(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119899265 A
(43)申请公布日 2025.04.29

(21)申请号 202411838920.0
(22)申请日 2020.10.21
(30)优先权数据
62/924,298 2019.10.22 US
(62)分案原申请数据
202080074414.2 2020.10.21
(71)申请人 美国政府(由卫生和人类服务部的部长所代表)
地址 美国马里兰州
(72)发明人 何苗壮 汪瑞雪 布莱德利·圣克罗伊 李丹
(74)专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理事务所(普通合伙) 11436
专利代理师 程淼 刘海
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 40/31(2025.01)
A61K 40/11(2025.01)
A61K 40/15(2025.01)
A61K 40/42(2025.01)
A61K 47/68(2017.01)

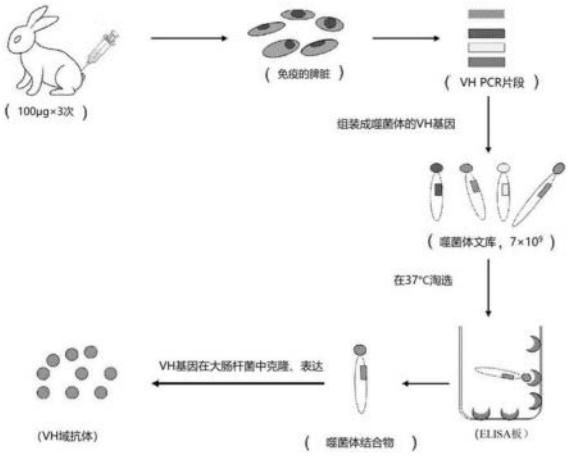
权利要求书3页 说明书53页
序列表（电子公布） 附图38页

(54)发明名称

用于治疗多种实体瘤的靶向B7H3(CD276)的高亲和力纳米抗体

(57)摘要

本发明描述了特异性结合B7H3(也称为CD276)的单域单克隆抗体。所述单域单克隆抗体包括选自噬菌体展示文库的骆驼V_HH和兔VH域纳米抗体。还描述了B7H3靶向的嵌合抗原受体(CAR)和其他抗体缀合物。所述单域单克隆抗体及其缀合物可用于诊断和治疗表达B7H3的实体瘤。



CN 119899265 A

1.一种特异性结合B7H3的单域单克隆抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:3的互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3序列,并且其中所述CDR1、CDR2和CDR3序列分别如以下所示:

SEQ ID NO:3的残基31-35、50-66和97-114;

SEQ ID NO:3的残基26-33、51-58和97-115;或者

SEQ ID NO:3的残基26-35、50-61和98-114。

2.根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体的氨基酸序列与SEQ ID NO:3至少90%相同,并且包括所述SEQ ID NO:3的CDR1、CDR2和CDR3序列。

3.根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

4.根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体是人源化抗体。

5.根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体是嵌合抗体。

6.一种嵌合抗原受体(CAR),包含权利要求1-5所述的抗体。

7.根据权利要求6所述的CAR,进一步包含铰链区、跨膜域、共刺激信号传导部分和信号传导域。

8.根据权利要求7所述的CAR,其中:

所述铰链区包括CD8α铰链区;

所述跨膜域包含CD8α跨膜域;

所述共刺激信号传导部分包含4-1BB信号传导部分;和

所述信号传导域包括一个CD3ζ信号传导域。

9.一种表达权利要求6-8中任一项所述的CAR的分离细胞。

10.根据权利要求9所述的分离细胞,它是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)或自然杀伤(NK)细胞。

11.一种免疫缀合物,包含权利要求1-5中任一项所述的抗体和效应分子。

12.根据权利要求11所述的免疫缀合物,其中所述效应分子是毒素。

13.根据权利要求12所述的免疫缀合物,其中所述毒素是假单胞菌外毒素或其变体。

14.根据权利要求13所述的免疫缀合物,其中所述假单胞菌外毒素变体是PE38。

15.根据权利要求11所述的免疫缀合物,其中所述效应分子是光子吸收剂。

16.根据权利要求11所述的免疫缀合物,其中所述效应分子是可检测标记物。

17.根据权利要求16所述的免疫缀合物,其中所述可检测标记物包括荧光团、酶或放射性同位素。

18.一种抗体-药物缀合物(ADC),包含缀合至权利要求1-5中任一项所述的抗体的药物。

19.根据权利要求18所述的ADC,其中所述药物是小分子。

20.根据权利要求18或19所述的ADC,其中所述药物是抗微管剂、抗有丝分裂剂和/或细胞毒剂。

21.一种多特异性抗体,包含权利要求1-5中任一项所述的抗体和至少一种另外的单克隆抗体或其抗原结合片段。

22.根据权利要求21所述的多特异性抗体,其是双特异性抗体。

23.根据权利要求21所述的多特异性抗体,其为三特异性抗体。

24.根据权利要求21-23中任一项所述的多特异性抗体,其中所述至少一种另外的单克

隆抗体或其抗原结合片段特异性结合T细胞受体或自然杀伤(NK)细胞活化受体的组分。

25.一种抗体-纳米颗粒缀合物,包含缀合至权利要求1-5中任一项所述的抗体的纳米颗粒。

26.根据权利要求25所述的抗体-纳米颗粒缀合物,其中所述纳米颗粒包括聚合物纳米颗粒、纳米球、纳米胶囊、脂质体、树枝状聚合物、聚合物胶束或囊泡。

27.根据权利要求25或26所述的抗体-纳米颗粒缀合物,其中所述纳米颗粒包含细胞毒剂。

28.一种融合蛋白,包含权利要求1-5中任一项所述的抗体和异源蛋白或肽。

29.根据权利要求28所述的融合蛋白,其中所述异源蛋白是Fc蛋白或亮氨酸拉链。

30.一种分离核酸分子,编码权利要求1-5中任一项所述的抗体、权利要求6-8中任一项所述的CAR、权利要求11-17中任一项所述的免疫缀合物、权利要求21-24任一项所述的多特异性抗体或权利要求28或权利要求29所述的融合蛋白。

31.根据权利要求30所述的分离核酸分子,其可操作地连接至启动子。

32.一种包含权利要求30或权利要求31所述的核酸分子的载体。

33.一种分离宿主细胞,包含权利要求31所述的核酸分子或权利要求32所述的载体。

34.一种组合物,包含药学上可接受的载体和权利要求1-5中任一项所述的抗体、权利要求6-8中任一项所述的CAR、权利要求9、10和33中任一项所述的分离细胞、权利要求11-17中任一项所述的免疫缀合物、权利要求18-20中任一项所述的ADC、权利要求21-24中任一项所述的多特异性抗体、权利要求25-27中任一项所述的抗体-纳米颗粒缀合物或权利要求28或权利要求29所述的融合蛋白。

35.一种检测样品中B7H3表达的非诊断目的的方法,包括:

使所述样品与权利要求1-5中任一项所述的抗体接触;和

检测所述抗体与所述样品的结合,从而检测所述样品中B7H3的表达。

36.根据权利要求35所述的方法,其中所述抗体是直接标记的。

37.根据权利要求35所述的方法,其中,所述方法还包括:

使所述抗体与检测抗体接触,和

检测所述检测抗体与所述抗体的结合,从而检测所述样品中B7H3的表达。

38.权利要求1-5中任一项所述的抗体、权利要求6-8中任一项所述的CAR、权利要求9-10中任一项所述的分离细胞、权利要求11-17任一项所述的免疫缀合物、权利要求18-20任一项所述的ADC、权利要求21-24任一项所述的多特异性抗体、权利要求25-27任一项所述的抗体-纳米颗粒缀合物、权利要求28或权利要求29所述的融合蛋白,或权利要求34所述的组合物用于制备在治疗受试者B7H3阳性癌症的方法中使用的药物的用途。

39.权利要求1-5任一项所述的抗体、权利要求6-8任一项所述的CAR、权利要求9-10任一项所述的分离细胞、权利要求11-17任一项所述的免疫缀合物,权利要求18-20任一项所述的ADC,权利要求21-24任一项所述的多特异性抗体、权利要求25-27中任一项所述的抗体-纳米颗粒缀合物、权利要求28或权利要求29所述的融合蛋白,或权利要求34所述的组合物用于制备在抑制受试者B7H3阳性癌症的肿瘤生长或转移的方法使用的药物的用途。

40.根据权利要求38或权利要求39所述的用途,其中所述B7H3阳性癌症是实体瘤。

41.根据权利要求40所述的用途,其中所述实体瘤是肝癌、胰腺癌、肾癌、膀胱癌、宫颈

癌、食道癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、脑癌、黑色素瘤或间皮瘤。

42.根据权利要求41所述的用途,其中所述肝癌是肝细胞癌。

43.根据权利要求41所述的用途,其中所述脑癌是神经母细胞瘤或胶质母细胞瘤。

44.根据权利要求38或权利要求39所述的用途,其中所述B7H3阳性癌症是小儿癌症。

45.根据权利要求44所述的用途,其中所述小儿癌症是骨肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤或尤文氏肉瘤。

用于治疗多种实体瘤的靶向B7H3(CD276)的高亲和力纳米抗体

[0001] 本申请是申请日为2020年10月21日,申请号为202080074414.2,题为“用于治疗多种实体瘤的靶向B7H3(CD276)的高亲和力纳米抗体”的分案申请。

[0002] 交叉引用相关申请

[0003] 本申请要求于2019年10月22日提交的美国临时申请号62/924,298的权益,该临时申请通过引用整体并入本文。

技术领域

[0004] 本公开涉及以高亲和力结合B7同源物3(B7H3)的单链单克隆抗体。本公开进一步涉及所述单克隆抗体和抗体缀合物的用途,例如用于治疗实体瘤。

[0005] 政府支持声明

[0006] 本发明是根据美国国立卫生研究院授予的项目编号Z01 BC010891在政府支持下完成的。美国政府对本发明享有一定的权利。

背景技术

[0007] 纳米抗体是已知最小的抗体抗原结合片段,由大约120个氨基酸组成,分子量为12kD至15kD,大小约为4×2.5nm(霍达巴赫什(Khodabakhsh)等人,《国际免疫学评论》(Int Rev Immunol),37,316-322,2018)。大多数经过充分研究的纳米抗体源自于重链可变区(VH),它可以天然存在于骆驼科动物(称为V_HH)和软骨鱼类(V_{NAR})中(冯(Feng(冯))等人,《抗体治疗》(Antib Ther),2,1-11,2019),并且在体内存在于一些人类重链疾病中(普雷利(Prelli)和弗朗吉奥内(Frangione),《免疫学杂志》(J Immunol),148,949-952,1992)。由于体积小、溶解度高、热稳定性好、可逆的重折叠能力以及与常规的完整IgG相比在体内相对更容易穿透组织,纳米抗体可用于医疗应用或作为研究工具(霍达巴赫什等人,《国际免疫学评论》,37,316-322,2018;韦索洛夫斯基(Wesolowski)等人,《医学微生物学和免疫学》(Med Microbiol Immunol),198,157-174,2009;霍(Ho),《抗体治疗》,1,1-5,2018),第一种纳米抗体药物卡普赛珠单抗(Caplacizumab)(CABLIVI®)的批准证明了这一点,它是一种人源化骆驼科V_HH,用于治疗获得性血栓性血小板减少性紫癜(aTTP)和血栓形成(埃尔维尔迪(Elverdi)和埃斯卡赞(Eskazan),《药物设计开发和治疗》(Drug Des Devel Ther),13,1251-1258,2019;史高丽(Scully)等人,《新英格兰医学杂志》(N Engl J Med),380,335-346,2019)。

[0008] 从历史上看,骆驼科V_HH域抗体一直是研究的主导方向,直到人类VH域抗体的兴起(冯等人,《美国科学院院报》(Proc Natl Acad Sci USA),110,E1083-1091,2013;唐(Tang)等人,《分子癌治疗》(Mol Cancer Ther),12,416-426,2013;李(Li)等人,《美国科学院院报》,114,E6623-E6631,2017)。在骆驼科的血清中,既有常规IgG,也有大量仅重链的IgG(HCAb),占所有血清免疫球蛋白的45%至75%,具体取决于特定物种(霍达巴赫什等人,《国际免疫学评论》,37,316-322,2018)。HCAb由V_HH片段、唯一的抗原结合域、之后的CH2和CH3

域以及与常规IgG中VH-CH1域配对的轻链组成。重组V_HH域是正在开发的功能实体。

[0009] 有几个结构特征使自然进化的骆驼科V_HH域高度可溶且稳定。第一,人类VH种系中的Val37(Kabat编号)通常是V_HH域中的Phe37(或Tyr37)(里赫曼(Riechmann)和穆尔德曼斯(Muyldermans),《免疫学方法杂志》(J Immunol Methods),231,25-38,1999),其使得所述域的疏水填充更紧凑且稳定,这可能是使V_HH特别稳定的驱动因素(筱崎(Shinozaki)等人,《生物科学与生物工程杂志》(JBiosci Bioeng),125,654-661,2018)。第二,人类VH种系中的轻链接触残基G44、L45和W47是V_HH中的E44(或Q44)、R45(或C45)和G47(或Ser、Leu、Phe)(霍尔特(Holt)等人,《生物技术趋势》(Trends Biotechnol),21,484-490,2003),这使得可接近表面积更亲水且更少聚集。此外,在一些V_HH域中,W103可以替换为R103。第三,V_HH域的CDR3通常比人类/啮齿动物CDR3更长,并且它们通常在CDR3中包含Cys,与CDR1(骆驼)末端或CDR2(美洲驼)开头的Cys形成另外的二硫键(韦索洛夫斯基等人,《医学微生物学和免疫学》,198,157-174,2009)。这种另外的CDR3二硫键和典型的C22-C92二硫键进一步使V_HH域更加稳定(T_m值范围为60-78℃),并实现可逆地展开/重折叠(霍尔特等人,《生物技术趋势》,21,484 -490,2003)。

[0010] 第一种非V_HH哺乳动物域抗体于1989年从用溶菌酶和钥孔-血蓝蛋白免疫的小鼠脾脏制成的cDNA表达文库中筛选出来,其中两个小鼠VH域在20nM范围内显示对溶菌酶的亲和力(沃德(Ward)等人,《自然》(Nature)341,544-546,1989),并且首次提出了“单域抗体”(dAbs)的名称。此后,发现了骆驼科V_HH,推动了探索人类VH域抗体的想法,人类VH域抗体在制药和其他应用中更具吸引力。尽管骆驼科域抗体和人类域抗体都已被大量研究,但在获取资源方面存在一些技术限制,特别是通过免疫发现域抗体。为了克服资源可及性的限制,已经制定了几种策略以产生人类或人源化VH域抗体。尽管亲和力并不总是与免疫抗体一样高,但原始(naïve)人类VH域文库的噬菌体展示是一种经过验证的方法(冯等人,《美国科学院院报》,110,E1083-1091,2013;唐等人,《分子癌治疗》,12,416-426,2013;李(Li)等人,《美国科学院院报》,114,E6623-E6631,2017)。产生人类域抗体的另一种方法是使用具有人类VH种系基因的转基因动物(舒瑟(Schusser)等人,《免疫学杂志》,46,2137-2148,2016;詹森斯(Janssens)等人,《美国科学院院报》,103,15130-15135,2006)。并非直接分离人类域抗体,产生免疫动物VH域抗体然后人源化也是产生高亲和力的类人抗体的方法。

发明内容

[0011] 本公开描述了特异性结合B7H3(也称为CD276)的十种骆驼单域V_HH单克隆抗体和两种兔VH单域抗体。B7H3特异性骆驼抗体(本文称为RWB12(“B12”)、RWG8(“G8”)、RWC4(“C4”)、RWB2、RWH5、RWD5、RWC3、RWG4、RWD9和RWH1),以及B7H3-特异性兔抗体(本文称为RFA1和RFB1)以高亲和力结合B7H3。还公开了产生由所公开的纳米抗体组成的嵌合抗原受体(CAR)T细胞。

[0012] 本文提供了结合(例如特异性结合)B7H3的单克隆抗体。在一些实施方案中,所述单克隆抗体包括纳米抗体RWB12、RWG8、RWC4、RWB2、RWH5、RWD5、RWC3、RWG4、RWD9、RWH1、RFA1或RFB1的互补决定区(CDR)序列。本文还提供了包括公开的单克隆抗体的缀合物。在一些实例中,提供了包括本文公开的单克隆抗体的CAR(以及表达CAR的T细胞和自然杀伤细胞)、免

疫缀合物(例如免疫毒素)、多特异性抗体(例如双特异性T细胞接合剂)、抗体-药物缀合物(ADC)、抗体-纳米颗粒缀合物、抗体-放射性同位素缀合物(例如用于癌症诊断和免疫PET成像)和融合蛋白。

[0013] 本公开还提供了包含B7H3特异性单克隆抗体和药学上可接受的载体的组合物。

[0014] 本文还提供了编码本文公开所述的B7H3特异性单克隆抗体、CAR、免疫缀合物(例如免疫毒素)、多特异性抗体和融合蛋白的核酸分子和载体。进一步提供了包括编码B7H3单克隆抗体或CAR的核酸或载体的分离细胞。

[0015] 本文还提供了治疗受试者B7H3阳性癌症的方法,以及抑制受试者B7H3阳性癌症的肿瘤生长或转移的方法。在一些实施方案中,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文公开的单克隆抗体,或向所述受试者施用治疗有效量的包含本文公开的单克隆抗体的CAR(或CAR T细胞或CAR NK细胞)、免疫缀合物(例如免疫毒素)、ADC、多特异性抗体、抗体-纳米颗粒缀合物或融合蛋白。

[0016] 本文进一步提供了检测样品中B7H3表达的方法。在一些实施方案中,所述方法包括使所述样品与本文公开的单克隆抗体接触,并检测所述抗体与所述样品的结合。

[0017] 本文还提供了诊断受试者患有B7H3阳性癌症的方法。在一些实施方案中,所述方法包括将获自所述受试者的样品与本文公开的单克隆抗体接触,并检测所述抗体与所述样品的结合。

[0018] 参照附图,通过以下详细的描述,本公开的前述和其他目的与特征将更加清楚。

附图说明

[0019] 图1A:用重组B7H3使兔免疫、产生VH域噬菌体展示文库和选择B7H3结合物的示意图。

[0020] 图1B:SDS-PAGE分析纯化的B7H3-hFc。在8% SDS-PAGE凝胶上分离1微克或5微克纯化的B7H3-hFc(非还原(Non.)或β-巯基乙醇还原(Red.))。通过考马斯蓝R-250染色观察蛋白质条带。

[0021] 图2A-2B:滴定B7H3-hFc免疫兔血清和确认其细胞结合。(图2A)通过蛋白质结合ELISA对B7H3-hFc免疫的兔血清进行滴定。IAB-hFc来源于间皮素的N端片段,用作hFc标签对照。R31M0、R31M1、R31M2、R31M3分别代表免疫前、第1次、第2次、第3次免疫的血清。(图2B)免疫血清的细胞结合测定。阴影区域表示仅用FITC缀合的二级抗体(山羊-抗-兔)染色的细胞;左曲线,用免疫前血清染色的细胞;右曲线,用免疫血清R31M3染色的细胞。

[0022] 图3A-3B:B7H3结合物的序列和结构建模。(图3A)B7H3结合物(A1,SEQ ID NO:11;B1,SEQ ID NO:12)以及兔抗羧腐胺赖氨酸单克隆抗体(PDB#5DUB,SEQ ID NO:34)的类似VH的序列比对。CDR区域由IMGT划定系统限定。(图3B)使用在线软件SWISS-MODEL对A1和B1结合物进行结构建模。5DUB的晶体结构也作为对照物进行显示。

[0023] 图4A-4C:B7H3结合物的结合特性。(图4A)SDS-PAGE分析从大肠杆菌纯化的A1和B1结合物(VH-His-FLAG融合)。在8% SDS-PAGE凝胶上分离两微克纯化的B7H3-hFc(非还原(Non.)或β-巯基乙醇还原(Red.))。通过考马斯蓝R-250染色观察蛋白质条带。(图4B)通过ELISA测量蛋白质结合亲和力。在ELISA板上包被5微克B7H3-hFc,并且与所述ELISA板一起培养不同浓度的域抗体,用HRP缀合的抗FLAG小鼠单克隆抗体M2检测结合。使用软件

GraphPad Prism绘制结合曲线,计算的EC50值由软件的双曲线单点结合算法确定。(图4C)通过流式细胞术测定细胞结合。将每毫升10微克的域抗体与1百万个细胞共同培养。通过APC缀合的抗FLAG单克隆抗体使抗体结合可视化。标记为“1”的曲线代表仅用二级抗体染色的细胞;标记为“2”的曲线代表用A1或B1域抗体染色的细胞。

[0024] 图5:在HEK-293细胞中产生B7H3-Fc融合蛋白。重组B7H3-Fc融合蛋白在HEK-293细胞中表达,并使用AKTA Explorer(通用电气医疗公司(GE Healthcare))在蛋白A柱(通用电气医疗公司)上纯化。纯化的B7H3-Fc融合蛋白在SDA-PAGE凝胶上的纯度超过99%,在非还原条件下(左)和还原条件下(右)的分子量分别为154kDa和77kDa。B7H3-Fc的产量为2mg/L。Glypican 2(GPC2)-Fc用作对照蛋白。

[0025] 图6:在针对B7H3结合物的八个骆驼V_HH文库上进行噬菌体淘选。使用由八只骆驼(单峰骆驼)制成的八个V_HH单域抗体文库,对重组B7H3-Fc蛋白进行3轮噬菌体淘选。每一轮的噬菌体效价如图所示。第三轮噬菌体淘选中噬菌体效价的增加表明对B7H3具有高亲和力的V_HH结合物的富集。

[0026] 图7A-7B:RWC4 V_HH纳米抗体的纯化。(图7A)从AKTA Explorer(通用电气医疗公司)洗脱的RWC4 V_HH骆驼纳米抗体级分的SDS-PAGE。(图7B)在AKTA Explorer(通用电气医疗公司)上镍柱(通用电气医疗公司)的纳米抗体洗脱的色谱图。RWC4的产率为33.8mg/L。

[0027] 图8A-8B:RWG8 V_HH纳米抗体的纯化。(图8A)从AKTA Explorer(通用电气医疗公司)洗脱的RWG8 V_HH骆驼纳米抗体级分的SDS-PAGE。(图8B)在AKTA Explorer(通用电气医疗公司)上镍柱(通用电气医疗公司)的RWG8纳米抗体洗脱的色谱图。RWG8的产量为50mg/L。

[0028] 图9A-9B:RWB12 V_HH纳米抗体的纯化。(图9A)从AKTA Explorer(通用电气医疗公司)洗脱的RWB12 V_HH骆驼纳米抗体级分的SDS-PAGE。(图9B)在AKTA Explorer(通用电气医疗公司)上镍柱(通用电气医疗公司)的RWB12纳米抗体洗脱的色谱图。RWB12的产量为132mg/L。

[0029] 图10:选定的B7H3靶向的V_HH纳米抗体与NBEB神经母细胞瘤细胞的结合。通过FACS分析评估所述B7H3特异性纳米抗体的结合。六种测试抗体(RWC4、RWB12、RWG8、RWA12、RWG4和RWD5)能够结合NBEB细胞。

[0030] 图11:选定的B7H3靶向的V_HH纳米抗体与A431表皮样癌细胞的结合。通过FACS分析评估所述B7H3特异性纳米抗体的结合。六种测试抗体(RWC4、RWB12、RWG8、RWA12、RWG4和RWD5)能够结合A431细胞。

[0031] 图12:RWC4对人类B7H3-Fc的动力学。使用重组人类B7H3-Fc蛋白在Octet系统(创意生物实验室公司(Creative Biolabs))上测量RWC4的缔合/解离特性。RWC4的K_D=3.8nM,RWC4的$K_{on}=2.65\times10^4$,RWC4的$K_{dis}=1.01\times10^{-4}$。

[0032] 图13:RWG4对人类B7H3-Fc的动力学。使用重组人类B7H3-Fc蛋白在Octet系统(创意生物实验室公司)上测量RWG4的缔合/解离特性。RWG4的K_D=6.94nM,RWG4的$K_{on}=9.13\times10^3$,RWG4的$K_{dis}=6.34\times10^{-5}$。

[0033] 图14:表达B7H3靶向的CAR的慢病毒的T细胞转染效率。通过FACS测量转染效率。

[0034] 图15A-15D:靶向B7H3的CAR-T细胞在B7H3阳性细胞中的细胞毒性。(图15A)人类神经母细胞瘤NBEB细胞。(图15B)人类神经母细胞瘤LAN-1细胞。(图15C)人类腺癌BXPC-3细胞。(图15D)人类胰脏癌Miacapa2细胞。RWB12、RWG8和RWC4 CAR-T细胞对诱导特异性裂解最

有效。

[0035] 图16A-16D:靶向B7H3的CAR-T细胞在B7H3阳性细胞和B7H3敲除细胞中的细胞毒性。(图16A)人类神经母细胞瘤IMR32细胞。(图16B)鼠结肠腺癌MC38-CD276^{+}细胞。(图16C)人类神经母细胞瘤IMR32-CD276$^{-/-}$细胞。(图16D)鼠结肠腺癌MC38-CD276$^{-/-}$细胞。三种所述CAR T细胞(RWB12、RWG8和RWC4)对B7H3阳性细胞表现出有效的细胞毒性,但对B7H3阴性细胞没有。

[0036] 图17A-17C:B7H3 CAR T细胞对胰腺癌细胞的细胞毒性。使用两种表达荧光素酶的B7H3阳性胰腺癌细胞系:Panc-1 GFP-Luc(GL)和BxPC-3GL,评估了人类B7H3靶向的纳米抗体衍生的CAR T细胞(B12、G8和C4)的细胞毒性。(图17A)流式细胞术显示Panc-1和BxPC-1都是B7H3阳性细胞系。(图17B)G8、C4和B12 CAR的T细胞转导效率分别为60.4%、58.6%和68.4%。不相关CAR(CD19)T细胞的转导效率为32%。(图17C)B7H3靶向的CAR(G8/B12/C4)T细胞以及不相关的对照CAR(CD19)T细胞与Panc-1 GL细胞或BxPC-3GL细胞以不同的效应物:靶标(E:T)比率培养24小时。Panc-1 GL和BxPC-3GL细胞均以剂量依赖性方式被所有三种B7H3靶向的CAR T细胞有效裂解,而在对照CAR T细胞观察到的杀伤最小。

[0037] 图18A-18D:用高剂量人类B7H3特异性CAR T细胞治疗的Panc-1小鼠模型。评估了输注1000万个B7H3靶向的CAR T细胞后Panc-1异种移植小鼠模型中的肿瘤消退。(图18A)Panc-1异种移植研究的示意图。100万个Panc-1 GFP/Luc肿瘤细胞以静脉注射的方式植入NSG小鼠体内,建立肿瘤模型。20天后(第0天),小鼠以静脉注射的方式输注1000万个C4、G8或B12 CAR T细胞(或对照CD19 CAR T细胞)。每周进行一次成像。(图18B)CAR T细胞治疗小鼠中Panc-1肿瘤生长的代表性生物发光图像。与输注对照CAR T细胞相比,用1000万个B7H3靶向的CAR T细胞(C4、G8或B12)治疗的小鼠肿瘤生长显著减缓。(图18C)在图18B所示的小鼠中,将肿瘤生物发光量化为每秒光子数。(图18D)荷瘤小鼠在用1000万个C4、G8或B12 CAR T细胞治疗后的Kaplan-Meier生存曲线。结果表明,当以高剂量(1000万)施用时,C4 CAR T细胞比G8或B12 CAR T细胞更有效地促进小鼠存活,并表明施用1000万个CAR T细胞对小鼠是安全的。

[0038] 图19A-19D:用低剂量人类B7H3特异性CAR T细胞治疗的Panc-1小鼠模型。在肿瘤再次攻击后,测量输注500万个B7-H3靶向的CAR T细胞后Panc-1异种移植小鼠模型中的肿瘤消退。(图19A)实验示意图。Panc-1异种移植小鼠在接种100万个Panc-1-Luc细胞后20天(第0天)以静脉注射的方式输注500万个C4 CAR T细胞、B12 CAR T细胞、未转导的T细胞(模拟)或PBS。经C4 CAR T细胞治疗和B12 CAR T细胞治疗且未显示可检测到肿瘤的小鼠以静脉注射的方式在第35天植入了100万个Panc-1细胞。作为对照,给空白小鼠植入了Panc-1细胞。每周进行一次成像。(图19B)在CAR T细胞治疗的小鼠中Panc-1肿瘤生长的代表性生物发光图像。与施用模拟T细胞或PBS的小鼠相比,用500万个C4 CAR T细胞或B12 CAR T细胞治疗的小鼠肿瘤生长显著减缓。虽然肿瘤在对照小鼠中快速生长,但之前用C4 CAR T细胞治疗的小鼠在Panc-1肿瘤再次攻击后100%保持无肿瘤状态,并且之前用B12 CAR T细胞治疗的小鼠有60%在治疗后10周内保持无肿瘤状态。(图19C)在图19B中所示小鼠中,将肿瘤生物发光量化为每秒光子数。(图19D)荷瘤小鼠治疗后的Kaplan-Meier生存曲线,显示接受500万个C4或B12 CAR T细胞的小鼠在第70天仍然存活。相比之下,用PBS或模拟T细胞治疗的小鼠输注后存活没有超过30天。

[0039] 图20A-20D:在IMR5神经母细胞瘤小鼠模型中测试B7H3靶向的CAR T细胞。(图20A)评估了使用B7H3靶向的CAR T细胞对神经母细胞瘤细胞系IMR5的体外杀伤。B7H3靶向的G8、B12或C4 CAR T细胞,以及基于商业抗人类B7H3杂交瘤抗体376.96的CAR T细胞,与IMR5 GL细胞以不同的效应物:靶标(E:T)比率培养24小时。与模拟T细胞相比,所有CAR T细胞均以剂量依赖性方式有效裂解IMR5肿瘤细胞;然而,B12 CAR T细胞比其他测试的CAR T细胞稍微有效。(图20B)体内研究的实验示意图。IMR5异种移植小鼠在肿瘤接种后35天以静脉注射的方式输注500万个C4 CAR T细胞、B12 CAR T细胞、G8 CAR T细胞、376.96CAR T细胞或未转导的T细胞(模拟)。(图20C)异种移植模型中IMR5肿瘤生长的代表性生物发光图像。与376.96CAR T细胞和模拟T细胞相比,用500万个B12 CAR T细胞治疗的小鼠肿瘤生长显著减缓。C4 CAR T细胞也显示出适度的抗肿瘤活性。(图20D)在治疗的小鼠中肿瘤生物发光为每秒光子数。

[0040] 图21A-21C:G8与小鼠B7H3交叉反应并杀死小鼠癌细胞。(图21A)通过流式细胞术检测的抗B7H3纳米抗体与小鼠抗原的结合活性。G8,而非C4或B12,显示出阳性结合三个KPC细胞系(CREP128096、CREP133239和PDA95775)和小鼠黑色素瘤细胞系B16上表达的小鼠B7H3。(图21B)只有G8 CAR T细胞表现出对小鼠B7H3阳性B16细胞系的特异性杀伤。(图21C)抗B7H3纳米抗体和商业抗体376.96的表位作图。共设计与合成了来自人类B7H3蛋白的48种肽。每种肽由18个氨基酸组成,并与相邻的肽重叠9个氨基酸。ELISA技术用于测试抗体与每种肽的结合能力。数字表示OD_{450}值。G8和376.96均与肽10、11和15(SEQ ID NO:35-37)结合,表明它们结合相似的表位。肽序列如下表所示。C4和B12可能具有线性化肽文库无法预测的构象表位。

[0041] 图22:通过ELISA测量的B7H3特异性抗体B12、C4、G8和376.96与B7H3蛋白的结合。

[0042] 序列表

[0043] 随附序列表中列出的核酸序列和氨基酸序列使用如37C.F.R.1.822限定的核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸三字母代码显示。仅显示了每个核酸序列的一条链,但是将互补链被理解成涵盖在展示链的任何引用中。序列表作以ASCII文本文件提交,创建于2020年10月19日,27.8KB,通过引用将其并入本文。在随附的序列表中:

[0044] SEQ ID NO:1是骆驼抗体RWB12的氨基酸序列。

[0045] SEQ ID NO:2是骆驼抗体RWG8的氨基酸序列。

[0046] SEQ ID NO:3是骆驼抗体RWC4的氨基酸序列。

[0047] SEQ ID NO:4是骆驼抗体RWB2的氨基酸序列。

[0048] SEQ ID NO:5是骆驼抗体RWH5的氨基酸序列。

[0049] SEQ ID NO:6是骆驼抗体RWD5的氨基酸序列。

[0050] SEQ ID NO:7是骆驼抗体RWC3的氨基酸序列。

[0051] SEQ ID NO:8是骆驼抗体RWG4的氨基酸序列。

[0052] SEQ ID NO:9是骆驼抗体RWD9的氨基酸序列。

[0053] SEQ ID NO:10是骆驼抗体RWH1的氨基酸序列。

[0054] SEQ ID NO:11是兔抗体RFA1的氨基酸序列。

[0055] SEQ ID NO:12是兔抗体RFB1的氨基酸序列。

[0056] SEQ ID NO:13是B7H3细胞外域的氨基酸序列。

[0057] SEQ ID NO:14-26是引物序列。

[0058] SEQ ID NO:27是GMCSFRss的氨基酸序列。

[0059] SEQ ID NO:28是所述CD8α铰链区的氨基酸序列。

[0060] SEQ ID NO:29是所述CD8α跨膜区的氨基酸序列。

[0061] SEQ ID NO:30是4-1BB的氨基酸序列。

[0062] SEQ ID NO:31是CD3ζ的氨基酸序列。

[0063] SEQ ID NO:32是自切割T2A肽的氨基酸序列。

[0064] SEQ ID NO:33是huEGFRt的氨基酸序列。

[0065] SEQ ID NO:34是兔VH域抗体5DUB的氨基酸序列。

[0066] SEQ ID NO:35-37是B7H3肽的氨基酸序列。

具体实施方式

[0067] I.缩写

[0068]	ADC	抗体-药物缀合物
[0069]	ADCC	抗体依赖性细胞介导的细胞毒性
[0070]	B7H3	B7同源物3
[0071]	BBIR	生物素结合免疫受体
[0072]	CAR	嵌合抗原受体
[0073]	CDR	互补决定区
[0074]	CTL	细胞毒性T淋巴细胞
[0075]	ECD	细胞外域
[0076]	EGF	表皮生长因子
[0077]	EGFR	表皮生长因子受体
[0078]	ELISA	酶联免疫吸附测定
[0079]	EM	效应物部分
[0080]	FACS	荧光激活细胞分选
[0081]	GMCSFRss	粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子受体信号序列
[0082]	hFc	人类Fc
[0083]	huEGFRt	人类截短的表皮生长因子受体
[0084]	IC50	抑菌浓度50
[0085]	Ig	免疫球蛋白
[0086]	KO	敲除
[0087]	NK	自然杀伤细胞
[0088]	PBD	吡咯并苯二氮卓
[0089]	PE	假单胞菌外毒素
[0090]	PET	正电子发射断层扫描
[0091]	TM	跨膜
[0092]	VH	可变重
[0093]	VL	可变轻

[0094] II.术语和方法

[0095] 除非另有说明,否则按照常规用法使用技术术语。分子生物学中常用术语的定义见于:本杰明·勒温(Benjamin Lewin),《基因X》(Genes X),琼斯和巴特利特出版社(Jones&Bartlett Publishers)出版,2009;和迈耶斯(Meyers)等人.(编辑),《细胞生物学和分子医学百科全书》(The Encyclopedia of Cell Biology and Molecular Medicine),由Wiley-VCH出版,共16卷,2008年;和其他类似的参考资料。

[0096] 如本文所用,单数形式“一种”(a)、“一种”(an)和“所述”(the)既指单数也指复数,除非上下文另有明确指示。例如,术语“一种抗原”包括单个或多个抗原并且可以被认为等同于短语“至少一种抗原”。如本文所用,术语“包括”是指“包含”。还应理解,除非另有说明,对核酸或多肽给出的任何和所有碱基大小或氨基酸大小,以及所有分子量或分子质量值都是近似值,并且是为了描述目的而提供的。尽管可以使用许多与本文描述的方法和材料相似或等效的方法和材料,但本文描述了特别合适的方法和材料。如有冲突,以本说明书(包括术语解释)为准。此外,所述材料、方法和实例仅是说明性的而不是限制性的。为了便于查看各种实施方案,提供以下术语解释:

[0097] 4-1BB:由T细胞受体(TCR)激活的淋巴细胞和其他细胞(包括自然杀伤细胞)表达的共刺激分子。4-1BB的连接诱导信号级联放大,导致细胞因子产生、抗凋亡分子的表达和免疫反应的增强。4-1BB的示例性氨基酸序列在本文中如SEQ ID NO:30所示。

[0098] 施用:通过任何有效途径向受试者提供或给予药剂,例如本文提供的单克隆抗体、CAR或表达CAR的细胞。示例性施用途径包括但不限于口服途径、注射途径(例如皮下、肌肉内、皮内、腹膜内、静脉内、前列腺内和肿瘤内)、舌下途径、直肠途径、经皮途径、鼻内途径、阴道途径和吸入途径。

[0099] 抗体:包含至少一个可变区的多肽配体,该可变区识别和结合(例如特异性识别和特异性结合)抗原的表位。哺乳动物免疫球蛋白分子由重(H)链和轻(L)链组成,每条链都有可变区,分别称为可变重(V_H)区和可变轻(V_L)区。V_H区和V_L区一起负责结合抗体识别的抗原。哺乳动物免疫球蛋白有五种主要的重链类别(或同种型),它们决定了抗体分子的功能活性:IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在哺乳动物中未发现的抗体同种型包括IgX、IgY、IgW和IgNAR。IgY是鸟类和爬行动物产生的一级抗体,在功能上与哺乳动物IgG和IgE相似。IgW和IgNAR抗体由软骨鱼类产生,而IgX抗体存在于两栖动物中。

[0100] 抗体可变区包含“框架”区和高变区,称为“互补决定区”或“CDR”。所述CDR主要负责与抗原的表位结合。抗体的框架区用于在三维空间中定位和比对CDR。使用许多众所周知的编号方案中的任何一种,包括以下描述的编号方案,可以很容易地确定给定CDR的氨基酸序列边界:卡巴特(Kabat)等人.(“具有免疫学意义的蛋白质序列”(Sequences of Proteins of Immunological Interest),美国卫生和人类服务部(U.S.Department of Health and Human Services),1991;“Kabat”编号方案)、乔提亚(Chothia)等人.(参见乔提亚和莱斯克(Lesk),《分子生物学杂志》(J Mol Biol)196:901-917,1987;乔提亚等人,《自然》342:877,1989;和阿尔拉齐卡尼(Al-Lazikani)等人,《分子生物学杂志》(JMB)273,927-948,1997;“乔提亚”编号方案)、库尼克(Kunik)等人.(参见库尼克等人,《PLoS计算生物学》(PLoS Comput Biol)8:e1002388,2012;和库尼克等人,《核酸研究》(Nucleic Acids Res)40(网络服务器期):W521-524,2012;“Paratome CDR”)和ImMunoGeneTics(IMGT)数据

库(参见勒弗朗克(Lefranc),《核酸研究》29:207-9,2001;“IMGT”编号方案)。Kabat、Paratome和IMGT数据库在线维护。

[0101] “单域抗体”是指在不存在另外抗体域的情况下,具有能够特异性结合抗原或抗原表位的单域(可变域)的抗体。单域抗体包括例如V_H域抗体、V_{NAR}抗体、骆驼科V_HH抗体和V_L域抗体。V_{NAR}抗体由软骨鱼类产生,例如护士鲨、沃贝贡鲨鱼、多刺角鲨和竹鲨。骆驼科V_HH抗体由多种物种产生,包括骆驼、美洲驼、羊驼、单峰骆驼和原驼,它们产生天然缺乏轻链的重链抗体。

[0102] “单克隆抗体”是由淋巴细胞的单个克隆或由单个抗体的编码序列已转染到其中的细胞产生的抗体。通过本领域技术人员已知的方法产生单克隆抗体。单克隆抗体包括人源化单克隆抗体。

[0103] “嵌合抗体”具有一个物种(例如人类)的框架残基和另一个物种的CDR(通常使抗原结合)。

[0104] “人源化”抗体是一种免疫球蛋白,包括人类框架区和非人类(例如小鼠、兔、大鼠、鲨鱼的或合成的)免疫球蛋白的一个或更多个CDR。提供CDR的非人类免疫球蛋白称为“供体”,而提供框架的人类免疫球蛋白称为“受体”。在一个实施方案中,所有CDR都来自人源化免疫球蛋白中的供体免疫球蛋白。恒定区不必存在,但如果存在,它们必须与人类免疫球蛋白恒定区基本相同,即至少约85-90%相同,例如约95%或更高百分比相同。因此,人源化免疫球蛋白的所有部分,可能除了CDR,与天然人类免疫球蛋白序列的相应部分基本相同。人源化抗体与提供CDR的供体抗体结合相同的抗原。人源化或其他单克隆抗体可以具有对抗原结合或其他免疫球蛋白功能基本上没有影响的另外保守氨基酸取代。

[0105] 抗体-药物缀合物(ADC):包括与药物(例如细胞毒剂)缀合的抗体(或抗体的抗原结合片段)的分子。ADC可用于通过抗体与细胞表面上表达的肿瘤抗原的特异性结合,将药物特异性靶向癌细胞。与ADC一起使用的示例性药物包括抗微管剂(例如美登素类、奥瑞他汀E和奥瑞他汀F)和链间交联剂(例如,吡咯并苯二氮卓;PBD)。在某些情况下,ADC是双特异性ADC,它由两种单克隆抗体或其抗原片段组成,每个都针对不同的抗原或表位,并与药物缀合。在一个实例中,附着在抗体上的试剂是IRDye® 700DX(IR700,力高泰公司(Li-cor),内布拉斯加州林肯市),然后可以与近红外光NIR光一起使用来杀死抗体结合的癌细胞(光免疫疗法;参见例如US 8,524,239和10,538,590)。例如,氨基反应性IR700可以使用IR700的NHS酯与抗体共价结合。

[0106] 抗微管剂:一种通过停止有丝分裂来阻止细胞生长的药物。抗微管剂,也称为“抗有丝分裂剂”,用于治疗癌症。

[0107] B7同源物3(B7H3):一种免疫检查点分子,由某些类型的实体瘤表达。这种蛋白质是共刺激分子B7超家族的成员。B7H3也称为CD276。

[0108] B7H3阳性癌症:表达或过度表达B7H3的癌症。B7H3-阳性癌症的实例包括但不限于肝癌(例如肝细胞癌)、胰腺癌、肾癌、膀胱癌、宫颈癌、食道癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、脑癌(例如神经母细胞瘤或胶质母细胞瘤)、小儿癌症(例如骨肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤或尤文氏肉瘤)、黑素瘤和间皮瘤(参见,例如,西曼(Seaman)等人,《癌细胞》(Cancer Cell)31(4):501-505,2017)。

[0109] 结合亲和力:抗体对抗原的亲和力。在一个实施方案中,亲和力是通过弗兰克尔

(Frankel)等人,《分子免疫学》(Mol.Immunol.),16:101-106,1979描述的Scatchard方法进行修改来计算的。在另一个实施方案中,结合亲和力通过抗原/抗体解离率来测量。在另一个实施方案中,通过竞争放射免疫测定测量高结合亲和力。在另一个实施方案中,结合亲和力通过ELISA测量。在其他实施方案中,抗体亲和力通过流式细胞术或通过表面等离子参比来测量。"特异性结合"抗原(如B7H3)的抗体是以高亲和力结合该抗原并且不显著结合其他无关抗原的抗体。

[0110] 在一些实例中,单克隆抗体(例如本文提供的抗B7H3单域抗体)特异性结合靶标(例如B7H3),结合常数比样品或受试者中其他分子的结合常数至少大10^3M^{-1}、10^4M^{-1}或10^5M^{-1}。在一些实例中,抗体(例如单克隆抗体)具有1μM或更小的平衡常数(Kd),例如900nM或更小、500nM或更小、250nM或更小、100nM或更小、50nM或更小、10nM或更少、5nM或更小,或1nM或更小。例如,单域单克隆抗体以下述结合亲和力结合靶标(例如B7H3):至少约$1\times10^{-6}M$、至少约$0.5\times10^{-6}M$、至少约$1\times10^{-7}M$、至少约$0.5\times10^{-7}M$、至少约$1\times10^{-8}M$、至少约$0.5\times10^{-8}M$、至少约$1\times10^{-9}M$、至少约$0.5\times10^{-9}M$,或至少约0.1×10^{-9}。在某些实施方案中,与其靶标结合的特异性结合物的解离常数(Kd)为≤1000nM、≤750nM、≤500nM、≤250nM、≤100nM、≤50nM、≤25nM、≤10nM、≤5nM、≤2.5nM、≤1nM、≤0.5nM、≤0.25nM、≤0.01nM,或≤0.001nM(例如,$10^{-6}M$或更小,例如,从$10^{-6}M$到$10^{-10}M$,例如,$10^{-7}M$到$10^{-9}M$)。在一些实例中,结合亲和力是使用基于生物层干涉测量(BLI)技术的Octet系统(创意生物实验室公司)测量的。在一些实例中,使用BIACORES-2000或BIACORES-3000(BIAcore公司,新泽西州皮斯卡塔韦市)的表面等离子共振测定测量Kd。

[0111] 双特异性抗体:一种重组蛋白,包括两种不同单克隆抗体的抗原结合片段,从而能够结合两种不同的抗原。在一些实施方案中,双特异性抗体通过同时靶向例如CTL(例如CTL受体组分,例如CD3)或效应物自然杀伤(NK)细胞和肿瘤抗原(例如B7H3)而用于癌症免疫疗法。类似地,多特异性抗体是包含至少两种不同单克隆抗体(例如两种、三种或四种不同单克隆抗体)的抗原结合片段的重组蛋白。

[0112] 脑癌或肿瘤:从脑组织发展而来的一种癌症或肿瘤。脑癌包括但不限于神经母细胞瘤、髓母细胞瘤、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、脑膜瘤、垂体腺瘤、星形细胞瘤、脉络丛癌、室管膜瘤和松果体母细胞瘤。

[0113] 乳腺癌:一种在乳腺组织中形成的癌症,通常在导管和小叶中。乳腺癌的类型包括例如导管原位癌、浸润性导管癌、三阴性乳腺癌、炎性乳腺癌、转移性乳腺癌、髓样癌、管状癌和粘液癌。三阴性乳腺癌是指癌细胞不表达雌激素受体、孕激素受体或显著水平的HER2/neu蛋白的一种乳腺癌。三阴性乳腺癌也称为ER阴性PR阴性HER2/neu阴性乳腺癌。

[0114] 化疗剂:在治疗以异常细胞生长为特征的疾病中具有治疗作用的任何化学剂。此类疾病包括肿瘤、赘生物和癌症以及以增生性生长为特征的疾病,例如牛皮癣。在一个实施方案中,化疗剂是用于治疗B7H3阳性肿瘤的药剂。在一个实施方案中,化疗剂是放射性化合物。本领域技术人员可以容易地确定使用的化学治疗剂(参见例如,斯拉帕克(Slapak)和库费(Kufe),《癌症治疗的原理》(Princes of Cancer Therapy),《哈里森内科医学原理》(Harrison's Principles of Internal Medicine)中的第86章,第14版;佩里(Perry)等人,《化学疗法》(Chemotherapy),阿贝洛夫(Abeloff),《临床肿瘤学》(Clinical Oncology)中第17章,第2版,©2000丘吉尔利文斯通公司(Churchill Livingstone,Inc);巴尔泽

(Baltzer),L.,伯克利(Berkery),R.(编辑):《化疗肿瘤学袖珍指南》(Oncology Pocket Guide to Chemotherapy),第2版,圣路易斯,莫斯比年书出版社(Mosby-Year Book),1995;费希尔(Fischer),DS,诺布夫(Knobf),MF,杜里瓦奇(Durivage),HJ(编辑):《癌症化学治疗手册》(The Cancer Chemotherapy Handbook),第4版.圣路易斯,莫斯比年书出版社,1993)。联合化疗是施用一种以上的药剂来治疗癌症。一个实例是施用与放射性或化学化合物组合使用的结合B7H3的抗体。在一个实例中,化疗剂是生物制剂,例如治疗性抗体(例如治疗性单克隆抗体),例如本文提供的抗B7H3抗体,以及其他抗癌抗体,例如抗PD1或抗-PDL1(例如,派姆单抗和纳武单抗)、抗CTLA4(例如,伊匹木单抗)、抗EGFR(例如,西妥昔单抗)、抗VEGF(例如,贝伐珠单抗)或它们的组合(例如,抗PD-1和抗-CTLA-4)。

[0115] 嵌合抗原受体(CAR):一种嵌合分子,包括抗原结合部分(例如scFv或单域抗体)和信号传导域,如T细胞受体的信号传导域(如CD3ζ)。通常,CAR由抗原结合部分、跨膜域和内域组成。所述内域通常包括具有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的信号传导链,例如CD3ζ或FcεRIγ。在一些情况下,所述内域还包括至少一个另外的共刺激域的细胞内部分,例如CD28、4-1BB(CD137)、ICOS、OX40(CD134)、CD27和/或DAP10。在一些实例中,CAR是多特异性的(例如双特异性的)或双顺反子的。多特异性CAR是由至少两个抗原结合域(例如scFv和/或单域抗体)组成的单个CAR分子,每个抗原结合域结合不同抗原或同一抗原上的不同表位(参见,例如,US2018/0230225)。例如,双特异性CAR是指具有两个抗原结合域的单个CAR分子,每个抗原结合域结合不同的抗原。双顺反子CAR是指两个完整的CAR分子,每个分子都包含结合不同抗原的抗原结合部分。在某些情况下,双顺反子CAR构建体表达通过切割接头连接的两个完整的CAR分子。表达双特异性或双顺反子CAR的T细胞或NK细胞可以结合表达结合部分所针对的两种抗原的细胞(参见例如秦(Qin)等人.,《血液》(Blood)130:810,2017;和WO/2018/213337)。

[0116] 结肠癌:在结肠或直肠中形成的一种癌症。最常见的结肠癌类型(也称为“结肠直肠癌”)是结肠直肠腺癌,约占所有结肠癌的95%。腺癌在结肠和/或直肠内部的细胞中形成。其他类型的结肠直肠癌包括胃肠道类癌、转移性结肠直肠癌、原发性结肠直肠淋巴瘤(一种非霍奇金淋巴瘤)、胃肠道间质瘤(归类为肉瘤,源于Cajal间质细胞)、平滑肌肉瘤(源于平滑肌细胞)和结肠直肠黑色素瘤。

[0117] 互补决定区(CDR):限定抗体的结合亲和力和特异性的高变氨基酸序列区域。哺乳动物免疫球蛋白的轻链和重链各自具有三种CDR,分别命名为L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3和H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3。单域抗体包含三种CDR,在本文中称为CDR1、CDR2和CDR3。

[0118] 缀合物:在本公开的语境中,“缀合物”是共价连接至效应分子或第二蛋白质(例如第二抗体)的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)。效应分子可以是例如药物、毒素、治疗剂、可检测标记物、蛋白质、核酸、脂质、纳米颗粒、光子吸收剂、碳水化合物或重组病毒。抗体缀合物通常被称为“免疫缀合物”。当缀合物包含与药物(例如细胞毒剂)连接的抗体时,缀合物通常被称为“抗体-药物缀合物”或“ADC”。其他抗体缀合物包括,例如,多特异性(例如双特异性或三特异性)抗体和嵌合抗原受体(CAR)。

[0119] 保守变体:一种含有保守氨基酸取代的蛋白质,该取代基本上不会影响或降低蛋白质(例如针对B7H3的抗体)的亲和力。例如,特异性结合B7H3的单克隆抗体可包括至多约1个、至多约2个、至多约5个,和至多约10个,或至多约15个保守取代并且特异性结合B7H3多

肽。术语“保守变体”还包括使用取代的氨基酸代替未取代的亲本氨基酸,条件是抗体特异性结合B7H3。非保守取代是降低对B7H3的活性或结合性取代。

[0120] 功能相似氨基酸的保守氨基酸取代表是本领域普通技术人员熟知的。以下六组是被认为是彼此互为保守替代的氨基酸的实例:

[0121] 1)丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T);

[0122] 2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0123] 3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0124] 4)精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0125] 5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、蛋氨酸(M)、缬氨酸(V);和

[0126] 6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

[0127] 接触:直接进行物理缔合;包括固体和液体两种形式。

[0128] 细胞毒剂:杀死细胞的任何药物或化合物。

[0129] 细胞毒性:一种分子(例如免疫毒素)对预期靶向细胞的毒性,而不是生物体其余部分的细胞。相比之下,术语“毒性”是指免疫毒素对除该免疫毒素的靶向部分预期靶向细胞以外的细胞的毒性,而术语“动物毒性”是指免疫毒素对动物的毒性,即该免疫毒素对除免疫毒素预期靶向细胞以外的细胞的毒性。

[0130] 简并变体:编码多肽的多核苷酸,包括由于遗传密码而简并的序列。有20种天然氨基酸,其中大部分由一个以上的密码子指定。因此,只要多肽的氨基酸序列不变,所有简并核苷酸序列都包括在内。

[0131] 诊断:确定病理状况(例如B7H3阳性癌症)的存在或性质。诊断方法的敏感性和特异性不同。诊断测定的“敏感性”是检测呈阳性的患病个体的百分比(真阳性的百分比)。诊断测定的“特异性”是1减去假阳性率,其中假阳性率定义为检测呈阳性的无疾病患者的比例。虽然特定的诊断方法可能无法明确诊断某种状况,但只要该方法提供有助于诊断的积极指示就足够了。“预后”是诸如癌症的病理状况发展(例如严重程度)的概率。

[0132] 诊断性肿瘤成像:将抗体及其衍生物与用于正电子发射断层扫描(PET)的正电子发射放射性核素偶联是通常称为免疫PET的过程。虽然全长抗体可以制成良好的免疫PET试剂,但它们的生物半衰期需要在成像前等待数天,从而使得非靶标辐射剂量增加。较小的单域抗体或纳米抗体的生物半衰期适合当天成像。

[0133] 药物:用于治疗、改善或预防受试者疾病或病症的任何化合物。在本文的一些实施方案中,所述药物是抗癌剂,例如细胞毒剂,例如抗有丝分裂剂或抗微管剂。

[0134] 效应分子:旨在对嵌合分子所靶向的细胞产生所需作用的嵌合分子部分。效应分子也称为效应物部分(EM)、治疗剂、诊断剂或类似术语。治疗剂(或药物)包括诸如核酸、蛋白质、肽、氨基酸或衍生物、糖蛋白、放射性同位素、光子吸收剂、脂质、碳水化合物或重组病毒等化合物。核酸治疗和诊断部分包括反义核酸、用于与单链或双链DNA共价交联的衍生寡核苷酸,以及形成三链的寡核苷酸。或者,与靶向部分(例如抗B7H3抗体)连接的分子可以是包封系统,例如脂质体或胶束,其包含可以被屏蔽以免直接暴露于循环系统的治疗性组合物(例如药物)、核酸(例如反义核酸),或另一治疗部分。制备附着于抗体的脂质体的方法为本领域技术人员所熟知(参见,例如,美国专利号4,957,735;和康纳(Connor)等人,《药物治疗》(Pharm Ther)28:341-365,1985)。诊断剂或诊断部分包括放射性同位素和其他可检测

标记物。可用于此类目的的可检测标记物也是本领域熟知的,并且包括放射性同位素(例如^{35}S、^{11}C、^{13}N、^{15}O、^{18}F、^{19}F、^{99m}Tc、^{131}I、^{3}H、^{14}C、^{15}N、^{90}Y、^{99}Tc、^{111}In和^{125}I)、荧光团、化学发光剂和酶。

[0135] 表位:抗原决定簇。这些是分子上具有抗原性(引发特异性免疫反应)的特定化学基团或肽序列。抗体特异性结合多肽上的特定抗原表位,例如B7H3。

[0136] 框架区:插入CDR之间的氨基酸序列。免疫球蛋白分子的框架区包括可变轻框架区和可变重框架区。

[0137] 融合蛋白:包含两种不同(异源)蛋白质的至少一部分的蛋白质。

[0138] 异源的:源于单独的遗传来源或物种。

[0139] 免疫反应:免疫系统细胞(如B细胞、T细胞或单核细胞)对刺激的反应。在一个实施方案中,免疫反应对特定抗原是特异性的("抗原特异性反应")。在一个实施方案中,免疫反应是T细胞反应,例如$CD4^+$反应或$CD8^+$反应。在另一个实施方案中,免疫反应是B细胞反应,并产生特异性抗体。

[0140] 免疫缀合物:效应分子与抗体或其功能片段的共价连接。所述效应分子可以是例如可检测标记物、光子吸收剂(例如IR700)或毒素(以形成免疫毒素,例如包含假单胞菌外毒素或其变体的免疫毒素)。毒素的具体非限制性实例包括但不限于相思豆毒素、蓖麻毒素、假单胞菌外毒素(PE,例如PE35、PE37、PE38和PE40)、白喉毒素(DT)、肉毒杆菌毒素或其修饰的毒素,或其他直接或间接抑制细胞生长或杀死细胞的毒剂。例如,PE和DT是剧毒化合物,通常通过肝毒性导致死亡。然而,PE和DT可以通过去除毒素的天然靶向组分(例如PE的域Ia和DT的B链)并将其替换为不同的靶向部分(比如抗体)来修饰成用作免疫毒素的形式。在一个实施方案中,抗体与效应分子结合。在另一个实施方案中,与效应分子结合的抗体进一步与脂质或其他分子结合,例如以延长其在体内的半衰期。连接可以通过化学或重组方式进行。在一个实施方案中,连接是化学形式的,其中抗体部分和效应分子之间的反应产生了在两个分子之间形成的共价键,从而形成一个分子。肽接头(短肽序列)可以任选地包含在抗体和效应分子之间。因为免疫缀合物最初是由两种具有不同功能的分子制备的,例如抗体和效应分子,它们有时也被称为"嵌合分子"。因此,如本文所用,术语"嵌合分子"是指与效应分子缀合(偶联)的靶向部分,例如配体或抗体。术语"缀合的"或"连接的"是指将两个多肽制成一个连续的多肽分子。

[0141] 免疫脂质体:表面缀合有抗体或抗体片段的脂质体。免疫脂质体可以将细胞毒剂或其他药物携带至抗体靶向的细胞,例如肿瘤细胞。

[0142] 链间交联剂:一种细胞毒性药物,能够在两条DNA链之间共价结合,从而阻止DNA复制和/或转录。

[0143] 分离的:"分离的"生物组分(例如核酸、蛋白质(包括抗体)或细胞器),已与该组分天然存在的环境(例如细胞)中的其他生物组分(例如其他染色体和染色体外DNA和RNA、蛋白质和细胞器)基本分离或纯化。已"分离"的核酸和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白质。该术语还包括通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸和蛋白质以及化学合成的核酸。

[0144] 标记物:一种可检测的化合物或组合物,它直接或间接与另一种分子(如抗体或蛋白质)缀合,以促进对该分子的检测。标记物的具体非限制性实例包括荧光标签、酶键和放

射性同位素。在一个实例中,“标记的抗体”是指在抗体中掺入另一种分子。例如,标记物是可检测标志物,例如掺入放射性标记的氨基酸或附接到可以通过标记的亲和素(例如,含有可以通过光学或比色法检测的荧光标志物或酶活性的链霉亲和素)检测的生物素基部分的多肽。标记多肽和糖蛋白的各种方法是本领域已知的并且可以使用。多肽标记物的实例包括但不限于以下:放射性同位素或放射性核苷酸(例如^{35}S、^{11}C、^{13}N、^{15}O、^{18}F、^{19}F、^{99m}Tc、^{131}I、^{3}H、^{14}C、^{15}N、^{90}Y、^{99}Tc、^{111}In和^{125}I)、荧光标记物(例如异硫氰酸荧光素(FITC)、罗丹明、镧系元素磷光体)、酶标记物(例如辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光标志物、生物素基团、由二级报告分子识别的预定多肽表位(如亮氨酸拉链对序列、二级抗体的结合位点、金属结合域、表位标签)或磁性剂,如钆螯合物。在一些实施方案中,标记物通过各种长度的间隔臂附接以减少潜在的空间位阻。

[0145] 接头:在一些情况下,接头是抗体结合片段(例如Fv片段)内的肽,用于将可变重链间接结合到可变轻链。“接头”还可以指用于将靶向部分(例如抗体)连接至效应分子(例如细胞毒素或可检测标记物)的肽。术语“缀合”、“连接”(joining)、“结合”或“连接”(linking)是指将两个多肽制成一个连续的多肽分子,或将放射性核素或其他分子共价连接到多肽,例如抗体。连接可以通过化学方式或重组方式进行。“化学方式”是指抗体部分和效应分子之间的反应,使得所述两个分子之间形成共价键以形成一个分子。

[0146] 肝癌:发生在肝组织中的任何类型的癌症。最常见的肝癌类型是肝细胞癌(HCC),它在肝细胞中形成。其他类型的肝癌包括在胆管中形成的胆管癌;肝血管肉瘤,这是一种罕见的肝癌,开始于肝脏血管;和肝母细胞瘤,这是一种非常罕见的肝癌,最常见于儿童。

[0147] 肺癌:在肺部形成的任何癌症。大多数始于肺的癌症是恶性肿瘤。肺癌的两种主要类型是小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC)。NSCLC的亚类包括腺癌、鳞状细胞癌和大细胞癌。

[0148] 可操作地连接:当第一核酸序列与第二核酸序列存在功能关系时,所述第一核酸序列与所述第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则所述启动子与所述编码序列可操作地连接。通常,可操作地连接的DNA序列是连续的,并且在需要连接两个蛋白质编码区时,在同一个阅读框中。

[0149] 卵巢癌:在卵巢组织中形成的癌症。大多数卵巢癌是卵巢上皮癌(开始于卵巢表面细胞的癌症)或恶性生殖细胞肿瘤(开始于卵细胞的癌症)。另一种卵巢癌是基质细胞癌,源于释放激素并连接卵巢不同结构的细胞。

[0150] 胰腺癌:在胰腺组织中发现恶性细胞的疾病。基于癌症的细胞来源,胰腺肿瘤可以是外分泌肿瘤或神经内分泌肿瘤。绝大多数(~94%)胰腺癌是外分泌肿瘤。外分泌癌包括例如腺癌(最常见的外分泌肿瘤类型)、腺泡细胞癌、导管内乳头状粘液性肿瘤(IPMN)和粘液性囊腺癌。在一些实例中,胰腺癌是胰腺导管腺癌(PDAC)。胰腺神经内分泌肿瘤,也称为胰岛细胞肿瘤,根据它们产生的激素类型进行分类。示例性神经内分泌肿瘤包括胃泌素瘤、胰高血糖素瘤、胰岛素瘤、生长抑素瘤、VIPoma(血管活性肠肽)和无功能胰岛细胞瘤。

[0151] 小儿癌症:一种在0至14岁儿童中发生的癌症。小儿癌症的主要类型包括,例如,神经母细胞瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL)、胚胎性横纹肌肉瘤(ERMS)、肺泡横纹肌肉瘤(ARMS)、尤文氏肉瘤、促纤维增生性小圆细胞瘤(DRCT)、骨肉瘤、脑和其他CNS肿瘤(如神经母细胞瘤和髓母细胞瘤)、Wilm瘤、非霍奇金淋巴瘤和视网膜母细胞瘤。

[0152] 药学上可接受的载体:使用的药学上可接受的载体是常规载体。《雷明顿:药学的科学与实践》(Remington:The Science and practice of Pharmacy),费城科学大学(The University of the Sciences in Philadelphia),编辑,利平科特·威廉姆斯和威尔金斯公司(Lippincott,Williams,&Wilkins),宾夕法尼亚州费城,第21版(2005),描述了适用于药物递送本文公开的抗体和其他组合物的组合物和配制物。一般而言,载体的性质将取决于所采用的特定施用方式。例如,肠胃外配制物通常包含可注射流体,其包括药学和生理学上可接受的流体,例如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等作为媒介物。对于固体组合物(例如粉末、丸剂、片剂或胶囊形式),常规的无毒固体载体可以包括例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除了生物中性载体之外,待施用的药物组合物可以包含少量无毒辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或失水山梨醇单月桂酸酯。

[0153] 光免疫疗法:一种靶向癌症疗法,利用可被近红外光激活以杀死被靶向细胞的抗原特异性抗体-光吸收剂缀合物。光子吸收剂通常基于酞菁染料,例如近红外(NIR)酞菁染料(例如,IRDye®700DX,也称为IR700)。抗体(例如,B7H3特异性抗体)与适当的细胞表面抗原(例如B7H3)结合,并且光活化染料在NIR光照射后诱导细胞膜致死性损伤。NIR光照射(例如690nm)可在数分钟内诱导高度选择性的坏死癌细胞死亡,而不会损伤相邻细胞(例如,参见美国申请号2018/0236076)。

[0154] 预防、治疗或减轻疾病:“预防”疾病是指抑制疾病的全面发展。“治疗”是指在疾病或病理状况开始发展后改善其体征或症状的治疗干预,例如减轻肿瘤负荷或减少转移灶的尺寸数值。“减轻”是指降低疾病(例如癌症)的体征或症状的数量或严重性。

[0155] 纯化:术语“纯化的”不要求绝对纯度;相反,它旨在作为相对术语。因此,例如,纯化的肽制剂是其中肽或蛋白质比所述肽或蛋白质在其细胞内自然环境中更富集的制剂。在一个实施方案中,纯化制剂以使蛋白质或肽占所述制剂的总肽或蛋白质含量的至少50%。基本纯化是指从其他蛋白质或细胞组分中纯化。基本上纯化的蛋白质的纯度为至少60%、70%、80%、90%、95%或98%。因此,在一个具体的非限制性实例中,基本上纯化的蛋白质90%不含其他蛋白质或细胞组分。

[0156] 吡咯并苯二氮卓(PBD):最初在链霉菌属种中发现的一类序列选择性DNA小沟结合交联剂。PBD比全身化疗药物更有效。PBD的作用机制与它们在DNA小沟中形成加合物的能力有关,从而干扰DNA加工。在本公开的语境中,PBD包括天然产生和分离的PBD、化学合成天然存在的PBD和化学合成的非天然存在的PBD。PBD还包括单体PBD、二聚体PBD和杂合PBD(综述参见杰拉塔纳(Gerratana),《医学研究评论》(Med Res Rev)32(2):254-293,2012)。

[0157] 重组:重组核酸或蛋白质是具有非天然存在的序列或具有通过人工组合两种另外分开的序列片段而产生的序列的核酸或蛋白质。这种人工组合通常通过化学合成或通过人工操作分离的核酸片段(例如通过基因工程技术)来完成。

[0158] 样品(或生物样品):从受试者获得的含有基因组DNA、RNA(包括mRNA)、蛋白质或它们组合的生物样本。实例包括但不限于外周血、组织、细胞、尿液、唾液、活体组织切片、细针抽吸物、手术样本和尸检材料。在一个实例中,样品包括肿瘤活体组织切片。

[0159] 序列同一性:氨基酸或核酸序列之间的相似性以序列之间的相似性来表示,也称为序列同一性。序列同一性通常以百分比同一性(或相似性或同源性)来衡量;百分比越高,

两个序列越相似。当使用标准方法比对时,多肽或核酸分子的同源物或变体将具有较高的序列同一性。

[0160] 用于比较的序列比对方法是本领域众所周知的。各种程序和比对算法描述于下列文献:史密斯(Smith)和沃特曼(Waterman),《应用数学的进展》(Adv.Appl.Math..2:482,1981;尼德曼(Needleman)和文施(Wunsch),《分子生物学杂志》(J.Mol.Biol.)48:443,1970;皮尔逊(Pearson)和利普曼(Lipman),《美国科学院院报》.85:2444,1988;希金斯(Higgins)和夏普(Sharp),《基因》(Gene)73:237,1988;希金斯和夏普,CABIOS 5:151,1989;科佩特(Corpet)等人,《核酸研究》16:10881,1988;和皮尔逊和利普曼,《美国科学院院报》.85:2444,1988。阿尔舒尔(Altschul)等人,《自然遗传学》(Nature Genet.)6:119,1994,详细考虑了序列比对方法和同源性计算。

[0161] NCBI基本局部比对搜索工具(BLAST)(阿尔舒尔等人,《分子生物学杂志》

[0162] 215:403,1990)可从多个来源获得,包括美国国家生物技术信息中心(NCBI,马里兰州贝塞斯达市)和互联网,用于与序列分析程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx结合使用。如何使用该程序确定序列同一性的说明可在互联网上的NCBI网站获得。

[0163] 特异性结合B7H3多肽的抗体的同源物和变体通常特征在于,在与抗体氨基酸序列的全长比对中具有至少约75%,例如至少约80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性,使用NCBI Blast 2.0,将空位的blastp设置为默认参数。对于大于约30个氨基酸的氨基酸序列的比较,采用Blast 2序列函数,使用设置为默认参数的默认BLOSUM62矩阵(空位存在成本为11,每个残基空位成本为1)。当比对短肽(少于大约30个氨基酸)时,应使用Blast 2序列函数进行比对,采用PAM30矩阵,设置为默认参数(产生空位罚分9,延伸空位罚分1)。当通过该方法评估时,与参考序列相似性更高的蛋白质将显示出百分比同一性增加,例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。当比较少于整个序列的序列同一性时,同源物和变体通常在10-20个氨基酸的短窗口内具有至少80%的序列同一性,并且可能具有至少85%或至少90%或95%的序列同一性,取决于它们与参考序列的相似性。在这样的短窗口上确定序列同一性的方法可在互联网上NCBI网站获得。本领域技术人员将理解,提供这些序列同一性范围仅用于指导之用;完全有可能获得超出所提供范围的高度显著的同源物。

[0164] 小分子:通常分子量小于约1000道尔顿的分子,或在一些实施方案中,小于约500道尔顿,其中所述分子能够在一定可测量的程度上调节靶分子的活性。

[0165] 受试者:活体多细胞脊椎动物生物,包括人类和动物受试者类别,包括人类和非人类哺乳动物。

[0166] 合成的:在实验室中通过人工方式产生的,例如,合成的核酸或蛋白质(例如抗体)可以在实验室中化学合成。

[0167] 治疗有效量:足以使接受治疗的受试者实现所需效果的特定物质的量。例如,这可以是阻止或抑制肿瘤生长所必需的量。在一个实施方案中,治疗有效量是消除、减小肿瘤大小或防止肿瘤转移所必需的量,例如与治疗前的大小/体积/数量相比,将肿瘤大小和/或体积减小至少10%、至少20%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或甚至100%,和/或将转移灶的数量和/或大小/体积减少至少10%、至少20%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或甚至100%的量。当施用于受试者时,通常使用的剂

量将达到靶组织(例如,在肿瘤中)浓度,其已被证明可实现所需的体外效果。

[0168] 毒素:对细胞具有细胞毒性的分子。毒素包括相思豆毒素、蓖麻毒素、假单胞菌外毒素(PE)、白喉毒素(DT)、肉毒杆菌毒素、皂草素、局限曲菌素或白树毒素,或它们的修饰毒素。例如,PE和DT是剧毒化合物,通常通过肝毒性导致死亡。然而,PE和DT可以通过去除毒素的天然靶向组分(例如PE的域Ia或DT的B链)并将其替换为不同的靶向部分(例如抗体)来修饰成用作免疫毒素的形式。

[0169] 载体:引入宿主细胞从而产生转化的宿主细胞的核酸分子。载体可以包括能够使其在宿主细胞中复制的核酸序列,例如复制起点。载体还可以包括一种或更多种可选择的标记基因和本领域已知的其他遗传元件。在一些实施方案中,载体是病毒载体,例如慢病毒载体。

[0170] Ⅲ.B7H3特异性单域单克隆抗体(“纳米抗体”)

[0171] 纳米抗体包括骆驼科V_HH、软骨鱼类V_{NAR}和人类VH单域抗体。兔单克隆抗体可以识别多种表位,包括小鼠和人类免疫原性较差的表位。本公开描述了用重组B7H3蛋白使兔免疫并生成噬菌体展示的VH单域文库。经过三轮噬菌体淘选,选出了两种结合物(分别称为RFA1和RFB1)。两种结合物在大肠杆菌中表达良好,产量为2 mg/L

[0172] (RFA1)和10 mg/L(RFB1)。兔纳米抗体表现出与B7H3阳性肿瘤细胞系(IMR32、MC38-B7H3+、A431和NBEB)而非B7H3敲除细胞系(IMR32-B7H3 KO、MC38-B7H3 KO)的抗原依赖性结合。本公开还描述了从八个不同的骆驼V_HH文库中分离的十种B7H3特异性骆驼V_HH纳米抗体。选定的纳米抗体能够结合B7H3表达细胞,例如神经母细胞瘤细胞、表皮样癌细胞和胰腺肿瘤细胞。

[0173] 下面提供了十种骆驼和两种兔单域抗体的氨基酸序列。使用Kabat、IMGT和Paratome方法确定的CDR序列分别用下划线、粗体和斜体表示。表格列出了使用Kabat、IMGT或Paratome确定的每种抗体的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸位置。本领域技术人员可以使用替代编号方案(例如Chothia编号方案)容易地确定CDR边界。

[0174] RWB12(SEQ ID NO:1)

[0175] QVQLVESGGGSVQVGGSLRLSCAASGFTYNSYSVGWFRQAPGKEREGVAAINSGGSST YYAASVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAMYYCAARSPSPLTFQTRTLREDSY NYWGQGTQVTVSSS

[0176]

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-66	97-118
IMGT	26-33	51-58	97-119
Paratome	27-35	47-62	98-118

[0177] RWG8(SEQ ID NO:2)

[0178] **DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMGWFRQAPGKGVEWVSTINSG GGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQLNNLKTEDTAMYYCAKEQWRTGSRGQG TQVTVSSS**

[0179]

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-66	97-105
IMGT	26-33	51-58	97-106
Paratome	27-35	47-61	97-106

[0180] RWC4(SEQ ID NO:3)

[0181] EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVAS*EDSTSAMCMG*WFRQAPGKEREGVA*CINPTGEV* ***TWYG*DSVKG**RFTISRDTVKKIVYLQMNSLKPEDTAMYYC***AARVTYGGDWSTDTDYEY*** WGQGTQVTVSSS

[0182]

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-66	97-114
IMGT	26-33	51-58	97-115
Paratome	26-35	50-61	98-114

[0183] RWB2(SEQ ID NO:4)

[0184] **AVQLVDSGGGSVQAGGSLRLSCVVSG*YAFSTYDMA*WFRQAPGEKCE*WVSTVTNN*** ***GRTFYA*DSVKGRFIISRDNAKNILYLQMNSLKPEDTAVYSC*AAAGVRWRCASGGN*E GTQVTVSSS**

[0185]

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-65	96-110
IMGT	26-33	51-57	96-110
Paratome	27-35	47-60	96-109

[0186] RWH5(SEQ ID NO:5)

[0187] AVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCKASG***YCMG***WFRQAPGKEREG*VAALNTEGGVTYYA* **DSVKG**RFSISRDNTNLYLQMNSLKPEDTAIYYC***AADDRPTRCAVGSLYLPYTYR***GQGT QVTVSSS

[0188]

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	27-30	45-61	90-109
IMGT	26-28	46-53	90-110
Paratome	27-30	43-55	90-110

[0189] RWD5(SEQ ID NO:6)

[0190] AVQLVESGGGLVQPGGSLSVSCAASG*FTFSVYWFY*WVRQAPRQGLE*WVSTIASNGSTY* ***YS*DSVKG**RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC***VSDPDYYSDYEREYKF***WAQG TQVTVSSS

[0191]

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-65	96-111
IMGT	26-33	51-57	96-112
Paratome	27-35	47-60	96-111

[0192] RWC3(SEQ ID NO:7)

[0193] QVQLVESGGGLVQPGGSLSVSCAASG***FTFSVYWFY***WVRQAPRQGLE*WVSTIASNGSTY* ***YS*DSVKG**RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC***VSDPDYYSDYERAYKF***WAQG TQVTVSSS

[0194]

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-65	96-111
IMGT	26-33	51-57	96-112
Paratome	27-35	47-60	96-111

[0195] RWG4(SEQ ID NO:8)

[0196] QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASG*FTFSVYWFY*WVRQAPRQGLE*WVS**TIASNGSTY YSDSVKG**RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC***VSDPDYYSDYERAYKF***WAQG TQVTVSSS

[0197]

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-65	96-111
IMGT	26-33	51-57	96-112
Paratome	27-35	47-60	96-111

[0198] RWD9(SEQ ID NO:9)

[0199] EVQLVESGGGLVQPGGSLSVSCAASG*FTFSVYWFY*WVRQAPRQGLE*WVS**TIASNGSTY YSDSVKG**RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC***VSDPDYYSDYERAYKF***WAQG TQVTVSSS

[0200]

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-65	96-111
IMGT	26-33	51-57	96-112
Paratome	27-35	47-60	96-111

[0201] RWH1(SEQ ID NO:10)

[0202] AVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASG*MNLDNYVRG*WLRQAPGSKCE*FVSIIRRDGTT DYGDSVKG**RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPDDTAVYYC***AAIVVPRAAEYACDGLPYR*** GQGTQVTVSSS

[0203]

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-65	96-113
IMGT	26-33	51-57	96-114
Paratome	27-35	47-60	97-114

[0204] RFA1(SEQ ID NO:11)

[0205] QSLEESGGGLVTPGGTLTLTCTVSG*FSLSSYGMS*WVRQAPGKGLE*WIGS**MANNGDPYY ASWAKG**RFTISKTSTTVDLKITSPTTEDTATYFC***VRAPWGSHSMWGP***GTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSDPVLTQTAGGGTNVEIK

[0206]

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	30-34	50-64	93-105
IMGT	25-32	50-56	93-104
Paratome	26-34	46-59	93-105

[0207] RFB1(SEQ ID NO:12)

[0208] QEQLKESGGRLVTPGTPLTLTCTVSG*FSPNNYGVS*WVRQPPGKGLE*WIGM**SSTAGATY YANWAKG**RFTISKTSTTVDLEITSPTTEDTATYFC***AKGTPSLSYGNIWGP***GTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSAQGPTQTPGGGGSGTEVVVK

[0209]

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	32-35	51-65	94-107
IMGT	26-33	51-57	94-107
Paratome	27-35	47-60	94-108

[0210] 本文提供了结合(例如,特异性结合)B7H3(例如细胞表面或可溶性B7H3)的单克隆抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体是单域抗体,例如VH单域抗体。

[0211] 在一些实施方案中,单域单克隆抗体包括本文中如SEQ ID NO:1-12中任一项所示的氨基酸序列的至少一部分,例如来自以下任何一种抗体的一个或更多个(例如所有三个)CDR序列:RWB12(SEQ ID NO:1)、RWG8(SEQ ID NO:2)、RWC4(SEQ IDNO:3)、RWB2(SEQ ID NO:4)、RWH5(SEQ ID NO:5)、RWD5(SEQ ID NO:6)、RWC3(SEQ ID NO:7)、RWG4(SEQ ID NO:8)、RWD9(SEQ ID NO:9)、RWH1(SEQ ID NO:10)、RFA1(SEQ ID NO:11)和RFB1(SEQ ID NO:12),由任何编号方案确定,例如IMGT、Kabat、Paratome或Chothia,或它们的任何组合。在一些实例中,单域抗体包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ IDNO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的CDR1、CDR2和CDR3序列。在特定实例中,使用Kabat、IMGT或Paratome编号方案,或Kabat、IMGT和Paratome编号方案的组合确定CDR序列。

[0212] 在一些实施方案中,抗体的CDR1、CDR2和CD3序列分别包含SEQ ID NO:1的残基31-35、50-66和97-118;SEQ ID NO:1的残基26-33、51-58和97-119;或SEQ IDNO:1的残基27-35、47-62和98-118。在一些实例中,抗体的氨基酸序列与SEQ ID NO:1至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在具体实例中,抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:1或由其组成。

[0213] 在一些实施方案中,抗体的CDR1、CDR2和CD3序列分别包含SEQ ID NO:2的残基31-35、50-66和97-105;SEQ ID NO:2的残基26-33、51-58和97-106;或SEQ IDNO:2的残基27-35、47-61和97-106。在一些实例中,抗体的氨基酸序列与SEQ ID NO:2至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在具体实例中,抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:2或由其组成。

[0214] 在一些实施方案中,抗体的CDR1、CDR2和CD3序列分别包含SEQ ID NO:3的残基31-35、50-66和97-114;SEQ ID NO:3的残基26-33、51-58和97-115;或SEQ IDNO:3的残基26-35、50-61和98-114。在一些实例中,抗体的氨基酸序列与SEQ ID NO:3至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在具体实例中,抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:3或由其组成。

[0215] 在一些实施方案中,抗体的CDR1、CDR2和CD3序列分别包含SEQ ID NO:4的残基31-35、50-65和96-110;SEQ ID NO:4的残基26-33、51-57和96-110;或SEQ IDNO:4的残基27-35、47-60和96-109。在一些实例中,抗体的氨基酸序列与SEQ ID NO:4至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在具体实例中,抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:4或由其组成。

[0216] 在一些实施方案中,抗体的CDR1、CDR2和CD3序列分别包含SEQ ID NO:5的残基27-30、45-61和90-109;SEQ ID NO:5的残基26-28、46-53和90-110;或SEQ ID NO:5的残基27-30、43-55和90-110。在一些实例中,抗体的氨基酸序列与SEQ ID NO:5至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在具体实例中,抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:5或由其组成。

[0217] 在一些实施方案中,抗体的CDR1、CDR2和CD3序列分别包含SEQ ID NO:6的残基31-35、50-65和96-111;SEQ ID NO:6的残基26-33、51-57和96-112;或SEQ ID NO:6的残基27-35、47-60和96-111。在一些实例中,抗体的氨基酸序列与SEQ ID NO:6至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在具体实例中,抗体

的氨基酸序列包含SEQ ID NO:6或由其组成。

[0218] 在一些实施方案中,抗体的CDR1、CDR2和CD3序列分别包含SEQ ID NO:7的残基31-35、50-65和96-111;SEQ ID NO:7的残基26-33、51-57和96-112;或SEQ ID NO:7的残基27-35、47-60和96-111。在一些实例中,抗体的氨基酸序列与SEQ ID NO:7至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在具体实例中,抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:7或由其组成。

[0219] 在一些实施方案中,抗体的CDR1、CDR2和CD3序列分别包含SEQ ID NO:8的残基31-35、50-65和96-111;SEQ ID NO:8的残基26-33、51-57和96-112;或SEQ ID NO:8的残基27-35、47-60和96-111。在一些实例中,抗体的氨基酸序列与SEQ ID NO:8至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在具体实例中,抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:8或由其组成。

[0220] 在一些实施方案中,抗体的CDR1、CDR2和CD3序列分别包含SEQ ID NO:9的残基31-35、50-65和96-111;SEQ ID NO:9的残基26-33、51-57和96-112;或SEQ ID NO:9的残基27-35、47-60和96-111。在一些实例中,抗体的氨基酸序列与SEQ ID NO:9至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在具体实例中,抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:9或由其组成。

[0221] 在一些实施方案中,抗体的CDR1、CDR2和CD3序列分别包含SEQ ID NO:10的残基31-35、50-65和96-113;SEQ ID NO:10的残基26-33、51-57和96-114;或SEQ ID NO:10的残基27-35、47-60和97-114。在一些实例中,抗体的氨基酸序列与SEQ ID NO:10至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在具体实例中,抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:10或由其组成。

[0222] 在一些实施方案中,抗体的CDR1、CDR2和CD3序列分别包含SEQ ID NO:11的残基30-34、50-64和93-105;SEQ ID NO:11的残基25-32、50-56和93-104;或SEQ ID NO:11的残基26-34、46-59和93-105。在一些实例中,抗体的氨基酸序列与SEQ ID NO:11或与SEQ ID NO:11的残基1-113至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在具体的实例中,抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:11或由其组成。在其他具体实例中,抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:11的残基1-113或由其组成。

[0223] 在一些实施方案中,抗体的CDR1、CDR2和CD3序列分别包含SEQ ID NO:12的残基32-35、51-65和94-107;SEQ ID NO:12的残基26-33、51-57和94-107;或SEQ ID NO:12的残基27-35、47-60和94-108。在一些实例中,抗体的氨基酸序列与SEQ ID NO:12或与SEQ ID NO:12的残基1-116至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在具体实例中,抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:12或由其组成。在其他具体实例中,抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:12的残基1-116或由其组成。

[0224] 在一些实施方案中,抗体是人源化抗体或嵌合抗体。

[0225] 本文还提供了包括本文公开的单域单克隆抗体的嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,CAR还包括铰链区、跨膜域、共刺激信号传导部分、信号传导域或它们的任何组合。在特定的非限制性实例中,铰链区包含CD8α铰链区,跨膜域包含CD8α跨膜域,共刺激信号传导部分包含4-1BB信号传导部分,和/或信号传导域包含CD3ζ信号传导域。

[0226] 本文还提供了经过修饰以使其能够与通用CAR系统一起使用的B7H3特异性抗体。

在一些实施方案中,B7H3特异性抗体与特异性结合对的一种组分融合。在一些实例中,抗体与亮氨酸拉链或生物素融合。

[0227] 本文进一步提供了表达B7H3特异性CAR的细胞。在一些实例中,所述细胞是T淋巴细胞,例如CTL,或自然杀伤细胞。在第IV部分中进一步描述CARs和表达CAR的细胞。

[0228] 本文还提供了包括本文公开的单域抗体和效应分子的免疫缀合物。在一些实施方案中,所述效应分子是毒素,例如但不限于假单胞菌外毒素或其变体,例如PE38。在其他实施方案中,所述效应分子是可检测标记物,例如但不限于荧光团、酶或放射性同位素。在其他实施例中,所述效应分子是光子吸收剂,例如IR700。包含光子吸收剂的免疫缀合物可用于光免疫疗法。在第V部分进一步描述免疫缀合物。

[0229] 本文进一步提供了抗体-药物缀合物(ADC),包括缀合至本文公开的单域抗体的药物。在一些实施方案中,药物是小分子,例如抗微管剂、抗有丝分裂剂和/或细胞毒剂。在第VI部分中进一步描述ADC。

[0230] 本文还提供了多特异性抗体,包括本文公开的单域抗体和至少一种另外的单克隆抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述多特异性抗体是双特异性抗体。在其他实施方案中,所述多特异性抗体是三特异性抗体。在一些实施方案中,所述至少一种另外的单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合T细胞受体或自然杀伤(NK)细胞活化受体的组分。在第VII部分中进一步描述多特异性抗体。

[0231] 本文进一步提供了抗体-纳米颗粒缀合物,包括缀合至本文公开的单域抗体的纳米颗粒。在一些实施方案中,所述纳米颗粒包括聚合物纳米颗粒、纳米球、纳米胶囊、脂质体、树枝状聚合物、聚合物胶束或囊泡。在一些实施方案中,纳米颗粒包括细胞毒剂。在第VIII部分中进一步描述抗体-纳米颗粒缀合物。

[0232] 本文还提供了融合蛋白,包括本文公开的单域抗体和异源蛋白或肽。在一些实施方案中,所述异源蛋白是Fc蛋白或亮氨酸拉链。

[0233] 本文进一步提供了编码本文公开的抗体、CAR、免疫缀合物、多特异性抗体或融合蛋白的核酸分子。在一些实施方案中,所述核酸分子可操作地连接至启动子。本文还提供了包括所公开的核酸分子的载体。进一步提供了分离细胞,包含作为本文公开的载体的核酸分子。

[0234] 本文还提供了表达CAR和截短的人类EGFR(huEGFRt)的核酸构建体。在一些实施方案中,所述核酸在5'至3'方向包含:编码第一粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子受体信号序列(GMCSFRss)的核酸;编码本文公开的B7H3特异性单域单克隆抗体的核酸;编码细胞外铰链区的核酸;编码跨膜域的核酸;编码细胞内共刺激域的核酸;编码细胞内信号传导域的核酸;编码自切割2A肽的核酸;编码第二GMCSFRss的核酸;以及编码截短的人类表皮生长因子受体(huEGFRt)的核酸。在一些实例中,所述核酸进一步包括编码第一GMCSFRss的核酸的人类延伸因子1α(EF1α)启动子序列5'。在一些实例中,铰链区包含CD8α铰链区。在一些实例中,跨膜域包含CD8α跨膜域。在一些实例中,共刺激信号传导部分包含4-1BB信号传导部分。在一些实例中,信号传导域包括CD3ζ信号传导域。在一些实例中,B7H3特异性抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:1-12中的任一项。本文还提供了包含核酸构建体的载体。在一些实施方案中,所述载体是慢病毒载体。

[0235] 本文进一步提供了共表达本文公开的B7H3特异性CAR和huEGFRt的分离细胞。在一

些实例中,所述细胞是CTL或NK细胞。

[0236] 本公开进一步提供了包含药学上可接受的载体和本文公开的单域单克隆抗体、CAR、分离细胞(例如表达CAR的细胞,例如CAR T细胞或CAR NK细胞)、免疫缀合物、ADC、多特异性抗体、抗体-纳米颗粒缀合物或融合蛋白的组合物。在第IX部分中进一步描述组合物及其用途。

[0237] IV.嵌合抗原受体(CAR)

[0238] 所公开的纳米抗体还可用于生产CAR(也称为嵌合T细胞受体、人工T细胞受体或嵌合免疫受体)和/或经工程改造以表达CAR的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)或自然杀伤(NK)细胞。通常,CAR包括结合部分、细胞外铰链和间隔元件、跨膜区和执行信号传导功能的内域(卡泰利里(Cartellieri)等人,《生物医学与生物技术杂志》(JBiomed Biotechnol)2010:956304,2010;戴(Dai)等人,《美国国家癌症研究所杂志》(J Natl Cancer Inst)108(7):djv439,2016)。在许多情况下,所述结合部分是单克隆抗体(如scFv或单域抗体)的抗原结合片段。间隔区/铰链区通常包括来自IgG亚类的序列,例如IgG1、IgG4、IgD和CD8域。跨膜域可以来源于多种不同的T细胞蛋白,例如CD3ζ、CD4、CD8或CD28。几种不同的内域已被用于生成CAR。例如,内域可以由具有ITAM的信号传导链组成,例如CD3ζ或FcεRIγ。在一些情况下,内域还包括至少一个另外的共刺激域的细胞内部分,例如CD28、4-1BB(CD137、TNFRSF9)、OX-40(CD134)、ICOS、CD27和/或DAP10。

[0239] 表达CAR的CTL、NK细胞(或其他免疫细胞)可用于靶向特定细胞类型,例如B7H3阳性肿瘤细胞。因此,本文公开的纳米抗体可用于改造表达含有B7H3特异性单克隆抗体的CAR的CTL或NK细胞,从而将改造的CTL或NK细胞靶向表达B7H3的肿瘤细胞。改造的T细胞以前已用于过继治疗某些类型癌症(参见,例如,帕克(Park)等人,《分子治疗》(Mol Ther)15(4):825-833,2007)。使用表达CAR的T细胞比基于标准CTL的免疫疗法更普遍,因为表达CAR的CTL不受HLA限制,因此可用于患有表达靶抗原的肿瘤的任何患者。

[0240] 本公开还涵盖多特异性(例如双特异性)或双顺反子CAR。在一些实施方案中,多特异性或双特异性CAR包括对B7H3具有特异性的纳米抗体(例如RWB12、RWG8、RWC4、RWB2、RWH5、RWD5、RWC3、RWG4、RWD9、RWH1、RFA1和RFB1中的任一种)和对不同抗原(例如T细胞抗原)具有特异性的单克隆抗体。类似地,双顺反子CAR包括从同一构建体表达的两个CAR分子,其中一个CAR分子是B7H3靶向CAR,第二个CAR靶向第二抗原。例如,参见秦等人,《血液》130:810,2017;和WO/2018/213337。

[0241] 因此,本文提供了包括B7H3特异性抗体(例如本文公开的任一种纳米抗体)的CAR。本文还提供了编码CAR(包括双特异性CAR和双顺反子CAR)的分离核酸分子和载体,以及表达CAR、双特异性CAR或双顺反子CAR的宿主细胞,例如CTL细胞或NK细胞。表达由B7H3特异性单克隆抗体组成的CAR的CTL或NK细胞可用于治疗表达B7H3的癌症。在本文的一些实施方案中,CAR是双特异性CAR。在本文的其他实施方案中,CAR是双顺反子CAR。

[0242] 在一些实施方案中,CAR包括信号肽序列,例如,抗原结合域的N端。信号肽序列可以是任何合适的信号肽序列,例如来自粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子受体(GMCSFR)、免疫球蛋白轻链κ或IL-2的信号序列。虽然信号肽序列可以促进CAR在细胞表面上的表达,但在表达的CAR中存在信号肽序列并不是CAR发挥作用所必需的。当CAR在细胞表面表达时,信号肽序列可能会从CAR上切下。因此,在一些实施方案中,CAR缺乏信号肽序列。

[0243] 在一些实施方案中,本文公开的CAR从也表达人类EGFR(huEGFRt)的截短形式的构建体(例如慢病毒载体)表达。CAR和huEGFRt由自切割肽序列(例如T2A)隔开,使得在转导细胞中表达后,CAR从huEGFRt切割下来。

[0244] 在本文公开的一些实施方案中,CAR构建体在N端至C端方向上编码以下氨基酸序列:

[0245] GMCSFRss:MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP(SEQ ID NO:27)

[0246] NdeI:HM

[0247] 抗原结合:B7H3特异性抗体(例如本文公开的纳米抗体)

[0248] SpeI:TS

[0249] CD8α铰链:TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD(SEQ ID NO:28)

[0250] CD8αTM:IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT(SEQ ID NO:29)

[0251] 4-1BB:KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL(SEQ ID NO:30)CD3ζ:

[0252] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE

[0253] GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(SEQ ID NO:31)

[0254] T2A:EGRGSLLTCGDVEENPGP(SEQ ID NO:32)

[0255] GMCSFRss:MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP(SEQ ID NO:27)

[0256] huEGFRt:

[0257] RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDI

[0258] LKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLK

[0259] EISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPE

[0260] GCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITC

[0261] TGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM(SEQ ID NO:33)

[0262] 人类表皮生长因子受体由四个细胞外域、跨膜域和三个细胞内域组成。EGFR域按以下N端到C端的顺序为:域I-域II-域III-域IV-跨膜(TM)域-近膜域-酪氨酸激酶域-C端尾。域I和域III是参与配体结合的富含亮氨酸的域。域II和域IV是富含半胱氨酸的域,不与EGFR配体接触。域II介导与其他EGFR家族成员的类似域形成同源二聚体或异源二聚体,域IV可以与域II形成二硫键。EGFR TM域单次穿过细胞膜并可能在蛋白质二聚化中起作用。细胞内域包括近膜域、酪氨酸激酶域和C端尾,它们介导EGFR信号转导(黄(Wee)和王(Wang),《癌症》(Cancers)9(52),doi:10.3390/cancers9050052;弗格森(Ferguson),《生物物理学年度回顾》(Annu Rev Biophys)37:353-373,2008;王等人,《血液》118(5):1255-1263,2011)。

[0263] 人类EGFR的截短形式,本文称为“huEGFRt”,仅包括域III、域IV和TM域。因此,huEGFRt缺少域I、域II和所有三个细胞内域。huEGFRt不能结合EGF并且不具有信号传导活性。然而,该分子保留了结合特定EGFR特异性单克隆抗体,例如FDA批准的西妥昔单抗的能力(PCT公开号WO 2011/056894,其通过引用并入本文)。

[0264] 用编码本文公开的huEGFRt和肿瘤抗原特异性CAR的构建体(例如慢病毒载体)转导T细胞(或NK细胞)能够使用标记的EGFR单克隆抗体西妥昔单抗(ERBITUX™)选择转导的T

细胞。例如,可以用生物素标记西妥昔单抗,并且可以使用可商购(例如美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec))的抗生物素磁珠选择转导的T细胞。huEGFRt的共表达还能够在体内跟踪过继转移的表达CAR的T细胞(或NK细胞)。此外,西妥昔单抗与表达huEGFRt的T细胞的结合诱导了ADCC效应细胞的细胞毒性,从而提供了在体内消除转导的T细胞的机制(王等人,《血液》118(5):1255-1263,2011),例如在治疗的结束时。

[0265] 本文还提供了B7H3特异性单克隆抗体(例如本文公开的纳米抗体),其经过修饰以使其能够与通用CAR系统一起使用。已研发通用CAR系统旨在提高CAR的灵活性并将其应用扩展到其他抗原。目前,对于每位接受CAR T细胞治疗的患者,必须培育、扩增和修饰自体T细胞以表达抗原特异性CAR。这个过程漫长且费用高昂,这限制了它的使用。通用CAR基于一个系统,其中CAR的信号传导组分从分子的抗原结合部分分离,但使用"锁匙"系统结合在一起。例如,生物素结合免疫受体(BBIR)CAR由与包含亲和素的细胞外域融合的细胞内T细胞信号传导域组成。然后,生物素化的抗原特异性(如B7H3特异性)单克隆抗体可以结合BBIR以将T细胞引导至肿瘤抗原表达细胞。另一实例是分离的通用可编程式(SUPRA)CAR系统。在SUPRA系统中,CAR包括与细胞外亮氨酸拉链融合的细胞内信号传导域,该域与与同源亮氨酸拉链融合的抗原特异性单克隆抗体配对。有关通用CAR系统的综述,请参见例如赵(Zhao)等人,《血液学与肿瘤学杂志》(J Hematol Oncol)11(1):132,2018;和秋(Cho)等人,《细胞》173:1426-1438,2018。在本文的一些实施方案中,B7H3-特异性单克隆抗体与特异性结合对的一个组分融合。在一些实例中,单克隆抗体与亮氨酸拉链或生物素融合。

[0266] 另一种类型的通用CAR可以使用分选酶生成。分选酶是一种通过识别和切割羧基末端分选信号来修饰表面蛋白的原核酶。分选酶催化分选酶识别基序和分选酶受体基序之间的转肽反应。因此,抗原特异性CAR可以通过将融合至分选酶识别基序的抗原特异性抗体与包括细胞内信号传导域、跨膜区和细胞外部分(包含分选酶受体基序)的CAR分子的一部分接触来产生。在分选酶存在的情况下,这两种组分共价附接以形成完整的抗原特异性CAR。因此,在本文的一些实施方案中,B7H3特异性单克隆抗体被修饰以包括分选酶识别基序(参见,例如,PCT公开号WO 2016/014553)。

[0267] V.免疫缀合物

[0268] 所公开的单域单克隆抗体可以与治疗剂或效应分子缀合。免疫缀合物包括但不限于其中治疗剂与抗体共价连接的分子。治疗剂是具有针对特定靶分子或带有靶分子的细胞的特定生物活性的试剂。本领域技术人员将理解,治疗剂可包括各种药物(例如长春碱、道诺霉素等)、细胞毒素(例如天然或修饰的假单胞菌外毒素或白喉毒素)、包含药理组合物的包封剂(例如脂质体)、放射性试剂(例如^{125}I、^{32}P、^{14}C、^{3}H和^{35}S)、光子吸收剂(例如IR700),以及其他标记物、靶部分和配体。

[0269] 特定治疗剂的选择取决于特定的靶分子或细胞,以及所需的生物效应。因此,例如,治疗剂可以是用于导致特定靶细胞(例如肿瘤细胞)死亡的细胞毒素。相反,在需要引起非致命性生物反应的情况下,治疗剂可以与非致命性药理剂或含有非致命性药理剂的脂质体缀合。

[0270] 使用本文所述的治疗剂和抗体,本领域技术人员可以容易地构建含有功能等同核酸(例如序列不同但编码相同效应部分或抗体序列的核酸)的多种克隆。因此,本公开提供了编码抗体及其缀合物和融合蛋白的核酸。

[0271] 可以使用本领域技术人员已知的任意数量的方式,将效应分子连接至所关注的抗体。可以使用共价和非共价附接方式。将效应分子附接到抗体的程序根据所述效应分子的化学结构而变化。多肽通常含有多种官能团;例如羧酸(COOH)、游离胺(-NH_2)或巯基(-SH)基团,它们可用于与抗体上合适的官能团反应从而使得效应分子结合。或者,抗体被衍生化以暴露或附接额外的反应性官能团。衍生化可以涉及附接许多已知的接头分子中的任一种。接头可以是用于将抗体连接到效应分子的任何分子。接头能够与抗体和效应分子形成共价键。合适的接头是本领域技术人员熟知的并且包括但不限于直链或支链碳接头、杂环碳接头或肽接头。在抗体和效应分子是多肽的情况下,接头可以通过它们的侧基(例如通过与半胱氨酸的二硫键)连接到组成氨基酸或连接到末端氨基酸的α碳氨基和羧基。

[0272] 在某些情况下,当免疫缀合物到达其靶位点时,需要将效应分子从抗体中释放出来。因此,在这些情况下,免疫缀合物将包含在靶位点附近可切割的键。可以通过酶活性或免疫缀合物在靶细胞内部或靶位点附近所受的条件促进接头的切割以从抗体中释放效应分子。

[0273] 鉴于将多种放射诊断化合物、放射治疗化合物、标记物(例如酶或荧光分子)、药物、毒素和其他试剂与抗体附接的大量方法已被报道,本领域技术人员将能够以确定将给定试剂与抗体或其他多肽附接的合适方法。

[0274] 本文公开的抗体可以衍生或连接到另一分子(例如另一种肽或蛋白质)。通常,抗体或其部分被衍生化,使得与靶抗原的结合不受衍生化或标记的不利影响。例如,抗体可以(通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或其他方式)与一个或更多个其他分子实体功能性连接,所述分子实体的实例为另一抗体(例如,双特异性抗体或双抗体)、检测剂、光子吸收剂、药剂和/或蛋白质或肽,可介导抗体或抗体部分与另一分子(例如链霉亲和素核心区或多组氨酸标签)缔合。

[0275] 一种类型的衍生抗体是通过交联两种或更多种抗体(相同类型或不同类型的,例如产生双特异性抗体)产生的。合适的交联剂包括异双官能的交联剂,具有由合适的间隔基(例如间马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)或同双官能(例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)隔开的两个明显反应性基团。这种接头是可商购的。

[0276] 抗体可以与可检测标志物缀合;例如,能够通过ELISA、分光光度法、流式细胞术、显微术或诊断成像技术(例如计算机断层扫描(CT)、计算机轴向断层扫描(CAT)、磁共振成像(MRI)、核磁共振成像(NMRI)、磁共振断层扫描(MTR)、超声、光纤检查和腹腔镜检查)检测的可检测标志物。具体地,可检测标志物的非限制性实例包括荧光团、化学发光剂、酶键、放射性同位素和重金属或化合物(例如用于通过MRI检测的超顺磁性氧化铁纳米晶体)。例如,可用的可检测标志物包括荧光化合物,包括荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲基胺-1-萘磺酰氯、藻红蛋白、镧系元素磷光体等。也可以使用生物发光标志物,例如荧光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)和黄色荧光蛋白(YFP)。抗体或抗原结合片段也可以与可用于检测的酶缀合,例如辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等。当抗体或抗原结合片段与可检测的酶缀合时,可以通过添加酶用来产生可识别反应产物的另外试剂来检测。例如,当存在辣根过氧化物酶试剂时,添加过氧化氢和二氨基联苯胺会导致有色反应产物,其可在视觉上检测到。抗体或抗原结合片段也可以与生物素缀合,并通过间接测量亲和素或链霉亲和素结合来检测。需要注意的是,亲和素本身可以与酶或荧光标记物缀

合。

[0277] 抗体可以用磁性试剂(如钆)标记。抗体也可以用镧系元素(如铕和镝)和锰标记。诸如超顺磁性氧化铁之类的顺磁性颗粒也可用作标记物。抗体也可以用被二级报告分子识别的预定多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列、二级抗体的结合位点、金属结合域、表位标签)标记。在一些实施方案中,标记物通过各种长度的间隔臂附接以减少潜在的空间位阻。

[0278] 抗体也可以用放射性标记的氨基酸进行标记。放射性标记物可用于诊断和治疗目的。例如,放射性标记物可用于通过x射线、发射光谱或其他诊断技术检测靶抗原的表达。多肽标记物的实例包括但不限于以下放射性同位素或放射性核苷酸:^{3}H、^{14}C、^{15}N、^{35}S、^{90}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{125}I、^{131}I。

[0279] 本文公开的抗体也可以与光子吸收剂缀合。在一些实施方案中,光子吸收剂是酞菁染料,例如但不限于IRDye® 700DX(也称为“IR700”)。抗体-光吸收剂缀合物可用于光免疫疗法。

[0280] 抗体也可以用化学基团如聚乙二醇(PEG)、甲基或乙基或碳水化合物基团衍生。这些基团可用于改善抗体的生物学特性,例如延长血清半衰期或增强组织结合。

[0281] 毒素可与本文所述的单克隆抗体一起使用以产生免疫毒素。示例性毒素包括蓖麻毒素、相思豆毒素、白喉毒素及其亚基,以及肉毒杆菌毒素A到F。这些毒素很容易从商业来源获得(例如,西格玛化学公司(Sigma Chemical Company),密苏里州圣路易市)。所考虑的毒素还包括本文所述的毒素的变体(参见,例如,参见美国专利号5,079,163和4,689,401)。在一个实施方案中,毒素是假单胞菌外毒素(PE)(美国专利号5,602,095)。如本文所用,“假单胞菌外毒素”是指全长天然(天然存在的)PE或已修饰的PE。此类修饰可包括但不限于域Ia的消除、域Ib、II和III中的多种氨基酸缺失、单个氨基酸取代和在羧基末端添加一个或更多个序列(例如,参见西格尔(Siegall)等人,《生物化学杂志》(J.Biol.Chem.)264:14256-14261,1989)。

[0282] 与本文所述的单克隆抗体一起使用的PE可以包括天然序列、天然序列的细胞毒性片段,以及天然PE及其细胞毒性片段的保守修饰变体。PE的细胞毒性片段包括在靶细胞中有或没有随后蛋白水解加工或其他加工的细胞毒性片段。PE的细胞毒性片段包括PE40、PE38和PE35。有关PE及其变体的另外说明,参见例如美国专利号4,892,827;5,512,658;5,602,095;5,608,039;5,821,238;5,854,044;美国专利申请公开号2015/0099707;PCT公开号WO 99/51643和WO 2014/052064;帕伊(Pai)等人,《美国科学院院报》88:3358-3362,1991;近藤(Kondo)等人,《生物化学杂志》263:9470-9475,1988;帕斯坦(Pastan)等人,《生物化学与生物物理学学报》1333:C1-C6,1997。

[0283] 本文还考虑了蛋白酶抗性PE变体和免疫原性降低的PE变体,例如但不限于PE-LR、PE-6X、PE-8X、PE-LR/6X和PE-LR/8X(参见例如,韦尔登(Weldon)等人,《血液》113(16):3792-3800,2009;昂达(Onda)等人,《美国科学院院报》105(32):11311-11316,2008;和PCT公开号WO 2007/016150、WO 2009/032954和WO 2011/032022,通过引用并入本文)。

[0284] 在一些实例中,PE是对溶酶体降解具有抗性的变体,例如PE-LR(韦尔登等人,《血液》113(16):3792-3800,2009;PCT公开号WO 2009/032954)。在其他实例中,PE是命名为PE-LR/6X(PCT公开号WO 2011/032022)的变体。在其他实例中,PE变体是免疫原性降低的PE。在又一实例中,PE是命名为PE-LR/8M的变体(PCT公开号WO 2011/032022)。

[0285] PE的修饰可以发生在任何先前描述的变体中,包括PE的细胞毒性片段(例如,PE38、PE-LR和PE-LR/8M)。修饰的PE可以包括任何取代,例如PE的一个或更多个T细胞表位和/或B细胞表位内的一个或更多个氨基酸残基取代,或一个或更多个T细胞和/或B细胞表位的缺失(参见,例如,美国专利申请公开号2015/0099707)。

[0286] 预期形式的PE还包括去免疫形式的PE,例如删除域II的版本(例如,PE24)。PE的去免疫形式描述于例如PCT公开号WO 2005/052006、WO 2007/016150、WO 2007/014743、WO 2007/031741、WO 2009/32954、WO 2011/32022、WO 2012/154530,和WO 2012/170617。

[0287] 本文所述的抗体还可用于将任何数量的不同诊断或治疗性化合物靶向在其表面表达B7H3的细胞。因此,本公开的抗体可以直接或通过接头附接至药物,该药物将被直接递送至表达细胞表面B7H3的细胞。这可以用于治疗、诊断或研究目的。治疗剂包括诸如核酸、蛋白质、肽、氨基酸或衍生物、糖蛋白、放射性同位素、光子吸收剂、脂质、碳水化合物或重组病毒之类的化合物。核酸治疗和诊断部分包括反义核酸、用于与单链或双链DNA共价交联的衍生寡核苷酸,以及形成三链的寡核苷酸。

[0288] 或者,与抗体连接的分子可以是包封系统,例如纳米颗粒、脂质体或胶束,包含最好被屏蔽以免直接暴露于循环系统的治疗性组合物(例如药物)、核酸(例如,反义核酸)或另一治疗部分。制备附着于抗体的脂质体的方法是本领域技术人员熟知的(参见,例如,美国专利号4,957,735;康纳等人,《药物治疗》(Pharm.Ther.)28:341-365,1985)。

[0289] 本文所述的抗体也可以共价或非共价连接至可检测标记物。适用于此类用途的可检测标记物包括可通过光谱方法、光化学方法、生物化学方法、免疫化学方法、电学方法、光学方法或化学方法检测的任何组合物。可用的标记物包括磁珠、荧光染料(例如,异硫氰酸荧光素、德克萨斯红、罗丹明、绿色荧光蛋白等)、放射性标记物(例如,^{3}H、^{125}I、^{35}S、^{14}C或^{32}P)、酶(例如例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和其他常用于ELISA的酶)和比色标记物,例如胶体金或有色玻璃或塑料(例如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等)珠。

[0290] 检测此类标记物的方法为本领域技术人员所熟知。因此,例如,可以使用照相胶片或闪烁计数器检测放射性标记物,可以使用光电检测器检测发射的光来检测荧光标记物。酶标记物通常通过向酶提供底物并检测酶在底物上作用产生的反应产物来检测,而比色标记物通过简单地观察有色标记物来检测。

[0291] VI.抗体药物缀合物(ADC)

[0292] ADC是由肿瘤抗原特异性抗体(例如免疫球蛋白的单域抗体或抗原结合片段)和药物(通常是细胞毒剂,例如抗微管剂或交联剂)组成的化合物。由于ADC能够特异性靶向癌细胞,因此该药物可以比用于标准化疗的药物更有效。目前与ADC一起使用的最常见细胞毒性药物的IC_{50}比常规化疗药物强100至1000倍。常见的细胞毒性药物包括抗微管剂,例如美登素类和奥瑞他汀(例如奥瑞他汀E和奥瑞他汀F)。与ADC一起使用的其他细胞毒素包括吡咯并苯二氮卓(PBD),它与DNA的小沟共价结合以形成链间交联。在许多情况下,ADC的抗体与药物比例为1:2至1:4(班德尔(Bander),《血液学与肿瘤学临床进展》(Clinical Advances in Hematology&Oncology)10(8;增刊10):3-7,2012)。

[0293] 抗体和药物可以通过可切割或不可切割的接头连接。然而,在某些情况下,需要有一个在循环中稳定的接头,从而防止全身释放可能导致显著脱靶毒性的细胞毒性药物。在ADC被靶细胞内化之前,不可切割的接头阻止释放细胞毒剂。一旦进入溶酶体,溶酶体蛋白

酶对抗体的酶切使细胞毒性剂得以释放(班德尔,《血液学与肿瘤学临床进展》10(8;增刊10):3-7,2012)。

[0294] 一种将药物与单克隆抗体进行位点特异性和稳定缀合的方法是通过聚糖工程。单克隆抗体在每条重链CH2域的Asn297残基处具有一条保守的N-连接寡糖链(卡斯巴(Qasba)等人,《生物技术进展》(Biotechnol Prog)24:520-526,2008)。使用突变型β1,4-半乳糖基转移酶(Y289L-Gal-T1;美国专利申请公开号2007/0258986和2006/0084162,通过引用并入本文),将2-酮-半乳糖转移到抗体重链上的游离GlcNAc残基,从而进行缀合化学处理。

[0295] 附接到单克隆抗体上的寡糖链可基于末端半乳糖残基分为三组——完全半乳糖基化(两个半乳糖残基;IgG-G2)的寡糖链、一个半乳糖残基(IgG-G1)的寡糖链或完全去半乳糖基化(IgG-G0)的寡糖链。用β1,4-半乳糖苷酶处理单克隆抗体可将抗体转化为IgG-G0糖型。突变型β1,4-半乳糖基转移酶能够将2-酮-半乳糖或2-叠氮基-半乳糖从它们各自的UDP衍生物转移到IgG-G1和IgG-G0糖型上的GlcNAc残基上。转移糖上的化学处理使多种分子能够通过聚糖残基与单克隆抗体缀合(卡斯巴等人,《生物技术进展》24:520-526,2008)。

[0296] 本文提供了ADC,包括与结合(例如特异性结合)B7H3的单克隆抗体缀合的药物(例如细胞毒剂)。在一些实施方案中,药物是小分子。在一些实例中,药物是交联剂、抗微管剂和/或抗有丝分裂剂,或适合介导杀死肿瘤细胞的任何细胞毒剂。示例性细胞毒剂包括但不限于PBD、奥瑞他汀、美登素类、多拉司他汀、加利车霉素、奈莫柔比星及其衍生物、PNU-159682、蒽环霉素、长春花生物碱、紫杉烷、单端孢菌素、CC1065、喜树碱、依利萘法德、康普瑞汀、多拉司他汀、多卡霉素、烯二炔、格尔德霉素、吲哚啉苯二氮卓二聚体、嘌呤霉素、微管溶素、半甾体素、剪接抑素或普拉地内酯,以及具有细胞毒活性的立体异构体、等排体、类似物和衍生物。

[0297] 在一些实施方案中,ADC包含吡咯并苯二氮卓(PBD)。天然产物蒽霉素(一种PBD)于1965年首次报道(莱姆格鲁伯(Leimgruber)等人,《美国化学会杂志》(JAm Chem Soc),87:5793-5795,1965;莱姆格鲁伯等人,《美国化学会杂志》,87:5791-5793,1965)。从那时起,已经报道了许多PBD,包括天然存在的和合成的类似物(杰拉塔纳,《医学研究评论》32(2):254-293,2012;和美国专利号6,884,799;7,049,311;7,067,511;7,265,105;7,511,032;7,528,126;和7,557,099)。作为一个实例,PBD二聚体识别并结合特定的DNA序列,并已被证明可用作细胞毒剂。PBD二聚体已与抗体缀合,所得ADC显示具有抗癌特性(参见例如US2010/0203007)。PBD二聚体上的示例性连接位点包括五元吡咯环、PBD单元之间的系链和N10-C11亚胺基团(参见WO 2009/016516;US2009/304710;US2010/047257;US2009/036431;US2011/0256157;和WO 2011/130598)。

[0298] 在一些实施方案中,ADC包含与一种或更多种美登素类分子缀合的抗体。美登素类是美登素的衍生物,并且是通过抑制微管蛋白聚合起作用的有丝分裂抑制剂。美登素最初是从东非灌木齿叶美登木中分离出来的(美国专利号3,896,111)。随后,发现某些微生物也产生美登素类,例如美登醇和C-3美登醇酯(美国专利号4,151,042)。合成美登素类例如在以下美国专利号中公开:4,137,230;4,248,870;4,256,746;4,260,608;4,265,814;4,294,757;4,307,016;4,308,268;4,308,269;4,309,428;4,313,946;4,315,929;4,317,821;4,322,348;4,331,598;4,361,650;4,364,866;4,424,219;4,450,254;4,362,663;和4,371,533。

[0299] 在一些实施方案中,ADC包括与多拉司他汀或奥瑞他汀或其类似物或衍生物缀合的抗体(参见美国专利号5,635,483;5,780,588;5,767,237;和6,124,431)。奥瑞他汀是海洋软体动物化合物多拉司他汀-10的衍生物。多拉司他汀和奥瑞他汀已被证明会干扰微管动力学、GTP水解以及核和细胞分裂(沃伊克(Woyke)等人,《抗菌剂和化学疗法》(Antimicrob Agents and Chemother)45(12):3580-3584,2001)并具有抗癌(美国专利号5,663,149)和抗真菌活性(佩蒂特(Pettit)等人,《抗菌剂和化学疗法》42:2961-2965,1998)。示例性多拉司他汀和奥瑞他汀包括但不限于多拉司他汀10、奥瑞他汀E、奥瑞他汀F、奥瑞他汀EB(AEB)、奥瑞他汀EFP(AEFP)、MMAD(单甲基奥瑞他汀D或单甲基多拉司他汀10)、MMAF(单甲基奥瑞他汀F或N-甲基缬氨酸-缬氨酸-海兔异亮氨酸-海兔脯氨酸-苯丙氨酸)、MMAE(单甲基奥瑞他汀E或N-甲基缬氨酸-缬氨酸-海兔异亮氨酸-海兔脯氨酸-去甲麻黄碱)、5-苯甲酰基戊酸-AE酯(AEVB)和其他奥瑞他汀(参见例如,美国公开号2013/0129753)。

[0300] 在一些实施方案中,ADC包含与一种或更多种加利车霉素分子缀合的抗体。加利车霉素家族的抗生素及其类似物能够在亚皮摩尔浓度下产生双链DNA断裂(欣曼(Hinman)等人,《癌症研究》(Cancer Res)53:3336-3342,1993;洛德(Lode)等人,《癌症研究》58:2925 -2928,1998)。在美国专利号5,712,374;5,714,586;5,739,116;和5,767,285中描述了用于制备具有加利车霉素药物部分的ADC的示例性方法。

[0301] 在一些实施方案中,ADC包含蒽环霉素。蒽环霉素是具有细胞毒活性的抗生素化合物。人们相信,蒽环霉素可以通过多种不同的机制杀死细胞,包括将药物分子嵌入细胞的DNA中,从而抑制DNA依赖性核酸合成;诱导产生自由基,然后自由基与细胞大分子发生反应,对细胞造成损害;和/或药物分子与细胞膜的相互作用。非限制性示例性蒽环霉素包括多柔比星、表柔比星、依达比星、道诺霉素、道诺红菌素、多柔比星、表柔比星、奈莫柔比星、戊柔比星和米托蒽醌,以及它们的衍生物。例如,PNU-159682是奈莫柔比星的有效代谢物(或衍生物)(昆蒂里(Quintieri)等人,《临床癌症研究》(Clin Cancer Res)11(4):1608-1617,2005)。奈莫柔比星是多柔比星的半合成类似物,在多柔比星的糖苷氨基上具有2-甲氧基吗啉基(格兰迪(Grandi)等人,《癌症治疗评论》(Cancer Treat Rev)17:133,1990;里帕蒙蒂(Ripamonti)等人,《英国癌症杂志》(Br J Cancer)65:703-707,1992)。

[0302] 在一些实施方案中,ADC可以进一步包括接头。在一些实例中,接头是可用于将一个或更多个药物部分连接至抗体以形成ADC的双官能或多官能部分。在一些实施方案中,使用具有用于共价附接药物和抗体的反应性官能团的接头制备ADC。例如,抗体的半胱氨酸硫醇可以与接头或药物-接头中间体的反应性官能团形成键以制备ADC。

[0303] 在一些实例中,接头具有能够与抗体上存在的游离半胱氨酸反应以形成共价键的官能团。具有此类反应性官能团的示例性接头包括马来酰亚胺、卤代乙酰胺、α-卤代乙酰、活化酯(如琥珀酰亚胺酯、4-硝基苯基酯、五氟苯基酯、四氟苯基酯)、酸酐、酸性氯化物、磺酰氯化物、异氰酸酯和异硫氰酸酯。

[0304] 在一些实例中,接头具有能够与抗体上存在的亲电子基团反应的官能团。这种亲电子基团的实例包括但不限于醛和酮羰基。在一些情况下,接头反应性官能团的杂原子可以与抗体上的亲电子基团反应并与抗体单元形成共价键。非限制性实例包括酰肼、肟、氨基、肼、缩氨硫脲、肼羧酸酯和芳基酰肼。

[0305] 在一些实例中,接头是促进药物释放的可切割接头。可切割接头的实例包括酸不

稳定接头(例如,包含脲)、蛋白酶敏感接头(例如,肽酶敏感接头)、光不稳定接头和含二硫键的接头(沙里河(Chari)等人,《癌症研究》52:127-131,1992;美国专利号5,208,020)。

[0306] 本文公开的ADC可单独用于治疗B7H3阳性癌症,或与另一种治疗剂组合和/或与治疗癌症的任何标准疗法(例如肿瘤的手术切除、化学疗法或放射疗法)组合使用治疗B7H3阳性癌症。

[0307] Ⅶ.多特异性抗体

[0308] 多特异性抗体是由两种或更多种单克隆抗体(如单域抗体)或两种或更多种不同单克隆抗体的抗原结合片段组成的重组蛋白。例如,双特异性抗体由两种不同单克隆抗体的抗原结合片段组成。因此,双特异性抗体结合两种不同的抗原,而三特异性抗体结合三种不同的抗原。多特异性抗体可通过同时靶向例如CTL(例如CTL受体成分,如CD3)或效应自然杀伤(NK)细胞,和至少一种肿瘤抗原来用于癌症免疫治疗。本文公开的B7H3特异性单域单克隆抗体可用于产生靶向B7H3和CTL两者或靶向B7H3和NK细胞两者的多特异性(例如双特异性或三特异性)抗体,从而提供治疗表达B7H3的癌症的方法。

[0309] 双特异性T细胞接合剂(BiTE)是一种类型的双特异性单克隆抗体,融合了靶向肿瘤抗原(如B7H3)的第一单克隆抗体(如scFv或单域抗体)和结合T细胞(例如T细胞上的CD3)的第二抗体。在本文的一些实施方案中,BiTE的结合部分的一种对B7H3是特异性的。

[0310] 双特异性杀伤细胞接合剂(BiKE)是一种类型的双特异性单克隆抗体,融合了靶向肿瘤抗原(如B7H3)的第一单克隆抗体(如scFv或单域抗体)和结合NK细胞活化受体(例如CD16)的第二scFv。

[0311] 本文提供了包含B7H3特异性单克隆抗体的多特异性(例如三特异性或双特异性)单克隆抗体。在一些实施方案中,多特异性单克隆抗体进一步包含特异性结合T细胞受体组分(例如CD3)的单克隆抗体。在其他实施方案中,多特异性单克隆抗体进一步包含特异性结合NK细胞活化受体(例如CD16、Ly49或CD94)的单克隆抗体。本文还提供了编码多特异性抗体的分离核酸分子和载体,以及包含所述核酸分子或载体的宿主细胞。包含B7H3特异性抗体的多特异性抗体可用于治疗表达B7H3的癌症。因此,本文提供了治疗患有癌症的受试者的方法,即选择患有表达B7H3癌症的受试者,并向所述受试者施用治疗有效量的靶向B7H3的多特异性抗体。

[0312] Ⅷ.抗体-纳米颗粒缀合物

[0313] 本文公开的单克隆抗体可以与多种不同类型的纳米颗粒缀合,以通过抗体与肿瘤细胞表面表达的B7H3结合,将细胞毒剂或其他抗癌剂直接递送至肿瘤细胞。纳米颗粒的使用减少了脱靶副作用,还可以提高药物的生物利用度并降低实现治疗效果所需的药物剂量。可以定制纳米颗粒配制物以适合在纳米颗粒内携带或包封的药物。例如,疏水性分子可以掺入纳米颗粒的核心内,而亲水性药物可以被携带在由聚合物壳或脂质壳保护的含水核内。纳米颗粒的实例包括但不限于纳米球、纳米胶囊、脂质体、树枝状聚合物、聚合物胶束、囊泡和聚合物纳米颗粒(费伊(Fay)和斯科特(Scott),《免疫疗法》(Immunotherapy)3(3):381-394,2011)。

[0314] 脂质体是用于药物递送的常见纳米颗粒类型。与脂质体缀合的抗体通常被称为“免疫脂质体”。免疫脂质体的脂质体组分通常是一个或更多个同心磷脂双层的脂质泡囊。在某些情况下,磷脂由亲水性头基和两条疏水链组成,从而能够包封疏水性药物和亲水性

药物。常规脂质体通过网状内皮系统(RES)的巨噬细胞迅速从循环中去除。为了产生长循环脂质体,可以调节脂质体的组成、大小和电荷。脂质体的表面也可以被修饰,例如用糖脂或唾液酸。例如,聚乙二醇(PEG)的加入显著延长了循环半衰期。用作药物递送剂的脂质体,包括用于制备免疫脂质体的脂质体,已在本领域中进行了说明(参见,例如,帕斯科(Paszko)和森格(Senge),《当代药物化学》(Curr Med Chem)19(31)5239-5277,2012;伊莫迪诺(Immordino)等人,《国际纳米医学杂志》(Int JNanomedicine)1(3):297-315,2006;美国专利申请公开号2011/0268655;2010/00329981)。

[0315] 囊泡(Niosome)是基于非离子表面活性剂的泡囊,结构类似于脂质体。囊泡膜仅由非离子表面活性剂组成,例如聚甘油基烷基醚或N-棕榈酰基葡糖胺。囊泡的范围从小的单层颗粒到大的多层颗粒。这些纳米颗粒是单分散的、水溶性的、化学稳定的,具有低毒性,可生物降解和非免疫原性的,并且提升了包封药物的生物利用度。

[0316] 树枝状聚合物包括一系列支链聚合物复合物。这些纳米颗粒是水溶性的、生物相容的,并且针对人类使用具有足够的非免疫原性。通常,树枝状聚合物由引发剂核组成,其周围是一层选定的聚合物(接枝到核上),形成支链的大分子复合物。树枝状聚合物通常使用聚合物如聚(酰胺-胺)或聚(L-赖氨酸)来生产。树枝状聚合物已用于多种治疗和诊断应用,包括用于递送DNA、RNA、生物成像造影剂和化疗剂。

[0317] 聚合物胶束的组成为,两亲共聚物(由亲水单体单元和疏水单体单元组成)的聚集体组装成疏水性核,由暴露在水性环境中的亲水聚合物链冠包围。在许多情况下,用于制备聚合物胶束的聚合物是异双官能共聚物,由PEG的亲水嵌段、聚(乙烯基吡咯烷酮)和形成颗粒核的疏水性聚(L-丙交酯)或聚(L-赖氨酸)组成。聚合物胶束可用于携带溶解性差的药物。这些纳米颗粒已用于包封许多抗癌药物,包括多柔比星和喜树碱。还研发了阳离子胶束来携带DNA或RNA分子。

[0318] 聚合物纳米颗粒包括纳米球和纳米胶囊。纳米球由聚合物的固体基质组成,而纳米胶囊包含含水核。选定的配制物通常取决于要携带/包封治疗剂的溶解度;水溶性差的药物更容易包封在纳米球中,而水溶性和不稳定的药物(如DNA和蛋白质)更容易包封在纳米胶囊中。用于生产这些纳米颗粒的聚合物包括,例如,聚(丙烯酰胺)、聚(酯)、聚(氰基丙烯酸烷基酯)、聚(乳酸)(PLA)、聚(乙醇酸)(PGA)和聚(D,L-乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)。

[0319] 根据本领域已知的标准方法,抗体可以与合适的纳米颗粒缀合。例如,缀合可以是共价的或非共价的。在一些实施方案中,其中纳米颗粒是脂质体,抗体通过PEG链附接到空间稳定的长循环脂质体。抗体或抗体片段与脂质体的偶联也可以涉及硫酯键,例如通过硫醇和马来酰亚胺基团的反应。交联剂可用于产生巯基以将抗体附接到纳米颗粒上(帕斯科和森格,《当代药物化学》19(31)5239-5277,2012)。

[0320] Ⅸ.组合物和使用方法

[0321] 本文提供的组合物包括一种或更多种结合(例如特异性结合)在载体中B7H3的所公开的单克隆抗体。还提供了包含ADC、CAR(和CTL或包含CAR的其他细胞)、多特异性(例如双特异性或三特异性)抗体、抗体-纳米颗粒缀合物、免疫脂质体和免疫缀合物的组合物。可以将组合物制备成单位剂型以施用于受试者。施用的量和时间由治疗的临床医生决定,以达到预期的结果。抗体、ADC、CAR、表达CAR的细胞、多特异性抗体、抗体-纳米颗粒缀合物、免疫脂质体或免疫缀合物可以配制用于全身或局部(例如肿瘤内)施用。在一个实例中,抗体

被配制用于肠胃外施用,例如静脉内施用。

[0322] 用于施用的组合物可以包括药学上可接受的载体(例如水性载体)中的抗体、ADC、CAR、表达CAR的细胞(例如CTL)、多特异性(例如双特异性或三特异性)抗体、抗体-纳米颗粒缀合物、免疫脂质体或免疫缀合物的溶液。可以使用多种水性载体,例如缓冲盐水等。这些溶液是无菌的并且通常不含不需要的物质。这些组合物可以通过常规的、众所周知的灭菌技术进行灭菌。所述组合物可以根据需要包含药学上可接受的辅助物质以接近生理条件,例如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些配制物中的抗体浓度可以有很大的不同,并且将主要基于体液量、粘度、体重等根据所选的特定施用方式和受试者的需要进行选择。

[0323] 用于静脉内施用的典型药物组合物包括每名受试者每天约0.1至10mg抗体(或ADC、CAR、多特异性抗体、抗体-纳米颗粒缀合物或免疫缀合物)。可以采用每名受试者每天0.1至约100mg的剂量,特别是如果将药剂施用到隐蔽部位而不是循环系统或淋巴系统,例如体腔或器官内腔。制备可施用组合物的实际方法对本领域技术人员来说是已知的或显而易见的,并且在诸如《雷明顿:药学的科学与实践》,费城科学大学,编辑,利平科特·威廉姆斯和威尔金斯公司,宾夕法尼亚州费城,第21版(2005年)。

[0324] 本文公开的单克隆抗体也可以通过其他途径施用,包括通过吸入、口服、局部或眼内施用。在一些实例中,单克隆抗体(或其缀合物)通过细针施用。

[0325] 尽管抗体(或其他治疗性分子)也以已知浓度的无菌溶液提供,但它们可以以冻干形式提供,并在施用前用无菌水再水化。然后将抗体溶液添加到含有0.9%氯化钠(USP)的输液袋中,并且在某些情况下,施用剂量为0.5至15mg/kg体重。自1997年Rituxan™批准以来,本领域在施用已在美国上市的抗体药物方面有大量经验。抗体、ADC、CAR(或表达CAR的细胞)、多特异性(如双特异性或三特异性)抗体、抗体-纳米颗粒缀合物、免疫脂质体或免疫缀合物可以通过缓慢输注施用,而不是静脉推注或大剂量推注施用。在一个实例中,施用较高负荷剂量,随后以较低水平施用维持剂量。例如,可以在大约90分钟的时间内输注4mg/kg的初始负荷剂量,如果之前的剂量耐受性良好,则每周于30分钟内输注2mg/kg的维持剂量,持续4-8周。

[0326] 控释非肠道配制物可以制成植入物、油性注射剂或微粒系统。有关蛋白质递送系统的全面概述,请参见邦加(Banga),A.J.,《治疗性肽和蛋白质:配制、加工和递送系统》(Therapeutic Peptides and Proteins:formulation,Processing,and Delivery Systems),技术出版公司(Technomic Publishing Company,Inc.),宾夕法尼亚州兰开斯特市,(1995)。微粒系统包括,例如,微球、微粒、微胶囊、纳米胶囊、纳米球和纳米颗粒。微胶囊含有作为核的治疗性蛋白质,例如细胞毒素或药物。在微球中,治疗剂分散在整个颗粒中。小于约1μm的颗粒、微球和微胶囊通常分别称为纳米颗粒、纳米球和纳米胶囊。毛细血管的直径约为5μm,因此只有纳米颗粒能被静脉内施用。微粒的直径通常约为100μm,可皮下或肌肉内施用。参见,例如,克鲁特(Kreuter),J.,《胶体药物递送系统》(Colloidal Drug Delivery Systems),J.克鲁特,编辑,马塞尔·德克尔公司(Marcel Dekker,Inc.),纽约,纽约州,第219-342页(1994);和泰丝(Tice)&塔比比(Tabibi),《受控药物递送论》(Treatise on Controlled Drug Delivery),A.凯多纽斯(Kydonieus),编辑,马塞尔·德克尔公司.纽约,纽约州,第315-339页,(1992)。

[0327] 聚合物可用于离子控释本文公开的基于抗体的组合物。用于受控药物递送的各种可降解和不可降解聚合物基质是本领域已知的(朗格(Langer),《化学研究报道》(Accounts Chem.Res.)26:537-542,1993)。例如,嵌段共聚物泊拉沙姆407在低温下以粘稠而流动的液体形式存在,但在体温下形成半固体凝胶。它已被证明是配制和持续递送重组白细胞介素-2和脲酶的有效媒介物(约翰斯顿(Johnston)等人,《药物研究》(Pharm.Res.)9:425-434,1992;和佩奇(Pec)等人,《肠外科学与技术杂志》(J.Parent.Sci.Tech.)44(2):58-65,1990)。或者,羟基磷灰石已被用作控释蛋白质的微载体(伊恩特玛(Ijntema)等人,《国际药学杂志》(Int.J.Pharm.)112:215-224,1994)。在又一方面,脂质体用于脂质包封药物的控释以及药物靶向(贝塔杰里(Betageri)等人,《脂质体药物递送系统》(Liposome Drug Delivery Systems),技术出版有限公司(Technomic Publishing Co.,Inc.),兰开斯特,宾夕法尼亚州(1993))。用于受控递送治疗性蛋白的许多另外系统是已知的(参见美国专利号5,055,303;5,188,837;4,235,871;4,501,728;4,837,028;4,957,735;5,019,369;5,055,303;5,514,670;5,413,797;5,268,164;5,004,697;4,902,505;5,506,206;5,271,961;5,254,342和5,534,496)。

[0328] A.治疗方法

[0329] 可以施用本文公开的抗体、组合物、CAR(和表达CAR的细胞,例如CTL)、ADC、多特异性(例如双特异性或三特异性)抗体、抗体-纳米颗粒缀合物、免疫脂质体和免疫缀合物以减缓或抑制肿瘤细胞的生长或抑制肿瘤细胞的转移,如B7H3阳性实体瘤。在这些应用中,组合物的治疗有效量是施用至受试者足以抑制癌细胞的生长、复制或转移或抑制癌症的体征或症状的量。合适的受试者可以包括被诊断患有表达B7H3的实体瘤的受试者,例如但不限于肝癌(例如肝细胞癌)、胰腺癌、肾癌、膀胱癌、宫颈癌、食道癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、脑癌(例如神经母细胞瘤或胶质母细胞瘤)、小儿癌症(例如骨肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤或尤文氏肉瘤)、黑色素瘤或间皮瘤。

[0330] 本文提供了通过向受试者施用治疗有效量的本文公开的B7H3特异性抗体、免疫缀合物、CAR(或表达CAR的细胞)、ADC、多特异性(例如双特异性或三特异性)抗体、抗体-纳米颗粒缀合物、免疫脂质体或组合物治疗受试者B7H3阳性癌症的方法。本文还提供了通过向所述受试者施用治疗有效量的本文公开的B7H3特异性抗体、免疫缀合物、CAR(例如表达CAR的细胞)、ADC、多特异性(例如双特异性或三特异性)抗体、抗体-纳米颗粒缀合物、免疫脂质体或组合物来抑制受试者B7H3阳性癌症的肿瘤生长或转移的方法。在一些实施方案中,B7H3阳性癌症是肝癌(例如肝细胞癌)、胰腺癌、肾癌、膀胱癌、宫颈癌、食道癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、脑癌(例如神经母细胞瘤或胶质母细胞瘤)、小儿癌症(例如骨肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤或尤文氏肉瘤)、黑色素瘤或间皮瘤。

[0331] 本文公开的B7H3特异性单克隆抗体、ADC、CAR(例如表达CAR的CTL)、多特异性(例如双特异性或三特异性)抗体、免疫缀合物、免疫脂质体或组合物的治疗有效量将取决于疾病的严重程度、疾病类型和患者健康的总体状况。基于抗体的组合物的治疗有效量是能够使症状有主观缓解或临床医生或其他合格观察者指出的客观可识别改善的量。

[0332] 在一个实例中,本文提供的B7H3特异性抗体与IR700缀合,并且光免疫疗法用于治疗B7H3阳性癌症。例如,这样的方法可以包括向患有B7H3阳性癌症的受试者施用治疗有效量的一种或更多种B7H3特异性抗体-IR700缀合物,其中B7H3特异性抗体特异性结合癌细胞

上的B7H3。在施用缀合物后,以660至740nm(例如660至710nm,例如680nm)的波长和至少1J cm^{-2}的剂量照射癌症,从而治疗受试者的B7H3阳性癌症。在一些实例中,以至少1J cm^{-2}(例如至少1J cm^{-2}、至少4J cm^{-2}、至少10J cm^{-2}、至少50J cm^{-2}或至少100J cm^{-2})的剂量在660至740nm(如660至710nm,例如680nm)的波长下照射B7H3阳性癌症,从而治疗受试者的肿瘤。在一些实例中,进行多轮治疗,例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个治疗周期。在特定实例中,例如当静脉内施用时,B7H3特异性抗体-IR700缀合物的治疗有效剂量为至少0.5毫克每60千克(mg/kg)、至少5mg/60kg、至少10mg/60kg、至少20mg/60kg、至少30mg/60kg、至少50mg/60kg,例如0.5至50mg/60kg,例如1mg/60kg、2mg/60kg、5mg/60kg、20mg/60kg或50mg/60kg的剂量。在另一实例中,例如,在瘤内或腹腔内施用时,B7H3特异性抗体-IR700缀合物的治疗有效剂量为至少10μg/kg,例如至少100μg/kg、至少500μg/kg或至少500μg/kg,例如10μg/kg至1000μg/kg,例如100μg/kg、250μg/kg、约500μg/kg、750μg/kg或1000μg/kg的剂量。在一个实例中,在以局部溶液施用时,B7H3特异性抗体-IR700缀合物的治疗有效剂量是至少1μg/ml,例如至少500μg/ml,例如20μg/ml至100μg/ml,例如10μg/ml、20μg/ml、30μg/ml、40μg/ml、50μg/ml、60μg/ml、70μg/ml、80μg/ml、90μg/ml或100μg/ml。

[0333] 施用本文公开的B7H3特异性抗体、ADC、CAR(或表达CAR的细胞)、免疫缀合物、多特异性抗体、抗体-纳米颗粒缀合物、免疫脂质体和组合物也可以伴随施用其他抗癌剂或疗法治疗(例如手术切除肿瘤)。任何合适的抗癌剂可以与本文公开的抗体、组合物和免疫缀合物组合施用。示例性抗癌剂包括但不限于化疗剂,例如有丝分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢物、嵌入抗生素、生长因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、抗-生存剂、生物反应调节剂、抗激素(例如抗雄激素)和抗血管生成剂。其他抗癌治疗包括放射疗法和其他特异性靶向癌细胞的抗体(例如,生物制剂)。

[0334] 烷化剂的非限制性实例包括氮芥(例如二氯甲基二乙胺、环磷酰胺、美法仑、尿嘧啶芥或苯丁酸氮芥)、烷基磺酸盐(例如白消安)、亚硝基脲(例如卡莫司汀、洛莫司汀、司莫司汀、链脲佐菌素或达卡巴嗪)。

[0335] 抗代谢物的非限制性实例包括叶酸类似物(例如甲氨蝶呤)、嘧啶类似物(例如5-FU或阿糖胞苷)和嘌呤类似物(例如巯基嘌呤或硫乌嘌呤)。

[0336] 天然产物的非限制性实例包括长春花生物碱(例如长春碱、长春新碱或长春地辛)、表鬼臼毒素(例如依托泊苷或替尼泊苷)、抗生素(例如更生霉素、道诺红菌素、多柔比星、博莱霉素、普卡霉素或丝裂霉素C),和酶(如L-天冬酰胺酶)。

[0337] 混和药剂的非限制性实例包括铂配位复合物(例如顺式-二胺-二氯铂II,也称为顺铂)、取代的脲(例如羟基脲)、甲基肼衍生物(例如丙卡巴肼)和肾上腺皮质激素抑制剂(例如米托坦和氨鲁米特)。

[0338] 激素和拮抗剂的非限制性实例包括肾上腺皮质类固醇(例如泼尼松)、孕激素(例如己酸羟孕酮、乙酸甲羟孕酮和乙酸地黄孕酮)、雌激素(例如己烯雌酚和炔雌醇)、抗雌激素(如他莫昔芬)和雄激素(如丙酸睾酮和氟甲睾酮)。最常用的化疗药物的实例包括阿霉素、马法兰、Ara-C、BiCNU、白消安、CCNU、卡铂、顺铂、环磷酰胺、道诺红霉素、DTIC、5-FU、氟达拉滨、羟基脲、依达比星、异环磷酰胺、甲氨蝶呤、光神霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、氮芥、紫杉醇(或其他紫杉烷,如多西他赛)、长春花碱、长春新碱、VP-16,而一些较新的药物包括吉西他滨(健择)、赫赛汀、伊立替康(依利替康、CPT-11)、禄斯得停注射剂、诺维本、美罗华

STI-571、泰索帝、拓扑替(和美新)、希罗达(卡培他滨)、Zevelin和骨化三醇。

[0339] 可以使用的免疫调节剂的非限制性实例包括AS-10(惠氏-艾尔斯特实验室(Wyeth-Ayerst Labs))、溴匹立明(厄普约翰公司(Upjohn))、γ干扰素(基因泰克公司(Genentech))、GM-CSF(粒细胞巨噬细胞集落刺激因子;基因研究所(Genetics Institute))、IL-2(赛特斯公司(Cetus)或霍夫曼罗氏公司(Hoffman-LaRoche))、人类免疫球蛋白(切特生物公司(Cutter Biological))、Imreg(来自路易斯安那州新奥尔良市的伊姆雷格公司(Imreg))、SK&F 106528和TNF(肿瘤坏死因子;基因泰克公司)。

[0340] 可与所公开B7H3特异性抗体、ADC、CAR(或表达CAR的细胞)、免疫缀合物、多特异性抗体、抗体-纳米颗粒缀合物、免疫脂质体组合使用的生物制剂的非限制性实例包括治疗性单克隆抗体,例如,3F8、阿巴伏单抗(Abagovomab)、阿德木单抗(Adecatumumab)、阿托珠单抗(Afutuzumab)、阿拉赛珠单抗(Alacizumab)、阿仑珠单抗(Alemtuzumab)、喷替酸阿妥莫单抗(Altumomab pentetate)、马安莫单抗(Anatumomab mafenatox)、阿泊珠单抗(Apolizumab)、阿西莫单抗(Arcitumomab)、巴维昔单抗(Bavituximab)、贝妥莫单抗(Bectumomab)、贝利木单抗(Belimumab)、贝索单抗(Besilesomab)、贝伐珠单抗(Bevacizumab)、莫比伐单抗(Bivatuzumab mertansine)、兰妥莫单抗(Blinatumomab)、本妥昔单抗(Brentuximab vedotin)、美坎珠单抗(Cantuzumab mertansine)、喷替酸卡罗单抗(Capromab pendetide)、卡妥索单搞(Catumaxomab)、CC49、西妥昔单抗(Cetuximab)、泊西他珠单抗(Citatuzumab bogatox)、西妥木单抗(Cixutumumab)、泰坦-克利妥珠单抗(Clivatuzumab tetraxetan)、可那木单抗(Conatumumab)、达西珠单抗(Dacetuzumab)、地莫单抗(Detumomab)、依美昔单抗(Ecromeximab)、依库珠单抗(Eculizumab)、依屈莫单抗(Edrecolomab)、依帕珠单抗(Epratuzumab)、厄马索单抗(Ertumaxomab)、埃达珠单抗(Etaracizumab)、法勒珠单抗(Farletuzumab)、芬妥木单抗(Figitumumab)、加利昔单抗(Galiximab)、伊巴珠单抗(Gemtuzumab ozogamicin)、吉瑞昔单抗(Girentuximab)、格莱木单抗-维多汀(Glembatumumab vedotin)、替伊莫单抗(Ibritumomab tiuxetan)、伊戈伏单抗(Igovomab)、英西单抗(Imciromab)、英妥木单抗(Intetumumab)、伊珠单抗-奥加米星(Inotuzumab ozogamicin)、伊匹木单抗(Ipilimumab)、伊妥木单抗(Iratumumab)、拉贝珠单抗(Labetuzumab)、来沙木单搞(Lexatumumab)、林妥珠单抗(Lintuzumab)、莫-洛伏珠单抗(Lorvotuzumab mertansine)、鲁卡木单抗(Lucatumumab)、鲁昔单抗(Lumiliximab)、马帕木单抗(Mapatumumab)、马妥珠单抗(Matuzumab)、美泊珠单抗(Mepolizumab)、美替木单抗(Metelimumab)、米拉珠单抗(Milatuzumab)、米妥莫单抗(Mitumomab)、莫罗木单抗(Morolimumab)、他那可单抗(Nacolomab tafenatox)、他那莫单抗(Naptumomab estafenatox)、奈妥木单抗(Necitumumab)、尼妥珠单抗(Nimotuzumab)、巯诺莫单抗(Nofetumomab merpentan)、奥法木单抗(Ofatumumab)、奥拉木单抗(Olaratumab)、莫妥珠单抗(Oportuzumab monatox)、奥戈伏单抗(Oregovomab)、帕木单抗(Panitumumab)、帕尼单抗(Pemtumomab)、培妥珠单抗(Pertuzumab)、平妥莫单抗(Pintumomab)、普立木单抗(Pritumumab)、雷莫芦单抗(Ramucirumab)、利妥木单抗(Rilotumumab)、利妥昔单抗(Rituximab)、罗妥木单抗(Robatumumab)、沙妥莫单抗-喷地肽(Satumomab pendetide)、西罗珠单抗(Sibrotuzumab)、索耐珠单抗(Sonepcizumab)、替珠单抗(Tacatuzumab tetraxetan)、帕他莫单抗(Taplitumomab paptox)、替妥莫单抗(Tenatumomab)、TGN1412、

曲美目单抗(Ticilimumab)(曲美木单抗(tremelimumab))、替加珠单抗(Tigatuzumab)、TNX-650、曲司珠单抗(Trastuzumab)、曲美木单抗(Tremelimumab)、西莫白介素单抗(Tucotuzumab celmoleukin)、维妥珠单抗(Veltuzumab)、伏洛昔单抗(Volociximab)、伏妥木单抗(Votumumab)和扎芦木单抗(Zalutumumab)。在一些实例中,治疗性抗体特异性结合和拮抗PD-1或PD-L1,例如阿特朱单抗(Atezolizumab)、MPDL3280A、BNS-936558(纳武单抗)、派姆单抗(pembrolizumab)、匹地利珠单抗(Pidilizumab)、CT011、AMP-224、AMP-514、MEDI-0680、BMS-936559、BMS935559、MEDI-4736、MPDL-3280A、MSB-0010718C、MGA-271、吲哚莫德(Indoximod)、Epacadostat、BMS-986016、MEDI-4736、MEDI-4737、MK-4166、BMS-663513、PF-05082566(PF-2566)、利丽单抗(Lirilumab)和德瓦鲁单抗(Durvalumab)。

[0341] 在一些实例中,施用的另外治疗剂是T细胞激动剂,例如4-1BB(CD137)、OX40和/或GITR的激动剂。在一个实例中,所施用的另外治疗剂是OX40激动剂,例如抗体,例如单克隆抗体(mAb)(例如PF-04518600、MEDI-6469、MEDI-0562、MEDI-6383、MOXR-0916、BMS 986178或GSK3174998)。在一些实例中,所施用的另外治疗剂是4-1BB激动剂,例如4-1BB激动剂抗体,例如mAb。可用于所公开方法的特定激动剂mAb包括PF-05082566(乌托鲁单抗)和BMS-663513(乌瑞芦单抗)。在一个实例中,4-1BB激动剂是4-1BB配体(4-1BBL),例如天然4-1BBL(例如人类4-1IBBL)或链霉亲和化4-1BBL(SA-4-1BBL)复合物。在一些实例中,所施用的另外治疗剂是GITR(糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子(TNF)受体,或TNFRSF18)激动剂,例如GITR激动剂抗体,例如mAb。可以与所公开的方法一起使用的特定GITR激动剂mAb包括DTA-1、TRX518、MK-4166、MK-1248、AMG 228、INCAGN01876、GWN323(来自诺华公司(Novartis))、CK-302(来自检查点治疗公司(Checkpoint Therapeutics))和BMS-986156。在一个实例中,GITR激动剂是GITR配体(GITRL),例如天然GITRL或多价GITR配体融合蛋白。在一个实例中,GITR激动剂是MEDI1873,一种具有人类IgGl Fc域的六聚体GITRL分子。在一些实例中,所施用的另外治疗剂是免疫疗法。可以使用的免疫调节剂的非限制性实例包括AS-101(惠氏-艾尔斯特实验室)、溴匹立明(厄普约翰公司)、γ干扰素(基因泰克公司)、GM-CSF(粒细胞巨噬细胞集落刺激因子;基因研究所)、IL-2(赛特斯公司或霍夫曼罗氏公司)、人类免疫球蛋白(切特生物公司)、Imreg(来自路易斯安那州新奥尔良的伊姆雷格公司)、SK&F 106528和TNF(肿瘤坏死因子;基因泰克公司)。

[0342] 在一个实例中,另外疗法是手术治疗,例如手术切除癌症或其一部分。治疗的另一实例是放射疗法,例如在手术切除之前向肿瘤部位施用放射性物质或能量(例如外照射疗法)以帮助根除肿瘤或使其缩小。

[0343] B.诊断和检测方法

[0344] 本文提供了用于在体外或体内检测B7H3蛋白的方法。例如,所公开的单克隆抗体可用于体内肿瘤成像。为了将所公开的抗体用作体内诊断试剂,抗体用可检测部分标记,例如放射性同位素、荧光标记物或正电子发射放射性核素。作为一个实例,本文公开的单克隆抗体可以与用于正电子发射断层扫描(PET)的正电子发射放射性核素缀合;这个诊断过程通常被称为免疫PET。虽然全长抗体可以制成良好的免疫PET试剂,但它们的生物半衰期需要在成像前等待几天,这会增加相关的非靶辐射剂量。较小的单域抗体/纳米抗体的生物半衰期适合当天成像。

[0345] 在其他情况下,在生物样品中检测B7H3表达。样品可以是任何样品,包括但不限于

来自活组织检查样本、尸检样本和病理样本的组织。生物样品还包括组织切片,例如,用于组织学目的的冷冻切片。生物样品还包括体液,例如血液、血清、血浆、痰液、脊髓液或尿液。在一些实例中,样品是含有外来体的血清样品。生物样品通常获自哺乳动物,例如人类或非人类灵长类动物。

[0346] 本文提供了一种通过将受试者样品与本文公开的B7H3特异性单克隆抗体接触,并且检测抗体与所述样品的结合来确定所述受试者是否患有B7H3阳性癌症的方法。与抗体与对照样品的结合相比,抗体与样品结合的增加将受试者确认为患有B7H3阳性癌症。

[0347] 在另一个实施方案中,提供了一种通过将来自被诊断患有B7H3阳性癌症的受试者的样品与本文公开的B7H3特异性单克隆抗体接触,并且检测抗体与样品的结合来确认受试者B7H3阳性癌症诊断的方法。与抗体与对照样品的结合相比,抗体与样品结合的增加证实了受试者患有B7H3阳性癌症的诊断。

[0348] 在所公开方法的一些实例中,单克隆抗体被直接标记。

[0349] 在其他实例中,该方法进一步包括将特异性结合单克隆抗体的第二抗体(检测抗体)与样品接触;以及检测第二抗体的结合。与第二抗体与对照样品的结合相比,第二抗体与样品结合的增加检测受试者患有B7H3阳性癌症或证实受试者患有B7H3阳性癌症的诊断。

[0350] 在一些情况下,癌症是肝癌(例如肝细胞癌)、胰腺癌、肾癌、膀胱癌、宫颈癌、食道癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、脑癌(例如神经母细胞瘤或胶质母细胞瘤)、小儿癌症(例如骨肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤或尤文氏肉瘤)、黑色素瘤或间皮瘤。

[0351] 在一些实例中,对照样品是来自未患癌症受试者的样品。在特定实例中,样品是血液样品或组织样品。

[0352] 在诊断和检测方法的一些实施方案中,结合(例如特异性结合)B7H3的抗体直接用可检测标记物进行标记。在另一实施方案中,结合(例如,特异性结合)B7H3的抗体(第一抗体)是未标记的,并且可以结合特异性结合B7H3的抗体的第二抗体或其他分子是标记的。如本领域技术人员所熟知的,选择能够特异性结合特定种类和类别的第一抗体的第二抗体。例如,如果第一抗体是人类IgG,那么二级抗体可以是抗人类IgG。可以与抗体结合的其他分子包括但不限于蛋白A和蛋白G,这两种都是可商购的。

[0353] 抗体或二级抗体的合适标记物包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、磁性试剂和放射性材料。合适酶的非限制性实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶。合适的辅基复合物的非限制性实例包括链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素。合适的荧光材料的非限制性实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白。非限制性示例性发光体材料为鲁米诺;非限制性示例性磁性试剂是钆,并且非限制性示例性放射性标记物包括^{125}I、^{131}I、^{35}S或^{3}H。

[0354] 在替代实施方案中,可以通过竞争免疫测定测定生物样品中的B7H3,该竞争免疫测定利用可检测物质标记的B7H3蛋白标准品和特异性结合B7H3的未标记抗体。在该测定中,将生物样品、标记的B7H3蛋白标准品和特异性结合B7H3的抗体组合,并确定与未标记抗体结合的标记B7H3蛋白标准品的量。生物样品中B7H3的量反比于与特异性结合B7H3抗体结合的标记B7H3蛋白标准品的量。

[0355] 本文公开的免疫测定和方法可用于多种目的。在一个实施方案中,特异性结合的抗体可用于检测细胞培养物中产生B7H3。在另一个实施方案中,抗体可用于检测生物样品

(例如组织样品或血液样品或血清样品)中B7H3的量。在一些实例中,B7H3是细胞表面B7H3。在其他实例中,B7H3蛋白是可溶的(例如,在细胞培养物上清液中或在体液样品中,例如血液样品或血清样品中)。

[0356] 在一个实施方案中,提供了一种用于检测生物样品(例如血液样品或组织样品)中的B7H3的试剂盒。例如,为了确认受试者的癌症诊断,可以进行活体组织切片以获得用于组织学检查的组织样品。用于检测多肽的试剂盒通常包含特异性结合B7H3的单克隆抗体,例如本文公开的任何单克隆抗体。在另一个实施方案中,抗体被标记(例如,用荧光标记物、放射性标记物或酶标记物)。

[0357] 在一个实施方案中,试剂盒包括公开使用结合B7H3抗体的方法的说明材料。说明材料可以以电子形式(例如计算机软盘或光盘)编写,也可以是可视的(例如视频文件)。试剂盒还可以包括附加组件,以便于试剂盒设计的特定应用。因此,例如,该试剂盒可以另外包含检测标记物(例如用于酶标记物的酶底物、用于检测荧光标记物的过滤器组、合适第二标记物,例如二级抗体等)的方法。试剂盒可以另外包括缓冲液和其他常规用于实施特定方法的试剂。这样的试剂盒和适当的内容物是本领域技术人员众所周知的。

[0358] 在一个实施方案中,诊断试剂盒包括免疫测定。尽管免疫测定的细节可能随所采用的特定形式而变化,但检测生物样品中B7H3的方法通常包括使生物样品与在免疫反应条件下与B7H3特异性反应的抗体接触的步骤。使抗体在免疫反应条件下特异性结合形成免疫复合物,因此,直接或间接检测免疫复合物(结合抗体)的存在。

[0359] 本文公开的抗体还可用于免疫测定,例如但不限于放射免疫测定(RIA)、ELISA或免疫组织化学测定。该抗体还可用于荧光激活细胞分选(FACS)。FACS采用多个颜色通道、低角度和钝角光散射检测通道、阻抗通道以及其他更复杂的检测水平来分离或分选细胞(参见美国专利号5,061,620)。如本文所公开的,任何结合B7H3的单克隆抗体都可以用于这些测定。因此,抗体可用于常规免疫测定,包括但不限于ELISA、RIA、FACS、组织免疫组织化学、蛋白质印迹或免疫沉淀。

[0360] 提供以下实施例以说明某些特定特征和/或实施方案。这些实施例不应被解释为将本公开限制于所描述的特定特征或实施方案。

[0361] 实施例

[0362] 实施例1:材料和方法

[0363] 本实施例描述了用于实施例2中研究的材料和实验程序。

[0364] 细胞系

[0365] 在补充有10%胎牛血清(海克龙公司(HyClone),犹他州洛根市)、1% L-谷氨酰胺和1%青霉素-链霉素(英杰公司(Invitrogen))的DMEM培养基(英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德市)中培育八种癌细胞系(Hep3B、HepG2、IMR32、MC38-B7H3+、A431、IMR32-B7H3 KO和MC38-B7H3 KO),并在37℃下5% CO_2(余量为空气)中培养。神经母细胞瘤细胞系NBEB在与DMEM有相同补充剂的RPMI-1640培养基中培养。培养基每周更新两次。

[0366] 蛋白质表达和纯化

[0367] B7H3的细胞外域(GenBank登录号NP_001019907,氨基酸29-466;SEQ ID NO:13)与hFc标签融合。B7H3-hFc在293F细胞中表达。hFc标签对照,IAB-hFc(嘉娜宝(Kaneko)等人,《生物化学杂志》(J Biol Chem),284,3739-3749,2009)以相同方式产生。使用蛋白质A柱

(通用电气医疗公司)完成蛋白质纯化。兔VH域抗体以VH-His-FLAG融合方式在大肠杆菌中表达。6x His标签用于镍柱(通用电气医疗公司)亲和纯化,FLAG标签用于ELISA的蛋白质结合测定和流式细胞术的细胞结合测定。

[0368] DNA寡核苷酸和兔VH噬菌体文库的构建

[0369] 为了扩增兔VH cDNA片段,根据文献(彭(Peng)等人,《分子生物学杂志》(JMol Biol),429,2954-2973,2017)合成了与VH cDNA 5′和3′端退火的正向和反向引物。引物列于表1,带下划线的核苷酸对应于SfiI限制酶位点。

[0370] 表1:用于构建兔VH噬菌体文库的引物

[0371]

引物	序列	SEQ ID NO:
VH-F1	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCAGTCGGTGGAGGAGTCCRGG	14
VH-F2	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCAGTCAGTGAAGGAGTCCGAG	15
VH-F3	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCAGTCGYTGGAGGAGTCCGGG	16
VH-F4	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCAGGAGCAGCTGGAGGAGTCCGGG	17
VH-F5	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCAGGAGCAGCTGAAGGAGTCCGG	18
VH-F6	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCAGRAGCAGCTGGTGGAGTCCGG	19
VH-F7	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCAGGAGCAGCAGAAGGAGTCCGGG	20
VH-F8	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCAGTCGCTGGAGGAGTCCAGG	21
VH-F9	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCAGTCGCTGGGGGAGTCCAGG	22
VH-F10	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCAGACAGTGAAGGAGTCCGAG	23
VH-F11	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCAGTCGCTGGAGGAATTCGGG	24
VH-R1	gaggagttTGGCCGGCCTGGCCTGARGAGAYGGTGACCAGGGTGCC	25

[0372]

引物	序列	SEQ ID NO:
VH-R2	gaggagttTGGCCGGCCTGGCCTGAAGAGACGGTGACGAGGGTCCC	26

[0373] 使用Invitrogen™SuperScript™IV第一链合成试剂盒根据制造商的说明(赛默飞世尔公司(ThermoFisher),Cat.#18091050)从免疫脾脏中分离的总RNA合成兔VH cDNA。每个正向引物与两个反向引物(R1或R2)之一配对,并使用22种正向/反向引物组合来扩增VH cDNA片段。PCR产物经凝胶纯化并用限制性酶SfiI(NEB,Cat.#R0123S)进行酶切,然后与已用相同酶预酶切的pComb3x质粒连接。根据制造商的说明,使用10微克连接产物通过电穿孔转化0.6ml大肠杆菌TG1感受态细胞(卢西根公司(Lucigen),Cat.#60502-2)。转化的TG1细胞在37℃下回收,持续45分钟,在150rpm下振摇,然后接种到1L 2XYT培养基中,在37℃下再培养1小时,在250rpm下振摇。此后,将1×10^{10}辅助噬菌体M13KO7(NEB,Cat.#N0315S)添加到细胞培养物中,并在37℃下继续培养4小时。将细胞培养物以3300g离心30分钟以沉淀细胞碎片,收集含有噬菌体颗粒的上清液并与3/10体积的PEG 8000/NaCl溶液(20% PEG的2.5M NaCl溶液,使用前高压灭菌)混合。将噬菌体/PEG溶液混合物在冰上培养4小时并以3300g的速率离心30分钟。最终的噬菌体团粒重新悬浮于100ml含有20%甘油的PBS缓冲液中,以1ml体积等分并储存在-80℃的温度下。

[0374] 噬菌体淘选方法

[0375] 使用固定的B7H3-hFc蛋白进行噬菌体淘选。为了排除hFc标签结合物,IAB-hFc对照也被并行固定。ELISA板(96孔板)用B7H3-hFc和IAB-hFc蛋白(PBS中浓度为100μg/mL)以50μl/孔包被,并在37℃下培养1小时。在倾倒包被的蛋白质溶液后,将该板和噬菌体溶液通

过与含有2% BSA的PBS缓冲液混合来预封闭,并在37℃下培养30分钟。在倾倒封闭缓冲液后,将预封闭的噬菌体溶液添加到IAB-hFc板中,通过在37℃下培养1小时来消耗hFc结合物。此后,将未结合的噬菌体溶液转移至B7H3-hFc板并在37℃下培养1小时。通过与pH 2.0的柠檬酸缓冲液一起培养,将B7H3特异性噬菌体结合物从所述板中洗脱出来,并立即用pH 8.0的Tris-HCl缓冲液中和。洗脱的输出噬菌体通过重新感染新鲜的TG1细胞重新扩增,重新扩增的噬菌体用作下一轮淘选的输入物。三轮淘选后,从输出的噬菌体感染的TG1细胞中随机挑取单个菌落,并进行单克隆噬菌体ELISA识别B7H3特异性结合物。

[0376] 噬菌体ELISA

[0377] 用B7H3-hFc和IAB-hFc标签对照包被ELISA板(96孔板)。用含有2% BSA的PBS缓冲液封闭后,将50微升预封闭的噬菌体溶液添加到所述板中,并在37℃下培养30分钟。将所述板用含有0.05%吐温20的PBS缓冲液洗涤两次后,通过HRP缀合的抗M13抗体(汉生生物公司(Sinobiological),Cat.#11973-MM05T-H)检测噬菌体结合。

[0378] 对于结合抗体的ELISA,如上所述在B7H3-hFc包被板上培养不同浓度的抗体(从100μg/mL开始1:2连续稀释),并通过HRP缀合的抗FLAG小鼠单克隆抗体M2(西格玛公司(Sigma),Cat.#A8592)检测抗体结合。

[0379] 流式细胞术法

[0380] 通过用胰蛋白酶-EDTA(赛默飞世尔公司,Cat.#25200114)分离来收获细胞,离心形成团粒,并重新悬浮在冰冷的PBS中。每毫升一百万个细胞与10μg/mL的B7H3域抗体一起培养。通过APC缀合的抗FLAG小鼠单克隆抗体(生物传奇公司(Biolegend),Cat.637308)检测抗体结合。使用FACS Calibur(BD生物科学公司(BD Biosciences),新泽西州富兰克林湖市)测量与活细胞相关的荧光。

[0381] 统计分析

[0382] 所有统计分析均使用GraphPad Prism(GraphPad软件公司(GraphPad Software,Inc.),加利福尼亚州拉霍亚市)进行。

[0383] 实施例2:通过蛋白质免疫和噬菌体展示产生针对B7H3的兔纳米抗体

[0384] 本实施例描述了选择和表征两种B7H3特异性兔单域VH单克隆抗体。

[0385] 重组B7H3蛋白的制备

[0386] B7H3的细胞外域(ECD)(NP_001019907,氨基酸29-466;SEQ ID NO:13)与人类IgG1 Fc融合,并以分泌方式在HEK293细胞中表达。在蛋白A柱上纯化后,通过在SDS-PAGE上运行来检查纯度(图1)。可能是由于糖基化且B7H3具有六个N-糖基化位点,还原的B7H3-hFc的理论大小约为75kD,凝胶上的表观迁移位置约为100kD。B7H3-hFc的瞬时表达水平极低,约为0.5mg/L。

[0387] 用重组B7H3-hFc使兔免疫

[0388] 将100微克B7H3-hFc的PBS缓冲液与等体积的弗氏佐剂混合,并肌肉注射到雌性新西兰白兔中。以14天的间隔进行3次免疫后,使用IAB-hFc作为hFc对照,通过ELISA测量抗B7H3-hFc的效价(图2A)。IAB是间皮素的片段(Q13421,氨基酸296-359)(嘉娜宝等人,《生物化学杂志》,284,3739-3749,2009)。与IAB-hFc标签对照相比,第二次(M2)和第三次(M3)免疫的血清清楚地显示出B7H3-hFc的结合增加。通过流式细胞术检查多克隆血清的细胞结合活性(图2B)。最终免疫的多克隆血清清晰地显示与B7H3阳性的肝细胞癌细胞系Hep3B和

HepG2的细胞结合(王等人,《癌症调查》(Cancer Invest),32,262-271,2014;邱(Qiu)等人,《ACTA化学诊所》(Clin Chim Acta),485,103-105,2018),而预免疫的血清的背景结合极低。ELISA和流式细胞术的结果表明,B7H3在兔体内具有良好的免疫原性,尽管该蛋白高度保守,尤其是在人类和兔之间。

[0389] B7H3特异性结合物的筛选

[0390] 确认免疫成功后,取免疫兔的脾脏,用简并引物克隆VH基因片段(彭等人,《分子生物学杂志》,429,2954-2973,2017),然后与噬菌体展示载体pComb3x连接。使用10微克的连接物通过电穿孔转化TG1感受态细胞,并制作了大小为7×10^9单个克隆的VH文库。文库噬菌体产生和随后的抗原淘选均在37℃下进行。

[0391] 在固定化的B7H3-hFc上进行淘选。B7-H6-hFc和IAB-hFc均包被在96孔ELISA板上,B7H3特异性噬菌体颗粒通过在IAB-hFc包被板上预吸附,然后在B7H3-hFc包被板上捕获而富集。三轮淘选后,进行单克隆噬菌体ELISA以识别B7H3特异性结合物。在96个随机挑选的克隆中,41个是B7H3特异性结合物,测序分析确定了两种代表性结合物,称为RFA1和RFB1(图3A)。这两种结合物具有非常相似的种系序列,这些序列也与来自兔抗羧腐胺赖氨酸mAb的VH相似(存储在GenBank结构数据库中,PDB#5DUB)。

[0392] 使用在线工具对A1和B1进行结构建模表明,它们可能具有相似的CDR1和CDR2环构象,这也类似于兔抗羧腐胺赖氨酸VH(PDB#5DUB)的晶体结构,但它们的CDR3环看起来不同(图3B)。

[0393] B7H3结合物的结合特性

[0394] 结合物A1和B1的VH编码序列在其C端与His-FLAG标签融合,并克隆到大肠杆菌表达载体中。可溶性VH域按照实验室方案通过一步Ni亲和层析纯化(冯等人,《抗体治疗》,2,1-11,2019)。纯化产量分别为2mg/L(A1)和10mg/L发酵物(B1)。由于在SDS-PAGE上分离,纯度很高(图4A)。通过ELISA测量RFA1和RFB1的蛋白质结合亲和力,计算的EC50值为403nM(A1)和189nM(B1)(图4B),这对于仅VH域的抗体来说相对较低但很常见。还通过流式细胞术测试了细胞结合能力(图4C),这表明A1和B1结合物对B7H3阳性细胞系(IMR32、MC38-B7H3+、A431和NBEB)具有良好的细胞结合能力,但对B7H3敲除细胞系IMR32-B7H3 KO、MC38-B7H3 KO没有。

[0395] 治疗应用

[0396] 兔是一种出色的资源,可用于生成极好的单克隆抗体,用作研究工具、诊断和治疗目的(韦伯(Weber)等人,《实验与分子医学杂志》(Exp Mol Med),49,e305,2017)。使用兔抗体有几个主要优点。第一,与小鼠相比,兔在系统发育上与人类的距离更远,因此在小鼠中免疫原性较差的保守蛋白在兔中免疫原性可能更好(波普科夫(Popkov)等人,《分子生物学杂志》,325,325-335,2003)。第二,兔单克隆抗体一般具有高亲和力和特异性,亲和力范围为20-200pM(韦伯等人,《实验与分子医学杂志》,49,e305,2017;兰德里(Landry)等人,《免疫学方法杂志》,417,86-96,2015)。第三,兔单克隆抗体可以成功人源化(张(Zhang)和霍,MAbs,9,419-429,2017),因此免疫原性不应成为其治疗应用的障碍。尽管有许多优点,但只有少数兔单克隆抗体被研究用于临床应用。

[0397] 尽管全兔单克隆抗体作为优良的研究试剂已被广泛使用多年,但兔VH域抗体的潜在优势尚未得到开发。最近一组研究表明,高亲和力兔VH域抗体可以通过低温(即16℃)噬

菌体展示方法产生(筱崎等人,《科学报告》(Sci Rep),7,5794,2017),这将大大加速兔VH域抗体的研究。然而,低温噬菌体展示方法往往会富集很大一部分不稳定且难以表达的结合物,这可能需要付出巨大努力来改善其物理化学性质,尤其是表达和热稳定性(筱崎等人,《生物科学与生物工程杂志》,125,654-661,2018)。目前的研究调查了使用高温噬菌体展示方法筛选热稳定和良好表达的结合物的可能性。

[0398] 作为一种概念验证,B7H3被选为靶标。B7H3在许多癌症类型中过表达,它可以抑制T细胞活化,因此B7H3被认为是B7和CD28家族的重要免疫检查点成员(皮卡达(Picarda)等,《临床癌症研究》,22,3425-3431,2016)。它还在许多实体瘤中广泛过表达,使其成为治疗靶标(西曼等人,《癌细胞》,31,501-515e508,2017)。B7H3的细胞外域在293F细胞中表达,尽管表达水平非常低(<0.5mg/L)。尽管B7H3在人类、小鼠和兔中高度保守,但重组B7H3-hFc蛋白在兔中具有足够的免疫原性,如可以结合重组蛋白和B7H3阳性细胞的免疫多克隆血清所示。采用高温(37℃)噬菌体展示法制备兔VH噬菌体文库颗粒并进行淘选。获得了对B7H3蛋白和B7H3阳性癌细胞具有中等亲和力的两种代表性结合物。RFA1和RFB1结合物对B7H3阳性细胞具有良好的细胞结合能力,但对B7H3敲除细胞则没有。该研究表明,具有中等亲和力和表达水平的兔VH域抗体可以通过噬菌体展示在常规温度(37℃)下产生。考虑到B7H3在调节T细胞功能中的重要作用,产生的两种B7H3域抗体可用于癌症免疫治疗应用。

[0399] 实施例3:通过噬菌体展示分离靶向B7H3(CD276)的骆驼纳米抗体

[0400] 这个实施例描述了从噬菌体展示文库中选择十种骆驼V_HH纳米抗体并对它们的结合特性进行表征。还描述了由V_HH纳米抗体组成的嵌合抗原受体。

[0401] 针对B7H3结合物的八种骆驼V_HH文库上的噬菌体淘选

[0402] 产生B7H3-Fc融合蛋白以选择B7H3结合物。重组B7H3-Fc融合蛋白在HEK-293细胞中表达,并使用AKTA Explorer(通用电气医疗公司)在蛋白A柱(通用电气医疗公司)上纯化。如SDA-PAGE凝胶上所示,纯化的B7H3-Fc融合蛋白纯度超过99%,并且在非还原条件下分子量为154kDa,在还原条件下分子量为77kDa(图5)。B7H3-Fc的产量为2mg/L。

[0403] 使用由八只骆驼(单峰骆驼)制成的八个V_HH单域抗体文库,对重组B7H3-Fc蛋白进行3轮噬菌体淘选。每一轮的噬菌体效价显示在图6中。第三轮噬菌体淘选中噬菌体效价的增加表明富集了对B7H3具有高亲和力V_HH结合物。还通过ELISA评估了噬菌体与B7H3-Fc的结合;结果显示在表2中。所有选定的噬菌体都可以与B7H3-Fc结合,但不能与IgG对照结合。

[0404] 表2:通过ELISA评估选定的噬菌体结合B7H3-Fc

[0405]

噬菌体	B7H3-Fc	IgG
RWA12	2.50985	0.1147
RWB2	2.54615	0.0777
RWH5	2.88595	0.06665
RWB12	2.4812	0.1637
RWG8	2.5186	0.10125
RWD5	2.4972	0.0685
RWC3	2.422	0.08885
RWG4	2.1349	0.10345
RWD9	2.43255	0.07875

RWC4	2.6597	0.07775
RWH1	2.75015	0.13615

[0406] 通过ELISA测试选定的B7H3特异性噬菌体与猴、小鼠、大鼠和人类B7H3的结合。如表3所示,9种选定的噬菌体可以结合猴B7H3,5种噬菌体可以结合小鼠B7H3,9种噬菌体可以结合大鼠B7H3,8种噬菌体可以结合人类B7H3(粗体数字表示阳性结合)。

[0407] 表3:通过ELISA测试选定的B7H3噬菌体的跨物种结合

[0408]

抗体	猴	小鼠	大鼠	人类	非相关抗原
RWA12	**2.4321**	0.0693	**2.5233**	**2.4312**	0.132866667

[0409]

抗体	猴	小鼠	大鼠	人类	非相关抗原
RWB2	**0.5782**	**1.0528**	**0.9811**	**2.5281**	0.068366667
RWH5	**2.2212**	**1.8958**	**2.3675**	**2.6701**	0.057433333
RWB12	**2.3071**	**1.7129**	**2.0702**	**2.7355**	0.059666667
RWG8	**2.4277**	**2.4724**	**2.4365**	**2.6674**	0.0659
RWD5	**0.2668**	0.0819	**0.8712**	**2.1256**	0.0583
RWC3	**0.2278**	0.0759	**0.7381**	**2.1403**	0.065433333
RWG4	**0.1904**	0.0665	**0.2924**	**1.7249**	0.1396
RWD9	**0.2366**	0.0782	**0.7776**	**2.2122**	0.1126
RWC4	**1.5397**	**0.3663**	**0.7968**	**2.4956**	0.0764
RWH1	0.0706	0.0738	0.0951	**2.0343**	0.0608
PBS	0.0633	0.085	0.0927	0.0485	0.072966667

[0410] V_HH纯化和结合

[0411] 从选定的噬菌体中纯化V_HH纳米抗体。RWC4、RWG8和RWB12纳米抗体的纯化示于图7-9中。对从AKTA Explorer(通用电气医疗公司)洗脱的V_HH骆驼纳米抗体级分进行SDS-PAGE(参见图7A、8A和9A)。从AKTA Explorer(通用电气医疗公司)上镍柱(通用电气医疗公司)洗脱的纳米抗体的色谱图显示在图7B、8B和9B中。RWC4、RWG8和RWB12的产量分别为33.8mg/L、50mg/L和132mg/L。

[0412] 通过ELISA测量所选V_HH纳米抗体对hB7H3-Fc、hB7H3-His、小鼠B7H3-His、猴B7H3-His和大鼠B7H3-His融合蛋白的结合。结果示于表4和图22中。除RWB2外,V_HH能够与B7H3-Fc和B7H3-His融合蛋白结合。RWG8表现出对小鼠B7H3的交叉反应性(图22)。此外,RWA12表现出与PBS和PD-L1的交叉反应性;其余的V_HH对PDL1没有交叉反应(表5)。

[0413] 表4:通过ELISA测量选定的V_HH结合B7H3融合蛋白

[0414]

V_HH	hB7H3-Fc	hB7H3-His	猴 B7H3-His	大鼠 B7H3-His	非相关抗原
RWH1	**2.594**	**2.6469**	**1.2967**	0.1341	0.1309
RWH5	**0.2128**	**0.3736**	0.09795	**0.30495**	0.07635
RWG8	**0.6408**	**1.03935**	0.117	0.06955	0.0562
RWB12	**0.56795**	**0.6859**	0.1644	0.0574	0.04945
RWC4	**2.0192**	**2.4388**	**0.28845**	0.158	0.0719
RWA12	**2.1821**	**2.40585**	**2.02145**	**1.99375**	**1.42755**
RWG4	**2.5413**	**2.55455**	**1.8126**	**1.49675**	0.0541
RWB2	0.0884	0.152	0.07985	0.0986	0.11535
RWC3	**2.34075**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RWD5	**2.3737**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RWD9	**0.49865**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PBS	0.064	0.0697	0.07795	0.13435	0.08595

[0415] 表5:通过ELISA测量选定的B7H3结合物对PD-L1的交叉反应

[0416]

V_HH	PD-L1	PBS
RWA12	0.9937	0.444
RWH1	0.0753	0.04645
RWH5	0.08255	0.0478
RWG8	0.0715	0.05055

[0417]

V_HH	PD-L1	PBS
RWB2	0.0522	0.0423
RWG4	0.0614	0.0474
RWC4	0.04305	0.04855
RWB12	0.04545	0.0475
RWC3	0.0454	0.04985
RWD9	0.0438	0.05345
RWD5	0.04705	0.0585
PBS	0.04565	0.07345

[0418] 选定的B7H3靶向V_HH与表达B7H3的细胞的结合

[0419] 通过FACS分析评估选定的B7H3靶向V_HH纳米抗体与NBEB神经母细胞瘤细胞的结合(图10)。六种测试抗体(RWC4、RWB12、RWG8、RWA12、RWG4和RWD5)能够结合NBEB细胞。

[0420] 通过FACS分析评估选定的B7H3靶向V_HH纳米抗体与A431表皮样癌细胞的结合(图11)。六种测试抗体(RWC4、RWB12、RWG8、RWA12、RWG4和RWD5)能够结合A431细胞。

[0421] 还评估了五种B7H3靶向的抗体(RWC4、RWB12、RWG8、RWG4和RWD5)结合MC38-CD276+和MC38-CD276KO细胞的能力。所有测试的抗体都与B7H3阳性细胞结合,但不与B7H3阴性细胞结合(参见表6)。

[0422] 表6:5种V_HH的细胞结合能力汇总

[0423]

MC38-CD276+	阳性率			
	50 μg/ml	10 μg/ml	2 μg/ml	0.5 μg/ml
RWC4	**98.80%**	**98.30%**	**84.70%**	**14.40%**
RWB12	**12%**	**4.16%**	0.18%	0.23%
RWG8	**26.50%**	**4.68%**	0.31%	0.10%
RWG4	**91.50%**	**85.80%**	**23.40%**	1.25%
RWD5	**88.90%**	**44.90%**	1.44%	0.19%

MC38-CD276KO	阳性率	
	50 μg/ml	10 μg/ml
RWC4	0.17%	0.24%
RWB12	0.37%	0.19%
RWG8	0.76%	0.25%
RWG4	0.13%	0.06%
RWD5	0.56%	0.12%

[0424] 结合动力学

[0425] 使用重组人类B7H3-Fc蛋白或重组小鼠B7H3-His蛋白在Octet系统(创意生物实验室公司)上测量RWC4和RWG4的缔合/解离特性。

[0426] RWC4与人类B7H3-Fc结合的动力学显示在图12中,并总结在表7中。RWC4对人类B7H3-Fc的K_D为3.8×10^{-9}。

[0427] 表7:RWC4对人类B7H3-Fc的动力学

[0428]

nM	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
660	3.8×10^{-9}	2.65×10^{4}	1.01×10^{-4}
132	3.8×10^{-9}	2.65×10^{4}	1.01×10^{-4}
26.4	3.8×10^{-9}	2.65×10^{4}	1.01×10^{-4}

[0429] RWG4对人类B7H3-Fc的动力学显示在图13中,并总结在表8中。RWG4对人类B7H3-Fc的K_D为6.94×10^{-9}。

[0430] 表8:RWG4对人类B7H3-Fc的动力学

[0431]

nM	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
660	6.94×10^{-9}	9.13×10^{3}	6.34×10^{-5}
528	6.94×10^{-9}	9.13×10^{3}	6.34×10^{-5}
264	6.94×10^{-9}	9.13×10^{3}	6.34×10^{-5}
198	6.94×10^{-9}	9.13×10^{3}	6.34×10^{-5}
66	6.94×10^{-9}	9.13×10^{3}	6.34×10^{-5}
33	6.94×10^{-9}	9.13×10^{3}	6.34×10^{-5}

[0432] B7H3在各种癌细胞系上的表达

[0433] 通过FACS评估了几种癌细胞系的B7H3表达。在14个细胞系上检测到了表达,但在B7H3(CD276)敲除的两个细胞系上未检测到表达(见表9)。

[0434] 表9:表达B7H3的细胞汇总

[0435]

细胞系(癌症类型)	B7H3表达
A431(人类表皮样癌)	+
NBEB(人类神经母细胞瘤)	+
IMR5(人类神经母细胞瘤)	+
MC-38-CD276+(鼠结肠腺癌细胞)	+
MC-38-CD276KO(鼠结肠腺癌细胞)	-
IMR32(人类神经母细胞瘤)	+
IMR32-CD276KO(人类神经母细胞瘤)	-

H9(人类皮肤T淋巴细胞)	+
EKVX(人类肺腺癌)	+
LAN-1(人类神经母细胞瘤)	+
H2269(人类黑色素瘤))	+
C55	+
Miaca2	+
OVCAR8(人类卵巢癌)	+
BXPC-3(腺癌)	+

[0436] B7H3靶向CAR的产生

[0437] 首先,进行PCR扩增纳米抗体序列,质粒Pwpt和PCR产物的骨架分别用NdeI和SpeI酶切,酶切后的骨架与酶切后的PCR产物连接。转化后,在氨苄青霉素板上选择细菌。

[0438] 通过FACS测量表达B7H3靶向CAR的慢病毒的T细胞转染效率。结果示于图14和表10。

[0439] 表10:CAR-T细胞的转染效率

[0440]

CAR-T	转染效率
模拟	0.15%
RWH5	87.2%
RWB2	71%
RWC3	73%
RWD9	48.3%
RWH1	56.7%

[0441]

CAR-T	转染效率
RWB12	88.8%
RWG8	78.6%
RWD5	69.5%
RWC4	83.3%
RWG4	64.2%

[0442] 靶向B7H3的CAR-T细胞的细胞毒性

[0443] 测试了靶向B7H3的CAR-T细胞对B7H3阳性细胞和B7H3敲除细胞的细胞毒性。图15显示使用B7H3阳性人类神经母细胞瘤NBEB细胞(图15A)、人类神经母细胞瘤LAN-1细胞(图15B)、人类腺癌BXPC-3细胞(图15C)和人类胰脏癌Miacapa2细胞(图15D)的细胞毒性测定的结果。在该测定中,RWB12、RWG8和RWC4 CAR-T细胞对诱导特异性裂解最有效。

[0444] 在第二测定中,评估了靶向B7H3的CAR-T细胞在B7H3阳性细胞和B7H3敲除细胞中的细胞毒性。图16显示了使用人类神经母细胞瘤IMR32细胞(图16A)、鼠结肠腺癌MC38-$CD276^{+}$细胞(图16B)、人类神经母细胞瘤IMR32-$CD276^{-/-}$细胞(图16C)和鼠结肠腺癌MC38-$CD276^{-/-}$细胞(图16D)的细胞毒性测定的结果。三种CAR T细胞(RWB12、RWG8和RWC4)对B7H3阳性细胞表现出有效的细胞毒性,但对B7H3阴性细胞没有。

[0445] 实施例4:B7H3靶向CAR T细胞在体外和体内杀死胰腺肿瘤细胞

[0446] 使用两种表达荧光素酶的B7H3阳性胰腺癌细胞系:Panc-1 GFP-Luc(GL)和BxPC-3GL评估了人类靶向B7H3的纳米抗体衍生的CAR T细胞(RWB12、RWG8和RWC4,本文简称为

B12、G8和C4)的体外细胞毒性。首先,进行流式细胞术以确认Panc-1和BxPC-1细胞均表达B7H3(图17A)。表达每个靶向B7H3的CAR以及靶向CD19的CAR的慢病毒构建体的转导效率也通过流式细胞术确定。如图17B所示,G8、C4和B12 CAR的转导效率分别为60.4%、58.6%和68.4%,而具有不相关CAR(CD19)的T细胞的转导效率为32%。为了评估细胞毒性,将靶向B7H3(C4、G8和B12)的CAR T细胞和对照(CD19)CAR T细胞与Panc-1 GL细胞或BxPC-3GL细胞以不同的效应物:靶标(E:T)比率培养。Panc-1 GL和BxPC-3GL细胞均以剂量依赖性方式被所有三种B7H3靶向CAR T细胞有效裂解,而从对照CAR T细胞中观察到杀伤最小。这些结果表明,靶向B7H3的基于纳米抗体的CAR T细胞能够在体外有效地裂解B7H3阳性胰腺癌细胞系。

[0447] 在Panc-1小鼠异种移植模型中进一步评估了B7H3靶向CAR T细胞。一项研究使用了高剂量的CAR T细胞(1000万),而第二项研究使用了低剂量的CAR T细胞(500万)。高剂量研究的实验设计的示意图示于图18A中。100万个Panc-1 GFP/Luc肿瘤细胞以静脉注射的方式植入NSG小鼠体内建立肿瘤模型。20天(第0天)后,小鼠以静脉注射的方式输注1000万个C4、G8或B12 CAR T细胞(或对照CD19 CAR T细胞),每周进行一次成像。Panc-1肿瘤生长的代表性生物发光图像显示在图18B中。与输注对照CAR T细胞相比,用1000万个B7H3靶向CAR T细胞(C4、G8或B12)治疗的小鼠肿瘤生长显著减缓,这可以从CAR T细胞治疗的小鼠(图18C)中以每秒光子数测量的肿瘤生物发光减少来证明。还确定了用B7H3靶向CAR T细胞治疗小鼠的存活率。图18D显示了荷瘤小鼠在用1000万个C4、G8或B12 CAR T细胞治疗后的Kaplan-Meier生存曲线。结果表明,当以高剂量(1000万)施用时,C4 CAR T细胞比G8或B12 CAR T细胞更有效地促进小鼠存活,并表明施用1000万个CAR T细胞对小鼠是安全的。

[0448] 第二项体内研究评估了在肿瘤再次攻击后输注较低剂量的B7H3特异性CAR T细胞治疗携带Panc-1肿瘤的小鼠。本研究的实验设计示意图如图19A所示。Panc-1异种移植小鼠以静脉注射的方式在接种100万个Panc-1-Luc细胞后20天(第0天)输注500万个C4 CAR T细胞、500万个B12 CAR T细胞、500万个未转导的T细胞(模拟)或PBS。经C4 CAR T细胞和B12 CAR T细胞治疗且未显示可检测肿瘤的小鼠以静脉注射的方式在第35天植入了100万个Panc-1细胞。作为对照,给空白小鼠植入了Panc-1细胞。每周进行一次成像。在CAR T细胞治疗的小鼠中,Panc-1肿瘤生长的代表性生物发光图像显示在图19B中。与施用模拟T细胞或PBS的小鼠相比,用500万个C4 CAR T细胞或500万个B12 CAR T细胞治疗的小鼠肿瘤生长显著减缓。虽然肿瘤在对照小鼠中快速生长,但在Panc-1肿瘤再次攻击后,100%先前用C4 CAR T细胞治疗的小鼠保持没有肿瘤的状态,而治疗后60%先前用B12 CAR T细胞治疗的小鼠10周内保持没有肿瘤的状态。肿瘤生物发光的量化显示在图19C中。还确定了用B7H3靶向CAR T细胞治疗小鼠的存活率。图19D显示了荷瘤小鼠治疗后的Kaplan-Meier生存曲线。接受500万个C4或B12 CAR T细胞的小鼠在第70天仍然存活。相比之下,用PBS或模拟T细胞治疗的小鼠在输注后存活没有超过30天。

[0449] 实施例5:B7H3靶向CAR T细胞在体外和体内杀死神经母细胞瘤肿瘤细胞

[0450] 测试了B7H3靶向CAR T细胞对神经母细胞瘤细胞系IMR5的体外细胞毒性。该研究比较了使用本文公开的B7H3靶向的纳米抗体产生的CAR T细胞与基于商业抗人类B7H3杂交瘤抗体376.96的CAR T细胞(杜(Du)等人,《癌细胞》35(2):221-237,2019)。G8、B12、C4和376.96CAR T细胞与IMR5 GL细胞以不同的效应物:靶标(E:T)比率培养24小时。与模拟T细

胞相比,所有CAR T细胞均以剂量依赖性方式有效裂解IMR5肿瘤细胞;然而,B12 CAR T细胞比其他测试的CAR T细胞略微有效(图20A)。

[0451] 接下来在IMR5异种移植模型中评估CAR T细胞(参见图20B中的示意图)。IMR5异种移植小鼠以静脉注射的方式在肿瘤接种后35天(第0天)输注500万个C4CAR T细胞、B12 CAR T细胞、G8 CAR T细胞、376.96CAR T细胞或未转导的T细胞(模拟)。异种移植模型中IMR5肿瘤生长的代表性生物发光图像显示在图20C中,并且肿瘤生物发光的量化显示在图20D中。与376.96CAR T细胞和模拟T细胞相比,用500万个B12 CAR T细胞治疗的小鼠肿瘤生长显著减缓。C4 CAR T细胞也显示出适度的抗肿瘤活性。

[0452] 实施例6:G8对小鼠B7H3的交叉反应性

[0453] 通过流式细胞术测量抗B7H3纳米抗体G8、C4和B12与小鼠B7H3的结合活性。G8,而非C4或B12,与在三种KPC细胞系(CREP128096、CREP133239和PDA95775;胰腺导管腺癌细胞)和小鼠黑色素瘤细胞系B16上表达的小鼠B7H3显示阳性结合。使用B16黑色素瘤细胞和B7H3(CD276)敲除细胞评估靶向B7H3的CAR的体外细胞毒性。只有G8 CAR T细胞表现出对小鼠B7H3阳性B16细胞的特异性杀伤(图21B)。

[0454] 实施例7:B7H3纳米抗体的表位作图

[0455] 进行了抗B7H3纳米抗体和商业抗体376.96的表位作图。共设计和合成了来自人类B7H3蛋白的48种肽。每种肽由18个氨基酸组成,并与相邻的肽重叠9个氨基酸。ELISA技术用于测试抗体与每种肽的结合能力(图21C)。结果表明,G8和376.96结合相似的表位,因为它们都与肽10、11和15(SEQ ID NO:35-37)结合。C4和B12可具有线性化肽文库无法预测的构象表位。

[0456] 本申请还涉及以下方面。

[0457] 1.一种特异性结合B7H3的单域单克隆抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3序列。

[0458] 2.根据项1所述的抗体,其中所述CDR序列使用Kabat、IMGT或Paratome编号方案,或所述Kabat、IMGT和Paratome编号方案的组合限定。

[0459] 3.根据项1或2所述的抗体,其中所述CDR1、CDR2和CD3序列分别包含:

[0460] SEQ ID NO:3的残基31-35、50-66和97-114;

[0461] SEQ ID NO:3的残基26-33、51-58和97-115;或者

[0462] SEQ ID NO:3的残基26-35、50-61和98-114。

[0463] 4.根据项1或2所述的抗体,其中所述CDR1、CDR2和CD3序列分别包含:

[0464] SEQ ID NO:1的残基31-35、50-66和97-118;

[0465] SEQ ID NO:1的残基26-33、51-58和97-119;或者

[0466] SEQ ID NO:1的残基27-35、47-62和98-118。

[0467] 5.根据项1或2所述的抗体,其中所述CDR1、CDR2和CD3序列分别包含:

[0468] SEQ ID NO:2的残基31-35、50-66和97-105;

[0469] SEQ ID NO:2的残基26-33、51-58和97-106;或者

[0470] SEQ ID NO:2的残基27-35、47-61和97-106。

[0471] 6.根据项1或2所述的抗体,其中所述CDR1、CDR2和CD3序列分别包含:

[0472] SEQ ID NO:4的残基31-35、50-65和96-110;

[0473] SEQ ID NO:4的残基26-33、51-57和96-110;或者

[0474] SEQ ID NO:4的残基27-35、47-60和96-109。

[0475] 7.根据项1或2所述的抗体,其中所述CDR1、CDR2和CD3序列分别包含:

[0476] SEQ ID NO:5的残基27-30、45-61和90-109;

[0477] SEQ ID NO:5的残基26-28、46-53和90-110;或者

[0478] SEQ ID NO:5的残基27-30、43-55和90-110。

[0479] 8.根据项1或2所述的抗体,其中所述CDR1、CDR2和CD3序列分别包含:

[0480] SEQ ID NO:6的残基31-35、50-65和96-111;

[0481] SEQ ID NO:6的残基26-33、51-57和96-112;或者

[0482] SEQ ID NO:6的残基27-35、47-60和96-111。

[0483] 9.根据项1或2所述的抗体,其中所述CDR1、CDR2和CD3序列分别包含:

[0484] SEQ ID NO:7的残基31-35、50-65和96-111;

[0485] SEQ ID NO:7的残基26-33、51-57和96-112;或者

[0486] SEQ ID NO:7的残基27-35、47-60和96-111。

[0487] 10.根据项1或2所述的抗体,其中所述CDR1、CDR2和CD3序列分别包含:

[0488] SEQ ID NO:8的残基31-35、50-65和96-111;

[0489] SEQ ID NO:8的残基26-33、51-57和96-112;或者

[0490] SEQ ID NO:8的残基27-35、47-60和96-111。

[0491] 11.根据项1或2所述的抗体,其中所述CDR1、CDR2和CD3序列分别包含:

[0492] SEQ ID NO:9的残基31-35、50-65和96-111;

[0493] SEQ ID NO:9的残基26-33、51-57和96-112;或者

[0494] SEQ ID NO:9的残基27-35、47-60和96-111。

[0495] 12.根据项1或2所述的抗体,其中所述CDR1、CDR2和CD3序列分别包含:

[0496] SEQ ID NO:10的残基31-35、50-65和96-113;

[0497] SEQ ID NO:10的残基26-33、51-57和96-114;或者

[0498] SEQ ID NO:10的残基27-35、47-60和97-114。

[0499] 13.根据项1或2所述的抗体,其中所述CDR1、CDR2和CD3序列分别包含:

[0500] SEQ ID NO:11的残基30-34、50-64和93-105;

[0501] SEQ ID NO:11的残基25-32、50-56和93-104;或者

[0502] SEQ ID NO:11的残基26-34、46-59和93-105。

[0503] 14.根据项1或2所述的抗体,其中所述CDR1、CDR2和CD3序列分别包含:

[0504] SEQ ID NO:12的残基32-35、51-65和94-107;

[0505] SEQ ID NO:12的残基26-33、51-57和94-107;或者

[0506] SEQ ID NO:12的残基27-35、47-60和94-108。

[0507] 15.根据项1-14中任一项所述的抗体,其中所述抗体的氨基酸序列与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12至少90%相同。

[0508] 16.根据项1-15中任一项所述的抗体,其中所述抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12或者由它们组成。

[0509] 17.根据项1-14中任一项所述的抗体,其中所述抗体是人源化抗体。

[0510] 18.根据项1-14中任一项所述的抗体,其中所述抗体是嵌合抗体。

[0511] 19.一种嵌合抗原受体(CAR),包含项1-18中任一项所述的抗体。

[0512] 20.根据项19所述的CAR,进一步包含铰链区、跨膜域、共刺激信号传导部分、信号传导域或它们的任何组合。

[0513] 21.根据项20所述的CAR,其中:

[0514] 所述铰链区包括CD8α铰链区;

[0515] 所述跨膜域包含CD8α跨膜域;

[0516] 所述共刺激信号传导部分包含4-1BB信号传导部分;和/或

[0517] 所述信号传导域包括一个CD3ζ信号传导域。

[0518] 22.一种表达项19-21中任一项所述的CAR的分离细胞。

[0519] 23.根据项22所述的分离细胞,它是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)或自然杀伤(NK)细胞。

[0520] 24.一种免疫缀合物,包含项1-18中任一项所述的抗体和效应分子。

[0521] 25.根据项24所述的免疫缀合物,其中所述效应分子是毒素。

[0522] 26.根据项25所述的免疫缀合物,其中所述毒素是假单胞菌外毒素或其变体。

[0523] 27.根据项26所述的免疫缀合物,其中所述假单胞菌外毒素变体是PE38。

[0524] 28.根据项24所述的免疫缀合物,其中所述效应分子是光子吸收剂。

[0525] 29.根据项24所述的免疫缀合物,其中所述效应分子是可检测标记物。

[0526] 30.根据项29所述的免疫缀合物,其中所述可检测标记物包括荧光团、酶或放射性同位素。

[0527] 31.一种抗体-药物缀合物(ADC),包含缀合至项1-18中任一项所述的抗体的药物。

[0528] 32.根据项31所述的ADC,其中所述药物是小分子。

[0529] 33.根据项31或32所述的ADC,其中所述药物是抗微管剂、抗有丝分裂剂和/或细胞毒剂。

[0530] 34.一种多特异性抗体,包含项1-18中任一项所述的抗体和至少一种另外的单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0531] 35.根据项34所述的多特异性抗体,其是双特异性抗体。

[0532] 36.根据项34所述的多特异性抗体,其为三特异性抗体。

[0533] 37.根据项34-36中任一项所述的多特异性抗体,其中所述至少一种另外的单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合T细胞受体或自然杀伤(NK)细胞活化受体的组分。

[0534] 38.一种抗体-纳米颗粒缀合物,包含缀合至项1-18中任一项所述的抗体的纳米颗粒。

[0535] 39.根据项38所述的抗体-纳米颗粒缀合物,其中所述纳米颗粒包括聚合物纳米颗粒、纳米球、纳米胶囊、脂质体、树枝状聚合物、聚合物胶束或囊泡。

[0536] 40.根据项38或39所述的抗体-纳米颗粒缀合物,其中所述纳米颗粒包含细胞毒剂。

[0537] 41.一种融合蛋白,包含项1-18中任一项所述的抗体和异源蛋白或肽。

[0538] 42.根据项41所述的融合蛋白,其中所述异源蛋白是Fc蛋白或亮氨酸拉链。

[0539] 43.一种分离核酸分子,编码项1-18中任一项所述的抗体、项19-21中任一项所述的CAR、项24-30中任一项所述的免疫缀合物、项34-37任一项所述的多特异性抗体或项41或项42所述的融合蛋白。

[0540] 44.根据项43所述的分离核酸分子,其可操作地连接至启动子。

[0541] 45.一种包含项43或项44所述的核酸分子的载体。

[0542] 46.一种分离宿主细胞,包含项44所述的核酸分子或项45所述的载体。

[0543] 47.一种组合物,包含药学上可接受的载体和项1-18中任一项所述的抗体、项19-21中任一项所述的CAR、项22、23和46中任一项所述的分离细胞、项24-30中任一项所述的免疫缀合物、项31-33中任一项所述的ADC、项34-37中任一项所述的多特异性抗体、项38-40中任一项所述的抗体-纳米颗粒缀合物或项41或项42所述的融合蛋白。

[0544] 48.一种检测样品中B7H3表达的方法,包括:

[0545] 使所述样品与项1-18中任一项所述的抗体接触;和

[0546] 检测所述抗体与所述样品的结合,从而检测所述样品中B7H3的表达。

[0547] 49.一种诊断受试者患有B7H3阳性癌症的方法,包括:

[0548] 使从所述受试者获得的样品与项1-18中任一项所述的抗体接触;和

[0549] 检测所述抗体与所述样品的结合,从而诊断所述受试者患有B7H3阳性癌症。

[0550] 50.根据项48或项49所述的方法,其中所述抗体是直接标记的。

[0551] 51.根据项48或项49所述的方法,还包括:

[0552] 使所述抗体与检测抗体接触,和

[0553] 检测所述检测抗体与所述抗体的结合,从而检测所述样品中B7H3的表达或诊断所述受试者患有B7H3阳性癌症。

[0554] 52.根据项48-51中任一项所述的方法,其中所述样品获自疑似患有B7H3阳性癌症的受试者。

[0555] 53.根据项48-52中任一项所述的方法,其中,所述样品是肿瘤活体组织切片。

[0556] 54.一种治疗受试者B7H3阳性癌症的方法,包括向所述受试者施用项1-18中任一项所述的抗体、项19-21中任一项所述的CAR、项22-23中任一项所述的分离细胞、项24-30任一项所述的免疫缀合物、项31-33任一项所述的ADC、项34-37任一项所述的多特异性抗体、项38-40任一项所述的抗体-纳米颗粒缀合物、项41或项42所述的融合蛋白,或项47所述的组合物。

[0557] 55.一种抑制受试者B7H3阳性癌症的肿瘤生长或转移的方法,包括向所述受试者施用项1-18任一项所述的抗体、项19-21任一项所述的CAR、项22-23任一项所述的分离细胞、项24-30任一项所述的免疫缀合物,项31-33任一项所述的ADC,项34-37任一项所述的多特异性抗体、项38-40中任一项所述的抗体-纳米颗粒缀合物、项41或项42所述的融合蛋白,或项47所述的组合物。

[0558] 56.根据项54或项55所述的方法,其中所述B7H3阳性癌症是实体瘤。

[0559] 57.根据项56所述的方法,其中所述实体瘤是肝癌、胰腺癌、肾癌、膀胱癌、宫颈癌、食道癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、脑癌、小儿癌症、黑色素瘤或间皮瘤。

[0560] 58.根据项57所述的方法,其中所述肝癌是肝细胞癌。

[0561] 59.根据项57所述的方法,其中所述脑癌是神经母细胞瘤或胶质母细胞瘤。

[0562] 60.根据项57所述的方法,其中所述小儿癌症是骨肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤或尤文氏肉瘤。

[0563] 考虑到可以应用所公开主题原理的许多可能的实施方案,应该认识到所示实施方案仅是本公开的实施例并且不应被视为限制本公开的范围。相反,本公开的范围由以下权利要求限定。因此,我们主张属于这些权利要求的范围和精神之内的所有内容。

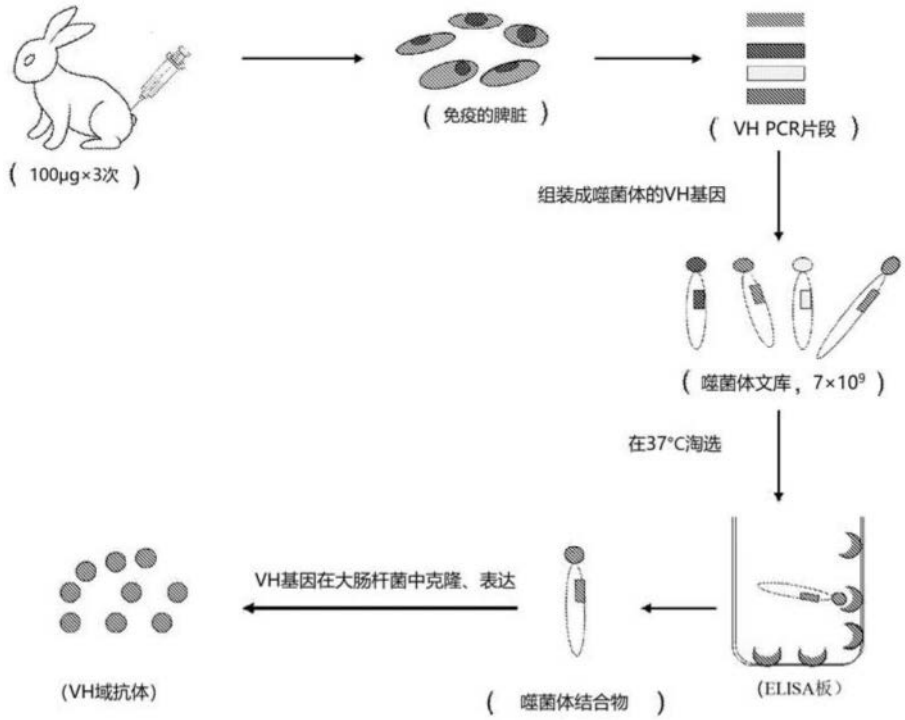

(100μg×3次)
(免疫的脾脏)
(VH PCR片段)
组装成噬菌体的VH基因
(噬菌体文库，7×10⁹)
在37°C淘选
(ELISA板)
(噬菌体结合物)
VH基因在大肠杆菌中克隆、表达
(VH域抗体)

图1A

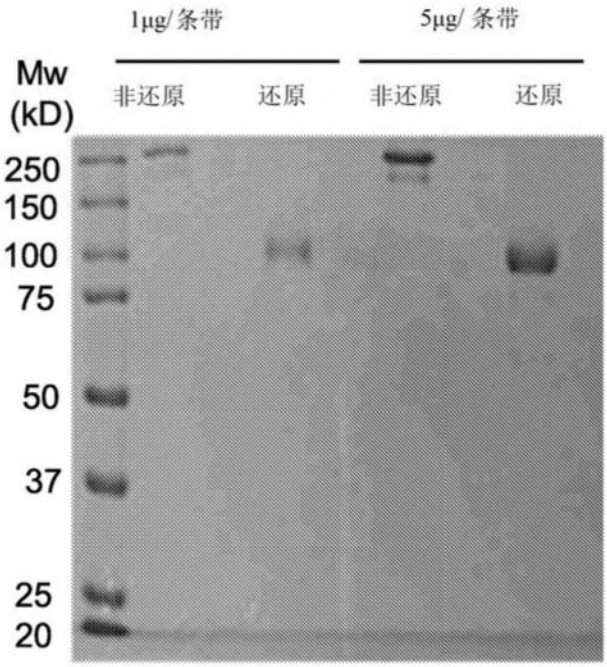

1μg/条带
5μg/ 条带
Mw (kD)
非还原
还原
非还原
还原
250
150
100
75
50
37
25
20

图1B

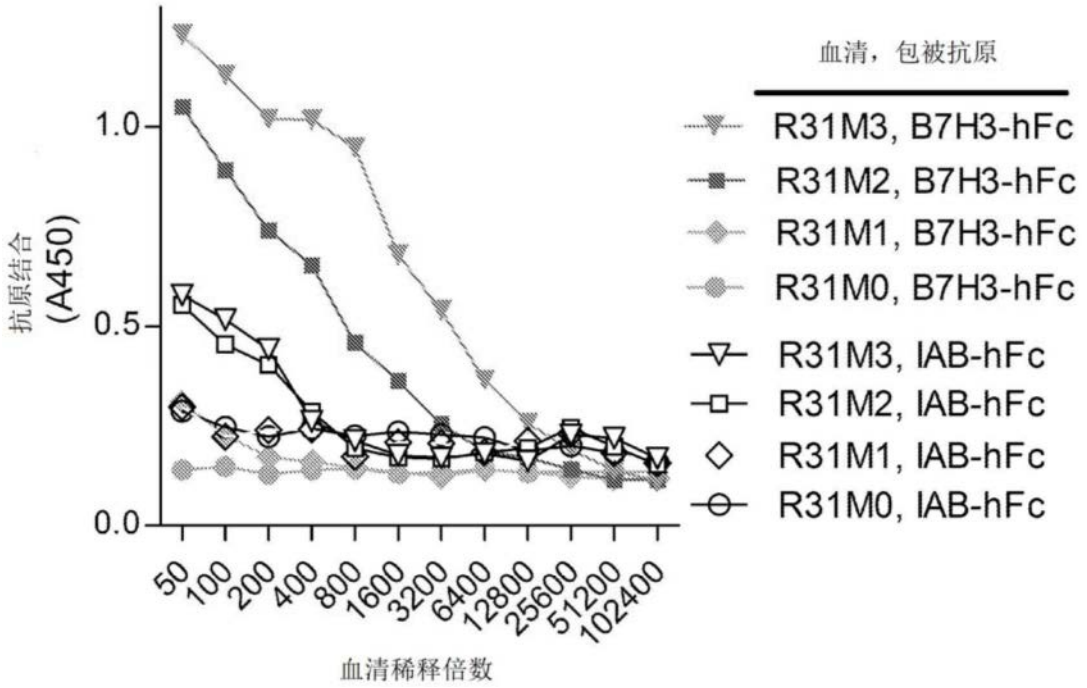

血清，包被抗原
R31M3, B7H3-hFc
R31M2, B7H3-hFc
R31M1, B7H3-hFc
R31M0, B7H3-hFc
R31M3, IAB-hFc
R31M2, IAB-hFc
R31M1, IAB-hFc
R31M0, IAB-hFc
抗原结合 (A450)
1.0
0.5
0.0
50
100
200
400
800
1600
3200
6400
12800
25600
51200
102400
血清稀释倍数

图2A

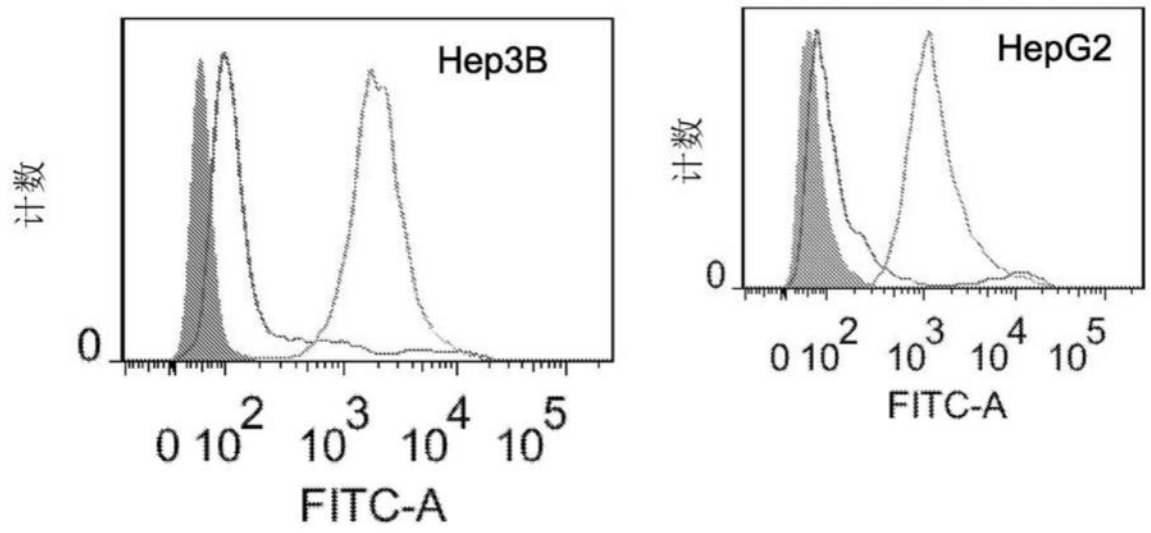

Hep3B
HepG2
计数
0
0 10^2 10^3 10^4 10^5
FITC-A

图2B

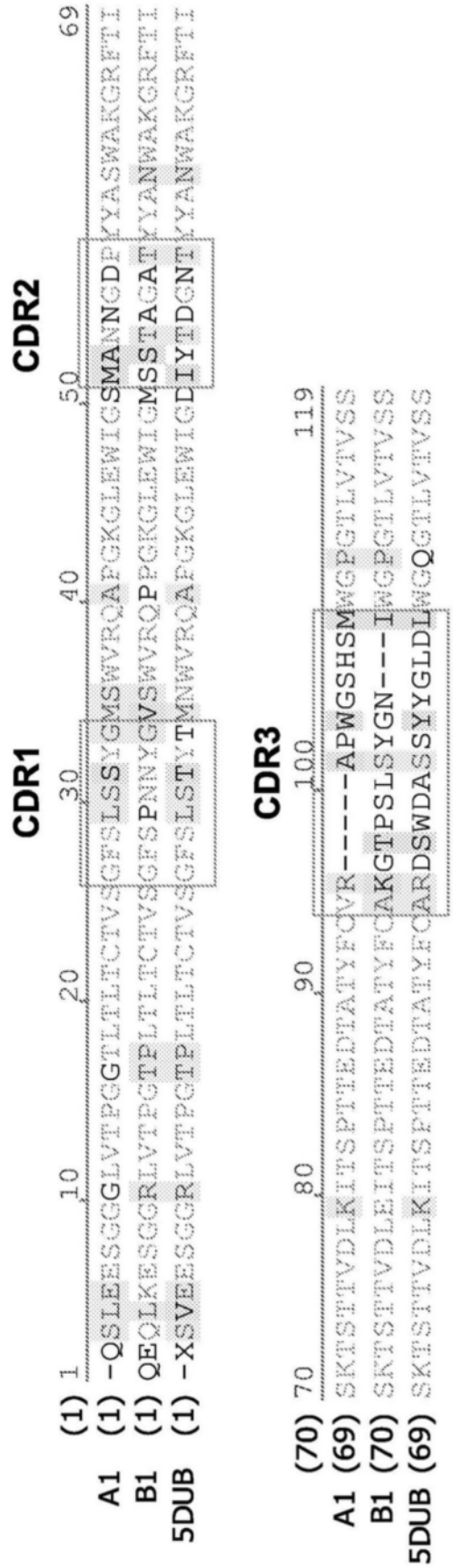

CDR1
CDR2
CDR3
(1) 1 10 20 30 40 50 69
A1 (1) -QSLEESGGGLVTPGGTLTLTCTVSGFSLSSYGMSWVRQAPGKGLEWIGSMANNGDPKYASWAKGRFTI
B1 (1) QEQLKESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSPNNYGVSWVRQPPGKGLEWICMSSTAGATKYANWAKGRFTI
5DUB (1) -XSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSTYTMNWVRQAPGKGLEWICGIIYTDGNTKYANWAKGRFTI
(70) 70 80 90 100 119
A1 (69) SKTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCVR-----APWGSHSMWGPGTLVTVSS
B1 (70) SKTSSTAVDLETSPTTEDTATYFCAKGTPSLSYGN---IWGPGTLVTVSS
5DUB (69) SKTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARDSWDASSYYGLDLWGQGTLVTVSS

图3A

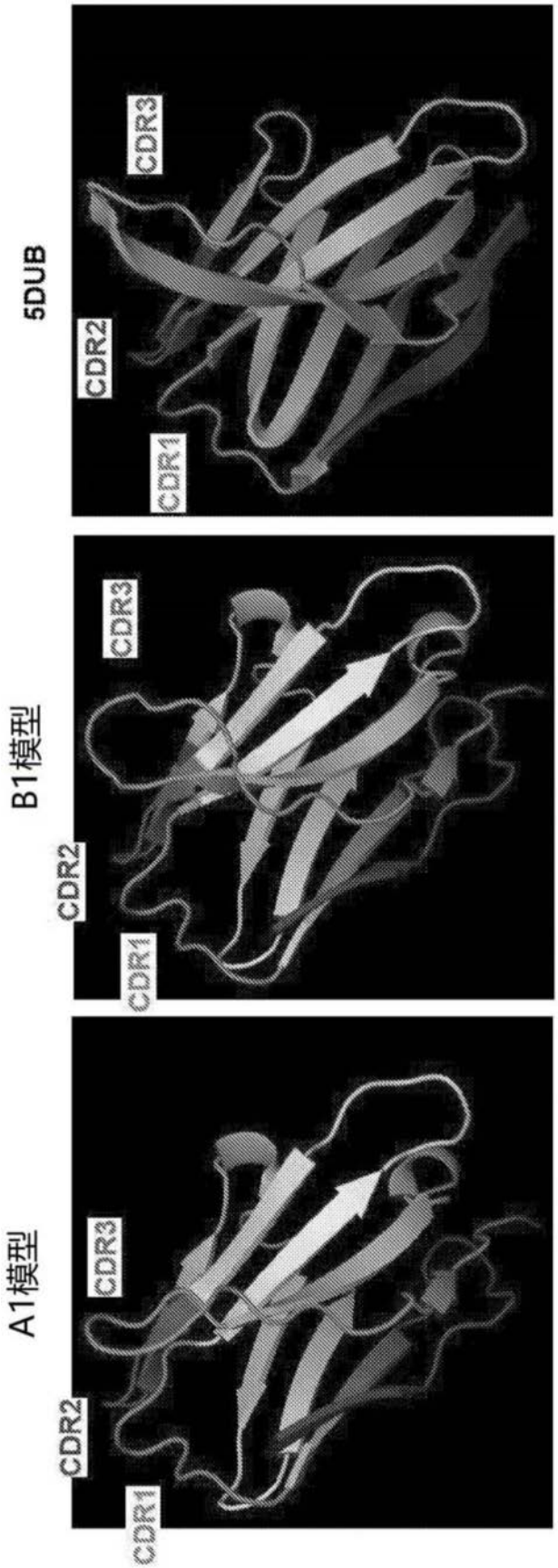


图3B

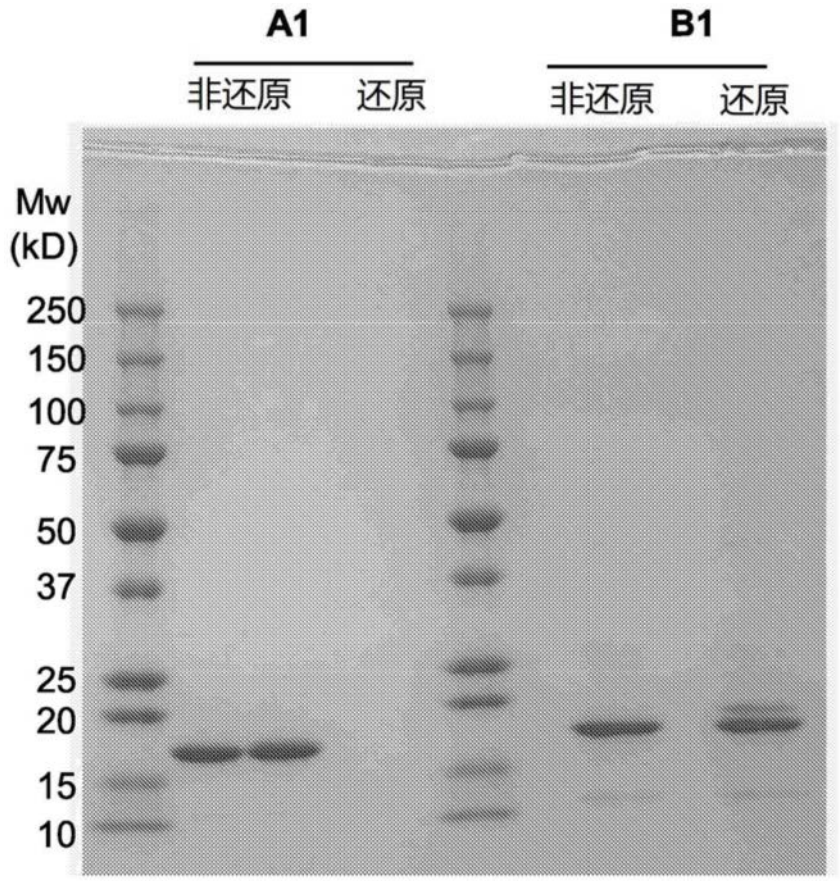


图4A

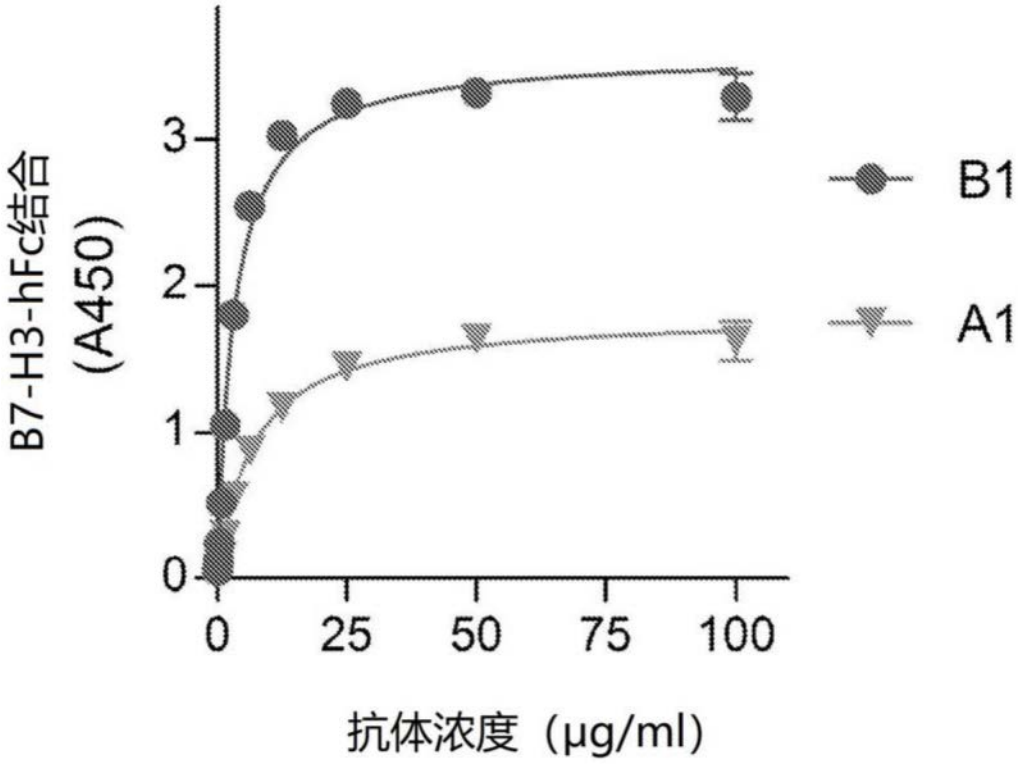


图4B

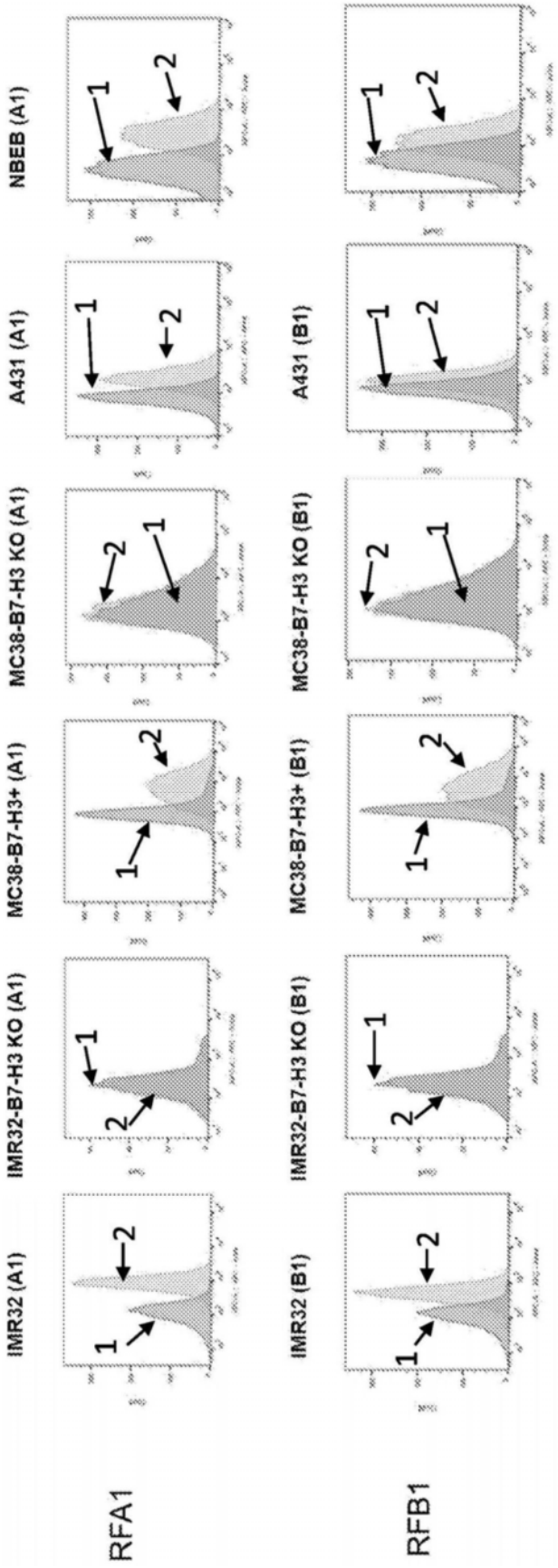

RFA1
IMR32 (A1)
IMR32-B7-H3 KO (A1)
MC38-B7-H3+ (A1)
MC38-B7-H3 KO (A1)
A431 (A1)
NBEB (A1)
RFB1
IMR32 (B1)
IMR32-B7-H3 KO (B1)
MC38-B7-H3+ (B1)
MC38-B7-H3 KO (B1)
A431 (B1)
1
2

图4C

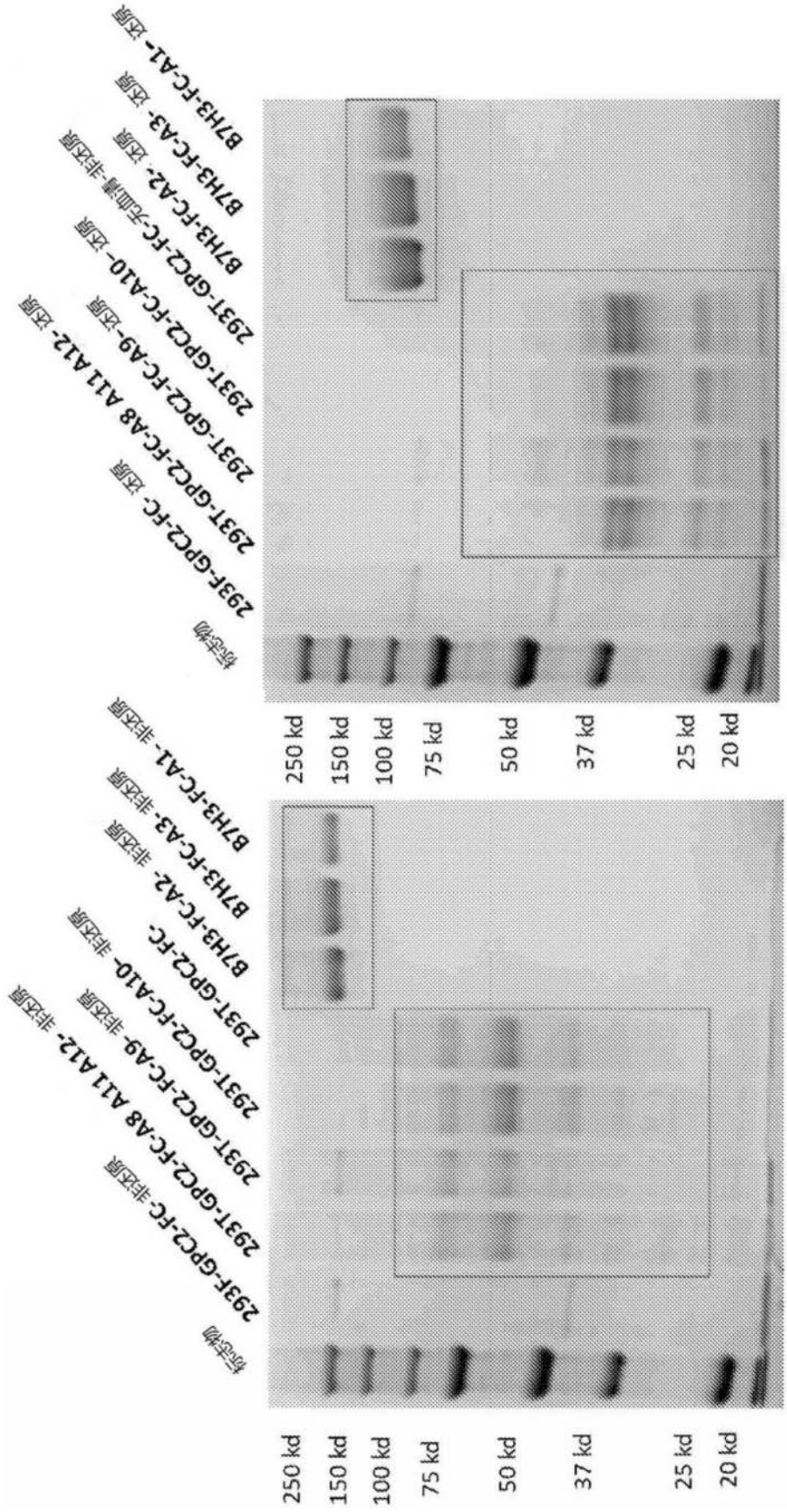

293F-GPC2-FC-还原
293T-GPC2-FC-还原
293T-GPC2-FC-A8 A11 A12-还原
293T-GPC2-FC-A9-还原
293T-GPC2-FC-A10-还原
B7H3-FC-A2-无唾液酸-非还原
B7H3-FC-A3-还原
B7H3-FC-A1-还原
标准物
250 kd
150 kd
100 kd
75 kd
50 kd
37 kd
25 kd
20 kd
293F-GPC2-FC-非还原
293T-GPC2-FC-A8 A11 A12-非还原
293T-GPC2-FC-A9-非还原
293T-GPC2-FC-A10-非还原
293T-GPC2-FC
B7H3-FC-A2-非还原
B7H3-FC-A3-非还原
B7H3-FC-A1-非还原
标准物
250 kd
150 kd
100 kd
75 kd
50 kd
37 kd
25 kd
20 kd

图5

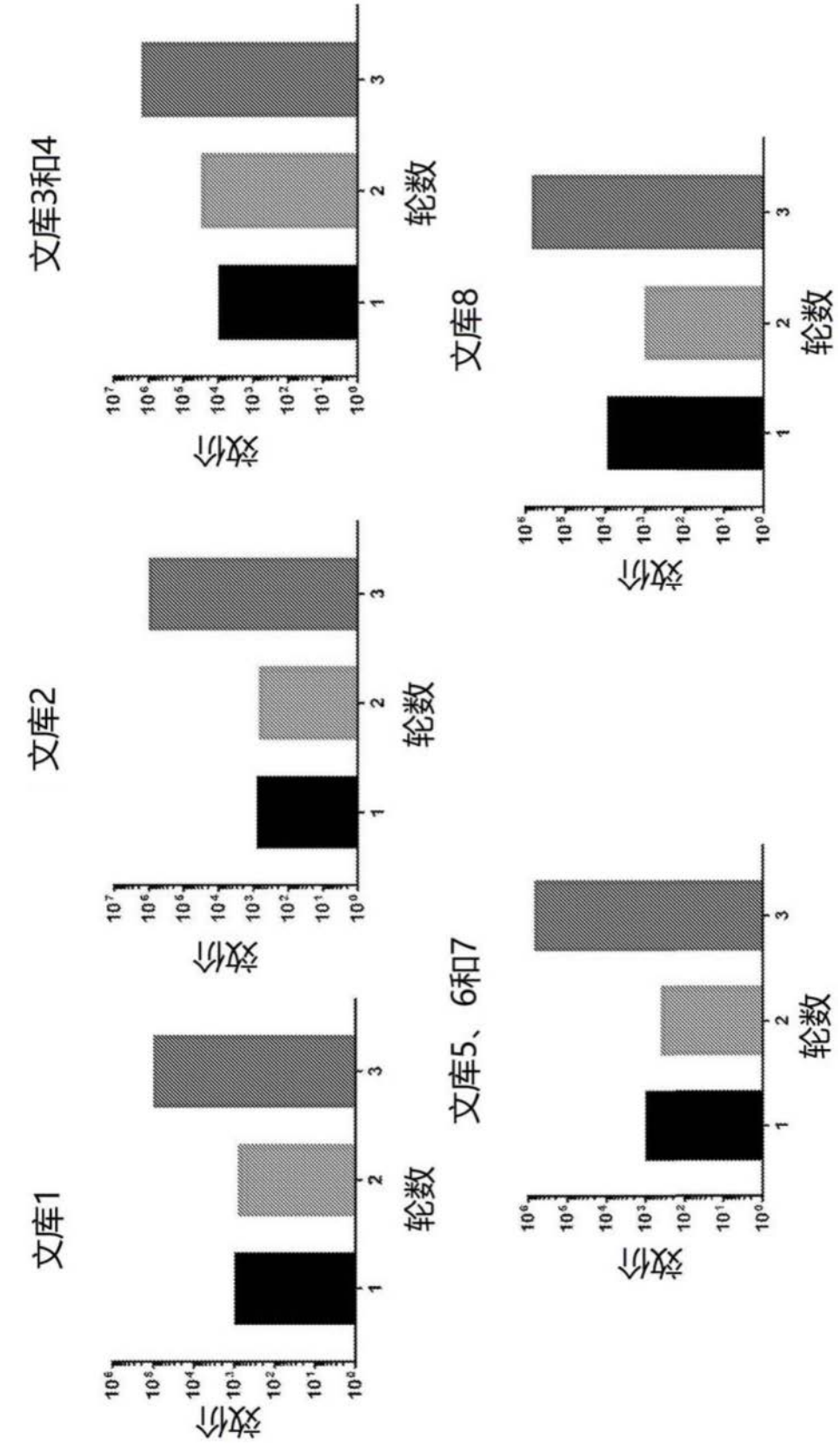


图6

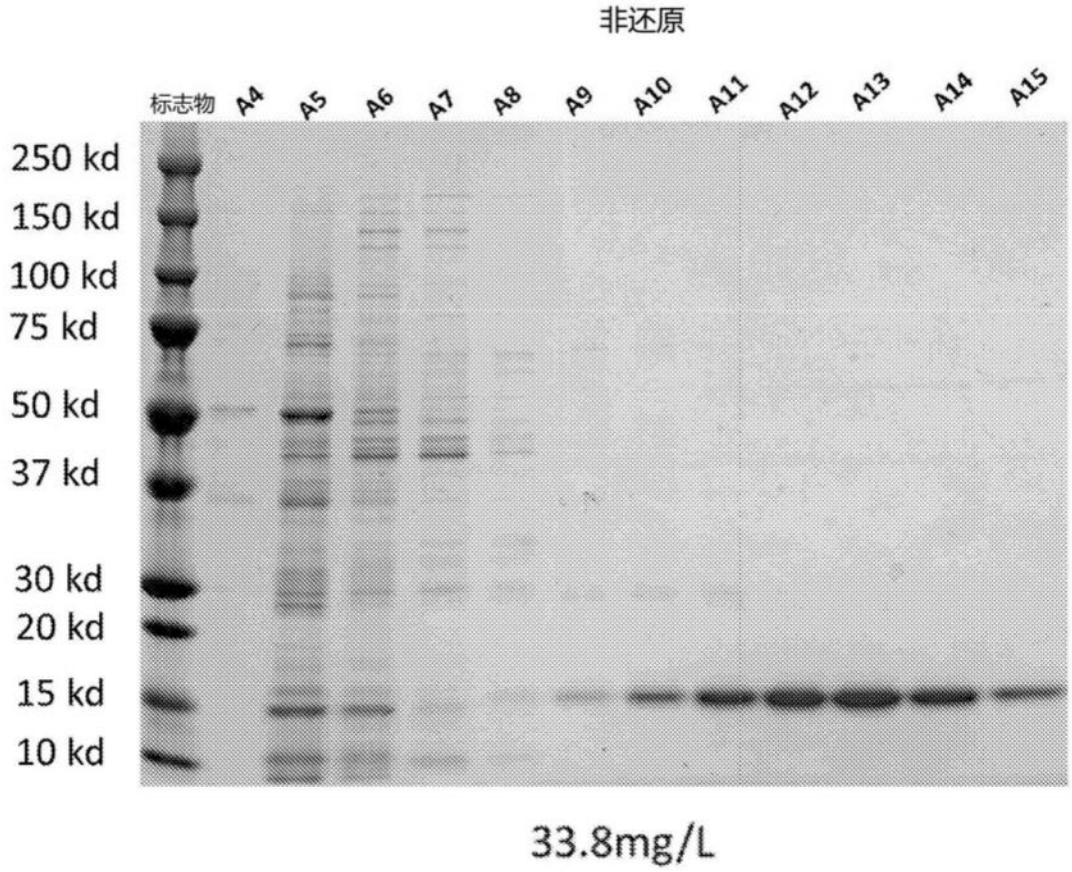

非还原
标志物
A4
A5
A6
A7
A8
A9
A10
A11
A12
A13
A14
A15
250 kd
150 kd
100 kd
75 kd
50 kd
37 kd
30 kd
20 kd
15 kd
10 kd
33.8mg/L

图7A

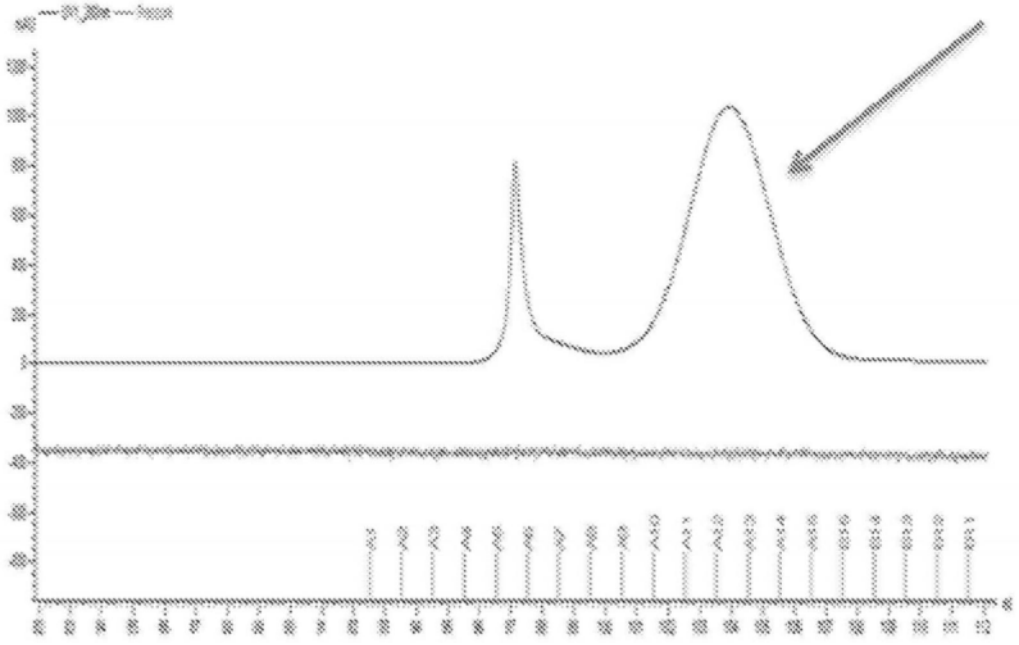


图7B

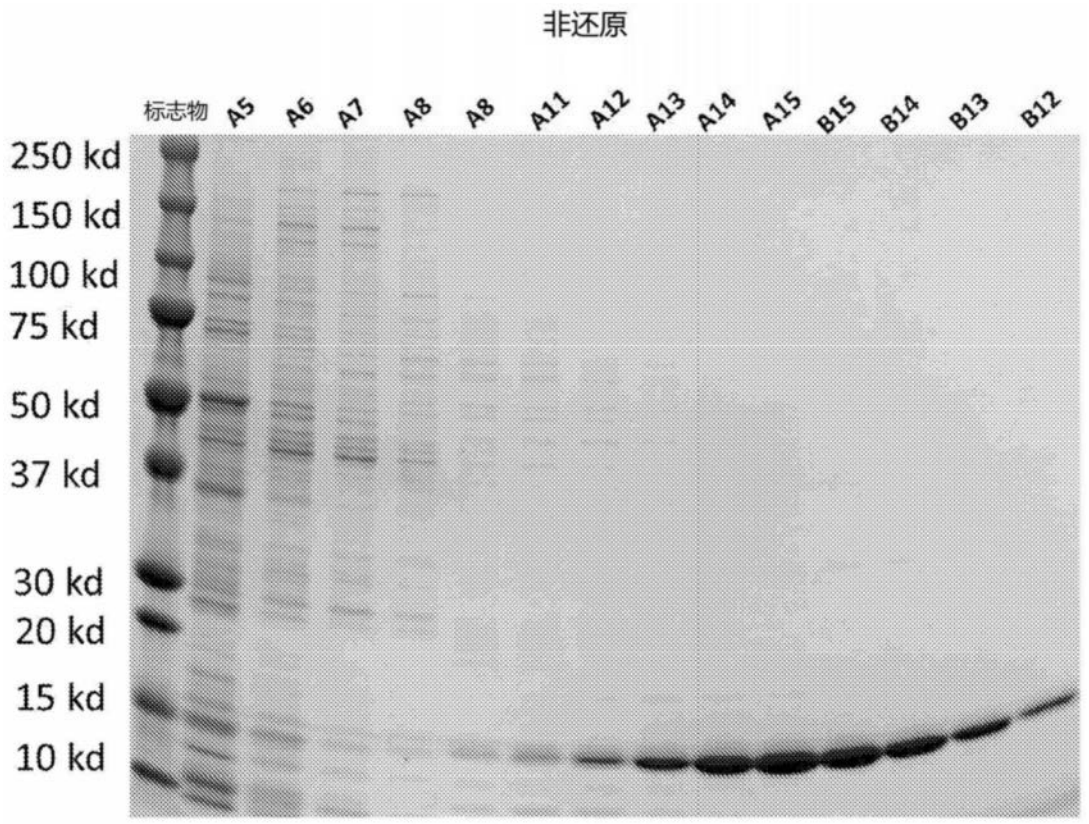

非还原
标志物
A5
A6
A7
A8
A8
A11
A12
A13
A14
A15
B15
B14
B13
B12
250 kd
150 kd
100 kd
75 kd
50 kd
37 kd
30 kd
20 kd
15 kd
10 kd

图8A

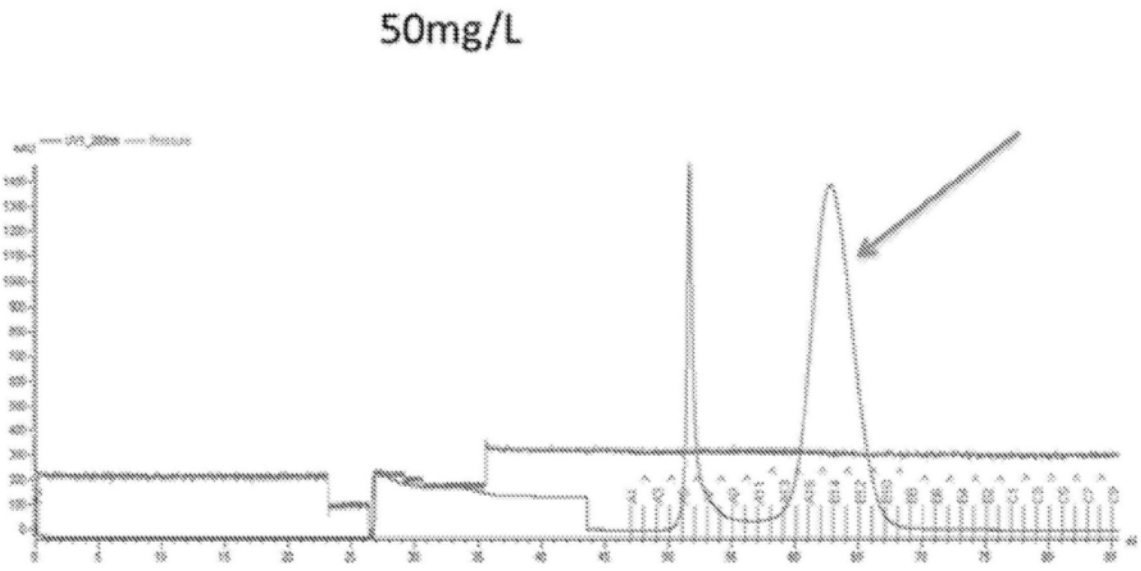

50mg/L

图8B

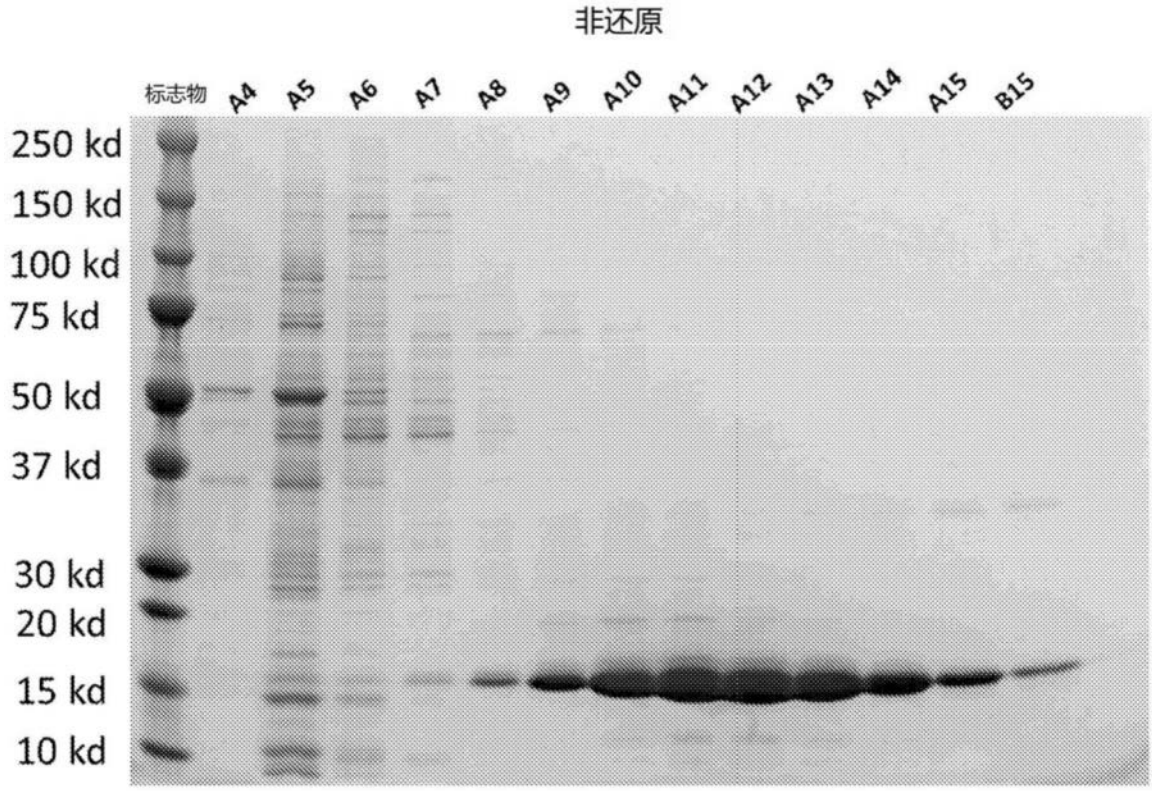

非还原
标志物
A4
A5
A6
A7
A8
A9
A10
A11
A12
A13
A14
A15
B15
250 kd
150 kd
100 kd
75 kd
50 kd
37 kd
30 kd
20 kd
15 kd
10 kd

图9A

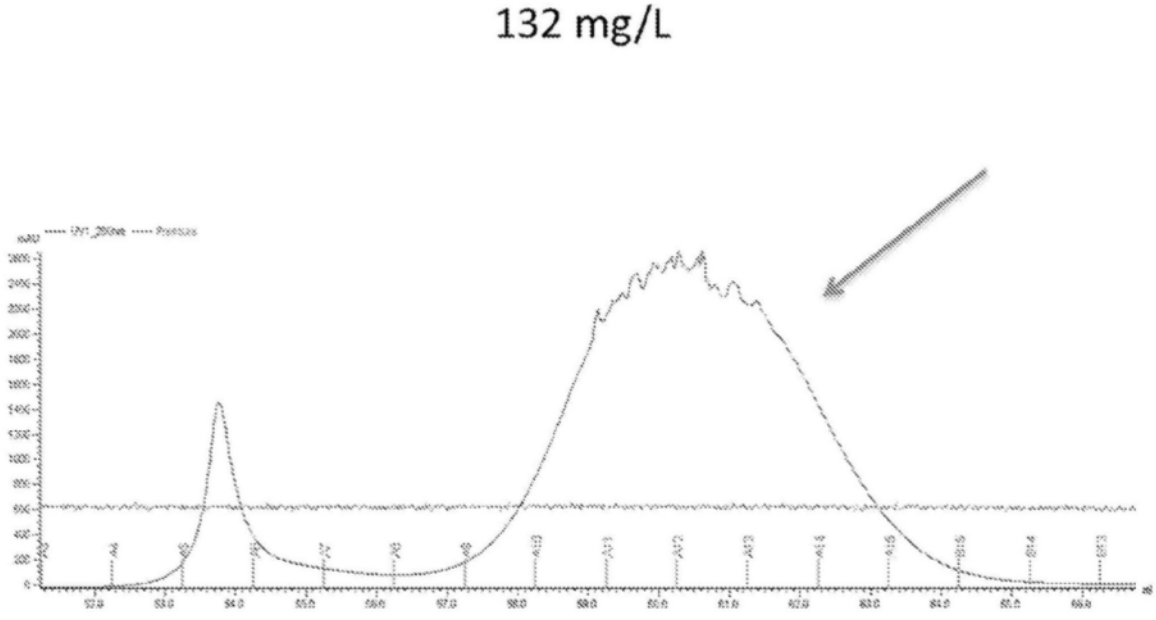

132 mg/L

图9B

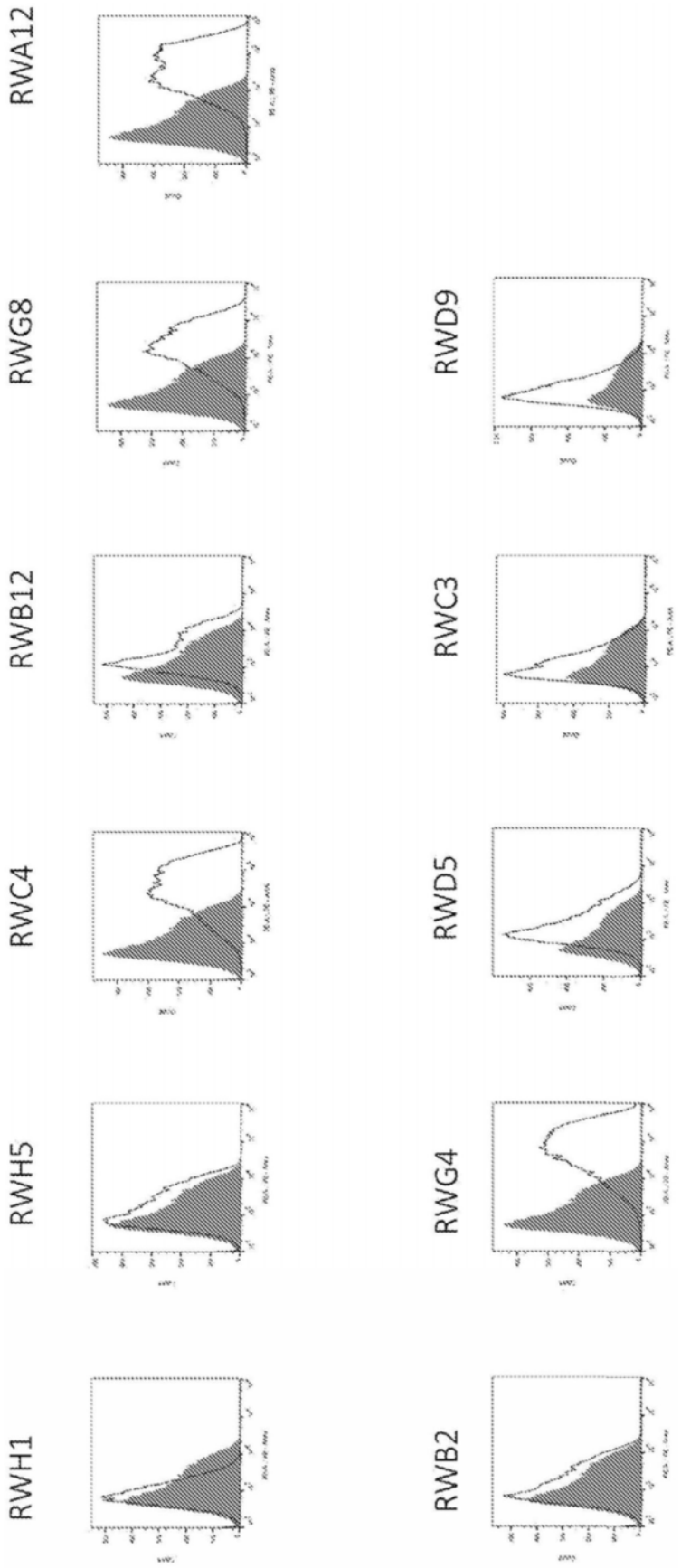


图10

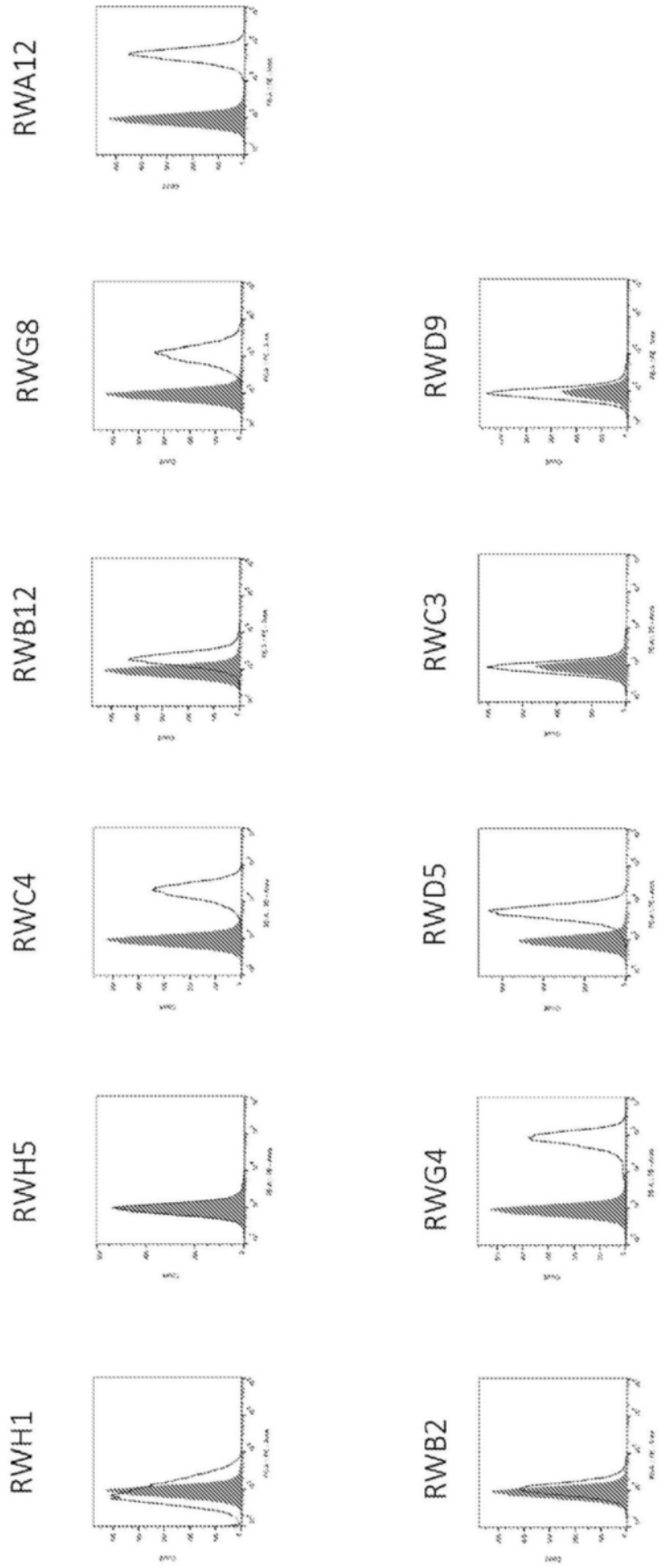


图11

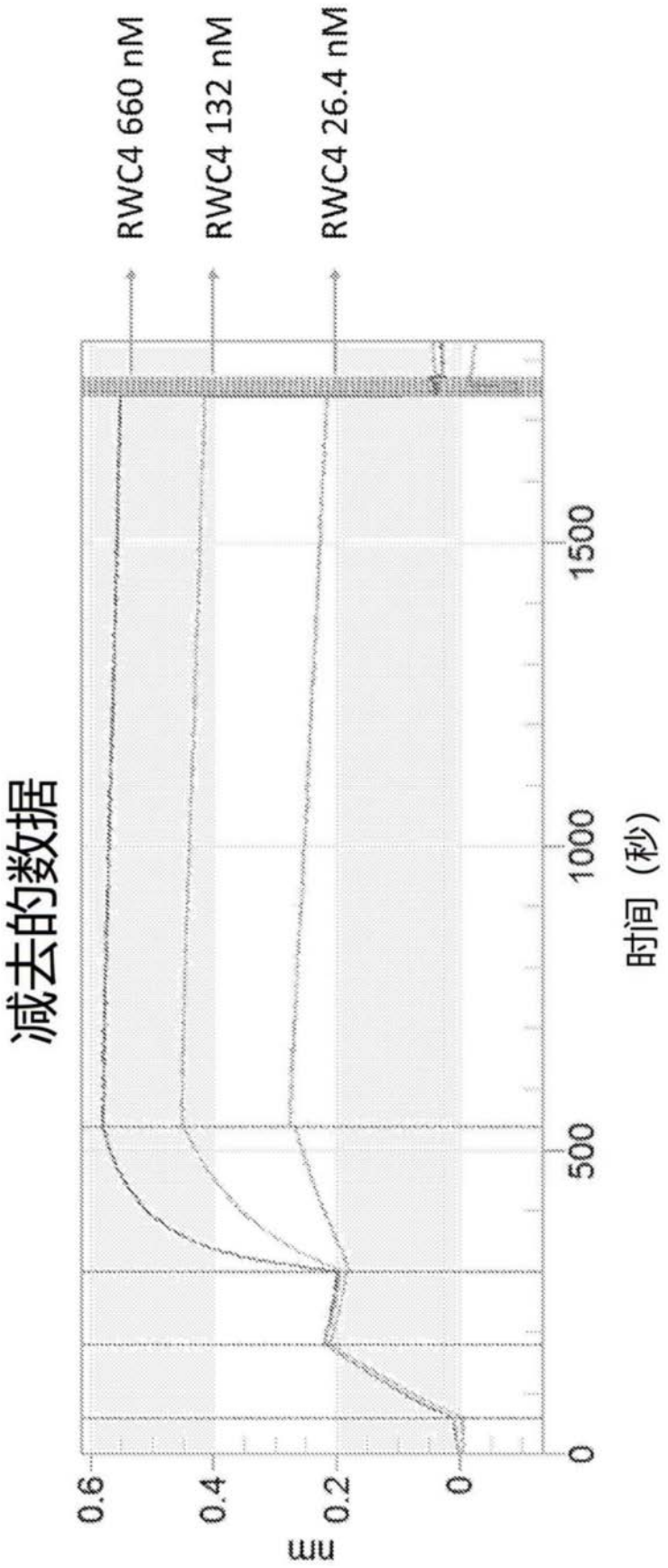

RWC4 660 nM
RWC4 132 nM
RWC4 26.4 nM
减去的数据
nm
0.6
0.4
0.2
0
0
500
1000
1500
时间（秒）

图12

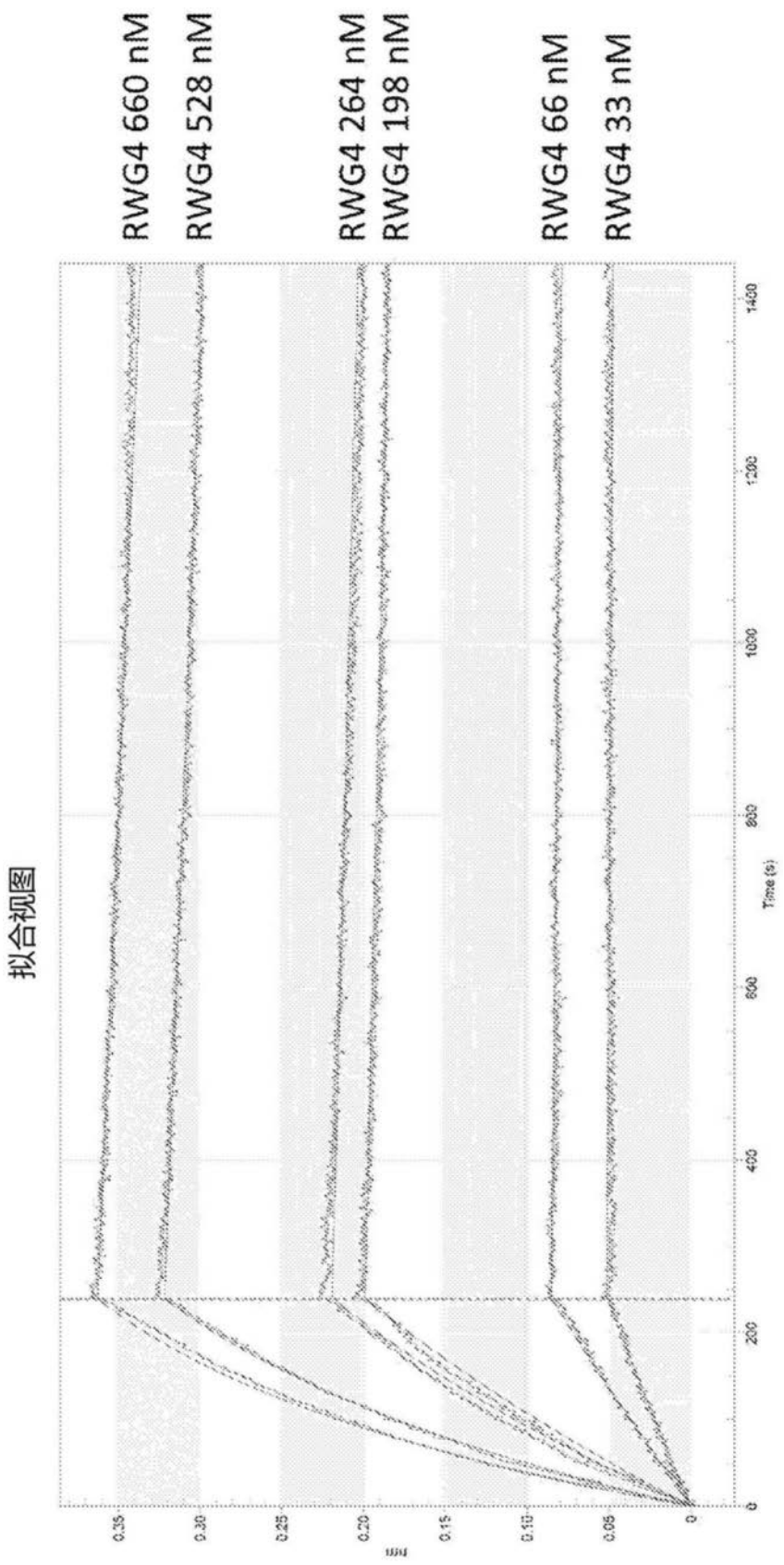

拟合视图
RWG4 660 nM
RWG4 528 nM
RWG4 264 nM
RWG4 198 nM
RWG4 66 nM
RWG4 33 nM
RU
Time (s)
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0

图13

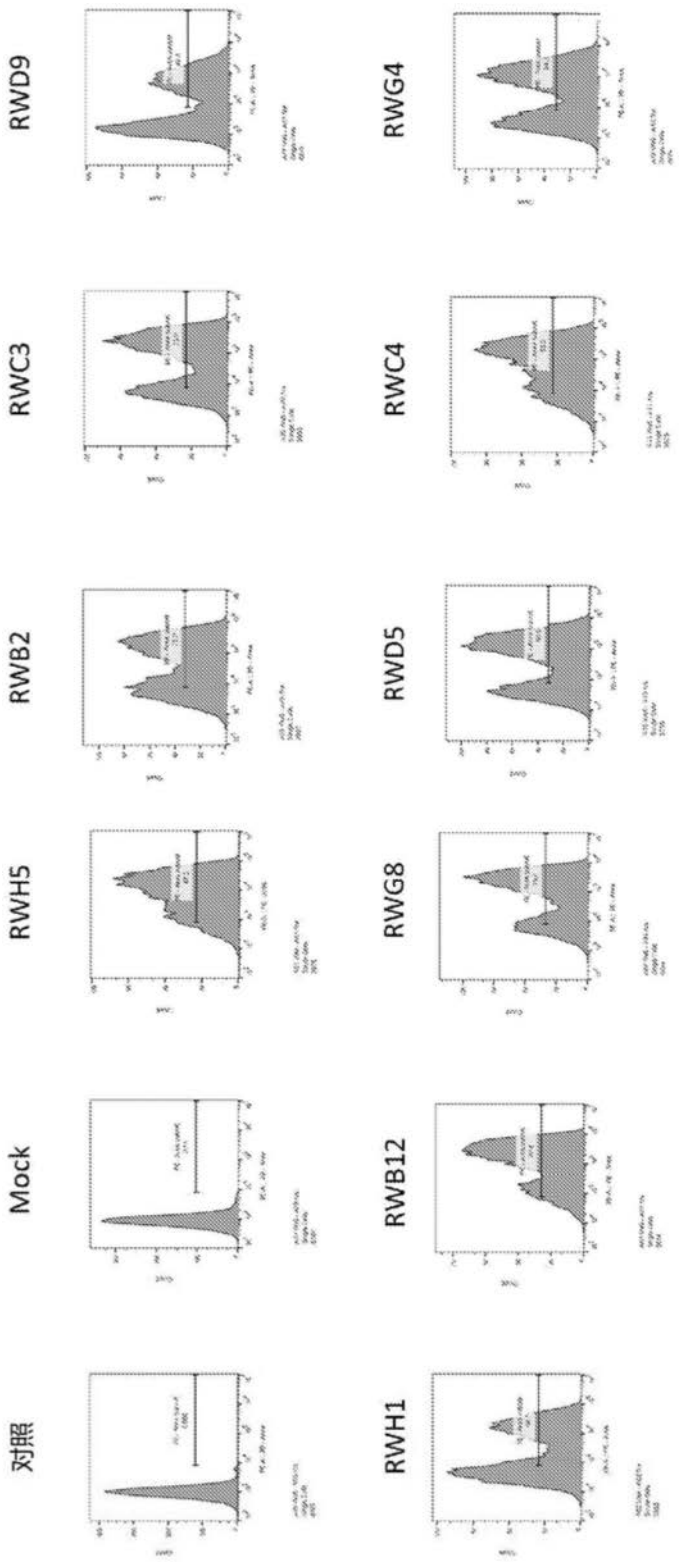


图14

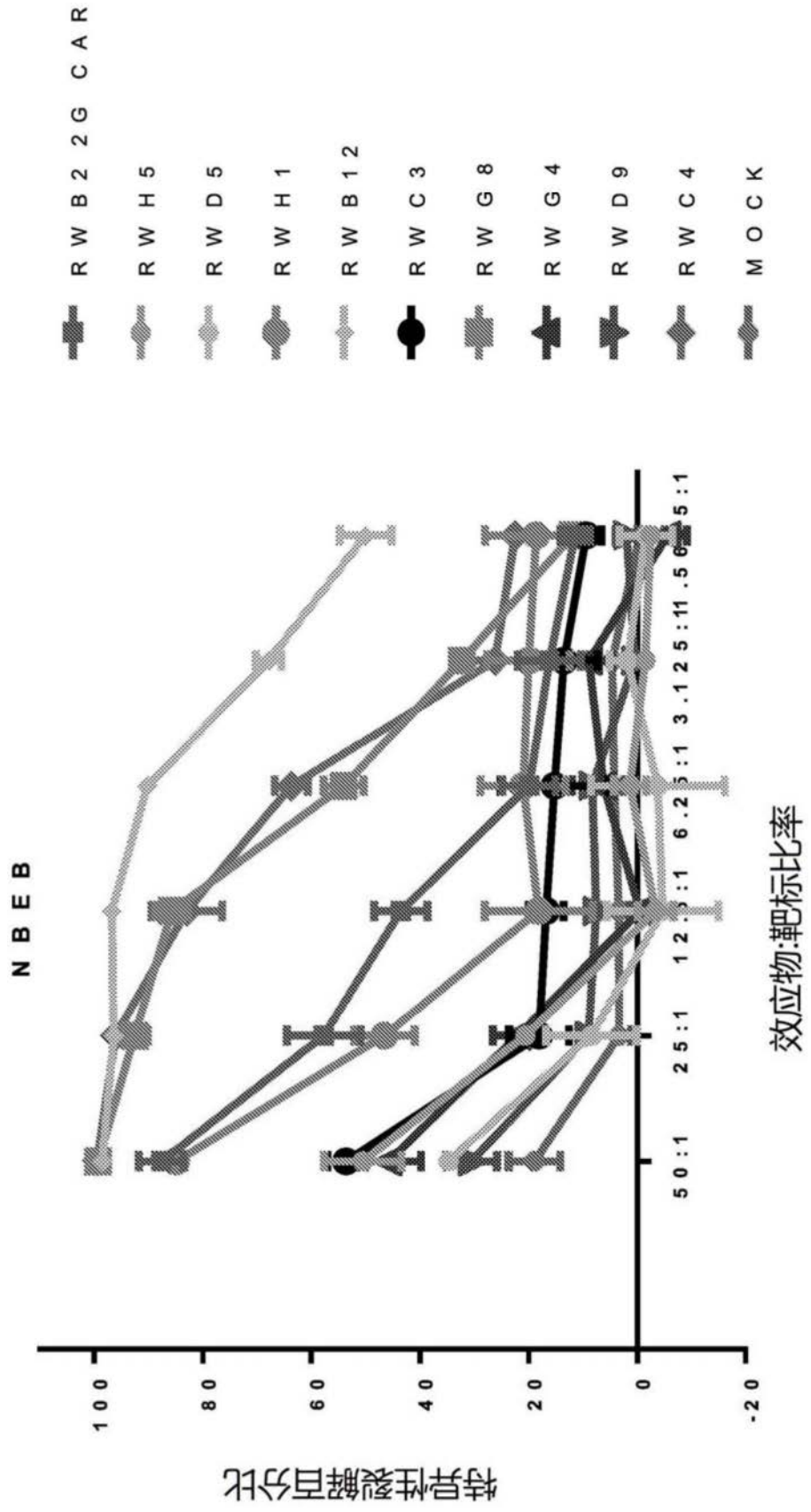

RWB22G CAR
RWH5
RWD5
RWH1
RWB12
RWC3
RWG8
RWG4
RWD9
RWC4
MOCK
NBEB
100
80
60
40
20
0
-20
特异性裂解百分比
50:1
25:1
12.5:1
6.25:1
3.125:1
1.56:1
效应物:靶标比率

图15A

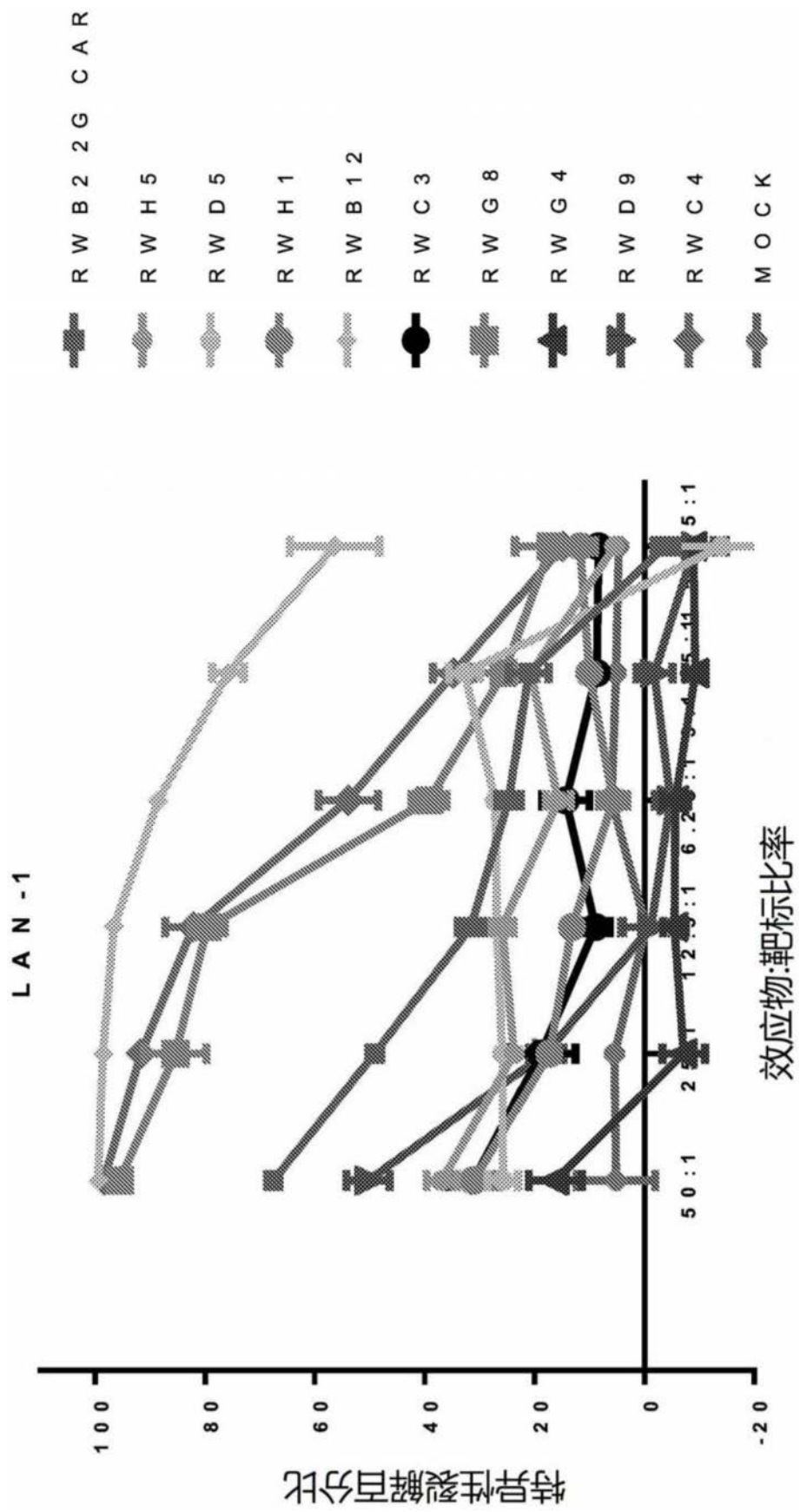

RWB22G CAR
RWH5
RWD5
RWH1
RWB12
RWC3
RWG8
RWG4
RWD9
RWC4
MOCK
LAN-1
特异性裂解百分比
效应物:靶标比率
100
80
60
40
20
0
-20
50:1
25:1
12.5:1
6.25:1
3.13:1
1.56:1

图15B

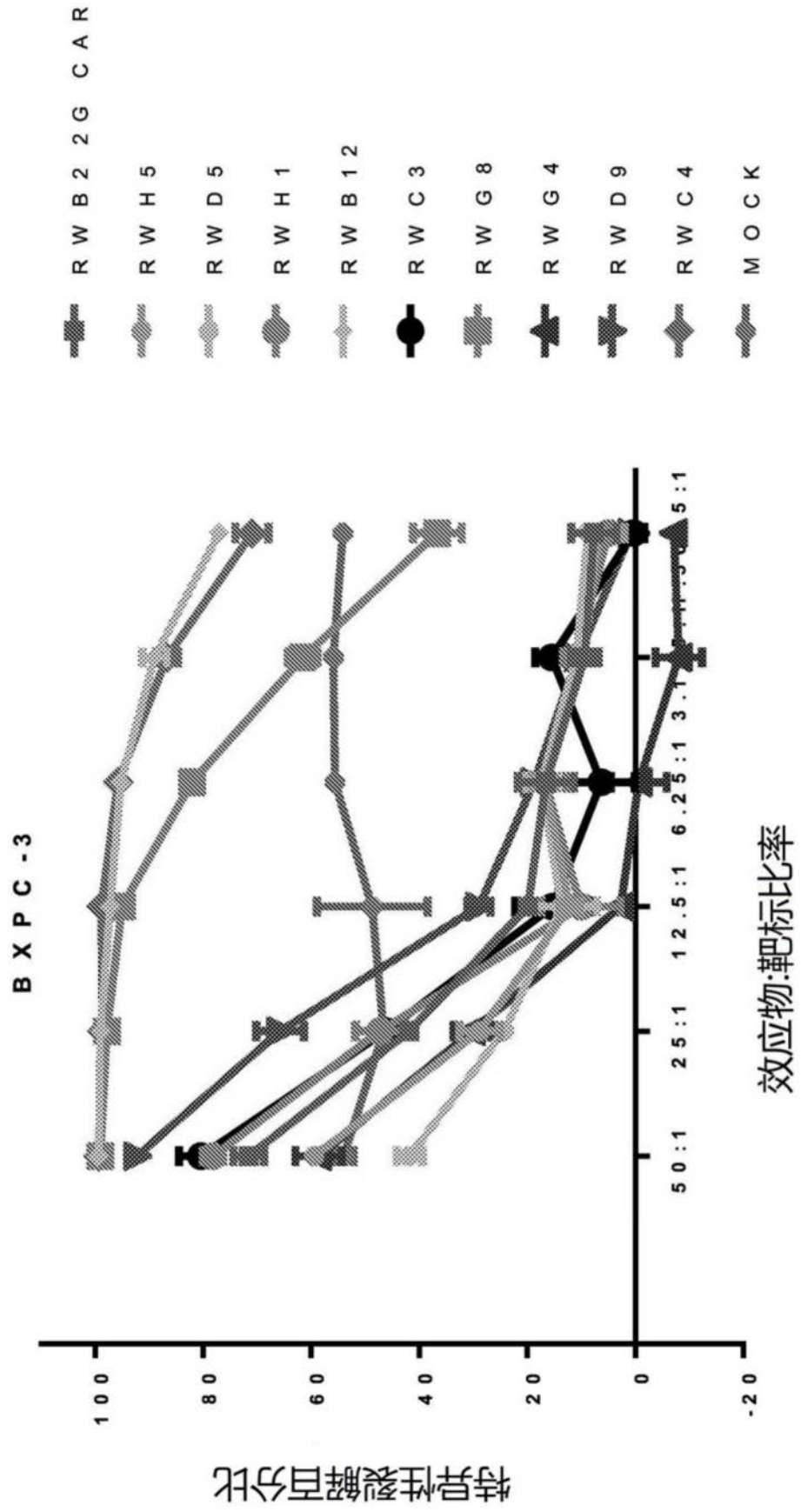

RWB22G CAR
RWH5
RWD5
RWH1
RWB12
RWC3
RWG8
RWG4
RWD9
RWC4
MOCK
BXPC-3
特异性裂解百分比
100
80
60
40
20
0
-20
50:1
25:1
12.5:1
6.25:1
3.1
5:1
效应物:靶标比率

图15C

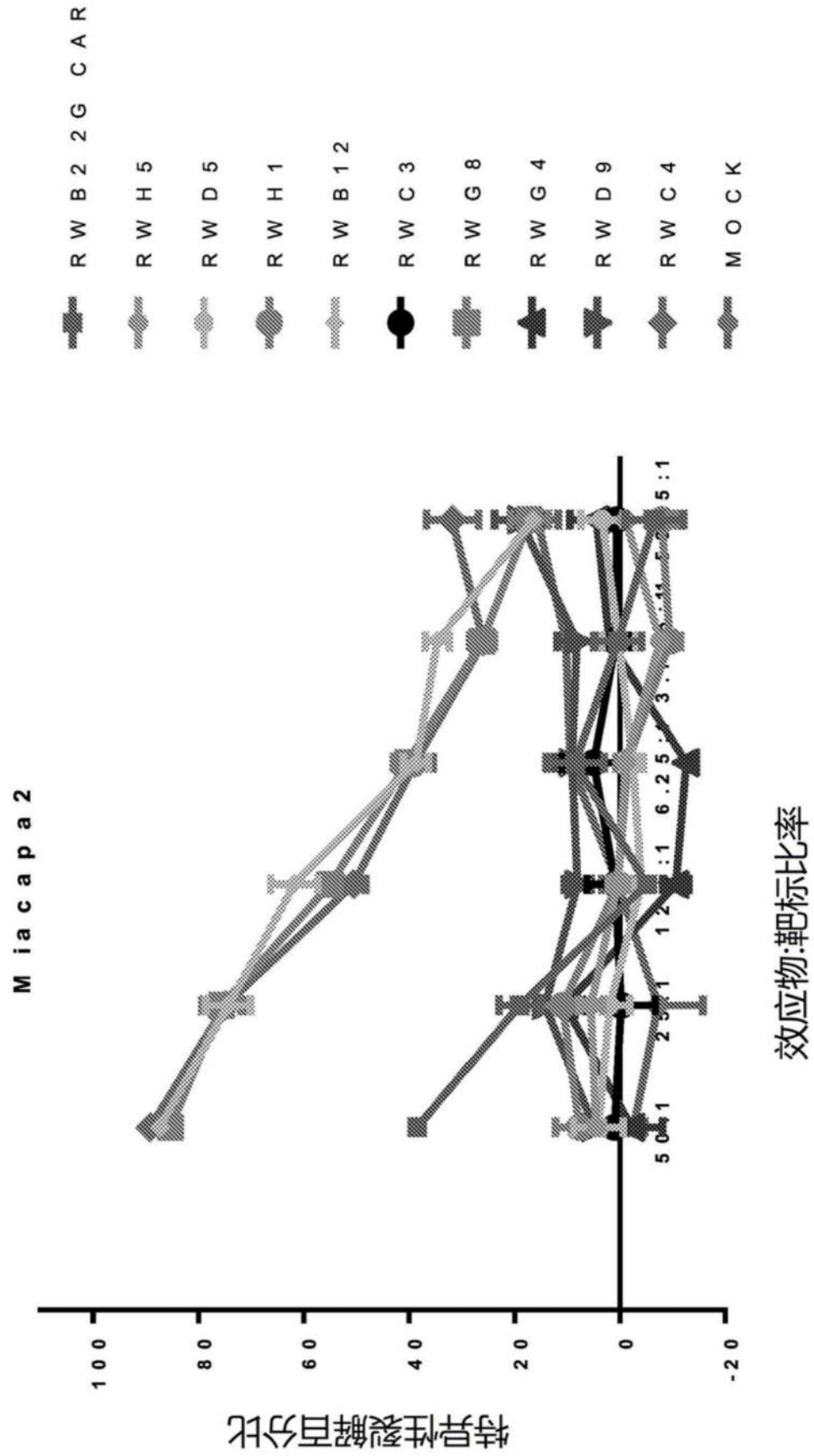

RWB22G CAR
RWH5
RWD5
RWH1
RWB12
RWC3
RWG8
RWG4
RWD9
RWC4
MOCK
Miacapa2
特异性裂解百分比
100
80
60
40
20
0
-20
效应物:靶标比率
5:1
1:1 6.25
1 2
1
2.5 1
5 0.1

图15D

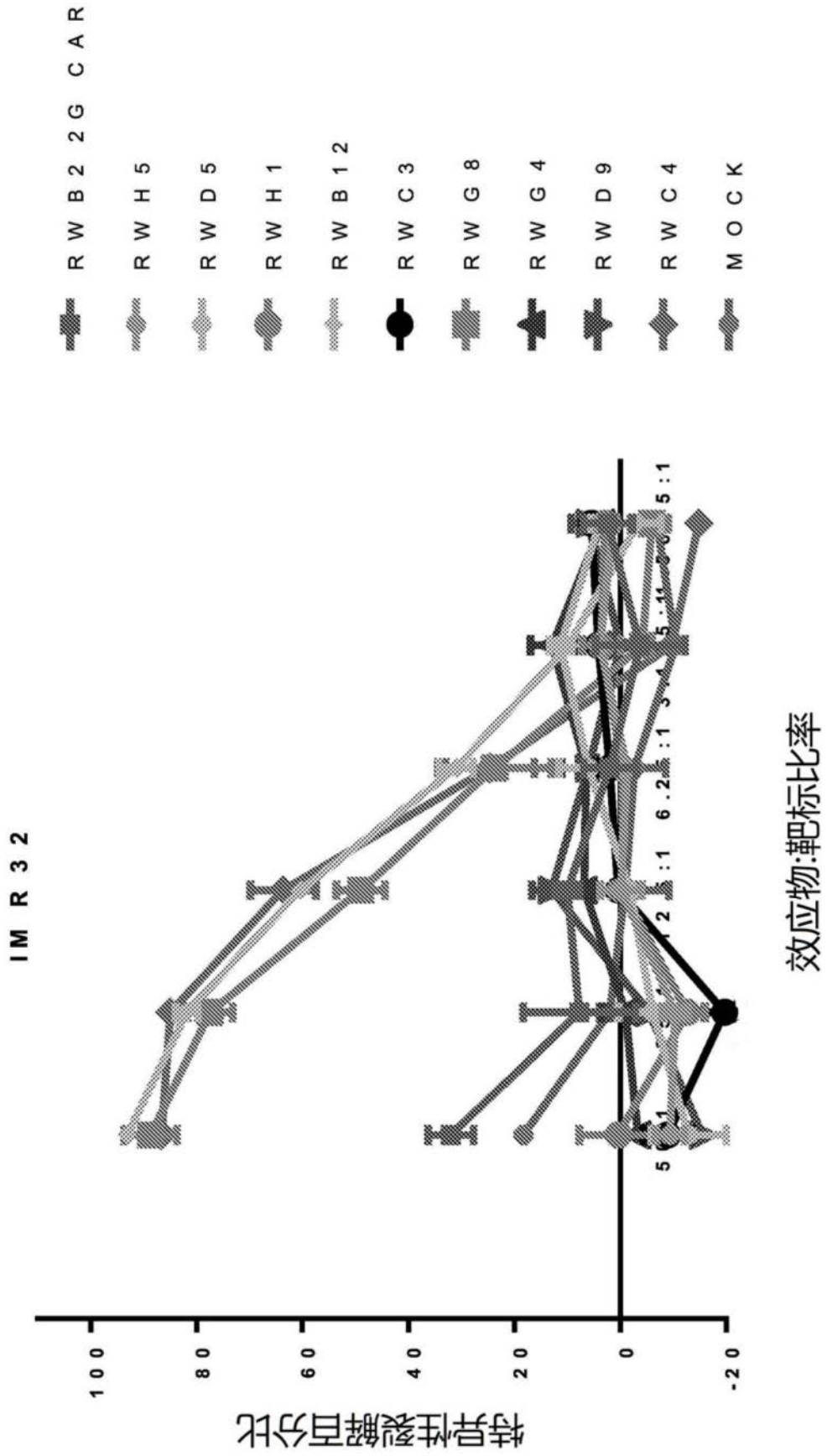

RWB22G CAR
RWH5
RWD5
RWH1
RWB12
RWC3
RWG8
RWG4
RWD9
RWC4
MOCK
IMR32
特异性裂解百分比
100
80
60
40
20
0
-20
效应物:靶标比率

图16A

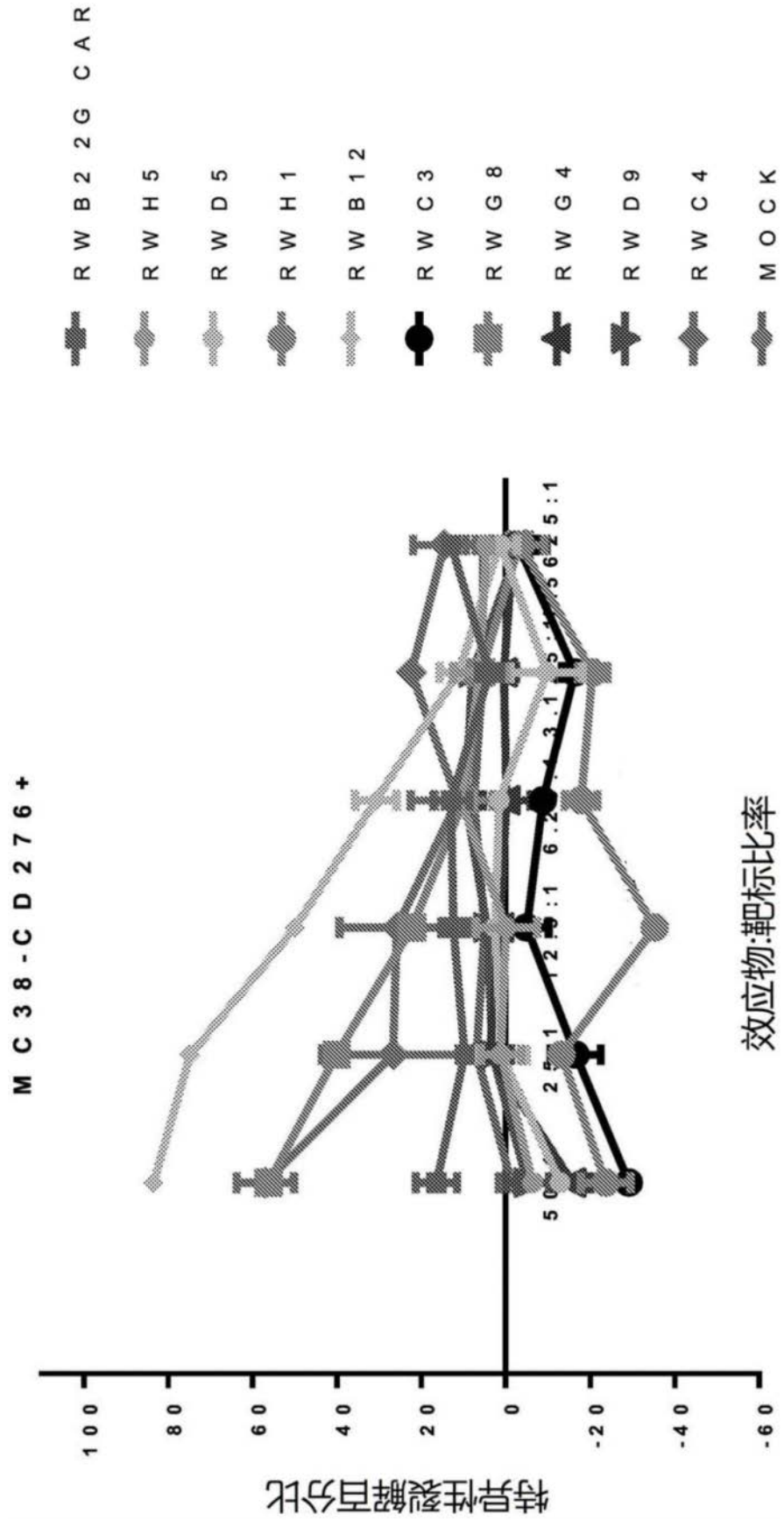

RWB22G CAR
RWH5
RWD5
RWH1
RWB12
RWC3
RWG8
RWG4
RWD9
RWC4
MOCK
MC38-CD276+
效应物:靶标比率
特异性裂解百分比
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-60

图16B

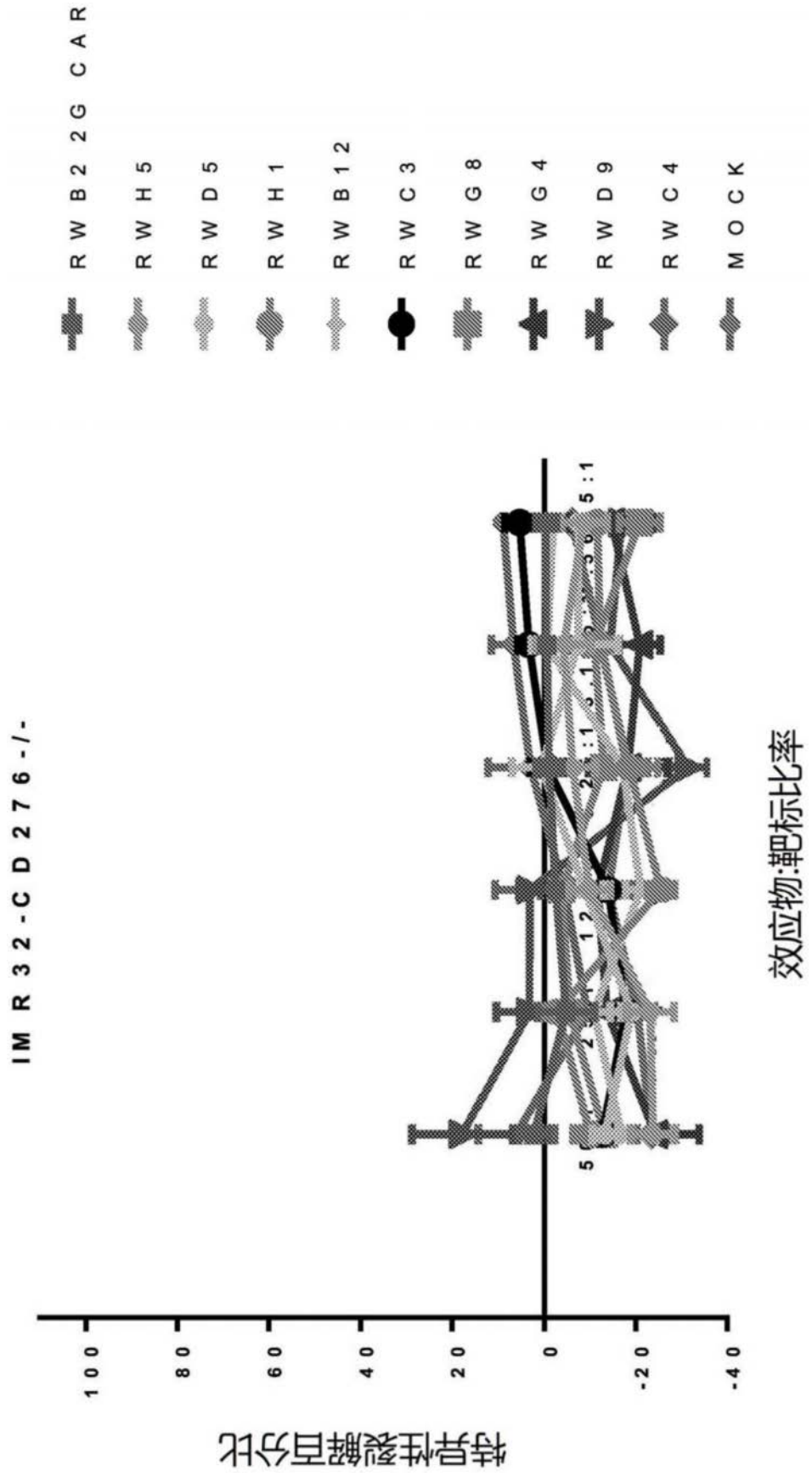

RWB22G CAR
RWH5
RWD5
RWH1
RWB12
RWC3
RWG8
RWG4
RWD9
RWC4
MOCK
IMR32-CD276-/-
特异性裂解百分比
100
80
60
40
20
0
-20
-40
效应物:靶标比率
5:1

图16C

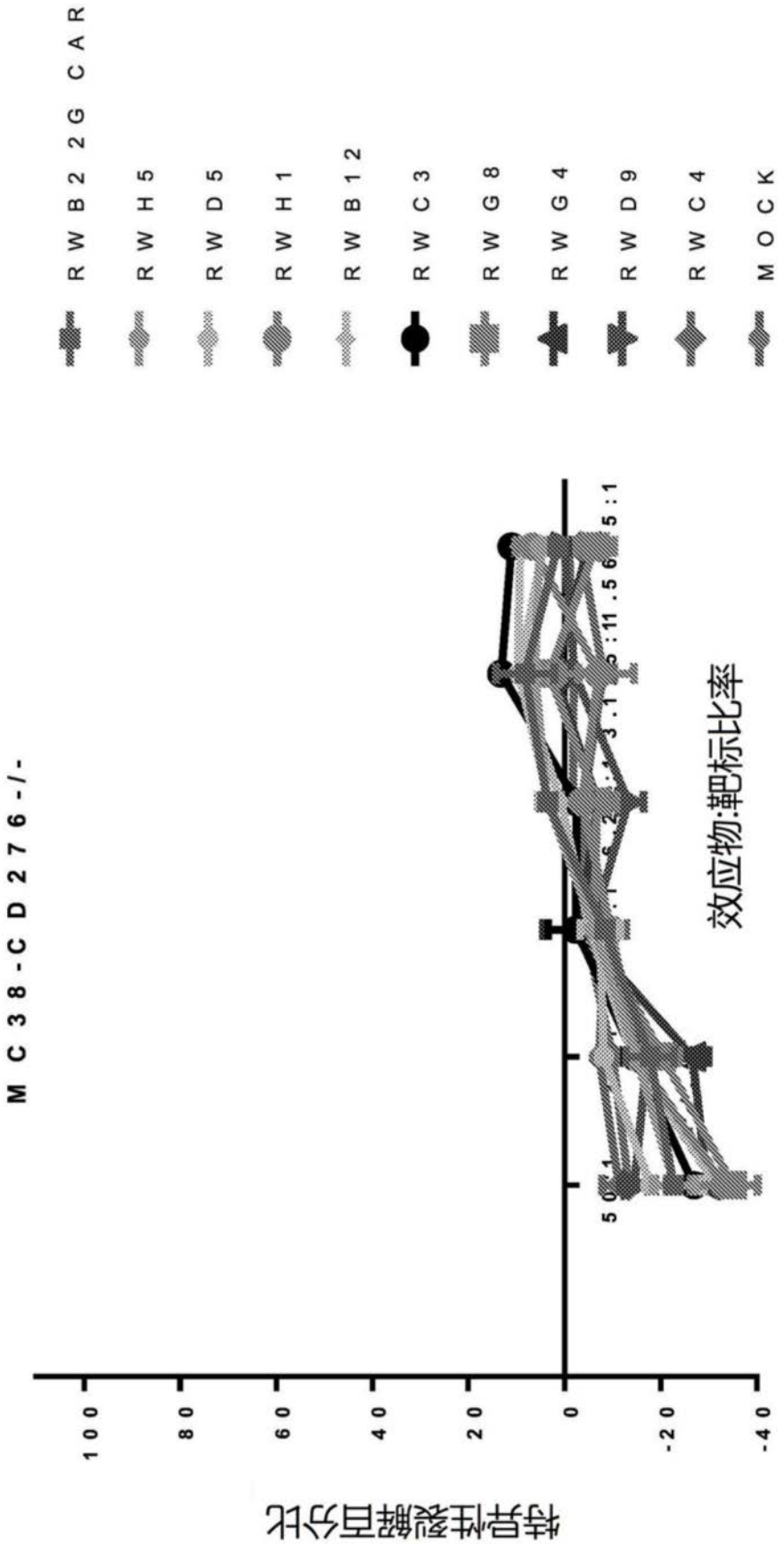

RWB22G CAR
RWH5
RWD5
RWH1
RWB12
RWC3
RWG8
RWG4
RWD9
RWC4
MOCK
MC38-CD276-/-
效应物:靶标比率
特异性裂解百分比
100
80
60
40
20
0
-20
-40

图16D

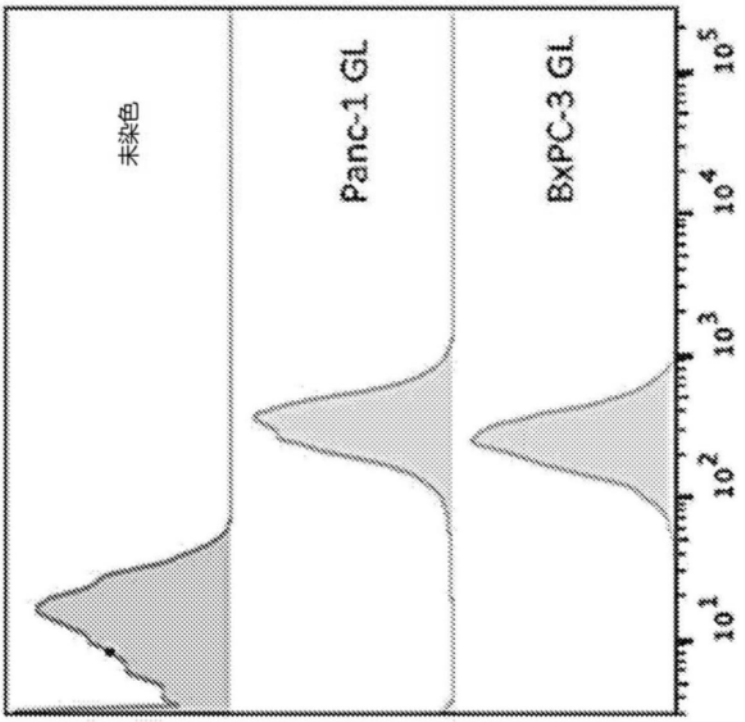

未染色
Panc-1 GL
BxPC-3 GL
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5

图17A

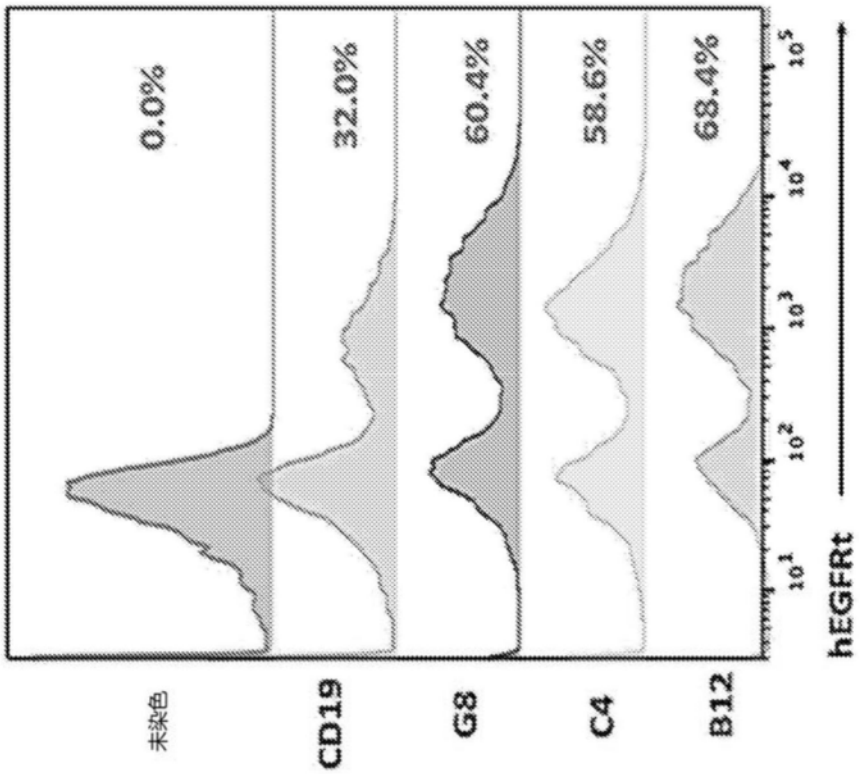

0.0%
32.0%
60.4%
58.6%
68.4%
未染色
CD19
G8
C4
B12
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
hEGFRt

图17B

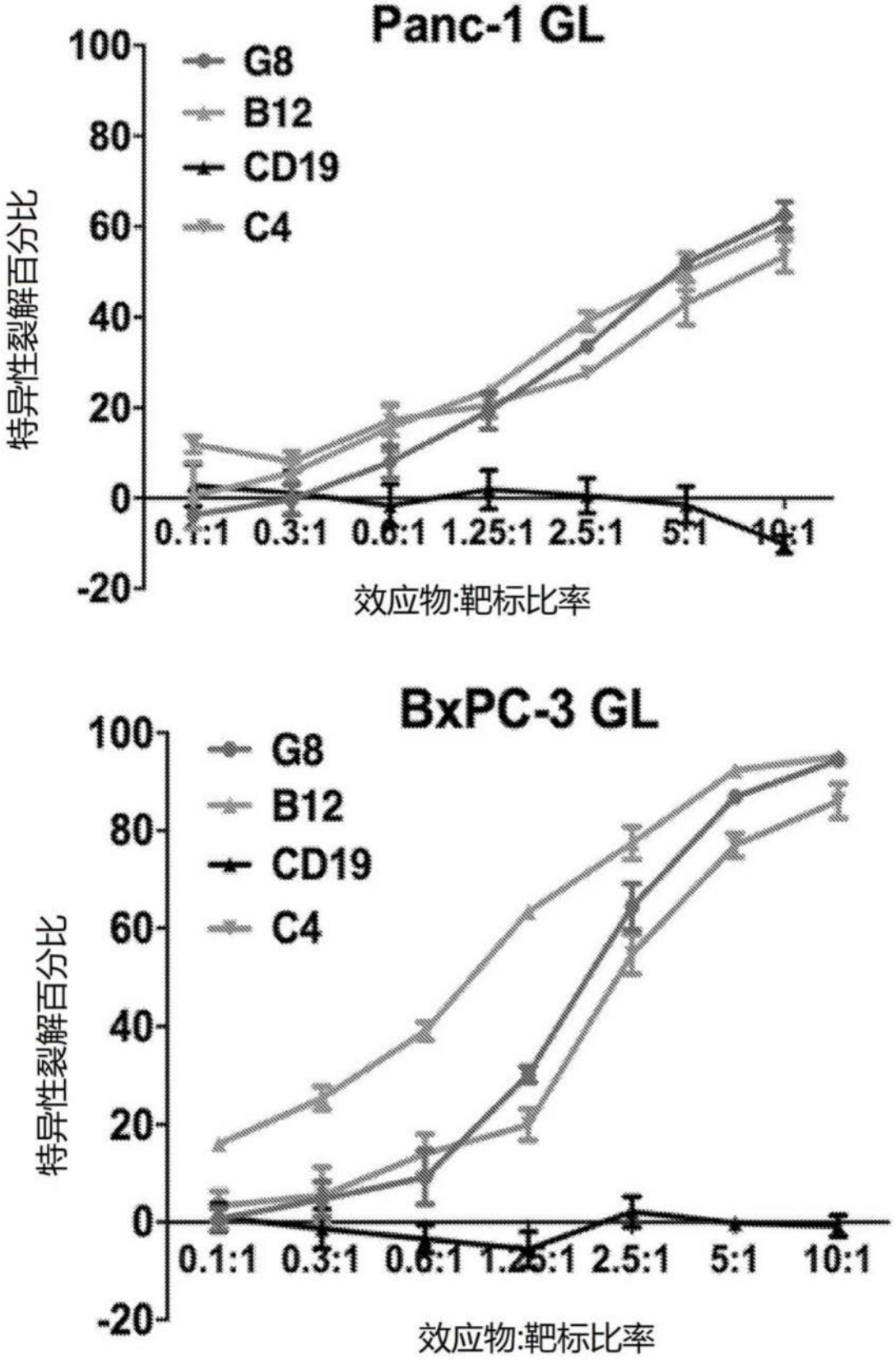

Panc-1 GL
G8
B12
CD19
C4
特异性裂解百分比
100
80
60
40
20
0
-20
0.1:1
0.3:1
0.6:1
1.25:1
2.5:1
5:1
10:1
效应物:靶标比率
BxPC-3 GL
G8
B12
CD19
C4
特异性裂解百分比
100
80
60
40
20
0
-20
0.1:1
0.3:1
0.6:1
1.25:1
2.5:1
5:1
10:1
效应物:靶标比率

图17C

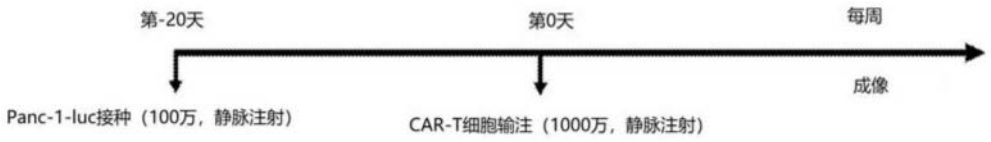

第-20天
第0天
每周
成像
Panc-1-luc接种（100万，静脉注射）
CAR-T细胞输注（1000万，静脉注射）

图18A

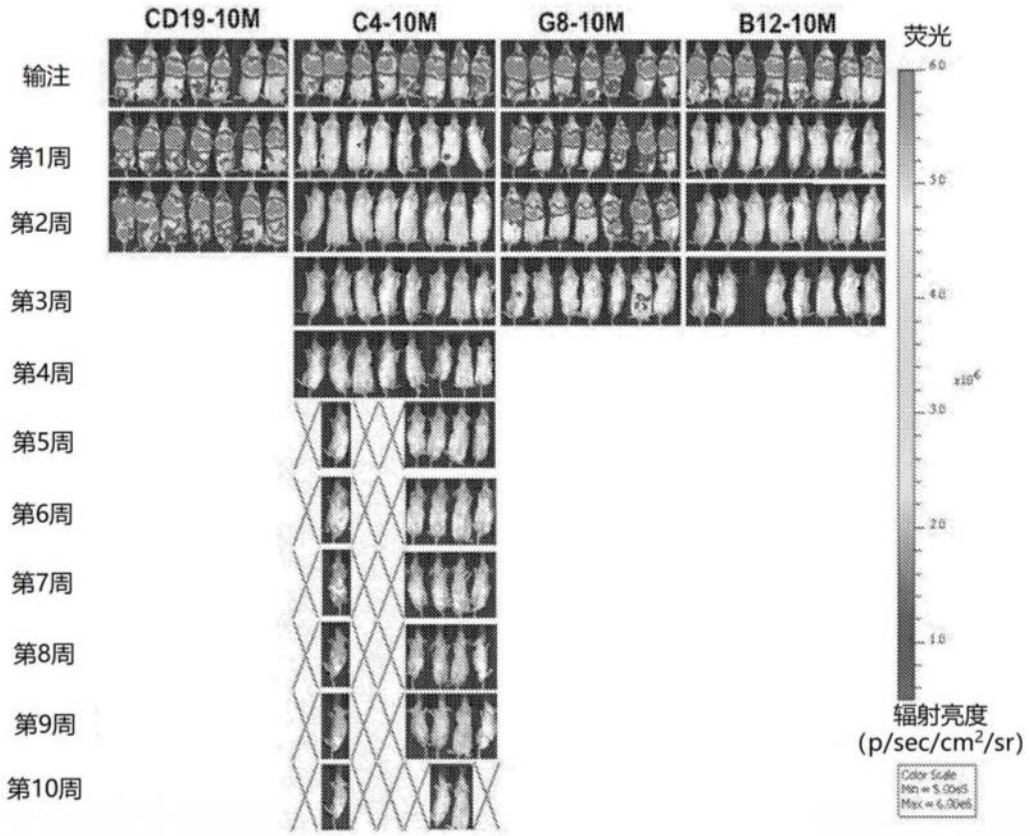

CD19-10M
C4-10M
G8-10M
B12-10M
荧光
输注
第1周
第2周
第3周
第4周
第5周
第6周
第7周
第8周
第9周
第10周
辐射亮度
(p/sec/cm²/sr)

图18B

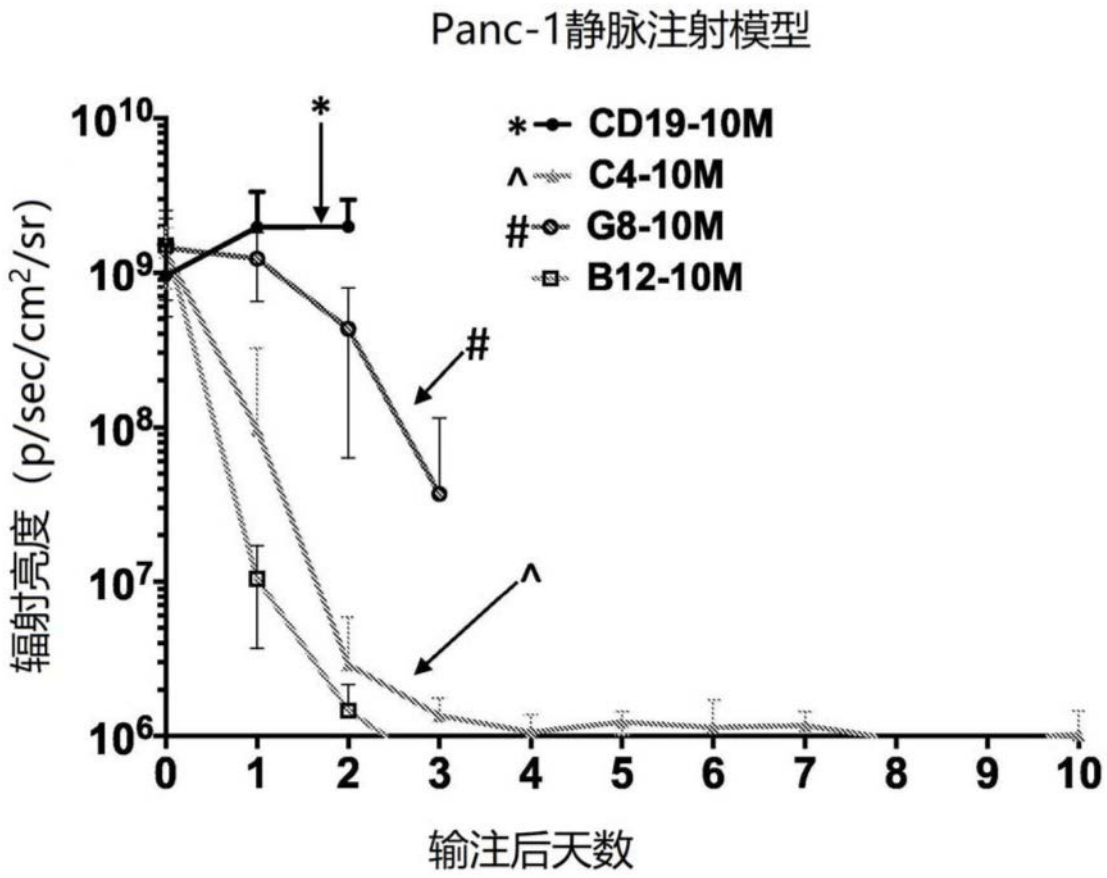

Panc-1静脉注射模型
辐射亮度（p/sec/cm²/sr）
输注后天数
CD19-10M
C4-10M
G8-10M
B12-10M
*
#
^

图18C

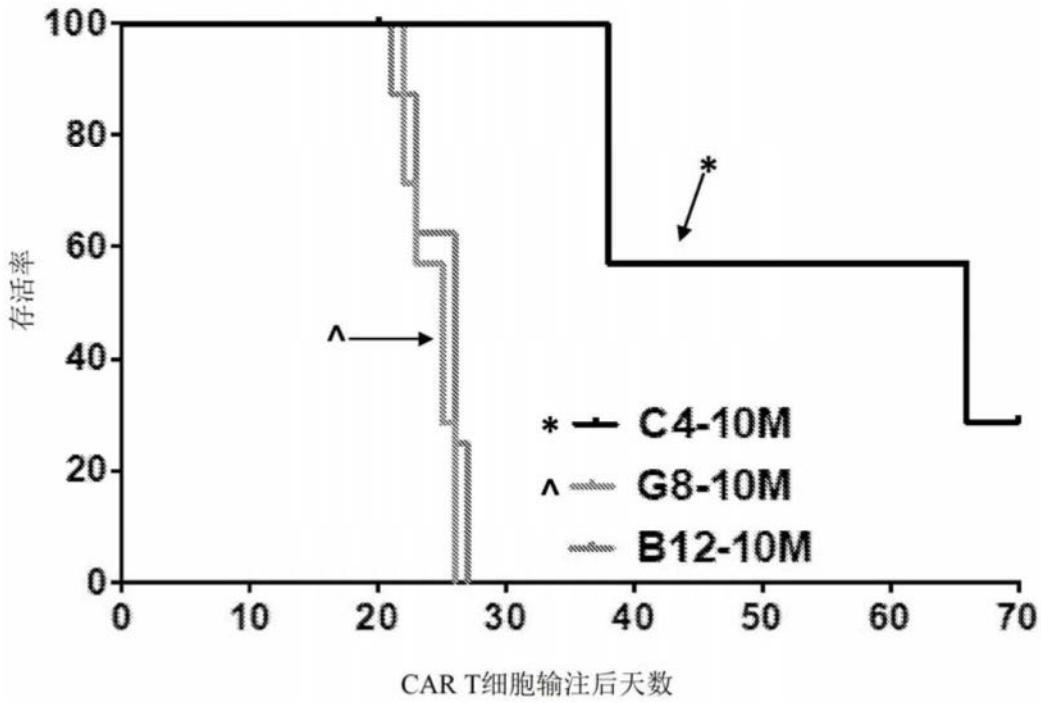

存活率
CAR T细胞输注后天数
C4-10M
G8-10M
B12-10M
*
^

图18D

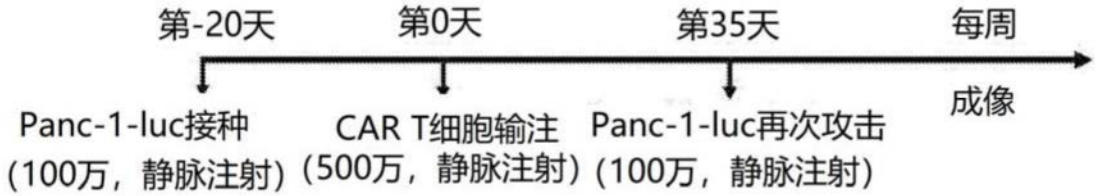

第-20天
第0天
第35天
每周
成像
Panc-1-luc接种
(100万，静脉注射)
CAR T细胞输注
(500万，静脉注射)
Panc-1-luc再次攻击
(100万，静脉注射)

图19A

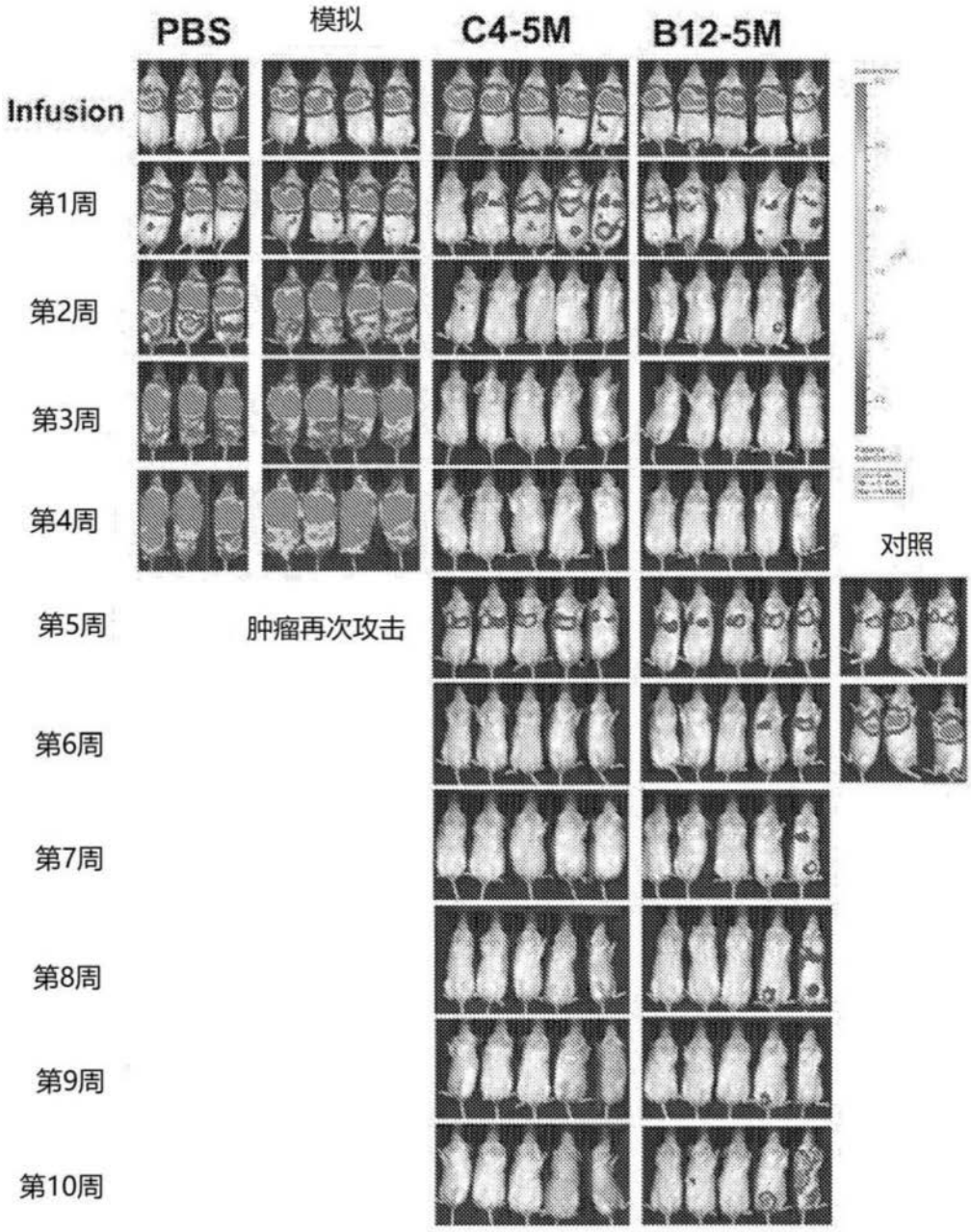

PBS
模拟
C4-5M
B12-5M
Infusion
第1周
第2周
第3周
第4周
第5周
第6周
第7周
第8周
第9周
第10周
肿瘤再次攻击
对照

图19B

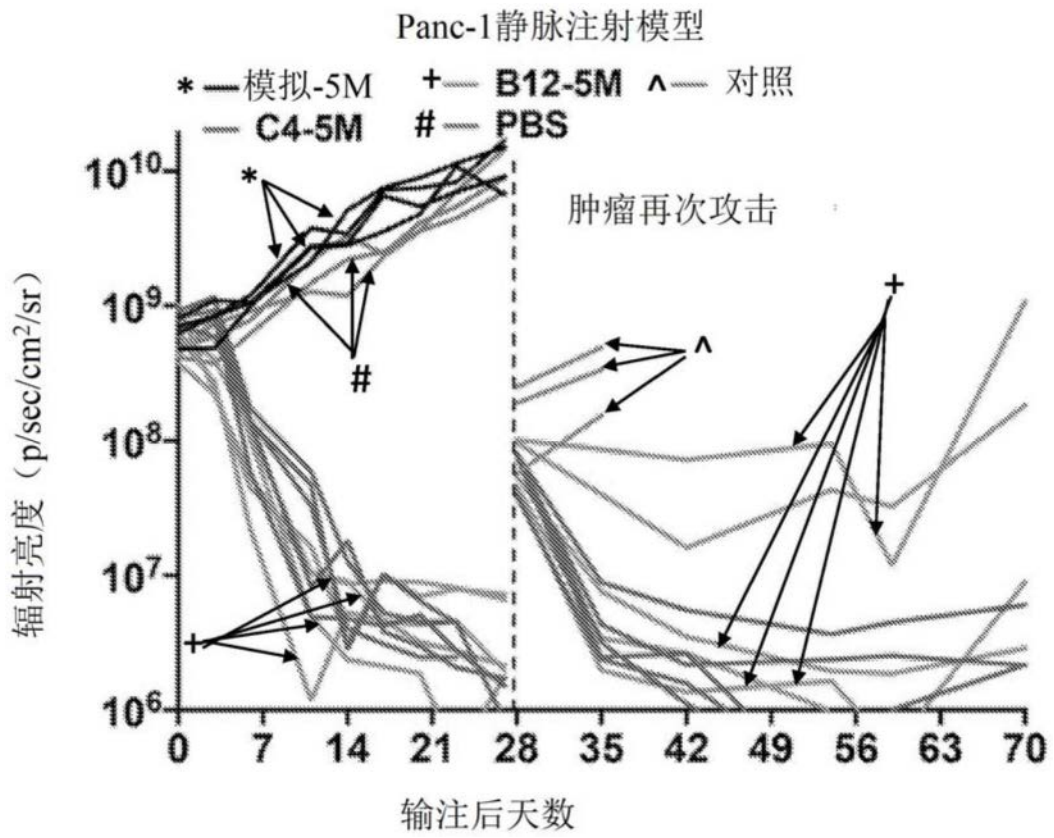

Panc-1静脉注射模型
*—模拟-5M
+— B12-5M
^— 对照
— C4-5M
#— PBS
肿瘤再次攻击
辐射亮度（p/sec/cm²/sr）
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70
输注后天数

图19C

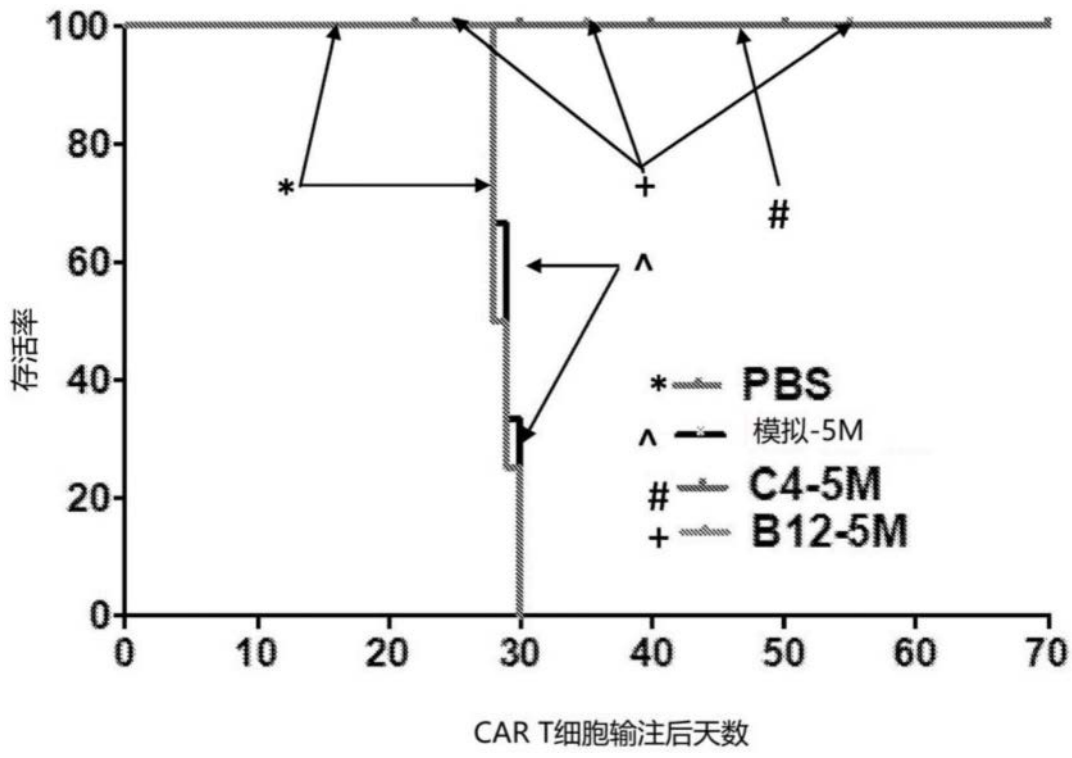

存活率
100
80
60
40
20
0
0 10 20 30 40 50 60 70
CAR T细胞输注后天数
*— PBS
^— 模拟-5M
#— C4-5M
+— B12-5M

图19D

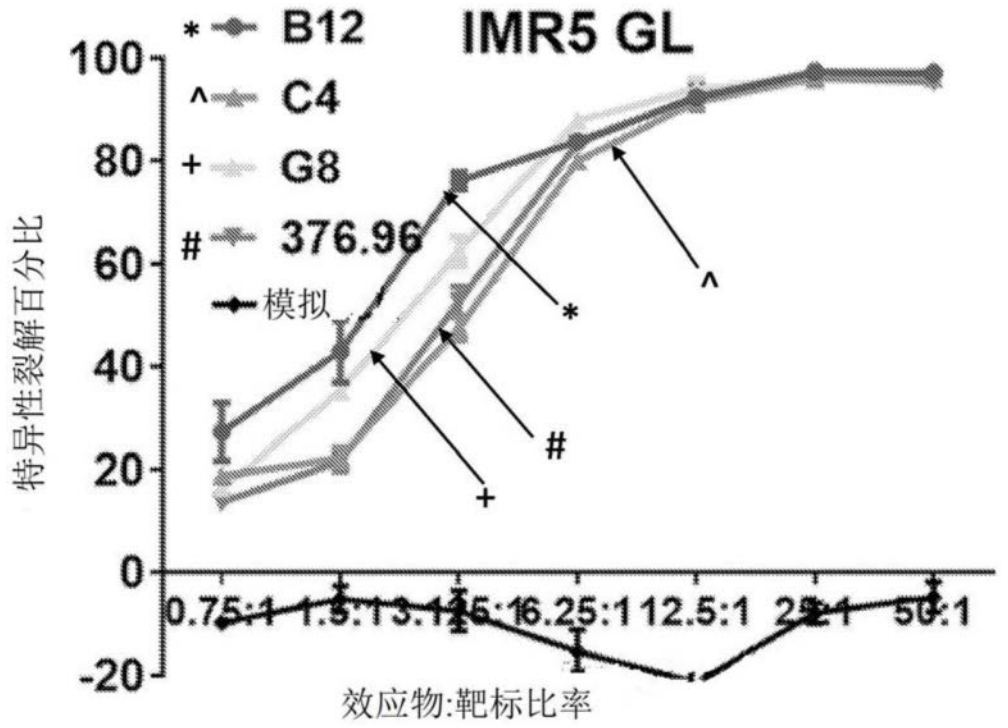

IMR5 GL
* B12
^ C4
+ G8
# 376.96
模拟
特异性裂解百分比
100
80
60
40
20
0
-20
0.75:1
1.5:1
3.125:1
6.25:1
12.5:1
25:1
50:1
效应物:靶标比率

图20A

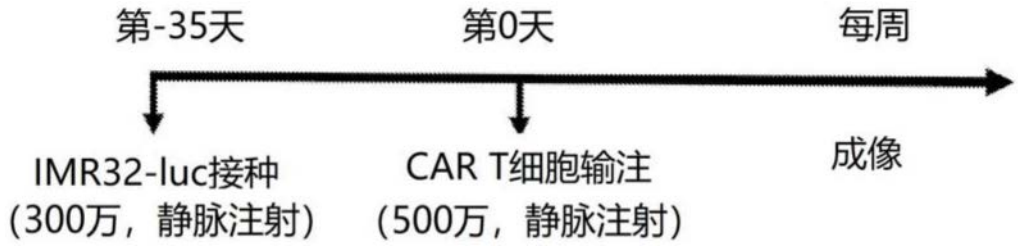

第-35天
第0天
每周
IMR32-luc接种
(300万，静脉注射)
CAR T细胞输注
(500万，静脉注射)
成像

图20B

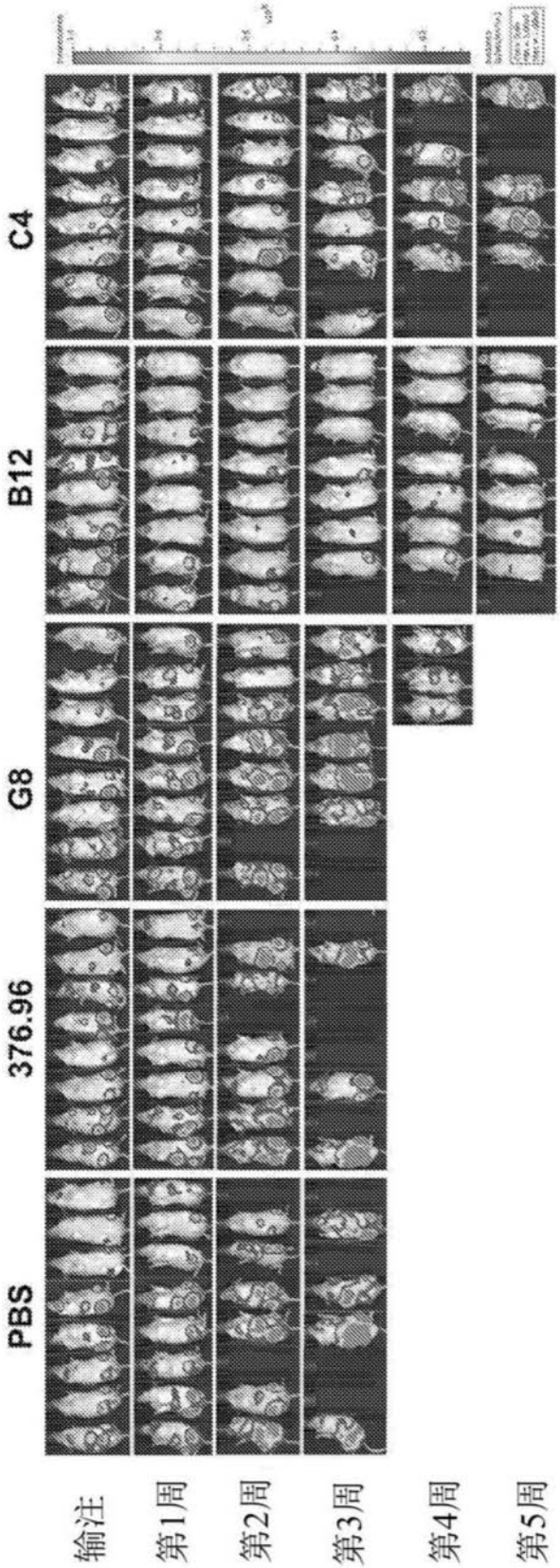


图20C

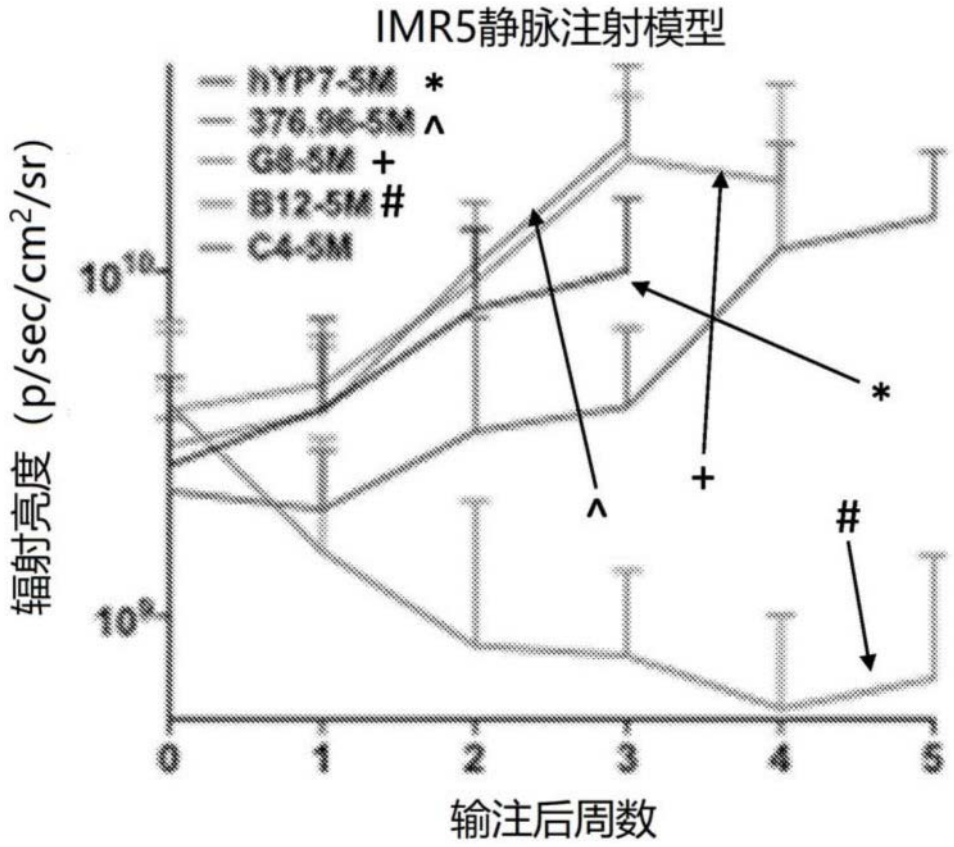

IMR5静脉注射模型
hYP7-5M *
376.96-5M ^
G8-5M +
B12-5M #
C4-5M
辐射亮度（p/sec/cm²/sr）
10¹⁰
10⁹
0
1
2
3
4
5
输注后周数
*
+
^
#

图20D

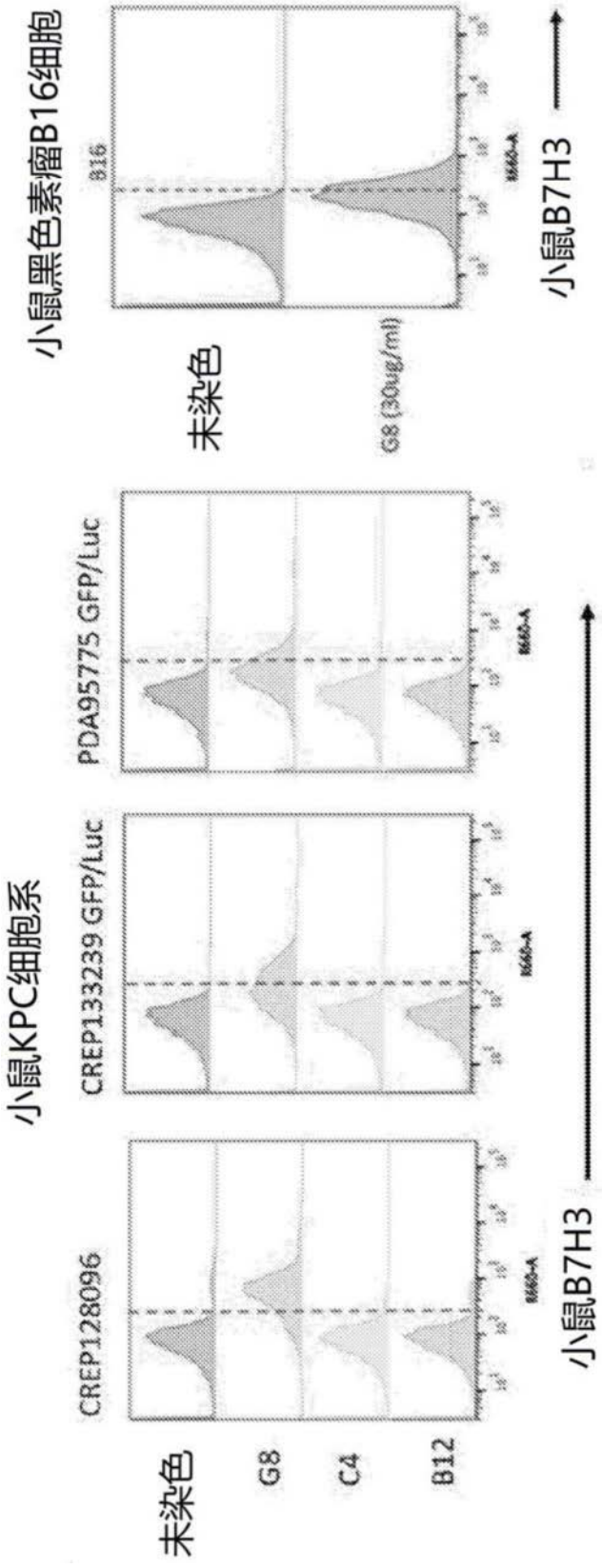

小鼠黑色素瘤B16细胞
B16
未染色
G8 (30ug/ml)
小鼠B7H3
小鼠KPC细胞系
CREP128096
CREP133239 GFP/Luc
PDA95775 GFP/Luc
未染色
G8
C4
B12
小鼠B7H3

图21A

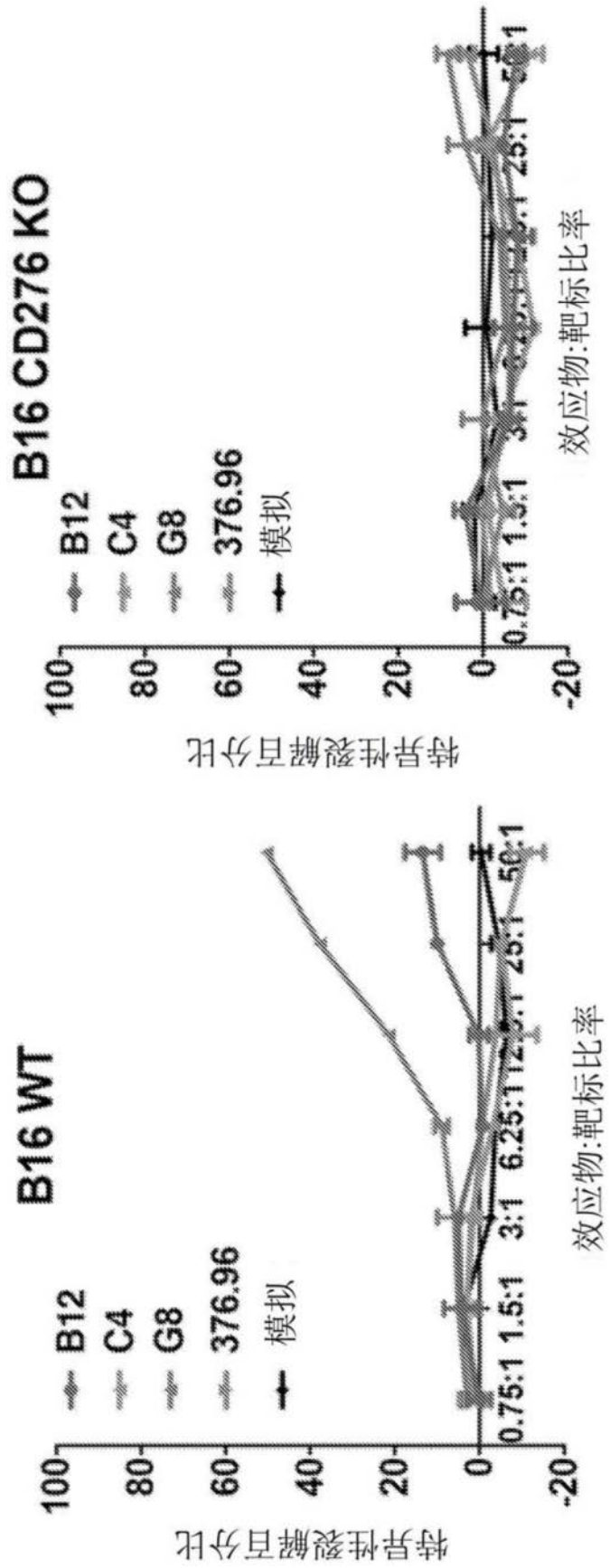

B16 CD276 KO
B12
C4
G8
376.96
模拟
特异性裂解百分比
效应物:靶标比率
0.75:1
1.5:1
3:1
6.25:1
12.5:1
25:1
50:1
100
80
60
40
20
0
-20
B16 WT
B12
C4
G8
376.96
模拟
特异性裂解百分比
效应物:靶标比率
0.75:1
1.5:1
3:1
6.25:1
12.5:1
25:1
50:1
100
80
60
40
20
0
-20

图21B

肽	G8			B12			C4			376.96		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
#1	0.0622	0.0666	0.0623	0.0582	0.0581	0.0574	0.0594	0.0578	0.0612	0.0681	0.0675	0.0838
#2	0.059	0.0528	0.0553	0.0481	0.0468	0.0465	0.0519	0.0467	0.0481	0.0566	0.0548	0.0545
#3	0.0484	0.0449	0.0469	0.044	0.0431	0.0436	0.0436	0.0436	0.0422	0.0527	0.0533	0.0511
#4	0.0463	0.0487	0.0467	0.0446	0.0431	0.0439	0.0437	0.0475	0.0461	0.0548	0.0552	0.0533
#5	0.0461	0.0434	0.041	0.0397	0.0384	0.0428	0.0622	0.043	0.0376	0.0434	0.0425	0.0446
#6	0.0515	0.0446	0.0438	0.0416	0.042	0.0417	0.0418	0.043	0.0417	0.0477	0.0466	0.0488
#7	0.0529	0.0485	0.0488	0.0485	0.0467	0.0635	0.0467	0.0466	0.0665	0.0526	0.0513	0.0647
#8	0.0533	0.0489	0.0493	0.048	0.1204	0.0561	0.0479	0.0477	0.0464	0.0515	0.0517	0.0605

肽	G8			B12			C4			376.96		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
#9	0.0717	0.0673	0.0861	0.0872	0.06	0.0598	0.0598	0.0601	0.0619	0.0706	0.0692	0.0686
#10	0.1979	0.1872	0.1878	0.0657	0.0639	0.0653	0.0637	0.0616	0.0628	0.2409	0.2405	0.2399
#11	0.1404	0.1008	0.1031	0.0682	0.0688	0.069	0.0701	0.0659	0.0667	0.1052	0.1036	0.1066
#12	0.0712	0.0577	0.0803	0.0437	0.0455	0.0572	0.0438	0.0493	0.0605	0.0576	0.0582	0.0578
#13	0.0486	0.0477	0.0461	0.0398	0.0418	0.0391	0.0384	0.0394	0.0372	0.0461	0.0448	0.0477
#14	0.0625	0.05	0.0516	0.0414	0.0444	0.0414	0.0414	0.0425	0.0418	0.0508	0.0511	0.0519
#15	0.1137	0.1005	0.1012	0.0489	0.0472	0.0509	0.0472	0.0501	0.0459	0.1003	0.0995	0.1055
#16	0.076	0.0707	0.0643	0.0475	0.047	0.049	0.0478	0.0508	0.0507	0.0927	0.088	0.0935

肽	G8			B12			C4			376.96		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
#17	0.0891	0.0889	0.0827	0.0576	0.0784	0.0596	0.0594	0.0618	0.0636	0.0794	0.08	0.0838
#18	0.0618	0.06	0.0638	0.0496	0.0472	0.0479	0.0465	0.0488	0.0487	0.06	0.0659	0.058
#19	0.0659	0.0581	0.0637	0.0432	0.0471	0.0436	0.0571	0.0434	0.0423	0.0569	0.0555	0.0571
#20	0.0574	0.05	0.0511	0.0434	0.0559	0.0429	0.0568	0.0433	0.0423	0.0501	0.0497	0.0516
#21	0.0456	0.0434	0.0449	0.0397	0.0405	0.0386	0.0385	0.0388	0.0378	0.0421	0.0443	0.0416
#22	0.0496	0.0469	0.0455	0.0418	0.0429	0.0414	0.0415	0.0415	0.0416	0.0498	0.0487	0.0479
#23	0.0647	0.0588	0.0581	0.0466	0.0459	0.046	0.0462	0.0459	0.0448	0.0584	0.0596	0.0632
#24	0.0753	0.0601	0.06	0.0503	0.0461	0.0476	0.0474	0.0472	0.0459	0.0581	0.1113	0.0592

肽	G8			B12			C4			376.96		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
#25	0.1199	0.108	0.187	0.0874	0.0935	0.0916	0.0981	0.0911	0.1014	0.1054	0.1091	0.1193
#26	0.0747	0.0811	0.0879	0.0525	0.0509	0.0494	0.0753	0.0537	0.0567	0.0703	0.0723	0.0773
#27	0.0516	0.0443	0.0432	0.0335	0.0312	0.0323	0.0359	0.0344	0.0314	0.0477	0.0461	0.047
#29	0.0421	0.0412	0.0403	0.0395	0.0399	0.0386	0.0392	0.04	0.0402	0.0405	0.0411	0.0401
#30	0.0445	0.057	0.0527	0.0412	0.0361	0.0351	0.0354	0.0353	0.0375	0.045	0.0429	0.0433
#39	0.0748	0.0639	0.0544	0.0518	0.0369	0.0772	0.0445	0.18	0.0541	0.0787	0.0824	0.0718
#40	0.0682	0.0573	0.0643	0.0434	0.0564	0.0484	0.045	0.0413	0.0555	0.0781	0.0769	0.0702
#44	0.0692	0.0626	0.0594	0.0446	0.0436	0.0438	0.0492	0.0435	0.0452	0.0674	0.0589	0.0629

肽	G8			B12			C4			376.96		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
#46	0.0963	0.1004	0.0938	0.0834	0.0967	0.0893	0.0891	0.0918	0.0975	0.1067	0.0936	0.1314
#47	0.0665	0.0652	0.0828	0.0531	0.0466	0.0494	0.0482	0.0489	0.0479	0.084	0.0628	0.0641
#48	0.0545	0.0449	0.0485	0.0418	0.0324	0.0333	0.042	0.0341	0.0319	0.0497	0.0476	0.0553
Control	0.0551	0.0604	0.0754	0.0414	0.0472	0.039	0.0396	0.0414	0.0382	0.0658	0.0689	0.0719
Control	0.0569	0.0547	0.0539	0.0381	0.0351	0.0366	0.04	0.0371	0.0354	0.0498	0.0482	0.0486

肽 # 10:QRVRVADEGSFTCFVSIR

肽 # 11:SFTCFVSIRDFGSAAVSL

肽 # 15:LRPGDTVTITCSSYQGYP

图21C

	B12			C4			G8			376.96		
大鼠	0.3718	0.4075	0.3594	0.0683	0.0688	0.0685	1.6838	1.7402	1.7262	0.9814	1.0111	1.0565
人类	0.1807	0.2104	0.1991	0.9761	0.9791	0.9377	0.1362	0.1473	0.1638	1.4823	1.5659	1.4414
猴子	0.1875	0.2006	0.1784	1.0019	1.0023	1.0413	0.1971	0.1984	0.1951	1.5898	1.5866	1.6533
小鼠-1 (msB7H3)	**0.0714**	**0.0683**	**0.0702**	**0.0616**	**0.0533**	**0.0488**	**0.2361**	**0.2327**	**0.2242**	**0.1402**	**0.1562**	**0.1332**
小鼠-2 (mB7H3)	**0.0742**	**0.0771**	**0.0764**	**0.0795**	**0.0498**	**0.0468**	**0.3168**	**0.3322**	**0.2945**	**0.1577**	**0.1451**	**0.1837**
B7H3 R&D	0.0582	0.0559	0.0955	0.1315	0.1518	0.1563	0.0696	0.0632	0.0646	0.9904	0.9934	1.0689
B7H3-Fc	0.8785	0.9453	0.9522	2.0063	1.9874	1.9504	1.9664	2.0073	1.8715	1.6051	1.5871	1.5903
B7H3-his	0.0603	0.0595	0.0946	0.1144	0.0879	0.0818	0.0693	0.0686	0.0636	0.8113	0.8125	0.8133
非相关抗原	0.08	0.0864	0.0853	0.0843	0.0888	0.1024	0.1044	0.0984	0.1144	0.0534	0.0634	0.0624
PDL1-Fc	0.0639	0.0685	0.0624	0.0625	0.0627	0.0613	0.0653	0.0633	0.0999	0.0652	0.0812	0.0749
HN3-Fc	0.0533	0.0611	0.0484	0.0801	0.0461	0.0467	0.0505	0.0514	0.0535	0.0545	0.0541	0.0521

图22