



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118055946 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 17

(21) 申请号 202280052987.4

(22) 申请日 2022.07.28

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2021/109028 2021.07.28 CN

PCT/CN2022/103725 2022.07.04 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.01.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/074284 2022.07.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/010098 EN 2023.02.02

(71) 申请人 科望(苏州)生物医药科技有限公司

地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区

桑田街218号17栋

申请人 科望(上海)生物医药科技有限公司

(72) 发明人 卢宏韬 孙大为 耿亚男 王静

蒋海侠 吴志浩 高瑞 牛晓峰

邱阳生

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

专利代理师 吴瑜 汪烨君

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61P 3/02 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

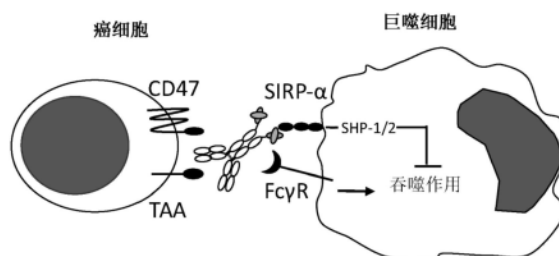
权利要求书10页 说明书88页 附图34页

(54) 发明名称

新型多特异性分子

(57) 摘要

本公开提供了对SIRP α 和一种或多种靶抗原具有特异性的多特异性分子、编码所述多特异性分子的分离的多核苷酸、包括所述多特异性分子的药物组合物和其用途。



1. 一种多特异性分子,其包括:

(a) SIRP α 结合结构域;

(b) 激活受体结合结构域;以及

(c) 靶抗原结合结构域,所述靶抗原结合结构域与在共表达靶抗原和CD47的靶细胞上表达的所述靶抗原结合,

其中在存在所述靶抗原的情况下,所述多特异性分子选择性地诱导免疫效应子细胞的效应子功能,并且其中所述免疫效应子细胞共表达SIRP α 和所述激活受体。

2. 根据权利要求1所述的多特异性分子,其中所述共表达所述靶抗原和所述CD47的靶细胞是通过所述免疫效应子细胞的所述效应子功能被消除的癌细胞、受感染细胞或所关注疾病细胞。

3. 根据权利要求1所述的多特异性分子,其中在不存在所述靶抗原的情况下,所述多特异性分子诱导所述免疫效应子细胞的最小效应子功能。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中在不存在所述靶抗原的情况下由所述多特异性分子诱导的所述效应子功能不超过在存在所述靶抗原的情况下由所述多特异性分子诱导的所述效应子功能的10%。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述免疫效应子细胞是髓样细胞,任选地所述免疫效应子细胞是巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、吞噬细胞或嗜碱性粒细胞,任选地所述免疫效应子细胞是巨噬细胞。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述效应子功能包括由所述免疫效应子细胞对共表达所述抗原和所述CD47的所述细胞的吞噬作用。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述激活受体是可片段结晶的 γ 受体(Fc γ R)、TREM2、凝集素、清道夫受体A1(SRA1)、MARCO、CD36、CD163、CD68、CD205、CD206、FcDR1、CD207、CD209、RAGE、CD14、CD64、F4/80、CD64、CD32a、CD16a、CD89、CD19、CD28、CSFR、PDGFR、MSR1、SCARA3、COLEC12、SCARA5、SCARB1、SCARB2、dectin 1、RAGE(SR-E1)、LRP1、LRP2、ASGP、SR-PSOX、CXCL16、OLR1、SCARF1、SCARF2、CXCL16、STAB1、STAB2、SRCRB4D、SSC5D、CCR2、CX3CR1、CSF1R、Tie2、HuCRIg(L)和CD169受体或补体受体(如CR1和CR3)、PI3K、Fc γ R1、Fc γ R2A、Fc γ R2B2、Fc γ R2C、Fc γ R3A、BAH、Tyro3、Axl、Traf6、Syk、MyD88、Zap70、Fc ϵ R1、Fc α R1、BAFF-R、DAP 12、NFAM1、MRC1、ItgB5、MERTK、ELMO和CD79b;任选地,所述激活受体是Fc γ R。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述激活受体结合结构域包括Fc结构域,任选地所述Fc结构域源自IgG1或IgG4。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述SIRP α 结合结构域能够基本上阻断SIRP α 与CD47之间的相互作用。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述SIRP α 结合结构域能够完全阻断SIRP α 与CD47之间的相互作用。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述SIRP α 结合结构域能够基本上阻断由SIRP α 与CD47之间的相互作用介导的SHP-1募集。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述SIRP α 结合结构域能够完全阻断由SIRP α 与CD47之间的相互作用介导的SHP-1募集。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子, 其中所述SIRP α 结合结构域具有最小的诱导所述免疫效应子细胞的所述效应子功能的固有活性。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子, 其中所述SIRP α 结合结构域和所述激活受体结合结构域紧密邻近, 以允许所述多特异性分子与在同一免疫效应子细胞上共表达的SIRP α 和所述激活受体两者结合。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子, 其中所述SIRP α 结合结构域和/或所述靶抗原结合结构域包括抗体结构域或抗体模拟结构域; 任选地所述抗体模拟结构域包括纤连蛋白结构域、蛋白A的Z结构域(亲和体)、 γ -B结晶结构域、泛素结构域、胱抑素结构域、Sac7d结构域、三螺旋卷曲螺旋结构域、脂质运载蛋白结构域、膜受体的A结构域、锚蛋白重复基序、Fyn的SH3结构域、蛋白酶抑制剂的库尼兹结构域、纤连蛋白的III型结构域(微型抗体)、碳水化合物结合模块32-2。

16. 根据权利要求15所述的多特异性分子, 其中所述抗体结构域包括Fab、VHH、单链Fv(scFv)、双功能抗体、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv片段、二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双功能抗体(ds双功能抗体)、F(ab)₂、scFv二聚体(二价双功能抗体)、骆驼化单结构域抗体、纳米抗体、四功能抗体、结构域抗体或二价结构域抗体。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子, 其包括多特异性抗体, 所述多特异性抗体包括靶抗原结合抗体结构域、SIRP α 结合抗体结构域和Fc结构域。

18. 根据权利要求17所述的多特异性分子, 其中所述靶抗原结合抗体结构域与所述Fc结构域的N末端连接。

19. 根据权利要求18所述的多特异性分子, 其中所述靶抗原结合抗体结构域包括Fab结构域, 任选地所述Fab结构域包括与所述Fc结构域的所述N末端之一连接的重链。

20. 根据权利要求18所述的多特异性分子, 其中所述多特异性分子包括两个靶抗原结合抗体结构域, 所述两个靶抗原结合抗体结构域中的每个靶抗原结合抗体结构域包括Fab结构域, 任选地所述Fab结构域中的每个Fab结构域分别包括与所述Fc结构域的每个N末端连接的重链。

21. 根据权利要求18到20中任一项所述的多特异性分子, 其中所述SIRP α 结合结构域与所述Fc结构域或所述靶抗原结合抗体结构域连接。

22. 根据权利要求21所述的多特异性分子, 其中所述SIRP α 结合结构域与所述Fc结构域的C末端连接。

23. 根据权利要求21所述的多特异性分子, 其中所述SIRP α 结合结构域与所述Fc结构域的N末端连接, 条件是所述SIRP α 结合结构域和所述靶抗原结合抗体结构域不与所述Fc结构域的同N末端连接。

24. 根据权利要求21所述的多特异性分子, 其中所述SIRP α 结合结构域与靶抗原结合Fab结构域的轻链的C末端连接。

25. 根据权利要求17所述的多特异性分子, 其中所述SIRP α 结合抗体结构域与所述Fc结构域的N末端连接。

26. 根据权利要求25所述的多特异性分子, 其中所述SIRP α 结合抗体结构域包括Fab结构域, 任选地所述Fab结构域包括与所述Fc结构域的所述N末端之一连接的重链。

27. 根据权利要求25所述的多特异性分子,其中所述抗体包括两个SIRP α 结合抗体结构域,所述两个SIRP α 结合抗体结构域中的每个SIRP α 结合抗体结构域包括Fab结构域,任选地所述Fab结构域中的每个Fab结构域分别包括与所述Fc结构域的每个N末端连接的重链。

28. 根据权利要求25到27中任一项所述的多特异性分子,其中所述靶抗原结合结构域与所述Fc结构域或所述SIRP α 结合抗体结构域连接。

29. 根据权利要求28所述的多特异性分子,其中所述靶抗原结合结构域与所述Fc结构域的所述N末端连接,条件是所述靶抗原结合结构域和所述SIRP α 结合结构域不与所述Fc结构域的同N末端连接。

30. 根据权利要求28所述的多特异性分子,其中所述靶抗原结合结构域与SIRP α 结合Fab结构域的轻链的C末端连接。

31. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述靶抗原包括肿瘤表面抗原。

32. 根据权利要求31所述的多特异性分子,其中所述肿瘤表面抗原是PD-L1、密封蛋白18.2、BCMA、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD30、CD33、CD38、CD44、CD52、CD56、CD70、CD96、CD97、CD99、CD123、EGFR、HER2、HER3、CD117、C-Met、EGFR、EGFRvIII、ERBB3、ERBB4、VEGFR1、VEGFR2、ROR1、PTHR2、B7-H1 (PD-L1)、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6、B7-H7、Trop-2、GPC-3、EPCAM、DLL-3、粘连蛋白-4、密封蛋白6、Muc-1、PSMA、GD3、FAP、CEA或EphA2。

33. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述SIRP α 结合结构域包括:

a) 包含X₁YYMH (SEQ ID NO:161) 的序列的HCDR1、包含RIDPEDX₂EX₃KYAPKFQG (SEQ ID NO:162) 的序列的HCDR2和包含GX₁₅X₄X₅Y (SEQ ID NO:163) 的序列的HCDR3;和/或包含SASSSVSSSYLY (SEQ ID NO:26) 的序列的LCDR1、包含STSNLAS (SEQ ID NO:27) 的序列的LCDR2和包含X₆QWSSYPYT (SEQ ID NO:164) 的序列的LCDR3;或

b) 包含TYGMS (SEQ ID NO:35) 的序列的HCDR1、包含WINTYSGVX₇TX₈ADDFKG (SEQ ID NO:165) 的序列的HCDR2和包含DPHX₉YGX₁₀SPAWFX₁₁Y (SEQ ID NO:166) 的序列的HCDR3;和/或包含X₁₂ASQX₁₃VGIX₁₄VA (SEQ ID NO:188) 的序列的LCDR1、包含SASNRYT (SEQ ID NO:39) 的序列的LCDR2和包含QQYSX₁₆YPX₁₇T (SEQ ID NO:189) 的序列的LCDR3;或

c) 包含EYVLS (SEQ ID NO:41) 的序列的HCDR1、包含EIYPGTITTYNEKFKG (SEQ ID NO:42) 的序列的HCDR2和包含FYDYDGGWFAY (SEQ ID NO:43) 的序列的HCDR3;和/或包含SASSSVSSDLH (SEQ ID NO:44) 的序列的LCDR1、包含GTSNLAS (SEQ ID NO:45) 的序列的LCDR2和包含QQWSGYPWT (SEQ ID NO:46) 的序列的LCDR3,

其中X₁是A或D;X₂是G或A;X₃是T或S;X₄是L或Y;X₅是E或A;X₆是Y或H;X₇是S或P;X₈是Y或C;X₉是Y或S;X₁₀是N或S;X₁₁是P或V;X₁₂是E或K;X₁₃是N或I;X₁₄是S或A;X₁₅是S或不存在;X₁₆是S或A;X₁₇是F或L。

34. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述SIRP α 结合结构域包括:

a) 包含SEQ ID NO:23的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:198的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:25的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:26的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:27的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:28的序列的LCDR3;或

b) 包含SEQ ID NO:29的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:30的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:31的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:32的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:33的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:34的序列的LCDR3;或

c) 包含SEQ ID NO:35的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:36的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:37的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:38的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:39的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:40的序列的LCDR3;或

d) 包含SEQ ID NO:47的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:48的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:49的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:50的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:51的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:52的序列的LCDR3。

35. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述SIRP α 结合结构域包括与选自以下组成的组的抗SIRP α 抗体相同的HCDR和LCDR:C25、C15、C42、C59和C73,其中:

a) 所述C25包括包含SEQ ID NO:1的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:2的序列的轻链可变区,

b) 所述C15包括包含SEQ ID NO:11的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:12的序列的轻链可变区,

c) 所述C42包括包含SEQ ID NO:13的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:14的序列的轻链可变区,

d) 所述C59包括包含SEQ ID NO:15的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:16的序列的轻链可变区,并且

e) 所述C73包括包含SEQ ID NO:17的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:18的序列的轻链可变区。

36. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述SIRP α 结合结构域进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一者或多者和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一者或多者,其中:

i) 所述HFR1包括EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKX₂₀SGFNLIK (SEQ ID NO:190) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

j) 所述HFR2包括WVQQAPGKGLEWIG (SEQ ID NO:191) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

k) 所述HFR3包括RVTITADTSTX₂₁TAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (SEQ ID NO:192) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

l) 所述HFR4包括WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:193) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

m) 所述LFR1包括EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:194) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

n) 所述LFR2包括WYQQKPGQAPKLWIY (SEQ ID NO:195) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

o) 所述LFR3包括GIPARFSGSGSGTDX₂₂TLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:196) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

p) 所述LFR4包括FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:197) 或与其具有至少80%序列同一性的同源

序列,

其中 X_{20} 是A或V; X_{21} 是N或D; X_{22} 是Y或F。

37.根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述SIRP α 结合结构域包括:

- a) 包含SEQ ID NO:1的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:2的序列的轻链可变区;或
- b) 包含SEQ ID NO:3的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:4的序列的轻链可变区;或
- c) 包含SEQ ID NO:5的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:6的序列的轻链可变区;或
- d) 包含SEQ ID NO:7的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:8的序列的轻链可变区;或
- e) 包含SEQ ID NO:9的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:10的序列的轻链可变区;或
- f) 包含SEQ ID NO:11的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:12的序列的轻链可变区;或
- g) 包含SEQ ID NO:13的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:14的序列的轻链可变区;或
- h) 包含SEQ ID NO:15的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:16的序列的轻链可变区;或
- i) 包含SEQ ID NO:17的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:18的序列的轻链可变区;或
- j) 包含SEQ ID NO:159的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:160的序列的轻链可变区。

38.根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述靶抗原结合结构域包括密封蛋白18.2结合结构域。

39.根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述密封蛋白18.2结合结构域包括:

- a) 包含SEQ ID NO:77的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:78的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:79的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:80的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:81的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:225的序列的LCDR3;或
- b) 包含SEQ ID NO:83的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:84的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:85的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:86的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:87的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:88的序列的LCDR3;或
- c) 包含SEQ ID NO:89的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:90的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:91的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:92的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:93的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:94的序列的LCDR3;或
- d) 包含SEQ ID NO:95的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:96的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:97的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:98的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:99的序列

的LCDR2和包含SEQ ID NO:100的序列的LCDR3;或

e) 包含SEQ ID NO:101的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:102的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:103的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:104的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:105的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:106的序列的LCDR3。

40. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述密封蛋白18.2结合结构域包括与选自以下组成的组的抗密封蛋白18.2抗体相同的HCDR和LCDR:hu26.H1L1、hu26.H1L2(S92A)、hu28.H1L2、C10、C29和C30,

a) 其中所述hu26.H1L1包括包含SEQ ID NO:65的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:66的序列的轻链可变区,

b) 其中所述hu26.H1L2(S92A)包括包含SEQ ID NO:65的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:224的序列的轻链可变区,

c) 所述hu28.H1L2包括包含SEQ ID NO:69的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:70的序列的轻链可变区,

d) 所述C10包括包含SEQ ID NO:71的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:72的序列的轻链可变区,

e) 所述C29包括包含SEQ ID NO:73的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:74的序列的轻链可变区,并且

f) 所述C30包括包含SEQ ID NO:75的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:76的序列的轻链可变区。

41. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述密封蛋白18.2结合结构域进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一者或多者和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一者或多者,其中:

a) 所述HFR1包括选自EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T L S (SEQ ID NO:167) 和 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T (SEQ ID NO:168) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

b) 所述HFR2包括选自WVRQAPGKGLEWVX₁₈(SEQ ID NO:169) 和WVRQAPGQGLEWMG(SEQ ID NO:170) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

c) 所述HFR3序列包括选自RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAX₂₃(SEQ ID NO:171) 和RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR(SEQ ID NO:172) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

d) 所述HFR4包括WGQGLVT VSS(SEQ ID NO:173) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

e) 所述LFR1包括选自DIQLTQSPSFLSASVGDRVITC(SEQ ID NO:174) 和DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC(SEQ ID NO:175) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

f) 所述LFR2包括选自WYQQKPGX₂₆X₂₇PKX₁₉LIY(SEQ ID NO:176) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

g) 所述LFR3包括选自GVPSRFGSGSGGTEX₂₄TLTISSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO:178) 和GV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYHC(SEQ ID NO:179) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至

少80%序列同一性的同源序列,并且

h) 所述LFR4包括FGX₂₅GTKLEIK (SEQ ID NO:180) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

其中X₁₈是S或A,X₁₉是L或A,X₂₃是T或K,X₂₄是Y或F,X₂₅是Q或G,X₂₆是Q或K,X₂₇是P或A。

42. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述密封蛋白18.2结合结构域包括:

a) 包含SEQ ID NO:65或68的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:66或67或224的序列的轻链可变区;或

b) 包含SEQ ID NO:69的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:70的序列的轻链可变区;或

c) 包含SEQ ID NO:71的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:72的序列的轻链可变区;或

d) 包含SEQ ID NO:73的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:74的序列的轻链可变区;或

e) 包含SEQ ID NO:75的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:76的序列的轻链可变区。

43. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述靶抗原结合结构域包括PD-L1结合结构域。

44. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述PD-L1结合结构域包括:

a) 包含SEQ ID NO:119的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:120的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:121的序列的HCDR3;或

b) 包含SEQ ID NO:122的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:123的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:124的序列的HCDR3;或

c) 包含SEQ ID NO:125的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:126的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:127的序列的HCDR3;或

d) 包含SEQ ID NO:128的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:129的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:130的序列的HCDR3;或

e) 包含SEQ ID NO:131的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:132的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:133的序列的HCDR3;或

f) 包含SEQ ID NO:134的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:135的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:136的序列的HCDR3;或

g) 包含SEQ ID NO:137的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:138的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:139的序列的HCDR3;或

h) 包含SEQ ID NO:140的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:141的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:142的序列的HCDR3;或

i) 包含SEQ ID NO:143的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:144的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:145的序列的HCDR3;或

j) 包含SEQ ID NO:146的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:147的序列的HCDR2和包含SEQ

ID NO:148的序列的HCDR3;或

k) 包含SEQ ID NO:149的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:150的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:151的序列的HCDR3;或

包含SEQ ID NO:152的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:153的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:154的序列的HCDR3。

45. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述PD-L1结合结构域包括与选自以下组成的组的抗PD-L1抗体相同的HCDR:C71、C71v38、C239、C492、C570、570h3、C446、C2811、C1778、C1793、C2855、C2713和C2719,

a) 其中所述C71包括包含SEQ ID NO:107的序列的重链可变区,

b) 所述C71v38包括包含SEQ ID NO:108的序列的重链可变区,

c) 所述C239包括包含SEQ ID NO:109的序列的重链可变区,

d) 所述C492包括包含SEQ ID NO:110的序列的重链可变区,

e) 所述C570包括包含SEQ ID NO:111的序列的重链可变区,

f) 所述570h3包括包含SEQ ID NO:223的序列的重链可变区,

g) 所述C446包括包含SEQ ID NO:112的序列的重链可变区,

h) 所述C2811包括包含SEQ ID NO:113的序列的重链可变区,

i) 所述C1778包括包含SEQ ID NO:114的序列的重链可变区,

j) 所述C1793包括包含SEQ ID NO:115的序列的重链可变区,

k) 所述C2855包括包含SEQ ID NO:116的序列的重链可变区,

l) 所述C2713包括包含SEQ ID NO:117的序列的重链可变区,并且

m) 所述C2719包括包含SEQ ID NO:118的序列的重链可变区。

46. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述PD-L1结合结构域包括:包含选自SEQ ID NO:107-118和223组成的组的序列的重链可变区。

47. 根据权利要求30到39中任一项所述的多特异性分子,其中

a) 所述SIRP α 结合结构域进一步包括仍保留对人SIRP α 的特异性结合的一个或多个氨基酸残基取代或修饰;和/或

b) 所述密封蛋白18.2结合结构域进一步包括仍保留对密封蛋白18.2的特异性结合的一个或多个氨基酸残基取代或修饰,和/或

c) 所述PD-L1结合结构域进一步包括仍保留对PD-L1的特异性结合的一个或多个氨基酸残基取代或修饰。

48. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述取代或修饰中的至少一个取代或修饰位于所述重链可变区或所述轻链可变区的CDR序列中的一个或多个CDR序列中和/或非CDR序列中的一个或多个非CDR序列中。

49. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其是人源化的。

50. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其与一个或多个缀合物部分连接。

51. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子,其中所述缀合物部分包括清除改性剂、化学治疗剂、毒素、放射性同位素、镧系元素、发光标记、荧光标记、酶底物标记、DNA烷基化剂、拓扑异构酶抑制剂、微管蛋白结合剂、纯化部分或其它抗癌药物。

52. 一种药物组合物,其包含根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子以及一种或多种药学上可接受的载体。

53. 一种分离的多核苷酸,其编码根据前述权利要求中任一项所述的多特异性分子。

54. 一种载体,其包括根据权利要求53所述的分离的多核苷酸。

55. 一种宿主细胞,其包括根据权利要求54所述的载体。

56. 一种试剂盒,其包括根据权利要求1到51中任一项所述的多特异性分子和/或根据权利要求52所述的药物组合物以及第二治疗剂。

57. 一种表达根据权利要求1到51中任一项所述的多特异性分子的方法,所述方法包括在表达根据权利要求54所述的载体的条件下培养根据权利要求55所述的宿主细胞。

58. 一种治疗受试者的可能受益于诱导的靶细胞的吞噬作用的疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1到51中任一项所述的多特异性分子。

59. 一种治疗受试者的靶抗原相关疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1到51中任一项所述的多特异性分子。

60. 一种治疗受试者的SIRP α 相关疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1到51中任一项所述的多特异性分子。

61. 一种治疗受试者的CD47相关疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1到51中任一项所述的多特异性分子。

62. 根据权利要求58到61中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中所述受试者已经诊断患有选自以下组成的组的疾病、病症或病状或有风险患有所述疾病、所述病症或所述病状:免疫相关疾病或病症、肿瘤和癌症、自身免疫性疾病和传染病。

64. 根据权利要求63所述的方法,所述免疫相关疾病或病症选自以下组成的组:全身性红斑狼疮、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、血管炎、重症肌无力、特发性肺纤维化、克罗恩氏病、哮喘、类风湿性关节炎、移植物抗宿主疾病、脊柱关节病(例如,强直性脊柱炎、银屑病性关节炎、与炎症肠病相关的孤立性急性肠病性关节炎、反应性关节炎、白塞氏综合征、未分化型脊柱关节病、前葡萄膜炎和幼年特发性关节炎)、多发性硬化症、子宫内膜异位、肾小球肾炎、败血症、糖尿病、急性冠状动脉综合征、缺血再灌注、银屑病、进行性全身性硬化症、动脉粥样硬化、舍格伦综合征、硬皮病或炎性自身免疫性肌炎。

65. 根据权利要求63所述的方法,其中所述肿瘤和癌症是实体瘤或恶性血液肿瘤,任性地选自以下组成的组:非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈样肉芽肿病、默克尔细胞癌和其它恶性血液肿瘤,如经典型霍奇金淋巴瘤(CHL)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的B细胞淋巴瘤、EBV阳性和阴性PTLD和EBV相关弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、浆母细胞性淋巴瘤、结外NK/T细胞淋巴瘤、鼻咽癌和HHV8相关原发性渗出性淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、中枢神经系统(CNS)赘生物,如原发性CNS淋巴瘤、脊髓轴肿瘤、脑干胶质细胞瘤、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、基底细胞癌、胆囊癌、胃癌、肺癌、支气管癌、骨癌、肝和胆管癌、胰腺癌、乳腺癌、肝癌、卵巢癌、睾丸癌、肾癌、肾盂和输尿管癌、唾液腺癌、小肠癌、尿道癌、膀

膀胱癌、头颈癌、脊柱癌、脑癌、宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、结肠癌、结直肠癌、直肠癌、食道癌、胃肠癌、皮肤癌、前列腺癌、垂体癌、阴道癌、甲状腺癌、喉癌、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、骨髓增生异常综合征、肉瘤、畸胎瘤、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、慢性髓性白血病 (CML)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、急性髓性白血病 (AML)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、T或B细胞淋巴瘤、GI器官间质瘤、软组织肿瘤、肝细胞癌和腺癌或其转移。

66. 根据权利要求58到65中任一项所述的方法, 其中所述施用是经口服、经鼻、静脉内、皮下、舌下或肌内施用。

67. 根据权利要求58到65中任一项所述的方法, 其进一步包括施用治疗有效量的第二治疗剂。

68. 根据权利要求67所述的方法, 其中所述第二治疗剂选自以下组成的组: 化学治疗剂、抗癌药物、放疗剂、免疫疗法剂、抗血管生成剂、靶向疗法剂、细胞疗法剂、基因疗法剂、激素疗法剂、抗病毒剂、抗生素、镇痛药、抗氧化剂、金属螯合剂和细胞因子。

69. 一种根据权利要求1到51中任一项所述的多特异性分子和/或根据权利要求52所述的药物组合物在制备用于治疗、预防或缓解受试者的可能受益于诱导的靶细胞的吞噬作用的疾病、病症或病状的药物中的用途。

70. 一种诱导受试者体内靶细胞的吞噬作用的方法, 所述方法包括以有效诱导所述靶细胞的吞噬作用的剂量向所述受试者施用根据权利要求1到51中任一项所述的多特异性分子和/或根据权利要求52所述的药物组合物。

71. 根据权利要求70所述的方法, 其中所述受试者是人。

72. 根据权利要求70或71所述的方法, 其中所述受试者已经诊断患有选自以下组成的组的疾病、病症或病状或有风险患有所述疾病、所述病症或所述病状: 免疫相关疾病或病症、肿瘤和癌症、自身免疫性疾病和传染病。

73. 一种体外诱导靶细胞的吞噬作用的方法, 所述方法包括在存在根据权利要求1到51中任一项所述的多特异性分子和/或根据权利要求52所述的药物组合物的情况下, 使所述靶细胞与SIRP α 阳性吞噬细胞样品接触, 由此通过所述SIRP α 阳性吞噬细胞诱导所述靶细胞的所述吞噬作用。

74. 根据权利要求73所述的方法, 其中所述靶细胞是表达所述靶抗原的细胞。

75. 一种诱导通过吞噬作用消除共表达靶抗原和CD47的靶细胞的方法, 所述方法包括在存在吞噬免疫细胞的情况下, 使所述靶细胞与根据权利要求1到51中任一项所述的多特异性分子接触。

76. 一种诱导受试者的相对于不表达靶抗原的细胞选择性针对共表达所述靶抗原和CD47的靶细胞的吞噬作用的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1到51中任一项所述的多特异性分子。

77. 一种增加有需要的受试者的肿瘤微环境中的M1巨噬细胞的水平的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1到51中任一项所述的多特异性分子。

新型多特异性分子

技术领域

[0001] 本公开总体上涉及对SIRP α 和肿瘤相关抗原具有特异性的新型多特异性分子。

背景技术

[0002] 信号调节蛋白 α (SIRP α) 是主要在髓样细胞和树突状细胞上表达的抑制性受体。SIRP α 包括基于免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITIM) 胞质结构域。SIRP α 在髓样细胞上的免疫调节活性通过与其配体CD47结合而被激活,所述配体诱导SIRP α 的ITIM胞质结构域的酪氨酸磷酸化,随后募集含有SH2的酪氨酸磷酸酶 (SHP-1/2)。SHP-1/2然后通过蛋白质脱磷酸化来介导抑制信号传导事件,从而最终引起对巨噬细胞中的吞噬作用的抑制 (Barclay AN, Van den Berg TK. 信号调节蛋白 α (SIRP α) 与CD47之间的相互作用:结构、功能和治疗靶标 (The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRP α) and CD47: structure, function, and therapeutic target.) 《免疫学年度综述 (Annu Rev Immunol.)》2014;32:25-50; Oldenborg PA等人, CD47作为自身在红细胞上的标志物的作用 (Role of CD47 as a marker of self on red blood cells.) 《科学 (Science.)》2000; 288 (5473): 2051-2054.)。如此, CD47与SIRP α 的结合递送“别吃我 (don't eat me)”信号以抑制吞噬作用。

[0003] CD47在正常细胞上普遍表达并且在许多癌细胞上调。高CD47表达是癌细胞用于避开与不良临床结果相关的免疫系统的机制 (Willingham SB等人, CD47-信号调节蛋白 α (SIRP α) 相互作用是人实体瘤的治疗靶标 (The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRP α) interaction is a therapeutic target for human solid tumors.) 《美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci U S A.)》2012;109 (17): 6662-6667; Zhao XW等人, CD47-信号调节蛋白 α (SIRP α) 相互作用形成用于抗体介导的肿瘤细胞破坏的屏障 (CD47-signal regulatory protein- α (SIRP α) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction.) 《美国国家科学院院刊》2011;108 (45): 18342-18347; Majeti R等人, CD47是一种对人急性髓性白血病干细胞不利的预后因子和治疗性抗体靶标 (CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells.) 《细胞 (Cell.)》2009;138 (2): 286-299.)。对SIRP α 和第二抗原 (例如, 靶抗原) 具有特异性的双特异性巨噬细胞增强 (BiME) 抗体已经被设计成提供对癌细胞的增强的吞噬性质, 参见例如W02015138600A2, 所述文献通过引用并入本文。并且需要更深入地研究和比较构建有不同性质的SIRP α 抗体和形式的更多BiME分子。

[0004] 因此, 需要开发具有降低的副作用和高安全性的对SIRP α 具有特异性的改善的BiME抗体或多特异性分子。

发明内容

[0005] 贯穿本公开, 如本文所使用的, 冠词“一个 (种) (a/an)”和“所述 (the)”是指冠词的

语法宾语中的一个(种)或多于一个(种)(即,至少一个(种))。举例来说,“一种抗体”意指一种抗体或多于一种抗体。

[0006] 本公开提供了对SIRP α 和肿瘤相关抗原具有特异性的新型多特异性分子、其氨基酸序列和核苷酸序列及其用途。

[0007] 一方面,本公开提供了一种多特异性分子,所述多特异性分子包括:

[0008] (a) SIRP α 结合结构域;

[0009] (b) 激活受体结合结构域;以及

[0010] (c) 靶抗原结合结构域,所述靶抗原结合结构域与在共表达靶抗原和CD47的靶细胞上表达的所述靶抗原结合,

[0011] 其中在存在所述靶抗原的情况下,所述多特异性分子选择性地诱导免疫效应子细胞的效应子功能,并且其中所述免疫效应子细胞共表达SIRP α 和所述激活受体。

[0012] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括本文所提供的SIRP α 结合结构域、包括Fc结构域的本文所提供的激活受体结合结构域和本文所提供的靶抗原结合结构域。

[0013] 在这些实施方式中的某些实施方式中,所述靶结合结构域是密封蛋白18.2结合结构域或PD-L1结合结构域。

[0014] 在某些实施方式中,所述共表达所述靶抗原和所述CD47的靶细胞是通过所述免疫效应子细胞的所述效应子功能被消除的癌细胞、受感染细胞或所关注疾病细胞。

[0015] 在某些实施方式中,在不存在所述靶抗原的情况下,所述多特异性分子诱导所述免疫效应子细胞的最小效应子功能。

[0016] 在某些实施方式中,在不存在所述靶抗原的情况下由所述多特异性分子诱导的所述效应子功能不超过在存在所述靶抗原的情况下由所述多特异性分子诱导的所述效应子功能的10%。

[0017] 在某些实施方式中,所述免疫效应子细胞是髓样细胞,任选地所述免疫效应子细胞是巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、吞噬细胞或嗜碱性粒细胞,任选地所述免疫效应子细胞是巨噬细胞。

[0018] 在某些实施方式中,所述效应子功能包括由所述免疫效应子细胞对共表达所述抗原和所述CD47的所述细胞的吞噬作用。

[0019] 在某些实施方式中,所述激活受体是可片段结晶的 γ 受体(Fc γ R)、TREM2、凝集素、清道夫受体A1(SRA1)、MARCO、CD36、CD163、CD68、CD205、CD206、Fc γ DR1、CD207、CD209、RAGE、CD14、CD64、F4/80、CD64、CD32a、CD16a、CD89、CD19、CD28、CSFR、PDGFR、MSR1、SCARA3、COLEC12、SCARA5、SCARB1、SCARB2、dectin 1、RAGE(SR-E1)、LRP1、LRP2、ASGP、SR-PSOX、CXCL16、OLR1、SCARF1、SCARF2、CXCL16、STAB1、STAB2、SRCRB4D、SSC5D、CCR2、CX3CR1、CSF1R、Tie2、HuCRIg(L)和CD169受体或补体受体(如CR1和CR3)、PI3K、Fc γ R1、Fc γ R2A、Fc γ R2B2、Fc γ R2C、Fc γ R3A、BAH、Tyro3、Ax1、Traf6、Syk、MyD88、Zap70、Fc ϵ R1、Fc α R1、BAFF-R、DAP12、NFAM1、MRC1、ItgB5、MERTK、ELMO和CD79b;任选地,所述激活受体是Fc γ R。

[0020] 在某些实施方式中,所述激活受体结合结构域包括Fc结构域,任选地所述Fc结构域源自IgG1或IgG4。

[0021] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域能够基本上阻断SIRP α 与CD47之间的相

互作用。

[0022] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域能够完全阻断SIRP α 与CD47之间的相互作用。

[0023] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域能够基本上阻断由SIRP α 与CD47之间的相互作用介导的SHP-1募集。

[0024] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域能够完全阻断由SIRP α 与CD47之间的相互作用介导的SHP-1募集。

[0025] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域具有最小的诱导所述免疫效应子细胞的所述效应子功能的固有活性。

[0026] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域和所述激活受体结合结构域紧密邻近,以允许所述多特异性分子与在同一免疫效应子细胞上共表达的SIRP α 和所述激活受体两者结合。

[0027] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域和/或所述靶抗原结合结构域包括抗体结构域或抗体模拟结构域;任选地所述抗体模拟结构域包括纤连蛋白结构域、蛋白A的Z结构域(亲和体)、 γ -B结晶结构域、泛素结构域、胱抑素结构域、Sac7d结构域、三螺旋卷曲螺旋结构域、脂质运载蛋白结构域、膜受体的A结构域、锚蛋白重复基序、Fyn的SH3结构域、蛋白酶抑制剂的库尼兹结构域(Kunitz domain)、纤连蛋白的III型结构域(微型抗体)、碳水化合物结合模块32-2。

[0028] 在某些实施方式中,所述抗体结构域包括Fab、VHH、单链Fv(scFv)、双功能抗体、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv片段、二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双功能抗体(ds双功能抗体)、F(ab)₂、scFv二聚体(二价双功能抗体)、骆驼化单结构域抗体、纳米抗体、四功能抗体、结构域抗体或二价结构域抗体。

[0029] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括多特异性抗体,所述多特异性抗体包括靶抗原结合抗体结构域、SIRP α 结合抗体结构域和Fc结构域。

[0030] 在某些实施方式中,所述靶抗原结合抗体结构域与所述Fc结构域的N末端连接。

[0031] 在某些实施方式中,所述靶抗原结合抗体结构域包括Fab结构域,任选地所述Fab结构域包括与所述Fc结构域的所述N末端之一连接的重链。

[0032] 在某些实施方式中,所述多特异性分子包括两个靶抗原结合抗体结构域,所述两个靶抗原结合抗体结构域中的每个靶抗原结合抗体结构域包括Fab结构域,任选地所述Fab结构域中的每个Fab结构域分别包括与所述Fc结构域的每个N末端连接的重链。

[0033] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域与所述Fc结构域或所述靶抗原结合抗体结构域连接。

[0034] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域与所述Fc结构域的C末端连接。

[0035] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域与所述Fc结构域的N末端连接,条件是所述SIRP α 结合结构域和所述靶抗原结合抗体结构域不与所述Fc结构域的同N末端连接。

[0036] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域与靶抗原结合Fab结构域的轻链的C末端连接。

[0037] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合抗体结构域与所述Fc结构域的N末端连接。

[0038] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合抗体结构域包括Fab结构域,任选地所述Fab结

构域包括与所述Fc结构域的所述N末端之一连接的重链。

[0039] 在某些实施方式中,所述抗体包括两个SIRP α 结合抗体结构域,所述两个SIRP α 结合抗体结构域中的每个SIRP α 结合抗体结构域包括Fab结构域,任选地所述Fab结构域中的每个Fab结构域分别包括与所述Fc结构域的每个N末端连接的重链。

[0040] 在某些实施方式中,所述靶抗原结合结构域与所述Fc结构域或所述SIRP α 结合抗体结构域连接。

[0041] 在某些实施方式中,所述靶抗原结合结构域与所述Fc结构域的所述N末端连接,条件是所述靶抗原结合结构域和所述SIRP α 结合结构域不与所述Fc结构域的同N末端连接。

[0042] 在某些实施方式中,所述靶抗原结合结构域与SIRP α 结合Fab结构域的轻链的C末端连接。

[0043] 在某些实施方式中,所述靶抗原包括肿瘤表面抗原。

[0044] 在某些实施方式中,所述肿瘤表面抗原是PD-L1、密封蛋白18.2、BCMA、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD30、CD33、CD38、CD44、CD52、CD56、CD70、CD96、CD97、CD99、CD123、EGFR、HER2、HER3、CD117、C-Met、EGFR、EGFRvIII、ERBB3、ERBB4、VEGFR1、VEGFR2、ROR1、PTHR2、B7-H1 (PD-L1)、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6、B7-H7、Trop-2、GPC-3、EPCAM、DLL-3、粘连蛋白-4、密封蛋白6、Muc-1、PSMA、GD3、FAP、CEA或EphA2。

[0045] 本文所提供的多特异性分子可以呈任何合适的形式。提供如下说明性实施例。在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括靶抗原结合抗体,所述靶抗原结合抗体包括两条重链和两条轻链,其中所述轻链中的每条轻链的C末端与抗SIRP α scFv (即,SIRP α 结合结构域)融合。所述靶抗原结合抗体包括所述靶抗原结合结构域和Fc结构域。图2A示出了说明性实施例。

[0046] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括靶抗原结合抗体,所述靶抗原结合抗体包括两条重链和两条轻链,其中所述重链中的每条重链的C末端与抗SIRP α scFv (即,SIRP α 结合结构域)融合。所述靶抗原结合抗体包括所述靶抗原结合结构域和Fc结构域。图2B示出了说明性实施例。

[0047] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括抗SIRP α 抗体,所述抗SIRP α 抗体包括两条重链和两条轻链,其中所述轻链中的每条轻链的C末端与能够与靶抗原 (即,靶抗原结合结构域) 结合的scFv融合。所述抗SIRP α 抗体包括所述SIRP α 结合结构域和Fc结构域。图2C示出了说明性实施例。

[0048] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括抗SIRP α 抗体,所述抗SIRP α 抗体包括两条重链和两条轻链,其中所述重链中的每条重链的C末端与能够与靶抗原 (即,靶抗原结合结构域) 结合的scFv融合。所述抗SIRP α 抗体包括所述SIRP α 结合结构域和Fc结构域。图2D示出了说明性实施例。

[0049] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括抗SIRP α 抗体,所述抗SIRP α 抗体包括两条重链和两条轻链,其中所述轻链中的每条轻链的C末端与能够与靶抗原 (即,靶抗原结合结构域) 结合的单结构域抗体 (sdAb) 融合。所述抗SIRP α 抗体包括所述SIRP α 结合结构域和Fc结构域。图6A示出了说明性实施例。

[0050] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括抗SIRP α 抗体,所述抗SIRP α 抗体包括两条重链和两条轻链,其中所述重链中的每条重链的C末端与能够与靶抗原 (即,

靶抗原结合结构域)结合的单结构域抗体(sdAb)融合。所述抗SIRP α 抗体包括所述SIRP α 结合结构域和Fc结构域。图6B示出了说明性实施例。

[0051] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括抗SIRP α 抗体,所述抗SIRP α 抗体包括两条重链和两条轻链,其中所述重链中的每条重链的N末端与能够与靶抗原(即,靶抗原结合结构域)结合的单结构域抗体(sdAb)融合。所述抗SIRP α 抗体包括所述SIRP α 结合结构域和Fc结构域。图6C示出了说明性实施例。

[0052] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括抗SIRP α 抗体,所述抗SIRP α 抗体包括两条重链和两条轻链,其中所述轻链中的每条轻链的N末端与能够与靶抗原(即,靶抗原结合结构域)结合的单结构域抗体(sdAb)融合。所述抗SIRP α 抗体包括所述SIRP α 结合结构域和Fc结构域。图6D示出了说明性实施例。

[0053] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括能够分别与靶抗原结合的抗SIRP α 结合结构域(例如,Fab)和单结构域抗体(sdAb),所述抗SIRP α 结合结构域和单结构域抗体各自与所述Fc结构域的多肽链的N末端融合。图6E示出了说明性实施例。

[0054] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括两条重链,所述两条重链各自包括与所述Fc结构域的多肽链的N末端融合的能够与靶抗原结合的单结构域抗体(sdAb),并且进一步包括与所述Fc结构域的所述多肽链之一的C末端融合的至少一个抗SIRP α 结合结构域。在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括与所述Fc结构域的所述多肽链之一的C末端融合的一个抗SIRP α 结合结构域。图6F示出了说明性实施例。

[0055] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括两个抗SIRP α 结合结构域,所述两个抗SIRP α 结合结构域各自与所述Fc结构域的所述多肽链之一的C末端融合。图6G示出了说明性实施例。

[0056] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域包括:

[0057] a) 包含X₁YYMH (SEQ ID NO:161)的序列的HCDR1、包含RIDPEDX₂EX₃KYAPKFQG (SEQ ID NO:162)的序列的HCDR2和包含GX₁₅X₄X₅Y (SEQ ID NO:163)的序列的HCDR3;和/或包含SASSSVSSSYLY (SEQ ID NO:26)的序列的LCDR1、包含STSNLAS (SEQ ID NO:27)的序列的LCDR2和包含X₆QWSSYPYT (SEQ ID NO:164)的序列的LCDR3;或

[0058] b) 包含TYGMS (SEQ ID NO:35)的序列的HCDR1、包含WINTYSGVX₇TX₈ADDFKG (SEQ ID NO:165)的序列的HCDR2和包含DPHX₉YGX₁₀SPAWFX₁₁Y (SEQ ID NO:166)的序列的HCDR3;和/或包含X₁₂ASQX₁₃VGIX₁₄VA (SEQ ID NO:188)的序列的LCDR1、包含SASNRYT (SEQ ID NO:39)的序列的LCDR2和包含QQYSX₁₆YPX₁₇T (SEQ ID NO:189)的序列的LCDR3;或

[0059] c) 包含EYVLS (SEQ ID NO:41)的序列的HCDR1、包含EIYPGTITTTYNEKFKG (SEQ ID NO:42)的序列的HCDR2和包含FYDYDGGWFAY (SEQ ID NO:43)的序列的HCDR3;和/或包含SASSSVSSSDLH (SEQ ID NO:44)的序列的LCDR1、包含GTSNLAS (SEQ ID NO:45)的序列的LCDR2和包含QQWSGYPWT (SEQ ID NO:46)的序列的LCDR3,其中

[0060] X₁是A或D;X₂是G或A;X₃是T或S;X₄是L或Y;X₅是E或A;X₆是Y或H;X₇是S或P;X₈是Y或C;X₉是Y或S;X₁₀是N或S;X₁₁是P或V;X₁₂是E或K;X₁₃是N或I;X₁₄是S或A;X₁₅是S或不存在;X₁₆是S或A;X₁₇是F或L。

[0061] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域包括:

[0062] a) 包含SEQ ID NO:23的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:198的序列

的HCDR2和包含SEQ ID NO:25的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:26的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:27的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:28的序列的LCDR3;或

[0063] b) 包含SEQ ID NO:29的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:30的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:31的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:32的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:33的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:34的序列的LCDR3;或

[0064] c) 包含SEQ ID NO:35的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:36的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:37的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:38的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:39的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:40的序列的LCDR3;或

[0065] d) 包含SEQ ID NO:47的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:48的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:49的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:50的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:51的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:52的序列的LCDR3。

[0066] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域包括与选自以下组成的组的抗SIRP α 抗体相同的HCDR和LCDR:C25、C15、C42、C59和C73,其中:

[0067] a) 所述C25包括包含SEQ ID NO:1的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:2的序列的轻链可变区,

[0068] b) 所述C15包括包含SEQ ID NO:11的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:12的序列的轻链可变区,

[0069] c) 所述C42包括包含SEQ ID NO:13的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:14的序列的轻链可变区,

[0070] d) 所述C59包括包含SEQ ID NO:15的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:16的序列的轻链可变区,并且

[0071] e) 所述C73包括包含SEQ ID NO:17的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:18的序列的轻链可变区。

[0072] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一者或多者和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一者或多者,其中:

[0073] a) 所述HFR1包括EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKX₂₀SGFNLIK (SEQ ID NO:190) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0074] b) 所述HFR2包括WVQQAPGKGLEWIG (SEQ ID NO:191) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0075] c) 所述HFR3包括RVTITADTSTX₂₁TAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (SEQ ID NO:192) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0076] d) 所述HFR4包括WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:193) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0077] e) 所述LFR1包括EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:194) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0078] f) 所述LFR2包括WYQQKPGQAPKLWIY (SEQ ID NO:195) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0079] g) 所述LFR3包括GIPARFSGSGSGTDX₂₂TLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:196) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0080] h) 所述LFR4包括FGQGTKLEIK(SEQ ID NO:197) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0081] 其中 X_{20} 是A或V; X_{21} 是N或D; X_{22} 是Y或F。

[0082] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域包括:

[0083] f) 包含SEQ ID NO:1的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:2的序列的轻链可变区;或

[0084] g) 包含SEQ ID NO:3的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:4的序列的轻链可变区;或

[0085] h) 包含SEQ ID NO:5的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:6的序列的轻链可变区;或

[0086] i) 包含SEQ ID NO:7的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:8的序列的轻链可变区;或

[0087] j) 包含SEQ ID NO:9的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:10的序列的轻链可变区;或

[0088] k) 包含SEQ ID NO:11的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:12的序列的轻链可变区;或

[0089] l) 包含SEQ ID NO:13的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:14的序列的轻链可变区;或

[0090] m) 包含SEQ ID NO:15的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:16的序列的轻链可变区;或

[0091] n) 包含SEQ ID NO:17的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:18的序列的轻链可变区;或

[0092] o) 包含SEQ ID NO:159的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:160的序列的轻链可变区。

[0093] 在某些实施方式中,所述靶抗原结合结构域包括密封蛋白18.2结合结构域。

[0094] 在某些实施方式中,所述密封蛋白18.2结合结构域包括:

[0095] p) 包含SEQ ID NO:77的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:78的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:79的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:80的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:81的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:225的序列的LCDR3;或

[0096] q) 包含SEQ ID NO:83的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:84的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:85的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:86的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:87的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:88的序列的LCDR3;或

[0097] r) 包含SEQ ID NO:89的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:90的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:91的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:92的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:93的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:94的序列的LCDR3;或

[0098] s) 包含SEQ ID NO:95的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:96的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:97的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:98的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:99的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:100的序列的LCDR3;或

[0099] t) 包含SEQ ID NO:101的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:102的序列的HCDR2和包含

SEQ ID NO:103的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:104的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:105的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:106的序列的LCDR3。

[0100] 在某些实施方式中,所述密封蛋白18.2结合结构域包括与选自以下组成的组的抗密封蛋白18.2抗体相同的HCDR和LCDR:hu26.H1L1、hu26.H1L2 (S92A)、hu28.H1L2、C10、C29和C30,

[0101] u) 其中所述hu26.H1L1包括包含SEQ ID NO:65的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:66的序列的轻链可变区,

[0102] v) 其中所述hu26.H1L2 (S92A) 包括包含SEQ ID NO:65的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:224的序列的轻链可变区,

[0103] w) 所述hu28.H1L2包括包含SEQ ID NO:69的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:70的序列的轻链可变区,

[0104] x) 所述C10包括包含SEQ ID NO:71的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:72的序列的轻链可变区,

[0105] y) 所述C29包括包含SEQ ID NO:73的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:74的序列的轻链可变区,并且

[0106] z) 所述C30包括包含SEQ ID NO:75的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:76的序列的轻链可变区。

[0107] 在某些实施方式中,所述密封蛋白18.2结合结构域进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一者或多者和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一者或多者,其中:

[0108] a) 所述HFR1包括选自EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (SEQ ID NO:167) 和QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT (SEQ ID NO:168) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0109] b) 所述HFR2包括选自WVRQAPGKGLEWVX₁₈ (SEQ ID NO:169) 和WVRQAPGQGLEWMG (SEQ ID NO:170) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0110] c) 所述HFR3包括选自RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAX₂₃ (SEQ ID NO:171) 和RVTMTTDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR (SEQ ID NO:172) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0111] d) 所述HFR4包括WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:173) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0112] e) 所述LFR1包括选自DIQLTQSPSFLSASVGDRVITC (SEQ ID NO:174) 和DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:175) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0113] f) 所述LFR2包括选自WYQQKPGX₂₆X₂₇PKX₁₉LIY (SEQ ID NO:176) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0114] g) 所述LFR3包括选自GVPSRFSGSGSGTEX₂₄TLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:178) 和GVPDFRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYHC (SEQ ID NO:179) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,并且

[0115] h) 所述LFR4包括FGX₂₅GTKLEIK (SEQ ID NO:180) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

- [0116] 其中 X_{18} 是S或A, X_{19} 是L或A, X_{23} 是T或K, X_{24} 是Y或F, X_{25} 是Q或G, X_{26} 是Q或K, X_{27} 是P或A。
- [0117] 在某些实施方式中,所述密封蛋白18.2结合结构域包括:
- [0118] aa) 包含SEQ ID NO:65或68的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:66或67或224的序列的轻链可变区;或
- [0119] bb) 包含SEQ ID NO:69的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:70的序列的轻链可变区;或
- [0120] cc) 包含SEQ ID NO:71的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:72的序列的轻链可变区;或
- [0121] dd) 包含SEQ ID NO:73的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:74的序列的轻链可变区;或
- [0122] ee) 包含SEQ ID NO:75的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:76的序列的轻链可变区。
- [0123] 在某些实施方式中,所述靶抗原结合结构域包括PD-L1结合结构域。
- [0124] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括:
- [0125] ff) 包含SEQ ID NO:119的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:120的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:121的序列的HCDR3;或
- [0126] gg) 包含SEQ ID NO:122的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:123的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:124的序列的HCDR3;或
- [0127] hh) 包含SEQ ID NO:125的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:126的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:127的序列的HCDR3;或
- [0128] ii) 包含SEQ ID NO:128的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:129的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:130的序列的HCDR3;或
- [0129] jj) 包含SEQ ID NO:131的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:132的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:133的序列的HCDR3;或
- [0130] kk) 包含SEQ ID NO:134的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:135的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:136的序列的HCDR3;或
- [0131] ll) 包含SEQ ID NO:137的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:138的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:139的序列的HCDR3;或
- [0132] mm) 包含SEQ ID NO:140的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:141的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:142的序列的HCDR3;或
- [0133] nn) 包含SEQ ID NO:143的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:144的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:145的序列的HCDR3;或
- [0134] oo) 包含SEQ ID NO:146的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:147的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:148的序列的HCDR3;或
- [0135] pp) 包含SEQ ID NO:149的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:150的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:151的序列的HCDR3;或
- [0136] 包含SEQ ID NO:152的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:153的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:154的序列的HCDR3。
- [0137] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括与选自以下组成的组的抗PD-L1

抗体相同的HCDR:C71、C71v38、C239、C492、C570、570h3、C446、C2811、C1778、C1793、C2855、C2713和C2719,

[0138] qq) 其中所述C71包括包含SEQ ID NO:107的序列的重链可变区,

[0139] rr) 所述C71v38包括包含SEQ ID NO:108的序列的重链可变区,

[0140] ss) 所述C239包括包含SEQ ID NO:109的序列的重链可变区,

[0141] tt) 所述C492包括包含SEQ ID NO:110的序列的重链可变区,

[0142] uu) 所述C570包括包含SEQ ID NO:111的序列的重链可变区,

[0143] vv) 所述570h3包括包含SEQ ID NO:223的序列的重链可变区,

[0144] ww) 所述C446包括包含SEQ ID NO:112的序列的重链可变区,

[0145] xx) 所述C2811包括包含SEQ ID NO:113的序列的重链可变区,

[0146] yy) 所述C1778包括包含SEQ ID NO:114的序列的重链可变区,

[0147] zz) 所述C1793包括包含SEQ ID NO:115的序列的重链可变区,

[0148] aaa) 所述C2855包括包含SEQ ID NO:116的序列的重链可变区,

[0149] bbb) 所述C2713包括包含SEQ ID NO:117的序列的重链可变区,并且

[0150] ccc) 所述C2719包括包含SEQ ID NO:118的序列的重链可变区。

[0151] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括:包含选自由SEQ ID NO:107-118和223组成的组的序列的重链可变区。

[0152] 在某些实施方式中,

[0153] ddd) 所述SIRP α 结合结构域进一步包括仍保留对人SIRP α 的特异性结合的一个或多个氨基酸残基取代或修饰;和/或

[0154] eee) 所述密封蛋白18.2结合结构域进一步包括仍保留对密封蛋白18.2的特异性结合的一个或多个氨基酸残基取代或修饰,和/或

[0155] fff) 所述PD-L1结合结构域进一步包括仍保留对PD-L1的特异性结合的一个或多个氨基酸残基取代或修饰。

[0156] 在某些实施方式中,所述取代或修饰中的至少一个取代或修饰位于所述重链可变区或所述轻链可变区的CDR序列中的一个或多个CDR序列中和/或非CDR序列中的一个或多个非CDR序列中。

[0157] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子是人源化的。

[0158] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子与一个或多个缀合物部分连接。

[0159] 在某些实施方式中,所述缀合物部分包括清除改性剂、化学治疗剂、毒素、放射性同位素、镧系元素、发光标记、荧光标记、酶底物标记、DNA烷基化剂、拓扑异构酶抑制剂、微管蛋白结合剂、纯化部分或其它抗癌药物。

[0160] 另一方面,本公开提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含本文所提供的多特异性分子和一种或多种药学上可接受的载体。

[0161] 另一方面,本公开提供了一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸编码本文所提供的多特异性分子。

[0162] 另一方面,本公开提供了一种载体,所述载体包括本文所提供的分离的多核苷酸。

[0163] 另一方面,本公开提供了一种宿主细胞,所述宿主细胞包括本文所提供的载体。

[0164] 另一方面,本公开提供了一种试剂盒,所述试剂盒包括本文所提供的多特异性分

子和/或本文所提供的药物组合物以及第二治疗剂。

[0165] 另一方面,本公开提供了一种表达本文所提供的多特异性分子的方法,所述方法包括在表达本文所提供的载体的条件下培养本文所提供的宿主细胞。

[0166] 另一方面,本公开提供了一种治疗受试者的可能受益于诱导的靶细胞的吞噬作用的疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所提供的多特异性分子。

[0167] 另一方面,本公开提供了一种治疗受试者的靶抗原相关疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所提供的多特异性分子。

[0168] 另一方面,本公开提供了一种治疗受试者的SIRP α 相关疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所提供的多特异性分子。

[0169] 另一方面,本公开提供了一种治疗受试者的CD47相关疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所提供的多特异性分子。

[0170] 在某些实施方式中,所述受试者是人。

[0171] 在某些实施方式中,所述受试者已经诊断患有选自以下组成的组的疾病、病症或病状或有风险患有所述疾病、所述病症或所述病状:免疫相关疾病或病症、肿瘤和癌症、自身免疫性疾病和传染病。

[0172] 在某些实施方式中,所述免疫相关疾病或病症选自以下组成的组:全身性红斑狼疮、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、血管炎、重症肌无力、特发性肺纤维化、克罗恩氏病(Crohn's Disease)、哮喘、类风湿性关节炎、移植物抗宿主疾病、脊柱关节病(例如,强直性脊柱炎、银屑病性关节炎、与炎性肠病相关的孤立性急性肠病性关节炎、反应性关节炎、白塞氏综合征(Behcet's syndrome)、未分化型脊柱关节病、前葡萄膜炎和幼年特发性关节炎)、多发性硬化症、子宫内膜异位、肾小球肾炎、败血症、糖尿病、急性冠状动脉综合征、缺血再灌注、银屑病、进行性全身性硬化症、动脉粥样硬化、舍格伦综合征(Sjogren's syndrome)、硬皮病或炎性自身免疫性肌炎。

[0173] 在某些实施方式,所述肿瘤和癌症是实体瘤或恶性血液肿瘤,任性地选自以下组成的组:非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈样肉芽肿病、默克尔细胞癌和其它恶性血液肿瘤,如经典型霍奇金淋巴瘤(classical Hodgkin lymphoma, CHL)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的B细胞淋巴瘤、EBV阳性和阴性PTLD和EBV相关弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、浆母细胞性淋巴瘤、结外NK/T细胞淋巴瘤、鼻咽癌和HHV8相关原发性渗出性淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、中枢神经系统(CNS)赘生物,如原发性CNS淋巴瘤、脊髓轴肿瘤、脑干胶质细胞瘤、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、基底细胞癌、胆囊癌、胃癌、肺癌、支气管癌、骨癌、肝和胆管癌、胰腺癌、乳腺癌、肝癌、卵巢癌、睾丸癌、肾癌、肾盂和输尿管癌、唾液腺癌、小肠癌、尿道癌、膀胱癌、头颈癌、脊柱癌、脑癌、宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、结肠癌、结直肠癌、直肠癌、食道癌、胃肠癌、皮肤癌、前列腺癌、垂体癌、阴道癌、甲状腺癌、喉癌、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、骨髓增生异常综合征、肉瘤、畸胎瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)、多发性骨髓

瘤、T或B细胞淋巴瘤、GI器官间质瘤、软组织肿瘤、肝细胞癌和腺癌或其转移。

[0174] 在某些实施方式中,所述施用是经口服、经鼻、静脉内、皮下、舌下或肌内施用。

[0175] 在某些实施方式中,本文所提供的方法进一步包括施用治疗有效量的第二治疗剂。

[0176] 在某些实施方式中,所述第二治疗剂选自由以下组成的组:化学治疗剂、抗癌药物、放疗剂、免疫疗法剂、抗血管生成剂、靶向疗法剂、细胞疗法剂、基因疗法剂、激素疗法剂、抗病毒剂、抗生素、镇痛药、抗氧化剂、金属螯合剂和细胞因子。

[0177] 另一方面,本公开提供了一种本文所提供的多特异性分子和/或本文所提供的药物组合物在制备用于治疗、预防或缓解受试者的可能受益于诱导的靶细胞的吞噬作用的疾病、病症或病状的药物中的用途。

[0178] 另一方面,本公开提供了一种诱导受试者体内靶细胞的吞噬作用的方法,所述方法包括以有效诱导所述靶细胞的吞噬作用的剂量向所述受试者施用本文所提供的多特异性分子和/或本文所提供的药物组合物。

[0179] 在某些实施方式中,所述受试者是人。

[0180] 在某些实施方式中,所述受试者已经诊断患有选自由以下组成的组的疾病、病症或病状或有风险患有所述疾病、所述病症或所述病状:免疫相关疾病或病症、肿瘤和癌症、自身免疫性疾病和传染病。

[0181] 另一方面,本公开提供了一种体外诱导靶细胞的吞噬作用的方法,所述方法包括在存在本文所提供的多特异性分子和/或本文所提供的药物组合物的情况下,使所述靶细胞与SIRP α 阳性吞噬细胞样品接触,由此通过所述SIRP α 阳性吞噬细胞诱导所述靶细胞的所述吞噬作用。

[0182] 在某些实施方式中,所述靶细胞是表达所述靶抗原的细胞。

[0183] 另一方面,本公开提供了一种诱导通过吞噬作用消除共表达靶抗原和CD47的靶细胞的方法,所述方法包括在存在吞噬免疫细胞的情况下,使所述靶细胞与本文所提供的多特异性分子接触。

[0184] 另一方面,本公开提供了一种诱导受试者的相对于不表达靶抗原的细胞选择性针对共表达所述靶抗原和CD47的靶细胞的吞噬作用的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所提供的多特异性分子。

[0185] 另一方面,本公开提供了一种增加有需要的受试者的肿瘤微环境中的M1巨噬细胞的水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所提供的多特异性分子。

附图说明

[0186] 图1示出了增强对表达肿瘤相关抗原(TAA)的癌细胞的巨噬细胞吞噬活性的双特异性巨噬细胞衔接子(BiME)抗体的示意图。

[0187] 图2A示出了包括靶向密封蛋白18.2的抗体的抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性分子(ES028-001)的示意图,所述抗体在轻链(LC)的C末端处与两个抗SIRP α scFv融合。

[0188] 图2B示出了包括靶向密封蛋白18.2的抗体的抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性分子(ES028-005)的示意图,所述抗体在重链(HC)的C末端处与两个抗SIRP α scFv融合。

[0189] 图2C示出了包括靶向SIRP α 的抗体的抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性分子(ES028-009)的示意图,所述抗体在轻链(LC)的C末端处与两个抗密封蛋白18.2scFv融合。

[0190] 图2D示出了包括靶向SIRP α 的抗体的抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性分子(ES028-013)的示意图,所述抗体在重链(HC)的C末端处与两个抗密封蛋白18.2scFv融合。

[0191] 图3A示出了通过FACS检测可得,代表性双特异性抗体可以与Raji/hClaudin18.2细胞结合。抗密封蛋白18.2抗体用作对照。

[0192] 图3B示出了通过FACS检测可得,代表性双特异性抗体可以与CHO-K1/SIRP α 细胞结合。抗SIRP α 抗体用作对照。

[0193] 图4A示出了抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体比单一或组合处理更好地刺激小鼠BMDM对MC38/hCD47/hClaudin18.2细胞的吞噬作用。抗CD47抗体用作对照。

[0194] 图4B示出了抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体不刺激小鼠BMDM对不表达密封蛋白18.2的MC38/hCD47细胞的吞噬作用。抗CD47抗体用作对照。

[0195] 图5示出了抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体同种型对小鼠BMDM对MC38/hCD47/hClaudin18.2细胞的吞噬作用的比较。抗CD47抗体用作对照。

[0196] 图6A是包括靶向SIRP α 的一种抗体的抗PDL1/SIRP α 双特异性分子(ES019-020)的示意图,所述抗体在轻链(LC)的C末端处与两个抗PDL1 sdAb融合。

[0197] 图6B是包括靶向SIRP α 的一种抗体的抗PDL1/SIRP α 双特异性分子(ES019-024)的示意图,所述抗体在重链(HC)的C末端处与两个抗PDL1 sdAb融合。

[0198] 图6C是包括靶向SIRP α 的一种抗体的抗PDL1/SIRP α 双特异性分子(ES019-025)的示意图,所述抗体在重链(HC)的N末端处与两个抗PDL1 sdAb融合。

[0199] 图6D是包括靶向SIRP α 的一种抗体的抗PDL1/SIRP α 双特异性分子(ES019-026)的示意图,所述抗体在轻链(LC)的N末端处与两个抗PDL1 sdAb融合。

[0200] 图6E是包括一种不对称抗体的抗PDL1/SIRP α 双特异性分子(ES019-029)的示意图,所述不对称抗体具有靶向SIRP α 的一个Fab臂以及含有两个抗PDL1 sdAb的另一个臂;异质二聚体通过Fc区中的杵臼(knob-in hole)突变连接。

[0201] 图6F是包括一种不对称抗体的抗PDL1/SIRP α 双特异性分子(ES019-072)的示意图,其中两个抗PDL1 sdAb与Fc的N末端融合并且一个抗SIRP α Fab与Fc的C末端融合;异质二聚体通过Fc区中的杵臼突变连接。

[0202] 图6G是包括一种不对称抗体的抗PDL1/SIRP α 双特异性分子(ES019-073或ES019-079)的示意图,其中两个抗PDL1 sdAb与Fc的N末端融合并且两个抗SIRP α Fab与Fc的C末端融合。

[0203] 图7A示出了通过FACS检测可得,代表性双特异性抗体ES019-020、ES019-024、ES019-025和ES019-026可以与Raji/hPDL1细胞结合。抗PDL1抗体用作对照。

[0204] 图7B示出了通过FACS检测可得,代表性双特异性抗体ES019-020、ES019-024、ES019-025和ES019-026可以与CHO-K1/SIRP α 细胞结合。抗SIRP α 抗体用作对照。

[0205] 图8示出了通过Jurat/PD1报告细胞测定可得,代表性双特异性抗体ES019-020、ES019-024、ES019-025和ES019-026可以激活Jurkat T细胞。抗PDL1抗体用作对照。

[0206] 图9A示出了抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体ES019-020、ES019-024、ES019-025、ES019-026和ES019-029比单一或类似于组合处理更好地刺激人单核细胞源性巨噬细胞对

K562/hPDL1细胞的吞噬作用。抗CD47抗体用作对照。

[0207] 图9B示出了与单一或组合处理类似,抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体不刺激人单核细胞源性巨噬细胞对K562细胞(PDL1阴性)的吞噬作用。抗CD47抗体用作对照。

[0208] 图9C示出了与单一或组合处理类似,抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体不刺激人单核细胞源性巨噬细胞对Jurkat细胞(SIRP γ 阳性)的吞噬作用。抗CD47抗体用作对照。

[0209] 图10示出了ES028 BiME (例如,ES028-001、ES028-005和ES028-009) 在MC38/hClaudin18.2/hSIRP α 同系模型中的体内抗肿瘤功效。

[0210] 图11A示出了基于不同SIRP α 抗体的组合或SIRP α 双特异性抗体诱导对Raji/hPDL1细胞的吞噬作用。

[0211] 图11B示出了基于不同SIRP α 抗体的组合或PDL1/SIRP α 双特异性抗体诱导对Raji (PDL1阴性) 细胞的吞噬作用。

[0212] 图12示出了嵌合抗体C15、C25、C42、C59、C73和hu1H9G4对CHOK1-hSIRP α v1和CHOK1-hSIRP α v2的结合亲和力。

[0213] 图13示出了嵌合抗体C15、C25、C42、C59、C73和hu1H9G4对人CD47/SIRP α v1相互作用和人CD47/SIRP α v2相互作用的IC₅₀值和阻断百分比。

[0214] 图14示出了嵌合抗体C15、C25、C42、C59、C73和hu1H9G4对SHP-1募集的IC₅₀值和阻断百分比。

[0215] 图15示出了人源化抗体hu025.021、hu025.023、hu025.033、hu025.059和hu025.060以及C25对CHOK1-hSIRP α v1和CHOK1-hSIRP α v2的结合亲和力。

[0216] 图16示出了人源化抗体hu025.021、hu025.023、hu025.033、hu025.059和hu025.060以及C25对人SIRP α v1和人SIRP α v2的结合动力学。

[0217] 图17示出了人源化抗体hu025.021、hu025.023、hu025.033、hu025.059和hu025.060以及C25对人CD47/SIRP α v1相互作用和人CD47/SIRP α v2相互作用的IC₅₀值和阻断百分比,如通过竞争性ELISA测定所测量的。

[0218] 图18示出了人源化抗体hu025.023、hu025.060和C25对人CD47/SIRP α v1相互作用和人CD47/SIRP α v2相互作用的IC₅₀值和阻断百分比,如通过竞争性FACS测定所测量的。

[0219] 图19示出了人源化抗体hu025.021、hu025.023、hu025.033、hu025.059和hu025.060以及C25对SHP-1募集的IC₅₀值和阻断百分比。

[0220] 图20A示出了在抗SIRP α 抗体025c、015c、042c、059c或073c单独存在或与利妥昔单抗组合存在的情况下,表达hSIRP α v1/v2的人巨噬细胞对Raji细胞的吞噬指数。

[0221] 图20B示出了在抗SIRP α 抗体025c或042c单独存在或与不同浓度的抗PD-L1抗体组合存在的情况下,表达hSIRP α v1/v1的人巨噬细胞对Raji细胞的吞噬指数。

[0222] 图20C示出了在抗SIRP α 抗体025c、042c或073c单独存在或与不同浓度的抗PD-L1抗体组合存在的情况下,表达hSIRP α v2/v2的人巨噬细胞对Raji细胞的吞噬指数。

[0223] 图21A示出了在抗SIRP α 抗体025c、hu025.023或hu025.060单独存在或与不同浓度的抗PD-L1抗体组合存在的情况下,表达hSIRP α v1/v1的人巨噬细胞对Raji细胞的吞噬指数。

[0224] 图21B示出了在抗SIRP α 抗体025c、hu025.023或hu025.060单独存在或与不同浓度的利妥昔单抗组合存在的情况下,表达hSIRP α v1/v1的人巨噬细胞对Raji细胞的吞噬指数。

[0225] 图21C示出了在抗SIRP α 抗体025c、hu025.023或hu025.060单独存在或与不同浓度的抗PD-L1抗体组合存在的情况下,表达hSIRP α v2/v2的人巨噬细胞对Raji细胞的吞噬指数。

[0226] 图21D示出了在抗SIRP α 抗体025c、hu025.023或hu025.060单独存在或与不同浓度的利妥昔单抗组合存在的情况下,表达hSIRP α v2/v2的人巨噬细胞对Raji细胞的吞噬指数。

[0227] 图22示出了用于阻断SIRP α 和CD47相互作用的不同浓度的抗SIRP α 抗体035、050和025的阻断百分比(阻断%)。

[0228] 图23示出了抗SIRP α 抗体025c(图23A)、042c(图23B)、073c(图23C)、hu1H9G4(图23D)、HEFLB(图23E)的潜在结合表位,如通过HDX-MS所测量的。所有抗体都是具有S228P突变的人IgG4嵌合抗体。

具体实施方式

[0229] 本公开的以下描述仅旨在说明本公开的各个实施方式。如此,所讨论的具体修改不应被解释为对本公开的范围的限制。对于本领域的技术人员将显而易见的是,在不脱离本公开的范围的情况下,可以做出各种等效物、改变和修改,并且应当理解,此类等效实施方式将被包括在本文中。在本文中引用的所有文献,包括公开出版物、专利和专利申请通过引用整体并入本文。

[0230] 定义

[0231] 如本文所使用的,术语“抗体”包括与特定抗原结合的任何免疫球蛋白、单克隆抗体、多克隆抗体、多价抗体、二价抗体、单价抗体、单结构域抗体、多特异性抗体或双特异性抗体。天然的完整IgG抗体包括两条重(H)链和两条轻(L)链。哺乳动物重链分为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ,每条重链由可变区(V_H)以及第一恒定区、第二恒定区和第三恒定区(分别为 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3})组成;哺乳动物轻链分为 λ 或 κ ,而每条轻链由可变区(V_L)和恒定区组成。抗体呈“Y”型,其中Y的茎部由通过二硫键结合在一起的两条重链的第二恒定区和第三恒定区组成。Y的每个臂包括单条重链的与单个轻链的可变区和恒定区结合的可变区和第一恒定区。轻链和重链的可变区负责抗原结合。每条链的可变区通常含有三个高度可变的环,称为互补决定区(CDR)(轻链CDR包括LCDR1、LCDR2、LCDR3,重链CDR包括HCDR1、HCDR2、HCDR3)。本文所公开的抗体和抗原结合结构域的CDR边界可以通过Kabat、IMGT、AbM、Chothia或Al-Lazikani公约来定义或鉴定(Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A.M., 《分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)》, 273(4), 927(1997); Chothia, C.等人,《分子生物学杂志》12月5日; 186(3): 651-63(1985); Chothia, C.和Lesk, A.M.,《分子生物学杂志》, 196, 901(1987); N.R. Whitelegg等人,《蛋白质工程化(Protein Engineering)》, 第13(12)卷, 819-824(2000); Chothia, C.等人,《自然(Nature.)》12月21-28日; 342(6252): 877-83(1989); Kabat E.A.等人, 马里兰州贝斯赛达的国立卫生研究院(National Institutes of Health, Bethesda, Md) (1991); Marie-Paule Lefranc等人,《发育与比较免疫学(Developmental and Comparative Immunology)》, 27: 55-77(2003); Marie-Paule Lefranc等人,《免疫组研究(Immunome Research)》, 1(3), (2005); Marie-Paule Lefranc,《B细胞的分子生物学(Molecular Biology of B cells)》(第二版), 第26章, 481-514, (2015))。三个CDR插置于称为框架区(FR)的侧翼延伸段之间, 所述FR比CDR更高度保守并且形成支架以支持高变环。重链和轻链的恒定区不参与抗原结

合,但表现出各种效应子功能。基于其重链恒定区的氨基酸序列将抗体分为多个类别。抗体的五个主要类别或同种型是IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其特征分别在于存在 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 重链。若干个主要抗体类别被分为亚类,如IgG1(γ 1重链)、IgG2(γ 2重链)、IgG3(γ 3重链)、IgG4(γ 4重链)、IgA1(α 1重链)或IgA2(α 2重链)。

[0232] 如本文所使用的,术语“抗体”还可以涵盖单结构域抗体,如重链抗体等。“重链抗体”或“HCAb”是指含有两个VH结构域而不含有轻链的抗体(Riechmann L.和Muyldermans S.,《免疫学方法杂志(J Immunol Methods)》12月10日;231(1-2):25-38(1999);Muyldermans S.,《生物技术杂志(J Biotechnol.)》6月;74(4):277-302(2001);W094/04678;W094/25591;美国专利第6,005,079号)。重链抗体最初源自骆驼科(Camelidae)(骆驼、单峰骆驼和美洲驼)。虽然缺失轻链,但骆驼化抗体具有确证的抗原结合谱(Hamers-Casterman C.等人,《自然》6月3日;363(6428):446-8(1993);Nguyen VK.等人“骆驼科的重链抗体;进化创新的案例(Heavy-chain antibodies in Camelidae;a case of evolutionary innovation)”,《免疫遗传学(Immunogenetics.)》4月;54(1):39-47(2002);Nguyen VK等人,《免疫学(Immunology.)》5月;109(1):93-101(2003))。重链抗体的可变结构域(VHH结构域)表示由适应性免疫应答产生的最小已知抗原结合单位(Koch-Nolte F.等人《美国实验生物学会联合会杂志(FASEB J.)》11月;21(13):3490-8.电子版2007年6月15日(2007))。

[0233] 如本文所使用的,术语“抗原结合结构域”是指由包括一个或多个CDR的抗体的一部分形成的抗体片段或与抗原结合但不包括完整天然抗体结构的任何其它抗体片段。抗原结合结构域的实例包括但不限于双功能抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双功能抗体(ds双功能抗体)、单链抗体分子(scFv)、scFv二聚体(二价双功能抗体)、双特异性抗体、多特异性抗体、骆驼化单结构域抗体、纳米抗体、结构域抗体和二价结构域抗体。抗原结合结构域能够与亲本抗体所结合的抗原相同的抗原结合。在某些实施方式中,抗原结合结构域可以包括来自特定人抗体的一个或多个CDR,所述特定人抗体移植到来自一种或多种不同人抗体的框架区。在Spiess等人,2015(同上)和Brinkman等人,《单克隆抗体(mAbs)》,9(2),第182-212页(2017)中描述了抗原结合结构域的更多和详细形式,所述文献通过引用整体并入本文。

[0234] 如本文所使用的,术语“吞噬作用”是指质膜包膜内的微粒(>0.5Dm)的细胞摄取的过程。吞噬作用包括不同变体,如涉及凋亡细胞的摄取的胞葬作用、涉及由感染和炎症引起的坏死细胞的更新的坏死性和细胞焦亡以及涉及外源性颗粒的摄取的异噬作用。

[0235] 如本文所使用的,术语“抗原”是指可以刺激细胞培养物或动物体内的抗体或免疫细胞(例如,T细胞或髓样细胞)应答的产生的化合物、组合物、肽、多肽、蛋白质或物质,包括添加到细胞培养物(如杂交瘤)中、或注射或吸收到动物体内、或在细胞表面上表达的组合物(如包括癌症特异性蛋白质的组合物)。抗原与特定体液或细胞免疫的产物(如抗体)发生反应。

[0236] 关于抗体的“Fab”是指抗体的由单条轻链(可变区和恒定区两者)与单条重链的可变区和第一恒定区通过二硫键结合组成的所述部分。“F(ab)₂”是指Fab的二聚体。

[0237] “Fab'”是指包括铰链区的一部分的Fab片段。

[0238] “F(ab')₂”是指Fab'的二聚体。

[0239] 关于抗体的“难断片段(fragment difficult;Fd)”是指可以与轻链组合以形成Fab的重链片段的氨基末端一半。例如,Fd片段可以由VH和CH1结构域组成。

[0240] 关于抗体的“Fv”是指携带完整抗原结合位点的抗体的最小片段。Fv片段由单条轻链的可变区与单条重链的可变区结合组成。已经提供了许多Fv设计,包括dsFv,其中两个结构域之间的缔合通过引入的二硫键得到增强;并且可以使用肽连接子将两个结构域结合在一起作为单条多肽来形成scFv。还已经产生了含有与对应免疫球蛋白重链或轻链的可变结构域和恒定结构域缔合的免疫球蛋白重链或轻链的可变结构域的Fv构建体。Fv也已经被多聚化以形成双功能抗体和三功能抗体(Maynard等人,《生物医学工程年评(Annu Rev Biomed Eng)》2 339-376(2000))。

[0241] “单链Fv抗体”或“scFv”是指由轻链可变区和重链可变区组成的工程化抗体,所述轻链可变区和重链可变区直接相互连接或通过肽连接子序列相互连接(Huston JS等人,《美国国家科学院院刊》,85:5879(1988))。ScFv也可以用作开发多聚体结构的基本模块(二聚体:“双功能抗体”;三聚体:“三功能抗体”;四聚体:“四功能抗体”)。

[0242] “双功能抗体”或“dAb”包括具有两个抗原结合位点的小抗体片段,其中所述片段包括在同一条多肽链中连接到V_L结构域的V_H结构域(V_H-V_L或V_L-V_H) (参见例如,Holliger P.等人,《美国国家科学院院刊》7月15日;90(14):6444-8(1993);EP404097;W093/11161)。通过使用太短以至于不允许在同一条链上的两个结构域之间配对的连接子,结构域被迫与另一条链的互补结构域配对,由此产生两个抗原结合位点。抗原结合位点可以靶向相同或不同的抗原(或表位)。在某些实施方式中,“双特异性ds双功能抗体”是靶向两种不同抗原(或表位)的双功能抗体。

[0243] “dsFv”是指二硫键稳定的Fv片段,其单条轻链的可变区与单条重链的可变区之间的连接是二硫键。在一些实施方式中,“(dsFv)₂”或“(dsFv-dsFv’)”包括三条肽链:两个V_H部分通过肽连接子(例如,长的柔性连接子)连接,并通过二硫键桥分别与两个V_L部分结合。在一些实施方式中,dsFv-dsFv’具有双特异性,其中每对通过二硫键配对的重链和轻链具有不同的抗原特异性。

[0244] 如本文所使用的,术语“价”是指给定分子中存在指定数量的抗原结合位点。术语“单价”是指仅具有一个单抗原结合位点的抗体或抗原结合片段;并且术语“多价”是指具有多个(即,多于一个)抗原结合位点的抗体或抗原结合片段。如此,术语“二价”、“四价”和“六价”分别表示抗原结合分子中存在两个结合位点、四个结合位点和六个结合位点。在一些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段是二价的。

[0245] “纳米抗体”是指由来自重链抗体的VHH结构域以及两个恒定结构域CH2和CH3组成的抗体片段。

[0246] “结构域抗体”或“单结构域抗体”或“sdAb”是指仅含有重链可变区或轻链可变区的抗体片段。在某些情况下,两个或更多个VH结构域由肽连接子共价接合以产生二价或多价结构域抗体。二价结构域抗体的两个VH结构域可以靶向相同或不同的抗原。

[0247] 关于抗体的“Fc”是指由第一重链的第二恒定区和第三恒定区通过二硫键与第二重链的第二恒定区和第三恒定区结合组成的抗体的所述部分。抗体的Fc部分负责各种效应子功能,如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和吞噬作用。

[0248] 如本文所使用的,术语“嵌合”意指具有源自一种物种的重链和/或轻链的一部分并且所述重链和/或轻链的其余部分源自另一不同物种的抗体或抗原结合结构域。在说明性实例中,嵌合抗体可以包括源自人的恒定区和源自非人动物(如,源自小鼠)的可变区。在另一个说明性实例中,嵌合抗体可以包括来源于人的FR区和源自非人动物(如,源自小鼠)的CDR区。在一些实施方式中,非人动物是哺乳动物,例如小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、豚鼠或仓鼠。

[0249] 如本文所使用的,术语“人源化”意指包括源自非人动物的CDR、源自人的FR区以及源自人的恒定区(当适用时)的抗体或抗原结合结构域。

[0250] 术语“可操作地连接(operably link)”或“可操作地连接(operably linked)”是指两个或更多个所关注生物序列在存在或不存在间隔子或连接子或间插序列的情况下的并置,其方式为使得所述所关注生物序列处于允许其以预期方式起作用的关系中。当用于多肽时,所述术语意指多肽序列以允许连接的产物具有预期的生物学功能的方式连接。例如,抗体可变区可以与恒定区可操作地连接,以便提供具有抗原结合活性的稳定产物。对于另一个实例,抗原结合结构域可以与其间具有间插序列的另一个抗原结合结构域可操作地连接,并且此类间插序列可以是间隔子或可以包括长得多的序列,如抗体的恒定区。所述术语还可以用于多核苷酸。举例来说,当编码多肽的多核苷酸与调节序列(例如,启动子、增强子、沉默子序列等)可操作地连接时,意指多核苷酸序列以允许多肽从多核苷酸的调节表达的方式连接。

[0251] 当用于氨基酸序列(例如,肽、多肽或蛋白质)时,术语“融合”或“融合的”是指例如通过化学键合或重组手段将两个或更多个氨基酸序列组合成单一氨基酸序列。融合氨基酸序列可以通过两个编码多核苷酸序列的基因重组产生,并且可以通过将含有重组多核苷酸的构建体引入到宿主细胞中的方法表达。

[0252] 如本文所使用的,与“SIRP α (SIRP α lpha)”或“SIRP- α (SIRP-alpha)”可互换使用的“SIRP α ”是指来自信号调节蛋白(SIRP)家族的调节膜糖蛋白,其主要由髓样细胞(例如,巨噬细胞、粒细胞、髓样树突状细胞、肥大细胞及其前体,如造血干细胞(HSC))、树突状细胞以及还由干细胞或神经元表达。SIRP α 的结构包括胞外结构域和胞质结构域。SIRP α 的胞外结构域由膜远端Ig可变样(IgV)折叠和两个膜近端Ig恒定样(IgC)折叠组成。SIRP α 的IgV结构域负责CD47的胞外Ig结构域的结合。在某些实施方式中,SIRP α 是人SIRP α 。编码人SIRP α 的基因是多态性基因,并且在人群中描述了若干种变体。最常见的蛋白质变体是SIRP α v1和SIRP α v2(登记号NP_542970(P78324)和CAA71403)。如本文所使用的SIRP α 可以来自其它动物物种,如来自小鼠和食蟹猴等。在NCBI参考序列编号NP_031573或BAA20376.1或BAA13521.1中公开了小家鼠(*Mus musculus*)(小鼠)SIRP α 蛋白的示例性序列。在NCBI参考序列编号NP_001271679中公开了食蟹猴(猴)SIRP α 蛋白的示例性序列。

[0253] 如本文所使用的,“PD-L1”是指程序性细胞死亡配体1(PD-L1,参见例如Freeman等人(2000)《实验医学杂志(J. Exp. Med.)》192:1027)。人PD-L1的代表性氨基酸序列以NCBI登录号:NP_054862.1公开,并且编码人PD-L1的代表性核酸序列以NCBI登录号:NM_014143.3示出。PD-L1在胎盘、脾脏、淋巴结、胸腺、心脏、胎肝中表达,并且还可在许多肿瘤细胞或癌细胞上找到。PD-L1与其受体PD-1或B7-1结合,所述受体在激活的T细胞、B细胞和髓样细胞上表达。PD-L1和其受体的结合诱导信号传导以抑制TCR介导的细胞因子产生和T细胞增殖

的激活。因此,PD-L1在特定事件(如妊娠、自身免疫性疾病、组织同种异体移植物等)期间在抑制免疫系统中起着主要作用,并且被认为允许肿瘤或癌细胞规避免疫学检查点并且避开免疫应答。

[0254] 如本文所使用的,“CLDN18”是指密封蛋白18并且包括其任何变体,包括CLDN18.1和CLDN18.2、CLDN18的由细胞天然表达或由用CLDN18基因转染的细胞表达的构象、同种型和物种同系物。在某些实施方式中,CLDN18是人CLDN18。如本文所使用的CLDN18可以来自其它动物物种,如来自人、小鼠和食蟹猴等。术语“CLDN18”、“CLDN-18”、“CLDN 18”、“密封蛋白18”、“密封蛋白-18”或“密封蛋白18”可以在本公开中互换使用。除非另有说明,否则本文所使用的CLDN18是指CLDN18蛋白。

[0255] “CLDN18.1”是CLDN18的剪接变体,并且包括CLDN18.1的由细胞天然表达或在用CLDN18.1基因转染的细胞上表达的翻译后修饰的变体、同种型和物种同系物。术语“CLDN18.1”、“CLDN-18.1”、“CLDN 18.1”、“密封蛋白18.1”、“密封蛋白-18.1”或“密封蛋白18.1”可以在本公开中互换使用。除非另有说明,否则本文所使用的CLDN18.1是指CLDN18.1蛋白。在NCBI参考序列编号NP_057453.1中公开了人CLDN18.1蛋白的示例性序列。

[0256] “CLDN18.2”是CLDN18的剪接变体,并且包括CLDN18.2的由细胞天然表达或在用CLDN18.2基因转染的细胞上表达的翻译后修饰的变体、同种型和物种同系物。术语“CLDN18.2”、“CLDN-18.2”、“CLDN 18.2”、“密封蛋白18.2”、“密封蛋白-18.2”或“密封蛋白18.2”可以在本公开中互换使用。除非另有说明,否则本文所使用的CLDN18.2是指CLDN18.2蛋白。在NCBI参考序列编号NP_001002026.1中公开了人CLDN18.2蛋白的示例性序列。

[0257] 如本文所使用的,术语“特异性结合(specific binding)”或“特异性结合(specifically binds)”是指两个分子之间,例如抗体或其抗原结合结构域与抗原之间的非随机结合反应。在某些实施方式中,本文所提供的抗体分子或抗原结合结构域与人SIRP α 、人密封蛋白18.2和/或人PD-L1特异性结合,其中结合亲和力(K_D) $\leq 10^{-6}$ M(例如, $\leq 5 \times 10^{-7}$ M, $\leq 2 \times 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 5 \times 10^{-8}$ M, $\leq 2 \times 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, $\leq 4 \times 10^{-9}$ M)。本文所使用的 K_D 是指解离速率与缔合速率的比率(k_{off}/k_{on}),所述比率可以使用本领域已知的任何常规方法来确定,包括但不限于表面等离子体共振法、微量热泳法、HPLC-MS方法和流式细胞测量术(如FACS)方法。在某些实施方式中, K_D 值可以通过使用流式细胞测量术适当地确定。

[0258] 如本文所使用的,术语“表位”是指抗体所结合的抗原上特定的一组原子或氨基酸。表位可以由连续氨基酸(也称为线性或顺序表位)或通过蛋白质的三级折叠并置的非连续氨基酸(也称为构型或构象表位)形成。由连续氨基酸形成的表位通常沿着蛋白质上的一级氨基酸残基线性排列,并且连续氨基酸的小区段可以从与主要组织相容性复合物(MHC)分子的抗原结合中消化或在暴露于变性溶剂时保留,而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。在独特的空间构象中,表位通常包括至少3个并且更常见地至少5个、约7个或约8-10个氨基酸。如果两种抗体展现出针对抗原的竞争性结合,则其可以结合抗原内相同或紧密相关的表位。例如,如果抗体或抗原结合结构域阻断了参考抗体与抗原结合至少85%或至少90%或至少95%,则所述抗体或抗原结合结构域可以视为与参考抗体结合相同/紧密相关的表位。

[0259] 如本文所使用的,术语“氨基酸”是指含有氨基($-NH_2$)和羧基($-COOH$)官能团以及

每个氨基酸特有的侧链的有机化合物。氨基酸名称在本公开中也表示为标准单字母或三字母代码,其总结如下。

[0260]	氨基酸名称	三字母代码	单字母代码
	丙氨酸	Ala	A
	精氨酸	Arg	R
	天冬酰胺	Asn	N
	天冬氨酸	Asp	D
	半胱氨酸	Cys	C
	谷氨酸	Glu	E
	谷氨酰胺	Gln	Q
	甘氨酸	Gly	G
	组氨酸	His	H
	异亮氨酸	Ile	I
	亮氨酸	Leu	L
	赖氨酸	Lys	K
	甲硫氨酸	Met	M
	苯丙氨酸	Phe	F
	脯氨酸	Pro	P
	丝氨酸	Ser	S
	苏氨酸	Thr	T
	色氨酸	Trp	W
	酪氨酸	Tyr	Y
	缬氨酸	Val	V

[0262] 关于氨基酸序列的“保守取代”是指将氨基酸残基用不同的具有类似理化性质的侧链的氨基酸残基替代。例如,可以在具有疏水侧链的氨基酸残基(例如, Met、Ala、Val、Leu 和 Ile)之间、具有中性亲水侧链的残基(例如, Cys、Ser、Thr、Asn 和 Gln)之间、具有酸性侧链的残基(例如, Asp、Glu)之间、具有碱性侧链的氨基酸(例如, His、Lys 和 Arg)之间或具有芳香族侧链的残基(例如, Trp、Tyr 和 Phe)之间进行保守取代。如本领域已知的,保守取代通常不会引起蛋白质构象结构的显著变化,并且因此可以保留蛋白质的生物学活性。

[0263] 如本文所使用的,术语“同系物”和“同源”是可互换使用的,并且是指在最佳排列时与另一个序列具有至少80%(例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)的序列同一性的核酸序列(或其互补链)或氨基酸序列。

[0264] 关于氨基酸序列(或核酸序列)的“序列同一性百分比(%)”被定义为在比对序列,并且必要时引入空位以实现最大数量的相同氨基酸(或核酸)后,在候选序列中与参考序列中的氨基酸(或核酸)残基相同的氨基酸(或核酸)残基的百分比。氨基酸残基的保守取代可以或不视为相同残基。可以例如使用公开可用的工具,如BLASTN、BLASTp(可在美国国家生物技术信息中心(U.S.National Center for Biotechnology Information,NCBI)的网站上获得,还参见Altschul S.F.等人,《分子生物学杂志》,215:403-410(1990);Stephen F.等人,《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》,25:3389-3402(1997))、ClustalW2(可在欧洲

生物信息研究所 (European Bioinformatics Institute) 的网站上获得, 还参见 Higgins D.G. 等人, 《酶学方法 (Methods in Enzymology)》, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. 等人, 《生物信息学 (Bioinformatics)》(英国牛津 (Oxford, England)), 23(21):2947-8 (2007)) 以及 ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件来实现比对以确定氨基酸 (或核酸) 序列的序列同一性百分比。本领域的技术人员可以使用由所述工具提供的默认参数或可以根据比对的需要适当定制参数, 例如通过挑选合适的算法。

[0265] 如本文所使用的, 术语“髓样细胞”是指在身体的血液、骨髓、其它造血区室或其它非造血区室中发现的正常或赘生性细胞。具体地, 术语“髓样细胞”在本文中用于意指起源于骨髓的细胞谱系, 其包括单核细胞 (其产生巨噬细胞和树突状细胞)、多形核嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞, 以及单核细胞/巨噬细胞系和不同的树突状细胞谱系。所述术语是指髓系在其分化的所有阶段的细胞并且因此包括造血母细胞, 即定向于髓样细胞谱系但处于分化早期阶段的造血细胞。实例尤其是成髓细胞。术语“髓样细胞”还包括髓样祖细胞 (即, 例如在骨髓中, 能够在如髓单核祖细胞、原成红细胞或未成熟的原巨核细胞等细胞中分化的细胞谱系)。如本文所使用的, 病状的“治疗 (treating)”或“治疗 (treatment)”包括预防或缓解病状、减缓病状的发作或发展速率、降低罹患病状的风险、预防或延迟与病状相关的症状的发展、减轻或结束与病状相关的症状、产生病状的完全或部分消退、治愈病状或其某种组合。

[0266] 如本文所使用的, 术语“受试者”或“个体”或“动物”或“患者”是指需要诊断、预后、减轻、预防和/或治疗疾病或病症的人或非人动物, 包括哺乳动物或灵长类动物。哺乳动物受试者包括人、家畜、农畜, 以及动物园、体育或玩赏动物, 如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、猪、牛、熊等。

[0267] 如本文所使用的, 术语“载体”是指可以将编码蛋白质的多核苷酸可操作地插入其中以便引起所述蛋白质的表达的媒剂。载体可以用于转化、转导或转染宿主细胞, 使其携带的遗传元件在宿主细胞内得以表达。载体的实例包括质粒、噬菌粒、粘粒和人工染色体 (如酵母人工染色体 (YAC)、细菌人工染色体 (BAC) 或 P1 源性人工染色体 (PAC) 等)、细菌噬菌体 (如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体等) 以及动物病毒。用作载体的动物病毒的类别包括逆转录病毒 (包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒 (例如, 单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒和乳多空病毒 (例如, SV40)。载体可以含有多种用于控制表达的元件, 包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、可选择元件和报告基因。另外, 载体可以含有复制起点。载体还可以包括辅助其进入细胞的材料, 包括但不限于病毒颗粒、脂质体或蛋白质涂层。载体可以是表达载体或克隆载体。

[0268] 如本文所使用的, 短语“宿主细胞”是指其中已引入有外源性多核苷酸和/或载体的细胞。

[0269] 如本文所使用的可与“肿瘤”互换使用的“癌症”是指特征在于恶性细胞生长或赘生物、异常增殖、浸润或转移的任何医学病状, 并且包括实体瘤和非实体癌 (恶性血液肿瘤) 如白血病。如本文所使用的, “实体瘤”是指赘生性和/或恶性细胞的实体团块。癌症或肿瘤的实例包括血液恶性肿瘤、口腔癌 (例如, 唇癌、舌癌或咽癌)、消化器官癌 (例如, 食道癌、胃癌、小肠癌、结肠癌、大肠癌或直肠癌)、腹膜癌、肝脏癌和胆道癌、胰腺癌、呼吸系统癌如喉癌或肺癌 (小细胞和非小细胞)、骨癌、结缔组织癌、皮肤癌 (例如, 黑色素瘤)、乳腺癌、生殖

器官癌(输卵管癌、子宫癌、宫颈癌、睾丸癌、卵巢癌或前列腺癌)、泌尿道癌(例如,膀胱癌或肾脏癌)、脑癌和内分泌腺癌如甲状腺癌。在某些实施方式中,癌症选自卵巢癌、乳腺癌、头颈癌、肾癌、膀胱癌、肝细胞癌和结直肠癌。在某些实施方式中,癌症选自淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤和B细胞淋巴瘤。

[0270] 术语“药学上可接受的”表示指定的载体、媒剂、稀释剂、赋形剂和/或盐通常与包括调配物的其它成分在化学和/或物理上相容,并且与其接受者在生理上相容。

[0271] A. 多特异性分子

[0272] 一方面,本公开提供了一种多特异性分子,所述多特异性分子包括:SIRP α 结合结构域、激活受体结合结构域和靶抗原结合结构域。本文所提供的多特异性分子被配置成能够与以下各项结合:1) 激活受体(例如,在吞噬细胞上表达的Fc γ R); 2) 在靶细胞上表达的靶抗原;和3) 在免疫效应子细胞(例如,吞噬细胞,如单核细胞或巨噬细胞)上表达的SIRP α 。靶抗原可以是例如肿瘤表面抗原、炎性抗原或传染性微生物的抗原。

[0273] 不希望受任何理论束缚,据信SIRP α 结合结构域和激活受体结合结构域可以通过与免疫效应子细胞(例如,吞噬细胞)上的SIRP α 和激活受体交联并且然后通过靶抗原结合结构域与靶细胞上的靶抗原之间的相互作用与靶细胞交联来接合并提供多个激活信号。这种设计允许激活免疫效应子细胞并且使激活的免疫效应子细胞接合或募集到靶微环境,以触发吞噬作用并且杀死靶细胞(例如,癌细胞、受感染细胞或受损细胞或疾病细胞)。因此,本公开的多特异性分子也被称为多特异性巨噬细胞衔接子。本文所提供的衔接子尤其在选择性地消除不想要的细胞(如癌细胞)方面是有利的,而正常细胞甚至对于表达CD47的细胞将不被巨噬细胞的吞噬作用靶向。因此,本文所提供的多特异性分子在消除异常细胞方面显示出高于正常细胞的高选择性,并且因此在例如癌症治疗中具有降低的副作用、更低的毒性和高安全性。

[0274] 不希望受任何理论束缚,在癌症治疗中,SIRP α 和/或激活受体(例如,Fc γ R)的激活将肿瘤相关巨噬细胞(TAM)从促肿瘤发生状态重定向到抗肿瘤发生状态。因此,本文所提供的多特异性分子或衔接子的设计还允许重定向先前存在于肿瘤微环境中中和/或新募集到肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞(TAM)以增强癌症杀伤。换言之,本文所提供的多特异性分子/多特异性巨噬细胞衔接子可以促进或维持单核细胞或巨噬细胞,所述单核细胞或巨噬细胞可以有效地且特异性地杀死癌细胞,而非成为免疫抑制和TAM。如此,本公开还提供了将TAM重定向到抗肿瘤巨噬细胞以增强癌细胞的吞噬作用的方法。

[0275] 在癌症中,存在有助于建立免疫抑制环境的肿瘤微环境。肿瘤微环境是复杂的细胞生态学,其在恶性肿瘤转变期间与肿瘤细胞一起进化并为肿瘤细胞提供支持(Noy等人,肿瘤相关巨噬细胞:从机制到疗法(Tumor-associated macrophages:from mechanisms to therapy),《免疫力(Immunity.)》2014年7月17日;41(1):49-61.)。如IL-10、糖皮质激素、凋亡细胞和免疫复合物等因子可以干扰先天免疫细胞功能。

[0276] 产生成熟巨噬细胞的单核细胞可能被多个因子吸引并且迁移到肿瘤微环境中,其中大多数这些单核细胞可以分化为TAM(Zhou等人,(2020)肿瘤相关巨噬细胞:最新见解和疗法(Tumor-Associated Macrophages:Recent Insights and Therapies.)《肿瘤学前沿(Front.Oncol.)》10:188)。存在于肿瘤微环境内的巨噬细胞也可以被肿瘤微环境中的各个因子重新极化,使得这些巨噬细胞分化成促进肿瘤的TAM。

[0277] TAM主要包括可替代地激活的巨噬细胞(M2表型)和一小部分经典激活的巨噬细胞(M1表型)(Zhou等人,(2020)肿瘤相关巨噬细胞:最新见解和疗法,《肿瘤学前沿》10:188)。具有M1表型的巨噬细胞是有效的并且能够杀死病原体或癌细胞。具有M2表型的巨噬细胞缺乏吞噬肿瘤细胞的功能并且还帮助这些肿瘤细胞逃避被杀死并且帮助这些肿瘤细胞扩散到其它组织和器官(Zhou等人,(2020)肿瘤相关巨噬细胞:最新见解和疗法,《肿瘤学前沿》10:188)。

[0278] 本文所提供的衔接子的SIRP α 结合结构域可以抑制由CD47-SIRP α 轴信号传导介导的巨噬细胞的吞噬作用的下调。癌细胞通常过度表达CD47,其与在免疫细胞(例如,单核细胞或巨噬细胞)上表达的SIRP α 结合以引发“别吃我”的信号,所述信号防止癌细胞被免疫细胞(例如,单核细胞或巨噬细胞)消除。因此,抑制CD47-SIRP α 轴可以抵消癌细胞介导的抗吞噬活性。

[0279] 本文所提供的SIRP α 结合结构域可以通过阻断CD47-SIRP α 相互作用和/或阻断由CD47-SIRP α 相互作用介导的下游信号传导(例如,SHP-1信号传导)来抑制CD47-SIRP α 轴信号传导。在某些实施方式中,SIRP α 结合结构域可以包括SIRP α 阻断剂,如识别SIRP α 并与其结合的CD47的胞外结构域(ECD)、或识别SIRP α 并与其结合的抗体或其抗原结合结构域。

[0280] 在更优选的实施方式中,识别SIRP α 并与其结合的抗体或其抗原结合结构域具有以下性质中的一个或多个性质:1)能够基本上或完全阻断SIRP α 与CD47之间的相互作用;2)能够基本上或完全阻断由SIRP α 与CD47之间的相互作用介导的SHP-1募集;3)具有最小的诱导单核细胞或巨噬细胞的吞噬作用的固有活性;和4)能够与SIRP α 的IgV结构域之外的表位结合。

[0281] 本文所提供的多特异性分子进一步包括靶抗原结合结构域。如此,如本文所使用的,术语“靶抗原结合结构域”涵盖用于靶抗原的任何结合结构域。术语“靶抗原”是指可以将表达靶抗原的细胞与其它细胞区分开的任何细胞表面标志物,所述靶抗原包括但不限于肿瘤抗原或呈递在受感染细胞上的抗原。

[0282] 在某些实施方式中,在存在靶抗原的情况下,本文所提供的多特异性分子选择性地诱导免疫效应子细胞(其共表达SIRP α 和激活受体)的效应子功能。

[0283] 本文所提供的多特异性分子能够与免疫效应子细胞结合并且激活免疫效应子细胞,从而相对于非靶标细胞产生对靶细胞的选择性应答。

[0284] 在某些实施方式中,靶细胞表达靶抗原。在某些实施方式中,靶细胞共表达靶抗原和CD47。

[0285] 在某些实施方式中,在不存在靶抗原的情况下,本文所提供的多特异性分子诱导免疫效应子细胞的最小效应子功能。如本文所使用的,关于效应子功能的术语“最小”是指与由同种型对照诱导的效应子功能相当的效应子功能的水平。在某些实施方式中,在不存在靶抗原的情况下由多特异性分子诱导的效应子功能不超过在存在靶抗原的情况下由多特异性分子诱导的效应子功能的10%、20%、30%、40%、50%。

[0286] 本公开的多特异性分子或衔接子还包括另外的结构,以辅助衔接子与多个靶标模块化地且伴随地接合。另外的结构是例如如连接子、同源肽或化学结合等连接元件,用于待连接和分离的两个或更多个结合结构域以实现空间接近性和柔性。

[0287] 将以上描述的另外的结构并入到本文所提供的更高阶多特异性巨噬细胞衔接子

中有助于衔接子的产生、折叠、稳定性、功能和组织可用性。

[0288] i. SIRP α 结合结构域

[0289] 本文所提供的多特异性分子的SIRP α 结合结构域能够基本上阻断SIRP α 与CD47之间的相互作用。

[0290] 所谓“基本上阻断两个相互作用的分子之间的相互作用”,意指抗体能够抑制两个相互作用的分子之间的至少50%结合,或能够抑制由两个分子之间的相互作用诱导的至少40%信号转导。由SIRP α 与CD47之间的相互作用诱导的信号转导的特征可以在于SHP1募集到SIRP α 的胞内部分(例如,C末端尾)。

[0291] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子的SIRP α 结合结构域能够完全阻断SIRP α 与CD47之间的相互作用。关于两个相互作用的分子的短语“完全阻断”意指抑制两个相互作用的分子之间的至少80%结合,或抑制由两个分子之间的相互作用诱导的至少50%信号转导。

[0292] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子的SIRP α 结合结构域可以通过完全阻断SIRP α -CD47相互作用或通过完全阻断SIRP α -CD47相互作用介导的下游信号传导(例如,SHP-1募集)来完全阻断由CD47与抑制吞噬作用的SIRP α 结合所递送的“别吃我”信号,而不管其对SIRP α -CD47相互作用的阻断效果如何。能够完全阻断SIRP α 与CD47之间的相互作用的SIRP α 抗体在本文中也被称为完全阻断剂。

[0293] 可以通过任何合适的测定,例如竞争性ELISA或竞争性FACS测定来确定SIRP α 与CD47之间的结合相互作用的阻断。简而言之,对于竞争性ELISA,SIRP α 的可溶性胞外结构域(ECD)可以固定在底物上,测试SIRP α 抗体可以以不同浓度测试其阻断一定浓度的CD47的可溶性ECD与SIRP α 的固定化ECD结合的能力。CD47的ECD与SIRP α 的固定化ECD的结合可以分别在不存在测试SIRP α 结合结构域的情况下或在存在测试SIRP α 结合结构域的情况下确定。可以确定在存在测试SIRP α 结合结构域的情况下CD47与SIRP α 的结合减少,并且因此可以确定阻断百分比。

[0294] 在某些实施方式中,本文所提供的某些抗SIRP α 结合结构域的最大阻断百分比大于90%,如通过竞争性ELISA测定所测量的。测定条件可以类似于本公开的实施例12中提供的测定条件(CD47的可溶性ECD的浓度为25nM,并且SIRP α 的可溶性ECD的浓度为20nM)。如本文所提供的示例性完全阻断剂是衍生自C15、C25、C42、C59、C73及其人源化抗体的抗SIRP α 结合结构域。

[0295] 与“最高阻断百分比”可互换使用的术语“最大阻断百分比”是指在存在渐增浓度的阻断剂(例如,SIRP α 结合结构域)的情况下,两种蛋白质(例如,SIRP α 和CD47)之间的相互作用的阻断百分比的稳定期。通常,阻断百分比可以随着SIRP α 结合结构域浓度的增加而升高,然而所述百分比可以达到这样一个稳定期:尽管SIRP α 结合结构域的浓度进一步增加,但不能实现更多阻断。最大阻断百分比可以根据不同测定,如竞争性ELISA测定和竞争性FACS测定而变化。

[0296] 在某些实施方式中,本文所提供的某些抗SIRP α 结合结构域的最大阻断百分比不超过10%最大阻断百分比,如通过竞争性ELISA测定所测量的。测定条件可以类似于本公开的实施例12中提供的测定条件(CD47的可溶性ECD的浓度为25nM,并且SIRP α 的可溶性ECD的浓度为20nM)。如本文所提供的示例性非阻断剂是C50和其人源化抗体。此类SIRP α 抗体在本

文中也称为非阻断剂。

[0297] 在某些实施方式中,本文所提供的某些抗SIRP α 抗体的最大阻断百分比不超过50%最大阻断百分比,如通过竞争性ELISA测定所测量的。测定条件类似于本公开的实施例12中提供的测定条件。此类SIRP α 抗体在本文中也称为部分阻断剂。如本文所提供的示例性部分阻断剂是C35和其人源化抗体。

[0298] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子的SIRP α 结合结构域具有最小的诱导免疫效应子细胞对靶细胞的效应子功能的固有活性。在某些实施方式中,靶细胞是肿瘤细胞或癌细胞、受感染细胞或需要通过SIRP α 介导的效应子功能如吞噬作用消除的特定疾病细胞类型。如本文所使用的,关于SIRP α 结合结构域的术语“固有活性”是指在不存在靶抗原结合结构域的情况下,SIRP α 结合结构域诱导免疫效应子细胞对共表达某一靶抗原和CD47的靶细胞的吞噬作用的能力。在某些实施方式中,SIRP α 结合结构域诱导对靶细胞的不超过20%、不超过15%、不超过10%吞噬作用。如本文所使用的,关于诱导吞噬作用的固有活性的术语“最小”是指与由同种型对照诱导的吞噬作用的水平相当的由SIRP α 结合结构域的固有活性诱导的吞噬作用的水平。在某些实施方式中,由单独的SIRP α 结合结构域或仅包括SIRP α 结合结构域的分子诱导的吞噬作用不超过由本文所提供的衔接子诱导的吞噬作用的10%、20%、30%、40%、50%。

[0299] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子的SIRP α 结合结构域包括抗体结构域或抗体模拟结构域。

[0300] 如本文所使用的,术语“抗体结构域”是指源自抗体的抗原结合结构域并且包括至少一个抗体片段(如CDR和/或可变区序列)。抗体结构域包括例如单克隆抗体、抗体片段或结构域、包括抗体片段或结构域的融合蛋白、包括抗体片段或结构域的多肽复合物等。在某些实施方式中,所述抗体结构域包括Fab、VHH、单链Fv(scFv)、双功能抗体、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv片段、二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双功能抗体(ds双功能抗体)、F(ab)₂、scFv二聚体(二价双功能抗体)、骆驼化单结构域抗体、纳米抗体、四功能抗体、结构域抗体或二价结构域抗体。

[0301] 如本文所使用的,术语“抗体模拟结构域”是指以与抗体类似的方式表现(例如,可以与类似于抗体的抗原特异性结合)但既不由免疫系统产生也不在结构上与抗体相关的人工肽或化合物。术语“抗体模拟结构域”还可以是指包括 α 螺旋、 β 折叠或无规卷曲的不相关蛋白支架,其可以与特异性靶标结合并且可以被设计成通过蛋白工程策略并入新的结合位点。

[0302] 在某些实施方式中,SIRP α 结合结构域是包括胞内抗体在内的抗体模拟结构域(例如,纤连蛋白结构域)、单体、线性肽、蛋白A的Z结构域(亲和体)、 γ -B结晶结构域、泛素结构域、胱抑素结构域、Sac7d结构域、三螺旋卷曲螺旋结构域、脂质运载蛋白结构域、膜受体的A结构域、锚蛋白重复基序、Fyn的SH3结构域、蛋白酶抑制剂的库尼兹结构域、纤连蛋白的III型结构域(微型抗体)、DARPin结构域或碳水化合物结合模块32-2。

[0303] 在某些实施方式中,SIRP α 结合结构域包括选自以下组成的组的抗SIRP α 抗体的一个或多个(例如,1个、2个、3个、4个、5个或6个)CDR序列:C25、hu025.021、hu025.033、hu025.023、hu025.059、hu025.060、C15、C42、C59和C73。

[0304] 如本文所使用的,“C25”或“025c”是指具有SEQ ID NO:1的重链可变区和SEQ ID

N0:2的轻链可变区的小鼠抗体。

[0305] 如本文所使用的,“hu025.021”是指基于包括SEQ ID N0:3的重链可变区和SEQ ID N0:4的轻链可变区的C25的人源化抗体。

[0306] 如本文所使用的,“hu025.023”是指基于包括SEQ ID N0:5的重链可变区和SEQ ID N0:6的轻链可变区的C25的人源化抗体。

[0307] 如本文所使用的,“hu025.033”是指基于包括SEQ ID N0:159的重链可变区和SEQ ID N0:160的轻链可变区的C25的人源化抗体。

[0308] 如本文所使用的,“hu025.059”是指基于包括SEQ ID N0:7的重链可变区和SEQ ID N0:8的轻链可变区的C25的人源化抗体。

[0309] 如本文所使用的,“hu025.060”是指基于包括SEQ ID N0:9的重链可变区和SEQ ID N0:10的轻链可变区的C25的人源化抗体。

[0310] 如本文所使用的,“C15”或“015c”是指具有SEQ ID N0:11的重链可变区和SEQ ID N0:12的轻链可变区的小鼠抗体。

[0311] 如本文所使用的,“C42”或“042c”是指具有SEQ ID N0:13的重链可变区和SEQ ID N0:14的轻链可变区的小鼠抗体。

[0312] 如本文所使用的,“C59”或“059c”是指具有SEQ ID N0:15的重链可变区和SEQ ID N0:16的轻链可变区的小鼠抗体。

[0313] 如本文所使用的,“C73”或“073c”是指具有SEQ ID N0:17的重链可变区和SEQ ID N0:18的轻链可变区的小鼠抗体。

[0314] 本文所提供的多特异性分子的SIRP α 结合结构域可以从抗SIRP α 抗体获得,所述抗体的可变区和CDR的氨基酸序列示于下表1-2中。

[0315] 表1.抗SIRP α 抗体的可变区的氨基酸序列(CDR用下划线表示)。

[0316]

抗体	VH	VL
C25	C25.VH, SEQ ID NO: 1: EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTA SGFNIKDYMHVWVKQRTEQGLEW IGRIDPEDGETKYAPKFQGKATITA DTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCD RGLAYWGQGTLVTVSA	C25.VL, SEQ ID NO: 2: QIVLTQSPAISASPGKVTLTCS ASSSVSSSYLYWYQQKPGSSPKL WIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTS YSLTISSMEAEDAASYFCHQWSS YPYTFGGGGTKLEIK
hu025.021	hu025.021.VH, SEQ ID NO: 3: EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKV SGFNIKDYMHVWVQQAPGKGLE WIGRIDPEDAETKYAPKFQGRVTIT ADTSTNTAYMELSSLRSEDYAVYY CDRGLAYWGQGTLVTVSS	hu025.021.VL, SEQ ID NO: 4: EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSA SSSVSSSYLYWYQQKPGQAPKLW IYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDY TLTISSLEPEDFAVYYCHQWSSYP YTFGGGGTKLEIK
hu025.023	hu025.023.VH, SEQ ID NO: 5: EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKV SGFNIKDYMHVWVQQAPGKGLE WIGRIDPEDAETKYAPKFQGRVTIT ADTSTNTAYMELSSLRSEDYAVYY CDRGLAYWGQGTLVTVSS	hu025.023.VL, SEQ ID NO: 6: EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSA SSSVSSSYLYWYQQKPGQAPKLW IYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCHQWSSYPY TFGGGGTKLEIK
hu025.033	SEQ ID NO: 159 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKV SGFNIKDYMHVWVQQAPGKGLE WIGRIDPEDAETKYAPKFQGRVTIT ADTSTDYAYMELSSLRSEDYAVYY CDRGLAYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 160 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSA SSSVSSSYLYWYQQKPGQAPKLW IYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDY TLTISSLEPEDFAVYYCHQWSSYP YTFGGGGTKLEIK
hu025.059	hu025.059.VH, SEQ ID NO: 7: EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKA SGFNIKDYMHVWVQQAPGKGLE	hu025.059.VL, SEQ ID NO: 8: EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSA SSSVSSSYLYWYQQKPGQAPKLW

[0317]

	WIGRIDPEDAETKYAPKFQGRVTIT ADTSTNTAYMELSSLRSED TAVYY CDRGLAYWGQGTTLTVSS	IYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDY TLTISSLEPEDFAVYYCHQWSSYP YTFGQGTKLEIK
hu025.060	hu025.060.VH, SEQ ID NO: 9: EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKA SGFNIKDYMHVWVQAPGKGLE WIGRIDPEDAETKYAPKFQGRVTIT ADTSTNTAYMELSSLRSED TAVYY CDRGLAYWGQGTTLTVSS	hu025.060.VL, SEQ ID NO: 10: EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSA SSSVSSSYLYWYQQKPGQAPKLW IYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDFT LTISSELEPEDFAVYYCHQWSSYPY TFGQGTKLEIK
C15	C15.VH, SEQ ID NO: 11: EVQLQQSGVEVVQPGASVKLSCTA SGFNIEAYMHVVKQRTEQGGLW IGRIDPEDGESKYAPKFQGKATMTA DTSSSTAYLQLSSLTSDDTAVYYCV RGSYEYWGQGTTLTVSS	C15.VL, SEQ ID NO: 12: QIVLTQSPAISASPGKEKVTLTCS ASSSVSSSYLYWYQQKPGSSPKL WIYSTSNLASGVPPRFSGSGSGSTS YSLTISSMQAEDAASYFCYQWSS YPYTFGGGGTKLEIK
C42	C42.VH, SEQ ID NO: 13: QIQLVQSGPELKKPGETVKISCRAS GYTFTTYGMSWVKQAPGKGLRW MGWINTYSGVSTCADDKGRFAFS LETSATTAYLQIHNLNEDTATYFC ARDPHSYGNPAWFPYWGQGTTLV TVSA	C42.VL, SEQ ID NO: 14: DIVMTQSQKFMSTTIRDRVSITCK ASQNVGISVAWYQQKSGQSPKLL IYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDF TLTISNMQSEDLADYFCQQYSSY PLTFGSGTKLAIK
C59	C59.VH, SEQ ID NO: 15: QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCK ASGYTFSEYVLSWVKQRTGQGLE WIGEIPGTITTYNEKFKGKATLT ADKSSNTAYIQLTSLTSEDSAVYFC GRFYDYDGGWFAYWGQGTLLTVS A	C59.VL, SEQ ID NO: 16: ENVLTQSPEKMAVSLGQKVTMT CSASSSVSSDLHWYQQKSGASP KPLIHGTSNLASGVPARFSGSGSG TSYSLTISSVEAEDAATYYCQQW SGYPWTFGGGTNLEIK
C73	C73.VH, SEQ ID NO: 17: QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS GYTFTTYGMSWVKQAPGKGLKW MVWINTYSGVPTYADDFKGRFAFS LETSASTSYLQINNLLKNEDTATYFC ARDPHYGGSPAWFVYWGQGTTLV TVSA	C73.VL, SEQ ID NO: 18: DIVMTQSQKFMSTTIGDRVSITCE ASQIVGIAVAWYQQKPGQSPKLLI YSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDF TLTISNMQSEDLANYFCQQYSAY PFTFGSGTKLEVK
C35	C35.VH, SEQ ID NO: 19: QIQLVQSGPELRKPGETVKISCKAS GYSFTNYAMNWVKQAPGKVLKW MGFINTYTGEPTYADDFKGRFAFS LETSASTAYLQINNLLKNEDTATYFC TRTRGYDDFDGGAFDYWGQGTSL TVSS	C35.VL, SEQ ID NO: 20: DIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTC KASQNVGTHLAWYQQKPGQSPK ALIFSASYRYIGVPDRFTGSGSGT DFTLTITNVQSEDLAEYFCQQYN TYPLTFGAGTKLELK
C50	C50.VH, SEQ ID NO: 21: QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS GYTFTHYSMHVVKQAPGKGLKW MGWINTETAPTYVDDFKGRFAFS LEASASTAFFQINNLLKNEDTATYFC ARGGLRQGDYWGQGTTLTVSS	C50.VL, SEQ ID NO: 22: QIVLTQSPPIASASPGKEKVTLTCSA TSSVSASYLYWFQQKPGSSPKLW IYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSSY SLTISNMEPADAASYFCHQWSSY PYTFGGGGTKLEIK
C25.scFv	SEQ ID NO: 226 QIVLTQSPAISASPGKEKVTLTCSASSSVSSSYLYWYQQKPGSSPKLWIYS TSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAASYFCHQWSSYPYTFGG GTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGAELVKPGASVKLS CTASGFNIKDYMHVVKQRTEQGGLWIGRIDPEDGETKYAPKFQGKATI TADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCDRGLAYWGQGTTLTVSA	

[0318]

[0319] 表2:本文所提供的抗SIRP α 抗体的CDR

抗体 ID	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
C15	SEQ ID NO: 29 AYYMH	SEQ ID NO: 30 RIDPEDGES KYAPKFQG	SEQ ID NO: 31 GSYEY	SEQ ID NO: 32 SASSSVSS YLY	SEQ ID NO: 33 STSNLAS	SEQ ID NO: 34 YQWSSYP YT
C25	SEQ ID NO: 23 DYYMH	SEQ ID NO: 24 RIDPEDGET KYAPKFQG	SEQ ID NO: 25 GLAY	SEQ ID NO: 26 SASSSVSS YLY	SEQ ID NO: 27 STSNLAS	SEQ ID NO: 28 HQWSSYP YT
		SEQ ID NO: 198 RIDPEDAET KYAPKFQG				
	SEQ ID NO: 161 X ₁ YYMH	SEQ ID NO: 162 RIDPEDX ₂ E X ₃ KYAPKFQ G	SEQ ID NO: 163 GX ₁₅ X ₄ X ₅ Y			SEQ ID NO: 164 X ₆ QWSSYP YT
C42	SEQ ID NO: 35 TYGMS	SEQ ID NO: 36 WINTYSGV STCADDK G	SEQ ID NO: 37 DPHSYGNSP AWFPY	SEQ ID NO: 38 KASQNVGI SVA	SEQ ID NO: 39 SASNRYT	SEQ ID NO: 40 QQYSSYPL T
C73	SEQ ID NO: 47 TYGMS	SEQ ID NO: 48 WINTYSGV PTYADDFK G	SEQ ID NO: 49 DPHYYGSSP AWFVY	SEQ ID NO: 50 EASQIVGIA VA	SEQ ID NO: 51 SASNRYT	SEQ ID NO: 52 QQYSAYPF T
		SEQ ID NO: 165 WINTYSGV X ₇ TX ₈ ADDF KG	SEQ ID NO: 166 DPHX ₉ YGX ₁ 0SPAWFX ₁₁ Y	SEQ ID NO: 188 X ₁₂ ASQX ₁₃ V GIX ₁₄ VA		SEQ ID NO: 189 QQYSX ₁₆ YP X ₁₇ T
C59	SEQ ID NO: 41 EYVLS	SEQ ID NO: 42 EIYPGTITT YYNEKFKG	SEQ ID NO: 43 FYDYDGG WFAY	SEQ ID NO: 44 SASSSVSS DLH	SEQ ID NO: 45 GTSNLAS	SEQ ID NO: 46 QQWSGYP WT
C35	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 58
[0321] C50	SGYSFTNYA MN	FINTYTGEPT YADDFKG	TRGYYDFD GGAFDY	KASQNVGT HLA	SASYRYI	QQYNTYPL T
	SEQ ID NO: 59 SGYTFTHYS MH	SEQ ID NO: 60 WINTETAEP TYVDDFKG	SEQ ID NO: 61 GGLRQGDY	SEQ ID NO: 62 SATSSVSAS YLY	SEQ ID NO: 63 STSNLAS	SEQ ID NO: 64 HQWSSYP YT

[0322] X₁是A或D;X₂是G或A;X₃是T或S;X₄是L或Y;X₅是E或A;X₆是Y或H;X₇是S或P;X₈是Y或C;X₉是Y或S;X₁₀是N或S;X₁₁是P或V;X₁₂是E或K;X₁₃是N或I;X₁₄是S或A;X₁₅是S或不存在;X₁₆是S或A;X₁₇是F或L。

[0323] 已知CDR负责抗原结合,然而,已经发现并非所有6个CDR都是必不可少的或不可改变的。换言之,可以替换或改变或修饰用于SIRP α 结合结构域的本文所提供的的一个或多个

CDR,但仍基本上保留对SIRP α 的特异性结合亲和力。

[0324] 重链CDR3区位于抗原结合位点的中心,并且因此被认为与抗原接触最多并为抗体对抗原的亲和力提供最多的自由能。还据信,重链CDR3是迄今为止抗原结合位点在长度、氨基酸组成和构象方面通过多种多样化机制的最多样化CDR (Tonegawa S.《自然》302:575-81)。重链CDR3的多样性足以产生大多数抗体特异性 (Xu JL, Davis MM.《免疫力》13:37-45) 以及理想的抗原结合亲和力 (Schier R等人,《分子生物学杂志》263:551-67)。

[0325] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域包括:

[0326] a) 包含X₁YYMH (SEQ ID NO:161) 的序列的HCDR1、包含RIDPEDX₂EX₃KYAPKFQG (SEQ ID NO:162) 的序列的HCDR2和包含GX₁₅X₄X₅Y (SEQ ID NO:163) 的序列的HCDR3;和/或包含SASSSVSSSYLY (SEQ ID NO:26) 的序列的LCDR1、包含STSNLAS (SEQ ID NO:27) 的序列的LCDR2和包含X₆QWSSYPYT (SEQ ID NO:164) 的序列的LCDR3;或

[0327] b) 包含TYGMS (SEQ ID NO:35) 的序列的HCDR1、包含WINTYSGVX₇TX₈ADDFKG (SEQ ID NO:165) 的序列的HCDR2和包含DPHX₉YGX₁₀SPAWFX₁₁Y (SEQ ID NO:166) 的序列的HCDR3;和/或包含X₁₂ASQX₁₃VGIX₁₄VA (SEQ ID NO:188) 的序列的LCDR1、包含SASNRYT (SEQ ID NO:39) 的序列的LCDR2和包含QQYSX₁₆YPX₁₇T (SEQ ID NO:189) 的序列的LCDR3;或

[0328] c) 包含EYVLS (SEQ ID NO:41) 的序列的HCDR1、包含EIYPGTITTTYNEKFKG (SEQ ID NO:42) 的序列的HCDR2和包含FYDYDGGWFAY (SEQ ID NO:43) 的序列的HCDR3;和/或包含SASSSVSSSDLH (SEQ ID NO:44) 的序列的LCDR1、包含GTSNLAS (SEQ ID NO:45) 的序列的LCDR2和包含QQWSGYPWT (SEQ ID NO:46) 的序列的LCDR3,

[0329] 其中X₁是A或D;X₂是G或A;X₃是T或S;X₄是L或Y;X₅是E或A;X₆是Y或H;X₇是S或P;X₈是Y或C;X₉是Y或S;X₁₀是N或S;X₁₁是P或V;X₁₂是E或K;X₁₃是N或I;X₁₄是S或A;X₁₅是S或不存在;X₁₆是S或A;X₁₇是F或L。

[0330] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域包括:

[0331] a) 包含SEQ ID NO:23的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:198的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:25的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:26的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:27的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:28的序列的LCDR3;或

[0332] b) 包含SEQ ID NO:29的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:30的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:31的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:32的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:33的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:34的序列的LCDR3;或

[0333] c) 包含SEQ ID NO:35的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:36的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:37的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:38的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:39的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:40的序列的LCDR3;或

[0334] d) 包含SEQ ID NO:47的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:48的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:49的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:50的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:51的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:52的序列的LCDR3。

[0335] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域包括与选自以下组成的组的抗SIRP α 抗体相同的HCDR和LCDR:C25、C15、C42、C59和C73,其中:

[0336] a) 所述C25包括包含SEQ ID NO:1的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:2的序列的轻链可变区,

[0337] b) 所述C15包括包含SEQ ID NO:11的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:12的序列的轻链可变区,

[0338] c) 所述C42包括包含SEQ ID NO:13的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:14的序列的轻链可变区,

[0339] d) 所述C59包括包含SEQ ID NO:15的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:16的序列的轻链可变区,并且

[0340] e) 所述C73包括包含SEQ ID NO:17的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:18的序列的轻链可变区。

[0341] 在某些实施方式中,本文所提供的SIRP α 结合结构域包括任何合适的框架区(FR)序列,只要抗原结合结构域可以与SIRP α 特异性结合。在某些实施方式中,hu025.021、hu025.033、hu025.023、hu025.059和hu025.060的CDR序列是从小鼠抗体C25获得的,但可以使用本领域已知的合适方法如重组技术将所述序列移植到如小鼠、人、大鼠、兔等任何合适的物种的任何合适的FR序列。

[0342] 在某些实施方式中,本文所提供的SIRP α 结合结构域是人源化的。人源化抗原结合结构域在其降低人的免疫原性方面是令人期望的。人源化抗原结合结构域在其可变区中是嵌合的,因为非人CDR序列被移植到人或基本上人FR序列。抗原结合结构域的人源化可以基本上通过用非人(如鼠)CDR基因取代人免疫球蛋白基因中的对应人CDR基因来进行(参见例如,Jones等人(1986),《自然》321:522-525;Riechmann等人(1988),《自然》332:323-327;Verhoeyen等人(1988),《科学》239:1534-1536)。

[0343] 可以使用本领域已知的方法选择合适的人重链和轻链可变结构域以实现此目的。在说明性实例中,可以使用“最佳拟合”方法,其中针对已知人可变结构域序列的数据库筛选或BLAST非人(例如,啮齿动物)抗体可变结构域序列,并且鉴定最接近非人查询序列的人序列并将其用于移植非人CDR序列的人支架(参见例如Sims等人,(1993)《免疫学杂志(J.Immunol.)》151:2296;Chothia等人(1987)《分子生物学杂志》196:901)。可替代地,衍生自所有人抗体的共有序列的框架可以用于非人CDR的移植(参见例如Carter等人(1992)《美国国家科学院院刊》,89:4285;Presta等人(1993)《免疫学杂志》,151:2623)。

[0344] 在某些实施方式中,本文所提供的人源化抗原结合结构域由除了非人的CDR序列之外的基本上全部的人序列构成。在一些实施方式中,可变区FR和恒定区(如果存在的话)完全或基本上来自人免疫球蛋白序列。人FR序列和人恒定区序列可以源自不同的人免疫球蛋白基因,例如,FR序列源自一种人抗体并且恒定区源自另一种人抗体。在一些实施方式中,人源化抗原结合结构域包括人FR1-4。

[0345] 在一些实施方式中,源自人的FR区可以包括与其所源自的人免疫球蛋白相同的氨基酸序列。在一些实施方式中,人FR的一个或多个氨基酸残基被来自亲本非人抗体的对应残基取代。在某些实施方式中,这可能是令人期望的,以使人源化抗体或其片段紧密近似非人亲本抗体结构。在某些实施方式中,本文所提供的人源化SIRP α 结合结构域在人FR序列中的每个人FR序列中包括不超过10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个氨基酸残基取代,或者在重链或轻链可变结构域的所有FR中包括不超过10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个氨基酸残基取代。在一些实施方式中,氨基酸残基的这种变化可以仅存在于重链FR区、仅存在于轻链FR区、或存在于两条链中。表2.1示出了人源化抗体hu025.021、

hu025.023、hu025.033、hu025.059和hu025.060的FR序列。

[0346] 表2.1.5种人源化抗体的FR氨基酸序列

[0347]

抗体		FR1	FR2	FR3	FR4
hu025.021	HFR	SEQ ID NO: 207 EVQLVQSGAEVK KPGATVKISCK <u>Y</u> S GFNIK	SEQ ID NO: 191 WVQQAPGKGLE WIG	SEQ ID NO: 208 RVTITADTST <u>N</u> TA YMESSLRSEDTA VYYCDR	SEQ ID NO: 193 WGQGLTVTVS S
	LFR	SEQ ID NO: 194 EIVLTQSPATLSLS PGERATLSC	SEQ ID NO: 195 WYQQKPGQAPKL WIY	SEQ ID NO: 209 GIPARFSGSGSGT D <u>Y</u> TLTISSLEPEDF AVYYC	SEQ ID NO: 197 FGQGTKLEIK
hu025.023	HFR	SEQ ID NO: 207 EVQLVQSGAEVK KPGATVKISCK <u>Y</u> S GFNIK	SEQ ID NO: 191 WVQQAPGKGLE WIG	SEQ ID NO: 208 RVTITADTST <u>N</u> TA YMESSLRSEDTA VYYCDR	SEQ ID NO: 193 WGQGLTVTVS S
	LFR	SEQ ID NO: 194 EIVLTQSPATLSLS PGERATLSC	SEQ ID NO: 195 WYQQKPGQAPKL WIY	SEQ ID NO: 212 GIPARFSGSGSGT D <u>F</u> TLTISSLEPEDF AVYYC	SEQ ID NO: 197 FGQGTKLEIK
hu025.033	HFR	SEQ ID NO: 207 EVQLVQSGAEVK KPGATVKISCK <u>Y</u> S GFNIK	SEQ ID NO: 191 WVQQAPGKGLE WIG	SEQ ID NO: 210 RVTITADTST <u>D</u> TA YMESSLRSEDTA VYYCDR	SEQ ID NO: 193 WGQGLTVTVS S
	LFR	SEQ ID NO: 194 EIVLTQSPATLSLS PGERATLSC	SEQ ID NO: 195 WYQQKPGQAPKL WIY	SEQ ID NO: 209 GIPARFSGSGSGT D <u>Y</u> TLTISSLEPEDF AVYYC	SEQ ID NO: 197 FGQGTKLEIK
hu025.059	HFR	SEQ ID NO: 211 EVQLVQSGAEVK KPGATVKISCK <u>A</u> S	SEQ ID NO: 191 WVQQAPGKGLE WIG	SEQ ID NO: 208 RVTITADTST <u>N</u> TA YMESSLRSEDTA	SEQ ID NO: 193 WGQGLTVTVS

[0348]

		GFNIK		VYYCDR	S
	LFR	SEQ ID NO: 194 EIVLTQSPATLSLS PGERATLSC	SEQ ID NO: 195 WYQQKPGQAPKL WIY	SEQ ID NO: 209 GIPARFSGSGSGT D <u>Y</u> TLTISSLEPEDF AVYYC	SEQ ID NO: 197 FGQGTKLEIK
hu025.060	HFR	SEQ ID NO: 211 EVQLVQSGAEVK KPGATVKISCK <u>A</u> S GFNIK	SEQ ID NO: 191 WV <u>Q</u> QAPGK <u>G</u> LE WIG	SEQ ID NO: 208 RVTITADTST <u>N</u> TA YMESSLRSEDTA VYYCDR	SEQ ID NO: 193 WGQGLTVTVS S
	LFR	SEQ ID NO: 194 EIVLTQSPATLSLS PGERATLSC	SEQ ID NO: 195 WYQQKPGQAPK <u>L</u> WIY	SEQ ID NO: 212 GIPARFSGSGSGT D <u>F</u> TLTISSLEPEDF AVYYC	SEQ ID NO: 197 FGQGTKLEIK
	HFR	SEQ ID NO: 190 EVQLVQSGAEVK KPGATVKISCK <u>X</u> ₂₀ SGFNK		SEQ ID NO: 192 RVTITADTST <u>X</u> ₂₁ T AYMESSLRSED AVYYCDR	
	LFR			SEQ ID NO: 196 GIPARFSGSGSGT D <u>X</u> ₂₂ TLTISSLEPE DFAVYYC	

[0349] 其中X₂₀是A或V;X₂₁是N或D;X₂₂是Y或F。

[0350] 在某些实施方式中,所述SIRPα结合结构域进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一者或多者和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一者或多者,其中:

[0351] a) 所述HFR1包括EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKX₂₀SGFNK (SEQ ID NO: 190) 或与其具

有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0352] b) 所述HFR2包括WVQQAPGKGLEWIG (SEQ ID NO:191) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0353] c) 所述HFR3包括RVTITADTSTX₂₁TAYMELSSLRSED TAVYYCDR (SEQ ID NO:192) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0354] d) 所述HFR4包括WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:193) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0355] e) 所述LFR1包括EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:194) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0356] f) 所述LFR2包括WYQQKPGQAPKLWIY (SEQ ID NO:195) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0357] g) 所述LFR3包括GIPARFSGSGSGTDX₂₂TLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:196) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0358] h) 所述LFR4包括FGQG TKLEIK (SEQ ID NO:197) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0359] 其中X₂₀是A或V;X₂₁是N或D;X₂₂是Y或F。

[0360] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一者或多者和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一者或多者,其中:

[0361] i) 所述HFR1包括EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIIK (SEQ ID NO:207) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0362] j) 所述HFR2包括WVQQAPGKGLEWIG (SEQ ID NO:191) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0363] k) 所述HFR3包括RVTITADTSTNTAYMELSSLRSED TAVYYCDR (SEQ ID NO:208) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0364] l) 所述HFR4包括WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:193) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0365] m) 所述LFR1包括EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:194) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0366] n) 所述LFR2包括WYQQKPGQAPKLWIY (SEQ ID NO:195) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0367] o) 所述LFR3包括GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:209) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0368] p) 所述LFR4包括FGQG TKLEIK (SEQ ID NO:197) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0369] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一者或多者和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一者或多者,其中:

[0370] q) 所述HFR1包括EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIIK (SEQ ID NO:207) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0371] r) 所述HFR2包括WVQQAPGKGLEWIG (SEQ ID NO:191) 或与其具有至少80%序列同一

性的同源序列,和/或

[0372] s) 所述HFR3包括RVTITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (SEQ ID NO:208) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0373] t) 所述HFR4包括WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:193) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0374] u) 所述LFR1包括EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:194) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0375] v) 所述LFR2包括WYQQKPGQAPKLWIY (SEQ ID NO:195) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0376] w) 所述LFR3包括GIPARFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:212) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0377] x) 所述LFR4包括FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:197) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0378] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一者或多者和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一者或多者,其中:

[0379] y) 所述HFR1包括EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIK (SEQ ID NO:207) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0380] z) 所述HFR2包括WVQQAPGKGLEWIG (SEQ ID NO:191) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0381] aa) 所述HFR3包括RVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (SEQ ID NO:210) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0382] bb) 所述HFR4包括WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:193) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0383] cc) 所述LFR1包括EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:194) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0384] dd) 所述LFR2包括WYQQKPGQAPKLWIY (SEQ ID NO:195) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0385] ee) 所述LFR3包括GIPARFSGSGSGTDYTLTITSSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:209) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0386] ff) 所述LFR4包括FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:197) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0387] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一者或多者和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一者或多者,其中:

[0388] gg) 所述HFR1包括EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIK (SEQ ID NO:211) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0389] hh) 所述HFR2包括WVQQAPGKGLEWIG (SEQ ID NO:191) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0390] ii) 所述HFR3包括RVTITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (SEQ ID NO:208) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0391] jj)所述HFR4包括WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:193)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0392] kk)所述LFR1包括EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC(SEQ ID NO:194)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0393] ll)所述LFR2包括WYQQKPGQAPKLWIY(SEQ ID NO:195)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0394] mm)所述LFR3包括GIPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDFAVYYC(SEQ ID NO:209)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0395] nn)所述LFR4包括FGQGTKLEIK(SEQ ID NO:197)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0396] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一者或多者和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一者或多者,其中:

[0397] oo)所述HFR1包括EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIK(SEQ ID NO:211)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0398] pp)所述HFR2包括WVQQAPGKGLEWIG(SEQ ID NO:191)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0399] qq)所述HFR3包括RVTITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCDR(SEQ ID NO:208)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0400] rr)所述HFR4包括WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:193)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0401] ss)所述LFR1包括EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC(SEQ ID NO:194)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0402] tt)所述LFR2包括WYQQKPGQAPKLWIY(SEQ ID NO:195)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0403] uu)所述LFR3包括GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC(SEQ ID NO:212)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

[0404] vv)所述LFR4包括FGQGTKLEIK(SEQ ID NO:197)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0405] 在某些实施方式中,本文所提供的SIRP α 结合结构域包括选自由以下组成的组的重链可变结构域序列:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17和159。在某些实施方式中,本文所提供的SIRP α 结合结构域包括选自由以下组成的组的轻链可变结构域序列:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、16、18和160。

[0406] 在某些实施方式中,所述SIRP α 结合结构域包括:

[0407] f) 包含SEQ ID NO:1的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:2的序列的轻链可变区;或

[0408] g) 包含SEQ ID NO:3的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:4的序列的轻链可变区;或

[0409] h) 包含SEQ ID NO:5的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:6的序列的轻链可变区;或

[0410] i) 包含SEQ ID NO:7的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:8的序列的轻链可变区;或

[0411] j) 包含SEQ ID NO:9的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:10的序列的轻链可变区;或

[0412] k) 包含SEQ ID NO:11的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:12的序列的轻链可变区;或

[0413] l) 包含SEQ ID NO:13的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:14的序列的轻链可变区;或

[0414] m) 包含SEQ ID NO:15的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:16的序列的轻链可变区;或

[0415] n) 包含SEQ ID NO:17的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:18的序列的轻链可变区;和/或

[0416] o) 包含SEQ ID NO:159的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:160的序列的轻链可变区。

[0417] 在一些实施方式中,本文所提供的SIRP α 结合结构域包括重链可变结构域的全部或一部分和/或轻链可变结构域的全部或一部分。在一个实施方式中,本文所提供的SIRP α 结合结构域是由本文提供的重链可变结构域的全部或一部分组成的单结构域抗体。关于这种单结构域抗体的更多信息可在本领域中获得(参见例如,美国专利第6,248,516号)。

[0418] 在某些实施方式中,SIRP α 结合结构域进一步包括仍保留对SIRP α 的特异性结合的一个或多个氨基酸残基取代或修饰。在某些实施方式中,所述取代或修饰中的至少一者位于重链可变区或轻链可变区的CDR序列中的一个或多个CDR序列中和/或非CDR序列中的一个或多个非CDR序列中。

[0419] ii. 靶抗原结合结构域

[0420] 如本文所使用的,术语“靶抗原结合结构域”是指靶向共表达抗原和CD47的细胞的抗原结合结构域。本文所提供的多特异性分子的靶抗原结合结构域可以是肿瘤抗原结合结构域。在某些实施方式中,所述靶抗原包括肿瘤表面抗原。如本文所使用的,术语“肿瘤表面抗原”是指主要由肿瘤细胞呈递以与非恶性组织区分的抗原,并且优选地位于肿瘤细胞的细胞膜上。肿瘤表面抗原可以呈各种形式,例如多肽(具体地糖基化蛋白)或多肽的糖基化模式、糖脂(例如,神经节苷脂,如GM2),或甚至是细胞膜的脂质的组成的变化,这可能是癌细胞的特性。肿瘤表面抗原可以是在癌细胞上特异性表达的引发免疫应答的抗原;和/或与T细胞受体结合(例如,当由MHC分子呈递时)或与抗体结合。在一些实施方式中,肿瘤表面抗原引发体液应答(例如,包含产生抗原特异性抗体)。在一些实施方式中,肿瘤表面抗原引发细胞应答(例如,涉及其受体与肿瘤表面抗原特异性相互作用的T细胞)。在一些实施方式中,肿瘤表面抗原与抗体结合并且可以或不诱导生物体体内的特定生理应答。

[0421] 在某些实施方式中,肿瘤表面抗原是例如PD-L1、密封蛋白18.2、BCMA、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD30、CD33、CD38、CD44、CD52、CD56、CD70、CD96、CD97、CD99、CD123、EGFR、HER2、HER3、CD117、C-Met、EGFR、EGFRvIII、ERBB3、ERBB4、VEGFR1、VEGFR2、PTHR2、B7-H1 (PD-L1)、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6、B7-H7、Trop-2、GPC-3、EPCAM、DLL-3、粘连蛋白-4、密封蛋白6、密封蛋白18.2、Muc-1、PSMA、GD3、FAP、CEA或EphA2。

[0422] 密封蛋白18.2结合结构域

[0423] 在某些实施方式中,肿瘤表面抗原是密封蛋白18.2。在某些实施方式中,密封蛋白18.2结合结构域能够与密封蛋白18.2(如人密封蛋白18.2)特异性结合。

[0424] 在某些实施方式中,密封蛋白18.2结合结构域包括选自以下组成的组的抗密封蛋白18.2抗体的一个或多个(例如,1个、2个、3个、4个、5个或6个)CDR序列:hu26.H1L1、hu26.H1L2、hu26.H1L2(S92A)、hu26.H3L1、hu26.H3L2、hu28.H1L2、C10、C29和C30。

[0425] 如本文所使用的,“hu26.H1L1”是指具有SEQ ID NO:65的重链可变区和SEQ ID NO:66的轻链可变区的人源化单克隆抗体。

[0426] 如本文所使用的,“hu26.H1L2”是指具有SEQ ID NO:65的重链可变区和SEQ ID NO:67的轻链可变区的人源化单克隆抗体。

[0427] 如本文所使用的,“hu26.H1L2(S92A)”是指具有SEQ ID NO:65的重链可变区和SEQ ID NO:224的轻链可变区的人源化单克隆抗体。

[0428] 如本文所使用的,“hu26.H3L1”是指具有SEQ ID NO:68的重链可变区和SEQ ID NO:66的轻链可变区的人源化单克隆抗体。

[0429] 如本文所使用的,“hu26.H3L2”是指具有SEQ ID NO:68的重链可变区和SEQ ID NO:67的轻链可变区的人源化单克隆抗体。

[0430] 如本文所使用的,“hu28.H1L2”是指具有SEQ ID NO:69的重链可变区和SEQ ID NO:70的轻链可变区的人源化单克隆抗体。

[0431] 如本文所使用的,“C10”是指具有SEQ ID NO:71的重链可变区和SEQ ID NO:72的轻链可变区的人源化单克隆抗体。

[0432] 如本文所使用的,“C29”是指具有SEQ ID NO:73的重链可变区和SEQ ID NO:74的轻链可变区的人源化单克隆抗体。

[0433] 如本文所使用的,“C30”是指具有SEQ ID NO:75的重链可变区和SEQ ID NO:76的轻链可变区的人源化单克隆抗体。

[0434] 表3示出了抗密封蛋白18.2抗体的CDR序列。下表4和表5也提供了重链和轻链可变区序列。

[0435] 表3.抗密封蛋白18.2抗体的可变区的氨基酸序列(CDR用下划线表示)。

[0436]

抗体	VH	VL
hu26.H1L1	hu26.VH_1, SEQ ID NO: 65: EVQLLES GGGLVQPGGSLRL SCAASG FTLSS YALSWVRQAPGK GLEWVSYIS NLGGSTFY PDTVKGRFTISR DNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAK HLYNYD AFASWGQGT LTVSS	hu26.VL_1, SEQ ID NO: 66: DIQLTQSPSFLSASV GDRV TITCR ASSSVNYIHWY QKPGKAPKLLI Y ATSNLASGVPSR FSGSGSGTEFT LTISSLQPEDFATYYC QQWNSNPL TFGQGT KLEIK
hu26.H1L2	hu26.VH_1, SEQ ID NO: 65: EVQLLES GGGLVQPGGSLRL SCAASG FTLSS YALSWVRQAPGK GLEWVSYIS NLGGSTFY PDTVKGRFTISR DNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAK HLYNYD AFASWGQGT LTVSS	hu26.VL_2, SEQ ID NO: 67: DIQLTQSPSFLSASV GDRV TITCR ASSSVNYIHWY QKPGKAPKALI Y ATSNLASGVPSR FSGSGSGTEYT LTISSLQPEDFATYYC QQWNSNPL TFGQGT KLEIK
hu26.H1L2 (S92A)	hu26.VH_1, SEQ ID NO: 65: EVQLLES GGGLVQPGGSLRL SCAASG FTLSS YALSWVRQAPGK GLEWVSYIS NLGGSTFY PDTVKGRFTISR DNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAK HLYNYD AFASWGQGT LTVSS	hu26.VL_2, SEQ ID NO: 224: DIQLTQSPSFLSASV GDRV TITCR ASSSVNYIHWY QKPGKAPKALI Y ATSNLASGVPSR FSGSGSGTEYT LTISSLQPEDFATYYC QQWNA NPL TFGQGT KLEIK
hu26.H3L1	hu26.VH_3, SEQ ID NO: 68: EVQLLES GGGLVQPGGSLRL SCAASG FTLSS YALSWVRQAPGK GLEWVAYIS NLGGSTFY PDTVKGRFTISR DNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCA THLYNYD	hu26.VL_1, SEQ ID NO: 66: DIQLTQSPSFLSASV GDRV TITCR ASSSVNYIHWY QKPGKAPKLLI Y ATSNLASGVPSR FSGSGSGTEFT LTISSLQPEDFATYYC QQWNSNPL

[0437]

	<u>AFASWGQGLTVTVSS</u>	<u>TFGQGTKLEIK</u>
hu26.H3L2	hu26.VH_3, SEQ ID NO: 68: EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASG FTLSS SYALSWVRQAPGKGLEWVAYIS NLGGSTFYPTDKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLR AEDTAVYYCATHLYNYD <u>AFASWGQGLTVTVSS</u>	hu26.VL_2, SEQ ID NO: 67: DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCR ASSSVNYI HWYQQKPGKAPKALI YATSNLASGVPSRFS SGSGSGTEYTL LTISLQPEDFATYYCQ QWNSNPL <u>TFGQGTKLEIK</u>
hu28.H1L2	hu28.VH_1, SEQ ID NO: 69: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAS GYTFTN WVHWVRQAPGQGLEWMGE INPTNARSNYNEKFKKRVMTMTRDTST STVYMELSSLRSED TAVYYCARIYYG <u>NSFAHWGQGLTVTVSS</u>	hu28.VL_1, SEQ ID NO: 70: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK SSQSLLNAGNQN KNTLTWYQQK PGPPKLLIYWSSTRESGV PDRFSG SGSGTDFTLTISLQAEDVAVYHC QNNYYYP LTFGGG <u>GTKLEIK</u>
C10	C10.VH, SEQ ID NO: 71: EVQLQQSGPELVKPGSSVKMSCKASG YTFTDYNM HWLKQSHGKSLEWIGYI NPKNGGTRYNQKFKGKATLTVNKSSS TAYMELRSLTSED SAVYYCARLYYGN <u>SFDYWGQGTTLTVSS</u>	C10.VL, SEQ ID NO: 72: DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSC KSSQSLLNSGNQN KNTLTWYQQK PGPPKLLIYWASTRESGV PDRFT SGSGTDFTLTISVQAEDLAVYF CQNDYSFP FTFGSG <u>GTKLEIK</u>
C29	C29.VH, SEQ ID NO: 73: DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASG FTFSSFGMH WVRQAPEKGLEWVAYIS SGSSSIYYVD TVKGRFTISRDNPKNL FLQMTSLRSED TAMYYCARNAYYGN <u>AFDYWGQGTTLTVSS</u>	C29.VL, SEQ ID NO: 74: DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMNC KSSQSLLNSGNQN KNTLTWYQQK PGPPKLLIYWASTRTSGV PDRFT SGSGTDFTLTISVQAEDLAVYC CQNGYTYPL TFGAGTKLEL <u>K</u>
C30	C30.VH, SEQ ID NO: 75: QVQLQQSGPDLVKPGASVKLSCKASG YTFTN YDINWVKQRPQG GLEWIGGIH PRDGNTKYNEKFKDKATLTIDTSANT AYMEFHS LTSEDSAVYFCARGYYGNS <u>FAYWGQGLTVTVSA</u>	C30.VL, SEQ ID NO: 76: DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMTC KSGQSLLNSGNQN RNTLTWYQQK PGQSPKLLIYWASTRESGV PDRFT SGSGADFTLTISVQAEDLALYY CQNAFYF PYTFGGG <u>GTKLEIK</u>
hu28.H1L2.scFv	SEQ ID NO: 227 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNAGNQN KNTLTWYQQKPGQPP KLLIYWSSTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYHCQNNYYYP LTFGGG GTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCASGYTFTN WVHWVRQAPGQGLEWMGEINPTNARSNYNEKFKK RVMTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARIYYGNSFAHWGQGLTVTV SS	

[0438] 表4: 本文所提供的抗密封蛋白18.2抗体的CDR

[0439]

抗体	VH	VL
hu26.H1L1	CDR1 (SEQ ID NO: 77) <u>SYALS</u>	CDR1 (SEQ ID NO: 80) <u>RASSSVNYIH</u>
hu26.H1L2		
hu26.H3L1		
hu26.H3L2	CDR2 (SEQ ID NO: 78) <u>YISNLGGSTFYPTDKG</u>	CDR2 (SEQ ID NO: 81) <u>ATSNLAS</u>

[0440]

	CDR3 (SEQ ID NO: 79) <u>HLNYDAFAS</u>	CDR3 (SEQ ID NO: 82) <u>QQWNSNPLT</u>
hu26.H1L2 (S92A)	CDR1 (SEQ ID NO: 77) <u>SYALS</u> CDR2 (SEQ ID NO: 78) <u>YISNLGGSTFYPTVKG</u> CDR3 (SEQ ID NO: 79) <u>HLNYDAFAS</u>	CDR1 (SEQ ID NO: 80) <u>RASSSVNYIH</u> CDR2 (SEQ ID NO: 81) <u>ATSNLAS</u> CDR3 (SEQ ID NO: 225) <u>QQWNANPLT</u>
hu28.H1L2	CDR1 (SEQ ID NO: 83) <u>NWVH</u> CDR2 (SEQ ID NO: 84) <u>EINPTNARSNYNEKFKK</u> CDR3 (SEQ ID NO: 85) <u>IYYGNSFAH</u>	CDR1 (SEQ ID NO: 86) <u>KSSQSLLNAGNQKNYLT</u> CDR2 (SEQ ID NO: 87) <u>WSSTRES</u> CDR3 (SEQ ID NO: 88) <u>QNNYYYPLT</u>
C10	CDR1 (SEQ ID NO: 89) <u>DYNMH</u> CDR2 (SEQ ID NO: 90) <u>YINPKNGGTRYNQKFKG</u> CDR3 (SEQ ID NO: 91) <u>LYYGNSFDY</u>	CDR1 (SEQ ID NO: 92) <u>KSSQSLLNSGNQKNYLT</u> CDR2 (SEQ ID NO: 93) <u>WASTRES</u> CDR3 (SEQ ID NO: 94) <u>QNDYSFPFT</u>
C29	CDR1 (SEQ ID NO: 95) <u>SFGMH</u> CDR2 (SEQ ID NO: 96) <u>YISSGSSSIYYVDTVKG</u> CDR3 (SEQ ID NO: 97) <u>NAYYGNAFDY</u>	CDR1 (SEQ ID NO: 98) <u>KSSQSLLNSGNQKNYLT</u> CDR2 (SEQ ID NO: 99) <u>WASTRES</u> CDR3 (SEQ ID NO: 100) <u>QNGYTYPLT</u>
C30	CDR1 (SEQ ID NO: 101) <u>NYDIN</u> CDR2 (SEQ ID NO: 102) <u>GIHPRDGNTKYNEKFKD</u> CDR3 (SEQ ID NO: 103) <u>GYYGNSFAY</u>	CDR1 (SEQ ID NO: 104) <u>KSGQSLLNSGNQKNYLT</u> CDR2 (SEQ ID NO: 105) <u>WASTRES</u> CDR3 (SEQ ID NO: 106) <u>QNAYFYPT</u>

[0441] 已知CDR负责抗原结合,然而,已经发现并非所有6个CDR都是必不可少的或不可改变的。换言之,有可能替换或改变或修饰用于密封蛋白18.2结合结构域的本文所提供的一个或多个CDR,但仍基本上保留对PD-1(例如,人密封蛋白18.2)的特异性结合亲和力。

[0442] 在某些实施方式中,所述密封蛋白18.2结合结构域包括:

[0443] a) 包含SEQ ID NO:77的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:78的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:79的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:80的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:81的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:225的序列的LCDR3;或

[0444] b) 包含SEQ ID NO:83的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:84的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:85的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:86的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:87

的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:88的序列的LCDR3;或

[0445] c) 包含SEQ ID NO:89的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:90的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:91的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:92的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:93的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:94的序列的LCDR3;或

[0446] d) 包含SEQ ID NO:95的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:96的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:97的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:98的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:99的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:100的序列的LCDR3;或

[0447] e) 包含SEQ ID NO:101的序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:102的序列的HCDR2和包含SEQ ID NO:103的序列的HCDR3;和/或包含SEQ ID NO:104的序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:105的序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:106的序列的LCDR3。

[0448] 在某些实施方式中,所述密封蛋白18.2结合结构域包括与选自以下组成的组的抗密封蛋白18.2抗体相同的HCDR和LCDR:hu26.H1L1、hu26.H1L2 (S92A)、hu28.H1L2、C10、C29和C30,

[0449] a) 其中所述hu26.H1L1包括包含SEQ ID NO:65的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:66的序列的轻链可变区,

[0450] b) 其中所述hu26.H1L2 (S92A) 包括包含SEQ ID NO:65的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:224的序列的轻链可变区,

[0451] c) 所述hu28.H1L2包括包含SEQ ID NO:69的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:70的序列的轻链可变区,

[0452] d) 所述C10包括包含SEQ ID NO:71的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:72的序列的轻链可变区,

[0453] e) 所述C29包括包含SEQ ID NO:73的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:74的序列的轻链可变区,并且

[0454] f) 所述C30包括包含SEQ ID NO:75的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:76的序列的轻链可变区。

[0455] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子的密封蛋白18.2结合结构域包括任何合适的框架区(FR)序列,只要抗原结合结构域可以与密封蛋白18.2特异性结合。

[0456] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子的密封蛋白18.2结合结构域是人源化的。人源化抗原结合结构域在其降低人的免疫原性方面是令人期望的。人源化抗原结合结构域在其可变区中是嵌合的,因为非人CDR序列被移植到人或基本上人FR序列。抗原结合结构域的人源化可以基本上通过用非人(如鼠)CDR基因取代人免疫球蛋白基因中的对应人CDR基因来进行(参见例如,Jones等人(1986),《自然》321:522-525;Riechmann等人(1988),《自然》332:323-327;Verhoeyen等人(1988),《科学》239:1534-1536)。如上所述,可以使用本领域已知的方法选择合适的人重链和轻链可变结构域以实现此目的。

[0457] 在某些实施方式中,本文所提供的人源化抗原结合结构域由除了非人的CDR序列之外的基本上全部的人序列构成。在一些实施方式中,可变区FR和恒定区(如果存在的话)完全或基本上来自人免疫球蛋白序列。人FR序列和人恒定区序列可以源自不同的人免疫球蛋白基因,例如,FR序列源自一种人抗体并且恒定区源自另一种人抗体。在一些实施方式中,人源化抗原结合结构域包括人FR1-4。

[0458] 在一些实施方式中,源自人的FR区可以包括与其所源自的人免疫球蛋白相同的氨基酸序列。在一些实施方式中,人FR的一个或多个氨基酸残基被来自亲本非人抗体的对应残基取代。在某些实施方式中,这可能是令人期望的,以使人源化抗体或其片段紧密近似非人亲本抗体结构。在某些实施方式中,本文所提供的人源化密封蛋白18.2结合结构域在人FR序列中的每个人FR序列中包括不超过10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个氨基酸残基取代,或者在重链或轻链可变结构域的所有FR序列中包括不超过10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个氨基酸残基取代。在一些实施方式中,氨基酸残基的这种变化可以仅存在于重链FR区、仅存在于轻链FR区、或存在于两条链中。表4.1示出了人源化抗体hu26.H1L1、hu26.H1L2、hu26.H3L1、hu26.H3L2、hu28.H1L2的FR序列。

[0459] 表4.1.5种人源化抗体的FR氨基酸序列

[0460]

抗体		FR1	FR2	FR3	FR4
hu26.H1L1	HFR	SEQ ID NO: 167 EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTLS	SEQ ID NO: 199 WVRQAPGKGLE WV <u>S</u>	SEQ ID NO: 200 RFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDT AVYYCA <u>K</u>	SEQ ID NO: 173 WGQGT ~~L~~ TVTS S
	LFR	SEQ ID NO: 174 DIQLTQSPSFLSAS VGDRVITITC	SEQ ID NO: 201 WYQQKPGK <u>A</u> PK <u>L</u> LIY	SEQ ID NO: 202 GVPSRFSGSGSGT E <u>F</u> TLTISSLQPEDF ATYYC	SEQ ID NO: 181 FG <u>Q</u> GTKLEIK
hu26.H1L2/ hu26.H1L2 (S92A)	HFR	SEQ ID NO: 167 EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTLS	SEQ ID NO: 199 WVRQAPGKGLE WV <u>S</u>	SEQ ID NO: 200 RFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDT AVYYCA <u>K</u>	SEQ ID NO: 173 WGQGT ~~L~~ TVTS S
	LFR	SEQ ID NO: 174 DIQLTQSPSFLSAS VGDRVITITC	SEQ ID NO: 203 WYQQKPGK <u>A</u> PK <u>A</u> LIY	SEQ ID NO: 204 GVPSRFSGSGSGT E <u>Y</u> TLTISSLQPEDF ATYYC	SEQ ID NO: 181 FG <u>Q</u> GTKLEIK
hu26.H3L1	HFR	SEQ ID NO: 167 EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTLS	SEQ ID NO: 213 WVRQAPGKGLE WV <u>A</u>	SEQ ID NO: 205 RFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDT AVYYCA <u>T</u>	SEQ ID NO: 173 WGQGT ~~L~~ TVTS S
	LFR	SEQ ID NO: 174 DIQLTQSPSFLSAS VGDRVITITC	SEQ ID NO: 201 WYQQKPGK <u>A</u> PK <u>L</u> LIY	SEQ ID NO: 202 GVPSRFSGSGSGT E <u>F</u> TLTISSLQPEDF ATYYC	SEQ ID NO: 181 FG <u>Q</u> GTKLEIK
hu26.H3L2	HFR	SEQ ID NO: 167 EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTLS	SEQ ID NO: 213 WVRQAPGKGLE WV <u>A</u>	SEQ ID NO: 205 RFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDT AVYYCA <u>T</u>	SEQ ID NO: 173 WGQGT ~~L~~ TVTS S
	LFR	SEQ ID NO: 174 DIQLTQSPSFLSAS VGDRVITITC	SEQ ID NO: 203 WYQQKPGK <u>A</u> PK <u>A</u> LIY	SEQ ID NO: 204 GVPSRFSGSGSGT E <u>Y</u> TLTISSLQPEDF ATYYC	SEQ ID NO: 181 FG <u>Q</u> GTKLEIK
	LFR		SEQ ID NO: 206 WYQQKPGKAP KX ₁₉ <u>L</u> IY		
hu28.H1L2	HFR	SEQ ID NO: 168 QVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKA SGYTFT	SEQ ID NO: 170 WVRQAPGQGLE WMG	SEQ ID NO: 172 RVTMTRDTSTST VYMELSSLRSED AVYYCAR	SEQ ID NO: 173 WGQGT ~~L~~ TVTS S
	LFR	SEQ ID NO: 175 DIVMTQSPDSLAV	SEQ ID NO: 177 WYQQKPG <u>Q</u> PPK	SEQ ID NO: 179 GVPDRFSGSGSGT	SEQ ID NO: 182 FG <u>G</u> GTKLEIK

[0461]		SLGERATINC	<u>L</u> LIY	DFTLTISSLQAEDV AVYHC	
	HFR		SEQ ID NO: 169 WVRQAPGKGLE WVX₁₈	SEQ ID NO: 171 RFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAED TAVYYCAX₂₃	
	LFR		SEQ ID NO: 176 WYQQKPGX₂₆X₂₇ PKX₁₉LIY	SEQ ID NO: 178 GVPSRFSGSGSG TEX₂₄TLTISSLQP EDFATYYC	SEQ ID NO: 180 FGX₂₅GTKLEI K

[0462] 其中X₁₈是S或A, X₁₉是L或A, X₂₃是T或K, X₂₄是Y或F, X₂₅是Q或G, X₂₆是Q或K, X₂₇是P或A。

[0463] 在一些实施方式中,所述密封蛋白18.2结合结构域进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一者或多者和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一者或多者,其中:

[0464] a) 所述HFR1包括选自由EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (SEQ ID NO:167) 和QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO:168) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0465] b) 所述HFR2包括选自由WVRQAPGKGLEWVX₁₈ (SEQ ID NO:169) 和WVRQAPGQGLEWMG (SEQ ID NO:170) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0466] c) 所述HFR3包括选自由RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAX₂₃ (SEQ ID NO:171) 和RVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:172) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0467] d) 所述HFR4包括WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:173) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0468] e) 所述LFR1包括选自由DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTC (SEQ ID NO:174) 和DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:175) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0469] f) 所述LFR2包括选自由WYQQKPGX₂₆X₂₇PKX₁₉LIY (SEQ ID NO:176) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0470] g) 所述LFR3包括选自由GVPSRFSGSGSGTEX₂₄TLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:178) 和GVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYHC (SEQ ID NO:179) 组成的组的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,并且

[0471] h) 所述LFR4包括FGX₂₅GTKLEIK (SEQ ID NO:180) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0472] 其中X₁₈是S或A, X₁₉是L或A, X₂₃是T或K, X₂₄是Y或F, X₂₅是Q或G, X₂₆是Q或K, X₂₇是P或A。

[0473] 在一些实施方式中,所述密封蛋白18.2结合结构域进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一者或多者和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一者或多者,其中:

[0474] a) 所述HFR1包括EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (SEQ ID NO:167) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0475] b) 所述HFR2包括WVRQAPGKGLEWVX₁₈ (SEQ ID NO:169) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0476] c) 所述HFR3包括RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAX₂₃ (SEQ ID NO:171) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0477] d) 所述HFR4包括WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:173) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0478] e) 所述LFR1包括DIQLTQSPSFLSASVGDRVITC (SEQ ID NO:174) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0479] f) 所述LFR2包括WYQQKPGKAPKX₁₉LIY (SEQ ID NO:206) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0480] g) 所述LFR3包括GVPSRFSGSGSGTEX₂₄TLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:178) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,并且

[0481] h) 所述LFR4包括FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:181) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0482] 其中X₁₈是S或A, X₁₉是L或A, X₂₃是T或K, X₂₄是Y或F。

[0483] 在一些实施方式中,所述密封蛋白18.2结合结构域进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一者或多者和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一者或多者,其中:

[0484] a) 所述HFR1包括EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (SEQ ID NO:167) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0485] b) 所述HFR2包括WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO:199) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0486] c) 所述HFR3包括RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK (SEQ ID NO:200) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0487] d) 所述HFR4包括WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:173) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0488] e) 所述LFR1包括DIQLTQSPSFLSASVGDRVITC (SEQ ID NO:174) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0489] f) 所述LFR2包括WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:201) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0490] g) 所述LFR3包括GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:202) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,并且

[0491] h) 所述LFR4包括FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:181) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0492] 在一些实施方式中,所述密封蛋白18.2结合结构域进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一者或多者和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一者或多者,其中:

[0493] a) 所述HFR1包括EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (SEQ ID NO:167) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0494] b) 所述HFR2包括WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO:199) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0495] c) 所述HFR3包括RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK (SEQ ID NO:200) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0496] d) 所述HFR4包括WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:173) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0497] e) 所述LFR1包括DIQLTQSPSFLSASVGDRVITC (SEQ ID NO:174) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0498] f) 所述LFR2包括WYQQKPGKAPKALIIY (SEQ ID NO:203) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0499] g) 所述LFR3包括GVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:204) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列, 并且

[0500] h) 所述LFR4包括FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:181) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0501] 在一些实施方式中, 所述密封蛋白18.2结合结构域进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一者或多者和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一者或多者, 其中:

[0502] a) 所述HFR1包括EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (SEQ ID NO:167) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0503] b) 所述HFR2包括WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:213) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0504] c) 所述HFR3包括RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT (SEQ ID NO:205) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0505] d) 所述HFR4包括WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:173) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0506] e) 所述LFR1包括DIQLTQSPSFLSASVGDRVITC (SEQ ID NO:174) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0507] f) 所述LFR2包括WYQQKPGKAPKLLIIY (SEQ ID NO:201) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0508] g) 所述LFR3包括GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:202) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列, 并且

[0509] h) 所述LFR4包括FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:181) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0510] 在一些实施方式中, 所述密封蛋白18.2结合结构域进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一者或多者和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一者或多者, 其中:

[0511] a) 所述HFR1包括EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (SEQ ID NO:167) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0512] b) 所述HFR2包括WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:213) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0513] c) 所述HFR3包括RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT (SEQ ID NO:205) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0514] d) 所述HFR4包括WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:173) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0515] e) 所述LFR1包括DIQLTQSPSFLSASVGDRVITC (SEQ ID NO:174) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0516] f) 所述LFR2包括WYQQKPGKAPKALIIY (SEQ ID NO:203) 或与其具有至少80%序列同

一性的同源序列,

[0517] g) 所述LFR3包括GVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:204) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,并且

[0518] h) 所述LFR4包括FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:181) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0519] 在一些实施方式中,所述密封蛋白18.2结合结构域进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一者或多者和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一者或多者,其中:

[0520] a) 所述HFR1包括QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO:168) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0521] b) 所述HFR2包括WVRQAPGQGLEWMG (SEQ ID NO:170) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0522] c) 所述HFR3包括RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:172) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0523] d) 所述HFR4包括WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:173) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0524] e) 所述LFR1包括DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:175) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0525] f) 所述LFR2包括WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:177) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0526] g) 所述LFR3包括GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYHC (SEQ ID NO:179) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列,并且

[0527] h) 所述LFR4包括FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:182) 或与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0528] 在一些实施方式中,所述密封蛋白18.2结合结构域包括:

[0529] a) 包含SEQ ID NO:65或68的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:66或67或224的序列的轻链可变区;或

[0530] b) 包含SEQ ID NO:69的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:70的序列的轻链可变区;或

[0531] c) 包含SEQ ID NO:71的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:72的序列的轻链可变区;或

[0532] d) 包含SEQ ID NO:73的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:74的序列的轻链可变区;或

[0533] e) 包含SEQ ID NO:75的序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:76的序列的轻链可变区。

[0534] 在一些实施方式中,本文所提供的密封蛋白18.2结合结构域包括重链可变结构域的全部或一部分和/或轻链可变结构域的全部或一部分。在一个实施方式中,本文所提供的密封蛋白18.2结合结构域是由本文提供的重链可变结构域的全部或一部分组成的单结构域抗体。关于这种单结构域抗体的更多信息可在本领域中获得(参见例如,美国专利第6,248,516号)。

[0535] 在某些实施方式中,密封蛋白18.2结合结构域进一步包括仍保留对密封蛋白18.2的特异性结合的一个或多个氨基酸残基取代或修饰。在某些实施方式中,所述取代或修饰中的至少一者位于重链可变区或轻链可变区的CDR序列中的一个或多个CDR序列中和/或非CDR序列中的一个或多个非CDR序列中。在某些实施方式中,所述取代或修饰中的至少一者位于例如hu26.H1L2(S92A)的CDR序列中的一个或多个CDR序列中。

[0536] PD-L1结合结构域

[0537] 在某些实施方式中,肿瘤表面抗原是PD-L1。在某些实施方式中,PD-L1结合结构域能够与PD-L1(如人PD-L1)特异性结合。

[0538] 在某些实施方式中,PD-L1结合结构域包括选自由以下组成的组的抗PD-L1抗体的一个或多个(例如,1个、2个或3个)CDR序列:C71、C71v38、C239、C492、C570、C446、C2811、C1778、C1793、C2855、C2713和C2719。

[0539] 如本文所使用的,“C71”是指具有SEQ ID NO:107的重链可变区的人源化重链抗体。

[0540] 如本文所使用的,“C71v38”是指具有SEQ ID NO:108的重链可变区的人源化重链抗体。

[0541] 如本文所使用的,“C239”是指具有SEQ ID NO:109的重链可变区的人源化重链抗体。

[0542] 如本文所使用的,“C492”是指具有SEQ ID NO:110的重链可变区的人源化重链抗体。

[0543] 如本文所使用的,“C570”是指具有SEQ ID NO:111的重链可变区的人源化重链抗体。

[0544] 如本文所使用的,“570h3”是指具有SEQ ID NO:223的重链可变区的人源化重链抗体。

[0545] 如本文所使用的,“C446”是指具有SEQ ID NO:112的重链可变区的人源化重链抗体。

[0546] 如本文所使用的,“C2811”是指具有SEQ ID NO:113的重链可变区的人源化重链抗体。

[0547] 如本文所使用的,“C1778”是指具有SEQ ID NO:114的重链可变区的人源化重链抗体。

[0548] 如本文所使用的,“C1793”是指具有SEQ ID NO:115的重链可变区的人源化重链抗体。

[0549] 如本文所使用的,“C2855”是指具有SEQ ID NO:116的重链可变区的人源化重链抗体。

[0550] 如本文所使用的,“C2713”是指具有SEQ ID NO:117的重链可变区的人源化重链抗体。

[0551] 如本文所使用的,“C2719”是指具有SEQ ID NO:118的重链可变区的人源化重链抗体。

[0552] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括包含SEQ ID NO:119的序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:120的序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:121的序列的重链CDR3。

[0553] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括包含SEQ ID NO:122的序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:123的序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:124的序列的重链CDR3。

[0554] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括包含SEQ ID NO:125的序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:126的序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:127的序列的重链CDR3。

[0555] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括包含SEQ ID NO:128的序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:129的序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:130的序列的重链CDR3。

[0556] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括包含SEQ ID NO:131的序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:132的序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:133的序列的重链CDR3。

[0557] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括包含SEQ ID NO:134的序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:135的序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:136的序列的重链CDR3。

[0558] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括包含SEQ ID NO:137的序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:138的序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:139的序列的重链CDR3。

[0559] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括包含SEQ ID NO:140的序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:141的序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:142的序列的重链CDR3。

[0560] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括包含SEQ ID NO:143的序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:144的序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:145的序列的重链CDR3。

[0561] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括包含SEQ ID NO:146的序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:147的序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:148的序列的重链CDR3。

[0562] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括包含SEQ ID NO:149的序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:150的序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:151的序列的重链CDR3。

[0563] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括包含SEQ ID NO:152的序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:153的序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:154的序列的重链CDR3。

[0564] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括与选自由以下组成的组的抗PD-L1抗体相同的HCDR:C71、C71v38、C239、C492、C570、570h3、C446、C2811、C1778、C1793、C2855、C2713和C2719。

[0565] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括:包含选自由SEQ ID NO:107-118和223组成的组的序列的重链可变区。

[0566] 表5示出了抗PD-L1抗体的重链可变区序列。下表6还提供了CDR序列。

[0567] 表5. 抗PD-L1抗体的可变区的氨基酸序列(CDR用下划线表示)。

抗体	VH
[0568] C71	C71.VH, SEQ ID NO: 107: EVQVVESGGGLVQSGGSLKLSCAGSGFTESAGFMVWHRQVPGKERELVALI <u>ATPSGSTNYADSVKGRFTISRDNQNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC</u> <u>NIRGYW</u> <u>GQGLTVTVSS</u>

[0569]

C71v38	C71v38.VH, SEQ ID NO: 108: EVQVVESGGGLVQSGGSLRLSCAGSGFTESAGFMVWHRQVPGKERELVALI <u>ATPSGSTQYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC</u> <u>NIRGYW</u> <u>GQGTLTVTVSS</u>
C239	C239.VH, SEQ ID NO: 109: EVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYFAMSWVRQAPGKGLEWVAD <u>IDTGGTDTDYADSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYC</u> <u>AKGPR</u> <u>EATDIRSWGQGTQVTVSS</u>
C492	C492.VH, SEQ ID NO: 110: EVQLVESGGDLVQTGGSLRLSCSASGFTFNYFAMSWVRQAPGKGLEWVADI <u>DTGGTDTDYADSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYC</u> <u>AKGP</u> <u>REATDIRSWGQGTQVTVSS</u>
C570	C570.VH, SEQ ID NO: 111: EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSD <u>IDTSGTTTDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYC</u> <u>AKGP</u> <u>REATDIRSWGQGTQVTVSS</u>
570h3	570h3.VH, SEQ ID NO 223: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSDI <u>DTSGTTTDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC</u> <u>AKGP</u> <u>REATDIRSWGQGTQVTVSS</u>
C446	C446.VH, SEQ ID NO: 112: QVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCKASGIIFFSYLLFWYRQPPGKERELVATISS <u>AGSSIDYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC</u> <u>RTPWPNY</u> <u>WGQGTTLTVTVSS</u>
C2811	C2811.VH, SEQ ID NO: 113: QVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGRTFADAAGWFRQVPGRDREWVAS <u>ISRSGDTYYEDSVKGRFTISRDNKNTVCLQMNSLRAEDTAVYHC</u> <u>AARN</u> <u>SGAPSSIVIAEYEWGQGTQVTVSS</u>
C1778	C1778.VH, SEQ ID NO: 114: QVQLVESGGGLVQAGGSLRLTCAASGRTFADAAGWFRQVPGRDREWVAS <u>ISRSGDTYYEDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYHC</u> <u>AARN</u> <u>SGAPSSIVIAEYEWGQGTQVTVSS</u>
C1793	C1793.VH, SEQ ID NO: 115: QVQLVESGGGLVQAGGSLRLTCAASGRAFADAAGWFRQVPGRDREWVA <u>SISRSGDTYYEDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYHC</u> <u>AARN</u> <u>SGAPSSIVIAEYEWGQGTQVTVSS</u>
C2855	C2855.VH, SEQ ID NO: 116: QVQLEESGGGLAQAGDSLRLTCAASGRTFADAAGWFRQVPGRNREWVA <u>SISRSGDTYYEDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYHC</u> <u>AARN</u> <u>SGAPSSIVIAEYEWGQGTQVTVSS</u>
C2713	C2713.VH, SEQ ID NO: 117: AVQLMESGGGLVQAGGSLRLTCAASGRTFADAAGWFRQVPGRDREWVA <u>SISRSGDTYYEDSVKGRFTISRDIYAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYHC</u> <u>AARN</u> <u>SGAPSSIVIAEYEWGHGTQVIVSS</u>
C2719	C2719.VH, SEQ ID NO: 118: QVQLVESGGGLVQAGGSLRLTCAASGRTFADAAGWFRQVPGRDREWVAS <u>ISRSGDTYYEDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYHC</u> <u>AARN</u> <u>SGAPSSIVIAEYEWGQGTQVTVSS</u>

[0570] 表6:本文所提供的抗PDL1单结构域抗体的CDR

[0571]

抗体	VH
C71	CDR1 (SEQ ID NO: 119) <u>GFTESAGFMV</u> CDR2 (SEQ ID NO: 120) <u>LVALIATPSGSTN</u> CDR3 (SEQ ID NO: 121) <u>NIRGYWG</u>
C71v38	CDR1 (SEQ ID NO: 122) <u>GFTESAGFMV</u> CDR2 (SEQ ID NO: 123) <u>VALIATPSGSTQ</u> CDR3 (SEQ ID NO: 124) <u>NIRGYWG</u>
C239	CDR1 (SEQ ID NO: 125) <u>GFTFNYFAMS</u> CDR2 (SEQ ID NO: 126) <u>IDTGGTDT</u> CDR3 (SEQ ID NO: 127) <u>AKGPREATDIRS</u>
C492	CDR1 (SEQ ID NO: 128) <u>GFTFNYFAMS</u> CDR2 (SEQ ID NO: 129) <u>IDTGGTDT</u> CDR3 (SEQ ID NO: 130) <u>AKGPREATDIRS</u>
C570/570h3	CDR1 (SEQ ID NO: 131) <u>GFTFSSHAMS</u> CDR2 (SEQ ID NO: 132) <u>IDTSGTTT</u> CDR3 (SEQ ID NO: 133) <u>AKGPREATDIRS</u>
C446	CDR1 (SEQ ID NO: 134) <u>GIIFSSYLLF</u>

[0572]

	CDR2 (SEQ ID NO: 135) <u>ISSAGSSI</u> CDR3 (SEQ ID NO: 136) <u>RTWPYNY</u>
C2811	CDR1 (SEQ ID NO: 137) <u>GRTFADAAWG</u> CDR2 (SEQ ID NO: 138) <u>ISRSGDT</u> CDR3 (SEQ ID NO: 139) <u>AARNSGAPSSIVIAIEY</u>
C1778	CDR1 (SEQ ID NO: 140) <u>GRTFADAAWG</u> CDR2 (SEQ ID NO: 141) <u>ISRSGDT</u> CDR3 (SEQ ID NO: 142) <u>AARNSGAPSSIVIAIEY</u>
C1793	CDR1 (SEQ ID NO: 143) <u>GRAFADAAWG</u> CDR2 (SEQ ID NO: 144) <u>ISRSGDT</u> CDR3 (SEQ ID NO: 145) <u>AARNSGAPSSIVIAIEY</u>
C2855	CDR1 (SEQ ID NO: 146) <u>GRTFADAAWG</u> CDR2 (SEQ ID NO: 147) <u>ISRSGDT</u> CDR3 (SEQ ID NO: 148) <u>AARNSGAPSSIVIAIEY</u>
C2713	CDR1 (SEQ ID NO: 149) <u>GRTFADAAWG</u> CDR2 (SEQ ID NO: 150) <u>ISRSGDT</u> CDR3 (SEQ ID NO: 151) <u>AARNSGAPSSIVIAIEY</u>
C2719	CDR1 (SEQ ID NO: 152) <u>GRTFADAAWG</u>

[0573]

	CDR2 (SEQ ID NO: 153) <u>ISRSGDT</u> CDR3 (SEQ ID NO: 154) <u>AARNSGAPSSIVIAIEY</u>
--	--

[0574] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域包括:包含选自由SEQ ID NO:107-118和223组成的组的序列的重链可变区。

[0575] 在某些实施方式中,所述PD-L1结合结构域进一步包括仍保留对PD-L1的特异性结合的一个或多个氨基酸残基取代或修饰。在某些实施方式中,所述取代或修饰中的至少一者位于重链可变区或轻链可变区的CDR序列中的一个或多个CDR序列中和/或非CDR序列中的一个或多个非CDR序列中。

[0576] iv. 激活受体结合结构域

[0577] 多特异性分子进一步包括激活受体结合结构域。如本文所使用的,术语“激活受体”是指在免疫效应子细胞(例如,吞噬细胞,如巨噬细胞)上表达的受体(例如,Fc γ R),所述受体在通过与例如Fc结构域结合而被激活时介导免疫效应子细胞(例如,吞噬细胞,如巨噬细胞)的至少一种效应子功能或促炎性应答。在某些实施方式中,本文所提供的免疫效应子细胞共表达SIRP α 和激活受体。

[0578] 在某些实施方式中,激活受体是Fc γ R,并且激活受体结合结构域是Fc结构域。Fc结构域可以激活巨噬细胞上的Fc受体(FcR),以驱动由基于受体的免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)繁殖的磷酸化级联。ITAM是存在于免疫效应子细胞上的若干激活受体的胞质尾部中的保守序列,如FcR、T细胞受体和免疫球蛋白(Ig)。ITAM可以以保守的氨基酸序列基序为特征,所述氨基酸序列基序由配对的YXXL/I基序(其中Y、L和I分别是指酪氨酸、赖氨酸和异亮氨酸)组成,并且被六到八个氨基酸的所定义间隔分开。ITAM内的残基的磷酸化募集若干信号传导分子用于吞噬作用激活。因此,激活受体可以是在免疫效应子细胞上表达的任何受体,所述免疫效应子细胞可以被结合并激活,以通过包括ITAM的胞内吞噬作用信号传导结构域诱导吞噬作用。

[0579] 在其它实施方式中,激活受体是参与不同吞噬信号传导或机制的受体,如Akt介导的信号传导级联(通过CD19、CD28、CSFR或PDGFR受体)、增强吞噬作用的免疫效应子细胞(例如,巨噬细胞)上的一组受体的聚集(通过例如整联蛋白或选择蛋白)或抗原介导的细胞毒性(通过FcDR1(CD89)受体或CD206)。

[0580] 例如,与如吞噬作用等效效应子功能相关的激活受体可以是可片段结晶的 γ 受体(Fc γ R)、TREM2、凝集素、清道夫受体A1(SRA1)、MARCO、CD36、CD163、CD68、CD205、CD206、FcDR1、CD207、CD209、RAGE、CD14、CD64、F4/80、CD64、CD32a、CD16a、CD89、CD19、CD28、CSFR、PDGFR、MSR1、SCARA3、COLEC12、SCARA5、SCARB1、SCARB2、dectin 1、RAGE(SR-E1)、LRP1、LRP2、ASGP、SR-PSOX、CXCL16、OLR1、SCARF1、SCARF2、CXCL16、STAB1、STAB2、SRCRB4D、SSC5D、CCR2、CX3CR1、CSF1R、Tie2、HuCRIg(L)和CD169受体或补体受体,如CR1和CR3。在某些实施方式中,激活受体是Fc γ R。

[0581] 在某些实施方式中,在激活时可以产生促炎性信号的激活受体包括但不限于PI3K、Fc γ R1、Fc γ R2A、Fc γ R2B2、Fc γ R2C、Fc γ R3A、BAH、Tyro3、Axl、Traf6、Syk、MyD88、Zap70、Fc ϵ R1、Fc α R1、BAFF-R、DAP 12、NFAM1、MRC1、ItgB5、MERTK、ELMO和CD79b。

[0582] 如本文所使用的,术语“激活受体结合结构域”是指能够与免疫效应子细胞上的激活受体特异性结合的结构域(例如,抗体的一部分),并且这种结合导致受体的激活及其下游信号传导(例如,免疫细胞的效应子功能或促炎性应答)。例如,激活受体结合结构域包括抗体的Fc结构域或其变体。在某些实施方式中,Fc结构域可以源自IgG1或IgG4。

[0583] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子的激活受体结合结构域结合并激活选自自由以下组成的组的激活受体:可片段结晶的 γ 受体 (Fc γ R)、TREM2、凝集素、清道夫受体A1 (SRA1)、MARCO、CD36、CD163、CD68、CD205、CD206、FcDR1、CD207、CD209、RAGE、CD14、CD64、F4/80、CD64、CD32a、CD16a、CD89、CD19、CD28、CSFR、PDGFR、MSR1、SCARA3、COLEC12、SCARA5、SCARB1、SCARB2、dectin 1、RAGE (SR-EI)、LRP1、LRP2、ASGP、SR-PSOX、CXCL16、OLR1、SCARF1、SCARF2、CXCL16、STAB1、STAB2、SRCRB4D、SSC5D、CCR2、CX3CR1、CSF1R、Tie2、HuCRIg (L) 和CD169受体或补体受体 (如CR1和CR3)、PI3K、FcYR1、Fc γ R2A、Fc γ R2B2、Fc γ R2C、Fc γ R3A、BAH、Tyro3、Axl、Traf6、Syk、MyD88、Zap70、Fc ϵ R1、Fc α R1、BAFF-R、DAP 12、NFAM1、MRC1、ItgB5、MERTK、ELMO和CD79b。

[0584] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子的激活受体结合结构域包括Fc结构域或其变体,所述结构域或其变体激活巨噬细胞上的Fc受体 (FcR),如FcYRII。

[0585] 在某些实施方式中,激活受体结合结构域包括人IgG1 (hIgG1) 或人IgG4 (hIgG4) 的Fc结构域,所述结构域的重链恒定区分别如下所示:

[0586] a) 重链恒定区 (hIgG4.S228P), SEQ ID NO:155 (CH1区的序列用粗体和波浪下划线表示 (SEQ ID NO:228), 铰链区的序列用斜体表示 (SEQ ID NO:229), 并且Fc区的序列用下划线表示 (SEQ ID NO:230)):

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV*ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL*
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

[0588] b) 重链恒定区 (hIgG1), SEQ ID NO:156 (CH1区的序列用粗体和波浪下划线表示 (SEQ ID NO:231), 铰链区的序列用斜体表示 (SEQ ID NO:232), 并且Fc区的序列用下划线表示 (SEQ ID NO:233)):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV*EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS*
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0590] 本文所提供的多特异性分子还可以包括人轻链恒定区 (CL), 如 κ 链和 λ 链, 其氨基酸序列提供如下:

[0591] 轻链恒定区 (κ), SEQ ID NO:157:

[0592] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0593] 轻链恒定区 (λ), SEQ ID NO:158:

[0594] GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS

SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0595] v. 多特异性分子的构型

[0596] 在某些实施方式中,本文所提供的衔接子是包括贯穿本说明书描述的多个结合结构域的重组蛋白,其中所述多个结合结构域的每个结合结构域具有对SIRP α 、激活受体或靶抗原的特异性结合亲和力,并且通过一个或多个连接子彼此连接。所述一个或多个连接子可以具有展现出彼此互补结合的同源肽。例如,本文所提供的衔接子的SIRP α 结合结构域与一对同源肽中的第一同源肽融合,本文所提供的衔接子的靶抗原结合结构域与所述一对同源肽的第二同源肽融合;因此,SIRP α 结合结构域和靶抗原结合结构域可以通过所述一对同源肽中的每个同源肽之间的互补结合借助于所述一对同源肽来连接。

[0597] 在某些实施方式中,所述一对同源肽包括抗体或其任何互补部分的两条重链、抗体或其任何互补部分的彼此互补的一对轻链和重链、展现出彼此互补结合的亮氨酸拉链结构域(例如,c-Fos和c-June蛋白的结合区内的拉链序列)、或被设计成通过合成连接子彼此特异性结合的合成肽。

[0598] 本文所提供的衔接子的SIRP α 结合结构域、激活受体结合结构域和靶抗原结合结构域还可以通过化学结合来连接,如交联(例如,BS2G交联剂(戊二酸双[磺基琥珀酰亚胺基]酯)、BS3交联剂(双辛二酸[磺基琥珀酰亚胺基]酯)、磺基-DSS、DST交联剂(酒石酸二琥珀酰亚胺基酯)、BMPS(N-(B-马来酰亚胺丙氧基)琥珀酰亚胺酯;MBS交联剂(m-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯);或PDPH交联剂(3-[2-吡啶基二硫代]丙酰基酰肼))。

[0599] 在某些实施方式中,本文提供的多特异性分子被配置成使得SIRP α 结合结构域与激活受体结合结构域紧密接近,以允许本文提供的多特异性分子与在同一免疫效应子细胞上共表达的SIRP α 和激活受体两者结合。如本文所使用的,术语SIRP α 结合结构域与激活受体结合结构域之间的“紧密接近”是指从三维角度来看两个结构域之间的相对位置,其允许同一免疫效应子细胞上的两个结构域与分别在免疫效应子细胞上共表达的SIRP α 和激活受体结合。SIRP α 结合结构域和激活受体结合结构域分别与在同一免疫效应子细胞上共表达的SIRP α 和激活受体的特异性结合可以通过例如共焦显微镜、荧光共振能量转移(FRET)或单分子超分辨率显微镜来检测。

[0600] 本文提供的多特异性分子的靶抗原结合结构域可以包括与靶抗原结合的抗体结构域或抗体模拟结构域。术语“抗体结构域”和术语“抗体模拟结构域”如上定义。

[0601] 在某些实施方式中,靶抗原结合抗体结构域(例如,肿瘤抗原结合抗体结构域)与激活受体结合结构域(例如,Fc结构域)的N末端连接。在某些实施方式中,靶抗原结合抗体结构域(例如,肿瘤抗原结合抗体结构域)包括Fab结构域,任选地Fab结构域包括与激活受体结合结构域(例如,Fc结构域)的N末端之一连接的重链。在某些实施方式中,本文提供的多特异性分子包括两个靶抗原结合抗体结构域,所述两个靶抗原结合抗体结构域中的每个靶抗原结合抗体结构域包括Fab结构域,任选地所述Fab结构域中的每个Fab结构域分别包括与激活受体结合结构域(例如,Fc结构域)的每个N末端连接的重链。

[0602] 在某些实施方式中,SIRP α 结合结构域与激活受体结合结构域(例如,Fc结构域)连接或与靶抗原结合抗体结构域(例如,肿瘤抗原结合抗体结构域)连接。

[0603] 在某些实施方式中,SIRP α 结合结构域与激活受体结合结构域(例如,Fc结构域)的C末端连接。在此类实施方式中,本文提供的多特异性分子包括靶抗原结合抗体,其中

SIRP α 结合结构域与靶抗原结合抗体的Fc区的C末端连接。说明性实施方式可见于例如图2B、6F和6G。

[0604] 在某些实施方式中,靶抗原结合抗体结构域(例如,肿瘤抗原结合抗体结构域)和SIRP α 结合结构域两者与激活受体结合结构域(例如,Fc结构域)的N末端连接,条件是SIRP α 结合结构域和靶抗原结合抗体结构域(例如,肿瘤抗原结合抗体结构域)不与激活受体结合结构域(例如,Fc结构域)的同一N末端连接。说明性实施方式可见于例如图6E。

[0605] 在某些实施方式中,SIRP α 结合结构域与靶抗原结合结构域(例如,肿瘤抗原结合Fab结构域)的轻链的C末端连接。说明性实施方式可见于例如图2A。

[0606] 在本文所提供的多特异性分子包括两个靶抗原结合抗体结构域的情况下,SIRP α 结合结构域可以与两个靶抗原结合结构域(例如,肿瘤抗原结合Fab结构域)之一的轻链的C末端连接;SIRP α 结合结构域还可以与两个靶抗原结合结构域(例如,肿瘤抗原结合Fab结构域)两者的轻链的C末端连接。

[0607] 在某些其它实施方式中,SIRP α 结合抗体结构域与激活受体结合结构域(例如,Fc结构域)的N末端连接。在某些实施方式中,SIRP α 结合抗体结构域包括Fab结构域,任选地Fab结构域包括与激活受体结合结构域(例如,Fc结构域)的N末端之一连接的重链。在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括两个SIRP α 结合抗体结构域,所述两个SIRP α 结合抗体结构域中的每个SIRP α 结合抗体结构域包括Fab结构域,任选地所述Fab结构域中的每个Fab结构域分别包括与激活受体结合结构域(例如,Fc结构域)的每个N末端连接的重链。在此类实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括SIRP α 结合抗体。在这些实施方式中的某些实施方式中,靶抗原结合结构域(例如,肿瘤抗原结合结构域)与激活受体结合结构域(例如,Fc结构域)或与SIRP α 结合抗体结构域连接。

[0608] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括SIRP α 结合抗体,其中靶抗原结合结构域与SIRP α 结合抗体的Fc区的C末端连接(参见例如图2D、6B)或与SIRP α 结合抗体的轻链的C末端连接(参见例如图2C和6A)。

[0609] 在某些实施方式中,靶抗原结合结构域(例如,肿瘤抗原结合结构域)与SIRP α 结合Fab结构域的轻链的C末端连接。说明性实施方式可见于例如图6A。在某些实施方式中,靶抗原结合结构域(例如,肿瘤抗原结合结构域)与SIRP α 结合Fab结构域的重链或轻链的N末端连接。说明性实施方式可见于例如图6C和6D。

[0610] 如本文所使用的,术语“与...连接”是指两种组分之间的共价或非共价相互作用(例如,氢键、离子键、范德华(van der Waals)相互作用和疏水键)。

[0611] 下表7总结了本文所提供的多特异性分子的构型。

[0612] 表7:本文所提供的多特异性分子的构型

[0613]

BiME	结合结构域	形式	结合结构域所 源自的抗体	构型	构成 BiME 的多肽 链
ES028-001 (图 2A)	密封蛋白 18.2 结合结构域	抗体	源自 hu28.H1L2	抗密封蛋白 18.2 抗体的轻链中的 每个轻链的 C 末 端与两个抗 SIRP α scFv 中的每个抗 SIRP α scFv 的 N 末 端融合	第 1 链: VL (hu28.H1L2) -CL-连接子-scFv (C25); 第 2 链: VH (hu28.H1L2) -CH1-Fc
	SIRP α 结合结 构域	scFv	源自 C25		
ES028-005 (图 2B)	密封蛋白 18.2 结合结构域	抗体	源自 hu28.H1L2	抗密封蛋白 18.2 抗体的重链中的 每个重链的 C 末 端与两个抗 SIRP α scFv 中的每个抗 SIRP α scFv 的 N 末 端融合	第 1 链: VL (hu28.H1L2) -CL; 第 2 链: VH (hu28.H1L2) -CH1-Fc-连接子 -scFv (C25)
	SIRP α 结合结 构域	scFv	源自 C25		
ES028-009 (图 2C)	密封蛋白 18.2 结合结构域	scFv	源自 hu28.H1L2	抗 SIRP α 抗体的轻 链中的每个轻链 的 C 末端与两个 抗密封蛋白 18.2 scFv 中的每个抗	第 1 链: VL (C25) -CL-连 接子-scFv (hu28.H1L2);
	SIRP α 结合结 构域	抗体	源自 C25		

[0614]

				密封蛋白 18.2 scFv 的 N 末端融合	第 2 链: VH(C25)-CH1-Fc
ES028-013 (图 2D)	密封蛋白 18.2 结合结构域	scFv	源自 hu28.H1L2	抗 SIRP α 抗体的重链中的每个重链的 C 末端与两个抗密封蛋白 18.2 scFv 中的每个抗密封蛋白 18.2 scFv 的 N 末端融合	第 1 链: VL(C25)-CL; 第 2 链: VH(C25)-CH1-Fc-连接子-scFv(hu28.H1L2)
	SIRP α 结合结构域	抗体	源自 C25		
ES019-020 (图 6A)	PD-L1 结合结构域	sdAb	源自 C71	抗 SIRP α 抗体的轻链中的每个轻链的 C 末端与两个抗 PDL1 sdAb 中的每个抗 PDL1 sdAb 的 N 末端融合	第 1 链: VL(C25)-CL-连接子-sdAb(C71); 第 2 链: VH(C25)-CH1-Fc
	SIRP α 结合结构域	抗体	源自 C25		
ES019-024 (图 6B)	PD-L1 结合结构域	sdAb	源自 C71	抗 SIRP α 抗体的重链中的每个重链的 C 末端与两个抗 PDL1 sdAb 中的每个抗 PDL1 sdAb 的 N 末端融合	第 1 链: VL(C25)-CL; 第 2 链: VH(C25)-CH1-Fc-连接子-sdAb(C71)
	SIRP α 结合结构域	抗体	源自 C25		
ES019-025 (图 6C)	PD-L1 结合结构域	sdAb	源自 C71	抗 SIRP α 抗体的重链中的每个重链的 N 末端与两个抗 PDL1 sdAb 中的每个抗 PDL1 sdAb 的 C 末端融合	第 1 链: VL(C25)-CL; 第 2 链: sdAb(C71)-连接子-VH(C25)-CH1-Fc
	SIRP α 结合结构域	抗体	源自 C25		
ES019-026 (图 6D)	PD-L1 结合结构域	sdAb	源自 C71	抗 SIRP α 抗体的轻链中的每个轻链的 N 末端与两个抗 PDL1 sdAb 中的每个抗 PDL1 sdAb 的 C 末端融合	第 1 链: sdAb(C71)-连接子-VL(C25)-CL; 第 2 链: VH(C25)-CH1-Fc
	SIRP α 结合结构域	抗体	源自 C25		
ES019-029 (图 6E)	PD-L1 结合结构域	sdAb	源自 C71	一种不对称抗体, 其具有靶向 SIRP α 的一个 Fab 臂以及含有两个抗 PDL1 sdAb 的另一个臂;	第 1 链: sdAb(C71)-连接子-sdAb(C71)-连接子-Fc;
	SIRP α 结合结构域	具有一个 Fab 臂的不	源自 C25		

[0615]

		对称抗体		异质二聚体通过Fc区中的杵臼突变连接	第2链: VH (C25) -CH1-Fc; 第3链: VL (C25) -CL
ES019-072 (图 6F)	PD-L1 结合结构域	sdAb	源自 C71	一种不对称抗体, 其中两个抗 PDL1 sdAb 的 C 末端与 Fc 的 N 末端融合, 并且一个抗 SIRP α Fab 的 N 末端与 Fc 的 C 末端融合; 异质二聚体通过 Fc 区中的杵臼突变连接	第1链: sdAb (C71) -连接 子- -Fc; 第2链: sdAb (C71) -连接 子-Fc-VH (C25) -CH1; 第3链: VL (C25) -CL
	SIRP α 结合结构域	Fab	源自 C25		
ES019-073 (图 6G)	PD-L1 结合结构域	sdAb	源自 C71	一种不对称抗体, 其中两个抗 PDL1 sdAb 的 C 末端与 Fc 的 N 末端融合, 并且两个抗 SIRP α Fab 的 N 末端与 Fc 的 C 末端融合	第1链: VL (C25) -CL; 第2链: sdAb (C71) -连接 子-Fc-VH (C25) -CH1
	SIRP α 结合结构域	Fab	源自 C25		
ES019-079 (图 6G)	PD-L1 结合结构域	sdAb	源自 C570	一种不对称抗体, 其中两个抗 PDL1 sdAb 的 C 末端与 Fc 的 N 末端融合, 并且两个抗 SIRP α Fab 的 N 末端与 Fc 的 C 末端融合	第1链: VL (C25) -CL; 第2链: sdAb (C570) -连接 子-Fc-VH (C25) -CH1
	SIRP α 结合结构域	Fab	源自 C25		

[0616] B. 多特异性分子

[0617] 在某些实施方式中, 本文所提供的多特异性分子包括本文所提供的SIRP α 结合结构域、包括Fc结构域的本文所提供的激活受体结合结构域和本文所提供的靶抗原结合结构域。

[0618] 本文所提供的多特异性分子可以呈任何合适的形式。提供如下说明性实施例。在某些实施方式中, 本文所提供的多特异性分子包括靶抗原结合抗体, 所述靶抗原结合抗体包括两条重链和两条轻链, 其中轻链中的每条轻链的C末端与抗SIRP α scFv (即, SIRP α 结合结构域) 融合。所述靶抗原结合抗体包括所述靶抗原结合结构域和Fc结构域。图2A示出了说明性实施例。

[0619] 在某些实施方式中, 本文所提供的多特异性分子包括靶抗原结合抗体, 所述靶抗原结合抗体包括两条重链和两条轻链, 其中重链中的每条重链的C末端与抗SIRP α scFv (即, SIRP α 结合结构域) 融合。所述靶抗原结合抗体包括所述靶抗原结合结构域和Fc结构域。图2B示出了说明性实施例。

[0620] 在某些实施方式中, 本文所提供的多特异性分子包括抗SIRP α 抗体, 所述抗SIRP α 抗体包括两条重链和两条轻链, 其中轻链中的每条轻链的C末端与能够与靶抗原 (即, 靶抗

原结合结构域)结合的scFv融合。所述抗SIRP α 抗体包括所述SIRP α 结合结构域和Fc结构域。图2C示出了说明性实施例。

[0621] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括抗SIRP α 抗体,所述抗SIRP α 抗体包括两条重链和两条轻链,其中重链中的每条重链的C末端与能够与靶抗原(即,靶抗原结合结构域)结合的scFv融合。所述抗SIRP α 抗体包括所述SIRP α 结合结构域和Fc结构域。图2D示出了说明性实施例。

[0622] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括抗SIRP α 抗体,所述抗SIRP α 抗体包括两条重链和两条轻链,其中轻链中的每条轻链的C末端与能够与靶抗原(即,靶抗原结合结构域)结合的单结构域抗体(sdAb)融合。所述抗SIRP α 抗体包括所述SIRP α 结合结构域和Fc结构域。图6A示出了说明性实施例。

[0623] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括抗SIRP α 抗体,所述抗SIRP α 抗体包括两条重链和两条轻链,其中重链中的每条重链的C末端与能够与靶抗原(即,靶抗原结合结构域)结合的单结构域抗体(sdAb)融合。所述抗SIRP α 抗体包括所述SIRP α 结合结构域和Fc结构域。图6B示出了说明性实施例。

[0624] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括抗SIRP α 抗体,所述抗SIRP α 抗体包括两条重链和两条轻链,其中重链中的每条重链的N末端与能够与靶抗原(即,靶抗原结合结构域)结合的单结构域抗体(sdAb)融合。所述抗SIRP α 抗体包括所述SIRP α 结合结构域和Fc结构域。图6C示出了说明性实施例。

[0625] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括抗SIRP α 抗体,所述抗SIRP α 抗体包括两条重链和两条轻链,其中轻链中的每条轻链的N末端与能够与靶抗原(即,靶抗原结合结构域)结合的单结构域抗体(sdAb)融合。所述抗SIRP α 抗体包括所述SIRP α 结合结构域和Fc结构域。图6D示出了说明性实施例。

[0626] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括能够分别与靶抗原结合的抗SIRP α 结合结构域(例如,Fab)和单结构域抗体(sdAb),所述抗SIRP α 结合结构域和单结构域抗体各自与所述Fc结构域的多肽链的N末端融合。图6E示出了说明性实施例。

[0627] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括两条重链,所述两条重链各自包括与所述Fc结构域的多肽链的N末端融合的能够与靶抗原结合的单结构域抗体(sdAb),并且进一步包括与所述Fc结构域的所述多肽链之一的C末端融合的至少一个抗SIRP α 结合结构域。在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括与所述Fc结构域的所述多肽链之一的C末端融合的一个抗SIRP α 结合结构域。图6F示出了说明性实施例。

[0628] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括两个抗SIRP α 结合结构域,所述两个抗SIRP α 结合结构域各自与所述Fc结构域的所述多肽链之一的C末端融合。图6G示出了说明性实施例。

[0629] 在这些实施方式中的某些实施方式中,所述靶结合结构域是密封蛋白18.2结合结构域或PD-L1结合结构域。

[0630] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括包含SEQ ID NO:23-64(源自C25、hu025.021、hu025.033、hu025.023、hu025.059、hu025.060、C15、C42、C59和C73)的一个或多个(例如,1个、2个、3个、4个、5个或6个)CDR序列的SIRP α 结合结构域、包含SEQ ID NO:77-106和225(源自hu26.H1L1、hu26.H1L2、hu26.H1L2(S92A)、hu26.H3L1、hu26.H3L2、

hu28.H1L2、C10、C29和C30)的一个或多个(例如,1个、2个、3个、4个、5个或6个)CDR序列的密封蛋白18.2结合结构域和/或包含SEQ ID NO:119-154和223(源自C71、C71v38、C239、C492、C570、570h3、C446、C2811、C1778、C1793、C2855、C2713和C2719)的一个或多个(例如,1个、2个、3个、4个、5个或6个)CDR序列的PD-L1结合结构域。

[0631] 在某些实施方式中,SIRP α /密封蛋白18.2/PD-L1结合结构域包括抗体结构域或抗体模拟结构域。在某些实施方式中,抗体结构域选自自由以下组成的组:Fab、VHH、单链Fv(scFv)、双功能抗体、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv片段、二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双功能抗体(ds双功能抗体)、F(ab)₂、scFv二聚体(二价双功能抗体)、骆驼化单结构域抗体(adAb)、纳米抗体、四功能抗体、结构域抗体或二价结构域抗体。在某些实施方式中,抗体模拟结构域选自自由以下组成的组:胞内抗体(例如,纤连蛋白结构域)、单体、线性肽、蛋白A的Z结构域(亲和体)、 γ -B结晶结构域、泛素结构域、胱抑素结构域、Sac7d结构域、三螺旋卷曲螺旋结构域、脂质运载蛋白结构域、膜受体的A结构域、锚蛋白重复基序、Fyn的SH3结构域、蛋白酶抑制剂的库尼兹结构域、纤连蛋白的III型结构域(微型抗体)、DARPin结构域、碳水化合物结合模块32-2。

[0632] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子包括:

[0633] a) SIRP α 结合结构域,所述SIRP α 结合结构域包括:

[0634] 包含SEQ ID NO:23的序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:24的序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:25的序列的重链CDR3;和/或包含SEQ ID NO:26的序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:27的序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:28的序列的轻链CDR3;

[0635] b) 密封蛋白18.2结合结构域,所述密封蛋白18.2结合结构域包括:

[0636] i) 包含SEQ ID NO:83的序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:84的序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:85的序列的重链CDR3,和/或包含SEQ ID NO:86的序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:87的序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:88的序列的轻链CDR3;或

[0637] ii) 包含SEQ ID NO:77的序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:78的序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:79的序列的重链CDR3,和/或包含SEQ ID NO:80的序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:81的序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:223的序列的轻链CDR3;和/或

[0638] c) PD-L1结合结构域,所述PD-L1结合结构域包括:

[0639] i) 包含SEQ ID NO:119的序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:120的序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:121的序列的重链CDR3;或

[0640] ii) 包含SEQ ID NO:131的序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:132的序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:133的序列的重链CDR3。

[0641] 在某些实施方式中,SIRP α 结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括选自自由SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19和21组成的组的序列或与其具有至少80%序列同一性但仍保留对SIRP α (例如,人SIRP α)的特异性结合亲和力的同源序列;和/或轻链可变区,所述轻链可变区包括选自自由SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20和22组成的组的序列或与其具有至少80%序列同一性但仍保留对SIRP α (例如,人SIRP α)的特异性结合亲和力的同源序列。

[0642] 在某些实施方式中,SIRP α 结合结构域包括抗SIRP α scFv。在某些实施方式中,scFv从N末端到C末端包括任选地通过连接子(例如,多肽连接子)与轻链可变区连接的重链可变

区。可替代地,在某些实施方式中,scFv从N末端到C末端包括任选地通过连接子(例如,多肽连接子)与重链可变区连接的轻链可变区。在某些实施方式中,抗SIRP α scFv包括SEQ ID NO:226的氨基酸序列。

[0643] 在某些实施方式中,密封蛋白18.2结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:65、68、69、71、73和75组成的组的序列或与其具有至少80%序列同一性但仍保留对密封蛋白18.2(例如,人密封蛋白18.2)的特异性结合亲和力的同源序列;和/或轻链可变区,所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:66、67、70、72、74、76和224组成的组的序列或与其具有至少80%序列同一性但仍保留对密封蛋白18.2(例如,人密封蛋白18.2)的特异性结合亲和力的同源序列。

[0644] 在某些实施方式中,密封蛋白18.2结合结构域包括抗密封蛋白18.2scFv。在某些实施方式中,scFv从N末端到C末端包括任选地通过连接子(例如,多肽连接子)与轻链可变区连接的重链可变区。可替代地,在某些实施方式中,scFv从N末端到C末端包括任选地通过连接子(例如,多肽连接子)与重链可变区连接的轻链可变区。在某些实施方式中,抗密封蛋白18.2scFv包括SEQ ID NO:227的氨基酸序列。

[0645] 在某些实施方式中,PD-L1结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:107-118和223组成的组的序列或与其具有至少80%序列同一性但仍保留对PD-L1(例如,人PD-L1)的特异性结合亲和力的同源序列。

[0646] 各种技术可以用于产生此类抗原结合结构域。说明性方法包括完整抗体的酶消化(参见例如,Morimoto等人,《生物化学与生物物理方法杂志(Journal of Biochemical and Biophysical Methods)》24:107-117(1992);以及Brennan等人,《科学》,229:81(1985))、通过如大肠杆菌(E.Coli)等宿主细胞进行的重组表达(例如,对于Fab、Fv和ScFv抗体片段)以及如上文讨论的从噬菌体展示文库筛选(例如,对于ScFv)。用于产生抗体片段的其它技术对熟练的从业者来说将是显而易见的。

[0647] 在某些实施方式中,SIRP α 结合结构域和/或密封蛋白18.2结合结构域是或包括scFv或Fab。在以下文献中描述了scFv的产生:例如WO 93/16185;美国专利第5,571,894号;以及第5,587,458号。scFv可以在氨基端或羧基末端与效应子蛋白融合以提供融合蛋白(参见例如,《抗体工程(Antibody Engineering)》,Borrebaeck编辑)。scFv可以包括与VL直接连接或通过肽连接子连接的VH。在某些实施方式中,VH可以位于scFv的N末端处并且VL可以位于C末端处。在某些实施方式中,VL可以位于scFv的N末端并且VH可以位于C末端处。

[0648] 在某些实施方式中,SIRP α 结合结构域、靶抗原结合结构域(例如,密封蛋白18.2结合结构域/PD-L1结合结构域)和激活受体结合结构域通过肽连接子连接。肽连接子可以包括由苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸构成的单个或重复序列,如TGGGG(SEQ ID NO:183)、GGGGS(SEQ ID NO:184)、GGGSGGGGS(SEQ ID NO:185)、(Gly4Ser)₃(SEQ ID NO:186)或SGGGG(SEQ ID NO:187)或其串联重复序列(例如,2个、3个、4个或更多个重复序列)。在某些实施方式中,肽连接子包括GGGSGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:34)。在某些实施方式中,肽连接子包括或是(Gly4Ser)₃(SEQ ID NO:186)。

[0649] C. 多特异性分子的表征

[0650] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子能够与人SIRP α 和表达CD47的细胞表面标志物(例如,在表达CD47的细胞的表面上表达的人密封蛋白18.2或PD-L1)两者特

异性结合。本文所提供的多特异性分子保留对人SIRP α 和人密封蛋白18.2/人PD-L1两者的特异性结合亲和力,在某些实施方式中,在所述方面至少与亲本抗体相当或者甚至更好。

[0651] 多特异性分子的结合可以由“半最大有效浓度”(EC₅₀)值表示,所述值是指观察到抗体的最大效应(例如,结合或抑制等)的50%的抗体的浓度。EC₅₀值可以通过本领域已知的方法,例如夹心测定,如ELISA、蛋白质印迹、流式细胞测量测定和其它结合测定来测量。

[0652] 本文所提供的抗原结合结构域的结合亲和力还可以由K_D值表示,其代表当抗原与抗原结合分子之间的结合达到平衡时解离速率与缔合速率的比率(k_{off}/k_{on})。可以使用本领域已知的合适方法(包括例如流式细胞术测定)适当地确定抗原结合亲和力(例如,K_D)。在一些实施方式中,抗原结合结构域与不同浓度的抗原的结合可以通过流式细胞术来确定,所确定的平均荧光强度(MFI)可以首先针对抗原结合结构域的浓度作图,然后可以通过将特异性结合荧光强度(Y)和抗体浓度(X)的依赖性拟合到一个位点饱和方程中来计算K_D值: $Y = B_{\max} * X / (K_D + X)$,使用Prism版本5(加利福尼亚州圣地亚哥的GraphPad软件(GraphPad Software, San Diego, CA)),其中B_{max}是指所测试的抗原结合结构域与抗原的最大特异性结合。

[0653] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子以不超过以下的结合亲和力(K_D)与人SIRP α 特异性结合: $25 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $20 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $15 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $12 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $10 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $9 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $8 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $7 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $6 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $4 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $3 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $2 \times 10^{-8} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-8} \text{M}$,如通过Octet测定所测量的。

[0654] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子以不超过 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 的结合亲和力(K_D)与人密封蛋白18.2特异性结合,如通过Octet测定所测量的。

[0655] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子以不超过以下的结合亲和力(K_D)与人PD-L1特异性结合: $70 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $65 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $60 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $55 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $50 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $45 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $40 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $35 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $30 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $25 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $20 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $15 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $12 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $10 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $9 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $8 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $7 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $6 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $4 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $3 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $2 \times 10^{-8} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-8} \text{M}$,如通过Octet测定所测量的。

[0656] 本文所提供的多特异性分子对CD47和SIRP α 相互作用或PD-1和PD-L1相互作用的阻断作用可以通过各种技术如荧光素酶报告基因测定、竞争性ELISA测定和竞争性FACS测定来测量,其可以在IC₅₀中表达。用于阻断CD47和SIRP α 相互作用的IC₅₀表示本文所提供的多特异性分子的浓度,在所述浓度下,在存在本公开的多特异性分子的情况下,CD47与SIRP α 的结合降低了50%。用于阻断PD-1和PD-L1相互作用的IC₅₀表示本文所提供的多特异性分子的浓度,在所述浓度下,在存在本公开的多特异性分子的情况下,PD-1与PD-L1的结合降低了50%。在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子的用于阻断PD-1和PD-L1相互作用的IC₅₀与抗PD-1C71的IC₅₀相当。

[0657] 在某些实施方式中,本文所提供的SIRP α 结合结构域的用于阻断SIRP α 和CD47相互作用的IC₅₀值不超过6.0nM、5.0nM、4.0nM、3.80nM、3.60nM、3.0nM、2.90nM、2.88nM、2.86nM、2.80nM、2.78nM、2.76nM、2.74nM、2.70nM、2.64nM、2.40nM、2.20nM、2.0nM、1.0nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.18nM、0.16nM、0.14nM、0.12nM,如通过竞争性ELISA测定或竞争性FACS测定所测量的。在某些实施方式中,本文所提供的SIRP α 结合结构域的用于阻断SHP-1募集的IC₅₀值不超过6.0nM、不超过5.0nM、不超过4.0nM、不超过3.80nM、不超过3.60nM、不超过

3.0nM、不超过2.90nM、不超过2.88nM、不超过2.86nM、不超过2.80nM、不超过2.78nM、不超过2.76nM、不超过2.74nM、不超过2.70nM、不超过2.64nM、不超过2.40nM、不超过2.20nM、不超过2.0nM、不超过1.0nM、不超过0.4nM、不超过0.3nM、不超过0.2nM、不超过0.18nM、不超过0.16nM、不超过0.14nM、不超过0.12nM、不超过0.10nM、不超过0.09nM、不超过0.08nM或不超过0.07nM,如通过竞争性ELISA测定或竞争性FACS测定所测量的。

[0658] D. 变体

[0659] 本文所提供的多特异性分子还涵盖其各种变体。在某些实施方式中,变体包括如表2、4和6中提供的一个或多个CDR序列、表1、3和5中提供的一个或多个可变区序列(但在任何CDR序列中)和/或恒定区(例如,Fc区)中的一个或多个修饰或取代。此类变体保留其亲本抗体对SIRP α 、密封蛋白18.2和/或PD-L1的特异性结合亲和力,但具有由修饰或取代赋予的一个或多个令人期望的性质。例如,变体可以具有改善的抗原结合亲和力、改善的生产力、改善的稳定性、改善的糖基化模式、降低的糖基化风险、减少的脱氨基作用、减少或耗竭的效应子功能、改善的FcR γ 受体结合、增加的药代动力学半衰期、pH敏感性和/或与缀合的相容性(例如,一个或多个引入的半胱氨酸残基)。

[0660] 可以使用本领域已知的方法,例如“丙氨酸扫描诱变”,筛选亲本抗体序列以鉴定合适的或优选的待修饰或取代的残基(参见例如Cunningham和Wells (1989)《科学》,244:1081-1085)。简而言之,可以鉴定靶残基(例如,带电的残基,如Arg、Asp、His、Lys和Glu)并由中性或带负电的氨基酸(例如,丙氨酸或聚丙氨酸)替代,并且产生经修饰的抗体,并且针对所关注性质对其进行筛选。如果在特定氨基酸位置处的取代表现出所关注功能变化,则所述位置可以被鉴定为进行修饰或取代的潜在残基。可以通过用不同类型的残基(例如,半胱氨酸残基、带正电的残基等)取代来进一步评估潜在残基。

[0661] 在某些实施方式中,本文所提供的SIRP α 结合结构域、密封蛋白18.2结合结构域和/或PD-L1结合结构域包括一个或多个CDR序列和/或一个或多个FR序列和/或一个或多个可变区序列中的一个或多个氨基酸残基取代。在某些实施方式中,变体包括CDR序列和/或FR序列和/或一个或多个可变区序列中总共不超过10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个取代。

[0662] 在某些实施方式中,SIRP α 结合结构域包括1个、2个、3个、4个、5个或6个CDR序列,所述序列与选自SEQ ID NO:23-64和198的1个、2个、3个、4个、5个或6个序列具有至少80%(例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)序列同一性,并且同时以相对于其亲本抗体而言类似或甚至更高的水平保留了对SIRP α 的结合亲和力。

[0663] 在某些实施方式中,SIRP α 结合结构域包括一个或多个可变区序列,所述一个或多个可变区序列与选自SEQ ID NO:1-22的一个或多个序列具有至少80%(例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)序列同一性,并且同时以相对于其亲本抗体而言类似或甚至更高的水平保留了对SIRP α 的结合亲和力。在一些实施方式中,在选自SEQ ID NO:1-22的可变区序列中已经取代、插入或缺失总共1到10个氨基酸。在一些实施方式中,取代、插入或缺失发生在CDR之外的区中(例如,在FR中)。

[0664] 在某些实施方式中,密封蛋白18.2结合结构域包括1个、2个、3个、4个、5个或6个CDR序列,所述序列与选自SEQ ID NO:77-106和225的1个、2个、3个、4个、5个或6个序列具有

至少80% (例如, 至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性, 并且同时以相对于其亲本抗体而言类似或甚至更高的水平保留了对密封蛋白18.2的结合亲和力。

[0665] 在某些实施方式中, 密封蛋白18.2结合结构域包括一个或多个可变区序列, 所述一个或多个可变区序列与选自SEQ ID NO:65-76和224的一个或多个序列具有至少80% (例如, 至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性, 并且同时以相对于其亲本抗体而言类似或甚至更高的水平保留了对密封蛋白18.2的结合亲和力。在一些实施方式中, 在选自SEQ ID NO:65-76和224的可变区序列中取代、插入或缺失总共1到10个氨基酸。在一些实施方式中, 取代、插入或缺失发生在CDR之外的区中 (例如, 在FR中)。

[0666] 在某些实施方式中, PD-L1结合结构域包括1个、2个或3个CDR序列, 所述序列与选自SEQ ID NO:119-154的1个、2个或3个序列具有至少80% (例如, 至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性, 并且同时以相对于其亲本抗体而言类似或甚至更高的水平保留了对PD-L1的结合亲和力。

[0667] 在某些实施方式中, PD-L1结合结构域包括一个或多个可变区序列, 所述一个或多个可变区序列与选自SEQ ID NO:107-118和223的一个或多个序列具有至少80% (例如, 至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性, 并且同时以相对于其亲本抗体而言类似或甚至更高的水平保留了对PD-L1的结合亲和力。在一些实施方式中, 在选自SEQ ID NO:107-118和223的可变区序列中取代、插入或缺失总共1到10个氨基酸。在一些实施方式中, 取代、插入或缺失发生在CDR之外的区中 (例如, 在FR中)。

[0668] i. 糖基化变体

[0669] 本文所提供的多特异性分子还涵盖糖基化变体, 可以获得所述糖基化变体以增加或减少多特异性分子的抗原结合结构域或激活受体结构域的糖基化程度。

[0670] 本文所提供的多特异性分子可以包括具有侧链的一个或多个氨基酸残基, 碳水化合物部分 (例如, 寡糖结构) 可以连接到所述侧链。抗体抗原结合结构域的糖基化通常是N-连接或O-连接。N连接是指碳水化合物部分连接到天冬酰胺残基 (例如, 如天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸等三肽序列中的天冬酰胺残基) 的侧链, 其中X是除了脯氨酸之外的任何氨基酸。O连接糖基化是指将糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一与羟基氨基酸连接, 最常见的是与丝氨酸或苏氨酸连接。可以很方便地去除天然糖基化位点, 例如通过改变氨基酸序列, 使得存在于所述序列中的上述三肽序列 (对于N连接糖基化位点) 或者丝氨酸或苏氨酸残基 (对于O连接糖基化位点) 中的一者被取代。可以通过引入此类三肽序列或者丝氨酸或苏氨酸残基以类似的方式产生新的糖基化位点。

[0671] ii. 半胱氨酸工程化变体

[0672] 本文所提供的多特异性分子还涵盖半胱氨酸工程化变体, 所述变体包括一个或多个引入的游离半胱氨酸氨基酸残基。

[0673] 游离半胱氨酸残基不是二硫键的一部分。半胱氨酸工程化变体可用于通过例如马来酰亚胺或卤代乙酰基在经工程化半胱氨酸的位点处与例如细胞毒性化合物和/或成像化合物、标记或放射性同位素等缀合。用于工程化抗体多肽以引入游离半胱氨酸残基的方法是本领域已知的, 参见例如W02006/034488。

[0674] iii.Fc变体

[0675] 本文所提供的多特异性分子还涵盖Fc变体,所述Fc变体包括在其Fc区和/或铰链区处的一个或多个氨基酸残基修饰或取代,例如以提供改变的效应子功能,如ADCC,ADCP和CDC。在本领域中已经描述了通过抗体工程化改变ADCC活性的方法,参见例如ShieldsRL.等人,《生物化学杂志(J Biol Chem.)》2001,276(9):6591-604;Idusogie EE.等人,《免疫学杂志》2000,164(8):4178-84;Steurer W.等人,《免疫学杂志》1995,155(3):1165-74;Idusogie EE.等人,《免疫学杂志》2001,166(4):2571-5;Lazar GA.等人,《美国国家科学院院刊》,2006,103(11):4005-4010;Ryan MC.等人,《分子癌症治疗学(Mol.Cancer Ther.)》,2007,6:3009-3018;Richards JO,.等人,《分子癌症治疗学》2008,7(8):2517-27;Shields R.L.等人,《生物化学杂志》,2002,277:26733-26740;Shinkawa T.等人,《生物化学杂志》,2003,278:3466-3473。

[0676] 本文所提供的抗体的CDC活性也可以例如通过改善或减少C1q结合和/或CDC来改变(参见例如W099/51642;Duncan和Winter《自然》322:738-40(1988);美国专利第5,648,260号;美国专利第5,624,821号);以及关于Fc区变体的其它实例的W094/29351。可以将选自Fc区的氨基酸残基329、331和322的一个或多个氨基酸替换为不同的氨基酸残基,以改变C1q结合和/或减少或消除补体依赖性细胞毒性(CDC)(参见Idusogie等人的美国专利第6,194,551号)。也可以引入一个或多个氨基酸取代,以改变抗体固定补体的能力(参见Bodmer等人的PCT公开W0 94/29351)。

[0677] 术语“抗体依赖性细胞吞噬作用”和“ADCP”是指一种过程,抗体包被的细胞或颗粒通过所述过程通过与免疫球蛋白Fc区结合的吞噬免疫细胞(例如,巨噬细胞、嗜中性粒细胞和树突状细胞)全部或部分地内化。通过抗体工程化改变抗体的ADCP活性的方法是本领域已知的,参见例如,Kellner C等人,《输血医学和血液疗法(Transfus Med Hemother)》,(2017)44:327-336和Chung AW等人,《艾滋病(AIDS)》,(2014)28:2523-2530。Fc变体的实例是本领域已知的,参见例如,Wang等人,《蛋白质细胞(Protein Cell)》2018,9(1):63-73和Kang等人,《实验与分子医学(Exp&Mol.,Med.)》(2019)51:138,所述文献以其整体并入本文。

[0678] i) 具有增强的效应子功能的Fc变体

[0679] 在某些实施方式中,本文所提供的Fc变体相对于野生型Fc(例如,IgG1的Fc)具有增加的ADCC和/或增加的对Fc γ 受体(例如,Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)和/或Fc γ RIII(CD16))的亲和力。在某些实施方式中,Fc变体包括以下位置中的一个或多个位置处的一个或多个氨基酸取代:Fc区的234、235、236、238、239、240、241、243、244、245、246、247、248、249、252、254、255、256、258、260、262、263、264、265、267、268、269、270、272、274、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、299、300、301、303、304、305、307、309、312、313、315、320、322、324、325、326、327、329、330、331、332、333、334、335、337、338、339、340、345、360、373、376、378、382、388、389、396、398、414、416、419、430、433、434、435、436、437、438、439和440(参见Presta的W0 00/42072、Lazar的W02006/019447和W02016/196228,所述文献以其整体并入本文),其中Fc区中的残基的编号是如Kabat中的EU索引的编号(参见,Kabat E.A.等人,《具有免疫学意义的蛋白质序列(Sequences of Proteins of immunological Interest)》,第5版马里兰州贝塞斯达的国立卫生研究院,(1991))。增加的

效应子功能的示例性取代包括但不限于234Y、235Q、236A、236W、239D、239E、239M、243L、247I、268D、267E、268D、268E、268F、270E、280H、290S、292P、298A、298D、298V、300L、305I、324T、326A、326D、326W、330L、330M、333S、332D、332E、298A、333A、334A、334E、326A、247I、339D、339Q、345R、280H、290S、298D、298V、243L、292P、300L、396L、305I、396L、430G、440Y或其任何组合(如239D/332E、239D/332E/330L、236A/332E、236A/239D/332E、268F/324T、267E/268F、267E/324T和267E/268F/324T)(参见,W02016/196228;Richards等人(2008)《分子癌症治疗学》7:2517;Moore等人(2010)《单克隆抗体》2:181;和Strohl(2009),《生物技术当前述评(Current Opinion in Biotechnology)》20:685-691)。

[0680] 示出位置256、290、298、333、334和339处的特异性突变以改善与Fc γ RIII的结合。另外,示出以下组合突变体以改善Fc γ RIII结合:一条重链中的T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224A、F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L、S298A/E333A/K334A和L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A和相对的重链中的D270E/K326D/A330M/K334E(具有增强的Fc γ RIII结合和ADCC活性)。具有与Fc γ RIIIa的强烈增强的结合的其它Fc变体包括具有S239D/I332E和S239D/I332E/A330L突变的变体(其示出对Fc γ RIIIa亲和力的最大增加、对Fc γ RIIb结合的降低和强细胞毒性活性)以及具有L235V、F243L、R292P、Y300L、V305I和P396L突变的变体(其展现出增强的Fc γ RIIIa和伴随增强的ADCC活性)。(参见Lazar等人(2006)《美国国家科学院院刊》103:4005;Awan等人(2010)《血液(Blood)》115:1204;Desjarlais和Lazar(2011)《实验细胞研究(Exp. Cell Res)》;Stavenhagen等人(2007)《癌症研究(Cancer Res)》67:8882)。可以引入增加与C1q结合的修饰以便增强CDC活性。示例性修饰包括IgG2中的K326(例如,K326W)和/或E333修饰、或IgG1中的单独或组合的S267E/H268F/S324T修饰(参见Idusogie等人(2001)《免疫学杂志》166:2571;Moore等人(2010)《单克隆抗体》2:181)。其它示例性修饰包括K326W/E333S、S267E/H268F/S324T和E345R/E430G/S440Y。

[0681] ii) 具有降低的效应子功能的Fc

[0682] 在某些实施方式中,本文所提供的Fc变体相对于野生型Fc(例如,IgG1的Fc)具有降低的效应子功能,并且包括选自由以下组成的组的位置处的一个或多个氨基酸取代:Fc区的220、226、229、233、234、235、236、237、238、267、268、269、270、297、309、318、320、322、325、328、329、330和331(参见W02016/196228;Richards等人(2008)《分子癌症治疗学》7:2517;Moore等人(2010)《单克隆抗体》2:181;和Strohl(2009)《生物技术当前述评》20:685-691),其中Fc区中的残基的编号是如Kabat中的EU索引的编号。降低的效应子功能的示例性取代包括但不限于220S、226S、228P、229S、233P、234V、234G、234A、234F、234A、235A、235G、235E、236E、236R、237A、237K、238S、267R、268A、268Q、269R、297A、297Q、297G、309L、318A、322A、325L、328R、330S、331S或其任何组合(参见W02016/196228;和Strohl(2009),《生物技术当前述评》20:685-691)。

[0683] 在某些实施方式中,本文所提供的Fc变体是IgG1同种型,并且包括选自由以下组成的组的一个或多个氨基酸取代:L234A、L234F、L234V、F234A、V234A、L235A、L235E、G237A、P238S、H268Q、H268A、N297A、N297Q、N297G、V309L、A330S和P331S或其任何组合(如L234A/L235A)。在某些实施方式中,本文所提供的Fc变体是IgG2同种型,并且包括选自由以下组成的组的一个或多个氨基酸取代:H268Q、V309L、A330S、P331S、V234A、G237A、P238S、H268A和

其任何组合。在某些实施方式中,本文所提供的Fc变体是IgG4同种型,并且包括选自以下组成的组的一个或多个氨基酸取代:S228P、F234A、L235E、L235A、G237A、E318A、N297A、N297Q、N297G和其任何组合。

[0684] iii) 具有与FcRn的改变的结合的Fc

[0685] 在某些实施方式中,Fc变体包括在pH 6.0下改善与新生儿Fc受体 (FcRn) 的结合亲和力和同时在pH 7.4下保留最小结合的一个或多个氨基酸取代。这种变体可以具有延长的药代动力学半衰期,因为所述变体在酸性pH下与FcRn结合,使其得以免于在溶酶体中降解,并且然后被转移并释放到细胞外。工程化抗体和其抗原结合片段以提高与FcRn的结合亲和力的方法是本领域众所周知的,参见例如Vaughn, D. 等人,《结构 (Structure) 》,6(1):63-73,1998;Kontermann, R. 等人,《抗体工程化 (Antibody Engineering) 》,第1卷,第27章:将Fc区工程化以改善PK (Engineering of the Fc region for improved PK),由施普林格 (Springer) 出版,2010年;Yeung, Y. 等人,《癌症研究》,70:3269-3277 (2010);Hinton, P. 等人,《免疫学杂志》,176:346-356 (2006);Petkova等人 (2006)《国际免疫学 (Int. Immunol.) 》18:1759;Ball Acqua等人《免疫学杂志》2002,169:5171-5180;Dall'AcquaWF. 等人,《生物化学杂志》281:23514-23524 (2006);Zalevsky J等人,《自然生物技术 (Nat Biotechnol.) 》;28:157-159 (2010);WO 2009/086320;US 6,277,375;US 6,821,505;WO 97/34631;和WO 2002/060919。

[0686] 当施用时可能导致抗体的血清半衰期增加的Fc修饰的非限制性实例包括例如在选自以下的一个或多个位置处的取代:234 (例如,具有F)、235 (例如,具有Q)、238 (例如,具有D)、250 (例如,具有E或Q)、252 (例如,具有L/Y/F/W或T)、254 (例如,具有S或T)、256 (例如,具有S/R/Q/E/D或T)、259 (例如,具有I)、272 (例如,具有A)、305 (例如,具有A)、307 (例如,具有A或P)、308 (例如,具有F、C或P)、311 (例如,具有A或R)、312 (例如,具有A)、322 (例如,Q)、328 (例如,E)、331 (例如,具有A)、378 (例如,具有A)、380 (例如,具有A)、382 (例如,具有A)、428 (例如,具有L或F)、432 (例如,具有C)、433 (例如,具有H/L/R/S/P/Q或K)、434 (例如,具有H/F或Y或S或A或W)、435 (例如,具有H)、436 (例如,具有L) 和437 (例如,具有C) (所有位置通过EU进行编号) (参见WO 2016049000A2;WO 2020052692;WO 2016196228)。在一些实施方式中,Fc变体包括选自以下组成的组的一个或多个氨基酸取代:234F、235Q、238D、250Q、252T、252Y、254T、256E、259I、272A、305A、307A、308F、311A、322Q、328E、331S、380A、428L、432C、433K、433S、434S、434Y、434F、434W、434A、435H、436L、437C和其任何组合。在一些实施方式中,Fc修饰包括选自以下的一个或一对或一组修饰:a) 428L (例如,M428L) 和434S (例如,N434S) 取代;428L、259I (例如,V259I) 和308F (例如,V308F) 取代;b) 433K (例如,H433K) 和434 (例如,N434Y或N434F) 取代;c) 252Y、254T和256E (例如,M252Y、S254T和T256E) 取代;d) 250Q和428L取代 (例如,T250Q和M428L);e) 307A、380A和434A取代 (例如,T307A、E380A和N434A);f) P238D和L328E取代;g) L234F、L235Q、K322Q、M252T、S254T和T256E取代;以及h) 和L432C、H433S、N434W、Y436L和T437C取代。

[0687] 在一些实施方式中,杂交IgG同种型可以用于增加抗体的FcRn结合和半衰期。杂交Ig可以由两种或更多种同种型产生。例如,IgG1/IgG3杂交变体可以通过在两种同种型不同的位置处用来自IgG3的氨基酸取代CH2和/或CH3区中的IgG1位置来构建。在一些实施方式中,杂交Ig可以包括此处所公开的一个或多个修饰 (例如,取代)。

[0688] E. 缀合物

[0689] 在一些实施方式中,本文所提供的多特异性分子进一步包括缀合物部分。缀合物部分可以与多特异性分子连接。缀合物部分是可以与多特异性分子连接的非蛋白质部分。设想的是,多种缀合物部分可以与本文所提供的多特异性分子连接(参见例如,“缀合物疫苗(Conjugate Vaccines)”,《对微生物学和免疫学的贡献(Contributions to Microbiology and Immunology)》,J.M.Cruse和R.E.Lewis,Jr.(编辑),纽约Carger出版社(Carger Press,New York),(1989))。这些缀合物部分可以通过共价结合、亲和力结合、嵌入、配位结合、络合、缔合、共混或添加等方法与多特异性分子连接。

[0690] 在某些实施方式中,本文所公开的多特异性分子可以被工程化成含有表位结合部分之外的可以用于与一个或多个缀合物结合的特异性位点。例如,此类位点可以包括一个或多个反应性氨基酸残基,例如半胱氨酸或组氨酸残基,以促进与缀合物共价连接。

[0691] 在某些实施方式中,多特异性分子可以间接地或通过另一缀合物部分与缀合物部分连接。例如,多特异性分子可以与生物素缀合,然后与亲和素缀合的第二缀合物部分间接缀合。缀合物部分可以是清除改性剂、毒素(例如,化学治疗剂)、可检测标记(例如,放射性同位素、镧系元素、发光标记、荧光标记或酶底物标记)或纯化部分。

[0692] “毒素”可以是对细胞有害或可以损伤或杀死细胞的任何药剂。毒素的实例包括但不限于紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、MMAE、MMAF、DM1、长春碱(vinblastine)、秋水仙碱(colchicin)、阿霉素(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、二羧基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神霉素(mithramycin)、放线菌素D(actinomycin D)、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)、嘌呤霉素(puromycin)及其类似物、抗代谢物(例如,甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶达卡巴嗪)、烷化剂(例如,氮芥、塞替派苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine)(BSNU)和洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、环磷酰胺、白消安(busulfan)、二溴甘露醇、链脲霉素(streptozotocin)、丝裂霉素C(mitomycin C)和二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环霉素(anthracycline)(例如,柔红霉素(以前的道诺霉素(daunomycin)和阿霉素)、抗生素(例如,更生霉素(dactinomycin)(以前的放线菌素)、博来霉素(bleomycin)、光神霉素和氨茴霉素(anthramycin)(AMC))、抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)、拓扑异构酶抑制剂和微管蛋白结合剂。

[0693] 可检测标记的实例可以包括荧光标记(例如,荧光素、罗丹明、丹酰、藻赤素或德克萨斯红)、酶底物标记(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光素酶、葡萄糖淀粉酶、溶菌酶、糖类氧化酶或 β -D-半乳糖苷酶)、放射性同位素(例如, ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{14}C 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 和 ^{32}P 、其它镧系元素)、发光标记、发色团部分、地高辛、生物素/亲和素、DNA分子或检测用金。

[0694] 在某些实施方式中,缀合物部分可以是帮助增加多特异性分子的半衰期的清除改性剂。说明性实例包括水溶性聚合物,如PEG、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、乙二醇/丙二醇的共聚物等。聚合物可以具有任何分子量,并且可以是支化或非支化

的。与多特异性分子连接的聚合物的数量可以变化,并且如果连接多于一种聚合物,则所述聚合物可以是相同或不同的分子。

[0695] 在某些实施方式中,缀合物部分可以是纯化部分,如磁珠。

[0696] 在某些实施方式中,本文所提供的多特异性分子用作缀合物的碱。

[0697] F. 多核苷酸和重组方法

[0698] 本公开提供了编码本文所提供的多特异性分子的分离的多核苷酸。

[0699] 如本文所使用的,术语“核酸”或“多核苷酸”是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)和其聚合物。除非特别限制,否则所述术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的多核苷酸,所述已知类似物具有与参考核酸类似的结合性质并且以类似于天然存在的核苷酸的方式代谢。除非另外指示,否则特定多核苷酸序列还隐含地涵盖其保守修饰变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指出的序列。具体地,简并密码子取代可以通过产生序列来实现,在所述序列中,一个或多个所选的(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代(参见Batzer等人,《核酸研究》19:5081(1991);Ohtsuka等人,《生物化学杂志》260:2605-2608(1985);以及Rossolini等人,《分子与细胞探测(Mol.Cell.Probes)》8:91-98(1994))。

[0700] 许多载体是可用的。载体组成通常包括但不限于以下中的一种或多种:信号序列、复制起点、一个或多个标志物基因、增强子元件、启动子(例如,SV40、CMV、EF-1 α)和转录终止序列。

[0701] 本公开提供了载体(例如,表达载体),所述载体含有编码多特异性分子的本文所提供的核酸序列、至少一个可操作地连接到所述核酸序列的启动子(例如,SV40、CMV、EF-1 α)和至少一个选择标志物。载体的实例包括但不限于逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(例如,单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳多空病毒(例如,SV40)、 λ 噬菌体和M13噬菌体、质粒pcDNA3.3、pMD18-T、pOptivec、pCMV、pEGFP、pIRES、pQD-Hyg-GSeu、pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS10、pLexA、pACT2.2、pCMV-SCRIPT.RTM.、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pcDNA3.1、pRc/RSV、PCR 2.1、pEF-1、pFB、pSG5、pXT1、pCDEF3、pSVSPORT、pEF-Bos等。

[0702] 可以将包括编码多特异性分子的多核苷酸序列的载体引入到宿主细胞以进行克隆或基因表达。用于克隆或表达本文载体中的DNA的合适的宿主细胞是上述原核细胞、酵母细胞或高等真核细胞。用于此目的的合适的原核生物包括真细菌,如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科(Enterobacteriaceae),如埃希氏杆菌属(Escherichia)(例如,大肠杆菌)、肠杆菌属(Enterobacter)、欧文氏菌属(Erwinia)、克雷伯氏菌属(Klebsiella)、变形杆菌属(Proteus)、沙门氏菌属(Salmonella)(例如,鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium))、沙雷氏菌属(Serratia)(例如,粘质沙雷氏菌(Serratia marcescans)) and 志贺氏菌属(Shigella)以及芽孢杆菌属(Bacilli),如枯草芽孢杆菌(B. subtilis)和地衣芽孢杆菌(B. licheniformis)、假单胞菌属(Pseudomonas),如铜绿假单胞菌(P. aeruginosa)以及链霉菌属(Streptomyces)。

[0703] 除了原核细胞之外,如丝状真菌(filamentous fungi)或酵母等真核微生物也是用于所提供的载体的合适克隆或表达宿主。酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)或普通

面包酵母是低等真核宿主微生物中最常用的。然而,许多其它属、种和株都比较常用且在本文中适用,如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属宿主(*Kluyveromyces host*),例如乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)、脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(*K.bulgaricus*) (ATCC 16,045)、魏氏克鲁维酵母(*K.wickerhamii*) (ATCC 24,178)、克鲁维酵母(*K.waltii*) (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilum*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母(*K.thermotolerans*)和马克斯克鲁维酵母(*K.marxianus*);耶氏酵母属(*Yarrowia*) (EP 402,226);巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) (EP 183,070);假丝酵母(*Candida*);里氏木霉(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234);粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*);许旺酵母(*Schwanniomyces*),如西方许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*);以及丝状真菌,例如脉孢菌(*Neurospora*)、青霉菌(*Penicillium*)、弯颈霉(*Tolypocladium*)和曲霉菌(*Aspergillus*)宿主,如钩巢曲霉(*A.nidulans*)和黑曲霉(*A.niger*)。

[0704] 用于表达本文所提供的糖基化多特异性分子的合适宿主细胞源自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已鉴定多种杆状病毒株和变体以及对应的许可性昆虫宿主细胞,所述许可性昆虫宿主细胞来自于如以下等宿主:草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及斑蚊(*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊(*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) (果蝇)和家蚕(*Bombyx mori*)。多种用于转染的病毒株为公众可得,例如苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*) NPV的L-1变体以及家蚕 NPV的Bm-5株,并且此类病毒都可以根据本发明用作本文的病毒,尤其是用于转染草地夜蛾细胞。棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄和烟草的植物细胞培养物也可以用作宿主。

[0705] 然而,最感兴趣的是脊椎动物细胞,并且脊椎动物细胞在培养物(组织培养物)中的繁殖已成为常规程序。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是由SV40(COS-7, ATCC CRL 1651)转化的猴肾CV1系;人胚胎肾系(被亚克隆以在悬浮培养物中生长的293或293细胞, Graham等人,《普通病毒学杂志(J.Gen Virol.)》36:59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub等人,《美国国家科学院院刊》77:4216(1980));小鼠塞托利细胞(TM4, Mather,《生殖生物学(Biol.Reprod.)》23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);布法罗大鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等人,《纽约科学院年鉴(Annals N.Y.Acad.Sci.)》383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4细胞;以及人肝癌细胞系(Hep G2)。在一些优选的实施方式中,宿主细胞是293F细胞。

[0706] 用上述用于产生本文所提供的多特异性分子的表达或克隆载体转化宿主细胞,并将所述宿主细胞在常规营养培养基中培养,所述常规营养培养基被改性成适于诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因。在另一个实施方式中,本文所提供的多特异性分子可以通过本领域已知的同源重组产生。

[0707] 用于产生本文所提供的多特异性分子的宿主细胞可以在多种培养基中培养。可商购获得的培养基如Ham's F10(西格玛公司(Sigma))、最低必需培养基(Minimal Essential Medium, MEM)(西格玛公司)、RPMI-1640(西格玛公司)和杜氏改良伊氏培养基(Dulbecco'

sModified Eagle's Medium, DMEM) (西格玛公司) 适用于培养宿主细胞。另外, 在以下文献中描述的任何培养基都可以用作宿主细胞的培养基: Ham等人, 《酶学方法 (Meth. Enz.)》58: 44 (1979); Barnes等人, 《分析生物化学 (Anal. Biochem.)》102: 255 (1980); 美国专利第4, 767, 704号; 第4, 657, 866号; 第4, 927, 762号; 第4, 560, 655号; 或第5, 122, 469号; WO 90/03430; WO 87/00195; 或美国再版专利30, 985。任何这些培养基都可以根据需要补充激素和/或其它生长因子(如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲液(如HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如GENTAMYCINTM药物)、微量元素(定义为最终浓度通常在微摩尔范围内的无机化合物)和葡萄糖或等效能量源。也可以以本领域技术人员已知的适当浓度包括任何其它必要的补充物。培养条件(如温度、pH等)是先前与所选的用于表达的宿主细胞一起使用的条件, 并且对于普通技术人员而言将是显而易见的。

[0708] 当使用重组技术时, 多特异性分子可以在胞内、周质间隙中产生, 或者直接分泌到培养基中。如果在胞内产生抗体, 则作为第一步骤, 可以例如通过离心或超滤来去除宿主细胞或溶解的片段的微粒状碎片。Carter等人, 《生物/技术 (Bio/Technology)》10: 163-167 (1992) 描述了用于分离分泌到大肠杆菌的周质间隙的抗体的程序。简而言之, 将细胞糊状物在存在乙酸钠(pH 3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟(PMSF)的情况下解冻约30分钟。细胞碎片可以通过离心去除。当多特异性分子被分泌到培养基中时, 通常首先使用可商购获得的蛋白质浓缩过滤器, 例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元对来自此类表达系统的上清液进行浓缩。如PMSF等蛋白酶抑制剂可以包括在任何前述步骤中以抑制蛋白水解, 并且可以包括抗生素以防止外来污染物的生长。

[0709] 由细胞制备的多特异性分子可以使用例如羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析、DEAE-纤维素离子交换色谱、硫酸铵沉淀、盐析和亲和色谱来纯化, 其中亲和色谱是优选的纯化技术。

[0710] 在某些实施方式中, 固定在固相上的蛋白A用于多特异性分子的免疫亲和纯化。蛋白A作为亲和力配体的适合性取决于存在于多特异性分子中的任何免疫球蛋白Fc结构域的物种和同种型。蛋白A可以用于纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体(Lindmark等人, 《免疫学方法杂志》62: 1-13 (1983))。蛋白G被推荐用于所有小鼠同种型和人 $\gamma 3$ (Guss等人, 《欧洲分子生物学学会杂志 (EMBO J.)》5: 1567-1575 (1986))。亲和力配体附着的基质最通常为琼脂糖, 但其它基质也是可用的。与可以用琼脂糖实现的流速和处理时间相比, 机械稳定的基质如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯可实现更快的流速和更短的处理时间。在多特异性分子包括CH3结构域的情况下, Bakerbond ABXTM树脂(新泽西州菲利普斯堡的马林克罗特贝克有限公司(J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.))可用于纯化。根据待回收的抗体, 用于蛋白质纯化的其它技术也是可用的, 如在离子交换柱上进行分离、乙醇沉淀、反相HPLC、在二氧化硅上进行色谱、在肝素SEPHAROSETM上进行色谱、在阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸柱)上进行色谱、色谱聚焦、SDS-PAGE以及硫酸铵沉淀。

[0711] 在任何初步纯化步骤之后, 可以使用pH介于约2.5与4.5之间的洗脱缓冲液使包括所关注抗体分子和污染物的混合物经受低pH疏水相互作用色谱, 优选地在低盐浓度(例如, 约0-0.25M盐)下进行。

[0712] G. 药物组合物

[0713] 本公开进一步提供了包括多特异性分子和一种或多种药学上可接受的载体的药物组合物。

[0714] 用于本文所公开的药物组合物的药学上可接受的载体可以包括例如药学上可接受的液体、凝胶或固体载体、水性媒剂、非水性媒剂、抗微生物剂、等渗剂、缓冲液、抗氧化剂、麻醉剂、悬浮剂/分配剂、多价螯合剂或螯合剂、稀释剂、佐剂、赋形剂或无毒辅助物质、本领域已知的其它组分或其各种组合。

[0715] 合适的组分可以包括例如抗氧化剂、填料、粘结剂、崩解剂、缓冲液、防腐剂、润滑剂、调味剂、增稠剂、着色剂、乳化剂或稳定剂,如糖和环糊精。合适的抗氧化剂可以包括例如甲硫氨酸、抗坏血酸、EDTA、硫代硫酸钠、铂、过氧化氢酶、柠檬酸、半胱氨酸、硫代甘油、巯基乙酸、硫代山梨糖醇、丁基化羟基茴香醚(butylated hydroxyanisole)、丁基化苯甲醇和/或没食子酸丙酯。如本文所公开的,在包括如本文所提供的多特异性分子和缀合物的组合物中包括一种或多种抗氧化剂如甲硫氨酸减少了多特异性分子的氧化。这种氧化的减少防止或减少了结合亲和力的损失,由此改进抗体稳定性并且使保质期最大化。因此,在某些实施方式中,提供了包括一种或多种如本文所公开的多特异性分子和一种或多种如甲硫氨酸等抗氧化剂的组合物。进一步提供了用于通过将如本文所提供的多特异性分子与一种或多种如甲硫氨酸等抗氧化剂混合来防止多特异性分子的氧化、延长所述多特异性分子的保质期和/或改进所述多特异性分子的功效的方法。

[0716] 为了进一步说明,药学上可接受的载体可以包括例如水性媒剂,如氯化钠注射液、林格氏注射液(Ringer's injection)、等渗右旋糖注射液、无菌水注射液或葡聚糖和乳酸林格氏注射液;非水性媒剂,如植物来源的固定油、棉籽油、玉米油、芝麻油或花生油;细菌抑制或真菌抑制浓度下的抗微生物剂;等渗剂,如氯化钠或葡聚糖;缓冲液,如磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液;抗氧化剂,如硫酸氢钠;局部麻醉剂,如盐酸普鲁卡因;悬浮剂和分散剂,如羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮;乳化剂,如聚山梨醇酯80(TWEEN-80);多价螯合剂或螯合剂,如EDTA(乙二胺四乙酸)或EGTA(乙二醇四乙酸)、乙醇、聚乙二醇、丙二醇、氢氧化钠、盐酸、柠檬酸或乳酸。可以将用作载体的抗微生物剂添加到多剂量容器中的药物组合物中,所述抗微生物剂包括苯酚或甲酚、汞剂、苯甲醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、硫柳汞、苯扎氯铵和苄索氯铵。合适的赋形剂可以包括例如水、盐水、葡聚糖、甘油或乙醇。合适的无毒辅助物质可以包括例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂、溶解度增强剂或如乙酸钠、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯或环糊精等药剂。

[0717] 药物组合物可以是液体溶液、悬浮液、乳液、丸剂、胶囊、片剂、缓释调配物或粉末。口服调配物可以包括标准载体,如医药级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0718] 在某些实施方式中,将药物组合物调配成可注射组合物。可注射药物组合物可以以任何常规形式制备,所述常规形式例如液体溶液、悬浮液、乳液或适用于产生液体溶液、悬浮液或乳液的固体形式。注射制剂可以包括准备注射的无菌和/或无热原溶液、准备在使用前与溶剂组合的无菌干燥可溶性产品,如冻干粉末,包括皮下注射片剂、准备注射的无菌悬浮液、准备在使用前与媒剂组合的无菌干燥不溶性产品以及无菌和/或无热原乳液。溶液可以是水性的或非水性的。

[0719] 在某些实施方式中,单位剂量肠胃外制剂被包装在安瓿、小瓶或带有针头的注射器中。正如本领域已知和实践的一样,所有用于肠胃外施用的制剂都应该是无菌且无热原的。

[0720] 在某些实施方式中,通过将如本文所公开的多特异性分子溶解在合适的溶剂中来制备无菌冻干粉末。所述溶剂可以含有赋形剂,所述赋形剂改善粉末或由粉末制备的重构溶液的稳定性或其它药理学组分。可以使用的赋形剂包括但不限于水、葡聚糖、山梨糖醇、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其它合适的药剂。溶剂可以含有缓冲液,如柠檬酸盐、磷酸钠或磷酸钾或本领域技术人员已知的其它此类缓冲液,在一个实施方式中,pH值为约中性。随后对溶液进行无菌过滤、随后在本领域技术人员已知的标准条件下冻干提供了期望调配物。在一个实施方式中,将所得溶液分配到小瓶中以冻干。每个小瓶可以含有单剂量或多剂量的多特异性分子或其组合物。用略微高于每次剂量所需或一组剂量所需的量(例如,约10%)过填充小瓶是可接受的,以便促进取样精确和给药精确。可以在适当的条件下如在约4℃到室温下储存冻干粉末。

[0721] 用注射用水将冻干粉末重构提供了用于肠胃外施用的调配物。在一个实施方式中,为了重构,将无菌和/或无热原水或其它合适的液体载体添加到冻干粉末中。精确的量取决于给予的所选疗法并且可以根据经验确定。

[0722] H. 使用方法

[0723] 另一方面,本公开提供了用于本文所提供的多特异性分子的使用方法。本文所提供的多特异性分子包括本文所提供的SIRP α 结合结构域、本文所提供的激活受体结合结构域和本文所提供的靶抗原结合结构域。靶抗原结合结构域与在共表达靶抗原和CD47的靶细胞上表达的靶抗原结合。在存在靶抗原的情况下,本文所提供的多特异性分子能够选择性地诱导免疫效应子细胞的效应子功能,并且免疫效应子细胞共表达SIRP α 和激活受体。

[0724] 一方面,本公开提供了一种体外诱导吞噬作用的方法,所述方法包括在存在本文所提供的多特异性分子的情况下,使靶细胞与SIRP α 阳性吞噬细胞样品接触,由此通过SIRP α 阳性吞噬细胞诱导靶细胞的吞噬作用。

[0725] 一方面,本公开提供了诱导受试者体内靶细胞的吞噬作用的方法,所述方法包括以有效诱导所述受试者体内所述靶细胞的吞噬作用的剂量向所述受试者施用本文所提供的多特异性分子。

[0726] 一方面,本公开提供了将肿瘤相关单核细胞或巨噬细胞(TAM)重定向到抗肿瘤巨噬细胞中以便增强有需要的受试者的癌细胞的吞噬作用的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所提供的多特异性分子或衔接子。另外,本文所提供的衔接子还可以激活巨噬细胞并将激活的巨噬细胞接合到肿瘤微环境中,以便展现出对癌细胞的吞噬作用。

[0727] 另一方面,本公开还提供了一种增加有需要的受试者的肿瘤微环境中的M1巨噬细胞的水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所提供的多特异性分子或衔接子。如本文所使用的,术语“肿瘤微环境”是指围绕癌细胞或肿瘤细胞的组织、细胞和环境。肿瘤微环境可以包括基质细胞,如成纤维细胞、周细胞、内皮细胞、脂肪细胞和骨髓间充质基质细胞(MSC)。肿瘤微环境还可以包括与癌细胞相关或与癌细胞周围的基质细胞相关的胞外基质。胞外基质主要由基质(主要由蛋白聚糖聚集体制成的多孔水合凝胶)和结

缔组织纤维构成。在实验上,特定肿瘤的肿瘤微环境可以例如通过解剖和分离携带特定肿瘤的组织来获得。

[0728] 如本文所使用的,关于M1巨噬细胞的水平的术语“增加(increase)”或“增加(increasing)”是指与在不存在本文所提供的多特异性分子或衔接子的情况下的肿瘤微环境相比,在存在本文提供的多特异性分子或衔接子的情况下的肿瘤微环境中的相对于总巨噬细胞计数归一化的升高的M1巨噬细胞计数。肿瘤微环境中的M1巨噬细胞的水平或M1巨噬细胞计数可以通过本领域已知的常规技术来测量,如用于具有M1表型的表面标志物谱的巨噬细胞的量的FACS测定(CD80^{high}和CD206^{mid}谱,参见Zhang M等人,抗CD47治疗通过M1和M2极化巨噬细胞刺激胶质母细胞瘤的吞噬作用并且在体内促进M1极化巨噬细胞(Anti-CD47 Treatment Stimulates Phagocytosis of Glioblastoma by M1 and M2 Polarized Macrophages and Promotes M1 Polarized Macrophages In Vivo.)《公共科学图书馆·综合(PloS one)》11,e0153550,10.1371/journal.pone.0153550(2016)。M1巨噬细胞的水平或M1巨噬细胞计数也可以通过可诱导的一氧化氮合酶1(Nos1)的mRNA表达水平(相对于总mRNA表达水平归一化)的qPCR分析来测量,已知其在M1巨噬细胞中升高(Zhang M等人,抗CD47治疗通过M1和M2极化巨噬细胞刺激胶质母细胞瘤的吞噬作用并且在体内促进M1极化巨噬细胞《公共科学图书馆·综合》11,e0153550,10.1371/journal.pone.0153550(2016)。可以计数具有M1表型的巨噬细胞的数量或者可以确定M1巨噬细胞的一个或多个特性标志物的表达水平的其它方法(如共聚焦荧光显微镜或蛋白质印迹)也在本公开的考虑内。另一方面,本公开还提供了治疗受试者的可能受益于诱导的靶细胞的吞噬作用的疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所提供的多特异性分子。

[0729] 在某些实施方式中,靶细胞共表达靶抗原和CD47。在一些实施方式中,靶细胞包括癌细胞、炎性细胞和/或慢性受感染细胞。在一些实施方式中,靶抗原是肿瘤表面抗原、炎性抗原或传染性微生物的抗原。在一些实施方式中,靶抗原可以是肿瘤抗原(例如,肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA),如新抗原)或呈递在受感染细胞上的抗原(例如,乙型肝炎表面抗原(HBsAg))。

[0730] 在某些实施方式中,可能受益于诱导的靶细胞的吞噬作用的病症或病状可以包括例如癌症(例如,实体瘤、恶性血液肿瘤)、炎性疾病、传染病(例如,慢性感染)、自身免疫性疾病(例如,多发性硬化症)、神经系统疾病、脑损伤、神经损伤、红细胞增多症、血色沉着病、创伤、脓毒性休克、纤维化、动脉粥样硬化、肥胖、II型糖尿病、移植功能障碍和关节炎。

[0731] 另一方面,本公开还提供了治疗受试者的靶抗原相关疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所提供的多特异性分子。例如,如果靶抗原包括肿瘤抗原,则靶抗原相关疾病可以包括肿瘤或癌症。例如,如果靶抗原包括呈递在受感染细胞上的抗原,则靶抗原相关疾病可以包括相关传染病。在某些实施方式中,靶抗原包括PD-L1。在某些实施方式中,靶抗原包括密封蛋白18.2。

[0732] 另一方面,本公开还提供了治疗受试者的SIRP α 相关疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所提供的多特异性分子。

[0733] 另一方面,本公开还提供了治疗受试者的CD47相关疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所提供的多特异性分子。

[0734] 在一些实施方式中,受试者是人。在一些实施方式中,受试者对SIRP α v1是纯合的。在一些实施方式中,受试者对SIRP α v2是纯合的。

[0735] 在一些实施方式中,所述受试者已经诊断患有选自由以下组成的组的疾病、病症或病状或有风险患有所述疾病、所述病症或所述病状:癌症(例如,实体瘤、恶性血液肿瘤)、炎性疾病、传染病(例如,慢性感染)、自身免疫性疾病(例如,多发性硬化症)、神经系统疾病、脑损伤、神经损伤、红细胞增多症、血色沉着病、创伤、脓毒性休克、纤维化、动脉粥样硬化、肥胖、II型糖尿病、移植功能障碍和关节炎。在优选实施方式中,所述受试者已经诊断患有的一种或多种实体瘤或有风险患有所述一种或多种实体瘤。

[0736] 在某些实施方式中,可通过本文所提供的方法治疗的病状或病症可以是免疫相关疾病或病症、肿瘤和癌症、自身免疫性疾病或传染病。在某些实施方式中,所述免疫相关疾病或病症选自由以下组成的组:全身性红斑狼疮、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、血管炎、重症肌无力、特发性肺纤维化、克罗恩氏病、哮喘、类风湿性关节炎、移植物抗宿主疾病、脊柱关节病(例如,强直性脊柱炎、银屑病性关节炎、与炎性肠病相关的孤立性急性肠病性关节炎、反应性关节炎、白塞氏综合征、未分化型脊柱关节病、前葡萄膜炎和幼年特发性关节炎)、多发性硬化症、子宫内膜异位、肾小球肾炎、败血症、糖尿病、急性冠状动脉综合征、缺血再灌注、银屑病、进行性全身性硬化症、动脉粥样硬化、舍格伦综合征、硬皮病或炎性自身免疫性肌炎。

[0737] 在某些实施方式中,可通过本文所提供的方法治疗的病状或病症包括肿瘤和癌症。在某些实施方式中,可通过本文所提供的方法治疗的病状或病症包括实体瘤和恶性血液肿瘤。癌症和肿瘤的实例包括非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈样肉芽肿病、默克尔细胞癌和其它恶性血液肿瘤,如经典型霍奇金淋巴瘤(CHL)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的B细胞淋巴瘤、EBV阳性和阴性PTLD和EBV相关弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、浆母细胞性淋巴瘤、结外NK/T细胞淋巴瘤、鼻咽癌和HHV8相关原发性渗出性淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、中枢神经系统(CNS)赘生物,如原发性CNS淋巴瘤、脊髓轴肿瘤、脑干胶质细胞瘤、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、基底细胞癌、胆囊癌、胃癌、肺癌、支气管癌、骨癌、肝和胆管癌、胰腺癌、乳腺癌、肝癌、卵巢癌、睾丸癌、肾癌、肾盂和输尿管癌、唾液腺癌、小肠癌、尿道癌、膀胱癌、头颈癌、脊柱癌、脑癌、宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、结肠癌、结直肠癌、直肠癌、食道癌、胃肠癌、皮肤癌、前列腺癌、垂体癌、阴道癌、甲状腺癌、喉癌、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、骨髓增生异常综合征、肉瘤、畸胎瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、T或B细胞淋巴瘤、GI器官间质瘤、软组织肿瘤、肝细胞癌和腺癌或其转移。在优选实施方式中,可通过本文所提供的方法治疗的病状或病症包括一种或多种实体瘤。

[0738] 在一些实施方式中,癌症是CD47阳性癌症。在一些实施方式中,癌症是CD47阳性癌症和靶抗原阳性癌症。在一些实施方式中,待治疗的受试者已经被鉴定为患有CD47阳性癌症、或CD47阳性癌症和靶抗原阳性癌症。如本文所使用的,“CD47阳性”癌症是指特征在于表达癌细胞中的CD47或以显著高于正常细胞所预期的水平表达癌细胞中的CD47的癌症。如本

文所使用的,“靶抗原阳性”癌症是指特征在于表达癌细胞中的靶抗原或以显著高于正常细胞所预期的水平表达癌细胞中的靶抗原的癌症。

[0739] 所关注生物样品中的CD47和靶抗原的存在和/或量可以使用各种合适方法在来自受试者的测试生物样品中确定。例如,测试生物样品可以暴露于抗CD47抗体或抗靶抗原抗体或其抗原结合片段,其结合并检测所表达的CD47蛋白或靶抗原蛋白。可替代地,也可以使用如qPCR、逆转录酶PCR、微阵列、SAGE、FISH等方法在核酸表达水平上检测CD47或靶抗原蛋白。在一些实施方式中,测试样品源自癌细胞或组织或肿瘤浸润免疫细胞。在某些实施方式中,测试生物样品中的CD47或靶抗原蛋白的存在或上调水平指示应答的可能性。如本文所使用的,术语“上调”是指与CD47或靶抗原的参考表达水平相比,测试样品中的CD47或靶抗原蛋白的表达水平的总体增加不小于10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%或更多。参考水平可以是在同一组织类型的正常细胞中发现的CD47或靶抗原表达的水平,任选地相对于另一种基因(例如,管家基因)的表达水平归一化。可替代地,参考水平可以是在健康受试者体内发现的CD47或靶抗原表达的水平。参考样品可以是健康或非患病个体获得的对照样品,或者是从测试样品所获自的同一个体获得的健康或非患病样品。例如,参考样品可以是与测试样品(例如,肿瘤)相邻或在测试样品附近的非患病样品。在一些实施方式中,与所关注的测试或确定基本上同时进行测试和/或确定参考。在一些实施方式中,参考是任选地体现在有形介质中的历史参考。通常地,如本领域技术人员将理解的,在与评估中的条件或环境相当的条件或环境下确定或表征参考。

[0740] 在某些实施方式中,肿瘤和癌症是转移性的,尤其是表达CD47的转移性肿瘤。

[0741] 在某些实施方式中,肿瘤和癌症是PD-L1阳性癌症。在某些实施方式中,PD-L1阳性癌症选自由以下组成的组: NSCLC、SCLC、黑色素瘤、头颈癌、肝细胞癌、MSI-H或dMMR癌、宫颈癌、乳腺癌、胃癌、经典霍奇金淋巴瘤、胰腺癌、尿路上皮癌。

[0742] 在某些实施方式中,肿瘤和癌症是密封蛋白18.2阳性癌症。在一些实施方式中,密封蛋白18.2阳性癌症是上皮细胞源性癌症。在一些实施方式中,癌症是胃癌、胰腺癌、肺癌、食道癌、卵巢癌和其转移。

[0743] 在某些实施方式中,可通过本文所提供的方法治疗的病状或病症包括自身免疫性疾病。自身免疫性疾病包括但不限于获得性免疫缺陷综合征(AIDS,其是一种具有自身免疫性组分的病毒性疾病)、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森氏病(autoimmune Addison's disease)、自身免疫性糖尿病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳病(AIED)、自身免疫性淋巴细胞增生综合征(ALPS)、自身免疫性血小板减少性紫癜(ATP)、白塞氏病、心肌病、口炎性腹泻-疱疹样皮炎;慢性疲劳免疫功能障碍综合征(CFIDS)、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIPD)、瘢痕性类天疱疮(cicatricial pemphigoid)、冷凝集素病、肢端硬皮综合征(crest syndrome)、克罗恩氏病、德戈斯病(Degos' disease)、幼年型皮肌炎、盘状狼疮、原发性混合性冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、格雷夫斯氏病(Graves' disease)、格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome)、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、胰岛素依赖型糖尿病、幼年型慢性关节炎(斯提耳氏病(Still's disease))、幼年型类风湿性关节炎、美尼尔氏病(Meniere's disease)、混合性结缔组织

病、多发性硬化症、重症肌无力、严重贫血 (pemacious anemia)、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、银屑病关节炎、雷诺氏现象 (Raynaud's phenomena)、莱特尔氏综合征 (Reiter's syndrome)、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病 (进行性全身性硬化症 (PSS), 也称为全身性硬化症 (SS))、舍格伦综合征、僵人综合征、全身性红斑狼疮、高安氏动脉炎 (Takayasu arteritis)、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、白癜风和韦格纳氏肉芽肿病 (Wegener's granulomatosis)。

[0744] 在某些实施方式中, 可通过本文所提供的方法治疗的病状或病症包括传染病。传染病包括例如慢性病毒感染, 例如, 真菌感染、寄生虫/原生动物感染或慢性病毒感染, 例如, 疟疾、粗球孢子菌病 (coccidioiodomycosis immitis)、组织胞浆菌病 (histoplasmosis)、甲真菌病 (onychomycosis)、曲霉菌病 (aspergilosis)、芽生菌病 (blastomycosis)、白色念珠菌病 (candidiasis albicans)、副球孢子菌病 (paracoccidioiomycosis)、微孢子虫病 (microsporidiosis)、棘阿米巴角膜炎 (Acanthamoeba keratitis)、阿米巴病 (Amoebiasis)、蛔虫病 (Ascariasis)、巴贝斯虫病 (Babesiosis)、小袋虫病 (Balantidiasis)、浣熊贝蛔虫病 (Baylisascariasis)、南美锥虫病 (Chagas disease)、华支睾吸虫病 (Clonorchiasis)、锥蝇属 (Cochliomyia)、隐孢子虫病 (Cryptosporidiosis)、裂头绦虫病 (Diphyllobothriasis)、麦地那龙线虫病 (Dracunculiasis)、包虫病 (Echinococcosis)、象皮病 (Elephantiasis)、蛲虫病 (Enterobiasis)、肝片吸虫病 (Fascioliasis)、姜片虫病 (Fasciolopsiasis)、丝虫病 (Filariasis)、贾第虫病 (Giardiasis)、颚口线虫病 (Gnathostomiasis)、膜壳绦虫病 (Hymenolepiasis)、等孢球虫病 (Isosporiasis)、片山热 (Katayama fever)、利什曼病 (Leishmaniasis)、莱姆病 (Lyme disease)、后殖吸虫病 (Metagonimiasis)、蝇蛆病 (Myiasis)、盘尾丝虫病 (Onchocerciasis)、虱病 (Pediculosis)、疥疮 (Scabies)、血吸虫病 (Schistosomiasis)、昏睡病 (Sleeping sickness)、类圆线虫病 (Strongyloidiasis)、绦虫病 (Taeniasis)、弓蛔虫病 (Toxocariasis)、弓形体病 (Toxoplasmosis)、旋毛虫病 (Trichinosis)、鞭虫病 (Trichuriasis)、锥虫病 (Trypanosomiasis)、蠕虫感染 (helminth infection)、乙型肝炎 (HBV) 感染、丙型肝炎 (HCV) 感染、疱疹病毒感染、艾普斯登-巴尔病毒 (Epstein-Barr virus) 感染、HIV-1 感染、HIV-2 感染、巨细胞病毒感染、单纯疱疹病毒 I 型感染、单纯疱疹病毒 II 型感染、人乳头状瘤病毒感染、腺病毒感染、卡波西西肉瘤相关疱疹病毒流行病感染、细环病毒 (转矩特诺病毒 (Torquetenovirus)) 感染、人 T 嗜淋巴细胞病毒 I 感染、人 T 嗜淋巴细胞病毒 II 感染、水痘带状疱疹病毒感染、JC 病毒感染或 BK 病毒感染。

[0745] 如本文所提供的多特异性分子的治疗有效量将取决于本领域已知的各种因素, 例如, 体重、年龄、既往病史、目前的药物、受试者的健康状况和交叉反应的潜力、过敏、敏感性和不良副作用, 以及施用途径和疾病发展的程度。如由这些和其它情况或要求所指示的, 本领域的普通技术人员 (例如, 医师或兽医) 可以按比例减少或增加剂量。

[0746] 在某些实施方式中, 如本文所提供的多特异性分子可以以约 0.01mg/kg 到约 100mg/kg 的治疗有效剂量施用。在这些实施方式中的某些实施方式中, 多特异性分子以约 50mg/kg 或更少的剂量施用, 并且在这些实施方式中的某些实施方式中, 剂量为 10mg/kg 或更少、5mg/kg 或更少、3mg/kg 或更少、1mg/kg 或更少、0.5mg/kg 或更少或 0.1mg/kg 或更少。在

某些实施方式中,施用剂量可以在治疗过程中改变。例如,在某些实施方式中,初始施用剂量可以高于随后的施用剂量。在某些实施方式中,施用剂量可以在治疗过程中根据受试者的反应而变化。

[0747] 可以调整剂量方案以提供最佳的期望应答(例如,治疗应答)。例如,可以施用单次剂量,或可以随时间推移施用若干分次剂量。

[0748] 本文所提供的多特异性分子可以通过本领域已知的任何途径施用,例如,肠胃外(例如,皮下、腹膜内、静脉内,包括静脉内输注、肌内或皮内注射)或非肠胃外(例如,口服、鼻内、眼内、舌下、直肠或局部)途径。

[0749] 在一些实施方式中,本文所公开的多特异性分子可以单独施用或与一种或多种另外的治疗方式或药剂组合施用。例如,本文所公开的多特异性分子可以与另一种治疗剂,例如化学治疗剂或抗癌药物组合施用。

[0750] 在这些实施方式中的某些实施方式中,与一种或多种另外的治疗剂组合施用的如本文所公开的多特异性分子可以与所述一种或多种另外的治疗剂同时施用,并且在这些实施方式中的某些实施方式中,多特异性分子和另外的治疗剂可以作为同一药物组合物的一部分施用。然而,与另一种治疗剂“组合”施用的多特异性分子不必与药剂同时施用或不必与药剂在同一组合物中施用。在另一种药剂之前或之后施用的多特异性分子被认为是与所述药剂“组合”施用,如本文所使用的短语,即使多特异性分子和第二药剂通过不同途径施用。在可能的情况下,与本文所公开的多特异性分子组合施用的另外的治疗剂根据另外的治疗剂的产品信息表中列出的时间表或根据医生桌上参考手册(Physicians' Desk Reference) 2003(《医生桌上参考手册》,第57版;医疗经济学公司(Medical Economics Company); ISBN: 1563634457; 第57版(2002年11月))或本领域众所周知的方案施用。

[0751] 本公开进一步提供了使用其多特异性分子的方法。

[0752] 在一些实施方式中,本公开还提供了一种本文所提供的多特异性分子在制备用于治疗受试者的可能受益于诱导的靶细胞的吞噬作用的疾病、病症或病状的药物中的用途。

[0753] 本公开基于具有以下特定性质的抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段的多特异性分子(例如,多特异性抗体)的令人惊讶的发现:例如,基本上或完全阻断SIRP- α 与CD47之间的相互作用;基本上或完全阻断SHP-1募集下游SIRP α 和CD47相互作用;当单独使用时,不诱导某些靶细胞的吞噬作用,和/或能够与SIRP α 的IgV结构域之外的表位结合。此类多特异性分子可以处于如上所述的特异性构型,并且所得多特异性分子展现出出乎意料的高选择性,以诱导对不想要的细胞的免疫应答(例如,吞噬作用),从而消除不想要的细胞(例如,癌细胞和受感染细胞)。

[0754] 因此,本公开还提供了一种本文所提供的此类多特异性分子在制备用于治疗CD47相关病状和病症的药物中的用途。

[0755] 提供以下实施例以更好地说明所要求保护的发明并且不应将所述实施例解释为限制本发明的范围。下文描述的所有具体组合物、材料和方法全部或部分地落入本发明的范围内。这些具体组合物、材料和方法不旨在限制本发明,而仅用于说明落入本发明的范围内的具体实施方式。本领域的技术人员可以开发出等效的组合物、材料和方法,而无需行使发明能力且不脱离本发明的范围。应理解,可以在本文所述的程序中进行许多变化,同时仍保持在本发明的范围内。本发明的发明人的意图是此类变化都包括在本发明的范围内。

[0756] 实施例

[0757] 实施例1:抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体构建和表达

[0758] 图1描绘了基于SIRP α 的双特异性巨噬细胞衔接子 (BiME) 抗体的原理。BiME可以将巨噬细胞物理地桥接到癌细胞以用于特异性杀死;阻断CD47-SIRP α 相互作用、去除SHP-1/2抑制并且接合巨噬细胞上的Fc受体以激活吞噬作用。

[0759] 将抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体构建为在重链或轻链的C末端处与抗SIRP α C25单链可变片段 (scFv) 融合的抗密封蛋白18.2抗体hu28.H1L2 (图2A-B)。将柔性 (Gly4Ser)₃连接子与抗SIRP α scFv的N末端遗传连接。将抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体构建为在重链或轻链的C末端处与抗密封蛋白18.2单链可变片段 (scFv) 融合的抗SIRP α 抗体 (图2C-D)。将柔性 (Gly4Ser)₃连接子与抗密封蛋白18.2scFv的N末端遗传连接。

[0760] 双特异性蛋白ES028-001包括在轻链的C末端处的一个抗密封蛋白18.2抗体和两个抗SIRP α scFv (图2A, 还参见表7)。

[0761] 双特异性蛋白ES028-005包括在重链的C末端处的一个抗密封蛋白18.2抗体和两个抗SIRP α scFv (图2B, 还参见表7)。

[0762] 双特异性蛋白ES028-009包括在轻链的C末端处的一个抗SIRP α 抗体和两个抗密封蛋白18.2scFv (图2C, 还参见表7)。

[0763] 双特异性蛋白ES028-013包括在重链的C末端处的一个抗SIRP α 抗体和两个抗密封蛋白18.2scFv (图2D, 还参见表7)。

[0764] 为了表达, 使用在同一表达载体或单独表达载体中编码轻链和重链的DNA来转染HEK293细胞用于转染。收获培养基, 并且通过蛋白A琼脂糖柱对融合蛋白进行纯化。

[0765] 实施例2:抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体结合亲和力

[0766] 分别根据制造商手册, 使用Octet测定 (ForeBio公司 (ForeBio)) 对抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性蛋白对人密封蛋白18.2或SIRP α 的结合亲和力进行表征。简而言之, 将抗体偶联到传感器上, 并且然后将传感器浸入密封蛋白18.2或SIRP α 蛋白梯度中 (以200nM开始, 稀释2倍, 并且总共8个剂量)。所述抗体的结合应答是实时测量的并且结果是全局拟合的。表8和表9总结了所测试抗体的亲和力数据。

[0767] 表8. 如通过Octet测定所测量的双特异性抗体对人SIRP α 的结合亲和力

	样品	KD (M)	kon (1/Ms)	koff (1/s)
[0768]	抗 SIRP α , C25	2.12E-09	5.12E+05	1.09E-03
	ES028-001	1.51E-09	1.79E+05	2.71E-04
	ES028-005	1.41E-09	3.34E+05	4.70E-04
	ES028-009	2.44E-09	5.44E+05	1.33E-03

[0769] 表9. 如通过Octet测定所测量的双特异性抗体对人密封蛋白18.2的结合亲和力

	样品	KD (M)	kon (1/Ms)	koff (1/s)
[0770]	抗密封蛋白 18.2, hu28.H1L2	<1.0E-12	9.58E+04	<1.0E-07
	ES028-001	<1.0E-12	1.05E+05	<1.0E-07
	ES028-005	<1.0E-12	1.06E+05	<1.0E-07
	ES028-009	<1.0E-12	2.11E+04	<1.0E-07
	抗密封蛋白 18.2, hu26.H1L2 (S92A)	1.81E-09	3.45E+04	6.25E-05

[0771] 实施例3:通过FACS进行的抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体与密封蛋白18.2

和SIRP α 的结合

[0772] 将大约100,000个过表达人密封蛋白18.2的Raji淋巴瘤细胞用洗涤缓冲液洗涤,并且与100ul连续稀释的密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性蛋白在冰上孵育30分钟。然后将细胞用洗涤缓冲液洗涤两次,并且与100ul抗人Fc-PE在冰上孵育30分钟。然后将细胞用洗涤缓冲液洗涤两次,并且在FACS Canto II分析仪(BD生物科学公司(BD Biosciences))上进行分析。如图3A所示,抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体以剂量依赖性方式与Raji/hClaudin18.2细胞结合。双特异性抗体ES028-001、ES028-005、ES028-013与Raji/hClaudin18.2结合,类似于抗密封蛋白18.2单克隆抗体hu28H1L2,而ES028-009与Raji/hClaudin18.2结合的程度相对于抗密封蛋白18.2,hu28H1L2较低。

[0773] 将过表达人SIRP α 的CHO-K1细胞用洗涤缓冲液洗涤,并且与100ul连续稀释的密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性蛋白在冰上孵育30分钟。然后将细胞用洗涤缓冲液洗涤两次,并且与100ul抗人Fc-PE在冰上孵育30分钟。然后将细胞用洗涤缓冲液洗涤两次,并且在FACS Canto II分析仪(BD生物科学公司)上进行分析。如图3B所示,抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体以剂量依赖性方式与CHO-K1/SIRP α 细胞结合。ES028-001和ES028-005与CHO-K1/hSIRP α 结合的程度相对于抗SIRP α ,C25较低。

[0774] 实施例4:抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体增强密封蛋白18.2+癌细胞的体外巨噬细胞吞噬作用

[0775] 将表达人CD47和人密封蛋白18.2的小鼠MC38结肠肿瘤细胞用荧光染料CFSE标记,并且在存在同种型对照、抗密封蛋白18.2抗体、抗SIRP α 抗体、抗密封蛋白18.2和抗SIRP α 抗体的组合、抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体的情况下,与由C57BL6/hCD47/hSIRP α 敲入小鼠制备的小鼠骨髓源性巨噬细胞(BMDM)一起孵育。2小时后,收获巨噬细胞,用荧光标记的抗小鼠巨噬细胞抗体染色,并且通过流式细胞术分析。CD11b+CFSE+双阳性事件鉴定具有已经吞噬CFSE标记的肿瘤细胞的巨噬细胞。每个样品由不同颜色表示。示出了三个单独样品的吞噬指数。

[0776] 如图4A所示,抗密封蛋白18.2抗体hu28H1L2通过抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)诱导约25%的吞噬作用,并且抗SIRP α 抗体C25几乎不诱导吞噬作用。抗密封蛋白18.2抗体和抗SIRP α 抗体C25的组合显著改善吞噬作用。与组合相比,抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体ES028-001、ES028-005、ES028-009以剂量依赖性方式诱导更强的吞噬作用,并且ES028-005示出最佳的吞噬作用效果;ES028-013未示出协同的吞噬作用效果。对于不表达密封蛋白18.2的MC38细胞,抗密封蛋白18.2抗体和抗SIRP α 抗体C25的组合没有显著改善对不表达密封蛋白18.2的细胞的吞噬作用(图4B)。抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体或抗密封蛋白18.2抗体和抗SIRP α 抗体的组合也不诱导对不表达密封蛋白18.2的细胞的改善的吞噬作用(图4B)。

[0777] 实施例5:抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体活性IgG1 Fc激活Fc γ R依赖性ADCP并且提供比IgG4或IgG1LALA同种型更强的效力

[0778] 在MC38/hCD47/hClaudin18.2的另一个小鼠BMDM吞噬作用测定中,测试了单处理或与抗SIRP α 抗体组合的具有IgG1、IgG4和IgG1LALA不同同种型的抗密封蛋白18.2抗体。类似地,还测试了具有IgG1、IgG4和IgG1LALA的抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体ES028-001、ES028-005和ES028-009的吞噬作用。

[0779] 共培养2小时后,收获巨噬细胞,用荧光标记的抗人巨噬细胞抗体染色,并且通过流式细胞术分析。CD11b+CFSE+双阳性事件鉴定具有已经吞噬CFSE标记的肿瘤细胞的巨噬细胞。每个样品由不同颜色表示。示出了三个单独样品的吞噬指数。

[0780] 如图5所示,与抗密封蛋白18.2IgG4和抗密封蛋白18.2IgG1LALA突变体相比,抗密封蛋白18.2IgG1在单处理和与抗SIRP α 抗体组合中均示出最佳的吞噬作用。抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体ES028-001 IgG1、ES028-005 IgG1和ES028-009 IgG1诱导与ES028-001 IgG4、ES028-005 IgG4和ES028-009 IgG4相比更强的吞噬作用效果,而对于抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体ES028-001 IgG1LALA、ES028-005 IgG1LALA和ES028-009 IgG1LALA不存在吞噬作用功效。数据显示抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体IgG1激活Fc γ R依赖性ADCP并且提供比IgG4或IgG1LALA同种型更强的效力。

[0781] 实施例6:抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体构建和表达

[0782] 抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体被构建为在重链或轻链的N末端或C末端处与抗PDL1单结构域抗体(sdAb)C71或C570融合的抗SIRP α 抗体C25(图6A-D,还参见表7)。抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体还可以在一个臂中构建抗SIRP α Fab并且在另一个臂中构建通过Fc区中的杵臼(KiH)连接的两个拷贝的抗PDL1 sdAb(图6E,还参见表7)。抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体还可以被构建为Fc的N末端中的抗PDL1 sdAb和与Fc的C末端融合的抗SIRP α Fab(图6F-G,还参见表7)。将柔性(Gly4Ser)₃连接子与抗SIRP α Fab的N末端遗传连接。

[0783] 双特异性蛋白ES019-020包括在轻链的C末端处的一个抗SIRP α 抗体和两个抗PDL1sdAb(图6A,还参见表7)。

[0784] 双特异性蛋白ES019-024包括在重链的C末端处的一个抗SIRP α 抗体和两个抗PDL1sdAb(图6B,还参见表7)。

[0785] 双特异性蛋白ES019-025包括在重链的N末端处的一个抗SIRP α 抗体和两个抗PDL1sdAb(图6C,还参见表7)。

[0786] 双特异性蛋白ES019-026包括在轻链的N末端处的一个抗SIRP α 抗体和两个抗PDL1sdAb(图6D,还参见表7)。

[0787] 双特异性蛋白ES019-029包括通过Fc区的杵臼突变产生的一个抗SIRP α Fab臂和两个抗PDL1 sdAb臂异质二聚体(图6E,还参见表7)。

[0788] 双特异性蛋白ES019-072包括Fc的N末端中的两个抗PDL1 sdAb和Fc区的C末端中的一个拷贝的抗SIRP α Fab。不对称异质二聚体通过Fc区中的杵臼突变形成(图6F,还参见表7)。

[0789] 双特异性蛋白ES019-073或ES019-079包括Fc的N末端中的两个抗PDL1 sdAb和Fc区的C末端中的两个抗SIRP α Fab(图6G,还参见表7)。

[0790] 实施例7:抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体结合亲和力

[0791] 分别根据制造商手册,使用Octet测定(ForBio公司)对抗PDL1/SIRP α 双特异性蛋白对人PDL1的结合亲和力进行表征。简而言之,将抗体偶联到传感器上,并且然后将传感器浸入PDL1蛋白梯度中(以200nM开始,稀释2倍,并且总共8个剂量)。所述抗体的结合应答是实时测量的并且结果是全局拟合的。表9.1总结了所测试抗体的亲和力数据。

[0792] 表9.1.如通过Octet测定所测量的双特异性抗体对人PDL1的结合亲和力

	样品	KD (M)	kon (1/Ms)	koff (1/s)
	抗 PDL1, C71	5.31E-09	9.42E+05	5.01E-03
	抗 PDL1, C570	3.74E-10	8.19E+05	3.06E-04
[0793]	抗 PDL1, 570h3	1.98E-10	4.70E+05	9.29E-05
	ES019-020	5.54E-09	9.18E+05	5.09E-03
	ES019-024	6.56E-09	9.20E+05	6.03E-03
	ES019-025	3.81E-09	1.58E+06	6.04E-03
	ES019-026	4.10E-09	1.56E+06	6.39E-03
	ES019-029	1.23E-09	1.11E+06	1.36E-03
	ES019-079	4.85E-11	5.88E+05	2.85E-05

[0794] 实施例8:通过FACS进行的抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体与PDL1和SIRP α 的结合

[0795] 将大约100,000个过表达人PDL1的Raji细胞用洗涤缓冲液洗涤,并且与100ul连续稀释的PDL1/SIRP α 双特异性蛋白在冰上孵育30分钟。然后将细胞用洗涤缓冲液洗涤两次,并且与100ul抗人Fc-PE在冰上孵育30分钟。然后将细胞用洗涤缓冲液洗涤两次,并且在FACS Canto II分析仪(BD生物科学公司)上进行分析。如图7A所示,抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体以剂量依赖性方式与Raji/hPDL1细胞结合。双特异性抗体ES019-025、ES019-026与Raji/hPDL1结合,类似于抗PDL1单克隆抗体C71,而ES019-020、ES019-024与Raji/hPDL1结合的程度相对于抗PDL1,C71较低。

[0796] 将过表达人SIRP α 的CHO-K1细胞用洗涤缓冲液洗涤,并且与100ul连续稀释的PDL1/SIRP α 双特异性蛋白在冰上孵育30分钟。然后将细胞用洗涤缓冲液洗涤两次,并且与100ul抗人Fc-PE在冰上孵育30分钟。然后将细胞用洗涤缓冲液洗涤两次,并且在FACS Canto II分析仪(BD生物科学公司)上进行分析。如图7B所示,抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体以剂量依赖性方式与CHO-K1/SIRP α 细胞结合。ES019-020、ES019-024、ES019-025和ES019-026与CHO-K1/hSIRP α 结合,类似于抗SIRP α ,C25。

[0797] 实施例9:通过Jurkat/PD1报告细胞测定产生的抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体的PDL1阻断活性

[0798] 使用由GenScript开发的PD1阻断报告基因测定进行PD1-PDL1阻断报告基因测定,所述测定使用基于表达PDL1和抗CD3 scFv的CHO细胞的双细胞系统以及过表达PD1的Jurkat/NFAT-RE报告细胞系。收获在对数生长期中生长的细胞并且以对于CHO 2×10^6 个细胞/毫升以及对于Jurkat/PD1 NFAT-RE细胞 4×10^6 个细胞/毫升的浓度重悬于含有1%热灭活的FBS的RPMI 1640 20。接下来,将在连续稀释的测定培养基(含有1% FBS的RPMI 1640)中的测试抗体添加到每个孔中。在37°C、5% CO₂下,在95%相对湿度下将板孵育6小时。第二天添加40ul荧光素酶(Bio-Glo荧光素酶测定系统),并且使用BioTek多模式酶标仪测量荧光素酶活性的量。

[0799] 如图8所示,双特异性抗体ES019-024、ES019-025、ES019-026激活Jurkat/PD1报告细胞,类似于抗PDL1单克隆抗体C71,而ES019-020激活Jurkat/PD1报告细胞的程度相对于抗PDL1,C71较低。

[0800] 实施例10:抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体增强PDL1+癌细胞的体外巨噬细胞吞噬作用

[0801] 将缺乏人PDL1表达的人K562白血病肿瘤细胞或表达人PDL1的K562用荧光染料CFSE标记,并且在存在同种型对照、抗PDL1抗体、抗SIRP α 抗体、抗PDL1和抗SIRP α 抗体的组

合、抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体的情况下,与人巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)处理的单核细胞源性巨噬细胞一起孵育。2小时后,收获巨噬细胞,用荧光标记的抗人巨噬细胞抗体染色,并且通过流式细胞术分析。CD11b+CFSE+双阳性事件鉴定具有已经吞噬CFSE标记的肿瘤细胞的巨噬细胞。每个样品由不同颜色表示。示出了三个单独样品的吞噬指数。

[0802] 如图9A所示,抗PDL1抗体C71通过抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)诱导约20%的吞噬作用,并且抗SIRP α 抗体C25几乎不诱导吞噬作用。抗PDL1和抗SIRP α 抗体C25的组合显著改善吞噬作用。抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体ES019-020、ES019-029以类似于组合的剂量依赖性方式诱导强吞噬作用;ES019-024、ES019-025和ES019-026未示出协同的吞噬作用效果。

[0803] 如图9B所示,抗PDL1抗体C71单一疗法或与抗SIRP α 抗体C25的组合几乎不诱导对缺乏PDL1表达的K562亲本细胞的吞噬作用。抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体ES019-020、ES019-024、ES019-025、ES019-026、ES019-029未示出对K562细胞(PDL1阴性)的吞噬作用效果。

[0804] 如图9C所示,抗PDL1抗体C71单一疗法或与抗SIRP α 抗体C25的组合几乎不诱导对表达人SIRP γ 的人Jurkat T细胞系的吞噬作用。抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体ES019-020、ES019-024、ES019-025、ES019-026、ES019-029未示出对Jurkat T细胞(SIRP γ 阳性)的吞噬作用效果。

[0805] 实施例11:抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体增强PDL1+癌细胞的体外巨噬细胞吞噬作用

[0806] 用hCD47/hCLDN18.2过表达MC38细胞接种人SIRP α /CD47双KI小鼠。当平均肿瘤体积达到约70到100mm³时,根据肿瘤体积将小鼠分为7组。向小鼠腹膜内给予同一摩尔浓度的10mpk同种型抗体、10mpk CLDN18.2 mAb、10mpk SIRP α mAb、10mpk CLDN18.2 mAb加上10mpk SIRP α mAb或14mpk ES028-001、ES028-005、ES009。给药方案是BIW,持续5个剂量。每周测量两次肿瘤体积。在第5次给药后3天,处死小鼠并对肿瘤进行称重。通过双向方差分析将不同处理组的平均肿瘤体积与同种型对照组的平均肿瘤体积进行比较来进行统计。

[0807] 相对肿瘤抑制率TGI(%)计算如下:

[0808] $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$ 。(T和C分别是处理组和对照组在特定时间点的相对肿瘤体积(RTV)或肿瘤重量(TW))。

[0809] $T/C\% = TRTV/CRTV \times 100\%$ (TRTV:处理组的平均RTV;CRTV:媒介对照组的平均RTV;

[0810] $RTV = V_t/V_0$, V_0 是分组时动物的肿瘤体积, V_t 是处理后动物的肿瘤体积);

[0811] T/C也可以基于肿瘤重量计算如下:

[0812] $T/C\% = TTW/CTW \times 100\%$ (TTW:结束时处理组的平均肿瘤重量;CTW:结束时媒介对照组平均肿瘤重量)。

[0813] 如图10所示,类似于同种型处理,抗密封蛋白18.2抗体hu28H1L2和抗SIRP α 抗体C25单一疗法不抑制肿瘤生长。抗密封蛋白18.2抗体和抗SIRP α 抗体C25的组合显著降低肿瘤生长。抗密封蛋白18.2/SIRP α 双特异性抗体ES028-005以类似于组合的方式诱导强肿瘤生长抑制;ES028-001示出了较弱的肿瘤抑制,并且ES028-009不抑制肿瘤生长。

[0814] 实施例12:基于抗SIRP α 完全阻断抗体的BiME提供了对肿瘤细胞的最佳协同的吞噬作用效果和选择性

[0815] 嵌合抗体的表征

[0816] 1.1结合特异性检测

[0817] 使用稳定表达人SIRP α v1的CHOK1细胞或293F细胞和稳定表达人SIRP α v2的CHOK1细胞通过FACS测定来检测经纯化嵌合抗体对人SIRP α 变体的结合活性。如图12所示,如所测试的所有抗体与细胞表面人SIRP α v1和细胞表面人SIRP α v2强烈结合。使用GraphPad Prism9.0来计算EC₅₀和靠前信号。

[0818] 1.2CD47/SIRP α 相互作用阻断活性检测

[0819] 使用竞争性ELISA测定来确定经纯化嵌合抗体是否可以阻断CD47和SIRP α 相互作用。简而言之,将抗体和mFc标记的人CD47 ECD重组蛋白与ELISA微孔板包被的人SIRP α v1 ECD或人SIRP α v2 ECD重组蛋白共孵育。CD47的可溶性ECD的浓度为25nM,并且SIRP α 的可溶性ECD的浓度为20nM。洗涤后,添加HRP标记的抗小鼠Fc第2抗体(西格玛公司)并且在37°C下孵育1小时。然后,添加100微升/孔的TMB溶液(生物技术公司(Biotechnology))。在室温下孵育15分钟后,通过添加50 μ l 1N HCl来终止反应。读取OD 450nm。通过阻断人SIRP α ECD重组蛋白与ELISA微孔板包被的人CD47 ECD重组蛋白的结合来确定阻断率。图13总结了使用GraphPad Prism9.0计算的IC₅₀和最高阻断百分比。如所测试的所有抗体可以阻断人CD47与不同的人SIRP α 变体之间的相互作用。

[0820] 1.2.1表位分析

[0821] 将竞争性ELISA测定用于经纯化嵌合抗体的表位分箱。简而言之,将过量的竞争者抗体和mFc标记的人SIRP α v1 ECD重组蛋白与ELISA微孔板包被抗体共孵育。洗涤后,添加HRP标记的抗小鼠Fc第2抗体(西格玛公司)并且在37°C下孵育1小时。然后,添加100微升/孔的TMB溶液(生物技术公司)。在室温下孵育15分钟后,通过添加50 μ l 1N HCl来终止反应。读取OD 450nm。计算竞争比率。可以彼此竞争与SIRP α 结合的抗体可以具有相关结合表位。如表B所示,025c没有显示出042c、073c和hu1H9G4与人SIRP α 的竞争性结合,表明其可以与不同的表位结合。042c、073c与hu1H9G4之间的竞争不是双向的,表明其结合表位可以是相关的但不是完全相同的。

[0822] 使用氢氘交换质谱(HDX-MS)进一步进行025c、042c、073c、HEFLB和hu1H9G4的表位作图。如图23A所示,025c结合导致His标记的人SIRP α v1 ECD的YNQKEGHFPRVTTVSDL(SEQ ID NO:218)的区域的氢氘交换率较小,这表明这些氨基酸对于025c结合可能是关键的。如图23B所示,042c结合导致His标记的人SIRP α v1 ECD的SGAGTEL(SEQ ID NO:219)和TNVDPVGESVS(SEQ ID NO:220)的2个区域的氢氘交换率较小,这表明这些氨基酸对于042c结合可能是关键的。如图23C所示,073c结合导致His标记的人SIRP α v1 ECD的TNVDPVGESVSY(SEQ ID NO:221)的区域的氢氘交换率较小,这表明这些氨基酸对于073c结合可能是关键的。具体地,这3个区域不位于CD47所结合的SIRP α ECD的IgV结构域,这表明042c和073c可以作为别构抗体起作用以阻断CD47和SIRP α 的相互作用,或者042c和073c的阻断活性是位阻效应。如图23D所示,hu1H9G4结合导致His标记的人SIRP α v1 ECD的YNQKEGHFPRVTTVSDL(SEQ ID NO:218)的区域的氢氘交换率较小,这表明这些氨基酸对于hu1H9G4结合可能是关键的。如图23E所示,HEFLB结合导致his标记的人SIRP α v1 ECD的VGPIQW(SEQ ID NO:222)的区域的氢氘交换率较小,这表明这些氨基酸对于HEFLB结合可能是关键的。

[0823] 将竞争性ELISA数据和HDX-MS数据一起考虑,得出结论,025c、042c和073c可以具

有不同的结合表位,这也不同于hu1H9G4和HEFLB的参考抗体。另外,结果显示025c、042c和073c的表位可能位于IgV结构域之外。IgV结构域负责CD47的胞外Ig结构域的结合。下表A示出了参考抗体的序列信息。

[0824] 表A.HEFLB和hu1H9G4的可变区氨基酸序列

	抗体	VH	VL
[0825]	HEFLB	SEQ ID NO: 214 EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKAS GYSFTSYWVHWVRQMPGKGLEWM GNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSD KSISTAYLQLSSLKASDTAMYYCVR GGTGTLAYFAYWGQGLTVTVSS	SEQ ID NO: 215 DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCR SSQSLVHSYGNTYLYWFQQRPGQ SPRLLIYRVSNRFSQVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF QGTHVPYTFGGGTKVEIK
	hu1H9G4	SEQ ID NO: 216 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFTSYWITWVKQAPGQGLEWI GDIYPGSGSTNHIEKFKSKATLTVD SISTAYMELSRLRSDDTAVYYCATGY GSSYGYFDYWGQGLTVTVSS	SEQ ID NO: 217 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLL IYTAKTLAEGVPSRFSQSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQHQQYGP FTFGQGTKLEIK

[0826] 表B.抗SIRP α 嵌合抗体表位分箱总结

[0827]	竞争%			
	包被 mAb	025c	042c	hu1H9G4
[0828]	竞争者			
	O25c	93.5	19.1	15.3
	042c	8.9	93.9	29.8
	hu1H9G4	14.5	82.6	90.5
	073c	9.1	93.6	37.7

[0829] 1.3SHP-1募集测定

[0830] 通过基于细胞的SHP-1募集测定评估经纯化嵌合抗体阻断CD47/SIRP α 介导的“别吃我”信号传导的功效。用与其C末端融合的小 β -gal片段(ED)对全长人SIRP α v1进行工程化,并且用互补 β -gal片段(EA)对SHP-1的SH2结构域进行工程化。这些构建体在K562细胞中稳定表达。通过与表达人CD47的细胞共培养,配体接合引起SIRP α -ED融合蛋白的磷酸化,从而导致迫使产生活性 β -gal酶的SHP-1-EA的募集。这种活性酶水解底物以产生化学发光作为报告基因活性的量度。使用GraphPad Prism9.0计算IC₅₀和最高阻断百分比。如图14中所总结的,如所测试的所有抗体可以在不同水平下破坏CD47/SIRP α 介导的“别吃我”信号传导。

[0831] 1.4体外吞噬作用测定

[0832] 通过基于流式细胞术的吞噬作用测定来评估经纯化嵌合抗体的功能功效。简而言之,在存在如所测试的抗体的情况下,将具有不同SIRPA基因型的M0非极化或M1极化的人单核细胞源性巨噬细胞与CellTrace Violet(生命技术公司(Life Technologies))标记的表达CD47的癌细胞共培养。通过确定对细胞痕量紫色染料呈阳性的巨噬细胞百分比来测定吞噬作用。对于非极化巨噬细胞,将外周血单核细胞接种到补充有10% FBS和50ng/ml M-CSF的1640中的10cm组织培养板中,持续七到九天。将贴壁细胞收获为M0非极化巨噬细胞。对于M1极化巨噬细胞,将外周血单核细胞接种到补充有10% FBS和50ng/ml GM-CSF的1640中的10cm组织培养板中,持续5天。添加50ug/ml IFN γ 和100ug/ml LPS用于另外的两到四天培

养。将贴壁细胞收获为M1极化巨噬细胞。

[0833] 如图20A所示,015c、025c、042c、059c和073c没有显示出增强从SIRPA杂合v1/v2个体获得的M0巨噬细胞对Raji细胞的肿瘤细胞摄取的单一药剂活性。然而,在存在利妥昔单抗(Rituximab)(一种抗CD20抗体)的情况下,除了具有较弱的阻断人CD47与人SIRP α v2之间的相互作用的活性的059c之外,如所测试的所有其它经纯化嵌合抗体增强了Raji细胞的巨噬细胞介导的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。

[0834] 在吞噬作用测定中使用从SIRPA纯合v1/v1(图20B)和v2/v2(图20C)个体获得的M0巨噬细胞测试SIRP α 抗体和PD-L1抗体的组合。在存在PD-L1抗体的情况下,025c、042c和073c有效地增强稳定表达PD-L1的Raji细胞的巨噬细胞介导的ADCP。

[0835] 人源化抗体的表征

[0836] 1.5结合特异性检测

[0837] 如所测试的所有人源化抗体被证实保留了与C25的亲本抗体结合SIRP家族成员的类似活性。图15总结了使用GraphPad Prism9.0计算的EC₅₀和靠前信号。因此,可以预期的是,本文所提供的所有人源化抗体(例如,hu025.021、hu025.033、hu025.023、hu025.059、hu025.060、hu26.H1L1、hu26.H1L2、hu26.H1L2(S92A)、C71、C71v38、C239、C492、C570、570h3、C446、C2811、C1778、C1793、C2855、C2713和C2719)分别具有与对应亲本抗体类似的活性。

[0838] 1.5.1亲和力检测

[0839] 使用表面等离子体共振技术(Biacore系统)表征人源化抗体对人SIRP α v1、人SIRP α v2的结合亲和力。用1:1结合模型拟合缔合和解离曲线,并且计算每种抗体的Ka/Kd/KD值。图16总结了每种抗体的Ka/Kd/KD值的亲和力数据。

[0840] 1.7 CD47/SIRP α 相互作用阻断活性检测

[0841] 用竞争性ELISA测定(参考上述方法)测试人源化抗体阻断CD47和SIRP α 相互作用的能力。如图17所示,如所测试的所有人源化抗体被证实保留了与C25的亲本抗体类似的活性,以阻断人CD47与不同的人SIRP α 变体之间的相互作用。图17总结了使用GraphPad Prism9.0计算的IC₅₀和最高阻断百分比。

[0842] 还建立竞争性FACS测定以进一步比较人源化抗体和一些已知的抗SIRP α 抗体的阻断活性。简而言之,将抗体和mFc标记的人CD47 ECD重组蛋白与稳定表达人SIRP α v1或人SIRP α v2的CHOK1细胞共孵育。洗涤后,添加染料标记的抗小鼠Fc第2抗体(西格玛公司)并且在37°C下孵育1小时。检测荧光强度。通过阻断人CD47 ECD重组蛋白与SIRP α 表达的CHOK1细胞结合来确定阻断率。图18总结了使用GraphPad Prism9.0计算的IC₅₀和最高阻断百分比。

[0843] 1.8 SHP-1募集测定

[0844] 通过基于细胞的SHP-1募集测定(参考上述方法)评估人源化抗体阻断CD47/SIRP α 介导的“别吃我”信号传导的功效。如所测试的所有人源化抗体被证实保留了与C25的亲本抗体类似的活性,以阻断CD47接合,从而导致SHP-1募集到SIRP α 胞内尾部。图19总结了使用GraphPad Prism9.0计算的IC₅₀和最高阻断百分比。

[0845] 1.9体外吞噬作用测定

[0846] 对于体外功能验证,在吞噬作用测定中使用从SIRPA纯合v1/v1(图21A和图21B)和v2/v2(图21C和图21D)个体获得的M0巨噬细胞测试SIRP α 抗体和PD-L1抗体或利妥昔单抗的

组合。如所测试的所有人源化抗体被证实保留了与025c的亲本抗体类似的活性,以增强在存在PD-L1抗体或利妥昔单抗的情况下稳定表达PD-L1的Raji细胞的巨噬细胞介导的ADCP。

[0847] 2. 将抗SIRP α 抗体分类为完全阻断剂、部分阻断剂和非阻断剂

[0848] 使用竞争性ELISA测定来确定经纯化嵌合抗体是否可以阻断CD47和SIRP α 相互作用。简而言之,将抗体和mFc标记的人CD47 ECD重组蛋白与ELISA微孔板包被的人SIRP α v1 ECD重组蛋白共孵育。洗涤后,添加HRP标记的抗小鼠Fc第2抗体(西格玛公司)并且在37°C下孵育1小时。然后,添加100微升/孔的TMB溶液(生物技术公司)。在室温下孵育15分钟后,通过添加50 μ l 1N HCl来终止反应。读取OD 450nm。通过阻断人SIRP α ECD重组蛋白与ELISA微孔板包被的人CD47 ECD重组蛋白的结合来确定阻断率。图22示出了025或C25的最大阻断百分比超过90%,其被定义为完全阻断剂;050或C50的最大阻断百分比接近于零,其被定义为非阻断剂;并且035或C35的最大阻断百分比介于两者之间,其被定义为部分阻断剂(表10)。

[0849] 表10. 不同抗SIRP α 克隆的CD47和SIRP α 阻断性质

[0850]	CD47-SIRP α 相互作用阻断活性	抗 SIRP α 克隆
	完全阻断剂	C25、C15、C42、 C59、C73
	部分阻断剂	C35
	非阻断剂	C50

[0851] 3. 使用完全阻断剂C25、C15、C42、C59和C73、部分阻断剂C35和非阻断剂C50的组合疗法和双特异性分子

[0852] 在缺乏人PDL1表达的人Raji淋巴瘤细胞中测试不同的CD47和SIRP α 阻断抗体,或用荧光染料CFSE标记表达Raji的人PDL1,并且在存在同种型对照、抗PDL1抗体、抗SIRP α 抗体C25、C35、C50、抗PDL1和抗SIRP α 抗体的组合或基于C25、C35、C50的抗PDL1/SIRP α 双特异性抗体的情况下,与人巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)处理的单核细胞源性巨噬细胞一起孵育。2小时后,收获巨噬细胞,用荧光标记的抗人巨噬细胞抗体染色,并且通过流式细胞术分析。CD11b+CFSE+双阳性事件鉴定具有已经吞噬CFSE标记的肿瘤细胞的巨噬细胞。每个样品由不同颜色表示。示出了三个单独样品的吞噬指数。

[0853] 如图11A所示,抗SIRP α 部分阻断抗体C35和非阻断抗体C50通过对Raji/PDL1细胞的单处理诱导约40%的吞噬作用;抗SIRP α 完全抗体C25单处理几乎不诱导吞噬作用。抗PDL1和抗SIRP α 抗体C25的组合或基于C25的BiME显著改善吞噬作用。抗PDL1和抗SIRP α 抗体C35、C50的组合或基于C35、C50的BiME没有显示出协同的吞噬作用效果。

[0854] 在对Raji (PDL1阴性) 细胞的吞噬作用测定中(图11B),抗SIRP α 部分阻断抗体C35和非阻断抗体C50单处理仍可以诱导对Raji (PDL1阴性) 细胞的吞噬作用;抗SIRP α 完全抗体C25单处理几乎不诱导吞噬作用。抗PDL1和抗SIRP α 抗体C25的组合或基于C25的PDL1/SIRP α 双特异性抗体不诱导吞噬作用,因为肿瘤细胞上缺乏PDL1表达。抗PDL1和抗SIRP α 抗体C35或C50的组合或基于C35或C50的BiME显示出与C35或C50抗体单处理类似的吞噬作用效果。

[0855] 结果显示,与C25抗体相比,抗SIRP α 抗体C35或C50单处理、组合或双特异性抗体可以独立于靶抗原表达诱导肿瘤细胞吞噬作用。基于抗SIRP α 抗体C25的双特异性抗体的性质提供了更特异性和安全的性质。

[0856] 下表11总结了实验结果。

[0857] 表11. 实施例10和12的实验结果的总结

	所测试细胞系	单一疗法	组合	BiME	实 施 例
[0858]	K562 白血病肿瘤细胞 (-人 PDL1)	C25: 几乎不诱导吞噬作用 抗 PDL1 抗体 C71: 几乎不诱导吞噬作用	C25 + C71: 无协同效应	C25 + C71: 无协同效应	10
	K562 白血病肿瘤细胞 (+人 PDL1)	抗 PDL1 抗体 C71: 约 20%吞噬作用;	C25 + C71: 协同效应	C25 + C71: 协同效应	10
[0859]		C25: 几乎不诱导吞噬作用			
	人 Raji 淋巴瘤细胞 (-人 PDL1)	C25: 几乎不诱导吞噬作用 抗 PDL1 抗体 C71: 几乎不诱导吞噬作用	C25 + C71: 无协同效应	C25 + C71: 无协同效应	12
		C35 和 C50: 诱导约 40%吞噬作用	C35 + C71 或 C50 + C71: 类似于单一疗法	C35 + C71 或 C50 + C71: 类似于单一疗法	
	人 Raji 淋巴瘤细胞 (+人 PDL1)	C25: 几乎不诱导吞噬作用	C25: 协同效应	C25: 协同效应	12
		C35 或 C50: 诱导约 40%吞噬作用 抗 PDL1 抗体 C71: 诱导约 20%吞噬作用	C35 + C71; 或 C50 + C71: 类似于单一疗法	C35 + C71; 或 C50 + C71: 类似于单一疗法	
	表达人 CD47 和人密封蛋白 18.2 的小鼠 MC38 结肠肿瘤细胞	抗密封蛋白 18.2 抗体 hu28H1L2: 诱导约 25%吞噬作用 抗 SIRPα 抗体 C25 几乎不诱导吞噬作用	C25 + hu28H1L2: 协同效应	C25 + hu28H1L2: 更强的协同效应	4

[0860] 如实施例4所示,相较于表达非密封蛋白18.2的细胞,抗密封蛋白18.2和抗SIRPα抗体C25的组合或基于C25的BiME也显著改善了对表达密封蛋白18.2的细胞的选择性吞噬作用。

[0861] 另外,如图20A和图21A所示,相较于不表达靶抗原的细胞,预期C15、C42、C59或C73与靶向靶抗原(例如,PD-L1、密封蛋白18.2)的抗体的组合对表达靶抗原(例如,PD-L1、密封蛋白18.2)的细胞具有选择性吞噬作用。完全阻断剂C15、C42、C59和C73也可以用于制备以某种形式(如ES028-001、ES028-005、ES028-009、ES028-013、ES019-020、ES019-024、ES019-025、ES019-026、ES019-029、ES019-072、ES019-073和ES019-079)提供的多特异性分子,并且可以预期相较于非表达靶抗原的细胞对表达靶抗原(例如,PD-L1、密封蛋白18.2)的细胞具有类似的选择性吞噬作用。

[0862] 虽然巨噬细胞贯穿说明书被例示,但此处所描述的多特异性分子、组合物和方法适用于髓样细胞系的细胞,如树突状细胞。如本领域的技术人员所知,在细胞到细胞的基础上设想了较小的优化和改变,并且这些优化和改变涵盖在本公开的范围內。

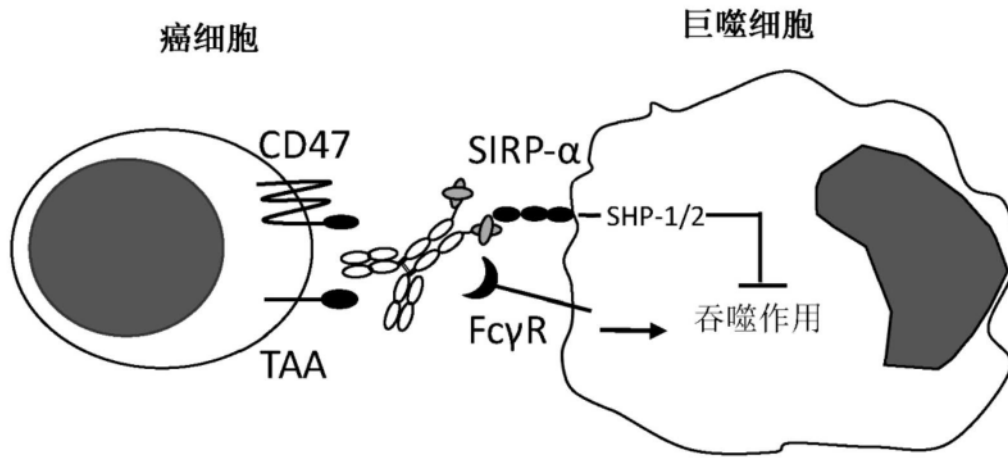


图1

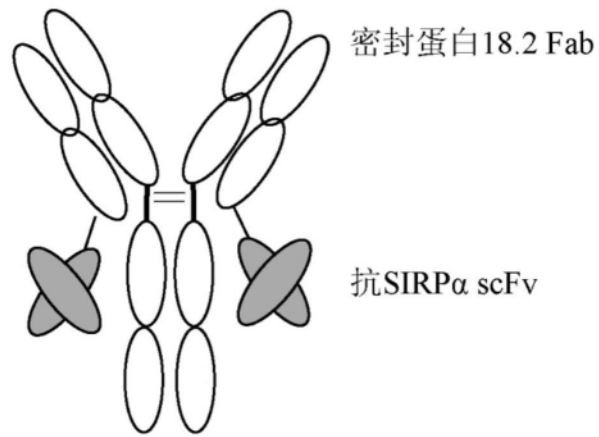


图2A

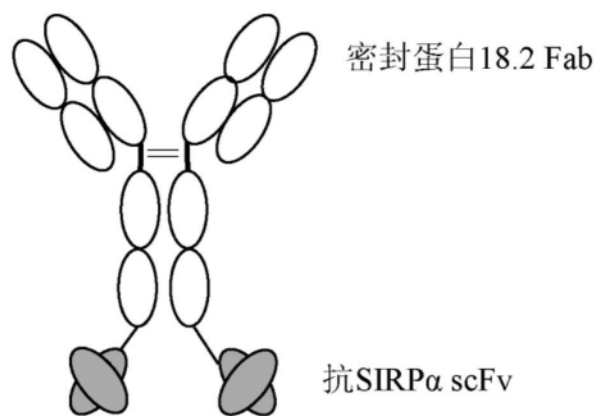


图2B

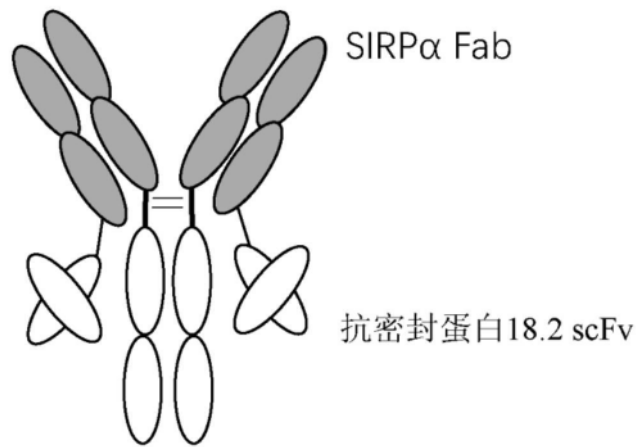


图2C

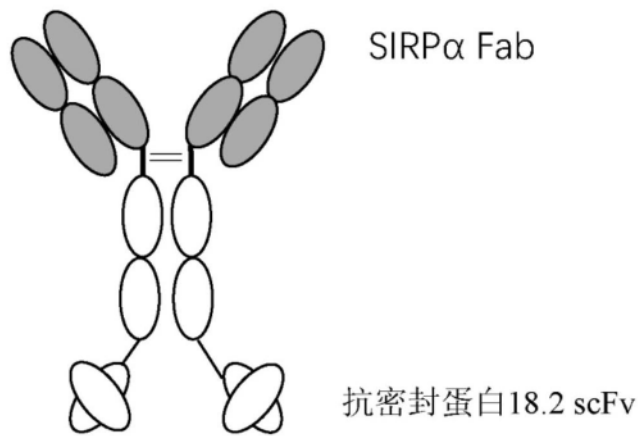


图2D

FACS与Raji/hClaudin18.2细胞结合

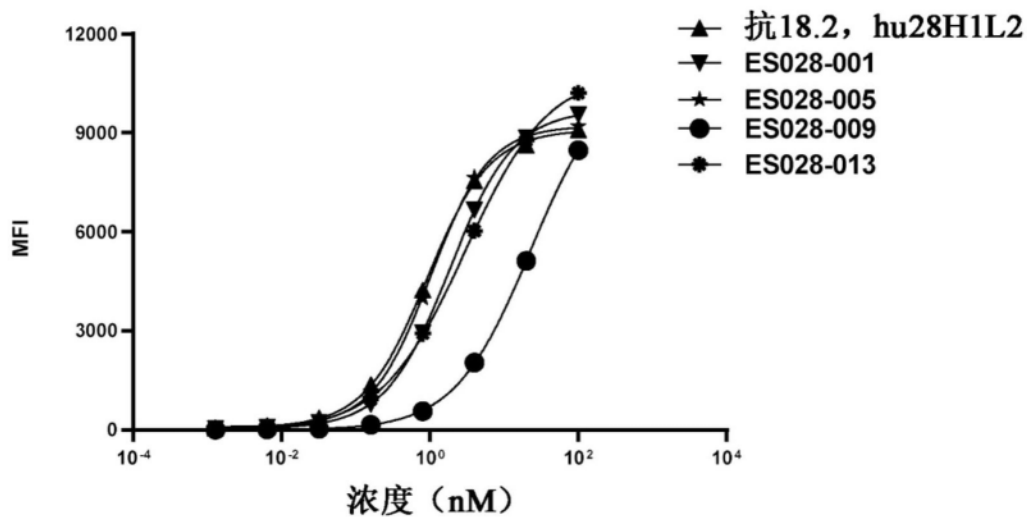


图3A

CHO-K1/SIRPa FACS结合

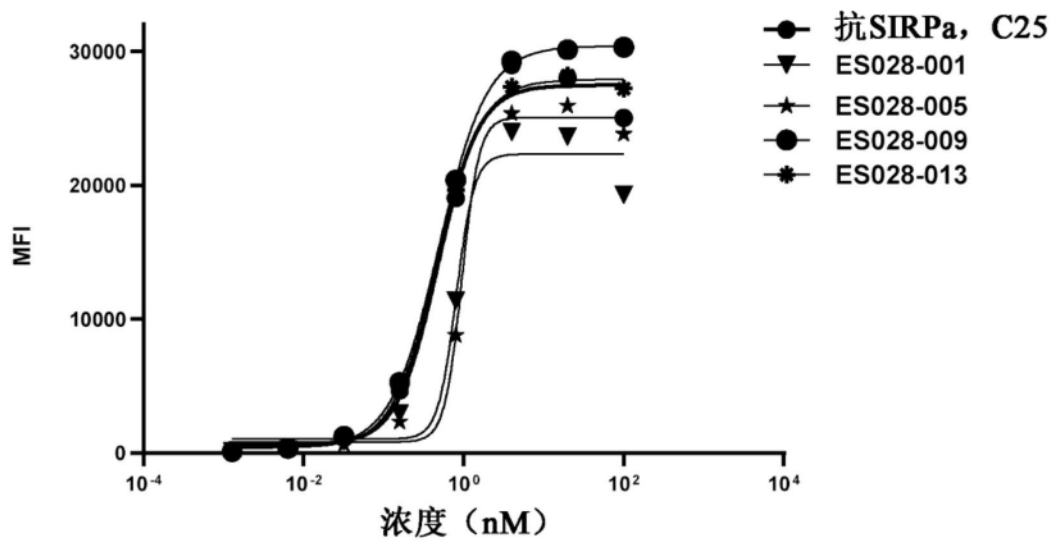


图3B

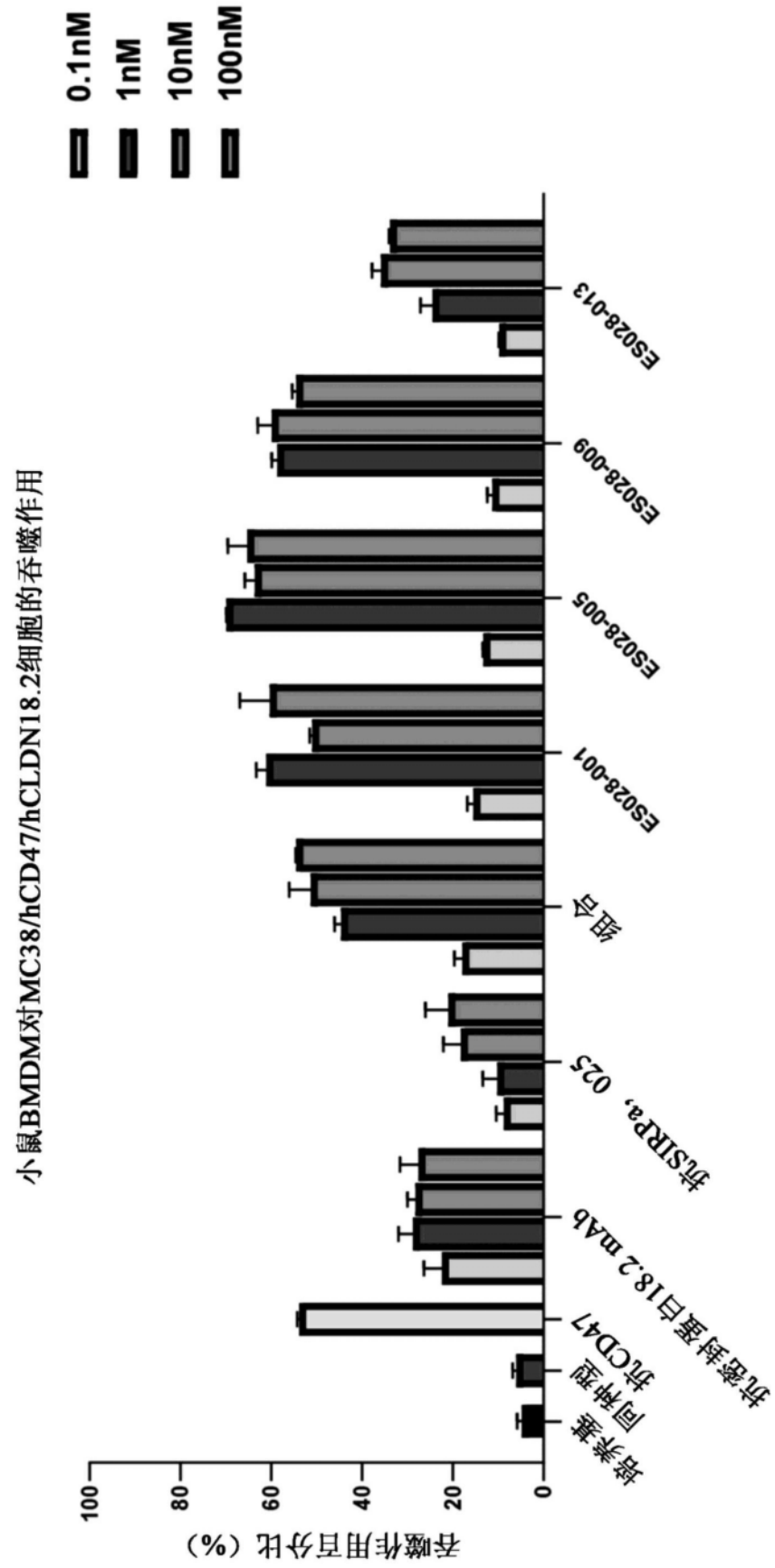


图4A

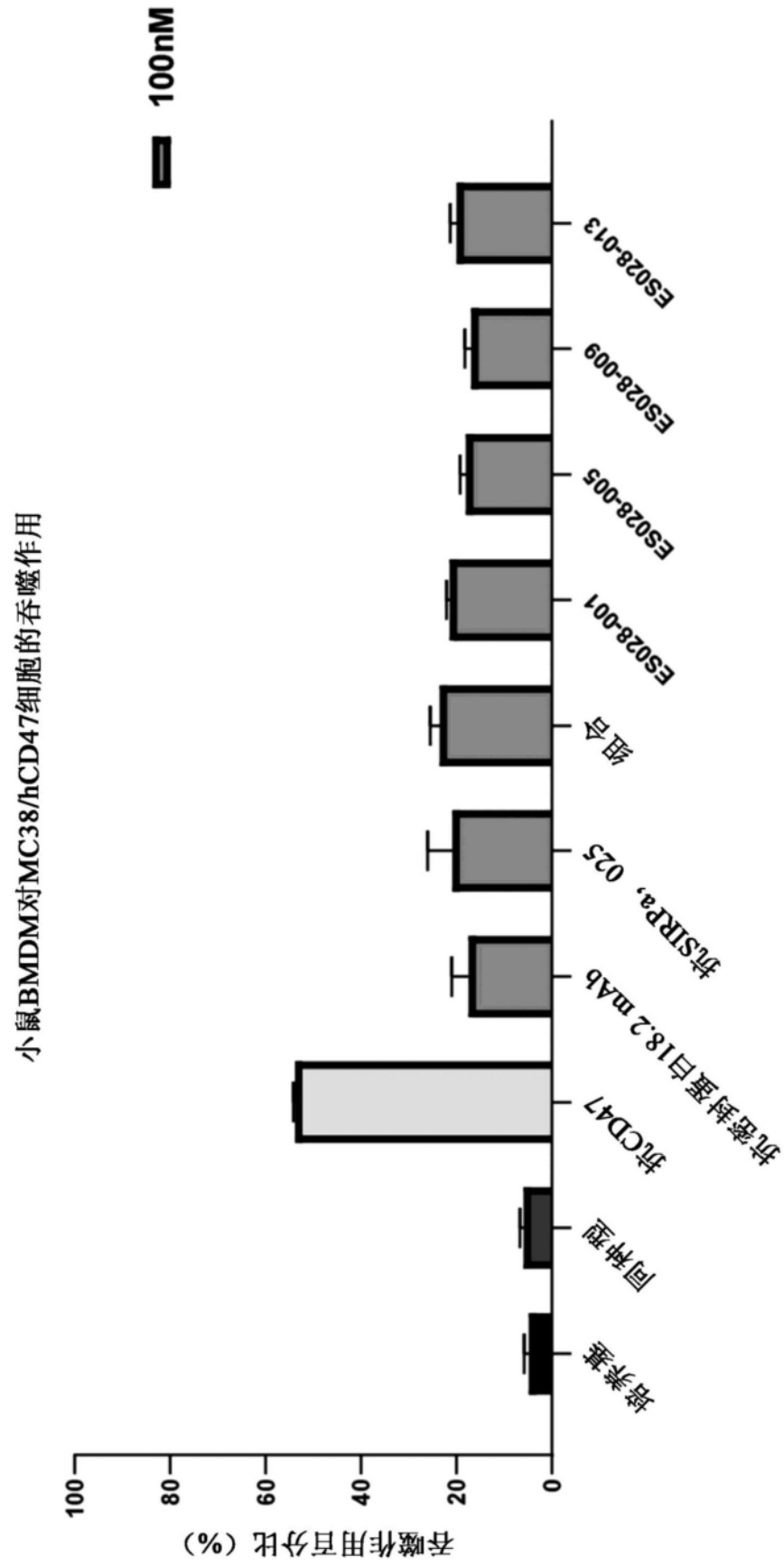


图4B

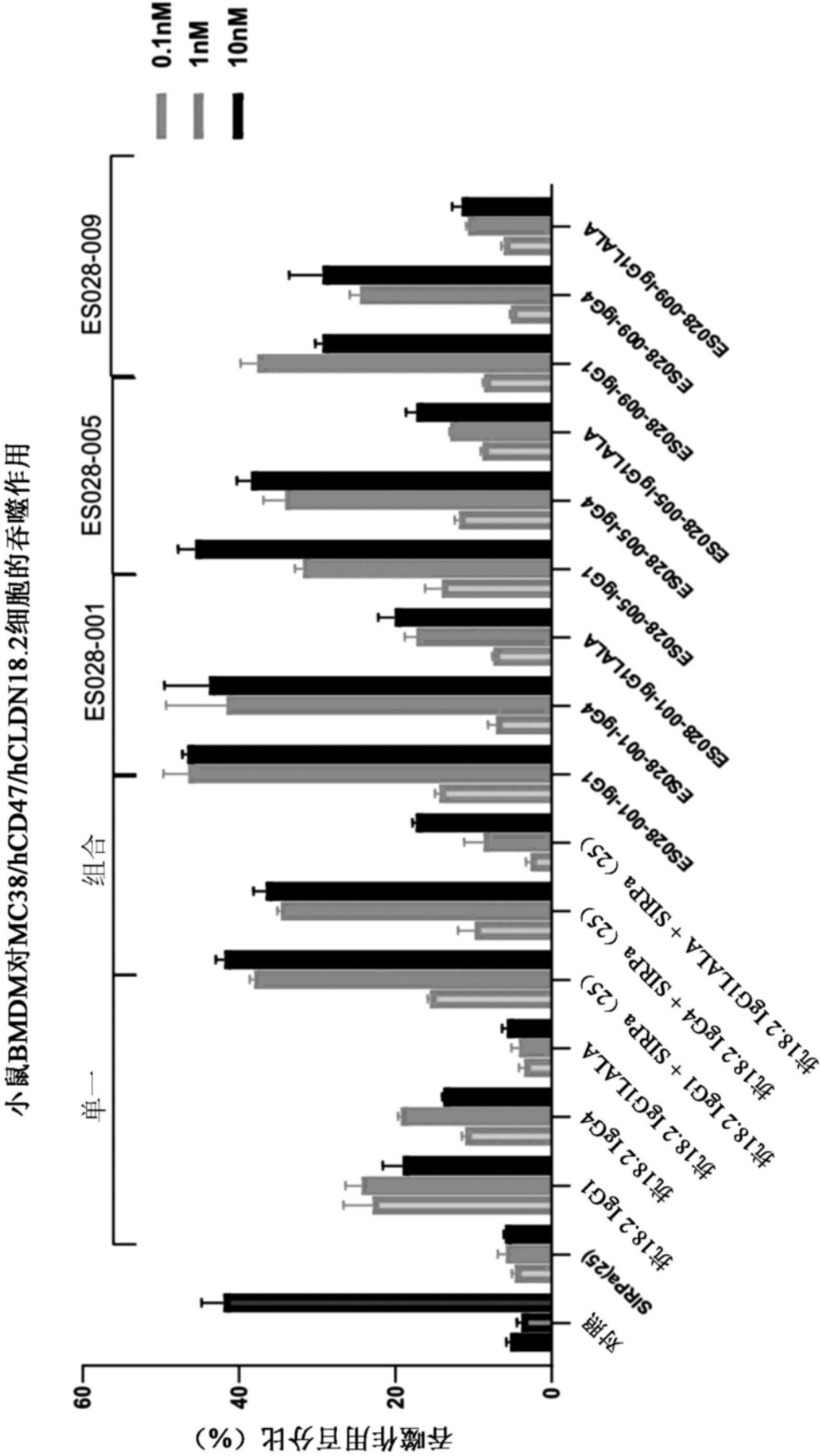


图5

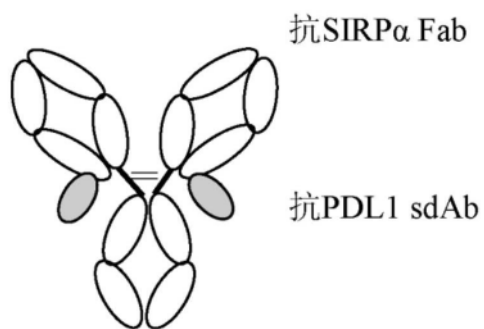


图6A

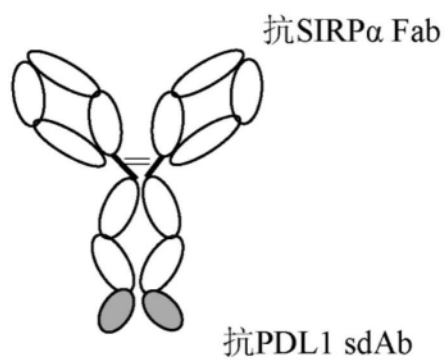


图6B

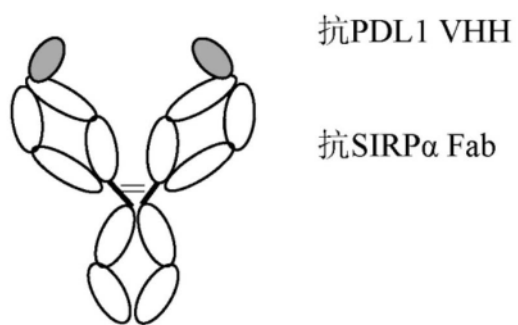


图6C

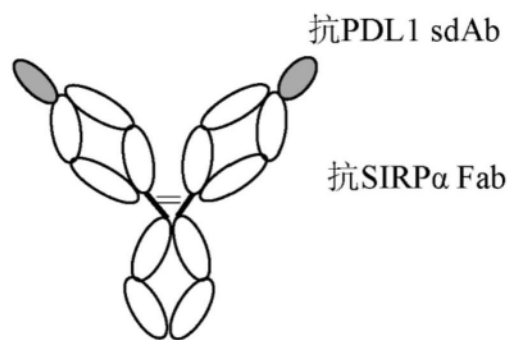


图6D

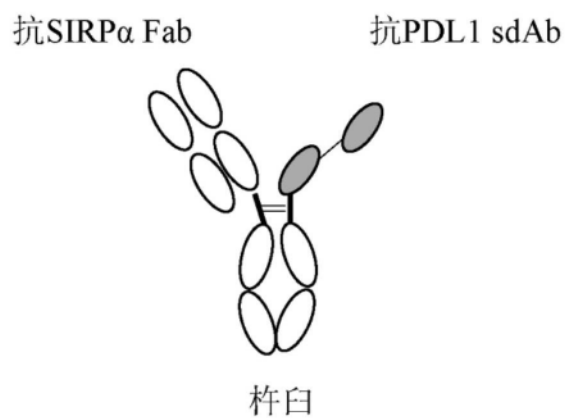


图6E

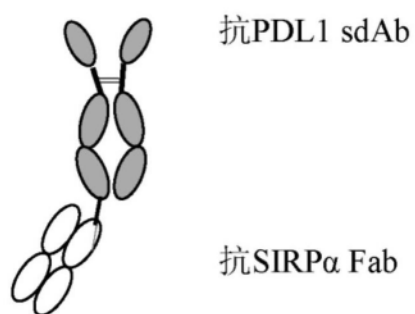


图6F

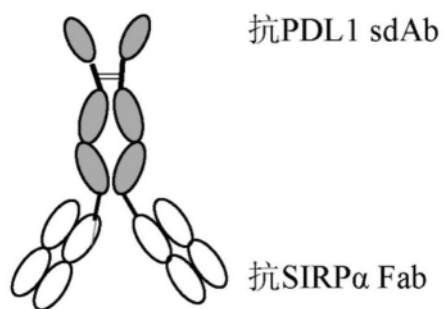


图6G

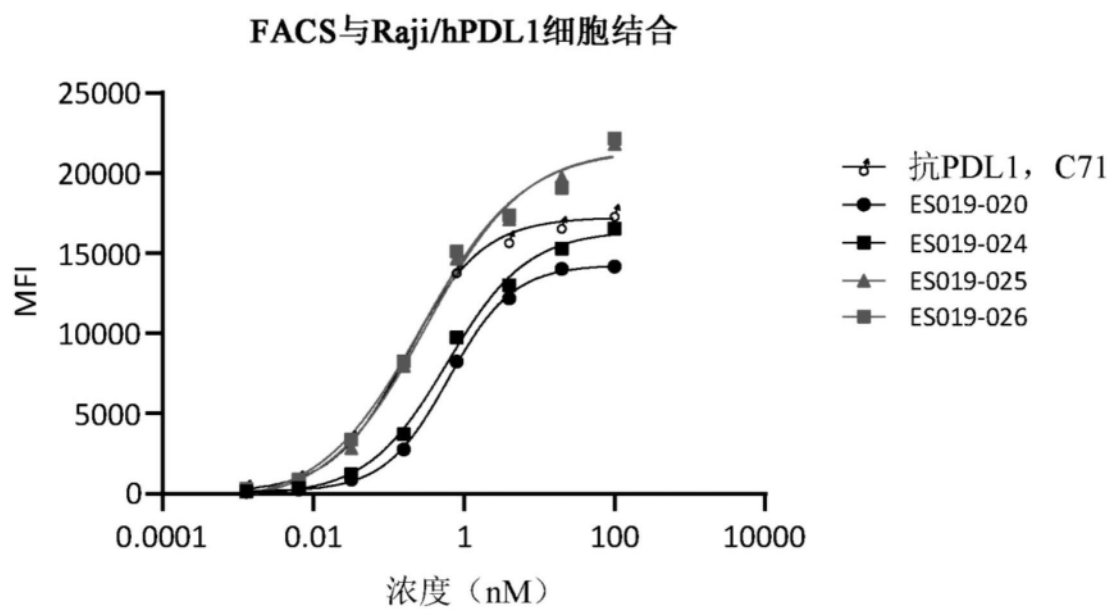


图7A

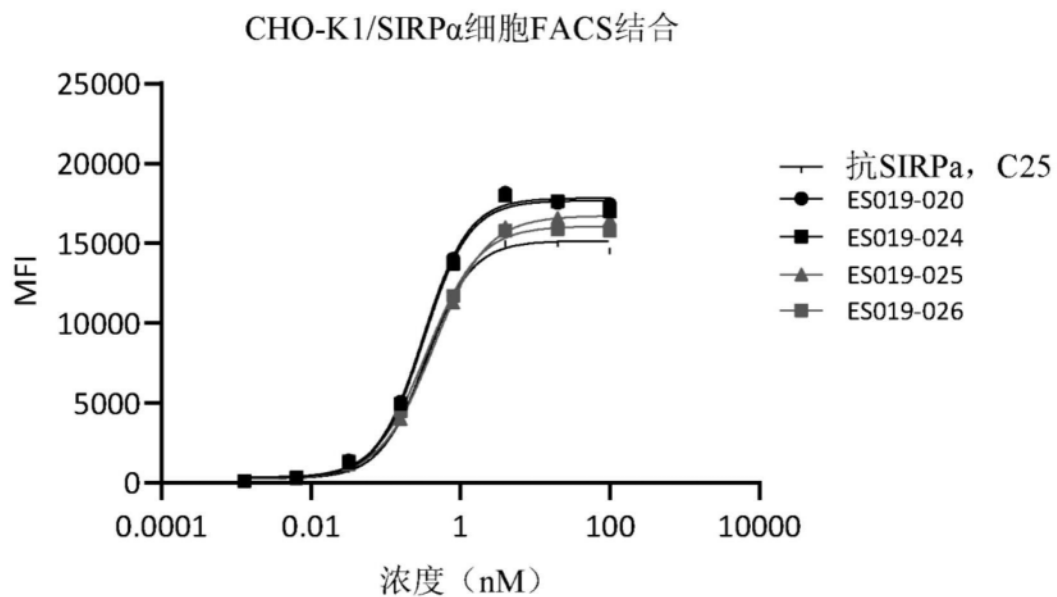


图7B

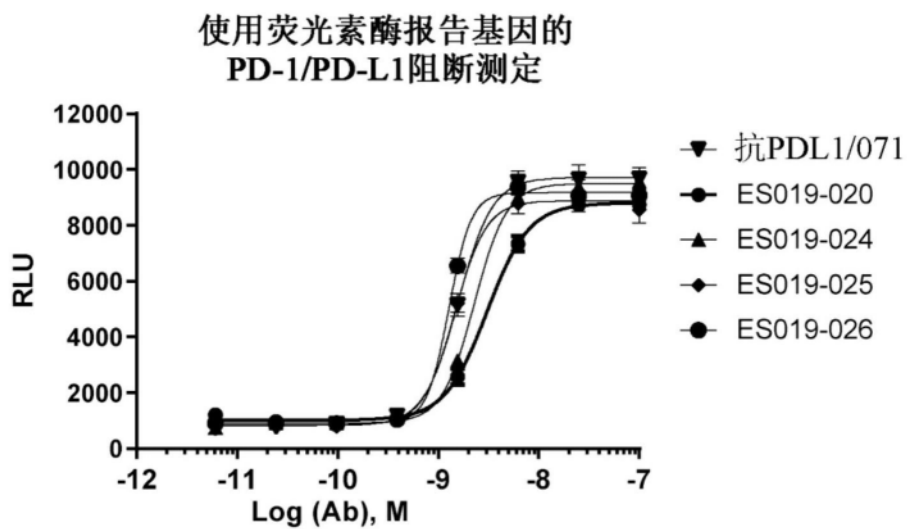


图8

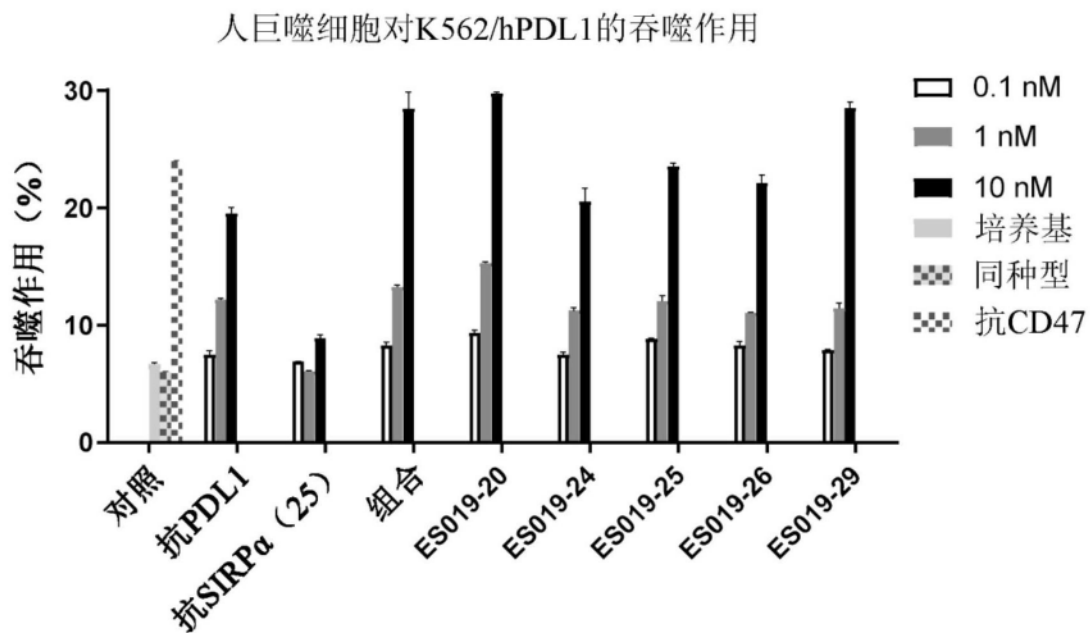


图9A

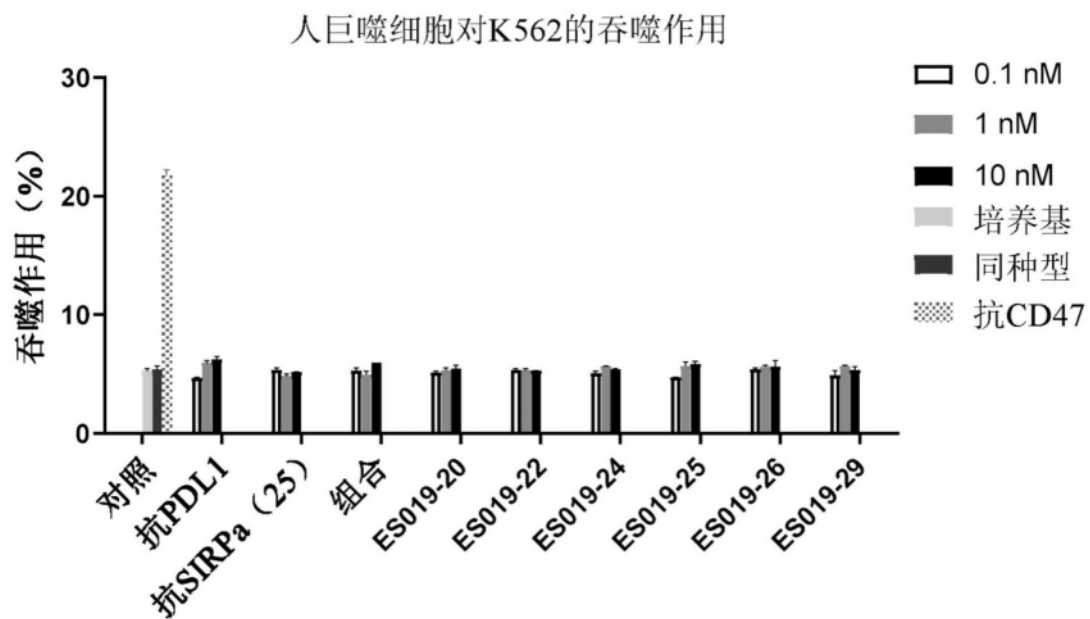


图9B

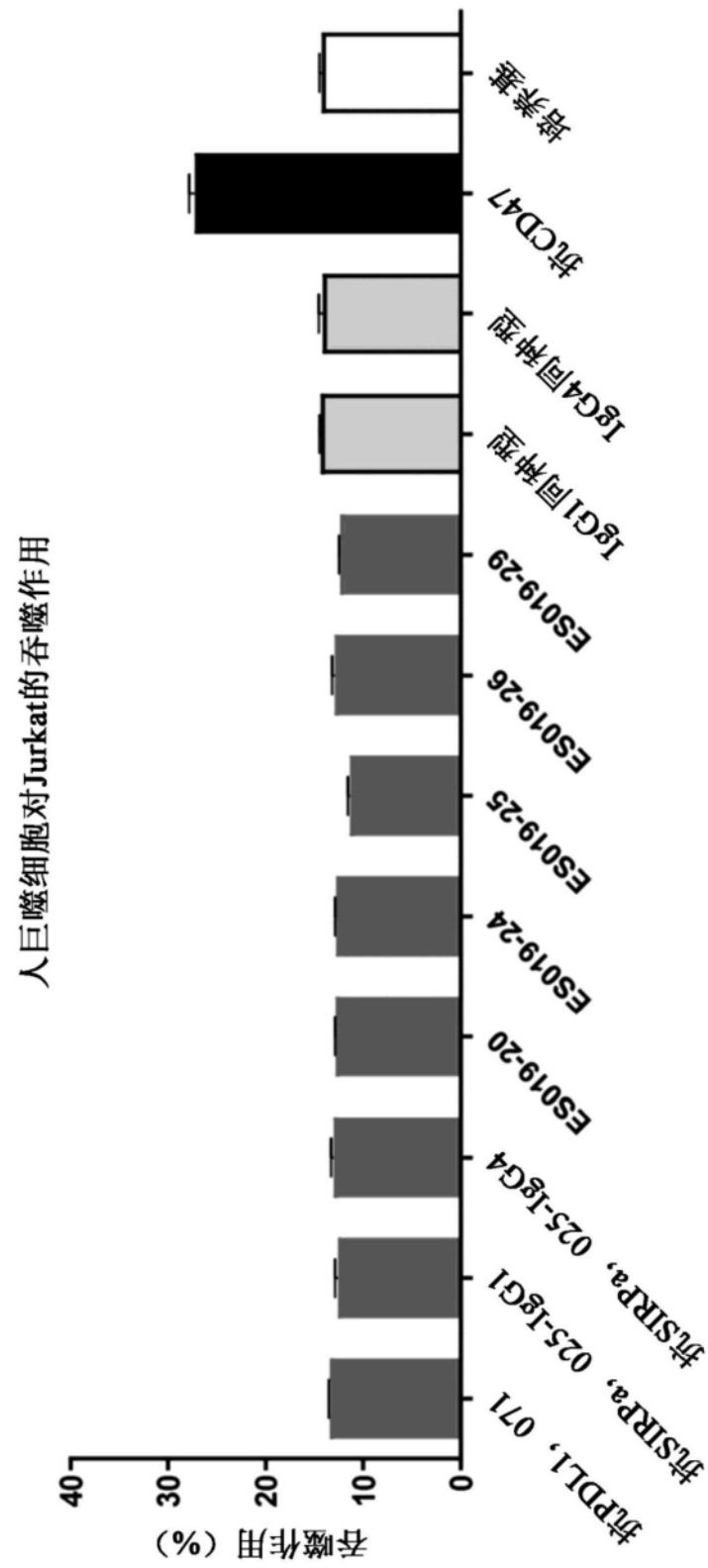


图9C

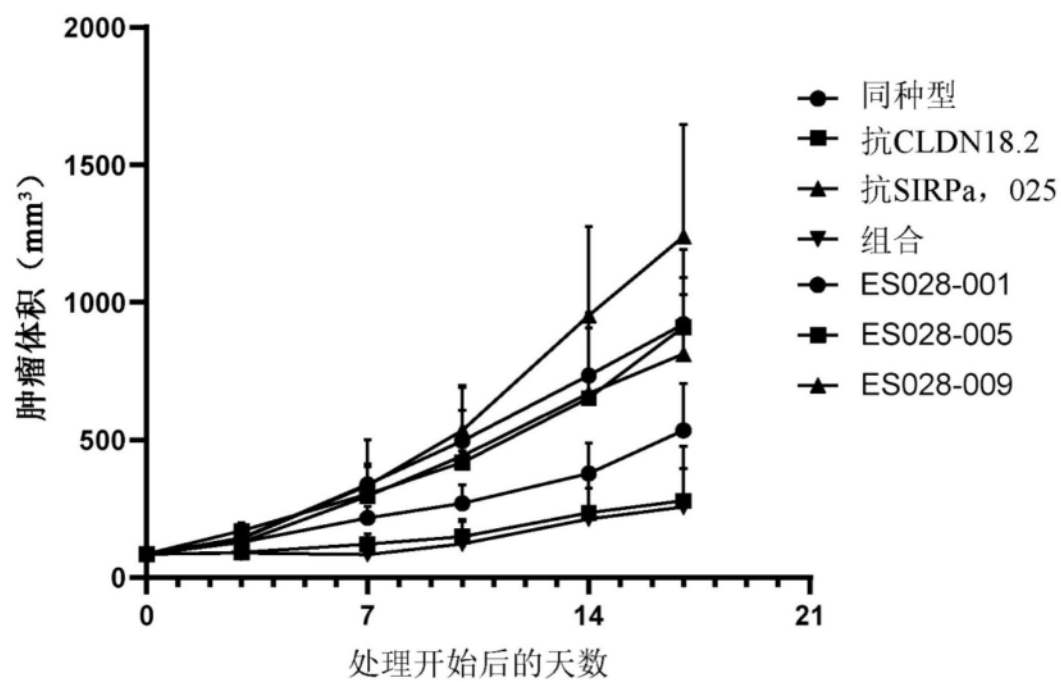


图10

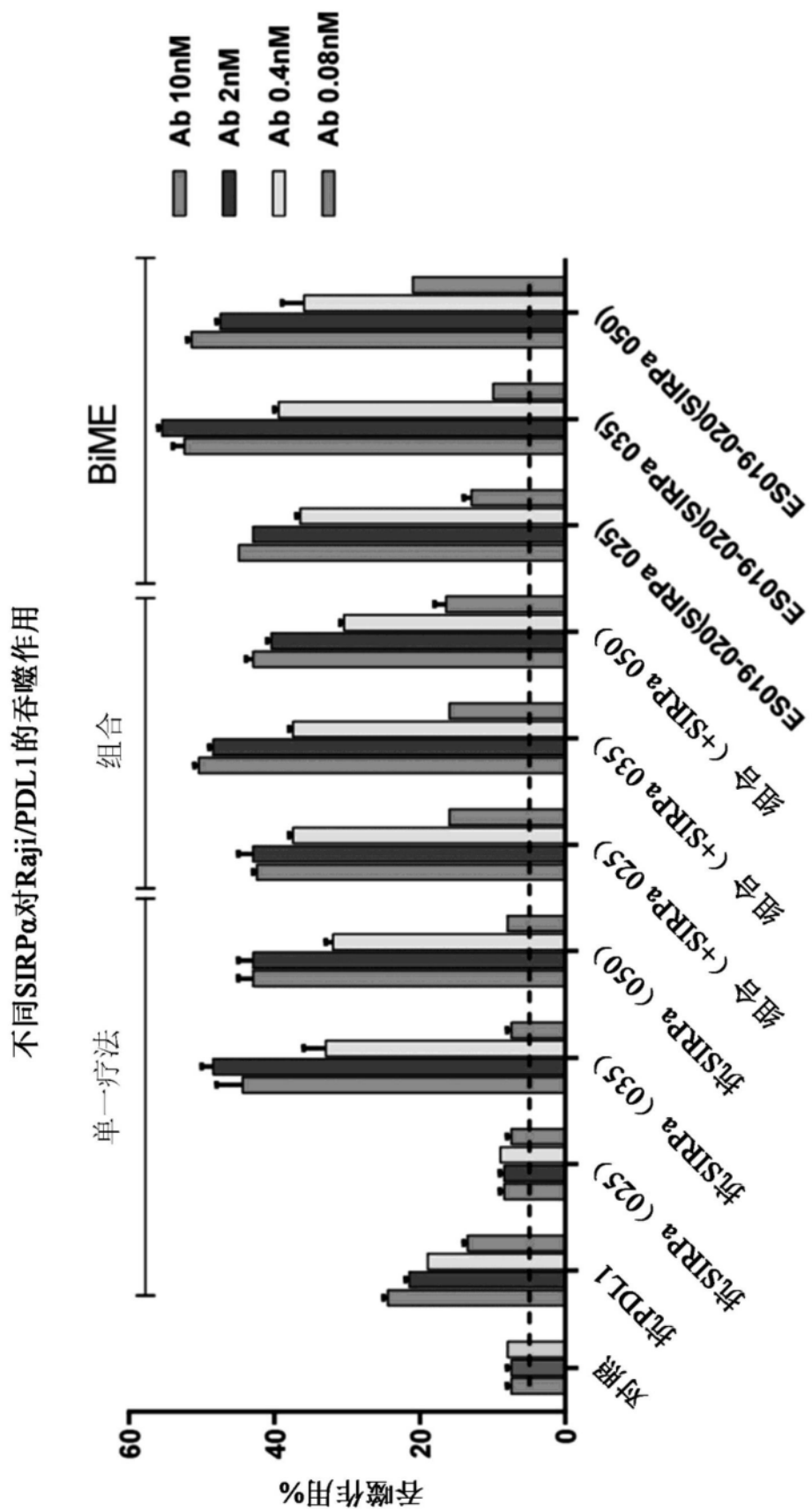


图11A

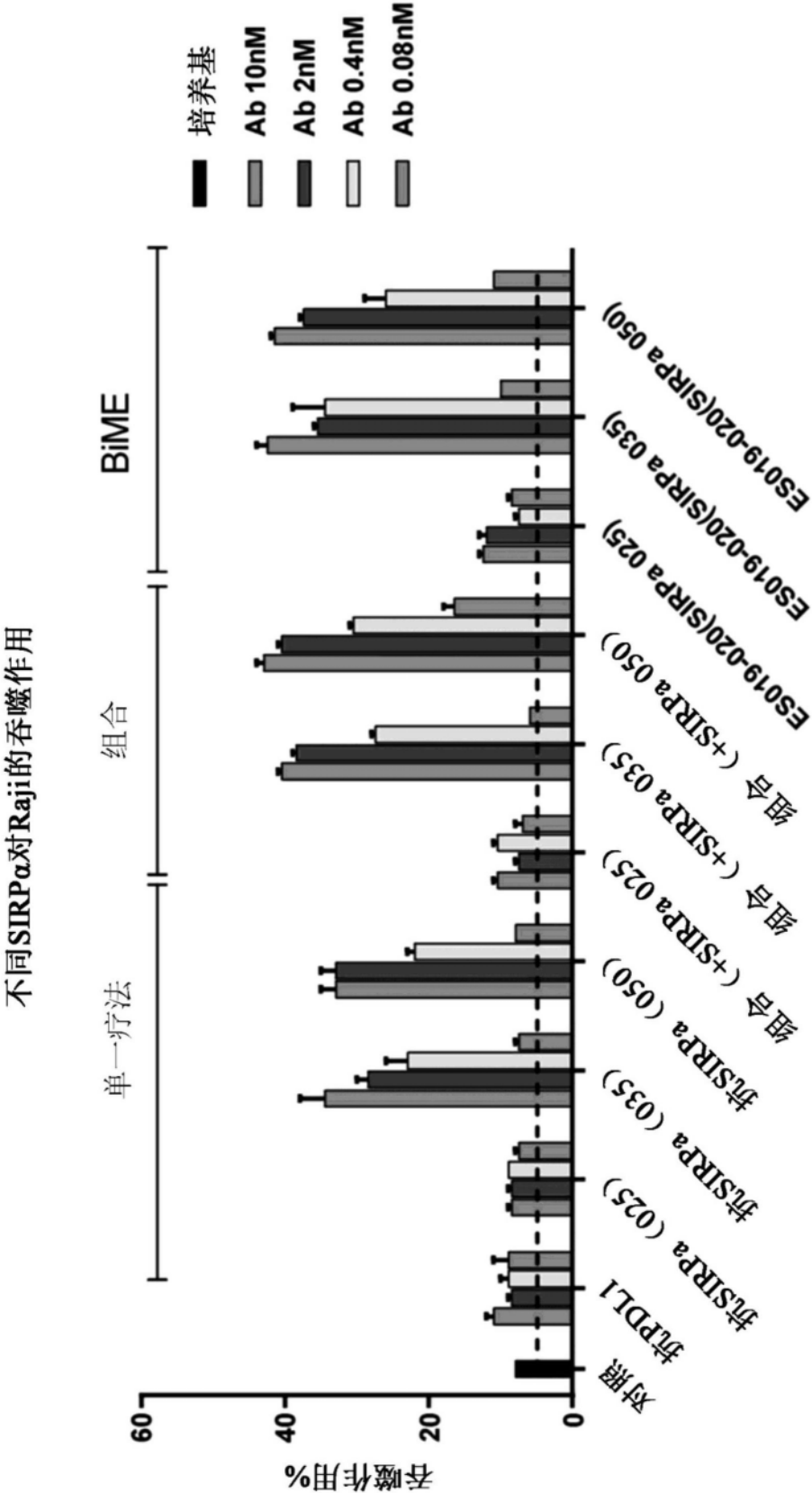


图11B

Ab	CHOK1-hSIRP α v1		CHOK1-hSIRP α v2	
	EC ₅₀ (nM)	最高MFI	EC ₅₀ (nM)	最高MFI
C15	1.49	79989	1.58	50062
C25	1.49	77587	1.34	51608
C42	1.90	73225	4.21	54782
C59	1.45	69840	12.03	19608
C73	1.50	67794	2.12	47326

图12

Ab	人CD47/SIRPα v1相互作用阻断		人CD47/SIRPα v2相互作用阻断	
	IC ₅₀ (nM)	最高阻断 (%)	IC ₅₀ (nM)	最高阻断 (%)
C15	2.32	96.4	2.45	96.71
C25	2.12	96.5	2.21	96.54
C42	3.60	97.1	4.49	94.64
C59	2.63	97.0	54.06	84.4
C73	2.74	95.1	4.92	82.76

N/A代表没有可用数据

图13

Ab	SHP-1募集阻断	
	IC ₅₀ (nM)	最高阻断 (%)
C15	0.09	73.51
C25	0.28	84.53
C42	0.99	70.00
C59	0.07	66.92
C73	5.66	51.25

图14

Ab	CHOK1-hSIRPα v1		CHOK1-hSIRPα v2	
	EC ₅₀ (nM)	最高MFI	EC ₅₀ (nM)	最高MFI
hu025.021	1.08	56405	0.87	46450
hu025.023	1.13	57807	0.81	45824
hu025.033	0.99	53789	0.62	39793
hu025.059	1.05	59377	0.75	47252
hu025.060	0.84	61472	0.80	48846
C25	1.22	64734	0.99	52966

图15

抗原	抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
人SIRPα v1	025c	6.02E+05	9.24E-04	1.53E-09
	hu025.21	5.99E+05	1.83E-03	3.05E-09
	hu025.23	6.43E+05	1.72E-03	2.67E-09
	hu025.59	5.36E+05	1.23E-03	2.29E-09
	hu025.60	5.60E+05	1.11E-03	1.99E-09
人SIRPα v2	025c	1.51E+06	2.54E-03	1.69E-09
	hu025.21	1.65E+06	5.60E-03	3.39E-09
	hu025.23	1.77E+06	4.92E-03	2.78E-09
	hu025.59	1.42E+06	3.92E-03	2.76E-09
	hu025.60	1.47E+06	3.44E-03	2.34E-09

图16

Ab	人CD47/SIRP α v1相互作用阻断		人CD47/SIRP α v2相互作用阻断	
	IC ₅₀ (nM)	最高阻断 (%)	IC ₅₀ (nM)	最高阻断 (%)
025c	2.03	97.5	1.86	98.6
hu025.021	2.07	97.7	1.96	98.3
hu025.023	2.60	97.2	2.07	98.0
hu025.033	2.22	97.2	1.88	98.3
hu025.059	2.48	97.1	2.03	98.3
hu025.060	2.15	95.2	1.88	97.0

图17

Ab	人CD47/SIRPα v1相互作用阻断		人CD47/SIRPα v2相互作用阻断	
	IC ₅₀ (nM)	最高阻断 (%)	IC ₅₀ (nM)	最高阻断 (%)
025c	0.40	97.6	0.63	99.7
hu025.023	0.57	97.7	0.75	100
hu025.060	0.53	98.7	0.77	99.8

图18

Ab	SHP-1募集阻断	
	IC ₅₀ (nM)	最高阻断 (%)
hu025.021	0.10	86.28
hu025.023	0.10	85.55
hu025.033	0.19	84.53
hu025.059	0.10	78.85
hu025.060	0.09	87.52
025c	0.08	86.98

图19

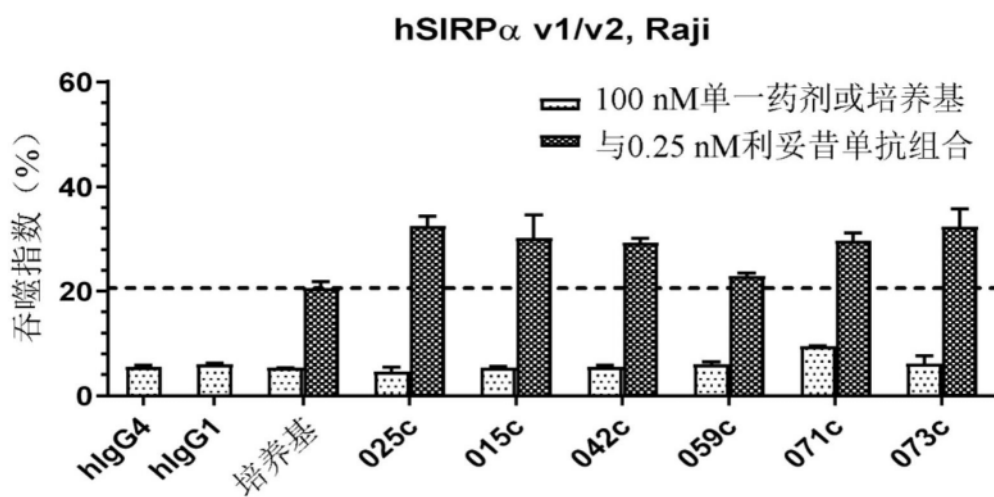


图20A

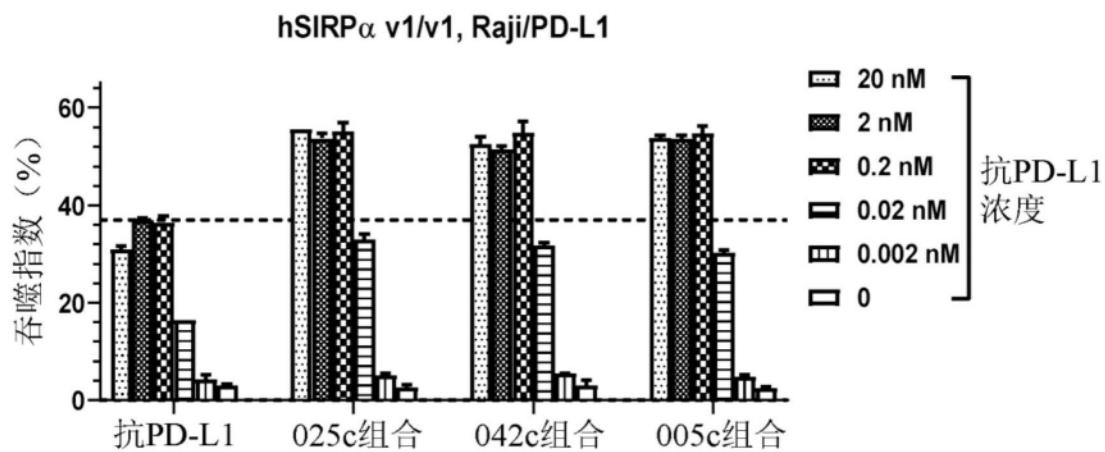


图20B

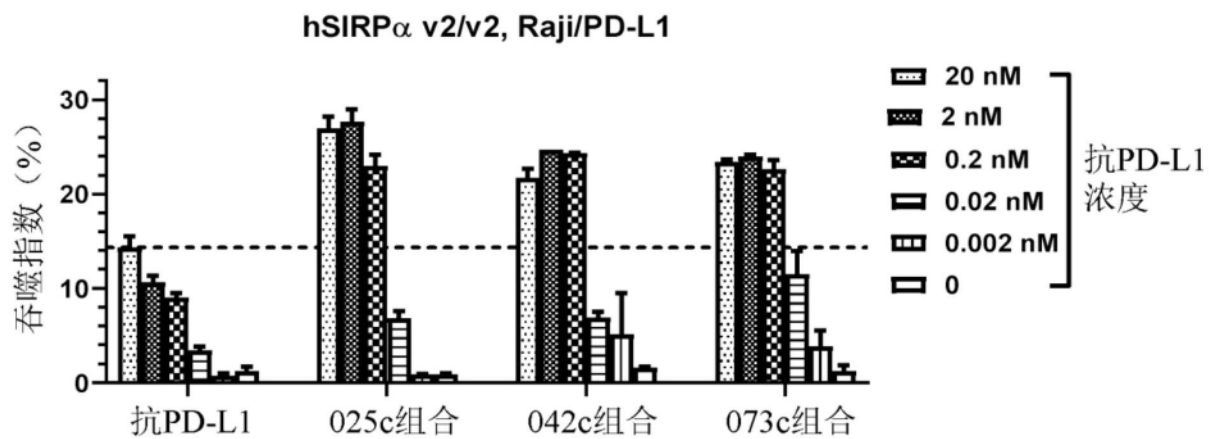


图20C

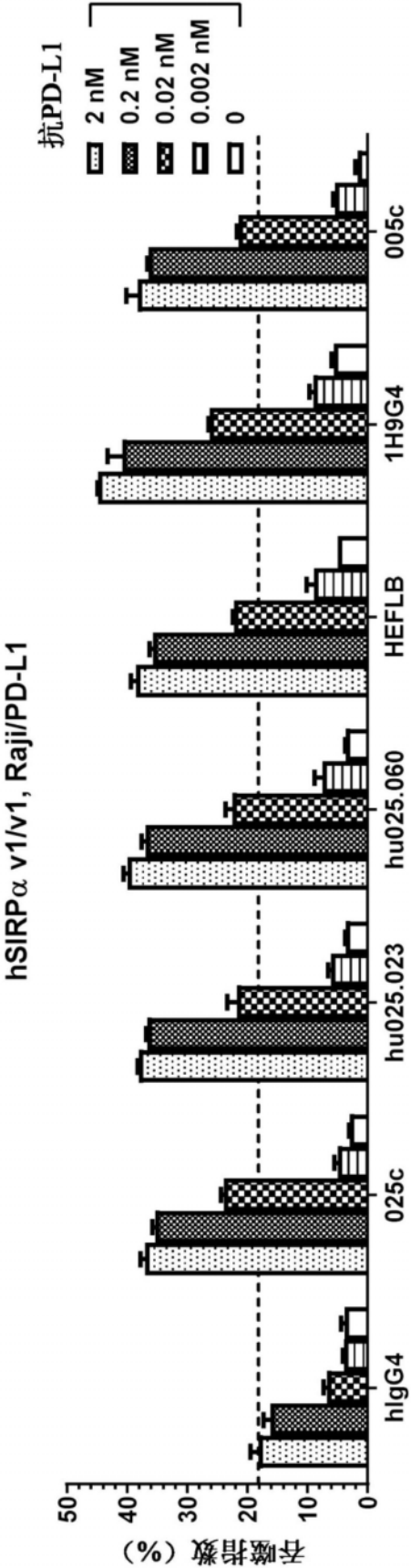


图21A

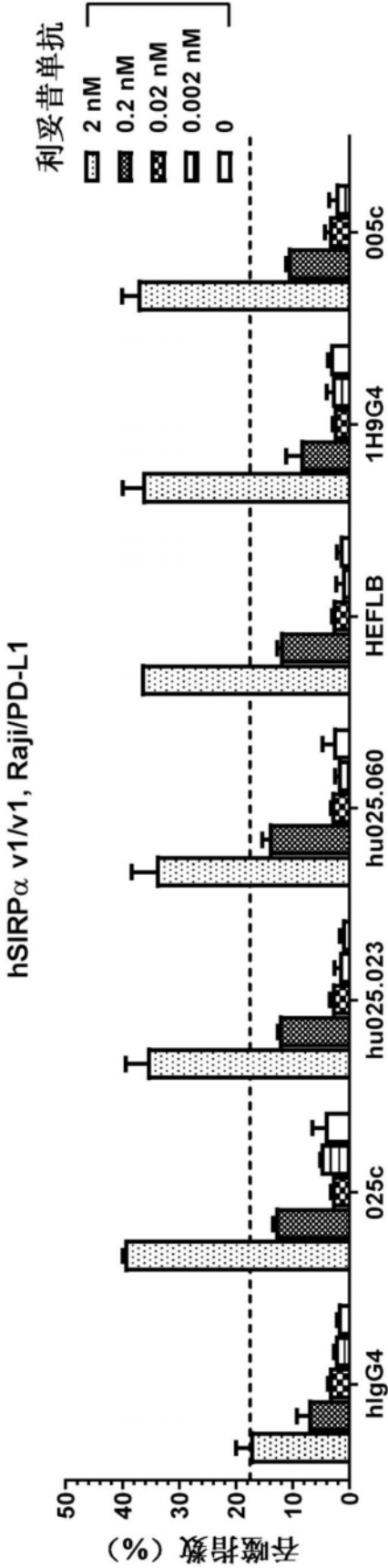


图21B

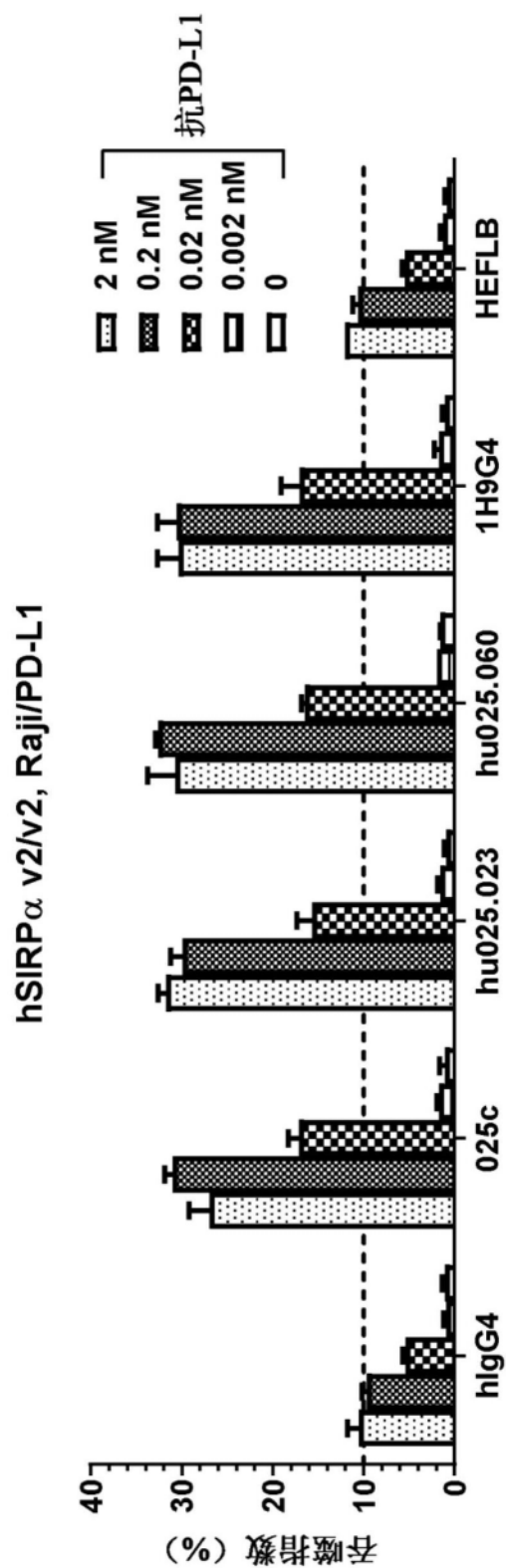


图21C

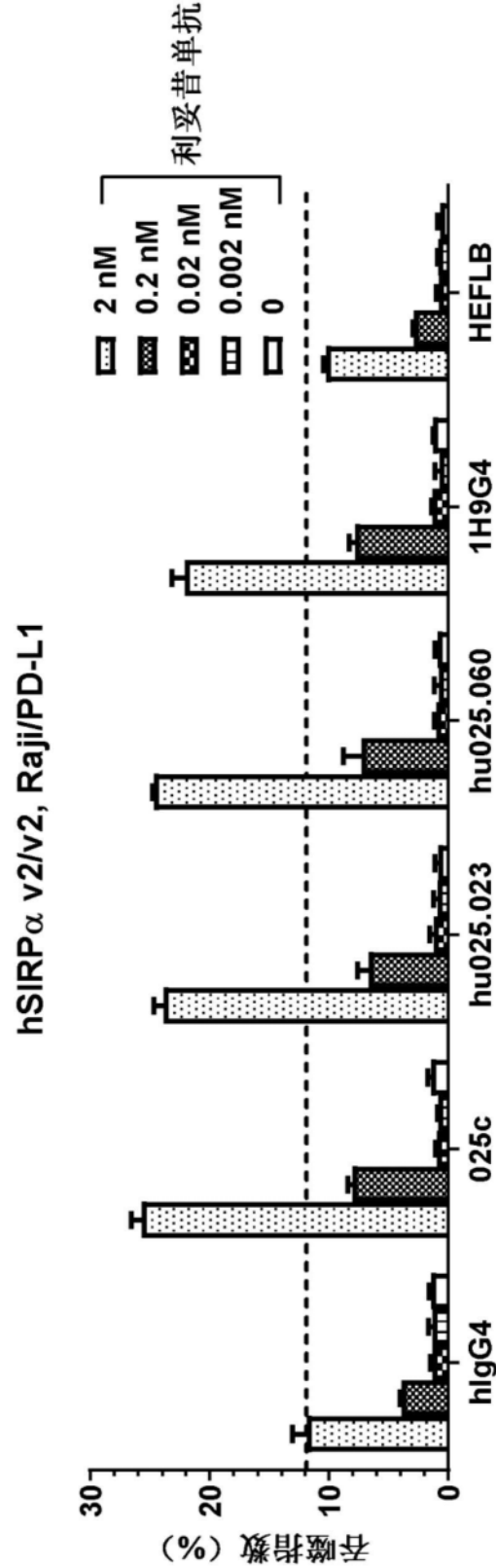


图21D

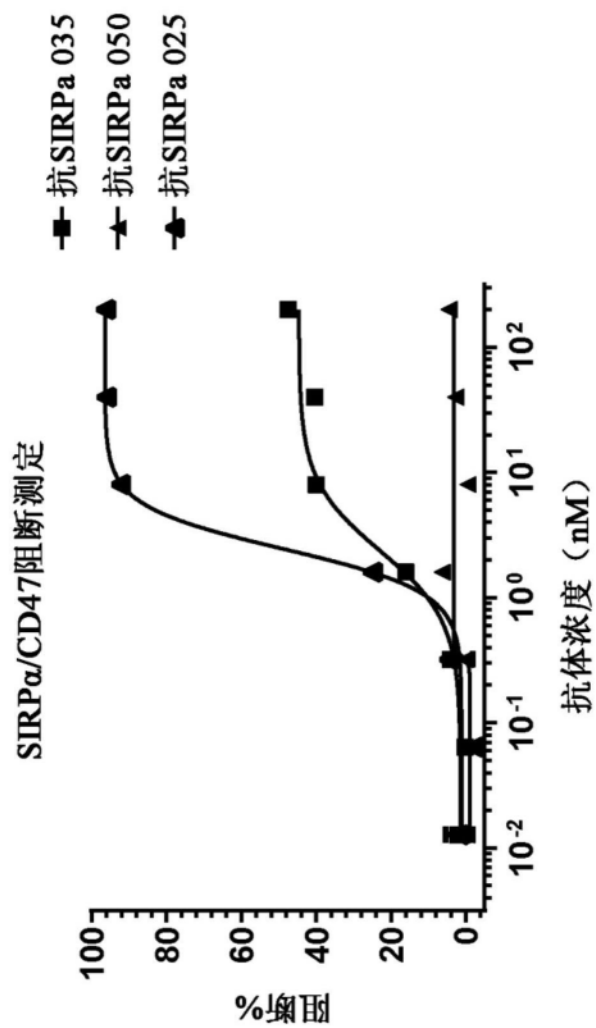


图22

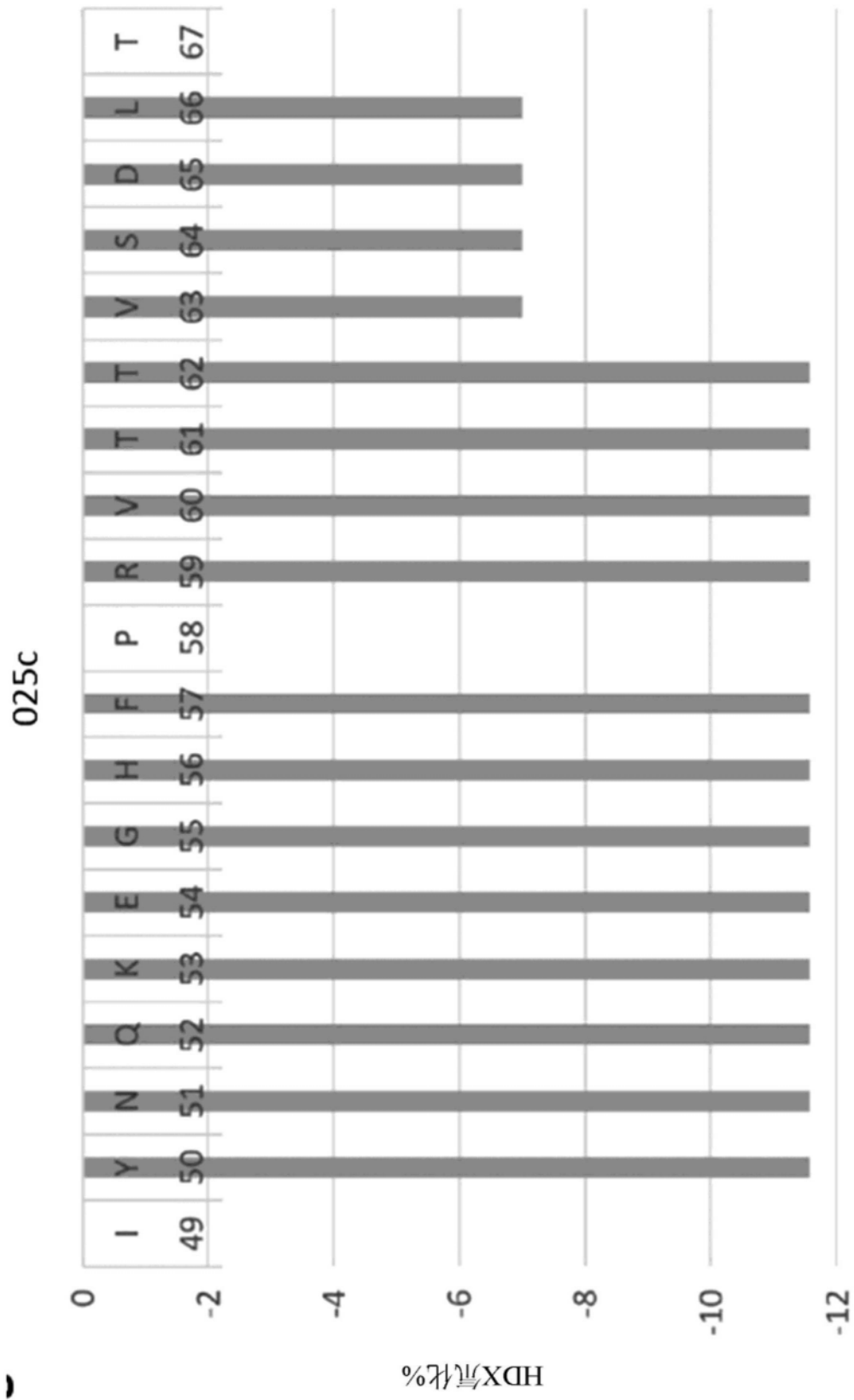


图23A

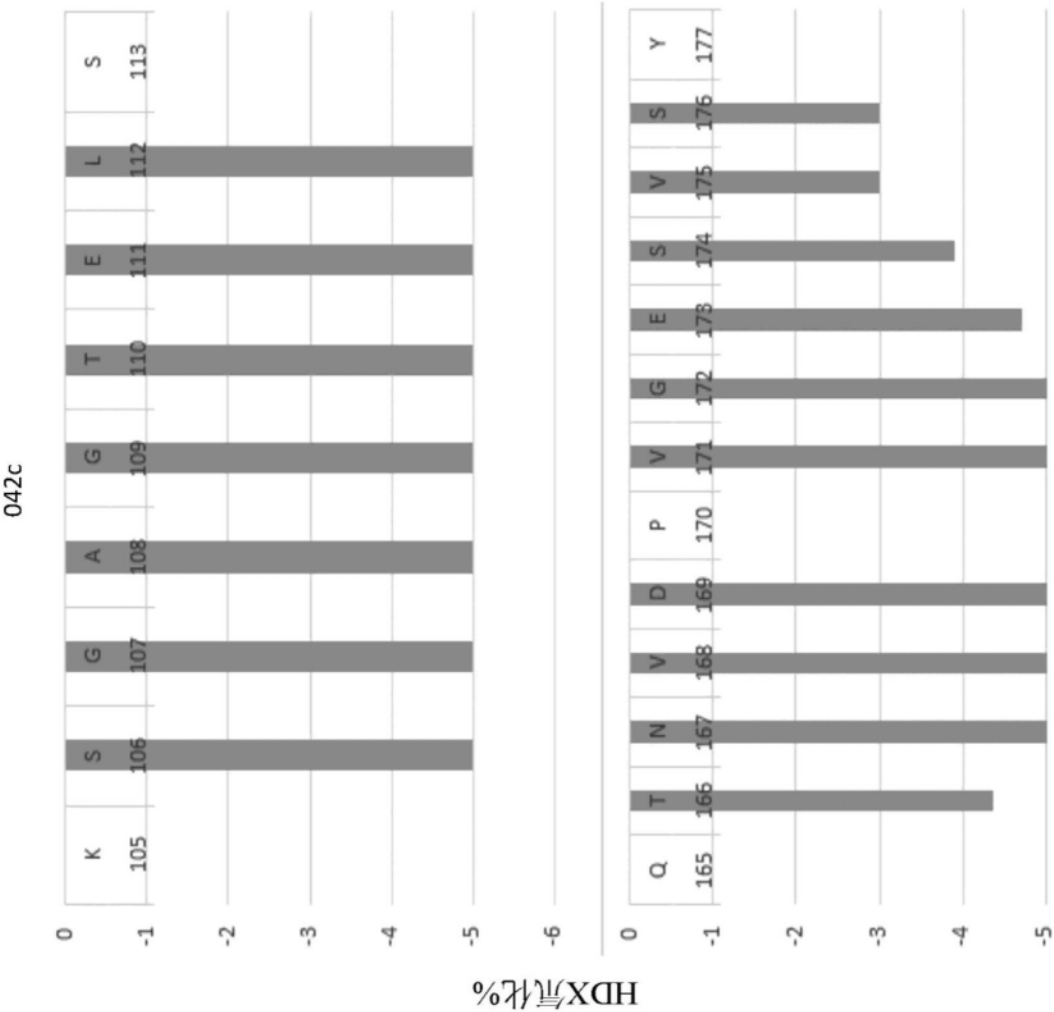


图23B

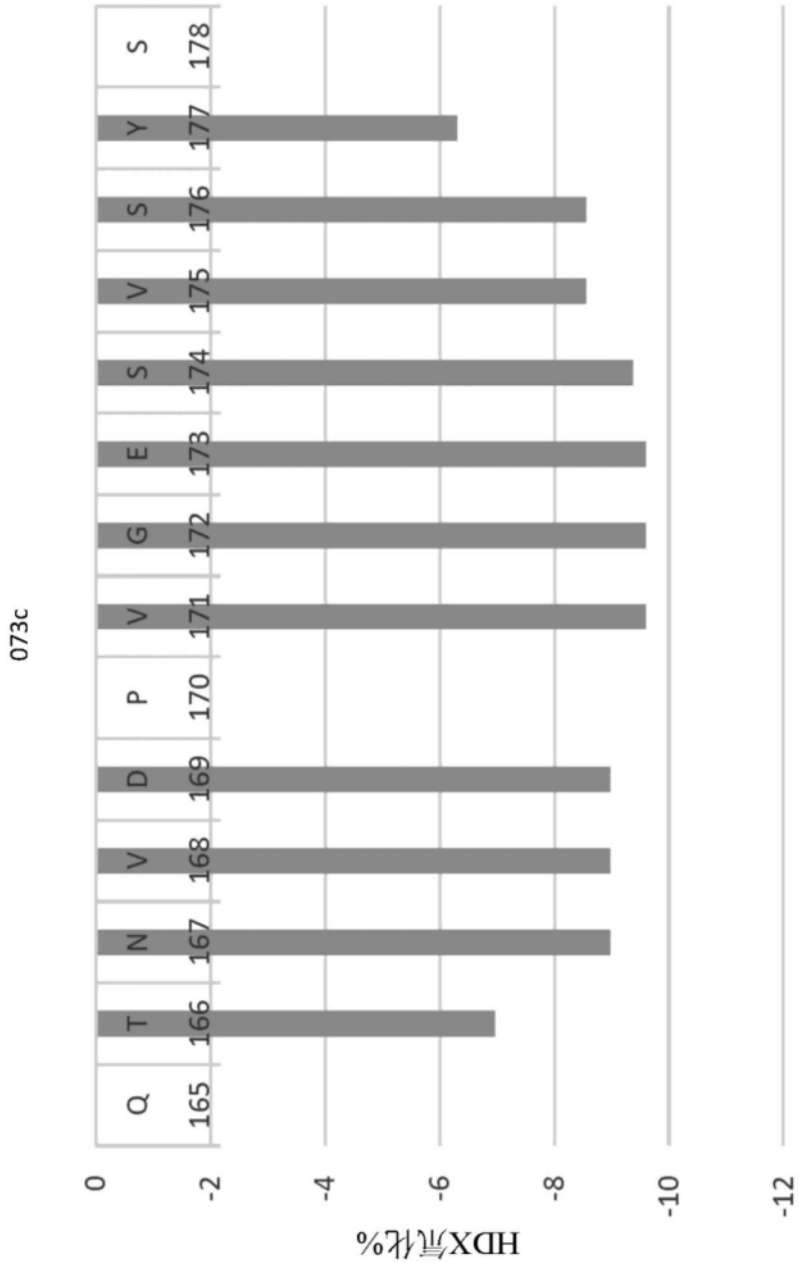


图23C

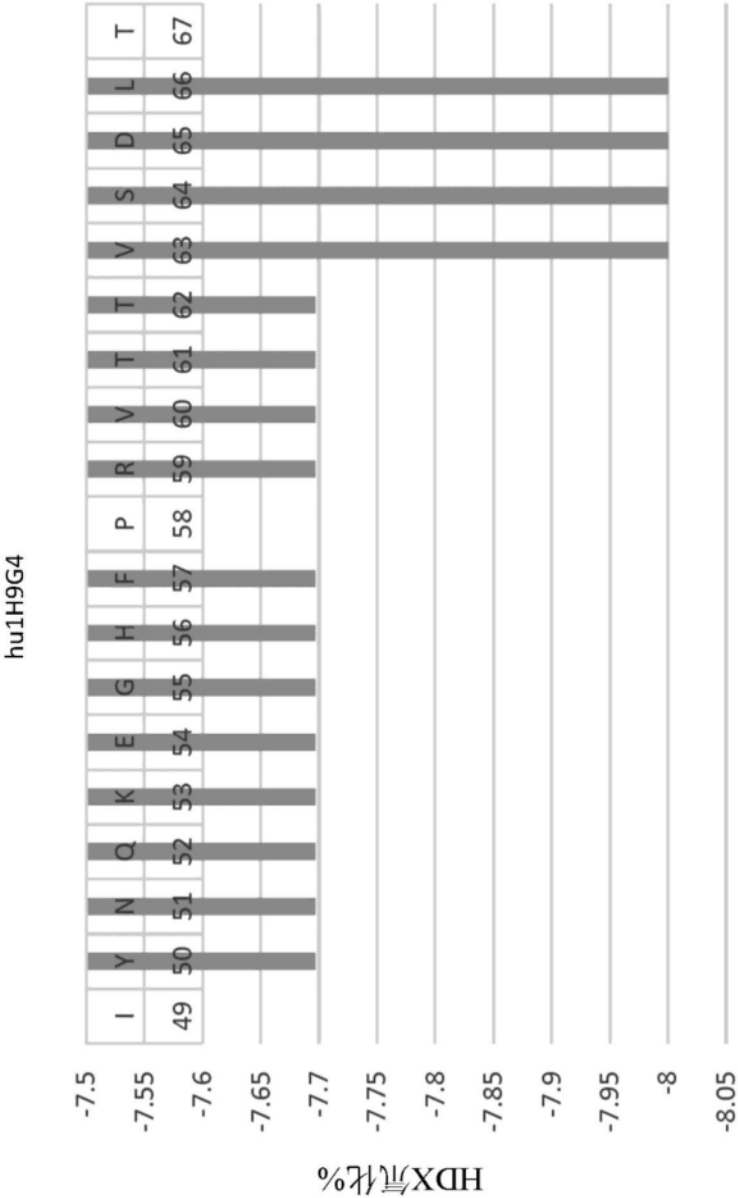


图23D

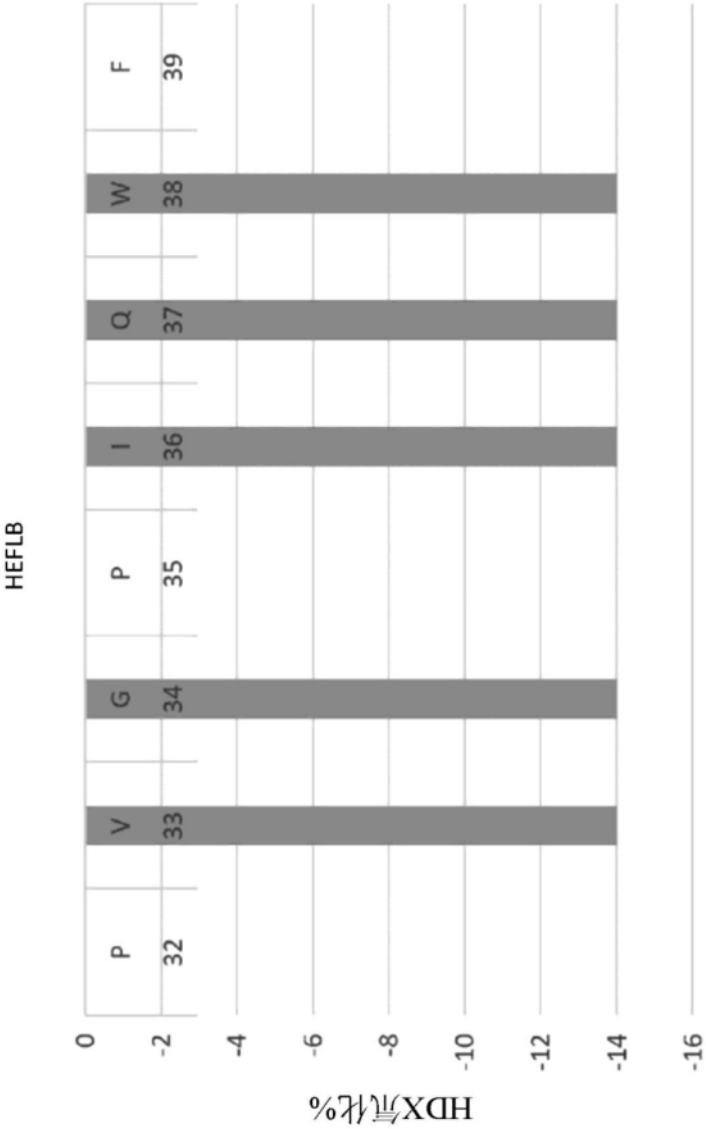


图23E