD47 重链序列:

[0258] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYSNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRV TITADTSASTAYMELSSLRSEDATVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG; 以及具有以下序列的抗 MDR1 轻链序列:

[0259] DVLMTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFP YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC。 在一些情况下, 主题抗体可以包含替代性异二聚体 Fc 配对策略。

[0260] 电荷间交换修饰是指这样的取代, 其中一条重链被修饰以含有 K392D 和 K409D 取代并且另一条重链被修饰以含有 E356K 和 D399K 取代。电荷对取代的链有利于彼此形成异二聚体。氨基酸取代的编号是按照对于 Ig HC 的 EU 编号系统。

[0261] 单特异性二价抗体和双特异性抗体

[0262] 本文还提供了可以作为单特异性二价抗体或由其来源的双特异性抗体的抗体。

[0263] 在某些方面,本公开文本的抗体包含可变轻(VL)链,所述可变轻链包含具有以下序列的VL链的轻链CDR(LCDR):

[0264] DVLMTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGX¹TYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK,其中X¹是N、Q或S;以及可变重(VH)链,所述可变重链包含具有以下序列的VH链的重链CDR(HCDR):

[0265] EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGX²TYYPDSVKGRFTVSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS,其中X²是N、Q或S。

[0266] 在某些方面,所述VL链包含具有以下序列的VL链的LCDR:

[0267] DVLMTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK;并且所述VH链包含具有以下序列的VH链的HCDR:

[0268] EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRFTVSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS,或者所述VL链包含具有以下序列的VL链的LCDR:

[0269] DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGQTYLEWYQQRPGQPPRLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHFPRTFGQGTKLEIK;并且所述VH链包含具有以下序列的VH链的HCDR:

[0270] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCLASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGQTYYPDSVKGRFTVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS,或者所述VL链包含具有以下序列的VL链的LCDR:

[0271] DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGSTYLEWYQQRPGQPPRLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHFPRTFGQGTKLEIK;并且所述VH链包含具有以下序列的VH链的LCDR:

[0272] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCLASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGSTYYPDSVKGRFTVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS。

[0273] 在某些方面,所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE、RSSQSIVHSTGQTYLE或RSSQSIVHSTGSTYLE,所述LCDR2包含序列:KISNRF,并且所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT。

[0274] 在某些方面,所述HCDR1包含序列:RYTMS,所述HCDR2包含序列:TISSGGGNTYYPDSVKG、TISSGGGQTYYPDSVKG或TISSGGGSTYYPDSVKG,并且所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY。

[0275] 在某些方面,所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE,所述LCDR2包含序列:KISNRF,并且所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且所述HCDR1包含序列:RYTMS,所述HCDR2包含序列:TISSGGGNTYYPDSVKG,并且所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY。

[0276] 在某些方面,所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGQTYLE,所述LCDR2包含序列:KISNRF,并且所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且所述HCDR1包含序列:RYTMS,所述HCDR2包含序列:TISSGGGQTYYPDSVKG,并且所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY。

[0277] 在某些方面,所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGSTYLE,所述LCDR2包含序列:

KISNRFS,并且所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且所述HCDR1包含序列:RYTMS,所述HCDR2包含序列:TISGGGQTYYPDSVKG,并且所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY。

[0278] 在某些方面,所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE,所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且所述HCDR1包含序列:RYTMS,所述HCDR2包含序列:TISGGGQTYYPDSVKG,并且所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY,或者所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE,所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且所述HCDR1包含序列:RYTMS,所述HCDR2包含序列:TISGGGQTYYPDSVKG,并且所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY。

[0279] 在某些方面,所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGQTYLE,所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且所述HCDR1包含序列:RYTMS,所述HCDR2包含序列:TISGGGNTYYPDSVKG,并且所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY。

[0280] 在某些方面,所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGSTYLE,所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且所述HCDR1包含序列:RYTMS,所述HCDR2包含序列:TISGGGNTYYPDSVKG,并且所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY。

[0281] 在某些方面,所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGSTYLE,所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且所述HCDR1包含序列:RYTMS,所述HCDR2包含序列:TISGGGQTYYPDSVKG,并且所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY。

[0282] 在某些方面,所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE,所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且所述HCDR1包含序列:RYTMS,所述HCDR2包含序列:TISGGGQTYYPDSVKG,并且所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY。

[0283] 在某些方面,所述抗体是与MDR-1特异性结合的单特异性二价抗体。在某些方面,与MDR-1特异性结合的单特异性二价抗体包含人源化VL链,所述人源化VL链具有与具有如下氨基酸序列的VL链至少80%相同(例如,至少85%相同、至少90%相同、至少95%相同或100%相同)的氨基酸序列:

[0284] DIVMTQTPLSPVTLGGQPASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFS
GSGAGTDFTLKISRVEAEDVGYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK;

[0285] DIVMTQTPLSPVTLGGQPASISCRSSQSIVHSTGQTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFS
GSGAGTDFTLKISRVEAEDVGYYCFQASHFPRTFGGQTKLEIK;或

[0286] DIVMTQTPLSPVTLGGQPASISCRSSQSIVHSTGSTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFS
GSGAGTDFTLKISRVEAEDVGYYCFQASHFPRTFGGQTKLEIK。

[0287] 在某些方面,与所述VL链序列或所述VH链序列不同的氨基酸残基位于框架区中。

[0288] 在某些方面,与MDR-1特异性结合的单特异性二价抗体包含人源化VH链,所述人源化VH链具有与具有如下氨基酸序列的VH链至少80%相同(例如,至少85%相同、至少90%相同、至少95%相同或100%相同)的氨基酸序列:

[0289] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGNTYYPDSVKGRF
TVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS;

[0290] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGQTYYPDSVKGRF
TVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS;或

[0291] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGSTYYPDSVKGRF

TVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS。

[0292] 在某些方面,所述抗体是包含作为共同轻链的VL链的双特异性抗体。

[0293] 在某些方面,所述双特异性抗体包含MDR-1结合结构域和肿瘤相关抗原(TAA)结合结构域,其中所述MDR-1结合结构域和所述TAA结合结构域中的每个包含所述VL链的LCDR 1-3。

[0294] 在某些方面,所述TAA是CD47并且其中所述TAA结合结构域包含具有以下序列的VH链的HCDR:

[0295] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRV TITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS。

[0296] 在某些方面,所述CD47结合结构域的VH链包含:含有序列NYNMH的HCDR1;含有序列 TIYPGNDDTSYNQKFKD的HCDR2;以及含有序列GGYRAMDY的HCDR3。

[0297] 在某些方面,本公开文本的抗体包含可变轻(VL)链,所述可变轻链包含具有以下序列的VL链的轻链CDR(LCDR):

[0298] DVLMTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGX¹TYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK,其中X¹是N、Q或S;以及可变重(VH)链,所述可变重链包含具有以下序列的VH链的重链CDR(HCDR):QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRV TITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARG GYRAMDYWGQGLTVTVSS。

[0299] 在某些方面,所述VH链包含:含有序列NYNMH的HCDR1;含有序列 TIYPGNDDTSYNQKFKD的HCDR2;以及含有序列GGYRAMDY的HCDR3。

[0300] 在某些方面,所述抗体是与CD47特异性结合的单特异性二价抗体。在其他方面,所述抗体是与CD47和MRD-1结合的双特异性抗体。

[0301] 在某些方面,如本文所述的与MDR-1特异性结合的单特异性二价抗体和与CD47特异性结合的单特异性二价抗体可以用于治疗受试者的癌症的方法中,所述方法可以涉及以有效治疗所述癌症的量向所述受试者共同施用所述两种抗体。在某些方面,所述方法还可以涉及向所述受试者施用化学治疗剂。

[0302] 主题抗体的区域和/或链可以通过一个或多个接头区连接或可以不通过一个或多个接头区连接。在存在的情况下,所述接头区的长度可以为约5个氨基酸至约50个氨基酸,例如长度为约5aa至约10aa、约10aa至约15aa、约15aa至约20aa、约20aa至约25aa、约25aa至约30aa、约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa或约45aa至约50aa。

[0303] 适用于主题抗体的接头包括“柔性接头”。如果存在的话,所述接头分子通常具有足够的长度以允许在连接的区域之间的一些柔性运动。所述接头分子通常为约6-50个原子长。所述接头分子还可以是例如芳基乙炔、含有2-10个单体单元的乙二醇寡聚物、二胺、二酸、氨基酸或其组合。根据本公开文本可以使用可与多肽结合的其他接头分子。

[0304] 可以容易地选择合适的接头,并且合适的接头可以具有任何合适的不同长度,如1个氨基酸(例如,Gly)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸或7个氨基酸至8个氨基酸,并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0305] 示例性的柔性接头包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如

(GS)_n、GSGGS_n(SEQ ID NO: //) 和GGGS_n(SEQ ID NO: //), 其中n是至少一的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其他柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是令人感兴趣的, 因为这两种氨基酸均是相对非结构化的, 因此可以充当组分之间的中性系链。甘氨酸聚合物特别令人感兴趣, 因为甘氨酸接近的 Φ - Ψ 空间甚至比丙氨酸显著更大, 并且比侧链较长的残基受到的限制小得多(参见Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992))。示例性的柔性接头包括但不限于GGSG (SEQ ID NO: //)、GSGGG (SEQ ID NO: //)、GSGSG (SEQ ID NO: //)、GSGGG (SEQ ID NO: //)、GGGSG (SEQ ID NO: //)、GSSSG (SEQ ID NO: //) 等。普通熟练技术人员应认识到, 与上述任何元件缀合的肽的设计可以包括完全或部分柔性的接头, 使得所述接头可以包括柔性接头以及赋予不那么柔性的结构的一个或多个部分。

[0306] 在一些实施方案中, 主题抗体是“人源化的”。术语“人源化抗体”是指包含如下至少一条链的抗体, 所述至少一条链包含基本上来自人抗体链(称为受体免疫球蛋白或抗体)的可变区框架残基和基本上来自非人抗体(例如像啮齿动物(例如, 小鼠抗体)、非人灵长类动物等)(称为供体免疫球蛋白或抗体)的至少一个CDR。参见Queen等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)、美国专利号5,530,101、美国专利号5,585,089、美国专利号5,693,761、WO 90/07861以及美国专利号5,225,539。一个或多个恒定区(如果存在的话)也可以基本上或完全来自人免疫球蛋白。在一些实施方案中, 主题抗体包含一个或多个MDR1 CDR和一个或多个CD47 CDR以及来自人抗体的一个或多个FR区。制备人源化抗体的方法是本领域已知的。参见例如美国专利号7,256,273。

[0307] 将小鼠CDR取代至人可变结构域框架中可以导致保留其正确的空间方向, 其中例如人可变结构域框架采用与CDR所起源的小鼠可变框架相同或相似的构象。这可以通过从人抗体获得人可变结构域来实现, 所述人抗体的框架序列展现出与CDR所来源的鼠可变框架结构域的高度序列同一性。所述重链和轻链可变框架区可以源自相同或不同的人抗体序列。所述人抗体序列可以是天然存在的人抗体的序列, 或者可以是若干种人抗体的共有序列。参见Kettleborough等人, Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger等人, Protein Engineering 6:971 (1993)。

[0308] 已经鉴定出鼠供体免疫球蛋白和适当的人受体免疫球蛋白的互补决定区, 下一步是确定来自这些组分的哪些残基(如果有的话)应当被取代以优化所得人源化抗体的特性。一般而言, 应当尽量减少用鼠氨基酸残基取代人氨基酸残基, 因为引入鼠残基会增加抗体在人体中引起人抗小鼠抗体(HAMA)应答的风险。可以进行本领域公认的确免疫应答的方法来监测特定患者或临床试验期间的HAMA应答。施用了人源化抗体的患者可以在施用所述疗法的开始和整个过程中进行免疫原性评估。使用本领域技术人员已知的方法, 包括表面等离子共振技术(BIACORE)和/或固相ELISA分析, 例如通过检测来自患者的血清样品中人源化治疗剂的抗体来测量HAMA应答。在许多实施方案中, 主题人源化抗体基本上不会在人类受试者中引起HAMA应答。

[0309] 基于对CDR构象和/或与抗原的结合的可能影响, 选择来自人可变区框架残基的某些氨基酸进行取代。鼠CDR区与人可变框架区的非自然并置可能导致非自然构象限制, 除非通过某些氨基酸残基的取代来纠正, 否则这导致结合亲和力的丧失。

[0310] 用于取代的氨基酸残基的选择可以部分地通过计算机建模来确定。用于产生免疫

球蛋白分子三维图像的计算机硬件和软件是本领域已知的。一般而言,从免疫球蛋白链或其结构域的已解析结构开始产生分子模型。将待建模的链与已解析的三维结构的链或结构域进行氨基酸序列相似性比较,并且选择显示出最大序列相似性的链或结构域作为构建分子模型的起点。选择具有至少50%序列同一性的链或结构域进行建模,并且优选地选择具有至少60%、70%、80%、90%序列同一性或更多的链或结构域进行建模。对已解析的起始结构进行修饰,以允许被建模的免疫球蛋白链或结构域中的实际氨基酸与起始结构中的氨基酸之间存在差异。然后将经修饰的结构组装成复合免疫球蛋白。最后,通过最小化能量并验证所有原子彼此之间在适当距离内以及键的长度和角度在化学上可接受的限值内来完善模型。

[0311] CDR和框架区如通过Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987和1991)所定义。替代性结构定义已由以下文献提出:Chothia等人, J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Nature 342:878 (1989); 以及J. Mol. Biol. 186:651 (1989) (统称为“Chothia”)。当如通过Kabat (同上)所定义的框架残基构成如通过Chothia (同上)所定义的结构环残基时,可以选择存在于小鼠抗体中的氨基酸以取代进入源化抗体中。“与CDR区相邻”的残基包括在人源化免疫球蛋白链一级序列中与一个或多个CDR紧邻的位置中,例如与如通过Kabat所定义的CDR或与如通过Chothia所定义的CDR紧邻的位置中的氨基酸残基(参见例如,Chothia和Lesk JMB 196:901 (1987))。这些氨基酸特别可能与CDR中的氨基酸相互作用,并且这些氨基酸如果从受体中选择,则扭曲供体CDR并降低亲和力。此外,相邻的氨基酸可以直接与抗原相互作用(Amit等人, Science, 233:747 (1986)), 并且可能希望从供体中选择这些氨基酸以保持提供原始抗体中的亲和力的所有抗原接触。

[0312] 在一些实施方案中,主题抗体包括scFv多聚体。例如,在一些实施方案中,主题抗体是scFv二聚体(例如,包含两个串联scFv (scFv₂))、scFv三聚体(例如,包含三个串联scFv (scFv₃))、scFv四聚体(例如,包含四个串联scFv (scFv₄)),或者是多于四个scFv (例如,串联)的多聚体。scFv单体可以经由长度为约2个氨基酸至约10个氨基酸(例如,长度为2aa、3aa、4aa、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa或10aa)的接头串联连接。合适的接头包括例如(Gly)_x, 其中x是2至10的整数。其他合适的接头是以上讨论的接头。在一些实施方案中,如上所述,主题scFv多聚体中的每个scFv单体是人源化的。

[0313] 在一些实施方案中,主题抗体包含免疫球蛋白的恒定区(例如,Fc区)。所述Fc区(如果存在的话)可以是人Fc区。如果存在恒定区,则所述抗体可以含有轻链和重链恒定区二者。合适的重链恒定区包括CH1、铰链、CH2、CH3和CH4区。本文所述的抗体包括具有所有类型(包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE)和任何同种型(包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)的恒定区的抗体。合适的重链Fc区的例子是人同种型IgG1 Fc。轻链恒定区可以是λ或κ。主题抗体(例如,主题人源化抗体)可以包含来自多于一个类别或同种型的序列。抗体可以表达为含有两条轻链和两条重链的四聚体,表达为单独的重链、轻链,表达为Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv,或者表达为单链抗体,其中重链和轻链可变结构域通过间隔子连接。

[0314] 在一些实施方案中,主题抗体在羧基末端包含游离巯基(-SH)基团,其中所述游离巯基可以用于将所述抗体附接至第二多肽(例如,另一种抗体,包括主题抗体)、支架、载体等。

[0315] 主题抗体可以使用例如戊二醛、同双功能交联剂或异双功能交联剂与第二部分(例如,脂质、除主题抗体以外的多肽、合成聚合物、碳水化合物等)共价连接。戊二醛经由多肽的氨基部分使多肽交联。同双功能交联剂(例如,同双功能亚氨酸酯、同双功能N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS)酯或同双功能巯基反应性交联剂)含有两个或更多个相同的反应性部分,并且可以用于一步反应程序中,其中将所述交联剂添加至含有待连接的多肽的混合物的溶液中。同双功能NHS酯和亚氨酸酯使含有胺的多肽交联。在温和的碱性pH下,亚氨酸酯仅与伯胺反应形成亚氨酰胺(imidoamide),并且交联的多肽的总电荷不受影响。同双功能巯基反应性交联剂包括双马来酰亚胺己烷(BMH)、1,5-二氟-2,4-二硝基苯(DFDNB)和1,4-二-(3',2'-吡啶基二硫代)丙酰胺基丁烷(DPDPB)。

[0316] 组合物和配制品

[0317] 本公开文本提供了包含主题抗体的组合物。主题抗体组合物除主题抗体之外还可以包含以下中的一种或多种:盐,例如NaCl、MgCl₂、KCl、MgSO₄等;缓冲剂,例如Tris缓冲液、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸钠盐(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、N-三[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)等;增溶剂;洗涤剂,例如非离子型洗涤剂如Tween-20等;蛋白酶抑制剂;甘油;等等。

[0318] 本公开文本的组合物还包括包含本文所述的多特异性抗体的药物组合物。一般而言,配制品包含有效量的主题抗体。“有效量”意指足以产生所需结果的剂量,所述所需结果例如受试者的癌症的减轻、受试者的癌症的生长速率的降低、癌症症状的改善等。通常,所需结果至少是与对照相比癌症症状的减轻、癌症生长的减缓、癌症大小的减小等。可以以避免血脑屏障的方式递送或配制主题抗体。在一些情况下,抗体可以包含递送增强剂,包括其中此类增强剂可以促进血脑屏障的跨越、增加的渗透性,例如从而允许高效的透皮递送等。有用的递送增强剂包括但不限于例如cereport、瑞加德松(regadenoson)、冰片、葛根素、丙二醇、油酸、氮酮、N-甲基吡咯烷酮、Tween 80、柠檬烯、基于脂质的纳米颗粒(NP)、脂质体、囊泡(niosome)、传递体、醇质体、树状大分子、胶束NP、聚合物纳米结构、金属纳米结构、磁性纳米结构、重组人透明质酸酶等。

[0319] 在主题方法中,可以使用能够产生所需的治疗效果或诊断效果的任何方便手段向宿主施用主题抗体。因此,所述药剂可以被掺入多种用于治疗性施用的配制品中。更具体地,主题抗体可以通过与适当的药学上可接受的载体或稀释剂组合而被配制成药物组合物,并且可以被配制成呈固体、半固体、液体或气体形式的制剂,如片剂、胶囊、粉末、颗粒、软膏、溶液、栓剂、注射剂、吸入剂和气雾剂。

[0320] 在药物剂型中,主题抗体可以与药学上可接受的赋形剂结合施用,或者它们还可以单独与其他药学活性化合物适当联合以及组合使用。以下方法和赋形剂仅仅是示例性的,而决不是限制性的。

[0321] 对于口服制剂,主题抗体可以单独使用或与适当的添加剂组合使用以制成片剂、粉末、颗粒或胶囊,例如与常规的添加剂,如乳糖、甘露醇、玉米淀粉或马铃薯淀粉;与粘合剂,如结晶纤维素、纤维素衍生物、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶;与崩解剂,如玉米淀粉、马铃薯淀粉或羧甲基纤维素钠;与润滑剂,如滑石粉或硬脂酸镁;以及(如果需要的话)与稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂和调味剂组合。在一些情况下,可以通过所述抗体与适当的水凝胶的络合来增强抗体的口服递送。

[0322] 可以通过以下方式将主题抗体配制成注射用制剂：将所述主题抗体溶解、悬浮或乳化在水性或非水性溶剂（如植物油或其他类似的油、合成脂肪酸甘油酯、高级脂肪酸酯或丙二醇）中；并且如果需要的话，与常规添加剂（如增溶剂、等渗剂、助悬剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂）一起配制。

[0323] 通过将具有所需纯度的抗体与任选的生理上可接受的载体、赋形剂、稳定剂、表面活性剂、缓冲剂和/或张力剂混合来制备包含主题抗体的药物组合物。可接受的载体、赋形剂和/或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对受体无毒，并且包括缓冲剂，如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸、谷胱甘肽、半胱氨酸、甲硫氨酸和柠檬酸；防腐剂（如乙醇、苯甲醇、苯酚、间甲酚、对氯间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯或丙酯、苯扎氯铵或其组合）；氨基酸，如精氨酸、甘氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、脯氨酸及其组合；单糖、二糖和其他碳水化合物；低分子量（少于约10个残基）多肽；蛋白质，如明胶或血清白蛋白；螯合剂，如EDTA；糖，如海藻糖、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、半乳糖、果糖、山梨糖、棉子糖、葡糖胺、N-甲基葡糖胺、半乳糖胺和神经氨酸；和/或非离子型表面活性剂，如Tween、Brij、Pluronic、Triton-X或聚乙二醇（PEG）。

[0324] 所述药物组合物可以呈液体形式、冻干形式或从冻干形式重构的液体形式，其中所述冻干制剂在施用之前用无菌溶液重构。用于重构冻干组合物的标准程序是添加回一定体积的纯水（通常等于冻干期间去除的体积）；然而，包含抗菌剂的溶液可以用于产生肠胃外施用的药物组合物；还参见Chen (1992) Drug Dev Ind Pharm 18, 1311-54。

[0325] 主题药物组合物中的示例性抗体浓度的范围可以是约1mg/mL至约200mg/mL、或从约50mg/mL至约200mg/mL、或从约150mg/mL至约200mg/mL。

[0326] 所述抗体的水性配制品可以在pH缓冲溶液中，例如在范围从约4.0至约7.0、或从约5.0至约6.0、或可替代地约5.5的pH下制备。适合于该范围内的pH的缓冲液的例子包括磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液和其他有机酸缓冲液。缓冲液浓度可以是约1mM至约100mM或约5mM至约50mM，这取决于例如缓冲液和配制品的所需张力。

[0327] 在所述抗体配制品中可以包含张力剂以调节所述配制品的张力。示例性的张力剂包括氯化钠，氯化钾，甘油和来自氨基酸、糖及其组合的组的任何组分。在一些实施方案中，所述水性配制品是等渗的，但高渗或低渗溶液可能是合适的。术语“等渗”表示具有与相比较的某些其他溶液（如生理盐溶液或血清）相同张力的溶液。可以以约5mM至约350mM的量，例如以100mM至350mM的量使用张力剂。

[0328] 还可以将表面活性剂添加至所述抗体配制品中以减少配制的抗体的聚集和/或最小化所述配制品中颗粒的形成和/或减少吸附。示例性的表面活性剂包括聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯（Tween）、聚氧乙烯烷基醚（Brij）、烷基苯基聚氧乙烯醚（Triton-X）、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物（泊洛沙姆、Pluronic）和十二烷基硫酸钠（SDS）。合适的聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯的例子是聚山梨醇酯20（以商标Tween 20TM出售）和聚山梨醇酯80（以商标Tween 80TM出售）。合适的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的例子是以名称Pluronic® F68或Poloxamer 188TM出售的那些。合适的聚氧乙烯烷基醚的例子是以商标BrijTM出售的那些。表面活性剂的示例性浓度的范围可以是约0.001%至约1%w/v。

[0329] 还可以添加冻干保护剂,以保护不稳定的活性成分(例如蛋白质)在冻干过程期间免受去稳定条件的影响。例如,已知的冻干保护剂包括糖(包括葡萄糖和蔗糖);多元醇(包括甘露醇、山梨醇和甘油);和氨基酸(包括丙氨酸、甘氨酸和谷氨酸)。冻干保护剂可以以约10mM至500mM的量被包含。

[0330] 在一些实施方案中,主题配制品包含主题抗体和一种或多种以上鉴定的药剂(例如,表面活性剂、缓冲剂、稳定剂、张力剂),并且基本上不含一种或多种防腐剂,如乙醇、苯甲醇、苯酚、间甲酚、对氯间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯或丙酯、苯扎氯铵及其组合。在其他实施方案中,在所述配制品中包含防腐剂,例如浓度范围为约0.001%至约2% (w/v)。

[0331] 例如,主题配制品可以是适合于肠胃外施用的液体或冻干配制品,并且可以包含:约1mg/mL至约200mg/mL的主题抗体;约0.001%至约1%的至少一种表面活性剂;约1mM至约100mM的缓冲剂;任选的约10mM至约500mM的稳定剂;和约5mM至约305mM的张力剂;并且具有约4.0至约7.0的pH。

[0332] 作为另一个例子,主题肠胃外配制品是液体或冻干配制品,其包含:约1mg/mL至约200mg/mL的主题抗体;0.04% Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;并且具有5.5的pH。

[0333] 作为另一个例子,主题肠胃外配制品包括冻干配制品,其包含:1) 15mg/mL主题抗体;0.04% Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;并且具有5.5的pH;或2) 75mg/mL主题抗体;0.04% Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;并且具有5.5的pH;或3) 75mg/mL主题抗体;0.02% Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;并且具有5.5的pH;或4) 75mg/mL主题抗体;0.04% Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;并且具有5.5的pH;或6) 75mg/mL主题抗体;0.02% Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;并且具有5.5的pH。

[0334] 作为另一个例子,主题肠胃外配制品是液体配制品,其包含:1) 7.5mg/mL主题抗体;0.022% Tween 20w/v;120mM L-组氨酸;和250 125mM蔗糖;并且具有5.5的pH;或2) 37.5mg/mL主题抗体;0.02% Tween 20w/v;10mM L-组氨酸;和125mM蔗糖;并且具有5.5的pH;或3) 37.5mg/mL主题抗体;0.01% Tween 20w/v;10mM L-组氨酸;和125mM蔗糖;并且具有5.5的pH;或4) 37.5mg/mL主题抗体;0.02% Tween 20w/v;10mM L-组氨酸;125mM海藻糖;并且具有5.5的pH;或5) 37.5mg/mL主题抗体;0.01% Tween 20w/v;10mM L-组氨酸;和125mM海藻糖;并且具有5.5的pH;或6) 5mg/mL主题抗体;0.02% Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;并且具有5.5的pH;或7) 75mg/mL主题抗体;0.02% Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM甘露醇;并且具有5.5的pH;或8) 75mg/mL主题抗体;0.02% Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和140mM氯化钠;并且具有5.5的pH;或9) 150mg/mL主题抗体;0.02% Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;并且具有5.5的pH;或10) 150mg/mL主题抗体;0.02% Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM甘露醇;并且具有5.5的pH;或11) 150mg/mL主题抗体;0.02% Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和140mM氯化钠;并且具有5.5的pH;或12) 10mg/mL主题抗体;0.01% Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和40mM氯化钠;并且具有5.5的pH。

[0335] 主题抗体可以用于待经由吸入施用的气雾剂配制品中。可以将主题抗体配制在加压的可接受的推进剂(如二氯二氟甲烷、丙烷、氮等)中。

[0336] 此外,通过与多种碱(如乳化碱或水溶性碱)混合可以将主题抗体制成栓剂。可以

经由栓剂直肠施用主题抗体。所述栓剂可以包含媒介物(如可可脂、碳蜡和聚乙二醇),其在体温下融化而在室温下固化。

[0337] 可以提供用于口服或直肠施用的单位剂型(如糖浆、酏剂和悬浮液),其中每个剂量单位(例如一茶匙、一汤匙、片剂或栓剂)含有预定量的含有一种或多种抑制剂的组合物。类似地,用于注射或静脉内施用的单位剂型可以包含作为无菌水、生理盐水或另一种药学上可接受的载体中的溶液形式的组合物中的主题抗体。

[0338] 如本文所用,术语“单位剂型”是指适合作为人和动物受试者的单位剂量的物理上离散的单位,每个单位含有经计算足以产生所需效果的量的预定量的本发明的化合物以及药学上可接受的稀释剂、载体或媒介物。主题抗体的规格可以取决于所采用的特定抗体和待实现的效果以及在宿主中与每种抗体相关的药效动力学。

[0339] 其他施用方式也将可用于本发明。例如,可以将主题抗体配制成栓剂,并且在一些情况下配制成气雾剂和鼻内组合物。对于栓剂,媒介物组合物将包含传统的粘合剂和载体,如聚亚烷基二醇或甘油三酯。此类栓剂可以由含有在约0.5%至约10% (w/w) (例如,约1%至约2%)的范围内的活性成分的混合物形成。

[0340] 鼻内配制品通常将包含既不会刺激鼻粘膜也不会明显干扰纤毛功能的媒介物。稀释剂(如水、盐水溶液或其他已知物质)可以用于本发明。经鼻配制品还可以含有防腐剂,如但不限于氯丁醇和苯扎氯铵。可以存在表面活性剂以增强鼻粘膜对主题蛋白质的吸收。

[0341] 主题抗体可以作为可注射配制品来施用。通常,可注射组合物被制备为液体溶液或悬浮液;还可以制备适合于在注射前溶解或悬浮于液体媒介物中的固体形式。也可以乳化所述制剂或将所述抗体封装在脂质体媒介物中。

[0342] 合适的赋形剂媒介物是例如水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。另外(如果需要的话),所述媒介物可以含有少量的辅助物质,如润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。制备此类剂型的实际方法是本领域技术人员已知的或应是本领域技术人员清楚的。参见例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 第17版, 1985。待施用的组合物或配制品将(无论如何)含有一定量的足以在所治疗的受试者中实现所需状况的主题抗体。

[0343] 所述药学上可接受的赋形剂(如媒介物、佐剂、载体或稀释剂)对公众而言易于得到。此外,药学上可接受的辅助物质(如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、稳定剂、润湿剂等)对公众而言易于得到。

[0344] 在一些实施方案中,将主题抗体配制成控制释放配制品。可以使用本领域熟知的方法制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有所述抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,其中所述基质呈成型制品(例如薄膜或微胶囊)的形式。持续释放基质的例子包括聚酯、L-谷氨酸和L-谷氨酸乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、水凝胶、聚乳酸、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。通过使用适当的添加剂、通过控制水分含量以及通过开发特定的聚合物基质组合物可以防止持续释放制剂中包含的抗体的生物活性的可能损失和免疫原性的可能变化。

[0345] 在本发明的范围内的控制释放可以被理解为意指多种延长释放剂型中的任何一种。出于本发明的目的,以下术语可以被认为基本上等同于控制释放:连续释放、控制释放、延迟释放、储库(depot)、逐步释放、长期释放、程序化释放、延长释放、成比例释放、拖延释

放、贮库(repository)、延迟、缓慢释放、间隔释放、持续释放、定时包衣(time coat)、定时释放、延迟作用、延长作用、分层时间作用、长效、延长作用、重复作用、缓效、持续作用、持续作用药物和延长释放。这些术语的进一步讨论可以在Lesczek Krowczynski, Extended-Release Dosage Forms, 1987 (CRC Press, Inc.)中找到。

[0346] 剂量

[0347] 合适的剂量可以由主治医师或其他有资格的医务人员根据各种临床因素来确定。如在医学领域中熟知的,对于任何一名患者的剂量取决于许多因素,包括患者的体型、体表面积、年龄、待施用的特定化合物、患者的性别、施用时间和途径、一般健康状况和正在同时施用的其他药物。主题抗体可以在每剂1ng/kg体重与20mg/kg体重之间(例如在0.1mg/kg体重至10mg/kg体重之间,例如在0.5mg/kg体重至5mg/kg体重之间)的量施用;然而,设想了低于或高于该示例性范围的剂量,尤其在考虑到上述因素的情况下。如果方案是连续输注,则也可以在每公斤体重每分钟1 μ g至10mg的范围内。

[0348] 技术人员应容易理解,剂量水平可以根据特定抗体、症状的严重性和受试者对副作用的易感性而变化。给定化合物的优选剂量可由本领域技术人员通过多种方式容易地确定。

[0349] 施用途径

[0350] 使用适合于药物递送的任何可用方法和途径(包括体内和离体方法以及全身和局部施用途径)向个体施用主题抗体。

[0351] 常规且药学上可接受的施用途径包括鼻内、肌内、气管内、皮下、皮内、外用施用、静脉内、动脉内、直肠、经鼻、口服和其他肠内和肠胃外施用途径。如果需要的话,施用途径可以进行组合,或者根据抗体和/或所需的效果进行调整。可以将主题抗体组合物以单剂量或以多剂量来施用。在一些实施方案中,口服施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,经由吸入途径施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,鼻内施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,局部施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,颅内施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,静脉内施用主题抗体组合物。

[0352] 可以使用适合于递送常规药物的任何可用的常规方法和途径(包括全身或局部途径)向宿主施用所述药剂。一般而言,本发明考虑的施用途径包括但不必限于肠内、肠胃外或吸入途径。

[0353] 除吸入施用以外的肠胃外施用途径包括但不必限于外用、透皮、皮下、肌内、眶内、囊内、脊柱内、胸骨内和静脉内途径,即除通过消化道以外的任何施用途径。可以进行肠胃外施用以实现主题抗体的全身或局部递送。在需要全身递送的情况下,施用通常涉及药物制剂的侵入性的或全身性吸收的外用或粘膜施用。

[0354] 还可以通过肠内施用将主题抗体递送至受试者。肠内施用途径包括但不必限于口服和直肠(例如,使用栓剂)递送。

[0355] 治疗意指至少改善与困扰宿主的病理学病症相关的症状,其中在广义上使用的改善是指至少减少与所治疗的病理学病症(如癌症和/或癌症的生长和与其相关的疼痛)相关的参数(例如症状)的量值。因此,治疗还包括以下情形,其中病理学病症或至少与其相关的症状被完全抑制,例如防止发生,或停止,例如终止,使得宿主不再患有所述病理学病症或至少表征所述病理学病症的症状。

[0356] 可根据主题方法对多种宿主(其中术语“宿主”在本文中与术语“受试者”、“个体”和“患者”可互换地使用)进行治疗。通常,此类宿主是“哺乳动物”(“mammal”或“mammalian”),其中这些术语被广泛用于描述哺乳纲中的生物,包括食肉目(例如,狗和猫)、啮齿目(例如,小鼠、豚鼠和大鼠)和灵长目(例如,人、黑猩猩和猴子)。在一些实施方案中,所述宿主将是人。

[0357] 提供了具有单位剂量的主题抗体(例如以口服或可注射剂量的形式)的试剂盒。在一些实施方案中,除所述单位剂量之外,所述容器还含有描述所述抗体在治疗目标病理学病症中的用途和伴随的益处信息性包装插页。

[0358] 核酸

[0359] 本公开文本提供了包含编码主题抗体的核苷酸序列的核酸。编码主题抗体的核苷酸序列可以与一种或多种调节元件(如启动子和增强子)可操作地连接,所述一种或多种调节元件允许所述核苷酸序列在预期的靶细胞(例如,经基因修饰以合成和/或分泌所编码的抗体的细胞)中表达。

[0360] 合适的启动子和增强子元件是本领域已知的。对于在细菌细胞中的表达,合适的启动子包括但不限于lacI、lacZ、T3、T7、gpt、 λ P和trc。对于在真核细胞中的表达,合适的启动子包括但不限于轻链和/或重链免疫球蛋白基因启动子和增强子元件;巨细胞病毒立即早期启动子;单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子;早期和晚期SV40启动子;存在于来自逆转录病毒的长末端重复序列中的启动子;小鼠金属硫蛋白-I启动子;以及各种本领域已知的组织特异性启动子。

[0361] 编码主题抗体的核苷酸序列可以存在于表达载体和/或克隆载体中。在主题抗体包含两种或更多种单独的多肽的情况下,编码这两种多肽的核苷酸序列可以在相同或单独的载体中克隆。可以使用各种策略从单个核酸或单一载体表达单独的多肽,所述各种策略如单独的启动子、一个或多个内部核糖体进入位点(IRES)、一个或多个自切割序列(例如2A切割序列,例如P2A、T2A、E2A和F2A)、其组合等。表达载体可以包含可选择的标记物、复制起点以及提供所述载体的复制和/或维持的其他特征。

[0362] 本领域技术人员已知大量合适的载体和启动子;许多可商购用于产生主题重组构建体。通过举例的方式提供了以下载体。细菌的:pBs、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBs KS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a(Stratagene,美国加利福尼亚州拉荷亚);pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540和pRIT5(Pharmacia,瑞典乌普萨拉)。真核的:pWLneo、pSV2cat、pOG44、PXR1、pSG(Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL(Pharmacia)。

[0363] 表达载体通常具有位于启动子序列附近的方便的限制位点,以提供编码异源蛋白质的核酸序列的插入。可以存在在表达宿主中有效的可选择的标记物。合适的表达载体包括但不限于病毒载体(例如基于以下病毒的病毒载体:痘苗病毒;脊髓灰质炎病毒;腺病毒(参见例如,Li等人,Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543-2549,1994;Borras等人,Gene Ther 6:515-524,1999;Li和Davidson,PNAS 92:7700-7704,1995;Sakamoto等人,H Gene Ther 5:1088-1097,1999;WO 94/12649;WO 93/03769;WO 93/19191;WO 94/28938;WO 95/11984和WO 95/00655);腺相关病毒(参见例如,Alì等人,Hum Gene Ther 9:81-86,1998;Flannery等人,PNAS 94:6916-6921,1997;Bennett等人,Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857-2863,1997;Jomary等人,Gene Ther 4:683-690,1997;Rolling等人,Hum Gene Ther

10:641 648,1999;Ali等人,Hum Mol Genet 5:591 594,1996;Srivastava,WO 93/09239;Samulski等人,J.Vir. (1989) 63:3822-3828;Mendelson等人,Viol. (1988) 166:154-165;和Flotte等人,PNAS (1993) 90:10613-10617);SV40;单纯疱疹病毒;人免疫缺陷病毒(参见例如,Miyoshi等人,PNAS 94:10319 23,1997;Takahashi等人,J Virol 73:7812 7816,1999));逆转录病毒载体(例如,鼠白血病病毒、脾坏死病毒以及源自逆转录病毒如劳斯肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒(Harvey Sarcoma Virus)、禽白血病病毒、人免疫缺陷病毒、骨髓增殖性肉瘤病毒和乳瘤病毒的载体);等等。

[0364] 如上所述,主题核酸包含编码主题多特异性抗体的核苷酸序列。主题核酸可以包含编码重链和轻链CDR(包括MDR1 CDR和CD47 CDR)的核苷酸序列。在一些实施方案中,主题核酸包含编码重链和/或轻链MDR1 CDR的核苷酸序列,其中所述CDR编码序列散布有FR编码核苷酸序列。在一些实施方案中,主题核酸包含编码重链和/或轻链CD47 CDR的核苷酸序列,其中所述CDR编码序列散布有FR编码核苷酸序列。在一些实施方案中,所述FR编码核苷酸序列是人FR编码核苷酸序列。

[0365] 在一些实施方案中,主题核酸包含编码氨基酸序列的核苷酸序列,其中所述氨基酸序列与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%序列同一性:

[0366] EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTIYPDSVKGRFTVSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDTALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS。

[0367] 在一些实施方案中,主题核酸包含编码氨基酸序列的核苷酸序列,其中所述氨基酸序列与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%序列同一性:

[0368] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRV TITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS。

[0369] 在一些实施方案中,主题核酸包含编码氨基酸序列的核苷酸序列,其中所述氨基酸序列与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%序列同一性:

[0370] DVLMTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK。

[0371] 在一些情况下,可以例如通过使细胞与核酸接触而将所述核酸(例如,如本文所述)引入所述细胞中。引入了核酸的细胞在本文中通常称为经基因修饰的细胞。可以采用各种核酸递送方法,包括但不限于例如裸核酸递送、病毒递送、化学转染、基因枪法等。

[0372] 细胞

[0373] 本公开文本提供了用主题核酸进行基因修饰的分离的经基因修饰的细胞(例如,体外细胞、离体细胞、经培养的细胞等)。在一些实施方案中,主题分离的经基因修饰的细胞可以产生主题抗体。在一些情况下,经基因修饰的细胞可以将抗体例如递送至有需要的受试者。在一些情况下,经基因修饰的细胞可以用于多特异性抗体的产生、筛选和/或发现。在一些情况下,经基因修饰的细胞还可以包括如下细胞,在所述细胞中内源性基因表达已被降低(例如,抑制、敲低等)或消除(例如,敲除)。在一些情况下,经基因修饰的细胞还可以包括如下细胞,在所述细胞中基因的表达已增强,例如内源性基因的表达增加或异源性基因

的表达增加。

[0374] 合适的细胞包括真核细胞,如哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞;以及原核细胞,如细菌细胞。可以例如通过磷酸钙沉淀、DEAE葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转染、电穿孔或其他已知方法来实现将主题核酸引入所述宿主细胞中。

[0375] 合适的哺乳动物细胞包括原代细胞和永生化细胞系。合适的哺乳动物细胞系包括人细胞系、非人灵长类动物细胞系、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠)细胞系等。合适的哺乳动物细胞系包括但不限于HeLa细胞(例如,美国典型培养物保藏中心(ATCC)编号CCL-2)、CHO细胞(例如,ATCC编号CRL9618、CCL61、CRL9096)、293细胞(例如,ATCC编号CRL-1573)、Vero细胞、NIH 3T3细胞(例如,ATCC编号CRL-1658)、Huh-7细胞、BHK细胞(例如,ATCC编号CCL10)、PC12细胞(ATCC编号CRL1721)、COS细胞、COS-7细胞(ATCC编号CRL1651)、RAT1细胞、小鼠L细胞(ATCC编号CCL1.3)、人胚肾(HEK)细胞(ATCC编号CRL1573)、HLHepG2细胞等。

[0376] 在一些情况下,有用的哺乳动物细胞可以包括源自哺乳动物组织或器官的细胞。在一些情况下,所采用的细胞是肾细胞,包括例如已建立的肾细胞系的肾细胞,如HEK 293T细胞。

[0377] 合适的酵母细胞或真菌或藻类细胞包括但不限于巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、芬兰毕赤酵母(*Pichia finlandica*)、喜海藻糖毕赤酵母(*Pichia trehalophila*)、科克拉迈毕赤酵母(*Pichia koclamae*)、膜醭毕赤酵母(*Pichia membranaefaciens*)、仙人掌毕赤酵母(*Pichia opuntiae*)、耐热毕赤酵母(*Pichia thermotolerans*)、柳毕赤酵母(*Pichia salictaria*)、盖尔库姆毕赤酵母(*Pichia guercuum*)、皮杰佩里毕赤酵母(*Pichia pijperi*)、树干毕赤酵母(*Pichia stiptis*)、甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)、毕赤酵母属物种(*Pichia sp.*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、酵母属物种(*Saccharomyces sp.*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、克鲁维酵母属物种(*Kluyveromyces sp.*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、白假丝酵母(*Candida albicans*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、卢克诺文思金孢子菌(*Chrysosporium lucknowense*)、镰刀菌属物种(*Fusarium sp.*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium gramineum*)、镶片镰刀菌(*Fusarium venenatum*)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)等。

[0378] 合适的原核细胞包括但不限于大肠杆菌(*Escherichia coli*)、乳杆菌属物种(*Lactobacillus sp.*)、沙门氏菌属物种(*Salmonella sp.*)、志贺氏菌属物种(*Shigella sp.*)等的各种实验室菌株中的任何一种。参见例如Carrier等人(1992) *J. Immunol.* 148: 1176-1181;美国专利号6,447,784;以及Sizemore等人(1995) *Science* 270:299-302。可用于本发明的沙门氏菌属菌株的例子包括但不限于伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)和鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)。合适的志贺氏菌属菌株包括但不限于福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、宋内志贺氏菌(*Shigella sonnei*)和痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)。通常,所述实验室菌株是非致病性的菌株。其他合适的细菌的非限制性例子包括但不限于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、迈氏假单胞菌(*Pseudomonas mevalonii*)、类球

红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*)、荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*)、深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*)、红球菌属物种 (*Rhodococcus* sp.) 等。在一些实施方案中,所述宿主细胞是大肠杆菌。

[0379] 在一些情况下,本公开文本的细胞可以是免疫细胞。如本文所用,术语“免疫细胞”通常包括源自骨髓中产生的造血干细胞 (HSC) 的白血细胞 (白细胞)。“免疫细胞”包括例如淋巴细胞 (T细胞、B细胞、自然杀伤 (NK) 细胞) 和髓源性细胞 (嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞)。“T细胞”包括表达CD3的所有类型的免疫细胞,包括辅助性T细胞 (CD4+细胞)、细胞毒性T细胞 (CD8+细胞)、调节性T细胞 (Treg) 和 γ - δ T 细胞。“细胞毒性细胞”包括CD8+T细胞、自然杀伤 (NK) 细胞和嗜中性粒细胞,所述细胞能够介导细胞毒性反应。

[0380] 在一些情况下,表达本公开文本的多特异性抗体的有用细胞可以包括生产T细胞。生产T细胞的非限制性例子包括在Tsai&Davila *Oncoimmunology*. (2016) 5 (5) :e1122158中描述的那些;将其公开内容通过引用以其整体并入本文。在一些情况下,可以采用经工程化以包含编码本公开文本的多特异性抗体的核酸序列的生产T细胞将所述抗体递送至有需要的受试者。

[0381] 本公开文本的细胞还包括经基因修饰以改变和/或修正细胞中MDR1和CD47中的一种或多种的表达的细胞。此类经修饰的细胞可用于各种目的,包括测定多特异性抗体 (包括但不限于根据本文提供的描述和方法产生的那些) 的结合。在一些情况下,可以在主题细胞系中敲除或敲低MDR1。在一些情况下,可以在主题细胞系中敲除或敲低CD47。在一些情况下,可以在主题细胞系中组成性或诱导性地过表达MDR1。在一些情况下,可以在主题细胞系中组成性或诱导性地过表达CD47。在一些情况下,可以在主题细胞系中敲低、敲除或者组成性或诱导性地过表达MDR1和CD47二者。可以采用任何方便且适当的敲低、敲除和/或过表达的方法。引入的核酸可以稳定地整合或暂时存在。

[0382] 在一些实施方案中,本公开文本的细胞包括经基因修饰的人细胞系,其表达CD47并且包含外源性核酸,所述外源性核酸包含用于过表达MDR1的编码MDR1的序列。在此类细胞中,CD47表达可以是内源性的或外源性来源的 (即,引入的),并且MDR1表达可以是稳定的或短暂的。在一些情况下,表达CD47的本公开文本的细胞系可以被配置为产生表达CD47并稳定地过表达MDR1的经基因修饰的人细胞。

[0383] 可以培养本公开文本的细胞和细胞系,包括例如通过使用本文所述的培养方法进行培养。在一些情况下,可以培养已将核酸引入其中以对所述细胞进行基因修饰的细胞以产生细胞系。有用的细胞系可以包括但不限于例如表达CD47并稳定地过表达MDR1的经基因修饰的细胞系,包括人细胞系。

[0384] 本公开文本的细胞及其细胞系可以用于本公开文本的各种方法中,例如作为测试样品、对照等。例如,在一些情况下,其中MDR1和/或CD47已被敲除和/或敲低的细胞可以用作参考细胞,例如,可以比较本公开文本的多特异性抗体与其的结合。其他有用的参考细胞包括但不限于例如非癌性细胞以及正常细胞和表达正常水平的各种蛋白质 (包括正常水平的MDR1和/或CD47) 的细胞。

[0385] 方法

[0386] 如上所总结,本公开文本的方法包括使细胞与本公开文本的抗体接触的方法、根

据涉及向受试者施用本公开文本的抗体的方法治疗所述受试者的方法、制备本申请中描述的元件(包括例如多特异性抗体、组合物和配制品、核酸、表达载体、细胞等)的方法。

[0387] 如上所总结,本公开文本的方法包括使癌细胞与本公开文本的多特异性抗体接触,例如以促进和/或增强对癌细胞的杀伤。在一些情况下,对癌细胞的杀伤是通过由于当两种靶标在癌细胞上共表达时通过双特异性靶向对癌细胞的调理作用导致的对癌细胞的免疫应答或免疫细胞作用来介导的。在一些情况下,对癌细胞的杀伤是通过例如由于所述多特异性抗体掩蔽或拮抗存在于癌细胞表面上的CD47表位导致的对癌细胞的免疫应答或免疫细胞作用来介导的。在一些情况下,对癌细胞的杀伤是通过例如由于所述多特异性抗体对癌细胞的MDR1拮抗作用导致的对癌细胞的细胞外排的抑制来介导的。在一些情况下,与所述多特异性抗体接触的细胞可以是多药耐药性癌细胞。涉及使癌细胞与本公开文本的多特异性抗体接触的方法可以包括或不包括使癌细胞与另外的疗法或活性剂(包括例如化学治疗剂、免疫疗法、放射疗法等)接触。

[0388] 例如与在不存在所述多特异性抗体的情况下对癌细胞的杀伤水平相比,使癌细胞与本公开文本的多特异性抗体接触将通常增强对癌细胞的杀伤。在一些情况下,在采用另外的活性剂的情况下,可以观察到与仅使用所述另外的活性剂观察到的杀伤水平相比增强的对癌细胞的杀伤。可归因于所述多特异性抗体的癌细胞杀伤的增强的量将变化,并且范围可以是癌细胞杀伤增加至少5%至增加至少90%或更多,包括但不限于例如至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%等。此类增加可以和仅与一种或多种另外的活性剂接触进行比较。

[0389] 可以通过多种手段来评估增强的对癌细胞的杀伤,所述多种手段包括但不限于例如观察性研究、基于细胞的体外细胞毒性测定、流式细胞术、细胞活力标记(例如,使用一种或多种细胞活力染色剂)等。

[0390] 治疗方法

[0391] 本公开文本提供了治疗癌症的方法,所述方法通常涉及向有需要的个体(例如,患有癌症的个体)单独(例如,在单一疗法中)或与一种或多种另外的治疗剂组合(例如,在组合疗法中)施用有效量的主题多特异性抗体。本公开文本的多特异性抗体的施用可以通过任何方便且适当的递送途径进行。

[0392] 本公开文本的方面包括根据本说明书的前述章节的双特异性抗体分子,所述双特异性抗体分子用于治疗受试者的癌症的方法中,所述方法包括向所述受试者施用所述抗体。所述方法包括将所述抗体与至少一种另外的活性剂组合施用,其中所述至少一种另外的活性剂包括化学治疗剂、多药耐药转运蛋白的抑制剂、免疫治疗剂或其组合。在某些方面,所述至少一种另外的活性剂是化学治疗剂,任选地其中所述化学治疗剂是泰素紫杉醇、长春花生物碱或蒽环类。作为MDR1泵的底物的一些化学治疗剂包括紫杉醇、秋水仙碱、维拉帕米、长春碱、拓扑替康、阿霉素、柔红霉素、依托泊苷和尼洛替尼。

[0393] 本文还公开了用于治疗受试者的癌症的方法中的化学治疗剂,所述方法包括将所述化学治疗剂与本文所述的抗体组合施用至所述受试者,任选地其中所述化学治疗剂是泰素紫杉醇、长春花生物碱或蒽环类。

[0394] 因此,施用包括但不限于例如通过注射递送所述抗体、通过输注递送所述抗体、递送编码所述多特异性抗体的核酸或表达载体、通过向所述受试者施用表达和分泌所述多特

异性抗体的细胞来递送所述抗体等。药剂、编码药剂的核酸、表达药剂的细胞等的施用可以包括与所述药剂接触、与所述核酸接触、与所述细胞接触等。

[0395] 在一些实施方案中,主题多特异性抗体的有效量是如下量,与在未用所述抗体的治疗的情况下不利症状的严重性相比,所述量当以一个或多个剂量单独(例如,在单一疗法中)或与一种或多种另外的治疗剂组合(例如,在组合疗法中)施用时将癌症的不利症状有效减轻至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或更多。

[0396] 在一些实施方案中,主题多特异性抗体的有效量是如下量,所述量当以一个或多个剂量单独(例如,在单一疗法中)或与一种或多种另外的治疗剂组合(例如,在组合疗法中)施用时有效改善所治疗的个体的癌症,即减缓癌症的生长、停止癌症的生长、逆转癌症的生长、杀伤癌细胞(包括肿瘤细胞等)。例如,与未用所述多特异性抗体的治疗相比,主题抗体的有效量可以降低个体的癌症生长速率或将癌症大小减小至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%或更多。

[0397] 在一些情况下,受试者可以进行全身治疗,包括在用或未用一种或多种另外的试剂的情况下用主题多特异性抗体。如本文所用,“全身治疗”意指并非仅针对靶标特定肿瘤(例如像原发性肿瘤或定义的继发性肿瘤)或含有特定癌症的组织(例如像,在肝癌的情况下的肝脏、在血液癌症的情况下的血液等)的治疗。全身治疗将通常针对受试者的整个身体,并且可以包括但不限于例如全身放射疗法、全身化学疗法、全身免疫疗法、其组合等。

[0398] 在一些情况下,受试者可以进行局部治疗,包括在用或未用一种或多种另外的试剂的情况下用主题多特异性抗体。如本文所用,“局部治疗”是指明确针对肿瘤(例如像原发性肿瘤或定义的继发性肿瘤)的位置或明确针对含有癌症的组织(例如像,在肝癌的情况下的肝脏、在血液癌症的情况下的血液等)的治疗。在一些情况下,局部治疗也可以以影响肿瘤周围环境(如肿瘤周围的组织,如紧邻肿瘤的组织)的方式来施用。局部治疗将通常不影响或不靶向远离癌症部位(包括肿瘤部位,如原发性肿瘤)的组织。除主题多特异性抗体之外或与主题多特异性抗体组合施用的有用的局部治疗例如包括但不限于手术、局部放射疗法、局部冷冻疗法、局部激光疗法、局部外用疗法、其组合等。

[0399] 在一些实施方案中,主题治疗方法涉及施用主题多特异性抗体和一种或多种另外的治疗剂。合适的另外的治疗剂包括但不限于化学治疗剂、放射疗法试剂、免疫疗法试剂、其他抗体或多特异性抗体药剂等。可在主题施用本公开文本的多特异性抗体之前、期间或之后施用至受试者的另外的疗法将根据多种因素而变化,所述多种因素包括例如癌症的类型、受试者的病史、一般健康状况和/或任何共病等。有用的癌症疗法包括但不限于例如放射疗法、化学疗法、免疫疗法等。

[0400] 放射疗法包括但不限于从外部施加的源(如束)或通过植入小放射源递送的x射线或 γ 射线。

[0401] 用于癌症治疗的合适抗体包括但不限于裸抗体,例如曲妥珠单抗(Herceptin)、贝伐单抗(AvastinTM)、西妥昔单抗(ErbixTM)、帕尼单抗(VectibixTM)、伊匹单抗(YervoyTM)、利妥昔单抗(Rituxan)、阿仑单抗(LemtradaTM)、奥法木单抗(ArzerraTM)、奥戈伏单抗(OvaRexTM)、兰洛利珠单抗(Lambrolizumab)(MK-3475)、帕妥珠单抗(PerjetaTM)、兰尼单抗(LucentisTM)等;以及缀合的抗体,例如吉妥珠单抗奥佐米星(gemtuzumab ozogamicin)

(MylortargTM)、维布妥昔单抗 (Brentuximab vedotin) (AdcetrisTM)、90Y标记的替伊莫单抗 (ZevalinTM)、¹³¹I标记的托西莫单抗 (BexxarTM) 等。用于癌症治疗的合适抗体还包括但不限于针对肿瘤相关抗原产生的抗体。此类抗原包括但不限于CD20、CD30、CD33、CD52、EpCAM、CEA、gpA33、粘蛋白、TAG-72、CAIX、PSMA、叶酸结合蛋白、神经节苷脂 (例如, GD2、GD3、GM2等)、Le y、VEGF、VEGFR、整合素 α V β 3、整合素 α 5 β 1、EGFR、ERBB2、ERBB3、MET、IGF1R、EPHA3、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP、腱生蛋白等。

[0402] 常规癌症疗法还包括针对癌症的靶向疗法, 包括但不限于例如靶向HER2 (ERBB2/neu) 的阿多曲妥珠单抗-美坦新 (Ado-trastuzumab emtansine) (Kadcyla) (被批准用于乳腺癌); 靶向EGFR (HER1/ERBB1)、HER2 (ERBB2/neu) 的阿法替尼 (Gilotrif) (被批准用于非小细胞肺癌); 靶向的阿地白介素 (Proleukin) (被批准用于肾细胞癌、黑色素瘤); 靶向ALK的阿来替尼 (Alecensa) (被批准用于非小细胞肺癌); 靶向CD52的阿仑单抗 (Campath) (被批准用于B细胞慢性淋巴细胞白血病); 靶向PD-L1的阿特珠单抗 (Tecentriq) (被批准用于尿路上皮癌、非小细胞肺癌); 靶向PD-L1的阿维鲁单抗 (Avelumab) (Bavencio) (被批准用于梅克尔细胞癌); 靶向KIT、PDGFR β 、VEGFR1/2/3的阿昔替尼 (Inlyta) (被批准用于肾细胞癌); 靶向BAFF的贝利单抗 (Benlysta) (被批准用于红斑狼疮); 靶向HDAC的贝利司他 (Beleodaq) (被批准用于外周T细胞淋巴瘤); 靶向VEGF配体的贝伐单抗 (Avastin) (被批准用于宫颈癌、结直肠癌、输卵管癌、胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、腹膜癌、肾细胞癌); 靶向CD19/CD3的博纳吐单抗 (Blincyto) (被批准用于急性成淋巴细胞性白血病 (前体B细胞)); 靶向蛋白酶体的硼替佐米 (Velcade) (被批准用于多发性骨髓瘤、套细胞淋巴瘤); 靶向ABL的博舒替尼 (Bosulif) (被批准用于慢性髓细胞性白血病); 靶向CD30的维布妥昔单抗 (Adcetris) (被批准用于霍奇金淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤); 靶向ALK的布加替尼 (Alunbrig) (被批准用于非小细胞肺癌 (ALK+)); 靶向FLT3、KIT、MET、RET、VEGFR2的卡博替尼 (Cabometyx、Cometriq) (被批准用于甲状腺髓样癌、肾细胞癌); 靶向蛋白酶体的卡非佐米 (Kyprolis) (被批准用于多发性骨髓瘤); 靶向ALK的色瑞替尼 (Zykadia) (被批准用于非小细胞肺癌); 靶向EGFR (HER1/ERBB1) 的西妥昔单抗 (Erbix) (被批准用于结直肠癌、头颈部鳞状细胞癌); 靶向MEK的考比替尼 (Cotellic) (被批准用于黑色素瘤); 靶向ALK、MET、ROS1的克唑替尼 (Xalkori) (被批准用于非小细胞肺癌); 靶向BRAF的达拉菲尼 (Tafinlar) (被批准用于黑色素瘤、非小细胞肺癌); 靶向CD38的达雷木单抗 (Darzalex) (被批准用于多发性骨髓瘤); 靶向ABL的达沙替尼 (Sprycel) (被批准用于慢性髓细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病); 靶向RANKL的地诺单抗 (Xgeva) (被批准用于骨巨细胞瘤); 靶向B4GALNT1 (GD2) 的地努图希单抗 (Dinutuximab) (Unituxin) (被批准用于小儿神经母细胞瘤); 靶向PD-L1的德瓦鲁单抗 (Durvalumab) (Imfinzi) (被批准用于尿路上皮癌); 靶向SLAMF7 (CS1/CD319/CRACC) 的艾洛珠单抗 (Empliciti) (被批准用于多发性骨髓瘤); 靶向IDH2的恩西地平 (Enasidenib) (Idhifa) (被批准用于急性髓性白血病); 靶向EGFR (HER1/ERBB1) 的埃罗替尼 (Tarceva) (被批准用于非小细胞肺癌、胰腺癌); 靶向mTOR的依维莫司 (Afinitor) (被批准用于胰腺、胃肠道或肺源性神经内分泌肿瘤、肾细胞癌、不可切除的室管膜下巨细胞星形细胞瘤、乳腺癌); 靶向EGFR (HER1/ERBB1) 的吉非替尼 (Iressa) (被批准用于非小细胞肺癌); 靶向CD20的替伊莫单抗 (Zevalin) (被批准用于非霍奇金淋巴瘤); 靶向BTK的依鲁替尼 (Imbruvica) (被批准用于套细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、华氏巨球蛋白血症); 靶向PI3K δ 的艾代拉里斯

(Zydelig) (被批准用于慢性淋巴细胞白血病、滤泡性B细胞非霍奇金淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤) ; 靶向KIT、PDGFR、ABL的伊马替尼 (Gleevec) (被批准用于胃肠道间质瘤 (KIT+)、隆突性皮肤纤维肉瘤、多发性血液系统恶性肿瘤) ; 靶向CTLA-4的伊匹单抗 (Yervoy) (被批准用于黑色素瘤) ; 靶向蛋白酶体的伊沙佐米 (Ninlaro) (被批准用于多发性骨髓瘤) ; 靶向HER2 (ERBB2/neu)、EGFR (HER1/ERBB1) 的拉帕替尼 (Tykerb) (被批准用于乳腺癌 (HER2+)) ; 靶向VEGFR2的乐伐替尼 (Lenvima) (被批准用于肾细胞癌、甲状腺癌) ; 靶向FLT3的米哚妥林 (Rydapt) (被批准用于急性髓性白血病 (FLT3+)) ; 靶向EGFR (HER1/ERBB1) 的耐昔妥珠单抗 (Portrazza) (被批准用于鳞状非小细胞肺癌) ; 靶向HER2 (ERBB2/neu) 的来那替尼 (Nerlynx) (被批准用于乳腺癌) ; 靶向ABL的尼洛替尼 (Tasigna) (被批准用于慢性髓细胞性白血病) ; 靶向PARP的尼拉帕尼 (Zejula) (被批准用于卵巢癌、输卵管癌、腹膜癌) ; 靶向PD-1的纳武单抗 (Opdivo) (被批准用于结直肠癌、头颈部鳞状细胞癌、霍奇金淋巴瘤、黑色素瘤、非小细胞肺癌、肾细胞癌、尿路上皮癌) ; 靶向CD20的奥滨尤妥珠单抗 (Obinutuzumab) (Gazyva) (被批准用于慢性淋巴细胞白血病、滤泡性淋巴瘤) ; 靶向CD20的奥法木单抗 (Arzerra、HuMax-CD20) (被批准用于慢性淋巴细胞白血病) ; 靶向PARP的奥拉帕尼 (Lynparza) (被批准用于卵巢癌) ; 靶向PDGFR α 的奥拉木单抗 (Olaratumab) (Lartruvo) (被批准用于软组织肉瘤) ; 靶向EGFR的奥希替尼 (Tagrisso) (被批准用于非小细胞肺癌) ; 靶向CDK4、CDK6的帕博西尼 (Ibrance) (被批准用于乳腺癌) ; 靶向EGFR (HER1/ERBB1) 的帕尼单抗 (Vectibix) (被批准用于结直肠癌) ; 靶向HDAC的帕比司他 (Farydak) (被批准用于多发性骨髓瘤) ; 靶向VEGFR、PDGFR、KIT的帕唑帕尼 (Votrient) (被批准用于肾细胞癌) ; 靶向PD-1的派姆单抗 (Keytruda) (被批准用于经典霍奇金淋巴瘤、黑色素瘤、非小细胞肺癌 (PD-L1+)、头颈部鳞状细胞癌、实体瘤 (MSI-H)) ; 靶向HER2 (ERBB2/neu) 的帕妥珠单抗 (Perjeta) (被批准用于乳腺癌 (HER2+)) ; 靶向ABL、FGFR1-3、FLT3、VEGFR2的帕纳替尼 (Iclusig) (被批准用于慢性髓细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病) ; 靶向VEGFR2的雷莫芦单抗 (Cyramza) (被批准用于结直肠癌、胃癌或胃食管交界处 (GEJ) 腺癌、非小细胞肺癌) ; 靶向KIT、PDGFR β 、RAF、RET、VEGFR1/2/3的瑞戈非尼 (Stivarga) (被批准用于结直肠癌、胃肠道间质瘤、肝细胞癌) ; 靶向CDK4、CDK6的瑞博西尼 (Kisqali) (被批准用于乳腺癌 (HR+、HER2-)) ; 靶向CD20的利妥昔单抗 (Rituxan、Mabthera) (被批准用于非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、类风湿性关节炎、肉芽肿病伴多血管炎) ; 靶向CD20的利妥昔单抗/人透明质酸酶 (Rituxan Hycela) (被批准用于慢性淋巴细胞白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤) ; 靶向HDAC的罗米地辛 (Istodax) (被批准用于皮肤T细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤) ; 靶向PARP的卢卡帕尼 (Rubraca) (被批准用于卵巢癌) ; 靶向JAK1/2的鲁索替尼 (Jakafi) (被批准用于骨髓纤维化) ; 靶向IL-6的司妥昔单抗 (Sylvant) (被批准用于多中心性卡斯尔曼病) ; 靶向的西普鲁塞-T (Sipuleucel-T) (Provenge) (被批准用于前列腺癌) ; 靶向Smoothened的索尼德吉 (Odomzo) (被批准用于基底细胞癌) ; 靶向VEGFR、PDGFR、KIT、RAF的索拉非尼 (Nexavar) (被批准用于肝细胞癌、肾细胞癌、甲状腺癌) ; 靶向mTOR的替西罗莫司 (Temsilimus) (Torisel) (被批准用于肾细胞癌) ; 靶向CD20的托西莫单抗 (Bexxar) (被批准用于非霍奇金淋巴瘤) ; 靶向MEK的曲美替尼 (Mekinist) (被批准用于黑色素瘤、非小细胞肺癌) ; 靶向HER2 (ERBB2/neu) 的曲妥珠单抗 (Herceptin) (被批准用于乳腺癌 (HER2+)、胃癌 (HER2+)) ; 靶向EGFR (HER1/ERBB1)、RET、VEGFR2的凡德他尼 (Caprelsa) (被批准用于甲状腺髓样癌) ; 靶向

BRAF的维莫非尼 (Zelboraf) (被批准用于黑色素瘤); 靶向BCL2的维奈托克 (Venclexta) (被批准用于慢性淋巴细胞白血病); 靶向PTCH、Smoothered的维莫德吉 (Vismodegib) (Erivedge) (被批准用于基底细胞癌); 靶向HDAC的伏立诺他 (Zolinza) (被批准用于皮肤T细胞淋巴瘤); 靶向PIGF、VEGFA/B的阿柏西普 (Ziv-aflibercept) (Zaltrap) (被批准用于结直肠癌); 等等。

[0403] 适合于与本公开文本的方法结合使用的生物反应调节剂包括但不限于: (1) 酪氨酸激酶 (RTK) 活性的抑制剂; (2) 丝氨酸/苏氨酸激酶活性的抑制剂; (3) 肿瘤相关抗原拮抗剂, 如与肿瘤抗原特异性结合的抗体; (4) 凋亡受体激动剂; (5) 白细胞介素-2; (6) 干扰素- α ; (7) 干扰素- γ ; (8) 集落刺激因子; (9) 血管生成的抑制剂; 以及 (10) 肿瘤坏死因子的拮抗剂。

[0404] 化学治疗剂是减少癌细胞增殖的非肽 (即, 非蛋白质) 化合物, 并且包括细胞毒性剂和细胞抑制剂。化学治疗剂的非限制性例子包括烷基化剂、亚硝基脲、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、植物 (长春花) 生物碱和类固醇激素。

[0405] 用于减少细胞增殖的药剂是本领域已知的并且被广泛使用。此类药剂包括烷基化剂, 如氮芥、亚硝基脲、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸盐和三氮烯, 包括但不限于二氯甲基二乙胺、环磷酰胺 (CytosanTM)、美法仑 (左旋苯丙氨酸氮芥)、卡莫司汀 (BCNU)、洛莫司汀 (CCNU)、司莫司汀 (甲基-CCNU)、链脲佐菌素、氯脲霉素、乌拉莫司汀、双氯乙基甲胺、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥、哌泊溴烷、曲他胺、三亚乙基硫代磷胺 (triethylenethiophosphoramine)、白消安、达卡巴嗪和替莫唑胺。

[0406] 抗代谢剂包括叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂, 包括但不限于阿糖胞苷 (cytarabine) (CYTOSAR-U)、胞嘧啶阿拉伯糖苷 (cytosine arabinoside)、氟尿嘧啶 (5-FU)、氟尿苷 (FudR)、6-巯鸟嘌呤、6-巯基嘌呤 (6-MP)、喷司他丁 (pentostatin)、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、甲氨蝶呤、10-炔丙基-5,8-二去氮杂叶酸酯 (PDDF、CB3717)、5,8-二去氮杂四氢叶酸 (DDATHF)、亚叶酸钙、磷酸氟达拉滨、喷司他丁 (pentostatine) 和吉西他滨。

[0407] 合适的天然产物及其衍生物 (例如, 长春花生物碱、抗肿瘤抗生素、酶、淋巴因子和表鬼臼毒素) 包括但不限于Ara-C、紫杉醇 (Taxol[®])、多西紫杉醇 (Taxotere[®])、脱氧助间型霉素、丝裂霉素C、左旋天冬酰胺酶、硫唑嘌呤; 布喹那; 生物碱, 例如长春新碱、长春碱、长春瑞滨、长春地辛等; 鬼臼毒素, 例如依托泊苷、替尼泊苷等; 抗生素, 例如蒽环类、盐酸柔红霉素 (daunorubicin) (柔红霉素 (daunomycin)、红比霉素、佐柔比星)、伊达比星、阿霉素、表柔比星和吗啉代衍生物等; 酚噻嗪双环肽 (phenoxizone biscyclopeptide), 例如更生霉素; 碱性糖肽, 例如博来霉素; 蒽醌糖苷, 例如普卡霉素 (光神霉素); 蒽二酮, 例如米托蒽醌; 氮杂环丙烯并吡咯并吡啶二酮 (azirinopyrrolo indoleione), 例如丝裂霉素; 大环免疫抑制剂, 例如环孢菌素、FK-506 (他克莫司、普乐可复)、雷帕霉素等; 等等。

[0408] 其他抗增殖细胞毒性剂是诺维本 (navelbene)、CPT-11、阿那曲唑、来曲唑 (letrozole)、卡培他滨、雷洛昔芬 (relaxafine)、环磷酰胺、异环磷酰胺 (ifosamide) 和曲洛昔芬 (droloxafine)。

[0409] 具有抗增殖活性的微管影响剂也是适合使用的, 并且包括但不限于秋水仙碱 (NSC 406042)、软海绵素B (NSC 609395)、秋水仙碱 (NSC 757)、秋水仙碱衍生物 (例如, NSC

33410)、尾海兔素(dolstatin) 10(NSC 376128)、美登素(NSC 153858)、利索新(rhizoxin)(NSC 332598)、紫杉醇(Taxol®)、Taxol®衍生物、多西紫杉醇(Taxotere®)、硫代秋水仙碱(NSC 361792)、三苯甲基半胱氨酸(trityl cysterin)、硫酸长春碱、硫酸长春新碱、天然和合成的埃博霉素(包括但不限于埃博霉素A、埃博霉素B)、圆皮海绵内酯;雌莫司汀、诺考达唑等。

[0410] 适合使用的激素调节剂和类固醇(包括合成类似物)包括但不限于肾上腺皮质类固醇,例如泼尼松、地塞米松等;雌激素和孕激素(pregestin),例如己酸羟孕酮、醋酸甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、雌二醇、克罗米芬、他莫西芬等;和肾上腺皮质抑制剂,例如氨鲁米特;17 α -乙炔基雌二醇;己烯雌酚、睾酮、氟羟甲睾酮、屈他雄酮丙酸酯、睾内酯、甲基泼尼松龙、甲基-睾酮、泼尼松龙、去炎松、氯烯雌醚、羟孕酮、氨鲁米特、雌莫司汀、醋酸甲羟孕酮、亮丙瑞林、氟他胺(Drogenil)、托瑞米芬(Fareston)和诺雷德。雌激素刺激增殖和分化,因此与雌激素受体结合的化合物被用于阻断这种活性。皮质类固醇可以抑制T细胞增殖。

[0411] 其他化学治疗剂包括金属络合物,例如顺铂(顺式-DDP)、卡铂等;脲,例如羟基脲;和胍,例如N-甲基胍;表鬼臼毒素(epidophyllotoxin);拓扑异构酶抑制剂;丙卡巴胍;米托蒽醌;亚叶酸钙;替加氟等。其他感兴趣的抗增殖剂包括免疫抑制剂,例如霉酚酸、沙利度胺、脱氧斯格埃林(desoxyspergualin)、氮杂孢菌素(azasporine)、来氟米特、咪唑立宾、氮杂螺烷(SKF 105685);Iressa®(ZD 1839,4-(3-氯-4-氟苯基氨基)-7-甲氧基-6-(3-(4-吗啉基)丙氧基)喹唑啉)等。

[0412] “紫杉烷”包括紫杉醇以及任何活性紫杉烷衍生物或前药。“紫杉醇”(其在本文中应当被理解为包括类似物、配制品和衍生物,例如像多西紫杉醇、TAXOL™、TAXOTERE™(多西紫杉醇的配制品)、紫杉醇的10-去乙酰基类似物和紫杉醇的3'-N-去苯甲酰基-3'-N-叔丁氧基羰基类似物)可以利用本领域技术人员已知的技术容易地制备(还参见WO 94/07882、WO 94/07881、WO 94/07880、WO 94/07876、WO 93/23555、WO 93/10076;美国专利号5,294,637;5,283,253;5,279,949;5,274,137;5,202,448;5,200,534;5,229,529;和EP 590,267),或从各种商业来源获得,所述商业来源包括例如密苏里州圣路易斯的Sigma Chemical Co.(来自短叶红豆杉(Taxus brevifolia)的T7402或来自云南红豆杉(Taxus yunnanensis)的T-1912)。

[0413] 紫杉醇应当被理解为不仅是指紫杉醇的常见化学可用形式,也指类似物和衍生物(例如,Taxotere™多西紫杉醇,如上所述)和紫杉醇缀合物(例如,紫杉醇-PEG、紫杉醇-葡聚糖、紫杉醇-木糖或紫杉醇-白蛋白)。

[0414] 术语“紫杉烷”内还包括多种已知的衍生物,包括亲水性衍生物和疏水性衍生物二者。紫杉烷衍生物包括但不限于国际专利申请号WO 99/18113中描述的半乳糖和甘露糖衍生物;WO 99/14209中描述的哌嗪子基及其他衍生物;WO 99/09021、WO 98/22451和美国专利号5,869,680中描述的紫杉烷衍生物;WO 98/28288中描述的6-硫代衍生物;美国专利号5,821,263中描述的亚磺酰胺衍生物;以及美国专利号5,415,869中描述的泰素紫杉醇衍生物。紫杉烷衍生物还包括紫杉醇的前药,包括但不限于WO 98/58927;WO 98/13059;以及美国专利号5,824,701中描述的那些。

[0415] 有用的免疫疗法包括:抗PD-1/PD-L1免疫疗法和/或其他免疫疗法靶标,例如像可在治疗方法中被靶向的免疫检查点标记物(如CTLA-4、LAG-3和TIM-3)。抗PD-1/PD-L1免疫

疗法包括但不限于例如包括向受试者施用有效量的一种或多种抗PD-1/PD-L1治疗性拮抗剂的疗法,其中此类拮抗剂包括但不限于例如**OPDIVO®**(纳武单抗)、**KEYTRUDA®**(派姆单抗)、**Tecentriq™**(阿特珠单抗)、德瓦鲁单抗(MEDI4736)、阿维鲁单抗(MSB0010718C)、BMS-936559(MDX-1105)、CA-170、BMS-202、BMS-8、BMS-37、BMS-242等。

[0416] CTLA-4也称为CD152,其与CD80和CD86结合。针对CTLA-4的抗体已被批准用于治疗某些癌症类型。CTLA-4与其他免疫疗法的共同抑制作用使得CTLA-4成为与其他免疫疗法组合使用以治疗某些癌症的良好候选物。TIM-3也可以被靶向以用于针对若干种癌症类型的免疫疗法。

[0417] LAG-3正处于用于治疗癌症的临床试验中。抗LAG-3免疫疗法包括采用拮抗剂LAG-3抗体的免疫疗法,所述拮抗剂LAG-3抗体既可以激活T效应细胞(通过将LAG-3抑制信号下调至预激活的LAG-3+细胞中)又可以抑制诱导的(即抗原特异性的)Treg抑制活性。有用的LAG-3拮抗性抗体包括瑞拉利单抗(relatlimab)(BMS-986016;由Bristol-Myers Squibb开发)、IMP701(由Immutep开发)、TSR-033(抗LAG-3mAb;由TESARO, Inc. 开发)等。

[0418] 免疫疗法还包括基于T细胞的免疫疗法,例如像过继细胞疗法(ACT)和嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法。例如,可以向受试者施用经工程化以靶向由受试者的癌症表达的抗原的CAR T细胞群体。在一些情况下,基于T细胞的疗法可以涉及从受试者获得细胞样品(如血液样品或肿瘤活检),并且在培养免疫细胞进行或未进行基因修饰的情况下离体培养来自所述样品的免疫细胞。例如,可以从受试者获得免疫细胞,将其进行离体培养并用对癌症表达的抗原具有特异性的CAR进行修饰以产生CAR T细胞群体。然后,可以将CAR T细胞重新引入所述受试者中以靶向癌症。取决于待治疗的特定癌症,基于T细胞的免疫疗法可以以各种方式进行配置,例如通过靶向各种抗原、通过收集/培养各种细胞类型等进行配置。另外,可以全身施用(例如,通过静脉内注射)或局部施用(例如,通过输注(例如,腹膜内输注、胸膜导管输注等)、直接注射等)基于T细胞的免疫疗法。

[0419] 在一些情况下,本文所述的治疗方法可以包括向受试者施用多药耐药转运蛋白(包括但不限于例如除MDR1以外的多药耐药转运蛋白)的一种或多种抑制剂。多药耐药转运蛋白的有用抑制剂包括例如酪氨酸激酶抑制剂、天然产物、微小RNA和小分子抑制剂。多药耐药转运蛋白的抑制剂包括ABC转运蛋白抑制剂。在Choi (2005), *Cancer Cell Int*, 5:30中提供了此类MDR调节剂或恢复剂的概述;将其公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0420] 适合于使用本公开文本的方法进行治疗的个体包括:患有癌症的个体;被诊断为患有癌症的个体;用化学疗法、放射疗法、抗体疗法、手术等治疗癌症的个体;已进行癌症治疗(例如,用化学疗法、放射疗法、抗体疗法、手术等中的一种或多种)且对所述治疗没有反应的个体;已进行癌症治疗(例如,用化学疗法、放射疗法、抗体疗法、手术等中的一种或多种)且最初对所述治疗有反应但随后复发(即,癌症复发)的个体。

[0421] 本公开文本的方法可以用于靶向和治疗多种癌症,包括例如原发性癌症、继发性癌症、再生长癌症、复发性癌症、难治性癌症等。例如,在一些情况下,本公开文本的方法可以用作在受试者中鉴定出的原发性癌症的初始治疗。在一些情况下,本公开文本的方法可以例如在患有先前治疗难治性的癌症的受试者中、在患有先前治疗后再生长的癌症的受试者中、在对先前治疗具有混合反应(例如,对受试者中的至少一种肿瘤有阳性反应且对受试者中的至少第二种肿瘤有阴性或中性反应)的受试者等中用作非原发性(例如,继发性或后

期) 治疗。

[0422] 在一些情况下,本公开文本的方法可以用于治疗患有耐药性癌症(如多药耐药性癌症)的受试者。多药耐药性(MDR)是许多癌症对化学疗法药物产生耐药性从而导致最少的细胞死亡和耐药性肿瘤的扩大的机制。MDR癌症可以涉及一种或多种耐药性机制,包括但不限于例如增加的外排泵表达、减少的药物吸收、细胞死亡或凋亡的抑制、调节药物代谢等。在一些情况下,本公开文本的方法可以阻止、逆转或规避MDR。

[0423] 在一些情况下,本公开文本的方法可以包括用有效量的本文所述的主体多特异性抗体与不同于第一药剂的第二药剂的组合治疗患有对所述第一药剂具有耐药性的癌症的受试者。例如,在一些情况下,受试者的癌症可能对第一化学治疗剂具有耐药性,并且所述受试者可以通过施用有效量的如本文所述的主体多特异性抗体与不同于所述第一化学治疗剂的第二化学治疗剂的组合来治疗。根据例如待治疗的癌症的类型、产生耐药性的可能性等,可以采用第一和第二化学治疗剂的各种组合。

[0424] 已知许多癌症会产生耐药性。出于这个和其他原因,本公开文本的方法可用于治疗各种癌症,包括但不限于例如急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、肾上腺皮质癌、艾滋病相关癌症(例如,卡波西肉瘤、淋巴瘤等)、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、非典型畸胎样肿瘤/横纹肌样肿瘤、基底细胞癌、胆管癌(肝外)、膀胱癌、骨癌(例如,尤文肉瘤、骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤等)、脑干胶质瘤、脑肿瘤(例如,星形细胞瘤、中枢神经系统胚胎性肿瘤、中枢神经系统生殖细胞肿瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤等)、乳腺癌(例如,女性乳腺癌、男性乳腺癌、儿童期乳腺癌等)、支气管肿瘤、伯基特淋巴瘤、类癌肿瘤(例如,儿童期、胃肠道等)、原发性不明癌、心脏的(心脏)肿瘤、中枢神经系统(例如,非典型畸胎样肿瘤/横纹肌样肿瘤、胚胎性肿瘤、生殖细胞肿瘤、淋巴瘤等)、宫颈癌、儿童期癌症、脊索瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性骨髓增殖性肿瘤、结肠癌、结直肠癌、颅咽管瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、导管(例如,胆管、肝外等)癌、导管原位癌(DCIS)、胚胎性肿瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、鼻腔神经胶质瘤、尤文肉瘤、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、眼癌(例如,眼内黑色素瘤、视网膜母细胞瘤等)、骨纤维组织细胞瘤(例如,恶性、骨肉瘤等)、胆囊癌、胃(胃部)癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、生殖细胞肿瘤(例如,颅外、性腺外、卵巢、睾丸等)、妊娠滋养细胞疾病、胶质瘤、毛细细胞白血病、头颈癌、心脏癌症、肝细胞(肝)癌、组织细胞增生症(例如,朗格汉斯细胞等)、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞肿瘤(例如,胰腺神经内分泌肿瘤等)、卡波西肉瘤、肾癌(例如,肾细胞、肾母细胞瘤、儿童期肾肿瘤等)、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、喉癌、白血病(例如,急性成淋巴细胞性(ALL)、急性髓性(AML)、慢性淋巴细胞(CLL)、慢性髓细胞性(CML)、毛细细胞等)、唇和口腔癌、肝癌(原发性)、小叶原位癌(LCIS)、肺癌(例如,非小细胞、小细胞等)、淋巴瘤(例如,艾滋病相关、伯基特、皮肤T细胞、霍奇金、非霍奇金、原发性中枢神经系统(CNS)等)、巨球蛋白血症(如华氏等)、男性乳腺癌、骨恶性纤维组织细胞瘤和骨肉瘤、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、间皮瘤、原发性隐匿性转移性鳞状颈癌、涉及NUT基因的中线癌、口腔癌、多发性内分泌肿瘤综合征、多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤、蕈样真菌病、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常性/骨髓增殖性肿瘤、髓细胞性白血病(例如,慢性(CML)等)、骨髓性白血病(例如,急性(AML)等)、骨髓增殖性肿瘤(例如,慢性等)、鼻腔和鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、口腔癌(Oral Cancer)、口腔癌(Oral

Cavity Cancer) (例如,唇等)、口咽癌、骨肉瘤及骨恶性纤维组织细胞瘤、卵巢癌(例如,上皮、生殖细胞肿瘤、低度恶性潜能肿瘤等)、胰腺癌、胰腺神经内分泌肿瘤(胰岛细胞肿瘤)、乳头瘤病、副神经节瘤、鼻旁窦及鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞(肾)癌、肾盂和输尿管癌、移行细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤(例如,尤文、卡波西、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、软组织、子宫等)、塞扎里综合征、皮肤癌(例如,儿童期、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、非黑色素瘤等)、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、鳞状颈癌(例如,具有隐匿性原发性、转移性等)、胃部(胃)癌、T细胞淋巴瘤、睾丸癌、咽喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、肾盂和输尿管的移行细胞癌、输尿管和肾盂癌、尿道癌、子宫癌(例如,子宫内膜等)、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、华氏巨球蛋白血症、肾母细胞瘤等。

[0425] 在一些情况下,本文所述的治疗方法可以在先前已进行一种或多种常规治疗的受试者中进行。例如,在肿瘤学的情况下,在一些情况下,本文所述的方法可以在常规癌症疗法之后进行,所述常规癌症疗法包括但不限于例如常规化学疗法、常规放射疗法、常规免疫疗法、手术等。在一些情况下,当受试者对常规疗法没有反应或是常规疗法难治性的时,可以使用本文所述的方法。在一些情况下,当受试者对常规疗法已经有反应时,可以使用本文所述的方法。

[0426] 在一些情况下,本公开文本的方法可以用于靶向、治疗或清除受试者在先前癌症疗法后残留的微小残留病(MRD)。可以使用本发明方法获得MRD的靶向、治疗和/或清除,无论MRD是否被确定为或已经被确定为先前治疗难治性的。在一些情况下,在确定MRD为先前治疗难治性的或除采用本文所述的多特异性抗体的那些以外的一种或多种可用治疗选项难治性的之后,可以使用本公开文本的方法靶向、治疗和/或清除受试者的MRD。

[0427] 在一些情况下,本发明方法可以预防性地用于监测。例如,当有需要的受试者没有可检测的疾病但有风险患上复发性癌症(包括例如耐药性癌症)时,可以向所述受试者施用涉及一种或多种本文所述的多特异性抗体的治疗。在一些情况下,当受试者有特别高的风险患上原发性癌症时,可以采用预防性方法,所述原发性癌症将被预测具有耐药性或预期变得具有耐药性。在一些情况下,当受试者先前已进行癌症治疗并且有风险复发或有风险产生耐药性时,可以采用预防性方法。

[0428] 在一些情况下,本公开文本的方法可以涉及分析癌症的一种或多种标记物或治疗性靶标的表达。例如,在一些情况下,方法可以涉及分析来自受试者的癌症样品以确定所述癌症是否表达高于预定阈值的MDR1、高于预定阈值的TAA(例如,CD47、PD-L1或EGFR)或二者。

[0429] 在一些情况下,受试者是否用本公开文本的多特异性抗体治疗可以取决于TAA和/或MDR1测试的结果。例如,在一些情况下,如果癌症表达等于或高于预定阈值的TAA,则所述受试者可以用本公开文本的多特异性抗体治疗,并且如果所述癌症表达低于预定阈值的TAA,则所述受试者可以不用所述多特异性抗体治疗,例如所述受试者可以在没有用主题多特异性抗体的情况下用针对相关癌症的常规疗法治疗。在一些情况下,如果癌症表达等于或高于预定阈值的MDR1,则所述受试者可以用本公开文本的多特异性抗体治疗,并且如果所述癌症表达低于预定阈值的MDR1,则所述受试者可以不用所述多特异性抗体治疗,例如所述受试者可以在没有用主题多特异性抗体的情况下用针对相关癌症的常规疗法治疗。在

一些情况下,如果癌症表达等于或高于预定阈值的TAA和MDR1二者,则所述受试者可以用本公开文本的多特异性抗体治疗,并且如果所述癌症表达低于预定阈值的TAA和MDR1,则所述受试者可以不用所述多特异性抗体治疗,例如所述受试者可以在没有用主题多特异性抗体的情况下用针对相关癌症的常规疗法治疗。

[0430] 可以采用任何方便的测定来分析MDR1和/或TAA水平,所述方便的测定包括但不限于例如流式细胞术、基于核酸的测定(例如,扩增、测序等)、细胞计数法、免疫组织化学等。可以采用任何方便的生物样品,包括但不限于例如癌症活检样品。用于评估一种或多种标记物和/或靶标的表达的有用的预定阈值可以通过任何方便且适当的方法来确定,所述方法包括将所测量的表达水平与相应的对照进行比较。例如,在一些情况下,在样品中测定的MDR1和/或TAA水平的有用的预定阈值可以对应于如在参考细胞(如健康/正常细胞)中测量的MDR1和/或TAA水平。所述TAA可以是CD47、PD-L1或EGFR。

[0431] 制备方法

[0432] 如上所总结,本公开文本的方法还包括制备和/或鉴定如本文所述的多特异性抗体的方法。主题抗体可以通过任何已知的方法产生,所述已知的方法例如用于蛋白质合成的常规合成方法;重组DNA方法等。

[0433] 在主题抗体是单链多肽的情况下,其可以使用标准的化学肽合成技术来合成。在化学合成多肽的情况下,所述合成可以经由液相或固相进行。固相多肽合成(SPPS)是用于主题抗体的化学合成的合适方法的例子,其中序列的C末端氨基酸附接至不溶性支持物,接着依序添加所述序列中的其余氨基酸。各种形式的SPPS(如Fmoc和Boc)可用于合成主题抗体。用于固相合成的技术通过以下文献进行描述:Barany和Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*;第3-284页, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. 第2卷: *Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.*; Merrifield等人 *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2156 (1963); Stewart等人, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 第2版Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984); 以及Ganesan A. 2006 *Mini Rev. Med Chem.* 6: 3-10和Camarero JA等人 2005 *Protein Pept Lett.* 12: 723-8。简而言之,用功能单元处理小的不溶性多孔珠,在所述功能单元上建立肽链。反复循环偶联/脱保护后,附接的固相的游离N末端胺与单个N保护的氨基酸单元偶联。然后将该单元脱保护,从而显露出新的N末端胺,其可以附接其他氨基酸。所述肽保持固定在固相上并经历过滤过程,然后被切割掉。

[0434] 标准重组方法可以用于产生主题抗体。例如,将编码轻链和重链可变区(任选地与恒定区连接)的核酸插入表达载体中。所述轻链和重链可以在相同或不同的表达载体中克隆。编码免疫球蛋白链的DNA区段与一种或多种表达载体中的控制序列可操作地连接,所述控制序列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,天然缔合启动子或异源启动子)、信号序列、增强子元件和转录终止序列。所述表达控制序列可以是能够转化或转染真核宿主细胞(例如,COS或CHO细胞)的载体中的真核启动子系统。一旦已经将载体掺入适当的宿主中,就将所述宿主在适合于高水平表达核苷酸序列以及收集和纯化所述抗体的条件下维持。

[0435] 由于密码的简并性,多种核酸序列可以编码每个免疫球蛋白氨基酸序列。可以通过从头固相DNA合成或通过所需多核苷酸的较早制备的变体进行的聚合酶链式反应(PCR)诱变来产生所需的核酸序列。寡核苷酸介导的诱变是用于制备靶多肽DNA的取代、缺

失和插入变体的合适方法的例子。参见Adelman等人,DNA2:183(1983)。简而言之,通过使编码所需突变的寡核苷酸与单链DNA模板杂交来改变靶多肽DNA。杂交后,DNA聚合酶用于合成模板的整个第二互补链,所述模板掺入了寡核苷酸引物并编码靶多肽DNA中选择的改变。

[0436] 合适的表达载体通常可在宿主生物中作为附加体或作为宿主染色体DNA的组成部分进行复制。一般来说,表达载体含有选择标记物(例如,氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性、卡那霉素抗性新霉素抗性)以允许检测用所需DNA序列转化的那些细胞。

[0437] 大肠杆菌是原核宿主细胞的例子,其可以用于克隆编码主题抗体的多核苷酸。适合使用的其他微生物宿主包括杆菌纲(bacilli)(如枯草芽孢杆菌)和其他肠杆菌科(enterobacteriaceae)(如沙门氏菌属(Salmonella)、沙雷氏菌属(Serratia)和各种假单胞菌属(Pseudomonas)物种)。在这些原核宿主中,还可以制备表达载体,其将通常含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如,复制起点)。另外,将存在任何数目的各种熟知的启动子,如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或来自噬菌体 λ 的启动子系统。启动子将通常任选地用操纵序列控制表达,并且具有核糖体结合位点序列等以用于启动和完成转录和翻译。

[0438] 其他微生物(如酵母)也可用于表达。酵母属(Saccharomyces)(例如,酿酒酵母)和毕赤酵母属(Pichia)是合适的酵母宿主细胞的例子,其中合适的载体具有所需的表达控制序列(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以及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

[0439] 除微生物之外,哺乳动物细胞(例如,在体外细胞培养物中生长的哺乳动物细胞)也可以用于表达和产生本发明的多肽(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)。合适的哺乳动物宿主细胞包括CHO细胞系、各种Cos细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系和转化的B细胞或杂交瘤。这些细胞的表达载体可以包含表达控制序列(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(如核糖体结合位点、RNA剪接位点、多腺苷酸化位点)和转录终止序列。合适的表达控制序列的例子是源自免疫球蛋白基因、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)。

[0440] 一旦合成(化学地或重组地),整个抗体、其二聚体、单条轻链和重链或其他形式的主题抗体(例如,scFv等)就可以根据本领域的标准程序进行纯化,所述标准程序包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱色谱、高效液相色谱(HPLC)纯化、凝胶电泳等(一般参见Scopes,Protein Purification(Springer-Verlag,N.Y.,(1982))。主题抗体可以是基本上纯的,例如至少约80%至85%纯、至少约85%至90%纯、至少约90%至95%纯、或98%至99%纯、或更纯,例如不含污染物(如细胞碎片、除主题抗体以外的大分子等)。

[0441] 在一些实施方案中,产生本公开文本的多特异性抗体的方法可以包括产生候选抗体以及筛选活性。此类方法可以通过使用一系列步骤产生特异性结合表达MDR1和CD47二者的细胞的多特异性抗体。此类方法的步骤可以包括:产生多特异性抗体或多种抗体,其各自包含或预期包含MDR1结合结构域和CD47结合结构域;使表达MDR1和CD47的第一测试细胞与所述多特异性抗体或多种抗体接触;使表达MDR1或CD47的第二细胞与所述多特异性抗体或

多种抗体接触;比较所述多特异性抗体或所述多种抗体的抗体与所述第一细胞的结合和所述多特异性抗体与所述第二细胞的结合以确定结合特异性比率;以及当所述比率高于预定阈值时,将所述多特异性抗体或所述多种抗体中的一种或多种鉴定为对于表达MDR1和CD47二者的细胞具有特异性。在采用这种用于比较结合的阈值的情况下,所述阈值可以变化并且范围可以是1.5:1或更大,包括但不限于例如2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、50:1、100:1等。

[0442] 在此类方法中可以使用各种细胞,包括但不限于例如本文所述的细胞。在一些情况下,可以进行所述抗体与仅表达MDR1的细胞和仅表达CD47的细胞二者的结合。例如,在一些情况下,所述方法可以包括,相对于上述步骤,在所述第二细胞表达MDR1而不表达CD47的情况下,并且所述方法还包括使表达CD47而不表达MDR1的第三细胞与所述多特异性抗体接触。

[0443] 在一些情况下,此类方法可以采用一种或多种对照,包括但不限于例如对照细胞、对照试剂等。有用的对照细胞包括具有一种或多种相关基因或蛋白质的已知表达或已知的表达缺乏的细胞。有用的对照试剂可以包括但不限于例如对照抗体,如但不限于例如针对已知靶标的单特异性抗体。例如,在一些情况下,本公开文本的此类方法还可以包括使所述第一细胞、所述第二细胞和/或所述第三细胞与选自单特异性抗MDR1抗体和单特异性抗CD47抗体的对照抗体接触。根据所使用的特定方法,可以视情况采用各种其他或另外的对照。

[0444] 试剂盒

[0445] 本公开文本的方面还包括试剂盒。所述试剂盒可以包含例如本文所述的多特异性抗体、试剂、组合物、配制品、细胞、核酸、表达载体等的任何组合。主题试剂盒可以包含以下中的一种或多种:主题多特异性抗体、编码其的核酸或含有主题多特异性核酸的细胞。试剂盒可以被配置用于各种目的,包括例如治疗试剂盒(例如,其中试剂盒可以包含多特异性抗体和例如一种或多种另外的活性剂,如化学治疗剂)、用于产生抗体的试剂盒、用于筛选抗体的试剂盒等。

[0446] 所述试剂盒的任选组分将变化,并且可以例如包含:缓冲液;蛋白酶抑制剂等。在主题试剂盒包含主题核酸的情况下,所述核酸还可以具有限制位点、多克隆位点、引物位点等。所述试剂盒的各种组分可以存在于单独的容器中,或者某些相容的组分可以根据需要预组合至单个容器中。

[0447] 除上述组分之外,主题试剂盒还可以包含用于使用所述试剂盒的组分来实践主题方法的说明书。用于实践主题方法的说明书通常记录在合适的记录介质上。例如,说明书可以印刷在基材(如纸或塑料等)上。因此,说明书可以作为包装插页存在于所述试剂盒中,可以存在于所述试剂盒的容器或其组分的标签中(即,与包装或子包装相关联)等。在其他实施方案中,说明书作为存在于合适的计算机可读存储介质(例如,只读式光盘存储器(CD-ROM)、数字通用光盘(DVD)、软盘等)上的电子存储数据文件存在。在又其他实施方案中,真实的说明书不存在于所述试剂盒中,而是提供了用于从远程源(例如经由因特网)获得说明书的手段。这个实施方案的例子是包含网址的试剂盒,在其中可以查看说明书和/或可以从其下载说明书。与说明书一样,将这种用于获得说明书的手段记录在合适的基材上。

[0448] 本公开文本的示例性非限制性方面

[0449] 上述本发明主题的各方面(包括实施方案)可以单独或与一个或多个其他方面或实施方案组合发挥益处。在不限制前述描述的情况下,下文提供了本公开文本的某些非限制性方面。正如本领域普通技术人员在阅读本公开文本后将清楚的,每个单独编号的方面可以与任何前述或后面单独编号的方面一起使用或组合。这旨在为所有此类方面组合提供支持,并且不限于下文明确提供的方面的组合。本领域普通技术人员将清楚的是,在不脱离本发明的精神或范围的情况下可以进行各种改变和修改。

[0450] 1.一种结合多药耐药蛋白1(MDR1)和肿瘤相关抗原(TAA)的双特异性抗体分子,所述抗体分子包含两条相同的可变轻(VL)链、第一可变重(VH)链和第二VH链,

[0451] 其中所述VL链各自包含对于MDR1的抗原结合位点,所述第一VH链包含针对MDR1的抗原结合位点,并且所述第二VH链包含针对所述TAA的抗原结合位点,并且其中所述第二VH链在与所述VL链之一配对时结合所述TAA,

[0452] 其中所述双特异性抗体与表达MDR1和所述TAA二者的癌细胞结合,同时显示降低的与表达MDR1和/或所述TAA的非癌细胞的结合。

[0453] 2.根据方面1所述的双特异性抗体分子,其中所述两条VL链的抗原结合位点包含具有以下序列的VL链的轻链CDR 1-3(LCDR 1-3):

[0454] DVLMTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGX¹TYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQASHFPRFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:1),其中X¹是N、Q或S。

[0455] 3.根据方面2所述的双特异性抗体分子,其中所述两条VL链包含具有以下序列的VL链的LCDR 1-3:

[0456] (i) DVLMTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQASHFPRFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:2);

[0457] (ii) DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGQTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHFPRFTFGGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3);或

[0458] (iii) DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGSTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHFPRFTFGGQGTKLEIK (SEQ ID NO:4)。

[0459] 4.根据方面2或3所述的双特异性抗体分子,其中:

[0460] (i) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGX¹TYLE (SEQ ID NO:5);

[0461] (ii) 所述LCDR2包含序列:KISNRF (SEQ ID NO:6);并且

[0462] (iii) 所述LCDR3包含序列:FQASHFPR (SEQ ID NO:7);

[0463] 其中X¹是N、Q或S。

[0464] 5.根据前述方面中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述两条VL链是人源化的。

[0465] 6.根据方面2至5中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述两条VL链包含以下序列或与以下序列至少90%相同的氨基酸:

[0466] DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHFPRFTFGGQGTKLEIK (SEQ ID NO:8);

[0467] DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGQTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHFPRFTFGGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3);或

[0468] DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGSTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHFPRFTFGGQGTKLEIK (SEQ ID NO:4)。

GSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCFQASHFPRTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:4)。

[0469] 7. 根据方面6所述的双特异性抗体分子,其中所述两条VL链包含以下序列或与以下序列至少90%相同的序列:

[0470] DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFS
GSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:8)。

[0471] 8. 根据前述方面中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第一VH链的抗原结合位点包含具有以下序列的VH链的重链CDR 1-3 (HCDR 1-3):

[0472] EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSCAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGX²TYYPDSVKGR
FTVSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:9), 其中X²是N、Q或S。

[0473] 9. 根据前述方面中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第一VH链的抗原结合位点包含具有以下序列的VH链的HCDR 1-3:

[0474] (i) EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSCAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVK
GRFTVSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:10) 或

[0475] (ii) EVQLVESGGVTVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGQTYYPDSV
KGRFTVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:11) 或

[0476] (iii) EVQLVESGGVTVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGSTYYPDS
VKGRFTVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:12)。

[0477] 10. 根据方面8或9所述的双特异性抗体分子,其中:

[0478] (i) 所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13);

[0479] (ii) 所述HCDR2包含序列:TISSGGG X²TYYPDSVKG (SEQ ID NO:14); 并且

[0480] (iii) 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15);

[0481] 其中X²是N、Q或S。

[0482] 11. 根据前述方面中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第一VH链和/或所述第二VH链是人源化的。

[0483] 12. 根据方面8至11中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第一VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸:

[0484] EVQLVESGGVTVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRF
TVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:16);

[0485] EVQLVESGGVTVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGQTYYPDSVKGRF
TVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:11); 或

[0486] EVQLVESGGVTVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGSTYYPDSVKGRF
TVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:12)。

[0487] 13. 根据方面2至12中任一项所述的双特异性抗体分子,其中:

[0488] (i) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE (SEQ ID NO:26),

[0489] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS (SEQ ID NO:6), 并且

[0490] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT (SEQ ID NO:7); 并且

[0491] 所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13),

[0492] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGNTYYPDSVKG (SEQ ID NO:29), 并且

- [0493] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15),或
- [0494] (ii)所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGQTYLE (SEQ ID NO:27),
- [0495] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS (SEQ ID NO:6),并且
- [0496] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT (SEQ ID NO:7);并且
- [0497] 所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13),
- [0498] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGQTYYPDSVKG (SEQ ID NO:30),并且
- [0499] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15),或
- [0500] (iii)所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGSTYLE (SEQ ID NO:28),
- [0501] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS (SEQ ID NO:6),并且
- [0502] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT (SEQ ID NO:7);并且
- [0503] 所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13),
- [0504] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGSTYYPDSVKG (SEQ ID NO:31),并且
- [0505] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15),或
- [0506] (iv)所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE (SEQ ID NO:26),
- [0507] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS (SEQ ID NO:6),并且
- [0508] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT (SEQ ID NO:7);并且
- [0509] 所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13),
- [0510] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGQTYYPDSVKG (SEQ ID NO:30),并且
- [0511] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15),或
- [0512] (v)所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE (SEQ ID NO:26),
- [0513] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS (SEQ ID NO:6),并且
- [0514] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT (SEQ ID NO:7);并且
- [0515] 所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13),
- [0516] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGSTYYPDSVKG (SEQ ID NO:31),并且
- [0517] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15),或
- [0518] (vi)所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGQTYLE (SEQ ID NO:27),
- [0519] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS (SEQ ID NO:6),并且
- [0520] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT (SEQ ID NO:7);并且
- [0521] 所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13),
- [0522] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGNTYYPDSVKG (SEQ ID NO:29),并且
- [0523] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15),或
- [0524] (vii)所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGSTYLE (SEQ ID NO:28),
- [0525] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS (SEQ ID NO:6),并且
- [0526] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT (SEQ ID NO:7);并且
- [0527] 所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13),
- [0528] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGNTYYPDSVKG (SEQ ID NO:29),并且
- [0529] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15),或
- [0530] (viii)所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGSTYLE (SEQ ID NO:28),
- [0531] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS (SEQ ID NO:6),并且

- [0532] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT (SEQ ID NO:7);并且
- [0533] 所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13),
- [0534] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGQTYYPDSVKG (SEQ ID NO:30),并且
- [0535] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15),或
- [0536] (ix)所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE (SEQ ID NO:26),
- [0537] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS (SEQ ID NO:6),并且
- [0538] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT (SEQ ID NO:7);并且
- [0539] 所述HCDR1包含序列:RYTMS (SEQ ID NO:13),
- [0540] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGQTYYPDSVKG (SEQ ID NO:30),并且
- [0541] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15)。
- [0542] 14.根据前述方面中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链源自结合所述TAA的单特异性抗体分子,并且其中当与所述轻链之一配对时,所述双特异性抗体分子对所述TAA的亲和力比所述VH链所来源的单特异性抗体分子对所述TAA的亲和力低至少2倍。
- [0543] 15.根据前述方面中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述TAA是CD47。
- [0544] 16.根据方面15所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链的抗原结合位点包含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR 1-3:
- [0545] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRV TITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTLTVTVSS (SEQ ID NO:17)。
- [0546] 17.根据方面15或16所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含含有序列NYNMH (SEQ ID NO:18)的HCDR1、含有序列TIYPGNDDTSYNQKFKD (SEQ ID NO:19)的HCDR2以及含有序列GGYRAMDY (SEQ ID NO:20)的HCDR3。
- [0547] 18.根据方面15至16中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:
- [0548] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRV TITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTLTVTVSS (SEQ ID NO:17),
- [0549] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFTNYNMHWVRQAPGKGLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRV TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTLTVTVSS (SEQ ID NO:21),
- [0550] EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYFTFTNYNMHWVRQMPGKGLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYRAMDYWGQGLT TVTVSS (SEQ ID NO:22),或
- [0551] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYNMHWVRQAPGQGLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRF VFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLT TVTVSS (SEQ ID NO:23)。
- [0552] 19.根据方面1至14中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述TAA是PD-L1。
- [0553] 20.根据方面19所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链的抗原结合位点包含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR 1-3:
- [0554] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLT TVTVSS (SEQ ID NO:32)。
- [0555] 21.根据方面19或20所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链的抗原结合位点包含含有序列DSWIH (SEQ ID NO:33)的HCDR1、含有序列WISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:

34)的HCDR2以及含有序列RHWPGGFDY (SEQ ID NO:35)的HCDR3。

[0556] 22.根据方面19至21中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

[0557] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:32)。

[0558] 23.根据方面1至14中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述TAA是EGFR。

[0559] 24.根据方面23所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链的抗原结合位点包含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR 1-3:QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWI RQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDYNPSLKS RVTVMSVDTSKNQFSLKVN SVTAADTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:36)。

[0560] 25.根据方面23或24所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链的抗原结合位点包含含有序列SGDYYWS (SEQ ID NO:37)的HCDR1、含有序列YIYYSGSTDYNPSLKS (SEQ ID NO:38)的HCDR2以及含有序列VSIFGVGTFDY (SEQ ID NO:39)的HCDR3。

[0561] 26.根据方面24至25中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

[0562] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDYNPSLKS RVTVMSVDTSKNQFSLKVN SVTAADTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:36)。

[0563] 27.根据方面23所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链的抗原结合位点包含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR 1-3:

[0564] QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWGGNTDYNTPTTSRLS INKDNKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:40)。

[0565] 28.根据方面26或27所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含含有序列NYGVH (SEQ ID NO:41)的HCDR1、含有序列VIWGGNTDYNTPTTS (SEQ ID NO:42)的HCDR2以及含有序列ALTYDYEFAY (SEQ ID NO:43)的HCDR3。

[0566] 29.根据方面26至28中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

[0567] QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWGGNTDYNTPTTSRLS INKDNKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:40)。

[0568] 30.根据方面1所述的双特异性抗体分子,其中所述两条VL链的抗原结合位点包含具有以下序列的VL链的轻链CDR 1-3 (LCDR 1-3):

[0569] DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFS GVPDRFS GSGSGTDFTLKISRLEAEDLG VYYCFQGSHFPRTFGGTRLEIK (SEQ ID NO:25)。

[0570] 31.根据方面30所述的双特异性抗体分子,其中:

[0571] (i)所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE (SEQ ID NO:44);

[0572] (ii)所述LCDR2包含序列:KISRLEA (SEQ ID NO:45);并且

[0573] (iii)所述LCDR3包含序列:FQGSHPRT (SEQ ID NO:46)。

[0574] 32.根据方面30或31所述的双特异性抗体分子,其中所述VL链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

[0575] DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFS GVPDRFS

GS GSGTDFTLKISRLEAEDLG VYYCFQGSHPRTFGGGTRLEIK (SEQ ID NO:25)。

[0576] 33. 根据方面30至32中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述第一VH链的抗原结合位点包含具有以下序列的VH链的重链CDR 1-3 (HCDR 1-3):

[0577] EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSY TMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPD SVKGRF TISRDN AKNNLYLQMSSLRSED TALYYCARYRYEAWFASWGQGLTVTVSA。

[0578] 34. 根据方面33所述的双特异性抗体分子, 其中:

[0579] (i) 所述HCDR1包含序列: SYTMS;

[0580] (ii) 所述HCDR2包含序列: TISSGGGNTYYPD SVKG; 并且

[0581] (iii) 所述HCDR3包含序列: YYRYEAWFAS。

[0582] 35. 根据方面30至34中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述第一VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸:

[0583] EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSY TMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPD SVKGRF TISRDN AKNNLYLQMSSLRSED TALYYCARYRYEAWFASWGQGLTVTVSA。

[0584] 36. 根据方面30至32中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述第一VH链的抗原结合位点包含具有以下序列的VH链的重链CDR 1-3 (HCDR 1-3):

[0585] EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSCAASGFTFSRY TMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGX²TYYPD SVKGR FTVSRDN AMSSLYLQMSSLRSED TALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:9), 其中X²是N、Q或S。

[0586] 37. 根据方面36所述的双特异性抗体分子, 其中:

[0587] (i) 所述HCDR1包含序列: RYTMS (SEQ ID NO:13);

[0588] (ii) 所述HCDR2包含序列: TISSGGG X²TYYPD SVKG (SEQ ID NO:14); 并且

[0589] (iii) 所述HCDR3包含序列: YGAGDAWFAY (SEQ ID NO:15);

[0590] 其中X²是N、Q或S。

[0591] 38. 根据方面36至37中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述第一VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸:

[0592] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRY TMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGNTYYPD SVKGRF TVSRDN SKNSLYLQMNSLRTE D TALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:16);

[0593] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRY TMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGQTYYPD SVKGRF TVSRDN SKNSLYLQMNSLRTE D TALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:11); 或

[0594] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRY TMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGSTYYPD SVKGRF TVSRDN SKNSLYLQMNSLRTE D TALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:12)。

[0595] 39. 根据方面1至7中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述第一VH链的抗原结合位点包含具有以下序列的VH链的重链CDR 1-3 (HCDR 1-3):

[0596] EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSY TMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPD SVKGRF TISRDN AKNNLYLQMSSLRSED TALYYCARYRYEAWFASWGQGLTVTVSA。

[0597] 40. 根据方面39所述的双特异性抗体分子, 其中:

[0598] (i) 所述HCDR1包含序列: SYTMS;

[0599] (ii) 所述HCDR2包含序列: TISSGGGNTYYPD SVKG; 并且

[0600] (iii) 所述HCDR3包含序列: YYRYEAWFAS。

[0601] 41. 根据方面39至40中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第一VH链包含以下序列或与以下序列至少90%相同的氨基酸:

[0602] EVILVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTIYPDSVKGRF
TISRDNANKNNLYLQMSSLRSEDTALYYCARYRYEAWFASWGQGLTVTVSA。

[0603] 42. 根据方面30至41中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链源自结合所述TAA的单特异性抗体分子,并且其中当与所述轻链之一配对时,所述双特异性抗体分子对所述TAA的亲和力比所述VH链所来源的单特异性抗体分子对所述TAA的亲和力低至少2倍。

[0604] 43. 根据方面30至42中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述TAA是CD47。

[0605] 44. 根据方面43所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR 1-3:

[0606] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRV
TITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:17)。

[0607] 45. 根据方面44所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含含有序列NYNMH (SEQ ID NO:18)的HCDR1、含有序列TIYPGNDDTSYNQKFKD (SEQ ID NO:19)的HCDR2以及含有序列GGYRAMDY (SEQ ID NO:20)的HCDR3。

[0608] 46. 根据方面44或45所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含以下氨基酸序列或与以下序列至少90%相同的氨基酸序列:

[0609] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRV
TITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:17),

[0610] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAASGYTFTNYNMHWVRQAPGKGLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRV
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:21),

[0611] EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTNYNMHWVRQMPGKGLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDQV
TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:22),或

[0612] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQGLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRF
VFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:23)。

[0613] 47. 根据方面30至42中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述TAA是PD-L1。

[0614] 48. 根据方面47所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR 1-3:

[0615] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRF
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:32)。

[0616] 49. 根据方面47或48所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含含有序列DSWIH (SEQ ID NO:33)的HCDR1、含有序列WISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:34)的HCDR2以及含有序列RHWPGGFDY (SEQ ID NO:35)的HCDR3。

[0617] 50. 根据方面48至49中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

[0618] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRF
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:32)。

[0619] 51. 根据方面30至42中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述TAA是EGFR。

[0620] 52. 根据方面51所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链的抗原结合位点包含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR 1-3:QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDYNPSLKS RVTMSVDTSKNQFSLKVN SVTAADTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:36)。

[0621] 53. 根据方面52所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含含有序列SGDYYWS (SEQ ID NO:37)的HCDR1、含有序列YIYYSGSTDYNPSLKS (SEQ ID NO:38)的HCDR2以及含有序列VSIFGVGTFDY (SEQ ID NO:39)的HCDR3。

[0622] 54. 根据方面52至53中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

[0623] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDYNPSLKS RVTMSVDTSKNQFSLKVN SVTAADTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:36)。

[0624] 55. 根据方面51所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链的抗原结合位点包含含有以下氨基酸序列的VH链的HCDR 1-3:QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGT LVTSA (SEQ ID NO:40)。

[0625] 56. 根据方面52所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链的抗原结合位点包含含有序列NYGVH (SEQ ID NO:41)的HCDR1、含有序列VIWSGGNTDYNTPFTS (SEQ ID NO:42)的HCDR2以及含有序列ALTYDYEFAY (SEQ ID NO:43)的HCDR3。

[0626] 57. 根据方面52至53中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述第二VH链包含以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

[0627] QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGT LVTVSA (SEQ ID NO:40)。

[0628] 58. 根据前述方面中任一项所述的双特异性抗体分子,其中与对表达MDR1或所述TAA的细胞的亲和力相比,所述抗体对表达MDR1和所述TAA二者的细胞的亲和力大于两倍。

[0629] 59. 根据前述方面中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述抗体能够提高癌细胞对采用化学治疗剂治疗的敏感性,其中当与所述抗体共同施用所述化学治疗剂的半数抑制浓度(IC50)比当与如下抗MDR1抗体15D3共同施用所述化学治疗剂的IC50低至少2倍,所述抗MDR1抗体15D3包含具有以下序列的VH链:

[0630] EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRF TVSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDTALYYCARYGAGDAWFAYWGQGT LVTVSA (SEQ ID NO:24);以及

[0631] 具有以下序列的VL链:

[0632] DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRLEAEDLGYYCFQGSHFPRTFGGGTRLEIK (SEQ ID NO:25),其中任选地,所述IC50在体外测量。

[0633] 60. 根据方面59所述的双特异性抗体分子,其中所述癌细胞是NALM6 ADR细胞,并且任选地其中所述化学治疗剂包括紫杉醇、秋水仙碱、维拉帕米、长春碱、拓扑替康、阿霉素、柔红霉素、依托泊苷或尼洛替尼。

[0634] 61. 根据前述方面中任一项所述的双特异性抗体分子,其中所述抗体在与表达MDR1的细胞结合时抑制通过所述MDR1的外排。

[0635] 62. 根据前述方面中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述抗体与MDR1结合的亲和力比如下抗MDR1抗体15D3与MDR1结合的亲和力低至少2倍, 所述抗MDR1抗体15D3包含具有以下序列的VH链:

[0636] EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPD SVKGRF TVSRDNAMSSLYLQMSSLRSED TALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:24); 以及

[0637] 具有以下序列的VL链:

[0638] DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFS GVPDRFS GSGSGTDFTLKISRLEAEDLG VYYCFQGSHPRTFGGGTRLEIK (SEQ ID NO:25)。

[0639] 63. 根据前述方面中任一项所述的双特异性抗体分子, 其中所述抗体包含Fc结构域, 所述Fc结构域已被修饰以降低或消除所述抗体与一种或多种Fc γ 受体的结合。

[0640] 64. 根据前述方面中任一项所述的双特异性抗体分子, 所述双特异性抗体分子用于治疗受试者的癌症的方法中, 所述方法包括向所述受试者施用所述抗体。

[0641] 65. 根据方面64所述的双特异性抗体分子, 其中所述方法包括将所述抗体与至少一种另外的活性剂组合施用, 其中所述至少一种另外的活性剂包括化学治疗剂、多药耐药转运蛋白的抑制剂、免疫治疗剂或其组合。

[0642] 66. 根据方面65所述的双特异性抗体分子, 其中所述至少一种另外的活性剂是化学治疗剂, 任选地其中所述化学治疗剂是泰素紫杉醇 (taxol)、长春花生物碱或蒽环类。

[0643] 67. 一种用于治疗受试者的癌症的方法中的化学治疗剂, 所述方法包括将所述化学治疗剂与根据方面1至63中任一项所述的抗体组合施用至所述受试者, 任选地其中所述化学治疗剂是泰素紫杉醇、长春花生物碱或蒽环类。

[0644] 68. 根据方面67所述的用于所述用途的双特异性抗体分子, 其中所述所治疗的受试者患有已被确定为对所述化学治疗剂具有耐药性的癌症。

[0645] 69. 一种治疗受试者的癌症的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据方面1至63中任一项所述的双特异性抗体分子。

[0646] 70. 根据方面69所述的方法, 其中所述方法包括将所述双特异性抗体分子与至少一种另外的活性剂组合施用, 其中所述至少一种另外的活性剂包括化学治疗剂、多药耐药转运蛋白的抑制剂、免疫治疗剂或其组合。

[0647] 71. 根据方面70所述的方法, 其中所述至少一种另外的活性剂是化学治疗剂, 任选地其中所述化学治疗剂是泰素紫杉醇、长春花生物碱或蒽环类。

[0648] 72. 根据方面71所述的方法, 其中所述所治疗的受试者患有已被确定为对用所述化学治疗剂治疗具有耐药性的癌症, 其中所述化学治疗剂任选地包括紫杉醇、秋水仙碱、维拉帕米、长春碱、拓扑替康、阿霉素、柔红霉素、依托泊苷或尼洛替尼。

[0649] 73. 一种抗体, 所述抗体包含:

[0650] 可变轻 (VL) 链, 所述可变轻链包含具有以下序列的VL链的轻链CDR (LCDR):

[0651] DVLMTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGX¹TYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK,

[0652] 其中X¹是N、Q或S; 以及

[0653] 可变重 (VH) 链, 所述可变重链包含具有以下序列的VH链的重链CDR (HCDR):

[0654] EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGX²TYYPDSVKGR

FTVSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS,

[0655] 其中 X^2 是N、Q或S;或

[0656] 一种抗体,所述抗体包含:

[0657] 可变轻(VL)链,所述可变轻链包含具有以下序列的VL链的轻链CDR(LCDR):

[0658] DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRLEAEDLGYYCFQGSHPRTFGGGTRLEIK(SEQ ID NO:25);以及

[0659] 可变重(VH)链,所述可变重链包含具有以下序列的VH链的重链CDR(HCDR):

[0660] EVILVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSYTMWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRF
TISRDNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYRYEAWFASWGQGLTVTVSA。

[0661] 74.根据方面73所述的抗体,其中:

[0662] 所述VL链包含具有以下序列的VL链的LCDR 1-3:

[0663] DVLMTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK;并且

[0664] 所述VH链包含具有以下序列的VH链的HCDR 1-3:

[0665] EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSAASGFTFSRYTMWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRF
TVSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS,或

[0666] 所述VL链包含具有以下序列的VL链的LCDR 1-3:

[0667] DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGQTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFS
GSGAGTDFTLKISRVEAEDVGYYCFQASHFPRTFGGQTKLEIK;并且

[0668] 所述VH链包含具有以下序列的VH链的HCDR 1-3:

[0669] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSAAAGFTFSRYTMWVRQAPGKGLEWVATISSGGGQTYYPDSVKGRF
TVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS,或

[0670] 所述VL链包含具有以下序列的VL链的LCDR 1-3:

[0671] DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGQTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFS
GSGAGTDFTLKISRVEAEDVGYYCFQASHFPRTFGGQTKLEIK;并且

[0672] 所述VH链包含具有以下序列的VH链的LCDR 1-3:

[0673] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSAAAGFTFSRYTMWVRQAPGKGLEWVATISSGGGSTYYPDSVKGRF
TVSRDNSKNSLYLQMNSLRTEALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSS。

[0674] 75.根据方面74所述的抗体,其中:

[0675] 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE、RSSQSIVHSTGQTYLE或
RSSQSIVHSTGSTYLE,

[0676] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且

[0677] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT。

[0678] 76.根据方面75所述的抗体,其中:

[0679] (i)所述HCDR1包含序列:RYTMS;

[0680] (ii)所述HCDR2包含序列:TISSGGG X^2 TYYPDSVKG;并且

[0681] (iii)所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY;

[0682] 其中 X^2 是N、Q或S。

[0683] 77.根据方面74-75中任一项所述的抗体,其中:

- [0684] (i) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE,
[0685] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且
[0686] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且
[0687] 所述HCDR1包含序列:RYTMS,
[0688] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGNTYYPDSVKG,并且
[0689] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY,或
[0690] (ii) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGQTYLE,
[0691] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且
[0692] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且
[0693] 所述HCDR1包含序列:RYTMS,
[0694] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGQTYYPDSVKG,并且
[0695] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY,或
[0696] (iii) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGSTYLE,
[0697] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且
[0698] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且
[0699] 所述HCDR1包含序列:RYTMS,
[0700] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGSTYYPDSVKG,并且
[0701] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY,或
[0702] (iv) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE,
[0703] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且
[0704] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且
[0705] 所述HCDR1包含序列:RYTMS,
[0706] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGQTYYPDSVKG,并且
[0707] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY,或
[0708] (v) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE,
[0709] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且
[0710] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且
[0711] 所述HCDR1包含序列:RYTMS,
[0712] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGSTYYPDSVKG,并且
[0713] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY,或
[0714] (vi) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGQTYLE,
[0715] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且
[0716] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且
[0717] 所述HCDR1包含序列:RYTMS,
[0718] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGNTYYPDSVKG,并且
[0719] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY,或
[0720] (vii) 所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGSTYLE,
[0721] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且
[0722] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且

- [0723] 所述HCDR1包含序列:RYTMS,
- [0724] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGNTYYPDSVKG,并且
- [0725] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY,或
- [0726] (viii)所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGSTYLE,
- [0727] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且
- [0728] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且
- [0729] 所述HCDR1包含序列:RYTMS,
- [0730] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGQTYYPDSVKG,并且
- [0731] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY,或
- [0732] (ix)所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE,
- [0733] 所述LCDR2包含序列:KISNRFS,并且
- [0734] 所述LCDR3包含序列:FQASHFPRT;并且
- [0735] 所述HCDR1包含序列:RYTMS,
- [0736] 所述HCDR2包含序列:TISSGGGQTYYPDSVKG,并且
- [0737] 所述HCDR3包含序列:YGAGDAWFAY。
- [0738] 78.根据方面73至77中任一项所述的抗体,其中所述抗体的VL链包含以下氨基酸序列或包含与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:
- [0739] DVLMTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGX¹TYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK,以及
- [0740] 其中所述抗体的VH链包含以下氨基酸序列或包含与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:
- [0741] EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGX²TYYPDSVKGRFTVSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYGAGDAWFAYWGQGTLLTVSS。
- [0742] 79.根据方面73所述的抗体,其中所述抗体包含:
- [0743] 可变轻(VL)链,所述可变轻链包含具有以下序列的VL链的轻链CDR1-3(LCDR):
- [0744] DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRLEAEDLGVYYCFQGSHFPRTFGGGTRLEIK(SEQ ID NO:25);以及
- [0745] 可变重(VH)链,所述可变重链包含具有以下序列的VH链的重链CDR1-3(HCDR):
- [0746] EVILVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSRYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRFTISRDNAMSSLYLQMSSLRSEDALYYCARYRYEAWFASWGQGTLLTVSA。
- [0747] 80.根据方面79所述的抗体,其中:
- [0748] (i)所述LCDR1包含序列:RSSQSIVHSTGNTYLE(SEQ ID NO:44);
- [0749] (ii)所述LCDR2包含序列:KISRLEA(SEQ ID NO:45);并且
- [0750] (iii)所述LCDR3包含序列:FQGSHPRT(SEQ ID NO:46);并且
- [0751] (i)所述HCDR1包含序列:SYTMS;
- [0752] (ii)所述HCDR2包含序列:TISSGGGNTYYPDSVKG;并且
- [0753] (iii)所述HCDR3包含序列:YYRYEAWFAS。
- [0754] 81.根据方面79或80所述的抗体,其中所述抗体的VL链包含以下氨基酸序列或包含与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHST

GNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRLEAEDLGVIYCFQGSHFPRTFGGGTRL EIK (SEQ ID NO:25);并且其中所述抗体的VH链包含以下氨基酸序列或包含与以下氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:EVILVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEW VATISSGGGNTYYPDSVKGRFTISRDNANKNNLYLQMSSLRSEDALYYCARYRYEAWFASWGQGLTVTVSA。

[0755] 82.根据方面73至81中任一项所述的抗体,其中所述抗体是与MDR-1特异性结合的单特异性二价抗体。

[0756] 83.根据方面73至81中任一项所述的抗体,其中所述抗体是包含作为共同轻链的VL链的双特异性抗体。

[0757] 84.根据方面83所述的抗体,其中所述双特异性抗体包含MDR-1结合结构域和肿瘤相关抗原(TAA)结合结构域,其中所述MDR-1结合结构域和所述TAA结合结构域中的每个包含所述VL链的LCDR 1-3。

[0758] 85.根据方面84所述的抗体,其中所述TAA是CD47,并且其中所述TAA结合结构域包含具有以下序列的VH链的HCDR 1-3:

[0759] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRVTITADTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS。

[0760] 86.根据方面85所述的抗体,其中所述CD47结合结构域的VH链包含含有序列NYNMH的HCDR1、含有序列TIYPGNDDTSYNQKFKD的HCDR2以及含有序列GGYRAMDY的HCDR3。

[0761] 87.根据方面84所述的抗体,其中所述TAA是PD-L1,并且其中所述PD-L1结合结构域包含具有以下序列的VH链的HCDR 1-3:EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS AASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:32)。

[0762] 88.根据方面87所述的抗体,其中所述PD-L1结合结构域的VH链包含含有序列DSWIH (SEQ ID NO:33)的HCDR1、含有序列WISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:34)的HCDR2以及含有序列RHWPGGFDY (SEQ ID NO:35)的HCDR3。

[0763] 89.根据方面84所述的抗体,其中所述TAA是EGFR,并且其中所述EGFR结合结构域包含具有以下序列的VH链的HCDR:QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGL EWIGYIYYSGSTDYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKVNSTAAADTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:36)。

[0764] 90.根据方面89所述的抗体,其中所述EGFR结合结构域的VH链包含含有序列SGDYYWS (SEQ ID NO:37)的HCDR1、含有序列YIYYSGSTDYNPSLKS (SEQ ID NO:38)的HCDR2以及含有序列VSIFGVGTFDY (SEQ ID NO:39)的HCDR3。

[0765] 91.根据方面84所述的抗体,其中所述TAA是EGFR,并且其中所述EGFR结合结构域包含具有以下序列的VH链的HCDR:QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKLEW LGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:40)。

[0766] 92.根据方面91所述的抗体,其中所述EGFR结合结构域的VH链包含含有序列NYGVH (SEQ ID NO:41)的HCDR1、含有序列VIWSSGNTDYNTPFTS (SEQ ID NO:42)的HCDR2以及含有序列ALTYDYEFAY (SEQ ID NO:43)的HCDR3。

[0767] 93.一种抗体,所述抗体包含:

[0768] 可变轻(VL)链,所述可变轻链包含具有以下序列的VL链的轻链CDR(LCDR):

[0769] DVLMTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGX¹TYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK,

[0770] 其中X¹是N、Q或S;或

[0771] DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFS GSGSGTDFTLKISRLEAEDLGVYYCFQGSHPRTFGGGTRLEIK (SEQ ID NO:25);以及

[0772] 可变重(VH)链,所述可变重链包含具有以下序列的VH链的重链CDR(HCDR):

[0773] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFCDRV TITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS;或

[0774] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:32);或

[0775] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISGDIYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYSGSTDYNPSLKS RVTMSVDTSKNQFSLKVNSTAAEDTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:36);或

[0776] QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLS INKDNSKSNQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:40)。

[0777] 94.根据方面93所述的抗体,其中所述VL链包含:(i)含有序列RSSQSIVHSTGX¹TYLE (SEQ ID NO:5)的LCDR1;(ii)含有序列KISNRF (SEQ ID NO:6)的LCDR2;以及(iii)含有序列FQASHFPRT (SEQ ID NO:7)的LCDR3,其中X¹是N、Q或S并且其中所述VH链包含:

[0778] (i)含有序列NYNMH的HCDR1、含有序列TIYPGNDDTSYNQKFCD的HCDR2以及含有序列GGYRAMDY的HCDR3;或

[0779] (ii)含有序列DSWIH (SEQ ID NO:33)的HCDR1、含有序列WISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:34)的HCDR2以及含有序列RHWPGGFDY (SEQ ID NO:35)的HCDR3;或

[0780] (iii)含有序列SGDIYWS (SEQ ID NO:37)的HCDR1、含有序列YIYSGSTDYNPSLKS (SEQ ID NO:38)的HCDR2以及含有序列VSIFGVGTFDY (SEQ ID NO:39)的HCDR3;或

[0781] (iv)含有序列NYGVH (SEQ ID NO:41)的HCDR1、含有序列VIWSGGNTDYNTPFTS (SEQ ID NO:42)的HCDR2以及含有序列ALTYDYEFAY (SEQ ID NO:43)的HCDR3。

[0782] 95.根据方面93所述的抗体,其中所述VL链包含:(i)含有序列RSSQSIVHSTGNTYLE (SEQ ID NO:44)的LCDR1;(ii)含有序列KISRLEA (SEQ ID NO:45)的LCDR2;以及(iii)含有序列FQGSHPRT (SEQ ID NO:46)的LCDR3,并且其中所述VH链包含:

[0783] 含有序列NYNMH的HCDR1、含有序列TIYPGNDDTSYNQKFCD的HCDR2以及含有序列GGYRAMDY的HCDR3;或

[0784] 含有序列DSWIH (SEQ ID NO:33)的HCDR1、含有序列WISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:34)的HCDR2以及含有序列RHWPGGFDY (SEQ ID NO:35)的HCDR3;或

[0785] 含有序列SGDIYWS (SEQ ID NO:37)的HCDR1、含有序列YIYSGSTDYNPSLKS (SEQ ID NO:38)的HCDR2以及含有序列VSIFGVGTFDY (SEQ ID NO:39)的HCDR3;或

[0786] 含有序列NYGVH (SEQ ID NO:41)的HCDR1、含有序列VIWSGGNTDYNTPFTS (SEQ ID NO:42)的HCDR2以及含有序列ALTYDYEFAY (SEQ ID NO:43)的HCDR3。

[0787] 96.根据方面93至95中任一项所述的抗体,其中所述抗体是双特异性抗体。

[0788] 97.根据方面1至96中任一项所述的抗体,其中所述抗体是人源化抗体或包含人Fc

结构域的嵌合抗体。

[0789] 98. 根据方面97所述的抗体, 所述抗体包含免疫球蛋白G1 (IgG1) Fc结构域。

[0790] 99. 根据方面1至98中任一项所述的抗体, 其中第一VH链与第一Fc结构域融合, 并且第二VH链与第二Fc结构域融合。

[0791] 100. 根据方面99所述的抗体, 其中所述Fc结构域包含经修饰的CH3结构域, 所述经修饰的CH3结构域优先形成包含所述第一VH链和所述第二VH链的异二聚体。

[0792] 101. 根据方面100所述的抗体, 其中所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域是人免疫球蛋白G1 (IgG1) Fc结构域。

[0793] 102. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含:

[0794] 根据前述方面中任一项所述的抗体; 以及

[0795] 药学上可接受的赋形剂。

[0796] 103. 根据方面102所述的药物组合物, 所述药物组合物还包含至少一种另外的活性剂。

[0797] 104. 根据方面103所述的药物组合物, 其中所述至少一种另外的活性剂包括化学治疗剂。

[0798] 105. 根据方面104所述的药物组合物, 其中所述化学治疗剂是泰素紫杉醇、长春花生物碱或蒽环类。

[0799] 106. 根据方面103至105中任一项所述的药物组合物, 其中所述至少一种另外的活性剂包括多药耐药转运蛋白的抑制剂。

[0800] 107. 根据方面103所述的药物组合物, 其中所述至少一种另外的活性剂包括免疫治疗剂。

[0801] 108. 一种或多种核酸, 所述一种或多种核酸包含编码根据前述方面中任一项所述的抗体的一种或多种序列。

[0802] 109. 根据方面108所述的一种或多种核酸, 其中所述一种或多种序列与启动子可操作地连接。

[0803] 110. 一种或多种重组表达载体, 所述一种或多种重组表达载体包含根据方面108或109所述的一种或多种核酸。

[0804] 111. 一种用根据方面110所述的一种或多种重组表达载体进行基因修饰的哺乳动物细胞。

[0805] 112. 根据方面111所述的细胞, 其中所述细胞是免疫细胞。

[0806] 113. 一种试剂盒, 所述试剂盒包含:

[0807] 根据方面1至63和73至101中任一项所述的抗体或编码所述抗体的核酸; 以及

[0808] 至少一种另外的活性剂。

[0809] 114. 根据方面113所述的试剂盒, 其中所述至少一种另外的活性剂包括化学治疗剂、多药耐药转运蛋白的抑制剂、免疫治疗剂或其组合。

[0810] 115. 一种杀伤癌细胞的方法, 所述方法包括使所述癌细胞与根据方面1至63和73至101中任一项所述的抗体接触。

[0811] 116. 根据方面115所述的方法, 所述方法包括施用至少一种另外的活性剂。

[0812] 117. 根据方面116所述的方法, 其中所述至少一种另外的活性剂包括化学治疗剂。

- [0813] 118. 根据方面116或117所述的方法, 其中与仅接触所述至少一种另外的活性剂相比, 所述方法使对所述癌细胞的杀伤增加至少5%。
- [0814] 119. 根据方面115至118中任一项所述的方法, 其中所述癌细胞是耐药性癌细胞。
- [0815] 120. 一种治疗受试者的癌症的方法, 所述方法包括向所述受试者施用根据方面1至63和73至101中任一项所述的抗体或根据方面102至107中任一项所述的药物组合物。
- [0816] 121. 根据方面120所述的方法, 其中所述受试者先前已针对所述癌症进行治疗。
- [0817] 122. 根据方面120或121所述的方法, 其中所述癌症是耐药性的或多药耐药性的。
- [0818] 123. 根据方面122所述的方法, 其中所述癌症对化学治疗剂具有耐药性。
- [0819] 124. 根据方面122所述的方法, 其中所述癌症对免疫治疗剂具有耐药性。
- [0820] 125. 根据方面120至122中任一项所述的方法, 其中所述癌症对多药耐药转运蛋白的抑制剂具有耐药性。
- [0821] 126. 根据方面120至125中任一项所述的方法, 所述方法还包括向所述受试者施用至少一种另外的活性剂。
- [0822] 127. 根据方面126所述的方法, 其中所述至少一种另外的活性剂包括化学治疗剂。
- [0823] 128. 根据方面127所述的方法, 其中所述化学治疗剂是泰素紫杉醇、长春花生物碱或蒽环类。
- [0824] 129. 根据方面126至128中任一项所述的方法, 其中所述至少一种另外的活性剂包括多药耐药转运蛋白的抑制剂。
- [0825] 130. 根据方面126至128中任一项所述的方法, 其中所述至少一种另外的活性剂包括免疫治疗剂。
- [0826] 131. 根据方面126至128中任一项所述的方法, 其中与仅用所述至少一种另外的活性剂治疗相比, 所述方法增加所述至少一种另外的活性剂的有效性。
- [0827] 132. 根据方面131所述的方法, 其中所述增加的有效性包括癌细胞杀伤的至少5%增加。
- [0828] 133. 根据方面120至132中任一项所述的方法, 所述方法还包括分析所述癌症的样品以确定所述癌症是否表达高于预定阈值的MDR1、高于预定阈值的肿瘤相关抗原 (TAA) 或二者, 其中所述TAA任选地包括CD47。
- [0829] 134. 根据方面133所述的方法, 其中所述预定阈值对应于由参考细胞表达的MDR1和/或TAA的水平。
- [0830] 135. 根据方面134所述的方法, 其中MDR1和/或TAA已经在所述参考细胞中被敲除或敲低。
- [0831] 136. 根据方面134或135所述的方法, 其中所述参考细胞是非癌性细胞。
- [0832] 137. 根据方面134所述的方法, 其中所述非癌性细胞表达正常水平的MDR1和/或TAA。
- [0833] 138. 根据方面120至137中任一项所述的方法, 其中如果所述癌症表达等于或高于所述预定阈值的MDR1和TAA, 则向所述受试者施用所述多特异性抗体, 并且如果所述癌症表达低于所述预定阈值的MDR1或TAA, 则用常规疗法治疗所述受试者而不施用所述多特异性抗体。
- [0834] 139. 一种产生特异性结合表达多药耐药蛋白1 (MDR1) 和肿瘤相关抗原 (TAA) 二者

的细胞的多特异性抗体的方法,其中所述TAA任选地包括CD47、PD-L1或EGFR,所述方法包括:

[0835] 产生包含MDR1结合结构域和TAA结合结构域的多特异性抗体;

[0836] 使表达MDR1和TAA的第一细胞与所述多特异性抗体接触;

[0837] 使表达MDR1或TAA的第二细胞与所述多特异性抗体接触;

[0838] 将所述多特异性抗体与所述第一细胞的结合和所述多特异性抗体与所述第二细胞的结合进行比较以确定结合特异性比率;以及

[0839] 当所述比率高于预定阈值时,鉴定所述多特异性抗体对所述表达MDR1和TAA二者的细胞具有特异性。

[0840] 140.根据方面139所述的方法,其中所述预定阈值大于2:1。

[0841] 141.根据方面139或140所述的方法,其中所述第二细胞表达MDR1而不表达所述TAA,并且所述方法还包括使表达所述TAA而不表达MDR1的第三细胞与所述多特异性抗体接触。

[0842] 142.根据方面139或140中任一项所述的方法,其中所述方法还包括使所述第一细胞、所述第二细胞和/或所述第三细胞与选自单特异性抗MDR1抗体和单特异性抗TAA抗体的对照抗体接触。

[0843] 143.一种经基因修饰的人细胞系,所述细胞系表达肿瘤相关抗原(TAA),其中所述TAA任选地包括白细胞表面抗原CD47;并且所述细胞系包含外源性核酸,所述外源性核酸包含用于过表达多药耐药蛋白1(MDR1)的编码MDR1的序列。

[0844] 144.根据方面143所述的细胞系,其中所述细胞系是肾细胞系。

[0845] 145.根据方面144所述的细胞系,其中所述细胞系是HEK 293T细胞系。

[0846] 146.一种制备根据方面143至145中任一项所述的细胞系的方法,所述方法包括在足以将所述外源性核酸引入所述细胞中的条件下使表达所述TAA的人细胞与所述外源性核酸接触,以产生表达所述TAA并稳定过表达MDR1的经基因修饰的人细胞;以及

[0847] 在足以产生表达所述TAA和稳定过表达MDR1的经基因修饰的人细胞系的条件下培养所述经基因修饰的人细胞。

[0848] 通过说明的方式而不是通过限制的方式,提供以下实施例。

[0849] 实施例

[0850] 提出以下实施例以向本领域普通技术人员提供如何制备和使用本发明的完整公开和描述,并且不旨在限制诸位发明人视为其发明的范围,也不旨在表示下面的实验是全部或唯一进行的实验。已经努力确保关于所使用的数字(例如量、温度等)的准确性,但是应当考虑一些实验误差和偏差。除非另有指示,否则份数是重量份,分子量是重均分子量,温度是按摄氏度计,并且压力是大气压或接近大气压。

[0851] 分子与细胞生物化学中的一般方法可以在标准教科书中找到,如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版(Sambrook等人,HaRBor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology,第4版(Ausubel等人编辑,John Wiley&Sons 1999);Protein Methods(Bollag等人,John Wiley&Sons 1996);Nonviral Vectors for Gene Therapy(Wagner等人编辑,Academic Press 1999);Viral Vectors(Kaplift&Loewy 编辑,Academic Press 1995);Immunology Methods Manual(I.Lefkovits编辑,Academic

Press 1997);以及Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle&Griffiths, John Wiley&Sons 1998),将其公开内容通过引用并入本文。用于本公开文本中提及或与之相关的方法的试剂、克隆载体、细胞和试剂盒可从以下获得:诸如BioRad、Agilent Technologies、Thermo Fisher Scientific、Sigma-Aldrich、New England Biolabs (NEB)、Takara Bio USA, Inc.等商业供应商,以及贮库例如像Addgene, Inc.、美国典型培养物保藏中心(ATCC)等。

[0852] 实施例1:产生双特异性mAb,其特异性结合至并重新敏化表达Pgp (MDR1) 和CD47二者的细胞而不是具有减少的任一种蛋白质表达或不存在任一种蛋白质表达的细胞

[0853] 本实施例证明了基于如下抗体形式的分子的开发,所述抗体形式可以通过以选择性方式结合EP的胞外结构域而有效地阻断外排,同时还特异性靶向由癌细胞表达的抗原。EP阻断导致重新敏化以及对细胞的杀伤,所述细胞对化学治疗剂具有耐药性或已经对化学治疗剂具有耐药性。在本实施例中,已经构建了双特异性抗体分子,其结合EP的胞外结构域(ECD),从而阻断外排,同时还靶向癌症免疫检查点蛋白。当EP与靶标免疫检查点蛋白共表达时,以下所述的双特异性抗体的施加以选择性方式使细胞对化学治疗剂重新敏化。

[0854] 材料与方法

[0855] 细胞系和细胞活力实验

[0856] 从美国典型培养物保藏中心中获得表达Pgp的HEK 293T、MCF-7、N6ADR和SKNF7细胞系。N6/ADR细胞也称为NALM6/ADR细胞。将所有细胞系和它们所来源的细胞系在37℃和5%CO₂下在加湿的培养箱中(除非另有说明)在补充有高达10%胎牛血清(Sigma)、非必需氨基酸和2mmol/L-谷氨酰胺的RPMI 1640或DMEM中维持。细胞按照所提供时的样子使用或者经修饰以过表达(0x)Pgp或者用慢病毒介导的短发夹RNA敲低(KD)Pgp表达或者通过基本上如所述的CRISPR/Cas介导的敲除技术(Cong, L.等人(2013) Science 339, 819-823)敲除(KO)功能性CD47基因。对于长春新碱和紫杉醇IC₅₀测定,将细胞铺板于正常生长培养基中,并使其粘附过夜。以稀释系列添加紫杉醇或长春新碱(Sigma),并且在0至500μM/L的范围内添加任何调节剂。72h后使用Celltiter-Glo发光细胞活力测定(Promega)测量细胞活力。从多参数曲线分析(GraphPad Prism软件, GraphPad Software, Inc.)计算导致细胞活力的50%抑制的药物浓度(IC₅₀),并且从最少2次重复实验来确定。在所进行的大多数实验中未显示出响应于药物和/或调节剂处理的细胞活力50%降低的细胞系根据定义被认为未达到IC₅₀,并且被列为对于紫杉醇或所研究的药物/调节剂组合具有>1000nmol/L的IC₅₀。

[0857] 还产生了具有所述单克隆抗体(mAb)的稳定表达的重组细胞系。

[0858] 重组DNA技术

[0859] 如Sambrook, J.等人, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989中所述,使用标准方法操纵DNA。根据制造商的说明书使用试剂。有关人免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列的一般信息在以下文献中给出:Kabat, E. A.等人, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, NIH Publication No. 91-3242。抗体链的氨基酸根据以下文献进行编号和提及:Kabat, E. A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1991)。

- [0860] DNA序列确定
- [0861] 通过双链测序确定DNA序列。
- [0862] DNA和蛋白质序列分析和序列数据管理
- [0863] Vector NTI (ThermoFisher) 软件包用于序列定位、分析、注释和说明。
- [0864] 细胞培养技术和抗体产生
- [0865] 标准细胞培养技术如Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. 和 Yamada, K.M. (编辑), John Wiley & Sons, Inc. 中所述来使用。
- [0866] 293&CHO细胞用于mAb、Fab'2、Fab和双特异性mAb的瞬时产生。使用基于聚合物的对Expi293细胞 (A14527, ThermoFisher) 的共转染来表达不同的抗体构建体。按照制造商的建议, 用哺乳动物表达载体使细胞悬浮生长。
- [0867] 为了制备双特异性构建体, 用相应的表达载体以1:1:4的比率 (重链KK: 重链DD: 轻链) 转染细胞。对于标准抗体表达, 使用1:2比率 (重链: 轻链)。
- [0868] 转染后六天, 通过离心收获细胞。详细地, 将每1ml转染的培养物中的1μg总编码DNA稀释至Opti-MEM®培养基 (Life Technologies) 中, 并与Expifectamine试剂 (Life Technologies) 在同一培养基中孵育20min。然后将混合物添加至在37℃下在用空气中8%的CO₂覆盖的情况下以250万个细胞/ml在Expi293®表达培养基 (Life Technologies) 中悬浮生长的Expi293®细胞中。6天后, 通过离心收获含有抗体构建体的培养基。
- [0869] 使用试剂细胞系测试: 结合、外排阻断、细胞对化学治疗剂的增敏
- [0870] 将人胚肾 (HEK) 细胞系HEK 293FT (Life Technologies) 在37℃且5%CO₂孵育下在补充有10%胎牛血清 (HyClone)、2mM GlutaMAX (Life Technologies)、100U/mL青霉素和100g/mL链霉素的杜尔贝克改良的伊格尔培养基 (DMEM) 中维持。
- [0871] 使用优化的PEIPro™转染方案 (Polyplus), 将293T细胞用pLenti-C-Myc-DDK-P2A-Puro质粒中的人P糖蛋白标记的ORF克隆瞬时转染。将DNA和JetPEI®分别在培养基中稀释, 然后轻轻混合约10min。这种混合导致形成转染复合物, 将其直接添加至细胞培养物中。根据制造商的方案, 使用多药耐药直接染料外排测定 (Chemicon) 来测量外排阻断。
- [0872] 靶序列、抗体序列和特异性抗靶标抗体序列的来源
- [0873] pLenti-C-Myc-DDK-P2A-Puro中的也称为多药耐药蛋白1 (MDR1) 的P糖蛋白 (Pgp) (基因ABCB1) (NM_000927) 人标记的ORF克隆是从Origene获得, 抗CD47抗体 (CC2C6, Seiffert M等人 (1999) Blood 94:3633) 是从Biolegend获得, 抗ABCB1 JSB-1 (MAB4120) 是从Millipore获得。
- [0874] 产生稳定的ABCB1过表达 (Ox) 细胞系
- [0875] 为了表征结合和体外功效二者, 开发了稳定过表达ABCB1的细胞系。使用从美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 获得的粘附293T初始细胞。如使用可商购的ABCB1抗体 (Biolegend, 克隆4E3.16) 通过流式细胞术所表征的, 该细胞系在细胞表面以低至中等程度内源性表达ABCB1。使用Polyplus PEIpro试剂用ABCB1转染293T初始细胞。转染后三天, 使用潮霉素B溶液 (Millipore Sigma) 选择细胞。连续潮霉素B选择后十四天, 评价293T细胞的ABCB1细胞表面表达。为了确保未转染的细胞在未来的培养物中不会扩增, 使用FACS Aria I

(BD Biosciences) 进行利用 ABCB1 阳性 293T 细胞的荧光激活细胞分选 (FACS) 的批量分选。扩增批量分选的 293T ABCB1 过表达细胞, 随后再次确认 ABCB1 过表达。类似的方法用于从如本文所述产生的 293T-CD47 敲除细胞产生 ABCB1 过表达细胞。

[0876] 产生稳定的 ABCB1 KD 293T 细胞系

[0877] 为了表征结合和体外功效, 开发了稳定敲低 ABCB1 表达的细胞系。通过用 R8.74 辅助质粒、VSVG 包膜质粒和含有针对 ABCB1 的 shRNA 的 GE Dharmacon GIPZ 慢病毒载体转染, 在 293T 初始细胞中产生慢病毒。然后使用收获的慢病毒来转导粘附 293T 初始细胞。转导后三天, 通过流式细胞术 (Biolegend, 克隆 4E3.16) 评价 293T 转导的细胞的 ABCB1 细胞表面表达。与以低水平内源性表达 ABCB1 的 293T 初始细胞相比, 转导的 293T 细胞没有 ABCB1 表达。除此之外, GIPZ 慢病毒载体还含有 GFP。所有转导的 293T 细胞都呈 GFP+, 且表达减少, 这表明转导是成功的。在随后的传代中, 通过流式细胞术再次证实了 ABCB1 表达的缺乏。

[0878] KO 细胞系的产生

[0879] 为了构建 ABCB1 和 CD47 基因敲除的 HEK293 细胞系, 首先在补充有 10% (v/v) FBS 和谷氨酰胺的 DMEM (杜尔贝克改良的伊格尔培养基, Gibco, 美国纽约州格兰德艾兰) 中培养 HEK293 宿主细胞。将细胞在 37°C 和 5% CO₂ 下在饱和湿度下培育。

[0880] 使用在线 CHOPCHOP web 工具以便选择用于 CRISPR/Cas9、CRISPR/Cpf1 或 TALEN 定向诱变的靶位点, 从而进行 gRNA 的设计。(参见 Kornel Labun 等人, (2016) *Nucleic Acids Research*; 以及 Tessa G. Montague 等人, (2014) *Nucleic Acids Res.* 42:W401-W407)。所有设计的 gRNA 都是化学合成的 (ThermoFisher)。

[0881] 根据制造商的方案, 使用 CRISPRMax 试剂 (ThermoFisher) 通过基于脂质的转染进行 293T 细胞的转染。简而言之, 在转染前一天, 将粘附细胞以每孔 0.2×10^5 个细胞铺板于 96 孔板上。在转染当天, 将 GeneArt Platinum Cas9 蛋白、gRNA 和转染试剂的溶液添加至细胞中。转染后 72h, 通过极限稀释方法选择单个细胞后, 在 96 孔板中将细胞继续培养 2 周。随后, 将挑选的克隆传代至 24 孔板, 并根据制造商的方案使用 Guide-it 试剂盒 (Takara) 通过基因型确认进行测试。PCR 扩增每个基因的 CRISPR 靶位点周围的基因组区域, 以确定基因编辑是否导致单个分离的克隆中的一个等位基因 (单等位基因) 或两个等位基因 (双等位基因) 上的插入缺失。通过 FACS 测试在两个等位基因中均具有突变的克隆上的目标蛋白质的表达。

[0882] 构建所测试的分子的人-小鼠序列 (人 Fc、小鼠 Fvs)

[0883] 表达载体: 对于抗体表达载体的产生, 将重链和轻链 DNA 序列的可变区亚克隆至框内, 其中将人 IgG1 恒定重链或人 IgG1 κ 恒定轻链预先插入至优化用于在哺乳动物细胞系中表达的相应通用受体表达载体中。将待表达的基因克隆至 pCI-neo 哺乳动物表达载体 (Promega) 中, 所述表达载体使用全长人巨细胞病毒 (CMV) 即时早期启动子以供高水平基因表达。将两条抗体链克隆至两个不同的载体中。

[0884] 来自小鼠 IgG 重链和 κ 轻链的 N 末端信号序列分别用于重链和轻链的分泌性表达。所述信号肽在表达过程中被切割, 留下完整的 N 末端。在 Fab 构建体中, CH1 IgG1 恒定区的 C 末端与 6 $\times$ His 标签融合以促进纯化。

[0885] 对于双特异性抗体载体的产生, IgG1 来源的双特异性分子包含能够与两个不同靶标 Pgp (ABCB1) 和 CD47 特异性结合的至少两个抗原结合部分。所述抗原结合部分是由重链和轻链构成的 Fab 片段, 所述重链和轻链中的每一条都包含可变区和恒定区。鉴定出共同轻

链,其能够配对并实现与Fab抗Pgp (aPgp) 和Fab抗CD47 (aCD47) 二者的可接受的结合;它的使用能够避免LC错配(参见例如,美国专利号8,765,412,将其公开内容通过引用以其整体并入本文)。基于静电转向效应制备双特异性构建体(参见例如,Gunasekeran等人,(2010) Journal of Biological Chemistry 285,19637-19646;将其公开内容通过引用以其整体并入本文)。简而言之,针对靶标的多肽链或半抗体通过CH3结构域的电荷对取代而组装为双特异性抗体:一条重链含有K392D和K409D取代,并且另一条含有E356K和D399K取代。

[0886] 图2提供了双特异性mAb的图,所述双特异性mAb包含含有来自以下的序列的区段:A,15D3;B:5F9(二者均在人IgG1Fc上),以及C:源自MRK16的共同轻链 κ 序列。

[0887] 将先前产生的针对Pgp的单克隆抗体15D3(参见例如,美国专利5,959,084;将其公开内容通过引用以其整体并入本文)和MRK16(Iwahashi等人,Cancer Research 53,1993;将其公开内容通过引用以其整体并入本文)单克隆抗体作为重组工程化抗体克隆至人IgG1/ κ 表达载体中。

[0888] 可获得来自小鼠杂交瘤序列的可变重链和轻链片段,并将其克隆至前导序列和恒定区的相同背景中。

[0889] 将抗CD47(5F9;参见例如,美国专利号9,017,675;将其公开内容通过引用以其整体并入本文)抗体可变重链片段和轻链片段克隆至两个单独载体中的前导序列和恒定区的相同背景中。

[0890] 产生并测试这些以及其他重链和轻链片段的许多组合。大多数测试的构建体没有产生可接受的结合或活性。图8中提供了构建和测试的抗体及其结合和细胞杀伤特性的例子。

[0891] 图8提供了不同双特异性抗体(具有各种人源化或嵌合的重链或轻链组合)的结合和增强的对细胞的杀伤的比较。特别地,图8的第1列("Ab")提供了测试的各种双特异性形式,例如在第1行中:15D3 IgG1 DD/5F9 IgG1 KK/MRK16指示:i)具有如本文所述的DD CH3突变的15D3重链序列(在人IgG1框架中嵌合)、ii)具有如本文所述的KK CH3突变的5F9重链序列以及iii)MRK16轻链(在人IgG κ 框架中嵌合)。所示的所有轻链均为 κ 形式。结合(图8,第2-3列;"Kd (nM)"和"Bmax")和杀伤(图8,第3列;"杀伤")如下进行确定:"Kd (nM)",通过ELISA结合(具有Fc标记的CD47的固相作为板上的捕获层);"Bmax",以对于"Kd (nM)"所述的方式与板结合的Bmax;"杀伤",在存在紫杉醇逐步调整(20 μ M-10⁻⁸ μ M范围)的情况下增强的293初始细胞杀伤(增敏);"-"=零,"±"=0至0.5个对数移位(在50%细胞杀伤曲线下),"+"=1至2个对数移位,"++"≥2个对数移位。第5-8列("结合(293)"、"结合(293K0 CD47)"、"结合(293K0 CD47,OX ABCB1)"和"结合(293OX ABCB1)")提供了与非结合对照抗体相比,与指定细胞系结合的抗体的FACS平均荧光强度:"-"=约零,"±"=0至约0.5个对数移位,"+"=约1个对数移位,"++"=1-2个对数移位(关于非结合对照和结合抗体的例子,参见图3A)。

[0892] 值得注意的是如下的那些构建和测试的抗体:其显示出不可接受的结合特征或者特别是与前导候选物相比,对表达MDR1和CD47二者的靶细胞的低效杀伤。

[0893] 例如,如图8所示,测试了含有15D3和5F9重链电荷间交换的Fc区和共同MRK16来源的轻链("15D3 IgG1 DD/5F9 IgG1 KK/MRK16")的抗体,其显示出期望的结合特征,并产生增强的对表达MDR1和CD47二者的靶细胞的杀伤(++)。因此,该抗体被选择为前导候选物。相

比之下,当前导候选物的共同轻链(即“MRK16”)被替代性共同轻链如“UIC2”(参见例如,“15D3 IgG1 DD/5F9 IgG1 KK/UIC2”)或“9F11”(参见例如,“15D3 IgG1 KK/5F9 IgG1 DD/9F11”)轻链取代时,基本上没有观察到对表达CD47和MDR1二者的细胞的特异性杀伤。另外,用替代性抗MDR1重链(如“MM4.17 2”或“UIC2”重链)取代“15D3”重链也导致对表达CD47和MDR1二者的细胞的特异性杀伤显著降低(例如,参见图8,例如,“MM4.17 2IgG1 DD/5F9 IgG1 KK/MRK16”和“UIC2 IgG1 KK/5F9 IgG1 DD/MRK16”)。

[0894] 通过ELISA和FACS结合测定评价交换所用的轻链(即“LC改组”)对抗体结合表达所述抗原的细胞的影响。在用CD47特异性重链测试LC改组时,将经修饰的抗CD47重链(5F9)与M89、15D3、MRK16或UIC2轻链组合并评估结合。表2中提供了这样的结果,其通过ELISA显示LC改组对各种抗MDR1分子的双特异性抗体与CD47-Fc包被的板的结合的影响:

[0895] 表2:

	5F9/5F9	5F9/M89	5F9/15D3	5F9/MRK16	5F9/UIC2
B _{max}	2.782	4.22	2.957	2.939	3.076
K _d (nM)	0.001968	1510	0.2571	0.1695	6.297

[0897] 在上表中值得注意的是,与未交换的5F9对照相比,在5F9/MRK16的组合中观察到亲和力和降低100倍。对于CD47的K_d类似于5F9/MRK16组合对于CD47的K_d的抗体是优选的,因为当以双特异性形式使用时,它们提供了必要的特异性程度,使得所述双特异性抗体与正常细胞的结合较低,并且对于以高于正常细胞的高水平表达CD47的癌细胞的特异性增加。

[0898] 表3中提供了LC改组测试的结果,其显示出15D3重链与UIC2、MRK16或5F9轻链的组合对与CD47的结合的影响,如通过ELISA测量的:

[0899] 表3:

	15D3/15D3	15D3/UIC2	15D3/MRK16	15D3/5F9
B _{max}	3.202	3.449	3.935	3.095
K _d (nM)	10.9	168.6	229.1	251.9

[0901] 上表中值得注意的是15D3对CD47的惊人亲和力,与未交换的15D3对照相比,15D3 HC与MRK16 LC组合后所述亲和力降低约20倍。

[0902] 具有15D3和5F9重链与共同MRK16轻链的组合的候选构建体具有可接受的结合和靶标拮抗特征。相比之下,其他测试的重链和轻链组合在测试时显示出不可接受的结合和/或靶细胞杀伤结果。参见图8。

[0903] mAb的纯化

[0904] 为了纯化含有Fc的抗体形式,将每1ml的上清液中10μl MabSelectTMSuReTM (GE Healthcare)添加至收获的培养基中,并在4℃下保持搅拌过夜。第二天,使用真空歧管单元(Pall Lifesciences,美国)将蛋白A树脂施加在24孔滤板中。将树脂用PBS洗涤,并将所述抗体在50mM磷酸盐(pH 3)中洗脱,并用10x PBS(pH 13)中和。

[0905] 使用Ni Sepharose 6快速流动组氨酸标记的蛋白质纯化树脂(GE Healthcare),按照相同的程序纯化组氨酸标记的Fab。将珠用PBS洗涤,接着用25mM磷酸盐缓冲液(pH 7.4)、补充有20mM咪唑的150mM NaCl洗涤。用2体积的25mM磷酸盐缓冲液(pH 7.4)、补充有500mM咪唑的150mM NaCl洗脱所述复合物。最后,将纯化的Fab经缓冲液交换至PBS中。

[0906] 序列

[0907] Pgp/MDR1具有以下氨基酸序列:

[0908] MDLEGDRNGGAKKKNFKLNKSEKDKKEKKPTVSVFSMFRYSNWLDKLYMVVGTLAAI IHGAGLPLM
MLVFGEMTDIFANAGNLEDLMSNITNRSDINDTGFFMNLEEDMTRYAYYYSGIGAGVLVAAYIQVSFWCLAAGRQI
HKIRKQFFHAIMRQEIGWFDVHDVGELNTRLTDDVSKINEGIGDKIGMFFQSMATFFTGFIVGFTRGWKLTIVILA
ISPVLGLSAAVWAKILSSFTDKELLAYAKAGAVAEVLAAIRTVIAFGGQKKELEERYKNLEEAKRIGIKKAITAN
ISIGAAFLLIYASYALAFWYGTTLVLSGEYSIGQVLTVFFSVLIGAFSVGQASPSIEAFANARGAAYEIFKIIDNK
PSIDSYSKSGHKPDNIKGNLEFRNVHFSYPSRKEVKILKGLNLKVQSGQTVALVGNSSGCGKSTTVQLMQRLYDPT
GMVSVDGQDIRTINVRFLREIIGVVSQEPVLFATTIAENIRYGRENVMTDEIEKAVKEANAYDFIMKLPKFDTLV
GERGAQLSGGQKQRIAIARALVRNPKILLDEATSALDTESEAVVQVALDKARKGRTTIVIAHRLSTVRNADVIAG
FDDGVIVEKGNHDELMKEKGIYFKLVTMQTAGNEVELENAADESKSEIDALEMSSNDSRSSLIRKRSTRRSVRGSQ
AQDRKLSTKEALDESIPPVSFWRIMRLNLTWPYFVVGVFCAIINGGLQPAFAIIFSKIIGVFTRIDDPETKRQNS
NLFSLFLALGIIISFITFFLQGFTEGKAGEILTKRLRYMVFRSMLRQDVSWFDDPKNTTGALTTRLANDAAQVKGA
IGSRLAVITQNIANLGTGIIISFIYGWQLTLLLLAIVPIIAIAGVEMKMLSGQALKDKKELESGSKIAEAIENF
RTVVSLTQEQKFEHMYAQLQVPYRNSLRKAHIFGITFSFTQAMMYFSYAGCFRFGAYLVAHKLMSFEDVLLVFS
VVFAMAVGQVSSFPADYAKAKISAAHIIMIIEKTPLIDSYSTEGLMPNTLEGNTVFGEVFNYPTRPDIPVLQGL
SLEVKKGQTLALVGSSGCGKSTVVQLLERFYDPLAGKVLLDGKEIKRLNVQWLRHLGIVSQEPILFDCSIAENIA
YGDNSRVVSQEEIVRAATEANIHAIESLPNKYSTKVGDKGTQLSGGQKQRIAIARALVRQPHILLDEATSALDT
ESEKVVQEALDKAREGRTCIVIAHRLSTIQNADLIVVFQNGRVKEHGTHQQLLAQKGIYFSMVSQAGTKRQ。

[0909] 编码Pgp/MDR1的核酸序列是可用的:P糖蛋白(ABCB1)(NM_000927)人基因组DNA智
人ATP结合盒亚家族B成员1(ABCB1),7号染色体上的Ref Seq Gene(NG_011513gen)

[0910] 编码CD47的核酸序列是可用的:智人CD47分子(CD47),转录变异体1,mRNA NCBI参
考序列:NM_001777.3

[0911] 抗CD47 5F9抗体可变重链序列如下:

[0912] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYSNMHWVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRV
TITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSS。

[0913] 抗CD47 5F9抗体可变轻链序列如下:

[0914] DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIIVYSNGNTYLGWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEADVGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIK。

[0915] 抗MDR1 MRK16抗体可变重链序列如下:

[0916] EVILVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSYTMWSVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRF
TISRDNKNNLYLQMSSLRSEDTALYYCARYRYEAWFASWGQGLTVTVSA。

[0917] MRK16抗体可变轻链的序列如下:

[0918] DVLMTQTPVSLSVSLGDQASISCRSSQSIIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQASHFPRTFGGGTKLEIK。

[0919] 抗体15D3序列可从美国专利号5849877获得,其中抗体15D3重链序列如下:

[0920] EVKVVESGGVLVRPGGSLKLSAASGFTFSRYTMWSVRQTPEKRLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRF
TVSRDNAMSSLYLQMSSLRSEDTALYYCARYGAGDAWFAYWGQGLTVTVSA,并且抗体15D3轻链序列如下:

[0921] DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRLEAEDLGVYYCFQGSHPRTFGGGTRLEIK。

[0922] 如本文所述使用的抗MDR1 UIC2抗体轻链的序列如下:

[0923] DVVMTQTTPRSLPVSLGDQASISCRSSQSLLSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYFCSQSTHIPPWTFGGGTKLDIK。

[0924] 如本文所述使用的抗MDR1 UIC2抗体重链的序列如下:

[0925] AVQLQQSGPELVKTGASVKISCKASGYFSNYYIHWVKQSHGKSLEWIGFISCYNGATFYNQKFKGKA
TFTVDTSSSTAYMKFNSLTFEDSAVYYCARLP IQFGNFYPM DYWGQTSVTVSS。

[0926] 如本文所述使用的抗MDR1 9F11抗体轻链的序列如下:

[0927] DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHRTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIK。

[0928] 如本文所述使用的抗MDR1 9F11抗体重链的序列如下:

[0929] EVKLVESGGGLVKFGGSLKLSAASGFTLSSYYMSWVRQSPEKRLELVAVINSNGGSTYYPD TVKGRF
TISRDN AKNTLYLQMSSLKSEDTALYYCARPFYYSNSPFAYWGQGT LVTVSS。

[0930] 如本文所述使用的抗MDR1 MM4.17抗体重链的序列如下:

[0931] QVQLQESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSRYGMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGSYTYFPDSVKGRF
TISRDN AKNTLYLQVSSLKSEDTAMYYCARPAEFRGYSWFAYWGQGT TTVTVSS。

[0932] 如本文所述使用的抗MDR1 M89抗体轻链的序列如下:

[0933] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGGSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPARFSGSGS
GTDFTLTISSLQPEDFASYFCQQTNTFPLTFGGGTKVEIK。

[0934] 如本文所述使用的抗MDR1 M89抗体重链的序列如下:

[0935] QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLS AASGFTFSYGMHWVRQDPGKGLMWSSISTDGSATKYADSVKGRF
TISRDN AKNTVSLQMNSLRAEDTAVYYCVGGFLGWVGQGT LVTVSS。

[0936] 结果

[0937] 纯化的mAb的生物物理分析测试(GXII仪器,还原和非还原蛋白)

[0938] 最终蛋白质制剂的纯度和单体含量是通过使用如制造商描述的蛋白质表达LabChip试剂盒(Perkin-Elmer)在Caliper LabChip GXII上进行高通量分析来测定的。用含有0.2% SDS和荧光染色染料的聚合物溶液将芯片自动装在仪器上。脱色通道填充不含SDS和染料的聚合物溶液。简而言之,通过将小体积(2-5 μ L)的样品与具有或不具有DDT的caliper样品缓冲液混合,制备了还原和非还原条件下的蛋白质。使样品在75 $^{\circ}$ C下变性5分钟,在2000g下离心3分钟,然后运行。电泳图由LabChip GXII Touch软件(Perkin Elmer)产生。

[0939] CD47和ABCB1特异性结合的检测

[0940] 使用人CD47-Fc融合蛋白(R&D系统),通过ELISA测试靶向CD47的mAb、Fab和双特异性IgG1的结合特异性。简而言之,将微量滴定板用50 μ l的在PBS中的0.5 μ g/ml纯化的人CD47-Fc融合蛋白包被,然后用在PBS中的100 μ l 0.4% BSA封闭。将不同抗体形式的稀释液以1/3连续稀释度添加至每个孔中,并在室温下孵育1小时。5F9即已知的抗CD47抗体用作阳性对照,并且人IgG1用作同种型对照。随后将板用PBS/Tween洗涤三次,然后在室温下与HRP缀合的驴抗人恒定特异性二级试剂孵育1小时。洗涤后,将板用HRP底物显影。用2M H₂SO₄终止反应,并在520nm下测量OD。

[0941] mAb、Fab和双特异性IgG1的结合特异性通过FACS使用天然表达CD47的293T细胞

系、过表达人ABCB1靶标的293T初始细胞、使用慢病毒RNA载体敲低ABCB1的293T初始细胞、敲除CD47的293T细胞以及过表达人ABCB1的敲除CD47的293T细胞进行测试。简而言之,将不同的细胞系与各种量的mAb或双特异性mAb或人IgG1同种型对照抗体在冰上孵育1h。将细胞用FACS缓冲液(含有0.5%BSA的PBS)洗涤三次。添加Alexa647标记的山羊抗人抗体作为二抗,并将样品在冰上再孵育1小时。使用BD FACS Canto (BD Biosciences)洗涤和分析样品。

[0942] 本实施例展现了双特异性异二价抗体分子的构建,其中一个臂与外排泵MDR1/Pgp结合,且另一个臂与癌症检查点蛋白CD47结合。当两种靶标同时存在于细胞表面时,所述双特异性抗体以相对较高的亲和力/亲合力与细胞结合。相比之下,如果MDR1/Pgp或CD47不存在或大大降低,则所述双特异性抗体的结合显著降低或无法检测到。(图4)。

[0943] 如图2所示构建的双特异性抗体含有一个臂(臂A),所述臂与转运蛋白结合并拮抗转运蛋白(外排泵Pgp)并使细胞对化学治疗剂更敏感。同时,另一个臂(臂B)与细胞表面上的“免疫-别吃我”信号(CD47)结合,其与IgG1 Fc一起允许对细胞产生更稳健的免疫应答。

[0944] 图3A-图3F提供了用于测试候选分子的各种试剂细胞系的FACS结合的图示。如方法与材料章节中所述,对这些试剂细胞系中的一些采用敲低、敲除或过表达靶蛋白进行工程化,以使人们能够精确而清晰地了解所涉及的靶标;它们的存在或不存在以及细胞对各种抗肿瘤剂的易感性。特别地,图3A显示了与初始293T细胞的结合,图3B显示了与293T CD47-KO(敲除)细胞的结合,图3C显示了与293T Pgp-KD(敲低)细胞的结合,图3D显示了与293T Pgp-ox(“过表达者”)的结合,图3E显示了与N6ADR(NALM6阿霉素耐药性)细胞的结合,以及图3F显示了与293T CD47-KO+Pgp-ox细胞的结合。

[0945] 在图4A-图4B中,通过针对多种细胞系的FACS分析显示了双特异性抗体的结合。第一扫描(图4A和图4B的左侧小图)示出了抗体与共表达两种靶标(Pgp和CD47)的细胞的结合。接下来的两次扫描(图4A和图4B中的中间小图和右侧小图)示出了当细胞系的Pgp(称为“KBP1”,右侧小图)或CD47(称为“KT14”,中间小图)被敲低(KD)或敲除(KO)时不存在或显著减小的结合。图4A-图4B进一步显示了与600nM、200nM、66nM、7.4nM和2nM的逐步调整浓度的抗体的结合,还提供了从同种型和无抗体对照测量的信号。在图4A和图4B中的左侧小图中指示了相应的抗体浓度,并且来自这些不同浓度的测量的信号通常在图4A和图4B的中间和右侧小图中重叠。图4A和图4B表示从两个不同批次的抗体获得的结果。

[0946] 图5和图6A-图6C示出了当细胞与15D3.aCD47:MRK16双特异性抗体(用箭头突出显示)结合时,抗肿瘤剂紫杉醇对细胞的杀伤增强。图5中提供的数据显示例如,与仅用化学疗法(“仅化学疗法”)或化学疗法与其他抗体(15D3:MRK16 Fab;a15D3:MRK16抗体;aCD47:MRK16抗体;aCD47:MRK16 Fab;和15D3:9F11 Fab)的组合的治疗相比,15D3.aCD47:MRK16双特异性抗体增强了初始293T细胞和N6ADR细胞对化学治疗剂的敏感性。

[0947] 图6A提供了使用GraphPad Prism软件(GraphPad Software, Inc.)得到的在图5中提供的数据的表格拟合图。图6B提供了图5和图6A中所示的数据的重新表示,其显示了初始293T细胞的原始数据(左)与拟合数据(右)的并行比较。图6C提供了图5和图6A中所示的数据的重新表示,其显示了对于N6ADR细胞的原始数据(左)与拟合数据(右)的并行比较。这些数据共同说明当存在15D3.aCD47:MRK16双特异性抗体时,共表达靶标Pgp和CD47的两种不同的耐药性细胞系(293T和N6ADR)对化学治疗剂的易感性增强和/或药物增敏作用。相比之下,针对相同靶标的多种其他测试的抗体没有显著的增敏作用。

[0948] 图7显示了例如与仅用长春新碱处理的细胞相比,在存在15D3.aCD47:MRK16双特异性抗体(25nM)和化学治疗剂长春新碱的情况下,对初始293T的体外杀伤增强。这些数据证明,药物增敏作用不限于用紫杉醇治疗,并且15D3.aCD47:MRK16双特异性抗体在与多种不同药剂组合使用时广泛增强药物敏感性。

[0949] 这些结果中揭示的特异性和伴随的靶向的这种组合证明了抗肿瘤剂对癌细胞(包括可能具有化疗耐药性的癌细胞)的治疗效果增强,同时使正常组织免受这些拮抗作用。同时,结合并可能拮抗或掩蔽第二蛋白质(例如在本实施例中的“别吃我”信号)局限于共同过表达该靶标与转运蛋白(外排泵)的癌细胞,从而使得能够同时、特异性且有益地靶向该第二蛋白质。

[0950] 因此,当靶标的组合展示在细胞表面时,通过优先结合来实现特异性。这种结合本身可能集中针对细胞的免疫应答(例如,通过将IgG1 Fc掺入双特异性分子中),但也有额外的益处,其中双特异性分子抵消参与特异性结合的一对靶蛋白中之一或二者的活性,如本实施例中证明的情况。换句话说,除了双特异性抗体提供的期望的组织(肿瘤)特异性程度之外,本公开文本的抗体还提供了同时靶向两种不同细胞机构的益处,由此结果可以是累加的、协同的或以其他方式有利的。通过调节或调整抗体的Fc区以增强或减少对结合的分子或细胞的伴随免疫应答,可以进一步增强抗体分子的这种“正交靶向”的作用。

[0951] 因此,该方法在如下癌症治疗领域中具有许多潜在的应用:其中涉及耐药性、多药耐药性、免疫掩蔽或可靶向的细胞表面蛋白的其他组合(包括例如TK激活剂、信号传导蛋白、异常过表达的蛋白质等),特别是如果所涉及的蛋白质之一是转运蛋白。此外,当多于两种不同的靶标可以同时癌细胞上共同过表达时,该方法适用于使用能够实现特异性和活性靶向此类细胞的适当的三价或其他多价分子。

[0952] 在许多情况下,相对于正常细胞,某些蛋白质的共同过表达发生在癌细胞上,特别是多药耐药性的癌细胞上。当存在两种不同的靶蛋白(即,转运蛋白和第二种蛋白质)时,本文所述的双特异性分子强烈地结合细胞,但当这对蛋白质中的一种或另一种的浓度不存在或降低(例如,如在正常细胞上所观察到的)时,则不那么强烈地结合细胞。当结合时,所述双特异性抗体通过拮抗、激活或掩蔽(或这些作用的组合)所靶向的表面蛋白来调节结合的细胞的活力、活性或易感性。

[0953] 在有利的形式中,使用标准方法将两条不同的重链(每条与单独的靶标结合)聚集在一起(以形成异二价对)。在一些实施方案中,这些不同的重链可以与适当的单条轻链组合使用,所述单条轻链允许任一HC单独地结合其同源靶标,而且也允许每个臂在它们组合成所得双特异性抗体形式时结合它们各自的靶标。如果两种靶标同时存在于细胞表面(而不是仅一个或另一个),则双特异性抗体的结合显著增强,从而导致组织特异性。

[0954] 在这种情况下,所述双特异性抗体可以强烈地且特异性结合至展示所述靶标的组合的癌细胞,同时拮抗这些靶标中之一或二者和/或抑制它们的正常功能,以使细胞例如对其他化学治疗剂和/或受试者的免疫系统更易感或增敏。

[0955] 实施例2:亲和力降低的单特异性二价抗MDR1抗体和抗CD47抗体抗癌活性以及与所述双特异性抗体的比较

[0956] 本实施例证明,当单独施用亲和力降低而在治疗癌症方面无效的抗MDR1抗体和抗CD47抗体在共同施用确实减小肿瘤体积。在不存在化学治疗剂的情况下,双特异性抗

体(15D3 HC:MRK16 LC::5F9 HC:MRK16 LC)比共同施用抗MDR1抗体和抗CD47抗体更有效。15D3 HC:MRK16 LC::5F9 HC:MRK16 LC在本文也称为15D3 HC::MRK16 LC::5F9 HC。

[0957] 所述抗MDR1抗体包含15D3抗体的两条重链和MRK16抗体的两条轻链。该抗体在图9中称为15D3/MRK16单克隆抗体。所述抗CD47抗体包含5F9抗体的两条重链和MRK16抗体的两条轻链。该抗体在图9中称为KT14/MRK16单克隆抗体。所述双特异性抗体包含15D3 HC:MRK16 LC::5F9 HC:MRK16 LC,并且在图9中称为KbisP1.1。

[0958] 图9显示了施用所指示的抗体对含有多药耐药性N6ADR细胞的肿瘤的体积的影响。在施用所指示的抗体之前,将N6ADR细胞注射至每个测试组6只小鼠的群组中。一旦可触知的肿瘤达到约100-150mm³的大小(注射肿瘤细胞后约7天),就施用抗体。在第0天、第4天、第7天和第11天施用抗体。测量肿瘤体积并绘图。小图A:15D3/MRK16单克隆抗MDR1抗体。小图B:KT14/MRK16单克隆抗CD47抗体。小图C:共同施用15D3/MRK16单克隆抗MDR1抗体和KT14/MRK16单克隆抗CD47抗体。小图D:KbisP1.1抗体。

[0959] 在使用或未使用化学治疗剂紫杉醇的情况下施用所指示的抗体。抗体在紫杉醇前约1-4h给药。

[0960] 单独的15D3/MRK16单克隆抗MDR1抗体和KT14/MRK16单克隆抗CD47抗体对肿瘤体积无显著影响。15D3/MRK16单克隆抗MDR1抗体使化疗耐药性N6ADR细胞对紫杉醇敏感。化疗增敏作用是15D3/MRK16单克隆抗MDR1抗体所特有的,而对于KT14/MRK16单克隆抗CD47抗体没有观察到化疗增敏作用。参见小图A和小图B。

[0961] 15D3/MRK16单克隆抗MDR1抗体和KT14/MRK16单克隆抗CD47抗体的共同施用使肿瘤体积减小的程度类似于当15D3/MRK16单克隆抗MDR1抗体和紫杉醇共同施用肿瘤体积减小的程度。当还施用紫杉醇时,针对肿瘤的15D3/MRK16单克隆抗MDR1抗体和KT14/MRK16单克隆抗CD47抗体的共同施用的功效进一步增加。这些数据表明,可以在存在或不存在化学治疗剂的情况下,使用15D3/MRK16单克隆抗MDR1抗体和KT14/MRK16单克隆抗CD47抗体的共同施用治疗癌症。参见小图C。

[0962] 小图D显示双特异性抗体比15D3/MRK16单克隆抗MDR1抗体和KT14/MRK16单克隆抗CD47抗体的共同施用更有效。

[0963] 本实施例的材料和方法与实施例1所述的材料和方法类似。

[0964] 实施例3:双特异性抗体对基于N6ADR细胞的异种移植物有效

[0965] 材料:

[0966] 细胞:NALM6(ATCC)和NALM6 ADR(ATCC),即本研究中使用的B细胞前体成淋巴细胞性白血病细胞系。NALM6 ADR是源自NALM6细胞的多药耐药性细胞系。

[0967] 小鼠:本研究中使用了六十五只5-6周龄雌性SCID-Bige小鼠(CharlesRiver)。

[0968] 试剂:BisP1.1(15D3重链/KT14重链/MRK16轻链)、人同种型IgG1(Bioxcell)、紫杉醇(Sigma)、伐司扑达(Sigma)。

[0969] 方法:

[0970] 细胞培养:将NALM6和NALM6 ADR细胞二者在37℃、5%CO₂下在补充有10%FBS和1%青霉素和1%链霉素的RPMI培养基中维持。使用的细胞系是真实的并被确认为支原体阴性。

[0971] 接种-在无菌条件下使用27G胰岛素注射器将在PBS:基质胶(1:1)中稀释的2X10⁶

个细胞皮下注射至五十只麻醉的5-6周龄雌性SCID-Bige小鼠中。

[0972] 给药-

[0973] NALM6皮下肿瘤:将小鼠随机分为三组,每组五只小鼠-(i)对照媒介物,(ii)5mg/kg紫杉醇,和(iii)20mg/kg紫杉醇。

[0974] NALM6 ADR皮下肿瘤:将小鼠随机分为九组,每组五只小鼠-(i)对照同种型IgG1 15mg/kg,(ii)对照同种型IgG1 15mg/kg和5mg/kg紫杉醇,(iii)对照同种型IgG1 15mg/kg和20mg/kg紫杉醇,(iv)BisP1.1 15mg/kg,(v)BisP1.1 15mg/kg和5mg/kg紫杉醇,(vi)BisP1.1 15mg/kg和20mg/kg紫杉醇,(vii)伐司扑达20mg/kg,(viii)伐司扑达20mg/kg和5mg/kg紫杉醇,以及(ix)伐司扑达20mg/kg和5mg/kg紫杉醇。将抗体、伐司扑达和紫杉醇每周腹膜内给药两次,持续连续四周。在紫杉醇注射前至少4小时注射抗体/伐司扑达。紫杉醇制剂:由于紫杉醇的溶解性差,因此在无水乙醇:Kolliphor (1:1)中制备50mg/ml的主储备液。注射前,将储备液用PBS稀释至5mg/kg或20mg/kg的推荐剂量,保持(1:16)的比率。

[0975] 测量:使用校准的游标卡尺每周进行三次肿瘤测量,并且肿瘤体积根据公式 $1/2 \times L \times S \times S$ 计算,其中L是肿瘤的长轴并且s是短轴。在开始治疗之前记录体重,并在整个研究过程中持续监测体重。从治疗的第一天到死亡,对动物的存活率进行评价。为了避免痛苦,根据上述预定义的标准:快速体重减轻、丧失行走能力、呼吸困难或无法饮水或进食,在濒临死亡时对小鼠实施安乐死。

[0976] 统计学:使用精确的单因素方差分析(ANOVA)比较不同实验组之间的肿瘤体积和体重。使用对数秩(Mantel-Cox)检验比较不同治疗组之间的Kaplan-Meier存活曲线。使用Graph Pad Prism(GraphPad,美国加利福尼亚州圣地亚哥)软件进行统计分析。所有分析的显著性水平设定为 $p < 0.05$ 。

[0977] 结果

[0978] 与多药耐药性NALM6 ADR细胞相比,NALM6细胞对紫杉醇的敏感性提高。NALM6细胞展现出在5mg/kg和20mg/kg的剂量下的紫杉醇的显著($p < 0.0001$)肿瘤生长抑制。相比之下,NALM6 ADR细胞在5mg/kg下显示出显著较小的肿瘤生长抑制,且在20mg/kg下显示出适中的抑制(图11)。这证实了在体内NALM6 ADR细胞中的紫杉醇耐药性(图10和图11)。

[0979] 此外,在NALM6 ADR模型中,注射15mg/kg剂量的BisP1.1对肿瘤生长有强烈的抑制作用(图11)。类似地,15mg/kg的BisP1.1与5mg/kg和20mg/kg的紫杉醇组合使用显著降低肿瘤生长(图11)。一致地,伐司扑达作为ABCB1的小分子抑制剂使得NALM6 ADR肿瘤发生化疗增敏(图12)。然而,与BisP1.1加紫杉醇组合组相比之下,用伐司扑达和紫杉醇20mg/kg的组合治疗的小鼠显示出显著的体重减轻(图13和图14)。

[0980] 与对照相比,用伐司扑达和紫杉醇20mg/kg治疗的小鼠具有最低的存活期。与对照或紫杉醇治疗的小鼠相比,用BisP1.1或BisP1.1加紫杉醇治疗的小鼠具有延长的存活期(图15)。

[0981] 结论:在单独以及与紫杉醇组合的两种情况下BisP1.1均显著地抑制NALM6 ADR细胞的肿瘤生长。BisP1.1未诱导小鼠体重的任何减轻。与对照和紫杉醇治疗的群组相比,用BisP1.1和Bis1.1加紫杉醇组合治疗的小鼠展现出延长的存活期。

[0982] 实施例4:双特异性抗体对多种不同癌症模型有效

[0983] 在异种移植物研究中,BisP1.1双特异性抗体对另外两种多药耐药性(MDR)癌细胞

系有效。A2780ADR MDR癌细胞系表达CD47和ABCB1二者。HeyT30 MDR癌细胞系也表达CD47和ABCB1二者,但与A2780ADR细胞相比表达水平较低(图16和图17)。) 。A2780ADR和HeyT30细胞系二者均来源于卵巢。使用PE缀合的可商购的抗MDR1和抗CD47试剂抗体;对于MDR1, Biolegend目录号348606,以及对于CD47, Biolegend目录号323108。

[0984] 根据实施例3中所述的方案将A2780ADR MDR癌细胞系和HeyT30 MDR癌细胞系注射至小鼠中。在使用或未使用紫杉醇的情况下用BisP1.1双特异性抗体治疗小鼠。如图18中所见,在使用或未使用紫杉醇的情况下BisP1.1双特异性抗体有效减少A2780ADR MDR癌细胞肿瘤体积。当使用较低浓度的抗体时,BisP1.1双特异性抗体与紫杉醇一起也可有效减少HeyT30MDR癌细胞肿瘤体积。在较高浓度下,在使用和未使用紫杉醇的情况下BisP1.1双特异性抗体都是有效的(图19)。

[0985] 实施例5:KbisP1.1双特异性抗体比抗MDR1 15D3抗体对MDR细胞更有效并且以剂量依赖性方式使得MDR癌细胞发生化疗增敏

[0986] 通过在使用或未使用紫杉醇的情况下施用抗MDR1抗体15D3或者在使用或未使用紫杉醇的情况下施用KbisP1.1来治疗通过在小鼠中注射多药耐药性N6ADR细胞而形成的肿瘤。

[0987] 如图20中所见,KbisP1.1比15D3抗体对体内N6ADR细胞肿瘤更有效。

[0988] 图21显示了KbisP1.1在体内使得多药耐药性N6ADR肿瘤对紫杉醇发生的化疗增敏是剂量依赖性的。

[0989] 实施例6:KbisP1.1双特异性抗体与人和食蟹猴红血球的结合显著降低

[0990] 与抗CD47 5F9抗体相比之下,KBisP1.1抗体未展现出与人和食蟹猴红血球的显著结合,因此预期不会引起一般的细胞毒性或经受红血球“抗原沉默”。在图22A和图22B中分别显示了人和食蟹猴RBC结合数据。图22A和图22B还显示,与抗CD47 5F9抗体(“KT14”)相比之下,包含5F9 HC和MRK16 LC的抗CD47抗体(“KT14_MRK16”)不显著结合人和食蟹猴红细胞(RBC)。

[0991] 随后在食蟹猴中对KBisP1.1抗体进行的测试表明,所述抗体不会导致显著的体重减轻、溶血性贫血,并且没有与该抗体相关的发病的增加。此外,KBisP1.1的清除率显现正常,没有观察到明显的“抗原沉默”效应。

[0992] 以10mg/kg的剂量向食蟹猴施用KBisP1.1抗体。所述抗体的半衰期为114-148h。

[0993] 实施例7:KbisP1.1双特异性抗体食蟹猴毒性研究

[0994] 十五只食蟹猴(cynomolgus monkey) (食蟹猴(macaca fascicularis))参加单剂量研究以评价KbisP1.1毒性。将猴分为5个群组(n=3只动物/群组):

[0995]

群组	KBisP1.1剂量	紫杉醇剂量
1	10mg/kg	无
2	10mg/kg	2mg/kg
3	50mg/kg	无
4	50mg/kg	2mg/kg
5	无	2mg/kg

[0996] 所有动物都接受全剂量的抗体和/或紫杉醇。没有动物展现出任何输注反应的体征。输注紫杉醇后,输注部位有预期的最小红斑量。仅输注所述抗体的部位没有红斑。

[0997] KBisP1.1在所有群组中耐受性良好,且活动或食欲无变化。体重保持稳定,并且详细的临床检查是正常的。

[0998] 给药后7天,观察到15只动物中有11只的红细胞比容略有降低,这与KbisP1.1剂量或已接受紫杉醇不相关。所有其他临床化学和血液学检查结果均正常。

[0999] 实施例8:经修饰以降低免疫原性或修饰ADCC的KbisP1.1双特异性抗体

[1000] 材料与方法

[1001] 细胞:MES-SA/Dx5细胞系(Sigma,目录号95051031)是源自亲本MES-SA细胞系(Sigma,目录号95051030)的子宫肉瘤,将其用于本研究。与其亲本细胞相比,MES-SA/Dx5细胞系展现出高约100倍的对阿霉素的耐药性。

[1002] 小鼠:本研究使用5-6周龄雌性裸鼠(Charles River)。

[1003] 人同种型IgG1(Bioxcell)用作对照。

[1004] 细胞培养:将MES-SA/Dx5细胞在37℃、5%CO₂下在补充有10%FBS和1%青霉素和1%链霉素的RPMI培养基中维持。每周用10E-7M阿霉素治疗至少一次。使用的细胞系是真实的并被确认为支原体阴性。

[1005] 接种-在无菌条件下使用27G胰岛素注射器将在PBS:基质胶(1:1)中稀释的0.5X10⁶个细胞皮下注射至三十只麻醉的5-6周龄雌性裸小鼠中。所有动物维护、处理、监测和动物程序均按照APLAC协议并获得APLAC协议的批准进行。

[1006] 给药-

[1007] MES-SA/Dx5皮下肿瘤:一旦肿瘤达到100-150mm³,就将小鼠随机化为六组,每组五只小鼠-(i)对照同种型IgG1 3mg/kg,(ii)对照同种型IgG1 3mg/kg和20mg/kg紫杉醇,(iii)KNJYBisP1.1 3mg/kg,(iv)KNJYBisP1.1 3mg/kg和20mg/kg紫杉醇,(v)KNJYBisP1.1 LALAPG 3mg/kg,以及(vi)KNJYBisP1.1 LALAPG 3mg/kg和20mg/kg紫杉醇。将抗体和紫杉醇每周腹膜内给药两次,持续连续两周。在紫杉醇注射前至少4小时注射抗体。

[1008] 紫杉醇制剂:由于紫杉醇的溶解性差,因此在无水乙醇:Kolliphor(1:1)中制备50mg/ml的主储备液。注射前,将储备液用PBS稀释至20mg/kg的推荐剂量,保持(1:16)的比率。

[1009] 测量-使用校准的游标卡尺每周进行三次肿瘤测量,并且肿瘤体积根据公式1/2*L*S*S计算,其中L是肿瘤的长轴并且s是短轴。在开始治疗之前记录体重,并在整个研究过程中持续监测体重。从治疗的第一天到死亡,对动物的存活率进行评价。根据上述预定义的标准:快速体重减轻、丧失行走能力、呼吸困难或无法饮水或进食,在濒临死亡时对动物实施安乐死,以避免动物痛苦。

[1010] KBisP1.1抗体在本文中也称为KNJYBisP1.1。KNJYBisP1.1 N297A抗体遵循相同的方案。

[1011] KbisP1.1人源化抗体

[1012] KBisP1.1抗体(在本文中也称为KNJYBisP1.1)经修饰以通过制备KbisP1.1抗体的嵌合和人源化形式来降低免疫原性。KbisP1.1嵌合抗体包含与具有带电荷对取代K392D和K409D的人IgG1 Fc区融合的15D3可变重链区和与具有带电荷对取代E356K和D399K的人IgG1 Fc区融合的5F9可变重链区。

[1013] 为了选择要用作CDR移植模板的人抗体框架区(FR),将小鼠15D3 VH和MRK16 VL区

与人种系序列的那些进行比较。发现小鼠15D3 VH区的FR与人IGHV3亚组具有最高的同源性。小鼠MRK16 VL区的FR展现出与人IGKV2亚组的同源性最高。为了减少潜在的翻译后修饰并提高抗体的稳定性,在15D3 CDR H2中引入了N56Q/N56S,并且在MRK16 CDR L1中引入了N30Q/N30S。设计了每种人源化VH (15D3 Hz0、15D3 Hz1和15D3 Hz2) 和VL (MRK16 Hz0、MRK16 Hz1和MRK16 Hz2) 的三种形式。可变区序列如下:

[1014] 15D3 Hz0:

[1015] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGNTYYPDSVKGRFT
VSRDNSKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCARYGAGDAWFAYWGQGTLLVTVSS

[1016] 15D3 Hz1:

[1017] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGQTYYPDSVKGRFT
VSRDNSKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCARYGAGDAWFAYWGQGTLLVTVSS

[1018] 15D3 Hz2:

[1019] EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGGSTYYPDSVKGRFT
VSRDNSKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCARYGAGDAWFAYWGQGTLLVTVSS

[1020] MRK16 Hz0:

[1021] DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSG
SGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHFPRTFGGQTKLEIK

[1022] MRK16 Hz1:

[1023] DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGQTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSG
SGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHFPRTFGQTKLEIK

[1024] MRK16 Hz2:

[1025] DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSTGSTYLEWYQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSG
SGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHFPRTFGQTKLEIK

[1026] 图23-图24中提供了每种形式的序列比对。

[1027] 如图25所示,人源化抗体在小鼠中使得多药耐药性MES-SA-DX5细胞产生的肿瘤发生化疗增敏。如图26所示,人源化抗体在小鼠中使得多药耐药性A2780ADR细胞产生的肿瘤发生化疗增敏。在图26中,KBisP1.1抗体称为“KNJYBisP1.1”,并且人源化KBisP1.1抗体称为“人源化”的。

[1028] 通过结合滴定和化学毒性测定对人源化KBisP1.1抗体进行表征。

[1029] 细胞结合测定。通过流式细胞术评价抗体与细胞的结合。将稳定转染以表达人ABCB1的293T细胞(293T_ABCB1_0X)在流式细胞术缓冲液(PBS+2%FBS+0.02%叠氮化钠)中洗涤一次,在流式细胞术缓冲液中以 2×10^6 个细胞/mL重悬,并以0.1mL/孔分配至96孔微量滴定板中。将重组抗体以5ug/mL添加至细胞中以用于初始结合确认,或在流式细胞术缓冲液中从100ug/mL进行系列稀释。将细胞在冰上孵育30min后,将细胞用流式细胞术缓冲液洗涤两次。用PE标记的F(ab')₂片段山羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch)检测结合的抗体,并在Attune NxT流式细胞仪上进行评价。EC50被计算为给出半最大反应的抗体浓度。

[1030] 细胞毒性测定。在N6/ADR(阿霉素选择的人急性成淋巴细胞性白血病(ALL)细胞系NALM6的B1阳性变体)上评价抗体对长春新碱细胞毒性的影响。将细胞以5000个细胞/孔铺板于白色平底96孔组织培养板中的0.05mL测定培养基(RPMI-1640+10%FBS)中。通过以下

方法制备2X最终测定浓度的长春新碱：在含有100ug/mL (2X最终浓度) 的测试抗体或对照抗体或7uM (2X最终浓度) 的小分子B1抑制剂伐司扑达的测定介质中从200uM系列稀释。将等效体积 (0.05mL) 的长春新碱/抗体混合物添加至96孔板中的N6/ADR细胞中。然后将板在37℃下在5%CO₂中孵育。72h后, 将板平衡至室温, 并使用Promega®CellTiter-Glo®发光细胞活力测定根据制造商推荐的方案测定细胞活力。在MolecularDevices®FlexStation®3多模式微板阅读器上测量发光, 并使用GraphPad Prism 8.0软件分析数据。IC₅₀是反应 (细胞生长) 降低50%时药物 (长春新碱或其他化学疗法细胞毒性剂) 的浓度。

[1031] 表4中总结了双特异性抗体与293T_ABCB1_OX细胞的细胞结合：

EC50 (nM)	Ab	HC1	HC2	LC
75.5	Ab1	15D3 IgG1 DD	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL-Hz1
212.4	Ab2	15D3 IgG1 DD	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL-Hz2
79.1	Ab3	15D3 IgG1 DD	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL Hz0
101.1	Ab4	15D3 HC-Hz1 DD hIgG1	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL Hz0
137.1	Ab5	15D3 HC-Hz1 DD hIgG1	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL-Hz1
230.4	Ab6	15D3 HC-Hz1 DD hIgG1	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL-Hz2
63.5	Ab7	15D3 HC-Hz2 DD hIgG1	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL-Hz0
216.6	Ab8	15D3 HC-Hz2 DD hIgG1	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL-Hz1
218.8	Ab9	15D3 HC-Hz2 DD hIgG1	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL-Hz2
34.7	Ab10	15D3 IgG1 DD Hz0	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL-Hz1
52.4	Ab11	15D3 IgG1 DD Hz0	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL-Hz2
33.5	Ab12	15D3 IgG1 DD Hz0	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL Hz0
14.6	15D3			
0.3	KT14			
40.3	KBisP1.1			

[1033] 表5中总结了抗体对长春新碱细胞毒性的影响：

长春新碱 IC ₅₀ (nM)	Ab	HC1	HC2	LC
-------------------------------	----	-----	-----	----

[1035]

0.0020	Ab1	15D3 IgG1 DD	KT14 IgG1 KK	MRk16 VL-Hz1
0.0030	Ab2	15D3 IgG1 DD	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL-Hz2
0.0003	Ab3	15D3 IgG1 DD	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL Hz0
0.0024	Ab4	15D3 HC-Hz1 DD hIgG1	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL Hz0
0.0589	Ab5	15D3 HC-Hz1 DD hIgG1	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL-Hz1
0.0479	Ab6	15D3 HC-Hz1 DD hIgG1	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL-Hz2
0.0076	Ab7	15D3 HC-Hz2 DD hIgG1	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL-Hz0
0.5084	Ab8	15D3 HC-Hz2 DD hIgG1	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL-Hz1
0.2417	Ab9	15D3 HC-Hz2 DD hIgG1	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL-Hz2
0.0572	Ab10	15D3 IgG1 DD Hz0	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL-Hz1
0.1074	Ab11	15D3 IgG1 DD Hz0	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL-Hz2
0.0001	Ab12	15D3 IgG1 DD Hz0	KT14 IgG1 KK	MRK16 VL Hz0
0.4663	15D3			
0.7335	MRK16			
0.0461	KBisP1.1			
0.5429	长春新碱 单独			
0.7869	人 IgG1			

[1036] KbisP1.1 LALAPG Fc 缄默抗体

[1037] 嵌合抗体的IgG1 Fc区经修饰以包含LALAPG效应子功能突变(L234A、L235A和P329G)或N297A突变,从而降低抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。此类抗体在本文中称为缄默抗体。取代的位置是关于人Ig G1的氨基酸序列。

[1038] 如图25所示,缄默的Fc LALAPG双特异性抗体在小鼠中使得多药耐药性MES-SA-DX5细胞产生的肿瘤发生化疗增敏。缄默的Fc LALAPG双特异性抗体的数据表明,KNJYBisP1.1的Fc效应子功能对于多药耐药性肿瘤对紫杉醇的化疗增敏是非必要的。在不存在化学疗法的情况下,KNJYBisP1.1的Fc效应子功能显现部分负责仅抗体的抗肿瘤作用。

[1039] KbisP1.1 N297A Fc 缄默抗体

[1040] 嵌合抗体的IgG1 Fc区经修饰以包含N297A突变,从而降低抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。此类抗体在本文中称为缄默抗体。取代的位置是关于人Ig G1的氨基酸序列。

[1041] 图27A显示了具有N297A取代的KBisP1.1双特异性抗体(在图中标记为KNJY N297A)在体内使得多药耐药性MES-SA/Dx5细胞肿瘤对紫杉醇发生化疗增敏。KBisP1.1的Fc效应子功能显现出对于多药耐药性肿瘤对紫杉醇的化疗增敏是非必要的。在不存在化学疗法的情况下,KBisP1.1的Fc效应子功能显现部分负责仅抗体的抗肿瘤作用。

[1042] 还针对不同的癌细胞系即A2780ADR细胞系测试了KbisP1.1 N297A Fc 缄默抗体。

[1043] 材料与方法

[1044] 细胞:A2780ADR细胞系(Sigma,目录号93112520)是源自亲本A2780细胞系(Sigma,目录号93112519)的上皮卵巢癌,将其用于本研究。

[1045] 小鼠:本研究使用5-6周龄雌性裸鼠(Charles River)。我们对于10%额外的没有进行治疗的小鼠做出了解释。

[1046] 人同种型IgG1(Bioxcell)用作对照。

[1047] 细胞培养:将A2780ADR细胞在37℃、5%CO₂下在补充有10%FBS和1%青霉素和1%链霉素的RPMI培养基中维持。每周用10E-7M阿霉素治疗至少一次。使用的细胞系是真实的并被确认为支原体阴性。

[1048] 接种-在无菌条件下使用27G胰岛素注射器将在PBS:基质胶(1:1)中稀释的0.5X10⁶个细胞皮下注射至三十只麻醉的5-6周龄雌性裸小鼠中。所有动物维护、处理、监测和动物程序均按照APLAC协议并获得APLAC协议的批准进行。

[1049] 给药-

[1050] A2780ADR皮下肿瘤:将小鼠随机化为六组,每组五只小鼠-(i)对照同种型IgG1 3mg/kg,(ii)对照同种型IgG1 3mg/kg和20mg/kg紫杉醇,(iii)KNJYBisP1.1 3mg/kg,(iv)KNJYBisP1.1 3mg/kg和20mg/kg紫杉醇,(v)KNJYBisP1.1 N297A 3mg/kg,以及(vi)KNJYBisP1.1 N297A 3mg/kg和20mg/kg紫杉醇。将抗体和紫杉醇每周腹膜内给药两次,持续连续两周。在紫杉醇注射前至少4小时注射抗体。紫杉醇制剂:由于紫杉醇的溶解性差,因此在无水乙醇:Kolliphor(1:1)中制备50mg/ml的主储备液。注射前,将储备液用PBS稀释至20mg/kg的推荐剂量,保持(1:16)的比率。

[1051] 测量-使用校准的游标卡尺每周进行三次肿瘤测量,并且肿瘤体积根据公式 $1/2 * L * S * S$ 计算,其中L是肿瘤的长轴并且s是短轴。在开始治疗之前记录体重,并在整个研究过程中持续监测体重。从治疗的第一天到死亡,对动物的存活率进行评价。根据上述预定义的标准:快速体重减轻、丧失行走能力、呼吸困难或无法饮水或进食,在濒临死亡时对动物实施安乐死,以避免动物痛苦。

[1052] 图27B显示了KBisP1.1 N297A抗体(在图中标记为N297A)在体内使得多药耐药性A2780ADR细胞对紫杉醇发生化疗增敏。在此模型中,KBisP1.1的Fc效应子功能对于多药耐药性肿瘤对紫杉醇的化疗增敏是非必要的。在不存在化学疗法的情况下,KBisP1.1的Fc效应子功能部分负责仅抗体的抗肿瘤作用。

[1053] 实施例9:KbisP1.1双特异性抗体与结合相同靶标的单特异性抗体进行比较

[1054] 使用A2780ADR和MES-SA/Dx5体内多药耐药模型评估KNJYBisP1.1抗体与抗MDR1单克隆抗体15D3和抗CD47 KT14单克隆抗体的抗肿瘤作用的比较。

[1055] 材料与方法

[1056] 细胞系和肿瘤模型如实施例7中所述。

[1057] 给药-

[1058] A2780ADR皮下肿瘤:一旦肿瘤达到100-150mm³,就将小鼠随机化为十组,每组五只小鼠-(i)对照同种型IgG1 3mg/kg,(ii)对照同种型IgG1 3mg/kg和20mg/kg紫杉醇,(iii)KNJYBisP1.1 3mg/kg,(iv)KNJYBisP1.1 3mg/kg和20mg/kg紫杉醇,(v)15D3杂交瘤单克隆Ab 3mg/kg,(vi)15D3杂交瘤3mg/kg和20mg/kg紫杉醇,(vii)KT14/KT14单克隆Ab 3mg/kg,

(viii) KT14/KT14单克隆Ab 3mg/kg和20mg/kg紫杉醇, (ix) 15D3杂交瘤+KT14/KT14各1.5mg, 以及 (x) 15D3杂交瘤+KT14/KT14各1.5mg和20mg/kg紫杉醇。将抗体和紫杉醇每周腹膜内给药两次, 持续连续两周。在紫杉醇注射前至少4小时注射抗体。紫杉醇制剂: 由于紫杉醇的溶解性差, 因此在无水乙醇:Kolliphor (1:1) 中制备50mg/ml的主储备液。注射前, 将储备液用PBS稀释至20mg/kg的推荐剂量, 保持 (1:16) 的比率。

[1059] MES-SA/Dx5皮下肿瘤: 一旦肿瘤达到100-150mm³, 就将小鼠随机化为十组, 每组五只小鼠 - (i) 对照同种型IgG1 3mg/kg, (ii) 对照同种型IgG1 3mg/kg和20mg/kg紫杉醇, (iii) KNJYBisP1.1 3mg/kg, (iv) KNJYBisP1.1 3mg/kg和20mg/kg紫杉醇, (v) 15D3杂交瘤单克隆Ab 3mg/kg, (vi) 15D3杂交瘤3mg/kg和20mg/kg紫杉醇, (vii) KT14单克隆Ab 3mg/kg, (viii) KT14单克隆Ab 3mg/kg和20mg/kg紫杉醇, (ix) 15D3杂交瘤+KT14各1.5mg, 以及 (x) 15D3杂交瘤+KT14各1.5mg和20mg/kg紫杉醇。将抗体和紫杉醇每周腹膜内给药两次, 持续连续两周。在紫杉醇注射前至少4小时注射抗体。紫杉醇制剂: 由于紫杉醇的溶解性差, 因此在无水乙醇:Kolliphor (1:1) 中制备50mg/ml的主储备液。注射前, 将储备液用PBS稀释至20mg/kg的推荐剂量, 保持 (1:16) 的比率。

[1060] 图28显示了KBisP1.1抗体在体内使得多药耐药性A2780ADR细胞对紫杉醇发生化疗增敏。与抗MDR1 15D3杂交瘤抗体或抗CD47 KT14单克隆抗体相比, KBisP1.1的化疗增敏作用更强。KNJYBisP1.1的化疗增敏作用与共同注射15D3杂交瘤+KT14单克隆抗体的化疗增敏作用是可比的。尽管15D3杂交瘤和KT14单克隆抗体均展现出与其各自靶标的强烈结合, 但离体KNJYBisP1.1比15D3或KT14单克隆抗体更有效。

[1061] 如图29所示, KBisP1.1抗体在体内使得多药耐药性MES-SA/Dx5细胞对紫杉醇发生化疗增敏。KBisP1.1的化疗增敏作用比15D3杂交瘤或KT14单克隆抗体的化疗增敏作用更强。与紫杉醇组合的单一KBisP1.1双特异性抗体的化疗增敏作用与15D3杂交瘤+KT14单克隆抗体的共同注射组合的化疗增敏作用是可比的。

[1062] 在图28-图29中, KBisP1.1抗体=KNJYBisP1.1; 15D3杂交瘤=抗MDR1单克隆抗体15D3; KT14/KT14=抗CD47单克隆抗体5F9。

[1063] KBis P1.1治疗作为单一双特异性抗体加紫杉醇的效果与图6B中所示的体外结果一致, 这表明有效的紫杉醇有效载荷在共同表达高浓度的两种靶标的原本抗药性肿瘤中积累。KBis P1.1抗体未显示与不表达两种靶抗原的细胞的显著结合 (参见图4A), 因此与单独的单克隆抗体相比, 在靶向表达两种靶抗原的癌细胞方面将提供更多特异性。

[1064] 实施例10: KBisP1.1在患者来源的乳腺癌模型CTG-2616中的体内抗肿瘤作用

[1065] 材料与方法

[1066] 细胞: CTG-2616是源自患有复发性乳腺导管腺癌的患者ER⁺/Her2⁺原发性乳腺癌。

[1067] 小鼠: 本研究使用5-6周龄无胸腺Nude-Foxn1nu雌性裸小鼠 (Envigo)。

[1068] 接种-将速冻的患者来源的肿瘤碎片解冻, 切成5x5x5 mm, 并在无菌条件下皮下注射至麻醉的5-6周龄雌性裸小鼠中。对于肿瘤植入程序, 在植入部位上做出1-1.5cm切口, 并使用镊子植入肿瘤片段。当足够的储备动物达到1000-1500mm³时, 收获肿瘤以重新植入研究前的动物中。将研究前的动物在左侧腹单侧植入从储备动物收获的肿瘤片段。每只动物都是从特定的传代批号植入, 并进行记录。在植入后七到十天开始记录每个实验的研究前

肿瘤体积。当肿瘤达到150-300mm³的平均肿瘤体积时,将动物按肿瘤体积匹配至用于给药的治疗组或对照组,并在第0天开始给药。所有外科手术均在无菌条件下进行。

[1069] 给药-

[1070] CTG-2616皮下肿瘤:一旦肿瘤在150-300mm³的范围内,就将小鼠随机化为三组,每组三只小鼠-(i)对照同种型IgG1 (Bioxcell) 6mg/kg+媒介物,(ii)对照同种型IgG1 6mg/kg和5mg/kg紫杉醇,以及(iii)KNJYBisP1.16mg/kg和5mg/kg紫杉醇。将抗体和紫杉醇每周腹膜内给药两次,持续连续四周。在紫杉醇注射前至少4小时注射抗体。紫杉醇制备:注射前,将储备液用PBS稀释至5mg/kg的推荐剂量。

[1071] 如在前述实施例中所所述进行肿瘤体积的测量。

[1072] 图30显示了KBisP1.1双特异性抗体在体内使得紫杉醇耐药性CTG-2616患者来源的乳腺肿瘤发生化疗增敏并导致肿瘤生长抑制。KNJYBisP1.1未引起荷载CTG-2616的动物的体重的任何变化。因此,KNJYBisP1.1双特异性抗体与紫杉醇的组合在体内有效地使得紫杉醇耐药性Her2⁺CTG-2616患者来源的乳腺肿瘤发生化疗增敏。

[1073] 实施例11:产生结合PD-L1和MDR-1的双特异性mAb

[1074] 使用用于产生实施例1-8中描述的KBis1.1抗体的策略来产生结合MDR-1和PD-L1二者的双特异性抗体。该抗体在本文中称为KBis2.1。使用具有针对MDR1的抗原结合位点的来自MRK16抗体的共同可变轻(VL)链、具有针对MDR1的抗原结合位点的来自15D3抗体的第一可变重(VH)链和具有针对PD-L1的抗原结合位点的第二VH链来制备所述双特异性抗体。MRK16 VL链和15D3 VH链与用于KBis1.1抗体的所述链相同。抗PD-L1抗体阿特殊单抗的VH链用作具有针对PD-L1的抗原结合位点的第二VH链。该抗体称为15D3 HC::PDL1 HC::MRK16 LC。还构建了该抗体的变体,其中使用了15D3 HC和MRK16 LC的人源化形式。该抗体可以称为15D3 HC Hz::PDL1 HC::MRK16 LC Hz。使用了15D3 Hz0 VH链和MRK16 Hz0 VL链。当与MRK16 VL链配对时阿特殊单抗VH链保留与PD-L1的结合,如通过ELISA测量的(数据未示出)。以实施例1中对于CD47所述的方式进行ELISA。另外,如从来自KBisP1.1抗体的数据所预期的,KBisP2.1抗体的15D3 HC::MRK16 LC臂保留与MDR1的结合,如使用过表达MDR1的293T细胞通过FACS所测量的(数据未示出)。如实施例1中所述进行对于MDR1结合的FACS测量。在图31中总结了该数据。

[1075] 与原初配对的VH-VL抗体(例如像在15D3单克隆抗体和抗PD-L1抗体阿特殊单抗中)相比,共同轻链的使用不仅增加了正确配对的抗体的产量,而且降低了抗体的每个臂对其靶标的亲和力。与以相对较低的水平表达所述靶标中的仅一种或以低水平表达两种靶标的正常细胞相比,这种降低的亲和力增加了KBis2.1抗体对于以高水平表达MDR1和PD-L1中的至少一种的癌细胞的特异性。

[1076] KBis2.1抗体中的15D3 VH链和MRK16 VL链的序列在前述实施例中。使用了15D3重链和MRK16轻链的嵌合和人源化形式。阿特殊单抗的重链具有以下序列:

[1077] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG

FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

[1078] 重链的Fc区经突变以引入电荷对取代“KK”，从而促进与具有“DD”取代的15D3重链配对。DD取代是指K392D和K409D取代，KK取代是指E356K和D399K取代。氨基酸取代的编号是按照对于HC的EU编号系统。

[1079] 根据Kabat命名法定义的抗PDL1抗体阿特殊单抗的HCDR 1-3如下：

[1080] HCDR1:DSWIH

[1081] HCDR2:WISPYGGSTYYADSVKG

[1082] HCDR3:RHWPGGFDY

[1083] 虽然抗PDL1抗体阿特殊单抗的轻链未用于双特异性抗体中，但为了完整起见提供了如下序列：

[1084] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[1085] 根据Kabat命名法定义的LCDR 1-3如下：

[1086] LCDR1:RASQDVSTAVA

[1087] LCDR2:SASFLYS

[1088] LCDR3:QQYLYHPAT

[1089] 使用过表达PDL1的293T细胞测量的抗PDL1抗体阿特殊单抗的EC50为0.29nM。

[1090] 实施例12：产生结合EGFR和MDR-1的双特异性mAb

[1091] 抗MDR1抗EGFR双特异性抗体形式1

[1092] 使用用于产生上述实施例中描述的KBis1.1抗体的策略来产生结合MDR-1和EGFR二者的双特异性抗体。

[1093] 使用具有针对MDR1的抗原结合位点的来自MRK16抗体的共同可变轻(VL)链、具有针对MDR1的抗原结合位点的来自15D3抗体的第一可变重(VH)链以及具有针对EGFR的抗原结合位点的第二VH链制备所述双特异性抗体。MRK16 VL链和15D3 VH链与本申请中描述的所述链相同。抗EGFR抗体西妥昔单抗或耐昔妥珠单抗的VH链用作具有针对EGFR的抗原结合位点的第二VH链。

[1094] 如本文所述通过ELISA测量的对于西妥昔单抗的Kd的范围是0.05nM-0.1nM。使用过表达EGFR的293T细胞通过FACS测量的对于耐昔妥珠单抗的EC50为0.044nM。

[1095] 所述双特异性抗体包括以下重链和轻链的组合：

[1096] i.15D3 DD HC::西妥昔单抗KK HC::MRK16 LC

[1097] ii.15D3 DD HC::耐昔妥珠单抗KK HC::MRK16 LC

[1098] 缩写“DD”和“KK”是指带电荷对取代。

[1099] 15D3 DD HC::西妥昔单抗KK HC::MRK16 LC抗体保留与MDR1的结合(如使用过表达MDR1的293T细胞通过FACS测量的)和与EGFR的结合(如通过ELISA测量的)。

[1100] 15D3 DD HC::耐昔妥珠单抗KK HC::MRK16 LC抗体保留与MDR1的结合(如使用过表达MDR1的293T细胞通过FACS测量的)和与EGFR的结合(如使用过表达EGFR的293T细胞通过FACS测量的)。该抗体在ELISA测定中未显示出显著的结合。

[1101] 还测试了VH和VL链的另外的组合。使用抗MDR1抗体UIC2的VH链代替15D3以产生双

特异性抗体:

[1102] UIC2 DD HC::西妥昔单抗KK HC::MRK16 LC。在本申请的详细描述中提供了UIC2 VH序列。然而,该抗体未显示出与MDR1的显著结合。

[1103] 在图31中总结了这些数据。

[1104] 抗MDR1抗EGFR双特异性抗体形式2

[1105] 将抗MDR1 MRK16抗体的VH链和抗MDR1抗体15D3的VL链与抗EGFR抗体西妥昔单抗的VH区组合测试,以产生抗体MRK16 DD HC::西妥昔单抗KK HC::15D3 LC。所述抗体还保留与MDR1的结合(如使用过表达MDR1的293T细胞通过FACS测量的)和与EGFR的结合(如通过ELISA测量的)。

[1106] 抗MDR1抗EGFR双特异性抗体形式3

[1107] 产生了保留来自相同抗MDR1抗体的VH和VL区并与西妥昔单抗VH区组合的双特异性抗体:

[1108] i.MRK16 DD HC::西妥昔单抗KK HC::MRK16 LC

[1109] ii.15D3 DD HC::西妥昔单抗KK HC::15D3 LC

[1110] 如图31中所总结,15D3 DD HC::西妥昔单抗KK HC::15D3 LC抗体与MDR-1和EGFR二者结合。MRK16 DD HC::西妥昔单抗KK HC::MRK16 LC还与MDR-1和EGFR二者结合,但与15D3 DD HC::西妥昔单抗KK HC::15D3 LC抗体相比以较低的亲和力与EGFR结合。

[1111] 还构建了UIC2 HC DD::EGFR HC KK::15D3 LC抗体。类似于当MRK16 LC与UIC HC组合时的观察结果,该抗体也未能与MDR1结合。参见图31。

[1112] 双特异性抗体中15D3 VH/VL链和MRK16 VL/VH链的序列在本申请的详细描述中。以下提供了西妥昔单抗和耐昔妥珠单抗的重链和轻链区的氨基酸序列。

[1113] 西妥昔单抗重链

[1114] QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPTFSTRLSI
NKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1115] HCDR1:NYGVH

[1116] HCDR2:VIWSGGNTDYNTPTFS

[1117] HCDR3:ALTYDYEFAY

[1118] 西妥昔单抗轻链

[1119] DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGGT
DFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[1120] LCDR1:RASQSIGTNIH

[1121] LCDR2:YASESIS

[1122] LCDR3:QQNNNWPTT

[1123] 耐昔妥珠单抗重链

[1124] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTDYNPSLKSRV
TMSVDTSKNQFSLKVNSTAAADTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVLPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
CDKTHCTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1125] HCDR1:SGDYYWS

[1126] HCDR2:YIYYSGSTDYNPSLKS

[1127] HCDR3:VSIFGVGTFDY

[1128] 耐昔妥珠单抗轻链

[1129] EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGGT
DFTLTISSELEPEDFAVYYCHQYGSTPLTFGGGTAEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[1130] LCDR1:RASQSVSSYLA

[1131] LCDR2:DASNRAT

[1132] LCDR3:HQYGSTPLT

[1133] 图31总结了所指示的抗体与MDR1的结合(通过FACS测量的)或与TAA的结合(通过ELISA或FACS测量的)。aCD47=抗CD47;aEGFR=抗EGFR;aPDL1=抗PDL1。

[1134] 图31中的“+”指示EC50的范围是5nM-700nM。图31中的“±”指示EC50的范围是701nM-900nM。图31中的“-”指示EC50>1000nM。

[1135] 图32A-图32C显示了所列抗体的MFI测量结果:

[1136] 人IgG1抗体(“hIgG”),

[1137] 抗EGFR抗体耐昔妥珠单抗(“KT3-2”),

[1138] 抗EGFR抗MDR1双特异性抗体:

[1139] 15D3 KK HC::西妥昔单抗DD HC::15D3 LC(“KT3QDD 15D3KK 15D3”);

[1140] MRK16 KK HC::西妥昔单抗DD HC::MRK16 LC(“KT3QDD MRK16KK MRK16”);

[1141] 15D3 DD HC::西妥昔单抗KK HC::MRK16 LC(“KT3QKK 15D3DD MRK16”);

[1142] 15D3 DD HC::耐昔妥珠单抗KK HC::MRK16 LC(“KT3-2KK 15D3DD 1MRK16”)

[1143] 图32A显示了双特异性抗体中的每一种与过表达MDR1的293T细胞结合。在图中指示的抗EGFR抗体耐昔妥珠单抗如KT3-2未显示与这些细胞的显著结合,这类似于阴性对照人IgG1抗体。

[1144] 图32B显示了双特异性抗体中的每一种与过表达EGFR的293T细胞结合,其亲和力显著低于抗EGFR抗体耐昔妥珠单抗“KT3-2”与所述细胞的结合亲和力。图32C显示了图32B中所示的双特异性抗体的结合数据,其中Y轴显示MFI在≤400的范围内。293T细胞不表达EGFR(参见图32A)。过表达EGFR的293T细胞表达EGFR至可检测水平,然而,EGFR表达相对较低,这说明双特异性抗体对这些细胞的低亲和力。相比之下,在过表达MDR1的293T细胞中MDR1的表达水平相当高,这说明了双特异性抗体即使在不存在EGFR表达的情况下也进行结合。

[1145] 下表6-7中提供了对于所述双特异性抗体测量的EC50的总结。在这些基于293细胞

的FACS测定中,EC50是产生半最大反应的抗体浓度(OD450):

[1146] 表6:抗MDR1抗EGFR双特异性Ab与293T-B10X细胞的结合

[1147]	Ab	EC50 (nM)
	15D3DD:耐昔妥珠单抗 KK:MRK16	33.1
	15D3DD:西妥昔单抗 KK:MRK16	53
	15D3KK:西妥昔单抗 DD:15D3	76.8
	MRK16KK:西妥昔单抗 DD:MRK16	144.7
	15D3	25.1
[1148]	MRK16	58.8
	hIgG1	NB

[1149] 表7:抗MDR1抗EGFR双特异性Ab与293T-EGFR OX细胞的结合

[1150]	Ab	EC50 (nM)
	15D3DD:耐昔妥珠单抗KK:MRK16	110.2
	15D3DD:西妥昔单抗KK:MRK16	85.3
	15D3KK:西妥昔单抗DD:15D3	ND
	MRK16KK:西妥昔单抗DD:MRK16	112.1
	耐昔妥珠单抗	0.13
	15D3	ND
	MRK16	ND
	hIgG1	NB

[1151] NB=未结合

[1152] ND=未进行

[1153] 实施例13:产生具有人源化5F9 VH区的双特异性抗MDR1抗CD47抗体

[1154] 为了选择要用作CDR移植模板的人抗体框架(FR),将小鼠5F9 VH区与人种序列的那些进行比较。最终选择来自人VH5-51和VH7-4和VH3-23的FR作为设计人源化5F9 VH的起点。

[1155] 接下来,产生人源化15D3 HC::5F9 HC::MRK16 LC双特异性构建体,并用293T细胞和293T-CD47 K0细胞通过流式细胞术分析进行检查。与人源化MRK16 LC配对的5F9.huVH5和5F9.huVH3 HC二者均可以与CD47结合(数据未示出)。

[1156] 尽管出于清楚理解的目的已经通过说明和实施例详细地描述了前述发明,但是根据本发明的教导,本领域普通技术人员容易清楚的是,可以在不脱离所附权利要求的精神或范围的情况下对其进行某些改变和修改。

[1157] 因此,前面仅说明了本发明的原理。应当理解,本领域技术人员将能够设计出各种安排,这些安排虽然未在本文中明确描述或示出,但体现了本发明的原理并且包括在其精神和范围内。此外,本文所述的所有实施例和条件语言主要旨在帮助读者理解本发明的原

理和诸位发明人为推进本领域所贡献的概念,并且应被解释为不限于此类具体叙述的实施例和条件。此外,本文叙述本发明的原理、方面和实施方案以及其具体实施例的所有陈述旨在包括其结构和功能等同物二者。另外,此类等同物旨在包括当前已知的等同物和将来开发的等同物,即,所开发的执行相同功能的任何元件,而不管结构如何。此外,本文所公开的任何内容都不旨在专用于公众,不管这种公开内容是否在权利要求中明确地叙述。

[1158] 因此,本发明的范围不旨在受限于本文示出并描述的示例性实施方案。相反,本发明的范围和精神由所附权利要求体现。在权利要求中,35U.S.C. §112 (f) 或35U.S.C. §112 (6) 被明确地定义为仅当在权利要求中限制的开头引用了确切短语“用于……的手段”或确切短语“用于……的步骤”时,才在权利要求中针对这种限制援引;如果未在权利要求的限制中使用这种确切短语,那么不援引35U.S.C. §112 (f) 或35U.S.C. §112 (6) 。

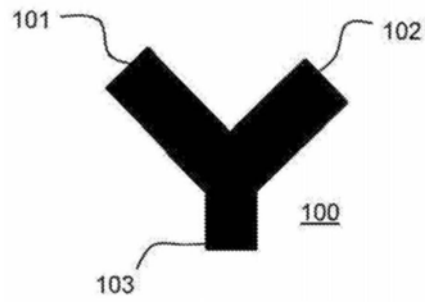


图1A

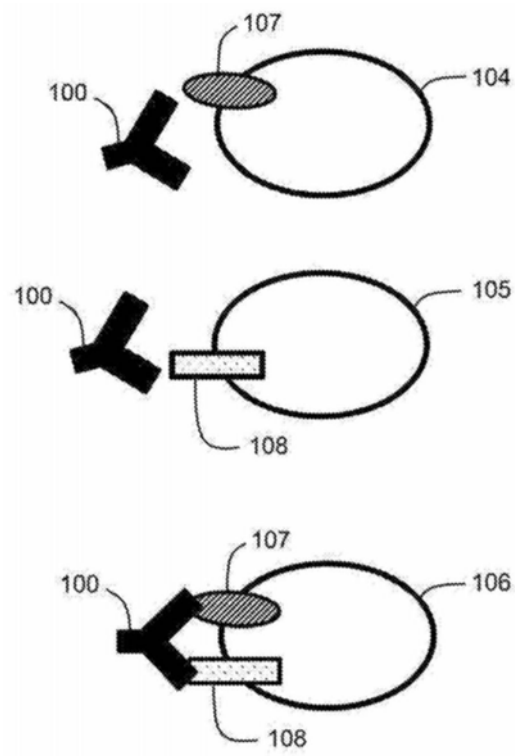


图1B

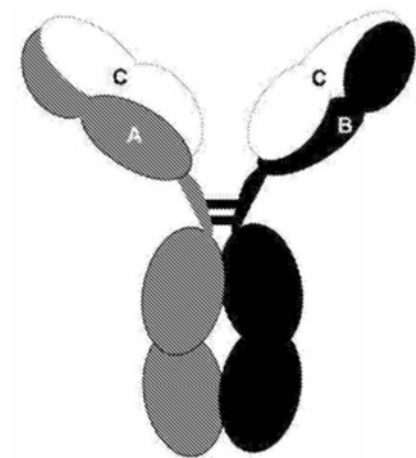


图2

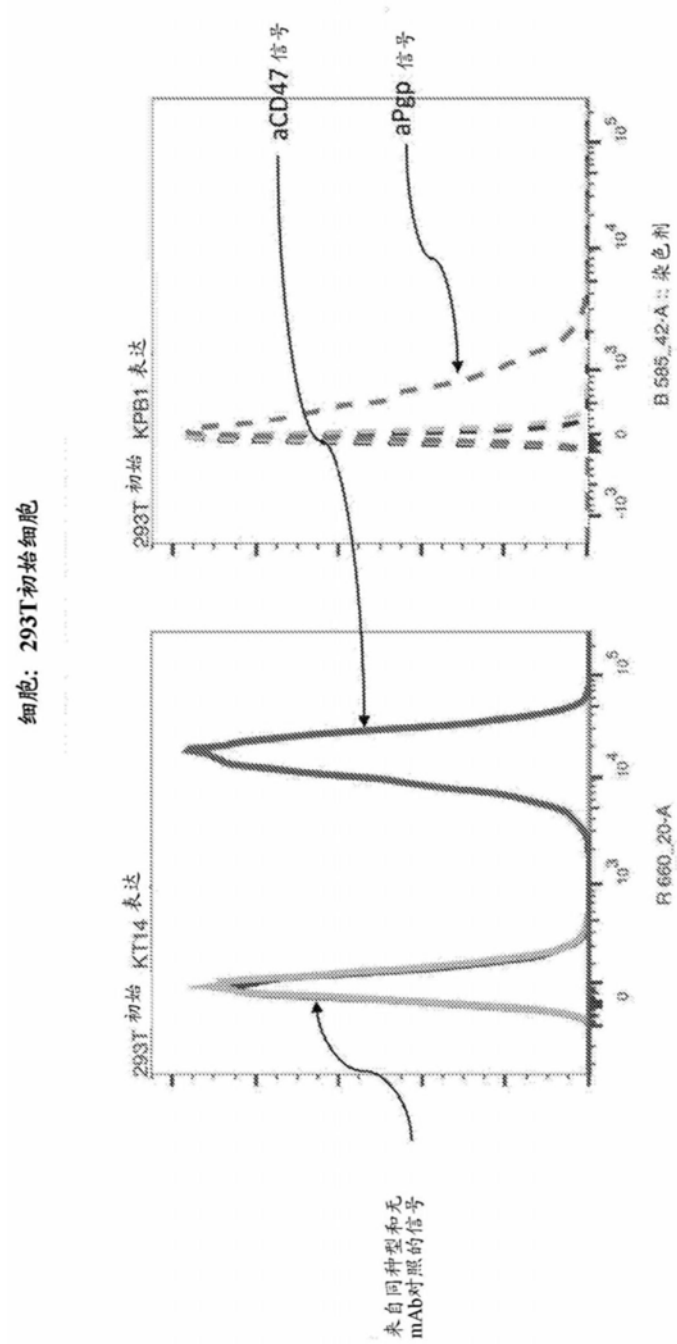


图3A

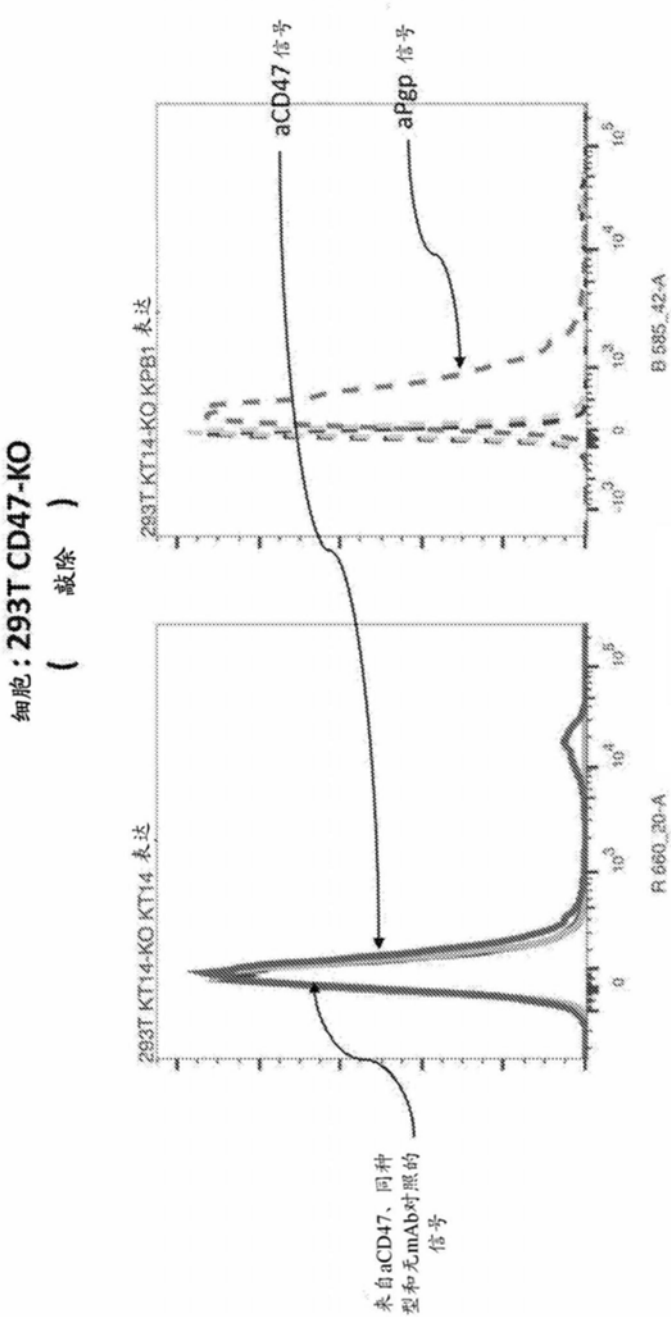


图3B

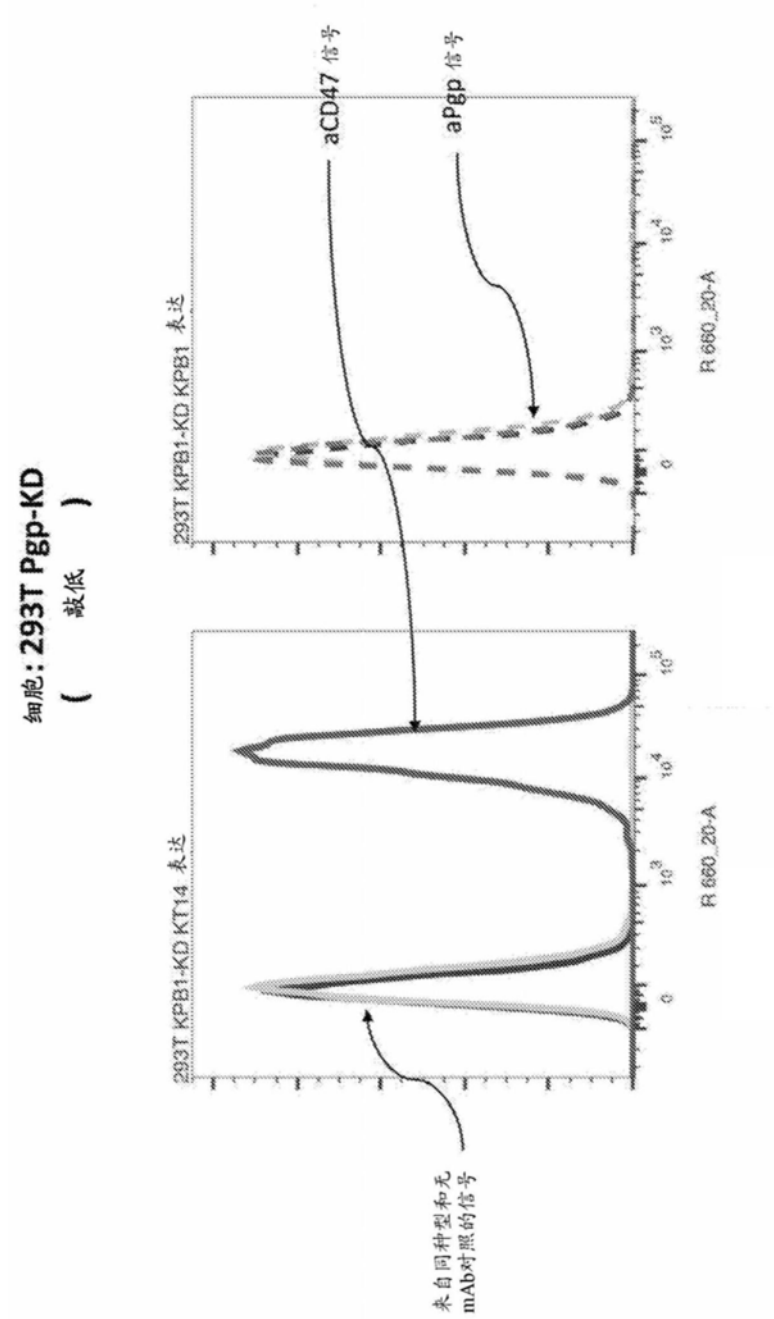


图3C

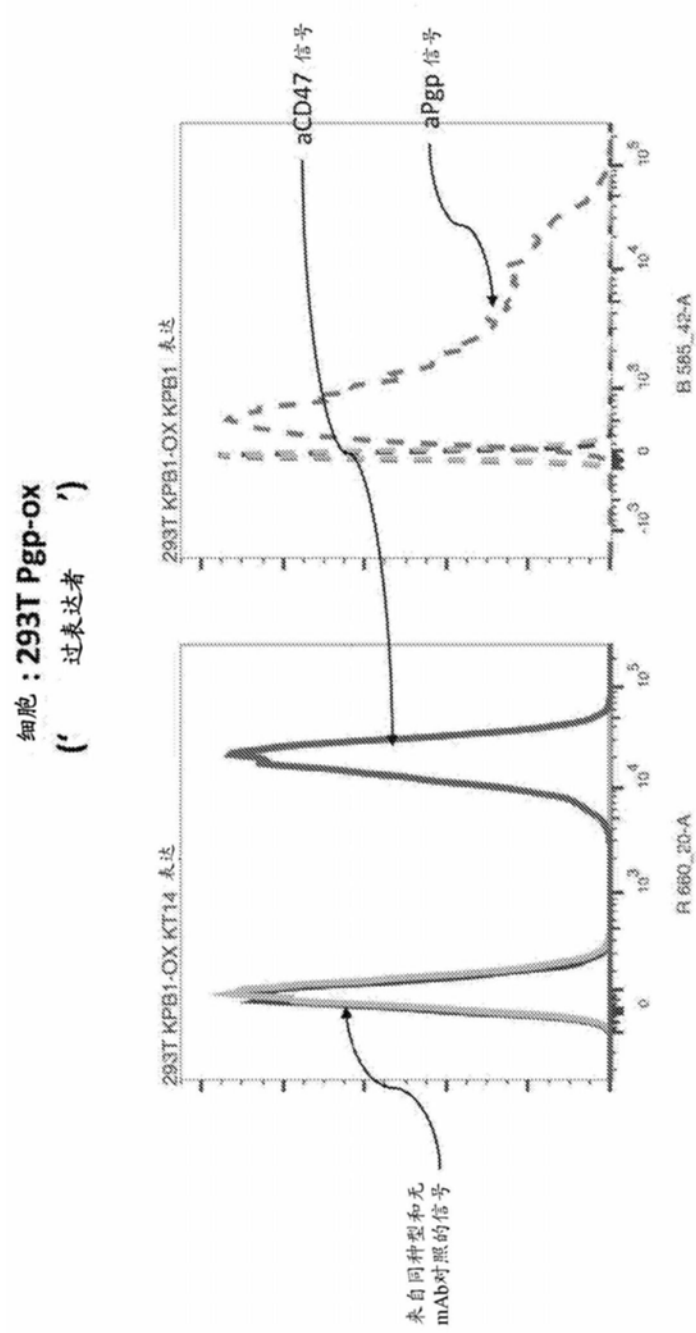


图3D

细胞: N6ADR (阿霉素耐药性)

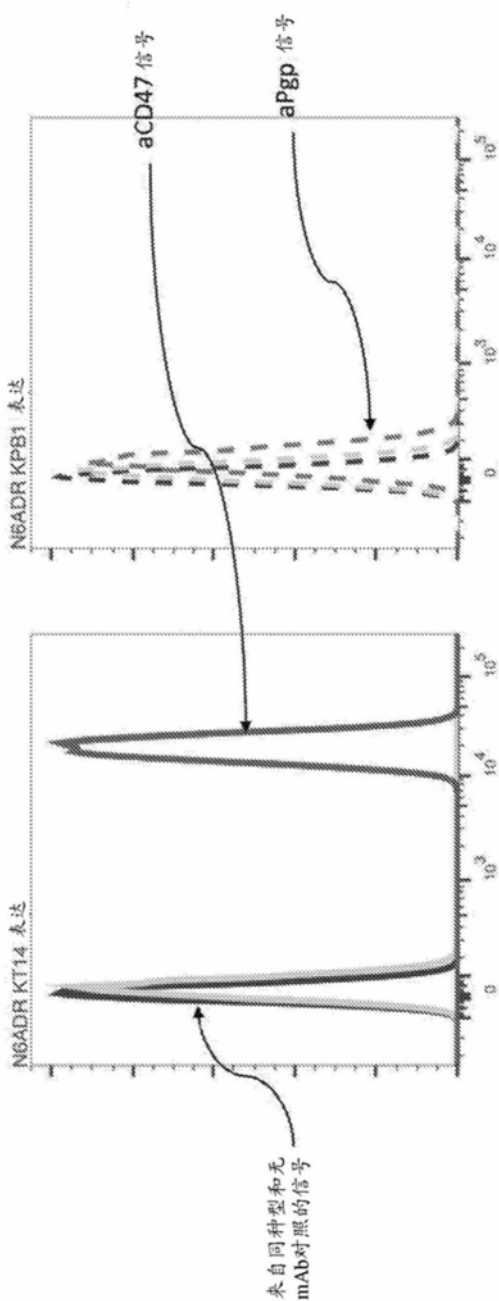


图3E

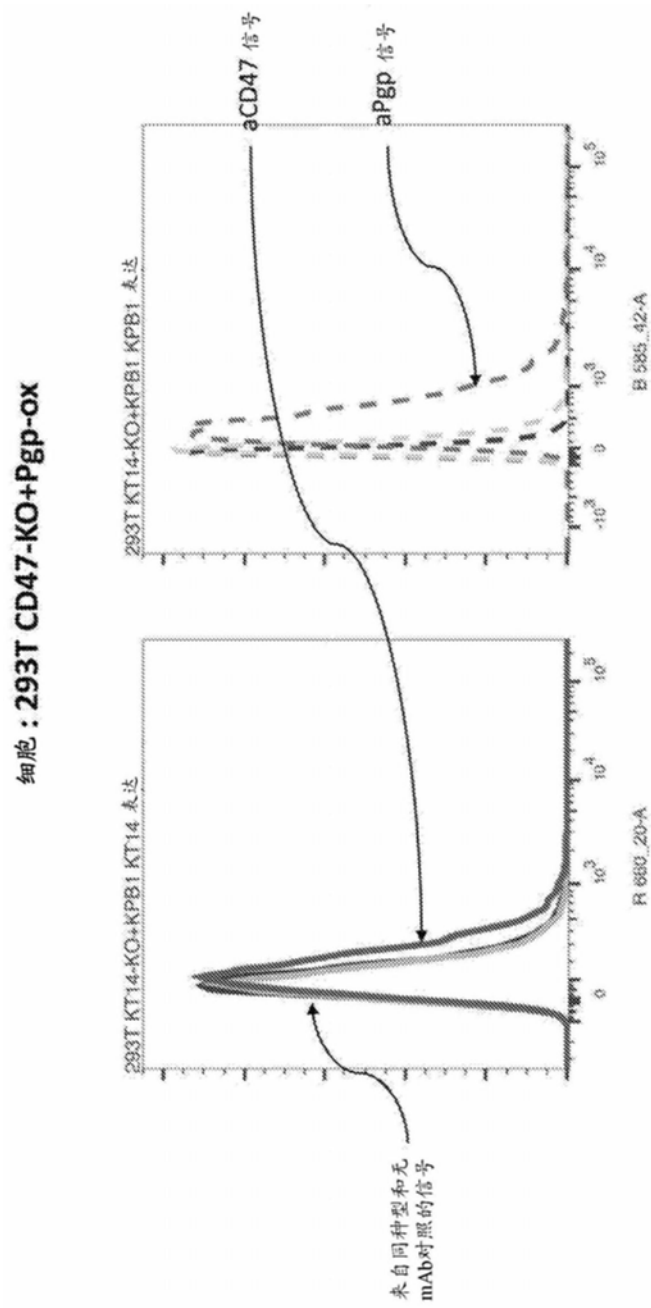


图3F

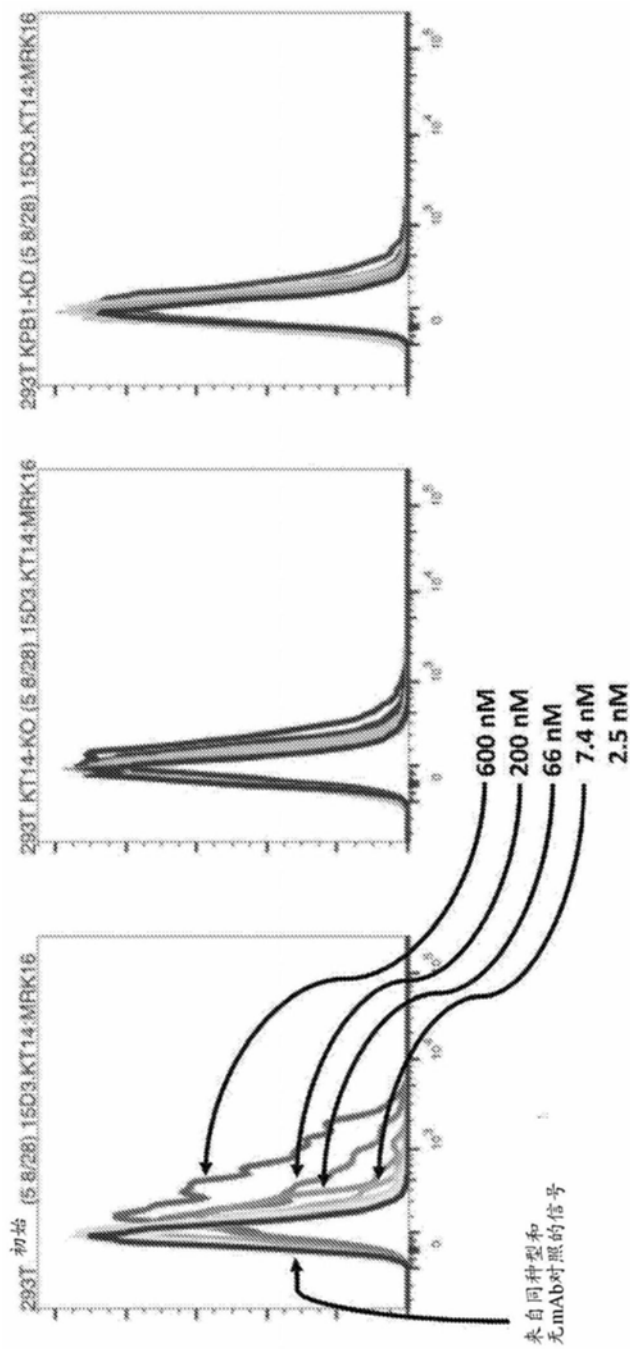


图4A

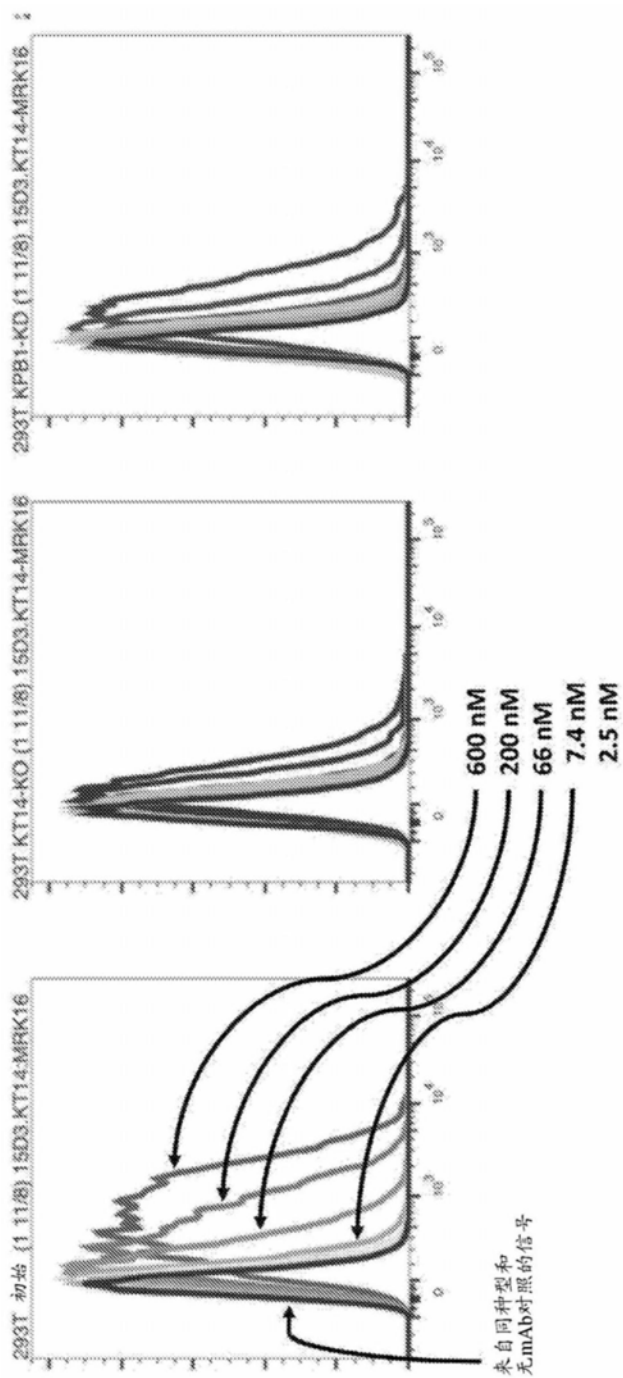


图4B

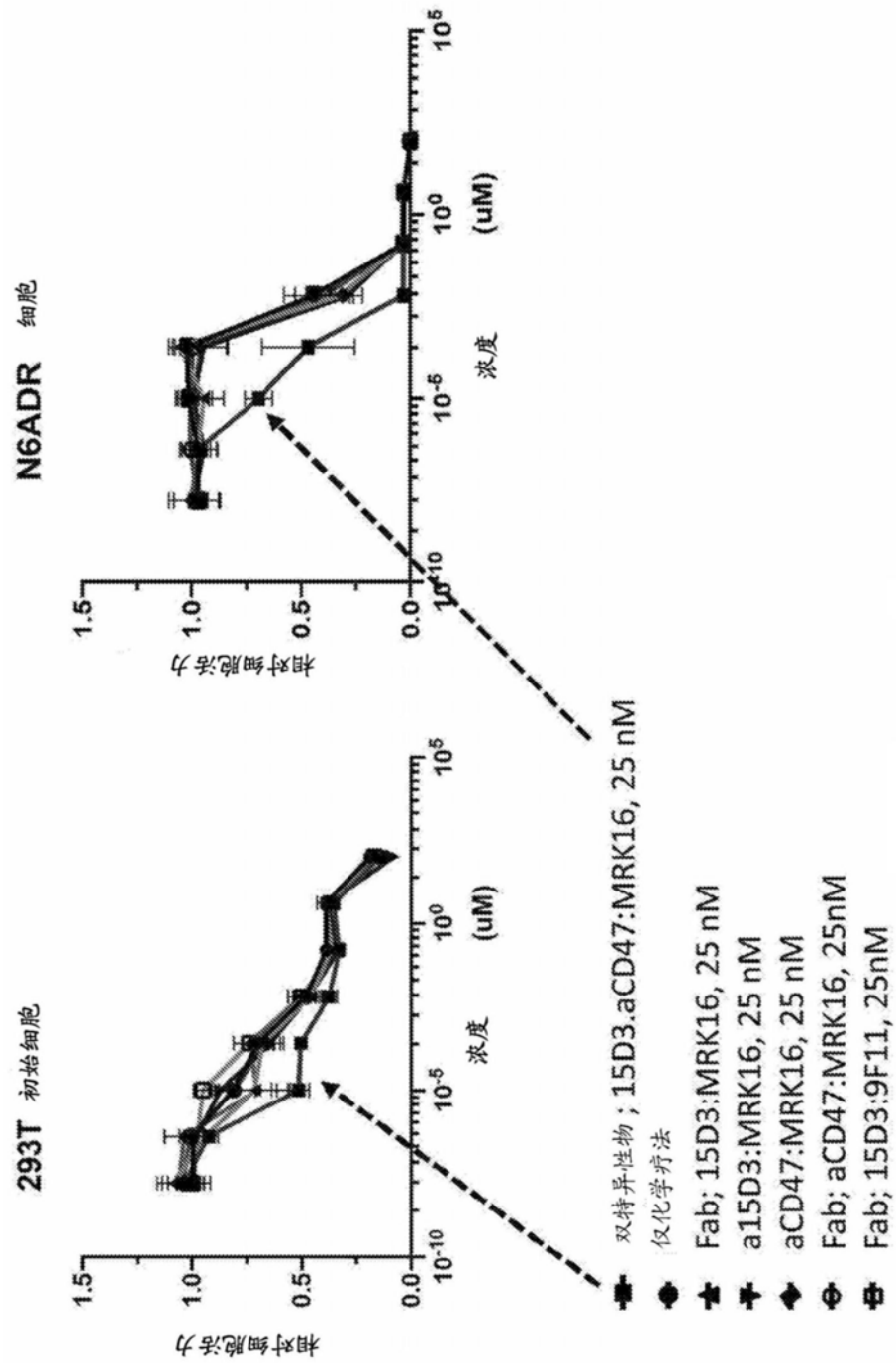


图5

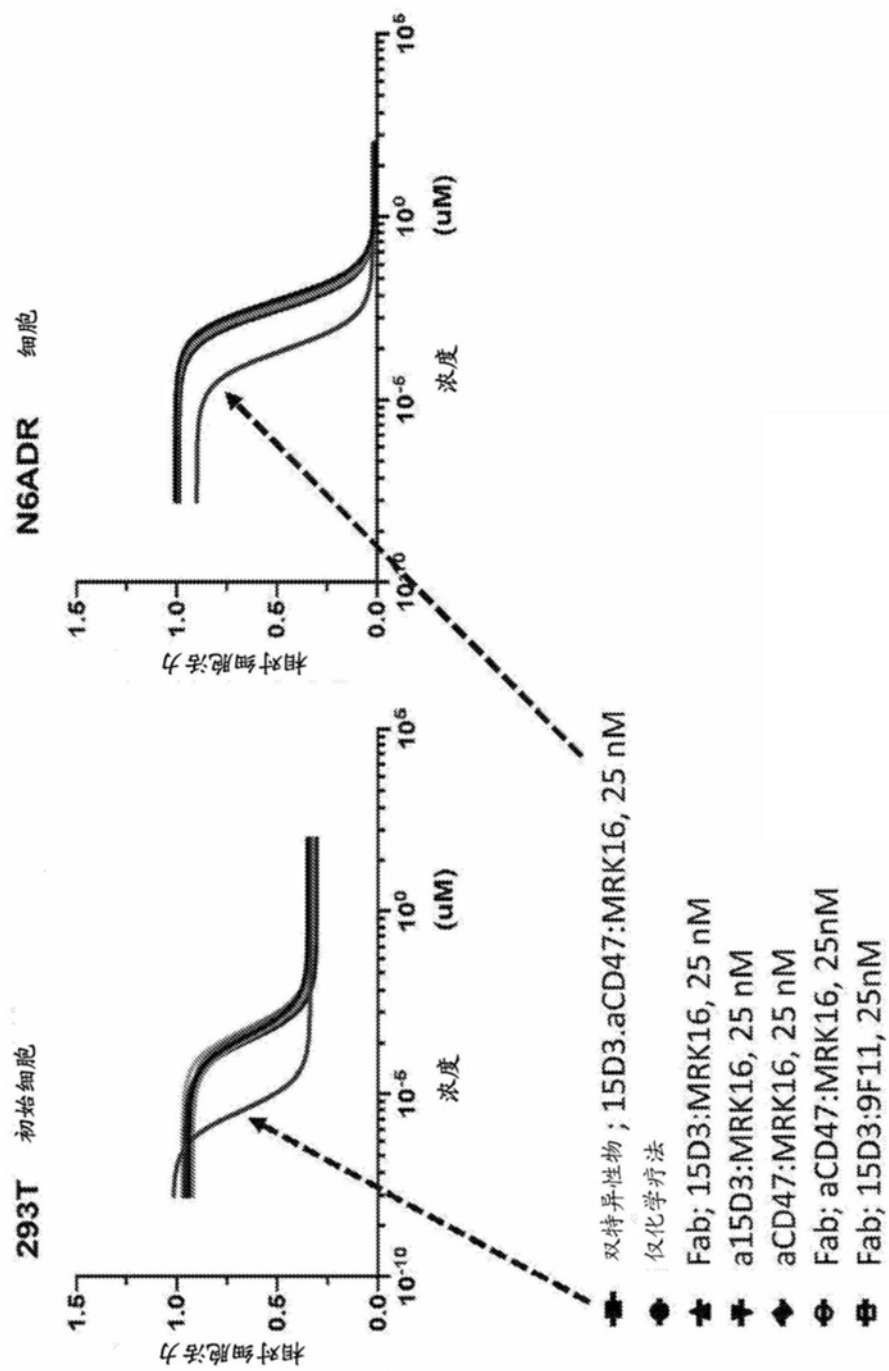


图6A

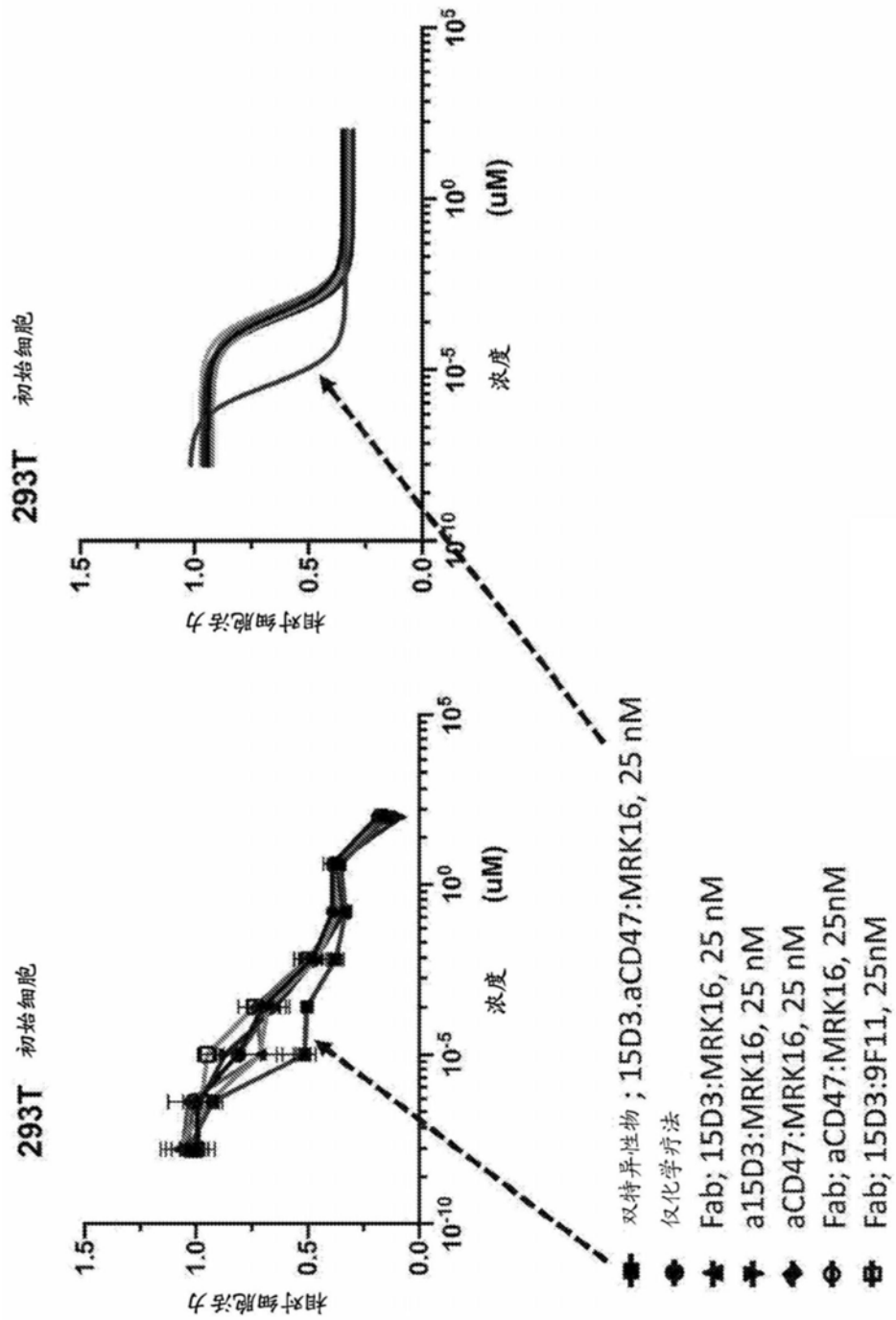


图6B

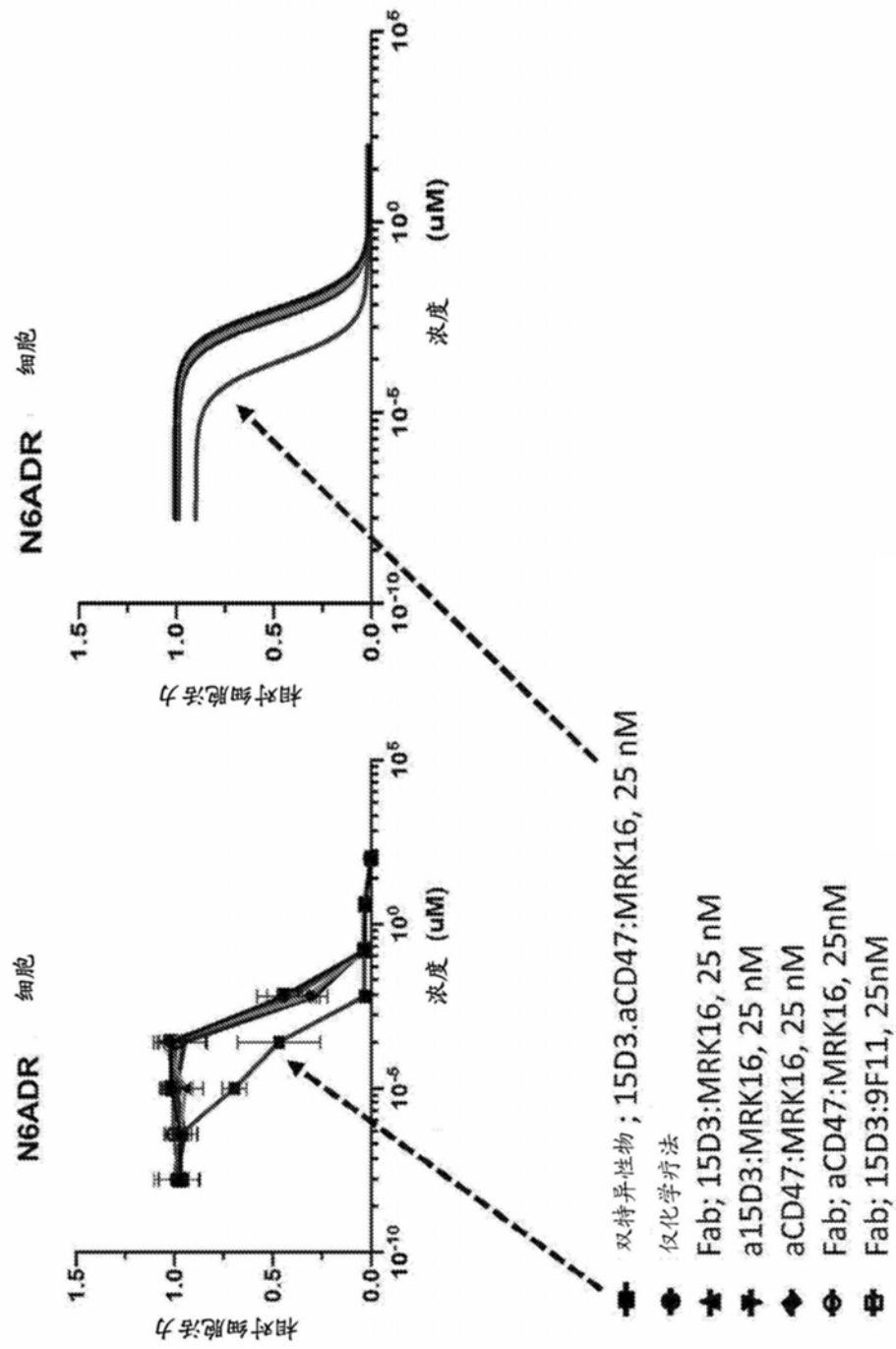


图6C

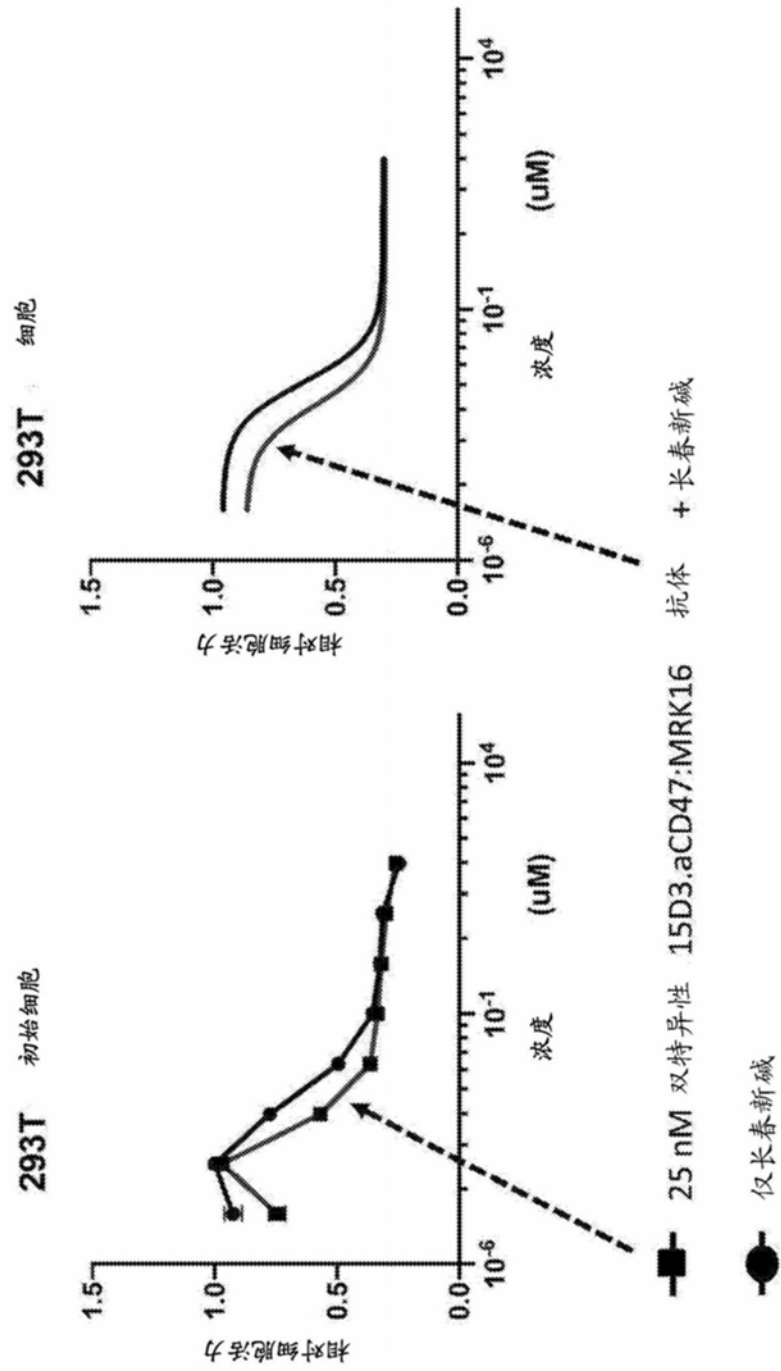


图7

Ab	Kd (nM)	Bmax	杀伤	结合 (293)	结合 (293 KO CD47)	结合 (293 KO CD47, OX ABCB1)	结合 (293 OX ABCB1)
15D3 IgG1 DD/5F9 IgG1 KK/MRK16	144.8	1.327	++	+	-	++	+
15D3 IgG1 DD/5F9 IgG1 KK/UIC2	655.4	1.211	-	-	-	-	-
15D3 IgG1 KK/5F9 IgG1 DD/9F11	74.88	1.204	-	-	-	+	+
15D3 IgG1 KK/5F9 IgG1 DD/MRK16	200	1.097	+	+	-	++	+
15D3 IgG1 KK/5F9 IgG1 DD/UIC2	1619	1.969	-	-	-	-	-
MM4.17 2 IgG1 DD/5F9 IgG1 KK/9F11	44.64	1.347	±	+	-	++	+
MM4.17 2 IgG1 DD/5F9 IgG1 KK/MRK16	75.21	1.109	±	±	-	++	+
MRK16 IgG1 KK/5F9 IgG1 DD/MRK16	205.7	1.307	+	+	-	++	+
MRK16 IgG1 KK/5F9 IgG1 DD/UIC2	868.7	1.289	-	-	-	-	-
UIC2 IgG1 KK/5F9 IgG1 DD/9F11	6.261	1.119	-	++	+	+	±
UIC2 IgG1 KK/5F9 IgG1 DD/MRK16	53.26	1.099	-	±	-	-	-
UIC2 IgG1 KK/5F9 IgG1 DD/UIC2	494.5	1.049	-	±	-	-	+

图8

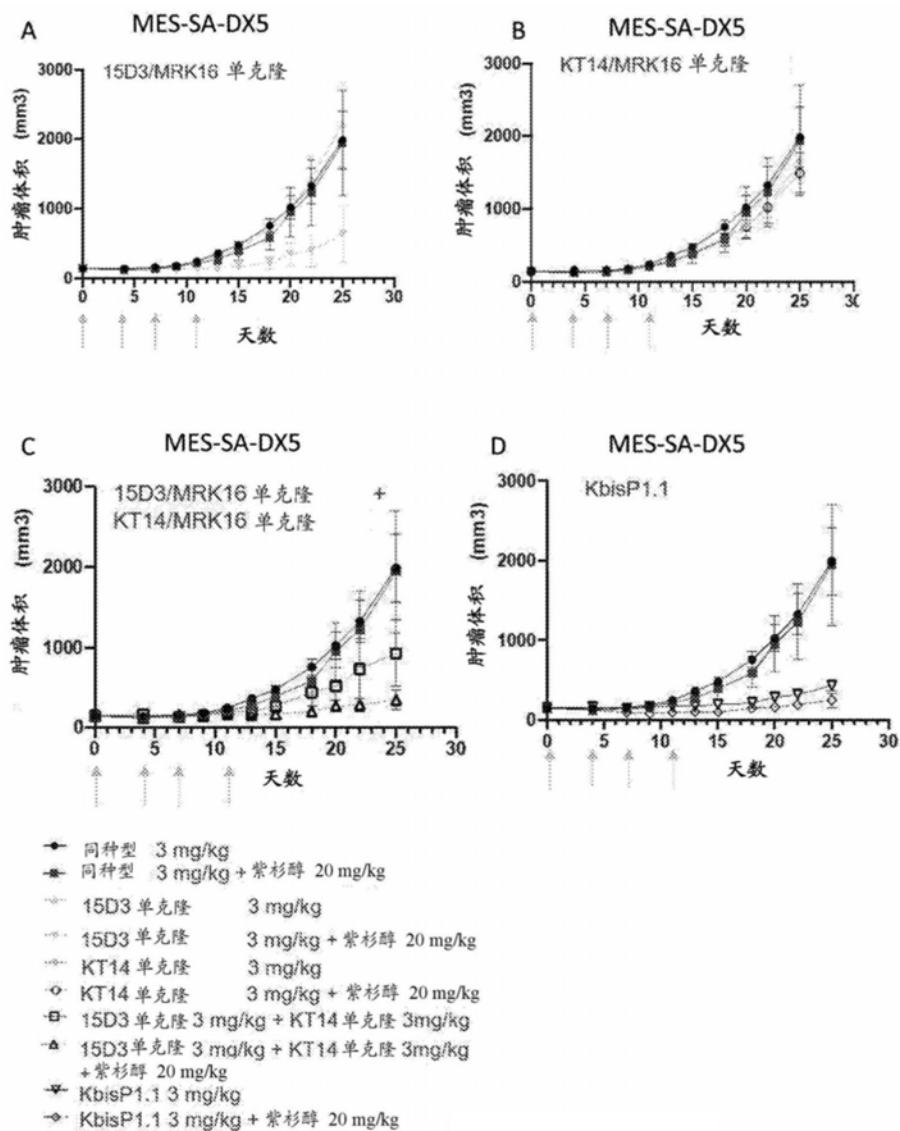


图9

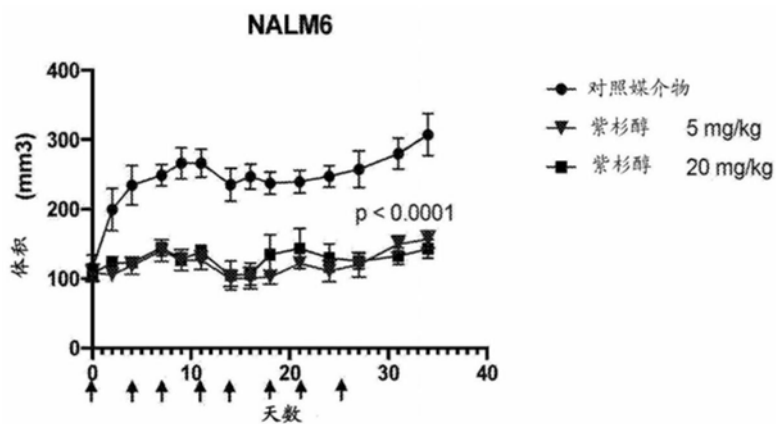


图10

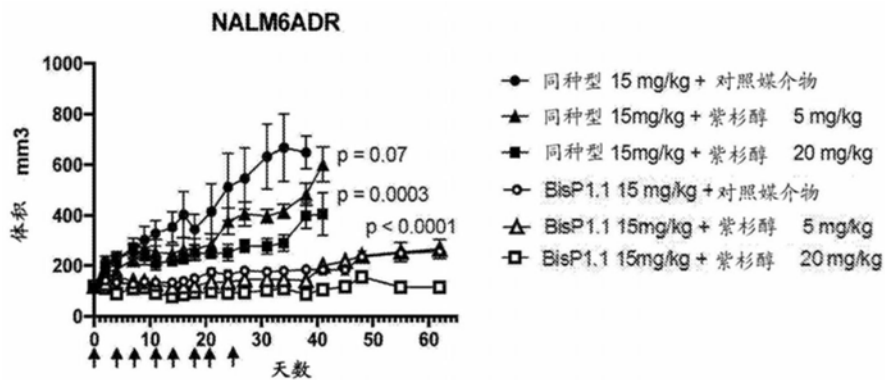


图11

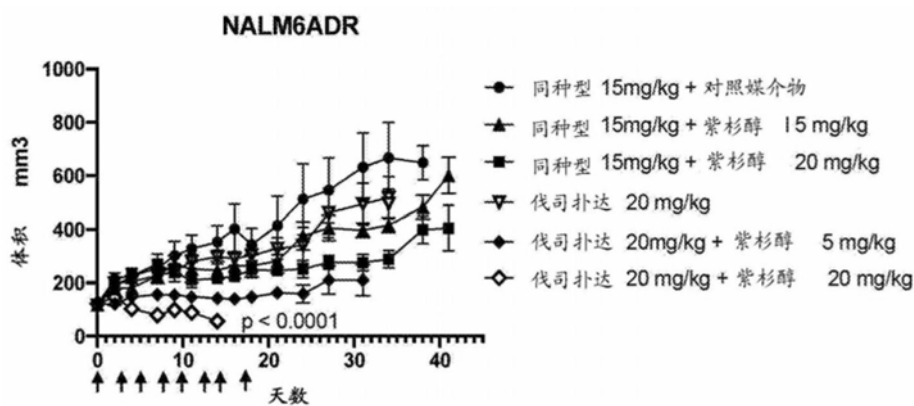


图12

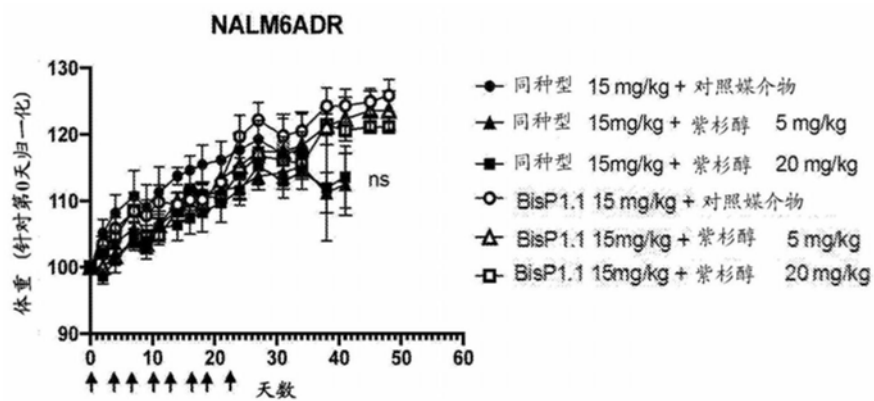


图13

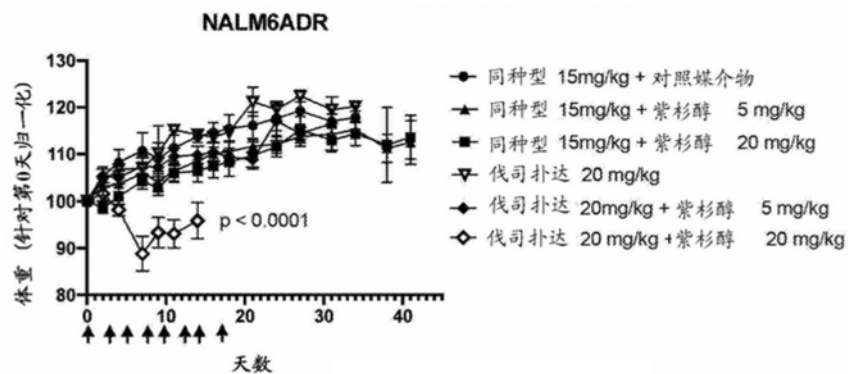


图14

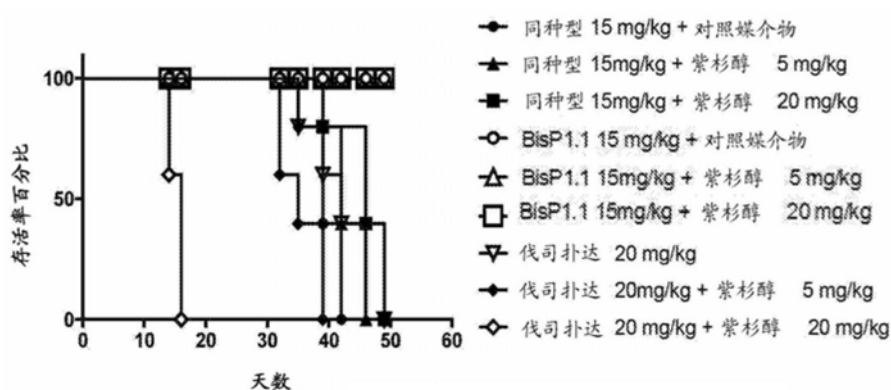


图15

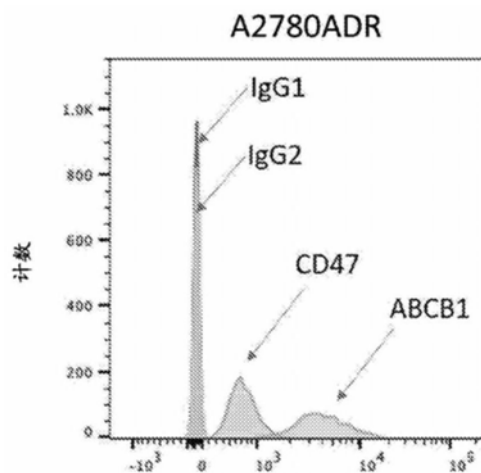


图16

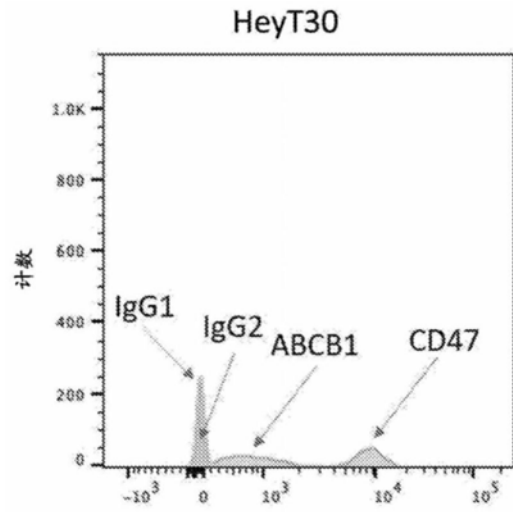


图17

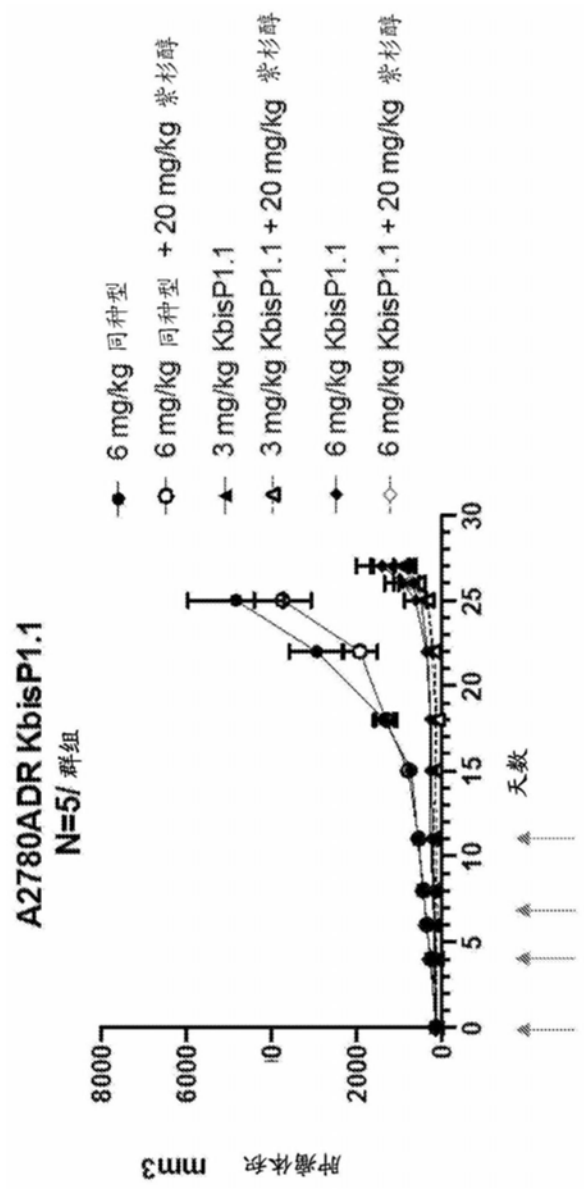


图18

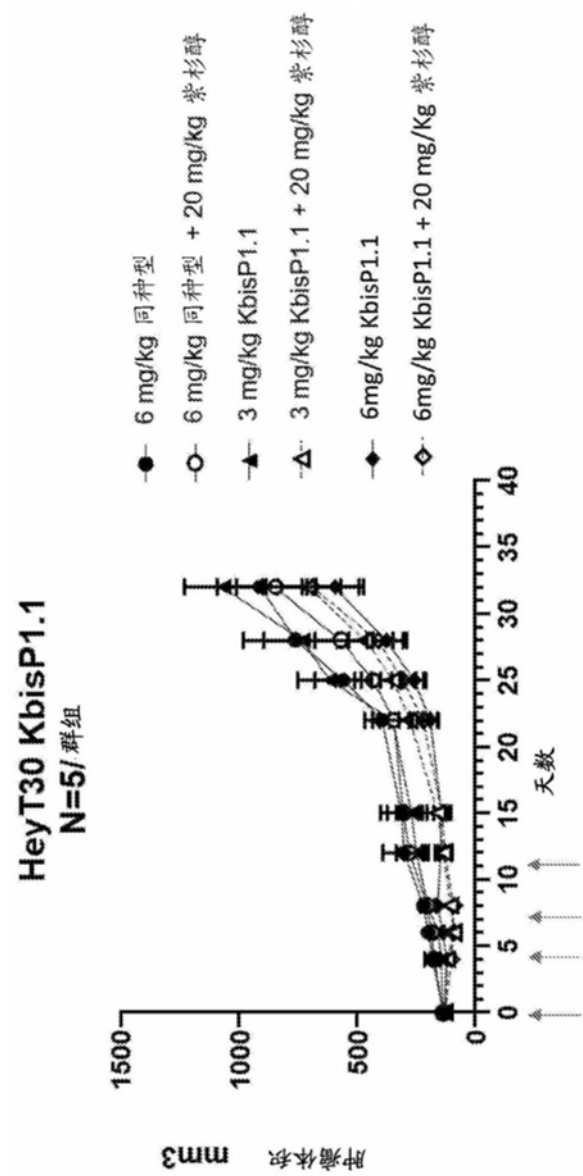


图19

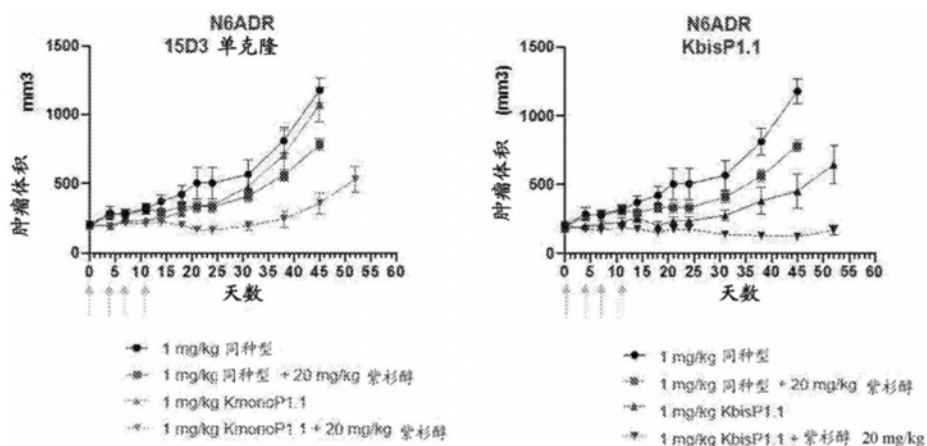


图20

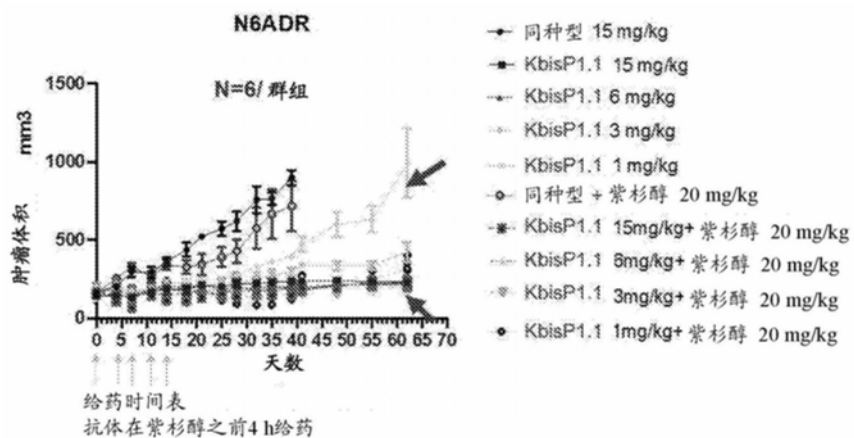


图21

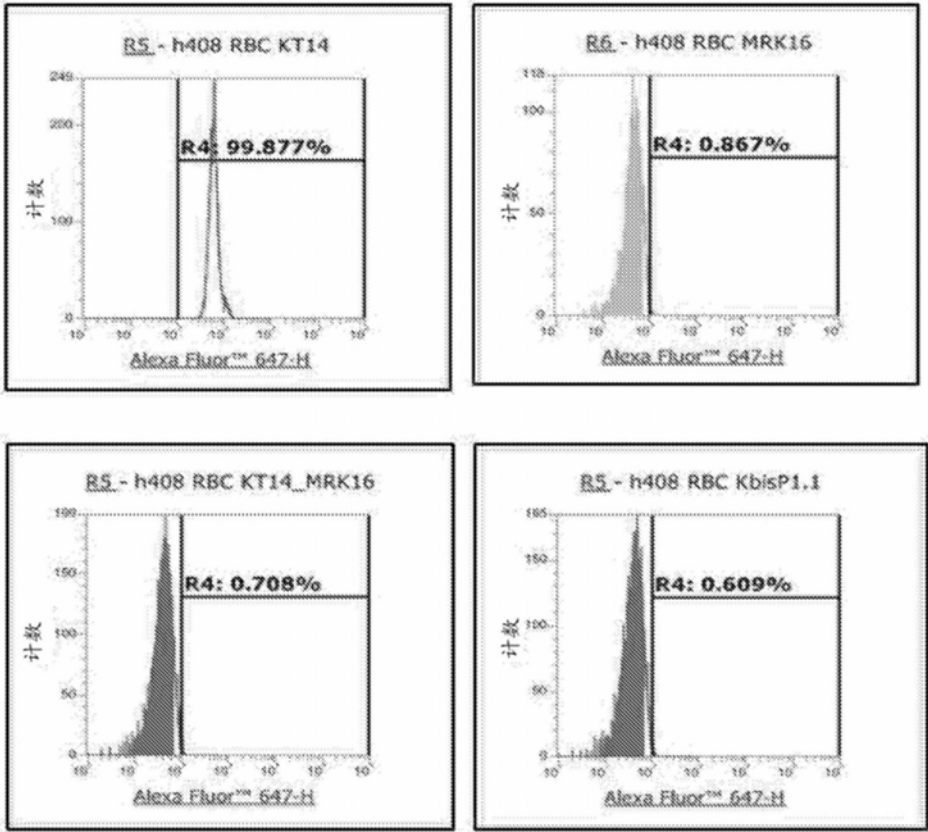


图22A

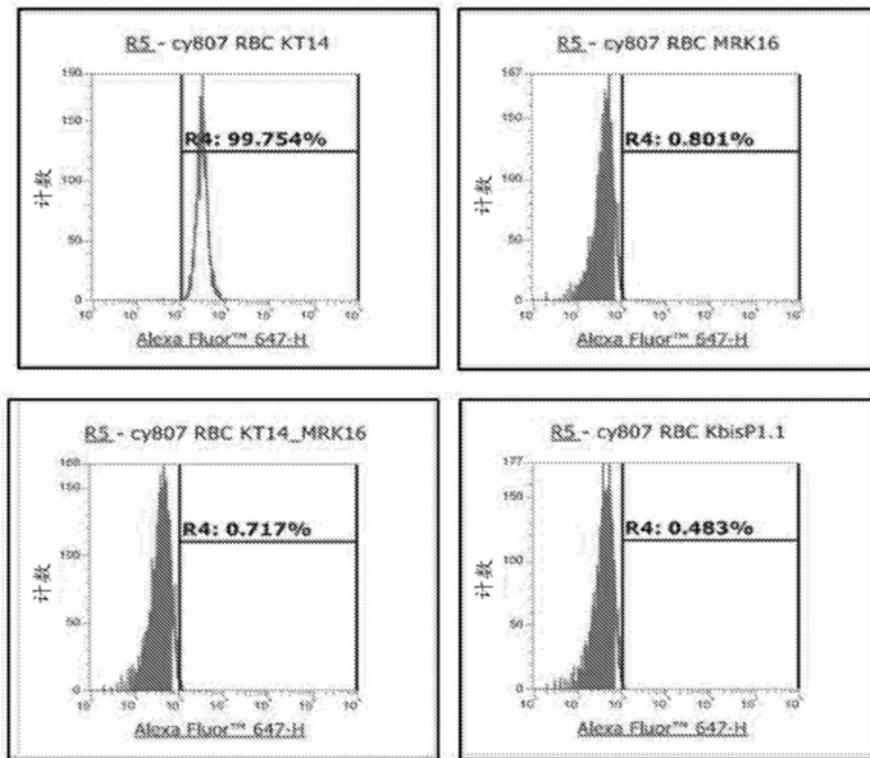


图22B

m15D3	evkvvesggvlvrpggskl	lscaasgftfsr	ymtswvrrqtpekr	lewvatisssgggntyy	60
15D3HZ0	evqlvesggvvvpqggs	rlscaasgftfsr	ymtswvrrqapgkglew	vatisssgggntyy	60
15D3HZ1	evqlvesggvvvpqggs	rlscaasgftfsr	ymtswvrrqapgkglew	vatisssgggntyy	60
15D3HZ2	evqlvesggvvvpqggs	rlscaasgftfsr	ymtswvrrqapgkglew	vatisssgggntyy	60
	::***:	*:*****:	*****:	* * *****:	***
m15D3	pdsvkgrftvsr	dnamsslylqmsslr	sedtalycaryagdgawfay	wgggtlvtvss	119
15D3HZ0	pdsvkgrftvsr	dnsknslylqmnslr	tedtalycaryagdgawfay	wgggtlvtvss	119
15D3HZ1	pdsvkgrftvsr	dnsknslylqmnslr	tedtalycaryagdgawfay	wgggtlvtvss	119
15D3HZ2	pdsvkgrftvsr	dnsknslylqmnslr	tedtalycaryagdgawfay	wgggtlvtvss	119
	*****:	*****:	*****:	*****:	*****

图23

MRK16m	dvlmtqtpvslsvslgdaqasiscrssqsivhstgntylewylqkpgqspklliyklsnrf	60
MRK16Hmz0	divmtqtp1sspvtlgqpasiscrssqsivhstgntylewylqkpgqspklliyklsnrf	60
MRK16Hmz1	divmtqtp1sspvtlgqpasiscrssqsivhstgntylewylqkpgqspklliyklsnrf	60
MRK16Hmz2	divmtqtp1sspvtlgqpasiscrssqsivhstgntylewylqkpgqspklliyklsnrf	60
	*:***** *::***** *****:***** *::***** *****	
MRK16m	sgvpdrfsgsgagtdftlklisrveaedlgvyycfqashfprtfgggtk1e1kr	113
MRK16Hmz0	sgvpdrfsgsgagtdftlklisrveaedlgvyycfqashfprtfgggtk1e1kr	113
MRK16Hmz1	sgvpdrfsgsgagtdftlklisrveaedlgvyycfqashfprtfgggtk1e1kr	113
MRK16Hmz2	sgvpdrfsgsgagtdftlklisrveaedlgvyycfqashfprtfgggtk1e1kr	113
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	

图24

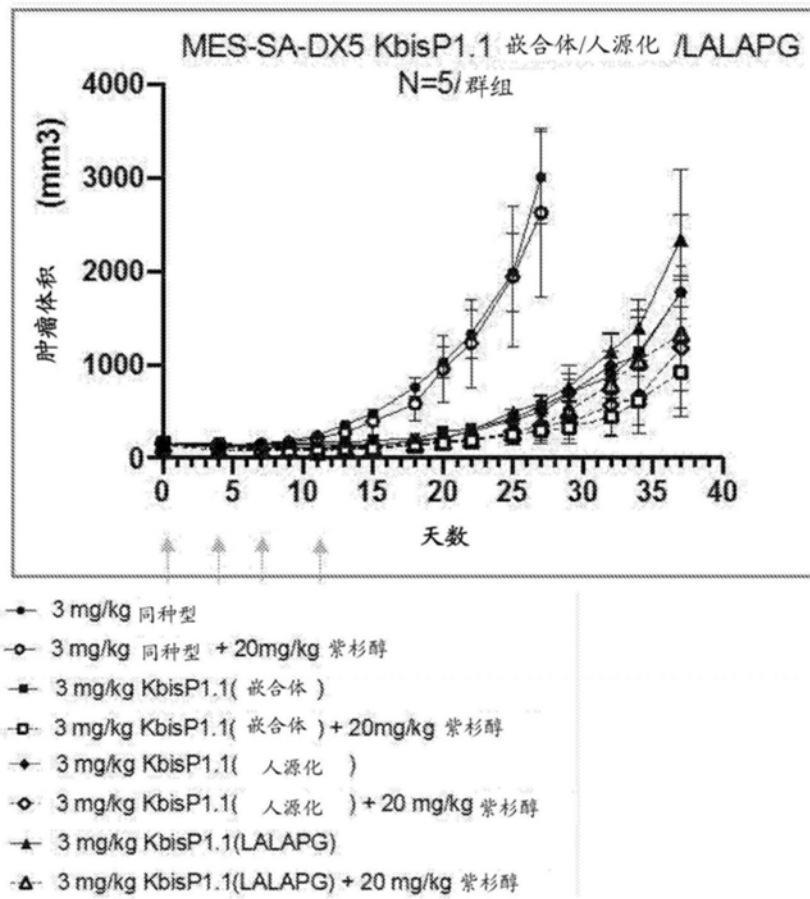


图25

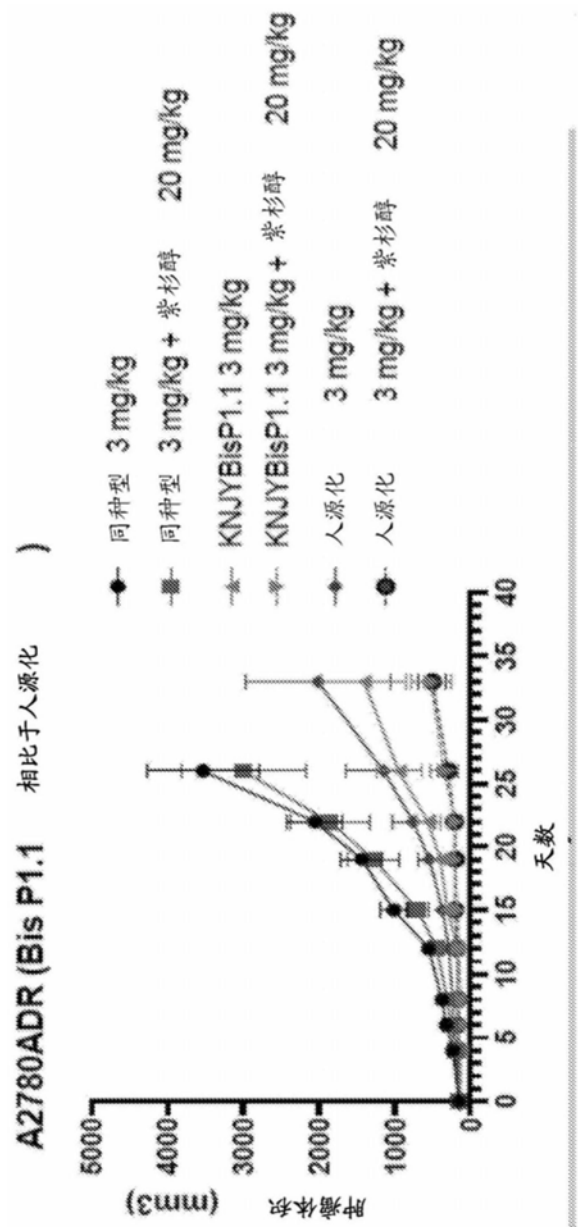


图26

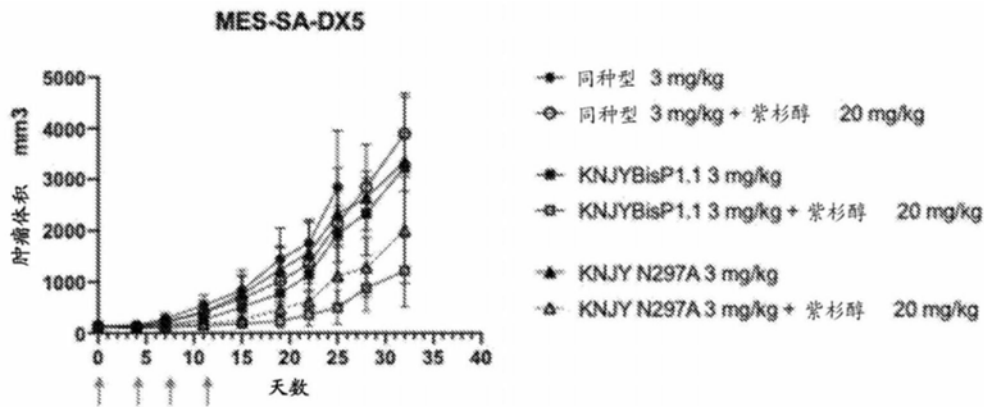


图27A

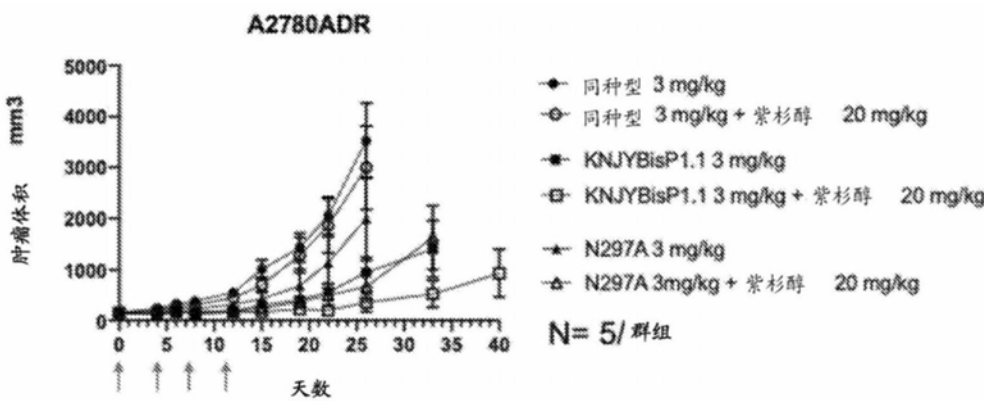


图27B

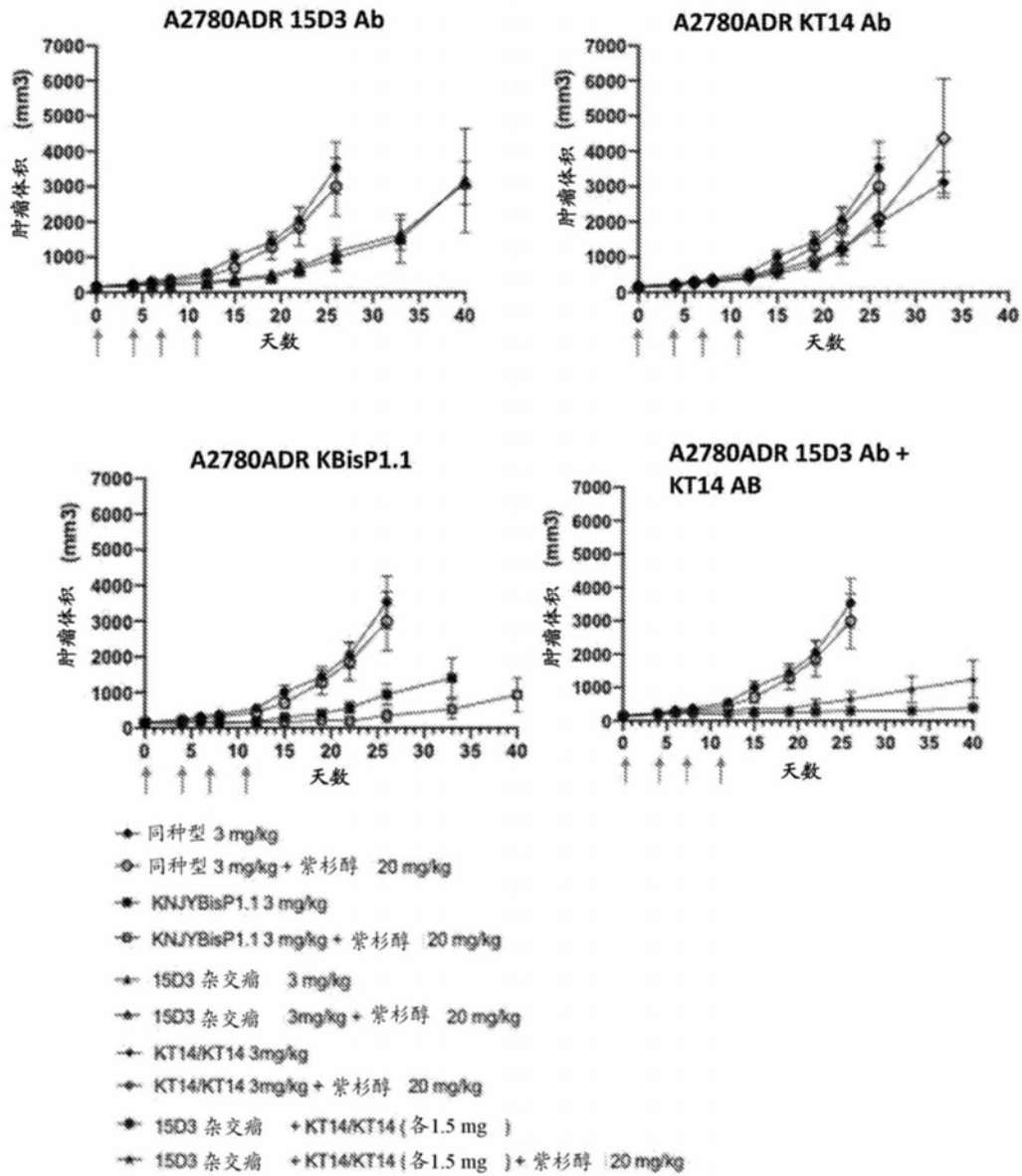


图28

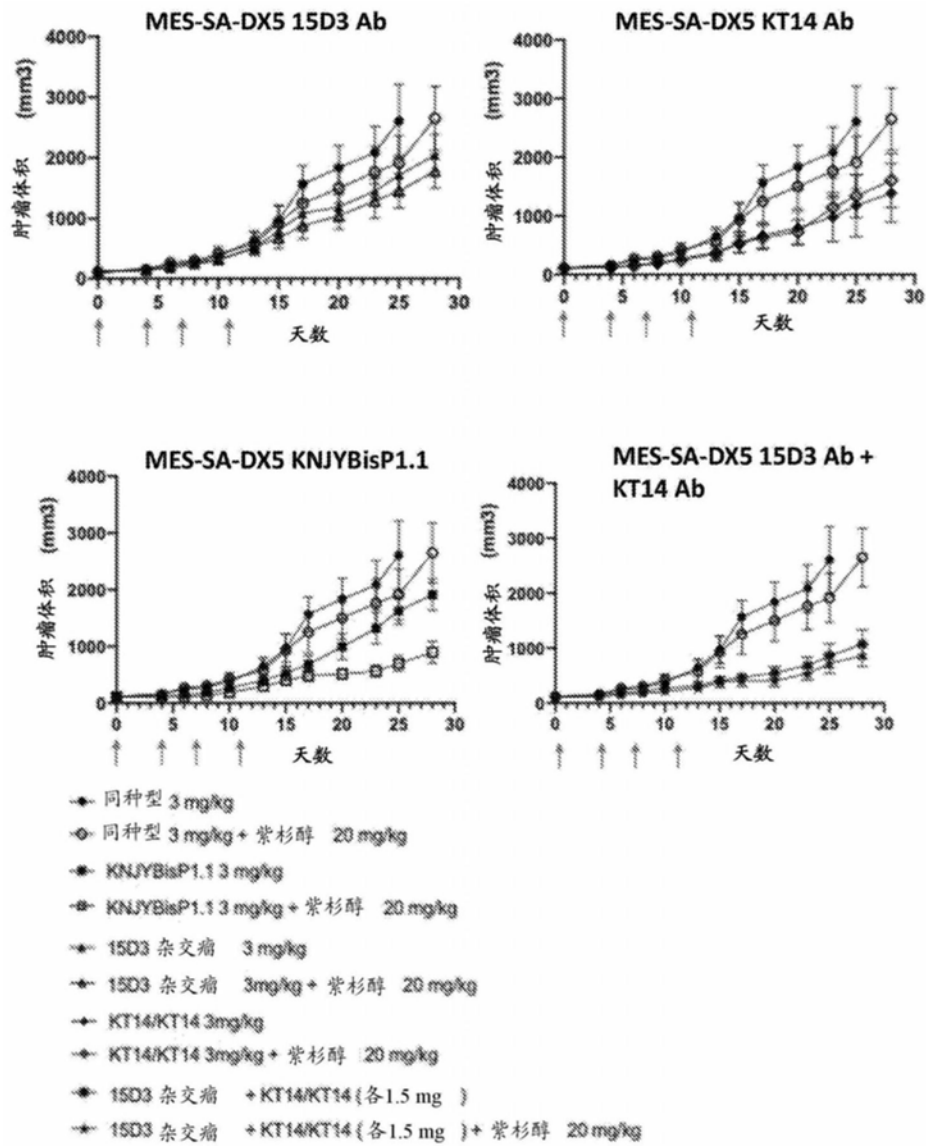


图29

KBisP1.1抗体使得乳腺PDX-CTG-2616对紫杉醇
发生化疗增敏

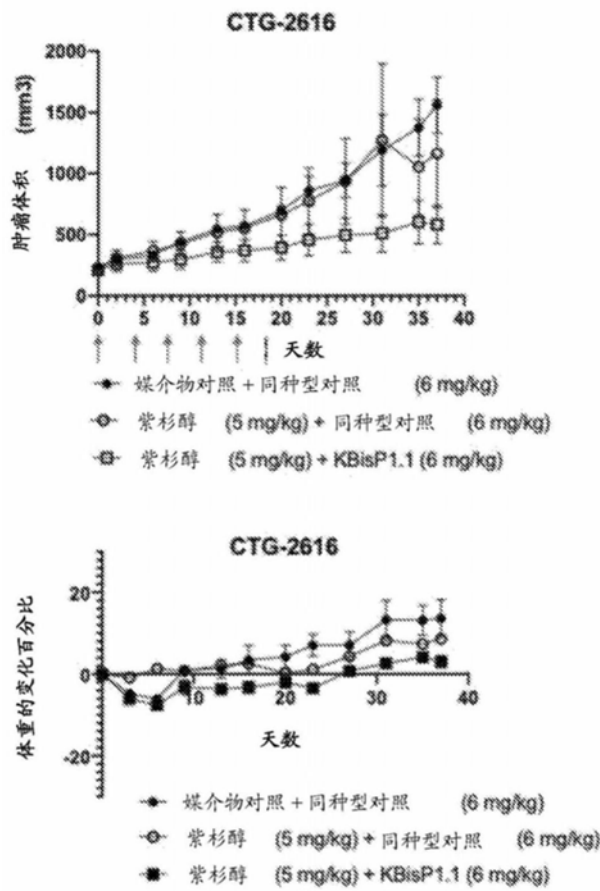


图30

HC1	HC2	LC	CD47 ELISA	MDR1 FACS	PDL1 ELISA	EGFR ELISA	EGFR FACS
15D3 hmz	5F9 (aCD47)	MRK16 hmz	+	+			
15D3	西妥昔单抗 (aEGFR)	15D3		+		+	
15D3	西妥昔单抗 (aEGFR)	MRK16		+		±	
MRK16	西妥昔单抗 (aEGFR)	15D3		+		+	
MRK16	西妥昔单抗 (aEGFR)	MRK16		+		±	
UIC2	西妥昔单抗 (aEGFR)	MRK16		-		+	
UIC2	西妥昔单抗 (aEGFR)	15D3		-		+	
15D3	耐昔安单抗 ab (aEGFR)	MRK16		+		-	+
15D3	阿特殊单抗 ab (aPDL1)	MRK16		+	+		
15D3 hmz	阿特殊单抗 ab (aPDL1)	MRK16 hmz		+	+		

图31

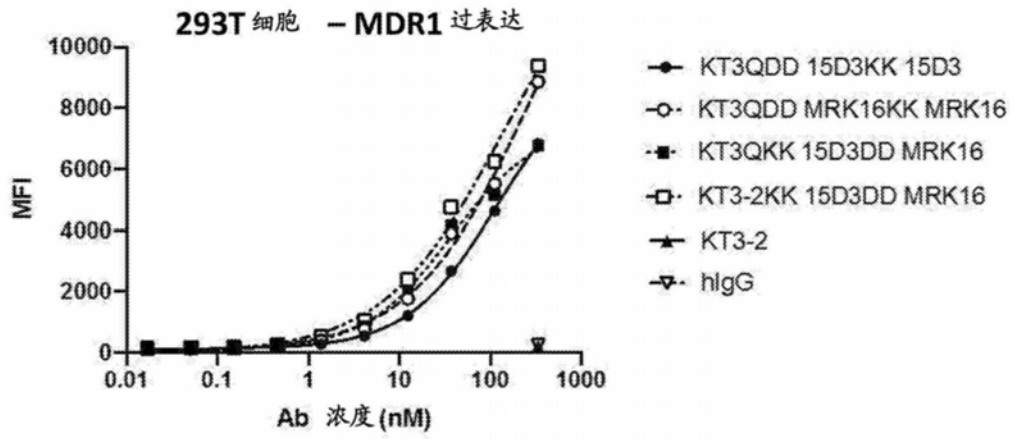


图32A

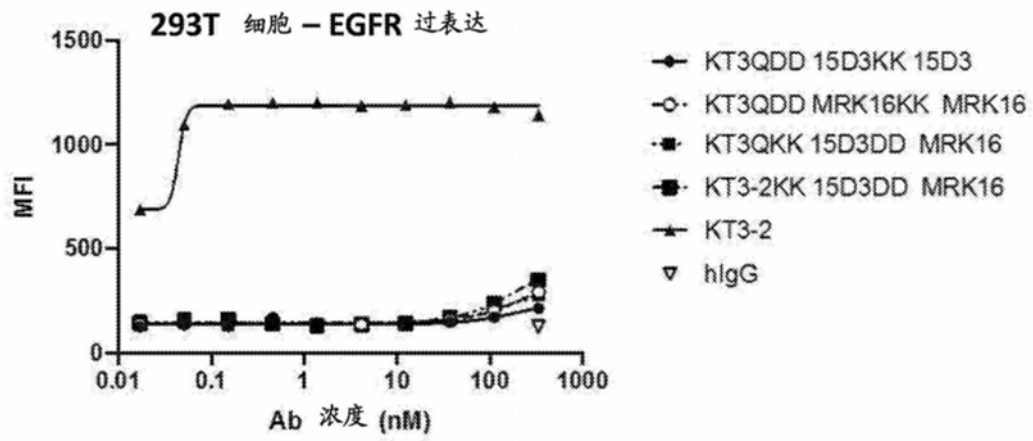


图32B

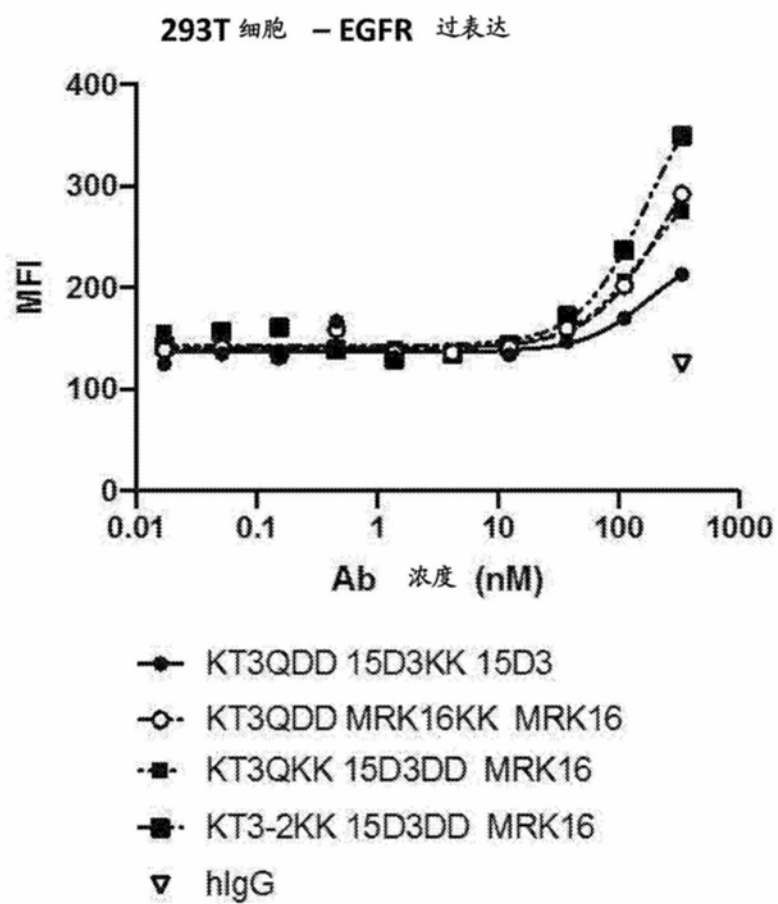


图32C