



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119855829 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 18

(21) 申请号 202380065076.X
(22) 申请日 2023.08.15
(30) 优先权数据
63/398,082 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/US2023/030268 2023.08.15
(87) PCT国际申请的公布数据
W02024/039672 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 11713
专利代理师 刘小立 王建秀
(51) Int.Cl.
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

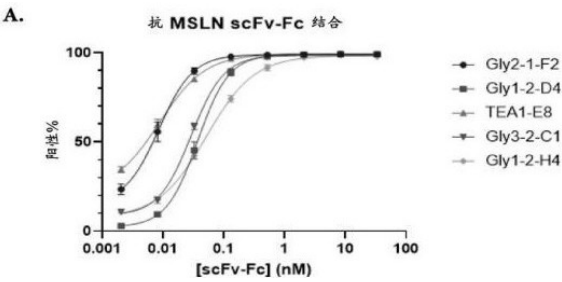
权利要求书13页 说明书91页 附图54页

(54) 发明名称

针对MSLN的抗体及其使用方法

(57) 摘要

本发明包含与间皮素 (MSLN) 蛋白结合的人抗体。这些抗体能用于治疗癌症。



1. 一种与间皮素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

HCDR1, 其包含GYTLTTNG (SEQ ID NO:31)、GGTFSSDT (SEQ ID NO:35)、GFTFDDYA (SEQ ID NO:38)、GFKFTDYY (SEQ ID NO:46)、或GYTFTHYA (SEQ ID NO:49),

HCDR2, 其包含VSPYNGHI (SEQ ID NO:32)、VNPYNGHI (SEQ ID NO:34)、INPNSGGT (SEQ ID NO:36)、ISWNSGSI (SEQ ID NO:39)、ISWNNGSI (SEQ ID NO:41)、ISWNSGNI (SEQ ID NO:43)、INTSSNHI (SEQ ID NO:47)、或IHAGNGNS (SEQ ID NO:50),

HCDR3, 其包含ARVNRANYYGMDV (SEQ ID NO:33)、ARESALGGSYPLSF (SEQ ID NO:37)、AKDPSSSWLAGAFDI (SEQ ID NO:40)、AKDPSTSWLAGAFDI (SEQ ID NO:42)、AKDAGSSGYFNAFDI (SEQ ID NO:44)、AKSPSSNWYPDAFDI (SEQ ID NO:45)、ARGASWGPL (SEQ ID NO:48)、或AREVGHGMDV (SEQ ID NO:51),

或其CDR的组合;

其中该轻链包含

LCDR1, 其包含QSLRSNGYNY (SEQ ID NO:52)、QSVSSSY (SEQ ID NO:59)、SLRRFY (SEQ ID NO:62)、SLIRFY (SEQ ID NO:65)、SLRAYY (SEQ ID NO:67)、SLRNY (SEQ ID NO:70)、NIGSKS (SEQ ID NO:73)、或SSNIGAGYD (SEQ ID NO:76),

LCDR2, 其包含LGS (SEQ ID NO:53)、GAS (SEQ ID NO:60)、GKN (SEQ ID NO:63)、AKN (SEQ ID NO:71)、DDS (SEQ ID NO:74)、或GNT (SEQ ID NO:77),

LCDR3, 其包含MQSSTNSAH (SEQ ID NO:54)、MQALQTPLT (SEQ ID NO:55)、MQALQTPL (SEQ ID NO:56)、MQALQTPLT (SEQ ID NO:57)、HASSTNSAH (SEQ ID NO:58)、LQDDSYPLT (SEQ ID NO:61)、NSRSDGNHVF (SEQ ID NO:64)、NSQDRDGNHVF (SEQ ID NO:66)、NSRDSSGNHLGV (SEQ ID NO:68)、NSRDSSGNHLGS (SEQ ID NO:69)、SSRDSSDNHVV (SEQ ID NO:72)、QSADYNWLCD (SEQ ID NO:75)、或QSYDSSLGYSYV (SEQ ID NO:78),

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、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27和29, 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、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28和30, 或与其至少90%同一的序列。

3. 一种抗体, 其如本文所述。

4. 一种与间皮素结合的治疗性抗体, 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间皮素的互补决定手段。

5. 如权利要求4所述的抗体, 其中该恒定区是IgG1或IgG4。

6. 一种与间皮素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:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3; 或

(b) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH

(l) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VL CDR3;

(m) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VL CDR3;

(n) 包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL CDR3;或

(o) 包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL CDR3。

7. 一种与人间皮素蛋白结合的分离的scFv抗体, 该分离的scFv抗体包含:

(a) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3;或

(b) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3;或

(c) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的VL CDR3;或

(d) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的VL CDR3;或

(e) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的VL CDR3;或

(f) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL

CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的VL CDR3;或

(g) 包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的VL CDR3;或

(h) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3;或

(i) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3;

(j) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的VL CDR3;

(k) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的VL CDR3;

(l) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VL CDR3;

(m) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VL CDR3;

(n) 包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL CDR3;或

(o) 包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL CDR3。

8. 一种与人间皮素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以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27和29,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、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28和30,或与其至少90%同一的序列。

9.一种与人间皮素蛋白结合的分离的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以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27和29,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、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28和30,或与其至少90%同一的序列。

10.一种与间皮素结合的F(ab),该F(ab)包含:

(a) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3;或

(b) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3;或

(c) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的VL CDR3;或

(d) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的VL CDR3;或

(e) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的VL CDR3;或

(f) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的VL CDR3;或

(g) 包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的VL CDR3;或

(h) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH

CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3;或

(i) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3;

(j) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的VL CDR3;

(k) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的VL CDR3;

(l) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VL CDR3;

(m) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VL CDR3;

(n) 包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL CDR3;或

(o) 包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL CDR3。

11. 一种与间皮素结合的VhH, 该VhH包含:

(a) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3;或

(b) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3;或

(c) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3;或

(d) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH

CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3;或

(e) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3;或

(f) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3;或

(g) 包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VH CDR3;或

(h) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3;或

(i) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3;

(j) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的VH CDR3;

(k) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3;

(l) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3;

(m) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR3;

(n) 包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH CDR3;或

(o) 包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:51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. 一种与人间皮素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:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3;或

(b) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的

VL CDR3;或

(c) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的VL CDR3;或

(d) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的VL CDR3;或

(e) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的VL CDR3;或

(f) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的VL CDR3;或

(g) 包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的VL CDR3;或

(h) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3;或

(i) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3;

(j) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的VL CDR3;

(k) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的VL CDR3;

(l) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL

CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VL CDR3;

(m) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VL CDR3;

(n) 包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL CDR3;或

(o) 包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL CDR3。

17. 一种与人间皮素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、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27和29,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、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28和30,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。

20. 如权利要求19所述的药物组合物,其包含:

(a) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3;或

(b) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3;或

(c) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的VL CDR3;或

(d) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的VL CDR3;或

(e) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的VL CDR3;或

(f) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的VL CDR3;或

(g) 包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的VL CDR3;或

(h) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3;或

(i) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3;

(j) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的VL CDR3;

(k) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的VL CDR3;

(l) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VL CDR3;

(m) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VL CDR3;

(n) 包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的

VL CDR3;或

(o) 包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL CDR3。

21. 如权利要求19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、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:29,并且该LCVR的氨基酸序列是SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:30。

22. 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。

23. 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。

24. 一种核酸,其编码如权利要求16-17中任一项所述的BiTE。

25. 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,其中该抗原包含间皮素,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:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3;或

(b) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3;或

(c) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的VL CDR3;或

(d) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的VL CDR3;或

(e) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的VL CDR3;或

(f) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH

CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的VL CDR3;或

(g) 包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的VL CDR3;或

(h) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3;或

(i) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3;

(j) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的VL CDR3;

(k) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的VL CDR3;

(l) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VL CDR3;

(m) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VL CDR3;

(n) 包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL CDR3;或

(o) 包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL CDR3。

26. 如权利要求25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、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27和29,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、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28和30,或与其至少90%同一的序列。

27. 如权利要求25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。

28. 如权利要求25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。

29. 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19所述的药物组合物。

30. 一种在受试者中抑制间皮素的方法,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19所述的药物组合物。

31. 如权利要求30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、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27和29,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、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28和30,或与其至少90%同一的序列。

32. (a) 如权利要求1-11中任一项所述的抗体或 (b) 如权利要求19所述的药物组合物用于治疗癌症的用途。

33. 如权利要求1-11中任一项所述的抗体或 (b) 如权利要求19所述的药物组合物,用于在疗法中使用。

34. 如权利要求1-11中任一项所述的抗体或 (b) 如权利要求19所述的药物组合物,用于在治疗癌症中使用。

针对MSLN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63/398,082的优先权,该临时专利申请的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特此通过引用以其整体并入。这些出版物的披露内容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将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,并且将其特此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] 本发明包含针对间皮素 (MSLN) 的抗体及其使用方法。

背景

[0006] 间皮素 (MSLN) 是通常在间皮细胞中表达的蛋白。MSLN能以两种形式存在,一种是通过GPI接头与细胞膜结合,另一种是可溶/脱落形式。

发明内容

[0007] 本发明的方面涉及包含重链、轻链或其组合的与间皮素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。在实施例中,重链包含含有GYTLTTNG (SEQ ID NO:31)、GGTFSSDT (SEQ ID NO:35)、GFTFDDYA (SEQ ID NO:38)、GFKFTDYY (SEQ ID NO:46) 或GYTFTHYA (SEQ ID NO:49) 的CDR1,含有VSPYNGHI (SEQ ID NO:32)、VNPYNGHI (SEQ ID NO:34)、INPNSGGT (SEQ ID NO:36)、ISWNSGSI (SEQ ID NO:39)、ISWNNGSI (SEQ ID NO:41)、ISWNSGNI (SEQ ID NO:43)、INTSSNHI (SEQ ID NO:47)、或IHAGNGNS (SEQ ID NO:50) 的CDR2,含有ARVNRANYYGMDV (SEQ ID NO:33)、ARESALGGSYPLSF (SEQ ID NO:37)、AKDPSSSWLAGAFDI (SEQ ID NO:40)、AKDPSTSWLAGAFDI (SEQ ID NO:42)、AKDAGSSGYFNAFDI (SEQ ID NO:44)、AKSPSSNWYPDAFDI (SEQ ID NO:45)、ARGASWGPL (SEQ ID NO:48) 或AREVGHGMDV (SEQ ID NO:51) 的CDR3,或其CDR的组合;其中轻链包含含有QSLLRNGYNY (SEQ ID NO:52)、QSVSSSY (SEQ ID NO:59)、SLRRFY (SEQ ID NO:62)、SLIRFY (SEQ ID NO:65)、SLRAYY (SEQ ID NO:67)、SLRNY (SEQ ID NO:70)、NIGSKS (SEQ ID NO:73) 或SSNIGAGYD (SEQ ID NO:76) 的CDR1,含有LGS (SEQ ID NO:53)、GAS (SEQ ID NO:60)、GKN (SEQ ID NO:63)、AKN (SEQ ID NO:71)、DDS (SEQ ID NO:74) 或GNT (SEQ ID NO:77) 的CDR2,含有MQSSTNSAH (SEQ ID NO:54)、MQALQTPLT (SEQ ID NO:55)、MQALQTPL (SEQ ID NO:56)、MQALQTPLT (SEQ ID NO:57)、HASSTNSAH (SEQ ID NO:58)、LQDDSYPLT (SEQ ID NO:61)、NSRDSGDNHVF (SEQ ID NO:64)、NSQDRDGNHVF (SEQ ID NO:66)、NSRDSSGNHLGV (SEQ ID NO:68)、NSRDSSGNHLGS (SEQ ID NO:69)、SSRDSSDNHVV

(SEQ ID NO:72)、QSADYNWLCD(SEQ ID NO:7475)或QSYDSSLGIV(SEQ ID NO:78)的CDR3,或其CDR的组合。在实施例中,序列已使用IMGT编号方案确定。

[0008] 在实施例中,间皮素蛋白是人间皮素蛋白。

[0009] 在实施例中,抗体是完全人的或人源化的。

[0010] 在实施例中,抗体是单特异性、双特异性或多特异性的。

[0011] 在实施例中,抗体是IgG。例如,抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。

[0012] 在实施例中,抗体是单链抗体、双特异性抗体或双特异性T细胞衔接器。

[0013] 在实施例中,抗体具有至少 1.0×10^{-9} M的结合亲和力。

[0014] 在实施例中,抗体进一步包含重链恒定区、轻链恒定区、Fc区或其组合。

[0015] 在实施例中,抗体包含Gly3-1-H10、TEA2-E10、TEA1-D3、Gly3-2-C1、TEA1-D2、Gly2-2-F7、Gly1-2-H4、Gly1-2-D4、TEA1-E5、Gly3-2-C10、Gly2-1-F2、Gly2-2-B6、Gly1-2-E10、TEA2-C9或TEA1-E8。

[0016] 在实施例中,抗体与Gly3-1-H10、TEA2-E10、TEA1-D3、Gly3-2-C1、TEA1-D2、Gly2-2-F7、Gly1-2-H4、Gly1-2-D4、TEA1-E5、Gly3-2-C10、Gly2-1-F2、Gly2-2-B6、Gly1-2-E10、TEA2-C9或TEA1-E8竞争结合。

[0017] 在实施例中,抗体与Gly3-1-H10、TEA2-E10、TEA1-D3、Gly3-2-C1、TEA1-D2、Gly2-2-F7、Gly1-2-H4、Gly1-2-D4、TEA1-E5、Gly3-2-C10、Gly2-1-F2、Gly2-2-B6、Gly1-2-E10、TEA2-C9或TEA1-E8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、双特异性抗体或双特异性T细胞衔接器(BiTE)。

[0020] 本发明的方面还涉及与人间皮素蛋白结合的分离的抗体或其片段。在实施例中,抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3;或(b)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3;或(c)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的VL CDR3;或(d)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的VL CDR3;或(e)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的VL CDR3;或(f)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸

序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的VL CDR3;或(g)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的VL CDR3;或(h)包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3;或(i)包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3; (j) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的VL CDR3; (k) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的VL CDR3; (l) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VL CDR3; (m) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VL CDR3; (n) 包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL CDR3;或(o)包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL CDR3。

[0021] 本发明的方面还涉及与人间皮素蛋白结合的分离的scFv抗体。在实施例中,抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3;或(b)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3;或(c)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID

NO:55的氨基酸序列的VL CDR3;或(d)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的VL CDR3;或(e)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的VL CDR3;或(f)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的VL CDR3;或(g)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的VL CDR3;或(h)包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3;或(i)包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3;(j)包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的VL CDR3;(k)包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的VL CDR3;(l)包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VL CDR3;(m)包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VL CDR3;(n)包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL CDR3;或(o)包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL CDR3。在实施例中,序列已使用IMGT编号方案确定。

[0022] 在实施例中,本发明包含与人间皮素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由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27和29,或与其至少90%同一的序列。

[0023] 在实施例中,本发明包含与人间皮素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、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28和30,或与其至少90%同一的序列。

[0024] 在实施例中,本发明包含与人间皮素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以及轻链可变区,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、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27和29,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、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28和30,或与其至少90%同一的序列。

[0025] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的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、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27和29,或与其至少90%同一的序列。

[0026] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的scFv,该分离的scFv包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28和30,或与其至少90%同一的序列。

[0027] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的scFv,该分离的scFv包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27和29,或与其至少90%同一的序列,以及轻链可变区,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、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28和30,或与其至少90%同一的序列。

[0028] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白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。

[0029] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的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。

[0030] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白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。

[0031] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的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。

[0032] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白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。

[0033] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的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。

[0034] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白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。

[0035] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的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: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] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白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、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:9约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:10约95%同一的氨基酸序列。

[0037] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的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:9约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:10约95%同一的氨基酸序列。

[0038] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白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、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:11约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:12约95%同一的氨基酸序列。

[0039] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的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:11约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:12约95%同一的氨基酸序列。

[0040] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白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、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:13约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:14约95%同一的氨基酸序列。

[0041] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的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:13约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:14约95%同一的氨基酸序列。

[0042] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白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、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:15约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:16约95%同一的氨基酸序列。

[0043] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的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:15约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:16约95%同一的氨基酸序列。

[0044] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白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、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:17约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:18约95%同一的氨基酸序列。

[0045] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的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:17约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:18约95%同一的氨基酸序列。

[0046] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白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、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:19约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:20约95%同一的氨基酸序列。

[0047] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的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:19约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:20约95%同一的氨基酸序列。

[0048] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白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、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:21约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:22约95%同一的氨基酸序列。

[0049] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的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:21约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:22约95%同一的氨基酸序列。

[0050] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白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、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:23约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:24约95%同一的氨基酸序列。

[0051] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的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:23约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:24约95%同一的氨基酸序列。

[0052] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白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、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:25约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:26约95%同一的氨基酸序列。

[0053] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的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:25约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:26约95%同一的氨基酸序列。

[0054] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白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、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:27约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:28约95%同一的氨基酸序列。

[0055] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的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:27约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:28约95%同一的氨基酸序列。

[0056] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白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、轻链或其组合,其中该重链包含与SEQ ID NO:29约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:30约95%同一的氨基酸序列。

[0057] 在实施例中,本发明包含与人间皮素蛋白结合的分离的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:29约95%同一的氨基酸序列,并且该轻链包含与SEQ ID NO:30约95%同一的氨基酸序列。

[0058] 本发明的方面还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。例如,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。

[0059] 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。

[0060] 在实施例中,双特异性抗体进一步包含Fc片段。

[0061] 更进一步地,本发明的方面涉及与人间皮素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:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3;或(b)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3;或(c)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的VL CDR3;或(d)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的VL CDR3;或(e)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的VL CDR3;或(f)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的VL CDR3;或(g)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的VL

CDR1、包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的VL CDR3;或(h)包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3;或(i)包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3; (j) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的VL CDR3; (k) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的VL CDR3; (l) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VL CDR3; (m) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VL CDR3; (n) 包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL CDR3;或(o)包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL CDR3。在实施例中,序列已使用IMGT编号方案确定。

[0062] 另外,本发明的方面涉及与人间皮素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、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27和29,或与其至少90%同一的序列。

[0063] 进一步地,本发明的方面涉及与人间皮素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、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28和30,或与其至少90%同一的序列。

[0064] 再进一步地,本发明的方面涉及与人间皮素蛋白结合的双特异性T细胞衔接器(BiTE),该BiTE包含重链可变区以及轻链可变区,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、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27和29,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、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28和30,或与其至少90%同一的序列。

[0065] 本发明的方面还涉及编码本文所述的抗体或片段的核酸。

[0066] 本发明的方面还涉及药物组合物,该组合物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。

[0067] 在实施例中,药物组合物进一步包含至少一种另外的治疗性药剂。例如,治疗性药剂是毒素、放射性标记、siRNA、小分子或细胞因子。

[0068] 本发明的方面还涉及分离的细胞,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。

[0069] 在实施例中,载体可以包含如本文所述的核酸。

[0070] 在实施例中,细胞可以包含如本文所述的载体。

[0071] 本发明的方面还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,其中该抗原包含间皮素,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:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3;(b) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VL CDR3;(c) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的VL CDR3;(d) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的VL CDR3;(e) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的VL CDR3;(f) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的VL CDR3;(g) 包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的VL CDR3;(h) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3;(i) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VL CDR3;(j) 包含SEQ ID NO:

38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的VL CDR3; (k) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的VL CDR3; (l) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VL CDR3; (m) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VL CDR3; (n) 包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL CDR3; 或 (o) 包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VH CDR3、包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VL CDR2、以及包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL CDR3。在实施例中, 序列已使用IMGT编号方案确定。

[0072] 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以下组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27和29, 或与其至少90%同一的序列。

[0073] 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以下组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28和30, 或与其至少90%同一的序列。

[0074] 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以下组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27和29, 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、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28和30, 或与其至少90%同一的序列。

[0075] 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。

[0076] 本发明的方面还涉及试剂盒。在实施例中, 试剂盒包含至少一种如本文所述的药物组合物; 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。

[0077] 进一步地, 本发明的方面涉及用于检测样品中间皮素的存在的方法。在实施例中, 方法包括将样品与如本文所述的单克隆抗体接触并检测抗体-抗原复合物的存在或不存在, 从而检测样品中间皮素的存在。

[0078] 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。

[0079] 在实施例中, 样品包含全血、血液组分、体液、活检、组织、血清或一种或多种细胞。

例如,一种或多种细胞包含体外培养物。例如,一种或多种细胞包含表达间皮素的细胞。

[0080] 在实施例中,样品包含正常样品或癌性样品。例如,样品是体外样品。

[0081] 实施例可以进一步包括从受试者获得样品的步骤。

[0082] 在实施例中,癌症表达间皮素。在实施例中,癌症包含上皮细胞癌。例如,上皮细胞癌包含肺癌、间皮瘤或卵巢癌。

[0083] 本发明的方面还涉及用于在受试者中治疗癌症的方法。在实施例中,方法包括向受试者施用本文所述的药物组合物。

[0084] 在实施例中,癌症包含上皮细胞癌。例如,癌症包括肺癌、间皮瘤或卵巢癌。

[0085] 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

[0086] 图1是针对CASS B细胞发育的一组抗体的表征。图1提供了抗MSLN(靠上图)和抗Muc1(靠下图) scFv-Fc的细胞结合曲线,表明我们之前已鉴定出高亲和力抗体。

[0087] 图2是CASS B细胞构建体测试和B细胞转导。分图A显示表达经工程改造的IgG-BCR构建体的细胞可以结合可溶性HA。分图B显示利用多个DNA构建体和供体,慢病毒可用于实现高转导效率。分图C显示了使用NFAT/NFkB诱导型应答元件在Jurkat细胞中的经工程改造的报告子系统,该系统显示在各种刺激条件下GFP表达水平增加。如本文所述的实施例可用于CASS B细胞平台中。

[0088] 图3显示了用经工程改造的膜结合IgG转染的293T细胞显示出高水平的膜IgG结合(分图A)和可溶性HA捕获(分图B)。

[0089] 图4是显示间皮素(MSLN)结构的示意图。改编自Mesothelin,Hassan,Raffit等人Clin Cancer Res[临床癌症研究],2004和New High Affinity Monoclonal Antibodies Recognize Non-Overlapping Epitopes On Mesothelin For Monitoring And Treating Mesothelioma[新型高亲和力单克隆抗体识别间皮素上的非重叠表位用于监测和治疗间皮瘤],Zhang,Yi-Fan等人Scientific Reports[科学报告],2015。

[0090] 图5是显示全细胞淘选方案的示意图。

[0091] 图6是显示间皮素淘选结果的表。

[0092] 图7显示了代表性的FACS数据和FACS筛选总结(14个板)。挑取14x 96孔板的菌落;3x Gly洗涤1;3x Gly洗涤2;4x Gly洗涤3;4x TEA洗脱;使用100K 293T-MSLN+细胞(蓝色)或100K 293-MSLN-细胞(红色)情况下的FACS

[0093] 图8显示MSLN血清水平。改编自Detection and Quantitation of Serum Mesothelin,a Tumor Marker for Patients with Mesothelioma and Ovarian Cancer[血清间皮素(间皮瘤和卵巢癌患者的肿瘤标志物)的检测和定量],Hassan,Raffit,等人,Clin Cancer Res[临床癌症研究],2006和A prospective trial evaluating the role of mesothelin in undiagnosed pleural effusions[评价间皮素在未确诊的胸腔积液中作用的前瞻性试验],Hooper,Clare E.等人,European Respiratory Journal[欧洲呼吸杂志],2013

[0094] 图9显示了纯化的噬菌体结合曲线(MSLN)。

[0095] 图10显示了动力学数据(原始上清液)。使用Expi293细胞在6孔板中表达scFv-Fc。

转染后两天,通过Bethyl IgG定量试剂盒对上清液中的scFv-Fc浓度进行定量。这些浓度用于将样品归一化至10ug/ml,以进行Octet动力学分析。将来自稀释的上清液的scFv-Fc加载到抗人Fc传感器上,并允许可溶性重组间皮素(博奇公司(Biolegend))结合,随后是在PBST中的解离步骤。动力学常数如上所示。使用原始上清液并以单一形式运行样品。

[0096] 图11显示了纯化的scFv-Fc结合曲线。

[0097] 图12显示了使用混合的293T-MSLN-BFP细胞和293T-CLDN4-mCard细胞情况下的杀伤测定。

[0098] 图13显示了使用混合的293T-MSLN-BFP细胞和293T-CLDN4-mCard细胞情况下的杀伤测定。

[0099] 图14显示了抗MSLN单CAR T细胞针对Ovcar8和Ovcar5细胞的杀伤测定。

[0100] 图15和图16显示了抗MSLN CAR T细胞与表达高水平(Ov8)或低水平(Ov5)MSLN的卵巢癌细胞系的1:1混合物以5:1比率孵育48小时。使用Celigo图像细胞计数仪在T0和T48时对Ov8和Ov5细胞的数量进行计数。细胞毒性CAR T细胞消除Ov8细胞(实线)比消除低MSLN+Ov5(虚线)细胞更有效。这两个图是相同的实验,只是不同的板,这些板测试不同抗体/CAR T构建体。

[0101] 图17显示了使用分选细胞情况下的杀伤测定。在杀伤测定之前对抗MSLN CART细胞进行分选和扩增。正数表示杀伤,负数表示靶细胞生长/扩增。如此处所示,抗MSLN CAR T细胞表现出优先杀伤MSLN+OVCAR8细胞,而不是MSLN-Skrc59细胞。

[0102] 图18显示了Ovcar8中的CRISPR敲除MSLN。

[0103] 图19显示了双CAR T E8-T4E3杀伤测定的方案。

[0104] 图20显示了双CAR T E8-T4E3杀伤测定。供体2020030401的CART进行了分选,供体2020030402的CART未进行分选。

[0105] 图21显示了F10非特异性杀伤是细胞系依赖性的。

[0106] 图22显示了F10非特异性杀伤是供体依赖性的。

[0107] 图23显示了Ovcar8 MSLN阴性细胞系的杀伤测定。

[0108] 图24显示了Ovcar8 MSLN阴性细胞系的杀伤测定。

[0109] 图25显示了COV362结合曲线。

[0110] 图26显示了Ovcar8结合曲线。

[0111] 图27显示了Ovcar8上的MSLN表面表达高于Cov362。

[0112] 图28显示了抗MSLN CAR T细胞表现出优先杀伤MSLN+OVCAR8细胞,而不是MSLN-Skrc59细胞。在杀伤测定之前对抗MSLN CART细胞进行分选和扩增。正数表示杀伤,负数表示靶细胞生长/扩增。

[0113] 图29显示了抗体竞争。抗His HIS1K传感器用于竞争。传感器加载5ug/ml MSLN-his(博奇公司)60秒。然后将YP158或YP218加载到传感器上直至受体饱和。在进行简短的基线读取后,传感器浸入含有8种aMSLN抗体的孔中。

[0114] 图30显示了用抗MSLN E8 CAR T杀伤另外的MSLN+OvCA细胞系。

[0115] 图31显示了抗muc1和抗msln双CAR T的杀伤测定。测试的CAR T:E8-T4E3:抗间皮素和抗muc1双CAR T;E8:抗间皮素单-CAR T;T4E3:抗MUC1单CAR T;F10:抗HA单-CAR T作为阴性对照。使用Celigo的体外杀伤方案:将1500个经BFP标记的293msln+细胞与1500个经

mCardinal标记的Cov362msln+/MUC1+细胞混合。单独的CAR T以E:T=2:1添加。将CAR T添加至肿瘤细胞后42小时收集数据。杀伤百分比基于:分图A;293msln+;分图B:Cov362(msln+/MUC1+)。

[0116] 图32显示了针对NSCLC的抗间皮素CASS B细胞疗法的示意图。

[0117] 图33显示了针对CASS B细胞发育的非限制性示例性抗体的表征。细胞结合曲线(左)和基于BLI的动力学测量(右)表明,一个克隆(Gly1-2-H4)结合仅存在于GPI连接形式上的构象表位。

[0118] 图34显示了以下的工程改造策略的示意图:抗MUC1/抗MSLN scFv靶向性部分的双重靶向和亲和力微调,以增加肿瘤杀伤功效和患者安全性。对两个靶标的平衡亲和力和scFv取向将提供优化的DFIR CAR靶向设计。

[0119] 图35显示了抗MSLN CAR杀伤。分图A提供了71kDa表面糖基磷脂酰肌醇(GPI)连接的糖蛋白的示意图,该糖蛋白被加工成31kDa巨核细胞增强因子(MPF)和保持膜结合的40kDa MSLN;分图B和C),三种(H4、F2和E8)抗MSLN CAR-T细胞杀伤MSLN+OVCAR8细胞(分图B),但不杀伤SK59 RCC细胞(分图C);分图D),抗MUC1(T4E3)和抗MSLN(E8)CAR-T细胞每者以及双靶向E8-TAE3 CAR-T细胞杀伤MUC1+、MSLN+CoV362细胞。

[0120] 图36显示了抗CCR4 mAb 2-3的体内抗肿瘤作用。分图A显示了mAb2-3处理阻断人Treg向分泌CCL22的OvCA细胞的迁移。分B图显示了mAb2-3体内处理通过耗竭Treg恢复IGROV-1的杀伤。

[0121] 图37显示了DFIR CAR的示意图。抗MUC1和抗MLSN靶向性部分将在不同位置和以不同长度进行测试,以优化对它们对应靶标的基于取向的可及性。内部核糖体进入位点(IRES)将允许Ab有效载荷的CAP独立性翻译。

[0122] 图38显示了评价ccRCC 3D培养物中的CAR-T细胞杀伤。分图A提供了ccRCC患者衍生的器官型球体(PDOTS)上的Hoechst(蓝色)、Calcein和EpCAM(绿色)、PI和CD8(红色)、CD45、EpCAM和CAIX(紫色)的IF染色。分图B提供了生成ccRCC PDOTS的工作流。分图C提供了T细胞迁移和细胞因子释放。在ccRCC PDOTS和抗BCMAA716(对照)CAR-T细胞中评价抗CAIX G36 CAR-T细胞(表达ZsGreen),未转导的T细胞和未处理用作阴性对照。使用ZsGreen观察并定量T细胞从侧通道到中心通道的迁移。通过ELISA评估CXCL10释放。

[0123] 图39显示了抗体结合数据。FACS结合代表细胞表达的MSLN,ELISA结合代表可溶性MSLN。这种区别很重要,因为MSLN可以从肿瘤细胞脱落,充当CAR T/Ab疗法的诱饵;然而,脱落后存在轻微的构象变化,使得只能靶向膜结合的MSLN。

[0124] 图40显示了抗间皮素抗体的氨基酸序列。

具体实施方式

[0125] 缩写与定义

[0126] 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。

[0127] 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。

[0128] 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。

[0129] 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”。

[0130] 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”,并且还被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。

[0131] 术语“约”在本文中用于意指大约、大致、大概在……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。

[0132] 本文描述了独特的重组单克隆间皮素(MSLN)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一起出现的多核苷酸或多肽来创建。

[0133] 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MSLN抗体的氨基酸序列(参见表1-15);MSLN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. MSLN-WC-R3-Gly3-1-H10 Ab 可变区氨基酸序列
Gly3-1-H10 的 V _H 链
QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYTLTTNGLSWVRQAPGHGLEWMGWVSPYNGHISY ARNLEGRITMTTDTSTNTAHMELRRLTSDDTAVYYCARVNRANYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 1)
Gly3-1-H10 的 V _L 链
EIVLTQSPSLPVTPGEPASISCRSSQSLLRSNGYNYLDWYLGKPGQSPQLLIYLGSNRASGVP DRFSASGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSSNSAHFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 2)

表 2. MSLN-WC-R3-TEA2-E10 Ab 可变区氨基酸序列

TEA2-E10 的 V_H 链

QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYTLTTNGLSWVRQAPGHGLEWMGWVSPYNGHISY
 ARNLEGRITMTTDTSTNTAHMELRRLTSDDTAVYYCARVNRANYYGMDIWGQGTTTVTVSS
 (SEQ ID NO: 3)

TEA2-E10 的 V_L 链

EIVLTQSPLSLPVTGPASISCRSSQSLLRSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVP
 DRFSASGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMOSSSTNSAHFGGGTKVEIK
 (SEQ ID NO: 4)

表 3. MSLN-WC-R3-TEA1-D3 Ab 可变区氨基酸序列

TEA1-D3 的 V_H 链

QVQLVQSGPEVKKPGASLRVSCKASGYTLTTNGLTWVRQAPGHGLEWMGWVNPYNGHIN
 YARNLKGRITMTTDTSTNTAHMELRRLTSDDTAVYYCARVNRANYYGMDIWGQGTTTVTVSS
 (SEQ ID NO: 5)

TEA1-D3 的 V_L 链

EIVLTHSPLSLPVTGPASISCRSSQSLLRSNGYNYLDWYLNPGQSPQLLIYLGSIRASGVPD
 RFSASGSRTDFTLKISKEDADDVGYYCMOALOTPLTFSGGTNVEIK
 (SEQ ID NO: 6)

表 4. MSLN-WC-R3-Gly3-2-C1 Ab 可变区氨基酸序列

Gly3-2-C1 的 V_H 链

QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYTLTTNGLSWVRQAPGHGLEWMGWVSPYNGHISY
 ARNLEGRITMTTDTSTNTAHMELRRLTSDDTAVYYCARVNRANYYGMDIWGQGTTTVTVSS
 (SEQ ID NO: 7)

Gly3-2-C1 的 V_L 链

EIVLTQSPLSLPVTGPASISCRSSQSLLRSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVP
 DRFSASGSCTDFTLKISRVEAEDVGYYCMOALOTPLFRGGTKVEIK
 (SEQ ID NO: 8)

表 5. MSLN-WC-R3-TEA1-D2 Ab 可变区氨基酸序列

TEA1-D2 的 V_H 链

QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYTLTTNGLSWVRQAPGHGLEWMGWVSPYNGHISY
 ARNLEGRITMTTDTSTNTAHMELRRLTSDDTAVYYCARVNRANYYGMDIWGQGTTTVTVSS
 (SEQ ID NO: 9)

TEA1-D2 的 V_L 链

EIVLTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLIRS.NGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVP
 DRFSASGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMOALOTPLTFGGGTKVEIK
 (SEQ ID NO: 10)

表 6. MSLN-WC-R3-Gly2-2-F7 Ab 可变区氨基酸序列

Gly2-2-F7 的 V_H 链

QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYTLTTNGLSWVRQAPGHGLEWMGWVSPYNGHI
 SYARNLEGRITMTTDTSTNTAHMELRRLTSDDTAVYYCARVNRANYYGMDIWGQGTTTVTS
 S
 (SEQ ID NO: 11)

Gly2-2-F7 的 V_L 链

EIVLTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLIRSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVP
 DRFSASGSGTDFTLKISRVEAEDVGGLLHASSTNSAHFGGGTKVEIK
 (SEQ ID NO: 12)

表 7. MSLN-WC-R3-Gly1-2-H4 Ab 可变区氨基酸序列

Gly1-2-H4 的 V_H 链

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKSSGGTFSSDTINWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNY
 AQKFQGWVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARESA LGGSYPLSFWGQGTTLTVTVSS
 (SEQ ID NO: 13)

Gly1-2-H4 的 V_L 链

ETTLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIIYGASSRATGIPDRFS
 GSGSGTDFTLTISRLEPEDSATYYCLODDSYPLTFGQGTKVEIK
 (SEQ ID NO: 14)

表 8. MSLN-WC-R3-Gly1-2-D4 Ab 可变区氨基酸序列

Gly1-2-D4 的 V_H 链

EVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYA
DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDPSSSWLAGAFDIWGQGTMTVSS
(SEQ ID NO: 15)

Gly1-2-D4 的 V_L 链

SSELTQDPTVSVALGQTVRITCQGDSLRRFYASWYQKPGQAPILVIYGKNNRPSGIPDRFSGS
YSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRSDSGNHVFFGGGKLTVL
(SEQ ID NO: 16)

表 9. MSLN-WC-R3-TEA1-E5 Ab 可变区氨基酸序列

TEA1-E5 的 V_H 链

EVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYA
DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDPSSSWLAGAFDIWGQGTMTVSS
(SEQ ID NO: 17)

TEA1-E5 的 V_L 链

SSELTQDPTVSVALGQTVRITCQGDSLRRFYASWYQKPGQAPILVIYGKNNRPSGIPDRFSGS
YSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRSDSGNHVFFGGGKLTVL
(SEQ ID NO: 18)

表 10. MSLN-WC-R3-Gly3-2-C10 Ab 可变区氨基酸序列

Gly3-2-C10 的 V_H 链

EVQLVQSGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWMSWISWNNGSIG
YADSVK.GRFPISRNNPQNSLYLQMNSLKAEDTALYYCAKDPSTSWLAGAFDIWGQGTMTV
VSS
(SEQ ID NO: 19)

Gly3-2-C10 的 V_L 链

SSDLTLDPTVSVALGHTVRITCQGDSLIRFYASWYHQEPGPAPILVIYGKNNRPSRIPDLFSGS
YSRNTSSLTISGAQVKDEADYYCNSQDRDGNHVFFGGGKLTVL
(SEQ ID NO: 20)

表 11. MSLN-WC-R3-Gly2-1-F2 Ab 可变区氨基酸序列

Gly2-1-F2 的 V_H 链

EVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGNI~~GYA~~
 DSVK.GRFTISRDN~~AKNSLYLQMN~~SLRAEDTALYYCAKDAGSSGYFNAFDIWGQGTMTVTVSS
 (SEQ ID NO: 21)

Gly2-1-F2 的 V_L 链

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSL~~RAYYASWY~~QKPGQAPVLVIYGKNSRPSGIPDRFSGS
 NSGNAASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHLGVF~~GGG~~TKLTVL
 (SEQ ID NO: 22)

表 12. MSLN-WC-R3-Gly2-2-B6 Ab 可变区氨基酸序列

Gly2-2-B6 的 V_H 链

EVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGNI~~GYA~~
 DSVKGRFTISRDN~~AKNSLYLQMN~~SLRAEDTALYYCAKDAGSSGYFNAFDIWGQGTMTVTVSS
 (SEQ ID NO: 23)

Gly2-2-B6 的 V_L 链

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSL~~RAYYASWY~~QKPGQAPVLVIYGKNSRPSGIPDRFSGS
 NSGNAASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHLGSF~~GGG~~TKLTVL
 (SEQ ID NO: 24)

表 13. MSLN-WC-R3-Gly1-2-E10 Ab 可变区氨基酸序列

Gly1-2-E10 的 V_H 链

QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQGP~~GK~~GLEWVSGISWNSGSI
 GFADSVKGRFTISRDN~~AKNSLYLQMN~~SLRVEDTALYYCAKSPSSNWYPDAFDIWGQGTMT
 VSS
 (SEQ ID NO: 25)

Gly1-2-E10 的 V_L 链

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSL~~RNY~~YASWYQKPGQAPVLVIYAKNNRPSGIPDRFSG
 SSSGNTASLTITGSQAED~~EADYYC~~SSRDSSDNHVIV~~FGG~~TKLTVL
 (SEQ ID NO: 26)

表 14. MSLN-WC-R3-TEA2-C9 Ab 可变区氨基酸序列

TEA2-C9 的 V_H 链

EVQLVESGGGLVKAGGSLRLSCTASGFKFTDYYMSWIRQTPGKGLEWVSYINTSSNHINYAH
SVKGRFTISRDNAINSLFLQMDRLTSEDYAVYYCARGASWGPLWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO: 27)

TEA2-C9 的 V_L 链

QPGLTQPPVSVAPGQTARITCGANNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVSDDSDDRPSGIPERFSGS
SSGTTATLTITEVHAEDEADYYCQSADYNWLCDFGGRTNLTVL
(SEQ ID NO: 28)

表 15. MSLN-WC-R3-TEA1-E8 Ab 可变区氨基酸序列

TEA1-E8 的 V_H 链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHYAVHWVRQAPGQGLEWMGWIHAGNGNSR
FSEKFQGRVTITRDTAASTAYMDLSNLKSEDTAVYYCAREVGHGMDVWGQGTITVTVSS
(SEQ ID NO: 29)

TEA1-E8 的 V_L 链

QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNTNRPSGVPDR
FSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYCQSYDSSLSGYVFGTGTKVTVL
(SEQ ID NO: 30)

[0134] MSLN抗体的重链和轻链互补决定区的氨基酸序列如下表16A-B所示：
表16A.MSLN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
Gly3-1-H10	GYTLTTNG (SEQ ID NO: 31)	VSPYNGHI (SEQ ID NO: 32)	ARVNRANYYGMDV (SEQ ID NO: 33)
TEA2-E10	GYTLTTNG (SEQ ID NO: 31)	VSPYNGHI (SEQ ID NO: 32)	ARVNRANYYGMDV (SEQ ID NO: 33)
TEA1-D3	GYTLTTNG (SEQ ID NO: 31)	VNPYNGHI (SEQ ID NO: 34)	ARVNRANYYGMDV (SEQ ID NO: 33)
Gly3-2-C1	GYTLTTNG (SEQ ID NO: 31)	VSPYNGHI (SEQ ID NO: 32)	ARVNRANYYGMDV (SEQ ID NO: 33)
TEA1-D2	GYTLTTNG (SEQ ID NO: 31)	VSPYNGHI (SEQ ID NO: 32)	ARVNRANYYGMDV (SEQ ID NO: 33)
Gly2-2-F7	GYTLTTNG (SEQ ID NO: 31)	VSPYNGHI (SEQ ID NO: 32)	ARVNRANYYGMDV (SEQ ID NO: 33)
Gly1-2-H4	GGTFSSDT (SEQ ID NO: 35)	INPNSGGT (SEQ ID NO: 36)	ARESALGGSYPLSF (SEQ ID NO: 37)
Gly1-2-D4	GFTFDDYA (SEQ ID NO: 38)	ISWNSGSI (SEQ ID NO: 39)	AKDPSSSWLAGAFDI (SEQ ID NO: 40)
TEA1-E5	GFTFDDYA (SEQ ID NO: 38)	ISWNSGSI (SEQ ID NO: 39)	AKDPSSSWLAGAFDI (SEQ ID NO: 40)
Gly3-2-C10	GFTFDDYA (SEQ ID NO: 38)	ISWNSGSI (SEQ ID NO: 41)	AKDPSTSWLAGAFDI (SEQ ID NO: 42)
Gly2-1-F2	GFTFDDYA (SEQ ID NO: 38)	ISWNSGNI (SEQ ID NO: 43)	AKDAGSSGYFNAFDI (SEQ ID NO: 44)
Gly2-2-B6	GFTFDDYA (SEQ ID NO: 38)	ISWNSGNI (SEQ ID NO: 43)	AKDAGSSGYFNAFDI (SEQ ID NO: 44)
Gly1-2-E10	GFTFDDYA (SEQ ID NO: 38)	ISWNSGSI (SEQ ID NO: 39)	AKSPSSNWYPDAFDI (SEQ ID NO: 45)
TEA2-C9	GFKFTDYY (SEQ ID NO: 46)	INTSSNHI (SEQ ID NO: 47)	ARGASWGPL (SEQ ID NO: 48)
TEA1-E8	GYTFTHYA (SEQ ID NO: 49)	IHAGNGNS (SEQ ID NO: 50)	AREVGHGMDV (SEQ ID NO: 51)

表16B.MSLN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
Gly3-1-H10	QSLLRNNGYNY (SEQ ID NO: 52)	LGS (SEQ ID NO: 53)	MQSSTNSAH (SEQ ID NO: 54)
TEA2-E10	QSLLRNNGYNY (SEQ ID NO: 52)	LGS (SEQ ID NO: 53)	MQSSTNSAH (SEQ ID NO: 54)
TEA1-D3	QSLLRNNGYNY (SEQ ID NO: 52)	LGS (SEQ ID NO: 53)	MQALQTPLT (SEQ ID NO: 55)
Gly3-2-C1	QSLLRNNGYNY (SEQ ID NO: 52)	LGS (SEQ ID NO: 53)	MQALQTPL (SEQ ID NO: 56)
TEA1-D2	QSLLRNNGYNY (SEQ ID NO: 52)	LGS (SEQ ID NO: 53)	MQALQTPLT (SEQ ID NO: 57)
Gly2-2-F7	QSLLRNNGYNY (SEQ ID NO: 52)	LGS (SEQ ID NO: 53)	HASSTNSAH (SEQ ID NO: 58)
Gly1-2-H4	QSVSSSY (SEQ ID NO: 59)	GAS (SEQ ID NO: 60)	LQDDSYPLT (SEQ ID NO: 61)
Gly1-2-D4	SLRRFY (SEQ ID NO: 62)	GKN (SEQ ID NO: 63)	NSRDSGDNHVF (SEQ ID NO: 64)
TEA1-E5	SLRRFY (SEQ ID NO: 62)	GKN (SEQ ID NO: 63)	NSRDSGDNHVF (SEQ ID NO: 64)
Gly3-2-C10	SLIRFY (SEQ ID NO: 65)	GKN (SEQ ID NO: 63)	NSQDRDGNHVF (SEQ ID NO: 66)
Gly2-1-F2	SLRAYY (SEQ ID NO: 67)	GKN (SEQ ID NO: 63)	NSRDSSGNHLGV (SEQ ID NO: 68)
Gly2-2-B6	SLRAYY (SEQ ID NO: 67)	GKN (SEQ ID NO: 63)	NSRDSSGNHLGS (SEQ ID NO: 69)
Gly1-2-E10	SLRNYY (SEQ ID NO: 70)	AKN (SEQ ID NO: 71)	SSRDSSDNHVV (SEQ ID NO: 72)
TEA2-C9	NIGSKS (SEQ ID NO: 73)	DDS (SEQ ID NO: 74)	QSADYNWLCD (SEQ ID NO: 75)
TEA1-E8	SSNIGAGYD (SEQ ID NO: 76)	GNT (SEQ ID NO: 77)	QSYDSSLSGYV (SEQ ID NO: 78)

[0135] MSLN抗体的重链和轻链框架区的氨基酸序列如下表17A-B所示：
表17A.MSLN抗体的重链 (V_H) 框架区 (FR)

序列 ID	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FR4
Gly3-1-H10	QVQLVQSGAEV KKPGASVRVSC KAS (SEQ ID NO: 79)	LSWVRQAPGHGL EWMGW (SEQ ID NO: 80)	SYARNLEGRITMT TDTSTNTAHMEL RRLTSDDTAVYYC (SEQ ID NO: 81)	WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 82)
TEA2-E10	QVQLVQSGAEV KKPGASVRVSC KAS (SEQ ID NO: 79)	LSWVRQAPGHGL EWMGW (SEQ ID NO: 80)	SYARNLEGRITMT TDTSTNTAHMEL RRLTSDDTAVYYC (SEQ ID NO: 81)	WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 82)
TEA1-D3	QVQLVQSGPEV KKPGASLRVSC KAS (SEQ ID NO: 83)	LTWVRQAPGHGL EWMGW (SEQ ID NO: 84)	NYARNLKGRITM TTDTSTNTAHMEL RRLTSDDTAVYYC (SEQ ID NO: 85)	WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 82)
Gly3-2-C1	QVQLVQSGAEV KKPGASVRVSC KAS (SEQ ID NO: 79)	LSWVRQAPGHGL EWMGW (SEQ ID NO: 80)	SYARNLEGRITMT TDTSTNTAHMEL RRLTSDDTAVYYC (SEQ ID NO: 86)	WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 82)
TEA1-D2	QVQLVQSGAEV KKPGASVRVSC KAS (SEQ ID NO: 79)	LSWVRQAPGHGL EWMGW (SEQ ID NO: 80)	SYARNLEGRITMT TDTSTNTAHMEL RRLTSDDTAVYYC (SEQ ID NO: 86)	WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 82)
Gly2-2-F7	QVQLVQSGAEV KKPGASVRVSC KAS (SEQ ID NO: 79)	LSWVRQAPGHGL EWMGW (SEQ ID NO: 80)	SYARNLEGRITMT TDTSTNTAHMEL RRLTSDDTAVYYC (SEQ ID NO: 86)	WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 82)

序列 ID	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FR4
Gly1-2-H4	QVQLVQSGAEV KKPGSSVKVSC KSS (SEQ ID NO: 87)	INWVRQAPGQGL EWMGW (SEQ ID NO: 88)	NYAQKFQGWVT MTRDTSISTAYME LSRLRSDDTAVYY C (SEQ ID NO: 89)	WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO: 90)
Gly1-2-D4	EVQLVQSGGGL VQPGRSLRLSCA AS (SEQ ID NO: 91)	MHWVRQAPGKG LEWVSG (SEQ ID NO: 92)	GYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQM NSLRAEDTALYYC (SEQ ID NO: 93)	WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 94)
TEA1-E5	EVQLVQSGGGL VQPGRSLRLSCA AS (SEQ ID NO: 91)	MHWVRQAPGKG LEWVSG (SEQ ID NO: 92)	GYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQM NSLRAEDTALYYC (SEQ ID NO: 93)	WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 94)
Gly3-2-C10	EVQLVQSGGGLI QPGGSLRLSCA AS (SEQ ID NO: 95)	MHWVRQAPGKG LEWMSW (SEQ ID NO: 96)	GYADSVKGRFPIS RNNPQNSLYLQM NSLKAEDTALYYC (SEQ ID NO: 97)	WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 94)
Gly2-1-F2	EVQLVQSGGGL VQPGRSLRLSCA AS (SEQ ID NO: 91)	MHWVRQAPGKG LEWVSG (SEQ ID NO: 92)	GYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQM NSLRAEDTALYYC (SEQ ID NO: 98)	WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 94)
Gly2-2-B6	EVQLVQSGGGL VQPGRSLRLSCA AS (SEQ ID NO: 91)	MHWVRQAPGKG LEWVSG (SEQ ID NO: 92)	GYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQM NSLRAEDTALYYC (SEQ ID NO: 98)	WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 94)
Gly1-2-E10	QVQLVQSGGGL VQPGRSLRLSCA AS	MHWVRQGP GKG LEWVSG	GFADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQM NSLRVEDTALYYC	WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 94)

序列 ID	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FR4
	(SEQ ID NO: 99)	(SEQ ID NO: 100)	(SEQ ID NO: 101)	
TEA2-C9	EVQLVESGGGL VKAGGSLRLSC TAS (SEQ ID NO: 102)	MSWIRQTPGKGL EWVSY (SEQ ID NO: 103)	NYAHSVKGRFTIS RDNAINSLFLQM DRLTSEDVAVYYC (SEQ ID NO: 104)	WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 105)
TEA1-E8	QVQLVQSGAEV KKPGASVKVSC KAS (SEQ ID NO: 106)	VHWVRQAPGQG LEWMGW (SEQ ID NO: 107)	RFSEKFQGRVTIT RDTAASTAYMDL SNLKSEDVAVYYC (SEQ ID NO: 108)	WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 109)

表17B.MSLN抗体的轻链 (V_L) 框架区 (FR)

序列 ID	VL FR1	VL FR2	VL FR3	VL FR4
Gly3-1-H10	EIVLTQSPLSLPV TPGEPASISCRSS (SEQ ID NO: 110)	LDWYLQKPGQSP QLLIY (SEQ ID NO: 111)	NRASGVPDRFSAS GSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC (SEQ ID NO: 112)	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 113)
TEA2-E10	EIVLTQSPLSLPV TPGEPASISCRSS (SEQ ID NO: 110)	LDWYLQKPGQSP QLLIY (SEQ ID NO: 111)	NRASGVPDRFSAS GSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC (SEQ ID NO: 112)	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 113)
TEA1-D3	EIVLTHSPLSLPV TPGKPASISCRSS (SEQ ID NO: 114)	LDWYLHNPQGSP QLLIY (SEQ ID NO: 115)	IRASGVPDRFSAS GSRTDFTLKISKE DADDVGVYYC (SEQ ID NO: 116)	FSGGTNVEIK (SEQ ID NO: 117)

序列 ID	VL FR1	VL FR2	VL FR3	VL FR4
Gly3-2-C1	EIVLTQSPLSLPV TPGEPASISCRSS (SEQ ID NO: 110)	LDWYLQKPGQSP QLLIY (SEQ ID NO: 111)	NRASGVPDRFSAS GSCTDFTLKISRV EAEDVGVIYYC (SEQ ID NO: 118)	FRGGTKVEIK (SEQ ID NO: 119)
TEA1-D2	EIVLTQSPLSLPV TPGEPASISCRSS (SEQ ID NO: 110)	LDWYLQKPGQSP QLLIY (SEQ ID NO: 111)	NRASGVPDRFSAS GSGTDFTLKISRV EAEDVGVIYYC (SEQ ID NO: 112)	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 113)
Gly2-2-F7	EIVLTQSPLSLPV TPGEPASISCRSS (SEQ ID NO: 110)	LDWYLQKPGQSP QLLIY (SEQ ID NO: 111)	NRASGVPDRFSAS GSGTDFTLKISRV EAEDVGGLL (SEQ ID NO: 120)	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 113)
Gly1-2-H4	ETTLTQSPGTL LSPGERATLSCR AS (SEQ ID NO: 121)	LAWYQQKPGQA PRLIY (SEQ ID NO: 122)	SRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLE PEDSATYYC (SEQ ID NO: 123)	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 124)
Gly1-2-D4	SSELTQDPTVSV ALGQTVRITCQ GD (SEQ ID NO: 125)	ASWYQQKPGQA PILVIY (SEQ ID NO: 126)	NRPSGIPDRFSGS YSGNTASLTITGA QAEDEADYYC (SEQ ID NO: 127)	FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 128)
TEA1-E5	SSELTQDPTVSV ALGQTVRITCQ GD (SEQ ID NO: 125)	ASWYQQKPGQA PILVIY (SEQ ID NO: 129)	NRPSGIPDRFSGS YSGNTASLTITGA QAEDEADYYC (SEQ ID NO: 127)	FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 128)

序列 ID	VL FR1	VL FR2	VL FR3	VL FR4
Gly3-2-C10	SSDLTLDPTVSV ALGHTVRITCQ GD (SEQ ID NO: 130)	ASWYHQEPGPAP ILVIY (SEQ ID NO: 131)	TRPSRIPDLFSGSY SRNTSSLTISGAQ VKDEADYYC (SEQ ID NO: 132)	FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 128)
Gly2-1-F2	SSELTQDPAVSV ALGQTVRITCQ GD (SEQ ID NO: 133)	ASWYQQKPGQA PVLVIY (SEQ ID NO: 134)	SRPSGIPDRFSGSN SGNAASLTITGAQ AEDEADYYC (SEQ ID NO: 135)	FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 128)
Gly2-2-B6	SSELTQDPAVSV ALGQTVRITCQ GD (SEQ ID NO: 133)	ASWYQQKPGQA PVLVIY (SEQ ID NO: 134)	SRPSGIPDRFSGSN SGNAASLTITGAQ AEDEADYYC (SEQ ID NO: 135)	FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 128)
Gly1-2-E10	SSELTQDPAVSV ALGQTVRITCQ GD (SEQ ID NO: 133)	ASWYQQKPGQA PVLVIY (SEQ ID NO: 134)	NRPSGIPDRFSGSS SGNTASLTITGSQ AEDEADYYC (SEQ ID NO: 136)	FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 128)
TEA2-C9	QPGLTQPPVSV APGQTARITCGA N (SEQ ID NO: 137)	VHWYQQKPGQA PVLVVS (SEQ ID NO: 138)	DRPSGIPERFSGSS SGTTATLTITEVHA EDEADYYC (SEQ ID NO: 139)	FGGRTNLTVL (SEQ ID NO: 140)
TEA1-E8	QSVLTQPPSVSG APGQRVTISCTG S (SEQ ID NO: 141)	VHWYQQLPGTAP KLLIY (SEQ ID NO: 142)	NRPSGVPDRFSGS KSGTSASLAITGL QAEDGADYYC (SEQ ID NO: 143)	FGTGTKVTVL (SEQ ID NO: 144)

[0136] 本文所述的MSLN抗体结合MSLN。在一个实施例中,MSLN抗体对MSLN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MSLN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MSLN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MSLN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。

[0137] 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MSLN抗体相比,本文披露的抗MSLN抗体的这样的保守修饰变体可以表现出与MSLN增加的交叉反应性。

[0138] 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。

[0139] 抗体

[0140] 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。

[0141] 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。

[0142] “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,区域用10至约25个氨基酸的短接头肽连接。接头可以富含甘氨酸以提供柔性,也可以富含丝氨酸或苏氨酸以提供溶解性,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。

[0143] 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))。

[0144] 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。

[0145] 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。

[0146] 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MSLN抗体的CDR以及框架 (FR) 的VH和VL区显示于表1-表17中。

[0147] 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))。

[0148] 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,应用任一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。包含特定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特定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

[0149] 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。

[0150] 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。

[0151] 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)]。

[0152] 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,并且可以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,抗体可以针对由NCBI参考号NM_005823编码并且具有以下氨基酸序列的间皮素(MSLN):

MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLDGVLNPPNISSLSPRQLLG
FPCAEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRI
TKANVDLLPRGAPERQRLPAALACWGVRSLLSEADVRALGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGPLDQDQQ
EAARAALQGGGPPYGPSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAARQRSSRDPSWRQPRTLPRFRRE
VEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYVESVIQHL
GYLFLKMSPEDIRKWNVTSLETLKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEE
LSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFM
KLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDDLTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGT
PCLLGPGPVLTVLALLLASTLA (SEQ ID NO:145)

[0153] 例如,参见SC110135(间皮素(MSLN)(NM_005823)人未标记克隆的产品数据表。

[0154] 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 。(通常参见,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MSLN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”。

[0155] 例如,MSLN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,MSLN抗体的结合亲和力在 10^{-5} M至 10^{-12} M范围内。例如,MSLN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。

[0156] MSLN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MSLN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。

[0157] 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MSLN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。

[0158] 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MSLN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MSLN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MSLN并确定测试单克隆抗体是否能够中和MSLN来进行。

[0159] 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)。

[0160] 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的亲合色谱法,其主要提供免疫血清的IgG级分。随后或可替代地,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。

[0161] 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。

[0162] 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。

[0163] 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),杂交瘤的培养基可以包括次黄嘌呤、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。

[0164] 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)。

[0165] 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。

[0166] 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。

[0167] 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。

[0168] 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。

[0169] 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。

[0170] “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。

[0171] 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人免疫系统的激活(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)。

[0172] 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)。

[0173] 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W094/02602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。

[0174] 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。

[0175] 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。

[0176] 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。

[0177] 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。

[0178] 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DNACloning: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))。

[0179] 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。

[0180] 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途径。

[0181] 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MSLN的存在。抗体还可用于尝试结合并破坏MSLN活性。

[0182] 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。

[0183] 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。

[0184] 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。

[0185] 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。

[0186] 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。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变体可以具有更短的半衰期,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W005/047327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)。

[0187] 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。

[0188] 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)。

[0189] 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MSLN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。

[0190] 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)。

[0191] 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。

[0192] 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)。

[0193] 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)。

[0194] 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。

[0195] 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。

[0196] 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

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中披露了具有延长的循环时间的脂质体。

[0197] 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。

[0198] 多特异性抗体 (双特异性和三特异性)

[0199] 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。

[0200] 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。

[0201] 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MSLN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MSLN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LING01)、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MSLN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MSLN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/US2006/005691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MSLN和配体的抗体的融合蛋白)。配体可以是肿瘤相关抗原 (例如,LING01、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-CA IX、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 R11、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MSLN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MSLN抗体的重链和轻链组合或scFv。

[0202] 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MSLN-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 (GGGSGGGGS; “(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, GGGSGGGSGGGSGGGGS);

“(G₄S)₄” (例如, GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS);

“(G₄S)₅” (例如, GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS);

“(G₄S)₆” (例如, GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS);

“(G₄S)₇” (例如, GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS); 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)。

[0203] 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MSLN-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。

[0204] 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MSLN-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MSLN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)。

[0205] 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MSLN-scFv融合物)可以通过在识别MSLN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MSLN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MSLN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MSLN-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MSLN-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传导通路,但不触发效应子活性。

[0206] 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MSLN-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MSLN-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MSLN-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MSLN-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MSLN-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。

[0207] 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MSLN抗体可以是针对第一抗原的第一结合位点。在实施例中,抗MSLN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}、(GGGS)_{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IgG4 Fc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:[])。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}、(GGGS)_{x1-6}或GSAGSAAGSGEF)。

[0208] 在实施例中,tBsAb可以对MSLN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、CXCR4、B7H4、CD27、CD28、CD40、CD40L、CD47、CD122、CCR4、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。

[0209] 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)可以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MSLN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。

[0210] 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MSLN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。

[0211] 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MSLN-scFv融合物)可用于治疗慢性感染、疾病或医学病症,例如癌症。

[0212] 融合蛋白

[0213] 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MSLN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MSLN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。

[0214] 在一些实施例中,本文披露的MSLN抗体或其功能片段直接连接至第二蛋白。在其他实施例中,MSLN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MSLN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。

[0215] 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MSLN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。

[0216] 针对MSLN的抗体的使用

[0217] 可以施用特异性结合MSLN蛋白或其片段的本发明的抗体用于治疗MSLN相关疾病或障碍。“MSLN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MSLN水平增加和/或涉及MSLN的细胞信号传导通路激活。示例性的MSLN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。在一些实施例中,传染病是病毒性疾病,例如流感。

[0218] 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,施用于受试者并可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MSLN蛋白的活性。

[0219] 药物组合物

[0220] 可以以药物组合物的形式施用特异性结合MSLN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。

[0221] 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。

[0222] 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。

[0223] 在使用抗体片段的情况下,优选特异性结合靶蛋白结合结构域的最小抑制片段。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。

[0224] 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。

[0225] 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。

[0226] 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 DEPOT™(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。

[0227] 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、类似物和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,否则考虑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。

[0228] 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。

[0229] 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。

[0230] 无菌可注射溶液可以通过将所需量的活性化合物根据需要将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优选成分的粉末。

[0231] 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。

[0232] 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。

[0233] 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)。

[0234] 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。

[0235] 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。

[0236] 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。

[0237] 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。

[0238] 诊断

[0239] 根据本发明的抗体可以用作用于检测样品中MSLN(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。

[0240] 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。

[0241] 针对MSLN蛋白(或其片段)的抗体可以用于本领域已知的涉及MSLN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MSLN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MSLN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”)。

[0242] 对MSLN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MSLN多肽。针对MSLN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。

[0243] 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 。

[0244] 筛选方法

[0245] 本发明提供了用于鉴定调节剂,即调节或以其他方式干扰MSLN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。

[0246] 例如,本发明提供了用于筛选调节MSLN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)。

[0247] 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。

[0248] 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。

[0249] 化合物的文库可以以下方式呈现:在溶液中(参见例如,Houghton,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)。

[0250] 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MSLN活性。

[0251] 在另一个实施例中,提供了至少一种MSLN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。

[0252] 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、碱性磷酸酶或萤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。

[0253] 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。

[0254] 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。

[0255] 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MSLN抗体。另外,抗原可以是MSLN蛋白或其部分。

[0256] 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MSLN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)。

[0257] 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。

[0258] 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, MSLN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。

[0259] 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。

[0260] 嵌合抗原受体(CAR)细胞疗法

[0261] 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,

[0262] 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。

[0263] 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MSLN抗体可以用作CAR细胞的靶向性部分。例如, MSLN抗体对其抗原具有低亲和力但高亲合力。在另一个实施例中, MSLN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。

[0264] 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MSLN的抗原并且该第二抗原包含MSLN。

[0265] 在实施例中, 本文所述的抗MSLN抗体或MSLN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MSLN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MSLN抗体)。待分泌的抗MSLN“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。

[0266] 在实施例中, 患者可能患有如本文所述的MSLN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MSLN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MSLN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MSLN抗体可以用作靶向性部分,并且靶向不同表位的不同MSLN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。

[0267] 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。

[0268] 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MSLN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MSLN抗体或MSLN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MSLN抗体或MSLN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MSLN抗体或MSLN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MSLN抗体或MSLN融合蛋白可以用作靶向性部分,并且靶向不同表位的不同MSLN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MSLN抗体或MSLN融合蛋白不是高亲和力MSLN抗体(例如,使得抗体不与其MSLN靶标强烈结合)。例如,本文所述的MSLN抗体或MSLN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-CA IX、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 Muc16	PD-1			nature biotechnology [自然生物技术] 36:847 (2018)
CD19 Muc16	IL-18			Cell Reports [细胞报告] 23:2130 (2018)
CD19 Muc16	IL-12	融合物	IRES	Scientific REPOrTS [科学报告] 7: 10541 (2017)
CD19	PD-1	scFv	P2A	Clin Cancer Res [临床癌症研究] 23:6982 (2017)
CAE	IL-18 IL-12		NEAT IL-2	Cell Reports [细胞报告] 21:3205 (2017)
VEGF2	IL-12			Clin Cancer Res [临床癌症研究] 18:1672 (2012)

[0269] 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。

[0270] 嵌合B细胞受体

[0271] 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。

[0272] 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MSLN)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。

[0273] 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。

[0274] 例如,可选择胞外配体结合结构域来识别配体,例如MSLN,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MSLN。

[0275] 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MSLN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。

[0276] 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。

[0277] 本发明的嵌合B细胞受体的信号转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。

[0278] 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。

[0279] 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。

[0280] 治疗方法

[0281] 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。

[0282] 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MSLN的异常表达和/或涉及MSLN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MSLN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,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、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、宫颈癌、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。

[0283] 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MSLN抗体。

[0284] 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。

[0285] 在另一方面,通过使细胞与本发明的抗MSLN抗体接触来抑制肿瘤细胞生长。细胞可以是表达MSLN的任何细胞。

[0286] 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。感染的非限制性实例包括流感感染。

[0287] 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。感染可以是流感感染。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。

[0288] 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。

[0289] 组合方法

[0290] 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)。

[0291] 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 。

[0292] 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。

[0293] 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(ublrituximab)、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。

[0294] 本发明提供了通过施用与MSLN蛋白的相同表位结合或可替代地与MSLN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MSLN结合的第一抗体和与除MSLN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MSLN结合并且与除MSLN之外的蛋白结合的双特异性抗体来治疗。例如,除MSLN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MSLN之外的另一种蛋白是肿瘤相关抗原;除MSLN以外的另一种蛋白也可以是细胞因子。除MSLN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。

[0295] 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MSLN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。

[0296] 另外,本发明提供了与MSLN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.)

[0297] 诊断性测定

[0298] 抗MSLN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。

[0299] 在一些实施例中,出于诊断目的,本发明的抗MSLN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。

[0300] 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。

[0301] 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MSLN的细胞。例如,用于检测MSLN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MSLN的体内技术包括将标记的抗MSLN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。

[0302] 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某个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。

[0303] 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。

[0304] 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(Hammamatsu Photonic Systems),布里奇沃特,新泽西州)。然而,需要更灵敏的光检测方法。

[0305] 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。

[0306] 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。

[0307] “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。

[0308] 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。

[0309] 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。图像处理器可以连接到个人计算机,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。

[0310] 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。

[0311] 本发明还涵盖用于检测生物样品中MSLN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MSLN scFv或单克隆抗体);用于确定样品中MSLN的量的手段;以及用于将样品中MSLN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。

[0312] 其他实施例

[0313] 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。

[0314] 下面的实例中进一步描述本发明,但这些实例并不限制权利要求描述的本发明的范围

实例

[0315] 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

[0316] 我们通过全细胞淘选鉴定了一系列抗间皮素(MSLN)抗体。使用转导的细胞(293T-MSLN或Cf2Th-MSLN)或天然富含MSLN(OVCAR8)的肿瘤细胞系完成淘选。总共鉴定了118种独特的抗体,并根据与OvCar8和/或Cf2Th细胞的结合鉴定了先导克隆。参见图39。这些抗体的表位广泛映射到MSLN的远端区域,这也是MUC16的结合位点。另外,我们的抗体之一(Gly1-2-H4)仅识别细胞表面表达的MSLN,并且不与可溶性MSLN包被板结合,表明存在构象表位。这些scFv的子集被用作CAR T细胞的靶向性部分,并对MSLN+细胞表现出有效的杀伤。

[0317] MSLN已被确定为很多种癌症(包括肺癌和卵巢癌)的肿瘤相关抗原。MSLN能以两种形式存在,一种是通过GPI接头与细胞膜结合,另一种是可溶/脱落形式。GPI接头的结合导致蛋白发生微妙的构象变化,这种变化被我们的抗体之一识别。通过开发仅能识别蛋白的膜结合形式的CAR T,我们可以避免可溶性MSLN充当诱饵,并保护我们的CARs免于过早激活。

[0318] 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,它们有潜力作为针对过度表达MSLN的癌症的CAR T细胞的靶向性部分。

实例2

[0319] 嵌合抗体信号传导和分泌(CASS)型B细胞-一种实现癌症治愈的新组合细胞免疫疗法

[0320] B细胞是患者自然免疫力的重要组分,且虽然包括T细胞、NK细胞和骨髓细胞的其他免疫细胞已用嵌合抗原受体(CAR)进行工程改造,但B细胞在很大程度上被忽视了。B细胞的主要作用是经由膜结合抗体(B细胞受体,BCR)识别外来入侵者,并通过产生结合和清除威胁的抗体来消除它们。我们建议通过工程改造靶结合结构域和分泌型抗体来开发嵌合抗体信号传导和分泌(CASS)型B细胞平台,以开发有效的抗癌治疗药物。靶结合结构域将被设计为识别肿瘤相关抗原,并且在结合后将导致三特异性T细胞接合抗体的分泌,该抗体有效地刺激募集的T细胞并使它们与肿瘤细胞接触,进一步增强肿瘤细胞裂解。B细胞的第二个主要功能是将外来蛋白作为MHC-II片段呈递给T细胞并形成免疫细胞簇,导致其激活并进一步招募各种抗肿瘤免疫细胞。最后,B细胞在免疫记忆中发挥着关键作用,CASS B细胞将提供终身的抗肿瘤监视网络,保护患者在最初的肿瘤被消除后免受转移和复发的伤害。

[0321] 虽然CASS B细胞平台适用于多种癌症,但我们将使用高级别浆液性卵巢癌(HGSOC)作为实验模型。选择HGSOC是因为虽然它是最常见和最致命的卵巢癌形式,但几乎没有新疗法被开发出来,且总体生存率仍然很低。

[0322] 目标1将验证CASS B细胞的工程改造,首先通过构建合成的B细胞受体来识别Muc1。与表达MUC1的肿瘤细胞结合后,CASS B细胞将诱导分泌三特异性T细胞接合抗体,该抗体识别第二肿瘤相关间皮素(MSLN)(CD3xCD28xMSLN),并进一步激活T细胞参与肿瘤细胞识别。

[0323] 目标2将使用2D和3D组织培养实验来验证CASS B细胞工程改造,并证明CASS B细胞的功效以及三特异性抗体刺激和接合T细胞的能力。

[0324] 目标3将使用人源化小鼠来验证CASS B细胞平台在体内的有效性,并允许对抗肿瘤免疫应答进行详细的分子表征。在实施例1中,我们可以研究HGSOC。在不希望受到理论束缚的情况下,CASS B细胞是开创性的平台,有可能为多种癌症提供治疗法。

[0325] 免疫调节性抗体(Abs)和过继性细胞疗法已对癌症疗法产生了革命性的影响,将重点从杀伤肿瘤细胞转变为激活患者的天然抗肿瘤免疫力并逆转免疫抑制性肿瘤微环境(TME)。虽然这些代表了迄今为止一些最有前途的抗癌治疗剂,但它们对高级别浆液性卵巢癌(HGSOC)患者的功效通常有限¹⁻³。这在一定程度上是由于HGSOC肿瘤中突变负荷低和新抗原生成有限,导致免疫学上的“冷”肿瘤,其中肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)极少^{4,5}。对于那些到达肿瘤部位的免疫细胞,它们会遇到大量的免疫抑制细胞,包括髓系衍生的抑制细胞、调节性T细胞和肿瘤相关的M2巨噬细胞^{6,7}。为了解决这个问题,本文的实施例包含嵌合抗体分泌

和信号传导 (CASS) 型B细胞,这是一种新的创新细胞免疫疗法平台。

[0326] 作为天然抗原呈递细胞 (APC), CASS B细胞利用其在MHC II类分子上呈递抗原的能力,增强肿瘤细胞识别和新抗原扩散,同时还依靠其在三级淋巴结构 (TLS) 的形成和功能中的作用来分泌趋化因子,这些趋化因子将各种免疫细胞子集招募到HGSOC肿瘤部位^{8,9}。为了进一步改善招募的T细胞对肿瘤的识别和接合,我们将工程改造CASS B细胞以表达经修饰的肿瘤相关抗原 (TAA) 靶向B细胞受体 (BCR), 该受体激活后将在肿瘤部位诱导局部表达抗CD3xCD28xTAA三特异性T细胞接合抗体。在本研究中,针对CASS B细胞和T细胞衔接器的靶向分别选择粘蛋白-1 (Muc1) 和间皮素 (MSLN)¹⁰⁻¹⁵。三特异性抗体上的抗CD3xCD28组合将允许有效刺激CD4和CD8 T细胞两者,并且抗MSLN结构域使激活的T细胞归巢至肿瘤,促进有效的肿瘤细胞裂解¹⁶。虽然本文开发的三特异性抗体旨在增强T细胞介导的细胞毒性,但它不会直接抑制TME中生成的免疫抑制信号。为了阻断免疫抑制并进一步增强CASS B细胞和招募的T细胞两者的功效,我们将使用CASS B细胞和全身递送抗PD1抗体的组合疗法^{17,18}。由于CASS B细胞本身没有内在的细胞毒性能力,因此CASS B细胞平台在细胞疗法领域是独一无二的,因为CASS B细胞具有启动稳健的抗肿瘤应答并增强所招募的免疫细胞的活性的能力。

[0327] 抗Muc1靶向CASS B细胞 (其分泌针对HGSOC的抗CD3xCD28xMSLN T细胞接合Ab) 在本文描述。CASS B细胞的模块化设计允许轻松靶向其他TAA,并且可以调整分泌的有效载荷以靶向相关的免疫轴,从而允许CASS B细胞能够适应广泛多种癌症。由于B细胞寿命长,并且是免疫记忆的重要部分,CASS B细胞在肿瘤处持续递送治疗性有效载荷,并在原发肿瘤被根除后,提供针对转移和复发的终身免疫监视系统。

[0328] 在不希望受理论束缚的情况下,CASS B细胞的肿瘤局部激活将经由先天抗原呈递能力重塑HGSOC肿瘤微环境,而三级淋巴结构 (TLS) 的形成将导致广泛的免疫细胞子集的招募和激活。进一步地,经工程改造以分泌抗CD3xCD28xMSLN三特异性T细胞接合抗体的CASS B细胞将进一步恢复抗肿瘤免疫力,增强T细胞激活、肿瘤识别和细胞毒性活性。

[0329] 我们使用包含270亿成员的人噬菌体库^{19, 20, 22, 23, 25}来鉴定抗MSLN (图1的靠上图) scFv的集和Muc1 scFv (图1的靠下图)。

[0330] 我们的经工程改造的IgG-BCR是使用与以高水平表达的膜结合IgG1铰链-Fc融合的scFv构建并结合靶抗原 (图2分图A)²⁶。使用原代B细胞的转导实验证明了多个供体和DNA构建体的高滴度转导 (图2分图B)。我们利用NFAT/NFkB应答元件 (RE) 开发了诱导型T细胞激活测定 (图2分图C)。将使用荧光蛋白代替分泌的三特异性T细胞接合抗体。

[0331] 非限制性目标

[0332] 非限制性目标1:CASS B细胞构建体和三特异性抗体有效载荷的工程改造和优化-将选择适当的Ab (抗MSLN、Muc1、CD3、CD28) 用于CASS B细胞开发,随后优化信号传导结构域和诱导型应答元件 (RE)。

[0333] 非限制性目标2:CASS B和三特异性T细胞衔接器的体外评价-将进行体外表征以鉴定激活阈值并定量Ab分泌水平。3D类器官培养物将用于对CASS B细胞和T细胞接合性有效载荷进行深入的分子表征和功能表征。

[0334] 非限制性目标3:使用HLA匹配的人源化HGSOC小鼠模型的体内功效-将在人源化小鼠中使用细胞系衍生的异种移植物 (CDX) 模型在体内测试具有或没有全身性抗PD1组合疗

法情况下对优化的CASS B细胞构建体的最终评价。

[0335] 非限制性目标1:CASS B细胞构建体和三特异性Ab有效载荷的工程改造和优化:

[0336] 非限制性目标1A:抗体发现和三特异性T细胞衔接器工程改造-在这个子目标中,我们将开发四种抗体;用于IgG-BCR靶向的抗Muc1和用于三特异性T细胞衔接器的抗CD3、CD28、MSLN。将进行亲和力调节和表位作图以进一步表征这些抗体。

[0337] 非限制性目标1B:CASS B细胞载体设计和工程改造-CASS B细胞慢病毒载体将使用经工程改造的IgG-BCR靶向性构建体和NFAT/NFκB诱导型报告系统进行设计。我们将验证IgG-BCR经由经工程改造的转录因子应答元件(RE)(包括具有最小启动子的各种NFAT和NFκB形式)诱导荧光蛋白表达的能力²⁷⁻³⁰。

[0338] 非限制性目标1C:原代B细胞的转导和指数扩增的优化-由于原代B细胞需要一系列细胞因子和刺激信号,我们将进一步工程改造3T3-msCD40L饲养细胞系来表达IL-2、15和21,以支持最大B细胞生长^{31,32}。我们将验证原代B细胞转导和指数扩增的优化方案。原代B细胞的慢病毒转导将通过测试用于慢病毒包封的不同包膜蛋白(VSVG、BaEV、GaLV)和驱动IgG-BCR表达的启动子(Ef1α、SFFV)来优化³³⁻³⁶。

[0339] 非限制性目标2:CASS B细胞和三特异性T细胞衔接器的体外验证

[0340] 非限制性目标2A:抗Muc1 CASS B细胞的体外功能验证-将使用非限制性目标1中开发的三特异性T细胞衔接器组装CASS B细胞构建体。将使用可溶性交联Muc1进行表征,以确定CASS B细胞激活阈值并定量三特异性Ab表达水平。

[0341] 非限制性目标2B:利用HGSOC肿瘤球体的3D培养中CASS B细胞的体外功效-Muc1/MSLN阳性HGSOC细胞系将被移植到HLA匹配的人源化小鼠中。从这些小鼠采集的肿瘤将与微流体芯片一起使用,以在体外生成HGSOC的3D类器官模型³⁷⁻⁴⁰。这将允许我们验证CASS B细胞归巢至肿瘤球体,并且TME的细胞因子分析将允许详细验证T细胞接合性有效载荷的效果。单细胞RNAseq和多参数FACS将用于CASS B细胞和T细胞衔接器功能和功效的详细分子和机制研究。

[0342] 非限制性目标3:使用HLA匹配的人源化HGSOC小鼠模型的体内功效

[0343] 非限制性目标3A:验证抗Muc1 CASS B细胞在携带CDX肿瘤的人源化NSG-SGM3小鼠中的抗肿瘤功效和持久性-HLA匹配的人源化NSG-SGM3小鼠将用于使用Muc1/MSLN阳性HGSOC细胞系生成HGSOC模型。然后,这些模型将用于验证三特异性T细胞衔接器和CASS B细胞作为一个整体的功效,其中各种先进的分析技术(IHC、多参数FACS、scRNAseq)用于进一步研究CASS B细胞疗法不仅对肿瘤而且对整个免疫系统的影响。

[0344] 非限制性目标3B:验证CASS B细胞与全身性抗PD1疗法组合的功效-非限制性目标3A中描述的HGSOC CDX模型将用于测试CASS B细胞与抗PD1疗法组合的功效。将评估免疫细胞衰竭标志物的分子特征和表型分析,并将其与非限制性目标3A中鉴定的那些进行比较。

[0345] 统计考虑因素:每组5只动物用于在目的条件和不同的结果测量之间进行个体成对比较,我们使用0.05水平的双样品双侧t检验,以0.93的功效检测到等于2.5SD的均值差异。在实践中,我们将应用线性混合效应模型路径。Bioconductor R包flowWorkspace将处理流数据,并使用R包flowFlowJo进行可视化。将使用斯皮尔曼相关性(Spearman Correlation)和交互信息来检查表达之间的关系。莫兰指数(Moran's Index)将用于定量分段的RNAscope ISH图像上蛋白的空间自相关性,并且加布里埃尔(Gabriel)图将用于评

价与应答相关的空间模式。将使用简单的莫兰 (Moran) 特征向量图和空间主成分分析来评估蛋白之间的多变量空间关联。另外的统计分析将通过与丹娜—法伯生物统计学中心 (Dana-Farber Biostatistics Core) 协商提供。

[0346] 在实施例中,可以通过修饰或替换IgG-BCR信号传导结构域来进行进一步的工程改造。我们拥有使用人源化小鼠的经验,在假设由于动物死亡或缺乏CD34植入而导致20%的脱落率情况下,生成队列。如果我们无法通过CD34植入实现适当的人源化,则可能的替代方案是通过hPBMC注射进行人源化。CDX模型的使用将使我们更容易建立用于体外和体内研究的模型。

[0347] 该实例中引用的参考文献

[0348] 1.Doo,D.W.,Norian,L.A.和Arend,R.C.Checkpoint inhibitors in ovarian cancer:A review of preclinical data.[卵巢癌中的检查点抑制剂:临床前数据综述]Gynecol.Oncol.Reports[妇科肿瘤报告]29,48-54(2019)。

[0349] 2.Nero,C.等人Patient-derived organoids and high grade serous ovarian cancer:from disease modeling to personalized medicine.[患者衍生的类器官和高级别浆液性卵巢癌:从疾病建模到个性化医疗]J.Exp.Clin.Cancer Res.[实验与临床癌症研究杂志]40,1-14(2021)。

[0350] 3.Matulonis,U.A.等人Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients with advanced recurrent ovarian cancer:results from the phase II KEYNOTE-100study.[派姆单抗在晚期复发性卵巢癌患者中的抗肿瘤活性和安全性:II期KEYNOTE-100研究的结果]Ann.Oncol.[肿瘤学年鉴]30,1080-1087(2019)。

[0351] 4.Wu,J.W.Y.等人T-Cell Receptor Therapy in the Treatment of Ovarian Cancer:A Mini Review.[卵巢癌治疗中的T细胞受体疗法:微型综述]Front.Immunol.[免疫学前沿]12,1-8(2021)。

[0352] 5.Bonaventura,P.等人Cold tumors:A therapeutic challenge for immunotherapy.[冷肿瘤:免疫疗法的治疗挑战]Front.Immunol.[免疫学前沿]10,1-10(2019)。

[0353] 6.Ciucci,A.等人Ovarian low and high grade serous carcinomas:Hidden divergent features in the tumor microenvironment.[卵巢低级别和高级别浆液性癌:肿瘤微环境中隐藏的趋异性特征]Oncotarget[肿瘤靶标]7,68033-68043(2016)。

[0354] 7.Drakes,M.L.,Czerlanis,C.M.和Stiff,P.J.Immune checkpoint blockade in gynecologic cancers:State of affairs.[妇科癌症中的免疫检查点阻断:事态]Cancers[癌症](巴塞尔).12,1-20(2020)。

[0355] 8.Kreiter,S.等人Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer.[突变的MHC II类表位驱动对癌症的治疗性免疫应答]Nature[自然]520,692-696(2015)。

[0356] 9.Alspach,E.等人MHC-II neoantigens shape tumour immunity and response to immunotherapy.[MHC-II新抗原塑造肿瘤免疫和对免疫疗法的应答]Nature[自然]574,696-701(2019)。

[0357] 10.Izar,B.等人A single-cell landscape of high-grade serous ovarian

cancer.[高级别浆液性卵巢癌的单细胞景观]Nat.Med.[自然·医学]26,1271-1279(2020)。

[0358] 11.Wang,L.等人Expression of MUC1 in primary and metastatic human epithelial ovarian cancer and its therapeutic significance.[MUC1在原发性和转移性人上皮性卵巢癌中的表达及其治疗意义]Gynecol.Oncol.[妇科肿瘤学]105,695-702(2007)。

[0359] 12.Feng,H.,Ghazizadeh,M.,Konishi,H.和Araki,T.Expression of MUC1and MUC2 mucin gene products in human ovarian carcinomas.[MUC1和MUC2粘蛋白基因产物在人卵巢癌中的表达]Jpn.J.Clin.Oncol.[日本临床肿瘤学杂志]32,525-529(2002)。

[0360] 13.Weidemann,S.等人Mesothelin Expression in Human Tumors:ATissue Microarray Study on 12,679Tumors.[人肿瘤中的间皮素表达:对12,679个肿瘤的组织微阵列研究]Biomedicines[生物医学]9,4-9(2021)。

[0361] 14.Hilliard,T.S.The impact of Mesothelin in the Ovarian cancer tumor microenvironment.[间皮素在卵巢癌肿瘤微环境中的影响]Cancers[癌症](巴塞尔).10,(2018)。

[0362] 15.Yildiz,Y.等人High expression of mesothelin in advanced serous ovarian cancer is associated with poor prognosis.[晚期浆液性卵巢癌中间皮素的高表达与不良预后相关]J.B.U.ON.[巴尔干医学肿瘤学杂志]24,1549-1554(2019)。

[0363] 16.Wu,L.等人Trispecific antibodies enhance the therapeutic efficacy of tumor-directed T cells through T cell receptor co-stimulation.[三特异性抗体通过T细胞受体共刺激增强肿瘤定向T细胞的治疗功效]Nat.Cancer[自然·癌症]1,86-98(2020)。

[0364] 17.Waite,J.C.等人Tumor-targeted CD28 bispecific antibodies enhance the antitumor efficacy of PD-1immunotherapy.[肿瘤靶向CD28双特异性抗体增强PD-1免疫疗法的抗肿瘤功效]Sci.Transl.Med.[科学转化医学]12,(2020)。

[0365] 18.Mullard,A.Trispecific antibodies take to the clinic.[三特异性抗体进入临床]Nat.Rev.Drug Discov.[自然药物发现综述]19,657-658(2020)。

[0366] 19.Chang,D.-K.等人Humanization of an anti-CCR4 antibody that kills cutaneous T-cell lymphoma cells and abrogates suppression by T-regulatory cells.[抗CCR4抗体的人源化,可杀伤皮肤T细胞淋巴瘤细胞并消除T调节细胞的抑制]Mol.Cancer Ther.[分子癌症治疗学]11,2451-2461(2012)。

[0367] 20.Xu,C.等人Unique biological properties of catalytic domain directed human anti-CAIX antibodies discovered through phage-display technology.[通过噬菌体展示技术发现的催化结构域定向人抗CAIX抗体的独特生物学特性]PLoS One[公共科学图书馆综合]5,(2010)。

[0368] 21.Chang,D.K.等人Humanized mouse G6 anti-idiotypic monoclonal antibody has therapeutic potential against IGHV1-69 germline gene-based B-CLL.[人源化小鼠G6抗独特型单克隆抗体具有针对基于IGHV1-69种系基因的B-CLL的治疗潜力]MAbs[单克隆抗体]8,787-798(2016)。

[0369] 22.Sui,J.等人Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses.[广谱中和禽类和人甲型流感病毒的结构和功能基础]Nat.Struct.Mol.Biol.[自然结构与分子生物学]16,265-273 (2009)。

[0370] 23.Fu,Y.等人Abroadly neutralizing anti-influenza antibody reveals ongoing capacity of haemagglutinin-specific memory B cells to evolve.[广泛中和的抗流感抗体揭示了血凝素特异性记忆B细胞持续进化的能力]Nat.Comm.[自然通讯]7, (2016)。

[0371] 24.Suarez,E.R.等人Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model.[在人源化小鼠模型中,分泌抗PD-L1抗体的嵌合抗原受体T细胞更有效地消退肾细胞癌]Oncotarget[肿瘤靶标]7, (2016)。

[0372] 25.Chang,D.K.等人Humanized mouse G6 anti-idiotypic monoclonal antibody has therapeutic potential against IGHV1-69 germline gene-based B-CLL.[人源化小鼠G6抗独特型单克隆抗体具有针对基于IGHV1-69种系基因的B-CLL的治疗潜力]MAbs[单克隆抗体]8,787-798(2016)。

[0373] 26.Wan,Z.等人The activation of IgM-or isotype-switched IgG-and IgE-BCR exhibits distinct mechanical force sensitivity and threshold.[IgM转换的或同种型转换的IgG-BCR和IgE-BCR的激活表现出不同的机械力敏感性和阈值]Elife[电子生命]4,1-24(2015)。

[0374] 27.Uchibori,R.等人Functional Analysis of an Inducible Promoter Driven by Activation Signals from a Chimeric Antigen Receptor.[由来自嵌合抗原受体的激活信号驱动的诱导型启动子的功能分析]Mol.Ther.-Oncolytics[分子疗法-溶瘤学]12, 16-25(2019)。

[0375] 28.Zhang,L.等人Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12expression to the tumor environment.[通过靶向和控制IL-12对肿瘤环境的表达来改善过继性T细胞疗法]Mol.Ther.[分子疗法]19,751-759(2011)。

[0376] 29.Hooijberg,E.,Bakker,A.Q.,Ruizendaal,J.J.和Spits,H.NFAT-controlled expression of GFP permits visualization and isolation of antigen-stimulated primary human T cells.[NFAT控制的GFP表达允许抗原刺激的原代人T细胞的可视化和分离]Blood[血液]96,459-466(2000)。

[0377] 30.Lin,T.等人Establishment of NF- κ B sensing and interleukin-4secreting mesenchymal stromal cells as an“on-demand”drug delivery system to modulate inflammation.[建立NF- κ B传感和白介素-4分泌间充质基质细胞作为“按需”药物递送系统以调节炎症]Cytotherapy[细胞疗法]19,1025-1034(2017)。

[0378] 31.Whaley,R.E.等人Generation of a cost-effective cell line for support of high-throughput isolation of primary human B cells and monoclonal neutralizing antibodies.[生成具有成本效益的细胞系,用于支持原代人B细胞和单克隆中和抗体的高通量分离]J.Immunol.Methods[免疫学方法杂志]488,112901(2021)。

[0379] 32.Huang,J.等人Isolation of human monoclonal antibodies from peripheral blood B cells.[从外周血B细胞中分离人单克隆抗体]Nat.Protoc.[自然方案]8,1907-1915(2013)。

[0380] 33.Girard-Gagnepain,A.等人Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs.[狒狒包膜假型LV在基因转移至早期细胞因子刺激和静息HSC方面优于VSV-G-LV]Blood[血液]124,1221-1231(2014)。

[0381] 34.Tomás,H.A.等人Improved GaLV-TR Glycoproteins to Pseudotype Lentiviral Vectors:Impact of Viral Protease Activity in the Production of LV Pseudotypes.[将GaLV-TR糖蛋白改善为假型慢病毒载体:病毒蛋白酶活性在LV假型的产生中的影响]Mol.Ther.-Methods Clin.Dev.[分子疗法-方法与临床开发]15,1-8(2019)。

[0382] 35.Bernadin,O.等人Baboon envelope LVs efficiently transduced human adult,fetal,and progenitor T cells and corrected SCID-X1 T-cell deficiency.[狒狒包膜LV有效转导了人成人、胎儿和祖T细胞,并纠正了SCID-X1 T细胞缺陷]Blood Adv.[血液进展]3,461-475(2019)。

[0383] 36.Winiarska,M.等人Selection of an optimal promoter for gene transfer in normal B cells.[在正常B细胞中选择用于基因转移的最佳启动子]Mol.Med.Rep.[分子医学报告]16,3041-3048(2017)。

[0384] 37.Jenkins,R.W.等人Ex vivo profiling of PD-1blockade using organotypic tumor spheroids.[使用器官型肿瘤球体对PD-1阻断进行离体分析]Cancer Discov.[癌症发现]8,196-215(2018)。

[0385] 38.Aref,A.R.等人3D microfluidic:Ex vivo culture of organotypic tumor spheroids to model immune checkpoint blockade.[3D微流体:器官型肿瘤球体的离体培养以模拟免疫检查点阻断]Lab Chip[实验室芯片]18,3129-3143(2018)。

[0386] 39.Wan,C.等人Enhanced Efficacy of Simultaneous PD-1and PD-L1Immune Checkpoint Blockade in High-Grade Serous Ovarian Cancer.[高级别浆液性卵巢癌中的同时PD-1和PD-L1免疫检查点阻断的功效增强]Cancer Res.[癌症研究]81,158-173(2021)。

[0387] 40.Odunsi,A.等人Fidelity of human ovarian cancer patient-derived xenografts in a partially humanized mouse model for preclinical testing of immunotherapies.[用于免疫疗法临床前测试的部分人源化小鼠模型中人卵巢癌患者衍生的异种移植物的保真度]J.Immunother.Cancer[癌症免疫治疗杂志]8,1-13(2020)。

实例3

[0388] 工程改造嵌合抗体信号传导和分泌(CASS)型B细胞以实现癌症治愈

[0389] 癌细胞是一种生命形式,它已经学会了利用我们的免疫系统来获得自身的生长优势。他们通过损害我们的细胞DNA修复机制来实现这一点,从而引起生长因子及其受体上调,进而导致肿瘤生长失控。这种分子劫持还会导致参与免疫检查点阻断(ICB)的分子的表面表达和分泌。通过抗PD1/PDL1阻断的免疫疗法代表了癌症领域的重要进展,并且是多种癌症的一线或标准治疗选择,该多种癌症包括非小细胞肺癌、黑素瘤、结直肠癌和肾细胞癌

(1-3)。然而,虽然治疗的成功已得到充分证实,但它们通常不会治愈癌症。我们必须做得更好。

[0390] 细胞疗法是利用免疫系统杀伤癌细胞的一种方法。例如,T细胞受体 (TCR) 和嵌合抗原受体 (CAR) T细胞能够归巢并靶向癌细胞。

[0391] 此外,本文中的实施例包含称为嵌合抗体信号传导和分泌 (CASS) 型B细胞的新形式的细胞疗法,其将利用体液免疫系统的B细胞来做它们最擅长的事情—分泌高水平的抗体。这些CASS B细胞将被工程改造为通过经工程改造的B细胞受体 (BCR) 识别肿瘤相关抗原 (TAA), TAA接合后, BCR就会激活该CASS B细胞并在肿瘤部位诱导产生高水平的免疫调节双特异性抗体 (BsAb)。这将允许逆转免疫抑制的肿瘤微环境,就像全身递送免疫检查点阻断单克隆抗体 (mAb) 时一样。BsAb分泌只有在CASS B细胞与TAA结合后才能有条件表达,并且大部分位于肿瘤部位。在不希望受理论束缚的情况下,这是迈向新的细胞疗法的一步,其中局部分泌的单克隆抗体致力于改变肿瘤微环境并恢复局部抗肿瘤免疫力。

[0392] 直接杀伤癌细胞、充当免疫检查点阻断抑制剂或破坏肿瘤血管系统的单克隆抗体 (mAb) 药物是正在开发的最有前途的抗癌治疗剂之一。然而,工程改造的人B细胞以寻找癌细胞并在体内肿瘤部位分泌这些mAb的想法是新的,并且可以提供一种强大的新方法治疗原发性和转移性肿瘤。它还可以提供终生的抗肿瘤免疫监视系统,以防止癌症复发并实现“治愈”。B细胞在我们的免疫系统中的作用是识别外来入侵者,并通过产生结合并清除威胁 (无论是微生物还是癌细胞) 的抗体来消除它们。他们通过表达膜结合抗体来实现这一点,该抗体充当结合肿瘤抗原的B细胞受体 (BCR), 导致B细胞从BCR表达细胞转变为抗体分泌细胞。BCR接合后,发生以下:两种主要酪氨酸激酶Lyn和Syn介导的快速酪氨酸磷酸化,以及钙离子极化。这些生化事件引起下游信号传导通路激活,从而导致NF- κ B和NFAT信号传导的进一步下游激活,并最终导致B细胞扩增和稳健的mAb分泌 (5)。我们将工程改造嵌合抗体信号传导和分泌 (CASS) 型B细胞,将利用这些信号传导通路在肿瘤部位诱导克隆CASS B细胞扩增和分泌免疫调节BsAb。

[0393] 在不希望受理论束缚的情况下,CASS B细胞平台的开发可以有益于对检查点阻断抑制剂敏感或具有免疫抑制微环境的多种临床适应症。抗PD1/PDL1疗法对NSCLC的治疗产生了革命性的影响,例如成为许多患者的一线疗法。然而,这种疗法的功效、持久性和使用范围存在局限性。(6-7)。我们将使用NSCLC作为实验模型,利用我们实验室正在开发的抗PD1/抗TIGIT双特异性抗体。

[0394] 为了将CASS B细胞靶向NSCLC肿瘤部位,将使用针对间皮素 (MSLN) 的工程改造的膜结合单链IgG BCR。质粒还将包含由NFAT或NF- κ B应答元件驱动的第二盒,该元件驱动抗TIGIT/抗PD1 BsAb的分泌。定位到肿瘤部位并激活BCR后,BsAb表达将由MSLN与NSCLC上的BCR接合后的天然信号传导通路诱导。由于这将是诱导型表达系统,因此在肿瘤部位将存在局部高抗体浓度区域,显著降低中靶、肿瘤外效应。

[0395] CASS B细胞将设计为两部分。我们将成功地将工程改造的BCR转移到B细胞中。为了有效转导B细胞,慢病毒颗粒将使用长臂猿白血病病毒 (GALV) 或经工程改造的狨猴包膜糖蛋白进行假型化,并且在转移载体中,BCR表达将由脾病灶形成病毒 (SFFV) 或人延伸因子1 α (EF1 α) 启动子驱动 (8)。接下来,我们将验证用于BsAb分泌的NFAT和/或NF- κ B诱导型表达盒 (9)。为了决定使用哪种应答元件,质粒最初将被设计为表达GFP。Raji细胞和原代B细胞

将用经工程改造的抗MSLN BCR和NFAT/NF- κ B诱导型GFP慢病毒载体转导,并将可溶性生物素化MSLN添加至含有链霉亲和素的培养基中以交联BCR。然后测量GFP表达以确定最佳应答元件。我们将使用抗流感抗体构建工程改造的膜结合IgG(memIgG)。图3显示了我们的memIgG构建体以高水平表达并且具有功能活性,因为它能够结合可溶性HA。

[0396] 接下来,将使用编码肿瘤特异性抗MSLN BCR的载体和替代GFP的诱导型BsAb,通过慢病毒转导构建CASS B细胞。将定量CASS B细胞分泌的抗TIGIT/PD1 BsAb,首先使用可溶性生物素化MSLN+链霉亲和素诱导表达,随后与MSLN+A549 NSCLC细胞共孵育。二次实验将通过将CASS B细胞与CD3+T细胞和表达PDL1和CD155(TIGIT的配体)的各种组合的A549细胞共培养来测试体外对衰竭的抑制。除了测量可溶性抗体浓度外,还将通过FACS染色测量细胞激活/衰竭。这些肿瘤细胞也会因与CASS B细胞脱落的抗MSLN抗体的结合而被染色。体内实验接下来将在携带A549肿瘤的人源化PBL NSG-SGM3小鼠中进行,以验证CASS B细胞的功效和持久性。功效将通过免疫组织化学染色的局部BsAb分泌、肿瘤部位周围B细胞群的增加以及肿瘤大小的变化来测量。我们还将通过检查血清中分泌的BsAb浓度来测量BsAb到外周的渗漏。为了测量持久性,将在外周血和肿瘤微环境(TME)中检测CASS B细胞。最后,scRNAseq将用于分析BsAb在调节TME方面的效果。与全身递送相比,肿瘤周围将出现高BsAb浓度的局部区域,从而导致改善的结果并肿瘤消除。

[0397] 开发新的癌症疗法的目标可以是实现“治愈”。通过了解个体常见或“公共”的免疫要素,可以在肿瘤部位恢复宿主的抗肿瘤免疫力。一旦完成,我们必须开发一种内部免疫监视系统,该系统将永远存在以防止癌症复发。我们将使用从未为此目的开发的免疫系统B细胞来开发新的免疫监视系统。

[0398] 我们将验证工程改造嵌合抗体信号传导和分泌(CASS)型B细胞靶向表达间皮素(MSLN)的NSCLC细胞的可行性。这些抗MSLN CASS B细胞将归巢于肿瘤部位,在那里它们将分泌高水平的双特异性抗TIGIT/抗PDL1抗体,该抗体将充当双检查点阻断抑制剂。这将导致肿瘤微环境发生动态变化,有助于逆转T细胞衰竭并恢复抗肿瘤免疫力。重要且实用的一点是,这种组合细胞免疫疗法将是患者一生中的一次性施用。

[0399] 该实例中引用的参考文献:

[0400] 1.Rolfo C,Caglevic C,Santarpia M,Araujo A,Giovannetti E,Gallardo CD,Pauwels P,Mahave M.Immunotherapy in NSCLC:A Promising and Revolutionary Weapon.[NSCLC的免疫疗法:一种有前途的革命性武器]Adv Exp Med Biol.[实验医学与生物学进展]2017;995:97-125.doi:10.1007/978-3-319-53156-4_5.PMID:28321814综述。

[0401] 2.M.-O.Grimm,K.Leucht,V.Grünwald,S.Foller,New First Line Treatment Options of Clear Cell Renal Cell Cancer Patients with PD-1or PD-L1 Immune-Checkpoint Inhibitor-Based Combination Therapies.[采用基于PD-1或PD-L1免疫检查点抑制剂的组合疗法的透明细胞肾细胞癌患者的新一线治疗选择]J.Clin.Med.[临床医学杂志]9,565(2020)。

[0402] 3.X.Wu,等人,Application of PD-1Blockade in Cancer Immunotherapy.[PD-1阻断在癌症免疫疗法中的应用]Comput.Struct.Biotechnol.J.[计算与结构生物技术杂志]17,661-674(2019)。

[0403] 4.Ryeong Lee B,Sehyun C,Moon J,Joon Kim M,Lee H,Wan Ko H,Chul Cho B,

Sup Shim H,Hwang D,Ryun Kim H,和Ha S-J.Combination of PD-L1 and PVR determines sensitivity to PD-1blockade.[PD-L1和PVR的组合决定了对PD-1阻断的敏感性]JCIinsite[美国临床研究学会洞察]2020;5(14):e128633.<https://doi.org/10.1172/jci.insight.128633>。

[0404] 5.Tolar P,Hanna J,Krueger PD,Pierce SK.The constant region of the membrane immunoglobulin mediates B cell-receptor clustering and signaling in response to membrane antigens.[膜免疫球蛋白的恒定区介导B细胞受体聚簇和应答膜抗原的信号传导]Immunity[免疫].2009;30(1):44-55.Epub 2009/01/13.doi:10.1016/j.immuni.2008.11.007.PubMed PMID:19135393;PMCID:PMC2656684.45。

[0405] 6.Bendell JC,Bedard P,Bang YJ,等人:Phase Ia/Ib dose-escalation study of the anti-TIGIT antibody tiragolumab as a single agent and in combination with atezolizumab in patients with advanced solid tumors.[抗TIGIT抗体替瑞利尤单抗作为单一药物以及与阿替利珠单抗组合治疗晚期实体瘤患者的Ia/Ib期剂量递增研究]2020AACR虚拟年会II.摘要CT302。

[0406] 7.M.-J.Ahn,等人.,1400P Vibostolimab,an anti-TIGIT antibody,as monotherapy and in combination with pembrolizumab in anti-PD-1/PD-L1-refractory NSCLC.[1400P维博利单抗(一种抗TIGIT抗体)作为单一疗法并与派姆单抗组合治疗抗PD-1/PD-L1难治性NSCLC]Ann.Oncol.[肿瘤学年鉴]31,S887(2020)。

[0407] 8.Levy C,Fusil F,Amirache F,Costa C,Girard-Gagnepain A,Negre D,Bernadin O,Garaulet G,Rodriguez A,Nair N,Vandendriessche T,Chuah M,Cosset FL,Verhoeyen E.Baboon envelope pseudotyped lentiviral vectors efficiently transduce human B cells and allow active factor IX B cell secretion in vivo in NOD/SCIDgammac(-/-)mice.[狒狒包膜假型慢病毒载体有效地转导人B细胞,并允许在NOD/SCIDgammac(-/-)小鼠体内的活性因子IX B细胞分泌]J Thromb Haemost.[血栓形成与止血杂志]2016;14(12):2478-92.Epub 2016/09/30.doi:10.1111/jth.13520.PubMed PMID:27685947。

[0408] 9.Uchibori R,Teruya T,Ido H,Ohmine K,Sehara Y,Urabe M,Mizukami H,Mineno J,Ozawa K.Functional Analysis of an Inducible Promoter Driven by Activation Signals from a Chimeric Antigen Receptor.[由来自嵌合抗原受体的激活信号驱动的诱导型启动子的功能分析]Mol Ther Oncolytics.[分子疗法-溶瘤学]2019;12:16-25.Epub2019/01/22.doi:10.1016/j.omto.2018.11.003.PubMed PMID:30662937;PMCID:PMC6325072。

实例4

[0409] 工程改造嵌合抗体信号传导和分泌(CASS)型B细胞以实现癌症治愈

[0410] 免疫检查点阻断抑制剂(CBI)和CAR T细胞彻底改变了我们治疗癌症的方式。虽然这两种疗法都可以激活患者的免疫系统,但都无法主动启动抗肿瘤免疫应答,并且其使用范围和功效存在重大限制。为了解决这个问题,我们可以开发嵌合抗体分泌和信号传导(CASS)型B细胞,其表达经工程改造的肿瘤靶向性B细胞受体,并且在接合后会在肿瘤部位局部分泌高水平的双靶向双特异性CBI抗体。由于B细胞还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,进一步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,CASS 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,从而提供监视程序,防止肿瘤转移和复发。

[0411] 选择非小细胞肺癌(NSCLC)作为模型来开发分泌免疫调节性抗PD1/TIGIT双特异性抗体(bsAb)的抗MSLN定向CASS B细胞。目标1将专注于CASS B细胞平台的开发,并在此阶段结束时,我们将鉴定出三种抗体并优化包含CASS B细胞的信号传导结构域。在目标2中,将进行体外表征和功效测试,从而清楚地了解CASS B细胞激活和bsAb分泌之间的联系,同时提供在功能和分子水平上CASS B细胞与CAR T细胞相比的功效的关键分析。目标3将使用细胞系衍生的和患者衍生的NSCLC模型在人源化小鼠中执行体内实验。多参数流式细胞术、单细胞RNA测序和免疫组织化学将提供免疫调节bsAb和CASS B细胞平台的分子和机制功效的详细评估。

[0412] 我们可以开发一种新型的组细胞免疫疗法,即嵌合抗体分泌和信号传导(CASS)型B细胞。这些B细胞将表达靶向B细胞受体(BCR)的经工程改造的肿瘤相关抗原(TAA),并且接合后会在肿瘤部位局部分泌高水平的检查点阻断抑制剂(CBI)双特异性抗体(bsAb)。这将能够逆转免疫抑制性肿瘤微环境(TME)并恢复患者的天然先天和适应性免疫力以消除癌细胞。此外,与T细胞不同,B细胞充当专门的抗原呈递(APC)细胞,并且可以增强肿瘤细胞识别并协助新抗原扩散,从而引起肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)衰竭的逆转,和更广泛且更稳健的抗肿瘤免疫应答的诱导。我们将设计一种抗PD1/TIGIT bsAb分泌型CASS B细胞,该细胞靶向间皮素(MSLN)用于治疗NSCLC¹⁻³。

[0413] 第一个目标包含构建和优化经工程改造的抗MSLN IgG-BCR、将在肿瘤部位递送的抗PD1/TIGIT bsAb以及驱动bsAb表达的诱导型应答元件(RE)。我们的实验室鉴定了抗MSLN、抗PD1和抗TIGIT抗体的组,功能测定将鉴定先导候选物。同时开展的工作将集中于诱导型应答元件的开发和B细胞转导条件的优化。

[0414] 第二个目标是抗MSLN CASS B细胞的体外功能验证。激活测定将用于定量bsAb和细胞因子分泌水平。患者衍生的器官型肿瘤球体(PDOTS)将用于验证CASS B细胞功效,并经由细胞因子谱分析、IHC和单细胞RNA测序(scRNAseq)与CAR T细胞进行分子/机制比较。

[0415] 另一个目标将是利用HLA匹配的人源化小鼠生成细胞系衍生的(CDX)和患者衍生的异种移植(PDX)NSCLC模型,以测试CASS B细胞功效。模型将与各种分析技术(IHC、流式细胞术、scRNAseq)搭配,以进一步研究CASS B细胞疗法对周围TME的影响。

[0416] 背景:检查点阻断抑制剂(CBI)单克隆抗体(mAb)和过继性细胞疗法已对癌症治疗产生了革命性的影响,将重点从杀伤肿瘤细胞转变为激活患者的天然抗肿瘤免疫力并逆转免疫抑制性肿瘤微环境(TME)。虽然这些代表了迄今为止一些最有前途的抗癌治疗剂,但只有少数患者经历了完全或持久的应答,并且许多患者经历了不同严重程度免疫相关不良事件(irAE)⁴⁻⁷。为了解决这个问题,组合CBI疗法(比如抗PD(L)1/抗TIGIT)已经过测试,并在临床试验中显示出显著的前景⁸⁻¹¹。另一个途径是开发装甲或免疫恢复性CAR T细胞,这些细胞被工程改造为直接在肿瘤部位分泌免疫调节有效载荷,增加功效,同时减少全身递送所见的中靶/肿瘤外副作用^{12,13}。

[0417] 除了T细胞之外,各种免疫细胞也已被用于创建新的CAR,包括自然杀伤细胞(NK-CAR)和巨噬细胞(CAR-M),这些细胞的共同之处在于它们提供直接的抗肿瘤活性^{14,15}。B细胞

是体液免疫的重要组分,它产生的抗体最初是免疫疗法领域发展的基础。然而,它们不具有内在的细胞毒性能力,因此在很大程度上被排除在这些进步之外。

[0418] 在不希望受理论束缚的情况下,嵌合抗体分泌和信号传导(CASS)型B细胞平台是独特的基于B细胞的细胞疗法,其不依赖于直接细胞毒性,而是利用B细胞的两种内在能力;分泌高水平CBI抗体以逆转免疫抑制性TME的能力,以及加工和在MHC II类分子上呈递抗原的能力,从而导致招募CD4⁺T细胞,并允许增强肿瘤细胞识别和新抗原扩散。虽然CBI的诱导性靶向递送将减少irAE,但作为专门的APC的能力使CASS B细胞平台在细胞疗法领域独一无二,因为CASS B细胞具有启动稳健抗肿瘤应答的能力。在先天抗肿瘤应答中发挥着关键作用的MHC II类新抗原进一步证明了这种影响^{16,17}。

[0419] 本文所述的是分泌针对NSCLC的抗PD1/TIGIT bsAb的MSLN+靶向CASS B细胞,该CASS B细胞的模块化设计允许轻松靶向其他TAA,并且可以调整分泌的有效载荷以靶向相关的免疫轴,从而允许CASS B细胞能够适应广泛多种癌症。由于B细胞寿命长,并且是免疫记忆的重要部分,CASS B细胞在肿瘤处持续递送治疗性有效载荷,并在原发肿瘤被根除后,提供针对转移和复发的终身免疫监视系统。在不希望受理论束缚的情况下,CASS B细胞平台的长持续时间和可诱导性质可以适应于用生物疗法治疗的其他疾病,例如心血管和自身免疫疾病以及神经障碍,其可能需要长期疾病维持和快速施用治疗剂以治疗急性症状。

[0420] 实验室致力于开发装甲和免疫恢复性CAR T细胞,包括分泌细胞因子、CBI mAb和bsAb(BiTE)的那些细胞,目标是通过重塑局部TME来增强CAR T功效^{12,13}。使用诱导型或组成型表达的有效载荷的研究表明,a)旁观者免疫细胞的参与和其他抗癌细胞类型的招募可显著增强治疗功效,以及b)在肿瘤部位分泌的蛋白在肿瘤周围保持高浓度,且极少转移至血清¹⁸⁻²⁰。

[0421] B细胞工程改造是一项较新的成就,主要集中于创建能够分泌针对RSV和HIV的中和和病原体抗体的B细胞²¹⁻²³。与本文所述的癌症治疗剂不同,这些工作中描述的B细胞专注于全身性产生抗体以中和病毒感染,并利用CRISPR/Cas9将重组mAb插入B细胞的Ig基因座中。这样做的具有允许抗体继续经历亲和力成熟的附加优势,这是对抗传染病的要求,但不是靶向免疫标志物的要求。在不希望受理论束缚的情况下,我们将操纵B细胞以可诱导的方式表达选择的经工程改造的抗体,并且激活后,这些经工程改造的B细胞不仅分化成Ab分泌型细胞,而且分化成提供长期保护的记忆B细胞²⁴。

[0422] 非限制性、示例性研究计划

[0423] 目标1:CASS B细胞构建体的工程改造和优化-将选择适当的scFv(抗MSLN、PD1、TIGIT)用于CASS B细胞开发,随后优化信号传导结构域和诱导型应答元件²⁵⁻²⁸。原代B细胞的高效转导和指数扩增方案也将利用各种慢病毒包膜蛋白和培养条件进行优化²⁹⁻³²。

[0424] 实验设计和程序

[0425] 抗体发现、工程改造和优化:我们已经建立了一个拥有270亿成员的人噬菌体库,其已用于分离许多治疗性抗体³³⁻³⁷。已鉴定了初步的抗PD1、TIGIT和MSLN集(图33)用于进一步的工程改造和优化。

[0426] 双特异性抗体设计和工程改造:由于PD1/TIGIT在免疫细胞上表达,因此免疫耗竭不是优选的^{38,39}。目前的设计利用了先前开发和表征的串联scFv构建体,但也会考虑其他设计。

[0427] B细胞分离、扩增和转导:将分离B细胞并测试各种扩增培养基配制品^{23,40,41}。对于转导,B细胞将被激活、转导并且在转导后72小时被分选。

[0428] IgG-BCR构建体的生成:我们的经工程改造的IgG-BCR是使用与以高水平表达的膜结合IgG1铰链-Fc融合的scFv构建并结合靶抗原⁴²。使用原代B细胞的初始转导实验证明了多个供体和DNA构建体的高滴度转导。我们之前利用NFAT/NFkB RE开发了诱导型T细胞激活测定。对于优化实验,将使用荧光蛋白代替分泌的bsAb。

[0429] 在不希望受理论束缚的情况下,mAb发现或CASS B细胞设计不会有问题。我们实验室采用的mAb工程改造技术将允许我们开发先前发现的mAb组,为每个靶标找到先导候选物。在不希望受理论束缚的情况下,对于体内实验,我们可以获得高转导效率和转导细胞的指数扩增。

[0430] 我们可以为每个靶标鉴定出先导抗体。然后我们可以构建载体并成功转导/扩增CASS B细胞。

[0431] 目标2:CASS B细胞的体外测试和功效-将进行深入的体外表征,以鉴定激活阈值并定量bsAb分泌水平。最终体外测定将使用患者衍生的器官型肿瘤球体(PDOTS)进行,允许我们观察CASS B细胞归巢并进行对bsAb有效载荷的详细分析。

[0432] 非限制性、示例性实验设计和程序

[0433] CASS B细胞激活测定:来自激活的CASS B细胞的上清液将通过ELISA进行筛选,以测量bsAb和细胞因子浓度。

[0434] NSCLC PDOT生成和评价:NSCLC PDOT的生成将按照Jenkins等人和Aref等人^{43,44}中概述的方案进行。除了测试bsAb和CASS B细胞功效之外,还将进行比较实验以验证CASS B细胞治疗和CAR T细胞治疗之间的治疗差异。将通过IHC、scRNAseq和细胞因子谱分析进行免疫谱分析。由于NSCLC肿瘤组织的可用性有限,已设计了一项备用计划,使用间皮瘤肿瘤进行PDOT生成。间皮瘤具有高度抑制性TME,并且免疫浸润细胞显示出高水平的衰竭标志物,使其成为体外测定的理想替代方案⁴⁵⁻⁴⁸。

[0435] 预计结果:目标2将深入了解CASS B细胞激活,并验证用于选择性靶向MSLN+肿瘤的最佳抗MSLN scFv。PDOT将经由细胞因子分泌和转录谱提供CASS B细胞功效的全面数据集,并且抗MSLN CASS B细胞将运输至肿瘤,且分泌的bsAb将逆转免疫细胞的抑制。另外,与CAR T细胞疗法相比,我们将看到CASS B细胞情况下具有更大的表位扩散和旁观者免疫细胞激活。

[0436] 里程碑:Aim 2的第一个里程碑将是生成CASS B细胞激活曲线和定量bsAb分泌。下一个里程碑将是建立PDOTS,并全身性地以及作为CASS B细胞有效载荷对bsAb进行功效测试。另一个里程碑将是比较CASS B细胞和CAR T细胞疗法,以及经由IHC和scRNAseq生成每种疗法的免疫谱。

[0437] 目标3:使用HLA匹配的人源化NSCLC小鼠模型的体内功效-体内实验将在人源化小鼠中的细胞系衍生的异种移植(CDX)模型上进行。使用来自公开可用的存储库的经过验证的患者衍生的异种移植(PDX)模型进行最终测试将改善肿瘤完整性和表型特征,同时准确模拟体内肿瘤的TME。

[0438] 实验设计和程序

[0439] 人源化小鼠中的NSCLC CDX和PDX模型的建立:在荧光化之前,将针对PDL1和CD155

表达水平筛选NSCLC细胞系和PDX模型⁴⁹。人免疫系统重建将按照我们自己和其他人的报告进行⁵⁰⁻⁵²。为了生成生长曲线,不同浓度的NSCLC细胞系/PDX肿瘤将被植入人源化小鼠⁵³的后肋腹。

[0440] CASS B细胞在人源化NSCLC小鼠模型中的功效的评估:我们将使用CDX和PDX模型来验证bsAb和CASS B细胞的体内功效。样品将按照我们实验室常用的既定方案通过多参数FACS、IHC/ISH和scRNASeq进行分析⁵⁴⁻⁶³。

[0441] 在不希望受理论束缚的情况下,将会成功生成NSCLC模型。这些模型将证明CASS B细胞聚簇在肿瘤周围并分泌高水平的bsAb,从而降低TME的免疫抑制性质并招募另外的抗肿瘤免疫细胞。IHC/ISH和scRNAseq将提供bsAb功效、CASS B细胞归巢以及CASS B细胞和CD4 T细胞中APC通路激活的分子证据,而TCR/BCR的5' scRNAseq将用于直接监测TIL之间的表位扩散。

[0442] 统计考虑因素:每组5只动物用于在目的条件和不同的结果测量之间进行个体成对比较,我们使用0.05水平的双样品双侧t检验,以0.93的功效检测到等于2.5SD的均值差异。

[0443] 里程碑:Aim 3的第一个里程碑将是生成NSCLC的CDX和PDX模型。随后的里程碑可以是启动和完成在CDX模型中测试bsAb,以及在CDX和PDX模型中测试CASS B细胞的计划动物实验。由于这些实验产生了大量的数据,第三个里程碑可以是完成每个动物实验的数据分析。

[0444] 该实例中引用的参考文献:

[0445] 1.Ho,M.等人Mesothelin expression in human lung cancer.[间皮素在人肺癌中的表达]Clin.Cancer Res.[临床癌症研究]13,1571-1575(2007)。

[0446] 2.Thomas,A.等人High mesothelin expression in advanced lung adenocarcinoma is associated with KRAS mutations and a poor prognosis.[间皮素在晚期肺腺癌中的高表达与KRAS突变和不良预后相关]Oncotarget[肿瘤靶标]6,11694-11703(2015)。

[0447] 3.Weidemann,S.等人Mesothelin Expression in Human Tumors:A Tissue Microarray Study on 12,679 Tumors.[人肿瘤中的间皮素表达:对12,679个肿瘤的组织微阵列研究]Biomedicines[生物医学]9,4-9(2021)。

[0448] 4.Berghmans,T.,Durieux,V.,Hendriks,L.E.L.和Dingemans,A.-M.Immunotherapy:From Advanced NSCLC to Early Stages,an Evolving Concept.[免疫疗法:从晚期NSCLC到早期,一个不断发展的概念]Front.Med.[医学前沿]7,1-16(2020)。

[0449] 5.Qu,J.等人The progress and challenge of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in treating non-small cell lung cancer.[抗PD-1/PD-L1免疫疗法在治疗非小细胞肺癌中的进展与挑战]Ther.Adv.Med.Oncol.[医学肿瘤学治疗进展]13,1-28(2021)。

[0450] 6.Ott,P.A.和Wu,C.J.Cancer vaccines:Steering t cells down the right path to eradicate tumors.[癌症疫苗:引导T细胞走上正确的道路以根除肿瘤]Cancer Discov.[癌症发现]9,476-481(2019)。

[0451] 7.Rogado,J.等人Immune-related adverse events predict the therapeutic efficacy of anti-PD-1 antibodies in cancer patients.[免疫相关不良事件预测抗PD-

1抗体对癌症患者的治疗功效]Eur.J.Cancer[欧洲癌症杂志]109,21-27(2019)。

[0452] 8.Lee,D.H.Update of early phase clinical trials in cancer immunotherapy.[癌症免疫疗法早期临床试验的更新]BMB Rep.[生物化学与分子生物学报告]54,70-88(2021)。

[0453] 9.Ahn,M.-J.等人。1400P Vibostolimab,an anti-TIGIT antibody,as monotherapy and in combination with pembrolizumab in anti-PD-1/PD-L1-refractory NSCLC.[1400P Vibostolimab是一种抗TIGIT抗体,作为单一疗法或与派姆单抗联合治疗抗PD-1/PD-L1难治性NSCLC]Ann.Oncol.[肿瘤学年鉴]31,S887(2020)。

[0454] 10.Niu,J.等人1410P Safety and efficacy of vibostolimab,an anti-TIGIT antibody,plus pembrolizumab in patients with anti-PD-1/PD-L1-naive NSCLC.[1410P维博利单抗(一种抗TIGIT抗体)加派姆单抗治疗抗PD-1/PD-L1初治NSCLC患者的安全性和功效]Ann.Oncol.[肿瘤学年鉴]31,S891-S892(2020)。

[0455] 11.Rodriguez-Abreu,D.等人Primary analysis of a randomized,double-blind,phase II study of the anti-TIGIT antibody tiragolumab(tira)plus atezolizumab(atezo)versus placebo plus atezo as first-line(1L)treatment in patients with PD-L1-selected NSCLC(CITYSCAPE).[对抗TIGIT抗体替瑞利尤单抗(tira)加阿替利珠单抗(atezo)相比于安慰剂加atezo作为PD-L1选择的NSCLC患者一线(1L)治疗的随机、双盲II期研究的初步分析(CITYSCAPE)]J.Clin.Oncol.[临床肿瘤学杂志]38,9503(2020)。

[0456] 12.Suarez,E.R.等人Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model.[在人源化小鼠模型中,分泌抗PD-L1抗体的嵌合抗原受体T细胞更有效地消退肾细胞癌]Oncotarget[肿瘤靶标]7,(2016)。

[0457] 13.Hawkins,E.R.,D'souza,R.R.和Klampatsa,A.Armored CAR T-cells:The next chapter in T-cell cancer immunotherapy.[装甲CAR T细胞:T细胞癌症免疫疗法的下一章]Biol.Targets Ther.[生物靶标与治疗]15,95-105(2021)。

[0458] 14.Mukhopadhyay,M.Macrophages enter CAR immunotherapy.[巨噬细胞进入CAR免疫疗法]Nat.Methods[自然方法]17,561(2020)。

[0459] 15.Oelsner,S.等人Continuously expanding CAR NK-92cells display selective cytotoxicity against B-cell leukemia and lymphoma.[持续扩增的CAR NK-92细胞对B细胞白血病和淋巴瘤表现出选择性细胞毒性]Cytotherapy[细胞疗法]19,235-249(2017)。

[0460] 16.Kreiter,S.等人Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer.[突变的MHC II类表位驱动对癌症的治疗性免疫应答]Nature[自然]520,692-696(2015)。

[0461] 17.Alspace,E.等人MHC-II neoantigens shape tumour immunity and response to immunotherapy.[MHC-II新抗原塑造肿瘤免疫和对免疫疗法的应答]Nature[自然]574,696-701(2019)。

[0462] 18.Chmielewski,M.,Kopecky,C.,Hombach,A.A.和Abken,H.IL-12release by

engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression.[由表达嵌合抗原受体的经工程改造的T细胞释放的IL-12可以有效地在已关闭肿瘤抗原表达的肿瘤细胞上激发抗原非依赖性巨噬细胞应答]Cancer Res.[癌症研究]71,5697-5706(2011)。

[0463] 19.Rafiq,S.等人Targeted delivery of a PD-1-blocking scFV by CAR-Tcells enhances anti-tumor efficacy in vivo.[通过CAR-T细胞靶向递送阻断PD-1的scFV增强体内抗肿瘤功效]Nat.Biotechnol.[自然生物技术]36,847-858(2018)。

[0464] 20.Iwahori,K.等人Engager T cells:A new class of antigen-specific t cells that redirect bystander T cells.[衔接器T细胞:可以重定向旁观者T细胞的抗原特异性T细胞的新类别]Mol.Ther.[分子疗法]23,171-178(2015)。

[0465] 21.Voss,J.E.等人Reprogramming the antigen specificity of b cells using genome-editing technologies.[使用基因组编辑技术重新编程b细胞的抗原特异性]Elife[电子生命]8,1-22(2019)。

[0466] 22.Nahmad,A.D.等人Engineered B cells expressing an anti-HIV antibody enable memory retention,isotype switching and clonal expansion.[表达抗HIV抗体的经工程改造的B细胞能够记忆保留、同种型转换和克隆扩增]Nat.Comm.[自然通讯]11,1-10(2020)。

[0467] 23.Moffett,H.F.等人B cells engineered to express pathogen-specific antibodies protect against infection.[表达病原体特异性抗体的经工程改造的B细胞防止感染]Sci.Immunol.[科学免疫学]4,(2019)。

[0468] 24.Nahmad,A.D.等人Engineered B cells expressing an anti-HIV antibody enable memory retention,isotype switching and clonal expansion.[表达抗HIV抗体的经工程改造的B细胞能够记忆保留、同种型转换和克隆扩增]Nat.Comm.[自然通讯]11,1-10(2020)。

[0469] 25.Uchibori,R.等人Functional Analysis of an Inducible Promoter Driven by Activation Signals from a Chimeric Antigen Receptor.[由来自嵌合抗原受体的激活信号驱动的诱导型启动子的功能分析]Mol.Ther.-Oncolytics[分子疗法-溶瘤学]12,16-25(2019)。

[0470] 26.Zhang,L.等人Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12expression to the tumor environment.[通过靶向和控制IL-12对肿瘤环境的表达来改善过继性T细胞疗法]Mol.Ther.[分子疗法]19,751-759(2011)。

[0471] 27.Hooijberg,E.,Bakker,A.Q.,Ruizendaal,J.J.和Spits,H.NFAT-controlled expression of GFP permits visualization and isolation of antigen-stimulated primary human T cells.[NFAT控制的GFP表达允许抗原刺激的原代人T细胞的可视化和分离]Blood[血液]96,459-466(2000)。

[0472] 28.Lin,T.等人Establishment of NF- κ B sensing and interleukin-4secreting mesenchymal stromal cells as an“on-demand”drug delivery system to modulate inflammation.[建立NF- κ B传感和白介素-4分泌间充质基质细胞作为“按需”药

物递送系统以调节炎症]Cytotherapy[细胞疗法]19,1025-1034(2017)。

[0473] 29.Girard-Gagnepain,A.等人Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. [狒狒包膜假型LV在基因转移至早期细胞因子刺激和静息HSC方面优于VSV-G-LV]Blood[血液]124,1221-1231(2014)。

[0474] 30.Tomás,H.A.等人Improved GaLV-TR Glycoproteins to Pseudotype Lentiviral Vectors:Impact of Viral Protease Activity in the Production of LV Pseudotypes.[将GaLV-TR糖蛋白改善为假型慢病毒载体:病毒蛋白酶活性在LV假型的产生中的影响]Mol.Ther.-Methods Clin.Dev.[分子疗法-方法与临床开发]15,1-8(2019)。

[0475] 31.Bernadin,O.等人Baboon envelope LVs efficiently transduced human adult,fetal,and progenitor T cells and corrected SCID-X1 T-cell deficiency. [狒狒包膜LV有效转导了人成人、胎儿和祖T细胞,并纠正了SCID-X1 T细胞缺陷]Blood Adv.[血液进展]3,461-475(2019)。

[0476] 32.Winiarska,M.等人Selection of an optimal promoter for gene transfer in normal B cells.[在正常B细胞中选择用于基因转移的最佳启动子]Mol.Med.Rep.[分子医学报告]16,3041-3048(2017)。

[0477] 33.Xu,C.等人Unique biological properties of catalytic domain directed human anti-CAIX antibodies discovered through phage-display technology.[通过噬菌体展示技术发现的催化结构域定向人抗CAIX抗体的独特生物学特性]PLoS One[公共科学图书馆综合]5,(2010)。

[0478] 34.Sui,J.等人Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses.[广谱中和禽类和人甲型流感病毒的结构和功能基础]Nat.Struct.Mol.Biol.[自然结构与分子生物学]16,265-273(2009)。

[0479] 35.Fu,Y.等人A broadly neutralizing anti-influenza antibody reveals ongoing capacity of haemagglutinin-specific memory B cells to evolve.[广泛中和的抗流感抗体揭示了血凝素特异性记忆B细胞持续进化的能力]Nat.Comm.[自然通讯]7,(2016)。

[0480] 36.Chang,D.-K.等人Humanization of an anti-CCR4 antibody that kills cutaneous T-cell lymphoma cells and abrogates suppression by T-regulatory cells.[抗CCR4抗体的人源化,可杀伤皮肤T细胞淋巴瘤细胞并消除T调节细胞的抑制]Mol.Cancer Ther.[分子癌症治疗学]11,2451-2461(2012)。

[0481] 37.Chang,D.K.等人Humanized mouse G6 anti-idiotypic monoclonal antibody has therapeutic potential against IGHV1-69 germline gene-based B-CLL.[人源化小鼠G6抗独特型单克隆抗体具有针对基于IGHV1-69种系基因的B-CLL的治疗潜力]MAbs[单克隆抗体]8,787-798(2016)。

[0482] 38.Marin-Acevedo,J.A.等人Next generation of immune checkpoint therapy in cancer:New developments and challenges.[下一代癌症免疫检查点疗法:新的发展和挑战]J.Clin.Oncol.[临床血液肿瘤学杂志]11,1-20(2018)。

- [0483] 39.Saunders,K.O.Conceptual approaches to modulating antibody effector functions and circulation half-life.[调节抗体效应子功能和循环半衰期的概念方法]Front.Immunol.[免疫学前沿]10,1-20(2019)。
- [0484] 40.Su,K.-Y.,Watanabe,A.,Yeh,C.-H.,Kelsoe,G.和Kuraoka,M.Efficient Culture of Human Naive and Memory B Cells for Use as APCs.[人原初B细胞和用作APC的记忆B细胞的有效培养]J.Immunol.[免疫学杂志]197,4163-4176(2016)。
- [0485] 41.Kuraoka,M.等人Complex Antigens Drive Permissive Clonal Selection in Germinal Centers.[复杂抗原驱动生发中心的宽容性克隆选择]Immunity[免疫力]44, 542-552(2016)。
- [0486] 42.Wan,Z.等人The activation of IgM-or isotype-switched IgG-and IgE-BCR exhibits distinct mechanical force sensitivity and threshold.[IgM转换的或同种型转换的IgG-BCR和IgE-BCR的激活表现出不同的机械力敏感性和阈值]Elife[电子生命]4,1-24(2015)。
- [0487] 43.Aref,A.R.等人3D microfluidic:Ex vivo culture of organotypic tumor spheroids to model immune checkpoint blockade.[3D微流体:器官型肿瘤球体的离体培养以模拟免疫检查点阻断]Lab Chip[实验室芯片]18,3129-3143(2018)。
- [0488] 44.Jenkins,R.W.等人Ex Vivo Profiling of PD-1Blockade Using Organotypic Tumor Spheroids.[使用器官型肿瘤球体对PD-1阻断进行离体分析]Cancer Discov.[癌症发现]176,139-148(2018)。
- [0489] 45.Lv,J.和Li,P.Mesothelin as a biomarker for targeted therapy.[间皮素作为靶向治疗的生物标志物]Biomark.Res.[生物标志物研究]7,(2019)。
- [0490] 46.Marcq,E.等人Abundant expression of TIM-3,LAG-3,PD-1and PD-L1 as immunotherapy checkpoint targets in effusions of mesothelioma patients.[TIM-3、LAG-3、PD-1和PD-L1作为免疫疗法检查点靶标在间皮瘤患者渗出液中大量表达]Oncotarget[肿瘤靶标]8,89722-89735(2017)。
- [0491] 47.Klampatsa,A.等人Phenotypic and functional analysis of malignant mesothelioma tumor-infiltrating lymphocytes.[恶性间皮瘤肿瘤浸润性淋巴细胞的表型和功能分析]Oncoimmunology[肿瘤免疫学]8,1-12(2019)。
- [0492] 48.Alay,A.等人Integrative transcriptome analysis of malignant pleural mesothelioma reveals a clinically relevant immune-based classification.[恶性胸膜间皮瘤的综合转录组分析揭示了临床相关的基于免疫的分类]J.Immunother.Cancer[癌症免疫治疗杂志]9,(2021)。
- [0493] 49.Liu,J.F.等人Establishment of patient-derived tumor xenograft models of epithelial ovarian cancer for preclinical evaluation of novel therapeutics.[建立上皮性卵巢癌的患者衍生的肿瘤异种移植模型,用于新颖治疗药物的临床前评价]Clin.Cancer Res.[临床癌症研究]23,1263-1273(2017)。
- [0494] 50.Biswas,S.等人Humoral immune responses in humanized BLT mice immunized with West Nile virus and HIV-1envelope proteins are largely mediated via human CD5+B cells.[用西尼罗河病毒和HIV-1包膜蛋白免疫的人源化BLT

小鼠中的体液免疫应答主要是经由人CD5+B细胞介导的]Immunology[免疫学]134,419-433(2011)。

[0495] 51.Chang,H.等人Human B-cell ontogeny in humanized NOD/SCID γ c(null) mice generates a diverse yet auto/poly-and HIV-1-reactive antibody repertoire.[人源化NOD/SCID γ c(null)小鼠中的人B细胞个体发生产生多样且自反应性/多反应性抗体库和HIV-1反应性抗体库]Genes Immun.[基因与免疫]13,399-410(2012)。

[0496] 52.Billerbeck,E.等人Development of human CD4+FoxP3+regulatory Tcells in human stem cell factor-,granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2R γ null humanized mice.[在表达人干细胞因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子和白介素-3的NOD-SCID IL2R γ null人源化小鼠中开发人CD4+FoxP3+调节性T细胞]Blood[血液]117,3076-3086(2011)。

[0497] 53.Lin,S.等人Establishment of peripheral blood mononuclear cell-derived humanized lung cancer mouse models for studying efficacy of PD-L1/PD-1targeted immunotherapy.[建立黑素瘤外周血单个核细胞衍生的人源化肺癌小鼠模型,用于研究PD-L1/PD-1靶向免疫疗法的功效]MAbs[单克隆抗体]10,1301-1311(2018)。

[0498] 54.Stoeckius,M.等人Cell Hashing with barcoded antibodies enables multiplexing and doublet detection for single cell genomics.[使用带有条形码的抗体进行细胞散列可实现单细胞基因组学的多路复用和双联检测]Genome Biol.[基因组生物学]19,1-12(2018)。

[0499] 55.Tian,L.等人scPipe:A flexible R/Bioconductor preprocessing pipeline for single-cell RNA-sequencing data.[scPipe:用于单细胞RNA测序数据的灵活R/Bioconductor预处理管道]PLoS Comput.Biol.[公共科学图书馆计算生物学]14,1-15(2018)。

[0500] 56.Amezquita,R.A.等人Orchestrating single-cell analysis with Bioconductor.[使用Bioconductor统筹单细胞分析]Nat.Methods[自然方法]17,137-145(2020)。

[0501] 57.Hao,Y.等人Integrated analysis of multimodal single-cell data.[多模态单细胞数据的综合分析]Cell[细胞]184,3573-3587.e29(2021)。

[0502] 58.Lytal,N.,Ran,D.和An,L.Normalization Methods on Single-Cell RNA-seq Data:An Empirical Survey.[单细胞RNA-seq数据的归一化方法:实证调查]Front.Genet.[遗传学前沿]11,1-14(2020)。

[0503] 59.McCarthy,D.J.,Campbell,K.R.,Lun,A.T.L.和Wills,Q.F.Scater:Pre-processing,quality control,normalization and visualization of single-cell RNA-seq data[Scater:单细胞RNA-seq数据的预处理、质量控制、归一化和可视化]载于R.Bioinformatics[生物信息学简报]33,1179-1186(2017)。

[0504] 60.Haghverdi,L.,Lun,A.T.L.,Morgan,M.D.和Marioni,J.C.Batch effects in single-cell RNA-sequencing data are corrected by matching mutual nearest neighbors.[单细胞RNA测序数据中的批次效应通过匹配相互最近邻来纠正]Nat.Biotechnol.[自然生物技术]36,421-427(2018)。

[0505] 61.Chen,Y.等人edgeR:differential analysis of sequence read count data User's Guide.[edgeR:序列读取计数数据的差异分析用户指南]R Packag.[R包]1-121 (2020)。

[0506] 62.Subramanian,A.等人Gene set enrichment analysis:A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles.[基因集富集分析:用于解释全基因组表达谱的基于知识的途径]Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院刊]102,15545-15550 (2005)。

[0507] 63.DeTomaso,D.等人Functional interpretation of single cell similarity maps.[单细胞相似性图的功能解释]Nat.Comm.[自然通讯]10,(2019)。

实例5

[0508] 设计和测试双靶向微调免疫恢复 (DFIR) 性CAR-T细胞疗法,以实现高级别浆液性卵巢癌的治愈

[0509] 卵巢癌(OvCA)是美国女性癌症死亡的第五大原因。在全球范围内,每年有200,000例新诊断病例和120-130,000例死亡病例¹。由于缺乏特定的症状或体征,并且缺乏值得信赖的早期检测筛选,大多数患有OvCA的女性(60-65%) 在癌症已扩散到卵巢界限之外时才被诊断为晚期。目前,OvCA的标准治疗是手术干预,然后进行含铂化疗,例如卡铂加紫杉醇2,3。III期或IV期疾病的治疗很少能治愈,5年生存率低于20%。对于一线疗法失败的复发或转移性疾病,没有有效的疗法可用⁴。此外,最近的几项抗PD(L)1免疫检查点抑制剂(ICI)的临床试验显示,无论是否使用化疗,应答率都很差⁵。迫切需要更有效的疗法。

[0510] 嵌合抗原受体(CAR) T细胞疗法是一种新型“活体药物”。CAR含有连接至胞内信号传导块的单链可变抗体片段(scFv),该信号传导块包括CD3- ζ (ζ) 激活结构域(第一代)、带CD28或41BB共刺激结构域(第二代)、或CD3- ζ 和共刺激结构域两者(第三代)⁶。FDA对第二代CAR-T细胞疗法的批准使这种新型细胞免疫疗法成为血液系统恶性肿瘤⁸⁻¹⁰的主流癌症疗法⁷。然而,这些结果尚未轻易转化至实体瘤¹¹。事实上,已经认识到几个主要障碍限制了我們使用CAR-T细胞“治愈”实体瘤的能力。这些包括由于在正常组织上共享肿瘤相关抗原(TAA)表位而导致的中靶肿瘤外毒性、肿瘤异质性和免疫抑制性肿瘤微环境(TME)。为了解决这些问题,我们已构建用于治疗实体瘤的双靶向微调免疫恢复性(DFIR) CAR-T细胞,着重于改善抗肿瘤功效和患者安全性。

[0511] 对于DoD卵巢癌(OvCA) 研究计划试点资助,我们将针对高级别浆液性卵巢癌(HGSOC) 验证DFIR CAR-T疗法。特别地,我们将工程改造抗粘蛋白1(MUC1)/抗间皮素(MSLN) 双靶向CAR,其起以下作用:通过在MUC1或MSLN存在的情况下允许CAR-T激活解决实体瘤异质性从而增加功效,以及减轻单一抗原逃逸。^{12,13} 由于许多用于靶向上皮肿瘤的抗原在健康组织中也以低密度存在,因此为CAR-T细胞建立增强的安全性谱非常重要。提高的安全性通过微调的CAR来解决,使得scFv靶向性部分的亲和力经过定制,以仅识别高密度肿瘤TAA,而不识别在正常组织上以生理水平表达的相同抗原(图34)。免疫恢复将通过在肿瘤部位局部分泌双特异性抗体(BsAb) 来实现,该抗体可充当有效的检查点阻断抑制剂(ICI) 以及调节性T细胞(Treg) 抑制和招募的抑制剂¹⁴。对于该项目,BsAb的第一臂针对TIGIT,该TIGIT已被证明在来自HGSOC个体的肿瘤抗原特异性(TA特异性) CD8+T细胞和CD8+肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL) 上过度表达。BsAb的第二臂被靶向至CCR4,该CCR4在调节性T细胞(Treg)

上过度表达,并且在OvCA中的肿瘤浸润性淋巴细胞群体中升高15-18。

[0512] 在这里,我们将验证通过双靶向和微调抗MUC1和抗MSLN CAR靶向性部分的结合亲和力,可以极大改善HGSOC的CAR-T细胞疗法的抗肿瘤功效和安全性。我们将进一步验证CAR-T细胞可以被另外工程改造为分泌双特异性抗体(BsAb),该抗体靶向HGSOC中起作用的两种主要免疫抑制通路。局部分泌的BsAb将针对存在于衰竭的T细胞、Treg和NK细胞上的TIGIT,以及在Treg上上调并在趋化性中发挥关键作用的CCR4。在不希望受理论束缚的情况下,同时阻断这两种通路将逆转免疫抑制并恢复局部抗肿瘤免疫力。

[0513] 特定目标:

[0514] 目标1-使用体外研究,验证在肿瘤部位局部组成性地分泌抗CCR4/TIGIT BsAb的抗MUC1/MSLN DFIR CAR-T细胞对OvCA细胞的杀伤功效。子任务将包括验证T细胞衰竭的逆转和细胞因子分泌的恢复。

[0515] DFIR CAR-T细胞将被设计为对单抗原阳性OvCA细胞(MUC1或MSLN)和双阳性(MUC1和MSLN)细胞具有高杀伤功效,我们称之为“和/或”门控。结合亲和力的微调将通过验证不同亲和力的作为单CAR的抗MUC1和抗MSLN scFv的以下能力来实现:其仅杀伤过度表达这两种抗原之一的肿瘤细胞,而不杀伤能够表达生理(较低)水平这些抗原的健康细胞。

[0516] DFIR CAR-T细胞抗体有效载荷已通过从公开可用的HGSOC患者样品中挖掘scRNAseq数据来确定,以鉴定肿瘤浸润性免疫细胞的两个非重叠功能失调通路的“公共”特征,我们可以将其用于治疗性干预。

[0517] 患者衍生的器官型肿瘤球体(PDOTS)将用于评估与分泌充当ICI的抗体的CAR-T细胞相比时单独的CAR-T细胞杀伤。来自这些离体3D TME培养的结果将指导体内DFIR CAR小鼠治疗模型。

[0518] 抗体工程改造技术将使我们能够微调MUC1和MSLN scFv靶向性部分的亲和力,以实现高效的肿瘤细胞杀伤。

[0519] 新型抗CCR4/TIGIT BsAb的设计将作为Treg、细胞毒性T细胞和NK细胞上的TIGIT/CD155轴的检查点控制抑制剂,并作为Treg对分泌趋化因子CCL17/CCL22的肿瘤细胞的趋化性的拮抗剂。

[0520] 改善的CAR功效和安全性:实体瘤可以表现出表型和基因型异质性。这是由于影响导致肿瘤生长失控的关键通路(例如DNA修复和复制)的固有特性。此外,可以看到免疫编辑并导致中和和逃逸,从而导致单个阳性肿瘤细胞的生长。如果CAR-T细胞针对单一靶标,可能会导致治疗失败。在不希望受理论束缚的情况下,双靶向可以提供“和/或”门控策略,借此CAR-T细胞可以靶向并杀伤单阳性肿瘤细胞和/或双阳性肿瘤细胞,其中后者由于亲合力增加而表现出协同结合和杀伤19-21。

[0521] 我们通过分离针对膜近端SEA结构域的人抗MUC1 scFv解决了双重靶向问题。我们针对重组MUC1-SEA多肽对具有27x 109个成员的人scFv噬菌体展示文库进行了淘选,并鉴定了先导scFv(T4E3)。我们还收到了第二抗MUC1-SEA scFv(3D1),它靶向MUC1上的类似结构域。T4E3 scFvFc的结合亲和力(5.26)比3D1scFvFc(57.02nM)高约10倍,从而为我们提供了良好的治疗范围,以评价结合亲和力和MUC1靶标密度对肿瘤细胞杀伤的影响,以及对表达低密度MUC-1的健康细胞的中靶肿瘤外杀伤的影响,显示出即使在低E:T(0.8:1)比率下也能有效杀伤MUC1+COV263细胞(靠下)(48小时生存率%),而对照MUC1-HCT116v细胞(靠

上)未被杀伤。

[0522] 进行了类似的发现活动来鉴定抗MSLN scFv。为了适应MSLN从GPI接头释放后经历的构象变化,我们在全细胞淘选途径中利用了一系列MSLN+细胞,以从我们的噬菌体文库中分离出新的抗MSLN抗体(图35,分图A)。该活动导致鉴定出几种抗MSLN scFv,它们对MSLN+OVCAR8细胞具有有效(图35,分图B)和特异性杀伤,但对MSLN-SK59肾细胞癌细胞没有有效和特异性杀伤(图35,分图C)。重要的是,每个MUC1(T4E3)和MSLN(E8)CAR都能够杀伤双MUC1+、MSLN+CoV362细胞,就像双靶向T4E3-E8 CAR一样(图35,分图D)。

[0523] IR CAR-T细胞改变了TME:改变TME对于CAR-T细胞疗法至关重要,以逆转在肿瘤部位的免疫细胞衰竭,并防止在肿瘤部位新到达的CAR-T细胞变得衰竭。我们花费了相当大的精力来分析已发表的scRNAseq数据,以鉴定我们可以开发BsAb的靶标,该BsAb可以充当有效的ICI并在肿瘤部位逆转免疫抑制。我们已经完成了这些发现工作,并选择了两个靶标:TIGIT和CCR4。进行了抗TIGIT mAb的结合数据及其与其免疫抑制配体CD155的竞争。这种Ab介导的CD155与TIGIT结合的阻断可以阻断通过该轴的免疫抑制。

[0524] CCR4是一种趋化因子受体,存在于迁移至OvCA肿瘤部位的免疫抑制性Treg上。我们的先导抗CCR4抗体是mAb2-322-24。该抗体阻断人Treg体内迁移至分泌趋化因子CCL17和CCL22的OvCA细胞(图36,分图A)并恢复体内肿瘤细胞杀伤(图36,分图B)

[0525] 研究计划:我们将验证单独的抗MUC1和抗MSLN CAR对OVCAR8、CoV362和MUC1或MSLN转导的293T细胞的杀伤。我们将对表达不同密度的MUC1和MSLN的OVCAR8和CoV362细胞以及阴性对照MUC1-MSLN-SK59细胞和其他低密度MSLN+或MUC1+细胞系进行另外的体外CAR-T细胞杀伤研究。我们将使用公开CeLigo测定来验证杀伤活性²⁵。将针对杀伤具有不同MUC1和MSLN密度的肿瘤细胞的能力分析这些研究的结果,并且将分析对对照细胞系缺乏杀伤的安全性。这些研究将使我们能够验证将用于构建双靶向CAR的抗MUC1和抗MSLN scFv。接下来,将使用以两个取向(T细胞膜的近端与远端)和不同的scFv间接头长度(GGGGS)的先导抗MUC1和抗MSLN scFv构建DF CAR-T细胞(图34和图37)1-3。这将确保每个scFv对其靶标的取向和可及性得到优化。从这些研究中,将选择一种先导双靶向CAR进行进一步测试。

[0526] 抗体有效载荷的递送将涉及一组使用原代OvCA PDOT的不同研究。我们已经成功建立了ccRCC离体3D模型,该模型重现了TME并提供了简便手段来筛选CAR-T变体的功效(图38,分图A)。工作流程如图38,分图B所示²⁶。我们证明了ccRCC PDOTS可以作为评估CAR-T细胞的功效和迁移的强大工具。共孵育6天后,抗CAIX G36 CAR-T细胞与ccRCC球体一起显著地从侧通道迁移至中间通道,并分泌CXCL10(图38,分图C)。对于我们的OvCA研究,我们将以2:1的CD4:CD8比率将CAR慢病毒转导到健康的供体T细胞中。离体纯化和扩增后,我们将DFIR CAR-T细胞添加至装置的外孔中,并测试分泌抗TIGIT、抗CCR4或抗CCR4/TIGIT BsAb的先导DFIR CAR-T细胞的迁移和细胞因子分泌。CAR-T迁移将通过共转导CAR-T细胞与表达ZsGreen的慢病毒来测量,并通过PI染色来测量活力。细胞因子释放谱将通过Luminex测量。

[0527] 我们将通过从微流体装置中收获DFIR CAR-T/TIL和上清液来验证具有不同有效载荷的单CAR-T细胞和DFIR CAR-T细胞,如所报道的²⁶。我们将验证是否存在将分泌抗CCR4/TIGIT BsAb的抗MUC1/MSLN DFIR CAR-T细胞与其他治疗区分开来的表型和功能特性,以及HGSOC细胞供体之间是否存在差异。

[0528] 结果:在不希望受理论束缚的情况下,抗MUC1/MSLN DF CAR-T细胞可被工程改造

以选择性杀伤过度表达MUC1和/或MSLN的OvCA细胞,但不杀伤表达生理(低)水平TAA或对这些TAA呈阴性的健康细胞。进一步地,与不分泌ICI有效载荷的抗MUC1/MSLN DF CAR-T细胞相比,分泌抗CCR4/TIGIT BsAb的抗MUC1/MSLN DFIR CAR-T细胞将表现出更强的杀伤。此外,由于双重ICI通路阻断,分泌抗CCR4/TIGIT BsAb的DFIR CAR-T细胞比仅分泌抗TIGIT或抗CCR4 Ab的DFIR CAR-T细胞表现出更强的TIL/CAR-T衰竭逆转/防止。我们的分泌BsAb的DFIR CAR-T细胞的一种或多种作用机制是防止CAR-T细胞衰竭并恢复对TIL的抗肿瘤免疫力。CAR-T/TIL衰竭的防止/逆转将通过PD1、TIM3和LAG3的FACS染色以及确定其细胞因子(例如IFN γ 、IL-2)分泌水平进行定量。

[0529] 数据分析和统计考虑:每个CAR-T测定将一式三份进行,并使用三个PBMC供体重复3次,并且将通过样品平均值总结跨这些条件的杀伤百分比。我们将首先通过检查针对每个靶标以及针对具有不同MUC1和MSLN靶标密度的2-3个OvCA细胞系具有不同亲和力的2-3个不同CAR,来比较抗MUC1和抗MSLN单CAR-T细胞的特异性(功效)和背景(安全性)杀伤。从这些研究中,我们将鉴定要使用的抗MUC1和抗MLSN CAR,例如选择跨这些细胞系具有最大功效的CAR,同时保持最多10%背景杀伤的可接受的安全性,以创建我们的双靶向抗MUC1/MSLN DFIR CAR。抗体有效载荷分泌对DFIR CAR-T细胞激活的影响将通过PDOT研究中的功能结果进行监测。通过FACS监测的结果包括TIL/CAR-T细胞中上调的衰竭标志物(PD1、TIM3、LAG3)的逆转和TIL/CAR-T生存的增加,以及通过Luminex监测的结果包括促炎细胞因子分泌的增加。

[0530] 体外CAR-T杀伤:数据将在GraphPad Prism中进行分析,并且多重比较的双向ANOVA将用于统计分析。

[0531] 细胞因子ELISA:数据将在GraphPad Prism中进行分析,并且多重比较的双向ANOVA将用于统计分析

[0532] 目标2-进行体内研究,验证CAR-T细胞在携带HLA匹配卵巢肿瘤的人源化小鼠(NSG-SGM3)中的功效。研究将设计适当的对照组,以分别评估抗MUC1/抗MSLN DFIR CAR-T细胞及其抗CCR4/TIGIT BsAb有效载荷的效果。子任务将包括通过scRNASeq、多参数FACS分析和血浆细胞因子分泌谱来分析TIL。

[0533] 开发人源化小鼠模型来探究OvCA TME和DFIR CAR-T干预

[0534] 使用scRNAseq对DFIR CAR-T疗法导致的TME变化进行分类和定量

[0535] 理由和数据:在不希望受理论束缚的情况下,改变HGSOC中的TME可以通过组合的检查点阻断抑制和通过阻断Treg向肿瘤部位的招募来实现。我们已经证明,我们的抗CCR4抗体在体内显著抑制Treg迁移至OvCA肿瘤部位,这也导致显著抑制肿瘤细胞生长。我们已经证明了我们开发的用于治疗ccRCC的IR CAR的抗肿瘤功效。CAR是用亲和力微调的抗CAIX scFv构建的,并且分泌的Ab有效载荷是抗PDL1或不相关的抗SARS抗体。可以看出,分泌抗PDL1 Ab的抗CAIX CAR的抗肿瘤功效显著改善,该Ab充当这种癌症的ICI。

[0536] 研究计划:

[0537] 来自HGSOC腹水产生的肿瘤细胞的原代OvCA PDX模型已建立27。其中十四个细胞系的生长动力学适合稳健的体内实验。其中两个将被荧光化并针对用于我们的DFIR CAR-T细胞研究进行表征。这些细胞系将是HLA型的,我们将从商业血液公司鉴定5/6或6/6HLA匹配的供体用于我们的研究。我们将使用G-CSF动员的外周血(PB),并使用商业试剂盒纯化

CD34+造血干细胞(HSC)和T细胞,分别用于免疫重建和CAR-T生成。重建后约3-4个月,当PB hCD45细胞>25%时,小鼠将被腹腔内植入体内传代肿瘤。在稍后的时间点,来自同一供体的CAR-T细胞将通过尾静脉注射。每周通过BLI成像监测小鼠,并根据肿瘤生长情况在适当的时间处死小鼠。将收集并处理腹水以确定肿瘤细胞计数。CAR-T细胞和TIL将被处理,用于T细胞子集和髓系谱系和衰竭标志物(PD1、TIM3和LAG3)的FACS染色,并用于scRNASeq来表征TME的变化。

[0538] 每项动物研究将涉及5组;分泌抗TIGIT/抗CCR4 BsAb的抗MUC1/抗MSLN DFIR CAR-T、分泌不相关BsAb的抗MUC1/抗MSLN DFIR CAR-T、分泌抗TIGIT/抗CCR4 BsAb的不相关DFIR CAR-T、分泌不相关BsAb的不相关DFIR CAR-T和未转导的T细胞(5组,n=6只小鼠/组)。动物将在肿瘤植入后立即从基线开始每周进行萤光素酶活性的BLI成像。肿瘤生长将通过萤光素酶活性进行定量。将对两种不同肿瘤细胞系中的每一种进行两次实验。(小鼠总数=144只,每项研究中允许36只小鼠(算上每次重建有6只小鼠因死亡、免疫重建不良、感染而退出))。

[0539] 对于scRNASeq分析,该项目的生物信息学管道将包括工具组合,这些工具包括alAkazam 28;Shazam 29;Seurat 30;Cumulus 31。我们将验证不同CAR-T治疗之间转录状态、代谢状态和进化模式的差异。子集之间会出现一些重叠。我们将比较这些不同的治疗,以验证是否存在将分泌抗CCR4/TIGIT BsAb的抗MUC1/MSLN DFIR CAR-T细胞与其他治疗区分开来的表型和功能特性,以及T细胞供体之间是否存在差异。

[0540] 结果:在不希望受理论束缚的情况下,与其他组相比,分泌抗TIGIT/抗CCR4 BsAb的抗MUC1/抗MSLN DFIR CAR-T将显示出最大的抗肿瘤活性,其次是分泌不相关BsAb的抗MUC1/抗MSLN DFIR CAR-T。此外,分泌抗TIGIT/抗CCR4BsAb的不相关DFIR CAR-T将不会有太大的临床效果,因为DFIR CAR-T细胞不是靶向的并且不会经历扩增。另外两个动物组将表现出不受控制的肿瘤细胞生长。在不希望受理论束缚的情况下,来自FACS染色和scRNASeq两者的T细胞衰竭谱将与抗肿瘤活性相关并支持分泌的抗CCR4/TIGIT BsAb对恢复抗肿瘤分子特征和功能特征的贡献。

[0541] 数据分析和统计考虑:

[0542] 肿瘤生长:数据将在GraphPad Prism中进行分析。BLI将使用Living Image软件进行分析。

[0543] 流式细胞术:将使用FlowJo分析流式细胞术数据。PBMC和外周血单个核(PMN)细胞使用每个单独的标志物进行染色,以适当补偿颜色。

[0544] 单细胞RNA测序:10X Genomics提供了用于数据处理(Cell Ranger)和可视化(Loupe Cell Browser)的综合分析套件。此外,R(如Seurat)可以进一步分析Cell Ranger输出的数据。

[0545] 对于在两种PDX模型中每一个内的四种类型的CAR-T疗法和对照疗法(未转导的T细胞)中的每一种,将通过跨重复实验的每个时间点的平均肿瘤生长来总结肿瘤生长轨迹。最有前景的CAR-T疗法将在两种PDX模型中最大程度地减少肿瘤生长。将每周采血进行T细胞子集和衰竭标志物的FACS分析,并随着时间的推移在5组之间进行比较。这些数据将使我们能够检查和定量DFIR CAR-T疗法随时间推移对T细胞分化和功能的影响。

[0546] 在每组6个样品的情况下,我们将使用0.05水平的2样品双尾t检验,以0.8的功效

检测到最极端比较对(对照组:具有不相关有效载荷的不相关的DFIR CAR-T或未转导的)中均值之间等于1.8个标准差的差异。然而,队列的规模最终将决定我们使用的统计方法。例如,如果我们每组有4只小鼠用于每次成对比较,那么对于相同的功效,我们将需要更大的效应量(组间差异)。同样,在每组4个样品的情况下,我们将使用0.05水平的2样品双尾t检验,以0.8的功效检测到等于2.3个标准差的组均值差异。

[0547] 所选的CAR-T细胞剂量将设定为 1×10^6 ,这一水平在其他CAR-T/小鼠癌症模型中产生了强烈的肿瘤细胞杀伤。这个剂量可以调整。

[0548] 该实例中引用的参考文献:

1.Webb PM,Jordan SJ.Epidemiology of epithelial ovarian cancer.[上皮性卵巢癌的流行病学]Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.[最佳实践与研究:临床妇产科]2017;41:3-14.Epub 2016/10/17.doi:10.1016/j.bpobgyn.2016.08.006.PubMed PMID:27743768.PMCID:NA

2.Agarwal R,Kaye SB.Ovarian cancer:strategies for overcoming resistance to chemotherapy.[卵巢癌:克服对化疗的抗性的策略]Nat Rev Cancer.[自然综述·癌症]2003;3(7):502-16.Epub 2003/07/02.doi:10.1038/nrc1123.PubMed PMID:12835670.PMCID:NA

3.DiSaia PJ,Bloss JD.Treatment of ovarian cancer:new strategies.[卵巢癌的治疗:新策略]Gynecol Oncol.[妇科肿瘤学]2003;90(2Pt 2):S24-32.Epub 2003/08/21.doi:10.1016/s0090-8258(03)00341-x.PubMed PMID:12928003.PMCID:PMC747367

4.Disis ML,Rivkin S.Future directions in the management of ovarian cancer.[卵巢癌治疗的未来方向]Hematol Oncol Clin North Am.[北美血液肿瘤学临床]2003;17(4):1075-85.Epub 2003/09/10.doi:10.1016/s0889-8588(03)00054-6.PubMed PMID:12959192.PMCID:NA

5.Borella F,Ghisoni E,Giannone G,Cosma S,Benedetto C,Valabrega G,Katsaros D.Immune Checkpoint Inhibitors in Epithelial Ovarian Cancer:An Overview on Efficacy and Future Perspectives.[上皮性卵巢癌中的免疫检查点抑制剂:功效概述和未来展望]Diagnostics[诊断学](巴塞尔).2020;10(3).Epub 2020/03/12.doi:10.3390/diagnostics10030146.PubMed PMID:32156035;PMCID:PMC7151145。

6.Lee DW,Barrett DM,Mackall C,Orentas R,Grupp SA.The future is now: chimeric antigen receptors as new targeted therapies for childhood cancer.[未来即现在:嵌合抗原受体作为儿童癌症的新靶向疗法]Clin Cancer Res.[癌症临床研究]2012;18(10):2780-90.Epub 2012/05/17.doi:10.1158/1078-0432.Ccr-11-1920.PubMed PMID:22589486;PMCID:PMC4119811。

7.Yip A,Webster RM.The market for chimeric antigen receptor T cell therapies.[嵌合抗原受体T细胞疗法的市场]Nature Reviews Drug Discovery.[自然综述药物发现]2018;17:161-2.PMCID:NA

8.Srivastava S,Riddell SR.Engineering CAR-T cells:Design concepts.[工程改造CAR-T细胞:设计概念]Trends Immunol.[免疫学趋势]2015;36(8):494-502.Epub2015/07/15.doi:10.1016/j.it.2015.06.004.PubMed PMID:26169254;PMCID:

PMC4746114。

9. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, Chew A, Gonzalez VE, Zheng Z, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, Rheingold SR, Shen A, Teachey DT, Levine BL, June CH, Porter DL, Grupp SA. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. [嵌合抗原受体T细胞用于白血病的持续缓解] *N Engl J Med*. [新英格兰医学杂志] 2014; 371(16): 1507-17. Epub 2014/10/16. doi: 10.1056/NEJMoa1407222. PubMed PMID: 25317870; PMCID: PMC4267531.

10. Zhu Y, Tan Y, Ou R, Zhong Q, Zheng L, Du Y, Zhang Q, Huang J. Anti-CD19 chimeric antigen receptor modified T cells for B-cell malignancies: a systematic review of efficacy and safety in clinical trials. [用于B细胞恶性肿瘤的抗CD19嵌合抗原受体修饰的T细胞: 临床试验中功效和安全性的系统综述] *Eur J Haematol*. [欧洲血液学杂志] 2016; 96(4): 389-96. Epub 2015/06/27. doi: 10.1111/ejh.12602. PubMed PMID: 26115358. PMCID: NA

11. Kakarla S, Gottschalk S. CAR T cells for solid tumors: armed and ready to go? [用于实体瘤的CAR T细胞: 整装待发?] *Cancer J*. [癌症杂志] 2014; 20(2): 151-5. Epub 2014/03/29. doi: 10.1097/ppo.0000000000000032. PubMed PMID: 24667962; PMCID: PMC4050065.

12. Deng J, Wang L, Chen H, Li L, Ma Y, Ni J, Li Y. The role of tumour-associated MUC1 in epithelial ovarian cancer metastasis and progression. [肿瘤相关MUC1在上皮性卵巢癌转移和进展中的作用] *Cancer Metastasis Rev*. [癌症转移评论] 2013; 32(3-4): 535-51. Epub 2013/04/24. doi: 10.1007/s10555-013-9423-y. PubMed PMID: 23609751. PMCID: NA

13. Hilliard TS. The Impact of Mesothelin in the Ovarian Cancer Tumor Microenvironment. [间皮素在卵巢癌肿瘤微环境中的影响] *Cancers* [癌症] (巴塞尔). 2018; 10(9). Epub 2018/08/24. doi: 10.3390/cancers10090277. PubMed PMID: 30134520; PMCID: PMC6162689.

14. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. [移植耐受中的调节性T细胞] *Nat Rev Immunol*. [自然综述免疫学] 2003; 3(3): 199-210. Epub 2003/03/27. doi: 10.1038/nri1027. PubMed PMID: 12658268. PMCID: NA

15. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. [卵巢癌中调节性T细胞的特异性招募促进免疫特权并预测生存率降低] *Nat Med*. [自然医学] 2004; 10(9): 942-9. Epub 2004/08/24. doi: 10.1038/nm1093. PubMed PMID: 15322536. PMCID: NA

16. Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. [CD4(+)

CD25 (+) 调节性T细胞的独特趋化应答谱和趋化因子受体CCR4和CCR8的特异性表达]J Exp Med.[实验医学杂志]2001;194 (6) :847-53.Epub 2001/09/19.doi:10.1084/jem.194.6.847.PubMed PMID:11560999;PMCID:PMC2195967。

17.Levings MK,Sangregorio R,Roncarolo MG.Human cd25 (+) cd4 (+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function.[人cd25 (+) cd4 (+) t调节细胞抑制原初和记忆T细胞增殖,并且可以在不丧失功能的情况下在体外扩增]J Exp Med.[实验医学杂志]2001;193 (11) :1295-302.Epub 2001/06/08.doi:10.1084/jem.193.11.1295.PubMed PMID:11390436;PMCID:PMC2193376。

18.Sakaguchi S,Miyara M,Costantino CM,Hafler DA.FOXP3+regulatory T cells in the human immune system.[人免疫系统中的FOXP3+调节性T细胞]Nat Rev Immunol.[自然综述免疫学]2010;10 (7) :490-500.Epub 2010/06/19.doi:10.1038/nri2785.PubMed PMID:20559327.PMCID:NA

19.Kloss CC,Condomines M,Cartellieri M,Bachmann M,Sadelain M.Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells.[具有平衡信号传导的组合抗原识别促进经工程改造的T细胞选择性肿瘤根除]Nat Biotechnol.[自然生物技术]2013;31 (1) :71-5.Epub 2012/12/18.doi:10.1038/nbt.2459.PubMed PMID:23242161;PMCID:PMC5505184。

20.Hegde M,Mukherjee M,Grada Z,Pignata A,Landi D,Navai SA,Wakefield A,Fousek K,Bielamowicz K,Chow KK,Brawley VS,Byrd TT,Krebs S,Gottschalk S,Wels WS,Baker ML,Dotti G,Mamonkin M,Brenner MK,Orange JS,Ahmed N.Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13R α 2 mitigate tumor antigen escape.[串联CAR T细胞靶向HER2和IL13R α 2减轻肿瘤抗原逃逸]J Clin Invest.[临床研究杂志]2016;126 (8) :3036-52.Epub 2016/07/19.doi:10.1172/jci83416.PubMed PMID:27427982;PMCID:PMC4966331。

21.Rafiq S,Hackett CS,Brentjens RJ.Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy.[克服当前CAR T细胞疗法中障碍的工程改造策略]Nat Rev Clin Oncol.[自然综述临床肿瘤学]2020;17 (3) :147-67.Epub 2019/12/19.doi:10.1038/s41571-019-0297-y.PubMed PMID:31848460;PMCID:PMC7223338美国朱诺医疗公司(JUNO Therapeutics)/新基生物制药公司(Celgene) 顾问。其他作者声明没有竞争利益。

22.Han T,Abdel-Motal UM,Chang DK,Sui J,Muvaffak A,Campbell J,Zhu Q,Kupper TS,Marasco WA.Human anti-CCR4 minibody gene transfer for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma.[用于治疗皮肤T细胞淋巴瘤的人抗CCR4微型抗体基因转移]PLoS One.[公共科学图书馆综合]2012;7 (9) :e44455.Epub 2012/09/14.doi:10.1371/journal.pone.0044455.PubMed PMID:22973452;PMCID:PMC3433438。

23.Chang DK,Peterson E,Sun J,Goudie C,Drapkin RI,Liu JF,Matulonis U,Zhu Q,Marasco WA.Anti-CCR4 monoclonal antibody enhances antitumor immunity by

modulating tumor-infiltrating Tregs in an ovarian cancer xenograft humanized mouse model.[抗CCR4单克隆抗体通过调节卵巢癌异种移植人源化小鼠模型中的肿瘤浸润性Treg来增强抗肿瘤免疫]Oncoimmunology.[肿瘤免疫学]2016;5(3):e1090075.Epub 2016/05/04.doi:10.1080/2162402x.2015.1090075.PubMed PMID:27141347;PMCID:PMC4839340。

24.Chang DK,Sui J,Geng S,Muvaffak A,Bai M,Fuhlbrigge RC,Lo A,Yammanuru A,Hubbard L,Sheehan J,Campbell JJ,Zhu Q,Kupper TS,Marasco WA.Humanization of an anti-CCR4 antibody that kills cutaneous T-cell lymphoma cells and abrogates suppression by T-regulatory cells.[抗CCR4抗体的人源化,可杀伤皮肤T细胞淋巴瘤细胞并消除T调节细胞的抑制]Mol Cancer Ther.[分子癌症疗法]2012;11(11):2451-61.Epub 2012/08/08.doi:10.1158/1535-7163.Mct-12-0278.PubMed PMID:22869555;PMCID:PMC3496034。

25.Wang Y,Chan LL,Grimaud M,Fayed A,Zhu Q,Marasco WA.High-Throughput Image Cytometry Detection Method for CAR-T Transduction,Cell Proliferation, and Cytotoxicity Assays.[用于CAR-T转导、细胞增殖和细胞毒性测定的高通量图像细胞计数检测方法]Cytometry A.[细胞计量学A]2020.Epub 2020/11/17.doi:10.1002/cyto.a.24267.PubMed PMID:33191639.PMCID:NA

26.Jenkins RW,Aref AR,Lizotte PH,Ivanova E,Stinson S,Zhou CW,Bowden M,Deng J,Liu H,Miao D,He MX,Walker W,Zhang G,Tian T,Cheng C,Wei Z,Palakurthi S,Bittinger M,Vitzthum H,Kim JW,Merlino A,Quinn M,Venkataramani C,Kaplan JA,Portell A,Gokhale PC,Phillips B,Smart A,Rotem A,Jones RE,Keogh L,Anguiano M,Stapleton L,Jia Z,Barzily-Rokni M,Cañadas I,Thai TC,Hammond MR,Vlahos R,Wang ES,Zhang H,Li S,Hanna GJ,Huang W,Hoang MP,Piris A,Eliane JP,Stemmer-Rachamimov AO,Cameron L,Su MJ,Shah P,Izar B,Thakuria M,LeBoeuf NR,Rabinowits G,Gunda V,Parangi S,Cleary JM,Miller BC,Kitajima S,Thummalapalli R,Miao B,Barbie TU,Sivathanu V,Wong J,Richards WG,Bueno R,Yoon CH,Miret J,Herlyn M,Garraway LA,Van Allen EM,Freeman GJ,Kirschmeier PT,Lorch JH,Ott PA,Hodi FS,Flaherty KT,Kamm RD,Boland GM,Wong KK,Dornan D,Paweletz CP,Barbie DA.Ex Vivo Profiling of PD-1Blockade Using Organotypic Tumor Spheroids.[使用器官型肿瘤球体对PD-1阻断进行离体谱分析]Cancer Discov.[癌症发现]2018;8(2):196-215.Epub 2017/11/05.doi:10.1158/2159-8290.Cd-17-0833.PubMed PMID:29101162;PMCID:PMC5809290。

27.Liu JF,Palakurthi S,Zeng Q,Zhou S,Ivanova E,Huang W,Zervantonakis IK,Selfors LM,Shen Y,Pritchard CC,Zheng M,Adleff V,Papp E,Piao H,Novak M,Fotheringham S,Wulf GM,English J,Kirschmeier PT,Velculescu VE,Paweletz C,Mills GB,Livingston DM,Brugge JS,Matulonis UA,Drapkin R.Establishment of Patient-Derived Tumor Xenograft Models of Epithelial Ovarian Cancer for Preclinical Evaluation of Novel Therapeutics.[建立上皮性卵巢癌的患者衍生的肿瘤异种移植模型,用于新颖治疗药物的临床前评价]Clin Cancer Res.[癌症临床研究]

2017;23(5):1263-73.Epub 2016/08/31.doi:10.1158/1078-0432.Ccr-16-1237.PubMed PMID:27573169;PMCID:PMC5332350。

28.Stern JN,Yaari G,Vander Heiden JA,Church G,Donahue WF,Hintzen RQ,Huttner AJ,Laman JD,Nagra RM,Nylander A,Pitt D,Ramanan S,Siddiqui BA,Vigneault F,Kleinstein SH,Hafler DA,O'Connor KC.B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes.[多发性硬化症脑部中的B细胞在引流颈淋巴结中成熟]Sci Transl Med.[科学转化医学]2014;6(248):248ra107.Epub 2014/08/08.doi:10.1126/scitranslmed.3008879.PubMed PMID:25100741;PMCID:PMC4388137。

29.Yaari G,Uduman M,Kleinstein SH.Quantifying selection in high-throughput Immunoglobulin sequencing data sets.[高通量免疫球蛋白测序数据集中的定量选择]Nucleic Acids Res.[核酸研究]2012;40(17):e134.Epub 2012/05/30.doi:10.1093/nar/gks457.PubMed PMID:22641856;PMCID:PMC3458526。

30.Butler A,Hoffman P,Smibert P,Papalexi E,Satija R.Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions,technologies,and species.[整合跨不同条件、技术和物种的单细胞转录组数据]Nat Biotechnol.[自然生物技术]2018;36(5):411-20.Epub 2018/04/03.doi:10.1038/nbt.4096.PubMed PMID:29608179;PMCID:PMC6700744.31.Li B,Gould J,Yang Y,Sarkizova S,Tabaka M,Ashenberg O,Rosen Y,Slyper M,Kowalczyk MS,Villani AC,Tickle T,Hacohen N,Rozenblatt-Rosen O,Regev A.Cumulus provides cloud-based data analysis for largescale single-cell and single-nucleus RNA-seq.[Cumulus为大规模单细胞和单核RNA-seq提供基于云的数据分析]Nat Methods.[自然方法]2020;17(8):793-8.Epub 2020/07/29.doi:10.1038/s41592-020-0905-x.PubMed PMID:32719530;PMCID:PMC7437817

实例6

[0549] 技术摘要

[0550] 背景:卵巢癌(OvCA)是美国女性癌症死亡的第五大原因。由于缺乏特定的症状或体征,并且缺乏值得信赖的早期检测筛选,大多数患有OvCA的女性(60-65%)在癌症已扩散到卵巢界限之外时才被诊断为晚期。目前,OvCA的标准治疗是手术干预,然后进行含铂化疗,例如卡铂加紫杉醇。III期或IV期疾病的治疗很少能治愈,5年生存率低于20%。对于一线疗法失败的复发或转移性疾病,没有有效的疗法可用。此外,几个抗PD(L)1检查点阻断抑制剂的临床试验显示结果不佳。迫切需要更有效的疗法。

[0551] 嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法是一种新型“活体药物”。FDA对第二代CAR-T细胞疗法的批准使这种新型细胞免疫疗法成为血液系统恶性肿瘤的主流癌症疗法。然而,这些结果尚未轻易转化至实体瘤。事实上,已经认识到几个主要障碍限制了我们使用CAR-T细胞“治愈”实体瘤的能力。这些包括由于在正常组织上共享肿瘤相关抗原(TAA)表位而导致的中靶肿瘤外毒性、肿瘤异质性和免疫抑制性肿瘤微环境(TME)。为了解决这些问题,我们设计了双靶向微调免疫恢复性(DFIR)CAR T细胞。我们工程改造了抗MUC1/抗间皮素(MSLN)双靶向CAR,其起以下作用:通过在MUC1或MSLN存在的情况下允许CAR-T激活解决实体瘤异质

性从而增加肿瘤杀伤功效,以及减轻单一抗原逃逸。提高的安全性通过微调的CAR来解决,使得CAR靶向性部分的亲和力经过定制,以仅识别高密度肿瘤TAA,而不识别在正常组织上以生理水平表达的相同抗原。肿瘤部位处的免疫恢复将通过在肿瘤部位分泌双特异性抗体(BsAb)来实现,该抗体充当检查点阻断抑制剂。在该项目中,BsAb的一个臂针对TIGIT,该TIGIT在来自高级别浆液性卵巢癌个体的肿瘤抗原特异性CD8+T细胞和CD8+肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)上过度表达,且第二臂针对CCR4,该CCR4在OvCA的TIL中升高的调节性T细胞(Treg)上过度表达。

[0552] 不希望受理论束缚,通过双靶向和微调抗MUC1和抗MSLN CAR靶向性部分的结合亲和力,可以极大改善HGSOC的CAR-T细胞疗法的抗肿瘤功效和安全性。进一步地,DF CAR-T细胞可以被另外工程改造为分泌双特异性抗体(BsAb),该抗体靶向HGSOC中起作用的两种主要免疫抑制通路。局部分泌的BsAb将针对存在于衰竭的T细胞、调节性T细胞(Treg)和NK细胞上的TIGIT以及在Treg上高度表达的CCR4。在不希望受理论束缚的情况下,同时阻断这两种通路将逆转免疫抑制并恢复局部抗肿瘤免疫力。

[0553] 特定目标:

[0554] 目标1-体外研究抗MUC1/MSLN DFIR CAR T细胞(其在肿瘤部位组成型地分泌抗TIGIT/CCR4 BsAb)对OvCA细胞的杀伤功效,并记录T细胞衰竭的逆转。

[0555] 目标2-体内研究测试DFIR CAR-T细胞在携带HLA匹配卵巢肿瘤的人源化小鼠(NSG-SGM3)中的功效。研究将设计适当的对照组,以分别评估抗MUC1/抗MSLN DFIR CAR-T细胞及其抗TIGIT/CCR4 BsAb有效载荷的效果。

[0556] 开发双靶向CAR T细胞以减轻肿瘤细胞异质性和单一抗原逃逸;开发微调CAR以提高表达相同抗原(尽管其密度较低)的正常组织的安全性;可充当双检查点阻断抑制剂的双特异性抗体的基因递送。

[0557] 使用PDOT表征DFIR CAR-T细胞;开发人源化小鼠模型来探究OvCA TME和DFIR CAR-T干预;使用scRNAseq对DFIR CAR-T疗法导致的TME变化进行分类和定量。

[0558] 在不希望受理论束缚的情况下,这些研究旨在提供作为活体药物的终身疗法,其可以实现OvCA的治愈。这种细胞组合免疫疗法被配制为作为一次性单一药剂施用,这也可以减轻患者、临床医生和付款人的负担。

[0559]

[0560] 实验室摘要

[0561] 卵巢癌通常诊断较晚,III期或IV期疾病的治疗很少能治愈,5年生存率低于20%。然而,对于一线疗法失败的复发或转移性疾病,没有有效的疗法可用。最近涉及新型免疫疗法药剂(称为免疫检查点抑制剂,例如抗PD(L)1单克隆抗体)的试验也显示出临床结果差。现役和退役女军人应该得到我们所能提供的最好待遇,以回报她们为国家做出的英勇服务。迫切需要更有效的疗法来治疗我们的女军人,并且我们的提案为高级别浆液性卵巢癌(HGSOC)得以被发现的突破性疗法给予了希望。

[0562] 嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法是一种新类型的“活体药物”,有望“治愈”OvCA。这种疗法利用我们自身的免疫细胞,并改造它们来识别和杀伤癌细胞。这些CAR-T疗法在治疗血液恶性肿瘤方面显示出具有临床意义的结果,从而产生了3种FDA批准的药物,然而,这些发现尚未轻易转化至实体瘤。已经认识到几个主要障碍限制了使用CAR-T细胞“治愈”

实体瘤的能力。为了解决这些问题,我们已设计了用于治疗实体瘤的双靶向微调免疫恢复性 (DFIR) CAR-T细胞,着重于改善抗肿瘤功效和患者安全性。

[0563] 如本文所述,我们将构建DFIR CAR-T细胞并验证其在组织培养中杀伤HGSOC肿瘤的能力。这种疗法还恢复到达肿瘤但很快衰竭的患者免疫细胞的抗肿瘤免疫力。此外,在人源化小鼠中进行的DFIR CAR-T治疗研究将验证这种治疗“治愈”HGSOC肿瘤。人源化小鼠是经工程改造而携带人免疫系统的小鼠。我们的分析还将旨在了解DFIR CAR-T细胞恢复抗肿瘤免疫力的工作机制,并且这是我们研究的重要部分。

[0564] 最终,DFIR CAR-T细胞可以终生保留在患者体内,他们可以通过我们称为“免疫监视”的过程持续监视,以防止新的HGSOC细胞产生。这种细胞组合免疫疗法被配制为作为一次性单一药剂施用,这也可以减轻患者、临床医生和付款人的负担。在不希望受理论束缚的情况下,这种DFIR CAR-T疗法为我们的战士和军队提供了一种治疗,他们应该得到最好的治疗。

[0565]

[0566] 影响声明

[0567] 卵巢癌通常诊断较晚,III期或IV期疾病的治疗很少能治愈,5年生存率低于20%。这种疾病侵袭美国女性,包括现役和退役女性军人,她们应该得到我们所能提供的最好待遇,以回报她们为国家做出的英勇服务。然而,对于一线疗法失败的复发或转移性疾病,没有有效的疗法可用。迫切需要更有效的疗法,并且我们的提案为HGSOC得以被发现的突破性疗法给予了希望。

[0568] 嵌合抗原受体 (CAR) T细胞疗法是一种新类型的“活体药物”,有望“治愈”OvCA。这种疗法利用我们自身的免疫细胞,并改造它们来识别和杀伤癌细胞。这些CAR-T疗法在治疗血液恶性肿瘤方面显示出具有临床意义的结果,从而产生了3种FDA批准的药物,然而,这些发现尚未轻易转化至实体瘤。已经认识到几个主要障碍限制了使用CAR-T细胞“治愈”实体瘤的能力。这些包括由于在正常组织上共享肿瘤相关抗原 (TAA) 表位而导致的中靶肿瘤外毒性、肿瘤异质性和免疫抑制性肿瘤微环境 (TME)。为了解决这些问题,我们已构建用于治疗实体瘤的双靶向微调免疫恢复性 (DFIR) CAR-T细胞,着重于改善抗肿瘤功效和安全性。

[0569] MUC1和MSLN在OvCA和HGSOC上过度表达。它们的表达存在异质性,因此并非患者中的所有肿瘤细胞都会表达这两种TAA。TME具有OvCA女性常见的“公共”特征,这些特征可以用免疫检查点阻断抑制剂 (ICIs) 来靶向。因为我们的“和/或”门控策略 (其允许双重抗MUC1和抗MSLN CAR-T靶向),我们的DFIR CAR-T细胞将能够杀伤异质肿瘤细胞群体。特别地,双重靶向将促进单 (MUC1或MSLN) 阳性肿瘤细胞和双 (MUC1和MSLN1) 阳性肿瘤细胞的杀伤。我们的DFIR CAR-T细胞也是抗TIGIT/CCR4 BsAb分泌型细胞。TIGIT和CCR4都是可靶向的检查点分子,并且被发现在TIL和肿瘤相关淋巴细胞 (TAL) 上高表达。此外,阻断TIGIT/CD155相互作用将逆转细胞毒性T细胞衰竭、阻断Treg免疫抑制功能并恢复NK杀伤功能。阻断CCR4相互作用还可以通过阻断由肿瘤细胞分泌的CCL17/CCL22趋化因子的结合来防止Treg在OvCA部位积聚。我们的项目涉及人源化小鼠的体外和体内研究,并利用最先进的技术来评价我们的新疗法。

[0570] 最后,这种细胞组合免疫疗法被配制为作为一次性单一药剂施用,这也可以减轻

患者、临床医生和付款人的负担。此外,充当ICI的抗TIGIT/CCR4 BsAb被直接递送至肿瘤部位,以使在TME中的效果最大化,同时使任何全身毒性最小化。CAR-T细胞杀伤肿瘤细胞后并不会消失,而是继续活着留在患者体内,以阻止任何疾病复发的机会。

等效物

[0571] 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。

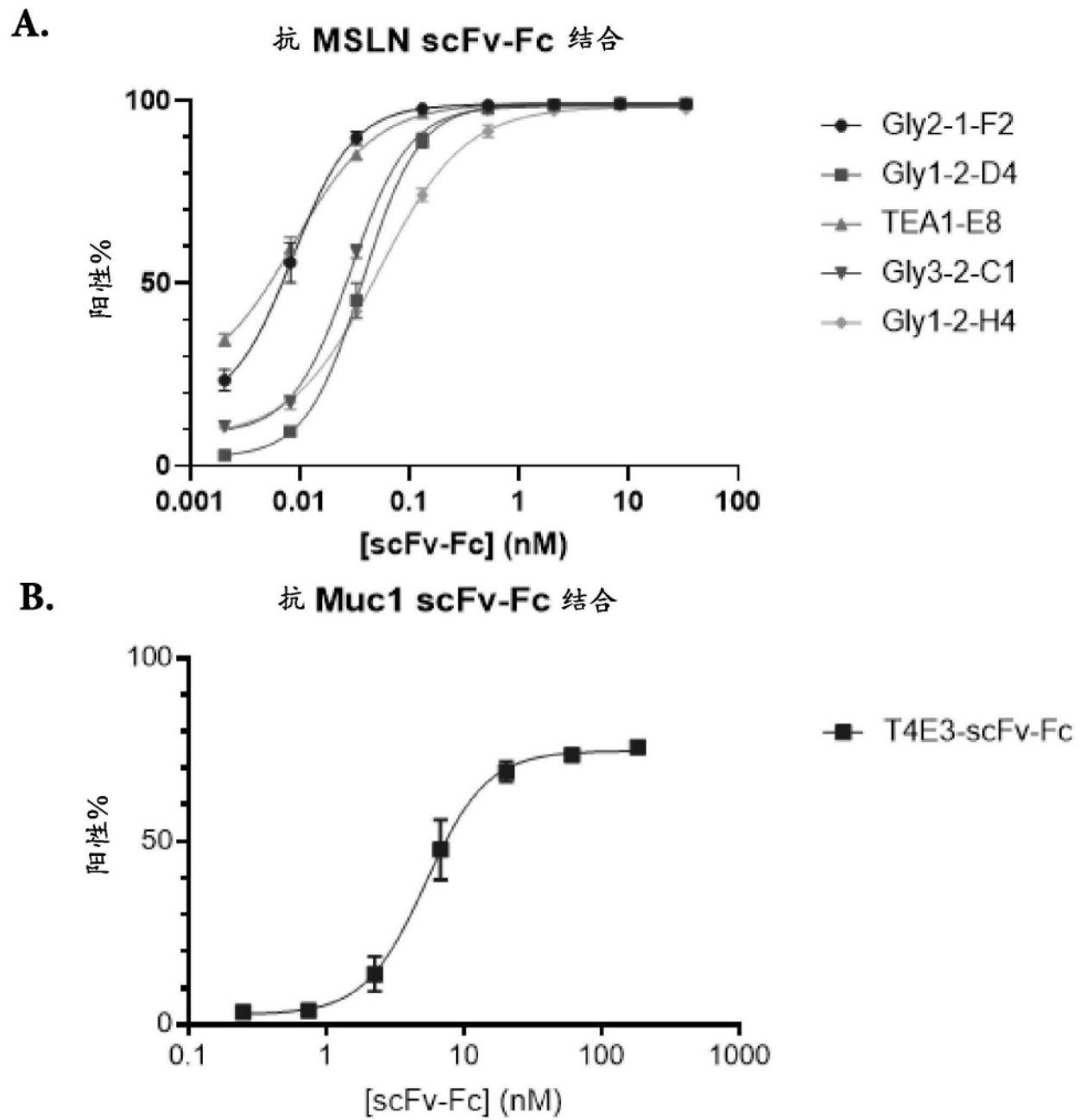


图1

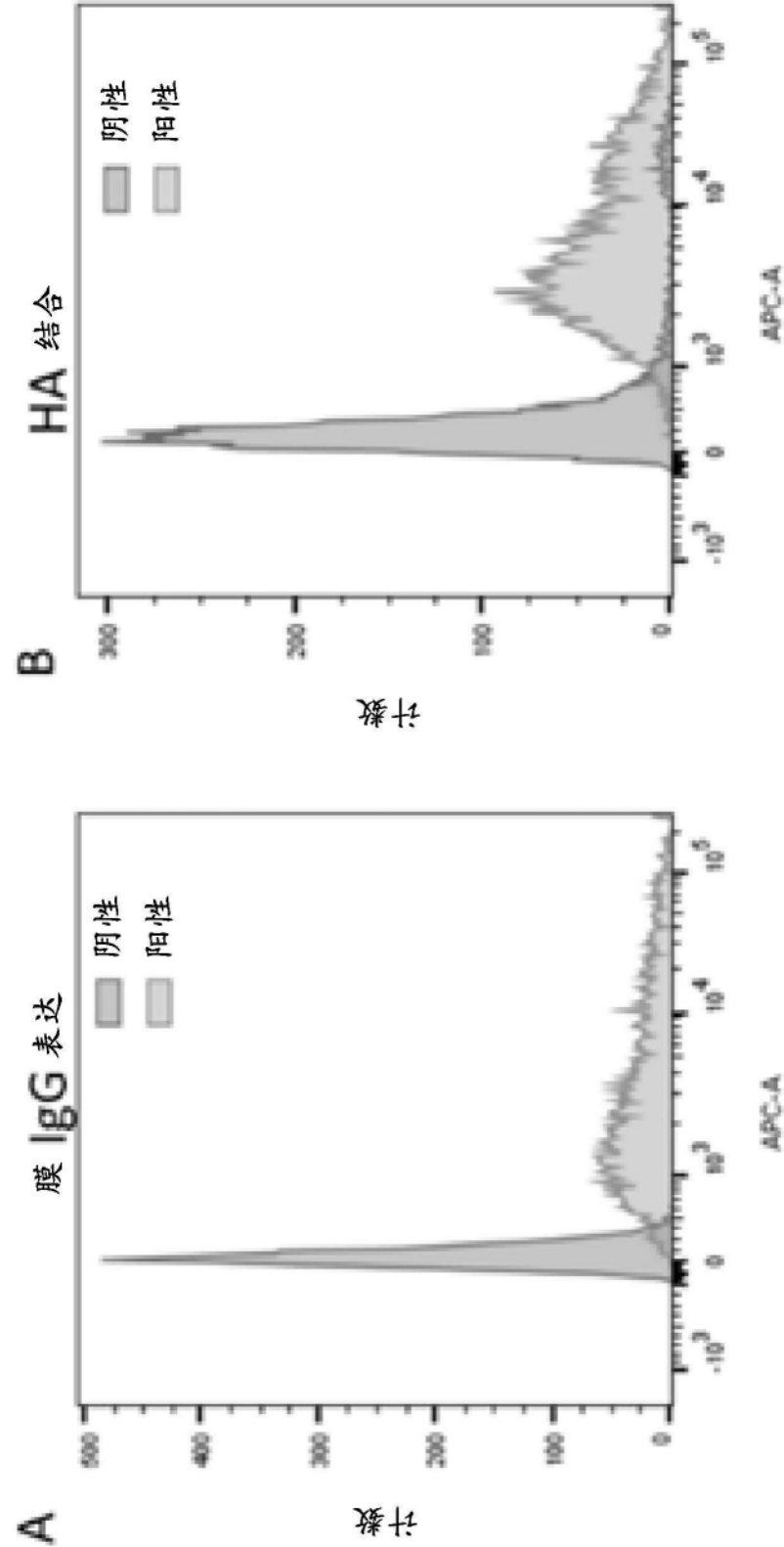


图3

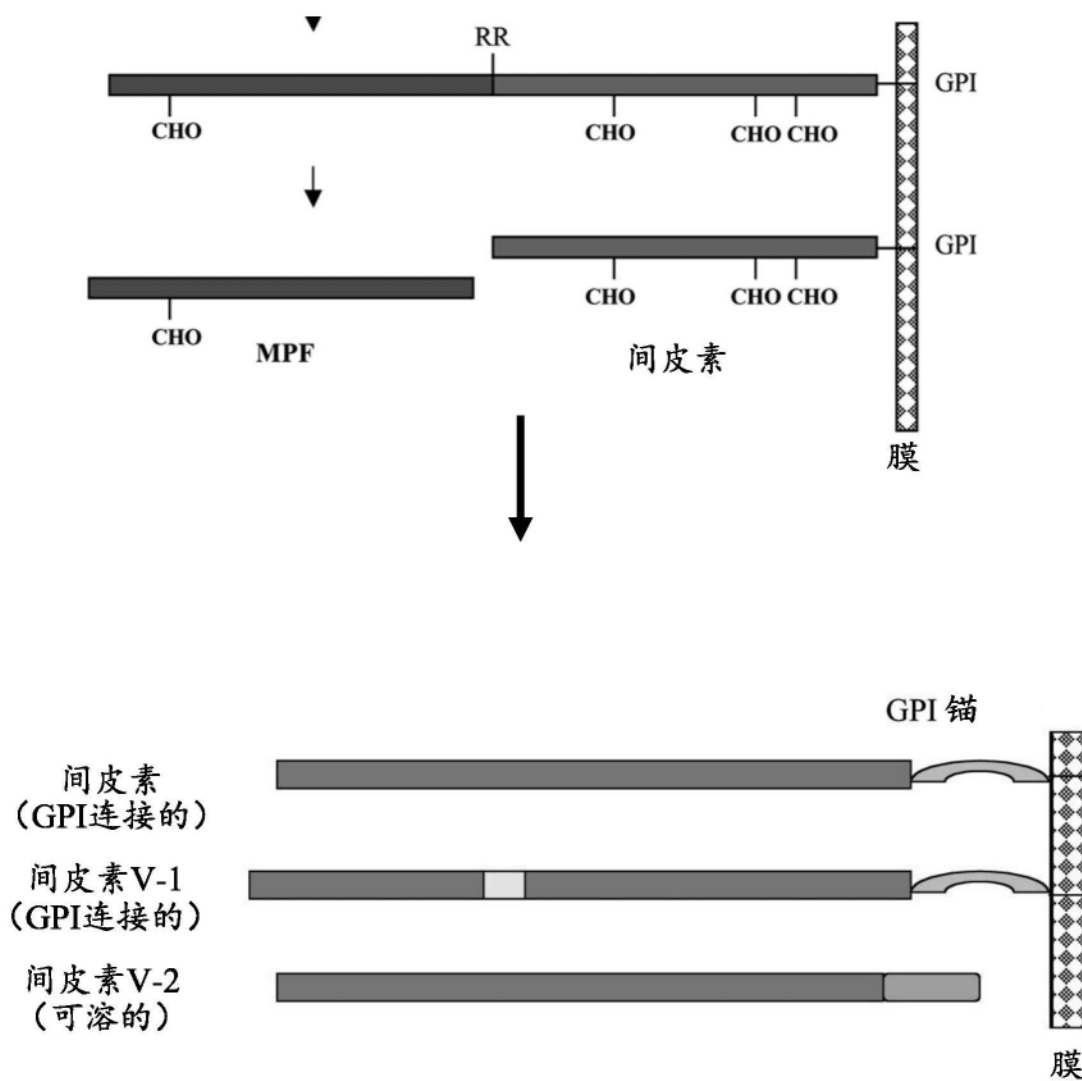


图4

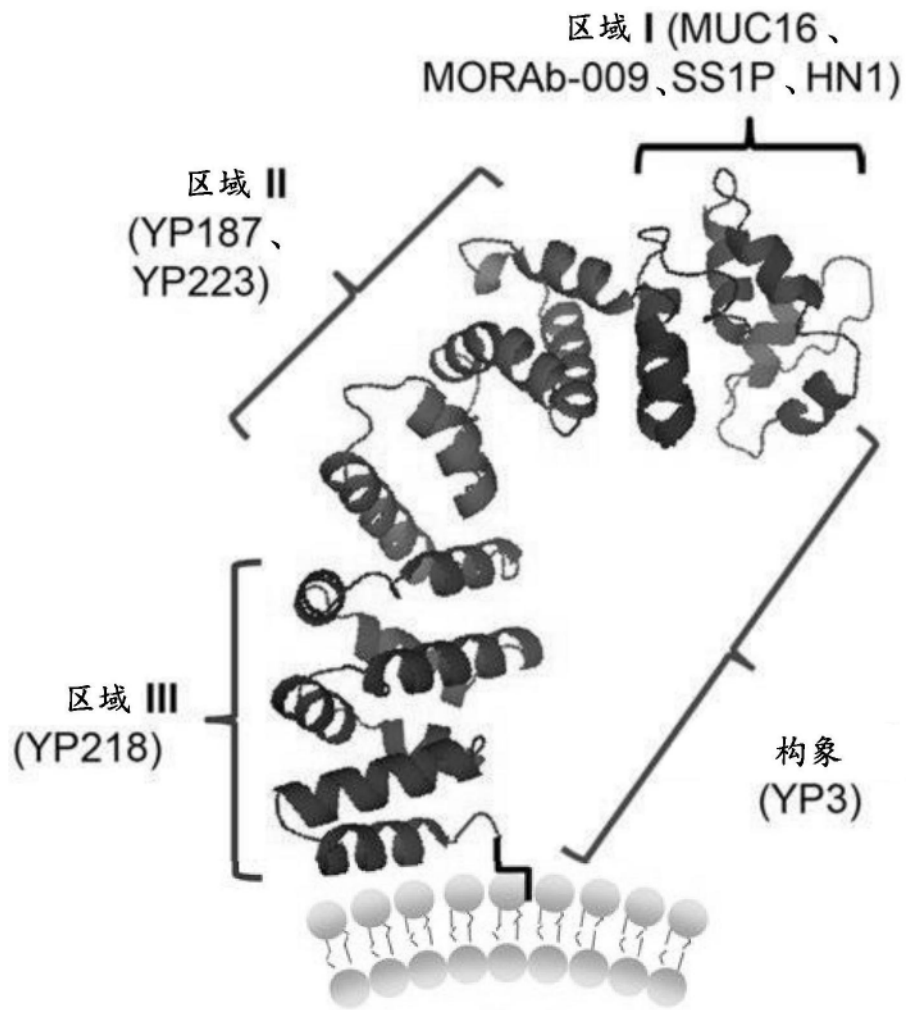


图4(续)

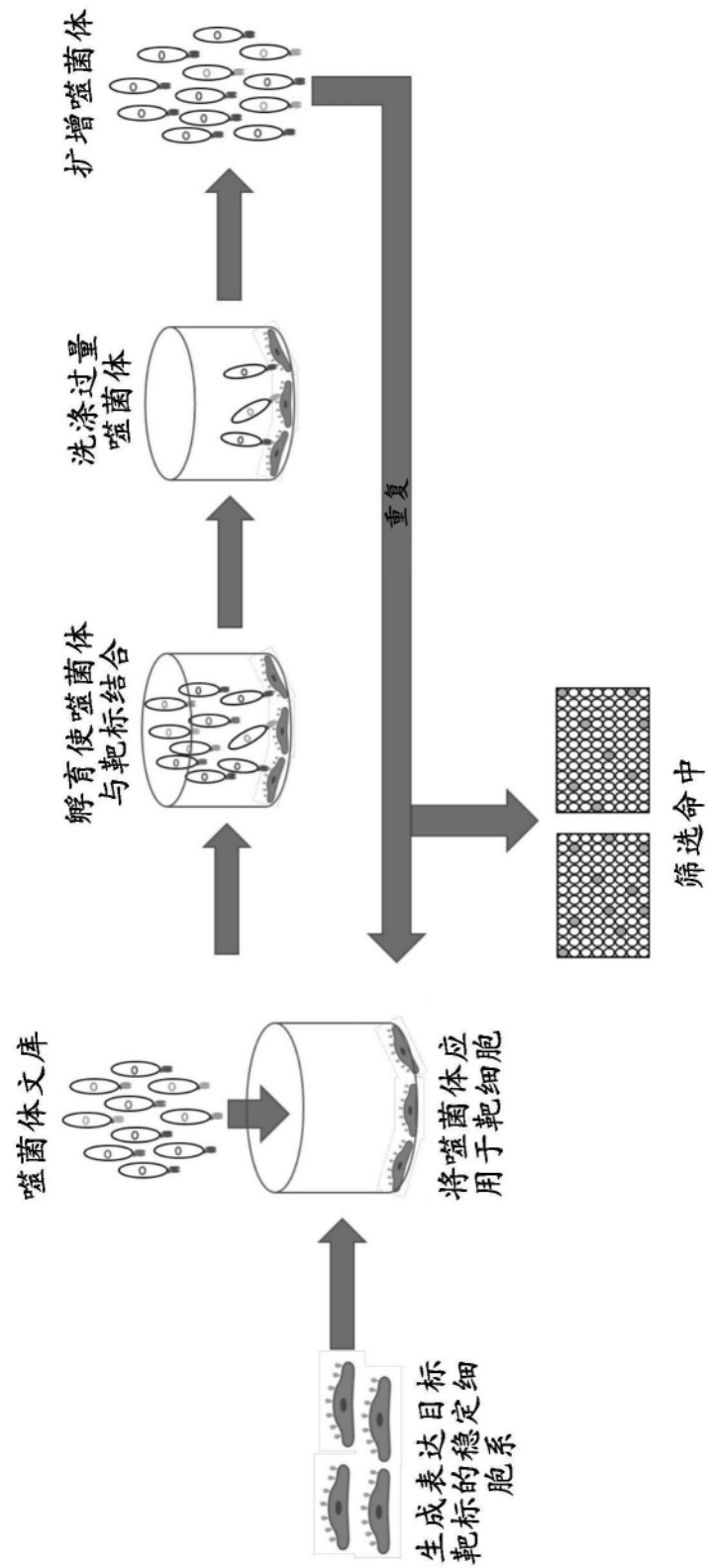


图5

第1轮 (10/10/19)			
2E7 293T-MSLN+ 细胞			
3.33E+12	I	靶标	O
		Gly1	1.33E+04
		Gly2	3.00E+03
		Gly3	6.00E+03
	TEA		9.38E+04

第2轮 (10/18/19)			
2E7 Cf2Th-MSLN+ 细胞			
8.00E+11	I	靶标	O
		Gly1	9.60E+04
		Gly2	1.60E+04
		Gly3	4.00E+03
	TEA		8.20E+04

第2b轮 (10/23/19)			
2E7 Cf2Th-MSLN+ 细胞			
4.00E+12	I	靶标	O
		Gly1	3.90E+04
		Gly2	1.25E+04
		Gly3	3.00E+03
	TEA		2.81E+05

第3轮 (10/27/19)			
2E7 293T-MSLN+ 细胞			
4.00E+12	I	靶标	O
		Gly1	9.60E+04
		Gly2	1.60E+04
		Gly3	4.00E+03
	TEA		8.20E+04

图6

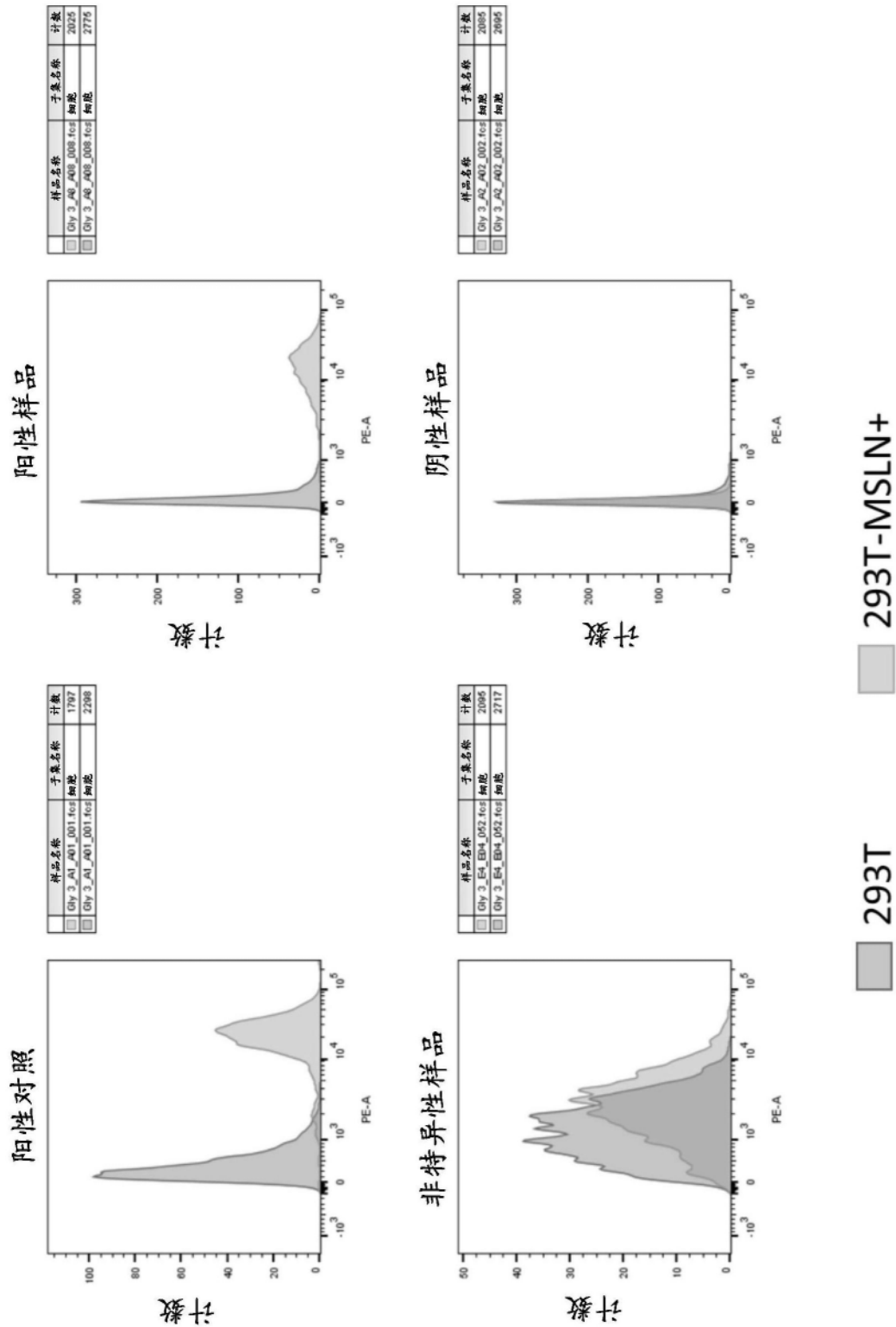


图7

	Gly1	Gly2	Gly3	TEA
阳性%	79.9	87.8	86.8	89.5
阴性%	14.2	10.4	8.0	6.6
非特异性%	5.9	1.7	5.2	3.9

图7续

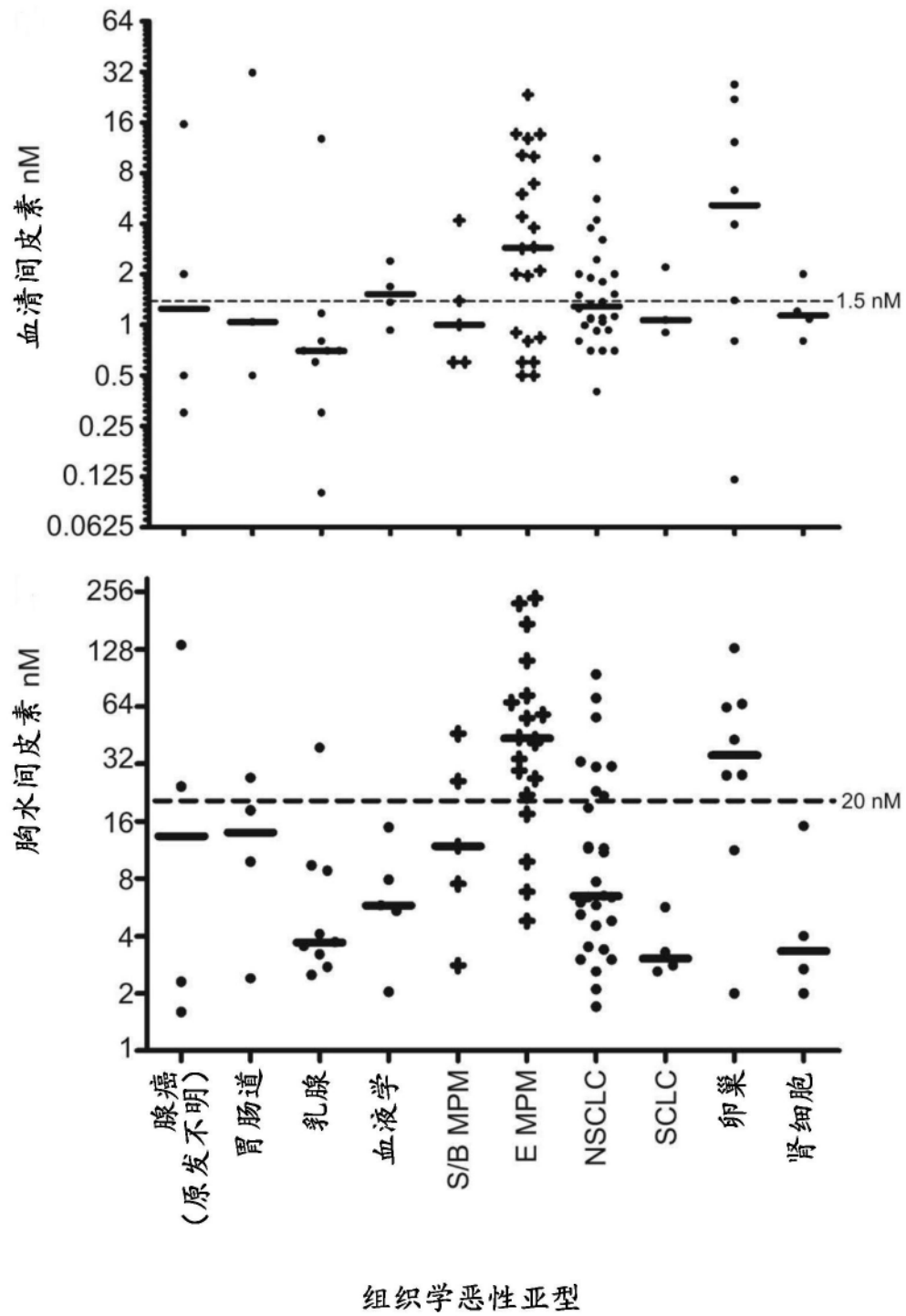


图8(续)

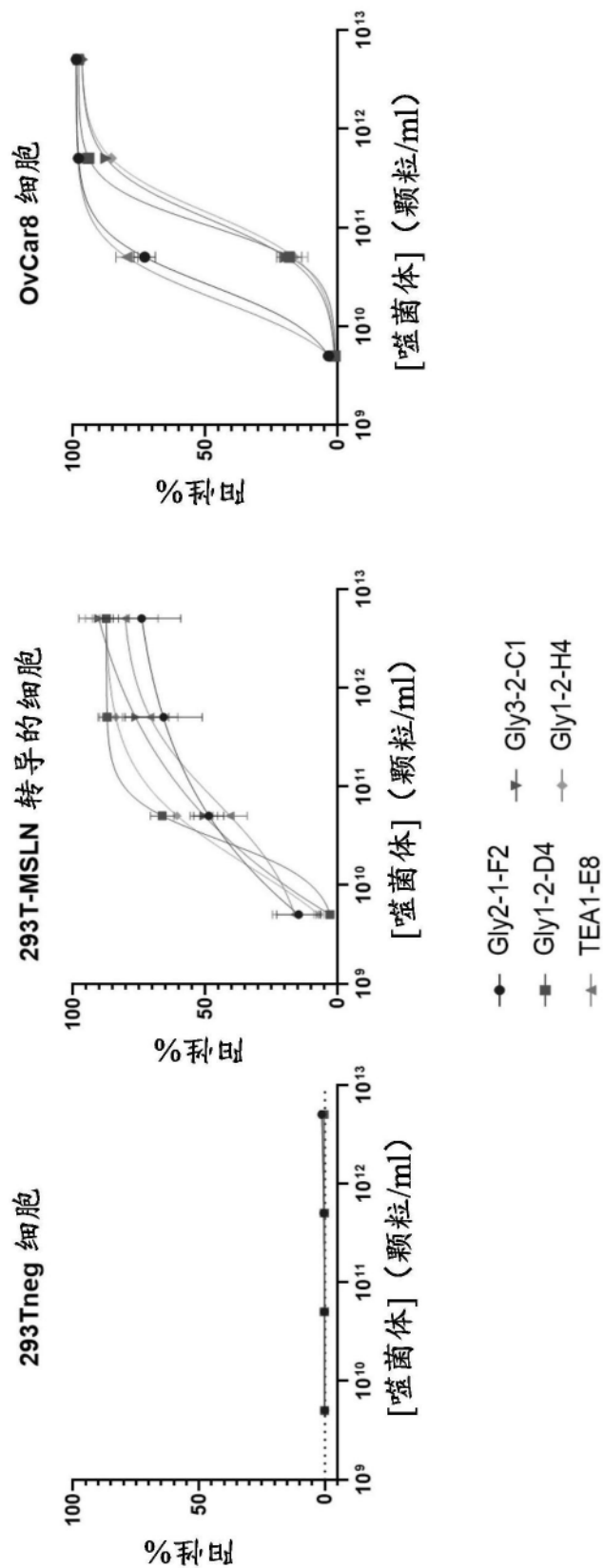


图9

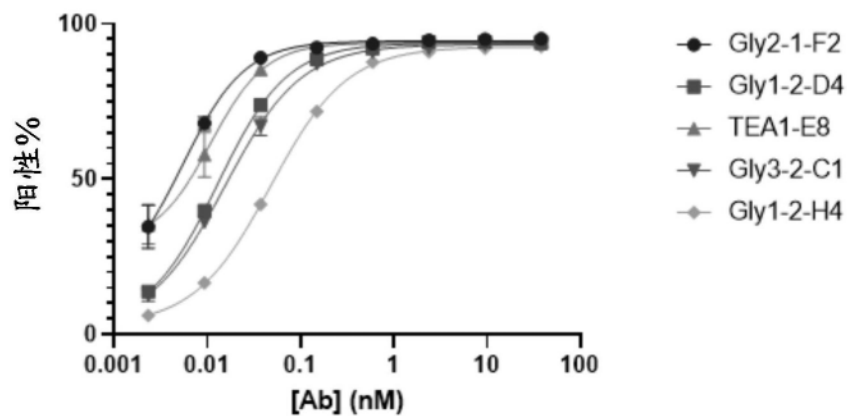
动力学数据 (原始上清液)

样品	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
Gly3-2-C1	4.88E-09	5.60E+04	2.73E-04
Gly1-2-H4	N/A	N/A	N/A
Gly1-2-D4	4.48E-09	3.52E+04	1.57E-04
Gly2-1-F2	<1.0E-12	6.49E+04	<1.0E-07
TEA1-E8	1.66E-10	7.99E+04	1.33E-05
YP158	<1.0E-12	9.30E+04	<1.0E-07
YP218	2.63E-10	6.42E+04	1.69E-05

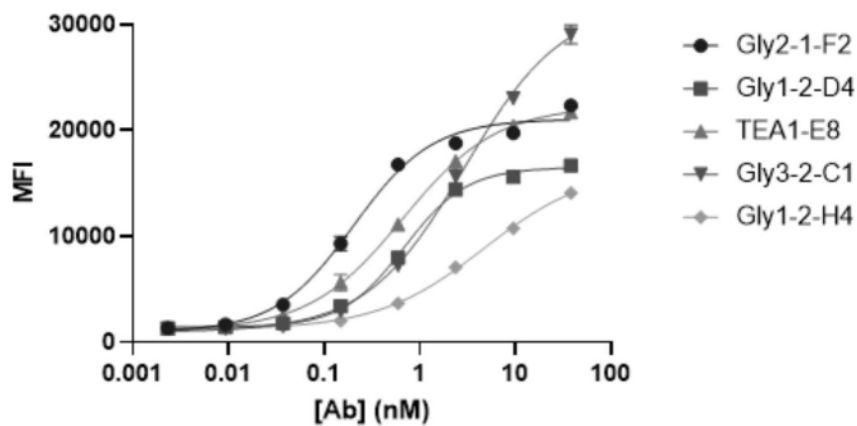
↓
Gly1-2-H4 ELISA
也呈阴性, 这只
识别膜形式?

来自Zhang等人的对照Ab

图10

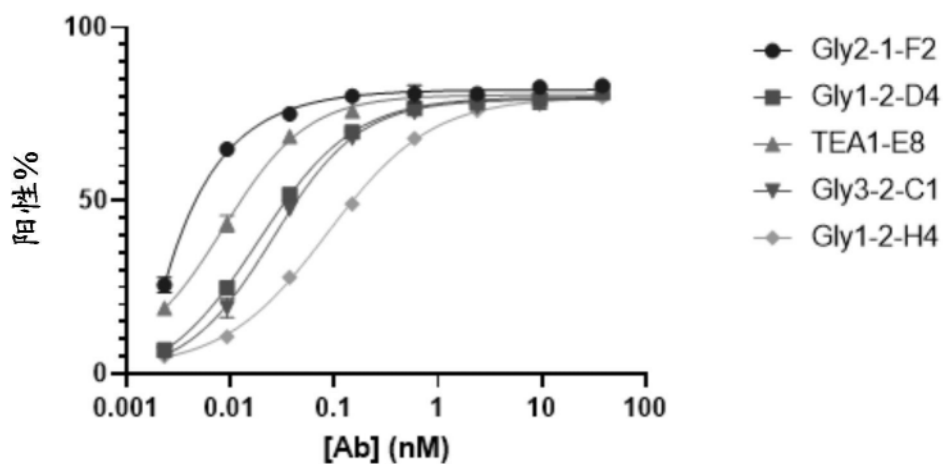
A.**aMSLN-Ovcar8 结合曲线 (阴性%)**

	Gly2-1-F2	Gly1-2-D4	TEA1-E8	Gly3-2-C1	Gly1-2-H4
EC50	0.005453	0.01279	0.01081	0.01538	0.04759

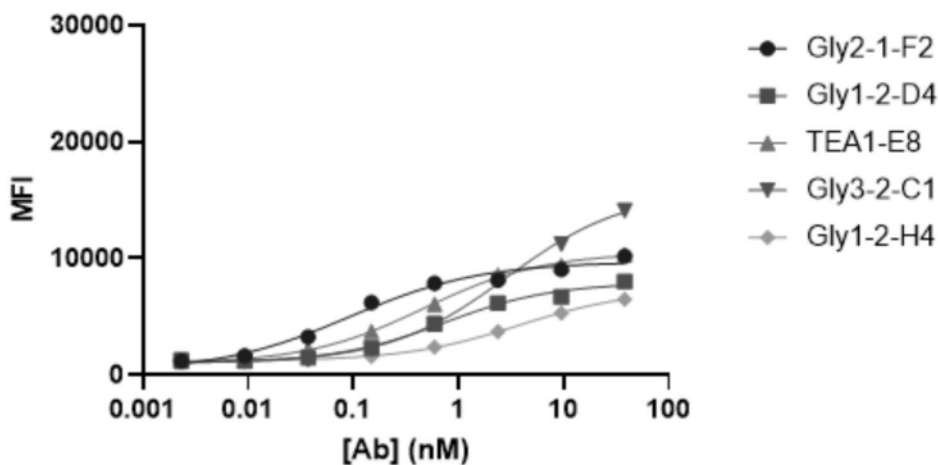
B.**aMSLN-Ovcar8 结合曲线 (MFI)**

	Gly2-1-F2	Gly1-2-D4	TEA1-E8	Gly3-2-C1	Gly1-2-H4
EC50	0.2032	0.6886	0.6684	2.951	4.693

图11

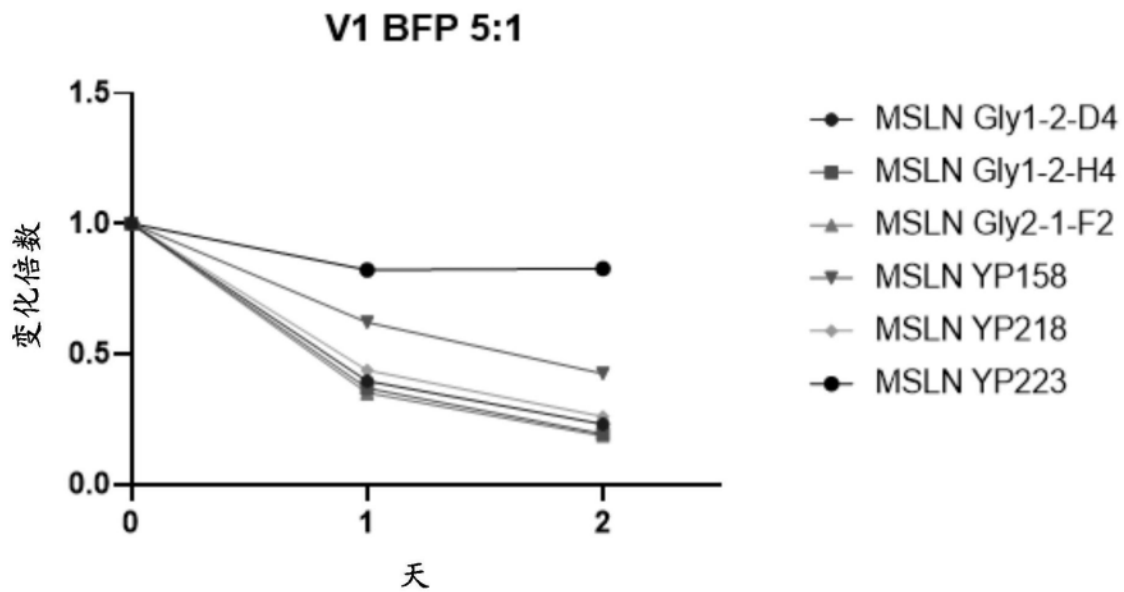
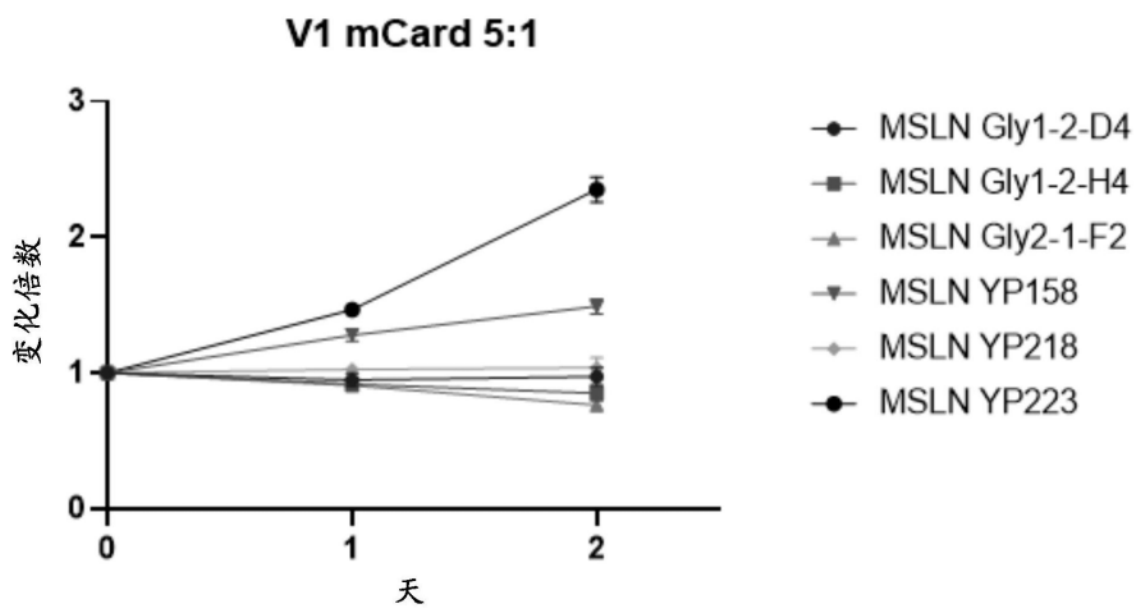
C.**aMSLN-Ovcar5 结合曲线 (阴性%)**

	Gly2-1-F2	Gly1-2-D4	TEA1-E8	Gly3-2-C1	Gly1-2-H4
EC50	~ 2.701e-007	0.01846	0.008609	0.02590	0.08642

D.**aMSLN-Ovcar5 结合曲线 (MFI)**

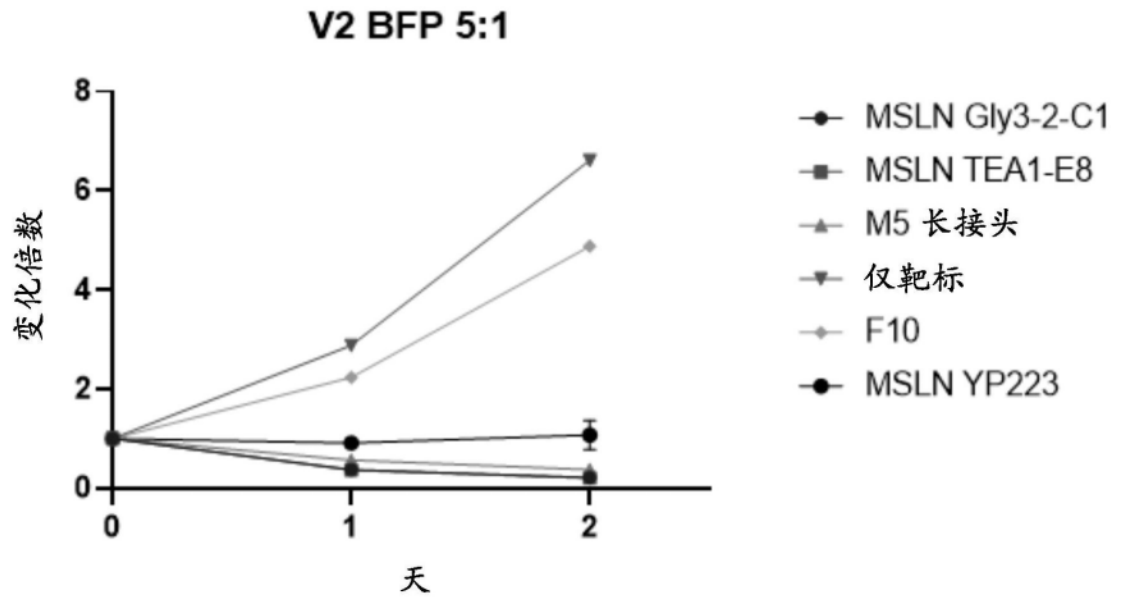
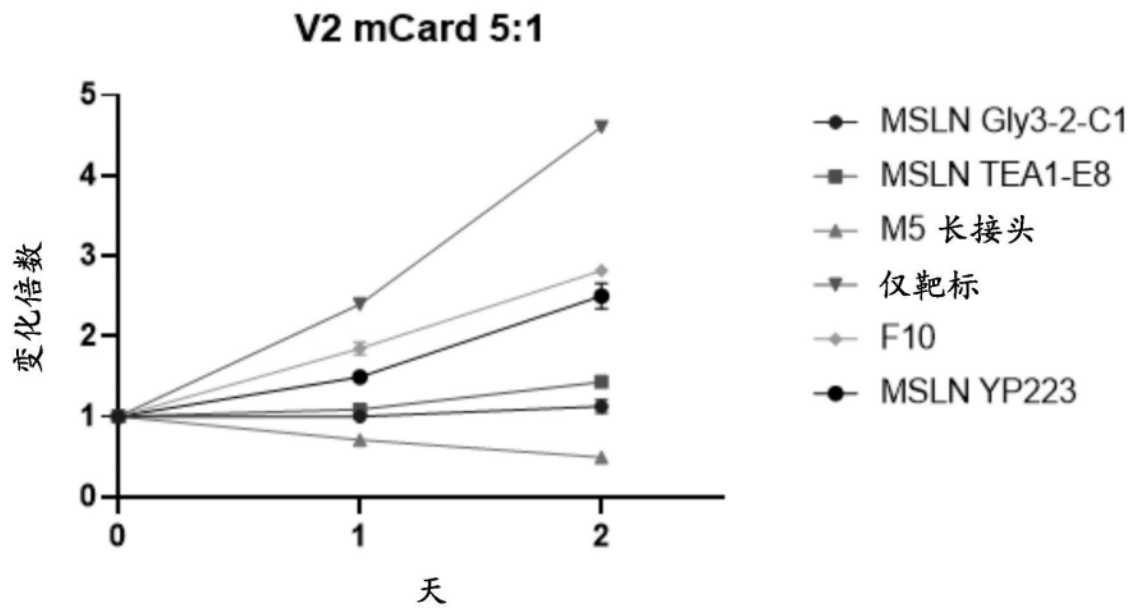
	Gly2-1-F2	Gly1-2-D4	TEA1-E8	Gly3-2-C1	Gly1-2-H4
EC50	0.09292	0.7291	0.4725	2.890	3.761

图11(续)

A.**B.**

变化倍数 = T_x 时的细胞数量/ T_0 时的细胞数量

图12

C.**D.**

变化倍数 = T_x 时的细胞数量/ T_0 时的细胞数量

图12(续)

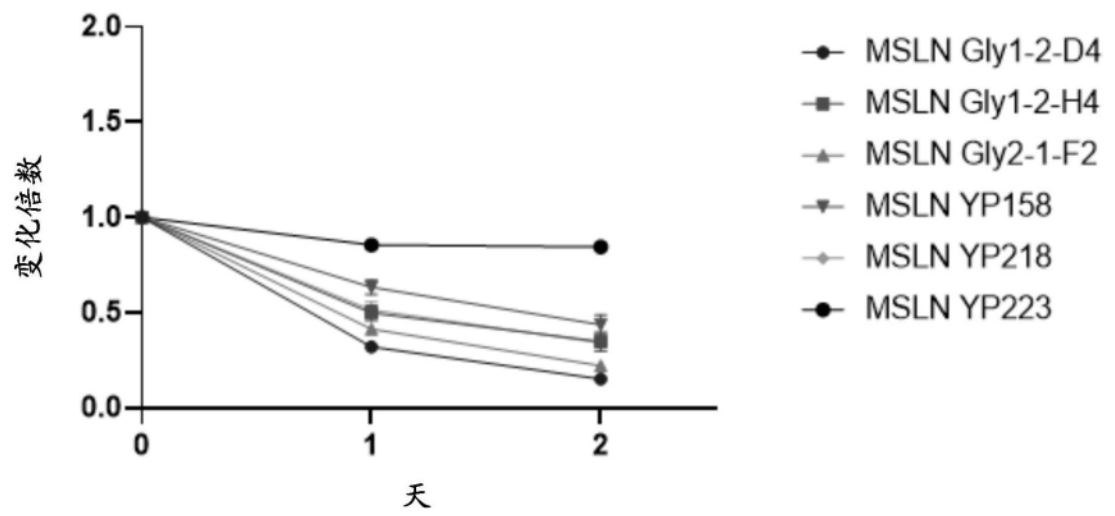
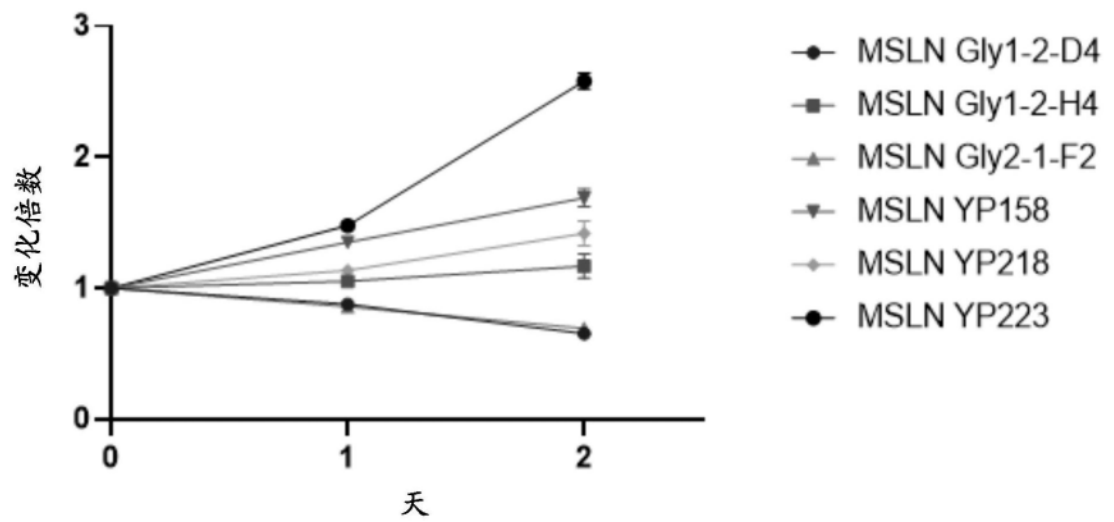
A.**W1 BFP 5:1****B.****W1 mCard 5:1**

图13

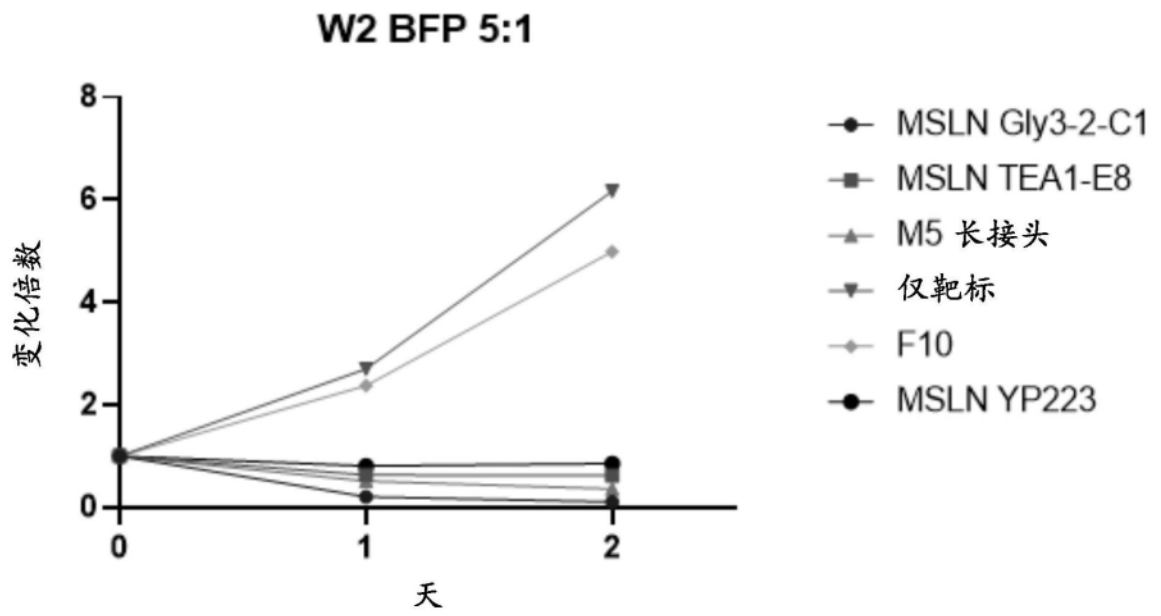
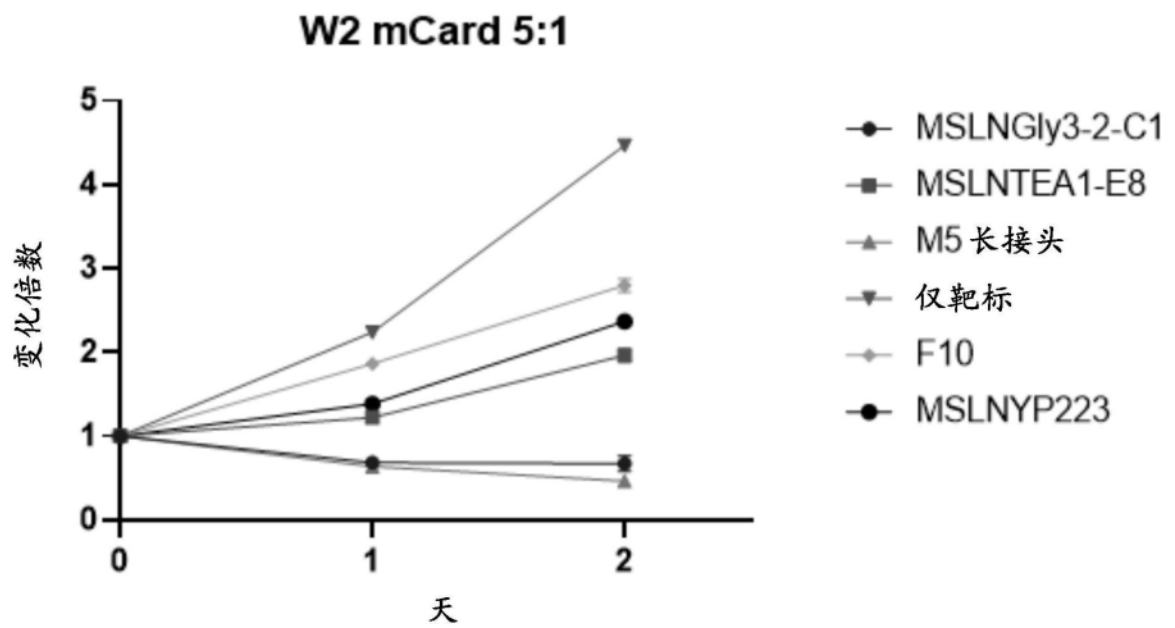
C.**D.**

图13(续)

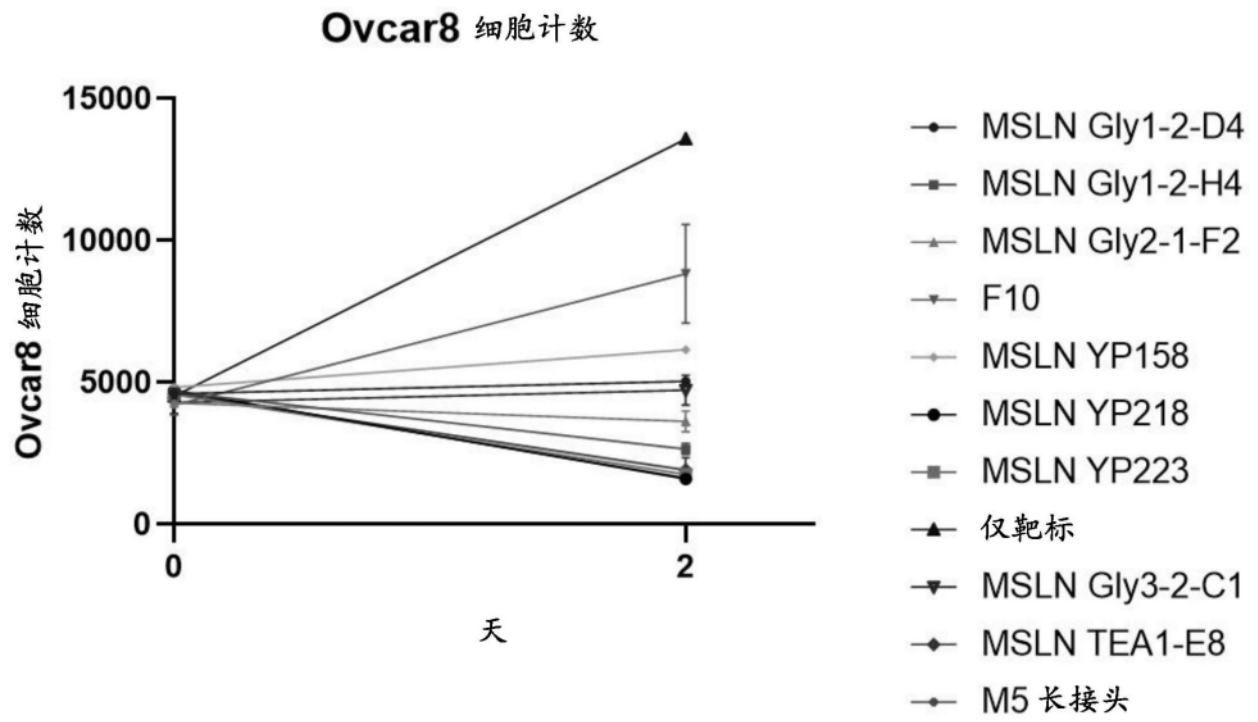


图14

E:T = 5:1

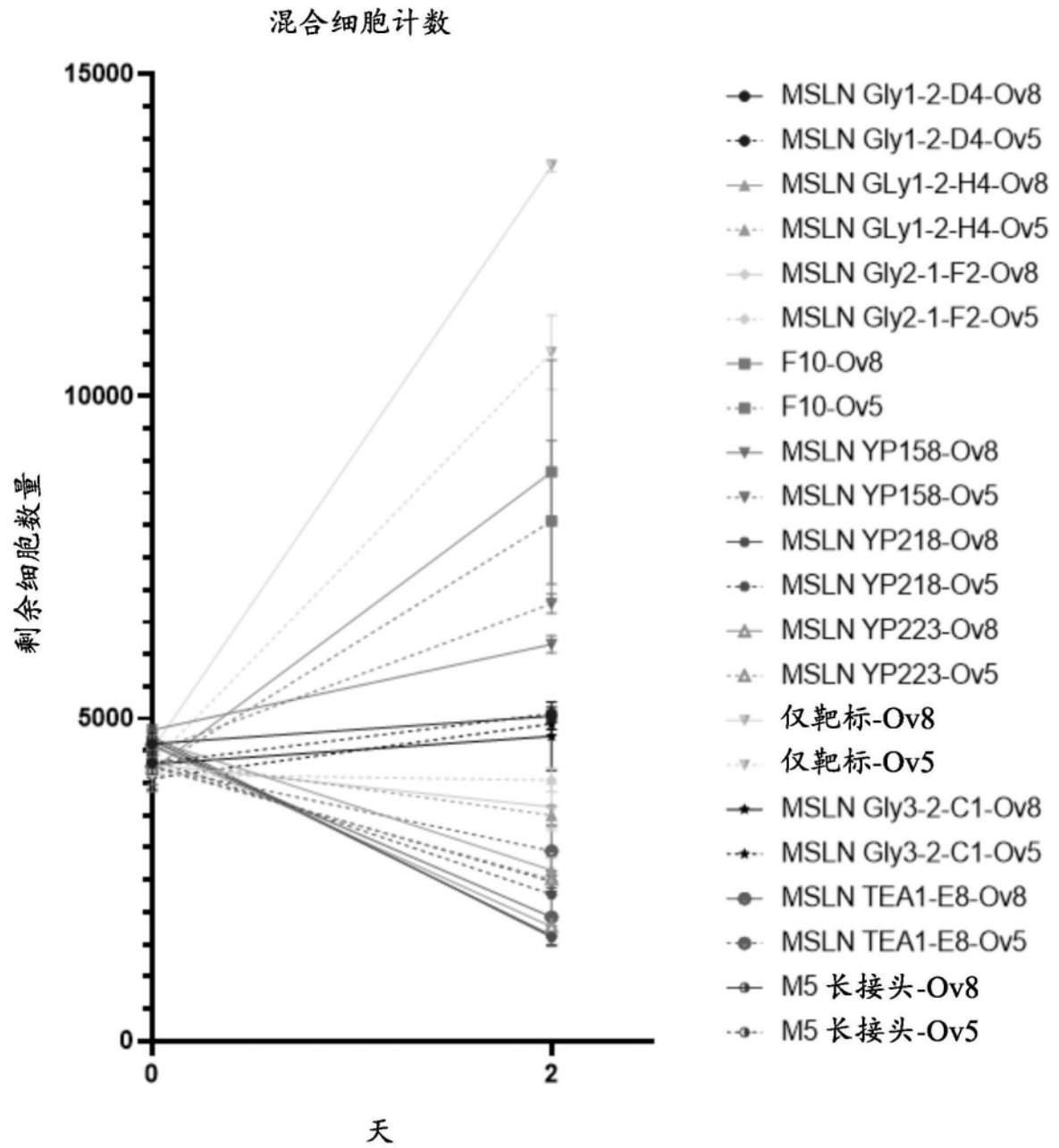


图15

A.

混合细胞计数的拷贝

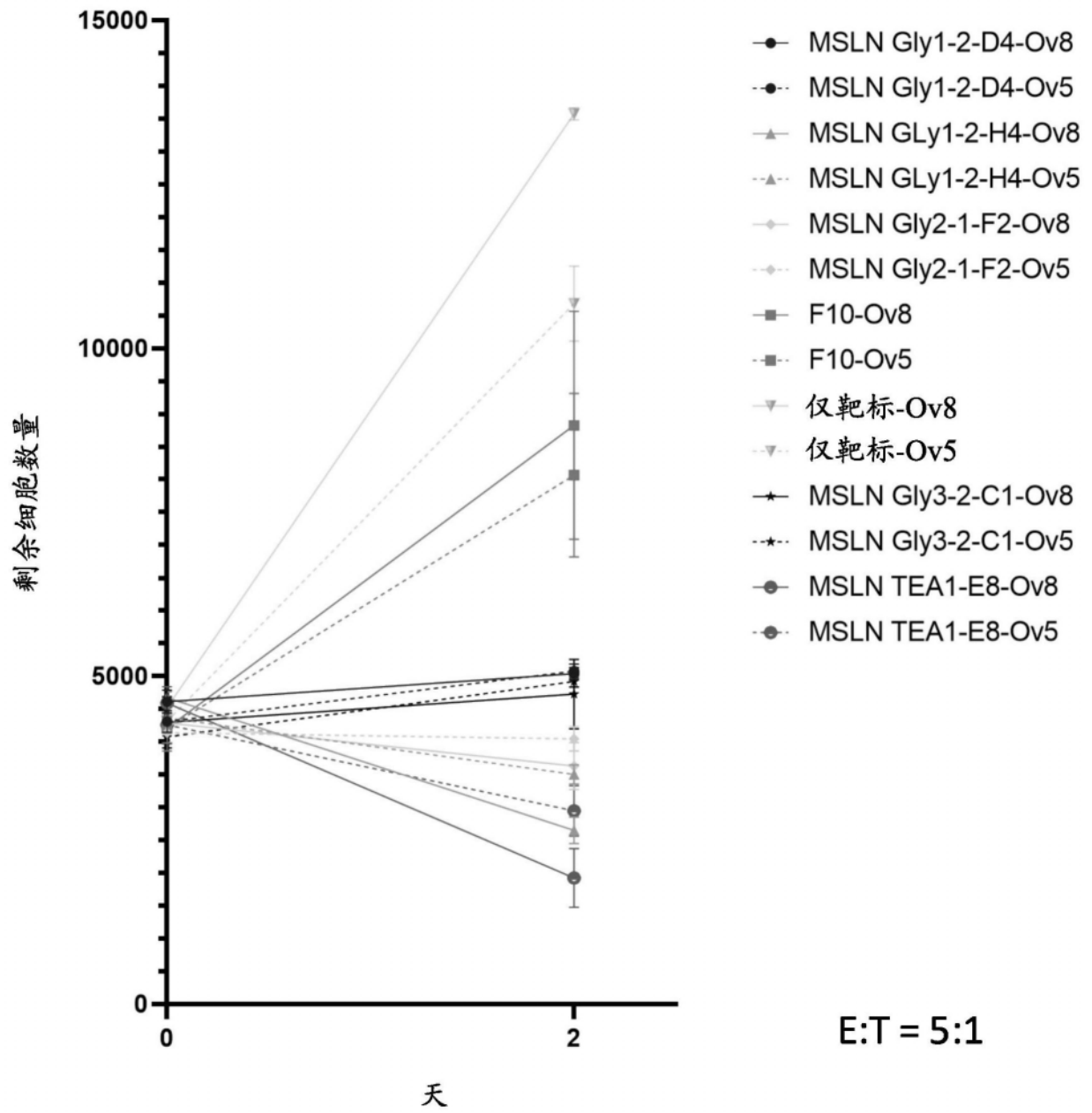


图16

B.

混合细胞计数的拷贝

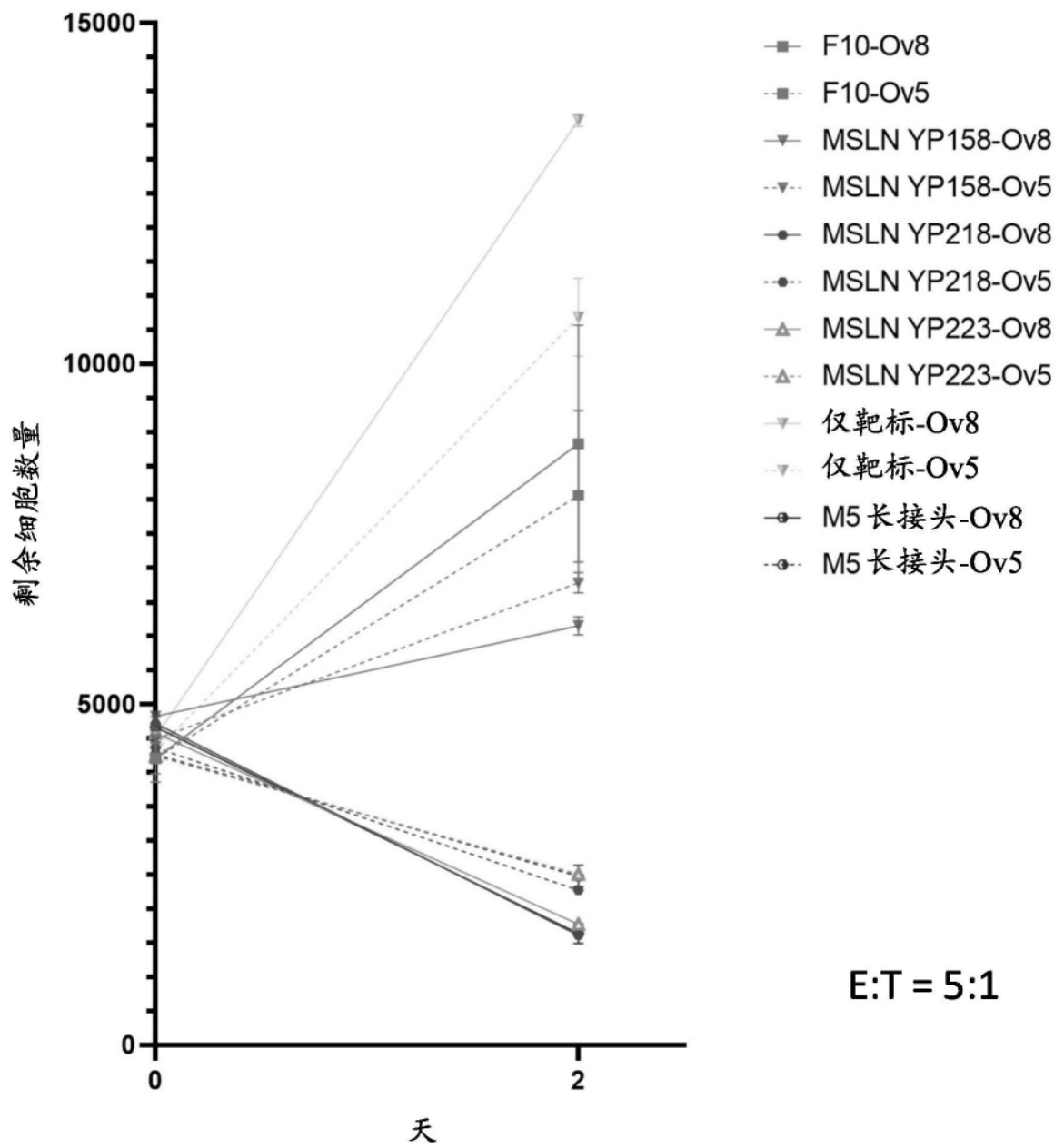


图16(续)

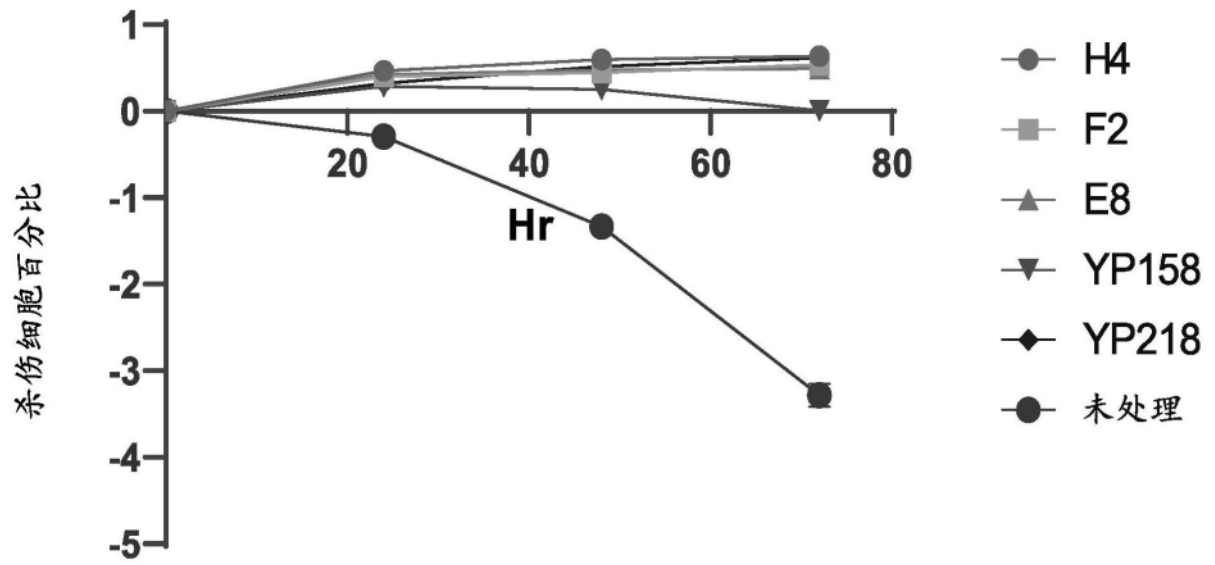
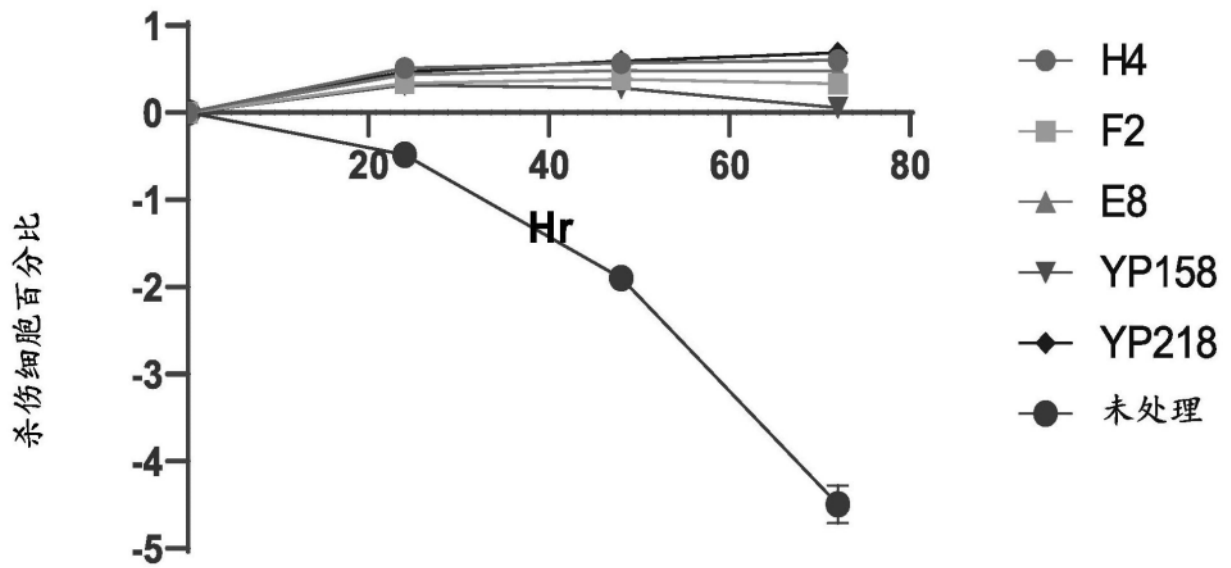
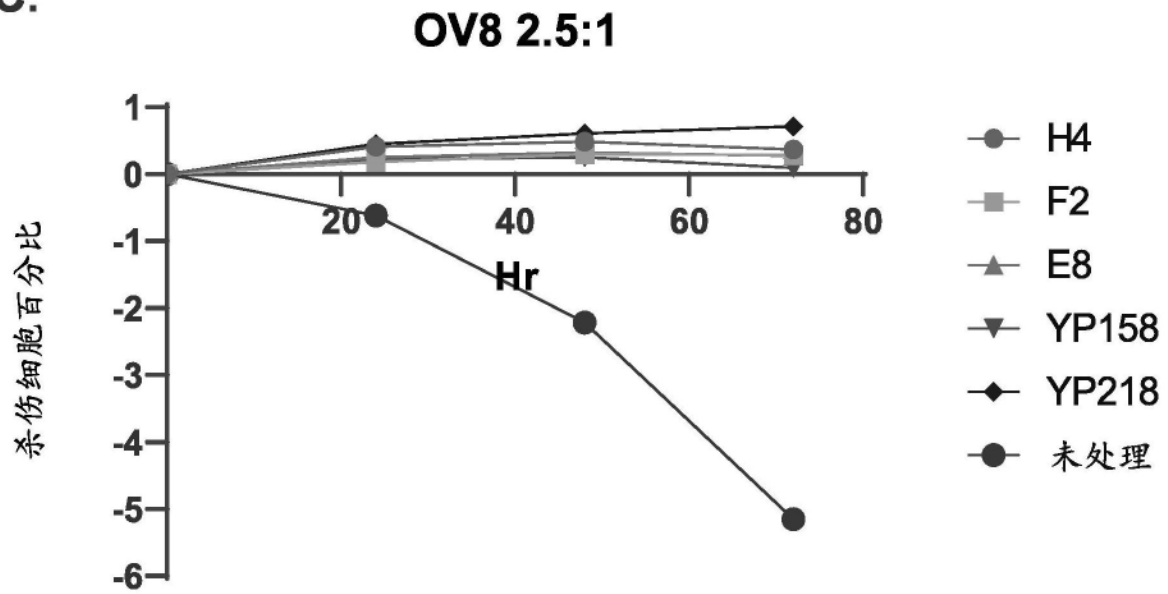
A.**OV8 10:1****B.****OV8 5:1**

图17

C.



D.

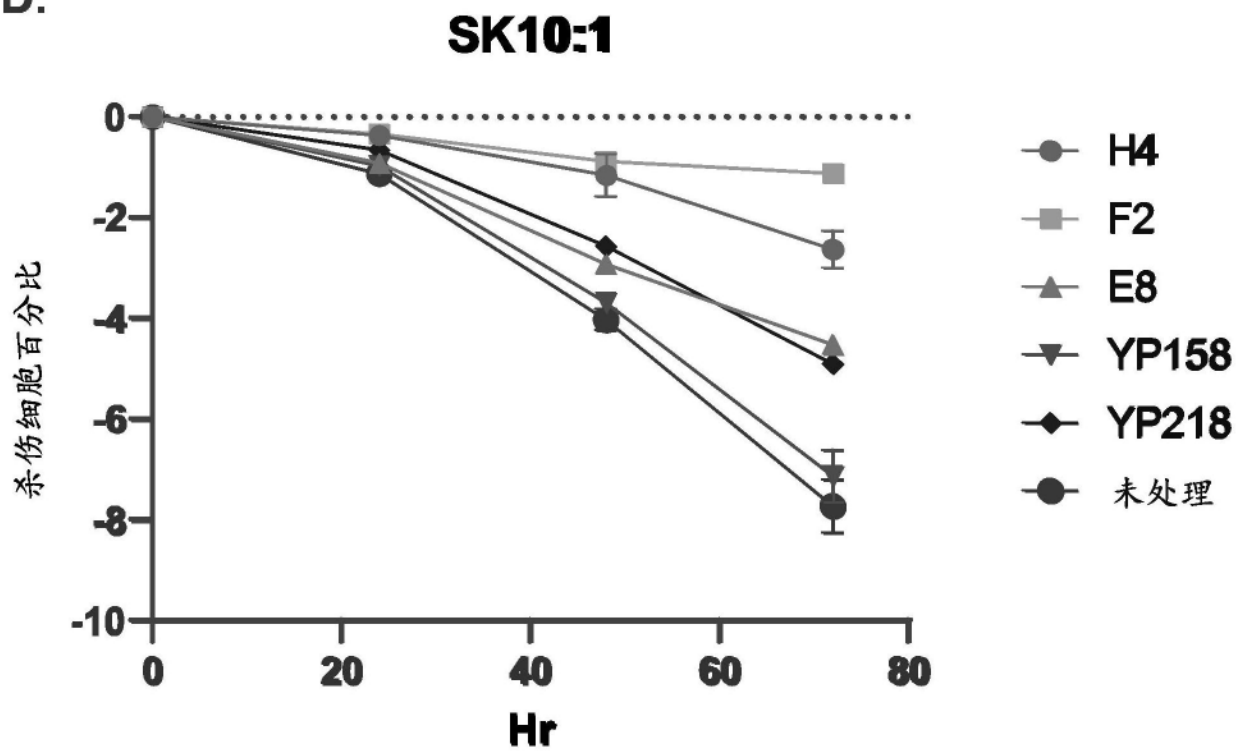


图17(续)

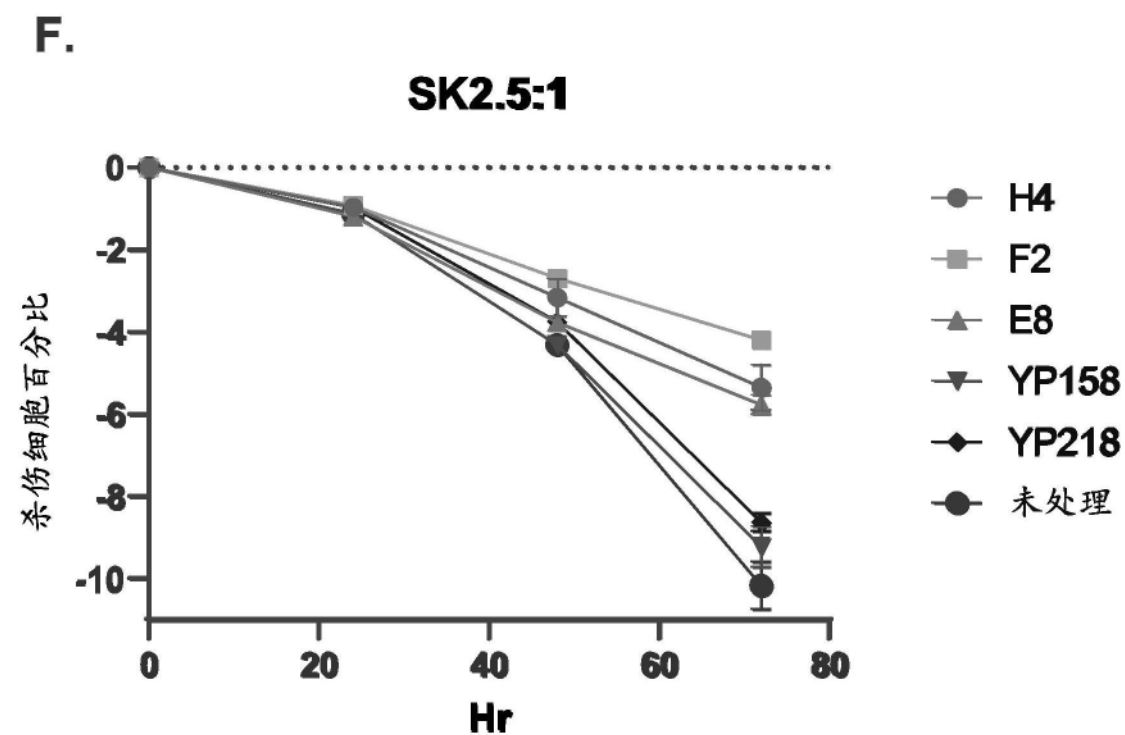
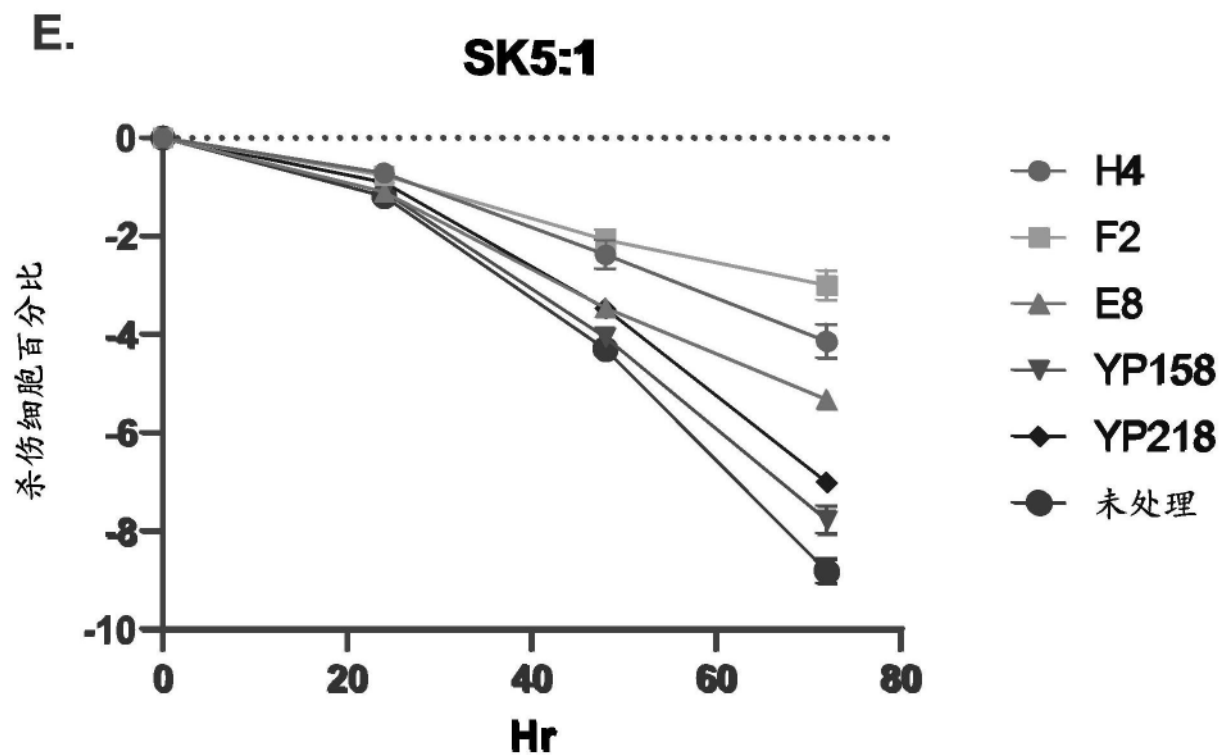
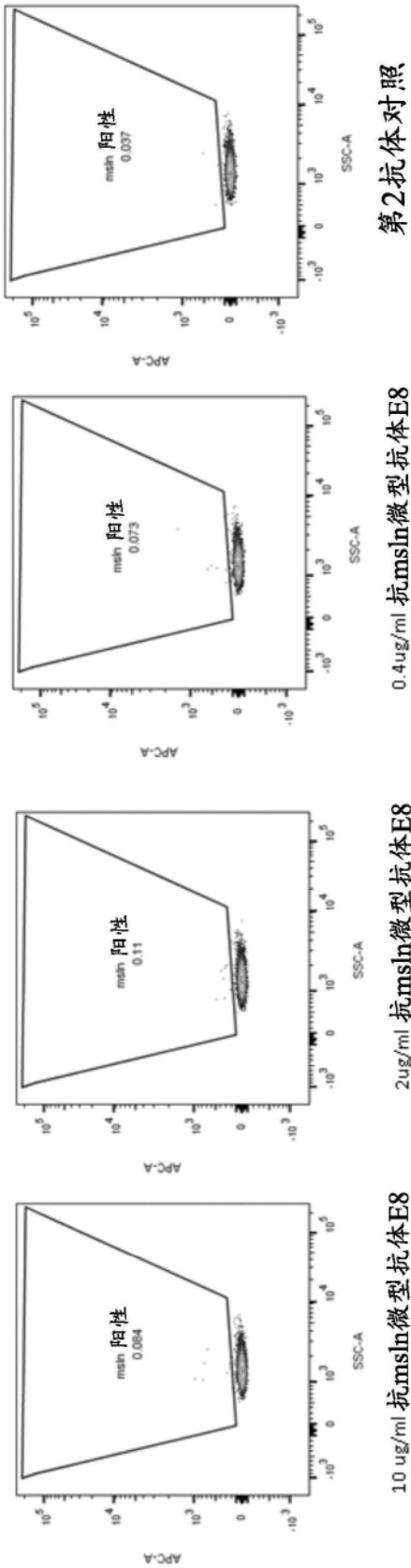


图17(续)



Ovcar8 msln 敲除

图18

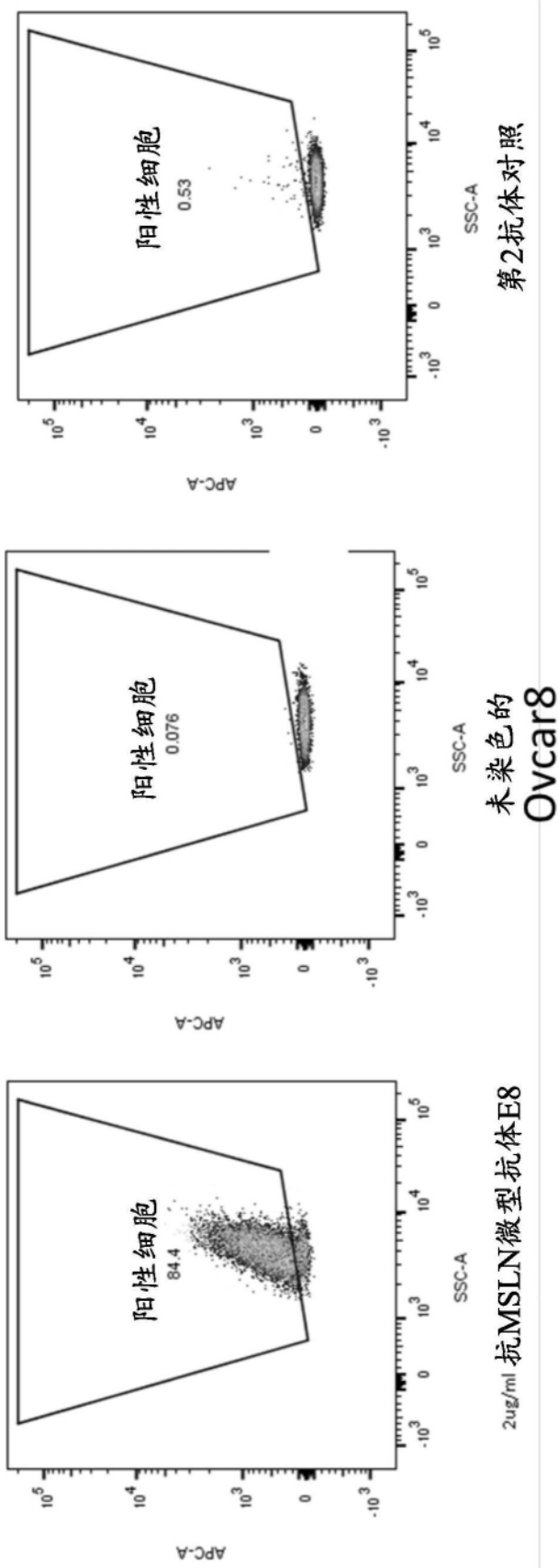


图18(续)

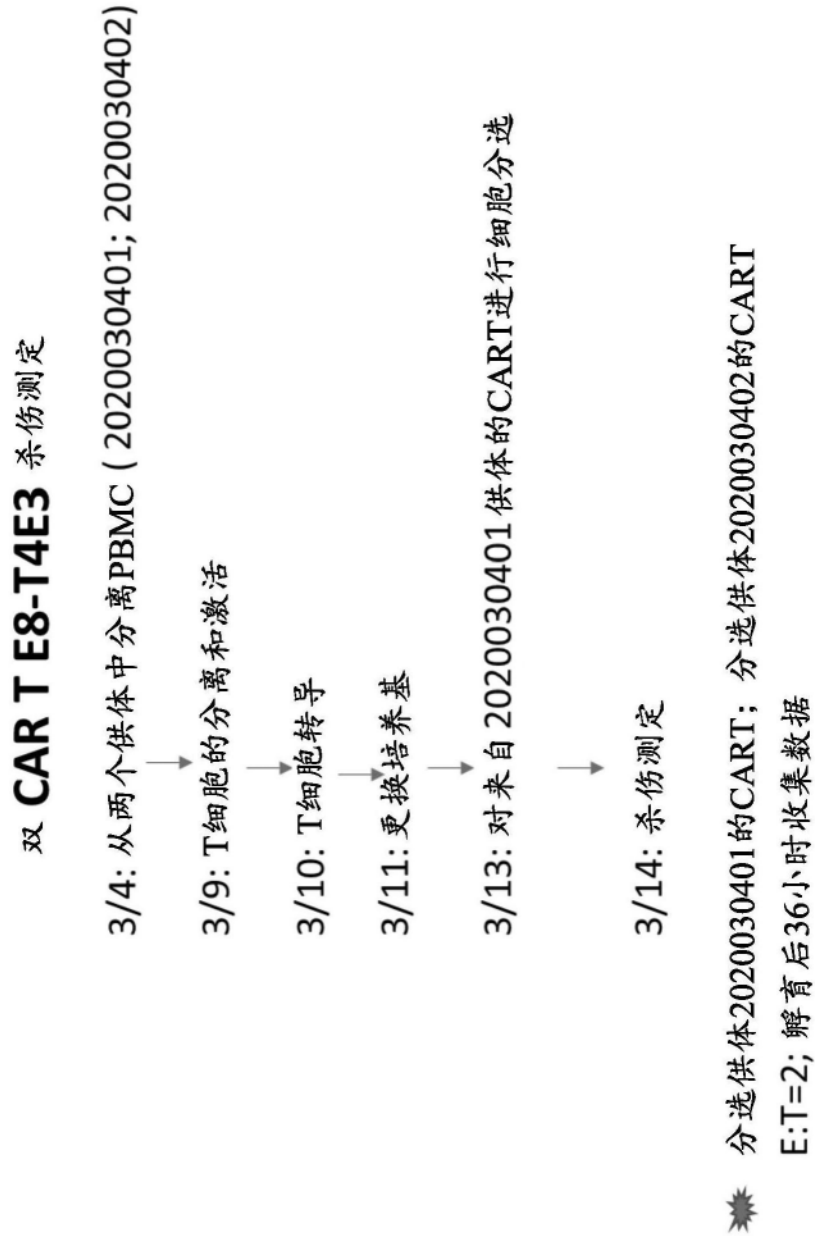
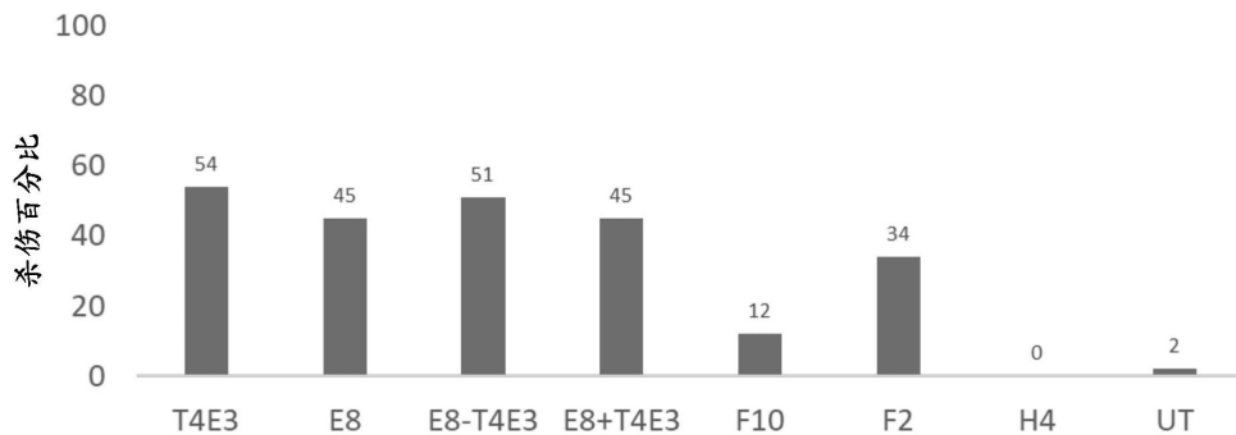


图19

双 **CAR T E8-T4E3** 杀伤测定

2020030401 供体 (Cov362 细胞系)



T4E3: 抗 muc1

E8: 抗 msln

E8-T4E3: 双特异性抗 msln&muc1

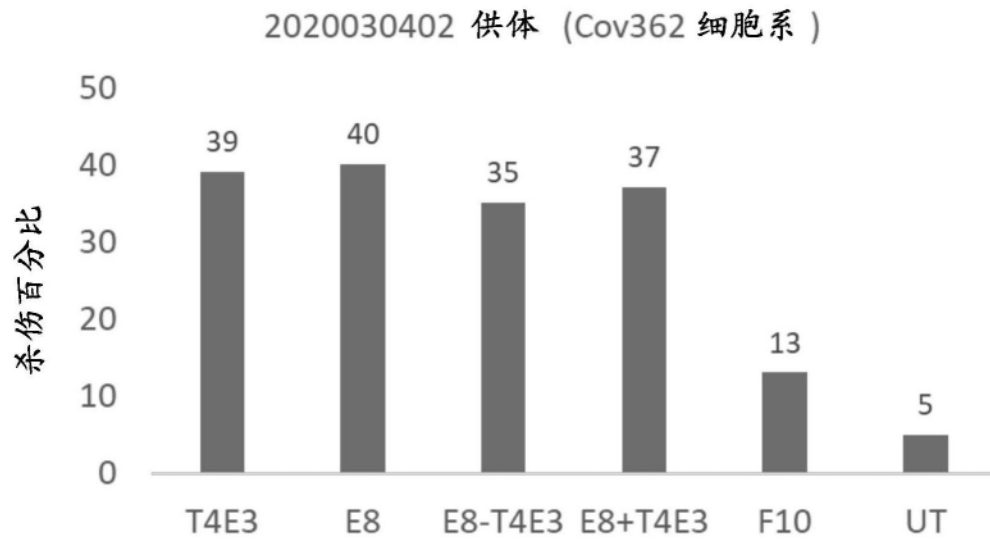
E8+T4E3: E8和T4E3的共转导

F10: 阴性对照

F2: 抗 msln

H4: 抗 msln

图20



E:T=2; 孵育后36小时收集数据

图20(续)

F10 非特异性杀伤是细胞系依赖性的

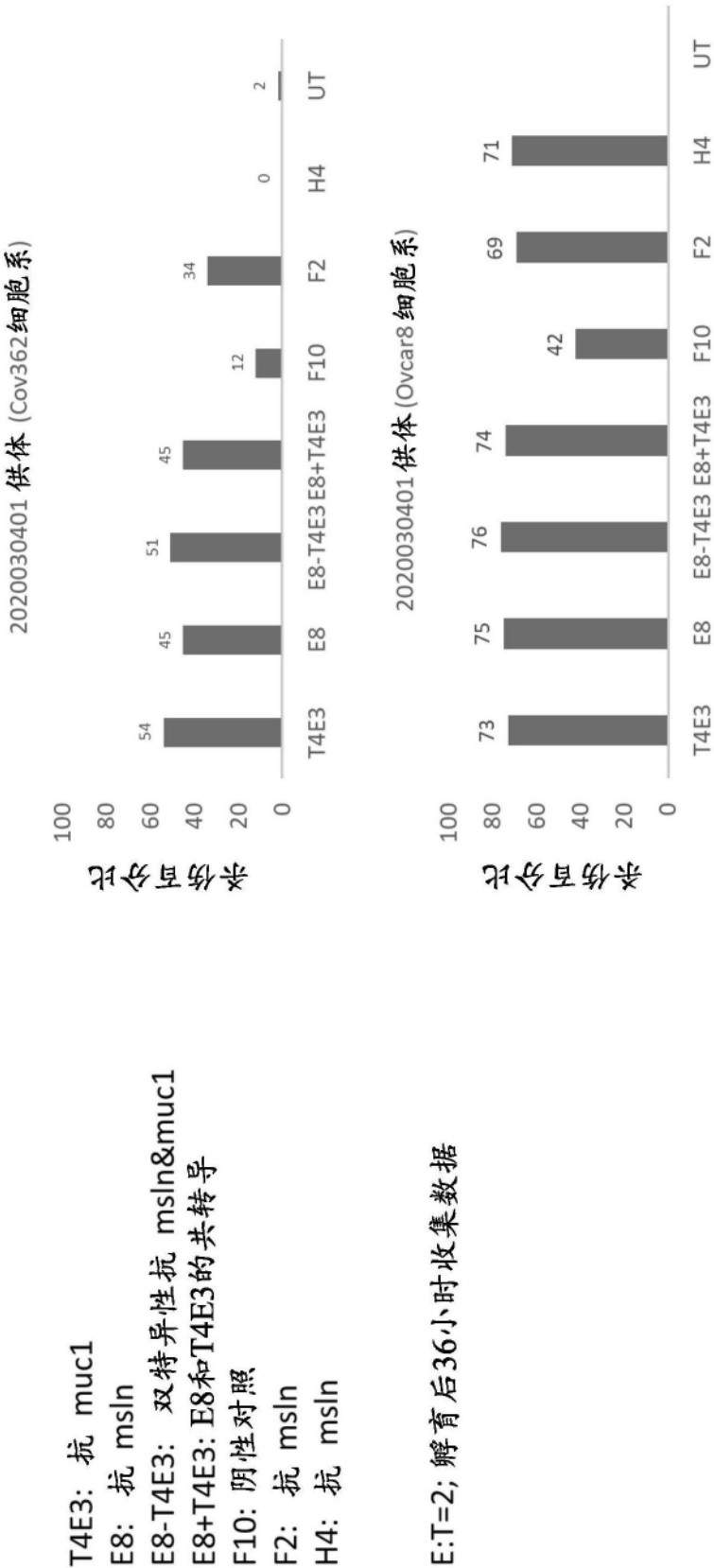
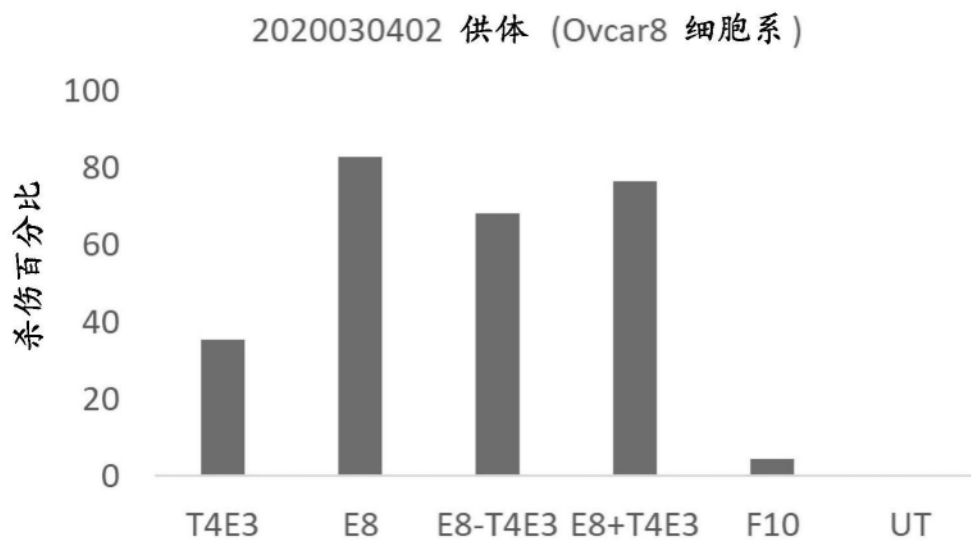
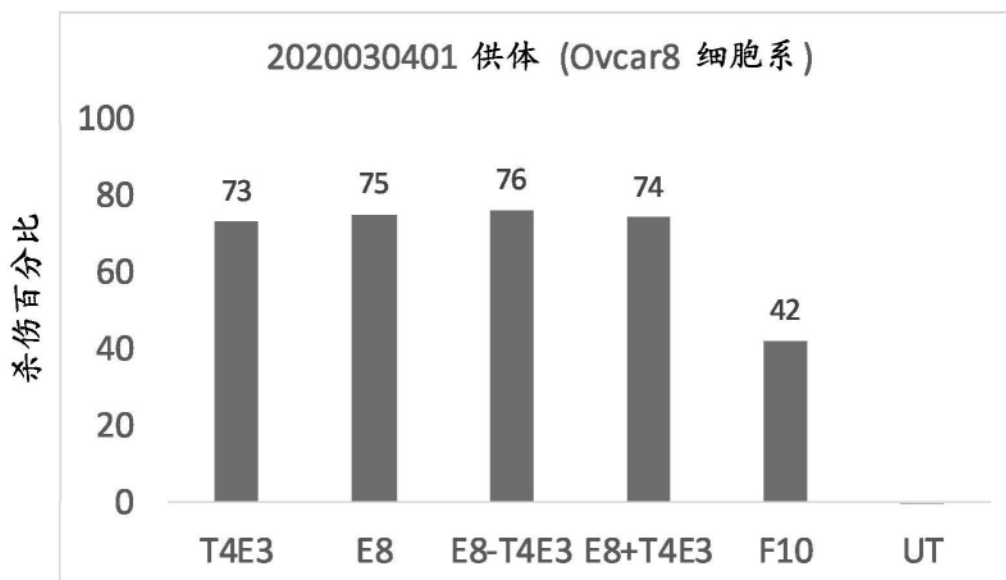


图21



T4E3: 抗 muc1

E8: 抗 msln

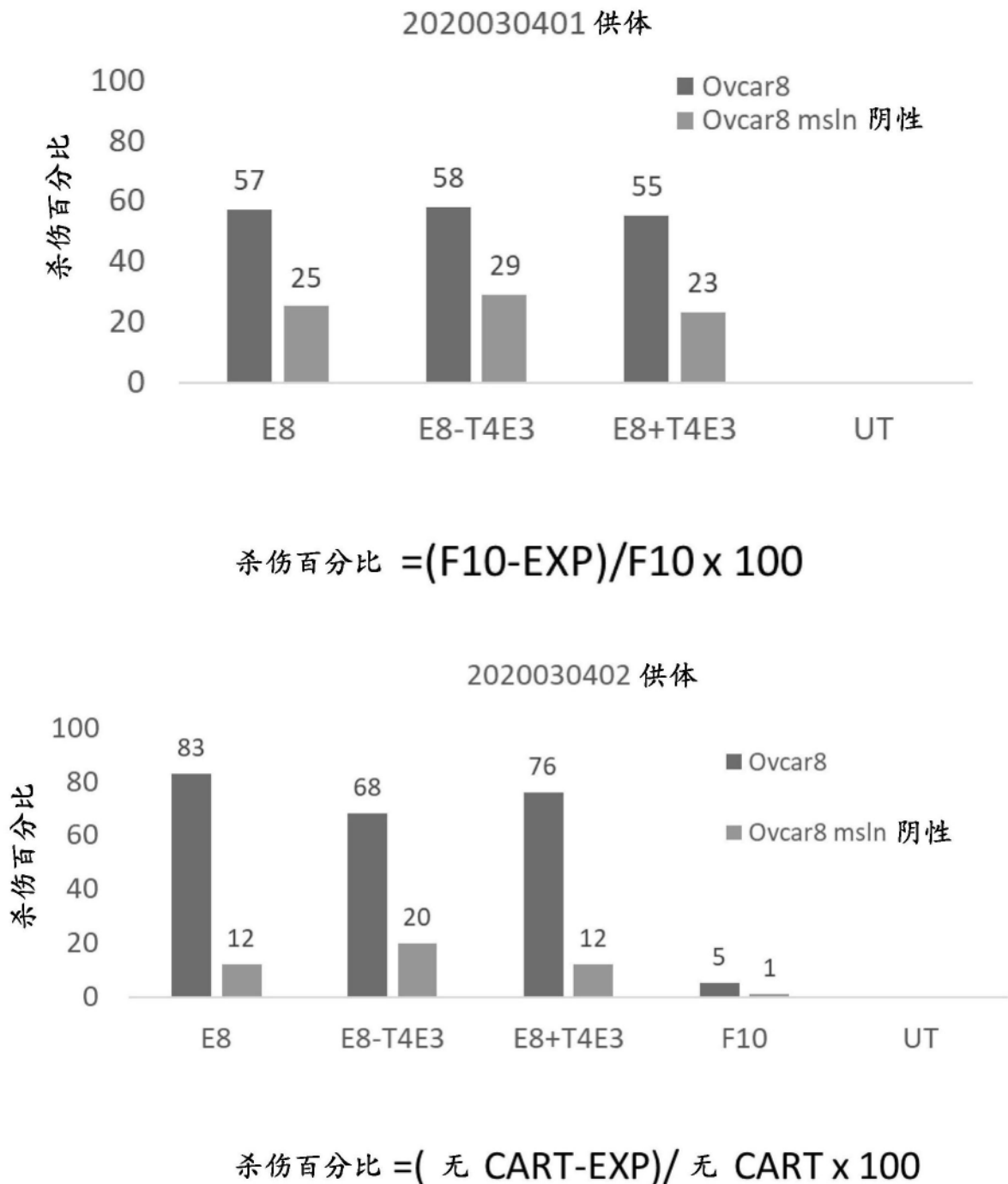
E8-T4E3: 双特异性抗 msln&muc1

E8+T4E3: E8和T4E3的共转导

F10: 阴性对照

E:T=2; 孵育后36小时收集数据

图22

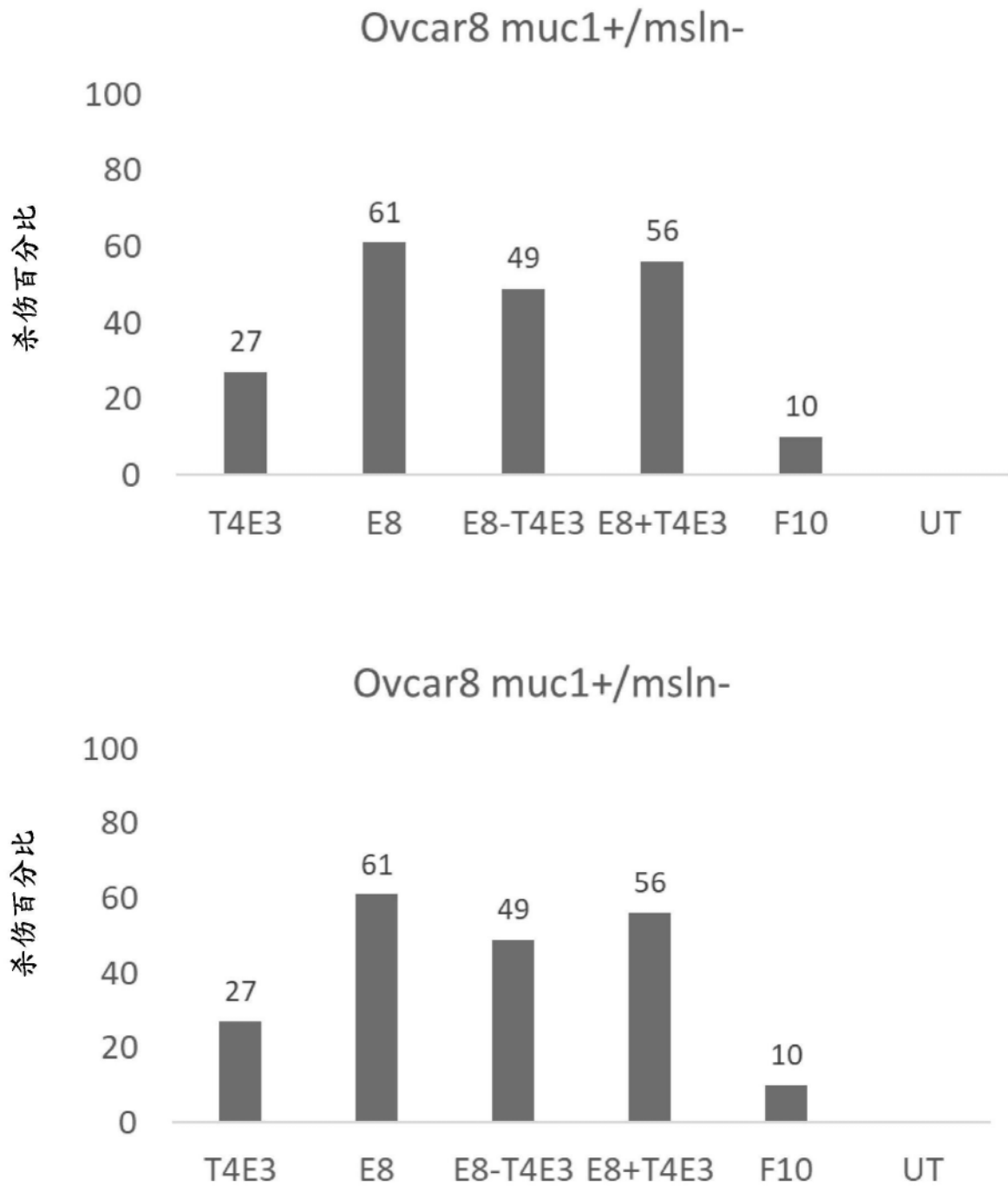


■ E8: 抗 msln; E8-T4E3: 双特异性抗 msln&muc1

E8+T4E3: E8和T4E3的共转导; F10: 阴性对照

E:T=2; 孵育后36小时收集数据

图23



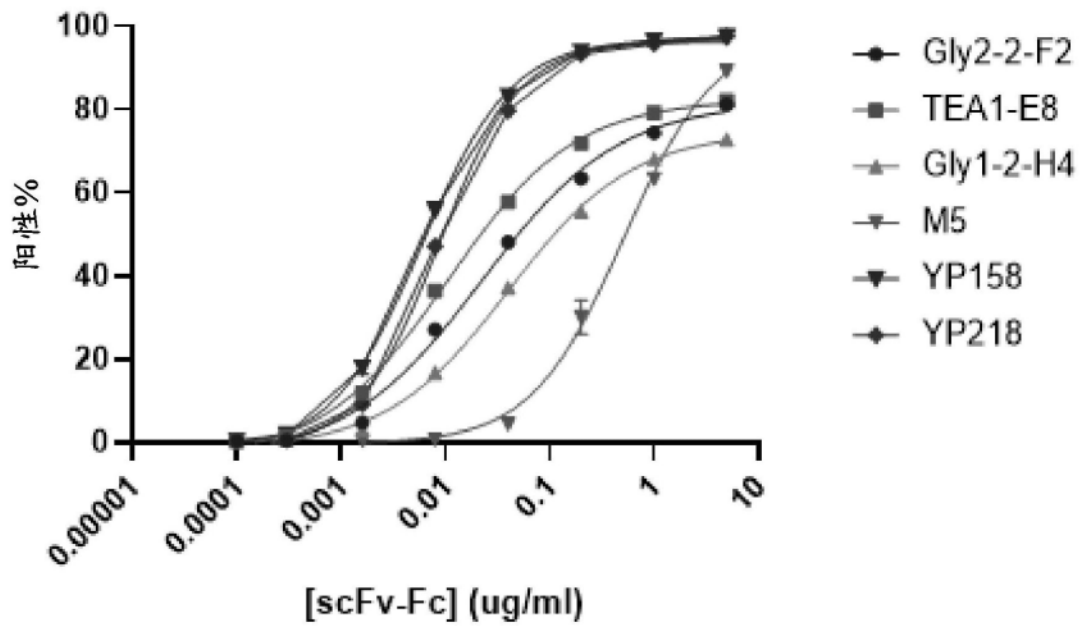
✶ T4E3: 抗 muc1; E8: 抗 msln; E8-T4E3: 双特异性抗 msln&muc1;
E8+T4E3: E8和T4E3的共转导; F10: 阴性对照

E:T=2; 孵育后36小时收集数据

图24

A.

Cov362细胞的结合曲线

**B.**

Cov362细胞的结合曲线

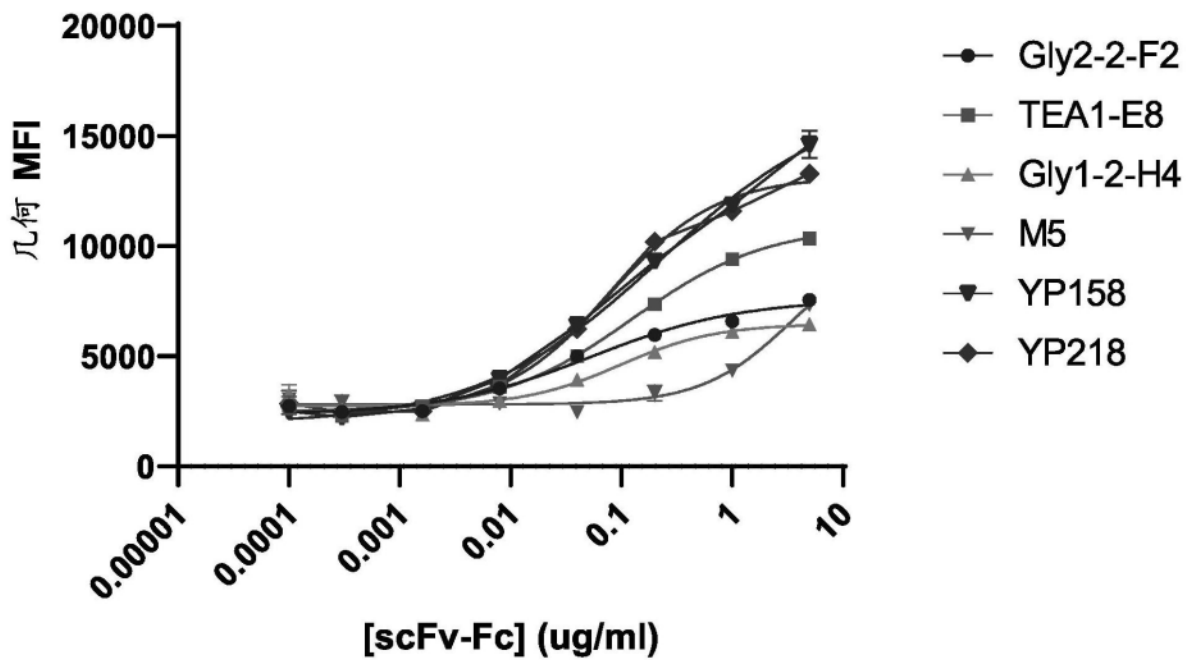
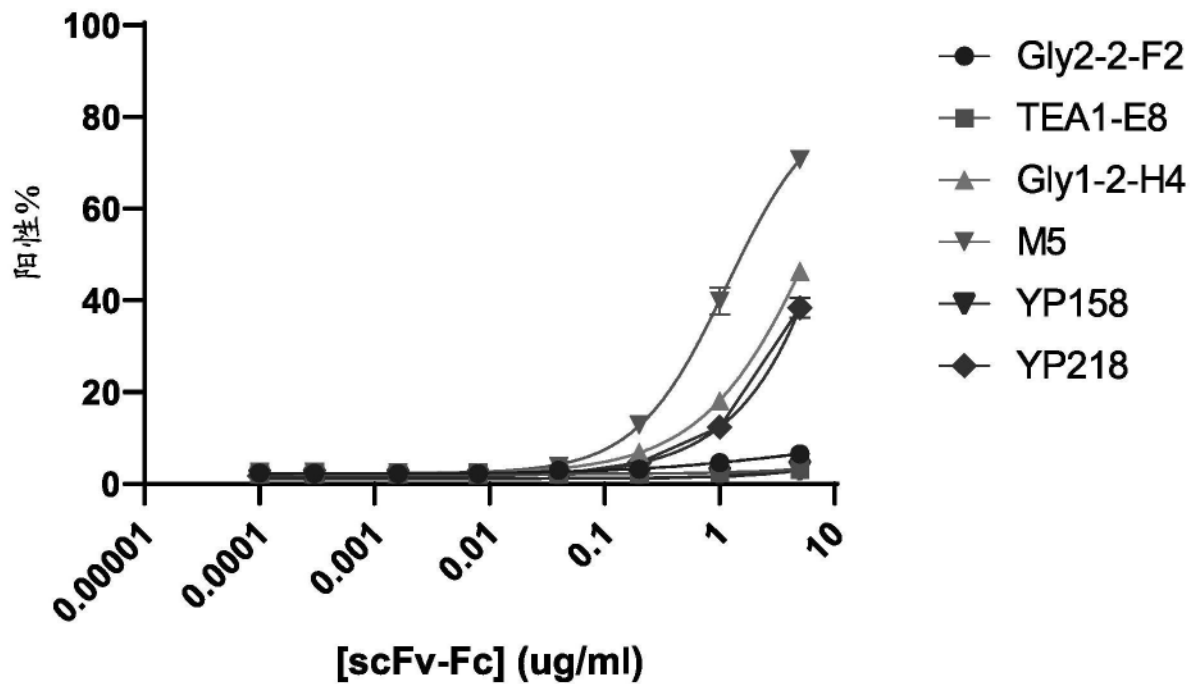


图25

C.

293T细胞的结合曲线

**D.**

293T细胞的结合曲线

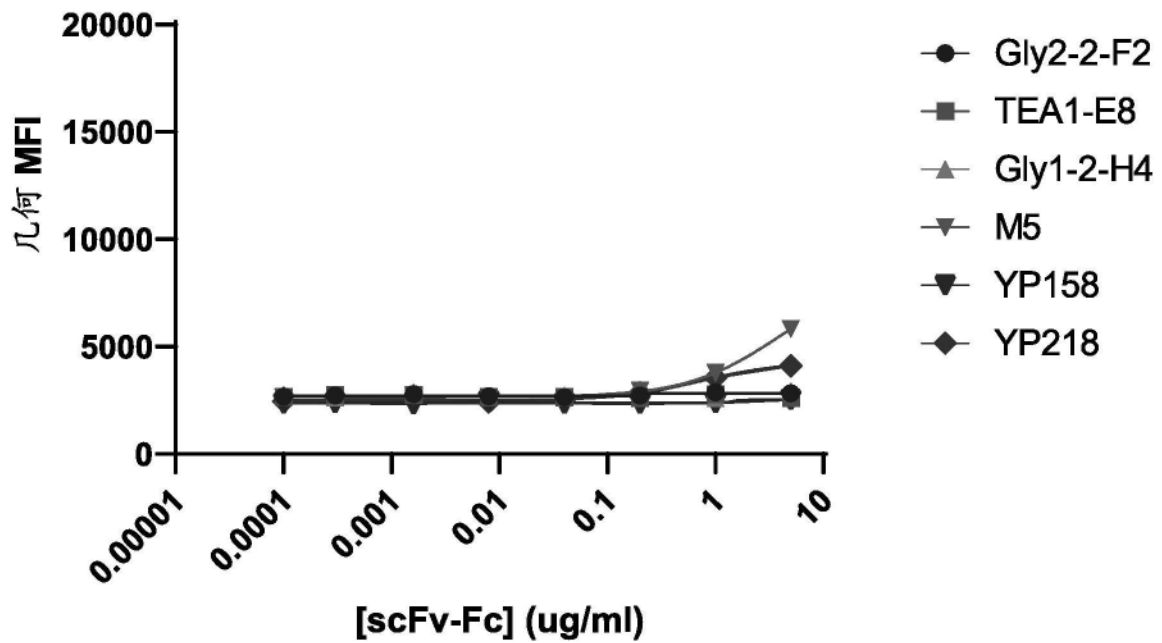


图25(续)

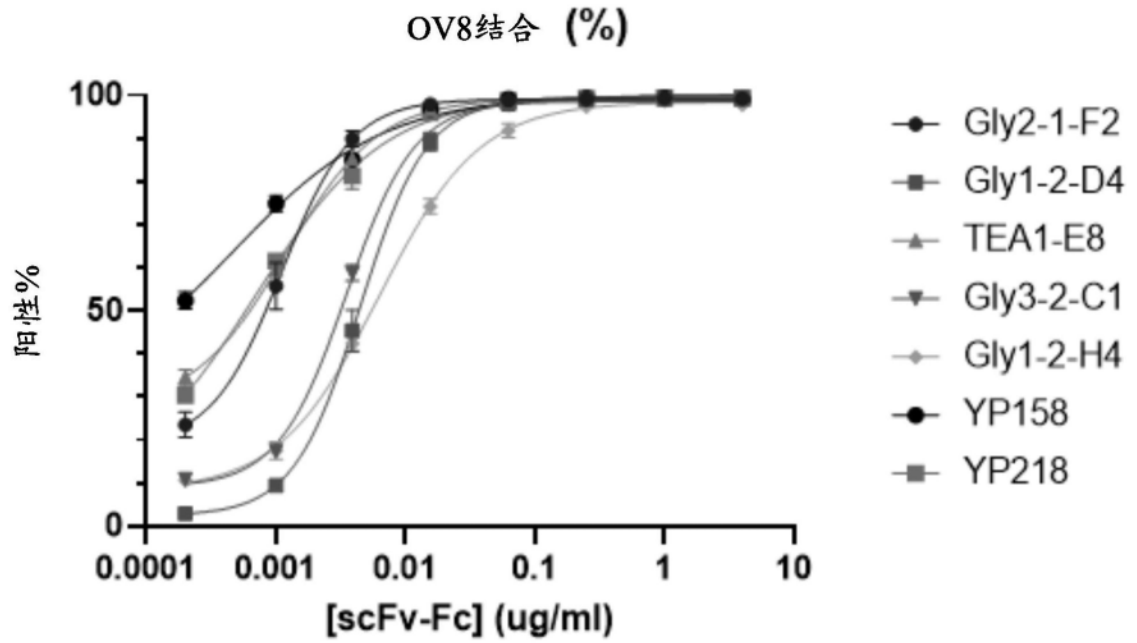
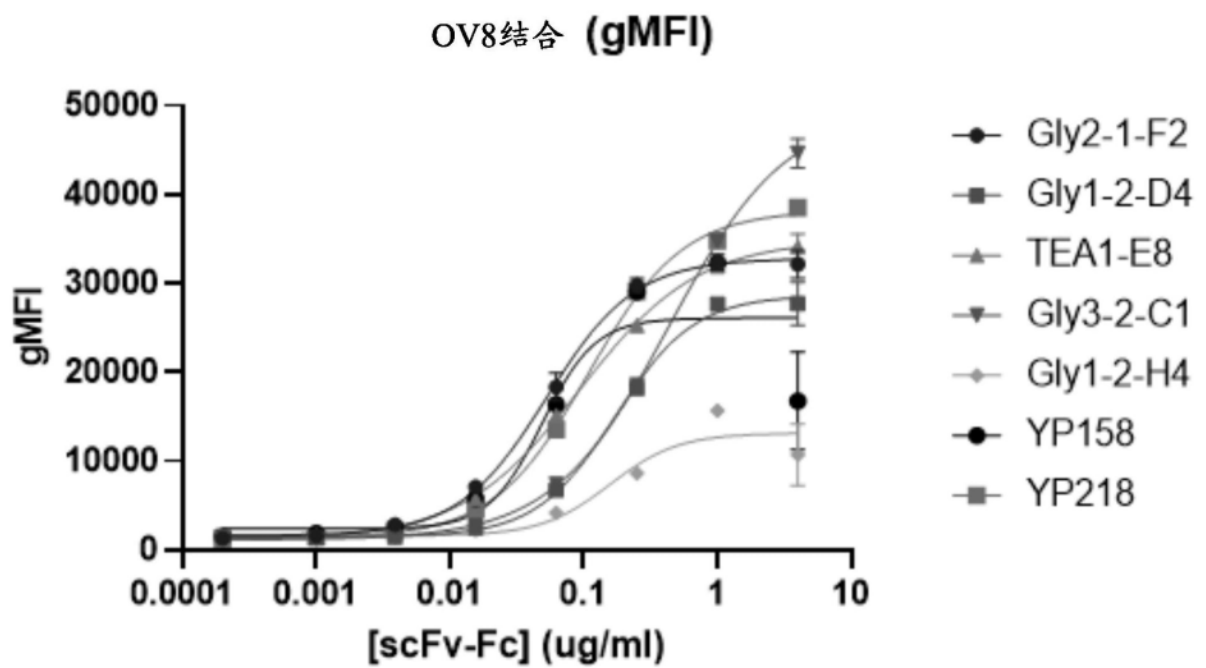
A.**B.**

图26

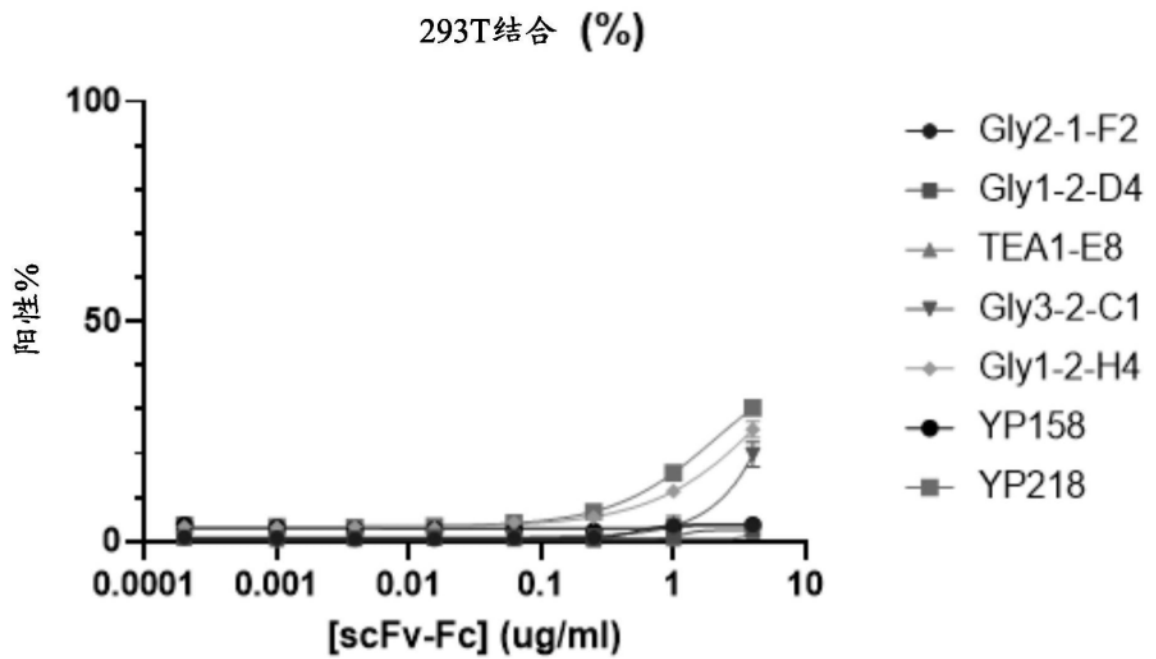
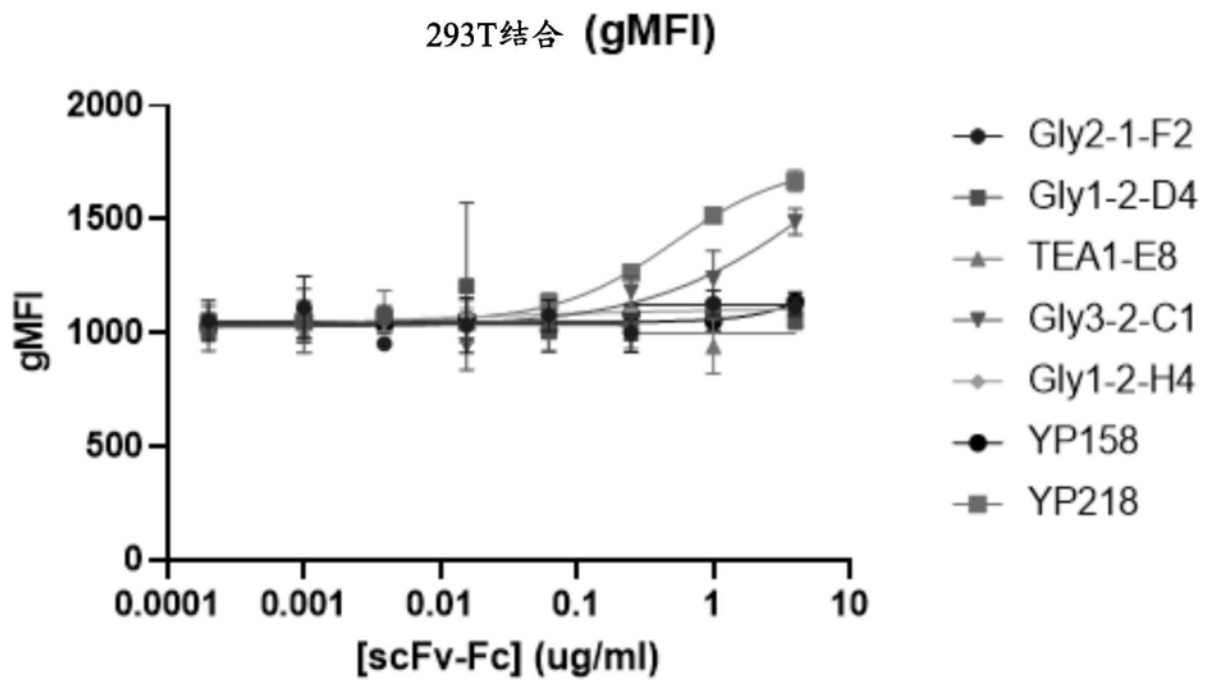
C.**D.**

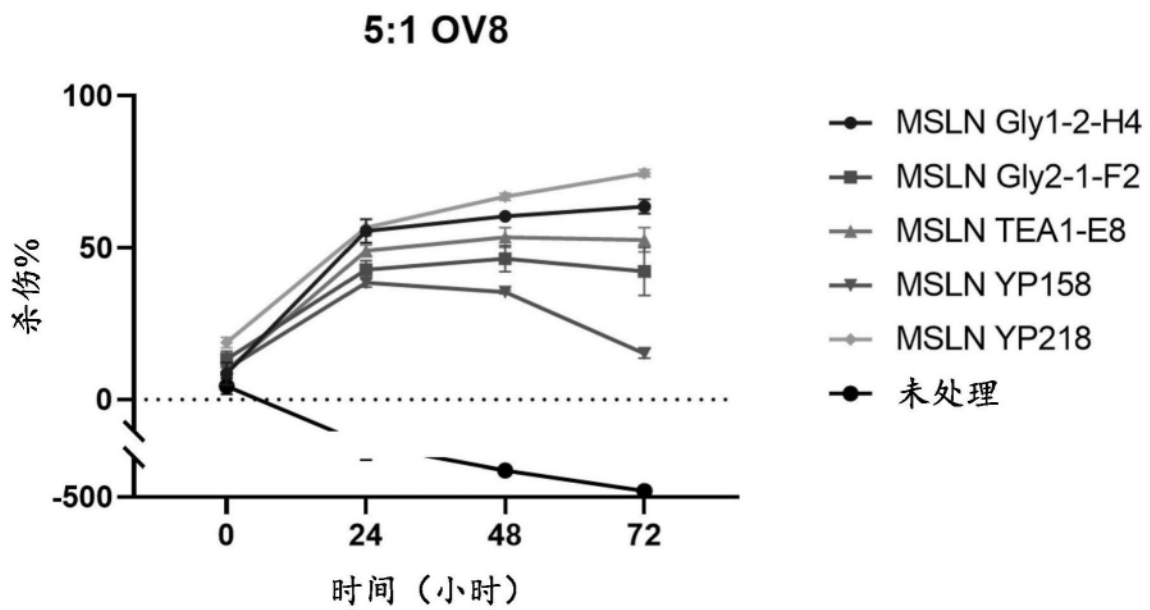
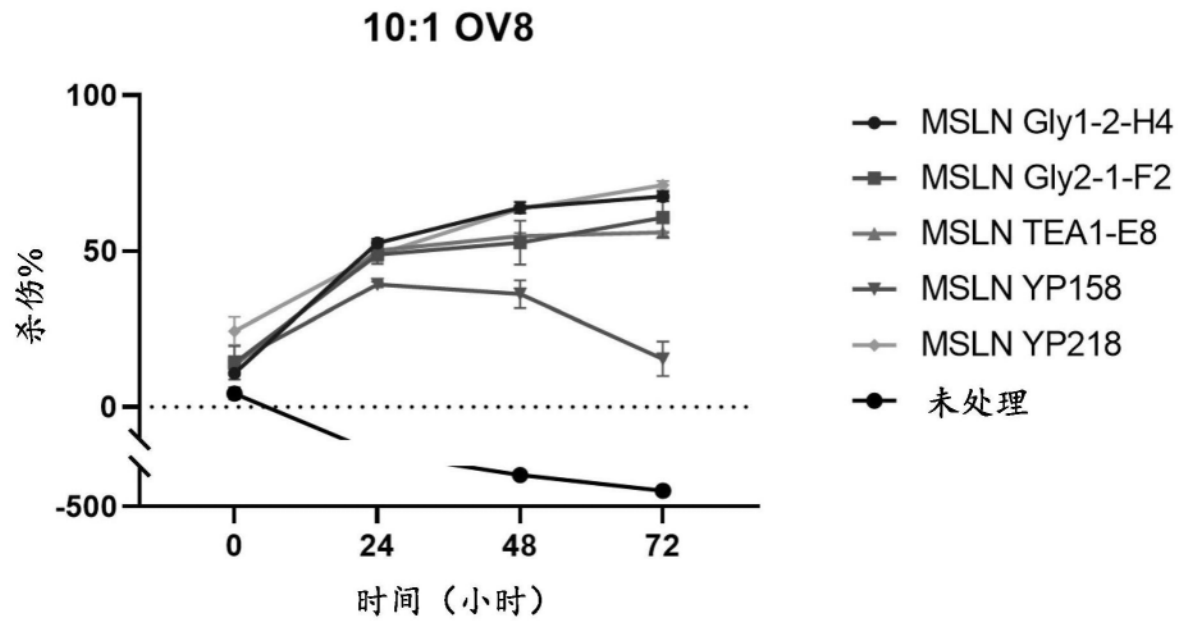
图26续

Ovcar8	
	EC50 (ug/ml)
Gly2-1-F2	0.0011
TEA1-E8	0.0012
Gly1-2-H4	0.0063
Gly1-2-D4	0.0045
Gly3-2-C1	0.0035
**YP158	0.0005
**YP218	0.0007

COV362	
	EC50 (ug/ml)
Gly2-2-F2	0.0225
TEA1-E8	0.0108
Gly1-2-H4	0.0402
*M5	0.5121
**YP158	0.0059
**YP218	0.0086

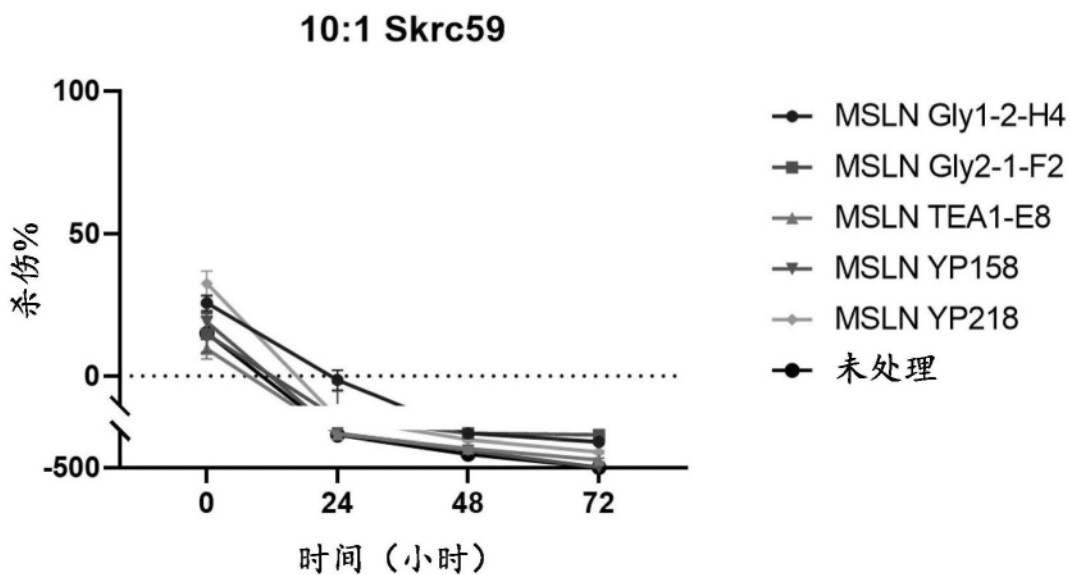
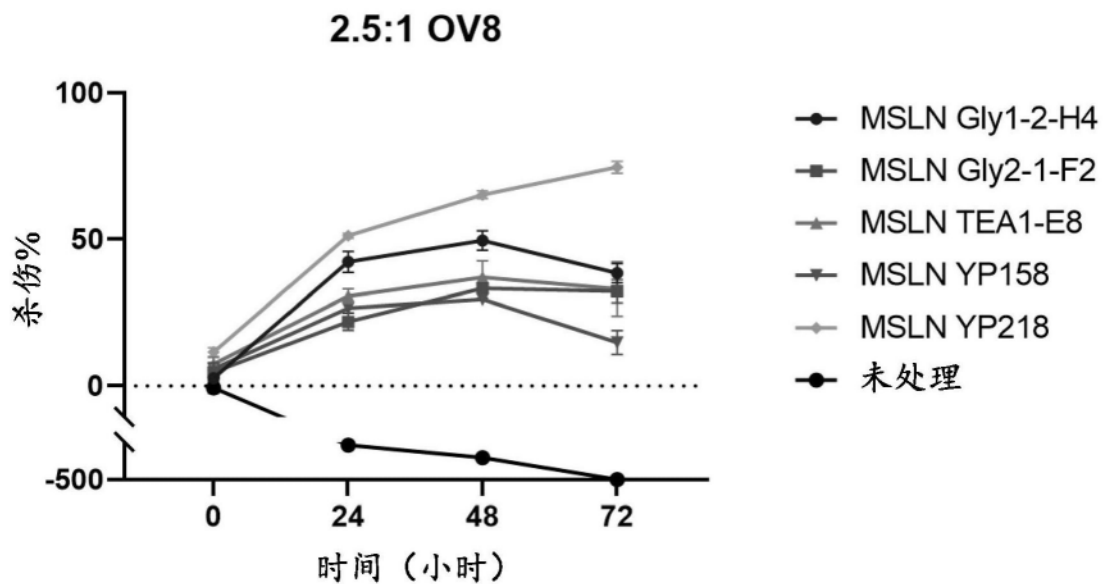
- * 对照抗MSLN Ab
- ** 使用已知表位作图情况下的对照抗MSLN抗体

图27



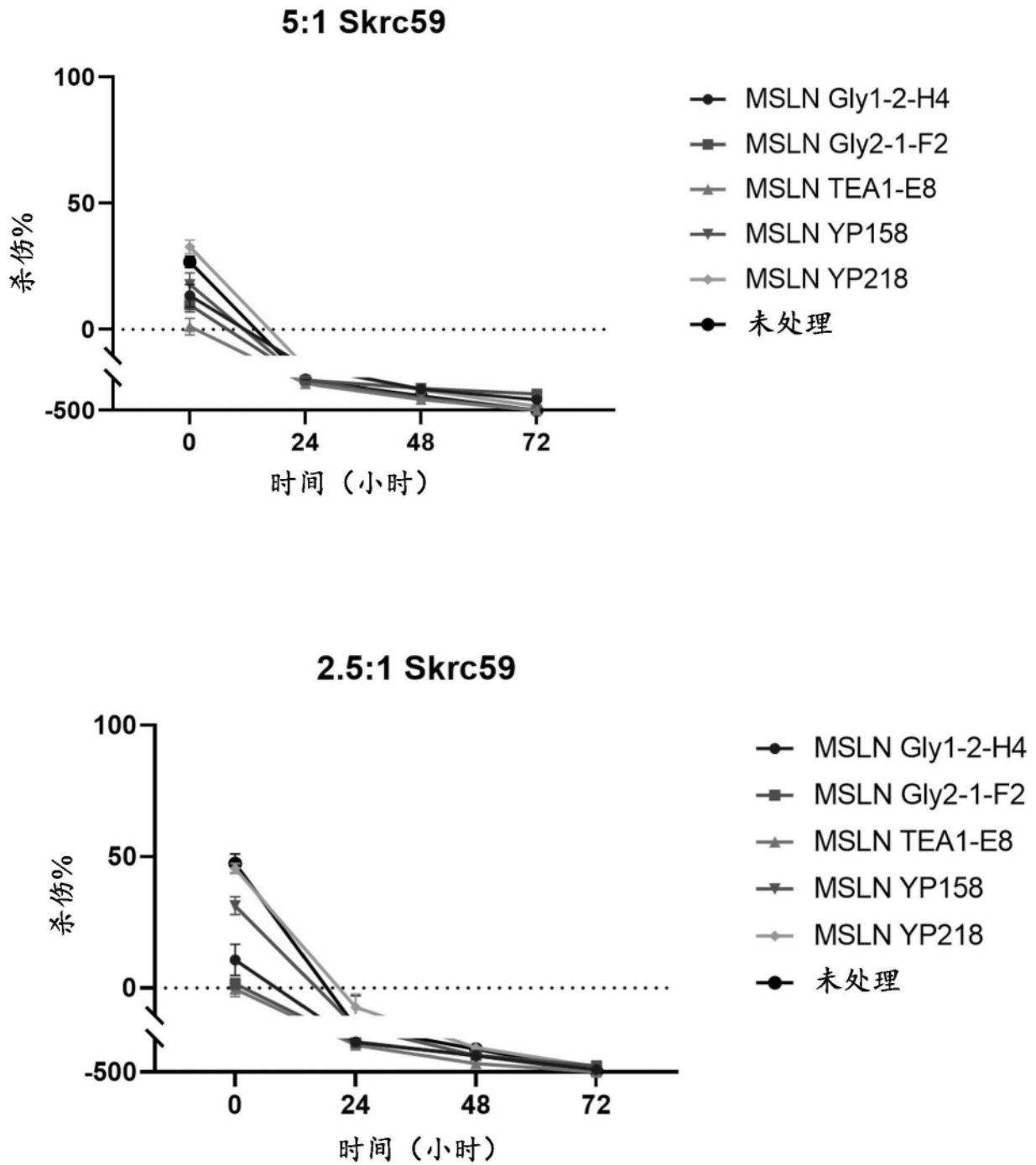
$$\text{杀伤百分比} = ((\text{仅细胞_T0} - \text{Exp}) / \text{仅细胞_T0}) \times 100$$

图28



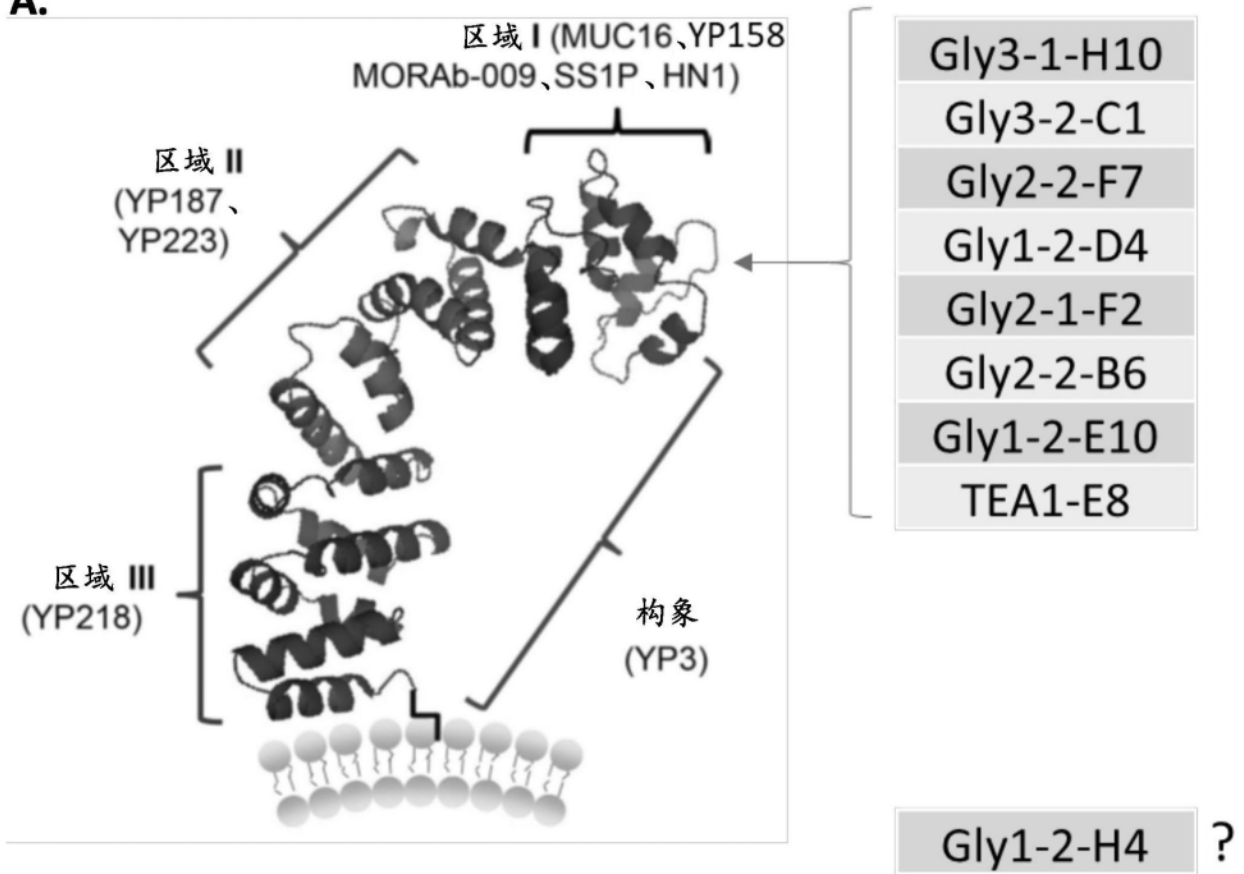
$$\text{杀伤百分比} = ((\text{仅细胞}_{T0} - \text{Exp}) / \text{仅细胞}_{T0}) \times 100$$

图28(续)



$$\text{杀伤百分比} = ((\text{仅细胞_T0} - \text{Exp}) / \text{仅细胞_T0}) \times 100$$

图28(续)

A.

2015 - Zhang 等人—Scientific Reports [科学报告]

图29

B.

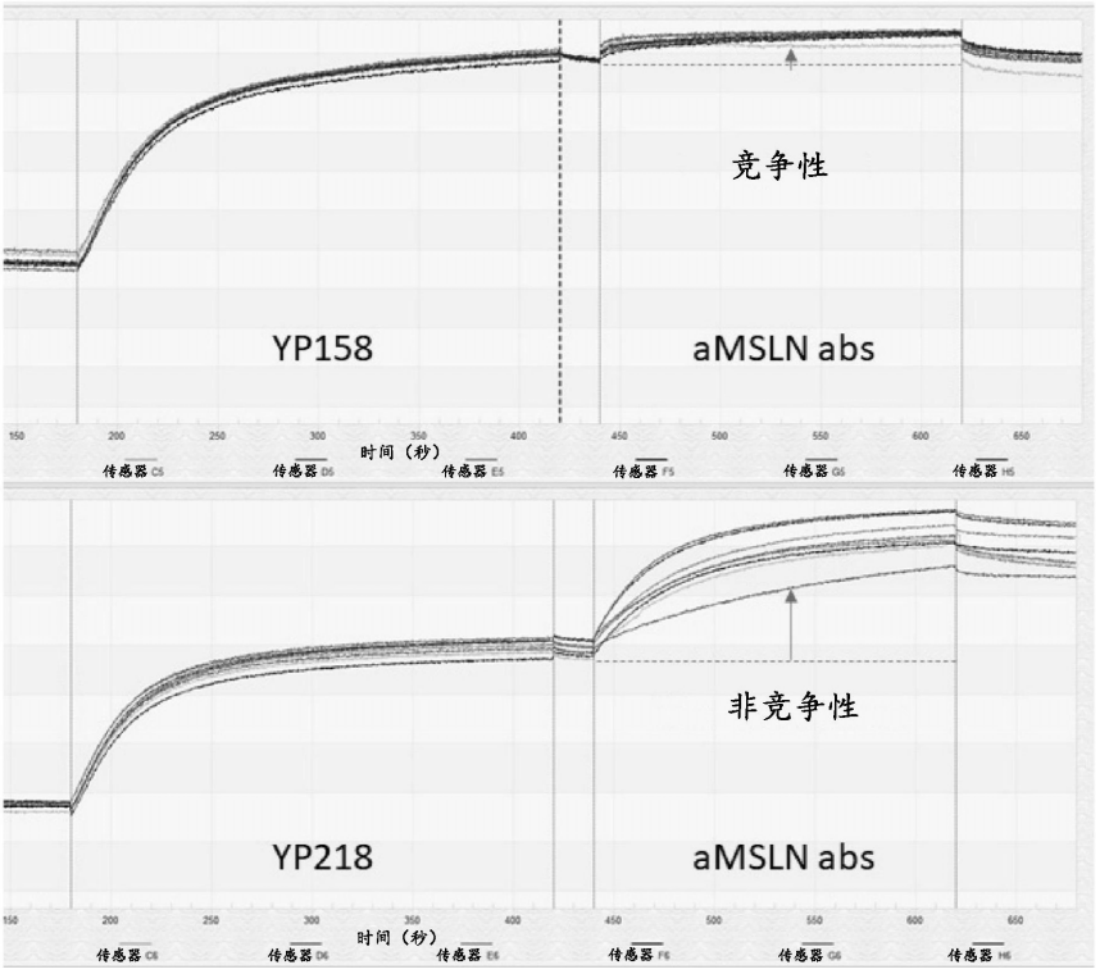


图29 (续)

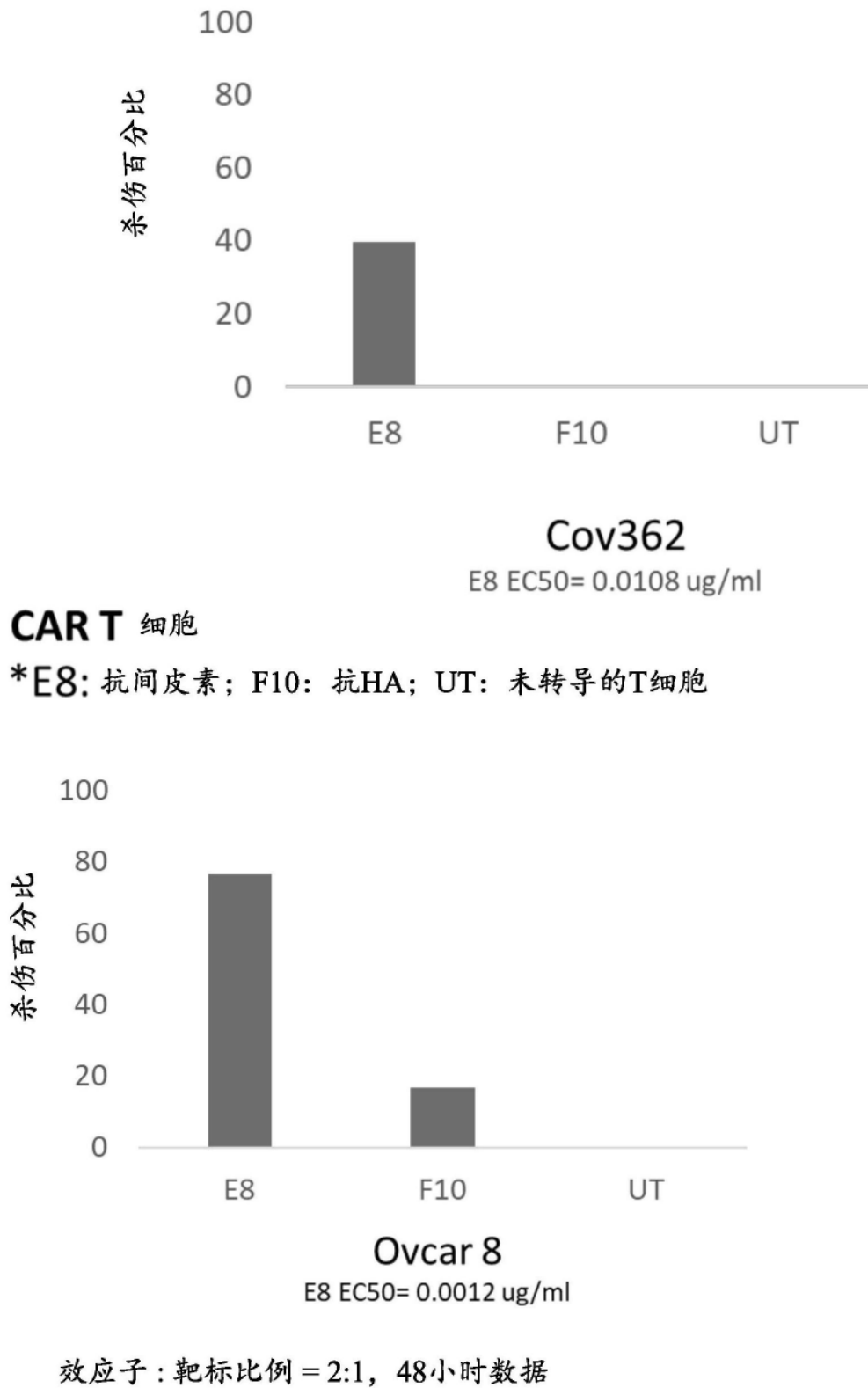


图30

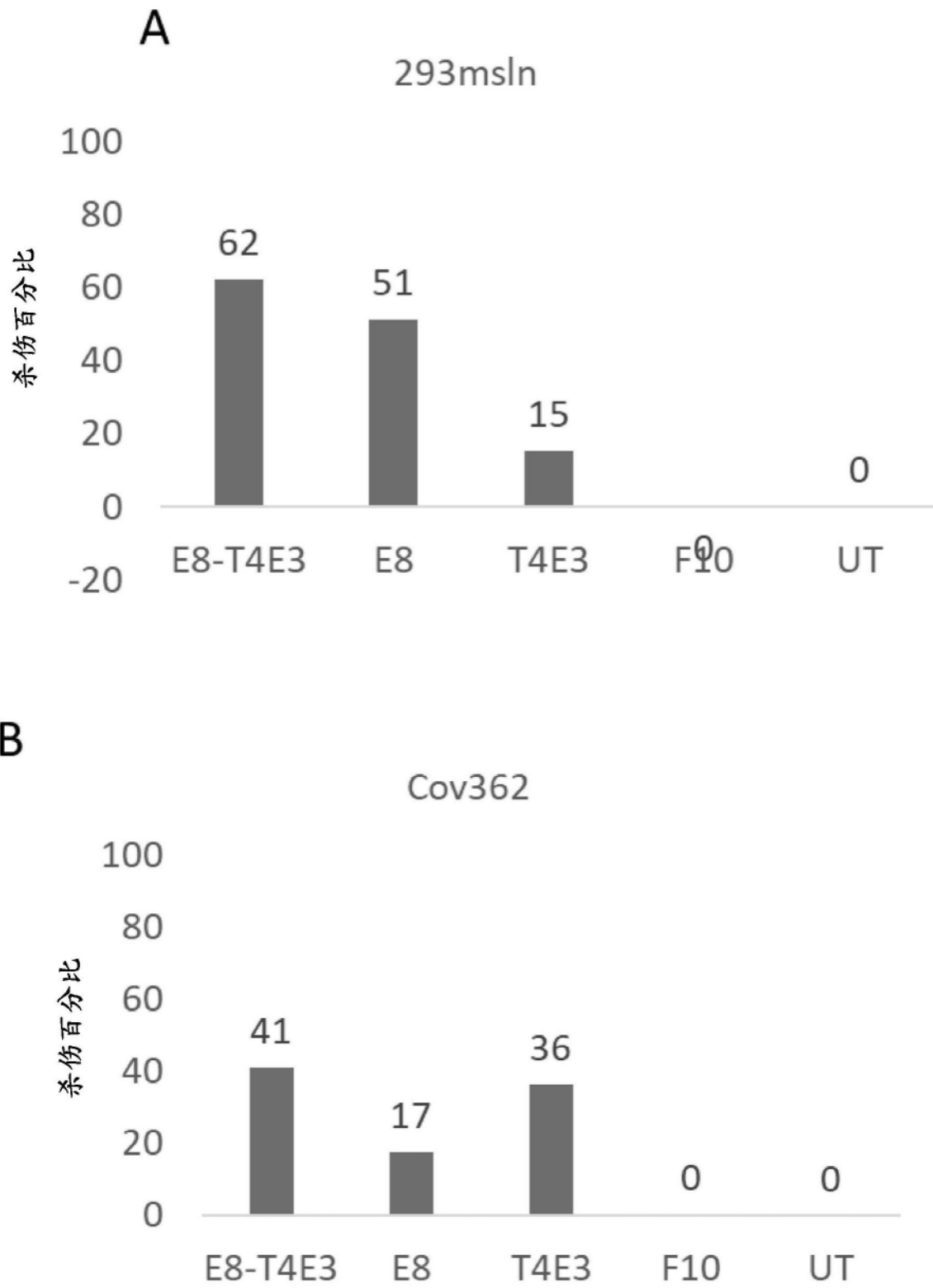


图31

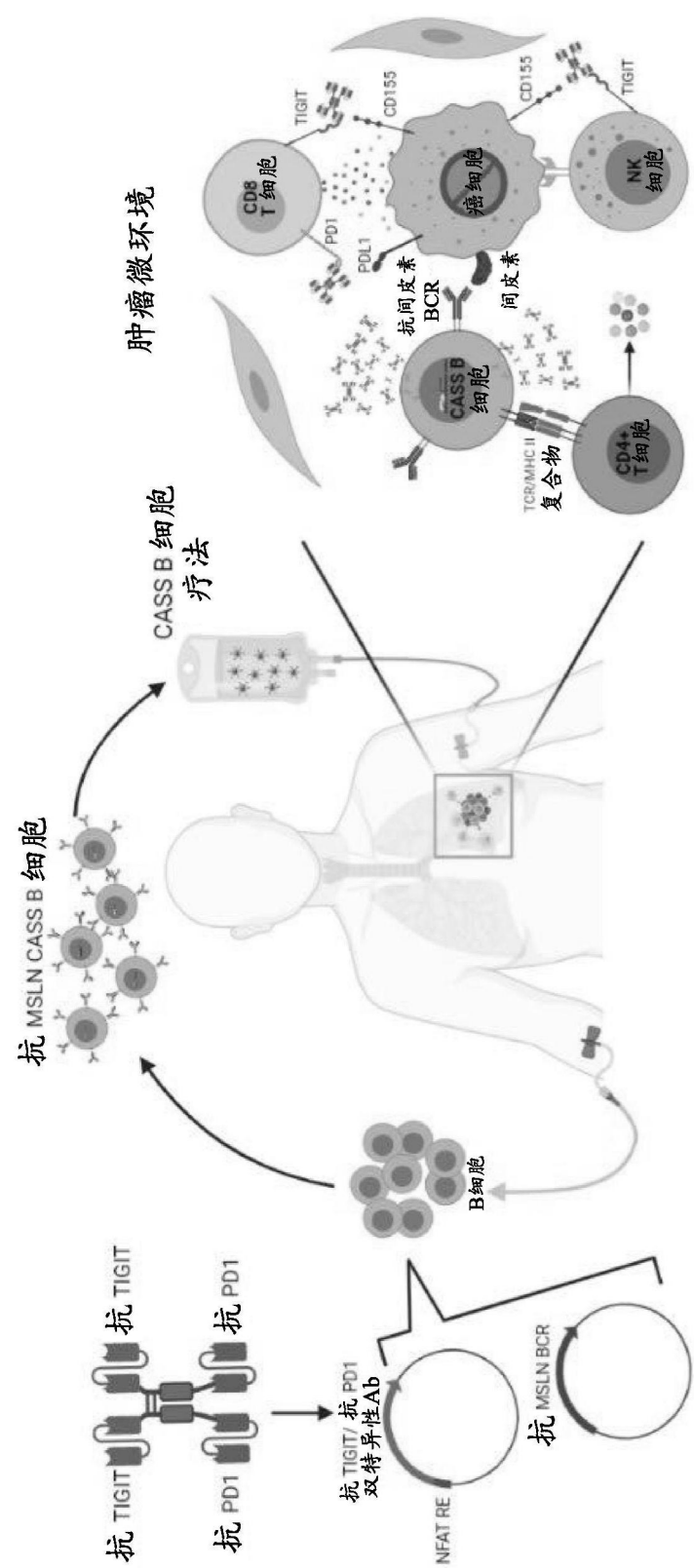


图32

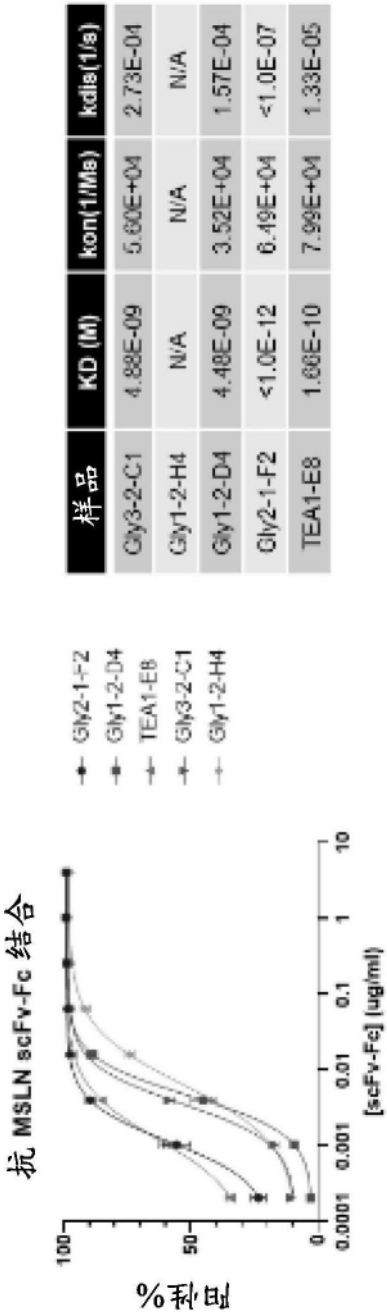


图33

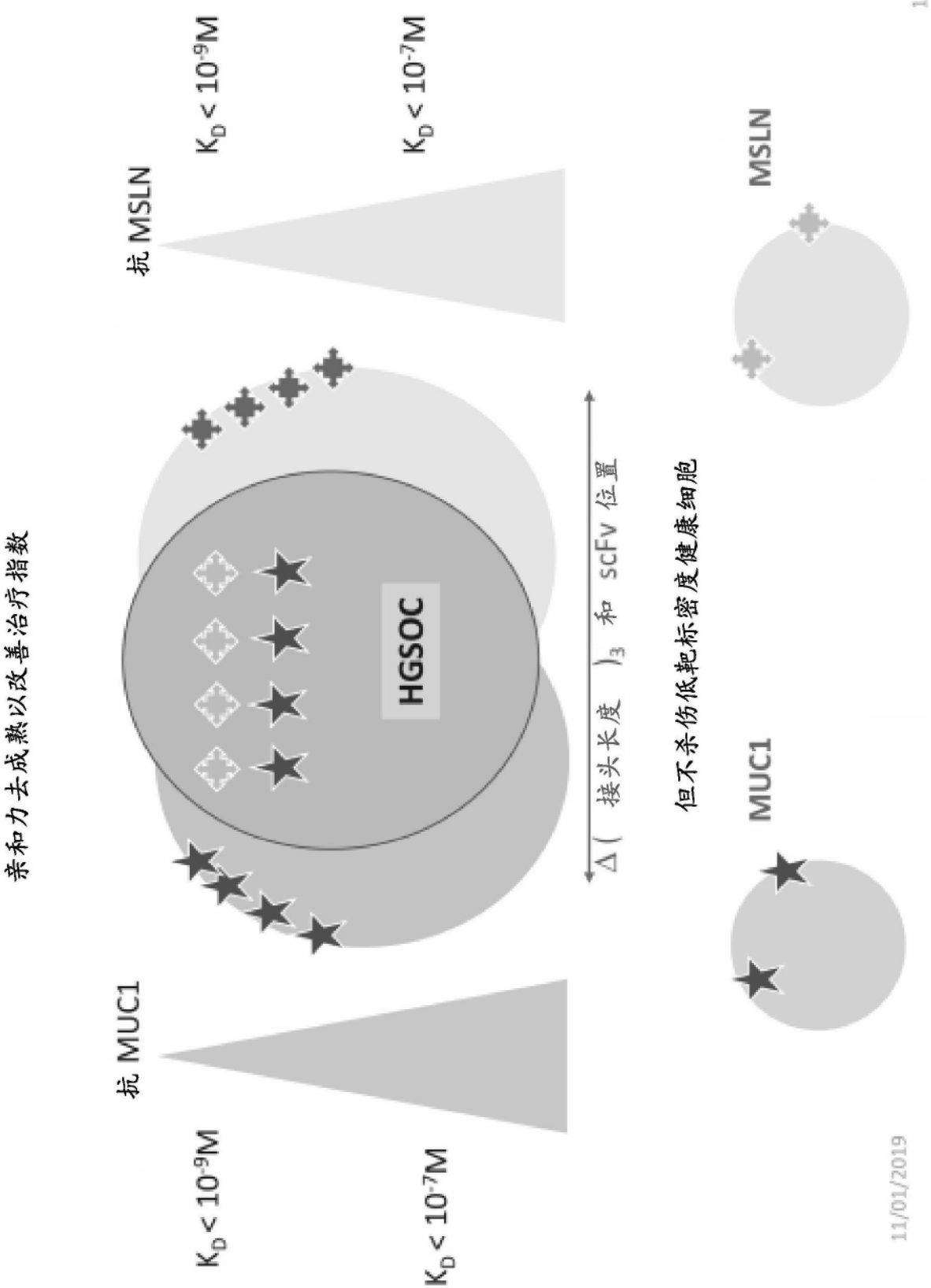


图34

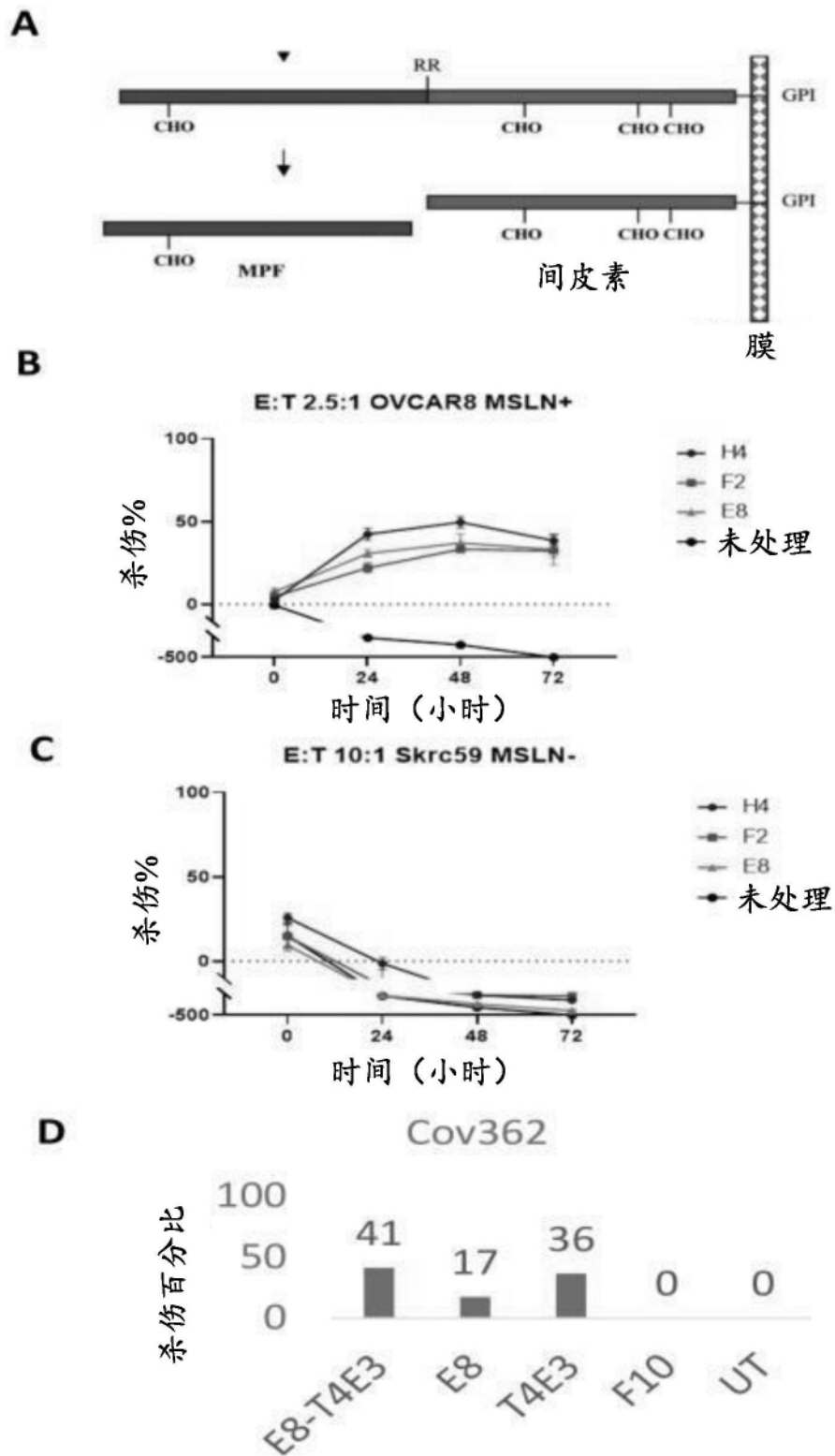


图35

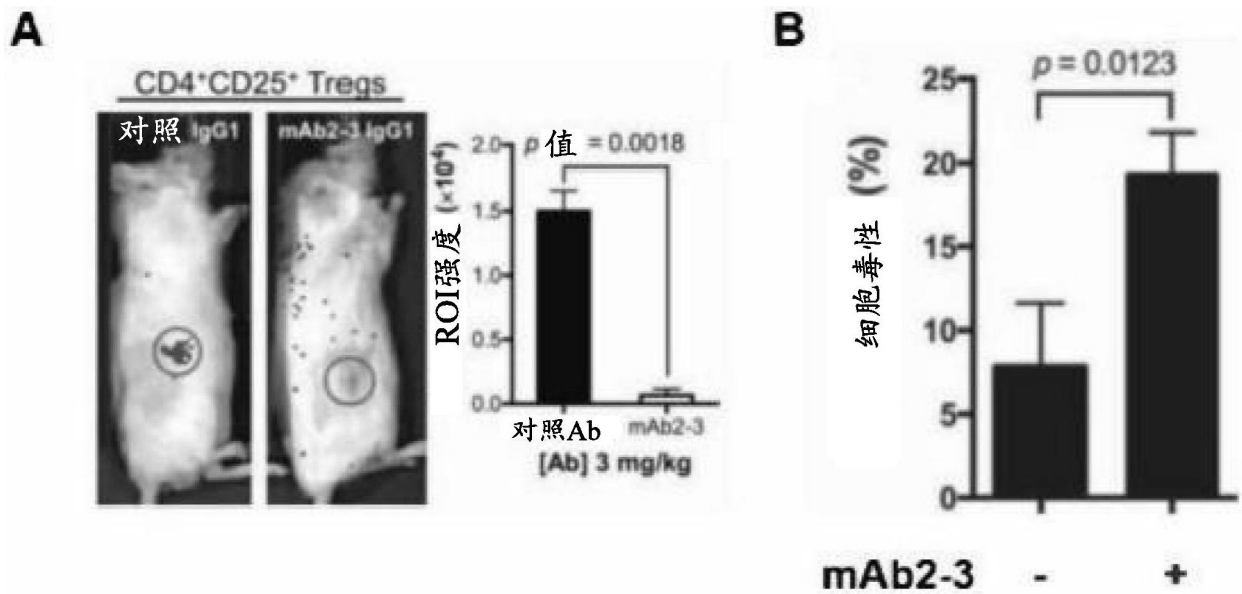


图36

双靶向微调免疫恢复性 (DFIR) CAR T细胞

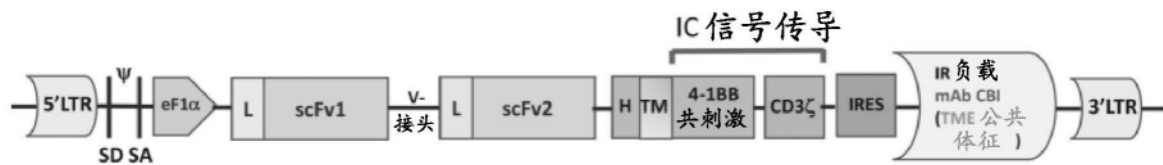


图37

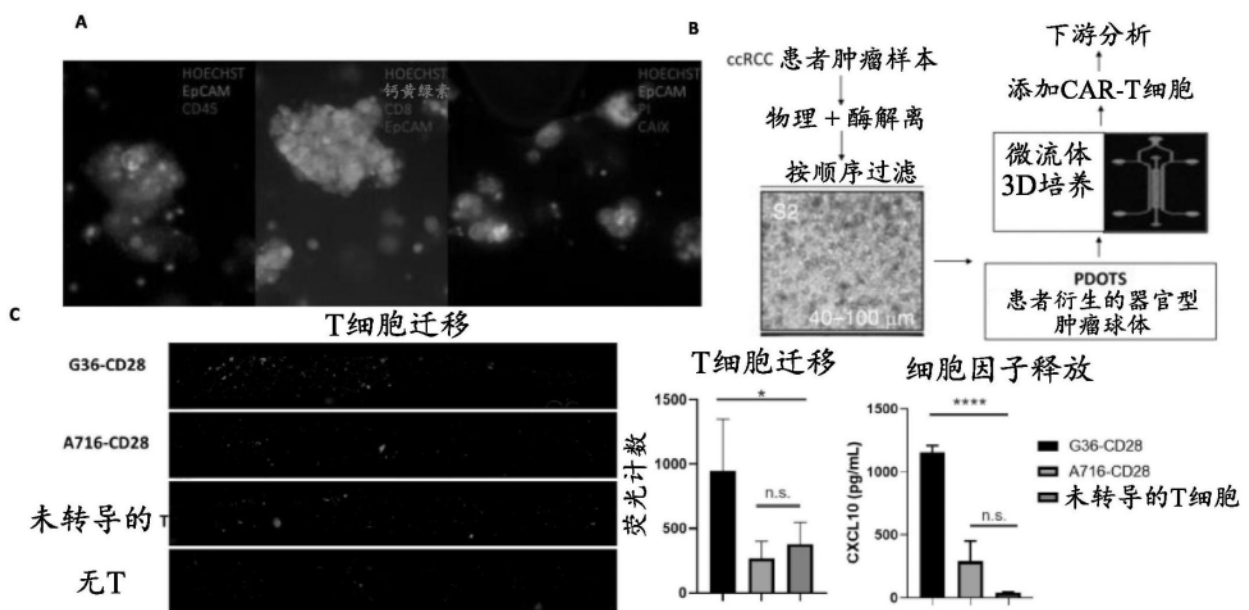


图38

序列 ID	FACS+	ELISA+	OvCar8 FACS % +	Cf2Th- MSLN+	Cf2Th-neg FACS %+	MCAS FACS %+
MSLN-WC-R3-Gly2-1-F2	85.27	3.223	96	84.9	0.14	2.36
MSLN-WC-R3-Gly2-2-B6	87.9	3.65	94	83.8	0.069	3.22
MSLN-WC-R3-Gly1-2-E10	91.86	3.412	87.4	85	0.14	1.53
MSLN-WC-R3-Gly1-2-D4	93.19	3.118	80.1	76.6	0.18	1.63
MSLN-WC-R3-TEA1-E8	92.69	3.457	79.1	85.7	0.31	1.51
MSLN-WC-R3-TEA1-E5	92.01	3.387	73.4	74.3	0.19	1.49
MSLN-WC-R3-Gly3-2-C10	89.04	2.936	59.9	70.3	0.11	1.74
MSLN-WC-R3-Gly3-1-H10	89.41	2.325	32.2	85	0.21	1.61
MSLN-WC-R3-Gly1-2-H4	94.01	0.148	29.9	82.2	0.26	1.41
MSLN-WC-R3-Gly3-2-C1	87.28	2.419	26.2	83.9	0.22	1.7
MSLN-WC-R3-Gly2-2-F7	83.11	3.005	23.1	76.3	0.11	1.67
MSLN-WC-R3-TEA1-D2	90.83	2.596	22.2	81.2	0.26	1.25
MSLN-WC-R3-TEA1-D3	91.73	2.631	19.9	74.9	0.25	1.4
MSLN-WC-R3-TEA2-E10	87.12	2.383	15.9	78.2	0.52	1.1
MSLN-WC-R3-TEA2-C9	87.61	0.523	11.8	52.4	0.45	1.85

图39

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	
MSLN-WC-R3-Gly2-1-F2	HV3-9*01 F	HJ3*02	FHD3-22*01	FEVQLVDSGG	GLVOPGRSLRLSCAAKGFTF.....DDYA	MHWVROAPGKGLEWWSG	ISWN...SGNI	GYADSVK	GRFTISRDNAKNSLYIQMNSLR	AEADTALYYC AKDAGSSGYFNAFDI	WGQGTMTVTSS
MSLN-WC-R3-Gly2-2-B6	HV3-9*01 F	HJ3*02	FHD3-22*01	FEVQLVDSGG	GLVOPGRSLRLSCAAKGFTF.....DDYA	MHWVROAPGKGLEWWSG	ISWN...SGNI	GYADSVK	GRFTISRDNAKNSLYIQMNSLR	AEADTALYYC AKDAGSSGYFNAFDI	WGQGTMTVTSS
MSLN-WC-R3-Gly1-2-E10	HV3-9*01 F	HJ3*02	FHD6-13*01	FQVQLVDSGG	GLVOPGRSLRLSCAAKGFTF.....DDYA	MHWVROAPGKGLEWWSG	ISWN...SGSI	GFADSVK	GRFTISRDNAKNSLYIQMNSLR	VEDTALYYC AKSPSSNYYPDADF	WGQGTMTVTSS
MSLN-WC-R3-Gly1-2-D4	HV3-9*01 F	HJ3*02	FHD6-13*01	FEVQLVDSGG	GLVOPGRSLRLSCAAKGFTF.....DDYA	MHWVROAPGKGLEWWSG	ISWN...SGSI	GYADSVK	GRFTISRDNAKNSLYIQMNSLR	AEADTALYYC AKDPSSSWLAGAFDI	WGQGTMTVTSS
MSLN-WC-R3-TEA1-E8	HV1-3*01 F	HJ6*02	FHD1-26*01	FQVQLVDSGA	EVKPKGASVRYSCAAKGFTF.....THYA	MHWVROAPGKGLEWWSG	ISWN...SGSI	NGNSRFESEKQ	GRVTITDQTAASYTMDLSNR	AEADTALYYC AREVGHGMDV	WGQGTMTVTSS
MSLN-WC-R3-TEA1-E5	HV3-9*01 F	HJ3*02	FHD6-13*01	FEVQLVDSGG	GLVOPGRSLRLSCAAKGFTF.....DDYA	MHWVROAPGKGLEWWSG	ISWN...SGSI	GYADSVK	GRFTISRDNAKNSLYIQMNSLR	AEADTALYYC AKDPSSSWLAGAFDI	WGQGTMTVTSS
MSLN-WC-R3-Gly3-2-C10	HV3-9*01 F	HJ3*02	FHD2-2*01 F	EVQLVDSGG	GLVOPGRSLRLSCAAKGFTF.....DDYA	MHWVROAPGKGLEWWSG	ISWN...SGSI	GYADSVK	GRFTISRDNAKNSLYIQMNSLR	AEADTALYYC AKDPSSSWLAGAFDI	WGQGTMTVTSS
MSLN-WC-R3-Gly3-1-H10	HV1-18*01	HJ6*02	FHD3-16*01	FQVQLVDSGA	EVKPKGASVRYSCAAKGFTF.....TTNG	MHWVROAPGKGLEWWSG	ISWN...SGSI	GYADSVK	GRFTISRDNAKNSLYIQMNSLR	AEADTALYYC ARVNRANYGMDV	WGQGTMTVTSS
MSLN-WC-R3-Gly1-2-H4	HV1-2*04 F	HJ4*02	FHD3-16*02	FQVQLVDSGA	EVKPKGASVRYSCAAKGFTF.....SSDT	MHWVROAPGKGLEWWSG	ISWN...SGSI	GYADSVK	GRFTISRDNAKNSLYIQMNSLR	AEADTALYYC ARVNRANYGMDV	WGQGTMTVTSS
MSLN-WC-R3-Gly3-2-C1	HV1-18*01	HJ6*02	FHD3-16*01	FQVQLVDSGA	EVKPKGASVRYSCAAKGFTF.....TTNG	MHWVROAPGKGLEWWSG	ISWN...SGSI	GYADSVK	GRFTISRDNAKNSLYIQMNSLR	AEADTALYYC ARVNRANYGMDV	WGQGTMTVTSS
MSLN-WC-R3-Gly2-2-F7	HV1-18*01	HJ6*02	FHD3-16*01	FQVQLVDSGA	EVKPKGASVRYSCAAKGFTF.....TTNG	MHWVROAPGKGLEWWSG	ISWN...SGSI	GYADSVK	GRFTISRDNAKNSLYIQMNSLR	AEADTALYYC ARVNRANYGMDV	WGQGTMTVTSS
MSLN-WC-R3-TEA1-D2	HV1-18*01	HJ6*02	FHD3-16*01	FQVQLVDSGA	EVKPKGASVRYSCAAKGFTF.....TTNG	MHWVROAPGKGLEWWSG	ISWN...SGSI	GYADSVK	GRFTISRDNAKNSLYIQMNSLR	AEADTALYYC ARVNRANYGMDV	WGQGTMTVTSS
MSLN-WC-R3-TEA1-D3	HV1-18*01	HJ6*02	FHD3-16*01	FQVQLVDSGA	EVKPKGASVRYSCAAKGFTF.....TTNG	MHWVROAPGKGLEWWSG	ISWN...SGSI	GYADSVK	GRFTISRDNAKNSLYIQMNSLR	AEADTALYYC ARVNRANYGMDV	WGQGTMTVTSS
MSLN-WC-R3-TEA2-E10	HV1-18*01	HJ6*02	FHD3-16*01	FQVQLVDSGA	EVKPKGASVRYSCAAKGFTF.....TTNG	MHWVROAPGKGLEWWSG	ISWN...SGSI	GYADSVK	GRFTISRDNAKNSLYIQMNSLR	AEADTALYYC ARVNRANYGMDV	WGQGTMTVTSS
MSLN-WC-R3-TEA2-C9	HV3-11*06	HJ5*02	FHD3-22*01	FEVQLVESGG	GLVKAGGSLRLSCTASGKFXF.....TDYY	MSWIRQTPGKGLEWWSY	INTS...SNHI	NYAHSVK	GRFTISRDNAISLFLQMDRLT	SEDTALYYC ARGASWGL	WGQGTMTVTSS

V-基因
和等位
基因

J-基因
和等位
基因

D-基因
和等位
基因

MSLN-WC-R3-Gly2-1-F2	LV3-19*01	FLJ3*02	F	SSELTQDPALV	VSVALGQTVRITCQGD SLR.....AYY	ASWYQKPKGQAPLVLY	GK.....N	SRPSGIP	DRFSGSN	SGNAASLTITGAQAEADYYC	NSRDSGSHLGV
MSLN-WC-R3-Gly2-2-B6	LV3-19*01	FLJ3*02	F	SSELTQDPALV	VSVALGQTVRITCQGD SLR.....AYY	ASWYQKPKGQAPLVLY	GK.....N	SRPSGIP	DRFSGSN	SGNAASLTITGAQAEADYYC	NSRDSGSHLGS
MSLN-WC-R3-Gly1-2-E10	LV3-19*01	FLJ2*01	F	SSELTQDPALV	VSVALGQTVRITCQGD SLR.....NYY	ASWYQKPKGQAPLVLY	AK.....N	NRPSGIP	DRFSGSN	SGNTASLTITGAQAEADYYC	SSRDSGSHV
MSLN-WC-R3-Gly1-2-D4	LV3-19*01	FLJ2*01	F	SSELTQDPALV	VSVALGQTVRITCQGD SLR.....RFY	ASWYQKPKGQAPLVLY	GK.....N	NRPSGIP	DRFSGSN	SGNTASLTITGAQAEADYYC	NSRDSGSHV
MSLN-WC-R3-TEA1-E8	LV1-40*01	FLJ1*01	F	QSVLTQPPS	VSVALGQTVRITCQGD SLR.....AGYD	ASWYQKPKGQAPLVLY	GN.....T	NRPSGVP	DRFSGSK	SGTASLTITGAQEDGADYYC	QSYDSSLGYY
MSLN-WC-R3-TEA1-E5	LV3-19*01	FLJ2*01	F	SSELTQDPALV	VSVALGQTVRITCQGD SLR.....RFY	ASWYQKPKGQAPLVLY	GK.....N	NRPSGIP	DRFSGSN	SGNTASLTITGAQAEADYYC	NSRDSGSHV
MSLN-WC-R3-Gly3-2-C10	LV3-19*01	FLJ2*01	F	SSDLTQDPALV	VSVALGQTVRITCQGD SLR.....RFY	ASWYQKPKGQAPLVLY	GK.....N	TRPSGIP	DLFSGSY	SRNTSSLTITGAQAEADYYC	NSQDRGSHV
MSLN-WC-R3-Gly3-1-H10	KV2-28*01	FKJ4*01	F	EVLTLQSPSL	SLPVTGPEPASISCRSS	QSLIRS NGYNYLDWYLOKPGQSPQLLY	LG.....S	NRASGVP	DRFSAGS	SGTDFTLKSRVEADVGYYC	MQSSSTNSAH
MSLN-WC-R3-Gly1-2-H4	KV3-20*01	FKJ1*01	F	ETTLTQSPSL	SLPVTGPEPASISCRSS	QSLIRS NGYNYLDWYLOKPGQSPQLLY	GA.....S	SRATGIP	DRFSAGS	SGTDFTLKSRVEADVGYYC	LQDSSYPLT
MSLN-WC-R3-Gly3-2-C1	KV2-28*01	FKJ4*01	F	EVLTLQSPSL	SLPVTGPEPASISCRSS	QSLIRS NGYNYLDWYLOKPGQSPQLLY	LG.....S	NRASGVP	DRFSAGS	SGTDFTLKSRVEADVGYYC	MQALQPLT
MSLN-WC-R3-Gly2-2-F7	KV2-28*01	FKJ4*01	F	EVLTLQSPSL	SLPVTGPEPASISCRSS	QSLIRS NGYNYLDWYLOKPGQSPQLLY	LG.....S	NRASGVP	DRFSAGS	SGTDFTLKSRVEADVGGLL	HASSTNSAH
MSLN-WC-R3-TEA1-D2	KV2-28*01	FKJ4*01	F	EVLTLQSPSL	SLPVTGPEPASISCRSS	QSLIRS NGYNYLDWYLOKPGQSPQLLY	LG.....S	NRASGVP	DRFSAGS	SGTDFTLKSRVEADVGYYC	MQALQPLT
MSLN-WC-R3-TEA1-D3	KV2-28*01	FKJ4*01	F	EVLTLQSPSL	SLPVTGPEPASISCRSS	QSLIRS NGYNYLDWYLOKPGQSPQLLY	LG.....S	NRASGVP	DRFSAGS	SGTDFTLKSRVEADVGYYC	MQALQPLT
MSLN-WC-R3-TEA2-E10	KV2-28*01	FKJ4*01	F	EVLTLQSPSL	SLPVTGPEPASISCRSS	QSLIRS NGYNYLDWYLOKPGQSPQLLY	LG.....S	NRASGVP	DRFSAGS	SGTDFTLKSRVEADVGYYC	MQALQPLT
MSLN-WC-R3-TEA2-C9	LV3-21*02	FLJ2*01	F	QPGLTQPPP	VSVALGQTVRITCQGD SLR.....SKS	ASWYQKPKGQAPLVLS	DD.....S	DRPSGIP	ERFSGSN	SGTATLITITGAQAEADYYC	QSDYNNWGLCD

图40