



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119855605 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 18

(21) 申请号 202380065012.X

(22) 申请日 2023.08.15

(30) 优先权数据

63/398,075 2022.08.15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.03.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/030265 2023.08.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/039670 EN 2024.02.22

(71) 申请人 丹娜-法伯癌症研究院

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 W·A·马拉斯科 M·张

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司

公司 11713

专利代理师 刘小立 王建秀

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

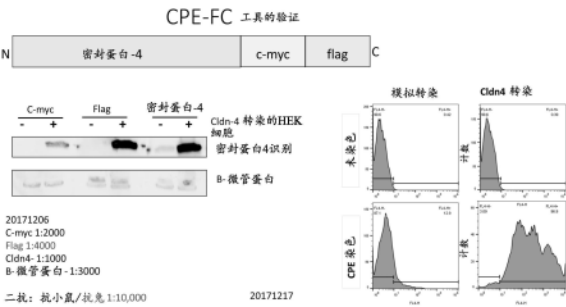
权利要求书6页 说明书47页 附图32页

(54) 发明名称

针对CLDN4的抗体及其使用方法

(57) 摘要

本发明包含与密封蛋白4结构域 (CLDN4) 蛋白结合的人抗体。这些抗体能用于治疗癌症。



1. 一种与密封蛋白4 (CLDN4) 蛋白或其片段结合的抗体或其抗原结合片段, 该抗体或其抗原结合片段包含重链、轻链、或重链和轻链两者,

其中该重链包含

包含GFTFNYYA (SEQ ID NO:9)、GFTFGGYA (SEQ ID NO:12)、GGTFSSYA (SEQ ID NO:15) 或GGTFNYYA (SEQ ID NO:18) 的HCDR1,

包含IRDSGGST (SEQ ID NO:10)、LSNSGSNA (SEQ ID NO:13) 或IIPIVDIA (SEQ ID NO:16) 的HCDR2,

包含ARRGYSSSWYGDGYYYGMDV (SEQ ID NO:11)、ARAVMSSSWYMRRYYYYYMDV (SEQ ID NO:14) 或ARGGSQGAYYMDV (SEQ ID NO:17) 的HCDR3,

或其CDR的组合; 并且

其中该轻链包含

包含SGSIASSF (SEQ ID NO:19)、RSNIGSNT (SEQ ID NO:22)、SGSIASNY (SEQ ID NO:25) 或QSVSNY (SEQ ID NO:28) 的LCDR1,

包含ENN (SEQ ID NO:20)、SNN (SEQ ID NO:23)、EDN (SEQ ID NO:26) 或GAS (SEQ ID NO:29) 的LCDR2,

包含QSYDSTSHV (SEQ ID NO:21)、AAWDDSLNGLYV (SEQ ID NO:24)、QSYDDSNRVV (SEQ ID NO:27) 或HQYGSLPQT (SEQ ID NO:30) 的LCDR3,

或其CDR的组合。

2. 如权利要求1所述的抗体, 其包含重链可变区和轻链可变区, 该重链可变区包含选自以下组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:1、3、5和7, 或与其至少90%同一的序列, 该轻链可变区包含选自以下组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:2、4、6和8, 或与其至少90%同一的序列。

3. 一种抗体, 其如本文所述。

4. 一种与密封蛋白4 (CLDN4) 结合的治疗性抗体, 该治疗性抗体包含可变结构域和恒定结构域, 其中该恒定结构域是IgG并且该可变结构域包含框架区和用于结合密封蛋白4的互补决定手段。

5. 如权利要求4所述的抗体, 其中该恒定区是IgG1或IgG4。

6. 一种与人密封蛋白4蛋白结合的分离的抗体或其片段, 该分离的抗体或其片段包含:

(a) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VL CDR3; 或

(b) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的VL CDR3; 或

(c) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的

VL CDR3;或

(d) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3。

7. 一种与人密封蛋白4蛋白结合的分离的scFv抗体,该分离的scFv抗体包含:

(a) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VL CDR3;或

(b) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的VL CDR3;或

(c) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VL CDR3;或

(d) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3。

8. 一种与人密封蛋白4蛋白结合的分离的抗体或其片段,该分离的抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3、5和7,或与其至少90%同一的序列,该轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、4、6和8,或与其至少90%同一的序列。

9. 一种与人密封蛋白4蛋白结合的分离的scFv,该分离的scFv包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3、5和7,或与其至少90%同一的序列,该轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、4、6和8,或与其至少90%同一的序列。

10. 一种与密封蛋白4结合的F(ab),该F(ab)包含:

(a) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VL CDR3;或

(b) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的VL CDR3;或

(c) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VL CDR3;或

(d) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3。

11. 一种与密封蛋白4结合的VhH, 该VhH包含:

(a) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VH CDR3;或

(b) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR3;或

(c) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3;或

(d) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3。

12. 一种分离的双特异性抗体, 其包含如权利要求1-11中任一项所述的片段和对免疫细胞上的分子具有特异性的第二抗原结合片段。

13. 如权利要求12所述的双特异性抗体, 其中该分子选自由以下组成的组: CCR4、B7H3、B7H4、CD27、CD28、CD40、CD40L、CD47、CD122、CTLA-4、GITR、GITRL、ICOS、ICOSL、LAG-3、LIGHT、OX-40、OX40L、PD-1、TIM3、4-1BB、TIGIT、VISTA、HEVM、BTLA和KIR。

14. 如权利要求12所述的双特异性抗体, 其中该片段和该第二片段各自独立地选自Fab片段、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体。

15. 如权利要求12所述的双特异性抗体, 其进一步包含Fc片段。

16. 一种与人密封蛋白4蛋白结合的双特异性T细胞衔接器(BiTE), 该BiTE包含:

(a) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VL CDR3;或

(b) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的VL CDR3;或

(c) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VL CDR3;或

(d) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH

CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3。

17. 一种与人密封蛋白4蛋白结合的双特异性T细胞衔接器(BiTE), 该BiTE包含重链可变区和轻链可变区, 该重链可变区包含选自以下组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:1、3、5和7, 或与其至少90%同一的序列, 该轻链可变区包含选自以下组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:2、4、6和8, 或与其至少90%同一的序列。

18. 如权利要求1-11中任一项所述的抗体, 其具有至少90%的序列同一性。

19. 一种核酸, 其编码如权利要求1-11中任一项所述的抗体, 其中:

编码HCDR1的核酸序列是SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:68、或SEQ ID NO:71、或其简并变体;

编码HCDR2的核酸序列是SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:69、或SEQ ID NO:72、或其简并变体;

编码HCDR3的核酸序列是SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70、或SEQ ID NO:73、或其简并变体;

编码LCDR1的核酸序列是SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:80、或SEQ ID NO:83、或其简并变体;

编码LCDR2的核酸序列是SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:81、或SEQ ID NO:84、或其简并变体; 并且

编码LCDR3的核酸序列是SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:82、或SEQ ID NO:85、或其简并变体。

20. 一种核酸, 其编码如权利要求1-11中任一项所述的抗体, 其中:

编码HCVR的核酸序列是SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、或SEQ ID NO:89、或其简并变体; 并且

编码LCVR的核酸序列是SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、或SEQ ID NO:93、或其简并变体。

21. 一种药物组合物, 其包含: 如权利要求1-11中任一项所述的抗体, 和一种或多种药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。

22. 如权利要求21所述的药物组合物, 其包含:

(a) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VL CDR3; 或

(b) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的VL CDR3; 或

(c) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VL

CDR1、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VL CDR3;或

(d) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3。

23. 如权利要求21所述的药物组合物,其包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR),其中该HCVR的氨基酸序列是SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7,并且该LCVR的氨基酸序列是SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8。

24. 一种核酸,其编码如权利要求1-11中任一项所述的抗体或片段。

25. 一种核酸,其编码如权利要求12-15中任一项所述的双特异性抗体。

26. 一种核酸,其编码如根据权利要求16-17中任一项所述的BiTE。

27. 如权利要求1-11中任一项所述的抗体或片段、如权利要求12-15中任一项所述的双特异性抗体、或如权利要求16-17中任一项所述的BiTE,其中该抗体、片段或双特异性抗体与密封蛋白3的结合亲和力比该抗体、片段或双特异性抗体与密封蛋白4的结合亲和力低至少5、10、25、50、100或1000倍。

28. 一种经工程改造的细胞,其包含嵌合抗原受体,其中该嵌合抗原受体包含对癌细胞表面上的抗原具有特异性的胞外配体结合结构域,其中该抗原包含密封蛋白4,其中该胞外配体结合结构域包含抗体或其片段,其中该抗体或其片段包含:

(a) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VL CDR3;或

(b) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的VL CDR3;或

(c) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VL CDR3;或

(d) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3。

29. 如权利要求28所述的经工程改造的细胞,其中该抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3、5和7,或与其至少90%同一的序列,该轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、4、6和8,或与其至少90%同一的序列。

30. 如权利要求28所述的经工程改造的细胞,其中该细胞包含T细胞、NK细胞、NKT细胞、iPS细胞、iPS衍生的细胞、细胞系或B细胞。

31. 如权利要求28所述的经工程改造的细胞,其中该细胞包含CD4+、CD8+、CD3+泛T细胞、或其任何组合。

32. 一种治疗癌症的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的 (a) 如权利要求1-11中任一项所述的抗体,或 (b) 如权利要求21所述的药物组合物。

33. 一种在受试者中抑制密封蛋白4的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的 (a) 如权利要求1-11中任一项所述的抗体,或 (b) 如权利要求21所述的药物组合物。

34. 如权利要求33所述的方法,其包括重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3、5和7,或与其至少90%同一的序列,该轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、4、6和8,或与其至少90%同一的序列。

35. (a) 如权利要求1-11中任一项所述的抗体或 (b) 如权利要求21所述的药物组合物用于治疗癌症的用途。

36. 如权利要求1-11中任一项所述的抗体或 (b) 如权利要求21所述的药物组合物,用于在疗法中使用。

37. 如权利要求1-11中任一项所述的抗体或 (b) 如权利要求21所述的药物组合物,用于在治疗癌症中使用。

针对CLDN4的抗体及其使用方法

[0001] 本申请是一项国际申请,该国际申请要求2022年8月15日提交的美国临时专利申请号63/398,075的优先权,将其全部内容通过引用并入本文。

[0002] 本文引用的所有专利、专利申请和出版物均通过引用以其整体并入本文。这些出版物的披露特此通过引用以其整体并入本申请中,以更全面地描述截至本文描述和要求保护的本发明的日期为止本领域技术人员已知的现有技术。

[0003] 本专利披露包含受版权保护的材料。版权所有人反对任何人对专利文件或专利披露进行传真复制,因为它出现在美国专利商标局的专利文件或记录中,但无论如何在其他方面保留任何和所有版权权利。

序列表

[0004] 本申请包含已经以ASCII格式电子提交的序列表,并且特此将其通过引用以其整体并入。在[]上创建的所述ASCII副本命名为[],大小为[]字节。

技术领域

[0005] 本发明包含针对密封蛋白4(CLDN4)的抗体及其使用方法。

背景

[0006] 密封蛋白是紧密连接的四跨跨膜蛋白。密封蛋白4蛋白由CLDN4基因编码。

发明内容

[0007] 本发明的方面涉及与密封蛋白4(CLDN4)蛋白或其片段结合的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链、轻链、或重链和轻链两者。

[0008] 在实施例中,重链包含含有GFTFNYYA(SEQ ID NO:9)、GFTFGGYA(SEQ ID NO:12)、GGTFSSYA(SEQ ID NO:15)或GGTFNYYA(SEQ ID NO:18)的CDR1,含有IRDSGGST(SEQ ID NO:10)、LSNSGSNA(SEQ ID NO:13)或IIPIVDIA(SEQ ID NO:16)的CDR2,含有ARRGYSSSWYGDGYYYGMDV(SEQ ID NO:11)、ARAVMSSSWYMRYYYYYMDV(SEQ ID NO:14)或ARGGSQGAYYMDV(SEQ ID NO:17)的CDR3,或其CDR的组合;并且其中轻链包含含有SGSIASSF(SEQ ID NO:19)、RSNIGSNT(SEQ ID NO:22)、SGSIASNY(SEQ ID NO:25)或QSVSNY(SEQ ID NO:28)的CDR1,含有ENN(SEQ ID NO:20)、SNN(SEQ ID NO:23)、EDN(SEQ ID NO:26)或GAS(SEQ ID NO:29)的CDR2,含有QSYDSTSHV(SEQ ID NO:21)、AAWDDSLNGLYV(SEQ ID NO:24)、QSYDDSNRVV(SEQ ID NO:27)或HQYGLPQT(SEQ ID NO:30)的CDR3,或其CDR的组合。在实施例中,抗体序列已根据IMGT编号方案确定。

[0009] 在实施例中,密封蛋白4蛋白是人密封蛋白4蛋白。

[0010] 在实施例中,抗体是完全人的或人源化的。

[0011] 在实施例中,抗体是单特异性、双特异性或多特异性的。

[0012] 在实施例中,抗体是IgG。例如,抗体是IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄抗体。

[0013] 在实施例中,抗体为单链抗体。

- [0014] 在实施例中,抗体具有至少 1.0×10^{-9} M的结合亲和力。
- [0015] 在实施例中,抗体或片段包含重链恒定区、轻链恒定区、Fc区和Fc变体,或其组合。
- [0016] 在实施例中,抗体包含Gly1-2-F4、Gly1-4-G3、Gly1-1-H9或Gly1-1-B2。
- [0017] 在实施例中,抗体与Gly1-2-F4、Gly1-4-G3、Gly1-1-H9或Gly1-1-B2竞争结合。
- [0018] 在实施例中,抗体或片段与治疗性药剂连接。
- [0019] 在实施例中,抗体是单链片段。
- [0020] 本发明的方面还涉及与人密封蛋白4蛋白结合的分离的抗体或其片段。
- [0021] 在实施例中,抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VL CDR3;或(b)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的VL CDR3;或(c)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VL CDR3;或(d)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3。在实施例中,抗体序列已根据IMGT编号方案确定。
- [0022] 本发明的方面还涉及与人密封蛋白4蛋白结合的分离的scFv抗体,该分离的scFv抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VL CDR3;或(b)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的VL CDR3;或(c)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VL CDR3;或(d)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3。在实施例中,抗体序列已根据IMGT编号方案确定。
- [0023] 本发明的方面涉及与人密封蛋白4蛋白结合的分离的抗体或其片段,该分离的抗体或其片段包含重链可变区,该重链可变区包含选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3、5和7,或与其至少90%同一的序列。

[0024] 本发明的方面涉及与人密封蛋白4蛋白结合的分离的抗体或其片段,该分离的抗体或其片段包含轻链可变区,该轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、4、6和8,或与其至少90%同一的序列。

[0025] 本发明的方面涉及与人密封蛋白4蛋白结合的分离的抗体或其片段,该分离的抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3、5和7,或与其至少90%同一的序列,该轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、4、6和8,或与其至少90%同一的序列。

[0026] 本发明的方面涉及与人密封蛋白4蛋白结合的分离的scFv,该分离的scFv包含重链可变区,该重链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3、5和7,或与其至少90%同一的序列。

[0027] 本发明的方面涉及与人密封蛋白4蛋白结合的分离的scFv,该分离的scFv包含轻链可变区,该轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、4、6和8,或与其至少90%同一的序列。

[0028] 本发明的方面涉及与人密封蛋白4蛋白结合的分离的scFv,该分离的scFv包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3、5和7,或与其至少90%同一的序列,该轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、4、6和8,或与其至少90%同一的序列。

[0029] 本发明的实施例包含与人密封蛋白4蛋白结合的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:1约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:2约95%同一的氨基酸序列。

[0030] 本发明的实施例包含与人密封蛋白4蛋白结合的分离的scFv,该分离的scFv包含重链、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:1约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:2约95%同一的氨基酸序列。

[0031] 本发明的实施例包含与人密封蛋白4蛋白结合的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:3约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:4约95%同一的氨基酸序列。

[0032] 本发明的实施例包含与人密封蛋白4蛋白结合的分离的scFv抗体,该分离的scFv抗体包含重链、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:3约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:4约95%同一的氨基酸序列。

[0033] 本发明的实施例包含与人密封蛋白4蛋白结合的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:5约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:6约95%同一的氨基酸序列。

[0034] 本发明的实施例包含与人密封蛋白4蛋白结合的分离的scFv,该分离的scFv包含重链、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:5约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:6约95%同一的氨基酸序列。

[0035] 本发明的实施例包含与人密封蛋白4蛋白结合的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:7约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:8约95%同一的氨基酸序列。

[0036] 本发明的实施例包含与人密封蛋白4蛋白结合的分离的scFv,该分离的scFv包含

重链、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:7约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:8约95%同一的氨基酸序列。

[0037] 本发明的方面涉及分离的双特异性抗体,其包含如本文所述的抗体片段和对免疫细胞上的分子具有特异性的第二抗原结合片段。在实施例中,该分子选自由以下组成的组:CCR4、CXCR4、B7H3、B7H4、CD27、CD28、CD40、CD40L、CD47、CD122、CTLA-4、GITR、GITRL、ICOS、ICOSL、LAG-3、LIGHT、OX-40、OX40L、PD-1、TIM3、4-1BB、TIGIT、VISTA、HEVM、BTLA和KIR。

[0038] 在实施例中,该片段和该第二片段各自独立地选自Fab片段、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体。

[0039] 本发明的方面进一步涉及与人密封蛋白4蛋白结合的双特异性T细胞衔接器(BiTE)。在实施例中,BiTE包含:(a)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VL CDR3;或(b)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的VL CDR3;或(c)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VL CDR3;或(d)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3。在实施例中,抗体序列已根据IMGT编号方案确定。

[0040] 本发明的方面进一步包含与人密封蛋白4蛋白结合的双特异性T细胞衔接器(BiTE),该BiTE包含重链可变区,该重链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3、5和7,或与其至少90%同一的序列。

[0041] 本发明的方面进一步包含与人密封蛋白4蛋白结合的双特异性T细胞衔接器(BiTE),该BiTE包含轻链可变区,该轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、4、6和8,或与其至少90%同一的序列。

[0042] 本发明的方面进一步包含与人密封蛋白4蛋白结合的双特异性T细胞衔接器(BiTE),该BiTE包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3、5和7,或与其至少90%同一的序列,该轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、4、6和8,或与其至少90%同一的序列。

[0043] 如本文所述的实施例可以进一步包含Fc片段。

[0044] 本发明的方面进一步涉及编码本文所述的抗体或片段的核酸。

[0045] 更进一步地,本发明的方面涉及药物组合物,其包含如本文所述的抗体或其片段,以及药学上可接受的载剂或赋形剂。

[0046] 在实施例中,药物组合物可以进一步包含至少一种另外的治疗性药剂。例如,治疗性药剂可以是毒素、放射性标记、siRNA、小分子或细胞因子。

[0047] 本发明的方面涉及分离的细胞,其包含编码如本文所述的抗体或片段的一种或多种多核苷酸。

[0048] 此外,本发明的方面涉及包含如本文所述的核酸的载体。

[0049] 更进一步地,本发明的方面涉及包含如本文所述的载体的细胞。

[0050] 本发明的方面涉及包含嵌合抗原受体的经工程改造的细胞。在实施例中,嵌合抗原受体包含对癌细胞表面上的抗原具有特异性的胞外配体结合结构域,其中该抗原包含密封蛋白4,其中该胞外配体结合结构域包含抗体或其片段,其中该抗体或其片段包含:(a) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VL CDR3;或(b) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的VL CDR3;或(c) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VL CDR3;或(d) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3。在实施例中,抗体序列已根据IMGT编号方案确定。

[0051] 在实施例中,抗体或其片段包含重链可变区,该重链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3、5和7,或与其至少90%同一的序列。

[0052] 在实施例中,抗体或其片段包含轻链可变区,该轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、4、6和8,或与其至少90%同一的序列。

[0053] 在实施例中,抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3、5和7,或与其至少90%同一的序列,该轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、4、6和8,或与其至少90%同一的序列。

[0054] 在实施例中,细胞包含T细胞、NK细胞、NKT细胞、iPS细胞、iPS衍生的细胞、细胞系或B细胞。例如,细胞包含CD4+、CD8+、CD3+泛T细胞、或其任何组合。

[0055] 本发明的方面进一步涉及试剂盒。在实施例中,试剂盒包含至少一种如权利要求36或39所述的药物组合物;用于向受试者施用至少一种抗体的注射器、针头或施用器;和使用说明。

[0056] 进一步地,本发明的方面涉及用于检测样品中密封蛋白4的存在的方法。在实施例中,方法包括使样品与如本文所述的分离的单克隆抗体或其片段接触,并检测抗体-抗原复合物的存在或不存在,从而检测样品中密封蛋白4的存在。在实施例中,接触包含免疫组织化学。例如,免疫组织化学包含沉淀、免疫荧光、蛋白印迹或ELISA。在实施例中,样品是全血、血液组分、体液、活检、组织、血清或一种或多种细胞。

[0057] 在实施例中,样品包含正常样品或癌性样品。例如,癌症表达密封蛋白4。例如,癌

症包括胆癌、乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、食道癌、肠癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、直肠癌、胃癌、甲状腺癌或子宫癌。

[0058] 在实施例中,一种或多种细胞包含体外培养物。

[0059] 在实施例中,一种或多种细胞包含表达密封蛋白4的细胞。

[0060] 在实施例中,样品是体外样品。

[0061] 实施例可以进一步包括从受试者获得样品的步骤。

[0062] 本发明的方面进一步涉及一种通过向受试者施用如本文所述的药物组合物来在该受试者中治疗癌症的方法。例如,癌症表达密封蛋白4。例如,癌症包括胆癌、乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、食道癌、肠癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、直肠癌、胃癌、甲状腺癌或子宫癌。在实施例中,如本文所述的抗体或片段与密封蛋白3的结合亲和力比该抗体、片段或双特异性抗体与密封蛋白4的结合亲和力低至少5、10、25、50、100或1000倍。

[0063] 从随后的描述中,本发明的其他目的和优点是显而易见的。

附图说明

[0064] 图1显示了验证细胞病变效应流式细胞术的非限制性示例性数据。

[0065] 图2显示了针对密封蛋白-4的淘选的非限制性示例性示意图。

[0066] 图3显示了使用昆虫细胞中表达的溶解的密封蛋白4根据噬菌体淘选的靶向密封蛋白4的scFv的非限制性示例性数据的图。

[0067] 图4显示了EK01 (参见,WO 2019/178359)噬菌体特异性结合可溶性密封蛋白-4的非限制性示例性数据的图。

[0068] 图5显示了F4结合密封蛋白-4的非限制性示例性数据的图。

[0069] 图6显示了非限制性示例性流式细胞术数据的直方图。

[0070] 图7显示了来自蛋白纯化的非限制性示例性蛋白印迹。

[0071] 图8显示了EK01微型抗体结合数据的非限制性示例性数据 (参见,WO 2019/178356)。

[0072] 图9显示了顺磁蛋白脂质体 (PMPL) 淘选的非限制性示例性示意图。在实施例中,对可溶性密封蛋白-4进行了三轮淘选,并用密封蛋白-4进行筛选。经过ELISA确认和可溶性密封蛋白4稀释系列后,初步鉴定出一个命中。淘选最初在PMPL上失败。然后制备了新的PMPL。

[0073] 图10显示了PMPL生产的非限制性示例性数据。

[0074] 图11显示了淘选的非限制性示例性示意图。

[0075] 图12显示了来自图11中的淘选的重新拯救的6个板的非限制性示例性结果。

[0076] 图13显示了来自图11中第1轮和第2轮淘选的克隆和频率的非限制性示例性结果。

[0077] 图14显示了来自图11的第1轮和第2轮的下一代测序 (NGS) 的非限制性示例性数据。

[0078] 图15显示了噬菌体结合溶解的密封蛋白-4ELISA的非限制性示例性数据。

[0079] 图16显示了密封蛋白-4阳性细胞和未转染的细胞中噬菌体结合的非限制性示例性数据。

[0080] 图17显示了噬菌体结合未转导的细胞的非限制性示例性数据。

[0081] 图18显示了非限制性示例性ELISA数据。

- [0082] 图19显示了非限制性示例性微型抗体结合数据。
- [0083] 图20显示了非限制性示例性微型抗体结合数据。
- [0084] 图21显示了密封蛋白-4全细胞淘选路径的非限制性示例性示意图。
- [0085] 图22显示了非限制性示例性的纯化噬菌体结合曲线 (CLDN-4)。
- [0086] 图23显示了MB231CLDN-4的非限制性示例性CLDN-4微型抗体结合。在该实例中, KM是从US 8,076,458合成的抗CLDN4抗体, 并克隆到我们的scFv-Fc载体中作为对照。从美天旎公司 (Miltenyi) 和R&D公司购买试剂并按原样使用。
- [0087] 图24显示了CLDN蛋白结构的非限制性示例性示意图。在实施例, CLDN-3和CLDN-4的结构和表达可以是类似的。在实施例, 癌组织中的表达水平也可以是类似的。
- [0088] 图25显示了人CLDN-3和CLDN-4胞外结构域的非限制性示例性示意图。在一些实施例中, 胞外结构域的同源性可用于发现CLDN-4特异性抗体。同源性: ECL1 98%, ECL2 79%, 两者93%。
- [0089] 图26显示了商业抗体稳定性的实例。
- [0090] 图27显示了细胞系染色的非限制性示例性定量数据。
- [0091] 图28显示了aCLDN-4微型抗体的CLDN-3结合的非限制性示例性数据。
- [0092] 图29显示了密封蛋白抗体的特异性的非限制性示例性数据。0.1mg/ml时观察到类似的结果。
- [0093] 图30显示了MB231用aCXCR4染色相比于K0的非限制性示例性数据。
- [0094] 图31显示了CD8+抗CLDN-4CART杀伤表达CLDN-4的MB231细胞的非限制性示例性图。阳性对照KM3900和CPE非特异性杀伤肿瘤, aC4-G3和aC4-F4确实特异性识别并杀伤CLDN+肿瘤(高9倍)。阴性对照背景杀伤较低(<10%)。我们的抗CLDN-4CART特异性杀伤表达高水平CLDN-4的肿瘤细胞。
- [0095] 图32显示了在E:T比率为2:1时CD8+抗CLDN-4CART杀伤的动力学的非限制性示例性数据的图。

具体实施方式

[0096] 缩写与定义

[0097] 本文提供了一个或多个实施例的详细描述。然而, 应当理解, 本发明可以以各种形式实施。因此, 在此披露的具体细节不应当被解释为是限制性的, 而是应当被解释为是权利要求书的一个基础以及用于传授本领域中的技术人员以任何适当的方式采用本发明的一个代表性基础。

[0098] 单数形式“一个/种(a/an)”和“该(the)”包括复数个指示物, 除非上下文中另外明确指明。在权利要求书和/或说明书中, 当结合术语“包含(comprising)”使用时, 词语“一个(a)”或“一种(an)”的使用可以指“一个/一种(one)”, 但是还与“一个或多个/一种或多种(one or more)”、“至少一个/至少一种(at least one)”、以及“一个或多于一个/一种或多于一种(one or more than one)”一致。

[0099] 无论何时在本文中使用短语“例如(for example)”、“比如(such as)”、“包括(including)”等中的任一个, 除非另有明确说明, 否则应理解为遵循短语“且不限于”。类似地, “实例”、“示例性”等应理解为非限制性的。

[0100] 术语“基本上”允许与描述语的偏差,该偏差不会对预期目的产生负面影响。描述性术语应理解为由术语“基本上”修饰,即使没有明确地叙述该词“基本上”。

[0101] 术语“包含(comprising)”和“包括(including)”以及“具有(having)”和“涉及(involving)”(以及类似地“包含(comprises)”、“包含(includes)”、“具有(has)”和“涉及(involves)”)等可互换使用并且具有相同的含义。特别地,这些术语中每个的定义与美国专利法对“包含(comprising)”的共同定义一致,因此被解释为开放术语,意为“至少以下”,并且还解释为不排除另外的特征、限制、方面等。因此,例如,“涉及步骤a、b和c的过程”意指该过程包括至少步骤a、b和c。无论何时使用术语“一个(a)”或“一种(an)”,都应理解为“一个或多个/一种或多种(one or more)”,除非此类解释在上下文中是无意义的。

[0102] 术语“约”在本文中用于意指大约、大致、大概或在……范围内。当术语“约”与数值范围结合使用时,它通过扩展以上示出的数值的上下边界来修改该范围。通常,术语“约”在本文中用于将数值在所述值之上和之下修改百分之20向上或向下(更高或更低)的变化。

[0103] 本文描述了独特的重组单克隆密封蛋白4(CLDN4)抗体。当与多肽(例如抗体)或多核苷酸有关时,“重组”可以指天然不存在的多肽或多核苷酸的形式,其非限制性实例可以通过组合通常不能一起出现的多核苷酸或多肽来创建。

[0104] 除了可与本文提供的VH和VL序列组合使用的示例性野生型IgG恒定区之外,本文还提供了单克隆CLDN4抗体的氨基酸序列(参见表1-4);CLDN4抗体的重链和轻链互补决定区CDR的氨基酸序列在以下被下划线(CDR1)、下划线且粗体(**CDR2**)或下划线、斜体且粗体(***CDR3***):

表 1. Gly1-2-F4_PelB-F_2019-12-08_C03 Ab 可变区氨基酸序列

Gly1-2-F4 的 V_H 链

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN~~NY~~AMSWVRQAPGKGLEWVSTIRDSGGSTYYT
 DSVKGRFTISRDSKNTLYLQMNSLRADDTAVYYCARRGYSSSWYGDGYYYGMDVWGQGTT
 VTVS

(SEQ ID NO: 1)

Gly1-2-F4 的 V_L 链

NFMLTQPHSVSESPGETVTISCARSSGSIASSFVQWYQQRPGASPTTVIYENNQRPSGVPDRFS
 GSIDSSNSASLTISGLKPEDEADYYCQSYDSTSHVFGTGTQVTVL

(SEQ ID NO: 2)

表 2. Gly1-4-G3_PelB-F_2019-12-08_H03 Ab 可变区氨基酸序列

Gly1-4-G3 的 V_H 链

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFGGYAMHWVRQAPGKGLEWVAELLSNSGSNAFYA
 DSVRGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCARAVMSSSWYMRRYYYYYMDVWGKG
 TTVTVS

(SEQ ID NO: 3)

Gly1-4-G3 的 V_L 链

LPVLTQPPSASGTPGQRVTMCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRF
 SGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGLYVFGTGTKVNVL

(SEQ ID NO: 4)

表 3. Gly1-1-H9_PelB-F_2019-12-08_B03 Ab 可变区氨基酸序列

Gly1-1-H9 的 V_H 链

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAIWVRQAPGQGPEWMGRIIPIVDIANYAQ
 KFQGRVTITADESTTTAYMELSSLRSDDTAVYYCARGGSQGAYYMDVWGKGTTTVTS

(SEQ ID NO: 5)

Gly1-1-H9 的 V_L 链

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRPSGVPDRFS
 GSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDDSNRVVFGGGTKLTVL

(SEQ ID NO: 6)

表 4. Gly1-1-B2_PelB-F_2019-12-08_A03 Ab 可变区氨基酸序列
Gly1-1-B2 的 V_H 链
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNNYAVSWVRQAPGQGPEWMGR IIP IVDIANYA QRFQGRVTITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARGGSQGAYYMDI WGKGTMVTVS (SEQ ID NO: 7)
Gly1-1-B2 的 V_L 链
ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSNYLAWYRQKPGQAPRLLIY G ASTRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYFC HOYGSLPQT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 8)

[0105] CLDN4抗体的重链和轻链互补决定区的氨基酸序列如下表5A-B所示：

表5A. CLDN4抗体的重链 (V_H) 互补决定区 (CDR)

序列 ID	V _H CDR1	V _H CDR2	V _H CDR3
Gly1-2-F4	GFTFNNYA (SEQ ID NO: 9)	IRDSGGST (SEQ ID NO: 10)	ARRGYSSSWYGDGYYYGMDV (SEQ ID NO: 11)
Gly1-4-G3	GFTFGGYA (SEQ ID NO: 12)	LSNSGSNA (SEQ ID NO: 13)	ARAVMSSSWYMRRYYYYYMDV (SEQ ID NO: 14)
Gly1-1-H9	GGTFSSYA (SEQ ID NO: 15)	IIPVDIA (SEQ ID NO: 16)	ARGGSQGAYYMDV (SEQ ID NO: 17)
Gly1-1-B2	GGTFNNYA (SEQ ID NO: 18)	IIPVDIA (SEQ ID NO: 16)	ARGGSQGAYYMDV (SEQ ID NO: 17)

表5B. CLDN4抗体的轻链 (V_L) 互补决定区 (CDR)

序列 ID	V _L CDR1	V _L CDR2	V _L CDR3
Gly1-2-F4	SGSIASSF (SEQ ID NO: 19)	ENN (SEQ ID NO: 20)	QSYDSTSHV (SEQ ID NO: 21)
Gly1-4-G3	RSNIGSNT (SEQ ID NO: 22)	SNN (SEQ ID NO: 23)	AAWDDSLNGLYV (SEQ ID NO: 24)
Gly1-1-H9	SGSIASNY (SEQ ID NO: 25)	EDN (SEQ ID NO: 26)	QSYDDSNRVV (SEQ ID NO: 27)
Gly1-1-B2	QSVSNY (SEQ ID NO: 28)	GAS (SEQ ID NO: 29)	HQYGSLPQT (SEQ ID NO: 30)

[0106] CLDN4抗体的重链和轻链框架区的氨基酸序列如下表6A-B所示：

表6A. CLDN4抗体的重链 (V_H) 框架区 (FR)

Seq ID	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FR4
Gly1-2-F4	QVQLVQSGGGLV QPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 31)	MSWVRQAPG KGLEWVST (SEQ ID NO: 32)	YYTDSVKGRFTISR DSSKNTLYLQMNS LRADDTAVYYC (SEQ ID NO: 33)	WGQGTTVTVS (SEQ ID NO: 34)
Gly1-4-G3	EVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 35)	MHWVRQAPG KGLEWVAE (SEQ ID NO: 36)	FYADSVRGRFTISR DNSKNTMYLQMN SLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 37)	WGKGTTVTVS (SEQ ID NO: 38)
Gly1-1-H9	QVQLQQSGAEVK KPGSSVKVSCKAS (SEQ ID NO: 39)	ISWVRQAPGQ GPEWMGR (SEQ ID NO: 40)	NYAQKFQGRVTITA DESTTTAYMELSSL RSDDTAVYYC (SEQ ID NO: 41)	WGKGTTVTVS (SEQ ID NO: 38)
Gly1-1-B2	QVQLVQSGAEVK KPGSSVKVSCKAS (SEQ ID NO: 42)	VSWVRQAPGQ GPEWMGR (SEQ ID NO: 43)	NYAQRFFQGRVTITA DESTNTAYMELSSL RSED TAVYYC (SEQ ID NO: 44)	WGKGTMVTVS (SEQ ID NO: 45)

表6B. CLDN4抗体的轻链 (V_L) 框架区 (FR)

Seq ID	VL FR1	VL FR2	VL FR3	VL FR4
Gly1-2-F4	NFMLTQPHSVSES PGETVTISCARS (SEQ ID NO: 46)	VQWYQQRPG ASPTTVIY (SEQ ID NO: 47)	QRPSGVPDRFSGSI DSSNSASLTISGLK PEDEADYYC (SEQ ID NO: 48)	FGTGTQVTVL (SEQ ID NO: 49)
Gly1-4-G3	LPVLTQPPSASGT PGQRVTMSCSGS (SEQ ID NO: 50)	VNWKYQLPGT APKLLIY (SEQ ID NO: 51)	QRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAISGLQS EDEADYYC (SEQ ID NO: 52)	FGTGTKVNVL (SEQ ID NO: 53)
Gly1-1-H9	NFMLTQPHSVSES PGKTVTISCTRS (SEQ ID NO: 54)	VQWYQQRPGS APTTVIY (SEQ ID NO: 55)	QRPSGVPDRFSGSI DSSNSASLTISGLK TEDEADYYC (SEQ ID NO: 56)	FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 57)
Gly1-1-B2	ETTLTQSPATLSVS PGERATLSCRAS (SEQ ID NO: 58)	LAWYRQKPGQ APRLIY (SEQ ID NO: 59)	TRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPE DFAVYFC (SEQ ID NO: 60)	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 61)

[0107] 本文提供了单克隆CLDN4抗体的核酸序列;CLDN4抗体的重链和轻链互补决定区CDR的核酸序列在以下被下划线 (CDR1)、下划线且粗体 (CDR2) 或下划线、斜体且粗体 (CDR3) :

[0108] 表7A. CLDN4抗体的重链 (V_H) 互补决定区 (CDR)

Seq ID	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
Gly1-2-F4	GGATTACCTTTAA CAACTATGCC (SEQ ID NO: 62)	ATTCGTGATAGTGGT GGTAGCACA (SEQ ID NO: 63)	GCGAGGCGCGGGTATAG CAGCAGCTGGTATGGTG ATGGCTACTACTACGGT ATGGACGTC (SEQ ID NO: 64)
Gly1-4-G3	GGATTACCTTCG GTGGCTATGCT (SEQ ID NO: 65)	CTATCAAATAGTGGA AGCAATGCC (SEQ ID NO: 66)	GCGAGAGCGGTTATGAG CAGCAGCTGGTACATGA GAAGGTACTACTACTAC TACATGGACGTC (SEQ ID NO: 67)
Gly1-1-H9	GGAGGCACCTTCA GCAGCTATGCT (SEQ ID NO: 68)	ATCATCCCTATTGTTG ACATAGCA (SEQ ID NO: 69)	GCGAGAGGGGGTCCCC AGGGGGCATACTACATG GACGTC (SEQ ID NO: 70)
Gly1-1-B2	GGAGGCACCTTCA ACAACTATGCT (SEQ ID NO: 71)	ATCATCCCTATCGTTG ATATCGCA (SEQ ID NO: 72)	GCCAGAGGGGGTCCCC AGGGGGCATATTACATG GACGTC (SEQ ID NO: 73)

[0109] 表7B. CLDN4抗体的重链 (V_H) 互补决定区 (CDR)

Seq ID	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
Gly1-2-F4	AGTGGCAGCATTG CCAGCAGCTTT (SEQ ID NO: 74)	GAGAATAAC (SEQ ID NO: 75)	CAGTCTTATGATAGTACC TCTCATGTC (SEQ ID NO: 76)
Gly1-4-G3	CGCTCCAACATCG GAAGTAATACT (SEQ ID NO: 77)	AGTAATAAT (SEQ ID NO: 78)	GCAGCATGGGATGACAG CCTGAATGGCCTTTATGT C (SEQ ID NO: 79)

Seq ID	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
Gly1-1-H9	AGTGGCAGCATTG CCAGCAACTAT (SEQ ID NO: 80)	GAGGATAAC (SEQ ID NO: 81)	CAGTCTTATGATGACAG TAATCGTGTGGTC (SEQ ID NO: 82)
Gly1-1-B2	CAGAGTGTAAGCA ACTAC (SEQ ID NO: 83)	GGCGCATCC (SEQ ID NO: 84)	CACCAGTATGGAAGTTT ACCTCAGACG (SEQ ID NO: 85)

[0110] 表8A. CLDN4抗体的V-D-J-区

Seq ID	V-D-J-区
Gly1-2-F4 (SEQ ID NO: 86)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCCGCCTCTGGATTACCTTTAACAA CTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG TGGGTCTCAACTATTCGTGATAGTGGTGGTAGCACATACTACACA GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAGTTCCAAGA ACACGTTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGACGACACGGC CGTGTATTACTGTGCGAGGGCGCGGGTATAGCAGCAGCTGGTATGGTG ATGGCTACTACTACGGTATGGACGTC TGGGGCCAAGGGACCACGGT CACCGTCTCC
Gly1-4-G3 (SEQ ID NO: 87)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTACCTTCGGTG GCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTAGA GTGGGTGGCAGAACTATCAAATAGTGGAAGCAATGCC TTCTACGC AGACTCCGTGAGGGGCGGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG AACACGATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG GCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCGGGTATGAGCAGCAGCTGGTACAT GAGAAGGTACTACTACTACTACATGGACGTC TGGGGCAAAGGGACC ACGGTCACCGTCTCC
Gly1-1-H9 (SEQ ID NO: 88)	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCA GCTATGCTATCAGTTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCCTGA GTGGATGGGAAGAATCATCCCTATTGTTGACATAGCAA ACTACGC ACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCAC GACCACAGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGATCTGACGACACG GCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGGTCCCAGGGGGCATACTACAT GGACGTC TGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC
Seq ID	V-D-J-区
Gly1-1-B2 (SEQ ID NO: 89)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAACA ACTATGCTGTGAGCTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCCTGA GTGGATGGGAAGGATCATCCCTATCGTTGATATCGCAAATTACGC ACAGAGGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCAC GAACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGTCTGAGATCTGAGGACAC GGCCGTATATTATTGTGCCAGAGGGGGGTCCCAGGGGGCATATTACA TGGACGTC TGGGGCAAAGGGACAATGGTCACCGTCTCC

[0111] 表8B.CLDN4抗体的V-J区

Seq ID	V-J 区
Gly1-2-F4 (SEQ ID NO: 90)	AATTTTATGCTGACGCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGG AGACGGTAACCATCTCCTGCGCCCGCAGCAGTGGCAGCATTGCCAG <u>CAGCTTTGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCGCTTCCCCACC</u> ACTGTTATCTAT <u>GAGAATAAC</u> CAAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATC GGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACC ATCTCTGGACTGAAGCCTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGT <u>CAGT</u> <u>CTTATGATAGTACCTCTCATGTC</u> TTCGGAACCTGGGACCCAGGTCACC GTCCTAG
Gly1-4-G3 (SEQ ID NO: 91)	CTGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGC AGAGGGTCACCATGTCTTGTCTGGAAGCCGCTCCAACATCGGAAG <u>TAATACTGTAACTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACGGCCCCAAA</u> CTCCTCATCTAT <u>AGTAATAAT</u> CAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCG ATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTG GGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGT <u>GCAGCATGGGAT</u> <u>GACAGCCTGAATGGCCTTTATGTC</u> TTCGGAACCTGGGACCAAGGTCA ACGTCCTAT
Gly1-1-H9 (SEQ ID NO: 92)	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAA GACGGTAACCATCTCCTGCACCCGCAGCAGTGGCAGCATTGCCAGC <u>AACATATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAGTGCCCCACCA</u> CTGTGATCTAT <u>GAGGATAAC</u> CAAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCG GTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTACCA TCTCTGGACTGAAGACTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGT <u>CAGTC</u> <u>TTATGATGACAGTAATCGTGTGGTC</u> TTCGGCGGAGGGACCAAGCTG ACCGTCCTGG
Seq ID	V-J 区
Gly1-1-B2 (SEQ ID NO: 93)	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCCGCCACTCTGTCTGTGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT <u>CAGAGTGTAAGCA</u> <u>ACTACTTAGCCTGGTATCGACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCT</u> CCTCATCTAT <u>GGCGCATCC</u> ACCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCA GACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTTCTGT <u>CACCAGTATGGA</u> <u>AGTTTACCTCAGACG</u> TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC

[0112] 本文所述的CLDN4抗体与CLDN4结合。在一个实施例中,CLDN4抗体对CLDN4具有高亲和力和高特异性。一些实施例还特征在于与本文所述的抗CLDN4抗体的氨基酸或核苷酸序列具有指定百分比同一性或相似性的抗体。例如,“同源性”或“同一性”或“相似性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。同源性可以通过比较每个序列中可以出于比较目的而对齐的位置来确定。当比较的序列中的一个位置被相同的碱基或氨基酸占据时,则分子在该位置是同源的。序列之间的同源性程度是由序列共享的匹配或同源位置数

目的函数。例如,当与本文所述的抗CLDN4抗体中任一个的指定区域或全长相比时,抗体可以具有60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的氨基酸序列同一性。例如,当与本文所述的抗CLDN4抗体中任一个的指定区域或全长相比时,抗体可以具有60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的核酸同一性。与本发明的核酸和蛋白的序列同一性或相似性可以通过本领域已知的方法通过序列比较和/或比对来确定,例如使用本领域已知的软件程序,例如以下中描述的那些:Ausubel等人编辑(2007)Current Protocols in Molecular Biology.[分子生物学现代方法]。例如,序列比较算法(即,BLAST或BLAST 2.0)、手动比对或目视检查可用于确定本发明的核酸和蛋白的序列同一性或相似性百分比。

[0113] 如本文所用,“多肽(Polypeptide)”可以涵盖单数“多肽(polypeptide)”以及复数“多肽(polypeptides)”,并且可以指由通过酰胺键(也称为肽键)线性连接的单体(氨基酸)构成的分子。术语“多肽”可以指两个或更多个氨基酸的任何一条链或多条链,并且不指产物的特定长度。因此,肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白”、“氨基酸链”或任何其他术语可用于指代两个或更多个氨基酸的一条链或多条链,在本文中可指“多肽”,并且该术语“多肽”可用来代替这些术语中的任一个或与这些术语中的任一个互换使用。“多肽”还可以指多肽的表达后修饰的产物,包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团的衍生化、蛋白水解切割或通过非天然存在的氨基酸的修饰。多肽可以衍生自天然生物来源或通过重组技术产生,但不一定是从核酸序列翻译而来。它可以以任何方式产生,包括通过化学合成。对于氨基酸序列,本领域技术人员应当容易地认识到,对核酸、肽、多肽或蛋白序列进行的单个取代、缺失或添加(这在经编码的序列中改变、添加、缺失或取代单个氨基酸或小百分数的氨基酸)在本文中统称为“保守修饰的变体”。在一些实施例中,改变导致氨基酸被化学上类似的氨基酸取代。提供在功能上相似的氨基酸的保守取代表是本领域熟知的。与未修饰的CLDN4抗体相比,本文披露的抗CLDN4抗体的这样的保守修饰变体可以表现出与CLDN4增加的交叉反应性。

[0114] 例如,“保守氨基酸取代”是氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基替换的取代。具有相似侧链的氨基酸残基的家族已在本领域中定义,包括以下侧链:碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β 分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,免疫球蛋白多肽中的非必需氨基酸残基被来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替换。在另一个实施例中,氨基酸串链可以被结构相似的在侧链家族成员的顺序和/或组成方面不同的串链替换。

[0115] 抗体

[0116] 如本文所用,“抗体”或“抗原结合多肽”可以指特异性识别并结合抗原的多肽或多肽复合物。抗体可以是完整抗体及其任何抗原结合片段或单链。例如,“抗体”可以包括任何含有蛋白或肽的分子,其包含具有结合抗原的生物活性的免疫球蛋白分子的至少一部分。非限制性实例是重链或轻链或其配体结合部分的互补决定区(CDR)、重链或轻链可变区、重

链或轻链恒定区、框架(FR)区、或其任何部分、或结合蛋白的至少一部分。如本文所用,术语“抗体”可以指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白(Ig)分子的免疫活性部分,即含有特异性结合抗原(与抗原免疫反应)的抗原结合位点的分子。“特异性结合”或“与……免疫反应”意指抗体与抗原的一个或多个抗原决定簇反应并且不与其他多肽反应。

[0117] 如本文所用,术语“抗体片段”或“抗原结合片段”是抗体的一部分,例如 $F_{(ab')_2}$ 、 $F_{(ab)_2}$ 、 F_{ab}' 、 F_{ab} 、Fv、scFv等。无论结构如何,抗体片段都会与完整抗体识别的相同抗原结合。术语“抗体片段”可包括适体(例如镜像适体)、微型抗体和双抗体。术语“抗体片段”还可以包括任何合成的或基因工程改造的蛋白,其通过与特定抗原结合形成复合物而像抗体一样发挥作用。本文所述的抗体、抗原结合多肽、变体或衍生物包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体、单链抗体、表位结合片段,例如Fab、Fab'和 $F(ab')_2$ 、Fd、Fv、单链Fv(scFv)、单链抗体、dAb(结构域抗体)、微型抗体、二硫化物连接的Fv(sdFv)、包含VL或VH结构域的片段、由Fab表达文库产生的片段以及抗独特型(抗Id)抗体。

[0118] “单链可变片段”或“scFv”是指免疫球蛋白的重链(V_H)和轻链(V_L)的可变区的融合蛋白。单链Fv(“scFv”)多肽分子是共价连接的VH:VL异二聚体,其可以由包括通过编码肽的接头连接的VH-编码基因和VL-编码基因的基因融合物表达。(参见Huston等人(1988)Proc Nat Acad Sci USA[美国国家科学院院刊]85(16):5879-5883)。在一些方面,这些区用10至约25个氨基酸的短肽连接。接头可以富含甘氨酸用于柔性,也可以富含丝氨酸或苏氨酸用于溶解性,并且可以将 V_H 的N末端与 V_L 的C末端连接,反之亦然。尽管去除了恒定区并引入了接头,但该蛋白保留了原始免疫球蛋白的特异性。已经描述了许多方法来解析化学结构,用于将来自抗体V区的天然聚集的、但化学分离的轻多肽链和重多肽链转化为scFv分子,其将折叠成与抗原结合位点的结构基本上相似的三维结构。参见,例如美国专利号5,091,513; 5,892,019; 5,132,405; 和美国专利号4,946,778、其中的每个均通过引用以其整体并入。

[0119] 非常大的初治人scFv文库已经创建并且可以创建,以提供针对大量靶分子的重排抗体基因的大量资源。可以从患有传染病的个体构建较小的文库,以分离疾病特异性抗体。(参见Barbas等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]89:9339-43(1992); Zebedee等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]89:3175-79(1992))。

[0120] 从人获得的抗体分子分为免疫球蛋白的五个类别:IgG、IgM、IgA、IgE和IgD,它们因分子中存在的重链的性质而彼此不同。本领域技术人员应当理解,重链被分类为伽马(gamma)、穆(mu)、阿尔法(alpha)、德尔塔(delta)或伊普西龙(epsilon)(γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ)以及其中的一些子类(例如, $\gamma 1$ - $\gamma 4$)。某些类别也有子类,例如IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄等。免疫球蛋白子类(同种型)例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgG₅等已被充分表征,并已知赋予功能特化。对于IgG,标准免疫球蛋白分子包含两条分子量大约为23,000道尔顿的相同轻链多肽和两条分子量为53,000-70,000道尔顿的相同重链多肽。这四条链以“Y”构型通过二硫键连接,其中轻链如括号一样夹在重链两侧,从“Y”的口处开始并且继续直达可变区末。本文所述的免疫球蛋白或抗体分子可以属于免疫球蛋白分子的任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或子类。

[0121] 轻链分类为卡帕(kappa)或拉姆达(lambda)(κ 、 λ)。每个重链类别都可以与 κ 或 λ 轻链结合。通常,当免疫球蛋白由杂交瘤、B细胞或基因工程改造的宿主细胞来生成时,轻链和

重链彼此共价键合并且两个重链的“尾”部分通过共价二硫化物连接或非共价连接来彼此键合。在重链中,氨基酸序列从Y构型的分叉末端的N末端延伸至每条链底部的C末端。

[0122] 轻链和重链都被划分为具有结构同源性和功能同源性的区。术语“恒定”和“可变”是在功能上使用的。轻链(VL)和重链(VH)部分的可变结构域决定抗原识别和特异性。相反地,轻链(CL)和重链(CH1、CH2或CH3)的恒定结构域赋予重要生物学特性例如分泌、经胎盘移动性(transplacental mobility)、Fc受体结合、补体结合等。术语“抗原结合位点”或“结合部分”可以指免疫球蛋白分子的参与抗原结合的部分。抗原结合位点由重链(“H”)和轻链(“L”)的N末端可变(“V”)区的氨基酸残基形成。在重链和轻链的V区内的三个高度相异区段(称为高变区)穿插在称为“框架区”或“FR”的更保守的侧翼区段之间。因此,术语“FR”可以指天然存在于免疫球蛋白的高变区之间和邻近免疫球蛋白的高变区的氨基酸序列。在抗体分子中,轻链的三个高变区和重链的三个高变区在三维空间中相对于彼此布置以形成抗原结合表面。抗原结合表面与结合的抗原的三维表面互补,并且重链和轻链中每者的三个高变区被称为“互补决定区”或“CDR”。含有CLDN4抗体的CDR以及框架(FR)的VH和VL区显示于表1-表4中。

[0123] 存在于每个抗原结合结构域中的六个CDR是短的不连续氨基酸序列,当抗体在水性环境中呈现其三维构象时,这些短的不连续氨基酸序列被特异性定位以形成抗原结合结构域。抗原结合结构域中的其余氨基酸(FR区)显示出较小的分子间变异性。框架区主要采用 β -折叠构象,并且CDR形成连接 β -折叠结构的环,并且在某些情况下形成 β -折叠结构的一部分。框架区起到形成支架的作用,该支架通过链间非共价相互作用将CDR定位在正确的取向。由定位的CDR形成的抗原结合结构域提供了与免疫反应性抗原上的表位互补的表面,这促进了抗体与其同源表位的非共价结合。本领域普通技术人员可以容易地针对重链或轻链可变区鉴定分别包含CDR和框架区的氨基酸,因为它们先前已被定义(参见,“Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫相关蛋白序列],”Kabat,E.,等人,美国卫生与公众服务部,(1983);以及Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],196:901-917(1987))。

[0124] 当本领域内使用和/或接受的术语存在两个或更多个定义时,如本文所用的术语的定义旨在包括这些含义,除非明确相反地说明。特别实例是使用术语“互补决定区”(“CDR”)来描述在重链和轻链多肽的可变区内发现的非连续抗原组合位点。该区域已由Kabat等人,美国卫生与公众服务部,“Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫相关蛋白序列]”(1983)并由Chothia等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196:901-917(1987)(将其通过引用以其整体并入本文)描述。根据Kabat和Chothia的CDR定义包括相互比较时氨基酸残基的重叠或子集。然而,应用定义来指代抗体或其变体的CDR旨在落入本文所定义和使用的术语的范围内。涵盖上述引用的参考文献各自所定义的CDR的适当氨基酸残基列于下表中作为比较。包含CDR的确切残基数目将根据CDR的序列和大小而变化。给定抗体的可变区氨基酸序列,本领域技术人员可以常规地确定哪些残基包含CDR。

CDR	Kabat 编号	Chothia 编号	IMGT 编号
VH CDR1	31-35	26-32	27-38
VH CDR2	50-65	52-58	56-65
VH CDR3	95-102	95-102	105-117
VL CDR1	24-34	26-32	27-38
VL CDR2	50-56	50-52	56-65
VL CDR3	89-97	91-96	105-117

[0125] Kabat等人定义了一种针对可变结构域序列的编号系统,它可适用于任何抗体。技术人员可以将这一“Kabat编号”系统明确地分配给任何可变结构域序列,无需依靠除序列本身外的任何实验数据。如本文所用,“Kabat编号”是指由Kabat等人,美国卫生与公众服务部,“Sequence of Proteins of Immunological Interest[免疫相关蛋白序列]”(1983)提出的编号系统。

[0126] 除了上表之外,Kabat编号系统对CDR区的描述如下:CDR-H1在大约氨基酸31(即,第一个半胱氨酸残基之后大约9个残基)处开始,包括大约5-7个氨基酸,并在下一个色氨酸残基处结束。CDR-H2在CDR-H1结束后的第十五个残基处开始,包括大约16-19个氨基酸,并在下一个精氨酸或赖氨酸残基处结束。CDR-H3在CDR-H2结束后的大约第三十三个氨基酸残基处开始;包括3-25个氨基酸;并在序列W-G-X-G处结束,其中X是任何氨基酸。CDR-L1在大约残基24(即,在半胱氨酸残基之后)处开始;包括大约10-17个残基;并在下一个色氨酸残基处结束。CDR-L2在CDR-L1结束后的大约第十六个残基处开始并且包括大约7个残基。CDR-L3在CDR-L2结束后的大约第三十三个残基(即,在半胱氨酸残基之后)处开始;包括大约7-11个残基并且在序列F或W-G-X-G处结束,其中X是任何氨基酸。

[0127] 在某些方面,抗体的CDR可以根据IMGT编号系统来确定。IMGT唯一编号已被定义为比较可变结构域,无论抗原受体、链类型或物种如何[Lefranc M.-P., Immunology Today [今日免疫学]18,509(1997)/Lefranc M.-P.,The Immunologist[免疫学家],7,132-136(1999)/Lefranc,M.-P.,Pommié,C.,Ruiz,M.,Giudicelli,V.,Foulquier,E.,Truong,L.,Thouvenin-Contet,V.和Lefranc,Dev.Comp.Immunol.[发育与比较免疫学],27,55-77(2003)]。在IMGT唯一编号中,保守氨基酸始终具有相同的位置,例如半胱氨酸23(第1-CYS)、色氨酸41(保守的-TRP)、疏水性氨基酸89、半胱氨酸104(第2-CYS)、苯丙氨酸或色氨酸118(J-PHE或J-TRP)。IMGT唯一编号提供以下的标准化界定:框架区(FR1-IMGT:位置1至26,FR2-IMGT:39至55,FR3-IMGT:66至104和FR4-IMGT:118至128)和互补决定区:CDR1-IMGT:27至38,CDR2-IMGT:56至65和CDR3-IMGT:105至117。由于空位代表未占据的位置,因此CDR-IMGT长度(显示在括号之间并用点分隔,例如[8.8.13])成为关键信息。IMGT唯一编号在2D图形表示中使用,指定为IMGT Colliers de Perles[Ruiz,M.和Lefranc,M.-P., Immunogenetics[免疫遗传学],53,857-883(2002)/Kaas,Q.和Lefranc,M.-P.,Current Bioinformatics[当代生物信息学],2,21-30(2007)],以及在IMGT/3Dstructure-DB中的3D结构中使用[Kaas,Q.,Ruiz,M.和Lefranc,M.-P.,T cell receptor and MHC structural data.[T细胞受体和MHC结构数据]Nucl.Acids.Res.[核酸研究],32,D208-D210(2004)]。

[0128] 如本文所用,术语“表位”可包括可特异性结合免疫球蛋白、scFv或T细胞受体的任何蛋白决定簇。可变区允许抗体选择性识别并特异性结合抗原上的表位。例如,抗体的VL结构域和VH结构域、或互补决定区(CDR)的子集组合形成定义三维抗原结合位点的可变区。这种四级抗体结构形成了存在于Y的每个臂末端的抗原结合位点。表位决定簇可以由化学活性表面分子群(例如氨基酸或糖侧链)组成,并且具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如,可以产生针对多肽的N末端肽或C末端肽的抗体。更特别地,抗原结合位点由VH链和VL链每条上的三个CDR(即,CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)定义。在一个实施例中,抗体可以针对以下:具有UniProtKB ID:014493CLDN4_人的密封蛋白4(CLDN4)(长度为209个氨基酸残基),其包含以下氨基酸序列:

```
MASGLQVMGIALAVLGWLAVMLCCALPMWRVTAFIGSNIVTSQTIWEG
LWMNCVVQSTGQMCKVYDSLALPQDLQAARALVIISIIVAALGVLLS
VVGKCTNCLEDESAKAKTMIVAGVVFLLAGLMVIVPVSHTAHNIIQDF
YNPLVASGQKREMGASLYVGWAASGLLLLGGGLCCNCPPRTDKPYSAK
YSAARSAAASNYV (SEQ ID NO:94)
```

[0129] 如本文所用,术语“免疫结合”和“免疫结合特性”可以指在免疫球蛋白分子和该免疫球蛋白对其具有特异性的抗原之间发生的类型的非共价相互作用。免疫结合相互作用的强度或亲和力可以用相互作用的解离常数(K_d)来表示,其中较小的 K_d 表示较大的亲和力。可以使用本领域众所周知的方法来定量所选多肽的免疫结合特性。一种这样的方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中这些速率取决于复合物配偶体的浓度、相互作用的亲和力以及在两个方向上同等地影响该速率的几何参数。因此,“缔合速率常数”(K_{on})和“解离速率常数”(K_{off})可以通过计算浓度以及缔合和解离的实际速率来确定。(参见Nature[自然]361:186-87(1993))。 K_{off}/K_{on} 的比率允许消除与亲和力无关的参数,并且等于平衡结合常数 K_D 。(参见,Davies等人(1990)Annual Rev Biochem[生物化学年度综述]59:439-473)。如通过动力学测定(如放射性配体结合测定)或本领域技术人员已知的类似测定(如BIAcore或Octet(BLI))所测量的,当平衡结合常数(K_D) $\leq 1\mu M$ 、 $\leq 10\mu M$ 、 $\leq 10nM$ 、 $\leq 10pM$ 、或 $\leq 100pM$ 至约 $1pM$ 时,本发明的抗体可以特异性结合CLDN4表位。例如,在一些实施例中, K_D 介于约 $1E-12M$ 和约 $1E-11M$ K_D 之间。在一些实施例中, K_D 介于约 $1E-11M$ 和约 $1E-10M$ K_D 之间。在一些实施例中, K_D 介于约 $1E-10M$ 和约 $1E-9M$ K_D 之间。在一些实施例中, K_D 介于约 $1E-9M$ 和约 $1E-8M$ K_D 之间。在一些实施例中, K_D 介于约 $1E-8M$ 和约 $1E-7M$ K_D 之间。在一些实施例中, K_D 介于约 $1E-7M$ 和约 $1E-6M$ K_D 之间。例如,在一些实施例中, K_D 是约 $1E-12M$,而在其他实施例中, K_D 是约 $1E-11M$ 。在一些实施例中, K_D 是约 $1E-10M$,而在其他实施例中, K_D 是约 $1E-9M$ 。在一些实施例中, K_D 是约 $1E-8M$,而在其他实施例中, K_D 是约 $1E-7M$ 。在一些实施例中, K_D 是约 $1E-6M$,而在其他实施例中, K_D 是约 $1E-5M$ 。例如,在一些实施例中, K_D 是约 $3E-11M$,而在其他实施例中, K_D 是约 $3E-12M$ 。在一些实施例中, K_D 是约 $6E-11M$ 。“特异性结合”或“对……具有特异性”可以指经由其抗原结合结构域与表位结合的抗体,并且该结合需要抗原结合结构域和表位之间的一些互补性。例如,当抗体经由其抗原结合结构域比其与随机不相关的表位结合更容易地与表位结合时,就被称为与该表位“特异性结合”。

[0130] 例如,CLDN4抗体可以是单价或二价的,和/或可以包含单链或双链。从功能上讲,CLDN4抗体的结合亲和力在 $10^{-5}M$ 至 $10^{-12}M$ 范围内。例如,CLDN4抗体的结合亲和力是 $10^{-6}M$ 至

10^{-12}M 、 10^{-7}M 至 10^{-12}M 、 10^{-8}M 至 10^{-12}M 、 10^{-9}M 至 10^{-12}M 、 10^{-5}M 至 10^{-11}M 、 10^{-6}M 至 10^{-11}M 、 10^{-7}M 至 10^{-11}M 、 10^{-8}M 至 10^{-11}M 、 10^{-9}M 至 10^{-11}M 、 10^{-10}M 至 10^{-11}M 、 10^{-5}M 至 10^{-10}M 、 10^{-6}M 至 10^{-10}M 、 10^{-7}M 至 10^{-10}M 、 10^{-8}M 至 10^{-10}M 、 10^{-9}M 至 10^{-10}M 、 10^{-5}M 至 10^{-9}M 、 10^{-6}M 至 10^{-9}M 、 10^{-7}M 至 10^{-9}M 、 10^{-8}M 至 10^{-9}M 、 10^{-5}M 至 10^{-8}M 、 10^{-6}M 至 10^{-8}M 、 10^{-7}M 至 10^{-8}M 、 10^{-5}M 至 10^{-7}M 、 10^{-6}M 至 10^{-7}M 或 10^{-5}M 至 10^{-6}M 。

[0131] CLDN4蛋白或其衍生物、片段、类似物、同系物或直系同源物可以用作免疫原,用于产生免疫特异性结合这些蛋白组分的抗体。与脂蛋白体偶联的CLDN4蛋白或其衍生物、片段、类似物、同系物或直系同源物可以用作免疫原,用于产生免疫特异性结合这些蛋白组分的抗体。

[0132] 本领域技术人员应当认识到,无需过度实验,通过确定人单克隆抗体是否阻止本发明的人单克隆抗体与CLDN4结合,就可以确定该人单克隆抗体是否与该本发明的人单克隆抗体具有相同的特异性。例如,如果待测的人单克隆抗体与本发明的人单克隆抗体竞争,如本发明的人单克隆抗体的结合减少所示,则两种单克隆抗体与相同的或密切相关的表位结合。

[0133] 确定人单克隆抗体是否具有本发明的人单克隆抗体的特异性的另一种方式是将本发明的人单克隆抗体与通常与其反应的CLDN4蛋白预孵育,然后加入待测的人单克隆抗体以确定待测的人单克隆抗体结合CLDN4的能力是否受到抑制。如果待测的人单克隆抗体被抑制,则其可具有与本发明的单克隆抗体相同或功能等效的表位特异性。本发明的人单克隆抗体的筛选还可以通过利用CLDN4并确定测试单克隆抗体是否能够中和CLDN4来进行。

[0134] 本领域已知的各种程序可用于产生针对本发明蛋白或其衍生物、片段、类似物、同系物或直系同源物的多克隆或单克隆抗体。(参见例如,Antibodies: A Laboratory Manual [抗体:实验室手册], Harlow E, 和 Lane D, 1988, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约州, 通过引用并入本文)。

[0135] 抗体可以通过众所周知的技术纯化,例如使用蛋白A或蛋白G的亲色谱法,其主要提供免疫血清的IgG级分。随后或可选择地,可以将作为所寻求的免疫球蛋白的靶标的特异性抗原或其表位固定在柱上以通过免疫亲和色谱法纯化免疫特异性抗体。免疫球蛋白的纯化例如由D. Wilkinson (The Scientist [科学家], 由科学家公司 (The Scientist, Inc.) 出版, 宾夕法尼亚州费城, 第14卷, 第8期 (2000年4月17日), 第25-28页) 讨论。

[0136] 如本文所用,术语“单克隆抗体”或“mAb”或“Mab”或“单克隆抗体组合物”可以指抗体分子群体,其仅包含一种由独特的轻链基因产物和独特的重链基因产物组成的抗体分子的分子种类。单克隆抗体的互补决定区 (CDR) 在群体的分子中是相同的。MAb含有抗原结合位点,该抗原结合位点可以与抗原的表位发生免疫反应,该表位的特征在于对该抗原结合位点具有独特的结合亲和力。

[0137] 单克隆抗体可以使用杂交瘤方法来制备,例如Kohler和Milstein, Nature [自然], 256: 495 (1975) 描述的那些。在杂交瘤方法中,用免疫剂免疫小鼠、仓鼠或其他合适的宿主动物以引发淋巴细胞,这些淋巴细胞产生或可以产生将与该免疫剂特异性结合的抗体。可替代地,可以在体外免疫淋巴细胞。

[0138] 免疫剂可以包括蛋白抗原、其片段或其融合蛋白。例如,如果人来源的细胞是优选的,则可以使用外周血淋巴细胞,或者如果非人哺乳动物来源是优选的,则可以使用脾细胞或淋巴结细胞。然后使用合适的融合剂 (例如聚乙二醇) 将淋巴细胞与永生化细胞系融合,

以形成杂交瘤细胞(参见Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice[单克隆抗体: 原理与实践], 学术出版社(Academic Press), (1986)第59-103页)。永生化细胞系可以是转化的哺乳动物细胞, 例如啮齿动物、牛和人来源的骨髓瘤细胞。例如, 使用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。杂交瘤细胞可以在合适培养基中培养, 该培养基含有一种或多种抑制未融合的永生化细胞生长或生存的物质。例如, 如果亲本细胞缺少酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT), 杂交瘤的培养基将包括次黄嘌呤、氨蝶呤和胸苷(“HAT培养基”), 这些物质阻止HGPRT缺陷型细胞的生长。

[0139] 有用的永生化细胞系是那些有效融合、支持通过所选的生产抗体的细胞稳定高水平表达抗体, 并且对培养基(如HAT培养基)敏感的细胞系。例如, 永生化细胞系可以是鼠骨髓瘤系, 其可以例如从索尔克研究所细胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center)(圣地亚哥, 加利福尼亚州)和美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(马纳萨斯, 弗吉尼亚州)获得。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也被描述用于人单克隆抗体的产生。(参见Kozbor, J. Immunol[免疫学杂志], 133:3001(1984); Brodeur等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications[单克隆抗体生产及应用], 马塞尔·德克尔公司(Marcel Dekker, Inc.), 纽约, (1987)第51-63页)。

[0140] 然后可以测定培养杂交瘤细胞的培养基中是否存在针对抗原的单克隆抗体。例如, 通过免疫沉淀或通过体外结合测定, 如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)确定由杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体的结合特异性。这样的技术和测定在本领域中是已知的。单克隆抗体的结合亲和力可以例如通过Munson和Pollard, Anal. Biochem. [分析生物化学], 107:220(1980)的斯卡查德分析(Scatchard analysis)来确定。此外, 在单克隆抗体的治疗性应用中, 重要的是鉴定对靶抗原具有高度特异性和高结合亲和力的抗体。

[0141] 杂交瘤细胞被鉴定后, 可以通过有限稀释程序对克隆进行亚克隆, 并通过标准方法进行培养。(参见Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice[单克隆抗体: 原理与实践], 学术出版社(Academic Press), (1986)第59-103页)。用于此目的合适的培养基包括, 例如, 杜氏改良伊戈尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)和RPMI-1640培养基。可替代地, 杂交瘤细胞可以在哺乳动物中在体内作为腹水生长。

[0142] 可以通过常规免疫球蛋白纯化程序(例如, 蛋白A-琼脂糖、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱)将由亚克隆所分泌的单克隆抗体从培养基或腹水液中分离或纯化。

[0143] 单克隆抗体还可以通过重组DNA方法来制备, 例如美国专利号4,816,567(通过引用以其整体并入本文)中描述的那些。使用常规程序(例如, 通过使用可以特异性结合至编码鼠抗体的重链和轻链的基因上的寡核苷酸探针), 可以很容易对编码本发明的单克隆抗体的DNA进行分离和测序。本发明的杂交瘤细胞用作这样的DNA的来源。一旦被分离, 可以将DNA置于表达载体中, 然后将这些载体转染至不另外产生免疫球蛋白的宿主细胞(如猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、或骨髓瘤细胞)中, 以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。DNA也可以被修饰, 例如用人重链和轻链恒定结构域的编码序列来代替同源鼠序列(参见美国专利号4,816,567; Morrison, Nature 368, 812-13(1994))或通过将非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列共价连接至免疫球蛋白编码序列。这样的非免疫球蛋白多肽

可以取代本发明抗体的恒定结构域,和/或可以取代本发明抗体的一个抗原结合位点的可变结构域,以产生嵌合二价抗体。

[0144] 例如,完全人抗体是其中轻链和重链的整个序列(包括CDR)产生自人基因的抗体分子。这样的抗体被称为“人抗体”或“完全人抗体”。利用以下技术可以制备人单克隆抗体,如完全人抗体和人源化抗体:trioma技术;人B细胞杂交瘤技术(参见Kozbor,等人,1983Immunol Today[今日免疫学]4:72);以及产生人单克隆抗体的EBV杂交瘤技术(参见Cole,等人,1985载于:MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY[单克隆抗体与癌症疗法],艾伦·R·利斯公司(Alan R.Liss,Inc.),第77-96页)。人单克隆抗体可以被利用,并且可以通过使用人杂交瘤(参见Cote等人,1983.Proc Natl Acad Sci USA[美国国家科学院院刊]80:2026-2030)或通过用爱泼斯坦-巴尔(Epstein Barr)病毒体外转化人B细胞(参见Cole,等人,1985载于:MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY[单克隆抗体与癌症疗法],艾伦·R·利斯公司,第77-96页)来产生。

[0145] “人源化抗体”可以是来自非人物种(例如小鼠)的抗体,其氨基酸序列(例如,在CDR区中)已被修饰以增加其与人产生的抗体变体的相似性。抗体可以通过本领域已知的方法(例如CDR移植)人源化。还参见,Safdari等人,(2013)Biotechnol Genet Eng Rev.[生物技术与基因工程综述];29:175-86。此外,人源化抗体可以在转基因植物中生产,作为现有哺乳动物系统的廉价生产替代品。例如,转基因植物可以是烟草植物,即、本塞姆氏烟草(Nicotiana benthamiana)和烟草(Nicotiana tabaccum)。抗体是从植物叶中纯化的。通过使用根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)或粒子轰击可以实现植物的稳定转化。例如,经由转化,在细菌培养物(即根癌农杆菌菌株BLA4404)中表达含有至少重链和轻链序列的核酸表达载体。植物的浸润可以通过注射来完成。可溶性叶提取物可以通过在研钵中研磨叶组织并通过离心来制备。抗体的分离和纯化可以通过本领域技术人员已知的许多方法进行。用于在植物中产生抗体的其他方法描述于例如Fischer等人,Vaccine[疫苗],2003,21:820-5;以及Ko等人,Current Topics in Microbiology and Immunology[微生物学与免疫学当前论题],第332卷,2009,第55-78页。因此,本发明进一步提供了包含编码本发明的抗体或产生本发明的抗体的载体的任何细胞或植物。

[0146] 可以使用本领域已知的多种技术将抗体人源化,这些技术包括例如CDR移植(EP 239,400;PCT公开WO 91/09967;美国专利号5,225,539;5,530,101;和5,585,089),镶面(veneering)或表面再塑(resurfacing)(EP 592,106;EP 519,596;Padlan,Molecular Immunology[分子免疫学]28(4/5):489-498(1991);Studnicka等人,Protein Engineering[蛋白工程]7(6):805-814(1994);Roguska.等人,Proc.Natl.Sci.USA[美国国家科学院院刊]91:969-973(1994)),以及链改组(美国专利号5,565,332,将其通过引用以其整体并入)。“人源化”(也称为重塑或CDR移植)是本领域技术人员理解的成熟技术,用于降低来自异种来源(例如啮齿动物)的单克隆抗体(mAb)的免疫原性并用于改善其对免疫系统激活(参见例如,Hou S,Li B,Wang L,Qian W,Zhang D,Hong X,Wang H,Guo Y(2008年7月)。“Humanization of an anti-CD34monoclonal antibody by complementarity-determining region grafting based on computer-assisted molecular modeling[基于计算机辅助分子建模,通过互补决定区移植进行抗CD34单克隆抗体的人源化]”.J Biochem.[生物化学杂志]144(1):115-20)。

[0147] 此外,抗体(例如人抗体)也可以使用其他技术产生,包括噬菌体展示文库。(参见Hoogenboom和Winter, *J.Mol.Biol* [分子生物学杂志], 227:381 (1991); Marks等人, *J.Mol.Biol* [分子生物学杂志], 222:581 (1991))。类似地,可以通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物(例如,内源免疫球蛋白基因已部分或完全失活的小鼠)中来制备人抗体。在激发之后,观察到人抗体的产生,这在所有方面都紧密地类似于在人中所见,包括基因重排、组装及抗体谱系。例如,在以下中描述了该途径:美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016,以及Marks等人, *Bio/Technology* [生物技术] 10,779-783 (1992); Lonberg等人, *Nature* [自然] 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* [自然] 368,812-13 (1994); Fishwild等人, *Nature Biotechnology* [自然生物技术] 14,845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* [自然生物技术] 14,826 (1996); 以及Lonberg和Huszar, *Intern.Rev.Immunol.* [国际免疫学综述] 13:65-93 (1995)。

[0148] 人抗体还可以使用转基因非人动物来产生,该转基因非人动物被修饰以应答于抗原的激发而产生完全人抗体而不是动物的内源抗体。(参见, PCT公开号W0 94/02602和美国专利号6,673,986)。非人宿主中编码重免疫球蛋白链和轻免疫球蛋白链的内源基因已失能,并且编码人重链和轻链免疫球蛋白的活性基因座被插入宿主的基因组中。例如,使用含有必需的人DNA的酵母人工染色体来并入人基因。提供优选修饰的动物然后通过以下获得作为子代:杂交育种含有少于这些修饰的完整集合的中间转基因动物。这样的非人动物的非限制性实例是小鼠,并且被称为XenomouseTM,如PCT公开号W0 96/33735和W0 96/34096中披露的。这样的动物产生的B细胞分泌完整人免疫球蛋白。抗体可以在用目的免疫原免疫后直接从动物获得,例如作为多克隆抗体的制剂,或者可替代地从衍生自该动物的永生B细胞(例如产生单克隆抗体的杂交瘤)获得。另外,编码具有人可变区的免疫球蛋白的基因可以被提取和表达以直接获得抗体,或者可以被进一步修饰以获得抗体类似物,诸如,例如单链Fv (scFv) 分子。

[0149] 因此,使用这样的技术,可以产生治疗上有用的IgG、IgA、IgM和IgE抗体。有关生产人抗体的技术的概述,参见Lonberg和Huszar *Int.Rev.Immunol.* [国际免疫学综述] 73:65-93 (1995)。对于用于产生人抗体及人单克隆抗体的此项技术及用于产生这样的抗体的程序的详细讨论,参见例如, PCT公开号W0 98/24893; W0 96/34096; W0 96/33735; 美国专利号5,413,923;5,625,126;5,633,425;5,569,825;5,661,016;5,545,806;5,814,318;和5,939,598,其通过引用以其整体并入本文。此外,公司例如科瑞博生物科技公司 (Creative BioLabs) (雪莉 (Shirley), 纽约州) 能够参与使用类似于本文所述的技术针对所选的抗原提供人抗体。

[0150] 产生缺少内源免疫球蛋白重链表达的非人宿主(以小鼠为例)的方法的实例披露于美国专利号5,939,598中。它可以通过一种方法获得,该方法包括:从胚胎干细胞中的至少一个内源重链基因座中缺失J区段基因,以防止该基因座的重排并防止重排的免疫球蛋白重链基因座的转录物的形成,该缺失是通过含有编码可选择标志物的基因的靶向性载体来实现的;以及从胚胎干细胞产生转基因小鼠,其体细胞和生殖细胞含有编码该可选择标志物的基因。

[0151] 美国专利号5,916,771披露了一种产生目的抗体(例如人抗体)的方法。该方法包括将含有编码重链的核苷酸序列的表达载体引入培养物中的一个哺乳动物宿主细胞中,将

含有编码轻链的核苷酸序列的表达载体引入另一哺乳动物宿主细胞中,以及融合这两个细胞以形成杂交细胞。杂交细胞表达含有重链和轻链的抗体。

[0152] 在该程序的进一步改善中,PCT公开号W0 99/53049中披露了用于鉴定免疫原上的临床相关表位的方法和用于选择以高亲和力与相关表位免疫特异性结合的抗体的相关方法。

[0153] 目的抗体也可以通过含有编码本文所述的单链抗体的DNA区段的载体来表达。载体包括但不限于化学缀合物(例如W0 93/64701中描述的,其具有靶向性部分(例如细胞表面受体的配体)和核酸结合部分(例如聚赖氨酸))、病毒载体(例如DNA或RNA病毒载体)、融合蛋白(例如PCT/US 95/02140(W0 95/22618)中描述的,其是含有靶标部分(例如对靶细胞具有特异性的抗体)和核酸结合部分(例如鱼精蛋白)的融合蛋白)、质粒、噬菌体、病毒载体等。载体可以是染色体的、非染色体的或合成的。还可以使用逆转录病毒载体,包括莫洛尼鼠白血病病毒。还可以使用DNA病毒载体,并且包括痘病毒载体例如正痘病毒载体或禽痘病毒载体、疱疹病毒载体例如I型单纯疱疹病毒(HSV)载体(参见Geller,A.I.等人,J.Neurochem[神经化学杂志],64:487(1995);Lim,F.,等人,载于DNA Cloning:Mammalian Systems[克隆:哺乳动物系统],D.Glover,编辑(牛津大学出版社,英国牛津)(1995);Geller,A.I.等人,Proc Natl.Acad.Sci.:U.S.A.[美国国家科学院院刊]90:7603(1993);Geller,A.I.,等人,Proc Natl.Acad.Sci USA[美国国家科学院院刊]87:1149(1990)、腺病毒载体(参见LeGal LaSalle等人,Science[科学],259:988(1993);Davidson,等人,Nat.Genet[自然遗传学]3:219(1993);Yang,等人,J.Virol.[病毒学杂志]69:2004(1995)和腺相关病毒载体(参见Kaplitt,M.G.等人,Nat.Genet.[自然遗传学]8:148(1994))。

[0154] 痘病毒载体可将基因引入到细胞质内。禽痘病毒载体只产生核酸的短期表达。腺病毒载体、腺相关病毒载体和单纯疱疹病毒(HSV)载体可用于将核酸引入神经细胞中。腺病毒载体的表达时间(约2个月)比腺相关病毒(约4个月)短,而腺相关病毒的表达时间又比HSV载体短。选择的载体将取决于靶细胞和所治疗的病症。引入可以通过标准技术,例如感染、转染、转导或转化。基因转移模式的实例包括例如裸DNA、CaPO₄沉淀、DEAE葡聚糖、电穿孔、原生质体融合、脂转染、细胞显微注射和病毒载体。

[0155] 载体可用于靶向基本上任何靶细胞。例如,立体定位注射可用于将载体(例如,腺病毒、HSV)引导至优选位置。另外,可以使用微型泵输注系统(例如SynchroMed输注系统)通过脑室内(icv)输注来递送颗粒。一种基于整体流动的方法(称为对流)也被证明可以有效地将大分子递送至脑的扩展区域,并且可用于将载体递送至靶细胞。(参见Bobo等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]91:2076-2080(1994);Morrison等人,Am.J.Physiol.[美国生理学杂志]266:292-305(1994))。可以使用的其他方法包括导管、静脉内、肠胃外、腹膜内和皮下注射以及口服或其他已知的施用途径。

[0156] 这些载体可用于表达以多种方式使用的大量抗体。例如,用以检测样品中CLDN4的存在。抗体还可用于尝试结合并破坏CLDN4活性。

[0157] 在实施例中,本文所述的抗体可以是全长抗体,包括那些含有与结合Fc受体的野生型Fc区类似的Fc区的抗体。

[0158] 技术可改适于产生对本发明的抗原蛋白具有特异性的单链抗体(参见例如美国专利号4,946,778)。此外,方法可改适用于构建F_{ab}表达文库(参见例如,Huse,等人,

1989Science[科学]246:1275-1281),以允许快速有效地鉴定对蛋白或其衍生物、片段、类似物或同系物具有优选的特异性的单克隆 F_{ab} 片段。含有针对蛋白抗原的独特型的抗体片段可以通过本领域已知的技术产生,包括但不限于:(i)通过胃蛋白酶消化抗体分子产生的 $F_{(ab')_2}$ 片段;(ii)通过还原 $F_{(ab')_2}$ 片段的二硫桥产生的 F_{ab} 片段;(iii)通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子产生的 F_{ab} 片段和(iv) F_v 片段。

[0159] 异缀合物抗体也在本发明的范围内。异缀合物抗体由两个共价连接的抗体构成。这样的抗体可以例如将免疫系统细胞靶向不需要的细胞(参见美国专利号4,676,980),并用于治疗HIV感染(参见PCT公开号WO 91/00360;WO 92/20373)。可以使用合成蛋白化学中的已知方法,包括涉及交联剂的方法,在体外制备抗体。例如,可以使用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。用于该目的的合适的试剂的实例包括亚氨基硫醇酯(iminothiolate)和4-巯基丁亚氨酸甲酯(methyl-4-mercaptobutyrimidate)以及例如在美国专利号4,676,980中的披露的那些。

[0160] 本发明的抗体可以就效应子功能而言进行修饰,以增强例如抗体在治疗癌症中的有效性。例如,可以将一个或多个半胱氨酸残基引入Fc区,从而允许在该区中形成链间二硫键。由此产生的同二聚抗体可以具有改善的内化能力和/或增强的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。(参见Caron等人,J.Exp Med.[实验医学杂志],176:1 191-1 195(1992)和Shopes,J.Immunol.[免疫学杂志],148:2918-2922(1992))。可替代地,抗体可以被工程改造以具有双Fc区并且从而可以具有增强的补体裂解和ADCC能力。(参见Stevenson等人,Anti-Cancer Drug Design[抗癌药物设计],3:219-230(1989))。在一个实施例中,本发明的抗体具有Fc区的修饰,使得该Fc区不与Fc受体结合。例如,Fc受体是Fc γ 受体。如本文所述,对Fc区进行修饰使得该Fc区不与Fc γ 结合但仍与新生儿Fc受体结合的抗体是有用的。

[0161] 在实施例中,本发明的抗体可以包含Fc变体。参见例如WO 2018/145075和WO 2019/183362,其提供了用于增强抗体介导的受体信号传导的Fc变体组合物。在实施例中,Fc变体可以包含改变抗体的抗原依赖性效应子功能(例如抗体的循环半衰期)的氨基酸取代。当与缺少这些取代的抗体相比时,这样的抗体表现出与FcRn的结合增加或减少,因此分别具有增加或减少的血清半衰期。预计对FcRn具有改善的亲力的Fc变体可以具有更长的血清半衰期,并且这样的分子在治疗哺乳动物的方法中具有有用的应用,其中所施用的抗体的长半衰期是优选的,例如,以治疗慢性疾病或障碍。相反地,具有降低的FcRn结合亲和力的Fc变体具有更短的半衰期,并且这样的分子也可用于例如向哺乳动物施用,其中缩短的循环时间可能是有利的,例如,对于体内诊断成像,或对于其中起始抗体在循环中长时间存在时具有毒副作用的情况。FcRn结合亲和力降低的Fc变体穿过胎盘的可能性也较小,并因此也可用于治疗孕妇的疾病或障碍。此外,其中FcRn结合亲和力降低可以是优选的其他应用包括其中定位至脑、肾和/或肝是优选的那些应用。在一个实施例中,含有Fc变体的抗体可以表现出从血管系统穿过肾小球上皮的转运减少。在另一个实施例中,含有Fc变体的抗体可以表现出从脑穿过血脑屏障(BBB)进入血管空间的转运减少。在一个实施例中,具有改变的FcRn结合的抗体包含在Fc结构域的“FcRn结合环”内具有一个或多个氨基酸取代的Fc结构域。FcRn结合环由氨基酸残基280-299(根据EU编号)构成。具有改变的FcRn结合活性的示例性氨基酸取代披露于PCT公开号WO 05/047327中,其通过引用并入本文。在某些示例

性实施例中,本发明的抗体或其片段包含具有以下取代中的一个或多个的Fc结构域:V284E、H285E、N286D、K290E和S304D(EU编号)。

[0162] 在一些实施例中,将突变引入mAb的恒定区,使得该mAb的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性被改变。例如,该突变是CH2结构域中的LALA突变。在一个实施例中,抗体(例如,人mAb或双特异性Ab)在异二聚mAb的一个scFv单元上含有突变,这降低了ADCC活性。在另一个实施例中,mAb在异二聚mAb的两条链上都含有突变,这完全消除了ADCC活性。例如,引入mAb的一个或两个scFv单元中的突变是CH2结构域中的LALA突变。这些具有可变ADCC活性的mAb可以被优化,使得mAb对表达被mAb识别的一种抗原的细胞表现出最大选择性杀伤,然而对被mAb识别的第二抗原表现出最小杀伤。

[0163] 在其他实施例中,用于本文所述的诊断方法和治疗方法中的本发明的抗体具有恒定区,例如IgG₁或IgG₄重链恒定区,其可以被改变以减少或消除糖基化。例如,本发明的抗体还可以包含Fc变体,其包含改变抗体糖基化的氨基酸取代。例如,Fc变体可以具有减少的糖基化(例如,N-或O-连接的糖基化)。在一些实施例中,Fc变体包含通常在氨基酸位置297(EU编号)处发现的N-连接聚糖的糖基化减少。在另一个实施例中,抗体在糖基化基序附近或内部具有氨基酸取代,例如含有氨基酸序列NXT或NXS的N-连接的糖基化基序。在实施例中,抗体包含在氨基酸位置228或299(EU编号)处具有氨基酸取代的Fc变体。在另一个实施例中,抗体包含IgG1或IgG4恒定区,其包含S228P和T299A突变(EU编号)。

[0164] 赋予降低或改变的糖基化的示例性氨基酸取代描述于PCT公开号W0 05/018572中,将其通过引用以其整体并入本文。在一些实施例中,本发明的抗体或其片段被修饰以消除糖基化。这样的抗体或其片段可称为“无糖基化(agly)”抗体或其片段(例如,“无糖基化”抗体)。尽管不希望受理论束缚,“无糖基化”抗体或其片段可以具有改善的体内安全性和稳定性谱。示例性无糖基化抗体或其片段包含IgG₄抗体的无糖基化Fc区,其缺乏Fc效应子功能,从而消除了Fc介导的对表达CLDN4的正常重要组织和细胞的毒性的可能性。在又一个实施例中,本发明的抗体或其片段包含改变的聚糖。例如,抗体可以在Fc区的Asn297处的N-聚糖上具有减少数量的岩藻糖残基,即,是无岩藻糖基化的。在另一个实施例中,抗体可以在Fc区的Asn297处的N-聚糖上具有改变数量的唾液酸残基。

[0165] 本发明还涉及包含与细胞毒性剂缀合的抗体的免疫缀合物,该细胞毒性剂是例如毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素或其片段)或放射性同位素(即,放射性缀合物)。

[0166] 可以使用的酶促活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A链、相思子毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α -帚曲霉素、油桐蛋白、香石竹毒蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、丝裂霉素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素和单端孢霉烯族毒素。多种放射性核素可用于产生放射性缀合抗体。非限制性实例包括²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y和¹⁸⁶Re。

[0167] 抗体和细胞毒性剂的缀合物使用多种双官能性蛋白偶联剂制备,这些偶联剂是例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯的双官能性衍生物(例如二亚胺代己二酸二甲酯HCL)、活性酯(例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(例如戊二醛)、双-叠氮基化合物(例如双(p-叠氮基苯甲酰基)己烷二胺)、双-重氮基衍生

物(例如双-(p-重氮基苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(例如甲苯2,6-二异氰酸酯)、以及双-活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,蓖麻毒素免疫毒素可以如Vitetta等人,Science[科学]238:1098(1987)中所述制备。碳14标记的1-异硫氰酸基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸缀合至抗体的示例性螯合剂。(参见PCT公开号W0 94/11026和美国专利号5,736,137)。

[0168] 本领域普通技术人员理解,各种各样可能的部分可以与所得抗体或本发明的其他分子偶联。(参见例如,“Conjugate Vaccines[缀合疫苗]”,Contributions to Microbiology and Immunology[微生物学与免疫学贡献],J.M.Cruse和R.E.Lewis,Jr(编辑),卡杰出版社(Carger Press),纽约,(1989),将其全部内容通过引用并入本文)。

[0169] 只要抗体和另一部分保留各自的活性,则可以通过任何能结合两个分子的化学反应来完成偶联。该连接可以包括许多化学机制,例如共价结合、亲和力结合、插入、配位结合和络合。在一个实施例中,结合是共价结合。共价结合可以通过现有侧链的直接缩合或通过外部桥接分子的并入来实现。许多二价或多价连接剂可用于将蛋白分子(例如本发明的抗体)与其他分子偶联。例如,代表性的偶联剂可包括有机化合物,例如硫酯、碳二亚胺、琥珀酰亚胺酯、二异氰酸酯、戊二醛、重氮苯和六亚甲基二胺。该清单并非旨在穷尽本领域中已知的各种偶联剂,而是更常见的偶联剂的示例。(参见Killen和Lindstrom,Jour.Immun.[免疫学杂志]133:1335-2549(1984);Jansen等人,Immunological Reviews[免疫学综述]62:185-216(1982);和Vitetta等人,Science[科学]238:1098(1987))。接头的非限制性实例描述于文献中。(参见例如,Ramakrishnan,S.等人,Cancer Res.[癌症研究]44:201-208(1984),其描述了MBS(M-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)的用途。还参见,美国专利号5,030,719,其描述了通过寡肽接头与抗体偶联的卤化乙酰基酰肼衍生物的用途。可与本发明的抗体一起使用的有用接头的非限制性实例包括:(i)EDC(1-乙基-3-(3-二甲氨基-丙基)碳二亚胺盐酸盐);(ii)SMPT(4-琥珀酰亚胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代)-甲苯(皮尔斯化学公司(Pierce Chem.Co.),目录号(21558G));(iii)SPDP(琥珀酰亚胺基-6[3-(2-吡啶基二硫代)丙酰胺基]己酸酯(皮尔斯化学公司,目录号#21651G));(iv)磺基-LC-SPDP(磺基琥珀酰亚胺基6[3-(2-吡啶基二硫代)丙酰胺]己酸酯(皮尔斯化学公司,目录号#2165-G));以及(v)磺基-NHS(-羟基磺基-琥珀酰亚胺:皮尔斯化学公司,目录号#24510),与EDC缀合。

[0170] 本文所述的接头包含具有不同属性的组分,从而导致具有不同理化特性的缀合物。例如,烷基羧酸盐的磺基-NHS酯比芳香族羧酸盐的磺基-NHS酯更稳定。含NHS酯的接头的可溶性不如磺基-NHS酯。进一步地,接头SMPT含有空间受阻的二硫键,并且可以形成具有增强的稳定性的缀合物。二硫化物连接通常比其他连接不稳定,因为二硫化物连接在体外被切割,导致可用的缀合物更少。磺基-NHS可以增强碳二亚胺偶联的稳定性。当与磺基-NHS缀合使用时,碳二亚胺偶联(例如EDC)形成比单独的碳二亚胺偶联反应对水解的抵抗力更大的酯。

[0171] 本文披露的抗体也可以配制为免疫脂质体。含有抗体的脂质体通过本领域已知的方法制备,例如以下中所述:Epstein等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],82:3688(1985);Hwang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],77:4030(1980);以及美国专利号4,485,045和4,544,545。美国专利号5,013,556中公开了具有

延长的循环时间的脂质体。

[0172] 有用的脂质体的非限制性实例可以通过反相蒸发法使用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物生成。脂质体通过确定孔径的过滤器挤出,以产生具有优选直径的脂质体。本发明的抗体的Fab'片段可以经由二硫键交换反应缀合至脂质体,如Martin等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志],257:286-288(1982)中所述。

[0173] 多特异性抗体(双特异性和三特异性)

[0174] 本文所述的实施例可以包含单特异性抗体或多特异性抗体。

[0175] 单特异性抗体是具有一个或多个特异性结合单一抗原的结合位点的抗体。

[0176] 多特异性抗体是可以识别两个或更多个不同抗原的抗体。例如,双特异性抗体(bsAb)是包含两个可变结构域或scFv单元的抗体,使得所得抗体识别两个不同的抗原。例如,三特异性抗体(tsAb)是包含两个可变结构域或scFv单元的抗体,使得所得抗体识别三个不同的抗原。本发明提供了识别CLDN4和第二抗原和/或第三抗原的多特异性抗体,例如双特异性和三特异性抗体。在一个实施例中,多特异性抗体(例如,双特异性抗体和三特异性抗体)可以包含涵盖本文所述的抗体的CLDN4特异性融合蛋白。示例性的第二和/或第三抗原包括肿瘤相关抗原(例如LINGO1)、细胞因子(例如具有NCBI参考号NP_000873.2的IL-12(IL-12A(p35亚基)蛋白序列;具有NCBI参考号NP_002178.2的IL-12B(p40亚基)蛋白序列);IL-18(具有NCBI参考号NP_001553.1的蛋白序列);IL-15(具有NCBI参考号NP_000576.1的蛋白序列);IL-7(具有NCBI参考号NP_000871.1的蛋白序列);IL-2(具有NCBI参考号NP_000577.2的蛋白序列);和IL-21(具有NCBI参考号NP_068575.1的蛋白序列))、细胞因子同源受体(例如IL-12R)和细胞表面受体。第二和/或第三抗原的非限制性实例包括CTLA-4、CXCR4、LAG-3、CD28、CD122、4-1BB、TIM3、OX-40、OX40L、CD40、CD40L、LIGHT、ICOS、ICOSL、GITR、GITRL、TIGIT、CD27、VISTA、B7H3、B7H4、HEVM(或BTLA)、CD47和CD73。在一个实施例中,双特异性和三特异性抗体包含CLDN4融合蛋白。例如,融合蛋白包含抗体,该抗体包含可变结构域或scFv单元和配体或抗原和/或如本文所述的第三配体或抗原,使得所得抗体识别抗原并与配体特异性受体结合。可用于设计如本文所述的CLDN4融合蛋白的示例性抗体组合物(例如,VH和/或VL序列或其片段)包括但不限于PCT/US2006/046350和PCT/US2015/067178中描述的抗CAIX抗体;PCT/US20006/005691和PCT/US2019/022272中描述的抗CXCR4抗体;PCT/US2008/088435、PCT/US2013/039744和PCT/US2015/054202中描述的抗CCR4抗体;PCT/US2008/088435和PCT/US2020/062815中描述的抗PD-L1抗体;PCT/US2020/037791和PCT/US2020/037781中描述的抗PD-1抗体;PCT/US2017/043504中描述的抗GITR抗体;PCT/US2019/022272中描述的抗密封蛋白(claudin)-4抗体;以及PCT/US2020/037783中描述的抗MUC1抗体(每个申请均通过引用以其整体并入)。在一个实施例中,融合蛋白进一步包含如本文所述的恒定区和/或接头。本文描述了多特异性抗体的不同形式(例如,双特异性抗体和三特异性抗体,例如包含识别CLDN4和配体的抗体的融合蛋白)。配体可以是肿瘤相关抗原(例如,LINGO1、ErbB2(HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、MUC1、MSLN、CD19、CD20、CD30、CD40、CD22、RAGE-1、MN-CAIX、RET1、RET2(AS)、前列腺特异性抗原(PSA)、TAG-72、PAP、p53、Ras、前列腺蛋白(prostein)、PSMA、生存素、9D7、前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)、GAGE、MAGE、间皮素、 β -连环蛋白、TGF- β RII、BRCA1/2、SAP-1、HPV-E6、HPV-E7(对于另外的肿瘤相关表面抗原还参见,PCT/US2015/

067225和PCT/US2019/022272,将其通过引用以其整体并入));细胞因子(例如,具有NCBI参考号NP_000873.2的IL-12(IL-12A(p35亚基)蛋白序列;具有NCBI参考号NP_002178.2的IL-12B(p40亚基)蛋白序列);IL-18(具有NCBI参考号NP_001553.1的蛋白序列);IL-15(具有NCBI参考号NP_000576.1的蛋白序列);IL-7(具有NCBI参考号NP_000871.1的蛋白序列);IL-2(具有NCBI参考号NP_000577.2的蛋白序列);和IL-21(具有NCBI参考号NP_068575.1的蛋白序列);CTLA-4、LAG-3、CD28、CD122、4-1BB、TIM3、OX-40、OX40L、CD40、CD40L、LIGHT、ICOS、ICOSL、GITR、GITRL、TIGIT、CD27、VISTA、B7H3、B7H4、HEVM(或BTLA)、CD47和CD73。本文还提供了双特异性抗体或三特异性抗体的不同形式。在一些实施例中,每个抗CLDN4片段以及第二抗原特异性片段和/或第三抗原特异性片段各自独立地选自Fab片段、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体。在一些实施例中,双特异性抗体或三特异性抗体进一步包括Fc片段(例如,如PCT/US2015/021529和PCT/US2019/023382中所述,将其中的每个均通过引用以其整体并入)。本发明的双特异性抗体或三特异性抗体可以包含本文所述的CLDN4抗体的重链和轻链组合或scFv。

[0177] 本发明的多特异性抗体(例如双特异性抗体和三特异性抗体)(例如抗CLDN4-scFv融合蛋白)可以使用本领域已知的方法构建。在一些实施例中,双特异性抗体是单个多肽,其中两个scFv片段通过长接头多肽连接,该长接头多肽的长度足以允许两个scFv单元之间的分子内缔合以形成抗体。在其他实施例中,双特异性抗体是通过共价键或非共价键连接的多于一个多肽。在一些实施例中,本文描述的氨基酸接头(GGGGSGGGGS;“(G4S)₂”)可以使用更长的G4S接头生成,以改善柔性。

例如,接头也可以是:

“(G₄S)₃”(例如,GGGGSGGGGS);

“(G₄S)₄”(例如,GGGGSGGGGS);

“(G₄S)₅”(例如,GGGGSGGGGS);

“(G₄S)₆”(例如,GGGGSGGGGS);

“(G₄S)₇”(例如,GGGGSGGGGS);等。例如,使用(G4S)₅

接头可以为本文所述的配体提供更大的柔性,并且可以改善表达。在一些实施例中,接头还可以是(GS)_n、(GGS)_n、(GGGS)_n、(GGSG)_n、(GGSGG)_n或(GGGGS)_n,其中n是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。本领域技术人员已知的可用于构建本文所述的融合体的接头的非限制性实例可以在以下中找到:美国专利号9,708,412;美国专利申请公开号US20180134789和US20200148771;以及PCT公开号WO 2019051122(其中的每个均通过引用以其整体并入)。

[0178] 在另一个实施例中,多特异性抗体(例如,双特异性抗体和三特异性抗体,例如抗CLDN4-scFv融合物)可以使用“杵入臼”方法构建(Ridgway等人,Protein Eng[蛋白工程]7:617-621(1996))。在该方法中,两个不同可变结构域的Ig重链被还原以选择性地破坏重链配对,同时保留重链-轻链配对。将识别两个不同抗原/配体或三个不同抗原/配体的两条重链-轻链异二聚体混合以促进异源连接配对,这是通过CH3结构域的经工程改造的“杵入臼”介导的。

[0179] 在另一个实施例中,多特异性抗体(例如,双特异性抗体和三特异性抗体,例如抗CLDN4-scFv融合物)可以通过交换来自两个或更多个不同抗体的重链-轻链二聚体来构建,以生成杂合抗体,其中第一重链-轻链二聚体识别CLDN4并且第二重链-轻链二聚体识别第

二抗原和/或第三抗原。重链-轻链二聚体的机制与也起到双特异性分子的作用的人IgG₄的形成类似。IgG重链的二聚化是由分子内力驱动的,例如使每条重链的CH3结构域与二硫桥配对。CH3结构域(R409)中特定氨基酸的存在已被证明可以促进二聚体交换和IgG₄分子的构建。抗体铰链区中的重链间二硫桥也进一步稳定了重链配对。具体地,在IgG₄中,铰链区在氨基酸226-230处含有氨基酸序列Cys-Pro-Ser-Cys(与含有序列Cys-Pro-Pro-Cys的稳定IgG1铰链区相比)。在位置229处的丝氨酸的这种序列差异与IgG₄在铰链区形成链内二硫键的倾向有关(Van der Neut Kolfshoten,M.等人,2007,Science[科学]317:1554-1557和Labrijn,A.F.等人,2011,Journal of Immunol[免疫学杂志]187:3238-3246)。

[0180] 本发明的多特异性抗体(例如,双特异性抗体和三特异性抗体,例如抗CLDN4-scFv融合物)可以通过在识别CLDN4或第二和/或第三抗原的抗体的CH3结构域中引入R409残基以及在该抗体的铰链区中引入Cys-Pro-Ser-Cys序列来产生,使得重链-轻链二聚体交换以产生具有识别CLDN4的一个重链-轻链二聚体和识别第二和/或第三抗原的第二重链-轻链二聚体的抗体分子,其中该第二和/或第三抗原(或配体)是本文披露的任何抗原(或配体)。已知的IgG₄分子也可被改变,使得重链和轻链识别CLDN4或如本文所披露的第二和/或第三抗原。由于IgG₄分子的内在特征,使用这种方法构建本发明的多特异性抗体(例如,双特异性抗体和三特异性抗体,例如抗CLDN4-scFv融合物)可以是有益的,其中Fc区与其他IgG亚型不同,因为它与免疫应答的效应子系统(例如由某些白细胞表达的补体和Fc受体)相互作用较差。这一特定特性使得这些基于IgG₄的多特异性抗体(例如,双特异性抗体和三特异性抗体,例如抗CLDN4-scFv融合物)对治疗性应用有吸引力,其中该抗体需要结合一个或多个靶标并在功能上改变与该一个或多个靶标相关的信号通路,但不触发效应子活性。

[0181] 本文所述的多特异性抗体(例如,双特异性抗体和三特异性抗体,例如抗CLDN4-scFv融合物)可以用非耗竭性重链同种型(例如IgG1-LALA或稳定化的IgG4、或其他非耗竭性变体之一)进行工程改造。在一些实施例中,将突变引入bsAb的恒定区,使得该bsAb的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性被改变。例如,该突变是CH2结构域中的LALA突变。在一方面,多特异性抗体(例如,双特异性抗体和三特异性抗体,例如抗CLDN4-scFv融合物)在异二聚多特异性抗体的一个scFv单元上含有突变,这降低了ADCC活性。在另一方面,多特异性抗体(例如,双特异性抗体和三特异性抗体,例如抗CLDN4-scFv融合物)在异二聚多特异性抗体的两条链上含有突变,这完全消除了ADCC活性。例如,在多特异性抗体(例如,双特异性抗体和三特异性抗体,例如抗CLDN4-scFv融合物)的一个或两个scFv单元中引入的突变是CH2结构域中的LALA突变。这些具有可变ADCC活性的多特异性抗体(例如,双特异性抗体和三特异性抗体,例如抗CLDN4-scFv融合物)可以被优化,使得该多特异性抗体对表达被该多特异性抗体识别的一种抗原的细胞表现出最大选择性杀伤;然而,对被该多特异性抗体识别的第二抗原表现出最小杀伤。

[0182] 本文所述的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)可以被工程改造为模块化四聚双特异性抗体(tBsAb)。参见例如WO 2018/071913,其通过引用以其整体并入本文。例如,四价抗体可以是双特异性scFv片段的二聚体,其包括针对第一抗原的第一结合位点和针对第二抗原的第二结合位点。在实施例中,抗CLDN4抗体可以是针对第一抗原的第一结合位点。在实施例中,抗CLDN4抗体可以是针对第二抗原的第二结合位点。两个结合位点可以通过接头结构域连接在一起。在实施例中,scFv片段是串联scFv,接头结构域包括免疫球蛋白铰链区

(例如, IgG1、IgG2、IgG3或IgG4铰链区)氨基酸序列。在实施例中,免疫球蛋白铰链区氨基酸序列的侧翼可以是柔性接头氨基酸序列,例如具有接头氨基酸序列(GGGS)_{x1-6}、(GGGGS)_{x1-6}或GSAGSAAGSGEF。在实施例中,接头结构域包括免疫球蛋白Fc结构域(例如, IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc结构域)的至少一部分。在实施例中,免疫球蛋白Fc结构域的至少一部分不包括CH2结构域。在实施例中,免疫球蛋白Fc结构域的至少一部分可以是CH2结构域。示例性CH2结构域氨基酸序列包括APELLGGPDVFLF(SEQ ID NO:95)。Fc结构域可以连接至免疫球蛋白铰链区(例如, IgG1、IgG2、IgG3或IgG4铰链区)氨基酸序列的C末端。接头结构域可在一个末端或两个末端处包括柔性接头氨基酸序列(例如, (GGGS)_{x1-6}、(GGGGS)_{x1-6}或GSAGSAAGSGEF)。

[0183] 在实施例中, tBsAb可以对CLDN4具有特异性,并且还可以对选自以下组成的组的靶标具有特异性: B7H3、B7H4、CD27、CD28、CD40、CD40L、CD47、CD122、CCR4、CXCR4、CTLA-4、GITR、GITRL、ICOS、ICOSL、LAG-3、LIGHT、OX-40、OX40L、PD-L1、PD-1、TIM3、4-1BB、TIGIT、VISTA、HEVM、BTLA和KIR。

[0184] 在实施例中,多特异性抗体可以是双特异性T细胞衔接器(BiTE)。术语“BiTE”(双特异性T细胞衔接器)指具有两个抗原结合结构域的单个多肽链分子,这两个抗原结合结构域中之一与T细胞抗原结合。例如, BiTE可以包含本文披露的CLDN4抗体或其功能片段,以及与T细胞抗原结合的抗体或其片段。例如,与T细胞抗原结合的抗体或其片段可以对CD3具有特异性。

[0185] 在实施例中,多特异性抗体可以是三特异性T细胞衔接器(TriTE)。术语“TriTE”(三特异性T细胞衔接器)可以指具有三个抗原结合结构域的单个多肽链分子,这三个抗原结合结构域中的一个或多个与T细胞抗原结合。例如, TriTE可以包含本文披露的CLDN4抗体或其功能片段,以及与T细胞抗原结合的抗体或其片段。例如,与T细胞抗原结合的抗体或其片段可以对CD3、CD28或两者具有特异性。

[0186] 本文披露的多特异性抗体(例如,双特异性抗体和三特异性抗体,例如抗CLDN4-scFv融合物)可用于治疗慢性感染、疾病或医学病症,例如癌症。

[0187] 融合蛋白

[0188] 本发明提供了包含本文披露的可操作地连接至第二蛋白的CLDN4抗体或其功能片段的融合蛋白。第二蛋白可以是例如细胞因子或生长因子。在实施例中,细胞因子是IL-2或TGF- β 及其变体。在一些其他实施例中,第二蛋白可以是治疗性药剂(例如毒素)、可检测部分(例如用于检测的荧光蛋白)或生物药剂(例如刺激T细胞(即, CD3)的药剂)。在一些实施例中,本发明的CLDN4抗体可以可操作地连接至多于一个另外的蛋白或肽,例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个另外的蛋白或肽序列。

[0189] 在一些实施例中,本文披露的CLDN4抗体或其功能片段直接连接至第二蛋白。在其他实施例中,CLDN4抗体或其功能片段通过接头例如柔性多肽链连接至第二蛋白。接头可以是任何长度的任何合适的接头,但长度可以是至少1、2、3、4、5、10、15、20、25或30个氨基酸。在一个实施例中,接头是天然存在于宿主的免疫球蛋白分子中的氨基酸序列,使得该接头的存在不能导致哺乳动物针对该接头序列产生免疫应答。除了CLDN4抗体包括多于一个另外的蛋白的本发明的融合蛋白可以具有连接每个另外的蛋白或肽序列的多个接头序列。

[0190] 本发明的融合蛋白可以通过本领域技术人员已知的重组方法构建。例如,含有编

码本发明的CLDN4抗体的核酸序列的表达载体可以可操作地连接至编码第二蛋白的核酸序列,并且可以被引入表达系统中以翻译并产生融合蛋白。可替代地,本领域技术人员可以容易地利用从头蛋白合成技术来产生本文所述的融合蛋白。

[0191] 针对CLDN4的抗体的使用

[0192] 可以施用特异性结合CLDN4蛋白或其片段的本发明的抗体用于治疗CLDN4相关疾病或障碍。“CLDN4相关疾病或障碍”包括疾病状态和/或与疾病状态相关的症状,其中发现CLDN4水平增加和/或涉及CLDN4的细胞信号传导通路激活。示例性的CLDN4相关疾病或障碍包括但不限于T细胞被抑制的疾病,例如癌症和传染病。在一些实施例中,癌症可以是肺癌、肾癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、脑癌、皮肤癌、肝癌、胰腺癌或胃癌。在实施例中,癌症可以是CLDN4相关癌症。在实施例中,CLDN-4相关癌症可以是三阴性乳腺癌。

[0193] 本发明的抗体,包括双特异性抗体、多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体和全人抗体,可以用作治疗性药剂。这样的药剂可用于治疗受试者的癌症、提高疫苗效率或增强天然免疫应答。将抗体制剂,例如对其靶抗原具有高特异性和高亲和力的抗体制剂,施用于受试者并将由于其与靶标结合而具有效果。抗体的施用可以消除或抑制或干扰CLDN4蛋白的活性。

[0194] 药物组合物

[0195] 可以以药物组合物的形式施用特异性结合CLDN4蛋白或其片段的本发明的抗体用于治疗癌症。制备包含抗体的治疗药物组合物所涉及的原则和考虑因素以及组分选择的指导例如在以下中提供:Remington:The Science And Practice Of Pharmacy[雷明顿:药学的科学与实践]第20版(Alfonso R.Gennaro,等人,编辑)麦克出版公司(Mack Pub.Co.),伊斯顿,宾夕法尼亚州,2000;Drug Absorption Enhancement:Concepts,Possibilities,Limitations,And Trends[药物吸收增强:概念、可能性、局限性和趋势],哈伍德学术出版社(Harwood Academic Publishers),兰霍恩,宾夕法尼亚州,1994;以及Peptide And Protein Drug Delivery[肽和蛋白药物递送](Advances In Parenteral Sciences[肠胃外科学进展],第4卷),1991,M.Dekker,纽约。

[0196] 对于任何患者的具体剂量和治疗方案将取决于多种因素,包括所使用的特定抗体、其变体或衍生物、患者的年龄、体重、总体健康、性别和饮食、以及施用时间、排泄速率、药物组合和被治疗疾病的严重程度。医疗护理人员对这些因素的判断属于本领域普通技术人员的范围内。该量还将取决于待治疗的个体患者、施用途径、配制品类型、所用化合物的特征、疾病的严重程度和优选的效果。所用的量可以通过本领域众所周知的药理学和药代动力学原理来确定。

[0197] 本发明的抗体的治疗有效量可以是实现治疗性目的所需的量。如本文所述,这可以是抗体与其靶抗原之间的结合相互作用,在某些情况下,该结合相互作用干扰靶标的功能。此外,需要施用的量将取决于抗体对其特异性抗原的结合亲和力,并且还将取决于所施用的抗体从其所施用的其他受试者的自由体积中耗竭的速率。向受试者(例如,患者)施用本文所述的抗原结合多肽的剂量是约0.1mg/kg至100mg/kg患者体重、0.1mg/kg至20mg/kg患者体重、或1mg/kg至10mg/kg患者体重。由于对外来多肽的免疫应答,人抗体比来自其他物种的抗体在人体内具有更长的半衰期。因此,通常可能的是较低剂量的人抗体及较低频

率的施用。进一步地,施用本披露的抗体的剂量和频率可通过增强这些抗体的摄取以及组织渗透性(例如,进入脑内)(通过修饰诸如,例如脂化)来减少。通过非限制性实例,本发明的抗体或抗体片段的治疗有效剂量的常见范围可以是约0.1mg/kg体重至约50mg/kg体重。常见的给药频率可以是例如从每天两次到每周一次。

[0198] 在使用抗体片段的情况下,优选特异性结合靶蛋白结合域的最小抑制片段。例如,基于抗体的可变区序列,可以设计肽分子使其保留结合靶蛋白序列的能力。这样的肽可以是化学合成地产生和/或通过重组DNA技术产生。(参见例如,Marasco等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],90:7889-7893(1993))。配制品还可以根据被治疗的适应症的需要含有多于一种活性化合物,例如具有不会对彼此产生不利影响的互补活性的那些。可替代地或此外,组合物可包含增强其功能的药剂,诸如,例如细胞毒性剂、细胞因子(例如,IL-15)、化疗剂或生长抑制剂。这样的分子合适地以对预期目的有效的量组合存在。

[0199] 活性成分也可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如分别在胶体药物递送系统中(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或在粗乳液中的羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。

[0200] 用于体内施用的配制品必须是无菌的。这可以通过无菌过滤膜过滤轻松实现。

[0201] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,这些基质处于成形物品形式,例如膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物(例如LUPRON DEPOTTM(由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林构成的可注射微球)),以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然聚合物(如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸)允许释放分子超过100天,但某些水凝胶释放蛋白持续的时间更短。

[0202] 本发明的抗体或药剂(本文中也称为“活性化合物”)及其衍生物、片段、类似物 and 同系物可以并入适合施用的药物组合物中。这样的药物组合物可以包含抗体或药剂和药学上可接受的载剂。如本文所用,术语“药学上可接受的载剂”包括与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。合适的载剂描述于最新版本Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学]中,这是本领域的标准参考文本,将其通过引用并入本文。这样的载剂或稀释剂的非限制性实例包括水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性媒剂例如固定油。用于药学活性物质的这样的介质和药剂的使用是本领域熟知的。除非任何常规介质或药剂与活性化合物不相容,否则预期在组合物中使用它们。还可以在这些组合物中并入补充性活性化合物。

[0203] 将本发明药物组合物配制成与预期的施用途径相容。施用途径的实例包括胃肠外施用,例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如吸入)、经皮(即局部)、经粘膜、和直肠施用。被用于胃肠外的、皮内的、或皮下应用的溶液或悬浮液可以包括以下组分:无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂,诸如苯醇或对羟苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲液,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节张力的药剂,如氯化钠或右旋糖。可以用

酸或碱(如盐酸或氢氧化钠)调节pH。肠胃外制剂可以封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0204] 适合于可注射使用的药物组合物可以包括无菌水性溶液(其中水溶性的)或分散液以及用于临时制备无菌的可注射的溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内施用,适当的载剂包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(巴斯夫公司(BASF),帕西波尼(Parsippany),新泽西州(N.J.))或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在实施例中,组合物是无菌的并且是流体,达到易于注射的程度。它在制造和储存条件下可以是稳定的并且可以防止微生物(如细菌和真菌)的污染作用。载剂可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,丙三醇、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。可以例如通过使用如卵磷脂的包衣、通过在分散液情况下保持所需粒度以及通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。防止微生物的作用可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂(例如,对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现。在许多情况下,组合物中可包含等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露醇、山梨醇)、氯化钠。可以通过在组合物中包括延迟吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的延长吸收。

[0205] 无菌可注射溶液可以通过将所需量的活性化合物根据与以上列举的成分中的一种或其组合一起并入适当溶剂中,随后过滤灭菌来制备。例如,通过将活性化合物并入无菌媒剂中来制备分散液,该无菌媒剂含有基础分散介质和来自以上列举的那些的其他所需成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法为真空干燥和冷冻干燥,其产生活性成分加来自其先前经无菌过滤溶液的任何另外的成分的粉末。

[0206] 口服组合物可包括惰性稀释剂或可食用载剂。它们可以被封装在明胶胶囊中或被压成片剂。出于口服治疗性施用的目的,可以将活性化合物随赋形剂一起并入并且以片剂、锭剂、或胶囊的形式使用。口服组合物也可以使用用作漱口水的流体载剂来制备,其中将在流体载剂中的化合物口服应用并且漱口(swished)并且吐出或吞咽。可以包括药学上相容的粘合剂和/或佐剂材料,作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可以含有以下成分中的任一种或具有类似性质的化合物:粘合剂,诸如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,诸如淀粉或乳糖;崩解剂,诸如海藻酸、Primogel或玉米淀粉;润滑剂,诸如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂,诸如胶体二氧化硅;甜味剂,诸如蔗糖或糖精;或调味剂,诸如薄荷、水杨酸甲酯、或橙味调味剂。

[0207] 为了通过吸入施用,可以将这些化合物以气溶胶喷雾剂的形式来递送,该气溶胶喷雾剂来自含有适当的推进剂(例如气体,诸如二氧化碳)的压力容器或分配器、或喷雾器。

[0208] 也可以通过经粘膜或经皮的方式进行全身施用。对于经粘膜施用或经皮施用而言,在配制品中使用对欲渗透的屏障适当的渗透剂。这样的渗透剂是本技术领域熟知的,并且对于经粘膜施用,包括例如洗涤剂、胆汁盐、和夫西地酸衍生物。经粘膜施用可以通过使用鼻喷雾剂或栓剂来完成。为了经皮施用,这些活性化合物被配制成软膏、药膏、凝胶、或乳膏(如在本领域中已知的)。

[0209] 化合物还可以被制备成栓剂(例如,利用常规的栓剂基质,诸如可可脂和其他甘油酯)或保留灌肠剂形式供直肠递送。

[0210] 在一个实施例中,将这些活性化合物与保护化合物免于从体内快速消除的载剂一起制备,诸如控释配制品,包括植入物和微囊化的递送系统。可以使用可生物降解的生物相

容聚合物,诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、和聚乳酸。用于制备这样的配制品的方法对本领域技术人员而言是显而易见的。这些材料也可以从阿尔扎公司(Alza Corporation)和新星制药有限公司(Nova Pharmaceuticals, Inc.)商购获得。脂质体悬浮液(包括靶向受感染细胞的具有针对病毒抗原的单克隆抗体的脂质体)也可以用作药学上可接受的载剂。这些可以根据在本领域中的普通技术人员已知的方法而制备,例如,如在美国专利号4,522,811中所说明的。

[0211] 口服或肠胃外组合物可以配制为剂量单位形式,以便于施用和剂量的均匀性。如本文所用的剂量单位形式是指作为针对治疗的受试者的单一剂量适合的物理上离散的单位;每个单位含有经计算产生与所需药物载剂相关的优选治疗效果的活性化合物的预定量。本发明的剂量单位形式的规格可以由如下决定并且直接依赖于:活性化合物的独特特征和待实现的治疗效果,以及本领域中混配用于治疗个体的这种活性化合物的固有局限性。

[0212] 药物组合物可以用于施用的说明书一起包括在容器、包装、或分配器中。

[0213] 诊断

[0214] 根据本发明的抗体可以用作用于检测样品中CLDN4(或其蛋白片段)的存在的药剂。例如,样品可以是癌症样品或来自处于患有癌症风险的受试者的样品。例如,癌症可以是肺癌、肾癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、脑癌、皮肤癌、肝癌、胰腺癌或胃癌。例如,抗体可以含有可检测标记。抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。可以使用完整抗体或其片段(例如, F_{ab} 、scFv或 $F_{(ab)2}$)。关于探针或抗体,术语“标记的”可以涵盖通过偶联(即,物理连接)可检测物质至该探针或抗体进行的该探针或抗体的直接标记,以及通过与另一种直接标记的试剂发生反应进行的该探针或抗体的间接标记。间接标记的实例包括使用荧光标记的二抗检测一抗,以及使用生物素对DNA探针进行末端标记,从而可以使用荧光标记的链霉亲和素进行检测。术语“生物样品”可以包括从受试者分离的组织、细胞和生物学流体,以及存在于受试者体内的组织、细胞和流体。因此,术语“生物样品”的使用包括血液和血液的级分或组分,包括血清、血浆或淋巴。也就是说,本发明的检测方法可用于体外以及体内检测生物样品中的分析物mRNA、蛋白或基因组DNA。例如,用于检测分析物mRNA的体外技术包括RNA杂交和原位杂交。体外检测分析物蛋白的技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白印迹、免疫沉淀和免疫荧光。用于检测分析物基因组DNA的体外技术包括DNA杂交。

[0215] 进行免疫测定的程序描述于例如“ELISA:Theory and Practice:Methods in Molecular Biology[ELISA:理论与实践:分子生物学方法]”,第42卷,J.R.Crowther(编辑)哈马纳出版社(Human Press),托托瓦,新泽西州,1995;“Immunoassay[免疫测定]”,E.Diamandis和T.Christopoulos,学术出版社,圣地亚哥,加利福尼亚州,1996;以及“Practice and Theory of Enzyme Immunoassays[酶免疫测定的实践与理论]”,P.Tijssen,爱思唯尔科学出版社(Elsevier Science Publishers),阿姆斯特丹,1985。此外,用于检测分析物蛋白的体内技术包括将标记的抗分析物蛋白抗体引入受试者中。例如,可以用放射性标志物来标记抗体,可以通过标准成像技术来检测该放射性标志物在受试者中的存在和位置。

[0216] 针对CLDN4蛋白(或其片段)的抗体可以用于本领域已知的涉及CLDN4蛋白的定位

和/或定量的方法(例如,用于测量适当的生理样品内CLDN4蛋白的水平、用于诊断方法、用于使蛋白成像,等)。在给定的实施例中,含有抗体衍生的抗原结合结构域的对CLDN4蛋白或其衍生物、片段、类似物或同系物具有特异性的抗体被用作药理学活性化合物(在本文中称为“治疗剂”)。

[0217] 对CLDN4蛋白具有特异性的本发明的抗体可用于通过标准技术例如免疫亲和、色谱或免疫沉淀来分离CLDN4多肽。针对CLDN4蛋白(或其片段)的抗体可以在诊断上用于监测组织中的蛋白水平,作为临床测试程序的一部分,例如,比如用于确定给定治疗方案的功效。

[0218] 可以通过将抗体偶联(即物理连接)至可检测物质来促进检测。可检测物质的实例包括但不限于各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适的酶的非限制性实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素;合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例包括鲁米诺;生物发光材料的实例包括萤光素酶、荧光素和水母发光蛋白,并且合适的放射性材料的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^{32}P 或 ^3H 。

[0219] 筛选方法

[0220] 本发明提供了用于鉴定调节剂,即调节或以其他方式干扰CLDN4活性的候选或测试化合物或药剂(例如,肽、肽模拟物、小分子或其他药物)的方法(本文中也称为“筛选测定”)。还提供了鉴定可用于治疗癌症的化合物的方法。本发明还涵盖使用本文所述的筛选测定而鉴定的化合物。

[0221] 例如,本发明提供了用于筛选调节CLDN4表达和/或活性的候选或测试化合物的测定。本发明的测试化合物可以使用本领域已知的组合文库方法中的多种途径中的任一种来获得,包括但不限于:生物文库;空间可寻址的平行固相或溶液相文库;需要反卷积的合成文库方法;“一珠一化合物”文库方法;以及使用亲和色谱选择的合成文库方法。生物文库途径仅限于肽文库,而其他四种途径适用于肽、非肽寡聚物、或化合物的小分子文库。(参见例如,Lam,1997.Anticancer Drug Design[抗癌药物设计]12:145)。

[0222] 如本文所用,“小分子”可以指具有小于约5kD且最优选小于约4kD的分子量的组合物。小分子可以是例如核酸、肽、多肽、肽模拟物、碳水化合物、脂质或其他有机或无机分子。化学和/或生物混合物(例如真菌、细菌或藻类提取物)的文库是本领域已知的并且可以用本发明的任何测定来筛选。

[0223] 用于合成分子文库的方法的实例可以在本领域中找到,例如在以下中:DeWitt,等人,1993.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]90:6909;Erb,等人,1994.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]91:11422;Zuckermann,等人,1994.J.Med.Chem.[药物化学杂志]37:2678;Cho,等人,1993.Science[科学]261:1303;Carrell,等人,1994.Angew.Chem.Int.Ed.Engl.[应用化学国际版(英文版)]33:2059;Carell等人,1994.Angew.Chem.Int.Ed.Engl.[应用化学国际版(英文版)]33:2061;和Gallop等人,1994.J.Med.Chem.[药物化学杂志]37:1233。

[0224] 化合物的文库可以以下方式呈现:在溶液中(参见例如,Houghten,1992.Biotechniques[生物技术]13:412-421),或在珠上(参见Lam,1991.Nature[自然]

354:82-84)、在芯片上(参见Fodor,1993.Nature[自然]364:555-556)、细菌(参见美国专利号5,223,409)、孢子(参见美国专利5,233,409)、质粒(参见Cull,等人,1992.Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]89:1865-1869)或在噬菌体上(参见Scott和Smith,1990.Science[科学]249:386-390;Devlin,1990.Science[科学]249:404-406;Cwirla,等人,1990.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]87:6378-6382;Felici,1991.J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]222:301-310;和美国专利号5,233,409)。

[0225] 在一个实施例中,将候选化合物引入抗体-抗原复合物并确定该候选化合物是否破坏该抗体-抗原复合物,其中该复合物的破坏表明该候选化合物调节CLDN4活性。

[0226] 在另一个实施例中,提供了至少一种CLDN4蛋白,其暴露于至少一种单克隆抗体。检测抗体-抗原复合物的形成,并将一种或多种候选化合物引入复合物中。如果在引入一种或多种候选化合物后抗体-抗原复合物被破坏,则该候选化合物可用于治疗癌症或增殖性疾病或障碍。

[0227] 确定测试化合物干扰或破坏抗体-抗原复合物的能力可以通过例如将该测试化合物与放射性同位素或酶标记偶联来实现,使得可以通过检测复合物中的经标记的化合物来确定该测试化合物与抗原或其生物活性部分的结合。例如,可以用¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C或³H直接或间接标记测试化合物,并通过射电辐射的直接计数或通过闪烁计数来检测放射性同位素。可替代地,可以用例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或荧光素酶对测试化合物进行酶标记,并通过确定适当的底物至产物的转化来检测该酶标记。

[0228] 在一个实施例中,测定包括使抗体-抗原复合物与测试化合物接触并确定该测试化合物与抗原相互作用或以其他方式破坏现有抗体-抗原复合物的能力。在该实施例中,确定测试化合物与抗原相互作用和/或破坏抗体-抗原复合物的能力包括确定与抗体相比,该测试化合物优先与抗原或其生物活性部分结合的能力。

[0229] 在另一个实施例中,测定法包括使抗体-抗原复合物与测试化合物接触并确定该测试化合物调节该抗体-抗原复合物的能力。确定测试化合物调节抗体-抗原复合物的能力可以通过例如在该测试化合物存在的情况下确定抗原与抗体结合或相互作用的能力来完成。

[0230] 本领域技术人员将认识到,在本文披露的任何筛选方法中,抗体可以是CLDN4抗体。另外,抗原可以是CLDN4蛋白或其部分。

[0231] 本文披露的筛选方法可以作为基于细胞的测定或无细胞测定进行。在包含膜结合形式的CLDN4蛋白的无细胞测定的情况下,期望使用增溶剂,使得该膜结合形式的蛋白维持在溶液中。这样的增溶剂的实例包括非离子型洗涤剂,例如正辛基葡萄糖苷、正十二烷基葡萄糖苷、正十二烷基麦芽糖苷、辛酰基1-N-甲基葡萄糖酰胺、癸酰基-N-甲基葡萄糖酰胺、Triton®X-100、Triton®X-114、Thesit®、异十三基聚(乙二醇醚)_n、N-十二烷基1--N,N-二甲基1-3-铵基-1-丙烷磺酸酯、3-(3-胆酰胺丙基)二甲基乙醇(dimethylamminiol)-1-丙烷磺酸酯(CHAPS)或3-(3-胆酰胺丙基)二甲基乙醇-2-羟基-1-丙烷磺酸酯(CHAPSO)。

[0232] 在多于一个实施例中,期望固定抗体或抗原,以促进在引入候选化合物后将抗体或抗原中一者或两者的复合形式与非复合形式分离,以及适应测定的自动化。在存在和不存在候选化合物的情况下对抗体-抗原复合物的观察可以在任何适合容纳反应物的容器中

完成。这样的容器的实例包括微量滴定板、试管和微量离心管。在一个实施例中,可以提供融合蛋白,其添加允许蛋白中的一种或两种与基质结合的结构域。例如,GST-抗体融合蛋白或GST-抗原融合蛋白可以吸附到谷胱甘肽琼脂糖珠(西格玛化学公司(Sigma Chemical),圣路易斯,密苏里州)或谷胱甘肽衍生微量滴定板上,然后与测试化合物组合,并将混合物在有利于复合物形成的条件下(例如,在盐和pH的生理条件下)孵育。孵育后,洗涤珠或微量滴定板孔以去除任何未结合的组分,在珠的情况下固定基质,直接或间接确定复合物。可替代地,可以将复合物从基质解离,并且可以使用标准技术测定抗体-抗原复合物形成的水平。

[0233] 用于将蛋白固定在基质上的其他技术也可以用于本发明的筛选测定中。例如,可以利用生物素和链霉亲和素的缀合来固定抗体或抗原(例如,CLDN4蛋白)。生物素化的抗体或抗原分子可以使用本领域众所周知的技术(例如,生物素化试剂盒,皮尔斯化学品公司(Pierce Chemicals),罗克福德,伊利诺伊州)从生物素-NHS(N-羟基-琥珀酰亚胺)制备,并固定在链霉亲和素包被的96孔板(皮尔斯化学品公司)的孔中。可替代地,可以将与目的抗体或抗原反应但不干扰目的抗体-抗原复合物的形成的其他抗体衍生至板的孔中,并且通过抗体缀合将未结合的抗体或抗原诱捕在孔中。除了本文所述的针对GST固定的复合物的方法之外,用于检测此类复合物的方法还包括使用与抗体或抗原反应的此类其他抗体对复合物进行免疫检测。

[0234] 本发明进一步涉及通过本文所述的任何筛选测定而鉴定的新药剂及其用于本文所述的治疗的用途。

[0235] 嵌合抗原受体(CAR)细胞疗法

[0236] 本文还提供了细胞疗法,例如嵌合抗原受体(CAR)细胞疗法。例如,细胞可以是CAR T细胞或CAR NK细胞。

[0237] 例如,CAR细胞疗法通过T细胞或NK细胞上CAR的外源表达来将患者的T细胞和/或NK细胞重定向以杀伤肿瘤细胞。CAR可以是跨膜融合蛋白,其将抗体的抗原识别结构域连接至T细胞受体和辅助受体或NK细胞受体的胞内信号传导结构域。

[0238] 在一个实施例中,提供了单特异性CAR细胞。例如,本文所述的抗CLDN4抗体可以用作CAR细胞的靶向性部分。例如,CLDN4抗体对其抗原具有低亲和力但高亲合力。在另一个实例中,CLDN4抗体对其抗原可具有高亲和力但低亲合力。结合位点较少的抗体可以具有高亲和力和低亲合力,而结合位点较多的抗体可以具有低亲和力和高亲合力。

[0239] 在另一个实施例中,提供了双特异性(或双靶向)CAR细胞。在另一个实施例中,CAR细胞是包含嵌合抗原受体的经工程改造的细胞,其中该嵌合抗原受体包含对癌细胞表面上的第一抗原和第二抗原具有特异性的胞外配体结合结构域,其中该第一抗原包含不是CLDN4的抗原并且该第二抗原包含CLDN4。

[0240] 在实施例中,本文所述的抗CLDN4抗体或CLDN4融合蛋白可用作装甲CAR细胞疗法的有效载荷。可以使用合适的细胞,例如,其可以分泌本发明的抗CLDN4抗体(或者可替代地经工程改造以表达待分泌的如本文所述的抗CLDN4抗体)。待分泌的抗CLDN4“有效载荷”可以是例如微型抗体、scFv、IgG分子、双特异性融合分子和本文所述的其他抗体片段。在接触或工程改造后,然后将本文所述的细胞引入需要通过本领域技术人员已知的输注疗法治疗的患者。

[0241] 在实施例中,患者可能患有如本文所述的CLDN4相关疾病或障碍,例如癌症。细胞(例如,T细胞)可以是例如T淋巴细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞或其组合,但不限于此。可用于本发明各方面的示例性CAR和CAR生产平台包括在例如PCT/US2015/067225和PCT/US2019/022272中披露的那些,将其中的每个均通过引用以其整体并入本文。在一个实施例中,本文讨论的CLDN4抗体可用于在构建多特异性抗体中或作为CAR-T细胞或CAR NK细胞的有效载荷使用。例如,在一个实施例中,本文讨论的抗CLDN4抗体可以用于CAR的靶向(即,作为靶向性部分)。在另一个实施例中,本文讨论的抗CLDN4抗体可以用作靶向性部分,并且靶向不同表位的不同CLDN4抗体可以用作有效载荷。在另一个实施例中,有效载荷可以是免疫调节抗体有效载荷。

[0242] 实体瘤为CAR-T疗法带来了独特的挑战。实体瘤中CAR-T有效性的一些障碍包括异质抗原表达、组织归巢不足、激活、持久性和免疫抑制性肿瘤微环境。与血液癌症不同,肿瘤相关靶蛋白在肿瘤和健康组织之间过度表达,导致中靶/肿瘤外健康组织被T细胞杀伤。此外,肿瘤微环境(TME)中的免疫抑制限制了CAR-T细胞朝向杀伤肿瘤的激活。在这样的接触或工程改造后,然后将细胞引入需要通过本领域技术人员已知的输注疗法治疗的癌症患者。癌症患者可以患有本文披露的任何类型的癌症。细胞(例如,T细胞)可以是例如肿瘤浸润性T淋巴细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞或其组合,但不限于此。

[0243] 在实施例中,CAR细胞(即,CAR T细胞或CAR NK细胞)可以根据本领域已知的方法使用慢病毒系统(经由转导)、逆转录病毒系统(经由转染(电穿孔))和转座子系统(经由PiggyBac)生成。针对用于在生成CAR-T中使用的有效载荷有用的启动子包括,例如,组成型启动子(其中该启动子与用于CAR-T的启动子相同,例如EF1a,然后是IRES或2A);诱导型启动子(该启动子与用于CAR-T的启动子不同,例如NFAT、IL-2prom);以及基因工程改造的启动子(例如细胞因子的CLDN4基因座“敲入”和/或在内源启动子控制下的启动子)。在一个实施例中,本文讨论的CLDN4抗体或CLDN4融合蛋白可用于在构建多特异性抗体中或作为CAR细胞的有效载荷使用。例如,在一个实施例中,本文讨论的抗CLDN4抗体或CLDN4融合蛋白可用于CAR的靶向(即,作为靶向性部分)。在一个实施例中,本文讨论的抗CLDN4抗体或CLDN4融合蛋白可以用作由CAR细胞分泌的有效载荷。在另一个实施例中,本文讨论的抗CLDN4抗体或CLDN4融合蛋白可以用作靶向性部分,并且靶向不同表位的不同CLDN4抗体可以用作有效载荷。在另一个实施例中,有效载荷可以是免疫调节抗体有效载荷。在一些实施例中,如本文所述的用于在CAR-T组合中使用的CLDN4抗体或CLDN4融合蛋白不是高亲和力CLDN4抗体(例如,使得抗体不与其CLDN4靶标强烈结合)。例如,本文所述的CLDN4抗体或CLDN4融合蛋白可以用作由CAR细胞分泌的有效载荷,其中具有针对特定癌症选择的两个靶向性部分(例如,肿瘤相关表面抗原)。肿瘤相关表面抗原的非限制性实例包括ErbB2 (HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、MUC1、MSLN、CD19、CD20、CD30、CD40、CD22、RAGE-1、MN-CAIX、RET1、RET2 (AS)、前列腺特异性抗原(PSA)、TAG-72、PAP、p53、Ras、前列腺蛋白(prostein)、PSMA、生存素、9D7、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、GAGE、MAGE、间皮素、 β -连环蛋白、TGF- β RII、BRCA1/2、SAP-1、HPV-E6、HPV-E7(对于另外的肿瘤相关表面抗原还参见,PCT/US2015/067225和PCT/US2019/022272,将其通过引用以其整体并入)。下表中列出了示例性的装甲CAR-T细胞。

CART	有效载荷	形式	启动子	出版物
PSMA	DN-TGFb			Molecular Therapy [分子疗法] 26 : 1855 (2018)
GD2	cJun	cDNA		Nature [自然] 576 : 293(2019)
纤连蛋白	CD47	VHH		Cancer Immunol Res.[癌症免疫学研究] 8 :518-529 (2020)
PD-L1	PD-L1			
	CTLA-4			
GPC3	IL-12			J Immunol[免疫学杂志] 2019; 203:198
CD20	PD-1			Cancer Science [癌症科学]. 2019;110:3079
CD19	PD-1			nature biotechnology [自然生物技术] 36:847 (2018)
Muc16				
CD19	IL-18			Cell Reports [细胞报告] 23:2130 (2018)
Muc16				
CD19	IL-12	融合物	IRES	Scientific REPOrTS [科学报告] 7: 10541 (2017)
Muc16				
CD19	PD-1	scFv	P2A	Clin Cancer Res [临床癌症研究] 23:6982 (2017)
CAE	IL-18		NFAT	Cell Reports [细胞报告] 21:3205 (2017)
	IL-12		IL-2	
VEGF2	IL-12			Clin Cancer Res [临床癌症研究] 18:1672 (2012)

[0244] 技术人员应认识到, CAR细胞可以由技术人员已知的细胞来源生成。非限制性实例包括T细胞、NK细胞、iPSC衍生的细胞(例如, iPSC衍生的T细胞和/或iPSC衍生的NK细胞)、外周血细胞(例如, 外周血单个核细胞)、脐血细胞、细胞系(例如, NK92细胞系)、人胚胎干细胞(hESC)和CD34+造血祖细胞(HPC)。参见例如, Lu, Hui, 等人“From CAR-T cells to CAR-NK cells: a developing immunotherapy method for hematological malignancies. [从CAR-T细胞到CAR-NK细胞: 一种正在开发的血液恶性肿瘤免疫疗法方法]”Frontiers in Oncology [肿瘤学前沿] (2021): 3151。

[0245] 嵌合B细胞受体

[0246] 被称为嵌合B细胞受体的经修饰的B细胞受体, 例如含有先前通过针对特定疾病相关抗原的高亲和力而选择的抗体或抗体片段的B细胞受体, 是对抗疾病的强大新途径。由于B细胞作为专门的抗原呈递细胞, 它们可以加工抗原和在MHC II类分子上呈递抗原, 增强免疫细胞对肿瘤的识别并协助新抗原扩散。作为免疫记忆的关键组分, 嵌合抗体信号传导和

分泌 (CASS) 型B细胞将同时招募广泛范围的免疫细胞并逆转肿瘤浸润性淋巴细胞衰竭,从而提供稳健且终身的监视程序,防止肿瘤转移和复发。在实施例中,B细胞可以包括嵌合的、非天然的并且至少部分由人工工程改造的受体。在某些情况下,经工程改造的嵌合B细胞受体具有一种、两种、三种、四种或更多种组分,并且在一些实施例中,该一种或多种组分促进B细胞靶向或结合一种或多种包含抗原的细胞。

[0247] 本发明的方面包括基因工程改造的B细胞,其被修饰以表达并在其表面上携带嵌合B细胞受体。在实施例中,经基因修饰的B细胞可以包含靶向一种抗原(例如CLDN4)的单一嵌合B细胞受体,或靶向两种或更多种抗原的单一嵌合B细胞受体(例如,双特异性嵌合B细胞受体或多特异性嵌合B细胞受体)。在一些实施例中,细胞包含分裂型嵌合B细胞受体,例如在B细胞表面上表达的具有不同共刺激结构域的两种不同scFv。进一步地,一些实施例包含微调的嵌合B细胞受体。

[0248] 在实施例中,嵌合B细胞受体包含胞外结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域;使得多肽组装在一起形成嵌合B细胞受体。

[0249] 例如,可选择胞外配体结合结构域来识别配体,例如CLDN4,其充当与疾病状态相关的靶细胞上的细胞表面标志物。例如,疾病状态可以是癌症,并且靶配体可以是癌症相关抗原,例如CLDN4。

[0250] 在实施例中,胞外配体结合结构域可以包含从针对靶标的抗原的抗体(例如本文所述的抗CLDN4抗体)衍生的抗原结合结构域或抗原识别结构域。在实施例中,胞外配体结合结构域可以包含本文所述的抗体或其片段。

[0251] 在实施例中,跨膜结构域包括茎区。茎区可以衍生自天然存在的分子的全部或部分,例如衍生自CD8、CD4或CD28的胞外区的全部或部分,或衍生自抗体恒定区(例如IgG抗体的CH1、CH2、CH3、或CH2和CH3二者,或IgM抗体的CH1、CH2、CH3、CH4或其任何组合)的全部或部分。在其他实施例中,茎区可以是对应于天然存在的茎序列的合成序列,或者可以是完全合成的茎序列。在实施例中,所述茎区是人CD8 α 链的一部分。

[0252] 本发明的嵌合B细胞受体的信号传导结构域或胞内信号传导结构域负责在胞外配体结合结构域与靶标结合后的胞内信号传导,导致免疫细胞和免疫应答的激活。换句话说,信号转导结构域负责表达嵌合B细胞受体的B细胞的至少一种正常功能的激活。因此,术语“信号转导结构域”可以指引导细胞执行特化功能(例如Lyn和Syk的早期激活以及NFAT和NF- κ B的晚期激活作为实例)的蛋白的部分。

[0253] 嵌合B细胞受体可包含天然跨膜结构域和胞内结构域。在天然B细胞中,B细胞受体的接合导致胞内结构域的快速酪氨酸磷酸化和钙离子极化,从而导致NFAT和NF- κ B的下游激活。使用NFAT/NF- κ B应答元件驱动我们的分泌蛋白的表达,我们设计了诱导型表达系统,该系统将被与疾病状态(例如癌症)相关的抗原激活。

[0254] 适当的跨膜多肽的显著特征包含能够在免疫细胞(例如B细胞)的表面表达并一起相互作用以引导免疫细胞针对预定靶细胞的细胞应答。包含胞外配体结合结构域和/或信号转导结构域的嵌合B细胞受体的不同跨膜多肽一起相互作用,以参与与靶配体结合后的信号转导并诱导免疫应答。跨膜结构域可衍生自天然来源或合成来源。跨膜结构域可以衍生自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。

[0255] 治疗方法

[0256] 如本文所用,术语“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”是指治疗性治疗、以及预防性或防止性的措施这两者,其中目标是防止或减缓(缩小)未寻求的生理变化或障碍,例如癌症的进展。有益的或优选的临床结果包括但不限于:症状的减轻、疾病程度的减小、疾病的稳定状态(即,不恶化)、疾病进展的延迟或减慢、疾病状态的改善或减缓、以及缓和(不论是部分还是总体),不论这些结果是可检测的还是不可检测的。“治疗”可以意指与如果不接受治疗的预期生存相比延长的生存。需要治疗的那些包括已经患有病症或障碍的那些,以及易于患有病症或障碍的那些,或其中要预防病症或障碍的那些。

[0257] 本发明提供了治疗处于癌症风险(或易患癌症)的受试者(例如,如果在这样的受试者中鉴定出早期检测癌症生物标志物)或其他细胞增殖相关疾病或障碍风险的受试者的预防性和治疗性方法。这样的疾病或障碍包括但不限于例如与CLDN4的异常表达和/或涉及CLDN4的细胞信号传导通路的异常激活相关的那些疾病或障碍。这样的疾病或障碍包括在CLDN相关疾病或障碍中。例如,方法用于治疗、预防或减轻癌症的症状。在实施例中,方法用于治疗、预防或减轻实体瘤的症状。可以通过本文所述的组合物治疗的其他肿瘤的非限制性实例包括肺癌、肾癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、宫颈癌、子宫癌、脑癌、皮肤癌、肝癌、胰腺癌或胃癌。另外,本发明的方法可用于治疗血液学癌症,例如白血病和淋巴瘤。可替代地,方法可用于治疗、预防或减轻已转移的癌症的症状。例如,可以被治疗或预防或可以减轻其症状的癌症包括B细胞慢性淋巴细胞白血病(CLL)、非小细胞肺癌、黑素瘤、卵巢癌、淋巴瘤或肾细胞癌。还可以被治疗或预防或可以减轻其症状的癌症包括具有高突变负荷和滤液中WBC的那些实体瘤。

[0258] 因此,在一个方面,本发明提供了通过向受试者施用本发明的单克隆抗体、scFv抗体或双特异性抗体来在受试者中预防以下、治疗以下或减轻以下的症状的方法:癌症或细胞增殖性疾病或障碍。例如,可以以治疗有效量施用抗CLDN4抗体。

[0259] 处于癌症或细胞增殖相关疾病或障碍风险中的受试者可以包括具有癌症家族史的患者或暴露于已知或疑似致癌剂的受试者。预防性药剂的施用可以发生在癌症表现之前,从而预防疾病或者可替代地延迟其进展。

[0260] 在另一方面,通过使细胞与本发明的抗CLDN4抗体接触来抑制肿瘤细胞生长。细胞可以是表达CLDN4的任何细胞。

[0261] 本发明进一步提供了治疗处于慢性或急性病毒、细菌或寄生虫感染风险中(或易患慢性或急性病毒、细菌或寄生虫感染)的受试者的预防性和治疗性方法。本发明还提供了用于治疗处于与T细胞衰竭相关的疾病或障碍或病症的风险中或处于发生T细胞衰竭的风险中的受试者的预防性和治疗性方法。本发明还提供了用于治疗处于与T细胞衰竭相关的疾病或障碍或病症的风险中或处于发生T细胞衰竭的风险中的受试者的预防性和治疗性方法。这样的疾病或障碍包括但不限于HIV、AIDS以及慢性或急性细菌、病毒或寄生虫感染。其他这样的慢性感染包括由例如以下引起的那些:乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、单纯疱疹病毒1(HSV-1)、幽门螺杆菌或弓形虫。包括的其他急性感染是由例如微生物引起的那些,这些微生物是例如如本文所述的革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、原生动物或真菌。

[0262] 本发明还包括增加或增强针对抗原的免疫应答的方法。通过向受试者施用本发明的单克隆抗体、scFv抗体或双特异性抗体来增加或增强应答免疫。例如通过增强抗原特异

性T效应子功能来增强应答免疫。抗原是病毒(例如,HIV)、细菌、寄生虫或肿瘤抗原。免疫应答是自然免疫应答。自然免疫应答是指由感染引起的免疫应答。感染是慢性感染。增加或增强对抗原的免疫应答可以通过本领域已知的多种方法来测量。例如,可以通过测量以下任意一项来测量免疫应答:T细胞活性、T细胞增殖、T细胞激活、效应细胞因子的产生和T细胞转录谱。可替代地,免疫应答是由于疫苗接种引起的应答。

[0263] 因此,在另一方面,本发明提供了通过向受试者施用本发明的单克隆抗体或scFv抗体和疫苗来增加疫苗效率的方法。抗体和疫苗按顺序施用或并行施用。疫苗是肿瘤疫苗、细菌疫苗或病毒疫苗。

[0264] 组合方法

[0265] 本文所述的本发明的组合物可以与化疗剂组合施用。可以与本披露的组合物一起施用的化疗剂包括但不限于抗生素衍生物(例如多柔比星、博来霉素、柔红霉素和放线菌素);抗雌激素药(例如他莫昔芬);抗代谢药(例如,氟尿嘧啶、5-FU、甲氨蝶呤、氟尿苷、干扰素 α -2b、谷氨酸、普卡霉素、巯基嘌呤和6-硫鸟嘌呤);细胞毒性剂(例如,卡莫司汀、BCNU、洛莫司汀、CCNU、阿糖胞苷、环磷酰胺、雌莫司汀、羟基脲、丙卡巴肼、丝裂霉素、白消安、顺铂和硫酸长春新碱);激素(例如甲羟孕酮、雌莫司汀磷酸钠、乙炔雌二醇、雌二醇、乙酸甲地孕酮、甲基睾酮、二磷酸己烯雌酚、氯烯雌醚和睾内酯);氮芥衍生物(例如,美法仑、苯丁酸氮芥、二氯甲基二乙胺(氮芥)和塞替派);类固醇及其组合(例如倍他米松磷酸钠);和其他(例如,达卡巴嗪、天冬酰胺酶、米托坦、硫酸长春新碱、硫酸长春花碱和依托泊苷)。

[0266] 在另外的实施例中,本文所述的本发明的组合物可以与细胞因子组合施用。可以与组合物一起施用的细胞因子包括但不限于IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、抗CD40、CD40L和TNF- α 。

[0267] 在另外的实施例中,本文所述的组合物可以与其他治疗性方案或预防性方案例如放射疗法组合施用。

[0268] 在一些实施例中,本文所述的组合物可以与其他免疫治疗剂组合施用。免疫治疗剂的非限制性实例包括辛妥珠单抗、阿巴伏单抗、阿德木单抗、阿托珠单抗、阿仑单抗、阿妥莫单抗、阿托昔单抗、马安那莫单抗、阿西莫单抗、巴维昔单抗、贝妥莫单抗、贝伐单抗、比伐珠单抗、比纳托单抗、布妥昔单抗、坎妥珠单抗、卡妥索单抗、西妥昔单抗、西他珠单抗、西妥木单抗、利伐珠单抗(clivatuzumab)、坎妥木单抗(conatumumab)、达妥木单抗(daratumumab)、曲兹妥单抗(droxitumab)、杜利妥单抗(duligotumab)、杜昔妥单抗(dusigitumab)、地莫单抗、达西珠单抗、多妥珠单抗(dalotuzumab)、依美昔单抗、艾妥珠单抗(elotuzumab)、恩脱昔单抗(ensituximab)、厄妥索单抗、达珠单抗、法妥珠单抗(farletuzumab)、拉妥珠单抗(ficlatuzumab)、费妥木单抗(figitumumab)、法伏妥单抗(flanvotumab)、弗妥昔单抗(futuximab)、加尼妥单抗(ganitumab)、吉妥珠单抗、吉瑞昔单抗、来巴妥单抗(glembatumumab)、替伊莫单抗、伊戈伏单抗、麦妥珠单抗(imgatuzumab)、印妥昔单抗(indatuximab)、伊珠单抗、英妥木单抗、伊匹单抗、伊妥木单抗、拉贝珠单抗、来沙木单抗、林妥珠单抗、洛伐珠单抗(lorvotuzumab)、鲁卡木单抗(lucatumumab)、曼妥木单抗(mapatumumab)、马妥珠单抗、米妥珠单抗(milatuzumab)、明瑞莫单抗、米妥莫单抗、莫妥木单抗(moxetumumab)、那妥单抗(narnatumab)、那莫单抗、尼妥木单抗(necitumumab)、尼妥珠单抗、若莫单抗(nofetumomab)、卡妥珠单抗(ocaratuzumab)、奥法木单抗、奥拉妥单抗

(olaratumab)、昂妥珠单抗(onartuzumab)、奥妥珠单抗(oportuzumab)、瑞戈伏单抗(oregovomab)、盘尼图单抗、帕图珠单抗(parsatuzumab)、帕托单抗(patritumab)、盘图莫单抗(pemtumomab)、帕妥珠单抗、平妥单抗、普托木单抗、拉妥木单抗(racotumomab)、拉图单抗(radretumab)、利妥木单抗(rilotumumab)、利妥昔单抗、罗妥木单抗、沙妥莫单抗、昔洛珠单抗、司妥昔单抗、索利图单抗(solitomab)、他妥珠单抗(tacatuzumab)、他妥莫单抗(taplutumomab)、替妥莫单抗(tenatumomab)、替普莫单抗(teprotumumab)、加珠单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗、托卡珠单抗(tucotuzumab)、乌妥昔单抗(ublituximab)、维妥珠单抗(veltuzumab)、沃妥珠单抗(vorsetuzumab)、沃图莫单抗(votumumab)、扎鲁木单抗、CC49和3F8。

[0269] 本发明提供了通过施用与CLDN4蛋白的相同表位结合或可替代地与CLDN4蛋白的两个不同表位结合的两个抗体来治疗患者中的癌症的方法。可替代地,癌症可以通过施用与CLDN4结合的第一抗体和与除CLDN4之外的蛋白结合的第二抗体来治疗。在其他实施例中,癌症可以通过施用与CLDN4结合并且与除CLDN4之外的蛋白结合的双特异性抗体来治疗。例如,除CLDN4之外的另一种蛋白可包括但不限于IL-12、IL-12R、IL-2、IL-2R、IL-15、IL-15R、IL-7、IL-7R、IL-21或IL-21R。例如,除CLDN4之外的另一种蛋白是肿瘤相关抗原;除CLDN4以外的另一种蛋白也可以是细胞因子。除CLDN4之外的另一种蛋白的非限制性实例包括CTLA-4、CXCR4、LAG-3、CD28、CD122、4-1BB、TIM3、OX-40、OX40L、CD40、CD40L、LIGHT、ICOS、ICOSL、GITR、GITRL、TIGIT、CD27、VISTA、B7H3、B7H4、HEVM(或BTLA)、CD47和CD73。

[0270] 在一些实施例中,本发明提供了抗PD-1抗体单独施用或与以下组合施用:识别除CLDN4之外的另一种蛋白的另外抗体,以及可以影响或增强免疫应答的细胞。例如,这些细胞可以是黑素瘤外周血单个核细胞(PBMC),或PBMC中发现的任何细胞类型,例如细胞毒性T细胞、巨噬细胞和自然杀伤(NK)细胞。

[0271] 另外,本发明提供了与CLDN4蛋白结合的抗体和抗肿瘤剂的施用,该抗肿瘤剂是例如小分子、生长因子、细胞因子或其他治疗剂,该其他治疗剂包括生物分子例如肽、肽模拟物、类肽、多核苷酸、脂质衍生的介体、小生物胺、激素、神经肽和蛋白酶。小分子包括但不限于无机分子和有机小分子。合适的生长因子或细胞因子包括IL-2、GM-CSF、IL-12和TNF- α 。小分子文库是本领域已知的。(参见Lam, Anticancer Drug Des., [抗癌药物设计], 12:145, 1997.)

[0272] 诊断性测定

[0273] 抗CLDN4抗体可在诊断上用于例如监测癌症的发展或进展,作为临床测试程序的一部分,以例如确定给定治疗和/或预防方案的功效。

[0274] 在一些实施例中,出于诊断目的,本发明的抗CLDN4抗体被连接至可检测部分,例如,以便提供用于检测处于癌症风险或患有癌症的受试者中的癌细胞的方法。

[0275] 可检测部分可以直接缀合至抗体或片段,或通过使用例如荧光二抗间接缀合。直接缀合可通过例如荧光团与抗体或抗体片段的标准化学偶联或通过基因工程改造来完成。可以构建嵌合体或融合蛋白,其含有与荧光或生物发光蛋白偶联的抗体或抗体片段。例如, Casadei, 等人, (Proc Natl Acad Sci U S A. [美国国家科学院院刊] 1990年3月; 87 (6) : 2047-51) 描述了一种制备能够在哺乳动物细胞中表达水母发光蛋白和抗体基因的融合蛋白的载体构建体的方法。

[0276] 如本文所用,关于探针或抗体,术语“标记的”可以涵盖通过偶联(即,物理连接)可检测物质至该探针或抗体进行的该探针或抗体的直接标记,以及通过与另一种直接标记的试剂发生反应进行的该探针或抗体的间接标记。间接标记的实例包括使用荧光标记的二抗检测一抗,以及使用生物素对DNA探针进行末端标记,从而可以使用荧光标记的链霉亲和素进行检测。术语“生物样品”是旨在包括从受试者分离的组织、细胞和生物学流体(例如活检),以及存在于受试者体内的组织、细胞和流体。也就是说,本发明的检测方法可用于检测在体外生物样品中以及在体内表达CLDN4的细胞。例如,用于检测CLDN4的体外技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白印迹、免疫沉淀和免疫荧光。此外,用于检测CLDN4的体内技术包括将标记的抗CLDN4抗体引入受试者中。例如,可以用放射性标志物来标记抗体,可以通过标准成像技术来检测该放射性标志物在受试者中的存在和位置。

[0277] 在“靶向的”缀合物(即含有靶向性部分的缀合物(该靶向性部分是设计用于将缀合物定位在受试者或动物体内的特定位点或多个位点的分子或特征))的情况下,定位可以指当受试者体内结合的、“定位的”实体和未结合的、“游离的”实体之间已经基本上实现平衡时的状态。实现这样的平衡的速度取决于施用途径。例如,通过静脉内注射施用的缀合物可以在注射的几分钟内实现定位。另一方面,口服施用缀合物可能需要数小时才能实现定位。可替代地,定位可以简单地指在施用实体后选定的时间段内实体在受试者或动物体内的位置。作为另一个实例,当部分在施用后变得分布时,实现了定位。

[0278] 本领域技术人员可以对实现定位的时间做出合理的估计。此外,可以根据本发明的方法,例如使用光电探测器装置,通过对可检测部分(例如,发光缀合物)进行成像来跟踪定位状态随时间的变化。所使用的“光电探测器装置”可以具有足够高的灵敏度,以允许在合理的时间内对来自哺乳动物体内的微弱光进行成像,并使用来自这样的装置的信号来构建图像。

[0279] 在可以使用极其明亮的产光部分和/或检测位于被成像的受试者或动物的表面附近的产光融合蛋白的情况下,可以使用一副“夜视”护目镜或标准高灵敏度摄像机,例如硅增强管(SIT)摄像机(例如,来自滨松光子系统公司(Hammatsu Photonic Systems),布里奇沃特,新泽西州)。然而,需要更灵敏的光检测方法。

[0280] 在极低的光水平下,每单位面积的光子通量变得如此之低,以至于成像的场景不再显得连续。相反,它由单个光子表示,这些光子在时间和空间上彼此不同。在监视器上查看时,这样的图像显示为闪烁的光点,每个光点代表单个检测到的光子。通过随着时间的推移在数字图像处理器中累积这些检测到的光子,可以获取并构建图像。与每个图像点的信号都分配有强度值的常规相机相比,在光子计数成像中,信号的幅度没有意义。目标是简单地检测信号(光子)的存在,并根据信号随时间的位置对信号的出现进行计数。

[0281] 本文所述的至少两种类型的光电探测器装置可以检测单个光子并生成可以由图像处理器分析的信号。降噪光电探测器装置通过降低光子探测器中的背景噪声(而不是放大光子信号)来实现灵敏度。主要通过冷却探测器阵列来降低噪声。这些装置包括被称为“背面减薄的”冷却电荷耦合器件(CCD)相机的CCD相机。在更灵敏的仪器中,可以使用例如液氮来实现冷却,从而使CCD阵列的温度达到大约-120°C。“背面减薄的”是指超薄背板,其可减少光子所遵循的被检测的路径长度,从而提高量子效率。灵敏的背面减薄的低温CCD相机是“TECH 512”,它是可从光度学有限公司(Photometries,Ltd.) (图森市,亚利桑那州)获

得的200系列相机。

[0282] “光子放大装置”在光子到达检测屏幕之前将其放大。此类包括带有增强器(例如微通道增强器)的CCD相机。微通道增强器包含垂直于相机检测屏幕并与其共同延伸的金属通道阵列。微通道阵列放置在待成像的样品、受试者或动物与相机之间。进入阵列的通道的大多数光子在离开之前会接触通道的一侧。施加在阵列上的电压会导致每次光子碰撞释放出许多电子。碰撞产生的这些电子以“霰弹枪”模式离开其起源通道,并被相机检测到。

[0283] 通过串联放置增强性微通道阵列可以实现甚至更高的灵敏度,以便在第一级中产生的电子反过来会在第二级中产生放大的电子信号。然而,灵敏度的提高是以空间分辨率为代价的,空间分辨率随着放大的每一个附加级而降低。示例性的基于微通道增强器的单光子检测装置是可从滨松公司(Hamamatsu)获得的C2400系列。

[0284] 图像处理器处理由光电探测器装置生成的信号,该光电探测器装置对光子进行计数以构建图像,该图像可以例如显示在监视器上或打印在视频打印机上。这样的图像处理器作为包括本文所述的灵敏光子计数相机的系统的一部分出售,因此可以从相同的来源获得。图像处理器连接到个人计算机,例如IBM兼容PC或苹果麦金塔电脑(苹果电脑公司(Apple Computer),库比蒂诺,加利福尼亚州),其可以或不可以作为购买的成像系统的一部分包含在内。一旦图像成为数字文件的形式,它们就可以通过各种图像处理程序(例如“ADOBE PHOTOSHOP”,奥多比系统公司(Adobe Systems),奥多比系统公司,山景城,加利福尼亚州)进行操作并打印。

[0285] 在实施例中,生物样品包含来自测试受试者的蛋白分子。一种示例性生物样品是通过常规手段从受试者分离的外周血白细胞样品。

[0286] 本发明还涵盖用于检测生物样品中CLDN4或表达TIGIT的细胞的存在试剂盒。例如,试剂盒可以包括:可以检测生物样品中的癌症或肿瘤细胞的经标记的化合物或药剂(例如抗CLDN4scFv或单克隆抗体);用于确定样品中CLDN4的量的手段;以及用于将样品中CLDN4的量与标准品进行比较的手段。在一些实施例中,标准品是非癌细胞或其细胞提取物。化合物或药剂可以包装在合适的容器中。试剂盒可以进一步包括使用该试剂盒检测样品中的癌症的说明。

[0287] 其他实施例

[0288] 虽然已经结合其具体实施方式对本发明进行了描述,但前面的描述旨在说明而非限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其他方面、优点以及修改都在以下权利要求的范围内。

[0289] 本发明在以下实例中进一步说明,这些实例不限制权利要求中所描述的本发明的范围。

实例

[0290] 下面提供了实例以有助于更全面地理解本发明。以下实例阐明了制造和实践本发明的示例性模式。然而,本发明的范围不限于在这些实例中披露的具体实施例,这些实例仅出于说明的目的,因为可以利用替代性方法来获得类似的结果。

实例1-密封蛋白4作为治疗性靶标

[0291] 我们通过全细胞淘选鉴定了两种抗密封蛋白4scFv(Gly1-4-G3和Gly1-2-F4)。我们进行了3轮淘选,交替使用经转导以稳定表达CLDN4的293T和Cf2Th细胞。我们的scfv与结

构上相关的蛋白密封蛋白3的交叉反应性极小。

[0292] 密封蛋白4是多种癌症(包括三阴性乳腺癌、胰腺癌和胆道癌)的治疗性靶标。我们的scFv能够特异性靶向CLDN4,并且可用于靶向CAR T细胞。

[0293] 这些scFv可开发为用于治疗性目的或诊断性目的的单克隆抗体。另外,它们还可用作针对过度表达CLND4的癌症的CAR T细胞的靶向性部分。

实例2

[0294] -我们用CLDN-3质粒瞬时转染293T细胞

[0295] -在没有CLDN-3或CLDN-4的情况下,抗体与293T具有低背景结合至无背景结合

[0296] -CLDN-3抗体仅特异性识别CLDN-3细胞系

[0297] -CLDN-4抗体与CLDN-3细胞系微弱结合

[0298] -一些293T CLDN-4细胞可能丢失CLDN-4表达

[0299] -我们可以进行CLDN-4微型抗体与表达CLDN-3的细胞系的结合测定

等效物

[0300] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验就确定本文描述的具体物质和程序的许多等效物。这类等效物被认为是在本发明的范围之内并且被以下权利要求书涵盖。

CPE-FC 工具的验证

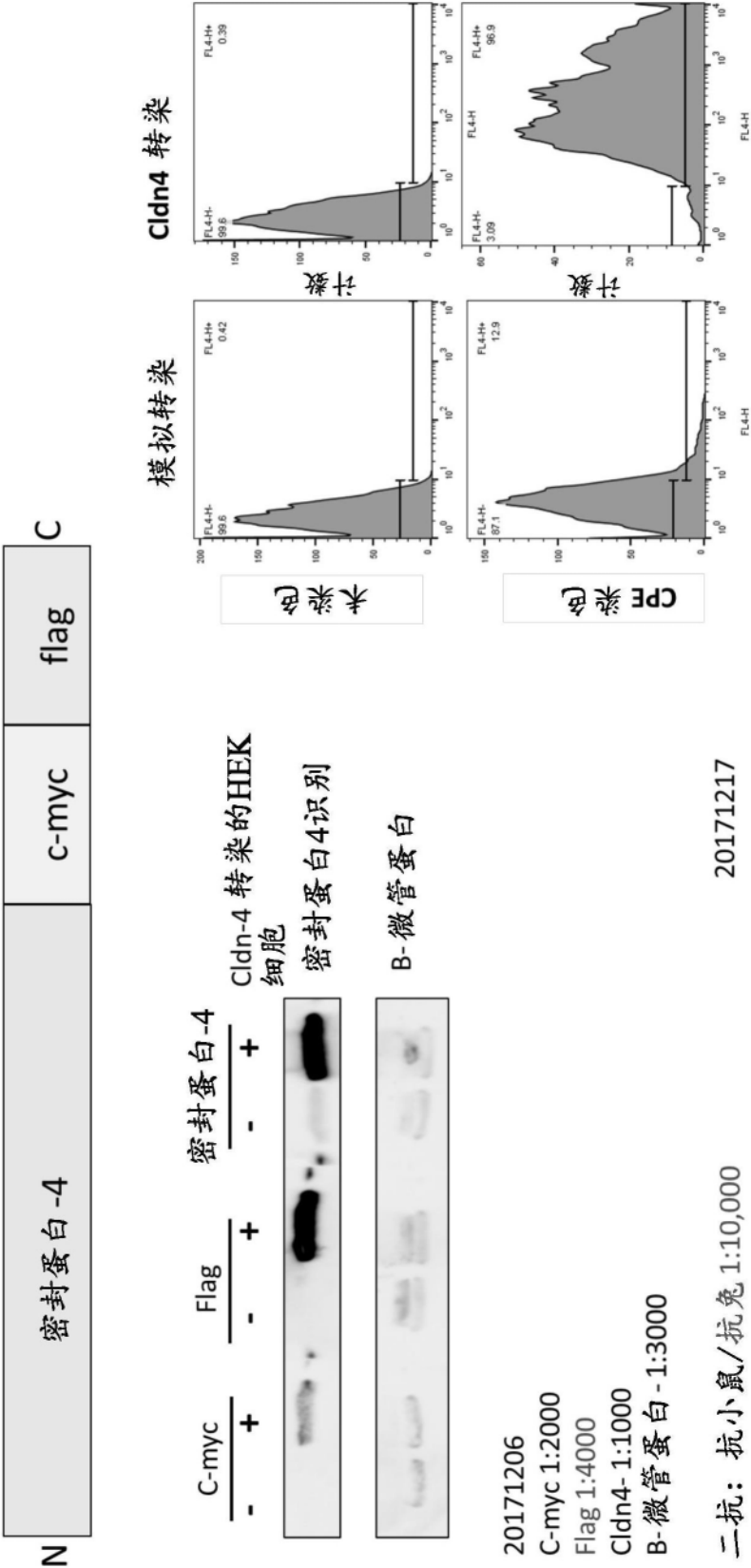


图1

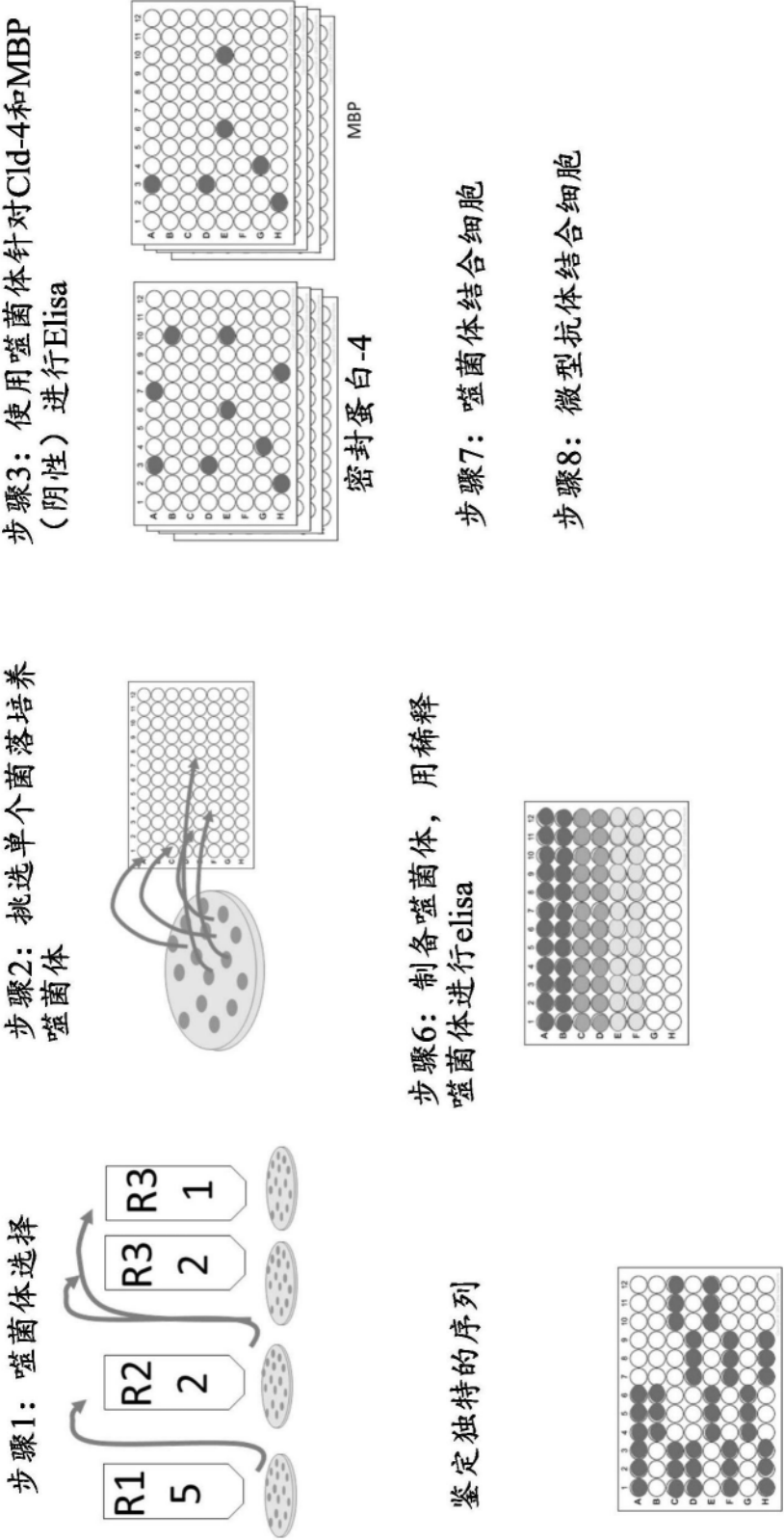


图2

使用在昆虫细胞中表达的溶解的密封蛋白-4，通过噬菌体淘选发现靶向密封蛋白-4的scFv

尝试	抗原	选择轮数 包被 ng/ul (R1,R2,R3)	筛选的菌落数 密封蛋白-4和MBP (阴性对照)	测序的 菌落数	独特的 序列	一式三份 重复Elisa	噬菌体 生产Elisa 稀释曲线	重新检查 独特的 序列
1	可溶性FL Cld-4	5, 2, 2 + 1	720	88 (良好 75)	4	2	2	1
2	可溶性FL Cld-4	5, 2, 2 + 1	768	73 (良好 73)	17	7	1	与尝试1 相同的 序列

序列 ID	V-基因和 等位基因	J-基因和 等位基因	D-基因和 等位基因	FR1-IMGT	CDR1-IMGT	FR2-IMGT	CDR2- IMGT	FR3-IMGT	CDR3-IMGT	FR4-IMGT
1E2_F4	HV3-53*01 F	HJ3*02 F	ORF	EVQLVQSGG.GLI*PGGSLRL SCAAS	GFTV....SSN Y	MSWVRQAPGKGLE WVSV	IYSG...GST	YYDSVK.GRFTISRDNKNTLYLQMNLSLR AEDTAVYYC	ARDNPLSAFDI	WGQGTILVTVSL

图3

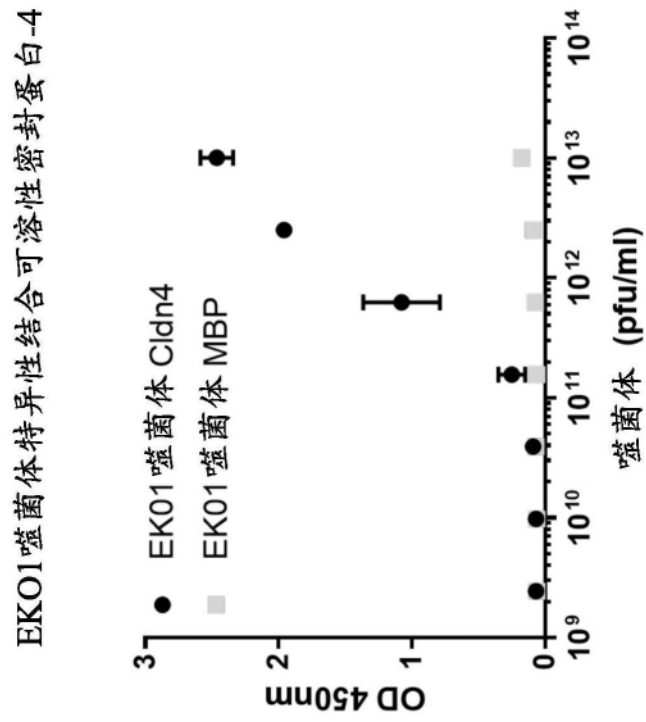


图4

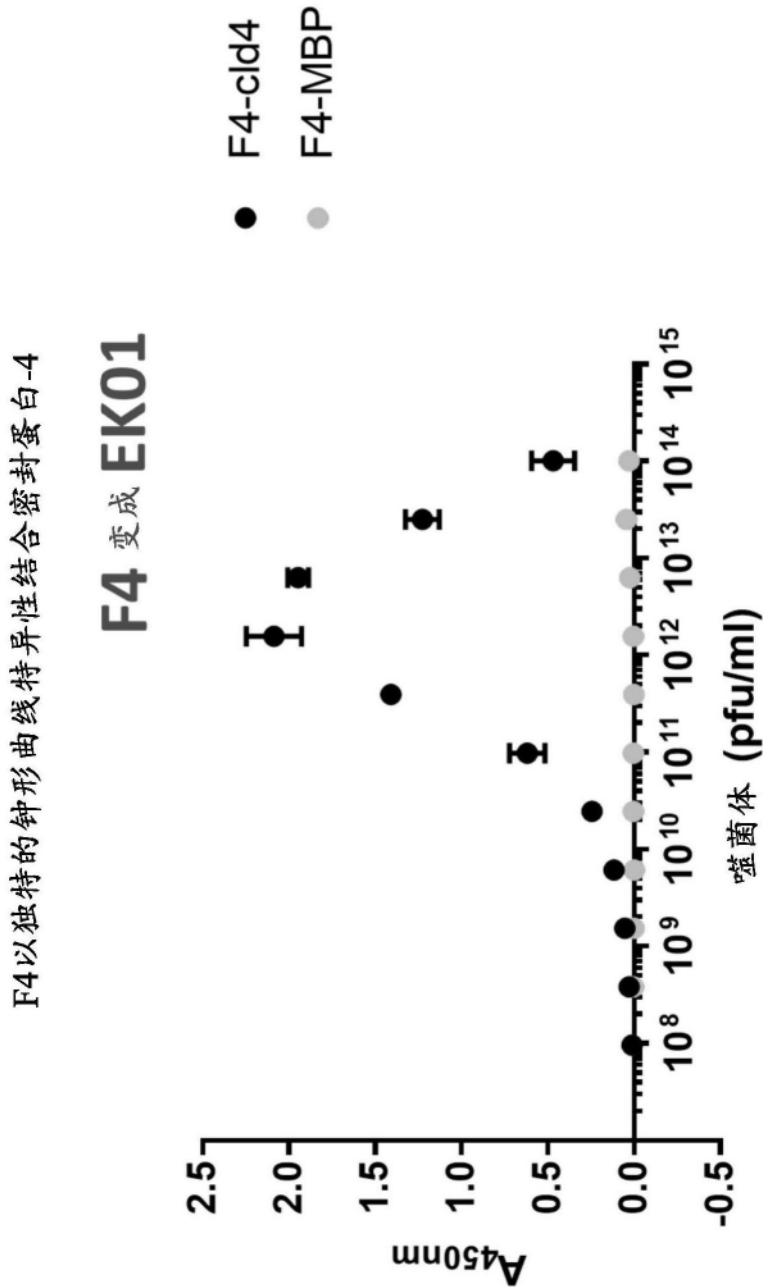
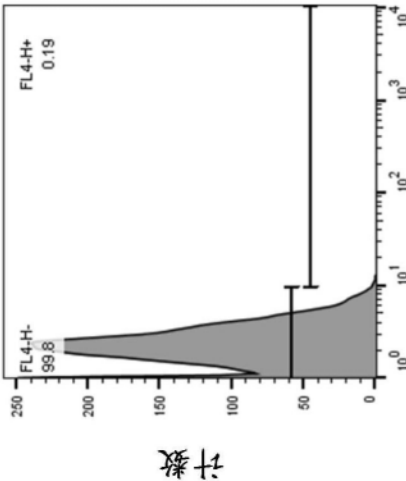


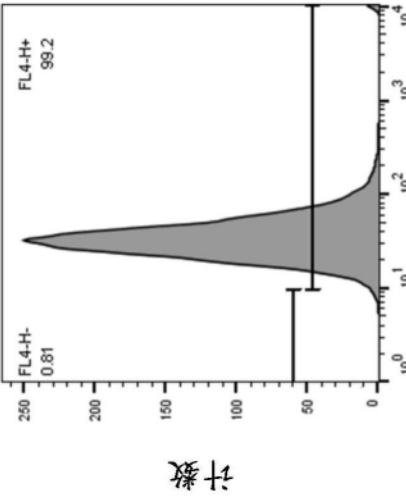
图5

EK01噬菌体不结合HCC38 TNBC细胞系

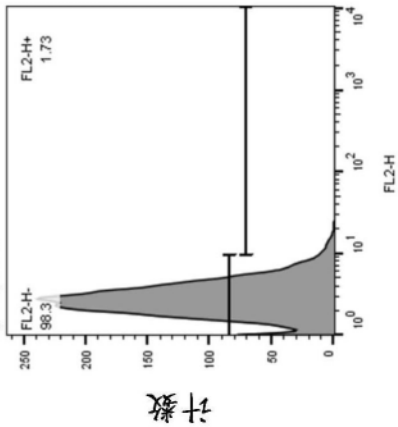
未染色



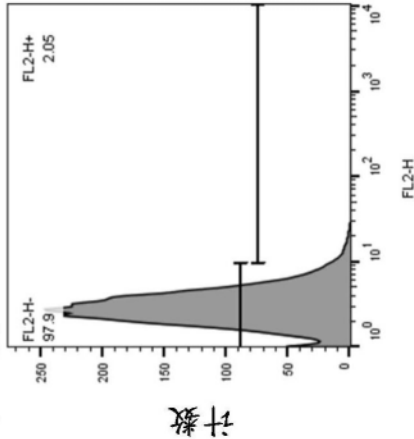
CPE



未染色



仅二抗



EK01噬菌体 (100 ul反应中1 E 13噬菌体)

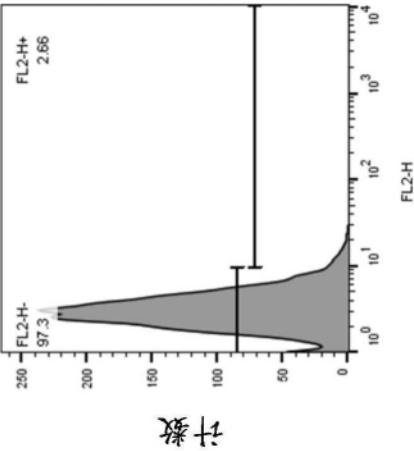


图6

EK01微型抗体（scFv-Fc）蛋白A纯化

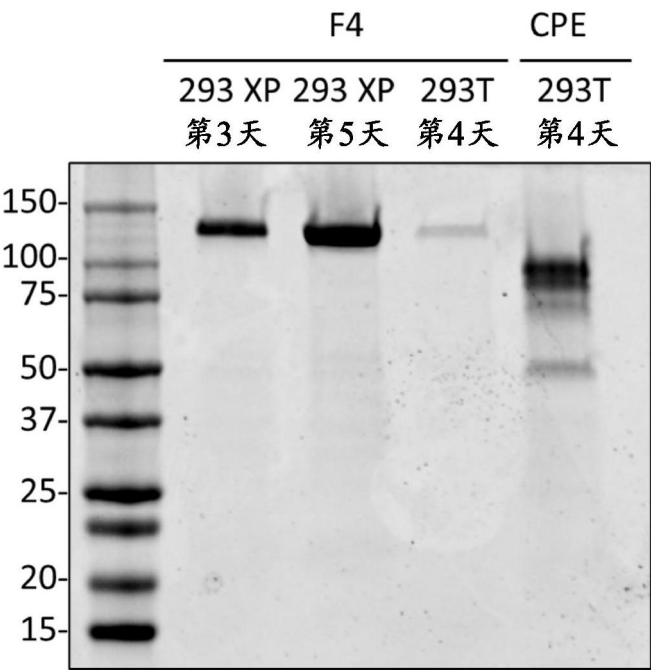


图7

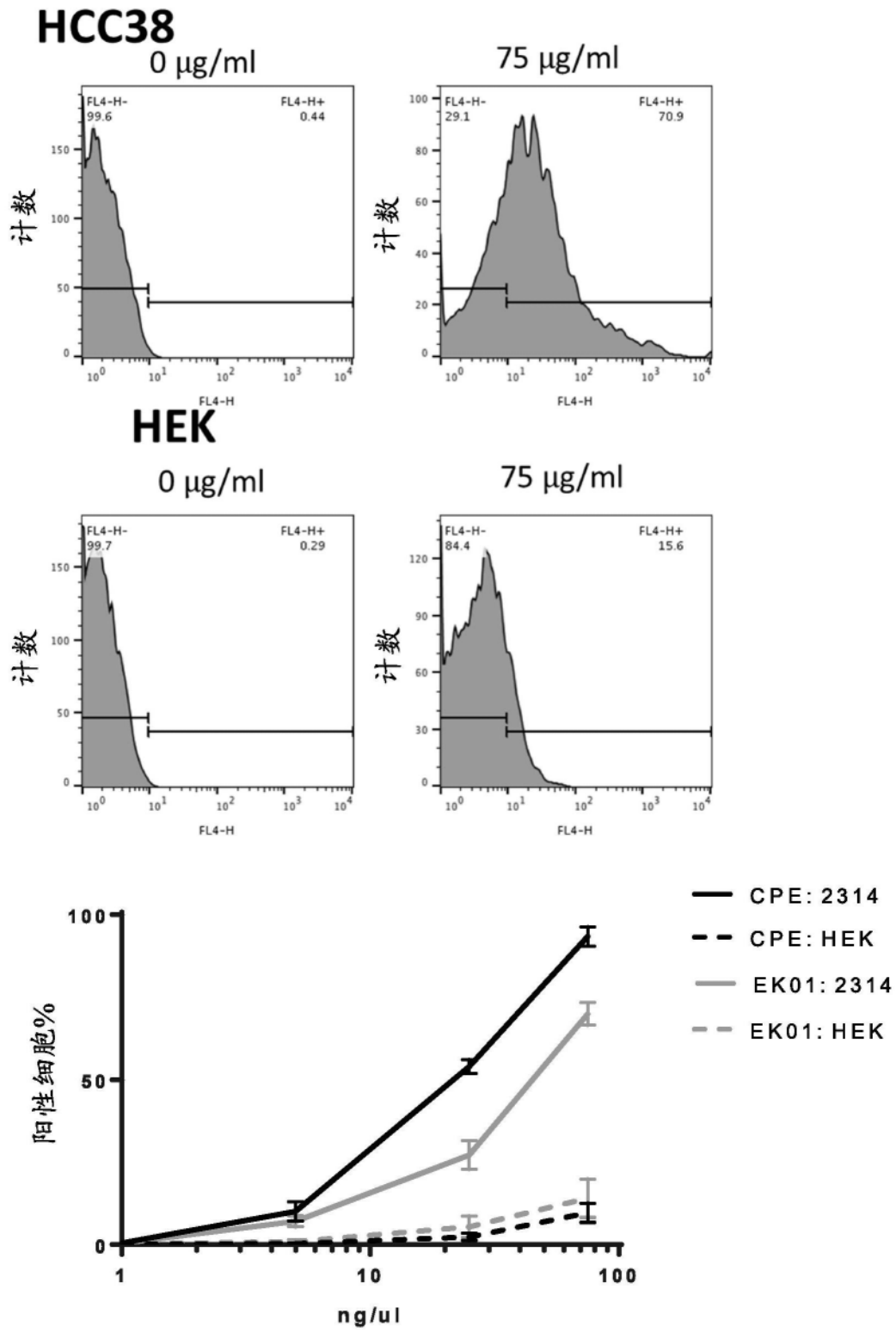


图8

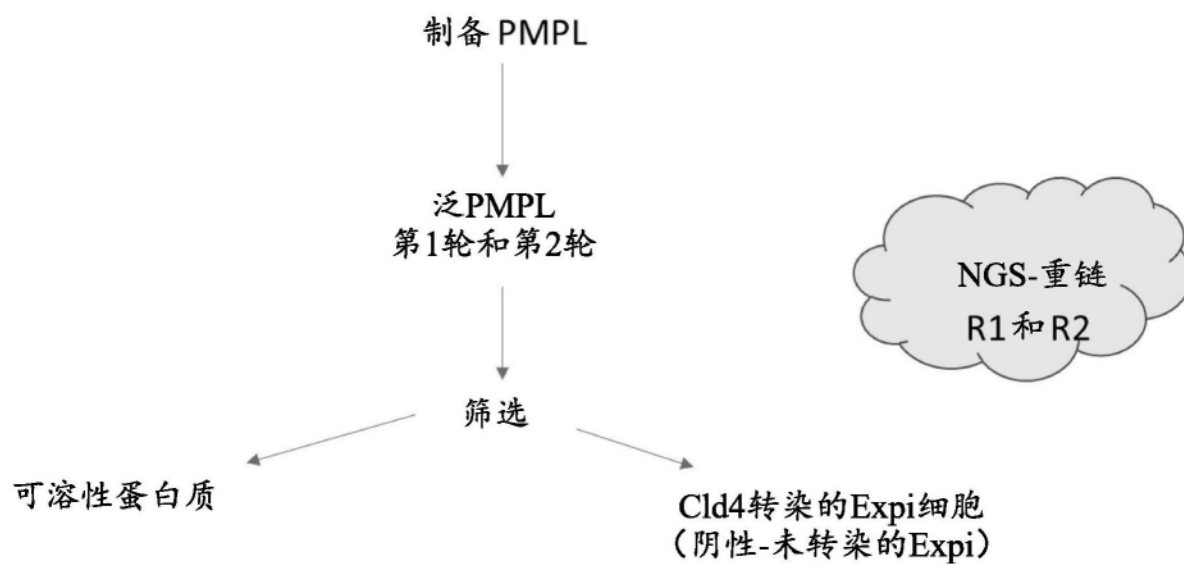


图9

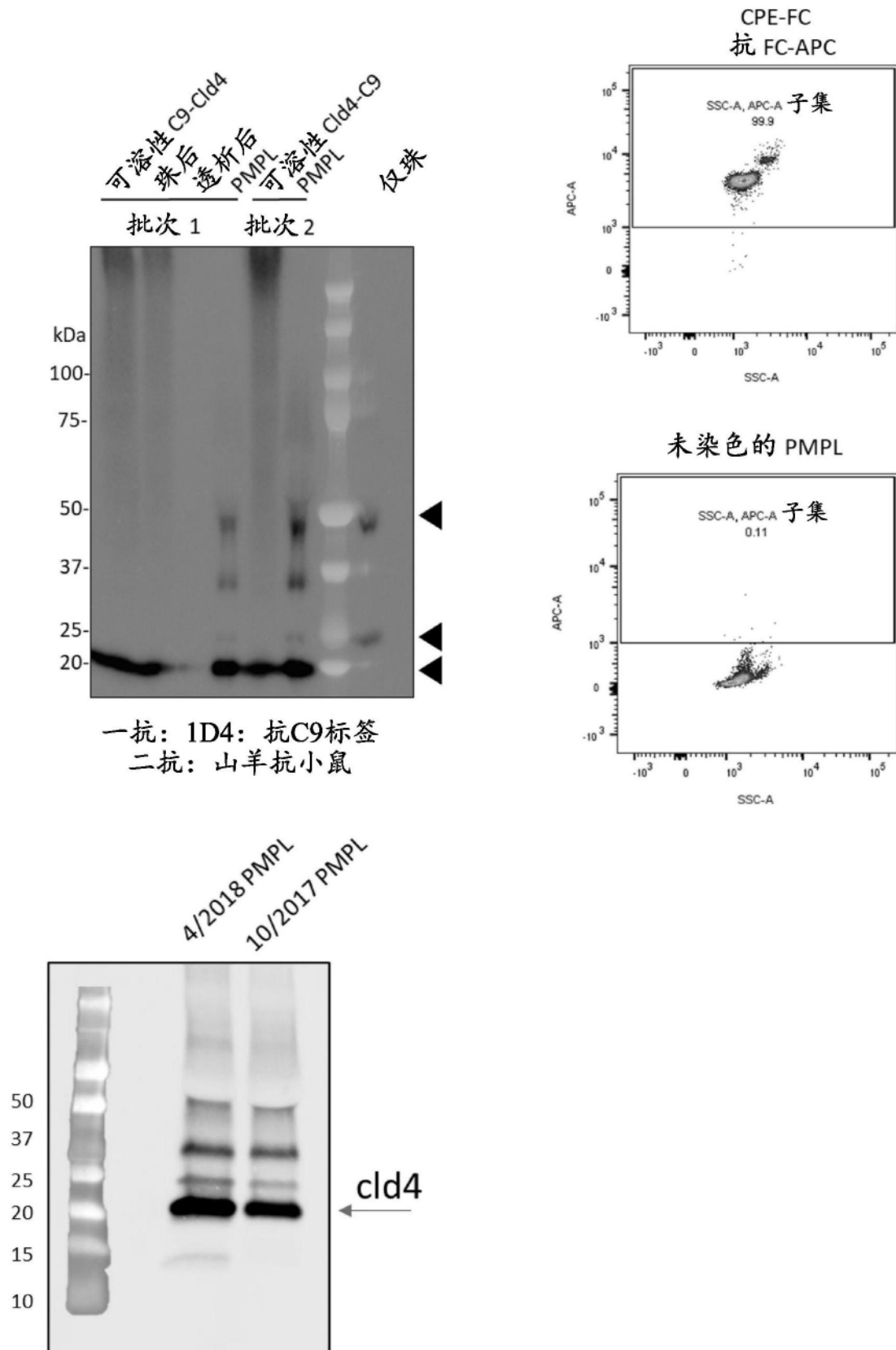


图10

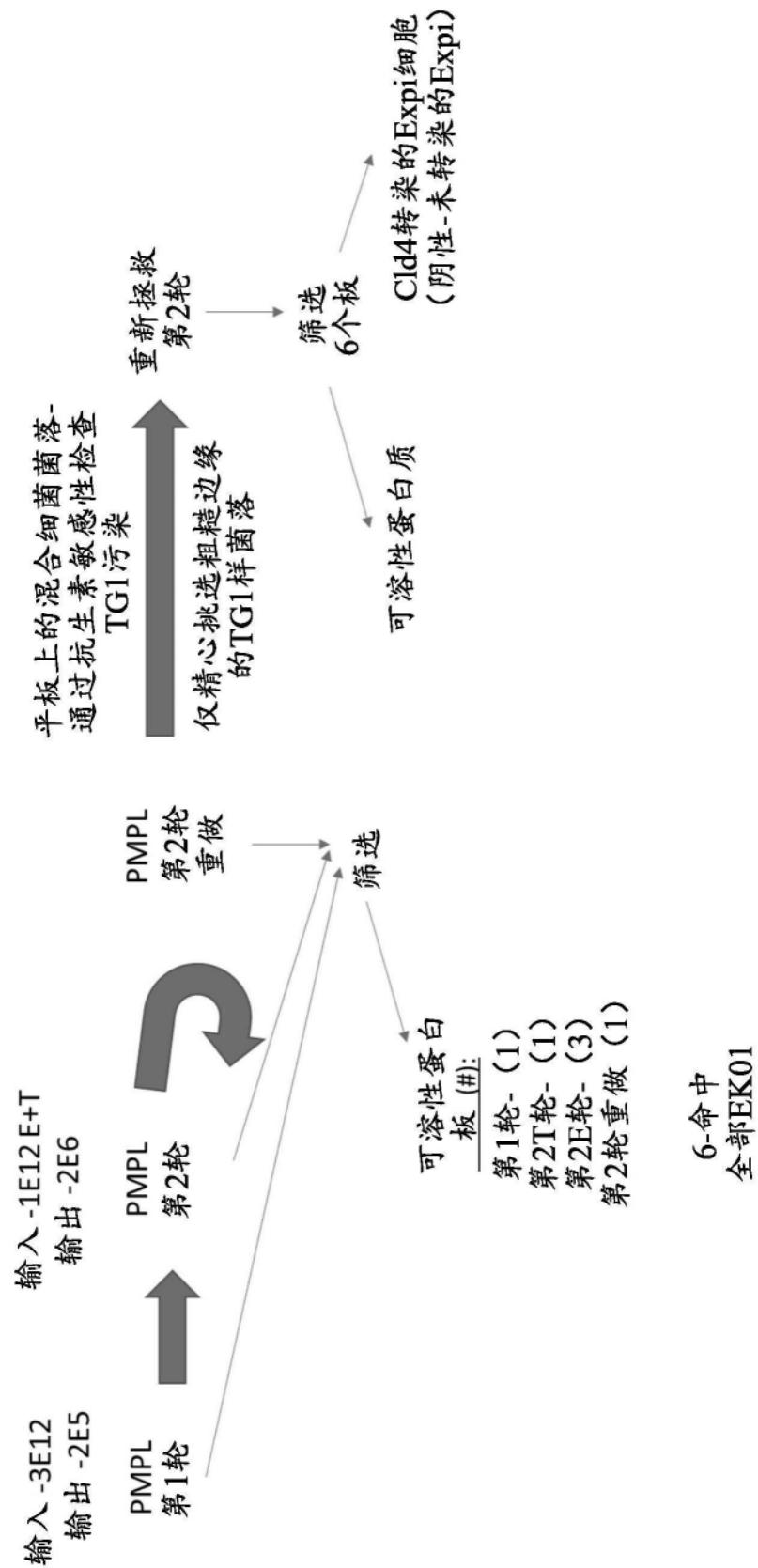


图11

来自第2轮重新拯救的6个板

可溶性筛选

		OD	
1	P1_A7	2.36	EK01
2	P1_G1	0.23	无价值 (JUNK)
3	P2_B8	3.6	EK01
4	P2_C11	3.2	EK01
5	P2_D1	0.278	无序列 (NO SEQ)
6	P3_A12	0.353	独特, 终止
7	P3_B11	0.42	独特-批次终止
8	P3_B12	0.442	EK01
9	P3_F12	2.02	EK01
10	P4_C3	2.75	EK01
11	P5_B9	2.24	EK01
12	P5_D5	3.59	EK01
13	P5_E11	0.989	独特-批次终止
14	P5_F11	2.6	EK01
15 (H)	P6_A4	0.25	独特, 未终止
16	P6_B3	0.5	独特-批次终止
17	P6_C10	0.2	无序列 (NO SEQ)
18 (J)	P6_D8	0.373	独特, 未终止
19	P6_E5	0.22	无序列 (NO SEQ)
20	P6_F2	0.654	无序列 (NO SEQ)

		OD (差异非特异性细胞)	
1	P1_F4		无序列 (NO SEQ)
2	P1_G3	0.33	终止 (STOPS), 独特 (UNIQUE)
3	P1_G5		无序列 (NO SEQ)
4	P1_B3		无价值不是SCFV
5	P1_D12	0.1	独特无myc
6 (A)	P2_G8	0.25	独特
7	P2_G12		无序列 (NO SEQ)
8 (B)	P3_A7	0.215	独特
9 (C)	P4_B4	0.39	独特
10 (D)	P4_B5	0.324	独特
11	P5_A3		无价值 (JUNK)
12	P5_A12		无序列 (NO SEQ)
13	P5_B9	0.21	EK01
14	P5_C5		无序列 (NO SEQ)
15	P5_C10		独特, 终止
16 (E)	P5_D5	0.21	独特
17	P5_D12		无序列 (NO SEQ)
18 (F)	P5_E1	0.32	独特
19 (G)	P5_G5	0.258	独特
20	P6_B6		无序列 (NO SEQ)
21	P6_F3	2.37	终止,
22	P6_F8		无序列 (NO SEQ)
23	P6_F10	0.26	独特, 终止

全细胞筛选

可溶性筛选:

9/20 EK01 = 45%

9/16序列- EK01 = 56%

无序列-4

无价值-1

Scfv批次终止-4

独特未终止-2

全细胞筛选:

无序列-8

无价值-2

独特终止-3

独特 (正向) - 7

图12

克隆(CLONE)	频率R1	频率R2	克隆(CLONE)	频率R1	频率R2
1	5317	5045	11	52	422
2	178	3778	12	50	292
3	148	1570	13	45	275
4	81	781	14	45	271
5	63	763	15	43	267
6	62	660	16	43	230
7	61	603	17	43	192
8	59	590	18	42	185
9	54	490	19	42	152
10	53	444	20	42	140

图13

克隆	最高频率R1	最高频率R2
A	5317	5045
B	2	275
C	1	46
D	4	55
E	6	6
F	5317	5045
G	1	1570
H	2	444
J	50	422
EK01	5	590

图14

噬菌体结合溶解的密封蛋白-4
以1.5 ng/ul包被ELISA

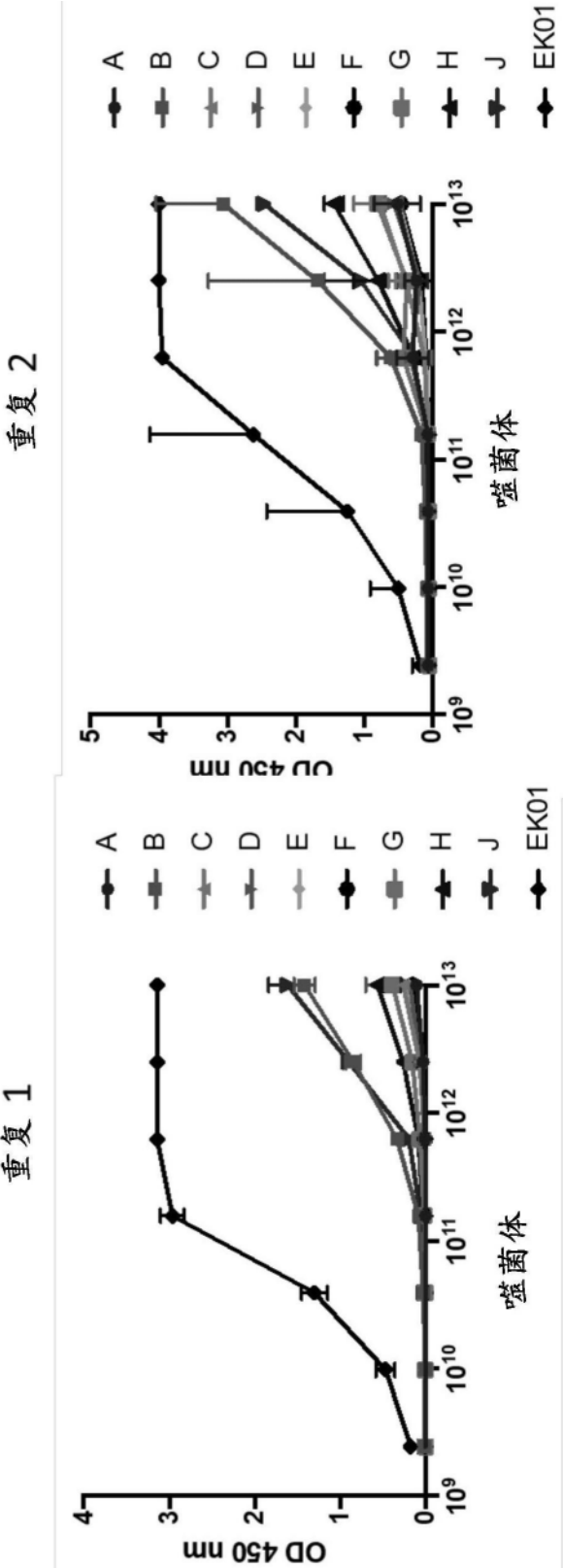


图15

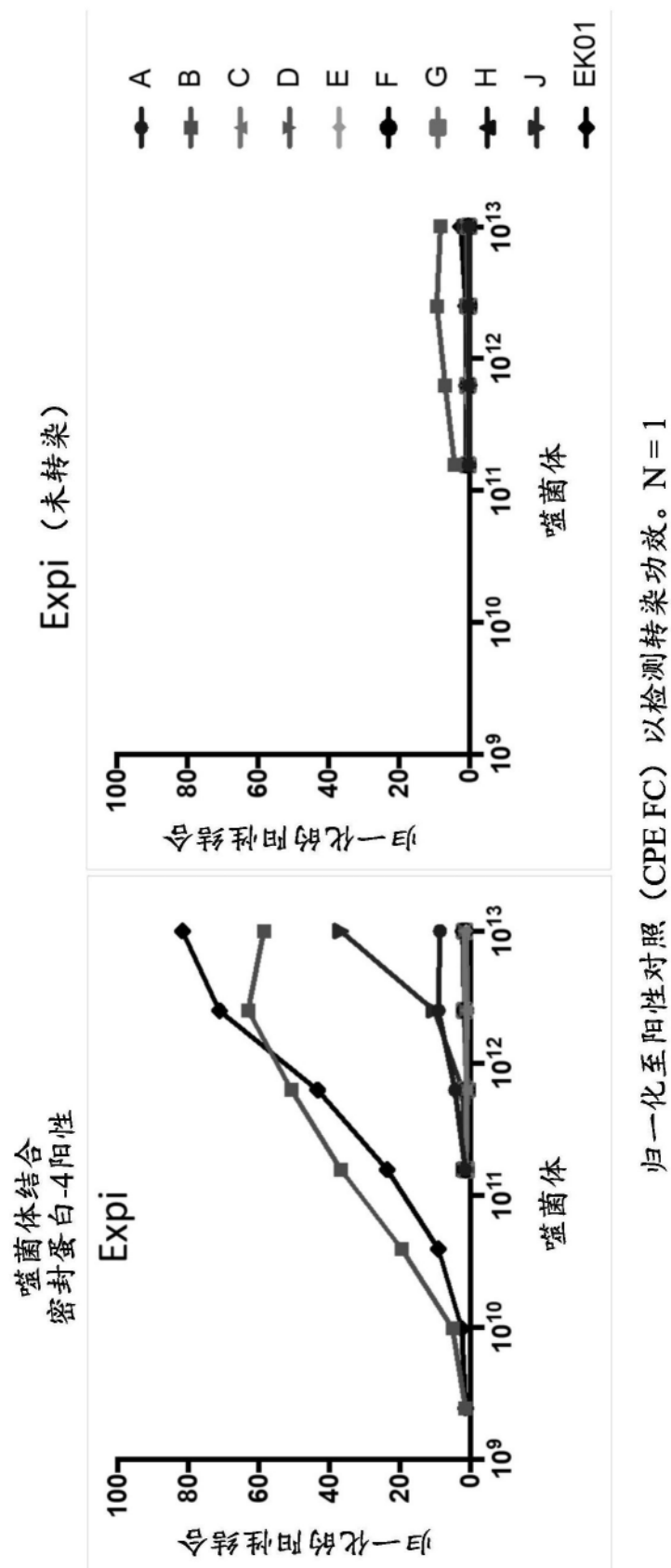


图16

噬菌体结合转导的expi细胞，重复2

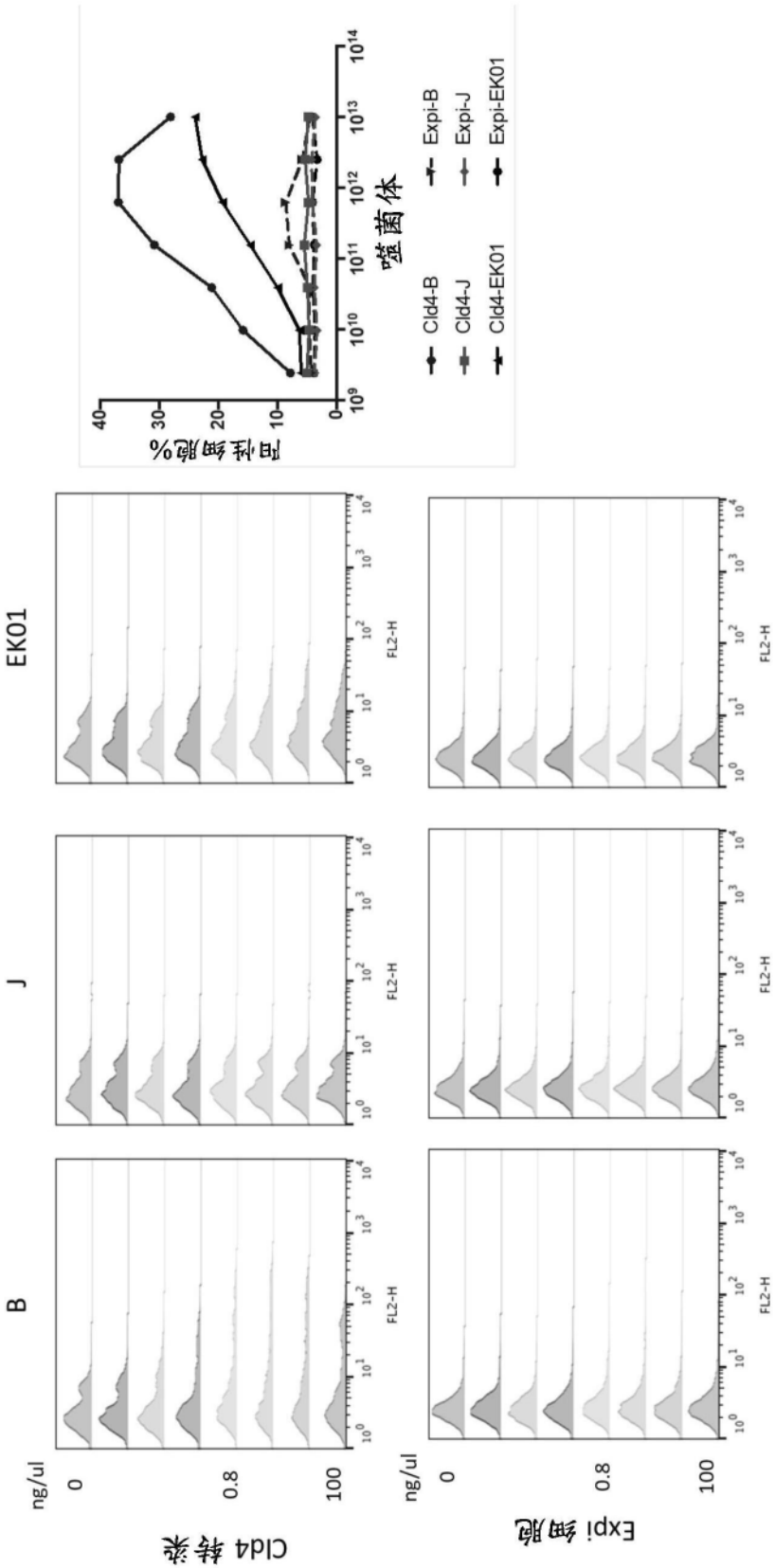


图17

针对可溶性cld4的微型抗体ELISA

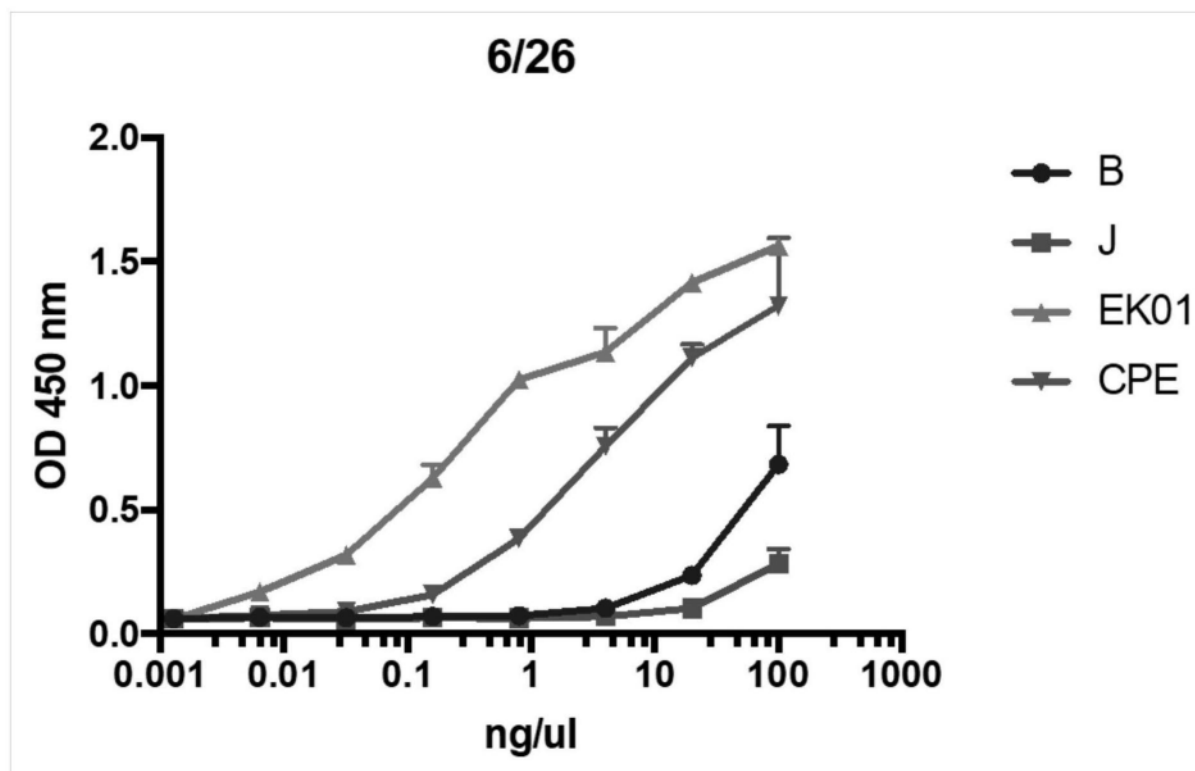


图18

微型抗体与密封蛋白-4转染的Expi细胞结合

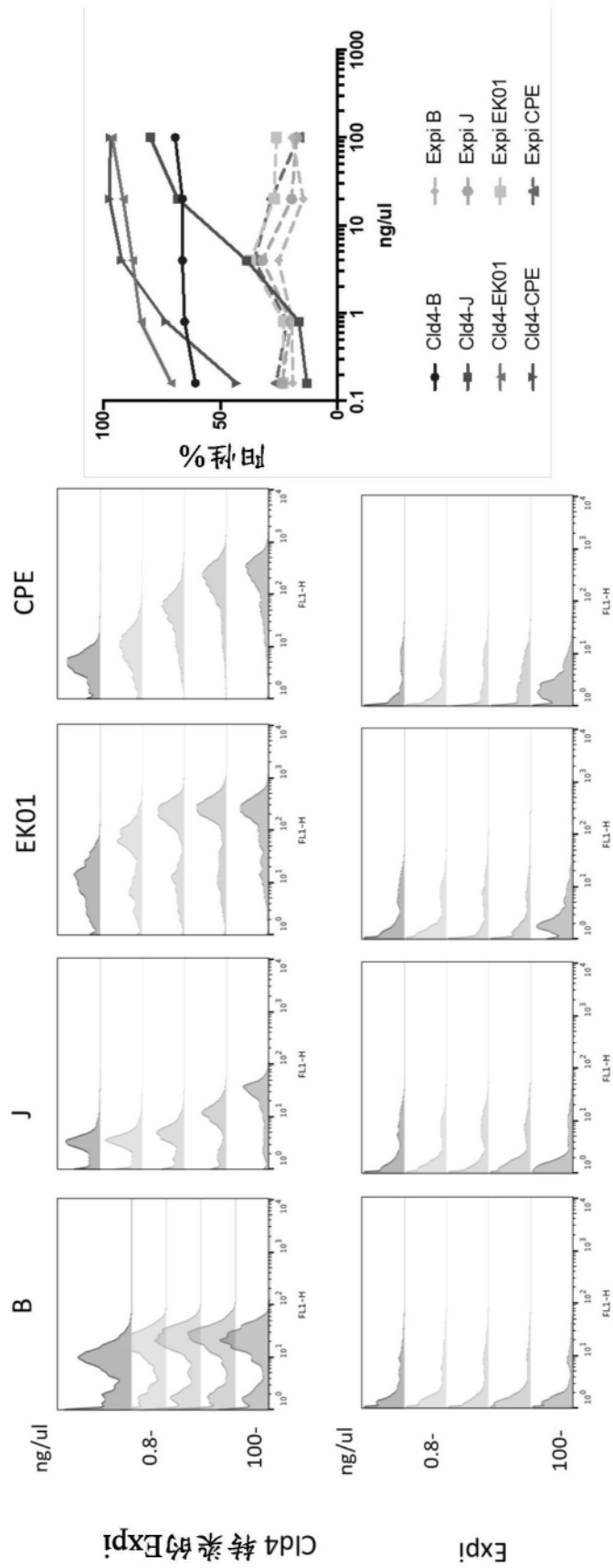


图19

微型抗体与密封蛋白-4转染的Exip细胞结合

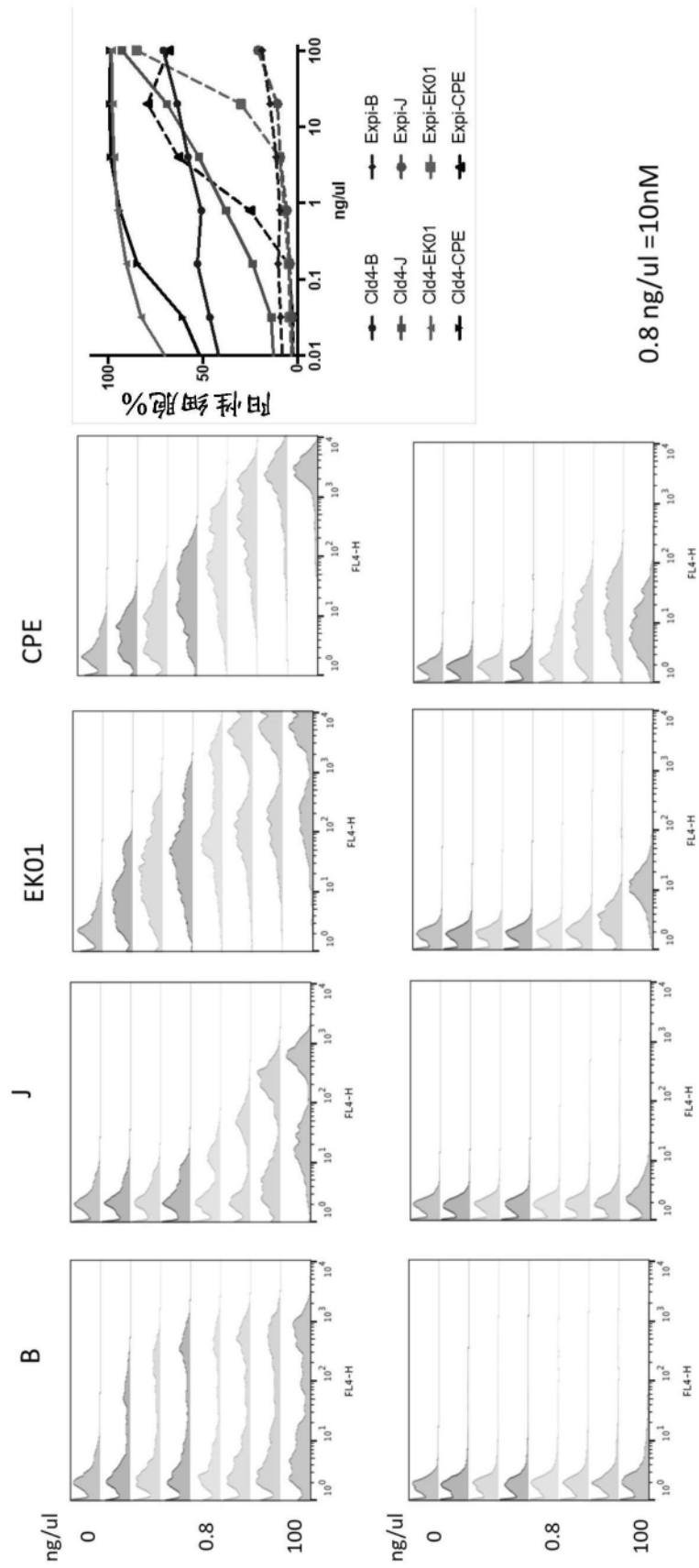


图20

密封蛋白-4全细胞淘选途径

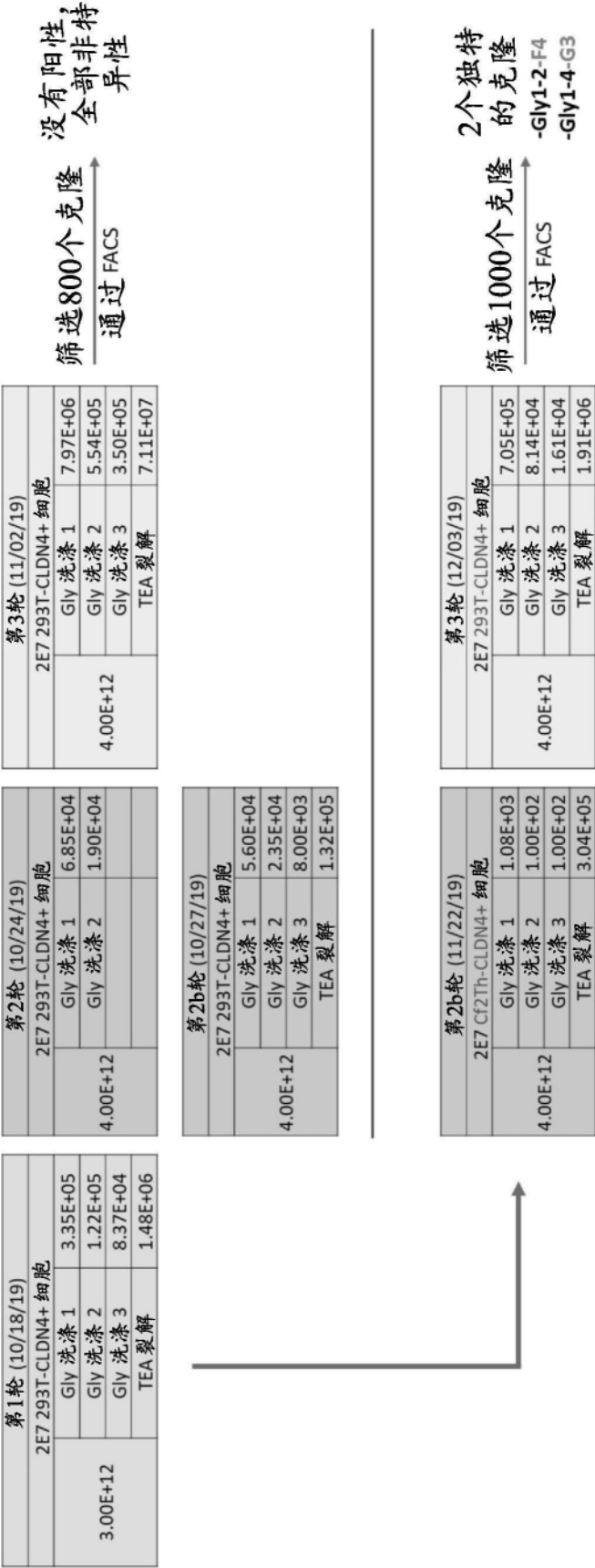
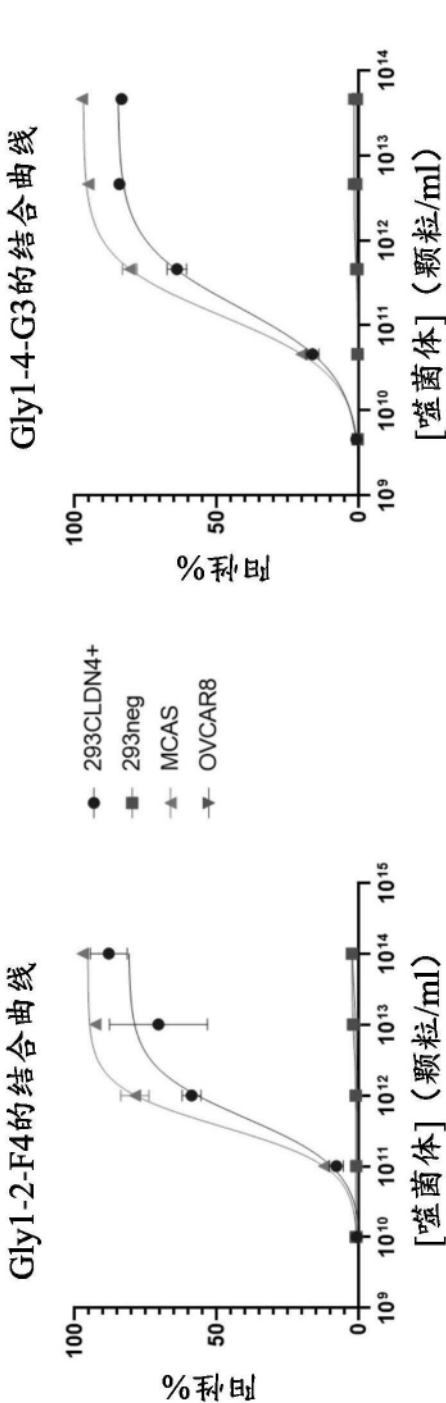


图21

纯化的噬菌体结合曲线 (CLDN-4)



Gly1-2-F4: IGHV3-23*04/IGLV6-57*01

Gly1-4-G3: IGHV3-30*07/IGLV1-44*01

图22

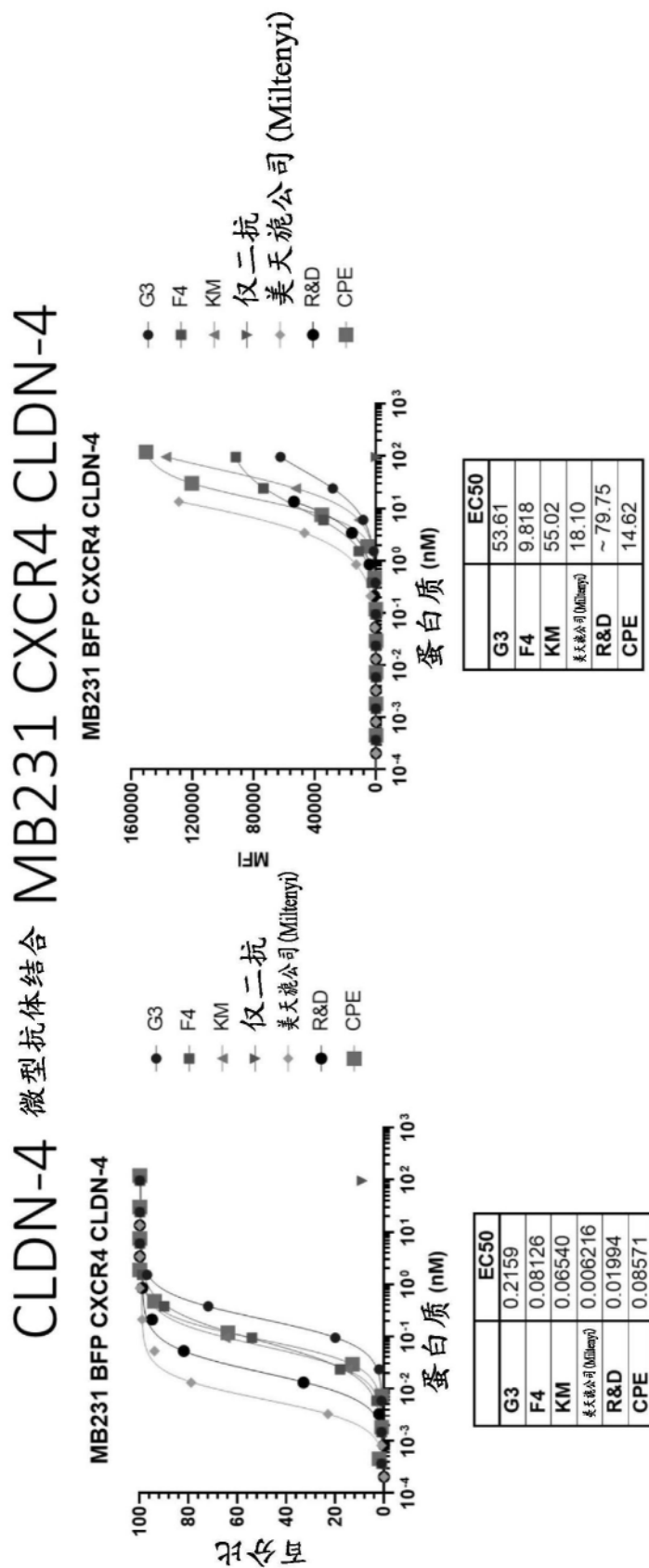


图23

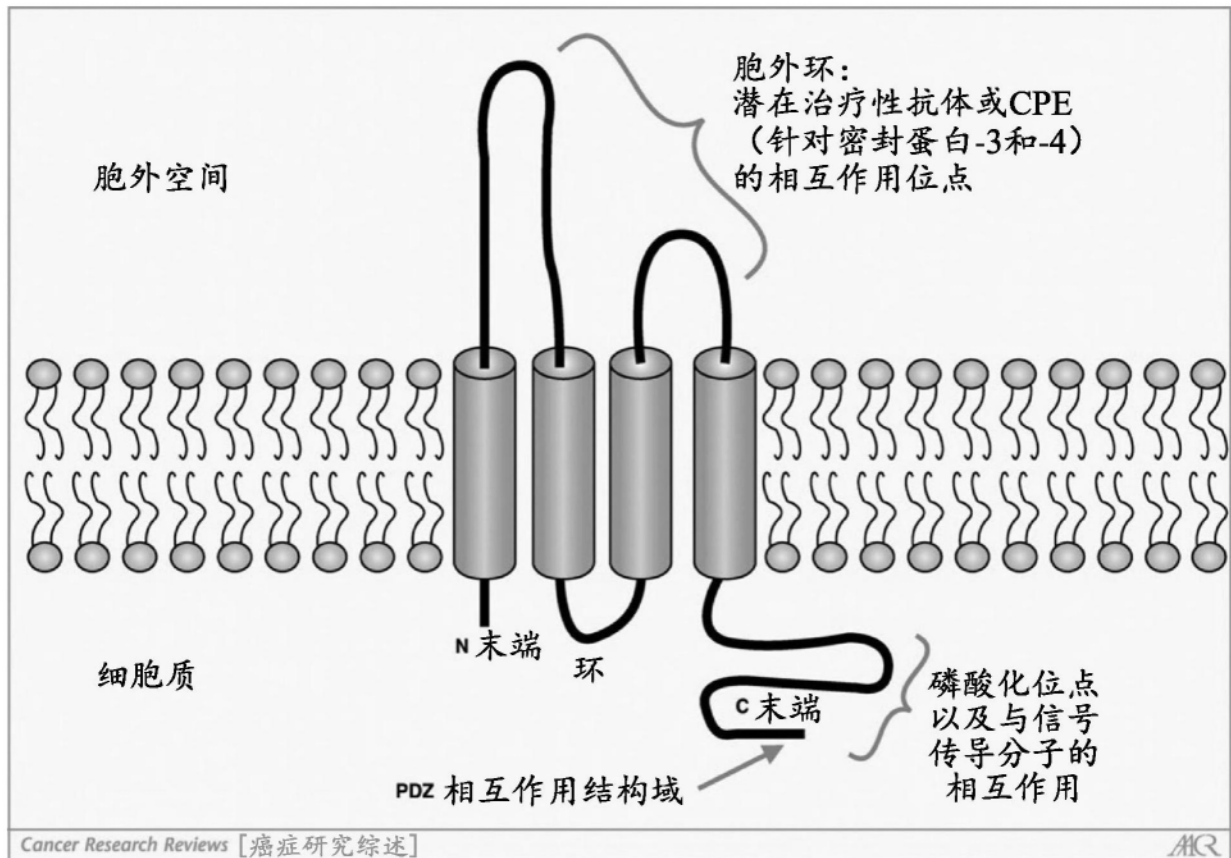


图24

人CLDN-3与CLDN-4胞外结构域

CLDN-3	SMGLEITGTALAVLGLGTLIVCCALH	MWRVSAFIGSNII	TSQNIWEG	WMNCVVQSTGQM	
	SMGL++ G	ALAVLGWL	++CCALH	MWRV+AFIGSNI+TSQ	IWEGWMNCVVQSTGQM
CLDN-4	SMGLQVMGIALAVLGLAVMLCCALH	MWRVTAFIGSNI	IVTSQTIWEG	WMNCVVQSTGQM	
					同源性 (Homol) 52/53
CLDN-3	QCKVYDSL	LALPQDLQAAR	ALIVVAI	LLAAFG	LLVALVGAQCTNCVQDDTAKAKITIVAG
	QCKVYDSL	LALPQDLQAAR	AL++++I	++AA	G+L+++VG +CTNC++D++AKAK IVAG
CLDN-4	QCKVYDSL	LALPQDLQAAR	ALVIISI	IIVAAL	GVLLSVVGGKCTNCLEDESAKAKTMIVAG
					同一性 (Ident) 50/53
CLDN-3	VLFLLAALLTLVPVSW	SANTII	IRDFYNP	VVPEAQK	REMGAGLYVGWAAALQLLGGALLC
	V+FLLA L+ +VPVSW	+A+ II+DFYNP	+V	QKREMG	ALYVGWAA+ L LLGG LLC
CLDN-4	VVFLLAGLMVIVPVSW	TAHNII	IQDFYNP	LVASGQK	REMGASLYVGWAAASGLLLGGGLLC
					同源性 (Homol) 15/19
CLDN-3	CSCPPPREKK				同一性 (Ident) 11/19
	C+CPPR K				
CLDN-4	CNCPPR	TDK			

图25

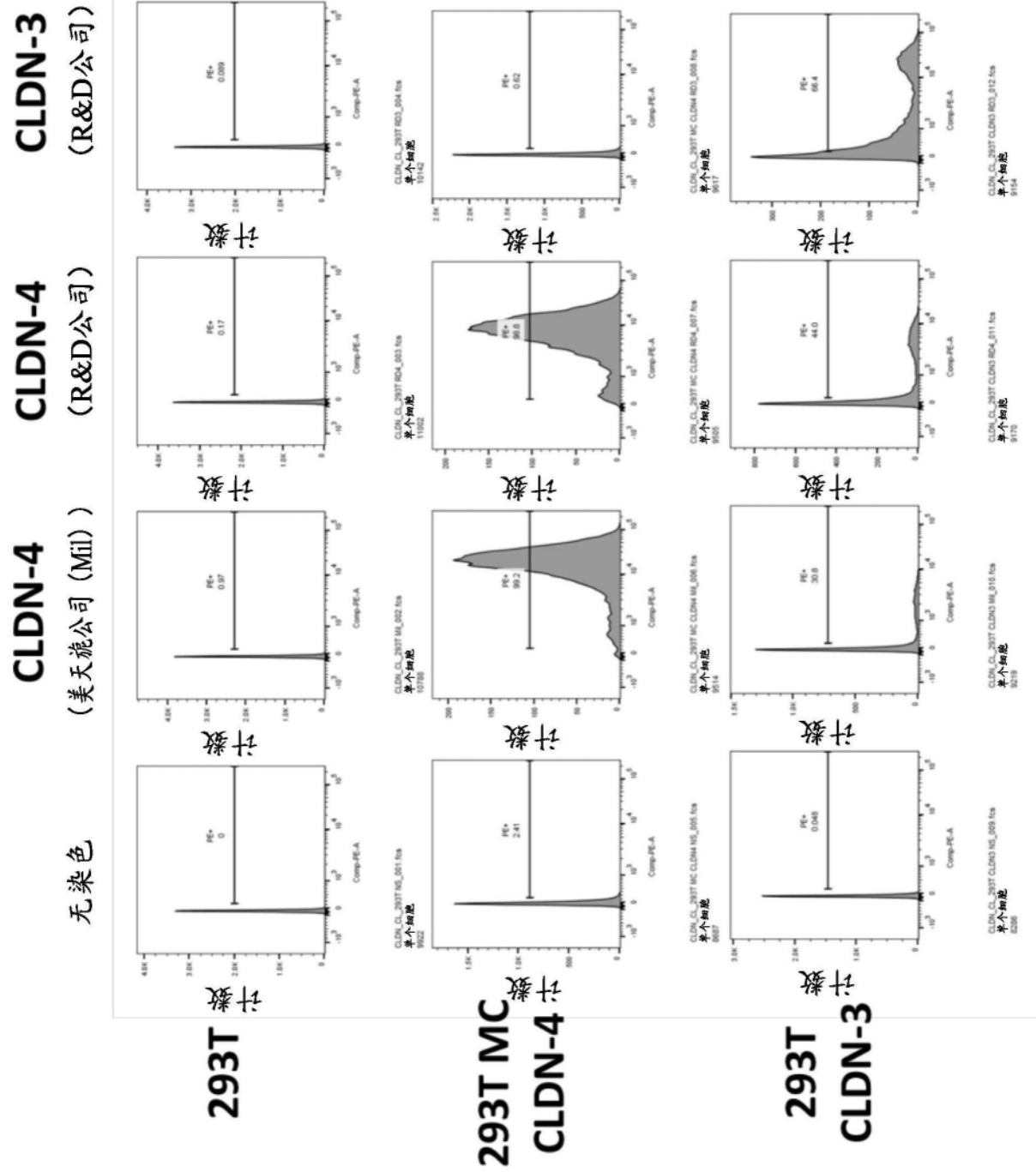


图26

百分比				
	抗体			
细胞系	无染色	aCLDN-4 (美天旎公司)	aCLDN-4 (R&D)	aCLDN-3 (R&D)
293T	0	1	0	0
293T MC CLDN-4	2	99	99	1
293T CLDN-3	0	31	44	66
MB231 BFP	0	30	1	0
MB231 BFP CLDN-4	0	97	94	0

平均FI				
	抗体			
细胞系	无染色	aCLDN-4 (美天旎公司)	aCLDN-4 (R&D)	aCLDN-3 (R&D)
293T	22	25	23	24
293T MC CLDN-4	80	20439	8829	64
293T CLDN-3	30	842	2027	6074
MB231 BFP	34	198	74	50
MB231 BFP CLDN-4	34	15337	5270	100

图27

CLDN-3与aCLDN-4微型抗体结合

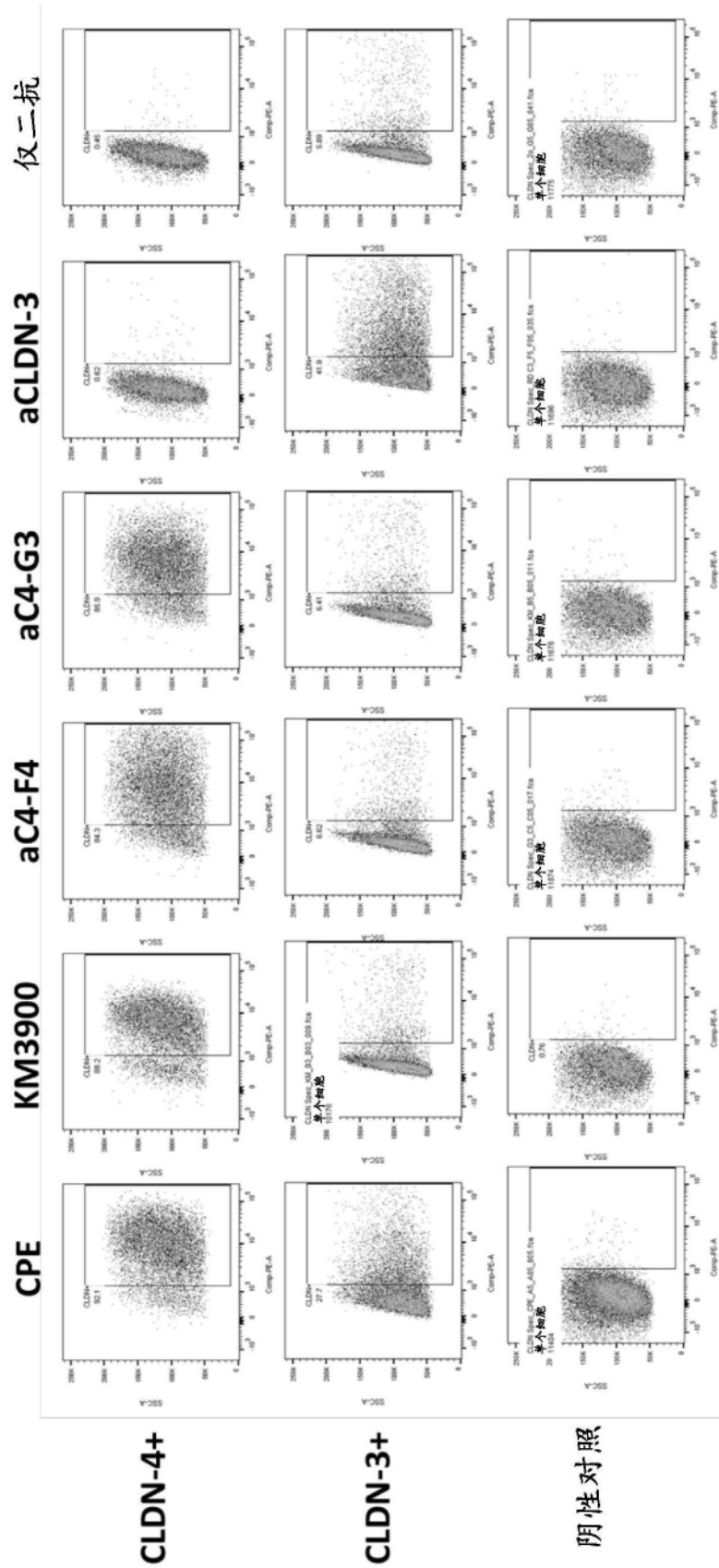


图28

密封蛋白抗体的特异性

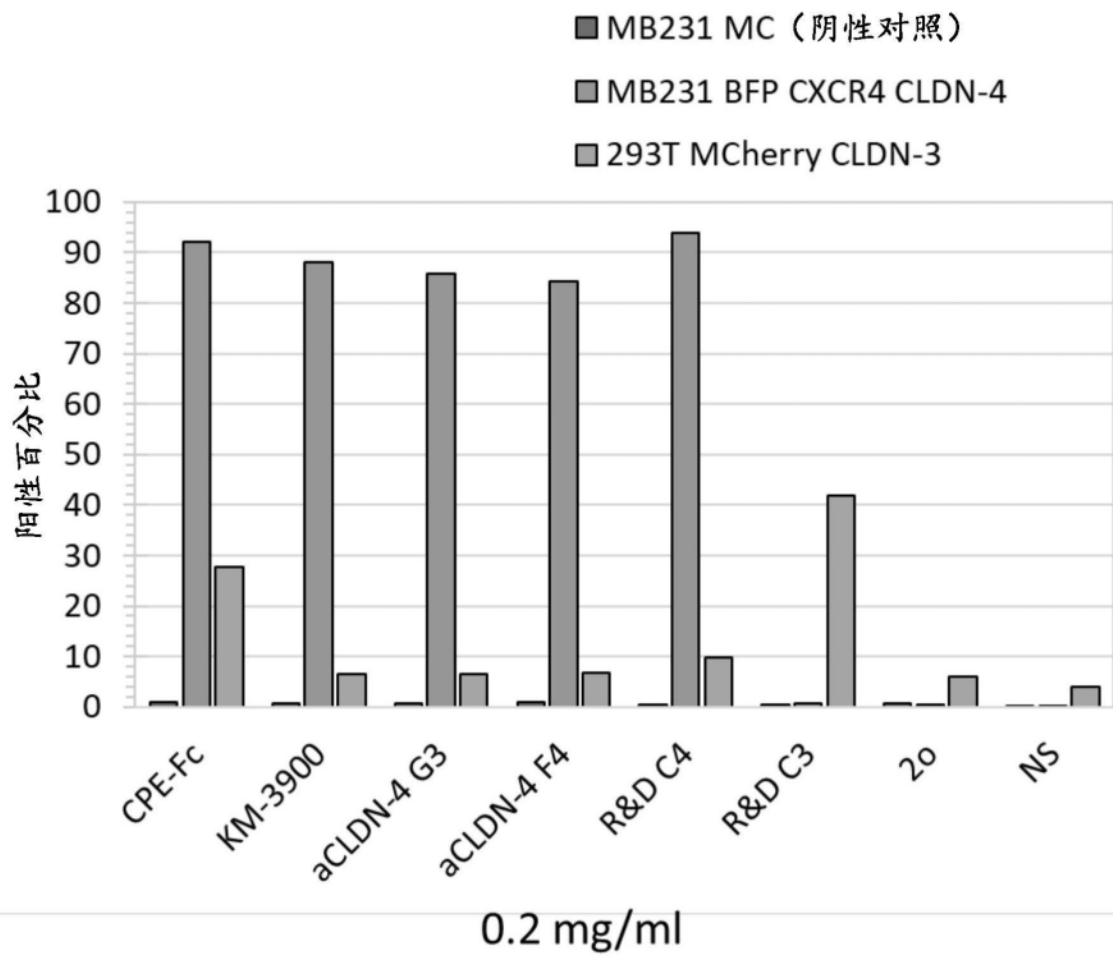


图29

用aCXCR4的MB231染色类似于KO

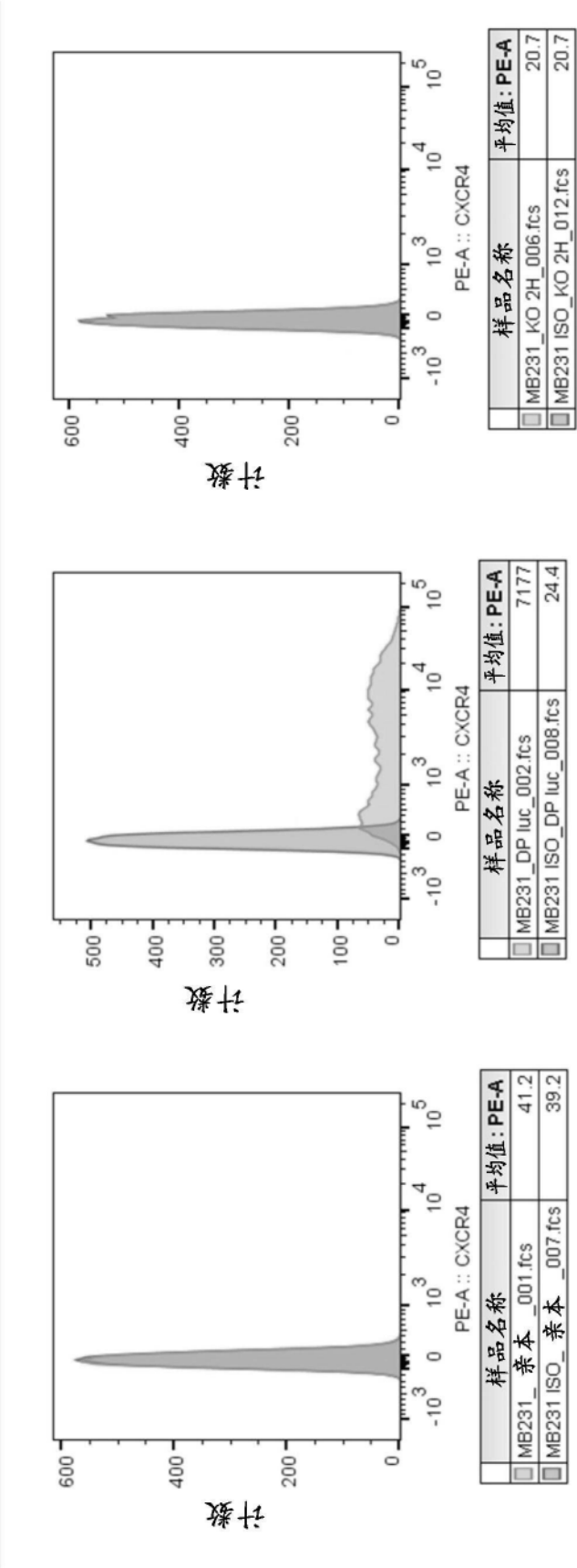


图30

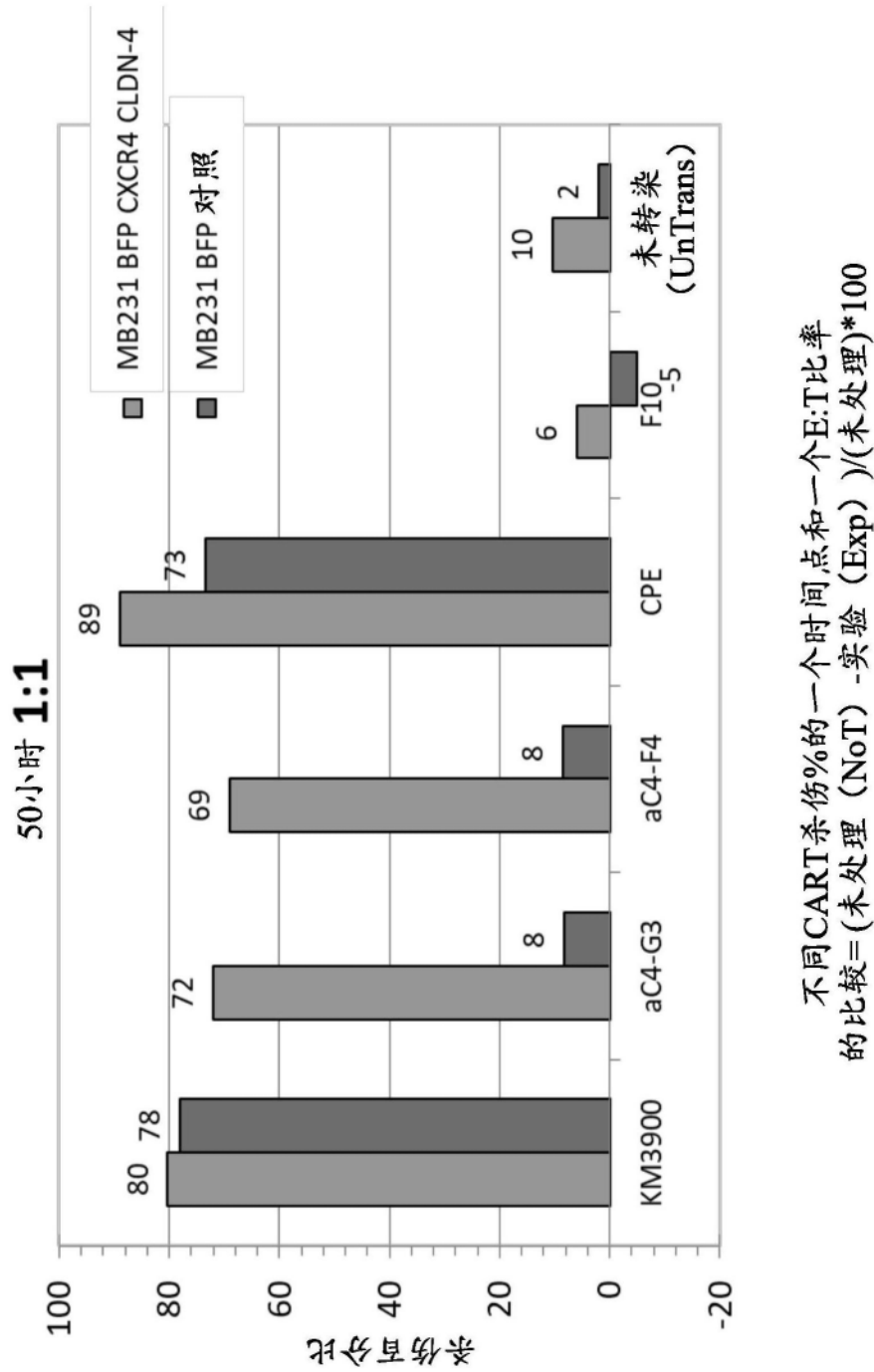


图31

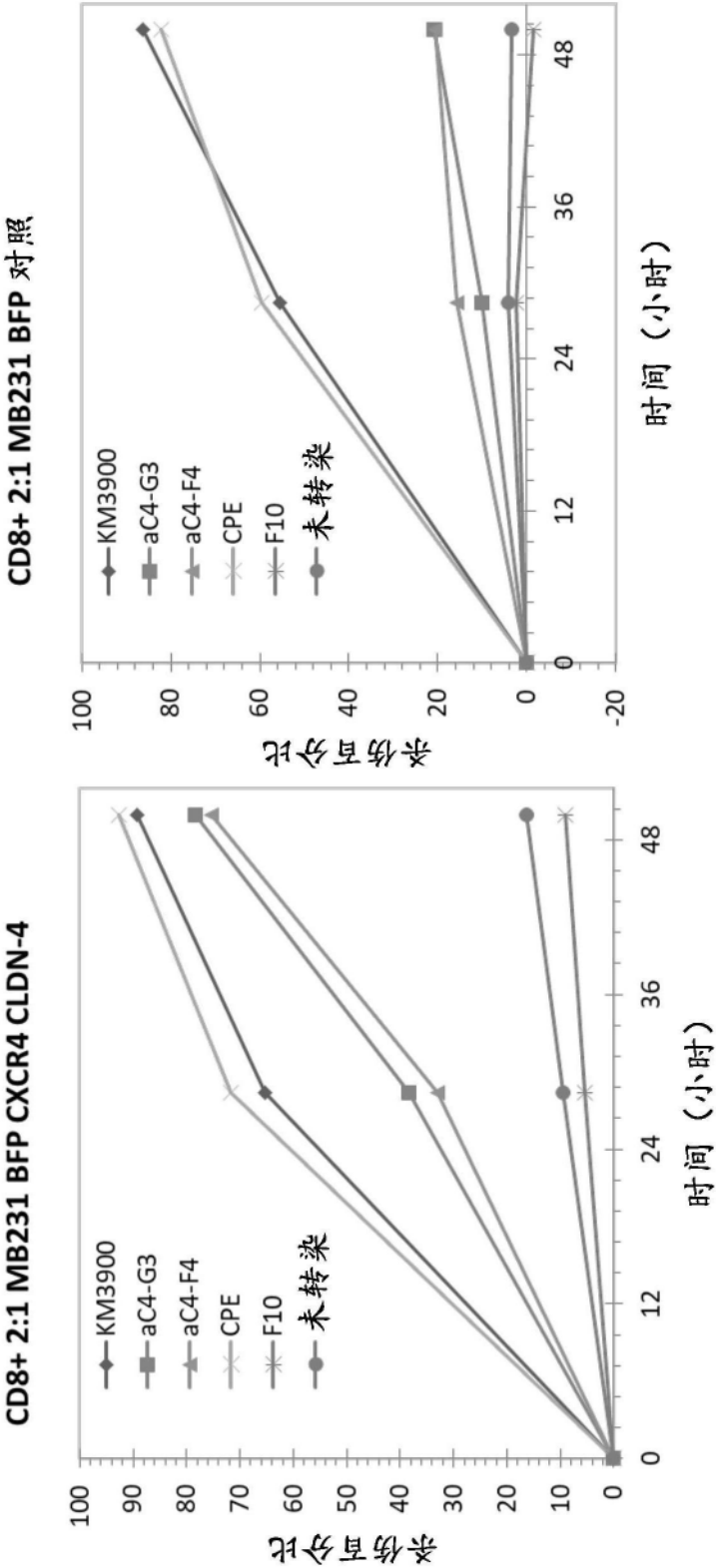


图32