



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116457018 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 18

(21) 申请号 202180077370.3

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2021.09.18

A61K 39/42 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2023.05.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/071505 2021.09.18

(87) PCT国际申请的公布数据
W02022/061368 EN 2022.03.24

(71) 申请人 阳光海岸生物技术股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 G·约翰宁 F·王-约翰宁

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

专利代理师 李芳芳

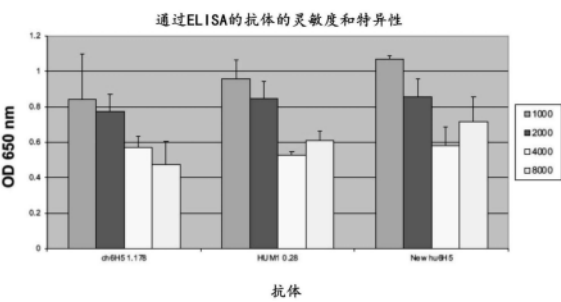
权利要求书2页 说明书53页 附图31页

(54) 发明名称

HERV-K抗体治疗剂

(57) 摘要

本发明提供治疗性人源化抗HERV-K抗体、CAR、或包含针对CD3和CD8的双特异性T细胞衔接器(BiTE)、编码BiTE的DNA(DBiTE)或抗体药物缀合物(ADC)的其融合物。本发明还涉及用于免疫治疗方法的肽、蛋白、核酸和细胞。特别的,本发明涉及与MHC分子结合的癌症肽或如可作为抗体或其它结合分子的靶标的肽的免疫疗法。



1. 与人内源逆转录病毒-K (HERV-K) 结合的分离的抗体,其包含重链可变区 (HCVR) 和轻链可变区 (LCVR)。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其包含人源化或人框架区。

3. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体是HERV-K拮抗剂。

4. 根据权利要求2所述的抗体,其用于减少肿瘤生长。

5. 根据权利要求2所述的抗体,其用于减少向肺、淋巴结或其他器官的转移。

6. 分离的核酸,其包含编码权利要求1所述的HCVR、LCVR或其组合的核苷酸序列。

7. 表达载体,其包含权利要求6所述的核酸。

8. 用权利要求7所述的表达载体转化的宿主细胞。

9. 治疗哺乳动物中癌症的方法,其包括向有此需要的哺乳动物施用有效量的根据权利要求2所述的抗体。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述抗体经由接头与细胞毒性药物、澳瑞他汀或功能性肽类似物或其衍生物缀合。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述癌症选自以下组成的组:黑色素瘤、慢性淋巴细胞性白血病、乳腺癌、胰腺癌、头颈癌、卵巢癌、宫颈癌、结直肠癌、睾丸癌、胃癌、肾癌、子宫内膜癌、子宫癌、膀胱癌、前列腺癌、食道癌、肝癌和非小细胞肺癌。

12. 根据权利要求9所述的方法,其中所述抗体是全长抗体。

13. 根据权利要求9所述的方法,其中所述抗体是人单克隆IgG1或IgG4抗体。

14. 人源化抗体,其用于CAR T、CAR NK或BiTE测定中。

15. 人源化抗体,其用于CAR T、CAR NK或BiTE测定中,其中所述测定用于开发CAR T、CAR NK或BiTE。

16. 过表达HERV-K的肿瘤细胞,其用作本发明所述的抗HERV-K人源化抗体和ADC的靶标。

17. hu6H5克隆 (FWJ1和FWJ2),其从细菌 (HUM1和HUM2) 或哺乳动物细胞中生成。

18. 针对T细胞CD3或CD8的BiTE和针对肿瘤相关抗原HERV-K的人源化scFv,其包含靶向CD3或CD8、以及HERV-K的抗体。

19. T细胞,其表达携带人源化或全人HERV-K scFv的慢病毒CAR表达载体。

20. 人源化单链可变片段 (scFv) 抗体,其能够与从重组HERV-K Env表面融合蛋白 (KSU) 和表达HERV-K Env蛋白的癌细胞裂解物产生的抗原结合。

21. CAR,其从权利要求19所述的人源化scFv产生。

22. 用于无记忆B细胞的供体的快速扩增和B细胞激活的改良体内富集方法,其包括以下步骤:

(a) 用细胞因子混合物在第1、7和14天处理小鼠,和

(b) 在第14和21天用抗原加强所述小鼠。

23. 细胞,其产生还能够结合抗原并杀伤癌细胞的抗体。

24. 用HERV-K的免疫检查点抑制剂阻断免疫抑制结构域 (ISD) 的方法。

25. 权利要求42所述的方法,其中所述HERV-K的免疫检查点抑制剂选自以下组成的组:靶向HERV-K的所述ISD的单克隆抗体和药物。

26. 靶向HERV-K的人源化和全人抗体,其用于增强检查点阻断抗体治疗功效。

27. 从用5种多抗原肽 (MAPS) 免疫的小鼠中产生抗体的方法, 所述5种多抗原肽 (MAPS) 是从癌症患者产生的HERV-K SU蛋白生成的。

28. 产生HERV-K CAR A:VH-VLhu6H5-CD8-CD28-4-1BB-CD3zeta的方法。

HERV-K抗体治疗剂

发明领域

本发明一般涉及癌症抗原。

相关申请的引用

本专利主题与2020年9月17日提交的临时专利申请美国系列号63/080,009有关,并要求临时专利申请美国系列号63/080,009的优先权。

发明背景

人内源逆转录病毒 (HERV) 是公知的基因组重复序列,在基因组中有许多拷贝,因此大约8%的人基因组具有逆转录病毒来源。参见下文科学文献1。HERV起源于数千个远古整合事件,其将逆转录病毒DNA整合到生殖细胞中²。通常,由于突变的积累,逆转录病毒失去了感染性。因此,除了在病理条件(如癌症)下,这些基因在正常成人组织中主要是沉默的并且不表达。最具生物活性的HERV是HERV-K家族的成员。HERV-K具有能表达具有复制能力的逆转录病毒所需的所有元件的完整序列(科学文献3、4),但在正常细胞中保持沉默。然而,在某些情况下,如在肿瘤中,发明人和其他人已经报道了HERV-K的表达被激活,并且可以在几种不同类型的肿瘤中以比正常组织中高得多的水平检测到其包膜 (Env) 蛋白。参见科学文献5至23。这说明HERV-K可以是很好的肿瘤相关抗原和癌症免疫治疗的理想靶点,因为它在肿瘤中表达而在正常组织中不存在,这使脱靶效应最小化。

开发癌症治疗剂的一个重要考虑因素是肿瘤相关抗原的表达谱。HERV-K在生殖细胞肿瘤(科学文献24)、黑色素瘤(科学文献25)、乳腺癌细胞系(T47D)(科学文献26至28)、乳腺癌组织(科学文献15、29)和卵巢癌(科学文献13)中是转录活性的。发明人具体鉴定了肿瘤细胞系和患者肿瘤中的HERV蛋白与序列。发明人观察到在乳腺癌、肺癌、前列腺癌、卵巢癌、结肠癌、胰腺癌中和其他实体瘤中HERV特别是HERV-K序列的表达。参见科学文献11、12、16、17、20、30至34。发明人还发现HERV-K env转录本在乳腺癌中的表达与基底乳腺癌(一种特别具有侵袭性的亚型)特别相关²⁰。

多种诊断产品可作为伴随诊断供患者选择。一种策略靶向仅存在于癌细胞而非正常组织上的内源病毒抗原。病毒RNA从这些肿瘤释放,并且发明人的组发现HERV-K RNA(env或gag)和抗HERV-K抗体出现在癌症患者的循环中。参见科学文献31至33、35。可利用这些非人来源的蛋白作为癌症治疗的理想靶标,并且作为靶向HERV-K的治疗性抗体的伴随诊断。

多个肿瘤类型的免疫疗法的临床试验数量急剧增加,促使寻求针对乳腺癌的高效免疫疗法。更好地了解乳腺癌的肿瘤微环境对设计合理有效的疗法是关键。限制针对实体瘤的成功治疗的一个问题是缺少在肿瘤细胞中高表达而在正常细胞中不表达的肿瘤抗原。

在发明人之前的工作中,发明人表明HERV-K Env蛋白通常在乳腺癌细胞表面表达³⁰。上皮间质转化(EMT)在一些肿瘤中降低CD4或CD8 T细胞的浸润,并且HERV-K表达被证明可诱导EMT,导致细胞运动性增加³⁷,这两者都有利于肿瘤散播。科学出版物10、33、37为HERV-K的过度表达会导致癌症产生并促进癌症进展提供了强力证据。由抗HERV-K单克隆抗体(mAb)(名为6H5)产生了HERV-K env蛋白特异性嵌合抗原受体(K-CAR),并在乳腺癌和黑

色素瘤中证明K-CAR疗法的抗转移性肿瘤效应。科学文献33、35。重要的是,在用K-CAR T细胞或shRNAenv治疗的肿瘤细胞中揭示了HERV-K和Ras的表达下调。参见科学文献10、33、38。

发明概述

发明人发现血浆和肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中检查点分子水平与HERV-K抗体滴度高度相关,特别是侵袭性乳腺癌患者(患有浸润性导管癌(IDC)和浸润性乳腺癌(IMC)的患者)中。乳腺癌中TIL的表型和功能特征与HERV-K状态相关,而且检查点抑制和HERV-K抗体治疗相结合可以产生更好的杀伤功效。

本发明提供了治疗性人源化抗HERV-K抗体或其融合物,该融合物包含针对CD3和CD8的双特异性T细胞衔接器(BiTE),编码BiTE的DNA(DBiTE)或抗体药物缀合物(ADC)。

在第一实施方案中,本发明提供过表达HERV-K的癌细胞。因为每个细胞可结合更多抗体,这些癌症细胞可以是本发明的抗HERV-K人源化抗体和ADC的特别好的靶标和良好模型。

在第二实施方案中,本发明提供由细菌产生的两个人源化抗体克隆(HUM1和HUM2)和由哺乳动物细胞产生的人源化抗体(hu6H5)。这两个克隆都能结合从来自重组HERV-K Env表面融合蛋白(KSU)和MDA-MB-231乳腺癌细胞的裂解物产生的抗原。将哺乳动物细胞产生的hu6H5与我们的其他形式的抗HERV-K抗体进行比较。hu6H5与HERV-K抗原的结合亲和力类似于鼠抗体(m6H5)、嵌合抗体(cAb)或人源化抗体(HUM1)。hu6H5抗体诱导癌症细胞发生凋亡,抑制癌细胞增殖,并杀伤表达HERV-K抗原的癌细胞。重要的是,在小鼠MDA-MB-231异种移植瘤中证明hu6H5抗体减少肿瘤存活力,并能显著减少癌细胞向肺和淋巴结的转移。与未接受抗体治疗的对照小鼠相比,用这些人源化抗体治疗的携带人类乳腺癌肿瘤的小鼠的存活时间更长。

在第三实施方案中,本发明提供从乳腺癌患者生成的HERV-K env基因,其作为能诱导癌细胞增殖、肿瘤生长和向肺和淋巴结转移的原癌基因。表达HERV-K的细胞示出包括半胱天冬酶3和半胱天冬酶9、pRB、SIRT-1和CIDEA在内的与肿瘤抑制相关的基因的表达减少,包括Ras、p-ERK、P-P-38和β连环蛋白在内的与肿瘤形成相关的基因的表达增加。

在第四实施方案中,本发明提供针对T细胞CD3或CD8和肿瘤相关抗原HERV-K的BiTE。发明人生产此类BiTE,其包含靶向CD3或CD8的抗体和靶向HERV-K的抗体(VL-VH 6H5scFv---VH-VLhuCD3或CD8+c-myc+FLAG)或(VL-VH hu6H5scFv---VH-VLhuCD3或huCD8+c-myc+FLAG)。FLAG标签是被抗体识别的肽(DYKDDDDK)(SEQ ID NO:39),而Myc标签是被抗体识别的短肽(EQKLISEEDL)(SEQ ID NO:40)。

在第五实施方案中,本发明提供表达慢病毒CAR表达载体的T细胞,该表达载体携带人源化或全人HERV-K scFv。

带psPAX2和pMD的的pWPT-GFP载体

人源化6H5 CAR

柔性接头



CD8铰链和TM

这些T细胞有效裂解和杀伤来自若干不同癌症的肿瘤细胞。慢病毒载体表达的人

源化K-CAR是泛癌CAR-T。

在第六实施方案中,本发明提供人源化单链可变片段(scFv)抗体。该抗体能结合从重组HERV-K Env表面融合蛋白(KSU)和来自MDA-MB-231乳腺癌细胞的裂解物产生的抗原。可将由该人源化scFv产生的CAR克隆入慢病毒载体。该重组载体可与疗法组合使用,这些疗法包括但不限于K-CAR T细胞加检查点抑制剂、促炎细胞因子如白介素(IL)-12和IL-18、溶瘤病毒和激酶抑制剂。激酶抑制剂包括但不限于p-RSK和p-ERK。

在第七实施方案中,本发明提供在许多情况下与血浆肿瘤标志物CK的染色重叠的HERV-K染色。HERV-K可以是CTC标志物以及HERV-K抗体疗法的靶标。

在第八实施方案中,本发明提供作为干细胞标志物的HERV-K。靶向HERV-K可通过减慢或阻止癌症干细胞的生长来阻断肿瘤进展。用循环治疗性抗体或其他疗法靶向HERV-K也可以杀伤CTC并阻止这些循环细胞转移到远端位点。

在第九实施方案中,本发明提供用药剂增强HERV-K过表达促使癌细胞增加靶标的产生使癌细胞对靶向疗法更敏感以包括靶向免疫疗法,所述药剂通过先天性免疫应答(如Poly I:C处理)或LTR低甲基化(如通过5-Aza)诱导HERV-K表达。

在第十实施方案中,本发明改良了在SCID/beige小鼠中的体内富集技术(IVE:增强约20倍),这允许快速扩增和B细胞激活。该改良技术可产生许多抗原特异性浆母细胞。对于携带具有更高抗体滴度的癌症的供体,该改良技术使用用人源化小鼠(HM)或人肿瘤小鼠(HTM)代替SCID/beige小鼠的方案。对于没有癌症和没有记忆B细胞的正常供体,该改良技术使用经过修改的方案:用细胞因子混合物(cytokine cocktail)处理小鼠(第1、7和14天)并在第14和21天用抗原加强。从小鼠收集血清并通过ELISA测试结合亲和力。在检测到抗体滴度增加后,采集、分析脾脏并用其制备杂交瘤。在使用IVE方案的小鼠中检测到更高的抗体滴度。

在第十一实施方案中,本发明提供确定不仅产生抗体还能结合抗原并杀伤癌细胞的细胞的方法。该方法可有效刺激并扩增CD40-B细胞以高纯度(>90%)至大数并诱导其抗体的分泌。

在第十二实施方案中,本发明提供处理的B细胞的后孵育方法。洗涤盖玻片并用荧光抗人IgG抗体标记,再使用微雕刻技术阅读以揭示对应于单个B细胞分泌的抗原特异性抗体的离散点。

在第十三实施方案中,本发明提供平台的开发以确定微孔板中每个细胞的结合动力学和细胞与细胞相互作用。

在第十四实施方案中,本发明引人注目地提供显著增强乳腺癌患者的血浆中的六种循环免疫检查点蛋白的表达。本发明还提供患者在手术后6个月或18个月相比于手术前免疫检查点蛋白水平的显著降低。重要的是,可溶免疫检查点蛋白分子水平与肿瘤中HERV-K表达诱导的HERV-K抗体滴度发生正相关。HERV-K抗体滴度可影响乳腺癌中免疫检查点蛋白水平。因此,HERV-K的表达可控制乳腺癌患者的免疫应答。

在另一方面,这些发现共同表明HERV-K的免疫抑制结构域(ISD)是癌细胞上尚未被识别的免疫检查点,类似于PD-L1免疫检查点。在第十五实施方案中,本发明提供用HERV-K的免疫检查点抑制剂(包括但不限于靶向HERV-K的ISD的单克隆抗体和药物)阻断ISD是癌症免疫调节剂疗法,其允许T细胞继续工作并释放针对癌症的免疫应答并增强现有应答,以

促进消除癌细胞。

在第十六实施方案中,本发明提供靶向HERV-K的人源化和全人(hTab)抗体。这些抗体增强检查点阻断性抗体的治疗功效。有效的组合癌症疗法包括但不限于以下的组合:(a)HERV-K人源化或hTAb(1.5mg/kg)、(b)K-CAR、(c)K-BiATE、(d)HERV-K shRNA或CRISPR/Cas9基因组编辑技术以敲低HERV-K基因表达、(e)或预防性或治疗性HERV-K疫苗,该疫苗包括全长和截短的HERV-K Env蛋白和HERV-K Env肽。有效的组合癌症疗法包括与包括但不限于以下因素组合的全长和截短的HERV-K Env蛋白和HERV-K Env肽:(a)抗ICP抗体,(b)癌症化疗,(c)5-氮杂胞苷、5-氮杂-2'-脱氧胞苷或其他表观遗传调节剂,如DNA甲基转移酶抑制剂(DNMTi)和组蛋白脱乙酰酶抑制剂(HDACi),(d)EMT抑制剂,(e)细胞迁移或侵袭的抑制剂、(f)诱导S或G2期细胞周期阻滞,(g)PI3K/AKT/mTOR或MAPK/ERK信号传导途径的抑制剂,或(f)信号转导至HIF1 α 。

在第十七实施方案中,本发明提供靶向HERV-K的人源化抗体,其可用于递送药物进入癌细胞和肿瘤的ADC。

在第十八实施方案中,本发明提供可用于肿瘤成像的靶向HERV-K的抗体。

在第十九实施方案中,本发明提供使用hu6H5 scFv的新CAR。

在第二十实施方案中,本发明提供使用hu6H5 scFv的新BITE,其包括CD3和CD8 BiTE。

附图说明

图1是用于在还原条件下于SDS-PAGE胶中检测人源化抗HERV-K抗体的VH链和VL链的蛋白印迹。检测到VH链的49KDa分子量和VL链的23KDa分子量。

图2.进一步采用按尺寸和/或分子量的尺寸排阻色谱(SEC)以确定蛋白表达。只检测到两个峰并且峰2的浓度高于峰1和峰2的总组合大小的99%。

图3.使用ELISA比较嵌合6H5、HUM1(由细菌生成)和新hu6H5(由哺乳动物细胞生成的新人源化抗HERV-K抗体)与HERV-K env靶标的结合。1000,1:1000稀释;2000,1:2000稀释;4000,1:4000稀释;8000,1:8000稀释。

图4.使用凋亡测定以确定小鼠抗HERV-K抗体和人源化抗HERV-K抗体对癌症细胞的细胞毒性。用m6H6或hu6H5(1或10 μ g/ml)处理癌症细胞4小时或16小时,该癌症细胞包括MDA-MB-231-pLVXK(231K)(用表达HERV-K env蛋白的pLVX载体转导的乳腺癌细胞系)或MDA-MB-231-pLVXC(231C)(用pLVX空载体转导的相同乳腺癌细胞系)。使用Annexin V和7AAD来确定凋亡细胞的百分比。此处示出抗体处理4小时的结果。

图5.使用活/死细胞活力测定来评价抗HERV-K抗体处理后诱导的细胞死亡。在24孔板中接种MDA-MB-231细胞过夜。用多种抗体(10 μ g/ml)处理细胞并在细胞培养孵育器中于37 $^{\circ}$ C孵育16小时。然后添加Calcein Am(4 μ l/10ml培养基)和Eth-D1(20 μ l/10ml培养基),每孔200 μ l,并且在室温孵育细胞30分钟。EthD-1穿透有膜损伤的细胞并与核酸结合以在死细胞中产生红色荧光。使用活/死细胞共染色活力测定鉴定活细胞(绿色;Calcein Am)和假定的死细胞(红色;EthD-1)。使用人IgG和小鼠IgG作为对照。在用对照人或小鼠IgG处理后未观察到红色荧光细胞。然而,用人源化抗HERV-K抗体或小鼠6H5抗HERV-K抗体处理后的细胞中观察到红色荧光细胞。

图6. 使用MTS测定以确定用hu6H5处理的细胞的增殖的抑制。在用任一6H5抗体(人或小鼠)处理的细胞中观察到细胞增殖显著减少。相比于未表达更高HERV-K水平的231C细胞,表达更高水平的HERV-K的231K细胞中抑制更明显。

图7. 使用ADCC以确定抗体诱导的细胞杀伤机制。相比于用m6H5处理的细胞,在用hu6H5处理的细胞中观察到更强的癌症细胞的ADCC裂解以及增加的PBMC百分比。

图8. 给小鼠接种231K或231C细胞(通过皮下注射两百万细胞)。之后用hu6H5抗体处理小鼠($n=3$; 4mg/kg, 每周两次)。每周监测并测量三次肿瘤生长,并确定小鼠存活。用hu6H5处理的小鼠导致比用对照抗体处理的另一组小鼠($n=4$)更长的存活。相比于接种231C细胞的小鼠,在接种231K细胞的小鼠中观察到更短的存活,这表明乳腺癌细胞中HERV-K的过表达缩短肿瘤相关的存活。

图9. 用H&E染色来自hu6H5和无抗体处理组的组织,并在此以2X、4X和10X示出染色结果。相比于无抗体处理的相同细胞(60%; B14; 图9A),在用hu6H5处理的231C细胞接种的小鼠(20%; B4)中证实肿瘤活力减少。并且,相比于无抗体处理的相同细胞,在用hu6H5处理的231K细胞接种的小鼠(45%; B1; 图9B)中证实肿瘤活力减少。使用抗Ki67和抗HERV-K mAb(6H5)(图9C)。相比于对照(60%; 上小图),在用hu6H5处理的231C接种的小鼠(20%; 下小图)中证实肿瘤活力减少。

图10. 在接种231K细胞的小鼠中观察到向肺和淋巴结的转移。仅在接种231K细胞的小鼠中观察到向肺(图10A和10B)或淋巴结(图10C)的转移。在用231K细胞接种并用hu6H5处理的小鼠的肺中检测到肿瘤活力减少和肿瘤坏死增加(图10B)。在接种231K细胞的小鼠中可见明显肿大的淋巴结,但在接种231C细胞的小鼠中未见。相比于231K细胞与未添加抗体(KCON; 上图)(B26>95%),在用231K细胞接种并用hu6H5(KAB)处理的小鼠的淋巴结中检测到肿瘤活力减少和肿瘤坏死增加(图10C; B18; 40%, 下小图)。这些结果示出HERV-K表达是肿瘤进展,特别是向远处器官部位转移的致病因素。重要的是,我们的人源化抗HERV-K抗体可以减少肿瘤活力,增加肿瘤坏死并降低向肺和淋巴结的转移。

图11. 在MDA-MB-231luc细胞存在的情况下,CD3BiTE介导正常供体PBMC分泌IFN γ 。在96孔板中接种 5×10^{-3} 细胞过夜。使用来自ND#230341(阳性对照)和四个正常供体的PBMC作为效应细胞。效应细胞/肿瘤细胞的比率是10/1。使用140 μ g/ml的CD3BiTE。设置板后72h,收集上清液用于IFN γ 测定。

图12. 图12A示出用PBMC加K3Bi(0ng/ml; 上小图)或PBMC加K3Bi(100ng/ml; 下小图)处理72小时的活的(绿色)或死的(红色)MCF-7细胞的图像。图12B. 在用0ng/ml K3Bi+PBMC或100ng/ml K3Bi+PBMC处理的效应细胞:肿瘤细胞(10:1)的上清液中通过LDH释放测定证实癌症细胞的杀伤显著增加。图12C. 在用K3Bi(100ng/ml)处理72小时的三个乳腺癌细胞系中IFN γ 分泌显著增加。使用未处理细胞、仅PBMC或仅BiTE作为对照。

图13. NOD/SCID/IL-2R γ null(NSG)小鼠在第0天接种MDA-MB-231HERV-K阳性乳腺癌细胞,并在指定的日期给药PBMC(红色箭头)或BiTE(黑色箭头)。在整个研究过程中,通过使用测径器测量肿瘤体积来计算肿瘤体积。

图14. 用K10标记的AF488蛋白染色的转导CAR-A/CAR-B的CD4+PBMC的百分比高于用K10标记的AF488蛋白染色的幼稚T细胞的百分比。

图15示出微雕刻过程。在图15A中,将富集的B细胞与肿瘤细胞混合并在覆盖有

HERV-K抗原包被的玻璃玻片的孔中共培养2小时至16小时用于免疫测定(右上)。通过CellCelector(右下)回收能够产生抗体并杀伤肿瘤细胞的B细胞用于RT-PCR和再克隆以产生抗体(左下)。图15B.使用从肿瘤组织(第7天和第14天)产生的乳腺球(Mammosphere)作为靶细胞。用混合物(cocktails)刺激自体PBMC四天以富集产生抗体的B细胞。之后B细胞与肿瘤靶向细胞共培养。将HERV-K Env蛋白包被的盖玻片与共培养细胞一起孵育。使用活/死细胞共染色活力测定鉴定假定的死细胞(红色)。EthD-1穿透有膜损伤的细胞并与核酸结合,在死细胞中产生红色荧光。使用相同孔的相同位置的盖玻片上的ELISA测定来检测产生可以与HERV-K Env蛋白结合的抗体的B细胞(红色正方形)。图15C.通过CellCelector拾取HERV-K+(绿色)和IgG+(红色)的B细胞(红圈;左)。示出细胞拾取前(右上)和细胞拾取后(右下)的细胞。

图16.在图16A中,使用ELISPOT来检测用HERV-K跨膜(TM)蛋白(小鼠M1至M4)或PBS(M5或M6)免疫的小鼠中分泌IFN- γ 的脾细胞。参见图16B和图16C.使用ELISA检测小鼠中抗HERV-K抗体滴度。无论CpG(图16B)或CDN(图16C)状态如何,在用KSU Env蛋白处理的小鼠中检测到更高滴度的抗体。图16D.使用抗人IgG mAb通过ELISA在接种MDA-MB-231(HTM1)或MDA-MB-468(HTM2)的HTM模型和用HERV-K SU Env蛋白免疫的HM(1-2)中检测抗HERV-K抗体滴度。

图17.人SCID嵌合体中HERV-K驱动的体内浆母细胞分化的示意图。将来自受试者的五千万PBMC与HERV-K蛋白(100 μ g)在体外预混合,在第0天脾内注射入人源化小鼠中。在第1、4和7天腹腔内注射细胞因子混合物(BAFF:50 μ g、IL-2:50ng、IL-6:50ng和IL-21:50ng)。在第2天腹膜内加强HERV-K Env蛋白(100 μ g)。通过流式细胞术或微雕刻平台分选IgG⁺、CD38⁺和HERV-K⁺用于后续分析。一半的脾细胞用于生成具有MFP-2融合配偶体的杂交瘤。使用ELISA测定来检测来自杂交瘤克隆的抗ZIKV Env抗体。加入每个杂交瘤克隆的上清液(100 μ l)并孵育1小时。之后加入山羊抗人IgG/A/M-HRP抗体(1:4000稀释),之后再孵育1小时。在一些杂交瘤克隆和来自供体322336的克隆中证实高滴度的抗体。使用从抗黄病毒4G2 mAb获得的上清液用作阳性对照(D1-4G2-4-15;ATCC HB-112)。

图18.在图18A中,在TNBC PDX细胞接种后四周时、接种后七周的MDA-MB-231HTM模型中获得的huCD45⁺细胞中量化CD33、CD3和CD19⁺的百分比,其中共植入CD34⁺造血干细胞。图18B.示出接种MDA-MB-231细胞后7周的脾脏细胞的流式数据。图18C.使用免疫荧光染色以使用抗HERV-K mAb 6H5(绿色)在从HTM中获得的MDA-MB-231肿瘤中检测HERV-K的表达。使用F-肌动蛋白(红)作为对照(左侧两小图)。还在肿瘤组织(右侧两小图)中检测到huCD3⁺细胞(绿色)。图18D.使用抗人IgG mAb通过ELISA在接种MDA-MB-231(HTM1)或MDA-MB-468(HTM2)的HTM模型和用HERV-K SU Env蛋白免疫的HM1和HM2中检测抗HERV-K抗体滴度。

图19说明了与乳腺癌患者中与HERV-K状态相关的基线免疫状态:组合的HERV-K和免疫检查点测定。通过Luminex测定在包括DCIS和侵袭性乳腺癌患者的乳腺癌患者与正常供体中确定可溶免疫检查点蛋白的表达。图19A示出六个ICP在DCIS、侵袭性乳腺癌(aBC)和正常女性供体中表达的比较。惊人的发现是在乳腺癌患者的浆细胞中六个循环ICP的表达显著增强图19A。图19B(a-c):进一步的发现是术后6个月(B;时间点2)或18个月(数据未示出)相比于术前(时间点1),患者的免疫检查点蛋白水平显著下降。重要的是,观察到可溶ICP分子水平与由肿瘤中HERV-K表达诱导的HERV-K抗体滴度的正相关(图19C),表明HERV-K

抗体滴度会影响乳腺癌的ICP水平。因此,HERV-K的表达可控制乳腺癌患者的免疫应答。

图20.在图20A中,使用免疫印迹测定证实6H5与r-Gel的缀合。图20B.使用抗HERV-K 6H5-rGel ADC在HERV-K阳性癌细胞中观察到重组白树毒素(r-Gel)的递送。使用抗HERV-K 6H5 mAb检测DOV13卵巢癌细胞中HERV-K的表面和细胞质表达。此外,使用抗-rGel抗体在处理4小时后检测DOV13细胞中的r-Gel表达。图20C.在内化1小时后于SKBr3、MCF-7和MDA-MB-231乳腺癌细胞中检测到HERV-K env蛋白(6H5;红色)或rGel信号(绿色)。黄橙色表示HERV-K env蛋白和rGel毒素在靶细胞细胞质中的共定位(右图)。将用6H5 ($p=0.0052$) 和6H5-r-Gel ($p=0.0001$) 处理的接种MDA-MB-231细胞的小鼠的抗肿瘤效果与用对照IgG(图20D)处理的小鼠进行比较。

图21.在体外和体内的多种HERV-K阳性乳腺癌细胞系中证实金纳米颗粒(GNP)的递送。在用裸GNP(图21A)或6H5-GNP(图21B)孵育两小时后使用TEM在MDAMB231细胞中体外检测GNP(黑点)。使用银增强测定在小鼠尾静脉用6H5-GNP或6H5scFv-GNP静脉内注射后24小时的MDAMB231肿瘤(图21C)或SKBr3肿瘤(图21D)中检测GNP。在自静脉内注射6H5-GNP后24小时的小鼠分离的肿瘤的MDAMB231细胞中通过TEM检测(E/F)GNP(白色箭头)。在肿瘤细胞临近观察到HERV病毒颗粒(绿色箭头)。

图22.通过使用Nuance系统的体内成像,在来自静脉内注射6H5-Alexa647(红色)后24小时的小鼠的肿瘤结节中检测到更高密度的6H5 mAb。

图23.用从BC患者血浆样品中鉴定的5种MAPS免疫小鼠并确定小鼠中产生的抗体对各种HERV病毒蛋白的亲和力,这些HERV病毒蛋白包括HERV-K SU包膜蛋白(K10G15)、ERV3(E3G4)、Rec、Np9和HERV-K TM包膜蛋白。在三只小鼠的血清中证实抗HERV-KSU抗体,并且从小鼠#2生成的杂交瘤细胞生成抗体序列。

发明详述

用途

本说明书提供用于生成人源化抗HERV-K抗体的方法。在体外和体内证实hu6H5的抗肿瘤效应。

本发明提供用于治疗患有癌症的患者的方法。在第二十实施方案中,本发明提供治疗癌症的方法,其包括施用治疗性人源化抗HERV-K抗体或其由CAR、BiTE或ADC组成的融合物、癌症疫苗,并任选地与一种或多种免疫检查点阻断剂组合。这些治疗剂中的每一种都单独靶向免疫系统。在第二十一实施方案中,本发明的方法抑制转移。在第二十二实施方案中,本发明的方法减少肿瘤尺寸。在第二十三实施方案中,本发明的方法抑制肿瘤细胞的生长。在第二十四实施方案中,本发明的方法检测癌症和癌症转移。

定义

为了方便,下面列出说明书、实施例和随附权利要求中使用的一些术语和短语的含义。除非另有说明或上下文中暗示,这些术语和短语具有以下含义。这些定义是为了帮助描述特定的实施方案,而不意欲限制要求保护的发明。除非另有定义,否则所有技术和科学术语具有与分子生物学领域的普通技术人员普遍理解相同的含义。对于本领域术语的含义与本说明书中提供的定义之间的任何明显差异,应以本说明书中提供的含义为准。

“5-Aza”具有生物技术领域公认的5-氮杂胞苷的含义。

“6H5”具有本实验室中开发的鼠抗HERV-K单克隆抗体的生物技术领域公认的含义。

义。

分子生物学领域的普通技术人员将理解“约”并取决于其所用的上下文进行一定程度的改变。如果在给出其使用上下文的情况下,分子生物学领域的普通技术人员不清楚该术语的用法,则“约”将表示高达该值的正负10%。

“抗体药物缀合物(ADC)”具有生物技术领域公认的通过将小分子抗癌药物或另一治疗剂用永久或不稳定的接头附接至抗体制备的高效生物药物的含义。该抗体靶向仅在靶细胞上发现的特定抗原。

“B7家族”具有生物技术领域公认的未定义受体的抑制性配体的含义。B7家族涵盖B7-H3和B7-H4,两者均在肿瘤细胞和肿瘤浸润细胞中上调。可分别在GenBank登录号Q5ZPR3和AAZ17406下找到完整的hB7-H3和hB7-H4序列。

“BiTE”有生物技术领域公认的双特异性T细胞衔接器的含义。BiTE表示具有来自两个不同抗体的两个连接的scFv的重组双特异性蛋白,一个抗体靶向T细胞上的细胞表面分子(例如,CD3 ϵ)而另一个抗体靶向恶性细胞表面的抗原。这两个scFv通过短柔性接头彼此连接。术语编码BiTE的DNA(DBiTE)包含可在体内表达的任何编码BiTE的DNA质粒。

“癌症抗原”或“肿瘤抗原”具有以下术语的生物技术领域公认的含义:(i) 肿瘤特异性抗原,(ii) 肿瘤相关抗原,(iii) 表达肿瘤特异性抗原的细胞,(iv) 表达肿瘤相关抗原的细胞,(v) 肿瘤上的胚胎抗原,(vi) 自体肿瘤细胞,(vii) 肿瘤特异性膜抗原,(viii) 肿瘤相关膜抗原,(ix) 生长因子受体,(x) 生长因子配体,和(xi) 与癌症相关的任何类型的抗原或抗原呈递细胞或材料。

“联合疗法”包括在会提供组合的有益效果的方案中以顺序方式施用每种药剂或疗法,并以基本上同时的方式共同施用这些剂或疗法,如以具有固定比例的这些活性剂的单个胶囊或以用于每种药剂的多个单独的胶囊施用。组合疗法还包含组合,该组合中单独的成分可以在不同的时间和/或通过不同的途径施用,但是这些成分以组合发挥作用以通过联合疗法的每种剂或肿瘤治疗方法共同作用或药代动力学和药效学效应提供有益效果。

“CTL”有生物技术领域公认的溶细胞性T细胞或细胞毒性T细胞的含义。

“细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4 (CTLA-4)”是T细胞表面分子并是免疫球蛋白超家族中的一员。该蛋白通过与CD80和CD86结合下调免疫系统。如本文所用,术语“CTLA-4”包含人CTLA-4(hCTLA-4)、hCTLA-4的变体、异构体和物种同系物和与hCTLA-4具有至少一个共同表位的类似物。可在GenBank登录号P16410下找到完整的hCTLA-4序列。

“衍生自”指定的多核苷酸或蛋白有生物技术领域公认的多肽的起源的含义。优选的,衍生自特定序列的多肽或氨基酸序列具有与该特定序列或其部分基本相同的氨基酸序列,其中该部分由至少10-20个氨基酸组成,优选至少20-30个氨基酸,更优选至少30-50个氨基酸,或分子生物学领域普通技术人员可以以其他方式将该多肽或氨基酸序列识别为起源于该特定序列。衍生自另一肽的多肽相对于起始多肽可具有一个或多个突变,例如,一个或多个氨基酸残基被另一氨基酸残基取代,或具有一个或多个氨基酸残基插入或缺失。多肽可包含不是天然存在的氨基酸序列。此类变体与起始分子的序列同一性或相似性必须低于100%。在一些实施方案中,通过核苷酸序列编码该肽。本发明的核苷酸序列在一些应用中是有用的,包括克隆、基因疗法、蛋白表达和纯化、引入突变、在有需要的宿主中的DNA疫

苗接种、用于例如被动免疫的抗体生成、PCR、引物和探针生成等。

“效应细胞”有生物技术领域公认的涉及免疫应答的效应阶段的免疫细胞的含义，该效应阶段与免疫应答的认知和激活阶段相反。示例性免疫细胞包含骨髓或淋巴来源的细胞，例如淋巴细胞（如B细胞和T细胞，包括溶细胞性T细胞（CTL））、杀伤细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、多形核细胞，如中性粒细胞、粒细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞。一些效应细胞表达特定Fc受体（FcR）并执行特定免疫功能。

“表位”表示能特异性结合抗体的蛋白决定簇。表位通常由表面分子如氨基酸或糖侧链组成并通常有特定三维结构特征以及特定电荷特征。构象表位和非构象表位的区别在于在变性溶剂的存在下，与前者的结合会消失而与后者的不会。表位可包含直接涉及结合的氨基酸残基（也称为表位的免疫优势组分）和其他氨基酸残基，其不直接涉及结合，如被特异性抗原结合肽有效阻断的氨基酸残基（换言之，该氨基酸残基在特异性抗原结合肽的足迹（footprint）内）。

“FACS”指荧光激活的细胞分选。

“HERV”有生物技术领域公认的人内源性逆转录病毒的含义，“HERV-K”有生物技术领域公认的内源逆转录病毒的HERV-K家族的含义。“人内源逆转录病毒（HERV）”是逆转录病毒，其以整合到所有正常细胞的基因组中的前病毒DNA的形式存在，并通过孟德尔遗传模式传播。“HERV-X”，其中“X”是英文字母，具有生物技术领域公认的HERV的其他家族的生物技术领域公认的含义。“Env”有生物技术领域公认的病毒包膜蛋白的含义。“KSU”具有生物技术领域公认的HERV-K包膜表面融合蛋白的含义，而“KTM”具有生物技术领域公认的HERV-K Env跨膜蛋白的含义。“env”具有生物技术领域公认的病毒的包膜RNA的含义。pLVXK具有生物技术领域公认的HERV-K表达载体的含义。术语MDA-MB-231pLVXK或231-K指转导pLVXK的MDA-MB-231细胞。pLVXC仅具有生物技术领域公认的对照表达载体的含义。术语MDA-MB-231pLVXC或231C指转导pLVXC的MDA-MB-231细胞。HERV-K在许多肿瘤类型中表达，包括但不限于黑色素瘤（Muster等人，2003；Buscher等人，2005；Li等人，2010；Reiche等人，2010；Serafino等人，2009），乳腺癌（Patience等人，1996；Wang-Johanning等人，2003；Seifarth等人，1995），卵巢癌（Wang-Johanning等人，2007），淋巴癌（Contreras-Galindo等人，2008）和畸胎瘤（Bieda等人，2001；Lower等人，1993）。此外，感染的细胞，包括那些被HIV感染的细胞（Jones等人，2012），也表达HERV-K。这提供了一个由吸引力的机会，一种靶向HERV-K的CAR设计可用于治疗多种癌症和感染。

“HM”具有生物技术领域公认的人源化小鼠的含义，而“HTM”具有人肿瘤小鼠的含义。

“hTab”具有生物技术领域公认的全人肿瘤抗体的含义。

“人内源逆转录病毒-K”、“HERV-K”、“HERV”、“人内源性逆转录病毒”、“内源性逆转录病毒”和“ERV”包含内源性逆转录病毒的任何变体、异构体和物种同系物，该内源性逆转录病毒由细胞天然表达或在转染内源性逆转录病毒基因的细胞中表达。

“ICP”具有生物技术领域公认的免疫检查点的含义。

“IHC”具有生物技术领域公认的免疫组化的含义。

“ILC”具有生物技术领域公认的浸润性小叶癌的含义。“DICS”具有生物技术领域公认的原位导管癌的含义。“IDC”具有生物技术领域公认的免疫检查点的含义。

“免疫细胞”是一种造血细胞并在免疫应答中发挥作用。免疫细胞包含淋巴细胞(例如,B细胞和T细胞)、天然杀伤细胞和髓系细胞(例如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和粒细胞)。

“免疫检查点阻断剂”具有生物技术领域公认的完全或部分减少、已知、干扰或调节一种或多种检查点蛋白的分子的含义。在一些实施方案中,该免疫检查点阻断剂阻止与免疫检查点相关的抑制信号。在一些实施方案中,该免疫检查点阻断剂是破坏与免疫检查点相关的抑制信号传导的抗体或其片段。在一些实施方案中,该免疫检查点阻断剂是破坏抑制信号传导的小分子。在一些实施方案中,该免疫检查点阻断剂是阻止检查点阻断蛋白之间相互作用的抗体、其片段、或抗体模拟物,例如阻止PD-1和PD-L1之间相互作用抗体或其片段。在一些实施方案中,该免疫检查点阻断剂是阻止CTLA-4和CD80或CD86之间相互作用的抗体或其片段。在一些实施方案中,该免疫检查点阻断剂是阻止LAG3及其配体之间或TIM-3及其配体之间相互作用的抗体或其片段。该检查点阻断剂也可以分子的可溶形式存在,例如,可溶的PD-L1或PD-L1融合物。

“免疫检查点”有生物技术领域公认的调节T细胞受体识别抗原的幅度和质量的共刺激和抑制信号的含义。在一些实施方案中,免疫检查点是抑制信号。在一些实施方案中,该抑制信号是PD-1和PD-L1之间的相互作用。在一些实施方案中,该抑制信号是CTLA-4和CD80或CD86之间相互作用以取代CD28结合。在一些实施方案中,该抑制信号是LAG3和MHC II类分子之间的相互作用。在一些实施方案中,该抑制信号是PD-1和PD-L1之间的相互作用。

“体内”有生物技术领域公认的发生在活生物体内过程的含义。如本文所用的术语“哺乳动物”或“受试者”或“患者”包含人和非人,包括但不限于人、非人灵长类动物、犬科动物、猫科动物、啮齿动物、牛科动物、马科动物和猪。

“抑制生长”(例如,指细胞,如肿瘤细胞)意欲包含相比于未接触HERV-K特异性治疗剂的相同细胞的生长,接触HERV-K特异性治疗剂的细胞的生长任何可测量的降低,例如抑制细胞培养的生长至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或100%。此类细胞生长的降低可以通过抗HERV-K剂单独或组合发挥的多种机制(例如凋亡)发生。

“ICD”具有生物技术领域公认的免疫抑制结构域的含义。

“K-CAR”或“HERV-Kenv CAR”具有生物技术领域公认的HERV-K包膜基因(表面或跨膜)嵌合抗原受体(CAR)基因构建体的含义。术语“HERV-Kenv CAR-T细胞”或“K-CAR-T细胞”具有生物技术领域公认的转导K-CAR或HERV-Kenv CAR慢病毒或睡美人表达系统的T细胞的含义。

“KD”具有生物技术领域公认的敲低(常常通过shRNA)的含义。

“连接的”、“融合的”或“融合”互换使用。这些术语指通过任何方式(包括化学缀合或重组方式)将两个以上的元件或组分或结构域连接在一起。本领域已知化学缀合(例如,使用异种双功能交联剂)的方法。

“接头”或“接头结构域”有生物技术领域公认的在线性序列中连接两个或多个结构域(例如靶向HERV-K的人源化抗体和靶向T细胞蛋白的抗体)的序列的含义。适于用于本文公开的方法的构建体可使用一种或多种“接头结构域”,如多肽接头。“多肽接头”有生物

技术领域公认的在多肽链的线性氨基酸序列中连接两个或多个结构域的肽或多肽序列(例如,合成的肽或多肽序列)的含义。此类多肽接头可为多肽分子提供柔性。该多肽接头可用于连接(例如,基因融合)一个或多个Fc结构域和/或药物。

“淋巴激活基因-3 (LAG3)”是通过与MHC II类分子结合与淋巴细胞活性的抑制相关的抑制性受体。该受体增强Treg细胞的功能并抑制CD8+效应T细胞功能。如本文所用,术语“LAG3”包含人LAG3 (hLAG3)、hLAG3的变体、异构体和物种同系物和与hLAG3具有至少一个共同表位的类似物。可在GenBank登录号P18627下找到完整的hLAG3序列。

“乳腺球”有生物技术领域公认的在非贴壁非分化条件下培养乳房或乳腺细胞形成的离散的细胞簇的含义。

“核酸”具有生物技术领域公认的单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物的含义。除非另有限制,涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,这些类似物具有与参考核酸相似的结合特性并且以与天然存在的核苷酸相似的方式代谢。除非另有指示,特定核酸序列也隐含地包涵其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)和互补序列以及明确指出的序列。具体的,可通过生成序列来实现简并密码子取代,该序列中用混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代序列中一个或多个选定的(或全部)密码子的第三位。参见Batzer等人,Nucleic Acid Res.,19,5081(1991);Ohtsuka等人,Biol.Chem.,260,2605-2608(1985);和Rossolini等人,Mol.Cell.Probes,8,91-98(1994)。对于精氨酸和亮氨酸,第二个碱基的修饰也可以是保守的。术语核酸可与基因、cDNA和基因编码的mRNA互换。

“PBMC”具有生物技术领域公认的外周血单个核细胞的含义。

“PDX”具有生物技术领域公认的患者衍生异种移植物的含义。PDX通常通过移植人肿瘤细胞或肿瘤组织进入人癌症的免疫缺陷小鼠模型产生。

“同一性百分比”,在两个或多个核酸或多肽序列的上下文中,指两个或多个序列或子序列在为了获得最大对应性进行比较和比对时具有特定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基,使用下述序列比较算法之一(例如BLASTP和BLASTN或技术人员可用的其他算法)或通过目视检查测量。取决于应用,“同一性百分比”可以存在于被比较的序列的区域中,例如,在功能结构域中,或者,存在于被比较的两个序列的全长中。为了序列对比,通常一个序列作为参考序列,其与测试序列进行比较。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入计算机,指定子序列坐标,如果需要,指定序列算法程序参数。序列比较算法之后基于制定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。可以进行用于比较的序列的最佳比对,例如,通过Smith&Waterman,Adv. Appl. Math.,2,482(1981)的局部同源性算法,通过Needleman&Wunsch,J.Mol.Biol.,48,443(1970)的同源比对算法,通过Pearson&Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A.,85,2444(1988)的相似性搜索方法,通过这些算法的计算机化实现(GAP,BESHERV-KIT,FASTA,and HERV-KASTA in the Wisconsin Genetics Software Package,Genetics Computer Group,575Science Dr.,Madison,WI,USA),或通过目视检查。适合确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的一个实例是BLAST算法,Altschul et al.,J.Mol.Biol.215,403-410(1990)中描述了该算法。用于进行BLAST分析的软件可通过生物技术信息网站国家中心公开获取。

“药学上可接受的”通常表示在合理的医学判断范围内适用于与人类和动物的组织、器官和/或体液接触的那些化合物、材料、组合物和/或剂型,没有过度毒性、刺激、过敏

反应或其他问题或并发症,与合理的收益/风险比相称。

“程序性死亡配体-1 (PD-L1)”是PD-1的两个表面糖蛋白配体之一(另一个是PD-L2),其在与PD-1结合后下调T细胞激活和细胞因子分泌。如本文所用,术语“PD-L1”包含人PD-L1 (hPD-L1)、hPD-L1的变体、异构体和物种同系物和与hPD-L1具有至少一个共同表位的类似物。可在GenBank登录号Q9NZQ7下找到完整的hPD-L1序列。

“程序性死亡-1 (PD-1)”受体具有生物技术领域公认的术语CD28家族的免疫抑制受体的含义。PD-1主要在体内之前激活的T细胞上表达,并与两种配体,PD-L1和PD-L2结合。如本文所用,术语“PD-1”包含人PD-1 (hPD-1)、hPD-1的变体、异构体和物种同系物和与hPD-1具有至少一个共同表位的类似物。可在GenBank登录号AAC51773下找到完整的hPD-1序列。

“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)有生物技术领域公认的引入表达载体的细胞的含义。此类术语不仅指特定种类的细胞,也指此类细胞的后代。由于突变或环境影响,后代可能发生某些修饰,此类后代实际上可能与亲代细胞不同,但仍包含在本文所用“宿主细胞”的范围内。重组宿主细胞包含,例如转染瘤,如CHO细胞、HEK293细胞、NS/O细胞和淋巴细胞。

“scFv”具有生物技术领域公认的单链可变片段的含义。

“SU”有生物技术领域公认的HERV-K表面蛋白的含义。

“足够的量”或“足以……的量”表示足以期望的效果的量,例如足以减少肿瘤大小的量。

关于由两种或多种单独组分产生的效应的“协同作用”或“协同效应”具有生物技术领域公认的现象的含义,该现象中这些组分产生的总效应在组合使用时每个组件单独作用的个体效应的总和。

“T细胞膜蛋白-3 (TIM3)”是涉及通过抑制TH1细胞应答抑制淋巴细胞活性的抑制性受体。TIM3的配体是半乳糖凝集素9,其在各种类型的癌症中上调。如本文所用,术语“TIM3”包含人TIM3 (hTIM3)、hTIM3的变体、异构体和物种同系物和与hTIM3具有至少一个共同表位的类似物。可在GenBank登录号Q8TDQ0下找到完整的hTIM3序列。

“T细胞”有生物技术领域公认的CD4+T细胞或CD8+T细胞的含义。术语T细胞包含TH1细胞、TH2细胞和TH17细胞。

“治疗有效量”是有效改善疾病的症状的量。治疗有效量可以是“预防性治疗有效量”,因为预防可以认为是治疗。

“TM”具有生物技术领域公认的HERV-K跨膜蛋白的含义。

“TNBC”具有生物技术领域公认的三阴性乳腺癌的含义。

“转基因非人动物”具有生物技术领域公认的非人动物的含义,其基因组包含一个或多个重链和/或轻链转基因或转染色体(整合的或非整合的进入动物的天然基因组DNA中)并且可以完全表达人抗体。例如,转基因小鼠可以具有人轻链转基因和人重链转基因或人重链转染色体,使该小鼠在用HERV-K抗原和/或表达HERV-K的细胞免疫时产生人抗HERV-K抗体。人重链转基因可整合到小鼠的染色体DNA中,如转基因小鼠的情况,例如HUMab小鼠,或人重链转基因可以在染色体外维持,如W002/43478中描述的转染色体KM小鼠的情况。此类转基因和转染色体小鼠(在本文中共同指“转基因小鼠”)通过进行V-D-J重组和同种型转换,可产生针对给定抗原的多种同种型人mAb(如IgG、IgA、IgM、IgD或IgE)。通过引入编码特

定抗体的基因,例如通过将基因与在动物乳汁中表达的基因可操作地连接,也可使用转基因非人动物产生针对特定抗原的抗体。

“治疗”表示出于缓解、改善、阻止或根除(治愈)疾病状态的症状的目的,施用有效量的本发明的治疗活性化合物。

“载体”具有生物技术领域公认的能运输与其连接的另一核酸的核酸分子的含义。一种类型的载体是“质粒”,其具有生物技术领域公认的可以将额外的DNA片段连接至其中的环状双链DNA环的含义。另一类型的载体是病毒载体,其中额外的DNA片段可连接至病毒基因组中。一些载体能够在它们被引入其中的宿主细胞中自主复制(例如有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其他载体(如非游离型哺乳动物载体)在引入宿主细胞后可整合入宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。另外,一些载体可以调节与其有效连接的基因的表达。本文中称此类载体为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。用于重组DNA技术的表达载体常常为质粒形式。在本说明书中,术语“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本发明意欲包含此类表达载体的其他形式,如病毒载体(如复制缺陷的逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),其发挥相同的功能。

在过去15年中,癌症治疗抗体如Herceptin®(曲妥珠单抗,trastuzumab), Avastin®(贝伐珠单抗,bevacizumab), Erbitux®(西妥昔单抗,cetuximab)等的研发在全世界范围内挽救了数以万计的生命。特别的,使用曲妥珠单抗治疗HER-2阳性转移乳腺或卵巢癌显著改变了患者的治疗结果。抗体疗法提供了相对于小分子药物的不同优势,即:(i)确定的作用机理;(ii)更高的特异性和更少的脱靶效应;和(iii)可预测的安全性和毒理学概况41,42。目前,超过200种抗体疗法正在美国进行临床试验。正如对抗Her2和抗EGFR单克隆抗体的广泛研究所证明的,在基于以高亲和力结合其分子靶标的能力鉴定出的数千种抗体中,只有少数抗体表现出所需的临床有效杀伤癌细胞的特性41。治疗性抗体的功效主要源于通过直接诱导靶细胞的凋亡或通过效应器介导的功能(如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC))引发强力肿瘤细胞毒性的能力41,42。

分离的抗体的主要方法是:(i)体外筛选来自免疫动物的文库或使用噬菌体或微生物展示的合成文库的43-45,和(ii)在B细胞永生或克隆后分离的抗体46-48。这些方法存在以下一个或两个缺点,严重限制了可分离的独特抗体的数量:(i)需要进行广泛的筛选以分离即使是少量的高亲和力抗体和(ii)这些抗体注射入人体后产生的免疫应答。因此,无论用于筛选/分离治疗性单克隆抗体(mAb)的方法如何,从发现到临床的转化率是低效且费力的。

加速治疗性mAb获得批准的一项进展是通过互补决定区(CDR)接枝技术生成人源化抗体。参见科学文献10。在CDR接枝中,将非人抗体CDR序列移植入人框架序列以维持靶向特异性。

人源化抗体和抗体药物缀合物(ADC)药物组合物

因为每个细胞可结合更多抗体,过表达HERV-K的癌症细胞可以是本发明的抗HERV-K人源化抗体和ADC的特别好的靶标。因此,在二十五实施方案中,将用本发明的抗HERV-K人源化抗体或ADC治疗的癌症患者是以下患者,例如在其肿瘤细胞中诊断出有HERV-K过表达的乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、肺癌或结直肠癌患者。

在纯化抗HERV-K人源化抗体或ADC后,可以使用公知的药物载体或赋形剂将它们

配制成药物组合物。

药物组合物可以根据常规技术(如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,19th Edition,Gennaro,Ed.(Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1995)中公开的那些)与药学上可接受的载体或稀释剂以及任何其他已知的佐剂和赋形剂一起配制。

药学上可接受的载体或稀释剂以及其他已知的佐剂和赋形剂应适于本发明的人源化抗体或ADC以及所选的使用模式。药物组合物的载体和其他组分的适用性是基于对本发明所选化合物或药物组合物与抗原结合的所需生物学特性没有显著负面影响(例如,小于实质性影响(10%或更少的相对抑制,5%或更少的相对抑制等))。

本发明的药物组合物还可包含稀释剂、填充剂、盐、缓冲液、去污剂(例如,非离子去污剂,如Tween-20或Tween-80)、稳定剂(例如,糖或无蛋白氨基酸)、防腐剂、组织固定剂、增溶剂和/或适合包含在药物组合物中的其他材料。

本发明的药物组合物中人源化抗体或ADC的实际剂量水平可以变化以获得对于特定患者、组合物和施用方式有效实现所需治疗应答而不会对患者产生毒性的人源化抗体或ADC的量。所选择的剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括所用的本发明特定组合物的活性、施用途、施用时间、所用特定化合物的排泄率、治疗持续时间、其他药物、化合物和/或与所用特定组合物组合使用的材料、接受治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、整体健康和既往病史,以及医学领域公知的类似因素。

该药物组合物可以任何合适的途径和模式施用。施用本发明的人源化抗体或ADCs的合适途径是本领域公知的并且可以由分子生物学领域的普通技术人员选择。

在第二十六实施方案中,本发明的药物组合物是胃肠外施用的。

如本文所用的短语“胃肠外施用”表示肠内和局部施用以外的施用模式,常常通过注射,并包含表皮、静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、皮内、腹膜内、肌腱内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下腔、脊柱内、颅内、胸腔内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

在第二十七实施方案中,药物组合物通过静脉内或皮下注射或输注来施用。

药学上可接受的载体包含任何和所有合适的溶剂、分散介质、涂料、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂、抗氧化剂和延缓吸收剂等与本发明的人源化抗体或ADC生理相容的试剂。

可用于本发明的药物组合物的合适的水性和非水性的载体的实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、乙醇、右旋糖、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油,如橄榄油、玉米油、花生油、棉籽油和芝麻油、羧甲基纤维素胶体溶液、黄芪胶和可注射的有机酯,如油酸乙酯,和/或各种缓冲剂。其他载体在制药领域是公知的。

药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。本领域公知此类媒介和试剂用于药物活性物质的用途。除非任何常规介质或试剂与本发明的抗HERV-K人源化抗体或ADC不相容,否则考虑其在本发明的药物组合物中的用途。

可以通过例如,使用涂层材料(如卵磷脂)来维持分散体所需的粒径和使用表面活性剂来维持适当的流动性。

本发明的药物组合物还可包含药学上可接受的抗氧化剂,例如(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化

剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;和(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

本发明的药物组合物还可包含等渗剂,如组合物中的糖、多元醇,如甘露醇、山梨糖醇、甘油或氯化钠。

本发明的药物组合物还可含有一种或多种适于所选施用途的佐剂,如可延长该药物组合物的保质期或有效性的防腐剂、润湿剂、乳化剂、分散剂、防腐剂或缓冲剂。本发明的抗HERV-K人源化抗体或ADC可与避免化合物快速释放的载体制备,如控释制剂,包括植入物、透皮贴剂和微囊化递送系统。此类载体可包含明胶、单硬脂酸甘油酯、二硬脂酸甘油酯、生物可降解的,生物相容性聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸,单独或与蜡一起,或分子生物学领域公知的其他材料。分子生物学领域技术人员通常知晓制备此类制剂的方法。参见例如,缓释和控释药物递送系统J.R.Robinson, ed. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1978)。

在第二十八实施方案中,可配制本发明的抗HERV-K人源化抗体或ADC以确保在体内适当分布。用于胃肠外施用的药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。本领域公知此类介质和试剂用于药物活性物质的用途。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,否则考虑其在本发明的药物组合物中的用途。补充活性化合物也可掺入该组合物。

用于注射的药物组合物必须是无菌并且在制造和储存条件下通常是稳定的。可以配制组合物为溶液、微乳剂、脂质体或其他适合高药物浓度的有序结构。载体可以是水性或非水性溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油如橄榄油,和可注射的有机酯,如油酸乙酯。可以通过例如,使用涂层(如卵磷脂)来维持分散体所需的粒径和使用表面活性剂来维持适当的流动性。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖、多元醇如甘油、甘露醇、山梨糖醇或氯化钠。通过在组合物中包含延迟吸收剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可以延长药物组合物的吸收。可通过在合适的溶液和一种成分或成分组合(例如根据需要如上所述的成分)中掺入所需量的抗-HERV-K人源化抗体或ADC之后无菌超滤来制备无菌可注射溶液。一般,通过在含有基本分散介质和所需的成分(例如如上所述的成分)的无菌介质中掺入所需量的抗-HERV-K人源化抗体或ADC来制备分散体。对于制备无菌可注射溶液所用的无菌粉末,制备方法的实例是从活性成分和任何额外所需成分的之前无菌过滤过的溶液中生产粉末的真空干燥和冷冻干燥(冻干)。

可通过在合适的溶液和一种成分或成分组合(例如根据需要如上所述的成分)中掺入所需量的抗-HERV-K人源化抗体或ADC之后无菌过滤来制备无菌可注射溶液。通常,通过在含有基本分散介质和来自如上所述的成分的所需的成分的其他成分的无菌介质中掺入抗-HERV-K人源化抗体或ADC来制备分散体。对于制备无菌可注射溶液所用的无菌粉末,制备方法的实例是从抗HERV-K人源化抗体或ADC和任何额外所需成分的之前无菌过滤过的溶液中生产粉末的真空干燥和冷冻干燥(冻干)。

本发明的药物组合物可包含本发明的抗HERV-K人源化抗体或ADC或本发明的抗HERV-K人源化抗体或ADC的组合。

抗HERV-K人源化抗体或ADC的有效剂量和给药方案取决于所治疗的疾病或病症并可由分子生物学领域的技术人员确定。本发明的化合物的治疗有效量的示例性非限制范围是约0.1-100mg/kg, 如约0.1-50mg/kg, 例如约0.1-20mg/kg, 如约0.1-10mg/kg, 如约0.5-5mg/kg, 例如约5mg/kg, 如约4mg/kg, 或约3mg/kg, 或约2mg/kg, 或约1mg/kg, 或约0.5mg/kg, 或约0.3mg/kg。本发明的抗HERV-K人源化抗体或ADC的治疗有效量的示例性非限制范围是约0.02-30mg/kg, 如约0.1-20mg/kg, 或约0.5-10mg/kg, 或约0.5-5mg/kg, 例如约1-2mg/kg, 特别是本文公开的抗体011、098、114或111的量。

在分子生物领域具有普通技术的医师可简单确定并规定所述药物组合物的有效量。例如, 医师可以开始以低于实现所需治疗效果的水平开始药物组合物中使用的抗HERV-K人源化抗体或ADC的剂量, 并逐渐增加剂量直到实现所需效果。本发明的组合物的合适的每日剂量将是有效产生治疗效果的最低剂量的化合物的量。这种有效剂量通常取决于上述因素。施用可以是静脉内的、肌内的、腹膜内的或皮下的, 并且例如在靶位点附近施用。如果需要, 药物组合物的有效每日剂量可以在一天中以合适的间隔作为2、3、4、5、6或更多分剂量来分别施用, 任选地以单位剂量形式。虽然本发明的抗HERV-K人源化抗体或ADC可单独施用, 优选以上述药物组合物施用该抗HERV-K人源化抗体或ADC。

在第二十九实施方案中, 可以约10至1500mg/m², 如30至1500mg/m², 或约50至1000mg/m², 或如10至500mg/m², 或如100至300mg/m²的每周一次的剂量通过输注施用抗HERV-K人源化抗体或ADC。可重复这种施用, 例如1次至8次, 如3次至5次。可通过在2小时至24小时, 如2小时至12小时的时间段连续输注进行该施用。

在第三十实施方案中, 可以约如30至1500mg/m², 或如50至1000mg/m², 或10至300mg/m²的每三周一次的剂量通过输注施用抗HERV-K人源化抗体或ADC。可重复这种施用, 例如1次至8次, 如3次至5次。可通过在2小时至24小时, 如2小时至12小时的时间段连续输注进行该施用。

在第三十一实施方案中, 可通过在延长的时间段(如超过24小时)缓慢连续输注施用抗HERV-K人源化抗体或ADC以减少毒副作用。

在第三十二实施方案中, 可以约50mg至2000mg, 例如50mg、100mg、200mg、300mg、500mg、700mg、1000mg、1500mg或2000mg的每周剂量施用抗HERV-K人源化抗体或ADC达高达16次, 如4至10次, 如4至6次。可通过在2小时至24小时, 如2小时至12小时的时间段连续输注进行该施用。如果有必要这种方案可重复一次或多次, 例如在6个月或12个月后。可通过测量施用后本发明的抗HERV-K人源化抗体或ADC在血液中的量, 例如通过取出生物样品并使用靶向本发明的抗HERV-K人源化抗体或ADC的抗原结合域的抗独特型抗体来确定或调节剂量。

在第三十三实施方案中, 抗HERV-K人源化抗体或ADC可以通过维持疗法来施用, 例如, 每周一次持续6个或更多个月的时段。

在第三十四实施方案中, ADC可以通过包含本发明的ADC的一次输注之后输注本发明的抗HERV-K人源化抗体(如抗体6H5hum)的方案来施用。

双特异性T细胞衔接器(BiTE)

在第三十五实施方案中, 本文提供治疗有需要的受试者的HERV-K阳性癌症的方法, 包括向受试者施用治疗有效量的包括两个不同抗原结合域(一个对CD3或CD8特异性结

合且一个对HERV-K特异性结合)的双特异性抗体。

在第三十六实施方案中,本发明涉及双特异性抗体,其包含结合HERV-K的第一单链人可变区串联合T细胞激活配体CD3或CD8的第二单链人可变区。第一和第二单链人可变区按氨基到羧基的顺序,其中在每个所述片段之间插入有连接子序列,并且其中间隔多肽连接第一和第二单链可变区。

在该方法的第三十七实施方案中,施用是静脉内的或腹膜内的。

在该方法的第三十八实施方案中,双特异性结合分子在所述施用步骤中不与T细胞结合。

在本文描述的方法的第三十九实施方案中,该方法进一步包括向受试者施用T细胞。在特定实施方案中,T细胞与跟所述双特异性结合分子相同的分子结合。

在第四十实施方案中,本文提供药物组合物,其包含治疗有效量的双特异性结合分子、药学上可接受的载体和T细胞。在第四十一实施方案中,T细胞与跟所述双特异性结合分子相同的分子结合。在第四十二实施方案中,T细胞与双特异性结合分子的结合是非公价的。在第四十三实施方案中,结合向受试者输注用于治疗HERV-K阳性癌症的T细胞来进行施用。在第四十四实施方案中,在用T细胞输注治疗病人后进行施用。在第四十五实施方案中,T细胞相对于被施用的受试者是自体的。在第四十六实施方案中,T细胞相对于被施用的受试者是同种异体的。在第四十七实施方案中,T细胞是人T细胞。

在本文描述的方法的第四十八实施方案中,该受试者是人。

在该方法的第四十九实施方案中,该双特异性结合分子含有在药物组合物中,药物组合物进一步包含药学上可接受的载体。

在该双特异性分子的第五十实施方案中,该双特异性结合分子不以其可溶形式或细胞结合形式与Fc受体结合。在该双特异性分子的一些实施方案,突变重链以摧毁N-连接的糖基化位点。在该双特异性结合分子的第五十一实施方案中,重链有一个氨基酸取代,用一个不作为糖基化位点的氨基酸取代作为N-连接糖基化位点的天冬酰胺。在该双特异性结合分子的第五十二实施方案的一些实施方案,突变重链以摧毁C1q结合位点。在第五十三实施方案中,该双特异性结合分子不激活补体。

在该双特异性结合分子的第五十四实施方案中,该HERV-K阳性癌症是乳腺癌,卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、结直肠癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌或任何其他表达HERV-K的肿瘤组织。在第五十五实施方案中,该HERV-K阳性癌症是原发性肿瘤或转移性肿瘤,例如脑、骨或肺转移。

DNA编码的双特异性T细胞衔接器(DBiTE)

特异性抗体治疗,包括mAb和双特异性T细胞衔接器(BiTE),是用于癌症免疫治疗的重要工具。BiTE是有潜力改造癌症治疗免疫格局的一类人造双特异性单克隆抗体。BiTE针对宿主的免疫系统,更具体的是T细胞针对癌症细胞的细胞毒活性。BiTE有两个结合结构域。一个结构域结合靶向肿瘤(如表达HERV-K的细胞)同时另一个结构域通过直接结合至T细胞上的分子衔接免疫系统。该双结合活性直接在肿瘤处驱动T细胞激活,从而产生杀伤功能肿瘤破坏。DBiTE享有双特异性单克隆抗体的许多优势。两者均由编码两个抗体片段的工程DNA序列组成。患者自己的细胞变成生产被递送的DBiTE序列编码的功能性BiTE的工厂。递送BiTE并允许一次给药DBiTE的组合作为一种多管齐下的方法来治疗耐药性癌症。BiTE

样分子的合成DNA设计包括在优化的合成质粒DNA盒中对它们工程化并编码。然后将DBiTE局部注射到肌肉中,肌肉细胞将一串指令转化为蛋白以便在体内直接释放直接进入血流的分子以寻找并摧毁肿瘤。参见Perales-Puchalt等人,编码存在长效抗肿瘤活性的双特异性T细胞衔接器和抗体的DNA,JCI Insight,4(8),e126086(April 18,2019)。在临床前研究中,DBiTE相比于传统BiTE表现出独特的发挥,克服一些与生产相关的技术挑战。进一步信息,还参见PCT专利公开W02016/054153(The Wistar Institute of Anatomy and Biology)和W02018/041827(Psioxus Therapeutics Limited)。

HERV-K CAR-T治疗

[0123] 研发了对靶向抗原特异性的CAR的许多制剂。参见例如,国际专利公开W02014/186469(Board of Regents,the University of Texas System)。本说明书提供了产生用于治疗目的具有体内长寿潜能的嵌合抗原受体(CAR)修饰的T细胞的方法,例如,表现出最小残留疾病(MRD)的白血病患者。总的来说,该方法描述了可溶性分子(如细胞因子)如何融合到细胞表面以增强治疗潜能。该方法的核心依赖于用白细胞介素15(IL-15)的人类细胞因子突变蛋白共同修饰CAR T细胞,此后称为mIL15。mIL15融合蛋白由密码子优化的通过柔性丝氨酸-甘氨酸接头与全长IL15受体alpha融合的IL-15cDNA序列组成。该IL-15突变蛋白被设计为这种融合物以:(i)限制mIL15表达至CAR+T细胞的表面以限制细胞因子在体内环境中非靶标的扩散,从而潜在提高了其安全性,因为外源可溶性细胞因子给药导致毒性;和(ii)在IL-15Ra的背景下呈现IL-15以模拟生理相关和定性信号以及IL15/IL15Ra复合物的稳定和再循环,以获得更长的细胞因子半衰期。表达mIL15的T细胞能继续支持细胞因子信号,这对它们的输注后生存是关键的。通过非病毒睡美人系统(Sleeping Beauty System)基因修饰生成mIL15+CAR+T细胞,并随后在临床可用的平台体外扩增产生在输注于有高、低或没有肿瘤负载的鼠模型有增强的持久性的T细胞输注产品。另外,该mIL15 CAR+T细胞还表明在高和低肿瘤负载模型中均改善的抗肿瘤功效。使用hu6H5 scFv以产生慢病毒载体中的K-CAR。

联合疗法

使用该说明书的治疗可以无需修饰地使用,这依赖于抗体或片段与HERV-K+癌症细胞的表面抗原的原位结合以刺激对该癌症细胞的免疫攻击。或者,上述方法可以使用结合有细胞毒性剂的抗体或结合片段来进行。该细胞毒性抗体或抗体结合片段与肿瘤的结合抑制其生长或杀伤该细胞。

HERV-K env蛋白特异性抗体可用于连接其他表达的HERV抗原。这对于其中表达几种不同HERV的疾病的免疫疗法和抗体治疗可能特别有用。例如,前列腺癌中的HERV-E,卵巢癌中的ERV3、HERV-E和HERV-K和其他癌症中的ERV3、HERV-H和HERV-W。

常见 γ 链受体家族(γ C)中的细胞因子是T细胞的重要共刺激分子,对淋巴功能、存活和增殖至关重要。IL-15具有过继治疗所需的几个属性。IL-15是支持长寿记忆细胞毒性T细胞存活、通过减轻肿瘤驻留细胞的功能抑制促进已建立的肿瘤的根除,并抑制激活诱导的细胞死亡(AICD)的稳态细胞因子。IL-15是组织限制性的,只有在病理条件下,才能在血清或全身的任何水平上观察到它。与分泌到周围环境中的其他 γ C细胞因子不同,IL-15在IL-15受体(IL-15Ra)的背景下由生产细胞转呈递至T细胞。该细胞因子向T细胞和其他响应细胞的独特递送机制:(i)是高度靶向并本地化的,(ii)增加IL-15的稳定性和半衰期,和

(iii)产生与可溶IL-15实现的信号传导定性不同的信号传导。

药物组合物

本说明书还涉及药物组合物,其包含特异性结合至HERV-K env蛋白的疗法和药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。这种药物组合物可以任何合适的形式施用,包括胃肠外、局部、口服或局部(如气雾剂或透皮)或其任何组合。合适的方案还包括通过静脉推注进行初始给药,然后以一个或多个间隔重复给药。

通过将具有所需纯度的含有肽配体的化合物与任选的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences第18版,1990)混合来制备用于储存的本公开化合物的药物组合物,以冻干制剂或水溶液的剂型。可接受的载体、赋形剂或稳定剂以对接受者无毒的剂量和浓度使用。

本文的组合物还可包含超过一种活性化合物,优选不会对彼此产生不利影响的具有互补活性的那些活性化合物,其对于所治疗的特定适应症是必需的。或者,或另外,该组合物可包含细胞毒性剂、细胞因子、生长抑制剂和/或心脏保护剂。此类分子以对预期目的有效的量适当地组合存在。

通过以下实施例进一步说明本发明,以下实施例不意欲以任何方式限制本发明的范围或内容。

实施例

实施例1:

通过CDR接枝生成hu6H5 Ab

小鼠ScFv基因的序列

ATGGCCCAGGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTG
AAGATATCCTGCAAGGCGTCTGGTTACTCATTCCTGGCTACTACATGCACTGGGTGAAG
CAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTGTTAATCCTAACAGTGGTGGTACA
AGCTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCATATTAAGTGTAGACAAGTCATCCAGCACACA
GCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGA
TCGAAAGGTAAGTACTTCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC
TCCTCAAGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCGAG
CTCACTCAGTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATCCTGC
AGAGCCAGTGAAAGTGTTGATAGTCATGGCACTAGTTTTATGCACTGGTACCAGCAGAAA
CCAGGACAGCCACCCAAATTCCTCATCTATCGTGCATCCAACCTAGAAATCTGGGATCCCT
GCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGACTTCACCCTCACCATTAATCCTGTGGAG
ACAGATGATGTTGCAATCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCTCCGACGTTCCGGT
GGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC (SEQ ID NO: 1)

VH

CAGGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCC
TGCAAGGCGTCTGGTTACTCATTCCTGGCTACTACATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGA

AAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTGTTAATCCTAACAGTGGTGGTACAAGCTACAACCAGAAG
TTCAAGGACAAGGCCATATTAAGTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGC
AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGAAAGGTAAGTACTTCTAT
GCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAA (SEQ ID NO: 2)

>FWJ_VH

QVKLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYMHVVKQSHGKSLEWIGRVNPNSSGGTSYNQK
FKDKAILTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSKGNIFYAMDYWGQGTTTVTVSS (SEQ
ID NO: 3)

1	Q	V	K	L	Q	Q	S	G	P	D	L	V	K	P	G	A	S	V	K	I	20	
1	C	A	G	G	T	G	A	A	G	C	T	G	C	A	G	C	T	G	A	A	G	60
21	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	G	Y	Y	M	H	W	V	K	Q	S	40	
61	T	C	C	T	G	C	A	A	G	G	C	T	G	T	T	A	C	T	A	C	T	120
41	H	G	K	S	L	E	W	I	G	R	V	N	P	N	S	G	G	T	S	Y	60	
121	C	A	T	G	G	A	A	G	A	G	C	C	T	T	G	A	G	T	G	G	T	180
61	N	Q	K	F	K	D	K	A	I	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	80	
181	A	A	C	C	A	G	A	A	G	T	T	C	A	A	G	G	C	A	T	A	T	240
81	M	E	L	R	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	S	K	100	
241	A	T	G	G	A	G	C	T	C	C	G	C	A	G	C	T	G	A	C	A	T	300
101	G	N	Y	F	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	120	
301	G	G	T	A	A	C	T	A	C	T	T	C	T	A	T	G	C	T	A	T	G	360

(SEQ ID NO: 3)

(SEQ ID NO: 2)

表1

查询蛋白质序列 &比对的密码子	Q CA G	V GTG	K AA G	L CTG	Q CA G	Q CA G	S TCA	G GG A	P CCT	D GA C	L CTG	V GTG	K AA G	P CCT	G GG G	A GCT	S TCA	V GTG	K AA G	I ATA		
CHOTHIA 编号	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20		
CHOTHIA 区域	HFR1																					
S TCC	C TGC	K AAG	A GCG	S TCT	G GGT	Y TAC	S TCA	F TTC	T ACT	G GGC	Y TAC	Y TAC	M ATG	H CAC	W TGG	V GTG	K AAG	Q CAG	S AGC	H CAT	G GGA	K AAG
H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43
CDR-H1										HFR2												
S AGC	L CTT	E GAG	W TGG	I ATT	G GGA	R CGT	V GTT	N AAT	P CCT	N AAC	S AGT	G GGT	G GGT	T ACA	S AGC	Y TAC	N AAC	Q CAG	K AAG	F TTC	K AAG	D GAC
H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H52A	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
CDR-H2										HFR3												
K AAG	A GCC	I ATA	L TTA	T ACT	V GTA	D GAC	K AAG	S TCA	S TCC	S AGC	T ACA	A GCC	Y TAC	M ATG	E GAG	L CTC	R CGC	S AGC	L CTG	T ACA	S TCT	E GAG
H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H82A	H82B	H82C	H83	H84	H85
D GAC	S TCT	A GCG	V GTC	Y TAT	Y TAC	C TGT	A GCA	R AGA	S TCG	K AAA	G GGT	N AAC	Y TAC	F TTC	Y TAT	A GCT	M ATG	D GAC	Y TAC	W TGG	G GGC	Q CAA
H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100A	H100B	H100C	H101	H102	H103	H104	H105
CDR-H3															HFR4							
G GGG	T ACC	T ACG	V GTC	T ACC	V GTC	S TCC	S TCA															
H106	H107	H108	H109	H110	H111	H112	H113															
预测的 CK2 磷酸化位点																						
预测的 PKC 磷酸化位点																						
插入																						

VL
GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGG
GCCACCATATCCTGCAGAGCCAGTGAAAGTGTTGATAGTCATGGCACTAGTTTT
ATGCACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCACCCAAATTCCTCATCTATCGT
GCATCCAACCTAGAATCTGGGATCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTAGG
ACAGACTTCACCCTCACCATTAATCCTGTGGAGACAGATGATGTTGCAATCTAT
TACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCTCCGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTG
GAAATCAAAC (SEQ ID NO: 4)
>FWJ_VL
DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSHGTSFMHWYQQKPGQPPKFLIYR
ASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETDDVAIYYCQQSNEDPPTFGGGTKL
EIK (SEQ ID NO: 5)

表2

展示 111 个残基中的 1-111:

查询蛋白序列	D	I	E	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T		
Chothia 编号	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20		
CHOTHIA 区域	LFR1																					
I	S	C	R	A	S	E	S	V	D	S	H	G	T	S	F	M	H	W	Y	Q	Q	K
L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L30A	L30B	L30C	L30D	L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39
CDR-L1																LFR2						
P	G	Q	P	P	K	F	L	I	Y	R	A	S	N	L	E	S	G	I	P	A	R	F
L40	L41	L42	L43	L44	L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	L62
CDR-L2																LFR3						
S	G	S	G	S	R	T	D	F	T	L	T	I	N	P	V	E	T	D	D	V	A	I
L63	L64	L65	L66	L67	L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85
Y	Y	C	Q	Q	S	N	E	D	P	P	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	
L86	L87	L88	L89	L90	L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L107	
CDR-L3												LFR4										

```

1  D I E L T Q S P A S L A V S L G Q R A T 20
1  GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACC 60

21  I S C R A S E S V D S H G T S F M H W Y 40
61  ATATCCTGCAGAGCCAGTGAAAGTGTGATAGTCATGGCACTAGTTTTATGCACTGGTAC 120

41  Q Q K P G Q P P K F L I Y R A S N L E S 60
121 CAGCAGAAACCAGGACAGCCACCCAAATTCCTCATCTATCGTGCATCCAACCTAGAATCT 180

61  G I P A R F S G S G S R T D F T L T I N 80
181 GGGATCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGACTTCACCCCTACCATTAAAT 240

81  P V E T D D V A I Y Y C Q Q S N E D P P 100
241 CCTGTGGAGACAGATGATGTTGCAATCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCTCCG 300

101 T F G G G T K L E I K 111 (SEQ ID NO: 5)
301 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA 333 (SEQ ID NO: 4)

```

人源化单链可变片段(scFv)抗体的设计

抗体编号计划和CDR定义: 抗体编号服务器是KabatMan数据库 (<http://www.bioinf.org.uk/>) 的一部分, 并用于根据增强的Chothia方案对本研究的所有抗体序列进行编号。在该人源化研究中, 发明人将增强的Chothia编号与抗体序列的完整CDR定义相结合以在以下位置定义抗体轻链和重链的CDR: H-CDR1 30-35、H-CDR2 47-58、H-CDR3 93-101、L-CDR1 30-36、L-CDR2 46-55、L-CDR3 89-96。<http://www.bioinf.org.uk/>

人模板的选择: 为生成人源化scFv基因, 将小鼠VH和VL的6个互补决定区(CDR)接枝在选定的显示出最高氨基酸序列同一性的人框架(FR)上以人源化给定抗体。使用人免疫球蛋白种系序列用于小鼠FWJ抗体克隆的选定的人FR(图1)。使用V-quest服务器(http://www.imgt.org/IMGT_vquest)和Ig-BLAST服务器(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>)独立鉴定在人和鼠FWJ的VH和VL间的框架区示出最高氨基酸序列相似性的人免疫球蛋白种系序列。基于保守种系选择重链VHIII和轻链KI。共有人FR是在选定的种系基因中设计的, 用于接枝FWJ的CDR残基。用人类残基取代与共有人FR不同的鼠VH和VL的FR中的氨基酸序列, 同时保留称为Vernier区残基和链堆积残基的位置处的小鼠残基。

>HUM1-FW.JVH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYSTGYMHVVRQAPGKGLEWIGRVNPNSSGGTSYNQK
FKDRATLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSKGNFYAMDYWGQGTLLTVSS (SEQ
ID NO: 6). 查询序列的Z分数为:0.7.

>Hum2 FW,JVH VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCKASGYSFTGYIMHWVRQASGKGLEWIGRVNPNSSGGTSYNQK
FKDRFTISRDKSISTLYLQMSSLRSEDNAVYYCARSKGNFYFAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ
ID NO: 7). 查询序列的Z分数为:0.5.

>FW.J VH

QVKLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYMHVVKQSHGKSLEWIGRVNPNSSGGTSYNQK
FKDKAILTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSKGNFYAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ
ID NO: 8). 查询序列的Z分数为:-1.7.

表3

```

Hum2 FWJVH
EVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCKASGYSFTGYIMHWVRQASGKGLEWIGRVNPNSGGTSY
HUM1_FWJVH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYSFTGYIMHWVRQAPGKGLEWIGRVNPNSGGTSY
FWJ_MuVH
QVKLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYIMHWVKQSHGKSLEWIGRVNPNSGGTSY
      :*:  :*:  .*:*:  .*:  :*:*****:*:
** .*****

Hum2 FWJVH
NQKFKDRFTISRDKSISTLYLQMSLSRSEDNAVYYCARSKGNIFYAMDYWGQGLTVTVSS
HUM1_FWJVH
NQKFKDRATLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDNAVYYCARSKGNIFYAMDYWGQGLTVTVSS
FWJ_MUVH
NQKFKDKAILTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSNAVYYCARSKGNIFYAMDYWGQGLTTVTVSS
      *****:  :  *:  .  *  *:  :
**  :*:*****  *****

Hum2 FWJVH      (SEQ ID NO: 7)
HUM1_FWJVH      (SEQ ID NO: 6)
FWJ_MUVH        (SEQ ID NO: 8)

```

表4

基因序列	Z值 (VH的人源性)	Z值 (VL的人源性)
小鼠基因 (FWJ)	-1.7	-1.0
人源化版本1 (Hum1-FWJ)	0.7	0.1
人源化版本2 (Hum2-FWJ)	0.5	0.0

表5

HUM2FWJVL	
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDSHGTSFMHWYQQKPGKAPKFLIYRASNLES	
HUM3FWJVL	
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASESVDSHGTSFMHWYQQKPGKSPKFLIYRASNLES	
FWJ_VL	
DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSHGTSFMHWYQQKPGQPPKFLIYRASNLES	
::**::**::*:*:*.*:**:*****:*****:*****	
HUM2FWJVL	
GIPSRFSGSGSGTDFTLTISVQPEDFAVYYCQQSNEDPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 9)	
HUM3FWJVL	
GIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAIYYCQQSNEDPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 10)	
FWJ_VL	
GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETDDVAIYYCQQSNEDPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 11)	
:.***	
*****.:::.*:*:*:*****:***	

>HUM1FWJVL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDSHGTSFMHWYQQKPGKAPKFLIYRASNLES
GIPSRFSGSGSGTDFTLTISVQPEDFAVYYCQQSNEDPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 9).
查询序列的Z分数为:0.1.

>HUM2FWJVL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASESVDSHGTSFMHWYQQKPGKSPKFLIYRASNLES
GIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAIYYCQQSNEDPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 10).
查询序列的Z分数为:0.0.

>FWJ_VL

DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSHGTSFMHWYQQKPGQPPKFLIYRASNLES
GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETDDVAIYYCQQSNEDPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 11).
查询序列的Z分数为:-1.0.

scFv基因的最终人源化版本

人源化scFv-1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYSFTGYMHWVRQAPGKGLEWIGRVNPNSGGTSYNQK
FKDRATLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSKGNYFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDSHGTSFMHWYQQKPGKAPKFLIYR
ASNLESGIPSRFSGSGSGTDFTLTISVQPEDFAVYYCQQSNEDPPTFGGGTKVEIK (SEQ
ID NO: 12)

人源化scFv-2

EVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCKASGYSFTGYMHWVRQASGKGLEWIGRVNPNSGGTSYNQK
FKDRFTISRDKSISTLYLQMSSLRSED TAVYYCARSKGNYFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASESVDSHGTSFMHWYQQKPGKSPKFLIYR
ASNLESGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAIYYCQQSNEDPPTFGGGTKVEIK (SEQ
ID NO: 13)

scFv的构建和针对人KV和231抗原的生物学活性的测试。扩增并合成FWJ_1和FWJ_2抗体基因的可变重链和轻链的克隆。编码scFv的基因是具有标准20氨基酸接头(Gly4Ser)3GGGAR (SEQ ID NO:14)的VH-接头-VL。用BssHII和NheI限制酶消化扩增基因并将其插入含有用于控制周质蛋白表达的pe1B启动子(Novagen, Madison, WI, USA)和用于通过金属亲和层析纯化的C端6x组氨酸tag的基于pET的载体(PAB-myc)并转化到DH5α菌株中。转化的克隆在含有氨苄青霉素肉汤的LB中扩增过夜。制备质粒DNA并送去DNA测序。将正确序列的scFv质粒转化到T7 Shuffle菌株中,并将转化的细菌用于周质区室中的可溶性蛋白质生产。

FWJ_1和FWJ_2_scFv基因和翻译的蛋白质:下图描绘了FWJ_1和FWJ_2_scFv的重链和轻链以及接头臂。在FWJ_1和FWJ_2_scFv基因的工程化中,两个表位标签被工程化至C端上:1)促进所编码的scFv通过镍亲和层析纯化的6His标签;和2)促进所表达的scFv快速免疫化学识别的myc标签。

scFv基因的最终人源化版本

人源化scFv-1 FWJ_humscFv-1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYSFTGYMHWVRQAPGKGLEWIGRVNPNSGGTSYNQK
FKDRATLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSKGNYFYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDSHGTSFMHWYQQKPGKAPKFLIYR
ASNLESGIPSRFSGSGSGTDFTLTISVQPEDFAVYYCQQSNEDPPTFGGGTKVEIK (SEQ
ID NO: 15)

>人源化scFv-1_nucleotide的密码子

CAGCGGCGCGCATGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGG
CAGCCTGAGGCTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACAGCTTCACCGGCTACTACATGCACTGGGT
GAGGCAGGCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAGGGTGAACCCCAACAGCGGCGGCAC
CAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGACAGGGCCACCCTGAGCGTGGACAACAGCAAGAACACCGC
CTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGCAA
GGGCAACTACTTCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGG
CGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGACATCCAGATGACCCAGAG
CCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGGGCCAGCGAGAG
CGTGACAGCCACGGCACCCAGCTTCATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAA
GTTCTGATCTACAGGGCCAGCAACCTGGAGAGCGGCATCCCCAGCAGGTTTCAGCGGCAGCGG
CAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTA
CTGCCAGCAGAGCAACGAGGACCCCCCACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG
GCTAGCGGTGC (SEQ ID NO: 16)

1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L 20
1 GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTG 60

21 S C K A S G Y S F T G Y Y M H W V R Q A 40
61 AGCTGCAAGGCCAGCGGCTACAGCTTCACCGGCTACTACATGCACTGGGTGAGGCAGGCC 120

41 P G K G L E W I G R V N P N S G G T S Y 60
121 CCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAGGGTGAACCCCAACAGCGGCGGCACCCAGCTAC 180

61 N Q K F K D R A T L S V D N S K N T A Y 80
181 AACCAGAAGTTCAAGGACAGGGCCACCCTGAGCGTGGACAACAGCAAGAACACCGCCTAC 240

81 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S K 100
241 CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGCAAG 300

101 G N Y F Y A M D Y W G Q G T L V T V S S 120
301 GGCAACTACTTCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC 360

121 G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M T 140
361 GCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGACATCCAGATGACC 420

141 Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A 160
421 CAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGGGCC 480

161 S E S V D S H G T S F M H W Y Q Q K P G 180
481 AGCGAGAGCGTGGACAGCCACGGCACCAGCTTCATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGC 540

181 K A P K F L I Y R A S N L E S G I P S R 200
541 AAGGCCCCCAAGTTCCTGATCTACAGGGCCAGCAACCTGGAGAGCGGCATCCCCAGCAGG 600

201 F S G S G S G T D F T L T I S S V Q P E 220
601 TTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCCGAG 660

221 D F A V Y Y C Q Q S N E D P P T F G G G 240
661 GACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGCAACGAGGACCCCCCACCTTCGGCGGCGGC 720
241 T K V E I K 246 (SEQ ID NO: 15)
721 ACCAAGGTGGAGATCAAG 738 (SEQ ID NO: 17)

人源化FWJ_humscFv-2

EVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCKASGYSFTGYMHWVRQASGKGLEWIGRVNPNSGGTSYNQK
FKDRFTISRDKSISTLYLQMSLRSEDTAVYYCARSKGNIFYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSG
GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVISCRASESVD SHGTSFMHWYQQKPGKSPKFLIYR
ASNLESGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAIYYCQQSNEDPPTFGGGTKVEIK (SEQ
ID NO: 18)

>>人源化scFv-2_nucleotide的密码子

CAGCGGCGCGCATGCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGG
CAGCCTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACAGCTTCACCGGCTACTACATGCACTGGGT
GAGGCAGGCCAGCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAGGGTGAACCCCAACAGCGGCGGCAC
CAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGACAGGTTACCATCAGCAGGGACAAGAGCATCAGCACCCCT
GTACCTGCAGATGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGCAA
GGGCAACTACTTCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGG
CGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGACATCCAGATGACCCAGAG
CCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCAGCTGCAGGGCCAGCGAGAG
CGTGGACAGCCACGGCACCAGCTTCATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAA
GTTCTGATCTACAGGGCCAGCAACCTGGAGAGCGGCATCCCCAGCAGGTTTCAGCGGCAGCGG
CAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCATCTACTA
CTGCCAGCAGAGCAACGAGGACCCCCCACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGC
TAGCGGTGC (SEQ ID NO: 19)

1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K V 20
1 GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCCTGAAGGTG 60

21 S C K A S G Y S F T G Y Y M H W V R Q A 40
61 AGCTGCAAGGCCAGCGGCTACAGCTTCACCGGCTACTACATGCACTGGGTGAGGCAGGCC 120

41 S G K G L E W I G R V N P N S G G T S Y 60
121 AGCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAGGGTGAACCCCAACAGCGGCGGCACCAGCTAC 180

61 N Q K F K D R F T I S R D K S I S T L Y 80
181 AACCAGAAGTTCAAGGACAGGTTACCATCAGCAGGGACAAGAGCATCAGCACCCCTGTAC 240

81 L Q M S S L R S E D T A V Y Y C A R S K 100
241 CTGCAGATGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGCAAG 300

101 G N Y F Y A M D Y W G Q G T L V T V S S 120
301 GGCAACTACTTCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC 360

121 G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M T 140
361 GGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGACATCCAGATGACC 420

141 Q S P S S L S A S V G D R V T I S C R A 160
421 CAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCAGCTGCAGGGCC 480

161 S E S V D S H G T S F M H W Y Q Q K P G 180
481 AGCGAGAGCGTGGACAGCCACGGCACCAGCTTCATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGC 540

181 K S P K F L I Y R A S N L E S G I P S R 200
541 AAGAGCCCCAAGTTCCTGATCTACAGGGCCAGCAACCTGGAGAGCGGCATCCCCAGCAGG 600

201 F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E 220
601 TTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAG 660

221 D F A I Y Y C Q Q S N E D P P T F G G G 240
661 GACTTCGCCATCTACTACTGCCAGCAGAGCAACGAGGACCCCCCACCTTCGGCGGCGGC 720

241 T K V E I K 246 (SEQ ID NO: 18)
721 ACCAAGGTGGAGATCAAG 738 (SEQ ID NO: 20)

在细菌宿主中诱导ScFv蛋白:将FWJ_1和FWJ_2 scFv克隆转化到T7 shuffle菌株中。T7 shuffle细胞在1.4L 2xYT加氨苄青霉素培养基中生长直到对数期(OD600=0.5),用0.3mM的IPTG诱导,并允许在30℃再生长16h。诱导后,通过4℃下以8000g离心15min收获细

菌,并沉淀物在-20℃中储存至少2小时。将冷冻的沉淀物短暂解冻并悬浮在40ml裂解缓冲液中(PBS中的1mg/ml溶菌酶加不含EDTA的蛋白酶抑制剂混合物(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)。裂解混合物在冰上孵育1小时,然后加入10mM MgCl₂和1μg/ml DNase I,并在25℃孵育该混合物20min。在12000g离心20min最终裂解混合物并收集上清液。将该上清液称为用于镍柱亲和层析的周质提取物。

使用FWJ_1和FWJ_2_scFv蛋白的蛋白质印迹分析:使用裂解物Ag和KSU蛋白作为斑点印迹分析中的抗原靶点。将作为非还原条件的2-5ugAg蛋白和作为阴性对照的1ug纯化蛋白加载到硝酸纤维素膜上。在室温下使用PBS中的3%脱脂乳封闭膜3小时。之后,将膜与FWJ_1和FWJ_2_scFv蛋白的周质提取物在4℃下孵育过夜。用含0.05%吐温20缓冲液(PBST)的磷酸钠缓冲盐水洗涤膜3次。洗涤的膜与抗c-Myc小鼠IgG室温孵育1h以识别scFv上的c-Myc标签并鉴定scFv结合的抗原的位置。用PBST洗涤后,用在PBS中稀释(1:3000)的山羊抗小鼠IgG(H+L)HRP缀合物室温孵育膜1h,并用TMB底物的混合物可视化特异性免疫反应性条带。

发明人鉴定抗-HERV-K mAb 6H5重链CDR(H-CDR1 30-35、H-CDR2 47-58、H-CDR3 93-101),和轻链CDR(L-CDR1 30-36、L-CDR2 46-55和L-CDR3 89-96)并将它们接枝到选定的示出最高氨基酸序列同一性的人框架(FR)上以优化给定抗体的人源性。V-quest(http://www.imgt.org/IMGT_vquest)和Ig-BLAST服务器(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>)独立鉴定在人和鼠VH和VL间的框架区示出最高氨基酸序列相似性的人免疫球蛋白种系序列。用人类残基取代与共有人FR不同的鼠VH和VL的FR中的氨基酸序列,同时保留称为Vernier区残基和链堆积残基的位置处的小鼠残基。扩增并合成候选人源化抗体基因的VH和VL链的克隆。将编码scFv的基因,其包括具有标准20氨基酸接头(Gly4Ser)3GGGAR的VH-接头-VL,插入含有用于控制周质蛋白表达的pe1B启动子(Novagen, Madison, WI)和用于通过金属亲和层析进行纯化的C端6x组氨酸标签以及为了促进表达的scFv快速免疫化学识别的myc标签的基于pET的载体(PAB-myc)。使用scFv质粒的正确序列生产周质隔室中的可溶性蛋白质。选择了两个hu6H5克隆(FWJ1和FWJ2)并确定了对抗原的结合亲和力。这些克隆都能结合重组HERV-K Env表面融合蛋白(KSU)和MDA-MB-231乳腺癌细胞的裂解物产生的抗原。

将具有人IgG1的HuVH或HuVL克隆到pcDNA 3.4载体中以产生VH-CH(人IgG1)或VL-CL(人κ)。将质粒瞬时转染到Expi293细胞中用于哺乳动物表达。H链与L链质粒的比例为2:3。使用蛋白印迹确定表达,并在还原条件下检测到预测的49/23kDa的MW(H链/L链)(图1)。

进一步采用按尺寸和/或分子量的体积排阻色谱(SEC)分离以确定蛋白表达(图2)。最后,使用内毒素水平<1EU/mg的人源化6H5抗体(纯度>95%)来确定体外和体内的抗肿瘤作用。

使用ELISA测定来比较hu6H5相对于m6H5的抗原结合敏感性和特异性。未检测到这两个参数之间存在显著差异。

使用细胞凋亡测定比较hu6H5和m6H5杀伤癌细胞的功效。使用各自的抗体(1或10μg/ml)处理MDA-MB-231乳腺癌细胞4小时和24小时(图4)。将未用抗体处理或用mIgG或人IgG处理的细胞用作对照。结果示出hu6H5在杀伤这些乳腺癌细胞上有与m6H5相似的效果。为了进一步评价细胞杀伤的功效,用多种抗体(10μg/ml)处理MDA-MB-231细胞。使用活/死细胞

共染色活力测定鉴定活细胞(绿色;Calcein Am)和假定的死细胞(红色;EthD-1)(图5),并且结果示出hu6H5在杀伤乳腺癌细胞上有类似于m6H5的有效性。此外,使用MTT(3-(4,5--二甲基噻唑-2-基)-2,5--二苯基四唑溴化物)测定来确认hu6H5可以抑制癌细胞生长(图6)。使用ADCC确定BC细胞杀伤的机制,并且我们的结果支持效应细胞介导的裂解抗体包被靶细胞的细胞毒性分子的分泌(图7)。

采用流式细胞术来确定hu6H5是否可以下调p-ERK、Ras和SIRT-1的表达。用10 μ g/ml hu6H5处理231C或231K细胞16小时。HERV-K、SIRT-1(图8A)、p-ERK和Ras(图8B)在perm和非perm下的两种细胞中的表达。在用hu6H5处理的231K或231C中证实了HERV-K、p-ERK、Ras和SIRT-1的表达下调。

重链序列:信号肽-VH-CH(人IgG1)

```
CGCGCCGCAAACCTACAAGACAGACTTGCAAAAAGAAGGCATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTT
GCCTGGTCCTCCTGACTGGGGTGAGGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGGGGGGGACTGG
TGCAGCCAGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGTAAGGCTTCAGGATACAGCTTCACAGGGTACT
ATATGCACTGGGTGAGACAGGCCCCCGAAAAGGACTGGAGTGGATCGGCAGAGTGAACCCCA
ACAGCGGAGGCACCAGCTACAACCAGAAATTCAAGGACCGGGCCACCCTGAGCGTGGACAACA
GCAAAAACACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT
GTGCCAGAAGCAAGGGCAACTACTTCTACGCCATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGA
CCGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCA
CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG
TGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT
CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT
ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT
CTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAG
TCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG
TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGA
CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA
GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC
ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATTCT
AGA (SEQ ID NO: 41)
```

氨基酸序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYSFTGYMHVVRQAPGKGLEWIGRVNPNSGGTSYNQK
FKDRATLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSKGNFYAMDYWGQGTLLTVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)

轻链序列:信号肽-VL-CL(人Kappa)

GCGGCCGCAAACTACAAGACAGACTTGCAAAAGAAGGCATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTT
GCCTGGTCCTCCTGACTGGGGTGAGGGCCGACATTCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA
GCGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGCAGAGCCAGCGAGAGCGTGGACAGCCATG
GCACCTCCTTTATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCAAATTCCTGATTTACA
GAGCCAGCAACCTGGAGAGCGGCATCCCCTCAAGATTCTCAGGCAGCGGAAGCGGAACCGACT
TCACACTGACTATCAGCAGCGTGACAGCCGAAGATTTTGCTGTGTACTACTGCCAGCAGAGCA
ACGAAGATCCTCCTACCTTCGGGGGCGGCACTAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCAC
CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGT
GCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC
AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCA
GCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA
CCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGATTCTAGA
(SEQ ID NO: 43)

氨基酸序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVDSHGTSFMHWYQQKPGKAPKFLIYRASNLSEGP
SRFSGSGSGTDFTLTISVQPEDFAVYYCQQSNEDPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 44)

pLVXK是HERV-K表达载体,并且MDA-MB-231 pLVXK是用pLVXK转导的MDA-MB-231细胞。另外,pLVXC是仅对照表达载体,而MDA-MB-231 pLVXK是用pLVXC转导的MDA-MB-231细胞。用MDA-MB-231 pLVXC(231-C;皮下,200万个细胞)与MDA-MB-231 pLVXK(231-K;皮下,200万个细胞)接种NSG雌性小鼠(8周龄)。在第6天,用hu6H5处理小鼠(4mg/kg腹膜内,每周两次,持续3周)。每隔一天监视并测量肿瘤生长。在不同的时间间隔存活的小鼠的百分比示于图9A中。在携带用抗体处理过的231-C和231-K细胞的小鼠中显示出存活更高。从每只小鼠中收集肿瘤和肺组织。在一些携带231-K细胞的小鼠中检测到更大的淋巴结,但在携带231-C细胞的小鼠中未检测到。

进一步使用苏木精和伊红(H&E)染色以评估肿瘤组织(图9)和其他器官组织(肺和淋巴结;图10)的形态学特征。肿瘤活力和肿瘤坏死由病理学家通过测量H&E染色的肿瘤面积来量化。人源化抗体治疗导致更小的肿瘤体积、更少的肿瘤局灶性和数量、更少的浸润性

边界和减少的有丝分裂活动。在携带231-C细胞(图9B)或用抗体处理的231-K细胞(图10B)的小鼠中观察到肿瘤活力百分比减少。相对于它们的对照,在用hu6H5处理的231C(图9B)或231K细胞(图9C)中证实了肿瘤变异性降低。使用抗Ki67和抗HERV-KmAb(图9D)。与对照(60%;上小图;图9B)相比,在用hu6H5(20%;下小图)处理的小鼠中证实了肿瘤活力减少。抗体治疗组外观较均一,有较少的多形性细胞核和较少的核仁并且肿瘤浸润淋巴细胞的数量明显增多。

在从携带231-K细胞的小鼠获得的肺组织中也发现了转移性肿瘤细胞,但在携带231-C细胞的小鼠中没有发现(图10A)。相比于那些未用抗体处理的小鼠(图10B),在携带用抗体处理过的231-K的小鼠的肺中观察到肿瘤活力百分比的减少。仅在接种231K细胞的小鼠中检测到转移性淋巴结(图10C)。在携带231-K细胞的小鼠的淋巴结中检测到超过95%的肿瘤活力(图10C;>95%;上小图)并且相比于未用抗体处理的小鼠(图10D),在用抗体处理的小鼠的淋巴结中观察到肿瘤活力百分比减少(图10C;>95%;下小图)。在没有抗体处理的携带231K或231C肿瘤的小鼠中证实有腹水。

实施例2:

双特异性T细胞衔接器(BiTE)靶向HERV-K的功效

产生了针对T细胞CD3或CD8和肿瘤相关抗原HERV-K的BiTE,其由靶向CD3或CD8和HERV-K的抗体组成。这种BiTE示出对表达载有HERV-K表位的主要组织相容性类(MHC)分子的MDA-MB-231乳腺癌细胞引发干扰素- γ (IFN- γ)细胞毒活性,用BiTE处理后IFN- γ 表达增加20-30倍(图11)。

BiTE是一种重组蛋白,构建为将T细胞重定向至肿瘤细胞的单链抗体构建体,并且不需要通过抗原呈递细胞扩增内源性T细胞。参见科学文献50。BiTE分子可以直接施用于患者,并且BiTE介导的T细胞激活不依赖于MHC I类分子的存在,CAR也是如此。鉴于靶向HERV-K Env作为肿瘤相关抗原(TAA)的成功,以及几乎所有乳腺癌细胞系都表达Kenv蛋白,发明人假设Kenv和CD3特异性的BiTE(K3Bi)如K-CAR一样有效治疗转移性疾病。发明人已设计并合成有Kenv和CD3双重特异性的K3Bi。因此,引导T细胞以靶向HERV-K+肿瘤细胞。发明人已经生成、纯化并验证了K3Bi和CD8BiTE(K8Bi)。这是使用也用于CAR构建体(科学文献33)的mAb 6H5和OKT3完成的,且OKT3是一种以前用于其他BiTE的抗人CD3抗体(它是人源化的,并与一个柔性接头和用于纯化和染色的两个C端表位标签(MYC和FLAG)连接)。在发明人的实验室中生成从OKT8杂交瘤细胞获得的CD8单链抗体(scFv)并用于生产K8Bi(VL-VH6H5接头VH-VLCD8-MYC和FLAG)。将K3Bi和K8Bi克隆到pLJM1-EGFP Lenti或pGEX-6P-1载体中用于重组蛋白表达。通过几种免疫测定确定K3Bi或K8Bi结合T细胞和HERV-K+乳腺癌细胞系的能力。发明人发现随着BiTE浓度的增加,与BiTE结合的靶细胞数量增加。

发明人还检查了K3Bi诱导T细胞激活、增殖、产生细胞因子和裂解靶肿瘤细胞的能力。来自健康对照的大量PBMC(每孔50,000个)与K3Bi(0、1、10、100和1,000ng/ml)和肿瘤细胞(每孔5,000个)共培养,以实现如科学参考文献51所述的效应细胞:靶细胞比例为10:1。图12中示出一个结果。相比于没有K3Bi的PBMC+MCF-7,PBMC+MCF-7+K3Bi展示出增加的肿瘤细胞杀伤。正如本发明人之前所做的,用LDH释放测定检测细胞活力和细胞毒性。参见科学文献33。在用K3Bi处理的MDA-MB-231、MDA-MB-468和MCF-7细胞中通过ELISA测定观察到产生增强的IFN- γ (图12C)。未处理细胞、仅PBMC组或仅BiTE组作为对照,并且在这些对照组

中未观察到产生IFN- γ 。

此外,用PBMC和CD3 HERV-K BiTE加IL-2或CD8 HERV-K BiTE加PBMC加IL-2治疗携带HERV-K阳性MDA-MB-231乳腺癌细胞的免疫缺陷NSG小鼠导致肿瘤生长大大减少(图13)。

实施例3:

CAR-A和CAR-B慢病毒载体转导的正常供体PBMC染色结果

用两种CAR-T慢病毒载体构建体K-CAR-A (CAR-A) 或K-CAR B (CAR-B)、带psPAX2和pMD2g的pWPT-GFP转导来自正常供体的PBMC。VH-VLhu6H5-CD8-CD28-4-1BB-CD3zeta。通过替代睡美人转导过程(即慢病毒转导)生成HERV-Kenv CAR-T细胞的方案如下:

1. 解冻PBMC (2×10^7) 并通过塑料吸附消减单核细胞 (37°C 孵育1小时, 5% CO₂)。
2. 在补充有10% FBS、100U/mL 盘尼西林、100 μg /mL 链霉素的RPMI1640 (完全培养基) 中培养消减单核细胞的PBMC。用抗CD3/CD28珠以珠:细胞为3:1的比例用40IU/mL的IL-2刺激T细胞24h。
3. 用CAR-A或CAR-B转导激活的T细胞 (CD19 CAR作为对照)。
4. 转导后24小时, 在含有300IU/mL IL-2和 γ -辐照 (100Gy) 的MDA-MB-231-Kenv (Kenv是HERV-K的包膜蛋白) aAPC的完全培养基中以aAPC/T细胞为2:1的比例培养T细胞以刺激CAR-T细胞增殖。使用 γ -辐照过的K562-CD19作为对照aAPC。
5. 在第5天去除抗CD3/CD28珠。每两到三天用含有IL-2的新鲜培养基补充CAR-T细胞。
6. 当增殖示出从对数期降低时使用CAR-T细胞进行进一步的实验。

CAR-A或CAR-B转导细胞与 γ 辐照 (100Gy) 的MDA MB 231抗原呈递细胞共培养。其他每一天都加入可溶IL-2细胞因子 (50U/mL)。在第14天收获用于染色的细胞。首先在 4°C 下用1:1000稀释的BV450活和死染料对它们染色20分钟。在20min后, 洗涤细胞并根据制造者的推荐用K10-AF 488蛋白 (1 μg /mL)、CD4 Amcyan、CD3 Pe cy7和山羊抗人IgG Fc AF 594抗体在 4°C 染色30min并用PBS洗涤。细胞用4% PFA固定15-30分钟, 并在于流式细胞仪中分析前洗涤。样品呈GFP阳性, 因为它们是用GFP+CAR-A/CAR-B转染的。

CD4+细胞的百分比通过门控BV450阴性和相应颜色阳性的那些群体来确定。CD4-ve (被称为CD8+ve细胞) 的百分比通过选择BV450阴性和CD4Amcyan颜色阳性的那些群体来门控。用K10标记的AF488蛋白染色的转导CAR-A/CAR-B的CD4+ve PBMC的百分比高于用K10标记的AF488蛋白染色的幼稚T细胞的百分比 (图14)。这示出用CAR-A或CAR-B转导的T细胞被HERV-K10蛋白染色。

表达携带人源化或全人HERV-K scFv的慢病毒CAR表达载体的T细胞将有效地裂解并杀死来自几种不同癌症的肿瘤细胞。慢病毒载体表达的人源化的K-CAR是泛癌症CAR-T。

实施例4:

HERV-K特异性人源化嵌合抗原受体 (K-CAR) 疗法

发明人产生了人源化单链可变片段 (scFv) 抗体 (实施例1), 它能够与从重组HERV-K Env表面融合蛋白 (KSU) (上文实施例3) 和MDA-MB-231乳腺癌细胞裂解物产生的抗原结合。从这种人源化scFv产生的CAR被克隆到慢病毒载体中, 并与疗法联合使用, 该疗法包括但不限于K-CAR T细胞+检查点抑制剂、促炎细胞因子, 如白细胞介素 (IL) -12和IL-18、溶瘤病毒和激酶抑制剂 (包括但不限于p-RSK、p-ERK)。

实施例5:

从非常罕见的展示出强靶向特异性和高灵敏度的B细胞鉴定人治疗性抗体(hTAb)

从人适应性免疫系统生成全人治疗性抗体:为了直接使用来自乳腺癌患者的B细胞作为高亲和力抗体的来源,发明人用HERV-K Env重组融合蛋白(发明人使用其检测来自几个不同的乳腺癌患者的抗HERV-K Env特异应答)进行了间接ELISA或免疫印迹。选择抗HERV-K抗体滴度较高的患者进行单B细胞实验。来自乳腺癌患者的PBMC经多克隆激活:1)使用辐照的3T3-CD40L成纤维细胞持续2周。该方法可以高效刺激并以高纯度(>90%)大量扩增CD40-B细胞并诱导其抗体分泌;和2)用重组人IL-21、IL-2、可溶性CD40配体和抗AP01离体4天。第二种方法可以使用最少的培养时间确保最高百分比的B细胞分泌。已知IL-21可促进向抗体分泌细胞的分化。参见科学文献53、54。体外IL-2刺激可引发人浆细胞分化,其需要适当的T细胞帮助以达到诱导阈值。参见科学文献55。sCD40L与B细胞细胞表面表达的CD40衔接以模拟T细胞介导的激活。参见科学文献56。由于激活也会诱导细胞死亡,因此使用抗AP01从Fas诱导的细胞凋亡中挽救B细胞。参见科学文献57。几乎没有检测到细胞毒性B细胞。

研发平台以确定微孔板中每个细胞的结合动力学和细胞与细胞相互作用。显微雕刻过程(其能够随着时间的推移筛选和监测B细胞相互作用,从而能够对产生抗体的B细胞进行单细胞克隆)的细节显示在图15A中。在聚二甲基硅氧烷(PDMS)中制造纳米孔阵列,并且使用在发明人实验室中产生和培养的来自患者乳腺肿瘤组织的乳腺球的细胞(图15B;左图)作为靶标来确定乳腺癌细胞的杀伤功效。将来自同一供体的B细胞和乳腺球细胞(1:1比例)加载到纳米孔阵列(每孔1个细胞)上,并允许细胞通过重力沉降(图15B中图)。死肿瘤细胞(红色)和B细胞显示在同一孔中(图15B)。在玻璃盖玻片的相同位置检测到由该B细胞产生的抗HERV-K抗体(右图,红色方块)。然后通过CellCelector(图15C)挑选单个B细胞用于RT-PCR。我们的结果表明,HERV-K特异性记忆B细胞表现出抗HERV-K抗体表达以及对其自体乳腺细胞球的细胞毒性。

使用体内富集(IVE)适应的治疗性抗体发现:我们的平台将能够分离出不仅能结合靶癌细胞还能杀死该细胞的抗体。它还将允许使用没有记忆B细胞的正常供体代替乳腺癌患者供体来生成hTAb。由于能够产生用于治疗的治疗性抗体的B细胞即使在离体富集后也极为罕见,因此发明人开发了以下平台来鉴定非常罕见的hTAb:

在第1天免疫野生型Balb/c小鼠(雌性,6周龄)的组(N=10/组),并在第3周和第5周加强。用ELISPOT确定从免疫小鼠获得的CD8+T细胞的IFN- γ 分泌(图16A)。使用(图16B、16C和16D)以检测免疫小鼠血清中抗HERV-K IgG的滴度。

实施例5.1:在SCID/beige小鼠中采用体内富集技术(IVE:约20倍增强),允许快速扩增和B细胞激活,目标是产生大量抗原特异性浆母细胞。参见图11A。该平台将在最短8天的时间内从B细胞产生全人抗体。作为原理证明,发明人开发了在从与MFP-2伴侣细胞融合第8天的脾细胞生成的杂交瘤细胞中产生全人抗寨卡病毒抗体的IVE技术(图17A和图17B)。

最近,通过静脉内注射CD34+细胞($1-2 \times 10^5$ /小鼠)用于生成HM并用HERV-K SU或PD-L1重组融合蛋白免疫,成功生成了人源化小鼠(HM)和人肿瘤小鼠(HTM)。发明人还在乳腺脂肪垫中共同植入CD34+造血干细胞和 $5 \times 10^4-3 \times 10^6$ 个乳腺癌细胞三阴性乳腺癌患者衍生异种移植物(TNBC PDX细胞,或MDA-MB-231或MDA-MB-468TNBC细胞)用于生成HTM。在用CD34

细胞接种后较长时间后, hCD19或hCD45细胞的百分比在小鼠中更高(图18A和图18B)。暴露于抗原与肿瘤中的HERV-K表达相关, 并且检测到更高的抗体滴度(HTM 2:40天对比HTM 1:30天;图18C和图18D)。重要的是, 这说明HTM可以在接种乳腺癌细胞的小鼠中产生抗HERV-K抗体。这一发现促使我们探索使用HM或/和HTM来生成完全hTAb, 尤其是使用从未接触过抗原的正常供体。认为缺乏T、B和NK细胞活性的NSG小鼠是建立HM的理想候选者。最近开发了人CD45+细胞植入率高于早期研究(图18B)且没有任何显著毒性的小鼠。

方案1.对于具有更高抗体滴度的癌症的供体, 发明人使用如图17A中的方案使用HM代替SCID/beige小鼠。通过IL-21、IL-2、可溶性CD40配体和抗AP01来多克隆激活来自乳腺癌患者的PBMC(50x10⁶), 并与抗原(HERV-K或PD-L1;100g)预混合。将使用EasySep™人B细胞富集试剂盒(Stemcell Technologies)通过阴性选择从上述PBMC中分离的B细胞与CD34+细胞共注射到用白消安处理的小鼠中。参见科学文献61。在第0天(Fisher:腹膜内30mg/kg)。用细胞因子混合物(第1、4和7天)处理小鼠, 并在第2天用抗原加强。该方案可以相对快的完成(8天)。

方案2.对于未患癌症且没有记忆B细胞的正常供体, 发明人使用经过修改的方案1:用细胞因子混合物(第1、7和14天)处理小鼠, 并在第14和21天用抗原加强。从小鼠收集血清并通过ELISA测试结合亲和力。在检测到抗体滴度增加后, 收获、分析脾脏并用于制备杂交瘤。使用IVE方案2的小鼠在第2周检测到更高的抗体滴度。

实施例5.2.IVE后, 收获一半脾脏用于流式细胞术分析、显微雕刻和其他分析。B细胞表面和细胞内标志物及CFSE标记的流式细胞术分析(Invitrogen CellTrace CFSE试剂盒)使用以下方法进行:与FITC、PE、PECy5、PECy7、Alexa 700或别藻蓝蛋白缀合的小鼠IgG1k的抗CD19 PECy5、抗CD27别藻蓝蛋白、抗CD38 PECy7、抗IgG FITC或抗IgM PE同种型对照(均来自BD Bioscience)。使用负磁免疫亲和珠分离(Miltenyi Biotec)从脾脏中分离总CD19+B细胞, 并在存在重组人B细胞激活因子(BAFF;75ng/ml;GenScript)、IL-2(20IU/ml)、IL-10(50ng/ml)和IL-15(10ng/ml)(均来自BD Biosciences)的情况下用CpG2006(10ng/ml;Oligos, Inc.)刺激72小时。使用我们的多孔显微雕刻平台(多达400,000个孔:图15), 以它们的自体肿瘤细胞或HERV-K+TNBC细胞作为靶细胞, 确定直接来自方案1或2的肿瘤杀伤B细胞。如图15中所示鉴定了不仅产生抗体还能结合抗原并杀伤癌症细胞的细胞。

实施例5.3.发明人随后开发了人杂交瘤细胞以确保抗体的长期可用性。为了开发全人杂交瘤, 使用MFP-2细胞作为伴侣, 使用ClonaCell™-HY(Stemcell Technologies Inc.,)按照它们的方案与剩余的一半脾脏一起生成杂交瘤。使用聚乙二醇(PEG)融合人淋巴细胞与MFP-2细胞, 并使用该试剂盒中基于甲基纤维素的半固体培养基克隆和选择杂交瘤细胞。将选择后长出的克隆移入96孔板中, 并通过ELISA筛选对HERV-K Env蛋白的反应性。使用来自Thermo Fisher Scientific的人IgG抗体同种型分析试剂盒确定阳性克隆的同种型。然后使克隆适应无血清培养基条件并扩增。收获杂交瘤上清液, 并取决于人抗体的同种型使用Hi-Trap蛋白A或蛋白G柱纯化抗体。已知蛋白A柱与同种型IgG1、2和4抗体具有高亲和力, 并且与同种型IgM抗体具有可变结合, 而已知蛋白G柱与同种型IgG1、2、3和4抗体具有高结合力, 但不结合IgM抗体。

实施例5.4.发明人在体外评估了从上述方案获得的候选B细胞的抗肿瘤功效, 包括对细胞生长、增殖和凋亡的影响, 正如发明人在我们的实验室中常规所做的那样。还完成

了评估hTAb在免疫缺陷小鼠模型中功效的体内研究以评估功效,使用乳腺癌细胞系和原发性肿瘤细胞,并与匹配的无关对照乳腺细胞进行比较。

实施例6:

联合疗法

发明人的乳腺癌数据来自强烈支持涉及HERV-K的联合治疗方法的潜力。因此,靶向HERV-K的人源化和全人抗体将增强检查点阻断抗体的治疗功效。有效的组合癌症疗法包括但不限于以下的组合:(a) HERV-K hTAb(1.5mg/kg)、(b) K-CAT、(c) K-BiTE、(d) HERV-K shRNA或CRISPR/Cas9基因组编辑技术以敲低HERV-K基因表达、(e) 或预防性或治疗性HERV-K疫苗,包括全长和截短的HERV-K Env蛋白和HERV-K Env肽,和(a) 抗ICP抗体(图19)、(b) 癌症化疗、(c) 5-氮杂胞苷、5-氮杂-2'-脱氧胞苷或其他表观遗传调节剂,如DNA甲基转移酶抑制剂(DNMTi) 和组蛋白脱乙酰酶抑制剂(HDACi)、(d) EMT抑制剂,(e) 细胞迁移或侵袭抑制剂,(f) 诱导S或G2期细胞周期停滞,(g) PI3K/AKT/mTOR或MAPK/ERK信号传导途径的抑制剂,或(h) 信号转导至HIF1 α 。

实施例7:

抗CD3和CD8 BiTE序列数据

OKT8重链(抗CD8 mAb序列)>H1

```
ttt gag gtc cag ctg cag cag tct ggg gca gag ctt gtg aag cca ggg gcc tca gtc aag
F E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K
ttg tcc tgc aca gct tct ggc ttc aac att aaa gac acc tat ata cac ttc gtg agg cag
L S C T A S G F N I K D T Y I H F V R Q
agg cct gaa cag ggc ctg gag tgg att gga agg att gat cct gcg aat gat aat act tta
R P E Q G L E W I G R I D P A N D N T L
tat gcc tca aag ttc cag ggc aag gcc act ata aca gca gac aca tca tcc aac aca gcc
Y A S K F Q G K A T I T A D T S S N T A
tac atg cac ctc tgc agc ctg aca tct ggg gac act gcc gtc tat tac tgt ggt aga ggt
Y M H L C S L T S G D T A V Y Y C G R G
tat ggt tac tac gta ttt gac cac ttg ggc caa ggc nnt nnn nnt nnc ann ntn nnn nnn
Y G Y Y V F D H L G Q G X X X X X X X X
```

(SEQ ID NO:21)

(SEQ ID NO:22)

>H3

```
tnt cag gtg cag ctg aag cag tct ggg gca gag ctt gtg aag cca ggg gcc tca gtc aag
X Q V Q L K Q S G A E L V K P G A S V K
ttg tcc tgc aca gct tct ggc ttc aac att aaa gac acc tat ata cac ttc gtg agg cag
L S C T A S G F N I K D T Y I H F V R Q
agg cct gaa cag ggc ctg gag tgg att gga agg att gat cct gcg aat gat aat act tta
R P E Q G L E W I G R I D P A N D N T L
tat gcc tca aag ttc cag ggc aag gcc act ata aca gca gac aca tca tcc aac aca gcc
Y A S K F Q G K A T I T A D T S S N T A
tac atg cac ctc tgc agc ctg aca tct ggg gac act gcc gtc tat tac tgt ggt aga ggt
Y M H L C S L T S G D T A V Y Y C G R G
tat ggt tac tac gta ttt gac cac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca ntn ncn nnn
Y G Y Y V F D H W G Q G T T L T X X X
```

(SEQ ID NO:23)

(SEQ ID NO:24)

>H6

```
ttt gag gtc cag ctg cag cag tct ggg gca gag ctt gtg aag cca ggg gcc tca gtc aag
F E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K
ttg tcc tgc aca gct tct ggc ttc aac att aaa gac acc tat ata cac ttc gtg agg cag
L S C T A S G F N I K D T Y I H F V R Q
agg cct gaa cag ggc ctg gag tgg att gga agg att gat cct gcg aat gat aat act tta
R P E Q G L E W I G R I D P A N D N T L
tat gcc tca aag ttc cag ggc aag gcc act ata aca gca gac aca tca tcc aac aca gcc
Y A S K F Q G K A T I T A D T S S N T A
tac atg cac ctc tgc agc ctg aca tct ggg gac act gcc gtc tat tac tgt ggt aga ggt
Y M H L C S L T S G D T A V Y Y C G R G
tat ggt tac tac gta ttt gac cac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca ntn ncn nna
Y G Y Y V F D H W G Q G T T L T X X X
```

(SEQ ID NO:25)

(SEQ ID NO:26)

>H7

```
tcag gtc caa ctg cag cag cct ggg gca gag ctt gtg aag cca ggg gcc tca gtc aag ttg
Q V Q L Q Q P G A E L V K P G A S V K L
tcc tgc aca gct tct ggc ttc aac att aaa gac acc tat ata cac ttc gtg agg cag agg
S C T A S G F N I K D T Y I H F V R Q R
cct gaa cag ggc ctg gag tgg att gga agg att gat cct gcg aat gat aat act tta tat
P E Q G L E W I G R I D P A N D N T L Y
gcc tca aag ttc cag ggc aag gcc act ata aca gca gac aca tca tcc aac aca gcc tac
A S K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y
atg cac ctc tgc agc ctg aca tct ggg gac act gcc gtc tat tac tgt ggt aga ggt tat
M H L C S L T S G D T A V Y Y C G R G Y
ggt tac tac gta ttt gac cac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca tnt nnn
G Y Y V F D H W G Q G T T L T X X
```

比对

H3	TNTCAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAG	60
H6	TTTGAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAG	60
H7	--TCAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAG	58
H1	TTTGAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAG	60
	* **** *.***.***** *****	
H3	TTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATACACTTCGTGAGGCAG	120
H6	TTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATACACTTCGTGAGGCAG	120
H7	TTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATACACTTCGTGAGGCAG	118
H1	TTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATACACTTCGTGAGGCAG	120

H3	AGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGATAATACTTTA	180
H6	AGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGATAATACTTTA	180
H7	AGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGATAATACTTTA	178
H1	AGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGATAATACTTTA	180

H3	TATGCCTCAAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCATCCAACACAGCC	240
H6	TATGCCTCAAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCATCCAACACAGCC	240
H7	TATGCCTCAAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCATCCAACACAGCC	238
H1	TATGCCTCAAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCATCCAACACAGCC	240

H3	TACATGCACCTCTGCAGCCTGACATCTGGGGACACTGCCGTCTATTACTGTGGTAGAGGT	300
H6	TACATGCACCTCTGCAGCCTGACATCTGGGGACACTGCCGTCTATTACTGTGGTAGAGGT	300
H7	TACATGCACCTCTGCAGCCTGACATCTGGGGACACTGCCGTCTATTACTGTGGTAGAGGT	298
H1	TACATGCACCTCTGCAGCCTGACATCTGGGGACACTGCCGTCTATTACTGTGGTAGAGGT	300

H3	TATGGTTACTACGTATTTGAC-CACTGGGGCCAAGGCACCAC---TCTCACANTNNCNNN	356
H6	TATGGTTACTACGTATTTGAC-CACTGGGGCCAAGGCACCAC---TCTCACANTNNCNNN	356
H7	TATGGTTACTACGTATTTGAC-CACTGGGGCCAAGGCACCAC---TCTCACATNTNNNTN	354
H1	TATGGTTACTACGTATTTGACTCACTTGGGCCAAGGCNNTNNNNNTNNCANNNTNNNNNN	360
	***** ***** * .** ...* *.*	
H3	N- 357 (SEQ ID NO:24)	
H6	A- 357 (SEQ ID NO:26)	
H7	-- (SEQ ID NO:28)	
H1	NN 362 (SEQ ID NO:22)	

OKT8 Kappa链:>K4

tttt gac att gtg ctg acc caa tct cct gct tcc tta gct gta tct ctg ggg cag agg gcc
F D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A
acc atc tca tac agg gcc agc aaa agt gtc agt aca tct ggc tat agt tat atg cac tgg
T I S Y R A S K S V S T S G Y S Y M H W
aac caa cag aaa cca gga cag cca ccc aga ctc ctc atc tat ctt gta tcc aac cta gaa
N Q Q K P G Q P P R L L I Y L V S N L E
tct ggg gtc cct gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc aac atc
S G V P A R F S G S G S G T D F T L N I
cat cct gtg gag gag gag gat gct gca acc tat tac tgt cag cac att agg gag ctt aca
H P V E E E D A A T Y Y C Q H I R E L T
cgt tcg gag ggg gac caa gcn nnn nnn (SEQ ID NO:29)
R S E G D Q X X X (SEQ ID NO:30)

>K6

tntt gat att gtg cta act cag tct cct gct tcc tta gct gta tct ctg ggg cag agg gcc
X D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A
acc atc tca tac agg gcc agc aaa agt gtc agt aca tct ggc tat agt tat atg cac tgg
T I S Y R A S K S V S T S G Y S Y M H W
aac caa cag aaa cca gga cag cca ccc aga ctc ctc atc tat ctt gta tcc aac cta gaa
N Q Q K P G Q P P R L L I Y L V S N L E
tct ggg gtc cct gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc aac atc
S G V P A R F S G S G S G T D F T L N I
cat cct gtg gag gag gag gat gct gca acc tat tac tgt cag cac att agg gag ctt aca
H P V E E E D A A T Y Y C Q H I R E L T
cgn nga (SEQ ID NO:31)
X X (SEQ ID NO:32)

>K8

tgac atc cag ctg act cag tct cct gct tcc tta gct gta tct ctg ggg cag agg gcc acc
D I Q L T Q S P A S L A V S L G Q R A T
atc tca tac agg gcc agc aaa agt gtc agt aca tct ggc tat agt tat atg cac tgg aac
I S Y R A S K S V S T S G Y S Y M H W N
caa cag aaa cca gga cag cca ccc aga ctc ctc atc tat ctt gta tcc aac cta gaa tct
Q Q K P G Q P P R L L I Y L V S N L E S
ggg gtc cct gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc aac atc cat
G V P A R F S G S G S G T D F T L N I H
cct gtg gag gag gag gat gct gct gac cta tta gct gtc agc aca tta tgg gag ctt aca
P V E E E D A A D L L A V S T L W E L T
cgt tcg gnn nnn (SEQ ID NO:33)
R S X X (SEQ ID NO:34)

比对

K4 TTTTGACATTGTGCTGACCCAATCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGC 60
K6 TNTTGATATTGTGCTAACTCAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGC 60
K8 ---TGACATCCAGCTGACTCAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGC 57
*** ** :***.*** ** .*****

K4 CACCATCTCATAACAGGGCCAGCAAAAGTGTGAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTG 120
K6 CACCATCTCATAACAGGGCCAGCAAAAGTGTGAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTG 120
K8 CACCATCTCATAACAGGGCCAGCAAAAGTGTGAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTG 117

K4 GAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACCTAGA 180
K6 GAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACCTAGA 180
K8 GAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACCTAGA 177

K4 ATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTGAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACAT 240
K6 ATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTGAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACAT 240
K8 ATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTGAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACAT 237

K4 CCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCA-ACCTATTA-CTGTCAGCACATTA-GGGAGCT 297
K6 CCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCA-ACCTATTA-CTGTCAGCACATTA-GGGAGCT 297
K8 CCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCTGACCTATTAGCTGTCAGCACATTATGGGAGCT 297
*****: ***** *****

K4 TACACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCNNNNNNN--- 328 (SEQ ID NO:30)
K6 TACACGNNNGANAANNNNNNNNNNCNNNNNTNNNNN 331 (SEQ ID NO:32)
K8 TACACGTTTCGGNNNNNTNNCTNNTNCNNNNNNNC 331 (SEQ ID NO:34)

结构域的顺序

VL-VH6H5---VH-VLhuCD3或CD8+c-myc标签+FLAG或VL-VHhu6H5---VH-VLhuCD3或
huCD8+c-myc标签+FLAG

CD8 BiTE:

acc ggt atg gat atc gag ctg acc cag agc cct agc agc ctg gcc gtg tca ctg ggc cag
T G M D I E L T Q S P S S L A V S L G Q
aga gcc acc atc agc tgc aga gcc tcc gag agc gtg gat agc cac ggc acc agc ctg atg
R A T I S C R A S E S V D S H G T S L M
cac tgg tat cag cag aag ccc ggc cag ccc ccc aag ttc ctg atc tac cgg gcc agc aac
H W Y Q Q K P G Q P P K F L I Y R A S N
ctg gaa agc ggc atc ccc gcc aga ttt tcc ggc agc ggc agc aga acc gac ttc acc ctg
L E S G I P A R F S G S G S R T D F T L
acc atc aac ccc gtg gag aca gac gac gtg gcc atc tac tac tgc cag cag agc aac gag
T I N P V E T D D V A I Y Y C Q Q S N E
gac cct ccc acc ttt ggc gga ggc acc aag ctg gaa ctg aag gag ggc gga gga agc gga
D P P T F G G G T K L E L K E G G G S G
ggg gga gga tct ggc gga ggc ggc agc gcc cag gtg aag ctg cag cag agc ggc cct gat
G G G S G G G G S A Q V K L Q Q S G P D
ctg gtg aag cct ggc gcc agc gtg aag atc agc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc
L V K P G A S V K I S C K A S G Y S F T
ggc tac tac atg cac tgg gtg aaa cag agc cac ggc aag agc ctg gaa tgg atc ggc aga

G Y Y M H W V K Q S H G K S L E W I G R
 gtg aac ccc aat agc ggc ggc acc agc tac aac cag aag ttc aag gac aag gcc atc ctg
 V N P N S G G T S Y N Q K F K D K A I L
 acc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac atg gaa ctg cgg agc ctg acc agc gag gac
 T V D K S S S T A Y M E L R S L T S E D
 agc gcc gtg tac tac tgc gcc cgg tcc aag ggc aac tac ttc tac gcc atg gac tac tgg
 S A V Y Y C A R S K G N Y F Y A M D Y W
 ggc cag ggc acc acc gtg acc gtg tct agc agc ggc ggc ggc gga agc gaa gtg cag ctg
 G Q G T T V T V S S S G G G G S E V Q L
 cag cag tcc gga gca gaa ctg gtg aaa ccc gga gcc agt gtg aag ctg agc tgt aca gcc
 Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C T A
 tcc ggc ttt aat atc aag gac acc tac atc cac ttc gtg cgc caa cgg cca gaa cag ggt
 S G F N I K D T Y I H F V R Q R P E Q G
 ctg gag tgg att ggc agg atc gat cca gca aat gat aac acc ctg tac gca agc aaa ttt
 L E W I G R I D P A N D N T L Y A S K F
 cag ggc aaa gcc acg ata acc gcc gat aca tct agt aat acg gct tac atg cac ctc tgc
 Q G K A T I T A D T S S N T A Y M H L C
 tcc ctg act tcc ggg gac acc gcc gtg tat tat tgc ggg cgc gga tac ggt tac tac gtg
 S L T S G D T A V Y Y C G R G Y G Y Y V
 ttc gat cat tgg ggt cag ggc acc acc ctc aca gtc tcc agt gca gga ggc gga ggt agt
 F D H W G Q G T T L T V S S A G G G G S
 gga ggc gga ggc tct ggc ggt ggc ggg tca gac ata gtg ctg aca cag tct ccc gcc agt
 G G G G S G G G G S D I V L T Q S P A S
 ctg gca gtg agc ctt ggc cag agg gct aca att tcc tat agg gcg tct aaa tcc gtt agc
 L A V S L G Q R A T I S Y R A S K S V S
 act tca ggt tac tct tat atg cac tgg aac cag cag aag cct ggt cag ccc ccc agg ctt
 T S G Y S Y M H W N Q Q K P G Q P P R L
 ctt att tac ctg gtc agc aat ctc gag tct ggc gtg ccc gct aga ttt tcc ggc agc ggg
 L I Y L V S N L E S G V P A R F S G S G
 agt ggg act gac ttc act ctg aac atc cac cca gtg gag gaa gag gat gcc gca acc tac
 S G T D F T L N I H P V E E E D A A T Y
 tat tgt cag cat atc cgg gaa ttg acc aga tca gag ggc gga cct tcc tgg aag gag cag
 Y C Q H I R E L T R S E G G P S W K E Q
 aag ctg att agc gag gaa gat ctg gat tat aag gac gac gat gac aaa tga gaa ttc
 K L I S E E D L D Y K D D D D K - E F

(SEQ ID NO:35)

(SEQ ID NO:36)

CD3 BiTE:

acc ggt atg gat atc gag ctg acc cag agc cct agc agc ctg gcc gtg tca ctg ggc cag_
T G M D I E L T Q S P S S L A V S L G Q
 aga gcc acc atc agc tgc aga gcc tcc gag agc gtg gat agc cac ggc acc agc ctg atg
 R A T I S C R A S E S V D S H G T S L M
 cac tgg tat cag cag aag ccc ggc cag ccc ccc aag ttc ctg atc tac cgg gcc agc aac
 H W Y Q Q K P G Q P P K F L I Y R A S N
 ctg gaa agc ggc atc ccc gcc aga ttt tcc ggc agc ggc agc aga acc gac ttc acc ctg

```

L E S G I P A R F S G S G S R T D F T L
acc atc aac ccc gtg gag aca gac gac gtg gcc atc tac tac tgc cag cag agc aac gag
T I N P V E T D D V A I Y Y C Q Q S N E
gac cct ccc acc ttt ggc gga ggc acc aag ctg gaa ctg aag gag ggc gga gga agc gga
D P P T F G G G T K L E L K E G G G S G
ggg gga gga tct ggc gga ggc ggc agc gcc cag gtg aag ctg cag cag agc ggc cct gat
G G G S G G G G S A Q V K L Q Q S G P D
ctg gtg aag cct ggc gcc agc gtg aag atc agc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc
L V K P G A S V K I S C K A S G Y S F T
ggc tac tac atg cac tgg gtg aaa cag agc cac ggc aag agc ctg gaa tgg atc ggc aga
G Y Y M H W V K Q S H G K S L E W I G R
gtg aac ccc aat agc ggc ggc acc agc tac aac cag aag ttc aag gac aag gcc atc ctg
V N P N S G G T S Y N Q K F K D K A I L
acc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac atg gaa ctg cgg agc ctg acc agc gag gac
T V D K S S S T A Y M E L R S L T S E D
agc gcc gtg tac tac tgc gcc cgg tcc aag ggc aac tac ttc tac gcc atg gac tac tgg
S A V Y Y C A R S K G N Y F Y A M D Y W
ggc cag ggc acc acc gtg acc gtg tct agc agc ggc ggc ggc gga agc gag gtt cag ctg
G Q G T T V T V S S S G G G G S E V Q L
gtg gag tct ggc ggt ggc ctg gtg cag cca ggg ggc tca ctc cgt ttg tcc tgt gca gct
V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A
tct ggc tac tcc ttt acc ggc tac act atg aac tgg gtg cgt cag gcc cca ggt aag ggc
S G Y S F T G Y T M N W V R Q A P G K G
ctg gaa tgg gtt gca ctg att aat cct tat aaa ggt gtt tcc acc tat aac cag aaa ttc
L E W V A L I N P Y K G V S T Y N Q K F
aag gat cgt ttc acg ata tcc gta gat aaa tcc aaa aac aca gcc tac ctg caa atg aac
K D R F T I S V D K S K N T A Y L Q M N
agc ctg cgt gct gag gac act gcc gtc tat tat tgt gct aga agc gga tac tac ggc gat
S L R A E D T A V Y Y C A R S G Y Y G D
agc gac tgg tat ttt gac gtc tgg ggt caa gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg ggt gga
S D W Y F D V W G Q G T L V T V S S G G
ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg gat atc cag atg acc cag tcc
G G S G G G G S G G G G S D I Q M T Q S
ccg agc tcc ctg tcc gcc tct gtg ggc gat agg gtc acc atc acc tgt cgt gcc agt cag
P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q
gac atc cgt aat tat ctc aac tgg tat caa cag aaa cca gga aaa gct ccg aaa cta ctg
D I R N Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L
att tac tat acc tcc cgc ctg gag tct gga gtc cct tct cgc ttc tct ggt tct ggt tct
I Y Y T S R L E S G V P S R F S G S G S
ggg acg gat tac act ctg acc atc agc agt ctg caa ccg gag gac ttc gca act tat tac
G T D Y T L T I S S L Q P E D F A T Y Y
tgt cag caa ggt aat act ctg ccg tgg acg ttc gga cag ggc acc aag gtg gag atc aaa
C Q Q G N T L P W T F G Q G T K V E I K
gag cag aag ctg att agc gag gaa gat ctg gat tat aag gac gac gat gac aaa tga gaa
E Q K L I S E E D L D Y K D D D D K - E
ttc (SEQ ID NO:37)
F (SEQ ID NO:38)

```

用5种Map免疫小鼠,收集血清并使用多种HERV融合蛋白通过ELISA进行测试(图23)。仅HERV-K SU是阳性的。从用5种Map免疫的小鼠生成杂交瘤细胞,并选择具有以下序列

的scFv。

针对HERV-K的MAP的scFv(抗HERV-K mAb的序列)。

```
1 ATGGCCAGGTGCAACTGCAGCAGTCAGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTG 60
  M A Q V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V
61 AAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGAAG 120
  K M S C K A S G Y T F T S Y W I T W V K
121 CAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTTATCTGGTAGTGGTAGTACT 180
  Q R P G Q G L E W I G D I Y P G S G S T
181 AACTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACA 240
  N Y N E K F K S K A T L T V D T S S S T
241 GCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGA 300
  A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R
301 TGGCGGGACGGGTACTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC 360
  W R D G Y Y A M D Y W G Q G T T V T V S
361 TCAAGTGAAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCGAGCTC 420
  S S E G G S G G G C S G G G G S D I E L
421 ACTCAGTCTCCAACCACCATGGCTGCATCTCCCGGGGAGAAGATCACTATCACCTGCAGT 480
  T Q S P T T M A A S P G E K I T I T C S
481 GCCAGCTCAAGTATAAGTTCCAATTACTTGCTTGGTATCAGCAGAAGCCAGGATTCTCC 540
  A S S S I S S N Y L H W Y Q Q K P G F S
541 CCTAAACTCTTGATTTATAGGACATCCAATCTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGT 600
  P K L L I Y R T S N L A S G V P A R F S
601 GGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATTGGCACCATGGAAGCTGAAGATGTT 660
  G S G S G T S Y S L T I G T M E A E D V
661 GCCACTTACTACTGCCAGCAGGGTAGTAGTATACCATTCACGTTCCGGCTCGGGGACGAAG 720
  A T Y Y C Q Q G S S I P F T F G S G T K
721 TTGGAGCTGAAACGGGCGGGCCGCAGGTGCGCCGGTGCCGTATCCG 766
  L E L K R A G R R C A G A V S
```

(SEQ ID NO: 45)

(SEQ ID NO: 46)

实施例8

可以用于ADC以递送药物进入癌症细胞和肿瘤的靶向HERV-K的人源化抗体

重组白树素(r-Ge1)毒素与6H5缀合(图20A)。使用抗r-Ge1抗体,内化1小时后在OVCAR3(图20B)、SKBr3、MCF-7和MDA-MB-231细胞(图20C)中检测到r-Ge1。此外,在与裸GNP(图21A)或6H5-GNP(图21B)孵育2小时后,通过透射电子显微镜(TEM)在MDA-MB-231细胞中检测到金纳米颗粒(GNP)。从用6H5-GNP(图21C、21E和21F)或6H5scFV-GNP(图21D)静脉内注射后24小时的小鼠分离的MDA-MB-231(图21C、21E和21F)或SKBr3(图21D)的肿瘤中使用银增强测定检测到GNP。当靶肿瘤细胞被置于射频场中时,GNP会产生杀死靶肿瘤细胞的热量。

实施例9

小鼠肿瘤结节中抗HERV-K抗体的体内成像

通过使用Nuance系统的体内成像(图22),在来自静脉内注射抗HERV-K-Alexa647缀合物6H5-Alexa647(红色)后24小时的小鼠的肿瘤结节中检测到更高密度的6H5。

实施方案的列表

HERV-K抗体治疗剂的具体组合物和方法。本发明的范围应仅由权利要求限定。生物医学领域的普通技术人员将以与本公开的上下文和精神一致的最广泛的可能方式解释所有权利要求术语。本公开中的详细描述是说明性的而不是限制性的或详尽的。本发明不限于本说明书中描述的特定方法学、方案和试剂并且在实务中可以改变。当说明书或权利要求叙述有序的步骤或功能时,可能以不同的顺序或基本上同时执行备选实施方案的功能。如生物医学领域的普通技术人员所认识到的,在不脱离本说明书中描述的发明构思的情况下,除已经描述的那些之外的其他等同物和修改是可能的。

本说明书整篇中引用的所有专利和出版物均通过引用并入,以公开和描述与本说明书中描述的技术一起使用的材料和方法。仅提供在本说明书的申请日之前公开的专利和出版物。所有关于专利和出版物的公开和出版日期的陈述均来自发明人的信息和信念。发明人不承认这些文件的内容或日期的正确性。如果本说明书中提供的日期与实际发布日期之间存在差异,则以实际发布日期为准。由于在先发明或其他原因,发明人可能会提前此类公开。如果在先专利或出版物的科学或技术教导与本说明书之间存在差异,则以本说明书和这些权利要求书的教导为准。

当说明书提供数值范围时,该范围上限和下限之间的每个中间值都在数值范围内,除非上下文另有规定。

本说明书中提供的实施方案如下:

1. 与人内源逆转录病毒-K (HERV-K) 结合的分离的抗体,其包含重链可变区 (HCVR) 和轻链可变区 (LCVR)。人源化抗HERV-K抗体能够减少肿瘤的生长,尤其是减少向肺、淋巴结和其他器官的转移。

2. 根据实施方案1的抗体,其包含人源化或人框架区。

3. 根据实施方案1的抗体,其中所述抗体是HERV-K拮抗剂。

4. 分离的核酸,其包含编码实施方案1的HCVR、LCVR或其组合的核苷酸序列。

5. 表达载体,其包含实施方案4的核酸。

6. 用实施方案5的表达载体转化的宿主细胞。

7. 产生包含HCVR、LCVR或其组合的抗体的方法,所述方法包括:在使得宿主细胞表达包含HCVR、LCVR或其组合的抗体的情况下培养实施方案1的宿主细胞;并分离包含HCVR、LCVR或其组合的抗体。

10. 治疗哺乳动物中的癌症的方法,其包括向有此需要的哺乳动物施用有效量的根据实施方案1中的抗体。

11. 治疗癌症的方法,其包括向有此需要的个体施用有效量的ADC,所述ADC包括包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 的抗体,其中:VH区包含CDR1、CDR2和CDR3,并且VL区包含CDR1、CDR2和CDR3,其中所述抗体经由接头与细胞毒性药物、澳瑞他汀 (auristatin) 或功能性肽类似物或其衍生物缀合。

12. 实施方案11的方法,其中所述ADC与一种或多种额外的治疗剂联合施用。

13. 实施方案11的方法,其中一种或多种额外的治疗剂包含化学治疗剂。

14. 根据实施方案11的方法,其中所述癌症选自黑色素瘤、慢性淋巴细胞性白血病、乳腺癌、胰腺癌、头颈癌、卵巢癌、宫颈癌、结直肠癌、睾丸癌、胃癌、肾癌、子宫内膜癌、子宫癌、膀胱癌、前列腺癌、食道癌、肝癌和非小细胞肺癌。

为CAR T、CAR NK和BiTE研究开发的人源化抗体。

15. 实施方案11的方法,其中所述抗体是全长抗体。

16. 实施方案11的方法,其中所述抗体是人单克隆IgG1或IgG4抗体。

17. 实施方案11的方法,其中所述澳瑞他汀是单甲基澳瑞他汀E(MMAE)。

18. 实施方案11的方法,其中所述澳瑞他汀是单甲基澳瑞他汀F(MMAE)。

19. 实施方案11的方法,其中所述细胞毒性药物是emtansine(DM1)。

20. 实施方案11的方法,其中所述细胞毒性药物是奥佐米星(ozogamicin)(加利车霉素(calicheamicin))。

21. 实施方案11的方法,其中所述细胞毒性药物是德鲁替康(deruxtecan,DXd)。

22. 实施方案11的方法,其中所述细胞毒性药物是戈维替康(govitecan,SN-38)。

23. 实施方案11的方法,其中所述细胞毒性药物是马福多丁(mafodotin,MMAF)。

24. 实施方案11的方法,其中所述细胞毒性药物是duocarmazine(duocarmycin)。

25. 实施方案11的方法,其中所述细胞毒性药物是BAT8001(美登素)索星(soravtansine)(DM4)。

26. 实施方案11的方法,其中所述细胞毒性药物是替西林(PBD)。

27. 实施方案11的方法,其中所述接头附接至通过抗体的部分还原获得的抗体的巯基残基。

28. 实施方案11的方法,其中所述接头-澳瑞他汀是vcMMAF或vcMMAE。

29. 早期检测、转移或HERV-K加免疫检查点生物标志物,基本上如本文所述。

30. 基于抗体的治疗,基本上如本文所述。

32. 过表达HERV-K的肿瘤细胞,其作为本发明的抗HERV-K人源化抗体和ADC的靶标。

33. 从细菌(HUM1和HUM2)或哺乳动物细胞中生成的hu6H5克隆(FWJ1和FWJ2)。

34. 针对T细胞CD3或CD8的BiTE和针对肿瘤相关抗原HERV-K的人源化scFv,其包含靶向CD3或CD8、以及HERV-K的抗体。

35. T细胞,其表达携带人源化或全人HERV-K scFv的慢病毒CAR表达载体。

36. 人源化单链可变片段(scFv)抗体,其能够与从重组HERV-K Env表面融合蛋白(KSU)和表达HERV-K Env蛋白的癌细胞裂解物产生的抗原结合,。

37. 由实施方案28的人源化scFv产生的CAR。

38. 由实施方案28的人源化scFv产生的CAR,其克隆到慢病毒载体中。

39. 由实施方案28的人源化scFv产生的克隆入慢病毒载体的CAR,其克隆到慢病毒载体中,用于联合疗法。

44. 用于无记忆B细胞的供体的快速扩增和B细胞激活的改良体内富集方法,其包括以下步骤:在第1、7和14天用细胞因子混合物处理小鼠,和在第14和21天用抗原加强小鼠。

45. 细胞,其不仅能产生抗体,抗体还能结合抗原并杀伤癌细胞,并且表达抗原的

细胞能被抗体杀死。

47.乳腺癌患者血浆中六种循环免疫检查点蛋白的表达显著增强。

50.用HERV-K免疫检查点抑制剂阻断免疫抑制结构域(ISD)的方法。

51.实施方案42的方法,其中HERV-K的免疫检查点抑制剂选自靶向HERV-K的ISD的单克隆抗体和药物。

52.靶向HERV-K的人源化和全人抗体,其用于增强检查点阻断抗体治疗功效。

53.从用5种多抗原肽(MAPS)免疫的小鼠中产生新抗体的方法,所述所述5种多抗原肽(MAPS)是从癌症患者产生的HERV-K SU蛋白生成的。

54.产生HERV-K CAR A:VH-VLhu6H5-CD8-CD28-4-1BB-CD3zeta的方法。

参考文献

分子生物学领域的普通技术人员可以使用以下专利、专利申请和科学参考作为制造和使用本发明时获得可预测结果的指导:

专利文献:

美国专利9,243,055(Wang-Johanning)。该专利公开并要求保护诊断和治疗。提供了用于检测、预防和治疗HERV-K+癌症的方法和组合物。一种方法是通过向受试者施用癌细胞增殖阻断或减少量的HERV-K env蛋白结合抗体来预防或抑制癌细胞增殖。

国际专利公开W02014/186469(Board of Regents,the University of Texas System)。该专利公开涉及使用包含嵌合抗原受体(CAR)的修饰T细胞进行免疫治疗的方法和组合物。使用电穿孔结合基于转座子的整合系统产生表达CAR的T细胞,以产生需要最小离体扩增或可以直接施用于患者进行癌症治疗的表达CAR的细胞群。

科学文献:

1.Lander ES,Linton LM,Birren B,et al.Initial sequencing and analysis of the human genome.Nature.2001;409:860-921.HERVs are well-known as genomic repeat sequences,with many copies in the genome,such that approximately 8%of the human genome is of retroviral origin.

2.Hughes JF,Coffin JM.Evidence for genomic rearrangements mediated by human endogenous retroviruses during primate evolution.Nat Genet.2001;29:487-489.HERVs originated from thousands of ancient integration events which incorporated retrovirus DNA into germline cells.

3.Larsson E,Kato N,Cohen M.Human endogenous proviruses.Curr Top Microbiol Immunol.1989;148:115-132.The most biologically active HERVs are members of the HERV-K family.HERV-K has a complete sequence capable of expressing all the elements needed for a replication-competent retrovirus

4.Ono M,Yasunaga T,Miyata T,Ushikubo H.Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome.J Virol.1986;60:589-598.The most biologically active HERVs are members of the HERV-K family.HERV-K has a complete sequence capable of expressing all the elements needed for a replication-competent retrovirus

5.Kraus B,Fischer K,Buchner SM,et al.Vaccination directed against the

human endogenous retrovirus-K envelope protein inhibits tumor growth in a murine model system. *PLoS One*.2013;8:e72756.

6.Denne M,Sauter M,Armbruester V,Licht JD,Roemer K,Mueller-Lantzsch N.Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Virol*.2007;81:5607-5616.

7.Fischer S,Echeverria N,Moratorio G,et al.Human endogenous retrovirus np9 gene is over expressed in chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Res Rep*.2014;3:70-72.

8.Li M RR,Yin B,Li J,Chivukula R,Lin K,Lu Y,Shen J,Chang DZ,Li D, Johanning GL,Wang-Johanning F.Down-regulation of human endogenous retrovirus type K (HERV-K) viral env RNA in pancreatic cancer cells decreases cell proliferation and tumor growth. *Clinical Cancer Research*.2017;In press.

9.Feng Wang-Johanning JL,Gary Johanning,Ming Li,Raghu Chivukula, Guoqing Wu.Tumor microenvironment predicts aggressive breast cancer: Combination of HERV-K,immune checkpoint and activation status of CD8+T cells. *Cancer Res*.2017;77:Abstract nr LB-221.

10.Zhou F,Li M,Wei Y,et al.Activation of HERV-K Env protein is essential for tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells. *Oncotarget*.2016;7:84093-84117.

11.Wang-Johanning F,Radvanyi L,Rycaj K,et al.Human endogenous retrovirus K triggers an antigen-specific immune response in breast cancer patients. *Cancer Res*.2008;68:5869-5877.The inventors observed the expression of HERVs,especially HERV-K sequences,in breast,lung,prostate,ovarian,colon, pancreatic,and other solid tumors.

12.Zhao J,Rycaj K,Geng S,et al.Expression of Human Endogenous Retrovirus Type K Envelope Protein is a Novel Candidate Prognostic Marker for Human Breast Cancer. *Genes Cancer*.2011;2:914-922.The inventors observed the expression of HERVs,especially HERV-K sequences,in breast,lung,prostate, ovarian,colon,pancreatic,and other solid tumors.

13.Wang-Johanning F,Liu J,Rycaj K,et al.Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. *Int J Cancer*.2007;120:81-90.

14.Wang-Johanning F,Li M,Esteva FJ,et al.Human endogenous retrovirus type K antibodies and mRNA as serum biomarkers of early-stage breast cancer. *Int J Cancer*.2014;134:587-595.

15.Wang-Johanning F,Frost AR,Johanning GL,et al.Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. *Clin Cancer Res*.2001;7:1553-1560.

16.Wang-Johanning F,Frost AR,Jian B,Epp L,Lu DW,Johanning GL.Quantitation ofHERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer.Oncogene.2003;22:1528-1535.The inventors observed the expression of HERVs,especially HERV-K sequences,in breast,lung,prostate,ovarian,colon,pancreatic,and other solid tumors.

17.Wang-Johanning F,Frost AR,Jian B,et al.Detecting the expression of human endogenous retrovirus E envelope transcripts in human prostate adenocarcinoma.Cancer.2003;98:187-197.The inventors observed the expression of HERVs,especially HERV-K sequences,in breast,lung,prostate,ovarian,colon,pancreatic,and other solid tumors.

18.Wallace TA,Downey RF,Seufert CJ,et al.Elevated HERV-K mRNA expression in PBMC is associated with a prostate cancer diagnosis particularly in older men and smokers.Carcinogenesis.2014;35:2074-2083.

19.Downey RF,Sullivan FJ,Wang-Johanning F,Amb S,Giles FJ,Glynn SA.Human endogenous retrovirus K and cancer:Innocent bystander or tumorigenic accomplice?Int J Cancer.2015;137:1249-1257.

20.Johanning GL,Malouf GG,Zheng X,et al.Expression of human endogenous retrovirus-K is strongly associated with the basal-like breast cancer phenotype.Sci Rep.2017;7:41960.The inventors observed the expression of HERVs,especially HERV-K sequences,in breast,lung,prostate,ovarian,colon,pancreatic,and other solid tumors.They also found that the expression of HERV-K env transcripts in breast cancer was specifically associated with basal breast cancer,a particularly aggressive subtype.

21.Serafino A,Balestrieri E,Pierimarchi P,et al.The activation of human endogenous retrovirus K(HERV-K)is implicated in melanoma cell malignant transformation.Exp Cell Res.2009;315:849-862.

22.Oricchio E,Sciamanna I,Beraldi R,Tolstonog GV,Schumann GG,Spadafora C.Distinct roles for LINE-1 and HERV-K retroelements in cell proliferation,differentiation and tumor progression.Oncogene.2007;26:4226-4233.

23.Gonzalez-Cao M,Iduma P,Karachaliou N,Santarpia M,Blanco J,Rosell R.Human endogenous retroviruses and cancer.Cancer Biol Med.2016;13:483-488.

24.Kleiman A,Senyuta N,Tryakin A,et al.HERV-K (HML-2) GAG/ENV antibodies as indicator for therapy effect in patients with germ cell tumors.Int J Cancer.2004;110:459-461.

25.Buscher K,Trefzer U,Hofmann M,Sterry W,Kurth R,Denner J.Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines.Cancer Res.2005;65:4172-4180.

26.Seifarth W,Skladny H,Krieg-Schneider F,Reichert A,Hehlmann R,Leib-

Mosch C. Retrovirus-like particles released from the human breast cancer cell line T47-D display type B- and C-related endogenous retroviral sequences. *J Virol.* 1995;69:6408-6416.

27. Etkind PR, Lumb K, Du J, Racevskis J. Type 1 HERV-K genome is spliced into subgenomic transcripts in the human breast tumor cell line T47D. *Virology.* 1997;234:304-308.

28. Ono M, Kawakami M, Ushikubo H. Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. *J Virol.* 1987;61:2059-2062.

29. Ejthadi HD, Martin JH, Junying J, et al. A novel multiplex RT-PCR system detects human endogenous retrovirus-K in breast cancer. *Arch Virol.* 2005;150:177-184.

30. Wang-Johanning F, Rycaj K, Plummer JB, et al. Immunotherapeutic potential of anti-human endogenous retrovirus-K envelope protein antibodies in targeting breast tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104:189-210. The inventors showed that the HERV-K Env protein is commonly expressed on the surface of breast cancer cells. The inventors observed the expression of HERVs, especially HERV-K sequences, in breast, lung, prostate, ovarian, colon, pancreatic, and other solid tumors 30-34.

31. Li M, Radvanyi L, Yin B, et al. Downregulation of Human Endogenous Retrovirus Type K (HERV-K) Viral env RNA in Pancreatic Cancer Cells Decreases Cell Proliferation and Tumor Growth. *Clin Cancer Res.* 2017;23:5892-5911. The inventors observed the expression of HERVs, especially HERV-K sequences, in breast, lung, prostate, ovarian, colon, pancreatic, and other solid tumors.

32. Rycaj K, Plummer JB, Yin B, et al. Cytotoxicity of human endogenous retrovirus K-specific T cells toward autologous ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2015;21:471-483. The inventors observed the expression of HERVs, especially HERV-K sequences, in breast, lung, prostate, ovarian, colon, pancreatic, and other solid tumors.

33. Zhou F, Krishnamurthy J, Wei Y, et al. Chimeric antigen receptor T cells targeting HERV-K inhibit breast cancer and its metastasis through downregulation of Ras. *Oncoimmunology.* 2015;4:e1047582. The inventors observed the expression of HERVs, especially HERV-K sequences, in breast, lung, prostate, ovarian, colon, pancreatic, and other solid tumors.

34. Zhou F, Li M, Wei Y, et al. Activation of HERV-K Env protein is essential for tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells. *Oncotarget.* 2016.

35. Krishnamurthy J, Rabinovich BA, Mi T, et al. Genetic Engineering of T Cells to Target HERV-K, an Ancient Retrovirus on Melanoma. *Clin Cancer*

Res.2015;21:3241-3251.The inventors observed the expression of HERVs, especially HERV-K sequences,in breast,lung,prostate,ovarian,colon,pancreatic, and other solid tumors.

36.Chae YK,Chang S,Ko T,et al.Epithelial-mesenchymal transition(EMT) signature is inversely associated with T-cell infiltration in non-small cell lung cancer(NSCLC).Sci Rep.2018;8:2918.

37.Lemaitre C,Tsang J,Bireau C,Heidmann T,Dewannieux M.A human endogenous retrovirus-derived gene that can contribute to oncogenesis by activating the ERK pathway and inducing migration and invasion.PLoS Pathog.2017;13:e1006451.

38.Li M,Radvanyi LG,Yin B,et al.Down-regulation of human endogenous retrovirus type K(HERV-K)viral env RNA in pancreatic cancer cells decreases cell proliferation and tumor growth.Clin Cancer Res.2017.

39.Helsen CW,Hammill JA,Lau VWC,et al.The chimeric TAC receptor co-opts the T cell receptor yielding robust anti-tumor activity without toxicity.Nat Commun.2018;9:3049.

40.Burstein HJ,Winer EP.Refining therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer:T stands for trastuzumab,tumor size, and treatment strategy.J Clin Oncol.2009;27:5671-5673.

41.Natsume A,Niwa R,Satoh M.Improving effector functions of antibodies for cancer treatment:Enhancing ADCC and CDC Drug Des Devel Ther.2009;3:7-16.

42.Spector NL,Blackwell KL.Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer.J Clin Oncol.2009;27:5838-5847.

43.Feldhaus MJ,Siegel RW,Opresko LK,et al.Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library.Nat Biotechnol.2003;21:163-170.

44.Mazor Y,Van Blarcom T,Mabry R,Iverson BL,Georgiou G.Isolation of engineered,full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli*.Nat Biotechnol.2007;25:563-565.

45.Zhou Y,Zou H,Zhang S,Marks JD.Internalizing cancer antibodies from phage libraries selected on tumor cells and yeast-displayed tumor antigens.J Mol Biol.2010;404:88-99.

46.Lanzavecchia A,Corti D,Sallusto F.Human monoclonal antibodies by immortalization of memory B cells.Curr Opin Biotechnol.2007;18:523-528.

47.Smith K,Garman L,Wrammert J,et al.Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen.Nat Protoc.2009;4:372-384.

48.Scheid JF,Mouquet H,Feldhahn N,et al.Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals.Nature.2009;458:636-640.

49.Meijer PJ,Andersen PS,Haahr Hansen M,et al.Isolation of human antibody repertoires with preservation of the natural heavy and light chain pairing.J Mol Biol.2006;358:764-772.

50.Kontermann RE,Brinkmann U.Bispecific antibodies.Drug Discov Today.2015.

51.Zhang P,Shi B,Gao H,et al.An EpCAM/CD3 bispecific antibody efficiently eliminates hepatocellular carcinoma cells with limited galectin-1 expression.Cancer Immunol Immunother.2014;63:121-132.

52.Seitz S,Schneider CK,Malotka J,et al.Reconstitution of paired T cell receptor alpha-and beta-chains from microdissected single cells of human inflammatory tissues.Proc Natl Acad Sci U S A.2006;103:12057-12062.

53.Ettinger R,Sims GP,Fairhurst AM,et al.IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells.J Immunol.2005;175:7867-7879.

54.Good KL,Bryant VL,Tangye SG.Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21.J Immunol.2006;177:5236-5247.

55.Hipp N,Symington H,Pastoret C,et al.IL-2 imprints human naive B cell fate towards plasma cell through ERK/ELK1-mediated BACH2 repression.Nat Commun.2017;8:1443.

56.Elgueta R,Benson MJ,de Vries VC,Wasiuk A,Guo Y,Noelle RJ.Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system.Immunol Rev.2009;229:152-172.

57.Koncz G,Hueber AO.The Fas/CD95 Receptor Regulates the Death of Autoreactive B Cells and the Selection of Antigen-Specific B Cells.Front Immunol.2012;3:207.

59.Song YC,Liu SJ.A TLR9 agonist enhances the anti-tumor immunity of peptide and lipopeptide vaccines via different mechanisms.Sci Rep.2015;5:12578.

60.Chiappinelli KB,Strissel PL,Desrichard A,et al.Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses.Cell.2015;162:974-986.

61.Choi B,Chun E,Kim M,et al.Human B cell development and antibody production in humanized NOD/SCID/IL-2Rgamma(null) (NSG) mice conditioned by busulfan.J Clin Immunol.2011;31:253-264.

62.Morozov VA,Dao Thi VL,Denner J.The transmembrane protein of the

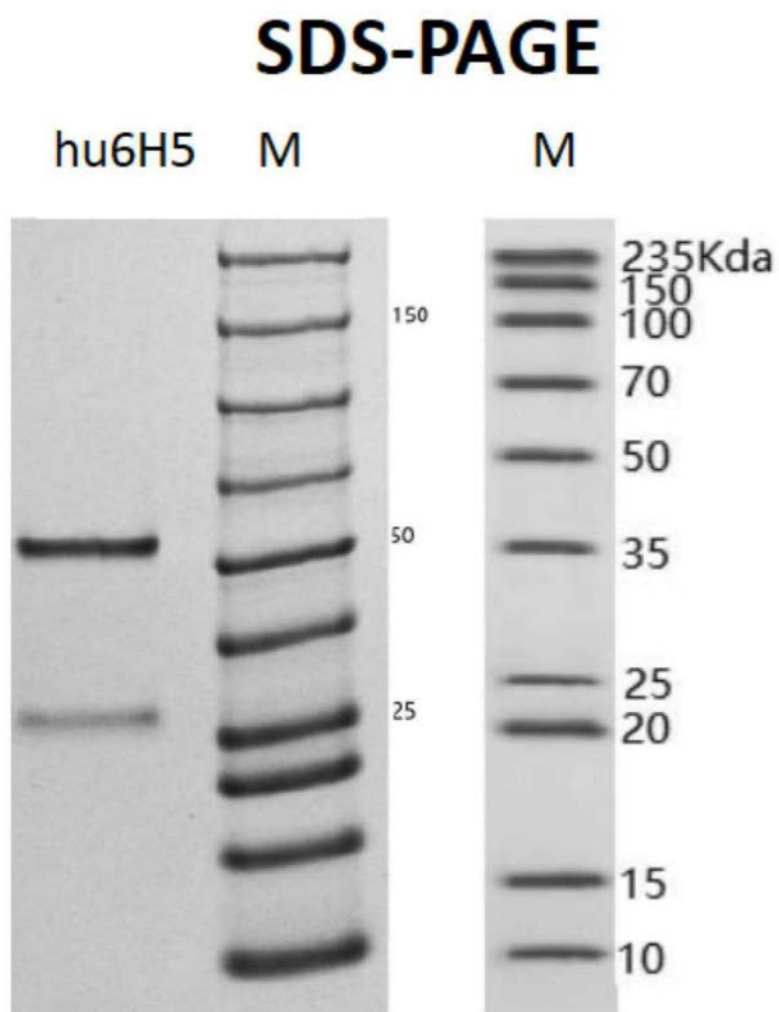
human endogenous retrovirus--K (HERV-K) modulates cytokine release and gene expression. *PLoS One*.2013;8:e70399.

63.Liu H,Moynihan KD,Zheng Y,et al.Structure-based programming of lymph-node targeting in molecular vaccines.*Nature*.2014;507:519-522.

64.Kontsekova E,Zilka N,Kovacech B,Novak P,Novak M.First-in-man tau vaccine targeting structural determinants essential for pathological tau-tau interaction reduces tau oligomerisation and neurofibrillary degeneration in an Alzheimer's disease model.*Alzheimers Res Ther*.2014;6:44.

65.Novak P,Schmidt R,Kontsekova E,et al.Safety and immunogenicity of the tau vaccine AADvac1 in patients with Alzheimer's disease:a randomised, double-blind,placebo-controlled,phase 1 trial.*Lancet Neurol*.2017;16:123-134.

66.Robinson-McCarthy LR,McCarthy KR,Raaben M,et al.Reconstruction of the cell entry pathway of an extinct virus.*PLoS Pathog*.2018;14:e1007123.



还原条件下预测分子量是
49Kda (VH) 和23Kda (VL)

图1

体积排阻液相色谱(SEC)以确定抗体蛋白表达

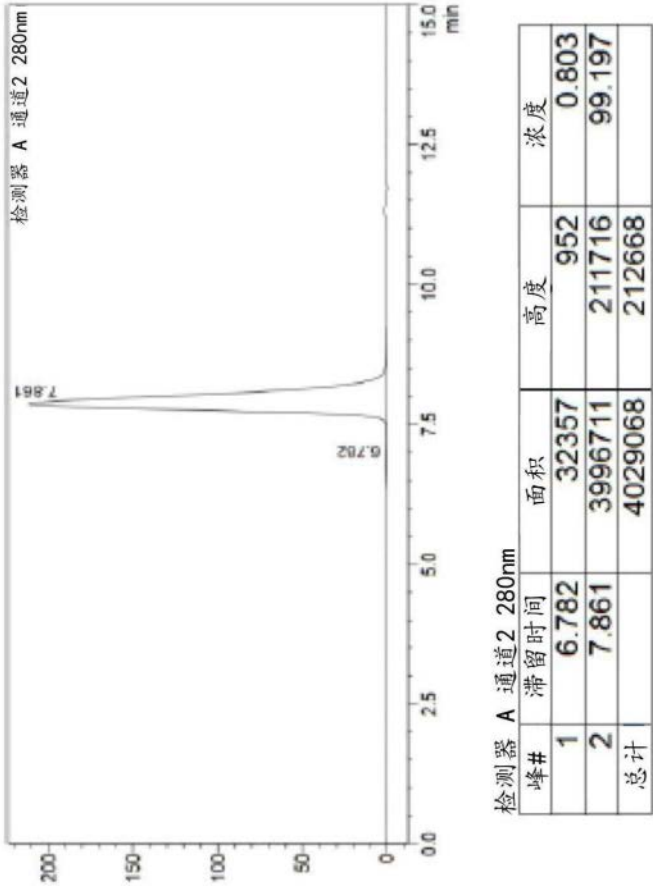


图2

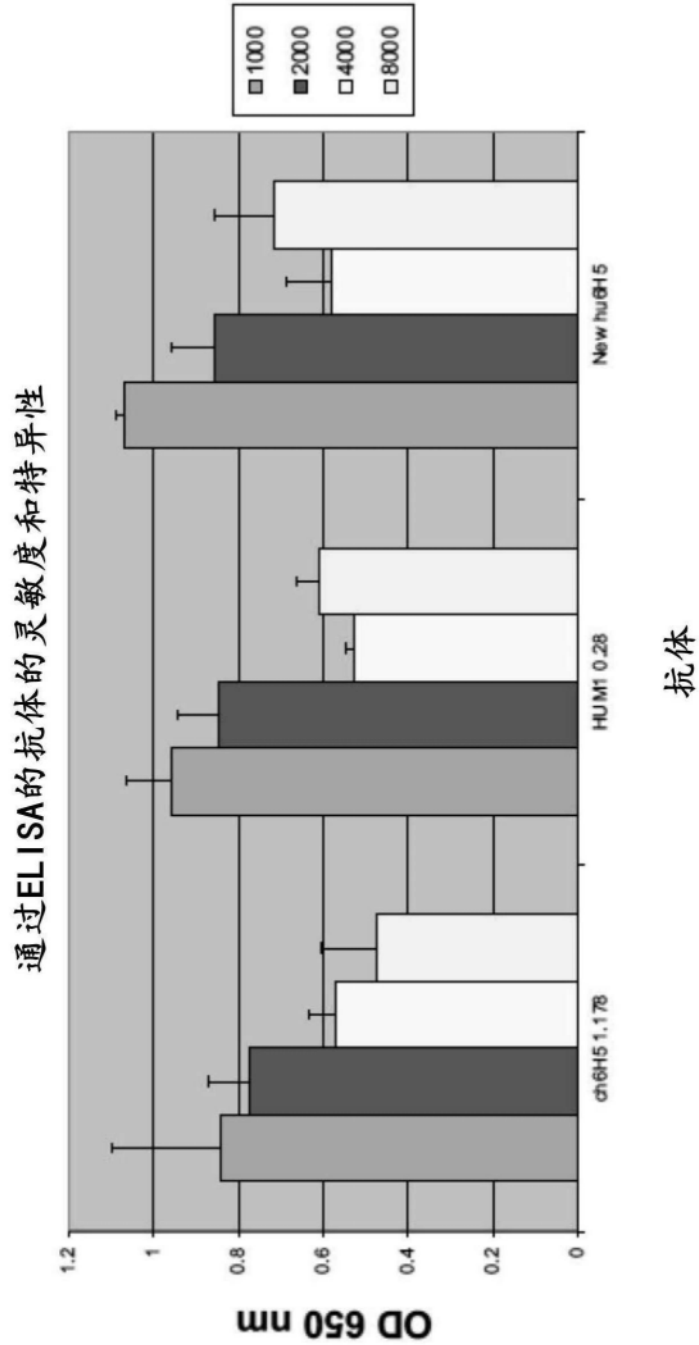
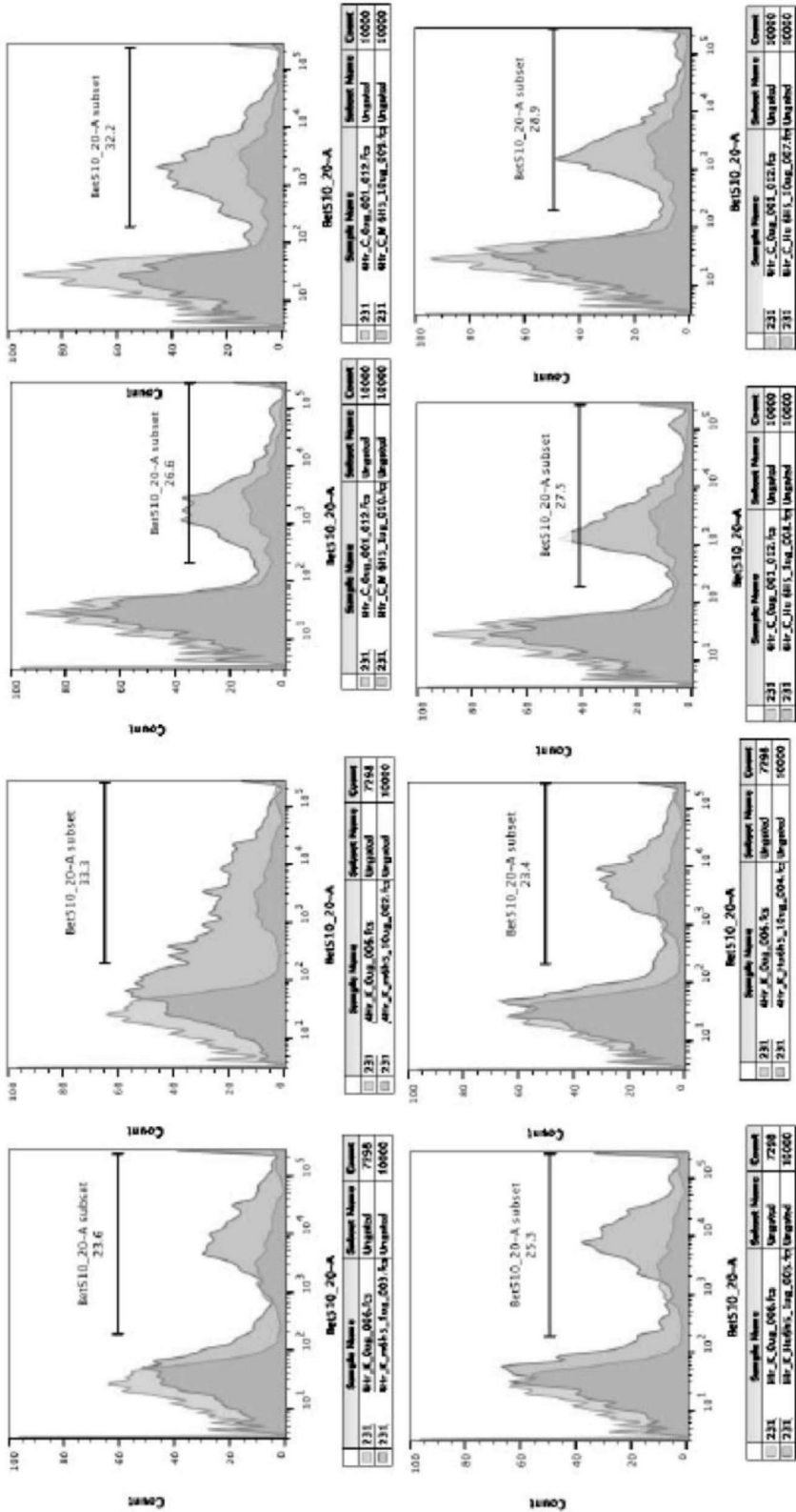


图3



K, 用MDA-MB-231-pLVXK转导; C, 用PLVXK空载体转导;
用0、1或10 μ g的小鼠(m6H5)或人源化抗HERV-K抗体(hu6H5)处理

图4

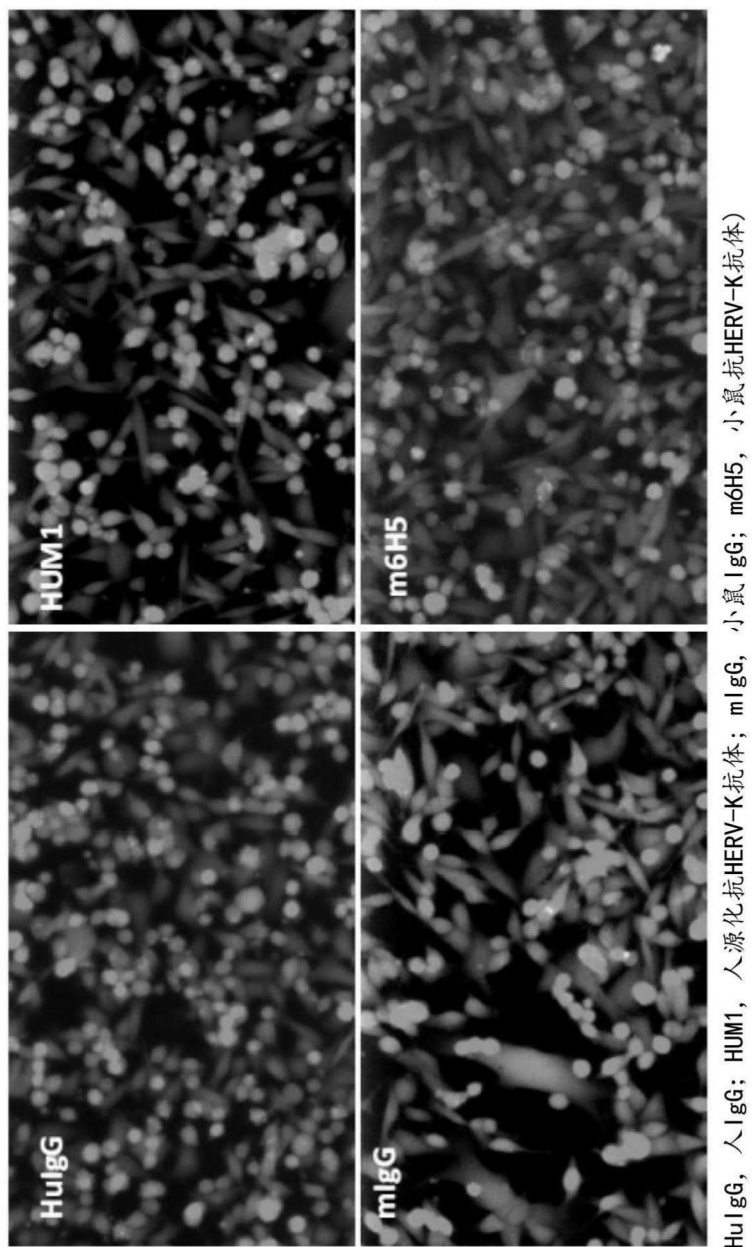


图5

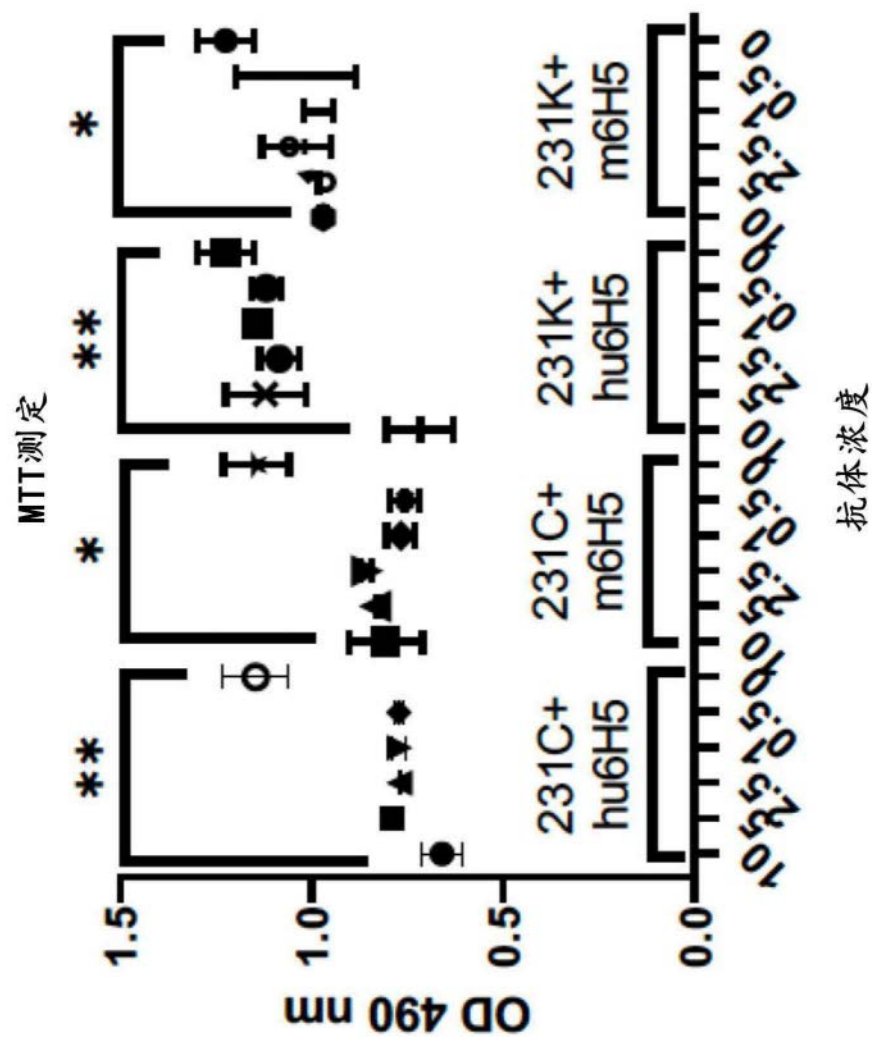


图6

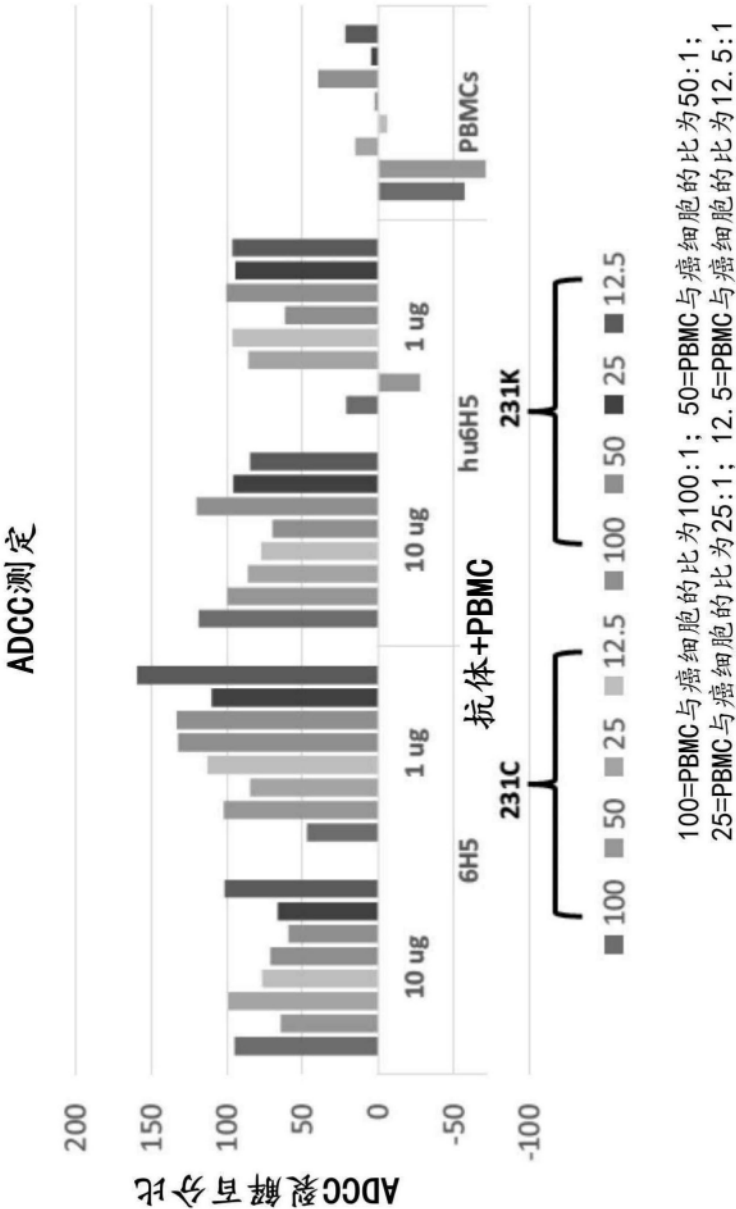


图7

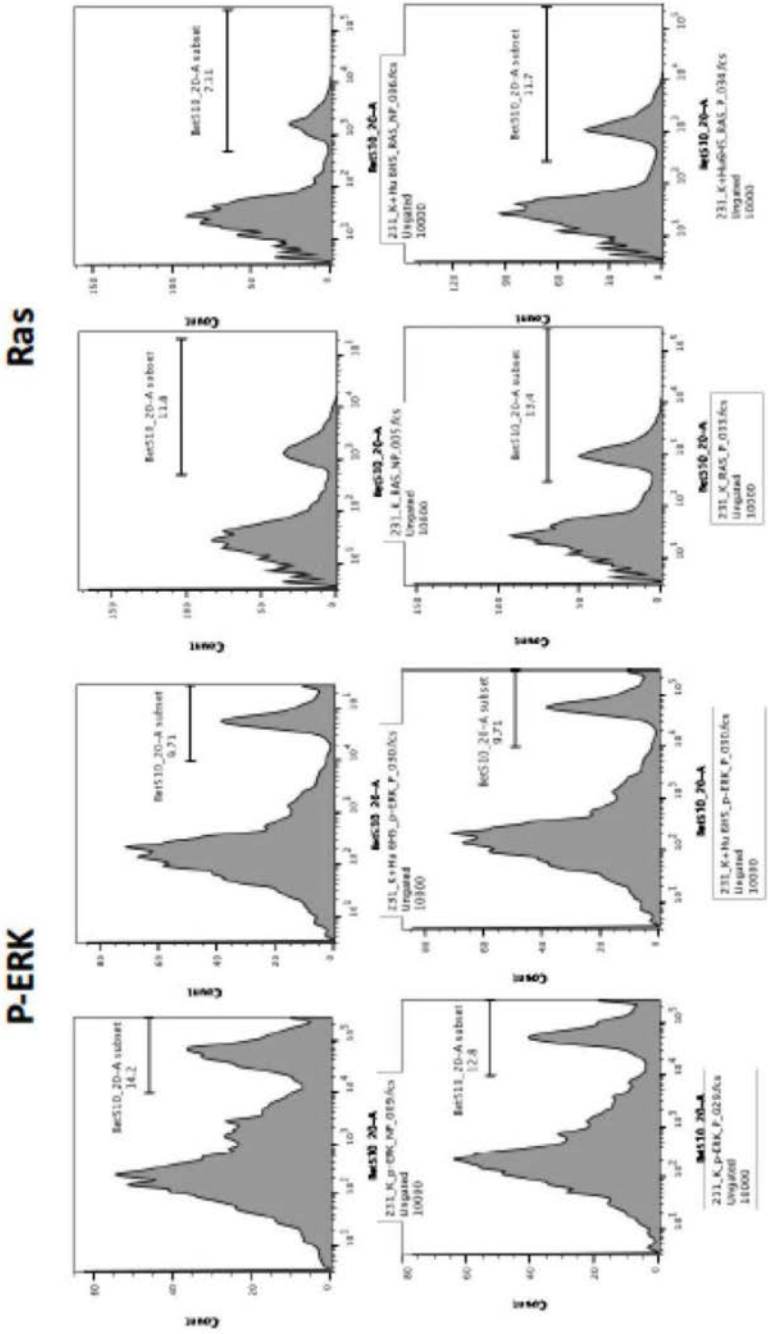


图8B

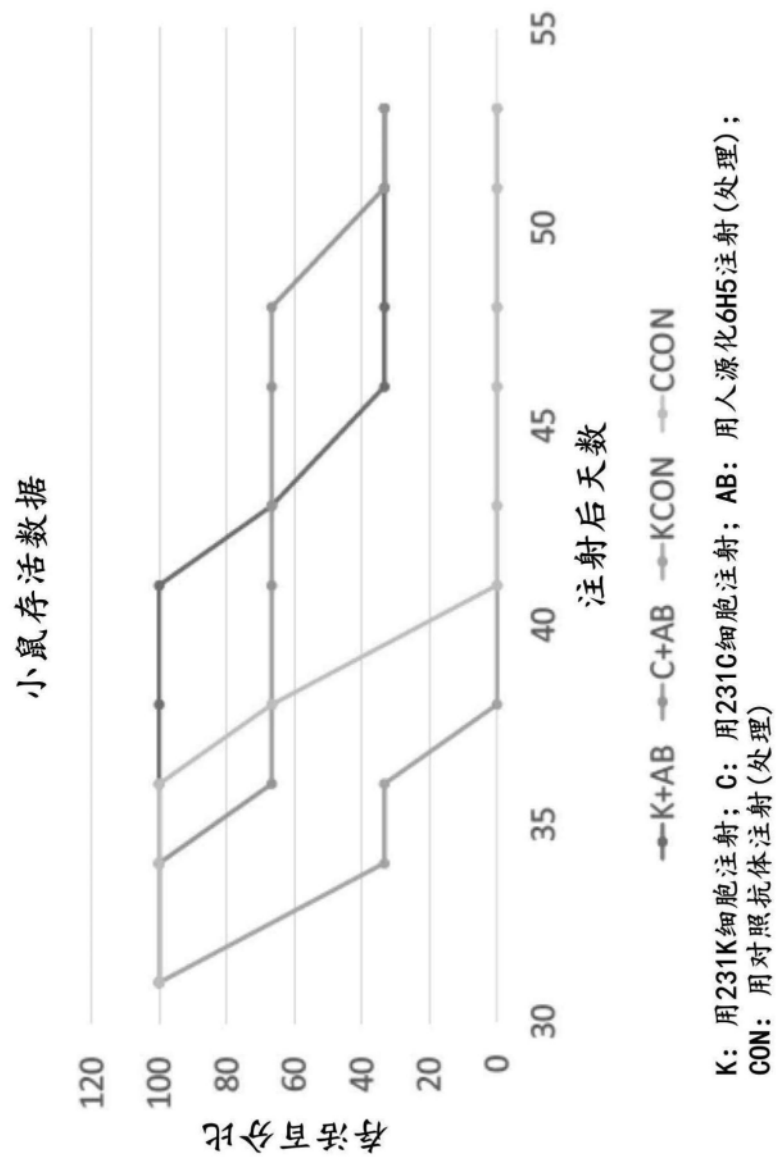
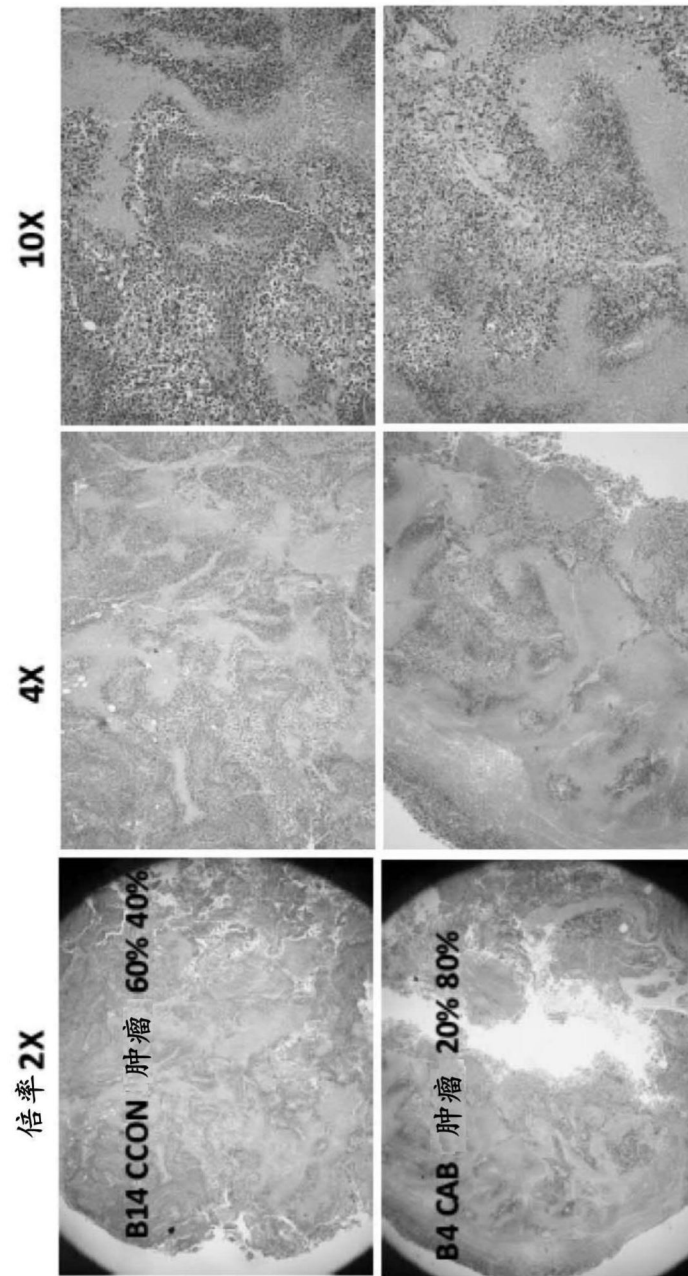


图9A



用hu6H5 (下小图) vs对照(上小图)处理的接种231C的小鼠
每个小图中第一个%是活肿瘤细胞的百分比;第二个%是非活力的百分比。“B”是玻片编号。

图9B

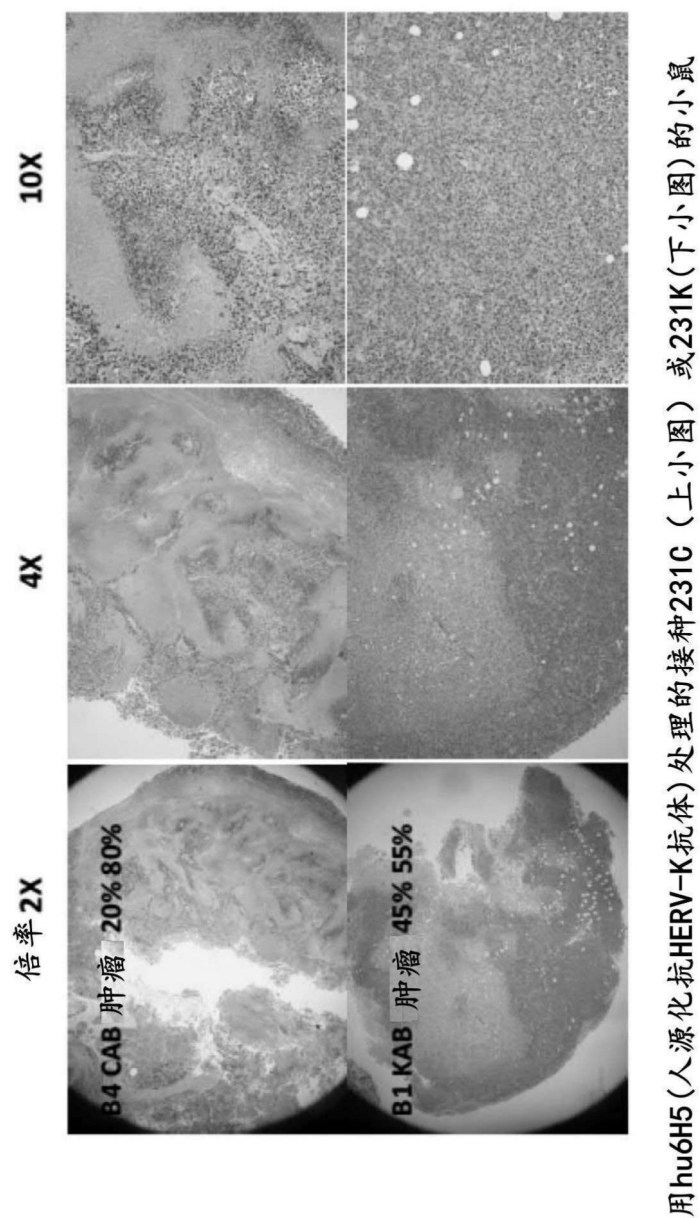
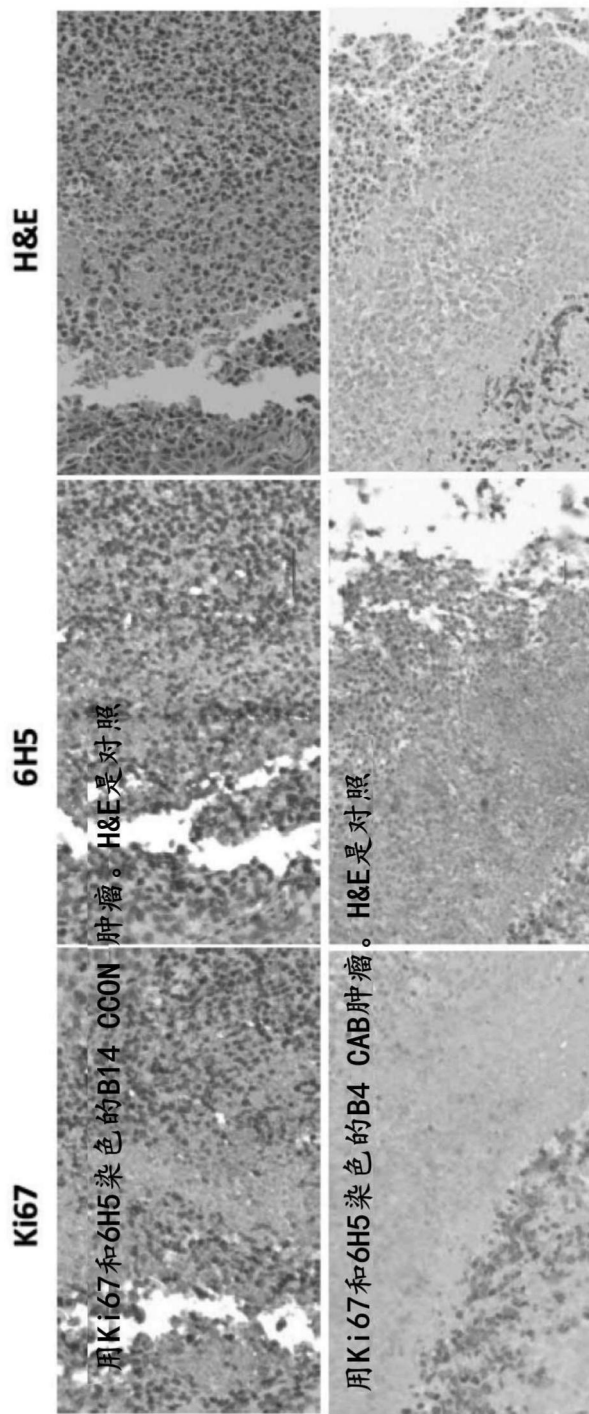
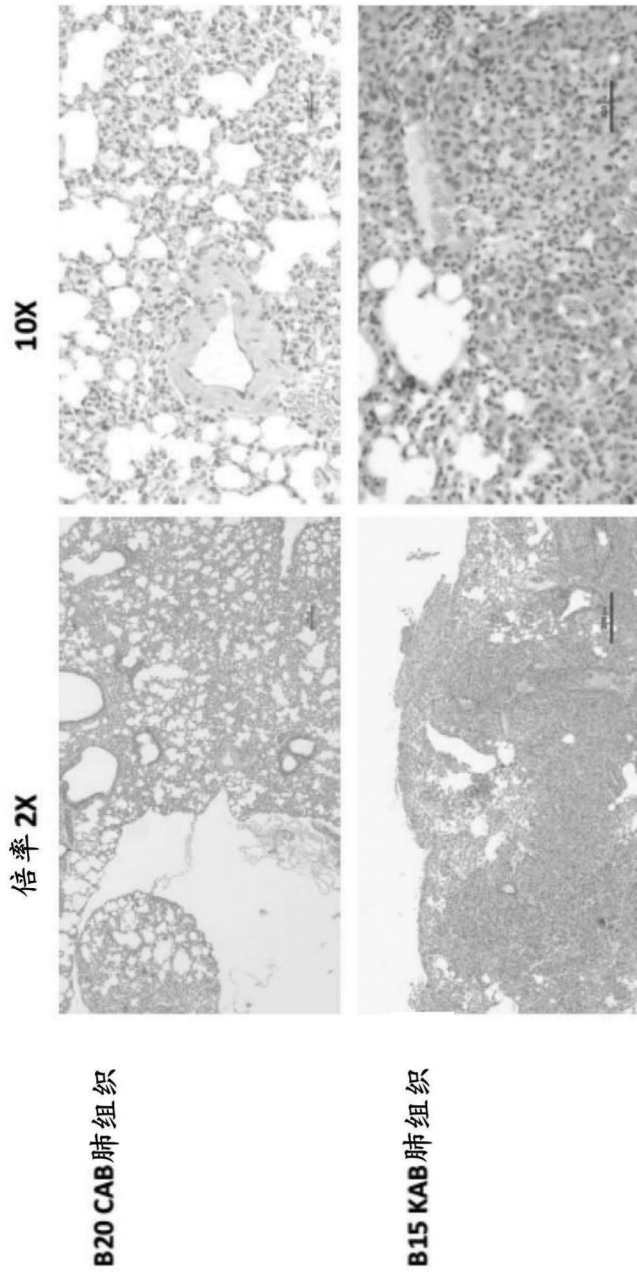


图9C



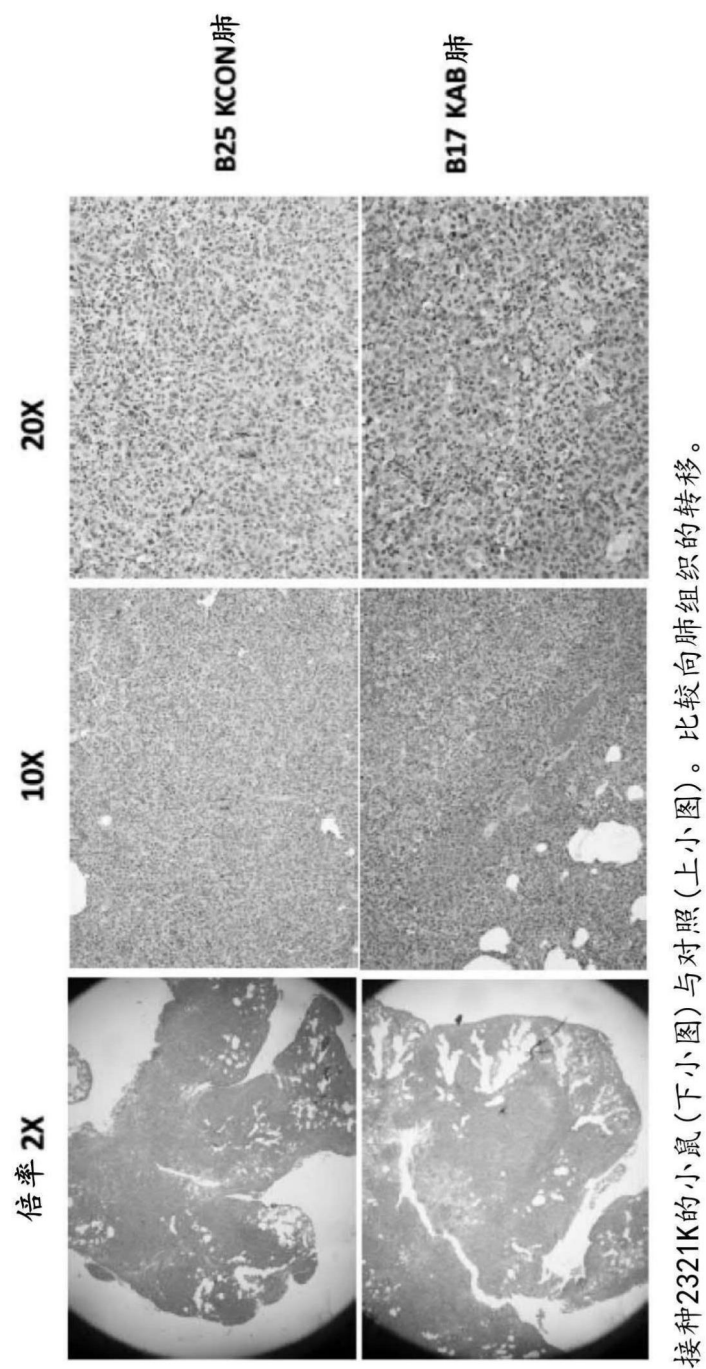
用hu6H5（上小图）处理的接种231C细胞的小鼠与对照（下小图）。用hu6H5处理的小鼠与对照相比证明Ki67或HERV-K的表达降低

图9D



在接种231C（上小图）与231K（下小图）的小鼠之间比较肺组织。
仅在231K小鼠的小鼠肺组织中检测到转移性肿瘤细胞。

图10A



接种2321K的小鼠(下小图)与对照(上小图)。比较向肺组织的转移。

图10B

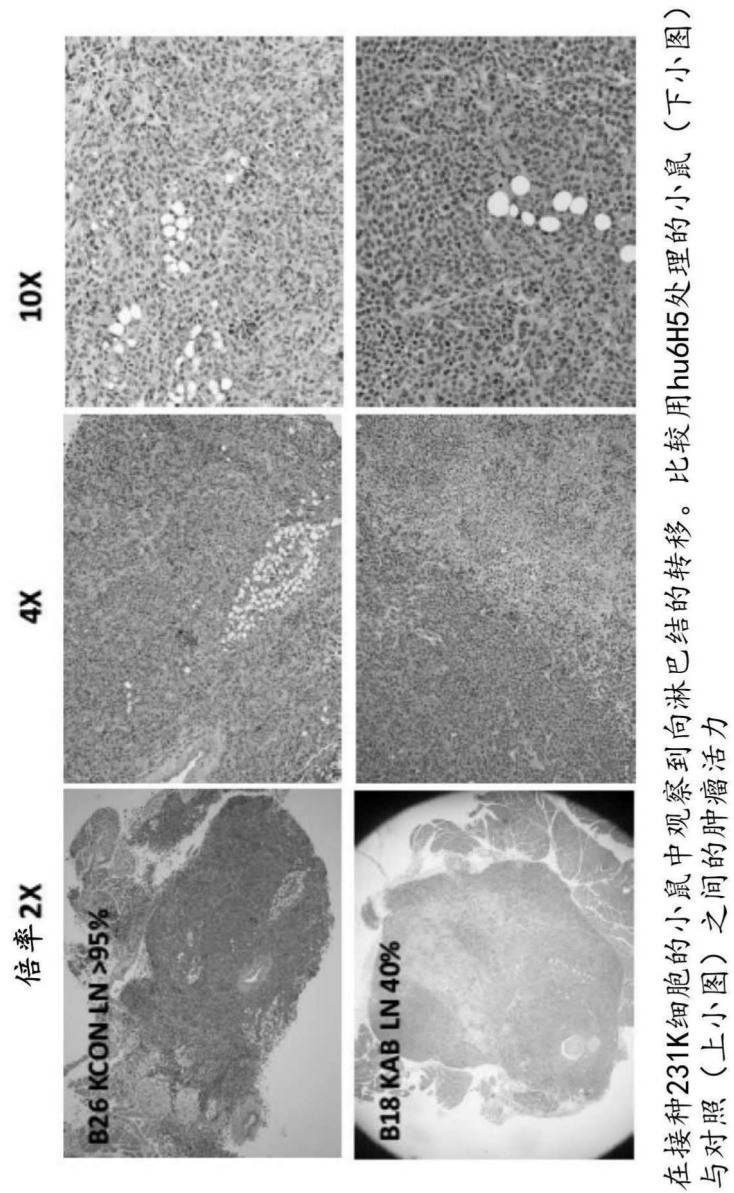


图10C

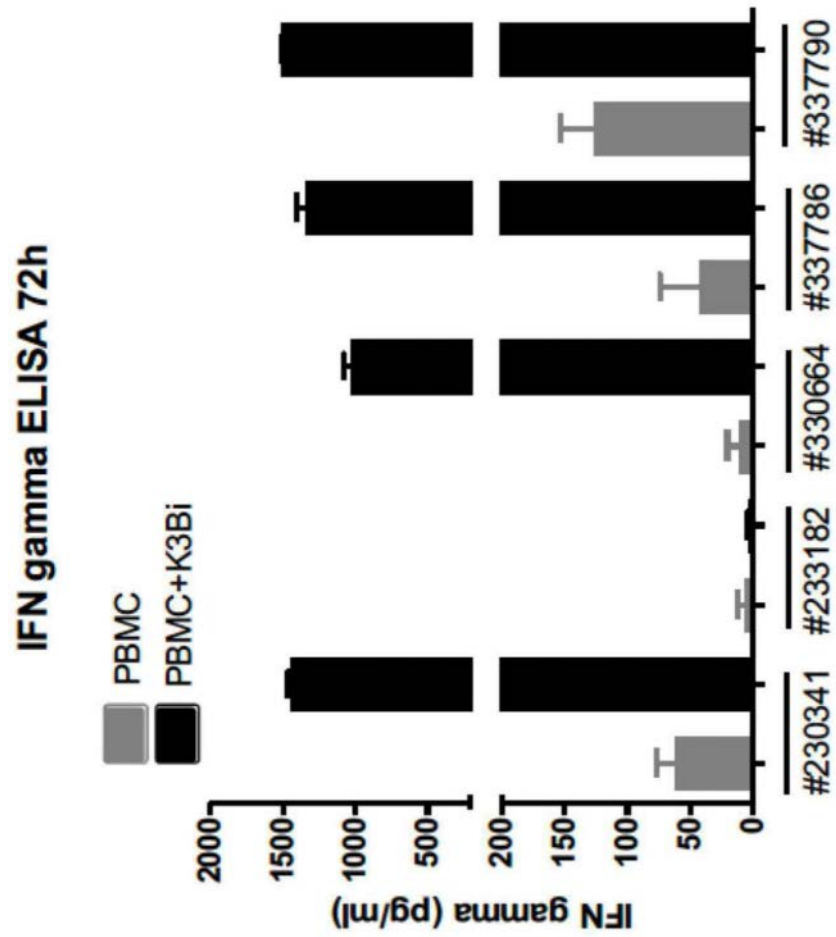


图11

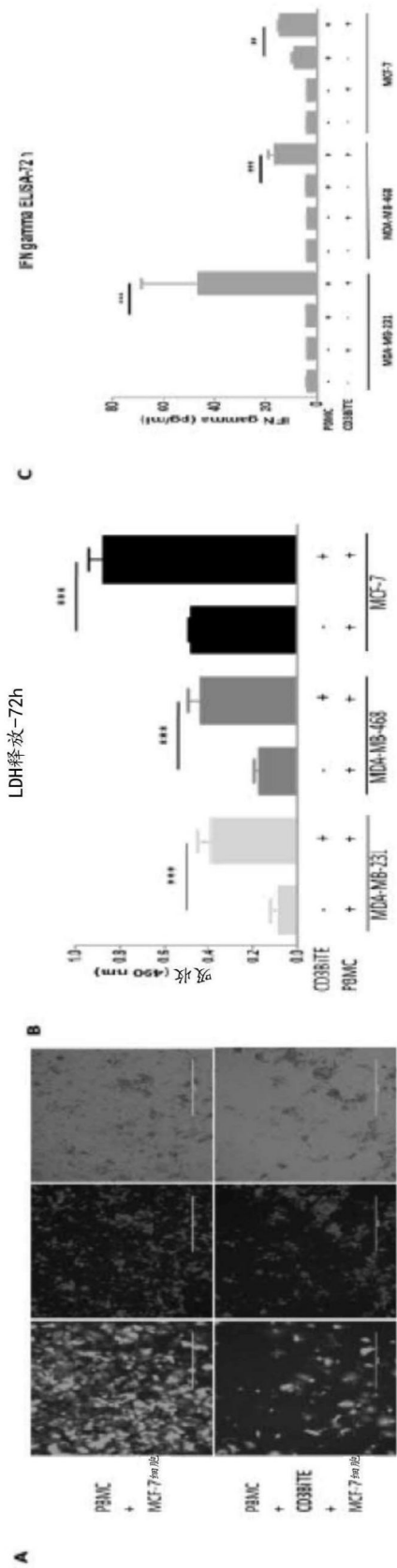


图12

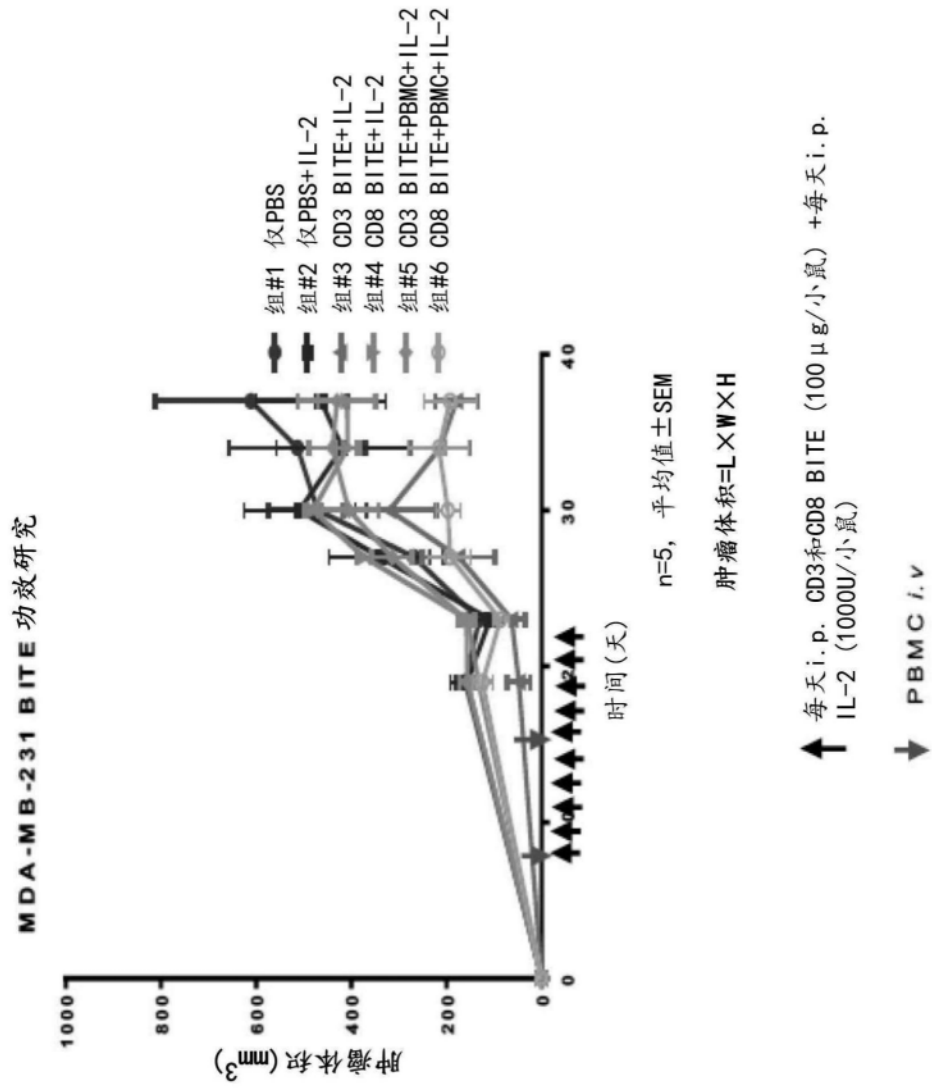


图13

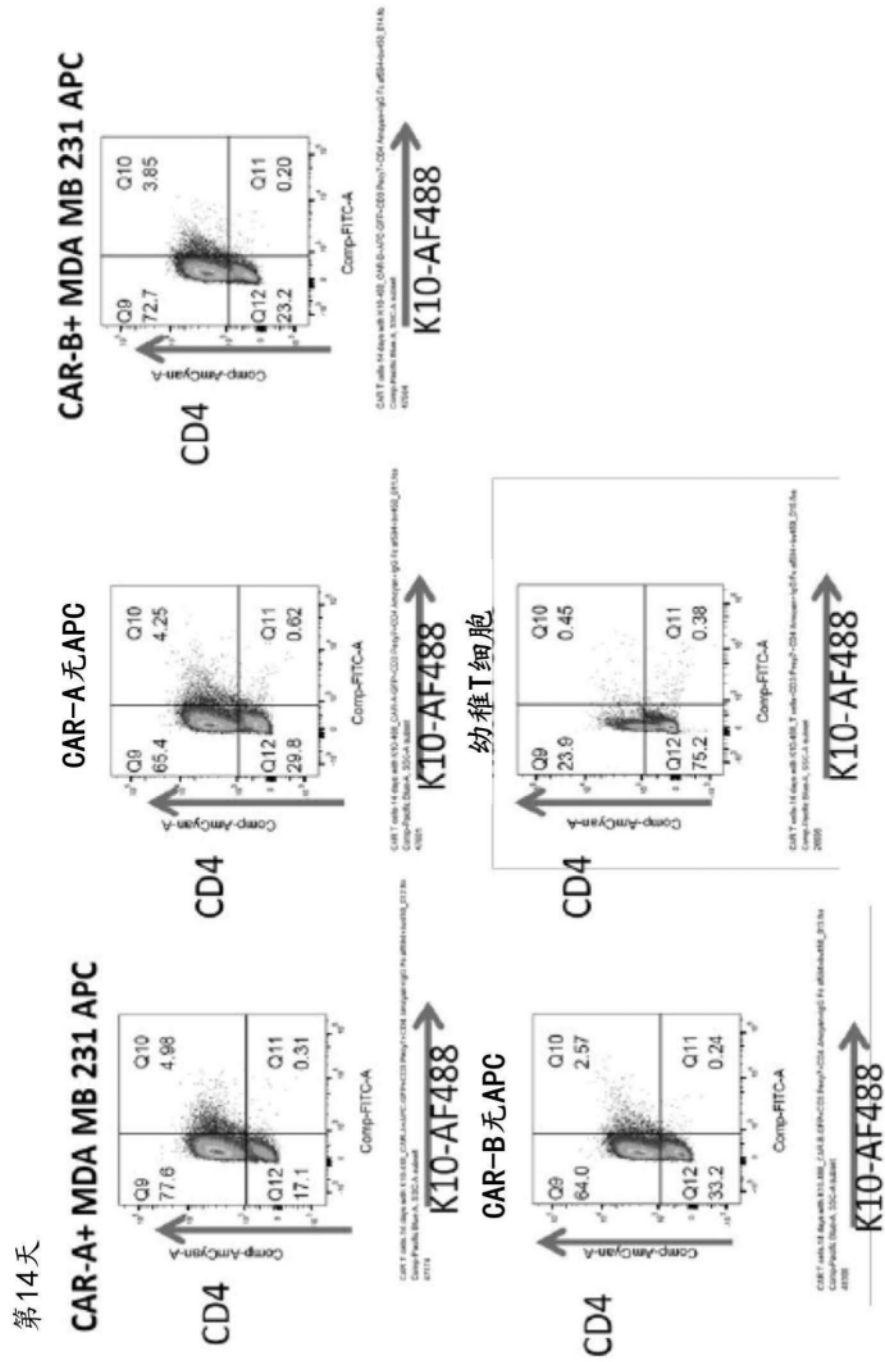


图14

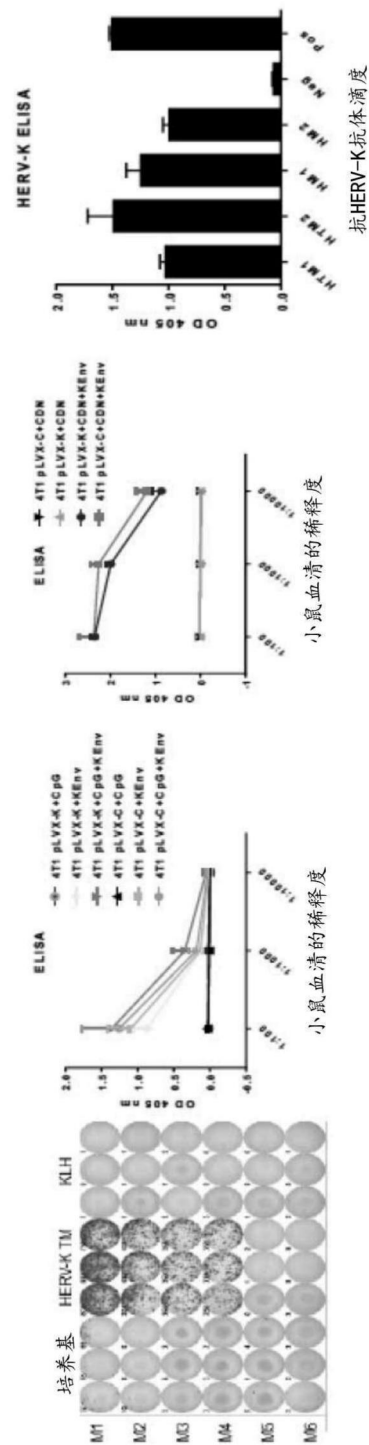


图16

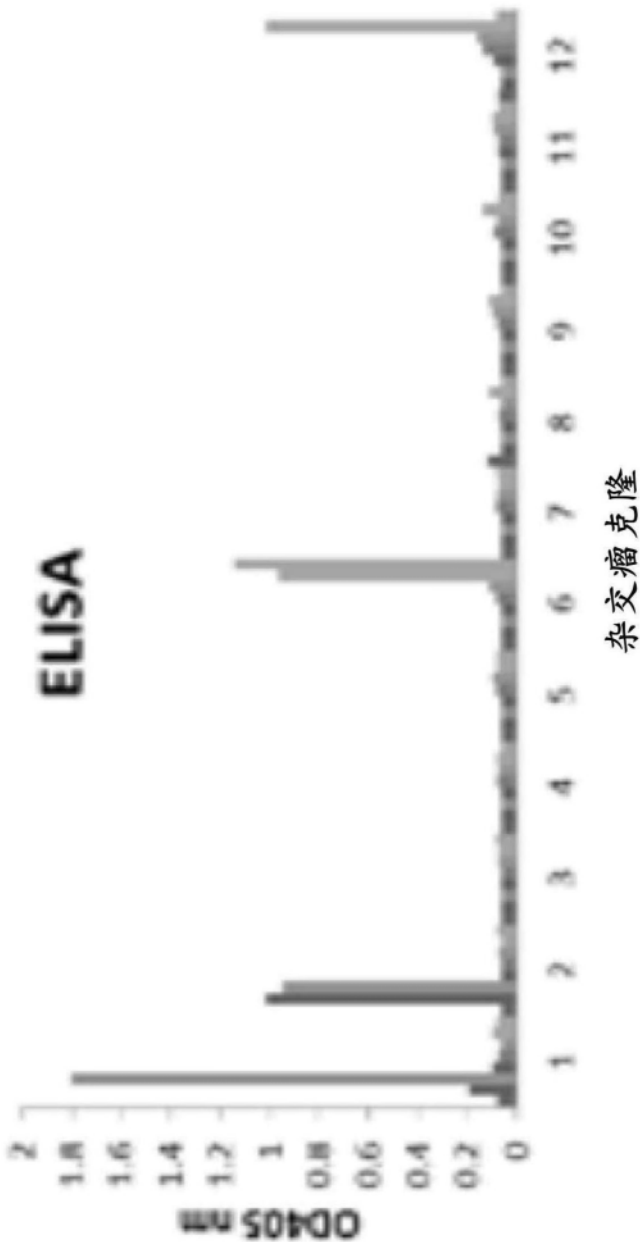


图17

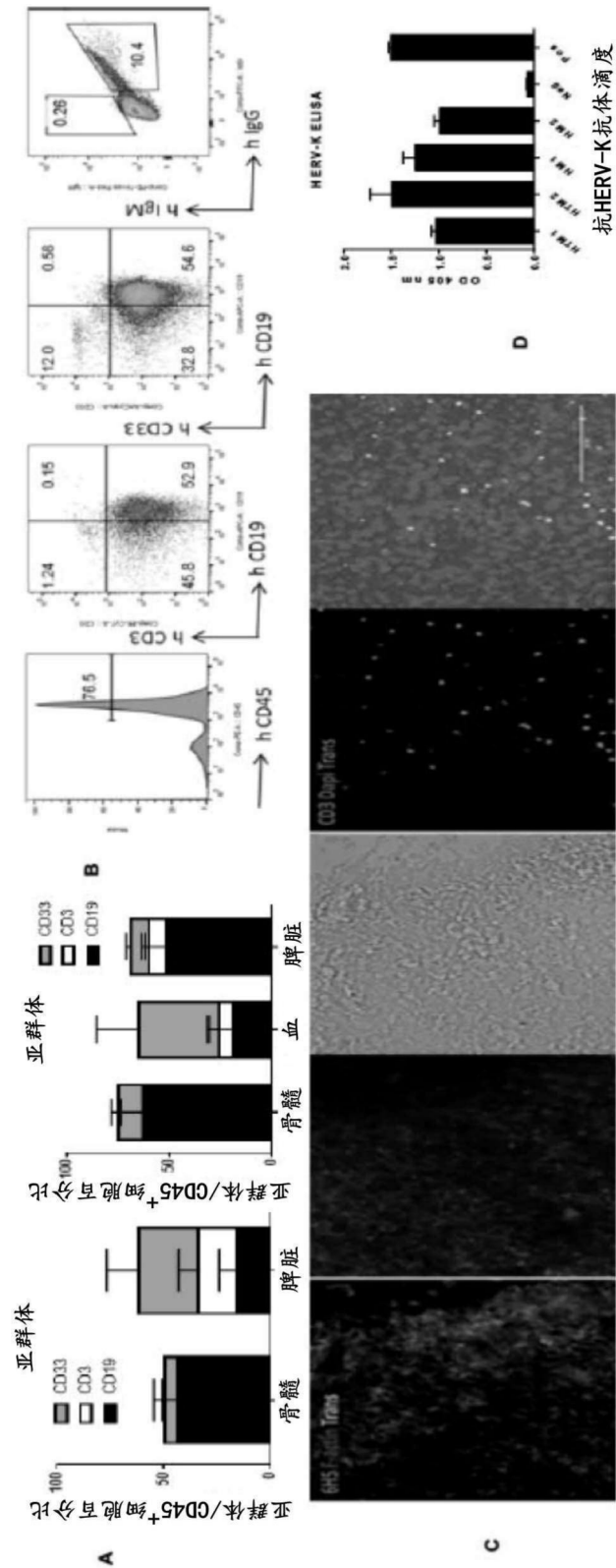


图18

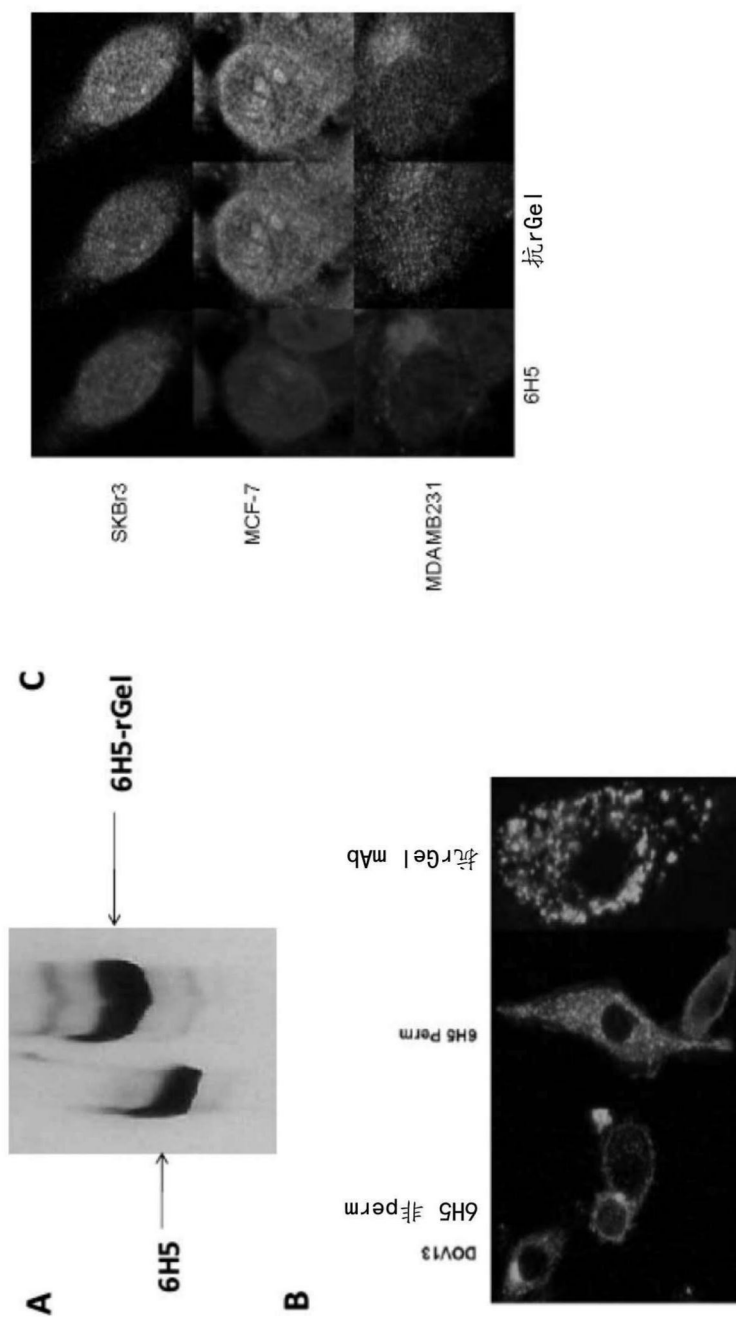


图20

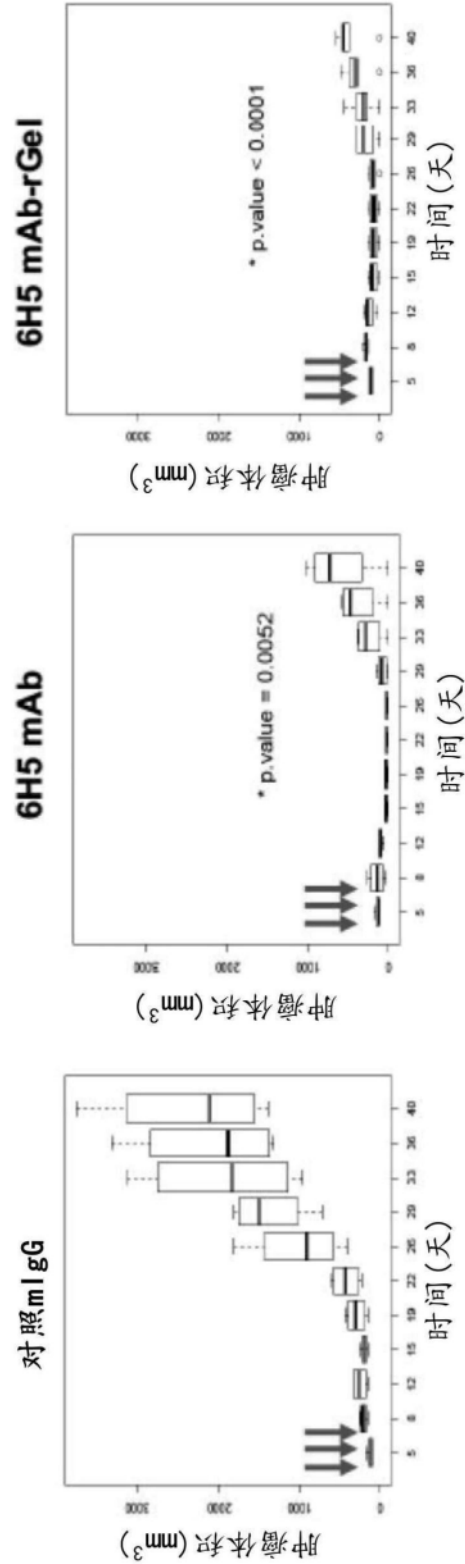


图20(续)

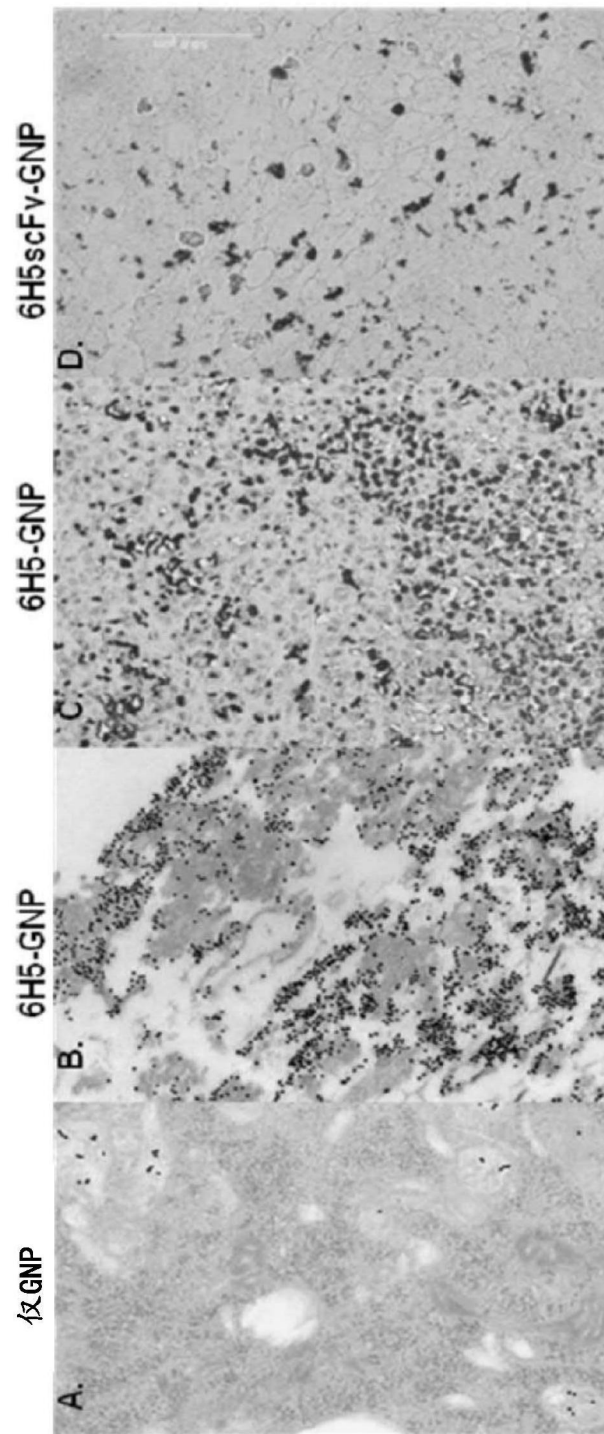


图21

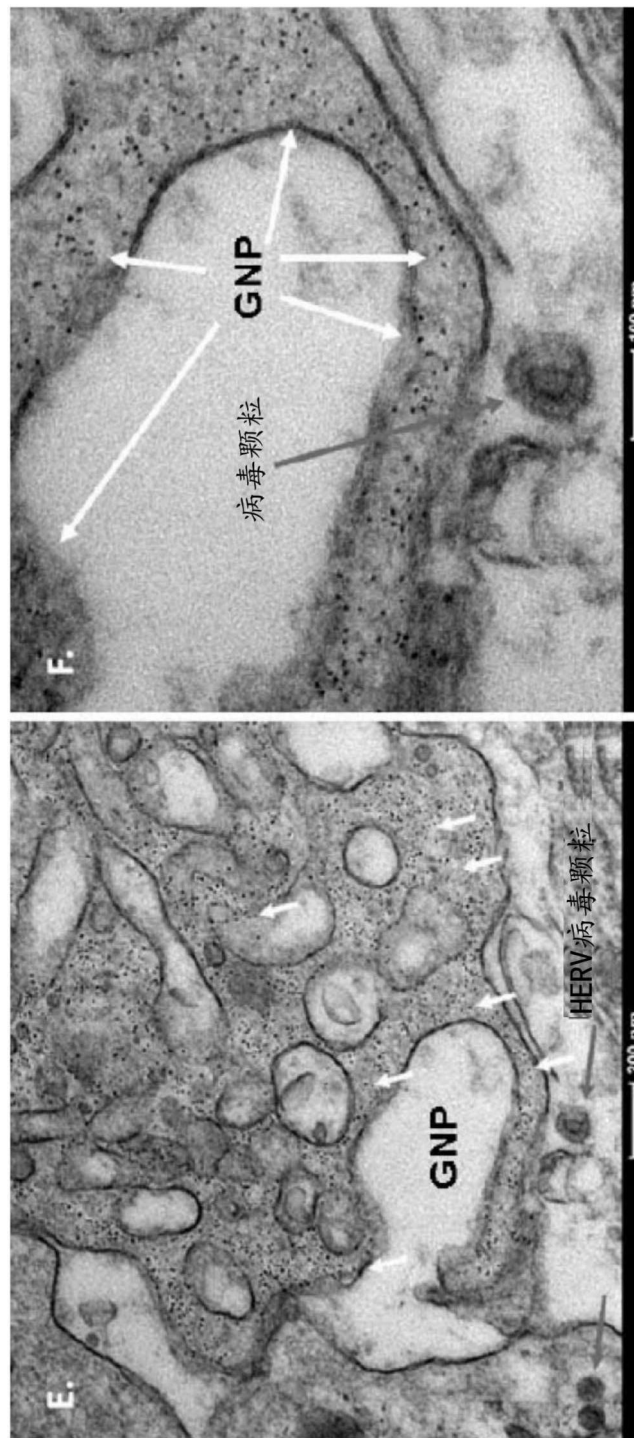
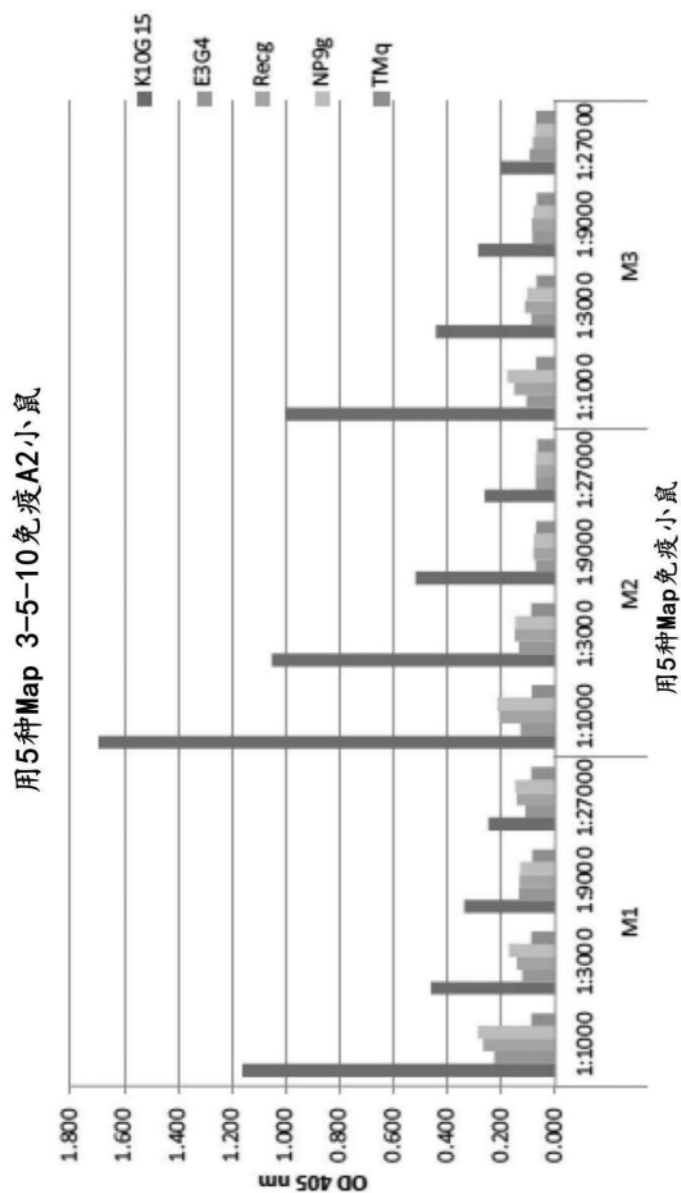


图21(续)



图22



用5种Map免疫小鼠并收集血清且使用各种HERV融合蛋白通过ELISA进行测试。
仅HERV-K SU蛋白是阳性的。

图23