(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118696064 A
(43)申请公布日 2024.09.24

(21)申请号 202380018798.X
(22)申请日 2023.01.24
(30)优先权数据
63/302,639 2022.01.25 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.07.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/061136 2023.01.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/147292 EN 2023.08.03
(71)申请人 费城儿童医院
地址 美国
申请人 匹兹堡大学联邦系统高等教育
(72)发明人 迪米特尔·迪米特罗夫 陈川 孙泽华 雅艾尔·莫斯
(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司 11332
专利代理师 刘明海 胡彬
(51)Int.Cl.
C07K 16/30(2006.01)
A61K 35/17(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)

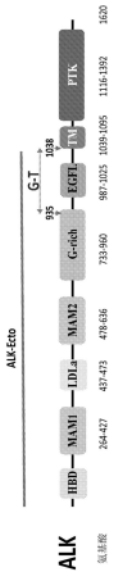
权利要求书1页 说明书13页
序列表（电子公布） 附图14页

(54)发明名称

间变性淋巴瘤激酶抗体及其使用方法

(57)摘要

神经母细胞瘤(NB)仍然是儿童癌症发病率和死亡率的主要原因。间变性淋巴瘤激酶(ALK)致癌基因中存在可遗传的激活突变,这些相同的突变通常在高风险NB肿瘤发生过程中体细胞获得。ALK已被确立为NB中易处理的分子靶点,并为ALK抑制疗法的临床开发提供了理论基础。提供了抗ALK抗体及其抗原结合片段及其使用方法。



CN 118696064 A

1.一种分离的抗体或其抗原结合片段,其对间变性淋巴瘤激酶(ALK)具有免疫特异性,其中所述抗体或其片段特异性结合ALK的氨基酸733-960或氨基酸935-1038。

2.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含来自VH20或VH78的至少一个互补性决定区。

3.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含来自VH20或VH78的全部三个互补性决定区。

4.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含GFTFSSYA(SEQ ID NO:3)、IWYDGSNQ(SEQ ID NO:4)和AKSSYYDSSGYYFPYGY(SEQ ID NO:5)。

5.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含GFTFSSYA(SEQ ID NO:3)、IYPGDSDT(SEQ ID NO:7)和ARERGWQDAFDI(SEQ ID NO:8)。

6.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAAI WYDGSNQYYADSVKGRFTISRDDSTNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKSSYY DSSGYYFPYGYWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:2)。

7.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWMGII YPGDSDTRYSPSFQGHVTISRDDSTNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARERGWQ DAFDIWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:6)。

8.一种免疫缀合物,其包含根据权利要求1至7中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

9.一种抗体-药物缀合物(ADC),其包含根据权利要求1至7中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

10.一种嵌合抗原受体(CAR),其包含根据权利要求1至7中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

11.一种CAR T细胞,其包含根据权利要求10所述的CAR。

12.一种双特异性T细胞接合物,其包含根据权利要求1至7中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

13.一种用于治疗、抑制和/或预防受试者的癌症的方法,其包括施用包含抗ALK抗体或其抗原结合片段的组合物,所述组合物包含根据权利要求1至12中任一项所述的化合物和至少一种药学上可接受的载体。

14.根据权利要求13所述的方法,其中所述癌症在其表面表达ALK。

15.根据权利要求13所述的方法,其中所述癌症是神经母细胞瘤。

16.根据权利要求13所述的方法,其进一步包含施用ALK抑制剂和/或化疗剂。

间变性淋巴瘤激酶抗体及其使用方法

[0001] 本申请根据35 U.S.C.§119(e)要求2022年1月25日提交的美国临时专利申请号63/302,639的优先权。前述申请通过引用的方式并入本文。

[0002] 这项发明是在美国国立卫生研究院授予的拨款号CA140198的政府资助下完成的。政府拥有本发明的某些权利。

技术领域

[0003] 本发明涉及肿瘤学领域。更具体地,本发明提供了用于治疗癌症如神经母细胞瘤的包含间变性淋巴瘤激酶(ALK)抗体的组合物和方法。

背景技术

[0004] 在整个说明书中引用了一些出版物和专利文件,以描述本发明所属领域的现状。这些引用中的每一个都通过引用的方式并入本文,就像被完整阐述一样。

[0005] 神经母细胞瘤(NB)仍然是儿童癌症发病率和死亡率的主要原因。遗传性激活突变存在于间变性淋巴瘤激酶(ALK)癌基因中,这些相同的突变在高危NB肿瘤发生过程中经常体细胞获得。ALK已被确定为NB中易处理的分子靶点,并为ALK抑制疗法的临床发展提供了理论基础。事实上,ALK在绝大多数NB和其他儿科恶性肿瘤的细胞表面大量表达,而在正常组织中不显著表达。值得注意的是,大多数激活ALK突变对第一代药物如克唑替尼(crizotinib)不敏感。然而,化疗可以使ALK突变NB对克唑替尼敏感。此外,劳拉替尼(lorlatinib)是唯一有效对抗所有激活突变的ALK抑制剂。分子靶向药物的组合(例如用于患ALK驱动的NB患者的塞瑞替尼(ceritinib)和瑞波西利(ribociclib))已经显示出协同活性。然而,仍然需要用于治疗表达ALK的癌症的新疗法。

发明内容

[0006] 根据本发明,提供了抗间变性淋巴瘤激酶(ALK)抗体及其片段(例如,抗原结合片段)。在某些实施方案中,抗ALK抗体或其片段结合ALK的氨基酸733-960或氨基酸935-1038。在某些实施方案中,抗体或其片段包含来自VH20或VH78的至少一个互补决定区。在某些实施方案中,抗体或其片段包含来自VH20或VH78的全部三个互补决定区。在某些实施方案中,抗体或其片段包含VH20或VH78。

[0007] 根据本发明的另一方面,提供了包含抗ALK抗体或其片段(例如抗原结合片段)的免疫缀合物。在某些实施方案中,免疫缀合物是包含抗ALK抗体或其片段的抗体-药物缀合物(ADC)。提供了包含抗ALK抗体或其片段(例如,抗原结合片段)的双特异性T细胞接合物(BiTE)。还提供了包含抗ALK抗体或其片段(例如,抗原结合片段)的嵌合抗原受体(CAR)和CAR-T细胞。

[0008] 根据本发明的另一方面,提供了用于治疗、抑制和/或预防(例如,抑制癌症发作)受试者或患者的癌症的方法。在某些实施方案中,该方法包括向受试者或患者施用抗ALK抗体或其片段(例如,抗原结合片段)或包含抗ALK抗体或其片段(例如,抗原结合片段)的化合

物或细胞。在某些实施方案中,癌症表达ALK,特别是在其表面上表达。在某些实施方案中,癌症是神经母细胞瘤。在某些实施方案中,该方法还包括向受试者施用化疗剂、放疗和/或ALK抑制剂。

附图说明

[0009] 图1A是间变性淋巴瘤激酶(ALK)蛋白的示意图。图1B提供了VH20或VH9与293T细胞或表达富G(G-rich)结构域(293T-ALK)的293T细胞的结合图。图1C提供了VH78或VH5与293T细胞或表达G-T结构域(293T-ALK)的293T细胞的结合图。

[0010] 图2A-2D提供了通过动态光散射(DLS)所确定的显示VH20(图2A)、VH9(图2B)、VH5(图2C)和VH78(图2D)在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的聚集的图。图2A提供了第0天、第1天、第4天、第7天和第14天的样品图(从上至下);图2B提供了第0天和第1天的样品图(从上至下);图2C提供了第0天、第1天、第4天和第7天的样品图(从上至下);图2D提供了第0天、第1天和第4天的样品图(从上至下)。

[0011] 图3A-3D提供了VH的表征。图3A提供了ELISA测定的图,其中指示了VH(●)和ALK-Fc(一种ALK胞外结构域融合体和人IgG1 Fc的融合体)。还显示了不含抗体的对照(▲)。图3B提供了VH20的尺寸排阻色谱(SEC)测定图。图3C提供了ALK、VH20和KTN0239-IgG的结合图。图3D提供了VH20或对照抗体与SK-N-AS、IMR32或SY5Y-D3细胞结合的流式细胞术结果的图。

[0012] 图4提供了具有VH9(左)、VH20(左)、VH5(右)或VH78(右)的CAR-T细胞和293T细胞或表达ALK的293T细胞的细胞毒性图。

[0013] 图5A提供了VH20双特异性T细胞接合物(VH20-OKT3-Fc BiTE)的示意图和在存在或不存在β-巯基乙醇的情况下的VH20-OKT3-Fc BiTE的SDS-PAGE分析图像。图5B提供了VH20-OKT3-Fc BiTE的尺寸排阻色谱(SEC)测定图。图5C提供了针对指定细胞的VH20-OKT3-Fc BiTE或对照(Iso)的体外细胞毒性测定的图。

[0014] 图6A提供了当与293T细胞或293T-ALK细胞一起培养时,不同浓度的标记VH20的内化图。图6B提供了与293T或293T-ALK细胞一起培养的单甲基瑞奥西汀E(MMAE)或抗体-药物缀合物VH20-Fc-MMAE的细胞毒性图。

具体实施方式

[0015] 人ALK蛋白是胰岛素受体超家族的220kDa细胞表面受体酪氨酸激酶。图1A提供了ALK的结构域的示意图。ALK包含氨基酸264-427和478-636处的两个MAM结构域(meprin/A5蛋白/PTPmu)、氨基酸437-473处的低密度脂蛋白A类(LDLa)基序、氨基酸733-960处的富含甘氨酸的区域(G-rich)、氨基酸1039-1059处的跨膜结构域(TM)和氨基酸1116-1392处的PTK(蛋白酪氨酸激酶)结构域。ALK还包含靠近N-末端的肝素结合结构域(HBD)(例如,从信号肽后的氨基酸19开始)和来自氨基酸987-1025的EGFL结构域。ALK还包含TNFL模块,它可以与富G区结合形成球状TNFL-GR超结构域。ALK的胞外结构域是ALK N-末端到TM结构域的区域(例如,氨基酸1-1038或氨基酸19-1038)。ALK氨基酸和核苷酸序列在例如GenBank基因ID:238;以及GenBank登录号NM_004304.5和NP_004295.2中提供。在某些实施方案中,ALK的氨基酸序列包含(SEQ ID NO:1):

MGAIGLLWLLPLLLSTAAVGSGMGTGQRAGSPAAGPPLQPREPLSYSRLQ 50

RKSLAVDFVVPSLFRVYARDLLLPPSSSELKAGRPEARGSLALDCAPLLR 100

LLGPAPGVSWTAGSPAPAEARTLSRVLKGGSVRKLRRAKQLVLELGEEAI 150

LEGCVGPPGEAAVGLLQFNLSELFSWWIRQGEGRLRIRLMPEKKASEVGR 200

EGRLSAAIRASQPRLLFQIFGTGHSSLESPTNMPSPSPDYFTWNLTWIMK 250

DSFPFLSHRSRYGLECSFDFPCELEYSPPLHDLRNQSWSWRRIPSEEASQ 300

MDLLDGPGAERSKEMPRGSFLLLNTSADSKHTILSPWMRSSSEHCTLAVS 350

VHRHLQPSGRYIAQLLPHNEAAREILLMPTPGKHGWTVLQGRIGRPDNPF 400

RVALEYISSGNRSLSAVDFFALKNCSEGTSPGSKMALQSSFTCWNGTVLQ 450

LGQACDFHQDCAQGEDESQMCRKLPVGFYCNFEDGFCGWTQGTLSPHTPQ 500

[0016] WQVRTLKDARFQDHQDHALLLSTTDVPASESATVTSATFPAPIKSSPCEL 550

RMSWLIRGVLRGNVSLVLVENKTGKEQGRMVWHVAAYEGLSLWQWMVLPL 600

LDVSDRFWLQMVAWWGQGSRAIVAFDNISISLDCYLTISGEDKILQNTAP 650

KSRNLFERNPNKELKPGENSPRQTPIFDPTVHWLFTTCGASGPHGPTQAQ 700

CNNAYQNSNLSVEVGSEGPLKGIQIWKVPATDTYSISGYGAAGGKGGKNT 750

MMRSHGVSVLGIFNLEKDDMLYILVGQQGEDACPSTNQLIQKVCIGENNV 800

IEEEIRVNRSVHEWAGGGGGGGGATYVFKMKDGVPVPLIIAAGGGGRAYG 850

AKTDTFHPERLENNSSVLGLNGNSGAAGGGGGWNDNTSLLWAGKSLQEGA 900

TGGHSCPQAMKKWGWETRGGFGGGGGGCSSGGGGGGYIGGNAASNNDPEM 950

DGEDGVSFISPLGILYTPALKVMEGHGEVNIKHYLNCSHCEVDECHMDPE 1000

SHKVICFCDHGTVLAEDGVSCIVSPTPEPHLPLSLILSVVTSALVAALVL 1050

[0017]

AFSGIMIVYRRKHQELQAMQMELQSPEYKLSKLRTSTIMTDYNPNYCFAG 1100

KTSSISDLKEVPRKNITLIRGLGHGAFGEVYEGQVSGMPNDPSPLQVAVK 1150

TLPEVCSEQDELDFLMEALIISKFNHQNIVRCIGVSLQSLPRFILLELMA 1200

GGDLKSFLRETRPRPSQPSSLAMLDLLHVARDIACGCQYLEENHFIHRDI 1250

AARNCLLTCPGPGRVAKIGDFGMARDIYRASYYRKGGCAMLPVKWMPPEA 1300

FMEGIFTSKTDTWSFGVLLWEIFSLGYMPYPSKSNQEVLEFVTSGGRMDP 1350

PKNCPGPVYRIMTQCWQHQPEDRPNFAIILERIEYCTQDPDVINTALPIE 1400

YGPLVEEEEKVPVRPKDPEGVPPLLVSQQAKREEERSPAAPPPLPTTSSG 1450

KAAKKPTAAEISVRVPRGPAVEGGHVNMAFSQSNPPSELHKVHGSRNKPT 1500

SLWNPTYGSWFTEKPTKKNNPIAKKEPHDRGNLGLEGSCTVPPNVATGRL 1550

PGASLLLEPSSLTANMKEVPLFRLRHFPCGNVNYGYQQQGLPLEAATAPG 1600

AGHYEDTILKSKNSMNQPGP 1620

[0018] 根据本发明的一个方面,提供了抗ALK抗体及其片段(例如抗原结合片段)。抗ALK抗体可以是单克隆或多克隆的。抗ALK抗体可以是双特异性的。在某些实施方案中,抗体或其片段对人ALK具有免疫学特异性。抗ALK抗体或其片段可以识别线性表位或构象表位。在某些实施方案中,抗ALK抗体或其片段结合ALK的富G结构域(例如,氨基酸733-960)。在某些实施方案中,抗ALK抗体或其片段结合ALK的G-T结构域(例如,氨基酸935-1038)。在某些实施方案中,抗ALK抗体或其片段对包含ALK(例如,SEQ ID NO:1)的氨基酸733-960的多肽具有免疫学特异性。在某些实施方案中,抗ALK抗体或其片段对包含ALK(例如,SEQ ID NO:1)的氨基酸935-1038的多肽具有免疫学特异性。在序列的N-末端和/或C-末端,上述表位可以比上述鉴定的序列长或短0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸,特别是1、2、3、4或5个氨基酸。在某些实施方案中,上述表位与SEQ ID NO:1具有至少90%、95%、97%、99%或100%的同源性或同一性。与本文提供的抗体结合相同表位的抗体也包括在本发明中。

[0019] 在某些实施方案中,抗ALK抗体或其片段对ALK的氨基酸733-960具有免疫学特异性。在某些实施方案中,抗ALK抗体包含VH20或其片段。在某些实施方案中,抗ALK抗体包含重链(例如,VH结构域),其包含:EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAAIWYDGSNQYYADSVKGRFTISRDDSTNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKSSYYDSSGYYFPYGYWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:2),其中下划线的序列是互补决定区(CDR)。在某些实施方案中,抗ALK抗体或其片段包含VH20的一个、两个或全部三个CDR(例如,由IMGT、Chothia、Kabat、Martin(例如,增强的Chothia)或AHo编号方案确定)。在某些实施方案中,抗ALK抗体或其片段包含SEQ ID NO:2的一个、两个或全部三个CDR。在某些实施方案中,抗ALK抗体或其片段包含重链(例如,VH结构域),该重链包含SEQ ID NO:2的一个、两个或全部三个CDR。在某些实施方案中,抗ALK抗体或其片段包含以下的一个、两个或全部三个:GFTFSSYA(SEQ ID NO:3)、IWYDGSNQ(SEQ ID NO:4)和AKSSYYDSSGYYFPYGY(SEQ ID NO:5)。在另一个实施方案中,抗ALK抗体或其片段包含与上文提供的任何序列(例如,任何SEQ ID NO:2-5)具有至少90%、95%、97%、99%或100%同源性或同一性的氨基酸序列。

[0020] 在某些实施方案中,抗ALK抗体或其片段对ALK的氨基酸935-1038具有免疫学特异

性。在某些实施方案中,抗ALK抗体包含VH78或其片段。在某些实施方案中,抗ALK抗体包含重链(例如,VH结构域),其包含:EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGHVTISRDDSTNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARERGWQDAFDIWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:6),其中下划线的序列是互补决定区(CDR)。在某些实施方案中,抗ALK抗体或其片段包含VH78的一个、两个或全部三个CDR(例如,由IMGT、Chothia、Kabat、Martin(例如,增强的Chothia)或AHo编号方案确定)。在某些实施方案中,抗ALK抗体或其片段包含SEQ ID NO:6的一个、两个或全部三个CDR。在某些实施方案中,抗ALK抗体或其片段包含重链(例如,VH结构域),该重链包含SEQ ID NO:6的一个、两个或全部三个CDR。在某些实施方案中,抗ALK抗体或其片段包含以下的一个、两个或全部三个:GFTFSSYA(SEQ ID NO:3)、IYPGDSDT(SEQ ID NO:7)和ARERGWQDAFDI(SEQ ID NO:8)。在另一个实施方案中,抗ALK抗体或其片段包含与上文提供的任何序列(例如,任何SEQ ID NO:3、6-8)具有至少90%、95%、97%、99%或100%同源性或同一性的氨基酸序列。

[0021] 本文还包括包含本发明的抗ALK抗体或其片段和载体(如药学上可接受的载体)的组合物。在某些实施方案中,组合物包含至少一种抗ALK抗体或抗体片段和至少一种载体(例如,药学上可接受的载体)。

[0022] 本文还包括编码本发明的抗ALK抗体或其片段的核酸分子。在某些实施方案中,编码抗ALK抗体或其片段的核酸分子包含编码上文提供的任何氨基酸序列的核苷酸序列。在某些实施方案中,本发明的核酸分子包含在载体中,特别是包含在表达载体中。本发明还包括包含并任选表达本发明核酸分子的细胞(例如,分泌抗ALK抗体的细胞)。

[0023] 抗体可以是合成的或修饰的抗体(例如,重组产生的抗体;嵌合抗体;双特异性抗体;人源化抗体;骆驼抗体等等)。在本发明的某些实施方案中,抗体是双特异性抗体。

[0024] 本发明的抗体可以是抗体片段。在一个具体的实施方案中,抗体片段是抗体的抗原结合片段。抗体片段包括但不限于免疫球蛋白片段,包括但不限于:单结构域(Dab;例如,单可变轻链或重链结构域)、Fab、Fab'、$F(ab')_2$和F(v);以及这些免疫球蛋白片段的融合体(例如,通过接头),包括但不限于:scFv、scFv2、scFv-Fc、微型抗体、双抗体、三抗体和四抗体。抗体也可以是包含至少一种抗体或抗体片段的蛋白质(例如融合蛋白)。在某些实施方案中,抗体片段是单结构域抗体(例如,VH结构域)。

[0025] 本发明的抗体可以进一步修饰。例如,抗体可以是人源化的。在一个具体的实施方案中,抗体(或其一部分)被插入到抗体或抗体片段构建体(例如,抗体框架),特别是人构建体/框架的骨架中。例如,本发明抗体的可变轻结构域和/或可变重结构域或其中包含的CDR可以插入到另一种抗体构建体或框架中,特别是人。重组产生抗体的方法是本领域众所周知的。抗体和抗体片段构建体的商业载体是可获得的。

[0026] 本发明的抗体也可以与其他成分缀合/连接。本文包括包含本发明的抗ALK抗体或其片段的免疫缀合物。例如,抗体或其片段可以与至少一种可检测试剂(例如,放射性原子(例如,放射性缀合物))、成像剂、造影剂或治疗剂或药物(例如,抗体-药物缀合物)可操作地连接(例如,任选地通过接头共价连接)。在某些实施方案中,抗ALK抗体或其片段与放射性核素(放射性同位素)缀合,例如但不限于发射正电子的同位素和α-、β-、γ-、Auger-和低能电子发射体。本发明的抗体还可以包含至少一种纯化标签(例如His标签)。

[0027] 根据本发明,提供了抗体-药物缀合物(ADC)。ADC在本领域是众所周知的(例如

Polakis(2016)Pharmacol.Rev.,68:3-19)。由于抗体的靶向能力,ADC可以精确地转运到靶细胞,从而有效地增加靶细胞的局部药物浓度,同时大大降低其他组织或器官中的药物浓度,从而降低毒性。在本文中,ADC包含本发明的抗ALK抗体或其片段和药物或治疗剂,特别是细胞毒性剂。药物和抗体或其片段可以直接缀合或通过接头缀合。

[0028] 通常,药物或细胞毒剂是小分子。本文所用的"细胞毒性剂"是抑制或阻止细胞功能和/或导致细胞破坏和/或死亡的物质。细胞毒剂的实例包括但不限于:抗代谢物、烷化剂、DNA小沟结合剂、DNA嵌入剂、DNA交联剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、核输出抑制剂、蛋白酶体抑制剂、热休克蛋白抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、抗有丝分裂剂、蒽环类、细胞骨架破坏剂、紫杉烷类、埃坡霉素、毒素(例如白喉、外毒素、蓖麻毒素(例如蓖麻毒素A)、相思豆毒素、假单胞菌外毒素、皂草素等)、拓扑异构酶I抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、核苷酸类似物、核苷酸前体类似物、抗生素(例如肽抗生素)、铂类药物、美登木素类药物(例如美坦辛(maitansine))、瑞奥西汀(例如单甲基瑞奥西汀E(MMAE))、多柔比星、多卡霉素(例如噻吩并吲哚)、伊立替康(irinotecan)和吡咯并苯二氮杂(PDB)或吡咯并苯二氮杂二聚体(参见,例如,Carlson(2012)Biotechnol.Healthc.,9(4):28-31;WO 2005/040170)。

[0029] 在某些实施方案中,细胞毒性剂是噻吩并吲哚。噻吩并吲哚(例如,NMS-P528)是有效的可溶性多卡霉素类似物,其是高度适合用作抗体有效载荷的DNA小沟烷化剂(Valsasina等人,(2014)Cancer Res.,74:822;Caruso等人,(2018)Cancer Res.78(13Suppl):Abstract nr 734)。

[0030] 在某些实施方案中,细胞毒性剂是吡咯并苯二氮杂(PBD)二聚体。在某些实施方案中,PBD二聚体通过CH2结构域上的聚糖与抗体或其片段偶联。PBD二聚体是有效的细胞毒性DNA小沟链间交联剂,已经在儿科癌症模型中证明了其效力和功效(Bosse等人,(2012)Cancer Res.,72(8):2068-78;Wood等人,(2013)Pediatr.Blood Cancer 60(11):1860-7)。

[0031] ADC的接头可以在任何化学上可行的位置与抗体或其片段缀合,优选使得抗体或其片段的活性(例如,靶结合)和药物的活性(例如,杀死细胞)不会受到显著的不利影响。例如,药物可以通过赖氨酸残基或半胱氨酸残基(例如,在抗体铰链区或恒定区或除CDR以外的区域)与抗体或其片段缀合。通过聚糖的位点特异性缀合也不会影响抗体的结合和其他特性(Zhu等人,(2014)MAbs 6(5):1190-200;Bosse等人,(2017)Cancer Cell 32(3):295-309;Seaman等人,(2017)Cancer Cell 31(4):501-15)。C2-叠氮-半乳糖可用作Fc-聚糖修饰的底物。DBCO-PEG4-VA-药物(例如,PDB)可用作基于点击化学方法的缀合的有效载荷(Baskin等人,(2007)Proc.Natl.Acad.Sci.,104(43):16793-7)。

[0032] ADC的接头可以是可切割的接头(例如,以便在细胞内释放缀合的药物)(Kellogg等人,(2011)Bioconjug.Chem.,22(4):717-27;Polson等人,(2011)Expert Opin.Investig.Drugs 20(1):75-85)。例如,可以使用酸不稳定的接头(例如,腙接头)、溶酶体或肽酶敏感的接头(例如,通常包含二肽如Val-Cit、Val-Lys、Val-Ala、Lys-Lys或Ala-Val的短肽基接头),或含二硫化物的接头。在某些实施方案中,抗体通过肽可裂解的药物接头和自固定间隔物与药物缀合,通过半胱氨酸残基的部分还原,使得在活化前需要两个化学键裂解的保护性部分成为可能,产生期望的药物-抗体比(DAR)(例如约2.7)。肽接头的一个优点是需要被溶酶体蛋白酶进行细胞内酶促裂解以释放细胞毒性有效载荷。

[0033] 双功能性的偶联剂或交联剂可用于将药物缀合到抗体或其片段上。交联剂可以包

括但不限于一个或多个羧基-胺反应性基团(例如碳化二亚胺)、胺反应性基团(例如NHS酯、亚氨基酯)、巯基反应性基团(例如马来酰亚胺、卤代乙酰基、吡啶基二硫化物)、醛反应性基团(例如酰肼、烷氧基胺)和羟基反应性基团(例如异氰酸酯)。

[0034] 根据本发明,提供了双特异性T细胞接合物(BiTE)。图5A提供了BiTE的实例的示意图。通常,BiTE具有两个抗原结合结构域,其中一个结合T细胞抗原,第二个结合靶表面上存在的抗原(参见,例如WO 05/061547;Baeuerle等人,(2008)Drugs of the Future 33:137-147;Bargou等人,(2008)Science 321:974-977)。本发明的BiTE可以包含两个结合位点,第一结合位点包含如本文所述的抗ALK抗体或其片段,第二结合位点包含特异性结合T细胞(例如细胞表面靶标如CD3)的抗体或其片段。在某些实施方案中,BiTE是单个多肽链分子。在某些实施方案中,BiTE包含Fc区。在某些实施方案中,特异性结合T细胞的抗体或其片段是抗CD3抗体或其片段。在某些实施方案中,抗CD3抗体或其片段是scFv。在某些实施方案中,抗CD3抗体或其片段是OKT3。

[0035] 本发明还包括本文所述的抗ALK抗体或其片段的序列(例如,CDR或VH序列)在制备嵌合抗原受体中的用途,该嵌合抗原受体可用于CAR-T技术。如本文所用,“嵌合抗原受体”或“CAR”指包含与细胞信号传导和/或细胞激活结构域连接的抗原结合结构域(例如,抗体的抗原结合部分)的杂合多肽。在某些实施方案中,本发明的嵌合抗原受体包含胞外域(ectodomain)(胞外结构域)、跨膜结构域和胞内域(endodomain)(胞质或胞内结构域)。本发明嵌合抗原受体的胞外域包含抗ALK抗体或其片段。在某些实施方案中,抗体或其片段包括Fab或scFv。抗体或胞外域的抗原结合片段可通过氨基酸接头/间隔区(例如,约1至约100个氨基酸)连接至跨膜结构域。胞外域还可以包含信号肽(例如,内质网信号肽)。

[0036] 本发明的嵌合抗原受体的跨膜结构域可以是任何跨膜结构域。在一个具体的实施方案中,跨膜结构域是跨越细胞膜的疏水性α螺旋。通常,跨膜结构域来自与胞内域相同的蛋白质。跨膜结构域的实例包括但不限于来自以下受体的跨膜结构域:T细胞受体(TCR)、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154。在一个具体实施方案中,跨膜结构域来自CD3-ζ或CD28。

[0037] 本发明的嵌合抗原受体的胞内域包含至少一个信号传导或激活结构域(例如,包含一个或多个免疫受体基于酪氨酸的激活基序(ITAM)的信号传导结构域)。信号传导或激活结构域被与胞外域结合的抗原激活,并导致T细胞的激活。信号传导或激活结构域包括但不限于来自以下的信号传导或激活结构域(例如,内结构域/胞质结构域或其片段):CD3、LIGHT、淋巴细胞功能相关抗原1(LFA-1)、CD2、CD28、ICOS、CD30、CD7、NKG2C、CD40、PD-1、OX40、CD18、CD27、B7-H3、4-1BB(CD137)、OX40、CD40和NKG2C。在某些实施方案中,胞内域包含CD3-ε、CD3-γ或CD3-ζ链的胞质结构域或其片段。在某些实施方案中,胞内域包含CD3-ζ、CD28、4-1BB和/或OX40的信号传导结构域。在某些实施方案中,胞内域包含CD3-ζ、CD28和OX40的信号传导结构域。在某些实施方案中,胞内域包含CD3-ζ、CD28和4-1BB的信号传导结构域。在某些实施方案中,胞内域包含4-1BB信号传导结构域。

[0038] 编码本发明CAR的核酸分子(例如载体)可以通过任何物理、化学或生物手段转移到所需的靶细胞(例如T细胞)中。

[0039] 本发明的方法包括向受试者施用编码CAR的核酸(DNA或RNA)。在一个具体的实施方案中,该方法包括向受试者施用包含编码CAR的核酸的T细胞(例如,T细胞、细胞毒性T细

胞和/或自然杀伤细胞)。T细胞可以是自体的。例如,该方法可以包括用编码本发明嵌合抗原受体的核酸(例如,用于表达嵌合抗原受体的整合或非整合载体)离体转导T细胞。本发明的方法可以进一步包括从受试者获得T细胞。

[0040] 本发明的抗体分子可以用本领域已知的多种方法制备。多克隆和单克隆抗体可以按照Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel等人编的方法制备。抗体可以通过化学交联、杂交瘤技术以及通过在宿主细胞(如细菌或酵母细胞)中表达重组抗体片段来制备。在本发明的一个实施方案中,通过在宿主细胞中表达重组抗体或抗体片段来产生抗体分子。编码抗体的核酸分子可以插入表达载体并导入宿主细胞。然后从表达系统中分离和纯化得到的抗体分子。抗体任选包含纯化标签,通过该标签可以纯化抗体。

[0041] 可以使用本领域技术人员已知的标准方法评估本发明抗体分子的纯度,包括但不限于ELISA、免疫组织化学、离子交换层析色谱、亲和层析色谱、固定金属亲和层析色谱(IMAC)、尺寸排阻层析色谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、蛋白质印迹、表面等离子体共振和质谱。

[0042] 根据本发明的另一方面,提供了抑制、治疗和/或预防癌症的方法。在某些实施方案中,癌症是表达ALK的癌症。在某些实施方案中,癌症是横纹肌肉瘤、成神经管细胞瘤、神经胶质瘤、尤因肉瘤或神经母细胞瘤。在某些实施方案中,癌症是神经母细胞瘤。该方法包括向有需要的受试者施用本发明的抗ALK抗体或其片段。抗ALK抗体可以在进一步包含药学上可接受的载体的组合物中施用。抗ALK抗体或其片段可以作为免疫缀合物施用。抗ALK抗体或其片段可以作为ADC施用。抗ALK抗体或其片段可以作为BiTE施用。抗ALK抗体或其片段可以作为CAR施用。抗ALK抗体或其片段可以作为CAR-T细胞施用。

[0043] 在某些实施方案中,癌症的特征在于ALK中的至少一个突变,特别是导致与正常人细胞相比ALK活性增加(例如激酶活性增加)和/或ALK拷贝数增加的突变。在某些实施方案中,ALK在以下位置包含至少一个突变:P36、P157、V198、G640、L684、G718、D993、L1204、I1170、A1200、L1204、F1245、G1128、R1192、R1275、D1091、M1166、I1171、F1174、F1245或I1250。在某些实施方案中,ALK在以下位置包含至少一个突变:G1128、R1192、R1275、D1091、M1166、I1171、F1174、F1245或I1250。在某些实施方案中,ALK在以下位置包含至少一个突变:G1128、R1192和R1275。在某些实施方案中,ALK包含至少一个选自由以下组成的组的突变:P36S、P157S、V198M、G640R、L684M、G718F、G718S、D993G、L1204F、I1170S、A1200V、L1204F、F1245I、G1128A、R1192P、R1275Q、D1091N、M1166R、I1171N、F1174I、F1174L、F1245C、F1245V、I1250T、T1151M、I1170S、F1174C、L1196M、F1245I、R259H、M770I、E1407K、E1433del、R1464G、G1494R和A1553P。在某些实施方案中,ALK包含至少一个选自由以下组成的组的突变:G1128A、R1192P、R1275Q、D1091N、M1166R、I1171N、F1174I、F1174L、F1245C、F1245V和I1250T。在某些实施方案中,ALK包含氨基酸R1275和/或F1174的至少一个突变,特别是R1275Q、F1174I和F1174L中的至少一个。在某些实施方案中,癌症可能对ALK抑制剂(例如克唑替尼)有抗性。

[0044] 该组合物还可以包含至少一种其他抗癌治疗剂。在某些实施方案中,另一种治疗剂是化疗剂和/或ALK抑制剂(例如,ALK siRNA和/或反义分子、克唑替尼、TAE684(Novartis)、CEP-14083(Cephalon)、劳拉替尼、塞瑞替尼或瑞波西利)。或者,其他治疗剂可以包含在具有至少一种药学上可接受的载体的单独组合物中。单独的组合物可以与包含抗

ALK抗体或其片段的组合物在同一时间(例如,同时)和/或不同时间(例如,依次)施用。例如,其它治疗剂可以分开施用(在抗ALK抗体或其片段之前、之后或同时)或在同一组合物中施用。在某些实施方案中,抗ALK抗体或其片段与放疗在同一时间(例如,同时)和/或在不同时间(例如,依次)施用。包含至少一种抗ALK抗体的组合物和/或包含至少一种其他治疗剂的组合物可以包含在试剂盒中。

[0045] 本发明的组合物可以通过任何合适的途径施用,例如,通过注射(例如,用于局部或全身施用)、肠胃外、皮下、口服(例如,液体或丸剂/胶囊/片剂形式)、局部、肺部、静脉内、腹膜内、鞘内、硬膜外、肌内、皮内、鼻内或其他施用方式。在一个具体的实施方案中,组合物通过注射(例如,胃肠外、皮下或进入血流(例如,静脉内))施用。该组合物可以直接施用到癌症部位。该组合物可以静脉内或口服施用。包含本发明抗体的组合物可以方便地与可接受的介质(如水、缓冲盐水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、二甲基亚砜(DMSO)、油、洗涤剂、悬浮剂或其合适的混合物)一起配制施用。合适药物制剂的选择取决于所选择的施用方法。所选介质中抗体的浓度可以变化,并且可以基于药物制剂的期望施用途径来选择介质。除了在任何常规介质或试剂与待施用的试剂不相容的范围内,其在药物制剂中的用途是预期的。本发明的药物组合物可以制备成例如液体形式,或者可以是干粉形式(例如冻干)。

[0046] 含有与药物载体紧密混合的本发明药物作为活性成分的药物组合物可以根据常规药物混合技术制备。根据施用所需的制剂形式,载体可以采取多种形式。在制备口服剂型的抗体时,可以使用任何常用的药物介质,如在口服液体制剂(例如,悬浮液、酏剂和溶液)的情况下,可以使用水、乙二醇、油、醇、调味剂、防腐剂、着色剂等;或者在口服固体制剂(例如粉末、胶囊和片剂)的情况下,可以使用载体如淀粉、糖、稀释剂、制粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂等。

[0047] 为了便于施用和剂量的均匀性,本发明的药物制剂可以配制成剂量单位形式。本文所用的剂量单位形式是指适用于接受治疗的患者的药物制剂的物理上分散的单位。每个剂量应含有一定量的活性成分,该活性成分与所选择的药物载体一起产生所需的效果。确定合适剂量单位的步骤是本领域技术人员熟知的。剂量单位可以根据患者的体重成比例地增加或减少。如本领域已知的,用于缓解特定病理状况的合适浓度可以通过剂量浓度曲线计算来确定。

[0048] 医生可以考虑患者的年龄、性别、体重、一般医学状况以及施用药物所针对的具体病况和严重程度,来确定适于对特定患者施用的根据本发明的抗体的剂量和给药方案。医生还可以考虑抗体的施用途径、抗体可以与之结合的药物载体以及抗体的生物活性。本发明药物施用的合适剂量单位可以通过在动物模型中评估药物的毒性来确定。合适的剂量单位也可以通过评估药物与其他标准药物组合的功效来确定。

[0049] 包含本发明药物的组合物可以以适当的间隔施用,例如,每天至少一次或更多次,直到病理症状减轻或缓解,之后剂量可以降低至维持水平。特定情况下的适当间隔通常取决于患者的病况。

[0050] 定义

[0051] 提供以下定义是为了便于理解本发明:

[0052] 除非上下文另有明确规定,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指代物。

[0053] “药学上可接受的”表示经联邦或州政府的监管机构批准,或列在美国药典或其他公认的药典中,用于动物,尤其是人类。

[0054] “载体”是指,例如,稀释剂、佐剂、赋形剂、辅助剂或媒介,其与本发明的活性剂一起施用。药学上可接受的载体可以是无菌液体,如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的液体,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。水或盐水溶液以及葡萄糖和甘油水溶液优选用作载体。合适的药物载体描述于例如E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中。

[0055] “抗体”或“抗体分子”是结合特定抗原的任何免疫球蛋白,包括抗体及其片段。如本文所用,抗体或抗体分子包括完整的免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的免疫活性部分(例如抗原结合片段)以及免疫球蛋白分子的免疫活性部分的融合体。

[0056] 如本文所用,术语“免疫特异性”是指蛋白/多肽,特别是抗体,其与目的蛋白或化合物的一个或多个表位结合,但基本上不识别和结合含有抗原性生物分子混合群体的样品中的其它分子。

[0057] 如本文所用,术语“受试者”是指动物,尤其是哺乳动物,尤其是人。

[0058] 化合物或药物组合物的“治疗有效量”是指有效预防、抑制、治疗或减轻特定病症或疾病症状的量。本文中疾病或病症的治疗可以指治愈、缓解和/或预防疾病或病症、其症状或其倾向。

[0059] 如本文所用,术语“治疗剂”是指化学化合物或生物分子,包括但不限于核酸、肽、蛋白质和抗体,其可用于治疗病况、疾病或病症或减轻病况、疾病或病症的症状。

[0060] 术语“分离的”是指将化合物从其生产过程中存在的其它组分中或从其自然环境中分离出来。“分离的”并不意味着排除与其它化合物或材料的人工或合成混合物,或者基本上不干扰基本活性的杂质的存在,以及例如由于不完全纯化或稳定剂的添加而可能存在的杂质。

[0061] 如本文所用,术语“小分子”是指具有相对低分子量(例如,小于2000)的物质或化合物。通常,小分子是有机物,但不是蛋白质、多肽或核酸。

[0062] 化疗剂是显示抗癌活性和/或对细胞有害的化合物(例如,毒素)。合适的化疗剂包括但不限于:毒素(例如,皂草毒素、蓖麻毒素、相思豆毒素、溴化乙锭、白喉毒素和假单胞菌外毒素);紫杉烷类;烷化剂(例如,替莫唑胺、氮芥如苯丁酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、二氯甲二乙胺、美法仑和尿嘧啶氮芥;氮丙啶类,如噻替派;甲基磺酸酯,如白消安;亚硝基脲类,如卡莫司汀、罗莫司汀和链脲佐菌素;铂络合物(例如,顺铂、卡铂、四铂、奥马铂、thioplatin、沙铂、奈达铂、奥沙利铂、依铂、异丙铂、反式铂和洛铂);生物还原性烷化剂,如丝裂霉素、甲基苄肼、达卡巴嗪和六甲蜜胺);DNA链断裂剂(例如博来霉素);拓扑异构酶II抑制剂(例如,安吖啶、美诺立尔(menogaril)、氨萘非特(amonafide)、更生霉素(dactinomycin)、佐柔比星、N,N-二苄基柔红霉素、椭圆玫瑰树碱(ellipticine)、柔红霉素、吡唑啉吖啶、伊达比星、米托蒽醌、m-AMSA、比生群(bisantrene)、多柔比星(阿霉素)、脱氧多柔比星、依托泊苷(VP-16)、磷酸依托泊苷、oxanthrazole、红比腙、表柔比星、博来霉素和替尼泊苷);DNA小沟结合剂(例如,plicamydin);抗代谢药(如叶酸拮抗剂,如甲氨蝶呤和曲美沙特);嘧啶拮抗剂,例如氟尿嘧啶、氟脱氧尿苷、CB3717、阿扎胞苷、阿糖胞苷和氟尿苷;嘌呤拮抗剂,如巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、氟达拉滨、喷司他丁;天冬氨酸酶;和核糖核苷酸

还原酶抑制剂,如羟基脲);蒽环类药物;和微管蛋白相互作用剂(例如长春新碱、长春碱和紫杉醇(Taxol®))。

[0063] 提供以下实施例来说明本发明的某些实施方案。这并不意味着以任何方式限制本发明。

[0064] 实施例

[0065] 最近的全面基因组分析得出了一个令人清醒的结论,即可操作的复发性体细胞突变在儿科癌症中很少见,这提出了一个前景,即有必要超越针对突变激酶的小分子,以便使用精确开发的疗法来大幅改善结果。迫切需要ALK靶向抗体作为神经母细胞瘤和其他表达ALK的儿童肿瘤的治疗方法。值得注意的是,ALK在神经母细胞瘤细胞表面表达,而在正常组织中不表达(Carpenter等人,(2012)Oncogene 31(46):4859-67)。值得注意的是,ALK在横纹肌肉瘤、成神经管细胞瘤、神经胶质瘤和尤因肉瘤中也有高水平的差异表达(Mosse,Y.P.(2016)Clin.Cancer Res.,22(3):546-52;Corao(2009)Pediatric Dev.Pathol.,12(4):275-83;Pillay等人,(2002)Histopathology 41(5):461-7;Yoshida等人,(2013)Mod.Pathol.,26(6):772-81)。这表明ALK也是免疫疗法的靶标。例如,针对ALK胞外区的抗体-药物缀合物(ADC)可用于ALK的免疫治疗靶向。ADC是一类快速增长的抗癌药物,其结合了对肿瘤细胞表面蛋白具有特异性的抗体(例如单克隆抗体)的靶向特性(Sliwkowski等人,(2013)Science 341(6151):1192-8)和强效细胞毒性药物的抗肿瘤作用(Teicher等人,(2011)Clin.Cancer Res.,17(20):6389-97)。

[0066] 图1A提供了ALK的示意图。分别表达MAM1、LDLa、MAM2、富G、G-T结构域和全长ALK胞外结构域(ALK-Ecto)用于噬菌体淘选。简言之,将293T和293T-ALK细胞在冰上用在200mL PBS中浓度为1μM的不同VH抗体染色30min。用1mL PBS洗涤细胞三次,并在冰上与抗FLAG-PE抗体(1:200,BioLegend)孵育30min。FLAG标签包含序列:DYKDDDDK(SEQ ID NO:9)。然后用1mL PBS洗涤染色的细胞三次。在BD™LSR II(BD Biosciences,San Jose,CA)上检测到抗体结合。使用FlowJo_V10_CL进行荧光激活细胞分类(FACS)数据分析。

[0067] 图1B和1C显示了与293T细胞(293T-ALK)细胞表面表达的ALK胞外结构域结合的各种VH的流式细胞术结果。VH9和VH20用富G的结构域抗原鉴定,而VH5和VH78用G-T结构域抗原鉴定。所有四种VH都显示出与293T-ALK细胞的良好结合,而没有显示出与293T细胞的显著非特异性结合。

[0068] 通过动态光散射(DLS)研究了4种VH。简而言之,用PBS更换VH抗体的缓冲液,并用0.22μM过滤器过滤。将抗体浓度调节至5mg/mL。500μL样品在37℃下培养用于DLS。在第0天、第1天、第4天、第7天和第14天,在Zetasizer Nano-ZS ZEN 3600(Malvern Instruments Limited;Malvern,英国)上确定蛋白质颗粒的尺寸分布。如图所示,2A-2D,VH20和VH5显示出比VH9和VH78更低的聚集。

[0069] 进一步表征VH。首先,在ELISA测定中使用包含与人IgG1 Fc(ALK-Fc)融合的ALK胞外结构域的融合蛋白来研究VH的结合亲和力。在4℃下将ELISA平板(Corning 3690;Tewksbury,MA)用50μl抗原(用1x PBS稀释的5μg/ml)包被过夜。第二天,用150μL 5%milk-PBS(Bio-RAD;Hercules,CA)在室温下封闭2h。然后,用0.05% PBST洗涤平板三次。将3倍系列稀释的VH抗体(在5%PBS-Milk中)加入每个孔中,在室温下孵育1h,然后用PBST洗涤4次。接下来,将50μL抗-Flag-HRP(在5% PBS-Milk中1:1000稀释,ThermoWaltham,MA)加入每个

孔中,在室温下孵育1h,然后用PBST洗涤5次。将50μL 3,3′,5,5′-四甲基联苯胺(TMB)底物(Sigma;St.Louis,MO)加入每个孔中,让颜色显色1-2min,然后用50μL H_2SO_4(1M,Sigma)终止显色。在450nm吸光度下对平板进行读数。使用GraphPad Prism 9.0.2分析ELISA结果。如图3A所示,VH20显示对ALK的EC_{50}约为0.4nM,VH5显示对ALK的EC_{50}约为0.32nM,VH78显示对ALK的EC_{50}约为1.32nM。

[0070] 还通过尺寸排阻色谱(SEC)研究了VH20。将200μL(1μg/mL)过滤后的样品用于分析。将Superdex® 200 Increase 10/300 GL柱(GE Healthcare,目录号28990944)用于SEC。用铁蛋白(440kDa)、醛缩酶(158kDa)、伴清蛋白(75kDa)、卵清蛋白(44kDa)、碳酸酐酶(29kDa)和核糖核酸酶A(13.7kDa)的蛋白质分子量标准校准该柱。用Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)缓冲液以0.5mL/min的流速洗脱蛋白质。如图3B所示,通过SEC确定VH20为二聚体。

[0071] 还研究了VH20与KTN0239竞争的能力。KTN0239是KTN0125的人源化变体(Sano等人,(2016)Cancer Res.,76(14 Suppl):Abstract2690),并能结合ALK的富G结构域。蛋白A生物传感器(18-5010,BLItz® system,ForteBio;Freemont,CA)用于固定KTN0239-IgG。DPBS(pH=7.4)用于基线和确定离解。使用的检测条件是(I)基线30s;(II)加载KTN0239-IgG 120s;KTN基线30s;(IV)与ALK结合120s;以及(V)与VH20结合120s。如图3C所示,VH20不与KTN0239-IgG竞争。

[0072] 还通过FACS研究了VH20结合表达ALK的细胞的能力。SK-N-AS(阴性细胞系)、IMR32(阳性细胞系)、SY5Y-D3(阳性细胞系)细胞在冰上用在200μL PBS中浓度为1μM的VH20染色30min。用1mL PBS洗涤细胞三次,并在冰上与抗FLAG-PE抗体(1:200,BioLegend)孵育30min。然后再次用1mL PBS洗涤细胞三次。在BD™LSR II(San Jose,CA)上检测到抗体结合。使用FlowJo_V10_CL进行FACS数据分析。如图3D所示,VH20能够结合IMR32和SY5Y-D3细胞上的细胞表面ALK,但不能结合阴性对照SK-N-AS细胞。

[0073] 还研究了抗ALK CAR-T细胞对293T和293T-ALK细胞的细胞毒性。将抗ALK CAR-T细胞(效应细胞)与293T和293T-ALK细胞在96孔细胞培养板(Corning)中孵育48h,效应细胞:靶细胞比率为1.25:1、2.5:1、5:1、10:1和20:1。将CAR-T细胞与293T细胞的共培养物用作阴性对照。根据制造商的说明,通过用细胞毒性乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(Promega)检测从靶细胞释放到培养基中的特异性LDH来确定细胞毒性。用以下公式计算细胞毒性百分比:细胞毒性(%)=(实验裂解-效应物自发裂解-靶标自发裂解)/(靶标最大裂解-靶标自发裂解)×100%。将抗ALK CAR-T细胞与293T细胞共培养作为阴性对照。如图4所示,检测到VH5和VH78具有更强的细胞毒性。

[0074] 还合成并表征了VH20双特异性T细胞接合物(VH20-OKT3-Fc BiTE)。图5A提供了人VH20-OKT3-Fc BiTE的示意图。VH20、OKT3-7 scFV和IgG1 Fc融合以产生BiTE。图5A还提供了含(减少)或不含β-巯基乙醇的SDS-PAGE上的BiTE的尺寸。用Expi293™表达系统(Thermo)表达蛋白质(在C末端包含His标签(6x His)),并用镍-NTA柱(Thermo)纯化。用NanoDrop™Lite分光光度计(Thermo)测量蛋白质浓度,通过SDS-PAGE评估蛋白质纯度>95%。

[0075] 还进行了尺寸排阻色谱(SEC)以表征VH20-OKT3-Fc BiTE。简言之,将200μL(1μg/

mL)过滤后的样品用于分析。使用Superdex® 200 Increase 10/300 GL柱(GE Healthcare,目录号28990944)。用铁蛋白(440kDa)、醛缩酶(158kDa)、伴清蛋白(75kDa)、卵清蛋白(44kDa)、碳酸酐酶(29kDa)和核糖核酸酶A(13.7kDa)的蛋白质分子量标准校准该柱。用DPBS缓冲液以0.5mL/min的流速洗脱蛋白质。如图5B所示,VH20-OKT3-Fc是单体。

[0076] 还测试了VH20-OKT3-Fc BiTE杀死ALK阳性细胞的能力。通过在96孔细胞培养板的培养基中加入3倍系列稀释的BiTE进行BiTE介导的细胞毒性测定。将活化的Pan-T细胞(效应细胞)和靶细胞(293T、293T-ALK、SK-N-AS、IMR32、SY5Y)混合物以E:T比率=4(10,000个靶细胞/孔)加入每个孔中。Iso型BiTE用作阴性对照。孵育24h后,通过用细胞毒性乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(Promega)检测从靶细胞释放到培养基中的特异性LDH来确定细胞毒性。用以下公式计算细胞毒性百分比:细胞毒性(%)=(实验裂解-效应物自发裂解-靶标自发裂解)/(靶标最大裂解-靶标自发裂解)×100%。如图5C所示,BiTE介导对ALK阳性肿瘤细胞(293T-ALK、SY5Y、IMR32)的细胞毒性。BiTE对SK-N-AS细胞(阴性对照)没有细胞毒性。因此,VH20-OKT3-Fc片段对不同的肿瘤细胞(293T-ALK、SY5Y、IMR32细胞,E:T=4:1),具有高效力的细胞毒性(293T-ALK的IC_{50}=0.01nM;SY5Y的IC_{50}=0.15nM;IMR32的IC_{50}=0.1nM)。

[0077] 还表征了VH20内化。对于内化研究,使用pHrodo™ Deep Red抗体标记试剂盒(Thermo)将VH20与pHrodo™ Deep Red染料结合。将缀合的VH20与不同浓度的293T和293T-ALK细胞一起孵育24h。用流式细胞仪测量VH20内化。如图6A所示,VH20被有效地内化至293T-ALK细胞中,而在293T细胞中没有检测到非特异性内化。

[0078] 还研究了包含VH20的抗体-药物缀合物(ADC)的细胞毒性。具体地,合成了VH20-Fc-单甲基瑞奥西汀E(MMAE)构建体。将VH20-ADC在96孔的细胞培养基中连续稀释3倍。培养4天后,将293T和293T-ALK细胞加入每个孔中(2000个细胞/孔)。然后通过CellTiter-Glo®发光细胞活力测定法(Promega)测定细胞活力。如图6B所示,VH20-Fc-MMAE对293T-ALK细胞显示出强效的细胞毒性(IC_{50}=4.528nM)。

[0079] 虽然上文已经描述并具体举例说明了本发明的某些优选实施方案,但这并不意味着本发明局限于这些实施方案。在不脱离本发明的范围和本质的情况下,可以对其进行各种修改,如下面的权利要求所述。

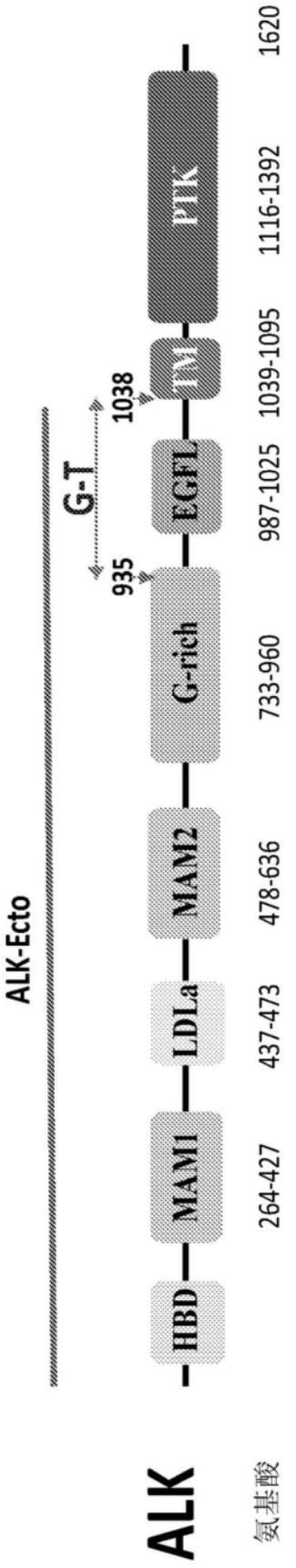

ALK-Ecto
G-T
1038
935
ALK
HBD
MAM1
LDLa
MAM2
G-rich
EGFL
TM
PTK
氨基酸
264-427
437-473
478-636
733-960
987-1025
1039-1095
1116-1392
1620

图1A

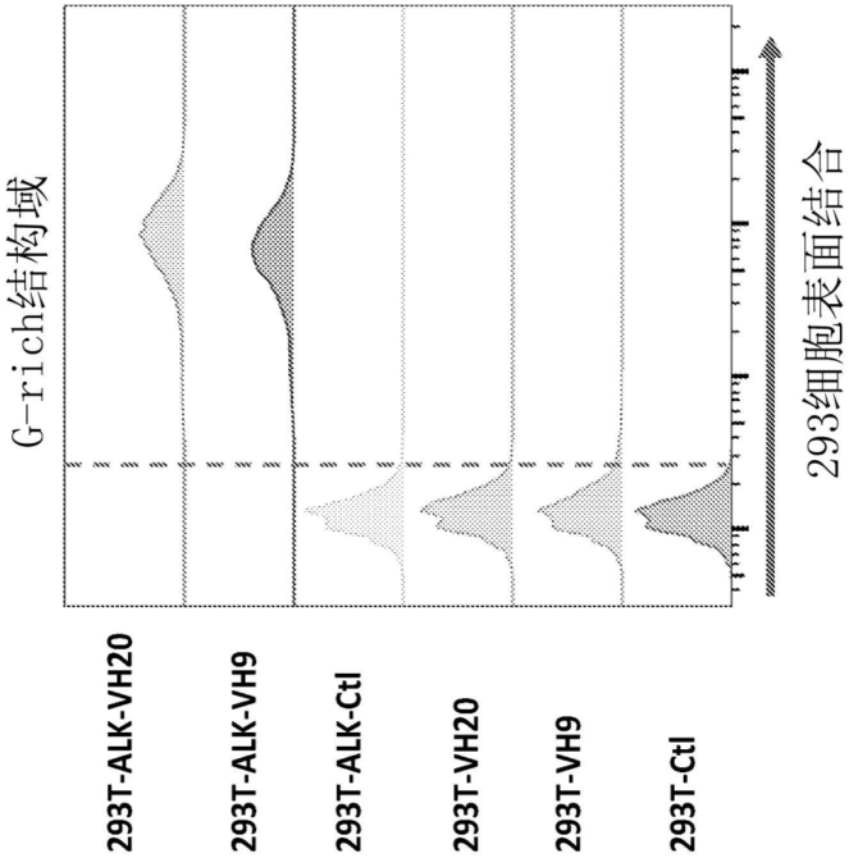

G-rich结构域
293细胞表面结合
293T-ALK-VH20
293T-ALK-VH9
293T-ALK-Ctl
293T-VH20
293T-VH9
293T-Ctl

图1B

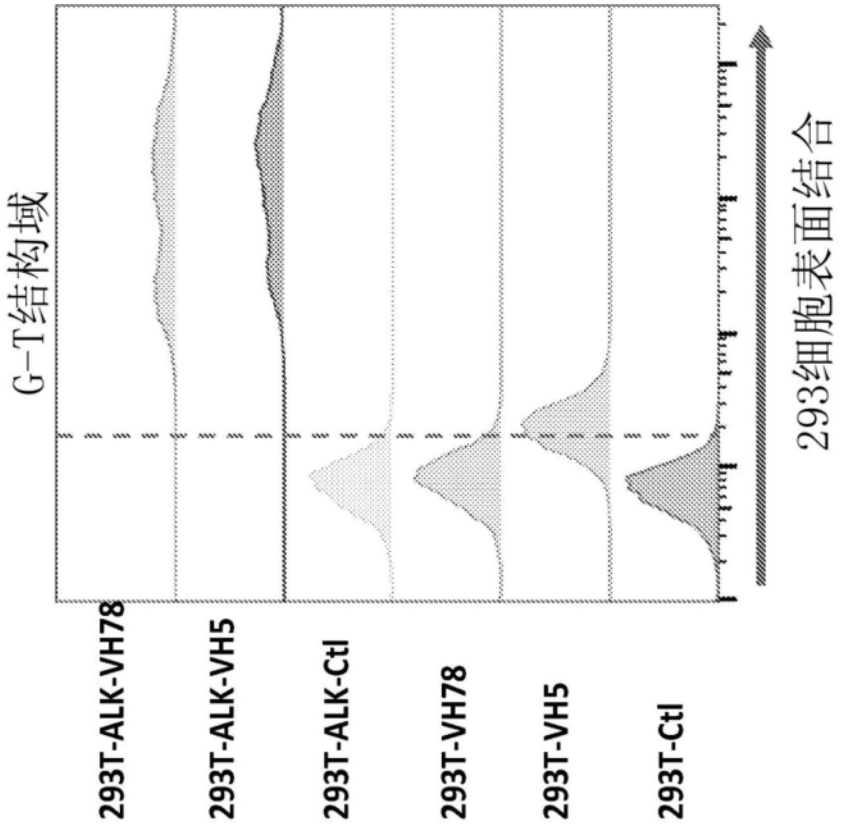

G-T结构域
293细胞表面结合
293T-ALK-VH78
293T-ALK-VH5
293T-ALK-Ctl
293T-VH78
293T-VH5
293T-Ctl

图1C

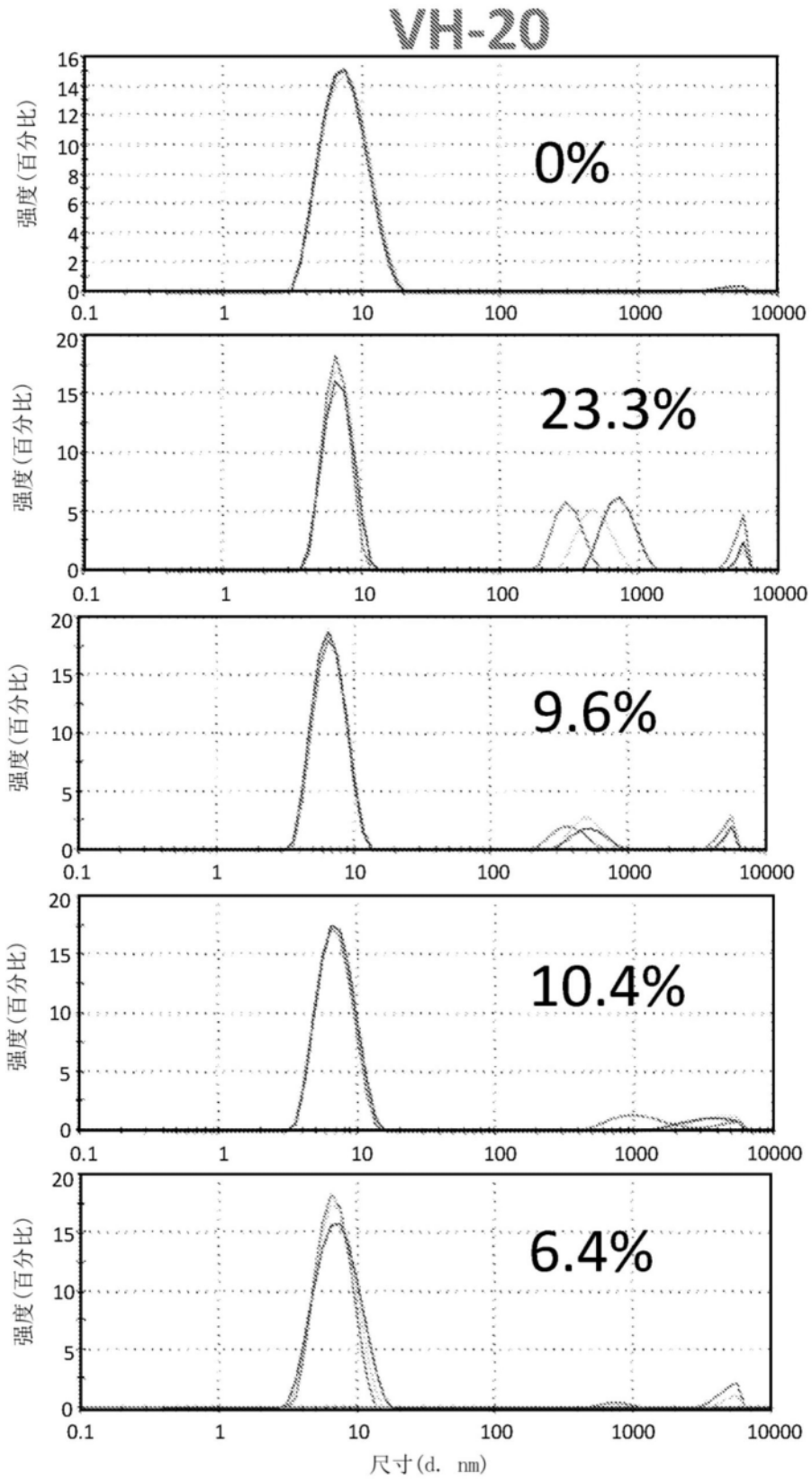


图2A

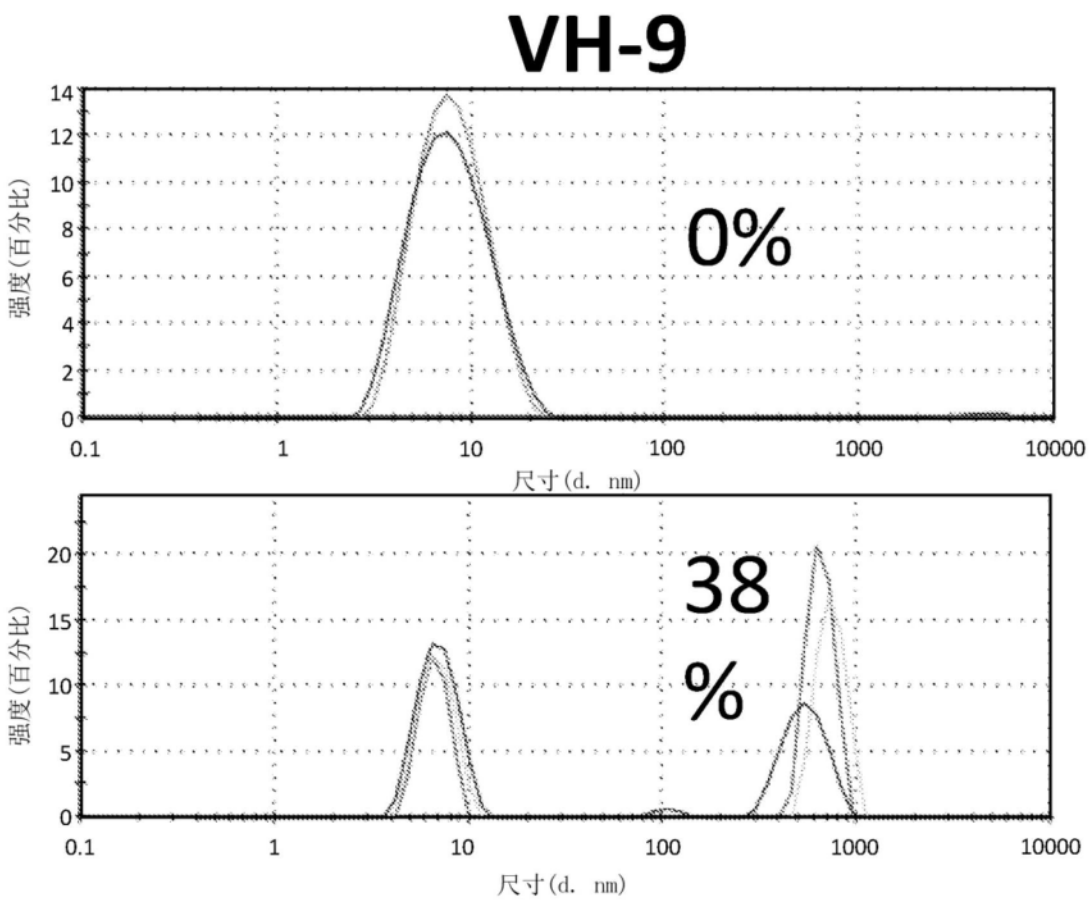


图2B

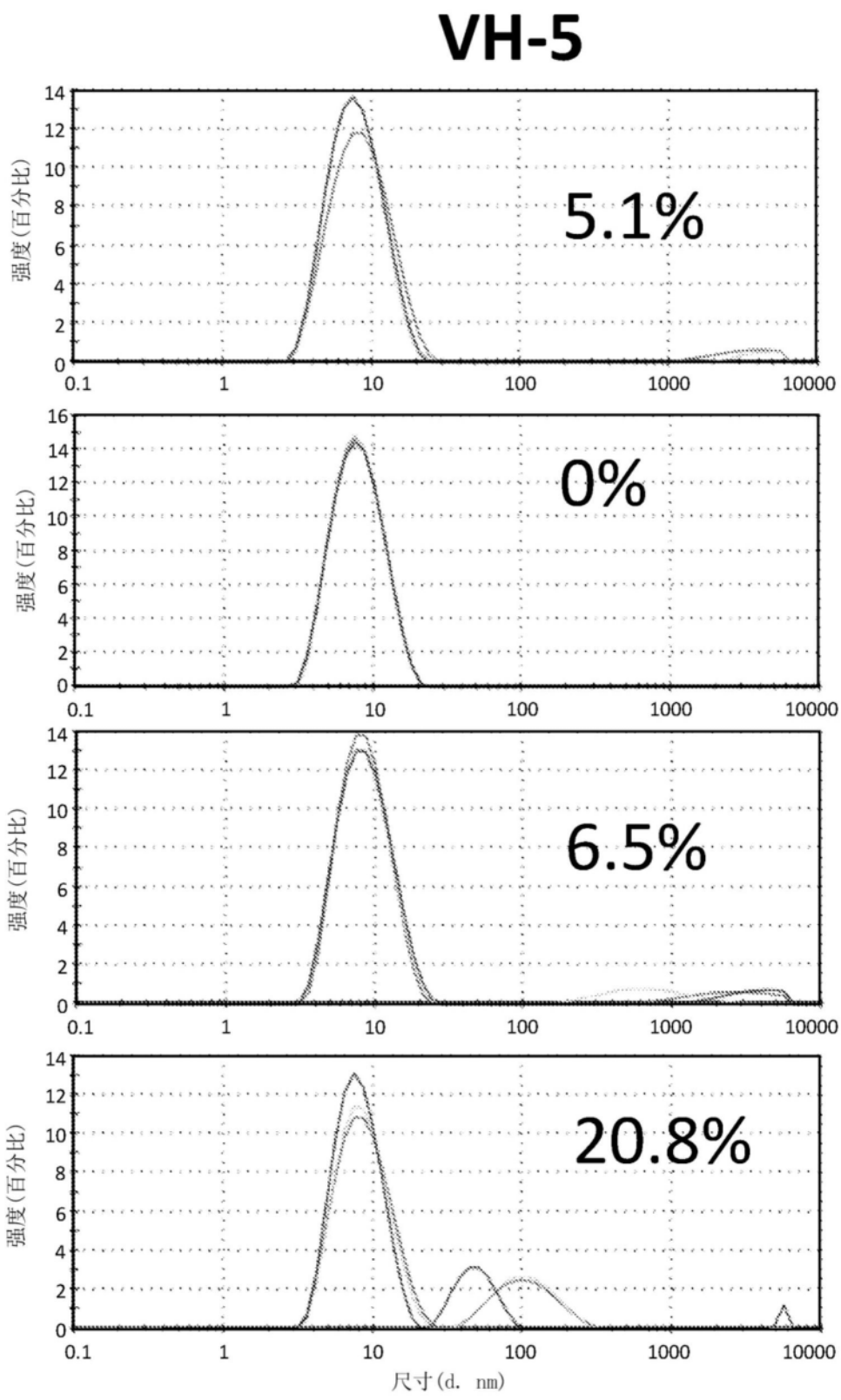


图2C

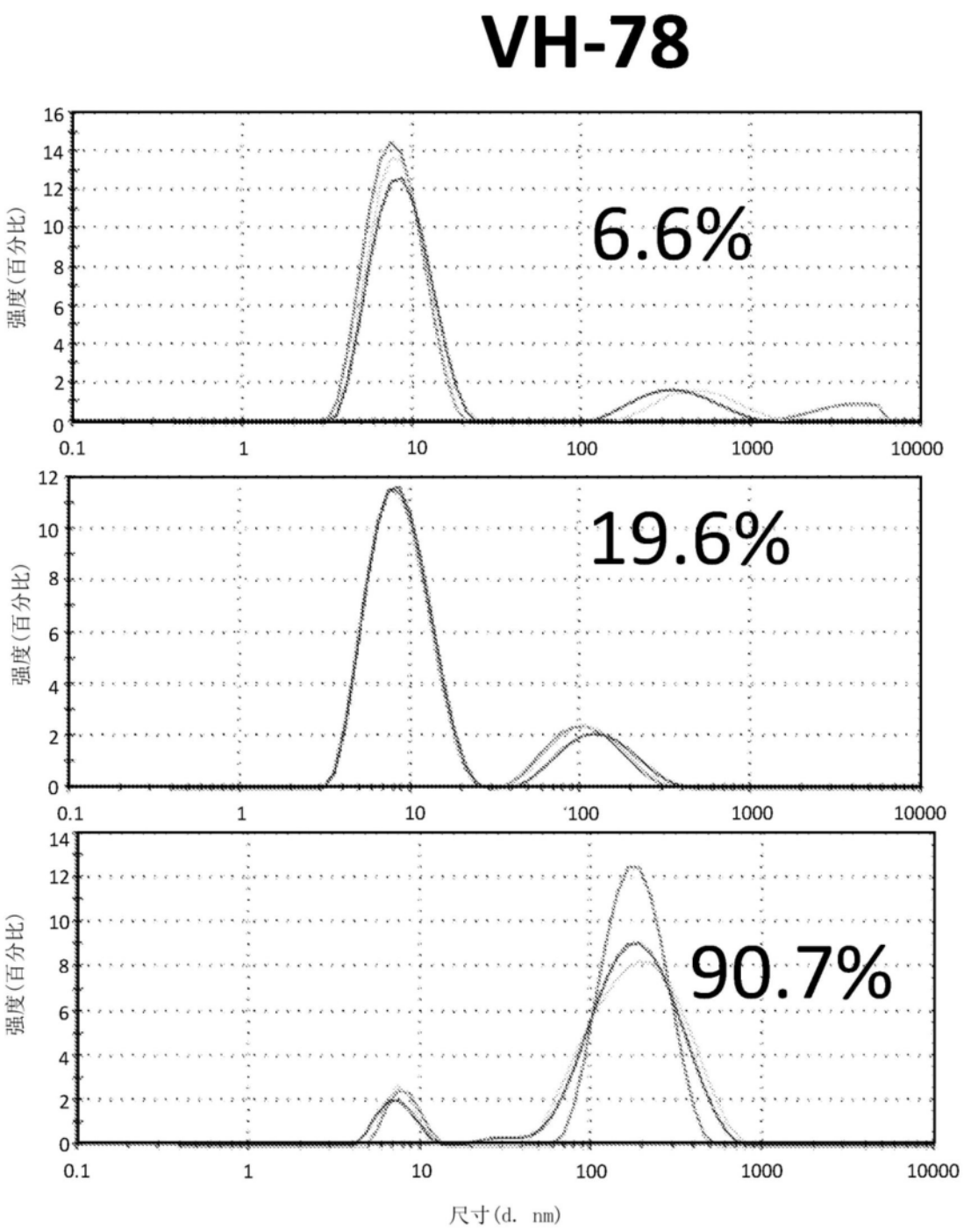


图2D

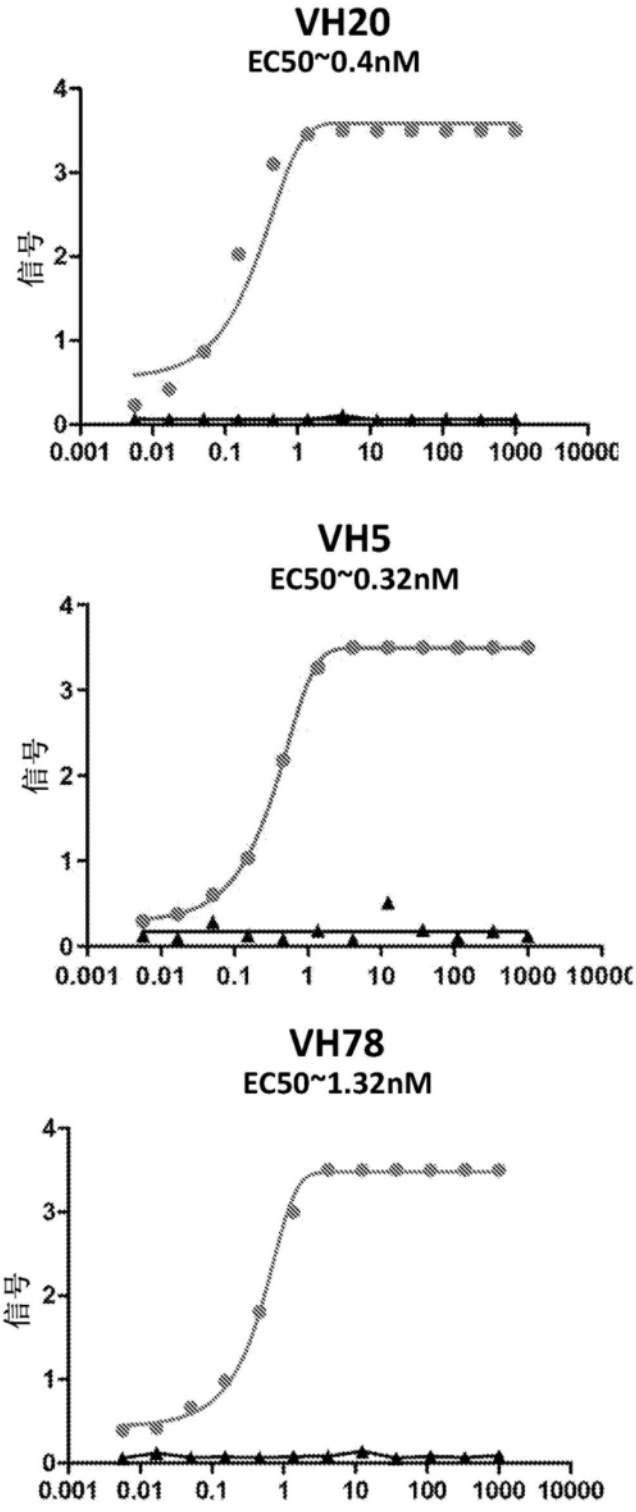

VH20
EC50~0.4nM
信号
0
1
2
3
4
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
VH5
EC50~0.32nM
信号
0
1
2
3
4
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
VH78
EC50~1.32nM
信号
0
1
2
3
4
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000

图3A

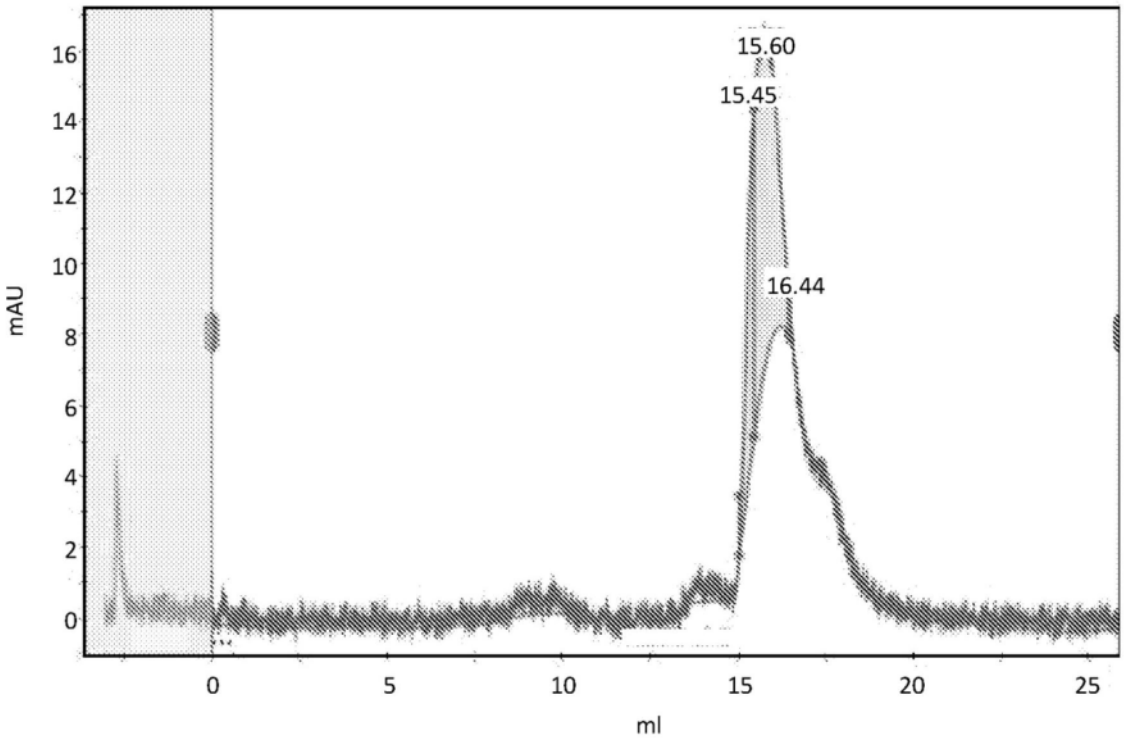

15.60
15.45
16.44
mAU
ml
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0
5
10
15
20
25

图3B

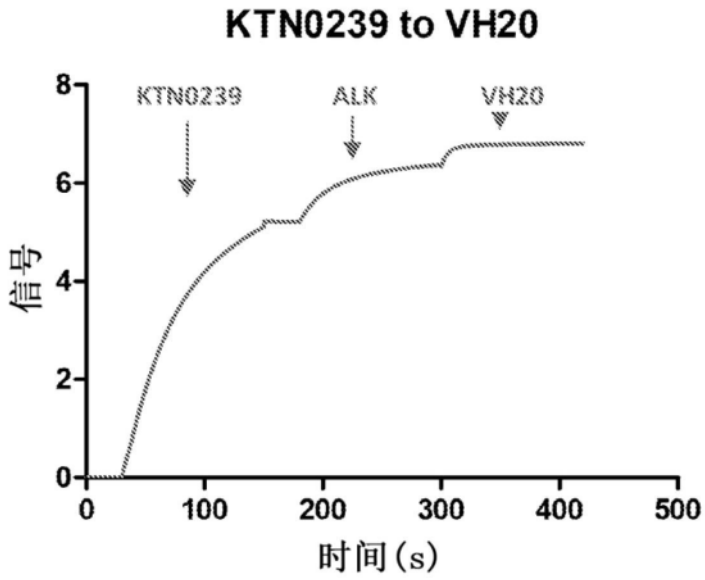

KTN0239 to VH20
KTN0239
ALK
VH20
信号
时间(s)
0
2
4
6
8
0
100
200
300
400
500

图3C

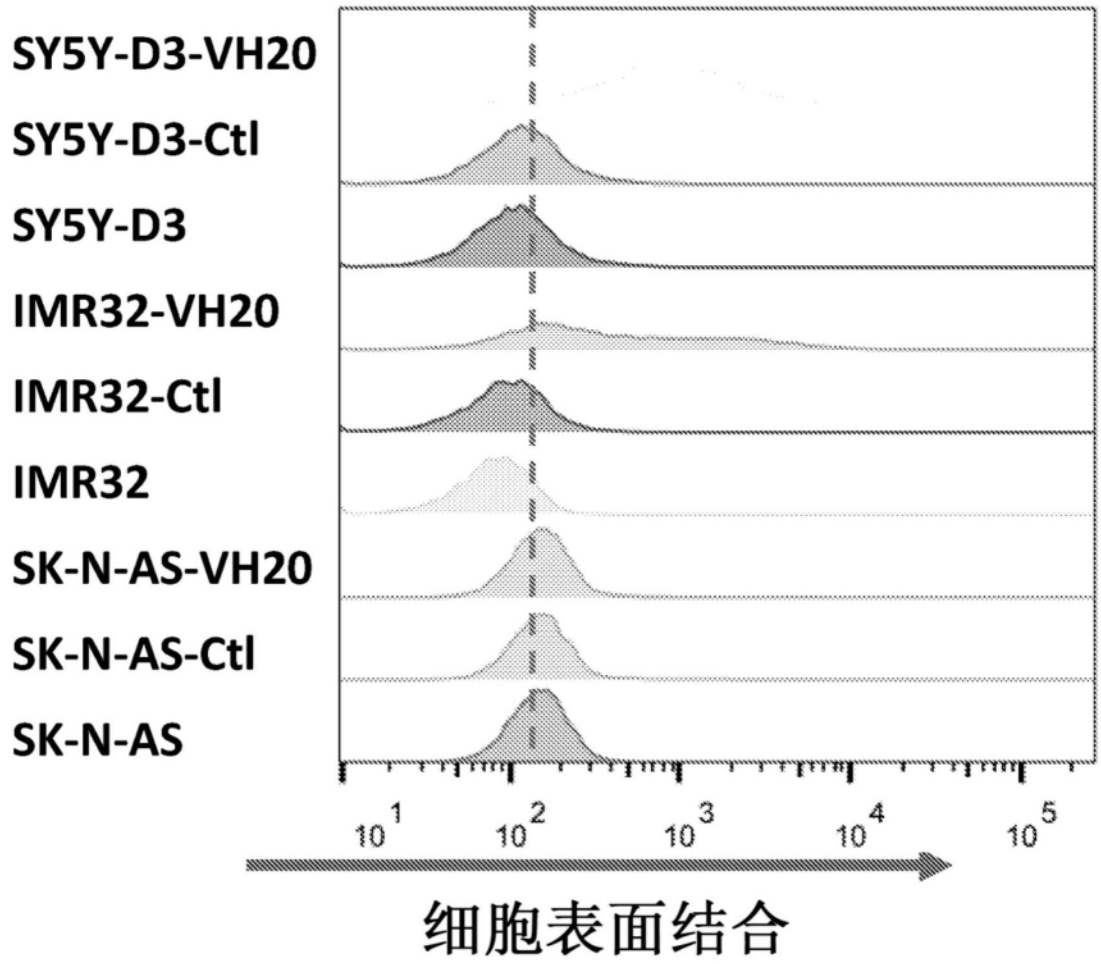

SY5Y-D3-VH20
SY5Y-D3-Ctl
SY5Y-D3
IMR32-VH20
IMR32-Ctl
IMR32
SK-N-AS-VH20
SK-N-AS-Ctl
SK-N-AS
10 1
10 2
10 3
10 4
10 5
细胞表面结合

图3D

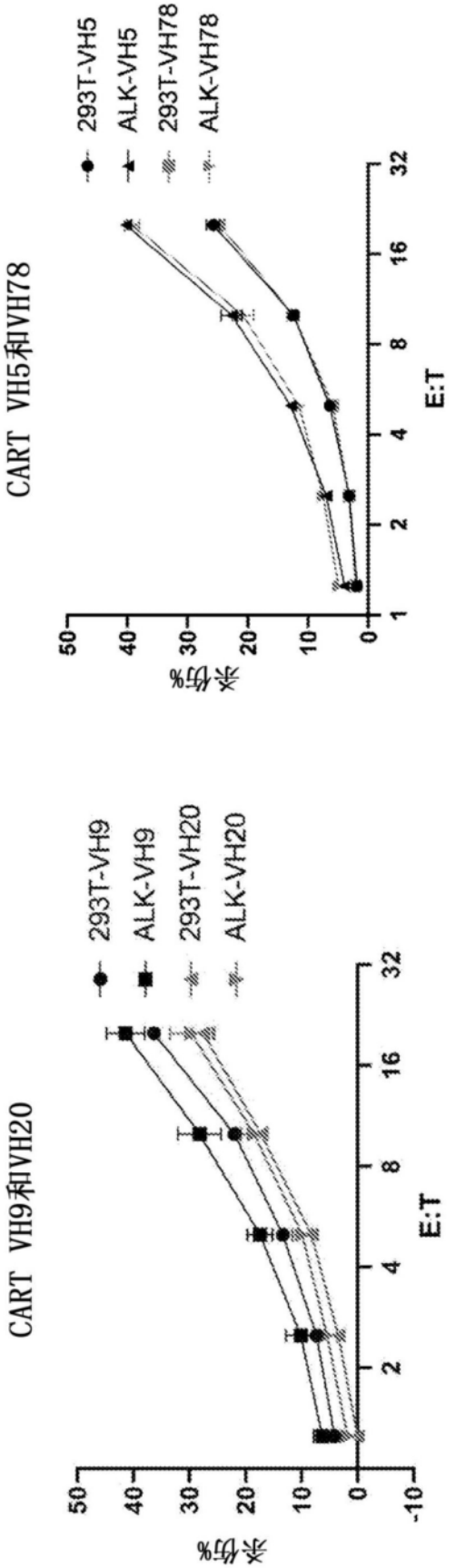

CART VH5和VH78
293T-VH5
ALK-VH5
293T-VH78
ALK-VH78
杀伤%
E:T
CART VH9和VH20
293T-VH9
ALK-VH9
293T-VH20
ALK-VH20
杀伤%
E:T

图4

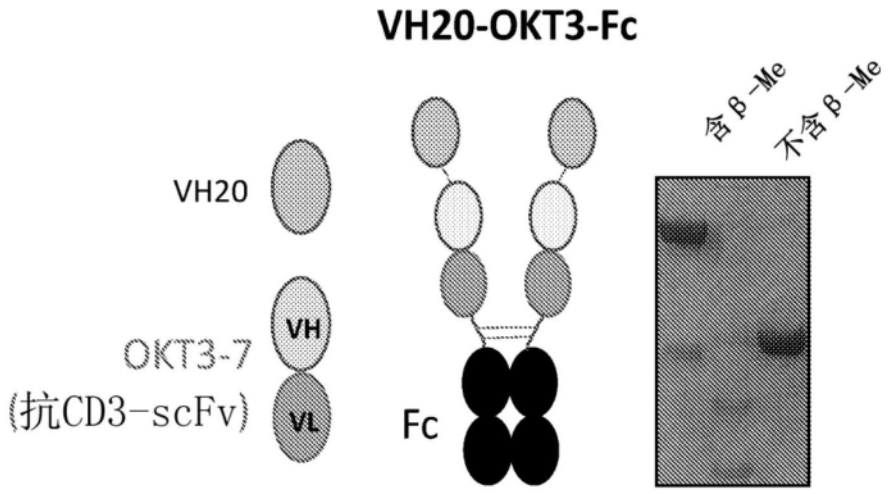

VH20-OKT3-Fc
VH20
VH
OKT3-7
(抗CD3-scFv)
VL
Fc
含β-Me
不含β-Me

图5A

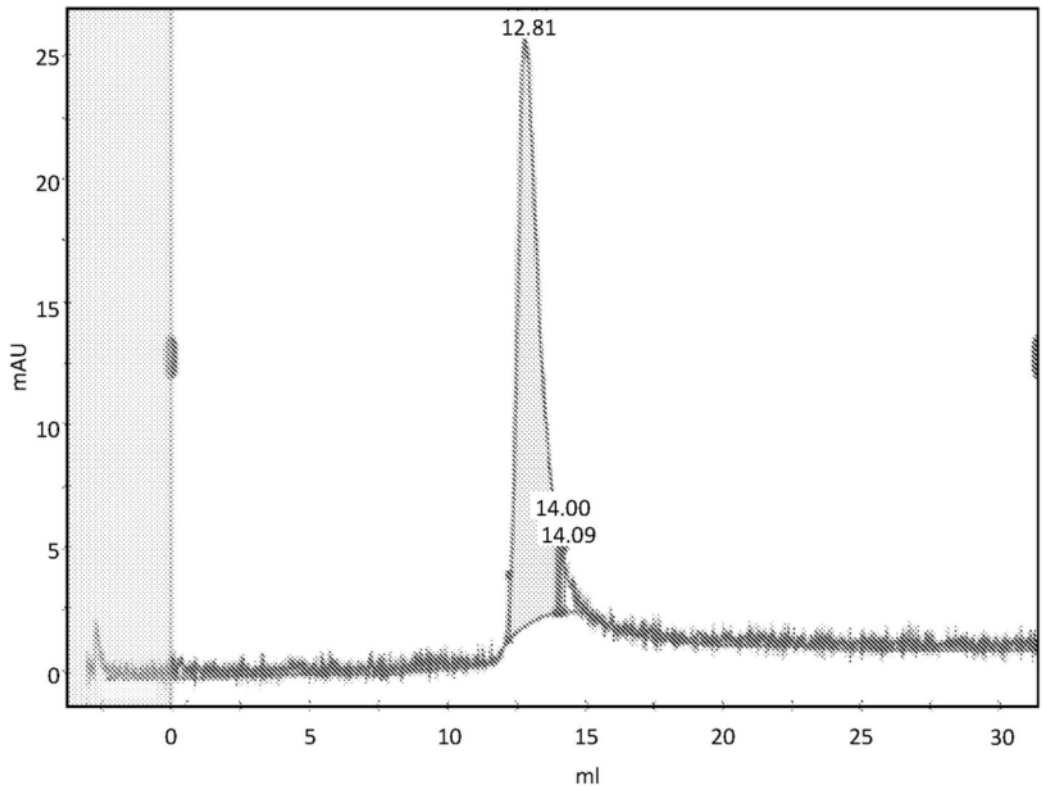

12.81
14.00
14.09
mAU
ml
0
5
10
15
20
25
30

图5B

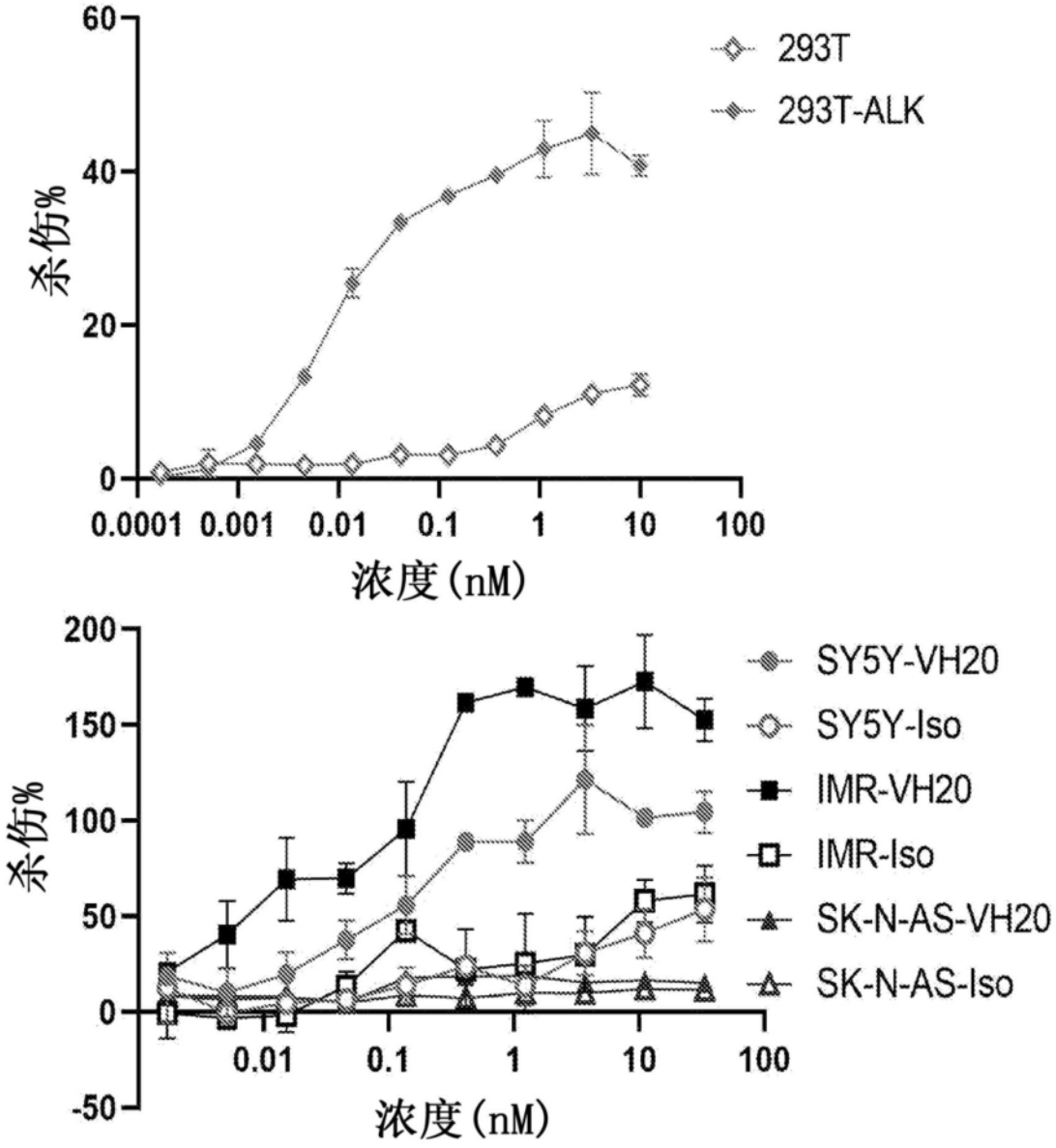

60
40
20
0
杀伤%
293T
293T-ALK
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
浓度(nM)
200
150
100
50
0
-50
杀伤%
SY5Y-VH20
SY5Y-Iso
IMR-VH20
IMR-Iso
SK-N-AS-VH20
SK-N-AS-Iso
0.01 0.1 1 10 100
浓度(nM)

图5C

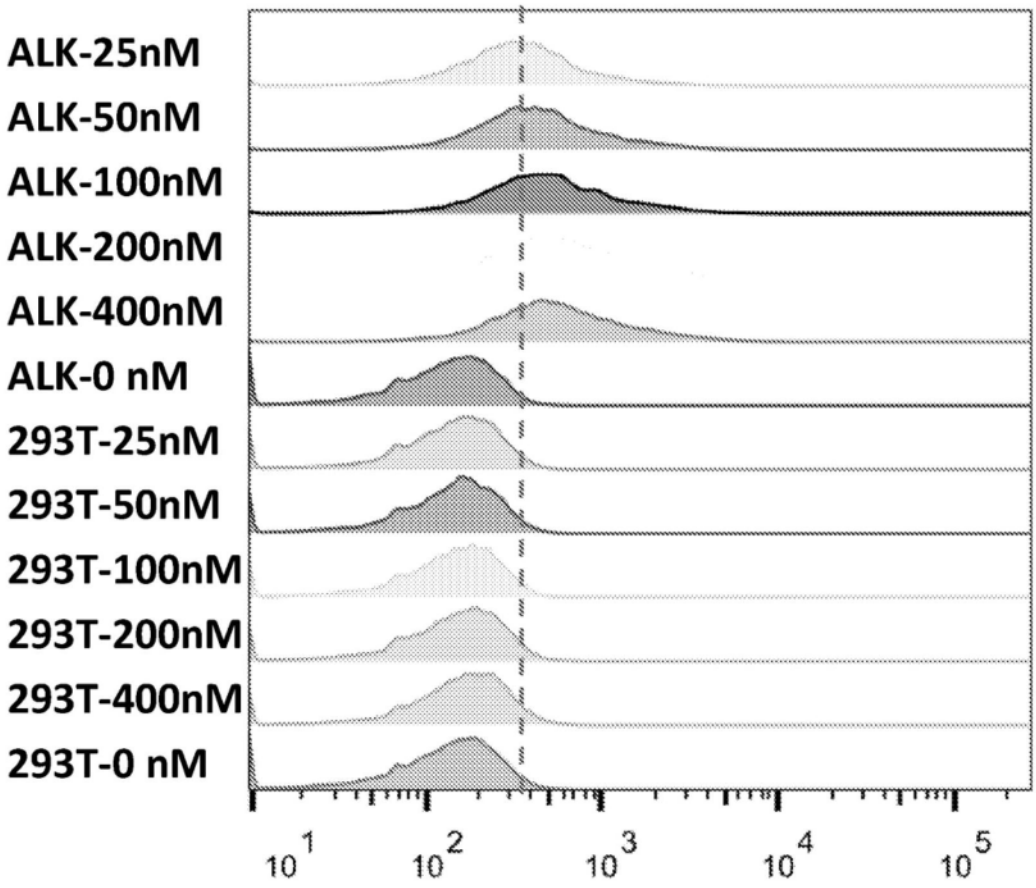

ALK-25nM
ALK-50nM
ALK-100nM
ALK-200nM
ALK-400nM
ALK-0 nM
293T-25nM
293T-50nM
293T-100nM
293T-200nM
293T-400nM
293T-0 nM
10 1
10 2
10 3
10 4
10 5

图6A

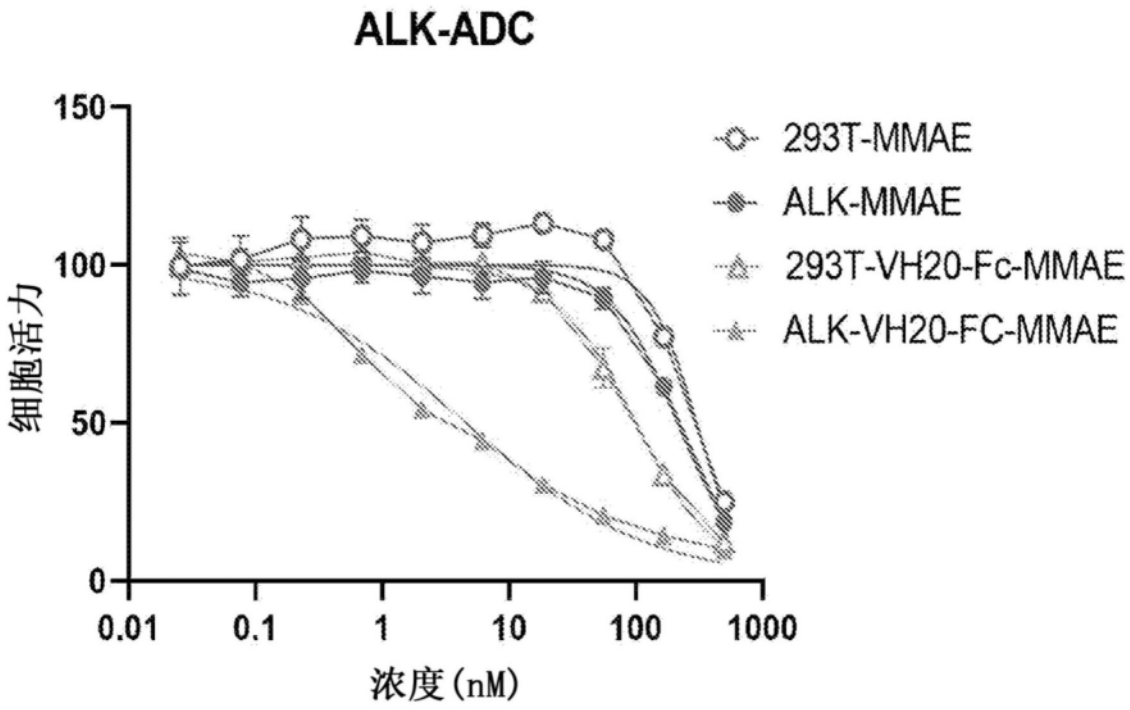

ALK-ADC
150
100
50
0
细胞活力
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度(nM)
293T-MMAE
ALK-MMAE
293T-VH20-Fc-MMAE
ALK-VH20-FC-MMAE

图6B