



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118451104 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 06

(21) 申请号 202280069477.8

(22) 申请日 2022.08.19

(30) 优先权数据

63/235,093 2021.08.19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.04.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/040931 2022.08.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/023354 EN 2023.02.23

(71) 申请人 阿迪塞特治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S·M·海斯 J·T·S·黄

A·巴特 M·图尔科兹

E·L·米杜格 H·邵

J·K·韦尔德 O·马勒

E·M·佩雷斯 M·I·霍佩斯

K·尼什莫托

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 邹宗亮

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书3页 说明书110页 附图25页

(54) 发明名称

检测膜结合磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的方法

(57) 摘要

实施方案提供了包含抗GPC3抗体的抗GPC3抗体组合物以及使用这类抗体和组合物预防、诊断和治疗癌症的方法。在一个实施方案中,预测抗GPC3免疫疗法对以癌症的细胞表达GPC3为特征的癌症的治疗效果的方法包括经由免疫组织化学方法检测受试者中所述细胞的存在,并且其中当检测到所述细胞的存在时,预测抗GPC3免疫疗法对受试者的癌症有治疗效果。

1. 一种结合磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3) 的分离的单克隆抗体, 其中:
所述抗GPC3抗体的重链包含如SEQ ID NO:6所示的互补决定区 (CDR) 1、如SEQ ID NO:8所示的CDR2和如SEQ ID NO:10所示的CDR3, 且所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:13所示的CDR1、如SEQ ID NO:15所示的CDR2和如SEQ ID NO:17所示的CDR3。
2. 如权利要求1所述的分离的单克隆抗体, 其中:
所述抗体的重链包含分别如SEQ ID NO:2的氨基酸残基31-35、50-66和99-105所示的CDR1、CDR2和CDR3, 且所述抗体的轻链包含分别如SEQ ID NO:4的氨基酸残基24-34、50-56和89-97所示的CDR1、CDR2和CDR3。
3. 如权利要求1所述的分离的单克隆抗体, 其中所述抗体的重链包含SEQ ID NO:2, 且所述抗体的轻链包含SEQ ID NO:4。
4. 如权利要求1所述的分离的单克隆抗体, 其中所述抗体包含:
(i) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的可变重链 (VH) 结构域; 和
(ii) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的可变轻链 (VL) 结构域。
5. 如权利要求1-4中任一项所述的分离的单克隆抗体, 其中所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的分离的单克隆抗体, 其中所述抗体是双特异性抗体。
7. 如权利要求1-5中任一项所述的分离的单克隆抗体, 其中所述抗体是抗体片段。
8. 如权利要求7所述的分离的单克隆抗体, 其中所述抗体是Fab片段、Fab' 片段、F(ab)'₂ 片段、单链可变片段 (scFv) 或二硫键稳定的可变片段 (dsFv)。
9. 一种检测组织制备物中的GPC3的方法, 所述方法包括:
使所述组织制备物与权利要求1所述的分离的单克隆抗体在足以形成权利要求1所述的分离的单克隆抗体与所述组织制备物的细胞的细胞膜上存在的GPC3的复合物的条件下接触; 并
检测所述抗体与所述组织制备物的结合。
10. 如权利要求9所述的方法, 其中所述组织制备物包括肝细胞癌 (HCC)、黑色素瘤、肺鳞状细胞癌、默克尔细胞癌或卵巢透明细胞癌肿瘤活检。
11. 如权利要求9所述的方法, 其中所述单克隆抗体被直接标记。
12. 如权利要求9所述的方法, 其进一步包括:
使特异性结合所述单克隆抗体的第二抗体与所述组织制备物接触; 并
检测所述第二抗体的结合。
13. 如权利要求9-12中任一项所述的方法, 其中检测所述抗体与所述组织样品的结合进一步包括对检测到的所述复合物的量进行评分。
14. 如权利要求13所述的方法, 其中所述评分由病理学家完成。
15. 如权利要求13所述的方法, 其中所述检测所述复合物的存在是经由数字化完成的;
且
其中所述评分是基于所检测到的复合物的所述数字化而自动进行的。
16. 如权利要求13-15中任一项所述的方法, 其中所述评分进一步包括使用从0 (阴性) 至3+的整数标度确定经由免疫组织化学检测到的所述复合物的染色强度, 记录在每个强度水平下阳性染色细胞的百分比, 并基于所述在每个强度水平下阳性染色细胞的百分比计算

膜相关H评分。

17. 一种预测抗GPC3免疫疗法对癌症的治疗效果的方法,所述癌症的特征在于所述癌症的细胞表达GPC3,所述方法包括:

经由权利要求9-16中任一项所述的方法检测受试者中所述细胞的存在,其中当检测到所述抗GPC3抗体与在所述癌细胞的膜上表达的GPC3的复合物时,预测所述抗GPC3免疫疗法对所述受试者的所述癌症具有治疗效果。

18. 如权利要求17所述的方法,其中在所述受试者接受任何抗GPC3免疫疗法之前进行所述预测所述治疗效果的方法。

19. 如权利要求17所述的方法,其中在所述受试者已在接受所述抗GPC3免疫疗法的过程时进行所述预测所述治疗效果的方法。

20. 如权利要求17所述的方法,其中所述抗GPC3免疫疗法包括嵌合抗原受体 (CAR) T细胞疗法或CAR NK细胞疗法,其中所述CAR被设计为特异性识别膜结合GPC3。

21. 如权利要求17所述的方法,其中所述抗GPC3免疫疗法包括抗GPC3抗体。

22. 一种分离的核酸分子,其编码权利要求1所述的单克隆抗体。

23. 如权利要求22所述的分离的核酸分子,其中:

编码所述单克隆抗体的重链的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1,且编码所述抗体的轻链的核苷酸序列包含SEQ ID NO:3。

24. 一种表达载体,其包含权利要求22或权利要求23所述的分离的核酸分子。

25. 一种用权利要求24所述的表达载体转化的分离的宿主细胞。

26. 一种双特异性抗体,其包含权利要求1所述的单克隆抗体。

27. 一种抗体-药物缀合物 (ADC), 其包含权利要求1所述的分离的单克隆抗体。

28. 一种嵌合抗原受体 (CAR), 其包含权利要求7或权利要求8所述的抗体片段。

29. 一种修饰的免疫细胞,其包含嵌合抗原受体 (CAR), 其中所述CAR包括权利要求28所述的CAR。

30. 如权利要求29所述的修饰的免疫细胞,其中所述修饰的免疫细胞是修饰的T细胞。

31. 如权利要求30所述的修饰的免疫细胞,其中所述修饰的免疫细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。

32. 如权利要求30所述的修饰的免疫细胞,其中所述修饰的免疫细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。

33. 如权利要求29所述的修饰的免疫细胞,其中所述修饰的免疫细胞是修饰的NK细胞。

34. 多种根据权利要求29-33中任一项所述的修饰的免疫细胞。

35. 一种抑制展示由权利要求1所述的抗体特异性识别的GPC3表位的细胞的生长的方法,其包括使所述细胞与权利要求1所述的分离的单克隆抗体、权利要求29-34中任一项所述的修饰的免疫细胞或根据权利要求27所述的ADC接触。

36. 一种组合物,其包含治疗有效量的权利要求1-6中任一项所述的分离的单克隆抗体、权利要求29-34中任一项所述的修饰的免疫细胞或权利要求27所述的ADC以及药学上可接受的载剂。

37. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,其包括选择患有表达GPC3的癌症的受试者,并对所述受试者施用根据权利要求35所述的组合物,从而治疗所述受试者的所述癌症。

38. 如权利要求37所述的方法,其中所述癌症是肝癌、卵巢癌、胃癌、默克尔细胞癌或肺癌。

- 39. 根据权利要求1-8中任一项所述的抗体在制备用于治疗癌症的药物中的用途。
- 40. 根据权利要求29-33中任一项所述的修饰的免疫细胞在制备用于治疗癌症的药物中的用途。
- 41. 如权利要求27所述的ADC在制备用于治疗癌症的药物中的用途。
- 42. 如权利要求28所述的CAR在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

检测膜结合磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年8月19日提交的美国临时申请第63/235,093号的优先权权益。

技术领域

[0003] 本发明涉及靶向癌细胞的抗体,所述癌细胞在它们的细胞表面上表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3,并且涉及使用这类抗体预防、诊断和治疗这类癌症的组合物和方法。

背景技术

[0004] 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3) 是一种膜结合硫酸肝素蛋白聚糖,其在大约70%-80%的肝细胞癌 (HCC) 以及卵黄囊瘤、胃癌、结直肠癌、非小细胞肺癌和甲状腺癌中过表达 (Moek等人,2018.The American Journal of Pathology,8:9;1973-1981),但在常见的健康组织中基本上不表达。在这种背景下,GPC3代表了有希望的肿瘤抗原靶点。然而,GPC3可以在细胞质中以及在细胞膜上表达。因为某些有希望的治疗方法 (例如,嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T) 疗法) 目前仅能够识别细胞表面上的GPC3,所以需要特异性靶向细胞表面GPC3的疗法,以及能够准确评估肿瘤细胞表面上的GPC3水平的诊断方法。

[0005] 迄今为止,仅有一种在商业上可行的GPC3免疫组织化学 (IHC) 体外诊断 (IVD) 测定法,其是使用对GPC3的C末端具有特异性的抗GPC3 mAb (1G12) 的定性测定法 (Cell MarqueTM,Rocklin,CA)。根据测定的规范,GPC3抗体在HCC的赘生性细胞中展示出弥漫性和膜性染色模式。此外,已经注意到,1G12 mAb在表达水平低的肿瘤细胞系中敏感性低 (Phung等人,2012.mAbs Landes Bioscience,4:5;592-599)。因此,至少基于以上所述,需要这样的mAb,其具有更高的灵敏度,并且能够优先对表达GPC3的肿瘤细胞的细胞膜进行染色,特别是在用于评估膜结合GPC3的IVD测定法中使用。

发明内容

[0006] 本发明利用提供了膜结合GPC3与细胞溶质GPC3之间改善的区分的组合物和方法处理和解决现有技术中的前述缺点,以用于更准确的诊断分析和治疗。在一些实施方案中,本发明提供抗GPC3抗体,包括其片段,以及其使用方法,例如用于癌症的诊断、预防和/或治疗。

[0007] 在一个实施方案中,本发明的抗GPC3抗体与位于GPC3的C末端 β 链中的GPC3表位结合。在一个实施方案中,抗GPC3抗体包含:包含SEQ ID NO:2的重链可变区和包含SEQ ID NO:4的轻链可变区。

[0008] 在一个实施方案中,本发明的抗GPC3抗体的重链包含如SEQ ID NO:6所示的互补决定区 (CDR) 1、如SEQ ID NO:8所示的CDR2和如SEQ ID NO:10所示的CDR3。

[0009] 在一个实施方案中,本发明的抗GPC3抗体的轻链包含如SEQ ID NO:13所示的CDR1、如SEQ ID NO:15所示的CDR2和如SEQ ID NO:17所示的CDR3。

[0010] 在一个实施方案中,本发明的抗GPC3抗体的重链包含如SEQ ID NO:6所示的互补

决定区(CDR)1、如SEQ ID NO:8所示的CDR2和如SEQ ID NO:10所示的CDR3,且本发明的抗GPC3抗体的轻链包含如SEQ ID NO:13所示的CDR1、如SEQ ID NO:15所示的CDR2和如SEQ ID NO:17所示的CDR3。

[0011] 在一个实施方案中,抗GPC3抗体的重链包含分别如SEQ ID NO:2的氨基酸残基31-35、50-66和99-105所示的CDR1、CDR2和CDR3,且抗体的轻链包含分别如SEQ ID NO:4的氨基酸残基24-34、50-56和89-97所示的CDR1、CDR2和CDR3。

[0012] 在一个实施方案中,本发明提供与包含:包含SEQ ID NO:2的重链可变区和包含SEQ ID NO:4的轻链可变区的抗体竞争与GPC3的结合的抗GPC3抗体。

[0013] 本发明的抗GPC3抗体包括例如单克隆抗体、抗体片段(包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段)、双抗体、单结构域抗体、嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体和竞争性抑制包含:包含SEQ ID NO:2的重链可变区和包含SEQ ID NO:4的轻链可变区的抗体与GPC3结合的抗体。

[0014] 在一个实施方案中,抗GPC3抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含选自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:10组成的组的氨基酸序列。

[0015] 在一个实施方案中,抗GPC3抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含选自由SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:17组成的组的氨基酸序列。

[0016] 在一个实施方案中,抗GPC3抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0017] 在一个实施方案中,抗GPC3抗体是单克隆抗体。

[0018] 在一个实施方案中,抗GPC3抗体是抗体片段。

[0019] 在一个实施方案中,抗GPC3抗体是双特异性抗体。

[0020] 一方面,本发明提供诊断受试者的癌症的方法,包括检测GPC3在受试者中或来自受试者的生物样品中构成癌症的细胞的细胞表面上的存在。

[0021] 一方面,本发明提供确定诊断患有癌症的受试者的预后的方法,包括检测在受试者中或得自受试者的生物样品中构成癌症的细胞的细胞表面上表达的GPC3的存在。在一个实施方案中,所述方法涉及在受试者已经接受用于癌症治疗的治疗剂后检测GPC3在受试者中或来自受试者的生物样品中的存在。在实施方案中,治疗剂是用于治疗癌症的药剂,所述癌症包含在其细胞表面上表达GPC3的癌细胞。

[0022] 一方面,本发明提供预测抗GPC3免疫疗法对癌症的治疗效果的方法。在实施方案中,癌症包含表达GPC3的细胞。在实施方案中,所述方法包括检测所述细胞的存在,其中当检测到所述细胞时,预测抗GPC3免疫疗法对受试者的癌症有治疗效果。在实施方案中,在受试者接受任何抗GPC3免疫疗法之前进行预测。在实施方案中,在受试者接受抗GPC3免疫疗法的过程中进行预测。

[0023] 一方面,本发明提供编码本发明的GPC3抗体(或其部分)的核酸。

[0024] 一方面,本发明提供包含编码任何本文所述的抗GPC3抗体或其部分的DNA的载体。还提供了包含任何这类载体的宿主细胞。举例来说,宿主细胞可以是CHO细胞、大肠杆菌细胞或酵母细胞。进一步提供了产生任何本文所述的多肽的方法,并且包括在适合表达所需多肽的条件下培养宿主细胞,并从细胞培养物中回收所需多肽。在一个实施方案中,载体包含SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:3(表2)。

[0025] 一方面,本发明提供CAR修饰的免疫细胞,优选CAR-T或CAR-NK细胞,其包含能够与GPC3结合、优选能够与GPC3的 β 链结合的嵌合抗原受体。一方面,本发明提供包含嵌合抗原

受体的CAR修饰的免疫细胞,优选CAR-T或CAR-NK细胞,其中所述嵌合抗原受体包含本公开的抗GPC3抗体的轻链可变区和本公开的抗GPC3抗体的重链可变区。

[0026] 一方面,本发明提供包含抗GPC3抗体的CAR修饰的免疫细胞(或其多个),优选CAR-T或CAR-NK细胞。在一个实施方案中,抗GPC3抗体是抗体片段。在一个实施方案中,抗GPC3抗体是scFv。在一个实施方案中,修饰的T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。在一个实施方案中,修饰的T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。

[0027] 一方面,本发明提供包含抗GPC3抗体和药学上可接受的载剂的药物组合物。一方面,本发明提供药物组合物,其包含本发明的CAR修饰的免疫细胞,优选CAR-T或CAR-NK细胞,和药学上可接受的载剂。在一个实施方案中,抗GPC3抗体以抗体-药物缀合物(ADC)的形式使用。

[0028] 一方面,本发明提供制备抗GPC3抗体的方法。一方面,本发明提供制备本文公开的CAR修饰的免疫细胞的方法。在一个实施方案中,本发明提供制备包含抗GPC3抗体的ADC的方法。

[0029] 一方面,本发明提供制备用于治疗癌症的药物的方法。在实施方案中,本发明涉及如本文公开的抗GPC3抗体用于制备药物的用途,所述药物可用于治疗对抗GPC3抗体有反应的病状。

[0030] 一方面,本发明提供本发明的核酸在制备药物中的用途,所述药物用于诸如癌症、肿瘤和/或细胞增殖性病症的疾病的治疗性和/或预防性治疗。

[0031] 一方面,本发明提供本发明的表达载体在制备药物中的用途,所述药物用于诸如癌症、肿瘤和/或细胞增殖性病症的疾病的治疗性和/或预防性治疗。

[0032] 一方面,本发明提供本发明的宿主细胞在制备药物中的用途,所述药物用于诸如癌症、肿瘤和/或细胞增殖性病症的疾病的治疗性和/或预防性治疗。

[0033] 一方面,本发明提供包含与细胞毒性剂缀合的抗GPC3抗体的ADC,所述细胞毒性剂如化疗剂、药物、生长抑制剂、毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素或其片段)或放射性同位素(即,放射性缀合物)。另一方面,本发明进一步提供使用免疫缀合物的方法。一方面,免疫缀合物包含与细胞毒性剂或可检测剂共价连接的任何上述抗GPC3抗体。

[0034] 一方面,本发明提供抑制细胞的增殖或生长的方法,所述细胞在其细胞表面上表达GPC3,包括使所述细胞与本发明的抗GPC3抗体或CAR修饰的免疫细胞(优选CAR-T或CAR-NK细胞)接触。在一个实施方案中,抗GPC3抗体以ADC的形式使用。在实施方案中,细胞的增殖或生长包括细胞增殖性病症。在实施方案中,细胞增殖性病症是癌症。

[0035] 一方面,本发明提供治疗性治疗患有包含表达GPC3的细胞的癌性肿瘤的哺乳动物的方法,所述方法包括对所述哺乳动物施用治疗有效量的本发明的抗体或CAR修饰的免疫细胞,优选CAR-T或CAR-NK细胞,从而有效治疗所述哺乳动物。在一个实施方案中,所述哺乳动物是人受试者。在一个实施方案中,所述癌症选自肝癌、卵巢癌、肺癌、默克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma)和胃癌或胃部癌组成的组。

[0036] 一方面,本发明提供诱导细胞死亡的方法,所述细胞在其细胞表面上表达GPC3,包括使所述细胞与本发明的抗GPC3抗体或CAR修饰的免疫细胞(优选CAR-T或CAR-NK细胞)接触。在一个实施方案中,抗GPC3抗体是ADC。

[0037] 在更进一步的方面,本发明涉及物质组合物,其包含如本文所述的抗GPC3抗体,在一些实施方案中与载体相组合。任选地,载体是药学上可接受的载体。在更进一步的方面,本发明涉及物质组合物,其包含如本文所述的CAR修饰的免疫细胞,优选CAR-T或CAR-NK细胞,与载体相组合。任选地,载体是药学上可接受的载体。

[0038] 本文还提供试剂盒及其使用方法。

[0039] 以引用的方式并入

[0040] 本说明书提到的所有出版物、专利和专利申请均以引用的方式并入本文,其程度如同具体且单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请以引用的方式并入。

附图说明

[0041] 在附图的图示中以举例而非限制的方式对实施方案进行说明。

[0042] 图1A-图1C示出使用204(图1A)、1G12(图1B)和GC33(图1C)进行的生物层干涉测量(BLI)结合测定的结果。

[0043] 图2A描绘通过蛋白质印迹在还原(R)和非还原(NR)条件下通过204(左图)、GC33(中图)和1G12(右图)检测重组人(rh)GPC3。

[0044] 图2B描绘在还原(R)和非还原(NR)条件下用来探测rhGPC3、rhGPC5和rhGPC6的204和1G12抗体的蛋白质印迹结果。

[0045] 图3描绘通过204检测到的可溶性天然人GPC3的蛋白质印迹分析。测试的样品作为来自肿瘤细胞系HepG2、NCI-H661和Hep3B的上清液获得。

[0046] 图4是示出 α 链、 β 链、弗林蛋白酶切割位点、GC33免疫原、1G12免疫原、GC33表位和可能的204表位的主要GPC3亚型(亚型2)的高级示意图。

[0047] 图5是GPC3的另一个高级示意图,显示了与GC33相比的ADAM10切割位点和204结合的区域。

[0048] 图6A描绘显示用ADAM10和ADAM17切割rhGPC3的考马斯染色的凝胶。通过用ADAM10切割GPC3使大约12kDa的片段释放。

[0049] 图6B描绘用204和GC33探测的ADAM10和ADAM17切割的GPC3的蛋白质印迹分析。关于图6A中提到的大约12kDa的片段被GC33而不是204检测到,表明204的表位在弗林蛋白酶切割位点与预测的ADAM10位点之间。

[0050] 图7示出用于本公开的204抗体的高级示例优化的免疫组织化学(IHC)方法。

[0051] 图8描绘使用204抗体和图7的优化方案来自人肝细胞癌(HCC)的肿瘤微阵列(TMA)的代表性图像。如图所示,半定量膜相关H评分用于评估染色。

[0052] 图9描绘使用204或1G12来检测肺鳞状细胞癌和HCC中的GPC3的IHC实验的代表性图像,以及使用图7的优化方案的相应膜相关H评分。

[0053] 图10描绘使用图7的优化方案,使用204或1G12来探测健康肺和肝组织的IHC实验的代表性图像。

[0054] 图11描绘来自用1G12(0.5 μ g/mL)或204(0.1 μ g/mL)抗体染色并经由作为二抗缀合的辣根过氧化物酶(HRP)的底物的3,3'-二氨基联苯胺(DAB)可视化的HepG2(GPC3^{hi})和PP5(GPC3^{lo})肿瘤的组织的IHC图像。还显示了同种型对照。在NOD SCID小鼠中皮下植入人肝细胞癌(HCC)细胞系HepG2(GPC3^{hi})和PP5(GPC3^{lo}),并分别在PP5和HepG2植入后第24天和第31

天收获肿瘤。

[0055] 图12显示量化对应于图11的图像的IHC染色的柱状图。定量的是HepG2肿瘤和两种不同的PP5肿瘤。柱状图的上图描绘膜相关H评分,且柱状图的下图是指总H评分(细胞质和膜)。

[0056] 图13描绘的图形显示对于包括胃癌(腺癌)、肝癌(HCC)、肺癌(鳞状细胞癌)和卵巢癌(透明细胞癌)在内的各种癌症,在IHC实验中使用204和1G12在福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)肿瘤块(上图)和来自组织微阵列(TMA)的FFPE肿瘤核心(下图)上获得的膜相关H评分的头对头比较。

[0057] 图14A-图14C显示基于使用204和1G12 mAb用于IHC的染色强度,膜相关GPC3在HCC和SCCL(图14A)、HCC(图14B)和SCCL(图14C)中的流行率分布。

[0058] 图14D-图14E显示基于使用204和1G12 mAb用于IHC的膜相关H评分,膜相关GPC3在HCC和SCCL(图14D)、HCC(图14E)和SCCL(图14F)中的流行率分布。

[0059] 图15描绘使用204mAb与1G12 mAb相比,在来自异种移植肿瘤模型的FFPE组织中的膜相关GPC3表达的图像。用于异种移植程序的细胞系包括Hep3B、HepG2、Huh-7和PLC/PRF/5。每个图像中的插图(较大的正方形)对应于所指示区域(较小的正方形)的更高分辨率的图像。用于参考所示的是对于每种条件相应的膜相关H评分。

[0060] 图16A-图16B描绘就膜相关H评分(图16A)和中至高膜强度的%(图16B)量化图15的IHC实验的图形。

[0061] 图17A是显示基于使用204mAb的IHC测量的对来自异种移植小鼠模型的肿瘤进行评分的表格。

[0062] 图17B是显示基于使用1G12 mAb的IHC测量的对来自异种移植小鼠模型的肿瘤进行评分的表格。

具体实施方式

[0063] 在以下具体实施方式中,参考构成其一部分的附图,并且在附图中通过图示显示了可以实施的实施方案。要理解的是,在不脱离范围的情况下,可以利用其它实施方案,并且可以进行结构或逻辑改变。因此,以下具体实施方式不应被视为具有限制意义。

[0064] 各种操作可以以可能有助于理解实施方案的方式依次被描述为多个离散操作;然而,描述的顺序不应被解释为暗示这些操作是顺序相关的。

[0065] 说明书可使用术语“实施方案”或“多个实施方案”,其各自可以指一个或多个相同或不同的实施方案。此外,关于实施方案使用的术语“包含”、“包括”、“具有”等是同义的,并且通常旨在作为“开放”术语(例如,术语“包括”应被解释为“包括但不限于”,术语“具有”应被解释为“具有至少”,术语“包括”应被解释为“包括但不限于”等)。

[0066] 关于本文中任何复数和/或单数术语的使用,本领域技术人员可以在上下文和/或应用适合的情况下从复数变化为单数和/或从单数变化为复数。为了清楚起见,可以在本文中明确地阐述各种单数/复数变换。

[0067] 在描述本发明之前,要理解的是,本发明不限于所描述的特定方法和实验条件,因为这类方法和条件可以变化。还要理解的是,本文中使用的术语仅是为了描述特定实施方案的目的,并不旨在进行限制,因为本发明的范围将仅由所附权利要求限定。任何实施方案

或实施方案的特征可以彼此组合,并且这类组合明确地涵盖在本发明的范围内。

[0068] 除另有定义外,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。

[0069] 除另指出外,本发明的实践将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,这些技术在本领域的技能范围内。这类技术在文献中有充分说明,如“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,第二版(Sambrook等人,1989);“Oligonucleotide Synthesis”(M.J.Gait编著,1984);“Animal Cell Culture”(R.I.Freshney编著,1987);“Methods in Enzymology”(Academic Press,Inc.);“Current Protocols in Molecular Biology”(F.M.Ausubel等人编著,1987,以及定期的更新);“PCR:The Polymerase Chain Reaction”,(Mullis等人编著,1994);“A Practical Guide to Molecular Cloning”(Perbal Bernard V.,1988);“Phage Display:A Laboratory Manual”(Barbas等人,2001)。

[0070] 本领域技术人员将认识到,有与本文所述类似或等价的许多方法和材料可用于本发明的实践。实际上,本发明决不限于所描述的方法和材料。

[0071] 虽然与本文所述类似或等价的任何方法和材料均可用于本发明的实践或测试,但现在描述优选的方法和材料。本说明书中提到的所有专利、申请和非专利出版物均以全文引用的方式并入本文。

[0072] I. 定义

[0073] 出于解释本说明书的目的,以下定义将适用,并且在适当时,以单数使用的术语也将包括复数,反之亦然。如果所阐述的任何定义与以引用的方式并入本文的任何文件相冲突,则以下面所阐述的定义为准。除另有定义外,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。

[0074] 当指可测量的值如量、持续时间等时,如本文所用的“约”意在涵盖 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 的变化。更优选偏离指定值 $\pm 5\%$,甚至更优选偏离指定值 $\pm 1\%$,还更优选偏离指定值 $\pm 0.1\%$,因为这类变化适于执行所公开的方法。此外,数值范围的列举包括所述范围涵盖的任何数值和/或包括在所述范围内的任何数值范围。例如,数值范围1-10涵盖该范围,并且另外涵盖单个数值(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10),以及所述数值范围内的范围(例如,1-2、1-4、2-5、3-7、4-9、5-10等)。

[0075] 如本文所用的“接触”包括在溶液或固相中使至少两种物质在一起。

[0076] 如本文所用的“磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)”是指通过糖基磷脂酰肌醇锚连接于细胞表面的硫酸乙酰肝素(HS)蛋白聚糖的磷脂酰肌醇蛋白聚糖家族的成员(Filmus和Selleck,J Clin Invest 108:497-501,2001)。GPC3基因编码大约70kD的核心蛋白,该核心蛋白可以被弗林蛋白酶切割,产生N末端40kD片段和C末端30kD片段。两条HS链连接在GPC3的C末端部分上。GPC3及其它磷脂酰肌醇蛋白聚糖家族蛋白在细胞分裂和细胞生长调控中发挥作用。GPC3在HCC和一些其它人类癌症中高度表达,包括黑色素瘤、肺鳞状细胞癌和卵巢透明细胞癌(Ho和Kim,Eur J Cancer 47(3):333-338,2011),但在正常组织中不表达。GPC3也被称为SGB、DGSX、MXR7、SDYS、SGBS、OCI-5、SGBS1和GTR2-2。

[0077] 人GPC3有四种已知的亚型(亚型1-4)。GPC3的四种亚型的核酸和氨基酸序列是已知的,包括GenBank登录号:NM_001164617和NP_001158089(亚型1);NM_004484和NP_004475

(亚型2);NM_001164618和NP_001158090(亚型3);以及NM_001164619和NP_001158091(亚型4)。在本公开的一些实施方案中,本文公开的抗体结合四种人GPC3亚型中的一种或多种或其保守变体。

[0078] 如本文所用的氨基酸残基/位置的“修饰”是指与起始氨基酸序列相比一级氨基酸序列的变化,其中所述变化由涉及所述氨基酸残基/位置的序列改变引起。例如,典型的修饰包括残基(或在所述位置处)用另一个氨基酸取代(例如,保守或非保守取代)、邻近所述残基/位置插入一个或多个(通常少于5或3个)氨基酸和缺失所述残基/位置。“氨基酸取代”或其变化形式是指用不同的氨基酸残基替换预定(起始)氨基酸序列中的现有氨基酸残基。一般且优选地,与包含起始(或“野生型”)氨基酸序列的多肽相比,修饰导致变体多肽的至少一种物理生化活性改变。例如,在抗体的情况下,改变的物理生化活性可以是对靶分子的结合亲和力、结合能力和/或结合效应。

[0079] 如本文所用,术语“T淋巴细胞”或“T细胞”是指表达或曾经表达CD3(CD3+)和T细胞受体(TCR+)的免疫细胞。T细胞在细胞介导的免疫中发挥核心作用。“曾经表达CD3和TCR”的T细胞已经被工程化以消除CD3和/或TCR细胞表面表达。

[0080] 如本文所用,术语“TCR”或“T细胞受体”是指形成 α - β 或 γ - δ 受体或其组合的二聚异源细胞表面信号传导蛋白。 $\alpha\beta$ TCR识别由MHC分子呈递的抗原,而 $\gamma\delta$ TCR可独立于MHC呈递来识别抗原。

[0081] 术语“MHC”(主要组织相容性复合物)是指编码人细胞表面抗原呈递蛋白的基因的子集,这些基因被称为人白细胞抗原(HLA)基因。在本文中,缩写MHC或HLA可互换使用。

[0082] 如本文所用的“激活”是指T细胞已被充分刺激以诱导可检测的细胞增殖的状态。激活也可与诱导的细胞因子产生和可检测的效应子功能相关。术语“激活的T细胞”尤其是指正在经历细胞分裂的T细胞。

[0083] 如本文所用的术语“抗体”是指与抗原特异性结合的免疫球蛋白分子。抗体可以是来源于天然来源或来源于重组来源的完整免疫球蛋白,并且可以是完整免疫球蛋白的免疫反应性部分。抗体通常是免疫球蛋白分子的四聚体。本发明中的抗体可以以多种形式存在,包括例如多克隆抗体、单克隆抗体(包括激动剂、拮抗剂、中和抗体、全长或完整单克隆抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、多价抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体,只要它们表现出所需的生物活性)、由至少两种完整抗体形成的双抗体、单结构域抗体(sdAb)(只要它们表现出所需的生物或免疫活性)、Fv、Fab和F(ab)以及单链抗体和人源化抗体(Harlow等人,1999,见:Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY;Harlow等人,1989,见:Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,N.Y.;Houston等人,1988,Proc.Nat Acad.Sci.USA 85:5879-5883;Bird等人,1988,Science 242:423-426)。

[0084] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体(参见美国专利第5,641,870号,实施例2;Zapata等人,Protein Eng.8(10):1057-1062[1995]);单链抗体分子;二硫键连接片段可变区(dsFv)和由抗体片段形成的多特异性抗体。在一个实施方案中,抗体片段包含完整抗体的抗原结合位点,因此保留了结合抗原的能力。抗体片段中还包括抗体的可用作针对例如CAR-T细胞或CAR-NK细胞的嵌合抗原受体中的GPC3肿瘤表位的靶向臂的部

分(和抗体的部分的组合,例如scFv)。这类片段不一定是蛋白水解片段,而是多肽序列的可以赋予靶标亲和力的部分。

[0085] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段(被称为“Fab”片段)和残余“Fc”片段(该名称反映了容易结晶的能力)。Fab片段由完整的L链以及H链的可变区结构域(VH)和一条重链的第一恒定结构域(CH1)组成。每个Fab片段就抗原结合而言是单价的,即其具有单个抗原结合位点。抗体的胃蛋白酶处理产生单个大的F(ab')₂片段,其大致对应于具有二价抗原结合活性的两个二硫键连接的Fab片段,并且仍然能够交联抗原。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在CH1结构域的羧基末端具有另外的几个残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH在本文中是其中恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离的硫醇基团的Fab'的名称。F(ab')₂抗体片段最初作为Fab'片段对产生,所述对在它们之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0086] Fc片段包含通过二硫键保持在一起的两条H链的羧基末端部分。抗体的效应子功能由Fc区中的序列决定,该区域也是由见于某些类型的细胞上的Fc受体(FcR)识别的部分。

[0087] “Fv”是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。此片段由紧密非共价缔合的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。在单链Fv(scFv)物质中,一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域可通过柔性肽接头共价连接,使得轻链和重链可以以类似于双链Fv物质中的“二聚”结构缔合。由这两个结构域的折叠产生出六个高变环(来自H链和L链各3个环),它们为抗原结合贡献氨基酸残基,并对抗体赋予抗原结合特异性。然而,即使单个可变结构域(或仅包含对抗原具有特异性的三个CDR的Fv的一半)也具有识别并结合抗原的能力,尽管亲和力低于整个结合位点。

[0088] “单链Fv”也缩写为“sFv”或“scFv”,是包含连接成单个多肽链的VH和VL抗体结构域的抗体片段。优选地,sFv多肽在VH与VL结构域之间进一步包含多肽接头,其使得sFv能够形成用于抗原结合的所需结构。关于sFv的综述,参见Pluckthun的The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编著,Springer-Verlag,New York,第269-315页(1994);Borrebaeck 1995,见下文。在一个实施方案中,抗GPC3抗体来源的scFv用作本文公开的CAR-T细胞或CAR-NK细胞的靶向臂。

[0089] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指获自基本上同质的抗体群体的抗体,即除了可能以少量存在的可能的天然存在的突变之外,构成所述群体的单个抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原位点。此外,与包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。单克隆抗体除了它们的特异性之外的优点还在于它们可以在不被其它抗体污染的情况下合成。修饰语“单克隆”不应被解释为需要通过任何特定的方法产生抗体。例如,可用于本发明的单克隆抗体可通过Kohler等人,Nature,256:495(1975)首先描述的杂交瘤方法来制备,或者可以采用重组DNA方法在细菌、真核动物或植物细胞中制备(参见例如美国专利第4,816,567号)。也可以例如采用Clackson等人,Nature,352:624-628(1991)和Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)中描述的技术从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”。

[0090] 术语“高变区”、“HVR”或“HV”当用在本文中时是指抗体可变结构域的在序列上高变和/或形成结构上限定的环的区域。一般地,抗体包含六个高变区;三个在VH中(H1、H2、H3),且三个在VL中(L1、L2、L3)。许多对高变区的描述在使用中,并且涵盖在本文中。Kabat

互补决定区 (CDR) 基于序列变异性,并且是最常用的 (Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。而 Chothia 涉及结构环的位置 (Chothia 和 Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。当使用 Kabat 编号惯例进行编号时, Chothia CDR-H1 环的端部在 H32 与 H34 之间变化, 这取决于环的长度 (这是因为 Kabat 编号方案将插入置于 H35A 和 H35B 处; 如果 35A 和 35B 都不存在, 则环在 32 处结束; 如果仅 35A 存在, 则环在 33 处结束; 如果 35A 和 35B 都存在, 则环在 34 处结束)。AbM 高变区代表 Kabat CDR 与 Chothia 结构环之间的折衷, 并且被 Oxford Molecular 的 AbM 抗体建模软件使用。“接触 (contact)” 高变区是基于对可用的复杂晶体结构的分析。来自这些高变区中的每一者的残基如下所示。

[0091] 环 Kabat AbM Chothia 接触

[0092] LI L24-L34 L24-L34 L24-L34 L30-L36

[0093] L2 L50-L56 L50-L56 L50-L56 L46-L55

[0094] L3 L89-L97 L89-L97 L89-L97 L89-L96

[0095] HI H31-H35B H26-H35B H26-H32...34H30-H35B

[0096] (Kabat 编号)

[0097] HI H31-H35 H26-H35 H26-H32 H30-H35

[0098] (Chothia 编号)

[0099] H2 H50-H65 H50-H58 H52-H56 H47-H58

[0100] H3 H95-H102 H95-H102 H95-H102 H93-H101

[0101] 高变区可包含如下“延伸的高变区”: VL 中的 24-36 或 24-34 (LI)、46-56 或 50-56 (L2) 和 89-97 (L3) 以及 VH 中的 26-35B (HI)、50-65、47-65 或 49-65 (H2) 和 93-102、94-102 或 95-102 (H3)。对于这些定义中的每一者, 可变结构域残基根据 Kabat 等人, 上文进行编号。

[0102] “框架”或“FR”残基是除了本文定义的高变区残基之外的那些可变结构域残基。

[0103] 术语“如 Kabat 中的可变结构域残基编号”或“如 Kabat 中的氨基酸位置编号”及其变化形式是指 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) 中用于抗体汇编的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用此编号系统, 实际的线性氨基酸序列可含有对应于可变结构域的 FR 或 CDR 的缩短或插入到可变结构域的 FR 或 CDR 中的较少或额外的氨基酸。例如, 重链可变结构域可包括 H2 的残基 52 之后的单个氨基酸插入 (根据 Kabat 的残基 52a) 和重链 FR 残基 82 之后的插入残基 (例如根据 Kabat 的残基 82a、82b 和 82c 等)。对于给定的抗体, 可通过在抗体序列的同源区与“标准”Kabat 编号的序列比对来确定残基的 Kabat 编号。

[0104] 当提到可变结构域中的残基 (大约轻链的残基 1-107 和重链的残基 1-113) 时, 通常使用 Kabat 编号系统 (例如, Kabat 等人, Sequences of Immunological Interest. 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。当提到免疫球蛋白重链恒定区中的残基时, 通常使用“EU 编号系统”或“EU 索引” (例如, Kabat 等人, 同上中报道的 EU 索引)。“如 Kabat 中的 EU 索引”是指人 IgG1 EU 抗体的残基编号。除本文另有说明外, 提到抗体的可变结构域中的残基编号意指通过 Kabat 编号系统进行残基编号。

[0105] “阻断”抗体或“拮抗剂”抗体是抑制或降低其结合的抗原的生物活性的抗体。优选

的阻断抗体或拮抗剂抗体基本上或完全抑制抗原的生物活性。

[0106] “结合”所关注的抗原或表位的抗体是以足够的亲和力结合抗原或表位的抗体,所述足够的亲和力可测量地不同于非特异性相互作用。特异性结合可例如通过与对照分子的结合相比测定分子的结合来测量,所述对照分子通常是不具有结合活性的类似结构的分子。

[0107] 抑制肿瘤细胞生长的抗体是导致可测量的癌细胞生长抑制的抗体。在一个实施方案中,抗GPC3抗体能够抑制展示GPC3肿瘤表位的癌细胞的生长。与适当的对照相比,优选的生长抑制性抗GPC3抗体对表达GPC3的肿瘤细胞的生长抑制超过20%,优选约20%至约50%,甚至更优选超过50%(例如,约50%至约100%),对照通常为没有用测试的抗体处理(或用同种型对照处理)的肿瘤细胞。

[0108] 抗GPC3抗体可以(i)抑制与它们结合的细胞的生长或增殖;(ii)诱导与它们结合的细胞死亡;(iii)抑制与它们结合的细胞分层;(iv)抑制与它们结合的细胞转移;或(v)抑制包含与它们结合的细胞的肿瘤的血管形成。

[0109] 术语“拮抗剂”以最广泛的含义使用,并且包括部分或完全阻断、抑制或中和抗原的生物活性的任何分子。合适的拮抗剂分子具体包括拮抗剂抗体或抗体片段、天然GPC3多肽的片段或氨基酸序列变体、肽、反义寡核苷酸、有机小分子等。确认GPC3多肽的拮抗剂的方法可包括使GPC3多肽与候选拮抗剂分子接触,并测量通常与GPC3多肽相关的一种或多种生物活性的可检测的变化。

[0110] 术语“抗GPC3抗体”、“GPC3抗体”和“与GPC3结合的抗体”可互换使用。抗GPC3抗体优选能够以足够的亲和力结合GPC3,使得所述抗体可用作诊断剂和/或治疗剂。

[0111] 在一个实施方案中,本文使用的抗GPC3抗体具体指抗GPC3单克隆抗体,其(i)包含如表2中所示的SEQ ID NO:2的重链可变结构域和/或SEQ ID NO:4的轻链可变结构域;或(ii)包含表1中所示的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR。

[0112] “分离的抗体”是已经从其天然环境的组分中确认并分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染物组分是会干扰抗体的治疗用途的物质,并且可以包括酶、激素及其它蛋白质或非蛋白质溶质。

[0113] 基本的4链抗体单元是由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成的异四聚糖蛋白。在IgG的情况下,4链单元通常为约150,000道尔顿。每条L链通过一个共价二硫键与H链连接,而两条H链根据H链同种型通过一个或多个二硫键彼此连接。每条H链和L链还具有规则间隔的链内二硫桥。每条H链在N末端具有可变结构域(VH),接着是 α 和 γ 链中的每一者的三个恒定结构域(CH),以及 μ 和 ϵ 同种型的四个CH结构域。每条L链在N末端具有可变结构域(VL),接着是在其另一端的恒定结构域(CL)。VL与VH对准,且CL与重链的第一恒定结构域(CH1)对准。据信特定的氨基酸残基形成轻链与重链可变结构域之间的界面。VH和VL在一起配对形成单个抗原结合位点。关于不同类别的抗体的结构和性质,参见例如Basic and Clinical Immunology,第8版,Daniel P.Stites、Abba I.Terr和Tristram G.Parslow(编著),Appleton&Lange,Norwalk,CT,1994,第71页和第6章。

[0114] 来自任何脊椎动物物种的L链均可基于它们的恒定结构域的氨基酸序列而归为被称作 κ 和 λ 的两种明显不同的类型之一。免疫球蛋白基于它们的重链(CH)的恒定结构域的氨基酸序列归为不同的类别或同种型。免疫球蛋白有五个类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,重链

分别标定为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。 γ 和 α 类别根据CH序列和功能上的相对较小的差异而进一步分成亚类,例如,人表达以下亚类:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。抗体的“可变区”或“可变结构域”是指抗体的重链或轻链的氨基末端结构域。重链的可变结构域可以被称为“VH”或“VH”。轻链的可变结构域可以被称为“VL”或“1/4。”。这些结构域通常是抗体的最可变的的部分,并且含有抗原结合位点。

[0115] 术语“可变”是指可变结构域的某些区段在抗体间的序列上有很大不同的事实。V结构域介导抗原结合,并定义特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,可变性在可变结构域的110个氨基酸范围内分布并不均匀。反而,V区由被称为框架区(FR)的相对不变的片段组成,这些片段有15-30个氨基酸,由各自为9-12个氨基酸长的被称为“高变区”的极端可变性的较短区域分隔开。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR,主要地采用 β -折叠构型,由三个高变区连接,其形成连接 β -折叠结构并且在一些情况下形成 β -折叠结构的一部分的环。每条链中的高变区通过FR紧密结合在一起,并与来自另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))。

[0116] “完整”抗体是包含抗原结合位点以及CL和至少重链恒定结构域CH1、CH2和CH3的抗体。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。优选地,完整抗体具有一种或多种效应子功能。

[0117] 如本文所用的术语“合成抗体”意指采用重组DNA技术产生的抗体。该术语还应被解释为意指一种抗体,所述抗体通过合成编码所述抗体的DNA分子产生,且所述DNA分子表达抗体蛋白或指定所述抗体的氨基酸序列,其中所述DNA或氨基酸序列采用本领域中可用且熟知的合成DNA或氨基酸序列技术获得。

[0118] “嵌合抗体”具有来自一个物种(如人)的框架残基和来自另一物种(如特异性结合GPC3的鼠抗体)的CDR(其通常赋予抗原结合)。

[0119] “人”抗体(也称为“完全人”抗体)是包括人框架区和来自人免疫球蛋白的所有CDR的抗体。在一个实例中,框架和CDR来自相同起源的人重链和/或轻链氨基酸序列。然而,来自一种人抗体的框架可以被工程化以包括来自不同人抗体的CDR。“人源化”免疫球蛋白是包括人框架区和来自非人(例如小鼠、大鼠或合成)免疫球蛋白的一个或多个CDR的免疫球蛋白。提供CDR的非人免疫球蛋白被称为“供体”,且提供框架的人免疫球蛋白被称为“受体”。在一个实施方案中,所有CDR均来自人源化免疫球蛋白中的供体免疫球蛋白。恒定区并不需要存在,但如果存在的话,则它们必须与人免疫球蛋白恒定区基本上是同一的,即至少约85-90%是同一的,如约95%或更多同一的。因此,人源化免疫球蛋白的所有部分(可能除了CDR之外)与天然人免疫球蛋白序列的相应部分基本上是同一的。“人源化抗体”是包含人源化轻链和人源化重链免疫球蛋白的抗体。人源化抗体结合与提供CDR的供体抗体相同的抗原。人源化免疫球蛋白或抗体的受体框架可能具有有限数量的被取自供体框架的氨基酸的取代。人源化或其它单克隆抗体可具有另外的保守氨基酸取代,其对抗原结合或其它免疫球蛋白功能基本上没有影响。可借助于基因工程构建人源化免疫球蛋白(参见例如美国专利第5,585,089号)。

[0120] 在抗体、Ig、抗体结合片段与抗原或其它分子(例如,糖)结合背景下的术语“结合”

通常是指最少两个实体或分子结构之间的相互作用或缔合,如抗体-抗原相互作用。

[0121] “保守”氨基酸取代是基本上不影响或降低蛋白质如抗体对GPC3的亲力的那些取代。例如,特异性结合GPC3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GPC3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母体氨基酸,前提是抗体特异性结合GPC3。非保守取代是降低活性或与GPC3的结合的那些。

[0122] 提供功能上类似的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为保守取代的氨基酸的实例:

[0123] 1) 丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T);

[0124] 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0125] 3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0126] 4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0127] 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);和

[0128] 6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

[0129] 如本文所用的术语“抗原”或“Ag”被定义为引起免疫反应的分子。这种免疫反应可涉及抗体产生或有特定免疫能力的细胞的激活,或两者兼而有之。技术人员将理解的是,包括蛋白质或肽在内的任何大分子均可充当抗原。此外,抗原可来源于重组或基因组DNA。技术人员将理解的是,包含编码引发免疫反应的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA因此编码本文所使用的术语“抗原”。此外,本领域技术人员将理解的是,抗原不需要仅由基因的全长核苷酸序列编码。显而易见的是,本发明包括但不限于使用一个以上基因的部分核苷酸序列,并且这些核苷酸序列以各种组合排列以引发所需的免疫反应。此外,技术人员将理解的是,抗原根本不需要由“基因”编码。显而易见的是,抗原可以由生物样品产生、合成,或者来源于生物样品。这种生物样品可包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物流体。

[0130] 术语“表位”包括能够与免疫球蛋白或T细胞受体(例如,特异性抗原结合位点)特异性结合的任何蛋白质决定簇、脂质或碳水化合物决定簇。表位决定簇通常由诸如氨基酸、脂质或糖侧链的分子的活性表面组群组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。当平衡解离常数(Kd)在 10^{-6} - 10^{-12} 的范围内时,抗体被认为特异性结合抗原。单一抗原可具有一个以上的表位。因此,不同的抗体可与抗原上的不同区域结合,并且可具有不同的生物学效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位由来自线性多肽链的不同区段的空间并列的氨基酸产生。线性表位是由多肽链中相邻氨基酸残基产生的表位。

[0131] 如本文所用的术语“嵌合抗原受体(CAR)”可以例如指人工T细胞受体、T体、单链免疫受体、嵌合T细胞受体或嵌合免疫受体,并且涵盖将人工特异性移植到特定免疫效应细胞上的工程化受体。CAR可用于将单克隆抗体的特异性赋予到T细胞上,从而允许产生大量特异性T细胞,例如在特定实施方案中用于过继细胞疗法,CAR将细胞的特异性引导至例如肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,CAR包含细胞内激活结构域(允许T细胞在靶向部分与靶细胞如靶肿瘤细胞接合后激活)、跨膜结构域和细胞外结构域,所述细胞外结构域长度可变化,并且包含疾病或病症相关区,例如肿瘤抗原结合区。在特定方面,CAR包含来源于单克隆抗体的单链可变片段(scFv)的融合体,其与CD3- ζ 跨膜结构域和胞内结构域融合。其它CAR

设计的特异性可来源于受体的配体(例如,肽)或来源于模式识别受体,如Dectin。在某些情况下,可以修改抗原识别结构域的间距以减少激活诱导的细胞死亡。在某些情况下,CAR包含用于另外的共刺激信号传导的结构域,如CD3C、FcR、CD27、CD28、CD137、DAP10/12和/或OX40、4-1BB、1COS、TLR(例如,TLR2)等。在一些情况下,分子可以与CAR共表达,包括共刺激分子、用于成像(例如,用于正电子发射断层扫描)的报告基因、在添加前药后有条件地消融T细胞的基因产物、归巢受体、趋化因子、趋化因子受体、细胞因子、细胞因子受体。此外,本领域技术人员将理解的是,共刺激结构域不需要仅由基因的全长核苷酸序列编码。显而易见的是,本发明包括但不限于使用一个以上基因的部分核苷酸序列,并且这些核苷酸序列以各种组合排列以引发所需的免疫反应。

[0132] 术语“免疫缀合物”或“抗体药物缀合物”(ADC)是指效应分子与抗体或其功能片段的共价连接。效应分子可以是可检测标记或免疫毒素。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,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它直接或间接抑制细胞生长或杀伤细胞的毒性剂。例如,PE和DT是通常通过肝脏毒性导致死亡的高毒性化合物。然而PE和DT可以通过移除毒素的天然靶向组分(如PE的结构域Ia和DT的B链)并用不同的靶向部分如抗体将其替换而被修饰成用作免疫毒素的形式。

[0133] 如本文所用的术语“抗肿瘤作用”是指可通过减小肿瘤体积、减少肿瘤细胞数量、减少转移数量、延长预期寿命或改善与癌病状相关的各种生理症状而表现出来的生物作用。“抗肿瘤作用”也可以通过本发明的肽、多核苷酸、细胞和抗体首先预防肿瘤发生的能力表现出来。

[0134] 术语“治疗有效量”是指将引发由研究人员、兽医、医生或其它临床医师所寻求的组织、系统或受试者的生物学或医学反应的组合物的量。术语“治疗有效量”包括当施用时足以预防所治疗的病症或疾病(例如,实体肿瘤)的一种或多种体征或症状的发展或在一定程度上减轻所述病症或疾病的一种或多种体征或症状的组合物的量。治疗有效量将根据组合物、疾病及其严重程度以及要治疗的受试者的年龄、体重等而变化。

[0135] 术语“治疗”疾病如本文所用意指降低受试者所经历的疾病或病症的至少一种体征或症状的频率或严重程度。

[0136] 与一种或多种进一步的治疗剂“组合”施用包括同时(并行)和以任意顺序依次施用。

[0137] 如本文所用的术语“药学上可接受的”是指物质(包括但不限于盐、载剂或稀释剂)不消除化合物的生物活性或性质,并且相对无毒,即可以对个体施用所述物质而不会引起不良的生物作用或以不利的方式与含有该物质的组合物的任何组分相互作用。

[0138] “编码”是指多核苷酸(如基因、cDNA或inRNA)中的核苷酸的特定序列充当在生物过程中合成具有限定的核苷酸序列(即,rRNA、tRNA和mRNA)或限定的氨基酸序列的其它聚合物和大分子的模板的固有性质和由此产生的生物学性质。因此,如果对应于基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物系统中产生蛋白质,则所述基因编码所述蛋白质。其核苷酸序列与序列表中通常提供的mRNA序列是同一的编码链和用作基因或cDNA转录的模板的非编码链两者均可以被称为编码蛋白质或该基因或cDNA的其它产物。

[0139] “分离的”意指自天然状态改变或脱离。例如,天然存在于活体动物中的核酸或肽

不是“分离的”,但与其天然状态的共存物质部分或完全分开的相同核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以基本上纯化的形式存在(例如,本公开的单克隆抗体),或者可以存在于非天然环境中,举例如宿主细胞。

[0140] 除另有说明外,“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此为简并形式且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质和RNA的核苷酸序列可包括内含子。

[0141] 术语“患者”、“受试者”、“个体”等在本文中可互换使用,并且是指适合本文所述的方法的任何动物。在某些非限制性实施方案中,患者、受试者或个体是人。

[0142] 如本文针对抗体所用的术语“特异性结合”或“特异性识别”意指识别特定抗原但基本上不识别或结合样品中的其它分子的抗体。例如,与来自一个物种的抗原特异性结合的抗体也可以与来自一个或多个物种的该抗原结合。但是,这种跨物种反应性本身并不改变抗体的特异性分类。在另一实例中,与抗原特异性结合的抗体也可以与所述抗原的不同等位基因形式结合。然而,这种交叉反应性本身并不改变抗体的特异性分类。在一些情况下,术语“特异性结合”或“特异性地结合”可用于指代抗体、蛋白质或肽与第二种化学物质的相互作用,以表示所述相互作用取决于所述化学物质上的特定结构(例如,抗原决定簇或表位)的存在;例如,抗体识别特定蛋白质结构并与之结合而不是与蛋白质一般地结合。如果抗体对表位“A”是特异性的,则在含有标记的“A”和所述抗体的反应中,含有表位A(或游离未标记的A)的分子的存在将减少与所述抗体结合的标记的A的量。

[0143] 在一些实施方案中,特异性结合可通过至少约 1×10^{-8} M或更小的平衡解离常数来表征(例如,更小的值表示更紧密的结合)。确定两个分子是否特异性结合的方法是本领域中熟知的,并且包括例如平衡透析、表面等离子共振等。

[0144] 如本文所用的术语“ K_D ”(M)是指特定结合蛋白-配体相互作用的解离平衡常数。例如, K_D 可以指抗体、Ig或抗体结合片段与抗原之间的解离平衡常数。 K_D 与结合亲和力之间存在反比关系,因此 K_D 值越小,亲和力越高,即越强。因此,术语“较高的亲和力”或“较强的亲和力”涉及较高的形成相互作用的能力,因此 K_D 值较小,相反,术语“较低的亲和力”或“较弱的亲和力”涉及较低的形成相互作用的能力,因此 K_D 值较大。解离平衡常数 K_D 等于 $1/K$ 。

[0145] 如本文所用的术语“ k_a ”(M⁻¹x sec⁻¹)是指特定蛋白质-抗原(例如,抗体-抗原)相互作用的缔合速率常数。

[0146] 如本文所用的术语“ k_d ”(sec⁻¹)是指特定蛋白质-抗原相互作用(例如,抗体-抗原)的解离速率常数。

[0147] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中通常以不受调控的细胞生长为特征的生理病状。“肿瘤”包含一种或多种癌性细胞。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、胚胎瘤、肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。这类癌症更具体的实例包括鳞状细胞癌(例如,上皮鳞状细胞癌)、皮肤癌、黑色素瘤、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌(“NSCLC”)、肺腺癌和肺鳞状癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌或胃部癌(包括胃肠道癌)、胰腺癌(例如,胰腺导管腺癌)、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌(例如,高级别浆液性卵巢癌、卵巢透明细胞癌)、肝癌(例如,肝细胞癌(HCC))、膀胱癌(例如,尿路上皮膀胱癌)、睾丸(生殖细胞肿瘤)癌、肝癌、乳腺癌、脑癌(例如,星形细胞瘤)、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾脏癌或肾癌(例如,肾细胞癌、肾母细胞瘤或维尔姆斯瘤(Wilms'tumour))、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌以及头颈癌。癌症另外的实例包括但不限于视网膜

母细胞瘤、卵泡膜细胞瘤 (thecomas)、男性细胞瘤 (arrhenoblastomas)、肝癌、血液学恶性肿瘤 (包括非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、多发性骨髓瘤和急性血液学恶性肿瘤)、子宫内膜癌或子宫癌、子宫内膜异位症、纤维肉瘤、绒毛膜癌、唾液腺癌、外阴癌、甲状腺癌、食管癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、鼻咽癌、喉癌、卡波西氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma)、黑色素瘤、皮肤癌、许旺氏细胞瘤、少突神经胶质瘤、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、成骨肉瘤、平滑肌肉瘤和尿路癌。

[0148] 在优选的实施方案中,癌症是肝癌 (例如,HCC)。在另一个优选的实施方案中,癌症是胃癌或胃部癌 (例如,腺癌)。在另一个优选的实施方案中,癌症是肺癌 (例如,鳞状细胞癌)。在另一个优选的实施方案中,癌症是卵巢癌 (例如,卵巢透明细胞癌)。术语“转移性癌症”意指这样的癌症状态,其中起源组织的癌细胞通过血管或淋巴管从原始部位传播到身体别处的一个或多个部位,在起源组织之外的一个或多个器官中形成一种或多种继发性肿瘤。一个突出的实例是转移性乳腺癌。

[0149] 如本文所用,“GPC3相关癌症”是与GPC3基因或基因产物的过表达相关和/或与GPC3肿瘤表位的展示相关的癌症。合适的对照细胞可以是例如来自未患癌症的个体的细胞或来自患有癌症的受试者的非癌性细胞。

[0150] 本发明方法包括治疗患有癌症的受试者的方法。特别是与GPC3的表达相关的癌症。本发明方法还包括调节某些细胞行为、特别是癌细胞行为、特别是其细胞表面上的癌细胞GPC3的方法。

[0151] 术语“细胞增殖病症”和“增殖病症”是指与一定程度的异常细胞增殖相关的病症。在一个实施方案中,细胞增殖病症是癌症。

[0152] 如本文所用的“肿瘤”是指所有赘生性细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,以及所有癌前性和癌性细胞和组织。

[0153] 如本文所用的术语“预测的”和“预后的”也是可互换的。在一种意义上,预测或预后的方法允许实施本发明的预测/预后方法的人选择被认为 (通常但不一定在治疗之前) 更有可能对用抗癌剂 (优选本发明的抗GPC3抗体或CAR-T细胞或CAR-NK细胞) 进行的治疗有反应的患者。

[0154] 如本文所提到的“实体肿瘤”是包含至少约10个或至少约100个肿瘤细胞的肿瘤块的肿瘤。实体肿瘤可以是软组织肿瘤、原发性实体肿瘤或转移性病变。与本公开相关的实体肿瘤的实例包括但不限于例如各种器官系统的肉瘤、腺癌和癌,如影响肝、肺、胃肠道 (例如,结肠)、泌尿生殖道 (例如,肾、尿路上皮细胞) 等的那些。腺癌包括恶性肿瘤,如大多数结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、肝癌、非小细胞肺癌、小肠癌和食管癌。也可以利用本发明的方法和组合物来治疗或预防前述癌症的转移性病变。

[0155] 在一些实施方案中,实体肿瘤细胞表达或过表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (GPC3)。在一些实施方案中,实体肿瘤细胞表达或过表达GPC3的被本文和/或以下文献中所述的抗GPC3抗体、T细胞受体或嵌合抗原受体 (例如,204单克隆抗体) 特异性结合的表位:U.S.7,919,086;WO 2014/180306;WO 2018/019772;WO 2016/049459;WO 2003/000883;WO 2006/046751;WO 2007/047291;WO 2016/086813;WO 2016/047722;WO 2016/036973;WO 2020/072546;Cancer Res.2008;68:9832-9838;Proc Natl Acad Sci U S A.2013年3月19日;110 (12):E 1083-1,上述文献中的每一者的内容以引用的方式并且出于所有目的全文并入,特别是关于结合结构域、抗体、抗体片段、互补决定区、含有所述互补决定区的多肽、编

码所述互补决定区的核酸以及表位特异性和用于确定其中所述的表位特异性的测定法。在一些实施方案中,实体肿瘤细胞表达或过表达GPC3的被抗GPC3抗体GC33或1G12或204特异性结合的表位。在一些实施方案中,实体肿瘤表达或过表达含有GPC3片段的HLA:肽复合物。在一些实施方案中,HLA是I类HLA,如HLA-A2。

[0156] II. 本发明的组合物和方法

[0157] A. 抗GPC3抗体的概述

[0158] 一方面,本发明提供抗GPC3抗体,包括其片段、包含其的组合物以及将其用于各种目的(包括治疗癌症)的方法。一方面,本发明提供与在细胞(例如,肿瘤细胞)的表面上表达的GPC3的 β 链结合的抗体。任选地,抗体是单克隆抗体、抗体片段,包括Fab、Fab'、F(ab')₂和scFv片段、双抗体、单结构域抗体、嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体或竞争性地抑制抗GPC3抗体与其相应抗原表位结合的抗体。本发明的抗体可任选在CHO细胞或细菌细胞中或通过其它方式产生。出于检测目的,本发明的抗GPC3抗体可以被可检测地标记、连接于固体支持物等。

[0159] 一方面,提供了与GPC3结合的抗体,其中所述抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含:

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYAMHWVKQSH

[0160] GKSLEWIGGINPNNGVTTYNQRFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSL
TSEDSAVYYCARGLLWYAYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO: 2)。

[0161] 一方面,提供了与GPC3结合的抗体,其中所述抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含:

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGK

[0162] SPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYYC
LQYDEFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 4)。

[0163] 一方面,提供了与GPC3结合的抗体,其中所述抗体包含:包含SEQ ID NO:2的重链可变区和包含SEQ ID NO:4的轻链可变区。

[0164] 一方面,提供了与GPC3结合的抗体,其中所述抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含CDR1,所述CDR1包含如EYAMH (SEQ ID NO:6)所示的氨基酸序列。

[0165] 一方面,提供了与GPC3结合的抗体,其中所述抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含CDR2,所述CDR2包含如GINPNNGVTTYNQRFKG (SEQ ID NO:8)所示的氨基酸序列。

[0166] 一方面,提供了与GPC3结合的抗体,其中所述抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含CDR3,所述CDR3包含如GLLWYAY (SEQ ID NO:10)所示的氨基酸序列。

[0167] 一方面,提供了与GPC3结合的抗体,其中所述抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含CDR1,所述CDR1包含如KASQDINSYLS (SEQ ID NO:13)所示的氨基酸序列。

[0168] 一方面,提供了与GPC3结合的抗体,其中所述抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含CDR2,所述CDR2包含如RANRLVD (SEQ ID NO:15)所示的氨基酸序列。

[0169] 一方面,提供了与GPC3结合的抗体,其中所述抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含CDR3,所述CDR3包含如LQYDEFPLT (SEQ ID NO:17)所示的氨基酸序列。

[0170] 一方面,提供了与GPC3结合的抗体,其中所述抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含如SEQ ID NO:6所示的CDR1;如SEQ ID NO:8所示的CDR2;和如SEQ ID NO:10所示的CDR3。

[0171] 一方面,提供了与GPC3结合的抗体,其中所述抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:13所示的CDR1;如SEQ ID NO:15所示的CDR2;和如SEQ ID NO:17所示的CDR3。

[0172] 一方面,提供了与GPC3结合的抗体,其中所述抗体包含重链可变区,并且进一步包含轻链可变区,所述重链可变区包含如SEQ ID NO:6所示的CDR1;如SEQ ID NO:8所示的CDR2;和如SEQ ID NO:10所示的CDR3;所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:13所示的CDR1;如SEQ ID NO:15所示的CDR2;和如SEQ ID NO:17所示的CDR3。在一个实施方案中,包含这些序列(以如本文所述的组合)的本发明的抗体是人源化抗体或人抗体。

[0173] 一方面,本发明包括抗GPC3抗体,其包含(i)包含SEQ ID NO:2的重链可变结构域;和/或(ii)包含SEQ ID NO:4的轻链可变结构域。

[0174] 在一些实施方案中,这些抗体进一步包含人亚组III重链框架共有序列。在这些抗体的一个实施方案中,这些抗体进一步包含人κ轻链框架共有序列。

[0175] 一方面,抗GPC3抗体与包含:包含SEQ ID NO:2的重链可变区和包含SEQ ID NO 4的轻链可变区的抗GPC3抗体竞争与肿瘤展示的GPC3(例如,如在HCC细胞上展示)的结合。

[0176] 下文给出本公开所涵盖的抗GPC3抗体的更全面的描述。

[0177] B.检测的方法

[0178] 本发明的实施方案涉及在怀疑含有GPC3多肽的样品中确定GPC3多肽的存在的方法,其中所述方法包括使样品暴露于与GPC3多肽结合的抗体,并确定样品中抗体与GPC3多肽的结合,其中这种结合的存在指示样品中存在GPC3多肽。任选地,样品可以含有怀疑表达GPC3多肽的细胞(其可以是癌细胞)。所述方法中使用的抗体可任选被可检测地标记、连接于固体支持物等。

[0179] 抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗体与磷脂酰肌醇蛋白聚糖3的结合可优选通过如本文公开的免疫组织化学(IHC)方法来检测,但可以理解的是,所述结合不限于IHC方法,而是可以包括本领域技术人员通常已知的方法。例如,可以采用ELISA(酶联免疫吸附测定)、EIA(酶免疫测定)、RIA(放射免疫测定)、免疫荧光、蛋白质印迹等。通用教科书“Antibodies A Laboratory Manual.Ed Harlow,David Lane,Cold Spring Harbor Laboratory,1988”中描述了相关方法。

[0180] 示例性IHC测定

[0181] 如本文所讨论,需要能够准确评估肿瘤细胞表面上的GPC3水平的诊断方法。这至少是因为某些免疫疗法(例如,CAR-T疗法)依赖于肿瘤细胞上表达的细胞表面GPC3与相应的抗GPC3抗体或抗原结合片段之间的相互作用。在此背景下,本文公开了依赖于抗GPC3单克隆抗体的体外IHC方法,其给出了优于使用其它现有技术抗体的优点。具体地,本文公开的IHC方法是通过要求测定展示出许多有利标准而实现的。首先,所公开的IHC IVD测定被限制为表现出基本上不存在非特异性背景。在IHC IVD的上下文中的非特异性背景可能会使组织样品染色的分析和评分复杂化,因此可能导致对检测到的靶标(例如,在本公开的上下文中的膜结合GPC3)的流行率(或缺乏)的评估不准确。因此,如本文所公开和实施例中所

例示,所公开的IHC IVD测定表现出基本上不存在非特异性背景信号。其次,该测定限于在细胞表面表现出明显的线性分界。这有利地实现了膜结合GPC3染色的高置信度评分。第三,该测定限于表现出清晰且明确的核复染。第四,该测定限于依赖使该测定能满足上面提到的标准的抗体(如本文公开的204),同时还表现出高精度度、灵敏度和特异性,以及对GPC3的低纳摩尔亲和力,如本文所公开和例示。

[0182] a. 组织制备物

[0183] 本文使用的术语“组织制备物”是指得自个体、体液(例如,血液、血清、血浆、脊髓液)、组织培养物、组织切片等的生物制备物。优选地,组织制备物是来源于受试者的制备物,例如得自受试者的肿瘤的组织。活检是本领域中已知的方法,优选用作收集所述组织的方法。在实施例中,组织制备物是肝组织或肺组织或胃组织或卵巢组织,然而其它的组织来源也在本公开的范围,包括含有表达GPC-3的肿瘤细胞的任何组织。作为示例性说明,活检可用于通过将细长针从皮肤表面直接插入受试者的肝脏来收集肝脏组织。所需的穿刺部位可以在右下胸部的肋骨之间,但其它部位也在本公开的范围。所述程序包括确定穿刺部位的安全性,例如经由依靠超声波检查设备,接着对穿刺部位进行消毒,对从皮肤到肝脏表面的区域进行麻醉,最后经由在穿刺部位处的皮肤上开一个小切口之后利用所需的小孔进行穿刺。虽然没有具体描述,但类似的活检方法可用于从其它身体位置(例如,肺、胃肠道系统、卵巢等)收集组织,并且技术人员很容易理解这种方法。

[0184] 本公开的组织制备物在显微镜下用透射光进行观察,因此被切成薄片以便于显微镜中所使用的光充分穿透所述制备物。在切成薄片之前,将组织制备物固定。简言之,使用切割工具(例如,手术刀)将要固定的组织制备物切割成具有适合制备石蜡包埋切片的尺寸和形状。随后,将片段浸入固定剂(用于进行固定的试剂)中。使用的固定剂优选为福尔马林,更优选中性缓冲的福尔马林。根据组织制备物的特性或物理性质适当地选择中性缓冲的福尔马林的浓度。使用浓度可以在1%与50%、优选5%与25%、更优选10%与15%之间适当变化。使用真空泵将含有浸入其中的组织制备物的固定剂适当脱气。通过在涉及常压和室温的条件下将组织制备物在固定剂中搁置数小时来进行固定。固定所需的时间可以适当地选择在1小时至7天、优选2小时至3天、更优选3小时至24小时、甚至更优选4小时至16小时的范围内。将如此固定的制备物进一步适当地浸入磷酸盐缓冲液等中数小时(时间可适当地选择在2小时至48小时、优选3小时至24小时、更优选4小时至16小时的范围内)。

[0185] 接下来,可以由固定的组织制备物制备切片,优选采用冷冻切片法或石蜡切片法。冷冻切片法的优选实例包括涉及通过将组织添加到O.C.T.化合物(Miles, Inc.)中来冷冻并使用低温恒温器(冷冻切片制备装置)将冷冻组织切成薄片的方法。在石蜡切片法中,将固定的组织制备物浸入包埋剂中,其然后被固化,从而给切片赋予均匀且适当的硬度。优选可以使用石蜡作为包埋剂。使用乙醇或乙醇洗液和二甲苯洗液的组合对固定的组织制备物进行脱水。在一个实例中,通过将组织制备物依次浸入70%乙醇、80%乙醇和100%乙醇中来对组织制备物进行脱水。浸渍所需的时间和浸渍次数可以适当地选择在1分钟至1小时至数天和1次至3次的范围内。此外,浸渍可以在室温或在4°C下进行。对于在4°C下浸渍,较长的浸渍时间(例如,过夜)是优选的。在另一实例中,通过将组织制备物依次浸入95% EtOH、100% EtOH中进行脱水,再次地,每次浸渍程序所需的时间和浸渍次数可以适当地选择在1分钟至1小时至数天和1次至3次的范围内。随后,用二甲苯置换液相,然后将组织制备物包

埋在石蜡中。二甲苯置换液相所需的时间可以适当地选择在数分钟至数小时的范围内。在此程序中,可以在室温或在4°C下进行置换。对于在4°C下置换,较长的置换时间(例如,过夜)是优选的。石蜡包埋所需的时间及其次数可以适当地选择在1小时至数小时和1次至4次的范围内。在此程序中,可以在室温或在4°C下进行包埋。对于在4°C下包埋,较长的包埋时间(例如,过夜)是优选的。此外,优选使用自动进行石蜡包埋反应的石蜡包埋装置(例如,EG1160,Leica Microsystems)对组织制备物进行石蜡包埋。

[0186] 将如此石蜡包埋的组织制备物粘合到支架上以制备“块”,然后使用切片机将其切成选自1至20 μ m厚度的所需厚度的薄片。将如此切割的薄组织切片搁置在作为透明支撑物的载玻片上用于粘合。在这种情况下,优选还可以使用涂有0.01%聚-L-赖氨酸(Sigma-Aldrich Co.)以防止组织切片剥离并干燥的载玻片。将粘合的组织切片在空气中干燥选自数分钟与1小时之间的适当时间。

[0187] 在一些另外或替代的实例中,本公开采取的是使用组织微阵列(TMA)。在实例中,通过使用空心针从石蜡块(供体块,FFPE组织)中取出组织的核心(例如,管状部分),并将此核心转移到单个石蜡块(例如,接受块)上的预定位置来构建TMA。TMA可用于在半自动化平台上构建的一个载玻片内比较对照和测试样品(例如,阳性对照、阴性对照、来自各种组织区域或类型的测试样品)。作为实例,单个阵列可构建有多达360个0.6mm直径的核心或187个1mm直径的核心或60个2mm直径的核心等。这种实例旨在是说明性而非限制性的。

[0188] b. 抗原恢复

[0189] 在本发明的示例性方法中,由于福尔马林固定而反应性降低的抗原的反应性被恢复。在一个实例中,可以采用蛋白酶诱导的表位恢复方法(PIER方法)。简言之,所述方法包括在免疫染色之前用蛋白酶(例如,胰蛋白酶、胃蛋白酶等)消化切片。蛋白酶诱导的表位恢复方法中使用的蛋白酶在其类型或来源上没有特别限制,并且可以适当地选择使用通常可获得的蛋白酶。所使用的蛋白酶的优选实例包括在0.01N盐酸中浓度为0.05%的胃蛋白酶、在Tris缓冲液(pH 7.6)中进一步含有0.1% CaCl_2 的浓度为0.1%的胰蛋白酶以及在含有10mM EDTA和0.5% SDS的10mM Tris-HCl缓冲液(pH 7.8)中浓度为1至50 μ g/ml的蛋白酶K。此外,当使用蛋白酶K时,其反应溶液的pH适当地选自6.5与9.5之间,并且可以适当地使用SH试剂或胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶抑制剂。Histofine Her2试剂盒(MONO)(Nichirei Bioscience)中包括的蛋白酶也包括在优选蛋白酶的这类具体实例中。蛋白酶诱导的表位恢复通常在37°C下进行。然而,反应温度可以在25°C至50°C的范围内适当地变化。当在37°C下进行蛋白酶诱导的表位恢复时,反应时间适当地选自例如1分钟与5小时之间,例如为15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、3小时或4小时。PIER处理完成后,用洗涤缓冲液洗涤如此处理的组织制备物。优选使用PBS(磷酸盐缓冲盐水)作为洗涤缓冲液。此外,优选也可以使用Tris-HCl缓冲液。洗涤条件通常采用涉及在室温下进行三次5分钟洗涤的方法。然而,可以适当地改变洗涤时间和温度。

[0190] 在另一示例性方法中,经由热诱导的表位恢复方法(HIER方法)恢复由于福尔马林固定而反应性降低的抗原的反应性。具体地,据称采用微波、煮沸或高压灭菌器加热能够使表位与抗体结合,这是通过高温处理水解抗原的结果。当以780W的输出进行煮沸处理以使溶液的温度保持在大约98°C时,包括处理在内的恢复所需的时间适当地选自5分钟与60分钟之间,例如为10分钟。抗原恢复处理可以在10mM柠檬酸钠缓冲液以及市售的Diva

Decloaker溶液(Biocare Medical,LLC,Pacheo,CA)、BOND表位恢复溶液1(ER1)或BOND表位恢复溶液2(ER2)(Leica Biosystems Richmond,Inc,Richmond,IL)等中进行。优选使用任何缓冲液或水溶液,只要由抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗体识别的抗原中的表位由于恢复处理而获得对抗体的亲和力,使得膜结合的GPC3可以被本公开的204抗体检测到而没有明显的非特异性背景,并且在细胞表面上表现出染色的线性分界。恢复处理完成之后,将如此处理的组织制备物在室温下搁置30分钟,并逐渐添加DI水,直到载玻片被冷却。

[0191] c.用于IHC IVD测定的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗体

[0192] 用于本发明的IHC IVD方法的优选抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗体是204或其一部分。与例如GC33抗体(WO 2006/006693)和1G12抗体(WO 2003/100429)相比,如实施例中详细描述204抗体是优选的,因为发现204抗体意外且有利地表现出较低的非特异性背景染色、细胞表面的线性分界,并且能够经由苏木精进行清晰的核复染。因此,与组织样品上的1G12染色相比,发现使用204的IHC染色常常导致更高的膜相关H评分(参见例如图9)。这表明如本文公开的204包含比1G12抗体具有更高灵敏度的抗GPC3单克隆抗体,并且能够优先对表达GPC3的细胞的细胞膜进行染色,如上所述,这是本领域中公认的需要解决方案的问题(参见例如Phung等人,2012.mAbs Landes Bioscience,4:5;592-599)。如下文实施例1中所讨论,本发明中优选使用的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗体是通过用磷脂酰肌醇蛋白聚糖3作为免疫抗原对非人动物进行免疫而获得的。下文在实施例中以及在WO 2003/100429和WO 2006/006693中描述了制备这类抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗体的一般方法。

[0193] 在实施方案中,优选的抗体包含所述抗体的重链和所述抗体的轻链,所述重链包含本文如SEQ ID NO:6所示的互补决定区(CDR)1、本文如SEQ ID NO:8所示的CDR2、本文如SEQ ID NO:10所示的CDR3,且所述轻链包含本文如SEQ ID NO:13所示的CDR1、本文如SEQ ID NO:15所示的CDR2和本文如SEQ ID NO:17所示的CDR3。在一些实施方案中,优选的抗体包含本文如SEQ ID NO:2所示的重链可变区(HCVR)和本文如SEQ ID NO:4所示的轻链可变区(LCVR)。

[0194] d.组织制备物与抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗体的反应

[0195] 使任选如上文所讨论的那样经受抗原恢复处理的组织制备物与作为一抗的抗GPC3抗体(例如,204)反应(即,接触)。反应在适合抗GPC3抗体特异性识别抗原(例如,GPC3)中的表位的条件下进行,从而形成抗原-抗体复合物。

[0196] 反应通常在4℃下过夜进行或在37℃下进行1小时。然而,反应条件可以在适合于抗体识别抗原中的表位并形成抗原-抗体复合物的范围内适当地变化。例如,反应温度可以在4℃至50℃的范围内变化,且反应时间可以在1分钟与7天之间变化。对于低温下的反应,较长的反应时间是优选的。一抗反应完成后,用洗涤缓冲液洗涤组织制备物。优选使用PBS(磷酸盐缓冲盐水)作为洗涤缓冲液。此外,优选也可以使用Tris-HCl缓冲液。洗涤条件通常采用涉及在室温下进行三次5分钟洗涤的方法。然而,可以适当地改变洗涤时间和温度。

[0197] 随后,使经历一抗反应的组织制备物与识别一抗的二抗反应。通常使用事先用使二抗可视化的标记材料标记的二抗。标记材料的优选实例包括:荧光染料,如FITC(异硫氰酸荧光素)、Cy2(Amersham Biosciences)和Alexa488(Molecular Probes,Inc.);酶,如过氧化物酶和碱性磷酸酶;以及胶体金。

[0198] 与二抗的反应在适合于由抗GPC3抗体和识别抗GPC3抗体的二抗形成抗原-抗体复

合物的条件下进行。反应通常在室温或37℃下进行30分钟至1小时。然而,反应条件可以在适合于由抗GPC3抗体和二抗形成抗原-抗体复合物的范围内适当地变化。例如,反应温度可以在4℃至50℃的范围内变化,且反应时间可以在1分钟与7天之间变化。对于低温下的反应,较长的反应时间是优选的。二抗反应完成后,用洗涤缓冲液洗涤组织制备物。优选使用PBS(磷酸盐缓冲盐水)作为洗涤缓冲液。此外,优选也可以使用Tris-HCl缓冲液。洗涤条件通常采用涉及在室温下进行三次5分钟洗涤的方法。然而,可以适当地改变洗涤时间和温度。

[0199] 接下来,使经历了二抗反应的组织制备物与用于使标记材料可视化的物质反应。当使用过氧化物酶作为二抗的标记材料时,将组织制备物与反应溶液一起温育,所述反应溶液是在临温育前通过将等量的0.02%过氧化氢水溶液和用0.1M Tris-HCl缓冲液(pH 7.2)调节至浓度为0.1%的DAB(二氨基联苯胺)溶液混合得到的。除了DAB之外,还可以适当地选择显色底物,如DAB-Ni和AEC+(Agilent Technologies,Santa Clara,CA)、DAB sparkle(Biocare Medical,Pacheco,CA)。在温育过程期间,每隔一段时间在显微镜下观察显色程度。在确认适当显色的时间点,通过将组织制备物浸入PBS中来终止可视化反应。

[0200] 当使用碱性磷酸酶作为二抗的标记材料时,将组织制备物与BCIP(5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸盐)/NBT(硝基蓝四唑鎓)(Zymed Laboratories Inc.,San Francisco,CA)底物溶液(浓度为0.4mM的NBT和浓度为0.38mM的BCIP溶解在含有10mM MgCl₂和28mM NaCl的50mM碳酸钠缓冲液(pH 9.8)中)一起温育。此外,除了BCIP和NBT之外,还可以适当地使用永久红、固红或品红+(均为Agilent产品)。在温育之前,可以将组织制备物在室温下与含有浓度为1mM的左旋咪唑氯(内源性碱性磷酸酶的抑制剂;Nacalai Tesque,Inc.,Kyoto,Japan)、0.1M氯化钠和50mM氯化镁的0.1M Tris-HCl缓冲液(pH9.5)一起预温育1分钟至数小时。在温育过程期间,每隔一段时间在显微镜下观察组织制备物。在当观察到最终反应产物紫色甲臞沉积时的时间点,通过用水洗涤组织制备物或添加含有2%聚乙烯醇的TBS来终止反应。然后,用TBST(含有0.1% Tween 20的TBS)洗涤组织制备物。当使用胶体金作为二抗的标记时,通过银增强将金属银连接于金颗粒而使胶体金可视化。银增强方法是本领域技术人员通常已知的。

[0201] 在实施方案中,所需抗体-抗原复合物的检测也可以与核染色相结合。例如,可以使用苏木精进行核染色,苏木精对包括异染色质和核仁在内的核组分进行染色。作为代表性实例,CAT苏木精(Biocare Medical,Pacheco,CA)可用于核染色的组织学演示。常规使用的苏木精溶液用铝进行媒染,并且通常使用的铝矾(硫酸铝铵)作为媒染剂盐。因为铝盐本身不是氧化剂,所以有必要将苏木精溶液暴露于空气或化学品以影响苏木精向苏木因的转化。向矾苏木精溶液(例如,CAT苏木精)中添加酸被认为可提高对核染色的选择性,并抵消化学氧化剂的快速氧化作用。这后一种功能使溶液能够维持一定的苏木精与苏木因的平衡,以确保更好的染色。甘油往往会稳定系统防止过度氧化,并有助于防止快速蒸发。

[0202] 当使用任何荧光染料如FITC(异硫氰酸荧光素)、Cy2(Amersham Biosciences,Amersham,UK)和Alexa488(Molecular Probes,Inc.,Eugene,OR)作为二抗的标记材料时,可视化物质反应步骤是不必要的。通过使用荧光显微镜可以适当地检测通过用荧光材料在激发波长的光照射而发射的光。

[0203] 在示例性实施方案中,检测受试者中表达GPC3的细胞的存在体外免疫测定方法

包括如下步骤:a)提供来自所述受试者的作为福尔马林固定的石蜡包埋切片的组织制备物,所述福尔马林固定的石蜡包埋切片连接于透明支持物;(b)使组织制备物经受脱石蜡处理;(c)任选使组织制备物经受抗原恢复处理;(d)在足以使抗GPC3抗体与在步骤(c)中处理的组织制备物的细胞的细胞膜上存在的GPC3形成复合物的条件下使抗GPC3抗体与组织制备物接触;(e)通过利用免疫组织化学检测复合物的存在,其中当存在复合物时,受试者被诊断为患有表达GPC3的肿瘤;且其中抗GPC3抗体是特异性结合GPC3的 β 链的表位的单克隆抗体,且其中抗GPC3抗体的重链包含如SEQ ID NO:6所示的互补决定区(CDR)1、如SEQ ID NO:8所示的CDR2和如SEQ ID NO:10所示的CDR3,且所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:13所示的CDR1、如SEQ ID NO:15所示的CDR2和如SEQ ID NO:17所示的CDR3。在实施例1中,表达GPC3的肿瘤选自肝细胞癌、非小细胞肺癌、卵巢透明细胞癌和胃癌组成的组。在实施例1中,抗GPC3抗体的重链具有如SEQ ID NO:2所示的重链可变区(HCVR)。在实施例1中,抗GPC3抗体的轻链具有如SEQ ID NO:4所示的轻链可变区(LCVR)。在实施例1中,抗GPC3抗体是204,其中204抗体特异性识别GPC3的 β 链中的表位,该表位不同于被1G12特异性识别的表位,并且另外不同于被GC33特异性识别的表位。在实施例1中,抗原恢复处理基于热诱导的表位恢复(HIER)方法。在实施例1中,HIER方法包括将步骤(c)的组织制备物加热到105-115°C之间持续10-20分钟之间的时间段,优选其中将组织制备物加热到110°C持续15分钟。在一些实施例中,抗原恢复处理另外或替代地基于蛋白酶诱导的表位恢复(PIER)方法。在其中利用PIER方法的实施例中,PIER方法中使用的蛋白酶选自胃蛋白酶、胰蛋白酶和蛋白酶K组成的组。在实施例1中,通过利用免疫组织化学检测复合物的存在包括酶促反应。在实施例1中,步骤(e)进一步包括使步骤(d)的组织制备物与同辣根过氧化物酶(HRP)酶缀合的二抗接触,并经由在由HRP催化的反应中通过过氧化氢氧化3,3'-二氨基联苯胺使复合物可视化。在实施例1中,检测复合物的存在进一步包括对检测到的复合物的量进行评分。在一些实施例中,所述评分由病理学家完成。在一些实施例中,检测复合物的存在经由数字化完成,并且所述评分基于检测到的复合物的数字化而自动进行。在一些实施例中,所述评分进一步包括使用从0(阴性)至3+的整数标度确定经由免疫组织化学检测到的复合物的染色强度,记录在每个强度水平下阳性染色细胞的百分比,并基于在每个强度水平下阳性染色细胞的百分比计算膜相关H评分。

[0204] e. IHC IVD测定的自动化

[0205] 如本文公开的IHC IVD测定可以手动进行,或者也可以自动进行。可以实施本公开的IHC IVD测定的自动化系统的相关实例包括但不限于Intellipath^{FLX}® (Biocare Medical, Pacheco, CA)、Autostainer Link 48 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)、BOND-III全自动化IHC染色系统 (Leica Biosystems, Richmond, IL) 等。

[0206] f. 表达GPC3的组织分类和治疗效果的预测

[0207] 已知GPC3可以将其N末端部分释放到血清中,例如在癌性组织(例如,肝癌组织)中消化时(WO 2004/022739)。因此,与GPC3的N末端部分反应的抗体预期不能够与消化之后仍锚定在细胞表面上的GPC3多肽的C末端部分结合。如下文实施例1中所述,204抗体用于如本文公开的IHC IVD测定是有利的,这至少部分是由于其能够特异性识别在肿瘤组织中消化之后仍锚定在细胞膜中的GPC3的C末端部分。

[0208] 已知抗GPC3抗体在肝癌的治疗和预防方面是有用的(参见例如WO 2004/022739),

并且有证据表明表达特异性结合在实体肿瘤细胞表面上表达的GPC3内的表位的CAR构建体的细胞赋予抗肿瘤活性(参见例如WO 2020/072546)。因为依赖于抗体、CAR等的免疫疗法通过与细胞表面GPC3结合而发挥作用,所以可取的是治疗效果的任何预测主要考虑膜相关的GPC3表达。换句话说,当治疗性抗GPC3免疫疗法(例如,抗体、CAR等)对表达GPC3的肿瘤细胞(例如,实体肿瘤细胞)的治疗效果是根据所述表达GPC3的细胞中是否存在由抗GPC3靶向剂结合的表位来预测时,可取的是所述方法依赖于特异性结合仍锚定在细胞膜中的GPC3的C末端部分的抗GPC3靶向剂。如本文讨论和实施例中所例示,就与本公开的IHC IVD方法一起使用而言优选的204抗体特异性识别GPC3的C末端部分,并优先与在肿瘤细胞的细胞表面表达的GPC3结合。因此,204抗体及其在本文公开的IHC IVD方法中的用途是有利的,因为测定的结果适用于预测抗GPC3剂的治疗效果,包括但不限于抗GPC3抗体、表达抗GPC3CAR的细胞等。

[0209] 表达GPC3的细胞/组织的分类依赖于评分系统,评分系统基于染色强度和膜相关H评分中的一者或多者,但不一定限于所述参数。简言之,使用从0(阴性)至3(或“3+”)的半定量整数标度对本公开的IHC IVD测定中的染色强度进行评分。记录每个强度水平下的阳性染色细胞的百分比。评分优选基于GPC3向细胞膜的定位(顶端和外周),但在一些实例中也可以考虑任何细胞质染色。H评分计算为0与300之间的值,定义为:1x(以1+强度染色的细胞的百分比)+2x(以2+强度染色的细胞的百分比)+3x(以3+强度染色的细胞的百分比)=H评分。H评分越高,则指示治疗性抗GPC3疗法(例如,抗GPC3免疫疗法)对表达GPC3的肿瘤细胞的预测治疗效果越大。在一些实施例中,评分可由有资格的病理学家完成。另外或替代地,评分可以自动进行也在本公开的范围内。例如,本公开提供了对由GPC3和抗GPC3抗体(例如,204)形成的抗原-抗体复合物在显微镜下检测的程度和模式的差异进行数字化。在其中评分由病理学家完成和/或其中对评分进行数字化的实施例中,可以将测试样品以对照样品进行归一化,例如同种型对照样品或在细胞表面上缺乏GPC3表达的类似组织制备物。

[0210] g. 基于IHC IVD测定的诊断和/或治疗方法

[0211] 本公开的IHC IVD方法可用于诊断患有癌症的患者,所述癌症包含在其细胞膜上表达GPC3的相应细胞。本公开的IHC IVD方法另外可用于在患者尚未接受抗GPC3疗法的情况下确定是否用抗GPC3疗法(例如,基于抗体的免疫疗法、基于CAR的免疫疗法等)来治疗患者。所述IHC IVD方法也可用于在患者已经接受抗GPC3疗法一段时间的情况下确定是否继续用所述疗法治疗患者。在一些实施例中,可以根据如本文所公开的IHC IVD测定的结果来调整抗GPC3疗法的剂量和/或给药间隔(例如,可以增加或减少剂量,可以增加或减小给药间隔等)。因此,如本文公开的IHC IVD测定可用于诊断患者患有特定癌症,即在包含所述肿瘤的细胞的表面上表达GPC3的实体肿瘤,并且还可用作监测患者对癌症疗法的反应的手段,所述癌症疗法包括但不限于特异性靶向癌性细胞的表面上的GPC3的癌症疗法。

[0212] 因此,一方面,本发明提供了确定怀疑含有GPC3的样品中GPC3的存在的方法,所述方法包括将所述样品暴露于本发明的抗体,并确定所述抗体与所述样品中的GPC3的结合,其中所述抗体与所述样品中的GPC3的结合指示所述样品中存在所述蛋白质。在一个实施方案中,样品是生物样品(例如,组织制备物)。在进一步的实施方案中,生物样品包含肝癌细胞。在一个实施方案中,生物样品来自经历或疑似经历肝癌病症和/或肝癌细胞增殖病症的哺乳动物。在进一步的实施方案中,生物样品包含卵巢癌细胞。在一个实施方案中,生物样品

来自经历或疑似经历卵巢癌病症和/或卵巢癌细胞增殖病症的哺乳动物。在进一步的实施方案中,生物样品包含胃癌(腺癌)细胞。在一个实施方案中,生物样品来自经历或疑似经历胃或胃部病症和/或胃或胃部细胞增殖病症的哺乳动物。在进一步的实施方案中,生物样品包含肺癌细胞。在一个实施方案中,生物样品来自经历或疑似经历鳞状细胞癌病症和/或肺癌细胞增殖病症的哺乳动物。在一个实施方案中,生物样品包含皮肤细胞。在进一步的实施方案中,生物样品来自经历或疑似经历默克尔细胞癌或黑色素瘤的哺乳动物。

[0213] 一方面,提供了诊断与以下相关的细胞增殖病症的方法:(i)表达GPC3的细胞(举例如肝癌细胞、卵巢癌细胞、肺癌细胞或者胃癌或胃部癌细胞)的增多,或(ii)肿瘤内GPC3表达的增加。在一个实施方案中,所述方法包括使生物样品(例如,组织制备物)中的测试细胞与本公开的抗GPC3抗体接触;通过检测抗体与GPC3的结合来确定与样品中的测试细胞结合的抗体的水平;并比较与对照样品中的细胞结合的抗体的水平,其中将结合的抗体的水平以测试样品和对照样品中表达GPC3的细胞的数量进行归一化,且其中与对照样品相比,测试样品中结合的抗体水平较高指示存在与表达GPC3的细胞相关的细胞增殖病症。

[0214] 一方面,提供了预测抗GPC3免疫疗法对癌症的治疗效果的方法,所述癌症的特征在于所述癌症的细胞表达GPC3,所述方法包括经由如本文公开的IVD IHC测定检测受试者中所述细胞的存在。在实施方案中,当检测到抗GPC3抗体与在癌细胞膜上表达的GPC3的复合物时,预测抗GPC3免疫疗法对受试者的癌症具有治疗效果。在实施方案中,在受试者接受任何抗GPC3免疫疗法之前进行预测治疗效果的方法。在一些实施方案中,在受试者已在接受抗GPC3免疫疗法的过程中时进行预测治疗效果的方法。

[0215] h. 相关检测方案和测定方法

[0216] 虽然本发明的重点在于使用本文公开的抗GPC3抗体的IHC方法,但是可以理解的是,本发明的抗GPC3抗体可用于任何已知的测定方法,如ELISA、竞争性结合测定、直接和间接夹心测定和免疫沉淀测定(Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, 第147-158页, CRC Press, Inc.)等。

[0217] 检测标记可用于定位、可视化和定量结合或识别事件。本发明的标记抗体可检测细胞表面GPC3。可检测标记的抗体的另一种用途是基于珠粒的免疫捕获的方法,包括将珠粒与荧光标记的抗体缀合,并在配体结合时检测荧光信号。类似的结合检测方法利用表面等离子共振(SPR)效应来测量和检测抗体-抗原相互作用。检测标记如荧光染料和化学发光染料(Briggs等人(1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids", *J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1*:1051-1058)提供可检测的信号,并且通常适用于标记抗体,优选具有以下特性:(i)标记的抗体应产生具有低背景的非常高的信号,以便可以在无细胞和基于细胞的测定中灵敏地检测到少量的抗体;和(ii)标记的抗体应该是光稳定的,以便可以观察、监测和记录荧光信号而没有显著的光漂白。对于涉及标记的抗体与膜或细胞表面(特别是活细胞)的细胞表面结合的应用,标记优选(iii)具有良好的水溶性以实现有效的缀合物浓度和检测灵敏度,并且(iv)对活细胞无毒,从而不会破坏细胞的正常代谢过程或导致过早的细胞死亡。

[0218] 细胞荧光强度的直接定量和荧光标记事件(例如肽-染料缀合物的细胞表面结合)的计数可以在自动进行混合及读取用活细胞或珠粒进行的非放射性测定的系统(FMAT® 8100HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.)上进行(Miraglia,

“Homogeneous cell-and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology”, (1999) *J. of Biomolecular Screening* 4:193-204)。标记的抗体的用途还包括细胞表面受体结合测定、免疫捕获测定、荧光联免疫吸附测定 (FLISA)、胱天蛋白酶切割 (Zheng, “Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo”, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:618-23; US 6372907)、细胞凋亡 (Vermes, “A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V” (1995) *J. Immunol. Methods* 184:39-51) 和细胞毒性测定。荧光微体积测定技术可用于确认被靶向细胞表面的分子的上调或下调 (Swartzman, “A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology”, (1999) *Anal. Biochem.* 271:143-51)。

[0219] 本发明的标记的抗体可通过生物学和分子成像的各种方法和技术用作成像生物标志物和探针, 如: (i) MRI (磁共振成像); (ii) MicroCT (计算机断层扫描); (iii) SPECT (单光子发射计算机断层扫描); (iv) PET (正电子发射断层扫描) Chen 等人, (2004) *Bioconjugate Chem.* 15:41-49; (v) 生物发光; (vi) 荧光; 和 (vii) 超声波。免疫闪烁法是一种成像程序, 其中对动物或人患者施用用放射性物质标记的抗体, 并对体内抗体定位的部位拍摄照片 (US 6528624)。可以客观地测量和评估成像生物标志物作为正常生物学过程、致病过程或对治疗干预的药理学反应的指标。

[0220] 肽标记方法是熟知的。参见 Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Glazer 等人, (1975) *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T.S. Work 和 E. Work 编著) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R.L. 和 Noyes, C.M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, 第 I 卷和第 II 卷, CRC Press, New York; Pfleiderer, G. (1985) “Chemical Modification of Proteins”, *Modern Methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche 编著, Walter DeGruyter, Berlin 和 New York; 以及 Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez 等人, (2004) *Chem. Eur. J.* 10:1149-1155; Lewis 等人, (2001) *Bioconjugate Chem.* 12:320-324; Li 等人, (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:110-115; Mier 等人, (2005) *Bioconjugate Chem.* 16:240-237。

[0221] 本发明的标记的抗体也可以用作亲和纯化剂。在此过程中, 采用本领域中熟知的方法将标记的抗体固定在固相如 Sephadex 树脂或滤纸上。使固定的抗体与含有要纯化的抗原的样品接触, 此后用合适的溶剂洗涤支持物, 这将基本上移除样品中除了要纯化的抗原之外的所有物质, 而要纯化的抗原与固定的多肽变体结合。最后, 用另一种合适的溶剂如甘氨酸缓冲液 (pH 5.0) 洗涤支持物, 这将从多肽变体中释放抗原。

[0222] 一方面, 本发明的抗 GPC3 抗体与另一种 GPC3 抗体结合的 GPC3 上的相同表位结合。

在另一实施方案中,本发明的GPC3抗体与包含SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4的可变结构域的单克隆抗体的片段(例如,Fab片段)或包含:包含SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4的序列的单克隆抗体的可变结构域和来自IgG1的恒定结构域的嵌合抗体结合的GPC3上的相同表位结合。

[0223] C.本公开涵盖的抗GPC3抗体的综合描述

[0224] 在一个实施方案中,本发明提供了可在本文中用作诊断剂和/或治疗剂的抗GPC3抗体。示例性抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。

[0225] 1.多克隆抗体

[0226] 多克隆抗体优选通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂在动物中产生。使相关抗原(特别是当使用合成肽时)与在要免疫的物种中具有免疫原性的蛋白质缀合可能是有用的。例如,使用双功能或衍生化剂,例如马来酰亚胺苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、SOC12或RTST=C=NR,其中R和R1是不同的烷基,可以使抗原与钥孔海螺血蓝蛋白(KLH)、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂缀合。

[0227] 通过将例如100 μ g或5 μ g蛋白质或缀合物(分别对于兔或小鼠)与3体积的弗氏完全佐剂组合,并在多个部位皮内注射溶液,使动物针对抗原、免疫原性缀合物或衍生物免疫。一个月后,通过在多个部位皮下注射,用1/2至1/10原始量的在弗氏完全佐剂中的肽或缀合物对动物进行加强免疫。七至14天后,给动物放血,并测定血清的抗体滴度。对动物进行加强免疫,直至滴度达到稳定水平。缀合物也可以在重组细胞培养物中作为蛋白质融合物制备。另外,合适地使用聚集剂如矾以增强免疫反应。

[0228] 2.单克隆抗体

[0229] 可以通过采用本领域中已知的任何技术来制备针对所关注的抗原的单克隆抗体(mAb)。这些包括但不限于最初由Kohler和Milstein(1975,Nature 256,495-497)描述的杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术(Kozbor等人,1983,Immunology Today 4:72)和EBV-杂交瘤技术(Cole等人,1985,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.,第77-96页)。选择的淋巴细胞抗体方法(SLAM)(Babcook,J.S.等人,A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single,isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities.Proc Natl Acad Sci U S A,1996.93(15):第7843-8页)和(McLean GR,Olsen OA,Watt IN,Rathanaswami P,Leslie KB,Babcook JS,Schrader JW.Recognition of human cytomegalovirus by human primary immunoglobulins identifies an innate foundation to an adaptive immune response.J Immunol.2005年4月15日;174(8):4768-78。这类抗体可属于任何免疫球蛋白类别,包括IgG、IgM、IgE、IgA和IgD及其任何亚类。可以在体外或体内培养产生用于本发明的mAb的杂交瘤。

[0230] 单克隆抗体可采用首先由Kohler等人,Nature,256:495(1975)描述的杂交瘤方法来制备,或者可以通过重组DNA方法(美国专利第4,816,567号)来制备。

[0231] 在杂交瘤方法中,如上所述对小鼠或其它适当的宿主动物如仓鼠进行免疫,以得到产生或能够产生将与用于免疫的蛋白质特异性结合的抗体的淋巴细胞。或者,可以在体外对淋巴细胞进行免疫。免疫后,分离淋巴细胞,然后使用合适的融合剂如聚乙二醇与骨髓瘤细胞系融合,以形成杂交瘤细胞(Coding,Monoclonal Antibodies:Principles and

Practice,第59-103页(Academic Press,1986))。

[0232] 将如此制备的杂交瘤细胞接种在合适的培养基中并生长,该培养基优选含有一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞(也称为融合配偶体)生长或存活物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏酶,即次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),则杂交瘤的选择性培养基通常将包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT培养基),这些物质阻止HGPRT缺乏的细胞的生长。

[0233] 优选的融合配偶体骨髓瘤细胞是有效地融合、支持选择的产生抗体的细胞稳定高水平地产生抗体并且针对未融合的亲本细胞选择的选择性培养基敏感的那些。优选的骨髓瘤细胞系有鼠骨髓瘤细胞系,如来源于MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤细胞系,可得自Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA, 和SP-2及衍生细胞系,例如X63-Ag8-653细胞,可得自American Type Culture Collection, Manassas, Va., USA。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也被描述用于产生人单克隆抗体(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); 和Brodeur等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第51-63页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0234] 测定生长杂交瘤细胞的培养基中针对抗原的单克隆抗体的产生。优选地,通过免疫沉淀或通过体外结合测定如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)来确定由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。

[0235] 可例如通过Munson等人, Anal. Biochem., 107:220 (1980) 中描述的Scatchard分析来确定单克隆抗体的结合亲和力。

[0236] 一旦确认出产生所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞,就可以通过有限稀释程序对克隆进行亚克隆,并通过标准方法生长(Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第59-103页(Academic Press, 1986))。用于此目的合适培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。此外,杂交瘤细胞可以作为动物中的腹水肿瘤体内生长,例如通过将细胞i.p.注射到小鼠体内。

[0237] 通过常规的抗体纯化程序例如亲和色谱法(例如,使用蛋白A或蛋白G-琼脂糖凝胶)或离子交换色谱法、羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析等将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水或血清合适地分离。

[0238] 利用常规的程序很容易对编码单克隆抗体的DNA进行分离和测序(例如,通过使用能够与编码鼠抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞用作这种DNA的优选来源。一旦分离,可以将DNA放入表达载体中,然后将其转染到宿主细胞中,如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不另外产生抗体蛋白的骨髓瘤细胞,以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。关于编码抗体的DNA在细菌中的重组表达的综述文章包括Skerra等人, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) 和Plickthun, Immunol. Revs. 130:151-188 (1992)。

[0239] 在进一步的实施方案中,可以从利用McCafferty等人, Nature, 348:552-554 (1990) 中描述的技术产生的抗体噬菌体文库中分离单克隆抗体或抗体片段。Clackson等人, Nature, 352:624-628 (1991) 和Marks等人, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) 描述了使用噬菌体文库分别分离鼠和人抗体。随后的出版物描述了通过链改组产生高亲和力(nM范围)的人抗体(Marks等人, Bio/Technology, 10:779-783 (1992))以及组合感染和作为构建

非常大的噬菌体文库的策略的体内重组 (Waterhouse等人, *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993))。因此,这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代方案。

[0240] 编码抗体的DNA可以被修饰以产生嵌合或融合抗体多肽,例如通过取代人重链和轻链恒定结构域(CH和CO序列取代同源鼠序列(美国专利第4,816,567号;和Morrison等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)),或通过将免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽(异源多肽)的全部或部分编码序列融合。非免疫球蛋白多肽序列可取代抗体的恒定结构域,或者它们取代抗体的一个抗原结合位点的可变结构域,以产生包含对抗原具有特异性的一个抗原结合位点和对不同抗原具有特异性的另一个抗原结合位点的嵌合二价抗体。

[0241] 3. 嵌合抗体、人源化抗体和人抗体

[0242] 在一些实施方案中,抗GPC3抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于例如美国专利第4,816,567号;和Morrison等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984) 中。在一个实施例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,来源于小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物如猴子的可变区)和人恒定区。在进一步的实施例中,嵌合抗体是“类别转换”抗体,其中类别或亚类已经从亲本抗体的类别或亚类发生改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0243] 在一些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,非人抗体被人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。一般地,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR(例如CDR,或其部分)来源于非人抗体,且FR(或其部分)来源于人抗体序列。人源化抗体任选将还包含人恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,CDR残基所来源的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0244] 本发明的抗GPC3抗体可进一步包含人源化抗体或人抗体。非人(例如,鼠或兔)抗体的人源化形式是嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其它抗原结合子序列),其含有来源于非人免疫球蛋白的最小序列。人源化抗体包括人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被来自具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)如小鼠、大鼠或兔的CDR的残基替换。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架残基被相应的非人残基替换。人源化抗体还可以包含既不见于受体抗体也不见于导入的CDR或框架序列中的残基。一般来说,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个、通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有的CDR区对应于非人免疫球蛋白的CDR区,并且所有或基本上所有的FR区是人免疫球蛋白共有序列的FR区。人源化抗体最佳地还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分 [Jones等人, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann等人, *Nature*, 332:323-329 (1988); 和Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)]。

[0245] 将非人抗体人源化的方法是本领域中熟知的。一般地,人源化抗体具有从非人的来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“导入”残基,其通常取自“导入”可变结构域。人源化基本上可以按照Winter及同事的方法进行 [Jones等人, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann等人, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等人, *Science*, 239:1534-1536 (1988)],即通过用啮齿动物CDR或CDR序列取代人抗体的相

应序列。因此,这类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利第4,816,567号),其中基本上少于完整的人可变结构域已经被来自非人物种的相应序列取代。在实践中,人源化抗体通常是人抗体,其中一些CDR残基和可能一些FR残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基取代。

[0246] 当抗体旨在用于人类治疗用途时,要用于制备人源化抗体的人可变结构域(轻链和重链两者)的选择对于降低抗原性和HAMA反应(人抗小鼠抗体)非常重要。降低或消除HAMA反应是临床开发合适治疗剂的一个重要方面。参见例如Khazzaeli等人,J.Natl.Cancer Inst.(1988),80:937;Jaffers等人,Transplantation(1986),41:572;Shawler等人,J.Immunol.(1985),135:1530;Sears等人,J.Biol.Response Mod.(1984),3:138;Miller等人,Blood(1983),62:988;Hakimi等人,J.Immunol.(1991),147:1352;Reichmann等人,Nature(1988),332:323;Junghans等人,Cancer Res.(1990),50:1495。如本文所述,本发明提供了人源化的抗体,使得HAMA反应被降低或消除。采用本领域中已知的常规方法可进一步获得这些抗体的变体,其中的一些方法在下文进一步描述。根据所谓的“最佳拟合”方法,针对已知的人可变结构域序列的整个文库筛选啮齿动物抗体的可变结构域的序列。确认了与啮齿动物最接近的人V结构域序列,并且其内的人框架区(FR)被接受用于人源化抗体(Sims等人,J.Immunol.151:2296(1993);Chothia等人,J.Mol.Biol.,196:901(1987))。另一种方法使用来源于特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列的特定框架区。相同的框架可用于数种不同的人源化抗体(Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);Presta等人,J.Immunol.151:2623(1993))。

[0247] 例如,来自如本文所述的抗体的氨基酸序列可用作框架和/或高变序列的多样化的起始(亲本)序列。起始高变序列所连接的选定框架序列在本文中被称作受体人框架。虽然受体人框架可来自或来源于人免疫球蛋白(其VL和/或VH区),但优选受体人框架来自或来源于人共有框架序列,因为这类框架已被证明在人患者中具有最小的免疫原性或者没有免疫原性。

[0248] 在受体来源于人免疫球蛋白的情况下,可任选地选择人框架序列,其是通过将供体框架序列与人框架序列集合中的各种人框架序列比对而基于其与供体框架序列的同源性而选择的,并选择最同源的框架序列作为受体。

[0249] 在一个实施方案中,本文的人共有框架来自或来源于VH亚组III和/或VL κ 亚组I共有框架序列。

[0250] 虽然受体在序列上可以与所选的人框架序列相同,无论其来自人免疫球蛋白还是人共有框架,但本发明预期受体序列相对于人免疫球蛋白序列或人共有框架序列可包含预先存在的氨基酸取代。这些预先存在的取代优选是最少的;通常相对于人免疫球蛋白序列或共有框架序列仅有四个、三个、两个或一个氨基酸差异。

[0251] 将非人抗体的高变区残基并入到VL和/或VH受体人框架中。例如,可以并入对应于Kabat CDR残基、Chothia高变环残基、Abm残基和/或接触残基的残基。任选地,并入如下延伸的高变区残基:24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)、26-35B(H1)、50-65、47-65或49-65(H2)和93-102、94-102或95-102(H3)。

[0252] 虽然本文讨论了“并入”高变区残基,但是将要了解的是,这可以以各种方式来实现,例如,可以通过使编码小鼠可变结构域序列的核酸突变来产生编码所需氨基酸序列的

核酸,使得其框架残基改变为受体人框架残基,或者通过使编码人可变结构域序列的核酸突变,使得高变结构域残基改变为非人残基,或者通过合成编码所需序列的核酸等。

[0253] 如本文所述,高变区移植变体可通过编码人受体序列的核酸的Kunkel诱变产生,对于每个高变区使用单独的寡核苷酸。Kunkel等人,Methods Enzymol.154:367-382 (1987)。采用常规的技术可以在框架和/或高变区内引入适当的改变,以纠正和重建适当的高变区-抗原相互作用。

[0254] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了人源化抗体,其与包含SEQ ID NO:2和4的序列的抗体相比在宿主受试者中以基本上降低的水平引发和/或预期引发人抗小鼠抗体反应(HAMA)。在另一个实施例中,本发明提供了引发和/或预期引发最小人抗小鼠抗体反应(HAMA)或不引发人抗小鼠抗体反应(HAMA)的人源化抗体。在一个实施例中,本发明的抗体引发处于或低于临床可接受水平的抗小鼠抗体反应。

[0255] 本发明的人源化抗体可以在其重链和/或轻链可变结构域中包含一个或多个个人和/或人共有非高变区(例如,框架)序列。在一些实施方案中,人和/或人共有非高变区序列内存在一个或多个另外的修饰。在一个实施方案中,本发明的抗体的重链可变结构域包含人共有框架序列,其在一个实施方案中是亚组III共有框架序列。在一个实施方案中,本发明的抗体包含在至少一个氨基酸位置修饰的变体亚组III共有框架序列。

[0256] 如本领域中已知,并且如本文更详细地描述,描绘抗体的高变区的氨基酸位置/边界可以变化,这取决于上下文和本领域中已知的各种定义(如下所述)。可变结构域内的一些位置可被视为杂交高变位置,因为这些位置在一组标准下可以被认为是在高变区内,而在不同的一组标准下被认为是在高变区以外。这些位置中的一者或多者也可见于延伸的高变区中(如下文进一步定义)。本发明提供了在这些杂交高变位置包含修饰的抗体。在一个实施方案中,这些高变位置包括重链可变结构域中的一个或多个位置26-30、33-35B、47-49、57-65、93、94和101-102。在一个实施方案中,这些杂交高变位置包括轻链可变结构域中的位置24-29、35-36、46-49、56和97中的一者或多者。在一个实施方案中,本发明的抗体包含在一个或多个杂交高变位置修饰的人变体人亚组共有框架序列。

[0257] 本发明的抗体可包含任意合适的人或人共有轻链框架序列,只要所述抗体表现出所需的生物学特性(例如,所需的结合亲和力)。在一个实施方案中,本发明的抗体包含人 κ 轻链的框架序列的至少一部分(或全部)。在一个实施方案中,本发明的抗体包含人 κ 亚组I框架共有序列的至少一部分(或全部)。

[0258] 噬菌体(粒)展示(本文中在一些情况下也称为噬菌体展示)可用作在通过序列随机化产生的文库中产生和筛选许多不同潜在变体抗体的方便且快速的方法。然而,制备和筛选改变的抗体的方法是技术人员可以获得的。

[0259] 噬菌体(粒)展示技术为产生和选择与配体如抗原结合的新型蛋白质提供了有力工具。采用噬菌体(粒)的展示技术允许产生可以快速分选那些以高亲和力与靶分子结合的序列的蛋白质变体的大型文库。通常将编码变体多肽的核酸与编码病毒外壳蛋白如基因III蛋白或基因VIII蛋白的核酸序列融合。已经开发了单价噬菌粒展示系统,其中编码蛋白质或多肽的核酸序列与编码基因III蛋白的一部分的核酸序列融合。(Bass,S.,Proteins,8:309(1990);Lowman和Wells,Methods:A Companion to Methods in Enzymology,3:205(1991))。在单价噬菌粒展示系统中,基因融合体以低水平表达,并且也表达野生型基因III

蛋白,使得颗粒的感染性得以保留。产生肽文库和筛选这些文库的方法已经在许多专利中公开(例如美国专利第5,723,286号、美国专利第5,432,018号、美国专利第5,580,717号、美国专利第5,427,908号和美国专利第5,498,530号)。

[0260] 已经以多种方式制备了抗体或抗原结合多肽的文库,包括通过插入随机DNA序列改变单个基因或通过克隆相关基因家族。采用噬菌体(粒)展示来展示抗体或抗原结合片段的方法已经在美国专利第5,750,373号、第5,733,743号、第5,837,242号、第5,969,108号、第6,172,197号、第5,580,717号和第5,658,727号中描述。然后筛选表达具有所需特性的抗体或抗原结合蛋白的文库。

[0261] 将选择的氨基酸取代到模板核酸中的方法已经在本领域中得到很好的确立,本文描述了其中的一些。例如,采用Kunkel方法可以取代高变区残基。参见例如Kunkel等人,Methods Enzymol.154:367-382(1987)。

[0262] 寡核苷酸的序列包括为要改变的高变区残基设计的密码子组中的一者或多者。密码子组是一组用于编码所需变体氨基酸的一组不同的核苷酸三联体序列。密码子组可以用符号表示,以指代特定核苷酸或核苷酸的等摩尔混合物,如下文根据IUB代码所示。

[0263] IUB代码

[0264] G鸟嘌呤

[0265] A腺嘌呤

[0266] T胸腺嘧啶

[0267] C胞嘧啶

[0268] R(A或G)

[0269] Y(C或T)

[0270] M(A或C)

[0271] K(G或T)

[0272] S(C或G)

[0273] W(A或T)

[0274] H(A或C或T)

[0275] B(C或G或T)

[0276] V(A或C或G)

[0277] D(A或G或T)H

[0278] N(A或C或G或T)

[0279] 例如,在密码子组DVK中,D可以是核苷酸A或G或T;V可以是A或G或C;且K可以是G或T。此密码子组可呈现18个不同的密码子,并且可以编码氨基酸Ala、Trp、Tyr、Lys、Thr、Asn、Lys、Ser、Arg、Asp、Glu、Gly和Cys。

[0280] 可以采用标准方法合成寡核苷酸或引物组。可以例如通过固相合成来合成一组寡核苷酸,其含有代表由密码子组提供的核苷酸三联体的所有可能组合并且将编码所需的氨基酸组的序列。在某些位置具有选定的核苷酸“简并性”的寡核苷酸的合成是该领域中熟知的。具有某些密码子组的这类核苷酸组可以使用商业核酸合成仪(可得自例如Applied Biosystems,Foster City,Calif)合成,或者可以从商业途径获得(例如,得自Life Technologies,Rockville,Md.)。因此,合成的具有特定密码子组的一组寡核苷酸通常将包

括多个具有不同序列的寡核苷酸,其差异是由整个序列内的密码子组确立的。根据本发明使用的寡核苷酸具有允许与可变结构域核酸模板杂交的序列,并且还可以包括用于克隆目的的限制酶位点。

[0281] 在一种方法中,编码变体氨基酸的核酸序列可通过寡核苷酸介导的诱变产生。这种技术是本领域中熟知的,如Zoller等人,Nucleic Acids Res.10:6487-6504(1987)所描述。简言之,通过将编码所需密码子组的寡核苷酸组与DNA模板杂交来产生编码变体氨基酸的核酸序列,其中模板是含有可变区核酸模板序列的质粒的单链形式。杂交后,DNA聚合酶用于合成模板的完整的第二条互补链,其将因此并入到寡核苷酸引物中,并且将含有如寡核苷酸组所提供的密码子组。

[0282] 一般地,使用长度为至少25个核苷酸的寡核苷酸。最佳寡核苷酸将具有12至15个与编码突变的核苷酸的任一侧的模板完全互补的核苷酸。这确保寡核苷酸将与单链DNA模板分子正确杂交。采用本领域中已知的技术很容易合成寡核苷酸,如Crea等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA,75:5765(1978)描述的技术。

[0283] 由来源于噬菌体M13载体的那些载体(可商购的M13mp18和M13mp19载体是合适的)或含有如Viera等人,Meth.Enzymol.,153:3(1987)所述的单链噬菌体复制起点的那些载体产生DNA模板。因此,可以将要突变的DNA插入到这些载体之一中,以便产生单链模板。

[0284] 单链模板的产生描述于Sambrook等人的上文第4.21-4.41节中。为了改变天然DNA序列,寡核苷酸在合适的杂交条件下与单链模板杂交。然后添加DNA聚合酶,通常是T7 DNA聚合酶或DNA聚合酶I的Klenow片段,以使用寡核苷酸作为合成的引物来合成模板的互补链。如此形成异源双链体分子,使得DNA的一条链编码基因1的突变形式,且另一条链(原始模板)编码基因1的天然未改变的序列。然后将此异源双链体分子转化到合适的宿主细胞中,通常是原核细胞,如大肠杆菌JM101。细胞生长后,将它们铺在琼脂糖板上,并使用32-磷酸盐放射性标记的寡核苷酸引物进行筛选,以确认含有突变DNA的细菌菌落。

[0285] 可以对上文刚刚描述的方法进行修改,使得产生同源双链体分子,其中质粒的两条链都含有突变。修改如下:将单链寡核苷酸退火到如上所述的单链模板上。将三种脱氧核糖核苷酸即脱氧核糖腺苷(dATP)、脱氧核糖鸟苷(dGTP)和脱氧核糖胸苷(dTT)的混合物与被称为dCTP-(aS)的修饰的硫代脱氧核糖胞嘧啶(可得自Amersham)组合。将此混合物添加到模板-寡核苷酸复合物中。在将DNA聚合酶添加到此混合物中后,产生除了突变的碱基外与模板相同的DNA的链。此外,这条新的DNA链将含有dCTP-(aS)而不是dCTP,这用来保护其免于限制性内切酶消化。

[0286] 在用适当的限制酶对双链异源双链体的模板链进行切口后,可以用ExoIII核酸酶或另一种适当的核酸酶消化模板链,使其经过含有要诱变的位点的区域。然后停止反应,留下仅部分单链的分子。然后在所有四种三磷酸脱氧核糖核苷酸、ATP和DNA连接酶的存在下使用DNA聚合酶形成完整的双链DNA同源双链体。然后将此同源双链体分子转化到合适的宿主细胞中。

[0287] 如先前所指出,寡核苷酸组的序列具有足够的长度以与模板核酸杂交,并且还可以但不一定含有限制性位点。DNA模板可由来源于噬菌体M13载体的那些载体或含有如Viera等人,Meth.Enzymol.,153:3(1987)所述的单链噬菌体复制起点的载体产生。因此,必

须将要突变的DNA插入到这些载体之一中,以便产生单链模板。单链模板的产生描述于 Sambrook等人的上文第4.21-4.41节中。

[0288] 根据另一种方法,通过选择修复的高变区,可以在抗体的人源化期间恢复抗原结合(参见2005年2月18日提交的11/061,841系列号申请)。所述方法包括将非人高变区并入到受体框架上,并在一个或多个高变区中进一步引入一个或多个氨基酸取代,而不修饰受体框架序列。或者,一个或多个氨基酸取代的引入可伴随受体框架序列中的修饰。

[0289] 根据另一种方法,可以通过提供上游和下游寡核苷酸组来产生文库,每组具有多个具有不同序列的寡核苷酸,不同序列由寡核苷酸的序列内提供的密码子组确立。上游和下游寡核苷酸组以及可变结构域模板核酸序列可用于聚合酶链反应以产生PCR产物的“文库”。PCR产物可以被称为“核酸盒”,因为它们可以采用确立的分子生物学技术与其它相关或不相关的核酸序列(例如,病毒外壳蛋白和二聚化结构域)融合。

[0290] PCR引物的序列包括为高变区中溶剂可及和高度多样性的位置设计的密码子组中的一者或多者。如上所述,密码子组是一组用于编码所需变体氨基酸的一组不同的核苷酸三联体序列。

[0291] 可采用标准重组技术分离通过适当的筛选/选择步骤选择的满足所需标准的抗体选择剂并进行克隆。

[0292] 进一步重要的是,将抗体人源化,保留对抗原的高结合亲和力及其它有利的生物学特性。为了实现这一目标,根据优选的方法,通过利用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产品的过程来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是普遍可以获得的,并且是本领域技术人员熟悉的。可以获得说明和展示选定的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序。对这些展示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列发挥功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方式,可以从受体和导入序列中选择FR残基并进行组合,从而获得所需的抗体特性,如实现对靶抗原增加的亲和力。一般来说,高变区残基直接且最实质性地参与影响抗原结合。

[0293] 考虑了各种形式的人源化抗GPC3抗体。例如,人源化抗体可以是抗体片段,如Fab。或者,人源化抗体可以是完整抗体,如完整IgG1抗体。

[0294] 作为人源化的替代方案,可以产生人抗体。例如,现在有可能产生转基因动物(例如,小鼠),它们在免疫后能够在没有内源性免疫球蛋白产生的情况下产生完整的人抗体库。例如,已经描述了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合缺失导致内源性抗体产生的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移到这种种系突变小鼠中将导致在抗原攻击时产生人抗体。参见例如Jakobovits等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551(1993);Jakobovits等人,Nature,362:255-258(1993);Bruggemann等人,Year in Immuno.7:33(1993);美国专利第5,545,806号、第5,569,825号、第5,591,669号(均为GenPharm的);第5,545,807号;和WO 97/17852。

[0295] 或者,噬菌体展示技术(McCafferty等人,Nature 348:552-553[1990])可用于由来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因库体外产生人抗体和抗体片段。根据这项技术,抗体V结构域基因被框内克隆到丝状噬菌体(如M13或fd)的主要或次要外壳蛋白基因中,并在噬菌体颗粒的表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒含有噬菌体基因

组的单链DNA拷贝,所以基于抗体的功能特性的选择也导致对编码表现出这些特性的抗体的基因的选择。因此,噬菌体模拟了B细胞的一些特性。噬菌体展示可以以多种形式进行,综述见于例如Johnson, Kevin S和Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)。几种来源的V基因区段可用于噬菌体展示。Clackson等人, *Nature*, 352:624-628 (1991) 从来源于免疫小鼠脾脏的V基因的小型随机组合文库中分离出多种抗噁唑酮抗体。可以构建来自未免疫人供体的V基因库,并且可以基本上按照Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) 或Griffith等人, *EMBO J.* 12:725-734 (1993) 描述的技术分离针对多种抗原(包括自身抗原)的抗体。还参见美国专利第5,565,332号和第5,573,905号。

[0296] 如上文所讨论,也可以通过体外激活的B细胞产生人抗体(参见美国专利第5,567,610号和第5,229,275号)。

[0297] 在另一实施方案中,本公开的抗体是人单克隆抗体。可以使用携带部分人免疫系统而不是小鼠系统的转基因或转染色体小鼠产生这类针对GPC3的人单克隆抗体。这些转基因和转染色体小鼠包括本文中分别称为HuMAb MouseTM和KM MouseTM的小鼠,并且在本文中统称为“人Ig小鼠”。HuMAb MouseTM (Medarex, Inc.) 含有编码未重排的人重链(μ 和 γ)和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因小基因座,以及使内源性 μ 和 κ 链基因座失活的靶向突变(参见例如Lonberg等人, (1994) *Nature* 368(6474):856-859)。因此,小鼠表现出小鼠IgM或 κ 的表达减少,并且响应于免疫,引入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变以产生高亲和力人IgG单克隆抗体(Lonberg, N. 等人, (1994), 同上;综述见于Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. 和Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93, 以及Harding, F. 和Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546)。以下文献中进一步描述了HuMAb MouseTM的准备和使用,以及这种小鼠携带的基因组修饰:Taylor, L. 等人, (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. 等人, (1993) *International Immunology* 5:647-656; Tuailon等人, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi等人, (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, L 等人, (1993) *EMBO J.* 12:821-830; Tuailon等人, (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. 等人, (1994) *International Immunology* 6:579-591; 和Fishwild, D. 等人, (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851, 所有这些文献的内容特此以全文引用的方式具体并入。进一步参见均为Lonberg和Kay的美国专利第5,545,806号;第5,569,825号;第5,625,126号;第5,633,425号;第5,789,650号;第5,877,397号;第5,661,016号;第5,814,318号;第5,874,299号;和第5,770,429号;Surani等人的美国专利第5,545,807号;均为Lonberg和Kay的PCT公布第W0 92/03918号、第W0 93/12227号、第W0 94/25585号、第W0 97/13852号、第W0 98/24884号和第W0 99/45962号;以及Korman等人的PCT公布第W0 01/14424号。在另一实施方案中,可以使用在转基因和转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠,如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠,来产生本公开的人抗体。这种小鼠在本文中被称为“KM MouseTM”,并且在Ishida等人的PCT公布W0 02/43478中有详细描述。

[0298] 更进一步地,表达人免疫球蛋白基因的替代转基因动物系统是本领域中可获得的,并且可用于产生本公开的抗GPC3抗体。例如,可以使用被称为Xenomouse (Abgenix, Inc.) 的替代转基因系统;这类小鼠描述于例如Kucherlapati等人的美国专利第5,939,598

号;第6,075,181号;第6,114,598号;第6,150,584号和第6,162,963号中。

[0299] 此外,表达人免疫球蛋白基因的替代转染色体动物系统是本领域中可获得的,并且可用于产生本公开的抗GPC3抗体。例如,可以使用同时携带人重链转染色体和人轻链转染色体的小鼠,被称为“TC小鼠”;Tomizuka等人,(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:722-727中描述了这类小鼠。此外,本领域中已经描述了携带人重链和轻链转折染色体的母牛(例如,Kuroiwa等人,(2002)Nature Biotechnology 20:889-894和PCT申请第W0 2002/092812号),并且可用于产生本公开的抗GPC3抗体。

[0300] 4. 抗体片段

[0301] 在某些情况下,使用抗体片段而非完整抗体具有优势。片段的较小尺寸允许快速清除,并且可以改善实体肿瘤的进入。

[0302] 已经开发了用于产生抗体片段的各种技术。传统上,这些片段经由完整抗体的蛋白水解消化而取得(参见例如Morimoto等人,Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992);和Brennan等人,Science,229:81 (1985))。然而,这些片段现在可以直接由重组宿主细胞产生。Fab、Fv和ScFv抗体片段都可以在大肠杆菌中表达和由大肠杆菌分泌,因此允许容易地产生大量的这些片段。可以从上面讨论的抗体噬菌体文库中分离抗体片段。或者,Fab'-SH片段可以直接从大肠杆菌中回收,并化学偶联以形成F(ab')₂片段(Carter等人,Bio/Technology 10:163-167 (1992))。根据另一种方法,可以直接从重组宿主细胞培养物中分离F(ab')₂片段。美国专利第5,869,046号中描述了具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段,其包含补救受体结合表位残基。产生抗体片段的其它技术对于技术人员来说将是显而易见的。在其它实施方案中,选择的抗体是单链Fv片段(scFv)。参见W0 93/16185;美国专利第5,571,894号;和美国专利第5,587,458号。Fv和sFv是具有缺乏恒定区的完整结合位点的仅有物种;因此,它们在体内使用期间适合减少的非特异性结合。可以构建sFv融合蛋白以在sFv的氨基或羧基末端产生效应蛋白的融合体。参见Antibody Engineering,Borrebaeck编著,同上。抗体片段也可以是“线性抗体”,例如,如美国专利第5,641,870号中所述。

[0303] 在一个实施方案中,抗GPC3抗体来源的scFv用于CAR修饰的免疫细胞,优选本文公开的CAR-T或CAR-NK细胞。抗GPC3抗体片段中包括抗GPC3抗体的可以在CAR-T或CAR-NK细胞的嵌合抗原受体中用作针对GPC3肿瘤表位的靶向臂的部分(以及抗GPC3抗体的部分的组合,例如scFv)。这类片段不一定是蛋白水解片段,而是多肽序列的可以赋予靶标亲和力的部分。

[0304] 5. 双特异性抗体

[0305] 双特异性抗体是对至少两个不同表位具有结合特异性的抗体。示例性双特异性抗体可以与如本文所述的GPC3蛋白的两个不同表位结合。其它这类抗体可以将GPC3结合位点与另一种蛋白质的结合位点相组合。或者,抗GPC3臂可以与结合白细胞上的触发分子如T细胞受体分子(例如CD3)或IgG的Fc受体(FcγR)如FcγRI (CD64)、FcγRII (CD32)和FcγRIII (CD16)的臂相组合,以便将细胞防御机制集中和定位到表达GPC3的细胞。双特异性抗体也可用于将细胞毒性剂定位于表达GPC3的细胞。这些抗体具有GPC3结合臂和结合细胞毒性剂(例如,皂草素、抗干扰素-α、长春花生物碱、蓖麻毒素A链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原)的臂。双特异性抗体可制备为全长抗体或抗体片段(例如,F(ab')₂双特异性抗体)。

[0306] WO 96/16673描述了双特异性抗ErbB2/抗FcYRIII抗体,且美国专利第5,837,234号公开了双特异性抗ErbB2/抗FcYRI抗体。双特异性抗ErbB2/Fca抗体示于W098/02463中。美国专利第5,821,337号教导了双特异性抗ErbB2/抗CD3抗体。

[0307] 制备双特异性抗体的方法是本领域中已知的。全长双特异性抗体的传统产生方法基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两条链具有不同的特异性(Millstein等人,Nature 305:537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分类,这些杂交瘤(四重瘤)产生10种不同抗体分子的潜在混合物,其中仅一种具有正确的双特异性结构。

[0308] 通常通过亲和色谱法步骤完成的正确分子的纯化相当麻烦,并且产物产率低。W093/08829中和Traunecker等人,EMBO J.10:3655-3659(1991)中公开了类似的程序。

[0309] 6.效应子功能工程化

[0310] 可能期望在效应子功能方面修饰本发明的抗体,例如以便增强抗体的抗原依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。这可以通过在抗体的Fc区中引入一个或多个氨基酸取代来实现。

[0311] 或者或另外,可以在Fc区中引入半胱氨酸残基,从而允许在此区域中形成链间二硫键。如此产生的同型二聚抗体可具有改善的内化能力和/或增加的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。参见Caron等人,J.Exp Med.176:1191-1195(1992)和Shopes,B.J.Immunol.148:2918-2922(1992)。也可以使用如Wolff等人,Cancer Research 53:2560-2565(1993)中所述的异双功能交联剂制备具有增强的抗肿瘤活性的同型二聚抗体。或者,可以对抗体进行工程化,使其具有双Fc区,从而可以具有增强的补体裂解和ADCC能力。参见Stevenson等人,Anti-Cancer Drug Design 3:219-230(1989)。为了增加抗体的血清半衰期,可以将补救受体结合表位并入到抗体(特别是抗体片段)中,例如如美国专利5,739,277中所述。如本文所用,术语“补救受体结合表位”是指IgG分子(例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的Fc区的表位,其负责增加IgG分子的体内血清半衰期。

[0312] D.制备抗体的某些方法

[0313] 1.筛选具有所需特性的抗GPC3抗体

[0314] 上文已经描述了产生与GPC3多肽结合的抗体的技术。例如,本发明提供了制备GPC3抗体(其如本文所定义包括全长及其片段)的方法,所述方法包括在合适的宿主细胞中表达编码所述抗体(或其片段)的本发明的重组载体,并且回收所述抗体。根据需要可进一步选择具有某些生物学特性的抗体。

[0315] 可以通过本领域中已知的方法来评估本发明的抗GPC3抗体的生长抑制作用,例如使用内源地或在用GPC3基因转染之后表达GPC3多肽的细胞。例如,可以用各种浓度的本发明的抗GPC3单克隆抗体将适当的肿瘤细胞系和GPC3转染的细胞处理几天(例如,2-7)天,并用结晶紫或MTT染色或通过一些其它比色测定法进行分析。测量增殖的另一种方法是通过比较在存在或不存在本发明的抗GPC3抗体的情况下经处理的细胞的³H-胸苷摄取。处理后,收获细胞,并在闪烁计数器中对并入到DNA中的放射性量进行定量。适当的阳性对照包括将选定的细胞系用已知抑制该细胞系生长的生长抑制抗体进行处理。可以以本领域中已知的各种方式来测定肿瘤细胞的体内生长抑制。肿瘤细胞可以是过表达GPC3多肽的细胞。在一个实施方案中,在约0.5至30 μ g/ml的抗体浓度下,与未处理的肿瘤细胞相比,抗GPC3抗体将使在体外或体内表达GPC3的肿瘤细胞的细胞增殖抑制约25-100%,更优选约30-

100%，甚至更优选约50-100%或70-100%。可以在细胞培养物中约0.5至30 $\mu\text{g/ml}$ 或约0.5nM至200nM的抗体浓度下测量生长抑制，其中在肿瘤细胞暴露于抗体后1-10天测定生长抑制。如果以约1 $\mu\text{g/kg}$ 至约100mg/kg体重施用抗GPC3抗体导致在从第一次施用抗体的约5天至3个月内、优选约5至30天内肿瘤尺寸减小或肿瘤细胞增殖减少，则抗体是体内生长抑制性的。

[0316] 为了选择诱导细胞死亡的抗GPC3抗体，可以相对于对照评估如由例如碘化丙锭(PI)、台盼蓝或7AAD摄取指示的膜完整性的损失。可以在没有补体和免疫效应细胞的情况下进行PI摄取测定。将表达GPC3多肽的肿瘤细胞与单独的培养基或含有适当的抗GPC3抗体(例如，约10 $\mu\text{g/ml}$)的培养基一起温育。将细胞温育3天的时间段。在每次处理之后，洗涤细胞，并等分到35mm带滤网盖的12x 75管中(每管1ml，每个处理组3管)以移除细胞团块。然后管接收PI(1 $\mu\text{g/ml}$)。可以使用FACSCAN®流式细胞仪和FACSCONVERT®CellQuest软件(Becton Dickinson)来分析样品。可以选择通过PI摄取测定诱导统计学显著水平的细胞死亡的那些抗GPC3抗体作为诱导细胞死亡的抗GPC3抗体。

[0317] 为了筛选与所关注的抗体结合的GPC3多肽上的表位结合的抗体，可以进行常规的交叉阻断测定，如Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow和David Lane编著(1988)中描述的测定。此测定可用于确定测试抗体是否与已知的抗GPC3抗体结合相同的位点或表位。或者或另外，可以通过本领域中已知的方法进行表位作图。例如，可以诱变抗体序列，如通过丙氨酸扫描，以确认接触残基。最初测试突变抗体与多克隆抗体的结合以确保正确折叠。在不同的方法中，对应于GPC3多肽的不同区域的肽可用于与测试抗体或与测试抗体和具有表征的或已知的表位的抗体的竞争测定。

[0318] 简言之，一方面，本公开提供了确认可用于所公开的IHC IVD测定和/或如本文公开的任何其它方法的药剂的表位的方法。在一些实施方案中，药剂是204。表位可包括呈独特空间构象的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸。表位可由通过蛋白质的三级折叠并置的连续氨基酸或非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常可以在暴露于变性溶剂时得以保留，而通过三级折叠形成的表位通常可以在用变性溶剂处理时丢失。

[0319] 可以进行表位作图以确认线性或非线性不连续的氨基酸序列，即表位，其由所关注的激活剂如204抗体识别。表位作图的一般方法可能需要通常在异源表达系统中表达由所关注的抗体或配体识别的全长多肽序列，以及各种片段，即多肽序列的截短形式。然后可以使用这些不同的重组多肽序列或其片段(例如，与N末端蛋白(例如，GFP)融合)来确定所关注的抗体或配体是否能够与多肽序列的一种或多种截短形式结合。通过利用重复截短和产生具有重叠氨基酸区域的重组多肽序列，有可能确认由所关注的抗体识别的多肽序列的区域(参见例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第66卷, Glenn E. Morris编著(1996))。所述方法依赖于药剂(如所关注的抗体)与从表位文库(如来源于膜支持物上的合成肽阵列的表位文库、组合噬菌体展示肽文库)重建的序列结合的能力。然后表位文库提供一系列针对抗体进行筛选的可能性。另外，可以进行靶向表位的一个或多个残基的位点特异性诱变或随机Ala扫描以确认表位的特质。

[0320] 可以通过合成设计GPC3的各种可能的重组作为cDNA构建体并在合适的系统中表达它们来创建表位的文库。例如，可以合成设计多个GPC3基因区段(例如，对应于N末端 α 链

的各种序列、对应于C末端 β 链的各种序列等)。或者,选定的序列也可以作为合成基因排序并克隆到合适的载体中。在其它情况下,可以从提取自人正常组织和恶性组织、优选GPC3表达水平高于正常组织的恶性组织的总RNA中扩增出各种GPC3序列。

[0321] 宿主系统可以是任意合适的表达系统,如293细胞、昆虫细胞或合适的体外翻译系统。转染到宿主系统中的合成设计的GPC3基因区段的多种不同可能的重组可提供例如超过25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85或90种可能的GPC3配对组合。药剂与先前描述的文库中的表位之一的结合可通过使标记的抗体如204与文库的表位接触并检测来自标记的信号来检测。

[0322] 对于表位作图,还开发了计算算法,其已显示可绘制构象不连续的表位。可以通过利用包括例如x射线晶体学和2维核磁共振的方法确定氨基酸的空间构象来确认构象表位。一些表位作图方法,如抗原:抗体复合物的晶体的x射线分析,可以提供表位的原子分辨率。在其它情况下,可以采用用于表位作图的计算组合方法来基于抗体(如204抗体)的序列对潜在的表位进行建模。在这样的情况下,对抗体的抗原结合部分进行测序,并使用计算模型来重构和预测抗体的潜在结合位点。

[0323] 在一些情况下,本公开提供了确定由204或其抗原结合片段特异性识别的GPC3的表位的方法,包括:(a)制备来自GPC3的表位的文库;(b)使表位的文库与204抗体或其抗原结合片段接触;和(c)确认表位的文库中被抗体结合的至少一个表位的氨基酸序列。在一种情况下,抗体连接于固体支持物。表位的文库可包含对应于GPC3的连续和不连续表位的序列。在一些情况下,表位的文库包含来自GPC3的片段,其长度范围是约10个氨基酸至约30个氨基酸、约10个氨基酸至约20个氨基酸或约5个氨基酸至约12个氨基酸。在一些情况下,204抗体或其抗原结合片段被标记,并且标记是放射性分子、发光分子、荧光分子、酶或生物素。

[0324] 下文在实施例2中描述了依赖于GPC3的蛋白质印迹和蛋白酶切割的高水平表位作图研究。简言之,在GPC3的蛋白酶切割(例如,解整联蛋白和金属蛋白酶或ADAM)之后,使用已知相应GPC3表位的抗体(例如,GC33)以及未知相应GPC3表位的抗体(例如,204)对样品进行蛋白质印迹分析。不同抗体对蛋白酶切割的GPC3片段的差异识别可提供关于靶抗体的潜在结合位点的信息,并且可以用作上面提到的表位作图方法的起点。

[0325] 此外,还可以采用以下中的一者或多者来筛选候选抗体的功能:体内筛选转移的抑制、通过体外方法抑制趋化性(例如,Huntsman等人,U.S.2010/0061978,以全文引用的方式并入本文)、抑制血管形成、抑制肿瘤生长和减小肿瘤尺寸。

[0326] 2. 某些文库筛选方法

[0327] 可以通过使用组合文库筛选具有所需的一种或多种活性的抗体来制备本发明的抗GPC3抗体。例如,本领域中已知多种方法用于产生噬菌体展示文库,并筛选这类文库中具有所需结合特性的抗体。这类方法一般描述于Hoogenboom等人(2001)的Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人编著,Human Press,Totowa,NJ)中,并且在某些实施方案中,描述于Lee等人,(2004)J.Mol.Biol.340:1073-1093中。

[0328] 原则上,通过筛选含有展示与噬菌体外壳蛋白融合的抗体可变区(Fv)的各种片段的噬菌体的噬菌体文库来选择合成抗体克隆。通过针对所需抗原的亲合色谱法来淘选这类噬菌体文库。表达能够与所需抗原结合的Fv片段的克隆被吸附到抗原上,从而与文库中的非结合克隆分离。然后将结合克隆从抗原上洗脱下来,并且可以通过另外的抗原吸附/洗脱

循环进一步富集。通过设计合适的抗原筛选程序来选择所关注的噬菌体克隆,接着使用来自所关注的噬菌体克隆的Fv序列和Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), 第1-3卷中描述的合适恒定区 (Fc) 序列来构建全长抗GPC3抗体克隆, 由此可以获得本发明的任何抗GPC3抗体。

[0329] 在某些实施方案中, 抗体的抗原结合结构域由两个约110个氨基酸的可变 (V) 区形成, 分别来自轻 (VL) 链和重 (VH) 链, 它们都呈现三个高变环 (HVR) 或互补决定区 (CDR)。可变结构域可以功能性地展示在噬菌体上, 或者作为单链Fv (scFv) 片段, 其中VH和VL通过短的柔性肽共价连接, 或者作为Fab片段, 其中它们各自与恒定结构域融合, 并且非共价相互作用, 如Winter等人, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994) 中所述。如本文所用, 编码scFv的噬菌体克隆和编码Fab的噬菌体克隆统称为“Fv噬菌体克隆”或“Fv克隆”。

[0330] VH和VL基因库可以通过聚合酶链反应 (PCR) 分别克隆, 并在噬菌体文库中随机重组, 然后可以在噬菌体文库中搜索抗原结合克隆, 如Winter等人, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994) 中所述。来自免疫来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体, 而不需要构建杂交瘤。或者, 可以克隆原始库以提供针对多种非自身抗原以及自身抗原的单一来源的人抗体而不进行任何免疫, 如Griffiths等人, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993) 所述。最后, 也可以通过克隆来自干细胞的未重排的V基因区段, 并使用含有随机序列的PCR引物来编码高度可变的CDR3区并在体外完成重排来合成制备原始文库, 如Hoogenboom和Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992) 所述。

[0331] 在某些实施方案中, 丝状噬菌体用于通过与次要外壳蛋白p11融合来展示抗体片段。抗体片段可以被展示为单链Fv片段, 其中VH和VL结构域通过柔性多肽间隔基连接在同一条多肽链上, 例如如Marks等人, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) 所述, 或展示为Fab片段, 其中一条链与p11融合, 另一条链分泌到细菌宿主细胞周质中, 在其中组装Fab-外壳蛋白结构, 该结构通过置换一些野生型外壳蛋白而展示在噬菌体表面上, 例如如Hoogenboom等人, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991) 中所述。

[0332] 一般来说, 编码抗体基因片段的核酸获自从人或动物收获的免疫细胞。如果需要偏向于抗GPC3克隆的文库, 则用GPC3对受试者进行免疫以产生抗体反应, 并回收脾细胞和/或循环B细胞、其它外周血淋巴细胞 (PBL) 用于文库构建。在优选的实施方案中, 通过在携带功能性人免疫球蛋白基因阵列 (并且缺乏功能性内源抗体产生系统) 的转基因小鼠中产生抗GPC3抗体反应来获得偏向于抗GPC3克隆的人抗体基因片段文库, 使得GPC3免疫产生针对GPC3产生人抗体的B细胞。产生人抗体的转基因小鼠的产生描述如下。

[0333] 可以通过采用合适的筛选程序分离表达GPC3特异性膜结合抗体的B细胞来获得抗GPC3反应性细胞群的另外的富集, 例如通过采用GPC3亲和色谱法进行细胞分离, 或者使细胞吸附到荧光染料标记的GPC3上, 接着进行流式激活细胞分选 (FACS)。

[0334] 或者, 使用来自未免疫供体的脾细胞和/或B细胞或其它PBL能更好地代表可能的抗体库, 并且也允许使用GPC3不具有抗原性的任何动物 (人或非人) 物种构建抗体文库。对于体外并入抗体基因构建的文库, 从受试者中收获干细胞以提供编码未重排的抗体基因区段的核酸。所关注的免疫细胞可得自多种动物物种, 如人、小鼠、大鼠、兔类、狼类、犬科动物、猫科动物、猪、牛、马和鸟类物种等。

[0335] 从所关注的细胞中回收编码抗体可变基因区段(包括VH和VL区段)的核酸并进行扩增。在重排的VH和VL基因文库的情况下,可以通过从淋巴细胞中分离基因组DNA或mRNA,接着用与重排的VH和VL基因的5'和3'端匹配的引物进行聚合酶链反应(PCR)来获得所需的DNA,如Orlandi等人,Proc.Natl.Acad.Sci.(USA),86:3833-3837(1989)中所述,从而产生用于表达的不同V基因库。V基因可以从cDNA和基因组DNA扩增,反向引物在编码成熟V结构域的外显子的5'端,且正向引物基于J区段内,如Orlandi等人,(1989)和Ward等人,Nature,341:544-546(1989)中所述。然而,为了从cDNA进行扩增,反向引物也可基于前导外显子,如Jones等人,Biotechnol.,9:88-89(1991)中所述,且正向引物在恒定区内,如Sastry等人,Proc.Natl.Acad.Sci.(USA),86:5728-5732(1989)中所述。为了使互补性最大化,可以在引物中并入简并性,如Orlandi等人,(1989)或Sastry等人,(1989)中所述。在某些实施方案中,通过使用被靶向每个V基因家族的PCR引物来使文库多样性最大化,以便扩增免疫细胞核酸样品中存在的所有可用的VH和VL排列,例如如Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)的方法中所述,或者如Orum等人,Nucleic Acids Res.,21:4491-4498(1993)的方法中所述。为了将扩增的DNA克隆到表达载体中,可以在PCR引物内引入罕见的限制性位点作为在一端的标签,如Orlandi等人,(1989)中所述,或者通过用带标签的引物进行进一步的PCR扩增,如Clackson等人,Nature,352:624-628(1991)中所述。

[0336] 合成重排的V基因库可体外来源于V基因区段。大部分人VH基因区段已被克隆并测序(报道于Tomlinson等人,J.Mol.Biol.,227:776-798(1992)中),并且已经作图(报道于Matsuda等人,Nature Genet,3:88-94(1993)中);这些克隆的区段(包括HI和H2环的所有主要构象)可用于产生不同的VH基因库,其中PCR引物编码不同序列和长度的H3环,如Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)中所述。VH库也可以用集中在单一长度的长H3环中的所有序列多样性来形成,如Barbas等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4457-4461(1992)中所述。人VK和 $\nu\lambda$ 区段已被克隆并测序(报道于Williams和Winter,Eur.J.Immunol.,23:1456-1461(1993)中),并且可用于形成合成轻链库。基于一系列VH和VL折叠以及L3和H3长度的合成V基因库将编码具有相当大的结构多样性的抗体。在扩增编码V基因的DNA之后,可以根据Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)的方法体外重排种系V基因区段。

[0337] 可以通过以若干方式将VH和VL基因库组合在一起构建抗体片段库。每个库可以在不同的载体中产生,并且载体在体外重组,例如如Hogrefe等人,Gene,128:119-126(1993)中所述,或者通过组合感染在体内重组,例如Waterhouse等人,Nucl.Acids Res.,21:2265-2266(1993)中所述的loxP系统。体内重组方法利用Fab片段的双链性质来克服大肠杆菌转化效率对文库大小产生的限制。分别克隆原始VH和VL库,一个克隆到噬菌粒中,且另一个克隆到噬菌体载体中。然后通过含有噬菌粒的细菌的噬菌体感染来组合两个文库,使得每个细胞含有不同的组合,并且文库大小仅受存在的细胞数量(约 10^{12} 个克隆)的限制。两种载体都含有体内重组信号,使得VH和VL基因重组到单个复制子上,并且共同包装到噬菌体病毒粒子中。这些巨大文库提供了大量具有良好亲和力的不同抗体(K_d^{-1} 为约 $10^8 M$)。

[0338] 或者,可以将库依次克隆到同一载体中,例如如Barbas等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:7978-7982(1991)中所述,或者通过PCR组装在一起,然后克

隆,例如如Clackson等人,Nature,352:624-628(1991)中所述。PCR组装也可用于将VH和VL DNA与编码柔性肽间隔基的DNA连接起来,以形成单链Fv(scFv)库。在又一项技术中,“细胞内PCR组装”用于通过PCR将淋巴细胞内的VH和VL基因组合,然后克隆连锁基因库,如Embleton等人,Nucl.Acids Res.,20:3831-3837(1992)中所述。

[0339] 由原始文库(天然的或合成的)产生的抗体可具有中等的亲和力(K_d -1为约106至107M⁻¹),但可以通过构建二级文库并从中重新选择来体外模拟亲和力成熟,如Winter等人,(1994),同上中所述。例如,在Hawkins等人,J.Mol.Biol.,226:889-896(1992)的方法中或在Gram等人,Proc.Natl.Acad.Sci USA,89:3576-3580(1992)的方法中,可以通过使用易错聚合酶(报道于Leung等人,Technique,1:11-15(1989)中)在体外随机引入突变。另外,可以通过使一个或多个CDR随机突变来进行亲和力成熟,例如在选定的个别Fv克隆中用携带跨越所关注的CDR的随机序列的引物进行PCR,并筛选更高亲和力的克隆。WO 9607754(1996年3月14日公布)描述了在免疫球蛋白轻链的互补决定区中诱导诱变以创建轻链基因的文库的方法。另一种有效的方法是将通过噬菌体展示选择的VH或VL结构域与得自未免疫供体的天然存在的V结构域变体库重组,并在几轮链改组中筛选更高的亲和力,如Marks等人,Biotechnol.,10:779-783(1992)中所述。这项技术允许产生亲和力为约10⁻⁹M或更低的抗体和抗体片段。

[0340] 可通过本领域中已知的各种技术来完成文库的筛选。例如,GPC3可用于包被吸附板的孔,在固定于吸附板的宿主细胞上表达或用于细胞分选,或与生物素缀合以用链霉亲和素包被的珠粒捕获,或用于淘选噬菌体展示文库的任何其它方法。

[0341] 使噬菌体文库样品与固定的GPC3在适合将噬菌体颗粒的至少一部分与吸附剂结合的条件下接触。通常,选择包括pH、离子强度、温度等在内的条件来模拟生理条件。洗涤与固相结合噬菌体,然后通过酸洗脱,例如如Barbas等人,Proc.Natl.Acad.Sci USA,88:7978-7982(1991)中所述,或通过碱洗脱,例如如Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)中所述,或通过GPC3抗原竞争洗脱,例如在类似于Clackson等人,Nature,352:624-628(1991)的抗原竞争方法的程序中。在单轮选择中,噬菌体可富集20-1,000倍。此外,富集的噬菌体可以在细菌培养物中生长,并进行更多轮的选择。

[0342] 选择的效率取决于许多因素,包括洗涤期间的解离动力学,以及单个噬菌体上的多个抗体片段是否能同时与抗原接合。通过利用短时间洗涤、多价噬菌体展示和固相中抗原的高包被密度可以保留具有快速解离动力学(和弱结合亲和力)的抗体。高密度不仅通过多价相互作用稳定噬菌体,而且有利于已经解离的噬菌体重新结合。通过利用长时间洗涤和单价噬菌体展示(如Bass等人,Proteins,8:309-314(1990)中和WO 92/09690中所述)以及抗原的低包被密度(如Marks等人,Biotechnol.,10:779-783(1992)中所述)可以促进选择具有慢解离动力学(和良好结合亲和力)的抗体。

[0343] 对于GPC3,有可能在不同亲和力的噬菌体抗体之间进行选择,即使亲和力差异不大。然而,选定抗体的随机突变(例如,如在一些亲和力成熟技术中进行)可能会产生许多突变体,其中大多数与抗原结合,少数具有更高的亲和力。由于GPC3受到限制,罕见高亲和力的噬菌体可能会被竞争淘汰。为了保留所有较高亲和力的突变体,可以将噬菌体与过量的生物素化GPC3一起温育,但生物素化GPC3的摩尔浓度低于GPC3的目标摩尔亲和力常数。然后高亲和力结合噬菌体可以被链霉亲和素包被的顺磁珠粒捕获。这种“平衡捕获”允许根据

结合的亲和力来选择抗体,其灵敏度允许从大量过量的较低亲和力噬菌体中分离出仅两倍高亲和力的突变克隆。还可以控制用于洗涤与固相结合噬菌体的条件,以根据解离动力学进行区分。

[0344] 可以根据活性来选择抗GPC3克隆。在某些实施方案中,本发明提供了与天然表达GPC3的活细胞结合的抗GPC3抗体。在一个实施方案中,本发明提供了阻断GPC3配体与GPC3之间的结合但不阻断GPC3配体与第二蛋白质之间的结合的抗GPC3抗体。可以通过如下方式选择对应于这类抗GPC3抗体的Fv克隆:(1)从如上所述的噬菌体文库中分离抗GPC3克隆,并任选通过在合适的细菌宿主中培养分离的噬菌体克隆群体来扩增该群体;(2)选择分别需要阻断和非阻断活性的GPC3和第二蛋白质;(3)将抗GPC3噬菌体克隆吸附到固定的GPC3上;(4)使用过量的第二蛋白质来洗脱识别与第二蛋白质的结合决定簇重叠或共享的GPC3结合决定簇的任何不需要的克隆;和(5)洗脱步骤(4)之后仍吸附的克隆。任选地,可以通过重复本文所述的选择程序一次或多次来进一步富集具有所需阻断/非阻断特性的克隆。

[0345] 利用常规的程序很容易分离编码本发明的杂交瘤来源的单克隆抗体或噬菌体展示Fv克隆的DNA并进行测序(例如通过使用设计用于从杂交瘤或噬菌体DNA模板特异性扩增所关注的重链和轻链编码区的寡核苷酸引物)。一旦分离,可以将DNA放入表达载体中,然后将其转染到宿主细胞中,如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞,以在重组宿主细胞中获得所需单克隆抗体的合成。关于编码抗体的DNA在细菌中的重组表达的综述文章包括Skerra等人,Curr.Opinion in Immunol.,5:256(1993)和Pluckthun,Immunol.Revs,130:151(1992)。

[0346] 编码本发明的Fv克隆的DNA可以与编码重链和/或轻链恒定区的已知DNA序列(例如适当的DNA序列可得自Kabat等人,同上)组合以形成编码全长或部分长度重链和/或轻链的克隆。将要了解的是,任何同种型的恒定区均可用于此目的,包括IgG、IgM、IgA、IgD和IgE恒定区,并且这类恒定区可得自任何人或动物物种。来源于一种动物(如人)物种的可变结构域DNA并然后与另一种动物物种的恒定区DNA融合以形成“杂交的”全长重链和/或轻链的编码序列的Fv克隆包括在如本文所用的“嵌合”和“杂交”抗体的定义中。在某些实施方案中,来源于人可变DNA的Fv克隆与人恒定区DNA融合以形成全长或部分长度的人重链和/或轻链的编码序列。

[0347] 编码来源于杂交瘤的抗GPC3抗体的DNA也可以被修饰,例如通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列代替来源于杂交瘤克隆的同源鼠序列进行取代(例如如在Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)的方法中)。编码杂交瘤或Fv克隆来源的抗体或片段的DNA可通过将非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列共价连接于免疫球蛋白编码序列来进一步修饰。以这种方式,制备了具有本发明的Fv克隆或杂交瘤克隆来源的抗体的结合特异性的“嵌合”或“杂交”抗体。

[0348] 3.使用CAR T细胞产生抗体

[0349] 可以通过使用CAR T细胞平台筛选具有所需的一种或多种活性的抗体来制备本发明的抗GPC3抗体。嵌合抗原受体(CAR)由连接于跨膜和细胞质信号传导结构域的细胞外抗原识别结构域(通常是单链可变片段(scFv)抗体)组成。Alvarez-Vallina,L,Curr Gene Ther 1:385-397(2001)。CAR介导的识别将在细胞表面上表达的肿瘤相关抗原(TAA)转化成效应子功能的募集点,从而实现了效应细胞的主要组织相容性复合物独立激活的目标。第

一代CAR是通过将基于scFv的TAA结合结构域与通常来源于T细胞受体(TCR)/CD3复合物的 ζ 链或来源于与一些Fc受体相关的 γ 链的细胞质信号传导结构域融合而构建的。Gross, G. 等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 86:10024-10028(1989)。也已经开发了第二代CAR (CARv2), 其包含TCR ζ 的信号传导区与来源于T细胞共刺激受体CD28、4-1BB(CD137)或OX40(CD134)的信号传导结构域相串联。Sanz, L. 等人, *Trends Immunol* 25:85-91(2004)。在遇到抗原时, 基因转移的CAR的相互作用触发效应子功能, 并且可介导肿瘤细胞的细胞溶解。CAR方法的实用性和有效性已经在多种动物模型中得到证实, 并且正在进行的临床试验使用基于CAR的基因工程化T淋巴细胞治疗癌症患者。Lipowska-Bhalla, G. 等人, *Cancer Immunol Immunother* 61:953-962(2012)。CAR能够使效应细胞靶向存在合适抗体的任何天然的细胞外抗原。工程化细胞不仅可以靶向蛋白质, 还可以靶向诸如碳水化合物和糖脂肿瘤抗原的结构。Mezzanzanica, D. 等人, *Cancer Gene Ther* 5:401-407(1998); Kershaw, MH. 等人, *Nat Rev Immunol* 5:928-940(2005)。

[0350] 目前产生重组抗体的方法主要基于使用纯化的蛋白质。Hoogenboom, H. R. 等人, *Nat Biotechnol* 23:1105-1116(2005)。然而, 最近描述了一种基于哺乳动物细胞的抗体展示平台, 其利用了T淋巴细胞的功能能力。Alonso-Camino 等人, *Molecular Therapy Nucleic Acids* (2013) 2, e93。由于激活标志物的表面表达, 抗体在T淋巴细胞的表面上的展示作为CAR介导信号传导的一部分可以理想地将抗原-抗体相互作用与细胞表型中的明显变化联系起来。Alonso-Camino, V. 等人, *PLoS ONE* 4:e7174(2009)。通过使用识别TAA的基于scFv的CAR, 已经证实将CAR介导的激活与CD69+T细胞的荧光激活细胞分选(FACS)相组合有可能分离与表面TAA的结合物, 两轮后富集因子为至少 10^3 倍, 从而产生表达TAA特异性CAR的同质T细胞群。Alonso-Camino, V 等人, *PLoS ONE* 4:e7174(2009)。

[0351] E. 抗GPC3抗体变体和修饰

[0352] 1. 变体

[0353] 除了本文所述的抗GPC3抗体之外, 预期可以制备抗GPC3抗体变体。可以通过将适当的核苷酸变化引入到编码DNA中和/或通过合成所需抗体或多肽来制备抗GPC3抗体变体。本领域技术人员将了解的是, 氨基酸变化可改变抗GPC3抗体的翻译后过程, 如改变糖基化位点的数量或位置或改变膜锚定特性。

[0354] 例如, 可以利用例如美国专利第5,364,934号中阐述的保守和非保守突变的任何技术和指导来产生本文所述的抗GPC3抗体的变异。变异可以是编码抗体或多肽的一个或多个密码子的取代、缺失或插入, 其导致与天然序列抗体或多肽相比, 氨基酸序列发生变化。任选地, 变异是通过将至少一个氨基酸用抗GPC3抗体的一个或多个结构域中的任何其它氨基酸取代。通过将抗GPC3抗体的序列与同源已知的蛋白质分子的序列进行比较, 并最小化在高同源区中进行的氨基酸序列改变的数量, 可以建立确定哪个氨基酸残基可以被插入、取代或缺失而不会对所需活性产生不利影响的指导。氨基酸取代可以是将一个氨基酸用具有类似结构和/或化学性质的另一个氨基酸置换的结果, 如用丝氨酸置换亮氨酸, 即保守氨基酸置换。插入或缺失可任选在约1至5个氨基酸的范围内。可以通过系统地在序列中进行氨基酸的插入、缺失或取代并测试所得变体由全长或成熟天然序列表现出的活性来确定允许的变异。

[0355] 本文提供了抗GPC3抗体片段。例如, 当与全长天然抗体或蛋白质相比时, 这类片段

可以在N末端或C末端被截短,或者可以缺少内部残基。某些片段缺少对于抗GPC3抗体的所需生物活性而言不是必需的氨基酸残基。

[0356] 可以通过多种常规技术中的任何一种来制备抗GPC3抗体片段。可以化学合成所需的肽片段。替代的方法涉及通过酶消化产生抗体或多肽片段,例如通过用已知在由特定氨基酸残基限定的位点处切割蛋白质的酶处理蛋白质,或者通过用合适的限制性酶消化DNA并分离所需的片段。又一种合适的技术涉及通过聚合酶链反应(PCR)分离并扩增编码所需抗体或多肽片段的DNA片段。在PCR中的5'和3'引物处使用限定DNA片段的所需末端的寡核苷酸。优选地,抗GPC3抗体片段与本文公开的天然抗GPC3抗体共有至少一种生物活性和/或免疫活性。

[0357] 在特定的实施方案中,所关注的保守取代示于表1中的优选取代的标题下。如果这类取代导致生物活性的变化,则引入更实质性的改变,即表1中命名的示例性取代,或如下面参考氨基酸类别进一步所描述,并筛选产物。

[0358] 表1原始示例性优选的残基取代取代

[0359] Ala(A) val; leu; ile val

[0360] Arg(R) lys; gin; asn lys

[0361] Asn(N) gin; his; lys; arg gin

[0362] Asp(D) glu glu

[0363] Cys(C) ser ser

[0364] Gin(Q) asn asn

[0365] Glu(E) asp asp

[0366] Gly(G) pro; ala ala

[0367] His(H) asn; gin; lys; arg arg

[0368] He(I) leu; val; met; ala; phe;

[0369] 正亮氨酸leu

[0370] Leu(L) 正亮氨酸; ile; val;

[0371] met; ala; phe ile

[0372] Lys(K) arg; gin; asn arg

[0373] Met(M) leu; phe; ile leu

[0374] Phe(F) leu; val; ile; ala; tyr leu

[0375] Pro(P) ala ala

[0376] Ser(S) thr thr

[0377] Thr(T) ser ser

[0378] Trp(W) tyr; phe tyr

[0379] Tyr(Y) trp; phe; thr; ser phe

[0380] Val(V) ile; leu; met; phe;

[0381] ala; 正亮氨酸leu

[0382] 通过选择取代来实现抗GPC3抗体的功能或免疫学特质的实质性修饰,所述取代在其对保持(a)取代区域中的多肽主链的结构,例如折叠或螺旋构象,(b)靶位点处的分子的电荷或疏水性,或(c)侧链的体积的影响方面显著不同。天然存在的残基根据常见的侧链特

性分成若干组:

[0383] (1) 疏水性的:正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile;

[0384] (2) 中性亲水性的:cys、ser、thr;

[0385] (3) 酸性的:asp、glu;

[0386] (4) 碱性的:asn、gin、his、lys、arg;

[0387] (5) 影响链取向的残基:gly、pro;和

[0388] (6) 芳族的:trp、tyr、phe。

[0389] 非保守取代将需要将这些类别之一的成员交换为另一类别。这类取代的残基也可以被引入到保守取代位点,或更优选地,引入到剩余的(非保守)位点。

[0390] 可以采用本领域中已知的方法产生变异,如寡核苷酸介导的(位点定向)诱变、丙氨酸扫描和PCR诱变。可以对克隆的DNA进行位点定向诱变[Carter等人,Nucl.Acids Res., 13:4331(1986);Zoller等人,Nucl.Acids Res.,10:6487(1987)]、盒式诱变[Wells等人, Gene, 34:315(1985)]、限制性选择诱变[Wells等人,Philos.Trans.R.Soc.London SerA, 317:415(1986)]或其它已知的技术以产生抗GPC3抗体变体DNA。

[0391] 扫描氨基酸分析也可用于沿连续的序列确认一个或多个氨基酸。优选的扫描氨基酸当中有相对较小的中性氨基酸。这类氨基酸包括丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸和半胱氨酸。丙氨酸通常是此组中优选的扫描氨基酸,因为其消除了 β -碳以外的侧链,并且不太可能改变变体的主链构象[Cunningham和Wells,Science,244:1081-1085(1989)]。丙氨酸通常也是优选的,因为其是最常见的氨基酸。进一步地,其经常见于埋藏和暴露的位置[Creighton, The Proteins, (W.H.Freeman&Co., N.Y.);Chothia, J.Mol.Biol.,150:1(1976)]。如果丙氨酸取代没有产生足够量的变体,则可以使用同构(isoteric)氨基酸。

[0392] 任何不参与维持抗GPC3抗体的正确构象的半胱氨酸残基也可以被取代,通常用丝氨酸取代,以提高分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反,可以将半胱氨酸键添加到抗GPC3抗体中以提高其稳定性(特别是在抗体是抗体片段如Fv片段的情况下)。

[0393] 特别优选类型的取代变体涉及取代亲本抗体(例如,人源化抗体或人抗体)的一个或多个高变区残基。一般地,选择用于进一步开发的所得变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改善的生物学特性。产生这类取代变体的便利方法涉及利用噬菌体展示的亲合力成熟。简言之,使几个高变区位点(例如,6-7个位点)突变,以在每个位点产生所有可能的氨基酸取代。如此产生的抗体变体以单价方式从丝状噬菌体颗粒展示为与包装在每个颗粒内的M13的基因III产物的融合体。如本文所公开,然后筛选噬菌体展示的变体的生物活性(例如,结合亲和力)。为了确认用于修饰的候选高变区位点,可以进行丙氨酸扫描诱变以确认对抗原结合有显著贡献的高变区残基。或者或另外,可能有益的是分析抗原-抗体复合物的晶体结构以确认抗体与GPC3多肽之间的接触点。这类接触残基和邻近残基是根据本文详述的技术进行取代的候选者。一旦产生这类变体,就对变体组进行如本文所述的筛选,并且可以选择在一个或多个相关测定中具有优异特性的抗体用于进一步开发。

[0394] 通过本领域中已知的多种方法制备编码抗GPC3抗体的氨基酸序列变体的核酸分子。这些方法包括但不限于从天然来源分离(在天然存在的氨基酸序列变体的情况下)或通过寡核苷酸介导的(或位点定向)诱变、PCR诱变和早期制备的抗GPC3抗体的变体或非变体形式的盒式诱变来制备。

[0395] 2. 修饰

[0396] 抗GPC3抗体的共价修饰包括在本发明的范围内。一种类型的共价修饰包括使抗GPC3抗体的靶向氨基酸残基与能够与抗GPC3抗体的选定侧链或N末端或C末端残基反应的有机衍生剂反应。用双功能试剂衍生化是有用的,例如用于使抗GPC3抗体与水不溶性支持基质或表面交联,以用于纯化抗GPC3抗体的方法,反之亦然。常用的交联剂包括例如1,1-双(重氮乙酰基)-2-苯基乙烷、戊二醛、N-羟基琥珀酰亚胺酯(例如与4-叠氮基水杨酸的酯)、同双官能亚氨基酯(包括二琥珀酰亚胺酯,如3,3'-二硫代双(琥珀酰亚胺丙酸酯))、双官能马来酰亚胺(如双-N-马来酰亚胺基-1,8-辛烷)和诸如甲基-3-[(对叠氮苯基)二硫代]丙酰亚胺酸酯的试剂。

[0397] 其它修饰包括谷氨酰胺基和天冬酰胺基残基分别脱酰胺为相应的谷氨酰基和天冬酰基残基、脯氨酸和赖氨酸的羟基化、丝氨酰基或苏氨酰基残基的羟基的磷酸化、赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化[T.E.Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 第79-86页(1983)]、N末端胺的乙酰化以及任何C末端羧基的酰胺化。

[0398] 包括在本发明的范围内的抗GPC3抗体的另一种类型的共价修饰包括改变抗体或多肽的天然糖基化模式。出于本文的目的,“改变天然糖基化模式”意指缺失天然序列抗GPC3抗体中存在的一个或多个碳水化合物部分(通过移除潜在的糖基化位点或通过化学和/或酶促方式缺失糖基化)和/或添加天然序列抗GPC3抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。此外,该短语包括天然蛋白质的糖基化的质变,涉及存在的各种碳水化合物部分的性质和比例的变化。

[0399] 抗体及其它多肽的糖基化通常是N-连接的或O-连接的。N-连接是指碳水化合物部分连接于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除脯氨酸之外的任何氨基酸)是用于将碳水化合物部分酶促连接于天冬酰胺侧链的识别序列。因此,多肽中这些三肽序列中的任一者的存在产生潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化是指将糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一连接于羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,尽管也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。

[0400] 通过改变氨基酸序列方便地完成对抗GPC3抗体添加糖基化位点,使得其含有一个或多个上述三肽序列(对于N-连接的糖基化位点)。还可以通过对原始抗GPC3抗体的序列添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基或原始抗GPC3抗体的序列被一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基取代来进行改变(对于O-连接的糖基化位点)。可任选通过在DNA水平上的变化来改变抗GPC3抗体氨基酸序列,特别是通过在预先选定的碱基处使编码抗GPC3抗体的DNA突变,使得产生将翻译成所需氨基酸的密码子。

[0401] 增加抗GPC3抗体上的碳水化合物部分的数量的一种方法是通过糖苷与多肽的化学偶联或酶促偶联。本领域中描述了这类方法,例如在1987年9月11日公布的W0 87/05330中以及在Aplin和Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 第259-306页(1981)中。抗GPC3抗体上存在的碳水化合物部分的移除可以以化学或酶促方式或通过编码充当糖基化靶标的氨基酸残基的密码子的突变取代来完成。化学去糖基化技术是本领域中已知的,并且例如由Hakimuddin等人, Arch. Biochem. Biophys., 259:52(1987)和Edge等人, Anal. Biochem., 118:131(1981)描述过。可以通过使用多种内切和外切糖苷酶来实现多肽

上的碳水化合物部分的酶促切割,如Thotakura等人,Meth.Enzymol.,138:350(1987)所述。

[0402] F.抗GPC3抗体的制备

[0403] 下面的描述主要涉及通过培养用含有编码抗GPC3抗体的核酸的载体转化或转染的细胞来产生抗GPC3抗体。当然,预期可采用本领域中熟知的替代方法来制备抗GPC3抗体。例如,可以通过采用固相技术的直接肽合成为产生适当的氨基酸序列或其部分[参见例如Stewart等人,Solid-Phase Peptide Synthesis,W.H.Freeman Co.,San Francisco,CA(1969);Merrifield,J.Am.Chem.Soc,85:2149-2154(1963)]。体外蛋白质合成可以采用手动技术或通过自动化进行。自动化合成可例如使用Applied Biosystems肽合成仪(Foster City,CA)按照制造商的说明来完成。抗GPC3抗体的各个部分可以单独地化学合成,并采用化学或酶促方法进行组合,以产生所需的抗GPC3抗体。

[0404] 1. 编码抗GPC3抗体的DNA的分离

[0405] 编码抗GPC3抗体的DNA可得自cDNA文库,所述cDNA文库由被认为具有抗GPC3抗体mRNA并以可检测的水平表达其的组织制备。因此,可以从由人组织制备的cDNA文库方便地获得人抗GPC3抗体DNA。抗GPC3抗体编码基因也可以由基因组文库或通过已知的合成程序(例如,自动化核酸合成)获得。

[0406] 可以用设计用于确认所关注的基因或由其编码的蛋白质的探针(如至少约20-80个碱基的寡核苷酸)来筛选文库。用选定的探针筛选cDNA或基因组文库可以采用标准程序来进行,如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述。分离编码抗GPC3抗体的基因的一种替代方法是采用PCR方法[Sambrook等人,同上;Dieffenbach等人,PCR Primer:A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1995)]。

[0407] 筛选cDNA文库的技术是本领域中熟知的。选择作为探针的寡核苷酸序列应具有足够的长度,并且足够明确,以使假阳性最小化。优选对寡核苷酸进行标记,使得其在与所筛选的文库中的DNA杂交时可以被检测到。

[0408] 标记的方法是本领域中熟知的,并且包括使用放射性标记如³²P-标记的ATP、生物素化或酶标记。Sambrook等人,同上中提供了杂交条件,包括中等严格性和高严格性。

[0409] 可以将在这类文库筛选方法中确认的序列与公共数据库如GenBank或其它私有序列数据库中保存和可用的其它已知序列进行比较和比对。可以采用本领域中已知且如本文所述的方法来确定分子的限定区域内或整个全长序列的序列同一性(在氨基酸或核苷酸水平上)。

[0410] 可以通过使用本文首次公开的推导的氨基酸序列筛选选定的cDNA或基因组文库来获得具有蛋白质编码序列的核酸,并且如果需要的话,采用如Sambrook等人,同上中所述的常规引物延伸程序来检测可能尚未逆转录成cDNA的mRNA的前体和加工中间体。

[0411] 2. 宿主细胞的选择和转化

[0412] 用本文所述用于产生抗GPC3抗体的表达或克隆载体转染或转化宿主细胞,并在经修饰为适合于诱导启动子、选择转化子或扩增编码所需序列的基因的常规营养培养基中培养。可由技术人员在无需过度实验的情况下选择培养条件,如培养基、温度、pH等。一般来说,最大化细胞培养物生产力的原则、方案和实用技术可见于Mammalian Cell Biotechnology:a Practical Approach,M.Butler编著(IRL Press,1991)和Sambrook等

人,同上。

[0413] 真核细胞转染和原核细胞转化的方法是普通技术人员已知的,例如CaCl₂、CaPO₄、脂质体介导的聚乙二醇/DMSO和电穿孔,其意味着将DNA引入到宿主中,使得DNA作为染色体外或通过染色体整合体是可复制的。根据所使用的宿主细胞,采用适合于这类细胞的标准技术进行转化。使用如Sambrook等人,同上中所述的氯化钙的钙处理或电穿孔通常用于原核细胞。用根癌农杆菌感染用于转化某些植物细胞,如Shaw等人, *Gene*, 23:315 (1983) 和 1989年6月29日公布的W0 89/05859所述。对于没有这类细胞壁的哺乳动物细胞,可以采用Graham和van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978) 的磷酸钙沉淀法。美国专利第4,399,216号中已经描述了哺乳动物细胞宿主系统转染的一般方面。转化到酵母中典型地是根据Van Solingen等人, *J. Bac.*, 130:946 (1977) 和Hsiao等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979) 的方法进行的。然而,也可以采用将DNA引入到细胞中的其它方法,如通过核微量注射、电穿孔、细菌原生质体与完整细胞融合或聚阳离子,例如聚凝胺、聚鸟氨酸。关于转化哺乳动物细胞的各种技术,参见Keown等人, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) 和Mansour等人, *Nature*, 336:348-352 (1988)。

[0414] 用于克隆或表达本文的载体中的DNA的合适宿主细胞包括原核细胞、酵母或高等真核生物细胞。

[0415] a. 原核宿主细胞

[0416] 合适的原核生物包括但不限于古细菌和真细菌,如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科,如大肠杆菌。各种大肠杆菌菌株是可公开获得的,如大肠杆菌K12菌株MM294 (ATCC 31,446);大肠杆菌XI 776 (ATCC 31,537);大肠杆菌菌株W3110 (ATCC 27,325) 和K5 772 (ATCC 53,635)。其它合适的原核宿主细胞包括肠杆菌科,如埃希氏菌属,例如大肠杆菌、肠杆菌属、欧文氏菌属、克雷伯氏菌属、变形杆菌属、沙门氏菌属,例如鼠伤寒沙门氏菌、沙雷氏菌属,例如粘质沙雷氏菌和志贺氏菌属,以及杆菌属,如枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌(例如1989年4月12日公布的DD 266,710中公开的地衣芽孢杆菌41P)、假单胞菌属,如铜绿假单胞菌、根瘤菌、透明颤菌、副球菌和链霉菌。这些实例是说明性而非限制性的。菌株W3110是一种特别优选的宿主或亲本宿主,因为它是用于重组DNA产物发酵的常见宿主菌株。优选地,宿主细胞分泌最少量的蛋白水解酶。例如,菌株W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, 第2卷 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 第1190-1219页; ATCC保藏号27,325) 可以被修饰以在编码宿主内源性蛋白质的基因中实现基因突变,这类宿主的实例包括大肠杆菌W3110菌株1A2,其具有完整基因型tonA;大肠杆菌W3110菌株9E4,其具有完整基因型tonA ptr3;大肠杆菌W3110菌株27C7 (ATCC 55,244),其具有完整基因型tonA ptr3 phoA E 15 (argF-lac) 169degP ompT kanr;大肠杆菌W3110菌株37D6,其具有完整基因型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169degP ompT rbs7 ilvG kanr;大肠杆菌W3110菌株40B4,其是具有非卡那霉素抗性degP缺失突变的菌株37D6;具有基因型W3110 AfhuA (AtonA) ptr3 lac Iq lacL8 AompTA (nmpe-fepE) degP41kanR的大肠杆菌W3110菌株33D3 (美国专利第5,639,635号) 和1990年8月7日授权的美国专利第4,946,783号中公开的具有突变型周质蛋白酶的大肠杆菌菌株。其它菌株及其衍生物如大肠杆菌294 (ATCC 31,446)、大肠杆菌B.E. 1776 (ATCC 31,537) 和大肠杆菌RV308 (ATCC 31,608) 也是合适的。这些实例是说明性而非限制性的。构建任何上面提

到的细菌的具有确定基因型的衍生物的方法是本领域中已知的,并且描述于例如Bass等人, *Proteins*, 8:309-314 (1990) 中。通常需要考虑复制子在细菌细胞中的可复制性来选择适当的细菌。例如,当使用熟知的质粒如pBR322、pBR325、pACYC177或pKN410来提供复制子时,大肠杆菌、沙雷氏菌属或沙门氏菌属物种可以合适地用作宿主。通常宿主细胞应当分泌最少量的蛋白水解酶,并且可能期望将另外的蛋白酶抑制剂掺入细胞培养物中。或者,体外克隆方法例如PCR或其它核酸聚合酶反应是合适的。

[0417] 可以在细菌中产生全长抗体、抗体片段和抗体融合蛋白,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。全长抗体在循环中具有更长的半衰期。在大肠杆菌中产生速度更快,并且更具成本效益。关于抗体片段和多肽在细菌中的表达,参见例如U.S. 5,648,237 (Carter等人)、U.S. 5,789,199 (Joly等人) 和U.S. 5,840,523 (Simmons等人),这些专利描述了翻译起始区(TIR)以及用于优化表达和分泌的信号序列,这些专利以引用的方式并入本文。表达后,将抗体以可溶性级分的形式从大肠杆菌细胞糊中分离出来,并且可以根据同种型通过例如蛋白A或G柱进行纯化。可以与纯化例如在CHO细胞中表达的抗体的过程类似地进行最终纯化。

[0418] b. 真核宿主细胞

[0419] 除了原核生物之外,真核微生物如丝状真菌或酵母也是编码抗GPC3抗体的载体的合适克隆或表达宿主。酿酒酵母是常用的低等真核宿主微生物。其它包括粟酒裂殖酵母(Beach和Nurse, *Nature*, 290:140 [1981]; 1985年5月2日公布的EP 139,383); 克鲁维酵母菌属宿主(美国专利第4,943,529号; Flier等人, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)), 举例如乳酸克鲁维酵母(MW98-8C、CBS683、CBS4574; Louvencourt等人, *J. Bacteriol.*, 154(2):737-742 [1983])、克雷白氏脆弱类杆菌(ATCC 12,424)、克雷白氏保加利亚乳杆菌(ATCC 16,045)、克鲁维酵母魏氏原壁菌(ATCC 24,178)、*K. waltii* (ATCC 56,500)、*K. drosophilum* (ATCC 36,906; Van den Berg等人, *Bio/Technology*, 8:135 (1990))、克鲁维酵母耐热链霉菌和马克斯克鲁维酵母; 亚罗酵母属(EP 402,226); 巴斯德毕赤酵母(EP 183,070; Sreekrishna等人, *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278 [1988]); 假丝酵母; 里氏木霉(EP 244,234); 粗糙脉孢菌(Case等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263 [1979]); 许旺酵母属,如Schwanniomycetes occidentalis (1990年10月31日公布的EP 394,538); 和丝状真菌,举例如脉孢菌属、青霉菌属、弯颈霉属(1991年1月10日公布的WO 91/00357)以及曲霉菌属宿主,如构巢曲菌(Ballance等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 [1983]; Tilburn等人, *Gene*, 26:205-221 [1983]; Yelton等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1470-1474 [1984]) 和黑曲霉菌(Kelly和Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479 [1985])。甲基营养型酵母在本文中是合适的,并且包括但不限于能够在甲醇上生长的酵母,其选自汉逊酵母属、假丝酵母属、克氏酵母属、毕赤酵母属、酵母菌属、球拟酵母属和红酵母属组成的属。作为这类酵母的示例的具体物种的列表可见于C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982)。

[0420] 用于表达糖基化的抗GPC3抗体的合适宿主细胞来源于多细胞生物体。无脊椎动物细胞的实例包括昆虫细胞,如果蝇S2和斜纹夜蛾Sf9,以及植物细胞,如棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄和烟草的细胞培养物。已经确认出许多杆状病毒株和变体以及来自诸如草地贪夜蛾(毛虫)、埃及伊蚊(蚊子)、白纹伊蚊(蚊子)、黑腹果蝇(果蝇)和家蚕的宿主的相

应许可昆虫宿主细胞。用于转染的多种病毒株是可公开获得的,例如苜蓿银纹夜蛾NPV的L-1变体和家蚕NPV的Bm-5株,并且这类病毒可用作本文根据本发明的病毒,特别是用于草地贪夜蛾细胞的转染。

[0421] 然而,脊椎动物细胞最受关注,并且在培养物(组织培养)中繁殖脊椎动物细胞已经成为常规程序。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例有由SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7, ATCC CRL 1651);人胚胎肾细胞系(293细胞或用于在悬浮培养物中生长而亚克隆的293细胞, Graham等人, J. Gen. Virol. 36:59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980));小鼠塞托利细胞(Sertoli cell)(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);水牛大鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等人, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4细胞;和人肝瘤细胞系(Hep G2)。

[0422] 用上述用于产生抗GPC3抗体的表达或克隆载体转化宿主细胞,并在经修饰为适合于诱导启动子、选择转化子或扩增编码所需序列的基因的常规营养培养基中进行培养。

[0423] 3. 可复制载体的选择和使用

[0424] 为了重组产生本发明的抗体,分离编码其的核酸(例如,cDNA或基因组DNA),并将其插入到可复制载体中用于进一步克隆(DNA的扩增)或用于表达。编码抗体的DNA很容易采用常规程序分离并进行测序(例如,通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。许多载体是可用的。载体的选择部分地取决于所使用的宿主细胞。一般地,优选的宿主细胞是原核生物或真核生物(通常是哺乳动物)来源的。

[0425] 载体可例如呈质粒、粘粒、病毒颗粒或噬菌体的形式。可以通过多种程序将适当的核酸序列插入到载体中。一般来说,采用本领域中已知的技术将DNA插入到适当的限制性内切核酸酶位点。载体组件通常包括但不限于信号序列、复制起点、一种或多种标志基因、增强子元件、启动子和转录终止序列中的一者或多者。构建含有这些组件中的一者或多者的合适载体采用技术人员已知的标准连接技术。GPC3不仅可以直接重组产生,还可以作为与异源多肽的融合多肽产生,所述异源多肽可以是信号序列或在成熟蛋白质或多肽的N末端具有特定切割位点的其它多肽。一般来说,信号序列可以是载体的组件,或者其可以是插入到载体中的编码抗GPC3抗体的DNA的一部分。信号序列可以是选自例如碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp或热稳定肠毒素II前导序列的原核信号序列。对于酵母分泌,信号序列可以是例如酵母转化酶前导序列、 α 因子前导序列(包括酵母菌属和克鲁维酵母属 α -因子前导序列,后者描述于美国专利第5,010,182号中)或酸性磷酸酶前导序列、白色念珠菌葡萄糖淀粉酶前导序列(1990年4月4日公布的EP 362,179)或1990年11月15日公布的WO 90/13646中描述的信号。在哺乳动物细胞表达中,哺乳动物信号序列可用于指导蛋白质的分泌,如来自相同或相关物种的分泌多肽的信号序列以及病毒分泌前导序列。

[0426] a. 原核宿主细胞

[0427] 可以采用标准重组技术获得编码本发明的抗体的多肽组件的多核苷酸序列。可以从产生抗体的细胞如杂交瘤细胞中分离所需的多核苷酸序列并进行测序。或者,可以采用

核苷酸合成仪或PCR技术来合成多核苷酸。一旦获得,将编码多肽的序列插入到能够在原核宿主中复制和表达异源多核苷酸的重组载体中。本领域中可获得且已知的许多载体可用于本发明的目的。适当载体的选择将主要取决于要插入到载体中的核酸的大小以及要用载体转化的特定宿主细胞。每种载体都含有各种组件,这取决于其功能(异源多核苷酸的扩增或表达,或两者)及其与其所在的特定宿主细胞的相容性。

[0428] 一般来说,含有复制子和来源于与宿主细胞相容的物种的对照序列的质粒载体与这些宿主结合使用。表达载体和克隆载体均含有使载体能够在一种或多种选定的宿主细胞中复制的核酸序列以及能够在转化细胞中提供表型选择的标志序列。对于多种细菌、酵母和病毒来说,这类序列是熟知的。来自质粒pBR322的复制起点含有编码氨苄青霉素(Amp)和四环素(Tet)抗性的基因,因此提供了确认转化细胞的简单方法,其适用于大多数革兰氏阴性细菌,2 μ 质粒起点适用于酵母,且各种病毒起点(SV40、多瘤、腺病毒、VSV或BPV)可用于在哺乳动物细胞中克隆载体。pBR322、其衍生物或其它微生物质粒或噬菌体也可以含有或被修饰为含有可被微生物用于表达内源蛋白质的启动子。Carter等人,美国专利第5,648,237号中详细描述了用于表达特定抗体的pBR322衍生物的实例。

[0429] 此外,含有复制子和与宿主微生物相容的对照序列的噬菌体载体可与这些宿主结合用作转化载体。例如,可利用噬菌体如 λ O E MTM-11来制备重组载体,该重组载体可用于转化易感宿主细胞如大肠杆菌LE392。

[0430] 本发明的表达载体可包含两个或更多个启动子-顺反子对,编码多肽组件中的每一者。启动子是位于调节其表达的顺反子上游(5')的非翻译调控序列。原核启动子通常分成两类,即诱导型和组成型。诱导型启动子是响应培养条件的变化(例如营养物质的存在或不存在或温度的变化)而在其控制下启动顺反子的转录水平增加的启动子。

[0431] 由多种潜在宿主细胞识别的大量启动子是熟知的。经由限制性酶消化从源DNA中移除启动子并将分离的启动子序列插入到本发明的载体中,由此可以将选定的启动子与编码轻链或重链的顺反子DNA可操作地连接。天然启动子序列和许多异源启动子均可用于指导靶基因的扩增和/或表达。在一些实施方案中,利用异源启动子,因为与天然靶多肽启动子相比,它们通常允许表达的靶基因转录更多且产量更高。

[0432] 由多种潜在宿主细胞识别的启动子是熟知的。适合与原核宿主一起使用的启动子包括PhoA启动子、 β -半乳糖苷酶和乳糖启动子系统[Chang等人,Nature,275:615(1978); Goeddel等人,Nature,281:544(1979)]、碱性磷酸酶、色氨酸(trp)启动子系统[Goeddel, Nucleic Acids Res.,8:4057(1980); EP 36,776]和杂交启动子,如tac[deBoer等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,80:21-25(1983)]或trc启动子。用于细菌系统的启动子还将含有与编码抗GPC3抗体的DNA可操作连接的Shine-Dalgarno(S.D.)序列。然而,在细菌中起作用的其它启动子(如其它已知的细菌或噬菌体启动子)也是合适的。它们的核苷酸序列已经公布,从而使技术人员能够使用接头或衔接子可操作地将它们与编码靶轻链和重链的顺反子连接(Siebenlist等人,(1980)Cell 20:269),以提供任何所需的限制性位点。

[0433] 在本发明的一个方面,重组载体内的每个顺反子包含指导表达的多肽跨膜易位的分泌信号序列组件。一般来说,信号序列可以是载体的组件,或者其可以是插入到载体中的靶多肽DNA的一部分。为了本发明的目的而选择的信号序列应当是被宿主细胞识别和加工(即被信号肽酶切割)的信号序列。对于不识别和加工对于异源多肽天然的信号序列的原核

宿主细胞,信号序列被选自例如由碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp或热稳定肠毒素II (STII) 前导序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA和MBP组成的组的原核信号序列取代。在本发明的一个实施方案中,表达系统的两个顺反子中使用的信号序列是STII信号序列或其变体。

[0434] 另一方面,根据本发明的免疫球蛋白的产生可以在宿主细胞的细胞质中发生,因此不需要在每个顺反子内存在分泌信号序列。在这方面,免疫球蛋白轻链和重链在细胞质内表达、折叠和组装以形成功能性免疫球蛋白。某些宿主菌株(例如,大肠杆菌trxB-菌株)提供有利于二硫键形成的细胞质条件,从而允许表达的蛋白质亚基的正确折叠和组装。Proba和Pluckthun *Gene*,159:203(1995)。

[0435] 本发明提供了一种表达系统,其中可以调节表达的多肽组件的数量比,以便使分泌的和正确组装的本发明的抗体的产量最大化。这种调节至少部分地通过同时调节多肽组件的翻译强度来完成。Simmons等人,美国专利第5,840,523号中公开了一种调节翻译强度的技术。其利用顺反子内的翻译起始区(TIR)的变体。对于给定的TIR,可以产生具有一定范围的翻译强度的一系列氨基酸或核酸序列变体,从而提供方便的方法来调节此因子以获得特定链的所需表达水平。可以通过常规诱变技术产生TIR变体,其导致可以改变氨基酸序列的密码子变化,尽管核苷酸序列中的沉默变化是优选的。TIR的改变可包括例如Shine-Dalgarno序列的数量或间隔的改变以及信号序列的改变。产生突变信号序列的一种方法是在编码序列的开头产生“密码子库”,其不改变信号序列的氨基酸序列(即,变化是沉默的)。这可以通过改变每个密码子的第三核苷酸位置来实现;另外,一些氨基酸如亮氨酸、丝氨酸和精氨酸具有多个第一和第二位置,这可能增加制备库的复杂性。Yansura等人,(1992) *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4:151-158中详细描述了这种诱变方法。

[0436] 优选地,为其中的每个顺反子产生具有一定范围的TIR强度的一组载体。这个有限组提供了每条链的表达水平以及在各种TIR强度组合下所需抗体产物的产量的比较。如Simmons等人,美国专利第5,840,523号中详述,可以通过量化报告基因的表达水平来确定TIR强度。基于翻译强度比较,选择所需的单个TIR以在本发明的表达载体构建体中进行组合。

[0437] b. 真核宿主细胞

[0438] 载体组件通常包括但不限于以下中的一者或多者:信号序列、复制起点、一种或多种标志基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0439] (1) 信号序列组件

[0440] 用于真核宿主细胞的载体也可以含有在所关注的成熟蛋白质或多肽的N末端具有特异性切割位点的信号序列或其它多肽。选择的异源信号序列优选为被宿主细胞识别和加工(即,被信号肽酶切割)的异源信号序列。在哺乳动物细胞表达中,哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列(例如,单纯疱疹gD信号)是可用的。将这类前体区的DNA在阅读框中与编码抗体的DNA连接。

[0441] (2) 复制起点

[0442] 一般地,哺乳动物表达载体不需要复制起点组件。例如,通常可以使用SV40起点,仅因为其含有早期启动子。

[0443] (3) 选择基因组件

[0444] 表达载体和克隆载体通常含有选择基因,也称为可选择标志物。典型的选择基因

编码蛋白质,所述蛋白质(a)赋予对抗生素或其它毒素例如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素的抗性,(b)补充营养缺陷型缺陷,或(c)提供不能从复杂培养基中获得的关键营养物质,例如编码杆菌的D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0445] 选择方案的一个实例利用药物来抑制宿主细胞的生长。用异源基因成功转化的那些细胞产生赋予耐药性的蛋白质,因此在选择方案中存活下来。这种显性选择的实例使用药物新霉素、麦考酚酸和潮霉素。

[0446] 用于哺乳动物细胞的合适可选择标志物的实例是能够确认有能力摄取编码抗GPC3抗体的核酸的细胞的那些,如DHFR或胸苷激酶、金属硫蛋白-I和-II,优选灵长类动物金属硫蛋白基因、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。当使用野生型DHFR时适当的宿主细胞是DHFR活性缺陷的CHO细胞系(例如,ATCC CRL-9096),其制备和繁殖如Urlaub等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216(1980)所述。例如,首先通过在含有作为DHFR的竞争性拮抗剂的甲氨蝶呤(Mtx)的培养基中培养所有转化体来确认用DHFR选择基因转化的细胞。或者,可以通过在含有用于可选择标志物的选择剂(如氨基糖苷抗生素,例如卡那霉素、新霉素或G418)的培养基中的细胞生长来选择用编码抗体、野生型DHFR蛋白和另一种可选择标志物如氨基糖苷3'-磷酸转移酶(APH)的DNA序列转化或共转化的宿主细胞(特别是含有内源性DHFR的野生型宿主)。参见美国专利第4,965,199号。

[0447] 用于酵母的合适选择基因是酵母质粒YRp7中存在的trp1基因[Stinchcomb等人,Nature,282:39(1979);Kingsman等人,Gene,7:141(1979);Tschemper等人,Gene,10:157(1980)]。trp1基因为缺乏在色氨酸中生长的能力的酵母突变株例如ATCC No.44076或PEP4-1提供了选择标志物[Jones,Genetics,85:12(1977)]。

[0448] (4) 启动子组件表达

[0449] 克隆载体通常含有与编码抗GPC3抗体的核酸序列可操作连接的启动子以指导mRNA合成。由多种潜在宿主细胞识别的启动子是熟知的。

[0450] 几乎所有的真核基因都具有位于转录起始位点上游大约25至30个碱基处的富含AT的区域。在许多基因的转录起点上游70-80个碱基处存在的另一个序列是CNCAAT区域,其中N可以是任意核苷酸。在大多数真核基因的3'端是AATAAA序列,该序列可能是将聚A尾添加至编码序列的3'端的信号。所有这些序列都被合适地插入到真核表达载体中。

[0451] 与酵母宿主一起使用的合适启动序列的实例包括用于3-磷酸甘油酸激酶的启动子[Hitzeman等人,J.Biol.Chem.,255:2073(1980)]或其它糖酵解酶[Hess等人,J.Adv.Enzyme Reg.,7:149(1968);Holland,Biochemistry,17:4900(1978)],如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡糖激酶。

[0452] 具有转录受生长条件控制的另外的优点的作为诱导型启动子的其它酵母启动子有醇脱氢酶2、异细胞色素C、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶以及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。用于酵母表达的合适载体和启动子进一步描述于EP 73,657中。

[0453] 抗GPC3抗体从哺乳动物宿主细胞中的载体转录例如受启动子的控制,所述启动子得自病毒如多瘤病毒、禽痘病毒(1989年7月5日公布的UK 2,211,504)、腺病毒(如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猿猴病毒40

(SV40)的基因组、得自异源哺乳动物启动子(例如,肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子)和得自热休克启动子,只要这类启动子与宿主细胞系统是相容的。

[0454] SV40病毒的早期和晚期启动子作为SV40限制性片段方便地获得,所述片段还含有SV40病毒复制起点。人巨细胞病毒的立即早期启动子作为HindIII E限制性片段方便地获得。美国专利第4,419,446号中公开了使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达DNA的系统。美国专利第4,601,978号中描述了对此系统的修改。关于在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下人 β -干扰素cDNA在小鼠细胞中的表达,还参见Reyes等人,Nature 297:598-601(1982)。或者,可以使用劳斯肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

[0455] (5) 增强子元件组件

[0456] 可以通过将增强子序列插入到载体中来增加高等真核生物对编码抗GPC3抗体的DNA的转录。增强子是DNA的顺式作用元件,通常约为10至300bp,作用于启动子以增加其转录。现在已知许多增强子序列来自哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)。然而,通常将使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括复制起点晚期侧的SV40增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点晚期侧的多瘤增强子和腺病毒增强子。关于用于激活真核启动子的增强元件,还参见Yaniv,Nature 297:17-18(1982)。增强子可以在抗GPC3抗体编码序列的位置5'或3'处剪接到载体中,但优选位于启动子的位点5'处。

[0457] (6) 转录终止组件

[0458] 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其他多细胞生物体的有核细胞)的表达载体还将含有终止转录和稳定mRNA所必需的序列。这类序列通常可从真核或病毒DNA或cDNA的5'非翻译区获得,有时从3'非翻译区获得。这些区域含有在编码抗GPC3抗体的mRNA的非翻译部分中转录为聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止组件是牛生长激素聚腺苷酸化区域。参见W094/11026和其中公开的表达载体。

[0459] Gething等人,Nature,293:620-625(1981);Mantei等人,Nature,281:40-46(1979);EP 117,060;和EP 117,058中描述了适合于在重组脊椎动物细胞培养物中合成抗GPC3抗体的更多其它方法、载体和宿主细胞。

[0460] 4. 培养宿主细胞

[0461] 可以在多种培养基中培养用于产生本发明的抗GPC3抗体的宿主细胞。

[0462] a. 原核宿主细胞

[0463] 在本领域中已知且适合培养选定的宿主细胞的培养基中生长用于产生本发明的多肽的原核细胞。合适培养基的实例包括luria肉汤(LB)加上必要的营养补充物。在一些实施方案中,培养基还含有基于表达载体的构建而选择的选择剂,以选择性地允许含有表达载体的原核细胞的生长。例如,将氨苄青霉素添加到培养基中,用于表达氨苄青霉素抗性基因的细胞的生长。

[0464] 除了碳源、氮源和无机磷酸盐源之外,还可以以适当的浓度包括任何必要的补充物,它们单独引入或作为与另一种补充物或培养基(如复合氮源)的混合物引入。任选地,培养基可含有选自谷胱甘肽、半胱氨酸、胱胺、硫代乙醇酸盐、二硫赤藓糖醇和二硫苏糖醇的一种或多种还原剂。

[0465] 在合适的温度下培养原核宿主细胞。例如对于大肠杆菌生长,优选的温度范围是

约20℃至约39℃,更优选约25℃至约37℃,甚至更优选为约30℃。培养基的pH可以是约5至约9范围内的任何pH,主要取决于宿主生物体。对于大肠杆菌,pH优选为约6.8至约7.4,更优选为约7.0。

[0466] 如果在本发明的表达载体中使用诱导型启动子,则在适合启动子激活的条件下诱导蛋白质表达。在本发明的一方面,PhoA启动子用于控制多肽的转录。因此,将转化的宿主细胞在磷酸盐限制培养基中培养以进行诱导。优选地,磷酸盐限制培养基是C.R.A.P培养基(参见例如Simmons等人,J.Immunol.Methods(2002),263:133-147)。如本领域中已知,根据所采用的载体构建体,可以使用多种其它诱导物。

[0467] 在一个实施方案中,本发明的表达多肽被分泌到宿主细胞的周质中并从中回收。蛋白质回收通常涉及破坏微生物,通常通过诸如渗透休克、声处理或溶解的方式。一旦细胞被破坏,可以通过离心或过滤移除细胞碎片或整个细胞。例如可以通过亲和树脂色谱法进一步纯化蛋白质。或者,可以将蛋白质转运到培养基中,并在其中进行分离。可以从培养物中取出细胞,过滤并浓缩培养物上清液以进一步纯化所产生的蛋白质。可以采用通常已知的方法如聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和蛋白质印迹测定进一步分离和确认表达的多肽。

[0468] 在本发明的一方面,通过发酵过程大量进行抗体产生。各种大规模补料分批发酵程序可用于重组蛋白的产生。大规模发酵具有至少1000升的容量,优选约1,000至100,000升的容量。这些发酵罐使用搅拌叶轮来分配氧气和营养物,特别是葡萄糖(优选的碳/能源)。小规模发酵通常是指在体积容量不超过大约100升的发酵罐中发酵,并且可以在约1升至约100升的范围内。

[0469] 在发酵过程中,蛋白质表达的诱导通常在细胞于合适的条件下生长至所需密度(例如,约180-220的OD₅₅₀)之后开始,在此阶段细胞处于早期稳定期。如本领域中已知和上文所述,根据所采用的载体构建体,可以使用多种诱导物。细胞在诱导之前可以生长较短的时段。通常诱导细胞约12-50小时,尽管可以使用更长或更短的诱导时间。

[0470] 为了提高本发明的多肽的产量和质量,可以改变各种发酵条件。例如,为了改善分泌的抗体多肽的正确组装和折叠,可以使用过表达伴侣蛋白如Dsb蛋白(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD和或DsbG)或FkpA(具有伴侣活性的肽基脯氨酰顺、反异构酶)的另外的载体来共转化宿主原核细胞。已证明伴侣蛋白促进在细菌宿主细胞中产生的异源蛋白的正确折叠和溶解性。Chen等人,(1999)J Bio Chem 274:19601-19605;Georgiou等人,美国专利第6,083,715号;Georgiou等人,美国专利第6,027,888号;Bothmann和Pluckthun(2000)J.Biol.Chem.275:17100-17105;Ramm和Pluckthun(2000)J.Biol.Chem.275:17106-17113;Arie等人,(2001)Mol.Microbiol.39:199-210。

[0471] 为了最小化表达的异源蛋白(特别是蛋白水解敏感的那些)的蛋白水解,本发明可以使用某些缺乏蛋白水解酶的宿主菌株。例如,可以修饰宿主细胞菌株以实现编码已知细菌蛋白酶如蛋白酶III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶I、蛋白酶Mi、蛋白酶V、蛋白酶VI及其组合的基因中的基因突变。一些大肠杆菌蛋白酶缺陷型菌株是可用的,并且描述于例如Joly等人,(1998),同上;Georgiou等人,美国专利第5,264,365号;Georgiou等人,美国专利第5,508,192号;Hara等人,Microbial Drug Resistance,2:63-72(1996)中。

[0472] 在一个实施方案中,缺乏蛋白水解酶并用过表达一种或多种伴侣蛋白的质粒转化的大肠杆菌菌株用作本发明的表达系统中的宿主细胞。

[0473] b.真核宿主细胞

[0474] 市售的培养基如哈姆F10 (Sigma)、最小必需培养基 ((MEM), Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) 和杜氏改良伊格尔培养基 ((DMEM), Sigma) 适合培养宿主细胞。此外, Ham等人, Meth. Enz. 58:44 (1979); Barnes等人, Anal. Biochem. 102:255 (1980); 美国专利第4,767,704号、第4,657,866号、第4,927,762号、第4,560,655号或第5,122,469号; WO 90/03430; WO 87/00195; 或美国专利Re. 30,985中描述的任何培养基均可用作宿主细胞的培养基。这些培养基中的任一者都可以根据需要补充激素和/或其它生长因子(如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲液(如HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如GENTAMYCINTM药物)、微量元素(定义为通常以微摩尔范围的最终浓度存在的无机化合物)和葡萄糖或等效的能量源。还可以以本领域技术人员已知的适当浓度包括任何其它必要的补充物。培养条件如温度、pH等是先前选择用于表达的宿主细胞所采用的那些条件, 并且对普通技术人员来说是显而易见的。

[0475] 5. 检测基因扩增/表达

[0476] 可以直接测量样品中的基因扩增和/或表达, 例如通过常规的Southern印迹、Northern印迹来定量mRNA的转录[Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]、斑点印迹(DNA分析)或原位杂交, 基于本文提供的序列使用适当标记的探针。或者, 可以采用能够识别特定双链体的抗体, 包括DNA双链体、RNA双链体和DNA-RNA杂交双链体或DNA-蛋白质双链体。抗体又可以被标记, 并且可以在双链体与表面结合的情况下进行测定, 使得在表面上形成双链体时, 可以检测与双链体结合的抗体的存在。或者可以通过免疫学方法测量基因表达, 如细胞或组织切片的免疫组织化学染色以及细胞培养物或体液的测定, 以直接定量基因产物的表达。可用于免疫组织化学染色和/或样品流体测定的抗体可以是单克隆的或多克隆的, 并且可以在任何哺乳动物中制备。方便地, 可以针对天然序列GPC3多肽或针对基于本文提供的DNA序列的合成肽或针对与GPC3 DNA融合并编码特定抗体表位的外源序列来制备抗体。

[0477] 6. 抗GPC3抗体的纯化

[0478] 可以从培养基或从宿主细胞裂解物中回收抗GPC3抗体的形式。如果是膜结合的, 则可以使用合适的洗涤剂溶液(例如Triton-X 100)或通过酶促切割将其从膜中释放出来。可以通过各种物理或化学方式破坏用于表达抗GPC3抗体的细胞, 如冻融循环、声处理、机械破坏或细胞裂解剂。

[0479] 可能需要从重组细胞蛋白或多肽中纯化抗GPC3抗体。以下程序是合适的纯化程序的示例: 通过在离子交换柱上分级; 乙醇沉淀; 反相HPLC; 硅胶或阳离子交换树脂如DEAE色谱法; 色谱聚焦; SDS-PAGE; 硫酸铵沉淀; 使用例如Sephadex G-75的凝胶过滤; 蛋白A琼脂糖凝胶柱, 用以移除污染物, 如IgG; 和金属螯合柱, 用以结合带表位标签形式的抗GPC3抗体。

[0480] 可以采用蛋白质纯化的各种方法, 这类方法是本领域中已知的, 并且描述于例如Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982) 中。选择的纯化步骤将取决于例如所采用的产生方法的性质和所产生的特定抗GPC3抗体。

[0481] 当采用重组技术时, 抗体可以在细胞内、周质空间中产生, 或直接分泌到培养基中。如果抗体在细胞内产生, 作为第一步, 例如通过离心或超滤移除颗粒碎片, 无论是宿主

细胞还是溶解片段。Carter等人, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) 描述了分离分泌到大肠杆菌的周质空间的抗体的程序。简言之,在乙酸钠 (pH 3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟 (PMSF) 的存在下将细胞糊解冻超过约30分钟。可以通过离心移除细胞碎片。在抗体分泌到培养基中的情况下,通常首先使用市售的蛋白质浓缩过滤器(例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元)浓缩来自这类表达系统的上清液。在任何前述步骤中可以包括蛋白酶抑制剂,如PMSF,以抑制蛋白水解,并且可以包括抗生素以阻止外来污染物的生长。

[0482] 可以采用例如羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析和亲和色谱法来纯化由细胞制备的抗体组合物,其中亲和色谱法是优选的纯化技术。作为亲和配体的蛋白A的适用性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。蛋白A可用于纯化基于人 γ 1、 γ 2或 γ 4重链的抗体(Lindmark等人, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983))。蛋白G被推荐用于所有小鼠同种型和人 γ 3 (Guss等人, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986))。亲和配体连接的基质最常见的是琼脂糖,但其它基质也是可用的。机械稳定的基质如受控孔玻璃或聚(苯乙烯-二乙烯基)苯允许实现比用琼脂糖更快的流速和更短的处理时间。在抗体包含CH3结构域的情况下, Bakerbond ABX™树脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) 可用于纯化。根据要回收的抗体,其它蛋白质纯化技术也是可用的,如离子交换柱分级、乙醇沉淀、反相HPLC、硅胶色谱法、肝素SEPHAROSE™色谱法、阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸柱)色谱法、色谱聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀。

[0483] 在任何初步纯化步骤之后,可以使包含所关注的抗体和污染物的混合物经历低pH疏水相互作用色谱法,使用pH在约2.5-4.5之间的洗脱缓冲液,优选在低盐浓度(例如,约0-0.25M盐)下进行。

[0484] G. 药物制剂

[0485] 可通过适合于要治疗的病状的任何途径施用本发明的抗体。抗体通常将肠胃外施用,即输注、皮下、肌内、静脉内、皮内、鞘内和硬膜外。

[0486] 为了治疗这些癌症,在一个实施方案中,经由静脉内输注施用抗体。经由输注施用的剂量在每剂约 $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至约 $10,000\mu\text{g}/\text{m}^2$ 的范围内,通常每周一剂,总共一剂、两剂、三剂或四剂。或者,剂量范围是约 $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至约 $1000\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、约 $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至约 $800\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、约 $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至约 $600\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、约 $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至约 $400\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、约 $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至约 $500\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、约 $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至约 $300\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、约 $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至约 $200\mu\text{g}/\text{m}^2$ 和约 $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至约 $200\mu\text{g}/\text{m}^2$ 。剂量的施用可以是每天一次、每周一次、每周多次但少于每天一次、每月多次但少于每天一次、每月多次但少于每周一次、每月一次或间歇施用,以缓解或减轻疾病的症状。可以以任何公开的时间间隔持续施用,直到所治疗的肿瘤或癌症的症状缓解。在实现症状缓解或减轻之后可以继续施用,其中通过这种持续的施用延长这种缓解或减轻。

[0487] 本发明还提供治疗乳腺癌的方法,包括对罹患乳腺癌的患者施用治疗有效量的前述实施方案中任一项的人源化GPC3抗体。抗体将通常以约 $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至约 $1000\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量范围施用。

[0488] 一方面,本发明进一步提供包含至少一种本发明的抗GPC3抗体的药物制剂。在一些实施方案中,药物制剂包含(1)本发明的抗体和(2)药学上可接受的载剂。

[0489] 通过将具有所需纯度的抗体与任选的药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂混合来制备包含根据本发明使用的抗GPC3抗体的治疗制剂,用于以冻干制剂或水溶液的形式储

存(Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.编著(1980))。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,并且包括缓冲剂,如乙酸盐、Tris、磷酸盐、柠檬酸盐及其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖及其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;张力调节剂,如海藻糖和氯化钠;糖类,如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;表面活性剂,如聚山梨醇酯;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如**TWEEN®**、**PLURONICS®**或聚乙二醇(PEG)。要用于体内施用的药物制剂通常是无菌的。这很容易通过无菌过滤膜过滤来实现。

[0490] 活性成分也可以被截留在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如分别在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)中或在粗乳剂中的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.编著(1980)中公开了这类技术。

[0491] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质呈成形制品的形式,例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)或聚(乙烯醇))、聚丙交酯(美国专利第3,773,919号)、L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酸盐的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如**LUPRONDEPOT®**(由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林组成的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸的聚合物能够释放分子超过100天,但某些水凝胶释放蛋白质的时间段较短。当包封的免疫球蛋白在体内长时间停留时,它们可能会因暴露于37°C的湿气而变性或聚集,导致生物活性丧失并且免疫原性可能发生变化。根据所涉及的机制,可以设计合理的稳定化策略。例如,如果发现聚集机制是通过硫代-二硫化物交换形成分子间S-S键,则可以通过修饰巯基残基、从酸性溶液中冻干、控制水分含量、使用适当的添加剂以及开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定化。

[0492] 可以以用于递送至靶细胞/组织的任意合适的形式配制抗体。例如,可以将抗体配制为免疫脂质体。“脂质体”是由各种类型的脂质、磷脂和/或表面活性剂组成的小囊泡,其可用于将药物递送至哺乳动物。脂质体的组分通常以双层阵型排列,类似于生物膜的脂质排列。通过本领域中已知的方法制备含有抗体的脂质体,如Epstein等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:3688(1985);Hwang等人,Proc.Natl Acad.Sci.USA 77:4030(1980);美国专利第4,485,045号和第4,544,545号;以及1997年10月23日公布的W097/38731中所述。具有延长的循环时间的脂质体公开于美国专利第5,013,556号中。

[0493] 特别有用的脂质体可通过反相蒸发方法用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物产生。将脂质体挤出通过限定孔径的过滤器,以产生具有所需直径的脂质体。本发明的抗体的Fab'片段可经由二硫键交换反应与如Martin等人,J.Biol.Chem.257:286-288(1982)中所述的脂质体缀合。脂质体内任选含有化疗剂。参

见Gabizon等人,J.National Cancer Inst.81(19):1484(1989)。

[0494] 要用于体内施用的制剂必须是无菌的。这很容易通过无菌过滤膜过滤来实现。

[0495] H.用抗GPC3抗体治疗

[0496] 为了确定癌症中的GPC3表达,各种检测测定法都是可用的。在一个实施方案中,可以通过免疫组织化学(IHC)来分析GPC3多肽过表达。可以对来自肿瘤活检的石蜡包埋组织切片进行IHC测定,并符合GPC3蛋白染色强度标准。在优选的实施方案中,确定癌症是否适合通过本文公开的方法治疗涉及检测受试者中或来自受试者的样品中GPC3肿瘤表位的存在。

[0497] 或者或另外,可以对福尔马林固定的石蜡包埋肿瘤组织进行FISH测定,如INFORM®(由Ventana,Arizona出售)或PATHVISION®(Vysis,Illinois),以确定肿瘤中GPC3过表达的程度(如果有的话)。

[0498] 可以采用体内检测测定来评估GPC3过表达或扩增,例如通过施用结合要检测的分子并用可检测标记(例如,放射性同位素或荧光标记)进行标记的分子(如抗体),并对患者进行外部扫描以定位标记。如上所述,本发明的抗GPC3抗体具有各种非治疗应用。本发明的抗GPC3抗体可用于对表达GPC3表位的癌症进行分期(例如,在放射成像中)。抗体还可用于从细胞中纯化或免疫沉淀GPC3表位,用于体外检测和定量GPC3表位,例如在ELISA或蛋白质印迹中,以从混合细胞群中杀伤和消除表达GPC3的细胞,作为纯化其它细胞的一个步骤。

[0499] 目前,根据癌症的阶段,癌症治疗涉及以下疗法之一或组合:手术切除癌性组织、放射疗法和化学疗法。抗GPC3抗体疗法对于不能很好地耐受化学疗法的毒性和副作用的老年患者以及放射疗法的有效性有限的转移性疾病可能是特别理想的。本发明的肿瘤靶向抗GPC3抗体可用于在疾病的初始诊断后或复发期间减轻表达GPC3的癌症。

[0500] 根据已知的方法,如静脉内施用,例如作为推注或通过经一段时间连续输注、通过肌内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入途径将抗GPC3抗体施用于人患者。抗体的静脉内或皮下施用是优选的。

[0501] 本发明的抗体组合物将以符合良好医学实践的方式配制、给药和施用。在此背景下考虑的因素包括所治疗的特定病症、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床状况、病症的原因、药剂的递送部位、施用的方法、施用的时间安排以及执业医师已知的其它因素。

[0502] 为了预防或治疗疾病,施用的剂量和方式将由医师根据已知的标准来选择。抗体的适当剂量将取决于如上文所定义要治疗的疾病的类型、疾病的严重程度和病程、施用抗体是用于预防还是治疗目的、既往治疗、患者的临床病史和对抗体的反应以及主治医师的判断。一次性或经一系列治疗对患者合适地施用抗体。优选地,通过静脉内输注或通过皮下注射施用抗体。根据疾病的类型和严重程度,约1 μ g/kg至约50mg/kg体重(例如,约0.1-15mg/kg/剂)的抗体可以是对患者施用的初始候选剂量,无论例如是通过一次或多次单独施用还是通过连续输注。给药方案可包括施用约4mg/kg的初始负荷剂量,接着施用约2mg/kg抗GPC3抗体的每周维持剂量。然而,其它给药方案也可能是有用的。典型的日剂量可以在约1 μ g/kg至100mg/kg或更高的范围内,这取决于上面提到的因素。对于经几天或更长时间的重复施用,根据病情,持续进行治疗,直到出现所需的疾病症状的抑制。这种治疗的进展可以很容易地通过常规的方法和测定并基于医生或本领域其他技术人员已知的标准来监测。

[0503] 本发明的抗GPC3抗体可以呈本文“抗体”的定义所涵盖的不同形式。因此,抗体包括全长或完整抗体、抗体片段、天然序列抗体或氨基酸变体、人源化、嵌合或融合抗体及其功能片段。在融合抗体中,抗体序列与异源多肽序列融合。可以在Fc区中修饰抗体以提供所需的效应子功能。如本文的章节中更详细地讨论,利用适当的Fc区,结合在细胞表面上的裸抗体可以诱导细胞毒性,例如经由抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或通过在补体依赖性细胞毒性中募集补体或一些其它机制。或者,在需要消除或降低效应子功能以便最小化副作用或治疗并发症的情况下,可以使用某些其它Fc区。

[0504] 在一个实施方案中,抗体(i)与本发明的抗体竞争结合相同的表位,和/或(ii)与本发明的抗体基本上结合相同的表位。还考虑了具有本发明的抗GPC3抗体的生物学特性的抗体,具体包括体内肿瘤靶向和任何细胞增殖抑制或细胞毒性特性。

[0505] 本发明的抗GPC3抗体可用于治疗哺乳动物中表达GPC3的癌症或减轻所述癌症的一种或多种症状。所述癌症涵盖本文所述的任何癌症的转移性癌症。所述抗体能够与表达哺乳动物中的GPC3表位的癌细胞的至少一部分结合。在优选的实施方案中,所述抗体在与细胞上的GPC3表位结合后在体外或体内有效破坏或杀伤表达GPC3的肿瘤细胞或抑制这类肿瘤细胞的生长。在其它优选的实施方案中,所述抗体有效地(i)抑制它们所结合的细胞的生长或增殖;(ii)诱导它们所结合的细胞死亡;(iii)抑制它们所结合的细胞的分层;(iv)抑制它们所结合的细胞的转移;或(v)抑制包含它们所结合的细胞的肿瘤的血管形成。

[0506] 本发明提供了包含本发明的抗GPC3抗体和载剂的组合物。本发明还提供了包含本发明的抗GPC3抗体和载剂的制剂。在一个实施方案中,所述制剂是包含药学上可接受的载剂的治疗制剂。

[0507] 本发明的另一方面是编码抗GPC3抗体的分离的核酸。涵盖编码H链和L链且特别是高变区残基的核酸、编码天然序列抗体以及抗体的变体、修饰和人源化形式的链。

[0508] 本发明还提供了可用于治疗哺乳动物中表达GPC3多肽的癌症或减轻所述癌症的一种或多种症状的方法,包括对哺乳动物施用治疗有效量的抗GPC3抗体。根据医生指导,可以短期(急性)或长期或间歇施用抗体治疗组合物。还提供了抑制表达GPC3多肽的细胞生长和杀伤表达GPC3多肽的细胞的方法。

[0509] 本发明还提供了包含至少一种抗GPC3抗体的试剂盒和制品。含有抗GPC3抗体的试剂盒可用于GPC3细胞杀伤测定、用于从细胞中纯化或免疫沉淀GPC3多肽。例如,为了分离和纯化GPC3,试剂盒可含有与珠粒(例如,琼脂糖珠粒)偶联的抗GPC3抗体。可以提供含有用于体外检测和定量GPC3的抗体的试剂盒,例如在ELISA或蛋白质印迹或IHC测定中(本文更详细地描述)。可用于检测的这类抗体可带有标记,如荧光标记或放射性标记。

[0510] 效应子功能工程化

[0511] 可能期望在效应子功能方面修饰本发明的抗体,例如以便增强抗体的抗原依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。这可以通过在抗体的Fc区中引入一个或多个氨基酸取代来实现。

[0512] 或者或另外,可以在Fc区中引入半胱氨酸残基,从而允许在此区域中形成链间二硫键。如此产生的同型二聚抗体可具有改善的内化能力和/或增加的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。参见Caron等人,J.Exp Med.176:1191-1195(1992)和Shopes,B.J.Immunol.148:2918-2922(1992)。也可以使用如Wolff等人,Cancer Research

53:2560-2565 (1993) 中所述的异双功能交联剂制备具有增强的抗肿瘤活性的同型二聚抗体。或者, 可以对抗体进行工程化, 使其具有双Fc区, 从而可以具有增强的补体裂解和ADCC能力。参见Stevenson等人, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)。为了增加抗体的血清半衰期, 可以将补救受体结合表位并入到抗体 (特别是抗体片段) 中, 例如如美国专利 5,739,277 中所述。如本文所用, 术语“补救受体结合表位”是指IgG分子 (例如, IgG1、IgG2、IgG3或IgG4) 的Fc区的表位, 其负责增加IgG分子的体内血清半衰期。

[0513] 用CAR修饰的免疫细胞治疗

[0514] 在某些实施方案中, 本发明涉及用于治疗癌症的组合物和方法, 所述癌症包括但不限于血液恶性肿瘤和实体肿瘤。在某些实施方案中, 使用CAR修饰的免疫细胞。CAR-T细胞可治疗性地用于罹患非血液肿瘤的患者, 如由乳腺、CNS和皮肤恶性肿瘤引起的实体肿瘤。在某些实施方案中, CAR-NK细胞可治疗性地用于罹患多种恶性肿瘤中的任一种的患者。在某些实施方案中, 本发明涉及经转导以表达嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞或NK细胞的过继细胞转移策略。CAR是将基于抗体的针对所需抗原 (例如, 肿瘤抗原) 的特异性与例如T细胞受体激活细胞内结构域相结合以产生表现出特异性抗肿瘤细胞免疫活性的嵌合蛋白的分子。

[0515] 一方面, 本发明涉及经基因修饰以稳定表达所需CAR的NK细胞的用途。表达CAR的NK细胞在本文中被称为CAR-NK细胞或CAR修饰的NK细胞。优选地, 可以对细胞进行基因修饰以在其表面上稳定地表达抗体结合结构域, 从而赋予新的抗原特异性。产生CAR-NK细胞的方法是本领域中已知的。例如参见Glienke等人, *Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells*, *Front Pharmacol.* 2015;6:21。产生CAR-NK细胞的服务已经商业化。参见例如Creative Biolabs Inc., 45-1 Ramsey Road, Shirley, NY 11967, USA。

[0516] 一方面, 本发明涉及经基因修饰以稳定表达所需CAR的T细胞的用途。表达CAR的T细胞在本文中被称为CAR-T细胞或CAR修饰的T细胞。优选地, 可以对细胞进行基因修饰以在其表面上稳定地表达抗体结合结构域, 从而赋予不依赖于MHC的新的抗原特异性。在一些情况下, T细胞经基因修饰以稳定地表达CAR, CAR将特定抗体的抗原识别结构域与CD3- ζ 链或Fc γ RI蛋白的细胞内结构域结合到单一嵌合蛋白中。

[0517] 在一个实施方案中, 本发明的CAR包含具有抗原识别结构域、跨膜结构域和细胞质结构域的细胞外结构域。在一个实施方案中, 使用与CAR中的结构域之一天然相关的跨膜结构域。在另一实施方案中, 可以通过氨基酸取代来选择或修饰跨膜结构域, 以避免这类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合, 从而最小化与受体复合物的其它成员的相互作用。在一个实施方案中, 跨膜结构域是CD8a铰链结构域。

[0518] 关于细胞质结构域, 本发明的CAR可以被设计为本身包含CD28和/或4-1BB信号传导结构域或与在本发明的CAR的背景下有用的任何其它所需细胞质结构域组合。在一个实施方案中, CAR的细胞质结构域可以被设计为进一步包含CD3- ζ 的信号传导结构域。例如, CAR的细胞质结构域可包括但不限于CD3- ζ 、4-1BB和CD28信号传导模块及其组合。因此, 本发明提供了CAR T细胞及其用于过继治疗的方法。

[0519] 在一个实施方案中, 可以通过将慢病毒载体引入到细胞中来产生本发明的CAR T细胞, 所述慢病毒载体包含所需的CAR, 例如包含抗GPC3、CD8a铰链和跨膜结构域以及人4-1BB和CD3 ζ 信号传导结构域的CAR。本发明的CAR T细胞能够在体内复制, 从而产生长期持续

性,这可导致持续的肿瘤控制。

[0520] 在一个实施方案中,抗GPC3结构域包含重链可变区,该重链可变区包含:

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYAMHWVKQSH

[0521] GKSLEWIGGINPNNGVTTYNQRFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSL
TSEDSAVYYCARGLLWYAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 2)。

[0522] 在一个实施方案中,抗GPC3结构域包含轻链可变区,该轻链可变区包含:

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGK

[0523] SPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYC
LQYDEFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 4)。

[0524] 在一个实施方案中,抗GPC3结构域包含SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4。

[0525] 在一个实施方案中,抗GPC3结构域包含选自以下组成的组的氨基酸序列:EYAMH
(SEQ ID NO:6);GINPNNGVTTYNQRFKG (SEQ ID NO:8);和GLLWYAY (SEQ ID NO:10)。

[0526] 在一个实施方案中,抗GPC3结构域包含选自以下组成的组的氨基酸序列:
KASQDINSYLS (SEQ ID NO:13);RANRLVD (SEQ ID NO:15);和LQYDEFPLT (SEQ ID NO:17)。

[0527] 在一个实施方案中,抗GPC3结构域包含选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ
ID NO:6、8、10;且进一步包含选自SEQ ID NO:13、15、17组成的组的氨基酸序列;

[0528] 在一个实施方案中,本发明涉及采用淋巴细胞输注施用表达CAR的基因修饰的T细胞以治疗患有癌症或有患癌症风险的患者。优选地,在治疗中采用自体淋巴细胞输注。收集来自需要治疗的患者的自体PBMC,并采用本文所述和本领域中已知的方法激活和扩增T细胞,然后输回患者体内。

[0529] 本发明还包括治疗恶性肿瘤或自身免疫性疾病,其中对患者的化学疗法和/或免疫疗法导致患者显著的免疫抑制,从而增加了患者发生恶性肿瘤(例如,CLL)的风险。

[0530] 本发明包括使用表达抗GPC3抗体来源的CAR的T细胞,所述CAR包括CD3- ζ 和4-1BB或CD28共刺激结构域(也称为CARTGPC3T细胞)。本发明的CARTGPC3 T细胞可经历强有力的体内T细胞扩增,并且可以建立对展示GPC3肿瘤表位的细胞具有特异性的记忆细胞,所述记忆细胞在血液和骨髓中长时间以高水平持续存在。本发明提供了包含细胞外和细胞内结构域的嵌合抗原受体(CAR)。细胞外结构域包含靶标特异性结合元件,其另外也称为抗原结合部分。细胞内结构域或另外细胞质结构域包含共刺激信号传导区和 ζ 链部分。共刺激信号传导区是指CAR的包含共刺激分子的细胞内结构域的一部分。共刺激分子是淋巴细胞对抗原有效反应所需的除抗原受体或其配体之外的细胞表面分子。

[0531] 在CAR的细胞外结构域与跨膜结构域之间或者在CAR的细胞质结构域与跨膜结构域之间可以并入间隔结构域。如本文所用,术语“间隔结构域”通常意指具有将跨膜结构域连接至多肽链中的细胞外结构域或细胞质结构域的功能的任何寡肽或多肽。间隔结构域可包含最多300个氨基酸,优选10至100个氨基酸,且最优选25至50个氨基酸。

[0532] 抗原结合部分

[0533] 在一个实施方案中,本发明的CAR包含靶标特异性结合元件,另外也称为抗原结合部分或靶向臂。本发明中使用的抗原结合部分能够结合在癌细胞的表面上表达的GPC3多

肽。因此,选择抗原结合部分来识别充当与特定疾病状态相关的靶细胞上的细胞表面标志物的配体。

[0534] 本发明的CAR通过工程化与GPC3的表位特异性结合的适当抗原结合部分而被工程化为靶向细胞GPC3。

[0535] 优选地,本发明的CAR中的抗原结合部分是scFV或scFab,其中scFV的核酸序列包含本文公开的抗GPC3抗体的一个或多个轻链CDR和一个或多个重链CDR的核酸序列,且其中scFab的核酸序列包含本文公开的抗GPC3抗体的一个或多个轻链CDR和一个或多个重链CDR的核酸序列。

[0536] 优选地,本发明的CAR中的抗原结合部分是scFV或scFab,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列: EYAMH (SEQ ID NO:6); GINPNNGVTTYNQRFKG (SEQ ID NO:8); 和GLLWYAY (SEQ ID NO:10)。优选地,本发明的CAR中的抗原结合部分是scFV或scFab,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列: KASQDINSYLS (SEQ ID NO:13); RANRLVD (SEQ ID NO:15); 和LQYDEFPLT (SEQ ID NO:17)。

[0537] 优选地,本发明的CAR中的抗原结合部分是scFV或scFab,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:6、8、10; 并且进一步包含选自由SEQ ID NO:13、15、17组成的组的氨基酸序列; 且进一步包含选自由SEQ ID NO:2和4组成的组的氨基酸序列。

[0538] 在一个实施方案中,本发明的CAR中的抗原结合部分是scFV或scFab,其包含与上面列举的SEQ ID NO具有约80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列。

[0539] 跨膜结构域

[0540] 关于跨膜结构域,CAR可以被设计为包含与CAR的细胞外结构域融合的跨膜结构域。在一个实施方案中,使用与CAR中的结构域之一天然相关的跨膜结构域。在一些情况下,可以通过氨基酸取代来选择或修饰跨膜结构域,以避免这类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,从而最小化与受体复合物的其它成员的相互作用。

[0541] 跨膜结构域可来源于天然来源或来源于合成来源。在天然来源的情况下,结构域可来源于任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。在本发明中特别有用的跨膜区可来源于T细胞受体、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154的 α 、 β 或 ζ 链(即包含至少上述的跨膜区)。或者,跨膜结构域可以是合成的,在这种情况下,其将主要包含疏水性残基,如亮氨酸和缬氨酸。优选地,在合成跨膜结构域的每一端都将存在苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。

[0542] 任选地,短的寡肽或多肽接头(优选长度在2个与10个氨基酸之间)可形成CAR的跨膜结构域与细胞质信号传导结构域之间的连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供了特别合适的接头。

[0543] 优选地,本发明的CAR中的跨膜结构域是CD8跨膜结构域。在一个实施方案中,CD8跨膜结构域包含美国专利第9,102,760号的SEQ ID NO:16的核酸序列。在一个实施方案中,CD8跨膜结构域包含编码美国专利第9,102,760号的SEQ ID NO:22的氨基酸序列的核酸序列。在另一实施方案中,CD8跨膜结构域包含美国专利第9,102,760号的SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在另一实施方案中,使用WO 2017/054089的表2中公开的序列。

[0544] 在一些情况下,本发明的CAR的跨膜结构域包含CD8a铰链结构域。在一个实施方案中,CD8铰链结构域包含美国专利第9,102,760号的SEQ ID NO:15的核酸序列。在一个实施

方案中,CD8铰链结构域包含编码美国专利第9,102,760号的SEQ ID NO:21的氨基酸序列的核酸序列。在另一实施方案中,CD8铰链结构域包含美国专利第9,102,760号的SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在另一实施方案中,使用WO 2017/054089的表2中公开的序列。

[0545] 细胞质结构域

[0546] 本发明的CAR的细胞质结构域或另外细胞内信号传导结构域负责激活其中已放置CAR的免疫细胞的至少一种正常效应子功能。术语“效应子功能”是指细胞的专门功能。T细胞的效应子功能例如可以是细胞溶解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。因此,术语“细胞内信号传导结构域”是指蛋白质的转导效应子功能信号并指导细胞执行专门功能的部分。虽然通常可以使用整个细胞内信号传导结构域,但在许多情况下没有必要使用整个链。就使用细胞内信号传导结构域的截短部分而言,这类截短部分可用来代替完整链,只要其转导效应子功能信号即可。因此术语细胞内信号传导结构域意在包括细胞内信号传导结构域的足以转导效应子功能信号的任何截短部分。

[0547] 用于本发明的CAR的细胞内信号传导结构域的优选实例包括T细胞受体 (TCR) 和共受体的细胞质序列,它们协同作用以在抗原受体接合之后启动信号转导,以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同功能能力的任意合成序列。

[0548] 已知仅通过TCR产生的信号不足以完全激活T细胞,还需要次级或共刺激信号。因此,T细胞激活可以说是由两类不同的细胞质信号传导序列介导的:通过TCR启动抗原依赖性初级激活的序列(初级细胞质信号传导序列)和以不依赖抗原的方式起作用以提供次级或共刺激信号的序列(次级细胞质信号传导序列)。初级细胞质信号传导序列以刺激方式或以抑制方式调控TCR复合物的初级激活。以刺激方式起作用的初级细胞质信号传导序列可含有被称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM的信号传导基序。

[0549] 在本发明中特别有用的含有初级细胞质信号传导序列的ITAM的实例包括来源于TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。特别优选的是,本发明的CAR中的细胞质信号传导分子包含来源于CD3 ζ 的细胞质信号传导序列。

[0550] 在优选的实施方案中,CAR的细胞质结构域可以被设计为包含CD3- ζ 信号传导结构域本身或与在本发明的CAR的背景下有用的任何其它所需细胞质结构域组合。例如,CAR的细胞质结构域可包含CD3 ζ 链部分和共刺激信号传导区。共刺激信号传导区是指CAR的包含共刺激分子的细胞内结构域的一部分。共刺激分子是淋巴细胞对抗原有效反应所需的除抗原受体或其配体之外的细胞表面分子。这类分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和与CD83特异性结合的配体等。

[0551] 本发明的CAR的细胞质信号传导部分内的细胞质信号传导序列可以以随机或指定的顺序彼此连接。任选地,短的寡肽或多肽接头(优选长度在2个与10个氨基酸之间)可形成连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供了特别合适的接头。

[0552] 在一个实施方案中,细胞质结构域被设计为包含CD3- ζ 的信号传导结构域和CD28的信号传导结构域。在另一实施方案中,细胞质结构域被设计为包含CD3- ζ 的信号传导结构域和4-1BB的信号传导结构域。在又一实施方案中,细胞质结构域被设计为包含CD3- ζ 的信号传导结构域以及CD28和4-1BB的信号传导结构域。

[0553] 在一个实施方案中,本发明的CAR中的细胞质结构域被设计为包含4-1BB的信号传

导结构域和CD3- ζ 的信号传导结构域,其中4-IBB的信号传导结构域包含美国专利第9,102,760号的SEQ ID NO:17中所示的核酸序列,且CD3- ζ 的信号传导结构域包含美国专利第9,102,760号的SEQ ID NO:18中所示的核酸序列。在另一实施方案中,使用WO 2017/054089的表2中公开的序列。在一个实施方案中,本发明的CAR中的细胞质结构域被设计为包含4-IBB的信号传导结构域和CD3- ζ 的信号传导结构域,其中4-IBB的信号传导结构域包含编码美国专利第9,102,760号的SEQ ID NO:23的氨基酸序列的核酸序列,且CD3- ζ 的信号传导结构域包含编码美国专利第9,102,760号的SEQ ID NO:24的氨基酸序列的核酸序列。在另一实施方案中,使用本文在WO 2017/054089的表2中公开的序列。

[0554] 在一个实施方案中,本发明的CAR中的细胞质结构域被设计为包含4-IBB的信号传导结构域和CD3- ζ 的信号传导结构域,其中4-IBB的信号传导结构域包含美国专利第9,102,760号的SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列,且CD3- ζ 的信号传导结构域包含美国专利第9,102,760号的SEQ ID NO:24中所示的氨基酸序列。在另一实施方案中,使用本文在WO 2017/054089的表2中公开的序列。

[0555] 载体

[0556] 本发明涵盖包含CAR的序列的DNA构建体,其中所述序列包含与细胞内结构域的核酸序列可操作连接的抗原结合部分的核酸序列。可用于本发明的CAR中的示例性细胞内结构域包括但不限于CD3- ζ 、CD28、4-1BB等的细胞内结构域。在一些情况下,CAR可包含CD3- ζ 、CD28、4-1BB等的任意组合。

[0557] 在一个实施方案中,本发明的CAR包含抗GPC3抗体来源的scFv、人CD8铰链和跨膜结构域以及人4-IBB和CD3 ζ 信号传导结构域。

[0558] 可以采用本领域中已知的重组方法获得编码所需分子的核酸序列,举例如通过从表达所述基因的细胞中筛选文库、通过从已知包含所述基因的载体中得到所述基因或通过利用标准技术从含有其的细胞和组织中直接分离。或者,可以合成产生而不是克隆所关注的基因。

[0559] 本发明还提供其中插入了本发明的DNA的载体。来源于逆转录病毒(如慢病毒)的载体是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因的长期稳定整合及其在子细胞中的繁殖。慢病毒载体比来源于肿瘤逆转录病毒(如鼠白血病病毒)的载体增加了优点,因为它们可以转导非增殖细胞,如肝细胞。它们还具有增加的低免疫原性的优点。

[0560] 简言之,通常通过将编码CAR多肽或其部分的核酸与启动子可操作地连接、并将构建体并入到表达载体中来实现编码CAR的天然或合成的核酸的表达。所述载体可适用于真核细胞的复制和整合。典型的克隆载体含有转录和翻译终止子、起始序列和可用于调控所需核酸序列的表达的启动子。

[0561] 除了上述方法之外,也可以采用以下方法。本发明的表达构建体也可用于采用标准基因递送方案进行核酸免疫和基因治疗。基因递送的方法是本领域中已知的。参见例如以全文引用的方式并入本文的美国专利第5,399,346号、第5,580,859号、第5,589,466号。在另一实施方案中,本发明提供了基因治疗载体。

[0562] 核酸可以被克隆到多种类型的载体中。例如,核酸可以被克隆到包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒的载体中。特别关注的载体包括表达载体、复制载体、探针产生载体和测序载体。

[0563] 进一步地,可以以病毒载体的形式将表达载体提供给细胞。病毒载体技术是本领域中熟知的,并且描述于例如Sambrook等人,(2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)以及其它病毒学和分子生物学手册中。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。一般来说,合适的载体含有在至少一种生物体中有功能的复制起点、启动子序列、方便的限制性内切核酸酶位点和一种或多种可选择标志物(例如,WO 01/96584;WO 01/29058;和美国专利第6,326,193号)。

[0564] 已经开发了许多基于病毒的系统,用于将基因转移到哺乳动物细胞中。例如,逆转录病毒为基因转移系统提供了方便的平台。可以采用本领域中已知的技术将选定的基因插入到载体中,并包装在逆转录病毒颗粒中。然后可以分离重组病毒,并将其体内或离体递送给受试者的细胞。许多逆转录病毒系统是本领域中已知的。在一些实施方案中,使用腺病毒载体。许多腺病毒载体是本领域中已知的。在一个实施方案中,使用慢病毒载体。

[0565] 另外的启动子元件(例如,增强子)调控转录起始的频率。通常,这些位于起始位点上游的区域30-110bp中,尽管最近显示许多启动子也含有起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间距通常是灵活的,使得当元件颠倒或彼此相对移动时,启动子功能得以保留。在胸苷激酶(tk)启动子中,在活性开始下降之前,可以将启动子元件之间的间距增加到50bp。

[0566] 取决于启动子,似乎单个元件可以协同或独立地起作用以激活转录。

[0567] 合适启动子的一个实例是立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。此启动子序列是能够驱动与其可操作地连接的任何多核苷酸序列的高水平表达的强组成型启动子序列。合适启动子的另一实例是延伸生长因子-1a(EF-1a)。然而,也可以使用其它组成型启动子序列,包括但不限于猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复序列(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、艾巴二氏病毒立即早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子以及人基因启动子,如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。进一步地,本发明不应限于使用组成型启动子。诱导型启动子也被考虑为本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关,其能够在需要表达其可操作地连接的多核苷酸序列时开启这种表达,或者在不需要表达时关闭表达。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0568] 为了评估CAR多肽或其部分的表达,要引入到细胞中的表达载体还可以含有可选择标志物基因或报告基因或两者,以便于从试图通过病毒载体转染或感染的细胞群中确认和选择表达细胞。在其它方面,可选择标志物可以携带在单独的DNA片段上,并用于共转染程序。可选择标志物和报告基因均可侧接适当的调控序列以使得能够在宿主细胞中表达。有用的可选择标志物包括例如抗生素抗性基因,如neo等。

[0569] 报告基因用于确认潜在的转染细胞并评估调控序列的功能。一般来说,报告基因是不存在于受体生物体或组织中或由受体生物体或组织表达的基因,并且其编码多肽,所述多肽的表达通过一些容易检测的特性(例如,酶活性)来表现。在已将DNA引入到受体细胞中之后的合适时间测定报告基因的表达。合适的报告基因可包括编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶的基因或绿色荧光蛋白基因(例如,Ui-Tei等

人,2000FEBS Letters 479:79-82)。合适的表达系统是熟知的,并且可以采用已知技术制备或商业获得。一般来说,具有显示报告基因的最高表达水平的最小5'侧翼区的构建体被确认为启动子。这类启动子区可以与报告基因连接,并用于评估药剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0570] 将基因引入到细胞中并表达的方法是本领域中已知的。在表达载体的情况下,通过本领域中的任何方法可以很容易地将载体引入到宿主细胞中,如哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如,可以通过物理、化学或生物方法将表达载体转移到宿主细胞中。

[0571] 将多核苷酸引入到宿主细胞中的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂转染、粒子轰击、微量注射、电穿孔等。产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域中熟知的。参见例如Sambrook等人,(2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)。将多核苷酸引入到宿主细胞中的优选方法是磷酸钙转染。

[0572] 将所关注的多核苷酸引入到宿主细胞中的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体,特别是逆转录病毒载体,已经成为将基因插入到哺乳动物(例如,人细胞)中的最广泛采用的方法。其它病毒载体可来源于慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺相关病毒等。参见例如美国专利第5,350,674号和第5,585,362号。

[0573] 将多核苷酸引入到宿主细胞中的化学方法包括胶体分散系统,如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠粒、和基于脂质的系统,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外和体内递送媒介物的示例性胶体系统是脂质体(例如,人工膜囊泡)。在利用非病毒递送系统的情况下,示例性递送媒介物是脂质体。考虑使用脂质制剂以将核酸引入到宿主细胞中(体外、离体或体内)。另一方面,核酸可以与脂质缔合。与脂质缔合的核酸可以包封在脂质体的水性内部中、散布在脂质体的脂质双层内、经由与脂质体和寡核苷酸两者缔合的连接分子连接于脂质体、截留在脂质体中、与脂质体复合、分散在含有脂质的溶液中、与脂质混合、与脂质组合、作为悬浮液包含在脂质中、包含在胶束中或与胶束复合或以其它方式与脂质缔合。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体相关组合物不限于溶液中的任何特定结构。例如,它们可以以双层结构存在,作为胶束或具有“塌陷”结构。它们也可以简单地散布在溶液中,可能形成尺寸或形状不均匀的聚集体。脂质是脂肪物质,其可以是天然存在的或合成脂质。例如,脂质包括天然存在于细胞质中的脂肪滴以及含有长链脂族烃及其衍生物的一类化合物,如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛。

[0574] 适合使用的脂质可以从商业来源获得。例如,二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(“DMPC”)可得自Sigma,St.Louis,Mo.;磷酸二鲸蜡脂(“DCP”)可得自K&K Laboratories(Plainview,N.Y.);胆固醇(“Choi”)可得自Calbiochem-Behring;二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(“DMPG”)及其它脂质可得自Avanti Polar Lipids,Inc.(Birmingham,Ala.)。可以在约-20℃下储存脂质在氯仿或氯仿/甲醇中的储备溶液。氯仿被用作仅有的溶剂,因为其比甲醇更容易蒸发。“脂质体”是通用术语,涵盖通过产生封闭的脂质双层或聚集体而形成的各种单层和多层脂质媒介物。脂质体的特征可在于具有带磷脂双层膜和内部水性介质的囊泡结构。多层脂质体具有由水性介质分隔的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时,它们自发地形成。脂质组件在形成封闭结构之前经历自我重排,并将水和溶解的溶质截留在脂质双层之间(Ghosh等人,1991Glycobiology 5:505-10)。然而,也涵盖在溶液中具有与正常囊泡结构不同的结构的组合物。例如,脂质可呈现胶束结构,或仅作为脂质分子的不均匀聚集体存在。

还考虑了阳离子脂质体(lipofectamine)-核酸复合物。

[0575] 无论采用何种方法将外源核酸引入到宿主细胞中或以另外的方式使细胞暴露于本发明的抑制剂,为了确认宿主细胞中重组DNA序列的存在,可以进行多种测定。这类测定包括例如本领域技术人员熟知的“分子生物学”测定,如Southern和Northern印迹、RT-PCR和PCR;“生化”测定,如检测特定肽的存在与否,例如通过免疫学方法(ELISA和蛋白质印迹)或通过本文所述的测定来确认落入本发明范围内的药剂。

[0576] T细胞的来源

[0577] 在本发明的T细胞的扩增和基因修饰之前,从受试者获得T细胞的来源。T细胞可以从多种来源获得,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、感染部位组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在本发明的某些实施方案中,可以使用本领域中可用的任何数量的T细胞系。在本发明的某些实施方案中,可以采用技术人员已知的任意数量的技术,如Ficoll™分离,从收集自受试者的血液单位中获得T细胞。在一个优选的实施方案中,通过单采血液成分获得来自个体的循环血液的细胞。单采血液成分产物通常含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞和血小板。在一个实施方案中,可以洗涤通过单采血液成分收集的细胞以移除血浆部分,并将细胞置于适当的缓冲液或培养基中用于后续处理步骤。在本发明的一个实施方案中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在替代实施方案中,洗涤溶液缺乏钙,并且可以缺乏镁,或者可以缺乏许多(如果不是全部的话)二价阳离子。再次意外的是,在没有钙的情况下的初始激活步骤导致放大的激活。如本领域普通技术人员将了解,可以通过本领域技术人员已知的方法完成洗涤步骤,如通过根据制造商的说明书使用半自动“流通式”离心机(例如,Cobe2991细胞处理器,Baxter CytoMate,或Haemonetics Cell Saver 5)。洗涤后,可以将细胞重悬于多种生物相容性缓冲液中,举例如不含Ca²⁺、不含Mg²⁺的PBS、PlasmaLyte A或其它含或不含缓冲剂的盐水溶液。或者,可以移除单采血液成分样品中不需要的组分,并将细胞直接重悬于培养基中。

[0578] 在另一实施方案中,通过溶解红细胞并消耗单核细胞,例如通过PERCOLL™梯度离心或通过逆流离心淘洗,从外周血淋巴细胞中分离T细胞。可以通过正选择或负选择技术进一步分离特定的T细胞亚群,如CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和CD45RO⁺T细胞。例如,在一个实施方案中,通过与抗CD3/抗CD28(即,3x28)缀合珠粒如DYNABEADS®M-450CD3/CD28 T一起温育足以进行所需T细胞的阳性选择的一段时间来分离T细胞。在一个实施方案中,该时间段为约30分钟。在进一步的实施方案中,该时间段的范围是30分钟至36小时或更长以及其间的所有整数值。在进一步的实施方案中,该时间段为至少1、2、3、4、5或6小时。在又一优选的实施方案中,该时间段为10至24小时。在一个优选的实施方案中,温育时间段为24小时。对于从白血病患者中分离T细胞,使用较长的温育时间(如24小时)可增加细胞产量。与其它细胞类型相比,更长的温育时间可用于在T细胞较少的任何情况下分离T细胞,如从肿瘤组织中或从免疫受损个体中分离肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。进一步地,使用更长的温育时间可提高CD8⁺T细胞的捕获效率。因此,通过简单地缩短或延长使T细胞与CD3/CD28珠粒结合的时间和/或通过增加或减少珠粒与T细胞的比率(如本文进一步描述),可以在培养开始时或在培养过程期间的其它时间点优先选择不选择T细胞亚群。另外,通过增加或减少珠粒或其它表面上的抗CD3和/或抗CD28抗体的比率,可以在培养开始时或在其它所需时间点优先选择不选择T细胞亚群。技术人员将认识到,在本发明的背景下也可以采用多轮

选择。在某些实施方案中,可能需要执行选择程序,并在激活和扩增过程中使用“未选择的”细胞。也可以对“未选择的”细胞进行更多轮选择。

[0579] 可以用针对负选择细胞特有的表面标志物的抗体的组合来实现通过负选择富集T细胞群。一种方法是经由负磁性免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,其使用针对负选择的细胞上存在的细胞表面标志物的单克隆抗体的混合物。例如,为了通过负选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在某些实施方案中,可能需要富集或正选择通常表达CD4⁺、CD25⁺、CD62L^{hi}、GITR⁺和FoxP3⁺的调控T细胞。或者,在某些实施方案中,通过抗C25缀合珠粒或其它类似的选择方法来消耗T调控细胞。

[0580] 为了通过正选择或负选择分离所需的细胞群,可以改变细胞的浓度和表面(例如颗粒,如珠粒)。在某些实施方案中,可能需要显著减小珠粒和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞的浓度),以确保细胞和珠粒的最大接触。例如,在一个实施方案中,使用20亿个细胞/ml的浓度。在一个实施方案中,使用10亿个细胞/ml的浓度。在进一步的实施方案中,使用大于1亿个细胞/ml。在进一步的实施方案中,使用1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在又一实施方案中,使用7500、8000、8500、9000、9500万或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在进一步的实施方案中,可以使用1.25或1.5亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可以使细胞产量、细胞激活和细胞扩增增加。进一步地,使用高细胞浓度允许更有效地捕获可能微弱表达所关注的靶抗原的细胞,如CD28阴性T细胞,或来自存在许多肿瘤细胞的样品(即,白血病血液、肿瘤组织等)的细胞。这类细胞群可能具有治疗价值,并且是期望获得的。例如,使用高浓度的细胞允许更有效地选择通常具有较弱的CD28表达的CD8⁺T细胞。

[0581] 在相关的实施方案中,可能需要使用较低浓度的细胞。通过显著稀释T细胞和表面(例如颗粒,如珠粒)的混合物,颗粒与细胞之间的相互作用被最小化。这选择了表达大量要与颗粒结合的所需抗原的细胞。例如,CD4⁺T细胞表达更高水平的CD28,并且在稀释浓度下比CD8⁺T细胞更有效地被捕获。在一个实施方案中,使用的细胞浓度为 5×10^6 /ml。在其它实施方案中,使用的浓度可以为约 1×10^5 /ml至 1×10^6 /ml,以及其间的任何整数值。

[0582] 在其它实施方案中,细胞可以在2-10°C或室温下以不同的速度在旋转器上温育不同的时长。

[0583] 在洗涤步骤之后,也可以冷冻用于刺激的T细胞。不希望受理论的束缚,冷冻和随后的解冻步骤通过移除细胞群中的粒细胞并且在一定程度上移除细胞群中的单核细胞来提供更均匀的产物。在移除血浆和血小板的洗涤步骤之后,可以将细胞悬浮在冷冻溶液中。虽然许多冷冻溶液和参数是本领域中已知的,并且在这种背景下是有用的,但有一种方法涉及使用含有20% DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或含有以下的培养基:10%葡聚糖40和5%右旋糖、20%人血清白蛋白和7.5% DMSO,或31.25% Plasmalyte-A、31.25%右旋糖5%、0.45%NaCl、10%葡聚糖40和5%右旋糖,20%人血清白蛋白和7.5% DMSO或含有例如Hespan和PlasmaLyte A的其它合适的细胞冷冻培养基,然后将细胞以每分钟的速率冷冻至-80°C,并在液氮储存罐的气相中储存。可以采用其它受控冷冻的方法以及立即在-20°C下或在液氮中不受控冷冻。

[0584] 在某些实施方案中,如本文所述将冷冻保存的细胞解冻并洗涤,并在利用本发明

的方法激活之前在室温下静置一小时。

[0585] 在本发明的背景下还考虑了在当可能需要如本文所述的扩增细胞之前的时间段从受试者中收集血液样品或单采血液成分产品。因此,可以在任何必要的时间点收集要扩增的细胞来源,并分离和冷冻所需的细胞,如T细胞,以供以后用于如本文所述的那些将受益于T细胞疗法的许多疾病或病状的T细胞疗法。在一个实施方案中,血液样品或单采血液成分取自一般健康的受试者。在某些实施方案中,血液样品或单采血液成分取自有患病风险但尚未患病的一般健康受试者,并且分离并冷冻所关注的细胞以供以后使用。在某些实施方案中,T细胞可以被扩增、冷冻,并在以后的时间使用。在某些实施方案中,在诊断出如本文所述的特定疾病后不久但在任何治疗之前从患者中收集样品。在进一步的实施方案中,在任何数量的相关治疗方式之前从来自受试者的血液样品或单采血液成分中分离细胞,所述治疗方式包括但不限于用诸如以下的药剂治疗:那他珠单抗、依法珠单抗、抗病毒剂、化学疗法、辐射、免疫抑制剂,如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯和FK506,抗体或其它免疫消融剂,如CAMPATH、抗CD3抗体、Cytosan、氟达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228和辐照。这些药物抑制钙依赖性磷酸酶钙调神经磷酸酶(环孢菌素和FK506)或抑制对生长因子诱导的信号转导很重要的p70S6激酶(雷帕霉素)(Liu等人,Cell 66:807-815,1991;Henderson等人,Immun 73:316-321,1991;Bierer等人,Curr.Opin.Immun 5:763-773,1993)。在进一步的实施方案中,为患者分离细胞并冷冻,以供以后与骨髓或干细胞移植、使用化学治疗剂如氟达拉滨、外粒子束辐射疗法(XRT)、环磷酰胺或抗体如OKT3或CAMPATH的T细胞消融疗法结合使用(例如,之前、同时或之后)。在另一实施方案中,在之前将细胞分离,并且可以冷冻以供以后在B细胞消融疗法(如与CD20反应的药剂,例如利妥昔单抗)之后用于治疗。

[0586] 在本发明进一步的实施方案中,在治疗之后直接从患者获得T细胞。在这方面,已经观察到,在某些癌症治疗之后,特别是用损害免疫系统的药物治疗,在治疗后不久,在当患者正常从治疗中恢复时期,获得的T细胞的质量可能是最佳的或改善的,因为它们能够离体扩增。同样,在采用本文所述的方法进行离体操作之后,这些细胞可能处于增强的移植和体内扩增的优选状态。因此,在本发明的背景内考虑在此恢复阶段期间收集血细胞,包括T细胞、树突细胞或造血谱系的其它细胞。进一步地,在某些实施方案中,动员(例如,用GM-CSF动员)和调理方案可用于在受试者中产生有利于特定细胞类型的再增殖、再循环、再生和/或扩增的条件,特别是在治疗之后确定的时间窗口期间。说明性的细胞类型包括T细胞、B细胞、树突细胞和免疫系统的其它细胞。

[0587] T细胞的激活和扩增

[0588] 无论是在对T细胞进行基因修饰以表达期望的CAR之前还是之后,通常都可以采用例如美国专利第6,352,694号;第6,534,055号;第6,905,680号;第6,692,964号;第5,858,358号;第6,887,466号;第6,905,681号;第7,144,575号;第7,067,318号;第7,172,869号;第7,232,566号;第7,175,843号;第5,883,223号;第6,905,874号;第6,797,514号;第6,867,041号;和第7,572,631号中所述的方法来激活和扩增T细胞。在一些实施方案中,用于T细胞(例如, $\gamma\delta$ T细胞)的离体扩增的方法和组合物包括但不限于WO 2016/081518、WO 2017/197347、WO 2019/099744和WO 2020/117862中描述的那些,上述专利文献中的每一者的内容以全文引用的方式并入本文。

[0589] 一般地,本发明的T细胞通过与连接有刺激CD3/TCR复合物相关信号的药剂和刺激T细胞的表面上的共刺激分子的配体的表面接触而扩增。特别地,可以如本文所述刺激T细胞群,如通过与固定在表面上的抗CD3抗体或其抗原结合片段或抗CD28抗体接触,或者通过与蛋白激酶C激活剂(例如,苔藓抑素)连同钙离子载体接触。为了共刺激T细胞的表面上的辅助分子,使用结合辅助分子的配体。例如,T细胞群可以在适合于刺激T细胞的增殖的条件下与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞的增殖,抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3、XR-CD28(Diaclone, Besancon, France),可以与本领域中通常已知的其它方法一样使用(Berg等人, Transplant Proc. 30 (8):3975-3977, 1998; Haanen等人, J. Exp. Med. 190 (9):1319-1328, 1999; Garland等人, J. Immunol Meth. 227 (1-2):53-63, 1999)。

[0590] 在本发明的T细胞包括 $\gamma\delta$ T细胞的某些实施方案中,可以根据WO 2017/197347中描述的方法和组合物选择性地扩增 $\gamma\delta$ T细胞。

[0591] 在某些实施方案中,可以通过不同的方案提供T细胞的初级刺激信号和共刺激信号。例如,提供每个信号的药剂可以在溶液中或与表面偶联。当与表面偶联时,药剂可以与同一表面偶联(即,以“顺式”形式)或与不同的表面偶联(即,以“反式”形式)。或者,一种药剂可以与表面偶联,且另一种药剂在溶液中。在一个实施方案中,提供共刺激信号的药剂与细胞表面结合,且提供初级激活信号的药剂在溶液中或与表面偶联。在某些实施方案中,两种药剂都可以在溶液中。在另一实施方案中,药剂可以是可溶形式的,然后与表面交联,如表达Fc受体的细胞或抗体或将与药剂结合的其它结合剂。在这方面,参见例如美国专利申请公布第20040101519号和第20060034810号关于人工抗原呈递细胞(aAPC),其预期用于在本发明中激活和扩增T细胞。

[0592] 在一个实施方案中,两种药剂固定在珠粒上,或者是同一珠粒,即“顺式”,或者是不同的珠粒,即“反式”。举例来说,提供初级激活信号的药剂是抗CD3抗体或其抗原结合片段,且提供共刺激信号的药剂是抗CD28抗体或其抗原结合片段;并且两种药剂以等同的分子数量共固定于同一珠粒上。在一个实施方案中,使用每种抗体与珠粒结合的1:1比率用于CD4⁺T细胞扩增和T细胞生长。在本发明的某些方面,使用抗CD3:CD28抗体与珠粒结合的一定比率,使得与使用1:1的比率观察到的扩增相比,观察到T细胞扩增的增加。在一个特定的实施方案中,与使用1:1的比率观察到的扩增相比,观察到约1至约3倍的增加。在一个实施方案中,CD3:CD28抗体与珠粒结合的比率范围是100:1至1:100及其间的所有整数值。在本发明的一方面,比抗CD3抗体更多的抗CD28抗体与颗粒结合,即CD3:CD28的比率小于一。在本发明的某些实施方案中,抗CD28抗体与抗CD3抗体与珠粒结合的比率大于2:1。在一个特定的实施方案中,使用抗体与珠粒结合的1:100CD3:CD28比率。在另一实施方案中,使用抗体与珠粒结合的1:75CD3:CD28比率。在进一步的实施方案中,使用抗体与珠粒结合的1:50CD3:CD28比率。在另一实施方案中,使用抗体与珠粒结合的1:30CD3:CD28比率。在一个优选的实施方案中,使用抗体与珠粒结合的1:10CD3:CD28比率。在另一实施方案中,使用抗体与珠粒结合的1:3CD3:CD28比率。在又一实施方案中,使用抗体与珠粒结合的3:1CD3:CD28比率。

[0593] 可以使用1:500至500:1以及其间的任何整数值的颗粒与细胞的比率以刺激T细胞或其它靶细胞。本领域普通技术人员可以很容易了解,颗粒与细胞的比率可取决于相对于

靶细胞的粒度。例如,小尺寸的珠粒只能结合少数细胞,而较大的珠粒可结合许多细胞。在某些实施方案中,细胞与颗粒的比率范围是1:100至100:1及其间的任何整数值,并且在进一步的实施方案中,该比率包括1:9至9:1及其间的任何整数值,也可用于刺激T细胞。导致T细胞刺激的抗CD3和抗CD28偶联颗粒与T细胞的比率可如上所述变化,然而某些优选的值包括1:100、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1和15:1,其中一个优选的比率是每个T细胞至少1:1的颗粒。在一个实施方案中,使用1:1或更小的颗粒与细胞的比率。在一个特定的实施方案中,优选的颗粒:细胞比率是1:5。在进一步的实施方案中,颗粒与细胞的比率可根据刺激的日期而变化。例如,在一个实施方案中,第一天颗粒与细胞的比率为1:1至10:1,并且此后每天或每隔一天向细胞中添加另外的颗粒,持续长达10天,最终比率为1:1至1:10(基于添加当天的细胞计数)。在一个特定的实施方案中,颗粒与细胞的比率在刺激的第一天为1:1,并且在刺激的第三天和第五天调节到1:5。在另一实施方案中,按每天或每隔一天添加颗粒,达到在第一天最终比率为1:1,且刺激的第三天和第五天为1:5。在另一实施方案中,颗粒与细胞的比率在刺激的第一天为2:1,并且在刺激的第三天和第五天调节到1:10。在另一实施方案中,按每天或每隔一天添加颗粒,达到在第一天最终比率为1:1,且刺激的第三天和第五天为1:10。本领域技术人员将了解的是,多种其它比率也可适用于本发明。特别地,比率将根据粒度以及细胞大小和类型而变化。

[0594] 在本发明进一步的实施方案中,将细胞如T细胞与药剂包被的珠粒组合,随后分离珠粒和细胞,然后培养细胞。在替代实施方案中,在培养之前,不分离药剂包被的珠粒和细胞,而是一起培养。在进一步的实施方案中,首先通过施加力(如磁力)来浓缩珠粒和细胞,导致细胞表面标志物的连接增加,从而诱导细胞刺激。

[0595] 举例来说,可以通过允许抗CD3和抗CD28连接的顺磁珠粒(3x28珠粒)接触T细胞来连接细胞表面蛋白。在一个实施方案中,将细胞(例如, 10^4 至 10^9 个T细胞)和珠粒(例如,**DYNABEADS®M-450CD3/CD28** T顺磁珠粒,比率为1:1)组合在缓冲液中,优选PBS(不含二价阳离子,如钙和镁)。再次地,本领域普通技术人员可以很容易了解,可以使用任何细胞浓度。例如,靶细胞在样品中可以非常少见,并且仅占样品的0.01%,或者整个样品(即,100%)可包含所关注的靶细胞。因此,任何细胞数量都在本发明的范围内。在某些实施方案中,可能需要显著减少颗粒和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞浓度),以确保细胞和颗粒的最大接触。例如,在一个实施方案中,使用约20亿个细胞/ml的浓度。在另一实施方案中,使用大于1亿个细胞/ml。在进一步的实施方案中,使用1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在又一实施方案中,使用7500、8000、8500、9000、9500万或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在进一步的实施方案中,可以使用1.25或1.5亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可以使细胞产量、细胞激活和细胞扩增增加。进一步地,使用高细胞浓度允许更有效地捕获可能微弱表达所关注的靶抗原的细胞,如CD28阴性T细胞。这类细胞群在某些实施方案中可能具有治疗价值,并且是期望获得的。例如,使用高浓度的细胞允许更有效地选择通常具有较弱的CD28表达的CD8⁺T细胞。

[0596] 在本发明的一个实施方案中,可以将混合物培养数小时(约3小时)至约14天或其间的任何小时整数值。在另一实施方案中,可以将混合物培养21天。在本发明的一个实施方案中,将珠粒和T细胞一起培养约八天。在另一实施方案中,将珠粒和T细胞一起培养2-3天。

也可能需要几个刺激周期,使得T细胞的培养时间可以是60天或更长。适合于T细胞培养的条件包括适当的培养基(例如,最低必需培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 15, (Lonza)),其可含有增殖和存活所必需的因子,包括血清(例如,胎牛或人血清)、白介素-2 (IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF和TNF- α 或技术人员已知用于细胞生长的任何其它添加剂。用于细胞生长的其它添加剂包括但不限于表面活性剂、血浆蛋白溶液(plasmanate)和还原剂,如N-乙酰基-半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo15和X-Vivo 20、Optimizer,添加有氨基酸、丙酮酸钠和维生素,无血清或补充有适当量的血清(或血浆)或确定的一组激素,和/或足以使T细胞生长和扩增的量的细胞因子。抗生素(例如,青霉素和链霉素)仅包括在实验培养物中,而不包括在要输注到受试者体内的细胞培养物中。将靶细胞维持在支持生长所必需条件下,例如适当的温度(例如,37°C)和气氛(例如,空气加上

[0597] 已经暴露于不同刺激时间的T细胞可表现出不同的特性。例如,典型的血液或单采的外周血单核细胞产品具有大于细胞毒性或抑制性T细胞群(Tc、CD8⁺)的辅助T细胞群(TH、CD4⁺)。通过刺激CD3和CD28受体进行T细胞的离体扩增产生在约第8-9天之前主要由TH细胞组成的T细胞群,而在约第8-9天后,T细胞群包含越来越大的Tc细胞群。因此,根据治疗的目的,给受试者输注主要包含TH细胞的T细胞群可能是有利的。类似地,如果已经分离出Tc细胞的抗原特异性子集,则更大程度地扩增此子集可能是有益的。

[0598] 进一步地,除了CD4和CD8标志物之外,其它表型标志物在细胞扩增过程期间有显著变化,但在很大程度上是可再现的。因此,这种可再现性使得能够为特定目的定制激活的T细胞产品。

[0599] 治疗应用

[0600] 本发明涵盖用慢病毒载体(LV)转导的细胞(例如,T细胞)。例如,LV编码将特定抗体(例如,GPC3)的抗原识别结构域与CD3- ζ 、CD28、4-1BB或其任意组合的细胞内结构域组合的CAR。因此,在一些情况下,转导的T细胞可引发CAR介导的T细胞反应。

[0601] 本发明提供了CAR用于将原代T细胞的特异性重定向至肿瘤抗原的用途。因此,本发明还提供了在哺乳动物中刺激针对靶细胞群或组织的T细胞介导的免疫反应的方法,包括对哺乳动物施用表达CAR的T细胞的步骤,其中CAR包含与预定靶标(例如,GPC3)特异性相互作用的结合部分、包含例如人CD3 ζ 的细胞内结构域的 ζ 链部分和共刺激信号传导区。

[0602] 在一个实施方案中,本发明包括一种类型的细胞疗法,其中T细胞被基因修饰以表达CAR,并且对有需要的接受者输注CAR T细胞。输注的细胞能够杀伤接受者体内的肿瘤细胞。与抗体疗法不同,CAR T细胞能够在体内复制,从而导致长期持续存在,这可持续控制肿瘤。

[0603] 在一个实施方案中,本发明的CAR T细胞可经历稳健的体内T细胞扩增,并且可持续很长的时间。在另一实施方案中,本发明的CAR T细胞进化成可以被重新激活以抑制任何另外的肿瘤形成或生长的特异性记忆T细胞。

[0604] 不希望受任何特定理论的束缚,由CAR修饰的T细胞引发的抗肿瘤免疫反应可以是主动或被动免疫反应。此外,CAR介导的免疫反应可以是过继免疫治疗方法的一部分,其中CAR修饰的T细胞诱导针对CAR中的抗原结合部分特异性的免疫反应。

[0605] 可以治疗的癌症包括未血管化或基本上尚未血管化的肿瘤以及血管化肿瘤。癌症

可包括非实体肿瘤(如血液肿瘤,例如白血病和淋巴瘤),或者可包括实体肿瘤。要用本发明的CAR治疗的癌症的类型包括但不限于癌、母细胞瘤和肉瘤,和某些白血病或淋巴样恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤以及恶性肿瘤,例如肉瘤、癌瘤和黑色素瘤。还包括成人肿瘤/癌症和儿童肿瘤/癌症。在某些实施方案中,CAR-T细胞可治疗性地用于罹患非血液肿瘤的患者,如由乳腺、CNS和皮肤恶性肿瘤引起的实体肿瘤。

[0606] 血液癌症是血液或骨髓的癌症。血液(或血源性)癌症的实例包括白血病,包括急性白血病(如急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、急性骨髓性白血病和成髓细胞白血病、早幼粒细胞白血病、骨髓单核细胞性白血病、单核细胞性白血病和红白血病)、慢性白血病(如慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病、慢性骨髓性白血病和慢性淋巴细胞性白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(无痛性和高等级形式)、多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症、重链病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病和骨髓增生异常。

[0607] 实体肿瘤是通常不含囊肿或液体区域的异常组织块。实体肿瘤可以是良性的或恶性的。不同类型的实体肿瘤根据形成它们的细胞类型来命名(如肉瘤、癌瘤和淋巴瘤)。实体肿瘤如肉瘤和癌瘤的实例包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤及其它肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、甲状腺乳头状癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管源性癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、维尔姆斯瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌、黑色素瘤和CNS肿瘤(如神经胶质瘤(如脑干神经胶质瘤和混合性神经胶质瘤)、胶质母细胞瘤(也称为多形性胶质母细胞瘤)、星形细胞瘤、CNS淋巴瘤、生殖细胞瘤、髓母细胞瘤、许旺氏细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑血管瘤、成神经细胞瘤、视网膜母细胞瘤和脑转移瘤)。

[0608] 一方面,CAR T细胞可用于离体免疫。关于离体免疫,在将细胞施用到哺乳动物体内之前,在体外发生以下中的至少一者:i)细胞的扩增,ii)将编码CAR的核酸引入细胞中,和/或iii)细胞的冷冻保存。

[0609] 离体程序是本领域中熟知的,并且在下文更全面地讨论。简言之,将细胞从哺乳动物(优选人)中分离出来,并用表达本文公开的CAR的载体进行基因修饰(即,体外转导或转染)。可以对哺乳动物接受者施用CAR修饰的细胞以提供治疗益处。哺乳动物接受者可以是人,并且CAR修饰的细胞对于接受者来说可以是自体的。或者,细胞对于接受者来说可以是同种异体的、同基因的或异种的。

[0610] 造血干细胞和祖细胞的离体扩增的程序描述于以引用的方式并入本文的美国专利第5,199,942号中,可应用于本发明的细胞。其它合适的方法是本领域中已知的,因此本发明不限于细胞离体扩增的任何特定方法。简言之,T细胞的离体培养和扩增包括:(1)从哺乳动物的外周血收获物或骨髓外植体中收集CD34+造血干细胞和祖细胞;(2)离体扩增这类细胞。除了美国专利第5,199,942号中描述的细胞生长因子之外,其它因子如f1t3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体也可用于细胞的培养和扩增。 γ δ T细胞的特定亚群的离体扩增也在本公开的范围内,其方法和组合物描述于以引用的方式并入本文的WO 2017/197347中。

[0611] 在离体免疫方面除了使用基于细胞的疫苗之外,本发明还提供了体内免疫以在患

者中引发针对抗原的免疫反应的组合物和方法。

[0612] 本发明的CAR修饰的T细胞可以单独施用,或作为与稀释剂和/或与其它组分如IL-2或其它细胞因子或细胞群组合的药物组合物施用。简言之,本发明的药物组合物可包含如本文所述的靶细胞群与一种或多种药学上或生理学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂相组合。这类组合物可包含缓冲剂,如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露糖醇;蛋白质;多肽或氨基酸,如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。本发明的组合物优选配制为用于静脉内施用。

[0613] 可以以适合于要治疗(或预防)的疾病的方式施用本发明的药物组合物。尽管可以通过临床试验来确定适当的剂量,但施用的量和频率将根据诸如患者的状况以及患者疾病的类型和严重程度的因素来确定。

[0614] 当指示“免疫学有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤抑制有效量”或“治疗量”时,要施用的本发明的组合物的精确量可以由医生考虑患者(受试者)的年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移程度以及状况的个体差异来确定。一般可以说,包含本文所述的T细胞的药物组合物可以以 10^4 至 10^9 个细胞/kg体重、优选 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重的剂量施用,包括这些范围内的所有整数值。T细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。可以通过采用免疫疗法中通常已知的输注技术来施用细胞(参见例如Rosenberg等人, New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988)。医学领域的技术人员可以通过监测患者的疾病体征并相应地调节治疗而很容易地确定针对特定患者的最佳剂量和治疗方案。

[0615] 在某些实施方案中,可能需要对受试者施用激活的T细胞,然后随后重新抽血(或进行单采血液成分),根据本发明从中激活T细胞,并给患者重新输注这些激活和扩增的T细胞。这个过程可以每隔几周进行多次。在某些实施方案中,可以从10cc至400cc的抽血中激活T细胞。在某些实施方案中,从20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc或100cc的抽血中激活T细胞。不受理论的束缚,采用这种多次抽血/多次重新输注方案可用来选出某些T细胞群。

[0616] 可以以任何方便的方式进行主题组合物的施用,包括通过气雾剂吸入、注射、摄入、输血、植入或移植。可以对患者皮下、皮内、肿瘤内、结内、髓内、肌内、通过静脉内(i.v.)注射或腹膜内施用本文所述的组合物。在一个实施方案中,通过皮内或皮下注射对患者施用本发明的T细胞组合物。在另一实施方案中,优选通过i.v.注射施用本发明的T细胞组合物。可以将T细胞的组合物直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位。

[0617] 在本发明的某些实施方案中,将采用本文所述的方法或本领域中已知将T细胞扩增至治疗水平的其它方法激活和扩增的细胞与任何数量的相关治疗方式相结合(例如,之前、同时或之后)对患者施用,所述相关治疗方式包括但不限于用诸如抗病毒疗法的药剂、西多福韦和白介素-2、阿糖胞苷(也称为ARA-C)或那他珠单抗治疗MS患者或依法珠单抗治疗银屑病患者或对PML患者的其它治疗。在进一步的实施方案中,本发明的T细胞可以与化学疗法、辐射、免疫抑制剂(如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯和FK506)、抗体或其它免疫消融剂(如CAM PATH)、抗CD3抗体或其它抗体疗法、细胞毒素、氟达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228、细胞因子和辐照组合使用。这些药物抑制钙依赖性磷酸酶钙调神经磷酸酶(环孢菌素和FK506)或抑制对生长因子诱导的信号转导很重要

的p70S6激酶(雷帕霉素)(Liu等人,Cell 66:807-815,1991;Henderson等人,Immun 73:316-321,1991;Bierer等人,Curr.Opin.Immun 5:763-773,1993)。在进一步的实施方案中,将本发明的细胞组合物与骨髓移植、使用化学治疗剂如氟达拉滨、外粒子束辐射疗法(XRT)、环磷酰胺或抗体如OKT3或CAMPATH的T细胞消融疗法结合(例如,之前、同时或之后)对患者施用。在另一实施方案中,在B细胞消融疗法(如与CD20反应的药剂,例如利妥昔单抗)之后施用本发明的细胞组合物。例如,在一个实施方案中,受试者可以经受高剂量化学治疗的标准治疗,接着进行外周血干细胞移植。在某些实施方案中,移植之后,受试者接受本发明的扩增免疫细胞的输注。在另一实施方案中,在手术之前或之后施用扩增的细胞。

[0618] 要对患者施用的上述治疗的剂量将根据所治疗的病状的确切性质和治疗的接受者而变化。可以根据本领域接受的做法来进行用于人施用的剂量缩放。例如,对于成年患者来说,CAMPATH的剂量通常在1至约100mg的范围内,通常每天施用,持续时段在1天与30天之间。在某些实施方案中,每天使用1至10mg。在其它实施方案中,可以使用每天高达40mg的较大剂量(例如,如美国专利第6,120,766号中所述)。

[0619] 免疫缀合物

[0620] 本发明还涉及免疫缀合物(可互换地称为“抗体-药物缀合物”或“ADC”),其包含与细胞毒性剂如化学治疗剂、生长抑制剂、毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(即,放射性缀合物)缀合的抗体。

[0621] 在某些实施方案中,免疫缀合物包含抗体和化学治疗剂或其它毒素。上文已经描述了可用于产生这类免疫缀合物的化学治疗剂。可以使用的酶活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、莫迪素A链、 α -八叠球菌素、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆素、皂草抑制剂、白树毒素、有丝分裂素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和三环脱氧烯醇类毒素。多种放射性核素可用于产生放射性缀合抗体。实例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。抗体和细胞毒性剂的缀合物是使用多种双官能蛋白质偶联剂制备的,如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫杂环戊烷(IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(如己二酰亚胺二甲酯HCL)、活性酯(如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(如戊二醛)、双叠氮基化合物(如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮鎓衍生物(如双-(对重氮鎓苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如甲代亚苯基2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以如Vitetta等人,Science.238:1098(1987)中所述来制备蓖麻毒素免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂。参见W094/11026。

[0622] 本文也考虑了抗体和一种或多种小分子毒素的缀合物,所述小分子毒素如卡利奇霉素(calicheamicin)、奥瑞他汀肽如单甲基奥瑞他汀(MMAE)(多拉司他汀的合成类似物)、美登木素生物碱如DM1、三酮环烯醇和CC1065,以及这些毒素的具有毒素活性的衍生物。毒素的另外的非限制性实例包括W0 2014144871中描述的那些,该专利文献的公开内容以全文引用的方式并入本文。

[0623] 示例性免疫缀合物-抗体-药物缀合物

[0624] 本发明的免疫缀合物(或“抗体-药物缀合物”(“ADC”))可具有下式I,其中抗体通

过任选的接头(L)与一个或多个药物部分(D)缀合(即,共价连接)。ADC可包括thioMAb药物缀合物(“TDC”)。

[0625] Ab-(L-D)_pI

[0626] 因此,抗体可直接或经由接头与药物缀合。在式I中,p是每个抗体的药物部分的平均数,其范围可以是例如每个抗体约1至约20个药物部分,并且在某些实施方案中,每个抗体1至约8个药物部分。本发明包括包含式I的抗体-药物化合物的混合物的组合物,其中每个抗体的平均载药量为约2至约5或约3至约4。

[0627] a. 示例性接头

[0628] 接头可包含一个或多个接头组件。示例性接头组件包括6-马来酰亚胺基己酰基(“MC”)、马来酰亚胺基丙酰基(“MP”)、缬氨酸-瓜氨酸(“val-cit”或“vc”)、丙氨酸-苯丙氨酸(“ala-phe”)、对氨基苄氧羰基(“PAB”)以及与接头试剂缀合产生的那些:形成接头部分4-巯基戊酸(“SPP”)的N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯、形成接头部分4-((2,5-二氧化吡咯烷-1-基)甲基)环己烷甲酸(“SMCC”,本文中也称为“MCC”)的N-琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1甲酸酯、形成接头部分4-巯基丁酸(“SPDB”)的2,5-二氧化吡咯烷-1-基4-(吡啶-2-基二硫烷基)丁酸酯、N-琥珀酰亚胺基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(“SIAB”)、作为一个或多个重复单元(“EO”或“PEO”)的亚乙基氧基-CH₂CH₂O-。另外的接头组件是本领域中已知的,并且一些在本文中有描述。各种接头组件是本领域中已知的,下文描述了其中的一些。

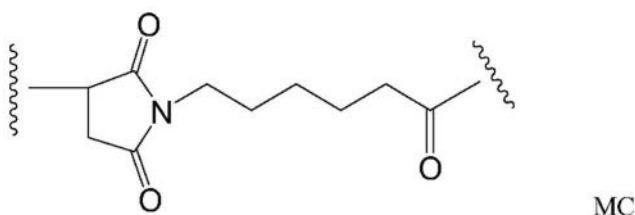
[0629] 接头可以是促进药物在细胞中释放的“可切割接头”。例如,可以使用酸不稳定接头(例如,脘)、蛋白酶敏感(例如,肽酶敏感)接头、光不稳定接头、二甲基接头或含有二硫化物的接头(Chari等人,Cancer Research 52:127-131(1992);美国专利第5,208,020号)。

[0630] 在某些实施方案中,接头如下式II所示:

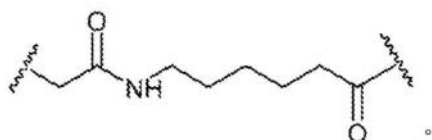
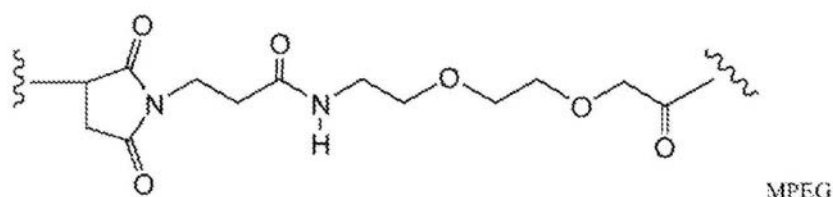
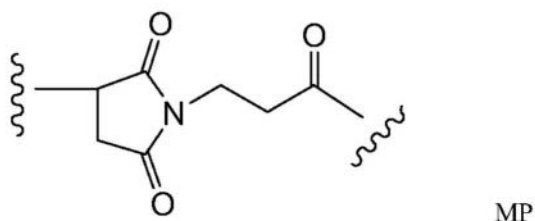
[0631] -A_a-W_w-Y_y- II

[0632] 其中A是拉伸单元,且a是0至1的整数;W是氨基酸单元,且w是0至12的整数;Y是间隔单元,且y是0、1或2;并且Ab、D和p如上式I所定义。US2005-0238649A1中描述了这类接头的示例性实施方案,该专利文献明确以引用的方式并入本文。

[0633] 在一些实施方案中,接头组件可包含将抗体与另一接头组件或药物部分连接的“拉伸单元”。下面显示了示例性拉伸单元(其中波浪线表示与抗体共价连接的位点):



[0634]



[0635] 在一些实施方案中,接头组件可包含氨基酸单元。在一个这样的实施方案中,氨基酸单元允许蛋白酶切割接头,从而在暴露于细胞内蛋白酶如溶酶体酶时促进药物从免疫缀合物中释放。参见例如Doronina等人,(2003)Nat.Biotechnol.21:778-784。示例性氨基酸单元包括但不限于二肽、三肽、四肽和五肽。示例性二肽包括:缬氨酸-瓜氨酸(vc或val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(af或ala-phe);苯丙氨酸-赖氨酸(fk或phe-lys);或N-甲基-缬氨酸-瓜氨酸(Me-val-cit)。示例性三肽包括:甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(gly-val-cit)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(gly-gly-gly)。氨基酸单元可包含天然存在的氨基酸残基,以及少量氨基酸和非天然存在的氨基酸类似物,如瓜氨酸。可以设计氨基酸单元,并优化它们对由特定酶(例如,肿瘤相关蛋白酶、组织蛋白酶B、C和D或纤溶酶蛋白酶)进行酶促切割的选择性。

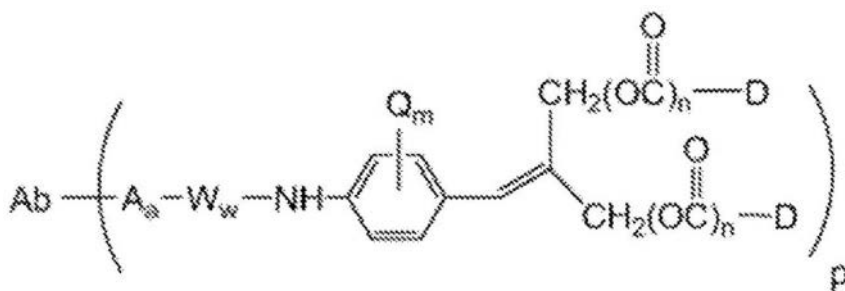
[0636] 在一些实施方案中,接头组件可包含直接或通过拉伸单元和/或氨基酸单元将抗体与药物部分连接的“间隔”单元。间隔单元可以是“自毁的”或“非自毁的”。“非自毁的”间隔单元是其中部分或全部间隔单元在ADC的酶促(例如,蛋白水解)切割后仍与药物部分结合的间隔单元。非自毁的间隔单元的实例包括甘氨酸间隔单元和甘氨酸-甘氨酸间隔单元,但不限于此。也考虑了对序列特异性酶促切割敏感的肽间隔基的其它组合。例如,肿瘤细胞相关蛋白酶对含有甘氨酸-甘氨酸间隔单元的ADC进行酶促切割将导致甘氨酸-甘氨酸-药物部分从ADC的剩余部分中释放。在一个这样的实施方案中,然后使甘氨酸-甘氨酸-药物部分在肿瘤细胞中经历单独的水解步骤,从而将甘氨酸-甘氨酸间隔单元与药物部分切割开来。

[0637] “自毁的”间隔单元允许释放药物部分而无需单独的水解步骤。在某些实施方案

中,接头的间隔单元包含对氨基苄基单元。在一个这样的实施方案中,对氨基苄醇经由酰胺键连接于氨基酸单元,并且在苄醇与细胞毒性剂之间形成氨基甲酸酯、甲基氨基甲酸酯或碳酸酯。参见例如Hamann等人,(2005)Expert Opin.Ther.Patents(2005)15:1087-1103。在一个实施方案中,间隔单元是对氨基苄氧羰基(PAB)。在某些实施方案中,对氨基苄基单元的亚苄基部分被 Q_m 取代,其中Q是-Ci-Cs烷基、-O-(Ci-Cs烷基)、-卤素、-硝基或-氰基;且m是0-4范围内的整数。自毁的间隔单元的实例进一步包括但不限于电子上类似于对氨基苄醇的芳族化合物(参见例如US2005/0256030 A1),如2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等人,(1999)Bioorg.Med.Chem.Lett.9:2237)和邻或对氨基苄基缩醛。可以使用在酰胺键水解时经历环化的间隔基,如取代和未取代的4-氨基丁酸酰胺(Rodrigues等人,Chemistry Biology,1995,2,223);适当取代的双环[2.2.1]和双环[2.2.2]环体系(Storm等人,/.Amer.Chem.Soc,1972,94,5815);和2-氨基苯基丙酸酰胺(Amsberry等人,/.Org.Chem.,1990,55,5867)。

[0638] 在甘氨酸的 α -位置被取代的含胺药物的消除(Kingsbury,等人,/.Med.Chem.,1984,27,1447)也是可用于ADC的自毁间隔基的实例。

[0639] 在一个实施方案中,间隔单元是如下所示的支链双(羟甲基)苯乙烯(BHMS)单元,其可用于并入和释放多种药物。



[0640]

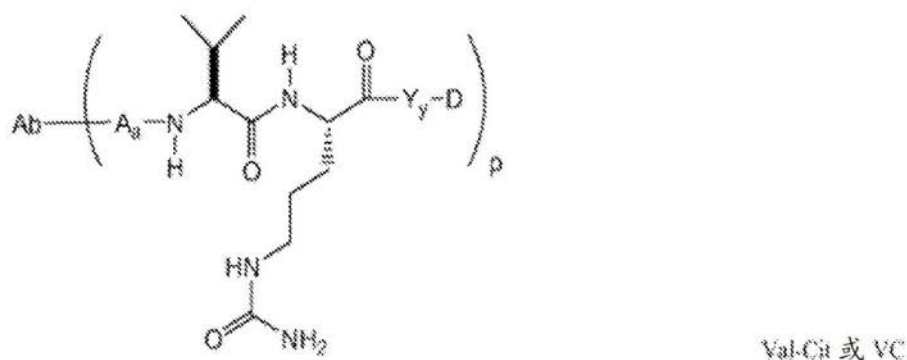
酶促切割

2 种药物

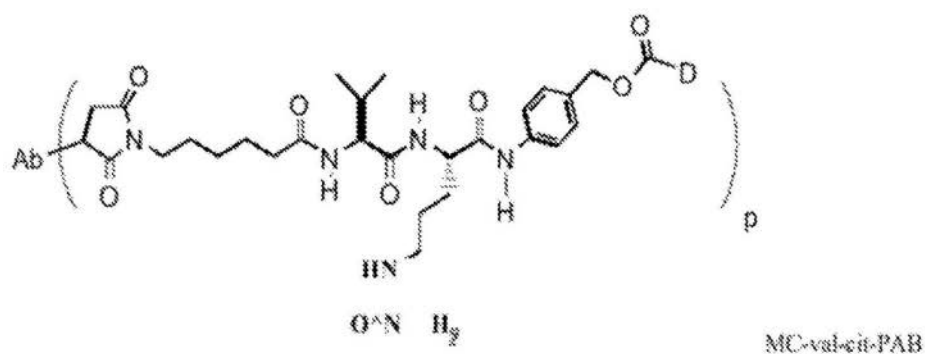
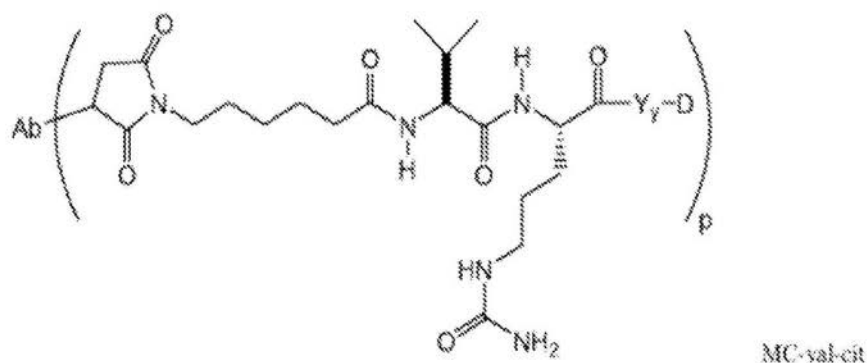
[0641] 其中Q是-Ci-Cs烷基、-O-(Ci-Cs烷基)、-卤素、-硝基或-氰基;m是0-4范围内的整数;n是0或1;且p的范围是1至约20。

[0642] 在另一实施方案中,接头L可以是用于将多于一个药物部分通过分支的多官能接头部分共价连接于抗体的树枝状接头(Sun等人(2002)Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215;Sun等人(2003)Bioorganic&Medicinal Chemistry 11:1761-1768)。树枝状接头可增加药物与抗体的摩尔比,即载量,其与ADC的效力有关。因此,在半胱氨酸工程化抗体仅带有一个反应性半胱氨酸硫醇基团的情况下,众多药物部分可通过树枝状接头连接。

[0643] 下面显示了在式II的ADC的上下文中的示例性接头组件及其组合:



[0644]



[0645] 可以通过本领域中已知的方法(如US 2005-0238649 A1中描述的方法)合成接头组件,包括拉伸基、间隔基和氨基酸单元。接头的另外的非限制性实例包括W0 2015095953中描述的那些,该专利文献的公开内容以全文引用的方式并入本文。

[0646] b. 示例性药物部分

[0647] (1) 美登素和美登素类化合物

[0648] 在一些实施方案中,免疫缀合物包含与一种或多种美登素类化合物分子缀合的抗体。美登素类化合物是通过抑制微管蛋白聚合起作用的有丝分裂抑制剂。美登素首先分离自东非灌木齿叶美登木 (*Maytenus serrata*) (美国专利第3896111号)。随后,发现某些微生物也会产生美登素类化合物,如美登醇和C-3美登醇酯(美国专利第4,151,042号)。合成的美登醇及其衍生物和类似物公开于例如美国专利第4,137,230号;第4,248,870号;第4,256,746号;第4,260,608号;第4,265,814号;第4,294,757号;第4,307,016号;第4,308,268号;第4,308,269号;第4,309,428号;第4,313,946号;第4,315,929号;第4,317,821号;第4,322,348号;第4,331,598号;第4,361,650号;第4,364,866号;第4,424,219号;第4,450,254

号;第4,362,663号;和第4,371,533号中。

[0649] 美登素类化合物药物部分是抗体-药物缀合物中有吸引力的药物部分,因为它们:
(i) 相对容易通过发酵或化学修饰或发酵产物的衍生化来制备,(ii) 易于用适合通过二硫键和非二硫键接头与抗体缀合的官能团进行衍生化,(iii) 在血浆中稳定,和(iv) 针对多种肿瘤细胞系有效。

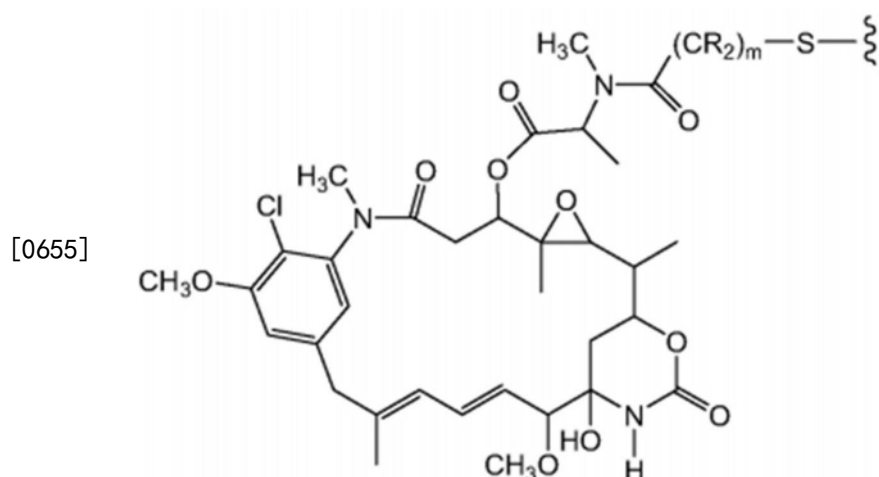
[0650] 适合用作美登素类化合物药物部分的美登素化合物是本领域中熟知的,并且可以根据已知的方法从天然来源分离或采用基因工程和发酵技术产生(US 6790952;US2005/0170475;Yu等人(2002)PNAS 99:7968-7973)。也可以根据已知的方法合成制备美登醇和美登醇类似物。

[0651] 示例性美登素类化合物药物部分包括具有修饰的芳族环的那些,如:C-19-脱氯(美国专利第4256746号)(通过安沙霉素P2的氢化铝锂还原制备);C-20-羟基(或C-20-脱甲基)+/-C-19-脱氯(美国专利第4361650号和第4307016号)(通过使用链霉菌或放线菌脱甲基或使用LAH脱氯来制备);和C-20-脱甲氧基、C-20-酰氧基(-OCOR)、+/-脱氯(美国专利第4,294,757号)(通过使用酰氯酰化制备)以及在其它位置具有修饰的那些。

[0652] 示例性美登素类化合物药物部分还包括具有修饰的那些,如:C-9-SH(美国专利第4424219号)(通过美登醇与H₂S或P2S₅反应制备);C-14-烷氧基甲基(脱甲氧基/CH₂OR)(US 4331598);C-14-羟甲基或酰氧基甲基(CH₂OH或CH₂OAc)(美国专利第4450254号)(由诺卡菌制备);C-15-羟基/酰氧基(US 4364866)(通过由链霉菌转化美登醇制备);C-15-甲氧基(美国专利第4313946号和第4315929号)(分离自裸花山麻杆(*Trewia nudiflora*));C-18-N-脱甲基(美国专利第4362663号和第4322348号)(通过链霉菌对美登醇的脱甲基化制备);和4,5-脱氧(US 4371533)(通过美登醇的三氯化钛/LAH还原制备)。

[0653] 已知美登素化合物上的许多位置可用作连接位置,这取决于连接的类型。例如,为了形成酯键,具有羟基的C-3位置、用羟甲基修饰的C-14位置、用羟基修饰的C-15位置和具有羟基的C-20位置均是合适的(US 5208020;US RE39151;US 6913748;US 7368565;US 2006/0167245;US2007/0037972)。

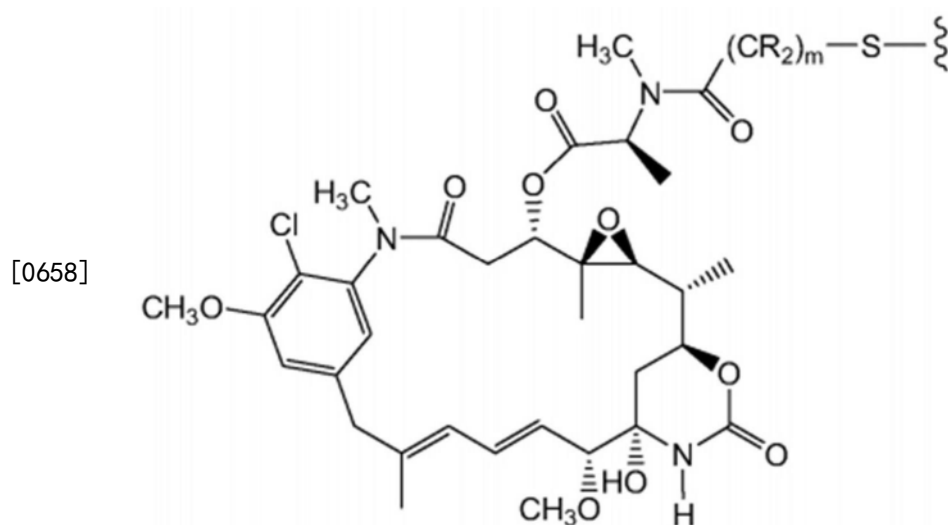
[0654] 美登素类化合物药物部分包括具有如下结构的那些:



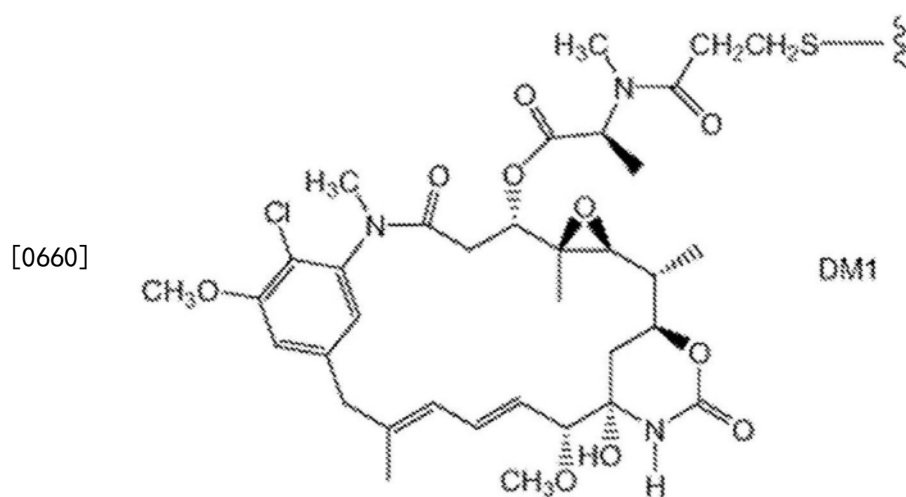
[0656] 其中波浪线表示美登素类化合物药物部分的硫原子与ADC的接头的共价连接。R可以独立地为H或C1-C6烷基。将酰胺基团与硫原子连接的亚烷基链可以是甲烷基、乙烷基或丙基,即m是1、2或3(US 633410;US 5208020;US 7276497;Chari等人(1992)Cancer

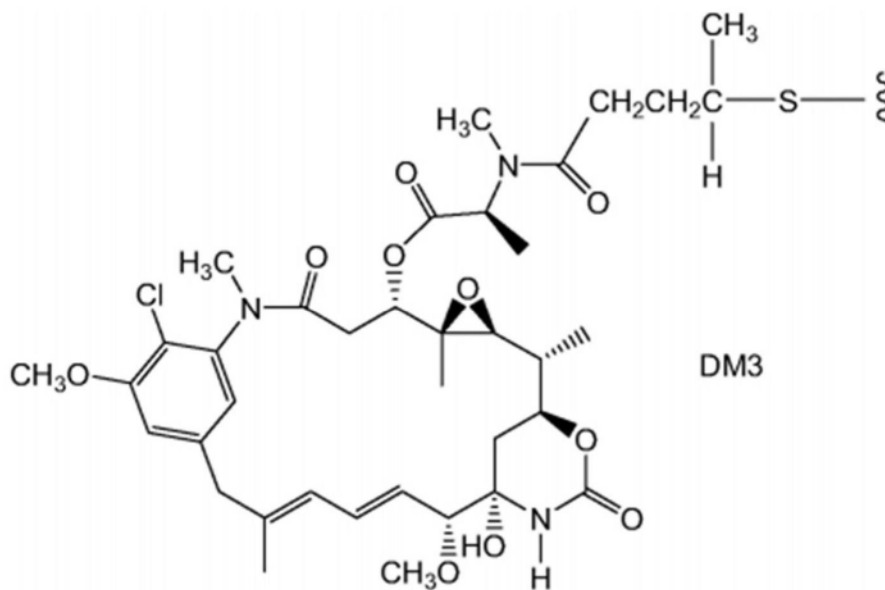
Res.52:127-131;Liu等人(1996)Proc.Natl.Acad.Sci USA 93:8618-8623)。

[0657] 本发明的化合物考虑了美登素类化合物药物部分的所有立体异构体,即D的手性碳处的R和S构型的任意组合。在一个实施方案中,美登素类化合物药物部分将具有以下立体化学:

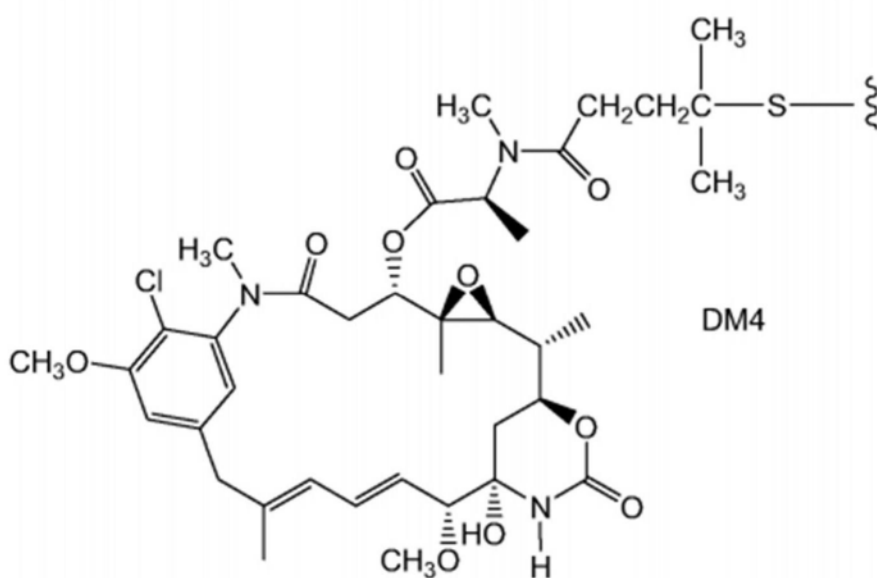


[0659] 美登素类化合物药物部分的示例性实施方案包括:DM1;DM3;和DM4,具有如下结构:



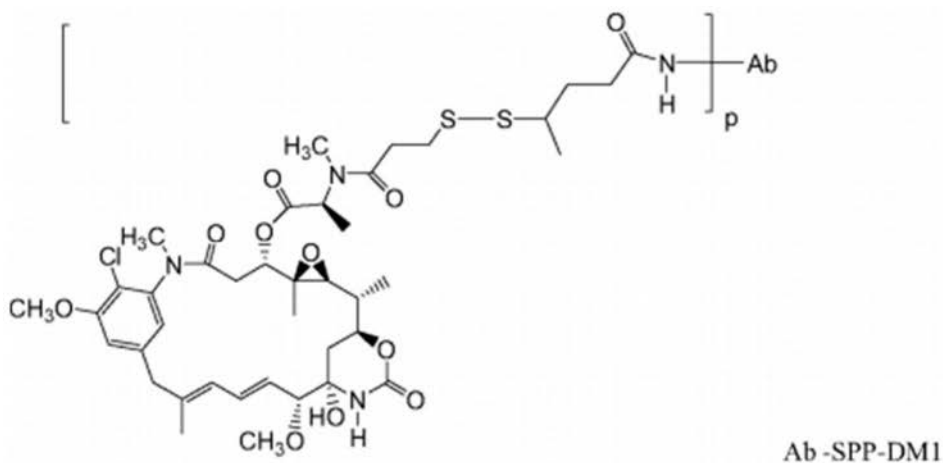


[0661]

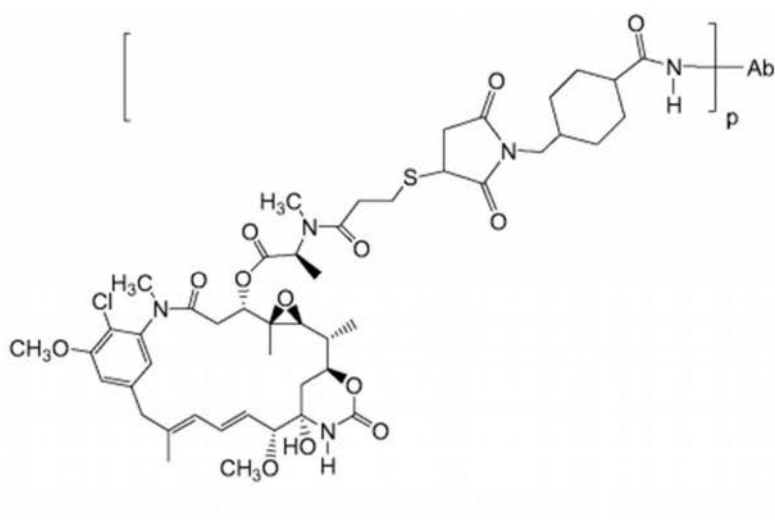
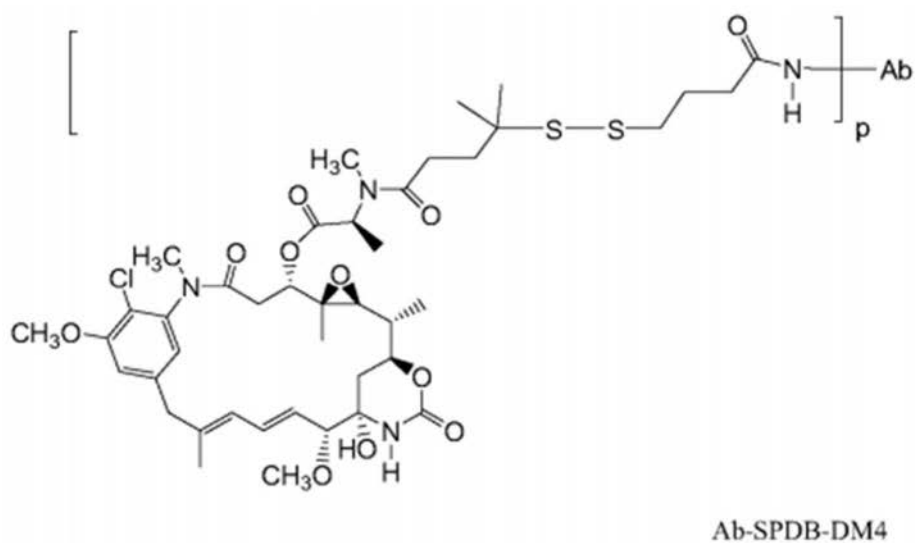


[0662] 其中波浪线表示药物的硫原子与抗体-药物缀合物的接头(L)的共价连接。(W0 2005/037992;US2005/0276812 A1)。

[0663] 其它示例性美登素类化合物抗体-药物缀合物具有以下结构和缩写(其中Ab是抗体,且p是1至约8):

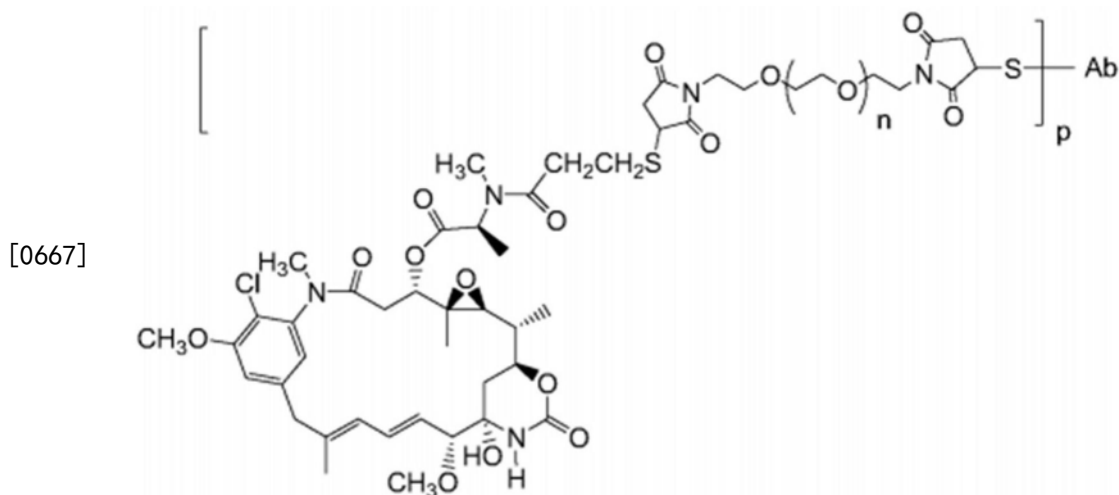


[0664]



[0665] 在一个实施方案中,形成抗体-药物缀合物,其中DM4通过SPDB接头与抗体的硫醇基团连接(参见以全文引用的方式并入本文的美国专利第6913748号和第7276497号)。

[0666] 其中DM1通过BMPE0接头与抗体的硫醇基团连接的示例性抗体-药物缀合物具有如下结构和缩写:



[0668] 其中Ab是抗体；n是0、1或2；且p是1、2、3或4。

[0669] 含有美登素类化合物的免疫缀合物、其制备方法以及它们的治疗用途公开于例如 Erickson等人(2006) Cancer Res. 66 (8) :4426-4433；美国专利第5,208,020号、第5,416,064号、US2005/0276812 A1和欧洲专利EP 0 425 235 B1中，上述专利文献的公开内容明确以引用的方式特此并入。

[0670] 抗体-美登素类化合物缀合物通过将抗体与美登素类化合物分子化学连接而制备，不会显著降低抗体或美登素类化合物分子的生物活性。参见例如美国专利第5,208,020号(其公开内容明确以引用的方式特此并入)。美登素类化合物可以通过已知技术合成，或从天然来源中分离。合适的美登素类化合物公开于例如美国专利第5,208,020号和上文提到的其它专利和非专利出版物中，如在美登醇分子的芳族环中或其它位置处修饰的美登醇和美登醇类似物，如各种美登醇酯。

[0671] 本领域中已知有许多连接基团用于制备抗体-美登素类化合物缀合物，包括例如美国专利第5208020号或EP专利0 425 235B1；Chari等人，Cancer Research 52:127-131 (1992)；和US2005/016993 A1中公开的那些，上述文献的公开内容明确以引用的方式特此并入。可以如US2005/0276812 A1，“Antibody-drug conjugates and Methods”中所公开的那样制备包含接头组件SMCC的抗体-美登素类化合物缀合物。接头包括二硫基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团或酯酶不稳定基团，如上面确认的专利中所公开。本文描述并例示了另外的接头。

[0672] 抗体和美登素类化合物的缀合物可以使用多种双官能蛋白质偶联剂制备，如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(SMCC)、亚氨基硫杂环戊烷(IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(如己二酰亚胺二甲酯HC1)、活性酯(如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(如戊二醛)、双叠氮基化合物(如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮鎓衍生物(如双-(对重氮鎓苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。在某些实施方案中，偶联剂是N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP) (Carlsson等人，Biochem. J. 173:723-737 (1978))或N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)，以提供二硫键。

[0673] 接头可在各种位置连接于美登素类化合物分子，这取决于连接的类型。例如，可以

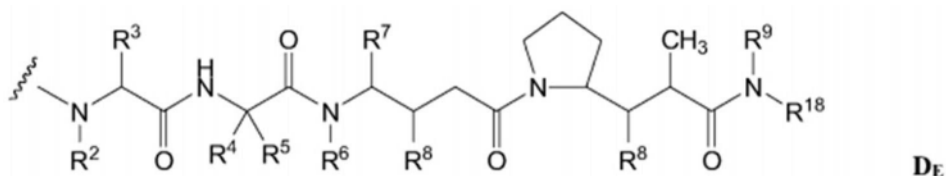
采用常规的偶联技术通过与羟基反应来形成酯键。该反应可以发生在具有羟基的C-3位置、用羟甲基修饰的C-14位置、用羟基修饰的C-15位置和具有羟基的C-20位置。在一个实施方案中,连接形成在美登醇或美登醇类似物的C-3位置。

[0674] (2) 奥瑞他汀类和多拉司他汀类

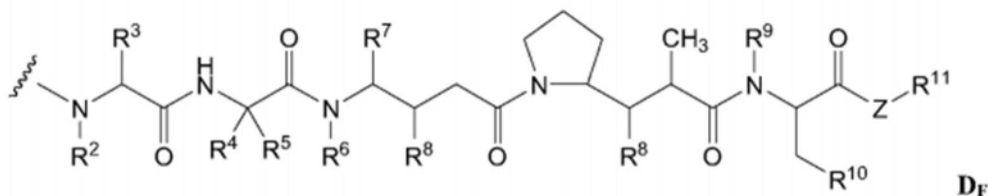
[0675] 在一些实施方案中,免疫缀合物包含与多拉司他汀或多拉司他汀肽类似物或衍生物(例如,奥瑞他汀(美国专利第5635483号;第5780588号))缀合的抗体。已表明多拉司他汀和奥瑞他汀干扰微管动力学、GTP水解以及核和细胞分裂(Woyke等人(2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45 (12):3580-3584),并且具有抗癌(美国专利第5663149号)和抗真菌活性(Pettit等人(1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)。多拉司他汀或奥瑞他汀药物部分可以通过肽药物部分的N(氨基)末端或C(羧基)末端与抗体连接(WO 02/088172)。

[0676] 示例性奥瑞他汀实施方案包括N末端连接的单甲基奥瑞他汀药物部分DE和DF(US2005/0238649,公开于Senter等人,Proceedings of the American Association for Cancer Research,第45卷,摘要号623,2004年3月28日提交,其公开内容明确以引用的方式全文并入)。

[0677] 肽药物部分可选自下式DE和DF:



[0678]



[0679] 其中DE和DF的波浪线表示与抗体或抗体-接头组件的共价连接位点,并且在每个位置独立地:

[0680] R^2 选自H和Ci-Cs烷基;

[0681] R^3 选自H、Ci-Cg烷基、C3-C8碳环、芳基、Ci-Cg烷基-芳基、Ci-Cg烷基-(C3-Cs碳环)、C3-C8杂环和Ci-Cg烷基-(C3-Cs杂环);

[0682] R^4 选自H、Ci-Cg烷基、C3-C8碳环、芳基、Ci-Cg烷基-芳基、Ci-Cg烷基-(C3-Cs碳环)、C3-C8杂环和Ci-Cg烷基-(C3-Cs杂环);

[0683] R^5 选自H和甲基;

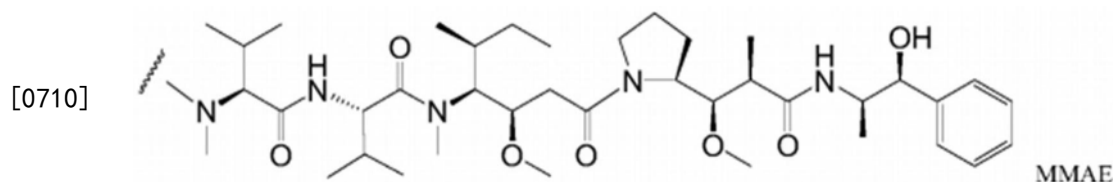
[0684] 或者 R^4 和 R^5 共同形成碳环,并具有式 $-(CR^aR^b)_n-$,其中

[0685] R^a 和 R^b 独立地选自H、Ci-Cg烷基和C3-C8碳环,并且n选自2、3、4、5和6;

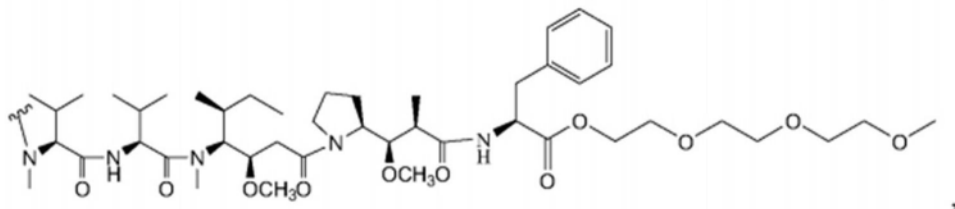
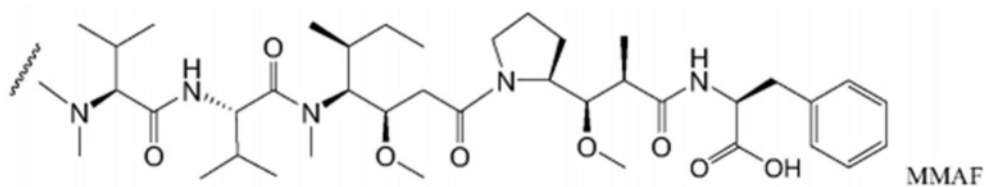
[0686] R^6 选自H和Ci-Cg烷基;

[0687] R^7 选自H、Ci-Cs烷基、C3-C8碳环、芳基、Ci-Cs烷基-芳基、Ci-Cs烷基-(C3-Cs碳环)、C3-C8杂环和Ci-Cg烷基-(C3-Cs杂环);

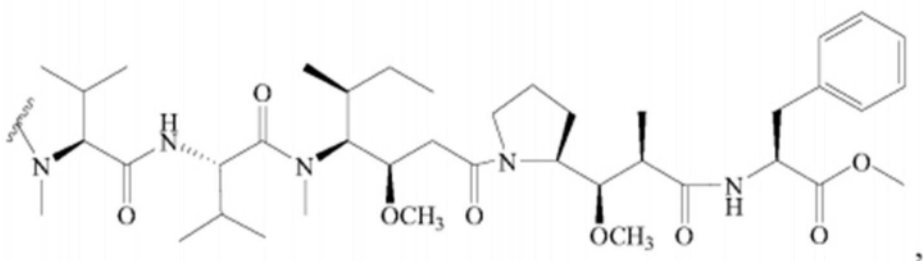
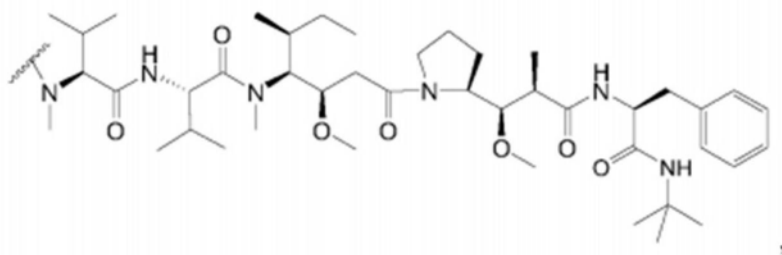
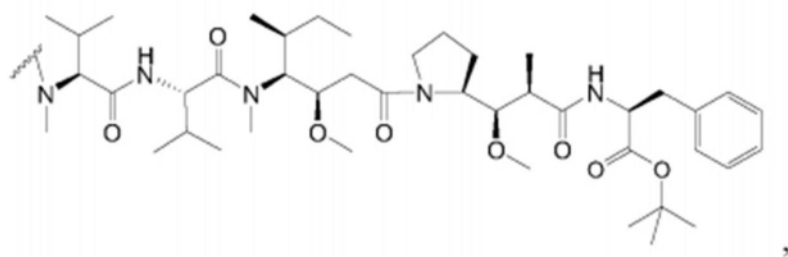
- [0688] 每个 R^8 独立地选自H、OH、Ci-Cs烷基、C3-C8碳环和O- (Ci-Cs烷基)；
- [0689] R^9 选自H和Ci-Cs烷基；
- [0690] R^{10} 选自芳基或C3-C8杂环；
- [0691] Z是O、S、NH或 NR^{12} ，其中 R^{12} 是Ci-Cs烷基； R^{11} 选自H、C1-C20烷基、芳基、C₃-C₈杂环、 $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ 或 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ ；
- [0692] m是1-1000范围内的整数；
- [0693] R^{13} 是C₂-C₈烷基；
- [0694] R^{14} 是H或Ci-C₈烷基；
- [0695] R^{15} 每次出现时独立地为H、COOH、 $-(CH_2)_n$ 、 $-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n$ 、 $-SO_3H$ 或 $-(CH_2)_n-SO_3$ -Ci-C₈烷基；
- [0696] R^{16} 每次出现时独立地为H、Ci-C₈烷基或 $-(CH_2)_n-COOH$ ；
- [0697] R^{18} 选自 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -芳基、 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(C₃-C₈杂环)和 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(C₃-C₈碳环)；且
- [0698] n是0至6范围内的整数。
- [0699] 在一个实施方案中， R^3 、 R^4 和 R^7 独立地为异丙基或仲丁基，且 R^5 是-H或甲基。在示例性实施方案中， R^3 和 R^4 各自是异丙基， R^5 是-H，且 R^7 是仲丁基。
- [0700] 在又一实施方案中， R^2 和 R^6 各自是甲基，且 R^9 是-H。
- [0701] 在再一实施方案中， R^8 每次出现时是 $-OCH_3$ 。
- [0702] 在示例性实施方案中， R^3 和 R^4 各自是异丙基， R^2 和 R^6 各自是甲基， R^5 是-H， R^7 是仲丁基， R^8 每次出现时是 $-OCH_3$ ，且 R^9 是-H。
- [0703] 在一个实施方案中，Z是-O-或-NH-。
- [0704] 在一个实施方案中， R^{10} 是芳基。
- [0705] 在示例性实施方案中， R^{10} 是-苯基。
- [0706] 在示例性实施方案中，当Z是-O-时， R^{11} 是-H、甲基或叔丁基。
- [0707] 在一个实施方案中，当Z是-NH时， R^{11} 是 $-CH(R^{15})_2$ ，其中 R^{15} 是 $-(CH_2)_n$ 、 $-N(R^{16})_2$ ，且 R^{16} 是-Ci-Cs烷基或 $-(CH_2)_n-COOH$ 。
- [0708] 在另一实施方案中，当Z是-NH时， R^{11} 是 $-CH(R^{15})_2$ ，其中 R^{15} 是 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 。
- [0709] 式DE的示例性奥瑞他汀实施方案是MMAE，其中波浪线表示与抗体-药物缀合物的接头(L)的共价连接：

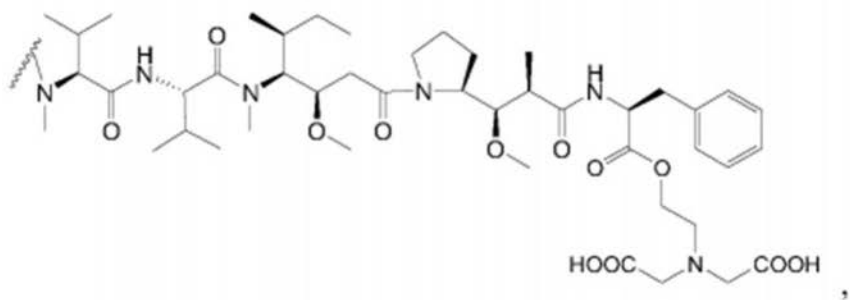
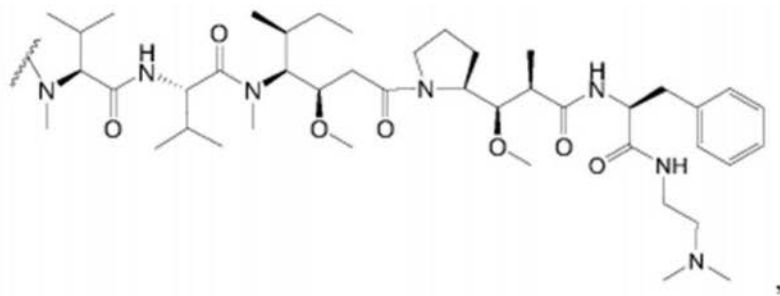


- [0711] 式DF的示例性奥瑞他汀实施方案是MMAF，其中波浪线表示与抗体-药物缀合物的接头(L)的共价连接(参见US2005/0238649和Doronina等人，(2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124)：

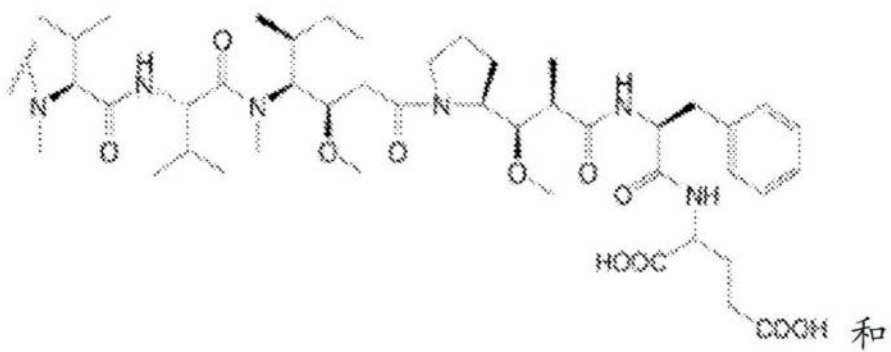
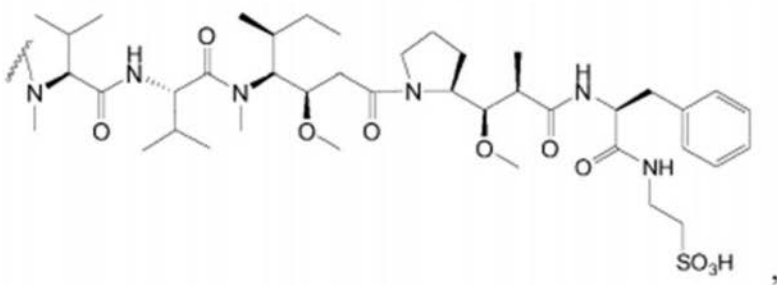


[0712]

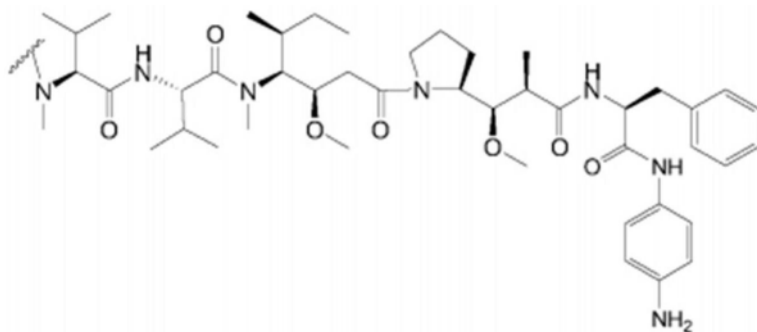




[0713]



[0714]

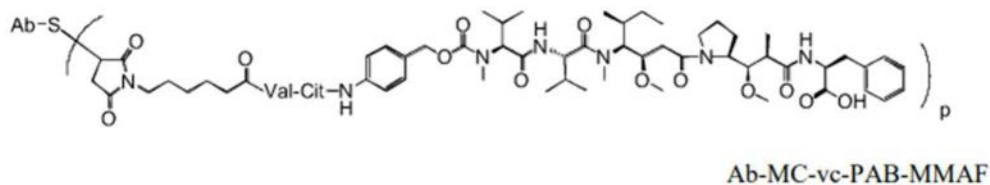


[0715] 一方面,亲水性基团包括但不限于三乙二醇酯(TEG),如上所示,可以在R¹¹处与药

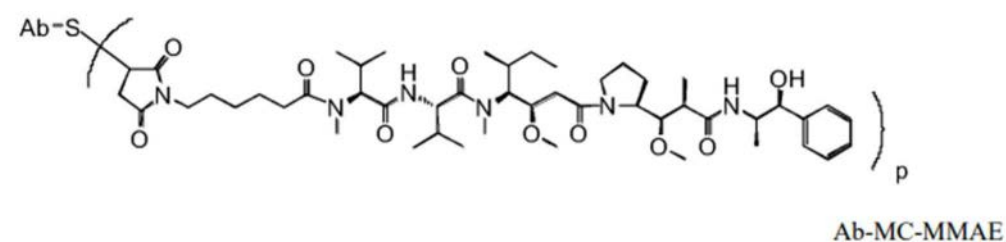
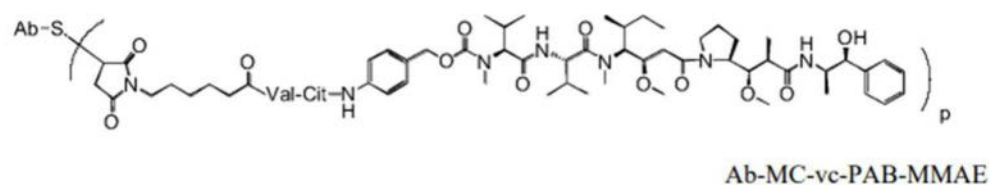
物部分连接。不受任何特定理论的束缚,亲水性基团有助于药物部分的内化和非聚集。

[0716] 包含奥瑞他汀/多拉司他汀或其衍生物的式I的ADC的示例性实施方案描述于US2005-0238649和Doronina等人,(2006)Bioconjugate Chem.17:114-124中,上述文献明确以引用的方式并入本文。

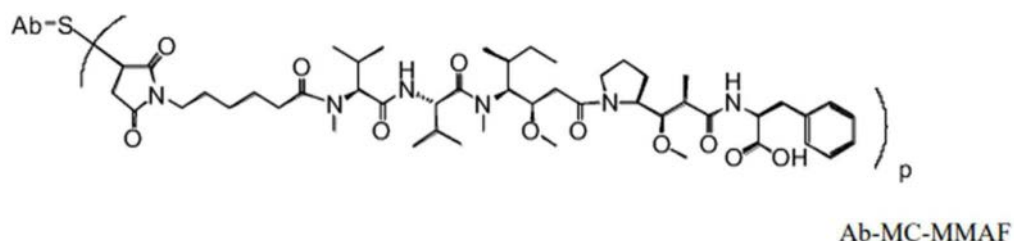
[0717] 包含MMAE或MMAF和各种接头组件的式I的ADC的示例性实施方案具有以下结构和缩写(其中“Ab”是抗体;p是1至约8,“Val-Cit”或“vc”是缬氨酸-瓜氨酸二肽;且“S”是硫原子。将要注意的是,在本文中对硫连接的ADC的某些结构描述中,抗体被表示为“Ab-S”仅是为了指示硫连接特征而不是指示特定的硫原子带有多个接头-药物部分。以下结构的左括号也可以被放到硫原子的左边、Ab与S之间,这将是本文通篇描述的本发明的ADC的等同描述。



[0718]



[0719]



[0720] 包含MMAF和各种接头组件的式I的ADC的示例性实施方案进一步包括Ab-MC-PAB-MMAF和Ab-PAB-MMAF。

[0721] 有意思的是,已显示包含通过不可蛋白水解切割的接头与抗体连接的MMAF的免疫缀合物具有与包含通过可蛋白水解切割的接头与抗体连接的MMAF的免疫缀合物相当的活性。参见Doronina等人,(2006)Bioconjugate Chem.17:114-124。在这样的情况下,药物释放被认为受细胞中的抗体降解影响。同上。

[0722] 通常,可以通过在两个或更多个氨基酸和/或肽片段之间形成肽键来制备基于肽的药物部分。这类肽键可例如根据液相合成方法来制备(参见E.Schroder和K.Liibke,“The

Peptides”,第1卷,第76-136页,1965,Academic Press),这是肽化学领域中熟知的。可以根据如下方法制备奥瑞他汀/多拉司他汀药物部分:US2005-0238649 A1;美国专利第5635483号;美国专利第5780588号;Pettit等人(1989)J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465;Pettit等人(1998)Anti-Cancer Drug Design 13:243-277;Pettit, G.R.等人, Synthesis, 1996, 719-725;Pettit等人(1996)/. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863;和Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784。

[0723] 特别地,可以采用US2005-0238649 A1和Doronina等人, (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124中描述的方法制备式DF的奥瑞他汀/多拉司他汀药物部分,如MMAF及其衍生物。可以采用Doronina等人, (2003) Nat. Biotech. 21:778-784中描述的方法制备式DE的奥瑞他汀/多拉司他汀药物部分,如MMAE及其衍生物。例如,如Doronina等人, (2003) Nat. Biotech. 21:778-784和专利申请公布第US 2005/0238649 A1号中所述,通过常规方法可以方便地合成药物-接头部分MC-MMAF、MC-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF和MC-vc-PAB-MMAE,然后与所关注的抗体缀合。

[0724] (3) 卡利奇霉素

[0725] 在其它实施方案中,免疫缀合物包含与一个或多个卡利奇霉素分子缀合的抗体。卡利奇霉素家族的抗生素能够在亚皮摩尔浓度下产生双链DNA断裂。关于卡利奇霉素家族的缀合物的制备,参见美国专利第5,712,374号、第5,714,586号、第5,739,116号、第5,767,285号、第5,770,701号、第5,770,710号、第5,773,001号、第5,877,296号(均属于American Cyanamid Company)。可以使用的卡利奇霉素的结构类似物包括但不限于 γ -I¹、ai¹、013¹、N-乙酰基- γ -I¹、PSAG和 Θ 'I (Hinman等人, Cancer Research 53:3336-3342 (1993); Lode等人, Cancer Research 58:2925-2928 (1998) 和前述的American Cyanamid的美国专利)。另一种可以与抗体缀合的抗肿瘤药物是QFA,其是抗叶酸剂。卡利奇霉素和QFA均具有细胞内作用位点,并且不容易穿过质膜。因此,这些药剂通过抗体介导的内化的细胞摄取大大增强了它们的细胞毒性作用。

[0726] c. 其它细胞毒性剂

[0727] 可以与抗体缀合的其它抗肿瘤剂包括BCNU、链佐星、长春新碱和5-氟尿嘧啶,统称为LL-E33288复合物的药剂家族,描述于美国专利第5,053,394号、第5,770,710号中,以及埃斯培拉霉素(esperamicin) (美国专利第5,877,296号)。

[0728] 可以使用的酶促活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、莫迪素A链、 α -八叠球菌素、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆素、皂草抑制剂、白树毒素、有丝分裂素、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和三环脱氧烯醇类毒素。参见例如1993年10月28日公布的WO 93/21232。本发明进一步考虑了在抗体与具有核酸溶解活性的化合物(例如,核糖核酸酶或DNA内切核酸酶,如脱氧核糖核酸酶;DNA酶)之间形成的免疫缀合物。

[0729] 在某些实施方案中,免疫缀合物可包含高放射性原子。多种放射性同位素可用于产生放射性缀合抗体。实例包括At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²以及Lu的放射性同位素。当免疫缀合物用于检测时,其可包含用于闪烁扫描研究的放射性原子,例如tc^{99m}或I¹²³,或用于核磁共振(MR)成像(也称为磁共振成像,mri)的自旋标记,如碘-123、

碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0730] 可以以已知的方式将放射性标记或其它标记并入免疫缀合物。例如,肽可以是生物合成的,或者可以通过化学氨基酸合成来合成,使用合适的氨基酸前体,涉及例如用氟-19代替氢。诸如 ^{99m}Tc 或 ^{123}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 和 ^{111}In 的标记可经由肽中的半胱氨酸残基连接。钇-90可经由赖氨酸残基连接。IODOGEN方法(Fraker等人(1978) Biochem.Biophys.Res.Comm.80:49-57可用于并入碘123。“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”(Chatal,CRC Press 1989)详细描述了其它方法。

[0731] 在某些实施方案中,免疫缀合物可包含与前药激活酶缀合的抗体,所述酶将前药(例如,肽基化学治疗剂,参见WO 81/01145)转化为活性药物,如抗癌药物。这类免疫缀合物可用于抗体依赖性酶介导的前药疗法(“ADEPT”)。可以与抗体缀合的酶包括但不限于碱性磷酸酶,其可用于将含有磷酸盐的前药转化成游离药物;芳基硫酸酯酶,其可用于将含有硫酸盐的前药转化成游离药物;胞嘧啶脱氨酶,其可将无毒的5-氟胞嘧啶转化成抗癌药物5-氟尿嘧啶;蛋白酶,如沙雷氏菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(如组织蛋白酶B和L),其可用于将含肽前药转化成游离药物;D-丙氨酰羧肽酶,其可用于转化含有D-氨基酸取代基的前药;碳水化合物切割酶,如 β -半乳糖苷酶和神经氨酸酶,其可用于将糖基化前药转化成游离药物; β -内酰胺酶,其可用于将用 β -内酰胺衍生的药物转化成游离药物;和青霉素酰胺酶,如青霉素V酰胺酶和青霉素G酰胺酶,它们可用于将在它们的胺氮上分别用苯氧乙酰基或苯乙酰基衍生的药物转化成游离药物。酶可以通过本领域中熟知的重组DNA技术与抗体共价结合。参见例如Neuberger等人,Nature 312:604-608(1984)。

[0732] d.载药量

[0733] 载药量由p表示,即式I的分子中每个抗体的药物部分的平均数。载药量的范围可以是每个抗体1至20个药物部分(D)。式I的ADC包括与一系列药物部分(1至20个)缀合的抗体的集合。来自缀合反应的ADC的制剂中每个抗体的药物部分的平均数可以通过常规的方法来表征,如质谱法、ELISA测定和HPLC。也可以确定根据p的ADC定量分布。在一些情况下,可以通过诸如反相HPLC或电泳的方法实现均质ADC的分离、纯化和表征,其中p是来自具有其它载药量的ADC的某个值。因此式I抗体-药物缀合物的药物制剂可以是这类缀合物与连接于1、2、3、4或更多个药物部分的抗体的非均质混合物。对于一些抗体-药物缀合物,p可能受抗体上的连接位点数的限制。例如,在连接是半胱氨酸硫醇的情况下,如在上述示例性实施方案中,抗体可以仅具有一个或几个半胱氨酸硫醇基团,或者可以仅具有一个或几个可以连接接头的足够反应性的硫醇基团。在某些实施方案中,较高的载药量(例如 $p>5$)可导致某些抗体-药物缀合物的聚集、不溶性、毒性或细胞渗透性的丧失。在某些实施方案中,本发明的ADC的载药量范围是1至约8;约2至约6;或约3至约5。实际上,已经显示对于某些ADC,每个抗体的药物部分的最佳比率可以小于8,并且可以为约2至约5。参见US2005-0238649 A1。

[0734] 在某些实施方案中,在缀合反应期间,与抗体缀合的药物部分少于理论最大值。抗体可含有例如不与药物-接头中间体或接头试剂反应的赖氨酸残基,如下文所讨论。一般地,抗体不含有许多可以与药物部分连接的游离和反应性的半胱氨酸硫醇基团;实际上,抗体中的大多数半胱氨酸硫醇残基以二硫桥形式存在。在某些实施方案中,可以在部分或完全还原条件下用还原剂如二硫苏糖醇(DTT)或三巯基乙基膦(TCEP)还原抗体,以产生反应性半胱氨酸硫醇基团。在某些实施方案中,使抗体经受变性条件以显露出反应性亲核基团,

如赖氨酸或半胱氨酸。

[0735] 可以以不同的方式控制ADC的载量(药物/抗体比率),例如通过:(i)限制药物-接头中间体或接头试剂相对于抗体的摩尔过量,(ii)限制缀合反应时间或温度,和(iii)半胱氨酸硫醇修饰的部分或限制还原条件。

[0736] 要理解的是,在多于一个亲核基团与药物接头中间体或接头试剂接着是药物部分试剂反应的情况下,则所得产物是ADC化合物的混合物,其分布有一个或多个与抗体连接的药物部分。可以通过对抗体具有特异性且对药物具有特异性的双重ELISA抗体测定法由混合物计算每个抗体的药物平均数。可以通过质谱法确认混合物中的个别ADC分子,并通过HPLC分离,例如疏水相互作用色谱法(参见例如McDonagh等人(2006) *Prot. Engr. Design & Selection* 19(7):299-307;Hamblett等人(2004) *Clin. Cancer Res.* 10:7063-7070;Hamblett, K.J.等人,“Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate”,摘要号624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 2004年3月27-31日, *Proceedings of the AACR*, 第45卷, 2004年3月;Alley, S.C.等人,“Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates”,摘要号627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 2004年3月27-31日, *Proceedings of the AACR*, 第45卷, 2004年3月)。在某些实施方案中,可以通过电泳或色谱法从缀合混合物中分离具有单一载量值的均质ADC。

[0737] I. 制品和试剂盒

[0738] 本发明的另一实施方案是含有可用于治疗、预防和/或诊断表达GPC3的癌症的物质的制品。所述制品包括容器和容器上或与容器关联的标签或包装说明书。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可由多种材料形成,如玻璃或塑料。容器容纳有效治疗、预防和/或诊断癌症病状的组合物,并且可具有无菌入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是本发明的抗GPC3抗体。在一些实施方案中,标签或包装说明书指示所述组合物用于治疗癌症。标签或包装说明书进一步包括对癌症患者施用抗体组合物的说明。另外,制品可进一步包括第二容器,其包含药学上可接受的缓冲液,如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。其可进一步包括从商业和用户角度来看所需的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0739] 还提供了可用于各种目的的试剂盒,例如用于表达GPC3的细胞杀伤测定、用于从细胞中纯化或免疫沉淀GPC3多肽、表达GPC3的细胞的IHC分析等。为了分离和纯化GPC3多肽,试剂盒可以含有与珠粒(例如,琼脂糖珠粒)偶联的抗GPC3抗体。可以提供含有用于体外检测和定量GPC3多肽的抗体的试剂盒,例如在ELISA或蛋白质印迹中。与所述制品一样,试剂盒包括容器和容器上或与容器关联的标签或包装说明书。容器容纳包含至少一种本发明的抗GPC3抗体的组合物。可以包括另外的容器,其含有例如稀释剂和缓冲液、对照抗体。标签或包装说明书可提供对组合物的描述以及关于预期的体外或检测用途的说明。

[0740] 在一个实施方案中,可以以试剂盒或包装盒的形式提供用于进行如本文公开的IHC体外诊断(IVD)测定的试剂。除了组织制备物本身之外,试剂盒中可以提供测定所需的部分或全部材料。试剂盒可包括但不限于例如用于安置组织制备物的载玻片、热灭活表位

恢复 (HIER) 缓冲液、任选用于封闭内源性过氧化物酶的高度稳定形式的过氧化氢、用于减少 IHC 常见的非特异性染色的通用封闭试剂、稀释或未稀释形式的抗 GPC3 一抗 (例如, 204)、根据特定检测方案适当标记的抗小鼠二抗、用于可视化检测抗体-抗原复合物形成的物质 (例如, 在用 HRP 标记二抗情况下的 DAB)、终止试剂、用作核复染剂的苏木精等。

[0741] 试剂盒或包装盒还可以包括用于收集或向医疗保健提供者运送患者样品 (例如, 组织制备物) 或用于从医疗保健提供者接收样品或用于执行本文所述的评估方法的说明和物品。例如, 除了说明性信息之外, 本发明中描述的试剂盒或包装盒可以包括用于肿瘤活检的一种或多种工具。

[0742] 试剂盒可包括一个或多个用于 IHC IVD 测定所需的试剂的容器。试剂可以以适合用于测定的浓度提供, 或附有助于测定的稀释说明。在一些实施方案中, 试剂盒含有用于测定组分和信息材料的单独容器、分隔器或隔室。例如, 测定组分可包含在瓶子或小瓶中, 且信息材料可包含在塑料套或包装盒中。在其它实施方案中, 试剂盒的单独元件包含在单个不可分割的容器中。例如, 测定试剂包含在其上附有标签形式的信息材料的瓶子或小瓶中。在一些实施方案中, 试剂盒包括多个 (例如, 一包) 单独的容器, 每个容器含有测定组分的一个或多个单位形式 (例如, 用于一次测定)。例如, 试剂盒包括多个安瓿、箔包装盒或泡罩包, 每个含有用于本公开的 IHC IVD 的测定试剂的单个单位。试剂盒的容器可以是气密的和/或防水的。容器可以贴上使用标签。

[0743] 试剂盒或包装盒的信息材料的形式不受限制。在许多情况下, 信息材料 (例如, 说明) 以印刷品 (例如, 印刷文本、图画和/或照片, 例如标签或印刷纸张) 的形式提供。然而, 信息材料也可以以其它格式提供, 如计算机可读材料、视频记录或音频记录。在另一实施方案中, 试剂盒的信例如物理地址、电子邮件地址、网站或息材料是联系信息, 例如物理地址、电子邮件地址、网站或电话号码, 其中试剂盒或包装盒的用户可以获得关于如何找到 IHC IVD 分析所需信息的实质性信息, 例如在哪里和如何确认对受试者进行的先前治疗, 以及如何进行测定以确定组织制备物的细胞上的 GPC3 表达。信息材料也可以以任意格式组合的形式提供。

[0744] 在一些实施方案中, 将组织制备物提供给测定提供者, 例如服务提供者 (如第三方机构) 或医疗保健提供者, 其在测定中评估样品并提供读数。例如, 在一个实施方案中, 测定提供者接收来自受试者的组织制备物, 如肿瘤活检样品, 采用本文所述的 IHC IVD 测定评估样品, 并确定样品含有表达膜结合 GPC3 的细胞。在一些实施方案中, 测定提供者 (例如, 服务提供者或医疗保健提供者) 可例如通过联系医疗保健提供者或数据库服务提供者进一步确定患者已接受的先前抗 GPC3 治疗的任何量或患者先前是否已接受过任何其它相关的免疫疗法或其它癌症疗法 (例如, 化学疗法) 的治疗。

[0745] 测定提供者可基于测定的结果进一步确定受试者是开始或继续用抗 GPC3 疗法 (如抗 GPC3 抗体或抗 GPC3 CAR-T 疗法) 治疗的候选者, 或受试者不是开始或继续这种治疗的候选者。在患者已经接受这种抗 GPC3 疗法的情况下, 基于测定的结果, 测定提供者可以潜在地确定是否应该或可以在给药、给药间隔等方面对当前的治疗进行任何调整。可以按照试剂盒内包括的说明来做出这类确定。换言之, 这类确定并非简单地是测定提供者的工作人员“头脑中”的, 而是可能基于试剂盒中包括的说明并且由 IHC IVD 测定本身确定的。

[0746] 测定提供者可以以任意合适的格式, 如通过邮件或电子方式, 或通过在线数据库,

向例如医疗保健提供者或患者或保险公司提供IHC IVD测定的结果,以及任选关于诊断、预后或适当的治疗选择中的一者或多者的结论。由测定提供者收集和提供的信息可以存储在数据库中。

[0747] 因此,一方面,本发明提供了一种制品,其包括容器;和容器内含有的组合物,其中所述组合物包含本发明的一种或多种GPC3抗体或CAR修饰的免疫细胞,优选CAR-T或CAR-NK细胞。在一个实施方案中,所述组合物包含本发明的核酸。在一个实施方案中,包含抗体或CAR修饰的免疫细胞、优选CAR-T或CAR-NK细胞的组合物进一步包含载剂,所述载剂在一些实施方案中是药学上可接受的。在一个实施方案中,本发明的制品进一步包括关于对受试者施用组合物(例如,抗体)的说明。

[0748] 一方面,本发明提供一种试剂盒,其包括第一容器,所述第一容器包含组合物,所述组合物包含本发明的一种或多种GPC3抗体或CAR修饰的免疫细胞,优选CAR-T或CAR-NK细胞;和包含缓冲液的第二容器。在一个实施方案中,缓冲液是药学上可接受的。在一个实施方案中,试剂盒进一步包括关于对受试者施用组合物(例如,抗体)的说明。

[0749] 一方面,本发明提供了本发明的制品在制备药物中的用途,所述药物用于诸如癌症、肿瘤和/或细胞增殖性病症的疾病的治疗性和/或预防性治疗。

[0750] 一方面,本发明提供了本发明的试剂盒在制备药物中的用途,所述药物用于诸如癌症、肿瘤和/或细胞增殖性病症的疾病的治疗性和/或预防性治疗。

[0751] III. 使用抗GPC3抗体的进一步的方法

[0752] A. 治疗方法

[0753] 本发明的抗体可用于例如体外、离体和体内治疗方法。一方面,本发明提供了体内或体外抑制细胞生长或增殖的方法,所述方法包括在允许抗体与GPC3结合的条件下使细胞暴露于抗GPC3抗体。“抑制细胞生长或增殖”意指将细胞的生长或增殖降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%,并且包括诱导细胞死亡。在某些实施方案中,所述细胞是肿瘤细胞。在某些实施方案中,所述细胞是异种移植物,例如,如本文所例示。抗体还可以(i)抑制与它们结合的细胞的生长或增殖;(ii)诱导与它们结合的细胞死亡;(iii)抑制与它们结合的细胞分层;(iv)抑制与它们结合的细胞转移;或(v)抑制包含与它们结合的细胞的肿瘤的血管形成。

[0754] 一方面,本发明的抗体用于治疗或预防细胞增殖性病症。在某些实施方案中,细胞增殖性病症与GPC3的表达和/或活性增加相关。例如,在某些实施方案中,细胞增殖性病症与细胞的表面上GPC3的表达增加相关。在某些实施方案中,细胞增殖性病症是肿瘤或癌症。

[0755] 一方面,本发明提供了治疗细胞增殖性病症的方法,包括对个体施用有效量的抗GPC3抗体。在一个实施方案中,抗GPC3抗体可用于在罹患与GPC3表达和/或活性增加相关的病症的个体中结合GPC3的方法,所述方法包括对个体施用所述抗体,使得个体中的GPC3被结合。在一个实施方案中,GPC3是人GPC3,并且个体是人个体。可以出于治疗目的对人施用抗GPC3抗体。此外,出于兽医学目的或作为人类疾病的动物模型,可以对表达GPC3的非人哺乳动物(例如,灵长类动物、猪、大鼠或小鼠)施用抗GPC3抗体,所述抗体与GPC3交叉反应。关于后者,这类动物模型可用于评估本发明的抗体的治疗功效(例如,测试施用的剂量和时间进程)。

[0756] 可以通过任意合适的方式施用本发明的抗体(和任何另外的治疗剂或佐剂),包括

肠胃外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内施用,并且如果需要局部治疗,则病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。此外,合适地通过脉冲输注施用抗体,特别是在抗体剂量递减的情况下。可以通过任意合适的途径给药,例如通过注射,如静脉内或皮下注射,这部分地取决于施用是短暂的还是长期的。

[0757] 本发明的抗体将以符合良好医学实践的方式配制、给药和施用。在此背景下考虑的因素包括所治疗的特定病症、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床状况、病症的原因、药剂的递送部位、施用的方法、施用的时间安排以及执业医师已知的其它因素。

[0758] B. 活性测定

[0759] 可以通过本领域中已知的各种测定法表征本发明的抗GPC3抗体的物理/化学特性和/或生物活性。

[0760] 1. 活性测定

[0761] 一方面,提供了用于确认其具有生物活性的抗GPC3抗体的测定法。生物活性可以包括例如抑制细胞生长或增殖的能力(例如,“细胞杀伤”活性)或诱导细胞死亡、包括程序性细胞死亡(细胞凋亡)的能力。还提供了在体内和/或体外具有这种生物活性的抗体。

[0762] 在某些实施方案中,测试抗GPC3抗体在体外抑制细胞生长或增殖的能力。抑制细胞生长或增殖的测定是本领域中熟知的。以本文所述的“细胞杀伤”测定例示的某些细胞增殖测定测量细胞活力。一种这样的测定是CellTiter-Glo™发光细胞活力测定法,其可以在商业上从Promega (Madison, WI) 获得。该测定基于存在的ATP(其是代谢活跃细胞的指标)的定量来确定培养物中存活细胞的数量。参见Crouch等人(1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81-88;美国专利第6602677号。测定可以以96孔或384孔格式进行,使其适合自动化高通量筛选(HTS)。参见Cree等人(1995) *Anticancer Drugs* 6:398-404。测定程序涉及将单一试剂(**CellTiter-Glo®**试剂)直接添加到培养的细胞中。这导致细胞溶解,并产生由荧光素酶反应产生的发光信号。发光信号与存在的ATP的量成正比,而ATP的量直接与培养物中存在的存活细胞的数量成正比。可以通过发光计或CCD摄相机成像装置记录数据。发光输出以相对光单位(RLU)表示。

[0763] 另一种细胞增殖测定法是“MTT”测定法,这是一种比色测定法,其测量线粒体还原酶将3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓溴化物氧化为甲臞。与CellTiter-Glo™测定一样,此测定指示细胞培养物中存在的代谢活跃细胞的数量。参见例如Mosmann (1983) *J. Immunol. Meth.* 65:55-63和Zhang等人, (2005) *Cancer Res.* 65:3877-3882。

[0764] 一方面,测试抗GPC3抗体在体外诱导细胞死亡的能力。诱导细胞死亡的测定是本领域中熟知的。在一些实施方案中,这类测定测量如通过碘化丙锭(PI)、台盼蓝(参见Moore等人, (1995) *Cytotechnology*, 17:1-11) 或7AAD的摄取指示的膜完整性的损失。在示例性PI摄取测定中,细胞在补充有10%热灭活FBS (Hyclone) 和2mM L-谷氨酰胺的杜氏改良伊格尔培养基(D-MEM):哈姆F-12 (50:50) 中培养。因此,该测定是在不存在补体和免疫效应细胞的情况下进行的。将细胞以每个培养皿 3×10^6 个的密度接种在100x20mm培养皿中,并使其附着过夜。移除培养基,并用单独的新鲜培养基或含有各种浓度的抗体的培养基替换。将细胞温育3天的时间段。处理之后,用PBS洗涤单层,并通过胰蛋白酶消化脱离。然后将细胞在4℃下以1200rpm离心5分钟,将沉淀重悬于3ml冷Ca²⁺结合缓冲液(10mM Hepes, pH 7.4、140mM NaCl、2.5mM CaCl₂)中,并等分到35mm带滤网盖的12x75mm管中(每管1ml,每个处理组3管)

以移除细胞团块。然后管接收PI (10 μ g/ml)。使用FACSCANTM流式细胞仪和FACSCONVERTTMCellQuest软件(Becton Dickinson)来分析样品。如此确认出通过PI摄取确定诱导统计学显著水平的细胞死亡的抗体。

[0765] 一方面,测试抗GPC3抗体在体外诱导细胞凋亡(程序性细胞死亡)的能力。诱导细胞凋亡的抗体的示例性测定是膜联蛋白结合测定。在示例性膜联蛋白结合测定中,如前一段中所讨论的那样在培养皿中培养和接种细胞。移除培养基,并用单独的新鲜培养基或含有0.001至10 μ g/ml抗体的培养基替换。在三天温育期之后,用PBS洗涤单层,并通过胰蛋白酶消化脱离。然后将细胞离心,重悬于Ca²⁺结合缓冲液中,并如前一段中讨论的那样等分到试管中。然后试管接收标记的膜联蛋白(例如膜联蛋白V-FITC) (1 μ g/ml)。使用FACSCANTM流式细胞仪和FACSCONVERTTMCellQuest软件(BD Biosciences)来分析样品。如此确认出相对于对照诱导统计学显著水平的膜联蛋白结合的抗体。诱导细胞凋亡的抗体的另一个示例性测定是用于检测基因组DNA的核小体降解的组蛋白DNA ELISA比色测定。可以使用例如细胞死亡检测ELISA试剂盒(Roche, Palo Alto, CA)来进行这种测定。

[0766] 用于任何上述体外测定的细胞包括天然表达GPC3或已被工程化以表达GPC3的细胞或细胞系。这类细胞包括相对于相同组织来源的正常细胞过表达GPC3的肿瘤细胞。这类细胞还包括表达GPC3的细胞系(包括肿瘤细胞系)和通常不表达GPC3但已被编码GPC3的核酸转染的细胞系。

[0767] 一方面,测试其抗GPC3抗体在体内抑制细胞生长或增殖的能力。在某些实施方案中,测试其抗GPC3抗体在体内抑制肿瘤生长的能力。这种测试可以使用体内模型系统,如异种移植物模型。在示例性异种移植物系统中,将人肿瘤细胞引入到免疫适当受损的非人动物(例如,SCID小鼠)中。对动物施用本发明的抗体。测量抗体抑制或减少肿瘤生长的能力。在上述异种移植物系统的某些实施方案中,人肿瘤细胞是来自人患者的肿瘤细胞。在某些实施方案中,通过皮下注射或通过移植到合适的部位(如乳腺脂肪垫)来将人肿瘤细胞引入到适当免疫受损的非人动物中。

[0768] 2. 结合测定及其它测定

[0769] 一方面,测试抗GPC3抗体的抗原结合活性。例如,在某些实施方案中,测试抗GPC3抗体与在细胞的表面上表达的GPC3结合的能力。FACS测定可用于这种测试。

[0770] 一方面,竞争测定可用于确认与包含SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4的可变结构域的单克隆抗体或包含:包含SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4的序列的单克隆抗体的可变结构域和来自IgG1的恒定结构域的嵌合抗体竞争与GPC3结合的单克隆抗体。在某些实施方案中,这种竞争性抗体与由单克隆抗体或嵌合抗体结合的相同表位(例如,线性或构象表位)结合,所述单克隆抗体包含SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4的可变结构域,所述嵌合抗体包含:包含SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4的序列的单克隆抗体的可变结构域和来自IgG1的恒定结构域。示例性竞争测定包括但不限于常规测定,如Harlow和Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) 中提供的那些。Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", 见于 *Methods in Molecular Biology*, 第66卷 (Humana Press, Totowa, NJ) 中提供了对抗体结合的表位作图的详细示例性方法。如果两种抗体彼此阻断50%或更多的结合,则认为这两种抗体结合相同的表位。

[0771] 在示例性竞争测定中,将固定的GPC3在包含第一标记抗体和第二未标记抗体的溶

液中温育,所述第一标记抗体与GPC3结合(例如,包含SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4的可变结构域的单克隆抗体,或包含:包含SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4的序列的单克隆抗体的可变结构域(图2)和来自IgG1的恒定结构域的嵌合抗体),所述第二未标记抗体被测试其与第一抗体竞争与GPC3结合的能力。第二抗体可存在于杂交瘤上清液中。作为对照,将固定的GPC3在包含第一标记抗体但不包含第二未标记抗体的溶液中温育。在允许第一抗体与GPC3结合的条件下温育后,移除过量的未结合抗体,并测量与固定的GPC3相关的标记的量。如果相对于对照样品在测试样品中与固定的GPC3相关的标记的量显著减少,则表明第二抗体与第一抗体竞争与GPC3的结合。在某些实施方案中,固定的GPC3存在于细胞的表面上或存在于获自表达其表面上的GPC3的细胞的膜制备物中。

[0772] 一方面,可以通过一系列测定进一步表征纯化的抗GPC3抗体,包括但不限于N末端测序、氨基酸分析、非变性尺寸排阻高压液相色谱法(HPLC)、质谱法、离子交换色谱法和木瓜蛋白酶消化。

[0773] 提供以下实施例仅用于说明目的,并不旨在以任何方式限制本发明的范围。

[0774] 本说明书中引用的所有专利、专利申请和文献参考均以全文引用的方式特此并入。

[0775] 实施例

[0776] 给出以下实施例是为了向本领域普通技术人员提供如何制备和利用本发明的方法和组合物的完整公开和描述,并不旨在限制发明人视为其发明的范围。已经努力确保关于所使用的数值(例如数量、温度等)的准确性,但也应考虑一些实验误差和偏差。除另指出外,份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,并且压力是大气压或接近大气压。

[0777] 实施例1.抗GPC3单克隆抗体产生

[0778] 免疫

[0779] 用纯化的rhGPC3蛋白对六周龄的Balb/c小鼠进行免疫,并用辅助双重疗法进行治疗。对于随后的加强免疫,在六周的过程中每只小鼠每3-4天接受rhGPC3与辅助疗法。

[0780] 小鼠供体的选择

[0781] 在第5次和第12次注射rhGPC3后获得补充采血,并收集血清样品用于滴度测定。为了监测免疫反应,通过流式细胞术筛选免疫小鼠的血清中与表达hGPC3的细胞系(例如,HepG2和RAT2 GPC3)结合的抗hGPC3抗体。选择具有最高血清滴度的小鼠进行融合。选择进行融合的小鼠在最后一次加强免疫后四天被处死。

[0782] 产生小鼠抗体的杂交瘤的产生

[0783] 将从小鼠淋巴结分离的淋巴细胞与非分泌型小鼠骨髓瘤细胞系Sp2/0-Ag14融合,并且这些杂交瘤细胞在6天的温育期后被单细胞分选到384孔板中。

[0784] 9天的温育期后,经由流式细胞术未稀释筛选杂交瘤上清液的抗原特异性。在96孔板中扩增阳性克隆,接着在24孔板中进行二次筛选和扩增。对来自杂交瘤上清液的抗体浓度进行定量、同种型测定/测序,并提交用于小规模纯化。

[0785] 测序程序

[0786] 从杂交瘤中分离总RNA。利用cDNA末端(RACE)5' /3'的SMARTer®快速扩增进行2步逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)(Takara Bio, Inc., Kusatsu, Shiga, Japan)。简言之,经由逆转录合成cDNA。使用针对特定同种型的基因特异性引物进行重链和轻链的RACE PCR

(Bradbury,A.2010.Cloning Hybridoma cDNA by RACE.见于:Kontermann R.,Dübel S.(编著)Antibody Engineering.Springer Protocols Handbooks.Springer,Berlin,Heidelberg.https://doi.org/10.1007/978-3-642-01144-3_2)。

[0787] 使用CloneJETPCR克隆试剂盒(ThermoFisher,Waltham,MA)对RACE PCR产物进行亚克隆,接着通过Kabat编号和分析进行Sanger测序和注释。具体地,框架区和CDR的范围已根据Kabat等人定义(参见Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Health and Human Services,1991)。Kabat数据库是在线维护的(万维网址ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)。

[0788] V_H 和 V_L 结构域的序列汇总

[0789] 下表1描述204mAb的框架区(FR 1-4)和互补决定区(CDR 1-3)的氨基酸序列。表2描述了对应于204的重链可变区和轻链可变区的核酸序列和氨基酸序列。表3和表4分别示出对应于表1和表2中所示序列的SEQ ID NO。

[0790]

表 1: 204 的框架区和互补决定区								
GP C3 克隆	同 种 型	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CD R3	FR4
204	IgG 2b	EVQLQQ SGPELV KP GASVKIS CKTSGY TFT (SEQ ID NO: 5)	EYAMH (SEQ ID NO: 6)	WVKQ SH GKSL EWIG (SEQ ID NO: 7)	GINPN NGVT TYNQ RFKG (SEQ ID NO: 8)	KATLTVDKS SSTAYMEL RSLTSEDSAV YYCAR (SEQ ID NO: 9)	GLL W YA Y (SE Q ID NO: 10)	WG QGT LVT VSA (SEQ ID NO: 11)
	κ	DIKMTQ SPSSMY ASLGER VTITC (SEQ ID NO: 12)	KASQDI NSYLS (SEQ ID NO: 13)	WFQQ KP GKSP KTLIY (SEQ ID NO: 14)	RANR LVD (SEQ ID NO: 15)	GVPSRFSGSG SGQDYS LTISSLEYED MGIYYC (SEQ ID NO: 16)	LQ YD E FPL T (SE Q ID NO: 17)	FGA G TKL ELK (SEQ ID NO: 18)

[0791]

表 2: 204 的 VH 和 VL 区			
GP C3 克隆	同 种 型	氨基酸序列	核苷酸序列
20 4	IgG 2b	EVQLQQSGPELVKPGASV KISCKTSGYTFTE YAMHWVKQSHGKSLEWI GGINPNNGVTT YNQRFK GKATLTVDKSSS TAYMELRSLTSED SAVYYCARGLLWYAYWG QGTLVTVSA (SEQ ID NO: 2)	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCT GGACCTGAGCTGG TGAAGCCTGGGGCTTCAGTGA AGATATCCTGCAA GACTTCTGGATACACATTCCT GAATACGCCATGC ACTGGGTGAAGCAGAGCCATG GAAAGAGCCTTGA GTGGATTGGAGGTATTAATCCT AACAATGGTGTTA CTACTTACAACCAGAGGTTCAA GGGCAAGGCCACA TTGACTGTAGACAAGTCCTCCA GCACAGCCTACATG GAGCTCCGCAGCCTGACATCTG AGGATTCTGCAGTC

[0792]

			TATTACTGTGCAAGAGGCCTAC TATGGTATGCTTAC TGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 1)
	κ	DIKMTQSPSSMYASLGER VTITCKASQDINS YLSWFQKPGKSPKTLIY RANRLVDGVPSRF SGSGSGQDYSLTISSEYE DMGIYYCLQYDEF PLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 4)	GACATCAAGATGACCCAGTCT CCATCTTCCATGTATGC ATCTCTAGGAGAGAGAGTCAC TATCACTTGCAAGGCG AGTCAGGACATTAATAGCTATT TAAGCTGGTTCCAGCA GAAACCAGGGAAATCTCCTAA GACCCTGATCTATCGTG CAAACAGATTGGTAGATGGGG TCCCATCAAGGTTTCAGT GGCAGTGGATCTGGGCAAGAT TATTCTCTCACCATCAGC AGCCTGGAGTATGAAGATATG GGAATTTATTATTGTCTA CAGTATGATGAGTTTCCTCTCA CGTTCGGTGCTGGGACCA AGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 3)

[0793] 表3和表4分别示出对应于表1和表2中所示序列的SEQ ID NO。

[0794]

表 3: 204 V _H 和 V _L SEQ ID NO		
	核苷酸	AA
V _H	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2
V _L	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4

[0795]

表 4: 204 FR 和 CDR SEQ ID NO	
HFR1	SEQ ID NO: 5
HCDR1	SEQ ID NO: 6
HFR2	SEQ ID NO: 7
HCDR2	SEQ ID NO: 8
HFR3	SEQ ID NO: 9
HCDR3	SEQ ID NO: 10
HFR4	SEQ ID NO: 11
LFR1	SEQ ID NO: 12
LCDR1	SEQ ID NO: 13

[0796]

LFR2	SEQ ID NO: 14
LCDR2	SEQ ID NO: 15
LFR3	SEQ ID NO: 16
LCDR3	SEQ ID NO: 17
LFR4	SEQ ID NO: 18

[0797] 实施例2.GPC.204单克隆抗体的表征

[0798] 基于细胞的测定生物层干涉测量 (BLI) 竞争性结合测定

[0799] 通过将抗原固定在低水平 (以最小化拥挤伪影), 用抗GPC3抗体使抗原饱和, 然后将生物传感器暴露于竞争性抗体, 由此串联进行交叉竞争测定。链霉亲和素 (SA) 生物传感器 (Fortébio, Fremont, CA) 经200秒以1 μ g/mL的浓度加载生物素化抗原 (至最终波长偏移为0.8nm)。将加载抗原的生物传感器暴露于150nM的饱和抗体600秒 (直至达到持续的稳定期), 然后暴露于150nM竞争性抗体300秒。加载抗原的生物传感器在仅暴露于缓冲液 (即, 没有饱和抗体) 后也暴露于竞争性抗体, 以示出抗原与每种抗体的最大结合。利用Octet数据分析软件v11.0 (Sartorius, AG, **Göttingen**, Germany) 和该软件的“处理表位分箱数据”特征对结合数据进行分析。通过除以每种抗体 (没有饱和抗体) 的最大结合信号, 将所得的每种竞争性抗体的结合信号 (nm) 表示为结合%。

[0800] 测定的结果在下表5中量化。在表5中, 小于50%的竞争性抗体结合被认为是阻断。对角线上的结合百分比测量自阻断, 并且预期接近0%。

表 5: BLI 竞争性结合测定的结果

[0801]

饱和抗体	竞争性抗体的结合%	
	204	GC33
204	18.2	97.2
GC33	89.9	0
缓冲液	100	100

[0802] 表5中的数据表明,与GC33相比,204与不同的GPC3表位结合,因为204结合的GPC3不阻断GP33的结合,并且GP33结合的GPC3基本上不阻断204的结合。

[0803] BLI结合测定

[0804] 为了评估本公开的纯化小鼠抗人GPC3单克隆抗体的结合参数,进行BLI结合测定。简言之,抗小鼠IgG-Fc捕获(AMC)生物传感器(Fortébio,Fremont,CA)经300秒以1-3 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度加载纯化抗体(小鼠IgG)(至最终波长偏移为0.8-1.0nm)。使用相同的参数将人源化GC33抗体固定到抗人IgG-Fc捕获(AHC)生物传感器上。将加载抗体的生物传感器暴露于以100nM起始并1:3连续稀释的5种浓度的抗原(分析物)。加载抗体的生物传感器也暴露于仅含有动力学缓冲液的参考溶液(以校正漂移)。未加载抗体的生物传感器也暴露于抗原以检查与传感器的非特异性结合,并且没有观察到结合(数据未显示)。使用全局1:1曲线拟合模型对来自至少4个浓度的数据进行拟合,其中确定了可能的动力学缔合和解离速率以及 K_D 值。对于要接受的计算常数,结合统计数据必须落在可接受的参数以内(即, $\text{Chi}^2 \leq 3.0$,且 $R^2 \geq 0.95$)。

[0805] 对应于本公开的各种抗GPC3单克隆抗体的结合测定的原始数据描绘于图1A-图1C中。测定的动力学缔合/解离速率和 K_D 值示于下表6中。

表 6: 204、1G12 和 GC33 的结合和动力学参数

[0806]

抗体	表位结构域	K_D (nM)	k_a (1.Ms)	k_d (1/s)	Chi^2	R^2
204	C 末端	2.5	8.2×10^5	2.1×10^{-3}	0.04	1.00
1G12	C 末端	3.0	1.7×10^5	5.3×10^{-4}	0.00	1.00
GC33	C 末端	1.0	3.4×10^5	3.4×10^{-4}	0.02	1.00

[0807] 表6中描绘的数据说明,当与其它对照C末端GPC3抗体1G12和GC33相比时,C末端204抗体表现出对重组GPC3相当的亲和力。

[0808] 经由蛋白质印迹评估细胞溶解物中的GPC3

[0809] 使各种肿瘤细胞系生长至汇合,24小时收集无血清上清液并浓缩20倍。将4X LDS缓冲液(ThermoFisher,Waltham,MA) $\pm 8\% \beta\text{-Me}$ 添加到浓缩的无血清上清液或rhGPC3中,到最终浓度为1X LDS $\pm 2\% \beta\text{-Me}$,并将样品在95 $^{\circ}\text{C}$ 下加热10分钟。将样品加载到含有40 μL 上清液或300ng rhGPC3的10孔Bis-Tris凝胶上,并在200V下试验40分钟。按照iBlot2说明(ThermoFisher,Waltham,MA)将蛋白质转移至硝化纤维素上。在室温下用在5% BSA、1X TBS、0.1% Tween20染色稀释剂中为1 $\mu\text{g/mL}$ 的一抗将印迹染色2小时。然后按照Li-Cor的建议,用IR_{dye} 800缀合的二抗(Li-Cor Biosciences,Lincoln,NE)对印迹进行染色,并使用Li-

Cor Odyssey仪器进行成像。

[0810] 图2A描绘了识别rhGPC3的C末端的本公开的抗体的蛋白质印迹结果。如图所示, 204、GC33和1G12中的每一者在还原条件(R)下检测到GPC3的32kDa β 链,但在非还原条件(NR)下检测不到。图2B描绘了用于在还原和非还原条件下探测rhGPC3、rhGPC5和rhGPC6的204和1G12抗体的蛋白质印迹结果。类似于图2A,在还原条件下检测到GPC3的32kDa β 链,但在非还原条件下检测不到。无论样品是否还原,204抗体和1G12抗体都检测不到rhGPC5或rhGPC6。

[0811] 转向图3,描绘的是用204探测的可溶性天然人GPC3的蛋白质印迹分析。测试的肿瘤细胞系包括HepG2、NCI-H661和Hep3B。32kDa β 链(没有HS侧链)仅在还原条件下在NCI-H661肿瘤细胞系上清液中检测到。实际上,可溶性GPC3似乎仅作为NCI-H661上清液中未糖基化和未亚硫酸化的核心蛋白存在。对于HepG2和Hep3B,还原条件下在37-50kDa之间的污点(smear)可能代表C末端片段的糖基化、亚硫酸化形式。

[0812] rhGPC3的ADAM切割

[0813] rhGPC3的ADAM10和ADAM17切割用于探测204的结合区。图4描绘的是主要GPC3亚型(亚型2)的高级图解,显示了弗林蛋白酶切割位点、可能的204表位、GC33免疫原(524-562)、1G12免疫原(511-580)和GC33表位(542-555)。图5描绘的是类似的图解,另外显示了潜在的ADAM 10切割位点。ADAM10和ADAM17用于切割rhGPC3($\sim 2\mu\text{g}$),样品在SDS-PAGE上试验,并利用考马斯染色使蛋白质可视化(图6A)。如图所示,ADAM10和ADAM17(程度较小)似乎都在弗林蛋白酶切割位点切割rhGPC3,导致与未消化的rhGPC3相比,N末端和C末端片段的强度增加。经由蛋白质印迹分析类似制备的样品,其中使用的一抗是204和GC33(图6B)。

[0814] 通过GC33抗体和考马斯检测到 $\sim 12\text{kDa}$ ADAM 10片段(参考图6A-图6B),其对应于所提出的ADAM10切割位点与GPI-锚切割位点(通过notum)之间的预测的11.7kDa C末端GPC3 Δ HS切割片段。204抗体未检测到此条带,表明204抗体的表位在弗林蛋白酶切割位点与预测的ADAM10切割位点之间的某个位置。

[0815] 实施例3. 经由IHC评估细胞表面GPC3

[0816] 针对204mAb优化的GPC3 IHC方案

[0817] 图7中的方法700描绘了204mAb的优化GPC3 IHC方案的概述。简言之,方法700的步骤702包括将载玻片加载到Leica Bond III系统(Leica Biosystems Inc.,Richmond,IL)上,但在不脱离本公开的范围的情况下也可以使用其它自动化IHC染色系统。在步骤704,方法700包括脱石蜡和再水合步骤。在步骤706,方法700包括热诱导的表位恢复步骤,其依赖于基于EDTA的高pH溶液。在步骤708,方法700包括在一抗(即,204mAb)中温育载玻片。进行到步骤708,方法700包括将载玻片与HRP-聚合物缀合二抗一起温育。步骤712包括过氧化物封闭步骤,接着在步骤714与DAB发色体一起温育。步骤716包括卸载、脱水以及将盖玻片施加到染色的载玻片上。虽然没有明确说明,但是可以理解的是,在进行图7的方法之前,将选定的组织固定并包埋在石蜡中,接着切割组织并安置。具体地,方案包括在95% EtOH中浸入5/5/3分钟,在100% EtOH中浸入3/3/3分钟,接着用二甲苯处理(直到澄清/5/5分钟浸入),然后安置。采用标准方案进行步骤704的脱石蜡。

[0818] 因此,图7代表对应于本公开的204mAb的优化GPC3 IHC染色方案的高级方法700。表7中示出了上面讨论的优化方案更详细的形式,其中的步骤按照它们在表中降序的顺序

进行。

[0819]

表 7: 对 Leica Bond III 染色系统上的 FFPE 样本优化的膜结合 GPC3 IHC 染色程序			
步骤	温育时间	分配体积	温度
组织切片和风干	不适用	不适用	环境
烘烤载玻片	60 分钟	不适用	55-65°C
将载玻片加载到 Leica Bond III 上	不适用	不适用	环境
Bond 脱蜡溶液	不适用	150 μ L, 3 次	72°C
醇	不适用	150 μ L, 3 次	环境
Bond 洗涤溶液	不适用	150 μ L, 3 次	环境
Bond ER 溶液 2	20 分钟	150 μ L, 4 次	100°C
Bond 洗涤溶液	不适用	150 μ L, 5 次	环境
一抗(0.1 μ g/mL; 在 Bond 稀释剂中 1:5000)	30 分钟	150 μ L, 1 次	环境
Bond 洗涤溶液	不适用	150 μ L, 3 次	环境
初免后	8 分钟	150 μ L, 1 次	环境
Bond 洗涤溶液	不适用	150 μ L, 3 次	环境
聚合物	8 分钟	150 μ L, 1 次	环境
Bond 洗涤溶液	不适用	150 μ L, 3 次	环境
过氧化物封闭	5 分钟	150 μ L, 1 次	环境
Bond 洗涤溶液	不适用	150 μ L, 3 次	环境
去离子水	不适用	150 μ L, 2 次	环境
混合的 DAB 精	10 分钟	150 μ L, 2 次	环境

[0820]

制			
去离子水	不适用	150 μ L, 3 次	环境
苏木精	7 分钟	150 μ L, 1 次	环境
去离子水	不适用	150 μ L, 3 次	环境
Bond 洗涤溶液	不适用	150 μ L, 1 次	环境
去离子水	不适用	150 μ L, 1 次	环境
卸载、脱水和盖玻片	不适用	不适用	环境

[0821] 示例性结果描绘于图8中。具体地,图8描绘了来自人HCC的TMA的代表性图像,其中

组织用上面针对204mAb讨论的优化方案进行染色。由专业认证的病理学家采用如本文公开的半定量膜结合GPC3 H评分来评估染色。

[0822] 健康的对比患病的肺和肝组织中的204和1G12 mAb的比较

[0823] 采用上面针对204抗体讨论的优化方案,与1G12抗体相比,针对204抗体检查健康的对比患病的组织的染色以及相应的膜相关H评分。具体地,患病组织样品包括肺鳞状细胞癌和HCC。图9所示是用204和1G12抗体染色的患病组织的代表性实例,以及相应的膜相关H评分测定。图10所示的是在正常肝和肺组织(即,图9的相应患病组织样品的邻近组织)中用204mAb以及1G12 mAb观察到缺乏染色的代表性实例。

[0824] GPC3^{hi}和GPC3^{lo}细胞中1G12和204的比较

[0825] 在这项研究中,将人HCC细胞系皮下植入NSG小鼠体内,对于PP5和HepG2分别在植入后第24天和第31天收获肿瘤。与HepG2肿瘤相比,PP5肿瘤具有相当高的GPC3表达可变性,因此PP5肿瘤具有较低的总GPC3表达。因此,PP5细胞在本文中被称为GPC3^{lo},且HepG2细胞在本文中被称为GPC3^{hi}。本研究中采用与上面讨论类似的方案。IHC方案使用由病理学家选择的抗体滴度,包括1G12为0.5μg/mL,且204为0.1μg/mL。使用同种型抗体作为阴性对照。如图11中所示,在这种情况下,对于GPC3^{hi}细胞,膜相关H评分基本上是类似的。或者,与1G12抗体相比,对于用204抗体染色的GPC3^{lo}细胞,膜相关H评分显著更高。图12中量化了对应于图11的数据。

[0826] 各种癌症中GPC3的流行率

[0827] 在本研究中,使用204和1G12抗体来探测由各种类型的癌细胞制备的TMA的GPC3表达。具体地,准备用于204抗体分析的TMA类型包括HCC、肺小细胞癌(SCC)、卵巢透明细胞癌(OCCC)和胃癌(III/IV期)。准备用于1G12抗体分析的TMA类型包括HCC、SCC和OCCC。在28/29名受试者的HCC TMA中包括每名受试者的两个核心。关于使用204抗体探测的HCC TMA,使用来自所有阳性受试者的核心的膜相关H评分来计算平均值和中值。使用204抗体获得的数据描绘于表8中,且使用1G12抗体获得的数据描绘于表9中。

[0828]

表 8: 用 204 mAb 探测的 TMA							
TMA 的类型	评估的病例的总数	GPC3 阳性病例的总数	细胞质加膜相关 GPC3 的流行率	膜相关 GPC3 阳性病例数	膜相关 GPC3 阳性病例的流行率	仅阳性病例的膜相关 GPC3 H 评分的中值	仅阳性病例的膜相关 GPC3 H 评分的平均值
HCC** , ***	29	22	76%	13	45%	60.0	117
肺 SCC	65	18	28%	11	17%	4.0	43.3
OCCC	30	9	30%	6	20%	4.0	31.3
胃 (III/IV)*	120	3	3%	1	1%	不适用	不适用

[0829]

表 9: 用 1G12 mAb 探测的 TMA							
TMA 的类型	评估的病例的总数	GPC3 阳性病例的总数	细胞质加膜相关 GPC3 的流行率	膜相关 GPC3 阳性病例数	膜相关 GPC3 阳性病例的流行率	仅阳性病例的膜相关 GPC3 H 评分的中值	仅阳性病例的膜相关 GPC3 H 评分的平均值
HCC**	29	22	76%	12	41%	30.0	106.1
肺 SCC	65	22	34%	15	23%	10.0	22.4

[0830]

OCCC	30	10	33%	6	20%	5.0	26.5
------	----	----	-----	---	-----	-----	------

[0831] 膜相关GPC3的流行率分布

[0832] 在本项研究中,使用204和1G12抗体中的每一者检查HCC和肺SCC(图14A)、HCC(图14B)和肺SCC(图14C)中膜相关GPC3的流行率分布。由有资格的病理学家使用从0(阴性)到3(或3+)的半定量整数标度对染色强度进行评分。合并1+、2+和3+的强度百分比。第一个箱设置为0-1%,第二个箱设置为>1%至≤10%,并以10%的增量依此类推。关于图14A和图14B,因为在大多数病例(28/29名受试者)的HCC TMA TA3134中包括每名受试者的两个核心,所以强度取这些病例中的平均值。

[0833] 还使用从使用204和1G12抗体进行IHC染色获得的膜特异性H评分检查HCC和肺SCC(图14D)、HCC(图14E)和肺SCC(图14E)中膜相关GPC3的流行率分布。通过评估膜特异性H评分来评估膜结合GPC3流行率分布,开始于≤3(≤1%)、>3(>1%)和≤30(≤10%),然后增量是30(10%)。类似关于图14A-14C的讨论,在28/29名受试者的HCC TMA中包括每名受试者(样品)的两个核心,用于使用204和1G12 mAb进行分析。为了计算膜结合H评分的平均值和中值,使用来自所有阳性受试者的核心。

[0834] 肝硬化和HCC患者中的GPC3流行率

[0835] 在这项研究中,与1G12抗体相比,使用204抗体评估肝硬化和HCC患者中膜相关GPC3的存在。分析的TMA的类型包括来自HCC患者的组织、邻近的正常肝组织(有轻度炎症)和来自单纯肝硬化/伴有炎症或肝炎的患者的肝组织。在28/29名受试者的HCC TMA中包括每名受试者的两个核心。使用204抗体获得的数据描绘于表10中,且使用1G12抗体获得的数据描绘于表11中。如图所示,当使用204抗体或1G12抗体探测时,在肝硬化患者中没有检测到肝细胞的细胞膜上的GPC3表达。

[0836]

表 10: 在用 204 mAb 探测的 TMA 中评估的肝硬化和 HCC 患者中的 GPC3 流行率					
TMA 的类型	评估的病例的总数	GPC3 阳性病例的总数	细胞质加膜相关 GPC3 的流行率	膜相关 GPC3 阳性病例数	膜相关 GPC3 阳性病例的流行率
邻近正常肝组织(轻度炎症)	26	0	0%	0	0%
来自单纯肝硬化/伴有炎症或肝炎的患者的肝组织	35	2	6%	0	0%
HCC	29	22	76%	13	45%

[0837]

表 11: 在用 1G12 mAb 探测的 TMA 中评估的肝硬化和 HCC 患者中的 GPC3 流行率					
TMA 的类型	评估的病例的总数	GPC3 阳性病例的总数	细胞质加膜相关 GPC3 的流行率	膜相关 GPC3 阳性病例数	膜相关 GPC3 阳性病例的流行率
邻近正常肝组织(轻度炎症)	27	0	0%	0	0%
来自单纯肝硬化/伴有炎症或肝炎的患者的肝组织	37	2	5%	0	0%
HCC	29	22	76%	12	41%

[0838] 性能特性:204对比1G12

[0839] 检查了204抗体的性能特性。来自分析中的福尔马林固定的石蜡包埋 (FFPE) 块和 TMA 的组织包括正常邻近组织 (NAT)、肝硬化组织、HCC、肺的 SCC 和 OCCC。灵敏度计算为真阳性评估数除以所有阳性评估数 (TP / (TP+FN)) (TP: 真阳性; FN: 假阴性)。特异性计算为真阴性评估数除以所有阴性评估数 (TN / (TN+FP)) (TN: 真阴性; FP: 假阳性)。准确度计算为正确评估数除以所有评估数 ((TN+TP) / (TN+TP+FN+FP))。为了可接受地进行实验室开发的测试 (LDT) 验证, 所有三个参数 (准确度、灵敏度和特异性) 必须具有 >90% 的一致性。结果示于表

12中。

[0840]

表 12: 204 性能特性-组合 FFPE 块和 TMA			
	一致性 (截止值> 1%)	一致性 (截止值> 5%)	一致性 (截止值> 10%)
真阳性	42	32	28
真阴性	207	217	221
假阳性	4	9	10
假阴性	7	2	1
准确度	96%	96%	96%
灵敏度	86%	94%	97%
特异性	98%	96%	96%

[0841] 表13描绘仅限于FFPE NAT和肿瘤块的附加数据,且表14描绘限于FFPE NAT、肝硬化和来自TMA的肿瘤核心的附加数据。再次综合起来,结果表明使用>5%或>10%的临时截止值进行204的LDT验证的准确度、灵敏度和特异性是可接受的。

[0842]

表 13: 204 性能特性- FFPE NAT 和肿瘤块			
	一致性 (截止值> 1%)	一致性 (截止值> 5%)	一致性 (截止值> 10%)
真阳性	13	11	11
真阴性	23	24	24
假阳性	1	2	2
假阴性	0	0	0
准确度	97%	95%	95%
灵敏度	100%	100%	100%
特异性	96%	92%	92%

[0843]

表 14: 204 性能特性- FFPE NAT、肝硬化和来自 TMA 的肿瘤核心			
	一致性 (截止值> 1%)	一致性 (截止值> 5%)	一致性 (截止值> 10%)
真阳性	29	21	17
真阴性	184	193	197
假阳性	3	7	8
假阴性	7	2	1
准确度	96%	96%	96%
灵敏度	81%	91%	94%
特异性	98%	97%	96%

[0844] 204与1G12的头对头比较

[0845] 在本研究中,用204或1G12抗体探测FFPE肿瘤块和FFPE肿瘤核心,并计算膜相关H评分。肿瘤块和肿瘤核心的来源以及每个组织来源的肿瘤块数/肿瘤核心数和病例数示于表15中。

表 15: 204 和 1G12 抗体的头对头比较所依赖的肿瘤块、肿瘤核心和病例数。			
	适应症	肿瘤块	肿瘤核心(TMA) 病例数(TMA)
[0846]	胃癌, 腺癌*	6	不适用 不适用
	肝癌、HCC**	8	57 29
	肺癌, SCC	9	65 65
	卵巢癌, CCC	9	30 30

[0847] 在分析中,使用1G12 IHC染色的胃癌的TMA不包括在头对头比较中。关于HCC样品,在更多情况下,在HCC TMA中包括每名受试者的两个核心。可用的组织的数量是FFPE肿瘤块与核心之间的关键区别,否则以类似的方式处理样品。

[0848] 图13描绘了对于FFPE肿瘤块(上,n=32个样品)和来自TMA的FFPE肿瘤核心(下,n=152个样品),使用204抗体获得的膜相关H评分相对于使用1G12抗体获得的膜相关H评分作图。如图所示,使用204抗体获得的膜相关H评分与使用1G12抗体获得的评分具有良好的-一致性(对于FFPE肿瘤块,Spearman相关性的r=0.99,且对于来自TMA的FFPE肿瘤核心,r=0.86)。此外,更常见的是相对于在同一TMA上的1G12染色,使用204抗体的IHC染色在肿瘤块中导致更高的膜相关H评分,特别是在肿瘤核心中。

[0849] 来自异种移植肿瘤模型的FFPE组织中的膜相关GPC3表达

[0850] 在本研究中,204抗体用于探测来自异种移植肿瘤模型的各种FFPE组织中的GPC3表达。具体地,肿瘤模型包括Hep3B、HepG2、Huh-7和PLC/PRF/5(它们都是人HCC的永生-化细胞系)。用204或1G12抗体进行IHC染色,以说明对于不同抗体的染色和相应的膜相关H-评分的差异。简言之,将肿瘤细胞与基质胶(Matrigel)和PBS按1:1混合,然后将细胞经由右-后侧皮下植入到ICR-SCID小鼠体内。图15的图像代表了使用204或1G12 mAb的GPC3 IHC染色。每个图像中较大的正方形代表包括每个图像的较小正方形的区域的更高分辨率图像。进一步示出的是相应的计算膜相关H评分,示出了当与1G12 mAb相比时,使用204mAb获得相-等或更高的膜相关H评分。图16A显示使用204或1G12抗体获得的测定的膜相关H评分图,且图16B示出对应于仅204抗体的中等/高膜强度的计算%的图。

[0851] 204和1G12抗体的膜染色与细胞质染色的比较

[0852] 在本研究中,使用204或1G12抗体对来自Hep3B和HepG2异种移植物的组织进行IHC-分析,并确定对应于膜染色的强度和H评分。进一步地,确定对应于细胞质染色的平均强度,并评估染色主要是细胞质的还是膜的。图17A描绘了使用204抗体获得的结果,且图17B描-绘了使用1G12抗体获得的结果。如图所示,用204和1G12抗体,肿瘤细胞系Hep3B和HepG2的染-色主要是膜的。然而,204的膜相关H评分通常较高,并且与1G12抗体相比,用204抗体的细胞-质染色的平均强度稍低。

[0853] 本发明的范围不限于本文描述的具体实施方案。实际上,根据前面的描述和附图,除了本文描述的那些之外对本发明的各种修改对于本领域技术人员来说将是显而易见的。

这类修改旨在落入所附权利要求的范围内。

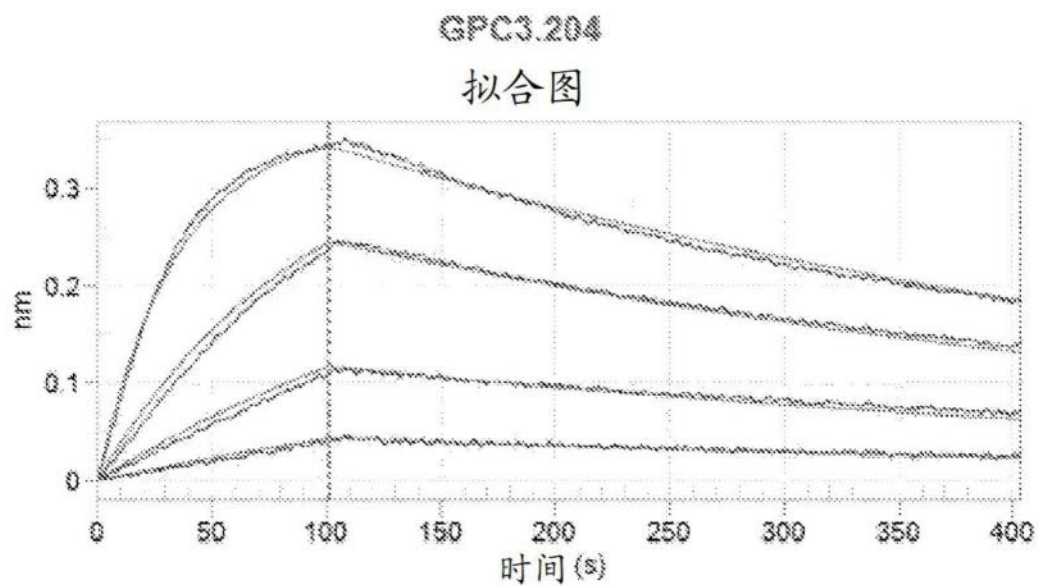


图1A

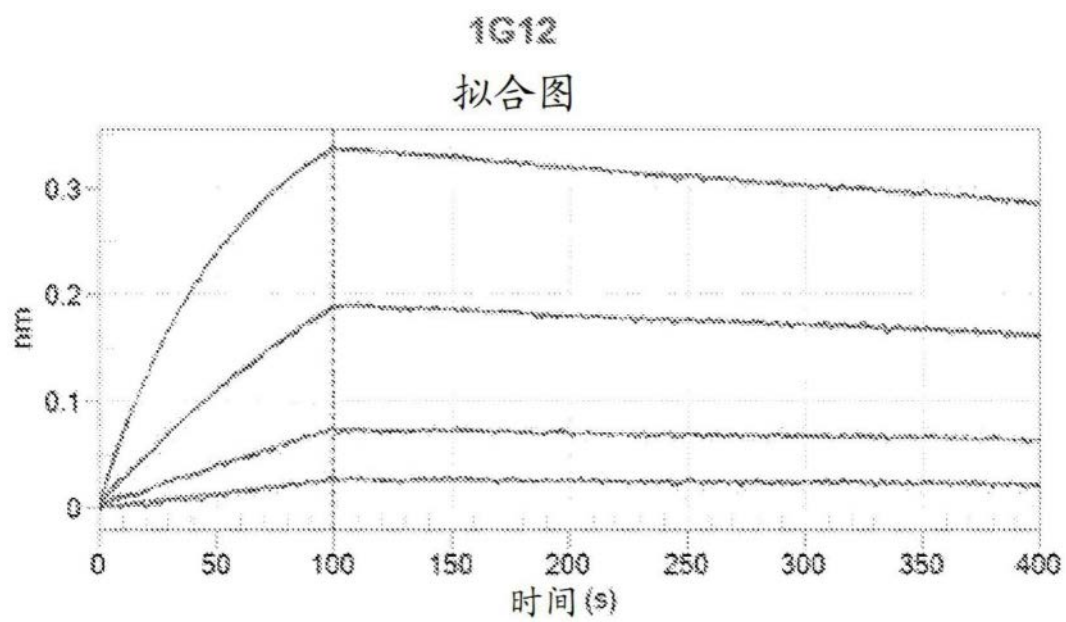


图1B

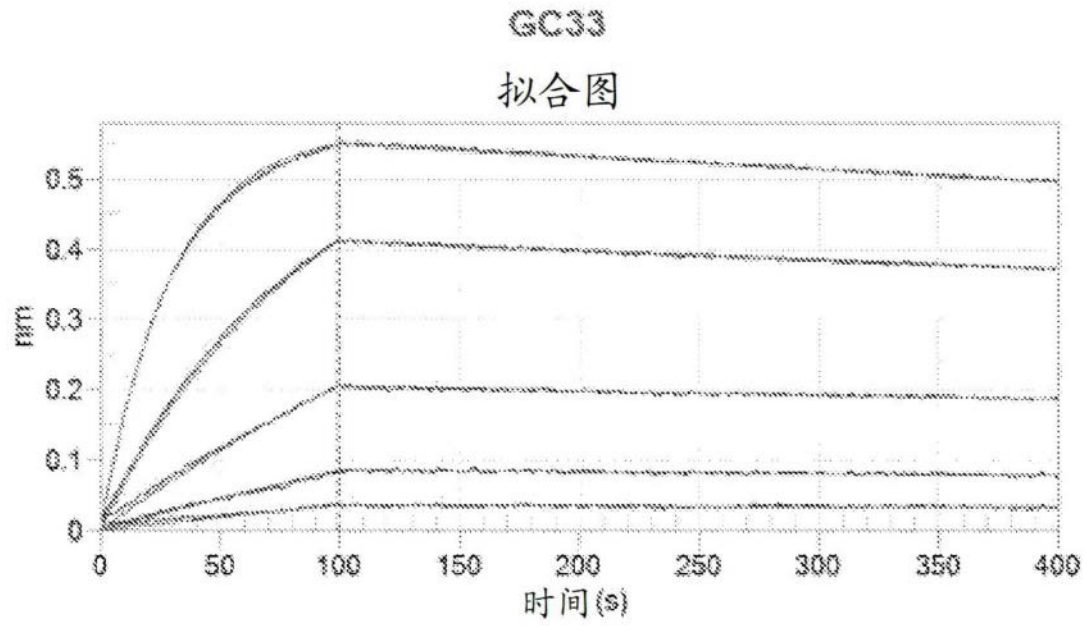


图1C

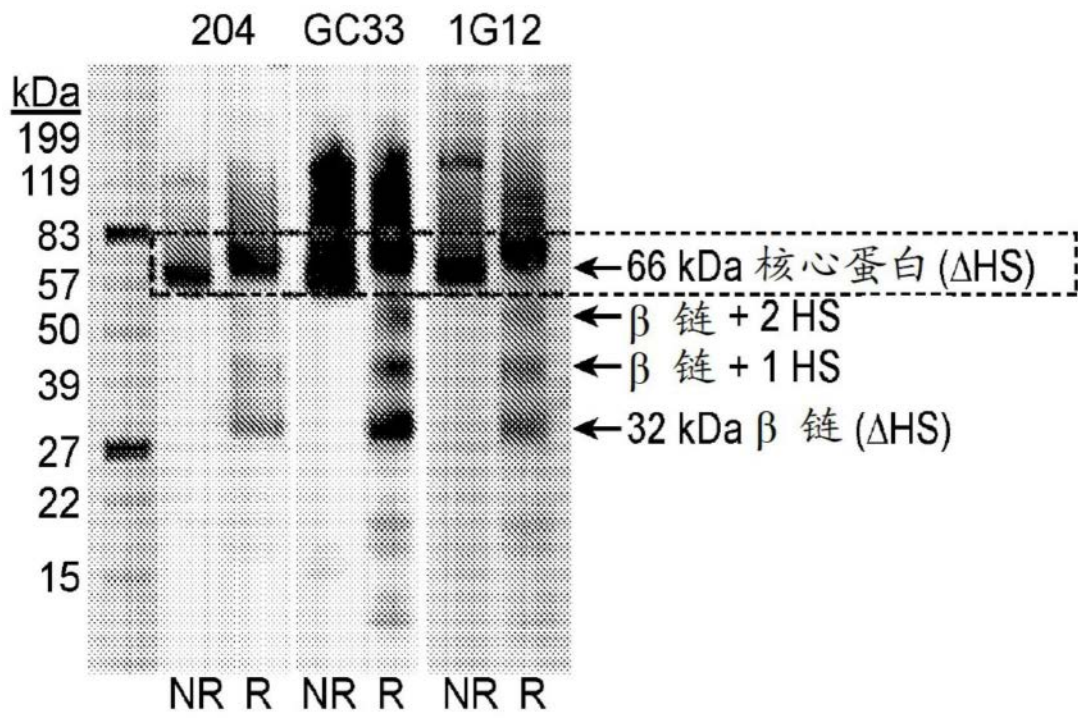


图2A

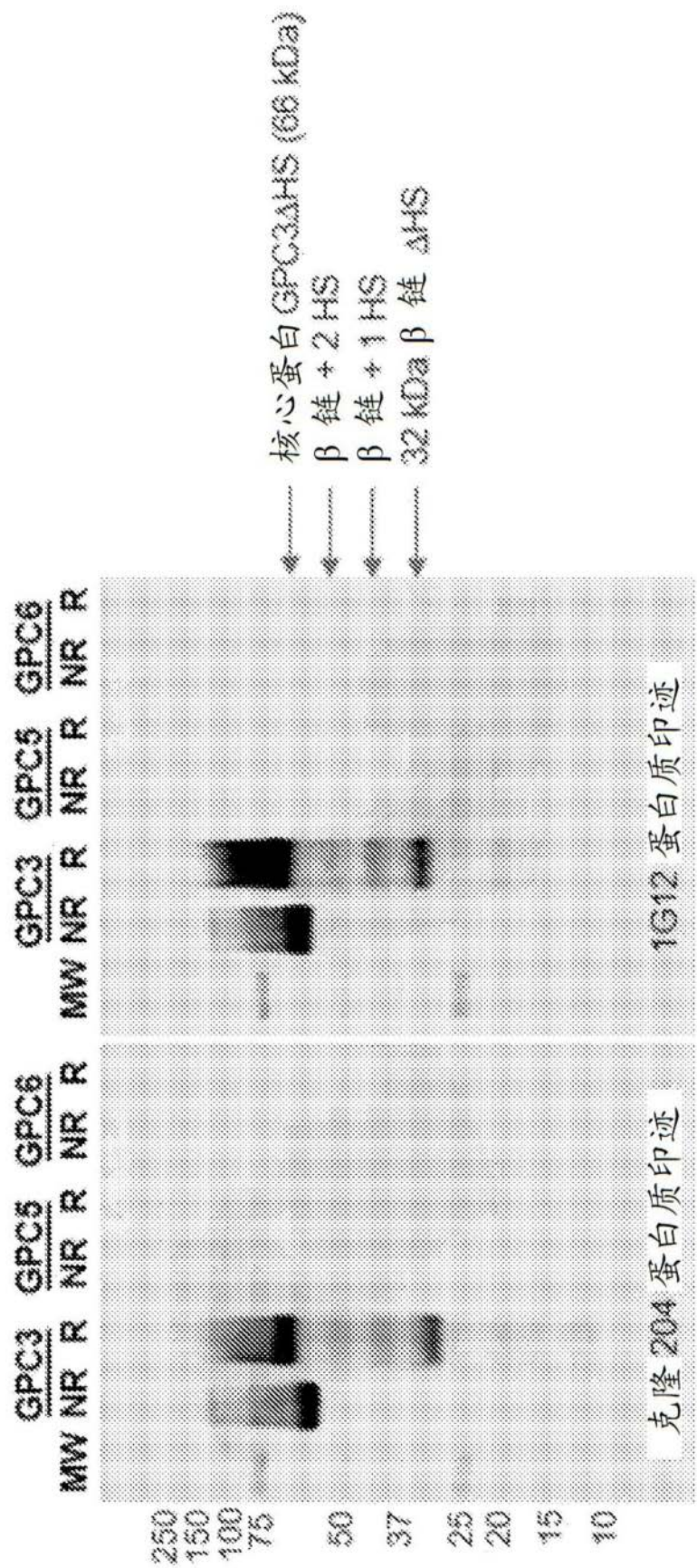


图2B

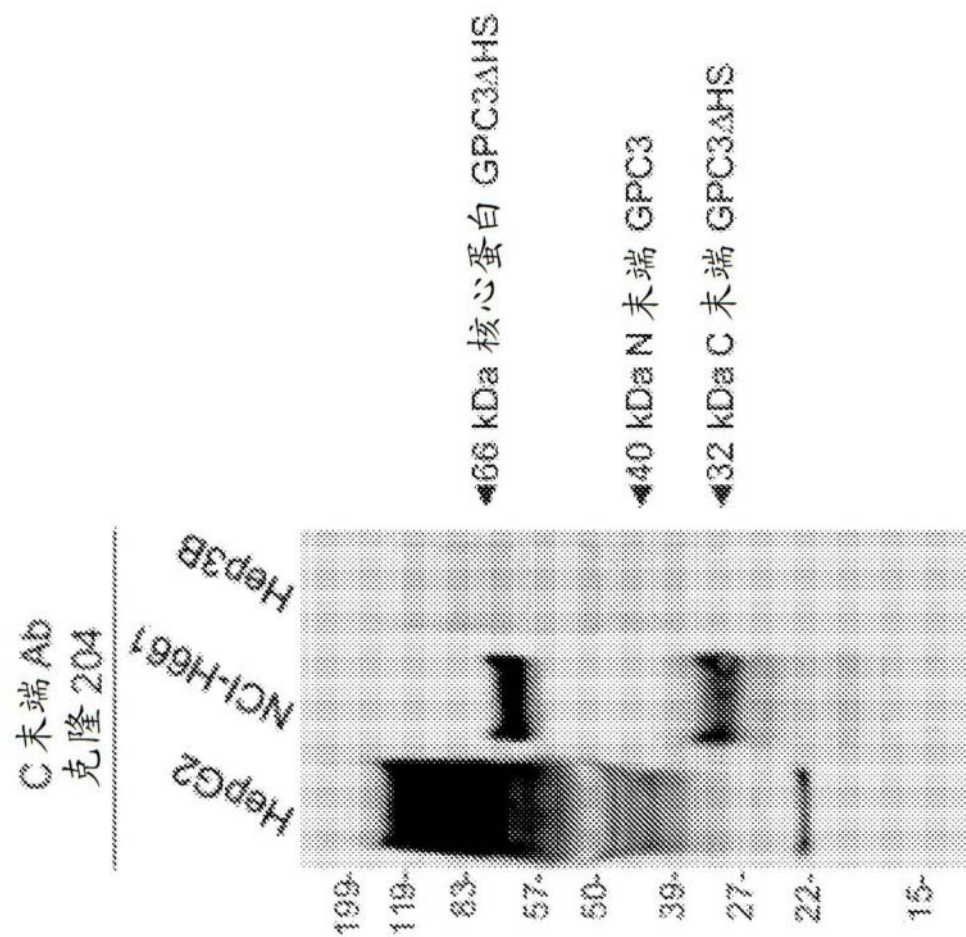


图3

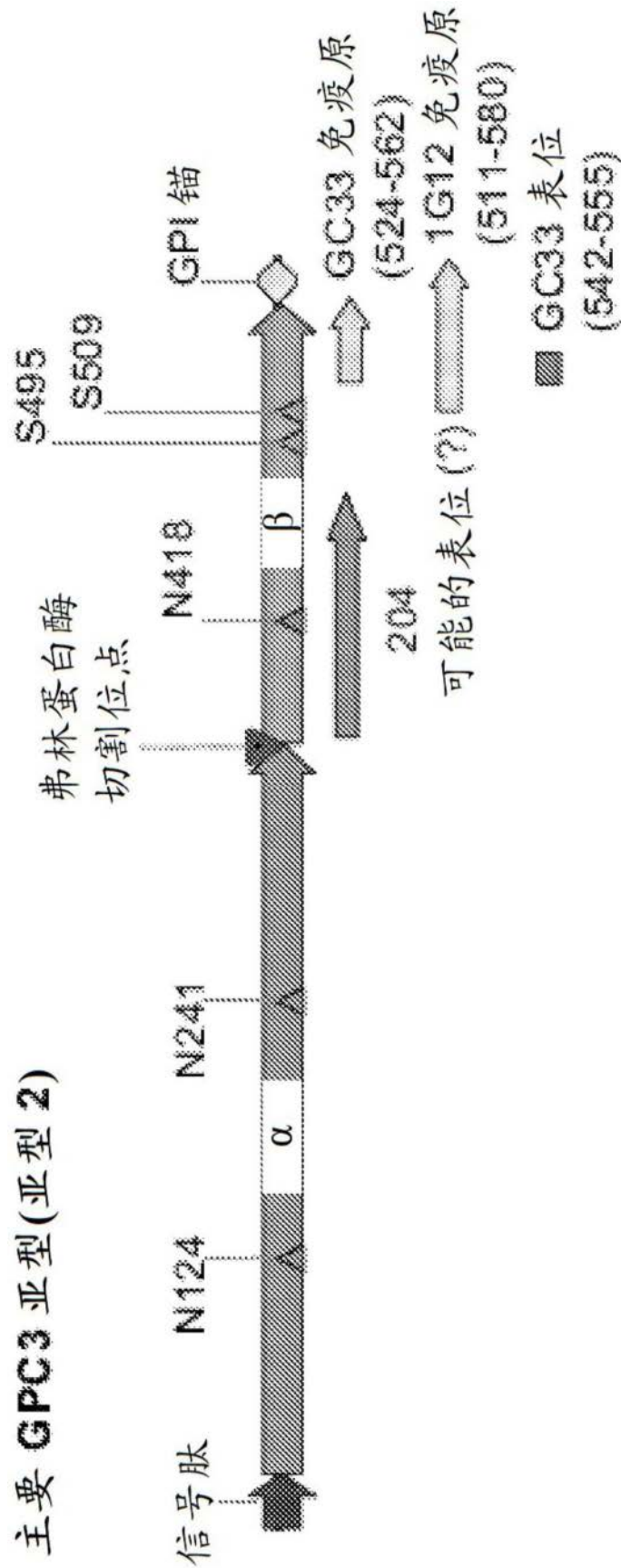


图4

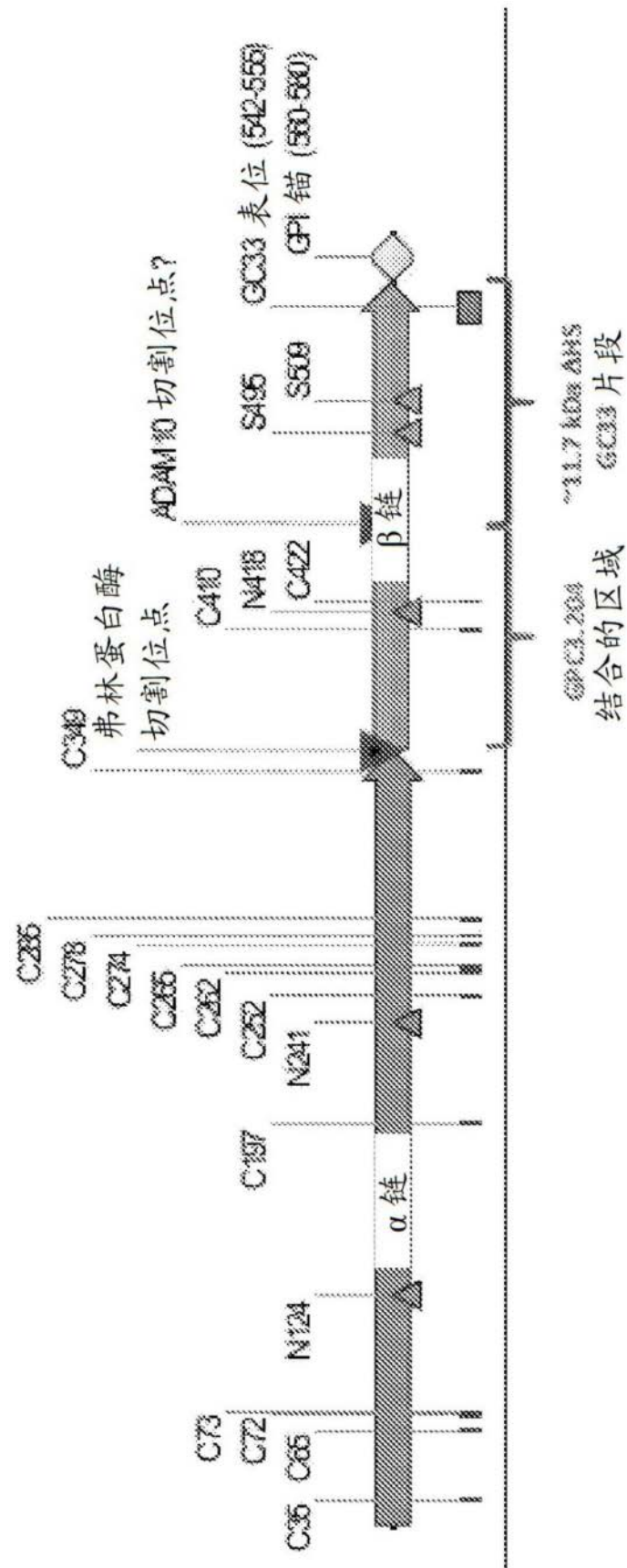


图5

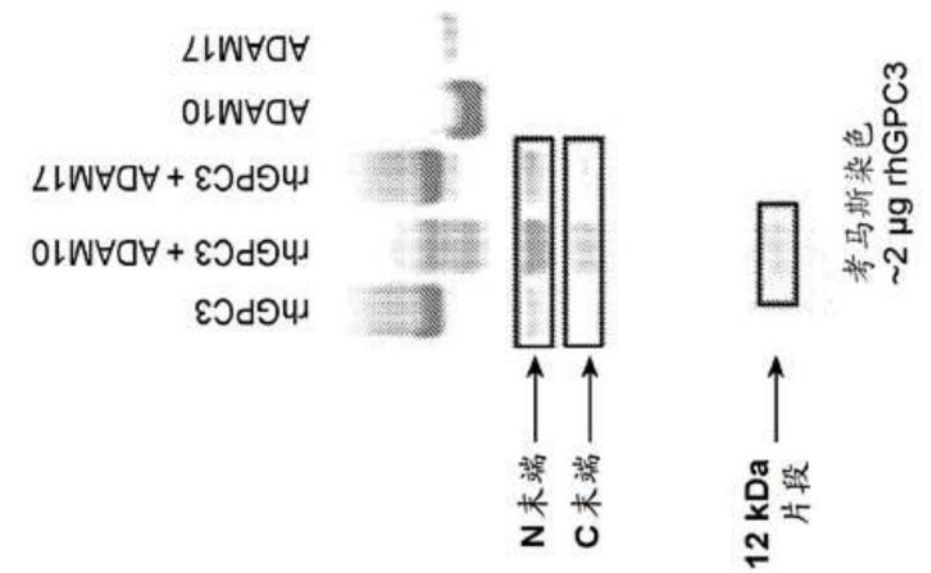


图6A

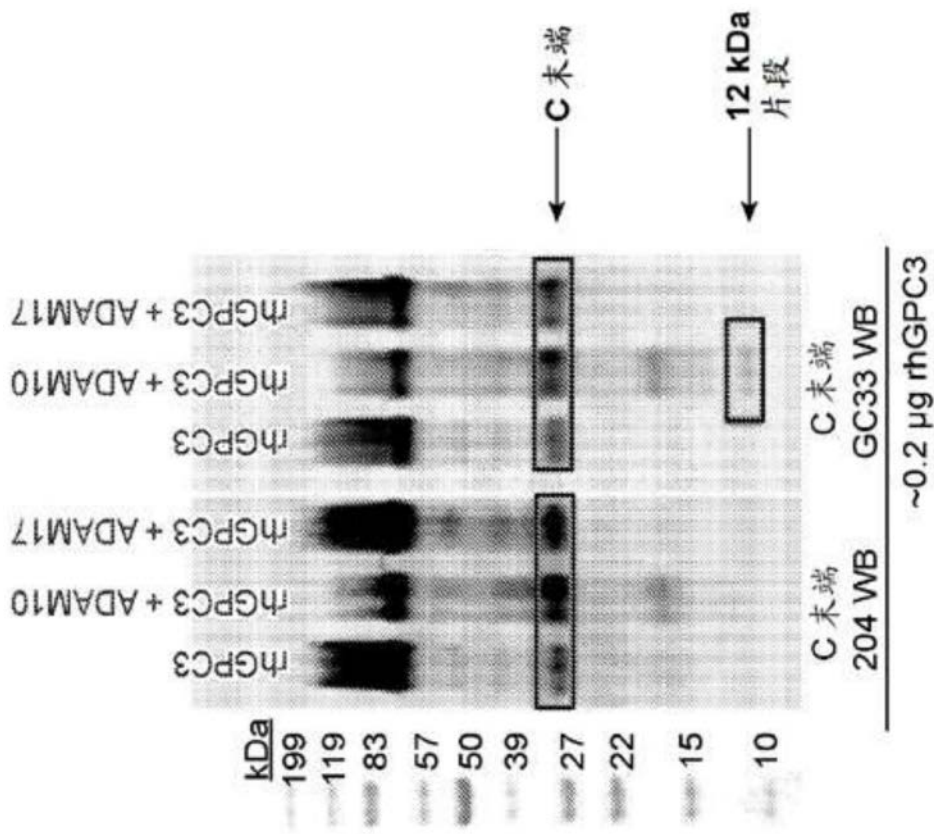


图6B

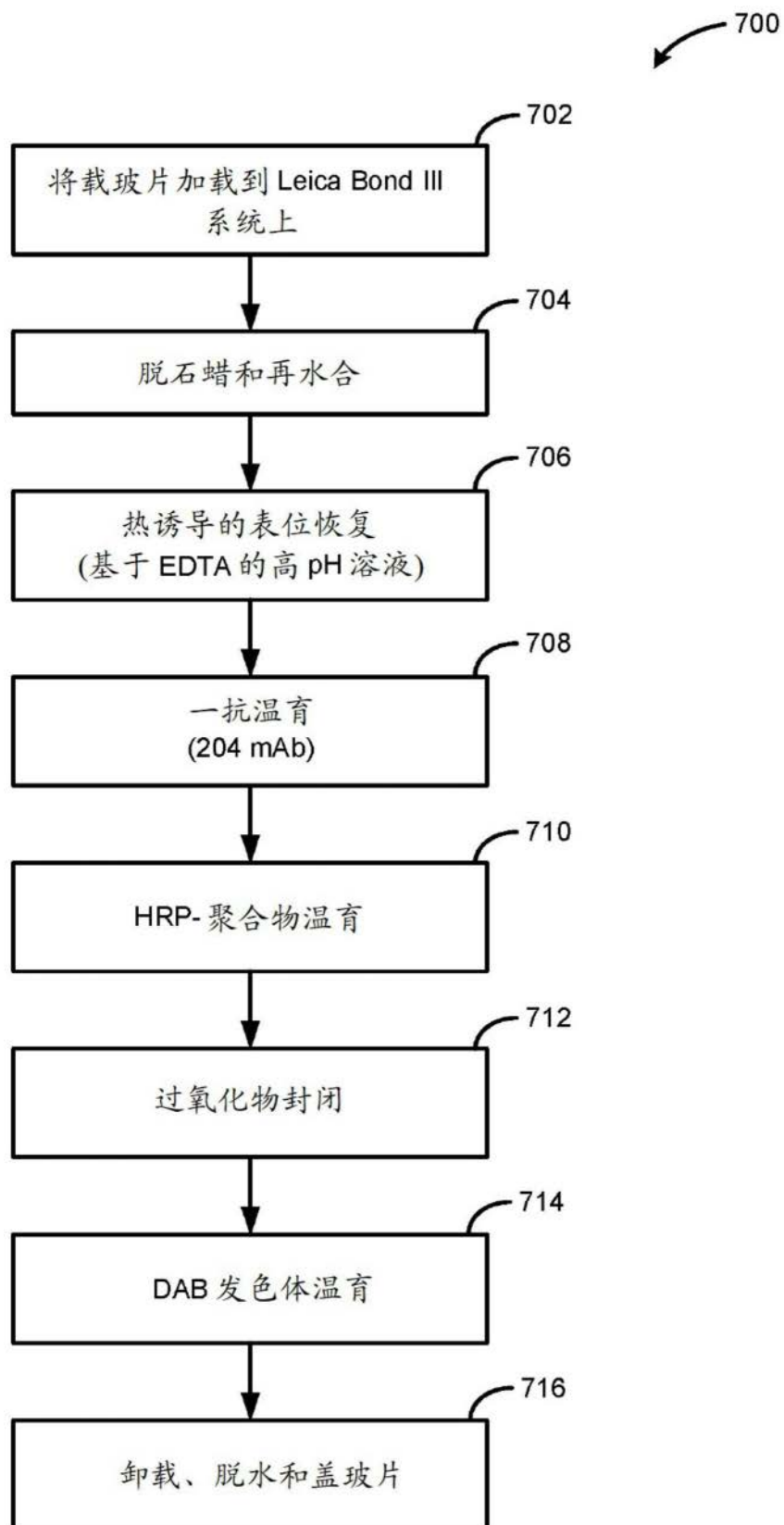


图7

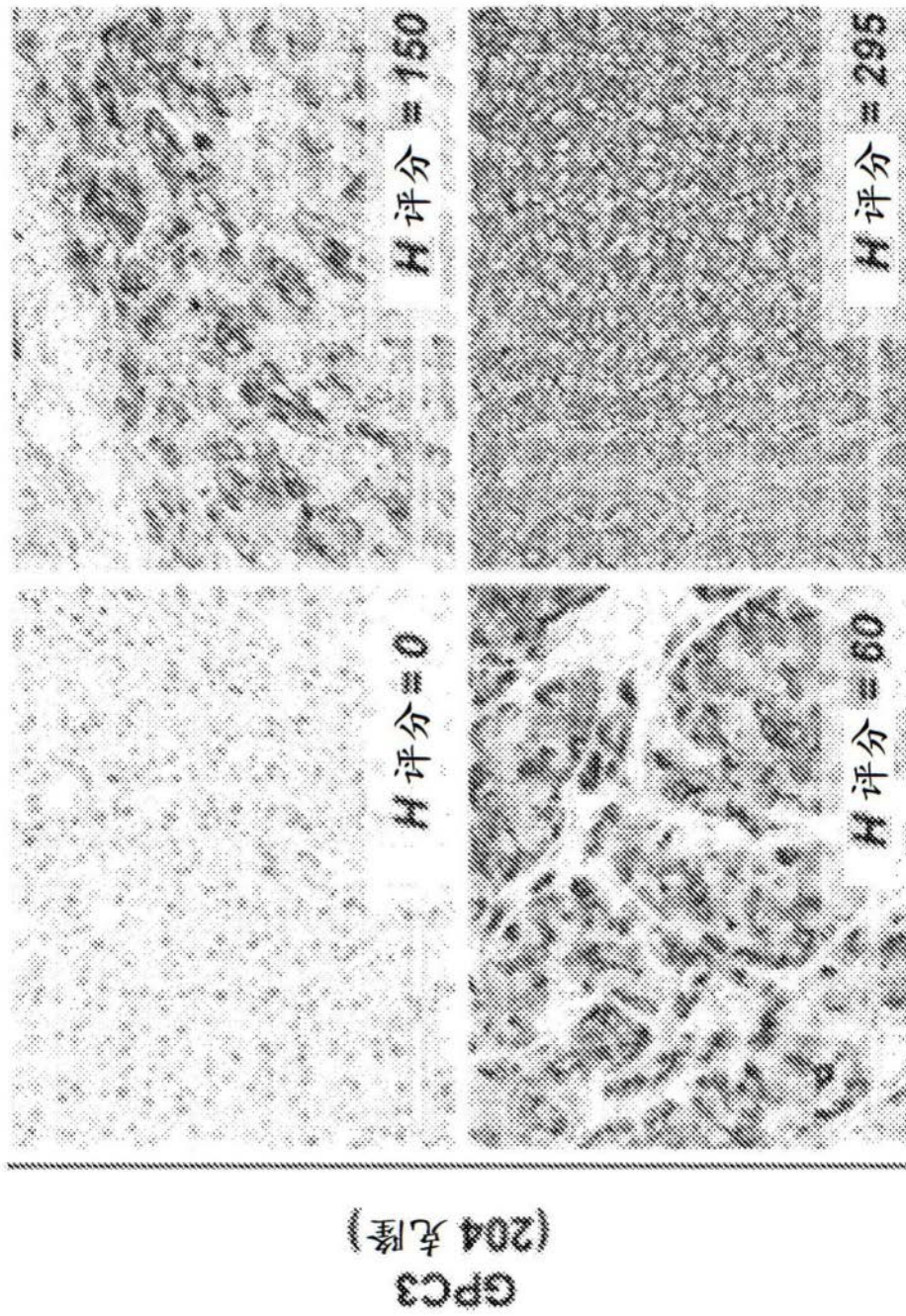


图8

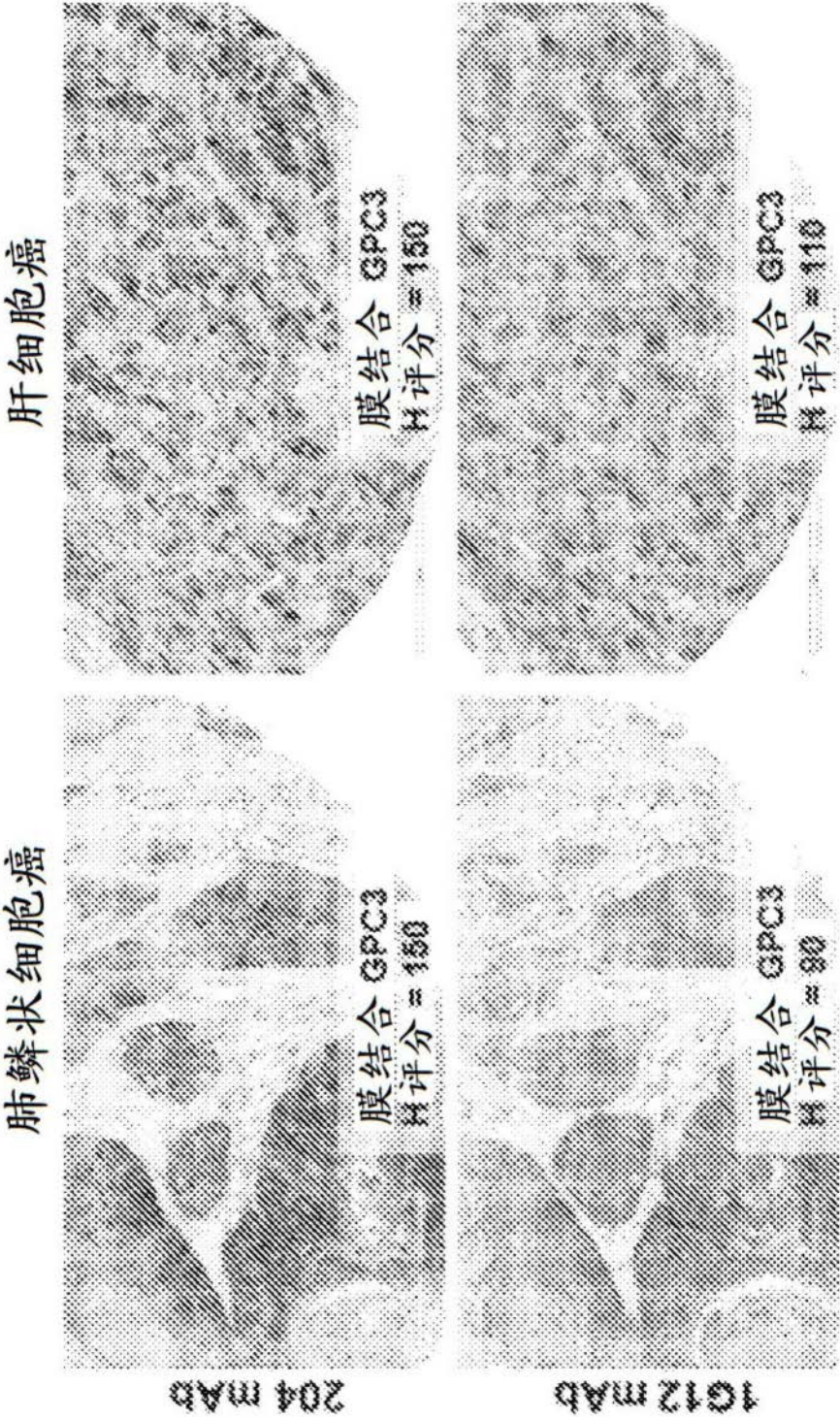


图6



图10

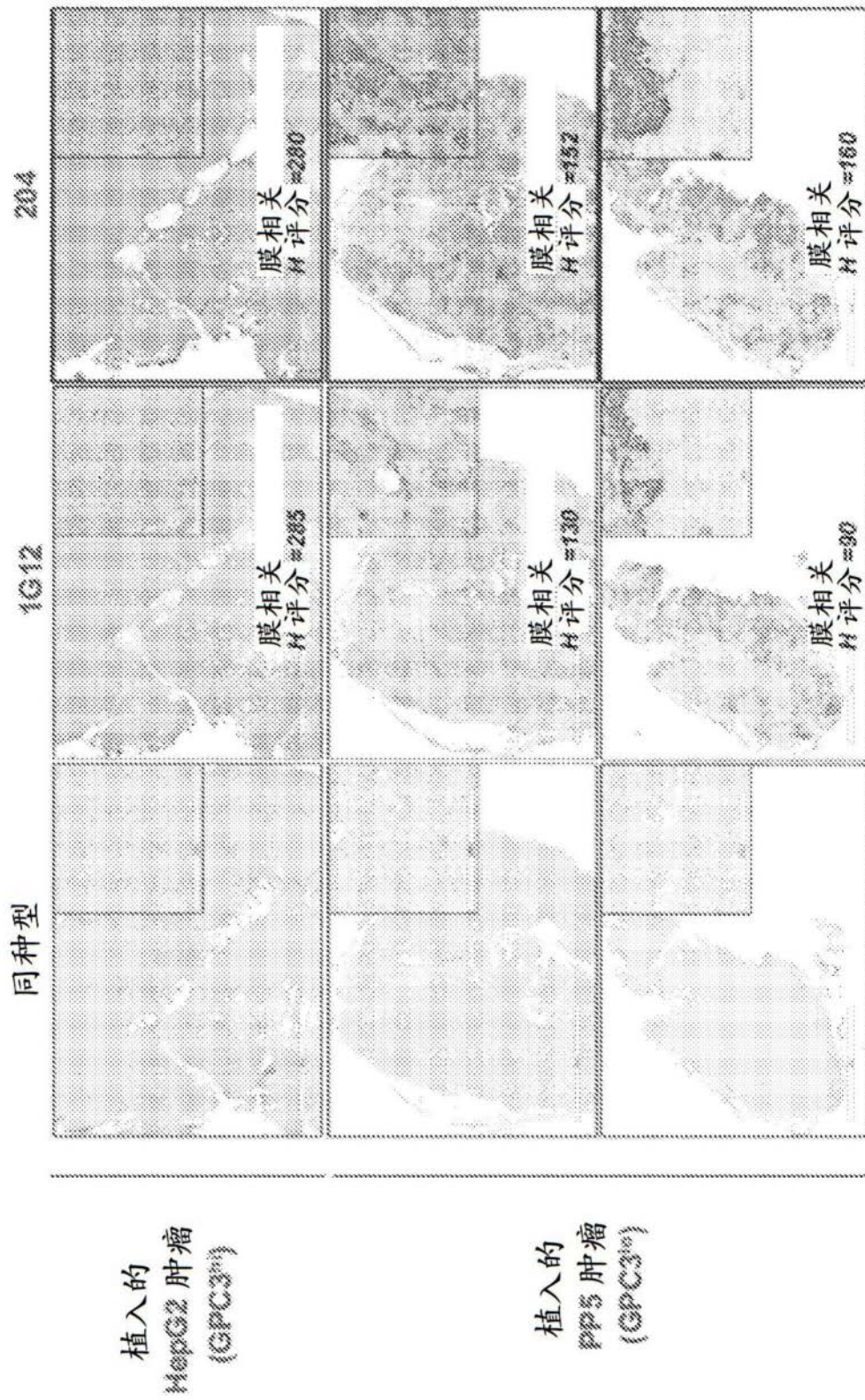


图11

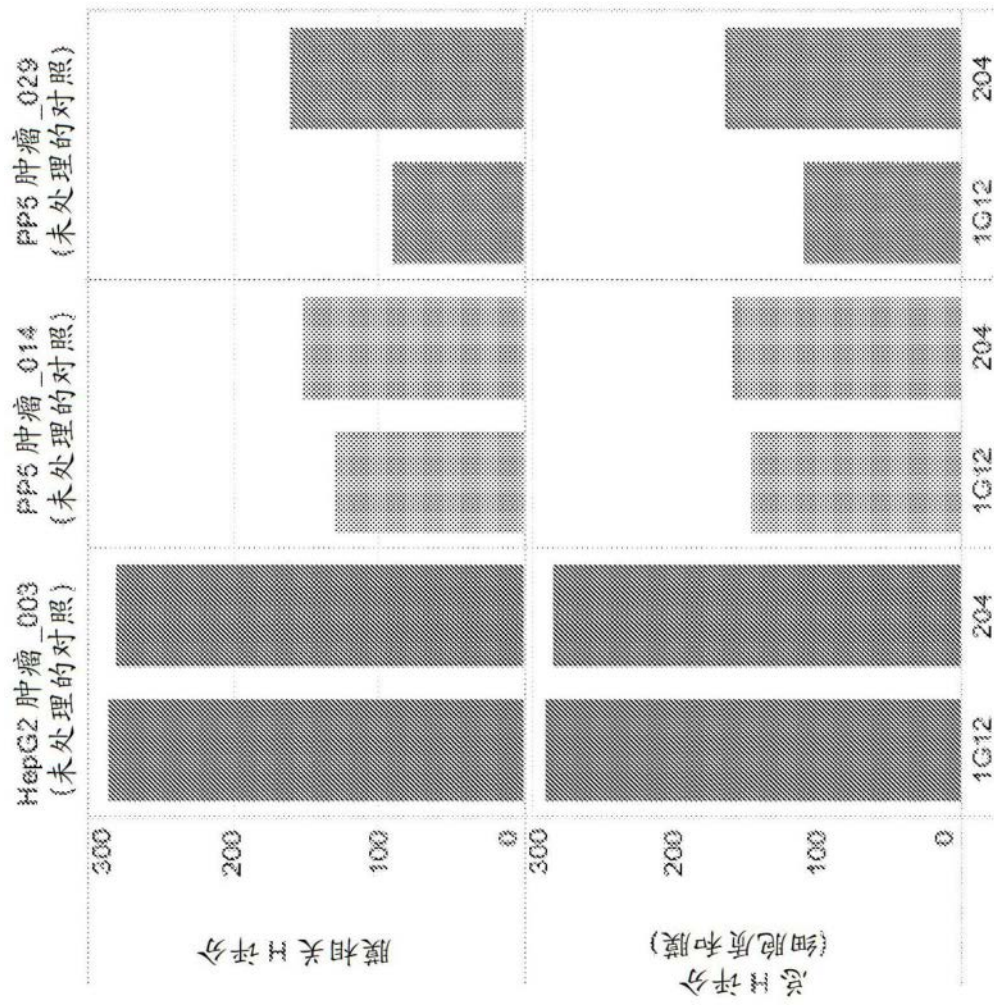


图12

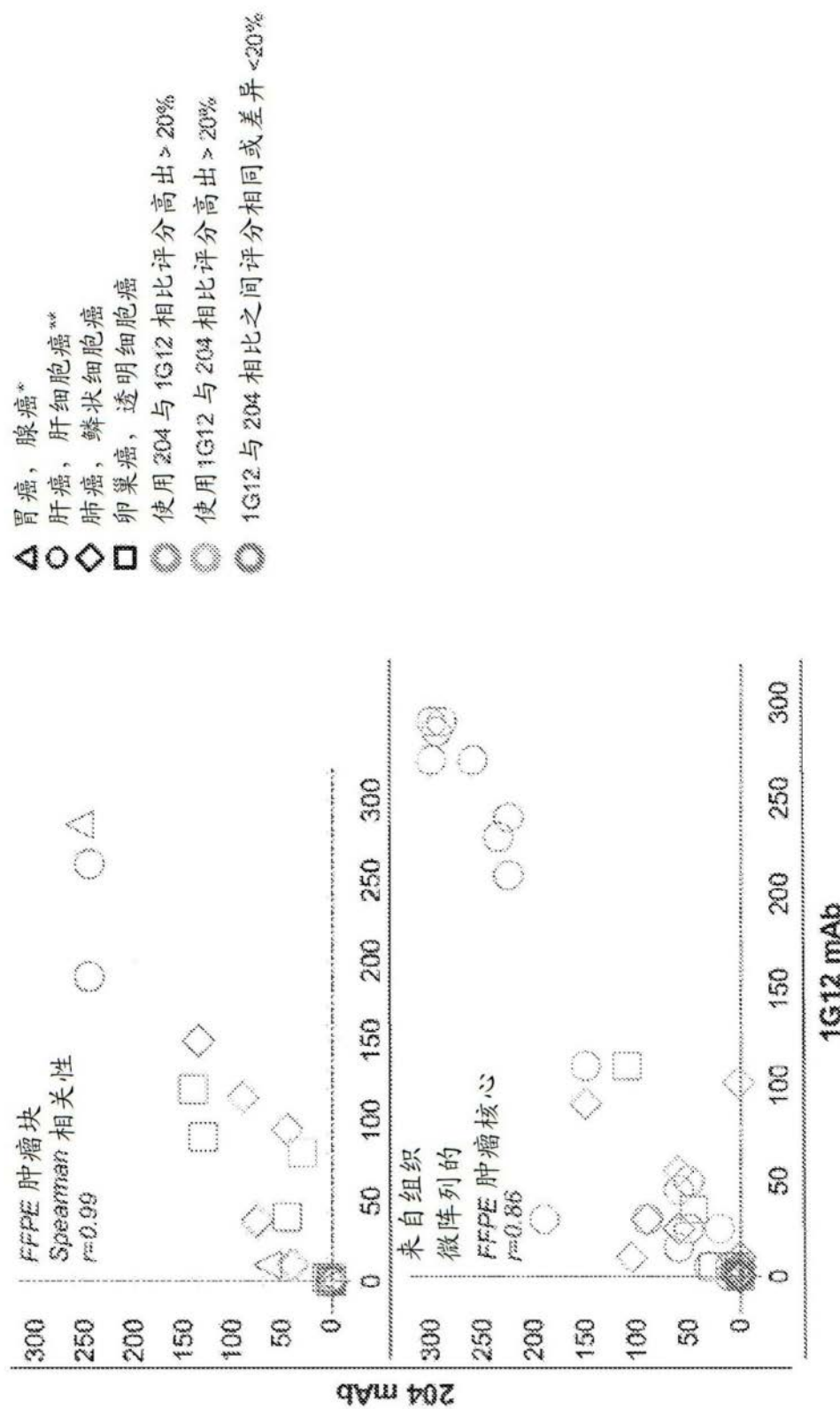


图13

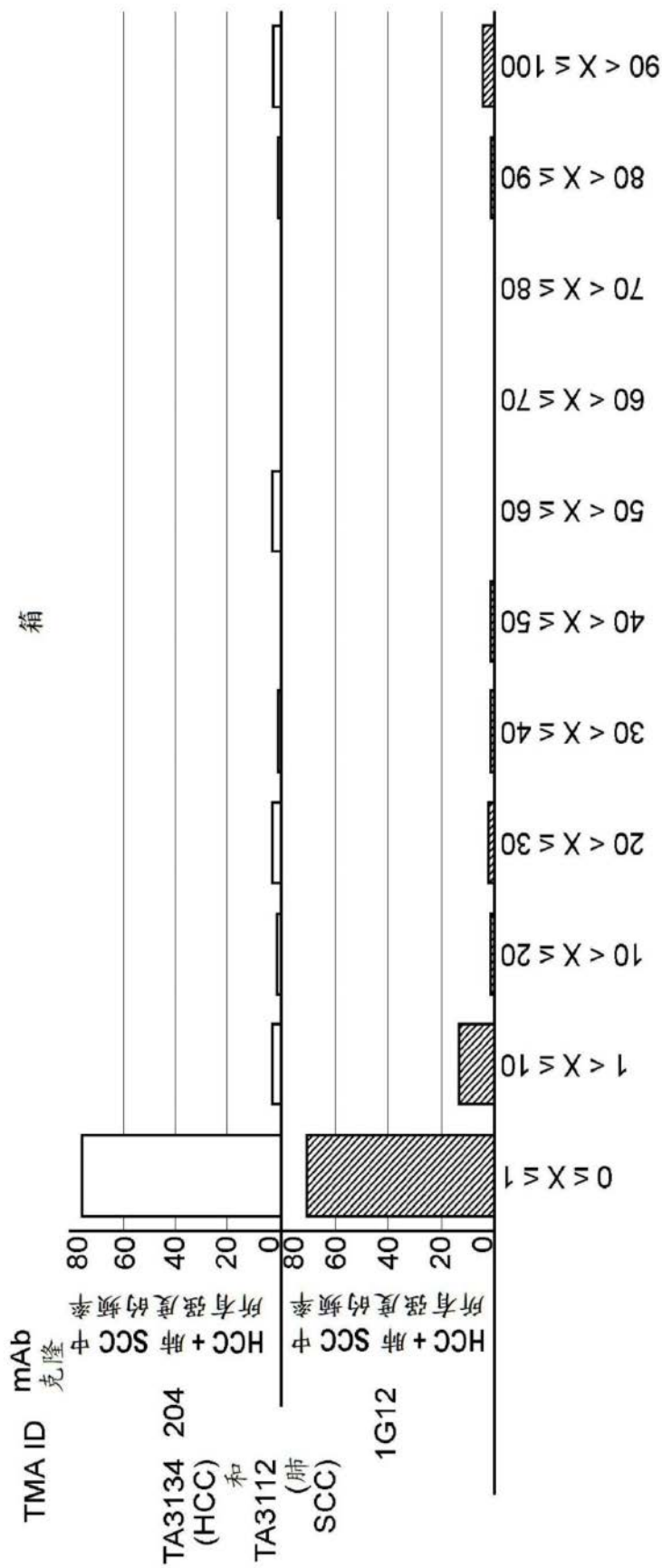


图14A

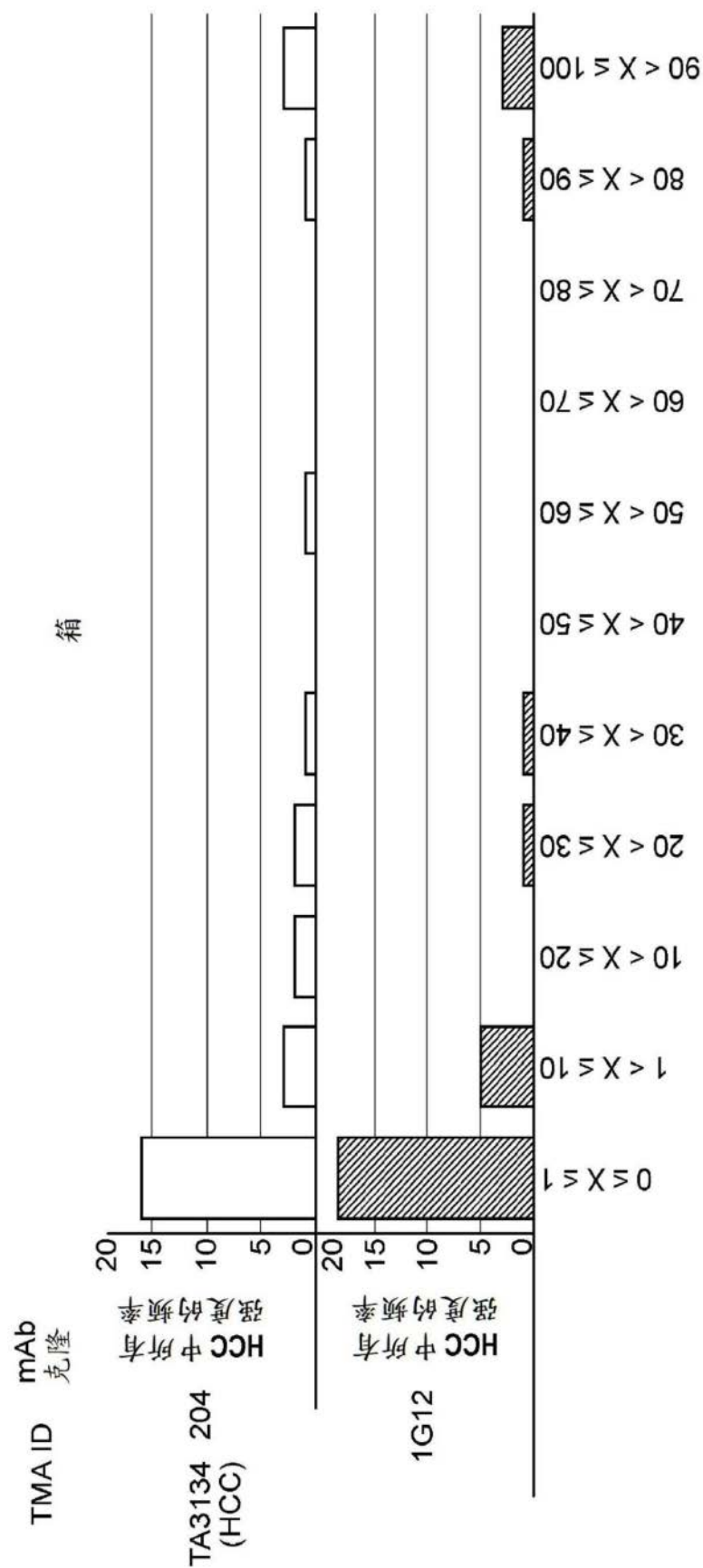


图14B

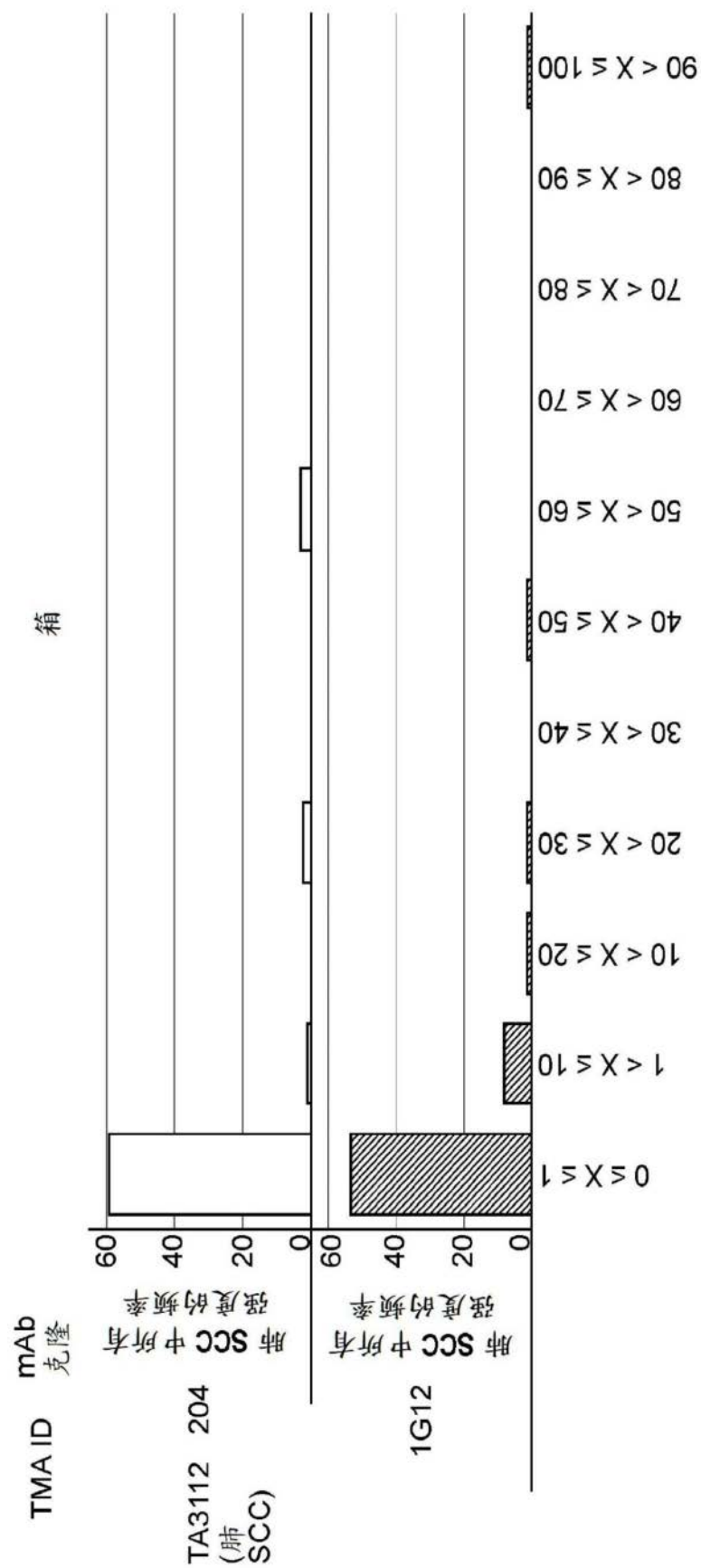


图14C

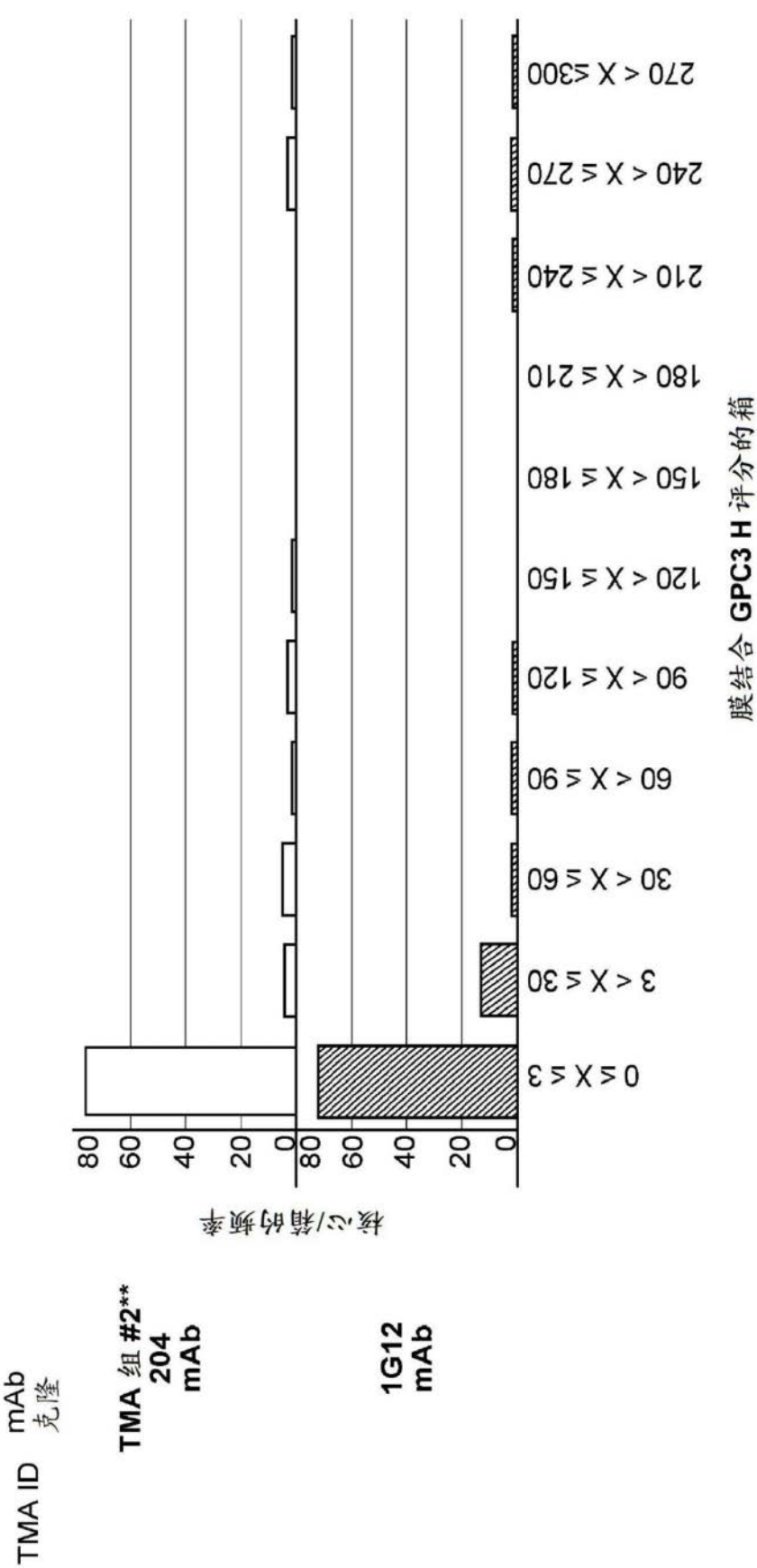


图14D

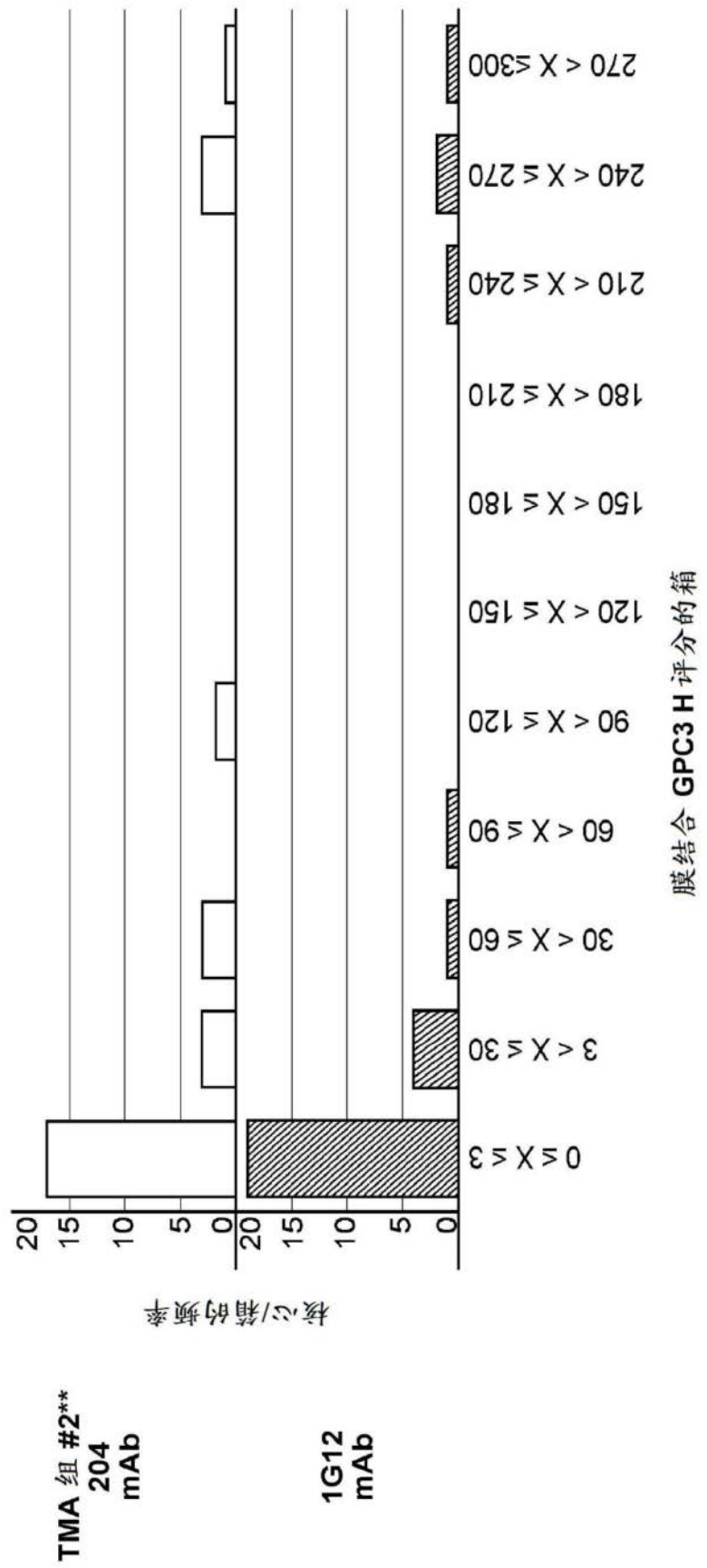


图14E

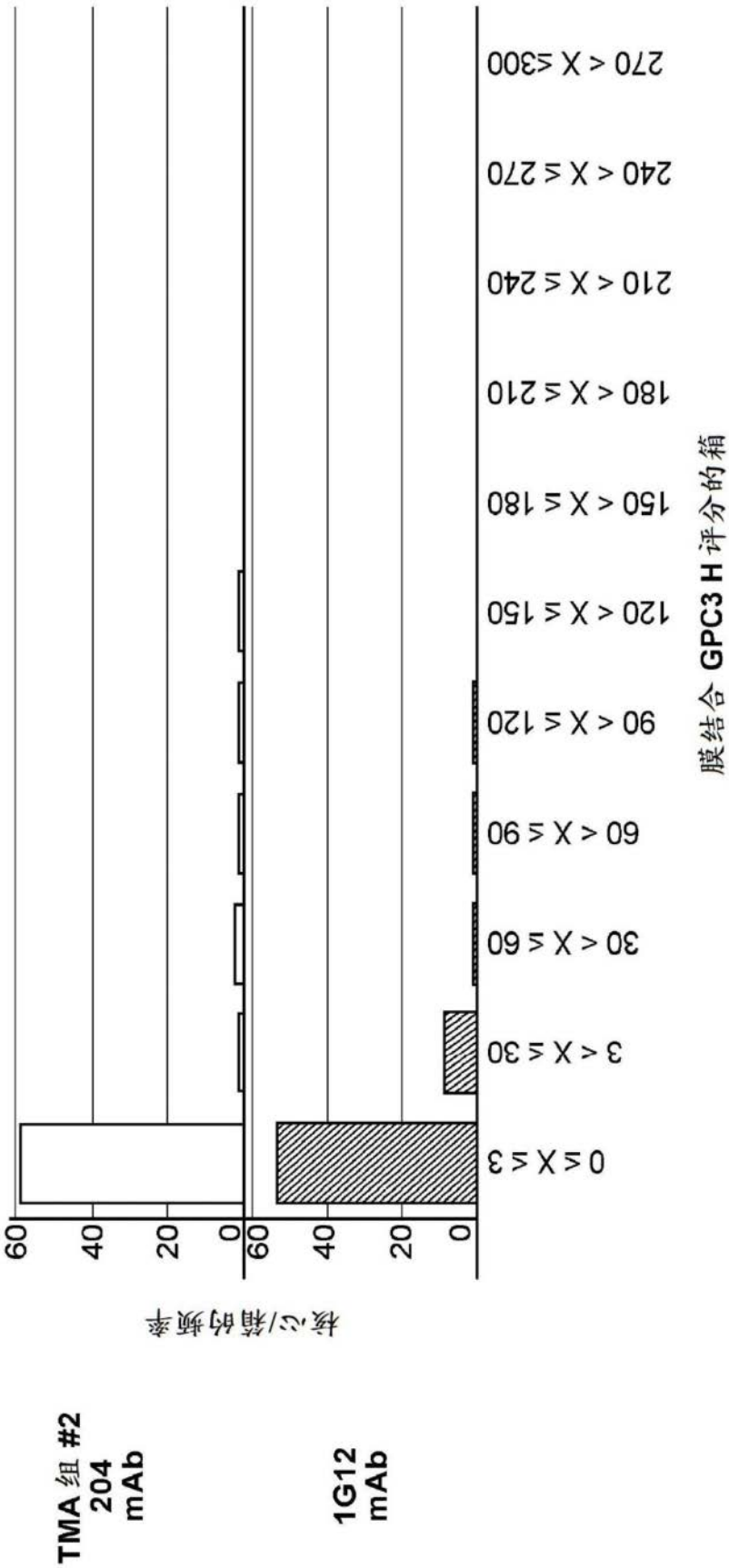


图14F

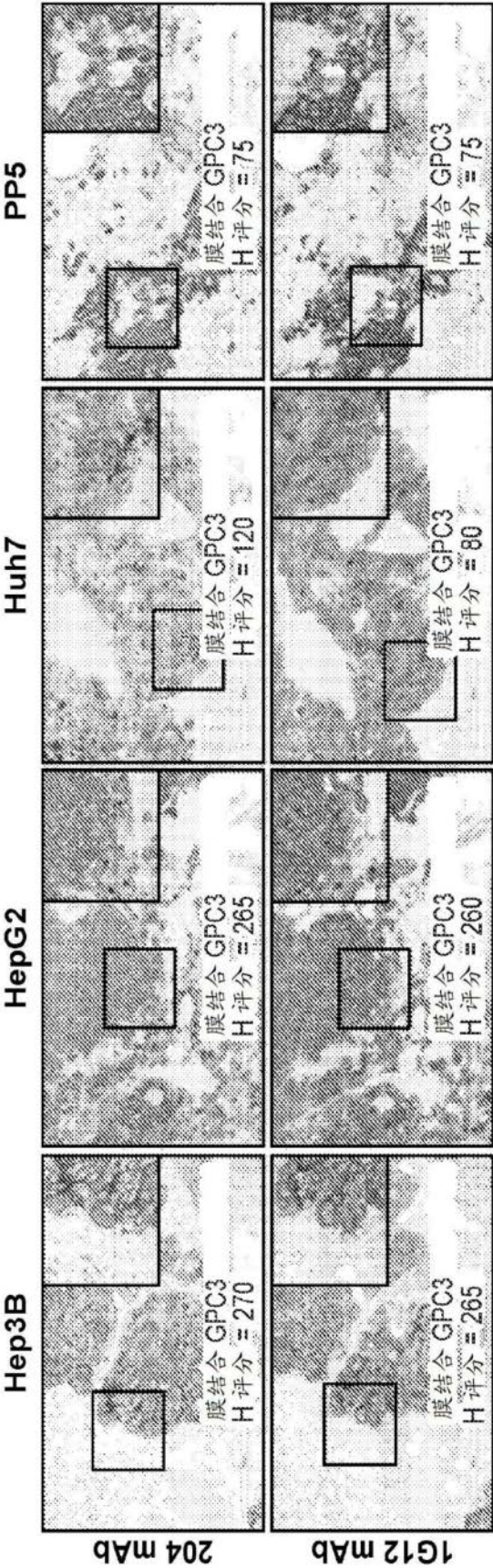


图15

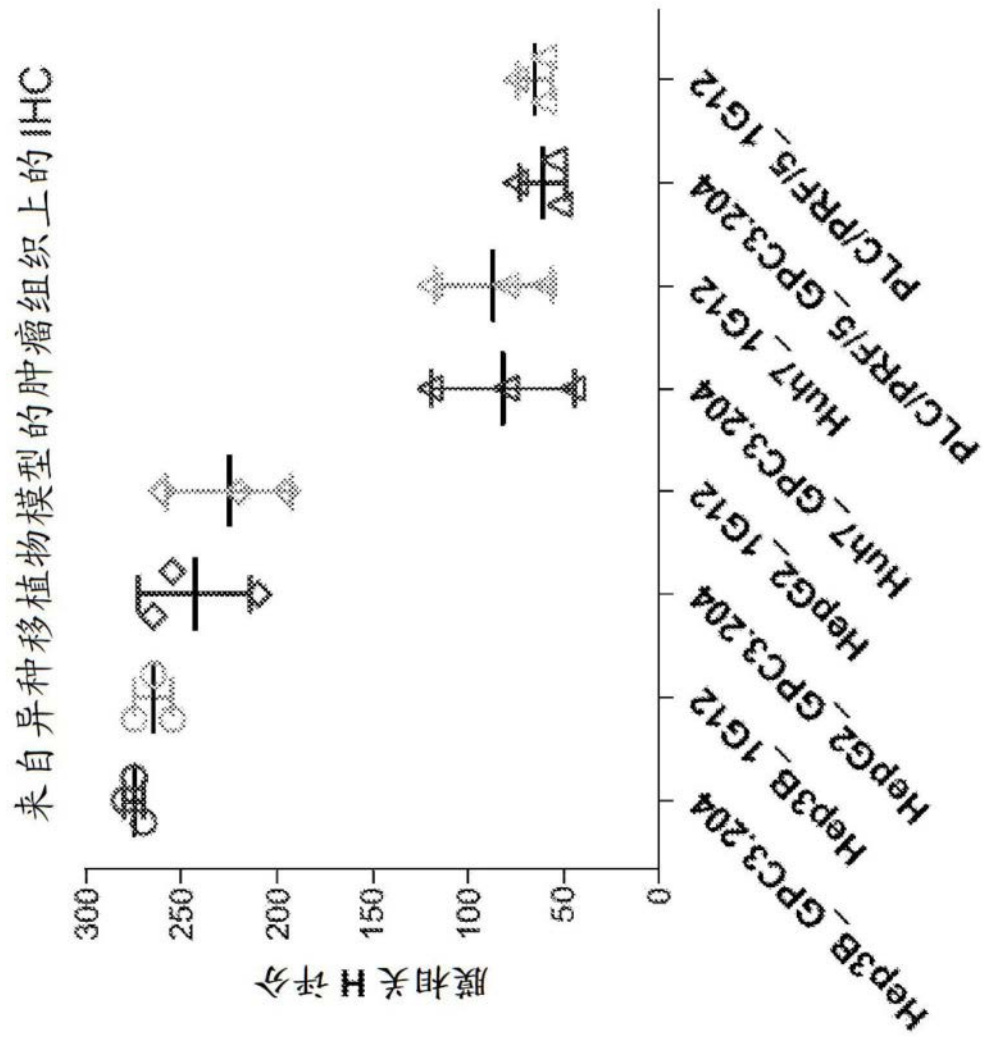


图16A

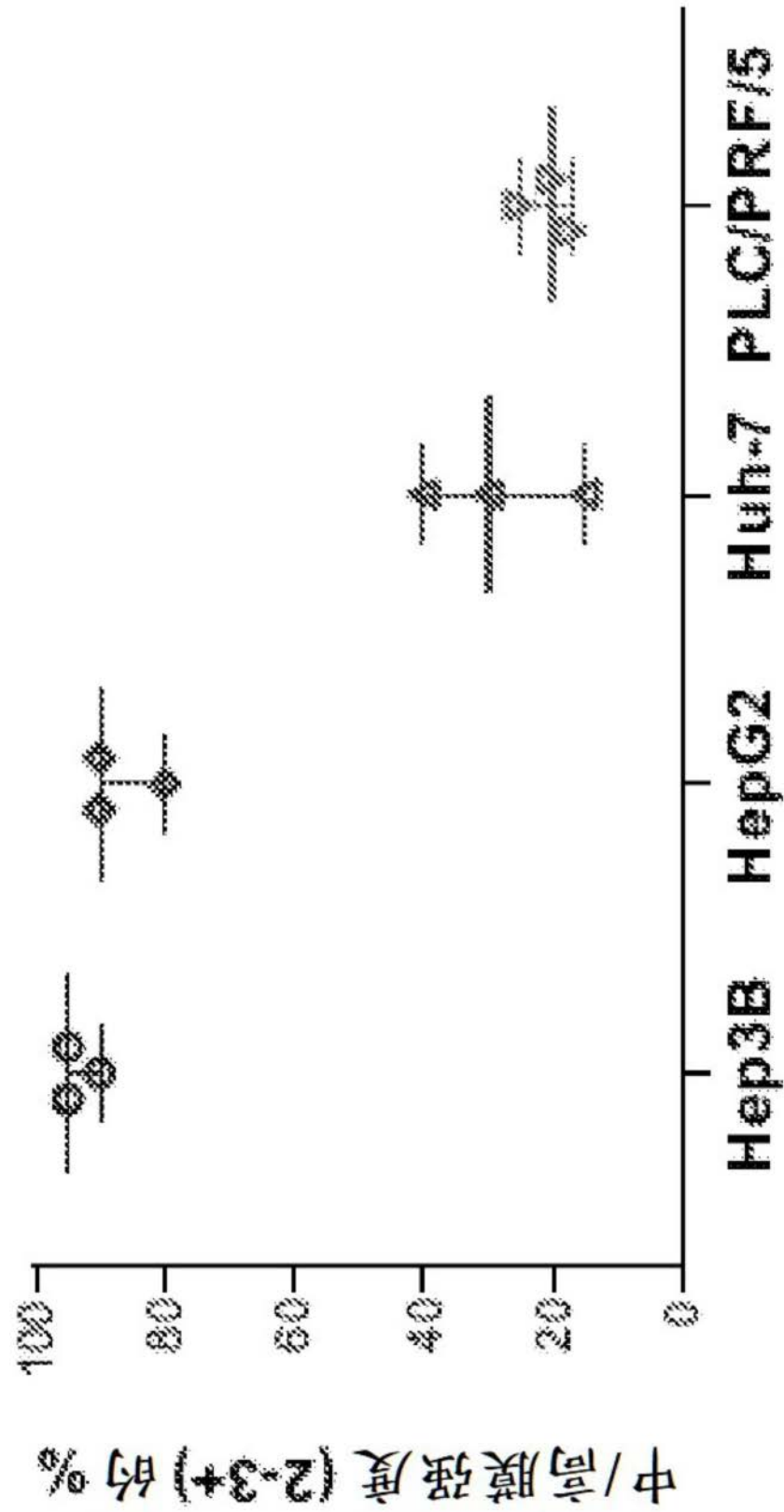


图16B

Adicet GPC3 (克隆 204)											
肿瘤 细胞系	肿瘤细胞阳性膜染色的 %						如果存在细胞质 染色:		染色主要是 细胞质的 还是膜的?		
	同种型 对照 强度	中/高 强度 (2/3+)					平均强度				
		0	1+	2+	3+	H评分					
Hep3B	0	5	5	5	85	90	270	局部1+	膜的		
Hep3B	0	0	5	10	85	95	280	局部1+	膜的		
Hep3B	0	0	5	15	80	95	275	很少 细胞为1+	膜的		
HepG2	0	10	10	40	40	80	210	1+	膜的		
HepG2	0	5	5	20	70	90	255	1+	膜的		
HepG2	0	5	5	10	80	90	265	局部1+	膜的		

图17A

肿瘤 细胞系	临床 GPC3 (克隆 1G12)									
	同种型 对照 强度	肿瘤细胞阳性膜染色的 %						如果存在细胞质 染色:		染色主要是 细胞质的 还是膜的?
		0	1+	2+	3+	中/高 强度 (2/3+)	H 评分	平均强度		
Hep3B	0	5	5	10	80	90	265	1+	膜的	
Hep3B	0	0	5	15	80	95	275	1+	膜的	
Hep3B	0	5	5	20	20	90	255	1+	膜的	
HepG2	0	5	20	50	25	75	195	2+	膜的	
HepG2	0	5	10	45	45	85	220	2 至局部 3+	膜的	
HepG2	0	5	10	5	80	85	260	2-3+	膜的	

图17B