



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116917327 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 20

(21) 申请号 202280016735.6

(22) 申请日 2022.02.28

(30) 优先权数据

63/154,618 2021.02.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.08.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/018117 2022.02.28

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2022/183101 EN 2022.09.01

(71) 申请人 特尼奥生物股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 K·哈里斯 B·阿万奇诺

N·艾伦 K·张 N·特林克莱因

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

专利代理师 王建秀 刘小立

(51) Int.Cl.

C07K 16/30 (2006.01)

权利要求书4页 说明书36页 附图7页

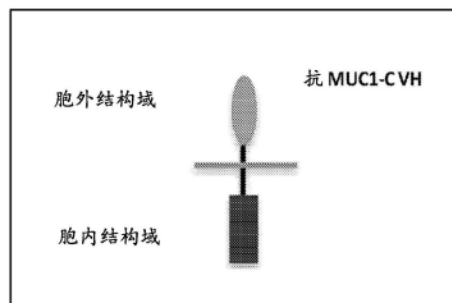
(54) 发明名称

抗MUC1-C抗体及CAR-T结构

(57) 摘要

披露了抗MUC1-C抗体(例如,UniAbs™)和CAR-T结构,以及制备此类抗体和CAR-T结构的方法,包含此类抗体和CAR-T结构的组合物,包括药物组合物,以及它们治疗特征在于MUC1-C的表达的疾患的用途。

A.



1. 一种与MUC1-C结合的抗体,其包含重链可变区,该重链可变区包含:
 - (a) 在SEQ ID NO:1或4的氨基酸序列中的任一个中包含两个或更少取代的CDR1序列;和/或
 - (b) 在SEQ ID NO:2或5的氨基酸序列中的任一个中包含两个或更少取代的CDR2序列;和/或
 - (c) 在SEQ ID NO:3或6的氨基酸序列中的任一个中包含两个或更少取代的CDR3序列。
2. 如权利要求1所述的抗体,其中所述CDR1、CDR2和CDR3序列存在于人框架中。
3. 如权利要求1所述的抗体,其进一步包含CH1序列不存在的重链恒定区序列。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的抗体,其包含:
 - (a) 选自由SEQ ID NO:1和4组成的组的CDR1序列;和/或
 - (b) 选自由SEQ ID NO:2和5组成的组的CDR2序列;和/或
 - (c) 选自由SEQ ID NO:3和6组成的组的CDR3序列。
5. 如权利要求4所述的抗体,其包含:
 - (a) 选自由SEQ ID NO:1和4组成的组的CDR1序列;和
 - (b) 选自由SEQ ID NO:2和5组成的组的CDR2序列;以及
 - (c) 选自由SEQ ID NO:3和6组成的组的CDR3序列。
6. 如权利要求5所述的抗体,其包含:
 - (a) SEQ ID NO:1的CDR1序列、SEQ ID NO:2的CDR2序列和SEQ ID NO:3的CDR3序列;或者
 - (b) SEQ ID NO:4的CDR1序列、SEQ ID NO:5的CDR2序列和SEQ ID NO:6的CDR3序列。
7. 如权利要求1-3中任一项所述的抗体,其包含与SEQ ID NO:7-8中任一序列具有至少95%序列同一性的重链可变区。
8. 如权利要求7所述的抗体,其包含选自由SEQ ID NO:7-8组成的组的重链可变区序列。
9. 如权利要求8所述的抗体,其包含SEQ ID NO:7的重链可变区序列。
10. 如权利要求8所述的抗体,其包含SEQ ID NO:8的重链可变区序列。
11. 一种与MUC1-C结合的抗体,其包含重链可变区,该重链可变区包含在人VH框架中的CDR1、CDR2和CDR3序列,其中这些CDR序列是在选自由SEQ ID NO:1-6组成的组的CDR序列中具有两个或更少取代的序列。
12. 如权利要求11所述的抗体,其包含重链可变区,该重链可变区包含在人VH框架中的CDR1、CDR2和CDR3序列,其中这些CDR序列选自由SEQ ID NO:1-6组成的组。
13. 一种与MUC1-C结合的抗体,其包含重链可变区,该重链可变区包含:
 - (a) 在人VH框架中的SEQ ID NO:1的CDR1序列、SEQ ID NO:2的CDR2序列和SEQ ID NO:3的CDR3序列;或者
 - (b) 在人VH框架中的SEQ ID NO:4的CDR1序列、SEQ ID NO:5的CDR2序列和SEQ ID NO:6的CDR3序列。
14. 如权利要求1至13中任一项所述的抗体,其呈CAR-T形式。
15. 如权利要求1-13中任一项所述的抗体,其是多特异性的。
16. 如权利要求15所述的抗体,其是双特异性的。

17. 如权利要求16所述的抗体,其与两个不同MUC1-C蛋白结合。
18. 如权利要求16所述的抗体,其与在同一MUC1-C蛋白上的两个不同表位结合。
19. 如权利要求15所述的抗体,其与效应细胞结合。
20. 如权利要求15所述的抗体,其与T细胞抗原结合。
21. 如权利要求20所述的抗体,其与CD3结合。
22. 如权利要求21所述的抗体,其包含:
 - (a) 重链可变区,该重链可变区包含:
 - (i) 在人VH框架中的SEQ ID NO:9的CDR1序列、SEQ ID NO:10的CDR2序列和SEQ ID NO:11的CDR3序列;或者
 - (ii) 在人VH框架中的SEQ ID NO:12的CDR1序列、SEQ ID NO:13的CDR2序列和SEQ ID NO:14的CDR3序列;以及
 - (b) 轻链可变区,该轻链可变区包含在人VL框架中的SEQ ID NO:15的CDR1序列、SEQ ID NO:16的CDR2序列和SEQ ID NO:17的CDR3序列。
23. 如权利要求22所述的抗体,其包含:
 - (a) 重链可变区,该重链可变区包含:
 - (i) 与SEQ ID NO:18具有至少95%序列同一性的重链可变区序列;或者
 - (ii) 与SEQ ID NO:19具有至少95%序列同一性的重链可变区序列;以及
 - (b) 与SEQ ID NO:20具有至少95%序列同一性的轻链可变区序列。
24. 如权利要求23所述的抗体,其包含:
 - (a) 重链可变区,该重链可变区包含:
 - (i) 包含SEQ ID NO:18的重链可变区序列;或者
 - (ii) 包含SEQ ID NO:19的重链可变区序列;以及
 - (b) 包含SEQ ID NO:20的轻链可变区序列。
25. 一种与MUC1-C和CD3结合的双特异性三链抗体样分子(TCA),其包含:
 - (a) 第一多肽,该第一多肽由SEQ ID NO:32组成;
 - (b) 第二多肽,该第二多肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:42;以及
 - (c) 第三多肽,该第三多肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39。
26. 一种包含CAR的CAR-T细胞,该CAR包含与MUC1-C结合的胞外抗原结合结构域,该胞外抗原结合结构域包含重链可变区,该重链可变区包含:
 - (a) SEQ ID NO:1的CDR1序列、SEQ ID NO:2的CDR2序列和SEQ ID NO:3的CDR3序列;或者
 - (b) SEQ ID NO:4的CDR1序列、SEQ ID NO:5的CDR2序列和SEQ ID NO:6的CDR3序列。
27. 如权利要求26所述的CAR-T细胞,其中该与MUC1-C结合的胞外抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:7-8中任一序列具有至少95%序列同一性的重链可变区。
28. 如权利要求27所述的CAR-T细胞,其中该与MUC1-C结合的胞外抗原结合结构域包含选自由SEQ ID NO:7-8组成的组的重链可变区序列。
29. 如权利要求28所述的CAR-T细胞,其中该与MUC1-C结合的胞外抗原结合结构域包含SEQ ID NO:7的重链可变区序列。

30. 如权利要求28所述的CAR-T细胞,其中该与MUC1-C结合的胞外抗原结合结构域包含SEQ ID NO:8的重链可变区序列。

31. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-25中任一项所述的抗体或如权利要求26-30中任一项所述的CAR-T细胞。

32. 一种用于治疗特征在于MUC1-C的表达的疾患的方法,其包括向患有所述疾患的受试者施用如权利要求1-25中任一项所述的抗体、如权利要求26-30中任一项所述的CAR-T细胞或如权利要求31所述的药物组合物。

33. 如权利要求32所述的方法,其中该疾患是癌症。

34. 如权利要求33所述的方法,其中该癌症是癌。

35. 如权利要求34所述的方法,其中该癌是腺癌或鳞状细胞癌。

36. 如权利要求34所述的方法,其中该癌选自自由以下组成的组:乳腺癌、非小细胞肺(NSCL)癌、小细胞肺(SSC)癌、间皮瘤、肾细胞癌、结直肠癌、卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌、鼻咽癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌、食管癌和宫颈癌。

37. 如权利要求33所述的方法,其中该癌症是血液癌症。

38. 如权利要求37所述的方法,其中该血液癌症是骨髓瘤。

39. 如权利要求38所述的方法,其中该骨髓瘤是多发性骨髓瘤(MM)。

40. 如权利要求37所述的方法,其中该血液癌症是白血病。

41. 如权利要求40所述的方法,其中该白血病是慢性髓性白血病(CML)。

42. 如权利要求37所述的方法,其中该血液癌症是淋巴瘤。

43. 一种多核苷酸,其编码如权利要求1-25中任一项所述的抗体或如权利要求26-30中任一项所述的CAR-T细胞的CAR。

44. 一种载体,其包含如权利要求43所述的多核苷酸。

45. 一种细胞,其包含如权利要求44所述的载体。

46. 一种产生如权利要求1-25中任一项所述的抗体的方法,该方法包括在允许该抗体表达的条件下使如权利要求43所述的细胞生长,以及从该细胞和/或该细胞在其中生长的细胞培养基中分离该抗体。

47. 一种制备如权利要求1-25中任一项所述的抗体的方法,该方法包括用MUC1-C对UniRat动物进行免疫,以及鉴定MUC1-C结合重链序列。

48. 一种治疗方法,其包括向有需要的个体施用有效剂量的如权利要求1-25中任一项所述的抗体、如权利要求26-30中任一项所述的CAR-T细胞或如权利要求31所述的药物组合物。

49. 如权利要求1-25中任一项所述的抗体或如权利要求26-30中任一项所述的CAR-T细胞在制备用于治疗有需要的个体的疾病或疾患的药物中的用途。

50. 如权利要求1-25中任一项所述的抗体、如权利要求26-30中任一项所述的CAR-T细胞或如权利要求31所述的药物组合物,用于在有需要的个体的疗法中使用。

51. 一种用于治疗有需要的个体的疾病或疾患的试剂盒,其包含如权利要求1-25中任一项所述的抗体、如权利要求26-30中任一项所述的CAR-T细胞或如权利要求31所述的药物组合物、以及使用说明书。

52. 如权利要求51所述的试剂盒,其进一步包含至少一种另外的试剂。

53. 如权利要求52所述的试剂盒,其中该至少一种另外的试剂包含化疗药物。

抗MUC1-C抗体及CAR-T结构

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年2月26日提交的美国临时专利申请序列号63/154,618的提交日期的优先权权益,该临时专利申请的披露内容通过援引以其全文并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及与MUC1-C结合的抗体(例如,UniAbs™)和CAR-T结构。本发明进一步涉及制备此类抗体和CAR-T结构的方法,包含此类抗体和CAR-T结构的组合物,包括药物组合物,以及它们治疗特征在于MUC1-C的表达的疾患的用途。

背景技术

[0004] MUC1

[0005] 黏蛋白1(MUC1)是高度糖基化的单通道(single pass)I型跨膜蛋白。N末端亚基(MUC1-N)和C末端亚基(MUC1-C)形成了稳定的异源二聚体复合物。MUC1是高度多态性的,具有超过90种同种型,它们的区别在于N末端亚基的VNTR(可变数目串联重复序列)区域中的串联重复序列的数量。黏蛋白排列在肺、胃、乳腺、肠和其他几个器官中的上皮细胞的顶面。在健康组织中,黏蛋白保护身体免受感染。异常糖基化的MUC1在人类上皮癌中过度表达,并且肿瘤细胞中顶端极性丧失(Sousa等人,2016,PMC:4998183,Nath和Mukherjee,2014,PMID:5500204)。MUC1可以被蛋白酶切割,经切割的MUC1-N从细胞中脱落并可引发炎症。非脱落致癌MUC1-C亚基很短,含有58个氨基酸的膜近端胞外结构域,显示出有希望作为抗体药物缀合物、单克隆抗体和CAR-T疗法的靶标(Panchamoorthy等人,2018,PMC:6124453;Kufe,2009,PMC:2951677)。

[0006] 重链抗体

[0007] 在常规IgG抗体中,重链和轻链的缔合部分是由于轻链恒定区与重链的CH1恒定结构域之间的疏水性相互作用。重链框架2(FR2)和框架4(FR4)区中存在另外的残基,这也有助于重链与轻链之间的这种疏水性相互作用。

[0008] 然而,已知骆驼科(包括骆驼、单峰骆驼和美洲驼的胼足亚目)的血清含有一种主要类型的抗体,其仅由成对的H链构成(仅重链抗体或UniAbs™)。骆驼科(单峰驼(Camelus dromedarius)、双峰驼(Camelus bactrianus)、驼羊(Lama glama)、原驼(Lama guanaco)、羊驼(Lama alpaca)和小羊驼(Lama vicugna))的UniAbs™具有独特的结构,由单个可变结构域(VHH)、铰链区和两个恒定结构域(CH2和CH3)组成,它们与经典抗体的CH2和CH3结构域高度同源。这些UniAbs™缺乏存在于基因组中的恒定区的第一结构域(CH1),但在mRNA加工期间被剪接掉。CH1结构域的缺失解释了UniAbs™中轻链的缺失,因为此结构域是轻链的恒定结构域的锚定位置。此类UniAbs™自然进化为通过来自常规抗体或其片段的三种CDR而赋予抗原结合特异性和高亲和力(Muyldermans,2001;J Biotechnol[生物技术期刊]74:277-302;Revets等人,2005;Expert Opin Biol Ther[生物治疗专家观点]5:111-124)。软骨鱼类,诸如鲨鱼也进化出一种独特的免疫球蛋白,被称为IgNAR,它缺乏轻多肽链,并且完全由

重链构成。IgNAR分子可以通过分子工程化以产生单个重链多肽(vNAR)的可变结构域来操纵(Nuttall等人Eur. J. Biochem. [欧洲生物化学杂志]270,3543-3554(2003);Nuttall等人Function and Bioinformatics[功能与生物信息学]55,187-197(2004);Dooley等人,Molecular Immunology[分子免疫学]40,25-33(2003))。

[0009] 没有轻链的仅重链抗体结合抗原的能力是在20世纪60年代建立的(Jaton等人(1968)Biochemistry[生物化学],7,4185-4195)。与轻链物理分离的重链免疫球蛋白相对于四聚体抗体保留了80%的抗原结合活性。Sitia等人(1990)Cell[细胞],60,781-790证明了从重排的小鼠 μ 基因中去除CH1结构域导致在哺乳动物细胞培养中产生没有轻链的仅重链抗体。所产生的抗体保留了VH结合特异性和效应子功能。

[0010] 通过免疫可以产生针对多种抗原具有高特异性和亲和力的重链抗体(van der Linden,R.H.等人Biochim. Biophys. Acta. [生物化学与生物物理学报]1431,37-46(1999)),并且可以在酵母中容易地克隆并表达VHH部分(Frenken,L.G.J.等人J. Biotechnol. [生物技术期刊]78,11-21(2000))。它们的表达水平、溶解性和稳定性显著高于经典F(ab)或Fv片段(Ghahroudi,M.A.等人FEBS Lett. [欧洲生物化学学会联合会快报]414,521-526(1997))。

[0011] 其中 λ (lambda)轻(L)链基因座和/或 λ 和 κ (kappa)L链基因座已被功能沉默的小鼠以及由此类小鼠产生的抗体描述于美国专利号7,541,513和8,367,888中。例如,例如在以下中已经报告了在小鼠和大鼠中重组产生仅重链抗体:WO 2006008548;美国专利公布号20100122358;Nguyen等人,2003,Immunology[免疫学];109(1),93-101;Brüggemann等人,Crit. Rev. Immunol. [免疫学评论综述];2006,26(5):377-90;以及Zou等人,2007,J Exp Med[实验医学杂志];204(13):3271-3283。通过锌指核酸酶的胚胎显微注射产生敲除大鼠描述于Geurts等人,2009,Science[科学],325(5939):433中。可溶性仅重链抗体和包含产生此类抗体的异源重链基因座的转基因啮齿类动物描述于美国专利号8,883,150和9,365,655中。包含单结构域抗体作为结合(靶向)结构域的CAR-T结构描述于例如Iri-Sofla等人,2011,Experimental Cell Research[实验细胞研究]317:2630-2641和Jamnani等人,2014,Biochim Biophys Acta[生物化学与生物物理学报],1840:378-386中。

发明内容

[0012] 本发明的各方面包括与MUC1-C结合的抗体,其包含重链可变区,该重链可变区包含:(a)在SEQ ID NO:1或4的氨基酸序列中的任一个中包含两个或更少取代的CDR1序列;和/或(b)在SEQ ID NO:2或5的氨基酸序列中的任一个中包含两个或更少取代的CDR2序列;和/或(c)在SEQ ID NO:3或6的氨基酸序列中的任一个中包含两个或更少取代的CDR3序列。在一些实施例中,该CDR1、CDR2和CDR3序列存在于人框架中。在一些实施例中,抗体进一步包含CH1序列不存在的重链恒定区序列。

[0013] 在一些实施例中,抗体包含:(a)选自由SEQ ID NO:1和4组成的组的CDR1序列;和/或(b)选自由SEQ ID NO:2和5组成的组的CDR2序列;和/或(c)选自由SEQ ID NO:3和6组成的组的CDR3序列。

[0014] 在一些实施例中,抗体包含:(a)选自由SEQ ID NO:1和4组成的组的CDR1序列;和(b)选自由SEQ ID NO:2和5组成的组的CDR2序列;和(c)选自由SEQ ID NO:3和6组成的组的

CDR3序列。

[0015] 在一些实施例中,抗体包含:(a) SEQ ID NO:1的CDR1序列、SEQ ID NO:2的CDR2序列和SEQ ID NO:3的CDR3序列;或(b) SEQ ID NO:4的CDR1序列、SEQ ID NO:5的CDR2序列和SEQ ID NO:6的CDR3序列。

[0016] 在一些实施例中,抗体包含与SEQ ID NO:7-8中任一序列具有至少95%序列同一性的重链可变区。在一些实施例中,抗体包含选自由SEQ ID NO:7-8组成的组的重链可变区序列。在一些实施例中,抗体包含SEQ ID NO:7的重链可变区序列。在一些实施例中,抗体包含SEQ ID NO:8的重链可变区序列。

[0017] 本发明的各方面包括与MUC1-C结合的抗体,其包含重链可变区,该重链可变区包含在人VH框架中的CDR1、CDR2和CDR3序列,其中这些CDR序列是在选自由SEQ ID NO:1-6组成的组的CDR序列中具有两个或更少取代的序列。

[0018] 在一些实施例中,抗体包含重链可变区,该重链可变区包含在人VH框架中的CDR1、CDR2和CDR3序列,其中这些CDR序列选自由SEQ ID NO:1-6组成的组。

[0019] 本发明的各方面包括与MUC1-C结合的抗体,其包含重链可变区,该重链可变区包含:(a)在人VH框架中的SEQ ID NO:1的CDR1序列、SEQ ID NO:2的CDR2序列和SEQ ID NO:3的CDR3序列;或(b)在人VH框架中的SEQ ID NO:4的CDR1序列、SEQ ID NO:5的CDR2序列和SEQ ID NO:6的CDR3序列。

[0020] 在一些实施例中,抗体是CAR-T形式的。在一些实施例中,抗体是多特异性的。在一些实施例中,抗体是双特异性的。在一些实施例中,抗体与两个不同MUC1-C蛋白结合。在一些实施例中,抗体与在同一MUC1-C蛋白上的两个不同表位结合。在一些实施例中,抗体与效应细胞结合。在一些实施例中,抗体与T细胞抗原结合。在一些实施例中,抗体与CD3结合。

[0021] 在一些实施例中,抗体包含:(a)重链可变区,该重链可变区包含:(i)在人VH框架中的SEQ ID NO:9的CDR1序列、SEQ ID NO:10的CDR2序列和SEQ ID NO:11的CDR3序列;或(ii)在人VH框架中的SEQ ID NO:12的CDR1序列、SEQ ID NO:13的CDR2序列和SEQ ID NO:14的CDR3序列;以及(b)轻链可变区,该轻链可变区包含在人VL框架中的SEQ ID NO:15的CDR1序列、SEQ ID NO:16的CDR2序列和SEQ ID NO:17的CDR3序列。

[0022] 在一些实施例中,抗体包含:(a)重链可变区,该重链可变区包含:(i)与SEQ ID NO:18具有至少95%序列同一性的重链可变区序列;或(ii)与SEQ ID NO:19具有至少95%序列同一性的重链可变区序列;以及(b)与SEQ ID NO:20具有至少95%序列同一性的轻链可变区序列。

[0023] 在一些实施例中,抗体包含:(a)重链可变区,该重链可变区包含:(i)包含SEQ ID NO:18的重链可变区序列;或(ii)包含SEQ ID NO:19的重链可变区序列;以及(b)包含SEQ ID NO:20的轻链可变区序列。

[0024] 本发明的各方面包括与MUC1-C和CD3结合的双特异性三链抗体样分子(TCA),其包含:(a)第一多肽,该第一多肽由SEQ ID NO:32组成;(b)第二多肽,该第二多肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:42;以及(c)第三多肽,该第三多肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39。

[0025] 本发明的各方面包括包含CAR的CAR-T细胞,该CAR包含与MUC1-C结合的胞外抗原

结合结构域,该胞外抗原结合结构域包含重链可变区,该重链可变区包含:(a)SEQ ID NO:1的CDR1序列、SEQ ID NO:2的CDR2序列和SEQ ID NO:3的CDR3序列;或(b)SEQ ID NO:4的CDR1序列、SEQ ID NO:5的CDR2序列和SEQ ID NO:6的CDR3序列。在一些实施例中,与MUC1-C结合的胞外抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:7-8中任一序列具有至少95%序列同一性的重链可变区。在一些实施例中,与MUC1-C结合的胞外抗原结合结构域包含选自SEQ ID NO:7-8组成的组的重链可变区序列。在一些实施例中,与MUC1-C结合的胞外抗原结合结构域包含SEQ ID NO:7的重链可变区序列。在一些实施例中,与MUC1-C结合的胞外抗原结合结构域包含SEQ ID NO:8的重链可变区序列。

[0026] 本发明的各方面包括包含如本文所述的抗体或如本文所述的CAR-T细胞的药物组合物。

[0027] 本发明的各方面包括用于治疗特征在于MUC1-C的表达的疾患的方法,其包括向患有所述疾患的受试者施用如本文所述的抗体、如本文所述的CAR-T细胞或如本文所述的药物组合物。在一些实施例中,疾患是癌症。在一些实施例中,癌症是癌。在一些实施例中,癌是腺癌或鳞状细胞癌。在一些实施例中,癌选自以下组成的组:乳腺癌、非小细胞肺(NSCL)癌、小细胞肺(SSC)癌、间皮瘤、肾细胞癌、结直肠癌、卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌、鼻咽癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌、食管癌和宫颈癌。在一些实施例中,癌症是血液癌症。在一些实施例中,血液癌症是骨髓瘤。在一些实施例中,骨髓瘤是多发性骨髓瘤(MM)。在一些实施例中,血液癌症是白血病。在一些实施例中,白血病是慢性髓性白血病(CML)。在一些实施例中,血液癌症是淋巴瘤。

[0028] 本发明的各方面包括编码如本文所述的抗体或如本文所述的CAR-T细胞的CAR的多核苷酸。

[0029] 本发明的各方面包括包含如本文所述的多核苷酸的载体。

[0030] 本发明的各方面包括包含如本文所述的载体的细胞。

[0031] 本发明的各方面包括产生如本文所述的抗体的方法,这些方法包括在允许该抗体表达的条件下使如本文所述的细胞生长,以及从该细胞和/或该细胞在其中生长的细胞培养基中分离该抗体。

[0032] 本发明的各方面包括制备如本文所述的抗体的方法,这些方法包括用MUC1-C对UniRat动物进行免疫,以及鉴定MUC1-C结合重链序列。

[0033] 本发明的各方面包括治疗方法,其包括向有需要的个体施用有效剂量的如本文所述的抗体、如本文所述的CAR-T细胞或如本文所述的药物组合物。

[0034] 本发明的各方面包括如本文所述的抗体或如本文所述的CAR-T细胞在制备用于治疗有需要的个体的疾病或疾患的药物中的用途。

[0035] 本发明的各方面包括用于治疗有需要的个体的疾病或疾患的试剂盒,其包含如本文所述的抗体、如本文所述的CAR-T细胞或如本文所述的药物组合物、以及使用说明书。在一些实施例中,试剂盒包含至少一种另外的试剂。在一些实施例中,至少一种另外的试剂包含化疗药物。

[0036] 这些和另外的方面将在本披露的其余部分(包括实例)中进一步解释。

附图说明

[0037] 图1是总结所指示抗体构建体与MUC1-C+Raji细胞和阴性对照细胞的MUC1-C结合数据的表。

[0038] 图2是显示在MUC1-C+Raji细胞中对于所指示抗体构建体,细胞结合作为抗体浓度的函数的图。

[0039] 图3是总结所指示抗体构建体在MUC1-C+Raji细胞上的细胞结合EC50值的表。

[0040] 图4,分图A是包含抗MUC1-C胞外结合结构域的CAR-T结构的示意图。

[0041] 图4,分图B是显示用根据本发明的一个实施例的抗MUC1-C CAR构建体转染的Jurkat细胞的T细胞活性的图。

[0042] 图4,分图C是显示用根据本发明的一个实施例的抗MUC1-C CAR构建体转染的Jurkat细胞的T细胞活性的图。

[0043] 图5,分图A是显示对于所指示抗体构建体,肿瘤进展作为CAR-T输注后天数的函数的图。

[0044] 图5,分图B是显示对于所指示抗体构建体,在图5,分图A中所显示的图的曲线下面积的条形图。

[0045] 图6,分图A是显示对于所指示抗体构建体,血液中体内T细胞计数作为CAR-T输注后天数的函数的图。

[0046] 图6,分图B是显示对于所指示抗体构建体,在图6,分图A中所显示的图的曲线下面积的条形图。

[0047] 图7,分图A是显示对于所指示抗体构建体,肿瘤进展作为CAR-T输注后天数的函数的图。

[0048] 图7,分图B是显示对于所指示抗体构建体,随着时间测量的血液中的T细胞持久性的线图。

[0049] 图8,分图A是显示对于所指示抗体构建体,血液中体内T细胞计数作为CAR-T输注后天数的函数的图。

[0050] 图8,分图B是显示对于所指示抗体构建体,在图6,分图A中所显示的图的曲线下面积的条形图。

具体实施方式

[0051] 除非另外指示,否则本披露的实践将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,这些技术都在本领域的技术范围内。此类技术在文献中有充分说明,诸如“Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册]”,第二版(Sambrook等人,1989);“Oligonucleotide Synthesis[寡核苷酸合成]”(M.J.Gait编辑,1984);“Animal Cell Culture[动物细胞培养]”(R.I.Freshney编辑,1987);“Methods in Enzymology[酶学方法]”(美国学术出版社(Academic Press,Inc.));“Current Protocols in Molecular Biology[最新分子生物学实验方法汇编]”(F.M.Ausubel等人编辑,1987,以及定期更新);“PCR:The Polymerase Chain Reaction [PCR:聚合酶链式反应]”,(Mullis等人编辑,1994);“A Practical Guide to Molecular Cloning[分子克隆实用指南]”(Perbal Bernard V.,1988);“Phage Display:A

Laboratory Manual[噬菌体展示:实验室手册]”(Barbas等人,2001);Harlow,Lane和Harlow,Using Antibodies:A Laboratory Manual:Portable ProtocolNo.I[使用抗体:实验室手册:I号便携式方案],冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory)(1998);以及Harlow和Lane,Antibodies:A Laboratory Manual[抗体:实验室手册],冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory);(1988)。

[0052] 在提供值范围的情况下,应当理解,在该范围的上限和下限之间的每个中间值(除非上下文另外明确说明,至下限单位的十分之一),以及在所述范围内的任何其他所述或中间值都包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在较小范围内,也包括在本发明内,受制于所述范围内任何特别排除的限制。在所述范围包括一个或两个限制的情况下,排除那些包括的限制中的任一个或两个的范围也包括在本发明中。

[0053] 除非另外指示,否则本文中的抗体残基根据Kabat编号系统进行编号(例如,Kabat等人,Sequences of Immunological Interest.[具有免疫学意义的序列]第5版美国公共卫生署,美国国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州(Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.)(1991))。

[0054] 在以下描述中,列出多个具体细节来提供对本发明的更完全理解。然而,对于本领域技术人员而言明显的是,本发明可以在没有多个这些具体细节的情况下实践。在其他情况下,本领域技术人员熟知的熟知特征和程序尚未被描述,以避免使本发明模糊。

[0055] 本披露引用的所有参考文献(包括专利申请和出版物)均通过援引以其全文并入本文。

[0056] I. 定义

[0057] “包含(comprising)”意指所列举的元素是组合物/方法/试剂盒中需要的,但也可以包括其他元素以形成权利要求范围内的组合物/方法/试剂盒等。

[0058] “基本上由…组成(consisting essentially of)”意指将所描述的组合物或方法的范围限制到不对主题发明的一个或多个基本和新颖特征产生实质性影响的指定材料或步骤。

[0059] “由…组成(consisting of)”意指从组合物、方法或试剂盒中排除权利要求中未指定的任何元素、步骤或成分。

[0060] 本文中的抗体残基根据Kabat编号系统和EU编号系统进行编号。在提及可变区中的残基时,通常使用Kabat编号系统(大约重链的残基1-113)(例如,Kabat等人,Sequences of Immunological Interest.[具有免疫学意义的序列]第5版美国公共卫生署,美国国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州(Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.)(1991))。在提及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时,通常使用“EU编号系统”或“EU索引”(例如,Kabat等人,同上中报告的EU索引)。“如Kabat中的EU索引”是指人IgG1 EU抗体的残基编号。除非本文另外说明,否则提及抗体的可变结构域中的残基号意指通过Kabat编号系统进行的残基编号。除非本文另外说明,否则提及抗体的恒定结构域中的残基号意指通过EU编号系统进行的残基编号。

[0061] 抗体,也被称为免疫球蛋白,通常包含至少一条重链和一条轻链,其中重链和轻链的氨基末端结构域在序列上是可变的,因此通常被称为可变区结构域,或可变重(VH)或可变轻(VL)结构域。这两个结构域通常缔合以形成特异性结合区,尽管正如在此将要讨论的,

特异性结合也可以用仅重链可变序列获得,并且本领域已知并使用各种非天然构型的抗体。

[0062] “功能性”或“生物活性”抗体或抗原结合分子(包括本文所述的仅重链抗体和多特异性(例如,双特异性)三链抗体样分子(TCA))是能够在结构、调节、生物化学或生物物理事件中发挥其一种或多种天然活性的分子。例如,功能性抗体或其他结合分子(例如,TCA)可以具有特异性结合抗原的能力,并且结合可以进而引发或改变细胞或分子事件,诸如信号转导或酶活性。功能性抗体或其他结合分子(例如,TCA)也可以阻断受体的配体激活或充当激动剂或拮抗剂。抗体或其他结合分子(例如,TCA)发挥其一种或多种天然活性的能力取决于若干因素,包括多肽链的适当折叠和组装。

[0063] 本文中的术语“抗体”以最广泛意义使用,并且特别涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、单体、二聚体、多聚体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、仅重链抗体、三链抗体、TCA、单链Fv(scFv)、纳米抗体等,并且还包括抗体片段,只要它们表现出所期望的生物活性即可(Miller等人(2003) *Jour. of Immunology*[免疫学杂志]170:4854-4861)。抗体可以是鼠抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体或来源于其他物种的抗体。

[0064] 术语抗体可以是指全长重链、全长轻链、完整免疫球蛋白分子;或任何这些多肽的免疫活性部分,即包含抗原结合位点的多肽,该抗原结合位点免疫特异性结合感兴趣的靶标或其部分的抗原,此类靶标包括但不限于癌细胞,或产生与自身免疫性疾病相关联的自身免疫性抗体的细胞。本文披露的免疫球蛋白可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类的免疫球蛋白分子,包括具有改变的Fc部分的工程化亚类,这些亚类提供降低或增强的效应细胞活性。主题抗体的轻链可以是 κ 轻链(Vkappa)或 λ 轻链(Vlambda)。免疫球蛋白可以来源于任何物种。在一方面,免疫球蛋白大部分来自人类。

[0065] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指从基本上同源的抗体群获得的一种抗体,即,构成该群体的个别抗体除以微量存在的可能天然存在的突变外是一致的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原性位点。此外,与典型地包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。根据本发明的单克隆抗体可以通过首先由Kohler等人(1975) *Nature*[自然]256:495描述的杂交瘤方法制备,并且还可以经由例如重组蛋白生产方法(参见例如,美国专利号4,816,567)制备。

[0066] 如与抗体结合使用的术语“可变的”是指以下事实:抗体可变结构域的某些部分在抗体之间在序列上差异很大,并且用于每种特定抗体针对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性在整个抗体的可变结构域中并不均匀分布。在轻链可变结构域和重链可变结构域两者中,该可变性集中在被称为高变区的三个区段中。可变结构域的更高度保守的部分被称为框架区(FR)。天然的重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR,其主要采用 β -片层构型,通过三个高变区连接,这三个高变区形成环,这些环连接 β -片层结构并且在一些情况下形成 β -片层结构的一部分。每条链中的高变区通过FR紧密靠近地保持在一起,并且与来自另一条链的高变区一起有助于抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*[具有免疫学意义的蛋白质的序列],第5版美国公共卫生署,美国国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州(1991))。恒定结构域并不直接涉及抗体与抗原的结合,但是表现出不同效应子功能,诸如抗体参与抗体依赖性细胞毒性

(ADCC)。

[0067] 当本文使用时,术语“高变区”是指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如,重链可变结构域中的残基31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白质的序列],第5版美国公共卫生署,美国国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州(1991))和/或来自“高变环”的那些残基(重链可变结构域中的残基26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3);Chothia和Lesk J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196:901-917(1987))。在一些实施例中,“CDR”意指抗体的互补决定区,如在Lefranc,MP等人,IMGT,the international ImMunoGeneTics database[IMGT,国际免疫遗传学数据库],Nucleic Acids Res.[核酸研究],27:209-212(1999)中定义的。“框架区”或“FR”残基是除如本文定义的高变区/CDR残基之外的那些可变结构域残基。

[0068] 本文示出了示例性CDR名称,然而,本领域技术人员将理解,CDR的许多定义是常用的,包括Kabat定义(参见“Zhao等人A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions.[一种用于确定抗体互补性决定区的基于种系知识的计算方法]”Mol Immunol.[分子免疫学]2010;47:694-700),其是基于序列可变性并且是最常用的。Chothia定义是基于结构环区的位置(Chothia等人“Conformations of immunoglobulin hypervariable regions.[免疫球蛋白高变区的构象]”Nature.[自然]1989;342:877-883)。替代性的感兴趣的CDR定义包括但不限于由以下披露的那些:Honegger,“Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool.[免疫球蛋白可变结构域的又一种编号方案:自动建模和分析工具]”J Mol Biol.[分子生物学杂志]2001;309:657-670;Ofran等人“Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B-cell epitopes.[互补决定区(CDR)的自动鉴定揭示了CDR和B细胞表位的特殊特征]”J Immunol.[免疫学杂志]2008;181:6230-6235;Almagro“Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size:implications for the rational design of antibody repertoires.[鉴定识别不同大小抗原的抗体的特异性决定残基的差异:对抗体库的合理设计的影响]”J Mol Recognit.[分子识别期刊]2004;17:132-143;以及Padlan等人“Identification of specificity-determining residues in antibodies.[抗体中特异性决定残基的鉴定]”Faseb J.[美国实验生物学会联合会杂志]1995;9:133-139.,其中的每一个特别地通过援引并入本文。

[0069] 术语“仅重链抗体”和“重链抗体”在本文中可互换使用,并且在最广泛的意义上是指缺乏常规抗体的轻链的抗体,或者抗体的一个或多个部分,例如抗体的一个或多个臂。这些术语特别地包括但不限于在CH1结构域不存在的情况下包含VH抗原结合结构域以及CH2和CH3恒定结构域的同源二聚体抗体;此类抗体的功能性(抗原结合)变体、可溶性VH变体、包含一个可变结构域(V-NAR)和五个C样恒定结构域(C-NAR)的同源二聚体的Ig-NAR及其功能性片段;以及可溶性单结构域抗体(sUniDabs™)。在一个实施例中,仅重链抗体由可变区抗原结合结构域构成,该可变区抗原结合结构域由框架1、CDR1、框架2、CDR2、框架3、CDR3和

框架4构成。在另一个实施例中,仅重链抗体由抗原结合结构域、铰链区的至少一部分以及CH2和CH3结构域构成。在另一个实施例中,仅重链抗体由抗原结合结构域、铰链区的至少一部分和CH2结构域构成。在另一个实施例中,仅重链抗体由抗原结合结构域、铰链区的至少一部分和CH3结构域构成。本文还包括CH2和/或CH3结构域被截短的仅重链抗体。在另一个实施例中,重链由抗原结合结构域和至少一个CH(CH1、CH2、CH3或CH4)结构域构成,但没有铰链区。仅重链抗体可以呈二聚体的形式,其中两条重链彼此以二硫键或以其他方式共价或非共价附接。仅重链抗体可以属于IgG亚类,但属于其他亚类(诸如IgM、IgA、IgD和IgE亚类)的抗体也包括在本文中。在特定实施例中,重链抗体属于IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型,特别是IgG1或IgG4亚型。在一个实施例中,重链抗体属于IgG4亚型,其中一个或多个CH结构域被修饰以改变抗体的效应子功能。在一个实施例中,重链抗体属于IgG1或IgG4亚型,其中一个或多个CH结构域被修饰以改变抗体的效应子功能。本文进一步描述了改变效应子功能的CH结构域的修饰。重链抗体的非限制性实例例如在W0 2018/039180中进行了描述,该文献的披露内容通过援引以其全文并入本文。

[0070] 在一些实施例中,本文中的仅重链抗体被用作嵌合抗原受体(CAR)的结合(靶向)结构域。该定义特别地包括通过人免疫球蛋白转基因大鼠(UniRatTM)产生的人仅重链抗体,被称为UniAbsTM。UniAbsTM的可变区(VH)被称为UniDabsTM,并且是多功能构建块,其可以与Fc区或血清白蛋白连接,用于开发具有多特异性、增加效力和延长半衰期的新颖治疗剂。因为同源二聚体UniAbsTM缺乏轻链,并且因此缺乏VL结构域,所以抗原被单个结构域,即重链抗体(VH或VHH)的重链的可变结构域识别。

[0071] 如本文所用的“完整抗体链”是包含全长可变区和全长恒定区(Fc)的抗体链。完整“常规”抗体包含完整轻链和完整重链,以及用于分泌IgG的轻链恒定结构域(CL)和重链恒定结构域、CH1、铰链、CH2和CH3。其他同种型,诸如IgM或IgA可以具有不同的CH结构域。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如,人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。完整抗体可以具有一个或多个“效应子功能”,其是指可归因于抗体的Fc恒定区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的那些生物活性。抗体效应子功能的实例包括C1q结合;补体依赖性细胞毒性;Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;以及细胞表面受体的下调。恒定区变体包括改变效应子谱、与Fc受体的结合等的那些变体。

[0072] 取决于它们的重链的Fc(恒定结构域)的氨基酸序列,抗体和各种抗原结合蛋白可以作为不同的类别提供。重链Fc区有五大类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的几种可以进一步分为“亚类”(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。对应于不同类别的抗体的Fc恒定结构域可以分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。Ig形式包括铰链修饰或无铰链形式(Roux等人(1998) *J. Immunol.* [免疫学杂志] 161: 4083-4090; Lund等人(2000) *Eur. J. Biochem.* [欧洲生物化学杂志] 267: 7246-7256; US2005/0048572; US 2004/0229310)。基于它们的恒定结构域的氨基酸序列,可以将来自任何脊椎动物物种的轻链分配到两种类型(被称为 κ (kappa)和 λ (lambda))之一。根据本发明实施例的抗体可以包含 κ 轻链序列或 λ 轻链序列。

[0073] “功能性Fc区”具有天然序列Fc区的“效应子功能”。效应子功能的非限制性实例包括C1q结合;CDC;Fc受体结合;ADCC;ADCP;细胞表面受体(例如,B细胞受体)的下调等。此类效应子功能通常需要Fc区与受体,例如Fc γ RI;Fc γ RIIA;Fc γ RIIB1;Fc γ RIIB2;Fc γ

R111A;Fc γ R111B受体以及低亲和力和FcRn受体相互作用;并且可以使用本领域已知的各种测定来评估。“死亡”或“沉默”Fc是已经突变以保留关于例如延长血清半衰期的活性,但不激活高亲和力Fc受体,或对Fc受体的亲和力降低的Fc。

[0074] “天然序列Fc区”包含与在自然界中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括例如天然序列人IgG1 Fc区(非A和A同种异型);天然序列人IgG2 Fc区;天然序列人IgG3 Fc区;和天然序列人IgG4 Fc区,以及其天然存在的变体。

[0075] 由于至少一个氨基酸修饰,优选地一个或多个氨基酸取代,“变体Fc区”包含与天然序列Fc区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。优选地,变体Fc区与天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区相比在天然序列Fc区中或在亲本多肽的Fc区中具有至少一个氨基酸取代,例如从约一个至约十个氨基酸取代,并且优选地从约一个至约五个氨基酸取代。本文中的变体Fc区优选地与天然序列Fc区和/或与亲本多肽的Fc区具有至少约80%同源性,并且最优选地与其具有至少约90%同源性,更优选地与其具有至少约95%同源性。

[0076] 变体Fc序列可以在CH2区中包含三个氨基酸取代,以减少在EU索引位置234、235和237处的Fc γ RI结合(参见Duncan等人,(1988)Nature[自然]332:563)。EU索引位置330和331处补体C1q结合位点中的两个氨基酸取代减少了补体固定(参见Tao等人,J.Exp.Med.[实验医学杂志]178:661(1993)以及Canfield和Morrison,J.Exp.Med.[实验医学杂志]173:1483(1991))。在位置233-236处取代为人IgG1或IgG2残基和在位置327、330和331处取代为人IgG4残基极大地减少了ADCC和CDC(参见例如,Armour KL.等人,1999Eur J Immunol.[欧洲免疫学杂志]29(8):2613-24;以及Shields RL.等人,2001.J Biol Chem.[生物化学杂志]276(9):6591-604)。人IgG4 Fc氨基酸序列(UniProtKB编号P01861)在本文中以SEQ ID NO:22提供。沉默的IgG1例如在以下中描述:Boesch,A.W.等人,“Highly parallel characterization of IgG Fc binding interactions.[IgG Fc结合相互作用的高度平行表征]”MAbs[单克隆抗体],2014.6(4):第915-27页,该文献的披露内容通过援引以其全文并入本文。

[0077] 其他Fc变体是可能的,包括但不限于能够形成二硫键的区域被删除,或者某些氨基酸残基在天然Fc的N末端消除,或者向其中添加甲硫氨酸残基的Fc变体。因此,在一些实施例中,抗体的一个或多个Fc部分可在铰链区中包含一个或多个突变以消除二硫键。在又一个实施例中,Fc的铰链区可以被完全去除。在再一个实施例中,抗体可包含Fc变体。

[0078] 进一步,可以构建Fc变体以通过取代(突变)、删除或添加氨基酸残基来去除或实质上减少效应子功能,以影响补体结合或Fc受体结合。例如但不限于,缺失可以发生在补体结合位点,诸如C1q结合位点中。用于制备免疫球蛋白Fc片段的此类序列衍生物的技术在国际专利公布号W0 97/34631和W0 96/32478中披露。另外,Fc结构域可以通过磷酸化、硫酸化、酰化、糖基化、甲基化、法呢基化、乙酰化、酰胺化等进行修饰。

[0079] 在一些实施例中,抗体包含含有T366W突变的变体人IgG4 CH3结构域序列,其在本文中可任选地被称为IgG4 CH3杆序列。在一些实施例中,抗体包含含有T366S突变、L368A突变和Y407V突变的变体人IgG4 CH3结构域序列,其在本文中可任选地被称为IgG4 CH3臼序列。本文所述的IgG4 CH3突变可以以任何合适的方式利用,以便在抗体二聚体中第一单体的第一重链恒定区上放置一个“杆”,并且在抗体二聚体中第二单体的第二重链恒定区上放置一个“臼”,从而促进抗体中所期望的一对重链多肽亚基的适当配对(异源二聚化)。

[0080] 在一些实施例中,抗体包含含有变体人IgG4 Fc区的重链多肽亚基,该变体人IgG4 Fc区包含S228P突变、F234A突变、L235A突变和T366W突变(杵)。在一些实施例中,抗体包含含有变体人IgG4 Fc区的重链多肽亚基,该变体人IgG4 Fc区包含S228P突变、F234A突变、L235A突变、T366S突变、L368A突变和Y407V突变(臼)。

[0081] 术语“包含Fc区的抗体”是指包含Fc区的抗体。Fc区的C末端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)可以例如在抗体纯化期间或通过编码抗体的核酸的重组工程化被去除。因此,具有根据本发明的Fc区的抗体可以包括具有或没有K447的抗体。

[0082] 本发明的各方面包括包含呈单价或二价构型的仅重链可变区的抗体。如本文所用,如参考仅重链可变区结构域使用的术语“单价构型”意味着仅存在一个仅重链可变区结构域,具有单个结合位点。相比之下,如参考仅重链可变区结构域使用的术语“二价构型”意味着存在两个仅重链可变区结构域(各自具有单个结合位点),并且通过接头序列连接。接头序列的非限制性实例在本文中进一步讨论,并且包括但不限于具有各种长度的GS接头序列。当仅重链可变区呈二价构型时,两个仅重链可变区结构域中的每一个都可以与相同抗原或不同抗原(例如,对于相同蛋白质上的不同表位;对于两个不同的蛋白质等)结合。然而,除非另外特别说明,否则表示为呈“二价构型”的仅重链可变区被理解为含有两个相同的仅重链可变区结构域,通过接头序列连接,其中两个相同的仅重链可变区结构域中的每一个都可以与相同的靶抗原结合。

[0083] 本发明的各方面包括具有多特异性构型的抗体,其包括但不限于双特异性、三特异性等。各种方法和蛋白质构型是已知的并且用于双特异性单克隆抗体(BsMAB)、三特异性抗体等。

[0084] 通过重组融合两个或更多个抗体的可变结构域,已经开发了用于产生多价人工抗体的各种方法。在一些实施例中,多肽上的第一和第二抗原结合结构域通过多肽接头连接。这种多肽接头的非限制性实例是GS接头,其氨基酸序列为四个甘氨酸残基,接着一个丝氨酸残基,并且其中该序列重复n次,其中n是范围为从1到约10的整数,诸如2、3、4、5、6、7、8或9。此类接头的非限制性实例包括GGGG(S_{EQ} ID NO:40) (n=1)和GGGGSGGG(S_{EQ} ID NO:41) (n=2)。也可以使用其他合适的接头,并且描述于例如Chen等人,Adv Drug Deliv Rev. [高级药物递送综述]2013年10月15日;65(10):1357-69中,该文献的披露内容通过援引以其全文并入本文。

[0085] 术语“三链抗体样分子”或“TCA”在本文中用于指抗体样分子,其包含三个多肽亚基、基本上由其组成或由其组成,其中两个包含单克隆抗体的一条重链和一条轻链、基本上由其组成或由其组成,或由此类抗体链的功能性抗原结合片段组成,该功能性抗原结合片段包含抗原结合区和至少一个CH结构域。此重链/轻链对对于第一抗原具有结合特异性。第三多肽亚基包含具有Fc部分的仅重链抗体、基本上由其组成或由其组成,该Fc部分包含CH2和/或CH3和/或CH4结构域,CH1结构域不存在,以及一个或多个结合第二抗原表位或第一抗原的不同表位的抗原结合结构域(例如,两个抗原结合结构域),其中这种结合结构域来源于抗体重链或轻链的可变区或与其具有序列同一性。这种可变区的一部分可以由V_H和/或V_L基因片段、D和J_H基因片段或J_L基因片段编码。可变区可以由重排的V_HDJ_H、VLDJ_H、V_HJ_L或V_LJ_L基因片段编码。

[0086] TCA结合化合物利用“仅重链抗体”或“重链抗体”或“重链多肽”,如本文所用,其意

指包含重链恒定区CH2和/或CH3和/或CH4,但没有CH1结构域的单链抗体。在一个实施例中,重链抗体由抗原结合结构域、铰链区的至少一部分以及CH2和CH3结构域构成。在另一个实施例中,重链抗体由抗原结合结构域、铰链区的至少一部分和CH2结构域构成。在另一个实施例中,重链抗体由抗原结合结构域、铰链区的至少一部分和CH3结构域构成。本文还包括CH2和/或CH3结构域被截短的重链抗体。在另一个实施例中,重链由抗原结合结构域和至少一个CH(CH1、CH2、CH3或CH4)结构域构成,但没有铰链区。仅重链抗体可以呈二聚体的形式,其中两条重链彼此以二硫键或以其他方式共价或非共价附接,并且可以任选地包括在一个或多个CH结构域之间的不对称界面(例如杵臼(knobs-in-holes,KiH)界面),以有利于多肽链之间的适当配对。重链抗体可以属于IgG亚类,但属于其他亚类(诸如IgM、IgA、IgD和IgE亚类)的抗体也包括在本文中。在特定实施例中,重链抗体属于IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型,特别是IgG1亚型或IgG4亚型。TCA结合化合物的非限制性实例例如在WO 2017/223111和WO 2018/052503中进行了描述,这些文献的披露内容通过援引以其全文并入本文。

[0087] 重链抗体占骆驼科动物(例如,骆驼和美洲驼)产生的IgG抗体的约四分之一(Hamers-Casterman C.等人Nature.[自然]363,446-448(1993))。这些抗体由两条重链形成,但没有轻链。因此,可变抗原结合部分被称为VHH结构域,并且它代表最小的天然存在的、完整的抗原结合位点,长度只有大约120个氨基酸(Desmyter,A.等人J.Biol.Chem.[生物化学杂志]276,26285-26290(2001))。通过免疫可以产生针对多种抗原具有高特异性和亲和力的重链抗体(van der Linden,R.H.等人Biochim.Biophys.Acta.[生物化学与生物物理学报]1431,37-46(1999)),并且可以在酵母中容易地克隆并表达VHH部分(Frenken,L.G.J.等人J.Biotechnol.[生物技术期刊]78,11-21(2000))。它们的表达水平、溶解性和稳定性显著高于经典F(ab)或Fv片段(Ghahroudi,M.A.等人FEBS Lett.[欧洲生物化学学会联合会快报]414,521-526(1997))。还显示鲨鱼在其抗体中具有单个VH样结构域,被称为VNAR。(Nuttall等人Eur.J.Biochem.[欧洲生物化学杂志]270,3543-3554(2003);Nuttall等人Function and Bioinformatics[功能与生物信息学]55,187-197(2004);Dooley等人,Molecular Immunology[分子免疫学]40,25-33(2003))。

[0088] 如本文所用的术语“MUC1”是指属于黏蛋白家族成员的膜结合蛋白。黏蛋白是O-糖基化蛋白,在上皮表面形成保护性黏液屏障中发挥着重要作用,并且还在细胞内信号传导中发挥作用。MUC1在上皮细胞的顶面表达,这些上皮细胞排列成许多不同组织的黏膜表面。

[0089] 术语“MUC1-N”是指MUC1的N末端或 α 亚基,并且术语“MUC1-C”是指MUC1的C末端或 β 亚基。在人MUC1(UniProt P15941)的情况下,MUC1-N包括MUC1的氨基酸残基24-1,097,并且MUC1-C包括MUC1(UniProt P15941)的氨基酸残基1,098-1,255。

[0090] 术语“MUC1”、“MUC1-N”和“MUC1-C”包括任何人和非人动物物种的MUC1、MUC1-N或MUC1-C蛋白,并且特别地包括人MUC1、MUC1-N和MUC1-C,以及非人哺乳动物的MUC1、MUC1-N和MUC1-C。

[0091] 如本文所用的术语“人MUC1”包括人MUC1(UniProt P15941)的任何变体、同种型和物种同源物,无论其来源或制备方式如何。因此,“人MUC1”包括由细胞天然表达的人MUC1和在用人MUC1基因转染的细胞上表达的MUC1。

[0092] 术语“抗MUC1-C仅重链抗体”、“MUC1-C仅重链抗体”、“抗MUC1-C重链抗体”和“MUC1-C重链抗体”在本文中可互换使用,是指如上定义的仅重链抗体,与MUC1-C免疫特异

性结合,包括人MUC1-C,如上所定义。该定义包括但不限于由转基因动物(诸如表达人免疫球蛋白的转基因大鼠或转基因小鼠,包括产生人抗MUC1-C UniAbTM抗体的UniRatsTM,如上所定义)产生的人重链抗体。

[0093] 关于参考多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”定义为在用以实现最大百分比序列同一性并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分而比对序列和引入缺口(如果需要)之后,候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可以以本领域技术范围内的各种方式实现,例如使用公众可用的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对的适当参数,包括为了在被比较的序列的全长上实现最大比对所需要的任何算法。然而,出于本文的目的,%氨基酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序ALIGN-2生成的。

[0094] “分离的”抗体是已经从其天然环境的组分鉴定并且分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染组分是会干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质,并且可以包括酶、激素和其他蛋白或非蛋白溶质。在优选的实施例中,抗体将被纯化(1)至通过劳里法确定的大于95%重量、并且最优选大于99%重量的抗体,(2)至足以获得通过使用转杯式测序仪发现的N末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,或(3)至通过SDS-PAGE在还原或非还原条件下使用考马斯蓝或优选银染法发现的均质性。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为抗体的天然环境的至少一种组分将不存在。然而,通常的是,通过至少一个纯化步骤制备分离的抗体。

[0095] 本发明的抗体包括多特异性抗体。多特异性抗体具有多于一种结合特异性。术语“多特异性”特别地包括“双特异性”和“三特异性”,以及高阶独立特异性结合亲和力,诸如高阶多表位特异性,以及四价抗体和抗体片段。术语“多特异性抗体”、“多特异性仅重链抗体”、“多特异性重链抗体”和“多特异性UniAbTM”在本文中以最广泛的意义使用,并且涵盖具有多于一种结合特异性的所有抗体。本发明的多特异性重链抗MUC1-C抗体特别地包括与MUC1-C蛋白(诸如人MUC1-C)上的两个或更多个非重叠表位免疫特异性结合的抗体(即,二价和双互补位)。本发明的多特异性重链抗MUC1-C抗体特别地还包括与MUC1-C蛋白(诸如人MUC1-C)上的一个表位和与不同蛋白质(例如像CD3蛋白,诸如人CD3)上的一个表位免疫特异性结合的抗体(即,二价和双互补位)。本发明的多特异性重链抗MUC1-C抗体特别地还包括与MUC1-C蛋白(诸如人MUC1-C蛋白)上的两个或更多个非重叠或部分重叠表位和与不同蛋白质(例如像CD3蛋白,诸如人CD3蛋白)上的一个表位免疫特异性结合的抗体(即,二价和双互补位)。

[0096] 本发明的抗体包括单特异性抗体,具有一种结合特异性。单特异性抗体特别地包括具有单一结合特异性的抗体,以及包含具有相同结合特异性的多于一个结合单元的抗体。术语“单特异性抗体”、“单特异性仅重链抗体”、“单特异性重链抗体”和“单特异性UniAbTM”在本文中以最广泛的意义使用,并且涵盖具有一种结合特异性的所有抗体。本发明的单特异性重链抗MUC1-C抗体特别地包括与MUC1-C蛋白(诸如人MUC1-C蛋白)上的一个表位免疫特异性结合的抗体(单价和单特异性)。本发明的单特异性重链抗MUC1-C抗体特别地还包括具有多于一个结合单元的抗体(例如,多价抗体),这些结合单元与MUC1-C蛋白(诸如人MUC1-C)上的一个表位免疫特异性结合。例如,根据本发明实施例的单特异性抗体可以包

括包含两个抗原结合结构域的重链可变区,其中每个抗原结合结构域均与MUC1-C蛋白上的相同表位结合(即,二价和单特异性)。

[0097] “表位”是单个抗体分子所结合的抗原分子表面上的位点。通常,抗原具有几个或许多不同的表位,并且与许多不同的抗体反应。该术语特别地包括线性表位和构象表位。

[0098] “表位作图”是鉴定抗体在其靶抗原上的结合位点或表位的过程。抗体表位可以是线性表位或构象表位。线性表位由蛋白质中的连续氨基酸序列形成。构象表位由蛋白质序列中不连续的氨基酸形成,但在蛋白质折叠成其三维结构时将它们聚集在一起。

[0099] “多表位特异性”是指与相同或不同靶标上的两个或更多个不同表位特异性结合的能力。如上说明,本发明特别地包括具有多表位特异性的抗MUC1-C重链抗体,即与MUC1-C蛋白(诸如人MUC1-C)上的一个或多个非重叠表位结合的抗MUC1-C重链抗体;以及与MUC1-C蛋白上的一个或多个表位和与不同蛋白质(例如像CD3蛋白)上的一个表位结合的抗MUC1-C重链抗体。术语抗原的“非重叠表位”或“非竞争性表位”在本文中定义为意指被一对抗原特异性抗体的一个成员识别但不被另一个成员识别的表位。靶向多特异性抗体上的相同抗原、识别非重叠表位的成对抗体或抗原结合区不竞争与此抗原的结合,并且能够同时结合此抗原。

[0100] 当两种抗体识别相同或空间重叠的表位时,抗体将与参考抗体结合“基本上相同的表位”。用于确定两个表位是否与相同或空间重叠的表位结合的最广泛使用和最快速的方法是竞争测定,其可以使用标记抗原或标记抗体以所有数量的不同形式进行配置。通常,将抗原固定在96孔板上,并且使用放射性或酶标记测量未标记抗体阻断标记抗体结合的能力。

[0101] 如本文所用的术语“价”是指抗体分子中指定数量的结合位点。

[0102] “单价”抗体具有一个结合位点。因此,单价抗体也是单特异性的。

[0103] “多价”抗体具有两个或更多个结合位点。因此,术语“二价”、“三价”和“四价”分别是指存在两个结合位点、三个结合位点和四个结合位点。因此,根据本发明的双特异性抗体至少是二价的,并且可以是三价的、四价的或其他多价的。根据本发明实施例的二价抗体对于同一表位(即,二价、单互补位)或对于两个不同表位(即,二价、双互补位)可以具有两个结合位点。

[0104] 各种方法和蛋白质构型是已知的并且用于制备双特异性单克隆抗体(BsMAB)、三特异性抗体等。

[0105] 术语“三链抗体样分子”或“TCA”在本文中用于指抗体样分子,其包含三个多肽亚基、基本上由其组成或由其组成,其中两个包含单克隆抗体的一条重链和一条轻链、基本上由其组成或由其组成,或由此类抗体链的功能性抗原结合片段组成,这些功能性抗原结合片段包含抗原结合区和至少一个CH结构域。此重链/轻链对对于第一抗原具有结合特异性。第三多肽亚基包含含有Fc部分的仅重链抗体、基本上由其组成或由其组成,该Fc部分包含CH2和/或CH3和/或CH4结构域,CH1结构域不存在,以及结合第二抗原表位或第一抗原的不同表位的抗原结合结构域,其中这种结合结构域来源于抗体重链或轻链的可变区或与其具有序列同一性。这种可变区的一部分可以由 V_H 和/或 V_L 基因片段、D和 J_H 基因片段或 J_L 基因片段编码。可变区可以由重排的 V_HDJ_H 、 V_LDJ_H 、 V_HJ_L 或 V_LJ_L 基因片段编码。TCA蛋白利用如上定义的仅重链抗体。

[0106] 术语“嵌合抗原受体”或“CAR”在本文中以最广泛的意义使用,是指工程化受体,其将所期望的结合特异性(例如,单克隆抗体或其他配体的抗原结合区)移植到跨膜和细胞内信号传导结构域。典型地,受体用于将单克隆抗体的特异性移植到T细胞上以产生嵌合抗原受体(CAR)。(J Natl Cancer Inst[美国国立癌症研究所杂志],2015;108(7):dvj439;和 Jackson等人,Nature Reviews Clinical Oncology[自然评论·临床肿瘤学],2016;13:370-383)。CAR-T细胞是经过基因工程化以产生用于在免疫疗法中使用的人工T细胞受体的T细胞。在一个实施例中,“CAR-T细胞”意指表达编码一个或多个嵌合抗原受体的转基因的治疗性T细胞,这些嵌合抗原受体至少由胞外结构域、跨膜结构域和至少一个胞质结构域组成。

[0107] 术语“人抗体”在本文中用于包括具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本文中的人抗体可以包含并非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,在体外通过随机或位点特异性诱变引入的突变或在体内通过体细胞突变引入的突变)。术语“人抗体”特别地包括具有人重链可变区序列的仅重链抗体,由转基因动物(诸如转基因大鼠或小鼠)产生,特别是由UniRatsTM产生的UniAbsTM,如上所定义。

[0108] “嵌合抗体”或“嵌合免疫球蛋白”意指包含来自至少两个不同Ig基因座的氨基酸序列的免疫球蛋白分子,例如,包含由人Ig基因座编码的部分和由大鼠Ig基因座编码的部分的转基因抗体。嵌合抗体包括具有非人Fc区或人工Fc区以及人独特型的转基因抗体。此类免疫球蛋白可以从本发明的动物中分离,这些动物已被工程化以产生此类嵌合抗体。

[0109] 如本文所用,术语“效应细胞”是指参与免疫应答的效应阶段而非免疫应答的认知和激活阶段的免疫细胞。一些效应细胞表达特定的Fc受体并执行特定的免疫功能。在一些实施例中,效应细胞诸如自然杀伤细胞能够诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。例如,表达FcR的单核细胞和巨噬细胞参与靶细胞的特异性杀伤,并将抗原呈递给免疫系统的其他组分,或与呈递抗原的细胞结合。在一些实施例中,效应细胞可以吞噬靶抗原或靶细胞。

[0110] “人效应细胞”是表达受体诸如T细胞受体或FcR并执行效应子功能的白细胞。优选地,这些细胞至少表达Fc γ R1III并执行ADCC效应子功能。介导ADCC的人白细胞的实例包括自然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞和嗜中性粒细胞;其中NK细胞是优选的。效应细胞可以从其自然来源中分离,例如,从如本文所述的血液或PBMC中分离。

[0111] 术语“免疫细胞”在本文中以最广泛的意义使用,包括但不限于骨髓或淋巴来源的细胞,例如淋巴细胞(诸如B细胞和T细胞,包括溶细胞性T细胞(CTL))、杀伤细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、多形核细胞,诸如嗜中性粒细胞、粒细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞。

[0112] “抗体效应子功能”是指可归因于抗体的Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的那些生物活性。抗体效应子功能的实例包括C1q结合;补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如,B细胞受体;BCR)的下调等。

[0113] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”是指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体并且随后引起靶细胞的裂解。用于介导ADCC的初级细胞NK细胞仅表达Fc γ R1III,而单核细胞表达Fc γ R1、Fc γ R2和Fc γ R3。造血细胞上的FcR表达在

Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol* [免疫学年评] 9:457-92 (1991) 的第464页上的表3中总结。为了评估感兴趣的分子的ADCC活性,可以进行体外ADCC测定,诸如美国专利号5,500,362或5,821,337中描述的测定。用于此类测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外,可以在体内,例如在动物模型(诸如Clynes等人, *PNAS (USA)* [美国国家科学院院刊] 95:652-656 (1998) 中披露的动物模型)中对感兴趣的分子的ADCC活性进行评估。

[0114] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指分子在补体存在的情况下裂解靶标的能力。补体激活途径是通过补体系统的第一组分(C1q)与和同源抗原复合的分子(例如,抗体)结合而启动的。为了评估补体激活,可以进行CDC测定(例如,如Gazzano-Santoro等人, *J. Immunol. Methods* [免疫学方法杂志] 202:163 (1996) 中所述)。

[0115] “结合亲和力”是指分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指示,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,抗体与抗原)之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以表示为解离常数(Kd)。亲和力可以通过本领域已知的常见方法测量。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并且倾向于容易解离,而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并且倾向于保持结合。

[0116] 如本文所用,“Kd”或“Kd值”是指在动力学模式中使用Octet QK384仪器(艾瑞生物公司,门洛帕克,加利福尼亚州(Fortebio Inc., Menlo Park, CA))通过生物层干涉技术确定的解离常数。例如,向抗小鼠Fc传感器加载小鼠Fc融合抗原,并且然后浸入含有抗体的孔中以测量浓度依赖性缔合速率(kon)。在最后步骤中测量抗体解离速率(koff),其中将传感器浸入仅含有缓冲液的孔中。Kd是koff/kon的比率。(关于更多细节,参见Concepcion, J等人, *Comb Chem High Throughput Screen* [组合化学与高通量筛选], 12 (8), 791-800, 2009)。

[0117] 术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等在本文中通常用于意指获得所期望的药理学和/或生理学作用。作用就完全或部分预防疾病或其症状而言可以是预防性的和/或就部分或完全治愈疾病和/或可归因于疾病的不良作用而言可以是治疗性的。如本文所用的“治疗”涵盖哺乳动物的疾病的任何治疗,并且包括:(a)防止疾病发生在可能易患该疾病但尚未被诊断为患有该疾病的受试者中;(b)抑制该疾病,即阻止其发展;或者(c)缓解该疾病,即引起疾病消退。治疗剂可以在疾病或损伤发作之前、期间或之后施用。对正在发生的疾病的治疗是特别令人感兴趣的,其中该治疗稳定或减少患者的不期望的临床症状。这种治疗期望在受影响组织完全丧失功能之前进行。主题治疗可以在疾病的症状阶段期间施用,并且在一些情况下在疾病的症状阶段之后施用。

[0118] “治疗有效量”旨在用于向受试者赋予治疗益处所必需的活性剂的量。例如,“治疗有效量”是诱导、减轻或以其他方式改善与疾病相关联的病理症状、疾病进展或生理状况或提高对疾患的抵抗力的量。

[0119] 术语“特征在于MUC1-C的表达”广义上是指其中MUC1-C表达与疾病或疾患所特有的一种或多种病理过程相关联或涉及该一种或多种病理过程的任何疾病或疾患。此类疾患包括但不限于实体瘤和血液恶性肿瘤,例如本文进一步描述的那些。在一些实施例中,特征在于MUC1-C的表达的疾病或疾患包括上皮来源的癌症,即癌,包括腺癌和鳞状细胞癌。癌的

非限制性实例包括：乳腺癌、非小细胞肺 (NSCL) 癌、小细胞肺 (SSC) 癌、间皮瘤、肾细胞癌、结肠直肠癌、卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌、鼻咽癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌、食管癌和宫颈癌。在一些实施例中，特征在于MUC1-C的表达的疾病或疾患包括血液恶性肿瘤，即骨髓瘤、白血病和淋巴瘤。血液恶性肿瘤的非限制性实例包括多发性骨髓瘤和慢性髓性白血病 (CML)。

[0120] 术语“受试者”、“个体”和“患者”在本文中可互换使用，是指正在评估治疗和/或正在治疗的哺乳动物。在一个实施例中，该哺乳动物是人。术语“受试者”、“个体”和“患者”包括但不限于患有癌症的个体、患有自身免疫性疾病的个体、患有病原体感染的个体等。受试者可以是人，但也包括其他哺乳动物，特别是可用作人类疾病的实验室模型的那些哺乳动物，例如小鼠、大鼠等。

[0121] 术语“药物配制品”是指呈使得活性成分的生物活性有效的形式，并且不含对该配制品所施用的受试者具有不可接受的毒性的另外的组分的配制品。此类配制品是无菌的。“药学上可接受的”赋形剂(媒介物、添加剂)是可以合理地施用于受试哺乳动物以提供有效剂量的所采用的活性成分的那些赋形剂。

[0122] “无菌”配制品是无菌的或不含有或基本上不含所有活微生物及其孢子。“冷冻”配制品是处于低于0°C的温度下的配制品。

[0123] “稳定的”配制品是在储存之后，其中的蛋白质基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物活性的配制品。优选地，配制品在储存之后基本上保留其物理和化学稳定性以及生物活性。储存期通常基于配制品的预期保质期来选择。用于测量蛋白质稳定性的各种分析技术在本领域中是可用的，并且在以下进行综述：例如Peptide and Protein Drug Delivery[肽和蛋白质药物递送]，247-301.Vincent Lee编辑,Marcel Dekker公司,纽约,纽约州(Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.) 出版(1991)以及Jones. A. Adv. Drug Delivery Rev. [高级药物递送综述]10:29-90) (1993)。可以在选定的温度下在选定的时间段内测量稳定性。稳定性可以通过各种不同的方式定性和/或定量评价，包括评价聚集体形成(例如，使用尺寸排阻色谱法、测量浊度和/或通过目视检查)；使用阳离子交换色谱法、图像毛细管等电聚焦(icIEF)或毛细管区带电泳评价电荷异质性；氨基末端或羧基末端序列分析；质谱分析；比较还原抗体和完整抗体的SDS-PAGE分析；肽图(例如，胰蛋白酶或LYS-C)分析；评价抗体的生物活性或抗原结合功能；等。不稳定性可以涉及以下中的一种或多种：聚集、脱酰胺(例如Asn脱酰胺)、氧化(例如Met氧化)、异构化(例如Asp异构化)、剪切/水解/片段化(例如铰链区片段化)、琥珀酰亚胺形成、未配对的半胱氨酸、N末端延伸、C末端加工、糖基化差异等。

[0124] II. 详细描述

[0125] 抗MUC1-C抗体

[0126] 本发明提供了与人MUC1-C结合的密切相关的抗体家族。该家族的抗体包含一组如本文定义和表1中所示的CDR序列，并且通过所提供的重链CDR1、CDR2和CDR3序列(在表2中列出)以及SEQ ID NO:7和8的重链可变区(VH)序列(在表3中列出)例示。抗体家族提供了许多益处，有助于作为一种或多种临床治疗剂使用。这些抗体包含具有一系列结合亲和力的成员，从而允许选择具有所期望结合亲和力的特定序列。

[0127] 表1:抗MUC1-C重链抗体独特CDR氨基酸序列。

	SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
[0128]	GFAFSGNS (SEQ ID NO: 1)	ITSSGRSI (SEQ ID NO: 2)	ATGGTGTSLFDY (SEQ ID NO: 3)
	GFTFSSHS (SEQ ID NO: 4)	ISSSSNIK (SEQ ID NO: 5)	ATGGTGITVLDY (SEQ ID NO: 6)

[0129] 表2:抗MUC1-C重链抗体CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列。

	克隆 ID 号	SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
[0130]	375747	GFAFSGNS (SEQ ID NO: 1)	ITSSGRSI (SEQ ID NO: 2)	ATGGTGTSLFDY (SEQ ID NO: 3)
	375505	GFTFSSHS (SEQ ID NO: 4)	ISSSSNIK (SEQ ID NO: 5)	ATGGTGITVLDY (SEQ ID NO: 6)

[0131] 表3. 抗MUC1-C重链抗体可变结构域氨基酸序列。

	克隆 ID 号	SEQ_aa_FR1_FR4	SEQ ID NO.
[0132]	375747	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFAFSGNSMNWVRQA PGKGLEWVAFITSSGRSIKYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNTLRDEDTALYYCATGGTGTSLFDYRGQGTSLTVSS	7
	375505	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHSMNWVRQA PGKGLEWVSFISSSSNIKKYADSVKGRFTISRDNKNSLFLQ MNSLRDEDTAVYYCATGGTGITVLDYRGQGTSLTVSS	8

[0133] 可以从本文提供的抗体中选择合适的抗体用于开发和治疗或其他用途,包括但不限于用作双特异性抗体,或CAR-T结构的一部分(例如,如在图4中所示)。

[0134] 候选蛋白质的亲和力的确定可以使用本领域已知的方法进行,诸如Biacore测量。抗体家族的成员可以对MUC1-C具有Kd为从约 10^{-6} 至大约 10^{-11} 的亲和力,包括但不限于:从约 10^{-6} 至大约 10^{-10} ;从约 10^{-6} 至大约 10^{-9} ;从约 10^{-6} 至大约 10^{-8} ;从约 10^{-8} 至大约 10^{-11} ;从约 10^{-8} 至大约 10^{-10} ;从约 10^{-8} 至大约 10^{-9} ;从约 10^{-9} 至大约 10^{-11} ;从约 10^{-9} 至大约 10^{-10} ;或这些范围内的任何值。可以用调节(例如,阻断)MUC1-C生物活性的生物评估来确认亲和力选择,包括体外测定、临床前模型和临床试验,以及潜在毒性的评估。

[0135] 本文中的抗体家族成员不与食蟹猴的MUC1-C蛋白交叉反应,但可以被工程化以提供与食蟹猴的MUC1-C蛋白或与任何其他动物物种的MUC1-C(如果期望)的交叉反应性。

[0136] 本文中的MUC1-C特异性抗体家族包含VH结构域,该结构域包含在人VH框架中的CDR1、CDR2和CDR3序列。例如,CDR序列可以分别位于SEQ ID NO:7-8中列出的所提供示例性可变区序列的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸残基26-33、51-58和97-116附近的区域中。本领域

普通技术人员将理解,如果选择不同的框架序列,则CDR序列可能处于不同的位置中,尽管通常序列的顺序将保持不变。

[0137] 在特定实施例中,抗MUC1-C抗体包含SEQ ID NO:1或4中任一个的CDR1序列。在特定实施例中,CDR1序列包含SEQ ID NO:1。在特定实施例中,CDR1序列包含SEQ ID NO:4。

[0138] 在特定实施例中,抗MUC1-C抗体包含SEQ ID NO:2或5中任一个的CDR2序列。在特定实施例中,CDR2序列包含SEQ ID NO:2。在特定实施例中,CDR2序列包含SEQ ID NO:5。

[0139] 在特定实施例中,抗MUC1-C抗体包含SEQ ID NO:3或6中任一个的CDR3序列。在特定实施例中,CDR3序列包含SEQ ID NO:3。在特定实施例中,CDR2序列包含SEQ ID NO:6。

[0140] 在另一个实施例中,抗MUC1-C仅重链抗体包含SEQ ID NO:1的CDR1序列;SEQ ID NO:2的CDR2序列;以及SEQ ID NO:3的CDR3序列。

[0141] 在另一个实施例中,抗MUC1-C抗体包含SEQ ID NO:4的CDR1序列;SEQ ID NO:5的CDR2序列;以及SEQ ID NO:6的CDR3序列。

[0142] 在另一个实施例中,抗MUC1-C抗体包含SEQ ID NO:7-8的重链可变区氨基酸序列中的任一个(表3)。

[0143] 在仍另一个实施例中,抗MUC1-C抗体包含SEQ ID NO:7的重链可变区序列。

[0144] 在仍另一个实施例中,抗MUC1-C抗体包含SEQ ID NO:8的重链可变区序列。

[0145] 在一些实施例中,本发明的抗MUC1-C抗体中的CDR序列包含相对于SEQ ID NO:1-6中任一个中的CDR1、CDR2和/或CDR3序列或CDR1、CDR2和CDR3序列组的一个或两个氨基酸取代(表1、表2)。

[0146] 在一些实施例中,抗MUC1-C抗体优选地包含重链可变结构域(VH)并且与MUC1-C结合,其中CDR3序列在氨基酸水平下与其CDR3序列在表1或表2中提供的任一抗体的CDR3序列具有大于或等于80%,诸如至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性。

[0147] 在一些实施例中,抗MUC1-C抗体优选地包含重链可变结构域(VH)并且与MUC1-C结合,其中整组CDR 1、2和3(组合)在氨基酸水平下与其CDR序列在表1或表2中提供的抗体的CDR 1、2和3(组合)具有大于或等于百分之八十五(85%)的序列同一性。

[0148] 在一些实施例中,抗MUC1-C抗体包含重链可变区序列并且与MUC1-C结合,该重链可变区序列与SEQ ID NO:7-8(在表3中示出)的任一重链可变区序列具有至少约80%同一性、至少85%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性、至少98%同一性或至少99%同一性。

[0149] 在一些实施例中,提供了双特异性或多特异性抗体,其可以具有本文讨论的任何构型,包括但不限于双特异性三链抗体样分子(TCA)。在一些实施例中,多特异性抗体可以包含至少一个对MUC1-C具有结合特异性的重链可变区,和至少一个对除MUC1-C之外的蛋白质具有结合特异性的重链可变区。在一些实施例中,多特异性抗体可以包含至少一个与MUC1-C结合的重链可变区,和至少一个与除MUC1-C之外的蛋白质结合的重链可变区。在一些实施例中,多特异性抗体可以包含含有至少两个抗原结合结构域的重链可变区,其中每个抗原结合结构域都与MUC1-C结合。在一些实施例中,多特异性抗体可以包含与第一抗原(例如,CD3)结合的重链/轻链对,以及来自仅重链抗体的重链。在某些实施例中,来自仅重链抗体的重链包含Fc部分,该Fc部分包含CH2和/或CH3和/或CH4结构域,不存在CH1结构域。在一个特定实施例中,双特异性抗体包含与效应细胞上的抗原(例如,T细胞上的CD3蛋白)

结合的重链/轻链对,以及来自包含与MUC1-C结合的抗原结合结构域的仅重链抗体的重链。

[0150] 在一些实施例中,多特异性抗体包含与轻链可变结构域配对的CD3结合VH结构域。在某些实施例中,该轻链是固定轻链。在一些实施例中,CD3结合VH结构域包含在人VH框架中的SEQ ID NO:9的CDR1序列、SEQ ID NO:10的CDR2序列和SEQ ID NO:11的CDR3序列。在一些实施例中,CD3结合VH结构域包含在人VH框架中的SEQ ID NO:12的CDR1序列、SEQ ID NO:13的CDR2序列和SEQ ID NO:14的CDR3序列。在一些实施例中,固定轻链包含在人VL框架中的SEQ ID NO:15的CDR1序列、SEQ ID NO:16的CDR2序列和SEQ ID NO:17的CDR3序列。共同地,CD3结合VH结构域和轻链可变结构域对CD3具有结合亲和力。在一些实施例中,CD3结合VH结构域包含SEQ ID NO:18的重链可变区序列。在一些实施例中,CD3结合VH结构域包含SEQ ID NO:19的重链可变区序列。在一些实施例中,CD3结合VH结构域包含与SEQ ID NO:18或19的重链可变区序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%同一性百分比的序列。在一些实施例中,固定轻链包含SEQ ID NO:20的轻链可变区序列。在一些实施例中,固定轻链包含与SEQ ID NO:20的重链可变区序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%同一性百分比的序列。

[0151] 包含上述CD3结合VH结构域和轻链可变结构域的多特异性抗体具有有利的特性,例如,如公开的PCT申请公开号W0 2018/052503中所述,其披露内容通过援引以其全文并入本文。本文所述的对MUC1-C具有结合亲和力的任何多特异性抗体和抗原结合结构域均可以与本文中(参见,例如,表4和表5)所述的CD3结合结构域和固定轻链结构域以及另外的序列(诸如表6和表7中提供的那些序列)组合,以产生对一个或多个MUC1-C表位以及CD3具有结合亲和力的多特异性抗体。

[0152] 表4.抗CD3重链和轻链CDR1、CDR2、CDR3氨基酸序列。

	SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
重链 (F2B)	GFTFDDYA (SEQ ID NO: 9)	ISWNSGSI (SEQ ID NO: 10)	AKDSRGYGDYRLGGAY (SEQ ID NO: 11)
重链 (F2F)	GFTFHNYA (SEQ ID NO: 12)	ISWNSGSI (SEQ ID NO: 13)	AKDSRGYGDYSLGGAY (SEQ ID NO: 14)
轻链	QSVSSN (SEQ ID NO: 15)	GAS (SEQ ID NO: 16)	QQYNNWPWT (SEQ ID NO: 17)

[0154] 表5.抗CD3重链和轻链可变区氨基酸序列。

[0155]	VH (F2 B) EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC <u>AKDSRGYGDYRLGGAYWGQGTLTVSS</u> (SEQ ID NO: 18)
[0155]	VH (F2 F) EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFHNYAMHWVRQAPGKGLEW VSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC <u>AKDSRGYGDYSLGGAYWGQGTLTVSS</u> (SEQ ID NO: 19)
[0156]	VL EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYG <u>ASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQ</u> GTKVEIK (SEQ ID NO: 20)

[0156] 表6:人IgG1和IgG4 Fc区序列。

<p>人 IgG1 (UniProt 编号 P01857)</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 21)</p>
<p>人 IgG4 (UniProt 编号 P01861)</p>	<p>ASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKT YTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 22)</p>
<p>[0157]</p>	<p>具有沉默突 变 (Fc 区) 的人 IgG1</p> <p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 23)</p>
<p>具有沉默突 变 (Fc 区) 的人 IgG4</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDPHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 24)</p>

[0158] 表7: 另外的序列。

[0159]

抗 CD3 轻链 恒定区序列 (κ 轻链)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 25)
抗 CD3 重链 序列 (VH + wt IgG1 Fc)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGTLLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 26)
抗 CD3 重链 序列 (具有 沉默的 IgG1 Fc)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGTLLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 27)

[0160]

抗 CD3 重链 恒定区序列 (具有 wt IgG4 Fc)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNVDPHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 28)
抗 CD3 重链 恒定区序列 (具有沉默 的 IgG4 Fc)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNVDPHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 29)

[0161]

<p>沉默的 IgG4 (铰链 - CH2 - CH3; 白 (S228P、 F234A、 L235A; T366S、 L368A、 Y407V))</p>	<p>ESKYGPPCP<u>P</u>CPAPE<u>A</u>AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSL<u>S</u>CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGFFLY<u>S</u>RRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 30)</p>
<p>沉默的 IgG4 (铰链 - CH2 - CH3; 杵 (S228P、 F234A、 L235A; T366W))</p>	<p>ESKYGPPCP<u>P</u>CPAPE<u>A</u>AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSL<u>W</u>CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGFFLY<u>S</u>RRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 31)</p>
<p>抗 CD3 全长 轻链 (VL + κCL)</p>	<p>EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQ YNNWPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSS TLTSLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 32)</p>

[0162]

抗 CD3 (F2B) 全 长重链 (VH + 沉默的 IgG4 Fc + 杵 (S228P、 F234A、 L235A; T366W))	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNVDPHKPSNT KVDKRVESKYGPPCP <u>PC</u> PAPE <u>AA</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSL <u>W</u> CLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 33)
抗 CD3 (F2F) 全 长重链 (VH + 沉默的 IgG4 Fc + 杵 (S228P、 F234A、 L235A; T366W))	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFHNYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTALYYCAKDSRGYGDYSLGGAYWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNVDPHKPSNT KVDKRVESKYGPPCP <u>PC</u> PAPE <u>AA</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSL <u>W</u> CLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 42)

[0163]

抗 MUC1-C 单价重链 (克隆 ID 375747) + 沉默的 IgG4 Fc, 白 (S228P、 F234A、 L235A、 T366S、 L368A、 Y407V	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFAFSGNSMNWVRQAPGK GLEWVAFITSSGRSIKYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNTLR DEDTALYYCATGGTGTSLFDYRGQGTTLVTVSSESKYGPPCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLVSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK (SEQ ID NO: 34)
抗 MUC1-C 二价重链 (克隆 ID 375747) + 沉默的 IgG4 Fc, 白 (S228P、 F234A、 L235A、 T366S、 L368A、 Y407V	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFAFSGNSMNWVRQAPGK GLEWVAFITSSGRSIKYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNTLR DEDTALYYCATGGTGTSLFDYRGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFAFSGNSMNWVRQAPGK LEWVAFITSSGRSIKYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNTLRD EDTALYYCATGGTGTSLFDYRGQGTTLVTVSSESKYGPPCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLVSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK (SEQ ID NO: 35)

[0164]

<p>抗 MUC1-C 单价重链 (克隆 ID 375505) + 沉默的 IgG4 Fc, 白 (S228P、 F234A、 L235A、 T366S、 L368A、 Y407V</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHS MNWVRQAPGK GLEWVSFISSSSNIKKYADSVKGRFTISRDN AKNSLFLQMNSLR DEDTAVYYCATGGTGITVLDYRGQGTLVTVSSE SKYGPPCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLVSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK (SEQ ID NO: 36)</p>
<p>抗 MUC1-C 二价重链 (克隆 ID 375505) + 沉默的 IgG4 Fc, 白 (S228P、 F234A、 L235A、 T366S、 L368A、 Y407V</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHS MNWVRQAPGK GLEWVSFISSSSNIKKYADSVKGRFTISRDN AKNSLFLQMNSLR DEDTAVYYCATGGTGITVLDYRGQGTLVTVSSG GGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHS MNWVRQAPGKG LEWVSFISSSSNIKKYADSVKGRFTISRDN AKNSLFLQMNSLRD EDTAVYYCATGGTGITVLDYRGQGTLVTVSSE SKYGPPCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSF FLVSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 37)</p>

[0165]	抗 MUC1-C 二价重链 (克隆 ID 375747 x 克隆 ID 375505) + 沉默的 IgG4 Fc, 白 (S228P、 F234A、 L235A、 T366S、 L368A、 Y407V	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFAFSGNSMNWVRQAPGK GLEWVAFITSSGRSIKYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNTLR DEDTALYYCATGGTGTSLFDYRGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHSMNWVRQAPGKG LEWVSFISSSSNIKKYADSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNSLRD EDTAVYYCATGGTGITVLDYRGQGTTLVTVSSESKYGPCCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSF FLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 38)
	抗 MUC1-C 二价重链 (克隆 ID 375505 x 克隆 ID 375747) + 沉默的 IgG4 Fc, 白 (S228P、 F234A、 L235A、 T366S、 L368A、 Y407V	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHSMNWVRQAPGK GLEWVSFISSSSNIKKYADSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNSLR DEDTAVYYCATGGTGITVLDYRGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFAFSGNSMNWVRQAPGKG LEWVAFITSSGRSIKYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNTLRD EDTALYYCATGGTGTSLFDYRGQGTTLVTVSSESKYGPCCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSF FLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 39)

[0166] 在一些实施例中,提供了双特异性或多特异性抗体,其可以具有本文讨论的任何构型,包括但不限于双特异性三链抗体样分子(TCA)。在一些实施例中,双特异性抗体可以包含至少一个与MUC1-C结合的重链可变区,和至少一个与除MUC1-C之外的蛋白质结合的重

链可变区。在一些实施例中，双特异性抗体可以包含与第一抗原结合的重链/轻链对，和来自包含Fc部分的仅重链抗体的重链，该Fc部分包含CH2和/或CH3和/或CH4结构域，不存在CH1结构域，以及与第二抗原的表位或第一抗原的不同表位结合的抗原结合结构域。在一个特定实施例中，双特异性抗体包含与效应细胞上的抗原（例如，T细胞上的CD3蛋白）结合的重链/轻链对，以及来自包含与MUC1-C结合的抗原结合结构域的仅重链抗体的重链。

[0167] 在一些实施例中，当本发明的抗体是双特异性抗体时，该抗体的一条臂（一个结合部分或一个结合单元）对人MUC1-C是特异性的，而另一条臂可以对靶细胞、肿瘤相关抗原、靶向抗原（例如，整联蛋白等）、病原体抗原、检查点蛋白等是特异性的。靶细胞特别地包括癌细胞，包括但不限于与实体瘤和/或特征在于MUC1-C的表达的血液恶性肿瘤相关的细胞。在一些实施例中，抗体的一条臂（一个结合部分或一个结合单元）对人MUC1-C是特异性的，而另一条臂对CD3是特异性的。

[0168] 在一些实施例中，抗体包含抗CD3轻链多肽，该抗CD3轻链多肽包含SEQ ID NO:32的序列；抗CD3重链多肽，该抗CD3重链多肽包含SEQ ID NO:18或19的序列；和抗MUC1-C重链多肽，该抗MUC1-C重链多肽包含与SEQ ID NO:30或31中任一个的序列连接的SEQ ID NO:7或8的序列，呈单价或二价构型。这些序列可以以各种方式组合以产生所期望IgG亚类的双特异性抗体，例如IgG1、IgG4、沉默的IgG1、沉默的IgG4。在一个优选的实施例中，抗体是TCA，其包含含有SEQ ID NO:32的第一多肽、含有SEQ ID NO:33的第二多肽和含有SEQ ID NO:34、35、36、37、38或39的第三多肽。

[0169] 各种形式的多特异性抗体都在本发明的范围内，包括但不限于单链多肽、二链多肽、三链多肽、四链多肽、及其多种。本文中的多特异性抗体特别地包括与MUC1-C和CD3结合的T细胞多特异性（例如，双特异性）抗体（抗MUC1-C x抗CD3抗体）。此类抗体诱导有效的T细胞介导的对表达MUC1-C的细胞的杀伤。

[0170] 抗MUC1-C抗体的制备

[0171] 本发明的抗体可以通过本领域已知的方法制备。在一个优选实施例中，本文中的抗体由转基因动物（包括转基因小鼠和大鼠，优选大鼠）产生，其中内源性免疫球蛋白基因被敲除或无效。在一个优选实施例中，本文中的重链抗体在UniRat™中产生。UniRats™的内源性免疫球蛋白基因被沉默，并且使用人免疫球蛋白重链转座点来表达多样化的自然优化的全人源HCAb库。虽然大鼠中的内源性免疫球蛋白基因座可以使用多种技术来敲除或沉默，但在UniRat™中，使用锌指（内）核酸酶（ZNF）技术来灭活内源性大鼠重链J基因座、轻链C κ 基因座和轻链C λ 基因座。用于微注射到卵母细胞中的ZNF构建体可以产生IgH和IgL敲除（KO）系。关于细节，参见例如Geurts等人，2009，Science[科学]325:433。Ig重链敲除大鼠的表征已经由Menoret等人，2010，Eur. J. Immunol. [欧洲免疫学杂志]40:2932-2941报告。ZNF技术的优点是，非同源末端连接经由高达若干kb的缺失使基因或基因座沉默也可以为同源整合提供靶位点（Cui等人，2011，Nat Biotechnol[自然-生物技术]29:64-67）。UniRat™中产生的人重链抗体被称为UniAbs™，并且可以结合常规抗体无法攻击的表位。它们的高特异性、亲和力和小尺寸使其成为单特异性和多特异性应用的理想选择。

[0172] 除UniAbs™之外，本文特别地包括缺乏骆驼科VHH框架和突变的仅重链抗体及其功能性VH区。例如，此类仅重链抗体可以在转基因大鼠或小鼠中产生，其包含例如在WO 2006/008548中描述的完全人仅重链基因座，但是也可以使用其他转基因哺乳动物，诸如兔、豚

鼠、大鼠，大鼠和小鼠是优选的。仅重链抗体，包括其VHH或VH功能性片段，也可以通过重组DNA技术，通过在合适的真核或原核宿主中表达编码核酸来产生，该宿主例如包括哺乳动物细胞（例如，CHO细胞）、大肠杆菌或酵母。

[0173] 仅重链抗体的结构域结合了抗体和小分子药物的优点：可以是单价的或多价的；具有低毒性；并且对于制造是成本有效的。由于其尺寸较小，这些结构域易于施用，包括口服或局部施用，其特征在于高稳定性，包括胃肠道稳定性；并且它们的半衰期可以根据所期望的用途或适应症进行定制。另外，HCAb的VH和VHH结构域可以以成本有效的方式制造。

[0174] 在特定实施例中，本发明的重链抗体，包括UniAbsTM，在FR4区的第一位置（根据Kabat编号系统的氨基酸位置101）处的天然氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代，该另一个氨基酸残基能够在此位置处破坏包含天然氨基酸或与天然氨基酸残基缔合的表面暴露的疏水贴剂。此类疏水贴剂通常埋在与抗体轻链恒定区的界面中，但在HCAb中暴露在表面，并且至少部分地用于HCAb的不需要的聚集和轻链缔合。经取代的氨基酸残基优选是带电的，并且更优选带正电荷，诸如赖氨酸(Lys, K)、精氨酸(Arg, R)或组氨酸(His, H)，优选精氨酸(R)。在一个优选实施例中，来源于转基因动物的仅重链抗体在位置101处含有Trp至Arg突变。所得的HCAb优选在聚集不存在的情况下在生理条件下具有高抗原结合亲和力和溶解性。

[0175] 作为本发明的一部分，鉴定了具有来自UniRatTM动物的独特序列的人IgG抗MUC1-C重链抗体(UniAbTM)，这些抗体在ELISA蛋白和细胞结合测定中结合人MUC1-C。所鉴定的重链可变区(VH)序列对于人MUC1-C蛋白结合和/或与MUC1-C+细胞的结合呈阳性，并且对于与不表达MUC1-C的细胞的结合全部呈阴性。

[0176] 与MUC1-C蛋白上的非重叠表位结合的重链抗体（例如，UniAbsTM）可以通过竞争结合测定来鉴定，诸如酶联免疫测定(ELISA测定)或流式细胞术竞争结合测定。例如，可以使用与靶抗原结合的已知抗体与感兴趣的抗体之间的竞争。通过使用这种方法，可以将一组抗体分为与参考抗体竞争的抗体和不与参考抗体竞争的抗体。非竞争抗体被鉴定为与不同表位结合，该不同表位不与参考抗体所结合的表位重叠。通常，将一种抗体固定，结合抗原，并且在ELISA测定中测试被标记的（例如，生物素化）第二抗体，以确定其结合捕获的抗原的能力。这也可以通过使用表面等离子体共振(SPR)平台，包括ProteOn XPR36(伯乐公司(BioRad, Inc))、Biacore 2000和Biacore T200(GE医疗生命科学部(GE Healthcare Life Sciences))和MX96 SPR成像仪(Ibis技术私人有限公司(Ibis technologies B.V.))以及在生物层干涉技术平台，诸如Octet Red384和Octet HTX(颇尔公司(ForteBio, Pall Inc))上实现。关于更多细节，参见本文中的实例。

[0177] 典型地，如果抗体导致参考抗体与靶抗原的结合减少约15%-100%（如通过标准技术，诸如通过以上所述的竞争结合测定确定），则该抗体与参考抗体“竞争”。在各种实施例中，相对抑制是至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或更高。

[0178] 药物组合物、用途和治疗方法

[0179] 本发明的另一方面提供了药物组合物，其包含与合适的药学上可接受的载剂混合的一种或多种本发明的抗体。如本文所用的药学上可接受的载剂是示例性的，但不限于辅

助剂、固体载剂、水、缓冲液或本领域用于容纳治疗组分的其他载剂或其组合。

[0180] 在一个实施例中,药物组合物包含与MUC1-C结合的重链抗体(例如,UniAbTM)。在另一个实施例中,药物组合物包含多特异性(包括双特异性)重链抗体(例如,UniAbTM),其对MUC1-C蛋白上的两个或更多个非重叠表位具有结合特异性。在一个优选实施例中,药物组合物包含多特异性(包括双特异性和TCA)重链抗体(例如,UniAbTM),其对MUC1-C具有结合特异性,并且对效应细胞上的结合靶(例如,T细胞上的结合靶,例如像T细胞上的CD3蛋白)具有结合特异性。在一个优选实施例中,药物组合物包含多特异性(包括双特异性和TCA)重链抗体(例如,UniAbTM),其与MUC1-C结合,并且与效应细胞上的结合靶(例如,T细胞上的结合靶,例如像T细胞上的CD3蛋白)结合。

[0181] 通过将具有所期望纯度的蛋白质与任选的药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂(参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition[雷明顿药物科学第16版],Osol,A.编辑(1980))混合来制备根据本发明使用的抗体的药物组合物,诸如呈冻干配制品或水溶液的形式。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者是无毒的,并且包括缓冲液(诸如磷酸盐、柠檬酸盐)和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化六甲铵;苯扎氯铵,苜索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质(诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);亲水聚合物(诸如聚乙烯吡咯烷酮);氨基酸(诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸);单糖、二糖和其他碳水化合物(包括葡萄糖、甘露糖或糊精);螯合剂(诸如EDTA);糖(诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇);成盐平衡离子,诸如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白质络合物);和/或非离子型表面活性剂(诸如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG))。

[0182] 用于肠胃外施用的药物组合物优选是无菌且基本上等渗的,并在良好生产规范(GMP)条件下制造。药物组合物可以呈单位剂型(即,用于单次施用的剂量)提供。配制品取决于所选的施用途径。本文中的抗体可以通过静脉内注射或输注或皮下施用。对于注射施用,本文中的抗体可以在水溶液,优选在生理相容的缓冲液中配制,以减少注射部位的不适。该溶液可以含有如上所讨论的载剂、赋形剂或稳定剂。可替代地,抗体可以呈冻干形式,以供在使用之前用合适的媒介物(例如,无菌无热原水)构造。

[0183] 抗体配制品披露于例如美国专利号9,034,324中。类似的配制品可以用于本发明的重链抗体,包括UniAbsTM。皮下抗体配制品描述于例如US20160355591和US 20160166689中。

[0184] 使用方法

[0185] 本文所述的抗MUC1-C抗体和药物组合物可以用于治疗特征在于MUC1-C表达的疾病和病症,包括但不限于本文进一步描述的病症和疾病。

[0186] 黏蛋白1(MUC1)是高度糖基化的单通道I型跨膜蛋白。N末端亚基(MUC1-N)和C末端亚基(MUC1-C)形成了稳定的异源二聚体复合物。MUC1是高度多态性的,具有超过90种同种型,它们的区别在于N末端亚基的VNTR(可变数目串联重复序列)区域中的串联重复序列的数量。黏蛋白排列在肺、胃、乳腺、肠和其他几个器官中的上皮细胞的顶面。在健康组织中,黏蛋白保护身体免受感染。异常糖基化的MUC1在人类上皮癌中过度表达,并且肿瘤细胞中

顶端极性丧失 (Sousa等人, 2016, PMC: 4998183, Nath和Mukherjee, 2014, PMID: 5500204)。MUC1可以被蛋白酶切割, 经切割的MUC1-N从细胞中脱落并引发炎症。非脱落致癌MUC1-C亚基很短, 含有58个氨基酸的膜近端胞外结构域, 显示出有希望作为抗体药物缀合物、单克隆抗体和CAR-T疗法的靶标 (Panchamoorthy等人, 2018, PMC: 6124453; Kufe, 2009, PMC: 2951677)。

[0187] 在一方面, 本文的抗MUC1-C抗体 (例如, UniAbs™) 和药物组合物可用于治疗特征在于MUC1-C的表达的疾患, 包括但不限于本文进一步描述的疾病和疾患。

[0188] 本发明的抗MUC1-C仅重链抗体 (UniAb) 可用于开发用于治疗癌症的治疗剂, 这些癌症包括实体瘤和血液恶性肿瘤, 例如本文进一步描述的那些。实体瘤包括上皮来源的癌症, 即癌, 包括腺癌和鳞状细胞癌。癌的非限制性实例包括: 乳腺癌、非小细胞肺 (NSCL) 癌、小细胞肺 (SSC) 癌、间皮瘤、肾细胞癌、结直肠癌、卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌、鼻咽癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌、食管癌和宫颈癌。血液恶性肿瘤包括但不限于骨髓瘤、白血病和淋巴瘤。血液恶性肿瘤的非限制性实例包括多发性骨髓瘤和慢性髓性白血病 (CML)。尽管一些单克隆抗体已显示出治疗这些疾病的希望, 但尚未最终证明一致的临床功效。因此, 非常需要针对这些癌症的新疗法, 包括免疫疗法。

[0189] 在一个实施例中, 本文中的抗体可以呈仅重链抗MUC1-C抗体-CAR结构, 即仅重链抗MUC1-C抗体-CAR转导T细胞结构的形式。图4是包含抗MUC1-C胞外结合结构域的CAR-T结构的示意图, 该抗MUC1-C胞外结合结构域包含根据本发明实施例的重链可变区 (VH) 序列。

[0190] 本发明的组合物用于治疗疾病的有效剂量根据许多不同的因素而变化, 包括施用手段、靶部位、患者的生理状态、患者是人还是动物、施用的其他药物、以及治疗是预防性的还是治疗性的。通常, 患者是人, 但是也可以治疗非人哺乳动物, 例如, 伴侣动物诸如狗、猫、马等, 实验室哺乳动物诸如兔、小鼠、大鼠等等。可以调整治疗剂量以优化安全性和有效性。

[0191] 剂量水平可以由一般熟练的临床医生容易地确定, 并且可以根据需要进行修改, 例如, 根据修改受试者对于疗法的应答的需要。可以与载剂材料组合以产生单一剂型的活性成分的量根据所治疗的宿主和具体施用模式而变化。剂量单位形式通常含有从约1mg至约500mg之间的活性成分。

[0192] 在一些实施例中, 该药剂的治疗剂量的范围可以从约0.0001至100mg/kg, 并且更通常0.01至5mg/kg宿主体重。例如, 剂量可以是1mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg的范围内。示例性治疗方案需要每两周一次或每月一次或每3至6个月施用一次。本发明的治疗实体通常在多个场合施用。单个剂量之间的间隔可以是每周、每月或每年。间隔也可以是不规则的, 如通过测量治疗实体在患者中的血液水平所指示。可替代地, 本发明的治疗实体可以作为缓释配制品施用, 在这种情况下需要较少的施用频率。剂量和频率根据多肽在患者中的半衰期而变化。

[0193] 典型地, 将组合物制备为注射剂, 作为液体溶液或悬浮液; 也可以制备适用于在注射之前溶解或悬浮在液体媒介物中的固体形式。本文中的药物组合物适用于直接或在固体 (例如, 冻干) 组合物重构之后静脉内或皮下施用。该制剂还可以乳化或包封在脂质体或微颗粒 (诸如聚丙交酯、聚乙交酯或共聚物) 中以增强辅助剂作用, 如上所讨论的。Langer, Science[科学]249:1527, 1990以及Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews[高级药物递送综述]28:97-119, 1997。本发明的药剂可以以贮库型注射剂或植入物制剂的形式施用, 该

形式可以以允许活性成分持续或脉动释放的方式配制。药物组合物通常被配制为无菌的、基本上等渗的,并且完全符合美国食品和药物管理局的所有良好生产规范(GMP)法规。

[0194] 可以在细胞培养物或实验动物中通过标准药理学程序,例如通过确定LD50(对群体的50%致死的剂量)和LD100(对群体的100%致死的剂量)来确定本文所述的抗体和抗体结构的毒性。毒性与治疗作用之间的剂量比是治疗指数。可以在配制对于在人类中使用无毒的剂量范围中使用由这些细胞培养测定和动物研究获得的数据。本文所述的抗体的剂量优选在包括有效剂量而具有很小或没有毒性的一系列循环浓度内。该剂量可以根据所采用的剂型和所利用的施用途径在这个范围内变化。确切配制、施用途径和剂量可以由个别医师根据患者的状况来选择。

[0195] 用于施用的组合物通常包含溶解在药学上可接受的载剂(优选水性载剂)中的抗体或其他烧蚀剂。可以使用多种水性载剂,例如缓冲盐水等。这些溶液是无菌的,并且通常不含不期望的物质。这些组合物可以通过常规、熟知的灭菌技术来灭菌。这些组合物可以含有药学上可接受的辅助物质,如近似生理条件所需的辅助物质,诸如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些配制品中活性剂的浓度可以变化很大,并且将主要根据所选择的特定施用模式和患者的需要,基于流体体积、粘度、体重等进行选择(例如,Remington's Pharmaceutical Science[雷明顿药物科学](第15版,1980)和Goodman和Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics[治疗学的药理学基础](Hardman等人编辑,1996))。

[0196] 包括本发明的活性剂及其配制品以及使用说明书的试剂盒也在本发明的范围内。试剂盒可以进一步含有至少一种另外的试剂,例如化疗药物等。试剂盒典型地包括指示试剂盒的内容物的预期用途的标签。如本文所用,术语“标签”包括在试剂盒上或与试剂盒一起提供的或以其他方式伴随试剂盒的任何书写或记录材料。

[0197] 现在正在充分描述本发明,对于本领域普通技术人员而言明显的是,可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下进行各种变化和修改。

[0198] 实例

[0199] 实例1:与MUC1-C+Raji细胞的结合

[0200] 通过流式细胞术评估与MUC1-C阳性Raji细胞的结合。简而言之,将50,000个靶细胞在4°C用稀释系列的经纯化的UniAbs™染色30分钟。孵育后,将细胞用流式细胞术缓冲液(1X PBS、1% BSA、0.1% NaN₃)洗涤两次,并用与R-藻红蛋白(PE)缀合的山羊F(ab')₂抗人IgG(南方生物技术公司(Southern Biotech),目录号2042-09)染色来检测细胞结合抗体。在4°C孵育20分钟后,将细胞用流式细胞术缓冲液洗涤两次,并通过流式细胞术测量平均荧光强度(MFI)。单独用二抗染色的细胞的MFI用于确定背景信号,并将每种抗体的结合转化为背景的倍数。

[0201] 结果提供于图1中,其总结了所指示的抗MUC1-C抗体的靶结合活性。第1列指示了HCAb的克隆ID。第2列指示了与Raji细胞的结合,测量为背景MFI信号的倍数。第3列指示了与不表达MUC1-C蛋白的CHO细胞(阴性对照)的结合,测量为背景MFI信号的倍数。

[0202] 实例2:与MUC1-C+Raji细胞的结合

[0203] 如实例1中所述,在Raji MUC1-C+细胞上进行细胞结合剂量曲线。以150nM的起始浓度测试抗体,接着进行3倍连续稀释以获得8点剂量曲线。将PE平均荧光强度作为相对于

背景(仅与第二检测抗体孵育的细胞)的倍数作图。结果提供于图2中。

[0204] 实例3:在MUC1-C+Raji细胞上的细胞结合EC50值

[0205] 为了确定细胞结合EC50值,在表达MUC1-C的Raji细胞上进行细胞结合剂量曲线,如上所述。以150nM的起始剂量测试抗体,接着进行3倍连续稀释以获得8点剂量曲线。使用非线性回归曲线拟合(可在GraphPad Prism 8.4.3中获得)将转化的数据绘制为xy-图以获得EC50(nM)。结果提供于图3(第2列提供EC50值,单位为nM)中。

[0206] 实例4:通过人肿瘤细胞进行的CAR-T介导的T细胞激活

[0207] 通过用抗MUC1-C CAR和6x NFAT TK纳米荧光素酶报告基因转染Jurkat T淋巴细胞来测量CAR-T细胞活性。将转染的Jurkat与稳定转染以表达人MUC1-C的MUC1-C+Raji细胞或MUC1-C阴性Raji细胞共培养24小时。使用Promega Nano-Glo荧光素酶测定系统(目录号N1110)测量荧光素酶活性,并且将数据归一化至含有CAR转染的Jurkat和MUC1阴性Raji细胞系的共培养物。使用非配对双尾t检验确定统计显著性。结果提供在图4,分图B和C中。

[0208] 图4,分图A是包含抗MUC1-C胞外结合结构域的CAR-T结构的示意图,该抗MUC1-C胞外结合结构域包含根据本发明的各方面的抗体序列。分图B描绘了与Raji-MUC1-C+一起的用抗MUC1-C 375747CAR转染的Jurkat的T细胞活性(**p=0.0009)。分图C描绘了与Raji-MUC1-C+一起的用抗MUC1-C 375505CAR转染的Jurkat的T细胞活性(**p=0.0019)。这些结果证明了T细胞激活对MUC1-C靶标结合具有特异性,因为与MUC1-C阴性Raji细胞共培养或单独孵育经转染的Jurkat,不产生明显的荧光素酶报告基因信号。

[0209] 实例5:通过CAR-T介导的T细胞激活的肿瘤控制的体内评估

[0210] 使用三阴性乳腺癌(TNBC)的鼠异种移植模型,对对应于克隆ID号375505和375747的抗体构建体进行肿瘤生长的临床前评估。将表达GFP和荧光素酶的MDA-MB-468细胞系(MDA-MB-468.lucGFP;5x 10⁶个细胞)皮下注射到NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/Szj(NSG)小鼠中,以评估VH嵌合抗原受体(VCAR)的体内抗肿瘤功效。未治疗的小鼠(PBS)作为对照。对于体内研究,所有CAR-T细胞均使用VCAR质粒的PiggyBac(PB)递送来产生。用MDA-MB-468在腋下注射小鼠(n=17,以考虑变异性),并在肿瘤建立(通过卡尺测量为100-200mm³,在植入后39天)时进行治疗。通过IV注射“应激”剂量(2.5x 10⁶)的CAR-T来治疗小鼠(n=4/组,并根据肿瘤体积进行分期)。每7天收集全血,每3天通过卡尺测量评估肿瘤体积,直到CAR-T输注后第32天研究完成。

[0211] 图5,分图A是显示在临床前评估中对于所指示抗体构建体,肿瘤进展作为CAR-T输注后天数的函数的图。通过卡尺测量完成肿瘤体积评估。与未治疗的小鼠相比,包含所指示抗体构建体(克隆ID:375505和375747)的CAR-T细胞显示出强大的肿瘤控制。例如,治疗后不久,观察到针对克隆ID号375505和375747的肿瘤体积急剧下降。相比之下,在施用对照治疗后,未治疗的小鼠的肿瘤体积继续攀升。

[0212] 图5,分图B是显示对于所指示抗体构建体,在图5,分图A中所显示的图的曲线下面积(AUC)的条形图。与克隆ID号375505和375747相比,未治疗的小鼠显示出显著更高的AUC。

[0213] 实例6:用于CAR-T体内评估的T细胞扩增

[0214] 使用实例5中描述的相同临床前评估来评估T细胞扩增。图6,分图A是显示对于所指示抗体构建体,血液中体内T细胞计数作为CAR-T输注后天数的函数的图。显示了用包含所指示抗体构建体(克隆ID:375505和375747)的CAR-T细胞治疗的小鼠的稳健T细胞扩增。

在第0天,显示了小鼠具有低的T细胞计数。。用包含所指示抗体构建体(克隆ID:375505和375747)的CAR-T细胞治疗后,与未治疗的小鼠的无变化相比,T细胞计数急剧增加。对于未治疗的小鼠,T细胞计数在研究过程中保持较低且没有变化。

[0215] 图6,分图B是显示对于所指示抗体构建体,在图6,分图A中所显示的图的曲线下面积(T细胞计数总数)的条形图。与未治疗的小鼠相比,两种抗体构建体的总T细胞计数显著。

[0216] 实例7:通过CAR-T介导的T细胞激活的肿瘤控制的体内评估

[0217] 使用卵巢癌的鼠异种移植模型,对对应于克隆ID号375505和375747的抗体构建体进行肿瘤生长的临床前评估。将表达GFP和荧光素酶的腺癌OVCAR-3细胞系(OVCAR-3.lucGFP; 5×10^6 个细胞)皮下注射到NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Wjl}/Szj(NSG)小鼠中,以评估VH嵌合抗原受体(VCAR)的体内抗肿瘤功效。未治疗的小鼠(PBS)作为对照。对于体内研究,所有CAR-T细胞均使用VCAR质粒的PiggyBac(PB)递送来产生。将小鼠(n=17,以考虑变异性)注射肿瘤细胞,并在肿瘤建立(植入后14天,通过生物发光成像(BLI),通量大于 1×10^8 光子/sec)时进行治疗。通过IV注射“应激”剂量(8×10^6)的CAR-T来治疗小鼠(n=4/组,并根据肿瘤体积进行分期)。每7天收集全血,每7天通过BLI测量评估肿瘤体积,直到CAR-T输注后第56天研究完成。

[0218] 图7,分图A是显示在临床前评估中对于所指示抗体构建体,肿瘤进展作为CAR-T输注后天数的函数的图。通过BLI测量完成肿瘤体积评估。与未治疗的小鼠相比,包含所指示抗体构建体(克隆ID:375505和375747)的CAR-T细胞显示出强大的肿瘤控制。例如,治疗后不久,观察到针对克隆ID号375505和375747的肿瘤体积急剧下降。相比之下,在施用对照治疗后,未治疗的小鼠的肿瘤体积继续攀升。

[0219] 图7,分图B是显示对于所指示抗体构建体,随着时间测量的血液中的T细胞持久性的线图。与克隆ID号375505和375747相比,未治疗的小鼠显示出显著更高的AUC。

[0220] 实例8:用于CAR-T体内评估的T细胞扩增

[0221] 使用实例7中描述的相同临床前评估来评估T细胞扩增。图8,分图A是显示对于所指示抗体构建体,血液中体内T细胞计数作为CAR-T输注后天数的函数的图。显示了用包含所指示抗体构建体(克隆ID:375505和375747)的CAR-T细胞治疗的小鼠的稳健T细胞扩增。在第0天,显示了小鼠具有低的T细胞计数。。用包含所指示抗体构建体(克隆ID:375505和375747)的CAR-T细胞治疗后,与未治疗的小鼠的无变化相比,T细胞计数急剧增加。对于未治疗的小鼠,T细胞计数在研究过程中保持较低且没有变化。

[0222] 图8,分图B是显示对于所指示抗体构建体,在图8,分图A中所显示的图的曲线下面积(T细胞计数总数)的条形图。与未治疗的小鼠相比,两种抗体构建体的总T细胞计数显著。

[0223] 尽管本文已示出和描述了本发明的优选实施例,但对于本领域的技术人员来说将显而易见,此类实施例仅作为实例提供。众多变化、改变和替代在不脱离本发明的情况下将被本领域技术人员所想到。应理解,本文所述的本发明的实施例的各种替代方案可以用于实践本发明。意图在于,以下权利要求限定本发明的范围,并且由此覆盖这些权利要求及其等同物范围内的方法和结构。

第1列	第2列	第3列
克隆 ID	Raji MUC1+ 细胞	CHO_OFFtgt
375747	64.36	1.7
375505	59.9	1.7

图1

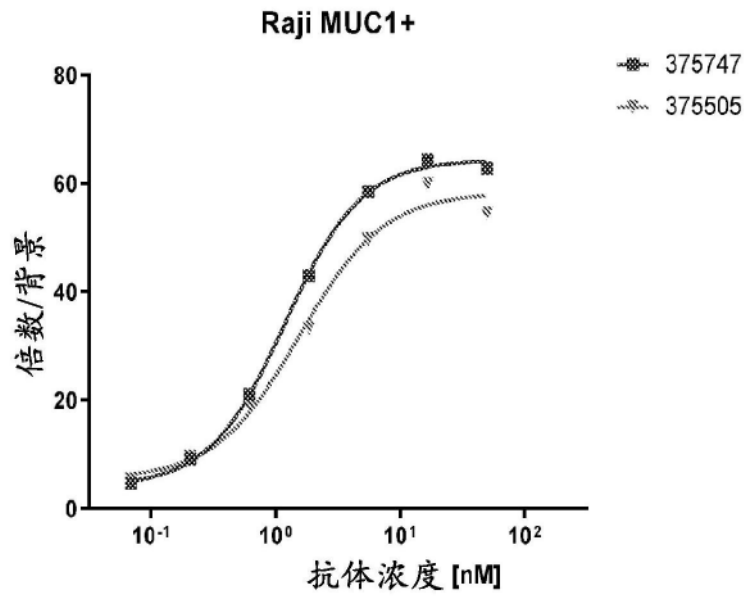
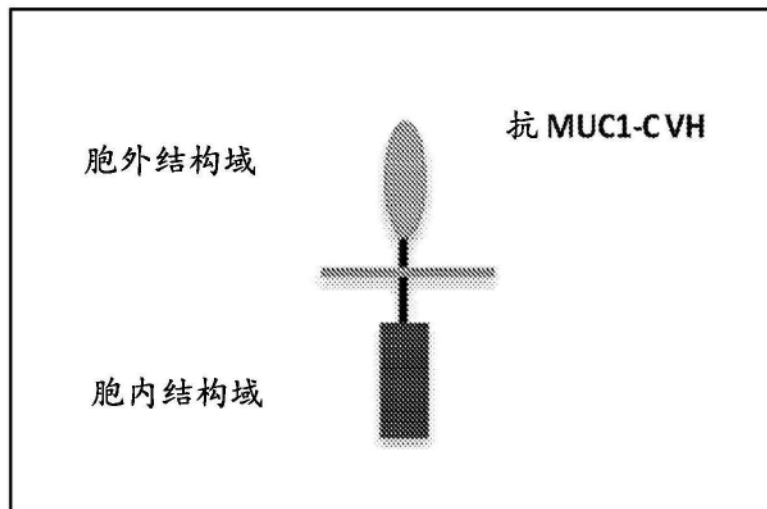


图2

第1列	第2列
克隆 ID	Raji MUC1+ 细胞
375747	1.0
375505	1.1

图3

A.



B.

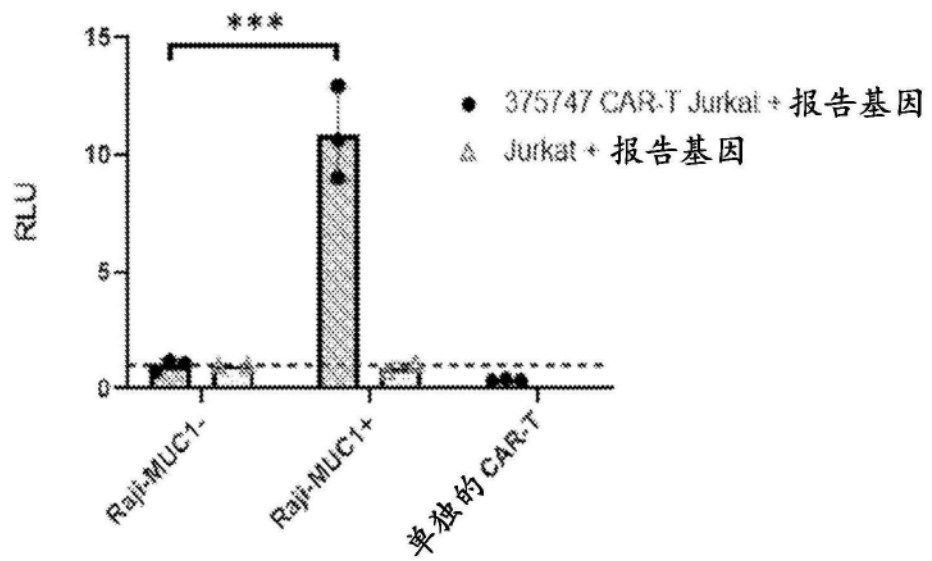


图4

C.

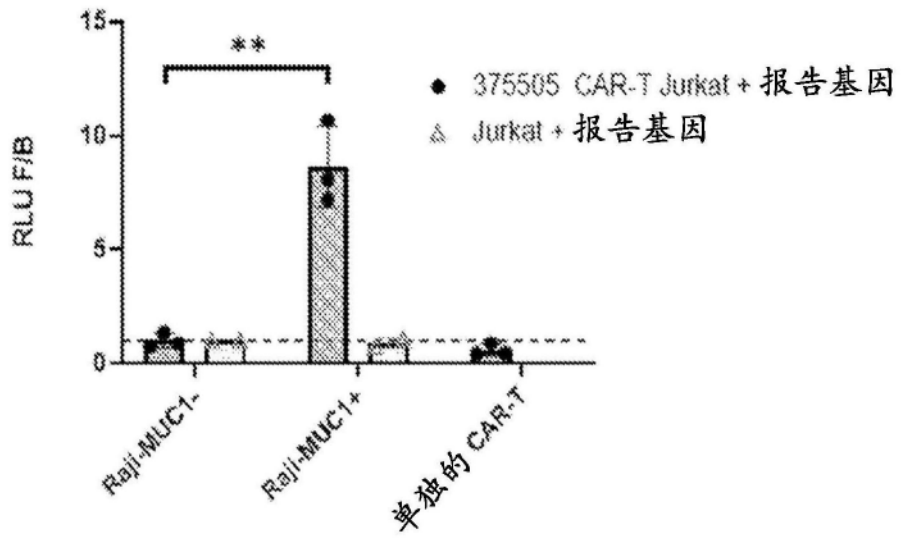
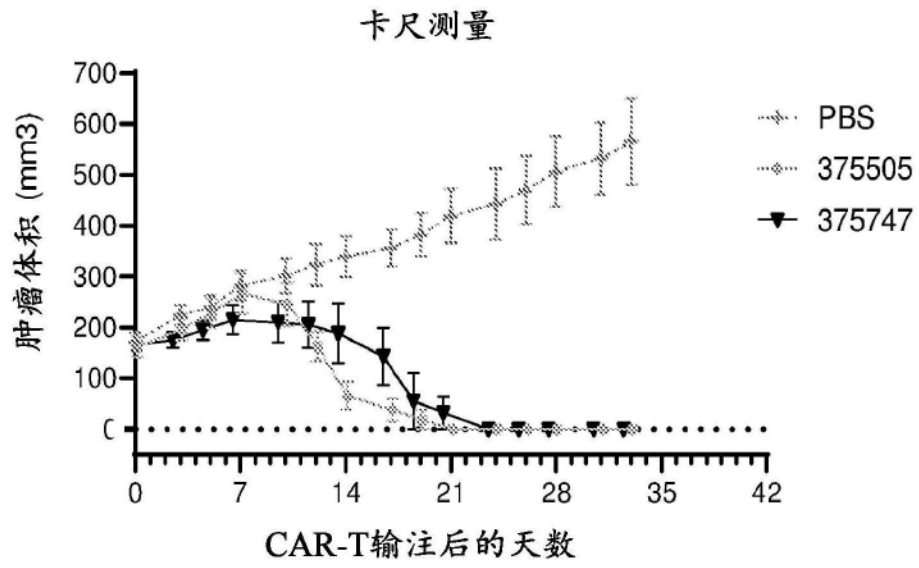


图4续

A.



B.

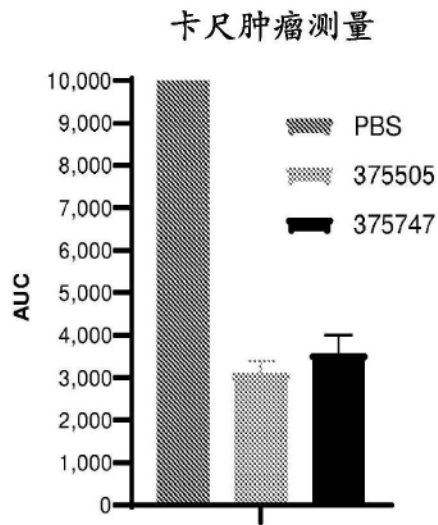
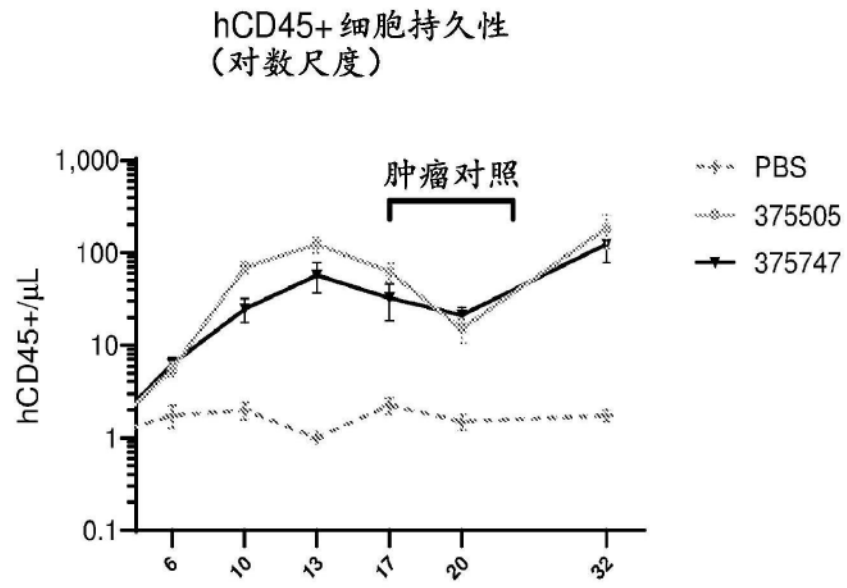


图5

A.



B.

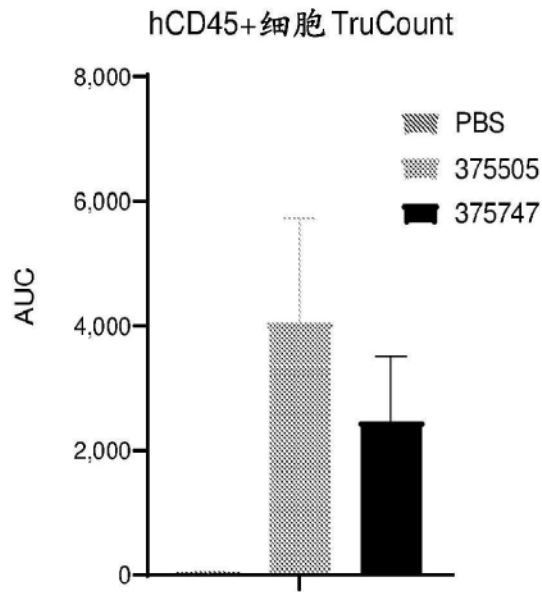
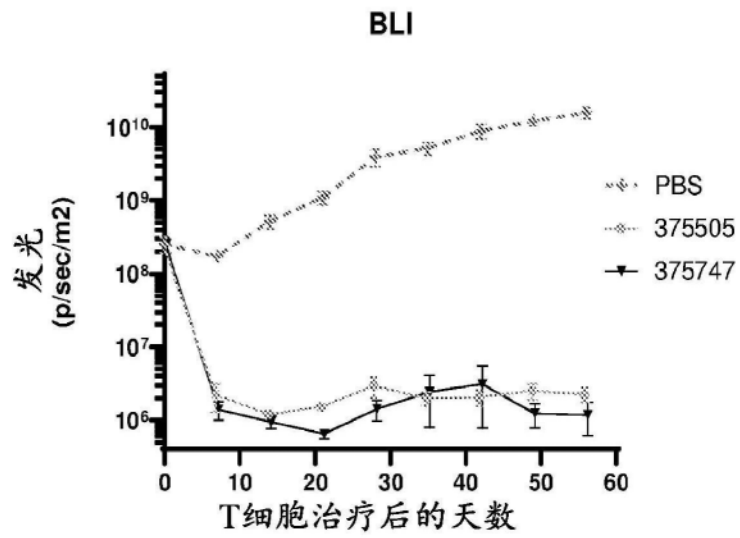


图6

A.



B.

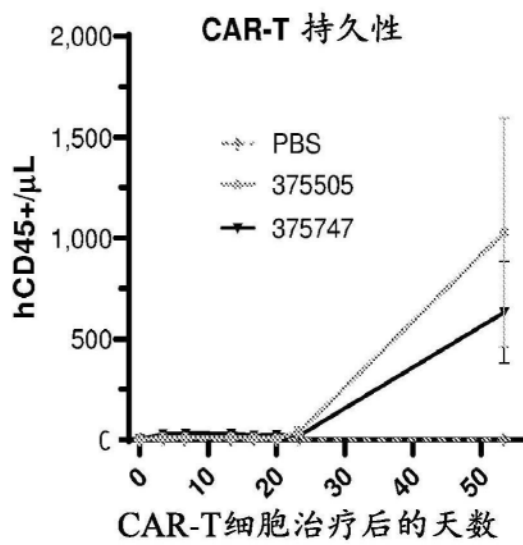
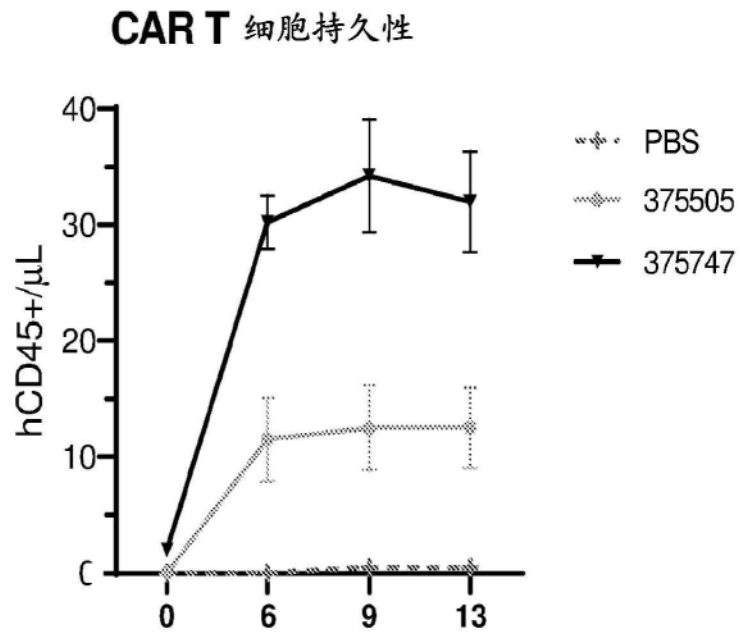


图7

A.



B.

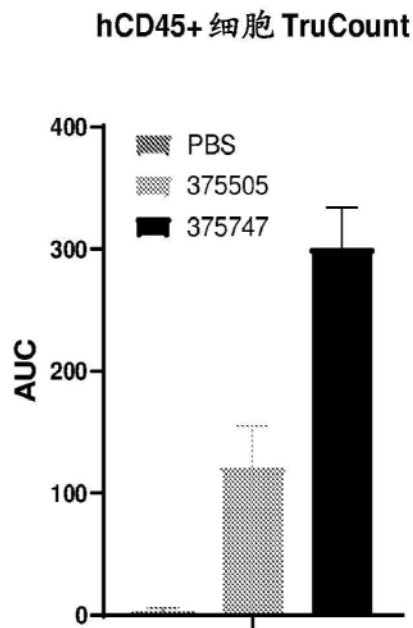


图8