(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119768429 A
(43)申请公布日 2025.04.04

(21)申请号 202380053576.1
(22)申请日 2023.07.10
(66)本国优先权数据
PCT/CN2022/104928 2022.07.11 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2023/106519 2023.07.10
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/012395 EN 2024.01.18
(71)申请人 诺纳生物(苏州)有限公司
地址 215000 江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号A3楼202单元
(72)发明人 张美红 王迪 汪晶晶 关广阔 邓长静
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 涂滔
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)

权利要求书9页 说明书58页
序列表（电子公布） 附图12页

(54)发明名称

抗间皮素抗体

(57)摘要

提供了与间皮素结合的抗体及其抗原结合片段,以及它们的用途、编码抗体和抗原结合片段的核酸、包含核酸的载体以及包含核酸或载体的宿主细胞。还提供了包含抗体的药物组合物和缀合物,以及通过施用抗体的治疗方法。

CN 119768429 A

1.特异性结合间皮素的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含轻链可变区(VL)和重链可变区(VH),并且其中

(1)所述VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

(2)所述VH包含具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:28所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

(3)所述VH包含具有SEQ ID NO:26所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

(4)所述VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:29所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

(5)所述VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

(6)所述VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

(7)所述VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:32所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

(8)所述VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:33所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

(9)所述VH包含具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:29所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

(10)所述VH包含具有SEQ ID NO:63所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:67所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

(11)所述VH包含具有SEQ ID NO:64所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:67所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

(12)所述VH包含具有SEQ ID NO:65所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:67所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

(13)所述VH包含具有SEQ ID NO:65所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:68所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

(14)所述VH包含具有SEQ ID NO:63所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:68所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

(15)所述VH包含具有SEQ ID NO:66所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:67所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

(16)所述VH包含具有SEQ ID NO:64所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:69所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

(17)所述VH包含具有SEQ ID NO:66所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:69所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

(18)所述VH包含具有SEQ ID NO:63所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含具有SEQ ID NO:69所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;或者

(19)所述VH包含具有SEQ ID NO:65所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且所述VL包含

具有SEQ ID NO:69所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3。

2.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中

(1)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、13所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

(2)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:15、16、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、18所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

(3)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:15、17、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、13所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

(4)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、19所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

(5)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、20所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

(6)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、21所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

(7)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、22所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

(8)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、23所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

(9)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:15、16、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、19所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

(10)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:45、47、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:52、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

(11)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:58、47、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:52、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

(12)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:58、59、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:52、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

(13)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:58、59、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:61、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

(14)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:45、47、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:61、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

(15)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:58、60、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:52、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

(16)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:58、47、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:62、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

(17)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:58、60、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:62、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

(18)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:45、47、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述VL包含分别包含SEQ ID NO:62、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;或者

(19)所述VH包含分别包含SEQ ID NO:58、59、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且所述

VL包含分别包含SEQ ID NO:62、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3。

3.根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

(1)所述VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:27具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(2)所述VH包含与SEQ ID NO:25具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:28具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(3)所述VH包含与SEQ ID NO:26具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:27具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(4)所述VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:29具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(5)所述VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:30具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(6)所述VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:31具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(7)所述VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:32具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(8)所述VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:33具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(9)所述VH包含与SEQ ID NO:25具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:29具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(10)所述VH包含与SEQ ID NO:63具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少

98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:67具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

(11)所述VH包含与SEQ ID NO:64具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:67具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

(12)所述VH包含与SEQ ID NO:65具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:67具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

(13)所述VH包含与SEQ ID NO:65具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:68具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

(14)所述VH包含与SEQ ID NO:63具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:68具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

(15)所述VH包含与SEQ ID NO:66具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:67具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

(16)所述VH包含与SEQ ID NO:64具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:69具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

(17)所述VH包含与SEQ ID NO:66具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:69具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

(18)所述VH包含与SEQ ID NO:63具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:69具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;或者

(19)所述VH包含与SEQ ID NO:65具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:69具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含重链(HC)和轻链(LC),并且其中:

(1)所述HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:37具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(2)所述HC包含与SEQ ID NO:35具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:38具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(3)所述HC包含与SEQ ID NO:36具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:37具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(4)所述HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:39具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(5)所述HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:40具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(6)所述HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:41具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(7)所述HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:42具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(8)所述HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:43具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(9)所述HC包含与SEQ ID NO:35具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:39具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

(10)所述HC包含与SEQ ID NO:70具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少

98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:74具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

(11)所述HC包含与SEQ ID NO:71具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:74具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

(12)所述HC包含与SEQ ID NO:72具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:74具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

(13)所述HC包含与SEQ ID NO:72具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:75具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

(14)所述HC包含与SEQ ID NO:70具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:75具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

(15)所述HC包含与SEQ ID NO:73具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:74具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

(16)所述HC包含与SEQ ID NO:71具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:76具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

(17)所述HC包含与SEQ ID NO:73具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:76具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

(18)所述HC包含与SEQ ID NO:70具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:76具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;或者

(19)所述HC包含与SEQ ID NO:72具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:76具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合膜结合的间皮素。

6.根据权利要求5所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段以比其结合可溶性间皮素的亲和力更高的亲和力结合膜结合的间皮素。

7.根据权利要求5所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段以其结合可溶性间皮素的亲和力的至少两倍、至少三倍、至少五倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少50倍或至少100倍的亲和力结合膜结合的间皮素。

8.根据权利要求5所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段不结合可溶性MSLN。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是鼠抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是选自IgG、IgA、IgM、IgE和IgD的同种型。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的亚型。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fd、Fd'、Fv、scFv、ds-scFv和dAb。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是单克隆抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是单价的、二价的或多价的。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段与荧光标记、放射性标记或细胞毒性剂连接。

16.双特异性抗体,所述双特异性抗体包含根据权利要求1至15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段以及特异性结合肿瘤相关抗原、免疫细胞抗原或免疫检查点分子的第二抗原结合区。

17.核酸,所述核酸包含编码根据权利要求1至15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求16所述的双特异性抗体的核苷酸序列。

18.载体,所述载体包含根据权利要求17所述的核酸。

19.宿主细胞,所述宿主细胞包含根据权利要求17所述的核酸或根据权利要求18所述的载体。

20.抗体药物缀合物(ADC),所述抗体药物缀合物包含根据权利要求1至15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求16所述的双特异性抗体。

21.药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或根据权利要求16所述的双特异性抗体、或根据权利要求17所述的核酸、或根据权利要求18所述的载体、或根据权利要求19所述的宿主细胞、或根据权利要求20所述的抗体药物缀合物,以及任选地药学上可接受的载体或赋形剂。

22.根据权利要求21所述的药物组合物,其中所述组合物还包含选自抗体、化学治疗剂、siRNA、反义寡核苷酸、多肽和小分子药物的第二治疗剂。

23.治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或根据权利要求16所述的双特异性抗体、或根据权利要求17所述的核酸、或根据权利要求18所述的载体、或根据权利要求19所述的宿主细胞、根据权利要求20所述的抗体药物缀合物、或根据权利要求21或22所述的药物组合物。

24.根据权利要求23所述的方法,其中所述癌症选自间皮瘤、前列腺癌、肺癌、胃癌、鳞状细胞癌、胰腺癌、胆管癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)和卵巢癌。

25.根据权利要求23或24所述的方法,所述方法还包括向所述受试者施用第二治疗剂。

26.根据权利要求25所述的方法,其中所述第二治疗剂选自抗体、化学治疗剂、siRNA、反义寡核苷酸、多肽和小分子药物。

27.根据权利要求1至15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或根据权利要求16所述的双特异性抗体、或根据权利要求17所述的核酸、或根据权利要求18所述的载体、或根据权利要求19所述的宿主细胞、根据权利要求20所述的抗体药物缀合物、或根据权利要求21或22所述的药物组合物在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的用途。

28.根据权利要求27所述的用途,其中所述癌症选自间皮瘤、前列腺癌、肺癌、胃癌、鳞状细胞癌、胰腺癌、胆管癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)和卵巢癌。

29.根据权利要求27或28中任一项所述的用途,其中所述药物还包含第二治疗剂,任选地所述第二治疗剂选自抗体、化学治疗剂、siRNA、反义寡核苷酸、多肽和小分子药物。

30.根据权利要求27或28中任一项所述的用途,其中所述药物与第二治疗剂组合施用,任选地所述第二治疗剂选自抗体、化学治疗剂、siRNA、反义寡核苷酸、多肽和小分子药物。

31.根据权利要求1至15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或根据权利要求16所述的双特异性抗体、或根据权利要求17所述的核酸、或根据权利要求18所述的载体、或根据权利要求19所述的宿主细胞、或根据权利要求20所述的抗体药物缀合物、或根据权利要求21或22所述的药物组合物,用于治疗受试者的癌症。

32.根据权利要求31所述的用于所述用途的抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体、核酸、载体、宿主细胞、抗体药物缀合物或药物组合物,其中所述癌症选自间皮瘤、前列腺癌、肺癌、胃癌、鳞状细胞癌、胰腺癌、胆管癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)和卵巢癌。

33.根据权利要求31或32所述的用于所述用途的抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体、核酸、载体、宿主细胞、抗体药物缀合物或药物组合物,还包括向所述受试者施用第二治疗剂,任选地所述第二治疗剂选自抗体、化学治疗剂、siRNA、反义寡核苷酸、多肽和小分子药物。

34.用于诊断受试者的间皮素阳性癌症的方法,所述方法包括:

(a)从所述受试者获得生物样本,

(b)使所述样本与根据权利要求1至15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段接触;以及

(c)检测所述抗体与所述样本的结合,

其中相比于所述抗体或其抗原结合片段与对照样本的结合,所述抗体或其抗原结合片段与所述样本的结合增加,鉴定出所述受试者患有间皮素阳性癌症。

35.用于对受试者的间皮素阳性癌症进行成像的方法,所述方法包括:

(a)向所述受试者施用根据权利要求1至15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体缀合到可检测标志物;以及

(b)检测所述标志物的存在。

36.根据权利要求34所述的方法,其中:

(a)所述可检测标志物是^{111}In并且优选地所述标志物的检测是通过单光子发射计算机断层扫描进行的,或者

(b)所述可检测标志物是^{89}Zr,并且优选地所述标志物的检测是通过正电子发射断层扫描进行的。

抗间皮素抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及结合间皮素(MSLN)的抗体及其抗原结合片段。

背景技术

[0002] 癌如间皮瘤、胰腺癌、卵巢癌和肺腺癌是高度破坏性的,并且非常难以治疗。例如,胰管腺癌占所有胰腺肿瘤的90%,并且其发病率正在上升,而预后非常差。缺乏可用的特定诊断测试和非常有限的治疗机会带来了严重的健康问题。

[0003] 间皮素(MSLN)是一种细胞表面分子,其表达为71kD前体蛋白质,该前体蛋白质被进一步加工成40kD糖蛋白,该糖蛋白被糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚固在细胞表面上。MSLN在正常组织中显示出非常有限和低的表达。它在形成胸膜、心包和腹膜的间皮细胞中表达,其中它似乎在细胞粘附中起作用(Chang等人(1996年),PNAS,第93卷:第136-140页)。还有研究提出可溶性切割的MSLN在巨核细胞刺激中起作用,但在小鼠中进行敲除后未显示出发育中的任何缺陷,因此其生物学作用尚不清楚(Yamaguchi等人(1994年),第269卷第2期:第805-808页;Bera等人(2000年),第20卷第8期:第2902-2906页)。

[0004] 相反,MSLN在几种人类癌症中高度表达,这些癌症包括几乎所有间皮瘤和胰腺癌以及大约70%的卵巢癌和50%的肺腺癌(Hassan和Ho(2008年),Eur.J.Cancer,第44卷:第46-53页;Miettinen和Sarlomo-Rikala(2003年),Am.J.Surg.Pathol.,第27卷:第150-158页;Ordonez(2003年),Am.J.Surg.Pathol.,第27卷:第1418-1428页;Ho等人(2007年),Clin.Cancer Res.,第13卷:第1571-1575页)。其高表达水平使MSLN成为用于靶向疗法的有吸引力的候选物,因为它促进增殖和侵袭,在肿瘤进程中起重要作用(Servais等人(2012年),Clin.Cancer Res.,第18卷第9期:第2478-2489页)。

[0005] MSLN与MUC16相互作用介导的细胞粘附在卵巢癌细胞腹膜种植中起重要作用并增加胰腺癌细胞的流动性和侵袭性(Rump等人(2004年),J Biol Chem.,第279卷第10期:第9190-9198页;Gubbels等人(2006年),Mol Cancer,第5卷第1期:第50页;Coehlo等人,Expert Rev Anticancer Ther.,第18卷第2期:第177-186页;Chen等人(2013年),Sci Rep.,第3卷:第1870页)。特别地,胰腺肿瘤常常在患者感觉到疾病的任何症状之前已经进展到中晚期,并且平均存活时间短(通常少于一年)。这种预后不良,因为肿瘤通常不能通过手术(完全)去除,并且已经转移(通常不能检测到)。化疗也无法大幅延长存活时间或治愈疾病。尽管进行了若干尝试,但是迄今为止还没有成功的免疫疗法。即使最著名的结合可溶形式的MSLN的抗间皮素单克隆抗体(Amatuximab)也不是特别成功(Baldo和Cecco(2017年),Onco.Targets Ther.,第10卷:第5337-5353页;Nicolaides等人(2018年),Cancer Biology&Therapy,第19卷第7期:第622-630页)。不幸的是,肿瘤引起的间皮素脱落会产生许多问题,尽管它可以用作疾病的生物标志物(Hassan等人(2006年),Clin.Cancer Res.,第12卷:第447-453页)。脱落会为肿瘤成像和潜在放射疗法带来问题。脱落到血流中的MSLN导致基于放射性标记抗体的成像的背景高,并且是有毒的,因为放射性标记的抗体在全身结合脱落的间皮素。这需要施用高剂量并因此毒性剂量的抗间皮素抗体。

发明内容

[0006] 本发明提供了特异性结合间皮素的抗体及其抗原结合片段,以及它们的用途、编码这些抗体和抗原结合片段的核酸、包含这些核酸的载体和包含这些核酸或这些载体的宿主细胞。还公开了包含这些抗体的药物组合物和缀合物,以及通过施用这些抗体的治疗方法。

[0007] 在第一方面,本发明提供了一种特异性结合间皮素的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体包含轻链可变区(VL)和重链可变区(VH),并且其中

[0008] (1)VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0009] (2)VH包含具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:28所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0010] (3)VH包含具有SEQ ID NO:26所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0011] (4)VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:29所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0012] (5)VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0013] (6)VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0014] (7)VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:32所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0015] (8)VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:33所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0016] (9)VH包含具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:29所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0017] (10)VH包含具有SEQ ID NO:63所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:67所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0018] (11)VH包含具有SEQ ID NO:64所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:67所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0019] (12)VH包含具有SEQ ID NO:65所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:67所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0020] (13)VH包含具有SEQ ID NO:65所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:68所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0021] (14)VH包含具有SEQ ID NO:63所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:68所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0022] (15)VH包含具有SEQ ID NO:66所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:67所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0023] (16)VH包含具有SEQ ID NO:64所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:69所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0024] (17)VH包含具有SEQ ID NO:66所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:69所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0025] (18)VH包含具有SEQ ID NO:63所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:69所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;或者

[0026] (19)VH包含具有SEQ ID NO:65所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:69所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3。

[0027] 在一些实施方案中,LCDR 1-3和HCDR 1-3由EU Kabat定义/编号系统定义。在一些实施方案中,LCDR 1-3和HCDR 1-3由Chothia定义/编号系统定义。在一些实施方案中,LCDR 1-3和HCDR 1-3由AbM定义/编号系统定义。在一些优选的实施方案中,LCDR 1-3和HCDR 1-3由Kabat和Chothia组合编号系统定义。

[0028] 在一些实施方案中,本发明提供了一种特异性结合间皮素的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体包含轻链可变区(VL)和重链可变区(VH),并且其中

[0029] (1)VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、13所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0030] (2)VH包含分别包含SEQ ID NO:15、16、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、18所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0031] (3)VH包含分别包含SEQ ID NO:15、17、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、13所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0032] (4)VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、19所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0033] (5)VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、20所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0034] (6)VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、21所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0035] (7)VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、22所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0036] (8)VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、23所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0037] (9)VH包含分别包含SEQ ID NO:15、16、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、19所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0038] (10)VH包含分别包含SEQ ID NO:45、47、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:52、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0039] (11)VH包含分别包含SEQ ID NO:58、47、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:52、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0040] (12)VH包含分别包含SEQ ID NO:58、59、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:52、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0041] (13)VH包含分别包含SEQ ID NO:58、59、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:61、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0042] (14)VH包含分别包含SEQ ID NO:45、47、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包

含分别包含SEQ ID NO:61、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0043] (15)VH包含分别包含SEQ ID NO:58、60、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:52、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0044] (16)VH包含分别包含SEQ ID NO:58、47、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:62、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0045] (17)VH包含分别包含SEQ ID NO:58、60、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:62、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0046] (18)VH包含分别包含SEQ ID NO:45、47、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:62、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;或者

[0047] (19)VH包含分别包含SEQ ID NO:58、59、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:62、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3。

[0048] 在一些实施方案中,本发明提供了一种特异性结合间皮素的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体包含轻链可变区(VL)和重链可变区(VH),并且其中:

[0049] (1)VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:27具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0050] (2)VH包含与SEQ ID NO:25具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:28具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0051] (3)VH包含与SEQ ID NO:26具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:27具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0052] (4)VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:29具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0053] (5)VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:30具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0054] (6)VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:31具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0055] (7)VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:32具有至少

80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0056] (8)VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:33具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0057] (9)VH包含与SEQ ID NO:25具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:29具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0058] (10)VH包含与SEQ ID NO:63具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:67具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0059] (11)VH包含与SEQ ID NO:64具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:67具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0060] (12)VH包含与SEQ ID NO:65具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:67具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0061] (13)VH包含与SEQ ID NO:65具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:68具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0062] (14)VH包含与SEQ ID NO:63具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:68具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0063] (15)VH包含与SEQ ID NO:66具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:67具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0064] (16)VH包含与SEQ ID NO:64具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:69具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0065] (17)VH包含与SEQ ID NO:66具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少

98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:69具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0066] (18)VH包含与SEQ ID NO:63具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:69具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;或者

[0067] (19)VH包含与SEQ ID NO:65具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:69具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列。

[0068] 在一些实施方案中,本发明提供了一种特异性结合间皮素的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体包含重链(HC)和轻链(LC),并且其中:

[0069] (1)HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:37具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0070] (2)HC包含与SEQ ID NO:35具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:38具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0071] (3)HC包含与SEQ ID NO:36具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:37具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0072] (4)HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:39具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0073] (5)HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:40具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0074] (6)HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:41具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0075] (7)HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:42具有至少

80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0076] (8)HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:43具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0077] (9)HC包含与SEQ ID NO:35具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:39具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0078] (10)HC包含与SEQ ID NO:70具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:74具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0079] (11)HC包含与SEQ ID NO:71具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:74具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0080] (12)HC包含与SEQ ID NO:72具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:74具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0081] (13)HC包含与SEQ ID NO:72具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:75具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0082] (14)HC包含与SEQ ID NO:70具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:75具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0083] (15)HC包含与SEQ ID NO:73具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:74具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0084] (16)HC包含与SEQ ID NO:71具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:76具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列；

[0085] (17)HC包含与SEQ ID NO:73具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少

98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:76具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0086] (18)HC包含与SEQ ID NO:70具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:76具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;或者

[0087] (19)HC包含与SEQ ID NO:72具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:76具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列。

[0088] 在一些优选的实施方案中,抗体或其抗原结合片段特异性结合膜结合的间皮素。在一些优选的实施方案中,抗体或其抗原结合片段以比其结合可溶性间皮素的亲和力更高的亲和力结合膜结合的间皮素。在一些优选的实施方案中,抗体或其抗原结合片段以其结合可溶性间皮素的亲和力的至少两倍、至少三倍、至少五倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少50倍或至少100倍的亲和力结合膜结合的间皮素。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段基本上不结合可溶性MSLN。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段不结合可溶性MSLN。

[0089] 在一些实施方案中,抗体是鼠抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0090] 在一些实施方案中,抗体是选自IgG、IgA、IgM、IgE和IgD的同种型。在优选的实施方案中,抗体是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的亚型。

[0091] 在一些实施方案中,抗原结合片段选自Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fd、Fd'、Fv、scFv、ds-scFv和dAb。

[0092] 在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

[0093] 在一些实施方案中,抗体是单价的、二价的或多价的。

[0094] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段连接到荧光标记、放射性标记或细胞毒性剂。

[0095] 在第二方面,本发明提供了一种双特异性抗体,该双特异性抗体包含本发明的第一方面的抗体或其抗原结合片段以及特异性结合肿瘤相关抗原、免疫细胞抗原或免疫检查点分子的第二抗原结合区。

[0096] 在第三方面,本发明提供了一种核酸,该核酸包含编码本发明的第一方面的抗体或其抗原结合片段或本发明的第二方面的双特异性抗体的核苷酸序列。

[0097] 在第四方面,本发明提供了一种包含本发明的第三方面的核酸的载体。

[0098] 在第五方面,本发明提供了一种包含本发明的第三方面的核酸或本发明的第四方面的载体的宿主细胞。

[0099] 在第六方面,本发明提供了一种抗体药物缀合物(ADC),其中ADC包含本发明的第一方面的抗体或其抗原结合片段或本发明的第二方面的双特异性抗体。

[0100] 在第七方面,本发明提供了一种药物组合物,该药物组合物包含(i)本发明的第一方面的抗体或其抗原结合片段、或本发明的第二方面的双特异性抗体、或本发明的第三方

面的核酸、或本发明的第四方面的载体、或本发明的第五方面的宿主细胞、或本发明的第六方面的抗体药物缀合物;和任选地(ii)药学上可接受的载体或赋形剂。

[0101] 在一些实施方案中,该组合物还包含选自抗体、化学治疗剂、siRNA、反义寡核苷酸、多肽和小分子药物的第二治疗剂。

[0102] 在第八方面,本发明提供了一种治疗受试者的癌症的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体、核酸、载体、宿主细胞、抗体药物缀合物或药物组合物。

[0103] 在一些具体的实施方案中,癌症选自间皮瘤、前列腺癌、肺癌、胃癌、鳞状细胞癌、胰腺癌、胆管癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)和卵巢癌。

[0104] 在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用第二治疗剂。优选地,第二治疗剂选自抗体、化学治疗剂、siRNA、反义寡核苷酸、多肽和小分子药物。

[0105] 在第九方面,本发明提供了本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体、核酸、载体、宿主细胞、抗体药物缀合物或药物组合物在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的用途。

[0106] 在一些实施方案中,癌症选自间皮瘤、前列腺癌、肺癌、胃癌、鳞状细胞癌、胰腺癌、胆管癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)和卵巢癌。

[0107] 在一些实施方案中,该药物还包含第二治疗剂,任选地,第二治疗剂选自抗体、化学治疗剂、siRNA、反义寡核苷酸、多肽和小分子药物。

[0108] 在一些实施方案中,该药物与第二治疗剂组合施用,任选地,第二治疗剂选自抗体、化学治疗剂、siRNA、反义寡核苷酸、多肽和小分子药物。

[0109] 在第十方面,本发明提供了在治疗受试者的癌症的方法中使用的本发明的抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体、核酸、载体、宿主细胞、抗体药物缀合物或药物组合物。

[0110] 在一些实施方案中,癌症选自间皮瘤、前列腺癌、肺癌、胃癌、鳞状细胞癌、胰腺癌、胆管癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)和卵巢癌。

[0111] 在一些实施方案中,向受试者进一步施用第二治疗剂,任选地,第二治疗剂选自抗体、化学治疗剂、siRNA、反义寡核苷酸、多肽和小分子药物。

[0112] 在第十一方面,本发明提供了一种用于诊断受试者的间皮素阳性癌症的方法,该方法包括:

[0113] (a)从受试者获得生物样本,

[0114] (b)使该样本与本发明的抗体或其抗原结合片段接触;以及

[0115] (c)检测该抗体与该样本的结合,

[0116] 其中相比于该抗体或其抗原结合片段与对照样本的结合,该抗体或其抗原结合片段与该样本的结合增加,鉴定出受试者患有间皮素阳性癌症。

[0117] 在第十二方面,本发明提供了一种用于对受试者的间皮素阳性癌症进行成像的方法,该方法包括:

[0118] (a)向该受试者施用本发明的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体缀合到可检测标志物;以及

[0119] (b)检测该标志物的存在。

[0120] 在一些优选的实施方案中,(a)可检测标志物是^{111}In,并且优选地该标志物的检测

是通过单光子发射计算机断层扫描进行的,或者

[0121] (b)可检测标志物是^{89}Zr,并且优选地该标志物的检测是通过正电子发射断层扫描进行的。

附图说明

[0122] 图1.产生抗间皮素抗体的方案。通过用重组间皮素蛋白质反复注射免疫HarbourH2L2转基因小鼠,随后通过杂交瘤产生和克隆筛选以鉴定MSLN特异性四聚体(H2L2)抗体。

[0123] 图2.用于单B细胞克隆筛选的筛选策略和方法的工作流程。

[0124] 图3.抗体PR300159和PR300186与CHOK1-人MSLN细胞表面上膜结合的人MSLN的结合。

[0125] 图4.抗体PR300159和PR300186与CHOK1-食蟹猴MSLN细胞表面上膜结合的食蟹猴MSLN的结合。

[0126] 图5.抗体PR300159和PR300186与在COV644细胞系上内源性表达的膜结合的人MSLN的结合。

[0127] 图6.PR300186抗体和PR300186PTM去除抗体与人MSLN蛋白质的结合。

[0128] 图7.PR300186抗体和PR300186PTM去除抗体与食蟹猴MSLN蛋白质的结合。

[0129] 图8.PR300159抗体和PR300159PTM去除抗体与COV 644细胞的结合。

[0130] 图9.PR300186抗体和PR300186PTM去除抗体与COV 644细胞的结合。

[0131] 图10.PR300159抗体和PR300159PTM去除抗体在COV644细胞上的内化。

[0132] 图11.PR300186抗体和PR300186PTM去除抗体在COV644细胞上的内化。

[0133] 图12.在存在或不存在可溶性MSLN(sMSLN)的情况下,抗体PR300159与COV644细胞的结合:(A)不存在sMSLN;(B)存在90nM sMSLN。

[0134] 图13.在存在或不存在可溶性MSLN(sMSLN)的情况下,抗体PR300186与COV644细胞的结合:(A)不存在sMSLN;(B)存在90nM sMSLN。

[0135] 图14.在存在或不存在可溶性MSLN(sMSLN)的情况下,抗体PR300159-8与COV644细胞的结合。

[0136] 图15.在存在或不存在可溶性MSLN(sMSLN)的情况下,抗体PR300186-10与COV644细胞的结合。

[0137] 序列

[0138] 轻链、重链、轻链可变区(VL)、重链可变区(VH)、轻链和重链的CDR和FWR的氨基酸序列如下表1至表4所示。

[0139] 表1.抗体的重链和轻链的序列

[0140]

克隆	重链	SEQ ID NO	轻链	SEQ ID NO
PR300159	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSDGMNWVRQAPGKGLEWVAVIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPLWPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ	34	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPDDFATFYCQQYNSYSRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	37

[0141]

	PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK			
PR3001 59-1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSDAMNWVRQAPGKGLEWVAVI WNEGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPL WPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	35	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SNLQPDDFATFYCQQYSSYSRTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	38
PR3001 59-3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSDAMNWVRQAPGKGLEWVAVI WNDASNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPL WPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	36	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SNLQPDDFATFYCQQYNSYSRTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	37
PR3001 59-4	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSDGMNWVRQAPGKGLEWVAVI WNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPL WPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	34	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SNLQPDDFATFYCQQYNAYSRTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	39

[0142]

PR300159-5	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSDGMNWVRQAPGKGLEWVAVIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPLWPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	34	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPDDFATFYCQQYQSYSRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	40
PR300159-6	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSDGMNWVRQAPGKGLEWVAVIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPLWPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	34	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPDDFATFYCQQYNTYSRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	41
PR300159-7	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSDGMNWVRQAPGKGLEWVAVIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPLWPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	34	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPDDFATFYCQQYTSYSRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	42
PR300159-8	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSDGMNWVRQAPGKGLEWVAVIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPL	34	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPDDFATFYCQQYASYSRTFG	43

[0143]

	WPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK		QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	
PR3001 59-9	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSDAMNWVRQAPGKGLEWVAVI WNEGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPL WPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	35	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SNLQPDDFATFYCQQYNAYSRTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	39
PR3001 86	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SINNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTNSNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	70	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVNSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	74
PR3001 86-2	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SIQNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTNSNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV	71	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVNSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY	74

[0144]

	DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK		SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	
PR3001 86-3	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SIQNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTQSNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	72	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVNSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	74
PR3001 86-4	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SIQNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTQSNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	72	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVQSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	75
PR3001 86-5	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SINNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTNSNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG	70	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVQSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	75

[0145]

	KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK			
PR300186-6	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SIQNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTNANPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	73	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVNSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	74
PR300186-7	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SIQNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTNSNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	71	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVNANLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	76
PR300186-8	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SIQNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTNANPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV	73	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVNANLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	76

[0146]

	LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK			
PR3001 86-9	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SINNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTNSNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	70	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVNANLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	76
PR3001 86-10	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SIQNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTQSNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	72	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVNANLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	76

[0147] 表2.抗体的重链可变区和轻链可变区的序列

[0148]

克隆	重链可变区	SEQ ID NO	轻链可变区	SEQ ID NO
PR3001 59	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSDGMNWVRQAPGKGLEWVAVI WNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPL WPLDYWGQGTLVTVSS	24	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SNLQPDDFATFYCQQYNSYSRTFG QGTKVEIK	27
PR3001 59-1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSDAMNWVRQAPGKGLEWVAVI WNEGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPL WPLDYWGQGTLVTVSS	25	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SNLQPDDFATFYCQQYSSYSRTFGQ GTKVEIK	28
PR3001 59-3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSDAMNWVRQAPGKGLEWVAVI WNDASNKYYADSVKGRFTISRDNSKN	26	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI	27

[0149]

	TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPL WPLDYWGQGTLVTVSS		SNLQPDDFATFYCQQYNSYSRTFG QGTKVEIK	
PR3001 59-4	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSDGMNWVRQAPGKGLEWVAVI WNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPL WPLDYWGQGTLVTVSS	24	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SNLQPDDFATFYCQQYNAYSRTFG QGTKVEIK	29
PR3001 59-5	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSDGMNWVRQAPGKGLEWVAVI WNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPL WPLDYWGQGTLVTVSS	24	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SNLQPDDFATFYCQQYQSYSRTFG QGTKVEIK	30
PR3001 59-6	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSDGMNWVRQAPGKGLEWVAVI WNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPL WPLDYWGQGTLVTVSS	24	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SNLQPDDFATFYCQQYNTYSRTFG QGTKVEIK	31
PR3001 59-7	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSDGMNWVRQAPGKGLEWVAVI WNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPL WPLDYWGQGTLVTVSS	24	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SNLQPDDFATFYCQQYTSYSRTFGQ GTKVEIK	32
PR3001 59-8	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSDGMNWVRQAPGKGLEWVAVI WNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPL WPLDYWGQGTLVTVSS	24	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SNLQPDDFATFYCQQYASYSRTFG QGTKVEIK	33
PR3001 59-9	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSDAMNWVRQAPGKGLEWVAVI WNEGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGPL WPLDYWGQGTLVTVSS	25	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRA SQSISRWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SNLQPDDFATFYCQQYNAYSRTFG QGTKVEIK	29
PR3001 86	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SINNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTNSNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSS	63	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVNSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIK	67
PR3001 86-2	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SIQNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTNSNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSS	64	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVNSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIK	67
PR3001 86-3	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SIQNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTQSNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSS	65	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVNSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIK	67
PR3001 86-4	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SIQNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTQSNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSS	65	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVQSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIK	68

[0150]

PR3001 86-5	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SINNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTNSNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSS	63	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVQSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIK	68
PR3001 86-6	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SIQNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTNANPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSS	66	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVNSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIK	67
PR3001 86-7	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SIQNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTNSNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSS	64	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVNANLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIK	69
PR3001 86-8	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SIQNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTNANPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSS	66	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVNANLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIK	69
PR3001 86-9	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SINNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTNSNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSS	63	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVNANLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIK	69
PR3001 86-10	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SIQNYYWSWVRQPPGKGLEWIGYIFYS GSTQSNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAREVGRIAVAGWF FDLWGRGTLVTVSS	65	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVNANLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG QGTRLEIK	69

[0151] 表3.抗体的HCDR1-3和HFWR1-4的序列(根据Kabat和Chothia组合系统)

[0152]

Ab	SEQ ID NO:	HFWR1	SEQ ID NO:	HCDR1	SEQ ID NO:	HFWR2	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HFWR3	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:	HFWR4
PR30 0159	1	QVQLVESG GGVVQPGR SLRLSCAA S	2	GFTFSS DGMN	3	WVRQAP GKGLEW VA	4	VIWNDGSN KYYADSV KG	5	RFTISRDNSK NTLYLQMNS LRAEDTAVY YCAR	6	DRGPLWPLD Y	7	WGQGT LVTVSS
PR30 0159-1	1	QVQLVESG GGVVQPGR SLRLSCAA S	15	GFTFSS DAMN	3	WVRQAP GKGLEW VA	16	VIWNEGSN KYYADSV KG	5	RFTISRDNSK NTLYLQMNS LRAEDTAVY YCAR	6	DRGPLWPLD Y	7	WGQGT LVTVSS
PR30 0159-3	1	QVQLVESG GGVVQPGR SLRLSCAA S	15	GFTFSS DAMN	3	WVRQAP GKGLEW VA	17	VIWNDASN KYYADSV KG	5	RFTISRDNSK NTLYLQMNS LRAEDTAVY YCAR	6	DRGPLWPLD Y	7	WGQGT LVTVSS
PR30 0159-4	1	QVQLVESG GGVVQPGR SLRLSCAA S	2	GFTFSS DGMN	3	WVRQAP GKGLEW VA	4	VIWNDGSN KYYADSV KG	5	RFTISRDNSK NTLYLQMNS LRAEDTAVY YCAR	6	DRGPLWPLD Y	7	WGQGT LVTVSS
PR30 0159-5	1	QVQLVESG GGVVQPGR SLRLSCAA S	2	GFTFSS DGMN	3	WVRQAP GKGLEW VA	4	VIWNDGSN KYYADSV KG	5	RFTISRDNSK NTLYLQMNS LRAEDTAVY YCAR	6	DRGPLWPLD Y	7	WGQGT LVTVSS
PR30 0159-6	1	QVQLVESG GGVVQPGR SLRLSCAA S	2	GFTFSS DGMN	3	WVRQAP GKGLEW VA	4	VIWNDGSN KYYADSV KG	5	RFTISRDNSK NTLYLQMNS LRAEDTAVY YCAR	6	DRGPLWPLD Y	7	WGQGT LVTVSS

[0153]

PR300159-7	1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	2	GFTFSSDGMN	3	WVRQAPGKGLEWVA	4	VIWNDGSNKYYADSVKG	5	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	6	DRGPLWPLDY	7	WGQGTLVTVSS
PR300159-8	1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	2	GFTFSSDGMN	3	WVRQAPGKGLEWVA	4	VIWNDGSNKYYADSVKG	5	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	6	DRGPLWPLDY	7	WGQGTLVTVSS
PR300159-9	1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	15	GFTFSSDAMN	3	WVRQAPGKGLEWVA	16	VIWNEGSNKYYADSVKG	5	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	6	DRGPLWPLDY	7	WGQGTLVTVSS
PR300186	44	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	45	GGSINNYYWS	46	WVRQPPGKGLEWIG	47	YIFYSGSTNSNPSLKS	48	RVIISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	49	EVGRIAVAGWFFDL	50	WGRGTLVTVSS
PR300186-2	44	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	58	GGSIQNYYWS	46	WVRQPPGKGLEWIG	47	YIFYSGSTNSNPSLKS	48	RVIISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	49	EVGRIAVAGWFFDL	50	WGRGTLVTVSS
PR300186-3	44	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	58	GGSIQNYYWS	46	WVRQPPGKGLEWIG	59	YIFYSGSTQSNPSLKS	48	RVIISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	49	EVGRIAVAGWFFDL	50	WGRGTLVTVSS
PR300186-4	44	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	58	GGSIQNYYWS	46	WVRQPPGKGLEWIG	59	YIFYSGSTQSNPSLKS	48	RVIISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	49	EVGRIAVAGWFFDL	50	WGRGTLVTVSS
PR300186-5	44	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	45	GGSINNYYWS	46	WVRQPPGKGLEWIG	47	YIFYSGSTNSNPSLKS	48	RVIISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	49	EVGRIAVAGWFFDL	50	WGRGTLVTVSS
PR300186-6	44	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	58	GGSIQNYYWS	46	WVRQPPGKGLEWIG	60	YIFYSGSTNANPSLKS	48	RVIISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	49	EVGRIAVAGWFFDL	50	WGRGTLVTVSS
PR300186-7	44	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	58	GGSIQNYYWS	46	WVRQPPGKGLEWIG	47	YIFYSGSTNSNPSLKS	48	RVIISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	49	EVGRIAVAGWFFDL	50	WGRGTLVTVSS
PR300186-8	44	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	58	GGSIQNYYWS	46	WVRQPPGKGLEWIG	60	YIFYSGSTNANPSLKS	48	RVIISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	49	EVGRIAVAGWFFDL	50	WGRGTLVTVSS
PR300186-9	44	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	45	GGSINNYYWS	46	WVRQPPGKGLEWIG	47	YIFYSGSTNSNPSLKS	48	RVIISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	49	EVGRIAVAGWFFDL	50	WGRGTLVTVSS
PR300186-10	44	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	58	GGSIQNYYWS	46	WVRQPPGKGLEWIG	59	YIFYSGSTQSNPSLKS	48	RVIISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	49	EVGRIAVAGWFFDL	50	WGRGTLVTVSS

[0154] 表4.抗体的LCDR1-3和LFWR1-4的序列(根据Kabat和Chothia组合系统)

[0155]

Ab	SEQ ID NO:	LFWR1	SEQ ID NO:	LCDR1	SEQ ID NO:	LFWR2	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LFWR3	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:	LFWR4
PR300159	8	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	9	RASQSISRWLA	10	WYQQKPGKAPKLLIY	11	KASSLES	12	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPDDFATFYC	13	QQYNSYSRT	14	FGQGTKVEIK
PR300159-1	8	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	9	RASQSISRWLA	10	WYQQKPGKAPKLLIY	11	KASSLES	12	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPDDFATFYC	18	QQYSSYSRT	14	FGQGTKVEIK
PR300159-3	8	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	9	RASQSISRWLA	10	WYQQKPGKAPKLLIY	11	KASSLES	12	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPDDFATFYC	13	QQYNSYSRT	14	FGQGTKVEIK
PR300159-4	8	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	9	RASQSISRWLA	10	WYQQKPGKAPKLLIY	11	KASSLES	12	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPDDFATFYC	19	QQYNAYSRT	14	FGQGTKVEIK
PR300159-5	8	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	9	RASQSISRWLA	10	WYQQKPGKAPKLLIY	11	KASSLES	12	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPDDFATFYC	20	QQYQSYSRT	14	FGQGTKVEIK
PR300159-6	8	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	9	RASQSISRWLA	10	WYQQKPGKAPKLLIY	11	KASSLES	12	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPDDFATFYC	21	QQYNTYSRT	14	FGQGTKVEIK

[0156]

PR300159-7	8	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	9	RASQSISRWLA	10	WYQQKPGKAPKLLIY	11	KASSLES	12	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPDDFATFYC	22	QQYTSYSRT	14	FGQGTKVEIK
PR300159-8	8	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	9	RASQSISRWLA	10	WYQQKPGKAPKLLIY	11	KASSLES	12	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPDDFATFYC	23	QQYASYSRT	14	FGQGTKVEIK
PR300159-9	8	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	9	RASQSISRWLA	10	WYQQKPGKAPKLLIY	11	KASSLES	12	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPDDFATFYC	19	QQYNAYSRT	14	FGQGTKVEIK
PR300186	51	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	52	RASQSVNSNLA	53	WYQQKPGQAPRLLIY	54	GASTRAT	55	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC	56	QQYNNWPLT	57	FGQGTRLEIK
PR300186-2	51	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	52	RASQSVNSNLA	53	WYQQKPGQAPRLLIY	54	GASTRAT	55	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC	56	QQYNNWPLT	57	FGQGTRLEIK
PR300186-3	51	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	52	RASQSVNSNLA	53	WYQQKPGQAPRLLIY	54	GASTRAT	55	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC	56	QQYNNWPLT	57	FGQGTRLEIK
PR300186-4	51	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	61	RASQSVQSNLA	53	WYQQKPGQAPRLLIY	54	GASTRAT	55	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC	56	QQYNNWPLT	57	FGQGTRLEIK
PR300186-5	51	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	61	RASQSVQSNLA	53	WYQQKPGQAPRLLIY	54	GASTRAT	55	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC	56	QQYNNWPLT	57	FGQGTRLEIK
PR300186-6	51	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	52	RASQSVNSNLA	53	WYQQKPGQAPRLLIY	54	GASTRAT	55	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC	56	QQYNNWPLT	57	FGQGTRLEIK
PR300186-7	51	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	62	RASQSVNANLA	53	WYQQKPGQAPRLLIY	54	GASTRAT	55	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC	56	QQYNNWPLT	57	FGQGTRLEIK
PR300186-8	51	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	62	RASQSVNANLA	53	WYQQKPGQAPRLLIY	54	GASTRAT	55	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC	56	QQYNNWPLT	57	FGQGTRLEIK
PR300186-9	51	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	62	RASQSVNANLA	53	WYQQKPGQAPRLLIY	54	GASTRAT	55	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC	56	QQYNNWPLT	57	FGQGTRLEIK
PR300186-10	51	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	62	RASQSVNANLA	53	WYQQKPGQAPRLLIY	54	GASTRAT	55	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC	56	QQYNNWPLT	57	FGQGTRLEIK

具体实施方式

[0157] 通过结合附图对以下实施方案的详细描述,本发明的上述特征和优点及其附加特征和优点将在下文中得到更清楚的理解。

[0158] 在此参考附图描述的实施方案是说明性的、例示性的,并且用于一般地理解本发明。这些实施方案不应被解释为限制本发明的范围。在整个说明书中,相同或相似的元素以及具有相同或相似功能的元素由相同的附图标记表示。

[0159] 除非另有说明或定义,否则所用的所有术语具有它们在本领域中的常规含义,这对于本领域技术人员来说是清楚的。例如,参考标准手册,诸如Leuenberger,H.G.W、Nagel,B.和Klbl,H.编撰,A multilingual glossary of biotechnological terms:(IUPAC Recommendations),Helvetica Chimica Acta(1995年),CH-4010Basel,Switzerland;Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版),第1卷至第3卷,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989年);F.Ausubel等人编撰,Current protocols in molecular biology,Green Publishing and Wiley InterScience,New York(1987年);Roitt等人,Immunology(第6版),Mosby/Elsevier,Edinburgh(2001年);和Janeway等人,Immunobiology(第6版),Garland Science Publishing/Churchill Livingstone,New York(2005年),以及上面引用的一般背景技术。

[0160] 如本文所用,除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”以及“该”包括复数指代。因此,例如,提及“一种抗体”包括多种抗体。

[0161] 除非另有说明或定义,否则术语“包括”及其变体诸如“包含”和“含有”应被理解为暗示包括所述元素或步骤或者元素或步骤的组,但不排除任何其他元素或步骤或者元素或步骤的组。术语“包含”涵盖“包括”以及“由其组成”,例如,组合物“包含”X,可仅由X组成,或

者可包含另外的一些物质,例如X+Y。

[0162] 与数值x相关的术语“约”是任选的,并且是指例如x±10%或x±5%。

[0163] 如本文所用,术语“抗体”是指具有特异性结合特定抗原的能力的免疫球蛋白分子。抗体通常在重链和轻链的每一者中包含可变区和恒定区。抗体的重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,该宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(诸如效应细胞)和补体系统的组分,诸如补体激活的经典途径中的第一组分C1q。大多数抗体具有重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),这些重链可变区和轻链可变区一起形成抗体的结合抗原的部分。

[0164] “轻链可变区”(VL)或“重链可变区”(VH)由被三个“互补性决定区”或“CDR”中断的四个“框架”区组成。框架区用于比对CDR,以特异性结合到抗原的表位。CDR包含抗体的氨基酸残基,这些氨基酸残基主要负责抗原结合。从氨基末端到羧基末端,VL结构域和VH结构域两者都包含以下框架区(FR)和CDR区:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。VL结构域的CDR1、CDR2和CDR3在本文中还分别称为LCDR1、LCDR2和LCDR3,VH结构域的CDR1、CDR2和CDR3在本文中还分别称为HCDR1、HCDR2和HCDR3。

[0165] 每个VL结构域和VH结构域的氨基酸分配与CDR的任何常规定义一致。常规定义包括Kabat定义(Kabat,Sequences of Proteins ofImmunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,MD,1987年和1991年)、Chothia定义(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.,第196卷:第901-917页,1987年;Chothia等人,Nature,第342卷:第878-883页,1989年);Chothia Kabat CDR的组合(也被称为Chothia和Kabat组合CDR),其中每个CDR是Chothia和Kabat CDR的组合;牛津分子的抗体建模软件所使用的AbM定义;以及Martin等人的接触定义(world wide web bioinfo.org.uk/abs)。Kabat提供了一种广泛使用的编号惯例(Kabat编号系统),其中不同重链之间或不同轻链之间的对应残基被分配相同的编号。

[0166] 尽管本公开涉及根据这些编号系统中的任一编号系统所定义的CDR,但优选的实施方案涉及Chothia和Kabat组合定义的CDR。

[0167] 表5.用于抗体的CDR的定义方法(参见http://bioinf.org.uk/abs/)

[0168]

	Kabat	Chothia	组合
LCDR1	L24--L34	L24--L34	L24-L34
LCDR2	L50--L56	L50--L56	L50-L56
LCDR3	L89--L97	L89--L97	L89-L97
HCDR1	H31--H35	H26--H32	H26-H35
HCDR2	H50--H65	H52--H56	H50-H65
HCDR3	H95--H102	H95--H102	H95-H102

[0169] 在表5中,Laa-Lbb可指从抗体轻链的N末端开始的从位置aa(根据Chothia编号系统)至位置bb(根据Chothia编号系统)的氨基酸序列;Haa-Hbb可指从抗体重链的N末端开始的从位置aa(根据Chothia编号系统)至位置bb(根据Chothia编号系统)的氨基酸序列。例如,L24-L34可指从抗体轻链的N末端开始的从位置24至位置34(根据Chothia编号系统)的氨基酸序列;H26-H32可指从抗体重链的N末端开始的从位置26至位置32(根据Chothia编号系统)的氨基酸序列。

[0170] 如本文所用,术语“抗体”应以其最广泛的含义理解,并且包括单克隆抗体(包括全

长单克隆抗体)、多克隆抗体、抗体片段和含有至少两个不同抗原结合区的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。抗体可含有另外的修饰,诸如非天然存在的氨基酸、Fc区中的突变以及糖基化位点中的突变。抗体还包括翻译后修饰的抗体、含有抗体的抗原决定簇的融合蛋白以及含有对抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子,只要这些抗体表现出所需的生物活性。

[0171] 如本文所用,抗体的术语"抗原结合片段"是指抗体的一个或多个片段,其保留特异性结合抗原(例如,MSLN)的能力。研究表明抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段来实现。

[0172] 涵盖在抗体的术语"抗原结合部分"内的抗原结合片段的示例包括(i)Fab片段,即由VL结构域、VH结构域、CL结构域和CH1结构域组成的单价片段;(ii)F(ab')2片段,即包括在铰链区处由二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)Fab'片段,其本质上是具有铰链区的一部分的Fab(参见FUNDAMENTALIMMUNOLOGY(Paul编撰,补充版本3,1993年));(iv)由VH结构域和CH1结构域组成的Fd片段;(v)具有VH结构域和CH1结构域以及位于CH1结构域的C末端的一个或多个半胱氨酸残基的Fd'片段;(vi)由抗体单臂的VL结构域和VH结构域组成的Fv片段;(vii)dAb片段(Ward等人,Nature(1989年),第341卷:第544-546页),其由VH结构域组成;(viii)分离的互补性决定区(CDR);和(ix)纳米抗体,即包含单个可变结构域和两个恒定结构域的重链可变区。此外,尽管Fv片段的两个结构域(VL和VH)由单独的基因编码,但仍可使用重组方法通过合成接头来连接这些结构域,使得这些结构域能够被制成单条蛋白质链,其中VL区和VH区配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird等人(1988年),Science,第242卷:第423-426页;和Huston等人(1988年),Proc.Natl.Acad.Sci.USA,第85卷:第5879-5883页)。此类单链抗体也旨在被涵盖在抗体的术语"抗原结合片段"内。此外,该术语还包括"线性抗体",该线性抗体包含一对串联Fd区段(VH-CH1-VH-CH1)以及前述片段中的任一片段的修饰形式,这一对串联Fd区段与互补轻链多肽一起形成抗原结合区,这些片段的修饰形式保留抗原结合活性。

[0173] 这些抗原结合片段可使用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且以与完整抗体相同的方式来筛选片段的用途。

[0174] 如本文所用,术语"结合"或"特异性结合"是指两个分子之间的非随机结合反应,诸如抗体与其靶抗原之间的非随机结合反应。抗体的结合特异性可基于亲和力和/或亲合力来确定。由抗原与抗体解离的平衡常数(KD)表示的亲和力是抗原决定簇(表位)与抗体上的抗原结合位点之间的结合强度的量度:KD值越小,抗原决定簇(表位)与抗体之间的结合强度越强。另选地,亲和力还可表示为亲和常数(KA),其为1/KD。

[0175] 亲合力是抗体与相关抗原之间的结合强度的量度。亲合力与抗原决定簇(表位)和其在抗体上的抗原结合位点之间的亲和力以及抗体上存在的相关结合位点的数目两者有关。通常,抗体将以10^{-5}M至10^{-12}M或以下,并且优选10^{-7}M至10^{-12}M或以下,并且更优选10^{-8}M至10^{-12}M的解离常数(KD),以及/或者以至少$10^{7}M^{-1}$、优选至少$10^{8}M^{-1}$、更优选至少$10^{9}M^{-1}$(诸如至少$10^{12}M^{-1}$)的结合亲和力结合。任何K_D值大于10^{-4}M通常都被认为是指示非特异性结合。抗体与抗原或抗原决定簇的特异性结合可以本身已知的任何合适的方式测定,包括例如Scatchard分析和/或竞争性结合测定,诸如放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定(EIA)、生物膜干涉技术(BLI)测定和夹心竞争测定,以及本领域本身已知的这些方法的不同变型。

[0176] 术语“表位”是指抗原上与抗体结合的位点。表位可由连续氨基酸形成,或者通过一个或多个蛋白的三级折叠而并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位(也称为线性表位)通常在暴露于变性溶剂时保留,而由三级折叠形成的表位(也称为构象表位)通常在用变性溶剂处理时丧失。表位通常包括至少3个,更通常至少5个或者8至10个呈独特空间构象的氨基酸。表位限定了抗体的最小结合位点,因此是抗体或其抗原结合片段的特异性靶标。

[0177] 如本文所用,术语“序列同一性”是指两个序列(氨基酸)在比对中的相同位置处具有相同残基的程度。例如,“氨基酸序列与SEQ ID NO:Y具有X%相同”是指该氨基酸序列与SEQ ID NO:Y的%同一性,并且被详细描述为该氨基酸序列中X%的残基与SEQ ID NO:Y中公开的序列的残基相同。通常,采用计算机程序进行此类计算。比较和比对序列对的示例性程序包括ALIGN(Myers和Miller,1988年)、FASTA(Pearson和Lipman,1988年;Pearson,1990年)和gapped BLAST(Altschul等人,1997年)、BLASTP、BLASTN或GCG(Devereux等人,1984年)。

[0178] 此外,在确定两个氨基酸序列之间的序列同一性程度时,技术人员可以考虑所谓的“保守”氨基酸取代,其通常可被描述为其中氨基酸残基被具有相似化学结构的另一氨基酸残基取代并且对多肽的功能、活性或其他生物学特性具有很少或基本上没有影响的氨基酸取代。此类保守氨基酸取代是本领域公知的,例如根据WO 04/037999、GB-A-2 357768、WO 98/49185、WO 00/46383和WO 01/09300;并且(优选的)类型和/或此类取代的组合可基于WO 04/037999以及WO 98/49185和其中引用的其他参考文献的相关教导内容来选择。

[0179] 此类保守取代优选的是以下基团(a)至(e)中的一个氨基酸被同一基团中的另一个氨基酸残基取代的取代:(a)小的脂族、非极性或轻微极性残基:Ala、Ser、Thr、Pro和Gly;(b)极性、带负电荷的残基以及它们的(不带电荷的)酰胺:Asp、Asn、Glu和Gln;(c)极性、带正电荷的残基:His、Arg和Lys;(d)大的脂族、非极性残基:Met、Leu、He、Val和Cys;和(e)芳族残基:Phe、Tyr和Trp。

[0180] 特别优选的保守取代如下:Ala转变为Gly或Ser;Arg转变为Lys;Asn转变为Gln或His;Asp转变为Glu;Cys转变为Ser;Gln转变为Asn;Glu转变为Asp;Gly转变为Ala或Pro;His转变为Asn或Gln;Ile转变为Leu或Val;Leu转变为Ile或Val;Lys转变为Arg、Gln或Glu;Met转变为Leu、Tyr或Ile;Phe转变为Met、Leu或Tyr;Ser转变为Thr;Thr转变为Ser;Trp转变为Tyr;Tyr转变为Trp;以及/或者Phe转变为Val、Ile或Leu。

[0181] 应用于本文所述的多肽的任何氨基酸取代还可基于以下分析:Schulz等人,Principles of Protein Structure,Springer-Verlag,1978年开发的不同物种的同源蛋白质之间氨基酸变异频率的分析;Chou和Fasman,Biochemistry,第13卷:第211页,1974年和Adv.Enzymol.,第47卷:第45-149页,1978年开发的结构形成电位的分析;以及Eisenberg等人,Proc.Nat.Acad Sci.USA,第81卷:第140-144页,1984年;Kyte和Doolittle,J Mol.Biol.,第157卷:第105-132页,198 1年;和Goldman等人,Ann.Rev.Biophys.Chem.,第15卷:第321-353页,1986年开发的蛋白质疏水性模式的分析,这些文献全文以引用方式并入本文。

[0182] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指从基本上同源的抗体群体获得的抗体。即,构成群体的每种抗体是相同的,除了少量可能天然存在的突变。单克隆抗体是高度特异性的,

并且针对的是单一抗原。术语“单克隆抗体”在本文中不限于通过杂交瘤技术产生的抗体，并且不应理解为需要通过任何特定方法来产生抗体。

[0183] 术语“双特异性抗体”在本发明的上下文中应理解为具有由不同抗体序列限定的两个不同抗原结合区的抗体。这可理解为不同的靶结合，但也包括与一个靶中的不同表位的结合。

[0184] 如本文所用，术语“肿瘤相关抗原”是指与正常细胞相比在癌细胞中差异表达的抗原，因此可用于靶向癌细胞。

[0185] 如本文所用，术语“载体”意指能够转运已经与其连接的另一个核酸的核酸分子。

[0186] 如本文所用，术语“宿主细胞”是指已经引入表达载体的细胞。

[0187] 术语“药学上可接受的”是指载体或佐剂与组合物的其他成分相容并且基本上对其接受者无害，并且/或者此类载体或佐剂被批准或可批准包含在用于对人肠胃外施用的药物组合物中。

[0188] 如本文所用，术语“治疗”(treatment/treating)等是指为了获得效果而施用药剂或执行程序。该效果可以是完全或部分预防疾病或其症状的预防性效果，并且/或者可以是部分或完全治愈疾病和/或疾病症状的治疗性效果。如本文所用，“治疗”可包括治疗哺乳动物，特别是人的疾病或障碍(例如，癌症)，并且包括：(a)预防受试者的疾病或疾病症状发生，该受试者可能易患该疾病但尚未被诊断为患有该疾病(例如，包括可能与原发性疾病相关或由原发性疾病导致的疾病)；(b)抑制该疾病，即阻止该疾病发展；以及(c)缓解该疾病，即导致该疾病的消退。治疗可以指癌症的治疗或改善或预防中的任何成功标记，包括任何客观或主观参数，诸如减轻；缓解；减少症状或使患者更耐受疾病病症；减缓退化或衰退的速率；或使退化的终点不那么衰弱。症状的治疗或改善基于一个或多个客观或主观参数；包括医生检查的结果。因此，术语“治疗”包括施用本文所公开的抗体或组合物或缀合物以预防或延迟、减轻或阻止或抑制与疾病(例如，癌症)相关的症状或病症的发展。术语“治疗效果”是指减少、消除或预防受试者的疾病、疾病症状，或疾病的副作用。

[0189] 如本文所用，术语“有效量”是指当施用于受试者以治疗疾病时，足以实现对该疾病的治疗的量。

[0190] 如本文所用，术语“受试者”是指需要诊断、治疗或疗法的任何哺乳动物受试者。用于治疗目的“哺乳动物”是指归类为哺乳动物的任何动物，包括人、家畜和农场动物，以及实验室动物、动物园动物、运动动物或宠物动物，诸如狗、马、猫、牛、绵羊、山羊、猪、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、猴等。

[0191] 术语“食蟹猴”(cyno/cynomolgus/Cynomolgus macaques)在本文中可互换使用，并且是指食蟹猴MSLN。该术语包括任何MSLN变体、同种型和物种同系物，它们由食蟹猴细胞天然表达，或者在用编码食蟹猴MSLN的基因或cDNA转染的细胞上表达，该食蟹猴MSLN在食蟹猴细胞上天然表达。

[0192] 抗MSLN抗体

[0193] 本发明提供了抗间皮素抗体。

[0194] 在第一方面，本发明提供了一种特异性结合间皮素的抗体或其抗原结合片段，其中该抗体包含轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)，并且其中

[0195] (1)VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3，并且VL包含具有

SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0196] (2)VH包含具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:28所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0197] (3)VH包含具有SEQ ID NO:26所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0198] (4)VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:29所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0199] (5)VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0200] (6)VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0201] (7)VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:32所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0202] (8)VH包含具有SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:33所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0203] (9)VH包含具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:29所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0204] (10)VH包含具有SEQ ID NO:63所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:67所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0205] (11)VH包含具有SEQ ID NO:64所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:67所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0206] (12)VH包含具有SEQ ID NO:65所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:67所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0207] (13)VH包含具有SEQ ID NO:65所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:68所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0208] (14)VH包含具有SEQ ID NO:63所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:68所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0209] (15)VH包含具有SEQ ID NO:66所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:67所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0210] (16)VH包含具有SEQ ID NO:64所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:69所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0211] (17)VH包含具有SEQ ID NO:66所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:69所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;

[0212] (18)VH包含具有SEQ ID NO:63所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:69所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3;或者

[0213] (19)VH包含具有SEQ ID NO:65所示氨基酸序列的VH的HCDR 1-3,并且VL包含具有SEQ ID NO:69所示氨基酸序列的VL的LCDR 1-3。

[0214] 在一些实施方案中,LCDR 1-3和HCDR 1-3由EU Kabat定义/编号系统定义。在一些实施方案中,LCDR 1-3和HCDR 1-3由Chothia定义/编号系统定义。在一些实施方案中,LCDR

1-3和HCDR 1-3由AbM定义/编号系统定义。在一些优选的实施方案中,LCDR 1-3和HCDR 1-3由Kabat和Chothia组合编号系统定义。

[0215] 在一些实施方案中,本发明提供了一种特异性结合间皮素的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体包含轻链可变区(VL)和重链可变区(VH),并且其中

[0216] (1)VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、13所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0217] (2)VH包含分别包含SEQ ID NO:15、16、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、18所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0218] (3)VH包含分别包含SEQ ID NO:15、17、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、13所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0219] (4)VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、19所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0220] (5)VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、20所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0221] (6)VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、21所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0222] (7)VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、22所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0223] (8)VH包含分别包含SEQ ID NO:2、4、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、23所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0224] (9)VH包含分别包含SEQ ID NO:15、16、6所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:9、11、19所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0225] (10)VH包含分别包含SEQ ID NO:45、47、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:52、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0226] (11)VH包含分别包含SEQ ID NO:58、47、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:52、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0227] (12)VH包含分别包含SEQ ID NO:58、59、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:52、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0228] (13)VH包含分别包含SEQ ID NO:58、59、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:61、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0229] (14)VH包含分别包含SEQ ID NO:45、47、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:61、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0230] (15)VH包含分别包含SEQ ID NO:58、60、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:52、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0231] (16)VH包含分别包含SEQ ID NO:58、47、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:62、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0232] (17)VH包含分别包含SEQ ID NO:58、60、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:62、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;

[0233] (18)VH包含分别包含SEQ ID NO:45、47、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包

含分别包含SEQ ID NO:62、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3;或者

[0234] (19)VH包含分别包含SEQ ID NO:58、59、49所示氨基酸序列的HCDR 1-3,并且VL包含分别包含SEQ ID NO:62、54、56所示氨基酸序列的LCDR 1-3。

[0235] 在一些实施方案中,通过Kabat Chothia组合系统定义CDRs。

[0236] 在一些实施方案中,本发明提供了一种特异性结合间皮素的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体包含轻链可变区(VL)和重链可变区(VH),并且其中

[0237] (1)VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:27具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0238] (2)VH包含与SEQ ID NO:25具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:28具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0239] (3)VH包含与SEQ ID NO:26具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:27具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0240] (4)VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:29具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0241] (5)VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:30具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0242] (6)VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:31具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0243] (7)VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:32具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0244] (8)VH包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:33具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0245] (9)VH包含与SEQ ID NO:25具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少

98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:29具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0246] (10)VH包含与SEQ ID NO:63具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:67具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0247] (11)VH包含与SEQ ID NO:64具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:67具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0248] (12)VH包含与SEQ ID NO:65具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:67具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0249] (13)VH包含与SEQ ID NO:65具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:68具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0250] (14)VH包含与SEQ ID NO:63具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:68具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0251] (15)VH包含与SEQ ID NO:66具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:67具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0252] (16)VH包含与SEQ ID NO:64具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:69具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0253] (17)VH包含与SEQ ID NO:66具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:69具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0254] (18)VH包含与SEQ ID NO:63具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:69具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;或者

[0255] (19)VH包含与SEQ ID NO:65具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且VL包含与SEQ ID NO:69具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列。

[0256] 在一些实施方案中,VL包含如SEQ ID NO:27至33和67至69中的任一者所示氨基酸序列的功能变体,该功能变体通过一个或多个氨基酸在其中的插入、缺失和/或取代而形成,条件是包含该功能变体的VL的抗体保留结合MSLN的能力。在一些实施方案中,VH包含如SEQ ID NO:24至26和63至66中的任一者所示氨基酸序列的功能变体,该功能变体通过一个或多个氨基酸在其中的插入、缺失和/或取代而形成,条件是包含该功能变体的VH的抗体保留结合MSLN的能力。

[0257] 该功能变体包含与亲本多肽的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.1％、至少99.2％、至少99.3％、至少99.4％、至少99.5％、至少99.6％、至少99.7％、至少99.8％或至少99.9％序列同一性的氨基酸序列或由其组成。例如,SEQ ID NO:27至33以及67至69中的任一者的功能变体包含分别与SEQ ID NO:27至33以及67至69中的任一者具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.1％、至少99.2％、至少99.3％、至少99.4％、至少99.5％、至少99.6％、至少99.7％、至少99.8％或至少99.9％序列同一性的氨基酸序列或由其组成。例如,SEQ ID NO:24至26和63至66中的任一者的功能变体包含与SEQ ID NO:24至26和63至66中的任一者具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.1％、至少99.2％、至少99.3％、至少99.4％、至少99.5％、至少99.6％、至少99.7％、至少99.8％或至少99.9％序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0258] 在一些实施方案中,SEQ ID NO:27至33和67至69中的任一者的功能变体包含与SEQ ID NO:27至33和67至69中的任一者具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.1％、至少99.2％、至少99.3％、至少99.4％、至少99.5％、至少99.6％、至少99.7％、至少99.8％或至少99.9％序列同一性的氨基酸序列或由其组成,并且通过一个或多个氨基酸在SEQ ID NO:27至33和67至69中的任一者中的插入、缺失和/或取代而形成。在一些实施方案中,SEQ ID NO:24至26和63至66中的任一者的功能变体包含与SEQ ID NO:24至26和63至66中的任一者具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.1％、至少99.2％、至少99.3％、至少99.4％、至少99.5％、至少99.6％、至少99.7％、至少99.8％或至少99.9％序列同一性的氨基酸序列或由其组成,并且通过一个或多个氨基酸在SEQ ID NO:24至26和63至66中的任一者中的插入、缺失和/或取代而形成。

[0259] 在功能变体的情况下,插入、缺失和/或取代的氨基酸的数目优选不超过亲本氨基酸序列中氨基酸总数的40％,更优选不超过35％,更优选为1％至33％,并且更优选为5％至30％,更优选为10％至25％,更优选为15％至20％。例如,插入、缺失和/或取代的氨基酸的数目可以为1至20,优选为1至10,更优选为1至7,还更优选为1至5,最优选为1至2。在一个优选的实施方案中,插入、缺失和/或取代的氨基酸的数目为1、2、3、4、5、6或7。

[0260] 在一些实施方案中,插入、缺失和/或取代可在框架(FR)区处进行,例如在FR1、

FR2、FR3和/或FR4处进行。

[0261] 在一些实施方案中,一个或多个氨基酸的取代可以是一个或多个氨基酸的保守取代。此类保守取代优选的是以下基团(a)至(e)中的一个氨基酸被同一基团中的另一个氨基酸残基取代的取代:(a)小的脂族、非极性或轻微极性残基:Ala、Ser、Thr、Pro和Gly;(b)极性、带负电荷的残基以及它们的(不带电荷的)酰胺:Asp、Asn、Glu和Gln;(c)极性、带正电荷的残基:His、Arg和Lys;(d)大的脂族、非极性残基:Met、Leu、He、Val和Cys;和(e)芳族残基:Phe、Tyr和Trp。

[0262] 特别优选的保守取代如下:Ala转变为Gly或Ser;Arg转变为Lys;Asn转变为Gln或His;Asp转变为Glu;Cys转变为Ser;Gln转变为Asn;Glu转变为Asp;Gly转变为Ala或Pro;His转变为Asn或Gln;Ile转变为Leu或Val;Leu转变为Ile或Val;Lys转变为Arg、Gln或Glu;Met转变为Leu、Tyr或Ile;Phe转变为Met、Leu或Tyr;Ser转变为Thr;Thr转变为Ser;Trp转变为Tyr;Tyr转变为Trp;以及/或者Phe转变为Val、Ile或Leu。

[0263] 在一个优选的实施方案中,VL包含如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:66所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:66所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列;或者VL包含如SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列,并且VH包含如SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列。

[0264] 基于抗体的重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白分子可分为五类(同种型):IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且可进一步分为不同的亚型,诸如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2等。基于轻链的氨基酸序列,抗体的轻链可以分类为lambda(λ)链或kappa(κ)链。本文所公开的抗体可以是上述任何类型或亚型。

[0265] 在一些实施方案中,抗体可以是选自IgG、IgA、IgM、IgE和IgD的同种型。在一些实施方案中,抗体可以是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的亚型。在一个优选的实施方案中,抗体

是IgG1抗体。

[0266] 本文所公开的抗体可以是完整抗体或其抗原结合片段。抗原结合片段可以是保留特异性结合MSLN能力的抗体的任何片段。抗原结合片段的示例包括但不限于Fab片段;F(ab')2片段;Fab'片段;Fd片段;Fd'片段;Fv片段;scFv片段;dAb片段;分离的互补性决定区(CDR);纳米抗体;线性抗体,其包含一对串联Fd区段(VH-CH1-VH-CH1)和前述片段中的任一片段的修饰形式,这些片段的修饰形式保留抗原结合活性。

[0267] 在一些实施方案中,抗原结合片段可选自Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv、scFv和ds-scFv。在一个优选的实施方案中,抗原结合片段是Fab或scFv。

[0268] 在一些实施方案中,本发明提供了一种特异性结合间皮素的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体包含重链(HC)和轻链(LC),并且其中:

[0269] (1)HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:37具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0270] (2)HC包含与SEQ ID NO:35具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:38具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0271] (3)HC包含与SEQ ID NO:36具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:37具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0272] (4)HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:39具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0273] (5)HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:40具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0274] (6)HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:41具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0275] (7)HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:42具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列;

[0276] (8)HC包含与SEQ ID NO:34具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少

98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:43具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0277] (9)HC包含与SEQ ID NO:35具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:39具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0278] (10)HC包含与SEQ ID NO:70具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:74具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0279] (11)HC包含与SEQ ID NO:71具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:74具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0280] (12)HC包含与SEQ ID NO:72具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:74具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0281] (13)HC包含与SEQ ID NO:72具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:75具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0282] (14)HC包含与SEQ ID NO:70具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:75具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0283] (15)HC包含与SEQ ID NO:73具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:74具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0284] (16)HC包含与SEQ ID NO:71具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:76具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0285] (17)HC包含与SEQ ID NO:73具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:76具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;

[0286] (18)HC包含与SEQ ID NO:70具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:76具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列;或者

[0287] (19)HC包含与SEQ ID NO:72具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列,并且LC包含与SEQ ID NO:76具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列。

[0288] 在一些实施方案中,轻链包含如SEQ ID NO:37至43和74至76中的任一者所示氨基酸序列的功能变体,该功能变体通过一个或多个氨基酸在其中的插入、缺失和/或取代而形成,条件是包含该功能变体的轻链的抗体保留结合MSLN的能力。在一些实施方案中,重链包含如SEQ ID NO:34至36和70至73中的任一者所示氨基酸序列的功能变体,该功能变体通过一个或多个氨基酸在其中的插入、缺失和/或取代而形成,条件是包含该功能变体的重链的抗体保留结合MSLN的能力。

[0289] 例如,SEQ ID NO:37至43以及74至76中的任一者的功能变体包含分别与SEQ ID NO:37至43以及74至76中的任一者具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.1％、至少99.2％、至少99.3％、至少99.4％、至少99.5％、至少99.6％、至少99.7％、至少99.8％或至少99.9％序列同一性的氨基酸序列或由其组成。例如,SEQ ID NO:34至36和70至73中的任一者的功能变体包含分别与SEQ ID NO:34至36和70至73中的任一者具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.1％、至少99.2％、至少99.3％、至少99.4％、至少99.5％、至少99.6％、至少99.7％、至少99.8％或至少99.9％序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0290] 在一些实施方案中,插入、缺失和/或取代的氨基酸的数目优选不超过亲本氨基酸序列中氨基酸总数的40％,更优选不超过35％,更优选为1％至33％,并且更优选为5％至30％,更优选为10％至25％,更优选为15％至20％。例如,插入、缺失和/或取代的氨基酸的数目可以为1至50,优选为1至20,更优选为1至10,还更优选为1至5。在一个优选的实施方案中,插入、缺失和/或取代的氨基酸的数目为1、2、3、4、5、6或7。

[0291] 在一些实施方案中,插入、缺失和/或取代可在框架(FR)区处进行,例如在FR1、FR2、FR3和/或FR4处进行;以及/或者在恒定区处进行,例如在CL、CH1、CH2和/或CH3处进行。

[0292] 在一些实施方案中,一个或多个氨基酸的取代可以是一个或多个氨基酸的保守取代。保守取代的示例如上所述。

[0293] 在一个优选的实施方案中,轻链包含如SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:34所示的氨基

酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列;或者轻链包含如SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列,并且重链包含如SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列。

[0294] 在一些实施方案中,抗体包含Fc区。在一些实施方案中,Fc区可以是任何同种型,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,并且可包含一个或多个突变或修饰。在一个实施方案中,Fc区是IgG1同种型或由其衍生,任选地具有一个或多个突变或修饰。在一个实施方案中,Fc区是人IgG1 Fc。

[0295] 在一个实施方案中,Fc区是效应子功能缺陷型。例如,Fc区可以是IgG1同种型,或非IgG1型,例如IgG2、IgG3或IgG4,其已经突变,使得介导效应子功能诸如ADCC的能力已经降低或甚至消除。此类突变已在例如Dall'Acqua WF等人,J Immunol.第177卷第2期:第1129-1138页(2006年)和Hezareh M,J Virol.,第75卷第24期:第12161-12168页(2001年)中进行了描述。在一些实施方案中,抗体的Fc区包含具有L234A、L235A和G237A突变的野生型IgG1 Fc。

[0296] 在一些实施方案中,抗体在一个或多个翻译后修饰位点处突变。在一个实施方案中,Fc区包含去除Asn连接的糖基化的受体位点的突变,或者对Fc区进行操作以消除抗体的效应子功能。

[0297] 在哺乳动物细胞中表达的蛋白质中广泛地观察到翻译后修饰(PTM)。除了抗体中的保守PTM位点例如IgG1抗体CH2结构域上的保守N-糖基化位点之外,抗体的抗原结合位点内出现的其他PTM位点(即,CDR区)也可降低抗原结合活性或降低化学稳定性。例如,脱酰胺或异构化可能使分子不稳定和异质。为了降低序列易感性,可以通过突变去除PTM基序。扫描VH序列或VL序列,观察PTM基序例如异构化基序(例如,DG)的存在。然后使"热点"残基(例如,DG基序中的D或G)突变为种系序列中的对应残基或具有相似生物物理特性的其他残基。

[0298] 双特异性抗体

[0299] 在第二方面,本申请提供了一种双特异性或多特异性抗体。在一些实施方案中,抗体是双特异性抗体,其还包含结合第二抗原的第二抗原结合区。在一些实施方案中,第二抗原可以是肿瘤相关抗原、免疫检查点分子或免疫细胞抗原。

[0300] 本领域已经鉴定了许多与特定癌症相关的肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,肿

瘤相关抗原是能够潜在地刺激明显的肿瘤特异性免疫应答的抗原。这些抗原中的一些抗原由正常细胞编码,但不一定由正常细胞表达。这些抗原可表征为在正常细胞中通常沉默(即不表达)的那些,仅在分化的某些阶段表达的那些,以及随时间推移表达的那些,诸如胚胎抗原和胎儿抗原。其他肿瘤抗原由突变细胞基因编码,诸如致癌基因(例如,激活的ras致癌基因)、抑制基因(例如,突变体p53)以及通过内部缺失或染色体易位产生的融合蛋白。其他肿瘤抗原可由病毒基因编码,诸如RNA肿瘤病毒和DNA肿瘤病毒携带的那些。许多其他肿瘤相关抗原和针对它们的抗体是已知的和/或商业可得的,并且还可由本领域技术人员生产。

[0301] 肿瘤相关抗原的示例包括但不限于5T4、甲胎蛋白、CA-125、癌胚抗原、CD19、CD20、CD22、CD23、CD30、CD33、CD40、CD56、CD79、CD78、CD123、CD138、c-Met、CSPG4、IgM、C型凝集素样分子1(CLL-1)、EGFR、EGFRvIII、上皮肿瘤抗原、ERBB2、FLT3、叶酸结合蛋白、GD2、GD3、HIV-1包膜糖蛋白gp41、HIV-1包膜糖蛋白gp120、黑色素瘤相关抗原、CD200R1、MUC-1、突变p53、突变Ras、ROR1、VEGFR2,以及它们的组合。

[0302] 在一些实施方案中,第二抗原是T细胞抗原。在一些实施方案中,T细胞抗原可选自T细胞受体(TCR)、CD3、CD4、CD8、CD16、CD25、CD28、CD44、CD62L、CD69、ICOS、41-BB(CD137)和NKG2D,或它们的任意组合。

[0303] 在一些实施方案中,第二抗原是免疫检查点分子。在一些实施方案中,免疫检查点分子可选自PD-1、PD-L1、CTLA-4等。

[0304] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含单多肽链,该单多肽链包含第一抗原结合区和第二抗原结合区,以及任选地Fc区。

[0305] Fc区可以是任何同种型,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,并且可以包含一个或多个突变或修饰。在一个实施方案中,Fc区是IgG1同种型或由其衍生,任选地具有一个或多个突变或修饰。在一个实施方案中,Fc区是人IgG1 Fc。

[0306] 在一个实施方案中,Fc区是效应子功能缺陷型。例如,Fc区可以是IgG1同种型,或非IgG1型,例如IgG2、IgG3或IgG4,其已经突变,使得介导效应子功能诸如ADCC的能力已经降低或甚至消除。此类突变已在例如Dall'Acqua WF等人,J Immunol.第177卷第2期:第1129-1138页(2006年)和Hezareh M,J Virol.,第75卷第24期:第12161-12168页(2001年)中进行了描述。

[0307] 在一个实施方案中,Fc区包含去除Asn连接的糖基化的受体位点的突变,或者对Fc区进行其他操作以改变糖基化特性。例如,在IgG1 Fc区中,可使用N297Q突变除去Asn连接的糖基化位点。因此,在一个具体实施方案中,Fc区包含具有N297Q突变的IgG1野生型序列。例如,在IgG1 Fc区中,可使用N297Q突变除去Asn连接的糖基化位点。因此,在一个具体实施方案中,Fc区包含具有N297Q突变的IgG1野生型序列。

[0308] 在另一个实施方案中,Fc区被糖工程化以减少岩藻糖,因此增强ADCC,例如,通过在抗体产生过程中向培养基中添加化合物,如US2009317869中所述或如van Berkel等人(2010年),Biotechnol.Bioeng.,第105卷:第350页中所述,或者通过使用FUT8敲除细胞,例如,如Yamane-Ohnuki等人(2004年),Biotechnol.Bioeng,第87卷:第614页中所述。ADCC可另选地使用Umaña等人(1999年),Nature Biotech,第17卷:第176页所述的方法来优化。在另一个实施方案中,Fc区已被工程化以增强补体激活,例如,如Natsume等人(2009年),Cancer Sci.,第100卷:第2411页中所述。

[0309] 核酸

[0310] 在第三方面,本发明提供了一种核酸,该核酸包含编码本文所公开的抗MSLN抗体或其抗原结合片段或者本文所公开的双特异性抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。

[0311] 术语“多核苷酸”或“核酸”包括单链核苷酸聚合物和双链核苷酸聚合物两者。包含核酸的核苷酸可以是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或任一类型核苷酸的修饰形式。所述修饰包括碱基修饰(诸如溴尿苷和肌苷衍生物)、核糖修饰(诸如2',3'-二脱氧核糖)和核苷酸间连接修饰(诸如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺基硫代磷酸酯(phosphoroanilothioate)、苯胺基磷酸酯(phoshoraniladate)和氨基磷酸酯。

[0312] 例如,本发明提供了编码本文所公开的重链可变区序列中的任一重链可变区序列的核酸分子。本发明还提供了与编码本文所公开的重链可变区序列中的任一重链可变区序列的核酸具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的核酸分子。

[0313] 例如,本发明提供了编码本文所公开的轻链可变区序列中的任一轻链可变区序列的核酸分子。本发明还提供了与编码本文所公开的轻链可变区序列中的任一轻链可变区序列的核酸具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的核酸分子。

[0314] 例如,本发明提供了编码以下项的核酸分子:(i)本文所公开的重链可变区序列中的任一重链可变区序列;和(ii)本文所公开的轻链可变区序列中的任一轻链可变区序列。本发明还提供了与编码以下项的核酸具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的核酸分子:(i)本文所公开的重链可变区序列中的任一重链可变区序列;和(ii)本文所公开的轻链可变区序列中的任一轻链可变区序列。

[0315] 例如,本发明提供了编码重链可变区序列的核酸分子,该重链可变区序列包含本文所公开的重链可变区序列中的任一重链可变区序列的CDR序列。

[0316] 在一些实施方案中,本发明提供了编码重链可变区序列的核酸分子,该重链可变区序列包含本文所公开的三个CDR序列的组中的任一组。

[0317] 本发明还提供了编码重链可变区序列的核酸分子,该重链可变区序列包含与本文所公开的重链可变区序列中的任一重链可变区序列的CDR序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的CDR序列。

[0318] 在一些实施方案中,本发明提供了编码重链可变区序列的核酸分子,该重链可变区序列包含分别与本文所公开的三个CDR序列的组中的任一组的CDR1、CDR2和CDR3具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的CDR1序列、CDR2序列和CDR3序列。

[0319] 例如,本发明提供了编码轻链可变区序列的核酸分子,该轻链可变区序列包含本文所公开的轻链可变区序列中的任一轻链可变区序列的CDR序列。

[0320] 在一些实施方案中,本发明提供了编码轻链可变区序列的核酸分子,该轻链可变区序列包含本文所公开的三个CDR序列的组中的任一组。

[0321] 本发明还提供了编码轻链可变区序列的核酸分子,该轻链可变区序列包含与本文所公开的轻链可变区序列中的任一轻链可变区序列的CDR序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的CDR序列。

[0322] 在一些实施方案中,本发明提供了编码轻链可变区序列的核酸分子,该轻链可变区序列包含分别与本文所公开的三个CDR序列的组中的任一组的CDR1、CDR2和CDR3具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的CDR1序列、CDR2序列和CDR3序列。

[0323] 例如,本发明提供了编码以下项的核酸分子:(i)重链可变区序列,其包含本文所公开的重链可变区序列中的任一重链可变区序列的CDR序列;和(ii)轻链可变区序列,其包含本文所公开的轻链可变区序列中的任一轻链可变区序列的CDR序列。在一些实施方案中,本发明提供了编码以下项的核酸分子:(i)重链可变区序列,其包含本文所公开的三个CDR序列的组中的任一组;和(ii)轻链可变区序列,其包含本文所公开的三个CDR序列的组中的任一组。本发明还提供了编码以下项的核酸分子:(i)重链可变区序列,其包含与本文所公开的重链可变区序列中的任一重链可变区序列的CDR序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的CDR序列;和(ii)轻链可变区序列,其包含与本文所公开的轻链可变区序列中的任一轻链可变区序列的CDR序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的CDR序列。在一些实施方案中,本发明提供了编码以下项的核酸分子:(i)重链可变区序列,其包含分别与本文所公开的三个CDR序列的组中的任一组的CDR1、CDR2和CDR3具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的CDR1序列、CDR2序列和CDR3序列;和(ii)轻链可变区序列,其包含分别与本文所公开的三个CDR序列的组中的任一组的CDR1、CDR2和CDR3具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的CDR1序列、CDR2序列和CDR3序列。

[0324] 在一些实施方案中,核酸是核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)。在一些实施方案中,本发明提供了一种核糖核酸(RNA),该核糖核酸包含编码本文所公开的抗MSLN抗体或其抗原结合片段或者本文所公开的双特异性抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。在一些实施方案中,本发明提供了一种脱氧核糖核酸(DNA),该脱氧核糖核酸包含编码本文所公开的抗MSLN抗体或其抗原结合片段或者本文所公开的双特异性抗体或其抗原结合片段的脱氧核苷酸序列。

[0325] 因此,包含编码本文所公开的抗MSLN抗体或其抗原结合片段或者本文所公开的双特异性抗体或其抗原结合片段的脱氧核苷酸序列的脱氧核糖核酸(DNA)用于治疗疾病。在一些实施方案中,该疾病是癌症。在一些实施方案中,癌症选自间皮瘤、前列腺癌、肺癌、胃癌、鳞状细胞癌、胰腺癌、胆管癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)和卵巢癌。

[0326] 在一些实施方案中,脱氧核糖核酸(DNA)可在体内引入人体细胞中。在一些实施方案中,本发明的脱氧核糖核酸(DNA)包含在载体或递送剂中。在一些实施方案中,本发明的脱氧核糖核酸(DNA)被整合到细胞的基因组中。

[0327] 因此,包含编码本文所公开的抗MSLN抗体或其抗原结合片段或者本文所公开的双特异性抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列的核糖核酸(RNA)可用于治疗疾病。在一些实施方案中,该疾病是癌症。在一些实施方案中,癌症选自间皮瘤、前列腺癌、肺癌、胃癌、鳞状细胞癌、胰腺癌、胆管癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)和卵巢癌。

[0328] 在一些实施方案中,核糖核酸(RNA)可在体内引入人体细胞中。在一些实施方案中,本发明的核糖核酸(RNA)包含在载体或递送剂中。

[0329] 在一些具体实施方案中,包含编码本文所公开的抗MSLN抗体或其抗原结合片段或者本文所公开的双特异性抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列的核糖核酸(RNA)是mRNA。在一些实施方案中,本发明的mRNA包含在载体或递送系统(诸如脂质体)中。在一些实施方案中,mRNA可在体内通过载体或递送系统(诸如脂质体)引入人体细胞中,并在体内表达本发明的MLSN抗体。

[0330] 本发明的mRNA可用于治疗疾病。在一些实施方案中,该疾病是癌症。在一些实施方案中,癌症选自间皮瘤、前列腺癌、肺癌、胃癌、鳞状细胞癌、胰腺癌、胆管癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)和卵巢癌。

[0331] 载体

[0332] 在第四方面,本发明还提供了一种包含核酸的载体,该核酸包含编码本文所公开的抗MSLN抗体或其抗原结合片段或者本文所公开的双特异性抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。

[0333] 在一些实施方案中,载体是能够表达多肽的重组表达载体,该多肽包含抗-MSLN抗体的重链可变区或轻链可变区。例如,本发明提供了包含上述核酸分子中的任一核酸分子的重组表达载体。

[0334] 任何载体都可适用于本公开。在一些实施方案中,载体是病毒载体。在一些实施方案中,载体是逆转录病毒载体、DNA载体、鼠白血病病毒载体、SFG载体、质粒、RNA载体、腺病毒载体、杆状病毒载体、爱泼斯坦巴尔(Epstein Barr)病毒载体、乳头多瘤空泡病毒载体、牛痘病毒载体、单纯疱疹病毒载体、腺病毒相关载体(AAV)、慢病毒载体或它们的任何组合。合适的示例性载体包括例如pGAR、pBABE-puro、pBABE-neo largeTcDNA、pBABE-hygro-hTERT、pMKO.1GFP、MSCV-IRES-GFP、pMSCV PIG(Puro IRES GFP空质粒)、pMSCV-loxp-dsRed-loxp-eGFP-Puro-WPRE、MSCV IRES荧光素酶、pMIG、MDH1-PGK-GFP_2.0、TtRMPVIR、pMSCV-IRES-mCherry FP、pRetroX GFP T2A Cre、pRXTN、pLncEXP和pLXIN-Luc。

[0335] 重组表达载体可以是任何合适的重组表达载体。合适的载体包括设计用于增殖和扩增或用于表达或用于两者的那些,诸如质粒和病毒。例如,载体可选自pUC系列(Fermentas Life Sciences,Glen Burnie,Md.)、pBluescript系列(Stratagene,LaJolla,Calif.)、pET系列(Novagen,Madison,Wis.)、pGEX系列(Pharmacia Biotech,Uppsala,Sweden)和pEX系列(Clontech,Palo Alto,Calif.)。还可使用噬菌体载体,诸如λGT10、λGT11、λZapII(Stratagene)、λEMBL4和λNM1149。在本公开的上下文中有用的植物表达载体的示例包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。在本公开的上下文中有用的动物表达载体的示例包括pcDNA、pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。

[0336] 重组表达载体可使用标准重组DNA技术制备,这些技术描述于例如Sambrook等人,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,第3版,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.2001;和Ausubel等人,“Current Protocols in Molecular Biology”,Greene Publishing Associates and John Wiley&Sons,NY,1994。可制备环状或线性表达载体的构建体,以含有在原核宿主细胞或真核宿主细胞中起作用的复制系统。复制系统可衍生自例如ColE1、2μ质粒、λ、SV40、牛乳头瘤病毒等。

[0337] 因此,载体可用于治疗疾病。在一些实施方案中,该疾病是癌症。在一些实施方案中,癌症选自间皮瘤、前列腺癌、肺癌、胃癌、鳞状细胞癌、胰腺癌、胆管癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)和卵巢癌。本发明的载体可引入细胞中。在一些实施方案中,本发明的载体可在体外或离体引入细胞中。任选地,随后可将用载体引入的细胞施用到受试者体内。在一些实施方案中,本发明的载体可在体内引入细胞中。

[0338] 例如,载体可以是腺病毒载体,该腺病毒载体包含编码本文所公开的抗MSLN抗体或其抗原结合片段或者本文所公开的双特异性抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。可将

载体施用到受试者体内,然后在体内进入受试者的细胞,从而将编码本文所公开的抗MSLN抗体或其抗原结合片段或者本文所公开的双特异性抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列整合到细胞的基因组中,随后该细胞表达本文所公开的抗MSLN抗体或其抗原结合片段,以便治疗本文所公开的疾病。

[0339] 宿主细胞

[0340] 在第五方面,本发明还提供了包含本文所公开的核酸或者本文所公开的载体的宿主细胞。

[0341] 任何细胞都可用作本公开的核酸或载体的宿主细胞。在一些实施方案中,细胞可以是原核细胞、真菌细胞、酵母细胞,或高等真核细胞诸如哺乳动物细胞。合适的原核细胞包括但不限于真细菌,诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科(Enterobactehaceae),诸如埃希氏菌属(Escherichia),例如大肠杆菌(E.coli);肠杆菌属(Enterobacter);欧文氏菌属(Erwinia);克雷伯菌属(Klebsiella);变形杆菌属(Proteus);沙门氏菌属(Salmonella),例如鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium);沙雷氏菌属(Serratia),例如粘质沙雷氏菌(Serratia marcescans)和志贺氏菌(Shigella);芽孢杆菌纲(Bacilli),诸如枯草芽孢杆菌(B.subtilis)和地衣芽孢杆菌(B.licheniformis);假单胞菌属(Pseudomonas),诸如铜绿假单胞菌(P.aeruginosa);和链霉菌属(Streptomyces)。在一些实施方案中,该细胞是人细胞。在一些实施方案中,该细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,宿主细胞包括例如CHO细胞,诸如CHOS细胞和CHOK1细胞,或HEK293细胞,诸如HEK293A、HEK293T和HEK293FS。

[0342] 本发明的宿主细胞通过体外或离体引入本文所公开的载体或者本文所公开的核酸来制备。可将本发明的宿主细胞施用到受试者体内,并且该宿主细胞在体内表达本文所公开的抗MSLN抗体或其抗原结合片段,以便治疗本文所公开的疾病。

[0343] 本发明还提供了已经引入上述载体中的任一载体的宿主细胞。本发明还提供了通过在允许抗体或抗体片段产生的条件下培养宿主细胞,并回收如此产生的抗体和抗体片段来产生本发明的抗体和抗体片段的方法。

[0344] 抗体药物缀合物

[0345] 在第六方面,本发明提供了一种抗体药物缀合物(ADC),该抗体药物缀合物包含本发明的第一方面的抗体或其抗原结合片段或本发明的第二方面的双特异性抗体。

[0346] 在本公开的上下文中,“缀合物”是指抗体或抗体片段(诸如抗原结合片段)共价连接到效应分子或第二蛋白(诸如第二抗体)。效应分子可以是例如药物、毒素、治疗剂、可检测标记、蛋白质、核酸、脂质、纳米颗粒、碳水化合物或重组病毒。抗体缀合物通常被称为“免疫缀合物”。当缀合物包含与药物(例如,细胞毒性剂)连接的抗体时,该缀合物通常被称为“抗体药物缀合物”或“ADC”。其他抗体缀合物包括例如多特异性(诸如双特异性或三特异性)抗体。

[0347] 在一些实施方案中,效应分子可以是可检测标记或免疫毒素。毒素的具体的非限制性示例包括但不限于相思豆毒素、蓖麻毒素、假单胞菌外毒素(PE,诸如PE35、PE37、PE38和PE40)、白喉毒素(DT)、肉毒杆菌毒素或其经修饰的毒素,或者直接或间接抑制细胞生长或杀死细胞的其他毒性剂。例如,PE和DT是剧毒化合物,通常通过肝毒性导致死亡。然而,PE和DT可通过去除毒素的天然靶向成分(诸如PE的结构域1a和DT的B链)并用不同的靶向部分

(诸如抗体)替代而被修饰成用作免疫毒素的形式。术语“缀合的”或“连接的”可以指将两个多肽制成一个连续的多肽分子。在一个实施方案中,抗体连接到效应分子。在另一个实施方案中,连接到效应分子的抗体进一步连接到脂质或其他分子,连接到蛋白质或肽,以增加其在体内的半衰期。连接可通过化学或重组方式进行。在一个实施方案中,连接是化学的,其中抗体部分与效应分子之间的反应已经产生了在两个分子之间形成的共价键,从而形成一个分子。肽接头(短肽序列)可任选地包括在抗体与效应分子之间。

[0348] 本发明提供了免疫缀合物,其包括本文所公开的单克隆抗体或抗原结合片段以及效应分子。在一些实施方案中,效应分子是毒素,诸如但不限于假单胞菌外毒素或其变体。在其他实施方案中,效应分子是可检测标记,诸如但不限于荧光团、酶或放射性同位素。

[0349] 可将所公开的单克隆抗体缀合到治疗剂或效应分子。免疫缀合物包括但不限于其中治疗剂与抗体共价连接的分子。治疗剂是具有针对特定靶分子或携带靶分子的细胞的特定生物活性的药剂。本领域技术人员将理解,治疗剂可包括各种药物,诸如长春花碱、道诺霉素等;细胞毒素诸如天然或修饰的假单胞菌外毒素或白喉毒素;含有药理学组合物的包封剂(诸如脂质体);放射性试剂诸如^{125}I、^{32}P、^{14}C、^{3}H和^{35}S和其他标记;靶部分;和配体。

[0350] 特定治疗剂的选择取决于特定的靶分子或细胞以及所需的生物学效应。因此,例如,治疗剂可以是用于引起特定靶细胞(诸如肿瘤细胞)死亡的细胞毒素。相反,当需要引起非致死生物反应时,可将治疗剂缀合到非致死药用试剂或含有非致死药用试剂的脂质体。

[0351] 使用本文所述的治疗剂和抗体,技术人员可容易地构建多种含有功能上等效的核酸的克隆,这些核酸诸如序列不同但编码相同效应部分或抗体序列的核酸。因此,本公开提供了编码抗体及其缀合物和融合蛋白的核酸。

[0352] 效应分子可使用本领域技术人员已知的任何数量的方式连接到所关注的抗体。可使用共价连接方式和非共价连接方式两者。将效应分子连接到抗体的方法根据效应子的化学结构而变化。多肽通常含有多种官能团;诸如羧酸(COOH)、游离胺(-NH_2)或巯基(-SH)基团,这些官能团可用于与抗体上的合适官能团反应以导致效应分子的结合。另选地,将抗体衍生化以暴露或连接另外的反应性官能团。衍生化可包括连接许多已知接头分子中的任一接头分子。接头可以是用于将抗体连接到效应分子的任何分子。接头能够与抗体和效应分子两者形成共价键。合适的接头是本领域技术人员公知的,包括但不限于直链或支链碳接头、杂环碳接头或肽接头。当抗体和效应分子是多肽时,接头可通过组成氨基酸的侧基(诸如通过与半胱氨酸的二硫键)连接到这些组成氨基酸,或者连接到末端氨基酸的α碳氨基基团和羧基基团。

[0353] 在一些情况下,当免疫缀合物已经到达其靶位点时,期望从抗体释放效应分子。因此,在这些情况下,免疫缀合物将包含在靶位点附近可切割的键。

[0354] 可通过酶活性或者免疫缀合物在靶细胞内或在靶位点附近所经受的条件来促进接头的切割,以从抗体释放效应分子。

[0355] 鉴于已报道的用于将多种放射性诊断化合物、放射性治疗化合物、标记(诸如酶或荧光分子)、药物、毒素和其他试剂连接到抗体的众多方法,本领域技术人员将能够确定用于将给定试剂连接到抗体或其他多肽的合适方法。

[0356] 可将本文所公开的抗体衍生化或连接到另一个分子(诸如另一个肽或蛋白质)。通常,将抗体或其部分衍生化,使得与靶抗原的结合不受衍生化或标记的不利影响。例如,可

将抗体官能性连接(通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或其他方式)到一个或多个其他分子实体,诸如另一个抗体(例如,双特异性抗体或双链抗体)、检测剂、药剂和/或可介导抗体或抗体部分与另一个分子(诸如链霉亲和素核心区或聚组氨酸标签)缔合的蛋白质或肽。

[0357] 一种类型的衍生化抗体通过交联两种或更多种抗体(相同类型或不同类型,诸如产生双特异性抗体)来产生。合适的交联剂包括具有由合适的间隔区隔开的两个明显反应性基团的异双官能团的那些交联剂(诸如间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯),或者具有同双官能团的那些交联剂(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)。此类接头是可商购获得的。

[0358] 抗体可与可检测标志物缀合;例如,可检测标志物能够通过ELISA、分光光度法、流式细胞术、显微镜检查或诊断成像技术(诸如计算机断层扫描(CT)、计算机轴向断层扫描(CAT)扫描、磁共振成像(MRI)、核磁共振成像(NMRI)、磁共振断层扫描(MTR)、超声、光纤检查和腹腔镜检查)来检测。可检测标志物的具体的非限制性示例包括荧光团、化学发光剂、酶连接、放射性同位素和重金属或化合物(例如用于通过MRI检测的超顺磁性氧化铁纳米晶体)。例如,有用的可检测标志物包括荧光化合物,这些荧光化合物包括荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲胺-1-萘磺酰氯、藻红蛋白、镧系元素磷光体等。生物发光标志物也是有用的,诸如荧光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)和黄色荧光蛋白(YFP)。抗体或抗原结合片段还可与用于检测的酶缀合,这些酶诸如辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等。当抗体或抗原结合片段与可检测的酶缀合时,可通过添加额外的试剂来检测,该酶使用该额外的试剂来产生可辨别的反应产物。例如,当试剂辣根过氧化物酶存在时,添加过氧化氢和二氨基联苯胺产生可目视检测的有色反应产物。抗体或抗原结合片段还可与生物素缀合,并通过抗生物素蛋白或链霉亲和素蛋白结合的间接测量来检测。应当注意,抗生物素蛋白本身可与酶或荧光标记缀合。

[0359] 抗体可与自我标记的蛋白质标签(例如HaloTag)融合。例如,可在恒定区的末端处克隆蛋白质标签。HaloTag是衍生自细菌酶(卤代烷烃脱卤素酶)的自我标记的蛋白质标签,其被设计为共价结合到合成配体。在一些情况下,该合成配体包含连接到荧光团诸如近红外荧光团的氯烷烃接头(Los等人(2008年),ACS Chem Biol.,第3卷第6期:第373-82页)。

[0360] 抗体可用磁性试剂诸如钆来标记。抗体还可用镧系元素(诸如铕和镝)和锰来标记。

[0361] 顺磁性颗粒诸如超顺磁性氧化铁也可用作标记。抗体还可用由二级报告基因(诸如亮氨酸拉链对序列、二级抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签)识别的预定多肽表位来标记。在一些实施方案中,标记通过各种长度的间隔区臂连接以降低潜在的空间位阻。

[0362] 抗体还可用放射性标记的氨基酸来标记。放射性标记可用于诊断目的和治疗目的两者。例如,放射性标记可用于通过X射线、发射光谱或其他诊断技术来检测靶抗原的表达。用于多肽的标记的示例包括但不限于以下放射性同位素或放射性核苷酸:^{3}H、^{14}C、^{15}N、^{35}S、^{90}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{125}I、^{131}I。

[0363] 抗体还可用化学基团诸如聚乙二醇(PEG)、甲基或乙基基团或者碳水化合物基团来衍生化。这些基团可用于改善抗体的生物学特性,诸如增加血清半衰期或增加组织结合。

[0364] 毒素可与本文所述的单克隆抗体一起使用以产生免疫毒素。示例性毒素包括蓖麻

毒素、相思豆毒素、白喉毒素以及它们的亚基,以及肉毒杆菌毒素A至F。这些毒素可容易地从商业来源(Sigma Chemical Company,St.Louis,MO)获得。所考虑的毒素还包括本文所述毒素的变体(参见,例如参见美国专利号5,079,163和4,689,401)。在一个实施方案中,该毒素是假单胞菌外毒素(PE)(美国专利号5,602,095)。如本文所用,“假单胞菌外毒素”是指全长天然(天然存在的)PE或已经修饰的PE。此类修饰可包括但不限于:结构域la的消除,结构域lb、II和III中的各种氨基酸缺失,单个氨基酸取代,以及在羧基末端添加一个或多个序列(例如参见Siegall等人,Biol.Chem.264:14256-14261,1989)。

[0365] 本文所述的单克隆抗体所采用的PE可包括天然序列、天然序列的细胞毒性片段以及天然PE及其细胞毒性片段的经保守修饰的变体。PE的细胞毒性片段包括在靶细胞中具有或不具有随后的蛋白水解或其他处理的细胞毒性片段。PE的细胞毒性片段包括PE40、PE38和PE35。关于PE及其变体的其他描述,参见例如美国专利号4,892,827;5,512,658;5,602,095;5,608,039;5,821,238;和5,854,044;美国专利申请公开号2015/0099707;PCT公开号WO 99/51643和WO 2014/052064;Pai等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,第88卷:第3358-3362页,1991年;Kondo等人,J.Biol.Chem.,第263卷:第9470-9475页,1988年;Pastan等人,Biochim.Biophys.Acta,第1333卷:第C1-C6页,1997年。

[0366] 本文还考虑了蛋白酶抗性PE变体和具有降低免疫原性的PE变体,诸如但不限于PE-LR、PE-6X、PE-8X、PE-LR/6X和PE-LR/8X(参见例如,Weldon等人,Blood,第113卷第16期:第3792-3800页,2009年;Onda等人,Proc Natl Acad Sci USA,第105卷第32期:第11311-11316页,2008年;以及PCT公开号WO 2007/016150、WO 2009/032954和WO 2011/032022,这些文献以引用方式并入本文)。

[0367] 在一些示例中,PE是对溶酶体降解有抗性的变体,诸如PE-LR(Weldon等人,Blood,第113卷第16期:第3792-3800页,2009年;PCT公开号WO 2009/032954)。在其他示例中,PE是命名为PE-LR/6X的变体(PCT公开号WO 2011/032022)。在其他示例中,PE变体是具有降低的免疫原性的PE。在另外的其他示例中,PE是命名为PE-LR/8M的变体(PCT公开号WO 2011/032022)。

[0368] PE的修饰可发生在任何前述变体中,包括PE的细胞毒性片段(例如PE38、PE-LR和PE-LR/8M)。经修饰的PE可包括任何取代,诸如PE的一个或多个T细胞表位和/或B细胞表位内的一个或多个氨基酸残基的取代,或者一个或多个T细胞表位和/或B细胞表位的缺失(参见例如美国专利申请公开号2015/0099707)。所考虑的PE形式还包括PE的去免疫形式,例如结构域II缺失的形式(例如PE24)。PE的去免疫形式描述于例如PCT公开WO 2005/052006、WO 2007/016150、WO 2007/014743、WO 2007/031741、WO 2009/32954、WO 2011/32022、WO 2012/154530和WO 2012/170617中。

[0369] 本文所述的抗体还可用于将任何数目的不同的诊断性或治疗性化合物靶向于在表面上表达肿瘤或病毒抗原的细胞。因此,本公开的抗体可直接或经由接头连接到药物,该药物将被直接递送至表达细胞表面抗原的细胞。这可用于治疗、诊断或研究目的。治疗剂包括化合物诸如核酸、蛋白质、肽、氨基酸或衍生物、糖蛋白、放射性同位素、脂质、碳水化合物或重组病毒。核酸治疗和诊断部分包括反义核酸、用于与单链或双链DNA共价交联的衍生化寡核苷酸以及形成三链体的寡核苷酸。

[0370] 另选地,连接到抗体的分子可以是包封系统,诸如纳米颗粒、脂质体或胶束,该包

封系统含有治疗组合物,诸如药物、核酸(例如反义核酸)或优选地被保护免于直接暴露于循环系统的另一种治疗部分。制备连接到抗体的脂质体的方法是本领域技术人员公知的(参见例如美国专利号4,957,735;Connor等人,Pharm.Ther.,第28卷:第341-365页,1985年)。

[0371] 本文所述的抗体还可共价或非共价地连接到可检测标记。适于此类用途的可检测标记包括可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学或化学方式检测的任何组合物。有用的标记包括磁珠、荧光染料(例如异硫氰酸荧光素、德克萨斯红、罗丹明、绿色荧光蛋白等)、放射性标记(例如^{3}H、^{125}I、^{35}S、^{14}C或^{32}P)、酶(诸如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶以及ELISA中常用的其他酶)和比色标记诸如胶体金或有色玻璃或塑料(诸如聚苯乙烯、聚丙烯、胶乳等)珠。

[0372] 检测此类标记的方式是本领域技术人员公知的。因此,例如,放射性标记可使用照相胶片或闪烁计数器来检测,荧光标志物可使用光检测器检测来检测发射的照明。酶标记通常通过向酶提供底物并检测酶对底物的作用所产生的反应产物来检测,而比色标记通过简单地使有色标记可视化来检测。

[0373] 药物组合物

[0374] 在第七方面,本发明提供了一种药物组合物,该药物组合物包含(i)本发明的第一方面的抗体或其抗原结合片段、或本发明的第二方面的双特异性抗体、或本发明的第三方面的核酸、或本发明的第四方面的载体、或本发明的第五方面的宿主细胞、或本发明的第六方面的ADC;和任选地(ii)药学上可接受的载体或赋形剂。

[0375] 本发明提供了包含本发明的抗体的药物组合物。在一些实施方案中,该药物组合物还包含药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的载体”包括生理上相容的任何和所有溶剂、缓冲液、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地,该载体适于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(例如,通过注射或输注)。例如,在一些实施方案中,用于静脉内施用的组合物通常是无菌等渗缓冲水溶液。

[0376] 可将本发明的抗体或试剂(本文也称为“活性化合物”)及其衍生物、片段、类似物和同系物掺入适于施用的药物组合物中。此类组合物通常包含抗体或试剂以及药学上可接受的载体。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”旨在包括与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。合适的载体描述于“Remington's Pharmaceutical Sciences”的最新版本中,该文献为该领域的标准参考文献文本,该文献以引用方式并入本文。此类载体或稀释剂的优选示例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和5%人血清白蛋白。还可使用脂质体和非水性溶媒诸如固定油。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域公知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,否则考虑将这些介质或试剂用于组合物中。还可将补充性活性化合物掺入组合物中。

[0377] 将本发明的药物组合物配制成与其预期施用途径相容。施用途径的示例包括肠胃外施用,例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如吸入)、透皮(即局部)、透粘膜和直肠施用。用于肠胃外、皮内或皮下施用的溶液或悬浮液可包括以下组分:无菌稀释剂,诸如注射用水、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,诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲

液,诸如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节张力的试剂,诸如氯化钠或葡萄糖。pH值可用酸或碱诸如盐酸或氢氧化钠来调节。肠胃外制剂可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。

[0378] 适于可注射用途的药物组合物包括无菌水溶液(如果是水溶性的)或分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌散剂。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF,Parsippany,N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物必须是无菌的并且应当是流动的以达到易于注射的程度。它在制备和储存条件下必须是稳定的;并且必须保存以抵抗微生物诸如细菌和真菌的污染作用。该载体可以是含有以下物质的溶剂或分散介质:例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及它们合适的混合物。可例如通过使用包衣(诸如卵磷脂),通过在分散体的情况下保持所需的粒径,以及通过使用表面活性剂来保持恰当的流动性。可通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现对微生物的预防作用。在许多情况下,将优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(诸如甘露糖醇、山梨糖醇)、氯化钠。可通过在组合物中包含延迟吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的持续吸收。

[0379] 无菌可注射溶液可通过以下方式制备:根据需要将所需量的活性化合物与上文列举的一种成分或多种成分的组合掺入到适当的溶剂中,随后过滤灭菌。通常,通过将活性化合物掺入到含有基本分散介质和来自上文列举的成分的所需其他成分的无菌溶媒中来制备分散液。就用于制备无菌可注射溶液的无菌散剂而言,制备方法是真空干燥和冷冻干燥,这些方法从活性成分加任何附加期望成分的先前无菌过滤的溶液中产生该活性成分加任何附加期望成分的散剂。

[0380] 口服组合物通常包含惰性稀释剂或可食用载体。它们可封装在明胶胶囊中或压制成片剂。出于口服治疗施用的目的,活性化合物可掺有赋形剂并以片剂、锭剂或胶囊剂的形式使用。还可使用用作漱口药的流体载体来制备口服组合物,其中流体载体中的化合物经口服施用并在漱口后吐出或吞服。药学上相容的结合剂和/或佐剂材料可作为组合物的一部分包括在内。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可含有以下成分或具有类似性质的化合物中的任一者: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;助流剂诸如二氧化硅胶体;甜味剂,诸如蔗糖或糖精;或调味剂,诸如薄荷、水杨酸甲酯或橙子调味剂。

[0381] 对于通过吸入施用,这些化合物以气溶胶喷雾剂的形式从含有合适的推进剂(例如气体诸如二氧化碳)的压力容器或分配器,或雾化器递送。

[0382] 全身性施用还可通过透粘膜或透皮方式进行。对于透粘膜或透皮施用,在制剂中使用适于待渗透的屏障的渗透剂。此类渗透剂在本领域中通常是已知的,并且包括例如用于透粘膜施用的洗涤剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。透粘膜施用可通过使用鼻腔喷雾剂或栓剂来完成。对于透皮施用,将活性化合物配制成本领域众所周知的软膏剂、药膏剂、凝胶或霜剂。

[0383] 还可将化合物制备成栓剂形式(例如,具有常规栓剂基质诸如可可脂和其他甘油酯)或用于直肠递送的保留灌肠剂。

[0384] 在一个实施方案中,活性化合物用载体制备,这些载体将保护化合物免于从机体

快速排出,这些载体诸如包括植入物和微胶囊化递送系统的控释制剂。可使用生物可降解、生物相容的聚合物,诸如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的方法对本领域技术人员来说是显而易见的。这些材料还可从Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals公司商购获得。脂质体悬浮剂(包括靶向具有针对病毒抗原的单克隆抗体的感染细胞的脂质体)也可用作药学上可接受的载体。这些材料可根据本领域技术人员已知的方法来制备,例如,如描述于美国专利号4,522,811中。

[0385] 为了易于施用和剂量的均匀性,将口服或肠胃外组合物配制成剂量单位形式是特别有利的。如本文所用的剂量单位形式指适合作为用于待治疗受试者的单位剂量的物理离散的单元;每个单元含有预定量的活性化合物,所述预定量的活性化合物经计算在与所需的药用载体缔合时产生所需的治疗效果。本发明的剂量单位形式的规格取决于活性化合物的独特特性和待达到的特定治疗效果以及配混用于治疗个体的此类活性化合物的领域中的固有局限性,并且直接取决于这些因素。

[0386] 药物组合物可与施用说明书一起包含在容器、包装或分配器中。

[0387] 本发明提供了治疗组合物,这些治疗组合物包含本发明的抗MSLN抗体或其抗原-结合片段。根据本发明的治疗组合物将与合适的载体、赋形剂和其他试剂一起施用,将这些药剂掺入到制剂中以改进转移、递送、耐受性等。在所有药物化学家已知的处方集中可找到大量合适的制剂:Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Company,Easton,PA。这些制剂包括例如散剂、糊剂、软膏、果冻、蜡、油、脂质、包含脂质(阳离子或阴离子)的囊泡(诸如LIPOFECTIN™)、DNA缀合物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳液、卡波蜡乳液(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有卡波蜡的半固体混合物。还参见Powell等人,"Compendium of excipients for parenteral formulations",PDA(1998年),J Pharm Sci Technol,第52卷:第238-311页。

[0388] 产生方法

[0389] 单克隆抗体可以使用杂交瘤方法诸如Kohler和Milstein,Nature,第256卷:第495页(1975年)所述的那些方法制备。在杂交瘤方法中,通常用免疫剂对小鼠、仓鼠或其他合适的宿主动物进行免疫,以引发产生或能够产生特异性结合免疫剂的抗体的淋巴细胞。另选地,可以在体外对淋巴细胞进行免疫。

[0390] 免疫剂通常包括蛋白质抗原、其片段或其融合蛋白。通常,如果需要人源细胞,则使用外周血淋巴细胞,或者如果需要非人哺乳动物来源,则使用脾细胞或淋巴结细胞。然后使用合适的融合剂诸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(Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,Academic Press(1986年),第59-103页)。永生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿动物、牛和人来源的骨髓瘤细胞。通常,采用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。杂交瘤细胞可以在合适的培养基中培养,该培养基优选含有一种或多种抑制未融合的永生化细胞生长或存活的物质。例如,如果亲本细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT),用于杂交瘤的培养基通常将包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷("HAT培养基"),这些物质阻止HGPRT缺陷型细胞的生长。

[0391] 优选的永生化细胞系是那些能有效融合、支持所选抗体产生细胞稳定高水平表达抗体并对培养基诸如HAT培养基敏感的细胞系。更优选的永生化细胞系是鼠骨髓瘤细胞系,

其可例如从加利福尼亚州圣地亚哥的索尔克研究所细胞分配中心和弗吉尼亚州马纳萨斯的美国菌种保藏中心获得。还已描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人种间骨髓瘤细胞系。(参见Kozbor,J.Immunol.,第133卷:第3001页(1984年);Brodeur等人,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,Marcel Dekker,Inc.,New York(1987年),第51-63页))。

[0392] 然后可以测定培养杂交瘤细胞的培养基中针对抗原的单克隆抗体的存在。优选地,由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或通过体外结合测定,诸如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)来测定。这些技术和测定是本领域已知的。单克隆抗体的结合亲和力可以例如通过Scatchard analysis of Munson and Pollard,Anal.Biochem.,第107卷:第220页(1980年)来测定。此外,在单克隆抗体的治疗应用中,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。

[0393] 在鉴定出所需的杂交瘤细胞后,克隆可以通过有限稀释程序亚克隆,并通过标准方法培养。(参见Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,Academic Press(1986年),第59-103页)。适用于此目的的培养基包括例如Dulbecco改良Eagle培养基和RPMI-1640培养基。另选地,杂交瘤细胞可以在哺乳动物体内生长为腹水。

[0394] 由亚克隆分泌的单克隆抗体可以通过常规免疫球蛋白纯化程序诸如例如蛋白质A-琼脂糖、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和层析从培养基或腹水中分离或纯化。

[0395] 单克隆抗体也可以通过重组DNA方法诸如美国专利号4,816,567中描述的那些方法制备。编码本发明的单克隆抗体的DNA可容易地使用常规程序分离和测序(例如,通过使用能够特异性结合编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。本发明的杂交瘤细胞用作此类DNA的优选来源。在分离后,可将DNA置于表达载体中,然后将这些表达载体转染到不另外产生免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞诸如猿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实现单克隆抗体的合成。也可以修饰DNA,例如,通过用人重链和轻链恒定区的编码序列取代同源鼠序列(参见美国专利号4,816,567;Morrison,Nature,第368卷:第812-813页(1994年))或通过将免疫球蛋白编码序列共价连接到非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列。此类非免疫球蛋白多肽可以取代本发明的抗体的恒定结构域,或者可以取代本发明的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。

[0396] 完全人抗体是其中轻链和重链两者的整条序列(包括CDR)都来自人基因的抗体分子。此类抗体在本文中被称为“人源化抗体”、“人抗体”或“完全人抗体”。人单克隆抗体可以通过使用三源杂交瘤技术;人B细胞杂交瘤技术(参见Kozbor等人,1983年,Immunol Today,第4卷:第72页);和EBV杂交瘤技术制备,以产生人单克隆抗体(参见Cole等,1985年,在:MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY,Alan R.Liss,Inc.,第77-96页)。可以利用人单克隆抗体,并且这些人单克隆抗体可以通过使用人杂交瘤(参见Cote等人,1983年,Proc Natl Acad Sci USA,第80卷:第2026-2030页)或通过用爱泼斯坦巴尔(Epstein Barr)病毒在体外转化人B细胞(参见Cole等人,1985年,在:MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY,Alan R.Liss,Inc.,第77-96页)来产生。

[0397] 此外,人源化抗体可以在转基因植物中产生,作为现有哺乳动物系统的低价产生替代方案。例如,转基因植物可以是烟草植物,即本氏烟草(Nicotiania benthamiana)和烟

草(Nicotiana tabaccum)。抗体从植物叶片中纯化。植物的稳定转化可以通过使用根癌农杆菌(Agrobacterium tumefacien)或粒子轰击来实现。例如,通过转化,在细菌培养物,即根癌农杆菌菌株BLA4404中表达至少含有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完成。可溶性叶片提取物可以通过在研钵中研磨叶片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容易地进行。在植物中产生抗体的其他方法在例如Fischer等人,Vaccine,2003年,第21卷:第820-825页;和Ko等人,Current Topics in Microbiology and Immunology,第332卷,2009年,第55-78页中有所描述。因此,本发明还提供了任何包含编码本发明的抗体或产生本发明的抗体的载体的细胞或植物。

[0398] 此外,可以在真菌中产生所关注的(人)抗体。例如,真菌可以是嗜热毁丝霉(Myceliophthora thermophila)(例如,嗜热毁丝霉菌株C1;Visser等人(2011年),Industrial Biotechnology,第7卷第3期:第214-223页)。其他示例包括曲霉属(Aspergillus)菌种(例如,米曲霉(A.oryzae)(Huynh等人(2020年),Fungal Biology and Biotechnology,第7卷:第7页)、黑曲霉(A.niger)(Ward等人(2004年),Environ.Microbiol.,第70卷:第2567-2576页)或泡盛曲霉(A.awamori)(Joosten等人(2003年),Microb.Cell Fact,第2卷:第1页))和木霉属(Trichoderma)菌种(例如,里氏木霉(T.reesei)(Nyyssönen等人(1993年),Biotechnology,第11卷:第591-595页))。在其他情况下,真菌可以是酵母,诸如酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、博伊丁氏假丝酵母(Candida boidinii)、多形汉逊酵母(Hansenula polymorpha)、甲醇毕赤酵母(Pichia methanolica)、巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)、解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica)、乳酸克鲁维酵母(Kluyveromyces lactis)或微小汉逊酵母(Ogataea minuta)(Joosten等人(2003年);Suzuki等人(2017年),J Biosci Bioeng.,第124卷:第156-163页)。

[0399] 此外,人抗体也可以使用其他技术(包括噬菌体展示文库)来产生。(参见Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,第227卷:第381页(1991年);Marks等人,J.Mol.Biol.,第222卷:第581页(1991年))。类似地,人抗体可以通过将人免疫球蛋白基因座引入到转基因动物,例如其中内源免疫球蛋白基因已经部分或完全失活的小鼠中来制备。在攻击时,观察到人抗体产生,其在包括基因重排、组装和抗体库在内的所有方面都非常类似于在人中所观察到的。该方法在例如WO 2006/008548、WO 2007/096779、WO 2010/109165、WO 2010/070263、WO 2014/141189和WO 2014/141192中有所描述。

[0400] 美国专利号5,916,771中公开了一种用于产生所关注的抗体诸如人抗体的方法。该方法包括将含有编码重链的核苷酸序列的表达载体导入到培养物中的一种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导入到另一种哺乳动物宿主细胞中,并将这两种细胞融合以形成杂交细胞。杂交细胞表达含有重链和轻链的抗体。

[0401] 在对该程序的进一步改进中,PCT公开WO 99/53049中公开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免疫特异性结合相关表位的抗体的关联方法。

[0402] 抗体可以用含有编码上述单链抗体的DNA片段的载体表达。

[0403] 这些可以包括载体、脂质体、裸DNA、佐剂辅助的DNA、基因枪、导管等。载体包括:化学缀合物,诸如WO 93/64701中所述的,该化学缀合物具有靶向部分(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,诸如PCT/US 95/02140(WO 95/22618)中所述的,该融合蛋白是含有靶部分(例如,对靶细胞特异性的抗体)和核酸结合部分(例如,鱼精蛋白)的融合蛋白;质粒;噬菌体等。载体可以是染色体的、非染色体的或合成的。

[0404] 优选的载体包括病毒载体、融合蛋白和化学缀合物。逆转录病毒载体包括莫洛尼鼠白血病病毒。优选的是DNA病毒载体。这些载体包括痘病毒载体诸如正痘病毒或禽痘病毒载体、疱疹病毒载体诸如单纯疱疹病毒I型(HSV)载体(参见Geller,A.I.等人,J.Neurochem,第64卷:第487页(1995年);Lim,F.等人,在:DNA Cloning:Mammalian Systems,D.Glover编撰(Oxford Univ.Press,Oxford,England)(1995年);Geller,A.I.等人,Proc Natl.Acad.Sci.:U.S.A.,第90卷:第7603页(1993年);Geller,A.I.等人,Proc Natl.Acad.Sci USA,第87卷:第1149页(1990年)、腺病毒载体(参见LeGal LaSalle等人,Science,第259卷:第988页(1993年);Davidson等人,Nat.Genet,第3卷:第219页(1993年);Yang等人,J.Virol.,第69卷:第2004页(1995年)和腺相关病毒载体(参见Kaplitt,M.G.等人,Nat.Genet.,第8卷:第148页(1994年)。

[0405] 痘病毒载体将基因导入到细胞质中。禽痘病毒载体导致核酸的仅短期表达。腺病毒载体、腺相关病毒载体和单纯疱疹病毒(HSV)载体优选用于将核酸导入到神经细胞中。腺病毒载体导致比腺相关病毒(约4个月)更短期的表达(约2个月),这继而比HSV载体更短。选择的特定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、转导或转化进行。基因转移模式的示例包括例如裸DNA、CaPO4沉淀、DEAE葡聚糖、电穿孔、原生质体融合、脂转染、细胞微注射和病毒载体。

[0406] 载体可用于靶向基本上任何所需的靶细胞。例如,立体定向注射可用于将载体(例如,腺病毒、HSV)引导至所需位置。另外,可以使用微型泵输注系统诸如SynchroMed输注系统,通过脑室内(icv)输注来递送颗粒。也已经证明称之为对流的基于整体流动的方法在将大分子递送至脑的扩展区域方面是有效的,并且可以用于将载体递送至靶细胞。(参见Bobo等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,第91卷:第2076-2080页(1994年);Morrison等人,Am.J.Physiol.,第266卷:第292-305页(1994年))。可以使用的其他方法包括导管、静脉内、肠胃外、腹膜内和皮下注射,以及口服或其他已知的施用途径。

[0407] 这些载体可用于表达大量可以多种方式使用的抗体。例如,以检测样本中MSLN的存在。抗体也可用于试图结合MSLN并破坏MSLN与MUC16之间的相互作用。

[0408] 在优选的实施方案中,本发明的抗体是全长抗体,含有与结合Fc受体的野生型Fc区相似的Fc区。

[0409] 治疗方法

[0410] 可施用本文提供的抗体以减缓或抑制间皮素阳性癌症的进展,或抑制间皮素阳性癌症的转移。在这些应用中,将治疗有效量的组合物以足以抑制癌细胞的生长、复制或转移或者抑制癌症的体征或症状的量施用于受试者。合适的受试者可包括诊断患有表达间皮素的癌症诸如间皮瘤、前列腺癌、肺癌、胃癌、鳞状细胞癌、胰腺癌、胆管癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)或卵巢癌的那些受试者。

[0411] 本文提供了一种通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的抗体来治疗该受试者的间皮素阳性癌症的方法。本文还提供了一种通过向受试者施用治疗有效量的本文所述

的抗体来抑制该受试者的间皮素阳性癌症转移的方法。在一些实施方案中,间皮素阳性癌症为间皮瘤、前列腺癌、肺癌、胃癌、鳞状细胞癌、胰腺癌、胆管癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)或卵巢癌。

[0412] 本文所公开的抗体的施用还可伴有其他抗癌剂的施用或治疗处理(诸如肿瘤的手术切除)。任何合适的抗癌剂都可与本文所公开的抗体组合施用。示例性抗癌剂包括但不限于化学治疗剂,诸如,例如有丝分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢物、嵌入抗生素、生长因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、抗存活剂、生物反应调节剂、抗-激素(例如抗雄激素)和抗血管生成剂。其他抗癌治疗包括放射疗法以及特异性靶向癌细胞的其他抗体。

[0413] 对于某些类型的癌症,另一种常见的治疗是手术治疗,例如转移性肿瘤的手术切除。治疗的另一个示例是放射性疗法,例如向肿瘤部位施用放射性材料或能量(诸如外照射疗法)以帮助根除肿瘤或在手术切除之前使其缩小。

[0414] 诊断和检测方法

[0415] 本文提供了在体外或体内检测间皮素蛋白质的方法。在一些情况下,在生物样本中检测到间皮素表达。该样本可以是任何样本,包括但不限于血液样本,来自活检、尸检和病理标本的组织。生物样本还包括组织切片,例如,用于组织学目的冷冻切片。生物样本还包括体液,诸如血液、血清、血浆、痰、脊髓液或尿。生物样本通常从哺乳动物获得,诸如人或非人灵长类动物。

[0416] 本文提供了一种通过使来自受试者的样本与本文所公开的间皮素特异性单克隆抗体接触以及检测该抗体与该样本的结合,来确定受试者是否患有间皮素阳性癌症的方法。相比于该抗体与对照样本的结合,该抗体与该样本的结合增加,鉴定出受试者患有间皮素阳性癌症。

[0417] 在另一个实施方案中,提供了一种通过使来自诊断患有间皮素阳性癌症的受试者的样本与本文所公开的间皮素特异性单克隆抗体接触以及检测该抗体与该样本的结合,来确认受试者的间皮素阳性癌症的诊断的方法。相比于该抗体与对照样本的结合,该抗体与该样本的结合增加,确认受试者的间皮素阳性癌症的诊断。

[0418] 在所公开的方法的一些示例中,单克隆抗体被直接标记。

[0419] 在其他示例中,该方法还包括使特异性结合单克隆抗体的第二抗体与样本接触;以及检测第二抗体的结合。相比于第二抗体与对照样本的结合,第二抗体与该样本的结合增加,检测出受试者的间皮素阳性癌症或确认受试者的间皮素阳性癌症的诊断。

[0420] 在一些情况下,癌症为间皮瘤、前列腺癌、肺癌、胃癌、鳞状细胞癌、胰腺癌、胆管癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)或卵巢癌。

[0421] 在一些示例中,对照样本是来自没有癌症的受试者的样本。在特定的示例中,样本是血液或组织样本。

[0422] 在诊断和检测方法的一些实施方案中,抗MSLN抗体用可检测标记来直接标记。在另一个实施方案中,抗MSLN抗体(第一抗体)是未标记的,并且第二抗体或可结合第一抗体的其他分子被标记。如本领域技术人员所公知的,选择能够特异性结合第一抗体的特定种类和类别的二级抗体。例如,如果第一抗体是人IgG,那么二级抗体可以是抗人IgG。可结合抗体的其他分子包括但不限于蛋白A和蛋白G,两者均是商业可得的。

[0423] 用于抗体或二级抗体的合适标记包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、磁性试

剂和放射性材料。合适的酶的非限制性示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非限制性示例包括链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素。合适的荧光材料的非限制性示例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白。非限制性的示例性发光材料是鲁米诺;非限制性的示例性磁性试剂是钆,并且非限制性的示例性放射性标记包括^{125}I、^{131}I、^{35}S或^{3}H。

[0424] 在另一个实施方案中,可利用标记有可检测物质的间皮素蛋白质标准品和未标记的抗MSLN抗体,通过竞争免疫测定来测定生物样本中的间皮素。在该测定中,将生物样本、标记的MSLN蛋白质标准品和抗MSLN抗体合并,并测定与未标记的抗体结合的标记的MSLN蛋白质标准品的量。生物样本中MSLN的量和与抗-MSLN抗体结合的标记的MSLN蛋白质标准品的量成反比。

[0425] 本文所公开的免疫测定和方法可用于许多目的。在一个实施方案中,抗MSLN抗体可用于检测细胞培养物中的细胞中MSLN的产生。在另一个实施方案中,该抗体可用于检测生物样本(诸如组织样本或者血液或血清样本)中MSLN的量。在一些示例中,MSLN是细胞表面MSLN。在其他示例中,MSLN蛋白质是可溶的(例如在细胞培养上清液中,或者在体液样本诸如血液或血清样本中)。

[0426] 在一个实施方案中,提供了一种用于检测生物样本(诸如血液样本或组织样本)中MSLN的试剂盒。例如,为了验证受试者的癌症诊断,可进行活检以获得用于组织学检查的组织样本。用于检测多肽的试剂盒通常将包括单克隆抗MSLN抗体,诸如本文所公开的单克隆抗体中的任何单克隆抗体。在另一个实施方案中,抗体被标记(例如,用荧光、放射性物质或酶标记)。

[0427] 在一个实施方案中,试剂盒包括说明材料,这些说明材料公开了使用抗-MSLN抗体的方法。说明材料可以电子形式(诸如计算机磁盘或光盘)书写,或者可以是可视的(诸如视频文件)。试剂盒还可包括另外的组分以促进试剂盒被设计用于的特定应用。因此,例如,试剂盒可另外含有检测标记的装置(诸如用于酶标记的酶底物,检测荧光标记、适当的二级标记(诸如二级抗体)的过滤器组等)。试剂盒可另外包括常规用于实施特定方法的缓冲液和其他试剂。这些试剂盒和适当的内容物是本领域技术人员公知的。

[0428] 在一个实施方案中,诊断试剂盒包括免疫测定。尽管免疫测定的细节可随所采用的特定形式而变化,但检测生物样本中MSLN的方法通常包括使生物样本与抗-MSLN抗体接触的步骤。使抗体在免疫反应条件下进行特异性结合以形成免疫复合物,并直接或间接检测该免疫复合物(结合的抗体)的存在。

[0429] 本文所公开的抗体也可用于免疫测定,诸如但不限于放射性免疫测定(RIA)、ELISA或免疫组织化学测定。抗体还可用于荧光激活的细胞分选(FACS)。FACS采用多个颜色通道、低角度和钝角光散射检测通道以及阻抗通道,以及其他更复杂的检测水平,以分离或分选细胞(参见美国专利号5,061,620)。如本文所公开的,任何结合间皮素的单克隆抗体都可用于这些测定。因此,抗体可用于常规免疫测定,包括但不限于ELISA、RIA、FACS、组织免疫组织化学、Western印迹或免疫沉淀。

[0430] 实施例

[0431] 实施例1.动物免疫方案

[0432] 为了获得MSLN特异性抗体,通过不同的方法对Harbour H2L2转基因小鼠(https://harbourantibodies.com/)进行免疫。这些免疫产生许多结合MSLN胞外(ECD)蛋白质和表达MSLN的细胞诸如COV644细胞(表达MSLN的卵巢上皮-粘液癌细胞系)的抗体。

[0433] 具体地,重组人MSLN ECD His-标签蛋白质(Acro Biosystem,目录号MSN-H5223)或重组食蟹猴MSLN ECD His-标签蛋白质(具有以下列出的序列,SEQ ID NO:77)用作免疫原以对Harbour H2L2转基因小鼠进行免疫。

[0434] 食蟹猴MSLN ECD His-标签蛋白质(SEQ ID NO:77)

[0435] DVERTTCPPEKEVHEIDESLIFYKKRELEACVDAALLAAQMDRVDAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIRHLGHLFLKMSPEDIRKWNVTSLETLKALLKVSKGHEMSAQVATLIDRVVVGRGQLDKDTVDTLTAFCPGCLCSLSPERLSSVPPSVIGAVRPQDLDTCGPRQLDVLYPKARLAFQNMSGSEYFVKIRPFLGGAPTEDVKALSQQNVSMDLATFMKLRREAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKVEEQHSPVRDWILKQRQDDLDTLGLGLQGGIPNGYLILDLSVREALSGTPCLLGPGPVLTVLALLLASHHHHHH

[0436] 通过抗原免疫和杂交瘤克隆筛选产生抗间皮素抗体的方案示于图1中。

[0437] 免疫方案的示例在下表6中列出。简言之,通过皮下或腹腔向每只小鼠施用50μg免疫原与佐剂(Sigma,S6322)一起进行第一次加强免疫,并施用25μg免疫原与佐剂一起进行随后的加强免疫。每两周进行一次免疫,共计6次。用稀释在PBS中的免疫原通过腹腔进行最终免疫。使用ELISA和FACS测试针对重组人MSLN ECD His-标签蛋白质(Acro Biosystem,目录号MSN-H5223)的血清滴度。

[0438] 表6.免疫方案

[0439]

免疫原	动物群体规模	品系	途径	佐剂
HuMSLN，his蛋白质	G1,N=10	H2L2	i.p.(250ul)	CFA/RIBI/RIBI/RIBI/RIBI/RIBI
食蟹猴MSLN，his蛋白质	G3,G5，N=5	H2L2	i.p.(250ul)	CFA/RIBI/RIBI/RIBI/RIBI/RIBI

[0440] 实施例2.MSLN特异性抗体的筛选

[0441] 2.1杂交瘤的产生和MSLN特异性抗体的筛选

[0442] 单克隆抗体可以使用杂交瘤方法诸如Kohler和Milstein,Nature,第256卷:第495页(1975年)所述的那些方法制备。在杂交瘤方法中,淋巴细胞与永生化细胞系融合以形成杂交瘤细胞(Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,Academic Press(1986年),第59-103页)。永生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿动物的骨髓瘤细胞。杂交瘤细胞可以在合适的培养基中培养,该培养基优选含有一种或多种抑制未融合的永生化细胞生长或存活的物质。可以通过体外测定诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)来筛选由杂交瘤细胞产生的抗体上清液与靶MSLN的结合特异性。在鉴定出所需的杂交瘤细胞后,克隆可以通过有限稀释步骤进行亚克隆,并通过标准方法培养。(参见Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,Academic Press(1986年),第59-103页)。

[0443] 2.2MSLN特异性抗体的单B细胞筛选

[0444] Beacon®Optofluidic系统用于单B细胞筛选。该系统使用光电定位(OEPTM)技术来移动单个细胞,并且允许在细胞培养条件下同时进行生物功能测试、实验分析、阳性克隆选择和其他操作。Beacon平台可以对数千个细胞以大规模并行、自动化的方式执行这些任务。

[0445] 在本示例中,使用浆细胞发现工作流程。在每个实验中,针对MSLN特异性抗体的分泌情况,筛选多达14,000个单独浆细胞。然后,将分泌抗原特异性抗体的浆细胞转移到96孔板中以用于随后的单B细胞测序,以鉴定由单B细胞(单克隆)产生的抗体的重链和轻链。图2示出了筛选策略和过程。

[0446] 本实施例使用单B细胞测序方法以从单个浆细胞中获得抗体的重链和轻链的序列。一般程序包括从单个浆细胞裂解物中提取和纯化总RNA、cDNA的逆转录合成、cDNA的扩增和纯化、编码抗体的重链和轻链的DNA序列的扩增、克隆和转染以及Sanger测序。对所获得的序列进行独特性和聚类分析,然后合成编码抗体的成对重链和轻链的DNA序列。

[0447] 实施例3.抗体产生和纯化

[0448] 使用PEI(Polyscience,24885)将编码靶抗体的重组质粒瞬时转染到HEK293-6E细胞或293-F细胞中。转染后,将细胞在37℃5% CO_2条件下温育,120rpm振荡。在转染后6天至7天,通过离心和过滤收获含有靶抗体的细胞培养上清液。使用蛋白质A磁珠(AmMag蛋白质A磁珠,Genscript,L00695)纯化单克隆抗体。

[0449] 通过SEC-HPLC(Agilent 1260Infinity II HPLC系统,Welch Xtimate SEC-300色谱柱,pH 7.4的1×PBS作为流动相)和SDS-PAGE(SurePAGE,Bis-Tris,10×8,4%-12%,12孔,Genscript,M00653)测试抗体的纯度。重组抗体成功表达并纯化以用于进一步表征。

[0450] 获得两种抗体PR300159和PR300186。抗体PR300159和PR300186的氨基酸序列在上表1至表4中列出。

[0451] 同时,抗MSLN抗体Amatuximab采用来自IMGT的序列信息也按照以上所示的程序生产制备(http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=9343)。该抗体在随后的研究中用作对照,并分配PR000685的代码。

[0452] 实施例4.抗体对表达MSLN的细胞的结合活性

[0453] 通过流式细胞术测试重组抗MSLN抗体与表达人或食蟹猴MSLN的细胞的结合。在本实施例中,表达MSLN的细胞系包括CHOK1细胞系,这些细胞系已经被转染以在表面上表达人MSLN(CHOK1-hu MSLN,供应商:Kyinno,目录号:KC-1152)或食蟹猴MSLN(CHOK1-cyno MSLN,供应商:Kyinno,目录号:KC-1174),还包括COV644细胞系(ECACC,目录号:07071908)。

[0454] 简言之,将抗MSLN抗体在染色缓冲液(含有2% FBS的PBS缓冲液)中连续稀释。将50μL稀释的抗体溶液加入到50μL含有1-2×10^5个细胞的细胞悬浮液中,并在4℃下温育1小时。用染色缓冲液(含有2% FBS的PBS缓冲液)将细胞洗涤两次,并将100μL的1:1000稀释的荧光标记的抗人IgG抗体(Alexa Fluor®488AffiniPure山羊抗人IgG(H+L),Jackson ImmunoResearch,目录号109-545-088)加入到每个孔中。在4℃下温育1小时后,用染色缓冲液将细胞洗涤两次,并进行流式细胞术。PR000685(Amatuximab)和非相关IgG同种型对照(Crownbio)分别用作阳性对照和阴性对照。

[0455] 结果示于下图3至图5中。结果表明,PR300159和PR300186都显示出与表达人MSLN的细胞和表达食蟹猴MSLN的细胞强结合的活性,其中EC50值与PR000685(Amatuximab)相当。这些结果表明,抗MSLN抗体PR300159和PR300186能够以高亲和力结合细胞膜上的人MSLN和食蟹猴MSLN。

[0456] 实施例5.抗体工程化

[0457] 抗MSLN抗体PR300159和PR300186的VH序列和VL序列通过PTM去除程序进一步优

化。

[0458] 在哺乳动物细胞表达的蛋白质中广泛地观察到翻译后修饰(PTM)。除了抗体中的保守PTM位点例如IgG1抗体CH2结构域上的保守N-糖基化位点之外,抗体的抗原结合位点内出现的其他PTM位点(即,CDR区)也可降低抗原结合活性或降低化学稳定性。例如,脱酰胺或异构化可能使分子不稳定和异质。为了降低序列易感性,可以通过突变去除PTM基序。扫描VH序列或VL序列,观察PTM基序例如异构化基序(例如,DG)的存在。然后使“热点”残基(例如,DG基序中的D或G)突变为种系序列中的对应残基或具有相似生物物理特性的其他残基。然后通过成熟的分子生物学技术重组产生由去除PTM后的序列变体组成的抗体。

[0459] 从PR300159和PR300186中去除PTM所获得的设计变体示于表7中。这些抗MSLN抗体的氨基酸序列示于表1至表4中。PR300159-1、PR300159-3、PR300159-4、PR300159-5、PR300159-6、PR300159-7、PR300159-8和PR300159-9是衍生自PR300159的去除PTM的抗体。PR300186-2、PR300186-3、PR300186-4、PR300186-5、PR300186-6、PR300186-7、PR300186-8、PR300186-9和PR300186-10是衍生自PR300186的去除PTM的抗体。

[0460] 表7.所设计的PR300159衍生变体和PR300186衍生变体

[0461]

亲本抗体	变体抗体	突变位点	Fc
PR300159	PR300159-1	重链G33A和D54E 轻链N92S	hIgG1 Fc
	PR300159-3	重链G33A和G55A	hIgG1 Fc
	PR300159-4	轻链S93A	hIgG1 Fc
	PR300159-5	轻链N92Q	hIgG1 Fc
	PR300159-6	轻链S93T	hIgG1 Fc
	PR300159-7	轻链N92T	hIgG1 Fc
	PR300159-8	轻链N92A	hIgG1 Fc
	PR300159-9	重链G33A和D54E 轻链S93A	hIgG1 Fc
PR300186	PR300186-2	重链N30Q	hIgG1 Fc
	PR300186-3	重链N30Q和N58Q	hIgG1 Fc

[0462]

	PR300186-4	重链N30Q和N58Q 轻链N30Q	hIgG1 Fc
	PR300186-5	轻链N30Q	hIgG1 Fc
	PR300186-6	重链N30Q和S59A	hIgG1 Fc
	PR300186-7	重链N30Q 轻链S31A	hIgG1 Fc
	PR300186-8	重链N30Q和S59A 轻链S31A	hIgG1 Fc
	PR300186-9	轻链S31A	hIgG1 Fc
	PR300186-10	重链N30Q和N58Q 轻链S31A	hIgG1 Fc

[0463] 实施例6.抗体对人MSLN蛋白质和食蟹猴MSLN蛋白质的结合活性

[0464] 将人MSLN(Acro Biosystems,目录号MSN-H5223)或食蟹猴MSLN蛋白质(Harbourbiomed,批号:2019072202)在PBS中稀释至1μg/mL的浓度。将每孔100μL稀释的人MSLN或食蟹猴MSLN加入ELISA微孔板中,并将板在4℃下温育过夜。用ELISA封闭液(含有2%重量/体积BSA,0.05%(体积/体积)Tween-20,pH为7.4的PBS缓冲液)在37℃下将板封闭1小

时,然后洗涤板,并与15μg/mL(100nM,10倍稀释,8个点)稀释的抗MSLN抗体(PR300186、PR300186-2、PR300186-3、PR300186-4、PR300186-5、PR300186-6、PR300186-7、PR300186-8、PR300186-9和PR300186-10)在37℃下温育1小时。然后洗涤板,并与HRP缀合的山羊抗人IgG(H+L)抗体(Jackson,目录号:109-035-088)在37℃下一起温育1小时。加入100μL的3,3′,5,5′-四甲基联苯胺(TMB)底物(Biopanda,目录号:TMB-S-003),并将板在室温下温育15分钟。加入100μL的ELISA终止溶液(Solarbio,目录号:C1058)以终止反应,并通过ELISA读板仪(Molecular Devices,Spectra max 384plus)测定450nm处的光学密度(OD450nm)。

[0465] PR300186和PR300186PTM去除抗体(PR300186-2、PR300186-3、PR300186-4、PR300186-5、PR300186-6、PR300186-7、PR300186-8、PR300186-9和PR300186-10)的结果示于图6、图7和下表8中。结果表明,所有衍生自PR300186的PTM去除抗体均显示出对人类MSLN蛋白质和食蟹猴MSLN蛋白质两者具有良好的结合活性,其中EC50值与PR300186相当。

[0466] 表8.PR300186PTM去除抗体与人MSLN蛋白质和食蟹猴MSLN蛋白质的结合

[0467]

抗体	人MSLN		食蟹猴MSLN	
	EC50（nM）	跨度	EC50（nM）	跨度
PR300186	0.12	3.42	0.05	2.33
PR300186-2	0.14	3.36	0.05	2.43

[0468]

PR300186-3	0.10	3.25	0.05	2.36
PR300186-4	0.18	3.47	0.07	2.53
PR300186-5	0.22	3.61	0.07	2.70
PR300186-6	0.21	3.66	0.07	2.67
PR300186-7	0.14	3.85	0.04	2.24
PR300186-8	0.13	3.87	0.04	2.18
PR300186-9	0.11	3.85	0.05	2.19
PR300186-10	0.10	3.71	0.04	2.19

[0469] 实施例7.抗体对表达MSLN的细胞的结合活性

[0470] 通过流式细胞术测试重组抗MSLN抗体与COV644细胞系(ECACC,目录号:07071908)的结合。简言之,将抗MSLN抗体在染色缓冲液(含有2% FBS的PBS缓冲液)中连续稀释。将50μL稀释的抗体溶液加入到50μL含有1-2×10^5个细胞的细胞悬浮液中,并在4℃下温育1小时。用染色缓冲液(含有2% FBS的PBS缓冲液)将细胞洗涤两次,并将100μL的1:1000稀释的荧光标记的抗人IgG抗体(Alexa Fluor®488AffiniPure山羊抗人IgG(H+L),Jackson ImmunoResearch,目录号109-545-088)加入到每个孔中。在4℃下温育1小时后,用染色缓冲液将细胞洗涤两次,并进行流式细胞术。

[0471] PR300159PTM去除抗体的结果示于图8和下表9中。结果表明,与PR300159相比,PTM去除抗体PR300159-1、PR300159-3、PR300159-5、PR300159-6和PR300159-8显示出与COV644细胞的相当的结合活性。

[0472] 表9.通过FACS的PR300159PTM去除抗体与细胞表面MSLN的结合

[0473]

抗体	COV644	
	EC50（nM）	TOP（MFI）
PR300159	1.99	2072495
PR300159-1	1.64	2340478
PR300159-3	2.14	2062034
PR300159-5	2.75	2127765
PR300159-6	4.07	2189544
PR300159-8	2.33	2153079
PR300159-9	8.25	1561284

[0474] 衍生自PR300186的PTM去除抗体的结果示于图9中。结果表明,与PR300186相比,PTM去除抗体PR300186-3、PR300186-9和PR300186-10显示出与COV644细胞的更好的结合活性。

[0475] 实施例8抗体被表达MSLN的细胞的内化

[0476] 在该示例中,采用pHAb胺反应性染料(Promega,目录号G9841)测定抗MSLN抗体在COV644细胞中的抗原内化。。pHAb染料是在pH>7处具有非常低荧光并且当溶液变成酸性时荧光显著增加的pH传感器染料。当用pHAb染料标记的抗体在中性pH值下与细胞膜外结合时,可以监测到无荧光或很低的荧光。内化后,荧光在内体和溶酶体的低pH环境中会变得更强。

[0477] 用pHAb染料标记抗体,并按照试剂盒说明书计算DAR。然后将标记的抗体与COV644在4℃(在该温度下的内化活性非常低,其用作背景对照)或37℃下一起温育24小时。然后检测在532nm处具有激发最大值(Ex)和在560nm处具有发射最大值(Em)的荧光。最终归一化的结果显示为37℃下的荧光强度减去4℃下背景的荧光强度,然后除以抗体的pHAb Dye的DARs。数值越高表示内化活性越高。

[0478] PR300159和衍生自PR300159的PTM去除抗体的内化速率结果示于图10和表10中。结果表明,与PR300159相比,PR300159-1、PR300159-4、PR300159-5、PR300159-6、PR300159-7、PR300159-8抗体显示出被COV644细胞相当的内化。

[0479] PR300186和衍生自PR300186的PTM去除抗体的内化速率结果示于图11和表10中。结果表明,与PR300186相比,PR300186-3、PR300186-9和PR300186-10显示出被COV644细胞更好的内化。

[0480] 表10.PR300159和PR300186PTM去除抗体被表达MSLN的细胞的内化

[0481]

抗体	内化
	FLU
PR300159	22214
PR300159-1	13720
PR300159-3	9180
PR300159-4	20888
PR300159-5	20912
PR300159-6	17753
PR300159-7	22440
PR300159-8	21172

PR300159-9	8299
PR300186	6049
PR300186-3	7042
PR300186-9	8069
PR300186-10	8219

[0482] 实施例9.通过BLI方法的抗体与可溶性MSLN蛋白质的结合活性

[0483] 在本实施例中,抗MSLN抗体与可溶性MSLN的结合动力学通过Octet Red384(Fortebio)分析。在生物膜干涉技术(BLI)分析中,用1×动力学缓冲液(Fortebio)连续稀释重组人MSLN-His标签(Acro Biosystems,目录号:MSN-H5223)。将抗MSLN抗体稀释至5μg/mL。然后将稀释的抗体、抗原和再生缓冲液(10mM甘氨酸,pH 1.75)加入96孔板(Greiner)。使用AHC传感器(Fortebio)测量结合和解离的速率常数。在每次结合实验后用再生缓冲液再生传感器表面。使用Octet数据分析软件(版本11.0,Pall ForteBio,CA,USA)处理踪迹。抗体与可溶性人MSLN结合的K_D值汇总于表11中。

[0484] 如表11所示,在Octet分析中,与PR300159相比,衍生自PR300159的PTM去除抗体显示出与可溶性MSLN相当的结合亲和力。

[0485] PR300186和PR300186-10对可溶性MSLN显示出低结合亲和力,当作为治疗性抗体应用时这是有利的,因为抗体最好结合肿瘤细胞上的细胞表面MSLN而不是循环系统中的可溶性MSLN。

[0486] 表11.PR300159和PR300186PTM去除抗体与可溶性人MSLN的结合

[0487]

抗体	Octet亲和力		
	KD (M)	kon (1/Ms)	全R^2
PR300159	9.65E-12	1.28E+06	0.9977
PR300159-1	<1.0E-12	9.47E+05	0.9974
PR300159-3	<1.0E-12	8.28E+05	0.9919
PR300159-4	<1.0E-12	9.78E+05	0.9975
PR300159-5	<1.0E-12	1.05E+06	0.9965
PR300159-6	<1.0E-12	8.19E+05	0.99
PR300159-7	<1.0E-12	1.06E+06	0.9973
PR300159-8	<1.0E-12	9.56E+05	0.9934
PR300159-9	<1.0E-12	5.66E+05	0.9706
PR300186	1.86E-08	7.05E+05	0.93
PR300186-10	1.28E-07	4.31E+05	0.99

[0488] 实施例10.可溶性MSLN干扰测定

[0489] 结合膜结合形式的MSLN的抗体对于诊断和治疗目的是有利的。因为它们不结合可溶性MSLN,所以它们将具有较低背景以用于成像应用,并且它们可以较低剂量用于治疗用途。

[0490] 测试在存在或不存在90nM可溶性MSLN(sMSLN)的情况下,抗体PR300159和PR300186以及衍生自PR300159-8或PR300186-10的PTM去除抗体与表达COV644的间皮素的结合。按照实施例4中所示的类似程序进行实验,不同的是将90nM可溶性MSLN加入系列稀释的+sMSLN组抗体中。

[0491] 如图12所示,与不存在可溶性MSLN的情况相比,在存在90nM可溶性MSLN的情况下,PR300159与COV644细胞的结合降低。如图13所示,PR300186显示出较少的变化,这表明可溶

性MSLN对PR300186与膜结合形式的MSLN的结合的干扰较小。

[0492] 如图14和图15所示,与不存在可溶性MSLN的情况相比,在存在90nM可溶性MSLN的情况下,PR300159-8和PR300186-10与COV644细胞的结合降低。然而,PR300186-10显示出较少的变化,这表明可溶性MSLN对这些抗体与膜结合形式的MSLN的结合的干扰较小。

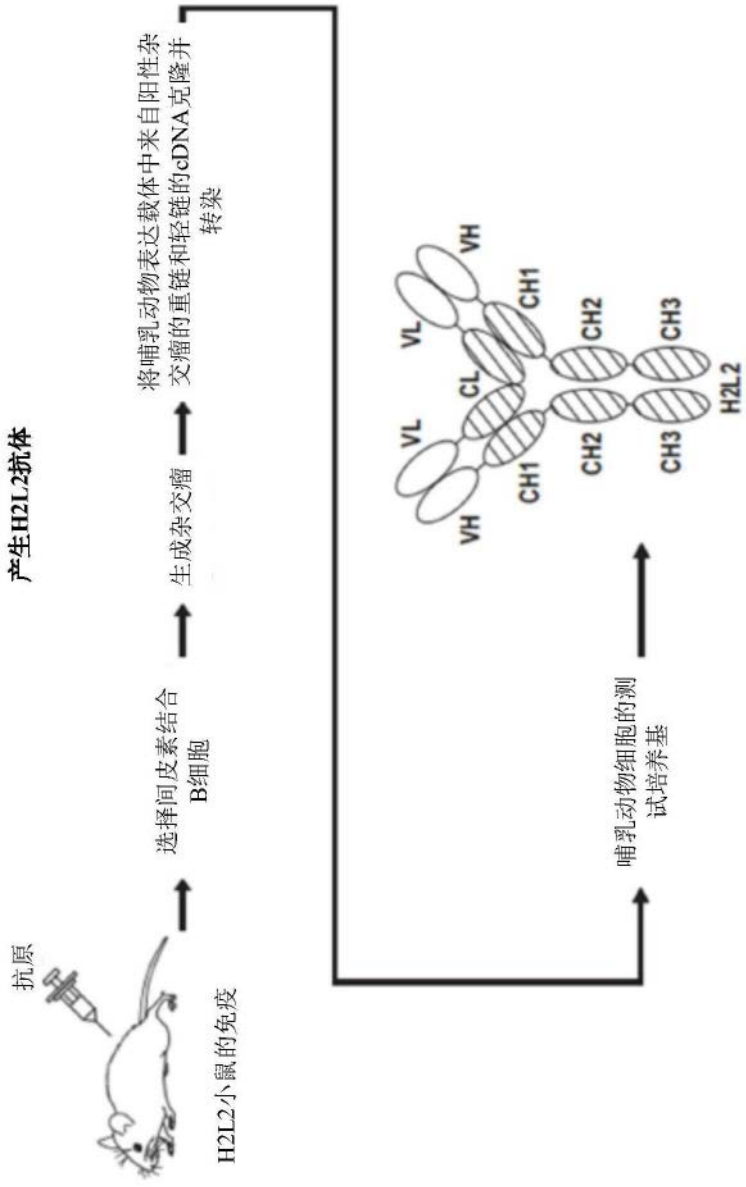

抗原
H2L2小鼠的免疫
选择间皮素结合
B细胞
生成杂交瘤
将哺乳动物表达载体中来自阳性杂
交瘤的重链和轻链的cDNA克隆并
转染
哺乳动物细胞的测
试培养基
产生H2L2抗体
VH
VL
CH1
CL
CH2
CH3
H2L2

图1

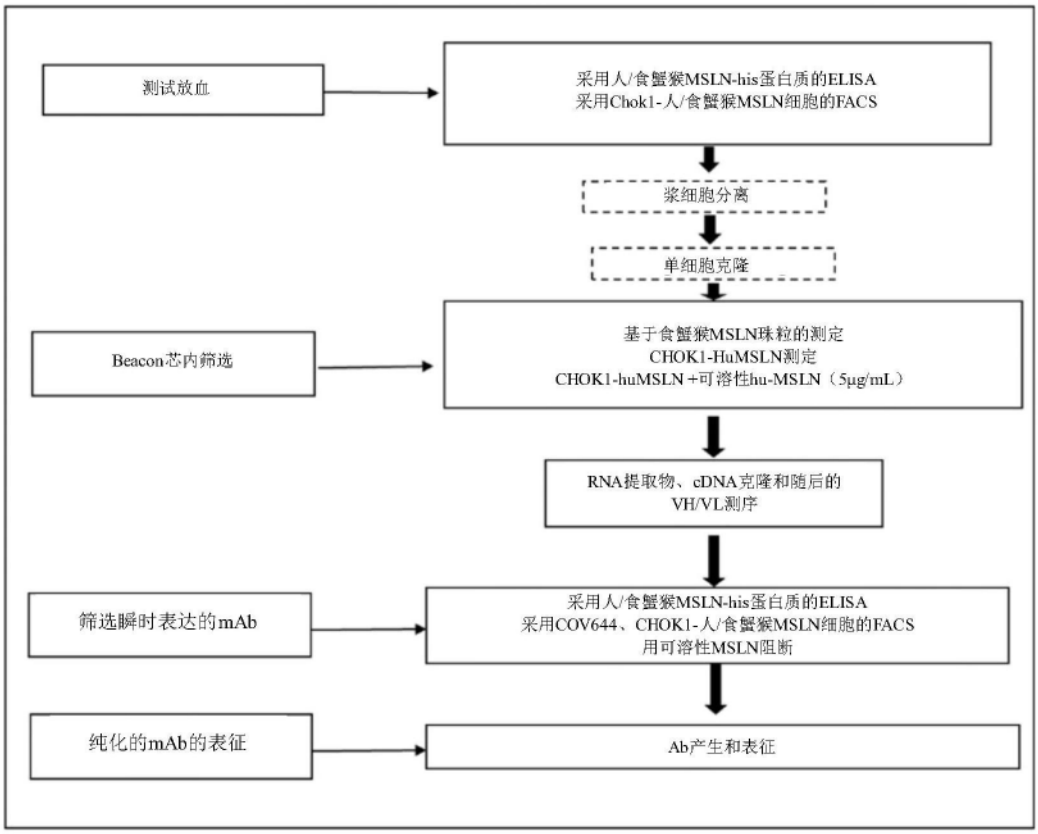
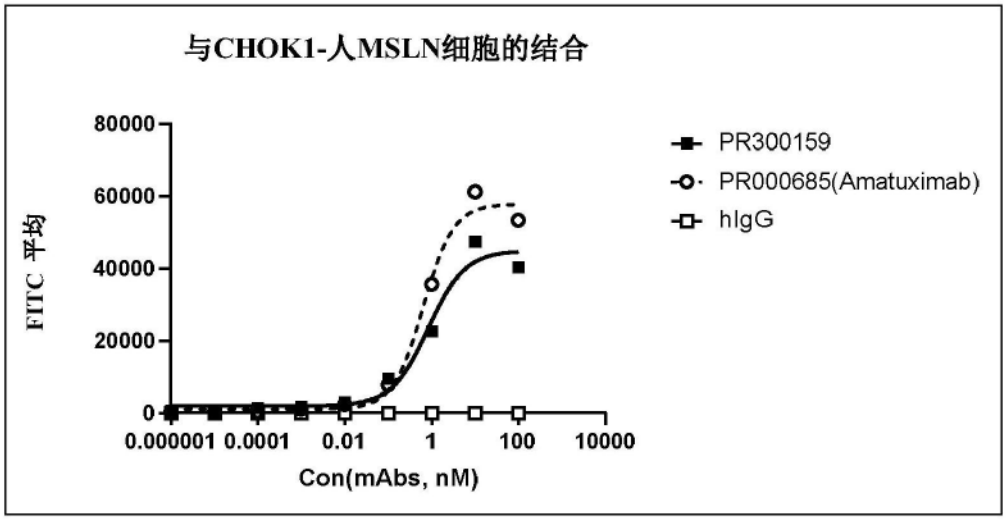

测试放血
采用人/食蟹猴MSLN-his蛋白质的ELISA
采用Chok1-人/食蟹猴MSLN细胞的FACS
浆细胞分离
单细胞克隆
Beacon芯内筛选
基于食蟹猴MSLN珠粒的测定
CHOK1-HuMSLN测定
CHOK1-huMSLN +可溶性hu-MSLN（5μg/mL）
RNA提取物、cDNA克隆和随后的
VH/VL测序
筛选瞬时表达的mAb
采用人/食蟹猴MSLN-his蛋白质的ELISA
采用COV644、CHOK1-人/食蟹猴MSLN细胞的FACS
用可溶性MSLN阻断
纯化的mAb的表征
Ab产生和表征

图2

A


与CHOK1-人MSLN细胞的结合
FITC 平均
80000
60000
40000
20000
0
0.000001 0.0001 0.01 1 100 10000
Con(mAbs, nM)
PR300159
PR000685(Amatuximab)
hIgG

B

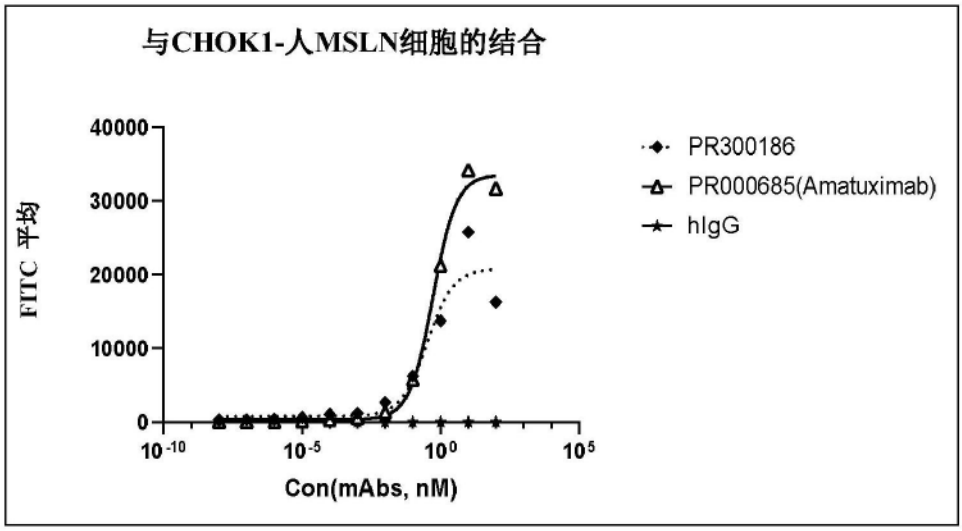
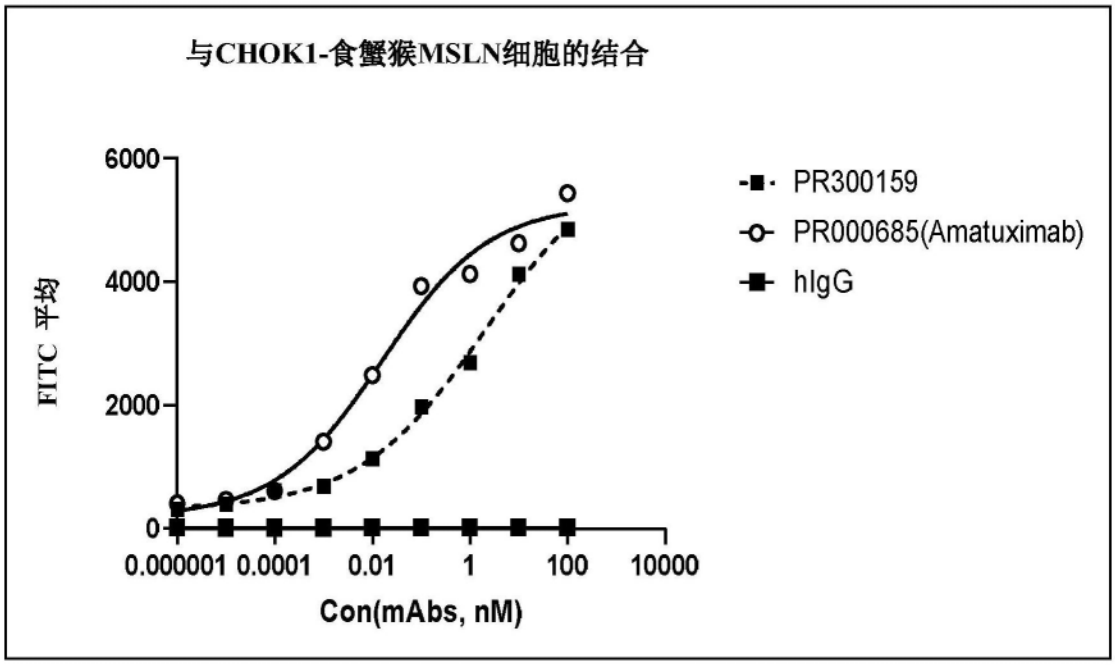

与CHOK1-人MSLN细胞的结合
FITC 平均
40000
30000
20000
10000
0
10-10 10-5 100 105
Con(mAbs, nM)
PR300186
PR000685(Amatuximab)
hIgG

图3

A


与CHOK1-食蟹猴MSLN细胞的结合
FITC 平均
6000
4000
2000
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
10000
Con(mAbs, nM)
PR300159
PR000685(Amatuximab)
hIgG

B

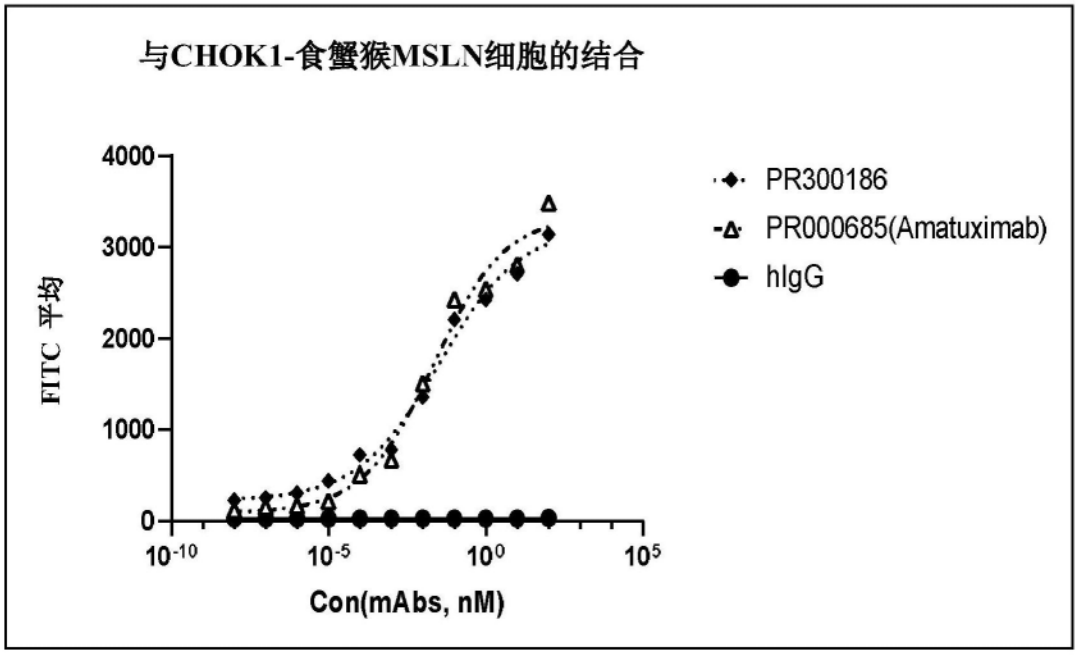
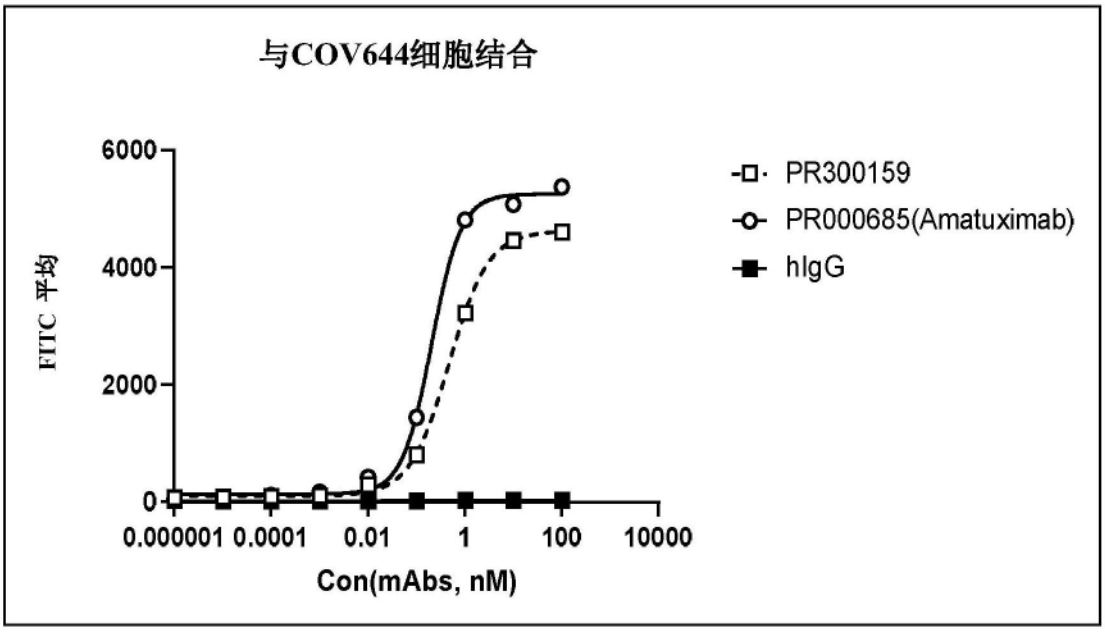

与CHOK1-食蟹猴MSLN细胞的结合
FITC 平均
4000
3000
2000
1000
0
10-10
10-5
100
105
Con(mAbs, nM)
PR300186
PR000685(Amatuximab)
hIgG

图4

A


与COV644细胞结合
FITC 平均
6000
4000
2000
0
0.000001 0.0001 0.01 1 100 10000
Con(mAbs, nM)
PR300159
PR000685(Amatuximab)
hIgG

B

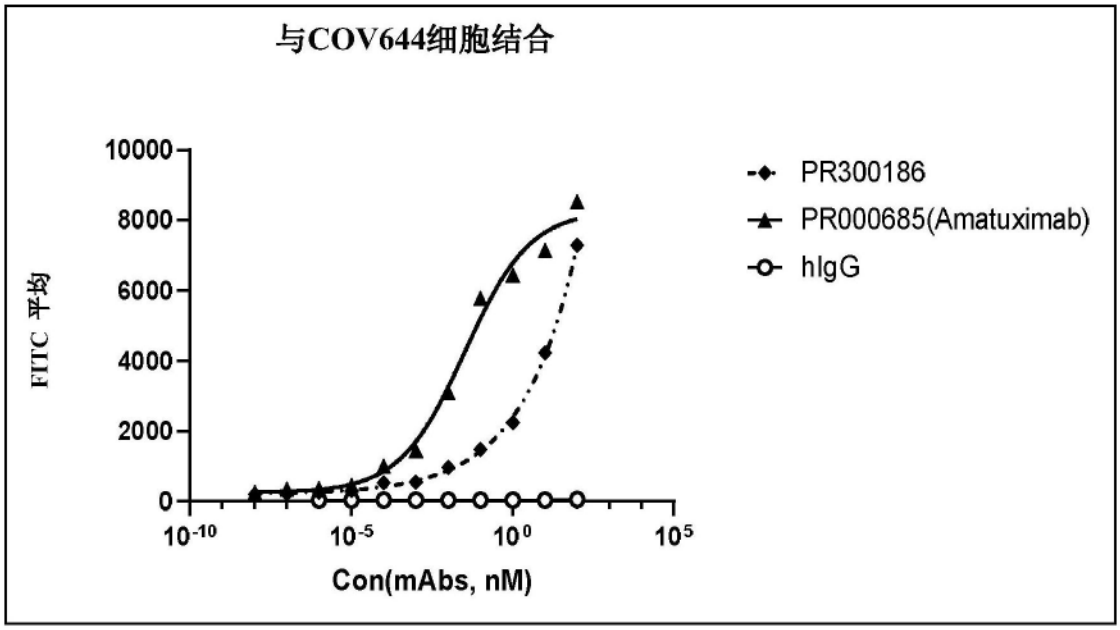

与COV644细胞结合
FITC 平均
10000
8000
6000
4000
2000
0
10-10 10-5 100 105
Con(mAbs, nM)
PR300186
PR000685(Amatuximab)
hIgG

图5

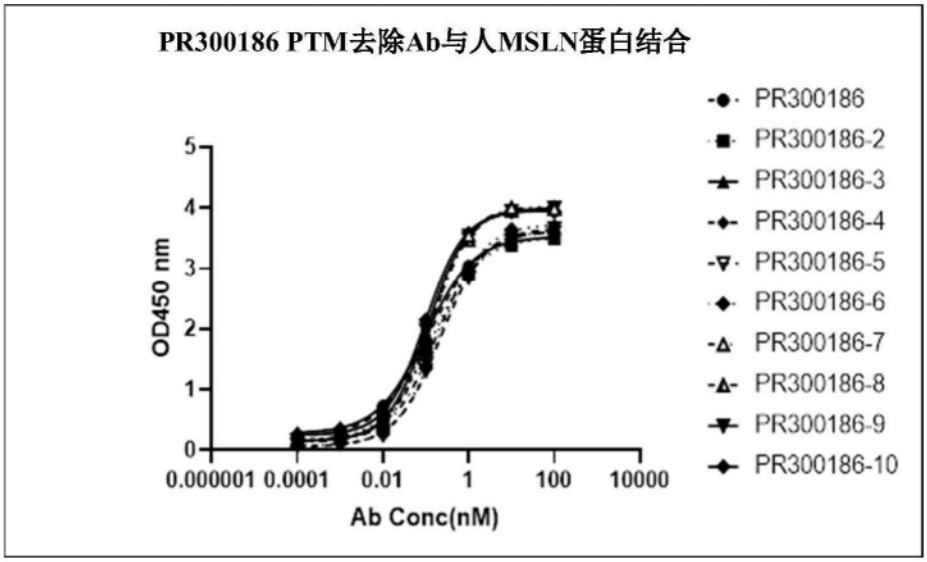

PR300186 PTM去除Ab与人MSLN蛋白结合
OD450 nm
Ab Conc(nM)
0.000001
0.0001
0.01
1
100
10000
PR300186
PR300186-2
PR300186-3
PR300186-4
PR300186-5
PR300186-6
PR300186-7
PR300186-8
PR300186-9
PR300186-10

图6

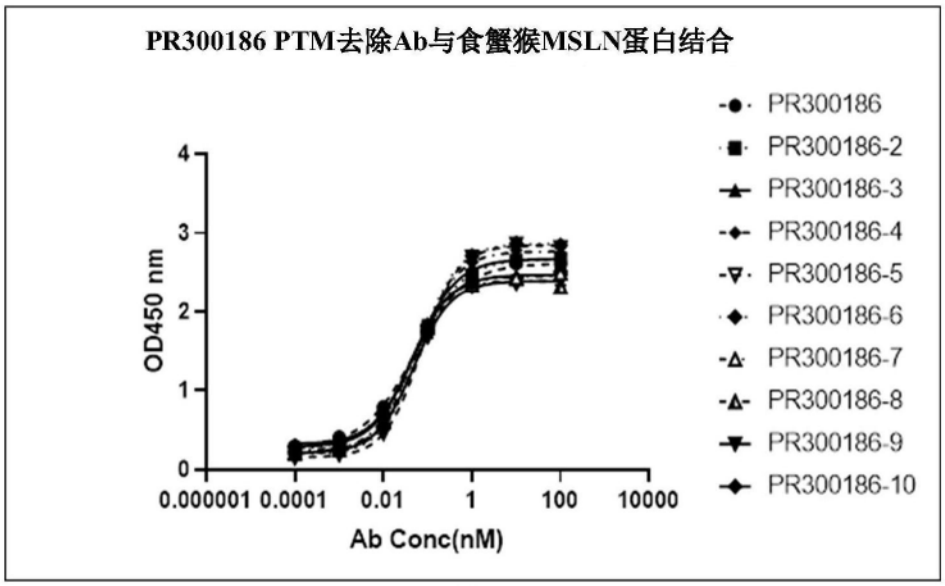

PR300186 PTM去除Ab与食蟹猴MSLN蛋白结合
OD450 nm
Ab Conc(nM)
0.000001
0.0001
0.01
1
100
10000
PR300186
PR300186-2
PR300186-3
PR300186-4
PR300186-5
PR300186-6
PR300186-7
PR300186-8
PR300186-9
PR300186-10

图7

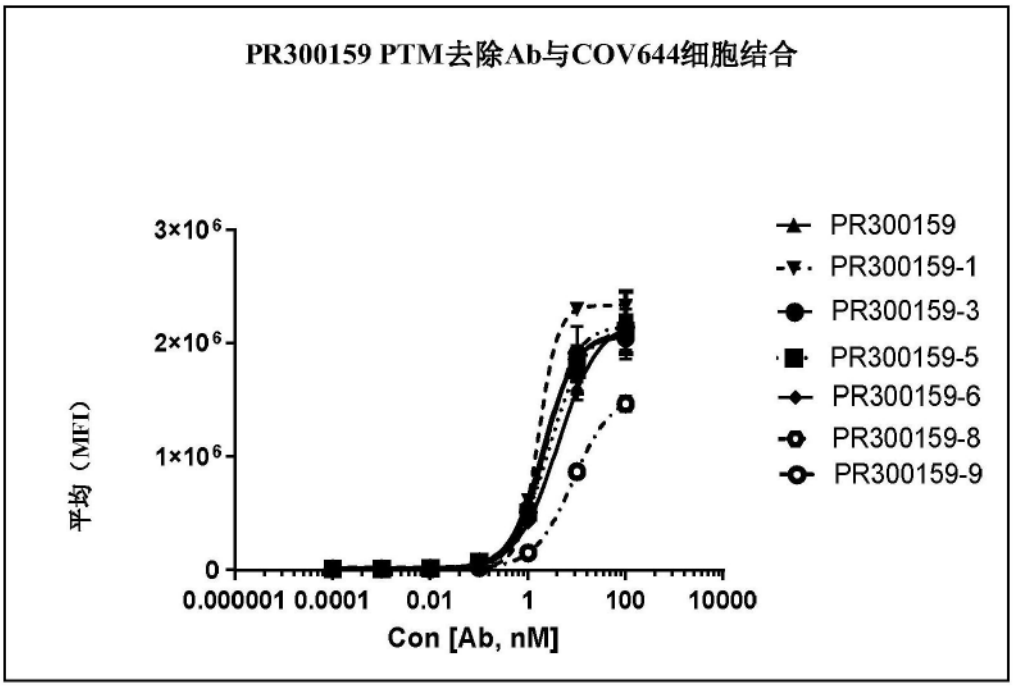
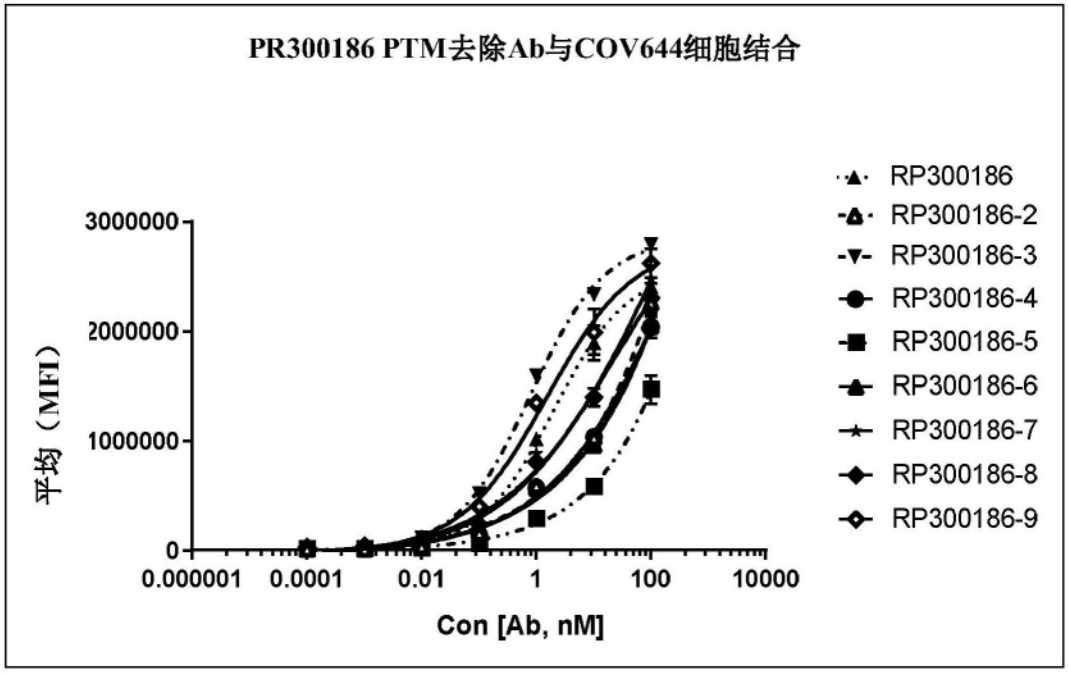

PR300159 PTM去除Ab与COV644细胞结合
平均（MFI）
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
0.000001 0.0001 0.01 1 100 10000
Con [Ab, nM]
PR300159
PR300159-1
PR300159-3
PR300159-5
PR300159-6
PR300159-8
PR300159-9

图8

A


PR300186 PTM去除Ab与COV644细胞结合
平均（MFI）
3000000
2000000
1000000
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
10000
Con [Ab, nM]
RP300186
RP300186-2
RP300186-3
RP300186-4
RP300186-5
RP300186-6
RP300186-7
RP300186-8
RP300186-9

B

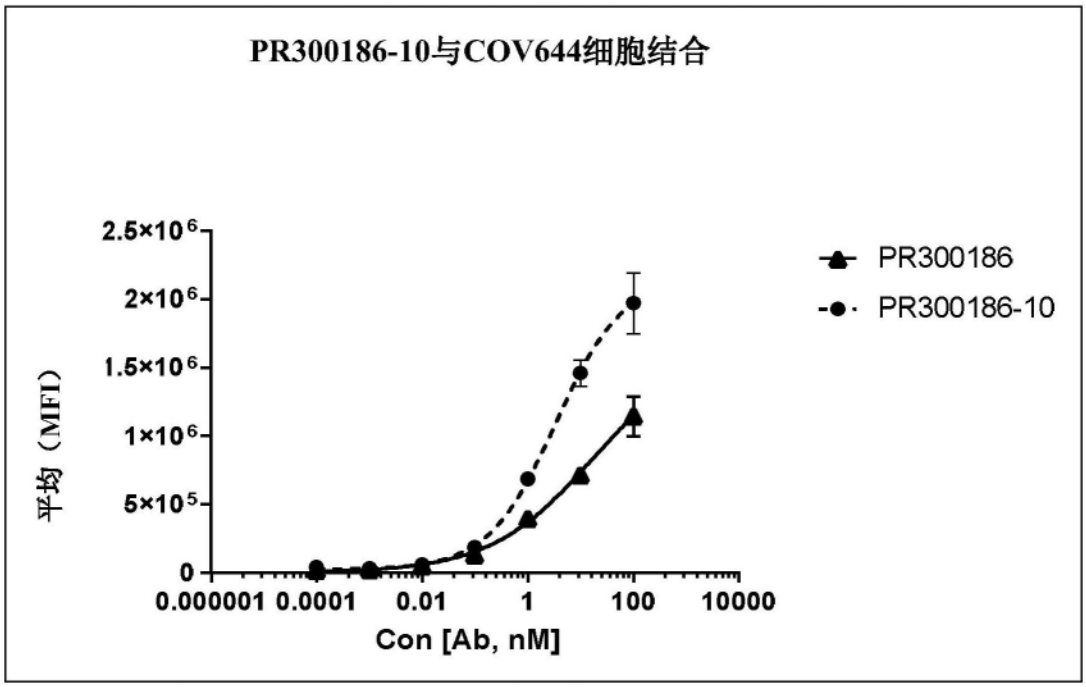

PR300186-10与COV644细胞结合
平均（MFI）
2.5×10⁶
2×10⁶
1.5×10⁶
1×10⁶
5×10⁵
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
10000
Con [Ab, nM]
PR300186
PR300186-10

图9

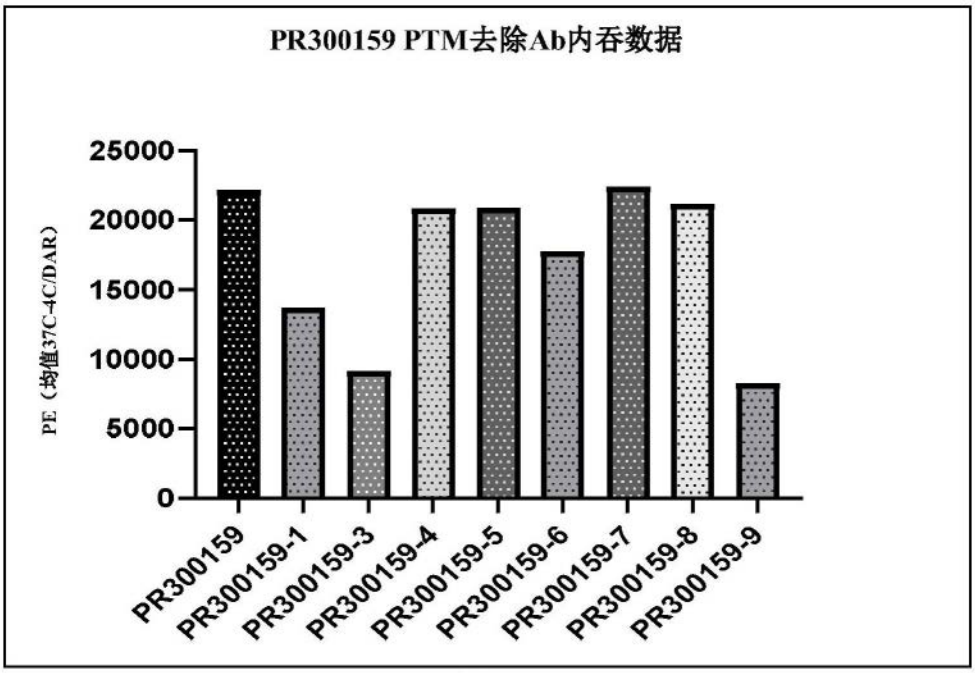

PR300159 PTM去除Ab内吞数据
PE（均值37C-4C/DAR）
25000
20000
15000
10000
5000
0
PR300159
PR300159-1
PR300159-3
PR300159-4
PR300159-5
PR300159-6
PR300159-7
PR300159-8
PR300159-9

图10

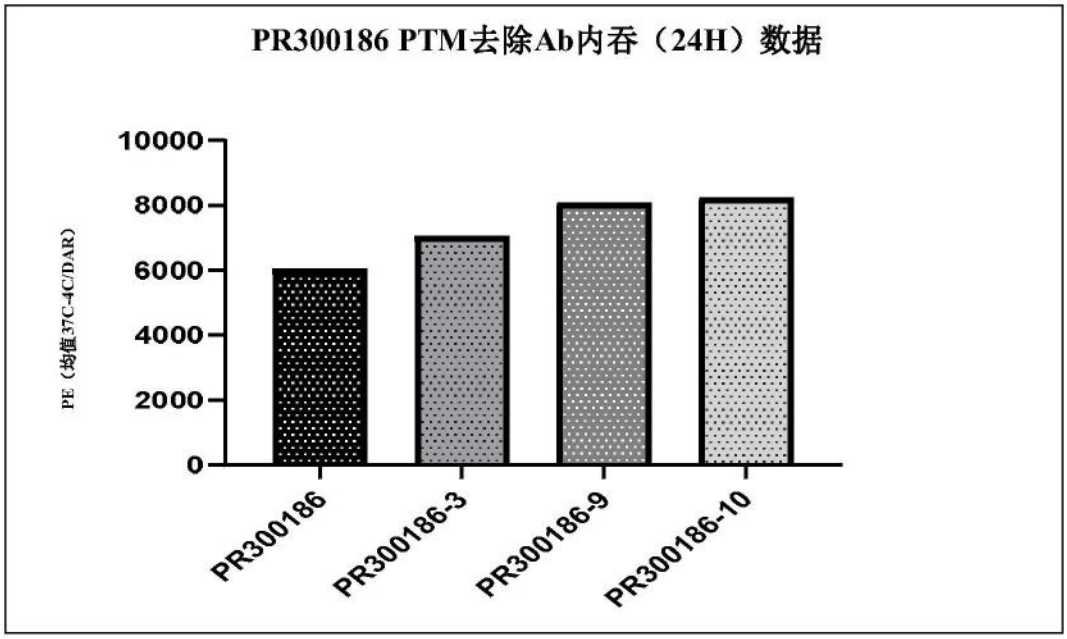
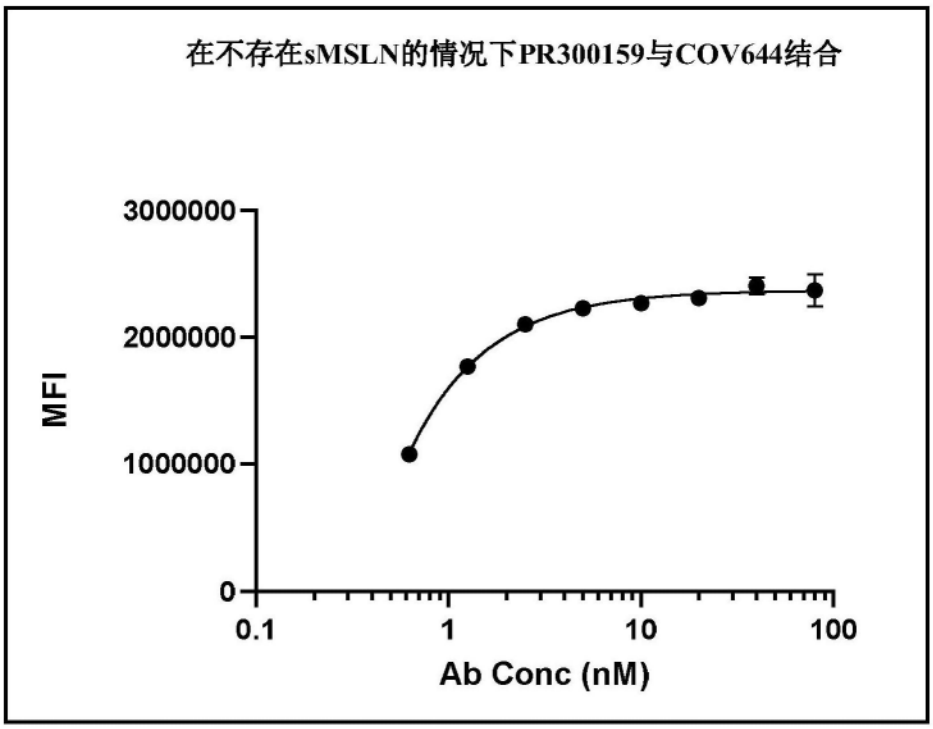

PR300186 PTM去除Ab内吞（24H）数据
PE（均值37C-4C/DAR）
10000
8000
6000
4000
2000
0
PR300186
PR300186-3
PR300186-9
PR300186-10

图11

A


在不存在sMSLN的情况下PR300159与COV644结合
MFI
3000000
2000000
1000000
0
0.1
1
10
100
Ab Conc (nM)

B

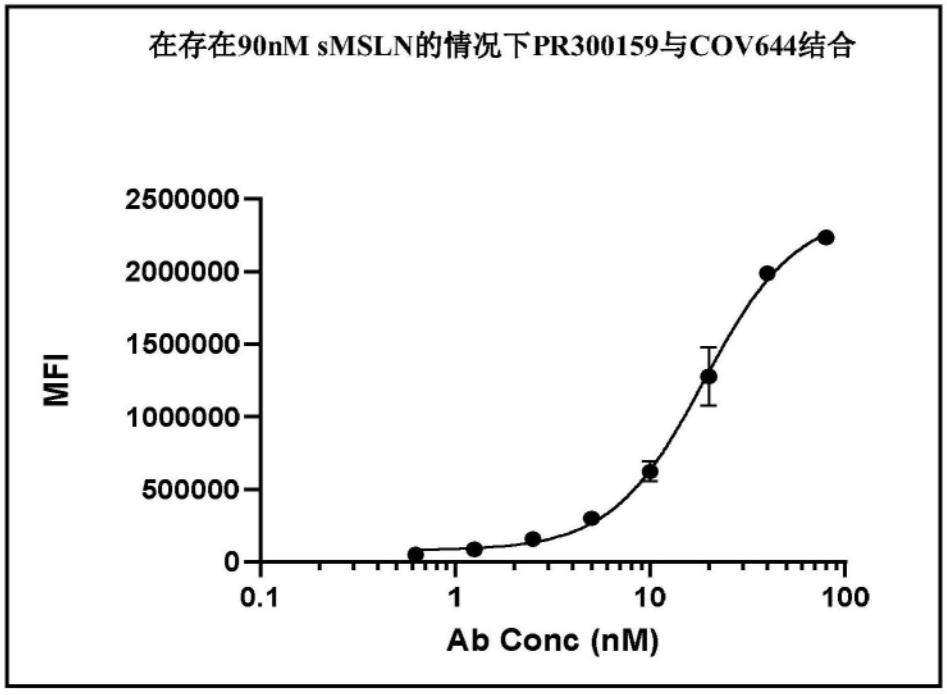
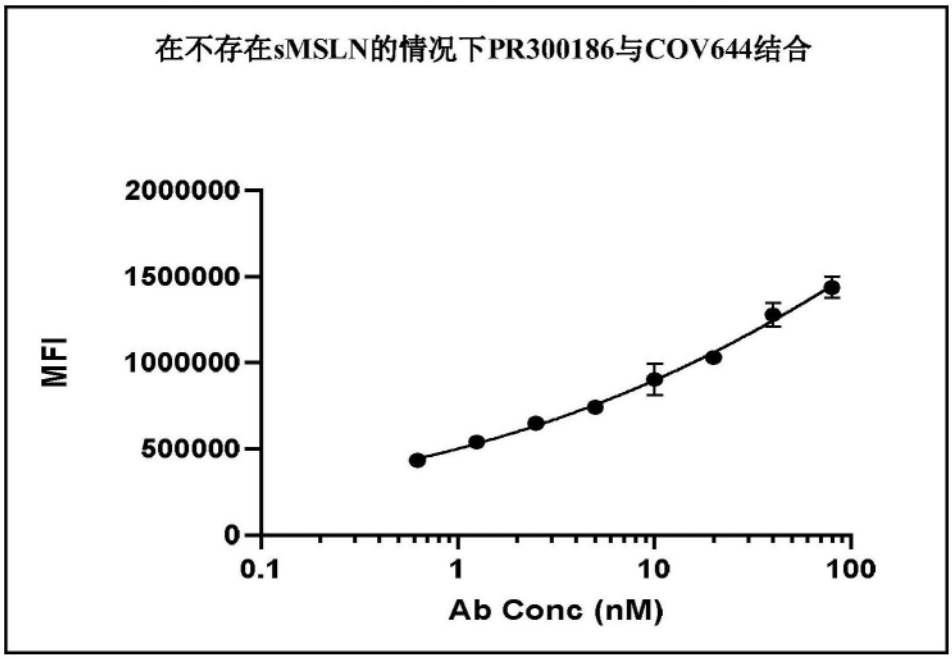

在存在90nM sMSLN的情况下PR300159与COV644结合
MFI
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
0.1
1
10
100
Ab Conc (nM)

图12

A


在不存在sMSLN的情况下PR300186与COV644结合
MFI
2000000
1500000
1000000
500000
0
0.1
1
10
100
Ab Conc (nM)

B

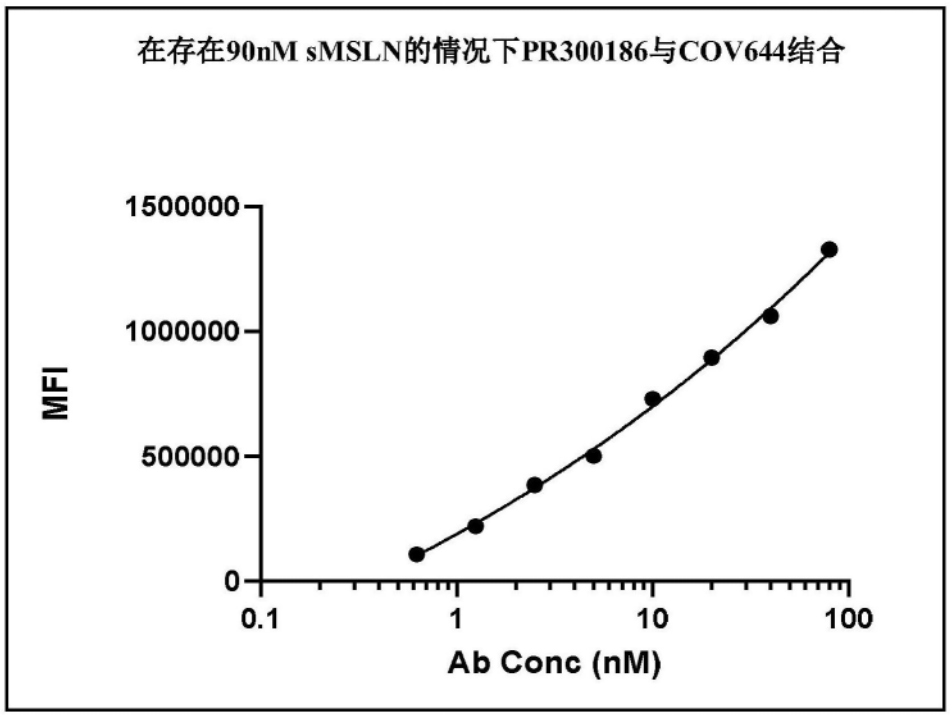

在存在90nM sMSLN的情况下PR300186与COV644结合
MFI
1500000
1000000
500000
0
0.1
1
10
100
Ab Conc (nM)

图13

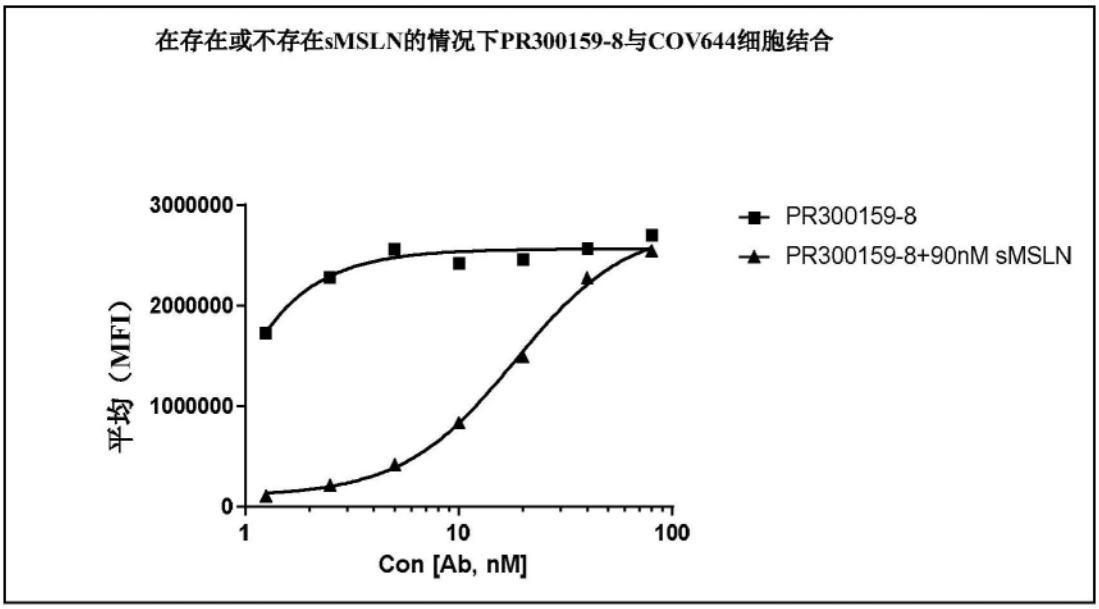

在存在或不存在sMSLN的情况下PR300159-8与COV644细胞结合
3000000
2000000
1000000
0
平均（MFI）
1
10
100
Con [Ab, nM]
PR300159-8
PR300159-8+90nM sMSLN

图14

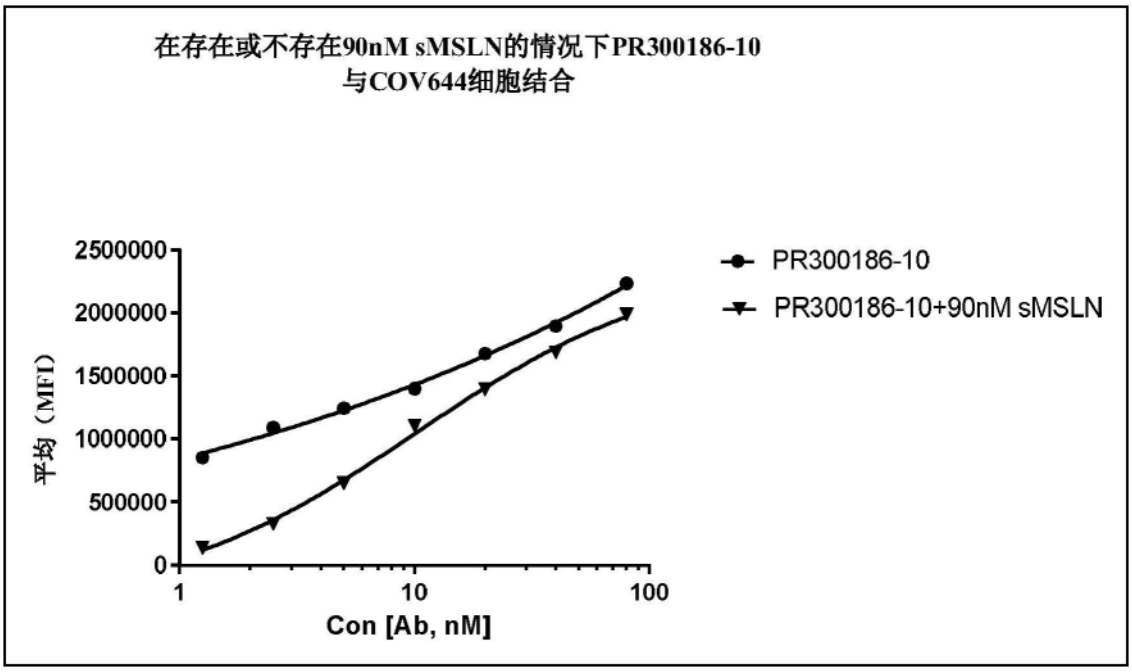

在存在或不存在90nM sMSLN的情况下PR300186-10
与COV644细胞结合
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
平均（MFI）
1
10
100
Con [Ab, nM]
PR300186-10
PR300186-10+90nM sMSLN

图15