



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115298221 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 04

(21) 申请号 202180022020.7

F.L.埃杰罗德 D.萨蒂恩

(22) 申请日 2021.03.17

E.C.W.布雷伊

(30) 优先权数据

20164059.6 2020.03.18 EP

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 张文辉

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.16

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/056879 2021.03.17

A61P 35/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/185934 EN 2021.09.23

(71) 申请人 健玛保

地址 丹麦哥本哈根

(72) 发明人 L.库普曼 P.恩格尔伯茨

D.弗齐尔 E.N.范登布林克

R.拉德梅克 S.波斯格拉

权利要求书8页 说明书62页

序列表41页 附图22页

(54) 发明名称

结合B7H4的抗体

(57) 摘要

本发明涉及结合B7H4的抗体,包括结合B7H4和CD3的双特异性抗体。本发明进一步提供了包含抗体的药物组合物,以及该抗体用于治疗 and 诊断程序,特别地在癌症疗法中的用途。

1. 抗体,其包含能够结合人B7H4的抗原结合区和能够结合人CD3的抗原结合区,其中所述抗原结合区包含重链和轻链可变区,其中所述重链和轻链可变区是人源化的和/或人的。
2. 根据权利要求1的抗体,其是双特异性抗体。
3. 根据权利要求1或2的抗体,其中所述抗体能够结合癌细胞和T细胞。
4. 根据权利要求1-3中任一项的抗体,其中所述癌细胞表达所述人B7H4。
5. 根据权利要求3或权利要求4的抗体,其中所述癌细胞是实体瘤的癌细胞。
6. 根据权利要求1-5中任一项的抗体,其中所述抗体能够诱导T细胞介导的细胞杀伤。
7. 根据前述权利要求中任一项的抗体,其中所述能够结合CD3的抗原结合区能够结合人CD3 ϵ (epsilon),诸如如SEQ ID NO:13中指定的人CD3 ϵ (epsilon)。
8. 根据权利要求1-7中任一项的抗体,其中所述结合CD3的抗原结合区包含重链可变区 (VH),其包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO.17的CDR1、CDR2和CDR3区,和,轻链可变区 (VL),其包含SEQ ID NO:22的CDR1、CDR2和CDR3区。
9. 根据权利要求1-7中任一项的抗体,其中所述结合CD3的抗原结合区包含重链可变区 (VH),其包含分别为SEQ ID NO:18、19和20或18、19和21的CDR1、CDR2和CDR3序列;和,轻链可变区 (VL),其包含分别为SEQ ID NO:23、GTN和24的CDR1、CDR2和CDR3序列。
10. 根据权利要求1-7中任一项的抗体,其中所述结合CD3的抗原结合区包含重链可变区 (VH),其包含SEQ ID NO:16的序列,或与SEQ ID NO:16的序列具有至少90%、至少95%、至少97%或至少99%氨基酸序列同一性的序列;和,轻链可变区 (VL),其包含SEQ ID NO:22的序列或与SEQ ID NO:22的序列具有至少90%、至少95%、至少97%或至少99%的氨基酸序列同一性的序列。
11. 根据权利要求7至10中任一项的抗体,其中所述结合CD3的抗原结合区和CD3之间的解离平衡常数 K_D 在1-100nM的范围内,诸如在5-100nM的范围内、在10-100nM范围内、在1-80nM范围内、在1-60nM范围内、在1-40nM范围内、在1-20nM范围内、在5-80nM范围内、在5-60nM范围内、在5-40nM范围内、在5-20nM范围内、在10-80nM范围内、在10-60nM范围内、在10-40nM的范围内,或诸如在10-20nM的范围内。
12. 根据权利要求7至10中任一项的抗体,其中所述抗体比具有抗原结合区的抗体具有更低的对人CD3 ϵ 的结合亲和力,所述抗原结合区包含如SEQ ID NO:16中所列的VH序列以及如SEQ ID NO:22中所列的VL序列,优选地其中所述亲和力低至少5倍,诸如低至少10倍,例如低至少20倍、低至少30倍、低至少40倍、低至少45倍或诸如低至少50倍。
13. 根据权利要求7至10中任一项的抗体,其中所述结合CD3的抗原结合区具有在200-1000nM范围内,例如在300-1000nM范围内、在400-1000nM范围内、在500-1000nM范围内、在300-900nM范围内、在400-900nM范围内、在400-700nM范围内、在500-900nM范围内、在500-800nM范围内、在500-700nM范围内、在600-1000nM范围内、在600-900nM范围内、在600-800nM范围内,或诸如在600-700nM的范围内的平衡解离常数 K_D 。
14. 根据权利要求11至13中任一项的抗体,其中

所述结合CD3的抗原结合区包括包含CDR1序列、CDR2序列和CDR3序列的重链可变(VH)区,

所述重链可变(VH)区在与包含SEQ ID NO:16中所列序列的重链可变(VH)区相比时具有在选自下组的位置处的氨基酸取代:T31、N57、H101、G105、S110和Y114,所述位置根据SEQ ID NO:16的序列编号;并且

野生型轻链可变(VL)区包含分别在SEQ ID NO:23、GTN和SEQ ID NO:24中列出的CDR1、CDR2和CDR3序列。

15. 根据权利要求14的抗体,其中所述结合CD3的抗原结合区在所述重链可变(VH)区中包含选自下组的取代:T31M、T31P、N57E、H101G、H101N、G105P、S110A、S110G、Y114M、Y114R、Y114V。

16. 根据权利要求8-10中任一项的抗体,其中所述结合CD3的抗原结合区的重链可变(VH)区的CDR1、CDR2和CDR3总共包含至多1、2、3、4或5个氨基酸取代,当与SEQ ID NO:16的序列的CDR1、CDR2和CDR3相比时,所述氨基酸取代优选包含如权利要求14或权利要求15中所定义的氨基酸取代。

17. 根据前述权利要求中任一项的抗体,其中所述人B7H4是SEQ ID NO.1的人B7H4。

18. 根据前述权利要求中任一项的抗体,其中所述能够结合人B7H4的抗原结合区能够结合人B7H4的细胞外域。

19. 根据权利要求17或权利要求18的抗体,其中所述能够结合人B7H4的抗原结合区能够结合人B7H4的IgC样恒定区。

20. 根据前述权利要求中任一项的抗体,其中所述能够结合人B7H4的抗原结合区能够结合具有SEQ ID NO.11的序列的B7H3-IgV/B7H4-IgC。

21. 根据权利要求20的抗体,其中所述能够结合人B7H4的抗原结合区不能够结合具有SEQ ID NO.10的序列的B7H4-IgV/B7H3-IgC。

22. 根据权利要求17-20中任一项的抗体,其中所述能够结合人B7H4的抗原结合区包含:

a) 可变重链(VH)区,其包含SEQ ID NO.25的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.33的CDR1、CDR2和CDR3区;

b) 可变重链(VH)区,其包含SEQ ID NO.29的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.33的CDR1、CDR2和CDR3区;

c) 可变重链(VH)区,其包含SEQ ID NO.36的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.40的CDR1、CDR2和CDR3区;

d) 可变重链(VH)区,其包含SEQ ID NO.43的CDR1、CDR2和CDR3,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.47的CDR1、CDR2和CDR3区;

e) 可变重链(VH)区,其包含SEQ ID NO.50的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.54的CDR1、CDR2和CDR3区;或者

f) 可变重链(VH)区,其包含SEQ ID NO.31的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.33的CDR1、CDR2和CDR3区

g) 可变重链(VH)区,其包含SEQ ID NO.65的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.69的CDR1、CDR2和CDR3区。

23. 根据权利要求17-20的抗体,其中所述能够结合人B7H4的抗原结合区包含:

a) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.26、27和28的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.34、GAS和SEQ ID NO.35的CDR1、CDR2和CDR3;

b) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.26、30和28的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.34、GAS和SEQ ID NO.35的CDR1、CDR2和CDR3;

c) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.37、38和39的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.41、DTS和SEQ ID NO.42的CDR1、CDR2和CDR3;

d) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.44、45和46的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.48、YTS和SEQ ID NO.49的CDR1、CDR2和CDR3;

e) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.51、52和53的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.55、GAS和SEQ ID NO.56的CDR1、CDR2和CDR3;或者

f) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.26、32和28的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.34、GAS和SEQ ID NO.35的CDR1、CDR2和CDR3

g) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.66、67和68的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.70、GAS和SEQ ID NO.71的CDR1、CDR2和CDR3。

24. 根据权利要求17-20中任一项的抗体,其中所述能够结合人B7H4的抗原结合区包含:

a) SEQ ID NO.25的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.33的可变轻链区;

b) SEQ ID NO.29的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.33的可变轻链区;

c) SEQ ID NO.36的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.40的可变轻链区;

d) SEQ ID NO.43的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.47的可变轻链区;

e) SEQ ID NO.50的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.54的可变轻链区;或者

f) SEQ ID NO.29的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.33的可变轻链区

g) SEQ ID NO.65的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.69的可变轻链区。

25. 根据前述权利要求中任一项的抗体,其中所述能够结合人B7H4的抗原结合区具有对应于 $5E-7M$ 或更小,诸如 $1E-7M$ 或更小的 K_D 值的结合亲和力,诸如具有对应于在 $5E-7$ 至 $2E-10M$ 范围内,诸如在 $2E-7$ 至 $1E-10M$ 或 $1E-7$ 至 $5E-9M$ 范围内的 K_D 值的结合亲和力。

26. 根据权利要求25的抗体,其中所述结合亲和力通过生物层干涉测量法测定,任选地如本文实施例3中所述。

27. 根据权利要求25和26中任一项的抗体,其中所述结合亲和力使用包括以下步骤的生物层干涉测量法测定:

I) 将所述抗体以 $1\mu g/mL$ 的量在抗人IgG Fc捕捉生物传感器上固定化600秒;

II) 使用范围为 $1.56nM$ 至 $100nM$ 的2倍稀释系列,测定人重组带His标签的B7H4蛋白(Sino Biological目录号10738-H08H;从编码具有C端多组氨酸标签的人VTCN1(Uniprot登录号Q7Z7D3)(Phe29-Ala258)的DNA序列的构建体表达的蛋白质)在300秒的时间段内的缔合和1000秒的时间段内的解离;

III) 相对于缓冲液对照(0nM)参考数据。

28. 根据权利要求25至27中任一项的抗体,其中所述结合亲和力是使用前述权利要求中任一项所定义的抗体测定的,所述抗体是单特异性二价抗体,诸如作为全长抗体IgG1的

抗体。

29. 根据权利要求1-28中任一项的抗体,其包含能够结合人B7H4的抗原区,所述抗原结合区能够交叉阻断

抗体,其包含SEQ ID NO.29的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.33的可变轻链区;和
抗体,其包含SEQ ID NO.36的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.40的可变轻链区;并且
其中所述抗原结合区不能交叉阻断

抗体,其包含SEQ ID NO.43的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.47的可变轻链区;
抗体,其包含SEQ ID NO.50的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.54的可变轻链区;和
抗体,其包含SEQ ID NO.65的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.69的可变轻链区。

30. 根据权利要求1-28中任一项的抗体,其包含能够结合人B7H4的抗原区,所述抗原结合区能够交叉阻断

抗体,其包含SEQ ID NO.43的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.47的可变轻链区,
抗体,其包含SEQ ID NO.50的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.54的可变轻链区;和
抗体,其包含SEQ ID NO.65的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.69的可变轻链区;
并且其中所述抗原结合区不能交叉阻断抗体,所述抗体包括

抗体,其包含SEQ ID NO.29的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.33的可变轻链区,和
抗体,其包含SEQ ID NO.36的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.40的可变轻链区。

31. 根据权利要求29或权利要求30的抗体,其中所述能够结合人B7H4的抗原结合区能够结合SEQ ID NO.11的B7H3-IgV/B7H4-IgC,并且任选地不能够结合SEQ ID NO.10的B7H4-IgV/B7H3-IgC。

32. 根据前述权利要求中任一项的抗体,其中每个抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),并且其中所述可变区各自包含三个CDR序列,分别为CDR1、CDR2和CDR3,以及四个框架序列,分别为FR1、FR2、FR3和FR4。

33. 根据前述权利要求中任一项的抗体,其中

- c) 所述能够结合B7H4的抗原结合区是人的,并且
- d) 所述能够结合CD3的抗原结合区是人源化的。

34. 根据权利要求1-32中任一项的抗体,其中

- b) 所述能够结合B7H4的抗原结合区是人的,和/或
- c) 所述能够结合CD3的抗原结合区是人源化的。

35. 根据前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体包含两个重链恒定区(CH)和两个轻链恒定区(CL)。

36. 根据权利要求35的抗体,其中所述两个重链恒定域和两个轻链恒定区衍生自人。

37. 根据前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体是全长抗体。

38. 根据前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体是IgG1同种型的抗体。

39. 根据前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体包含第一和第二重链,所述第一和第二重链各自至少包含铰链区、CH2和CH3区,其中在所述第一重链中,与选自人IgG1重链中T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置相对应的位置中的氨基酸中的至少一个已被取代,并且在所述第二重链中,与选自人IgG1重链中T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置相对应的位置中的氨基酸中的至少一个已被取代,其中所述第一重链和所述

第二重链的所述取代不在同一位置中,并且其中所述氨基酸位置根据Eu编号进行编号。

40. 根据权利要求39的抗体,其中与人IgG1重链中的K409相对应的位置中的氨基酸在所述第一重链中为R,并且与人IgG1重链中的F405相对应的位置中的氨基酸在所述第二重链中为L,或反之亦然。

41. 根据前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体包含第一重链和任选地第二重链,并且其中所述第一重链和在存在时所述第二重链经修饰使得所述抗体相对于相同的未修饰抗体在更小程度上诱导Fc介导的效应物功能。

42. 根据权利要求41的抗体,其中所述抗体包含第一和第二重链,并且其中在所述第一和第二重链两者中,在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置L234和L235的位置处的氨基酸残基分别是F和E。

43. 根据权利要求41或权利要求42的抗体,其中抗体包含第一和第二重链,并且其中在所述第一和第二重链两者中,在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置D265的位置处的氨基酸残基是A。

44. 根据前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体包含kappa (κ) 轻链。

45. 根据前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体包含lambda (λ) 轻链。

46. 根据前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体包含lambda (λ) 轻链和kappa (κ) 轻链;例如抗体,其具有包含能够结合CD3的结合区的重链和lambda轻链,以及包含能够结合B7H4的结合区的重链和kappa轻链。

47. 根据前述权利要求中任一项的抗体,其中所述能够结合人B7H4的抗原结合区包含在重链和轻链中,所述重链包含所述VH区和IgG1重链恒定区并且所述轻链包含所述VL区和kappa轻链恒定区;并且其中所述能够结合人CD3的抗原结合区包含在重链和轻链中,所述重链包含所述VH区和IgG1重链恒定区并且所述轻链包含所述VL区和lambda轻链恒定区。

48. 根据权利要求47的抗体,其中一个IgG1重链恒定区如SEQ ID NO.60中所定义且另一个如SEQ ID NO.61中所定义,并且其中所述kappa轻链恒定区如SEQ ID NO.63中所定义且所述lambda轻链恒定区如SEQ ID NO.64中所定义。

49. 根据权利要求48的抗体,其中所述如SEQ ID NO.60和61中所定义的IgG1重链恒定区已经缺失其末端赖氨酸。

50. 根据前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体缺乏Fc介导的效应物功能或具有降低的Fc介导的效应物功能,并且所述抗体:

a) 能够结合表达B7H4的人肿瘤细胞,诸如本文实施例9和10中所述,

b) 在表达B7H4的人肿瘤细胞中介导浓度依赖性细胞毒性,在使用例如PBMC或T细胞作为效应细胞时,当如本文实施例11和12中所述进行测定时,

c) 能够在选自MCF-7、MDA-MB-468、SK-BR3、NIH-OVCAR-3、HCC1954和NCI-H1650的一种或多种表达人B7H4的肿瘤细胞系中介导浓度依赖性细胞毒性,在使用例如PBMC或T细胞作为效应细胞时,当如本文实施例11和12中所述进行测定时,

d) 能够在表达B7H4的人肿瘤细胞的存在下在体外激活T细胞;例如当如本文实施例13所述进行测定时,

e) 能够在选自MCF-7、MDA-MB-468、SK-BR3、NIH-OVCAR-3、HCC1954和NCI-H1650的一种或多种表达B7H4的人肿瘤细胞系的存在下在体外激活T细胞;例如当如本文实施例13所述

进行测定时，

f) 能够诱导表达B7H4的人肿瘤细胞的细胞毒性；例如当如本文实施例11和12中所述进行测定时，和/或

g) 能够在选自MCF-7、MDA-MB-468、SK-BR3、NIH-OVCAR-3、HCC1954和NCI-H1650的一种或多种表达B7H4的人肿瘤细胞系中诱导T细胞介导的细胞毒性；例如当如本文实施例11和12中所述进行测定时。

51. 根据权利要求47的抗体，其中所述抗体具有0.001-5微克/ml范围内的IC50，其中所述IC50在体外细胞毒性测定法中测定，所述体外细胞毒性测定法包括以下步骤：

i) 提供来自健康人供体血沉棕黄层的分离的外周血单个核细胞(PBMC)或纯化的T细胞，

ii) 提供表达B7H4的肿瘤细胞；

iii) 在多个样品中将PBMC或纯化的T细胞和表达人B7H4的肿瘤细胞系组合，所述表达人B7H4的肿瘤细胞系选自下组：MCF-7、MDA-MB-468、SK-BR3、NIH-OVCAR-3、HCC1954和NCI-H1650，其中来自所述PBMC的T细胞或纯化的T细胞与所选肿瘤细胞的数量比率为8:1；

iv) 以稀释系列向所述样品提供所述抗体，范围例如0.0128ng/mL至10,000ng/mL，和

v) 温育所述样品，例如在37°C达72小时；并且随后，

vi) 评估所述表达B7H4的肿瘤细胞的存活力，

vii) 测定每个稀释样品的活细胞的百分比，和

viii) 测定所述IC50。

52. 根据权利要求48的抗体，其中所述IC50在0.001-0.03微克/ml的范围内。

53. 根据权利要求48的抗体，其中所述IC50在0.05-5微克/ml的范围内。

54. 抗体，其包含能够结合人B7H4的抗原结合区，其中所述能够结合人B7H4的抗原结合区包含：

a) 可变重链(VH)区，其包含SEQ ID NO.25的CDR1、CDR2和CDR3区，以及可变轻链区，其包含分别为SEQ ID NO.33的CDR1、CDR2和CDR3区；

b) 可变重链(VH)区，其包含SEQ ID NO.29的CDR1、CDR2和CDR3区，以及可变轻链区，其包含分别为SEQ ID NO.33的CDR1、CDR2和CDR3区；

c) 可变重链(VH)区，其包含分别为SEQ ID NO.26、27和28的CDR1、CDR2和CDR3区，以及可变轻链区，其包含分别为SEQ ID NO.34、GAS和SEQ ID NO.35的CDR1、CDR2和CDR3；

d) 可变重链(VH)区，其包含分别为SEQ ID NO.26、30和28的CDR1、CDR2和CDR3区，以及可变轻链区，其包含分别为SEQ ID NO.34、GAS和SEQ ID NO.35的CDR1、CDR2和CDR3；

e) SEQ ID NO.25的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.33的可变轻链区；或者

f) SEQ ID NO.29的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.33的可变轻链区。

55. 根据权利要求54的抗体，其中所述抗体是单特异性抗体。

56. 根据权利要求54或权利要求55的抗体，其中所述抗体是二价抗体。

57. 根据权利要求56的抗体，其中所述抗体是包含能够结合人CD3的另外的抗原结合区的双特异性抗体，其中优选地，所述能够结合CD3的另外的抗原结合区是如权利要求7-16中任一项所定义的能够结合人CD3的抗原结合区。

58. 组合物，其包含如权利要求1至57中任一项所定义的抗体。

59. 药物组合物,其包含如权利要求1至58中任一项所定义的抗体和药学上可接受的载体。

60. 如权利要求1至57中任一项所定义的抗体,用作药物。

61. 根据权利要求60所述的用作药物的抗体,其用于治疗疾病。

62. 根据权利要求61所述的用作药物的抗体,其中所述疾病是癌症。

63. 根据权利要求62所述的用作药物的抗体,其中所述癌症的特征在于在癌细胞中的B7H4的表达。

64. 根据权利要求63所述的用作药物的抗体,其中所述B7H4的表达在从患者获得的癌细胞中测定。

65. 根据权利要求62至64中任一项所述的用作药物的抗体,其中所述癌症是实体瘤。

66. 根据权利要求62至65中任一项使用的抗体,其中所述癌症选自下组:肺癌、NSCLC (ADC或SQCC)、胃癌、胰腺癌、胆管癌、膀胱癌、宫颈癌、头颈癌、乳腺癌、卵巢癌和子宫癌。

67. 治疗疾病的方法,所述方法包括将如权利要求1至57中任一项所定义的抗体、如权利要求58中所定义的组合物或权利要求59中所定义的药物组合物施用于有此需要的受试者。

68. 根据权利要求67所述的方法,所述方法用于治疗癌症。

69. 根据权利要求68所述的方法,其中所述癌症选自下组:子宫癌肉瘤(UCS)、膀胱尿路上皮癌(BLCA)、胰腺腺癌(PAAD)、肺鳞状细胞癌(LUSC)、乳腺侵入癌(BRCA)、子宫体子宫内膜癌(UCEC)、卵巢浆液性囊腺癌(OV)和胆管癌(CHOL)。

70. 核酸,其包含:

a) 编码如权利要求54中所定义的能够结合B7H4的抗原结合区的重链可变区序列的核酸序列,和/或

b) 编码如权利要求54中所定义的所述能够结合B7H4的抗原结合区的相应轻链可变区序列的核酸序列。

71. 一种或多种核酸,其包含

a) 编码抗体的重链序列的核酸序列,所述抗体包含如权利要求22-24中任一项所定义的能够结合B7H4的抗原结合区,

b) 编码抗体的相应轻链序列的核酸序列,所述抗体包含如权利要求22-24中任一项所定义的所述能够结合B7H4的抗原结合区,

c) 编码抗体的重链序列的核酸序列,所述抗体包含如权利要求8-10中任一项所定义的能够结合CD3的抗原结合区;和

d) 编码抗体的相应轻链序列的核酸序列,所述抗体包含如权利要求8-10中任一项所定义的所述能够结合CD3的抗原结合区。

72. 如权利要求70或71所定义的核酸或一种或多种核酸,其中所述核酸是RNA或DNA。

73. 根据权利要求70至72中任一项的核酸或一种或多种核酸,其用于在哺乳动物细胞中表达。

74. 细胞,其包含如权利要求70-73中任一项所定义的核酸或包含如权利要求70-73中任一项所定义的一种或多种核酸。

75. 根据权利要求74的细胞,其中所述细胞是人来源的,诸如人胚胎肾(HEK)细胞,诸如

HEK/Expi细胞,或者是啮齿动物来源的,诸如中国仓鼠卵巢细胞,诸如CHO/N50细胞。

76. 用于产生根据权利要求1至53中任一项的能够结合B7H4和CD3两者的抗体的方法,其包括以下步骤:

a) 提供能够结合B7H4的抗体,所述抗体包含如权利要求1至6和17至34中任一项所定义的能够结合B7H4的抗原结合区;

b) 提供能够结合CD3的抗体,所述抗体包含如权利要求1至16和32至34中任一项所定义的能够结合CD3的抗原结合区;

c) 在足以允许较链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将所述能够结合B7H4的抗体与所述能够结合CD3的抗体一起温育,和

d) 获得所述能够结合B7H4和CD3的抗体。

77. 根据权利要求76的用于产生能够结合B7H4和CD3两者的抗体的方法,其中所述步骤a) 和/或b) 包括:

- 提供含有用于产生一种或多种所述抗体的表达载体的细胞;和

- 允许所述细胞产生一种或多种所述抗体,以及随后,

- 获得一种或多种所述抗体,从而提供一种或多种所述抗体。

78. 试剂盒,诸如用作伴随诊断/用于在患者群体内鉴定那些具有响应于用如权利要求1至57中任一项所定义的抗体的治疗的倾向的患者的试剂盒,其包含如权利要求1至57中任一项所定义的抗体;以及所述试剂盒的使用说明。

结合B7H4的抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及结合B7H4的抗体,特别是结合B7H4和CD3的双特异性抗体。本发明进一步提供了包含该抗体的药物组合物以及该抗体在治疗和诊断规程中的用途,特别是在癌症疗法中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] B7H4 (B7-H4, 含有V-set域的T细胞活化抑制剂1或VTCN1) 是B7蛋白家族的成员,该家族包含与淋巴细胞上的受体结合的细胞表面蛋白配体。B7家族在免疫应答的调节中起重要作用。B7H4通过抑制T细胞活化、增殖、细胞因子产生和细胞毒活性来负调节T细胞介导的免疫应答 (Prasad et al., 2003, *Immunity* 18:863-873)。B7H4是I型跨膜蛋白,其包括短的细胞内域、疏水性跨膜域和细胞外域,所述细胞外域具有IgV和IgC样域,其具有四个保守的半胱氨酸残基和七个N-连接糖基化位点。(Sica et al., 2003, *Immunity* 18:849-861)。迄今为止,尚未鉴定出B7H4受体。

[0004] 在正常成人组织中,B7H4表达非常有限,而B7H4表达在许多癌症组织的肿瘤细胞上发现 (Kaur and Janakiram, 2019, *ESMO Open* 4:e000554)。在癌症中,B7H4表达与癌症晚期、不良预后和降低的总体患者生存相关。

[0005] 因此,已提出靶向B7H4用于治疗癌症 (Podojil and Miller, *Immunological Reviews*, 2017:276;40-51)。目前,正在开发用于癌症疗法的B7H4结合抗体。例如,FPA150是无岩藻糖基化 (afucosylated) 人抗体,其减轻B7H4介导的对T细胞活化的抑制并表现出抗体依赖性细胞性的细胞毒性 (ADCC) 活性 (Wainberg et al., 2019, *Annals of Oncology* 30, Suppl. 5, v489 (1198P))。它目前作为单一疗法或联合派姆单抗用于晚期实体瘤的早期临床试验。

[0006] 还努力将T细胞靶向B7H4。基于小鼠抗人B7H4抗体和小鼠抗人CD3抗体的Fab和单链可变片段 (scFv) 结构制备B7H4/CD3双特异性单链抗体Fab scFv (Iizuka et al., 2019, *Clin Cancer Res* 25:2925-2934)。Smith等人已经描述具有B7H4特异性嵌合抗原受体 (CAR) 的工程化T细胞,其针对B7H4阳性人卵巢肿瘤异种移植物展示出抗肿瘤活性,但也在小鼠中显示出多器官淋巴细胞浸润和致死毒性 (Smith et al. 2016, *Molecular Therapy*, Vol. 24 Iss. 11 pp1987-99)。

[0007] 尽管已经取得一些进展,但仍需要开发对人使用而言有效和/或安全的靶向B7H4的基于抗体的癌症疗法。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明的目的是提供包含能够结合人B7H4的抗原结合区和结合CD3诸如人CD3 ϵ (epsilon) 的抗原结合区的抗体。此类抗体的抗原结合区至少包含人框架区,诸如FR1、FR2、FR3和FR4。最优选的是所有框架区均是人的。此类抗原结合区是人源化和/或人的抗原结合区。这些抗体可用于治疗病况,其中期望B7H4表达细胞的特异性靶向和T细胞介导的杀伤,例如在病况诸如癌症中。优选地,此类抗体适合人使用,例如在医疗中使用。可以适合治疗的癌症是实体瘤。根据本发明,所述B7H4表达和T细胞介导的杀伤(例如在癌细胞中)的范围

可以为B7H4的相对低表达,诸如在MCF-7细胞中,至B7H4的相对高表达,诸如在SK-BR3细胞中,如例如在实施例12中所示。更优选地,此类双特异性抗体具有在恒定区内的使得Fc区(如果存在)为惰性的取代。

[0010] 在一个实施方案中,提供了双特异性抗体,其包含能够结合人B7H4的抗原结合区和能够结合CD3诸如人CD3 ϵ (ϵ)的抗原结合区,其中该能够结合人B7H4的抗原结合区包含可变重链(VH)区和可变轻链区,该可变重链(VH)区包含SEQ ID NO.25、29或31的CDR1、CDR2和CDR3区,该可变轻链区包含SEQ ID NO.33的CDR1、CDR2和CDR3,并且其中该能够结合CD3的抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),该重链可变区(VH)包含分别为18、19和21的CDR1、CDR2和CDR3序列;该轻链可变区(VL)包含分别为SEQ ID NO:23、GTN和24的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0011] 在另一方面,提供了编码如本文所定义的抗体的核酸,诸如DNA或RNA,以及产生如本文所定义的抗体或其组分的方法。

[0012] 在进一步的方面,根据本发明的所述抗体或核酸用于医学治疗。

[0013] 附图简述

[0014] 图1.使用B7H4-B7H3嵌合分子确定参与结合的B7H4域。使用经转染以表达人B7H4(I)、人B7H4-B7H3嵌合分子B7H3-IgV/B7H4-IgC(II)或B7H4-IgV/B7H3-IgC(III),或人B7H3(IV)的一组细胞来确定B7H4抗体的B7H4域特异性。通过流式细胞术测定结合。A=bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C4-FEAR;B=bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C3-FEAR;C=bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR;D=bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-FEAR;E=IgG1-B7H3-BRCA84D。

[0015] 图2.B7H4抗体与B7H4、B7H3或B7H4-B7H3嵌合分子的结合。使用流式细胞术评估bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR、bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C2-FEAR、bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C3-FEAR、bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR与经瞬时转染以表达人B7H4或B7H4-B7H3嵌合分子B7H3-IgV/B7H4-IgC或B7H4-IgV/B7H3-IgC的HEK细胞的结合。

[0016] 图3.B7H4抗体与具有ECD中的丙氨酸突变的B7H4变体的结合。结合表示为与参考抗体相比的倍数变化。倍数变化定义为 $\text{Log}_{10}(\text{归一化gMFI}[\text{ala突变体}]/\text{归一化gMFI}[\text{wt}])$ 。认为其中结合中倍数变化低于平均倍数变化-1.5xSD的残基是“结合丢失突变体”。结合中具有正倍数变化的残基是参考抗体的结合丢失残基。x轴下方的数字是指氨基酸位置。(A) C1-N52S的结果,以C2作为参考抗体。(B) C2的结果,以C1-N52S作为参考抗体。(C) C3的结果,以C2作为参考抗体。

[0017] 图4.B7H4抗体和CD3xB7H4双特异性抗体与人和食蟹猴B7H4的结合。通过流式细胞术测定IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR(A)和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR(B)与用人B7H4或食蟹猴B7H4瞬时转染的HEK-293F细胞的结合。未转染的HEK-293F细胞(C)用作阴性对照;对于这些,显示了bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR的结合。

[0018] 图5.B7H4抗体和CD3xB7H4双特异性抗体与来自兔、大鼠、小鼠、犬和猪的B7H4的结合。通过流式细胞术测定IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR(A)和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR(B)与用来自兔、大鼠、小鼠、犬或猪的B7H4瞬时转染的HEK-293F细胞的结合。未转染的HEK-293F细胞(C)用作阴性对照;对于这些,显示了bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR的结合。

[0019] 图6. B7H4抗体与来自不同物种的B7H4瞬时转染的HEK-293F细胞的结合。通过流式细胞术测定IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR (A)、IgG1-B7H4-C3-FEAR (B)、IgG1-B7H4-C2-FEAR (C)、IgG1-B7H4-C4-FEAR (D)和IgG1-B7H4-C5-FEAR (E)与用来自人、食蟹猴、小鼠、大鼠或猪的B7H4转染的HEK-293F细胞,或未转染的HEK-293F细胞的结合。IgG1-b12用作非结合对照抗体(未显示)。

[0020] 图7. IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR (A)和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (B)与MCF-7和MDA-MB-468细胞的结合。通过流式细胞术测定结合。IgG1-b12 (C)和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR (D)用作非结合对照抗体。

[0021] 图8. bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (A)与NIH-OVCAR-3、HCC1954和HeLa细胞的结合。通过流式细胞术测定结合。BsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR (B)用作非结合对照抗体。

[0022] 图9. bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (A)和bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (B)与SK-BR3和MDA-MB-486细胞的结合。通过流式细胞术测定结合。bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR (C)和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR (D)用作非结合对照抗体。

[0023] 图10同二聚体和bsAb格式的各种B7H4抗体与MDA-MB-486和HCC1954细胞的结合。通过流式细胞术测定IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR (A同二聚体)、IgG1-B7H4-C2-FEAR (B同二聚体)、IgG1-B7H4-C3-FEAR (C同二聚体)、IgG1-B7H4-C4-FEAR (D同二聚体)、IgG1-B7H4-C5-FEAR (E同二聚体)、bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (A bsAb)、bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR [MDA-MB-468]或bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C2-FEAR [HCC1954] (B bsAb)、bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C3-FEAR (C bsAb)、bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR (D bsAb)和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR (E bsAb)的结合。bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR (F bsAb)或IgG1-b12-K409R (F同二聚体)用作非结合对照抗体。

[0024] 图11. 使用纯化的T细胞作为效应细胞,以不同的效应物与靶物比(E:T),通过CD3xB7H4双特异性抗体在体外诱导SK-BR3细胞的T细胞介导的细胞毒性。bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR用作非结合对照抗体。A=bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR; B=bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR; C=bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR。

[0025] 图12. 在具有不同CD3臂的CD3xB7H4双特异性抗体存在下,在各种肿瘤细胞系中体外诱导T细胞介导的细胞毒性。bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR用作非结合对照抗体。A=bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR; B=bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR; C=bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, D=bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR。

[0026] 图13. B7H4表达水平和T细胞介导的肿瘤细胞杀伤的IC50。(A)肿瘤细胞系上的B7H4表达水平的定量流式细胞术分析。显示的是个体测量值(点)、几何平均值(条)和标准偏差(误差条)。sABC=特异性抗体结合能力。(B)对于不同肿瘤细胞系,在bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (I)或bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (II)存在下的T细胞介导的肿瘤细胞杀伤的IC50。每个点代表用个体T细胞供体(每个细胞系4-6个供体)进行的实验,水平线表示中位数。细胞系根据B7H4表达水平进行排序。

[0027] 图14. 在T细胞-肿瘤细胞共培养物中通过B7H4双特异性抗体的T细胞活化。(A)通

过流式细胞术测定的,对于各种B7H4阳性肿瘤细胞系,在bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (I) 或bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (II) 存在下的T细胞活化(CD8+细胞上CD69的%)。(B)对于每个靶细胞系,使用衍生自3-5个供体的T细胞,T细胞活化的EC50。每个点代表用个体T细胞供体进行的实验;水平线表示几何平均值。

[0028] 图15.通过多重U-plex测定法测定的,对于bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (A) 和bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (B),使用来自3-4个供体的T细胞,在EC50、EC90和EC99下的T细胞-肿瘤细胞共培养物的上清液中的IFN γ 。显示的是个体测量值(点)、几何平均值(水平线)和标准偏差(误差条)。

[0029] 图16.用bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (A) 或bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (B) 的单剂量IV输注处理的食蟹猴血浆中的IL-6和MCP-1水平。

[0030] 图17.bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (A) 或bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (B) 的单次IV输注后的平均血浆浓度-时间曲线图。

[0031] 图18.一系列原发性实体瘤中的B7H4 mRNA表达水平。B7H4 mRNA水平从Omicsoft TCGA数据库中提取,并使用Oncoland软件进行可视化。根据B7H4 mRNA表达的中位数对适应症进行排序。THYM=胸腺瘤,UVM=葡萄膜黑色素瘤,PCPG=嗜铬细胞瘤和副神经节瘤,ACC=肾上腺皮质癌,MESO=间皮瘤,SKCM=皮肤黑色素瘤,READ=直肠腺癌,COAD=结肠腺癌,GMB=多形性胶质母细胞瘤,SARC=肉瘤,LIHC=肝细胞癌,LGG=脑低级别胶质瘤,KIRC=肾透明细胞癌,TGCT=睾丸生殖细胞肿瘤,KICH=肾嫌色细胞,STAD=胃腺癌,THCA=甲状腺癌,HNSC=头颈部鳞状细胞癌,PRAD=前列腺腺癌,LUAD=肺腺癌,ESCA=食管癌,CESC=宫颈鳞状细胞癌和宫颈腺癌,KIRP=肾乳头状细胞癌,UCS=子宫癌肉瘤,BLCA=膀胱尿路上皮癌,PAAD=胰腺腺癌,LUSC=肺鳞状细胞癌,BRCA=乳腺侵入癌,UCEC=子宫体子宫内膜癌,OV=卵巢浆液性囊腺癌和CHOL=胆管癌。

[0032] 表1-氨基酸和核酸序列

SEQ ID NO:	参考	域	序列
[0033] 1	人 B7H4	ORF	MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASA GNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQWLKEGVLGLVHEFKEGK DELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLRKNVQLTDAG TYKCYIITSKGGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVVDYNASSETL RCEAPRWFPQPTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFEINSE NVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTESEI KRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK

2	食蟹猴 (<i>Macaca fascicularis</i>) B7H4 转录物 1	ORF	<u>MASLGQILFWSIISIIFILAGAI</u> ALIIGFGISGRHSITVTTVASA GNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQWLKEGVIGLVHEFKEGK DELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKKNVQLTDAG TYKCYIITSKGGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVNDYNASSETL RCEAPRWFPQPTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSE NVTMKVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTESEI KRRSHLQLLNSKASLCVSSFLAISWALLPLAPYMLK
3	家犬(<i>Canis familiaris</i>) B7H4	ORF	<u>MASPGQNI</u> FWSIISVIII L AGAI L ALIIGFGISGRHSITVTTLTS AGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQWLKEGVMGLVHEFKE GKDDLSQDEMFRGRTAVFADQVIGGNASRLKKNVQLT DAGTYKCYIITSKGGKGNANLEYKTGAFSIPEVNVNDYNASSE NLRCEAPRWFPQPTVVWASQADQGANFSEVFNTSFELN SENVTMKVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTD SEIKRRSHLQLLNSKASLGVSSFFAISWVLLPLSSYMLK
4	穴兔 (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) B7H4	ORF	<u>MASLGQIIFWSIISIIII</u> LAGAI L ALIIGFGISGRHSITVTTLTSAG NIGEDGILSCTFEPDIRLSDIVIQWLKEGVVGLVHEFKEGK DDLSDQDEMFRGRTAVFTDQVIVGNASRLKKNVQLTDA GTYKCYIITSKGGKGNANLEYKTGAFSMPEVNLNDYNASSESL RCEAPRWFPQPTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSE NVTMKVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTDSEI KRRSSLQLLNSRAAPSVSPRSVAVGWLLLPLSSYVMLK
5	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>) B7H4	ORF	<u>MASLGQIIFWSIINVIII</u> LAGAI L ALIIGFGISGKHFITVTTFTSA GNIGEDGTLCTFEPDIKLNIGIVIQWLKEGIKGLVHEFKEG KDDLSQQHEMFRGRTAVFADQVVVGNASRLKKNVQLTD AGTYTCYIHTSKGGKGNANLEYKTGAFSMPEINVDYNASSE SLRCEAPRWFPQPTVAWASQVDQGANFSEVSNTSFELN SENVTMKVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTD SEVKRRSQLELLNSGPSPCVSSVSAAGWALLSLSCCLMLR
6	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>) B7H4	ORF	<u>MASLGQIIFWSIINI</u> IIII L LAGAI L ALIIGFGISGKHFITVTTFTSA GNIGEDGTLCTFEPDIKLNIGIVIQWLKEGIKGLVHEFKEG KDDLSQQHEMFRGRTAVFADQVVVGNASRLKKNVQLTD AGTYTCYIRTSKGGKGNANLEYKTGAFSMPEINVDYNASSE SLRCEAPRWFPQPTVAWASQVDQGANFSEVSNTSFELN SENVTMKVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTD SEVKRRSQLQLLNSGPSPCVFSSAFVAGWALLSLSCCLMLR
7	欧亚野猪 (<i>Sus scrofa</i>) B7H4	ORF	<u>MASLGQVV</u> FWSIISIIII L LAGAI L AFIIGFGISGRHSITVTTLTS GNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQWLKEGVTGLVHEFKKG KDDLSQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKKNVQLTD AGTYKCYIITSKGGKNAKLEYKTGAFSIPEVNVDSNASSES RCEAPRWFPQPTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNPE NVTMKVSVLYNVTINTTYSCMIENDIAKATGDIRVTDSEI KRQSHLQLLNSKASLCLSSFVAISWVLLPLCPYMLK
8	Kozak		GCCGCCACC

[0034]

[0035]

9	B7H3	ORF	<p>MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDP VVALVGTDATLCCSFSEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVH SFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLQRVRVAD EGSFTCFVSIRDGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLR PGDTVITICSSYQGYPEAEVFWQDGGQVPLTGNVTTSSQ MANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAH SSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCFSFSP EPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRT ALFPDLLAQGNASRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDGSAAV VSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVITICSSYRGYPE AEVFWQDGGQVPLTGNVTTSSQMANEQGLFDVHSVLRV VLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEAL WVTVGLSVCLIALLVAFVWCWRKIKQSCEENAGAEDQ DGEGEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA</p>
10	B7H4-IgV/B 7H3-IgC	ORF	<p>MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASA GNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQWLKEGVLGLVHEFKEGK DELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKKNVQLTDAG TYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAPYSKPSMTLEPNKDLRPG DTVTITICSSYRGYPEAEVFWQDGGQVPLTGNVTTSSQMA NEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGS VTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLVAFVWCWRKI KQSCEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKHSDSKEDDG QEIA</p>
11	B7H3-IgV/B 7H4-IgC	ORF	<p>MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDP VVALVGTDATLCCSFSEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVH SFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLQRVRVAD EGSFTCFVSIRDGSAAVSLQVAAFSMPEVNVDYNASSET LRCEAPRWFPQPTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNS ENVTMKVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTES EIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK</p>
12	B7H4ECD-F cHisC	成熟蛋 白	<p>LIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFE PDIKLSDIVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSE QDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKKNVQLT DAGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEV NVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWASQVD QGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVSVLYNVT INNTYSCMIENDIAKATGDIKVTSEIKRRSHLQ LLNSKASIEGRMDPKSCDKTHTCPPCPAPEAEG APSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTAPP VLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVSM HEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHHHHHEPEA</p>

13	成熟人 CD3ε (epsilon)	成熟蛋 白	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQH NDKNIGGEDDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPR GSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVM SVATIVIVDICIT GGLLLL VYYWSKNR KAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKER PPPVPNPDYEPiRKGQRDLYSGLNQRRi
14	b12_VH	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFIHWVR QAPGQRFQEWGMWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTS ANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYY <u>MDVWGKGTIVSS</u>
15	b12_VL	VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSH <i>SIRSR</i> RVAWYQHQP GQAPRLVIHGVS <i>NRASGISDR</i> FGSGSGTDFTLITRVEPE DFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERK
16	VH_huCD3- H1L1	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYADSVKDRFTISRDDSK SSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYW GQGLTVTVSS
17	VH_huCD3- H1L1-H101 G	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYADSVKDRFTISRDDSK SSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRGGNFGNSYVSWFAYW GQGLTVTVSS
18	VH_huCD3- H1L1_CDR1	VH_CDR1	GFTFNTYA
19	VH_huCD3- H1L1_CDR2	VH_CDR2	IRSKYNNYAT
20	VH_huCD3- H1L1_CDR3	VH_CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
21	VH_huCD3- H1L1-H101 G_CDR3	VH_CDR3	VRGGNFGNSYVSWFAY
22	VL_huCD3- H1L1	VL	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQ QTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITG AQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
23	VL_huCD3- H1L1_CDR1	VL_CDR1	TGAVTTSNY
	VL_huCD3- H1L1_CDR2	VL_CDR2	GTN
24	VL_huCD3- H1L1_CDR3	VL_CDR3	ALWYSNLWW
25	VH_B7H4-C 1	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIR QPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTISIDTSKNQFS LKLTSVTAADTAVFYCARGLFNWNFDSWGQGLTVTVSS
26	VH_B7H4-C 1_CDR1	VH_CDR1	GGSFSGYY
27	VH_B7H4-C 1_CDR2	VH_CDR2	INHSGST
28	VH_B7H4-C 1_CDR3	VH_CDR3	ARGLFNWNFDS

[0036]

[0037]

29	VH_B7H4-C 1-N52S	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIR QPPGKGLEWIGEISHSGSTNYNPSLKS SRVTISIDTSKNQFS LKLTSVTAADTAVFYC <u>CARGLFNWNFDS</u> WGQGLT LVTVSS
30	VH_B7H4-C 1-N52S _CDR2	VH_CDR2	ISHSGST
31	VH_B7H4-C 1-N52Q	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIR QPPGKGLEWIGEIQHSGSTNYNPSLKS RVTISIDTSKNQFS LKLTSVTAADTAVFYC <u>CARGLFNWNFDS</u> WGQGLT LVTVSS
32	VH_B7H4-C 1-N52Q_CD R2	VH_CDR2	IQHSGST
33	VL_B7H4-C 1	VL	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQ GIRNDL GWYQQK PGKAPKRLIYG <u>GASSLQSGVPSRFSGSGSTEFTLTISSLQPE</u> DFATYYC <u>LQHNSYPRT</u> FGQGTTVEIK
34	VL_B7H4-C 1_CDR1	VL_CDR1	QGIRND
	VL_B7H4-C 1_CDR2	VL_CDR2	GAS
35	VL_B7H4-C 1_CDR3	VL_CDR3	LQHNSYPRT
36	VH_B7H4-C 3	VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC <u>KASGYFTNFWIHWVR</u> QAPGQGLEWIGEID <u>PSDSYTNYNQFKGRVTITRDTSTST</u> AYLESSLRSEDTAVYYC <u>CAREITVDYWGQGLT</u> LVTVSS
37	VH_B7H4-C 3_CDR1	VH_CDR1	GYTFTNFW
38	VH_B7H4-C 3_CDR2	VH_CDR2	IDPSDSYT
39	VH_B7H4-C 3_CDR3	VH_CDR3	AREITVDY
40	VL_B7H4-C 3	VL	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCSATSSISY MHWYQQK P GKAPKGWIYD <u>TSKLAHGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPE</u> DFATYYC <u>HQRRSYPFT</u> FGQGTKVEIK
41	VL_B7H4-C 3_CDR1	VL_CDR1	SSISY
	VL_B7H4-C 3_CDR2	VL_CDR2	DTS
42	VL_B7H4-C 3_CDR3	VL_CDR3	HQRRSYPFT
43	VH_B7H4-C 2	VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC <u>KASGYFTSYWIGWVR</u> QAPGQGLEWIGDI <u>YPGGYTNYNEKFKGRVTITRDTSTST</u> AYLESSLRSEDTAVYYC <u>CARLDGSSYRGAMDS</u> WGQGLT LV TVSS
44	VH_B7H4-C 2_CDR1	VH_CDR1	GYTFTSYW
45	VH_B7H4-C 2_CDR2	VH_CDR2	IYPGGYT

[0038]

46	VH_B7H4-C 2_CDR3	VH_CDR3	ARLDGSSYRGAMDS
47	VL_B7H4-C 2	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQGFNKYVAWYQQK PGKAPKLLIYYTSTLQPGVPSRFSGSGSGRDTLTLSLQPE DFATYYCLQYGNLLYAFGQGTKVEIK
48	VL_B7H4-C 2_CDR1	VL_CDR1	QGFNKY
	VL_B7H4-C 2_CDR2	VL_CDR2	YTS
49	VL_B7H4-C 2_CDR3	VL_CDR3	LQYGNLLYA
50	VH_B7H4-C 4	VH	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMNWVR QAPGKGLEWVSVIYGSGRTYYADSVKGRVTISRDNKNTL YLQMNSLR AEDTAVYYCARDTYAMDVWGQGT TVVSS
51	VH_B7H4-C 4_CDR1	VH_CDR1	GFTVSSNY
52	VH_B7H4-C 4_CDR2	VH_CDR2	IYGSGRT
53	VH_B7H4-C 4_CDR3	VH_CDR3	ARDTYAMDV
54	VL_B7H4-C 4	VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYGSSPMYTFGQGTKLEIK
55	VL_B7H4-C 4_CDR1	VL_CDR1	QSVSSSY
	VL_B7H4-C 4_CDR2	VL_CDR2	GAS
56	VL_B7H4-C 4_CDR3	VL_CDR3	QQYGSSPMYT
57	IgG1-Fc	恒定	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
58	IgG1-Fc_F4 05L	恒定	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK

[0039]

59	IgG1-Fc_FE A	恒定	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
60	IgG1-Fc_FE AL	恒定	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
61	IgG1-Fc_FE AR	恒定	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
62	IgG1-Fc_K4 09R	恒定	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
63	Kappa	恒定	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
64	Lambda	恒定	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
65	VH_B7H4-C 5	VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIKSGSYWGWIR QPPGKGLEWIGNIYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFS LKLSVTAADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGLTVTVSS
66	VH_B7H4-C 5_CDR1	VH_CDR1	GGSIKSGSY

[0040]	67	VH_B7H4-C 5_CDR2	VH_CDR2	IYYSGST
	68	VH_B7H4-C 5_CDR3	VH_CDR3	AREGSYPNQFDP
	69	VL_B7H4-C 5	VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSE DFAVYYCQQYHSFPFTFGGGTKVEIK
	70	VL_B7H4-C 5_CDR1	VL_CDR1	QSVSSN
		VL_B7H4-C 5_CDR2	VL_CDR2	GAS
	71	VL_B7H4-C 5_CDR3	VL_CDR3	QQYHSFPFT

[0041] 上表中的CDR区 (CDR1、CDR2和CDR3,以及VH和VL序列中带下划线的序列) 已根据IMGT(参见Lefranc MP.et al.,Nucleic Acids Research,27,209-212,1999]和Brochet X.Nucl.Acids Res.36,W503-508(2008))进行注释。如上表中使用,对K405L和K409R的引用符合Eu-编号索引(描述于Kabat,E.A.et al.,Sequences of proteins of immunological interest.5th Edition-US Department of Health and Human Services,NIH publication No.91-3242,pp662,680,689(1991))。

[0042] 发明详述

[0043] 定义

[0044] 如本文所用,术语“抗体”意图指具有在典型的生理条件和/或肿瘤特异性条件下以相当长的时间段的半衰期,诸如至少约30分钟、至少约45分钟、至少约1小时、至少约2小时、至少约4小时、至少约8小时,至少约12小时、至少约24小时或更多、至少约48小时或更多、至少约3、4、5、6、7或更多天等,或任何其他相关的功能定义的时段(例如足以诱导、促进、增强和/或调节与抗体与抗原的结合相关的生理应答的时间和/或足以使抗体内在化的时间)与抗原特异性结合的能力的免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的片段或其任一者的衍生物。抗体包含可以与抗原相互作用的结合区(或在本文中可以使用的具有相同含义的结合域)、包含免疫球蛋白分子的重链和轻链的可变区的结合区等。抗体可以包含可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合的抗体(Ab)的恒定区,其包括免疫系统的各种细胞(诸如效应细胞)和补体系统的组分,诸如C1q,补体激活的经典途径中的第一组分。

[0045] 在本发明的上下文中,术语“抗体”包括单克隆抗体(mAb)、抗体样多肽、嵌合抗体、人源化抗体,以及通过任何已知技术诸如酶促裂解、肽合成和重组DNA技术提供的“抗体片段”或“其片段”,其保留与抗原特异性结合的能力(抗原结合片段)。术语“抗体”包括双特异性抗体和/或具有进一步修饰的抗体,例如,其抗体-药物缀合物。

[0046] 除非本文的公开内容另外受到限制,否则根据本发明定义的抗体可以具有任何同种型。

[0047] 已经显示抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段进行。术语“抗体”中涵盖的抗原结合片段的实例包括(i) Fab' 或Fab片段,由轻链可变域(VL)、重链可变域(VH)、轻链恒定区(CL)和重链恒定区域1(CH1)域组成的单价片段或如W0 2007/059782中所述的单价抗体;(ii) F(ab')₂片段,包含在铰链区处通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)基本上由VH和CH1域组成的Fd片段;(iv)基本上由抗体单臂的VL和VH域组成的Fv片

段, (v) dAb片段Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989), 其基本上由VH域组成并且也称为域抗体Holt et al.; Trends Biotechnol. 2003 Nov; 21(11): 484-90; (vi) 骆驼抗体或纳米抗体Revets et al.; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan; 5(1): 111-24和(vii) 分离的互补决定区(CDR)。此外, 尽管Fv片段的两个域VL和VH由不同的基因编码, 但可以使用重组方法通过合成接头将它们连接起来, 所述合成接头使它们能够制备成单一蛋白链, 其中VL区和VH区配对以形成单价分子(称为单链抗体或单链Fv(scFv), 参见例如Revets et al.; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan; 5(1): 111-24 and Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)。除非另有说明或上下文文明确指出, 否则此类单链抗体涵盖在术语抗体内。尽管此类片段通常包括在抗体的含义内, 但是它们共同且各自独立地是本发明的独特特征, 表现出不同的生物学特性和效用。在本发明的上下文中, 这些和其他有用的抗体片段在本文中进一步讨论。

[0048] 可以在不同的体外或离体表达或生产系统中生产抗体并从中收集抗体, 例如从重组修饰的宿主细胞, 从杂交瘤或使用支持体外转录和/或翻译编码该抗体的核酸序列的细胞提取物的系统中。应当理解, 多种不同的抗体(所述抗体如在本发明的上下文中定义)可以通过在如上所述的生产系统中分开生产每种抗体并然后混合抗体, 或者通过在相同生产系统中生产几种抗体来提供。

[0049] 如本文所用, 术语“免疫球蛋白重链”或“免疫球蛋白的重链”是指免疫球蛋白的重链之一。重链通常由定义免疫球蛋白同种型的重链可变区(在本文中缩写为VH)和重链恒定区(在本文中缩写为CH)组成。重链恒定区通常由三个域CH1、CH2和CH3组成。如本文所用, 术语“免疫球蛋白”意指由两对多肽链, 一对轻(L)低分子量链和一对重(H)链组成的一类结构相关的糖蛋白, 所有四者潜在通过二硫键相互连接。免疫球蛋白的结构已经得到充分表征(参见例如Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))。在免疫球蛋白的结构内, 两条重链在所谓的“铰链区”中经由二硫键相互连接。与重链相同, 每个轻链通常由几个区域组成: 轻链可变区(在本文中缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区通常由一个域CL组成。此外, VH和VL区可进一步细分为高变性区(或高变区, 其在序列和/或结构上定义的环的形式上可以是高变的), 也称为互补决定区(CDR), 散布有更保守的区域, 称为框架区(FR)。每个VH和VL通常由三个CDR和四个FR组成, 其从氨基端到羧基端按以下次序排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0050] 当在本文中使用时, 术语“半分子”、“Fab臂”和“臂”是指一个重链-轻链对。当双特异性抗体被描述为包含“衍生自”第一抗体的半分子抗体和“衍生自”第二抗体的半分子抗体时, 术语“衍生自”表示双特异性抗体通过任何已知方法将来自所述第一抗体和第二抗体中每一种的所述半分子重组为所得的双特异性抗体来生成。在此上下文下, “重组”并不意图受到任何特定的重组方法的限制, 并且因此包括例如下文所述的用于产生双特异性抗体的所有方法, 包括例如通过半分子交换进行重组以及在核酸水平上的重组和/或通过在单一细胞中两个半分子的共表达的重组。

[0051] 如本文所用, 术语“抗原结合区”或“结合区”是指能够结合抗原的抗体的区域。抗原可以是任何分子, 诸如多肽。抗原可以, 例如存在于细胞、细菌或病毒粒子上。除非与上下文相矛盾, 否则术语“抗原”和“靶物”可以在本发明的上下文中可互换地使用。除非与上下文相矛盾, 否则术语“抗原结合区”和“抗原结合位点”可以在本发明的上下文中可互换地使

用。

[0052] 术语“阻断结合”或“阻断抗体的结合”或“交叉阻断结合”是指其中一种抗体与特定抗原的结合阻止第二抗体与相同抗原结合的情况,反之亦然。在不存在另一种抗体的情况下,每种抗体均具有结合抗原的能力,如通过显著的结合响应测定,而当存在另一种抗体时,抗体之一缺乏结合响应。一种抗体阻断另一种抗体结合的能力可以通过生物层干涉测量法以经典的夹心表位框并测定法(sandwich epitope binning assay)格式来测定,例如,如本申请中的实施例5和Abdiche等人所述(Abdiche YN,Malashock DS,Pinkerton A,Pons J.Exploring blocking assays using Octet,ProteOn,and Biacore biosensors.Anal Biochem.2009;386(2):172-180)。简而言之,在夹心表位框并测定法中,对溶液中的抗体测试与其特异性抗原的结合,该特异性抗原首先通过固定化的抗体捕捉。在本发明的上下文中,如果一种抗体能够在存在第二抗体的情况下与抗原结合,则该抗体不阻断第二抗体的结合,反之亦然。除非上下文矛盾,否则术语“阻断结合”和“阻断抗体的结合”以及“交叉阻断的结合”和“交叉阻断结合”可以在本发明的上下文中可互换地使用。称为阻断另一种抗体结合的抗体,也可以称为与另一种抗体竞争与靶物的结合。

[0053] 如本文所用,术语“ K_D ”(M)是指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数,并且通过将 k_d 除以 k_a 获得。 K_D 也可以称为“结合亲和力”。

[0054] 如本文所用,术语“ k_d ”(sec⁻¹)是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。所述值也称为 k_{off} 值或解离率(off-rate)。

[0055] 如本文所用,术语“ k_a ”(M⁻¹x sec⁻¹)是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率常数。所述值也称为 k_{on} 值或缔合率(on-rate)。

[0056] 如本文所用,术语“结合”是指抗体与预先确定的抗原或靶物的结合,通常在通过使用抗体作为配体和抗原作为分析物的生物层干涉测量法测定时以对应于1E⁻⁶M或更小,例如5E⁻⁷M或更小,1E⁻⁷M或更小,如5E⁻⁸M或更小,如1E⁻⁸M或更小,诸如5E⁻⁹M或更小,或如1E⁻⁹M或更小的 K_D 的结合亲和力结合,并且以对应于如下的 K_D 的亲和力结合预先确定的抗原,所述 K_D 比其结合除预先确定的抗原或紧密相关抗原以外的非特异性抗原(例如BSA,酪蛋白)的亲和力低至少10倍,例如低至少100倍,例如低至少1000倍,例如低至少10,000倍,例如低至少100,000倍。

[0057] 如本文所用,术语“B7H4”是指名为B7H4的蛋白质,其也称为:B7-H4;含有T细胞活化抑制剂1的V-set域;或VTCN1。B7H4是B7蛋白家族的成员,该家族包含与淋巴细胞上的受体结合的细胞表面蛋白配体。B7H4是I型跨膜蛋白,其包括短的细胞内域、疏水性跨膜域和具有IgV和IgC样域的细胞外域,该IgC样域具有四个保守的半胱氨酸残基和七个N-连接糖基化位点。(Sica et al.,2003,Immunity 18:849-861)。B7H4蛋白已知来自各种物种,诸如人(智人)B7H4(Uniprot登录号Q7Z7D3)、食蟹猴(食蟹猴)B7H4转录物1(Uniprot登录号A0A2K5U6P5)、犬(家犬)B7H4(Uniprot登录号F1P8R9)、兔(穴兔)B7H4(Uniprot登录号G1TQE8)、大鼠(褐家鼠)B7H4(Uniprot登录号Q501W4)、小鼠(小家鼠)B7H4(Uniprot登录号Q7TSP5)和猪(欧亚野猪)B7H4(Uniprot登录号F1SAY4)。可存在所列B7H4序列的天然变体。

[0058] 如本文所用,术语“CD3”是指人分化簇3蛋白,其是T细胞共受体蛋白复合物的一部分并且由四个不同的链组成。CD3存在于各种物种中,因此,除非上下文矛盾,术语“CD3”可以不限于人CD3。在哺乳动物中,复合物含有CD3 γ (gamma)链(人CD3 γ 链UniProtKB/Swiss-

Prot No P09693或食蟹猴CD3 γ UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI7), CD3 δ (delta) 链(人CD3 δ UniProtKB/Swiss-Prot No P04234或食蟹猴CD3 δ UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI8), 两条CD3 ϵ (epsilon) 链(人CD3 ϵ UniProtKB/Swiss-Prot No P07766, 其序列在此并入作为SEQ ID NO:13, 其中氨基酸残基1-22代表信号肽, 并且氨基酸残基23-207代表成熟CD3 ϵ 多肽; 食蟹猴CD3 ϵ UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI5; 或猕猴 (rhesus monkey) CD3 ϵ UniProtKB/Swiss-Prot No G7NCB9) 和CD3 ζ 链 (zeta) 链(人CD3 ζ UniProtKB/Swiss-Prot No P20963, 食蟹猴CD3 ζ UniProtKB/Swiss-Prot No Q09TK0)。这些链与称为T细胞受体 (TCR) 的分子缔合, 并在T淋巴细胞中生成活化信号。TCR和CD3分子一起构成TCR复合物。

[0059] 术语“抗体结合区”是指抗原中包含抗体结合的表位的区域。可以通过使用生物层干涉测量法的表位框并, 通过丙氨酸扫描或通过域改组测定法 (使用将抗原区域与另一种抗原区域交换的抗原构建体, 并且测定抗体仍结合抗原与否) 来测定抗体结合区域。可以通过氢/氘交换质谱法和/或通过与其抗原结合的抗体的晶体学测定参与与抗体的相互作用的抗体结合区内的氨基酸。

[0060] 术语“表位”是指被抗体特异性结合的抗原决定簇。表位通常由诸如氨基酸、糖侧链或其组合的分子的表面分组组成, 并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象性和非构象性表位的区别在于, 在存在变性溶剂的情况下, 失去与前者的结合而非与后者的结合。表位可以包含直接参与结合的氨基酸残基, 以及不直接参与结合的其他氨基酸残基, 例如当抗体与抗原结合时被抗体有效阻断或覆盖的氨基酸残基 (换言之, 氨基酸残基在特定抗体的足迹内或与该足迹紧密相邻)。

[0061] 如本文所用, 术语“单克隆抗体”、“单克隆Ab”、“单克隆抗体组合物”、“mAb”等是指单分子组成的抗体分子的制备物, 并且通常表现出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。单克隆抗体通常可以由相同的细胞制备, 这些相同的细胞均是独特亲本细胞的克隆, 诸如例如杂交瘤、稳定细胞系等。因此, 术语“人单克隆抗体”是指表现出单一结合特异性的抗体, 其具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。人单克隆抗体可以由杂交瘤产生, 所述杂交瘤包括与永生化细胞融合的从转基因或转染色体非人动物如转基因小鼠获得的B细胞, 所述B细胞具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组。人单克隆抗体可以衍生自人B细胞或浆细胞。也可以从重组修饰的宿主细胞或使用支持体外转录和/或翻译编码抗体的核酸序列的细胞提取物的系统产生单克隆抗体。

[0062] 如本文所用, 术语“同种型”是指由重链恒定区基因编码的免疫球蛋白类别 (例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE或IgM) 或其任何同种异型, 例如IgG1m (za) 和IgG1m (f)。此外, 每个重链同种型均可与kappa (κ) 或lambda (λ) 轻链组合。

[0063] 当在本文中使用时, 术语“全长抗体”是指包含一对重链和轻链或两对不同的重链和轻链的抗体 (例如, 亲本或变体抗体), 每对重链和轻链含有重链和轻链恒定和可变域, 诸如通常在该同种型的野生型抗体的重链-轻链对中发现的。在全长变体抗体中, 与全长亲本或野生型抗体相比, 重链和轻链恒定和可变域可以特别含有修饰和/或改善抗体的功能特性的氨基酸取代。根据本发明的全长抗体可以通过包括以下步骤的方法来产生: (i) 将CDR序列克隆到包含完整重链和轻链序列的一个或多个合适载体中, 和(ii) 在合适的表达系统中表达所获得的具有完整的重链和轻链序列的合适载体。当从CDR序列或完整可变区序列开始时产生全长抗体在本领域技术人员的知识范围内。因此, 本领域技术人员知道如何生

成根据本发明的全长抗体。

[0064] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指遗传工程化的非人抗体,其含有人抗体恒定域和经修饰以与人可变域具有高水平序列同源性的非人可变域。这可以通过将一起形成抗原结合位点的非人抗体互补决定区(CDR)移植到同源人受体框架区(FR)上来实现(参见例如W092/22653和EP0629240)。为了完全重建亲本抗体的结合亲和力和特异性,可能需要将来自亲本抗体(即非人抗体)的构架残基替换为人构架区(反向突变)。结构同源性建模可以帮助鉴定构架区中对于抗体的结合特性重要的氨基酸残基。因此,人源化抗体可包含非人CDR序列,主要地人框架区以及完全人恒定区,所述人框架区任选地包含一个或多个向非人氨基酸序列的氨基酸反向突变。任选地,可以应用不一定是反向突变的其他氨基酸修饰,以获得具有优选特性诸如特别有用的亲和力和生化特性,例如来包括修饰以避免脱酰胺,提供“惰性Fc区”,和/或改进制造的人源化抗体。

[0065] 如本文所用,术语“人抗体”意图包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和框架区和衍生自人免疫球蛋白恒定域的恒定域的抗体。本发明的人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变、插入或缺失)。“人抗体”可以掺入已经从人、转基因动物诸如本文实施例中所述的、HIS小鼠等中的人种系免疫球蛋白序列生成的VH和VL序列。此类VH和VL序列被认为是人VH和VL序列,其已经例如融合至衍生自人免疫球蛋白恒定域的恒定域。

[0066] 因此,“人抗体”可以是工程化抗体。“人抗体”可能已经受进一步的工程化改造,例如包括修饰以避免脱酰胺、提供“惰性Fc区”、实现双特异性抗体生成和/或改进制造。人抗体也可以在非人细胞中产生,例如在CHO细胞等中产生。然而,如本文所用,术语“人抗体”并不意图包括其中衍生自另一非人物种如小鼠的种系的CDR序列已被移植到人框架序列上的抗体。

[0067] 如本文所用,术语“Fc区”是指在从抗体的两条重链的N端至C端末端的的方向上至少包含铰链区、CH2区和CH3区的区域。抗体的Fc区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(诸如效应细胞)和补体系统的组分。

[0068] 如本文所用,术语“铰链区”是指免疫球蛋白重链的铰链区。因此,例如人IgG1抗体的铰链区对应于根据如Kabat Kabat,E.A.et al.,Sequences of proteins of immunological interest.5th Edition-US Department of Health and Human Services,NIH publication No.91-3242,pp 662,680,689(1991)中阐述的EU编号的氨基酸216-230。然而,铰链区也可以是如本文所述的任何其他亚型。

[0069] 如本文所用,术语“CH1区”或“CH1域”是指免疫球蛋白重链的CH1区。因此,例如,人IgG1抗体的CH1区对应于根据如Kabat(同上)中所阐述的Eu编号的氨基酸118-215。然而,CH1区域也可以是如本文所述的任何其他亚型。

[0070] 如本文所用,术语“CH2区”或“CH2域”是指免疫球蛋白重链的CH2区。因此,例如,人IgG1抗体的CH2区对应于根据如Kabat(同上)中所阐述的Eu编号的氨基酸231-340。然而,CH2区域也可以是如本文所述的任何其他亚型。

[0071] 如本文所用,术语“CH3区”或“CH3域”是指免疫球蛋白重链的CH3区。因此,例如,人IgG1抗体的CH3区对应于根据如Kabat(同上)中所阐述的Eu编号的氨基酸341-447。然而,CH3区域也可以是如本文所述的任何其他亚型。

[0072] 如本文所用,术语“Fc介导的效应物功能”意图指作为多肽或抗体与其在细胞膜上的靶物或抗原结合结果的功能,其中Fc介导的效应物功能可归因于多肽或抗体的Fc区。Fc介导的效应物功能的实例包括(i) C1q结合,(ii) 补体激活,(iii) 补体依赖性细胞毒性(CDC),(iv) 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),(v) Fc-gamma受体(FcγR)结合,(vi) 抗体依赖性FcγR介导的抗原交联,(vii) 抗体依赖性细胞吞噬(ADCP),(viii) 补体依赖性细胞毒性(CDCC),(ix) 补体增强的细胞毒性,(x) 由抗体介导的调理抗体与补体受体的结合,(xi) 调理和(xii) (i)至(xi)中任一项的组合。

[0073] 如本文所用,术语“惰性”、“惰性的”或“非活化的”指至少不能结合任何FcγR,诱导Fc介导的FcγR交联或诱导经由个别抗体的两个Fc区的FcγR介导的靶抗原交联,或无法结合C1q的Fc区。其实例是如本文所述的恒定域内的FEA取代。可以使用单特异性或双特异性形式的抗体来测试抗体的Fc区的惰性。

[0074] 当在抗体的上下文中使用时,术语“全长”表示该抗体不是片段,但是含有与特定同种型相对应的所有域,诸如对于该同种型通常在自然界发现的,例如IgG1抗体的VH、CH1、CH2、CH3、铰链、VL和CL域。

[0075] 在本发明的上下文中,术语“单价抗体”是指可以凭借仅一个抗原结合域(例如一个Fab臂)与抗原相互作用的抗体分子。在双特异性抗体的上下文中,“单价抗体结合”是指双特异性抗体凭借仅一个抗原结合域(例如一个Fab臂)与一个抗原的结合。

[0076] 在本发明的上下文中,术语“单特异性抗体”是指仅对一种抗原、一个表位具有结合特异性的抗体。该抗体可以是单特异性单价抗体(即仅携带一个抗原结合区)或单特异性二价抗体(即具有两个相同抗原结合区的抗体)。

[0077] 术语“双特异性抗体”是指抗体,其具有结合不同表位的两个抗原结合域,例如两对不同的VH和VL区、两个不同的Fab臂或两个具有不同CDR区的Fab臂。在本发明的上下文中,双特异性抗体对至少两个不同的表位具有特异性。此类表位可以在相同或不同的抗原或靶物上。若表位在不同的抗原上,则此类抗原可以在同一细胞或不同细胞、细胞类型或结构上,例如细胞外基质或囊泡和可溶性蛋白上。因此,双特异性抗体可能能够交联多种抗原,例如,两个不同细胞。

[0078] 术语“二价抗体”是指具有两个抗原结合区的抗体,所述两个抗原结合区结合相同抗原上的相同表位中的两个或结合相同或不同抗原上的两个不同表位。因此,二价抗体可以是单特异性抗体或双特异性抗体。

[0079] 术语“氨基酸”和“氨基酸残基”在本文中可以互换使用,并且不应理解为限制性的。氨基酸是含有胺(-NH₂)和羧基(-COOH)官能团以及每个氨基酸特有的侧链(R基团)的有机化合物。在本发明的上下文中,可以基于结构和化学特性对氨基酸进行分类。因此,氨基酸类别可反映在以下一个或两个表中:

[0080] 基于R基团的结构和一般化学表征的主要分类

[0081] 表2

[0082]

类别	氨基酸
酸性残基	D和E
碱性残基	K、R和H
亲水性的不带电荷的残基	S、T、N和Q

脂肪族的不带电荷的残基	G、A、V、L和I
非极性的不带电荷的残基	C、M和P
芳香族残基	F、Y和W

[0083] 表3

[0084] 氨基酸残基的替代物理和功能分类

类别	氨基酸
含有羟基的残基	S 和 T
[0085] 脂肪族残基	I、L、V 和 M
环烯基相关残基	F、H、W 和 Y
疏水性残基	A、C、F、G、H、I、L、M、R、
	T、V、W 和 Y
带负电荷的残基	D 和 E
极性残基	C、D、E、H、K、N、Q、R、S 和 T
[0086] 带正电荷的残基	H、K 和 R
小残基	A、C、D、G、N、P、S、T 和 V
极小的残基	A、G 和 S
参与转角形成的残基	A、C、D、E、G、H、K、N、Q、 R、S、P 和 T
柔性残基	Q、T、K、S、G、P、D、E 和 R

[0087] 用一个氨基酸取代另一个氨基酸可分类为保守或非保守取代。在本发明的上下文中，“保守取代”是一个氨基酸被具有相似结构和/或化学特征的另一个氨基酸取代，如用一个氨基酸残基取代如上文两个表的任一个中定义的同类别的另一个氨基酸残基：例如，亮氨酸可以被异亮氨酸取代，因为它们均是脂肪族的、支链的疏水物。类似地，天冬氨酸可以被谷氨酸取代，因为它们都是小的带负电荷的残基。

[0088] 在本发明的上下文中，抗体中的取代表示为：

[0089] 原始氨基酸-位置-取代氨基酸；

[0090] 参照公认的氨基酸命名法，使用三个字母代码或一个字母代码，包括代码“Xaa”或“X”表示任何氨基酸残基。因此，Xaa或X通常可以代表20种天然存在的氨基酸中的任一种。如本文所用，术语“天然存在的”是指以下氨基酸残基中的任何一个：甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸和半胱氨酸。

[0091] 因此，符号“K409R”或“Lys409Arg”是指该抗体在氨基酸位置409处包含赖氨酸被

精氨酸的取代。将给定位置处的氨基酸取代为任何其他氨基酸被称为：原始氨基酸-位置；或例如“K409”。对于其中一个或多个原始氨基酸和/或一个或多个取代氨基酸可以包含超过一个但并非所有氨基酸的修饰，超过一个氨基酸可以用“，”或“/”分开。例如，位置409处的赖氨酸经精氨酸、丙氨酸或苯丙氨酸的取代是：“Lys409Arg,Ala,Phe”或“Lys409Arg/Ala/Phe”或“K409R,A,F”或“K409R/A/F”或“K409至R,A或F”。此类名称在本发明的上下文中可以互换使用，但是具有相同的含义和目的。

[0092] 此外，术语“取代”包括取代成任何一个或其他19种天然氨基酸，或取代成其他氨基酸，例如非天然氨基酸。例如，位置409中的氨基酸K的取代包括以下每个取代：409A、409C、409D、409E、409F、409G、409H、409I、409L、409M、409N、409Q、409R、409S、409T、409V、409W、409P和409Y。顺便说一下，这等同于名称409X，其中X表示除原始氨基酸以外的任何氨基酸。这些取代也可以称为K409A、K409C等或K409A,C等或K409A/C/etc。类似地，这适用于本文提及的每个位置，以在本文中具体包括此类取代的任一个。

[0093] 根据本发明的抗体还可以包含氨基酸残基的缺失。此类缺失可以表示为“del”，并且包括例如写为K409del。因此，在此类实施方案的情况下，位置409中的赖氨酸已经从氨基酸序列中缺失。

[0094] 如本文所用，术语“宿主细胞”意图指已经引入核酸诸如表达载体的细胞。应当理解，此类术语不仅意图指特定的对象细胞，而且还可以包括此类细胞的后代。因为某些修饰可以由于突变或环境影响而在后代中发生，所以此类后代实际上可以与亲本细胞不同，但仍在本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。重组宿主细胞包括例如转染瘤，例如CHO细胞、HEK 293细胞、Expi293F细胞、PER.C6细胞、NS0细胞和淋巴细胞，以及原核细胞，例如大肠杆菌和其他真核宿主，例如植物细胞和真菌。

[0095] 如本文所用，术语“转染瘤”包括表达抗体或靶抗原的重组真核宿主细胞，例如CHO细胞、PER.C6细胞、NS0细胞、HEK 293细胞、Expi293F细胞，植物细胞或真菌，包括酵母细胞。

[0096] 为了本发明的目的，使用Needleman-Wunsch算法(Needleman and Wunsch,1970, J.Mol.Biol.48:443-453)，如在EMBOSS包(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite,Rice et al.,2000,Trends Genet.16:276-277)的Needle程序，优选5.0.0版本以上中实施，在参考序列的长度上测定两个氨基酸序列之间的序列同一性。使用的参数是空位开放罚分10，空位延伸罚分0.5和EBLUSUM62(BLUSUM62的EMBOSS版本)取代矩阵。标有“最长身份”的Needle的输出(使用-nobrief选项获得)用作同一性百分比，并且如下计算：

[0097] $(\text{相同残基} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$ 。

[0098] 相似残基的保留也可以或备选地可以通过相似性得分测量，如通过使用BLAST程序(例如，经由NCBI获得的BLAST 2.2.8，使用标准设置BLOSUM62，开放空位=11和延伸空位=1)测定。合适的变体通常与亲本或参考序列表现出至少约45%，例如至少约55%，至少约65%，至少约75%，至少约85%，至少约90%，至少约95%或更多(例如，约99%)相似性。

[0099] 如本文所用，术语“内在化的”或“内在化”是指分子如根据本发明的抗体被细胞膜吞噬并被吸入细胞内部中的生物学过程。内在化也可以称为“胞吞”。靶向CD3xB7H4的双特异性抗体

[0100] 在本发明的第一方面，提供了包含能够结合人B7H4的抗原结合区和能够结合人

CD3的抗原结合区的抗体,其中所述抗原结合区包含重链和轻链可变区,其中所述抗原结合区是人可变区和/或人源化可变区。例如,一个抗原结合区可以包含人重链和轻链可变区,而另一个抗原结合区可以包含人源化重链和轻链可变区。或者,两个抗原结合区均可以包含人重链和轻链可变区,或两个抗原结合区均可以包含人源化重链和轻链可变区。因此,相应地,提供了包含能够结合人B7H4的抗原结合区和能够结合人CD3的抗原结合区的抗体,其中所述抗原结合区包含重链和轻链可变区,其中所述重链和轻链可变区包括人框架区。如本文所述的根据本发明的抗体,其包含能够结合人B7H4的抗原结合区和能够结合人CD3的抗原结合区,也可以在本文中称为例如B7H4xCD3抗体。

[0101] 此类抗体优选地是双特异性抗体。如上所述的此类抗体在另一个实施方案中能够结合癌细胞和T细胞,诸如实施例中所描述的。可以选择的癌细胞是表达人B7H4的癌细胞和/或属于实体瘤的癌细胞。此类抗体优选能够诱导T细胞介导的癌细胞杀伤。

[0102] 如实施例中所示,能够结合理解为包括在结合测定中,抗体与其靶物结合,如通过例如典型的结合曲线,诸如本文图3和4中所示,或通过使用例如生物层干涉测量法测定结合亲和力,如实施例3和4所示。不能与特定靶物结合的抗原结合区具有例如不可检测的对其靶物的结合亲和力,例如在诸如实施例3所示的典型生物层干涉测定法中使用的最高浓度下具有<0.05nm的响应。在任何情况下,技术人员很清楚如何确定抗原结合区是否能够结合至其靶物。

[0103] 双特异性格式

[0104] 本发明提供双特异性CD3xB7H4抗体,其高效促进表达B7H4的肿瘤细胞的T细胞介导的杀伤。取决于特定用途期望的功能特性,特定抗原结合区可以选自本发明提供的一组抗体或抗原结合区。双特异性抗体的许多不同格式和用途是本领域已知的,并由Kontermann;Drug Discov Today,2015Jul;20(7):838-47和;MAbs,2012Mar-Apr;4(2):182-97进行了综述。根据本发明的双特异性抗体可以不限于任何特定的双特异性格式或产生其的方法。

[0105] 可以用于本发明的双特异性抗体分子的实例包括(i)具有包含不同抗原结合区的两个臂的单第一抗体,(ii)对两个不同表位具有特异性的单链抗体,例如经由通过额外的肽接头串联连接的两个scFv;(iii)双重可变域抗体(DVD-Ig),其中每个轻链和重链含有经由短肽连接串联的两个可变域(Wu et al.,Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule,In:Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010));(iv)化学连接的双特异性(Fab')2片段;(v) Tandab,其是两个单链双抗体(diabodies)的融合体,产生四价双特异性抗体,其对每个靶抗原具有两个结合位点;(vi)弹性体(flexibody),其是scFv与双抗体的组合,产生多价分子;(vii)基于蛋白质激酶A中的“二聚化和对接域”的所谓“对接和锁(dock and lock)”分子,所述二聚化和对接域当应用于Fab时可以产生三价双特异性结合蛋白,其由与不同Fab片段连接的两个相同Fab片段组成;(viii)所谓的Scorpion分子,其包含例如与人Fab臂的两个末端融合的两个scFv;和(ix)双抗体。

[0106] 在一个实施方案中,本发明的双特异性抗体是双抗体、交叉抗体(cross-body),或通过受控的Fab臂交换获得的双特异性抗体(诸如W02011131746(Genmab)中所述)。

[0107] 不同类别的双特异性抗体的实例包括但不限于(i)具有互补CH3域以迫使异源二

聚化的IgG样分子；(ii) 重组IgG样双重靶向分子，其中分子的两侧各含有至少两种不同抗体的Fab片段或Fab片段的一部分；(iii) IgG融合分子，其中全长IgG抗体与额外的Fab片段或Fab片段的一部分融合；(iv) Fc融合分子，其中单链Fv分子或稳定化的双抗体与重链恒定域、Fc区或其部分融合；(v) Fab融合分子，其中不同的Fab片段融合在一起，融合至重链恒定域、Fc区或其部分；(vi) 基于ScFv的和基于双抗体的重链抗体（例如，域抗体、纳米抗体），其中将不同的单链Fv分子或不同的双抗体或不同的重链抗体（例如，域抗体、纳米抗体）彼此融合或者与另一种蛋白质或载体分子融合，所述另一种蛋白质或载体分子与重链恒定域、Fc区或其部分融合。

[0108] 具有互补的CH3域分子的IgG样分子的实例包括但不限于Triomab/Quadroma分子 (Trion Pharma/Fresenius Biotech;Roche,W02011069104)、所谓的杵入臼 (Knobs-into-Holes) 分子 (Genentech,W09850431)、CrossMAbs (Roche,W02011117329) 和静电匹配分子 (Amgen,EP1870459和W02009089004;Chugai,US201000155133;Oncomed,W02010129304)、LUZ-Y分子 (Genentech,Wranik et al.J.Biol.Chem.2012,287(52):43331-9,doi:10.1074/jbc.M112.397869.Epub 2012Nov 1)、DIG-body和PIG-body分子 (Pharmabcine,W02010134666,W02014081202)、链交换工程化域抗体 (Strand Exchange Engineered Domain body,SEEDbody) 分子 (EMD Serono,W02007110205)、Biclonics分子 (Merus,W02013157953)、Fc Δ Adp分子 (Regeneron,W0201015792)、双特异性IgG1和IgG2分子 (Pfizer/Rinat,W011143545)、Azymetric支架分子 (Zymeworks/Merck,W02012058768)、mAb-Fv分子 (Xencor,W02011028952)、二价双特异性抗体 (W02009080254) 和DuoBody®分子 (Genmab A/S,W02011131746)。

[0109] 重组IgG类双重靶向分子的实例包括但不限于双重靶向 (DT) - Ig分子 (W02009058383)、二合第一抗体 (Genentech;Bostrom,et al 2009.Science 323,1610-1614)、交联Mabs (Karmanos Cancer Center)、mAb2 (F-Star,W02008003116)、Zybody分子 (Zyngenia;LaFleur et al.MAbs.2013Mar-Apr;5(2):208-18)、用共同轻链的方法 (Crucell/Merus,US7,262,028)、 $\kappa\lambda$ Bodies (NovImmune,W02012023053) 和CovX-body (CovX/Pfizer;Doppalapudi,V.R.,et al 2007.Bioorg.Med.Chem.Lett.17,501-506.)。

[0110] IgG融合分子的实例包括但不限于双重可变域 (DVD) - Ig分子 (Abbott,US7,612,181)、双重域双重头抗体 (Unilever;Sanofi Aventis,W020100226923)、IgG样双特异性分子 (ImClone/Eli Lilly,Lewis et al.Nat Biotechnol.2014Feb;32(2):191-8)、Ts2Ab (MedImmune/AZ;Dimasi et al.J Mol Biol.2009Oct30;393(3):672-92) 和BsAb分子 (Zymogenetics,W02010111625)、HERCULES分子 (Biogen Idec,US007951918)、scFv融合分子 (Novartis)、scFv融合分子 (Changzhou Adam Biotech Inc,CN 102250246) 和TvAb分子 (Roche,W02012025525,W02012025530)。

[0111] Fc融合分子的实例包括但不限于ScFv/Fc融合物 (Pearce et al.,Biochem Mol Biol Int.1997Sep;42(6):1179-88)、SCORPION分子 (Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW,et al.AACR 100th Annual meeting 2009 (Abstract#5465); Zymogenetics/BMS,W02010111625)、双重亲和再靶向技术 (Dual Affinity Retargeting Technology) (Fc-DART) 分子 (MacroGenics,W02008157379,W02010080538) 和双重 (ScFv) 2-Fab分子 (National Research Center for Antibody Medicine-China)。

[0112] Fab融合双特异性抗体的实例包括但不限于F(ab)2分子(Medarex/AMGEN;Deo et al J Immunol.1998Feb 15;160(4):1677-86.)、Dual-Action或Bis-Fab分子(Genentech, Bostrom,et al 2009.Science 323,1610-1614.)、对接-和-锁(DNL)分子(ImmunoMedics, W02003074569,W02005004809)、二价双特异性分子(Biotecol,Schoonjans,J Immunol.2000Dec 15;165(12):7050-7.)和Fab-Fv分子(UCB-Celltech,W0 2009040562 A1)。

[0113] 基于scFv的抗体、基于双抗体的抗体和域抗体的实例包括但不限于接合剂(BiTE)分子(Micromet,W02005061547)、串联双抗体分子(TandAb)(Affimed)Le Gall et al., Protein Eng Des Sel.2004Apr;17(4):357-66.)、双重亲和再靶向技术(DART)分子(MacroGenics,W02008157379,W02010080538)、单链双抗体分子(Lawrence,FEBS Lett.1998Apr 3;425(3):479-84)、TCR样抗体(AIT,ReceptorLogics)、人血清白蛋白ScFv融合物(Merrimack,W02010059315)和COMBODY分子(Epigen Biotech,Zhu et al.Immunol Cell Biol.2010Aug;88(6):667-75.)、双重靶向纳米抗体(dual targeting nanobodies)(Ablynx,Hmila et al.,FASEB J.2010)和双重靶向的仅重链的域抗体。

[0114] 本发明的双特异性抗体可以是任何同种型。示例性同种型包括但不限于人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4同种型中的任一种。优选地,双特异性抗体可以选择为人IgG1同种型,如实施例中所示。可以使用人轻链恒定区 κ 或 λ 中的任一种。在一个实施方案中,本发明的抗体的两条重链均属于IgG1同种型,例如IgG1, κ 。在一个实施方案中,双特异性抗体的两条重链分别属于IgG1和IgG4同种型。优选地,双特异性抗体可以选择为人IgG1同种型,如实施例中所示。任选且优选地,所选同种型的重链及其Fc序列可以如本文所述在铰链区和/或CH3区进行修饰,以使得能够生成双特异性抗体并引入惰性。

[0115] 在一个方面,本发明的双特异性抗体包含Fc区,该Fc区包含第一重链和第二重链,该第一重链具有包含第一CH3区的第一Fc序列,该第二重链具有包含第二CH3区的第二Fc序列,其中第一和第二CH3区的序列不同并且使得所述第一和第二CH3区之间的异二聚体相互作用比所述第一和第二CH3区的同二聚体相互作用中的每一个强。W02011131746和W02013060867(Genmab)中提供了关于这些相互作用以及如何实现它们的更多细节,其在此通过引用并入。

[0116] 如本文进一步描述的,基于一种B7H4抗体和一种CD3抗体,可以以高产率获得稳定的双特异性CD3xB7H4抗体,每种抗体由两条相同的重链和两条相同的轻链组成,每种抗体仅含有在CH3区域中的少量、相当保守、(不对称)突变。不对称突变是指所述第一和第二CH3区的序列在不同位置含有一个或多个氨基酸取代。

[0117] 能够结合CD3的抗原结合区

[0118] 如所述,本发明提供了根据本发明的抗体,其包含能够结合人B7H4的抗原结合区和能够结合人CD3的抗原结合区。此外,本发明提供了根据本发明的抗体,其包含能够结合人B7H4的抗原结合区和能够结合人CD3的抗原结合区,其中能够结合CD3的抗原结合区能够结合人CD3 ϵ (epsilon),诸如SEQ ID NO:13中指定的人CD3 ϵ (epsilon)。此类抗原结合区能够结合人CD3 ϵ (epsilon),如在T细胞诸如原代人T细胞上存在的。

[0119] 根据本发明的所述抗体可以是包含能够结合人B7H4的抗原结合区和能够结合人CD3的抗原结合区的抗体,其中结合CD3的抗原结合区包含

[0120] 重链可变区 (VH), 其包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO.17的CDR1、CDR2和CDR3区, 以及, 任选地,

[0121] 轻链可变区 (VL), 其包含SEQ ID NO:22的CDR1、CDR2和CDR3区。

[0122] 可以使用本领域已知的方法从可变的重链和轻链区鉴定CDR1、CDR2和CDR3区。可以根据IMGT注释来自所述可变重链和轻链区的CDR区 (参见Lefranc MP.et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999] and Brochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008))。因此, 还公开了包含能够结合人B7H4的抗原结合区和能够结合人CD3的抗原结合区的抗体, 其中结合CD3的抗原结合区包含

[0123] 重链可变区 (VH), 其包含分别为SEQ ID NO:18、19和20或18、19和21的CDR1、CDR2和CDR3序列; 以及, 任选地

[0124] 轻链可变区 (VL), 其包含分别为SEQ ID NO:23、GTN和24的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0125] 进一步公开了包含能够结合人B7H4的抗原结合区和能够结合人CD3的抗原结合区的抗体, 其中结合CD3的抗原结合区包含

[0126] 重链可变区 (VH), 其包含SEQ ID NO:16的序列, 或与SEQ ID NO:16的序列具有至少90%、至少95%、至少97%或至少99%氨基酸序列同一性的序列; 以及, 任选地

[0127] 轻链可变区 (VL), 其包含SEQ ID NO:22的序列, 或与SEQ ID NO:22的序列具有至少90%、至少95%、至少97%或至少99%的氨基酸序列同一性的序列。

[0128] 此类能够结合人CD3的抗原结合区已经在例如W02015001085和W02017009442中进行了描述。能够结合人CD3的另外的抗原结合区在W02015001085和W02017009442中公开和描述, 其可以进一步考虑并充当生成根据本发明的抗体的基础, 其通过引用并入本文。

[0129] 根据本发明的所述抗体可以是与人CD3结合的抗原结合区和人CD3之间的平衡解离常数 K_D 在1-1000nM的范围内。

[0130] 根据本发明的所述抗体可以在结合人CD3的抗原结合区和人CD3之间以平衡解离常数 K_D 结合, 该 K_D 在1-100nM的范围内, 诸如在5-100nM的范围内、在10-100nM的范围内、在1-80nM的范围内、在1-60nM的范围内、在1-40nM的范围内、在1-20nM的范围内、在5-80nM的范围内、在5-60nM的范围内、在5-40nM的范围内、在5-20nM的范围内、在10-80nM的范围内、在10-60nM的范围内、在10-40nM的范围内, 或诸如在10-20nM的范围内。示例性且合适的抗原结合区包含SEQ ID NO:16的重链可变区 (VH) 和SEQ ID NO:22的轻链可变区 (VL) 区。此类可变区已在例如W02015001085中描述。

[0131] 在本发明的另一个方面, 所述抗体对人CD3 ϵ 的结合亲和力低于具有抗原结合区的抗体, 该抗原结合区包含如SEQ ID NO:16中所列的VH序列和如SEQ ID NO:22中所列的VL序列, 优选地其中所述亲和力低至少5倍, 诸如低至少10倍, 例如低至少20倍、低至少30倍、低至少40倍、低至少45倍或诸如低至少50倍。

[0132] 在本发明的另一个方面, 所述抗体可以在结合人CD3的抗原结合区和人CD3抗原之间以平衡解离常数 K_D 结合, 该 K_D 在200-1000nM的范围内, 诸如在300-1000nM的范围内、在400-1000nM的范围内、在500-1000nM的范围内、在300-900nM的范围内、在400-900nM的范围内、在400-700nM的范围内、在500-900nM的范围内、在500-800nM的范围内、在500-700nM的范围内、在600-1000nM的范围内、在600-900nM的范围内、在600-800nM的范围内, 或诸如在600-700nM的范围内。示例性且合适的抗原结合区包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO.17的重

链可变区 (VH), 以及 SEQ ID NO:22 的轻链可变区 (VL) 区。此类可变区已在例如 W02017009442 中描述。

[0133] 所述结合亲和力可以通过生物层干涉测量法测定, 任选地如本文实施例 4 中所述。因此, 如本文所定义的对人 CD3 具有结合亲和力的根据本发明的抗体可以具有使用包括以下步骤的生物层干涉测量法测定的结合亲和力:

[0134] I) 将抗体以 1 μ g/mL 的量在抗人 IgG Fc 捕捉生物传感器上固定化 600 秒;

[0135] II) 使用范围为 1.40nM 至 1000nM 的 3 倍稀释系列, 测定人重组可溶性 CD3 ϵ (CD3E27-GSKa) (SEQ ID NO:13 的成熟蛋白) 在 1000 秒的时间段内的缔合和 2000 秒的时间段内的解离。

[0136] III) 相对于缓冲液对照 (0nM) 参考数据。

[0137] 此外, 所述结合亲和力可以使用抗体诸如单特异性二价抗体, 诸如为全长 IgG1 的抗体来测定。

[0138] 因此, 在进一步的实施方案中, 根据本发明的抗体是抗体, 其中

[0139] 结合 CD3 的抗原结合区包含如本文所定义的重链可变 (VH) 区, 其包含 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列, 当与包含 SEQ ID NO:16 中所列的序列的重链可变 (VH) 区相比时, 具有在选自下组的位置处的氨基酸取代: T31、N57、H101、G105、S110 和 Y114, 该位置根据 SEQ ID NO:16 的序列编号; 并且

[0140] 野生型轻链可变 (VL) 区包含分别在 SEQ ID NO:23、GTN 和 SEQ ID NO:24 中列出的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。

[0141] 特别地, 根据本发明的抗体是其中结合 CD3 的抗原结合区在本文定义的重链可变 (VH) 区中包含选自下组的取代的抗体: T31M、T31P、N57E、H101G、H101N、G105P、S110A、S110G、Y114M、Y114R、Y114V。

[0142] 此外, 根据本发明的抗体是抗体, 其中结合 CD3 的抗原结合区包含如本文所定义的重链可变区, 在氨基酸位置 31 处具有 M 或 P, 或在氨基酸位置 57 处具有 E, 或在氨基酸位置 101 处具有 G 或 N, 或在氨基酸位置 105 处具有 P, 或在氨基酸位置 110 处具有 A 或 G, 或在氨基酸位置 114 处具有 M、R 或 V, 所述位置与具有 SEQ ID NO:16 中所列序列的重链可变 (VH) 区的氨基酸位置编号相对应。

[0143] 更进一步, 根据本发明的抗体是抗体, 其中如本文所定义的结合 CD3 的抗原结合区的重链可变 (VH) 区的 CDR1、CDR2 和 CDR3, 当与 SEQ ID NO:16 的序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3 相比时, 总共包含最多 1、2、3、4 或 5 个氨基酸取代, 所述氨基酸取代优选包括如上定义的氨基酸取代。

[0144] 能够结合 B7H4 的抗原结合区

[0145] 特别地, 本发明提供了根据本发明的抗体, 其包含能够结合人 B7H4 的抗原结合区和能够结合人 CD3 的抗原结合区, 其中所述人 B7H4 是 SEQ ID NO.1 的人 B7H4。优选地, 根据本发明的所述抗体包含如 SEQ ID NO:13 中指定的能够结合人 CD3 ϵ (epsilon) 的抗原结合区, 以及能够结合 SEQ ID NO:1 的人 B7H4 的抗原结合区。

[0146] 特别地, 根据本发明的抗体是其中所述能够结合人 B7H4 的抗原结合区能够结合人 B7H4 的细胞外域的抗体。优选地, 所述 B7H4 在细胞上, 更优选在人细胞上表达。

[0147] 在进一步的实施方案中, 根据本发明的抗体是其中所述能够结合人 B7H4 的抗原结

合区能够结合人B7H4的IgC样恒定区的抗体。在另一个进一步的实施方案中,根据本发明的抗体是其中所述能够结合人B7H4的抗原结合区能够结合B7H3-IgV/B7H4-IgC的抗体。B7H3-IgV/B7H4-IgC代表人B7H3和B7H4之间的融合物,其中B7H3 IgV样域与B7H4 IgC样域融合,对应于SEQ ID NO.11。所述B7H3-IgV/B7H4-IgC由诸如本文实施例7中所述的细胞表达。在又进一步的实施方案中,根据本发明的抗体是其中所述能够结合人B7H4的抗原结合区不能结合B7H4-IgV/B7H3-IgC的抗体。B7H4-IgV/B7H3-IgC代表人B7H3和B7H4之间的融合物,其中B7H4 IgV样域与B7H3 IgC样域融合,对应于SEQ ID NO.10。所述B7H4-IgV/B7H3-IgC由诸如本文实施例7中所述的细胞表达。

[0148] 如本文所述的根据本发明考虑的合适的能够结合人B7H4的抗原结合区包含:

[0149] a) 可变重链 (VH) 区,其包含SEQ ID NO.25的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.33的CDR1、CDR2和CDR3区;

[0150] b) 可变重链 (VH) 区,其包含SEQ ID NO.29的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.33的CDR1、CDR2和CDR3区;

[0151] c) 可变重链 (VH) 区,其包含SEQ ID NO.36的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.40的CDR1、CDR2和CDR3区;

[0152] d) 可变重链 (VH) 区,其包含SEQ ID NO.43的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.47的CDR1、CDR2和CDR3区;

[0153] e) 可变重链 (VH) 区,其包含SEQ ID NO.50的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.54的CDR1、CDR2和CDR3区;或者

[0154] f) 可变重链 (VH) 区,其包含SEQ ID NO.31的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.33的CDR1、CDR2和CDR3区。

[0155] g) 可变重链 (VH) 区,其包含SEQ ID NO.65的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.69的CDR1、CDR2和CDR3区。

[0156] 可以使用本领域已知的方法从可变重链和轻链区鉴定CDR1、CDR2和CDR3区。可以根据IMGT注释来自所述可变重链和轻链区的CDR区(参见Lefranc MP.et al.,Nucleic Acids Research,27,209-212,1999]和Brochet X.Nucl.Acids Res.36,W503-508(2008))。因此,如本文所述的根据本发明考虑的合适的能够结合人B7H4的抗原结合区包含:

[0157] a) 重链可变区 (VH),其包含分别为SEQ ID NO.26、27和28的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.34、GAS和SEQ ID NO.35的CDR1、CDR2和CDR3;

[0158] b) 重链可变区 (VH),其包含分别为SEQ ID NO.26、30和28的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.34、GAS和SEQ ID NO.35的CDR1、CDR2和CDR3;

[0159] c) 重链可变区 (VH),其包含分别为SEQ ID NO.37、38和39的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.41、DTS和SEQ ID NO.42的CDR1、CDR2和CDR3;

[0160] d) 重链可变区 (VH),其包含分别为SEQ ID NO.44、45和46的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.48、YTS和SEQ ID NO.49的CDR1、CDR2和CDR3;

[0161] e) 重链可变区 (VH),其包含分别为SEQ ID NO.51、52和53的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.55、GAS和SEQ ID NO.56的CDR1、CDR2和CDR3;或者

[0162] f) 重链可变区 (VH),其包含分别为SEQ ID NO.26、32和28的CDR1、CDR2和CDR3区,

以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.34、GAS和SEQ ID NO.35的CDR1、CDR2和CDR3

[0163] g) 重链可变区 (VH),其包含分别为SEQ ID NO.66、67和68的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.70、GAS和SEQ ID NO.71的CDR1、CDR2和CDR3。

[0164] 如本文所述的根据本发明考虑的更进一步合适的能够结合人B7H4的抗原结合区包含:

[0165] a) SEQ ID NO.25的可变重链 (VH) 区和SEQ ID NO.33的可变轻链区;

[0166] b) SEQ ID NO.29的可变重链 (VH) 区和SEQ ID NO.33的可变轻链区;

[0167] c) SEQ ID NO.36的可变重链 (VH) 区和SEQ ID NO.40的可变轻链区;

[0168] d) SEQ ID NO.43的可变重链 (VH) 区和SEQ ID NO.47的可变轻链区;

[0169] e) SEQ ID NO.50的可变重链 (VH) 区和SEQ ID NO.54的可变轻链区;或者

[0170] f) SEQ ID NO.31的可变重链 (VH) 区和SEQ ID NO.33的可变轻链区

[0171] g) SEQ ID NO.65的可变重链 (VH) 区和SEQ ID NO.69的可变轻链区。

[0172] 任选地,所述结合B7H4的抗原结合区包含与以下具有至少90%、至少95%、至少97%或至少99%氨基酸序列同一性的重链和轻链可变区 (VH):

[0173] a) SEQ ID NO.25的可变重链 (VH) 区和SEQ ID NO.33的可变轻链区;

[0174] b) SEQ ID NO.29的可变重链 (VH) 区和SEQ ID NO.33的可变轻链区;

[0175] c) SEQ ID NO.36的可变重链 (VH) 区和SEQ ID NO.40的可变轻链区;

[0176] d) SEQ ID NO.43的可变重链 (VH) 区和SEQ ID NO.47的可变轻链区;

[0177] e) SEQ ID NO.50的可变重链 (VH) 区和SEQ ID NO.54的可变轻链区;或者

[0178] f) SEQ ID NO.31的可变重链 (VH) 区和SEQ ID NO.33的可变轻链区

[0179] g) SEQ ID NO.65的可变重链 (VH) 区和SEQ ID NO.69的可变轻链区。

[0180] 根据本发明的抗体可以具有能够结合B7H4的抗原结合区,其对B7H4具有对应于 $5E-7M$ 或更小,诸如 $1E-7M$ 或更小的 K_D 值的结合亲和性,诸如具有对应于在 $5E-7$ 至 $2E-10M$ 的范围内,诸如在 $2E-7$ 到 $1E-10M$ 或 $1E-7$ 到 $5E-9M$ 的范围内的 K_D 值的结合亲和力。

[0181] 所述结合亲和力可以通过生物层干涉测量法测定,任选地如本文实施例3中所述。因此,对如本文所定义的人B7H4具有结合亲和力的根据本发明的抗体可以具有使用包括以下步骤的生物层干涉测量法测定的结合亲和力:

[0182] I) 将抗体以 $1\mu g/mL$ 的量在抗人IgG Fc捕捉生物传感器上固定化600秒;

[0183] II) 使用范围为 $1.56nM$ 至 $100nM$ 的2倍稀释系列,测定人重组带His标签的B7H4蛋白 (Sino Biological目录号10738-H08H;由编码具有C端多组氨酸标签的人VTCN1 (Uniprot登录号Q7Z7D3) (Phe29-Ala258) 的DNA序列的构建体表达的蛋白质) 在300秒的时间段内的缔合和1000秒的时间段内的解离。

[0184] III) 相对于缓冲液对照 (0nM) 参考数据。

[0185] 此外,所述结合亲和力可以使用抗体诸如单特异性二价抗体,诸如为全长IgG1的抗体来测定。

[0186] 在进一步的实施方案中,提供了根据本发明的抗体,其包含能够结合人B7H4的抗原区,其中所述抗原结合区能够交叉阻断:

[0187] 抗体,其包含SEQ ID NO.29的可变重链 (VH) 区和SEQ ID NO.33的可变轻链区;和

[0188] 抗体,其包含SEQ ID NO.36的可变重链 (VH) 区和SEQ ID NO.40的可变轻链区;和

- [0189] 其中所述抗原结合区不能交叉阻断
- [0190] 抗体,其包含SEQ ID NO.43的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.47的可变轻链区;
- [0191] 抗体,其包含SEQ ID NO.50的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.54的可变轻链区;和
- [0192] 抗体,其包含SEQ ID NO.65的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.69的可变轻链区。
- [0193] 在又一个进一步的实施方案中,根据本发明的所述抗体包含能够结合人B7H4的抗原区,所述抗原结合区能够交叉阻断
- [0194] 抗体,其包含SEQ ID NO.43的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.47的可变轻链区;
- [0195] 抗体,其包含SEQ ID NO.50的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.54的可变轻链区,和
- [0196] 抗体,其包含SEQ ID NO.65的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.69的可变轻链区;
- [0197] 并且其中所述抗原结合区不能交叉阻断抗体,所述抗体包括
- [0198] 抗体,其包含SEQ ID NO.29的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.33的可变轻链区;和
- [0199] 抗体,其包含SEQ ID NO.36的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.40的可变轻链区。
- [0200] 特别地,“交叉阻断”或根据本发明的抗体阻断另一种抗体与B7H4结合的能力被定义为与B7H4结合的第一抗体阻断第二抗体对与第一抗体结合的B7H4结合的能力。可以使用如实施例5中描述的测定法来确定交叉阻断。此类交叉阻断也可以例如在包括以下步骤的规程中确定:
- [0201] i) 提供一组样品,每个样品包含与B7H4结合的抗体;
- [0202] ii) 将来自该组样品的第一抗体以20 μ g/mL的量在胺反应性第二代生物传感器(AR2G)上固定化600秒;
- [0203] iii) 用人B7H4的固定化抗体加载ARG2生物传感器(100nM人重组带His标签的B7H4蛋白(Sino Biological目录号10738-H08H;由编码具有C端多组氨酸标签的人VTCN1(Uniprot登录号Q7Z7D3)(Phe29-Ala258)的DNA序列构建体表达的蛋白质)
- [0204] iv) 以10 μ g/mL的量确定来自该组样品的第二抗体的缔合300秒。
- [0205] 当第二抗体不能缔合时,认为第一抗体交叉阻断第二抗体。技术人员将熟悉用于确定抗体交叉阻断另第一抗体对其靶物结合的能力的合适技术,本申请公开了适用于确定结合和置换的阻断的规程。在进一步的实施方案中,如本文所述的交叉阻断如实施例5中所述确定。
- [0206] 在进一步的实施方案中,根据本发明的抗体具有能够结合人B7H4的抗原结合区,其符合如上所述的交叉阻断特征,其中所述能够结合人B7H4的抗原结合区能够结合B7H3-IgV/B7H4-IgC(SEQ ID NO.11),并且任选地不能够结合B7H4-IgV/B7H3-IgC(SEQ ID NO.10)。
- [0207] CD3和B7H4抗原结合区组合
- [0208] 本发明进一步提供了根据本发明的抗体,其包含能够结合人B7H4的抗原结合区和能够结合人CD3的抗原结合区,其中结合CD3的抗原结合区包含
- [0209] 重链可变区(VH),其包含SEQ ID NO:16的CDR1、CDR2和CDR3区的,以及轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:22的CDR1、CDR2和CDR3区。并且
- [0210] 其中能够结合B7H4的抗原结合区包括:
- [0211] a) 可变重链(VH)区,其包含SEQ ID NO.25的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.33的CDR1、CDR2和CDR3区;

[0212] b) 可变重链 (VH) 区, 其包含 SEQ ID NO.29 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 以及可变轻链区, 其包含分别为 SEQ ID NO.33 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区;

[0213] c) 可变重链 (VH) 区, 其包含 SEQ ID NO.36 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 以及可变轻链区, 其包含分别为 SEQ ID NO.40 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区;

[0214] d) 可变重链 (VH) 区, 包含 SEQ ID NO.43 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 以及可变轻链区, 其包含分别为 SEQ ID NO.47 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区的;

[0215] e) 可变重链 (VH) 区, 其包含 SEQ ID NO.50 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 以及可变轻链区, 其包含分别为 SEQ ID NO.54 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区; 或者

[0216] f) 可变重链 (VH) 区, 其包含 SEQ ID NO.31 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 以及可变轻链区, 其包含分别为 SEQ ID NO.33 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区

[0217] g) 可变重链 (VH) 区, 其包含 SEQ ID NO.65 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 以及可变轻链区, 其包含分别为 SEQ ID NO.69 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区。

[0218] 本发明进一步提供根据本发明的抗体可以是包含能够结合人 B7H4 的抗原结合区和能够结合人 CD3 的抗原结合区的抗体, 其中结合 CD3 的抗原结合区包含

[0219] 重链可变区 (VH), 其包含 SEQ ID NO.17 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 以及轻链可变区 (VL), 其包含 SEQ ID NO:22 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区。并且

[0220] 其中能够结合 B7H4 的抗原结合区包括:

[0221] a) 可变重链 (VH) 区, 其包含 SEQ ID NO.25 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 以及可变轻链区, 其包含分别为 SEQ ID NO.33 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区;

[0222] b) 可变重链 (VH) 区, 其包含 SEQ ID NO.29 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 以及可变轻链区, 其包含分别为 SEQ ID NO.33 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区;

[0223] c) 可变重链 (VH) 区, 其包含 SEQ ID NO.36 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 以及可变轻链区, 其包含分别为 SEQ ID NO.40 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区;

[0224] d) 可变重链 (VH) 区, 其包含 SEQ ID NO.43 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 以及可变轻链区, 其包含分别为 SEQ ID NO.47 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区;

[0225] e) 可变重链 (VH) 区, 其包含 SEQ ID NO.50 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 以及可变轻链区, 其包含分别为 SEQ ID NO.54 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区; 或者

[0226] f) 可变重链 (VH) 区, 其包含 SEQ ID NO.31 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 以及可变轻链区, 其包含分别为 SEQ ID NO.33 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区

[0227] g) 可变重链 (VH) 区, 其包含 SEQ ID NO.65 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 以及可变轻链区, 其包含分别为 SEQ ID NO.69 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区。

[0228] 此外, 本发明进一步提供了包含能够结合人 B7H4 的抗原结合区和能够结合人 CD3 的抗原结合区的抗体, 其中能够结合 CD3 的抗原结合区包含:

[0229] 重链可变区 (VH), 其包含分别为 SEQ ID NO:18、19 和 20 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列; 以及轻链可变区 (VL), 其包含分别为 SEQ ID NO:23、GTN 和 24 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列; 并且

[0230] 其中能够结合 B7H4 的抗原结合区包含:

[0231] a) 可变重链 (VH) 区, 其包含分别为 SEQ ID NO.:26、27 和 28 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 以及可变轻链区, 其包含分别为 SEQ ID NO.34、GAS 和 SEQ ID NO.35 的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

[0232] b) 可变重链 (VH) 区, 其包含分别为 SEQ ID NO.26、30 和 28 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区,

以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.34、GAS和SEQ ID NO.35的CDR1、CDR2和CDR3;

[0233] c) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.37、38和39的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.41、DTS和SEQ ID NO.42的CDR1、CDR2和CDR3;

[0234] d) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.44、45和46的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.48、YTS和SEQ ID NO.49的CDR1、CDR2和CDR3;

[0235] e) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.51、52和53的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.55、GAS和SEQ ID NO.56的CDR1、CDR2和CDR3;或者

[0236] f) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.26、32和28的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.34、GAS和SEQ ID NO.35的CDR1、CDR2和CDR3

[0237] g) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.66、67和68的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.70、GAS和SEQ ID NO.71的CDR1、CDR2和CDR3。

[0238] 本发明还提供了包含能够结合人B7H4的抗原结合区和能够结合人CD3的抗原结合区抗体,其中能够结合CD3的抗原结合区包含:

[0239] 重链可变区(VH),其包含分别为SEQ ID NO:18、19和21的CDR1、CDR2和CDR3序列;以及轻链可变区(VL),其包含分别为SEQ ID NO:23、GTN和24的CDR1、CDR2和CDR3序列;并且

[0240] 其中能够结合B7H4的抗原结合区包含:

[0241] a) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.26、27和28的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.34、GAS和SEQ ID NO.35的CDR1、CDR2和CDR3;

[0242] b) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.26、30和28的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.34、GAS和SEQ ID NO.35的CDR1、CDR2和CDR3;

[0243] c) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.37、38和39的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.41、DTS和SEQ ID NO.42的CDR1、CDR2和CDR3;

[0244] d) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.44、45和46的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.48、YTS和SEQ ID NO.49的CDR1、CDR2和CDR3;

[0245] e) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.51、52和53的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.55、GAS和SEQ ID NO.56的CDR1、CDR2和CDR3;或者

[0246] f) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.26、32和28的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.34、GAS和SEQ ID NO.35的CDR1、CDR2和CDR3

[0247] g) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.66、67和68的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.70、GAS和SEQ ID NO.71的CDR1、CDR2和CDR3。

[0248] 进一步公开了包含能够结合人B7H4的抗原结合区和能够结合人CD3的抗原结合区的抗体,其中结合CD3的抗原结合区包含:

[0249] 包含SEQ ID NO:16的序列的重链可变区(VH)和包含SEQ ID NO:22的序列的轻链可变区(VL);并且

[0250] 其中能够结合B7H4的抗原结合区包含结合B7H4的抗原结合区,其包含具有以下重链和轻链可变区(VH):

[0251] a) SEQ ID NO.25的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.33的可变轻链区;

- [0252] b) SEQ ID NO.29的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.33的可变轻链区;
- [0253] c) SEQ ID NO.36的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.40的可变轻链区;
- [0254] d) SEQ ID NO.43的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.47的可变轻链区;
- [0255] e) SEQ ID NO.50的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.54的可变轻链区;或者
- [0256] f) SEQ ID NO.31的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.33的可变轻链区
- [0257] g) SEQ ID NO.65的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.69的可变轻链区。
- [0258] 还进一步公开了包含能够结合人B7H4的抗原结合区和能够结合人CD3的抗原结合区的抗体,其中结合CD3的抗原结合区包含:
- [0259] 包含SEQ ID NO:17的序列的重链可变区(VH)和包含SEQ ID NO:22的序列的轻链可变区(VL);和并且
- [0260] 其中能够结合B7H4的抗原结合区包含具有以下抗原结合重链和轻链可变区(VH):
- [0261] a) SEQ ID NO.25的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.33的可变轻链区;
- [0262] b) SEQ ID NO.29的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.33的可变轻链区;
- [0263] c) SEQ ID NO.36的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.40的可变轻链区;
- [0264] d) SEQ ID NO.43的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.47的可变轻链区;
- [0265] e) SEQ ID NO.50的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.54的可变轻链区;或者
- [0266] f) SEQ ID NO.31的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.33的可变轻链区
- [0267] g) SEQ ID NO.65的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.69的可变轻链区。
- [0268] 在进一步的实施方案中,在此类双特异性抗体中,所述能够结合人B7H4的抗原结合区包含在重链和轻链中,所述重链包含所述VH区和IgG1重链恒定区并且所述轻链包含所述VL区和 κ 轻链恒定区;并且其中所述能够结合人CD3的抗原结合区包含在重链和轻链中,所述重链包含所述VH区和IgG1重链恒定区并且所述轻链包含所述VL区和 λ 轻链恒定区。更优选地,在此类双特异性抗体中,一个IgG1重链恒定区如SEQ ID NO.60中所定义并且另一个如SEQ ID NO.61中所定义,并且其中所述 κ 轻链恒定区如SEQ ID NO.63中所定义以及所述 λ 轻链恒定区如SEQ ID NO.64中所定义。应理解,任选地,所述IgG1重链恒定区如SEQ ID NO.60和61中所定义,可以删除末端赖氨酸。
- [0269] 如本领域技术人员所熟知的,抗体的每个抗原结合区通常包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),并且可变区中的每一个包含三个CDR序列,分别为CDR1、CDR2和CDR3,并且可以包含四个框架序列,分别为FR1、FR2、FR3和FR4。抗体的每个抗原结合区通常可以包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),并且可变区中的每一个包含三个CDR序列,分别为CDR1、CDR2和CDR3,并且可以包括四个人框架序列,分别为FR1、FR2、FR3和FR4。该结构优选地也存在于根据本发明的抗体中。此外,根据本发明的抗体可以包含两个重链恒定区(CH)和两个轻链恒定区(CL)。恒定区的实例.提供在例如SEQ ID NO.57-64中。
- [0270] 在特定的实施方案中,根据本发明的抗体包含第一和第二重链,如第一和第二重链,其各自至少包含铰链区、CH2和CH3区。可以例如通过如W02008/119353和W0 2011/131746中提供的所谓Fab臂交换,基于两个同源二聚体起始蛋白以高产量获得稳定的异源二聚体抗体,所述同源二聚体起始蛋白仅在CH3区中含有几个不对称突变。因此,在本发明的一些实施方案中,抗体包含第一重链,其中与选自人IgG1重链中T366、L368、K370、D399、

F405、Y407和K409的位置相对应的位置处的至少一个氨基酸已被取代,和第二重链,其中与选自人IgG1重链中T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置相对应的位置中的至少一个氨基酸已被取代,其中所述第一和所述第二重链的所述取代不在同一位置中,并且其中所述氨基酸位置根据Eu编号进行编号。例如,具有此类取代的恒定域提供在例如SEQ ID NO.58和62中,其可以与不具有此类取代的SEQ ID NO.57进行比较。

[0271] 如本文所用,术语“与位置相对应的氨基酸”是指人IgG1重链中的氨基酸位置编号。通过与人IgG1比对,可以发现其他免疫球蛋白中相对应的氨基酸位置。除非另有说明或与上下文相矛盾,否则本文中恒定区序列的氨基酸根据EU编号索引进行编号(描述于Kabat,E.A.et al.,1991,Sequences of proteins of immunological interest.5th Edition-US Department of Health and Human Services,NIH publication No.91-3242,pp 662,680,689)。因此,“对应于”另一序列中的氨基酸或区段的一个序列中的氨基酸或区段是使用标准序列比对程序(诸如ALIGN、ClustalW或类似程序,通常在默认设置)与其他氨基酸或区段比对,并且与人IgG1重链具有至少50%、至少80%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸或区段。如何比对序列或序列中的区段并由此确定序列中与根据本发明的氨基酸位置相对应的位置在本领域中被认为是众所周知的。

[0272] 在特定的实施方案中,本发明提供了抗体,其中与人IgG1重链中的K409相对应的位置中的氨基酸在所述第一重链中为R,而与人IgG1重链中的F405相对应的位置中的氨基酸在所述第二条重链中为L,反之亦然。

[0273] 在一些实施方案中,根据本发明的抗体除抗原结合区之外还包含具有两条重链的Fc序列的Fc区。第一和第二Fc序列可以各自具有任何同种型,包括任何人同种型,诸如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgD、IgM或IgA同种型或混合同种型。优选地,Fc区是人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4同种型或混合同种型,诸如人IgG1同种型。在一些实施方案中,优选根据本发明的抗体是全长抗体,最优选它是IgG1型的。

[0274] 根据本发明的抗体可以在Fc区中包含修饰以使抗体成为惰性或非活化抗体。因此,在本文公开的抗体中,可以修饰一条或两条重链,使得相对于除了包含未修饰的第一和第二重链之外相同的抗体,抗体在更小程度上诱导Fc介导的效应物功能。可以通过测定T细胞上的Fc介导的CD69表达(即,由于CD3抗体介导的、Fc γ 受体依赖性的CD3交联而产生的CD69表达),通过与Fc γ 受体结合,通过与C1q结合,或通过诱导Fc介导的Fc γ R交联来测量Fc介导的效应物功能。特别地,可以修饰重链恒定序列,使得在与野生型(未修饰的)抗体相比时,将Fc介导的CD69表达降低至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少99%或100%,其中在基于PBMC的功能测定法中测定所述Fc介导的CD69表达,例如,如W02015001085的实施例3中所述。重链和轻链恒定序列的修饰也可以导致C1q与所述抗体的结合减少。与未修饰的抗体相比,可以减少至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%或100%,并且可以通过ELISA测定C1q结合。此外,可以修饰Fc区,使得与未修饰的抗体相比,所述抗体介导降低至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少99%或100%的Fc介导的T细胞增殖,其中在基于PBMC的功能测定中测量所述T细胞增殖。

[0275] 已经开发了多种不同的非活化抗体格式,其中氨基酸取代及其组合已被引入IgG1同种型抗体的恒定重链区以消除Fc介导的效应物功能(例如Chiu et al.,Antibodies 2019Dec;8(4):55;Liu et al.,Antibodies,2020Nov 17;9(4):64;29(10):457-66;

Shields et al., J Biol Chem, .2001Mar 2;276 (9) :6591-604)。

[0276] 可以被修饰的氨基酸位置(例如IgG1同种型抗体中)的实例包括位置L234和L235。因此,根据本发明的抗体可以包含第一和第二重链,并且其中在所述第一和第二重链两者中,与根据Eu编号的人IgG1重链中的位置L234和L235相对应的位置处的氨基酸残基分别为F和E。据了解,除了氨基酸位置L234和L235的修饰,可以修饰进一步的位置。

[0277] 另外,D265A氨基酸取代可以减少与所有Fc γ 受体的结合并防止ADCC(Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. (276) :6591-604)。因此,根据本发明的抗体可以包含第一和第二重链,其中在第一和第二重链两者中,与根据Eu编号的人IgG1重链中的位置D265对应的位置处的氨基酸残基是A。本发明的进一步的实施方案提供了抗体,其中在所述第一和第二重链的至少一个中,例如在两者中,在与IgG1重链中的位置L234、L235和D265相对应的位置中的氨基酸分别是F、E和A。在本申请中,具有三个氨基酸取代L234F、L235E和D265A的组合和另外上文公开的K409R或F405L突变的抗体可以分别以后缀“FEAR”或“FEAL”称谓。

[0278] 野生型IgG1重链恒定区的氨基酸序列在本文中被鉴定为SEQ ID NO:57。与以上公开的实施方案一致,本发明的抗体可以包含携带F405L取代的IgG1重链恒定区并且可以具有SEQ ID NO:58中所列的氨基酸序列和/或携带K409R取代的IgG1重链恒定区并且可以具有SEQ ID NO:62中所列的氨基酸序列。

[0279] 携带L234F、L235E和D265A取代的IgG1重链恒定区的氨基酸序列在本文中被鉴定为SEQ ID NO:59。携带L234F、L235E、D265A和F405L取代的IgG1重链恒定区的氨基酸序列在本文中鉴定为SEQ ID NO:60。携带L234F、L235E、D265A和K409R取代的IgG1重链恒定区的氨基酸序列在本文中鉴定为SEQ ID NO:61。

[0280] SEQ ID NO.57-62中列出的恒定区序列列出了末端赖氨酸(K),此类序列用于本文的实施例部分。该赖氨酸的来源是在人中发现的天然存在的序列,这些Fc区衍生自该序列。在重组抗体的细胞培养生产过程中,该末端赖氨酸可以通过内源性羧肽酶的蛋白水解被裂解出,导致具有相同序列但缺少C端赖氨酸的恒定区。出于制造抗体的目的,编码该末端赖氨酸的DNA可以从序列中省略,从而产生没有赖氨酸的抗体。从编码或不编码末端赖氨酸的核酸序列产生的抗体在序列和功能上基本上相同,因为在例如使用在基于CHO的生产系统中生产的抗体时,末端赖氨酸的加工程度通常很高(Dick, L. W. et al. Biotechnol. Bioeng. 2008;100:1132-1143)。因此,应当理解,根据本发明的抗体可以在不编码或不具有诸如本文所列的末端赖氨酸的情况下生成。出于制造目的,因此可以在没有末端赖氨酸的情况下生成抗体。

[0281] 本发明还提供了抗体,其中

[0282] a) 能够结合B7H4的抗原结合区是人的,并且

[0283] b) 能够结合CD3的抗原结合区是人源化的。

[0284] 此外,本发明提供了抗体,其中

[0285] a) 能够结合B7H4的抗原结合区是人的,和/或

[0286] 能够结合CD3的抗原结合区是人源化的

[0287] 在本发明的一些实施方案中,抗体包含kappa(κ)轻链。在本发明特定实施方案中关于双特异性抗体的序列,kappa轻链包含如上文公开的B7H4抗体轻链的CDR1、-2和-3序列。

[0288] 在本发明的进一步实施方案中,根据前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体包含lambda(λ)轻链。在关于双特异性抗体的本发明的特定实施方案中,lambda轻链包含如上文公开的CD3抗体轻链的CDR1,-2和-3序列,特别是如上文公开的对CD3具有降低的亲合力的CD3抗体的CDR1,-2和-3序列。在本文中作为SEQ ID NO:63包括kappa轻链恒定区的氨基酸序列,并且在本文中作为SEQ ID NO:64包括lambda轻链恒定区。

[0289] 在特定的实施方案中,抗体包含lambda(λ)轻链和kappa(κ)轻链;例如抗体,其具有包含能够结合CD3的结合区的重链和lambda轻链;以及包含能够结合B7H4的结合区的重链和kappa轻链。

[0290] 因此,在进一步的实施方案中,在如本文所定义的双特异性抗体中,所述能够结合人B7H4的抗原结合区包含在重链和轻链中,所述重链包含所述VH区和IgG1重链恒定区并且所述轻链包含所述VL区和 κ 轻链恒定区;并且所述能够结合人CD3的抗原结合区包含在重链和轻链中,所述重链包含所述VH区和IgG1重链恒定区并且所述轻链包含所述VL区和 λ 轻链恒定区地区。更优选地,在所述双特异性抗体中,一个IgG1重链恒定区如SEQ ID NO.60中所定义和另一个如SEQ ID NO.61中所定义,并且所述 κ 轻链恒定区如SEQ ID NO.63中所定义以及所述 λ 轻链恒定区如SEQ ID NO.64中所定义。应当理解,如SEQ ID NO.60和61中所定义的所述IgG1重链恒定区可能删除其末端赖氨酸。结合、细胞毒性和T细胞活化

[0291] 如本文所述的可以结合人CD3和人B7H4的抗体,诸如双特异性抗体,可以有利地将T细胞靶向表达人B7H4的癌细胞,从而诱导所述癌细胞的T细胞介导的杀伤。通过在此类抗体中具有降低或惰性的Fc功能,如实施例部分所示,可以将安全、有效和足够的抗体施用于人患者,同时针对B7H4表达水平不同的多种多样的癌症有效。

[0292] 如所述,优选地,根据本发明的抗体缺乏或具有降低的Fc介导的效应物功能,并且此外,该抗体:

[0293] a) 如本文实施例9和10中所述,能够结合表达B7H4的人肿瘤细胞,

[0294] b) 当如本文实施例11和12中所述进行测定时,在使用例如PBMC或T细胞作为效应细胞时,在表达B7H4的人肿瘤细胞中介导浓度依赖性细胞毒性,

[0295] c) 当如本文实施例11和12中所述进行测定时,在使用例如PBMC或T细胞作为效应细胞时,能够在选自MCF-7、MDA-MB-468、SK-BR3、NIH-OVCAR-3、HCC1954和NCI-H1650的一种或多种表达B7H4的肿瘤细胞系中介导浓度依赖性细胞毒性,

[0296] d) 在表达B7H4的人肿瘤细胞的存在下,能够在体外激活T细胞;例如当如本文实施例13所述进行测定时,

[0297] e) 在选自MCF-7、MDA-MB-468、SK-BR3、NIH-OVCAR-3、HCC1954和NCI-H1650的一种或多种表达B7H4的人肿瘤细胞系的存在下,能够在体外激活T细胞;例如当如本文实施例13所述进行测定时,

[0298] f) 能够诱导表达B7H4的人肿瘤细胞的细胞毒性;例如当如本文实施例11和12中所述进行测定时,和/或

[0299] g) 能够在选自MCF-7、MDA-MB-468、SK-BR3、NIH-OVCAR-3、HCC1954和NCI-H1650的一种或多种表达B7H4的人肿瘤细胞系中诱导T细胞介导的细胞毒性;例如当如本文实施例11和12中所述进行测定时。

[0300] 此外,根据本发明的抗体可以缺乏或具有降低的Fc介导的效应物功能,并且还能

够诱导T细胞介导的细胞毒性抗体,其中细胞毒性在体外IC50测定法中评估,其包括:

[0301] i) 提供来自健康人供体血沉棕黄层的分离的外周血单个核细胞(PBMC)或纯化的T细胞,

[0302] ii) 提供表达B7H4的肿瘤细胞,诸如选自MCF-7、MDA-MB-468、SK-BR3、NIH-OVCAR-3、HCC1954和NCI-H1650的表达人B7H4的肿瘤细胞系;

[0303] iii) 将所述PBMC或所述纯化的T细胞与所述表达B7H4的肿瘤细胞的多个样品组合,其中来自所述PBMC的T细胞或所述纯化的T细胞与所选的肿瘤细胞的数量比率为8:1;

[0304] iv) 以稀释系列向所述样品提供所述抗体,范围例如0.0128ng/mL至10,000ng/mL用于所选的表达人B7H4的肿瘤细胞,和

[0305] v) 温育步骤iv)中获得的样品,例如在37°C下72小时;并且随后,

[0306] vi) 评估表达B7H4的肿瘤细胞的存活力,

[0307] vii) 测定每个稀释样品的活细胞百分比,和

[0308] viii) 测定IC50。

[0309] 除了分离的外周血单个核细胞(PBMC),还可以在步骤i)中提供纯化的T细胞。

[0310] 因此,该抗体可以具有在0.001-2微克/mL范围内的IC50,其中IC50在体外细胞毒性测定法中测定,其包括以下步骤:

[0311] i) 提供来自健康的人供体血沉棕黄层分离的外周血单个核细胞(PBMC),

[0312] ii) 提供表达B7H4的肿瘤细胞,诸如选自MCF-7、MDA-MB-468、SK-BR3、NIH-OVCAR-3和HCC1954的表达人B7H4的肿瘤细胞系;

[0313] iii) 将所述PBMC与所述表达B7H4的肿瘤细胞的多个样品组合,其中来自所述PBMC的T细胞与所选肿瘤细胞的数量比率为8:1;

[0314] iv) 以稀释系列向所述样品提供所述抗体,范围例如0.0128ng/mL至10,000ng/mL用于所选的表达人B7H4的肿瘤细胞,和

[0315] v) 温育步骤iv)中获得的样品,例如在37°C下72小时;并且随后,

[0316] vi) 评估表达B7H4的肿瘤细胞的存活力,

[0317] vii) 测定每个稀释样品的活细胞的百分比,和

[0318] viii) 测定IC50。

[0319] 因此,该抗体可以具有0.001-5微克/mL范围内的IC50,其中IC50在体外细胞毒性测定法中测定,其包括以下步骤:

[0320] i) 提供来自健康人供体血沉棕黄层的分离的外周血单个核细胞(PBMC)或纯化的T细胞,

[0321] ii) 提供表达B7H4的肿瘤细胞,诸如选自MCF-7、MDA-MB-468、SK-BR3、NIH-OVCAR-3、HCC1954和NCI-H1650的表达人B7H4的肿瘤细胞系;

[0322] iii) 将所述PBMC或所述纯化的T细胞与所述表达B7H4的肿瘤细胞的多个样品组合,其中来自所述PBMC的T细胞或所述纯化的T细胞与所选的肿瘤细胞的数量比率为8:1;

[0323] iv) 以稀释系列向所述样品提供所述抗体,范围例如0.0128ng/mL至10,000ng/mL用于所选的表达人B7H4的肿瘤细胞,和

[0324] v) 温育步骤iv)中获得的样品,例如在37°C下72小时;并且随后,

[0325] vi) 评估表达B7H4的肿瘤细胞的处活力,

[0326] vii) 测定每个稀释样品的活细胞的百分比,和

[0327] viii) 测定IC50。

[0328] 在一个实施方案中,根据本发明的抗体可以具有在0.001-5微克/ml范围内的IC50。在一个实施方案中,根据本发明的抗体可以具有在0.001-2微克/ml范围内的IC50。在另一个实施方案中,根据本发明的抗体可以具有在0.001-0.03微克/ml范围内的IC50。在又进一步的实施方案中,IC50可以在0.05-2微克/ml的范围内。在又一个进一步的实施方案中,IC50可以在0.05-5微克/ml的范围内。所述IC50可以使用诸如实施例12中描述的方法来测定。

[0329] 在进一步的实施方案中,根据本发明的抗体介导T细胞活化的能力在体外测定法中测定,其包括以下步骤:

[0330] i) 提供来自健康的人供体血沉棕黄层分离的外周血单个核细胞(PBMC),ii) 提供表达B7H4的肿瘤细胞;

[0331] iii) 将PBMC和多个样品中的表达B7H4的肿瘤细胞组合,其中PBMC与肿瘤细胞的数量比率为8:1;

[0332] iv) 以稀释系列向所述样品提供所述抗体,范围例如0.0128ng/mL至10,000ng/mL,和

[0333] v) 温育样品,例如在37°C下72小时;和

[0334] vi) 随后检测细胞因子。

[0335] 可以例如检测到的示例性细胞因子可以是例如IFN- γ ,例如在实施例13中描述。优选地,表达B7H4的肿瘤细胞是表达人B7H4的肿瘤,诸如原发性肿瘤,或选自MCF-7、MDA-MB-468、SK-BR3、NIH-OVCAR-3和HCC1954的肿瘤细胞系。

[0336] B7H4抗体

[0337] 在另一个实施方案中,提供了包含能够结合人B7H4的抗原结合区的抗体,其中所述能够结合人B7H4的抗原结合区包含:

[0338] a) 可变重链(VH)区,其包含SEQ ID NO.25的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.33的CDR1、CDR2和CDR3区;

[0339] b) 可变重链(VH)区,其包含SEQ ID NO.29的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.33的CDR1、CDR2和CDR3区;

[0340] c) 可变重链(VH)区,其包含SEQ ID NO.31的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.33的CDR1、CDR2和CDR3区;

[0341] d) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.26、27和28的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.34、GAS和SEQ ID NO.35的CDR1、CDR2和CDR3;

[0342] e) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.26、30和28的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.34、GAS和SEQ ID NO.35的CDR1、CDR2和CDR3;

[0343] f) 可变重链(VH)区,其包含分别为SEQ ID NO.26、32和28的CDR1、CDR2和CDR3区,以及可变轻链区,其包含分别为SEQ ID NO.34、GAS和SEQ ID NO.35的CDR1、CDR2和CDR3;

[0344] g) SEQ ID NO.25的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.33的可变轻链区;或者

[0345] h) SEQ ID NO.29的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.33的可变轻链区;

[0346] i) SEQ ID NO.31的可变重链(VH)区和SEQ ID NO.33的可变轻链区;

[0347] j) 具有与相应的SEQ ID NO.25的可变重链(VH)和SEQ ID NO.33的可变轻链区具有至少90%、至少95%、至少97%或至少99%氨基酸序列同一性的重链(VH)和轻链(VH)可变区。

[0348] 此类抗体不一定包含结合CD3的抗原结合区。此类抗体可能是有用的,例如在用于检测B7H4的试剂盒和测定法中。此类抗体还可以在治疗癌症中 useful。因此,此类抗体可以是结合B7H4的单特异性抗体。此类抗体可以是二价抗体。

[0349] 优选地,此类抗体是包含重链恒定区的抗体,该重链恒定区是人IgG1恒定区。例如,重链恒定区如SEQ ID NO.57-62中所列。优选的轻链恒定区是 κ 轻链,诸如SEQ ID NO.63.中所列。

[0350] 在一个实施方案中,本文提供的抗体可以结合人B7H4上的表位或抗体结合区,包含氨基酸残基S151、V157、D158、Y159、E164、L166、W173、P175、P177、V179、W181、F199、M208、V210、T222、Y223、V240、E242和I245中的一个或多个;每个氨基酸残基的编号参考其在SEQ ID NO:1中的位置。在进一步实施方案中,本文提供的抗体可以结合人B7H4上的表位或抗体结合区,包含氨基酸残基V157、D158、Y159、E164、L166中的一个或多个;每个氨基酸残基的编号参考其在SEQ ID NO:1中的位置。

[0351] 在另一个实施方案中,本文提供的抗体可以结合人B7H4上的表位或抗体结合区,包含氨基酸残基S151、V157、D158、Y159、E164、L166、W173、P175、P177、V179、W181、F199、M208、V210、T222、Y223、V240、E242和I245;每个氨基酸残基的编号参考其在SEQ ID NO:1中的位置。在进一步实施方案中,本文提供的抗体可以结合人B7H4上的表位或抗体结合区,包含氨基酸残基V157、D158、Y159、E164、L166;每个氨基酸残基的编号是指其在SEQ ID NO:1中的位置。

[0352] 基于本文实施例7中提供的结果,不希望受理论束缚,假设这些氨基酸残基中的任何一个或多个(即S151、V157、D158、Y159、E164、L166、W173、P175、P177、V179、W181、F199、M208、V210、T222、Y223、V240、E242和I245)直接参与抗体的结合,诸如通过非共价相互作用;例如具有抗体的CDR序列中的氨基酸残基。

[0353] 所述表位或抗体结合区所包含的氨基酸残基和任选地间接参与结合的一个或多个额外氨基酸残基可以通过对具有SEQ ID NO:1所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:1的细胞外域序列的人B7H4的丙氨酸扫描来鉴定。丙氨酸扫描特别地可以如本文实施例7中所述或基本上如本文实施例7中所述进行。

[0354] 此外,丙氨酸扫描可以通过包括以下步骤的规程进行:

[0355] i) 表达突变体人B7H4多肽,其中人B7H4的细胞外域中的氨基酸残基,除了半胱氨酸和丙氨酸,分别地由丙氨酸取代,并且相应的野生型B7H4多肽分别地在人胚胎肾细胞,例如HEK 293细胞中,从而为每个突变体或野生型B7H4提供包含40-60,000个细胞,诸如50,000个细胞的样品,

[0356] ii) 用20 μ L的所述抗体温育每个样品中的细胞,其中所述抗体由单个重链和单个轻链组成,该抗体例如经用于流式细胞术分析的合适标记物,诸如mNeogreen标记物标记,并在室温下温育1小时,然后用FACS缓冲液(例如磷酸盐缓冲盐水[PBS;Lonza,目录号BE17-517]+0.1% [w/v] BSA[Roche,目录号10735086001]+0.02% [w/v] 叠氮化钠[NaN₃;EMELCA Bioscience,目录号41920044-3)清洗,并将每个样品中的细胞重悬浮于30 μ L FACS缓冲液,

[0357] iii) 对于每个样品,测定每个细胞结合的抗体的平均量,作为所述样品中活的单细胞群的荧光强度(gMFI)的几何平均值,并使用以下等式将每个测试抗体的数据针对非交叉阻断B7H4特异性参考抗体的结合强度进行归一化:

$$[0358] \quad \text{归一化gMFI}_{aa\text{位置}} = \text{Log}_{10} \left(\frac{\text{gMFI}_{\text{测试Ab}}}{\text{gMFI}_{\text{对照Ab}}} \right)$$

[0359] 其中“aa位置”是指突变为丙氨酸的位置,

[0360] 其中根据以下计算计算倍数变化或Z-分数以表达抗体结合的损失或获得:

$$[0361] \quad \text{倍数变化} = \text{Log}_{10} \left(\frac{\text{归一化gMFI}_{\text{ala突变体}}}{\text{归一化gMFI}_{\text{wt}}} \right)$$

[0362] 其中在用丙氨酸替换氨基酸后,特定抗体没有结合损失或获得的氨基酸位置将给出结果“0”,并且结合的获得将导致“>0”和结合的损失将导致“<0”,并且其中,对于特定的测试抗体,其中结合倍数变化低于平均倍数变化的-1.5x SD,其中SD是从四个独立实验计算的倍数变化的标准偏差的仅B7H4氨基酸残基被认为是“结合突变体的损失”,并且其中,如果特定B7H4突变体的参考抗体的gMFI低于平均gMFI对照Ab的平均gMFI-2.5x SD,则从分析中排除数据。

[0363] 此外,此类抗体也可以是双特异性抗体,该双特异性抗体包含除能够与B7H4结合的抗原结合区之外的另一个抗原结合区。此类另一个抗原结合区可以是能够结合人CD3的抗原结合区。此类能够结合人CD3的抗原结合区可以是如本文所述和公开的能够结合CD3的抗原结合区。

[0364] 在进一步的实施方案中,在此类双特异性抗体中,所述能够结合人B7H4的抗原结合区包含在重链和轻链中,所述重链包含所述VH区和IgG1重链恒定区以及所述轻链包含所述VL区和κ轻链恒定区;并且其中所述能够结合人CD3的抗原结合区包含在重链和轻链中,所述重链包含所述VH区和IgG1重链恒定区以及所述轻链包含所述VL区和λ轻链恒定区。更优选地,在此类双特异性抗体中,一个IgG1重链恒定区如SEQ ID NO.60中所定义并且另一个如SEQ ID NO.61中所定义,并且其中所述κ轻链恒定区如SEQ ID NO.63中所定义并且所述λ轻链恒定区如SEQ ID NO.64中所定义。应理解,任选地,如SEQ ID NO.60和61中所定义的所述IgG1重链恒定区可以删除末端赖氨酸。

[0365] 根据本发明的高度优选的双特异性抗体如实施例部分所述和使用,并且被称为BsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR。

[0366] 因此,在优选的实施方案中,提供了能够结合人CD3和人B7H4的双特异性抗体,其包含:

[0367] -第一重链和第一轻链,其包含能够结合人CD3的结合区,其中所述第一重链包含如SEQ ID NO:17所定义的重链可变区和如本文所定义的人IgG1重链恒定区,并且其中所述第一轻链包含如SEQ ID NO:22所定义的轻链可变区和人λ轻链恒定区;和

[0368] -第二重链和第二轻链,其包含能够结合人B7H4的结合区,其中所述第二重链包含如SEQ ID NO:29所定义的重链可变区和如本文所定义的人IgG1重链恒定区,并且其中所述第二重链包含如SEQ ID NO:33定义的轻链可变区和人κ轻链恒定区。

[0369] 应理解,如本文所定义的人IgG1重链恒定区可以涵盖本文定义的取代(例如FEAR/FEAL)等。还应理解,人IgG1重链恒定区可以具有其末端赖氨酸(K)缺失。

[0370] 在进一步优选的实施方案中,提供了能够结合人CD3和人B7H4的双特异性抗体,其包含:

[0371] -第一重链和第一轻链,其包含能够结合人CD3的结合区,其中所述第一重链包含如SEQ ID NO:17所定义的重链可变区和如SEQ ID NO:60所定义的重链恒定区,并且其中所述第一轻链包含如SEQ ID NO:22所定义的轻链可变区和如SEQ ID NO:64所定义的轻链恒定区;和

[0372] -第二重链和第二轻链,其包含能够结合人B7H4的结合区,其中所述第二重链包含如SEQ ID NO:29所定义的重链可变区和如SEQ ID NO:61所定义的重链恒定区,并且其中所述第二轻链包含如SEQ ID NO:33所定义的轻链可变区和如SEQ ID NO:63所定义的轻链恒定区。

[0373] 同样,应理解人IgG1重链恒定区可以缺失其末端赖氨酸(K)。

[0374] 在又一个进一步优选的实施方案中,提供了能够结合人CD3和人B7H4的双特异性抗体,其包含:

[0375] -第一重链和第一轻链,其包含能够结合人CD3的结合区,其中所述第一重链由如SEQ ID NO:17所定义的重链可变区和如SEQ ID NO:60所定义的重链恒定区组成,并且其中所述第一轻链由如SEQ ID NO:22所定义的轻链可变区和如SEQ ID NO:64所定义的轻链恒定区组成;和

[0376] -第二重链和第二轻链,其包含能够与人B7H4结合的结合区,其中所述第二重链由如SEQ ID NO:29所定义的重链可变区和如SEQ ID NO:61所定义的重链恒定区组成,并且其中所述第二轻链由如SEQ ID NO:33所定义的轻链可变区和如SEQ ID NO:63所定义的轻链恒定区组成。

[0377] 在另一个进一步优选的实施方案中,提供了能够结合人CD3和人B7H4的双特异性抗体,其包含:

[0378] -第一重链和第一轻链,其包含能够结合人CD3的结合区,其中所述第一重链由如SEQ ID NO:17所定义的重链可变区和如SEQ ID NO:60所定义的重链恒定区组成,其中末端赖氨酸(K)缺失,并且其中所述第一轻链由如SEQ ID NO:22所定义的轻链可变区和如SEQ ID NO:64所定义的轻链恒定区组成;和

[0379] 第二重链和第二轻链,其包含能够与人B7H4结合的结合区,其中所述第二重链由如SEQ ID NO:29所定义的重链可变区和如SEQ ID NO:61所定义的重链恒定区组成,其中末端赖氨酸(K)缺失,并且其中所述第二轻链由如SEQ ID NO:33所定义的轻链可变区和如SEQ ID NO:63所定义的轻链恒定区组成。制备双特异性抗体的方法

[0380] 传统方法诸如杂交瘤和化学缀合方法(Marvin and Zhu(2005)Acta Pharmacol Sin 26:649)可以用于制备本发明的双特异性抗体。由不同的重链和轻链组成的两种抗体在宿主细胞中的共表达导致除期望的双特异性抗体之外可能的抗体产物的混合物,然后通过例如亲和层析或类似方法将其分离。

[0381] 也可以使用有利于在不同抗体构建体共表达时形成功能性双特异性产物的策略,例如Lindhofer等人(1995J Immunol 155:219)中描述的方法。由于优先的物种限制的重

链/轻链配对,产生不同抗体的大鼠和小鼠杂交瘤的融合导致数量有限的异二聚体蛋白。促进异二聚体形成优于同二聚体的另一种策略是“杵入臼”策略,其中在第一重链多肽上引入突起并在第二重链多肽中引入相应的空腔,使得突起可以是位于这两条重链界面的空腔中,以便促进异二聚体的形成并阻碍同二聚体的形成。通过用较大的侧链替换来自第一多肽界面的小氨基酸侧链来构建“突起”。通过用较小的氨基酸侧链替换大的氨基酸侧链,在第二多肽的界面中产生与突起相同或相似大小的补偿性“空腔”。(美国专利5,731,168)。EP1870459 (Chugai) 和W02009089004 (Amgen) 描述了在宿主细胞中共表达不同抗体域时有利于异二聚体形成的其他策略。在这些方法中,在两个CH3域中构成CH3-CH3界面的一个或多个残基被带电氨基酸替换,使得同二聚体的形成在静电上是不利的,而异二聚体在静电上是有利的。W02007110205 (Merck) 描述了又一种策略,其中利用IgA和IgG CH3域之间的差异来促进异源二聚化。

[0382] W02008119353 (Genmab) 中描述了另一种产生双特异性抗体的体外方法,其中在还原条件下温育后通过两个单特异性IgG4或IgG4样抗体之间的“Fab臂”或“半分子”交换(交换重链和连接的轻链)形成双特异性抗体。所得产物是具有可能包含不同序列的两个Fab臂的双特异性抗体。

[0383] 制备本发明的双特异性CD3xB7H4抗体的优选方法包括W02011131746和W013060867 (Genmab) 中描述的方法,其包括以下步骤:

[0384] a) 提供包含Fc区的第一抗体,所述Fc区包含第一CH3区;

[0385] b) 提供包含第二Fc区的第二抗体,所述Fc区包含第二CH3区,其中第一抗体是CD3抗体并且第二抗体是B7H4抗体,或反之亦然;

[0386] 其中所述第一和第二CH3区的序列不同并且是使得所述第一和第二CH3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一和第二CH3区的同二聚体相互作用中的每一个;

[0387] c) 在还原条件下将所述第一抗体与所述第二抗体一起温育;和

[0388] d) 获得所述双特异性CD3xB7H4抗体。

[0389] 在一个实施方案中,在足以允许铰链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将所述第一抗体与所述第二抗体一起温育,其中在所得异二聚体抗体中所述第一和第二抗体之间的异二聚体相互作用是使得在37°C下24小时后在0.5mM GSH下不发生Fab臂交换。

[0390] 不受理论的限制,在步骤c)中,亲本抗体的铰链区中的重链二硫键被还原,然后所得半胱氨酸能够与另一个亲本抗体分子(最初具有不同的特异性)的半胱氨酸残基形成重链间二硫键。在该方法的一个实施方案中,步骤c)中的还原条件包括添加还原剂,例如选自下组的还原剂:2-巯基乙胺(2-MEA)、二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)、谷胱甘肽、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、L-半胱氨酸和β-巯基-乙醇,优选选自下组的还原剂:2-巯基乙胺、二硫苏糖醇和三(2-羧乙基)膦。在进一步的实施方案中,步骤c)包括恢复条件以变为非还原性或较少还原性,例如通过去除还原剂,例如通过脱盐。

[0391] 对于该方法,可以使用本文所述的任何CD3和B7H4抗体。在特定的实施方案中,可以分别选择CD3和B7H4抗体以获得如本文所述的双特异性CD3xB7H4抗体。

[0392] 在该方法的一个实施方案中,所述第一和/或第二抗体是全长抗体。

[0393] 第一和第二抗体的Fc区可以是任何同种型,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3或

IgG4。在该方法的一个实施方案中,所述第一抗体和所述第二抗体两者的Fc区均是IgG1同种型。在另一个实施方案中,所述抗体的一个Fc区是IgG1同种型并且另一个是IgG4同种型。在后一个实施方案中,所得双特异性抗体包含IgG1的Fc区和IgG4的Fc区,并且可以因此具有关于激活效应物功能的令人感兴趣的中间特性。

[0394] 在进一步的实施方案中,抗体起始蛋白之一已被工程化改造以不结合蛋白A,因此允许通过将产物通过蛋白A柱将异二聚体蛋白与所述同二聚体起始蛋白分离。

[0395] 如上所述,同二聚体起始抗体的第一和第二CH3区的序列是不同的并且是使得所述第一和第二CH3区之间的异源二聚体作用强于所述第一和第二CH3区的同二聚体相互作用中的每一个。W02011131746和W02013060867 (Genmab) 中提供了关于这些相互作用以及如何实现它们的更多细节,在此通过引用整体并入。

[0396] 特别地,基于分别结合CD3和B7H4,并且在CH3区域中仅含有少数相当保守的不对称突变的两种同二聚体起始抗体,可以使用本发明的上述方法以高产率获得稳定的双特异性CD3xB7H4抗体。不对称突变是指所述第一和第二CH3区的序列在不同的位置含有氨基酸取代。

[0397] 本发明的双特异性抗体也可以通过在单个细胞中共表达编码第一和第二多肽的构建体来获得。

[0398] 因此,在另一方面,本发明涉及用于产生双特异性抗体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0399] a) 提供编码包含第一抗体重链的第一Fc区和第一抗体原结合区的第一多肽的第一核酸构建体,所述第一Fc区包含第一CH3区,

[0400] b) 提供编码包含第二抗体重链的第二Fc区和第二抗体原结合区的第二多肽的第二核酸构建体,所述第二Fc区包含第二CH3区,

[0401] 其中所述第一和第二CH3区的序列不同并且是使得所述第一和第二CH3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一和第二CH3区的同二聚体相互作用中的每一个,并且其中所述第一同二聚体蛋白质具有在位置409处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸,并且所述第二同二聚体蛋白质具有在选自下组的位置处的氨基酸取代:366、368、370、399、405和407,

[0402] 任选地其中所述第一和第二核酸构建体编码所述第一和第二抗体的轻链序列

[0403] c) 在宿主细胞中共表达所述第一和第二核酸构建体,和

[0404] d) 从细胞培养物中获得所述异二聚体蛋白质。

[0405] 因此,本发明还涉及重组真核或原核宿主细胞,其产生本发明的双特异性抗体。

[0406] 合适的表达载体,包括启动子、增强子等,以及用于产生抗体的合适的宿主细胞是本领域众所周知的。宿主细胞的实例包括酵母、细菌和哺乳动物细胞,诸如CHO或HEK细胞。

[0407] 在实施方案中,提供了根据本发明的产生能够结合B7H4和CD3两者的抗体的方法,其包括以下步骤:

[0408] a) 提供能够结合B7H4的抗体,所述抗体包含如本文所定义的能够结合B7H4的抗原结合区;

[0409] b) 提供能够结合CD3的抗体,所述抗体包含如本文所定义的能够结合CD3的抗原结合区;

[0410] c) 在足以允许铰链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将所述能够

结合B7H4的抗体与所述能够结合CD3的抗体一起温育,和

[0411] d) 获得所述能够结合B7H4和CD3的抗体。

[0412] 在此类方法中,提供能够结合B7H4和/或CD3的抗体的步骤可以包括以下步骤:

[0413] -提供含有用于产生一种或多种所述抗体的表达载体的细胞;和

[0414] -允许细胞产生一种或多种所述抗体,随后,

[0415] -获得一种或多种所述抗体,从而提供一种或多种所述抗体

[0416] 此外,本发明提供

[0417] a) 编码如本文所定义的能够结合B7H4的抗原结合区的重链序列的核酸序列,和/或

[0418] b) 编码能够结合B7H4的抗原结合区的相应轻链序列的核酸序列。此外,本发明提供一种或多种核酸,其包含:

[0419] a) 编码如本文所定义的能够结合B7H4的抗原结合区的重链序列的核酸序列,

[0420] b) 编码所述能够结合B7H4的抗原结合区的相应轻链序列的核酸序列,

[0421] c) 编码如本文所定义的能够结合CD3的抗原结合区的重链序列的核酸序列;和

[0422] d) 编码所述能够结合CD3的抗原结合区的相应轻链序列的核酸序列。

[0423] 如本文所定义的核酸或一种或多种核酸可以是RNA或DNA。如本文所定义的核酸或一种或多种核酸可以用于在哺乳动物细胞中的表达。因此,此外,本发明提供了一种或多种细胞,其包含核酸,或包含一种或多种核酸,如本文所定义的。

[0424] 本发明上下文中的核酸可以是表达载体,其可以是任何合适的载体,包括染色体、非染色体和合成核酸载体(包含合适的一组表达控制元件的核酸序列)。此类载体的实例包括SV40的衍生物、细菌质粒、噬菌体DNA、杆状病毒、酵母质粒、衍生自质粒和噬菌体DNA组合的载体以及病毒核酸(RNA或DNA)载体。在一个实施方案中,编码B7H4或CD3抗体的核酸包含在裸DNA或RNA载体中,包括例如线性表达元件(如在例如Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997) 中描述)、紧密核酸载体(如在例如US 6,077,835和/或WO 00/70087中描述)、质粒载体诸如pBR322、pUC19/18或pUC118/119、“midge”最小尺寸的核酸载体(如在例如Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001) 中描述),或作为沉淀的核酸载体构建体,诸如CaPO₄沉淀的构建体(如在例如WO200046147, Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., Cell 14, 725 (1978), 和Coraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981) 中描述)。此类核酸载体及其用途在本领域中是众所周知的(参见例如US 5,589,466和US 5,973,972)。

[0425] 在一个实施方案中,载体适合于在细菌细胞中表达B7H4抗体和/或CD3抗体。此类载体的实例包括表达载体,例如BlueScript (Stratagene)、pIN载体((Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)、pET载体(Novagen, Madison WI)等)。

[0426] 表达载体还可以或替代地是适合在酵母系统中表达的载体。可以使用任何适合在酵母系统中表达的载体。合适的载体包括,例如,包含组成型或诱导型启动子诸如 α 因子、醇氧化酶和PGH的载体(综述于:F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), 和Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987))。

[0427] 核酸和/或表达载体还可以包含编码分泌/定位序列的核酸序列,其可以将多肽诸

如新生多肽链靶向周质空间或进入细胞培养基。此类序列是本领域已知的,并且包括分泌前导肽或信号肽。核酸和/或表达载体可以包含促进表达的任何合适的元件,即核酸的转录和/或翻译使得(双特异性)抗体的组分得以表达。核酸和/或载体与任何合适的启动子、增强子和其他促进表达的元件结合。此类元件的实例包括强表达启动子(例如,人CMV IE启动子/增强子以及RSV、SV40、SL33、MMTV和HIV LTR启动子)、有效poly(A)终止序列、大肠杆菌中的质粒产物的复制起点、作为选择标志物的抗生素抗性基因,和/或方便的克隆位点(例如,多接头)。核酸还可以包含与组成型启动子相对的诱导型启动子,诸如CMV IE。

[0428] 在一个实施方案中,编码B7H4和/或CD3抗体的表达载体可以定位在细胞中和/或递送至细胞。因此,在另一方面,本发明涉及包含如本文所定义的核酸或载体的宿主细胞。该细胞可以是人来源的,诸如人胚肾(HEK)细胞,诸如HEK/Expi细胞,或者可以是啮齿动物来源的,诸如中国仓鼠卵巢细胞,诸如CHO/N50细胞。

[0429] 组合物和(医疗)用途

[0430] 此外,本发明提供了包含如本文定义的抗体的组合物。优选地,此类组合物是药物组合物,即抗体包含在药学上可接受的载体中。本发明的药物组合物可以含有本发明的双特异性抗体,其靶向B7H4和CD3两者。药物组合物还可以包含靶向B7H4的抗体。药物组合物还可以包含抗体的组合,包括根据本发明的靶向B7H4的抗体和/或双特异性抗体。

[0431] 药物组合物可以根据常规技术,诸如在Remington:The Science and Practice of Pharmacy,19th Edition,Gennaro,Ed.,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1995中公开的那些技术配制。本发明的药物组合物发明可以例如包括稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、去污剂(例如,非离子去污剂,例如Tween-20或Tween-80)、稳定剂(例如,糖或无蛋白质的氨基酸)、防腐剂、组织固定剂、增溶剂和/或适合包含在药物组合物中的其他材料。

[0432] 根据本发明的抗体、组合物或药物组合物优选用作药物。根据本发明的抗体、组合物或药物组合物优选用于治疗疾病。本发明的双特异性抗体可以用于多种目的。特别地,本发明的双特异性抗体可以用于治疗各种形式的癌症,包括转移性癌症和难治性癌症。优选地,癌症可以是实体瘤类型。

[0433] 特别地,根据本发明的双特异性抗体可以在其中期望对表达B7H4的细胞的特异性靶向和T细胞介导的杀伤的治疗环境中有用。

[0434] 在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗受试者癌症的方法,该方法包括施用治疗有效量的本发明的双特异性B7H4xCD3抗体。在进一步的实施方案中,本发明提供了用于在受试者中治疗涉及表达B7H4的细胞的病症的方法,该方法包括施用治疗有效量的本发明的双特异性抗体。

[0435] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于治疗受试者癌症的方法,该方法包括施用治疗有效量的本发明的能够结合人B7H4的抗体。在进一步的实施方案中,本发明提供了用于在受试者中治疗涉及表达B7H4的细胞的病症的方法,该方法包括施用治疗有效量的本发明的能够结合人B7H4的单特异性抗体。

[0436] 如所述,可以在根据本发明的方法和用途中考虑的合适疾病是癌症。所述癌症最优选地特征在于B7H4的表达。B7H4在癌症中的表达可以使用本领域已知的方法容易地测定,诸如PCR、免疫染色或FACS分析,即检测B7H4转录物和/或蛋白质的表达。如本文所述的能够结合人B7H4的抗体可以用于例如免疫染色和/或FACS分析等中。

[0437] 可以表达B7H4的癌症包括乳腺癌、子宫/子宫内膜癌、子宫癌肉瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(鳞状细胞癌和腺癌)、头颈部鳞状细胞癌、膀胱癌、食管癌、胆管癌、胰腺癌、胃癌、肾癌和前列腺癌。

[0438] 可以表达B7H4的癌症包括癌症诸如胃癌、胆管癌、膀胱癌、非小细胞肺癌(特别是鳞状NSCLC)、胰腺癌、宫颈癌、头颈癌、乳腺癌(包括三阴性乳腺癌)、卵巢癌和子宫癌。可能优选的癌症类型是选自子宫癌肉瘤(UCS)、膀胱尿路上皮癌(BLCA)、胰腺腺癌(PAAD)、肺鳞状细胞癌(LUSC)、乳腺侵入癌(BRCA)、子宫内膜癌(UCEC)、卵巢浆液性囊腺癌(OV)和胆管癌(CHOL)的癌症。

[0439] 在进一步的实施方案中,可以对被诊断患有癌症的患者进行癌细胞中B7H4表达的评估,并且当检测到可以在从低到高的范围内的B7H4时,可以选择此类患者用根据本发明的抗体进行治疗。被诊断患有胃癌、胆管癌、膀胱癌、非小细胞肺癌(特别是鳞状NSCLC)、胰腺癌、宫颈癌、头颈癌、乳腺癌(包括三阴性乳腺癌)、卵巢癌或子宫癌的患者可能接受此类测试。在进一步的实施方案中,被诊断患有子宫癌肉瘤(UCS)、膀胱尿路上皮癌(BLCA)、胰腺腺癌(PAAD)、肺鳞状细胞癌(LUSC)、乳腺侵入癌(BRCA)、子宫体子宫内膜癌(UCEC)、卵巢浆液性囊腺癌(OV)或胆管癌(CHOL)的患者可能接受此类测试。然而,在选择患者进行治疗时可能不一定需要包括此类评估。

[0440] 试剂盒

[0441] 本发明进一步提供了包含如上公开的抗体的试剂盒,诸如用作伴随诊断/用于在患者群体内鉴定那些具有响应于用如本文以上定义的抗体或如本文以上定义的免疫缀合物或抗体-药物缀合物(ADC)的治疗的倾向的患者,或用于预测所述抗体或免疫缀合物或ADC在用于治疗患者时的功效或抗肿瘤活性的试剂盒,该试剂盒包含如上定义的抗体;以及所述试剂盒的使用说明。

[0442] 试剂盒,诸如用作伴随诊断/用于在患者群体中鉴定那些具有对如权利要求1至55中任一项所定义的抗体的治疗的倾向的患者的试剂盒,其包含如权利要求1至55中任一项所定义的抗体;以及该试剂盒的使用说明。

[0443] 因此,在一方面,本发明涉及包含如本文定义的双特异性CD3xB7H4抗体或如本文定义的B7H4抗体的诊断组合物及其用途。

[0444] 在另一个方面,本发明涉及用于检测衍生自患者的样品中表达CD3和B7H4的细胞之间的交联的试剂盒,其包含

[0445] i) 如本文公开的实施方案中任一项的双特异性抗体;和

[0446] ii) 所述试剂盒的使用说明。

[0447] 在一个实施方案中,本发明提供了用于诊断癌症的试剂盒,其包括包含双特异性CD3xB7H4抗体的容器,以及用于检测B7H4表达细胞和CD3表达细胞的交联的一种或多种试剂。试剂可以包括例如荧光标签、酶标签或其他可检测标签。试剂还可以包括二级或三级抗体或用于酶促反应的试剂,其中该酶促反应产生可以可视化的产物。

[0448] 在另一方面,本发明涉及用于检测在施用根据本文公开的实施方案中的任一项的双特异性抗体后在衍生自患者的样品中是否发生表达CD3和B7H4的细胞之间的交联的方法,其包括以下步骤:

[0449] (i) 在允许所述双特异性抗体与表达CD3的细胞和表达B7H4的细胞之间形成复合

物的条件下,使样品与如本文所公开的实施方案中任一项的双特异性抗体接触;和

[0450] (ii) 分析是否已形成复合体。

[0451] 本发明通过以下实施例进一步说明,这些实施例不应被解释为限制本发明的范围。

[0452] 实施例1-B7H4抗体的生成和筛选材料

[0453] B7H4构建体的表达

[0454] 生成了编码各种全长B7H4变体的构建体:人(智人)B7H4(Uniprot登录号Q7Z7D3)、食蟹猴(食蟹猴)B7H4转录物1(Uniprot登录号A0A2K5U6P5)、犬(家犬)B7H4(Uniprot登录号F1P8R9)、兔(穴兔)B7H4(Uniprot登录号G1TQE8)、大鼠(褐家鼠)B7H4(Uniprot登录号Q501W4)、小鼠(小家鼠)B7H4(Uniprot登录号Q7TSP5)和猪(欧亚野猪)B7H4(Uniprot登录号F1SAY4)(见表1)。

[0455] 此外,生成了细胞外域(人B7H4的ECD(来自Uniprot登录号Q7Z7D3的aa 25-259)与具有C端His标签和C标签的人IgG1 Fc域融合的构建体(B7H4ECD-FcHisC)(SEQ ID NO:12)。在SEQ ID NO:1中,氨基酸残基1-24是信号肽;因此成熟的B7H4ECD-FcHisC蛋白对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基25-259。

[0456] 构建体含有用于克隆的合适限制性位点和最佳Kozak(GCCGCCACC)序列(Kozak, M., Gene 1999;234(2):187-208)。B7H4构建体的全长和ECD被克隆到pSB中,pSB是哺乳动物表达载体,含有睡美人(Sleeping Beauty)反向末端重复,其在由CMV启动子和HSV-TK polyA信号组成的表达盒侧翼。

[0457] 瞬时表达全长B7H4变体的HEK-293F细胞系的生成

[0458] Freestyle™ 293-F(HEK-293亚克隆,适于悬浮生长和化学成分确定的Freestyle培养基[HEK-293F])细胞获得自Invitrogen(目录号R790-07),并根据制造商的说明使用293fectin(Invitrogen,目录号12347-019)用上述构建体进行转染。

[0459] 带His标签的B7H4的纯化

[0460] 基本上如制造商所述,使用Expi293F表达平台(Thermo Fisher Scientific, Waltham,MA,USA,目录号A14527)表达B7H4ECD-FcHisC。

[0461] His标签使得能够用固定化金属亲和层析Ni-NTA进行纯化。带His标签的蛋白质与柱材料强烈结合,而与带His标签的蛋白质相比,培养物上清液中存在的其他蛋白质不结合或较弱结合,并在流出液中洗脱。清洗柱以去除弱结合的蛋白质。然后用含有咪唑的缓冲液洗脱强烈结合的带His标签的蛋白质,该缓冲液竞争His对Ni²⁺的结合。通过在脱盐柱上进行缓冲液交换除去洗脱液。

[0462] 免疫接种

[0463] 如下使OmniRat®动物(表达具有完全人独特型的多样化抗体库的转基因大鼠;Ligand Pharmaceuticals Inc.,San Diego,USA)免疫:在双后肢的跗关节中皮下注射(每周两次持续7周)在PBS中与等体积佐剂(Sigma佐剂系统(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO,USA,目录号S6322)或CFA,完全弗氏佐剂(第一次注射)和IFA,不完全弗氏佐剂(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO,USA,目录号F5881/F5506)(后续注射))混合的50μg B7H4ECD-FcHisC,然后是在不含佐剂的PBS中的抗原的最后加强s.c.注射。

[0464] 抗体生成

[0465] 在最后加强后3天,根据标准规程将来自免疫动物的淋巴结细胞与小鼠骨髓瘤SP2.0细胞融合。从产生B7H4特异性抗体的杂交瘤中提取RNA,并根据制造商的说明,使用SMART RACE cDNA扩增试剂盒(Clontech)从100ng总RNA中制备5'-RACE互补DNA(cDNA)。VH和VL编码区通过PCR扩增,并通过连接非依赖性克隆(Aslanidis,C.and P.J.de Jong, Nucleic Acids Res1990;18(20):6069-74)以符合读码框的方式直接克隆到p33G1f、p33Kappa和p33Lambda表达载体(基于pcDNA3.3的载体,分别具有密码子优化的人IgG1m(f)、Kappa和Lambda恒定域)。对来自这些表达载体的可变域进行测序并根据IMGT定义注释CDR(Lefranc MP.et al.,Nucleic Acids Research,27,209-212,1999和Brochet X.Nucl.Acids Res.36,W503-508(2008))。表达具有正确开放阅读框(ORF)的克隆并测试其与抗原的结合。进行抗原特异性筛选测定法后,将重链和轻链可变区序列基因合成并克隆到表达载体中,该表达载体包括含有以下氨基酸突变的人IgG1重链:L234F、L235E、D265A和K409R(FEAR),其中氨基酸位置编号是根据Eu编号(对应于SEQ ID NO 60),并克隆到包括人 κ 或 λ 轻链的表达载体中。对于抗体中的一些,生成了在可变域中具有点突变的变体以去除半胱氨酸残基,这潜在可以生成不期望的二硫键形成,或将天冬酰胺替换为丝氨酸或种系残基以去除潜在的N连接糖基化位点。例如,从C1重链和轻链可变区序列,制备具有N52S取代的变体,对应于CDR2中的取代(参见表1,SEQ ID NO.25和29),并且另外的变体可以具有N52Q取代(SEQ ID NO.31)。

[0466] 抗原特异性筛选测定法

[0467] 在同质结合测定法中确定免疫动物血清或杂交瘤和转染瘤培养物上清液中B7H4抗体的存在。分析样品中抗体与用为了表达全长B7H4变体而制备的构建体瞬时转染的表达人B7H4、食蟹猴B7H4或鼠B7H4的HEK-293F细胞或HEK-293F野生型细胞(阴性对照)的结合。将样品添加到细胞中以允许抗体与B7H4结合。随后,使用合适的荧光缀合物(AffiniPure山羊抗大鼠IgG(H+L)Alexa Fluor® 647;Jackson ImmunoResearch,目录号112-605-143;AffiniPure山羊抗人IgG Fc gamma-Alexa Fluor® 647;Jackson ImmunoResearch,目录号109-605-098)检测抗体结合。取决于抗体的主链,将细胞(2.5×10^5 个细胞/ml)与山羊抗人AffiniPure山羊抗人IgG Fc gamma-Alexa Fluor® 647(0.2 μ g/ml;Jackson ImmunoResearch Laboratories,109-605-098)或AffiniPure山羊抗大鼠IgG(H+L)Alexa Fluor® 647(0.2 μ g/ml;Jackson ImmunoResearch,112-605-143)混合。制备测试和对照抗体的连续稀释物(范围为0.003至3 μ g/mL,2倍稀释步骤),并将2 μ l抗体稀释物添加到1536孔板(Greiner,目录号789866)中的5 μ l细胞/缀合物混合物中。将板在室温下温育9小时,然后使用ImageXpress Velos激光扫描细胞仪(Molecular Devices,LLC,Sunnyvale,CA,USA)测定荧光强度,并使用总荧光作为读数。当计数高于50并且计数x荧光比阴性对照高至少3倍时,样品被视为阳性。

[0468] 来自B7H4抗体组生成的结果

[0469] 从产生的193个杂交瘤中的176个中,成功地获得了重链和轻链可变区序列。在测试的351种重链/轻链组合中,98种在使用如上所述的人B7H4转染的HEK-293F细胞的抗原筛选测定法中显示出结合。选择了35种抗体:26种具有原始序列,并且9种变体具有在可变域中引入的点突变。抗体作为单价结合抗体(作为CD3双特异性)和二价结合抗体(作为IgG1分子)产生,并如下所述测试与肿瘤细胞的结合。在来自所生成的组的抗体中,仅抗体B7H4-C1

及其变体B7H4-C1-N52S,其中相应的VH和VL抗体可变域编码序列列于表1中,提供了与肿瘤细胞结合的抗体,如下所述。

[0470] 另外的B7H4抗体

[0471] 在实施例中,使用了另外的对B7H4具有特异性的抗体,其含有先前在W02014159835中描述的可变域(在其中引用为SEQ ID NO 38和35),在本文中对应于B7H4-C2,可变域的相关序列在本文中列于表1中并且包括SEQ ID NO.43和47;W02014159835(在其中引用为SEQ ID NO 56和55),在本文中对应于B7H4-C3,可变域的相关序列在本文中列于表1中并且包括SEQ ID NO.36和40;W02009073533(在其中引用为SEQ ID NO 2和7),在本文中对应于B7H4-C4,可变域的相关序列在本文中列于表1中并且包括SEQ ID NO.50和54;和US20190085080A1,在本文中对应于B7H4-C5并且可变域的相关序列在本文中列于表1中并且包括SEQ ID NO.65和69。合成相应的VH和VL抗体可变域编码序列并克隆到具有密码子优化的人IgG1m(f)和Kappa或Lambda恒定域或其变体的基于pcDNA3.3的载体中,以产生单特异性和双特异性抗体。当提及抗体IgG1-B7H4-CX-FEAL时,这表示抗体具有B7H4-CX可变区,属于IgG1同种型,并且在重链的恒定区具有氨基酸取代L234F、L235E、D265A和F409R。

[0472] IgG1-b12抗体

[0473] 抗体b12,一种HIV-1gp120特异性抗体(Barbas,CF.J Mol Biol.1993Apr5;230(3):812-23)在一些实施例中用作阴性对照IgG1,或用作双特异性对照的非结合对照Fab臂。合成该对照抗体的密码子优化的抗体编码序列并克隆到基于pcDNA3.3的载体中,该载体具有密码子优化的人IgG1m(f)和Kappa恒定域或其变体。可变重链(VH)区的序列和可变轻链(VL)区的序列分别作为SEQ ID NO:14和15包括在本文中。

[0474] 实施例2-用于生成CD3xB7H4双特异性抗体的人源化CD3抗体

[0475] W02015/001085的实施例1中描述了人源化抗体IgG1-huCD3-H1L1(其可变重链和轻链区序列在本文中列于SEQ ID NO:16和22)的生成。IgG1-huCD3-H1L1在本文中称为“IgG1-huCD3”。抗体IgG1-huCD3-H1L1-FEAL是其在Fc域中具有三个氨基酸取代(L234F、L235E、D265A)的变体,此外还有允许通过受控的Fab臂交换生成双特异性抗体的氨基酸取代(F405L),如下文所述。已经表明,此类突变对引入它们的抗体的靶物结合没有影响(参见例如US 2015/0337049和Engelberts et al.,2020,EBioMedicine 52:102625)。

[0476] W02017/009442的实施例2描述了人源化抗体IgG1-huCD3-H1L1-H101G(其可变重链和轻链区序列在本文中列为SEQ ID NO:17和22)的生成。IgG1-huCD3-H1L1-H101G可被称为“IgG1-huCD3-H101G”。该变体包含在可变重链区序列中的取代H101G(比较SEQ ID NO.16和17),并且具有与IgG1-huCD3-H1L1相同的轻链。抗体IgG1-huCD3-H101G-FEAL是其具有氨基酸取代L234F、L235E、D265A和F405L的变体。

[0477] 实施例3-使用生物层干涉测量法的B7H4结合亲和力测定

[0478] B7H4抗体的靶物结合亲和力通过Octet HTX仪器(FortéBio)上的无标记物的生物层干涉测量法(BLI)确定。实验是在30℃下以1,000RPM摇动进行的。最初,使用BLI测定IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR、IgG1-B7H4-C2-FEAR、IgG1-B7H4-C3-FEAR和IgG1-B7H4-C4-FEAR对人和小鼠B7H4的亲和力。抗人IgG Fc捕捉(AHC)生物传感器(FortéBio,目录号18-5060)通过暴露于10mM甘氨酸(Sigma-Aldrich,目录号15527)缓冲液pH 1.7持续5s,然后通过样品稀释剂(FortéBio,目录号18-1048)中进行中和和5s进行预处理;这两个步骤重复2次。接

下来,用抗体(样品稀释剂中为 $1\mu\text{g}/\text{mL}$)加载AHC传感器600s。在样品稀释剂中进行基线测量(100s)后,用在样品稀释剂中的两倍稀释步骤,对于人和小鼠B7H4分别使用 $1.56\text{-}100\text{nM}$ ($0.04\text{-}2.68\mu\text{g}/\text{mL}$)和 $5.9\text{-}375\text{nM}$ ($0.16\text{-}10\mu\text{g}/\text{mL}$)的浓度范围,测定人B7H4(Sino Biological,目录号10738-H08H-100)或小鼠B7H4(R&D Systems,目录号2154-B7-050)的缔合(300s)和解离(1,000s)。人B7H4和小鼠B7H4(作为ECD-带His标签分子)的基于其氨基酸序列的理论分子量(分别为 26.8kDa 和 26.6kDa)用于计算。对于每种抗体,使用了参考传感器,它与样品稀释剂而不是抗原一起温育。AHC传感器通过暴露于 10mM 甘氨酸缓冲液pH 1.7持续5s,然后在样品稀释剂中进行中和5s再生;这两个步骤重复两次。随后再次用抗体加载传感器用于下一轮动力学测量。

[0479] 使用数据采集软件v9.0.0.49d(FortéBio)采集数据,并使用数据分析软件v9.0.0.12(FortéBio)进行分析。通过减去参考传感器来校正每个抗体的数据迹线。Y轴与基线的最后10s对齐,应用了对解离的Interstep Correction对齐和Savitzky-Golay过滤。具有响应 $<0.05\text{nm}$ 的数据迹线被排除在分析之外。使用缔合和解离时间分别设置为300s和200s的感兴趣的窗口,用1:1全局全拟合模型对数据进行拟合。

[0480] 在第二项实验中,使用BLI测定IgG1-B7H4-C1-N52S- FEAR、IgG1-B7H4-C2- FEAR、IgG1-B7H4-C3- FEAR、IgG1-B7H4-C4- FEAR和IgG1-B7H4-C5- FEAR对人和小鼠B7H4的亲合力。实验如上所述进行,但有一些小例外。预条件化步骤重复5次。用在样品稀释剂中的两倍稀释步骤,使用 $0.78\text{-}800\text{nM}$ 的浓度范围测定人或小鼠B7H4的缔合(200s)和解离(1,000s)。使用数据采集软件v12.0.1.8(FortéBio)采集数据,并使用数据分析软件v12.0.1.2(FortéBio)进行分析。除使用了1,000s的解离时间的IgG1-B7H4-C2- FEAR外,使用200s缔合时间的感兴趣窗口和200s解离时间的感兴趣窗口,用1:1全局全拟合模型对数据进行拟合。基于 R^2 值、曲线的视觉检查和解离步骤期间至少5%的信号衰减选择解离时间。对于具有低于 50nM 的亲合力的抗体,用高于 100nM 的抗原浓度生成的数据迹线被排除在分析之外。

[0481] 此外,通过BLI测定对食蟹猴B7H4的亲合力。在第一项实验中,测定了bsIgG1-huCD3- FEALxB7H4-C1- FEAR、bsIgG1-huCD3- FEALxB7H4-C1- N52S- FEAR、bsIgG1-huCD3- FEALxB7H4-C2- FEAR、bsIgG1-huCD3- FEALxB7H4-C3- FEAR和bsIgG1-huCD3- H101G- FEALxB7H4-C4- FEAR对食蟹猴B7H4的亲合力。通过与 20mM EDC(N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐)(FortéBio,目录号18-1033)和 10mM s-NHS(N-羟基磺基琥珀酰亚胺钠盐)(FortéBio,目录号18-1067)反应活化胺反应性第二代(AR2G)生物传感器(FortéBio,目录号18-5092)300s。活化的传感器用 10mM 醋酸钠pH 4.0(FortéBio,目录号18-1068)中的 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 重组带hIgG1 Fc标签的食蟹猴B7H4(Creative BioMart,目录号VTCN1-1517R)加载600s并用 1M 乙醇胺pH 8.5(FortéBio,目录号18-1071)淬灭300s。在样品稀释剂(300s;FortéBio,目录号18-1048)中进行基线测量后,用在样品稀释剂中的两倍稀释步骤使用 $0.23\text{-}15\mu\text{g}/\text{mL}$ ($1.56\text{-}100\text{nM}$)的浓度范围测定CD3xB7H4双特异性抗体对功能性单价B7H4结合的缔合(100s)和解离(1,000s)(如表8所示)。使用分子量为 150kDa 的抗体进行计算。对于每种抗体,使用了参考传感器,它与样品稀释剂而不是抗体一起温育。

[0482] 使用数据采集软件v9.0.0.49d(FortéBio)采集数据,并使用数据分析软件v9.0.0.12(FortéBio)进行分析。通过减去参考传感器来校正每个抗体的数据迹线。Y轴与基线的最后10s对齐,应用了对解离的Interstep Correction对齐和Savitzky-Golay过滤。

具有响应 $<0.05\text{nm}$ 的数据迹线被排除在分析之外。使用缔合和解离时间分别设置为100s和200s的感兴趣的窗口,用1:1全局全拟合模型对数据进行拟合。

[0483] 在测定B7H4抗体对食蟹猴B7H4的亲力的第二项实验中,测定了bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR的亲力。实验如上所述进行,但有一些小例外。在样品稀释剂中进行600s的基线测量后,用在样品稀释剂中的两倍稀释步骤,使用大约 $0.1-116\mu\text{g/mL}$ ($0.78-800\text{nM}$) 的浓度范围测定CD3xB7H4双特异性抗体(如表9所示)对功能性单价B7H4结合的缔合(200s)和解离(1,000s)。每种抗体的特定分子量(约145kDa)用于计算。使用数据采集软件v12 (FortéBio) 采集数据,并使用数据分析软件v12 (FortéBio) 进行分析。具有响应 $<0.03\text{nm}$ 的数据迹线被排除在分析之外。使用200s的缔合时间和解离时间的感兴趣窗口,用1:1全局全拟合模型对数据进行拟合。基于 R^2 值、曲线的视觉检查和解离步骤期间至少5%的信号衰减选择解离时间。对于具有低于50nM的亲力的抗体,用高于200nM的抗体浓度生成的数据迹线被排除在分析之外。所有结果均以至少0.98的 R^2 测定。

[0484] “ K_D ” (M) 是指抗体-抗原相互作用的平衡解离常数,并由 k_d 除以 k_a 获得。“ k_d ” (sec^{-1}) 是指抗体-抗原相互作用的解离速率常数。这有时也称为 k_{off} 值或解离率。“ k_a ” ($\text{M}^{-1}\times\text{sec}^{-1}$) 是指抗体-抗原相互作用的缔合速率常数。这有时也称为 k_{on} 值或缔合率。

[0485] 表4和5显示了第一项和第二项实验的结果,其中针对人B7H4的指示抗体的缔合速率常数 k_a (1/Ms)、解离速率常数 k_d (1/s) 和平衡解离常数 K_D (M) 由生物层干涉测量法测定。

[0486] 表4. 抗体与人B7H4细胞外域的结合亲和力,如通过无标记物的生物层干涉测量法测定的。ND=未测定。

抗体	缔合率 k_a (1/Ms)	解离率 k_d (1/s)	K_D (M)
IgG1-B7H4-C1-FEAR	ND	ND	ND
[0487] IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	9.4E+04	5.4E-03	5.7E-08
IgG1-B7H4-C2-FEAR	5.2E+04	8.8E-04	1.7E-08
IgG1-B7H4-C3-FEAR	9.9E+04	4.1E-03	4.2E-08
IgG1-B7H4-C4-FEAR	1.5E+05	1.6E-03	1.1E-08

[0488] 表5. 抗体与人B7H4细胞外域的结合亲和力,如通过无标记物的生物层干涉测量法测定的。

抗体	缔合率	解离率	K_D (M)
[0489]			

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	
[0490] IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR ¹	8.4E+04	4.7E-03	5.7E-08
IgG1-B7H4-C2-FEAR	5.9E+04	1.7E-04	3.0E-09
IgG1-B7H4-C3-FEAR	8.1E+04	4.4E-03	5.4E-08
IgG1-B7H4-C4-FEAR	2.2E+05	1.7E-03	7.9E-09
IgG1-B7H4-C5-FEAR	2.5E+05	2.5E-03	9.9E-09

[0491] ¹显示的是n=3次实验的平均结果。

[0492] 表6和7显示了两次实验的结果,其中针对小鼠B7H4的指示抗体的 k_a (1/Ms)、 k_d (1/s)和 K_D (M)通过生物层干涉测量法测定。

[0493] 表6. 抗体与小鼠B7H4细胞外域的结合亲和力,如通过无标记物的生物层干涉测量法测定的。ND=未测定;- =无结合(在使用的最高浓度下响应<0.05nm)。

抗体	缔合率 k_a (1/Ms)	解离率 k_d (1/s)	K_D (M)
[0494] IgG1-B7H4-C1-FEAR	ND	ND	ND
IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	-	-	-
IgG1-B7H4-C2-FEAR	3.3E+04	7.7E-04	2.4E-08
IgG1-B7H4-C3-FEAR	5.1E+04	2.0E-02	3.9E-07
IgG1-B7H4-C4-FEAR	8.4E+04	1.4E-03	1.6E-08

[0495] 表7. 抗体与小鼠B7H4细胞外域的结合亲和力,如通过无标记物的生物层干涉测量法测定的。-=无结合(在使用的最高浓度下响应<0.05nm)。

抗体	缔合率 k_a (1/Ms)	解离率 k_d (1/s)	K_D (M)
[0496] IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	-	-	-
IgG1-B7H4-C2-FEAR	6.3E+04	1.3E-04	2.1E-09
IgG1-B7H4-C3-FEAR	5.9E+04	1.8E-02	3.0E-07

[0497]	IgG1-B7H4-C4-FEAR	1.4E+05	1.4E-03	9.7E-09
	IgG1-B7H4-C5-FEAR	1.7E+05	2.4E-03	1.4E-08

[0498] 表8和表9显示了两次实验的结果,其中针对食蟹猴B7H4的指示抗体的 k_a (1/Ms)、 k_d (1/s)和 K_D (M)通过生物层干涉测量法测定。

[0499] 表8.功能性单价抗体与食蟹猴B7H4细胞外域的结合亲和力,如通过无标记物的生物层干涉测量法测定的。

抗体	缔合率	解离率	K_D (M)
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	
bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-FEAR	2.7E+05	1.4E-03	5.1E-09
bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR	1.4E+05	3.0E-03	2.1E-08
bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR	1.3E+05	4.1E-04	3.1E-09
bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C3-FEAR	2.8E+05	4.1E-03	1.5E-08
bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR	3.5E+05	1.5E-03	4.2E-09

[0501] 表9.功能性单价抗体与食蟹猴B7H4细胞外域的结合亲和力,如通过无标记物的生物层干涉测量法测定的。

抗体	R^2	缔合率	解离率	K_D (M)
		k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	
bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR ^a	0.99	1.2E+05	2.7E-03	2.5E-08
bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR ^b	0.97	4.2E+05	2.5E-03	6.0E-09

[0503] ^a显示的是n=3次实验的平均结果。

[0504] ^b不符合0.98的严格质量控制 R^2 阈值。

[0505] 实施例4-使用生物层干涉测量法测定CD3结合亲和力

[0506] 如W02017/009442的实施例7中所述,测定IgG1-huCD3-FEAL和IgG1-huCD3-H101G-FEAL的结合亲和力。

[0507] 简而言之,使用ForteBio Octet HTX (ForteBio)上的生物层干涉测量法测定IgG1-huCD3-FEAL形式的选定CD3抗体与重组可溶性CD3 ϵ (CD3E27-GSKa) (SEQ ID NO:13的

成熟蛋白)的结合亲和力。将抗人Fc捕捉生物传感器(ForteBio,目录号18-5060)加载hlgG(1 μ g/mL)达600s。基线测量(200s)后,以三倍稀释步骤,使用27.11 μ g/mL-0.04 μ g/mL(1000nM-1.4nM)的CD3E27-GSKa浓度范围(样品稀释物,ForteBio,目录号18-5028)测定CD3E27-GSKa的缔合(1000s)和解离(2000s)。为了进行计算,使用基于氨基酸序列的CD3E27-GSKa的理论分子量,即27.11kDa。在30 $^{\circ}$ C以1000rpm摇动的情况下进行实验。在至少两个独立的实验中测试了每种抗体。使用ForteBio数据分析软件v8.1,使用1:1模型和具有1000s缔合时间和100s解离时间的全局全拟合分析数据。通过减去参考曲线(生物传感器上的抗体,仅使用样品稀释剂进行测量)校正数据迹线,将Y轴与基线的最后10s对齐,并应用步骤间校正以及Savitzky-Golay过滤。具有响应 <0.05 nm的数据迹线从分析中排除。

[0508] 表10显示了通过生物层干涉测量法测定的重组CD3 ϵ 的缔合速率常数 k_a (1/Ms)、解离速率常数 k_d (1/s)和平衡解离常数 K_D (M)。与IgG1-huCD3-H101G-FEAL(K_D :683nM)相比,IgG1-huCD3-FEAL对重组CD3 ϵ 显示相对高的结合亲和力(K_D :15nM)。

[0509] 表10:单特异性二价CD3抗体与重组CD3 ϵ 的结合亲和力,如通过无标记物的生物层干涉测量法测定的

抗体	缔合率 k_a (1/Ms)	解离率 k_d (1/s)	K_D (nM)
[0510] IgG1-huCD3-FEAL	2.7E+05	4.0E-03	15
IgG1-huCD3-H101G-FEAL	3.0E+04	2.0E-02	683

[0511] 实施例5-通过生物层干涉测量法测定的B7H4抗体的交叉阻断

[0512] 通过BLI在Octet HTX仪器(ForteBio)上进行经典夹心格式的抗体交叉阻断分析(表位框并)。在以1,000RPM摇动的情况下并且在30 $^{\circ}$ C用IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR、IgG1-B7H4-C2-FEAR、IgG1-B7H4-C3-FEAR和IgG1-B7H4-C4-FEAR进行第一次交叉阻断实验。

[0513] 用20mM EDC(N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐)(Sigma-Aldrich,目录号03449)和10mM s-NHS(N-羟基磺基琥珀酰亚胺钠盐)(Sigma-Aldrich,目录号56485)的溶液活化胺反应性第二代(AR2G)生物传感器(ForteBio,目录号18-5092)300s。活化的AR2G传感器用在10mM醋酸钠pH6.0(ForteBio,目录号18-1070)中的20 μ g/mL第一抗体加载600s,并用1M乙醇胺pH 8.5(ForteBio目录号18-1071)淬灭300s。在样品稀释剂(50s;ForteBio,目录号18-1048)中进行基线测量后,用人B7H4(在样品稀释剂中稀释的100nM或2.68 μ g/mL;Sino Biological,目录号10738-H08H)加载含有固定化抗体的AR2G生物传感器300s。基于氨基酸序列的人B7H4的理论分子量(26.8k Da)用于计算。测定了第二抗体(样品稀释剂中的10 μ g/mL)的缔合(300s)。传感器通过暴露于10mM甘氨酸(Riedel-deHaën,目录号15527)缓冲液pH 2.5持续5s,然后在样品稀释剂中中和5s进行再生;这两个步骤重复两次。随后再次使用含有固定化第一抗体的传感器,从基线步骤开始。

[0514] 使用数据采集软件v9.0.0.49d(ForteBio)采集数据,并使用数据分析HT软件v10.0.17(ForteBio)进行分析。通过减去参考曲线(样品稀释剂而不是第二抗体)来校正数据迹线,以校正B7H4从固定化第一抗体的解离。Y轴与缔合步骤的开始对齐,并应用了

Savitzky-Golay过滤。以矩阵格式绘制第二抗体的校正缔合响应。一般来说， $>0.05\text{nm}$ 的响应被认为是非交叉阻断抗体，而 $<0.05\text{nm}$ 的响应被认为是阻断抗体对。

[0515] 重复交叉阻断实验以也包括IgG1-B7H4-C5-FEAR，并按上述进行，稍作修改。在以1,000RPM摇动的情况下并且在22℃下进行该实验。使用数据采集软件v12.0.1.8 (ForteBio) 采集数据，并使用数据分析HT软件v12.0.1.55 (ForteBio) 进行分析。一般来说， $>0.1\text{nm}$ 的响应被认为是非交叉阻断抗体，而 $<0.1\text{nm}$ 的响应被认为是阻断抗体对。

[0516] 对抗体IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR、IgG1-B7H4-C3-FEAR、IgG1-B7H4-C4-FEAR和IgG1-B7H4-C2-FEAR进行了初始交叉阻断实验。结果汇总在表11中。进行了第二组交叉阻断实验以也包括IgG1-B7H4-C5-FEAR。这些结果汇总在表12中。第一列显示固定化抗体；第一行显示溶液中的抗体（上面称为“第二抗体”）。显示了溶液中抗体的校正缔合响应。抗体的交叉阻断由深灰色表示，并且非阻断抗体组合未标记（透明背景），表明IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR、IgG1-B7H4-C3-FEAR和IgG1-B7H4-C5-FEAR相互交叉阻断，而不与IgG1-B7H4-C4-FEAR和IgG1-B7H4-C2-FEAR交叉阻断，且反之亦然。

[0517] 表11：使用生物层干涉测量法的第一抗体交叉阻断实验。

[0518] 第一列显示固定化抗体并且第一行显示溶液中的抗体。显示了溶液中抗体的校正缔合响应。抗体的交叉阻断由深灰色表示，非阻断抗体组合未标记（透明背景）。

[0519]

抗体交叉阻断	IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	IgG1-B7H4-C3-FEAR	IgG1-B7H4-C4-FEAR	IgG1-B7H4-C2-FEAR
IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	-0.01	0.00	0.80	0.56
IgG1-B7H4-C3-FEAR	-0.02	-0.01	0.97	0.53
IgG1-B7H4-C4-FEAR	0.82	0.56	-0.02	-0.01
IgG1-B7H4-C2-FEAR	0.74	0.54	0.00	0.00

[0520] 表12：使用生物层干涉测量法的第二抗体交叉阻断实验。

[0521] 第一列显示固定化抗体并且第一行显示溶液中的抗体。显示了溶液中抗体的校正缔合响应。抗体的交叉阻断由深灰色表示，非阻断抗体组合未标记（透明背景）。

抗体交叉阻断	IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	IgG1-B7H4-C3-FEAR	IgG1-B7H4-C2-FEAR	IgG1-B7H4-C4-FEAR	IgG1-B7H4-C5-FEAR
IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	0	0.01	0.38	0.42	0.43
IgG1-B7H4-C3-FEAR	0.01	0	0.44	0.57	0.61
IgG1-B7H4-C2-FEAR	0.28	0.25	0.01	0.01	0.02
IgG1-B7H4-C4-FEAR	0.5	0.39	0	-0.01	0
IgG1-B7H4-C5-FEAR	0.67	0.57	-0.03	-0.03	-0.01

[0523] 实施例6-通过2-MEA诱导的Fab臂交换生成双特异性抗体

[0524] 如W02011147986、W02011131746和W02013060867 (Genmab) 和Labrijn等人 (Labrijn et al., PNAS 2013, 110:5145-50; Gramer et al., MAbs 2013, 5:962-973) 所述, 使用DuoBody[®]平台技术, 即2-MEA诱导的Fab-臂交换, 在体外产生双特异性抗体。为了使得能够通过这种方法产生双特异性抗体, 生成了在CH3域中携带特定的点突变的IgG1分子: 在一个亲本IgG1抗体中为F405L突变 (即本申请中的CD3抗体), 在另一个亲本IgG1抗体中为K409R突变 (即本申请中的B7H4或对照, HIV-1gp120特异性抗体)。除这些突变外, 亲本IgG1抗体包含取代L234F、L235E、D265A (FEA)。

[0525] 为了生成双特异性抗体, 将两种亲本抗体以等质量的量在PBS缓冲液 (磷酸盐缓冲液; 8.7mM HPO_4^{2-} , 1.8mM H_2PO_4^- , 163.9mM Na^+ , 140.3mM Cl^- , pH 7.4) 中混合。加入2-巯基乙胺-HCl (2-MEA) 至终浓度75mM, 并将反应混合物在31°C温育5小时。根据制造商的方案, 使用10kDa分子量截留的Slide-A-Lyzer滑架 (carriages) (Thermo Fisher Scientific), 通过透析到PBS缓冲液中去除2-MEA, 以允许链间二硫键的再氧化和完整的双特异性抗体的形成。

[0526] 在实施例中使用了以下抗体:

[0527] B7H4抗体

[0528] IgG1-B7H4-C1-FEAR (具有SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:33中所列的VH和VL序列)。

[0529] IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR (具有SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:33中所列的VH和VL序列)。

[0530] IgG1-B7H4-C2-FEAR, 具有SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:47中所列的VH和VL序列。

[0531] IgG1-B7H4-C3-FEAR, 具有SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:40中所列的VH和VL序列。

[0532] IgG1-B7H4-C4-FEAR, 具有SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:54中所列的VH和VL序列。

[0533] IgG1-B7H4-C5-FEAR, 具有SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:69中所列的VH和VL序列。

[0534] 注释IgG1表明制备了IgG1同种型的全长抗体, 并且FEAR注释表明重链恒定区包含氨基酸取代L234F、L235E、D265A和K409R, 并且轻链恒定区是κ型 (SEQ ID NO.61和63)。

- [0535] CD3抗体
- [0536] IgG1-huCD3-FEAL(具有SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:22中所列的VH和VL序列)。
- [0537] IgG1-huCD3-H101G-FEAL(具有SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:22中所列的VH和VL序列)。
- [0538] 注释IgG1表明制备了IgG1同种型的全长抗体,并且FEAL注释表明重链恒定区包含氨基酸取代L234F、L235E、D265A和F405L,并且轻链恒定区是λ型(SEQ ID NO.60和64)。
- [0539] 对照抗体
- [0540] IgG1-b12-K409R(具有SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15中所列的VH和VL序列)。
- [0541] 注释IgG1表明制备了IgG1同种型的全长抗体,并且K409R注释表明重链恒定区包含氨基酸取代K409R并且轻链恒定区是κ型(分别为SEQ ID NO.62和63)。
- [0542] 双特异性抗体
- [0543] 将上述CD3和B7H4抗体组合以生成双特异性抗体,其具有一个能够结合人CD3的抗原结合区和另一个能够结合B7H4的抗原结合区,提供同种型IgG1的双特异性抗体,其被注释为bsIgG1。
- [0544] bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-FEAR
- [0545] bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR
- [0546] bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR
- [0547] bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR
- [0548] bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C3-FEAR
- [0549] bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C4-FEAR
- [0550] bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C2-FEAR
- [0551] bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C3-FEAR
- [0552] bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR
- [0553] bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR
- [0554] bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR(对于具有SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15中所列的VH和VL序列的b12臂)
- [0555] bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR
- [0556] 实施例7-使用B7H4-B7H3嵌合分子和B7H4丙氨酸扫描文库确定参与结合的B7H4域和功能表位
- [0557] 使用终点分析的B7H4-B7H3嵌合分子的域定位
- [0558] 使用转染以表达人B7H4、人B7H3(在细胞外域中具有足够氨基酸序列差异的结构上相当的蛋白质)或两种不同的人B7H4-B7H3嵌合分子的一组细胞测定B7H4抗体的B7H4域特异性。制备表达构建体,其编码人B7H4、人B7H3(Uniprot登录号Q5ZPR3-1;SEQ ID NO:9)或含有B7H3的IgV域和B7H4的IgC域的嵌合分子(B7H3-IgV/B7H4-IgC;SEQ ID NO:11),或含有B7H4的IgV域和B7H3的IgC域的嵌合分子(B7H4-IgV/B7H3-IgC;SEQ ID NO:10)。HEK细胞被瞬时转染以表达这些构建体。
- [0559] 细胞(3×10^4 个细胞/孔)在聚苯乙烯96孔圆底板(Greinerbio-one,目录号650101)中与在50μL PBS/0.1%BSA/0.02%叠氮化物(FACS缓冲液)中的抗体的连续稀释物(范围为0.0046至10μg/mL,3倍稀释步骤)在4℃下温育30分钟。在FACS缓冲液中清洗两次后,将细胞

与第二抗体在4℃下温育30分钟。作为第二抗体,使用了R-藻红蛋白(PE)-缀合山羊抗人IgGF(ab')₂(1:500在染色缓冲液中;Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, 目录号109-116-098)。接下来,将细胞在FACS缓冲液中清洗两次,重悬浮在20μL FACS缓冲液中并在iQue Screener (Intellicyt Corporation, USA) 上进行分析。10μg/mL的bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR、bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C4-FEAR、bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C3-FEAR和bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR的结合测定为10μg/mL下列项的结合的%平均荧光强度(MFI):

[0560] • IgG1-B7H3-BRCA84D (B7H3特异性IgG1抗体,如上文所述生成,具有如W02011109400中抗体BRCA84D所述的CDR序列)对B7H3表达细胞的结合,

[0561] • bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C4-FEAR对B7H3-IgV/B7H4-IgC表达细胞的结合,

[0562] • bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR对B7H4-IgV/B7H3-IgC表达细胞的结合,

[0563] • 和bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C3-FEAR对B7H4表达细胞的结合。

[0564] 图1显示B7H4的IgC域参与bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR和bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C4-FEAR的结合,B7H4的IgC和IgV域均参与bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C3-FEAR的结合,并且B7H4的至少IgV域参与bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR的结合。对于使用可变域以产生bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR的C2抗体,已经描述其与IgV域结合;图1中的数据表明IgC域也参与结合(W02014159835和Leong et al 2015, Mol. Pharmaceutics 12, 1717-1729)。

[0565] 使用全剂量响应曲线分析,使用B7H4-B7H3嵌合分子的域定位

[0566] 通过分析全剂量响应曲线,进行了进一步的实验以更详细地研究B7H4抗体的B7H4域特异性。在这些实验中,还确定了bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR的域特异性。如上所述测定bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR、bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C2-FEAR、bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C3-FEAR、bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR的连续稀释物(0.014至30 μg/mL,在3倍稀释步骤中)与经瞬时转染以表达人B7H3-IgV/B7H4-IgC或B7H4-IgV/B7H3-IgC嵌合分子的HEK细胞的结合。图2显示剂量响应曲线,显示B7H4的IgC域参与bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR的结合,与丙氨酸扫描文库实验的结果一致。此外,IgV域参与bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C2-FEAR、bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR的结合,而IgC和IgV域两者似乎参与了bsIgG1-huCD3-H101GFEALxB7H4-C3-FEAR的结合。

[0567] 使用B7H4丙氨酸扫描文库确定B7H4氨基酸残基对B7H4抗体结合的贡献文库设计

[0568] 合成了人B7H4 (Uniprot Q7Z7D3-1) 单残基丙氨酸文库 (GeneArt), 其中人B7H4细胞外域中的所有氨基酸残基单独突变为丙氨酸,但含有丙氨酸或半胱氨酸的位置除外。半胱氨酸没有发生突变以最小化抗原结构破坏的机会。该文库被克隆到含有CMV/TK-polyA表达盒、Amp抗性基因和pBR322复制起点的pMAC表达载体中。

[0569] 文库生产和筛选

[0570] 如W02007059782中所述将抗体C1-N52S、C2和C3生成为重组单价抗体,具有mNeonGreen标签。根据制造商的说明 (Thermo Scientific), 野生型B7H4和丙氨酸突变体在FreeStyle HEK293细胞中单独表达。转染后一天收获细胞。大约50,000个细胞与20μL

mNeoGreen标记的感兴趣的抗体一起温育。细胞在室温下温育1小时。随后,添加150 μ L FACS缓冲液并用FACS缓冲液清洗细胞两次。将细胞重悬浮在30 μ L新鲜FACS缓冲液中,并使用iQue Screener (Intellicyt Corporation, USA) 通过流式细胞术进行分析。

[0571] 整个实验一式两份地进行2次。

[0572] 数据分析

[0573] 对于每个样品,每个细胞的平均抗体结合确定为非门控细胞群的荧光强度(gMFI)的几何平均值。gMFI受抗体对B7H4突变体的亲和力和每个细胞的B7H4突变体表达水平的影响。由于特定的丙氨酸突变可影响突变体B7H4的表面表达水平,并且通常为了校正每个B7H4突变体的表达差异,使用以下等式将数据相对于非交叉阻断B7H4特异性参考抗体的结合强度进行归一化:

$$[0574] \quad \text{归一化gMFI}_{aa\text{位置}} = \frac{gMFI_{\text{测试Ab}}}{gMFI_{\text{参考Ab}}}$$

[0575] 其中C2用作C1-N52S和C3的参考抗体,C1-N52S用作C2的参考抗体,并且其中“aa位置”是指B7H4的特定ala突变体或野生型(wt)B7H4。

[0576] 为了在线性倍数变化标度上表达抗体结合的损失或获得,使用了以下计算:

$$[0577] \quad \text{倍数变化} = \text{Log}_{10} \left(\frac{\text{归一化gMFI}_{ala\text{突变体}}}{\text{归一化gMFI}_{wt}} \right)$$

[0578] 在大多数情况下,结合的获得将由参考抗体与特定ala突变体的结合丧失引起。

[0579] 根据这些计算,在用丙氨酸替换氨基酸时,特定抗体没有结合损失或获得的氨基酸位置将给出结果“0”,结合的获得将导致“>0”和结合的损失将导致“<0”。为了校正样品变异,仅B7H4氨基酸残基被认为是“结合丢失突变体”,在所述B7H4氨基酸残基中结合倍数变化低于平均倍数变化-1.5x SD,其中SD是针对特定测试抗体的四个独立实验计算的倍数变化的标准偏差。

[0580] 如果特定B7H4突变体的参考抗体的gMFI低于平均gMFI_{对照Ab}的平均gMFI-2.5x SD,则从分析中排除数据(对于那些B7H4突变体,假设表达水平不足)。

[0581] 图3显示了B7H4抗体与ECD中具有ala突变的B7H4变体结合的倍数变化,其中注释了氨基酸残基,在所述氨基酸残基中结合的倍数变化低于平均倍数变化-1.5x SD。倍数变化在图3中表示为Z分数。结果表明:

[0582] • 抗体C1-N52S的结合至少依赖于人B7H4的IgC域中的aa S151、V157、D158、Y159、E164、L166、W173、P175、P177、V179、W181、F199、M208、V210、T222、Y223、V240、E242和I245,

[0583] • 抗体C2的结合至少依赖于人B7H4的IgV中的aa R98、G99、R116、K118、N119和D124,并且

[0584] • 抗体C3的结合至少依赖于人B7H4的IgC域中的aa N156、E164、V217和R248,并且

[0585] • 抗体C1-N52S、C2和C3识别B7H4上不同的功能表位。

[0586] 实施例8-B7H4单特异性和CD3xB7H4双特异性抗体与来自各种物种的B7H4的结合

[0587] 首先,通过流式细胞术分析双特异性CD3xB7H4抗体和单特异性B7H4抗体与用人B7H4或食蟹猴(Macaca fascicularis) B7H4瞬时转染的HEK-293F细胞的结合。未转染的

HEK-293F细胞用作阴性对照;这些细胞(也)被证实不表达CD3。

[0588] 细胞(3×10^4 个细胞/孔)在聚苯乙烯96孔圆底板(Greiner bio-one,目录号650180)中与100 μ L PBS/0.1%BSA/0.02%叠氮化物(染色缓冲液)中的抗体连续稀释物(范围从0.000458到30 μ g/mL,4倍稀释步骤)在4 $^{\circ}$ C下温育30分钟。实验在技术重复中进行。在染色缓冲液中清洗两次后,将细胞在4 $^{\circ}$ C的50 μ L第二抗体中温育30分钟。作为第二抗体,使用了R-藻红蛋白(PE)-缀合山羊抗人IgGF(ab')₂(FACS缓冲液中1:500;Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., WestGrove, PA, 目录号109-116-098)。将细胞在染色缓冲液中清洗两次,重悬浮在含有Topro-3(1:10,000稀释物)的30 μ L FACS缓冲液中,并在iQue Screener(Intellicyt Corporation, USA)上进行分析。使用GraphPad Prism V7.02软件(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)使用非线性回归(具有可变斜率的S型剂量响应)分析结合曲线。

[0589] 图4显示IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR均与表达人B7H4或食蟹猴B7H4的细胞结合。

[0590] 接着,如上所述,测定对用来自犬、兔、大鼠、小鼠或猪的B7H4瞬时转染的HEK-293F细胞的结合。图5显示了IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR与来自犬、兔、大鼠和小鼠的B7H4不同程度地结合;对于每种,bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR的表观亲和力(EC₅₀)均低于IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR的表观亲和力(EC₅₀)。bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR不能与猪B7H4结合,而IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR结合较弱并且仅在测试的最高抗体浓度下结合。

[0591] bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR和IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR与人和食蟹猴B7H4结合的EC₅₀在相似的范围。

[0592] 进行了类似的研究以比较IgG1-B7H4-C1-052S-FEAR、IgG1-B7H4-C3-FEAR、IgG1-B7H4-C4-FEAR、IgG1-B7H4-C2-FEAR和IgG1-B7H4-C5-FEAR与来自不同物种(人、食蟹猴、小鼠、大鼠、兔、犬和猪)的B7H4的结合。图6显示对于测试抗体,对用人和食蟹猴B7H4转染的HEK细胞的结合是相似的。用表达兔和犬B7H4的细胞获得了类似的结果。然而,IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR与小鼠B7H4的结合相对于IgG1-B7H4-C3-FEAR、IgG1-B7H4-C4-FEAR、IgG1-B7H4-C2-FEAR和IgG1-B7H4-C5-FEAR的结合似乎更低,与实施例3中的结果一致。另外,IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR和IgG1-B7H4-C3-FEAR与大鼠B7H4的结合相对于IgG1-B7H4-C4-FEAR、IgG1-B7H4-C2-FEAR和IgG1-B7H4-C5-FEAR似乎更低。此外,虽然IgG1-B7H4-C4-FEAR、IgG1-B7H4-C2-FEAR和IgG1-B7H4-C5-FEAR与猪B7H4结合,但IgG1-B7H4-C1-052S-FEAR的结合非常弱并且仅在测试的最高抗体浓度明显。无法检测到IgG1-B7H4-C3-FEAR与猪B7H4的结合。

[0593] 实施例9-B7H4单特异性和CD3xB7H4双特异性抗体与表达B7H4的人肿瘤细胞系的结合

[0594] 测定了IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR和/或bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR和/或bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR与表达B7H4的人肿瘤细胞系MCF-7(乳腺癌;ATCC,目录号HTB-22)、MDA-MB-468(乳腺癌;ATCC,目录号HTB-132)和SK-BR3(乳腺癌;ATCC,目录号HTB-30)的结合,以及bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR与表达B7H4的人肿瘤细胞系NIH-OVCAR-3(卵巢腺癌;ATCC,目录号HTB-161)或HCC1954(乳腺导管癌;ATCC,目录号CRL-2338)的结合。此外,测定了IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR、

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR、IgG1-B7H4-C2-FEAR、bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR或bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C2-FEAR、IgG1-B7H4-C3-FEAR、bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C3-FEAR、IgG1-B7H4-C4-FEAR、bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR、IgG1-B7H4-C5-FEAR和/或bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR与MDA-MB-468和HCC1954细胞的结合。实体瘤细胞系通常不表达CD3。作为阴性对照,使用未显示可检测到的B7H4表达的肿瘤细胞系HeLa(宫颈腺癌;ATCC,目录号CCL-2)。如上所述通过流式细胞术分析结合。

[0595] 图7显示IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR对MCF-7和MDA-MB-468细胞显示出相当的剂量依赖性结合,具有相当的最大结合水平。

[0596] 图8显示了bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR对NIH-OVCAR-3和HCC1954细胞的剂量依赖性结合,并且缺乏与非B7H4表达细胞系HeLa的可检测结合。

[0597] 使用MDA-MB-486和SK-BR3细胞比较bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR和bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR与表达B7H4的肿瘤细胞的结合。图9显示bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR和bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR对这些细胞显示出相当的剂量依赖性结合,具有相当的最大结合水平。

[0598] 图10显示同二聚体或双特异性抗体格式的C1-N52S、C2、C3、C4和C5B7H4抗体对MDA-MB-468和HCC1954细胞的剂量依赖性结合。基于C4和C5的抗体显示出最高的结合效率,基于C1-N52S和C2的抗体显示出中等的结合效率,基于C3的抗体结合显示出最低的效率。基于C1-N52S、C2、C4和C5的抗体之间的最大结合相当,但基于C3的抗体较低。

[0599] 实施例10-B7H4抗体与原发肿瘤细胞的结合

[0600] 卵巢癌患者的原发性肿瘤细胞获得自Discovery Life Sciences (Huntsville, AL, USA; 患者ID 110045042)。通过流式细胞术评估IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR与肿瘤细胞的结合:将细胞以 2×10^4 个细胞/孔接种在聚苯乙烯96孔圆底板(Greiner bio-one, 目录号650180)中,离心并与在PBS中以1:1000稀释的50 μ l Fixable Viability Stain FVS-BV510(BDBiosciences, 目录号564406)在4 $^{\circ}$ C下温育30分钟。在染色缓冲液中清洗后,将细胞与FITC标记的IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR和一组CD3(EF450标记;eBioscience, 目录号48-0037-42)、CD45(BV786标记;Biolegend, 目录号304048)、CD14(PE-Cy7标记;BD Biosciences, 目录号557742)、CD86(PerCP-Cy5.5标记;Biolegend, 目录号305420)、CD163(APC-Cy7标记;Biolegend, 目录号333622)和EpCAM(AF700标记;R&D系统, 目录号FAB9601N)特异性抗体在4 $^{\circ}$ C下温育30分钟。清洗后,将细胞重悬浮在染色缓冲液中并使用FACS Fortessa(BD Biosciences)进行分析。基于散射FSC/SSC对单个细胞进行门控,并通过排除FVS-BV510阳性细胞鉴定活细胞。肿瘤细胞鉴定为EpCAM阳性细胞。

[0601] 流式细胞术分析显示,IgG1-B7H4-N52S-FEAR结合EpCAM阳性活肿瘤细胞,但不结合卵巢癌样品的解离肿瘤细胞悬浮液中的单核细胞或T细胞。

[0602] 实施例11-使用纯化的T细胞作为效应细胞以不同的效应物与靶物的比率,通过CD3xB7H4双特异性抗体在体外诱导T细胞介导的细胞毒性

[0603] 为了确定在双特异性抗体bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR存在下T细胞介导的肿瘤细胞杀伤效率,使用B7H4阳性肿瘤细胞系作为靶细胞和纯化的T细胞作为效应细胞,以不同的效应细胞与靶细胞(E:

T) 比率进行体外细胞毒性测定。

[0604] 从健康的人供体血沉棕黄层 (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands) 中获得T细胞, 并根据制造商的说明使用RosetteSep™人T细胞富集混合物 (Stemcell Technologies, France, 目录号15061) 进行分离。将SK-BR3细胞 (16,000个细胞/孔) 接种到平底96孔板 (Greiner-bio-one, The Netherlands, 目录号655180) 中, 并37°C下静置粘附4小时。将T细胞以2:1、4:1或8:1的效应物与靶物 (E:T) 比率添加到肿瘤细胞中。添加bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR或bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR的连续稀释物 (最终浓度范围为10,000至0.0128ng/mL; 5倍稀释) 并将板在37°C下温育72小时。将板用PBS清洗3次, 并将细胞与150μl/孔的10% alamarBlue (r) 溶液 (Invitrogen, 目录号DAL1100) 在37°C下温育4小时。作为细胞毒性的阳性对照, 将细胞与16μg/mL氧化苯肿 (PAO; Sigma-Aldrich, 目录号P3075; 溶于二甲亚砜 [DMSO; Sigma-Adrich, 目录号D2438]) 一起温育。在EnVision读板器 (PerkinElmer) 上在615nm (OD615) 处测量AlamarBlue荧光, 作为肿瘤细胞培养物和因此存活肿瘤细胞的代谢活性的量度。将PAO处理的肿瘤细胞样品的吸光度设为0%存活, 并且将未处理的肿瘤细胞样品的吸光度设为100%存活。“百分比活细胞”计算如下:

[0605] $\% \text{活细胞} = ([\text{样品吸光度} - \text{PAO处理的靶细胞吸光度}] /$

[0606] $[\text{未处理的靶细胞吸光度} - \text{PAO处理的靶细胞吸光度}]) \times 100。$

[0607] 使用GraphPad Prism V7.02软件 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) 使用非线性回归分析 (具有可变斜率的S型剂量响应) 生成剂量响应曲线和IC50值。

[0608] 图11显示在所有E:T比率下均观察到T细胞介导的细胞毒性, 在E:T比率为8:1时观察到最大的肿瘤细胞杀伤 (小于10%的活肿瘤细胞)。

[0609] 实施例12-CD3xB7H4双特异性抗体在各种肿瘤细胞系中体外诱导细胞毒性以及与B7H4表达水平的相关性。

[0610] 使用8:1的E:T比率, 如上所述在体外细胞毒性测定法中测定双特异性抗体bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR对各种表达B7H4的肿瘤细胞系的T细胞介导的杀伤。使用了以下细胞系: MCF-7、MDA-MB-486、SK-BR3、NIH-OVCAR-3、HCC1954和NCI-H1650。对于每次温育, 将含有T细胞的150μL上清液转移至U底96孔培养板 (CellStar, 目录号650180), 然后进行清洗和alamarBlue温育 (以确定T细胞活化和细胞因子释放, 如下所述)

[0611] 对于这些肿瘤细胞系, 根据制造商的说明, 使用bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR通过定量流式细胞术 (人IgG校准器, BioCytex) 对B7H4的表达进行量化, 以检测B7H4。

[0612] 图12显示了bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR两者在MCF-7、MDA-MB-486、SK-BR3、NIH-OVCAR-3和HCC1954细胞中体外诱导的剂量依赖性T细胞介导的细胞毒性。虽然两种bsAb变体均达到了最大的细胞毒活性 (<10%的活肿瘤细胞), 但与bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR相比, 这对于bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR在较低浓度下发生 (表13)。

[0613] 对于bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR或bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (图13B), 未观察到肿瘤细胞裂解与B7H4表达水平之间的显著关

[0623] 总体而言,在bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR或bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR存在下,CD8+T细胞子集(在最高抗体浓度下为约20-50%)变为活化的。bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR诱导的T细胞活化通常在比bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR诱导的浓度更高的浓度下发生(图14A)。这两种双特异性抗体的T细胞活化的EC50在使用的靶细胞系之间和供体之间是可变的(图14B)。

[0624] 通过Mesoscale Discovery U-plex多重ELISA在肿瘤细胞-T细胞培养物的上清液中评估细胞因子的产生。在细胞系组间分析的10种细胞因子中,使用来自4名供体的T细胞,主要观察到IFN- γ 和IL-8的细胞因子水平显著增加(>2 000pg/ml)。IL-4、IL-6和IL-13的调节水平要低得多(<500pg/ml),而IL-1 β 、IL-2、IL-10、IL-12p70和TNF α 水平通常低于50pg/ml。因为IFN- γ 变化被稳健且一致地检测到,并且IFN- γ 是细胞因子释放综合征患者血清中升高的核心细胞因子之一,所以代表了该细胞因子的数据。

[0625] 图15显示了在bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR存在下在50%、90%和99%的肿瘤细胞(分别为EC50、EC90、EC99)中诱导T细胞介导的细胞毒性的抗体浓度下,T细胞-肿瘤细胞共培养物的上清液中的IFN- γ 水平,每个细胞系使用来自分析的至少3个供体的T细胞进行下。每个供体和每个靶肿瘤细胞系的细胞因子产生水平不同。然而,在诱导相同水平(%)的肿瘤细胞杀伤的抗体浓度下,通常在将T细胞-肿瘤细胞共培养物暴露于bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR后,观察到与暴露于bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR后的水平相比较低的细胞因子产生水平。因此,在相同的肿瘤细胞杀伤水平下,与bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR温育导致细胞因子产生低于bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR。

[0626] 实施例14-CD3xB7H4双特异性抗体在食蟹猴中的非临床安全性研究

[0627] 在法国Citoxlab,在非人灵长类动物(食蟹猴,Macaca fascicularis,起源于毛里求斯)中评估了bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR的非临床安全性概况。基于bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR和bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR的CD3臂的物种特异性,此外由于B7H4臂与人和食蟹猴B7H4的相似结合以及进一步的药理学发现,食蟹猴被认为是非临床安全性研究的唯一相关物种。这些研究是按照动物健康法规(2010年9月22日第2010/63/EU号理事会指令和2013年2月1日关于保护用于科学目的的动物的第2013-118号法国法令)进行的。

[0628] 研究的目的是确定CD3xB7H4双特异性抗体的潜在毒性和毒动学。此处仅描述了毒动学的结果和血浆中细胞因子水平测定。

[0629] 在两项独立的研究中,用单剂量0.1、1、3或10mg/kg bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR或bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR(每剂一只雌性动物)通过静脉内(IV)输注处理动物。输注之日在研究中表示为第1天。在给药前和给药后0.5h、2h、4h、12h、24h和48h获得血样两次用于评估毒动学概况和血浆细胞因子水平,并且另外在给药后168、336和504小时评估毒动学。

[0630] 细胞因子水平

[0631] 使用LuminexMAP技术分析血浆样品的细胞因子水平(IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、

IL-6、IL-8、IL-10、TNF、IL-12p70、IL-15和CCL2/MCP1)。

[0632] 对食蟹猴施用BsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR仅产生血浆细胞因子水平的微小变化,这被认为与测试化合物无关,而施用bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR导致IL-6和MCP-1水平的剂量依赖性增加,如图16所示。

[0633] 与BsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR抗体相比,用双特异性BsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR治疗后产生的较低细胞因子水平可能在临床环境中提供优势。

[0634] 毒动学

[0635] 使用通用IgG PK ECLIA方法测定CD3xB7H4双特异性的血浆浓度。使用与静脉内输注注射施用途径一致的非房室方法,使用Certara Phoenix WinNonlin药代动力学软件8.1版估计毒动学参数。图17显示这两种CD3xB7H4双特异性抗体的毒动学概况在给药后直至7天高度相当,两者均显示出与剂量相关的血浆暴露。

[0636] 进行药代动力学建模以评估具有较低CD3亲和力的BsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR变体所需的预计临床剂量范围是否无法持续较高。使用由食蟹猴中的观察结果得到的PK模型。推导出的临床剂量范围预计产生与体外观察到的T细胞介导的细胞杀伤的EC50至EC90相等的一周平均血浆暴露。所得的剂量范围被认为是可行的,并且这方面没有先验给出相对于另一类双特异性抗体有利于一类双特异性抗体(BsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR相对于BsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR)的理由。

[0637] 实施例15-B7H4在各种人癌症适应症中的表达

[0638] 从Omicsoft TCGA数据库中提取B7H4 mRNA水平,并使用OncoLand软件(Qiagen, USA)进行可视化。

[0639] 图18显示了一系列原发性实体瘤中的B7H4 mRNA表达水平,根据表达的中位数排列。在一大批癌症适应症中发现mRNA表达,并且在每种适应症中有所不同,在子宫癌肉瘤(UCS)、膀胱尿路上皮癌(BLCA)、胰腺腺癌(PAAD)、肺鳞状细胞癌(LUSC)、乳腺侵入癌(BRCA)、子宫体子宫内膜癌(UCEC)、卵巢浆液性囊腺癌(OV)和胆管癌(CHOL)中发现最高的表达中位数。

[0640] 通过在组织微阵列(TMA;均购自BioMax)上的免疫组织化学(IHC)分析结肠、肺(小细胞肺癌,SCLC和非小细胞肺癌,NSCLC)、胃、胰腺、膀胱、宫颈、头和颈、乳腺(包括三阴性乳腺癌,TNBC)、卵巢癌、食管癌、肾癌、前列腺癌和子宫癌以及胆管癌中B7H4的蛋白质表达。染色前,将新鲜切割的TMA切片(5 μ m)脱蜡并与Target Retrieval Solution pH 9(DAKO, S2367;97 $^{\circ}$ C下30min,冷却60min)一起温育。在LabVision自动染色平台上使用商业兔抗人B7-H4单克隆抗体(克隆D1M8I,#14572,Cell Signaling Technologies)以最佳稀释(1:25;最终浓度2.6 μ g/mL)进行B7H4 IHC 30min(RT)。随后,切片与抗兔IgG聚合物(EnvisionTM FLEX+兔(DAKO, S2022)一起温育,清洗并与DAKO Liquid DAB+底物显色系统(DAKO, K3468)一起温育。苏木精(DAKO, S3301)用于检测有核细胞。使用OptiView检测在Ventana Benchmark上用小鼠抗细胞角蛋白抗体混合物(克隆AE1/AE3)进行细胞角蛋白(以确定感兴趣的肿瘤区域,ROI) IHC。用DAB可视化细胞角蛋白,并使用默认的Ventana试剂用苏木精复染细胞核。在AxioScan(Zeiss)上以20x放大率对染色的TMA切片进行数字化处理。最初,进

行手动评分以确定平均B7H4染色强度(阴性-低-中-高)和具有>10%B7H4阳性肿瘤细胞的肿瘤核心的百分比。

[0641] 随后,进行了自动评分。使用与B7H4染色的TMA切片相邻的TMA切片上的细胞角蛋白掩模来定义肿瘤ROI。量化肿瘤ROI中的B7H4染色强度(阴性、弱(1)、中等(2)或强(3)),并使用HALO图像分析软件确定B7H4阳性肿瘤细胞的百分比(范围0-100%)。对于每个适应症,确定具有>10%B7H4阳性肿瘤细胞的肿瘤核心的百分比。

[0642] 表14显示了通过BioMax TMA的IHC分析测定的B7H4蛋白表达。在结肠癌、前列腺癌、肾癌和小细胞肺癌样品中看到从无B7H4表达至极低的B7H4表达。在来自其他适应症的样品中,B7H4表达有所不同,在胃癌、胰腺癌、胆管癌、食管癌、膀胱癌、非小细胞肺癌(特别是鳞状NSCLC)、宫颈癌、头颈癌、乳腺癌(三阴性乳腺癌[TNBC]和非TNBC)、卵巢癌和子宫癌中发现B7H4表达增加。

[0643] 表14. 通过BioMax TMA的IHC分析测定的B7H4蛋白表达。ND=未测定。

[0644]

适应症(BioMax TMA)		手动评分		自动评分
		>10 % B7H4 阳性(任何强度, 通过视觉评估)	染色强度	>10 % B7H4 阳性(1+及以上, 通过数字图像分析)
结肠癌(n=64)		0%	阴性	
肺癌	SCLC (n=60)	1%	阴性-低	
NSCLC	AC (n=82)	17%	低	ND
	SQCC (n=95)	48%	中等	ND
胃癌(n=90)		17%	低	
胰腺癌(n=60)		25%	低	ND
胆管癌(n=98)		31%	低	16%
膀胱癌(n=60)		43%	低-中等	25%
宫颈癌(n=60)		52%	低-中等	27%
头颈癌(n=92)		47%	低-中等	23%
乳腺癌	全部(n=232)	78%	中等-高	72%
	TNBC (n= 35)	89%	中等-高	ND
卵巢癌(n=74)		82%	中等-高	68%
子宫癌(n=73)		82%	中等-高	75%
食管癌(n= 53)		36%	低	ND
肾癌(n= 83)		9%	阴性	ND
前列腺癌(n= 57)		1%	阴性	ND

序列表

<110> Genmab A/S

<120> 抗体

<130> P/0155-W0-PCT

<160> 71

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 282

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile
 1 5 10 15
 Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser
 20 25 30
 Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile
 35 40 45
 Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu
 50 55 60
 Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val
 65 70 75 80
 His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met
 85 90 95
 Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn
 100 105 110
 Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr
 115 120 125
 Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu
 130 135 140
 Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn
 145 150 155 160
 Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln
 165 170 175
 Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser
 180 185 190
 Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met
 195 200 205
 Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser

210	215	220
Cys Met Ile Glu Asn Asp	Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp	Ile Lys Val
225	230	235
Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser		
	245	250
Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu		
	260	265
Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys		270
	275	280
<210> 2		
<211> 282		
<212> PRT		
<213> 食蟹猴		
<400> 2		
Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile		
1	5	10
Phe Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser		
	20	25
Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile		
	35	40
Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu		
	50	55
Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Ile Gly Leu Val		
65	70	75
His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met		
	85	90
Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn		
	100	105
Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr		
	115	120
Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu		
	130	135
Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn		
145	150	155
Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln		
	165	170
Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser		
	180	185
Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met		

195	200	205
Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser		
210	215	220
Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val		
225	230	235
Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser		
	245	250
Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Leu Ala Ile Ser Trp Ala Leu		
	260	265
Leu Pro Leu Ala Pro Tyr Leu Met Leu Lys		270
	275	280
<210> 3		
<211> 282		
<212> PRT		
<213> 家犬		
<400> 3		
Met Ala Ser Pro Gly Gln Asn Ile Phe Trp Ser Ile Ile Ser Val Ile		
1	5	10
Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser		
	20	25
Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Leu Thr Ser Ala Gly Asn Ile		
	35	40
Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu		
	50	55
Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Met Gly Leu Val		
65	70	75
His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Asp Leu Ser Asp Gln Asp Glu Met		
	85	90
Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Gly Gly Asn		
	100	105
Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr		
	115	120
Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu		
	130	135
Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Ile Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn		
145	150	155
Ala Ser Ser Glu Asn Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln		
	165	170
Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Ala Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser		

	180		185		190
Glu Val Phe Asn Thr Ser Phe	Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met				
195	200	205			
Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser					
210	215	220			
Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val					
225	230	235	240		
Thr Asp Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser					
	245	250	255		
Lys Ala Ser Leu Gly Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Val Leu					
	260	265	270		
Leu Pro Leu Ser Ser Tyr Leu Met Leu Lys					
	275	280			
<210> 4					
<211> 282					
<212> PRT					
<213> 穴兔					
<400> 4					
Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Ile Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile					
1	5	10	15		
Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser					
	20	25	30		
Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Leu Thr Ser Ala Gly Asn Ile					
	35	40	45		
Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Arg Leu					
	50	55	60		
Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Val Gly Leu Val					
65	70	75	80		
His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Asp Leu Ser Asp Gln Asp Glu Met					
	85	90	95		
Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Thr Asp Gln Val Ile Val Gly Asn					
	100	105	110		
Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr					
	115	120	125		
Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu					
	130	135	140		
Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Leu Asp Tyr Asn					
145	150	155	160		
Ala Ser Ser Glu Ser Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln					

	165		170		175
Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser					
	180		185		190
Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met					
	195		200		205
Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Val Asn Asn Thr Tyr Ser					
	210		215		220
Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val					
225		230		235	240
Thr Asp Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser Ser Leu Gln Leu Leu Asn Ser					
	245		250		255
Arg Ala Ala Pro Ser Val Ser Pro Arg Ser Ala Val Gly Trp Leu Leu					
	260		265		270
Leu Pro Leu Ser Ser Tyr Val Met Leu Lys					
	275		280		
<210> 5					
<211> 282					
<212> PRT					
<213> 褐家鼠					
<400> 5					
Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Ile Phe Trp Ser Ile Ile Asn Val Ile					
1	5		10		15
Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Val Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser					
	20		25		30
Gly Lys His Phe Ile Thr Val Thr Thr Phe Thr Ser Ala Gly Asn Ile					
	35		40		45
Gly Glu Asp Gly Thr Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu					
	50		55		60
Asn Gly Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Ile Lys Gly Leu Val					
65		70		75	80
His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Asp Leu Ser Gln Gln His Glu Met					
	85		90		95
Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Val Val Gly Asn					
	100		105		110
Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr					
	115		120		125
Thr Cys Tyr Ile His Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu					
	130		135		140
Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Ile Asn Val Asp Tyr Asn					

145	150	155	160
Ala Ser Ser Glu Ser Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln			
	165	170	175
Pro Thr Val Ala Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser			
	180	185	190
Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met			
	195	200	205
Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser			
	210	215	220
Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val			
225	230	235	240
Thr Asp Ser Glu Val Lys Arg Arg Ser Gln Leu Glu Leu Leu Asn Ser			
	245	250	255
Gly Pro Ser Pro Cys Val Ser Ser Val Ser Ala Ala Gly Trp Ala Leu			
	260	265	270
Leu Ser Leu Ser Cys Cys Leu Met Leu Arg			
	275	280	
<210> 6			
<211> 283			
<212> PRT			
<213> 小家鼠			
<400> 6			
Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Ile Phe Trp Ser Ile Ile Asn Ile Ile			
1	5	10	15
Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser			
	20	25	30
Gly Lys His Phe Ile Thr Val Thr Thr Phe Thr Ser Ala Gly Asn Ile			
	35	40	45
Gly Glu Asp Gly Thr Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu			
	50	55	60
Asn Gly Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Ile Lys Gly Leu Val			
65	70	75	80
His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Asp Leu Ser Gln Gln His Glu Met			
	85	90	95
Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Val Val Gly Asn			
	100	105	110
Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr			
	115	120	125
Thr Cys Tyr Ile Arg Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu			

130	135	140
Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Ile Asn Val Asp Tyr Asn		
145	150	155
Ala Ser Ser Glu Ser Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln		
	165	170
Pro Thr Val Ala Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser		
	180	185
Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met		
	195	200
Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser		
210	215	220
Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val		
225	230	235
Thr Asp Ser Glu Val Lys Arg Arg Ser Gln Leu Gln Leu Leu Asn Ser		
	245	250
Gly Pro Ser Pro Cys Val Phe Ser Ser Ala Phe Val Ala Gly Trp Ala		
	260	270
Leu Leu Ser Leu Ser Cys Cys Leu Met Leu Arg		
	275	280

<210> 7

<211> 282

<212> PRT

<213> 欧亚野猪

<400> 7

Met Ala Ser Leu Gly Gln Val Val Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile		
1	5	10
Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Phe Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser		
	20	25
Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Leu Thr Ser Ala Gly Asn Ile		
	35	40
Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu		
	50	55
Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Thr Gly Leu Val		
65	70	75
His Glu Phe Lys Lys Gly Lys Asp Asp Leu Ser Asp Gln Asp Glu Met		
	85	90
Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn		
	100	105
Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr		

115	120	125
Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser	Lys Gly Lys Gly Asn Ala Lys Leu Glu	
130	135	140
Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Ile Pro Glu Val Asn Val Asp Ser Asn		
145	150	155
Ala Ser Ser Glu Ser Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln		
165	170	175
Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser		
180	185	190
Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Pro Glu Asn Val Thr Met		
195	200	205
Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Thr Thr Tyr Ser		
210	215	220
Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Arg Val		
225	230	235
Thr Asp Ser Glu Ile Lys Arg Gln Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser		
245	250	255
Lys Ala Ser Leu Cys Leu Ser Ser Phe Val Ala Ile Ser Trp Val Leu		
260	265	270
Leu Pro Leu Cys Pro Tyr Leu Met Leu Lys		
275	280	

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于翻译的核酸基序

<400> 8

Gly Cys Cys Gly Cys Cys Ala Cys Cys

1 5

<210> 9

<211> 534

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala

1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln

20 25 30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
 35 40 45
 Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
 50 55 60
 Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
 65 70 75 80
 Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
 85 90 95
 Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
 100 105 110
 Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
 115 120 125
 Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
 130 135 140
 Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
 145 150 155 160
 Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
 165 170 175
 Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
 180 185 190
 Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Ile Leu
 195 200 205
 Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
 210 215 220
 Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr Ile Thr Pro Gln
 225 230 235 240
 Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val
 245 250 255
 Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro
 260 265 270
 Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr
 275 280 285
 Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly
 290 295 300
 Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln
 305 310 315 320
 Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly
 325 330 335
 Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val

	340		345		350										
Ser	Leu	Gln	Val	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ser	Lys	Pro	Ser	Met	Thr	Leu	Glu
	355		360		365										
Pro	Asn	Lys	Asp	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser
	370		375		380										
Ser	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ala	Glu	Val	Phe	Trp	Gln	Asp	Gly	Gln
385			390		395		400								
Gly	Val	Pro	Leu	Thr	Gly	Asn	Val	Thr	Thr	Ser	Gln	Met	Ala	Asn	Glu
	405		410		415										
Gln	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	His	Ser	Val	Leu	Arg	Val	Val	Leu	Gly	Ala
	420		425		430										
Asn	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Leu	Val	Arg	Asn	Pro	Val	Leu	Gln	Gln	Asp
	435		440		445										
Ala	His	Gly	Ser	Val	Thr	Ile	Thr	Gly	Gln	Pro	Met	Thr	Phe	Pro	Pro
	450		455		460										
Glu	Ala	Leu	Trp	Val	Thr	Val	Gly	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	Ile	Ala	Leu
465			470		475		480								
Leu	Val	Ala	Leu	Ala	Phe	Val	Cys	Trp	Arg	Lys	Ile	Lys	Gln	Ser	Cys
	485		490		495										
Glu	Glu	Glu	Asn	Ala	Gly	Ala	Glu	Asp	Gln	Asp	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly
	500		505		510										
Ser	Lys	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro	Leu	Lys	His	Ser	Asp	Ser	Lys	Glu	Asp
	515		520		525										
Asp	Gly	Gln	Glu	Ile	Ala										
	530														
<210>	10														
<211>	325														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	域交换														
<400>	10														
Met	Ala	Ser	Leu	Gly	Gln	Ile	Leu	Phe	Trp	Ser	Ile	Ile	Ser	Ile	Ile
1			5						10					15	
Ile	Ile	Leu	Ala	Gly	Ala	Ile	Ala	Leu	Ile	Ile	Gly	Phe	Gly	Ile	Ser
			20						25					30	
Gly	Arg	His	Ser	Ile	Thr	Val	Thr	Thr	Val	Ala	Ser	Ala	Gly	Asn	Ile
	35								40					45	
Gly	Glu	Asp	Gly	Ile	Leu	Ser	Cys	Thr	Phe	Glu	Pro	Asp	Ile	Lys	Leu

<220>

<223> 域交换

<400> 11

Met	Leu	Arg	Arg	Arg	Gly	Ser	Pro	Gly	Met	Gly	Val	His	Val	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ala	Leu	Gly	Ala	Leu	Trp	Phe	Cys	Leu	Thr	Gly	Ala	Leu	Glu	Val	Gln
			20					25					30		
Val	Pro	Glu	Asp	Pro	Val	Val	Ala	Leu	Val	Gly	Thr	Asp	Ala	Thr	Leu
			35				40					45			
Cys	Cys	Ser	Phe	Ser	Pro	Glu	Pro	Gly	Phe	Ser	Leu	Ala	Gln	Leu	Asn
			50				55					60			
Leu	Ile	Trp	Gln	Leu	Thr	Asp	Thr	Lys	Gln	Leu	Val	His	Ser	Phe	Ala
65					70					75					80
Glu	Gly	Gln	Asp	Gln	Gly	Ser	Ala	Tyr	Ala	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu	Phe
				85						90					95
Pro	Asp	Leu	Leu	Ala	Gln	Gly	Asn	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Gln	Arg	Val
				100						105				110	
Arg	Val	Ala	Asp	Glu	Gly	Ser	Phe	Thr	Cys	Phe	Val	Ser	Ile	Arg	Asp
				115						120				125	
Phe	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Ser	Leu	Gln	Val	Ala	Ala	Phe	Ser	Met	Pro
							135						140		
Glu	Val	Asn	Val	Asp	Tyr	Asn	Ala	Ser	Ser	Glu	Thr	Leu	Arg	Cys	Glu
145						150					155				160
Ala	Pro	Arg	Trp	Phe	Pro	Gln	Pro	Thr	Val	Val	Trp	Ala	Ser	Gln	Val
						165					170				175
Asp	Gln	Gly	Ala	Asn	Phe	Ser	Glu	Val	Ser	Asn	Thr	Ser	Phe	Glu	Leu
				180						185				190	
Asn	Ser	Glu	Asn	Val	Thr	Met	Lys	Val	Val	Ser	Val	Leu	Tyr	Asn	Val
				195				200						205	
Thr	Ile	Asn	Asn	Thr	Tyr	Ser	Cys	Met	Ile	Glu	Asn	Asp	Ile	Ala	Lys
				210				215				220			
Ala	Thr	Gly	Asp	Ile	Lys	Val	Thr	Glu	Ser	Glu	Ile	Lys	Arg	Arg	Ser
225						230					235				240
His	Leu	Gln	Leu	Leu	Asn	Ser	Lys	Ala	Ser	Leu	Cys	Val	Ser	Ser	Phe
					245					250					255
Phe	Ala	Ile	Ser	Trp	Ala	Leu	Leu	Pro	Leu	Ser	Pro	Tyr	Leu	Met	Leu
					260				265						270

Lys

<210> 12

Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys
 50 55 60
 Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg
 65 70 75 80
 Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg
 85 90 95
 Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met Ser Val Ala Thr Ile
 100 105 110
 Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr
 115 120 125
 Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly
 130 135 140
 Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro
 145 150 155 160
 Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
 180 185

<210> 14

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe
 20 25 30
 Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe
 50 55 60
 Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr
 100 105 110

Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 15

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 15

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Ser Ile Arg Ser Arg
 20 25 30

Arg Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val
 35 40 45

Ile His Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser
 85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys
 100 105

<210> 16

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 16

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser

65		70		75		80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr						
		85		90		95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe						
		100		105		110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser						
		115		120		125

<210> 17

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 17

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly						
1		5		10		15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr						
		20		25		30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val						
		35		40		45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp						
		50		55		60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser						
65		70		75		80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr						
		85		90		95
Tyr Cys Val Arg Gly Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe						
		100		105		110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser						
		115		120		125

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 18

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala		
1		5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 19

Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr

1 5 10

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 20

Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10 15

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 21

Val Arg Gly Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10 15

<210> 22

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 22

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

	35		40		45												
	Gly	Glu	Ile	Asn	His	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	
	50						55					60					
	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	
	65						70				75				80		
	Lys	Leu	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Phe	Tyr	Cys	Ala	
					85					90				95			
	Arg	Gly	Leu	Phe	Asn	Trp	Asn	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
					100				105					110			
	Val	Thr	Val	Ser	Ser												

115

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 26

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr

1 5

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 27

Ile Asn His Ser Gly Ser Thr

1 5

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 28

Ala Arg Gly Leu Phe Asn Trp Asn Phe Asp Ser

1 5 10

<210> 29

<211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 结合域序列
 <400> 29
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Ser His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Leu Phe Asn Trp Asn Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 结合域序列
 <400> 30

Ile Ser His Ser Gly Ser Thr
 1 5

<210> 31
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 结合域序列
 <400> 31

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Gln His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Leu Phe Asn Trp Asn Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 32

Ile Gln His Ser Gly Ser Thr

1 5

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp

20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

<220>

<223> 结合域序列

<400> 40

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Thr	Ser	Ser	Ile	Ser	Tyr	Met
			20					25					30		
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Gly	Trp	Ile	Tyr
		35					40					45			
Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	His	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu
65					70					75				80	
Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Arg	Arg	Ser	Tyr	Pro	Phe	Thr
				85					90					95	
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys						
			100					105							

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 41

Ser	Ser	Ile	Ser	Tyr
1			5	

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 42

His	Gln	Arg	Arg	Ser	Tyr	Pro	Phe	Thr
1				5				

<210> 43

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 结合域序列
 <400> 46
 Ala Arg Leu Asp Gly Ser Ser Tyr Arg Gly Ala Met Asp Ser
 1 5 10
 <210> 47
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 结合域序列
 <400> 47
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Gly Phe Asn Lys Tyr
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Gly Asn Leu Leu Tyr
 85 90 95
 Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 48
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 结合域序列
 <400> 48
 Gln Gly Phe Asn Lys Tyr
 1 5
 <210> 49
 <211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 49

Leu Gln Tyr Gly Asn Leu Leu Tyr Ala

1 5

<210> 50

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn

20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Val Ile Tyr Gly Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Thr Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 51

Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn Tyr

1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 52

Ile Tyr Gly Ser Gly Arg Thr

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 53

Ala Arg Asp Thr Tyr Ala Met Asp Val

1 5

<210> 54

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 54

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 结合域序列
 <400> 55
 Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 结合域序列
 <400> 56
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Met Tyr Thr
 1 5 10
 <210> 57
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 57
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 58

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 恒定区

<400> 58

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 59

<211> 330

<212> PRT

275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	325	330
<210> 60		
<211> 330		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 恒定区		
<400> 60		
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
1	5	10
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
	20	25
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
	35	40
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
	50	55
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
65	70	75
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
	85	90
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
	100	105
Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
	115	120
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
	130	135
Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
	165	170
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
	180	185
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		

195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
225	230	235
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
	245	250
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
	260	265
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu		
	275	280
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
	290	295
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	325	330

<210> 61

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 恒定区

<400> 61

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
1	5	10
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
	20	25
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
	35	40
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
	50	55
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
65	70	75
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
	85	90
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
	100	105
Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		

115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
225	230	235
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330	

<210> 62

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 恒定区

<400> 62

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
1	5	10
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		

35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
65	70	75
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
85	90	95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
225	230	235
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330	

<210> 63

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 63

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 64

<211> 106

<212> PRT

<213> 智人

<400> 64

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 25 30
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 35 40 45
 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 65 70 75 80
 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 65

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 65

Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Lys	Ser	Gly
				20					25					30	
Ser	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
				35				40						45	
Trp	Ile	Gly	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
				50				55					60		
Leu	Arg	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
65					70					75					80
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
					85					90					95
Cys	Ala	Arg	Glu	Gly	Ser	Tyr	Pro	Asn	Gln	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln
					100					105					110
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
					115										120

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 66

Gly	Gly	Ser	Ile	Lys	Ser	Gly	Ser	Tyr	Tyr
1				5					10

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 67

Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr
1				5		

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 结合域序列

<400> 71

Gln Gln Tyr His Ser Phe Pro Phe Thr

1

5

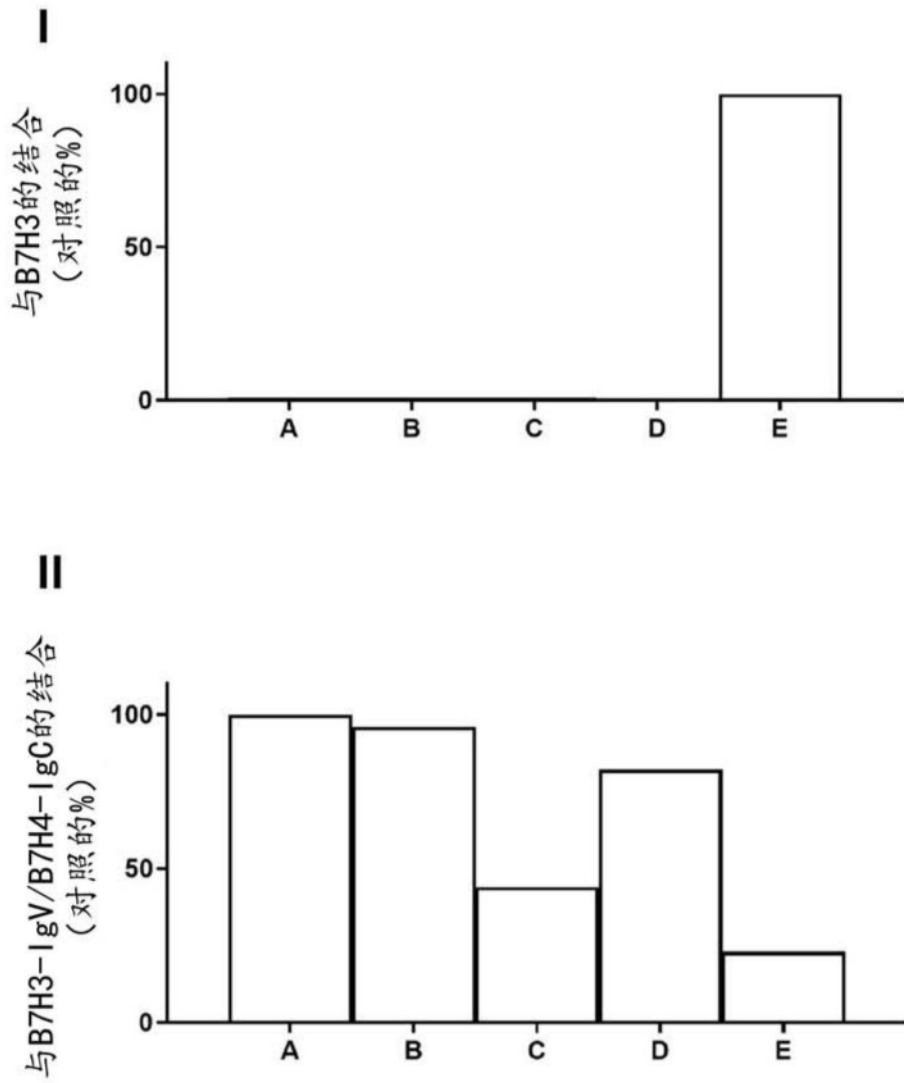


图1

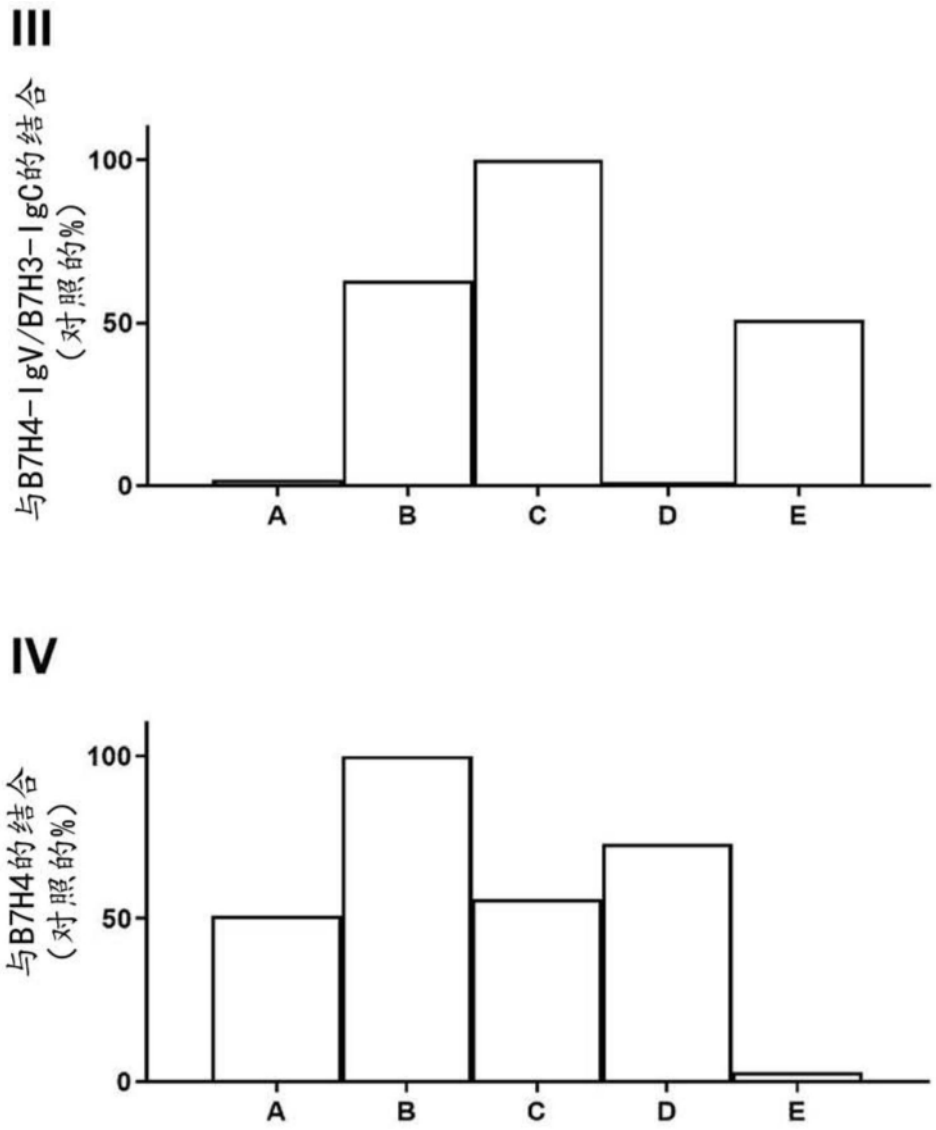


图1(续)

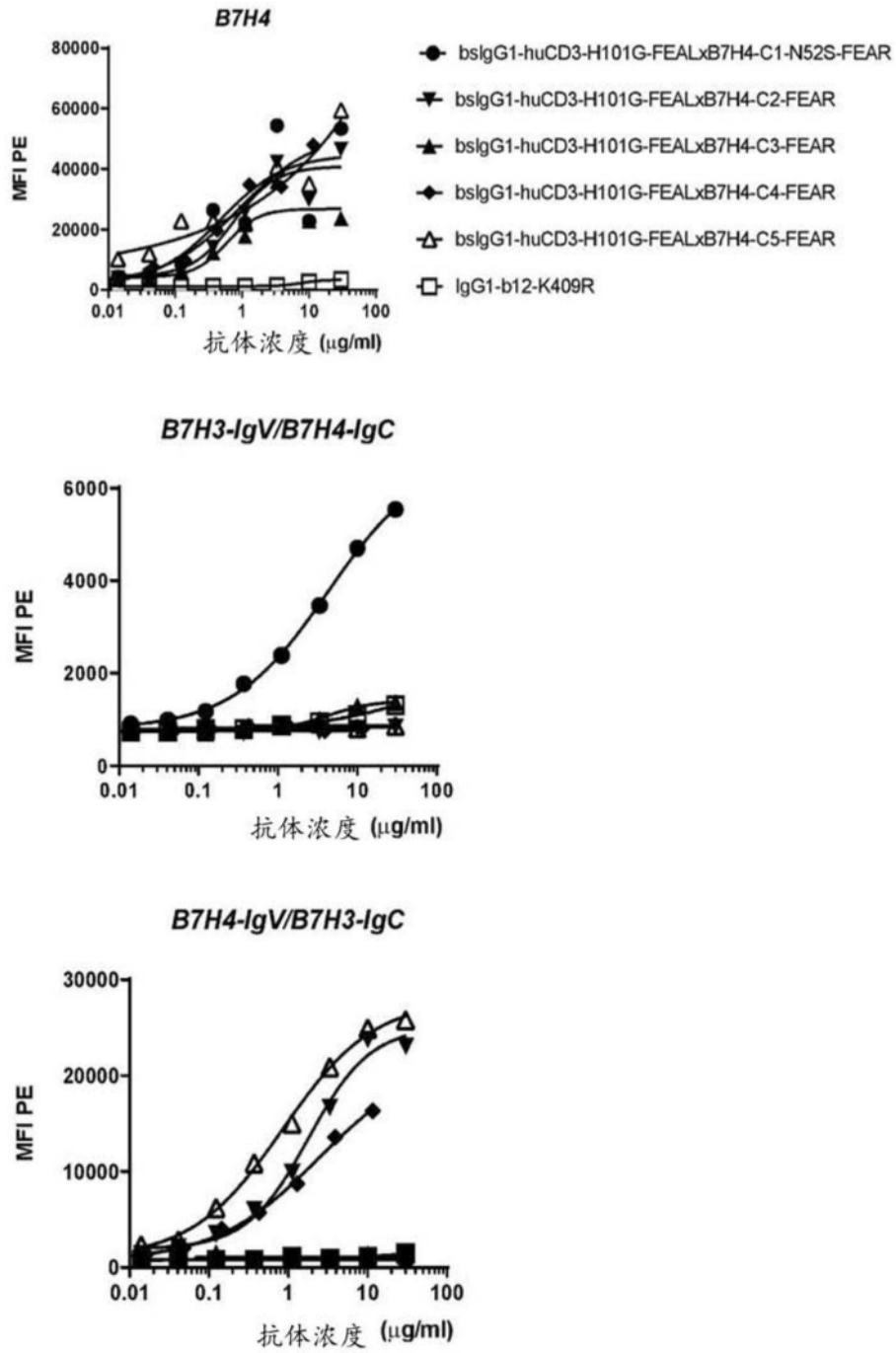


图2

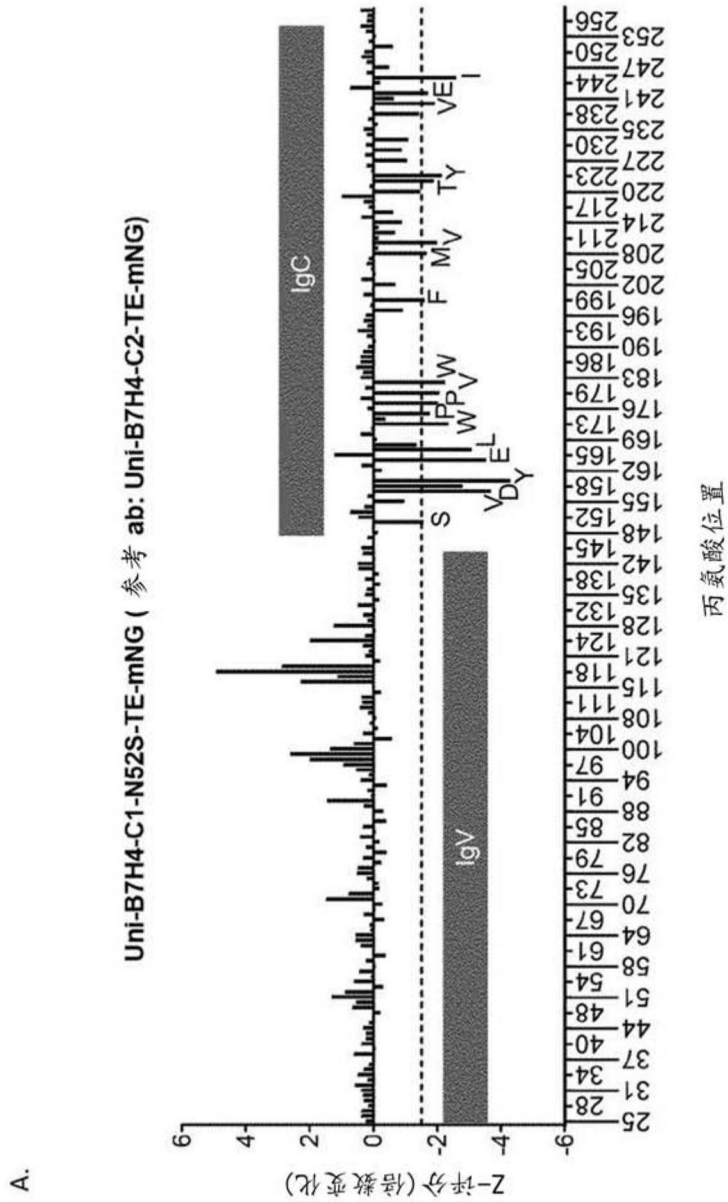


图3

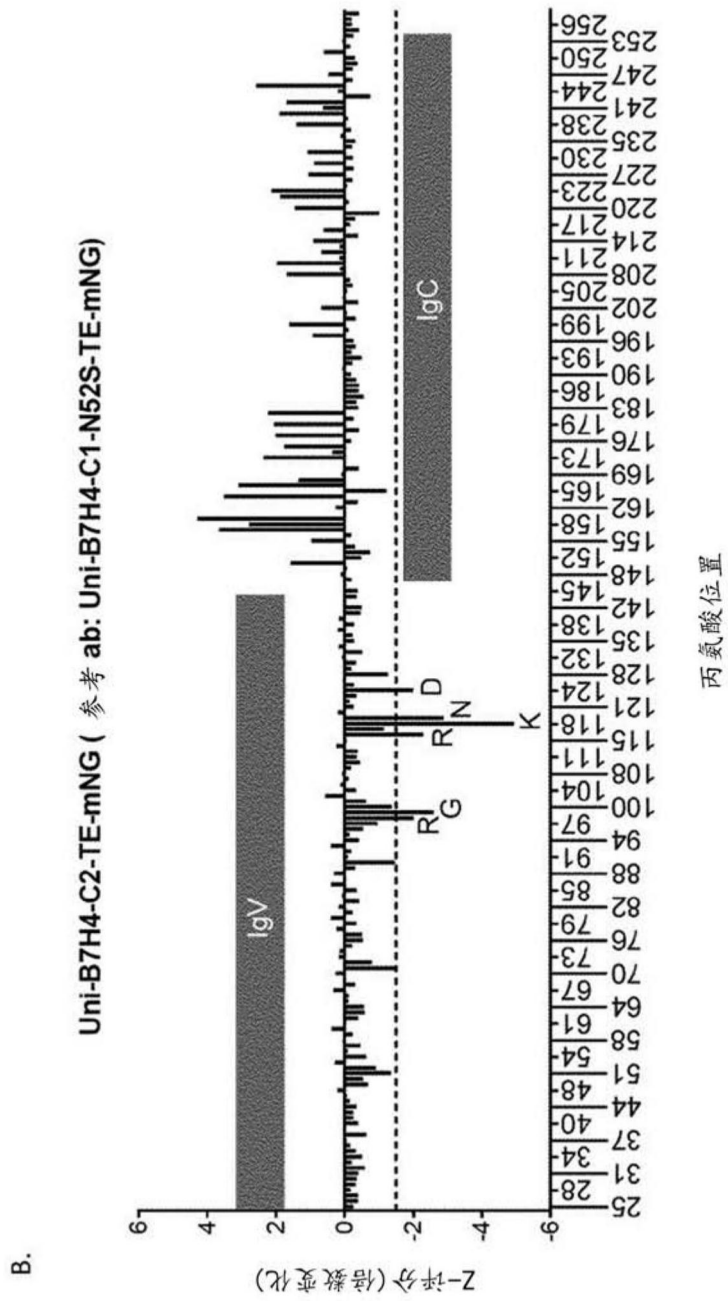


图3(续)

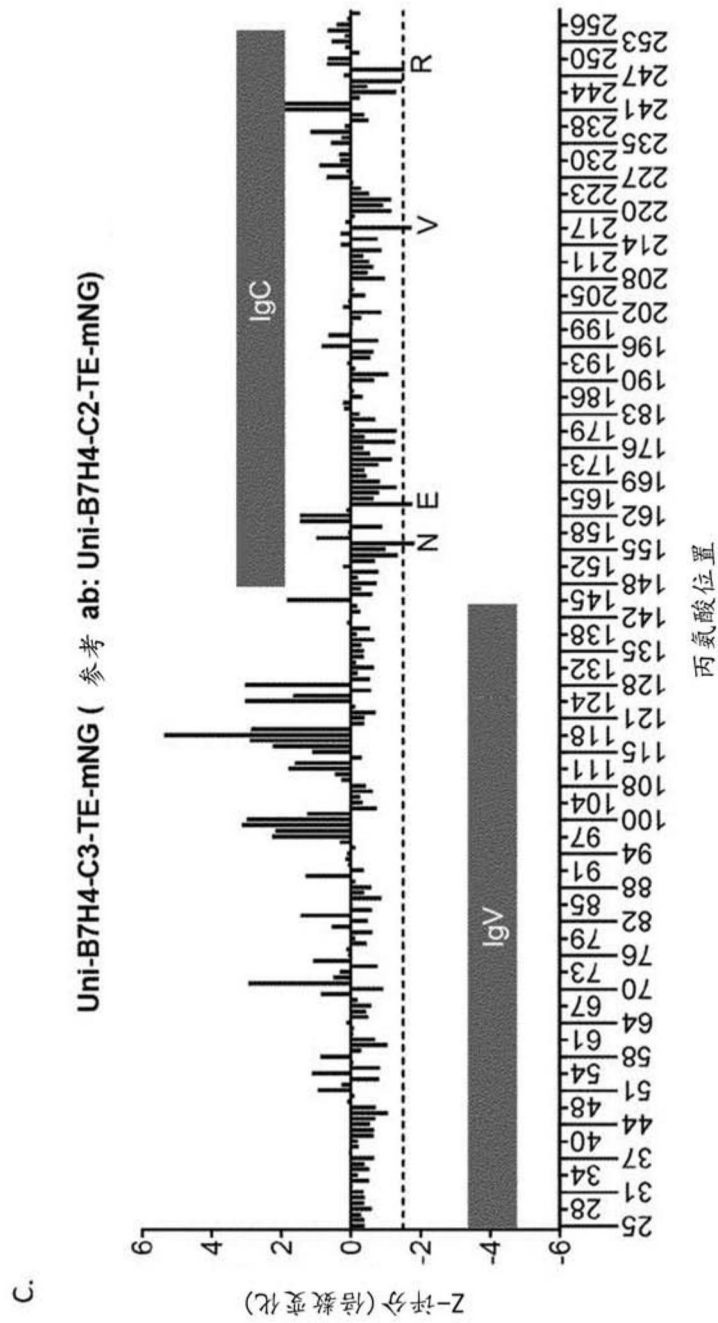


图3(续)

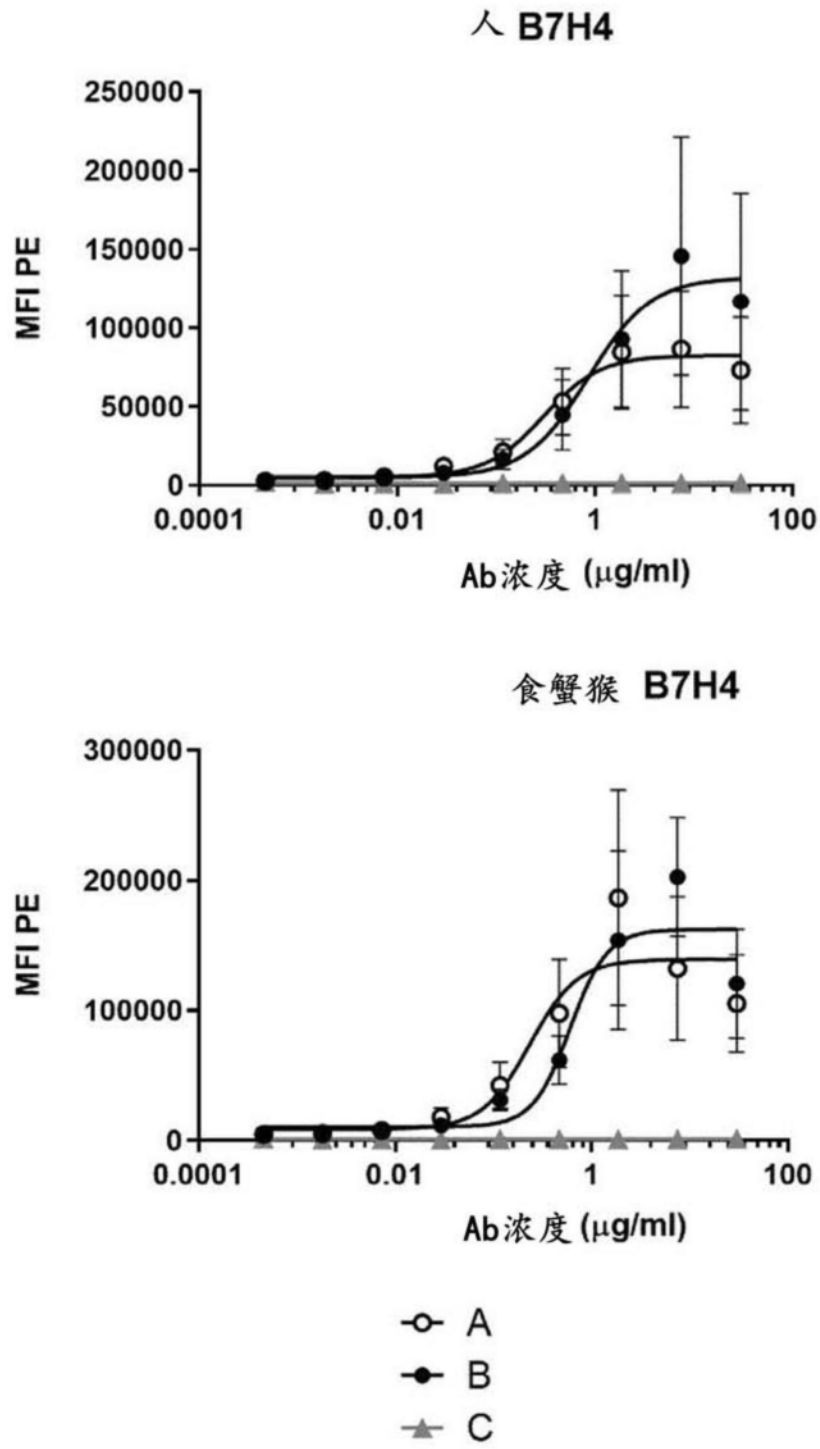


图4

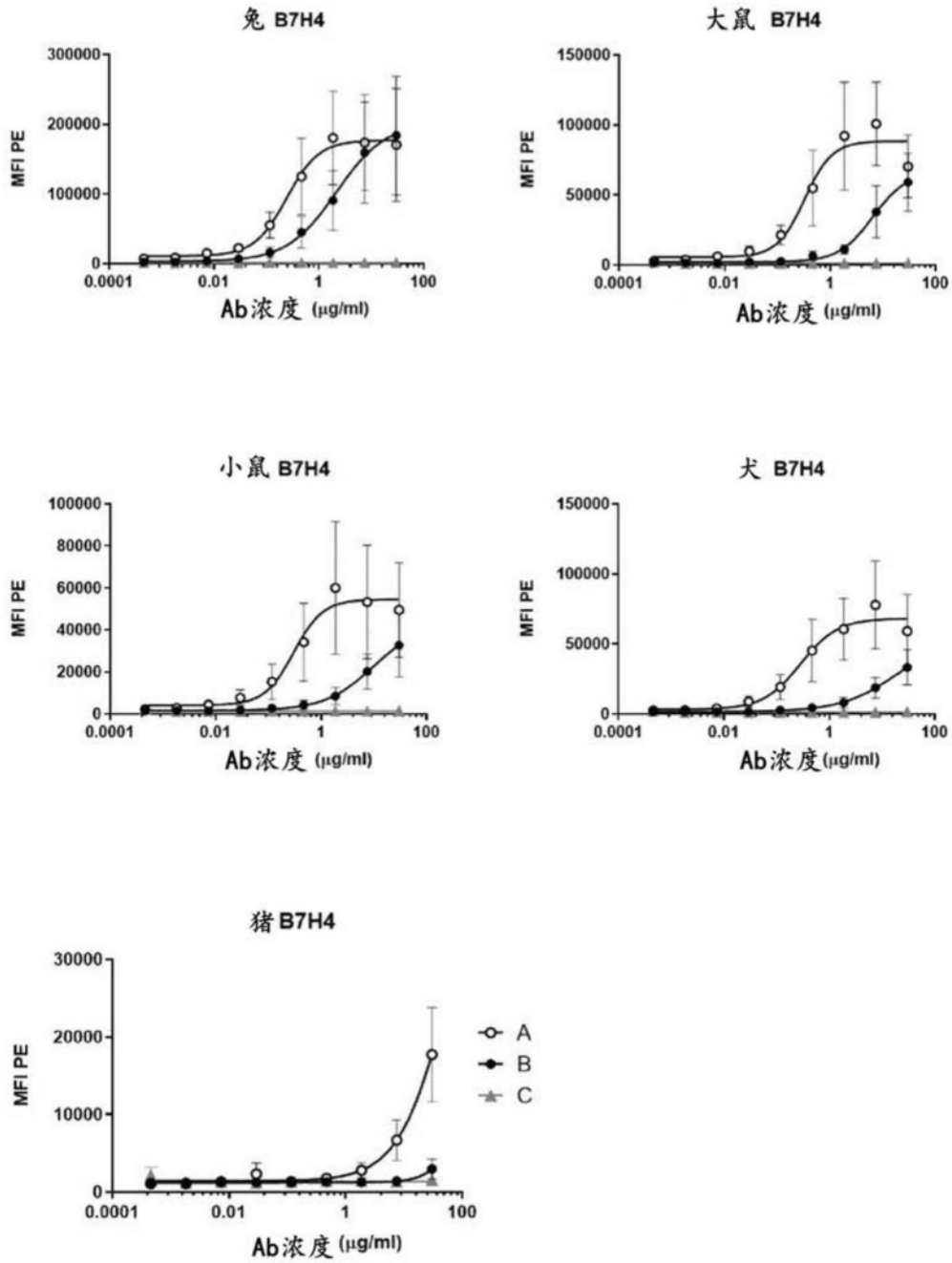


图5

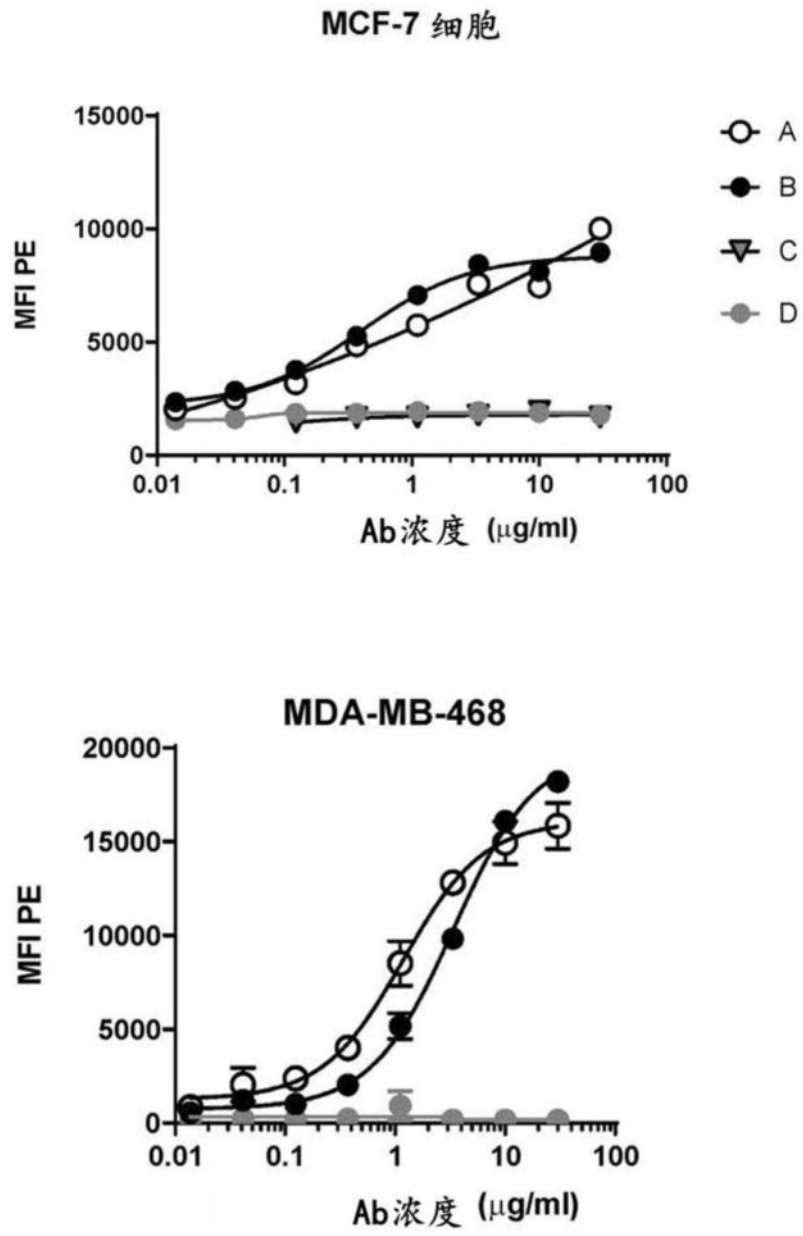


图7

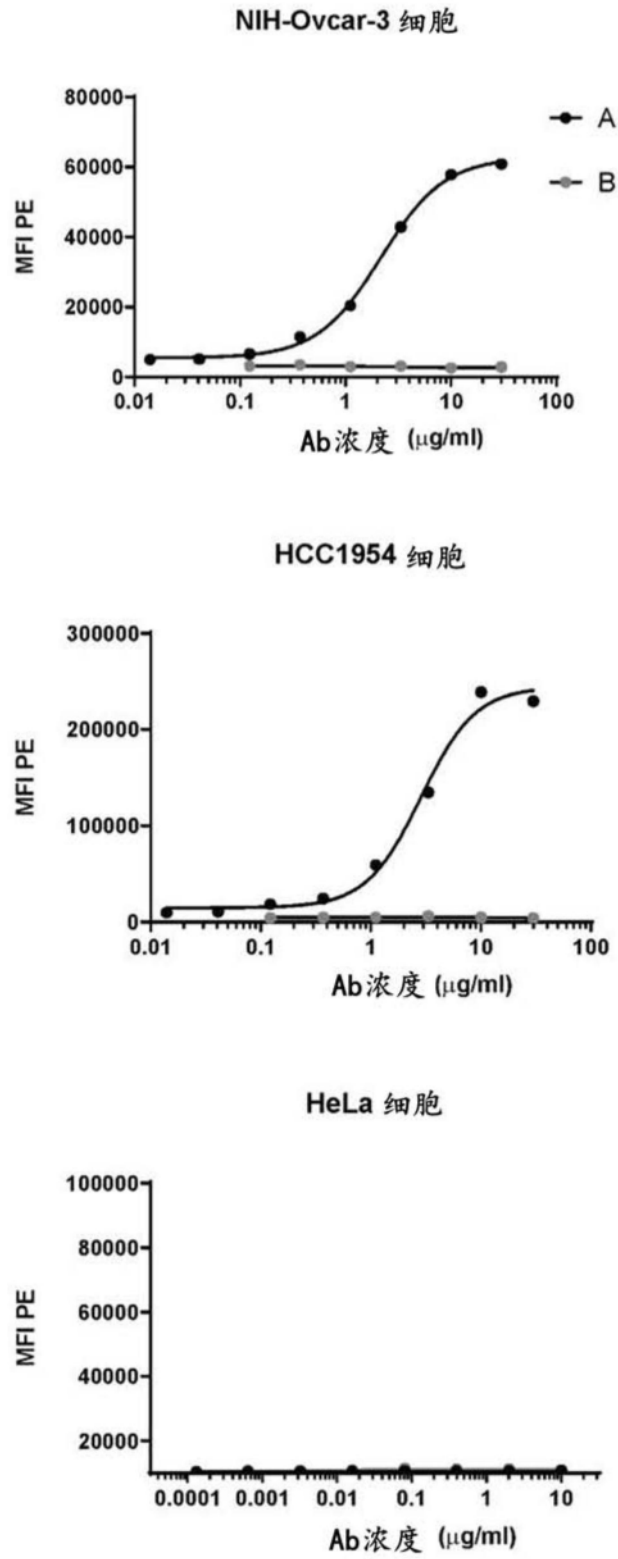


图8

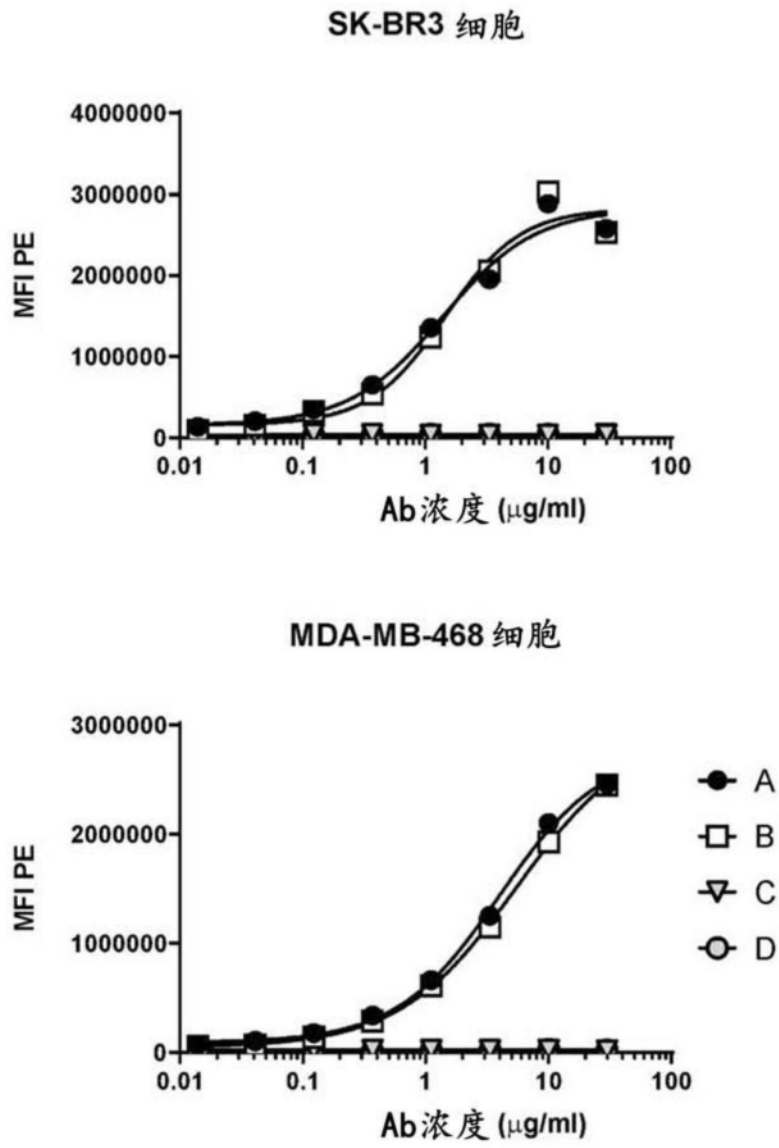
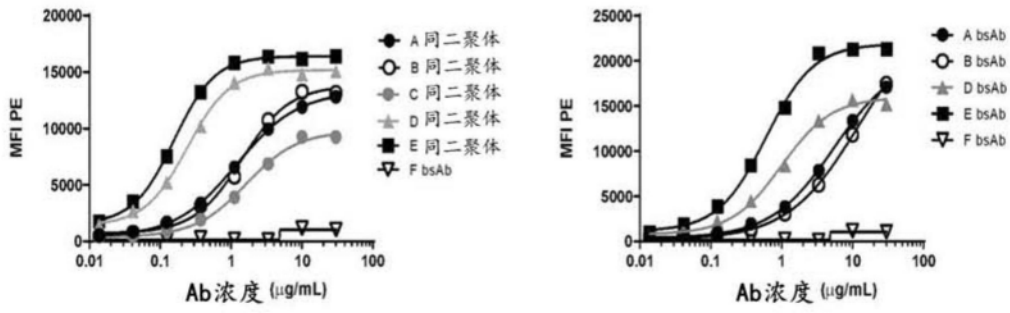


图9

MDA-MB-468



HCC1954

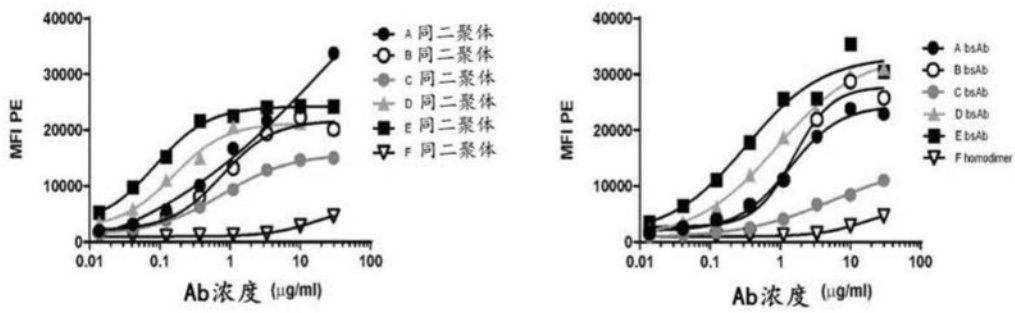


图10

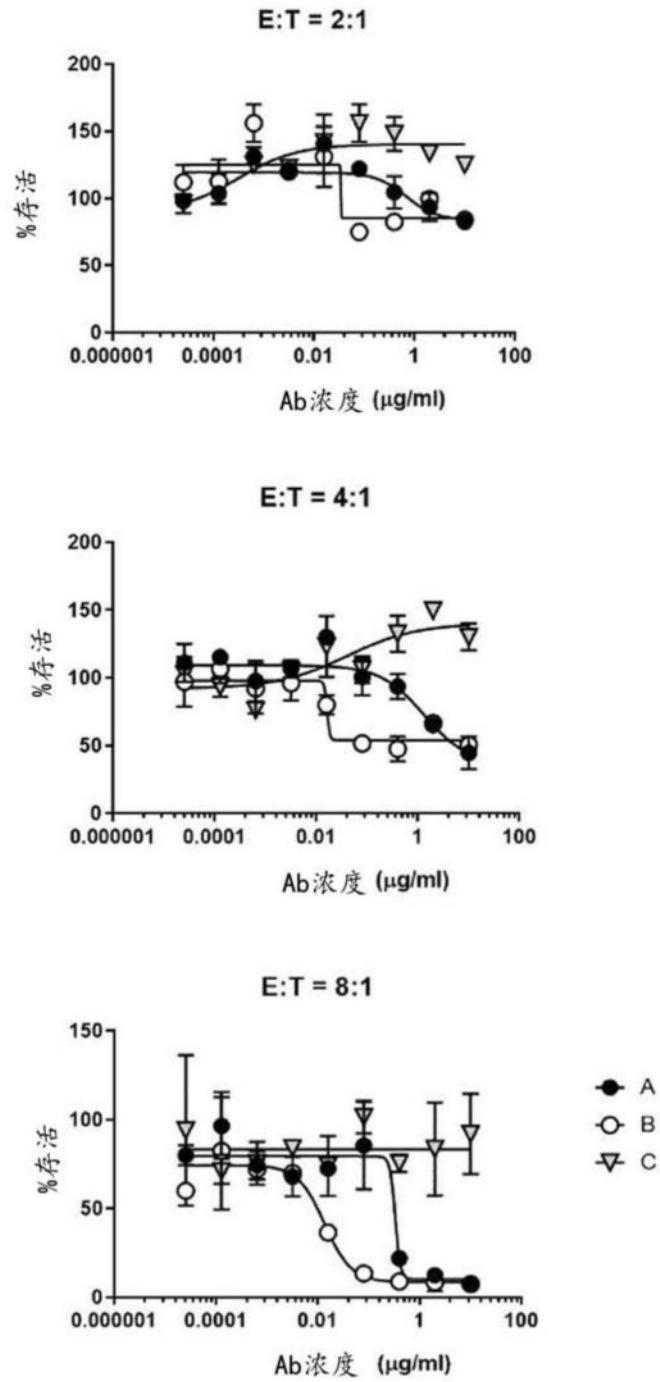


图11

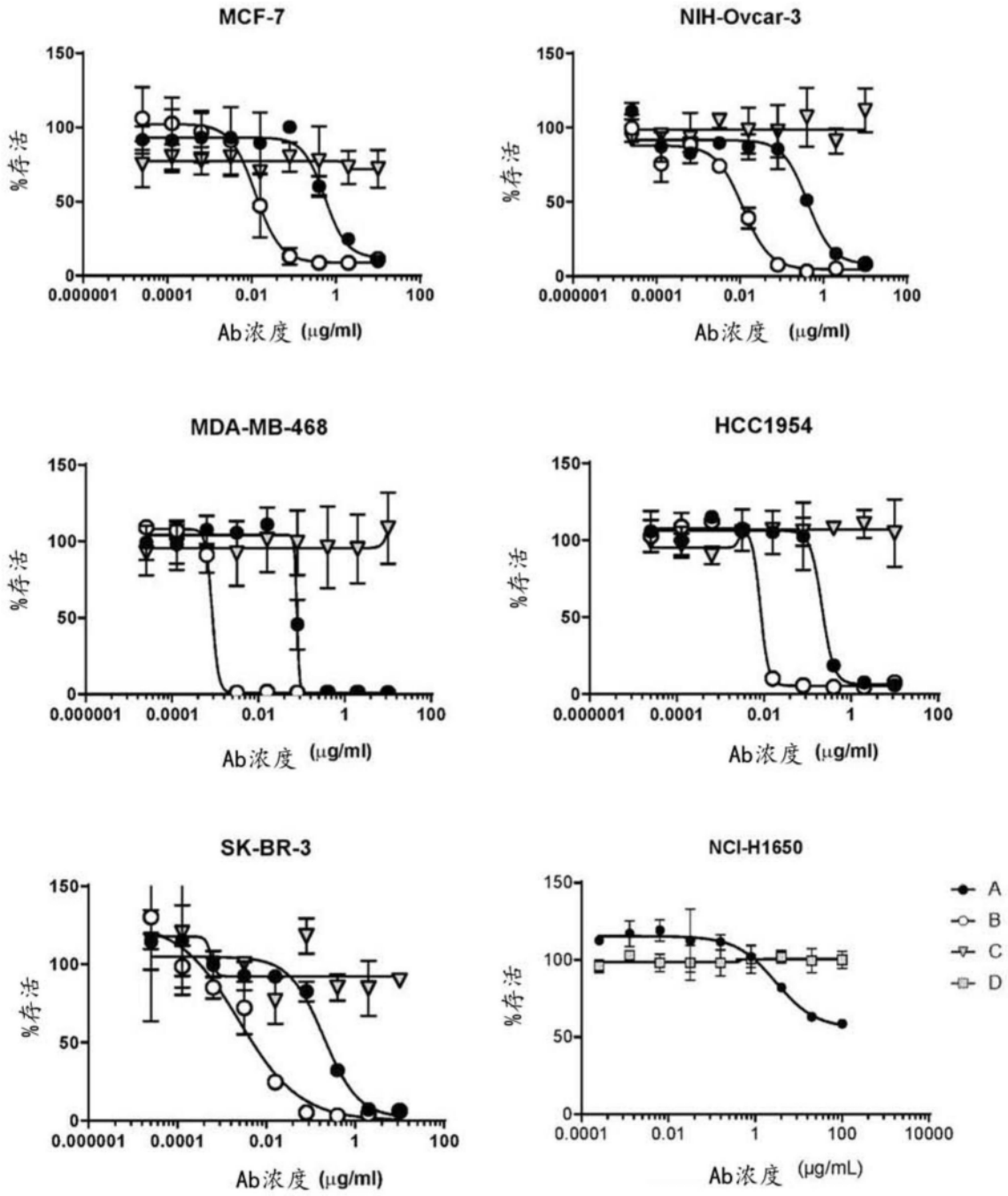


图12

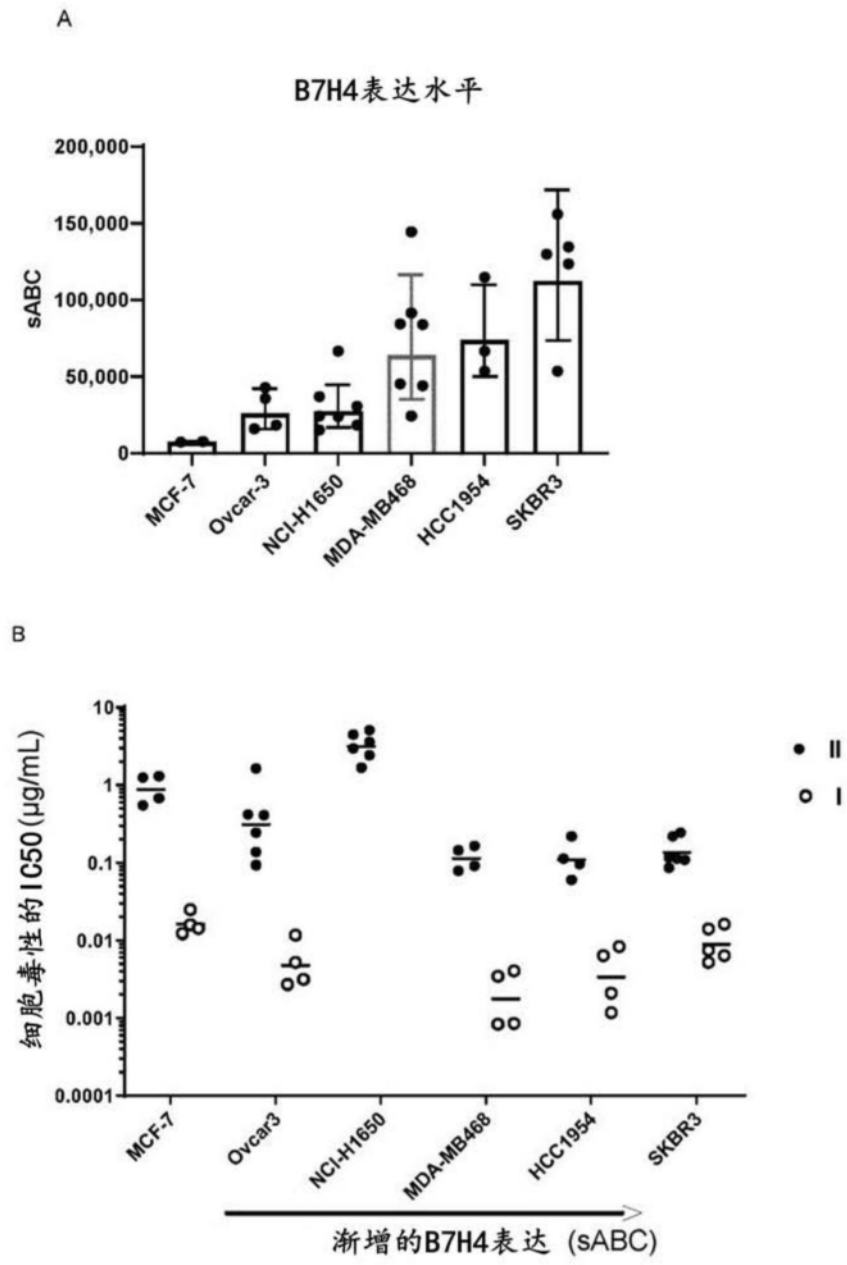


图13

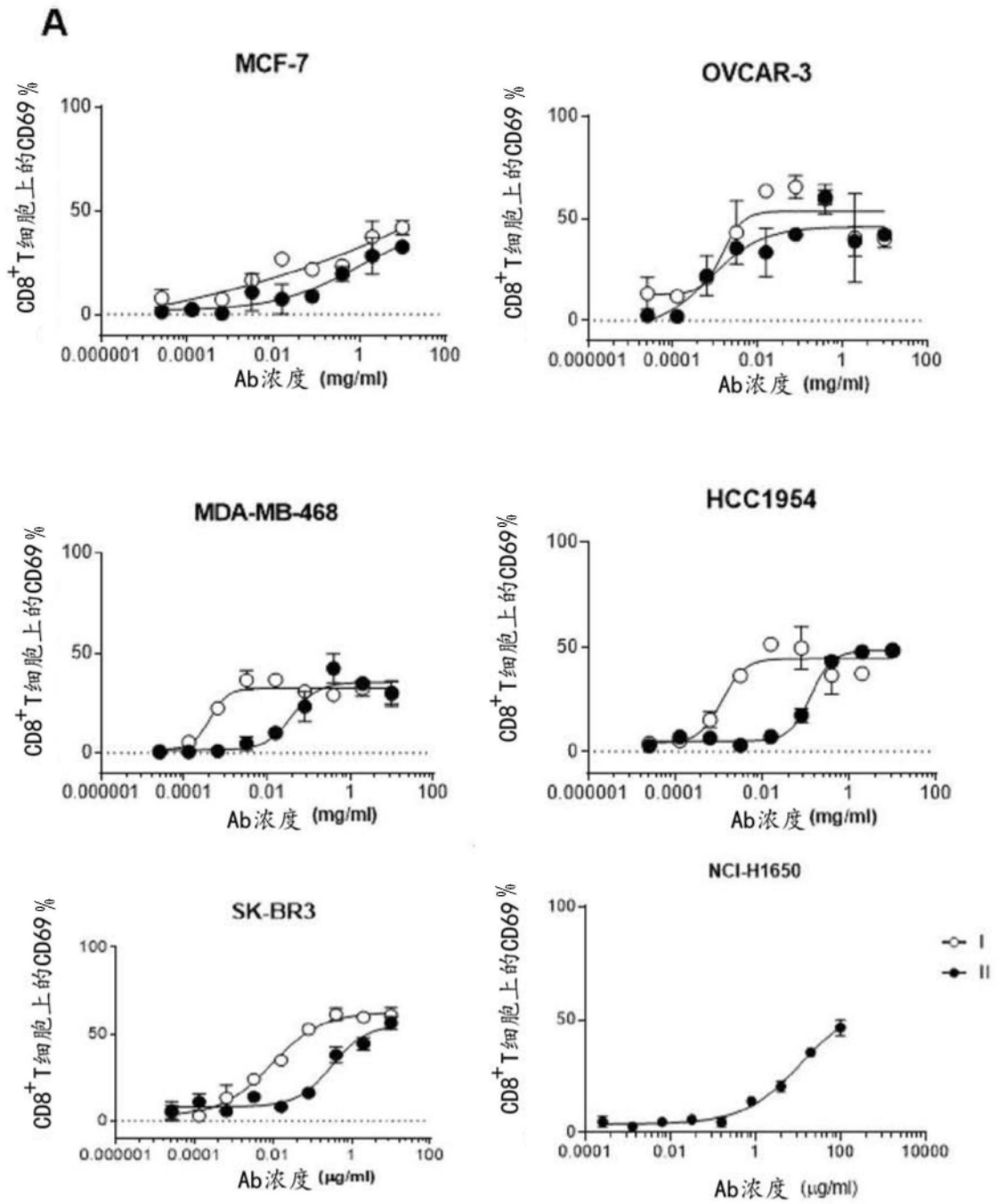


图14

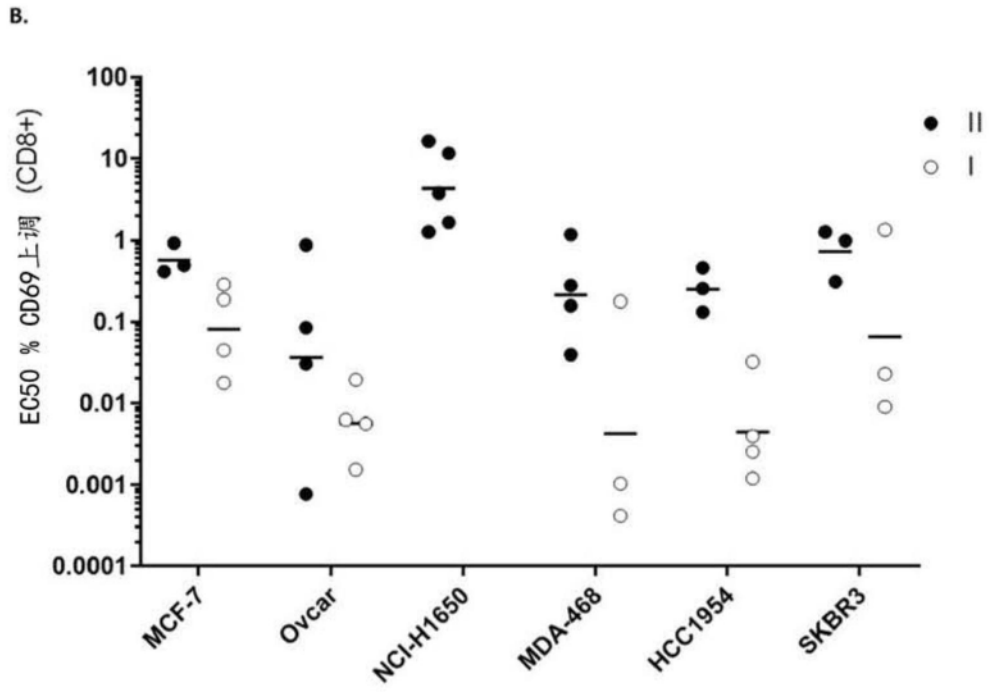


图14(续)

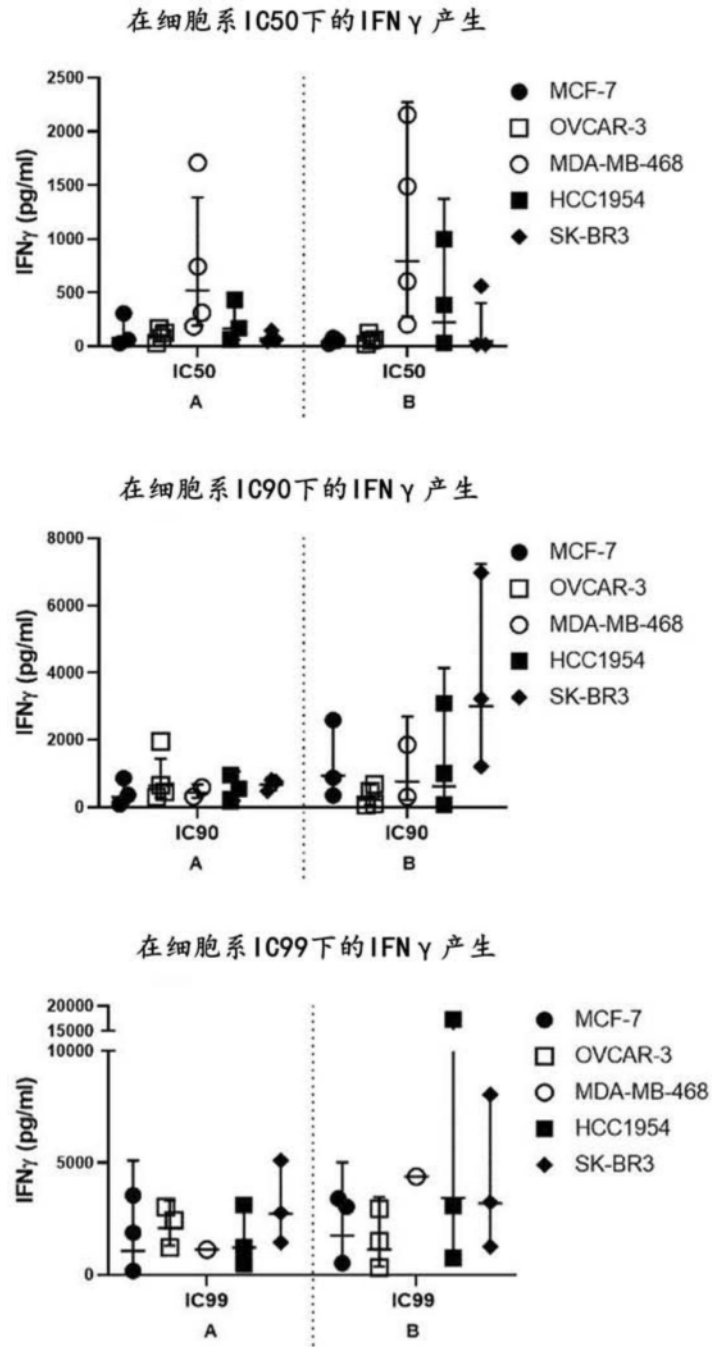


图15

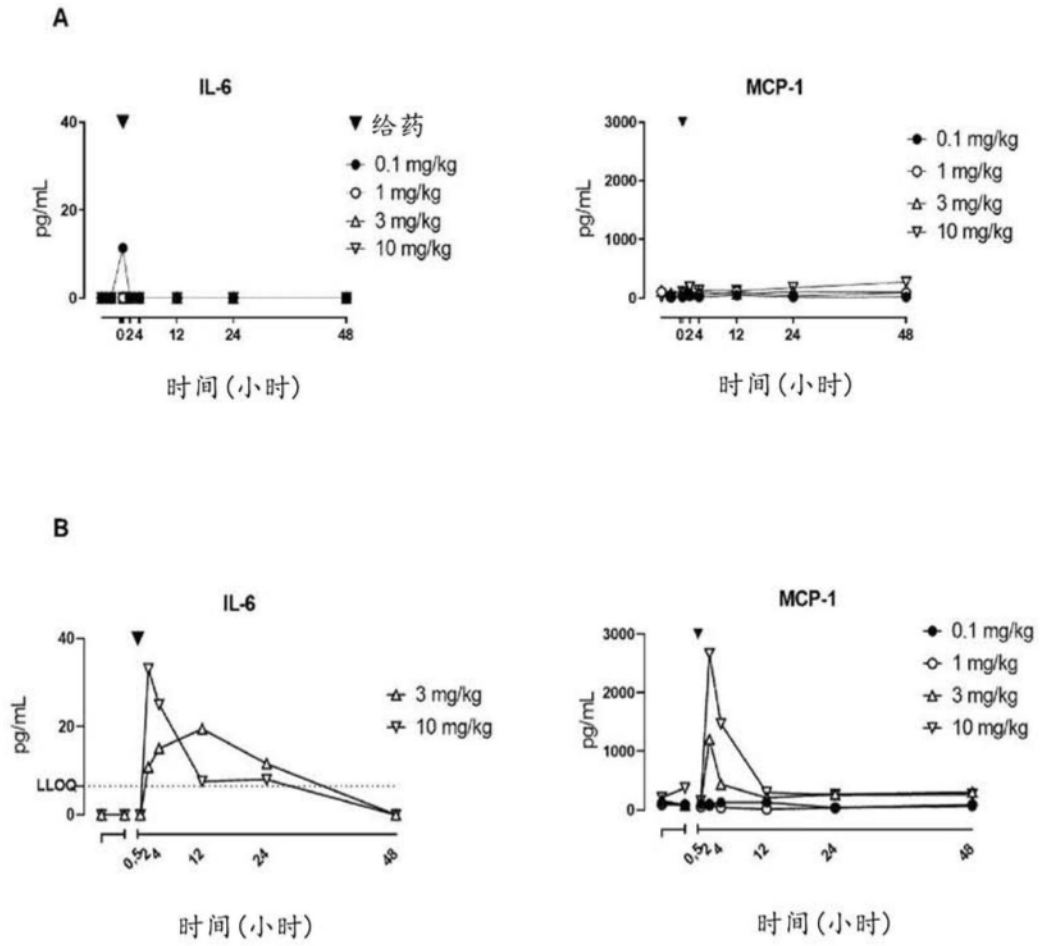


图16

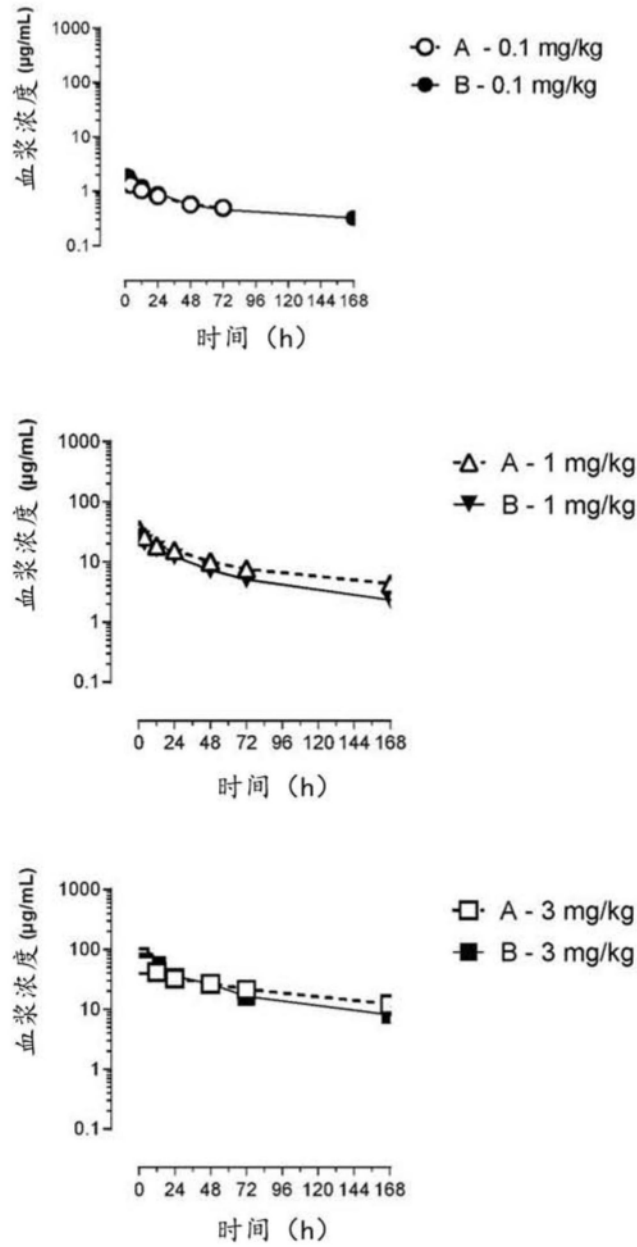


图17

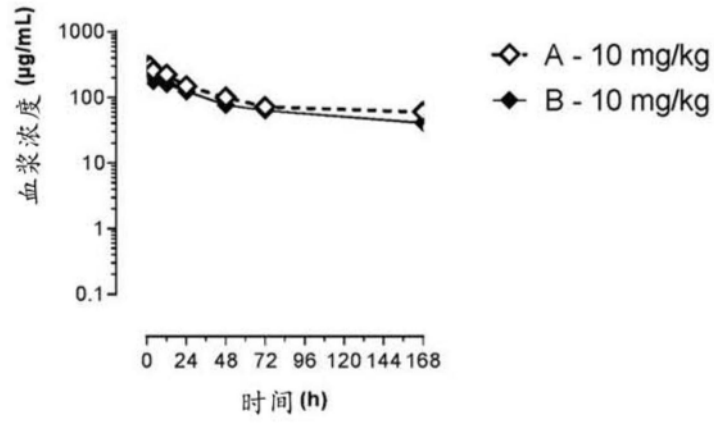


图17(续)

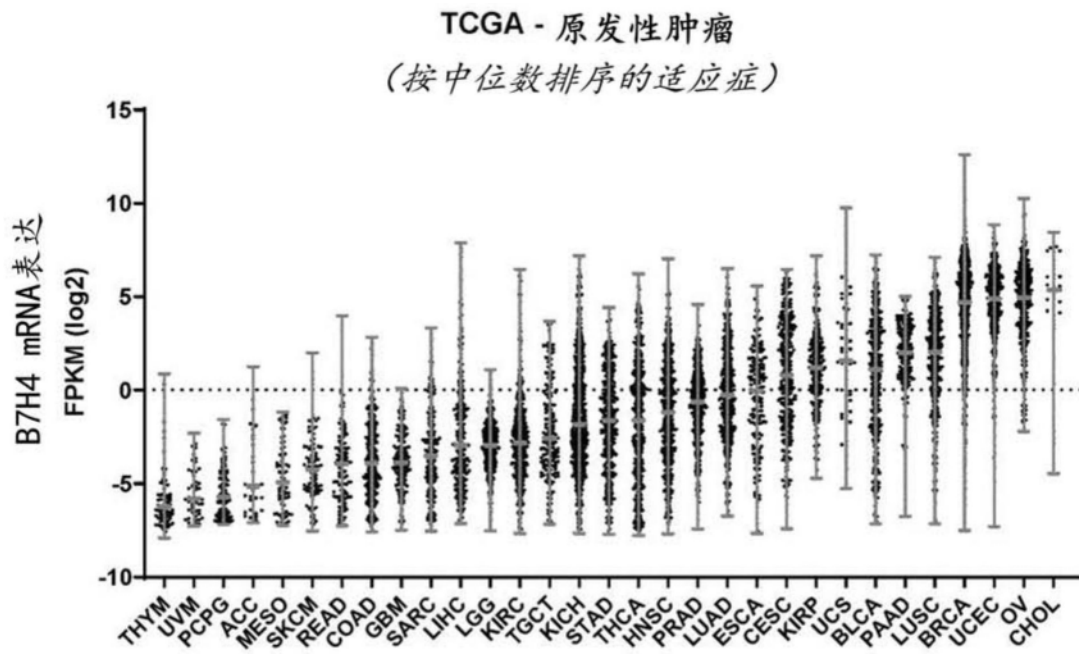


图18