



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119136832 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 13

(21) 申请号 202380037780.4

(22) 申请日 2023.05.09

(30) 优先权数据

2022-077725 2022.05.10 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/017369 2023.05.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/219072 JA 2023.11.16

(71) 申请人 第一三共株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 河崎德人 石田佐央里

须江真由美 石本容子 川濑由美

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 权陆军 彭昶

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/68 (2006.01)

A61K 38/07 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 31/537 (2006.01)

权利要求书2页 说明书20页

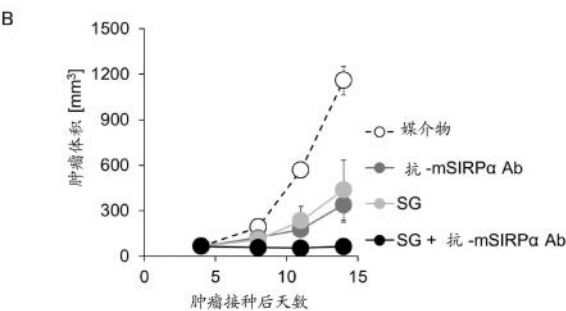
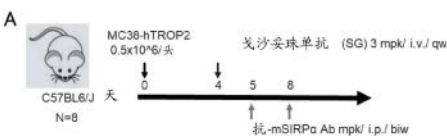
序列表(电子公布) 附图10页

(54) 发明名称

抗体-药物缀合物与抗-SIRP α 抗体的组合

(57) 摘要

提供了就抗肿瘤作用 and 安全性而言卓越的药物组合物、治疗方法和抗-SIRP α 抗体。所述药物组合物和治疗方法的特征在于抗-SIRP α 抗体和选自戈沙妥珠单抗、维泊妥珠单抗和恩美曲妥珠单抗的至少一种抗体-药物缀合物被组合且施用。所述抗-SIRP α 抗体的特征在于与所述抗体-药物缀合物组合施用。



1. 一种药物组合物,其中抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体组合施用,并且所述抗体-药物缀合物为选自戈沙妥珠单抗、维泊妥珠单抗和恩美曲妥珠单抗的任一种抗体-药物缀合物。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述抗体-药物缀合物为戈沙妥珠单抗。

3. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述抗体-药物缀合物为维泊妥珠单抗。

4. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述抗体-药物缀合物为恩美曲妥珠单抗。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的药物组合物,其中所述抗-SIRP α 抗体为下述抗体(1)至(5)中的任一种:

(1) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:1的氨基酸编号20或466的氨基酸序列组成,所述轻链由SEQ ID NO:4的氨基酸编号21或234的氨基酸序列组成;

(2) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:1的氨基酸编号20或466的氨基酸序列组成,所述轻链由SEQ ID NO:5所示的氨基酸编号21或234的氨基酸序列组成;

(3) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:2的氨基酸编号20或466的氨基酸序列组成,所述轻链由SEQ ID NO:3所示的氨基酸编号21或234的氨基酸序列组成;

(4) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:2的氨基酸编号20或466的氨基酸序列组成,所述轻链由SEQ ID NO:4所示的氨基酸编号21或234的氨基酸序列组成;和

(5) 根据(1)至(4)中任一项的抗体,其在重链羧基末端缺少赖氨酸残基。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的药物组合物,其中所述抗体-药物缀合物和所述抗-SIRP α 抗体作为活性成分分别包含在不同的制剂中,并同时或在不同时间施用。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的药物组合物,其用于治疗选自乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌、肺癌、食管癌、唾液腺癌、食管胃结合处腺癌、胆道癌、佩吉特病、胰癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、子宫癌肉瘤、头和颈癌、肝细胞癌、宫颈癌、脑肿瘤、神经胶质瘤、眼肿瘤、甲状腺癌、胸腺癌、胆囊癌、淋巴瘤、白血病和骨髓增生异常综合征的至少一种。

8. 一种治疗方法,包括向需要治疗的主体组合施用抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体,其中所述抗体-药物缀合物为选自戈沙妥珠单抗、维泊妥珠单抗和恩美曲妥珠单抗的任一种抗体-药物缀合物。

9. 根据权利要求8所述的治疗方法,其中所述抗体-药物缀合物为戈沙妥珠单抗。

10. 根据权利要求8所述的治疗方法,其中所述抗体-药物缀合物为维泊妥珠单抗。

11. 根据权利要求8所述的治疗方法,其中所述抗体-药物缀合物为恩美曲妥珠单抗。

12. 根据权利要求8至11中任一项所述的治疗方法,其中所述抗-SIRP α 抗体为下述抗体(1)至(5)中的任一种:

(1) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基20至466组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:4的氨基酸残基21至234组成;

(2) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基20至466组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基21至234组成;

(3) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基20至466组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID

NO:3的氨基酸残基21至234组成;

(4) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基20至466组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:4的氨基酸残基21至234组成;和

(5) 根据(1)至(4)中任一项的抗体,其在重链羧基末端缺少赖氨酸残基。

13. 根据权利要求8至12中任一项所述的治疗方法,其中所述抗体-药物缀合物和所述抗-SIRP α 抗体作为活性组分分别包含在不同的制剂中,并同时或在不同时间施用。

14. 根据权利要求8至13中任一项所述的治疗方法,其中所述方法用于治疗选自乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌、肺癌、食管癌、唾液腺癌、食管胃结合处腺癌、胆道癌、佩吉特病、胰癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、子宫癌、肉瘤、头和颈癌、肝细胞癌、宫颈癌、脑肿瘤、神经胶质瘤、眼肿瘤、甲状腺癌、胸腺癌、胆囊癌、淋巴瘤、白血病和骨髓增生异常综合征的至少一种。

15. 待与抗体-药物缀合物组合施用的抗-SIRP α 抗体,其中所述抗体-药物缀合物为选自戈沙妥珠单抗、维泊妥珠单抗和恩美曲妥珠单抗的任一种抗体-药物缀合物。

16. 根据权利要求15所述的抗-SIRP α 抗体,其中所述抗体-药物缀合物为戈沙妥珠单抗。

17. 根据权利要求15所述的抗-SIRP α 抗体,其中所述抗体-药物缀合物为维泊妥珠单抗。

18. 根据权利要求15所述的抗-SIRP α 抗体,其中所述抗体-药物缀合物为恩美曲妥珠单抗。

19. 根据权利要求15至18中任一项所述的抗-SIRP α 抗体,其中所述抗-SIRP α 抗体为下述抗体(1)至(5)中的任一种:

(1) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:1的氨基酸编号20或466的氨基酸序列组成,所述轻链由SEQ ID NO:4所示的氨基酸编号21或234的氨基酸序列组成;

(2) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:1的氨基酸编号20或466的氨基酸序列组成,所述轻链由SEQ ID NO:5所示的氨基酸编号21或234的氨基酸序列组成;

(3) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:2的氨基酸编号20或466的氨基酸序列组成,所述轻链由SEQ ID NO:3所示的氨基酸编号21或234的氨基酸序列组成;

(4) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:2的氨基酸编号20或466的氨基酸序列组成,所述轻链由SEQ ID NO:4所示的氨基酸编号21或234的氨基酸序列组成;和

(5) 根据(1)至(4)中任一项的抗体,其在重链羧基末端缺少赖氨酸残基。

20. 根据权利要求15至19中任一项所述的抗-SIRP α 抗体,其中所述抗体-药物缀合物和所述抗-SIRP α 抗体作为活性成分分别包含在不同的制剂中,并同时或在不同时间施用。

21. 根据权利要求15至20中任一项所述的抗-SIRP α 抗体,其用于治疗选自乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌、肺癌、食管癌、唾液腺癌、食管胃结合处腺癌、胆道癌、佩吉特病、胰癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、子宫癌肉瘤、头和颈癌、肝细胞癌、宫颈癌、脑肿瘤、神经胶质瘤、眼肿瘤、甲状腺癌、胸腺癌、胆囊癌、淋巴瘤、白血病和骨髓增生异常综合征的至少一种。

抗体-药物缀合物与抗-SIRP α 抗体的组合

技术领域

[0001] 本发明涉及一种药物组合物,其中具体的抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体组合施用,包括向主体组合施用具体的抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体的治疗方法,和/或待与具体的抗体-药物缀合物组合施用的抗-SIRP α 抗体。

背景技术

[0002] SIRP α (SHPS-1) 是存在于诸如巨噬细胞、树突细胞和嗜中性粒细胞的中幼粒细胞以及神经胶质细胞中的属于Ig超家族的单跨膜分子(非专利文献1)。其胞外区由单个IgV结构域和两个IgC结构域组成。据报道作为与CD47的连接位置的IgV结构域在人中有10个变体(非专利文献2)。另一方面,其细胞内区域含有免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)。当ITIM与CD47结合时,诱导与酪氨酸去磷酸化酶SHP-1和SHP-2的结合并传递抑制信号。

[0003] 据报道SIRP α -CD47相互作用引起生理现象,即,红细胞上的CD47与巨噬细胞上的SIRP α 结合以传递“不要吃我”的信号,因此可以避免红细胞不必要的吞噬作用(非专利文献3)。同样,在肿瘤微环境下,提示当肿瘤细胞上高表达的CD47与巨噬细胞和树突细胞上的SIRP α 结合时,吞没肿瘤细胞的吞噬活性受到抑制。当吞噬活性受到抑制时,后来的肿瘤抗原呈递给T细胞以及进一步后来的肿瘤免疫应答将受到抑制。因此,免疫现象,即肿瘤细胞的吞噬作用,被认为是肿瘤抗原进入的检查点。

[0004] 已报道通过由针对作为SIRP α 的配体的CD47的抗体抑制SIRP α -CD47相互作用增强了吞没肿瘤细胞的吞噬活性(非专利文献4)。当抗-SIRP α 在其中具有将肿瘤细胞吸引至免疫细胞的效应子活性的抗癌抗体组合使用的条件下使用时,已观察到与此相同的现象(非专利文献5和6)。提示在同种异体小鼠携癌模型中使用的抗-CD47抗体不仅诱导抗肿瘤作用,而且还诱导肿瘤免疫(非专利文献7)。如果将抗-SIRP α 抗体与抗癌抗体组合使用,则预期抗-SIRP α 抗体产生相同的作用。

[0005] 同时,已经开发了多种针对T细胞上的免疫抑制分子(例如PD-1/PD-L1)的抗体作为免疫检查点抑制剂,并且已经证明了其临床效果(非专利文献8和9)。SIRP α -CD47是目前被证实的唯一吞噬作用抑制分子。预期针对所述分子的抑制性抗体有可能充当靶向除T细胞外的目标的新检查点抑制剂,且对于对传统免疫检查点抑制剂抗性的患者广泛发挥作用。

[0006] 到目前为止,在使用抗小鼠SIRP α 抗体(MY-1)且在人伯基特淋巴瘤皮下移植模型中进行的研究中,在与利妥昔单抗的组合使用中已发挥了抗肿瘤作用。在小鼠结肠直肠癌模型中,已证实了在与PD-1抗体组合使用中的抗肿瘤作用(非专利文献5)。在使用不同克隆的抗-mSIRP α 抗体(P84)的研究中,在小鼠肝癌模型中,甚至在与抗-PD-L1抗体和抗-4-1BB抗体组合使用中也已证实了抗肿瘤作用和延长寿命作用。当将相同的肿瘤细胞再次移植到表现出延长寿命作用的小鼠中时,获得了进一步的抗肿瘤作用和延长寿命作用。这提示,通过抑制不同的免疫检查点可以诱导强的肿瘤免疫应答(专利文献1)。这些病例的结果表明,不仅可以通过与具有效应子活性的抗癌抗体组合使用来获得组合作用,如常规预期的,而

且可以通过与靶向T细胞的免疫检查点抑制剂组合使用来获得组合作用。如果使用抗人SIRP α 抗体,则可预期相同的作用。

[0007] 最近,已由不同公司相继报道了关于抗-SIRP α 抗体的专利(专利文献1、2和3)。在各个文献的实施例中,公开了与各种变体和家族分子(例如SIRP β 1、SIRP γ)的结合活性中的差异以及抗体IgG亚类中的差异。例如,作为IgG4Pro抗体的OSE-172结合SIRP α V1和SIRP β 1且既不结合SIRP α V2也不结合SIRP γ ;作为IgG1N279A抗体的KWAR23结合所有10种类型的SIRP α 变体和家族分子,SIRP β 1和SIRP γ ;且作为IgG2抗体的ADU-1805结合所有10种类型的SIRP α 变体和SIRP γ 。关于哪一种抗体最适合作为药物仍然是未知的。正在进行努力以获得优良的抗体。

[0008] 进一步地,在使用抗-CD47抗体的研究中,已报道不仅与前述抗体药物的组合使用,而且与广泛用作传统SOC(标准治疗)的化学疗法和/或放射疗法的组合使用都发挥足够的抗肿瘤作用和/或延长寿命作用。特别地,在与化学疗法的组合使用中,发现当预先施用化疗剂且然后施用抗-CD47抗体时,比同时施用化疗剂和抗-CD47抗体发挥更强的抗肿瘤作用和/或延长寿命作用(非专利文献7)。由此看来,如果以前施用化疗剂,以由此准备其中肿瘤抗原可以容易被吸收的环境,则可以有效增强通过抑制SIRP α -CD47相互作用的抗原的吸收(免疫刺激能力)。

[0009] 如上所述,与各种抗肿瘤剂组合使用抗-SIRP α 抗体可能充当可以诱导进一步的强肿瘤免疫应答的药物。

[0010] 因此预期具有与抗体缀合的具有细胞毒性的药物的抗体-药物缀合物(ADC)引起药物在癌细胞内积累并杀死癌细胞,所述抗体的抗原在癌细胞表面表达,并且还与能够细胞内化的抗原结合,且因此可以将药物选择性地递送至癌细胞(非专利文献10至14)。

[0011] 戈沙妥珠单抗(Sacituzumab govitecan)是靶向表达TROP2的癌细胞的抗体-药物缀合物,且由作为药物的SN-38与其结合的IgG1-型抗体形成(非专利文献15)。维泊妥珠单抗(Polatuzumab vedotin)是靶向表达CD79b的癌细胞的抗体-药物缀合物,且由作为药物的单甲基澳瑞他汀(monomethyl auristatin)E与其结合的IgG1-型抗体形成(非专利文献16)。恩美曲妥珠单抗(Trastuzumab emtansine)是靶向表达HER2的癌细胞的抗体-药物缀合物,且由作为药物的DM1与其结合的IgG1-型抗体形成(非专利文献15)。维恩妥尤单抗(Enfortumab vedotin)是靶向表达柄蛋白-4(NECTIN-4)的癌细胞的抗体-药物缀合物,且由作为药物的单甲基澳瑞他汀E与其结合的IgG1-型抗体形成(非专利文献15)。

[0012] 然而,当上述抗体-药物缀合物与抗-SIRP α 抗体组合使用时显示优良的组合作用的测试结果或提示这种测试结果的科学依据均尚未向公众公开。

[0013] 引用列表

专利文献

专利文献1:国际公开No.WO 2017/178653

专利文献2:国际公开No.WO 2018/026600

专利文献3:国际公开No.WO 2018/190719

专利文献4:国际公开No.WO 2020/013170

非专利文献

非专利文献1:Matozaki等人,Trends in cell biol.2009(19)2,72-80

- 非专利文献2:Takenaka等人,Nat Immunol.2007(8)12,1313-1323
非专利文献3:Matozaki等人,Trends in cell biol.2009(19)2,72-80
非专利文献4:Liu等人,Plos One,2015(10)9
非专利文献5:Yanagita等人,JCI Insight,2017(2)1,1-15
非专利文献6:Ring等人,PNAS,2017(114)49,E10578-E10585
非专利文献7:Liu等人,Nat Med.2015(21)10,1209-1215
非专利文献8:Lee等人,The Oncologist,2017(22)11,1392-1399
非专利文献9:Weinstock等人,Clin Can Res.2017(23)16,4534-4539
非专利文献10:Ducry,L.等人,Bioconjugate Chem. (2010)21,5-13。
[0014] 非专利文献11:Alley,S.C.等人,Current Opinion in Chemical Biology(2010)14,529-537。
[0015] 非专利文献12:Damle N.K.Expert Opin.Biol.Ther. (2004)4,1445-1452。
[0016] 非专利文献13:Senter P.D.等人,Nature Biotechnology(2012)30,631-637。
[0017] 非专利文献14:HowardA.等人,J Clin Oncol 29:398-405。
[0018] 非专利文献15:Khongorzul P.等人,Mol.Cancer Res. (2020)18,3-19。
[0019] 非专利文献16:Burke JM.等人,Expert Rev.Clin.Pharmacol. (2020)13,1073-1083。

发明内容

[0020] 技术问题已证实本发明中使用的抗体-药物缀合物即使作为单一试剂也发挥优良的抗肿瘤作用。然而,需要获得一种治疗方法,其可以通过将抗体-药物缀合物与具有不同作用机制的另一种抗癌剂组合使用以多种方式抑制癌细胞的生长并发挥进一步优良的抗肿瘤作用。

[0021] 本发明的目的是提供一种药物组合物,其中具体的抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体组合施用,包括向主体组合施用具体的抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体的治疗方法,和/或待与具体的抗体-药物缀合物组合施用的抗-SIRP α 抗体。

[0022] 问题的解决方案

作为为了解决上述问题的勤奋研究的结果,本发明人已发现具体的抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体的组合施用表现出优良的组合作用,并完成了本发明。

[0023] 即,本发明提供了下述[1]至[21]:

[1]一种药物组合物,其中抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体组合施用,并且所述抗体-药物缀合物为选自戈沙妥珠单抗、维泊妥珠单抗和恩美曲妥珠单抗的任一种抗体-药物缀合物。

[0024] [2]根据[1]所述的药物组合物,其中所述抗体-药物缀合物为戈沙妥珠单抗。

[0025] [3]根据[1]所述的药物组合物,其中所述抗体-药物缀合物为维泊妥珠单抗。

[0026] [4]根据[1]所述的药物组合物,其中所述抗体-药物缀合物为恩美曲妥珠单抗。

[0027] [5]根据[1]至[4]中任一项所述的药物组合物,其中所述抗-SIRP α 抗体为下述抗体(1)至(5)中的任一种:

(1)包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ

ID NO:1的氨基酸残基20至466组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:4的氨基酸残基21至234组成;

(2) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基20至466组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基21至234组成;

(3) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基20至466组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:3的氨基酸残基21至234组成;

(4) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基20至466组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:4的氨基酸残基21至234组成;和

(5) 根据(1)至(4)中任一项的抗体,其在重链羧基末端缺少赖氨酸残基。

[0028] [6]根据[1]至[5]中任一项所述的药物组合物,其中所述抗体-药物缀合物和所述抗-SIRP α 抗体作为活性组分分别包含在不同的制剂中,并同时或在不同时间施用。

[0029] [7]根据[1]至[6]中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物用于治疗选自乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌、肺癌、食管癌、唾液腺癌、食管胃结合处腺癌、胆道癌、佩吉特病、胰癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、子宫癌肉瘤、头和颈癌、肝细胞癌、宫颈癌、脑肿瘤、神经胶质瘤、眼肿瘤、甲状腺癌、胸腺癌、胆囊癌、淋巴瘤、白血病和骨髓增生异常综合征的至少一种。

[0030] [8]一种治疗方法,包括向需要治疗的主体组合施用抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体,其中所述抗体-药物缀合物为选自戈沙妥珠单抗、维泊妥珠单抗和恩美曲妥珠单抗的任一种抗体-药物缀合物。

[0031] [9]根据[8]所述的治疗方法,其中所述抗体-药物缀合物为戈沙妥珠单抗。

[0032] [10]根据[8]所述的治疗方法,其中所述抗体-药物缀合物为维泊妥珠单抗。

[0033] [11]根据[8]所述的治疗方法,其中所述抗体-药物缀合物为恩美曲妥珠单抗。

[0034] [12]根据[8]至[11]中任一项所述的治疗方法,其中所述抗-SIRP α 抗体为下述抗体(1)至(5)中的任一种:

(1) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基20至466组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:4的氨基酸残基21至234组成;

(2) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基20至466组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基21至234组成;

(3) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基20至466组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:3的氨基酸残基21至234组成;

(4) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基20至466组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:4的氨基酸残基21至234组成;和

(5) 根据(1)至(4)中任一项的抗体,其在重链羧基末端缺少赖氨酸残基。

[0035] [13]根据[8]至[12]中任一项所述的治疗方法,其中所述抗体-药物缀合物和所述抗-SIRP α 抗体作为活性组分分别包含在不同的制剂中,并同时或在不同时间施用。

[0036] [14]根据[8]至[13]中任一项所述的治疗方法,其中所述方法用于治疗选自乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌、肺癌、食管癌、唾液腺癌、食管胃结合处腺癌、胆道癌、佩吉特病、胰癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、子宫癌肉瘤、头和颈癌、肝细胞癌、宫颈癌、脑肿瘤、神经胶质瘤、眼肿瘤、甲状腺癌、胸腺癌、胆囊癌、淋巴瘤、白血病和骨髓增生异常综合征的至少一种。

[0037] [15]待与抗体-药物缀合物组合施用的抗-SIRP α 抗体,其中所述抗体-药物缀合物为选自戈沙妥珠单抗、维泊妥珠单抗和恩美曲妥珠单抗的任一种抗体-药物缀合物。

[0038] [16]根据[15]所述的抗-SIRP α 抗体,其中所述抗体-药物缀合物为戈沙妥珠单抗。

[0039] [17]根据[15]所述的抗-SIRP α 抗体,其中所述抗体-药物缀合物为维泊妥珠单抗。

[0040] [18]根据[15]所述的抗-SIRP α 抗体,其中所述抗体-药物缀合物为恩美曲妥珠单抗。

[0041] [19]根据[15]至[18]中任一项所述的抗-SIRP α 抗体,其中所述抗-SIRP α 抗体为下述抗体(1)至(5)中的任一种:

(1) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基20至466组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:4的氨基酸残基21至234组成;

(2) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基20至466组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基21至234组成;

(3) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基20至466组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:3的氨基酸残基21至234组成;

(4) 包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基20至466组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:4的氨基酸残基21至234组成;和

(5) 根据(1)至(4)中任一项的抗体,其在重链羧基末端缺少赖氨酸残基。

[0042] [20]根据[15]至[19]中任一项所述的抗-SIRP α 抗体,其中所述抗体-药物缀合物和所述抗-SIRP α 抗体作为活性组分分别包含在不同的制剂中,并同时或在不同时间施用。

[0043] [21]根据[15]至[20]中任一项所述的抗-SIRP α 抗体,其中所述抗体用于治疗选自乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌、肺癌、食管癌、唾液腺癌、食管胃结合处腺癌、胆道癌、佩吉特病、胰癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、子宫癌肉瘤、头和颈癌、肝细胞癌、宫颈癌、脑肿瘤、神经胶质瘤、眼肿瘤、甲状腺癌、胸腺癌、胆囊癌、淋巴瘤、白血病和骨髓增生异常综合征的至少一种。

[0044] 此外,本发明提供下述[22]和[23]。

[0045] [22]使用抗-SIRP α 抗体用于生产用于治疗癌症的药物产品的方法,其中所述抗-SIRP α 抗体与抗体-药物缀合物组合施用,且所述抗体-药物缀合物为选自戈沙妥珠单抗、维泊妥珠单抗和恩美曲妥珠单抗的任一种抗体-药物缀合物。

[0046] [23]使用抗-SIRP α 抗体用于治疗癌症的方法,其中所述抗-SIRP α 抗体与抗体-药

物缀合物组合施用,且所述抗体-药物缀合物为选自戈沙妥珠单抗、维泊妥珠单抗和恩美曲妥珠单抗的任一种抗体-药物缀合物。

[0047] 本发明的有利效果

本发明可以提供一种药物组合物,其中具体的抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体组合施用,包括向主体组合施用具体的抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体的治疗方法,和/或待与具体的抗体-药物缀合物组合施用的抗-SIRP α 抗体。

附图说明

[0048] [图1]图1为显示人源化抗-SIRP α 抗体D13的hH1重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:1) 的图。

[0049] [图2]图2为显示人源化抗-SIRP α 抗体D13的hH2重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:2) 的图。

[0050] [图3]图3为显示人源化抗-SIRP α 抗体D13的hL2轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:3) 的图。

[0051] [图4]图4为显示人源化抗-SIRP α 抗体D13的hL3轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:4) 的图。

[0052] [图5]图5为显示人源化抗-SIRP α 抗体D13的hL4轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:5) 的图。

[0053] [图6]图6为显示抗-SIRP α 抗体cD13的CDR序列 (SEQ ID NO:6-11) 的图。

[0054] [图7]图7为显示5C12抗小鼠SIRP α 抗体的重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:12) 及其轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:13) 的图。

[0055] [图8]图8是显示抗-SIRP α 抗体和/或戈沙妥珠单抗对TROP2-阳性人胃癌细胞的ADCP活性的图。

[0056] [图9]图9是显示抗-SIRP α 抗体和/或维泊妥珠单抗对CD79b-阳性人伯基特淋巴瘤细胞的ADCP活性的图。

[0057] [图10]图10是显示抗-SIRP α 抗体和/或恩美曲妥珠单抗对HER2-阳性人乳腺癌细胞的ADCP活性的图。

[0058] [图11-1] (图11A) 图11A显示了在其中已移植了表达TROP2的小鼠结肠直肠癌细胞的小鼠中通过抗-SIRP α 抗体和/或戈沙妥珠单抗的抗肿瘤研究的概观。(图11B) 图11B为显示在其中已移植了表达TROP2的小鼠结肠直肠癌细胞的小鼠中通过抗-SIRP α 抗体和/或戈沙妥珠单抗的抗肿瘤作用的图表。

[0059] [图11-2] (图11C) 图11C为显示在其中已移植了表达TROP2的小鼠结肠直肠癌细胞的各个小鼠中通过抗-SIRP α 抗体和/或戈沙妥珠单抗的抗肿瘤作用的图表。

[0060] [图12-1] (图12A) 图12A显示了在其中已移植了表达HER2的小鼠结肠直肠癌细胞的小鼠中通过抗-SIRP α 抗体和/或恩美曲妥珠单抗的抗肿瘤研究的概观。(图12B) 图12B为显示在其中已移植了表达HER2的小鼠结肠直肠癌细胞的小鼠中通过抗-SIRP α 抗体和/或恩美曲妥珠单抗的抗肿瘤作用的图表。

[0061] [图12-2] (图12C) 图12C为显示在其中已移植了表达HER2的小鼠结肠直肠癌细胞的小鼠个体中通过抗-SIRP α 抗体和/或恩美曲妥珠单抗的抗肿瘤作用的图表。

具体实施方式

[0062] 在下文中,描述了用于实施本发明的优选方式。下述实施方案仅为了举例说明本发明的典型实施方案的一个例子而给出,且不意图限制本发明的范围。

[0063] 1. 抗体-药物缀合物

本发明使用的抗体-药物缀合物为戈沙妥珠单抗、维泊妥珠单抗、恩美曲妥珠单抗或维恩妥尤单抗。

[0064] 戈沙妥珠单抗是靶向表达TROP2的癌细胞的抗体-药物缀合物,且由作为药物的SN-38与其结合的IgG1-型抗体形成(非专利文献15)。维泊妥珠单抗是靶向表达CD79b的癌细胞的抗体-药物缀合物,且由作为药物的单甲基溴瑞他汀E与其结合的IgG1-型抗体形成(非专利文献16)。恩美曲妥珠单抗是靶向表达HER2的癌细胞的抗体-药物缀合物,且由作为药物的DM1与其结合的IgG1-型抗体形成(非专利文献15)。维恩妥尤单抗是靶向表达柄蛋白-4的癌细胞的抗体-药物缀合物,且由作为药物的单甲基溴瑞他汀E与其结合的IgG1-型抗体形成(非专利文献15)。

[0065] 2. 抗-SIRP α 抗体

SIRP α (信号调节蛋白 α)是存在于诸如巨噬细胞、树突细胞和嗜中性粒细胞的中幼粒细胞以及神经胶质细胞中的属于Ig超家族的单跨膜分子。其胞外区由单个IgV结构域和两个IgC结构域组成。据报道其中存在与CD47的连接位置的IgV结构域在人中有10个变体V1-V10。SIRP α 蛋白的胞外IgV结构域是构成SIRP α 蛋白的三个胞外Ig-样结构域之一。在所述结构域中,V1和V2是主要变体。本发明的抗-SIRP α 抗体结合所有变体,包括主要变体V1和V2。在本发明中,“SIRP α ”有时将被称为“SIRPA”。

[0066] 人SIRP α 蛋白的氨基酸序列在GenBank检索No.:NP_001035111中公开。

[0067] 本发明中使用的抗-SIRP α 抗体可以以与国际公开No.WO 2020/013170中描述的相同的方式获得。

[0068] 本发明中使用的单克隆抗体可以通过下述获得:利用用作免疫原的SIRP α 或其片段对诸如小鼠、大鼠、兔、仓鼠、豚鼠、马、猴、狗、猪、牛、山羊、绵羊的哺乳动物进行免疫,将脾细胞与骨髓瘤细胞融合以获得杂交瘤,且允许杂交瘤产生并分泌抗体。杂交瘤可以通过本领域已知的方法来产生。

[0069] 充当免疫原的SIRP α 可以基于序列信息化学合成,或者可以作为重组蛋白获得,所述重组蛋白是基于编码蛋白的DNA序列并依照本领域已知方法产生的。

[0070] 抗体可以以任何方法进行筛选;优选地,通过使用转染了编码SIRP α 的DNA的动物细胞的细胞-ELISA(Cell-ELISA)。

[0071] 本发明中使用的抗-SIRP α 抗体抑制SIRP α 和CD47之间的结合。

[0072] 肿瘤细胞高表达CD47。当在具有吞噬活性的吞噬细胞上表达的SIRP α 结合CD47且它们相互作用时,向吞噬细胞传递“不要吃我”信号。这样,肿瘤细胞逃避了通过吞噬细胞的吞噬作用。抗-SIRP α 抗体抑制SIRP α 和CD47之间的结合,从而抑制从肿瘤细胞向吞噬细胞传递“不要吃我”信号,由此增强通过吞噬细胞的吞噬作用以吞没肿瘤细胞。结果,可以发挥抗肿瘤作用。具有吞噬活性的吞噬细胞的例子包括巨噬细胞,例如M1和M2巨噬细胞,以及树突细胞,例如未成熟树突细胞(imDC)。

[0073] 在这种情况下,当具有效应子功能的抗-SIRP α 抗体结合Fc受体,例如效应细胞如

吞噬细胞(例如,巨噬细胞)、天然杀伤细胞和T细胞的Fc γ 受体时,抗-SIRP α 抗体由于ADCC(抗体依赖性细胞毒作用)ADCP(抗体依赖性细胞吞噬作用)而攻击自体效应细胞,如PBMC(外周血单核细胞)和巨噬细胞。

[0074] 为了避免攻击自体细胞,本发明中使用的抗-SIRP α 抗体的效应子功能降低。结果,本发明中使用的抗-SIRP α 抗体仅具有抑制SIRP α 和CD47之间的结合的功能,且从不结合效应细胞的Fc受体;也就是说,不产生效应子功能。

[0075] 本发明中使用的抗-SIRP α 抗体因为不攻击自体免疫细胞,所以可以安全地用作不具有副作用的药物。

[0076] 然而,本发明中使用的抗-SIRP α 抗体因为效应子功能降低,所以如果其单独使用则不产生足够的抗肿瘤作用。因此,抗-SIRP α 抗体与另一种抗肿瘤剂组合使用。

[0077] 为了降低效应子功能,抗-SIRP α 抗体的Fc部分必须不与巨噬细胞和T细胞的Fc受体结合。由于所述原因,本发明中使用的抗-SIRP α 抗体的亚类被从IgG4衍生的那些取代。一般来说,在人IgG亚类中,IgG4被认为是效应子功能例如ADCC活性、CDC活性和/或ADCP活性低的亚类(Bruggemann等人,J.Exp.Med.,1351-1361,1987)。当治疗用抗体用于靶向健康器官中表达的分子时(例如Opdivo),IgG4被用作用于避免归因于经由效应子功能的细胞损伤的毒性的IgG形式之一。值得注意的是,IgG4亚类的效应子功能低,但不是零。于是,在本发明中使用的抗-SIRP α 抗体中,向重链恒定区中引入突变,例如可以进一步降低效应子功能的突变,更具体地说,诸如用至少一个用于降低ADCC和/或ADCP活性的氨基酸取代的突变。这种突变的例子包括根据Kabat等人的EU索引,在位置234处用丙氨酸取代苯丙氨酸(F234A)(Kabat等人,Sequences of proteins of immunological interest,1991第五版),以及在位置235处用丙氨酸取代亮氨酸(L235A)(Parekh等人,mAbs,310-318,2012)。抗体的这种突变称为FALA突变。

[0078] 在IgG4中,抗体重链之间的S-S键不是稳定地形成的。为了提高稳定性,引入了促进抗体重链之间S-S键的突变。突变的例子包括根据Kabat等人的EU索引在位置228处用脯氨酸取代丝氨酸(S228P)(ANGAL等人,Molecular Immunology,105-108,1993)。抗体的所述突变称为PRO突变。

[0079] 在本发明中使用的抗-SIRP α 抗体的恒定区中,可以同时引入前述FALA突变和PRO突变(Vafa等人,Methods,65,114-126,2014)。具有FALA突变和Pro突变两者的IgG4重链称为“IgG4proFALA”重链、“IgG4PFALA”重链或“IgG4pf”重链。

[0080] 在人IgG亚类中,人IgG1具有非常强的效应子功能,例如经由补体结合的CDC活性和抗体依赖性细胞毒作用活性(Bruggemann等人,J.Exp.Med.,1351-1361,1987),且用作当使用治疗用抗体靶向癌症中高表达的分子(如曲妥珠单抗、利妥昔单抗)时,通过归因于经由效应子功能的细胞损伤来促进癌细胞的细胞死亡而发挥治疗作用的IgG形式。当IgG1用作在本发明中使用的抗-SIRP α 抗体的同种型时,可以通过取代恒定区的氨基酸残基的一部分来控制效应子功能(参见,WO 88/007089、WO 94/28027、WO 94/29351)。效应子功能减弱的IgG1突变体的例子包括IgG1 LALA(IgG1-L234A,L235A)和IgG1 LAGA(IgG1-L235A,G237A)。作为本发明中使用的抗-SIRP α 抗体的恒定区,可以使用具有其中引入的这些突变的IgG1重链恒定区。

[0081] 在人IgG亚类中,人IgG2具有非常弱的效应子功能,例如经由补体结合的CDC活性

和抗体依赖性细胞毒作用活性 (Bruggemann等人, J. Exp. Med., 1351-1361, 1987), 且用作当使用治疗用抗体靶向健康器官中表达的分子 (例如地诺单抗 (Denosumab)、依洛尤单抗 (Evolocumab)、博达路单抗 (Brodalumab)) 时, 用于避免归因于经由效应子功能的细胞损伤的毒性的IgG形式之一。作为本发明中使用的抗-SIRP α 抗体的恒定区, 可以使用IgG2重链恒定区。

[0082] 在本发明中使用的抗-SIRP α 抗体中, 还包括抗体的修饰的变体。修饰的变体指通过使要在本发明中使用的抗-SIRP α 抗体经受化学或者生物学修饰获得的变体。化学修饰的变体的例子包括具有化学部分与氨基酸骨架的连接变体或具有化学部分与N-连接的或O-连接的碳水化合物链的连接变体。生物学修饰的变体的例子包括通过翻译后修饰 (例如, N联或O联糖基化、N-末端或C-末端加工、脱酰胺作用、天冬氨酸的异构化或甲硫氨酸的氧化) 获得的变体, 以及其中已通过使用原核宿主细胞表达将甲硫氨酸残基添加到N-末端的变体。进一步地, 在修饰的变体的含义内还包括被进行标记以便使得能够检测或分离本发明中使用的抗-SIRP α 抗体或抗原的抗体, 例如, 酶标记的抗体、荧光标记的抗体和亲和标记的抗体。这种本发明中使用的抗-SIRP α 抗体的修饰的变体用于例如提高抗体的稳定性和血液停留、降低其抗原性、检测或分离抗体或抗原。

[0083] 值得注意的是, 已知在培养的哺乳动物细胞中产生的抗体的重链羧基末端的赖氨酸残基被缺失 (Journal of Chromatography A, 705:129-134 (1995))。还已知在培养的哺乳动物细胞中产生的抗体的重链羧基末端的两个氨基酸残基 (甘氨酸和赖氨酸) 被缺失, 并且新位于羧基末端的脯氨酸残基被酰胺化 (Analytical Biochemistry, 360:75-83 (2007))。然而, 重链序列的这种缺失和修饰不影响抗体的抗原结合亲和力和效应子功能 (例如, 补体的激活、抗体依赖性细胞毒作用)。因此, 在本发明中使用的抗-SIRP α 抗体中, 还包括经受这种修饰的抗体及其功能性片段, 且还包括其中重链羧基末端已缺失一个或两个氨基酸的缺失变体、具有酰胺化的残基的缺失变体 (例如, 其中羧基末端脯氨酸残基已被酰胺化的重链)。值得注意的是, 在本发明中使用的抗-SIRP α 抗体的重链羧基末端具有缺失的缺失变体的类型不限于上述变体, 只要保存抗原结合亲和力和效应子功能即可。构成本发明中使用的抗-SIRP α 抗体的两条重链可以是选自全长重链和上述具有缺失的重链的一种, 或可以是由其选择的组合的两种类型。每种缺失变体的量的比可能受到产生本发明中使用的抗-SIRP α 抗体的培养的哺乳动物细胞类型和培养条件的影响; 然而, 可以优选地例示其中羧基末端的1个氨基酸残基已在本发明中使用的抗-SIRP α 抗体中两条重链中均缺失的抗体。

[0084] 本发明中使用的抗-SIRP α 抗体包括为了降低对人的异质抗原性而修饰的嵌合抗体和人源化抗体。人源化抗体也称为CDR移植的抗体。

[0085] 嵌合抗体指由非人动物抗体的轻链可变区和重链可变区以及人抗体的轻链恒定区和重链恒定区组成的抗体。嵌合抗体可以通过下述制备: 从产生抗-SIRP α 抗体的杂交瘤获得编码轻链可变区的cDNA和编码重链可变区的cDNA, 并将所述cDNAs插入具有编码人抗体轻链恒定区和重链恒定区的cDNA的表达载体中以构建嵌合抗体表达载体, 将嵌合抗体表达载体引入宿主细胞中, 且允许抗体表达。

[0086] 重链恒定区由三个结构域C_H1, C_H2和C_H3形成。在本发明中使用的抗-SIRP α 抗体中, 嵌合抗体的人重链恒定区为具有Pro变和FALA突变的IgG4-亚类重链恒定区, 即, 重链恒定区IgG4proFALA。轻链恒定区如果属于人Ig, 则可能是足够的, 并且为 κ 或者 λ 恒定区。

[0087] 本发明中使用的抗-SIRP α 抗体的嵌合抗体的实例包括具有大鼠抗人SIRP α 单克隆抗体D13可变区的嵌合抗体,即抗体cD13。抗体cD13是具有结合人SIRP α 的高结合活性且具有针对SIRP α 和CD47之间的结合的高抑制活性的抗体。

[0088] 抗体cD13包含,作为轻链可变区的CDRs(互补性决定区),由SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列(GASKSVRTYMH)组成的CDRL1、由SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列(SASNLEA)组成的CDRL2和由SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列(QQSNEPPYT)组成的CDRL3,以及进一步的,作为重链可变区的CDRs,由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列(GFTFSDYGMI)组成的CDRH1、由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列(SISSSSSYIY)组成的CDRH2和由SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列(RYYGFNYPFDY)组成的CDRH3(图6)。

[0089] 更具体地,本发明中使用的抗-SIRP α 抗体是包含由SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列组成的CDRL3以及,作为重链可变区的CDRs,由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列组成的CDRH3的抗体。

[0090] 前述CDRs包括由在CDRs的每个氨基酸序列中具有一个或几个氨基酸,优选一个或两个氨基酸且更优选单个氨基酸的缺失、取代和/或添加的氨基酸序列组成的CDRs。

[0091] 人源化抗体(CDR-移植的抗体)指通过将非人动物抗体的轻链可变区和重链可变区的CDRs的氨基酸序列移植到人抗体的轻链可变区和重链可变区的适当位置所制备的抗体。

[0092] 本发明的人源化抗-SIRP α 抗体可以通过下述来生产:构建编码可变区的cDNA,所述可变区是通过将非人动物抗体的轻链可变区和重链可变区的CDRs的氨基酸序列移植到人抗体的轻链可变区和重链可变区的构架(FR)区而获得的,所述非人动物抗体是由产生与人SIRP α 结合以抑制SIRP α 和CD47之间的结合的单克隆抗体的杂交瘤产生的,由此增强巨噬细胞吞噬作用;将所述cDNA插入具有编码人抗体的轻链恒定区和重链恒定区的基因的动物细胞表达载体中以构建人源化抗体表达载体;和表达所述cDNA。

[0093] 更具体地,可以合成进行设计从而使得抗体cD13的CDRs连接至人抗体的构架区的DNA序列。选择待经由CDRs连接的人抗体构架区,从而使得CDRs形成令人满意的抗原连接位置。如果必需,可以取代抗体可变区中的构架区的氨基酸,从而使得人源化的抗体的CDRs形成适当的抗原连接位置。可以依照本领域已知的CDR移植技术,通过移植CDR来制备人源化抗体。

[0094] 作为依照上述方法制备且具有可变区的构架区中一部分氨基酸的取代的具有抗体cD13的重链和轻链可变区的CDRs(由SEQ ID NOs:6至11所示的氨基酸形成的6个CDRs)的人源化抗体的重链,可以例示人源化抗体重链hH1和人源化抗体重链hH2。作为具有抗体D13的轻链可变区的CDRs且具有所述可变区的构架区中一部分氨基酸的取代的人源化抗体的轻链,可以例示人源化抗体轻链hL2、人源化抗体轻链hL3和人源化抗体轻链hL4。

[0095] 人源化抗体重链hH1的全长氨基酸序列由SEQ ID NO:1表示。人源化抗体重链hH2的全长氨基酸序列由SEQ ID NO:2表示。在SEQ ID NOs:1和2中,由第1个至第19个氨基酸残基组成的氨基酸序列为信号序列的氨基酸序列;由第20个至第139个氨基酸残基组成的氨基酸序列为可变区的氨基酸序列;且由第140个至第466个氨基酸残基组成的氨基酸序列为

恒定区的氨基酸序列。

[0096] 本发明中使用的抗-SIRP α 抗体包括具有由SEQ ID NO:1或2的第20个至第139个氨基酸残基组成的重链可变区和由其第140个至第466个氨基酸残基组成的重链恒定区的抗体。

[0097] 人源化抗体轻链hL2的全长氨基酸序列由SEQ ID NO:3表示。人源化抗体轻链hL3的全长氨基酸序列由SEQ ID NO:4表示。人源化抗体轻链hL4的全长氨基酸序列由SEQ ID NO:5表示。在SEQ ID NOs:3、4和5中,由第1个至第20个氨基酸残基组成的氨基酸序列为信号序列的氨基酸序列;由第21个至第127个氨基酸残基组成的氨基酸序列为可变区的氨基酸序列;且由第128个至第234个氨基酸残基组成的氨基酸序列为恒定区的氨基酸序列。

[0098] 本发明中使用的抗-SIRP α 抗体包括具有由SEQ ID NO:3、4和5的第21个至第127个氨基酸残基组成的轻链可变区和由其第128个至第234个氨基酸残基组成的轻链恒定区的抗体。

[0099] 人源化抗体的重链恒定区为IgG4亚类的重链恒定区,更具体地为具有Pro突变和FALA突变的重链恒定区IgG4proFALA。

[0100] 具有与人SIRP α 的高结合活性以及针对SIRP α 和CD47之间的结合的高抑制活性的抗体的实例包括由人源化抗体重链hH1和人源化抗体轻链hL3组成的抗体(hD13_H1L3抗体);由人源化抗体重链hH1和人源化抗体轻链hL4组成的抗体(hD13_H1L4抗体);由人源化抗体重链hH2和人源化抗体轻链hL2组成的抗体(hD13_H2L2抗体);和由人源化抗体重链hH2和人源化抗体轻链hL3组成的抗体(hD13_H2L3抗体)。

[0101] hD13_H1L3抗体是具有由SEQ ID NO:1的第20个至第466个氨基酸残基组成的重链和由SEQ ID NO:4的第21个至第234个氨基酸残基组成的轻链的抗体。

[0102] hD13_H1L4抗体是具有由SEQ ID NO:1的第20个至第466个氨基酸残基组成的重链和由SEQ ID NO:5的第21个至第234个氨基酸残基组成的轻链的抗体。

[0103] hD13_H2L2抗体是具有由SEQ ID NO:2的第20个至第466个氨基酸残基组成的重链和由SEQ ID NO:3的第21个至第234个氨基酸残基组成的轻链的抗体。

[0104] hD13_H2L3抗体是具有由SEQ ID NO:2的第20个至第466个氨基酸残基组成的重链和由SEQ ID NO:4的第21个至第234个氨基酸残基组成的轻链的抗体。

[0105] 值得注意的是,在培养的哺乳动物细胞中产生的抗体中,已知重链羧基末端的赖氨酸残基被缺失(Tsubaki等人,Int.J.Biol.Macromol,139-147,2013)。然而,重链序列的缺失不影响抗体的抗原结合亲和力和效应子功能(例如补体的激活和抗体依赖性细胞毒作用)。因此,在本发明中包括缺少重链羧基末端赖氨酸残基的抗体。

[0106] 本发明中使用的癌症治疗剂可以含有治疗有效量的抗-SIRP α 抗体以及药学上可接受的载体、稀释剂、增溶剂、乳化剂、防腐剂、助剂等。“药学上可接受的载体”等可以依照靶疾病的类型和药物的剂型在广泛的范围内适当选择。可以适当选择施用根据本发明的抗肿瘤剂的方法,例如,可以选择通过注射施用。可以采用的注射的例子包括局部注射、腹膜内注射、选择性静脉内注射、静脉内注射、皮下注射和器官灌注液注射。注射溶液可通过使用由盐溶液、葡萄糖溶液、或盐溶液和葡萄糖溶液的混合物与任意一种缓冲液组成的载体进行配制。另一方面,可以通过配制成粉末制剂且在使用时将所述粉末制剂与前述液体载体混合来制备注射溶液。

[0107] 可以和制剂的开发一同适当地选择其他施用方法。例如,对于口服施用,可以应用口服液体、粉末、丸剂、胶囊和片剂。在口服液体的情况下,可以通过使用水;诸如蔗糖、山梨糖醇和果糖的糖;诸如聚乙二醇的乙二醇;诸如芝麻油和大豆油的油;诸如对羟基苯甲酸烷基酯的防腐剂;和诸如草莓调味料、薄荷调味香料的调味料,来生产诸如混悬剂和糖浆的口服液体制剂。粉末、丸剂、胶囊和片剂可以通过使用例如诸如乳糖、葡萄糖、蔗糖和甘露糖醇的赋形剂;诸如淀粉和藻酸钠(soda alginate)的崩解剂;诸如硬脂酸镁和滑石的润滑剂;诸如聚乙烯醇、羟丙基纤维素和明胶的黏合剂;诸如脂肪酸酯的表面活性剂;和诸如甘油的增塑剂来配制。片剂和胶囊容易施用。在所述方面,它们是本发明组合物的优选单位剂型。在生产片剂和胶囊中,使用固体生产载体。

[0108] 3. 药物

现在,将描述根据本发明的药物组合物 and 治疗方法,其中抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体组合施用。

[0109] 本发明的药物组合物 and 治疗方法可以是其中抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体作为活性组分分别包含在不同的制剂中并同时或在不同时间施用的那些,或者可以是其中抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体作为活性组分包含在单一制剂中并施用的那些。

[0110] 本发明的药物组合物 and 治疗方法可用于治疗癌症,优选用于治疗选自下述的至少一种疾病:乳腺癌、胃癌(也称为胃腺癌)、结肠直肠癌(也称为结肠和直肠癌,包括结肠癌和直肠癌)、肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、食管癌、头和颈癌(包括唾液腺癌和咽癌)、食管胃结合处腺癌、胆道癌(包括胆管癌)、佩吉特病、胰癌、卵巢癌、子宫癌肉瘤、尿路上皮癌、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道间质瘤、子宫颈癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、子宫内膜癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、多形性胶质母细胞瘤、骨肉瘤和黑色素瘤;更优选用于治疗选自下述的至少一种癌症:乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌、肺癌、食管癌、唾液腺癌、食管胃结合处腺癌、胆道癌、佩吉特病、胰癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌和子宫癌肉瘤;并且甚至更优选用于治疗选自下述的至少一种癌症:乳腺癌、胃癌、肺癌和卵巢癌。

[0111] 将包含在本发明中使用的抗体-药物缀合物中优选的抗体-药物缀合物中的抗体种类可以通过检查癌症的类型和肿瘤标志物来确定。例如,如果癌症中发现了TROP2表达,则可以优选使用戈沙妥珠单抗;如果癌症中发现了CD79b表达,则可以优选使用维泊妥珠单抗;如果癌症中发现了HER2表达,则可以优选使用恩美曲妥珠单抗;且如果癌症中发现了柄蛋白-4表达,则可以优选使用维恩妥尤单抗。

[0112] TROP2、CD79b、HER2和柄蛋白-4的存在或不存在可以通过例如下述来检查:从癌症患者收集肿瘤组织,且使福尔马林固定的石蜡包埋的样品(FFPE)经受诸如免疫组织化学(IHC)方法、流式细胞术、蛋白印迹方法的基因产物(蛋白)水平的检查,或者诸如原位杂交方法(ISH)、定量PCR方法(q-PCR)、微阵列分析的基因翻译水平的检查,或者另一方面,也可以通过从癌症患者收集无细胞血液循环肿瘤DNA(ctDNA)并经受使用诸如下一代测序(NGS)的方法的检查来检查。

[0113] 本发明的药物组合物 and 治疗方法优选可以用于哺乳动物,且更优选可以用于人。

[0114] 本发明的药物组合物 and 治疗方法的抗肿瘤效果可以通过例如下述来确认:生成其中将癌细胞移植到试验动物的模型,并测量归因于本发明的药物组合物 and 治疗方法治疗的

肿瘤体积的减少、延长寿命作用。此外,与本发明中使用的抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体的每一种的单一施用的抗肿瘤作用的比较可以提供本发明中使用的抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体的组合作用的确认。

[0115] 此外,本发明的药物组合物和治疗方法的抗肿瘤作用可以在临床研究中利用实体瘤临床疗效评价标准(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) (RECIST) 评价方法、WHO评价方法、Macdonald评价方法、体重测量等方法确认;且可以通过诸如完全缓解(Complete response) (CR)、部分缓解(Partial response) (PR)、疾病进展(Progressive disease) (PD)、客观缓解率(Objective response rate) (ORR)、缓解持续时间(Duration of response) (DoR)、无进展生存期(Progression-free survival) (PFS) 和总生存期(Overall survival) (OS) 的指标来确定。

[0116] 上述方法可以提供本发明的药物组合物和治疗方法就抗肿瘤作用而言优于现存的用于癌症疗法的药物组合物和治疗方法的证实。

[0117] 本发明的药物组合物和治疗方法可以阻滞癌细胞生长,抑制其增殖,并进一步破坏癌细胞。这些效果可以允许癌症患者摆脱癌症所引起的症状或实现癌症患者的生活质量(QOL) 的改善,并且通过维持癌症患者的生命达到治疗效果。即使本发明的药物组合物及治疗方法不达到杀死癌细胞,它们也可以通过抑制或控制癌细胞的生长来在实现更长期的生存的情况下实现癌症患者的更高生活质量。

[0118] 本发明的药物组合物预期可以通过作为全身疗法应用于患者且额外通过局部应用于癌组织来发挥治疗作用。

[0119] 本发明的药物组合物可以在含有至少一种药学上合适的成分的情况下施用。考虑到本发明中使用的抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体的剂量、施用浓度等,可以从本领域通常使用的制剂添加剂等中适当选择和应用药学上合适的成分。例如,本发明中使用的抗体-药物缀合物可以作为含有缓冲剂例如组氨酸缓冲剂、赋形剂例如蔗糖或海藻糖和表面活性剂例如聚山梨酯80或20的药物组合物施用。本发明中使用的含有抗体-药物缀合物的药物组合物优选可以作为注射液使用,更优选可以作为水性注射液或冻干注射液使用,且甚至更优选可以作为冻干注射液使用。

[0120] 在本发明中使用的含有抗体-药物缀合物的药物组合物为水性注射液的情况下,其优选可以用合适的稀释剂稀释且然后作为静脉内输注给予。对于稀释剂,可例示葡萄糖溶液、生理盐水等,且可以优选地例示葡萄糖溶液,且可以更优选地例示5%葡萄糖溶液。

[0121] 在本发明中使用的含有抗体-药物缀合物的药物组合物为冻干注射液的情况下,其优选可以被溶解于注射用水中,且接着用合适的稀释剂稀释需要的量,并然后作为静脉内输注给予。对于稀释剂,可例示葡萄糖溶液、生理盐水等,且可以优选地例示葡萄糖溶液,且可以更优选地例示5%葡萄糖溶液。

[0122] 可用于施用本发明的药物组合物的施用途径的实例包括静脉内、皮内、皮下、肌肉和腹膜内途径;并且优选包括静脉内途径。

[0123] 本发明中使用的抗体-药物缀合物可以间隔1至180天向人施用一次,且优选地可以每周一次、每2周一次、每3周一次或每4周一次施用,且可以甚至更优选地每3周一次施用。同样,本发明中使用的抗体-药物缀合物可以以约0.001至100mg/kg的剂量施用,并且可以优选以0.8至12.4mg/kg的剂量施用。根据本发明的抗-SIRP α 抗体可以间隔1至180天向人

施用一次,且优选地可以每周一次、每2周一次、每3周一次或每4周一次施用。同样,根据本发明的抗-SIRP α 抗体可以以每剂约0.001至100mg/kg的剂量施用。

[0124] 本发明的药物组合物 and 治疗方法可以进一步含有除根据本发明的抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体之外的癌症治疗剂。本发明的药物组合物 and 治疗方法还可以与另一只癌症治疗剂组合施用,从而增强抗肿瘤作用。待用于这种目的的另一只癌症治疗剂可以与本发明的药物组合物同时、分开或顺序施用于主体,或者可以以不同的各自剂量间隔施用。这种癌症治疗剂不受限制,只要它们是具有抗肿瘤活性的试剂,且可以通过选自下述的至少一种例示:伊立替康(CPT-11)、顺铂、卡铂、奥沙利铂、氟尿嘧啶(5-FU)、吉西他滨、卡培他滨、阿霉素、表柔比星、环磷酰胺、丝裂霉素C、喃氟啶-吉莫斯特(gimeracil)-奥特拉西(oteracil)组合、帕尼单抗(panitumumab)、贝伐珠单抗(bevacizumab)、雷莫卢单抗(ramucirumab)、瑞戈非尼(regorafenib)、三氟尿苷-替吡嘧啶(tipiracil)组合、吉非替尼(gefitinib)、厄洛替尼(erlotinib)、阿法替尼(afatinib)、甲氨蝶呤、培美曲塞(pemetrexed)、他莫昔芬、托瑞米芬、氟维司群(fulvestrant)、亮丙瑞林、性瑞林、来曲唑、阿那曲唑、黄体酮制剂和拉帕替尼(lapatinib)。

[0125] 在本发明的药物组合物 and 治疗方法中,除了根据本发明的抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体,还可以进一步含有免疫检查点抑制剂和特异性结合癌症抗原并具有ADCC和/或ADCP活性的抗体药物作为待组合使用的癌症治疗剂。作为免疫检查点抑制剂,可以例示PD-1和其配体PD-L1之间结合的抑制剂或CTLA4抑制剂。其具体例子包括抗-PD-1抗体(纳武单抗(nivolumab)、帕博利珠单抗(pembrolizumab)、西米普利单抗(cemiplimab)、斯巴达珠单抗(spartalizumab)、PDR-001或BI 754091)、抗-PD-L1抗体(阿替利珠单抗(atezolizumab)、阿维鲁单抗(avelumab)或德瓦鲁单抗(durvalumab))和抗-CTLA4抗体(伊匹单抗(ipilimumab)或替西木单抗(tremelimumab))。与癌症抗原特异性结合并具有ADCC活性和/或ADCP活性的抗体药物的例子包括抗-CD20抗体(利妥昔单抗)、抗-HER2抗体(曲妥珠单抗或帕妥珠单抗(pertuzumab))、抗-EGFR抗体(西妥昔单抗(cetuximab))和抗-CD52抗体(阿来珠单抗(alemtuzumab))。

[0126] ADCC指细胞介导的反应,其中表达Fc γ 受体的非特异性细胞毒性细胞(例如,NK细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别与靶细胞结合的抗体,且然后导致靶细胞的裂解。在作为负责ADCC的主要细胞的NK细胞中,Fc γ RIIC和Fc γ RIIIA表达。在单核细胞中,Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIC和Fc γ RIIIA表达。另一方面,ADCP指细胞介导的反应,其中表达Fc受体的吞噬细胞(例如,巨噬细胞、嗜中性粒细胞)识别与靶细胞结合的抗体,且然后在细胞内吞没靶细胞。在作为负责ADCP的主要细胞的单核细胞中,Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIC和Fc γ RIIIA表达。

[0127] 本发明的药物组合物 and 治疗方法还可与放疗组合使用。例如,癌症患者在接受利用本发明的药物组合物的疗法之前和/或之后或同时接受放疗。

[0128] 本发明的药物组合物 and 治疗方法还可作为与外科手术组合的辅助化学疗法使用。本发明的药物组合物可以在外科手术前为了以缩小肿瘤大小起见施用(称为术前辅助化学疗法或肿瘤辅助疗法),或可以在外科手术后为了预防肿瘤复发起见施用(称为术后辅助化学疗法或辅助疗法)。

[0129] 实施例

考虑到下面所示的实施例来具体描述本发明。然而,本发明并不局限于这些。进一步地,其绝不以限制的方式进行解释。

[0130] 制备例1:抗人SIRP α 抗体的制备(克隆:hD13_H1L3)

抗人SIRP α 抗体hD13_H1L3是通过与国际公开No.WO 2020/013170中描述的方法类似的方法制备的。hD13_H1L3抗体的重链和轻链的氨基酸序列示于SEQ ID NOs:1和4中。

[0131] 制备例2:抗小鼠SIRP α 抗体的制备(克隆:5C12)

抗小鼠SIRP α 抗体5C12通过下述方法确立。对于免疫接种,使用WKY/Izm或Wister雌性大鼠(Japan SLC, Inc.)。将小鼠SIRP α 蛋白(由Sino Biological Inc.制造)和弗氏完全佐剂(由Wako Pure Chemical Industries, Ltd.制造)混合,并皮下施用于大鼠尾根部。取出大鼠的淋巴结并用于生产杂交瘤。

[0132] 依照聚乙二醇方法将淋巴结细胞与小鼠骨髓瘤SP2/0-ag14细胞(ATCC:CRL-1581)融合。将融合的细胞悬浮于HAT选择性培养基中,并依照有限稀释方法进行培养。收集出现的杂交瘤集落。以所述方式制备单克隆杂交瘤。对收集的杂交瘤集落进行培养。使用所得杂交瘤培养物上清液,基于作为指标的与小鼠SIRP α 蛋白的结合活性筛选产生抗体的杂交瘤。以所述方式筛选了克隆:5C12。

[0133] 为了扩增编码5C12可变区的cDNA,通过使用TRIzol试剂(Ambion, Inc.)从产生5C12的杂交瘤制备总RNA。基于总RNA,通过使用SMARTer RACE 5'/3'试剂盒(Clontech, Inc.)扩增编码重链和轻链可变区的cDNA。将通过5'-RACE PCR扩增的编码重链和轻链可变区的cDNA克隆到质粒。接着,分析了编码重链和轻链可变区的cDNA的核苷酸序列。5C12重链和轻链的氨基酸序列示于SEQ ID NOs:12和13中。人SIRP α 和小鼠SIRP α 之间的同源性低至60%。据报道,人在SIRP α 的IgV结构域中存在10种类型的变体,所述IgV结构域是与CD47的相互作用位点;而小鼠由于遗传背景的差异,具有至少4种类型的变体。因此,据推测难以获得与人和小鼠的直向同源物具有交叉反应性的功能性抗体,在所述功能性抗体的场合SIRP α -CD47相互作用可以被抑制。实际上,在用人抗原免疫接种的大鼠中尚未发现与小鼠具有交叉反应性的功能性抗体。

[0134] SIRP α 分子存在于诸如巨噬细胞和树突细胞的髓样细胞中。在直接对癌症产生抗癌作用的药物的情况中,通常可以通过使用通过将人癌细胞系移植到免疫缺陷小鼠制备的异种移植模型来评价药物。然而,为了评价在宿主免疫细胞中表达的靶分子如SIRP α 的抗肿瘤作用,必须采用下述方法的任一种:(1)使用通过向免疫活性的小鼠移植具有相容遗传背景的小鼠的癌细胞系制备的模型,以及与小鼠SIRP α 具有交叉反应性的替代抗体;(2)使用通过将人SIRP α 基因引入免疫缺陷小鼠并向其移植人癌细胞系制备的模型,以及抗人SIRP α 抗体;(3)使用通过将其中表达人CD47基因的小鼠癌细胞系移植到具有其中引入了SIRP α 靶基因的免疫活性小鼠中制备的小鼠模型,以及抗人SIRP α 抗体。其中,方法(2)的问题在于,由于使用了T细胞缺陷型免疫缺陷小鼠,所以不能评价当SIRP α 被抑制时对获得性免疫系统(主要通过T细胞的免疫应答)的作用;且方法(3)的问题在于其耗费长时间用于准备,并且例如SIRP α 基因表达水平的控制对抗肿瘤作用的影响不容易估计。另一方面,在使用替代抗体的方法(1)的情况下,可以在一般的小鼠模型中进行评价;另外,已报道在诸如MY-1和P84的克隆中,当其与抗癌抗体和免疫检查点抗体组合使用时获得了组合作用(国际公开No.WO 2017/178653,或Yanagita等人,JCI Insight,2017(2)1,1-15)。由此,在本实验中,获得了

5C12克隆作为抗小鼠SIRP α 抗体并评价了抗肿瘤作用。5C12对小鼠SIRP α 抗原具有高结合亲和力。证实所述结合亲和力与抗人SIRP α 抗体hD13_H1L3与人SIRP α 抗原的结合亲和力处于相同水平。值得注意的是,已上市的许多PD-1抗体通过非临床药理学研究中使用替代抗体进行评价,且此后在临床上确认了抗体的效果。根据前述,使用抗-SIRP α 替代抗体的抗肿瘤研究的免疫学评价和评价结果可以外推到人中的结果。

[0135] 实施例1:戈沙妥珠单抗(SG)和维泊妥珠单抗(PV)的每一种以及抗人SIRP α 抗体对癌细胞系的ADCP活性。

[0136] 1-1靶细胞的制备

收集CD47-和TROP2-阳性的人胃癌细胞系AGS细胞,以及CD47-和CD79b-阳性的人伯基特淋巴瘤Ramos细胞,用PBS洗涤两次并在PBS中重悬浮。根据锥虫蓝染色计数活细胞数。以每 1×10^6 个细胞/mL 1 μ L的体积添加CellTrace Violet (CTV/Thermo Fisher Scientific)溶液。允许混合物于室温静置10分钟。添加10mL含有10%FBS的RPMI1640培养基(R10),且离心于室温以 $270 \times g$ 进行3分钟。然后,添加10ml R10,并进行一次洗涤。进行重悬浮,以便成为 1×10^6 个细胞/mL,且将重悬浮的细胞用作靶细胞。

[0137] 1-2效应细胞的制备

向SepMate-50管(STEMCELL)中以15mL/管的量分配菲可帕克PLUS (GE Healthcare)。将用含有2%FBS的PBS稀释2倍的全血以33.3mL/管的量覆盖。离心于室温以 $1200 \times g$ 进行10分钟。通过倾析将含有PBMC的上清液收集到新鲜的50mL管中,并添加10mL含有2%FBS的PBS。离心于室温以 $300 \times g$ 进行5分钟。去除上清液后,添加30mL含有2%FBS的PBS。离心于室温以 $300 \times g$ 进行5分钟,以进行两次洗涤。进行用1mL RoboSep缓冲液的悬浮,且然后根据锥虫蓝拒染试验(trypsin blue pigment exclusion test)计数PBMC活细胞数。使用RoboSep缓冲液进行制备,以便成为 5×10^7 个细胞/mL,并以每PBMC细胞50 μ L (5×10^7 个细胞)的量添加没有CD16耗尽的EasySep人单核细胞富集试剂盒(EasySep human monocyte Enrichment Kit Without CD16 Depletion) (STEMCELL)中提供的EasySep人单核细胞富集混合物。于4 $^{\circ}$ C反应10分钟后,以每PBMC细胞每mL 50 μ L (5×10^7 个细胞)的量添加EasySep磁性颗粒。于4 $^{\circ}$ C反应5分钟后,添加RoboSep缓冲液以便成为2.5mL。在EasySep磁体(Magnet)上进行设置。两分三十秒后,收集上清液。离心以 $300 \times g$ 进行5分钟,且然后收集单核细胞级分。添加含有20ng/mL M-CSF (PEPROTEC)的R10。在漂浮的225cm²瓶中进行接种。培养在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂的条件下进行7天。培养开始后第7天,去除培养物上清液,并用含有20ng/mL M-CSF的新鲜R10更换培养基。培养开始后第11天,去除培养物上清液,添加含有20ng/mL IL-10 (PEPROTEC)和20ng/mL M-CSF的R10。将培养进一步进行两天。十三天后,向通过分化诱导的巨噬细胞添加TrypLE Express (Life Technology) (7mL)。反应于37 $^{\circ}$ C进行10分钟,去除巨噬细胞。添加R10 (23mL)并进行收集。用PBS进行两次洗涤,并用PBS进行重悬浮,以便成为 1×10^6 个细胞/mL。作为标准溶液,添加1 μ L/ 10^6 个细胞/mL CellTrace Far Red溶液(ThermoFisher)。允许混合物于室温放置10分钟。添加R10 (10ml),且离心于室温以 $300 \times g$ 进行5分钟。添加R10 (10mL)并进一步进行一次洗涤。进行重悬浮,以便成为 1×10^6 个细胞/mL,并将重悬浮的细胞用作效应细胞。

[0138] 1-3ADCP活性的评价

向96-孔(U型底)微量培养板中以100 μ L/孔的量添加用R10稀释以便成为1 μ g/mL的

终浓度的SG,用R10稀释以便成为0.2 μ g/mL的终浓度的PV,用R10稀释以便成为10 μ g/mL的终浓度的人源化抗-SIRP α 抗体(克隆:hD13_H1L3),与人源化抗-SIRP α 抗体组合的抗体-药物缀合物,或稀释至相同最终浓度的不同对照组的每一个。向孔中以50 μ L/孔的量顺序添加步骤1-2中制备的效应细胞和步骤1-1中制备的靶细胞。允许细胞在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂的条件下放置4小时。于室温以510 $\times$ g离心3分钟后,去除上清液。用FACS缓冲液(200 μ L/孔)进行洗涤。此后,以50 μ L/孔的量添加1 $\times$ BD稳定固定剂(Stabilizing Fixative)(Becton,Dickison)以固定细胞。通过流式细胞术(BD LSRFortessa X-20/BD Biosciences)分析固定的细胞。CTV-阳性细胞被定义为癌细胞,且Far Red阳性细胞被定义为巨噬细胞。此外,CTV-阳性和Far Red阳性细胞被定义为被巨噬细胞吞没的癌细胞。ADCP活性(%)依照下式计算。

[0139] $ADCP(\%) = (CTV\text{阳性和Far Red阳性细胞计数}/CTV\text{阳性细胞计数}) \times 100$ 获得的结果通过GraphPad Prism 9.1.0(GraphPad Software)进行分析,并通过SAS System Release 9.2(SAS Institute)进行统计分析。

[0140] 如图8中所示的,SG对CD47和TR0P2-阳性的人胃癌细胞系AGS细胞表现出ADCP活性。进一步地,通过与人源化抗-SIRP α 抗体hD13_H1L3组合使用增加了ADCP活性。类似地,如图9中所示的,PV对CD47和CD79b-阳性的人伯基特淋巴瘤Ramos细胞表现出ADCP活性,并且通过与人源化抗-SIRP α 抗体hD13_H1L3组合使用增加了ADCP活性。统计分析通过配对t-检验进行,且P值表示到小数第四位。满足 $P < 0.05$ (双侧检验)的结果被确定为显著的。

[0141] 实施例2:恩美曲妥珠单抗(T-DM1)以及抗人SIRP α 抗体对癌细胞系的ADCP活性
2-1靶细胞的制备

收集CD47和HER2-阳性的人乳腺癌细胞系SK-BR-3细胞,用PBS洗涤一次并在5mL的PBS中重悬浮。根据锥虫蓝染色计数活细胞数。以每 1×10^6 个细胞/mL 1 μ L的体积个别添加CellTrace Far Red溶液。允许混合物于室温放置10分钟。向其添加20mL R10,且使其于室温放置5分钟。此后,进行离心并添加10mL R10。在进行一次洗涤后,进行重悬浮,以便成为 1×10^6 个细胞/mL。将重悬浮的细胞用作靶细胞。

[0142] 2-2效应细胞的制备向SepMate-50管中以15mL/管的量分配菲可帕克PLUS。将用含有2%FBS的PBS稀释2倍的全血以34mL/管的量覆盖。离心于室温以1200 $\times$ g进行10分钟。通过倾析将含有PBMC的上清液收集到新鲜的50mL管中,并添加10mL含有2%FBS的PBS。离心于室温以300 $\times$ g进行8分钟。去除上清液后,添加25mL含有2%FBS的PBS。离心于室温以300 $\times$ g进行5或8分钟,以进行两次洗涤。在用1mL Robosep缓冲液悬浮后,根据锥虫蓝拒染试验计数PBMC活细胞数。使用RoboSep缓冲液进行制备,以便成为 5×10^7 个细胞/mL,并以每PBMC细胞50 μ L(5×10^7 个细胞)的量添加没有CD16耗尽的Easysep人单核细胞富集试剂盒中提供的EasySep人单核细胞富集混合物。于4 $^{\circ}$ C反应10分钟后,以每PBMC细胞50 μ L(5×10^7 个细胞)的量添加EasySep磁性颗粒。于4 $^{\circ}$ C反应5分钟后,添加RoboSep缓冲液以便成为约2.5mL。在EasySep磁体(Magnet)上进行设置。两分三十秒后,收集上清液。离心以1200rpm进行5分钟,且然后收集单核细胞级分。添加含有20ng/mL M-CSF的R10。在漂浮的225cm²瓶中进行接种。培养在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂的条件下进行7天。培养开始的第7天,去除培养物上清液,并用含有20ng/mL M-CSF的新鲜R10更换培养基。培养开始的第11天,去除培养物上清液,且添加含有20ng/mL IL-10和20ng/mL M-CSF的R10,并将培养进一步进行2天。在第13天,向通过分化诱导的巨噬细胞添加3mL的TrypLE Express。反应于37 $^{\circ}$ C进行15分钟,并去除巨噬细胞。添加

R10 (10mL) 并进行收集。用PBS进行两次洗涤,并用PBS进行重悬浮,以便成为 1×10^6 个细胞/mL。作为标准溶液,添加 $1\mu\text{L}/10^6$ 个细胞/mL CellTrace CFSE溶液(ThermoFisher)。允许混合物于室温放置10分钟。添加10%的R10 (20mL),且允许其于室温放置5分钟。离心以1200rpm进行5分钟。洗涤用10mL的R10进行一次。进行重悬浮,以便成为 1×10^6 个细胞/mL。将重悬浮的细胞用作效应细胞。

[0143] 2-3ADCP活性的评价向96-孔(U型底)微量培养板中以 $50\mu\text{L}/\text{孔}$ 的量添加用R10稀释的人源化抗-SIRP α 抗体(克隆:hD13_H1L3)或对照抗体。然后,以 $50\mu\text{L}/\text{孔}$ 的量添加通过步骤2-1的方法制备的靶细胞。接着,以 $50\mu\text{L}/\text{孔}$ 的量添加在步骤2-2中制备的效应细胞。最后,以 $50\mu\text{L}/\text{孔}$ 的量添加T-DM1或对照ADC。允许细胞在 37°C 和5% CO_2 的条件下放置4小时。于室温以1500rpm离心2-3分钟后,去除上清液。用含有2%FBS的PBS ($150\mu\text{L}/\text{孔}$) 进行洗涤。此后,添加 $50\mu\text{L}/\text{孔}$ 的 $1 \times \text{BD}$ 稳定固定剂以固定细胞。通过流式细胞术(Attune NxT/Thermo Fisher)分析固定的细胞。Far Red阳性细胞被定义为癌细胞,且CFSE阳性细胞被定义为巨噬细胞。进一步地,Far Red阳性和CFSE阳性细胞被定义为被巨噬细胞吞没的癌细胞。ADCP活性(%)依照下式计算:

$$\text{ADCP}(\%) = (\text{Far Red阳性和CFSE阳性细胞计数} / \text{Far Red阳性细胞计数}) \times 100$$
获得的结果通过GraphPad Prism 9.1.0(GraphPad Software)进行分析,并通过SAS System Release 9.2(SAS Institute)进行统计分析。

[0144] 如图10中所示的,T-DM1对人乳腺癌细胞系SK-BR-3细胞表现出ADCP活性。进一步地,通过与人源化抗-SIRP α 抗体hD13_H1L3组合使用增加了ADCP活性。统计分析通过配对t-检验进行,且P值表示到小数第四位。满足 $P < 0.05$ (双侧检验)的结果被确定为显著的。

[0145] 实施例3:抗肿瘤研究(1)

使6-周龄的雌性C57BL/6J小鼠(CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.)经受实验。

[0146] 测量及计算公式:每周两次用电子数字式卡尺(Mitutoyo Corporation)测量肿瘤的长轴及短轴,且计算肿瘤体积(mm^3)。计算公式如下:

$$\text{肿瘤体积}(\text{mm}^3) = 0.5 \times \text{长轴}(\text{mm}) \times [\text{短轴}(\text{mm})]^2$$

通过使用反转录病毒载体向从美国国家癌症研究所(National Cancer Institute) (US, Maryland)提供的小鼠结肠直肠癌细胞系MC38引入人TROP2基因,以获得MC38-hTROP2细胞,其被投入使用。所述细胞在细胞膜上表达人TROP2蛋白。将MC38-hTROP2细胞悬浮于盐水中,且将 0.5×10^6 个细胞皮下移植到每只C57BL/6J小鼠的右侧腹部(第0天)。四天后,基于肿瘤体积将小鼠随机分组(第4天)。于第4天经由尾静脉向要接受抗体-药物缀合物和抗-SIRP α 抗体的组合组以总计 $3\text{mg}/\text{kg}$ 一次的剂量施用利用 10mM 乙酸盐缓冲液和5%山梨糖醇, pH5.5 (ABS) 稀释的戈沙妥珠单抗(SG)。然后在第5天和第8天以总计 $10\text{mg}/\text{kg}$ 两次的剂量腹膜内施用利用盐水稀释的抗-SIRP α 抗体(克隆:5C12)。除组合组外,设置接受SG或抗-SIRP α 抗体的单一施用组和接受ABS和盐水的对照(媒介物)组。每组小鼠数目为8只。继续肿瘤体积的测量直到第14天为止。

[0147] 结果示于图11中。图11A显示了抗肿瘤研究的概观。图11B和C分别显示了各个施用组的平均和个别肿瘤生长曲线。纵轴表示肿瘤体积(mm^3),且横轴表示肿瘤移植后的天数。在第14天,接受SG和抗-SIRP α 抗体的组合组表现出最强的抗肿瘤作用。

[0148] 实施例4:抗肿瘤研究(2)

使6-周龄的雌性BALB/c小鼠(BALB/c AnNCr1Cr1j)(CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.)经受实验。

[0149] 测量及计算公式:每周两次用电子数字式卡尺(Mitutoyo Corporation)测量肿瘤的长轴及短轴,且计算肿瘤体积(mm^3)。计算公式如下:

$$\text{肿瘤体积}(\text{mm}^3) = 0.5 \times \text{长轴}(\text{mm}) \times [\text{短轴}(\text{mm})]^2$$

通过使用慢病毒载体向从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)购买的小鼠结肠直肠癌细胞系CT26.WT(CRL2638)引入人HER2基因,以制备CT26.WT-hHER2细胞,其被投入使用。所述细胞在细胞膜上表达人HER2蛋白。将CT26.WT-hHER2细胞悬浮于PBS(-)中,且将 3.0×10^6 个细胞皮下移植到每只BALB/c小鼠的右侧腹部(第-6天)。六天后,基于肿瘤体积将小鼠随机分组(第0天)。T-DM1用盐水稀释,且在第0天和第7天经由尾静脉以总计10mg/kg两次的剂量施用。抗-SIRP α 抗体(克隆:5C12)用盐水稀释,且在第0、3、7和10天以总计10mg/kg四次的剂量腹膜内施用。此外,设置接受T-DM1或抗-SIRP α 抗体的单一施用组和接受盐水的对照(媒介物)组。每组小鼠数目为6只。继续肿瘤体积的测量直到第14天为止。各单一施用组及组合组间的比较依照Dunnett多重比较进行。P值表示到小数第四位,且满足 $P < 0.05$ (双侧检验)的结果被确定为显著的。

[0150] 结果示于图12中。图12A显示了抗肿瘤研究的概观。图12B和C分别显示了各个施用组的平均和个别肿瘤生长曲线。纵轴表示肿瘤体积(mm^3),且横轴表示药物开始施用后的天数。在第14天,接受T-DM1和抗-SIRP α 抗体的组合组与单一施用组的每一种相比表现出显著卓越的抗肿瘤作用。

[0151] 实施例5:抗肿瘤测试(3)

使用CT26.WT-h柄蛋白-4细胞或MC38-h柄蛋白-4细胞,其通过使用慢病毒载体将人柄蛋白-4基因引入小鼠结肠直肠癌细胞系CT26.WT或小鼠结肠直肠癌细胞系MC38产生。有时,可以表达具有维恩妥尤单抗可结合的表位的小鼠和人的嵌合体柄蛋白-4(m柄蛋白-4_I75A_N90S)来代替h柄蛋白-4。这些细胞被皮下移植到BALB/c或C57BL/6J小鼠中,且然后施用维恩妥尤单抗和抗-SIRP α 抗体(克隆:5C12)并评价它们的组合。

[0152] 根据上述实验结果,发现与抗-SIRP α 抗体组合施用的根据本发明的抗体-药物缀合物发挥比这些的单独施用所获得的作用的每一种更卓越的抗肿瘤作用。

[0153] 序列表的自由文本

SEQ ID NO:1-人源化抗-SIRP α 抗体hD13的hH1重链的氨基酸序列

SEQ ID NO:2-人源化抗-SIRP α 抗体hD13的hH2重链的氨基酸序列

SEQ ID NO:3-人源化抗-SIRP α 抗体hD13的hL2轻链的氨基酸序列

SEQ ID NO:4-人源化抗-SIRP α 抗体hD13的hL3轻链的氨基酸序列

SEQ ID NO:5-人源化抗-SIRP α 抗体hD13的hL4轻链的氨基酸序列

SEQ ID NO:6-嵌合体SIRP α 抗体cD13 CDR-H1的氨基酸序列

SEQ ID NO:7-嵌合体SIRP α 抗体cD13 CDR-H2的氨基酸序列

SEQ ID NO:8-嵌合体SIRP α 抗体cD13 CDR-H3的氨基酸序列

SEQ ID NO:9-嵌合体SIRP α 抗体cD13 CDR-L1的氨基酸序列

SEQ ID NO:10-嵌合体SIRP α 抗体cD13 CDR-L2的氨基酸序列

SEQ ID NO:11-嵌合体SIRP α 抗体cD13 CDR-L3的氨基酸序列

SEQ ID NO:12-5C12抗小鼠SIRP α 抗体重链的氨基酸序列

SEQ ID NO:13-5C12抗小鼠SIRP α 抗体轻链的氨基酸序列

SEQ ID NO: 1 : hH1的氨基酸序列

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDYGMIVRQA
PGKGLEWVASISSSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCARR
YYGFNYPFDYWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKR
VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

信号序列 (1-19), 可变区 (20-139), 恒定区 (140-466)

图1

SEQ ID NO: 2 : hH2的氨基酸序列

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDYGMIVRQA
PGKGLEWVASISSSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARR
YYGFNYPFDYWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKR
VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

信号序列 (1-19), 可变区 (20-139), 恒定区 (140-466)

图2

SEQ ID NO: 3 : hL2的氨基酸序列

MVLQTQVFISLLLLWISGAYGAIQLTQSPSSLSASVGQRVTITCGASKSVRTYMHWYQQK
PGKAPKLLIYSASNLEAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSNEPPYTF
GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

信号序列 (1-20), 可变区 (21-127), 恒定区 (128-234)

图3

SEQ ID NO: 4 : hL3的氨基酸序列

MVLQTQVFISLLLLWISGAYGDTQLTQSPSSLSASVGQRVTITCGASKSVRTYMHWYQQK
PGKQPKLLIYSASNLEAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSNEPPYTF
GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

信号序列 (1-20), 可变区 (21-127), 恒定区 (128-234)

图4

SEQ ID NO: 5 : hL4的氨基酸序列

MVLQTQVFISLLLLWISGAYGDTVLTQSPDSLAVSLGQRATINCGASKSVRTYMHWYQQK
PGQQPKLLIYSASNLEAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSNEPPYTF
GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

信号序列 (1-20), 可变区 (21-127), 恒定区 (128-234)

图5

SEQ ID NO:6 : D 1 3 C D R H 1
GFTFSDYGMI

SEQ ID NO:7 : D 1 3 C D R H 2
SISSSSSYIY

SEQ ID NO:8 : D 1 3 C D R H 3
RYYGFNYPFDY

SEQ ID NO:9 : D 1 3 C D R L 1
GASKSVRTYMH

SEQ ID NO:1 0 : D 1 3 C D R L 2
SASNLEA

SEQ ID NO:1 1 : D 1 3 C D R L 3
QQSNEPPYT

图6

SEQ ID NO: 12

抗小鼠SIRP α 抗体5C12-mIgG1-D265A的重链的氨基酸序列

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYDMAWVRQA
PTKGLEWVASISTRGGSSYYRDSVKGRFTVSRDNAKSTLYLQMDSLRSEDATATYYCARH
PGDYFDYWGGQGMVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTW
NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPR
DCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDV
EVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKG
RPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDT
DGSYFVYSKLVNPKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK*

SEQ ID NO: 13

抗小鼠SIRP α 抗体5C12-mIgG1-D265A的轻链的氨基酸序列

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDTVLTQSPALAVSPGERVTISCRASESVSTLIHWYQQKP
GQQPKLLIYLTSHLESGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPVEADDTATYYCQQSWTHPWTFG
GGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFFPKDINVKKIDGSRQNG
VLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC*

图7

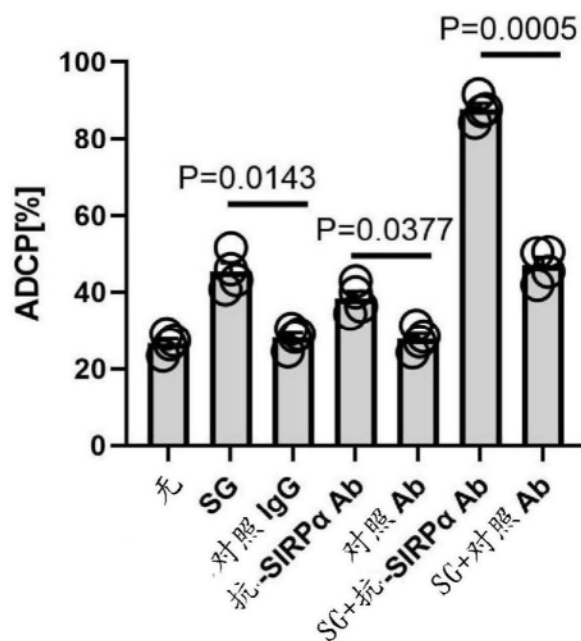


图8

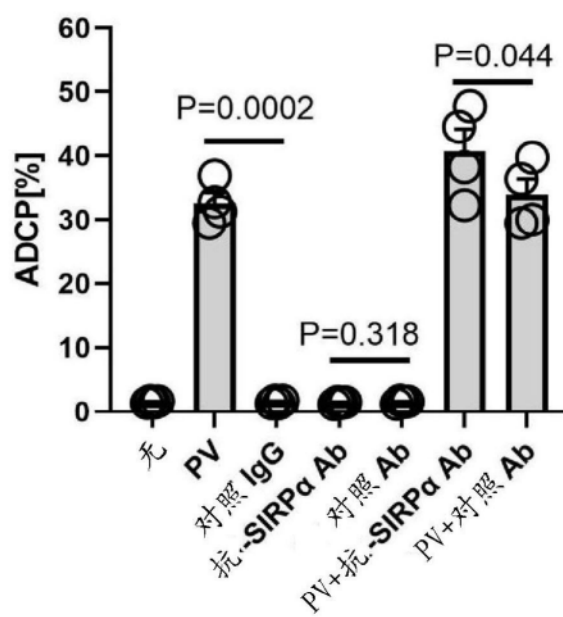


图9

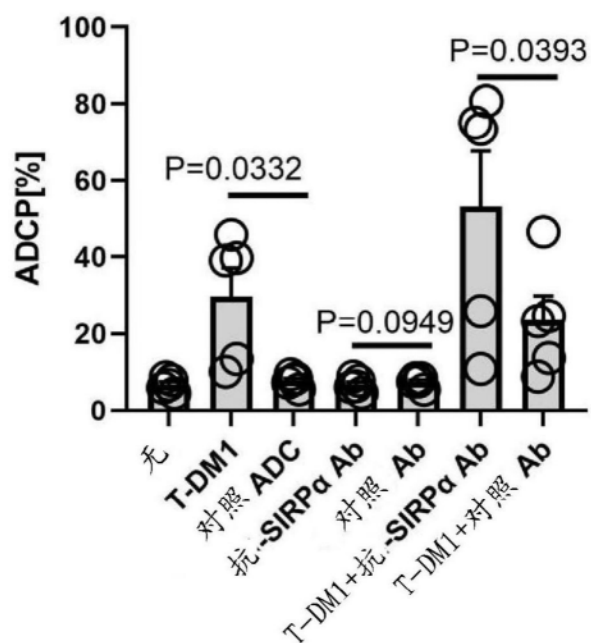


图10

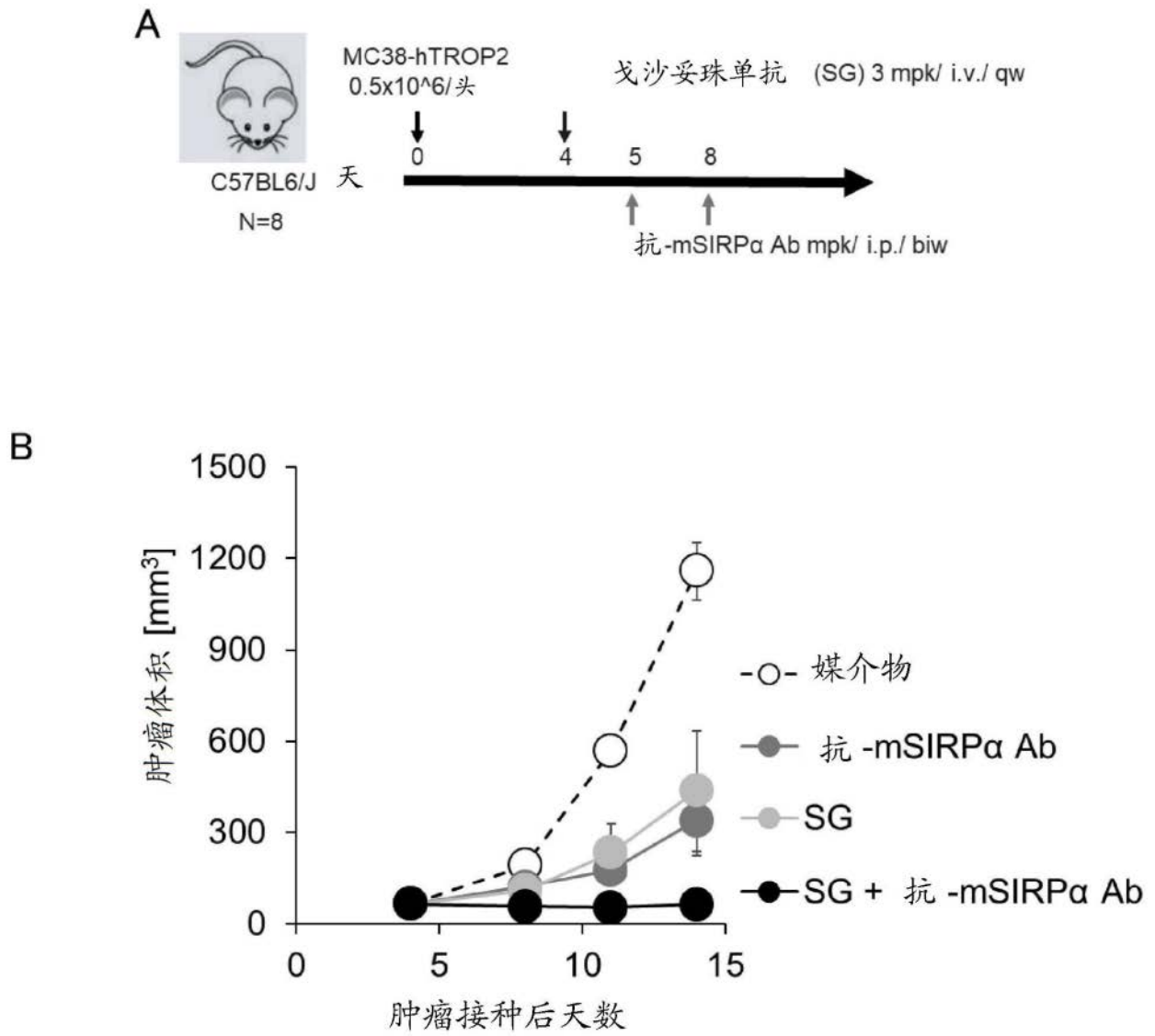


图11-1

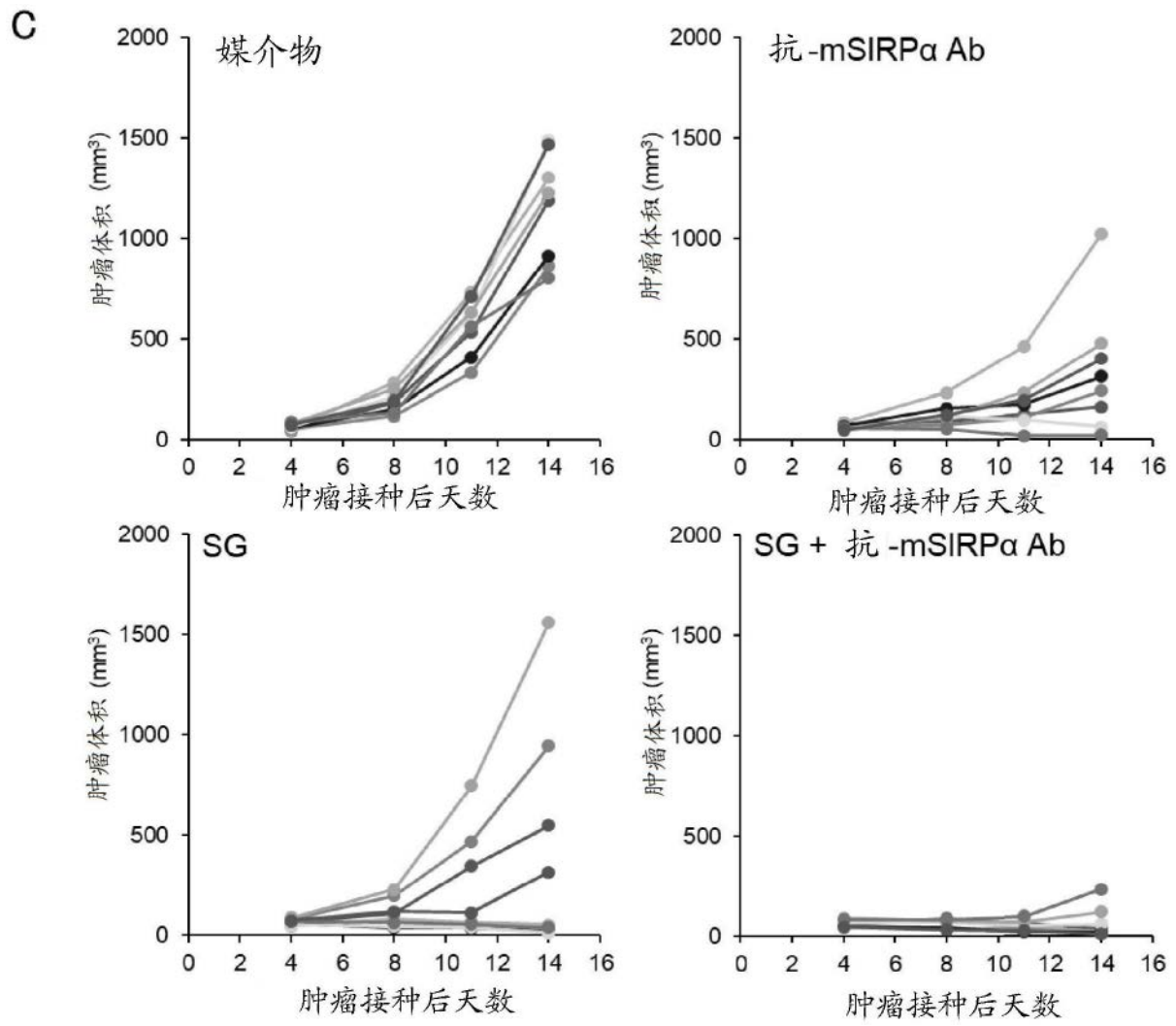


图11-2

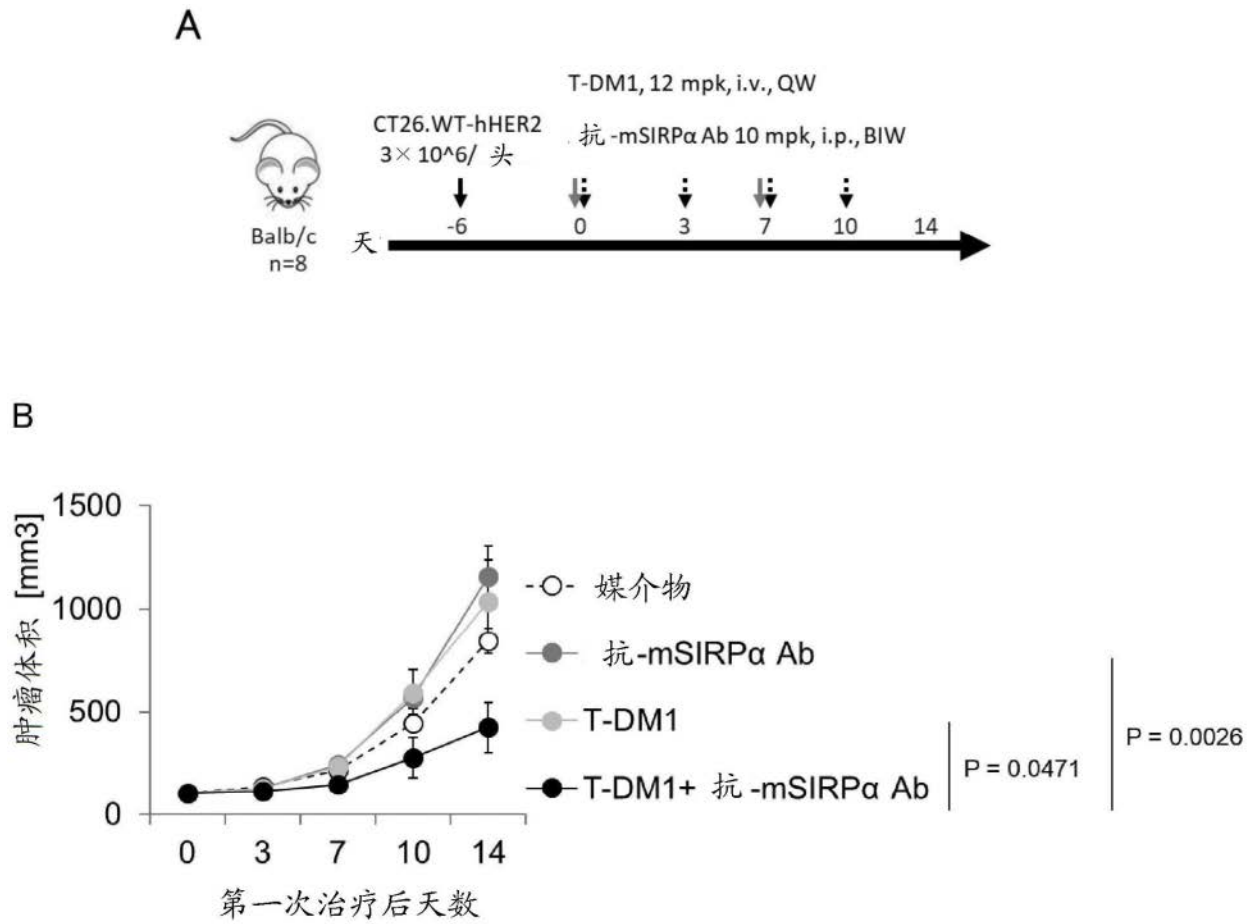


图12-1

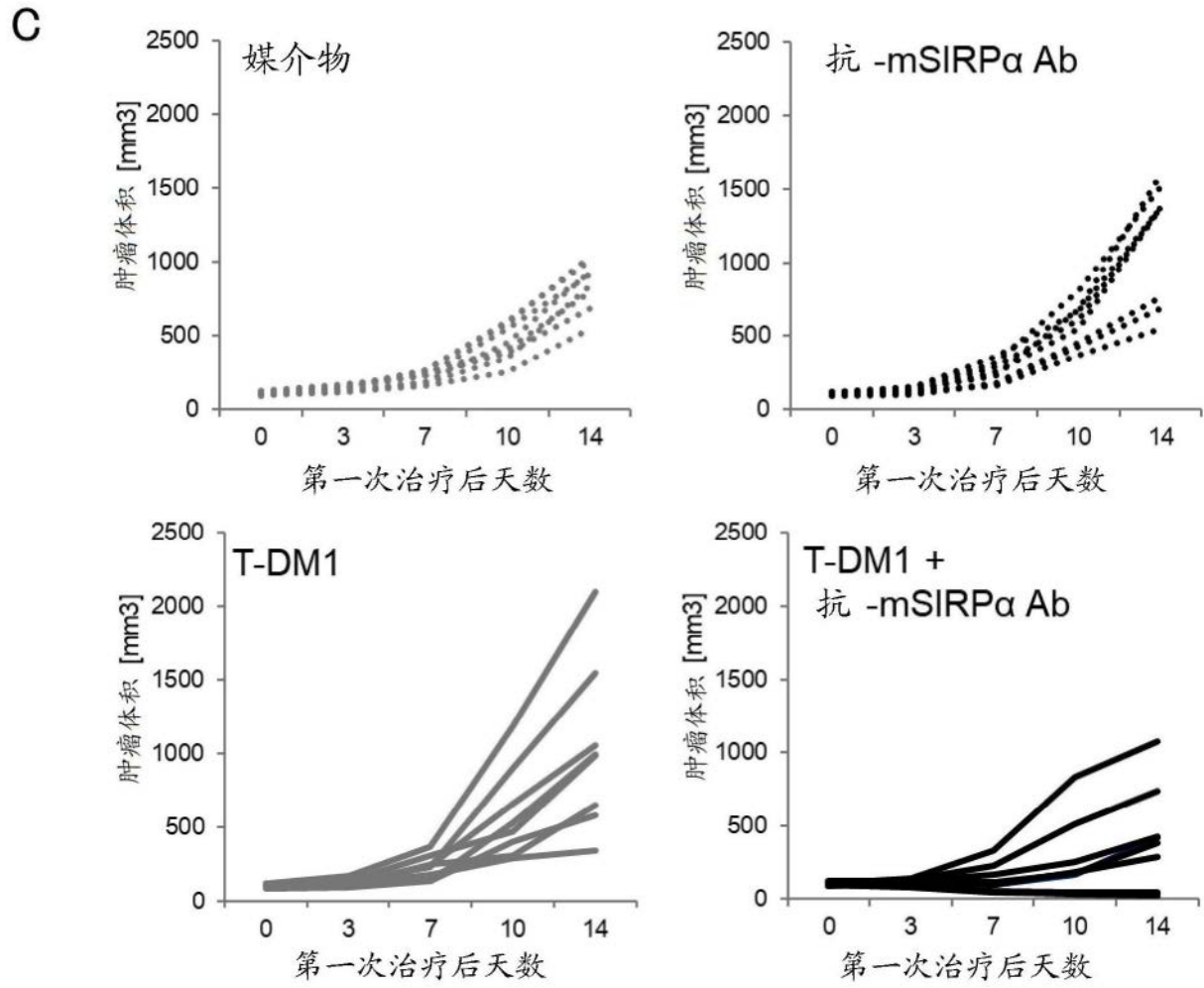


图12-2