



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118871473 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 29

(21) 申请号 202380026867.1

(22) 申请日 2023.02.24

(30) 优先权数据

10-2022-0031019 2022.03.11 KR

10-2022-0113082 2022.09.06 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2023/002676 2023.02.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/171958 KO 2023.09.14

(71) 申请人 艾克隆株式会社

地址 韩国

(72) 发明人 李种瑞 李英河 李钟镐 金起贤

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

专利代理师 郑天松

(51) Int.Cl.

C07K 16/44 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

权利要求书2页 说明书22页

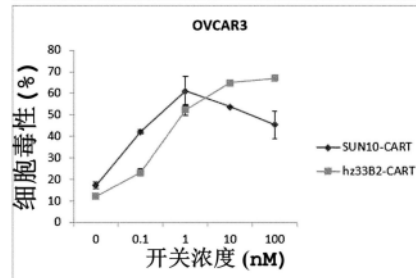
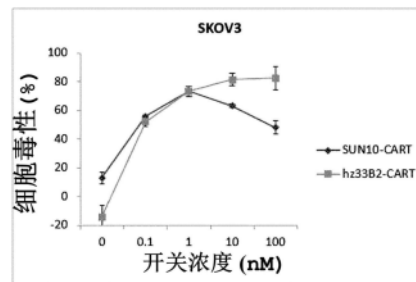
序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

靶向可替宁的抗体或其抗原结合片段、包含其的嵌合抗原受体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及靶向可替宁的抗体或其抗原结合片段、包含其的嵌合抗原受体及其用途。本发明的抗体作为与可替宁特异性结合的抗体,尤其是与可替宁的R异构体相比,与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体。并且,与现有的可替宁靶向抗体的CDR序列相比,同源性非常低,具有其序列独特性。表达包含本发明的抗可替宁抗体或抗原结合片段的嵌合抗原受体的细胞通过与结合有可替宁的开关结合来与其靶向的细胞株反应,从而诱导免疫细胞活性。因此,在利用本发明的抗体或其抗原结合片段的情况下,不仅可以通过可替宁介导的嵌合抗原受体效应细胞的激活调节来抑制由T细胞的过度激活引起的免疫副作用,还可以有效用作CAR-免疫细胞治疗剂。



1. 与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段,其与可替宁的R异构体相比,与可替宁的S异构体更特异性地结合。

2. 根据权利要求1所述的与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段,其中

所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区及轻链可变区,

所述重链可变区包含:

包含序列1的氨基酸序列的HCDR1;

包含序列2的氨基酸序列的HCDR2;以及

包含序列3的氨基酸序列的HCDR3,

所述轻链可变区包含:

包含序列4的氨基酸序列的LCDR1;

包含序列5的氨基酸序列的LCDR2;以及

包含序列6的氨基酸序列的LCDR3。

3. 根据权利要求1所述的与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

(i) 包含序列7的氨基酸序列的重链可变区及包含序列8的氨基酸序列的轻链可变区;或者

(ii) 包含序列9的氨基酸序列的重链可变区及包含序列10的氨基酸序列的轻链可变区。

4. 根据权利要求1所述的与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段选自自由包含重链可变区及轻链可变区的单克隆抗体、多克隆抗体、人类抗体、人源化抗体、嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab)及F(ab)₂组成的组中。

5. 核酸分子,其包含编码权利要求1至4中任一项所述的与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。

6. 根据权利要求5所述的核酸分子,其中所述核酸分子包含:

(i) 编码重链可变区的序列12的核苷酸序列及编码轻链可变区的序列13的核苷酸序列;或者

(ii) 编码重链可变区的序列14的核苷酸序列及编码轻链可变区的序列15的核苷酸序列。

7. 重组载体,其包含权利要求5所述的核酸分子。

8. 宿主细胞,其包含权利要求7所述的重组载体。

9. 嵌合抗原受体,其包含权利要求1至4中任一项所述的与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段。

10. 嵌合抗原受体效应细胞,其表达包含权利要求1至4中任一项所述的与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段的嵌合抗原受体。

11. 根据权利要求10所述的嵌合抗原受体效应细胞,其中

所述嵌合抗原受体效应细胞的激活由开关分子调节,

所述开关分子包含:

(a) 可替宁的S异构体;以及

(b) 与靶细胞上的细胞表面分子结合的靶向部分。

12. 根据权利要求11所述的嵌合抗原受体效应细胞,其中构成所述用于调节激活的开关分子的靶向部分为抗体、抗体的抗原结合片段或靶结合多肽。

13. 根据权利要求12所述的嵌合抗原受体效应细胞,其中所述用于调节激活的开关分子为与可替宁的S异构体缀合的可替宁缀合亲和体。

14. 免疫治疗用药物组合物,其包含权利要求10所述的嵌合抗原受体效应细胞作为有效成分。

15. 免疫治疗用药物套件,其包含权利要求10所述的嵌合抗原受体效应细胞作为有效成分。

靶向可替宁的抗体或其抗原结合片段、包含其的嵌合抗原受体及其用途

【技术领域】

[0001] 本发明在韩国产业通商支援部的支持下通过课题固有编号1415175509、详细课题编号20002893来实现,上述课题的研究管理专门机构为韩国产业技术评估管理院,研究事业名称为“生物产业核心技术开发项目”,研究课题名称为“利用创新的可开关CART技术的HER2靶向卵巢癌治疗剂的开发”,主管机构为Abclon(株),研究期间为2018年10月01日-2022年06月30日。

[0002] 本申请要求于2022年3月11日提交且申请号为第10-2022-0031019号、于2022年9月6日提交且申请号为第10-2022-0113082号的韩国专利申请的优先权,其全部内容通过引用结合在本申请中

[0003] 本发明涉及靶向可替宁的抗体或其抗原结合片段、包含其的嵌合抗原受体及其用途。

【背景技术】

[0004] 在本说明书全文中,参照许多论文及专利文献并标出其引用。引用的论文及专利文献的公开内容的全文作为参照插入本说明书中来更为明确地说明本发明所属技术领域的水平及本发明的内容。

[0005] 已知免疫细胞之一的T细胞在人类及动物中的细胞介导免疫中起到重要作用。CAR-T治疗剂作为基因被重组的T细胞,为通过导入特异性识别表达靶分子的细胞(癌细胞等)的受体基因来激活T细胞的细胞毒性,从而诱导靶细胞的细胞凋亡的细胞治疗剂。尤其,在以对以往的所有治疗都无应答的白血病患者初期临床试验中,CAR-T治疗剂激活无效的免疫系统,示出约80%的治疗率,被认为是梦幻般的抗癌剂,2017年8月,Novartis公司的Kymriah,同年10月,吉利德的子公司Kite Pharma的阿基仑赛得到美国食品药品监督管理局(FDA)的认证而开始商用化。

[0006] 然而,尽管有初期阶段的成功临床功效,现有的CAR-T细胞在生物体内无法控制激活及扩张,因此,有关于此的稳定性问题亟待解决。例如,CAR-T细胞会在体内长时间持续,因此存在对潜在风险的隐患,会引起由细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome; CRS)引起的严重的症状。于是,新开发出了通过赋予能够调节CAR-T细胞的活性的开关功能来克服现有CAR-T治疗剂的问题的作为新一代CAR-T平台的可开关(switchable)CAR-T。

[0007] 在可开关CAR-T系统中起到开关作用的媒介使用可以被CAR-T的嵌合抗原受体识别的同时能够识别靶分子的物质。例如,在最近的研究中,在现有的癌症免疫疗法中使用的抗体结合可替宁(cotinine)作为衔接子,利用其作为开关分子(switch molecule)来构建与可替宁特异性结合的利用现有的抗体的可开关CAR-T系统。由此,通过开关分子的开/关(ON/OFF)机制使以往成为问题的CAR-T细胞激活的调节成为可能。并且,将可替宁结合在现有癌症免疫疗法中使用的抗体来使用,使结合可替宁的形态的多种开关分子的多靶向型

(multi-targeting) CAR-T系统的制备成为可能。

[0008] 可替宁作为尼古丁的代谢产物,在体内无法生物合成,也不诱导生理活性,可以说作为开关分子的结构要素的有效性突出。然而,为了改善利用可替宁作为开关分子的衔接子的可开关CAR系统,需要开发能够诱导更为优秀的细胞毒性活性的改善的可替宁特异性抗体。

【发明内容】

[0009] 【技术问题】

[0010] 本发明人欲开发与现有的可替宁靶向抗体相比,能够诱导更为优秀的细胞毒性活性的新型抗体。并且,为了开发利用本发明的新型抗体的嵌合抗原受体而进行多次努力研究。结果,开发出与现有的可替宁靶向抗体的CDR序列相比,同源性非常低的新颖抗体或其抗原结合片段。并且,制备出利用其人源化抗体的嵌合抗原受体及表达上述嵌合抗原受体的效应细胞,查明与现有的可替宁靶向抗体相比,在高浓度中诱导有效的免疫细胞活性,从而完成本发明。

[0011] 因此,本发明的目的在于,提供与可替宁的S异构体更特异性地结合的靶向可替宁的抗体或其抗原结合片段。

[0012] 本发明的再一目的在于,提供包含上述抗体或其抗原结合片段的嵌合抗原受体及其效应细胞(effector cell)。

[0013] 本发明的另一目的在于,提供包含由于调节上述效应细胞的激活的开关分子及效应细胞的免疫治疗用药物组合物及其药物套件。

[0014] 【技术方案】

[0015] 本发明提供下述1至27的发明。

[0016] 1.一种与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段,与可替宁的R异构体相比,与可替宁的S异构体更特异性地结合。

[0017] 2.根据1所述的与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段,其中,上述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区及轻链可变区。上述重链可变区包含:包含序列1的氨基酸序列的HCDR1;包含序列2的氨基酸序列的HCDR2;以及包含序列3的氨基酸序列的HCDR3。

[0018] 上述轻链可变区包含:包含序列4的氨基酸序列的LCDR1;包含序列5的氨基酸序列的LCDR2;以及包含序列6的氨基酸序列的LCDR3。

[0019] 3.根据1所述的与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段,其中,上述抗体或其抗原结合片段包含:

[0020] (i) 包含序列7的氨基酸序列的重链可变区及包含序列8的氨基酸序列的轻链可变区;或者

[0021] (ii) 包含序列9的氨基酸序列的重链可变区及包含序列10的氨基酸序列的轻链可变区。

[0022] 4.根据1所述的与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段,其中,上述抗体或抗原结合片段选自自由包含重链可变区及轻链可变区的单克隆抗体、多克隆抗体、人类抗体、人源化抗体、嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab)及F(ab)₂组成的组中。

- [0023] 5.一种核酸分子,包含编码1至4中任一项所述的与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。
- [0024] 6.根据5所述的核酸分子,其中,上述核酸分子包含
- [0025] (i) 编码重链可变区的序列12的核苷酸序列及编码轻链可变区的序列13的核苷酸序列;或者
- [0026] (ii) 编码重链可变区的序列14的核苷酸序列及编码轻链可变区的序列15的核苷酸序列。
- [0027] 7.一种重组载体,包含5的核酸分子。
- [0028] 8.一种宿主细胞,包含7的重组载体。
- [0029] 9.一种嵌合抗原受体,包含1至4中任一项所述的与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段。
- [0030] 10.一种嵌合抗原受体效应细胞,包含1至4中任一项所述的与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段。
- [0031] 11.根据10所述的嵌合抗原受体效应细胞,其中,上述嵌合抗原受体效应细胞的激活由开关分子调节,上述开关分子包含:
- [0032] (a) 可替宁的S异构体;以及
- [0033] (b) 与靶细胞上的细胞表面分子结合的靶向部分(targeting moiety)。
- [0034] 12.根据11所述的嵌合抗原受体效应细胞,其中,上述靶细胞上的细胞表面分子选自自由HER2、CD19、EGFR、VEGFR2、CD80、CD86、间皮素(mesothelin)、前列腺特异性膜抗原(PSMA,prostate specific membrane antigen)、CD20、MUC1及它们的组合组成的组中。
- [0035] 13.根据11所述的嵌合抗原受体效应细胞,其中,构成上述用于调节激活的开关分子的靶向部分为抗体、抗体的抗原结合片段、或靶结合多肽(target binding polypeptide)。
- [0036] 14.根据13所述的嵌合抗原受体效应细胞,其中,上述用于调节激活的开关分子为与可替宁的S异构体缀合的可替宁缀合亲和体(cotinine-conjugated affibody)。
- [0037] 15.一种免疫治疗用药物组合物,包含10的嵌合抗原受体效应细胞作为有效成分。
- [0038] 16.一种免疫治疗用药物套件,包含10至14的嵌合抗原受体效应细胞作为有效成分。
- [0039] 17.一种方法,包括向需要治疗的对象给药10至14的嵌合抗原受体效应细胞及与上述嵌合抗原受体结合的开关分子的步骤。
- [0040] 18.根据17所述的方法,其中,上述方法为治疗肿瘤或与癌症相关的疾病或状态的方法。
- [0041] 19.根据17所述的方法,其中,上述方法为治疗与自身免疫相关的疾病或状态的方法。
- [0042] 20.一种方法,包括:向需要治疗的对象给药10至14的嵌合抗原受体效应细胞及与上述嵌合抗原受体结合的开关分子的步骤;以及
- [0043] 抑制嵌合抗原受体效应细胞的活性的步骤。
- [0044] 21.根据20所述的方法,抑制因给药嵌合抗原受体效应细胞而引起的副作用。
- [0045] 22.根据20所述的方法,其中,抑制嵌合抗原受体效应细胞的活性的步骤为加入与

嵌合抗原受体结合的物质。

[0046] 23. 根据22所述的方法,其中,与嵌合抗原受体结合的物质为可替宁,优选为S-可替宁。

[0047] 24. 根据20所述的方法,其中,抑制嵌合抗原受体效应细胞的活性的步骤为加入与开关分子结合的物质。

[0048] 25. 根据24所述的方法,其中,与开关分子结合的物质为与可替宁结合的断离的抗体或抗原结合片段。

[0049] 26. 根据24所述的方法,其中,与开关分子结合的物质为与开关分子的靶向部分结合的断离的靶细胞的表面分子。

[0050] 27. 一种嵌合抗原受体-效应细胞治疗系统,包含10至14的嵌合抗原受体效应细胞及与上述嵌合抗原受体结合的开关分子。

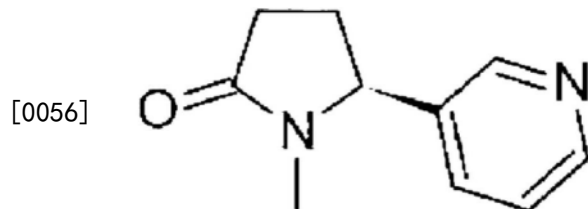
[0051] 本发明人通过与现有的可替宁靶向抗体比较开发出能够诱导更为优秀的细胞毒性活性的抗体或其抗原结合片段。

[0052] 尤其,包含本发明的靶向可替宁的新型抗体或其抗原结合片段的嵌合抗原受体效应细胞与现有的可替宁靶向抗体相比,确认到根据可替宁的异构体的种类在高浓度中诱导有效的免疫细胞活性。

[0053] 根据本发明的一实施方式,本发明提供一种抗体或其抗原结合片段,与可替宁的R异构体相比,与可替宁的S异构体更特异性地结合。

[0054] 在本说明书中,术语“可替宁(cotinine)”作为尼古丁的主要代谢产物,是指具有下述化学式1的结构物质。

[0055] 【化学式1】



[0057] 上述可替宁的特征在于,在体内不被生物合成(de novo biosynthesis),不诱发生理活性,不改变缀合物质的特性,可以与特异性识别可替宁的抗体结合。并且,易于制备为与羧基结合的形态,从而具有能够与缀合物质结合的特征。

[0058] 上述可替宁具有分为S异构体及R异构体的立体异构体。

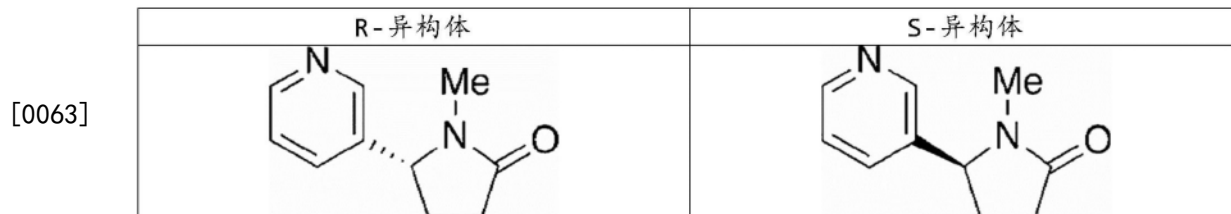
[0059] 在本说明书中,术语“异构体(isomer)”是指虽然分子式相同,但所构成的原子的连接方式或空间排列不同的分子。异构体大体分为同分异构体(constitutional isomer或structural isomer)及立体异构体(stereoisomer)。同分异构体是指虽然分子式相同,但分子内原子的连接状态(键的种类、数量、官能团的种类及位置等)不同的化合物。立体异构体是指虽然原子的连接状态相同,但因原子之间的空间排列不同而不相互重叠的化合物。上述立体异构体(stereoisomer)再细分为对映异构体(enantiomer)或旋光异构体(optical isomer)及非对映异构体(diastereoisomer)。上述对映异构体是指因相互具有镜像的关系而不与原化合物重叠的异构体。除对映异构体以外的立体异构体,即,虽不是镜像关系但也不重叠的异构体都归为非对映异构体,其中包括几何异构体(geometric isomer)

及旋转异构体 (conformational isomer)。

[0060] 因此,尽管异构体具有相同的分子式,但结果却可以分为具有不同的物理/化学性质的不同的化合物。例如,尽管在生物体内的物理性质相同,但根据基于光学活性的旋光异构体的特异的环境,可能只有一种旋光异构体具有生理活性。因此,具有不同物理/化学性质的各异构体在生物或药理作用方面强调其重要性。

[0061] 上述可替宁具有立体异构体,其异构体表示为具有下述化学式2的结构物质。若排除以前缀“顺式-反式 (cis-trans)”或“R-S”加以区分的方式,则具有相同的名称,因此,在以下的说明书中将以可替宁的S异构体及R异构体来明示。

[0062] 【化学式2】



[0064] -Me: -CH₃

[0065] 在本发明的一实施例中,利用手性柱 (chiral column) 将混合两种异构体的可替宁分离为两个单一的异构体,确认到与可替宁的R异构体相比,本发明的抗体及其抗原结合片段与可替宁的S异构体更特异性地结合。

[0066] 在本发明的一实例中,本发明的与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区及轻链可变区,上述重链可变区包含:包含序列1的氨基酸序列的HCDR1;包含序列2的氨基酸序列的HCDR2;以及包含序列3的氨基酸序列的HCDR3。上述轻链可变区包含:包含序列4的氨基酸序列的LCDR1;包含序列5的氨基酸序列的LCDR2;以及包含序列6的氨基酸序列的LCDR3。

[0067] 在本发明的一具体实例中,本发明的与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段包含:(i) 包含序列7的氨基酸序列的重链可变区及包含序列8的氨基酸序列的轻链可变区;或者(ii) 包含序列9的氨基酸序列的重链可变区及包含序列10的氨基酸序列的轻链可变区。

[0068] 在本说明书中,术语“抗体 (antibody)”作为与特定抗原特异性结合的抗体,不仅包括完整的抗体形态,还包括抗体分子的抗原结合片段 (antigen binding fragment)。完整的抗体为具有2个全长 (full length) 轻链及2个全长重链的结构,各个轻链通过二硫键与重链连接。抗体的恒定区 (constant region) 分为重链恒定区和轻链恒定区,重链恒定区具有伽马 (γ)、缪 (μ)、阿尔法 (α)、德尔塔 (δ) 及伊普西龙 (ε) 型,亚型有伽马1 (γ 1)、伽马2 (γ 2)、伽马3 (γ 3)、伽马4 (γ 4)、阿尔法1 (α1) 及阿尔法2 (α2)。轻链的恒定区具有卡帕 (κ) 及兰布达 (λ) 型。(Cellular and Molecular Immunology, Wonsiewicz, M.J., Ed., Chapter 45, pp. 41-50, W.B. Saunders Co. Philadelphia, PA (1991); Nisonoff, A., Introduction to Molecular Immunology, 2nd Ed., Chapter 4, pp. 45-65, sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1984))。

[0069] 在本说明书中,上述术语“抗体 (antibody)”作为与可替宁特异性结合的抗体,不仅包括完整的抗体形态,还包括抗体分子的抗原结合片段。具体地,在本说明书中,术语“抗

体”作为与可替宁的R异构体相比,与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体,不仅包括完整的抗体形态,还包括抗体分子的抗原结合片段。

[0070] 在本说明书中,术语“抗原结合片段(antigen binding fragment)”是指保有抗原结合功能的片段,包括Fab、F(ab')、F(ab')₂、化学连接的F(ab')₂及Fv等。在抗体片段中,抗原结合片段(Fab,fragment antigen binding)可以通过具有轻链及重链的可变区以及轻链的恒定区及重链的第一恒定区(CH1)的结构来具有一个抗原结合部位。Fab'与Fab的不同点在于,在重链CH1结构域的C-末端具有包含一个以上半胱氨酸残基的铰链区(hinge region)。F(ab')₂抗体通过Fab'的铰链区的半胱氨酸之间形成二硫键来生成。Fv为仅具有重链可变区及轻链可变部位的最小的抗体片段,生成Fv片段的重组技术公开在PCT国际公开专利申请WO 88/10649、WO88/106630、WO 88/07085、WO 88/07086及WO 88/09344中。双链Fv(two-chain Fv)通过非共价键连接重链可变部位与轻链可变部位,单链Fv(single-chain variable fragment,scFv)通常通过肽接头以共价键连接重链的可变区与轻链的可变区或者在C-末端直接连接,可以像双链Fv那样形成二聚体结构。上述抗原结合片段可以利用蛋白水解酶来获得(例如,利用木瓜蛋白酶(papain)有限切割全长抗体可以获得Fab,利用胃蛋白酶切割可以获得F(ab')₂片段),或者可以通过基因重组技术来制备。

[0071] 具体地,本发明的抗体或其抗原结合片段为scFv形态或完整的抗体形态。并且,重链恒定区可以选自伽马(γ)、缪(μ)、阿尔法(α)、德尔塔(δ)及伊普西龙(ϵ)型中的任一种同型(isotype)。优选地,重链恒定区为 γ 1(IgG1)、 γ 2(IgG2)、 γ 3(IgG3)或 γ 4(IgG4),最具体地,为 γ 4(IgG4)同型。轻链恒定区可以为 κ 或 λ 型,优选地,为 κ 型。因此,本发明的具体抗体为具有 κ 轻链与 γ 4(IgG4)重链scFv形态或IgG4形态,但不限于于此。

[0072] 在本说明书中,术语“重链(heavy chain)”是指为了赋予对抗原的特异性而包含含有具有充分的可变区序列的氨基酸序列的抗体的可变区结构域VH及包含三个恒定区结构域CH1、CH2、CH3以及铰链(hinge)的全长的重链及其片段的含义。并且,在本说明书中,术语“轻链(light chain)”是指为了赋予对抗原的特异性而包含含有具有充分的可变区序列的氨基酸序列的可变区结构域VL及包含恒定区结构域CL的全长的轻链及其片段。

[0073] 在本说明书中,术语“互补决定区(CDR,complementarity determining region)”是指免疫球蛋白重链及轻链的超变区(hypervariable region)的氨基酸序列(Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,4th Ed.,U.S.Department of Health and Human Services,National Institutes of Health(1987))。重链(HCDR1、HCDR2及HCDR3)及轻链(LCDR1、LCDR2及LCDR3)分别包含3个CDRs,这些CDRs之间存在骨架区(framework region,FR)部分,起到支撑CDR环的作用。上述CDR为与抗原的识别相关的环状的部分,在抗体与抗原或抗原决定表位(epitope)结合时提供主要的接触残基,从而决定抗体对抗原的特异性。

[0074] 上述术语“骨架(Framework)”或“FR”表示除超变区残基以外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由4个FR结构域FR1、FR2、FR3及FR4构成。

[0075] 在本说明书中,术语“可变区(variable region)”或“可变结构域(variable domain)”是指与使抗体与抗原结合相关的抗体重链或轻链的结构域。天然(Native)抗体的重链及轻链的可变结构域(各个VH及VL)通常具有相似的结构,其的结构域包括4个保守的骨架区及3个超变区(Kindt et al.,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,page

91 (2007))。单一VH或VL结构域可以充分赋予抗原结合特异性。并且,与特定抗原结合的抗体可以通过与抗原结合来筛选各个互补性的VH或VL结构域的文库的抗体中使用VH或VL结构域来分离。

[0076] 在本说明书中,术语“特异性结合”或与之相同的概念是指抗体、其抗原结合片段或scFv等其他结构物特异性地与抗原或与之相应的物质相互作用来引起免疫反应。特异性结合可以至少特性化为约 1×10^{-6} M以下(例如, 9×10^{-7} M、 8×10^{-7} M、 7×10^{-7} M、 6×10^{-7} M、 5×10^{-7} M、 4×10^{-7} M、 3×10^{-7} M、 2×10^{-7} M或 1×10^{-7} M)的平衡解离常数,优选地,特性化为 1×10^{-7} M以下(例如, 9×10^{-8} M、 8×10^{-8} M、 7×10^{-8} M、 6×10^{-8} M、 5×10^{-8} M、 4×10^{-8} M、 3×10^{-8} M、 2×10^{-8} M或 1×10^{-8} M)的平衡解离常数,更优选地,特性化为 1×10^{-8} M以下(例如, 9×10^{-9} M、 8×10^{-9} M、 7×10^{-9} M、 6×10^{-9} M、 5×10^{-9} M、 4×10^{-9} M、 3×10^{-9} M、 2×10^{-9} M或 1×10^{-9} M)的平衡解离常数(例如,比这小的 K_D 表示更为特异性的结合)。确定两个分子是否特异性结合的方法在本发明所属技术领域是广为人知的,例如,包括平衡透析、表面等离子体共振等。

[0077] 本发明的抗体或其抗原结合片段不仅包括全长或原本的多克隆(polyclonal-)或单克隆(monoclonal-)抗体,还包括其的抗原结合片段(例如,Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab₃、Fv及它们的变体)、包含一个以上抗体部分的融合蛋白、人类抗体、人源化抗体、嵌合抗体、微抗体、双抗、三抗、四抗、线性抗体、单链抗体(scFv)、scFv-Fc、双特异抗体、多特异抗体、作为包含所需特异性的抗原识别部位的免疫球蛋白分子的其他修饰的排列形态的抗体的糖基化变体、抗体的氨基酸序列变体及通过共价键修饰的抗体。修饰的抗体及其抗原结合片段的具体的例包括单抗、白蛋白域抗体(AlbuAbs)、双亲和重定向分子(DARTs, dual affinity re-targeting)、双特异性T细胞衔接器(BiTEs, bispecific T-cell engager)、串联双抗体(TandAbs, tandem diabodies)、双活性抗原结合片段(DAFs, dual acting Fab)、二合一抗体(two-in-one antibodies)、小分子免疫药物(SMIPs, small modular immunopharmaceuticals)、与抗体融合的fynomers(FynomAbs, fynomers fused to antibodies)、双可变结构域免疫球蛋白(DVD-Igs, dual variable domain immunoglobulin)、肽修饰的抗体(CovX-bodies, peptide modified antibodies)、双抗体及trioAbs。这样的抗体及其抗原结合片段的目录不限于上述内容。

[0078] 在本发明的一具体实例中,本发明的抗体或其抗原结合片段选自包含上述重链可变区及轻链可变区的单克隆抗体、多克隆抗体、人类抗体、人源化抗体、嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab)及F(ab)₂组成的组中,但不限于于此。

[0079] 优选地,上述抗体或其抗原结合片段可以为人源化抗体。

[0080] 在本说明书中,术语“人源化抗体”为含有源自非人类(例如鼠)抗体的非人类免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、其免疫球蛋白链或片段(例如,Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他抗原结合下游序列)。在大部分情况下,人源化抗体为受体的互补决定区(CDR)的残基被具有所目标的特异性、亲和性及能力的非人类种(供体抗体),例如小鼠、大鼠或兔的CDR的残基替代的人免疫球蛋白(受体抗体)。在部分情况下,上述人类免疫球蛋白的Fv骨架区(FR)残基被相应的非人类残基替代。并且,人源化抗体还可以包含未在受体抗体或供体抗体的CDR或骨架序列中发现的残基。这种修饰是为追加改善抗体性能以及使其最佳化而形成的。通常,上述人源化的抗体包含至少一个可变结构域,典型地包含2个实质上的全部可变结构域,在上述结构域中,上述CDR区的全部或实质上的全部与非人类免疫

球蛋白的CDR区相对应,上述FR区的全部或实质上的全部具有人类免疫球蛋白的FR区的序列。上述人源化的抗体包含免疫球蛋白恒定区(Fc region)的至少一部分至实质上的人类免疫球蛋白的恒定区(Fc region)序列。

[0081] 根据本发明的再一实施方式,本发明提供一种核酸分子,包含编码上述与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。

[0082] 在本发明的一实例中,本发明所属技术领域的普通技术人员应该自明的是,只要是编码构成本发明的上述抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列的核苷酸序列就即可,不限于某种特定的核苷酸序列。这是因为,即使核苷酸序列发生变异,变异的核苷酸序列表达为蛋白质时,也有不给蛋白质序列带来变化的情况。这称为密码子的退化。因此,上述核苷酸序列包括包含功能上同等的密码子或编码相同的氨基酸的密码子(例如,通过密码子的退化,编码精氨酸或丝氨酸的密码子为六个)或编码在生物学上同等的氨基酸的密码子的核苷酸序列。

[0083] 在本发明的一具体实例中,本发明的上述核酸分子包含:(i) 编码重链可变区的序列12的核苷酸序列及编码轻链可变区的序列13的核苷酸序列;或者(ii) 编码重链可变区的序列14的核苷酸序列及编码轻链可变区的序列15的核苷酸序列。

[0084] 在本说明书中,术语“核酸(nucleic acids)”具有包括脱氧核糖核酸(DNA)(基因组脱氧核糖核酸(gDNA)及互补脱氧核糖核酸(cDNA))和核糖核酸(RNA)分子在内的含义。在上述核酸分子中,作为基本结构单位的核苷酸不仅包括天然的核苷酸,还包括糖或碱基部位被修饰的类似物(analogue)(Scheit,Nucleotide Analogs,John Wiley,New York(1980);Uhlman及Peyman,Chemical Reviews,90:543-584(1990))。

[0085] 若考虑上述具有生物学同等活性的变异,编码构成上述抗体及其抗原片段的氨基酸序列的本发明的核酸分子还应解释为包括与其示出实质上的同一性(substantial identity)的序列。上述实质上的同一性是指在将上述本发明的序列与任意其他序列以最大相对应的方式对齐(align)后通过本发明所属技术领域中通常使用的算法分析对齐的序列的情况下,示出60%以上的同源性的序列,更具体地,示出70%以上的同源性的序列,更为具体地,示出80%以上的同源性的序列,更加具体地,示出90%以上的同源性的序列,最为具体地,示出95%以上的同源性的序列。这样用于序列比较的对齐(alignment)方法是本发明所属技术领域中公知的。有关对齐的多种方法及算法在Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981); Needleman and Wunsch, J. Mol. Bio. 48:443(1970); Pearson and Lipman, Methods in Mol. Biol. 24:307-31(1988); Higgins and Sharp, Gene 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-3(1989); Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16:10881-90(1988); Huang et al., Comp. Appl. BioSci. 8:155-65(1992) and Pearson et al., Meth. Mol. Biol. 24:307-31(1994)中公开,但限于于此。

[0086] 根据本发明的另一实施方式,本发明提供一种重组载体,包含上述核酸分子。

[0087] 在本说明书中,术语“载体”作为用于在宿主细胞中表达目标基因的工具,包括:质粒载体;粘粒载体;以及噬菌体载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体及腺相关病毒载体等病毒载体。

[0088] 根据本发明的具体实例,在本发明的载体中,上述编码抗CD19抗体或其抗原结合片段的核酸分子与启动子可操作地连接(operatively linked)。

[0089] 在本说明书中,术语“可操作地连接”是指核酸表达调节序列(例如,启动子、信号序列或转录调节因子结合位点的阵列)与其他核酸序列之间的功能性结合,上述调节序列通过此调节上述其他核酸序列的转录和/或解读。

[0090] 本发明的重组载体系统可以通过本发明所属技术领域中公知的多种方法来构建,有关于此的具体方法在Sambrook et al.,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)中公开,该文献作为参考插入本说明书中。

[0091] 本发明的载体可以典型地构建为用于克隆的载体或用于表达的载体。并且,本发明的载体能够以原核细胞或真核细胞为宿主来构建。

[0092] 例如,在本发明的载体为表达载体且以真核细胞为宿主的情况下,可以利用源自哺乳动物细胞的基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子、 β -肌动蛋白启动子、人血红蛋白启动子及人肌肉肌酸启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子、痘苗病毒7.5K启动子、SV40启动子、巨细胞病毒启动子、单纯疱疹病毒(HSV)的tk启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、人获得性免疫缺陷病毒(HIV)的LTR启动子、莫罗尼病毒的启动子、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)的启动子及劳氏肉瘤病毒(RSV)的启动子),通常具有聚腺苷酸化序列作为转录终止序列。

[0093] 本发明的载体为了便于由其表达的抗体或抗原结合片段的纯化,可以与其他序列融合。融合的序列可以为例如谷胱甘肽S-转移酶(法玛西亚公司(Pharmacia),美国(USA))、麦芽糖结合蛋白(NEB公司,美国)、FLAG(ABI公司,美国)及6x His(六组氨酸(hexahistidine);Quiagen公司,美国)等。

[0094] 另一方面,本发明的表达载体作为选择标记物,可以包含本发明所属技术领域通常使用的抗生素耐药性基因,例如,有对氨基青霉素、庆大霉素、羧苄青霉素、氯霉素、链霉素、卡那霉素、遗传霉素、新霉素及四环素的耐药性基因。

[0095] 根据本发明的又一实施方式,本发明包括由上述重组载体转化的宿主细胞。

[0096] 能够稳定且连续克隆及表达本发明的载体的宿主细胞可以利用本发明所属技术领域中公知的任意宿主细胞,例如,适合上述载体的真核细胞宿主细胞包括猴肾细胞7(COS7;monkey kidney cells)、NS0细胞、SP2/0细胞、中国仓鼠卵巢(CHO;Chinese Hamster Ovary)细胞、W138细胞、幼年仓鼠肾(BHK:baby hamster kidney)细胞、MDCK细胞、骨髓瘤细胞株、HuT 78细胞及HEK-293细胞,但不限于此。

[0097] 在本说明书中,术语“转化”、“转导”或“转染”是指外源性核酸向宿主细胞内传递或导入的过程。“转化的”、“转导的”或“转染的”细胞是指由外源性核酸转化、转导或转染的细胞,上述细胞包括相关细胞及由其传代培养的后代细胞。

[0098] 根据本发明的又一实施方式,本发明提供一种嵌合抗原受体(Chimeric Antigen Receptor),包含上述与可替宁特异性结合的抗体或其抗原结合片段。

[0099] 上述嵌合抗原受体的抗体或其抗原结合片段为抗可替宁抗体或其抗原结合片段。

[0100] 在本发明的实例中,提供连接包含抗可替宁抗体或其抗原结合片段、铰链结构域、跨膜结构域及信号传导结构域的抗可替宁抗体的嵌合抗原受体。

[0101] 在本说明书中,术语“嵌合抗原受体(Chimeric Antigen Receptor;CAR)”是指与效应细胞的信号传导结构域或效应细胞的激活结构域(例如,T细胞信号传导结构域或T细胞激活结构域)连接的包含靶向结合结构域的人工制备的杂交蛋白或多肽。嵌合抗原受体

(CAR)通常利用单克隆抗体的抗原结合性质以非MHC限制方式来具有重新诱导T细胞对选择的目标的特异性及反应性的能力。非MHC限制的抗原识别以与是否处理抗原无关地向表达嵌合抗原受体的T细胞提供识别抗原的能力,从而回避肿瘤逃逸的主要机制。并且,在T细胞中表达时有利的是,嵌合抗原受体不与内在性T细胞受体(TCR) α 及 β 链二聚体化。

[0102] 具体地,本发明的嵌合抗原受体是指“可开关嵌合抗原受体(switchable chimeric antigen receptor;sCAR)”。以往通常的典型嵌合抗原受体(classical chimeric antigen receptor)的胞外结构域包含直接靶向靶细胞的细胞表面的特定抗原的抗体或抗体的抗原结合片段。但本发明的嵌合抗原受体的胞外结构域不是直接靶向靶细胞的细胞表面抗原,而是通过包含上述与可替宁特异性结合的抗体或其抗原结合片段来靶向可替宁(具体为缀合开关分子的可替宁)。

[0103] 上述“铰链结构域(hinge domain)”是指连接抗可替宁抗体或其片段与跨膜结构域的结构域。它可以包含半胱氨酸残基,上述半胱氨酸残基可以与铰链结构域与抗体的结合相关。例如,上述铰链结构域可以为源自CD8或CD28的铰链结构域、源自IgG1、IgG2、IgG4或IgGD的铰链结构域、杀伤性免疫球蛋白样受体(KIR,killer immunoglobulin-like receptor)细胞外区以及它们的组合,但不限于于此。

[0104] 上述“跨膜结构域(transmembrane domain)”是指可以连接嵌合抗原受体的铰链结构域与信号传导结构域的部位。跨膜结构域能够以使嵌合抗原受体的抗可替宁抗体或其抗原结合片段位于细胞表面而信号传导结构域位于细胞内的方式来跨越细胞膜。上述跨膜结构域可以选自由T细胞受体、CD27、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8(CD8 α)、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137及CD154的 α 、 β 或 ζ 链组成的组中,但不限于于此。

[0105] 上述“信号传导结构域(intracellular signlaing domain)”作为位于免疫细胞的细胞膜内侧,即,位于细胞质中的部分,为在细胞外结构域中包含的抗体或其抗原结合片段与靶向抗原结合时,通过向细胞内传导信号来激活免疫细胞的免疫反应的部位。

[0106] 本发明的细胞内信号传导结构域可以为选自由CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、FcR γ 、FcR β 、CD5、CD22、CD79a、CD79b及CD66d组成的组中的一种以上细胞内信号传导结构域,但不限于于此,优选地,可以为CD3 ζ 。

[0107] 并且,本发明的上述细胞内信号传导结构域还可以包含共刺激(co-stimulatory)结构域,可以为选自由特异性地与CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、ICOS、LFA-1、GITR、MyD88、DAP1、PD-1、LIGHT、NKG2C、B7-H3及CD83结合的配体组成的组中的一种以上共刺激结构域,但不限于于此。

[0108] 追加地,本发明的嵌合抗原受体还可以包括如上所述的抗体及结构域被修饰的形态。在此情况下,上述修饰不使上述抗体及结构域的功能修饰,而是可以在野生型的抗体或结构域的氨基酸序列中通过取代、替换或追加一个以上氨基酸来进行。通常,上述取代可以通过丙氨酸(alanine),或者通过不给整体蛋白质的电荷、极性或疏水性带来影响的保守性氨基酸取代(conservative amino acid substitution)来进行。

[0109] 根据本发明的又一实施方式,本发明提供一种嵌合抗原受体效应细胞,包含上述与可替宁特异性结合的抗体或其抗原结合片段。

[0110] 在本说明书中,术语“效应细胞”为由包含编码嵌合抗原受体多肽的基因的载体转

化的细胞,是指在细胞膜表达上述导入的嵌合抗原受体的细胞。

[0111] 在本发明的一实例中,效应细胞是指承担先天和/或后天免疫反应的开始和/或实行的造血起源的免疫细胞。

[0112] 本发明的上述免疫细胞可以为树突状细胞、杀伤性树突状细胞、肥大细胞、T细胞、自然杀伤(NK) T细胞、调节T细胞(regulator T cell)、自然杀伤细胞(natural killer cell)或B细胞(B cell)等免疫细胞,可以从骨髓、外周血、外周血单个核细胞或脐带血中获得。

[0113] 在本发明的一实例中,相对于给药的对象,上述细胞可以为同种动物来源或者自身来源细胞。

[0114] 在本发明的具体实例中,效应细胞可以为作为在表面表达上述嵌合抗原受体的免疫细胞的T细胞。

[0115] 在本发明的一实例中,效应细胞以与本发明的抗体或其抗原结合片段连接的形态通过表达上述嵌合抗原受体来靶向可替宁标记的化合物。在此情况下,上述效应细胞与可替宁标记的缀合物质的结合可以为嵌合抗原受体的抗可替宁抗体或其抗原结合片段与可替宁之间的抗原-抗体结合。

[0116] 并且,效应细胞可以通过与可替宁标记的化合物结合来诱导其活性。其中,可替宁标记的缀合物质起到调节上述效应细胞的激活的开关分子的作用。上述效应细胞的激活为对靶细胞的细胞毒性功能发挥、细胞因子分泌及它们的组合。

[0117] 在本发明的具体实例中,上述嵌合抗原受体效应细胞的激活通过包含如下部分的开关分子来调节:

[0118] (a) 可替宁的S异构体;以及

[0119] (b) 与靶细胞上的细胞表面分子结合的靶向部分。

[0120] 在本发明更具体的实例中,上述开关分子的靶向部分为抗体、抗体的抗原结合片段或靶结合多肽。

[0121] 在本发明更为具体的实例中,上述开关分子为与可替宁的S异构体缀合的可替宁缀合亲和体。

[0122] 在本说明书中,术语“开关分子”是指在利用嵌合抗原受体的效应细胞中,分离嵌合抗原受体的靶识别结构域与嵌合抗原受体的细胞信号传导结构域并介导它们的衔接子分子(adaptor molecule)。对于异种目标(heterogenous target)或抗性肿瘤(resistant tumor),开关分子更换嵌合抗原受体的靶向,或者在因表达嵌合抗原受体的细胞的过度激活引起副作用的情况下,可以通过调节开关分子的给药来减少嵌合抗原受体效应细胞的活性(Cao et al., Angew Chem Int Ed Engl. 2016 June 20; 55(26): 7520-7524.)。

[0123] 在本说明书中,术语“靶结合多肽(target binding polypeptide)”是指像抗体一样具有对靶向抗原的结合亲和性或在结构上与抗体没有相关性的非免疫球蛋白多肽分子。上述靶结合多肽也称为抗体样分子(antibody-like molecule)或抗体类似物(antibody mimetics),与具有约150Kda的分子量的抗体不同,通常具有3KDa至20KDa的分子量。上述靶结合多肽包括源自上述蛋白A(protein A)的Z-结构域的亲和体、源自 γ -B晶体或泛素的affilin、源自血清胱抑素(cystatin)的Affimer、Alphabody、源自脂质运载蛋白(lipocalin)的Anticalin、源自细胞膜受体的结构域的Avimer、源自锚蛋白重复基序

(ankyrin repeat motif)的DARPin、源自Fyn的SH3结构域的Fynomer、源自蛋白酶抑制剂(protease inhibitor)的库尼茨结构域的库尼茨结构域肽(Kunits domain peptide)、源自纤连蛋白的第十个III型结构域(10th type III domain of fibronectin)的单体(Monobody)、源自产气荚膜梭菌(*clostridium perfringens*)的NagH的碳水化合物结合模块32-2(carbohydrate binding module 32-2)的纳米梭菌抗体模拟蛋白(nanoCLAMP)等,但不限定于此。

[0124] 上述靶结合多肽可以通过噬菌体展示(phage display)、核糖体展示(ribosome display)等本发明所属技术领域中的多种筛选方法来人工合成以具有对任意抗原的结合亲和性。

[0125] 在本说明书中,术语“亲和体(Affibody)”是指金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的蛋白A(Protein A)中对IgG具有亲和性的部位Z结构域(Z domain)。亲和体为由58个氨基酸残基形成的小蛋白质,在这样的亲和体分子的蛋白质序列中,与IgG形成结合面的13个氨基酸可以根据氨基酸序列与多种靶向抗原结合,可以随机排列,从而可以构建文库(library)。与抗体相似地,亲和体分子可以从文库中通过噬菌体文库(phage library)、酵母蛋白杂交法(yeast two hybrid;Y2H)等筛选方法来筛选可以与多种靶向抗原结合的亲和体分子。最近,利用能够与抗原结合的亲和体分子的特性开发出了与HER2及 β -淀粉样蛋白(amyloid- β)特异性结合的亲和体(Orlova et al.2006,Cancer Res.,Gronwall et al.,2007,J.Biotechnol.)。并且,亲和体的分子量为非常小的6Kda,与通常具有150Kda的分子量的IgG形态的抗体相比,向人体给药时,具有扩散到全身并通过肾脏过滤迅速清除的特征。因此,亲和体主要应用在诊断试样的研究开发中(Goldstein R et al.,2013,Expert Rev Anticancer Ther.)。

[0126] 在本发明的一实例中,构成上述开关分子的亲和体与吡啶咯酮可以通过化学共轭(chemical conjugation)来结合。

[0127] 上述化学共轭可以通过化学交联剂形成。上述化学交联剂有1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC,1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)、二环己基碳二亚胺(DCC,dicyclohexyl carbodiimide)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,Nhydroxysuccinimide)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS,N-hydroxysulfosuccinimide)、亚氨酸酯(imidoester)系列交联剂、磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(Sulfo-SMCC,sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)等,但不限定于此,可以不受限制地使用本发明所属技术领域通常使用的化学交联剂。

[0128] 并且,构成上述开关分子的亲和体与可替宁可以通过接头(linker)来间接连接。

[0129] 若为普通的技术人员,则通常可以包括在所要融合的功能部分(moiety)之间使用接头的方式,应该知道具有不同特性的多种接头,例如,柔性氨基酸接头、非柔性接头及可切割的氨基酸接头等。接头以增加融合蛋白的表达量、提高生物活性、使靶向成为可能、变更药物动力学的目的或者为增加融合蛋白质的稳定性并提高可折叠性(folding)来使用。

[0130] 根据本发明的又一实施方式,本发明提供包含上述嵌合抗原受体效应细胞作为有效成分的免疫治疗用药物组合物。

[0131] 在本发明的一实例中,为了调节嵌合抗原受体效应细胞的活性,上述免疫治疗用

药物组合物还可以包含上述开关分子。

[0132] 在本说明书中,术语“免疫治疗(immunotherapy)”是指帮助免疫系统清除癌症的癌症的治疗方法。免疫治疗分为主动免疫治疗及被动免疫治疗,主动免疫资料包括:i)通过向人体注入由癌细胞或癌细胞生成的物质来激活免疫系统的癌症疫苗治疗(cancer vaccine therapy);以及ii)通过给药细胞因子(干扰素、白细胞介素等)、生长因子等免疫调节剂(immune-modulating agents)来激活特定白细胞的免疫调节治疗。被动免疫治疗包括与特定癌细胞结合的治疗性抗体(therapeutic antibody)以及免疫细胞治疗(immune cell therapy)。具体地,免疫细胞治疗包括树突状细胞疫苗治疗(dendritic cell vaccine therapy)、CAR-T(嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell))治疗、自然杀伤细胞治疗(natural killer cell therapy)、CTL(细胞毒性T淋巴细胞)治疗(cytotoxic T lymphocyte therapy)、过继性细胞转移(adoptive cell transfer)等,但不仅限于此。本发明中的免疫治疗主要指上述免疫细胞治疗。

[0133] 上述术语“癌症”是指以异常细胞的急速且不可调节的生长及增殖为特征的疾病。癌细胞可以局限在局部或者通过血流及淋巴系统扩散到身体的其他部分。上述癌症包括固体肿瘤及非固体肿瘤(例如,血液学肿瘤,例如白血病及淋巴瘤)。

[0134] 上述“肿瘤”是指阳性、前癌性、恶性或转移性的组织异常生长。尤其,固体肿瘤大体为不含有囊肿或液体区域的非正常的组织肿块,可以为阳性或恶性。不同类型的固体肿瘤根据形成上述肿瘤的细胞的类型来命名(例如,肉瘤、癌肿瘤及淋巴瘤)。

[0135] 优选地,成为本发明的免疫治疗对象的疾患或疾病可以为癌症,上述癌症可以为固体癌或血液癌。其中,上述固体癌可以为肺癌、大肠癌、前列腺癌、甲状腺癌、乳腺癌、脑癌、头颈部癌、食管癌、皮肤癌、黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、胸腺癌、胃癌、结肠癌、肝癌、卵巢癌、子宫癌、膀胱癌、直肠癌、胆囊癌或胰腺癌。并且,上述血液癌可以为血液或骨髓的癌症,例如,可以为淋巴瘤、白血病或多发性骨髓瘤。

[0136] 因此,利用本发明的嵌合抗原受体效应细胞的治疗系统不仅可以通过给药含有表达上述嵌合抗原受体的效应细胞的药物组合物来治疗癌症,还可以通过追加给药开关分子来调节上述效应细胞的活性,从而可以进行有效的治疗。

[0137] 尤其,如在本发明的实施例中证明的,本发明的开关分子包含与HER2抗原特异性结合的亲合体,可以使用上述药物组合物治疗的疾病可以为与表达HER2的细胞相关的人及哺乳动物的疾病。

[0138] 具体地,本发明的包含与可替宁结合的抗HER2亲和体的开关分子及表达靶向上述开关分子的可替宁的嵌合抗原受体的效应细胞有效杀灭作为在表面过表达HER2的癌细胞株的SKOV3及作为表达HER2的癌细胞株的OVCAR3。因此,本发明的表达包含与可替宁的S异构体更特异性地结合的抗体或其抗原结合片段的嵌合抗原受体的效应细胞可以有效用作对于表达HER2的癌症的治疗用药物组合物。

[0139] 更为具体地,成为上述治疗对象的疾病可以为乳腺癌、胃癌、卵巢癌、直结肠癌、子宫内膜癌,但不仅限于此。

[0140] 具体地,本发明的药物组合物还可以包含含有与靶细胞的细胞表面分子结合的靶向部分的开关分子,可以通过靶向部分的靶向抗原的操作来在更多疾病的预防或治疗中有效使用。

[0141] 本发明的药物组合物所包含的药学上可接受的载体为配制时通常使用的载体,包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、海藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁及矿物油,但不限定于此。

[0142] 除上述成分以外,本发明的药物组合物还可以包含润滑剂、湿润剂、甜味剂、香味剂、乳化剂、助悬剂、保存剂等。适当的药学上可接受的载体及制剂详细记载在Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995) 中。

[0143] 本发明的药物组合物可以口服或胃肠外给药,例如,可以通过静脉内注射、皮下注射、皮内注射、肌肉内注射、腹腔内注射、胸骨内注射、肿瘤内注射、局部给药、鼻内给药、脑内给药、颅骨内给药、肺内给药及直肠内给药等来给药,但不限定于此。

[0144] 本发明的药物组合物的适当给药量可以根据包括疾病的种类、疾病的严重程度、药物组合物所含的有效成分及其他成分的种类及含量、给药方式及患者的年龄、体重、性别及饮食、给药时间、给药途径、给药期间及同时使用的药物在内的多种因素来调节,普通的熟练医生可以轻松确定及处方对于所希望治疗的有效给药量。根据本发明的优选实例,本发明的药物组合物的一天给药量为 $0.1-9 \times 10^5$ 至 $0.1-9 \times 10^9$ CAR阳性活细胞 (CAR-positive viable cells)/kg。本说明书中的术语“药学上有效的量”是指治疗上述疾病的充分的量。

[0145] 本发明的药物组合物可以根据本发明所属技术领域的普通技术人员可以轻松实施的方法利用药学上可接受的载体和/或赋形剂来配制,可以制备为单位剂量形态或者装入多剂量容器内来制备。在此情况下,剂型可以为油或水性溶剂中的溶液、悬液或乳液的形态,或者也可以为提取剂、散剂、栓剂、粉末剂、颗粒剂、片剂或胶囊剂形态,还可以包含分散剂或稳定剂。

[0146] 并且,除上述开关分子以外,本发明的药物组合物还可以包含其他药剂学活性药剂或药物,例如,还可以包含天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、阿霉素、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春花碱、长春新碱等化疗剂,但不限定于此。

[0147] 根据本发明的又一实施方式,本发明提供包含上述嵌合抗原受体效应细胞作为有效成分的免疫治疗用药物套件。

[0148] 在本发明的一实例中,为了调节嵌合抗原受体效应细胞的激活,上述药物套件还可以包含上述开关分子。

[0149] 本发明的免疫治疗用药物套件包含上述本发明又一实施方式的嵌合抗原受体效应细胞及开关分子,为避免本说明书记载的过度复杂性,援引重复的内容,省略其记载。

[0150] **【发明的效果】**

[0151] 本发明的特征及优点摘要如下。

[0152] (a) 本发明提供一种可替宁的抗体或其抗原结合片段,与可替宁的R异构体相比,与可替宁的S异构体更特异性地结合。

[0153] (b) 本发明提供包含与上述可替宁的S异构体更特异性地结合的靶向可替宁的抗体或其抗原结合片段的嵌合抗原受体及表达上述嵌合抗原受体的效应细胞。

[0154] (c) 本发明提供给用于激活表达上述嵌合抗原受体的效应细胞的开关分子。

[0155] (d) 本发明提供包含上述嵌合抗原受体及开关分子的免疫治疗用药物组合物及免

疫治疗用药物套件。

[0156] (e) 在利用本发明的与可替宁的S异构体更特异性地结合的靶向可替宁的抗体或其抗原结合片段的情况下,与现有的抗体相比,可以诱导优秀的细胞毒性活性。并且,进一步提高抗体与开关分子间结合的特异性,可以更为细微地调节CAR-T等嵌合抗原受体效应细胞的作用,从而可以有效调节因效应细胞在体内的残留而引起的副作用。

【附图说明】

[0157] 图1为通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 分析法以定量的方式确认对可替宁具有特异性的抗体的结合的图。

[0158] 图2为以作为HER2表达细胞的NCI-N87细胞为对象确认与HER2结合的开关(结合有可替宁的曲妥珠单抗(trastuzumab))的细胞结合能力并将平均荧光强度(MFI, mean fluorescence intensity)值图表化的图。

[0159] 图3为通过酶联免疫吸附测定分析法以定量的方式比较确认hz33B2抗体的结合的图。

[0160] 图4为通过流式细胞(Flow cytometry)分析法确认hz33B2抗体的结合的图。

[0161] 图5为包含hz33B2抗体以及作为用作对照组的SUN10抗体的CAR结构的示意图。

[0162] 图6为测定包含结合有可替宁的亲合体与抗可替宁抗体的CAR-T对作为HER2过表达的细胞株的SKOV-3与作为HER2表达细胞株的OVCAR-3细胞株的细胞毒性效果的图。

[0163] 图7为通过酶联免疫吸附测定分析法确认hz33B2抗体与结合有各个可替宁异构体的开关的结合的图。

[0164] 图8为通过流式细胞分析法确认结合有各个可替宁异构体的开关与包含hz33B2抗体的CAR-T的结合的图。

[0165] 图9为测定包含结合有各个可替宁异构体的开关与抗可替宁抗体的CAR-T对作为HER2过表达细胞株的SKOV-3细胞株的细胞毒性效果的图。

【具体实施方式】

[0166] 以下,通过实施例更为详细地说明本发明。但这些实施例仅用于更为具体地说明本发明,本发明所属技术领域的普通技术人员应该自明的是,根据本发明的要旨,本发明的范围不限于这些实施例。

[0167] 在本说明书全文中,若无其他说明,则用来表示特定物质的浓度的“%”,固体/固体为(重量/重量)%,固体/液体为(重量/体积)%,液体/液体为(体积/体积)%。

[0168] 【实施例】

[0169] 【实施例1.开发与可替宁结合的抗体】

[0170] 【1.1.开发生产与可替宁特异性结合的抗体的细胞】

[0171] 【1.1.1.筛选生产与可替宁特异性结合的抗体的细胞】

[0172] 为了开发与可替宁特异性结合的抗体,制备及筛选生产与可替宁特异性结合的抗体的细胞。

[0173] 首先,使用SMCC(赛默飞世尔公司,22122)作为接头将KLH(赛默飞世尔公司(Thermo),77600)与可替宁结合。以2:1的重量比混合KLH与SMCC,在RT中反应1小时来结合

后,通过超滤(ultra-centrifugal filter)去除残余的SMCC。以1:1的比例在与SMCC结合的KLH中混合可替宁后,在4°C的温度下过夜结合。将100 μ g的KLH-Cotinine与弗氏(Freund's)佐剂(西格玛公司(Sigma),F5506)混合后,向BALB/c小鼠((株)大韩生物公司)的腹腔注射。2周后,将100 μ g的KLH-Cotinine稀释在磷酸盐缓冲溶液(PBS)中来追加注射,3天后,摘出上述小鼠的脾脏并分离淋巴细胞。将分离的淋巴细胞与作为骨髓瘤细胞株(myeloma cell)的SP2/0-Ag14(ATCC公司,CRL-1581)以5:1的比例混合后,利用PEG-1500(罗氏公司(Roche),10783641001)来融合(fusion)。在包含HAT添加物(supplement)(西格玛公司,H0262)的培养基中培养融合的细胞来选择性地筛选融合的细胞(杂交瘤,hybridoma)而培养。

[0174] 【1.1.2. 确认与可替宁特异性结合的细胞生产抗体的能力】

[0175] 通过酶联免疫吸附测定方法确认上述筛选的杂交瘤细胞是否生产与抗原结合的抗体。首先,使用与上述KLH-Cotinine的制备方法相同的方法制备能够检测出与可替宁特异性结合的抗体的BSA-Cotinine。以1 μ g/mL的浓度将BSA-Cotinine在Costar 96孔培养板(康宁公司(Corning),3590)中以常温的条件固着1小时。使用TBS-T(0.05%的Triton X-100)洗涤3次后,使用300 μ l的TBS-T/SM(2%的脱脂牛奶(skim milk))在常温下封闭(blocking)30分钟。使用TBS-T洗涤封闭的培养板3次后,加入上述筛选的杂交瘤培养液并在37°C的温度下进行抗原-抗体反应1小时。其中,使用SUN10抗体(US2008-0226650 A1)作为阳性对照组。然后,使用TBS-T洗涤3次后,使用抗-mIgG-HRP(Pierce公司,31439)作为二抗以1:5000的比例在TBS-T/SM中稀释后加入并在37°C的温度下反应1小时。然后,使用TBS-T洗涤3次,加入TMB(Surmodics公司,TMBC-1000-01)并在常温下显色5分钟后,再加入1N的硫酸(sulfuric acid,Duksan公司,254)来停止显色。利用Victor X3(PerkinElmer公司,2030-0030)在450nm的波长中测量吸光度,结果,可以确认上述筛选的杂交瘤细胞生产与可替宁特异性结合的抗体。

[0176] 结果,如图1所示,筛选20E12、30G5及33B2作为与BSA-Cotinine特异性结合的抗体。

[0177] 【1.2. 确认与可替宁特异性结合的抗体的细胞结合能力】

[0178] 为了确认上述筛选的与BSA-Cotinine特异性结合的抗体的细胞结合能力,利用作为表达HER2的癌细胞的NCI-N87(ATCC公司,CRL5822)及抗HER2开关(结合有可替宁的曲妥珠单抗)进行细胞结合亲和力测定(Cell binding affinity assay)来评估细胞结合能力。

[0179] 【制备结合有可替宁的HER2-靶向开关分子】

[0180] 首先,通过EDC反应在人IgG形态的曲妥珠单抗结合反式4-可替宁羧酸(Trans-4-cotininecarboxylic acid)(西格玛公司,33224-01-0)来制备抗HER2开关。上述抗HER2开关利用蛋白测定染色(Protein assay dye)(Bio-Rad公司,Cat.No.500-0006)来定量,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)并通过考马斯亮蓝染色(coomassie blue staining)来确认浓度及纯度。

[0181] 【确认与可替宁特异性结合的抗体与靶向开关间的细胞结合能力】

[0182] 然后,以 5×10^5 个细胞/管准备NCI-N87细胞,以1200rpm离心3分钟来聚集细胞(cell)。使用包含5%的胎牛血清(FBS)的磷酸盐缓冲溶液洗涤后,处理抗HER2开关并在4°C的温度下培养1小时。以利用200 μ l的包含5%的胎牛血清的磷酸盐缓冲溶液在1200rpm的条件下离心3分钟的方法洗涤细胞3次。然后,处理杂交瘤细胞培养液后在4°C的温度下培养1

小时。以与上述方法相同的方法洗涤细胞3次。然后,以1 μ g/mL的浓度对细胞处理抗小鼠(anti-mouse) IgG-FITC(Jackson公司,715-095-150),在遮光的条件下在4 $^{\circ}$ C的温度下培养45分钟。以与上述方法相同的方法洗涤细胞3次。利用高效液相色谱(FACS)仪器来判断上述筛选的抗体是否与细胞结合。

[0183] 结果,如图2所示,可以确认33B2抗体与靶向开关的结合能力最为优秀。下述表1示出有关筛选的33B2抗体的序列信息。【表1:与可替宁特异性结合的抗体:33B2】

序列编号	名称	序列	种类
1	33B2_HCDR1	SYWIQ	PRT
2	33B2_HCDR2	EIFPGTGTTY YNEKFKG	PRT
3	33B2_HCDR3	GGYYDSRAW FAY	PRT
4	33B2_LCDR1	RSSTGTVTTS NYAN	PRT
5	33B2_LCDR2	GTNNRAP	PRT
6	33B2_LCDR3	ALWFSNHVW	PRT
7	33B2_VH	EVQLQSGAE LVKPGASVKL SCKTSGYTFT SYWIQWIKQR PGQGLGWVGE IFPGTGTTY NEKFKGKATL TIDTSSSTAY MQLSSLTSED SAVYFCARGG YYYDSRAWFA YWGQGLVTV SA	PRT
8	33B2_VL	DAVVTQESAL TTSPGETVTL TCRSSSTGTVT TSNYANWVQE KPDHLFTGLI GGTNNRAPGV PARFSGSLIG DEAAALTITGA QTEDEAIYFC ALWFSNHVWF GGGKLTVLG	PRT
[0184]	12	33B2_VH	脱氧核糖核酸(DNA)
		GAGGTGCAGC TTCAGCAGTC TGGAGCTGAG CTGGTGAAGC CTGGGGCTTC AGTGAAGCTG TCCTGCAAGA CTTCTGGCTA CACCTTCACC AGCTACTGGA TTCAGTGGAT AAAACAGAGG CCTGGACAGG GCCTTGGGTG GGTGGAGAG ATATTTCTCG GAAGTGGCAC TACTTACTAC AATGAGAAGT TCAAGGGCAA GGCCACACTG ACTATAGACA CATCCTCCAG CACAGCCTAC ATGCAGCTCA GCAGCCTGAC CTCTGAGGAC TCTGCTGTCT ATTTCTGTGC AAGAGGGGT TATTACTACG ATAGTAGAGC CTGGTTTGCT TACTGGGGCC AAGGGACTCT GGTCACTGTC TCTGCAG	
	13	33B2_VL	脱氧核糖核酸(DNA)
		GATGCTGTTG TGAAGCAGGA ATCTGCACTC ACCACATCAC CTGGTGAAC AGTCACACTC ACTTGTGCT CAAGTACTGG GACTGTTACA ACTAGTAACT ATGCCAACTG GGTCCAAGAA AAACCAGATC ATTTATTCAC TGGTCTAATA GGTGGTACCA ACAACCAGC TCCAGGTGTT CCTGCCAGAT TCTCAGGCTC CCTGATTGGA GACGAGGCTG CCCTCACCAT CACAGGGGCA CAGACTGAAG ATGAGGCAAT ATATTCTGT GCTCTATGGT TCAGCAACCA TTGGGTGTT GGTGGAGGAA CCAAAGTGC TGTCTAGGT	

[0185] 【实施例2.制备及生产人源化抗体】

[0186] 为了将上述筛选的抗体制备为更为可药化(druggable)的形态,进行人源化抗体的制备。

[0187] 【2.1.制备人源化抗体】

[0188] 利用CDR移植方法开发上述实施例1中开发的小鼠33B2抗体的人源化抗体。要移植开发的抗体的CDR的人类抗体利用IMGT/V-QUEST以碱基序列为基准来筛选相似度高的人生殖细胞系(germline)抗体基因的V及J基因(Brochet,X.et al.,Nucl Acids Res.36:503-508(2008))。使用重链的V基因及J基因分别筛选出IGHV1-46*01及IGHJ4*03基因,它们的相似度分别为74.65%及81.25%。而且,使用轻链的V基因及J基因分别筛选出IGLV7-46*01及IGLJ3*02基因,它们的相似度分别为63.54%及88.24%。合成时,分别在正方向添加C1aI限制酶位点,反方向的重链添加NheI限制酶位点,轻链添加BsiWI限制酶位点。然后,在可变区的正方向追加下述表2所示的信号序列以能够使人源化抗体向细胞培养中也分泌。

[0189] 【表2:小鼠IgG κ (Mouse IgG kappa)的信号肽(signal peptide)序列】

序列编号	名称	序列	种类
[0190]	11	小鼠IgG κ _信号肽(Mouse IgG κ _signal peptide)	PRT
		METDTLLLWV LLLWVPGSTG	

[0191] 将合成结束的各可变区与人类恒定区C_κ与C_H连接,重链部分使用pcDNA3.3-TOPO (英杰公司(英杰公司,K8300-01))载体进行TA克隆,轻链部分使用pOptiVEC-TOPO (英杰公司,12744-017)载体进行TA克隆。下述表3示出与可替宁特异性结合的人源化抗体(hz33B2)的序列信息。

[0192] 【表3:与可替宁特异性结合的人源化抗体:hz33B2】

序列编号	名称	序列	种类
9	hz33B2_VH	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWIQWVRQA PGQGLEWMGE	PRT
		IFPGTGTTY NEKFKGRVTM TIDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARGG	
		YYYDSRAWFA YWGQGLTVTV SS	
10	hz33B2_VL	QQAVVTQEPS LTVSPGGTV LTRCSSTGTV TTSNYANWVQ QKPGQAPRGL	PRT
		IGGTNNRAPW TPARFSGSLL GDKAALTLTG AQPEDEAEYY CALWFSNHWV	
		FGGGTKLTVL G	
[0193] 14	hz33B2_VH	CAAGCGGTTG TGACACAAGA GCCCTCTTTG ACTGTAAGCC CGGGTGGTAC	脱氧核糖核酸
		GGTCACACTT ACATGCCGCA GCTCTACCGG GACTGTAACA ACCAGCAACT	
		ACGCGAACTG GGTACAACAG AAACCTGGAC AAGCGCCACG CGGTTTGATA	
		GGAGGGACGA ATAATCGCGC CCCTTGACC CCTGCGAGAT TCTCTGGATC	
		TTTGCTTGGG GACAAAGCAG CCCTTACCCT TAGCGGCGCA CAGCCAGAGG	
ATGAAGCTGA GTATTATTGC GCGCTGTGGT TTTCAAACCA CTGGGTGTTT			
GGCGGCGGCA CGAAATTGAC CGTCTTGGG			
15	hz33B2_VL	CAAGCGGTTG TGACACAAGA GCCCTCTTTG ACTGTAAGCC CGGGTGGTAC	脱氧核糖核酸
		GGTCACACTT ACATGCCGCA GCTCTACCGG GACTGTAACA ACCAGCAACT	
		ACGCGAACTG GGTACAACAG AAACCTGGAC AAGCGCCACG CGGTTTGATA	
		GGAGGGACGA ATAATCGCGC CCCTTGACC CCTGCGAGAT TCTCTGGATC	
		TTTGCTTGGG GACAAAGCAG CCCTTACCCT TAGCGGCGCA CAGCCAGAGG	
ATGAAGCTGA GTATTATTGC GCGCTGTGGT TTTCAAACCA CTGGGTGTTT			
GGCGGCGGCA CGAAATTGAC CGTCTTGGG			

[0194] 【2.2.生产及纯化人源化抗体】

[0195] 利用聚乙烯亚胺(polyscience Inc.公司,23966)向FreeStyle™293F(英杰公司,R790-07)动物细胞瞬时转染(transient transfection)克隆的上述载体,从细胞培养液中利用Protein-A Ceramic HyperD F树脂(PALL公司,20078-028)纯化人源化抗体。

[0196] 利用BCA分析(Pierce公司,23227)定量人源化抗体,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳并通过考马斯亮蓝染色确认浓度及纯度。

[0197] 【实施例3.确认人源化抗体(hz33B2)的结合能力】

[0198] 【3.1.确认人源化抗体(hz33B2)的可替宁结合能力】

[0199] 为了确认上述实施例2中开发的人源化抗体(hz33B2)的可替宁结合能力,利用结合有可替宁的抗HER2亲和体进行酶联免疫吸附测定及流式细胞分析。

[0200] 使用TBS-T(0.05%Triton X-100)洗涤以2μg/mL的浓度包被hHER2-ECD-His蛋白的培养板3次后,使用200μl的TBS-T/SM(3%的脱脂牛奶)在常温下封闭120分钟。使用TBS-T洗涤封闭的培养板3次后,以2μg/mL的浓度在常温下固着结合有可替宁的抗HER2亲和体(ZQAA1-Cot)1小时。使用TBS-T洗涤培养板3次后,将人源化的抗体从20μg/mL开始1/10稀释(dilution)并处理9个点(point)后,在室温下培养1小时。其中,使用SUN10抗体(US2008-0226650 A1)作为阳性对照组。然后,使用抗hIgG-Fc-HRP(英杰公司,H10007)作为二抗在室温下处理1小时。最后,利用TMB进行显色反应,利用酶标仪(ELISA reader)测量OD450值。

[0201] 结果,如图3所示,可以确认人源化抗体(hz33B2)对可替宁具有高的结合能力。

[0202] 【3.2.确认人源化抗体(hz33B2)的细胞结合能力】

[0203] 为了确认人源化的抗体的细胞结合程度,利用表达HER2的SKOV-3及结合有可替宁的抗HER2亲和体进行细胞结合亲和力测定来评估细胞结合能力。

[0204] 以 2×10^5 个细胞/管准备表达HER2的SKOV-3 (韩国细胞株银行, 30077)后,以1200rpm的条件离心3分钟来聚集细胞。然后,使用包含5%的胎牛血清的磷酸盐缓冲溶液洗涤3次后,以 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度在 4°C 的温度下培养结合有可替宁的抗HER2亲和体(ZQAA1-Cot)1小时。使用包含5%的胎牛血清的磷酸盐缓冲溶液洗涤细胞3次后,将人源化的抗体从 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 开始1/10稀释(dilution)并处理6个点(point)后,在 4°C 的温度下培养1小时。其中,使用SUN10抗体(US2008-0226650 A1)作为阳性对照组。然后,以利用 $200\mu\text{l}$ 的包含5%的胎牛血清的磷酸盐缓冲溶液在1200rpm的条件下离心3分钟的方法洗涤细胞3次。然后,处理 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 的作为二抗的抗人(anti-human)-IgG-BV421(BD公司,562581)后在遮光的条件下在 4°C 的温度下培养30分钟。通过与上述方法相同的方法洗涤后,利用高效液相色谱仪器测量荧光的强度。

[0205] 结果,如图4所示,可以确认人源化抗体(hz33B2)通过与结合有可替宁的靶向开关的结合来具有高的细胞结合能力。

[0206] 【实施例4. 包含人源化抗可替宁抗体的CAR-T的开发及其活性的确认】

[0207] 【4.1. 制备包含连接有抗可替宁抗体片段的嵌合抗原受体的慢病毒】

[0208] 利用抗可替宁抗体片段开发嵌合抗原受体。嵌合抗原受体由CD8前导序列、scFV形态的抗-可替宁、CD8铰链及跨膜区、CD137细胞质区域及CD3 β 的细胞质区域构成。对嵌合抗原受体的密码子最佳化后,在由下述表4的EF-1 α 启动子变更的pLenti6-V5/DEST慢病毒载体(英杰公司,V53306)中使用SpeI/XhoI进行切割机连接。

[0209] 【表4:EF-1 α 启动子序列】

序列编号	名称	序列	种类
[0210] 16	EF-1 alpha 启动子 (promoter)	GATGGAGTTT CCCACACTG AGTGGGTGGA GACTGAAGTT AGGCCAGCTT GGCACCTTGAT GTAATTCTCC TTGGAATTTG CCCTTTTTGA GTTTGGATCT TGGTTCATTC TCAAGCCTCA GACAGTGGTT CAAAGTTTTT TTCTCCATT TCAGGTGTCG TGA	脱氧核 糖核酸

[0211] 通过碱基序列分析确认上述制备的构建体,下述表5中示出有关于此的序列信息。

[0212] 【表5:CAR构建体序列】

序列编号	名称	序列	种类
[0213] 17	CAR 构建 体 (cons truct)	ATCGAGGTGA TGTACCCTCC TCCCTATCTC GATAACGAGA AATCTAACGG CACCATCATC CATGTGAAAG GGAAACACCT CTGCCCTTCA CCACTCTTCC CAGGTCCGAG CAAGCCAATT TATATCTGGG CACCGTTGGC GGGGACTTGC GGAGTGCTTT TACTTTCACT GGTATTACG CTGTACTGTA AACGCGGTGC GAAGAAGCTC CTTTACATTT TCAAGCAGCC TTTTATGCGC CCAAGTGCAGA CCACACAGGA GGAAGATGGC TGTAGTTGCA GATTTCCCGA GGAAGAAGAG GGAGGGTGTG AACTGAGAGT CAAATTCAGC CGTTCGCTG ATGCCCCAGC CTATCAACAG GGGCAGAATC AACTGTATAA TGAATTGAAT CTGGGCAGGA GAGAAGAATA CGACGTCCTG GATAAGAGGC GAGGCAGAGA CCCCAGATG GGCGGTAAAC CCCGGCGGAA GAACCCCCAG GAAGGCCTGT ACAACGAGCT GCAGAAGGAC AAGATGGCTG AGGCCTACTC CGAAATAGGA ATGAAGGGGG AGAGAAGGAG AGGCAAAGGA CATGACGGCC TGTACCAGGG ACTGTCTACA	脱氧核 糖核酸

[0214]

	GCTACTAAGG ACACCTATGA TGCATTGCAC ATGCAAGCCC TACCCCTAG A
--	---

[0215] 将制备的慢病毒构建体与编码作为病毒薄膜蛋白的VSV-G(水疱性口炎印第安纳病毒G蛋白(vesicular stomatitis indiana virus G protein))的核酸以及作为包含gag、pol及rev基因的质粒的pCMV-dR8.91一同转导到Lenti-X 293T(宝日医生物技术公司(Takara Bio Inc.),632180)细胞株。转导利用Lipofectamine2000(英杰公司,11668019)根据生产公司的说明书来进行。72小时后,使用离心型过滤装置(密理博公司(Millipore),

UFC910024)将含有慢病毒的培养液浓缩10倍并在-80°C的温度下冷冻保管。

[0216] 【4.2.制备在表面示出包含抗可替宁抗体片段的嵌合抗原受体的细胞毒性T细胞】

[0217] 利用实施例4.1中制备的慢病毒制备在表面示出包含抗可替宁抗体片段的嵌合抗原受体的细胞毒性T细胞。

[0218] 首先,分离人类天然(**naïve**)T细胞并使用Dynabeads™人T细胞激活剂(Human T-Activator)CD3/CD28(赛默飞世尔公司(Thermofisher scientific),11131D)刺激24小时,向上述细胞加入聚凝胺(西格玛亚德里奇公司(Sigma-Aldrich),H9268)及上述慢病毒并培养24小时来转导。然后,更换包含IL-2(Gibco公司,CTP0021)的培养基并在5%的CO₂、37°C的条件下培养。制备的在表面示出包含抗可替宁抗体片段的嵌合抗原受体的T细胞在制备后的24小时内随后的实验中使用。

[0219] 【4.3.确认利用包含抗可替宁抗体的CAR-T的细胞毒性效果】

[0220] 利用上述实施例4.2中制备的CAR-T与结合有可替宁的抗HER2亲和体确认它们的复合物是否通过识别细胞表面的HER2来诱导嵌合抗原受体细胞的激活。

[0221] 具体地,向作为HER2过表达细胞株的SKOV-3及作为HER2表达细胞株的OVCAR-3导入表达GFP-荧光素酶(Luciferase)的慢病毒(Biosettia公司,GlowCell-16p-1)来构建作为基因导入细胞株的SKOV3-Luc及OVCAR3-Luc细胞株来在实验中使用。首先,将SKOV3-Luc细胞株及OVCAR3-Luc细胞株以每孔 1×10^4 的量分注到96孔培养板中。向分注Luc细胞株的培养板中以每孔的SKOV3-Luc或OVCAR3-Luc:细胞毒性T细胞为2:1的比例(细胞数比例)的方式加入制备的细胞毒性T细胞。按照浓度(0.1nM、1nM、10nM、100nM)向处理Luc细胞株和细胞毒性T细胞的试验组中加入结合有可替宁的抗HER2亲和体,在5%的CO₂及37°C的条件下培养24小时。其中,使用SUN10-CAR-T细胞(US2008-0226650 A1)作为阳性对照组。培养后,通过荧光素酶测定(Bio-Glo荧光素酶测定系统(Luciferase assay system),Promega公司,G7941)确认细胞毒性T细胞的毒性效果。通过如下方式确认:培养细胞毒性T细胞、与可替宁结合的亲和体及Luc细胞株后,使用3X裂解缓冲液(Lysis buffer)(75mM的Tris(pH8.0)、30%的甘油(glycerol)、3%的Triton X100)裂解剩余的SKOV3-Luc或OVCAR3-Luc细胞株并洗脱,将出现的荧光素酶与底物反应来确认。以仅培养Luc细胞株的孔中的信号为基准(100%)来确定裂解(Lysis)比例。

[0222] 如图6所示,可以确认对于所有细胞株,细胞毒性效果随着结合有可替宁的亲和处理浓度的增加而增加。尤其,确认到细胞毒性效果与之前报告的SUN10-CAR-T(US2008-0226650 A1)相比,示出同等的细胞毒性,或者在高浓度中示出相对更为优秀的细胞毒性效果。

[0223] 【实施例5.确认可替宁异构体的CAR-T的结合能力及细胞毒性活性】

[0224] 可替宁以混合两种异构体的形态存在,确认上述开发的抗可替宁结合抗体对于各种可替宁异构体是否具有其他结合特性及细胞毒性活性。

[0225] 【制备可替宁异构体的抗HER2亲和体】

[0226] 利用手性柱将混合两种异构体的可替宁分离为两个单一的异构体。通过晶体结构(crystal structure)分析确定分离的各异构体分别为R异构体和S异构体。分别将分离的异构体与作为抗HER2亲和体的ZQAA1结合来合成两种开关:ZQAA1-Cot(R)及ZQAA1-Cot(S)。

[0227] 【5.1.确认根据可替宁异构体的CAR-T的结合能力】

[0228] 为了确认CAR-T对上述制备的具有各不相同的可替宁异构体的抗HER2开关的结合能力,利用酶联免疫吸附测定及流式细胞仪进行分析。

[0229] **【5.1.1.通过酶联免疫吸附测定(ELISA assay)确认CAR-T的结合能力】**

[0230] 首先,利用酶联免疫吸附测定确认CAR-T对上述两种抗HER2开关的结合能力。

[0231] 使用TBS-T(0.05%Triton X-100)洗涤以2 μ g/mL的浓度包被hHER2-ECD-His蛋白的培养板3次后,使用200 μ l的TBS-T/SM(3%的脱脂牛奶)在常温下封闭120分钟。使用TBS-T洗涤封闭的培养板3次后,以2 μ g/mL的浓度在常温下固着结合有不同的可替宁异构体的抗HER2开关1小时。然后,使用TBS-T洗涤培养板3次后,将人源化的抗体从20 μ g/mL开始1/10稀释并处理9个点后,在室温下培养1小时。使用抗hIgG-Fc-HRP(英杰公司,H10007)作为二抗在室温下处理1小时后,加入TMB进行显色反应。然后,利用酶标仪测量OD450值。

[0232] 结果,如图7所示,可以确认本发明的包含抗可替宁抗体的CAR-T与结合有可替宁的S异构体的抗HER2开关(ZQAA1-Cot(S))具有高的结合力。与有关结合有混合形态的可替宁的抗HER2开关(ZQAA1-Cot)的结果相比,示出相同或更高水平的结合能力,进而,在高浓度中示出与S型的可替宁异构体的结合能力更高一些。

[0233] 相反,确认到几乎不与结合有可替宁的R异构体的抗HER2开关(ZQAA1-Cot(R))结合,通过此可以确认本发明的包含抗可替宁抗体的CAR-T与可替宁的S异构体特异性地结合。

[0234] **【5.1.2.通过流式细胞仪确认CAR-T的结合能力】**

[0235] 接着,利用流式细胞仪确认包含抗可替宁抗体的CAR-T是否与上述两种抗HER2开关结合。

[0236] 以 2×10^5 个细胞/管的密度准备通过实施例4.2制备的h33B2-CART后,以1200rpm离心3分钟来聚集细胞。使用包含5%的胎牛血清的磷酸盐缓冲溶液洗涤后,以2 μ g/mL的浓度加入两种抗HER2开关并在4 $^{\circ}$ C的温度下培养1小时。以与上述方法相同的方法洗涤细胞后,以2 μ g/mL的浓度加入HER2-ECD-Fc并在4 $^{\circ}$ C的温度下培养1小时。然后,以利用200 μ l的包含5%的胎牛血清的磷酸盐缓冲溶液在1200rpm的条件下离心3分钟的方法洗涤细胞3次。然后,向细胞处理2 μ l的抗CD3-APC-H7(BD公司,560176)、2 μ l的an-human-Fc-PE(BioLegend公司,410708)及5 μ l的7-ADD(BD公司,559925)后在遮光的条件下在4 $^{\circ}$ C的温度下培养1小时。然后,以利用200 μ l的包含5%的胎牛血清的磷酸盐缓冲溶液在1200rpm的条件下离心3分钟的方法洗涤细胞3次。利用高效液相色谱仪测量荧光的强度。

[0237] 结果,如图8所示,可以确认包含本发明的抗可替宁的CAR-T与结合有可替宁的S异构体的抗HER2开关(ZQAA1-Cot(S))具有高的结合能力。尤其,与结合有混合形态的可替宁的抗HER2开关(ZQAA1-Cot)相比,示出相同或更高水平的结合能力,相反,对于可替宁的R异构体,示出几乎不具有结合能力。确认这与上述酶联免疫吸附测定的结果相同。

[0238] **【5.2.确认可替宁异构体的CAR-T的细胞毒性活性】**

[0239] 利用本发明的包含抗可替宁抗体的CAR-T确认上述两种的抗HER2开关的CAR-T的细胞毒性激活。为此,利用通过实施例4.2制备的h33B2-CART,以与实施例4.3相同的方法评估细胞毒性活性。

[0240] 具体地,将SKOV3-Luc细胞株以每孔 1×10^4 个的量分注到96孔培养板中。向分注Luc细胞株的培养板以每孔SKOV3-Luc:细胞毒性T细胞为1:2的比例加入细胞毒性T细胞。按

照浓度(0.0001nM、0.001nM、0.01nM、0.1nM、1nM、10nM及100nM)向处理Luc细胞株和细胞毒性T细胞的试验组中加入上述两种抗HER2亲和体后,以5%的CO₂及37°C的条件培养24小时。培养后,通过荧光素酶测定(Bio-Glo荧光素酶测定系统,Promega公司,G7941)确认细胞毒性T细胞和毒性效果。通过如下方式确认其细胞毒性效果:培养细胞毒性T细胞、与可替宁结合的亲和体及Luc细胞株后,使用3X裂解缓冲液(75mM的Tris(pH8.0)、30%的甘油、3%的Triton X100)裂解剩余的SKOV3-Luc或OVCAR3-Luc细胞株并洗脱,将出现的荧光素酶与底物反应来确认。以仅培养Luc细胞株的孔中的信号为基准(100%)来确定裂解比例。

[0241] 结果,如图9所示,可以确认结合有可替宁的S异构体的抗HER2开关(ZQAA1-Cot(S))的优秀的细胞毒性活性。尤其,与结合有混合形态的可替宁的抗HER2开关(ZQAA1-Cot)相比,示出相同水平的高的细胞毒性活性。相反,可替宁的R异构体的细胞毒性活性仅在高浓度处理时略有增加,示出显著低水平的活性。

[0242] 因此,可以确认本发明的抗可替宁抗体随着可替宁异构体的种类在可替宁结合能力及利用其的CAR-T的细胞毒性活性中示出差异。

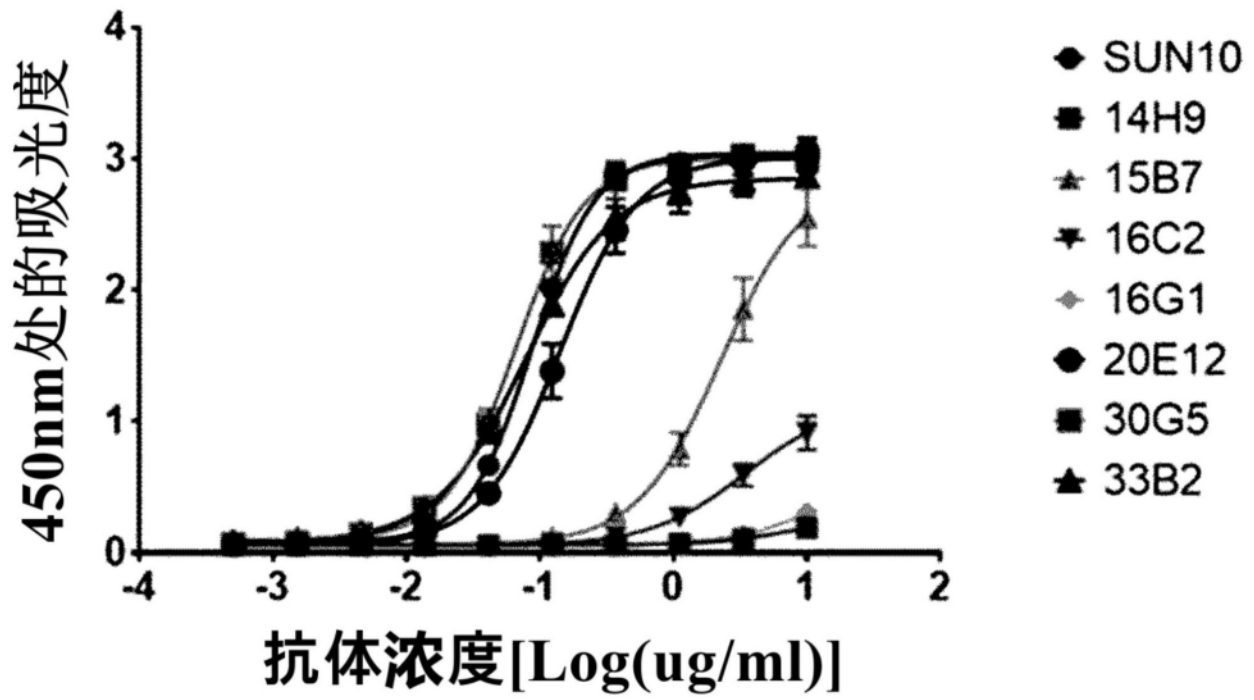


图1

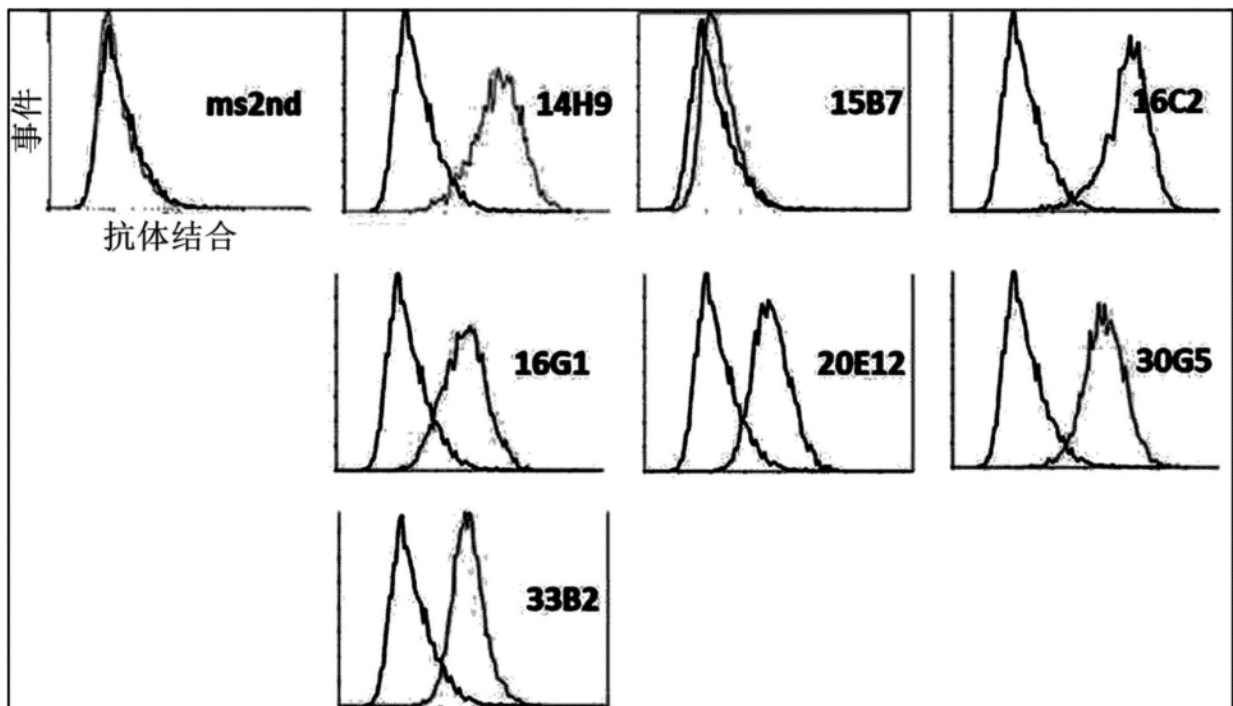


图2

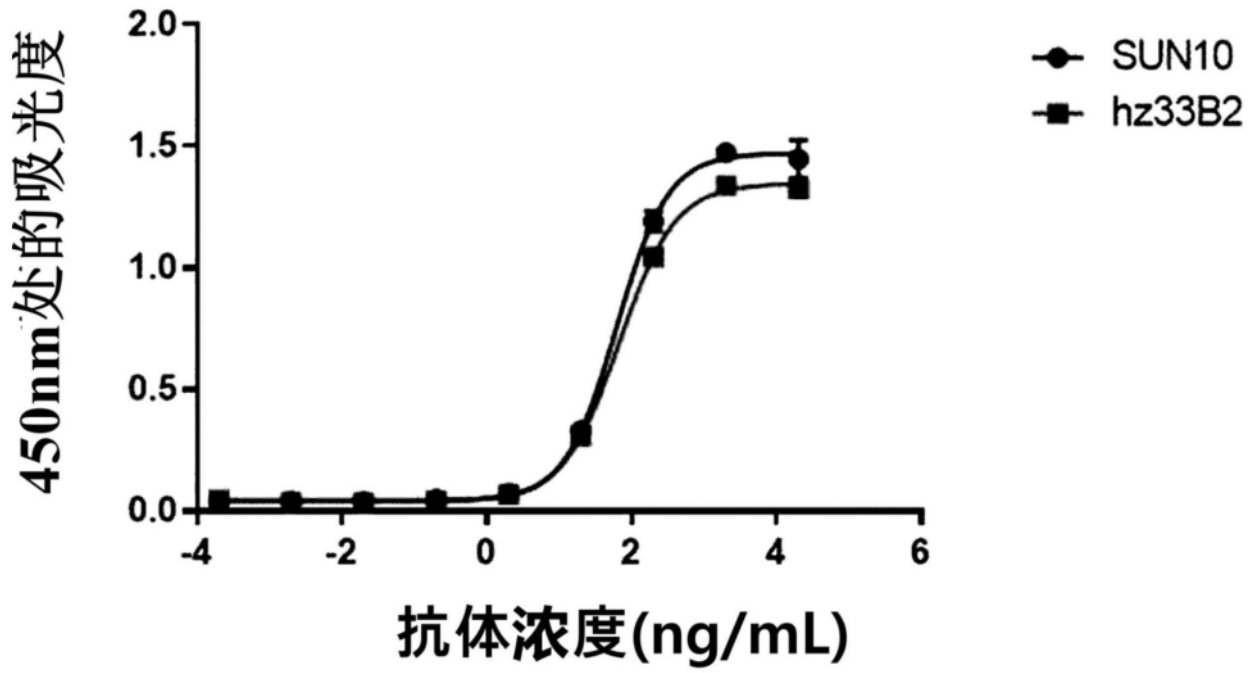


图3

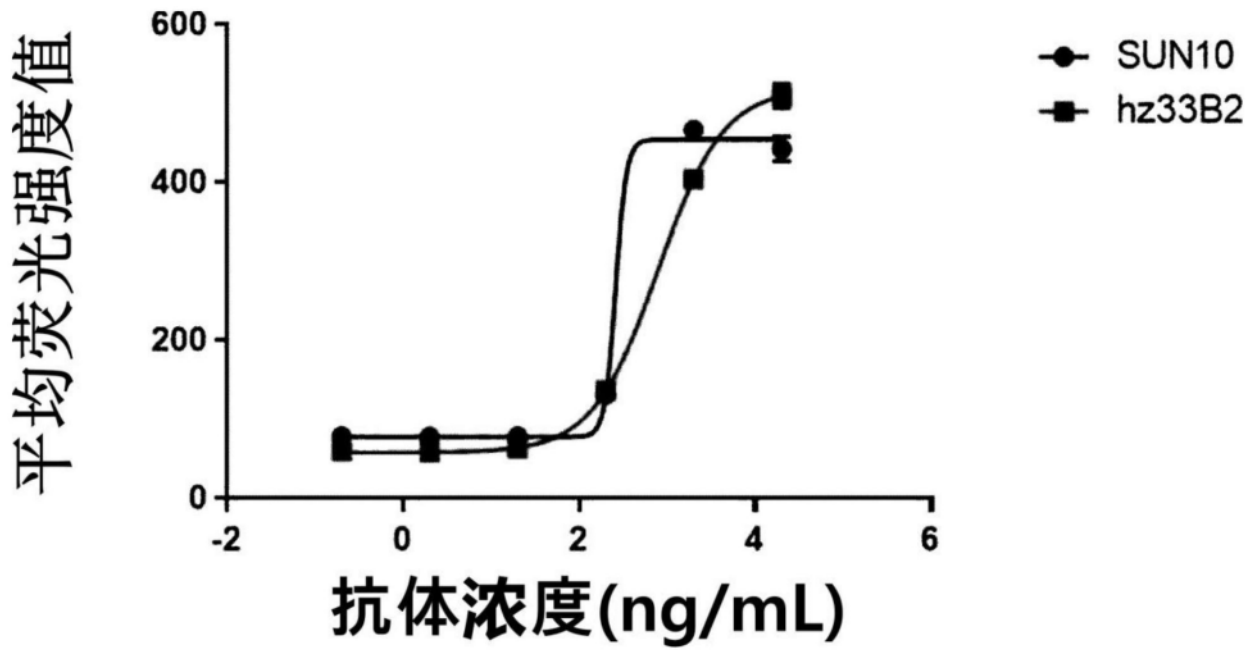


图4

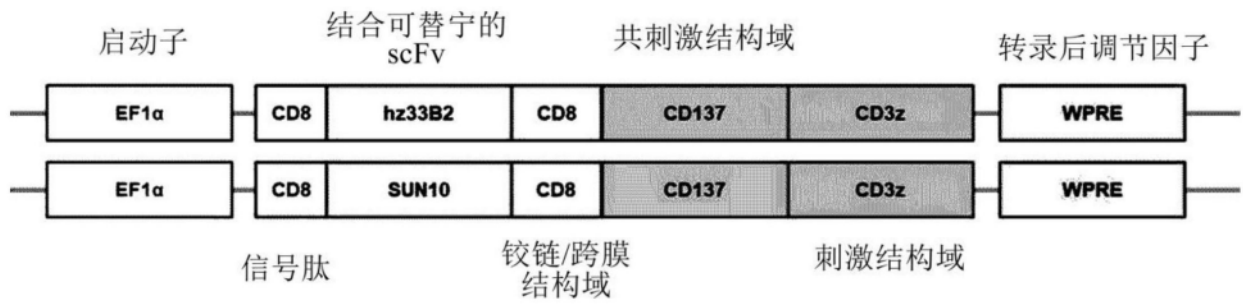


图5

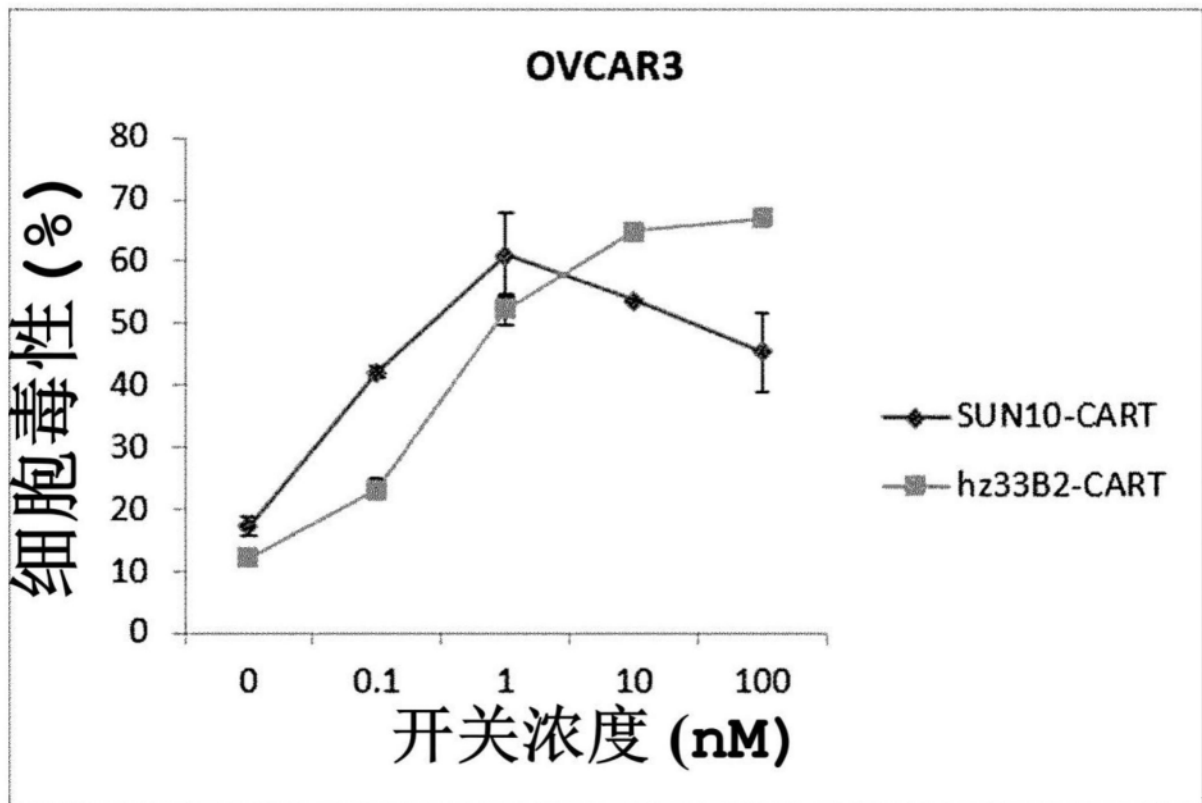
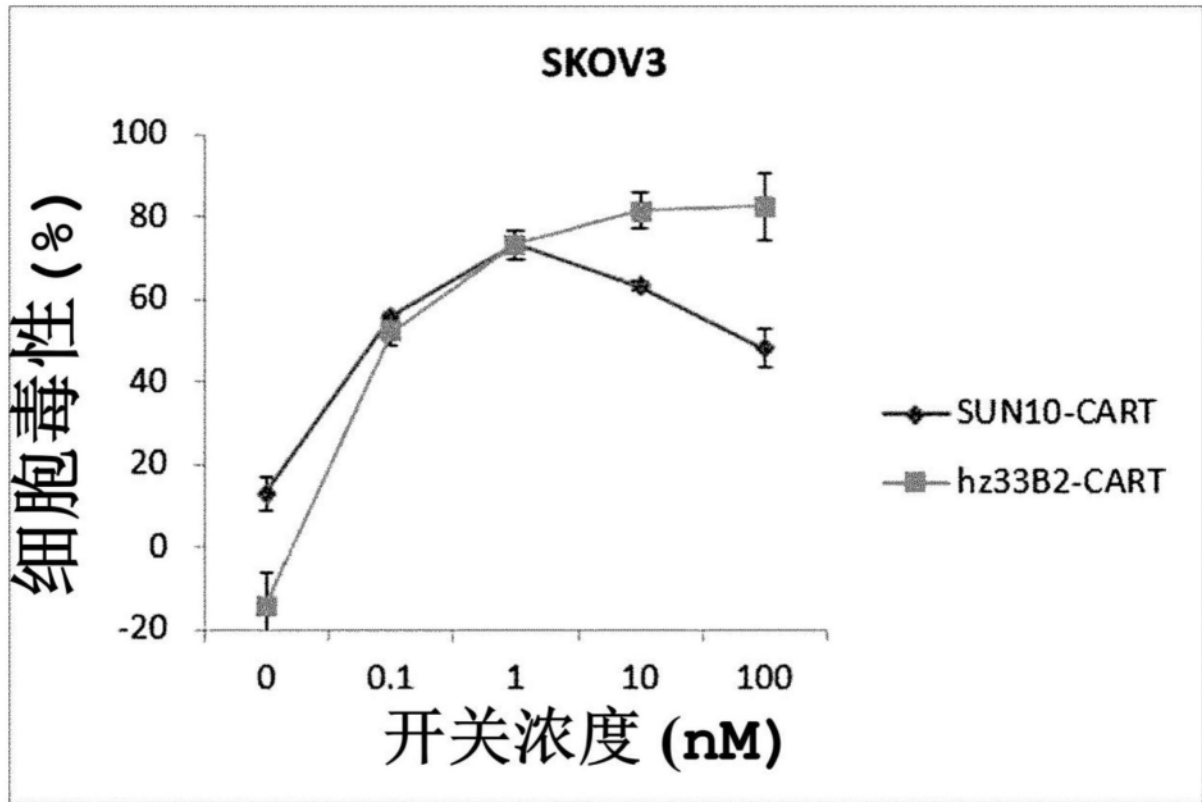


图6

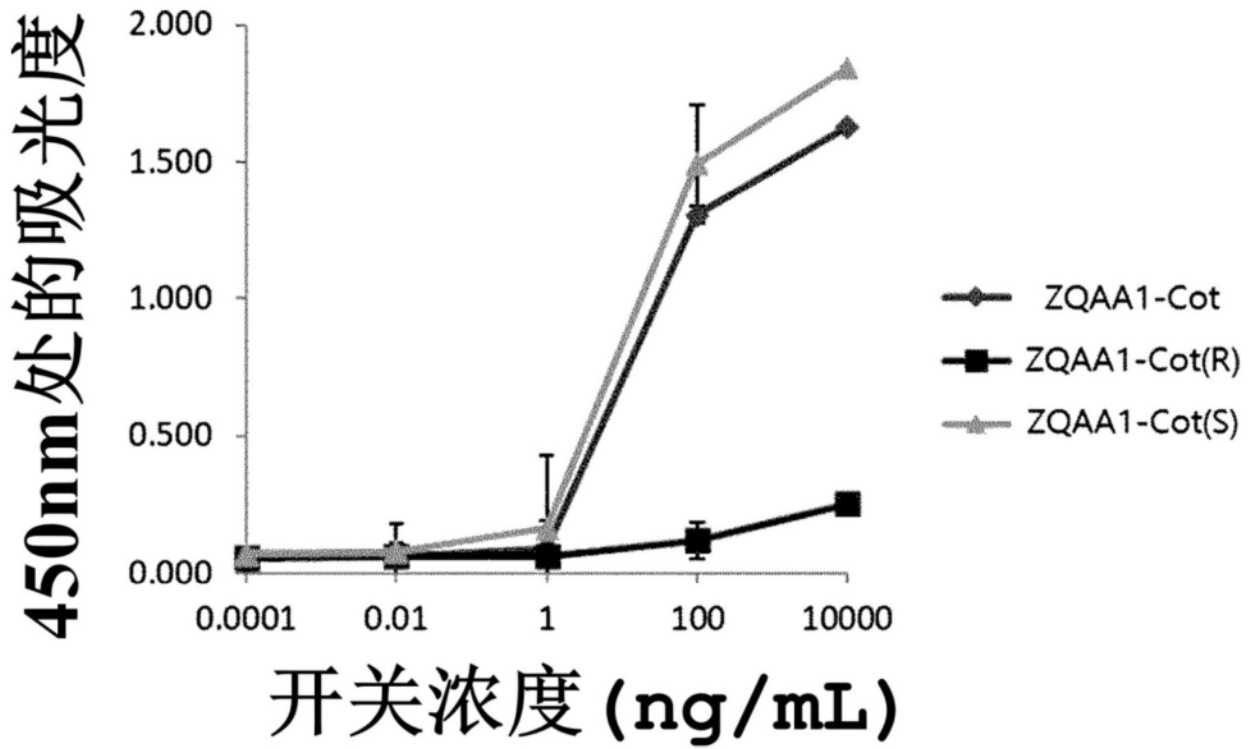


图7

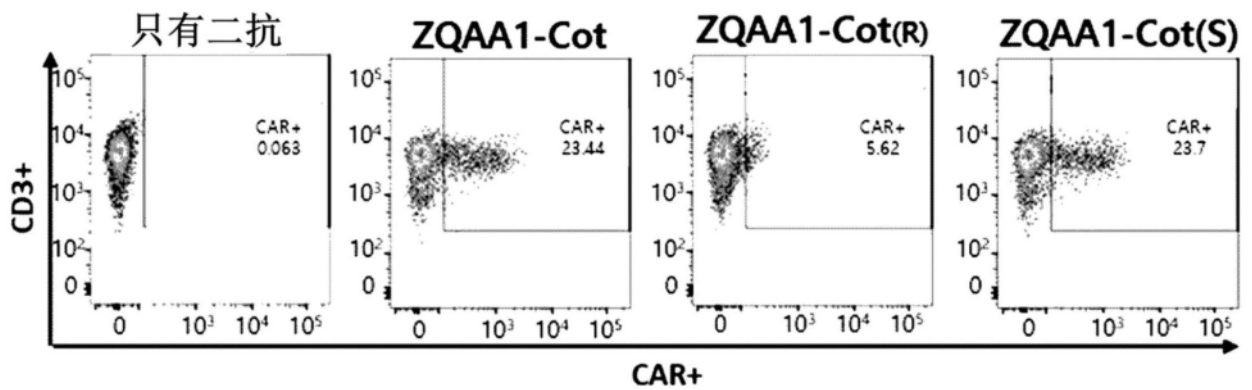


图8

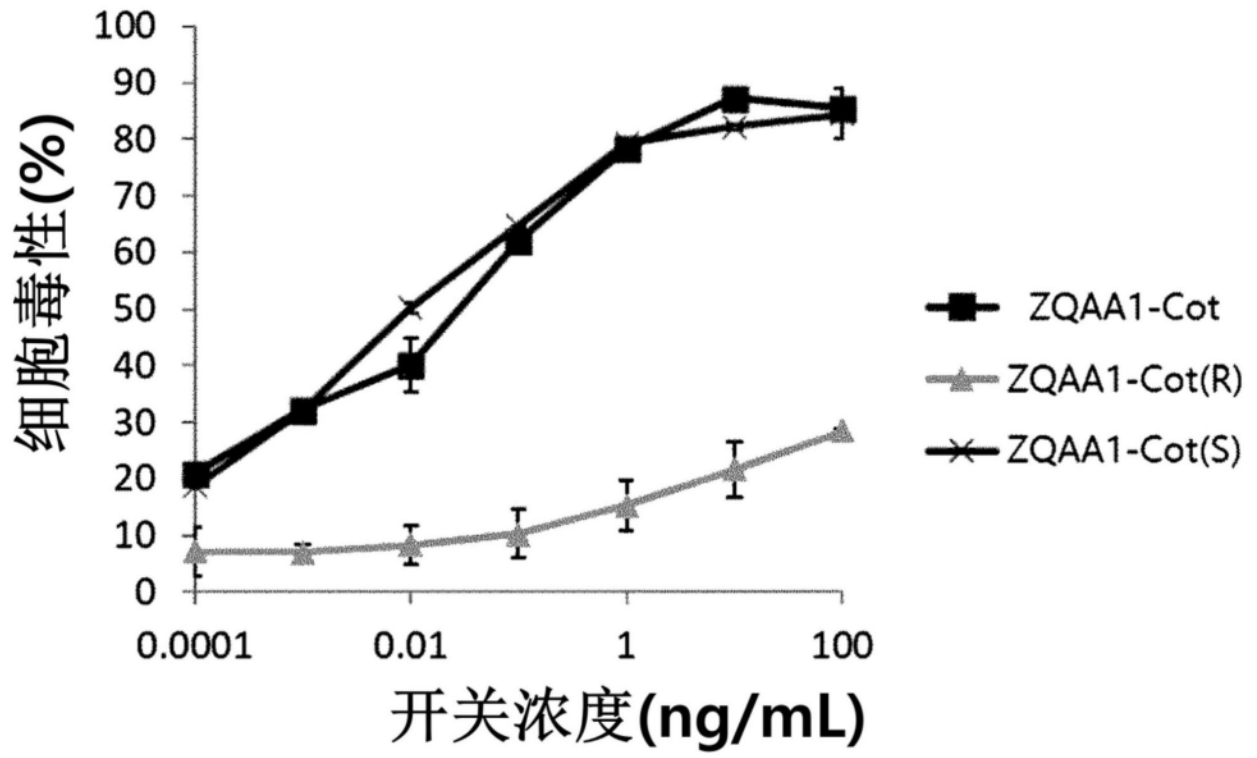


图9