



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118339184 A

(43) 申请公布日 2024.07.12

(21) 申请号 202280079188.6

(22) 申请日 2022.11.29

(30) 优先权数据

63/284,937 2021.12.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/080542 2022.11.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/102367 EN 2023.06.08

(71) 申请人 卡德门企业有限公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 陆丹 J·P·帕特尔 T·章

Z·波隆斯卡娅 F·米雅拉

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

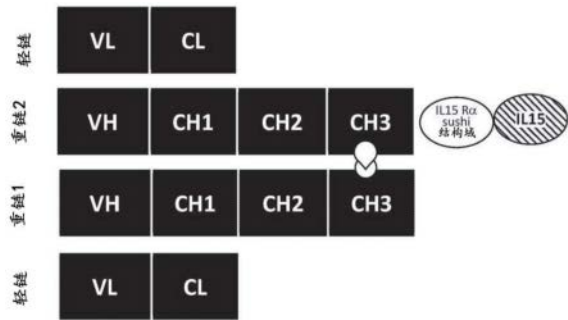
权利要求书10页 说明书92页
序列表(电子公布) 附图76页

(54) 发明名称

B7-H4抗体和抗B7-H4抗体/IL-15融合蛋白

(57) 摘要

本文提供了可用于结合且抑制B7-H4的重组抗体、其抗原结合片段及其融合蛋白。还提供了编码本文公开的抗体、其抗原结合片段及其融合蛋白的核酸分子以及它们的治疗组合物。还公开了将所公开的抗体、其抗原结合片段及其融合蛋白用于治疗疾病的方法。



1. 一种抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区和所述轻链可变区中的每一个包含CDR1、CDR2和CDR3,并且其中:

a. CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,并且其中:

i. CDR1L包含SEQ ID NO:20,CDR2L包含SEQ ID NO:21并且CDR3L包含SEQ ID NO:22;或

ii. CDR1L包含SEQ ID NO:66,CDR2L包含SEQ ID NO:67并且CDR3L包含SEQ ID NO:68;

或

iii. CDR1L包含SEQ ID NO:70,CDR2L包含SEQ ID NO:71并且CDR3L包含SEQ ID NO:72;

或

b. CDR1H包含SEQ ID NO:4,CDR2H包含SEQ ID NO:5,CDR3H包含SEQ ID NO:

6,并且其中:

i. CDR1L包含SEQ ID NO:8,CDR2L包含SEQ ID NO:9并且CDR3L包含SEQ ID NO:10;

ii. CDR1L包含SEQ ID NO:77,CDR2L包含SEQ ID NO:78并且CDR3L包含SEQ ID NO:79;

或

iii. CDR1L包含SEQ ID NO:81,CDR2L包含SEQ ID NO:82并且CDR3L包含SEQ ID NO:83。

2. 根据权利要求1所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:70,CDR2L包含SEQ ID NO:71,并且CDR3L包含SEQ ID NO:72。

3. 根据权利要求1所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中:

a. 所述重链可变区包含SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15至少90%、至少95%、

至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中

i. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:19或与SEQ ID NO:19至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

ii. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:65或与SEQ ID NO:65至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;或

iii. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:69或与SEQ ID NO:69至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;或

b. 所述重链可变区包含SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中:

i. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:7或与SEQ ID NO:7至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

ii. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:76或与SEQ ID NO:76至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;或

iii. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:80或与SEQ ID NO:80至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:69或与SEQ ID NO:69至

少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

5. 根据权利要求3所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中:

a. 所述重链可变区包含SEQ ID NO:15,并且其中:

i. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:19;

ii. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:65;或

iii. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:69;或

b. 所述重链可变区包含SEQ ID NO:3,并且其中:

i. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:7;

ii. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:76;或

iii. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:80。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:15并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:69。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与人hB7-H4的IgV结构域结合。

8. 一种抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区和所述轻链可变区中的每一个包含CDR1、CDR2和CDR3,并且其中CDR1H包含SEQ ID NO:46,CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,并且其中:

a. CDR1L包含SEQ ID NO:50,CDR2L包含SEQ ID NO:51并且CDR3L包含SEQ ID NO:52;

b. CDR1L包含SEQ ID NO:88,CDR2L包含SEQ ID NO:89并且CDR3L包含SEQ ID NO:90;

c. CDR1L包含SEQ ID NO:92,CDR2L包含SEQ ID NO:93并且CDR3L包含SEQ ID NO:94;

d. CDR1L包含SEQ ID NO:96,CDR2L包含SEQ ID NO:97并且CDR3L包含SEQ ID NO:98;

e. CDR1L包含SEQ ID NO:100,CDR2L包含SEQ ID NO:101并且CDR3L包含SEQ ID NO:102;

f. CDR1L包含SEQ ID NO:104,CDR2L包含SEQ ID NO:105并且CDR3L包含SEQ ID NO:106;或

g. CDR1L包含SEQ ID NO:108,CDR2L包含SEQ ID NO:109并且CDR3L包含SEQ ID NO:110。

9. 根据权利要求8所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:46,CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:108,CDR2L包含SEQ ID NO:109并且CDR3L包含SEQ ID NO:110。

10. 根据权利要求8所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列,并且其中:

a. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:49或与SEQ ID NO:49至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

b. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:87或与SEQ ID NO:87至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

c. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:91或与SEQ ID NO:91至少90%、至少95%、至少

96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列；

d.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:95或与SEQ ID NO:95至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列；

e.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:99或与SEQ ID NO:99至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列；

f.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:103或与SEQ ID NO:103至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列；或

g.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:107或与SEQ ID NO:107至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

11.根据权利要求8-10中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:107或与SEQ ID NO:107至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

12.根据权利要求10所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45,并且其中:

a.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:49;

b.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:87;

c.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:91;

d.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:95;

e.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:99;

f.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:103;或

g.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:107。

13.根据权利要求8-12中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45,并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:107。

14.根据权利要求8-13中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与人和鼠hB7-H4的IgC结构域结合。

15.一种抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区和所述轻链可变区中的每一个包含CDR1、CDR2和CDR3,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,并且其中:

a.CDR1L包含SEQ ID NO:62,CDR2L包含SEQ ID NO:63并且CDR3L包含SEQ ID NO:64;

b.CDR1L包含SEQ ID NO:115,CDR2L包含SEQ ID NO:116并且CDR3L包含SEQ ID NO:117;

c.CDR1L包含SEQ ID NO:119,CDR2L包含SEQ ID NO:120并且CDR3L包含SEQ ID NO:121;

d.CDR1L包含SEQ ID NO:123,CDR2L包含SEQ ID NO:124并且CDR3L包含SEQ ID NO:125;

e.CDR1L包含SEQ ID NO:127,CDR2L包含SEQ ID NO:128并且CDR3L包含SEQ ID NO:129;或

f. CDR1L包含SEQ ID NO:131, CDR2L包含SEQ ID NO:132并且CDR3L包含SEQ ID NO:133。

16. 根据权利要求15所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:58, CDR2H包含SEQ ID NO:59, CDR3H包含SEQ ID NO:60, CDR1L包含SEQ ID NO:119, CDR2L包含SEQ ID NO:120, 并且CDR3L包含SEQ ID NO:121。

17. 根据权利要求15所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57或与SEQ ID NO:57至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列,并且其中:

a. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:61或与SEQ ID NO:61至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

b. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:114或与SEQ ID NO:114至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

c. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:118或与SEQ ID NO:118至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

d. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:122或与SEQ ID NO:122至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

e. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:126或与SEQ ID NO:126至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;或

f. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:130或与SEQ ID NO:130至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

18. 根据权利要求15-17中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57或与SEQ ID NO:57至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:118或与SEQ ID NO:118至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

19. 根据权利要求17所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57, 并且其中:

a. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:61;

b. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:114;

c. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:118;

d. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:122;

e. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:126;或

f. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:130。

20. 根据权利要求15-19中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57, 并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:118。

21. 根据权利要求15-20中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与人和鼠hB7-H4的IgV结构域结合。

22. 一种抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段与根据前述权利要求中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段结合B7-H4上相同的表位。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体

或抗原结合片段是嵌合抗体、CDR移植抗体或人源化抗体或其抗原结合片段。

24. 根据前述权利要求中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是多特异性抗体或双特异性抗体或其抗原结合片段。

25. 根据前述权利要求中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是scFv、Fv、Fab'、Fab、F(ab')₂或双抗体。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是IgG类免疫球蛋白。

27. 根据权利要求26所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段具有同种型IgG1。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段被去糖基化。

29. 根据前述权利要求中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含第一重链恒定区和第二重链恒定区,并且其中所述抗体或其抗原结合片段包含至少一个在所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区的CH3结构域中引起异二聚化的修饰。

30. 根据权利要求29所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述第一重链恒定区的CH3结构域中的修饰与所述第二重链恒定区的CH3结构域中的修饰不同。

31. 根据权利要求29或30所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述第一重链恒定区包含选自S354C、T366W、Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代,并且其中所述第二重链恒定区包含选自S354C、T366W、Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代。

32. 根据权利要求31所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中:

a. 所述第一重链恒定区包含选自S354C和T366W(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代,并且所述第二重链恒定区包含选自Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代;或

b. 所述第二重链恒定区包含选自S354C和T366W(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代,并且所述第一重链恒定区包含选自Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代。

33. 根据权利要求32所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中:

a. 所述第一重链恒定区包含氨基酸取代S354C和T366W(Kabat EU索引编号),并且所述第二重链恒定区包含氨基酸取代Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号);或

b. 所述第二重链恒定区包含氨基酸取代S354C和T366W(Kabat EU索引编号),并且所述第一重链恒定区包含氨基酸取代Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)。

34. 根据前述权利要求中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述第一重链恒定区、所述第二重链恒定区或两者均包含氨基酸取代M428L和N434S(Kabat EU索引编号)。

35. 一种融合蛋白,所述融合蛋白包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段;

b. IL-15 α sushi结构域多肽,其包含SEQ ID NO:167或与SEQ ID NO:167至少90%、至

少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;以及

c. IL-15多肽,其包含SEQ ID NO:166或与SEQ ID NO:166至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。

36. 根据权利要求35所述的融合蛋白,其中所述B7H4抗体包含重链CDR1 (CDR1H)、CDR2 (CDR2H)和CDR3 (CDR3H)以及轻链CDR1 (CDR1L)、CDR2 (CDR2L)和CDR3 (CDR3L),其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:70,CDR2L包含SEQ ID NO:71并且CDR3L包含SEQ ID NO:72。

37. 根据权利要求35所述的融合蛋白,其中所述B7H4抗体包含重链CDR1 (CDR1H)、CDR2 (CDR2H)和CDR3 (CDR3H)以及轻链CDR1 (CDR1L)、CDR2 (CDR2L)和CDR3 (CDR3L),其中CDR1H包含SEQ ID NO:172,CDR2H包含SEQ ID NO:173,CDR3H包含SEQ ID NO:174,CDR1L包含SEQ ID NO:175,CDR2L包含SEQ ID NO:176并且CDR3L包含SEQ ID NO:177。

38. 根据权利要求35所述的融合蛋白,其中所述B7H4抗体包含重链CDR1 (CDR1H)、CDR2 (CDR2H)和CDR3 (CDR3H)以及轻链CDR1 (CDR1L)、CDR2 (CDR2L)和CDR3 (CDR3L),其中CDR1H包含SEQ ID NO:178,CDR2H包含SEQ ID NO:179,CDR3H包含SEQ ID NO:180,CDR1L包含SEQ ID NO:181,CDR2L包含SEQ ID NO:182并且CDR3L包含SEQ ID NO:183。

39. 根据权利要求35所述的融合蛋白,其中所述B7H4抗体包含重链CDR1 (CDR1H)、CDR2 (CDR2H)和CDR3 (CDR3H)以及轻链CDR1 (CDR1L)、CDR2 (CDR2L)和CDR3 (CDR3L),其中CDR1H包含SEQ ID NO:184,CDR2H包含SEQ ID NO:185,CDR3H包含SEQ ID NO:186,CDR1L包含SEQ ID NO:187,CDR2L包含SEQ ID NO:188并且CDR3L包含SEQ ID NO:189。

40. 根据权利要求35-39中任一项所述的融合蛋白,其中所述IL-15 α sushi结构域多肽包含SEQ ID NO:167。

41. 根据权利要求40所述的融合蛋白,其中所述IL-15 α sushi结构域多肽由SEQ ID NO:167的氨基酸序列组成。

42. 根据权利要求35-41中任一项所述的融合蛋白,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID NO:166。

43. 根据权利要求42所述的融合蛋白,其中所述IL-15多肽由SEQ ID NO:166组成。

44. 根据权利要求35-43中任一项所述的融合蛋白,其中所述IL-15 α sushi结构域多肽与所述IL-15多肽的N末端融合。

45. 根据权利要求35-44中任一项所述的融合蛋白,其中所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段包含第一重链恒定区和第二重链恒定区,并且其中所述IL-15 α sushi结构域多肽和所述IL-15多肽与所述第一重链恒定区的C末端融合。

46. 根据权利要求45所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含接头,所述接头连接(i)所述IL-15 α sushi结构域多肽和所述IL-15多肽以及(ii)所述恒定区的C末端。

47. 根据权利要求46所述的融合蛋白,其中所述接头的长度在25-35个氨基酸之间。

48. 根据权利要求47所述的融合蛋白,其中所述接头主要由Gly (G)、Asn (N)、Ser (S)、Thr (T)、Ala (A)、Leu (L)和Gln (Q)组成。

49. 根据权利要求46-48中任一项所述的融合蛋白,其中所述接头包含SEQ ID NO:168。

50. 根据权利要求35-49中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO:169。

51. 根据权利要求45-50中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区包含至少一个在所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区的CH3结构域中引起异二聚化的修饰。

52. 根据权利要求51所述的融合蛋白,其中所述第一重链恒定区的CH3结构域中的修饰与所述第二重链恒定区的CH3结构域中的修饰不同。

53. 根据权利要求52所述的融合蛋白,其中所述第一重链恒定区包含选自S354C、T366W、Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代。

54. 根据权利要求53所述的融合蛋白,其中:

a. 所述第一重链恒定区包含选自S354C和T366W(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代,并且所述第二重链恒定区包含选自Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代;或

b. 所述第二重链恒定区包含选自S354C和T366W(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代,并且所述第一重链恒定区包含选自Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代。

55. 根据权利要求54所述的融合蛋白,其中:

a. 所述第一重链恒定区包含氨基酸取代S354C和T366W(Kabat EU索引编号),并且所述第二重链恒定区包含氨基酸取代Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号);或

b. 所述第二重链恒定区包含氨基酸取代S354C和T366W(Kabat EU索引编号),并且所述第一重链恒定区包含氨基酸取代Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)。

56. 根据权利要求35-51中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一重链恒定区、所述第二重链恒定区或两者均包含氨基酸取代M428L和N434S(Kabat EU索引编号)。

57. 根据权利要求35-50中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含不多于一个IL-15 α sushi结构域多肽和不多于一个IL-15多肽。

58. 根据权利要求35-57中任一项所述的融合蛋白,其中所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段是根据权利要求1-22中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段。

59. 一种融合蛋白,所述融合蛋白包含:

a. 含有SEQ ID NO:69和/或SEQ ID NO:145的轻链;

b. 含有SEQ ID NO:150或SEQ ID NO:151的第一重链;和

c. 含有SEQ ID NO:157或SEQ ID NO:158的第二重链。

60. 根据权利要求59所述的融合蛋白,其中:

a. 所述第一重链包含SEQ ID NO:150;并且

b. 所述第二重链包含SEQ ID NO:157。

61. 根据权利要求59所述的融合蛋白,其中:

a. 所述第一重链包含SEQ ID NO:151;并且

b. 所述第二重链包含SEQ ID NO:158。

62. 一种融合蛋白,所述融合蛋白包含:

a. 含有SEQ ID NO:118和/或SEQ ID NO:144的轻链;

b. 含有SEQ ID NO:148或SEQ ID NO:149的第一重链;和

c. 含有SEQ ID NO:155或SEQ ID NO:156的第二重链。

63. 根据权利要求62所述的融合蛋白, 其中:
- 所述第一重链包含SEQ ID NO:148; 并且
 - 所述第二重链包含SEQ ID NO:155。
64. 根据权利要求62所述的融合蛋白, 其中:
- 所述第一重链包含SEQ ID NO:149; 并且
 - 所述第二重链包含SEQ ID NO:156。
65. 一种融合蛋白, 所述融合蛋白包含:
- 含有SEQ ID NO:145的轻链
 - 含有SEQ ID NO:150的第一重链
 - 含有SEQ ID NO:157的第二重链。
66. 一种核酸序列, 所述核酸序列编码根据权利要求1-34中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者根据权利要求35-65中任一项所述的融合蛋白。
67. 一种载体, 所述载体包含根据权利要求66所述的核酸。
68. 一种细胞, 所述细胞包含根据权利要求66所述的核酸或根据权利要求67所述的载体。
69. 一种细胞, 所述细胞表达根据权利要求1-34中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者根据权利要求35-65中任一项所述的融合蛋白。
70. 一种表达抗B7-H4结合蛋白的T细胞, 所述抗B7-H4结合蛋白包含根据权利要求1-34中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段。
71. 一种表达抗B7-H4结合蛋白的T细胞, 所述抗B7-H4结合蛋白包含根据权利要求1-34中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的重可变链和轻可变链。
72. 根据权利要求1-34中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或根据权利要求35-65中任一项所述的融合蛋白, 其中所述抗体或抗原结合片段或者所述融合蛋白与细胞毒素、荧光标记和显像剂中的一种或多种缀合。
73. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含 (i) 根据权利要求1-34中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者根据权利要求35-65中任一项所述的融合蛋白以及 (ii) 药学上可接受的载体。
74. 一种产生抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白的方法, 所述方法包括将根据权利要求59所述的细胞在使得产生所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白的条件下培养。
75. 一种抑制有需要的受试者中的B7-H4与B7-H4的配体结合的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1-34中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者根据权利要求35-65中任一项所述的融合蛋白。
76. 一种增加有需要的受试者中的T细胞激活的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1-34中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者根据权利要求35-65中任一项所述的融合蛋白。
77. 一种增加有需要的受试者中的CD8+T细胞增殖的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1-34中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者根据权利要求35-65中任一项所述的融合蛋白。

78. 一种诱导有需要的受试者中的B7-H4表达细胞中抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1-34中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者根据权利要求35-65中任一项所述的融合蛋白。

79. 一种刺激有需要的受试者中的免疫系统的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1-34中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者根据权利要求35-65中任一项所述的融合蛋白。

80. 一种治疗有需要的受试者中的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1-34中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者根据权利要求35-65中任一项所述的融合蛋白。

81. 根据权利要求80所述的方法,其中所述癌症是卵巢癌、黑色素瘤、胰腺癌、甲状腺癌、肺癌、结直肠癌、鳞状细胞癌、前列腺癌、乳腺癌、膀胱癌或胃癌。

82. 根据权利要求80所述的方法,其中所述癌症是三阴性乳腺癌或卵巢癌。

83. 一种减少有需要的受试者中的肿瘤生长的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1-34中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者根据权利要求35-65中任一项所述的融合蛋白。

84. 一种减少有需要的受试者中的肿瘤转移的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1-34中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者根据权利要求35-65中任一项所述的融合蛋白。

85. 根据权利要求75-84中任一项所述的方法,其中所述受试者对用检查点抑制剂的疗法没有反应或起初对检查点抑制剂治疗有反应但是之后对检查点抑制剂阻断具有耐药性。

86. 根据权利要求75-85中任一项所述的方法,所述方法进一步包括施用另外的治疗剂或另外的疗法。

87. 根据权利要求85所述的方法,其中所述另外的治疗剂选自癌症疫苗、检查点抑制剂、针对肿瘤特异性抗原的抗体、卡介苗、细胞毒素、白细胞介素6受体(IL-6R)抑制剂、白细胞介素4受体(IL-4R)抑制剂、IL-10抑制剂、IL-2、IL-7、IL-21、IL-15、抗体-药物缀合物、抗炎药和膳食补充剂。

88. 根据权利要求87所述的方法,其中所述检查点抑制剂是CTLA-4、PD-1、PD-L1或PD-L2抑制剂。

89. 根据权利要求85所述的方法,其中所述另外的治疗剂是LAG3、TIGIT、LAP、平足蛋白、蛋白C受体、ICOS、GITR、CD226或CD160的抑制剂。

90. 根据权利要求85所述的方法,其中所述另外的疗法是化学疗法、放射疗法或外科手术。

91. 根据权利要求85-90中任一项所述的方法,其中将所述另外的治疗剂或另外的疗法与所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者所述融合蛋白并行或连续施用。

92. 根据权利要求85-88中任一项所述的方法,其中将所述另外的治疗剂与所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者所述融合蛋白分开施用或作为混合物施用。

93. 根据权利要求74-92中任一项所述的方法,其中所述受试者具有B7-H4的上调表达,或所述受试者已经被鉴定为B7-H4的表达阳性。

94. 根据权利要求74-93中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

95. 一种检测样品中的B7-H4的方法,所述方法包括使所述样品与根据权利要求1-34中任一项所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者根据权利要求35-65中任一项所述的融合蛋白接触。

B7-H4抗体和抗B7-H4抗体/IL-15融合蛋白

技术领域

[0001] 本公开文本总体上涉及分子生物学和医学领域。更特别地,本公开文本提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含与IL-15多肽连接的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,所述IL-15多肽进而与包含IL-15R α sushi结构域的IL-15受体 α (IL-15R α) 多肽连接。此外,本公开文本提供了与B7-H4特异性结合的抗体及其抗原结合片段,以及包含此类抗B7-H4抗体或其B7-H4结合片段的融合蛋白。还公开了包含抗体融合物或抗体的治疗组合物用于治疗疾病。

背景技术

[0002] B7-H4是仅在肿瘤细胞、抗原呈递细胞(APC)和TAM(肿瘤相关巨噬细胞)上表达的B7家族的共抑制配体。B7-H4与T细胞上的未鉴定的同源受体结合。虽然PD-L1表达与免疫学上“热”肿瘤相关,但是B7-H4表达标记“冷”环境。B7-H4表达与PD-L1表达负相关。重要地,B7-H4的过表达与癌症患者中的晚期疾病阶段和不良预后相关。肿瘤和TAM表达的B7-H4抑制抗肿瘤T细胞的活性,促进T细胞的耗尽的功能异常状态,促进肿瘤相关嗜中性粒细胞(髓源性抑制细胞)并且诱导调节性T细胞(T_{regs})、IL-6和IL-10产生。

[0003] IL-15是具有114个氨基酸的12.5kDa糖蛋白,属于细胞因子的四 α 螺旋束家族。此家族还包括IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和GM-CSF。IL-15由巨噬细胞、树突细胞和单核细胞分泌。IL-15可以刺激中央记忆CD8细胞发挥免疫,而对其他T细胞无调节作用。此外,IL-15可以激活自然杀伤(NK)细胞以及效应和记忆CD8T细胞并且可以拯救T细胞免于T_{regs}诱导的细胞凋亡。与其他细胞因子相比,以较高剂量施用IL-15也与较低的诱导全身性毒性的风险相关。人IL-15可以是可溶的或膜结合的。膜结合的IL-15(其是IL-15的主要形式)通过IL-15与细胞膜直接结合形成或通过IL-15通过膜结合IL-15R受体的呈现形成。IL-15受体由以下三个亚基构成:IL-15R α 、IL-15R β 和IL-15R γ 。在与T细胞和NK细胞上的功能性IL-15R β 和 γ 基结合前,IL-15典型地与APC上表达的IL-15受体 α 形成复合物。IL-15可以以一定亲和力($K_D \approx 10$ pM)与IL-15R α 受体单独结合。它还可以以较低亲和力($K_D \approx 1$ nM)与IL-15R β γ c信号传导复合物结合。IL-15R α 的sushi结构域(29.5kDa)在IL-15与IL-15R α 的复合物形成中起关键作用。全身性IL-15治疗的局限之一是它的体内半衰期非常短。因此,需要产生具有较长的体内半衰期同时保留其调节免疫应答的能力的IL-15/IL-15R α 的合适的免疫刺激形式。此外,需要这样的有效IL-15拮抗剂,其可以选择性地靶向疾病位点以避免不想要的全身性毒性并且提供更有效的治疗益处。

[0004] 涉及B7-H4抗体与各种细胞因子(如IL-2、IL-15、IL-21)、肿瘤坏死因子(TNF)和粒细胞集落刺激因子(GM-CSF)的组合疗法可以在治疗癌症和感染方面具有一些功效。然而,这些疗法受限于全身性毒性,所述全身性毒性与获得功效所需的高血液浓度的细胞因子相关并且与缺乏针对累及的细胞和组织而施用细胞因子的特异性相关。

[0005] 因此,对开发将各种效应分子靶向疾病位点以在没有与非特异性免疫活性相关的副作用的情况下提供治疗益处的新策略存在显著未满足的需要。

发明内容

[0006] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含与IL-15多肽连接的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,所述IL-15多肽进而与包含IL-15R α sushi结构域的IL-15受体 α (IL-15R α)多肽连接。本公开文本提供了与B7-H4特异性结合的抗体及其抗原结合片段,以及包含此类抗B7-H4抗体或其B7-H4结合片段的融合蛋白。还公开了使用所公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白治疗有需要的受试者的方法。

[0007] 在一方面,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区和所述轻链可变区中的每一个包含CDR1、CDR2和CDR3,并且其中:

a. CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,并且其中:

i. CDR1L包含SEQ ID NO:20,CDR2L包含SEQ ID NO:21并且CDR3L包含SEQ ID NO:22;

ii. CDR1L包含SEQ ID NO:66,CDR2L包含SEQ ID NO:67并且CDR3L包含SEQ ID NO:68;或

iii. CDR1L包含SEQ ID NO:70,CDR2L包含SEQ ID NO:71并且CDR3L包含SEQ ID NO:72;或

b. CDR1H包含SEQ ID NO:4,CDR2H包含SEQ ID NO:5,CDR3H包含SEQ ID NO:6,并且其中:

i. CDR1L包含SEQ ID NO:8,CDR2L包含SEQ ID NO:9并且CDR3L包含SEQ ID NO:10;

ii. CDR1L包含SEQ ID NO:77,CDR2L包含SEQ ID NO:78并且CDR3L包含SEQ ID NO:79;或

iii. CDR1L包含SEQ ID NO:81,CDR2L包含SEQ ID NO:82并且CDR3L包含SEQ ID NO:83。

[0008] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:70,CDR2L包含SEQ ID NO:71并且CDR3L包含SEQ ID NO:72。

[0009] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中:

a. 所述重链可变区包含SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中

i. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:19或与SEQ ID NO:19至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

ii. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:65或与SEQ ID NO:65至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;或

iii. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:69或与SEQ ID NO:69至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;或

b. 所述重链可变区包含SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中:

i. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:7或与SEQ ID NO:7至少90%、至少95%、至少

96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

ii.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:76或与SEQ ID NO:76至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;或

iii.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:80或与SEQ ID NO:80至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0010] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:69或与SEQ ID NO:69至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0011] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中:

a.所述重链可变区包含SEQ ID NO:15,并且其中:

i.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:19;

ii.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:65;

iii.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:69;并且

b.所述重链可变区包含SEQ ID NO:3,并且其中:

i.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:7;

ii.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:76;或

iii.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:80。

[0012] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:15并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:69。

[0013] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与人hB7-H4的IgV结构域结合。

[0014] 在一方面,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区和所述轻链可变区中的每一个包含CDR1、CDR2和CDR3,并且其中CDR1H包含SEQ ID NO:46,CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,并且其中:

a.CDR1L包含SEQ ID NO:50,CDR2L包含SEQ ID NO:51并且CDR3L包含SEQ ID NO:52;

b.CDR1L包含SEQ ID NO:88,CDR2L包含SEQ ID NO:89并且CDR3L包含SEQ ID NO:90;

c.CDR1L包含SEQ ID NO:92,CDR2L包含SEQ ID NO:93并且CDR3L包含SEQ ID NO:94;

d.CDR1L包含SEQ ID NO:96,CDR2L包含SEQ ID NO:97并且CDR3L包含SEQ ID NO:98;

e.CDR1L包含SEQ ID NO:100,CDR2L包含SEQ ID NO:101并且CDR3L包含SEQ ID NO:102;

f.CDR1L包含SEQ ID NO:104,CDR2L包含SEQ ID NO:105并且CDR3L包含SEQ ID NO:106;或

g.CDR1L包含SEQ ID NO:108,CDR2L包含SEQ ID NO:109并且CDR3L包含SEQ ID NO:

110。

[0015] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:46,CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:108,CDR2L包含SEQ ID NO:109并且CDR3L包含SEQ ID NO:110。

[0016] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列,并且其中:

a.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:49或与SEQ ID NO:49至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

b.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:87或与SEQ ID NO:87至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

c.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:91或与SEQ ID NO:91至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

d.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:95或与SEQ ID NO:95至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

e.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:99或与SEQ ID NO:99至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

f.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:103或与SEQ ID NO:103至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;或

g.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:107或与SEQ ID NO:107至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0017] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:107或与SEQ ID NO:107至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0018] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45,并且其中:

a.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:49;

b.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:87;

c.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:91;

d.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:95;

e.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:99;

f.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:103;或

g.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:107。

[0019] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:107。

[0020] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与人和鼠hB7-H4的IgC结构域结合。

[0021] 在一方面,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片

段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区和所述轻链可变区中的每一个包含CDR1、CDR2和CDR3,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,并且其中:

a.CDR1L包含SEQ ID NO:62,CDR2L包含SEQ ID NO:63并且CDR3L包含SEQ ID NO:64;

b.CDR1L包含SEQ ID NO:115,CDR2L包含SEQ ID NO:116并且CDR3L包含SEQ ID NO:117;

c.CDR1L包含SEQ ID NO:119,CDR2L包含SEQ ID NO:120并且CDR3L包含SEQ ID NO:121;

d.CDR1L包含SEQ ID NO:123,CDR2L包含SEQ ID NO:124并且CDR3L包含SEQ ID NO:125;

e.CDR1L包含SEQ ID NO:127,CDR2L包含SEQ ID NO:128并且CDR3L包含SEQ ID NO:129;或

f.CDR1L包含SEQ ID NO:131,CDR2L包含SEQ ID NO:132并且CDR3L包含SEQ ID NO:133。

[0022] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,CDR1L包含SEQ ID NO:119,CDR2L包含SEQ ID NO:120并且CDR3L包含SEQ ID NO:121。

[0023] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57或与SEQ ID NO:57至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列,并且其中:

a.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:61或与SEQ ID NO:61至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

b.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:114或与SEQ ID NO:114至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

c.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:118或与SEQ ID NO:118至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

d.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:122或与SEQ ID NO:122至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;

e.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:126或与SEQ ID NO:126至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;或

f.所述轻链可变区包含SEQ ID NO:130或与SEQ ID NO:130至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0024] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57或与SEQ ID NO:57至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:118或与SEQ ID NO:118至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0025] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57,并且其中:

- a. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:61;
- b. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:114;
- c. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:118;
- d. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:122;
- e. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:126;或
- f. 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:130。

[0026] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:118。

[0027] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与人和鼠hB7-H4的IgV结构域结合。

[0028] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段与本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段结合B7-H4上相同的表位。

[0029] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是嵌合抗体、CDR移植抗体或人源化抗体或其抗原结合片段。

[0030] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是多特异性抗体或双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0031] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是scFv、Fv、Fab'、Fab、F(ab')₂或双抗体。

[0032] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是IgG类免疫球蛋白。

[0033] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段具有同种型IgG1。

[0034] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段被去糖基化。

[0035] 在一个实施方案中,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含第一重链恒定区和第二重链恒定区,并且其中所述抗体或其抗原结合片段包含至少一个在所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区的CH3结构域中引起异二聚化的修饰。在一个实施方案中,所述第一重链恒定区的CH3结构域中的修饰与所述第二重链恒定区的CH3结构域中的修饰不同。在一个实施方案中,所述第一重链恒定区包含选自S354C、T366W、Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代并且所述第二重链恒定区包含选自S354C、T366W、Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中,(i)所述第一重链恒定区包含选自S354C和T366W(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代并且所述第二重链恒定区包含选自Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代;或(ii)所述第二重链恒定区包含选自S354C和T366W(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代并且所述第一重链恒定区包含选自Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中,(i)所述第一重链恒定区包含氨基酸取代S354C和T366W(Kabat EU索引编号)并且所述第二重链恒定区包含氨基酸取代Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号);或(ii)所述第二重链恒定区包含氨基酸取代S354C和T366W

(Kabat EU索引编号)并且所述第一重链恒定区包含氨基酸取代Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)。在一个实施方案中,所述第一重链恒定区、所述第二重链恒定区或两者均包含氨基酸取代M428L和N434S(Kabat EU索引编号)。

[0036] 在一个方面,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段;

b. IL-15 α sushi结构域多肽,其包含SEQ ID NO:167或与SEQ ID NO:167至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;以及

c. IL-15多肽,其包含SEQ ID NO:166或与SEQ ID NO:166至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。

[0037] 在一些实施方案中,所述融合蛋白包含重链CDR1(CDR1H)、CDR2(CDR2H)和CDR3(CDR3H)以及轻链CDR1(CDR1L)、CDR2(CDR2L)和CDR3(CDR3L),其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:70,CDR2L包含SEQ ID NO:71并且CDR3L包含SEQ ID NO:72。在一些实施方案中,所述融合蛋白包含重链CDR1(CDR1H)、CDR2(CDR2H)和CDR3(CDR3H)以及轻链CDR1(CDR1L)、CDR2(CDR2L)和CDR3(CDR3L),其中CDR1H包含SEQ ID NO:172,CDR2H包含SEQ ID NO:173,CDR3H包含SEQ ID NO:174,CDR1L包含SEQ ID NO:175,CDR2L包含SEQ ID NO:176并且CDR3L包含SEQ ID NO:177。在一些实施方案中,所述融合蛋白包含重链CDR1(CDR1H)、CDR2(CDR2H)和CDR3(CDR3H)以及轻链CDR1(CDR1L)、CDR2(CDR2L)和CDR3(CDR3L),其中CDR1H包含SEQ ID NO:178,CDR2H包含SEQ ID NO:179,CDR3H包含SEQ ID NO:180,CDR1L包含SEQ ID NO:181,CDR2L包含SEQ ID NO:182并且CDR3L包含SEQ ID NO:183。在一些实施方案中,所述融合蛋白包含重链CDR1(CDR1H)、CDR2(CDR2H)和CDR3(CDR3H)以及轻链CDR1(CDR1L)、CDR2(CDR2L)和CDR3(CDR3L),其中CDR1H包含SEQ ID NO:184,CDR2H包含SEQ ID NO:185,CDR3H包含SEQ ID NO:186,CDR1L包含SEQ ID NO:187,CDR2L包含SEQ ID NO:188并且CDR3L包含SEQ ID NO:189。

[0038] 在一个实施方案中,所述IL-15 α sushi结构域多肽包含SEQ ID NO:167。在一个实施方案中,所述IL-15 α sushi结构域多肽由SEQ ID NO:167的氨基酸序列组成。在一个实施方案中,所述IL-15多肽包含SEQ ID NO:166。在一个实施方案中,所述IL-15多肽由SEQ ID NO:166组成。在一个实施方案中,所述IL-15 α sushi结构域多肽与所述IL-15多肽的N末端融合。

[0039] 在一个实施方案中,所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段包含第一重链恒定区和第二重链恒定区,并且其中所述IL-15 α sushi结构域多肽和所述IL-15多肽与所述第一重链恒定区的C末端融合。在一个实施方案中,所述融合蛋白包含接头,所述接头连接(i)所述IL-15 α sushi结构域多肽和所述IL-15多肽以及(ii)所述恒定区的C末端。在一些实施方案中,所述接头的长度在25-35个氨基酸之间。在一些实施方案中,所述接头主要由Gly(G)、Asn(N)、Ser(S)、Thr(T)、Ala(A)、Leu(L)和Gln(Q)组成。在一个实施方案中,所述接头包含SEQ ID NO:168。在一个实施方案中,所述融合蛋白包含SEQ ID NO:169。在一个实施方案中,所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区包含至少一个在所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区的CH3结构域中引起异二聚化的修饰。在一个实施方案中,第一重链恒定区的CH3结构域中的修饰与所述第二重链恒定区的CH3结构域中的修饰不同。在一个实施方案中,所述第一重链恒定区包含选自S354C、T366W、Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU

索引编号)的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中,(i)所述第一重链恒定区包含选自S354C和T366W(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代并且所述第二重链恒定区包含选自Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代;或(ii)所述第二重链恒定区包含选自S354C和T366W(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代并且所述第一重链恒定区包含选自Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中,(i)所述第一重链恒定区包含氨基酸取代S354C和T366W(Kabat EU索引编号)并且所述第二重链恒定区包含氨基酸取代Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号);或(ii)所述第二重链恒定区包含氨基酸取代S354C和T366W(Kabat EU索引编号)并且所述第一重链恒定区包含氨基酸取代Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)。在一个实施方案中,所述第一重链恒定区、所述第二重链恒定区或两者均包含氨基酸取代M428L和N434S(Kabat EU索引编号)。在一个实施方案中,所述融合蛋白包含不多于一个IL-15 α sushi结构域多肽和不多于一个IL-15多肽。在一些实施方案中,所述融合蛋白包含本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段。

[0040] 在一个方面,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:

- a. 含有SEQ ID NO:69和/或SEQ ID NO:145的轻链;
- b. 含有SEQ ID NO:150或SEQ ID NO:151的第一重链;和
- c. 包含SEQ ID NO:157或SEQ ID NO:158的第二重链。

[0041] 在一个实施方案中,所述第一重链包含SEQ ID NO:150;并且所述第二重链包含SEQ ID NO:157。在一个实施方案中,所述第一重链包含SEQ ID NO:151;并且所述第二重链包含SEQ ID NO:158。

[0042] 在一个方面,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:

- a. 含有SEQ ID NO:118和/或SEQ ID NO:144的轻链;
- b. 含有SEQ ID NO:148或SEQ ID NO:149的第一重链;和
- c. 含有SEQ ID NO:155或SEQ ID NO:156的第二重链。

[0043] 在一个实施方案中,所述第一重链包含SEQ ID NO:148;并且所述第二重链包含SEQ ID NO:155。

[0044] 在一个实施方案中,所述第一重链包含SEQ ID NO:149;并且所述第二重链包含SEQ ID NO:156。

[0045] 在一方面,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:含有SEQ ID NO:145的轻链;含有SEQ ID NO:150的第一重链;和含有SEQ ID NO:157的第二重链。

[0046] 在一方面,提供了编码本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白的核酸序列。

[0047] 本文提供了包含本文公开的核酸的载体。本文提供了包含两个或更多个本文公开的核酸分子的一组载体。

[0048] 本文提供了包含本文公开的核酸或载体的细胞。本文提供了表达本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白的细胞。本文提供了表达本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白的T细胞。本文提供了表达抗B7-H4结合蛋白的T细胞,所述抗B7-H4结合蛋白包含本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的轻可变链和重可变链。在一些实施方案中,所述细胞是分离的。

[0049] 在一些实施方案中,所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者所述融合蛋白与细胞毒素、荧光标记和显像剂中的一种或多种缀合。

[0050] 本文提供了药物组合物,所述药物组合物包含(i)本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白以及(ii)药学上可接受的载体。

[0051] 本文提供了产生本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白的方法,所述方法包括将本文公开的细胞在使得产生所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白的条件下培养。

[0052] 本文提供了抑制有需要的受试者中的B7-H4与B7-H4的配体结合的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白。

[0053] 本文提供了增加有需要的受试者中的T细胞激活的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白。

[0054] 本文提供了增加有需要的受试者中的CD8+T细胞增殖的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白。

[0055] 本文提供了诱导有需要的受试者中的B7-H4表达细胞中抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白。

[0056] 本文提供了刺激有需要的受试者中的免疫系统的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白。

[0057] 本文提供了治疗有需要的受试者中的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白。在一些实施方案中,所述癌症是卵巢癌、黑色素瘤、胰腺癌、甲状腺癌、肺癌、结直肠癌、鳞状细胞癌、前列腺癌、乳腺癌、膀胱癌或胃癌。在一些实施方案中,所述癌症是三阴性乳腺癌或卵巢癌。

[0058] 本文提供了减少有需要的受试者中的肿瘤生长的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白。

[0059] 本文提供了减少有需要的受试者中的肿瘤转移的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白。

[0060] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括施用另外的治疗剂或另外的疗法。在一些实施方案中,所述另外的治疗剂选自癌症疫苗、检查点抑制剂、针对肿瘤特异性抗原的抗体、卡介苗、细胞毒素、白细胞介素6受体(IL-6R)抑制剂、白细胞介素4受体(IL-4R)抑制剂、IL-10抑制剂、IL-2、IL-7、IL-21、IL-15、抗体-药物缀合物、抗炎药和膳食补充剂。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂是CTLA-4、PD-1、PD-L1或PD-L2抑制剂。在一些实施方案中,所述另外的治疗剂是LAG3、TIGIT、LAP、平足蛋白、蛋白C受体、ICOS、GITR、CD226或CD160的抑制剂。在一些实施方案中,所述另外的疗法是化学疗法、放射疗法或外科手术。在一些实施方案中,将所述另外的治疗剂或另外的疗法与所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者所述融合蛋白并行或连续施用。在一些实施方案中,将所述另外的治疗剂与所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者所述融合蛋白分开施用或作为混合物施用。

[0061] 在一个实施方案中,所述受试者具有上调表达的B7-H4,或所述受试者已经被鉴定为B7-H4表达阳性。在一个实施方案中,所述受试者对用检查点抑制剂的疗法没有反应或起

初对检查点抑制剂治疗有反应但是之后对检查点抑制剂具有耐药性。在一个实施方案中，所述受试者是人。

[0062] 在一方面，提供了检测样品中的B7-H4的方法，所述方法包括使样品与本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白接触。

附图简述

[0063] 图1A展示了B7-H4的独特结构，所述结构包含高度糖基化的IgC和非常短的胞质尾区。图1B示出了示例性的本文公开的融合蛋白。

[0064] 图2展示了这样的过程，通过对B7-H4淘选全人scFv噬菌体展示文库（来自Distributed Bio的Superman 2.0）获得高亲和力B7-H4抗体，然后进行亲和力成熟（轻链改组）。

[0065] 图3A、图3B、图3C、图3D、图3E和图3F展示了抗体1D3、3F2、1A12、1F11和6C3与可溶性B7-H4和细胞B7-H4两者的结合。进行了ELISA实验，以测定与hB7-H4-Fc（图3A）、hB7-H4-his（图3B）、mB7-H4-Fc（图3C）和hB7-H4 IgV结构域（图3D）的结合。进行了流式细胞术实验，以测定与表达hB7-H4（图3E）或mB7-H4（图3F）的CHO细胞的结合。抗体1D3、3F2、1A12、1F11和6C3与可溶性B7-H4和细胞hB7-H4结合，与hB7-H4的IgV结构域特异性结合。

[0066] 图4A、图4B、图4C、图4D、图4E和图4F展示了抗体6C3、1D3、3D1和4H6与可溶性B7-H4和细胞B7-H4两者的结合。进行了ELISA实验，以测定与hB7-H4-Fc（图4A）、hB7-H4-his（图4B）、hB7-H4 IgV结构域（图4C）和mB7-H4 IgV结构域（图4D）的结合。进行了流式细胞术实验，以测定与表达hB7-H4（图4E）或mB7-H4（图4F）的CHO细胞的结合。抗体6C3、1D3、3D1和4H6与可溶性B7-H4和细胞hB7-H4两者结合，与hB7-H4的IgV结构域特异性结合。将交叉反应性IgV结合抗体用作对照。

[0067] 图5A、图5B、图5C、图5D、图5E、图5F和图5G展示了抗体9H2与可溶性B7-H4和细胞B7-H4两者的结合。进行了ELISA实验，以测定与hB7-H4-Fc（图5A）、hB7-H4-his（图5B）、mB7-H4-Fc结构域（图5C）、hB7-H4 IgV结构域（图5D）和hB7-H4 IgC结构域（图5E）的结合。进行了流式细胞术实验，以测定与表达hB7-H4（图5F）或mB7-H4（图5G）的CHO细胞的结合。抗体9H2与可溶性B7-H4和细胞hB7-H4两者结合，与hB7-H4的IgV结构域特异性结合。将交叉反应性IgV结合抗体和IgC结合抗体用作对照。

[0068] 图6A、图6B、图6C、图6D、图6E和图6F展示了抗体5G6、9E1、5F4、5E4和4B9与可溶性B7-H4和细胞B7-H4两者的结合。进行了ELISA实验，以测定与hB7-H4-Fc（图6A）、mB7-H4-hFc（图6B）、hB7-H4 IgV结构域（图6C）和mB7-H4 IgV结构域（图6D）的结合。进行了流式细胞术实验，以测定与表达hB7-H4（图6E）或mB7-H4（图6F）的CHO细胞的结合。抗体5E4、5F4、5G6和9E1与人和小鼠B7-H4两者的IgC结构域结合。抗体4B9与hB7-H4-Fc强结合但不与合mB7-H4结合。抗体4B9的结合需要IgV和IgC两者。将交叉反应性IgV结合抗体用作对照。

[0069] 图7A、图7B、图7C、图7D、图7E、图7F、图7G和图7H展示了抗体9D11、24B6、15B11、30G4和24F4与可溶性B7-H4和细胞B7-H4两者的结合。进行了ELISA实验，以测定与hB7-H4-Fc（图7A）、hB7-H4-His（图7B）、mB7-H4-hFc（图7C）、mB7-H4-His（图7D）、hB7-H4 IgC结构域（图7E）和mB7-H4 IgC结构域（图7F）的结合。进行了流式细胞术实验，以测定与表达hB7-H4（图7G）或mB7-H4（图7H）的CHO细胞的结合。抗体9D11、24B6、15B11、30G4和24F4与人和小鼠B7-H4两者的IgC结构域结合。将交叉反应性IgC结合抗体用作对照。

[0070] 图8A、图8B、图8C、图8D、图8E、图8F、图8G和图8H展示了抗体39A11和31D7与可溶性B7-H4和细胞B7-H4两者的结合。进行了ELISA实验,以测定与hB7-H4-Fc(图8A)、hB7-H4-His(图8B)、mB7-H4-hFc(图8C)、mB7-H4-His(图8D)、hB7-H4 IgV结构域(图8E)、hB7-H4 IgC结构域(图8F)、mB7-H4 IgV结构域(图8G)和mB7-H4 IgC结构域(图8H)的结合。进行了流式细胞术实验,以测定与表达hB7-H4(图8I)或mB7-H4(图8J)的CHO细胞的结合。抗体39A11和31D7与人和小鼠B7-H4两者的IgV结构域结合。将交叉反应性IgV结合抗体用作对照。

[0071] 图9A、图9B、图9C、图9D、图9E、图9F、图9G、图9H展示了抗体1D3/1D3、1D3/1D3衍生物1D3/45A2、1D3/1D3衍生物1D3/47B2、3F2/3F2、3F2/3F2衍生物3F2/50A10和3F2/3F2衍生物3F2/49A2与可溶性B7-H4的结合。进行了ELISA实验,以测定与hB7-H4-Fc(图9A)、mB7-H4-Fc(图9B)、hB7-H4-his(图9C)、mB7-H4-his(图9D)、hB7-H4 IgV结构域(图9E)、mB7-H4 IgV结构域(图9F)、hB7-H4 IgC结构域(图9G)、mB7-H4 IgC结构域(图9H)的结合。3F2衍生物3F2/50A10和3F2/49A2具有与3F2相同的重链序列,但是具有与3F2不同的轻链序列。1D3衍生物1D3/47B2和1D3/45A2具有与1D3相同的重链序列,但是具有与1D3不同的轻链序列。抗体C3与49A2具有相同的VH和VL序列。

[0072] 图10A、图10B、图10C、图10D展示了抗体1D3/1D3、1D3/1D3衍生物1D3/45A2、1D3/1D3衍生物1D3/47B2、3F2/3F2、3F2/3F2衍生物3F2/50A10和3F2/3F2衍生物3F2/49A2与结合细胞的B7-H4的结合。进行了流式细胞术实验,以测定与表达hB7-H4的CHO细胞(图10A)、表达mB7-H4的CHO细胞(图10B)、表达hB7-H4的三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-468细胞(图10C)和表达hB7-H4的卵巢癌细胞系SK-BR-3细胞(图10D)的结合。

[0073] 图11A、图11B、图11C、图11D、图11E和图11F展示了抗体9D11/9D11以及9D11/9D11衍生物9D11/67H9、9D11/67C3、9D11/67C6、9D11/67E12和9D11/67G3与可溶性B7-H4的结合。进行了ELISA实验,以测定与hB7-H4-Fc(图11A)、mB7-H4-Fc(图11B)、hB7-H4 IgC结构域(图11C)、mB7-H4 IgC结构域(图11D)、hB7-H4 IgV结构域(图11E)和mB7-H4 IgV结构域(图11F)的结合。9D11衍生物9D11/67E12、9D11/67C3、9D11/67C6、9D11/67H9、9D11/67G3和9D11/68F5具有与9D11相同的重链序列,但是具有与9D11不同的轻链序列。

[0074] 图12A、图12B、图12C和图12D展示了9D11/9D11衍生物9D11/67C3、9D11/67E12和9D11/68F5与可溶性B7-H4的结合。进行了ELISA实验,以测定与hB7-H4-Fc(图12A)、mB7-H4-Fc(图12B)、hB7-H4-his(图12C)和hB7-H4-his(图12D)的结合。9D11衍生物9D11/67C3、9D11/67E12和9D11/68F5具有与9D11相同的重链序列,但是具有与9D11不同的轻链序列。

[0075] 图13A和图13B展示了抗体9D11/9D11以及9D11/9D11衍生物9D11/67C3、9D11/67C6、9D11/67E12、9D11/67G3、9D11/67H9和9D11/68F5与结合细胞的B7-H4的结合。进行了流式细胞术实验,以测定与表达mB7-H4的CT26细胞(图13A)和表达hB7-H4的SK-BR-3细胞(图13B)的结合。9D11衍生物9D11/67C3、9D11/67C6、9D11/67E12、9D11/67G3、9D11/67H9和9D11/68F5具有与9D11相同的重链序列,但是具有与9D11不同的轻链序列。

[0076] 图14A、图14B、图14C、图14D、图14E和图14F展示了抗体39A11/39A11以及39A11/39A11衍生物39A11/62F9、39A11/56H7、39A11/57G8、39A11/57H3和39A11/56A9与可溶性B7-H4的结合。进行了ELISA实验,以测定与hB7-H4-Fc(图14A)、mB7-H4-Fc(图14B)、hB7-H4 IgV结构域(图14C)、mB7-H4 IgV结构域(图14D)、hB7-H4 IgC结构域(图14E)和mB7-H4 IgC结构域(图14F)的结合。39A11衍生物39A11/62F9、39A11/56H7、39A11/57G8、39A11/57H3和

39A11/56A9具有与39A11相同的重链序列,但是具有与39A11不同的轻链序列。

[0077] 图15A和图15B展示了抗体39A11/39A11以及39A11/39A11衍生物39A11/62F9、39A11/56H7、39A11/57G8、39A11/57H3和39A11/56A9与结合细胞的B7-H4的结合。进行了流式细胞术实验,以测定与表达mB7-H4的CT26细胞(图15A)和表达hB7-H4的SK-BR-3细胞(图15B)的结合。39A11衍生物39A11/62F9、39A11/56H7、39A11/57G8、39A11/57H3和39A11/56A9具有与39A11相同的重链序列,但是具有与39A11不同的轻链序列。

[0078] 图16A、图16B、图16C、图16D、图16E和图16F展示了抗体3F2/50A10(hB7-H4 IgV结构域结合抗体)、39A11/57G8(h/mB7-H4 IgV结构域结合抗体)和9D11/68F5(h/mB7-H4 IgC结构域结合抗体)与可溶性B7-H4的结合。进行了ELISA实验,以测定与hB7-H4-Fc(图16A)、mB7-H4-Fc(图16B)、hB7-H4 IgV结构域(图16C)、mB7-H4 IgV结构域(图16D)、hB7-H4 IgC结构域(图16E)和mB7-H4 IgC结构域(图16F)的结合。将分别与IgV或IgC结合的抗体用作对照。

[0079] 图17A、图17B和图17C展示了抗体3F2/50A10(hB7-H4 IgV结构域结合抗体)、39A11/57G8(h/mB7-H4 IgV结构域结合抗体)和9D11/68F5(h/mB7-H4 IgC结构域结合抗体)与结合细胞的B7-H4的结合。进行了流式细胞术实验,以测定与表达hB7-H4的SK-BR-3细胞(图17A)、表达mB7-H4的CT26细胞(图17B)和表达hB7-H4的MDA-MB-468细胞(图17C)的结合。

[0080] 图18A和图18B展示了抗B7-H4抗体3F2/50A10(hB7-H4 IgV结构域结合抗体)、39A11/57G8(h/mB7-H4 IgV结构域结合抗体)和9D11/68F5(h/mB7-H4 IgC结构域结合抗体)与它们的hB7-H4结合后的内化。使抗体与抗体标记试剂(即与pH敏感型荧光探针缀合的靶向Fc区的Fab片段)混合。由于Fab-Ab复合物被内化并且经由酸性(pH 4.5-5.5)溶酶体和内涵体处理,观察到荧光信号。示出了表达hB7-H4的SK-BR-3细胞(图18A)和表达hB7-H4的MDA-MB-468细胞(图18B)的内化。分别将IgV结合抗体或IgC结合抗体用作对照。

[0081] 图19A和图19B展示了通过抗体3F2/50A10(hB7-H4 IgV结构域结合抗体)、39A11/57G8(h/mB7-H4 IgV结构域结合抗体)(图19A)和9D11/68F5(h/mB7-H4 IgC结构域结合抗体)(图19B)对T细胞细胞因子分泌功能(此处为IFN γ 分泌)的恢复。分别将IgV结合抗体或IgC结合抗体用作对照。还包括了不相关对照抗体。

[0082] 图20A和图20B展示了抗体3F2/50A10(hB7-H4 IgV结构域结合抗体)、39A11/57G8(h/mB7-H4 IgV结构域结合抗体)和9D11/68F5(h/mB7-H4 IgC结构域结合抗体)诱导肿瘤细胞中的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。示出了表达hB7-H4的SK-BR-3细胞(图20A)和表达hB7-H4的MDA-MB-468细胞(图20B)的肿瘤细胞杀伤。

[0083] 图21A和图21B展示了,在IncuCyte[®]免疫细胞杀伤测定中,IgV结构域结合抗体3F2/50A10和39A11/57G8杀伤肿瘤细胞。建立了SKBR3/hPBMC共培养模型用于分析ADCC,在所述模型中将SK-BR-3癌细胞与hPBMC分别以1:5(图21A)或1:10(图21B)的比率混合。将DP47用作对照抗体。

[0084] 图22A、图22B、图22C、图22D、图22E和图22F展示了抗体39A11/57G8和阳性对照抗体(IgV结合抗体)以及包含抗体39A11/57G8(即融合蛋白57G8/IL15)或所述阳性对照抗体(即融合蛋白(+) Ab1/IL15)的融合蛋白分别与B7-H4的结合。进行了ELISA实验,以测定与hB7-H4-Fc(图22A)、hB7-H4-his(图22B)、hB7-H4 IgV结构域(图22C)、mB7-H4-Fc(图22D)、mB7-H4-his(图22E)和mB7-H4 IgV结构域(图22F)的结合。

[0085] 图23A、图23B、图23C、图23D、图23E和图23F展示了抗体3F2/50A10和阳性对照抗体(IgV结合抗体)以及包含抗体3F2/50A10(即融合蛋白50A10/IL15)或所述阳性对照抗体(即融合蛋白(+))Ab1/IL15的融合蛋白分别与B7-H4的结合。进行了ELISA实验,以测定与hB7-H4-Fc(图23A)、hB7-H4-his(图23B)、hB7-H4 IgV结构域(图23C)、mB7-H4-Fc(图23D)、mB7-H4-his(图23E)和mB7-H4 IgV结构域(图23F)的结合。

[0086] 图24A、图24B、图24C和图24D展示了抗体3F2/50A10、39A11/57G8和阳性对照抗体(与B7-H5 IgV结构域结合)以及包含抗体3F2/50A10(即融合蛋白50A10/IL15)、抗体39A11/57G8(即融合蛋白57G8/IL15)或所述阳性对照抗体(即融合蛋白(+))Ab1/IL15的融合蛋白与细胞B7-H4的结合。进行了流式细胞术实验,以测定与表达hB7-H4的SK-BR-3细胞(图24A和图24B)或表达mB7-H4的CT26细胞(图24C和图24D)的结合。

[0087] 图25A、图25B、图25C和图25D展示了抗体3F2/50A10、39A11/57G8和阴性对照抗体DP47以及包含抗体3F2/50A10(即融合蛋白50A10/IL15)、抗体39A11/57G8(即融合蛋白57G8/IL15)或所述阴性对照抗体(即融合蛋白DP47/IL15)的融合蛋白与MDA-MB-468细胞(图25A和图25B)或MX-1(图25C和图25D)上表达的细胞B7-H4的结合,如通过流式细胞术测定的。

[0088] 图26A和图26B展示了使用IncuCyte®免疫细胞杀伤测定,通过抗体3F2/50A10、39A11/57G8和阴性对照抗体DP47的肿瘤细胞杀伤以及通过包含抗体3F2/50A10(即融合蛋白50A10/IL15)、抗体39A11/57G8(即融合蛋白57G8/IL15)或所述阴性对照抗体(即融合蛋白DP47/IL15)的肿瘤细胞杀伤。示出了3F2/50A10和融合蛋白50A10/IL15(图26A)以及39A11/57G8和融合蛋白57G8/IL15(图26B)对SK-BR-3细胞的杀伤。示出了3F2/50A10和融合蛋白50A10/IL15(图26C)对MDA-MB-468细胞的杀伤。图26D示出了图26C中示出的曲线的端点值。图26E示出了在用50A10/IL-15、57G8/IL-15、57G8和50A1处理MDA-MB-468细胞后的凋亡。

[0089] 图27A、图27B和图27C展示了抗体39A11/57G8和3F2/50A10以及融合蛋白57G8/IL15和50A10/IL15对hPBMC的增殖(图27A)以及特异性地对CD8⁺T细胞(图27B)和CD4⁺T细胞(图27C)的作用。将抗体DP47和包含DP47的IL-15融合蛋白用作对照。

[0090] 图28A和图28B展示了抗体39A11/57G8和3F2/50A10以及融合蛋白57G8/IL15和50A10/IL15通过IL-2受体激活p-STAT5信号途径的能力。图28A展示了STAT5信号传导途径。图28B示出了所述途径通过指示的抗体和融合蛋白的激活。将抗体DP47和包含DP47的IL-15融合蛋白用作对照。

[0091] 图29A和图29B展示了抗体39A11/57G8和3F2/50A10以及融合蛋白57G8/IL15和50A10/IL15诱导肿瘤细胞中的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。示出了表达hB7-H4的SK-BR-3细胞(图29A)和表达hB7-H4的MDA-MB-468细胞(图29B)的肿瘤细胞杀伤。

[0092] 图30A、图30B、图30C和图30D展示了融合蛋白57G8/IL-15、57G8/IL-15_LS、50A10/IL-15和50A10/IL-15_LS与可溶性B7-H4的结合。抗体的恒定区中的“LS”突变(M428L/N434S)在pH 6下增强对FcRn的亲合力并且降低 K_{off} 速率,因此导致延长的血清半衰期。进行了ELISA实验,以测定与hB7-H4-Fc(图30A)、mB7-H4-Fc(图30B)、hB7-H4his(图30C)和mB7-H4his(图30D)的结合。将包含DP47的IL-15融合蛋白用作对照。

[0093] 图31A和图31B展示了融合蛋白57G8/IL-15、57G8/IL-15_LS、50A10/IL-15和

50A10/IL-15_LS与结合细胞的B7-H4的结合。进行了流式细胞术实验,以测定与表达hB7-H4的SK-BR-3细胞(图31A)和表达mB7-H4的CT26细胞(图31B)的结合。将包含DP47的IL-15融合蛋白用作对照。

[0094] 图32展示了融合蛋白57G8/IL-15、57G8/IL-15_LS、50A10/IL-15和50A10/IL-15_LS诱导IL-2依赖性M07e细胞增殖的能力。将包含DP47的IL-15融合蛋白用作对照。

具体实施方式

[0095] 融合蛋白

[0096] B7-H4(也称为含V-set结构域的T细胞激活抑制剂1,也称为B7同源物4、B7h.5、免疫共刺激蛋白B7-H4、蛋白B7S1或T细胞共刺激分子B7x)是与包括PD-L1在内的其他B7家族成员同源的免疫调节分子。B7-H4是由IgV和IgC胞外结构域两者组成的I型跨膜蛋白。虽然在蛋白水平上B7-H4表达在健康组织中相对有限,但是B7-H4还在一些实体瘤中表达。B7-H4在肿瘤中的表达倾向于与不良预后相关。B7-H4具有独特结构,所述结构包含高度糖基化的IgC结构域和非常短的胞质尾区(图1A)。

[0097] 在一方面,本公开文本提供了包含与B7-H4结合的抗体或其抗原结合片段的融合蛋白。此部分融合蛋白可以是特异性结合B7-H4的任何抗体或其抗体片段,包括包含表1、表5、表7、表9和表16-表20中提供或本文其他地方所述的抗体的对应重链可变区和轻链可变区或CDR的那些。

[0098] 本文公开了包含刺激结构域的融合蛋白。如本文所用,“刺激结构域”是促进免疫应答的结构域。所述刺激结构域可以刺激通过例如诱导T细胞或NK细胞活性和/或增殖介导的免疫应答。在实施方案中,所述刺激结构域刺激对白细胞介素或干扰素(诸如但不限于IL-2、IL-7、IL-15和IL-21)有反应的细胞。在一个实施方案中,所述刺激结构域结合并且刺激对白细胞介素或干扰素(诸如但不限于IL-2、IL-7、IL-13、IL-15和IL-21)有反应的受体。所述刺激结构域也可以是杂合结构域,所述杂合结构域是两个或更多个彼此共价连接的配体的异复合物。

[0099] 在实施方案中,所述刺激结构域包含促进IL-15受体(IL-15R)的IL-15刺激的序列或结构域。

[0100] 在一个实施方案中,促进IL-15R刺激的刺激结构域包含IL-15或IL-15衍生物。

[0101] 在一个实施方案中,促进IL-15R刺激的刺激结构域包含含有IL-15R α sushi结构域的IL-15R α 多肽或其衍生物。在一个实施方案中,所述刺激结构域包含IL-15R α 链的sushi结构域。

[0102] 在一个实施方案中,所述刺激结构域包含IL-15或其衍生物,所述IL-15或其衍生物的结合可以通过包含IL-15R α sushi结构域的IL-15R α 多肽或其衍生物的存在而增强。在一个实施方案中,所述刺激结构域包含IL-15或其衍生物与含有IL-15R α sushi结构域的IL-15R α 多肽或其衍生物的复合物。在一些实施方案中,所述刺激结构域包含IL-15或其衍生物与含有IL-15R α sushi结构域的IL-15R α 多肽或其衍生物,其中所述两种多肽通过接头共价连接。

[0103] 在一个实施方案中,IL-15或其衍生物位于包含IL-15R α sushi结构域的IL-15R α 多肽或其衍生物的N末端。在一个实施方案中,IL-15或其衍生物位于包含IL-15R α sushi结构

域的IL-15R α 多肽或其衍生物的C末端。在一个实施方案中,所述刺激结构域包含序列SEQ ID NO:169。

[0104] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含(1)阻断B7-H4与其配体结合并且抑制免疫抑制作用的抗B7H4结合结构域,和(2)促进免疫应答的刺激结构域,其中与提供分别前述的功能的两种不同分子相比,所述融合蛋白可以提供增强的免疫细胞活性。具体地,本文公开的实验证明,含有阻断B7-H4与其配体结合的B7-H4结合结构域和刺激结构域IL-15或其衍生物两者以及包含IL-15R α sushi结构域或其衍生物的IL-15R α 多肽的融合蛋白杀伤肿瘤细胞、诱导T细胞增殖并且激活IL-2R β γ 下游的STAT5途径。

[0105] 本文提供的融合蛋白可以展现出(a)与B7-H4结合并且阻断下游信号传导事件;(b)阻断B7-H4与其同源配体的结合;(c)增加T细胞增殖;(d)上调T细胞介导的免疫应答;(e)刺激细胞因子分泌;(f)减少通过B7-H4进行的抑制性信号转导;和/或(g)杀伤肿瘤细胞。本文公开的融合蛋白展现出强效结合和抑制性活性并且可用于治疗和诊断用途。

[0106] 在某些实施方案中,所述融合蛋白包含本文公开的刺激结构域,所述刺激结构域经由灵活接头与本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段共价连接。在一些实施方案中,本文提供了融合蛋白,其中本文公开的刺激结构域与本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段直接融合。

[0107] 如本文所用,“共价连接的”或“融合的”是指两个或更多个多肽通过共价键缔合。在一些实施方案中,共价连接的两个多肽彼此直接融合,即在第一肽与第二肽之间无任何另外的多肽序列。因此,在一些实施方案中,所述第一多肽的N末端与所述第二多肽的C末端直接融合,或反之亦然。在其他实施方案中,共价连接的两个多肽是连续多肽链的部分,但是彼此不直接融合(即所述两个多肽可以通过一个或多个氨基酸、接头或另一个多肽分离)。术语“共价连接的”不表明彼此融合的两个或更多个多肽的具体取向。

[0108] IL-15是与IL-2结构类似的14-15kDa细胞因子。IL-15也称为MGC9721。各种细胞类型组成地产生IL-15mRNA,并且这些细胞类型包括单核细胞、巨噬细胞、DC、角质形成细胞、表皮细胞、成纤维细胞、各种上皮细胞、骨髓基质细胞和神经细胞。此外,IL-15mRNA还在肾、胎盘、肺、心脏、骨骼肌和脑组织中产生。然而,只有单核细胞、DC、上皮细胞、骨髓基质细胞、成纤维细胞以及非常少的其他细胞和组织分泌可检测水平的IL-15。发现IL-15和IL-2与相同的造血亚基结合并且共享许多生物活性。IL-15调节T细胞和NK细胞活性和增殖,并且CD8+记忆细胞的数量受IL-15与IL-2之间的平衡影响。在实施方案中,本文公开的IL-15或IL-15衍生物具有人IL-15活性的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。IL-15可以是哺乳动物IL-15,优选灵长类动物IL-15,并且更优选人IL-15。人IL-15氨基酸序列被提供为SEQ ID NO:164(全长蛋白)和SEQ ID NO:165(成熟蛋白)。

[0109] 术语“IL-15衍生物”是指与SEQ ID NO:164(成熟形式的人IL-15)或SEQ ID NO:165(具有N65S突变的成熟形式的人IL-15)具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的多肽。用于制造此类衍生物的技术是本领域已知的。在一些实施方案中,IL-15或IL-15衍生物序列可以包含一个或多个氨基酸取代。在实施方案中,本文公开的融合蛋白包含含有N65S的IL-15多肽。在实施方案中,本文公开的融合蛋白包含含有SEQ ID NO:165的IL-15多肽。

[0110] IL-15受体(即IL-15受体复合物)以高亲和力与IL-15特异性结合并且由独特白细胞介素15受体 α 亚基、IL-2/IL-15R β 和共用的 γ 链/IL-2R γ 亚基组成。IL-15R α 通过丝裂原激活的巨噬细胞、NK细胞以及CD4+和CD8+T细胞表达。人IL-15R α 由七个外显子组成,并且选择性mRNA剪接可以导致八种具有不同胞外结构域或胞内结构域分子IL-15R α 亚型。全长亚型由含有保守蛋白结合基序(sushi结构域)的胞外部分、跨膜结构域和胞内尾区组成。如本文所用,IL-15R α 的术语“sushi结构域”是指从IL-15R α 的信号肽之后的第一半胱氨酸残基(C1)开始,并且在所述信号肽之后的第四半胱氨酸残基(C4)处结束的结构域。对应于IL-15R α 的胞外区部分的sushi结构域涉及与IL-15的结合。本公开文本中的sushi结构域具有人IL-15R α 链的sushi结构域的活性的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。人IL-15R α 的sushi结构域氨基酸序列提供于SEQ ID NO:167中。

[0111] 术语“IL-15R α sushi结构域衍生物”或“IL-15R α sushi结构域变体”是指与人IL-15R α sushi结构域的序列(SEQ ID NO:167)具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的多肽。用于制造此类衍生物或变体的技术是本领域已知的。所有此类衍生物包含IL-15R α 的sushi结构域的四个半胱氨酸残基。在一些此类衍生物中,可以用化学修饰的氨基酸替代天然存在的氨基酸,以改变多肽半衰期。在一些实施方案中,IL-15R α sushi结构域或IL-15R α sushi结构域衍生物序列可以包含一个或多个氨基酸取代。

[0112] IL-15以高亲和力与IL-15R α 结合,然后所述IL-15R α 与相同靶细胞表达的IL-15R β / γ c复合物缔合(顺式呈递)。还已知IL-15R α 将具有高亲和力的IL-15反式呈递至表达IL-15R β / γ (c)复合物的不同靶细胞(反式呈递)。IL-15顺式呈递和反式呈递机制导致受体激活和信号转导的不同动态,其中顺式呈递诱导快速且短暂的反应,而反式呈递诱导更缓慢更持久的反应。

[0113] 在一些实施方案中,本文公开的融合蛋白包含刺激结构域,所述刺激结构域包含含有通过接头与IL-15附接的IL-15R α 链的sushi结构域的杂合结构域。在某些实施方案中,本文公开的刺激结构域经由第二接头与本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段共价连接。在其他实施方案中,本文例示的刺激结构域与本文公开的抗B7-H4抗体或抗原结合片段直接融合。

[0114] 在一个实施方案中,提供了“C末端融合蛋白”,其中刺激结构域与所述融合蛋白的抗B7-H4结合部分的C末端(例如本文公开的抗B7-H4抗体的重链的C末端)直接或经由接头(例如经由一个或多个肽)连接。

[0115] C末端融合蛋白包括但不限于以下(示例性)融合蛋白(从N末端至C末端所述的组分,“-”指示直接共价连接或经由接头(例如经由一个或多个肽)连接):

(a) (抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的重链) - (IL-15或其衍生物)

(b) (抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的重链) - (包含IL-15R α sushi结构域的IL-15R α 多肽或其衍生物);以及

(c) (抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的重链) - (包含IL-15R α sushi结构域的IL-15R α 多肽或其衍生物) - (IL-15或其衍生物)

[0116] C末端融合蛋白可以包含多于一个刺激结构域。

[0117] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,其中所述刺激结构域与所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的重链之一(并且仅一个)的C末端共价连接。

[0118] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含(1)刺激结构域,(2)抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的第一重链,其中所述刺激结构域与所述第一重链的C末端共价连接,以及(3)抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的第二重链,其中所述第二重链与刺激结构域不连接。在一些实施方案中,所述刺激结构域包含(i)IL-15或其衍生物,或(ii)包含IL-15 α sushi结构域的IL-15 α 多肽或其衍生物,或(iii)两者。

[0119] 图1B描绘了本文所述融合蛋白的非限制性例子的示意图。

[0120] 在一个方面,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:

- (a) 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,
- (b) IL-15 α sushi结构域多肽,和
- (c) IL-15多肽。

[0121] 在一个方面,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:

- (a) 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,
- (b) IL-15 α sushi结构域多肽,
- (c) IL-15多肽,和
- (d) 连接IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头。

[0122] 在一个方面,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:

- (a) 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,
- (b) 连接抗B7-H4抗体或其抗原结合片段和IL-15 α sushi结构域多肽的接头,
- (c) IL-15 α sushi结构域多肽,
- (d) 连接所述IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和
- (e) IL-15多肽。

[0123] 在一个方面,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:

- (a) 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,
- (b) IL-15 α sushi结构域多肽,其包含SEQ ID NO:167或与SEQ ID NO:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;以及

(c) IL-15多肽,其包含SEQ ID NO:166或与SEQ ID NO:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。

[0124] 在一个方面,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:

- (a) 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,
- (b) IL-15 α sushi结构域多肽,其包含SEQ ID NO:167或与SEQ ID NO:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;

(c) IL-15多肽,其包含SEQ ID NO:166或与SEQ ID NO:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,以及

- (d) 连接IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头。

[0125] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白从N末端到C末端包含

- (a) 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,
- (b) 恒定重链,
- (c) IL-15 α sushi结构域多肽,其包含SEQ ID NO:167或与SEQ ID NO:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,
- (d) 连接所述IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和
- (e) IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID NO:166或与SEQ ID NO:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。

[0126] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白从N末端到C末端包含

- (a) 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,
- (b) 恒定重链,
- (c) 连接所述恒定重链和IL-15 α sushi结构域多肽的接头,
- (d) IL-15 α sushi结构域多肽,其中所述IL-15 α sushi结构域多肽包含SEQ ID NO:167或与SEQ ID NO:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,
- (e) 连接所述IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和
- (f) IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID NO:166或与SEQ ID NO:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。

[0127] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含

- (a) 第一链,其从N末端到C末端包含:
 - a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,
 - b. 恒定重链,
 - c. IL-15 α sushi结构域多肽,其包含SEQ ID NO:167或与SEQ ID NO:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,
 - d. 连接所述IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和
 - e. IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID NO:166或与SEQ ID NO:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;以及

- (b) 第二链,其从N末端到C末端包含:
 - a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变轻链,和
 - b. 恒定轻链;任选地其中所述恒定重链包含一个或多个引起异二聚化的修饰。

[0128] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含

- (a) 第一链,其从N末端到C末端包含:
 - a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,
 - b. 恒定重链,

c. 连接所述恒定重链和IL-15 α sushi结构域多肽的接头,
d. IL-15 α sushi结构域多肽,其中所述IL-15 α sushi结构域多肽包含SEQ ID NO:167或与SEQ ID NO:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,
e. 连接所述IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和
f. IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID NO:166或与SEQ ID NO:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,以及

(b) 第二链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变轻链,和

b. 恒定轻链;

任选地其中所述恒定重链包含一个或多个引起异二聚化的修饰。

[0129] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含

(a) 第一重链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的第一可变重链,

b. 第一恒定重链,

c. IL-15 α sushi结构域多肽,其包含SEQ ID NO:167或与SEQ ID NO:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

d. 连接所述IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和

e. IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID NO:166或与SEQ ID NO:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;

(b) 第二重链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的第二可变重链,和

b. 第二恒定重链;以及

(c) 轻链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变轻链,和

b. 恒定轻链;

任选地其中所述第一恒定重链和所述第二恒定重链包含一个或多个引起异二聚化的修饰。

[0130] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含

(a) 第一重链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的第一可变重链,

b. 第一恒定重链,

c. 连接所述恒定重链和IL-15 α sushi结构域多肽的接头,

d. IL-15 α sushi结构域多肽,其中所述IL-15 α sushi结构域多肽包含SEQ ID NO:167或与SEQ ID NO:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

e. 连接所述IL-15R α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和
f. IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID NO:166或与SEQ ID NO:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;

(b) 第二重链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的第二可变重链,和

b. 第二恒定重链;以及

(c) 轻链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变轻链,和

b. 恒定轻链;

任选地其中所述第一恒定重链和所述第二恒定重链包含一个或多个引起异二聚化的修饰。

[0131] 在一个实施方案中,所述IL-15R α sushi结构域多肽包含SEQ ID NO:167。在一个实施方案中,所述IL-15R α sushi结构域多肽由SEQ ID NO:167组成。

[0132] 在一个实施方案中,所述IL-15多肽包含SEQ ID NO:166。在一个实施方案中,所述IL-15多肽由SEQ ID NO:166组成。

[0133] 在一个实施方案中,连接IL-15R α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头包含SEQ ID NO:168。在一个实施方案中,连接IL-15R α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头由SEQ ID NO:168组成。

[0134] 在一个实施方案中,所述融合蛋白包含SEQ ID NO:169。

[0135] 在一方面,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区和所述轻链可变区中的每一个包含CDR1、CDR2和CDR3。

[0136] 在一个实施方案中,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:73,CDR2L包含SEQ ID NO:74并且CDR3L包含SEQ ID NO:75。

[0137] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:20,CDR2L包含SEQ ID NO:21并且CDR3L包含SEQ ID NO:22。

[0138] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:66,CDR2L包含SEQ ID NO:67并且CDR3L包含SEQ ID NO:68。

[0139] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:70,CDR2L包含SEQ ID NO:71并且CDR3L包含SEQ ID NO:72。

[0140] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:84,CDR2L包含SEQ ID NO:85并且CDR3L包含SEQ ID NO:86。

[0141] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中

CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:8,CDR2L包含SEQ ID NO:9并且CDR3L包含SEQ ID NO:10。

[0142] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:77,CDR2L包含SEQ ID NO:78并且CDR3L包含SEQ ID NO:79。

[0143] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:81,CDR2L包含SEQ ID NO:82并且CDR3L包含SEQ ID NO:83。

[0144] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:19或与SEQ ID NO:19至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0145] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:65或与SEQ ID NO:65至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0146] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:69或与SEQ ID NO:69至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0147] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:7或与SEQ ID NO:7至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0148] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:76或与SEQ ID NO:76至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0149] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:80或与SEQ ID NO:80至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0150] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:15并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:19。

[0151] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:15并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:65。

[0152] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:15并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:69。

[0153] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所

述重链可变区包含SEQ ID NO:3并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:7。

[0154] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:3并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:76。

[0155] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:3并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:80。

[0156] 在一方面,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区和所述轻链可变区中的每一个包含CDR1、CDR2和CDR3。

[0157] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:46,CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:111,CDR2L包含SEQ ID NO:112并且CDR3L包含SEQ ID NO:113。

[0158] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:46,CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:50,CDR2L包含SEQ ID NO:51并且CDR3L包含SEQ ID NO:52。

[0159] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:46,CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:88,CDR2L包含SEQ ID NO:89并且CDR3L包含SEQ ID NO:90。

[0160] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:46,CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:92,CDR2L包含SEQ ID NO:93并且CDR3L包含SEQ ID NO:94。

[0161] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:46,CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:96,CDR2L包含SEQ ID NO:97并且CDR3L包含SEQ ID NO:98。

[0162] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:46,CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:100,CDR2L包含SEQ ID NO:101并且CDR3L包含SEQ ID NO:102。

[0163] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:46,CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:104,CDR2L包含SEQ ID NO:105并且CDR3L包含SEQ ID NO:106。

[0164] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:46,CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:108,CDR2L包含SEQ ID NO:109并且CDR3L包含SEQ ID NO:110。

[0165] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:49或与SEQ ID NO:49至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0166] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:87或与

SEQ ID NO:87至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0167] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:91或与SEQ ID NO:91至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0168] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:95或与SEQ ID NO:95至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0169] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:99或与SEQ ID NO:99至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0170] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:103或与SEQ ID NO:103至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0171] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:107或与SEQ ID NO:107至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0172] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:49。

[0173] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:87。

[0174] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:91。

[0175] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:95。

[0176] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:99。

[0177] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:103。

[0178] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:107。

[0179] 在一方面,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区和所述轻链可变区中的每一个包含

CDR1、CDR2和CDR3。

[0180] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,并且其中CDR1L包含SEQ ID NO:134,CDR2L包含SEQ ID NO:135并且CDR3L包含SEQ ID NO:136。

[0181] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,并且其中CDR1L包含SEQ ID NO:62,CDR2L包含SEQ ID NO:63并且CDR3L包含SEQ ID NO:64。

[0182] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,并且其中CDR1L包含SEQ ID NO:115,CDR2L包含SEQ ID NO:116并且CDR3L包含SEQ ID NO:117。

[0183] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,并且其中CDR1L包含SEQ ID NO:119,CDR2L包含SEQ ID NO:120并且CDR3L包含SEQ ID NO:121。

[0184] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,并且其中CDR1L包含SEQ ID NO:123,CDR2L包含SEQ ID NO:124并且CDR3L包含SEQ ID NO:125。

[0185] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,并且其中CDR1L包含SEQ ID NO:127,CDR2L包含SEQ ID NO:128并且CDR3L包含SEQ ID NO:129。

[0186] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,并且其中CDR1L包含SEQ ID NO:131,CDR2L包含SEQ ID NO:132并且CDR3L包含SEQ ID NO:133。

[0187] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57或与SEQ ID NO:57至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:61或与SEQ ID NO:61至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0188] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57或与SEQ ID NO:57至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:114或与SEQ ID NO:114至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0189] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57或与SEQ ID NO:57至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:118或与SEQ ID NO:118至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0190] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57或与SEQ ID NO:57至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:122或与

SEQ ID NO:122至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0191] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57或与SEQ ID NO:57至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:126或与SEQ ID NO:126至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。或者

[0192] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57或与SEQ ID NO:57至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:130或与SEQ ID NO:130至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0193] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:61。

[0194] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:114。

[0195] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:118。

[0196] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:122。

[0197] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:126。

[0198] 本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:130。

[0199] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含

(a) 第一链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,其中所述可变重链包含CDR1H、CDR2H和CDR3H,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,

b. 恒定重链,

c. IL-15 α sushi结构域多肽,其包含SEQ ID NO:167或与SEQ ID NO:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

d. 连接所述IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和

e. IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID NO:166或与SEQ ID NO:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,以及

(b) 第二链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变轻链,其中所述可变轻链包含CDR1L、

CDR2L和CDR3L,其中CDR1L包含SEQ ID NO:70,CDR2L包含SEQ ID NO:71并且CDR3L包含SEQ ID NO:72,和

b. 恒定轻链;

任选地其中所述恒定重链包含一个或多个引起异二聚化的修饰。

[0200] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含

(a) 第一链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,其中所述可变重链包含CDR1H、CDR2H和CDR3H,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,

b. 恒定重链,

c. 连接所述恒定重链和IL-15 α sushi结构域多肽的接头,

d. IL-15 α sushi结构域多肽,其中所述IL-15 α sushi结构域多肽包含SEQ ID NO:167或与SEQ ID NO:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

e. 连接所述IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和

f. IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID NO:166或与SEQ ID NO:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;以及

(b) 第二链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,其中所述可变重链包含CDR1H、CDR2H和CDR3H,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18;和

b. 恒定轻链;

任选地其中所述恒定重链包含一个或多个引起异二聚化的修饰。

[0201] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含

(a) 第一链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,其中所述可变重链包含CDR1H、CDR2H和CDR3H,其中CDR1H包含SEQ ID NO:46,CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,

b. 恒定重链,

c. IL-15 α sushi结构域多肽,其包含SEQ ID NO:167或与SEQ ID NO:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

d. 连接所述IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和

e. IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID NO:166或与SEQ ID NO:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;以及

(b) 第二链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变轻链,其中所述可变轻链包含CDR1L、

CDR2L和CDR3L,其中CDR1L包含SEQ ID NO:108,CDR2L包含SEQ ID NO:109并且CDR3L包含SEQ ID NO:110,和

b. 恒定轻链;

任选地其中所述恒定重链包含一个或多个引起异二聚化的修饰。

[0202] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含

(a) 第一链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,其中所述可变重链包含CDR1H、CDR2H和CDR3H,其中CDR1H包含SEQ ID NO:46,CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,

b. 恒定重链,

c. 连接所述恒定重链和IL-15 α sushi结构域多肽的接头,

d. IL-15 α sushi结构域多肽,其中所述IL-15 α sushi结构域多肽包含SEQ ID NO:167或与SEQ ID NO:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

e. 连接所述IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和

f. IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID NO:166或与SEQ ID NO:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;以及

(b) 第二链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变轻链,其中所述可变轻链包含CDR1L、CDR2L和CDR3L,其中CDR1L包含SEQ ID NO:108,CDR2L包含SEQ ID NO:109并且CDR3L包含SEQ ID NO:110,和

b. 恒定轻链;

任选地其中所述恒定重链包含一个或多个引起异二聚化的修饰。

[0203] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含

(a) 第一链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,其中所述可变重链包含CDR1H、CDR2H和CDR3H,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,

b. 恒定重链,

c. IL-15 α sushi结构域多肽,其包含SEQ ID NO:167或与SEQ ID NO:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

d. 连接所述IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和

e. IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID NO:166或与SEQ ID NO:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;以及

(b) 第二链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变轻链,其中所述可变轻链包含CDR1L、

CDR2L和CDR3L,其中CDR1L包含SEQ ID NO:119,CDR2L包含SEQ ID NO:120并且CDR3L包含SEQ ID NO:121,和

b. 恒定轻链;

任选地其中所述恒定重链包含一个或多个引起异二聚化的修饰。

[0204] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含

(a) 第一链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,其中所述可变重链包含CDR1H、CDR2H和CDR3H,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,

b. 恒定重链,

c. 连接所述恒定重链和IL-15 α sushi结构域多肽的接头,

d. IL-15 α sushi结构域多肽,其中所述IL-15 α sushi结构域多肽包含SEQ ID NO:167或与SEQ ID NO:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

e. 连接IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,

f. IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID NO:166或与SEQ ID NO:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;以及

(b) 第二链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变轻链,其中所述可变轻链包含CDR1L、CDR2L和CDR3L,其中CDR1L包含SEQ ID NO:119,CDR2L包含SEQ ID NO:120并且CDR3L包含SEQ ID NO:121,和

b. 恒定轻链;

任选地其中所述恒定重链包含一个或多个引起异二聚化的修饰。

[0205] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含

(a) 第一链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,其包含SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

b. 恒定重链,

c. IL-15 α sushi结构域多肽,其包含SEQ ID NO:167或与SEQ ID NO:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

d. 连接所述IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和

e. IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID NO:166或与SEQ ID NO:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;以及

(b) 第二链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变轻链,其包含SEQ ID NO:69或与SEQ ID

N0:69至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,和

b. 恒定轻链;

任选地其中所述恒定重链包含一个或多个引起异二聚化的修饰。

[0206] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含

(a) 第一链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,其包含SEQ ID N0:15或与SEQ ID N0:15至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

b. 恒定重链,

c. 连接所述恒定重链和IL-15 α sushi结构域多肽的接头,

d. IL-15 α sushi结构域多肽,其中所述IL-15 α sushi结构域多肽包含SEQ ID N0:167或与SEQ ID N0:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

e. 连接所述IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和

f. IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID N0:166或与SEQ ID N0:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;以及

(b) 第二链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变轻链,其包含SEQ ID N0:69或与SEQ ID N0:69至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,和

b. 恒定轻链;

任选地其中所述恒定重链包含一个或多个引起异二聚化的修饰。

[0207] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含

(a) 第一链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,其包含SEQ ID N0:45或与SEQ ID N0:45至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

b. 恒定重链,

c. IL-15 α sushi结构域多肽,其包含SEQ ID N0:167或与SEQ ID N0:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

d. 连接所述IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和

e. IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID N0:166或与SEQ ID N0:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;以及

(b) 第二链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,其包含SEQ ID N0:107或与SEQ ID

N0:107至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,和

b. 恒定轻链;

任选地其中所述恒定重链包含一个或多个引起异二聚化的修饰。

[0208] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含

(a) 第一链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,其包含SEQ ID N0:45或与SEQ ID N0:45至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

b. 恒定重链,

c. 连接所述恒定重链和IL-15 α sushi结构域多肽的接头,

d. IL-15 α sushi结构域多肽,其中所述IL-15 α sushi结构域多肽包含SEQ ID N0:167或与SEQ ID N0:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

e. 连接所述IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和

f. IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID N0:166或与SEQ ID N0:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;以及

(b) 第二链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,其包含SEQ ID N0:107或与SEQ ID N0:107至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,和

b. 恒定轻链;

任选地其中所述恒定重链包含一个或多个引起异二聚化的修饰。

[0209] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含

(a) 第一链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,其包含SEQ ID N0:57或与SEQ ID N0:57至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

b. 恒定重链,

c. IL-15 α sushi结构域多肽,其包含SEQ ID N0:167或与SEQ ID N0:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

d. 连接所述IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和

e. IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID N0:166或与SEQ ID N0:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;以及

(b) 第二链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,其包含SEQ ID N0:118或与SEQ ID

N0:118至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,和

b. 恒定轻链;

任选地其中所述恒定重链包含一个或多个引起异二聚化的修饰。

[0210] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含

(a) 第一链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,其包含SEQ ID N0:57或与SEQ ID N0:57至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

b. 恒定重链,

c. 连接所述恒定重链和IL-15 α sushi结构域多肽的接头,

d. IL-15 α sushi结构域多肽,其中所述IL-15 α sushi结构域多肽包含SEQ ID N0:167或与SEQ ID N0:167至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,

e. 连接所述IL-15 α sushi结构域多肽和IL-15多肽的接头,和

f. IL-15多肽,其中所述IL-15多肽包含SEQ ID N0:166或与SEQ ID N0:166至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;以及

(b) 第二链,其从N末端到C末端包含:

a. 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的可变重链,其包含SEQ ID N0:118或与SEQ ID N0:118至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,和

b. 恒定轻链;

任选地其中所述恒定重链包含一个或多个引起异二聚化的修饰。

[0211] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:

(a) 轻链,其包含SEQ ID N0:69或与SEQ ID N0:69至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列和/或SEQ ID N0:145或与SEQ ID N0:145至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;

(b) 第一重链,其包含SEQ ID N0:150或与SEQ ID N0:150至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;和

(c) 第二重链,其包含SEQ ID N0:157或与SEQ ID N0:157至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。

[0212] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:

(a) 轻链,其包含SEQ ID N0:69或与SEQ ID N0:69至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列和/或SEQ ID N0:145或与SEQ ID N0:145至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;

(b) 第一重链,其包含SEQ ID N0:151或与SEQ ID N0:151至少80%、至少85%、至

少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;和

(c) 第二重链,其包含SEQ ID NO:158或与SEQ ID NO:158至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。

[0213] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:

(a) 轻链,其包含SEQ ID NO:118或与SEQ ID NO:118至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:144或与SEQ ID NO:144至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;

(b) 第一重链,其包含SEQ ID NO:148或与SEQ ID NO:148至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;和

(c) 第二重链,其包含SEQ ID NO:155或与SEQ ID NO:155至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。

[0214] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:

(a) 轻链,其包含SEQ ID NO:118或与SEQ ID NO:118至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:144或与SEQ ID NO:144至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;

(b) 第一重链,其包含SEQ ID NO:149或与SEQ ID NO:149至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列;和

(c) 第二重链,其包含SEQ ID NO:156或与SEQ ID NO:156至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。

[0215] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:

(a) 含有SEQ ID NO:69和/或SEQ ID NO:145的轻链;

(b) 含有SEQ ID NO:150的第一重链;和

(c) 含有SEQ ID NO:157的第二重链。

[0216] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:

(a) 含有SEQ ID NO:69和/或SEQ ID NO:145的轻链;

(b) 含有SEQ ID NO:151的第一重链;和

(c) 含有SEQ ID NO:158的第二重链。

[0217] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:

(a) 含有SEQ ID NO:118和/或SEQ ID NO:144的轻链;

(b) 含有SEQ ID NO:148的第一重链;和

(c) 含有SEQ ID NO:155的第二重链。

[0218] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:

(a) 含有SEQ ID NO:118和/或SEQ ID NO:144的轻链;

(b) 含有SEQ ID NO:149的第一重链;和

(c) 含有SEQ ID NO:156的第二重链。

[0219] 在一个实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:

(a) 含有SEQ ID NO:145的轻链;

(b) 含有SEQ ID NO:150的第一重链;和

(c) 含有SEQ ID NO:157的第二重链。

[0220] 本文提供了包含表13、表21或表22中公开的一个或多个序列的融合蛋白。

[0221] 抗体及其抗原结合片段

[0222] 术语抗体在本文中以最广泛的意义使用并且包括单克隆抗体(包括全长或完整单克隆抗体)、多克隆抗体、双特异性抗体、人源化抗体、单链抗体、嵌合抗体、合成抗体、重组抗体、杂合抗体、诱变抗体和移植抗体(移植抗体)、双特异性抗体、特异性抗体部分(例如结构域抗体)、以及与完整抗体竞争特异性结合的其任何抗原结合部分、其抗原结合部分(例如互补位、CDR)以及包含抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他经修饰的构象,只要它们展现出所需的生物活性和特异性即可。因此,抗体是包括包含抗原结合位点的任何多肽的免疫球蛋白分子或其片段或其衍生物,所述抗原结合位点能够通过位于所述免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点与靶标特异性结合。所公开的抗体可以是鼠类、大鼠、人或任何其他来源的(包括嵌合抗体或人源化抗体)。

[0223] 在某些实施方案中,抗体(或其抗原结合片段)的框架区可以与人种系序列相同,或者可以是天然的或人工修饰的。

[0224] 在一个优选的实施方案中,所公开的抗体结构属于免疫球蛋白分子的IgG类。标准IgG免疫球蛋白分子包含两条相同的轻链多肽和两条相同的重链多肽。轻链多肽的分子量是大约23,000道尔顿并且重链多肽的分子量在53,000道尔顿-70,000道尔顿之间变化。四条链典型地以“Y”构型通过二硫键连接。

[0225] 当免疫球蛋白由杂交瘤、B细胞或基因工程化宿主细胞产生时,所述免疫球蛋白分子的两条重链(HC)和两条轻链(LC)彼此共价键合,并且所述两条重链的末端部分通过共价二硫化物连接或非共价连接彼此键合。轻链和重链两者均含有结构和功能同源性的区域。在功能方面使用术语“可变”和“恒定”。每条重链由重链可变区(“HCVR”或“VH”)和重链恒定区(由结构域CH1、CH2和CH3组成)组成。每条轻链由轻链可变区(“LCVR”或“VL”)和轻链恒定区(CL)组成。VH和VL区可以进一步细分为具有高变性的区域,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由三个CDR和四个FR组成,按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0226] 可变区允许抗体识别且特异性结合位于抗原上的表位。轻链(VL)和重链(VH)部分两者的可变结构域决定抗原识别和特异性。抗体的抗原结合位点由VL结构域和VH结构域或者CDR的子集组成。更具体地,抗原结合位点由VH链和VL链各自上的一个、两个或三个CDR(即CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)界定。相反,轻链(CL)和重链(CH1、CH2或CH3)的恒定结构域赋予生物学特性,如分泌、经胎盘移动、Fc受体结合、补体结合。按照惯例,恒定区结构域的编号随着它们离抗体的抗原结合位点或氨基末端越来越远而增加。

[0227] 如本文所用,术语“互补决定区”(CDR)是指(典型地)涉及抗原结合的抗体可变结构域的部分。每个可变区具有三个非连续CDR,称为CDR1、CDR2和CDR3。CDR通过称为框架区(FR-1、FR-2、FR-3和FR-4)的结构保守区域分开,所述框架区形成展示可变结构域表面上的这些环的“核心” β 片层结构。存在于每个抗原结合结构域中的六个CDR是短的非连续的氨基酸序列,其特异性定位以形成抗原结合结构域,因为假定抗体在水性环境中呈现其三维构

型。CDR序列的长度和组成是高度可变的,尤其是在CDR3中。位于抗原结合结构域或“框架”区中的氨基酸的剩余部分显示出较少的分子间可变性。由定位的CDR形成的抗原结合结构域限定了与免疫应答性抗原上的表位互补的表面。此互补表面促进抗体与其同源表位的非共价结合。每个CDR可以包含来自如通过例如Kabat所定义的CDR的氨基酸残基(即轻链可变结构域中的约残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)以及重链可变结构域中的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987,1991))。每个CDR包含来自“高变环”的氨基酸残基(即轻链可变结构域中的约残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)以及重链可变结构域中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)(Chothia和Lesk 196J.Mol.Biol.901(1987))。在一些情形下,CDR可以包括来自根据Kabat所定义的CDR区和高变环两者的氨基酸。由于基本可变结构域结构缺少或插入结构组分(无论是框架还是CDR),Kabat编号可能不总是对应于氨基酸残基上的线性编号。给定抗体残基的正确Kabat编号可以通过所述给定抗体或其抗原结合片段的序列中同源的残基与“标准”Kabat编号的序列的比对来确定或者可以根据ImMunoGeneTics(IMG)系统来定义(Lefranc,M.-P.等人,Dev.Comp.Immunol.,27,55-77(2003))。

[0228] 如本文所用,术语“抗原结合部分”或“抗原结合片段”可以是包含以下的片段: Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、结构域抗体(dAb,如鲨鱼抗体和骆驼抗体)、ScFv、巨型抗体、微型抗体、纳米抗体、内抗体、双抗体、三抗体、四抗体、v-NAR和双-scFv或这样的多肽,所述多肽含有足以为所述多肽赋予特异性抗原结合性质的免疫球蛋白的至少某些部分。

[0229] 所述抗体可以是任何类的抗体,如IgG、IgA或IgM(或其子类),并且所述抗体不需要是任何特定类别,并且可以涵盖包含所需特异性的抗原识别位点的任何免疫球蛋白分子、其他经修饰的构型(包括抗体的糖基化变体、抗体的氨基酸序列变体和共价修饰的抗体)。这些类别和同种型中的每一种的修饰形式是本领域技术人员已知的,因此,它们在本公开文本的范围内。

[0230] 在本文所述方面的一些实施方案中,抗B7-H4抗体片段是Fab片段,所述Fab片段包含轻链的可变(VL)结构域和恒定(CL)结构域以及重链的可变结构域(VH)和第一恒定结构域(CH1)或基本上由其组成。

[0231] 在本文所述方面的一些实施方案中,抗B7-H4抗体片段是Fab'片段,所述Fab'片段是指具有在CH1结构域的C末端处的一个或多个半胱氨酸残基的Fab片段。

[0232] 在本文所述方面的一些实施方案中,抗B7-H4抗体片段是包含VH结构域和CH1结构域或基本上由其组成的Fd片段。

[0233] 在本文所述方面的一些实施方案中,抗B7-H4抗体片段是Fd'片段,所述Fd'片段包含VH结构域和CH1结构域以及在CH1结构域的C末端处的一个或多个半胱氨酸残基。

[0234] 单链Fv或scFv抗体片段包含抗体的VH结构域和VL结构域或基本上由其组成,使得这些结构域存在于单一多肽链中。通常,Fv多肽进一步包含VH结构域与VL结构域之间的多肽接头,其允许scFv形成抗原结合的所需结构。因此,在本文所述方面的一些实施方案中,抗B7-H4抗体片段是包含抗体单臂的VL结构域和VH结构域或基本上由其组成的Fv片段。

[0235] 在本文所述方面的一些实施方案中,抗B7-H4抗体片段是包含两个抗原结合位点的双抗体,所述双抗体包含在相同多肽链中与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域

(VH)。

[0236] 在本文所述方面的一些实施方案中,抗B7-H4抗体片段是包含VH结构域或基本上由其组成的dAb片段。

[0237] 在本文所述方面的一些实施方案中,抗B7-H4抗体片段是F(ab')₂片段,所述F(ab')₂片段包含含有在铰链区处通过二硫桥连接的两个Fab'片段的二价片段。

[0238] 在本文所述方面的一些实施方案中,抗B7-H4抗体片段是包含一对串联Fd区段(VH-CH1-VH-CH1)的线性抗体,所述一对串联Fd区段连同互补轻链多肽形成一对抗原结合区。

[0239] 本领域技术人员可以使用已开发的并且可以用于产生抗体片段的各种技术。传统上,经由完整抗体的蛋白水解消化得到这些片段。然而,可以直接从重组宿主细胞培养物分离F(ab')₂片段。用于产生抗体片段的其他技术对于熟练从业人员会是显而易见的。在其他实施方案中,选择的抗体片段是单链Fv片段(scFv)。参见例如,WO 93/16185。可替代地,还可直接由重组宿主细胞产生这些片段。例如,可以从本文所讨论的抗体噬菌体文库中分离抗体片段。在另一方法中,可以直接从大肠杆菌(E. coli)回收Fab'-SH片段并且将其化学偶联以形成F(ab')₂片段(Carter等人,1992)。

[0240] 在一个实施方案中,所述抗体是包含结合B7-H4的互补区的双特异性抗体。

[0241] 考虑的抗体或抗原结合片段可以具有所有类型的恒定区(包括IgM、IgG、IgD和IgE)和任何同种型(包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。在一个实施方案中,所述同种型是人IgG1。在另一个实施方案中,使用人同种型IgG4。轻链恒定区可以是λ或κ。抗体或其抗原结合片段可以包含来自多于一种类别或同种型的序列。

[0242] 本公开文本描述了与B7-H4结合的抗体及与B7-H4结合的其抗原结合片段,以及包含此类抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的融合蛋白。术语“B7-H4”是指含有V-set结构域的T细胞激活抑制剂1(VTCN1),还称为B7同源物4、B7h.5、免疫共刺激蛋白B7-H4、蛋白B7S1或T细胞共刺激分子B7x。人B7-H4的序列提供于SEQ ID NO:161中。鼠B7-H4的序列提供于SEQ ID NO:162中。术语B7-H4涵盖重组B7-H4和/或其片段。术语还包括B7-H4或其片段,其与例如小鼠或人Fc、组氨酸标签和/或信号序列偶联。术语可以进一步涵盖包含B7-H4的融合蛋白。

[0243] 在实施方案中,抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的融合蛋白与B7-H4特异性结合并且拮抗B7-H4介导的免疫抑制。本文公开的抗B7-H4抗体及其抗原结合片段(以及包含此类抗B7-H4抗体及其抗原结合片段的融合蛋白)可以干扰、抑制或降低B7-H4生物活性(包括由B7-H4介导的下游事件)。本文公开的抗B7-H4抗体及其抗原结合片段(以及包含此类抗B7-H4抗体及其抗原结合片段的融合蛋白)可以展现出以下特征中的任一种或多种:(a)与B7-H4结合并且阻断下游信号传导事件;(b)阻断B7-H4与其同源配体的结合;(c)增加T细胞增殖;(d)上调T细胞介导的免疫应答;(e)刺激细胞因子分泌;(f)减少通过B7-H4进行的抑制性信号转导;和/或(g)杀伤肿瘤细胞。本文公开的抗B7-H4抗体及其抗原结合片段(以及包含此类抗B7-H4抗体及其抗原结合片段的融合蛋白)展现出强效结合和抑制活性并且可用于治疗和诊断用途。

[0244] 在一方面,本公开文本提供了与B7-H4结合的抗体及其抗原结合片段(以及包含此类抗B7-H4抗体及其抗原结合片段的融合蛋白)。在某些实施方案中,本公开文本提供了与

B7-H4和至少一个其他分子特异性结合的双特异性抗体和结合蛋白。

[0245] 在一方面,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区和所述轻链可变区中的每一个包含CDR1、CDR2和CDR3。

[0246] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:73,CDR2L包含SEQ ID NO:74并且CDR3L包含SEQ ID NO:75。

[0247] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:20,CDR2L包含SEQ ID NO:21并且CDR3L包含SEQ ID NO:22。

[0248] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:66,CDR2L包含SEQ ID NO:67并且CDR3L包含SEQ ID NO:68。

[0249] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:70,CDR2L包含SEQ ID NO:71并且CDR3L包含SEQ ID NO:72。

[0250] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:84,CDR2L包含SEQ ID NO:85并且CDR3L包含SEQ ID NO:86。

[0251] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:8,CDR2L包含SEQ ID NO:9并且CDR3L包含SEQ ID NO:10。

[0252] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:77,CDR2L包含SEQ ID NO:78并且CDR3L包含SEQ ID NO:79。

[0253] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:81,CDR2L包含SEQ ID NO:82并且CDR3L包含SEQ ID NO:83。

[0254] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:16,CDR2H包含SEQ ID NO:17,CDR3H包含SEQ ID NO:18,CDR1L包含SEQ ID NO:70,CDR2L包含SEQ ID NO:71并且CDR3L包含SEQ ID NO:72。

[0255] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:172,CDR2H包含SEQ ID NO:173,CDR3H包含SEQ ID NO:174,CDR1L包含SEQ ID NO:175,CDR2L包含SEQ ID NO:176并且CDR3L包含SEQ ID NO:177。

[0256] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:178,CDR2H包含SEQ ID NO:179,CDR3H包含SEQ ID NO:180,CDR1L包含SEQ ID NO:181,CDR2L包含SEQ ID NO:182并且CDR3L包含SEQ ID NO:183。

[0257] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:184,CDR2H包含SEQ ID NO:185,CDR3H包含SEQ ID NO:186,CDR1L包含SEQ ID NO:187,CDR2L包

含SEQ ID NO:188并且CDR3L包含SEQ ID NO:189。

[0258] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:19或与SEQ ID NO:19至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0259] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:65或与SEQ ID NO:65至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0260] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:69或与SEQ ID NO:69至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0261] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:7或与SEQ ID NO:7至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0262] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:76或与SEQ ID NO:76至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0263] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:80或与SEQ ID NO:80至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0264] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:15并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:19。

[0265] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:15并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:65。

[0266] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:15并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:69。

[0267] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:3并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:7。

[0268] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:3并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:76。

[0269] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:3并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:80。

[0270] 在一方面,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区和所述轻链可变区中的每一个包含

CDR1、CDR2和CDR3。

[0271] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:46, CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:111,CDR2L包含SEQ ID NO:112并且CDR3L包含SEQ ID NO:113。

[0272] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:46, CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:50,CDR2L包含SEQ ID NO:51并且CDR3L包含SEQ ID NO:52。

[0273] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:46, CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:88,CDR2L包含SEQ ID NO:89并且CDR3L包含SEQ ID NO:90。

[0274] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:46, CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:92,CDR2L包含SEQ ID NO:93并且CDR3L包含SEQ ID NO:94。

[0275] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:46, CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:96,CDR2L包含SEQ ID NO:97并且CDR3L包含SEQ ID NO:98。

[0276] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:46, CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:100,CDR2L包含SEQ ID NO:101并且CDR3L包含SEQ ID NO:102。

[0277] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:46, CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:104,CDR2L包含SEQ ID NO:105并且CDR3L包含SEQ ID NO:106。

[0278] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR1H包含SEQ ID NO:46, CDR2H包含SEQ ID NO:47,CDR3H包含SEQ ID NO:48,CDR1L包含SEQ ID NO:108,CDR2L包含SEQ ID NO:109并且CDR3L包含SEQ ID NO:110。

[0279] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:49或与SEQ ID NO:49至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0280] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:87或与SEQ ID NO:87至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0281] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:91或与SEQ ID NO:91至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0282] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相

同的序列并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:95或与SEQ ID NO:95至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0283] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:99或与SEQ ID NO:99至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0284] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:103或与SEQ ID NO:103至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0285] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45或与SEQ ID NO:45至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:107或与SEQ ID NO:107至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0286] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:49。

[0287] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:87。

[0288] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:91。

[0289] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:95。

[0290] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:99。

[0291] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:103。

[0292] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:45并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:107。

[0293] 在一方面,提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区和所述轻链可变区中的每一个包含CDR1、CDR2和CDR3。

[0294] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,并且其中CDR1L包含SEQ ID NO:134,CDR2L包含SEQ ID NO:135并且CDR3L包含SEQ ID NO:136。

[0295] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,并且其中CDR1L包含SEQ ID NO:62,CDR2L包含SEQ ID NO:63并且CDR3L包含SEQ ID NO:64。

[0296] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,并且其中CDR1L包含SEQ ID NO:115,CDR2L包

含SEQ ID NO:116并且CDR3L包含SEQ ID NO:117。

[0297] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,并且其中CDR1L包含SEQ ID NO:119,CDR2L包含SEQ ID NO:120并且CDR3L包含SEQ ID NO:121。

[0298] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,并且其中CDR1L包含SEQ ID NO:123,CDR2L包含SEQ ID NO:124并且CDR3L包含SEQ ID NO:125。

[0299] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,并且其中CDR1L包含SEQ ID NO:127,CDR2L包含SEQ ID NO:128并且CDR3L包含SEQ ID NO:129。

[0300] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中CDR1H包含SEQ ID NO:58,CDR2H包含SEQ ID NO:59,CDR3H包含SEQ ID NO:60,并且其中CDR1L包含SEQ ID NO:131,CDR2L包含SEQ ID NO:132并且CDR3L包含SEQ ID NO:133。

[0301] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57或与SEQ ID NO:57至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:61或与SEQ ID NO:61至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0302] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57或与SEQ ID NO:57至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:114或与SEQ ID NO:114至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0303] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57或与SEQ ID NO:57至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:118或与SEQ ID NO:118至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0304] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57或与SEQ ID NO:57至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:122或与SEQ ID NO:122至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0305] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57或与SEQ ID NO:57至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:126或与SEQ ID NO:126至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。或者

[0306] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57或与SEQ ID NO:57至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:130或与SEQ ID NO:130至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列。

[0307] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:61。

[0308] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:114。

[0309] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:118。

[0310] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:122。

[0311] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:126。

[0312] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:57并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:130。

[0313] 表5、表7、表9、表16-20和表24示出了本文公开抗体的重链可变区和轻链可变区以及相关CDR,正如通过引用以其整体并入的所附序列列表。如以下实施例中所示,抗B7-H4抗体的轻链改组导致鉴定出赋予B7-H4结合亲和力明显改善的抗体变体。对所述变体的分析揭示了在轻链改组的抗体中氨基酸保持相对不变的某些CDR位置以及可以在不消除B7-H4结合的情况下引入变化的其他CDR位置。

[0314] 本文公开的抗B7-H4抗体及其抗原结合片段以及本文公开的融合蛋白可以具有一个或多个氨基酸取代、缺失、插入和/或添加。在一些实施方案中,本文公开的抗B7-H4抗体或抗原结合片段(或包含所述抗B7-H4抗体或抗原结合片段的融合蛋白)的一个或多个CDR残基或者多个或更多个框架残基已经通过氨基酸取代、缺失、插入和/或添加改变。氨基酸取代可以是保守取代或非保守取代。本公开文本还包括抗B7-H4抗体及其抗原结合片段(以及包含所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的融合蛋白),其衍生自本文公开的氨基酸序列,其中一个或多个框架和/或CDR区内的一个或多个氨基酸被突变为衍生所述抗体的种系序列的一个或多个对应残基,或另一个人种系序列的一个或多个对应残基,或所述一个或多个对应种系残基的保守氨基酸取代(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。在某些实施方案中,抗B7-H4抗体或其结合片段(或包含所述抗B7-H4抗体或抗原结合片段的融合蛋白)包含具有与表5、表7、表9、表16-表20或表24中所示的CDR和/或可变结构域序列至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列的一个或多个CDR或一个或多个可变结构域。

[0315] 本文还提供了与表16-表20中公开的可变重链和可变轻链(及其对)相似但不相同的可变重链序列和可变轻链序列(及其对)。将明显的是,本文所述任何框架可以与本文所述任何CDR和CDR基序组合利用。在一些实施方案中,抗B7-H4抗体或其抗原结合片段利用表16-表20中所述框架。

[0316] 本文还提供了嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体包含本文公开的抗B7-H4抗体和抗原结合片段的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR。本文还提供了CAR,所述CAR包含本文公开的抗B7-H4抗体和抗原结合片段的六个CDR中的任一个。

[0317] 公开了表达CAR的免疫细胞,所述CAR包含本文公开的抗B7-H4抗体和抗原结合片段的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR。公开了表达CAR的免疫细胞,所述CAR包含本文公开的抗B7-H4抗体和抗原结合片段的六个CDR中的任一个。在一些实施方案中,免疫细胞是T细胞。

[0318] “同一性”是指在考虑了最佳比对所需空位的数量和每个空位的长度后,最佳比对序列中的两个氨基酸序列或核酸序列共享的相同位置的数量或百分比。“基本上相同的”意指氨基酸序列与初始序列的不同之处仅在于保守氨基酸取代,这不会破坏蛋白的功能。

[0319] 本文还公开了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者包含与本文公开的氨基酸序列至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少98%、或至少99%相同的氨基酸序列的融合蛋白。用于测定序列相似性的方法和计算机程序是可以公开获取的,包括但不限于GCG程序包(Devereux等人,Nucleic Acids Research 12:387,1984)、BLASTP、BLASTN、FASTA(Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403(1990)) 和ALIGN程序(版本2.0)。Smith Waterman算法也可以用于测定相似性。BLAST程序可以从NCBI和其他来源公开获取(BLAST手册,Altschul等人,NCBI NLM NIH,Bethesda,Md.20894;<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>的BLAST 2.0)。在比较序列中,这些方法考虑了各种取代、缺失和其他修饰。

[0320] 在本文所述方面的一些实施方案中,考虑了本文所述的与B7-H4结合的抗体或其抗原结合片段或者与B7-H4结合的融合蛋白的一个或多个氨基酸序列修饰。通过将合适的核苷酸改变引入编码抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白的核酸中或者通过肽合成制备所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者所述融合蛋白的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如所述抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或取代。如果最终的构建体具有所需的特征,例如结合特异性、生物活性的抑制,则进行缺失、插入和取代的任何组合以得到最终的构建体。

[0321] 在一些情况下,可以通过选择在对维持以下的作用的方面没有显著不同的取代进行氨基酸取代:(a) 取代区域的肽骨架的结构;(b) 分子在靶位处的电荷或疏水性;或(c) 大部分侧链(保守氨基酸取代变体)。这些变体在抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白中具有至少一个被具有相似侧链特性的不同残基替代的氨基酸残基。根据其侧链特性的相似性,可以将氨基酸如下分组(参见Lehninger,BIOCHEMISTRY(第2版,Worth Publishers,New York,1975)):

- (1) 非极性的:Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M);
- (2) 不带电荷的极性的:Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q);
- (3) 酸性的:Asp(D)、Glu(E);
- (4) 碱性的:Lys(K)、Arg(R)、His(H)。

[0322] 因此,保守氨基酸取代的非限制性例子是将非极性氨基酸用另一个非极性氨基酸替代的保守氨基酸取代。

[0323] 可替代地,基于共同的侧链性质,天然存在的残基可以如下分组:

- (1) 疏水性的:Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Met(M);
- (2) 中性亲水性的:Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Asn(N)、Gln(Q);
- (3) 酸性的:Asp(D)、Glu(E);
- (4) 碱性的:Lys(K)、Arg(R)、His(H);
- (5) 影响链取向的残基:Gly(G)、Pro(P);
- (6) 芳族的:Phe(F)、Trp(W)、Tyr(Y)。

[0324] 这些分组中进行的取代可以被视为保守取代。非限制性取代的例子包括缬氨酸对丙氨酸、赖氨酸对精氨酸、谷氨酰胺对天冬酰胺、谷氨酸对天冬氨酸、丝氨酸对半胱氨酸、天

冬酰胺对谷氨酰胺、天冬氨酸对谷氨酸、脯氨酸对甘氨酸、精氨酸对组氨酸、亮氨酸对异亮氨酸、异亮氨酸对亮氨酸、精氨酸对赖氨酸、亮氨酸对甲硫氨酸、亮氨酸对苯丙氨酸、甘氨酸对脯氨酸、苏氨酸对丝氨酸、丝氨酸对苏氨酸、酪氨酸对色氨酸、苯丙氨酸对酪氨酸和/或亮氨酸对缬氨酸的取代。

[0325] 进一步考虑了氨基酸序列插入物,其可以包括长度在一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽范围内的氨基末端和/或羧基末端融合物,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入物。

[0326] 末端融合物的例子包括具有N末端甲硫氨酰基残基的抗体或其抗原结合片段,或者与细胞毒性多肽融合的抗体或其抗原结合片段(或包含此类抗体或其抗原结合片段的融合蛋白)。抗体或其抗原结合片段的末端融合物的其他例子包括与所述抗体或其抗原结合片段的N末端或C末端的融合物、与增加所述抗体或其抗原结合片段的血清半衰期的酶或多肽(例如像生物素)的融合物(或包含此类抗体或其抗原结合片段的融合蛋白)。

[0327] 在一些实施方案中,抗B7-H4抗体或其抗原结合片段(或包含此类抗体或其抗原结合片段的融合蛋白)包含增加所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段(或包含此类抗体或其抗原结合片段的融合蛋白)对FcRn的亲力的修饰(包括但不限于氨基酸修饰或取代)。在一些实施方案中,抗B7-H4抗体或其抗原结合片段(或包含此类抗体或其抗原结合片段的融合蛋白)包含M428L氨基酸取代(Kabat EU索引编号)。在一些实施方案中,抗B7-H4抗体或其抗原结合片段(或包含此类抗体或其抗原结合片段的融合蛋白)包含N434S氨基酸取代(Kabat EU索引编号)。在一些实施方案中,抗B7-H4抗体或其抗原结合片段(或包含此类抗体或其抗原结合片段的融合蛋白)包含M428L和N434S氨基酸取代(Kabat EU索引编号)。

[0328] 也可以例如用丝氨酸或丙氨酸来取代不参与维持与B7-H4结合的抗体或其抗原结合片段的适当构象的任何半胱氨酸残基,以改善分子的氧化稳定性并且防止异常交联。

[0329] 相反地,可以向抗B7-H4抗体或其抗原结合片段添加一个或多个半胱氨酸键以改善其稳定性(特别是在所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段是诸如Fv片段的抗体片段的情况下)。

[0330] 在一些实施方案中,本文所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段(或包含本文所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的融合蛋白)具有改变所述抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的初始糖基化模式的氨基酸改变。“改变初始糖基化模式”意指使抗体或其抗原结合片段中存在的一个或多个碳水化合物部分缺失和/或添加抗体或其抗原结合片段中不存在的一个或多个糖基化位点。抗体的糖基化典型地是N连接或O连接的。N连接是指碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链附接。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除脯氨酸外的任何氨基酸)是用于将碳水化合物部分与天冬酰胺侧链的识别序列酶促附接。因此,多肽中这些三肽序列任一的存在产生了潜在的糖基化位点。O连接的糖基化指将糖类N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附接至羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可以使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。也可以通过向初始抗体或其抗原结合片段的序列添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基或者用一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基取代来进行改变(对于O连接的糖基化位点)。

[0331] 在一些实施方案中,本文所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段(或包含本文所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的融合蛋白)可以包括修饰,包括但不限于糖基化、乙酰

化、聚乙二醇化、磷酸化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/阻断基团衍生化、蛋白水解切割、与细胞配体或其他蛋白连接等。进行化学修饰的方法是本领域中已知的并且可以包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外,分子可以含有一种或多种非典型氨基酸。

[0332] 本文公开的抗B7-H4抗体及其抗原结合片段可以包括这样的抗B7-H4抗体及其抗原结合片段,其结合特征已经通过直接突变、亲和力成熟、噬菌体展示或链改组改变。亲和力和特异性可以通过使CDR突变并且筛选具有所需特征的CDR来改变。诱变的方法是本领域技术人员已知的。

[0333] 抗体和融合蛋白结合

[0334] 本文还提供了与本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段之一结合B7-H4上相同的表位的(i)抗B7-H4抗体及其抗原结合片段以及(ii)包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的融合蛋白。

[0335] 在一些实施方案中,(i)抗B7-H4抗体及其抗原结合片段或(ii)包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的融合蛋白与B7-H4的IgV结构域结合。IgV结构域与免疫球蛋白的可变结构域相关。人和鼠B7-H4的IgC结构域指示在表23(参见SEQ ID NO:162和162)中。

[0336] 在一些实施方案中,(i)抗B7-H4抗体及其抗原结合片段或(ii)包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的融合蛋白与B7-H4的IgC结构域结合。IgC结构域与免疫球蛋白的恒定结构域相关。人和鼠B7-H4的IgC结构域指示在表23(参见SEQ ID NO:162和162)中。

[0337] 在一些实施方案中,(i)抗B7-H4抗体及其抗原结合片段或(ii)包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的融合蛋白与B7-H4的IgV结构域和IgC结构域结合。

[0338] 在一些实施方案中,(i)抗B7-H4抗体及其抗原结合片段或(ii)包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的融合蛋白与鼠B7-H4或其结构域结合。在一些实施方案中,(i)抗B7-H4抗体及其抗原结合片段或(ii)包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的融合蛋白与人B7-H4或其结构域结合。在一些实施方案中,(i)抗B7-H4抗体及其抗原结合片段或(ii)包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的融合蛋白与鼠和人B7-H4或其结构域结合。

[0339] 如本文所用,抗体或其抗原结合片段或者包含抗体或其抗原结合片段的融合蛋白与B7-H4、B7-H4上的表位或在下文所述的某些实施方案中B7-H4上的特定残基的“结合”包括所述抗体或其抗原结合片段与B7-H4的选择性相互作用。因此,结合包括例如主要相互作用和次要相互作用,包括氢键、离子相互作用、盐桥以及亲水性相互作用和疏水性相互作用。

[0340] 在某些实施方案中,本文所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段(或包含此类抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的融合蛋白)以 10^{-2} 至 10^{-13} mol/l、 10^{-3} 至 10^{-13} mol/l、 10^{-4} 至 10^{-13} mol/l、 10^{-5} 至 10^{-13} mol/l、 10^{-6} 至 10^{-13} mol/l、 10^{-7} 至 10^{-13} mol/l、 10^{-8} 至 10^{-13} mol/l、 10^{-9} 至 10^{-13} mol/l、 10^{-10} 至 10^{-13} mol/l、 10^{-12} 至 10^{-13} mol/l的解离平衡常数(K_D)与B7-H4结合。在一些实施方案中,本文所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段(或包含此类抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的融合蛋白)以 10^{-2} 至 10^{-9} mol/l、 10^{-3} 至 10^{-9} mol/l、 10^{-4} 至 10^{-9} mol/l、 10^{-5} 至 10^{-9} mol/l、 10^{-6} 至 10^{-9} mol/l、 10^{-7} 至 10^{-9} mol/l、 10^{-8} 至 10^{-9} mol/l、 10^{-10} 至 10^{-11} mol/l、 10^{-11} 至 10^{-12} mol/l、 10^{-12} 至 10^{-13} mol/l或 10^{-12} 至 10^{-14} mol/l的 K_D 与B7-H4结合。在一个实施方案中,本文所述的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段(或包含此类抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的融合蛋

白)以 10^{-9} 至 10^{-13} mol/l的 K_D 与B7-H4结合。

[0341] 如本文所用,由具有抗原结合蛋白的抗原的 K_D 表示的“亲和力”是抗原决定簇与抗原结合蛋白(如抗体或其抗体片段)上的抗原结合位点之间的结合强度的量度。 K_D 的值与抗原决定簇与抗原结合分子之间的结合强度成反比。可替代地,亲和力还可以表示为缔合常数(K_A),其是 $1/K_D$ 。亲和力可以由本领域技术人员基于感兴趣的特异性抗原以本身已知的方式测定。

[0342] 本文中的术语“特异性”是指抗体或其抗原结合片段(如抗B7-H4抗体或其抗原结合片段)识别B7-H4中的表位同时仅与B7-H4的其他部分几乎没有可检测的反应性的能力。特异性可以通过竞争测定或通过本文所述的表位鉴定/表征技术或本领域中已知的其等效技术相对地测定。

[0343] 本文中的术语“表位”是指抗体结合的特异性靶标。可以通过连续延伸的氨基酸(连续表位)以及通过氨基酸残基的三维排列(仅当靶蛋白以特定构象折叠时存在)(不连续的表位)两者形成表位。通常,表位包含至少3个氨基酸、至少4个、至少5个或约7-10个氨基酸。

[0344] 本文公开了与抗B7-H4抗体38B2特异性结合相同表位的抗B7-H4抗体及其抗原结合片段以及包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的融合蛋白。本文还公开了与抗B7-H4抗体31B1结合相同表位的抗B7-H4抗体及其抗原结合片段以及包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的融合蛋白。

[0345] 如本文所用,“阻断”抗体或抗体“拮抗剂”是抑制或降低其结合抗原的生物活性的抗体。例如,在一些实施方案中,抗B7-H4拮抗剂抗体或其抗原结合片段结合B7-H4并且抑制B7-H4的活性和/或B7-H4与其一种或多种结合配偶体的结合。活性的抑制和结合的抑制包括部分抑制。鉴定阻断B7-H4相互作用的B7-H4抗体的方法描述于本文中并且是本领域技术人员已知的。例如,可以使用本领域中已知的任何合适的方法鉴定竞争、交叉阻断和交叉阻断的抗体,包括竞争ELISA或BIAcore®测定,其中竞争或交叉阻断抗体与人B7-H4的结合阻止了本文公开的抗体的结合,或者反之亦然。

[0346] 在某些实施方案中,不是所有的CDR直接参与与抗原的结合。在一个实施方案中,抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的六个CDR中的四个与抗原接触。在一个实施方案中,抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的六个CDR中的五个与抗原接触。在一个实施方案中,抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的六个CDR中的六个与抗原接触。

[0347] 本文中的术语“选择性的”和“选择性”是指与一种或多种其他生物分子(包括其他B7-H4家族成员)相比,抗体或其抗原结合片段(即B7-H4抗体或其抗原结合片段)与特定区、靶标或肽(典型地B7-H4中的区或表位)的优先结合。

[0348] 在一方面,提供了这样的抗B7-H4抗体及其抗原结合片段,其与B7-H4上的至少部分结合位点特异性结合,从而阻断B7-H4与一个或多个B7-H4配体的相互作用。

[0349] 在某些实施方案中,根据本公开文本的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段包含由第一和第二亚基构成的Fc结构域。抗体的Fc结构域由一对多肽链组成,所述多肽链包含免疫球蛋白分子的重链结构域。Fc结构域的两个亚基形成稳定的缔合。在实施方案中,Fc结构域的两个亚基是相同的。在可替代的实施方案中,Fc结构域的两个亚基是不同的。在实施方案中,Fc结构域的一个亚基可以与免疫缀合分子融合。在实施方案中,抗体的Fc结构域可以是

IgG Fc结构域、IgG₁ Fc结构域、IgG₂ Fc结构域、IgG₃ Fc结构域、IgG₄ Fc结构域。在进一步特定的实施方案中,Fc结构域是人Fc结构域。

[0350] 促进异二聚化的Fc结构域修饰

[0351] 进一步考虑了所公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的Fc结构域中促进二聚化的修饰。修饰可以是氨基酸取代、插入、缺失或任何其他化学或物理修饰。在实施方案中,抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的Fc结构域包含促进Fc结构域的第一和第二亚基的缔合的修饰。在一个实施方案中,所述修饰是在Fc结构域的CH3结构域中。在特定的实施方案中,促进Fc结构域的第一和第二亚基的缔合的所述修饰被称为“杵臼结构”修饰,其包含在Fc结构域的两个亚基中的一个中的“杵”修饰和在Fc结构域的两个亚基中的另一个中的“臼”修饰。

[0352] 杵臼结构修饰是“突起进入空腔”策略,所述“突起进入空腔”策略用于使第一和第二多肽之间的界面工程化,以促进异寡聚化。“突起”(即杵)是通过用较大侧链替代第一多肽的界面中的小氨基酸侧链来构建。任选地通过用较小侧链替代大氨基酸侧链在第二多肽的界面上产生与突起大小相同或类似的补偿“空腔”(即臼)。在特定的实施方案中,将第一Fc亚基的CH3结构域中的氨基酸残基用具有较大侧链体积的氨基酸残基替代,从而产生可定位于第二Fc亚基的CH3结构域中呈现的臼中的第一Fc亚基的CH3结构域中的杵,所述臼通过用第二Fc亚基的CH3结构域中的具有较小侧链体积的氨基酸残基替代一个氨基酸残基来产生。优选地所述具有较大侧链体积的氨基酸残基选自半胱氨酸(C)、缬氨酸(V)、丙氨酸(A)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、亮氨酸(L)、赖氨酸(K)、脯氨酸(P)、谷氨酸(E)和色氨酸(W)。优选地具有较小侧链体积的所述氨基酸残基选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、精氨酸(R)、色氨酸(W)、半胱氨酸(C)、赖氨酸(L)、谷氨酸(E)、天冬氨酸(D)和缬氨酸(V)。

[0353] 可以通过改变编码多肽的核酸,例如通过位点特异性诱变或通过肽合成进行对应于杵和臼的突变。

[0354] 在其中只有一个重链与IL-15/IL-15R α sushi连接的融合蛋白实施方案中,抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的Fc结构域可以包含促进异二聚体形成的一个或多个氨基酸取代(即重链融合物与缺乏融合物的重链的缔合)。在实施方案中,一条重链的CH3结构域(CH3-1)中的氨基酸残基包含用具有较大侧链体积的氨基酸残基替代氨基酸的氨基酸取代,从而产生可定位于另一条重链的CH3结构域(CH3-2)中呈现的“臼”中的CH3结构域中的“杵”,所述臼通过用具有较小侧链体积的氨基酸残基替代氨基酸残基产生。

[0355] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段(或包含此类抗体或其抗原结合片段的融合蛋白),其中:

(a) 其中所述第一重链恒定区包含选自S354C、T366W、Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代并且其中所述第二重链恒定区包含选自S354C、T366W、Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代;

(b) 所述第一重链恒定区包含选自S354C和T366W(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代并且所述第二重链恒定区包含选自Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代;

(c) 所述第二重链恒定区包含选自S354C和T366W(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代并且所述第一重链恒定区包含选自Y349C、T366S、L368A和Y407V(Kabat EU索引编号)的一个或多个氨基酸取代;

(d) 所述第一重链恒定区包含氨基酸取代S354C和T366W (Kabat EU索引编号), 并且所述第二重链恒定区包含氨基酸取代Y349C、T366S、L368A和Y407V (Kabat EU索引编号); 或

(e) 所述第二重链恒定区包含氨基酸取代S354C和T366W (Kabat EU索引编号), 并且所述第一重链恒定区包含氨基酸取代Y349C、T366S、L368A和Y407V (Kabat EU索引编号)。

[0100] 本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段(或包含此类抗体或其抗原结合片段的融合蛋白), 其中所述抗体或其抗原结合片段包含含有选自SEQ ID NOS:147-160的序列的重链和/或包含选自SEQ ID NOS:147-160的序列的部分。

[0356] 接头

[0357] 在实施方案中, 本文提供的融合蛋白可以包含连接本文公开的融合蛋白的组分的一个或多个接头。接头可以位于 (i) IL-15多肽与包含sushi结构域的IL15 α 多肽之间; (ii) 抗B7-H4抗体或其抗原结合片段与IL-15多肽或包含sushi结构域的IL15 α 多肽之间; 或 (iii) 两者。在本公开文本的实施方案中, IL-15多肽与包含sushi结构域的IL15 α 多肽通过第一接头氨基酸序列连接(joined)或连接(linked)。在实施方案中, IL15 α 多肽通过第二接头氨基酸序列与本文所述的抗体或其抗原结合片段连接。第一和第二接头可以具有相同或不同的氨基酸序列。

[0358] 本文所述的接头氨基酸序列可以具有足以确保融合蛋白形成合适的二级和三级结构的长度。接头氨基酸的长度可以在5个至40个氨基酸之间, 优选10个至40个氨基酸、更优选15个至40个氨基酸、仍更优选20个至40个氨基酸、最优选25个至35个氨基酸。

[0359] 优选地, 接头序列包含选自Gly(G)、Asn(N)、Ser(S)、Thr(T)、Ala(A)、Leu(L)和Gln(Q)的近中性氨基酸, 最优选地选自Gly(G)、Asn(N)和Ser(S)的氨基酸。优选地, 接头序列是富含甘氨酸和丝氨酸的, 并且在一些实施方案中, 接头仅含有丝氨酸和甘氨酸残基。

[0360] 在一些实施方案中, 接头包含IL15 α 多肽的sushi结构域外部的部分, 包括但不限于SEQ ID NO:171的序列(IRDPALVHQRAPP)。在一些实施方案中, 接头包含SEQ ID NO:168(SGGSGGGSGGGSGGGSLQ)。在一些实施方案中, 接头包含SEQ ID NO:171和SEQ ID NO:168。在一些实施方案中, 接头包含SEQ ID NO:170。

[0361] 在实施方案中, 可以使用允许VR和VL结构域缔合以形成抗原结合位点的第三接头, 将本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的重链和轻链与单一多肽链(“单链Fv”或“scFv”)连接。接头的氨基酸序列可以相同或不同。

[0362] 在一个实施方案中, IL-15多肽或IL-15衍生物通过接头与IL-15 α sushi多肽或IL-15 α sushi衍生物共价连接。

[0363] 在一些实施方案中, IL-15多肽或IL-15衍生物通过第一接头与IL-15 α sushi多肽或IL-15 α sushi衍生物共价连接, 并且IL-15多肽或IL-15衍生物或者IL-15 α sushi多肽或IL-15 α sushi衍生物通过第二接头与抗B7-H4抗体或其抗原结合片段共价连接。在一些实施方案中, 第一接头和第二接头的氨基酸序列是相同的。在其他实施方案中, 第一接头和第二接头的氨基酸序列是不同的。

[0364] 缀合物

[0365] 本文公开的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段和融合蛋白可以进一步包含一个或多个功能部分。有用的功能部分的例子包括但不限于阻断部分、可检测部分、诊断部分、靶标

和治疗部分。

[0366] 阻断部分可以包括具有足够的空间体积和/或电荷的部分,使得例如通过阻断糖苷酶糖基化抗体或其抗原结合片段的能力产生降低的糖基化。优选的阻断部分包括半胱氨酸加合物如半胱氨酸、混合的二硫化物加合物、或二硫化物连接,和PEG部分(如聚乙二醇(“PEG”))、聚丙二醇(“PPG”)、聚氧乙烯丙三醇(“POG”)和其他聚氧乙烯多元醇、聚乙烯醇(“PVA”)以及其他聚环氧烷、聚氧乙烯山梨糖醇或聚氧乙烯葡萄糖。出于一些原因,PEG是生物应用中优选的部分。PEG化可以通过增加分子的表现分子量来改善分子的药代动力学表现。增加的表现分子量降低了皮下或全身施用后从机体清除的速率。在许多情况下,聚乙二醇化可以降低抗原性和免疫原性。PEG化还可以增加生物活性分子的溶解度。此外,PEG典型地是清澈的、无色、无味、可溶于水、对热稳定、对许多化学剂呈惰性、不水解且无毒的,使其是生物应用的优先选择。

[0367] 可以与本文公开的抗B7-H4抗体或抗原结合片段或者融合物缀合的可检测部分的例子可以包括荧光部分或标签、显像剂、放射性同位素部分、不透射线部分等,例如可检测标签,如生物素、荧光团、生色团、自旋共振探针或放射性标记。荧光团的例子包括荧光染料(例如荧光素、罗丹明等)和其他发光分子(例如鲁米那)。荧光团可以是环境敏感的,使得如果它位于经修饰的蛋白中的一个或多个残基附近,则其荧光会发生变化,所述经修饰的蛋白在结合底物(例如丹磺酰探针)时经历结构变化。示例性放射性标记包括含有具有一个或多个低敏感性核的原子的的小分子(^{13}C 、 ^{15}N 、 ^2H 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{99}Tc 、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{111}In 等)。

[0368] 诊断部分包括适合显示疾病或障碍的存在的可检测部分。典型地,诊断部分允许测定与疾病或障碍相关的分子(例如靶肽、一种或多种蛋白质)的存在、不存在或水平。此类诊断还适合预后和/或诊断疾病或障碍及其进展。

[0369] 治疗部分的例子包括抗炎剂、抗癌剂、抗神经变性剂、抗感染剂或通常地治疗剂。功能部分还可以具有一个或多个上述功能。示例性治疗部分可以包括抗生素、第二抗B7-H4抗体或针对另一个抗原(如肿瘤特异性抗原、自身免疫性组织抗原、病毒感染细胞抗原)的抗体、Fc受体、T细胞受体或T细胞共抑制剂或免疫毒素或可用于治疗包括癌症、自身免疫性疾病或慢性病毒感染在内的疾病或病症的任何其他治疗部分。示例性治疗部分还可以是沿分子的任何位置处的细胞毒素、放射活性剂、细胞因子、干扰素、靶标或报告部分、酶、毒素、肽或治疗剂,只要它能够结合其靶标即可。免疫缀合物的例子包括抗体药物缀合物和抗体-毒素融合蛋白。在某些实施方案中,抗体可以缀合至对肿瘤细胞或病毒感染的细胞具有特异性的药剂。

[0370] 如例如美国专利号5,739,277所述的补救受体结合表位也可以与抗体或其抗原结合片段(尤其是抗体片段)衔接,以增加本文所述的抗体或抗原结合片段的半衰期。术语“补救受体结合表位”可以是指IgG分子(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的Fc区中负责增加IgG分子的体内血清半衰期的表位(例如Ghetie等人,18Ann.Rev.Immunol.739(2000))。

[0371] 核酸

[0372] 本文还提供了编码本文公开的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段和融合蛋白的核酸以及载体、宿主细胞和表达系统。如本文所用的术语“核酸”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的聚合物形式,并且包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA;基因组DNA;cDNA;DNA-RNA杂合体;或者包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然的、化学修饰的或生

化修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基的聚合物。编码本文公开的抗B7-H4抗体及其抗原结合片段以及融合蛋白的核酸可以是例如DNA、cDNA、RNA、合成产生的DNA或RNA、或者单独或组合地包含任何那些多核苷酸的重组产生的嵌合核酸分子。

[0373] 术语“载体”是指能够将核酸分子转运至细胞的包含核酸分子的媒介物。“载体”包括但不限于病毒载体、质粒、RNA载体、或者可以由染色体的、非染色体的、半合成的或合成的核酸组成的线性或环状DNA或RNA分子。在一些实施方案中，采用的载体是能够自主复制的载体(附加型载体)和/或表达其连接的核酸的载体(表达载体)。大量合适的载体是本领域技术人员已知的并且是可商购获得的。

[0374] 本文提供了编码表1、表5、表7、表9、表16-表20或表24中公开的抗体或其抗原结合片段的一种核酸或一组核酸。本文提供了编码表13、表21或表22中公开的融合蛋白的一种核酸或一组核酸。

[0375] 本文提供了编码表16-表21中公开的VH序列的核酸。本文提供了编码表16-表21中公开的VL序列的核酸。本文提供了编码表21-表22中公开的HC序列的核酸。本文提供了编码表21-表22中公开的LC序列的核酸。

[0376] 本文提供了包含本文公开的一种或多种核酸序列的一种载体或一组载体。

[0377] 本文提供了包含本文公开的一种载体或一组载体的细胞。在一些实施方案中，所述细胞是免疫细胞。在一些实施方案中，所述细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中，所述细胞是人细胞。在一些实施方案中，所述细胞是分离的细胞。

[0378] 抗体和融合蛋白制备和表达系统

[0379] 本文公开的抗B7-H4抗体、抗原结合片段或融合蛋白典型地通过重组表达产生。可以将编码轻链可变区和重链可变区(任选地与恒定区连接)的核酸插入相同的表达载体中。可替代地，将编码轻链可变区和重链可变区(任选地与恒定区连接)的核酸插入不同的表达载体中。表达载体可以进一步包含一个或多个表达控制序列，所述表达控制序列包括但不限于启动子(例如，同源启动子或异源启动子)、信号序列、增强子元件和转录终止序列。优选地，所述表达控制序列是能够转化或转染真核宿主细胞的载体中的真核启动子系统。典型地，在载体并入合适的宿主后，将宿主在适合核苷酸序列的高水平表达的条件下维持，并且进行交叉反应抗体的收集和纯化。

[0380] 一般来说，表达载体含有选择标记物(例如，氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性 or 新霉素抗性)以允许检测用所需DNA序列转化的那些细胞。

[0381] 用于表达本文公开的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白的宿主可以是原核宿主或真核宿主。合适的宿主的例子包括细菌宿主或真核宿主，包括酵母、昆虫、真菌、鸟和哺乳动物在体内或原位的细胞；或者哺乳动物、昆虫、鸟或酵母来源的宿主细胞。哺乳动物细胞或组织可以是人、灵长类动物、仓鼠、兔、啮齿动物、牛、猪、绵羊、马、山羊、狗或猫来源的，但是可以使用任何其他哺乳动物细胞。

[0382] 可以用于表达本文公开的抗体、抗原结合片段或融合蛋白的细菌宿主的例子可以是大肠杆菌，杆菌如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和其他肠杆菌科(如沙门氏菌属(*Salmonella*)、沙雷氏菌属(*Serratia*))，和各种假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种。

[0383] 酵母还可以用作用于表达本文公开的抗体、抗原结合片段或融合蛋白的宿主。酵母属(*Saccharomyces*)和毕赤酵母属(*Pichia*)是示例性的酵母宿主，其中合适的载体根据

需要具有表达控制序列(例如,启动子)、复制起点、终止序列等。典型的启动子包括3-磷酸甘油酸激酶和其他糖酵解酶。诱导型酵母启动子尤其包括来自醇脱氢酶、异细胞色素C以及负责甲醇、麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

[0384] 培养物中的哺乳动物细胞还可以用作用于表达本文公开的抗体、抗原结合片段或融合蛋白的宿主细胞。本领域中熟知的能够分泌异源蛋白(例如完整免疫球蛋白)的合适的宿主细胞系的例子包括CHO细胞系、各种COS细胞系、HeLa细胞、293细胞、骨髓瘤细胞系、转化的B细胞和杂交瘤。这些细胞的表达载体可以包括表达控制序列,如复制起点、启动子、增强子,以及必要的处理信息位点,如核糖体结合位点、RNA剪接位点和/或转录终止子序列。表达控制序列的例子包括SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒、巨细胞病毒等。

[0385] 可以使用单个表达构建体或载体或者多个表达构建体或载体(例如两个或三个表达构建体)表达本文公开的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段和融合蛋白。当在分开的表达载体上克隆抗体重链和轻链时,将所述载体共转染,以获得完整免疫球蛋白的表达和组装。一旦表达,本文公开的整个抗体、其二聚体、单条轻链和重链或其他免疫球蛋白形式就可以根据本领域的标准程序进行纯化,所述标准程序包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱色谱、HPLC纯化、凝胶电泳等(一般参见Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)))。对于药物用途,优选至少约90%至95%同质性(最优选98%至99%或更高的同质性)的基本上纯的免疫球蛋白。

[0386] 可以通过本领域中已知的任何方法制造公开的抗B7-H4抗体、抗原结合片段和融合蛋白。产生人或小鼠抗体或融合分子的一般技术是本领域中已知的。

[0387] 调节B7-H4活性的方法

[0388] 在一方面,提供了将本文所述的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段和融合蛋白用于减少B7-H4与其同源配体之间的相互作用的方法。此减少可以包括在抗体的结合后受体的内化或者受体在靶细胞上的表达的减少。

[0389] 在一方面,提供了将本文所述的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段和融合蛋白用于减少由于B7-H4与同源受体结合产生的信号转导的方法。此减少可以是部分的(即减弱但不消除B7-H4的活性)或者可以完全消除此活性(例如中和B7-H4介导信号转导的能力)。此减少可以包括在抗体的结合后受体的内化或者受体在靶细胞上的表达的减少。

[0390] 在一方面,提供了将本文所述的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段和融合蛋白用于降低免疫抑制(例如T细胞耐受性)的方法。免疫抑制可以由免疫细胞表面上表达的免疫抑制受体和它们与它们的配体的相互作用介导。测量T细胞活性的方法是本领域已知的。通过非限制性例子,可以通过使T细胞与回忆抗原、抗CD3(在不存在共刺激的情况下)和/或离子霉素接触诱导T细胞耐受性。可以监测例如IL-27、LDH-A、RAB10和/或ZAP70(细胞内或分泌的)的水平,例如以测定T细胞致耐受性的程度(其中IL-2、干扰素 γ 和TNF的水平与增加的T细胞耐受性相关)。

[0391] 在一方面,提供了将本文所述的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段和融合蛋白用于增加T细胞扩展、激活和/或增殖的方法。提供了将本文所述的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段和融合蛋白用于增加CD8⁺T细胞增殖的方法。提供了将本文所述的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段和融合蛋白用于增加CD4⁺T细胞增殖的方法。

[0392] 在一方面,提供了将本文所述的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段和融合蛋白用于耗

竭受体人或人组织(原位或离体)中的B7-H4表达肿瘤细胞或肿瘤相关巨噬细胞(TAM)的方法。可以使用所公开的抗B7-H4抗体(或另一肿瘤特异性或TAM特异性标记物)通过肿瘤组织的免疫组织化学(IHC)监测B7-H4阳性肿瘤细胞或TAM的耗竭,或者通过PCR、原位杂交或本领域技术人员已知的另一种其他方法监测B7-H4 mRNA水平的降低。

[0393] 在一方面,提供了将本文所述的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段和融合蛋白用于诱导有需要的受试者中的B7-H4表达细胞中的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的方法。

[0394] “降低”(或“减少”)意指与未经治疗的对照相比,引起约20%或更高、30%或更高、40%或更高、45%或更高、50%或更高、55%或更高、60%或更高、65%或更高、70%或更高、75%或更高、80%或更高、85%或更高、90%或更高或95%或更高的总体减少的能力。

[0395] 本文所述的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段和融合蛋白靶向的细胞包括但不限于表达B7-H4的细胞(例如典型地当B7-H4未转化时不表达B7-H4的转化的细胞)或特征在于与对照细胞相比增加的表达的细胞。优选的靶细胞包括癌细胞和肿瘤相关巨噬细胞。

[0396] 治疗方法

[0397] 在一方面,本公开文本提供了可用于治疗有需要的受试者的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段和融合蛋白。

[0398] 在本文所述的方法中,将治疗有效量的本文公开的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白施用于有需要的哺乳动物。如本文所用的术语“哺乳动物”包括但不限于人、实验动物、家养宠物和家畜。优选地,哺乳动物是人。如本文所述的“治疗有效量”是指当施用于哺乳动物时有效产生所需治疗效果的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白的量。

[0399] 在实施方案中,“受试者”是哺乳动物。在实施方案中,受试者是非灵长类动物(例如,牛、猪、马、猫、狗、大鼠、小鼠等)或灵长类动物(例如,猴和人)。本文中的个体和患者也是受试者。

[0400] 如本文所用的术语“治疗(treat、treated、treating或treatment)”是指治疗性治疗,其中目的是减缓(减轻)不希望的生理病症、障碍或疾病,或获得有益或期望的临床结果。出于本公开文本的目的,有益或期望的临床结果包括但不限于症状的减轻;病症、障碍或疾病程度的降低;病症、障碍或疾病状态的稳定(即不恶化);病症、障碍或疾病发作的延迟或病症、障碍或疾病进展的减缓;病症、障碍或疾病状态的一种或多种症状的改善;以及缓解(部分或全部)。治疗包括引起临床上显著的反应而没有过量水平的副作用。治疗也包括与如果不接受治疗的预期存活时间相比延长存活时间。

[0401] 术语“预防(prevent、prevention)”等是指在出现明显的疾病或障碍发作之前起作用,以防止疾病或障碍发展或者以最小化疾病或障碍的程度或者减缓其发展进程。

[0402] 可能受益于用抗B7-H4抗体治疗的受试者将在肿瘤或TAM上表达靶B7-H4蛋白,并且可通过肿瘤样品的IHC、FAC、原位杂交或本领域技术人员已知的另一种其他方法对此评估。在实施方案中,受试者具有上调的B7-H4表达。

[0403] 本文提供了治疗有需要的受试者中的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白。本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白,用于治疗有需要的受试者中癌症。本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白用于治疗有需要的受试者中的癌症的用途。本文提

供了在制造用于治疗有需要的受试者中的癌症的药剂中的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白。

[0404] 本文提供了减少有需要的受试者中的肿瘤生长的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白。本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白用于减少有需要的受试者中的肿瘤生长。本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白用于减少有需要的受试者中的肿瘤生长的用途。本文提供了在制造用于减少有需要的受试者中的肿瘤生长的药剂中的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白。

[0405] 本文提供了减少有需要的受试者中的肿瘤转移的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白。本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白,用于减少有需要的受试者中的肿瘤转移。本文提供了抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白用于减少有需要的受试者中的肿瘤转移的用途。本文提供了在制造用于减少有需要的受试者中的肿瘤转移的药剂中的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白。

[0406] 可以用本文公开的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段和融合蛋白治疗或预防的癌症和相关障碍包括但不限于以下:白血病,包括但不限于急性白血病(急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病如成髓细胞白血病、早幼粒细胞白血病、髓单核细胞白血病、单核细胞白血病、红白血病和骨髓增生异常综合征)、慢性白血病(诸如但不限于慢性髓细胞(粒细胞)白血病、慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病);真性红细胞增多症;淋巴瘤,诸如但不限于霍奇金病、非霍奇金病;多发性骨髓瘤,诸如但不限于冒烟型多发性骨髓瘤、非分泌型骨髓瘤、骨硬化性骨髓瘤、浆细胞白血病、孤立性浆细胞瘤和髓外浆细胞瘤;瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症;意义未明的单克隆丙种球蛋白病;良性单克隆丙种球蛋白病;重链病;骨与结缔组织肉瘤,诸如但不限于骨肉瘤(bone sarcoma)、骨肉瘤(osteosarcoma)、软骨肉瘤、尤因肉瘤、恶性巨细胞瘤、骨纤维肉瘤、脊索瘤、骨膜肉瘤、软组织肉瘤、血管肉瘤(血管内皮瘤)、纤维肉瘤、卡波西肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、神经鞘瘤、横纹肌肉瘤、滑膜肉瘤;脑肿瘤,包括但不限于胶质瘤、星形细胞瘤、脑干胶质瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤、非神经胶质瘤、听神经瘤、颅咽管瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、松果体细胞瘤、松果体母细胞瘤、原发性脑淋巴瘤;乳腺癌,包括但不限于腺癌、小叶(小细胞)癌、导管内癌、髓样乳腺癌、粘液乳腺癌、管状乳腺癌、乳头状乳腺癌、佩吉特病和炎性乳腺癌;肾上腺癌,包括但不限于嗜铬细胞瘤和肾上腺皮质癌;甲状腺癌,诸如但不限于乳头状甲状腺癌或滤泡性甲状腺癌、髓样甲状腺癌和间变性甲状腺癌;胰腺癌,包括但不限于胰岛素瘤、胃泌素瘤、胰高血糖素瘤、舒血管肠肽瘤、分泌生长抑素的肿瘤以及类癌或胰岛细胞瘤;垂体癌,包括但不限于库欣病、分泌催乳素的肿瘤、肢端肥大症和尿崩症;眼癌,包括但不限于眼黑色素瘤(如虹膜黑色素瘤、脉络膜黑色素瘤和睫状体黑色素瘤)以及视网膜母细胞瘤;阴道癌,包括但不限于鳞状细胞癌、腺癌和黑色素瘤;外阴癌,包括但不限于鳞状细胞癌、黑色素瘤、腺癌、基底细胞癌、肉瘤和佩吉特病;子宫颈癌,包括但不限于鳞状细胞癌和腺癌;子宫癌,包括但不限于子宫内膜癌和子宫肉瘤;卵巢癌,包括但不限于卵巢上皮性癌、交界性肿瘤、生殖细胞肿瘤和间质肿瘤;食管癌,包括但不限于鳞状癌、腺癌、腺样囊性癌、粘液表皮样癌、腺鳞癌、肉瘤、黑色素瘤、浆细胞瘤、疣状癌和燕麦细胞(小细胞)癌;胃癌,包括但不限于腺癌、蕈伞型(息

肉样)、溃疡、表面扩散、弥漫性扩散、恶性淋巴瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和癌肉瘤;结肠癌;直肠癌;肝癌,包括但不限于肝细胞癌和肝母细胞瘤;胆囊癌,包括但不限于腺癌;胆管癌,包括但不限于乳头状、结节性和弥漫性;肺癌,包括但不限于非小细胞肺癌、鳞状细胞癌(表皮样癌)、腺癌、大细胞癌和小细胞肺癌;睾丸癌,包括但不限于生殖肿瘤、精原细胞瘤(间变性、经典(典型)、精母细胞性)、非精原细胞瘤、胚胎性癌、畸胎瘤、绒毛膜癌(卵黄囊瘤);前列腺癌,包括但不限于腺癌、平滑肌肉瘤和横纹肌肉瘤;阴茎癌(penal cancers);口腔癌,包括但不限于鳞状细胞癌;基底癌;唾液腺癌,包括但不限于腺癌、粘液表皮样癌和腺样囊性癌;咽癌,包括但不限于鳞状细胞癌和疣状癌;皮肤癌,包括但不限于基底细胞癌、鳞状细胞癌和黑色素瘤、表面扩散性黑色素瘤、结节性黑色素瘤、雀斑样痣恶性黑色素瘤、肢端雀斑样痣黑色素瘤;肾癌,包括但不限于肾细胞癌、腺癌、肾上腺样瘤、纤维肉瘤、移行细胞癌(肾盂和/或输尿管);维尔姆斯瘤;膀胱癌,包括但不限于移行细胞癌、鳞状细胞癌、腺癌、癌肉瘤。此外,癌症包括粘液肉瘤、成骨性肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、间皮瘤、滑膜瘤、血管母细胞瘤、上皮癌、囊腺癌、支气管癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌和乳头状腺癌。

[0407] 因此,本文公开的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段和融合蛋白还可用于治疗或预防各种癌症(特别地,卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、胃癌、肾癌、甲状腺癌和子宫癌)或其他异常增殖性疾病,包括(但不限于)以下:癌,包括膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、肾癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、胰癌、胃癌、宫颈癌、甲状腺癌和皮肤癌;包括鳞状细胞癌;淋系的造血系统肿瘤,包括白血病、急性淋巴细胞白血病、急性成淋巴细胞性白血病、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤;髓系的造血系统肿瘤,包括急性和慢性髓细胞性白血病和前髓细胞性白血病;间叶性来源的肿瘤,包括纤维肉瘤和横纹肌肉瘤;其他肿瘤,包括黑色素瘤、精原细胞瘤、畸胎瘤、神经母细胞瘤和神经胶质瘤;中央和外周神经系统的肿瘤,包括星形细胞瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤和许旺氏细胞瘤;间叶性来源的肿瘤,包括纤维肉瘤、横纹肌肉瘤和骨肉瘤;以及其他肿瘤,包括黑色素瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、精原细胞瘤、甲状腺滤泡性癌和畸胎瘤。还考虑了,细胞凋亡异常引起的癌症也可以通过本文公开的方法和组合物治疗。此类癌症可以包括但不限于滤泡性淋巴瘤、具有p53突变的癌、乳腺激素依赖性肿瘤、前列腺癌和卵巢癌、以及癌前病变如家族性腺瘤性息肉病和骨髓增生异常综合征。在特定的实施方案中,通过所公开的方法和组合物治疗或预防卵巢、膀胱、乳腺、结肠、肺、皮肤、胰腺或子宫中的恶性或增殖异常变化(如骨髓化生和发育异常)或过度增殖性障碍。在其他特定的实施方案中,通过所提供的方法和组合物治疗或预防肉瘤、黑色素瘤或白血病。

[0408] 尽管通过各种机制,癌细胞在其发展过程中获得了功能性能力的一组特征。此类能力包括逃避细胞凋亡、在生长信号方面的自足、对抗生长信号不敏感、组织入侵/转移、无限复制潜力以及持续的血管生成。术语“癌细胞”意在涵盖恶化前癌细胞和恶性癌细胞。在一些实施方案中,癌症是指保持在局部的良性肿瘤。在其他实施方案中,癌症是指已经入侵并且破坏相邻机体结构并且扩散至远处位点的恶性肿瘤。在又其他的实施方案中,癌症与特异性癌症抗原相关(例如泛癌抗原(KS1/4)、卵巢癌抗原(CA125)、前列腺特异性抗原(PSA)、癌胚抗原(CEA)、CD19、CD20、HER2/neu等)。

[0409] 组合疗法

[0410] 本文公开的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段和融合蛋白可以与另外的治疗剂有利地组合。此类另外的药剂包括但不限于细胞毒性剂、化学治疗剂、生长抑制剂、抗炎剂、抗癌

剂、抗神经变性剂、免疫抑制剂和抗感染剂。抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白以及另外的治疗剂(或另外的疗法)的施用可以是并行的、连续的或间歇性的。抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白以及另外的治疗剂(或另外的疗法)的施用可以是分开地或作为混合物。此外,本文提供的治疗方法可以涉及治疗与一种或多种疗法组合治疗,所述一种或多种疗法包括但不限于抗体疗法、化学疗法、细胞因子疗法、树突细胞疗法、基因疗法、激素疗法、激光疗法和放射疗法。

[0411] 本公开文本的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段和融合蛋白可以与一种或多种用于治疗癌症的抗癌药物或疗法协同组合,所述癌症包括但不限于肾细胞癌、结直肠癌、多形性胶质母细胞瘤、头颈鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、结肠癌、卵巢癌、腺癌、前列腺癌、神经胶质瘤和黑色素瘤。此类药剂的例子包括但不限于针对PD-L1的抗体(例如,纳武单抗)、LAG-3抑制剂、CTLA-4抑制剂(例如,伊匹单抗)、TIM3抑制剂、BTLA抑制剂、TIGIT抑制剂、CD47抑制剂、另一种T细胞共抑制剂或配体的拮抗剂(例如,针对CD-28、2B4、LY108、LAI R 1、ICOS、CD160或VISTA的抗体)、吡啶胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂、血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂(例如,“VEGF-Trap”,诸如如在US 7,087,411中列出的阿柏西普或其他抑制VEGF的融合蛋白,或抗VEGF抗体或其抗原结合片段(例如,贝伐单抗或雷珠单抗)或VEGF受体的小分子激酶抑制剂(例如,舒尼替尼、索拉非尼或帕唑帕尼))、Ang2抑制剂(例如,奈伐苏单抗(nesvacumab))、转化生长因子 β (TGF3)抑制剂、表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂(例如,厄洛替尼、西妥昔单抗)、共刺激受体的激动剂(例如,糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白的激动剂)、肿瘤特异性抗原(例如,CA9、CA125、黑色素瘤相关抗原3(MAGE3)、癌胚抗原(CEA)、抗病毒药物(例如齐多夫定、拉米夫定、阿巴卡韦、利巴韦林、洛匹那韦、依法韦仑、考西司他、替诺福韦、利匹韦林和皮质类固醇)、波形蛋白、肿瘤M2-PK、前列腺特异性抗原(PSA)、粘蛋白-1、MART-1和CA19-9)的抗体、疫苗(例如,卡介苗(一种癌症疫苗))、增加抗原呈递的佐剂(例如,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)、双特异性抗体(例如,CD3xCD20双特异性抗体、PSMAxCD3双特异性抗体)、癌症疫苗(例如MAGE3、MUC1、EGFRv3、ALVAC-CEA)、细胞毒素、化学治疗剂(例如,达卡巴嗪、替莫唑胺、环磷酰胺、多西他赛、阿霉素、柔红霉素、顺铂、卡铂、吉西他滨、氨甲蝶呤、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇和长春新碱)、环磷酰胺、放射疗法、IL-6R抑制剂(例如,萨瑞鲁单抗)、IL-4R抑制剂(例如,度匹鲁单抗)、IL-10抑制剂、细胞因子(如IL-2、IL-7、IL-21和IL-15)、抗体-药物缀合物(ADC)(例如,抗CD19-DM4 ADC和抗DS6-DM4ADC)、抗炎药(例如,皮质类固醇和非甾体类抗炎药)、膳食补充剂(如抗氧化剂)或任何治疗癌症的姑息疗护、放射疗法和/或用于治疗自身免疫性疾病的针对免疫细胞上的Fc受体的抗体。

[0412] 施用方法

[0413] 将包含本文所述的任何抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白的治疗组合物可以以任何便利的方式(包括但不限于通过注射、输注、植入或移植)施用于有需要的受试者。可以将本文所述组合物皮下、皮内、瘤内、结内、髓内、肌内、颅内、通过静脉内或淋巴管内注射或腹膜内施用于有需要的受试者。在一个实施方案中,本公开文本的细胞组合物优选地通过静脉内注射来施用。

[0414] 在某些实施方案中,将抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白通过静脉内输注施用于哺乳动物,即将抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白经特定时间段导入哺乳动

物的血管中。在某些实施方案中,时间段是约5min、约10min、约30min、约1h、约2h、约4h或约8h。

[0415] 在一些实施方案中,将组合物直接施用至肿瘤或肿瘤微环境,以增强组合物定位至肿瘤位点并且降低对表达B7-H4的非靶细胞的毒性。

[0416] 施用方案

[0417] 根据本公开文本的此方面的方法包括向受试者依序施用多个剂量的本公开文本的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白。如本文所用,“依序施用”意指将每个剂量的本公开文本的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白在不同时间点施用于受试者,例如,以预定间隔(例如,数小时、数天、数周或数月)隔开的不同日期。本公开文本包括这样的方法,所述方法包括向患者依序施用单个初始剂量的本公开文本的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白,随后施用一个或多个第二剂量的本公开文本的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白,并且任选地随后施用一个或多个第三剂量的本公开文本的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白。本公开文本的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白可以以0.01mg/kg至100mg/kg之间的剂量施用。

[0418] 在某些实施方案中,将一定剂量的化合物或组合物每天、每隔一天、每隔几天、每三天、一周一次、一周两次、一周三次、每两周一次或每月一次施用于受试者。在其他实施方案中,将两个、三个或四个剂量的化合物或组合物每天、每隔几天、每三天、一周一次、每两周一次或每月一次施用于受试者。在一些实施方案中,将一个或多个剂量的化合物或组合物施用2天、3天、5天、7天、14天、21天或28天。在某些实施方案中,将一定剂量的化合物或组合物施用1个月、1.5个月、2个月、2.5个月、3个月、4个月、5个月、6个月或更长时间。

[0419] 药物组合物

[0420] 在另一方面,提供了药学上可接受的组合物,所述药学上可接受的组合物包含连同一种或多种药学上可接受的赋形剂一起配制的治疗有效量的本公开文本的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白。

[0421] 一种或多种活性剂的剂量可以根据使用原因、单个受试者和施用模式而变化。所述剂量可以基于受试者的体重、年龄和受试者的健康以及对一种或多种化合物或组合物的耐受性而调整。

[0422] 可以根据本领域已知的方法将活性剂和一种或多种赋形剂配制为组合物和剂型。本文提供的药物组合物可以被特别配制为固体形式或液体形式,包括适于肠胃外施用(例如通过皮下、瘤内、肌内或静脉内注射)的形式,例如无菌溶液或混悬剂。

[0423] 包含抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或其融合蛋白的治疗组合物可以与一种或多种药学上可接受的赋形剂一起配制,所述一种或多种药学上可接受的赋形剂可以是药学上可接受的材料、组合物或媒介物,如液体或固体填充剂、稀释剂、载体、制造助剂(例如润滑剂、滑石镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌或硬脂酸)、涉及携带或转运施用于受试者的治疗化合物的溶剂或包封材料、填充剂、盐、表面活性剂和/或防腐剂。可以用作药学上可接受的赋形剂的材料的一些例子包括糖类,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;明胶;滑石;蜡;油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,如乙二醇和丙二醇;多元醇,如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;酯类,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂;水;

等渗生理盐水;pH缓冲溶液;以及其他在药物配制品中采用的非毒性相容物质。

[0424] 如本文所指的填充剂可以被描述为化合物,添加所述化合物以增加药物组合物的质量并且有助于呈冻干形式的配制品的物理结构。填充剂的例子可以包括但不限于合适的甘露糖醇、甘氨酸、聚乙二醇和山梨糖醇。

[0425] 治疗组合物可以任选地包含表面活性剂。表面活性剂的使用可以减少重构蛋白的聚集和/或减少重构配制品中微粒的形成。可以根据本公开文本使用的合适的表面活性剂的例子包括但不限于聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80);泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆188);Triton;十二烷基硫酸钠(SDS);月桂硫酸钠;辛基糖苷钠;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-或硬脂基-磺基甜菜碱;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-或硬脂基-肌氨酸;亚油基-、肉豆蔻基或鲸蜡基-甜菜碱;月桂酰胺丙基-、椰油酰胺丙基-、亚油酰胺丙基-、肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈酰胺丙基-或异硬脂酰胺丙基-甜菜碱(例如,月桂酰胺丙基);肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈酰胺丙基-或异硬脂酰胺丙基-二甲胺;甲基椰油酰-牛磺酸钠或甲基油基牛磺酸二钠;和聚乙二醇、聚丙二醇以及乙二醇和丙二醇的共聚物(例如,Pluronic、PF68等)。

[0426] 防腐剂可以任选地用于本文所述的治疗组合物中。可用于本文提供的配制品中的合适的防腐剂包括十八烷基二甲基苄基氯化铵、氯化六甲双铵、苯扎氯铵(烷基苄基二甲基氯化铵的混合物,其中烷基是长链化合物)和苄索氯铵。其他类型的防腐剂包括芳族醇,如苯酚、丁醇和苯甲醇;烷基对羟基苯甲酸酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇和间甲酚。

[0427] 本文所述治疗组合物可以具有变化浓度的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白。例如,组合物可以包含10mg/ml至200mg/ml、25mg/ml至130mg/ml、50mg/ml至125mg/ml、75mg/ml至110mg/ml或80mg/ml至100mg/ml的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白。例如,组合物还可以包含约10mg/ml、20mg/ml、30mg/ml、40mg/ml、50mg/ml、60mg/ml、70mg/ml、80mg/ml、90mg/ml、100mg/ml、110mg/ml、120mg/ml、130mg/ml、140mg/ml或150mg/ml的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白。在一些实施方案中,治疗组合物可以是冻干的并且提供在用于施用前重构的组合物中。

[0428] 诊断用途

[0429] 本公开文本的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白可以用于检测和/或测量例如用于诊断目的样品中的B7-H4。本文公开的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白可以用于测定中以检测诸如癌症的疾病或障碍。针对B7-H4的示例性诊断测定可以包括例如使从患者获得的样品与本公开文本的抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白接触,其中将所述抗B7-H4抗体、其抗原结合片段或融合蛋白用可检测标记或报告分子进行标记或者用作捕获配体以从患者样品中选择性地分离B7-H4或者可替代地与本身被可检测地标记的二抗组合使用。可检测标记或报告分子可以是放射性同位素;荧光或化学发光部分,如异硫氰酸荧光素或罗丹明;或者酶,如碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶或萤光素酶。可以用于检测或测量样品中的B7-H4的特定示例性测定包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和荧光激活细胞分选(FACS)。

[0430] 本公开文本的试剂盒可以包括本文提供的药剂、组合物、组分、试剂、施用装置或机制或者其他实体的任何组合。例如,本公开文本的试剂盒可以包括一种或多种本文公开的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段或者融合蛋白以及一种或多种载体组合物、施用装置和

组合治疗剂。试剂盒可以进一步包括有助于递送的装置如注射器或有助于向有需要的受试者递送治疗组合物的工具。本文提供的任何试剂盒可以与施用说明书一起包括在容器、包装或分配器中。

[0431] 所有其他引用的专利和申请均通过引用以其整体并入本文。此外,在通过引用并入本文的参考文献中的术语的定义或用途与本文提供的该术语的定义不一致或相反的情况下,应用本文提供的该术语的定义并且不应用参考文献中的该术语的定义。

[0432] 应当理解,本公开文本不限于特定的分子、组合物、方法或方案,这些可以变化。与本文所述的类似或等同的任何方法和材料都可以用于本公开文本的实施方案的实践或测试中。应当进一步理解,本说明书中的本公开文本包括此类特定特征的所有可能的组合。例如,当在本公开文本的特定方面或实施方案或者特定权利要求的情形下公开特定特征时,该特征也可以尽可能地与本公开文本的其他特定方面和实施方案组合和/或在本公开文本的其他特定方面和实施方案的情形下,并且总体上在本公开文本中使用。

[0433] 在本文引用包括两个或更多个限定步骤的方法的情况下,所述限定步骤可以以如所列的顺序或者以任何顺序或者同时(除了上下文排除该可能的情况下)进行,并且所述方法可以包括一个或多个其他步骤,所述一个或多个其他步骤在任何限定步骤之前、在两个限定步骤之间或所有限定步骤之后(除了上下文排除那些可能的情况下)进行。

[0434] 为了有助于更好地理解本公开文本,给出了以下具体实施方案的实施例。以下实施例不应被解读为限制或限定本公开文本的整体范围。

实施例

[0435] 实施例1:实施例1-21的材料和方法

[0436] 人/小鼠B7-H4-Fc、人/小鼠B7-H4的IgV结构域以及人和小鼠B7-H4的IgC结构域的生成。

[0437] 合成(IDT)人B7-H4(NCBI登录号:NP_078902、Phe29-Ala258)和小鼠B7-H4(NCBI登录号:Q7TSP5、Phe29-Pro258)的基因并且将其与编码人IgG1 Fc(NCBI登录号:P01587, Pro100-Lys330)的N末端的基因融合。将编码B7-H4-Fc融合蛋白的基因插入哺乳动物表达载体(如pcDNA 3.1(ThermoFisher))中并且转染至Expi293F细胞(ThermoFisher)中。将细胞在大容量可接触CO2培养器(Thermo Scientific)中在30°C下孵育4-5天后,将澄清的上清液装载到MabSelect SuRe蛋白A柱。将纯化的蛋白质用pH 3甘氨酸缓冲液洗脱。用pH 7.5Tris缓冲液中和后,通过SDS-PAGE和/或SE-HPLC分析蛋白质。使用相同的方法产生人和小鼠B7-H4-Fc两者(Phe29-Val157)的IgV结构域以及人B7-H4-Fc(Asp158-Ala258)或小鼠B7-H4-Fc(Asp158-Pro258)的IgC结构域。

[0438] 来自Superman 2.0噬菌体展示文库的抗体鉴定

[0439] 通过使用EZ-Link™NHS-PEG4-生物素(ThermoFisher)将人和小鼠B7-H4-his生物素化。将来自Superman 2.0噬菌体展示文库(Distributed Bio)的纯化的噬菌体与100μg至0.5μg的人/小鼠B7-H4-Fc或生物素化的人/小鼠B7-H4-his混合。在室温下孵育0.5至1小时后,通过蛋白G(针对Fc-融合物B7-H4)或链霉素(针对生物素化B7-H4)磁珠捕获B7-H4/噬菌体的混合物。将未结合的噬菌体用PBS-T和PBS洗掉并且用100mm三乙胺(TEA)洗脱。将洗脱的噬菌体用pH 7.5Tris缓冲液中和并且用于感染在对数期生长的电转感受态ER2738大肠杆菌细胞。在30°C下孵育过夜后,收获细菌并且将其用于接种至具有葡萄糖、四环素和羧苄

青霉素的2YT。将M13辅助噬菌体用于感染对数期细菌,并且将培养基改为具有卡那霉素和羧苄青霉素的2YT,以继续过夜扩增噬菌体。第二天,将噬菌体通过PEG纯化并且重新悬浮于PBS中。将纯化的噬菌体准备用于下一轮淘选。为了监测淘选,挑取单个细菌菌落并且使其生长至对数期。如上所述,添加M13辅助噬菌体以扩增噬菌体。将粗噬菌体混合物添加至B7-H4包被的板。使用HRP抗M13抗体检测结合。总体上,进行3-4轮淘选,直至阳性率达到>50%。

[0440] 将轻链改组方法用于改善先导物的亲和力。简而言之,通过将先导物重链与来自Superman 2.0文库的轻链集合配对来构建新的噬菌体文库。在困难条件(如较高的温度、较低或高pH以及在洗涤缓冲液中另外的B7-H4抗原的存在)下鉴定较高亲和力抗体。

[0441] 来自scFv的IgG转化、表达和纯化

[0442] 将编码可变结构域轻链和可变重链的基因分别与编码人IgG1轻链或重链的恒定结构域的基因融合。将整个蛋白编码序列(编码可变结构域和恒定结构域两者)插入到哺乳动物表达载体(如pcDNA3.1(ThermoFisher)中。将载体转染到表达细胞系(如HEK293、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或 α 1,6-岩藻糖基转移酶(FUT8)转染的CHO(增强ADCC活性)中。使用蛋白A柱和SEC-HPLC纯化抗体,以产生具有单体>95%的纯抗体。

[0443] 融合蛋白产生

[0444] 合成编码IL-15受体sushi结构域(NCBI登录号:EAW86418.1的残基33-93)和成熟IL-15(NCBI登录号:P40933的残基49-162)的基因并且将其与编码抗B7-H4抗体的重链的序列的3'端融合(产生编码C末端融合蛋白的基因)。引入重链中的突变(一条重链中的S354C和T366W,另一条重链中的Y349C、T366S、L368A和Y407V),以稳定两条重链的异二聚体。引入抗体的Fc区中另外的突变(M428L和N434S),以增加在pH 6下抗体与FcRn结合,因此延长蛋白质的血清半衰期。如上所述进行融合抗体的表达和纯化。

[0445] 剂量反应ELISA

[0446] 在4°C下将约1-2 μ g/ml的人或小鼠B7-H4-Fc(或his标记的)在ELISA板(Immuno 2HB,Thermo scientific,目录号3455)上固定过夜。将板用3% PBS+奶封闭后,将连续稀释的抗体添加到封闭的板中并且在室温下孵育1-1.5h。将板用PBS-T(0.05%)洗涤后,将靶向hFab的辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗体添加到板中。通过添加3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)发出信号,然后添加1N H₂SO₄停止反应。通过ELISA板读取器(来自TECAN的Infinite M1000)读取450nm处的OD。将来自Prism的GraphPad用于绘制OD450与抗体浓度的曲线并且计算EC50值。

[0447] Biacore动力学

[0448] 使用配备有CM5传感器芯片的Biacore T200仪器进行表面等离子体共振实验。将系统在运行缓冲液HBS-EP pH 7.4中平衡。使用胺偶联化学固定配体。将流通池一至四的表面使用胺偶联试剂盒以10 μ l/min的流速激活5min。将配体(人B7-H4-Fc、人B7-H4-his和小鼠B7-H4-Fc;浓度为10mM乙酸钠中的5 μ g/ml,pH 5.0)以50-100RU的密度分别固定在流通池2、3、4上。将流通池1空出,以用作参考表面。将所有流通池表面用5min注射1M乙醇胺(pH 8.0)封闭。为了收集动力学结合数据,将相应的分析物(在1X HBS-EP缓冲液pH 7.4中稀释)以100nM至0.1nM的浓度以30 μ l/min的流速并且在25°C的温度下注射到四个流通池中。允许蛋白复合物分别缔合和解离180秒和1000秒或1200秒。将表面用30秒注射1.5M NaCl/0.05M NaOH再生。使用Biaevaluation软件中可获得的Langmuir拟合选项将数据拟合到样品1:1相

相互作用模型中。

[0449] 表达mB7-H4的CT26细胞系的产生

[0450] 鼠癌CT26细胞系(CT26.CL25,目录号CRL-2639)获自ATCC。pReceiver-M68载体中的鼠B7-H4(Vtcn1)ORF cDNA(目录号EX-32401-M68)及其空对照载体pReceiver-M68载体(目录号EX-NEG-M68)购自GeneCopoeia。使用Lipofectamine®2000DNA转染试剂将CT26细胞用纯化的质粒转染。转染48-72小时后,选择转染的CT26细胞集落并且将其在含嘌呤霉素的培养基中培养。使用Guava®FLOW Cytometry easyCyte™系统通过染色PE抗小鼠B7-H4抗体(目录号139406、Biolegend)来检测选定的克隆的mB7-H4表达水平。

[0451] 通过FACS评估抗体/融合蛋白与细胞表达的B7-H4的结合

[0452] 将细胞收获,洗涤一次然后在冰冷的FACS缓冲液中重新悬浮至 1×10^6 个细胞/ml的浓度。将25 μ l的细胞悬浮液添加到96孔圆底微量滴定板的每孔中。将连续稀释的抗体或融合蛋白添加到每孔中并且在4°C下孵育1小时。将细胞通过在1500rpm下离心5分钟洗涤三次然后用二抗(1:200稀释)在黑暗中以4°C下染色30min。将细胞洗涤一次,重新悬浮于在100 μ l PBS缓冲液中然后使用Guava Flow Cytometry EasyCyte系统分析。

[0453] M-07e细胞培养和增殖测定

[0454] 将人急性巨核细胞白血病M-07e细胞系在补充有15%热灭活FBS和20%细胞系5637的条件培养基的IMDM培养基中培养。将抗体或融合蛋白的连续稀释液添加到96孔板中,然后将细胞以在完全的IMDM培养基中的 2.5×10^4 每孔接种。将细胞在37°C下孵育3天并且使用CellTiter-Glo®发光细胞活力测定试剂盒检测细胞增殖。

[0455] 人PBMC的增殖和T细胞亚型分析

[0456] 将人冷冻PBMC在实验当天解冻并且制备在补充有10%热灭活FBS的完全IMDM培养基中立即用于增殖测定。将抗体的连续稀释液添加到96孔板中,然后将细胞以 1×10^5 个细胞/孔接种。将细胞在37°C下培养6天并且使用CellTiter-Glo®发光细胞活力测定试剂盒检测细胞增殖。

[0457] 对于T细胞群体分析,将细胞洗涤一次并且在4°C下用可固定活力染料eFluor780染色10分钟。洗涤后,将细胞固定,用Foxp3转录因子染色缓冲液组透化然后在4°C下用抗CD3-PE、抗CD4-APC、抗CD8 α -PECy7和抗Ki67-FITC染色1小时。使用Guava Flow Cytometry EasyCyte系统分析和限定增殖性CD4(CD4+Ki67+)或CD8(CD8+Ki67+)T细胞群体。

[0458] T细胞的IFN γ 细胞因子分泌

[0459] 将人B7-H4转染的细胞系hB7-H4-CHO以 4×10^4 个细胞/孔接种到96孔U底板中。将连续稀释的抗体添加到每孔中。制备效应细胞和人T细胞(使用EasySep人T细胞分离试剂盒从LeuPak分离)的细胞悬浮液并且将其以所需的效应细胞与靶细胞比率(例如,以5:1)接种到每孔中。将共培养物在37°C下孵育96小时并且收集培养基用于IFN γ 细胞因子ELISA(R&D)。

[0460] 抗体内化测定

[0461] 将靶细胞(如SK-BR-3MDA-MB-468细胞)以6,000个细胞/孔接种到96孔平底板中并且孵育3小时,以允许细胞沉降在水平表面上。将抗体/Incucyte FabFlour试剂混合物(Incucyte®人Fabfluor-pH红色抗体标记染料)添加到每孔中,以以2 μ g/ml的最终浓度测试。使用Incucyte®活细胞分析系统将测定板每小时重复扫描。通过Incucyte®软件分析图像。

[0462] 使用来自Promega的ADCC报告物生物测定评估肿瘤细胞杀伤

[0463] ADCC报告物生物测定使用工程化的效应细胞。使用ADCC报告物生物测定试剂盒(hIgG1的ADCC报告物生物测定G7010)进行测定。简而言之,将靶癌细胞以 1.5×10^4 个细胞/孔种到96孔平底板中。第二天,将生长培养基吸出并且将ADCC测定缓冲液和抗体稀释液系列添加到每孔中。制备ADCC生物测定的效应细胞的细胞悬浮液并且将其以所需的效应细胞与靶细胞比率(例如5:1)接种。在以 37°C 下孵育6小时后,将Bio-Glo™荧光素酶测定试剂添加到每孔中并且孵育15分钟,并且使用板读取器测量发光信号。

[0464] hPBMC杀伤肿瘤细胞(免疫细胞杀伤测定)

[0465] 为了测量在抗体或融合蛋白的存在下免疫细胞杀伤肿瘤细胞,建立了SKB-R3/hPBMC共培养模型,以分析抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)(短期分析)或细胞毒性T细胞杀伤(长期分析)。将靶癌细胞SKB-R3细胞用IncuCyte® CytoLight Red Rapid试剂标记并且以5,000个细胞/孔接种到96孔平底板中。第二天,将生长培养基吸出,并且将IncuCyte® Annexin V绿色染料和抗体稀释液添加到每孔中。制备效应细胞hPBMC的细胞悬浮液并且以所需的效应细胞与靶细胞比率(10:1或5:1)接种。将测定板重复扫描并且使用IncuCyte®活细胞分析系统和IncuCyte®软件基于说明书分析图像。

[0466] 使用HEK-Blue IL-2报告细胞测量pSTAT5

[0467] 通过将人胚肾HEK 293细胞系用人IL-2R α 、IL-2R β 和IL-2R γ 基因连同人JAK3和STAT5基因稳定转染产生HEK-Blue™IL-2细胞,以获得全功能IL-2信号传导途径。此外,还引入了STAT5诱导的SEAP报告基因。IL-2刺激后,HEK-Blue™IL-2细胞引发STAT5的激活和随后的SEAP分泌。可以使用QUANTI-Blue™溶液容易地监测STAT5诱导的SEAP水平。

[0468] 将HEK-Blue IL-2细胞在具有 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 嘌呤霉素和1X HEK-Blue CLR选择素的完全DMEM培养基(补充有10%热灭活FBS)中维持并且传代培养。将细胞以 $2.8 \times 10^5/\text{ml}$ 悬浮于完全DMEM培养基中,用于报告物测定。首先将 $20\mu\text{l}$ 的连续稀释的抗体或融合抗体添加到平底96孔板的每孔中然后添加 $180\mu\text{l}$ 的细胞悬浮液。将细胞在 37°C 下在 CO_2 培养箱中孵育20-24h。按照QUANTI-Blue™溶液的说明书在630nm处检测SEAP水平。

[0469] 抗体命名法

[0470] 简称为“X”的抗体是指包含称为“X”的重可变链和称为“X”的轻可变链两者的抗体。例如,抗体3F2包含3F2轻可变链和3F2重可变链。

[0471] 称为“X/Y”的抗体包含称为“X”的重可变链和轻可变链“Y”。例如,抗体3F2/50A10包含3F2重可变链和50A10轻可变链。

[0472] 对照抗体

[0473] 将以下抗体用作对照:(1) B7-H4 IgV结构域结合抗体FPA150(Five Prime),参见美国公开US2019/0085080A1中的抗体“20502”(“对照抗体1”;与b7-H4的IgV结构域结合,也称为FPA150);(2) B7-H4 IgC结构域结合抗体6H3(Medimmune),参见美国专利US9,574,000中的抗体“6H3”(“对照抗体2”;与b7-H4的IgC结构域结合);和(3) DP47。

[0474] 实施例2:高亲和力抗B7-H4抗体的产生

[0475] 如上文所述进行噬菌体展示。首先,进行通过链霉素珠捕获的固定的hB7-H4-Fc或生物素-hB7-H4-his的淘选。参见图1(步骤1)。在此步骤中,鉴定了以下抗体:

[0476] (1) 与hB7-H4结合的抗体:1A12、1D3、1F11、3D1、3F2、4H6、6C3、9H2和4B9(图2(批次A-1))。抗体1A12、1D3、1F11、3D1、3F2、4H6、6C3和9H2与可溶性B7-H4和细胞hB7-H4两者结合,与hB7-H4的IgV结构域特异性结合(图2-图5)。4B9与hB7-H4-Fc强结合但是不与mB7-H4结合。4B9与hB7-H4的结合需要IgV和IgC两者(图6)。

[0477] (2) 与人和鼠hB7-H4的IgC结构域结合的抗体:5E4、5F4、5G6、9D11、9E1、15B11、24B6、24F4和30G4(图2(批次A-2)和图6-图7)。

[0478] (3) 与人和鼠hB7-H4的IgV结构域结合的抗体:31D7和39A11。参见图1(批次A-3)和图8。

[0479] 分离的抗体的特异性和特异性结合位点总结于表1中。

表1. 分离的抗B7-H4抗体的特异性和特异性结合位点。

抗体 [VH/VL]	特异性	结合位点
1A12/1A12	仅人hB7-H4	人B7-H4的IgV结构域
1D3/1D3	仅人hB7-H4	人B7-H4的IgV结构域
1F11/1F11	仅人hB7-H4	人B7-H4的IgV结构域
3D1/3D1	仅人hB7-H4	人B7-H4的IgV结构域
3F2/3F2	仅人hB7-H4	人B7-H4的IgV结构域
4H6/4H6	仅人hB7-H4	人B7-H4的IgV结构域
6C3/6C3	仅人hB7-H4	人B7-H4的IgV结构域
9H2/9H2	仅人hB7-H4	人B7-H4的IgV结构域
4B9/4B9	仅人hB7-H4	人B7-H4的IgV结构域和IgC结构域两者
5E4/5E4	人和小鼠B7-H4	h/mB7-H4的IgC结构域
5F4/5F4	人和小鼠B7-H4	h/mB7-H4的IgC结构域
5G6/5G6	人和小鼠B7-H4	h/mB7-H4的IgC结构域
9D11/9D11	人和小鼠B7-H4	h/mB7-H4的IgC结构域
9E1/9E1	人和小鼠B7-H4	h/mB7-H4的IgC结构域
15B11/15B11	人和小鼠B7-H4	h/mB7-H4的IgC结构域
24B6/24B6	人和小鼠B7-H4	h/mB7-H4的IgC结构域
24F4/24F4	人和小鼠B7-H4	h/mB7-H4的IgC结构域
30G4/30G4	人和小鼠B7-H4	h/mB7-H4的IgC结构域
39A11/39A11	人和小鼠B7-H4	h/mB7-H4的IgV结构域
31D7/31D7	人和小鼠B7-H4	h/mB7-H4的IgV结构域

[0480] 实施例3:分离的抗B7-H4抗体与可溶性B7-H4的结合的动力学

[0481] 使用Biacore分析检查了不同抗体与其靶标的结合的动力学。结果总结于表2-表4中。

[0482] 抗体1D3和3F2与hB7-H4强结合并且被选择用于亲和力成熟(轻链改组)(图1(步骤B))。h/mB7-H4交叉反应抗体9D11(IgC结构域结合抗体)和39A11(IgV结构域结合抗体)与其靶标强结合并且也被选择用于亲和力成熟(轻链改组)(图1(步骤B))。

表2. 指示的hB7-H4 IgV结构域结合抗体与hB7-H4-Fc和hB7-H4-his的结合。未观察到mB7-H4-Fc或mB7-H4-his的结合。n/a = 未测定。*选择抗体1D3和3F2用于亲和力成熟(轻链改组)。

抗体	hB7-H4-Fc的结合动力学			hB7-H4-his的结合动力学		
	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D
1A12	1.41E+05	5.04E-04	3.57E-09	2.36E+05	5.83E-04	2.47E-09
1D3*	9.02E+05	7.26E-04	8.05E-10	1.01E+06	5.58E-04	5.51E-10
1F11	1.75E+06	2.91E-03	1.66E-09	4.38E+06	4.88E-03	1.11E-09
3D1	1.12E+06	2.49E-03	2.23E-09	1.36E+05	3.88E-03	2.85E-08
3F2*	1.12E+07	1.06E-03	9.51E-11	1.19E+08	1.01E-02	8.49E-11
4B9	4.10E+05	1.18E-03	2.89E-09	4.90E+04	2.02E-04	4.13E-09
4H6	5.51E+05	1.57E-03	2.86E-09	9.03E+05	3.61E-03	4.00E-09
6C3	1.29E+05	1.40E-03	1.09E-08	3.15E+05	1.99E-03	6.30E-09
9H2	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

表3. 抗h/mB7-H4抗体与hB7-H4-Fc和hB7-H4-his的结合。n/a=不可用。选择抗体39A11用于亲和力成熟(轻链改组)。

抗体	hB7-H4-Fc的结合动力学			hB7-H4-his的结合动力学		
	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D
5E4	3.87E+05	4.52E-03	1.17E-08	4.53E+05	4.55E-03	1.00E-08
5F4	1.92E+05	2.88E-03	1.50E-08	1.99E+05	3.29E-03	1.66E-08
5G6	1.87E+05	2.26E-03	1.21E-08	3.77E+05	1.96E-03	5.19E-09
9D11	3.74E+05	6.74E-04	1.80E-09	6.47E+05	5.49E-04	8.50E-10
9E1	2.72E+05	3.72E-03	1.37E-08	7.11E+05	5.62E-03	7.91E-09
15B11	1.84E+05	7.84E-04	4.26E-09	1.11E+05	5.73E-04	5.17E-09
24B6	n/d			1.49E+05	7.89E-04	5.30E-09
24F4				2.68E+04	5.20E-03	1.94E-07
30G4				1.15E+05	6.94E-04	6.05E-09
39A11*				7.27E+05	6.74E-04	9.26E-10
31D7	8.97E+05	7.66E-04	8.54E-10			

表4. 抗h/mB7-H4抗体与mB7-H4-Fc和mB7-H4-his的结合。n/a=未测定。选择抗体39A11用于亲和力成熟(轻链改组)。

抗体	mB7-H4-Fc的结合动力学			mB7-H4-his的结合动力学		
	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D
5E4	1.97E+05	2.79E-03	1.41E-08	1.17E+06	1.06E-02	9.09E-09
5F4	2.40E+05	2.86E-03	1.19E-08	2.56E+05	3.84E-03	1.50E-08
5G6	2.00E+05	2.61E-03	1.31E-08	2.86E+05	2.24E-03	7.83E-09
9D11	6.99E+05	4.49E-04	6.42E-10	1.85E+05	2.81E-04	1.52E-09
9E1	3.09E+05	3.28E-03	1.06E-08	2.81E+05	3.49E-03	1.24E-08
15B11	2.76E+05	9.80E-04	3.55E-09	1.18E+05	7.29E-04	6.17E-09
24B6	n/d			1.62E+05	5.52E-04	3.40E-09
24F4				1.07E+05	3.14E-03	2.92E-08
30G4				9.54E+04	6.09E-04	6.38E-09
39A11				7.30E+05	1.11E-03	1.53E-09
31D7	8.88E+05	1.43E-03	1.61E-09			

[0483] 实施例4: 抗B7-H4抗体3F2和1D3(hB7-H4 IgV结构域结合抗体)通过轻链改组的亲和力成熟

[0484] 通过轻链改组进行3F2和1D3的亲和力成熟。为此,将3F2或1D3的重链分别与包含 $>1.0 \times 10^8$ 条轻链的文库配对(参见图1(步骤B-1和B-2))。如实施例1中所述,在艰难的条件下在通过链霉素珠捕获的固定的hB7-H4-Fc或生物素-hB7-H4-his上淘选产生的文库。分离的3F2衍生物和1D3衍生物的序列示于表5中。

[0485] 分离的3F2衍生物3F2/50A10和3F2/49A2具有与3F2相同的重链序列,但是具有与

3F2不同的轻链序列(图1(批次B-1))。像其亲本抗体,衍生物3F2/50A10和3F2/49A2仅与hB7-H4的IgV结构域结合。3F2衍生物3F2/50A10和3F2/49A2示出了比亲本抗体3F2更强的与细胞人B7-H4的结合(表6)。

[0486] 分离的1D3衍生物1D3/47B2和1D3/45A2具有与1D3相同的重链序列,但是具有与1D3不同的轻链序列(图1(批次B-2))。像其亲本抗体,衍生物1D3/47B2和1D3/45A2仅与hB7-H4的IgV结构域结合。1D3衍生物1D3/47B2和1D3/45A2示出了比亲本抗体1D3更强的与细胞人B7-H4的结合(表6)。

[0487] 这些抗体与可溶性B7-H4和细胞B7-H4的结合示于图9-图10中。

表5. 抗体3F2和1D3及其各自的衍生物的轻链CDR序列。

抗体 VL	SEQ ID NO	LCDR1	SEQ ID NO	LCDR2	SEQ ID NO	LCDR3
3F2	20	RASQSISSYLN	21	SSLQS	22	QQSYSTPLT
50A10	70	QASQDISNYIN	71	SRLQS	72	QQSYRSPFT
49A2	66	RASQNIDTYVN	67	SRLHT	68	QQSYTSPFT
3F2 CDR 基序	73	X ₁ ASQX ₂ IX ₃ X ₄ YX ₅ N 其中: X ₁ 是R或Q X ₂ 是D、N或S X ₃ 是D或S	74	SX ₆ LX ₇ X ₈ 其中: X ₆ 是R或S X ₇ 是H或Q X ₈ 是S或T	75	QQSYX ₉ X ₁₀ PX ₁₁ T 其中: X ₉ 是R、S或T X ₁₀ 是S或T
		X ₄ 是N、S或T X ₅ 是I、L或V				X ₁₁ 是F或L
1D3	8	RASRSIYTWLA	9	STLQS	10	QQSYSTPYT
47B2	81	RASQTVYTWLA	82	TNLAT	83	QQSYSTSWT
45A2	77	RASQNIYTWLA	78	TNLPT	79	QQSYSTRWT
1D3 CDR 基序	84	RASX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ YTWLA 其中: X ₁₂ 是Q或R X ₁₃ 是N、S或T X ₁₄ 是I或V	85	X ₁₅ X ₁₆ LX ₁₇ X ₁₈ 其中: X ₁₅ 是S或T X ₁₆ 是N或T X ₁₇ 是A、P或Q X ₁₈ 是S或T	86	QQSYSTX ₁₉ X ₂₀ T 其中: X ₁₉ 是P、R或S X ₂₀ 是W或Y

表6. 抗体3F2(hB7-H4 IgV结构域结合抗体)及其衍生物以及抗体1D3(对hB7-H4的IgV结构域具有特异性)及其衍生物的结合特性。

抗 体 (VH/VL)	EC50, nM		hB7-H4的结合动力学			EC50, nM		mB7-H4 的 结合动力学		
	SK- BR -3	hB7- H4	K _a	K _d	K _D	mB7- H4/ CT26	mB7- H4	K _a	K _d	K _D
3F2/3F2	0.84	0.048	1.59E+07	1.30E-03	8.19E-11	不结合				
3F2/50A10	0.41	0.046	1.07E+07	4.13E-04	3.85E-11					
3F2/49A2	0.79	0.056	8.12E+06	1.22E-04	1.50E-11					
1D3/1D3	18.6	0.044	6.37E+05	4.94E-04	7.75E-10					
1D3/47B2	36.0	0.078	5.85E+05	1.22E-04	2.09E-10					
1D3/45A2	52.1	0.041	2.32E+05	7.36E-05	3.17E-10					

[0488] 实施例5:抗B7-H4抗体9D11(h/mB7-H4 IgC结构域结合抗体)通过轻链改组的亲和力成熟

[0489] 通过轻链改组进行9D11的亲和力成熟。为此,将9D11的重链与包含 $>1.0 \times 10^8$ 条轻

链的文库配对。参见图1(步骤B-3)。如实施例1中所述,在艰难的条件下在通过链霉素珠捕获的固定的hB7-H4-Fc或生物素-hB7-H4-his上淘选产生的文库。参见图1(步骤B)。分离的9D11衍生物的序列示于表7中。

[0490] 分离的9D11衍生物9D11/67E12、9D11/67C3、9D11/67C6、9D11/67H9、9D11/67G3和9D11/68F5具有与9D11相同的重链序列,但是具有与9D11不同的轻链序列(图1(批次B-3))。这些抗体的结合亲和力示于表8中,这些抗体与可溶性B7-H4和细胞B7-H4的结合示于图11-图13中。

表7. 抗体9D11及其衍生物的轻链CDR序列。

抗体VL	SEQ ID NO	LCDR1	SEQ ID NO	LCDR2	SEQ ID NO	LCDR3
9D11	50	KSSQSVLYSSNNKNYLA	51	STRES	2	QQYFSTPS
67E12	88	KSSQSVLYSSNNKNYLA	89	SKRVS	90	QQYFDSPT
67C6	92	KSSQSVLSSSNNKNYLA	93	STRQS	94	QQYYS DPT
67C3	96	KSSQSVLYSSNNKNYLA	97	STRAS	98	QQYYDTPT
68F5	108	KSSRSVLSRSNNKNYLA	109	STRQF	110	QQYYDTPT
67G3	100	KSSQSVLSSSNNKNYLA	101	STRQS	102	QQYYTSPT
67H9	104	RSSQSVLYSSNNKNYLA	105	SNRKS	106	QQYYSAPT
9D11 CDR基序	111	X ₂₁ SSX ₂₂ SVLX ₂₃ X ₂₄ SNNKNYLA 其中: X ₂₁ 是K或R X ₂₂ 是Q或R	112	SX ₂₅ RX ₂₆ X ₂₇ , 其中: X ₂₅ 是K、N、T X ₂₆ 是A、E、K、	113	QQYX ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ PX ₃₁ 其中: X ₂₈ 是F或Y X ₂₉ 是D、S或T
		X ₂₃ 是S或Y X ₂₄ 是R或S		Q或V X ₂₇ 是F或S		X ₃₀ 是A、D、S或T X ₃₁ 是S或T

表8. 抗体9D11(h/mB7-H4 IgC结构域结合抗体)及其衍生物的结合特性。

抗 体 (VH/VL)	EC50, nM		hB7-H4的结合动力学		
	SK-BR-3	hB7-H4	K _a	K _d	K _D
9D11/9D11	125.9	0.180	3.72E+05	2.22E-03	5.97E-09
9D11/67E12	8.08	0.203	1.04E+05	6.54E-04	6.30E-09
9D11/67C6	9.20	0.115	4.25E+04	6.36E-04	1.50E-08
9D11/67C3	4.06	0.112	3.45E+04	3.94E-04	1.14E-08
9D11/67G3	22.5	0.261	1.44E+05	1.53E-03	1.06E-08
9D11/68F5	9.53	0.778*	1.18E+05	8.42E-04	7.15E-09
9D11/68H9	24.0	0.100	1.52E+05	1.08E-03	7.09E-09
抗 体 (VH/VL)	EC50, nM		mB7-H4的结合动力学		
	mB7-H4/CT26	mB7-H4	K _a	K _d	K _D
9D11/9D11	122.4	0.104	4.28E+05	2.05E-03	4.78E-09
9D11/67E12	16.7	0.110	1.65E+05	7.67E-04	4.66E-09
9D11/67C6	45.7	0.082	3.36E+04	9.41E-05	2.80E-09
9D11/67C3	28.2	0.086	3.11E+04	3.23E-04	1.04E-08
9D11/67G3	45.3	0.162	1.91E+05	1.61E-03	8.46E-09
9D11/68F5	31.8	0.145*	1.52E+05	9.03E-04	5.96E-09
9D11/68H9	54.3	0.105	1.75E+05	1.06E-03	6.08E-09

[0491] 实施例6:抗B7-H4抗体39A11(h/mB7-H4 IgV结构域结合抗体)通过轻链改组的亲和力成熟

[0492] 通过轻链改组进行39A11的亲和力成熟。为此,将39A11的重链与包含 $>1.0 \times 10^8$ 条轻链的文库配对。参见图1(步骤B-4)。如实施例1中所述,在艰难的条件下在通过链霉素珠捕获的固定的hB7-H4-Fc或生物素-hB7-H4-his上淘选产生的文库(图1(步骤B))。分离的39A11衍生物的序列示于表9中。

[0493] 分离的39A11衍生物39A11/57H3、39A11/57G8、39A11/56A9、39A11/56H7和39A11/62F9具有与39A11相同的重链序列,但是具有与39A11不同的轻链序列(图1(批次B-4))。像亲本39A11,所有衍生物仅与人和小鼠B7-H4的IgV结构域结合。39A11衍生物通常示出了比亲本抗体39A11更强的与细胞人B7-H4的结合。这些抗体与可溶性B7-H4和细胞B7-H4的结合示于表10和图14-图15中。

表9. 抗体39A11及其衍生物的轻链CDR序列。

抗体 VL	SEQ ID NO	LCDR1	SEQ ID NO	LCDR2	SEQ ID NO	LCDR3
39A11	62	RASQTIRSYLN	63	SHLQS	64	QQSYTTPYT
57H3	115	QASQDIRKYLN	116	STRES	117	QQYYSLPLT
57G8	119	RASQSIRSYLN	120	SSLQS	121	QQYYSTPLT
56A9	123	RASQSISSYLN	124	SIRES	125	QQYYTTPLT
56H7	127	RASQSISSYLN	128	SNLQS	129	QQYYTTPLT
62F9	131	RASQSVSSAVA	132	SIRES	133	QQYYSTPLT
CDR 基 序	134	X ₃₂ ASQX ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ 其中: X ₃₂ 是Q或R X ₃₃ 是D、S或T X ₃₄ 是I或V X ₃₅ 是R或S X ₃₆ 是K或S X ₃₇ 是A或Y	135	SX ₄₀ X ₄₁ X ₄₂ S 其中: X ₄₀ 是H、I、 N、S或T X ₄₁ 是L或R X ₄₂ 是E或Q	136	QQX ₄₃ YX ₄₄ X ₄₅ P X ₄₆ T 其中: X ₄₃ 是S或Y X ₄₄ 是S或T X ₄₅ 是L或T X ₄₆ 是L或Y
		X ₃₈ 是L或V X ₃₉ 是A或N				

表10. 抗体39A11(h/mB7-H4 IgV结构域结合抗体)及其衍生物的结合特性。

抗体(VH/VL)	EC50, nM		hB7-H4的结合动力学		
	SK-BR-3	hB7-H4	K _a	K _d	K _D
39A11/39A11	4.17	0.080	1.73E+06	1.81E-03	1.05E-09
39A11/57H3	2.07	0.086	6.16E+05	2.95E-04	4.78E-10
39A11/57G8	1.90	0.068	8.63E+05	2.61E-04	3.03E-10
39A11/56A9	2.53	0.081	5.73E+05	6.91E-04	1.21E-09
39A11/56H7	2.85	0.061	5.14E+05	4.00E-04	7.79E-10
39A11/62F9	1.31	0.079	7.33E+05	6.25E-04	8.53E-10
抗体(VH/VL)	EC50, nM		mB7-H4的结合动力学		
	mB7-H4/CT26	mB7-H4	K _a	K _d	K _D
39A11/39A11	6.73	0.136	5.21E+06	6.80E-02	1.30E-08
39A11/57H3	1.63	0.128	5.00E+05	6.22E-07	1.25E-12
39A11/57G8	1.22	0.096	9.69E+05	9.66E-05	9.98E-11
39A11/56A9	1.85	0.130	7.37E+05	1.02E-06	1.38E-12
39A11/56H7	1.67	0.107	6.30E+05	1.38E-07	2.19E-13
39A11/62F9	1.32	0.124	4.55E+05	8.41E-04	1.85E-09

[0494] 选择来自实施例3-实施例6的前三种抗体3F2/50A10(hB7-H4 IgV结构域结合抗体)、39A11/57G8(h/mB7-H4 IgV结构域结合抗体)和9D11/68F5(h/mB7-H4 IgC结构域结合抗体)进行另外的表征。

[0495] 实施例7: 抗B7-H4抗体与可溶性B7-H4和细胞表达的B7-H4的结合

[0496] 分别通过ELISA或流式细胞术测定抗体3F2/50A10(hB7-H4 IgV结构域结合抗体)、39A11/57G8(h/mB7-H4 IgV结构域结合抗体)和9D11/68F5(h/mB7-H4 IgC结构域结合抗体)

与可溶性B7-H4或细胞表达的B7-H4的结合。

[0497] ELISA实验证明抗体3F2/50A10和39A11/57G8两者与hB7-H4的IgV结构域强结合。抗体39A11与mB7-H4交叉反应。抗体9D11/68F5与人和小鼠B7-H4的IgC结构域结合(图16)。

[0498] 流式细胞术实验证明抗体3F2/50A10和39A11/57G8与三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-468和卵巢癌细胞系SK-BR-3上表达的细胞hB7-H4强结合。抗体39A11/57G8和9D11/68F5还与mB7-H4转染的小鼠克隆癌细胞系CT26上表达的细胞mB7-H4结合(图17)。

[0499] 实施例8:抗B7-H-4抗体引起B7-H4内化

[0500] 对细胞表面抗原具有特异性的抗体可以诱导抗原介导的对抗体/抗原复合物的胞吞。为了测定抗B7-H-4抗体3F2/50A10(hB7-H4 IgV结构域结合抗体)、39A11/57G8(h/mB7-H4 IgV结构域结合抗体)和9D11/68F5(h/mB7-H4 IgC结构域结合抗体)与其靶标的结合是否会导致抗体/抗原复合物的内化,使用了IncuCyte®FabFluor抗体标记试剂。FabFluor是与pH敏感荧光探针缀合的靶向Fc区的Fab片段。由于Fab-Ab复合物被内化并且经由酸性(pH 4.5-5.5)溶酶体和内涵体处理,观察到荧光信号。

[0501] IgC结构域抗体9D11/68F5和IgV结构域抗体39A11/57G8通过与B7-H4结合引发内化(图18)。

[0502] 实施例9:抗B7-H-4抗体恢复T细胞功能

[0503] 细胞表达的B7-H4与其在T细胞上的(未知)同源受体的结合抑制T细胞细胞因子分泌功能。因此,通过干扰B7-H4与其在T细胞上的同源受体的相互作用测试了抗B7-H-4抗体3F2/50A10(hB7-H4 IgV结构域结合抗体)、39A11/57G8(h/mB7-H4 IgV结构域结合抗体)和9D11/68F5(h/mB7-H4 IgC结构域结合抗体)是否可以恢复T细胞细胞因子分泌功能(例如,IFN γ 分泌)。

[0504] 如通过IFN γ 分泌所测量的,IgV结合抗体39A11/57G8和3F2/50A10示出了在恢复T细胞功能方面的高效力(图19)。

[0505] 实施例10:抗B7-H-4抗体杀伤肿瘤细胞

[0506] 为了测定抗B7-H4抗体3F2/50A10(hB7-H4 IgV结构域结合抗体)、39A11/57G8(h/mB7-H4 IgV结构域结合抗体)和9D11/68F5(h/mB7-H4 IgC结构域结合抗体)杀伤肿瘤细胞的能力,使用了抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)生物测定(Promega G7010/G7018)。如下进行测定:当效应细胞(例如自然杀伤细胞)的细胞表面上的Fc γ RIIIa受体与抗体(与其在例如癌细胞上的靶标结合)的Fc效应部分结合时,发生效应细胞与癌细胞的交叉连接。这导致ADCC的激活。此实验中采用的ADCC受体测定检测了ADCC途径激活中的早期步骤:通过效应细胞中的NFAT(激活的T细胞的核因子)途径的基因转录的激活。此外,测定将稳定表达Fc γ RIIIa受体的V158(高亲和力)变体和驱动萤火虫萤光素酶的表达的NFAT反应元件的工程化Jurkat细胞用作效应细胞。

[0507] 测试的所有三种抗体在杀伤SK-BR-3和MDA-MB-468细胞两者方面均是有效的(图20)。

[0508] 还使用IncuCyte®免疫细胞杀伤测定评估了肿瘤细胞杀伤。为此,建立了SKBR3/hPBMC共培养模型用于分析ADCC。

[0509] IgV结构域结合抗体3F2/50A10和39A11/57G8(而不是阴性对照抗体DP47)当与hPBMC混合时在杀伤SK-BR-3癌细胞方面是有效的(图21)。

[0510] 实施例11:选定的抗B7-H4抗体的结合特性

[0511] 测定了抗B7-H4抗体3F2/50A10 (hB7-H4 IgV结构域结合抗体)、39A11/57G8 (h/mB7-H4 IgV结构域结合抗体)和9D11/68F5 (h/mB7-H4 IgC结构域结合抗体)的抗原结合动力学(表11和表12)。将这些实验作为和上文所述的Biacore分析分开的实验进行。

表11. 抗体39A11及其衍生物的结合特性。Ab1是B7-H4 IgV结构域结合抗体FPA150 (Five Prime)。Ab2是B7-H4 IgC结构域结合抗体6H3 (Medimmune)。

抗体(VH/VL)	EC50, nM		与hB7-H4结合的动力学		
	SK-BR-3	hB7-H4	K _a	K _d	K _D
3F2/50A10	1.18	0.082	8.67E+06	3.93E-04	4.54E-11
9D11/68F5	3.53	0.105	7.20E+04	2.13E-04	2.96E-09
39A11/57G8	2.82	0.060	9.18E+05	1.40E-04	1.52E-10
(+)对照Ab1	2.64	0.106	5.33E+05	2.66E-04	4.99E-10
(+)对照Ab2	3.37	0.222	2.04E+05	1.28E-04	6.26E-10

表12. 抗体39A11及其衍生物的结合特性。Ab1是B7-H4 IgV结构域结合抗体FPA150 (Five Prime)。Ab2是B7-H4 IgC结构域结合抗体6H3 (Medimmune)。

抗体(VH/VL)	EC50, nM		与mB7-H4结合的动力学		
	mB7-H4/CT26	mB7-H4	K _a	K _d	K _D
3F2/50A10	ND	ND	8.67E+06	3.93E-04	4.54E-11
9D11/68F5	9.41	0.144	7.20E+04	2.13E-04	2.96E-09
39A11/57G8	7.82	0.051	9.18E+05	1.40E-04	1.52E-10
(+)对照Ab1	2.06	0.139	5.33E+05	2.66E-04	4.99E-10
(+)对照Ab2	18.36	0.289	2.04E+05	1.28E-04	6.26E-10

[0512] 实施例12:包含抗B7-H4抗体的融合蛋白的构建

[0513] 产生了一些包含抗B7-H4抗体的异二聚化C末端融合蛋白(表13)。如图1B所展示的,融合蛋白包含第一重链(从N末端到C末端包含可变区和恒定区)、第二重链(从N末端到C末端包含可变区、恒定区、IL-15R α sushi结构域和IL-15)以及两条轻链。通过将所谓的杵臼结构(CW-CSAV)突变引入抗体的Fc区实现异二聚化,这进一步稳定了异二聚体。“LS”突变(M428L/N434S)在pH 6下增强对FcRn的亲和力并且降低K_{off}速率,因此导致延长的血清半衰期。最终,IL-15中的N65S突变降低了IL-15刺激淋巴细胞增殖的能力。

表 13.融合蛋白的结构。HC1 =重链1。HC2 =重链2。WT =野生型。Ab1 是 B7-H4 IgV 结构域结合抗体 FPA150 (Five Prime)。

融合蛋白中使 用的抗体 (VH/VL)	抗原	融合蛋白			HC1			HC2			恒定区突变			LC	
		名称	SEQ ID NO	名称	SEQ ID NO	名称	SEQ ID NO	名称	SEQ ID NO	名称	SEQ ID NO	名称	SEQ ID NO	名称	SEQ ID NO
(+)对照抗体 1 (20502)	h/m B7-H4 的 IgV 结构域	20502 HC1	147	(+)Ab1/IL15	20502 HC-2	154	20502 HC-2	147	HC1	N65S	HC1: S354C, T366W; HC2: Y349C, T366S, L368A, Y407V	20502 LC	143		
39A11/57G8	h/m B7-H4 的 IgV 结构域	39A11 HC1	148	39A11/57G8-IL15 (也称为 57G8/IL15)	39A11-HC2	155	39A11-HC2	148	HC1	N65S	HC1: S354C, T366W; HC2: Y349C, T366S, L368A, Y407V	57G8 LC	144		
39A11/57G8	h/m B7-H4 的 IgV 结构域	39A11 HC1-LS	149	39A11/57G8-IL15-LS (也称为 57G8/IL15-LS)	39A11-HC2- LS	156	39A11-HC2- LS	149	HC1-LS	N65S	HC1: S354C, T366W, M428L, N434S HC2: Y349C, T366S, L368A, Y407V, M428L, N434S	57G8 LC	144		
3F2/50A10	hB7-H4 的 IgV 结 构域	3F2 HC1	150	3F2/50A10-IL15 (也称为 50A10/IL15)	3F2 HC1	157	3F2 HC1	150	3F2 HC1	N65S	HC1: S354C, T366W; HC2: Y349C, T366S, L368A, Y407V	50A10 LC	145		
3F2/50A10	hB7-H4 的 IgV 结 构域	3F2 HC1- LS	151	3F2/50A10-IL15-LS (也称为 50A10/IL15-LS)	3F2 HC2-LS	158	3F2 HC2-LS	151	3F2 HC2-LS	N65S	HC1: S354C, T366W, M428L, N434S HC2: Y349C, T366S, L368A, Y407V, M428L, N434S	50A10 LC	145		
DP47	不相关对照抗原	DP47 HC1	152	DP47/IL15	DP47 HC2	159	DP47 HC2	152	DP47 HC1	N65S	HC1: S354C, T366W; HC2: Y349C, T366S, L368A, Y407V	DP47 LC	146		
DP47	不相关对照抗原	DP47 HC1-LS	153	DP47/IL15-LS	DP47 HC2-LS	160	DP47 HC2-LS	153	DP47 HC1-LS	N65S	HC1: S354C, T366W, M428L, N434S HC2: Y349C, T366S, L368A, Y407V, M428L, N434S	DP47 LC	146		

[0514] 实施例13:包含抗B7-H4抗体的融合蛋白与可溶性B7-H4的结合

[0515] 通过Biacore和ELISA测定融合蛋白57G8/IL15和50A10/IL15与可溶性B7-H4的结

合。Biacore分析的结果示于表14中。

[0516] 像其亲本抗体,融合蛋白50A10/IL15仅与hB7-H4(IgV结构域)结合并且57G8/IL15与h/m B7-H4(IgV结构域)结合(参见表14和图22和图23)。在ELISA和Biacore两者中均未观察到抗体与融合抗体之间与可溶性B7-H4结合的显著差异。

表14. 包含抗B7-H4抗体的融合蛋白与可溶性B7-H4结合的结合亲和力(K_D [M])。 (+)Ab1=B7-H4 IgV结构域结合抗体FPA150(Five Prime)。

	(+) Ab1	(+) Ab/IL15	39A11/57G8	57G8/IL15	3F2/50A10	50A10/IL15
抗体	✓		✓		✓	
融合蛋白		✓		✓		✓
hB7-H4 Fc	4.50E-10	6.47E-10	1.07E-10	2.19E-10	4.33E-11	1.01E-10
hB7-H4 his	1.10E-10	1.80E-10	3.55E-11	4.54E-11	1.55E-11	2.59E-11
mB7-H4 Fc	5.09E-10	7.61E-10	5.18E-11	1.07E-10	不结合	

[0517] 实施例14: 包含抗B7-H4抗体的融合蛋白与细胞表达的B7-H4的结合

[0518] 使用FACS评估了融合蛋白与细胞表达的B7-H4的结合。抗体3F2/50A10和融合蛋白3F2/50A10与SK-BR-3上表达的人B7-H4结合(图24A和图24C)。抗体39A11/57G8和融合蛋白57G8/IL15与分别在SK-BR-3和mB7-H4-CT26上表达的人和小鼠B7-H4结合(图24B和图24D)。

[0519] 抗体39A11/57G8和3F2/50A10两者均与三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-468和三阴性乳腺癌细胞系MX-1上表达的B7-H4结合(图25和表15)。包含39A11/57G8或3F2/50A10的IL-15融合蛋白还分别以与它们各自的亲本单特异性抗体相似的亲和力与MDA-MB-468和MX-1上表达的B7-H4结合(图25和表15)。

表15. 指示的抗体和融合蛋白与MDA-MB-468和MX-1细胞上表达的B7-H4结合的EC50值。

	39A11/57G8	3F2/50A10	57G8/IL-15	50A10/IL-15
抗体	✓	✓		
融合蛋白			✓	✓
MDA-MB-468 EC50 [nM]	13.07	0.416	29.63	0.398
MX-1细胞 EC50 [nM]	8.87	0.120	24.79	0.162

[0520] 实施例15: 包含抗B7-H4抗体的融合蛋白在肿瘤细胞/hPBMC共培养模型中杀伤肿瘤细胞

[0521] 使用IncuCyte®免疫细胞杀伤测定评估了包含抗B7-H-4抗体的融合蛋白杀伤肿瘤细胞的能力。为此,建立了SKBR3/hPBMC共培养模型或MDA-MB-468/hPBMC共培养模型用于分析ADCC。以较低的效应细胞和靶细胞比率(5:1)测试了肿瘤细胞杀伤;通过IncuCyte监测细胞生长长达96小时。

[0522] 融合蛋白57G8/IL15和50A10/IL15融合物分别示出了比它们的亲本抗体39A11/57G8和3F2/50A10更强的杀伤。融合蛋白50A10/IL15和57G8/IL15融合物示出了比非靶向的融合物DP47/IL15更强的杀伤(图26)。

[0523] 在分别用融合蛋白57G8/IL15或50A10/IL15处理7天后,大多数MDA-MB-468细胞被杀伤(图26E)。

[0524] 实施例16: 包含抗B7-H4抗体的融合蛋白对hPBMC增殖的作用

[0525] 测定了抗体39A11/57G8和3F2/50A10以及融合蛋白57G8/IL15和50A10/IL15对hPBMC增殖的作用。将抗体DP47和包含DP47的IL-15融合蛋白用作对照。所有融合物均显示了在不表达B7-H4的人PBMC中诱导淋巴细胞增殖的相似的能力(图27A)。CD8⁺T细胞扩增多于CD4⁺T细胞(图27B和图27C)。

[0526] 实施例17:包含抗B7-H4抗体的融合蛋白激活STAT5信号传导途径

[0527] 检查了融合蛋白57G8/IL15和50A10/IL115通过IL-2受体激活p-STAT5信号途径的能力。将包含DP47的IL-15融合蛋白用作对照。所有融合物均展现了激活IL-2R β γ 下游的STAT5途径的相似效力(图28)。

[0528] 实施例18:在Promega生物测定中包含抗B7-H4抗体的融合蛋白杀伤肿瘤细胞

[0529] 使用抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)生物测定(Promega)评估了融合蛋白57G8/IL15和50A10/IL115杀伤肿瘤细胞的能力。

[0530] 抗体39A11/57G8和3F2/50A10以及融合蛋白57G8/IL15和50A10/IL15引发SK-Br-3和MDA-MB-468细胞的B7-H4介导的ADCC(图29)。在MDA-MB-468细胞中,由于抗体与MDA-MB-468细胞上表达的B7-H4的增加的结合,3F2/50A10和50A10/IL-15显示了比39A11/57G8和57G8/IL-15更强的ADCC功能。

[0531] 实施例19:融合蛋白(包含抗B7-H4抗体和LS突变)与可溶性B7-H4的结合

[0532] 抗体的恒定区中的“LS”突变(M428L/N434S)在pH 6下增强对FcRn的亲合力并且降低K_{off}速率,因此导致延长的血清半衰期。

[0533] 融合蛋白57G8/IL-15、57G8/IL-15_LS、50A10/IL-15和50A10/IL-15_LS与可溶性人B7-H4Fc和人B7-H4his结合。未观察到这四种融合蛋白在结合方面的差异(图30A和图30C)。仅融合蛋白57G8/IL-15和57G8/IL-15_LS与可溶性小鼠B7-H4Fc和小鼠B7-H4his结合。未观察到57G8/IL-15_LS和57G8/IL-15在结合方面的差异(图30B和图30D)。

[0534] 实施例20:融合蛋白(包含抗B7-H4抗体和LS突变)与细胞表达的B7-H4的结合

[0535] 使用FACS评估了融合蛋白与细胞表达的B7-H4的结合。

[0536] 融合蛋白57G8/IL-15、57G8/IL-15_LS、50A10/IL-15和50A10/IL-15_LS均与人肿瘤细胞表达的B7-H4结合。融合蛋白50A10/IL-15和50A10/IL-15_LS显示了比融合蛋白57G8/IL-15或57G8/IL-15_LS更强的与SK-BR-3细胞的结合(图31A)。融合蛋白57G8/IL-15和57G8/IL-15_LS与在鼠肿瘤细胞系CT-26中转染的小鼠B7-H4结合(图31B)。未观察到57G8/IL-15_LS与57G8/IL-15相比或50A10/IL-15_LS于50A10/IL-15相比在结合方面的差异(图31)。

[0537] 实施例21:融合蛋白(包含抗B7-H4抗体和LS突变)诱导IL-2依赖性M07e细胞增殖的能力

[0538] 测定了融合蛋白57G8/IL-15、57G8/IL-15_LS、50A10/IL-15和50A10/IL-15_LS诱导IL-2依赖性M07e细胞增殖的能力。所有融合物均能诱导M07e细胞增殖(图32)。

[0100] 序列

表16. 与人B7H4的IgV结构域结合的抗体(3F2和衍生物)

类型	3F2	类型	3F2	49A2	50A10	3F2 CDR基序
	SEQ ID NO:		SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	
VH	15	VL	19	65	69	
CDR1H	16	CDR1L	20	66	70	73
CDR2H	17	CDR2L	21	67	71	74

CDR3H	18	CDR3L	22	68	72	75
-------	----	-------	----	----	----	----

表17. 与人B7H4的IgV结构域结合的抗体 (1D3和衍生物)

类型	1D3	类型	1D3	45A2	47B2	1D3 CDR基序
	SEQ ID NO:		SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	
VH	3	VL	7	76	80	
CDR1H	4	CDR1L	8	77	81	84
CDR2H	5	CDR2L	9	78	82	85
CDR3H	6	CDR3L	10	79	83	86

表18. 与人和鼠hB7-H4的IgC结构域结合的抗体 (9D11和衍生物)

类型	9D11	类型	9D11	67E12	67C6	67C3	67G3	67H9	68F5	9D11 CDR基序
	SEQ ID NO:		SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	
VH	45	VL	49	87	91	95	99	103	107	
CDR1H	46	CDR1L	50	88	92	96	100	104	108	111
CDR2H	47	CDR2L	51	89	93	97	101	105	109	112
CDR3H	48	CDR3L	52	90	94	98	102	106	110	113

表19. 与人和鼠hB7-H4的IgV结构域结合的抗体 (39A11和衍生物)

类型	39A11	类型	39A11	57H3	57G8	56A9	56H7	62F9	39A11 CDR基序
	SEQ ID NO:		SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	
VH	57	VL	61	114	118	122	126	130	
CDR1H	58	CDR1L	62	115	119	123	127	131	134
CDR2H	59	CDR2L	63	116	120	124	128	132	135
CDR3H	60	CDR3L	64	117	121	125	129	133	136

表 20. 抗体序列。

抗体	描述	SEQ ID NO:	序列
与人 B7H4 的 IgV 结构域结合的抗体			
1A12	VH	1	EVQLLESGGGLVFRPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMHWVROAPGKGLHWAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARGHWDAEDI WGQGTLLTVSS
1A12	VL	2	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNRLNWKYQQKPKAPKLLIYLASSLQGGVFSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAISFPLTFGGGTKVEI K
ID3	VH	3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GF TFNT HAMH WVROAPGKGLHWVSAI SGSGG STYYADSVKGRFTISRDI SKNTLYLQ MNSLR AEDTAVYYCARLLGRFGEY GMDVWGQGT TVTVSS
ID3	CDR1H	4	GFNT HAMH
ID3	CDR2H	5	AISGGSTYYADSVRG
ID3	CDR3H	6	LLGRFGEY GMDV
ID3	VL	7	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC RASRSIYTWL AWYQQKPKAPKLLIYDA STLQ SGVFSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQS Y STPYT FGGGTKVEI K
ID3	CDR1L	8	RASRSIY TWLA
ID3	CDR2L	9	STL QS
ID3	CDR3L	10	QQS Y STPYT
1F11	VH	11	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCRASGDTFTTYQIHWVROAPGQGLEWMMGGIMPIFGTTKYAQNFQGRVITTADEST STAYMELSSLR SED TAVYYCARRNYGMDVW GQGTLLTVSS
1F11	VL	12	DIYMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYRFPVKNFLAWYQQKFGQPPKLLIYWASTRGSVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVATYFCQQ Y Y STPT TFGQ GTRVEIK
3D1	VH	13	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCRASGYSTISYAI TWVROAPGQGLEW IGGINPIFGTAKY AQK FQGRVITTADEST STAYMELSSLR SED TAVYYCARGQALLQHW GQGTLLTVSS
3D1	VL	14	DIYMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSNNKNY LAWYQQKFGQPPKLLIYWASTRES GV PDRESGSGG TDFTLTISSLQ AEDVAVYYCQQ Y Y STPT PLAFGQ

3F2	VH	15	GTRVEIK QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKKASGYTFRTAQYMYWVRQAPGGQGLEWMGRINPTSGNTVYAQKLGQRVTHTRDTSTSYVMELSSLRSEDTAVYYCARGINWFDPW GGTLVTVSS
3F2	CDR1H(EU 索引编号)	16	GYTFTAQYMY
3F2	CDR2H (EU 索引编号)	17	RINPTSGNTVYAQKLG
3F2	CDR3H(EU 索引编号)	18	GINWFDE
3F2	CDR1H(Kabat EU 索引编号)	172	AQYMY
3F2	CDR2H(Kabat EU 索引编号)	173	RINPTSGNTVYAQKLG
3F2	CDR3H(Kabat EU 索引编号)	174	GINWFDP
3F2	CDR1H (IGMT)	178	GYTFTAQY
3F2	CDR2H (IGMT)	179	INPTSGNT
3F2	CDR3H (IGMT)	180	ARGINWFDP
3F2	CDR1H(Chothia)	184	GYTFTAQ
3F2	CDR2H(Chothia)	185	PTSG
3F2	CDR3H(Chothia)	186	INWFD
3F2	VL	19	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLINWYQQRKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTITSSIQPEDEFTATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK K
3F2	CDR1L	20	RASQSISSYLIN
3F2	CDR2L	21	SSLQS
3F2	CDR3L	22	QQSYSTPLT

24F4	VH	35	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVCSCKASGYRFTGDIHWVRQAFGQGLEWMGMNPNFNSGNTGLAQKFKQGRVITITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVLGFSGGM DVMGQGTIVTVSS
24F4	VL	36	DIYMTQSPFLSLPVTGPEPASISCRSSQSLHHSNGYNLDWYLQKPKQSFLLIYAASSLRSGVDFRFSGSGSDFTLKISRVEADVGVVYCMQGTHWPFYFGQ TKLEIK
30G4	VH	37	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVCSCKASGYTFSYTMHWVRQAFGQGLEWMGMNPNFNSGDTGYAQKFKQGRVITMTRDTSTSTVYMEELSSLRSEDTAVYYCARVPEYGGMD VMGQGTIVTVSS
30G4	VL	38	DIYMTQSPFLSLPVTGPEPASISCRSSQSLHHSNGYNLDWYLQKPKQSFLLIYGASSLHSGVDFRFSGSGSDFTLKISRVEADVGVVYCMQGTHWPFYFGQ TKVEIK
5E4	VH	39	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVCSCKASGYTFTSYDINWVRQAFGQGLEWMGMNPNFNSGNTGYAQKFKQGRVITMTRDTSTSTVYMEELSSLRSEDTAVYYCARGELWYGF DYIYYGMDVMGQGTIVTVSS
5E4	VL	40	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYGASSLQSGVFSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQADRIFFTFRGRGPKVEI K
5F4	VH	41	EVQLLESGGGLVFKPGSLRSLCAASGFTFSYAMHWVRQAFGKGLWVAISGSGGATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARERGYSYQG IDYWGQGTIVTVSS
5F4	VL	42	DIYMTQSPFLSLPVTGPEPASISCRSSQSLHHSNGYNLDWYLQKPKQSFLLIYAASSLQSGVDFRFSGSGSDFTLKISRVEADVGVVYCMQGAHWPLTFGQ TKVEIK
5G6	VH	43	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVCSCKASGYTFSYTMHWVRQAFGQGLEWLGWVNPNTGTRFAQKFKQGRVITMTRDTSTSTVYMEELSSLRSEDTAVYYCARDANYYGM DVMGQGTIVTVSS
5G6	VL	44	DIYMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLYSNNKRYLAWYQQKPKQLIYWASTRESVDFRFSGSGSDFTLTISLQAEADVATYYCQKYNLSALEFITFG QGTRLEIK
9D11	VH	45	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVCSCKASGYTFSYISWVRQAFGQGLEWVGVINPNGGTTTAAQTFQGRVITMTRDTSTSTVYMEELSSLRSEDTAVYYCAR FGYSSGWA FDY WGRGTLIVTVSS
9D11	CDR1H	46	GYTFTSYGIS
9D11	CDR2H	47	VINPNGGTTTAAQTFQ
9D11	CDR3H	48	TGYSSGWAIFY
9D11	VL	49	DIYMTQSPDLSAVSLGERATIN CKSSQSVLYSSNNKRYLAWYQQKPKQLIYWASTRESVDFRFSGSGSDFTLTISLQAEADVATYYCQYFTFPFGQ

9D11	CDR1L	50	TRVEIK KSSQSVLYSSNNRNYLA
9D11	CDR2L	51	STRES
9D11	CDR3L	52	QQYFSTFS
9E1	VH	53	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKRASGYTFGTYYLHWVRQAFGQGLEWMGWINENSGGTNSAQRFAQGRVTMTRDTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARVRYEGGM DWWGQGTIVTVSS
9E1	VL	54	DIVMTQSPFSLPVTPEGPASISCRSSQSLIHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGSDTFTLKISRVEAEDVGVYCMQSSHWPPFTFGQG TRLEIK
与人鼠 hB7-H4 的 IgV 结构域结合的抗体			
31D7	VH	55	EVQLLESGGGLVQPGGSRRLSCHAASGFTFSSYGMHWVRQAFPGKLEWSSISSSSSIIYYADSVKGRFTISRDNKNTLIYLNINSLRRAEDTAVYYCARLGGSGSLD YWGQGTIVTVSS
31D7	VL	56	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYAASLQSGVSRFSGSGSDTFTLTSSLPEDFAFYCOQSYTIFTFGQTRLEI K
39A11	VH	57	EVQLLESGGGLVQPGGSRRLSCHAASGFTFSSYGMHWVRQAFPGKLEWVA SISSSGYIYYADSVKGRFTISRDNKNTLIYLNINSLRRAEDTAVYYCARASSGMDVW GQGTIVTVSS
39A11	CDR1H	58	GFTFSSYGMH
39A11	CDR2H	59	SISSSGYIYYADSVRG
39A11	CDR3H	60	ASSGMDV
39A11	VL	61	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQ TIRSYLN WYQQKPKAPKLLIYAAS HLQ SGVSRFSGSGSDTFTLTSSLPEDFAFY COQSYTTPYTF FGQTRLEI K
39A11	CDR1L	62	RASQ TIRSYLN
39A11	CDR2L	63	SHLQ S
39A11	CDR3L	64	COQSY TTPYT
与 hB7-H4 结合的抗体：3F2 衍生物			
49A2	VL	65	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQ NI DT VY NWYQQKPKAPKLLIYAAS RLHT VP S RFSGSGSDTFTLTSSLPEDFAFY COQSYTSPFT FGGTRVEIK

49A2	CDR1L	66	RASQNIIDTYVN
49A2	CDR2L	67	SRLHT
49A2	CDR3L	68	QQSYTSFFT
50A10	VL	69	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC QASQDISNYIN WYQQKPKAKPKLLIYAA SRLQSGVFSRFS SGSGGTDFTLTITSSIQPEDEFAIYYC QQSYRSPT FGGTFKLEI K
50A10	CDR1L(EU 索引编号)	70	QASQDISNYIN
50A10	CDR2L (EU 索引编号)	71	SRLQS
50A10	CDR3L(EU 索引编号)	72	QQSYRSFFT
50A10	CDR1L(Kabat EU 索引编号)	175	SQDISNY
50A10	CDR2L(Kabat EU 索引编号)	176	AAS
50A10	CDR3L(Kabat EU 索引编号)	177	SYRSPF
50A10	CDR1L (IGMT)	181	SQDISNY
50A10	CDR2L (IGMT)	182	AAS
50A10	CDR3L (IGMT)	183	SYRSPF
50A10	CDR1L(Chothia)	187	QASQDISNYIN
50A10	CDR2L(Chothia)	188	AASRLQS
50A10	CDR3L(Chothia)	189	QQSYRSFFT
3F2 CDR 基序	CDR1L	73	X ₁ ASQX ₂ LX ₃ YX ₄ N 其中： X ₁ 是 R 或 Q

			<p>X₂ 是 D、N 或 S X₃ 是 D 或 S X₄ 是 N、S 或 T X₅ 是 I、L 或 V</p>
3F2 CDR 基序	CDR2L	74	<p>SX₆LX₇X₈ 其中: X₆ 是 R 或 S X₇ 是 H 或 Q X₈ 是 S 或 T</p>
3F2 CDR 基序	CDR3L	75	<p>QQSYX₉X₁₀PX₁₁T 其中: X₉ 是 R、S 或 T X₁₀ 是 S 或 T X₁₁ 是 F 或 L</p>
与 hB7-H4 结合的抗体: ID3 衍生物			
45A2	VL	76	<p>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQNIYTWLA^{WT}YQQRFGKAPKLLIYD^{ATN}LPTGVF^{SR}FSGGSGTDF^{LT}ITSS^{LQ}PE^{DF}FAT^{YYC}QQSYSTRWT^{FGGGTK}VEI K</p>
45A2	CDR1L	77	RASQNIYTWLA
45A2	CDR2L	78	TNLLPT
45A2	CDR3L	79	QQSYSTRWT
47B2	VL	80	<p>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQNIYTWLA^{WT}YQQRFGKAPKLLIYD^{ATN}LPTGVF^{SR}FSGGSGTDF^{LT}ITSS^{LQ}PE^{DF}FAT^{YYC}QQSYSTRWT^{FGGGTK}VEI K</p>
47B2	CDR1L	81	RASQIVYTWLA
47B2	CDR2L	82	TNLLAT
47B2	CDR3L	83	QQSYSTRWT
ID3 CDR 基序	CDR1L	84	RASX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ YTWLA

			其中： X ₁₂ 是 Q 或 R X ₁₃ 是 N、S 或 T X ₁₄ 是 I 或 V
1D3 CDR 基序	CDR2L	85	X ₁₅ X ₁₆ LX ₁₇ X ₁₈ 其中： X ₁₅ 是 S 或 T X ₁₆ 是 N 或 T X ₁₇ 是 A、P 或 Q X ₁₈ 是 S 或 T
1D3 CDR 基序	CDR3L	86	QQSYSTX ₁₉ X ₂₀ T 其中： X ₁₉ 是 P、R 或 S X ₂₀ 是 W 或 Y
与人和鼠 hB7-H4 的 IgC 结构域结合的抗体：9D11 衍生物			
67E12	VL	87	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC KSSQSVLYSSNNKNYLA WYQOKRGQPKLLIYW SKRVS GVPDFRSGSGSGTDFLTITSSLQAEEDVAVYYC QQYFDSPTFGQG TKVEIK
67E12	CDR1L	88	KSSQSVLYSSNNKNYLA
67E12	CDR2L	89	SKRVS
67E12	CDR3L	90	QQYFDSFT
67C6	VL	91	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC KSSQSVLYSSNNKNYLA WYQOKRGQPKLLIYW STRQS GVPDFRSGSGSGTDFLTITSSLQAEEDVAVYYC QQYISDPTFGQG TKVEIK
67C6	CDR1L	92	KSSQSVLYSSNNKNYLA
67C6	CDR2L	93	STRQS
67C6	CDR3L	94	QQYISDPT
67C3	VL	95	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC KSSQSVLYSSNNKNYLA WYQOKRGQPKLLIYW STRAS GVPDFRSGSGSGTDFLTITSSLQAEEDVAVYYC QQYIDTPTFGQG

67C3	CDR1L	96	TKVEIK KSSQSVLYSSNNKNYLA
67C3	CDR2L	97	STRAS
67C3	CDR3L	98	QQYYDTFT
67G3	VL	99	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC KSSQSVLYSSNNKNYLA YQOKRGQPKLLIYW STRQS GVPDFRSGSGSGTDFTLTISSLQAEADVAVYYC QQYTSPTFGQG TKVEIK
67G3	CDR1L	100	KSSQSVLYSSNNKNYLA
67G3	CDR2L	101	STRQS
67G3	CDR3L	102	QQYTSPT
67H9	VL	103	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC RSSQSVLYSSNNKNYLA YQOKRGQPKLLIYW SNRKS GVPDFRSGSGSGTDFTLTISSLQAEADVAVYYC QQYTSPTFGQG TKVEIK
67H9	CDR1L	104	RSSQSVLYSSNNKNYLA
67H9	CDR2L	105	SNRKS
67H9	CDR3L	106	QQYTSPT
68F5	VL	107	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC KSSRSVLSRSSNNKNYLA YQOKRGQPKLLIYW STRQF GVPDFRSGSGSGTDFTLTISSLQAEADVAVYYC QQYDTPTFGQG TKVEIK
68F5	CDR1L	108	KSSRSVLSRSSNNKNYLA
68F5	CDR2L	109	STRQF
68F5	CDR3L	110	QQYDTPT
9D11 CDR 基序	CDR1L	111	X ₂₁ SSX ₂₂ SVLX ₂₃ X ₂₄ SNNNKNYLA 其中： X ₂₁ 是 K 或 R X ₂₂ 是 Q 或 R X ₂₃ 是 S 或 Y X ₂₄ 是 R 或 S
9D11 CDR 基序	CDR2L	112	SX ₂₅ FX ₂₆ X ₂₇ ，其中：

9D11 CDR 基序	CDR3L	113	<p>X₂₅ 是 K、N、T X₂₆ 是 A、E、K、Q 或 V X₂₇ 是 F 或 S</p> <p>QQYX₂₈X₂₉X₃₀PX₃₁ 其中： X₂₈ 是 F 或 Y X₂₉ 是 D、S 或 T X₃₀ 是 A、D、S 或 T X₃₁ 是 S 或 T</p>
与人和鼠 hB7-H4 的 IgV 结构域结合的抗体：39A11 衍生物			
57H3	VL	114	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITTCQA SQDIRKYL NWYQOKPKGKAPKLLIYAA STRES GVFSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYTS LP LT FGGGTKLEI K
57H3	CDR1L	115	QASQDIRKYLIN
57H3	CDR2L	116	STRES
57H3	CDR3L	117	QQYTSLELT
57G8	VL	118	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITTC RASQSI RSYLINWYQOKPKGKAPKLLIYAA SSLQ SGVFSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYTS LP LT FGGGTKVEI K
57G8	CDR1L	119	RASQSI RSYLIN
57G8	CDR2L	120	SSLQS
57G8	CDR3L	121	QQYTSLELT
56A9	VL	122	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITTC RASQSI SSYLINWYQOKPKGKAPKLLIYAA SIRE SGVFSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYTT LP LT FGGGTKLEI K
56A9	CDR1L	123	RASQSISSYLIN
56A9	CDR2L	124	SIRE S
56A9	CDR3L	125	QQYTTLELT
56H7	VL	126	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITTC RASQSI SSYLINWYQOKPKGKAPKLLIYAA SNLQ SGVFSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYTT LP LT FGGGTKLEI

				K
56H7	CDR1L	127	RASQSISSYLIN	
56H7	CDR2L	128	SNLQS	
56H7	CDR3L	129	QQYTTPLT	
62F9	VL	130	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSVSSAVAVMTQQKFGKAPKLLIYAA SIRE SGVFSRFSGSGGTDFLTITISSIQPEDFATYYC QQY STPLT FGG TKLEI K	
62F9	CDR1L	131	RASQSVSSAVA	
62F9	CDR2L	132	SIRE	
62F9	CDR3L	133	QQYTTPLT	
39A11 CDR 基序	CDR1L	134	X ₃₂ ASQX ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ 其中： X ₃₂ 是 Q 或 R X ₃₃ 是 D、S 或 T X ₃₄ 是 I 或 V X ₃₅ 是 R 或 S X ₃₆ 是 K 或 S X ₃₇ 是 A 或 Y X ₃₈ 是 L 或 V X ₃₉ 是 A 或 N	
39A11 CDR 基序	CDR2L	135	SX ₄₀ X ₄₁ X ₄₂ S 其中： X ₄₀ 是 H、I、N、S 或 T X ₄₁ 是 L 或 R X ₄₂ 是 E 或 Q	
39A11 CDR 基序	CDR3L	136	QQX ₄₃ YX ₄₄ X ₄₅ FX ₄₆ T 其中：	

					<p>X₄₃是 S 或 Y X₄₄是 S 或 T X₄₅是 L 或 T X₄₆是 L 或 Y</p>
对照抗体					
对照抗体 1 (US20190085080A1 中所述的抗体 20502)	VH	137			<p>QLQLQESGPGLVKRPSETLSLTCVTVSGGSIKSGSYWGWIRQPPGKGLWIGNIYYSGSTYINPESLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTPAADTAVYYCAREGSSYENQ FDEWGQGTLVTVSS</p>
对照抗体 1 (US20190085080A1 中所述的抗体 20502)	VL	138			<p>EIVYNTQSPATLVSFGERATLSCRASQSVSNLAWYQQKPKGQAPRLLIYGASTRAITGI PARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYHSFFFTFGGGTKVEI K</p>
对照抗体 2 (US9,574,000 中所述的抗体 6H3)	VH	139			<p>EVQLQQSGGFLVLRPGTSVKRMSCKASGYTFDYTMNWKQSHGKSLLEWIGVINPYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMEVNSLTFEDSAVYYCARYPESTYWG QGTLVTVSA</p>
对照抗体 2 (US9,574,000 中所述的抗体 6H3)	VL	140			<p>DVVNTQTPLSLFVSLGDSISCRSSQSLVHINGNTYLHWYLQKPKGSEKVLIIKVSNRFSGVDFRFSGSGSGTFTLKLSRVEADLGVIYFCSSQSTHVLPTFGAG TKLELK</p>
DP47	VH	141			<p>EVQLLEGGGLVQPGGSLRLSCLCAASGFTFSYAMSWVRQAPFGKLEWSAISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRADDTAVYYCAKGGGFDYWG QGTLVTVSS</p>
DP47	VL	142			<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPKGQAPRLLIYGASSTRATGIPDRFSGSGSGTFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSTLFTFGQTKVE IK</p>

表 21.融合蛋白序列。

融合蛋白	VH		VL		HC1		HC2		LC	
	名称	SEQ ID NO	名称	SEQ ID NO	名称	SEQ ID NO	名称	SEQ ID NO	名称	SEQ ID NO
(+) Ab1/IL15	20502 VH	137	20502 VL	138	20502 HC1	147	20502 HC-2	154	20502 LC	143
39A11/57G8-IL15 (也称为 57G8/IL15)	39A11 VH	57	57G8 VL	118	39A11 HC1	148	39A11-HC2	155	57G8 LC	144
39A11/57G8-IL15-LS (也称为 57G8/IL15-LS)	39A11 VH	57	57G8 VL	118	39A11 HC1-LS	149	39A11-HC2-LS	156	57G8 LC	144
3F2/50A10-IL15 (也称为 50A10/IL15)	3F2 VH	15	50A10 VL	69	3F2 HC1	150	3F2 HC1	157	50A10 LC	145
3F2/50A10-IL15-LS (也称为 50A10/IL15-LS)	3F2 VH	15	50A10 VL	69	3F2 HC1-LS	151	3F2 HC2-LS	158	50A10 LC	145
DP47/IL15	DP47 VH	141	DP47 VL	142	DP47 HC1	152	DP47 HC2	159	DP47 LC	146
DP47/IL15-LS	DP47 VH	141	DP47 VL	142	DP47 HC1-LS	153	DP47 HC2-LS	160	DP47 LC	146

表 22.融合蛋白序列。

描述	用于以下融合蛋白中	类型	注释	SEQ ID NO:	序列
20502 LC(对照抗体1)	(+) Ab1/IL15	LC	20502 VL	143	EI VMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAMYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARF SGSGSGTEFTLTISSLQSEDEFAVYYCQQYHSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
57G8 LC	39A11/57G8-IL15 以及	LC	57G8 VL	144	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQSIIRSYLNMYQQKPKAPKLLIYYASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFLTITISSLQPEDFATYCCQQYYSYPLTFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ

<p>39A11/57G8-IL15-LS</p>	<p>LC</p>	<p>50A10 VL</p>	<p>145</p>	<p>LKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>50A10 LC</p>	<p>LC</p>	<p>50A10 VL</p>	<p>145</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGRVVTITCQASQDISNYINMYQQKPKAPKLLIYAASRLQSGVPSRF SGSGSGTDFLTISLQPEDEFATYYCQSYRSPFTEGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>DP47 LC</p>	<p>LC</p>	<p>DP 47 VL</p>	<p>146</p>	<p>EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSYSSSYLAMYQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDR FSGSGGTDFLTISRLEPEDEFAVYCCQYGGSSPLTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>20502 HCl</p>	<p>HCl</p>	<p>20502 VH</p>	<p>147</p>	<p>QLQLQESGFLVQKPSFTLSLCTVSGGSIKSGSYWGWIRQPPGKGLEWIGNIYYSGSTYYN PSLRSRVTISVDTSKQFSLKLSVTAADTAVYYCAREGSPYFNQDFPMGQGLVTVSSASTK GPSVFPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCTPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVAVDVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKREEQYNSYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYVTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQQGNVFCVSMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>39A11 HCl</p>	<p>HCl</p>	<p>39A11 VH</p>	<p>148</p>	<p>EIVQLLESGGGLVQPGSSRLSLCAASGFTFSSYGMHWVYRQAPGKGLEWVASISSSSGYIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARASSGMDVWGQGTFTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVT VPSSSLGTQYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCTPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVAVDVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYVTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDLAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQQGNVFCVSMHEALHNNH YTQKSLSLSPGK</p>

39A11 HCl-LS	39A11/57G8-IL15-LS	HCl	<u>39A11 VH</u> LS 突变	149	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLLEWVAS ISSSSGYIYAD SVKGRFTISRDN SKNTIYLQMN SLRAEDTAVYYCARASSGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTTFAVLQSSGLYSLSVVT VPSSSLGTQYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLITVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHSH YTQKSLSLSPGK
3F2 HCl	3F2/50A10-IL15	HCl	<u>3F2 VH</u>	150	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFDAQYMYVWVRQAPGQGLEWMGRINFTSGNTVYAQ KLGGRVTMTRDTSSTVYME LSSLRSEDTAVYICARGINWFDPMWGQGTLLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTTFAVLQSSGLYSLSVVT VPSSSLGTQYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLITVDKSRWQQGNVFCSVMHEALHSH YTQKSLSLSPGK
3F2 HCl-LS	3F2/50A10-IL15-LS	HCl	<u>3F2 VH</u> LS 突变	151	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFDAQYMYVWVRQAPGQGLEWMGRINFTSGNTVYAQ KLGGRVTMTRDTSSTVYME LSSLRSEDTAVYICARGINWFDPMWGQGTLLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTTFAVLQSSGLYSLSVVT VPSSSLGTQYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLITVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHSH YTQKSLSLSPGK
DP47 HCl	DP47/IL15	HCl		152	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLLEWVAS ISSGGSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTIYLQMN SLRAEDTAVYYCAKSGGFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV

DP47 HC1-LS	DP47/IL15-LS	HC1	LS 突变	153	<p>P LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYCKKVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK</p> <p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLVWVSAISGGSGGSIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAKGSFGFDYWGQGTFLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYCKKVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK</p>
20502 HC-2	(+) Ab1/IL15	HC2	20502 VH <i>IL-15Ra sushii 结构域</i> 接头 IL-15	154	<p>QLQLQESGEGELVLPSEFTLSLCTVYSGGSIKSGSYWGWIRQPPGKGLEWIGNIYYSGSTYYN P SLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAIYYCAREGSEYFNQDFWGGQGLVTVVSSASTK GPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHHTFPVAVLQSSGLYSLS SVVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNSTYRVVSVLT VLHQDWLNKKEYCKKVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGCPPPMSVEHADITWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTCEVLN KATNVVAHMTTFSLKCTIRDPAALVHQRPA P SGGSGGGGGGGGGGGSLQNVNVI S DLKKIE DLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVLSLESGDASHTDVTESIILANNLSLS SNGNVTESGKCECELEKEKNIKEFLQSEVHIYQMFINTS</p>
39A11-HC2	39A11/57G8-IL15	HC2	39A11 VH	155	<p>EYQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLVWVSAISGGSGIYYAD</p>

	<p><u>IL-15Ra sushi 结构域</u> 接头 IL-15</p>		<p>融合物</p>	<p>39A11/57G8-IL15-LS 融合物</p>	<p>39A11-HC2-LS</p>	<p>SYKGRFTIISRDNSKNTLYLQANSLRAEDTAVYICARASSGMDVWGQGTTVTVYSASATKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQYIICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQOGNVFSCSMHEALHNH YTKQKLSLSFGSCPPPEMSVEHADIMVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAAGTSSLTTECVLNKATN VAHWITPSLAKCIRDPALVHQRPAPPSSGGSGGGGGGGSLQNWNVISDLKKIEDLIQ SMHIDATLYTESDVEHPCKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTVESLIILANNSLSSNGN VTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</p>
<p>39A11 VH LS 突变 <u>IL-15Ra sushi 结构域</u> 接头 IL-15</p>	<p>156</p>		<p>融合物</p>	<p>39A11/57G8-IL15-LS 融合物</p>	<p>39A11-HC2</p>	<p>EVQLLESGGGLYQPGGSLRLSCAASGFTFSYCMHWYRQAPGKLEWVASISSSSSGIYYAD SYKGRFTIISRDNSKNTLYLQANSLRAEDTAVYICARASSGMDVWGQGTTVTVYSASATKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQYIICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQOGNVFSCVLHEALHSH YTKQKLSLSFGSCPPPEMSVEHADIMVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAAGTSSLTTECVLNKATN VAHWITPSLAKCIRDPALVHQRPAPPSSGGSGGGGGGGSLQNWNVISDLKKIEDLIQ SMHIDATLYTESDVEHPCKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTVESLIILANNSLSSNGN VTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</p>
<p>3F2 VH <u>IL-15Ra sushi 结构域</u> 接头 IL-15</p>	<p>157</p>		<p>融合物</p>	<p>3F2/50A10-IL15 融合物</p>	<p>3F2 HC1</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPKGASVKYSCKASGIFTTAQIMYVYRQAPGQGLEWGRINPTSGNTVYAQ KLQGRVTMTFDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYICARGINWFDPWGQGTLVTVYSASATKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQYIICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ</p>

<p>DWLNNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVLSLCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLITVDKSRWQGNVFCSCVMHEALHNH YTQKLSLSLSPGSCPPPMMSVEHADIMVKSYLSYSRERYICNSGGFKRKAAGTSSLTCVLNKATN VAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSGGSGGGGGGGGGGLQNNWVVISDLKKIEDLIQ SMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLELQVLSLESGDAS IHDITVESLI ILANNLSLSSNGN VTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</p>		<p>158</p>		<p>39A11/57G8-IL15- LS</p>	<p>3F2 HC2-LS</p>	<p>DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVLSLCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLITVDKSRWQGNVFCSCVMHEALHNH YTQKLSLSLSPGSCPPPMMSVEHADIMVKSYLSYSRERYICNSGGFKRKAAGTSSLTCVLNKATN VAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSGGSGGGGGGGGGGLQNNWVVISDLKKIEDLIQ SMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLELQVLSLESGDAS IHDITVESLI ILANNLSLSSNGN VTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</p>
<p>QVQLVQSGAEVKKPQASVKVSCKASGYTFDFAQYMTWVRQAPGGLEWMGRINP TSGNTVYIAQ KLQGRVITMTRDTSTSTFYMELSSLRSEDTAVYICARGINWFDPWGQGTLYTVYSASATKGPSPV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCTPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWVDGVFNHAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVLSLCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLITVDKSRWQGNVFCSCV LHEALHSH YTQKLSLSLSPGSCPPPMMSVEHADIMVKSYLSYSRERYICNSGGFKRKAAGTSSLTCVLNKATN VAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSGGSGGGGGGGGGGLQNNWVVISDLKKIEDLIQ SMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLELQVLSLESGDAS IHDITVESLI ILANNLSLSSNGN VTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</p>	<p>3F2 VH LS 突变 IL-15Ra sashi 结构域 接头 IL-15</p>	<p>159</p>	<p>DP47 VH IL-15Ra sashi 结构域 接头 IL-15</p>	<p>DP47/IL15</p>	<p>DP47 HC2</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGGGGSTFYAD SYKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICAKGSGFDYWGQGTLYTVYSASATKGPSPV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCTPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWVDGVFNHAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVLSLCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLITVDKSRWQGNVFCSCVMHEALHNH TQKLSLSLSPGSCPPPMMSVEHADIMVKSYLSYSRERYICNSGGFKRKAAGTSSLTCVLNKATN VAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSGGSGGGGGGGGGGLQNNWVVISDLKKIEDLIQ</p>

DP47 HC2-LS	DP47/IL15-LS	HC2	LS 突变 <i>IL-15Ra sushi 结构域</i> 接头 IL-15	160	MHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVLSLESGDASIHDTVESLIIILANSLSSNGNV TESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGTYAD SVKGRFTISRDNKNTLYIQMNSLRAEDTAVYYCAKSGSDYWGQGTITVTVSSASTKPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTTPAVLQSSGLYSLSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMSISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFLVSKLTVDKSRWQGNVFSVLEALHSHY TQKSLSLSPGS <u>CPPPMSVEHADIMVKYSYLSRERYICNSGFKRKA</u> GTSSLTFCVLNKATNV <u>AHWTTPSLK</u> CI RD PA ^L VH ^Q R ^P PA ^P PPSGSGGGGGGGGGSLQ ^N WV ^N VI ^S DL ^L KK ^I ED ^L LI ^Q S MHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVLSLESGDASIHDTVESLIIILANSLSSNGNV TESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
-------------	--------------	-----	--	-----	--

表 23.其他蛋白质序列。

蛋白质	SEQ ID NO:	序列
人 B7-H4 (NCBI 登录号: NP_078902) <u>信号肽</u> IgV <i>IgC 结构域</i> 跨膜区	161	<u>MASL</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>O</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>K</u>
鼠 B7-H4 (NCBI 登录号: Q7TSP5, Phe29-Pro258)	162	<u>MASL</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>O</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>K</u>

<p><u>信号肽</u> IgV IgC 结构域 跨膜区</p>		<p>RRS^QL^LN^SG^FS^PC^VF^T S^AF^VA^GW^AL^LS^LS^CC^LM^LR</p>
<p>IgG1 Fc (NCBI 登录号: P01857) Pro100-Lys330 未标记</p>	<p>163</p>	<p>ASTKGPVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTYVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPFSSSLGTQTYI CNYNHKPSNTKVDKVKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPETCVVYVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTRPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFFPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK</p>
<p>全长人 IL-15(NCBI 登录号: P40933) <u>成熟蛋白</u></p>	<p>164</p>	<p>MRISKPHLRSISIQYLCLLLNSHFLTEAGIHVFI LGCFSAGLPKTEANWVNVISDLK^KIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPS CKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTIVENLIILLANSSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</p>
<p>人 IL-15(成熟蛋白, 残基 N65 呈粗体)</p>	<p>165</p>	<p>NWNVISDLK^KIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTIVENLIILLANSSSNGNVTE SGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</p>
<p>人 IL-15 N65S(成熟蛋白, 残基 N65S 粗体呈)</p>	<p>166</p>	<p>NWNVISDLK^KIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTIVENLIILLANSSSNGNVTE SGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</p>
<p>IL-15Rα sushi 结构域(NCBI 登录号: EAW86418.1 的残基 33-93) 人工序列</p>	<p>167</p>	<p>CPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKR^KAGTSSLTECVLNKATNVAHWITP^SLK^C SGSGGGGGGGGGGSLQ</p>
<p>IL-15Rα sushi 结构域 + 接头 + IL-15 N65S <u>IL-15Rα sushi 结构域</u> 接头 IL-15</p>	<p>168 169</p>	<p>CPPPMSVEHADIMVKSYSLSYRERYICNSGFKR^KAGTSSLTECVLNKATNVAHWITP^SLK^CIRDPALVHQRPAPPSGGSGGG GSGGGGGGSLQNWNVISDLK^KIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDTIVENLIILLANSSSNGNVTE SGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</p>
<p>人工序列</p>	<p>170</p>	<p>IRDPALVHQRPAPPSGGSGGGGGGGGGGSLQ</p>
<p>人工序列</p>	<p>171</p>	<p>IRDPALVHQRPAPF</p>

表 24. 与人 B7H4 的 IgV 结构域结合的抗体 CDR 的例子 (3F2 和 50A10)

	CDR	EU 索引编号	EU 索引编号	Kabat EU 索引编号替代	IMGT	Chothia
3F2	CDR1H	GYTFTAQMY (SEQ ID NO: 16)	GYTFTAQMY (SEQ ID NO: 172)	AQYMY (SEQ ID NO: 172)	GYTFTAQY (SEQ ID NO: 178)	GYTFTAQ (SEQ ID NO: 184)
3F2	CDR2H	RINPTSGNTVYAQKLOQ (SEQ ID NO: 17)	RINPTSGNTVYAQKLOQ (SEQ ID NO: 173)	RINPTSGNTVYAQKLOQ (SEQ ID NO: 173)	INPTSGNT (SEQ ID NO: 179)	PTSG (SEQ ID NO: 185)
3F2	CDR3H	GINWFDP (SEQ ID NO: 18)	GINWFDP (SEQ ID NO: 174)	GINWFDP (SEQ ID NO: 174)	ARGINWFDP (SEQ ID NO: 180)	INWFD (SEQ ID NO: 186)
50A10	CDR1L	QASQDISNYIN (SEQ ID NO: 70)	SQDISNY (SEQ ID NO: 175)	SQDISNY (SEQ ID NO: 175)	SQDISNY (SEQ ID NO: 181)	QASQDISNYIN (SEQ ID NO: 187)
50A10	CDR2L	SRLQS (SEQ ID NO: 71)	AAS (SEQ ID NO: 176)	AAS (SEQ ID NO: 176)	AAS (SEQ ID NO: 182)	AASRLQS (SEQ ID NO: 188)
50A10	CDR3L	QQSYRSPFT (SEQ ID NO: 72)	SYRSPF (SEQ ID NO: 177)	SYRSPF (SEQ ID NO: 177)	SYRSPF (SEQ ID NO: 183)	QQSYRSPFT (SEQ ID NO: 189)

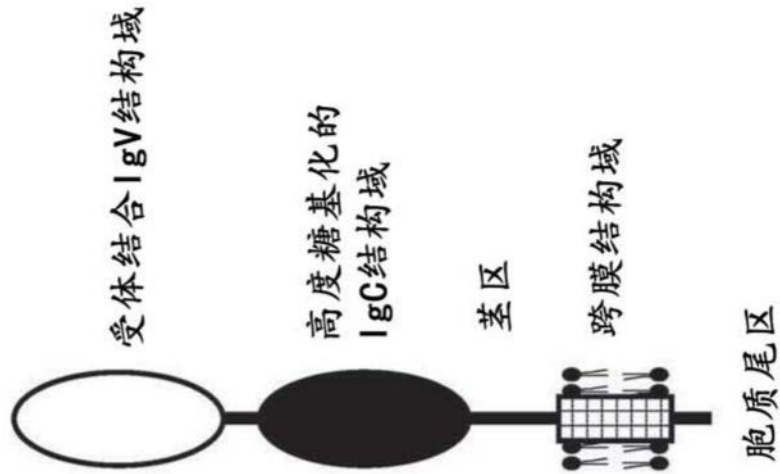


图1A

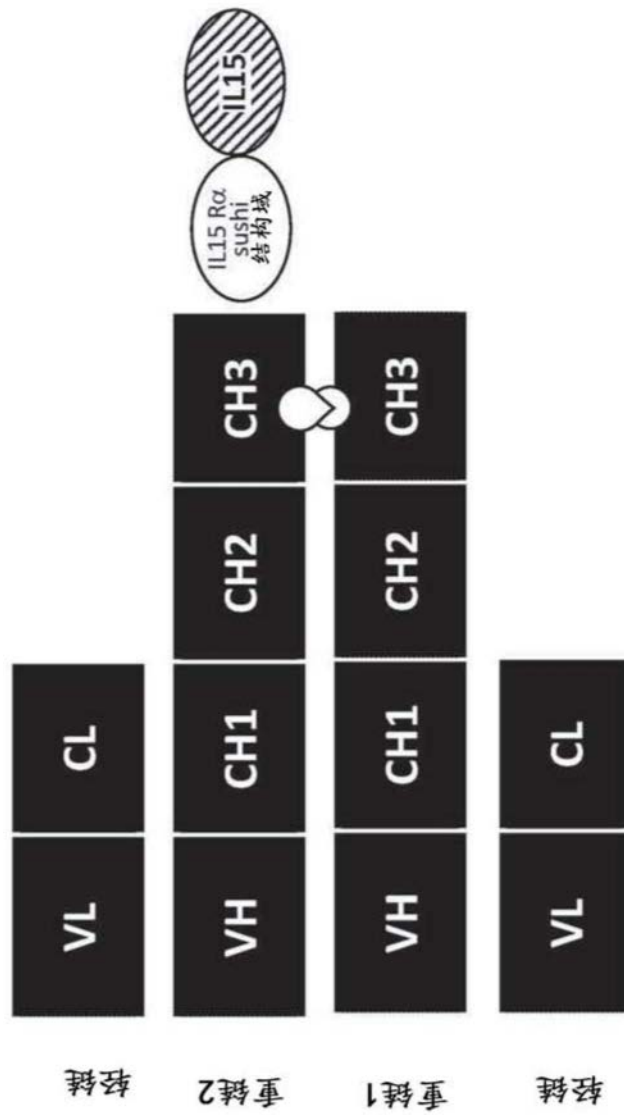


图1B

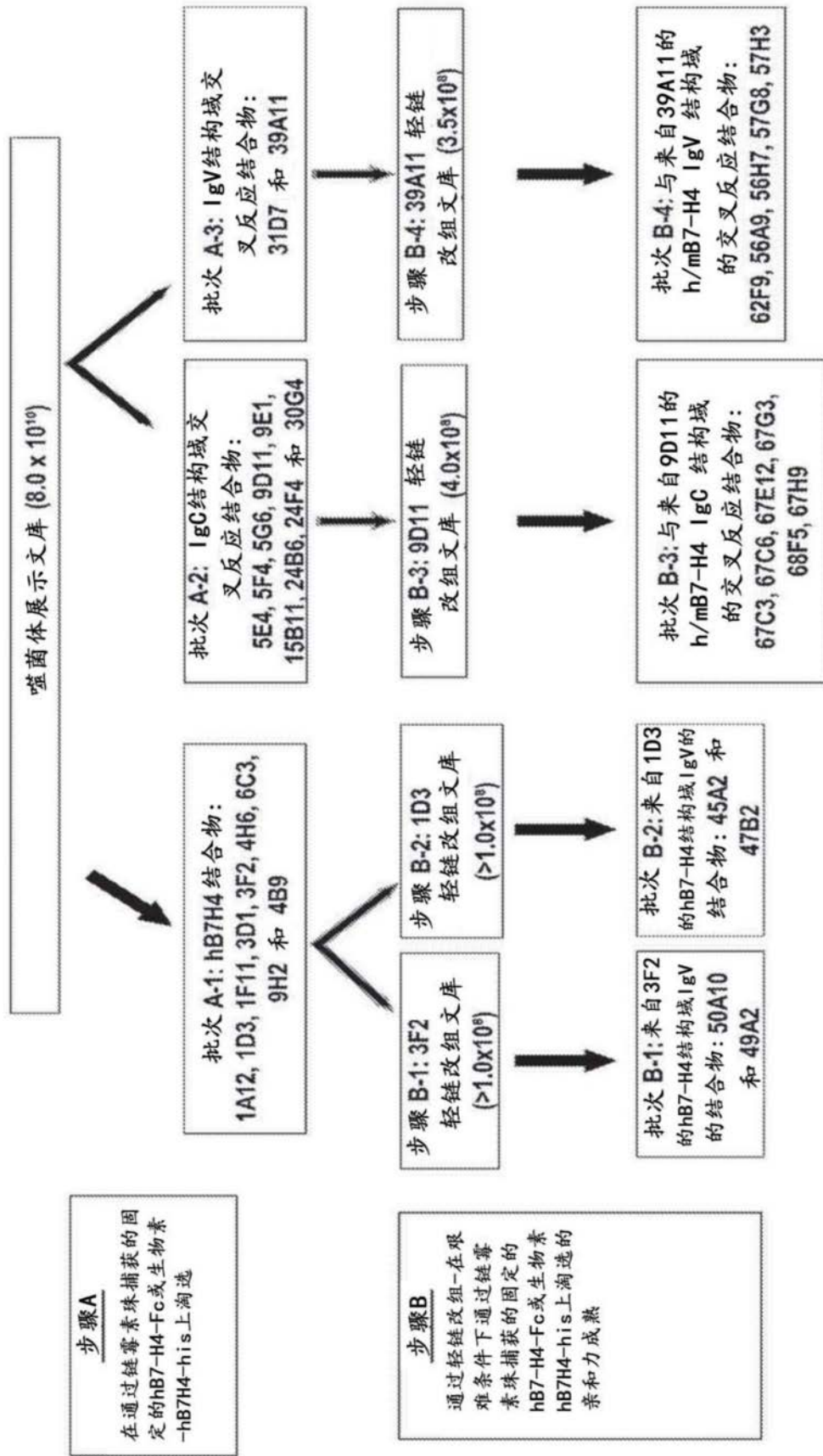


图2

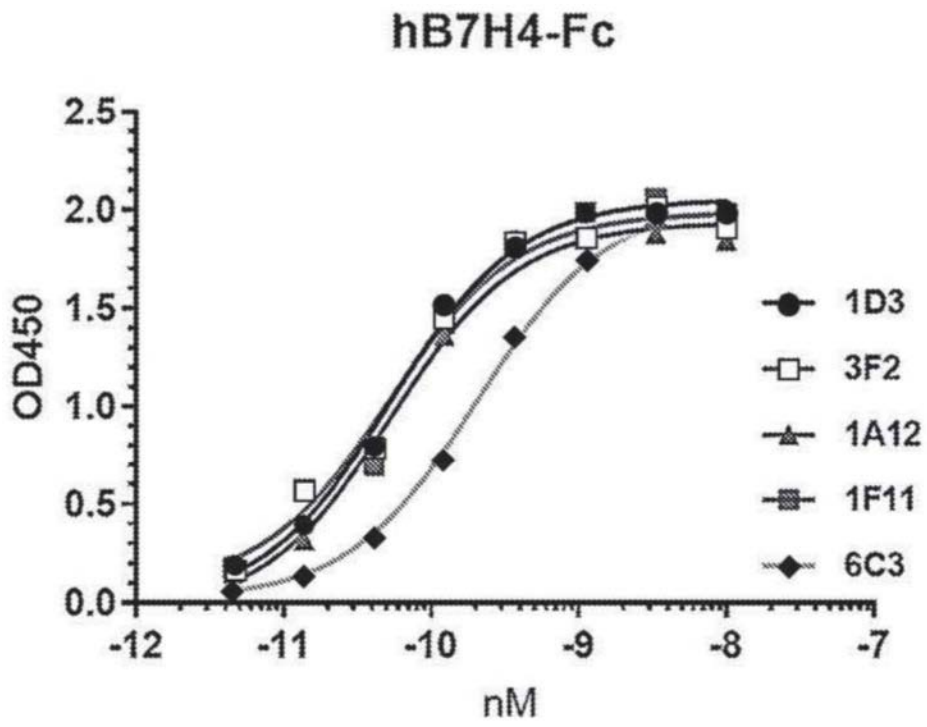


图3A

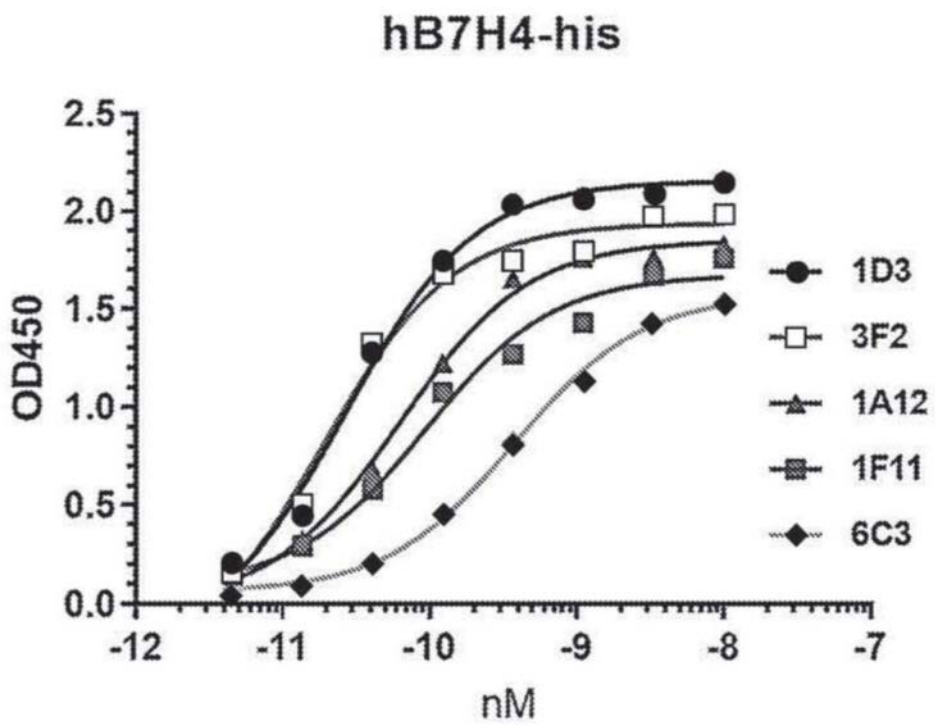


图3B

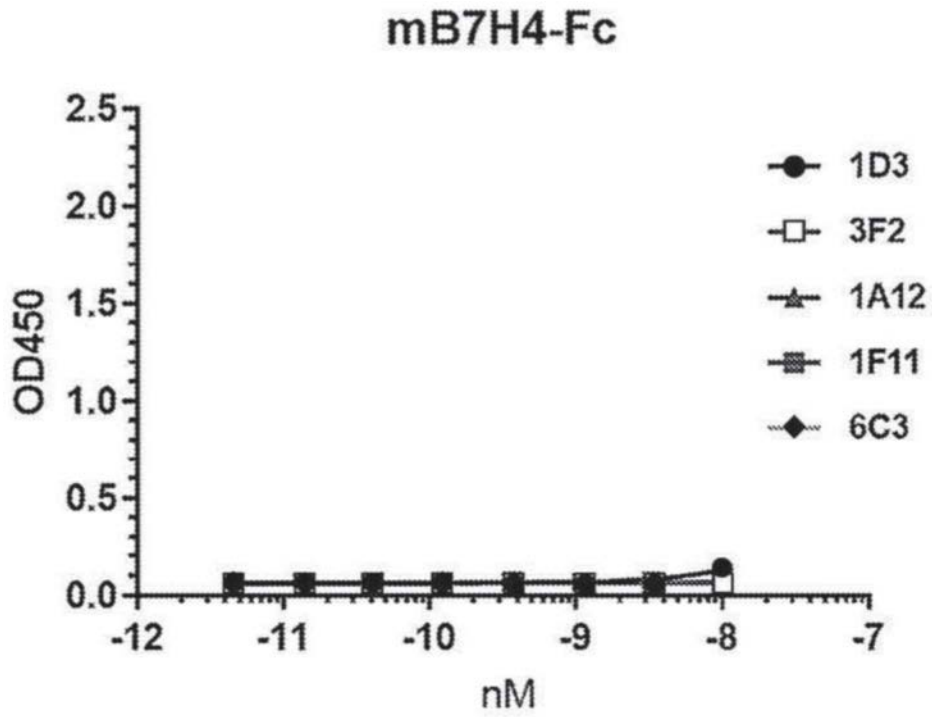


图3C

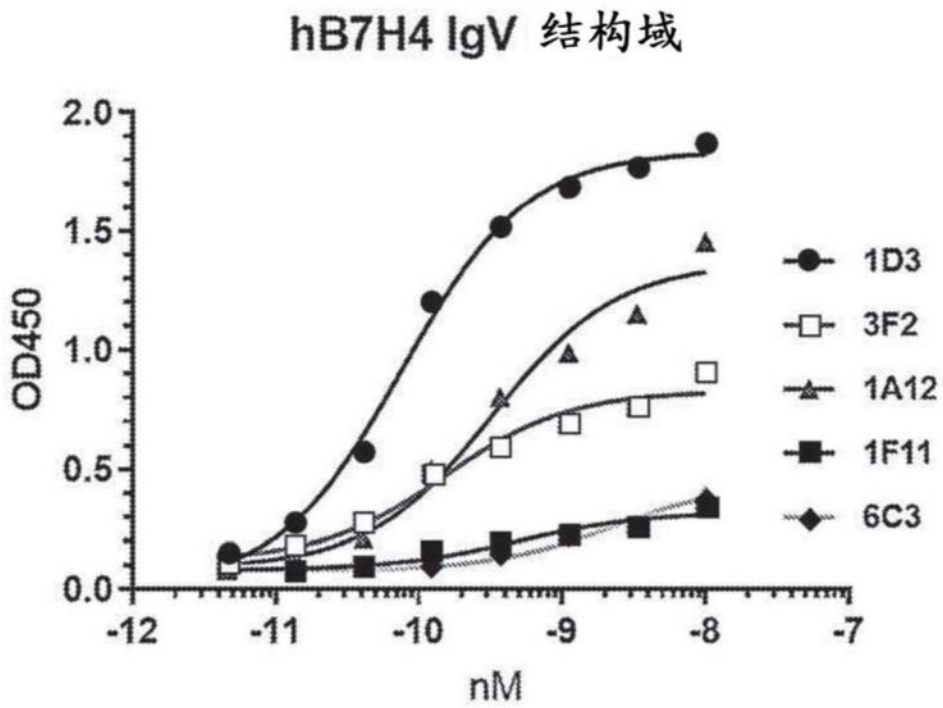


图3D

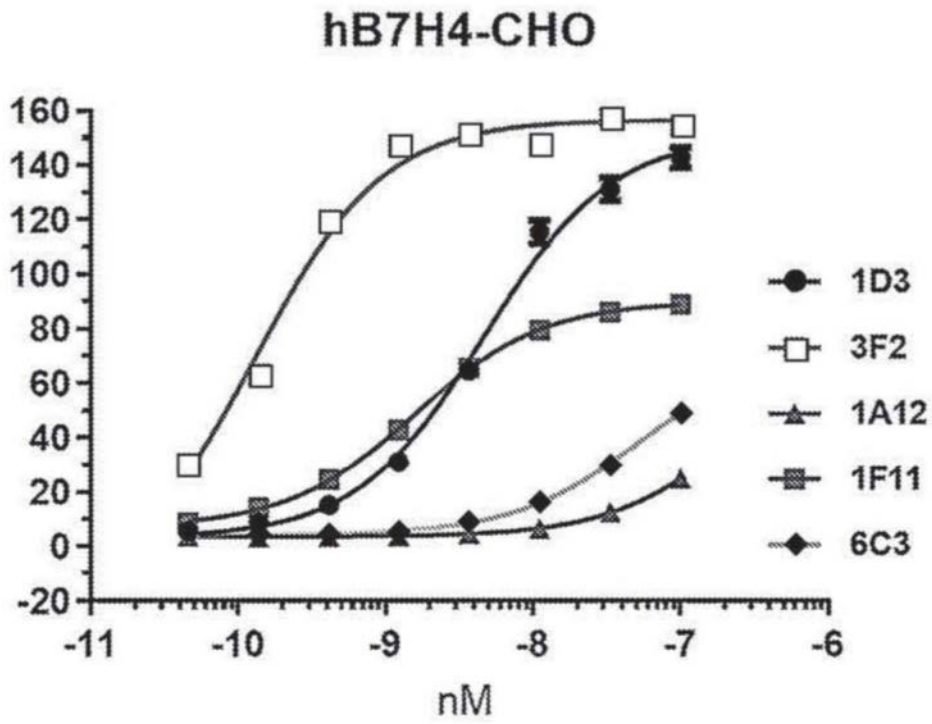


图3E

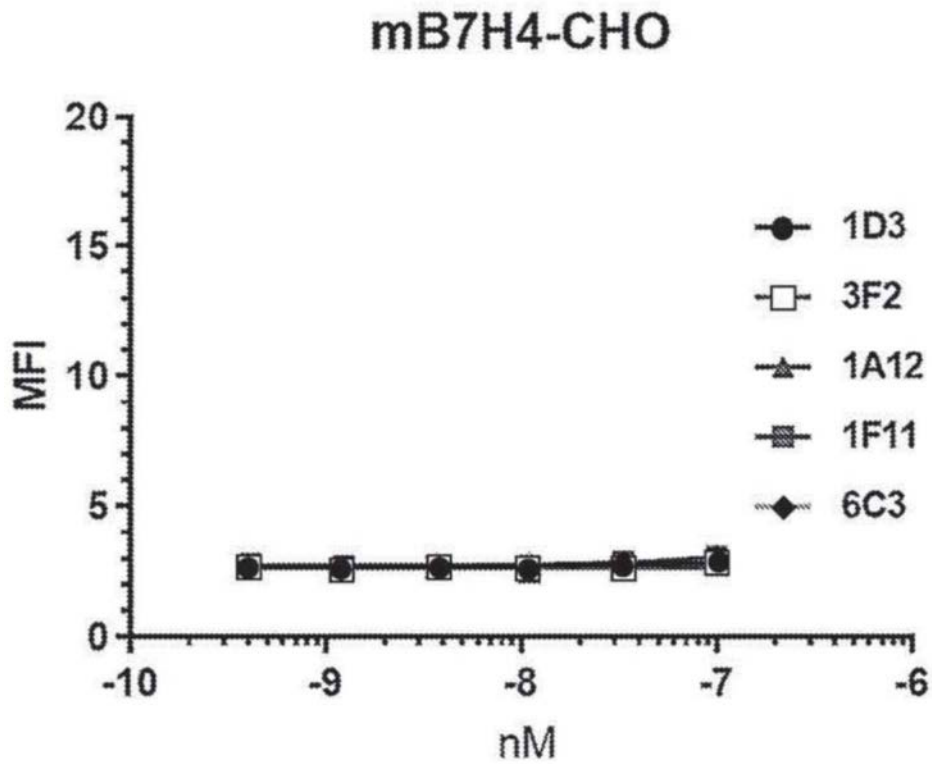


图3F

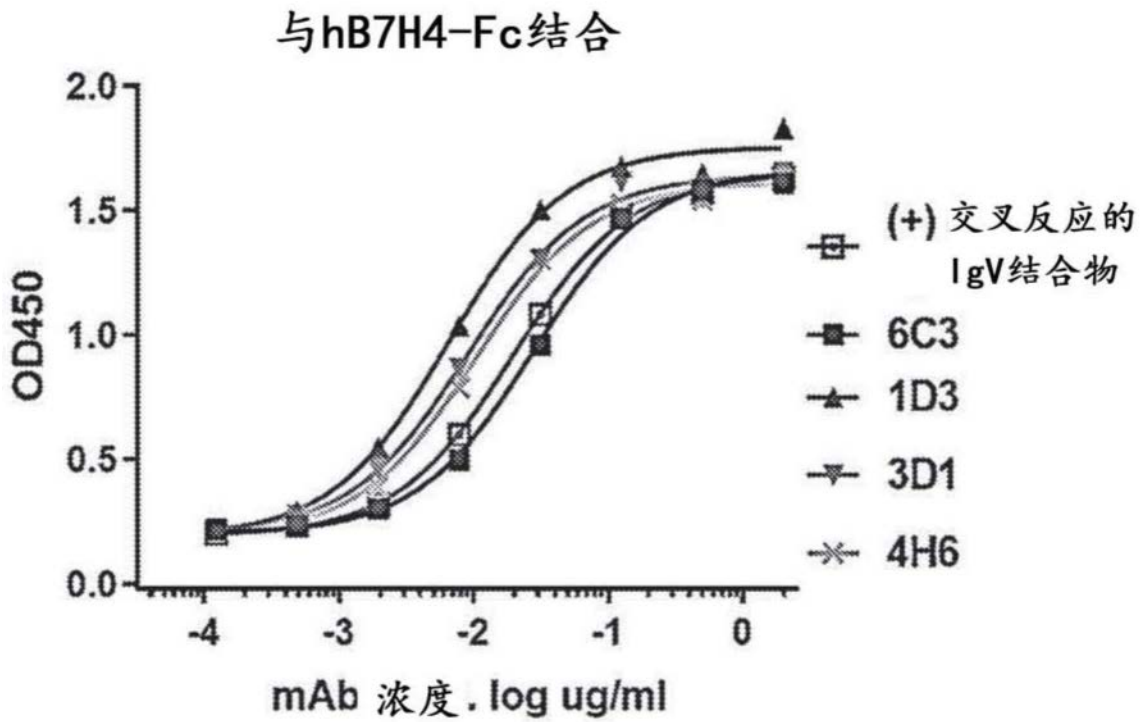


图4A

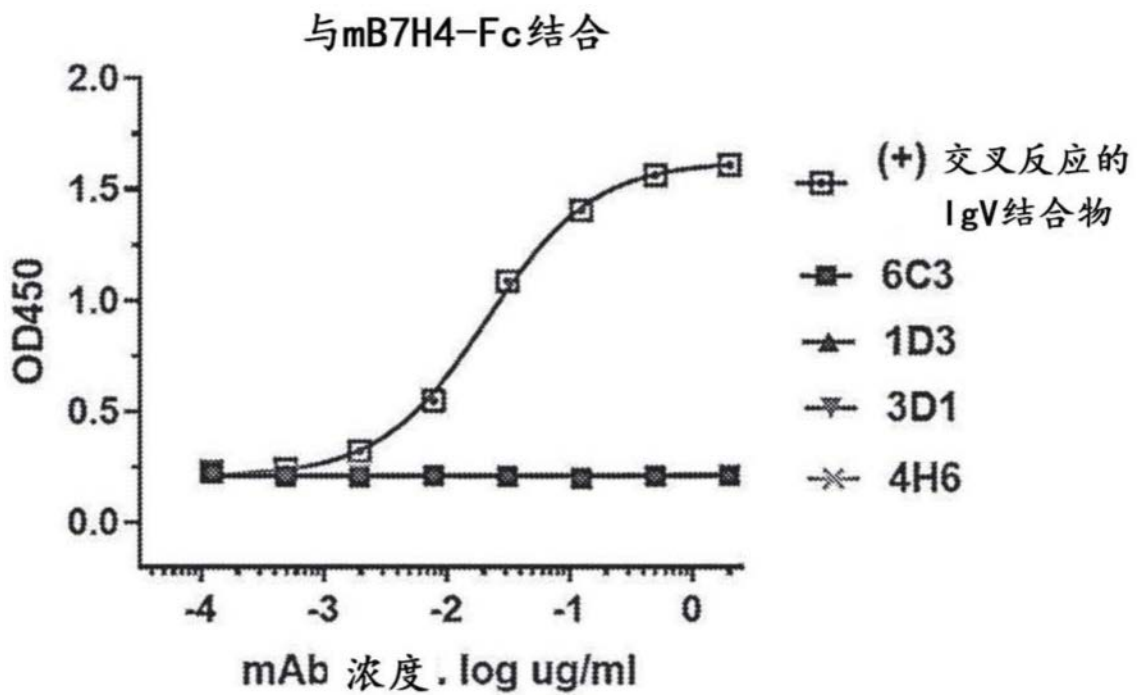


图4B

与hB7H4 IgV结构域结合

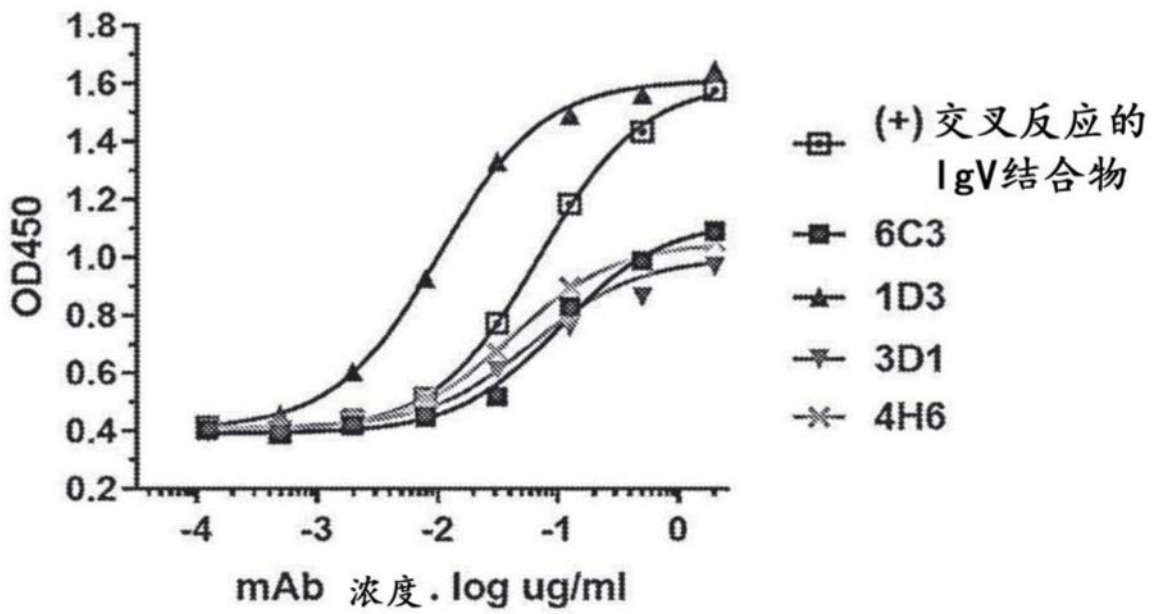


图4C

与mB7H4 IgV结构域结合

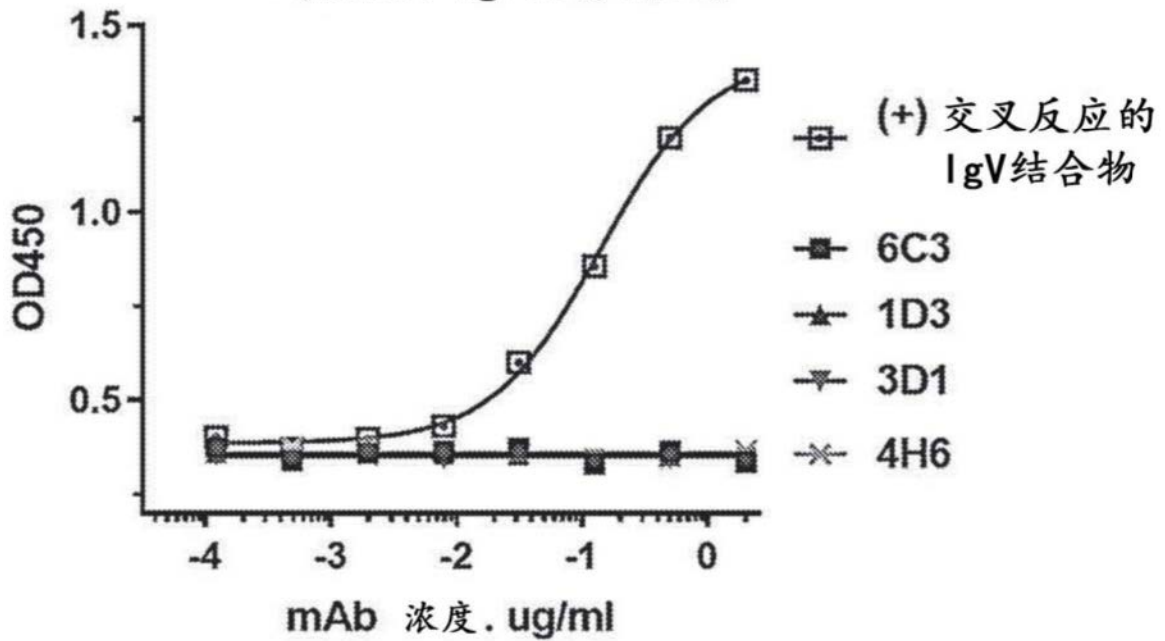


图4D

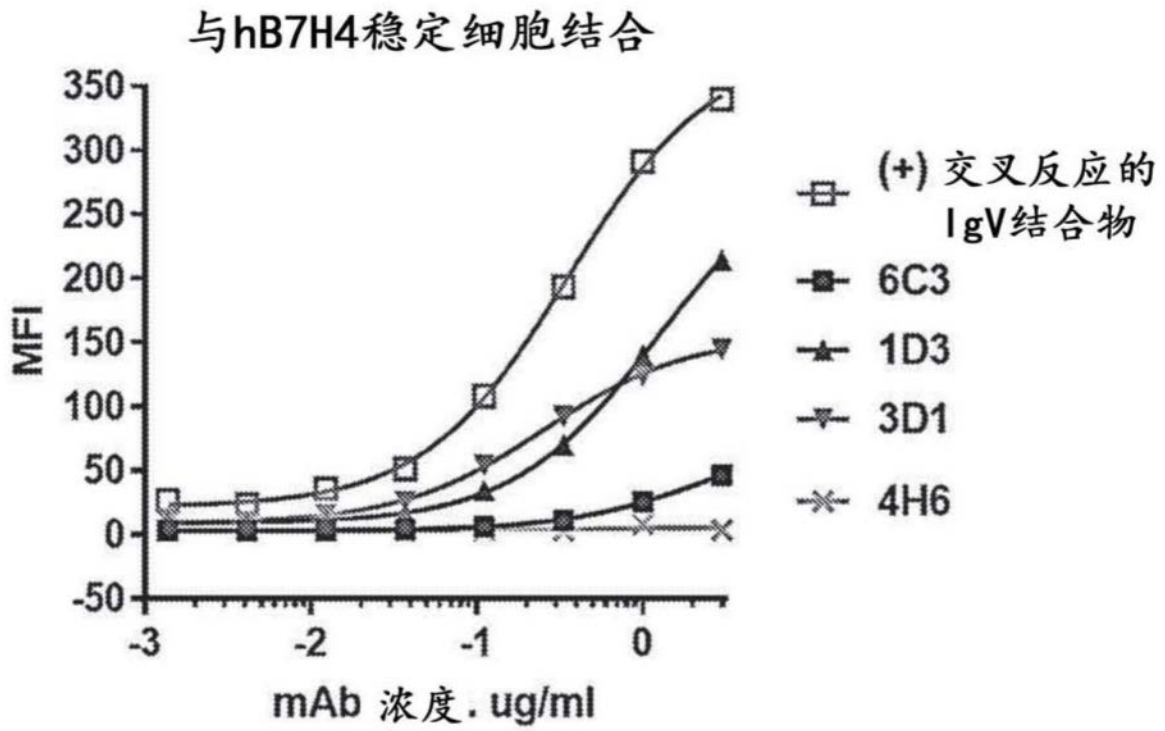


图4E

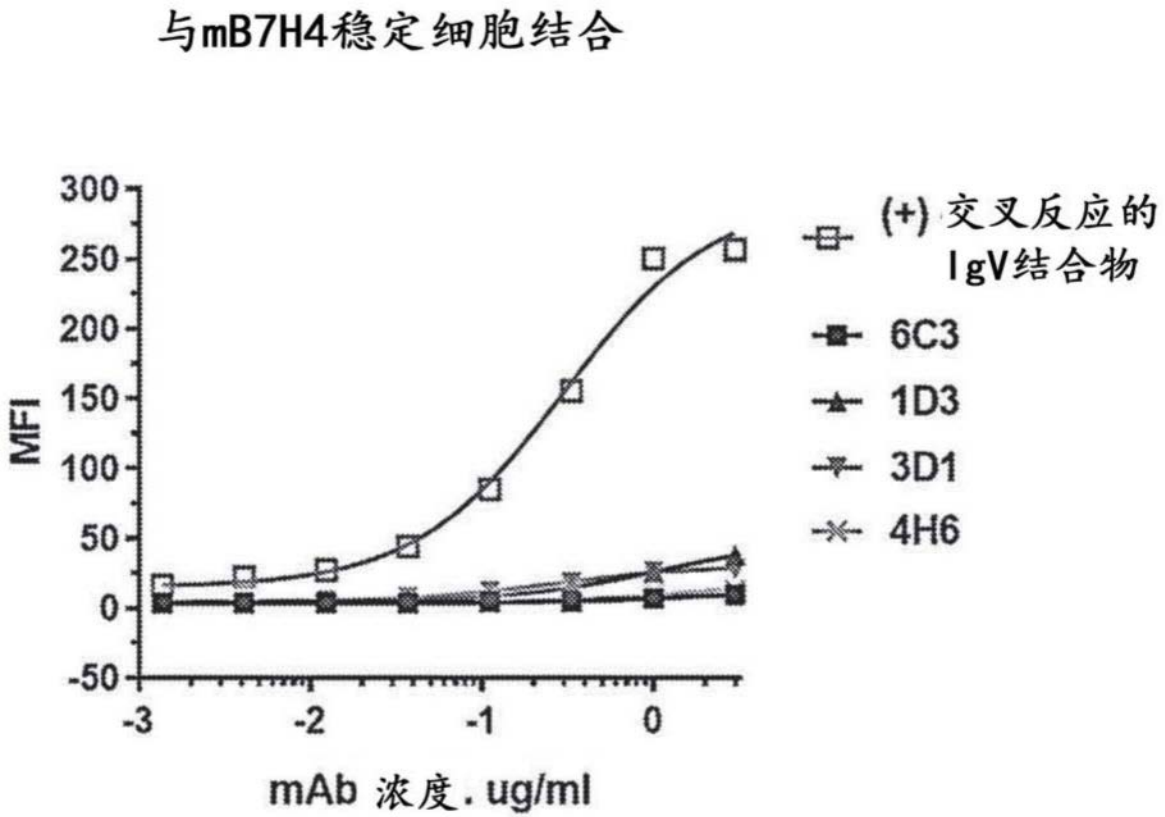


图4F

与hB7H4-Fc结合

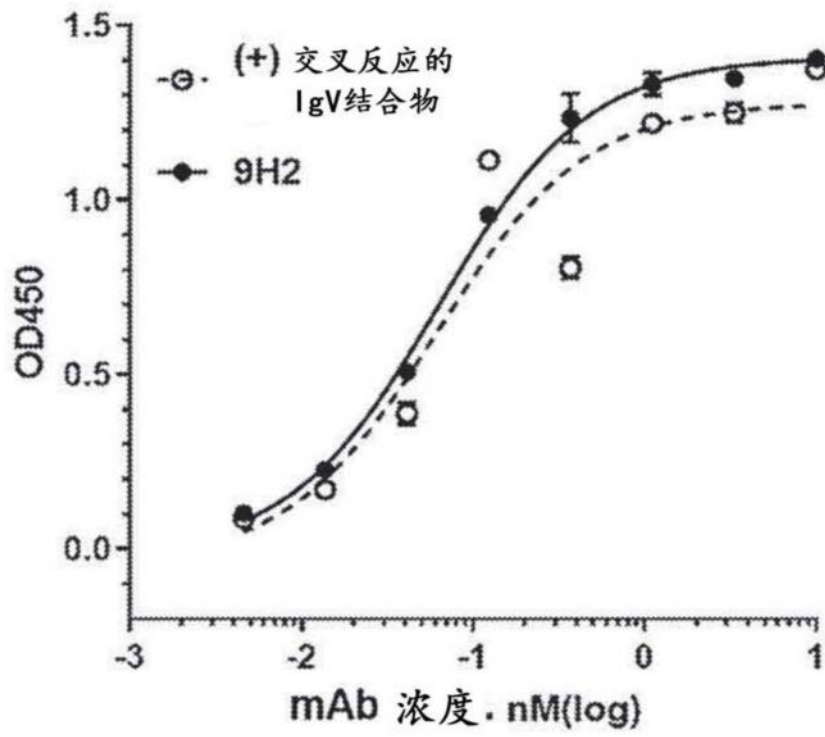


图5A

与hB7H4-His结合

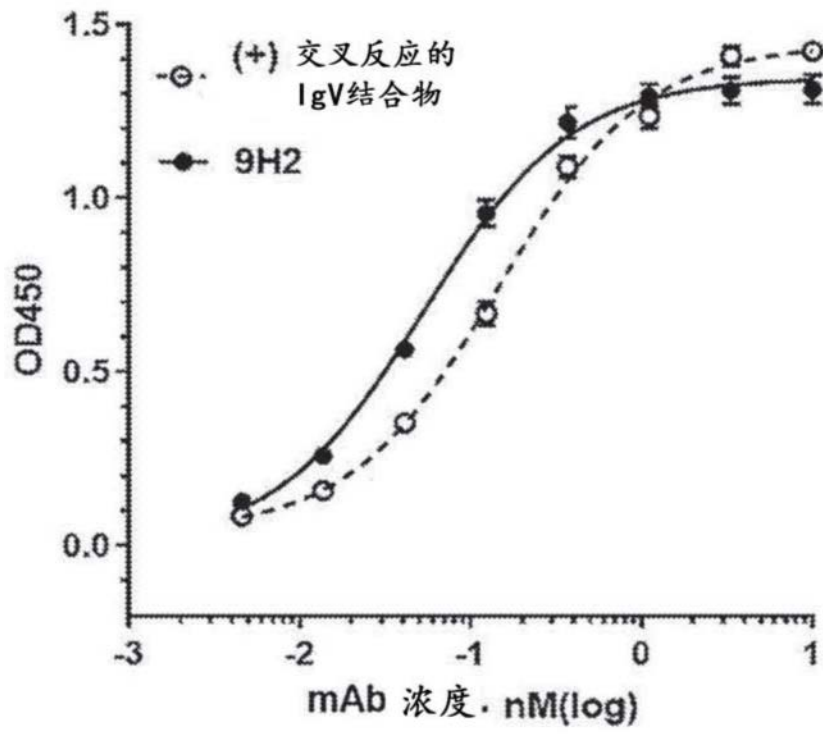


图5B

与mB7H4-Fc结合

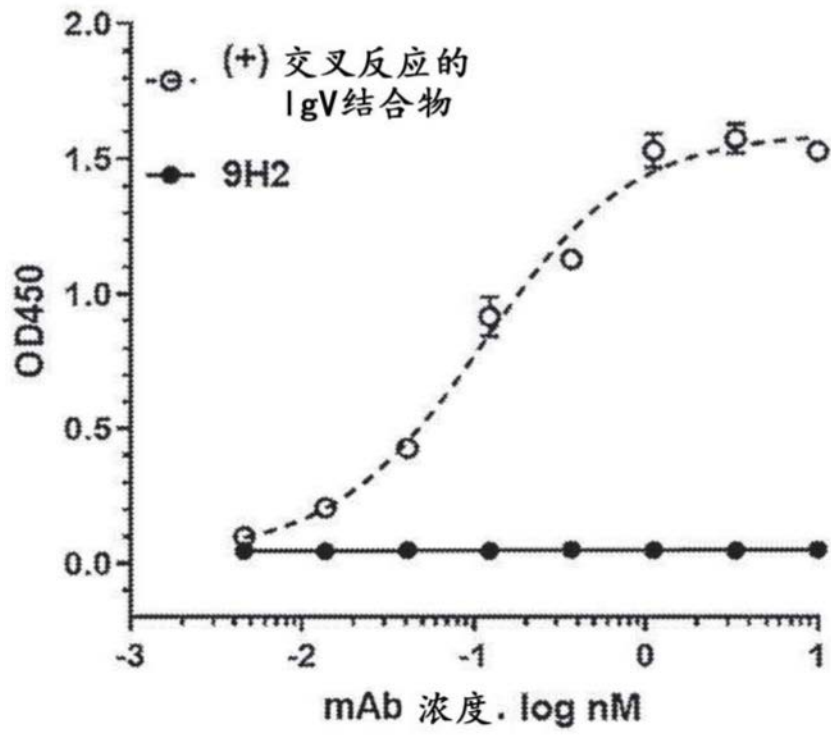


图5C

与hB7H4 IgV结构域结合

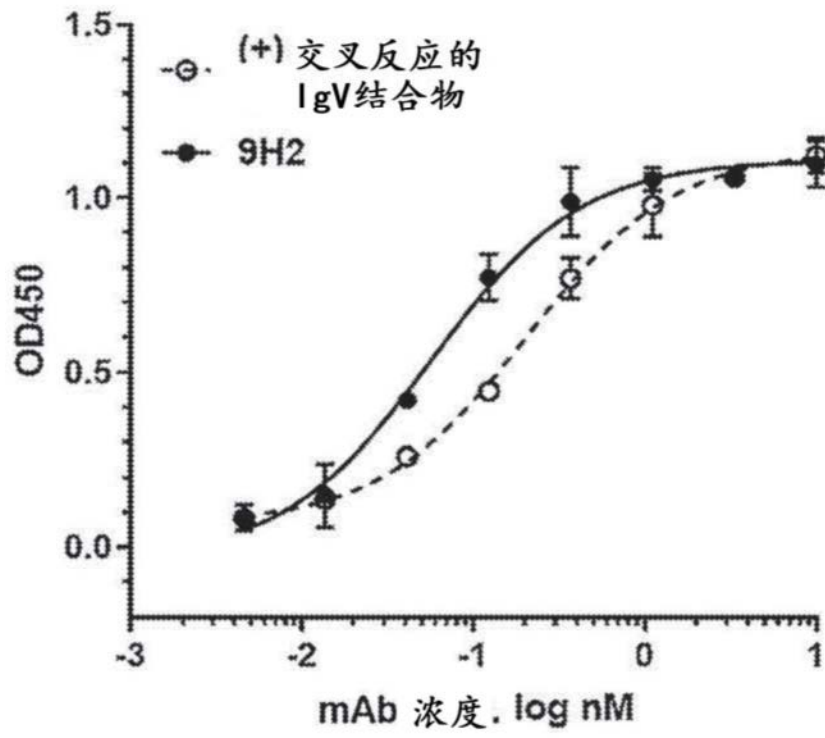


图5D

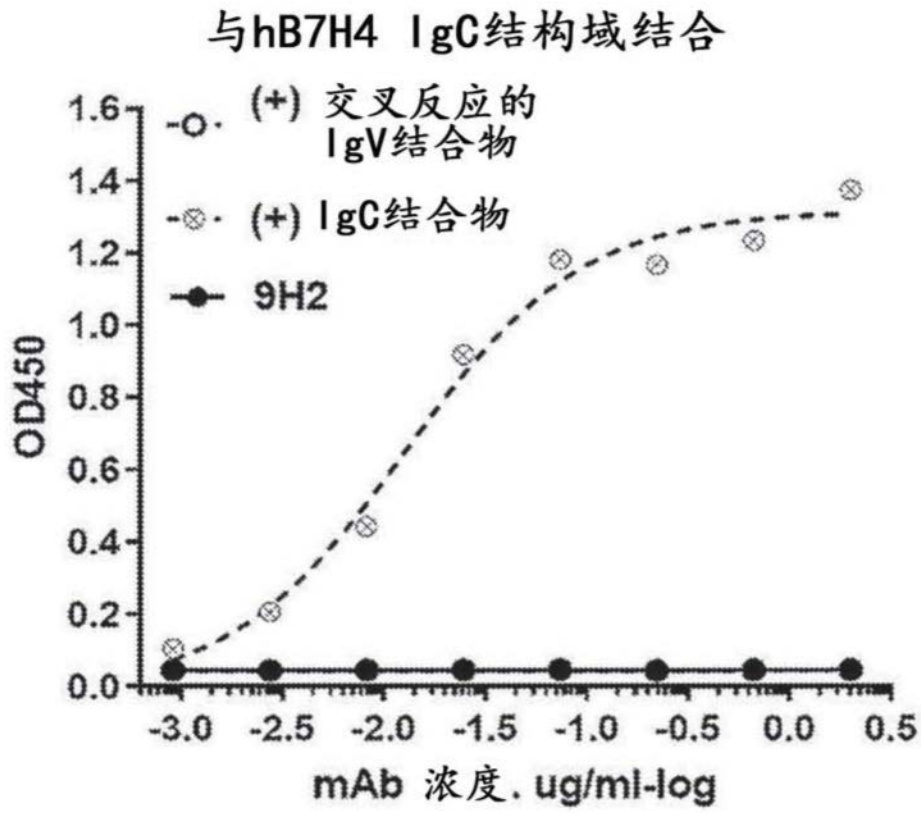


图5E

与hB7H4-CHO结合

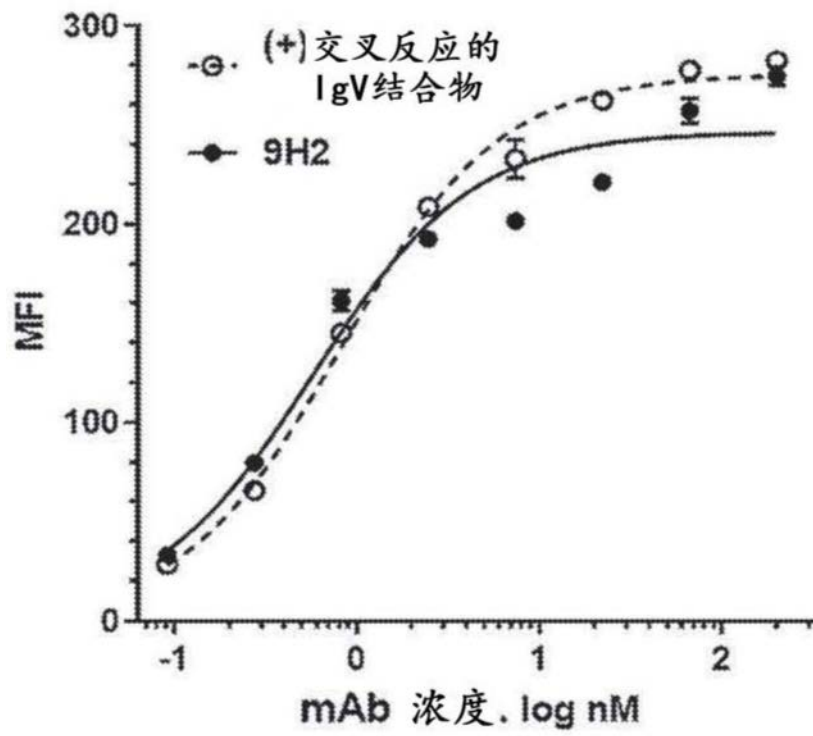


图5F

与mB7H4-CHO结合

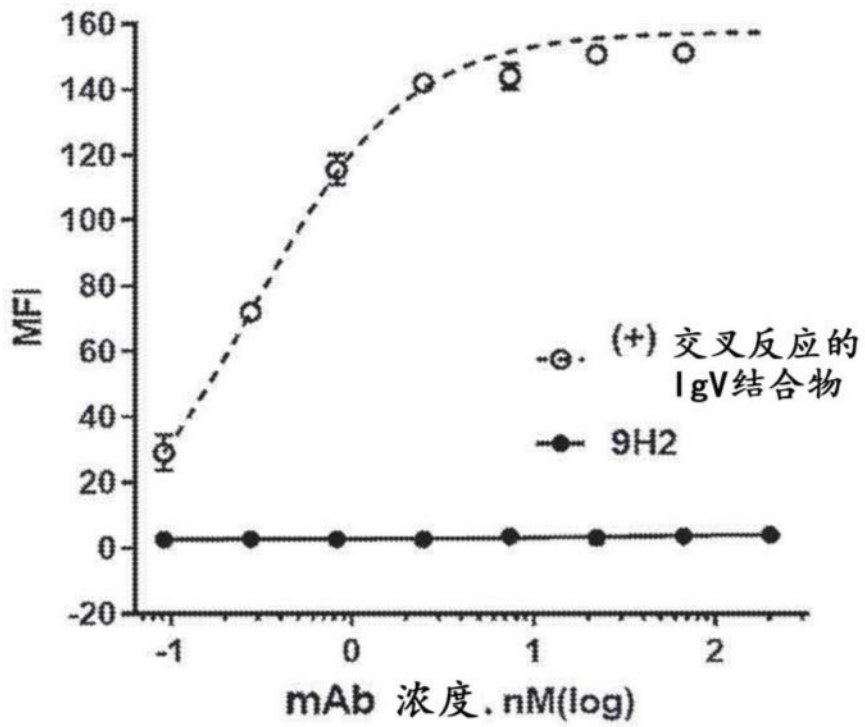


图5G

与hB7H4-Fc结合

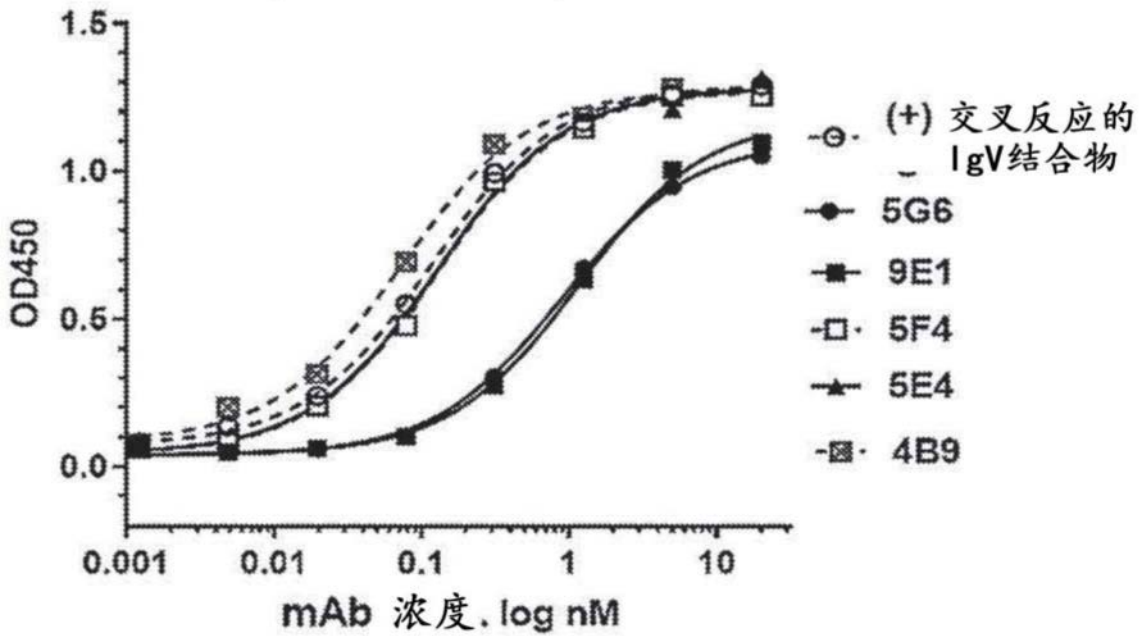


图6A

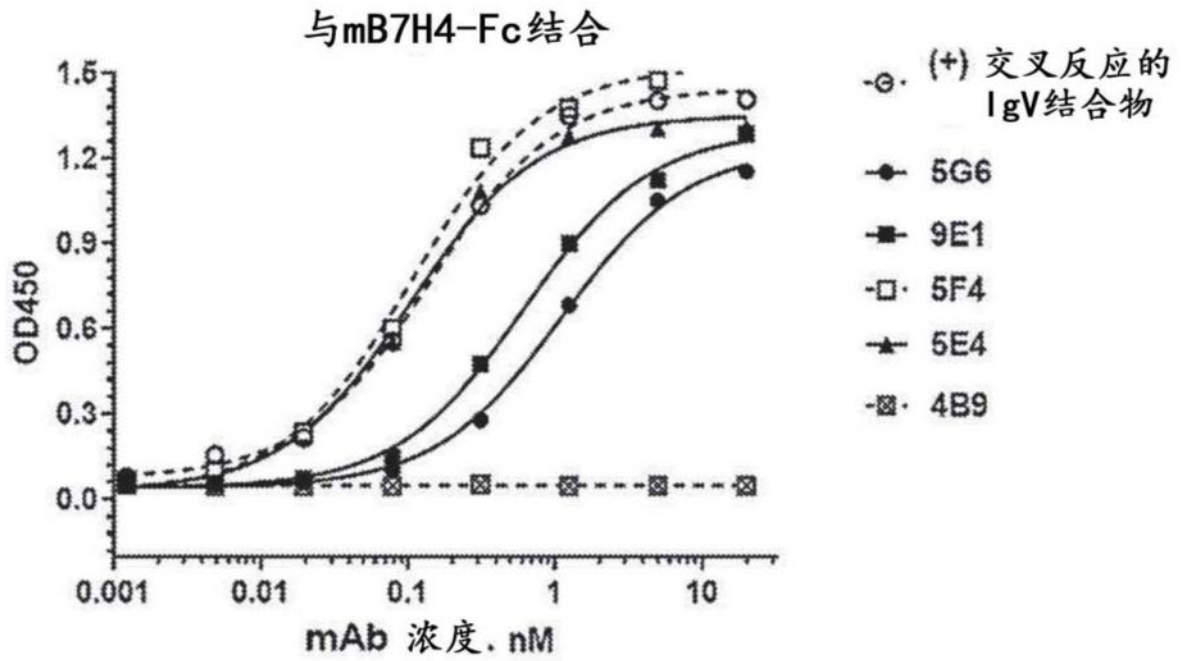


图6B

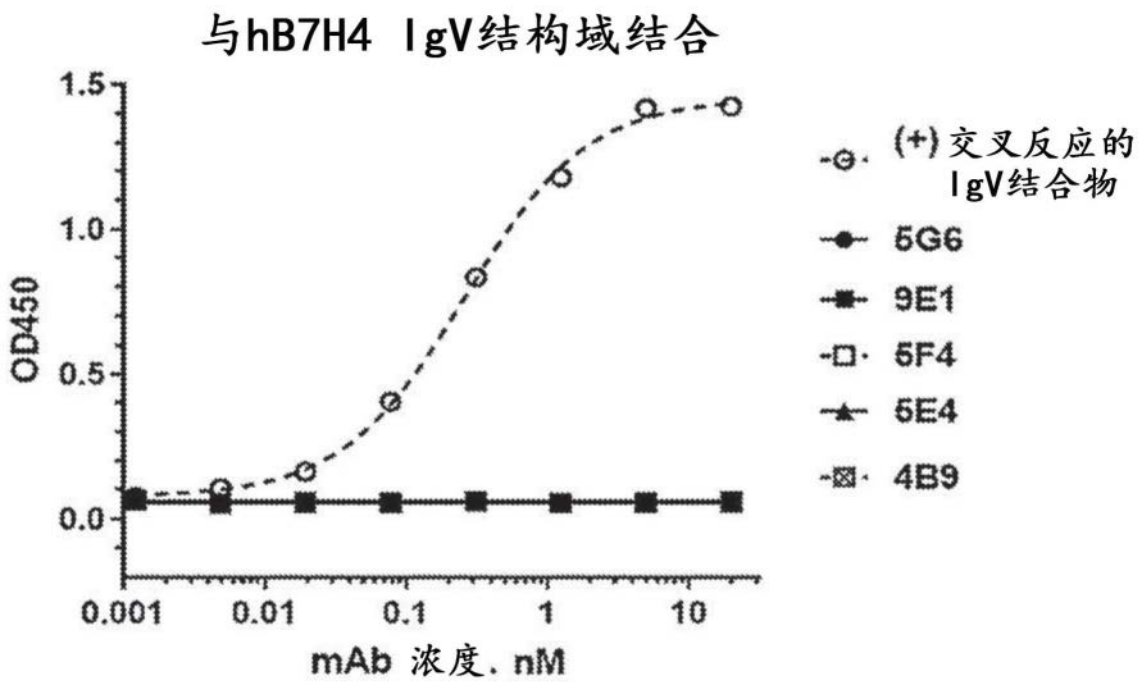


图6C

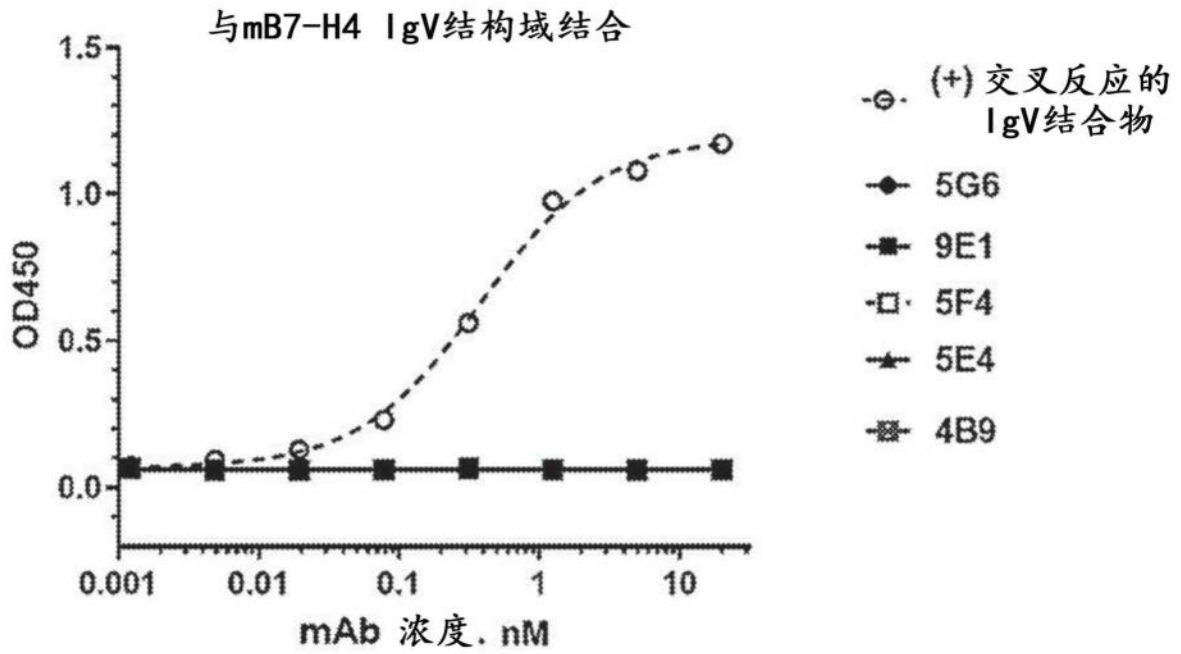


图6D

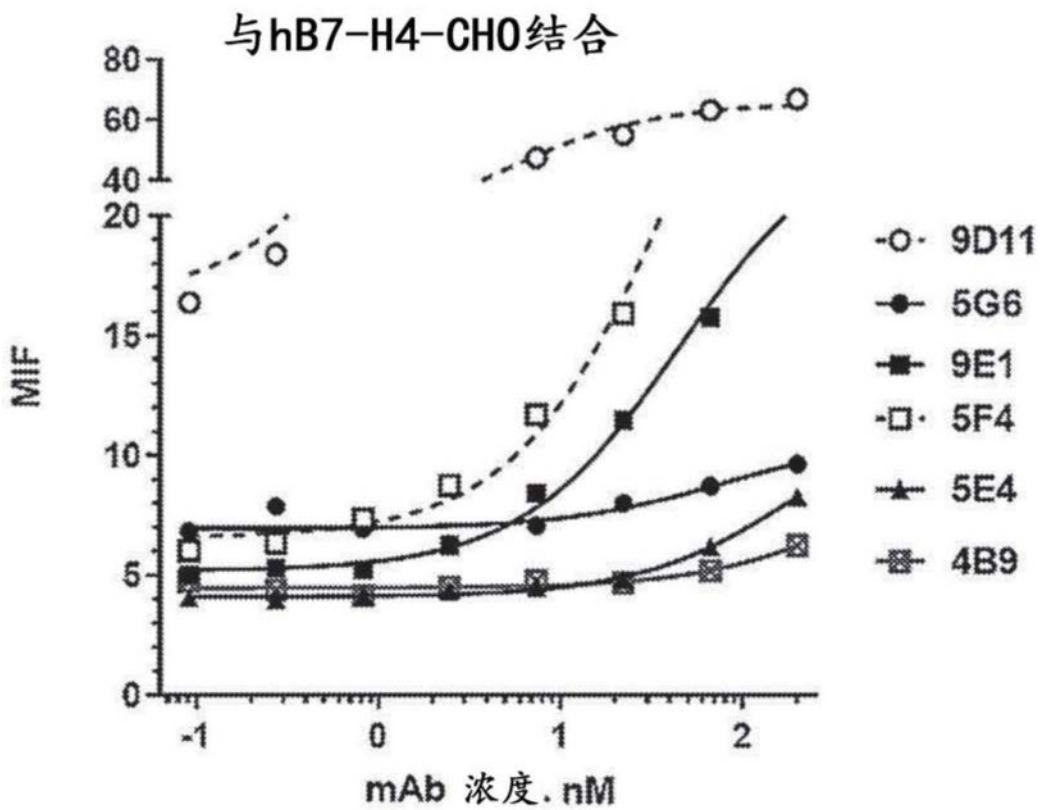


图6E

与mB7-H4-CHO结合

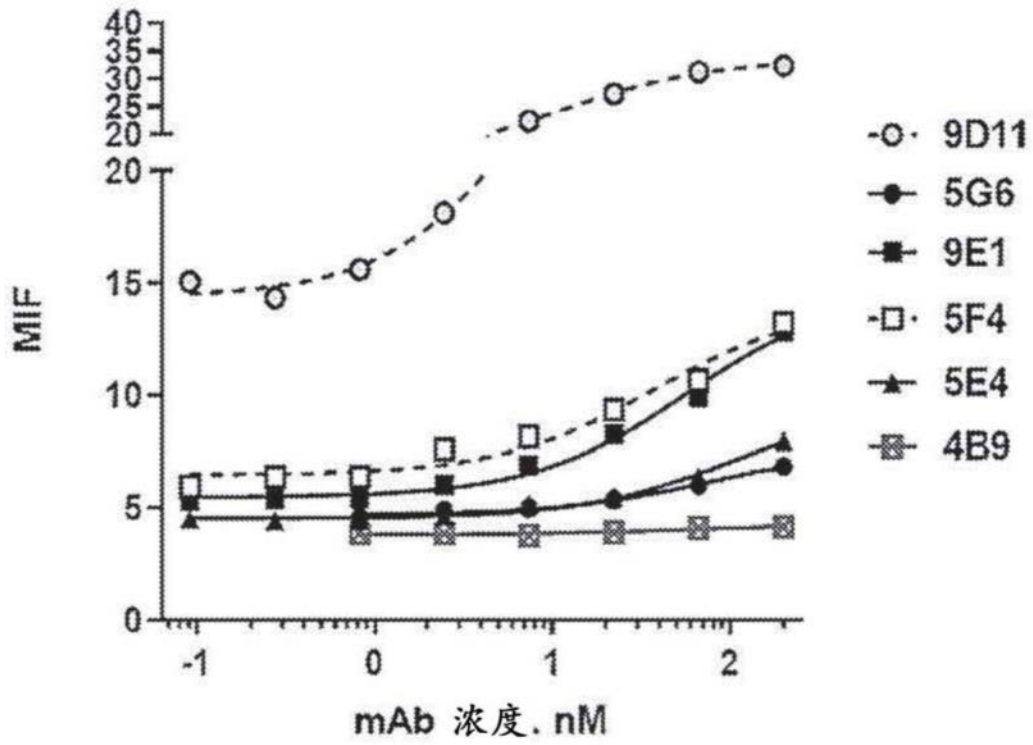


图6F

与hB7H4-Fc结合

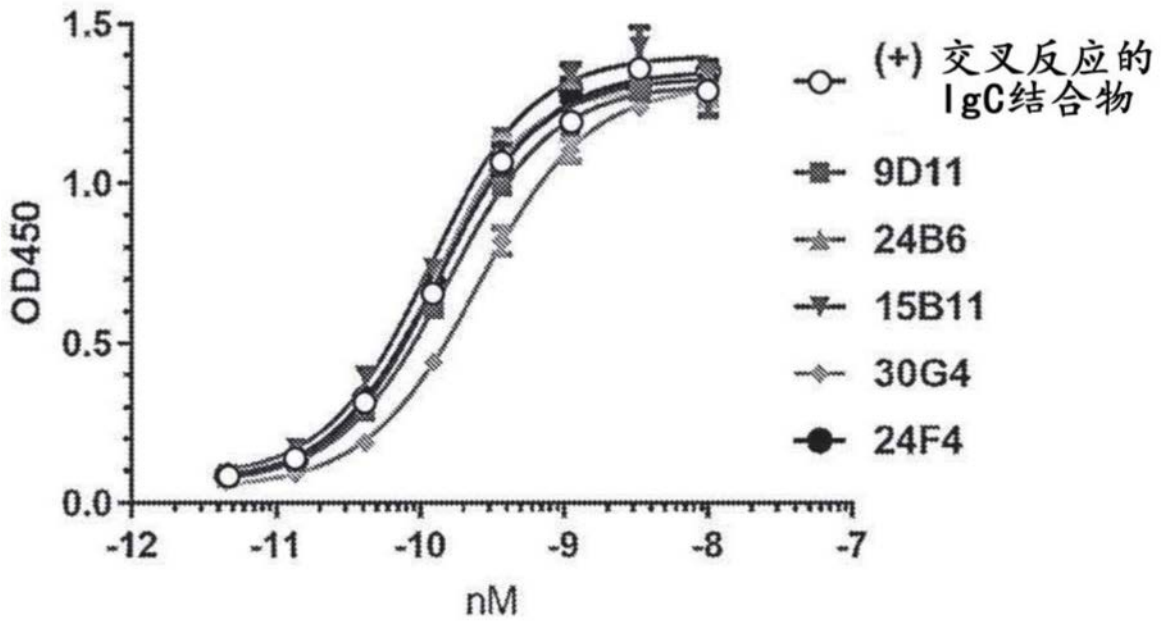


图7A

与hB7H4-his结合

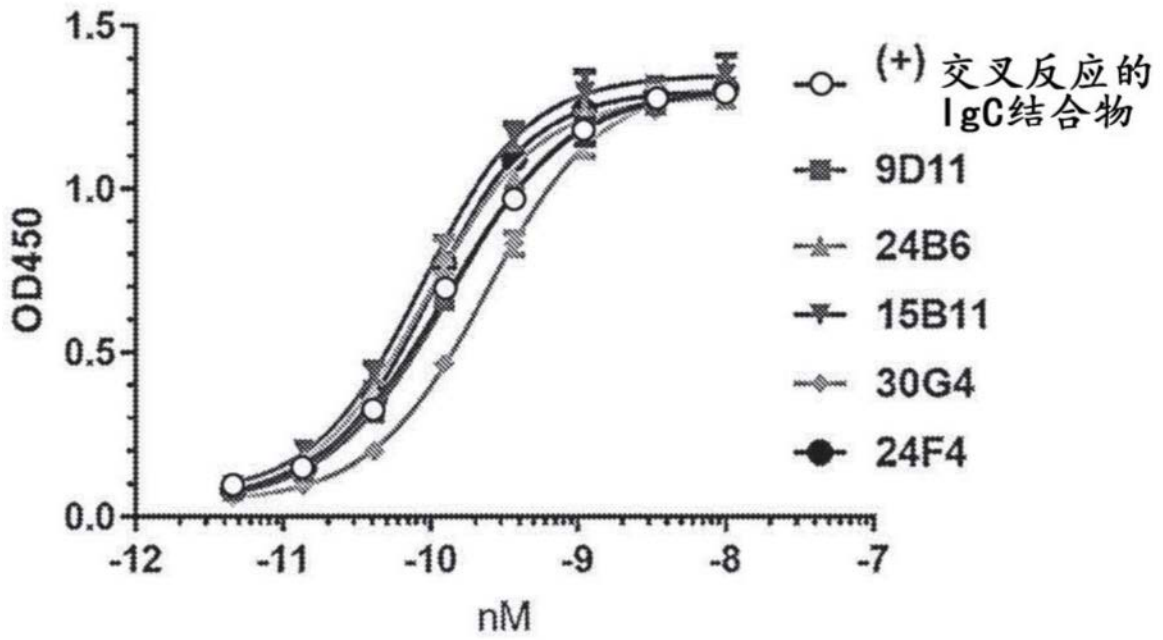


图7B

与mB7H4-Fc结合

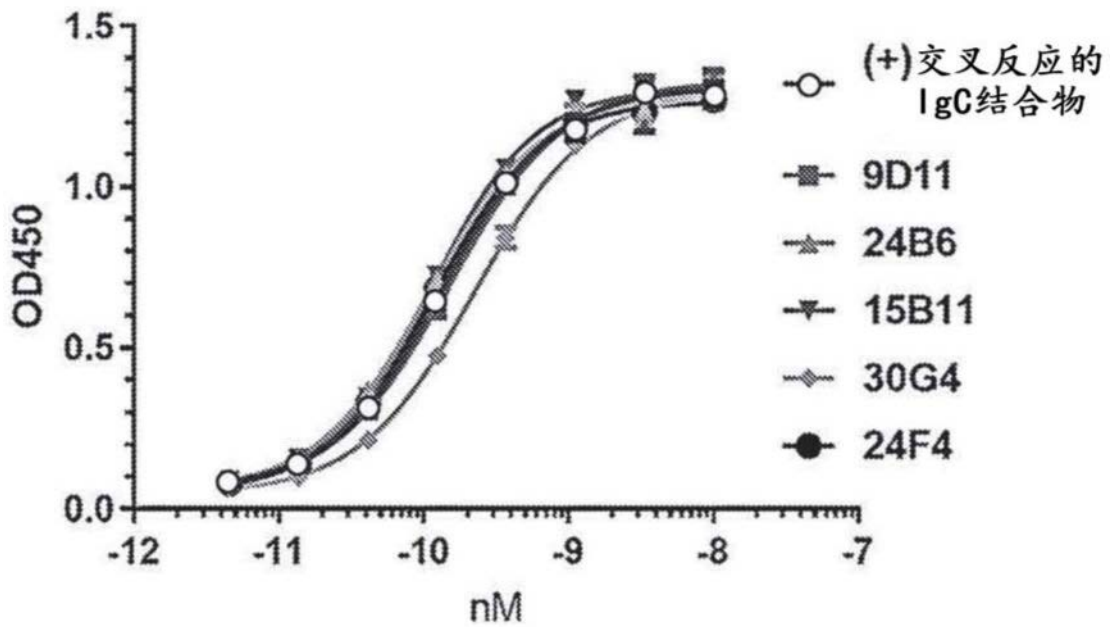


图7C

与mB7H4-his结合

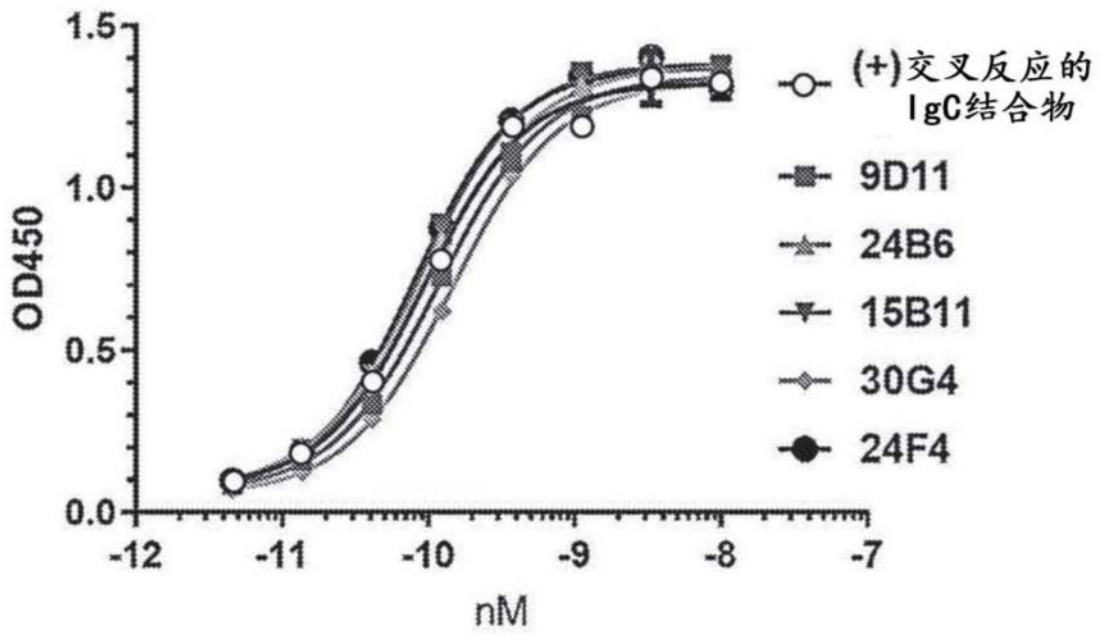


图7D

与hB7H4 IgC结构域结合

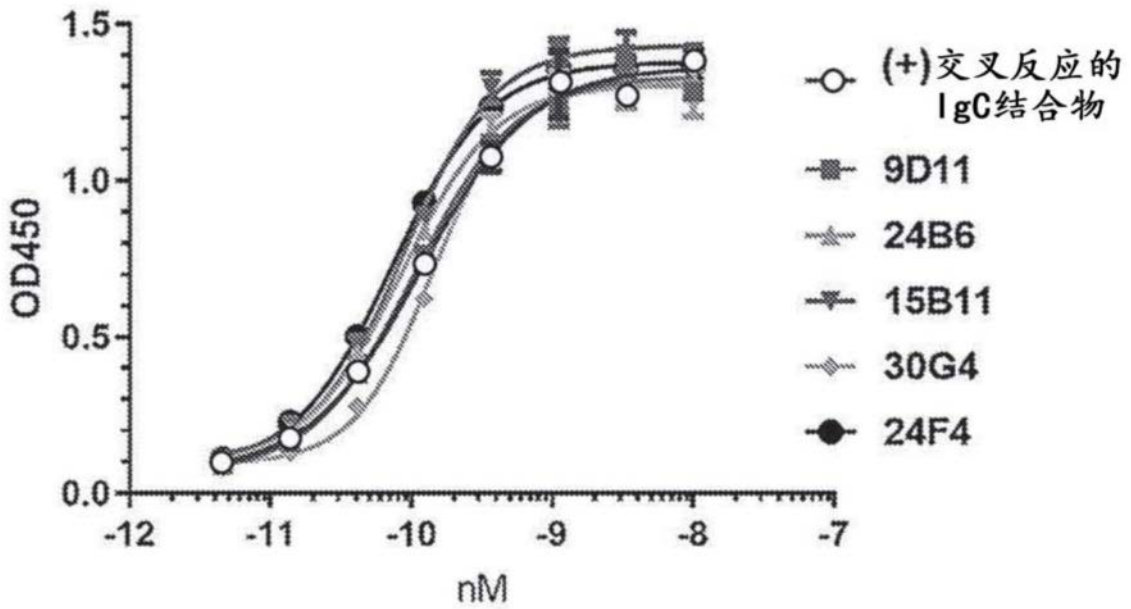


图7E

与mB7H4 IgC结构域结合

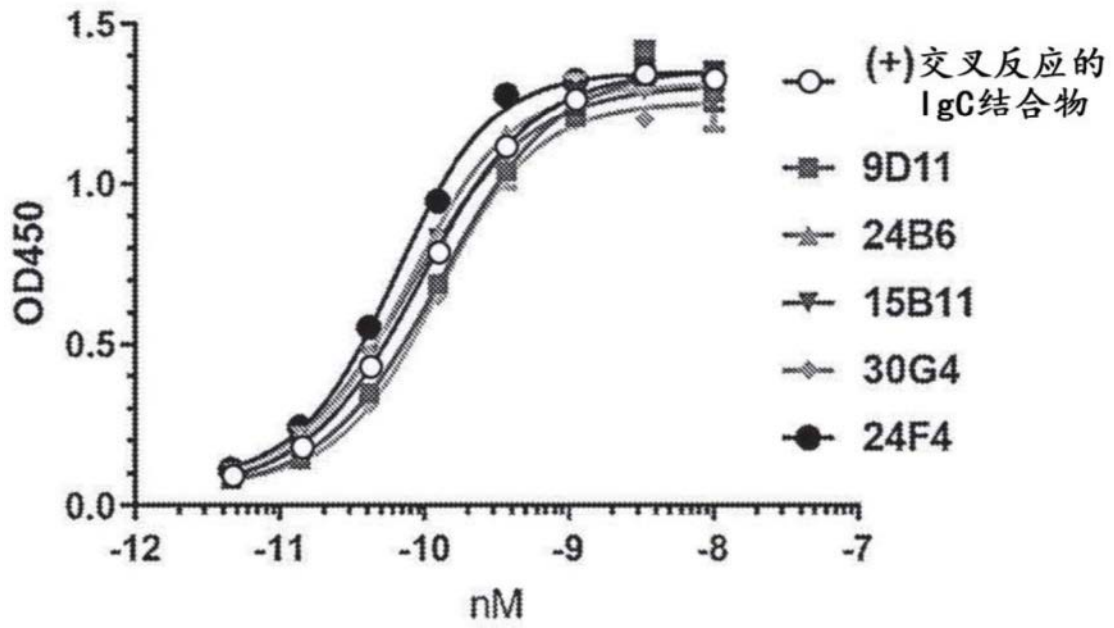


图7F

与hB7H4-CHO结合

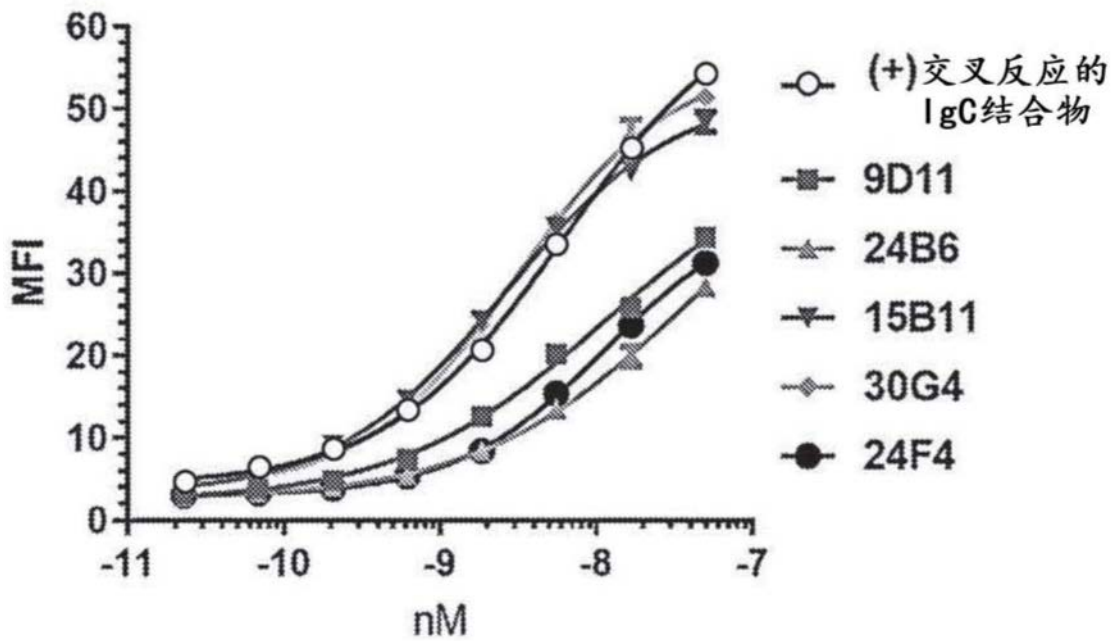


图7G

与mB7H4-CHO结合

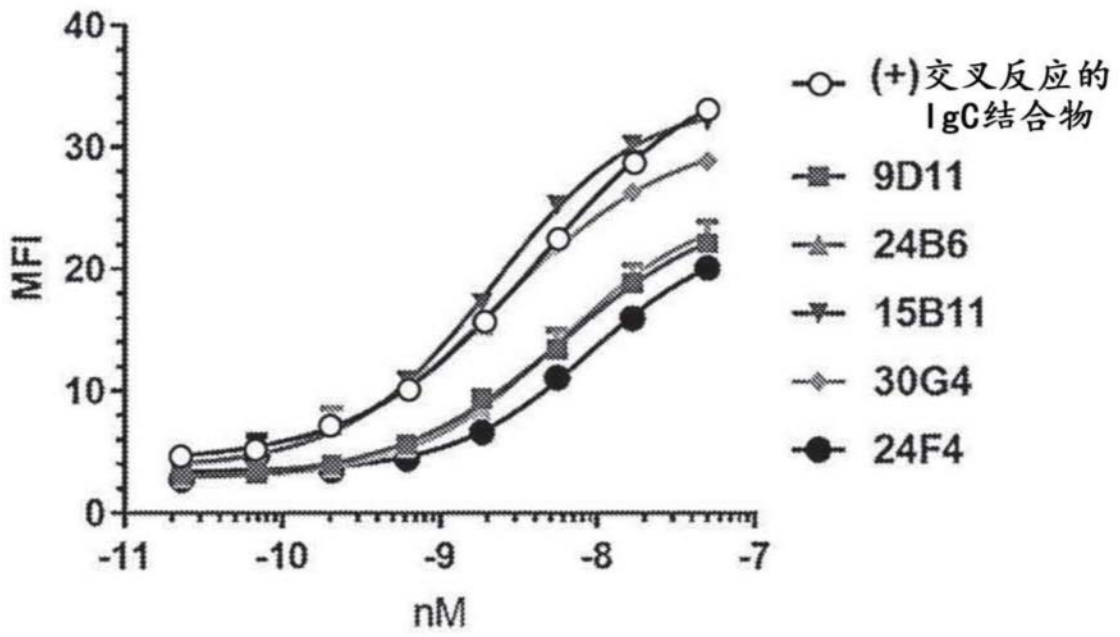


图7H

与hB7H4-Fc结合

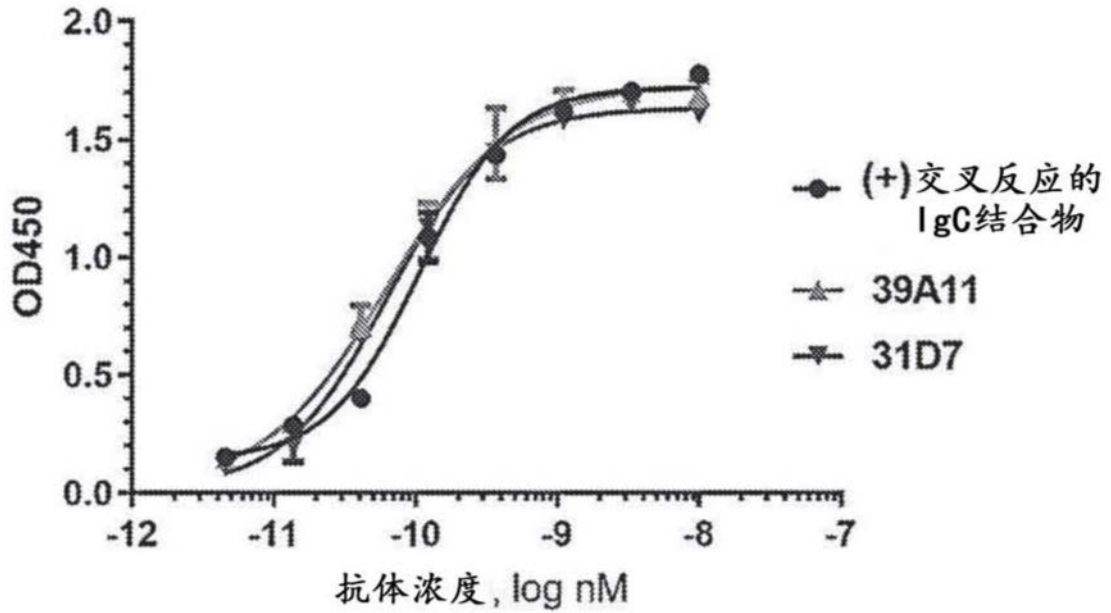


图8A

与hB7H4-his结合

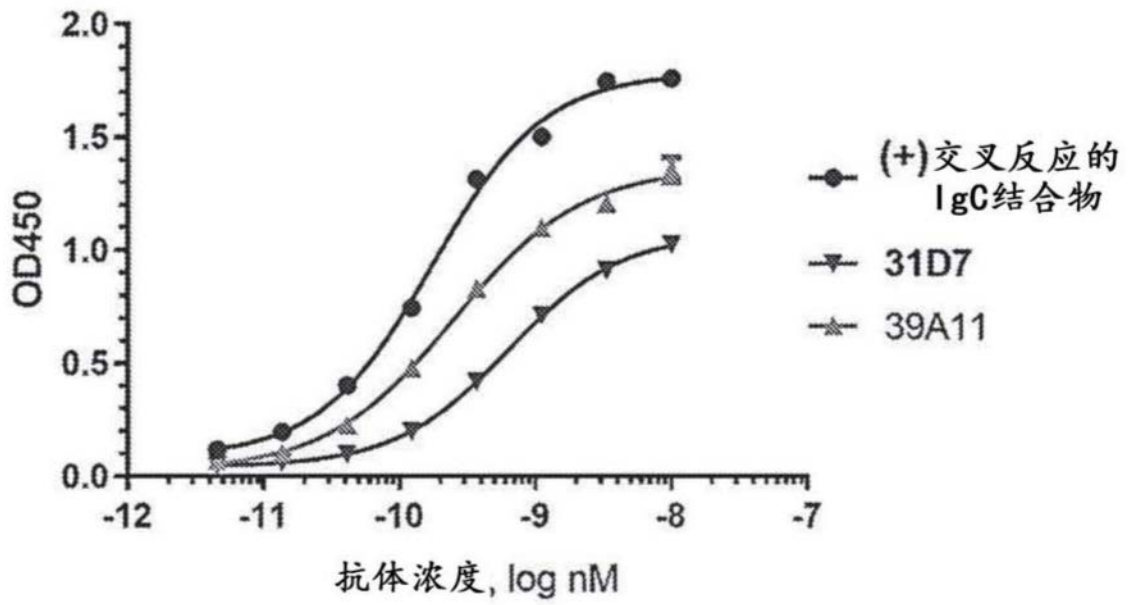


图8B

与mB7H4-Fc结合

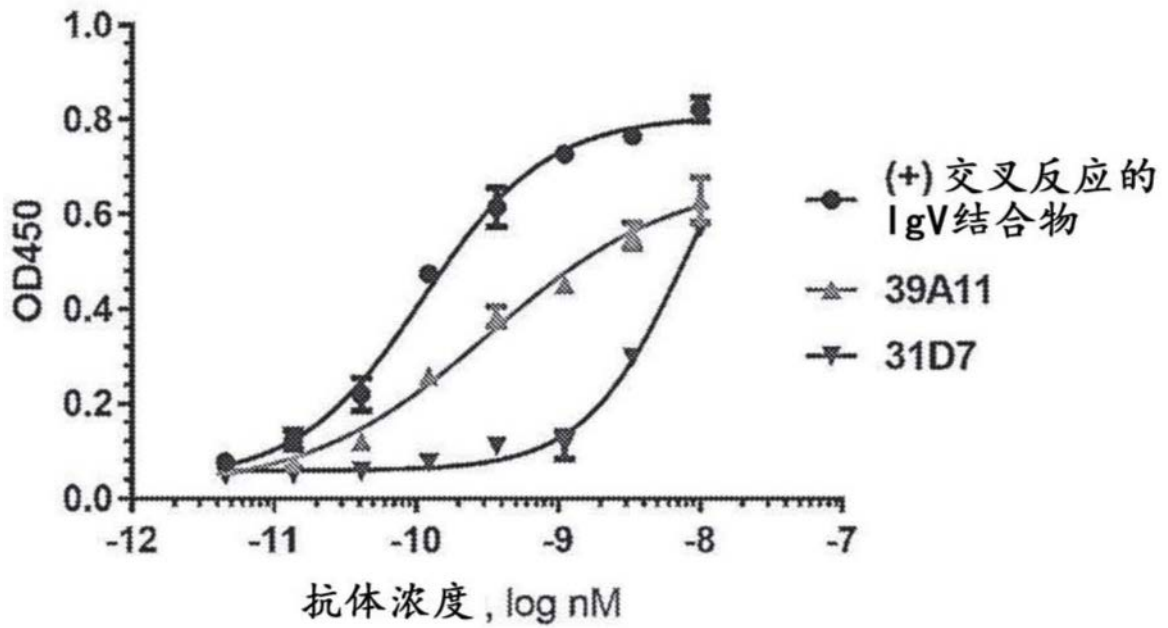


图8C

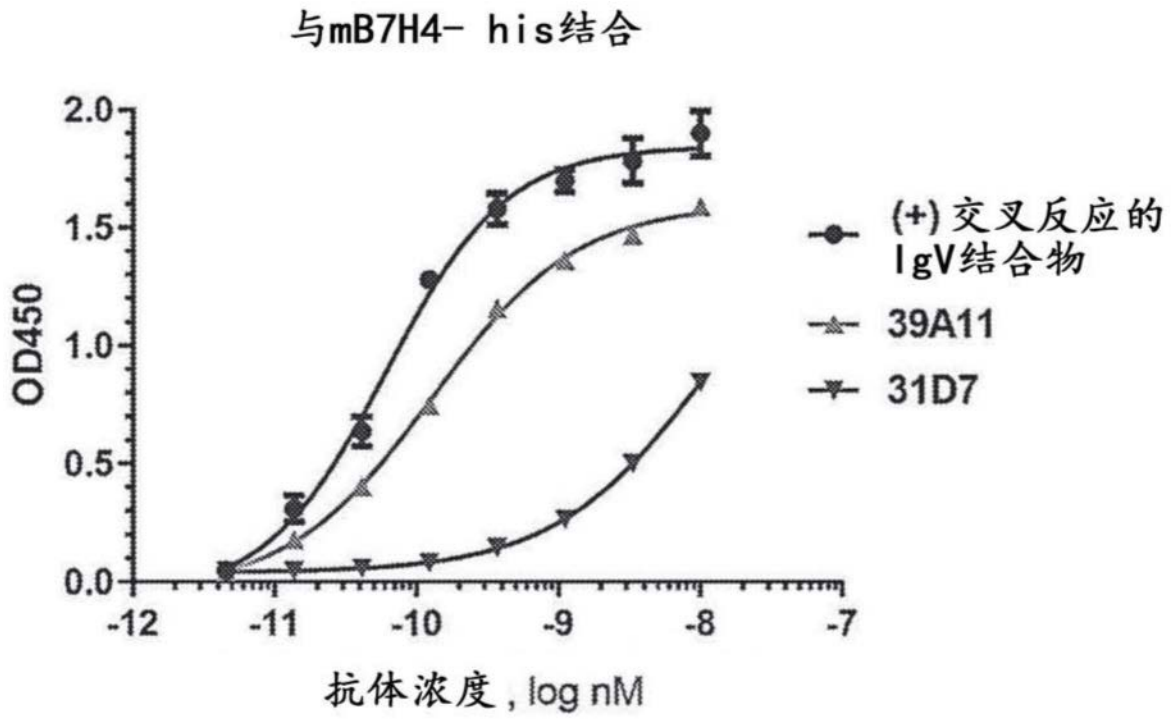


图8D

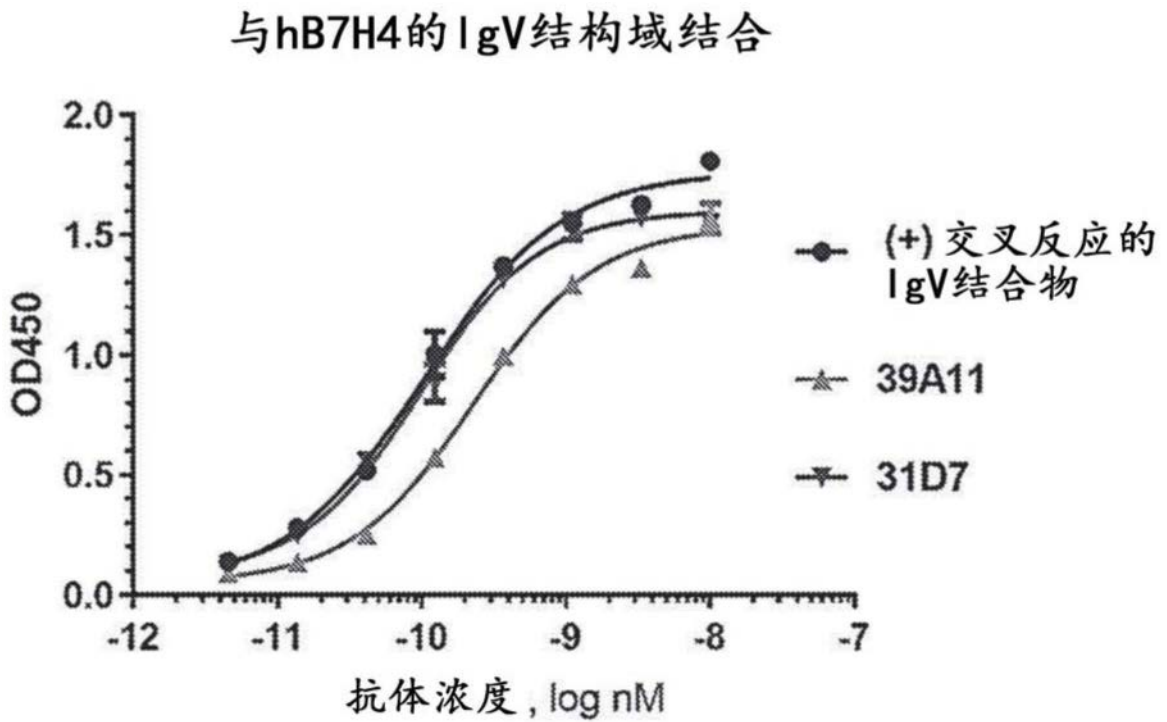


图8E

与hB7H4的IgC结构域结合

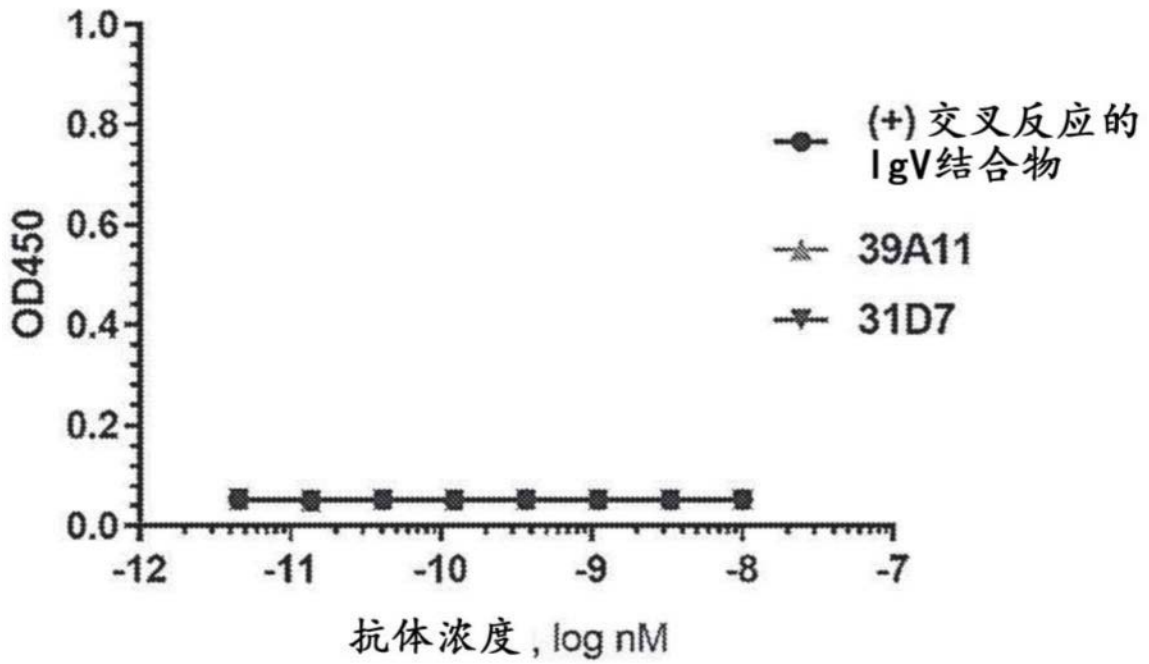


图8F

与mB7H4-IgV的IgV结构域结合

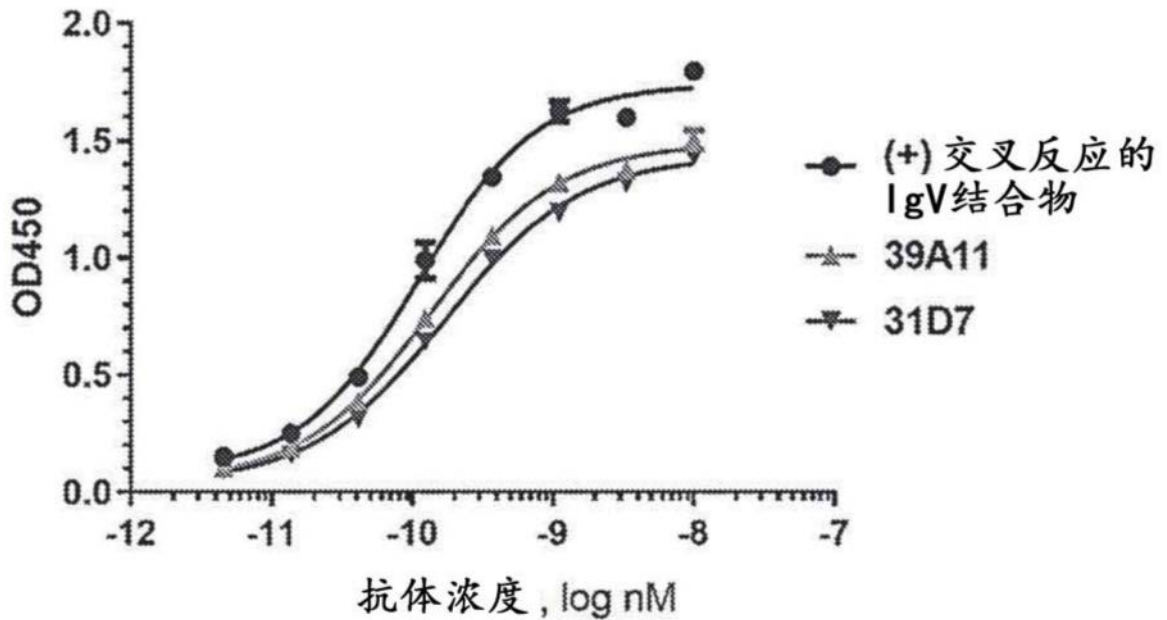


图8G

与mB7H4-IgC的IgC结构域结合

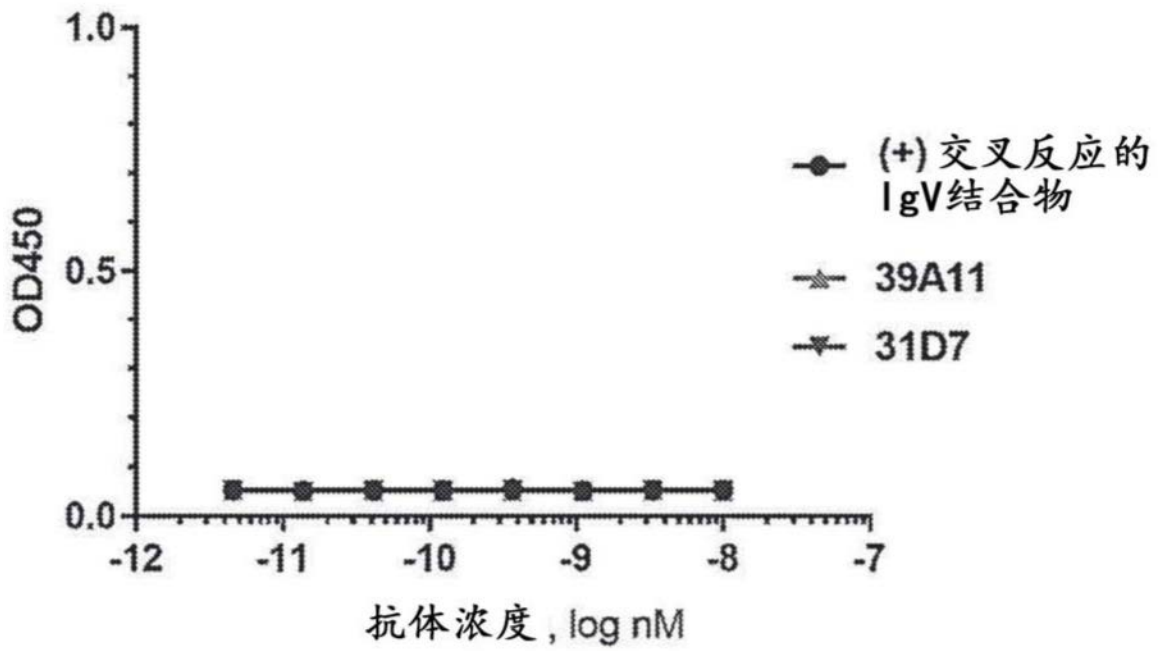


图8H

与hB7H4-CHO结合

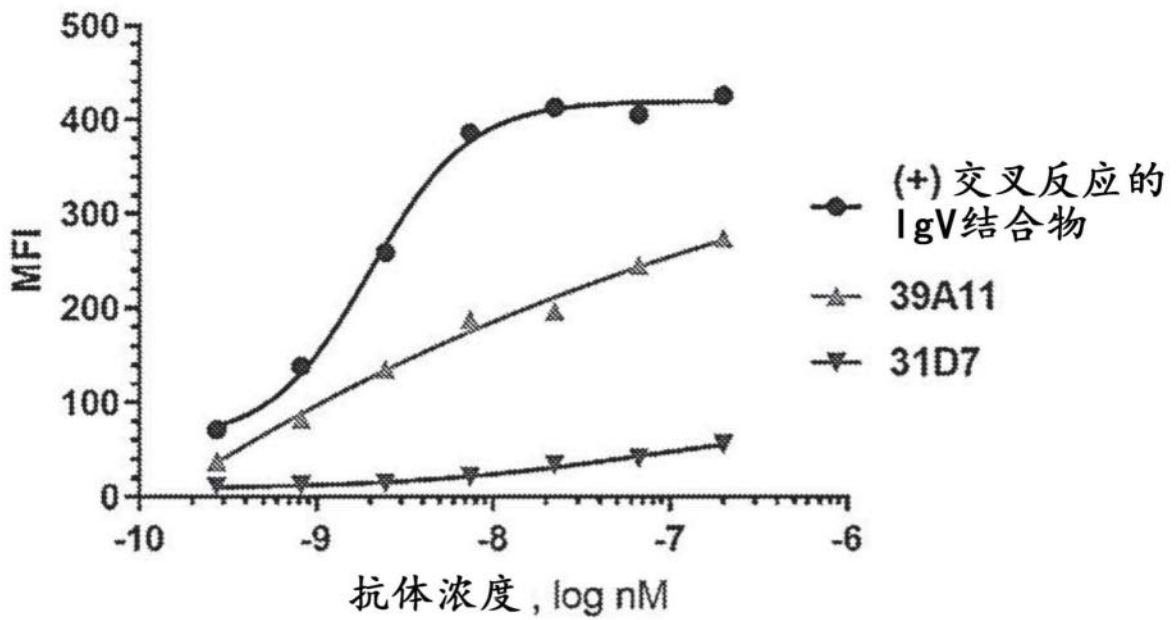


图8I

与mB7H4-CHO结合

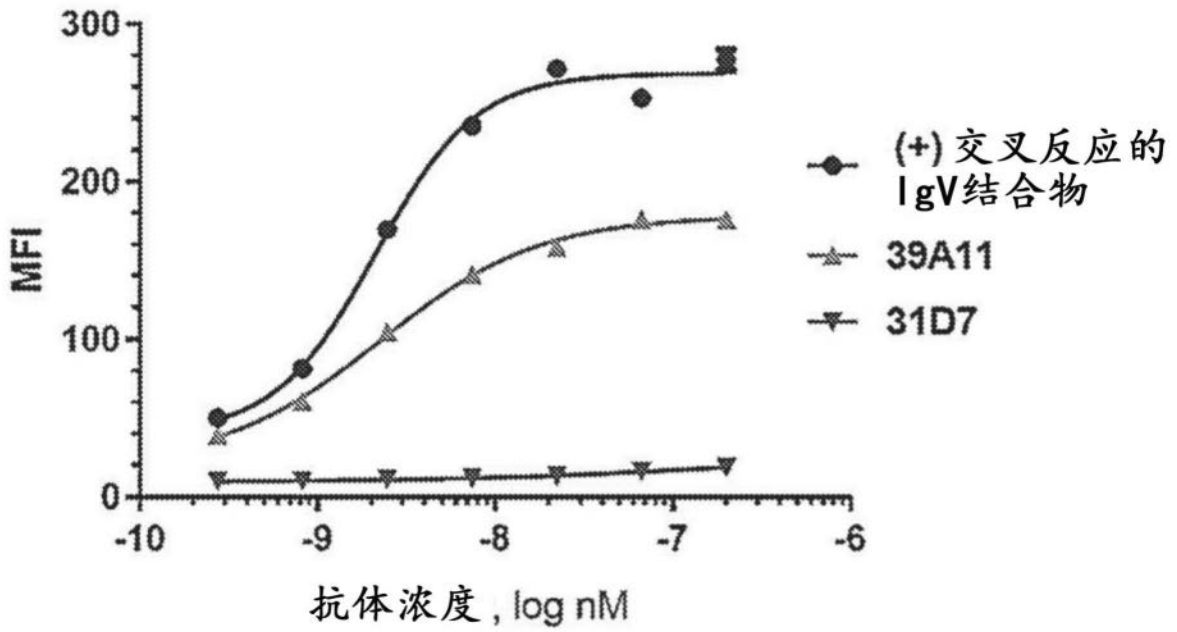


图8J

与hB7H4-Fc结合

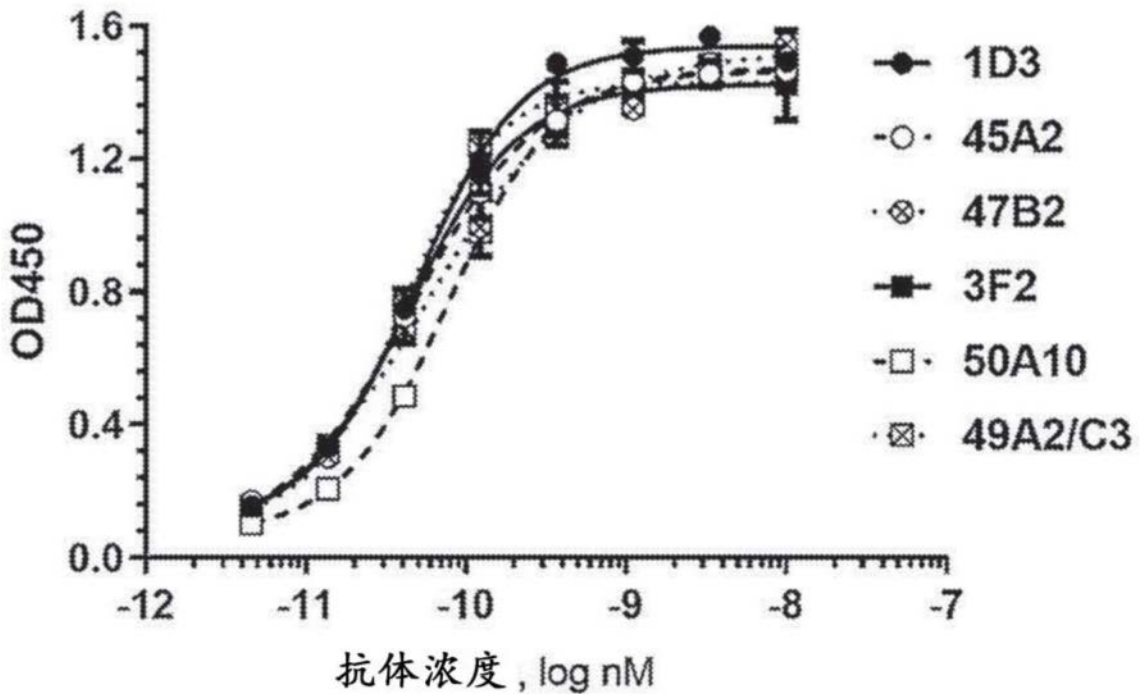


图9A

与mB7-H7-Fc结合

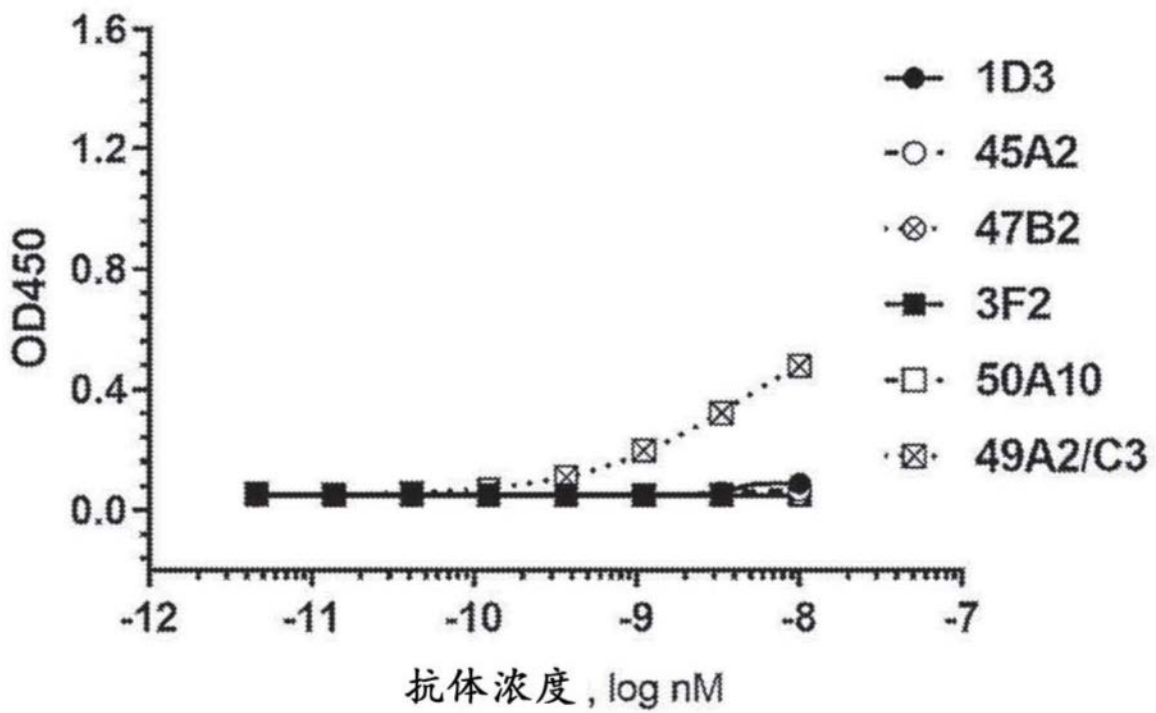


图9B

与hB7H4-his结合

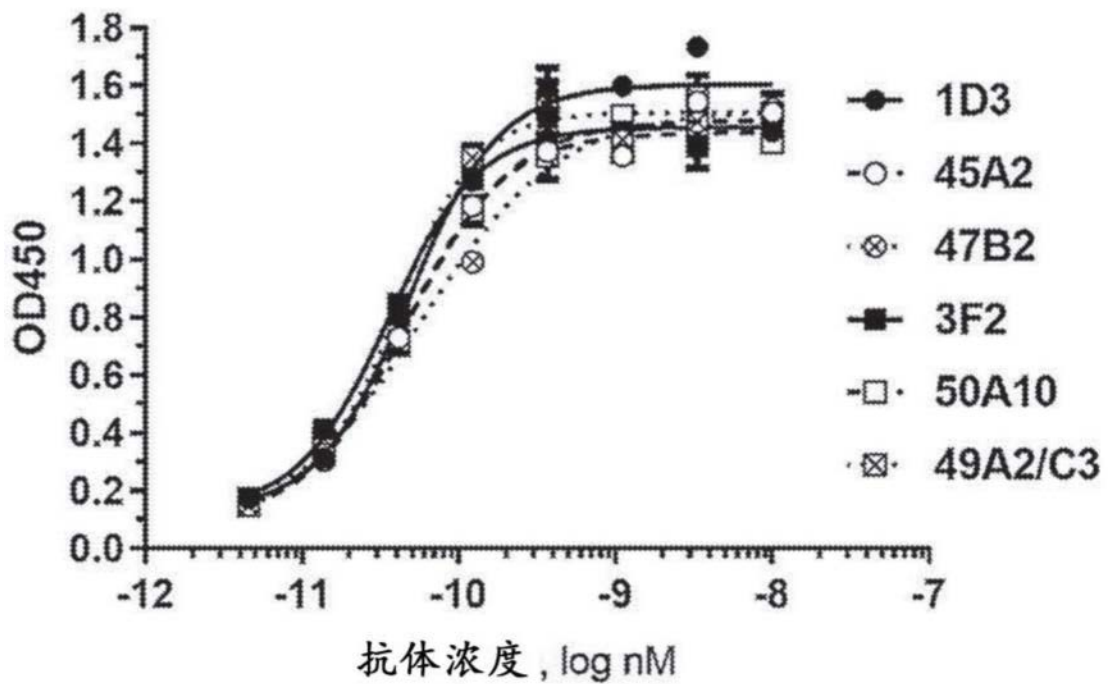


图9C

与mB7H4-his结合

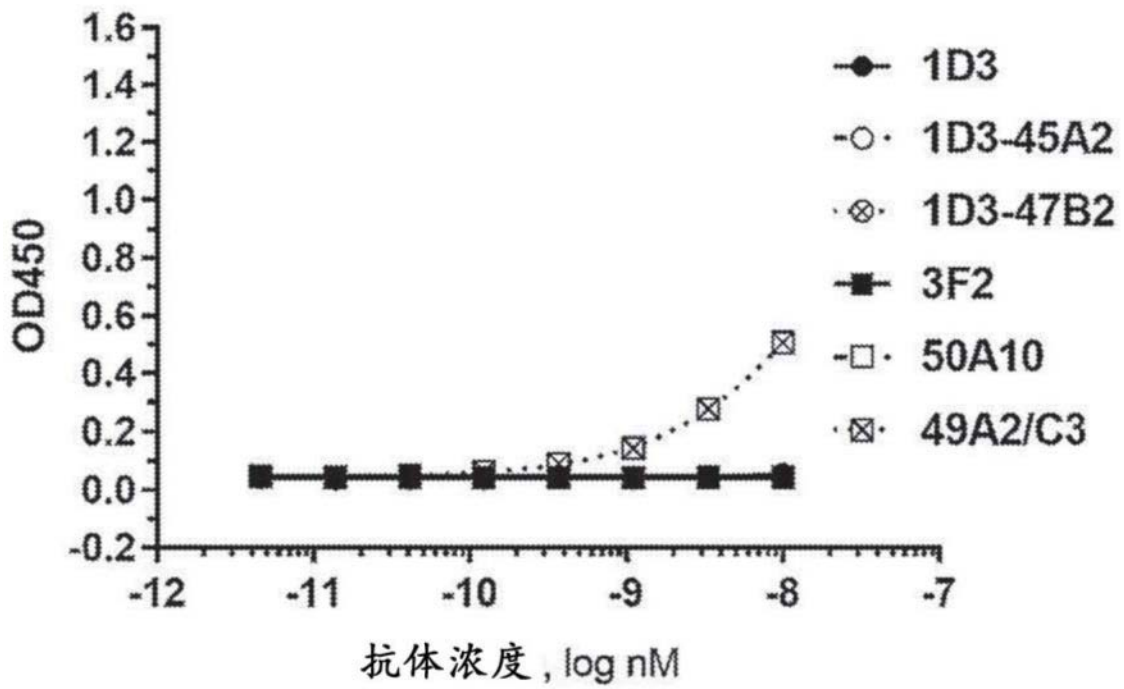


图9D

与hB7H4的IgV结构域结合

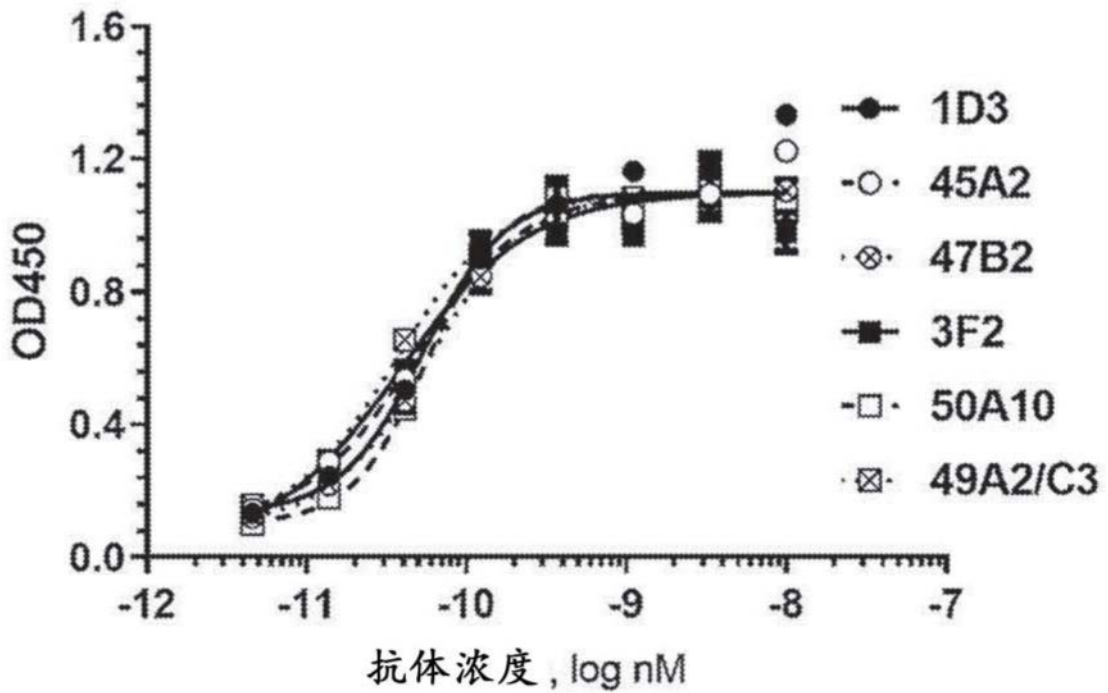


图9E

与mB7H4的IgV结构域结合

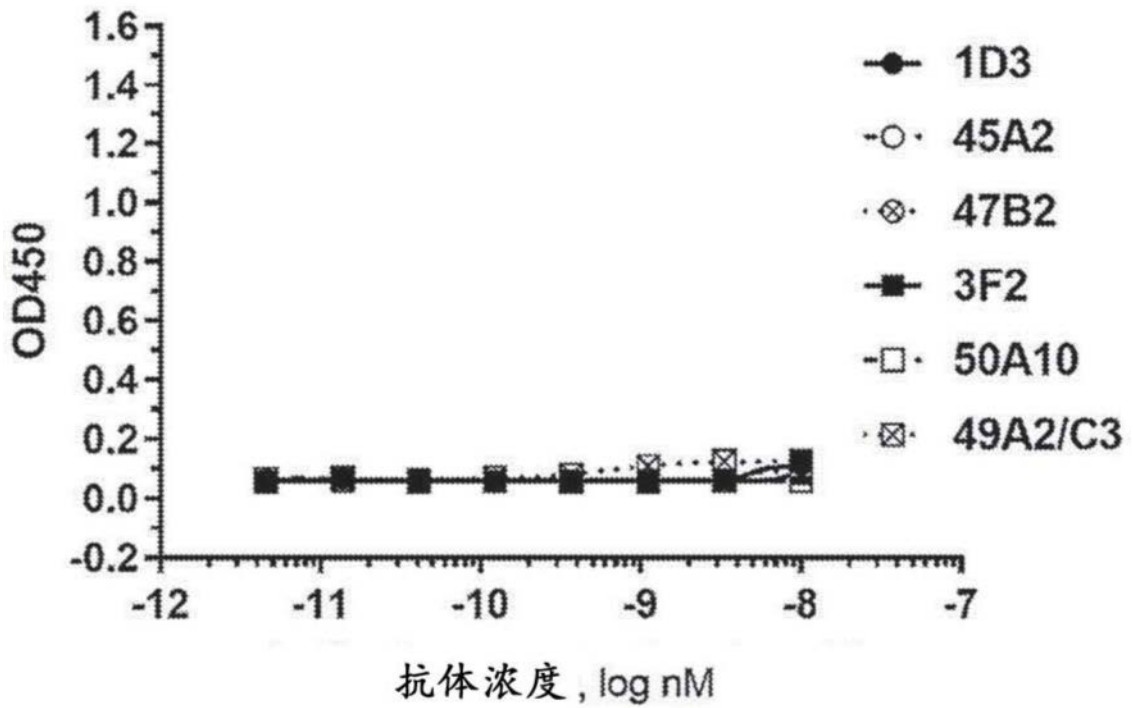


图9F

与mB7H4的IgC结构域结合

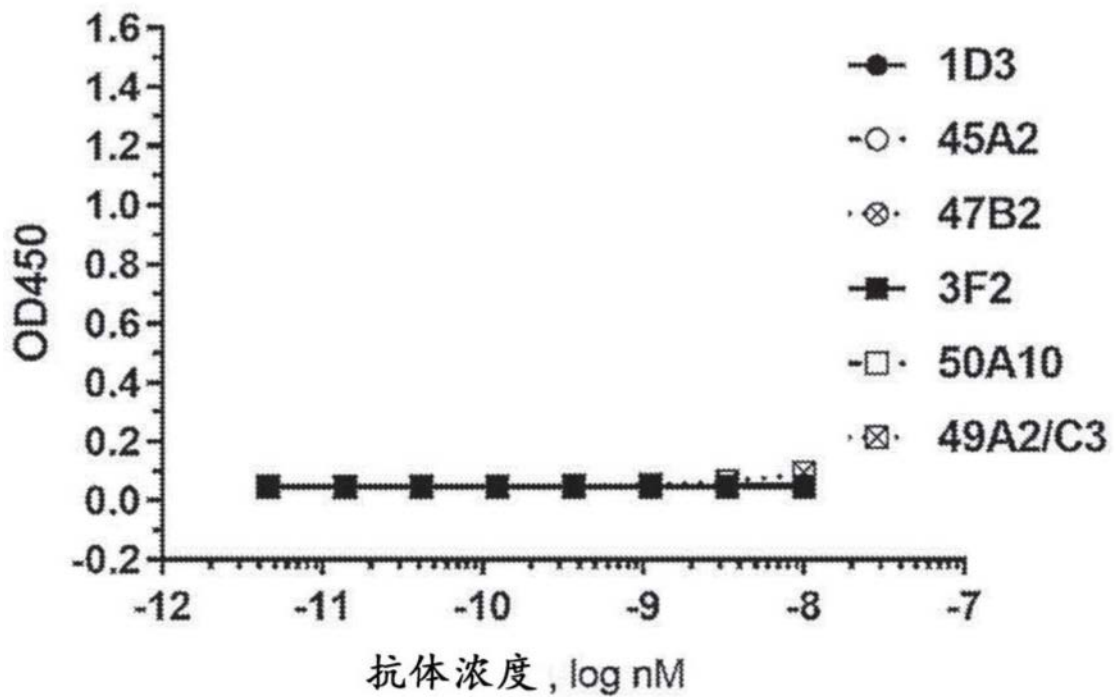


图9G

与hB7H4的IgC结构域结合

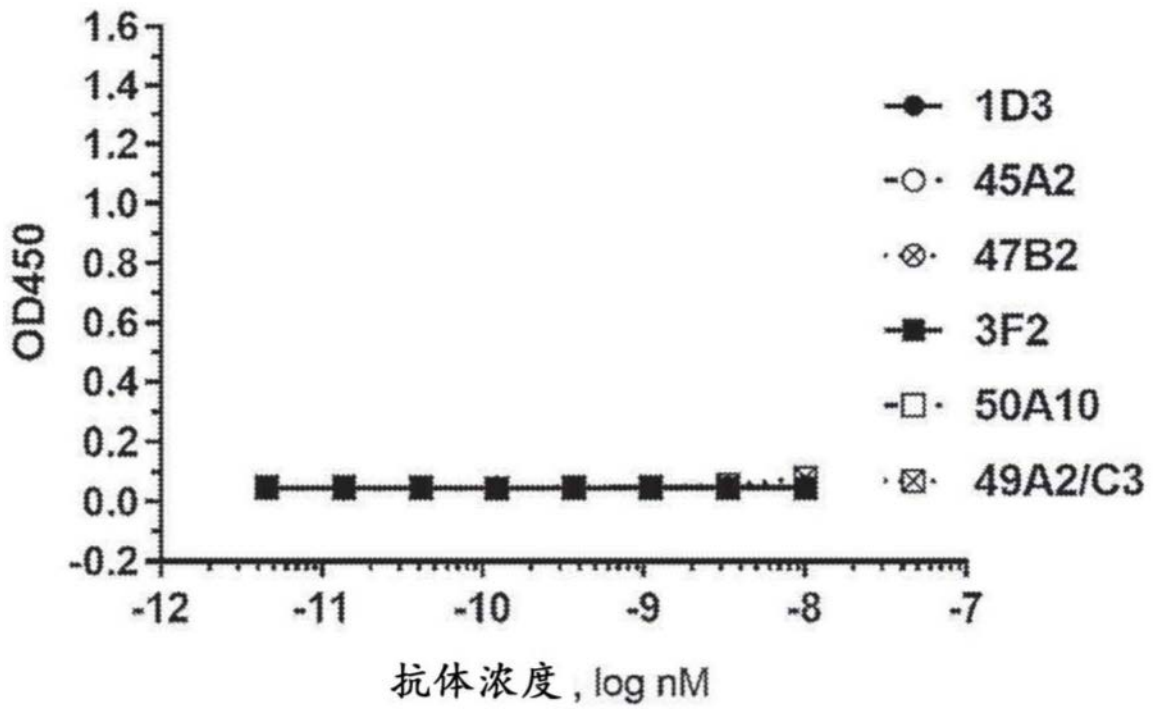


图9H

与hB7H4-CHO结合

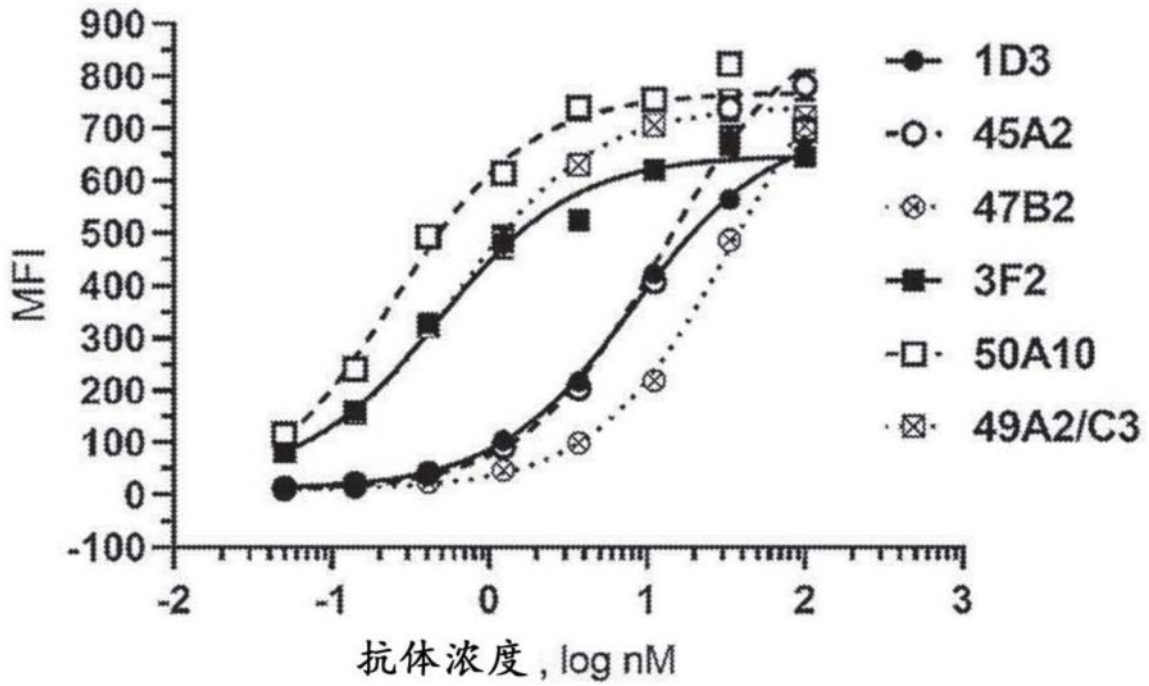


图10A

与CHO-mB7H4结合

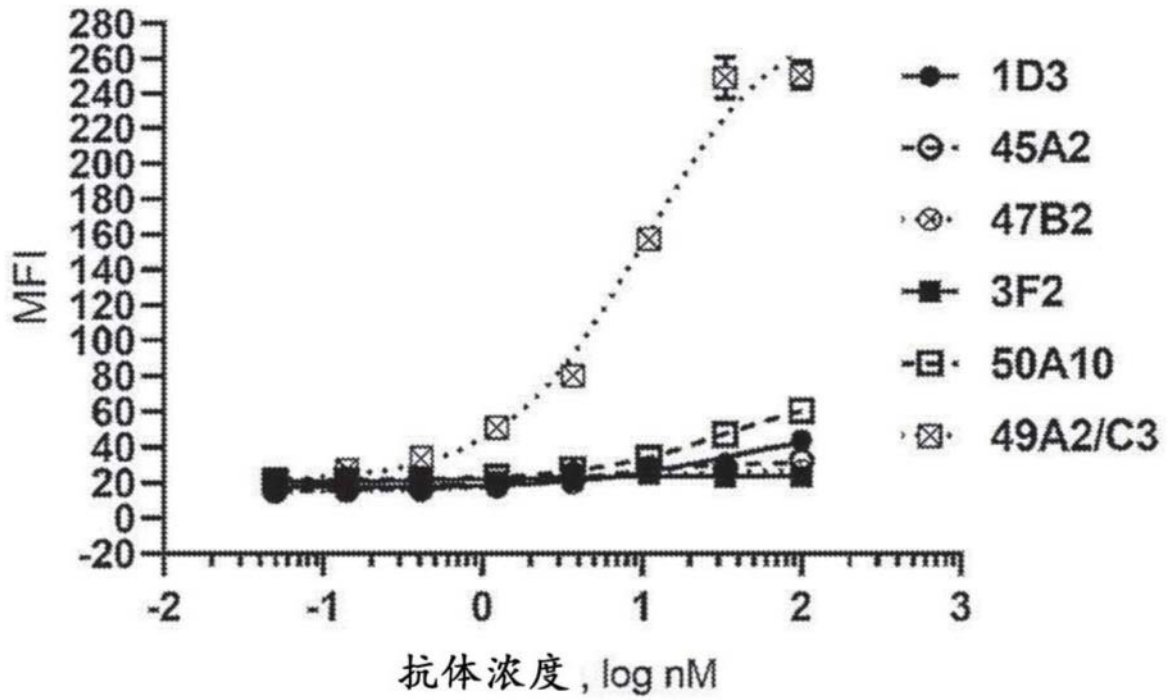


图10B

与MDA-MB-468结合

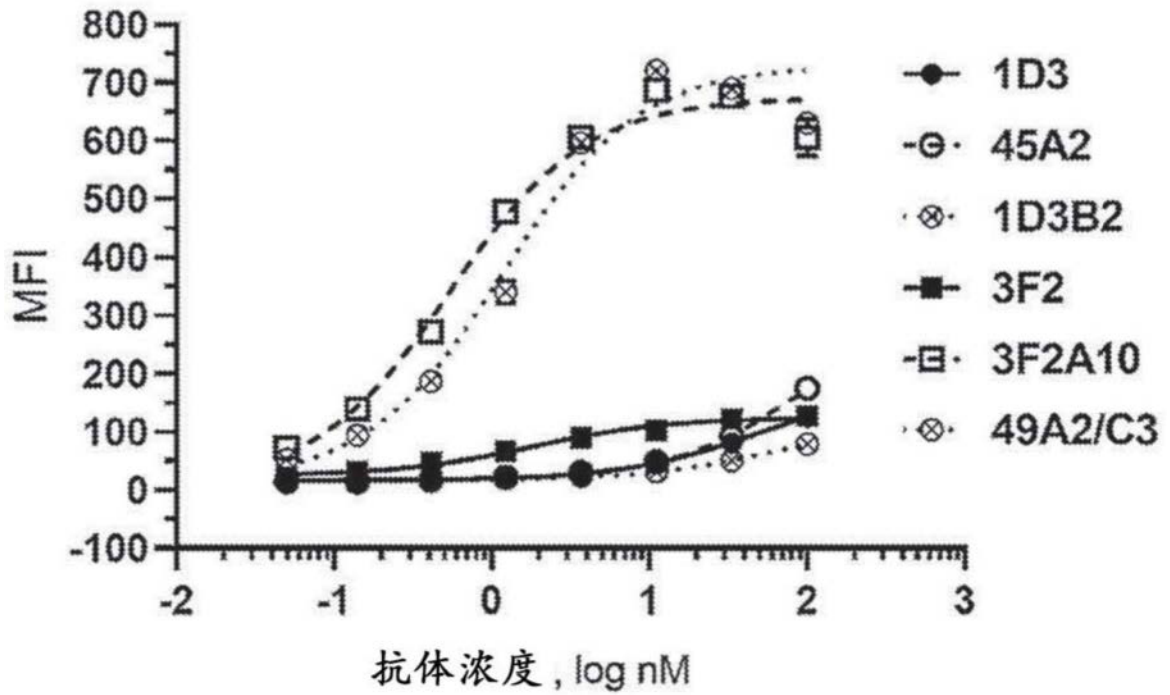


图10C

与SK-BR-3结合

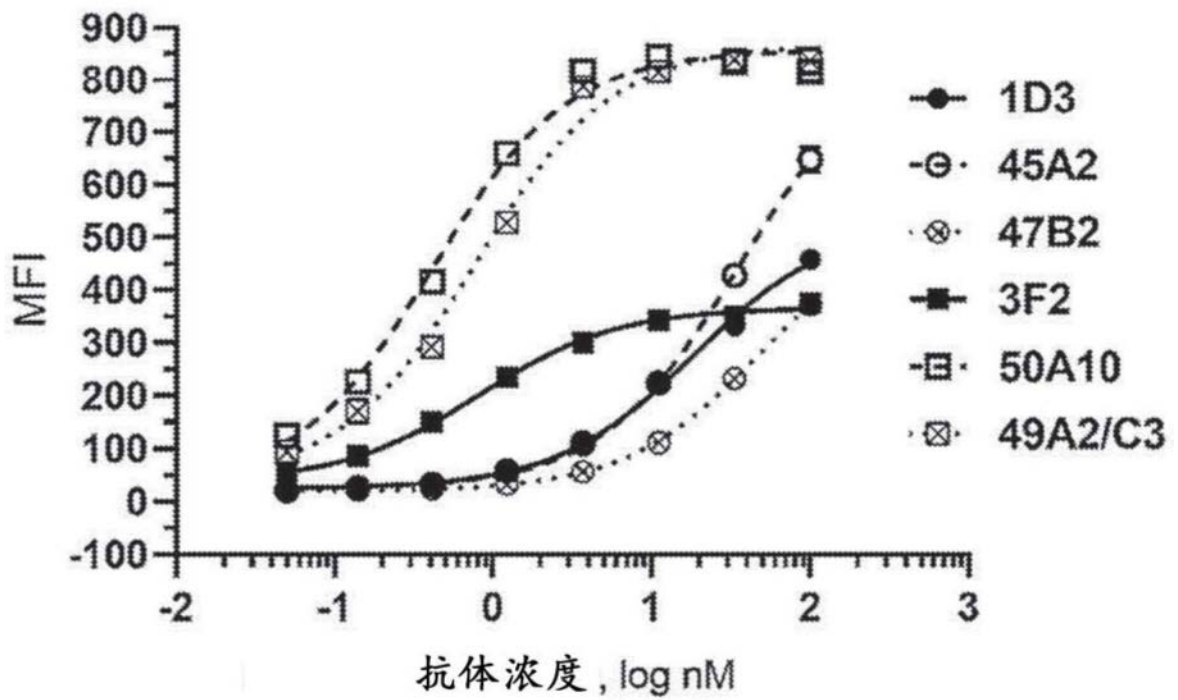


图10D

与hB7H4-Fc结合

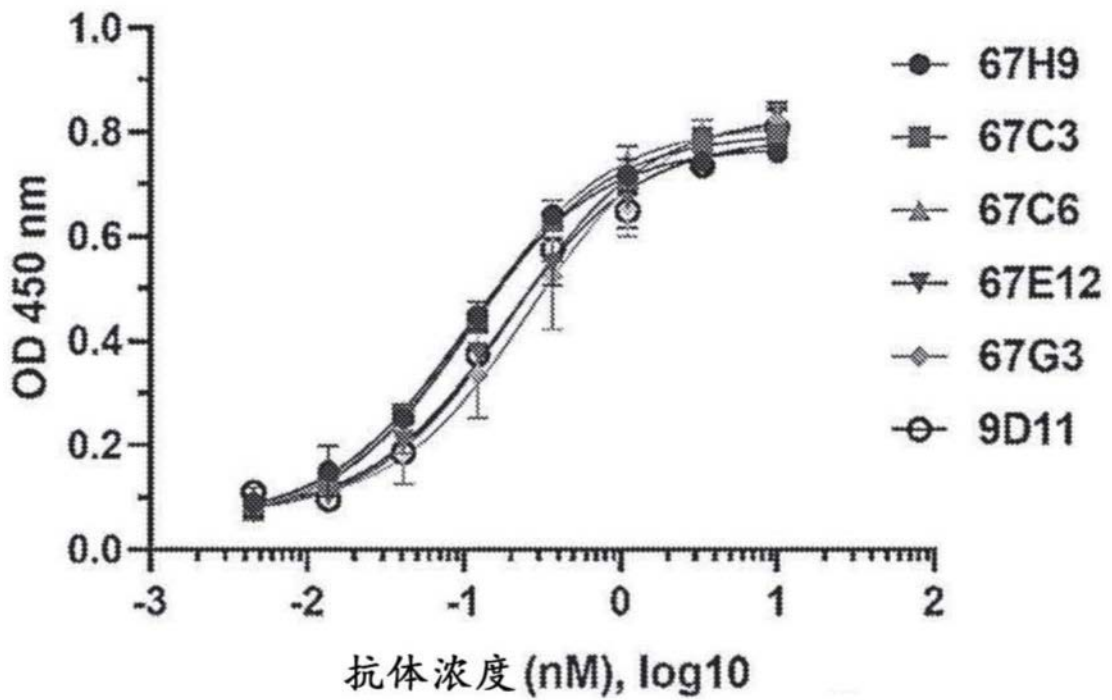


图11A

与mB7H4-Fc结合

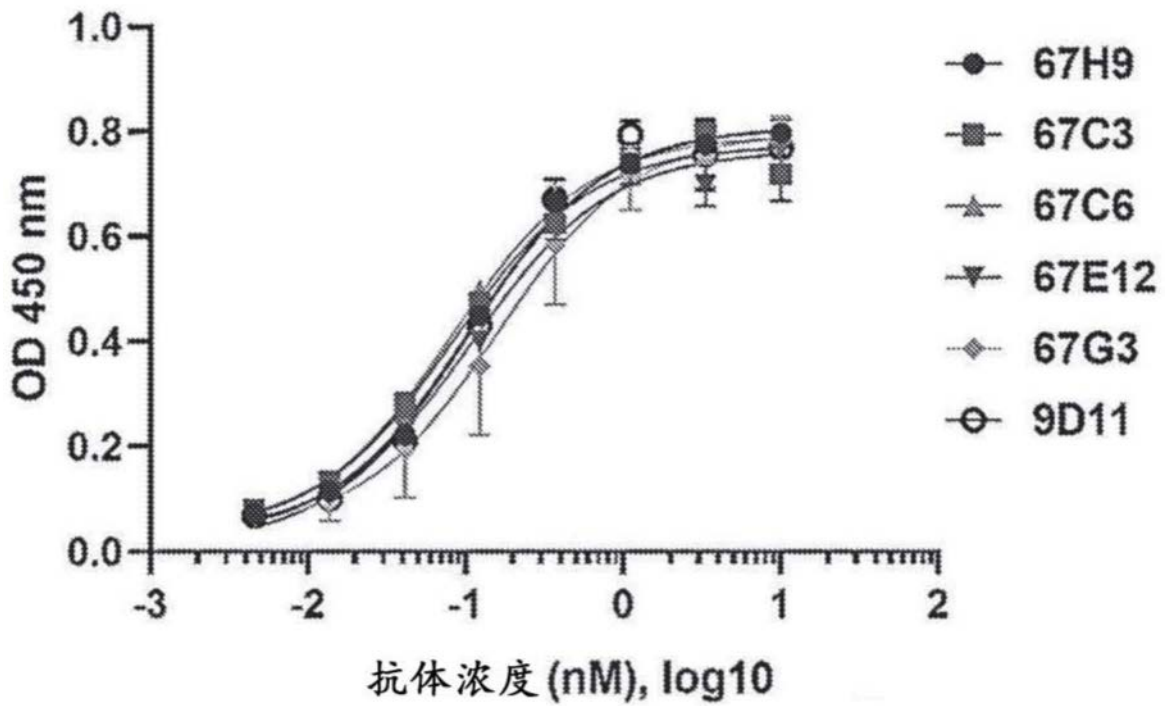


图11B

与hB7H4的IgC结构域结合

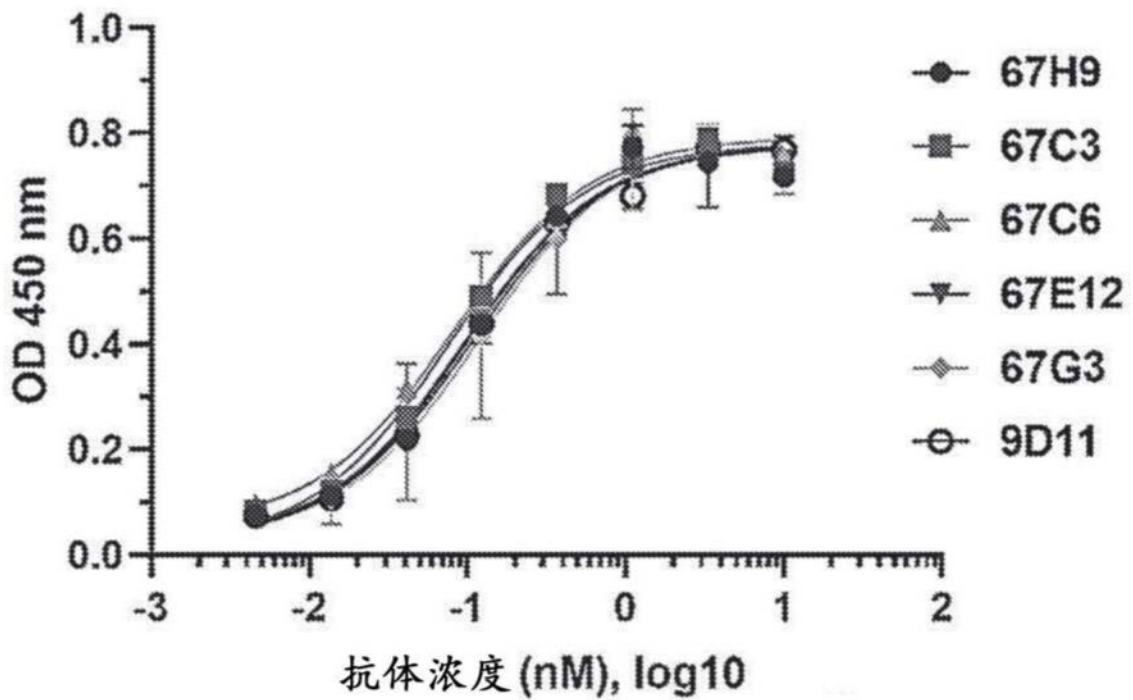


图11C

与mB7H4的IgC结构域结合

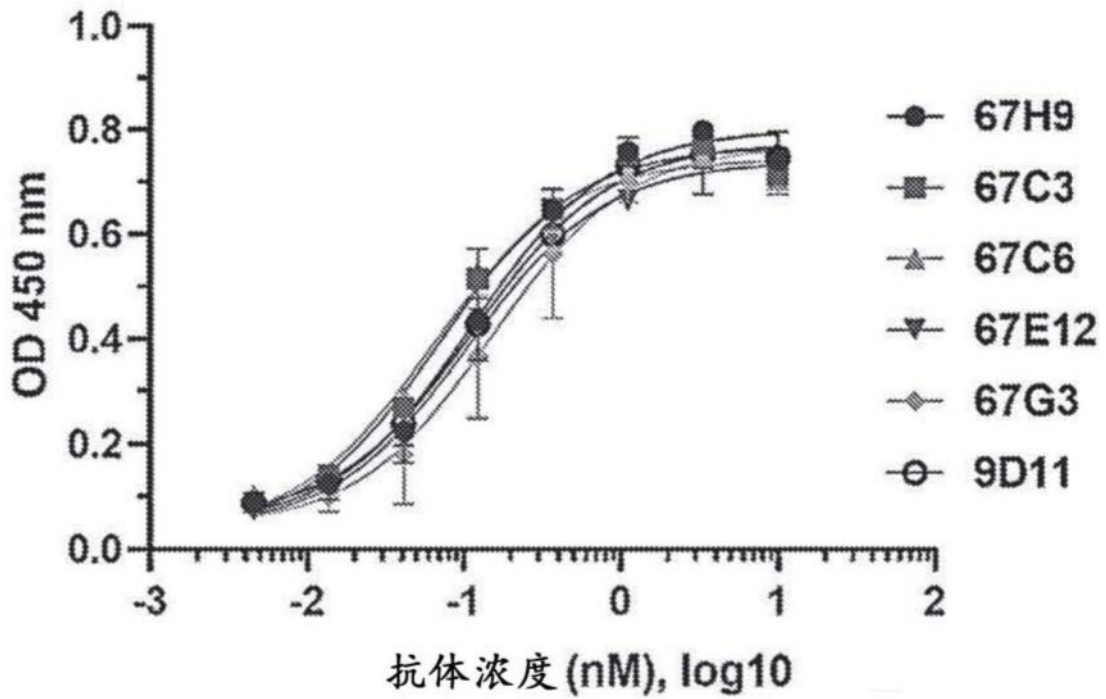


图11D

与hB7H4的IgV结构域结合

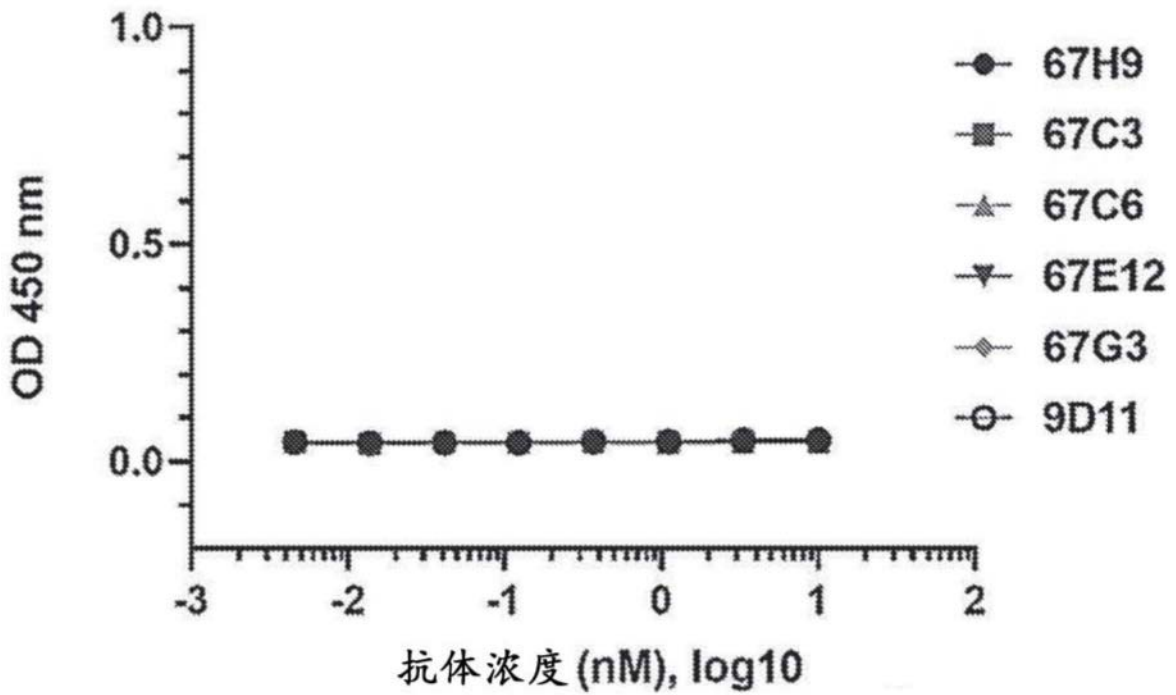


图11E

与mB7H4的IgV结构域结合

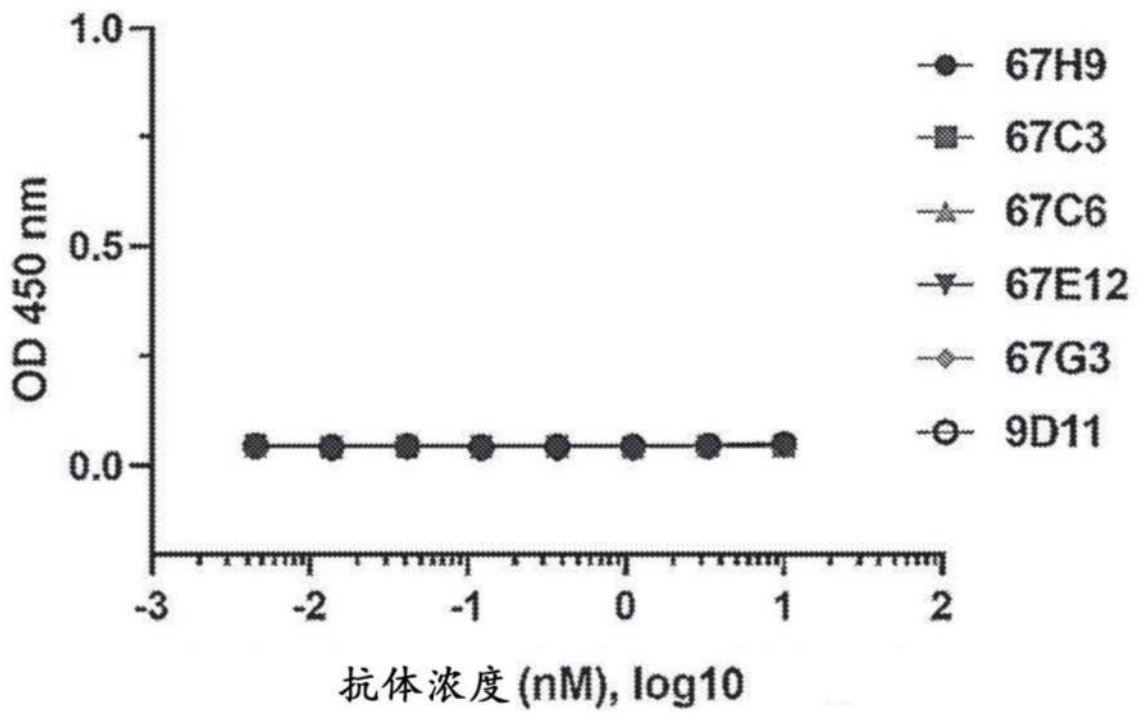


图11F

与hB7H4-Fc结合

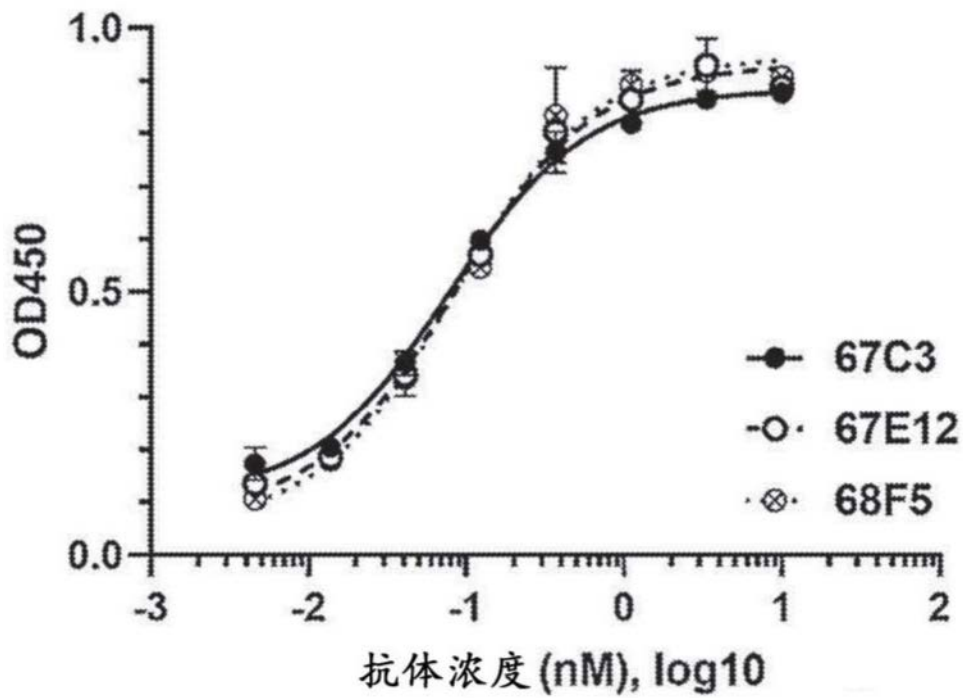


图12A

与mB7H4-Fc结合

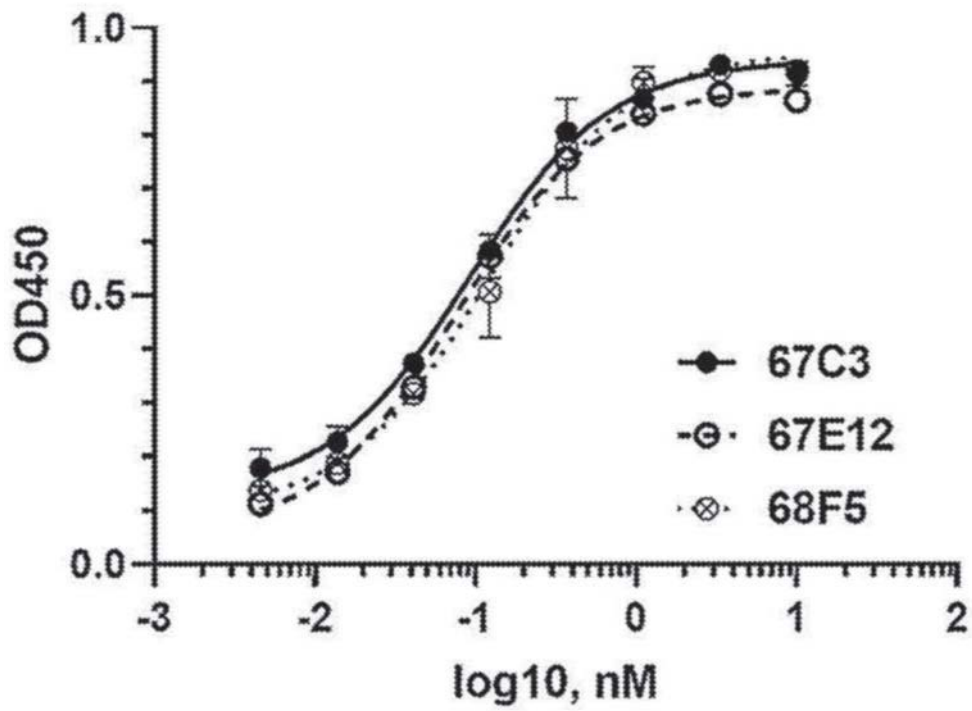


图12B

与hB7H4- his结合

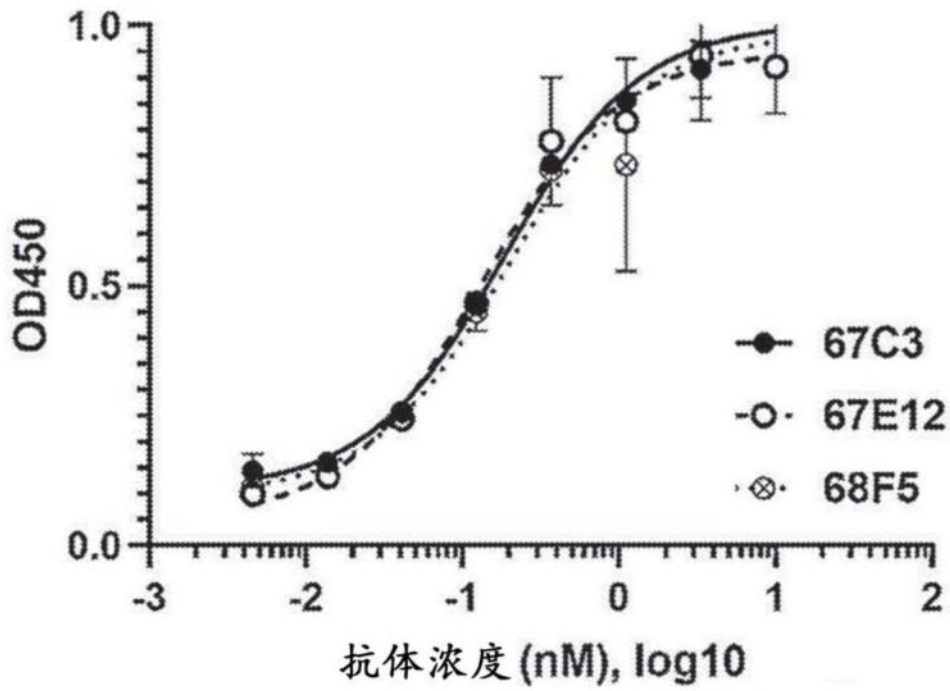


图12C

与mB7H4- his结合

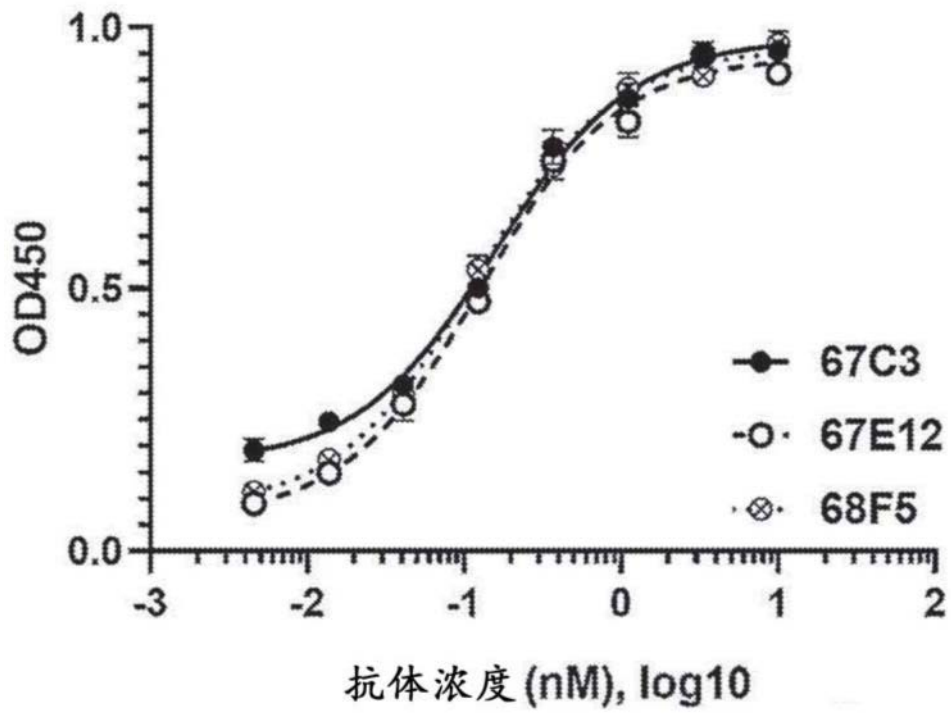


图12D

与mB7H4-CT26结合

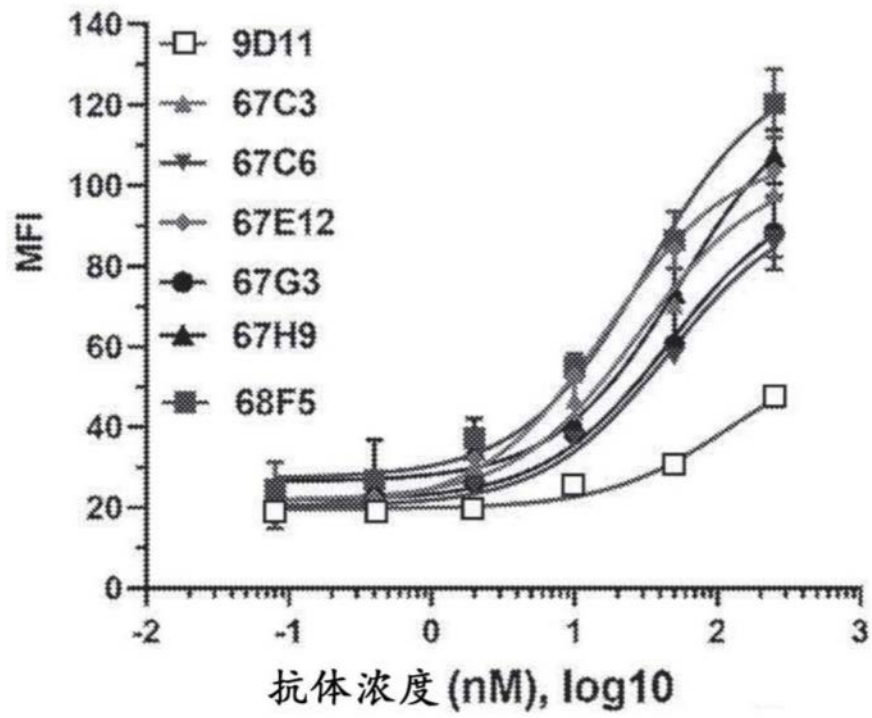


图13A

与SK-BR-3结合

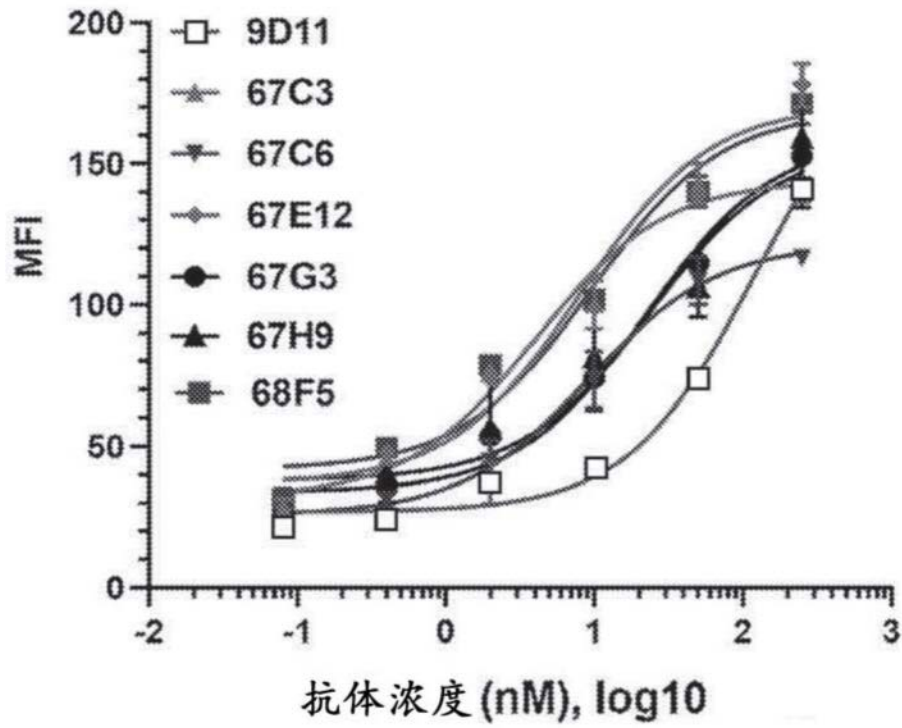


图13B

与hB7H4-Fc结合

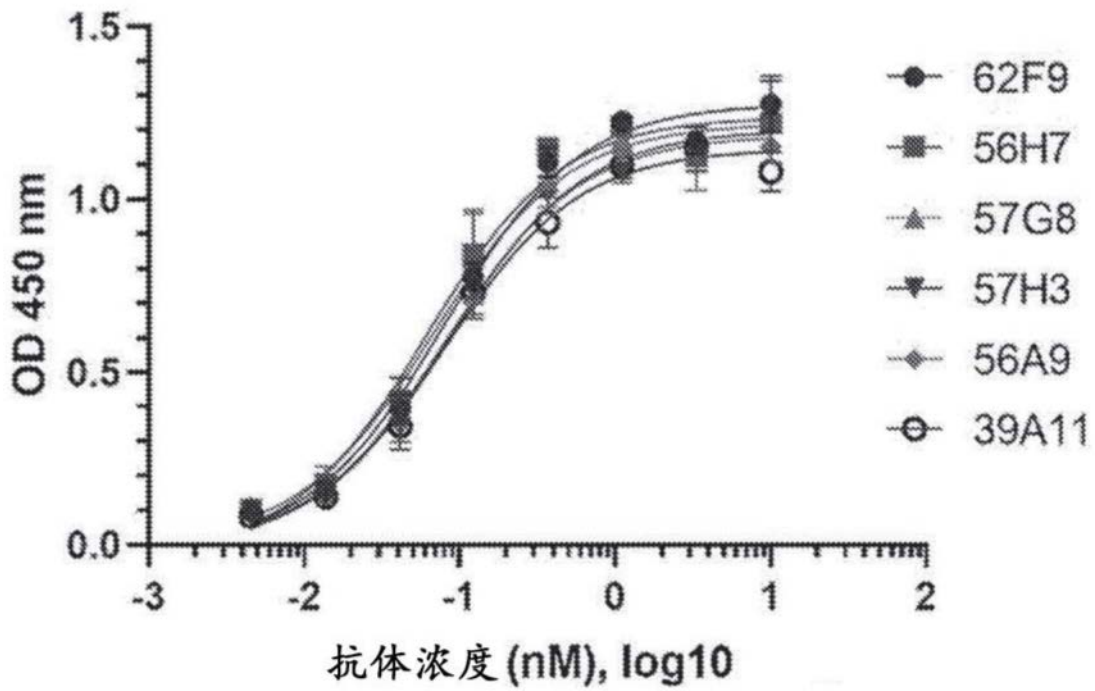


图14A

与mB7H4-Fc结合

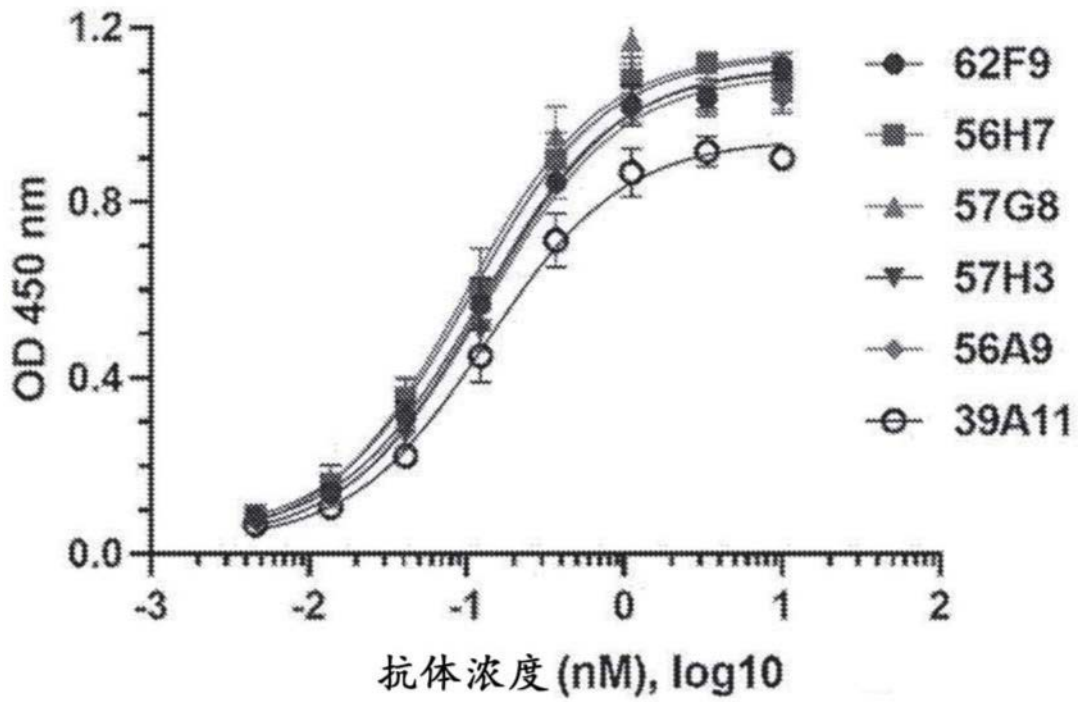


图14B

与hB7H4的IgV结构域结合

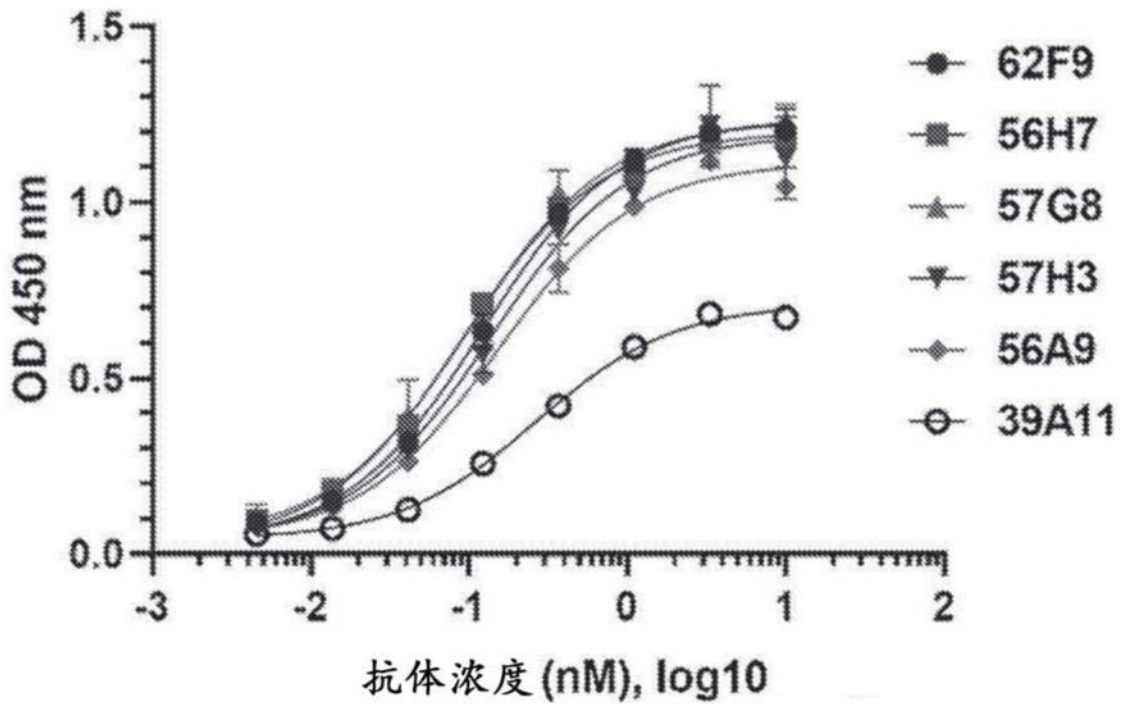


图14C

与mB7H4的IgV结构域结合

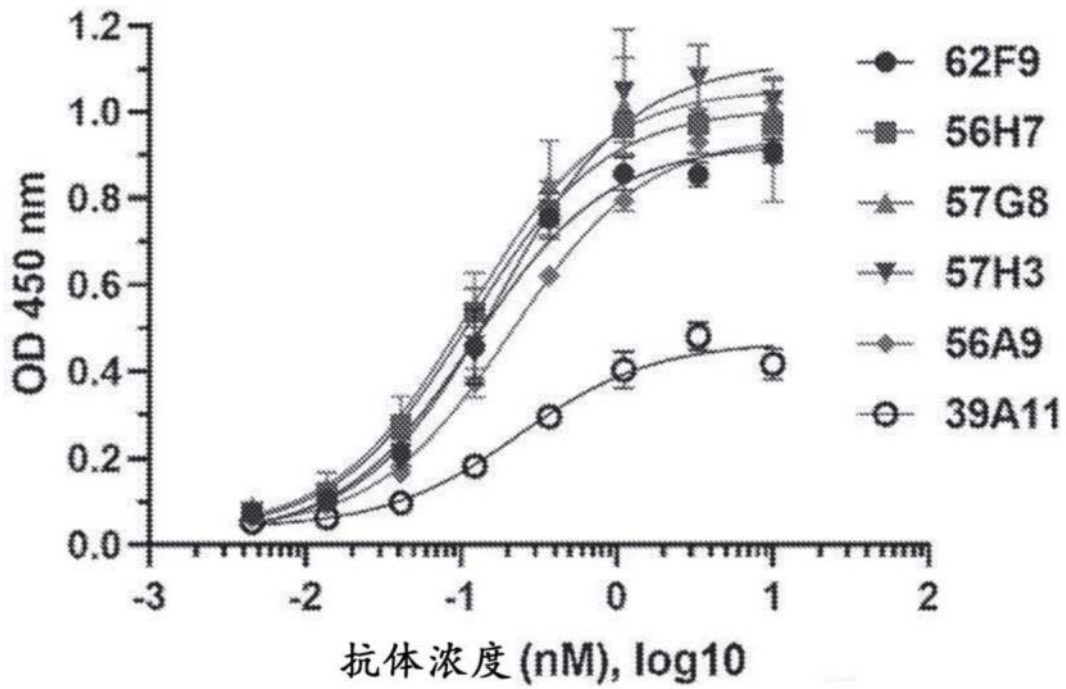


图14D

与hB7H4的IgC结构域结合

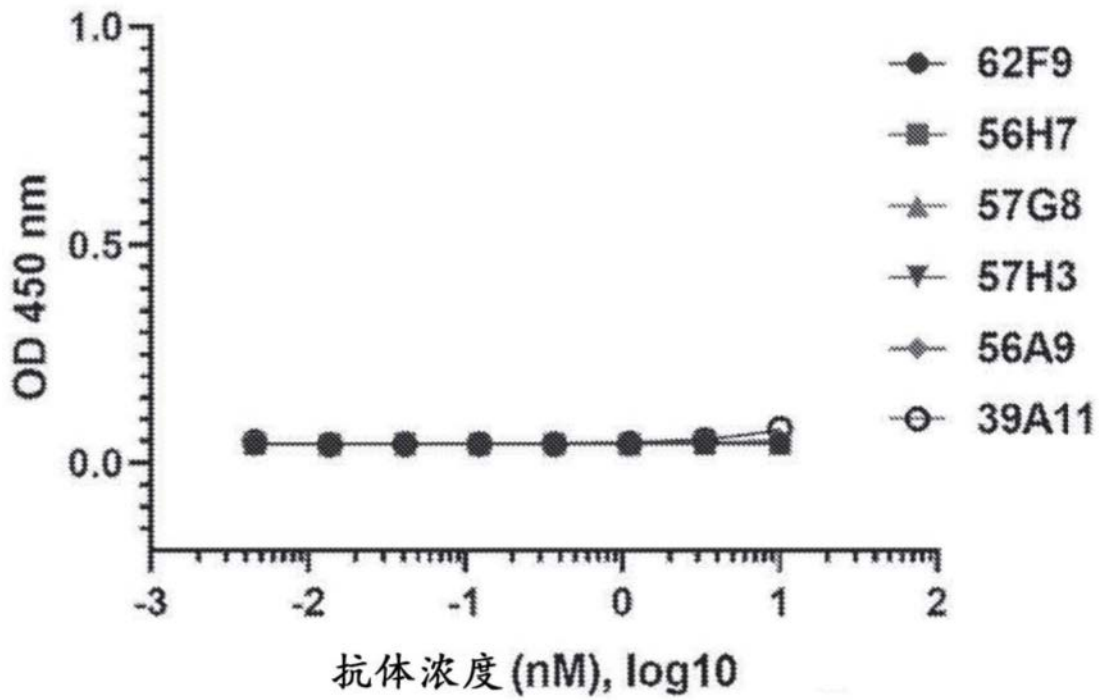


图14E

与mB7H4的IgC结构域结合

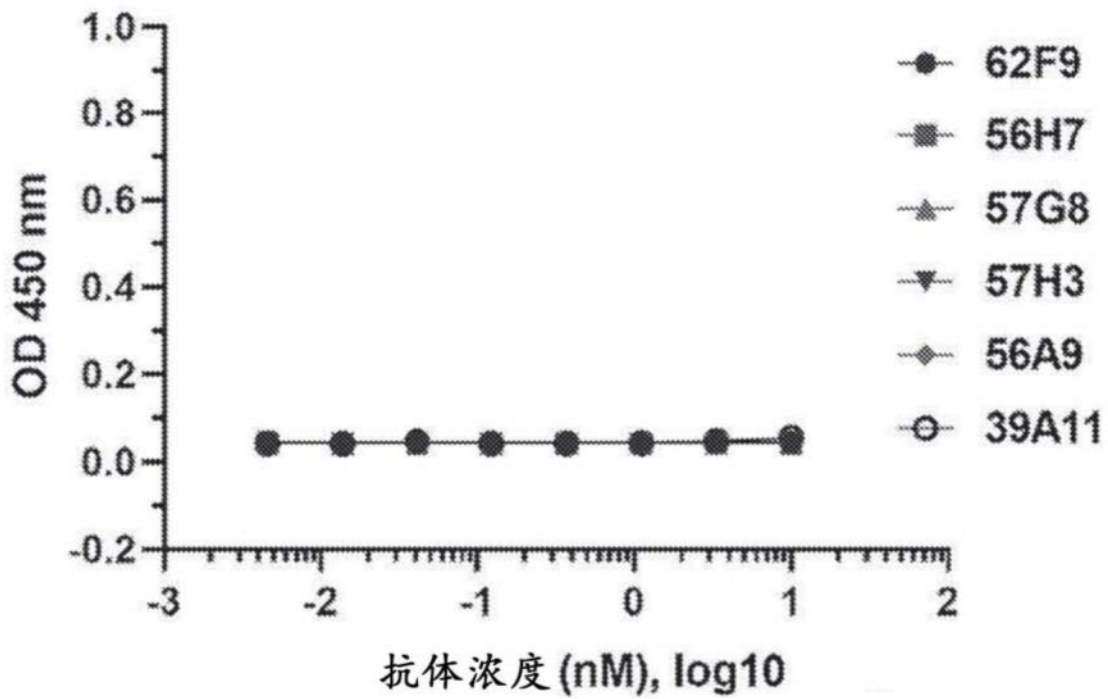


图14F

与mB7H4-CT26结合

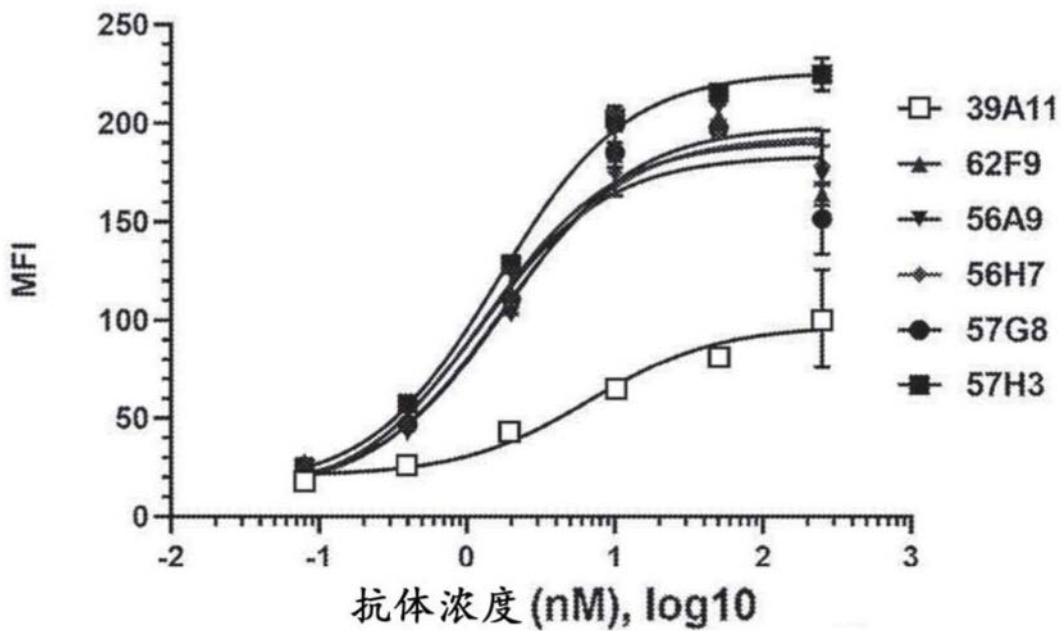


图15A

与SK-BR-3结合

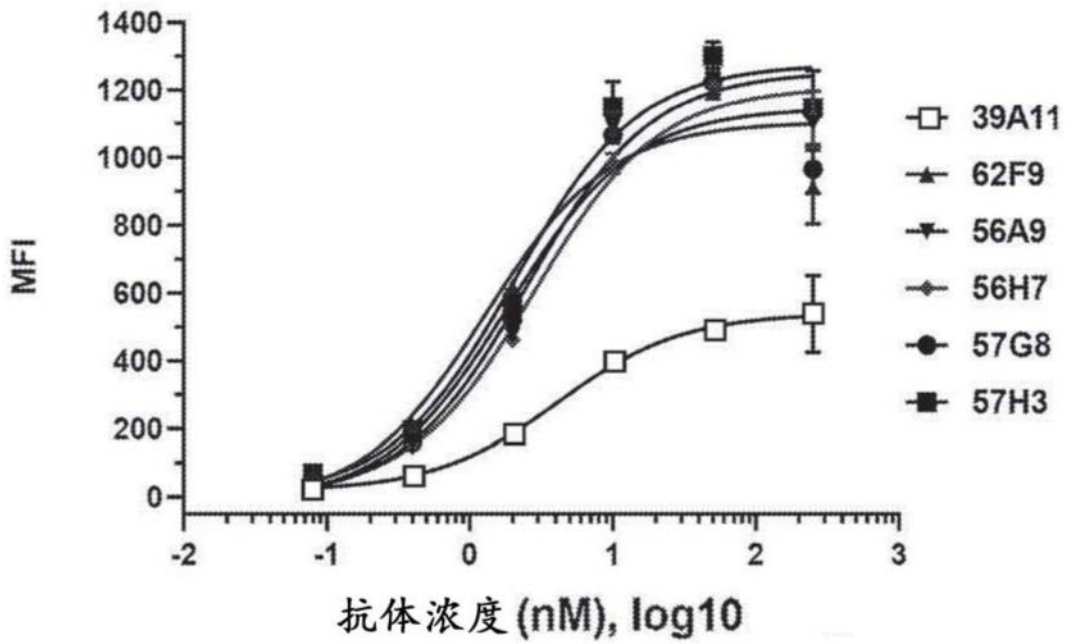


图15B

与hB7H4-Fc结合

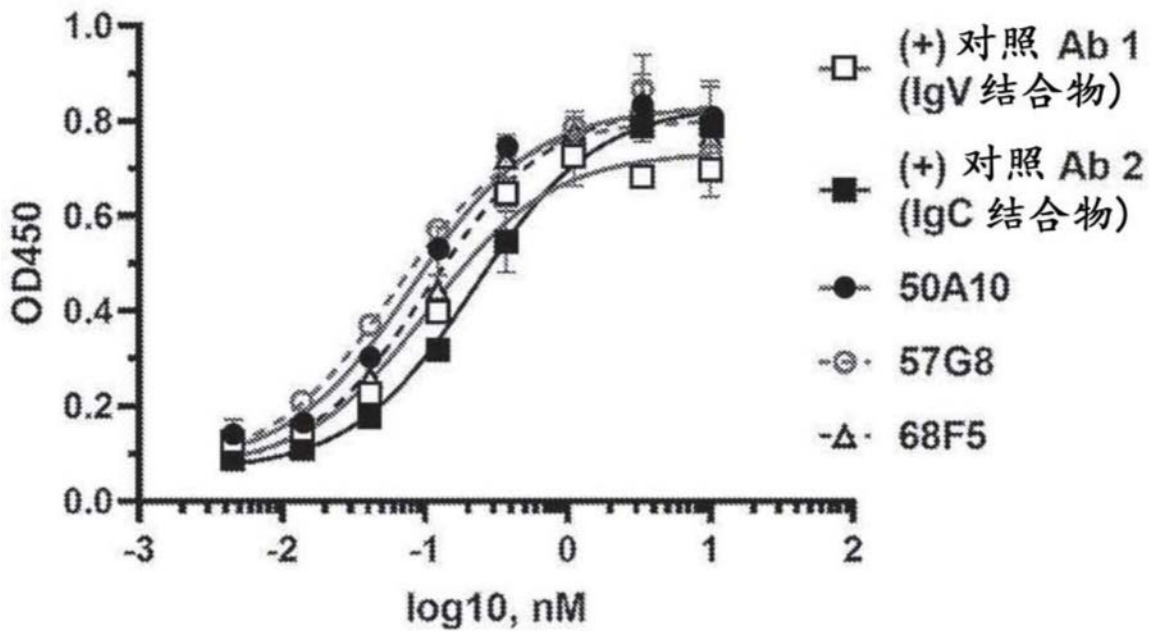


图16A

与mB7H4-Fc结合

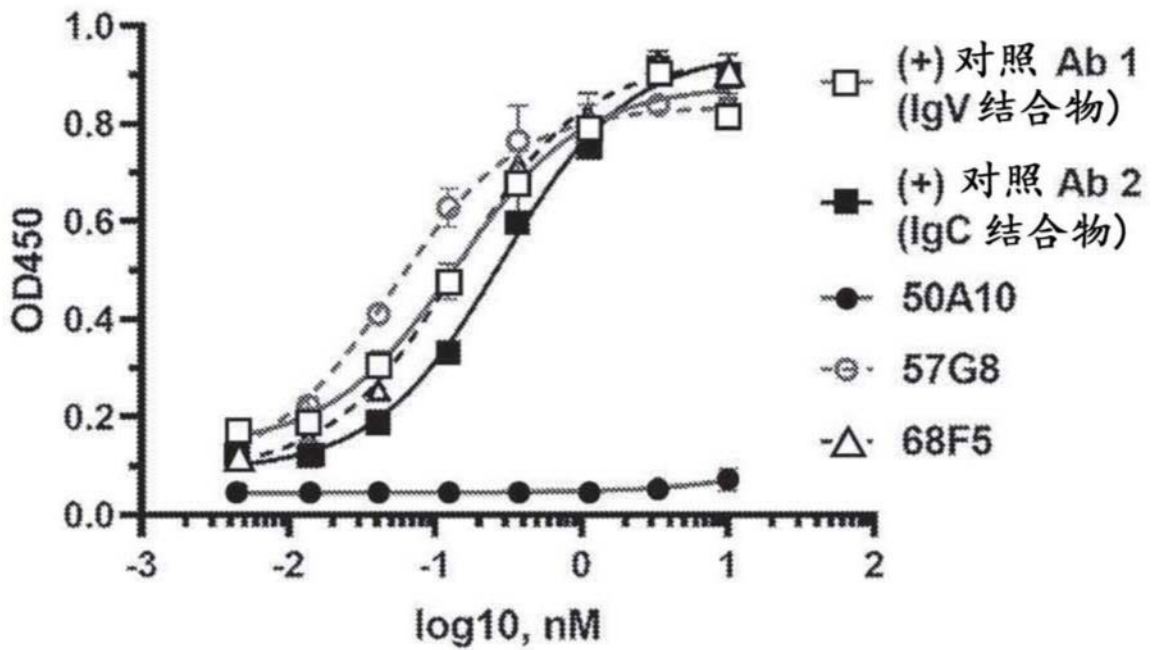


图16B

与hB7H4 IgV结构域结合

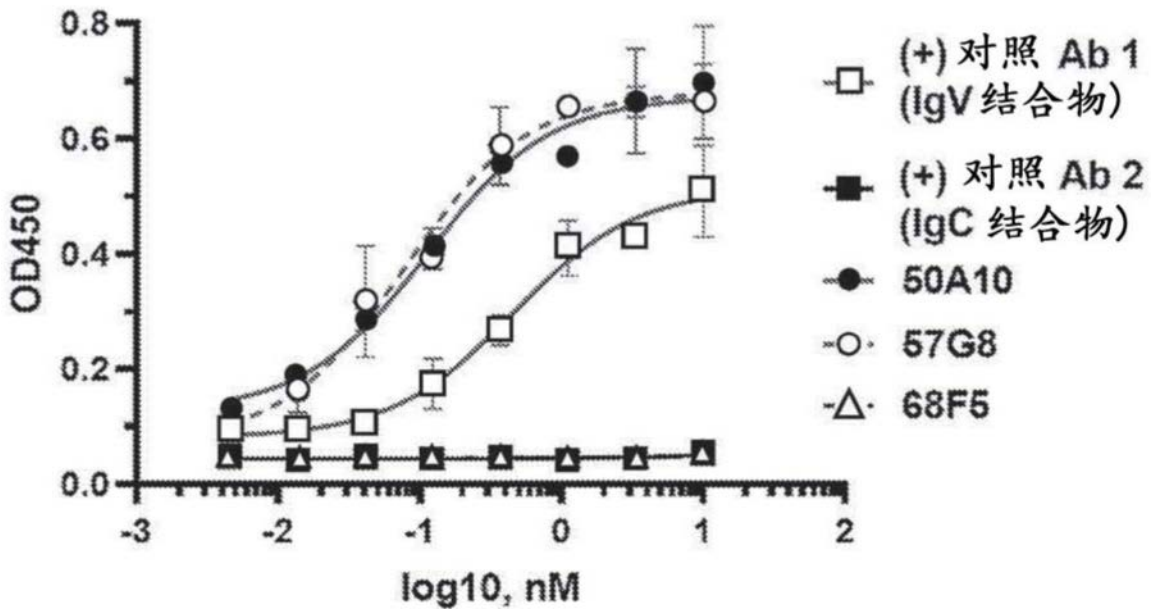


图16C

与mB7H4 IgV结构域结合

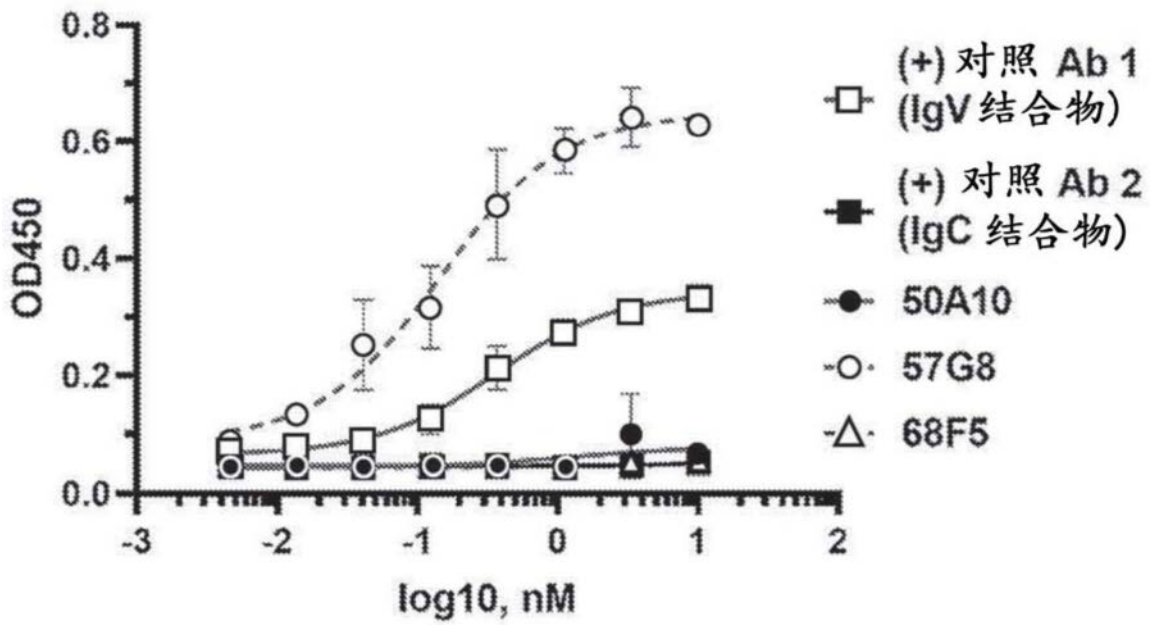


图16D

与hB7H4 IgC结构域结合

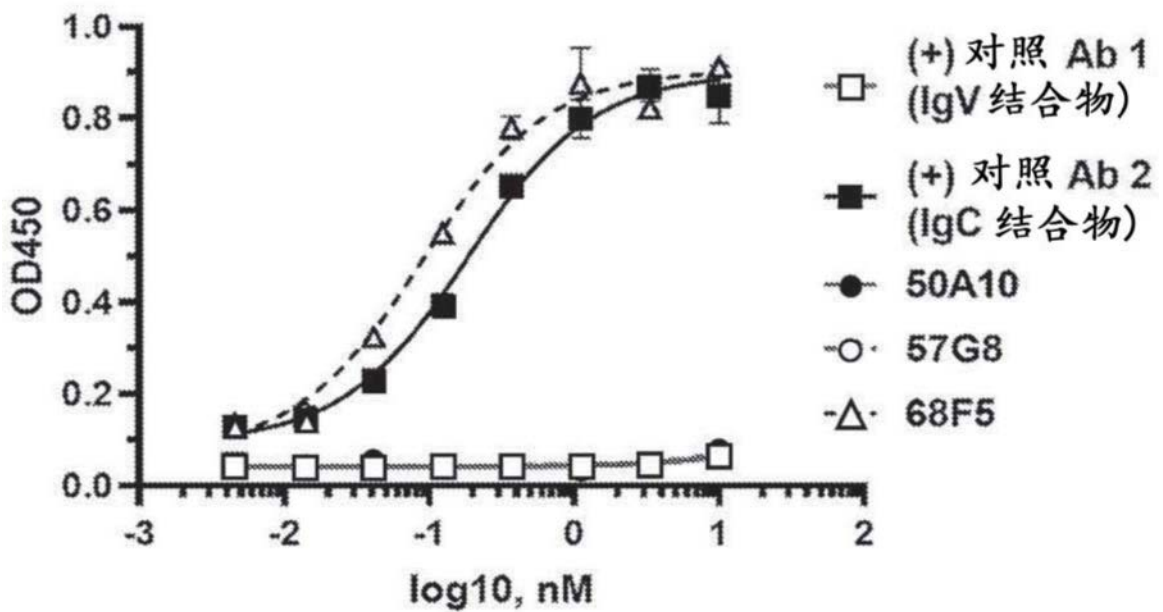


图16E

与mB7H4 IgC结构域结合

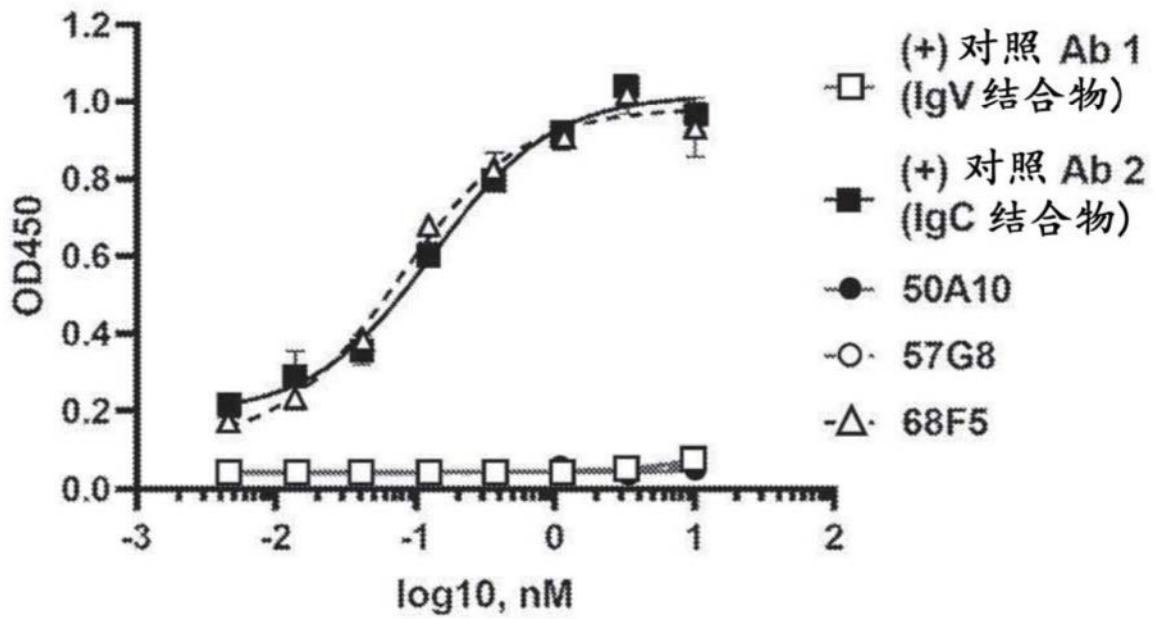


图16F

与SK-BR-3结合

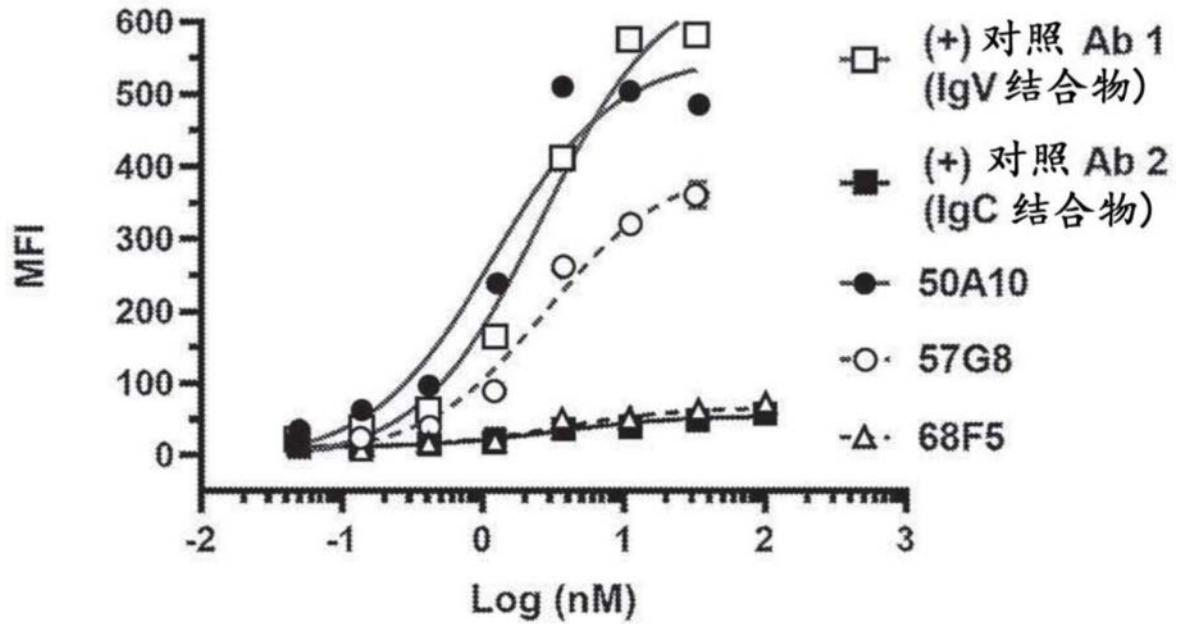


图17A

与mB7H4/CT26结合

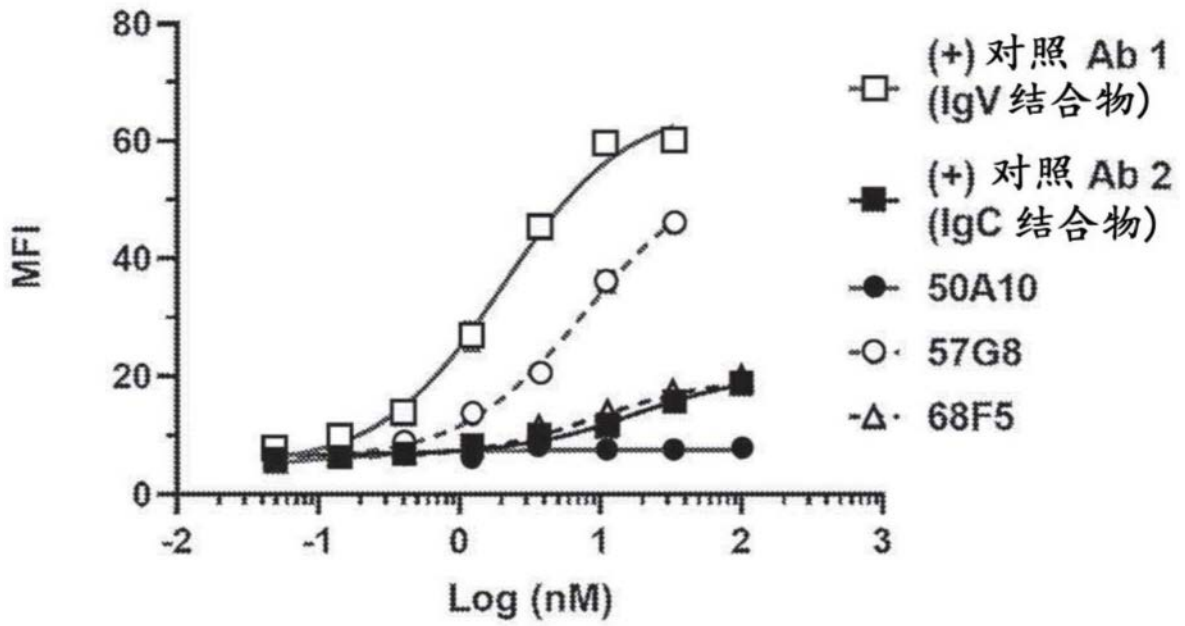


图17B

与MDA-MB-468结合

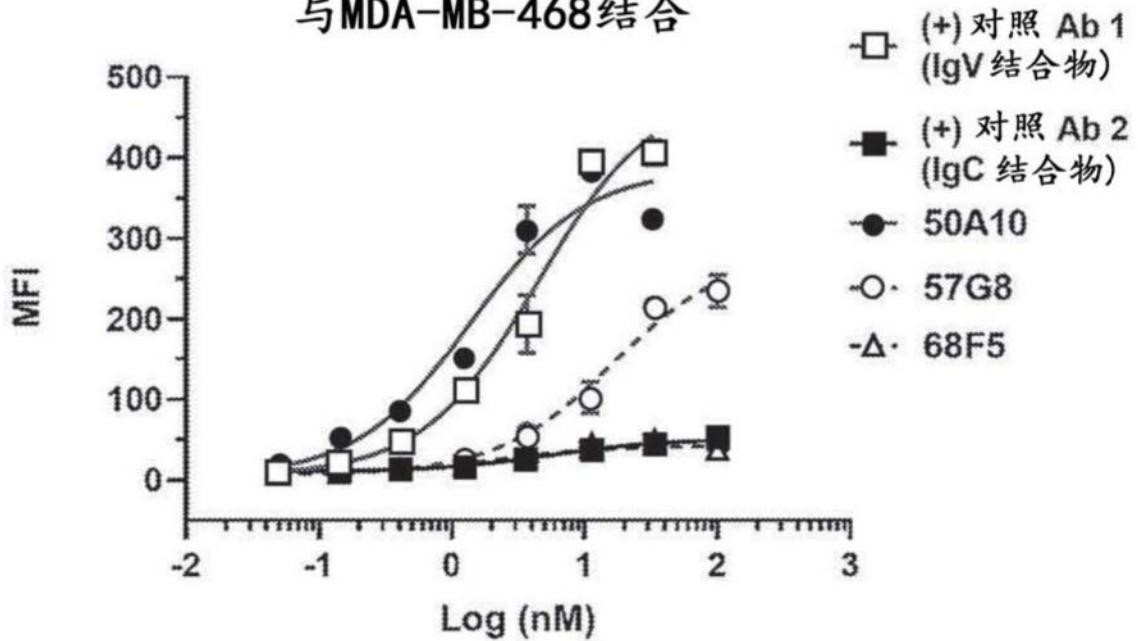


图17C

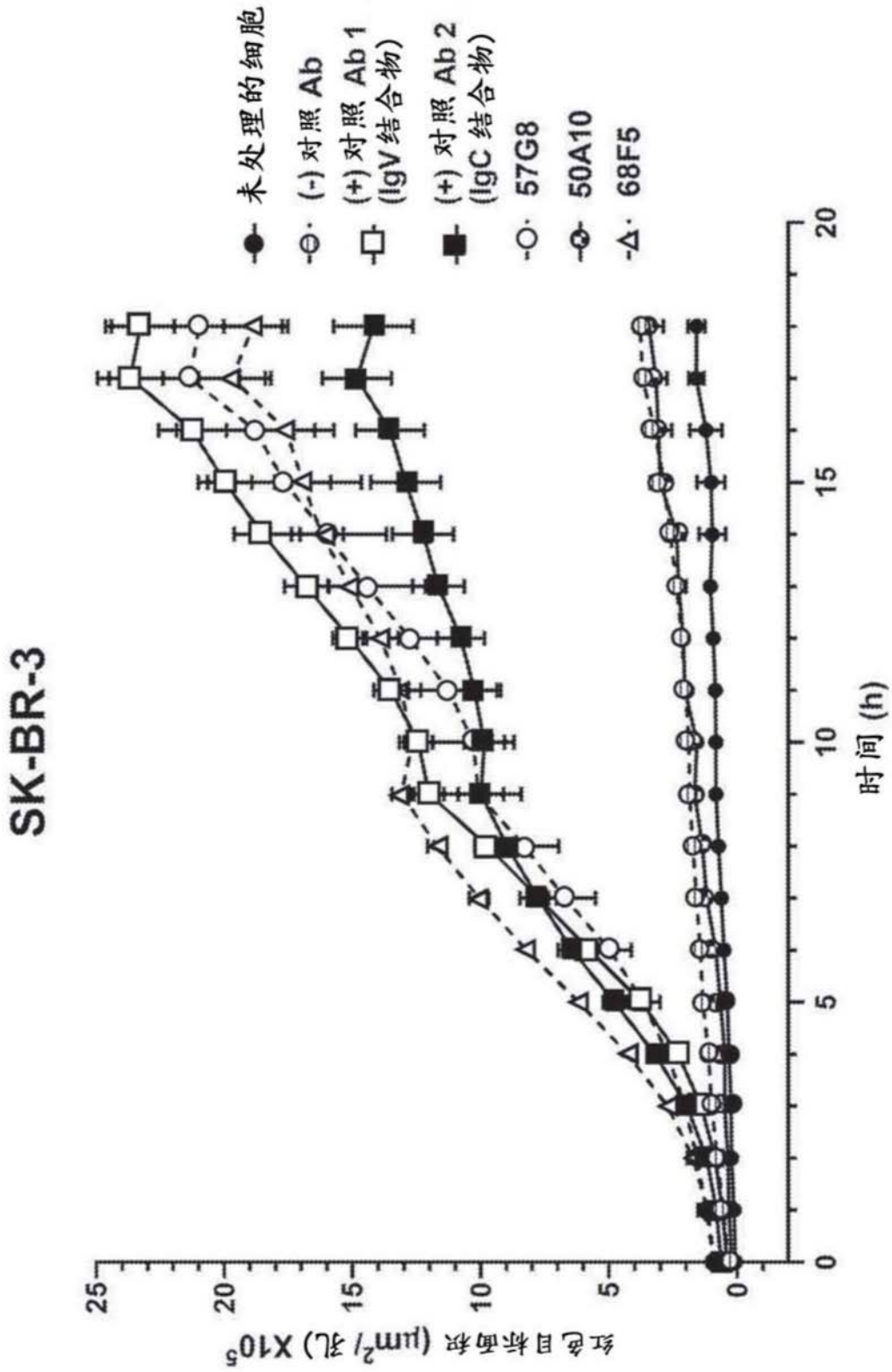


图18A

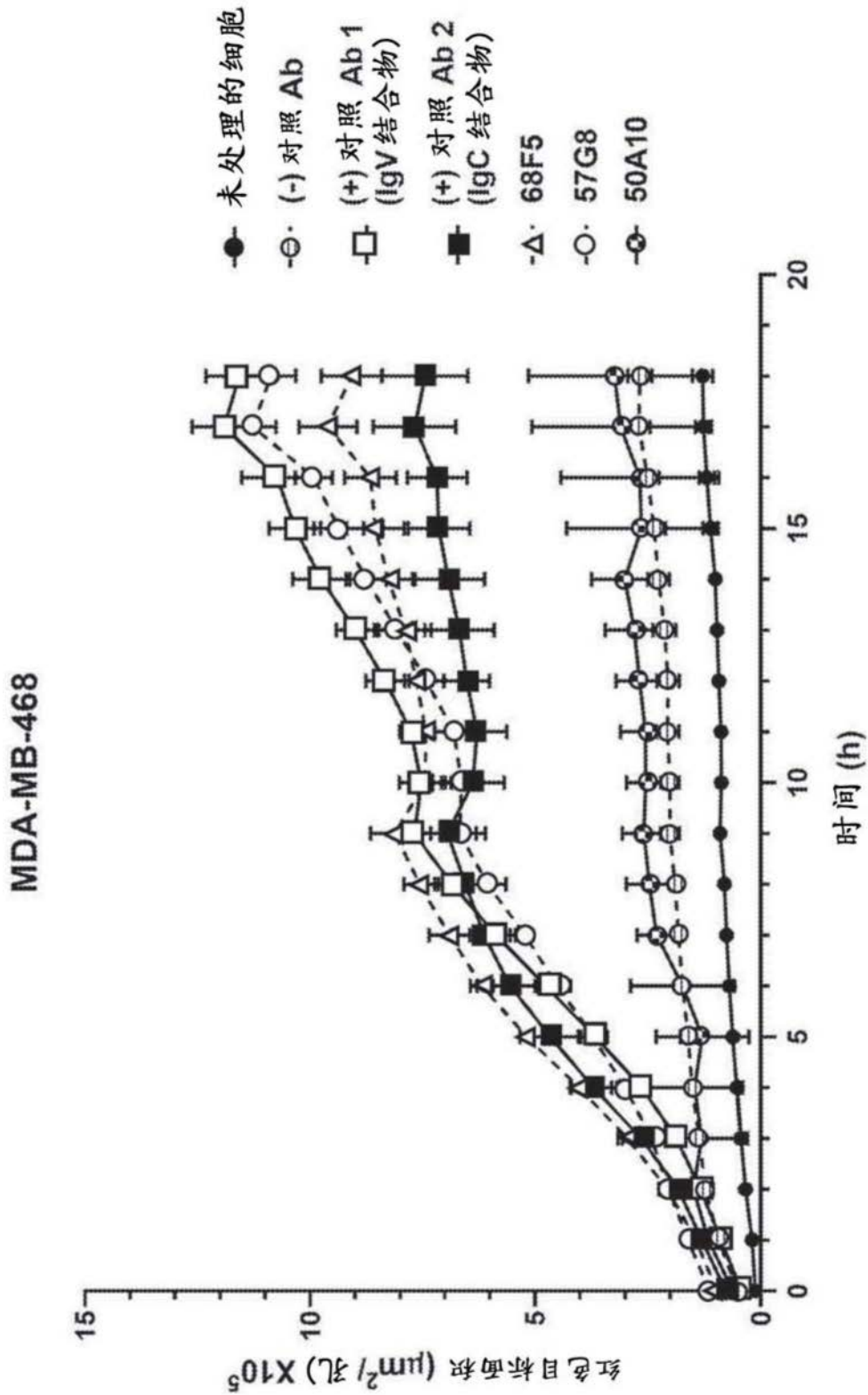
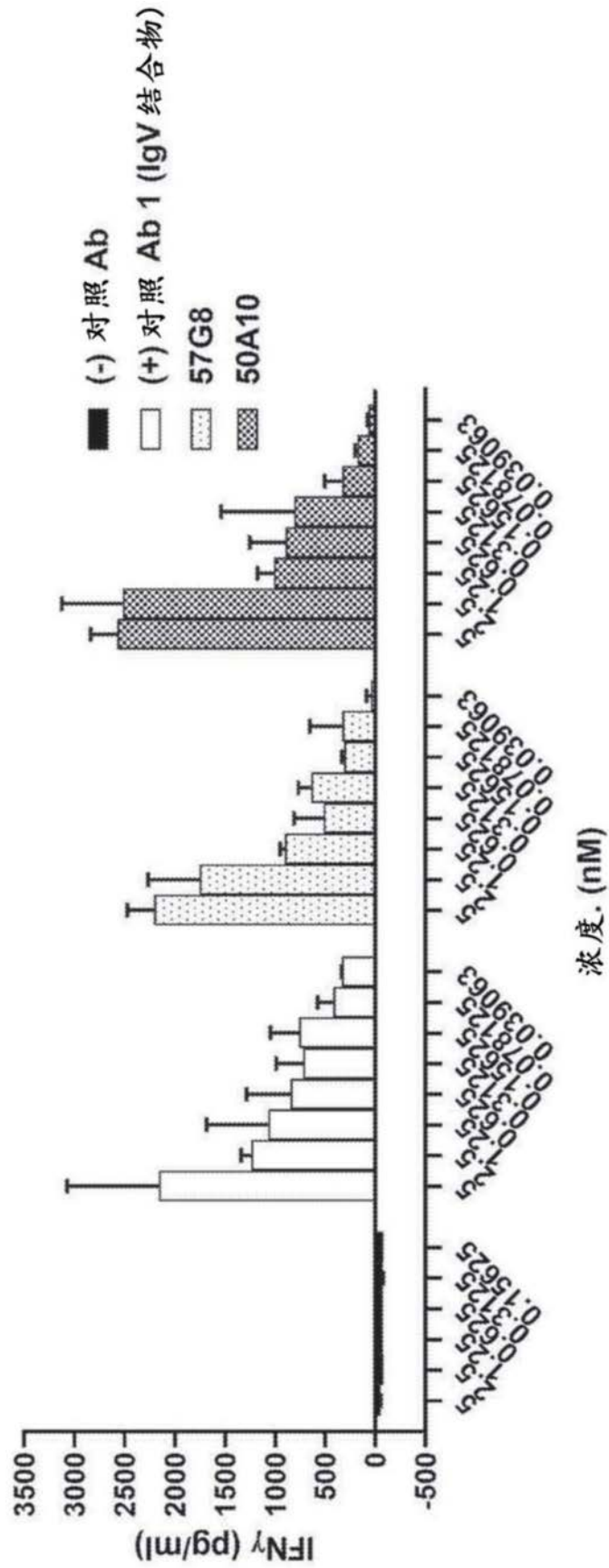


图18B



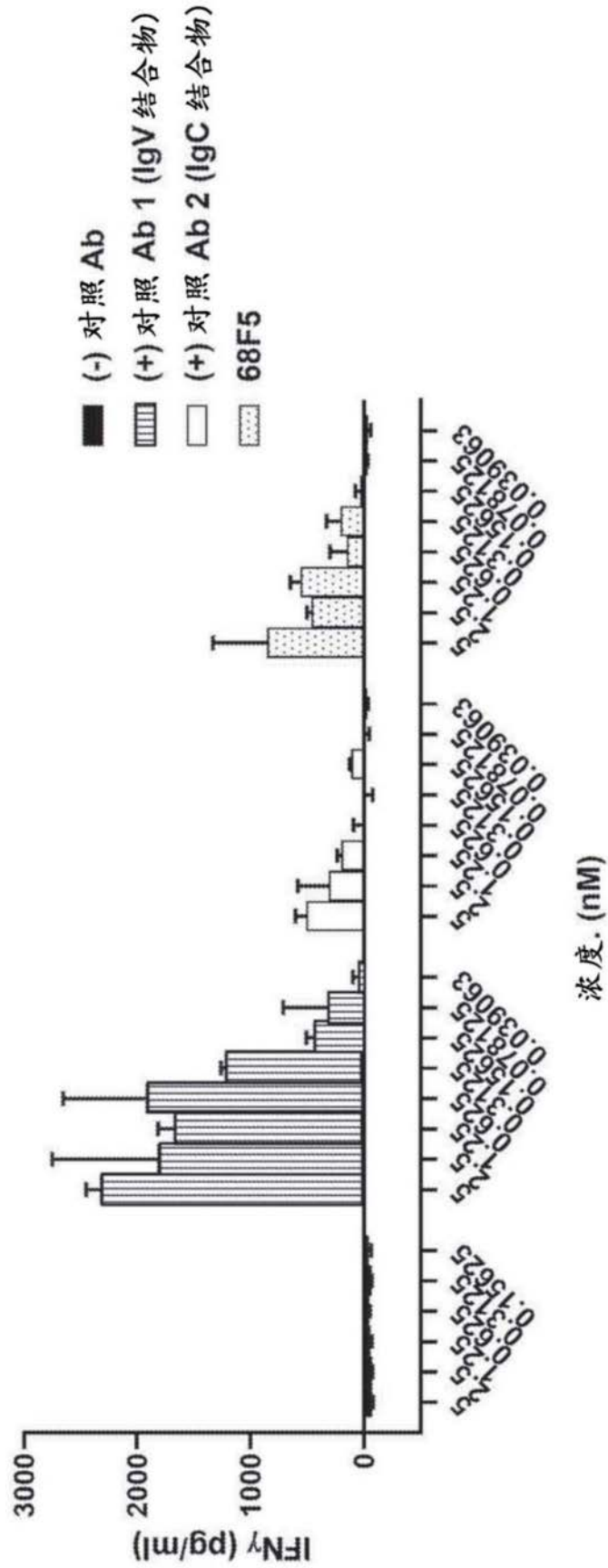


图19B

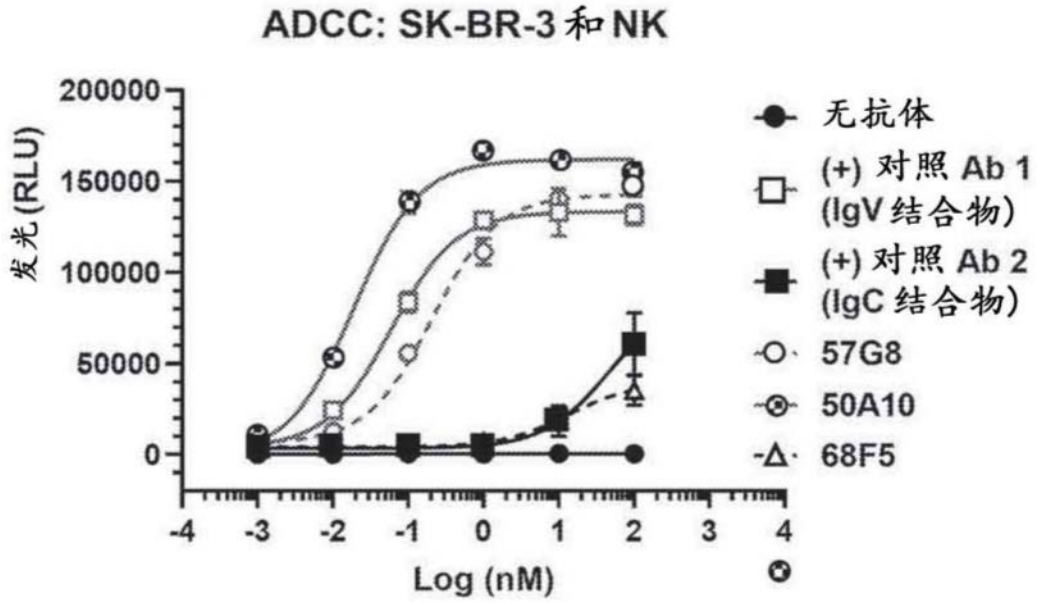


图20A

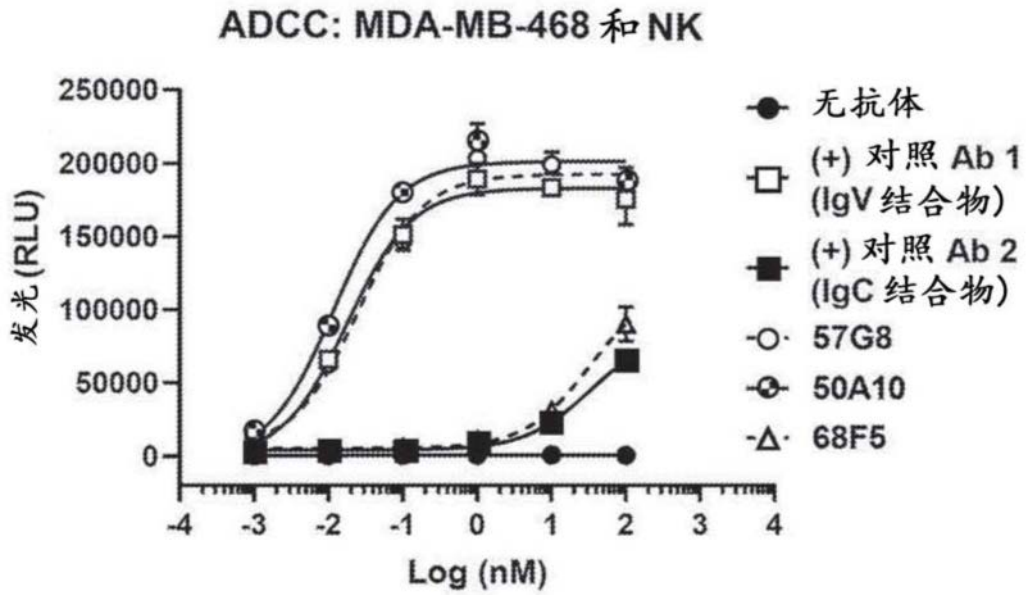


图20B

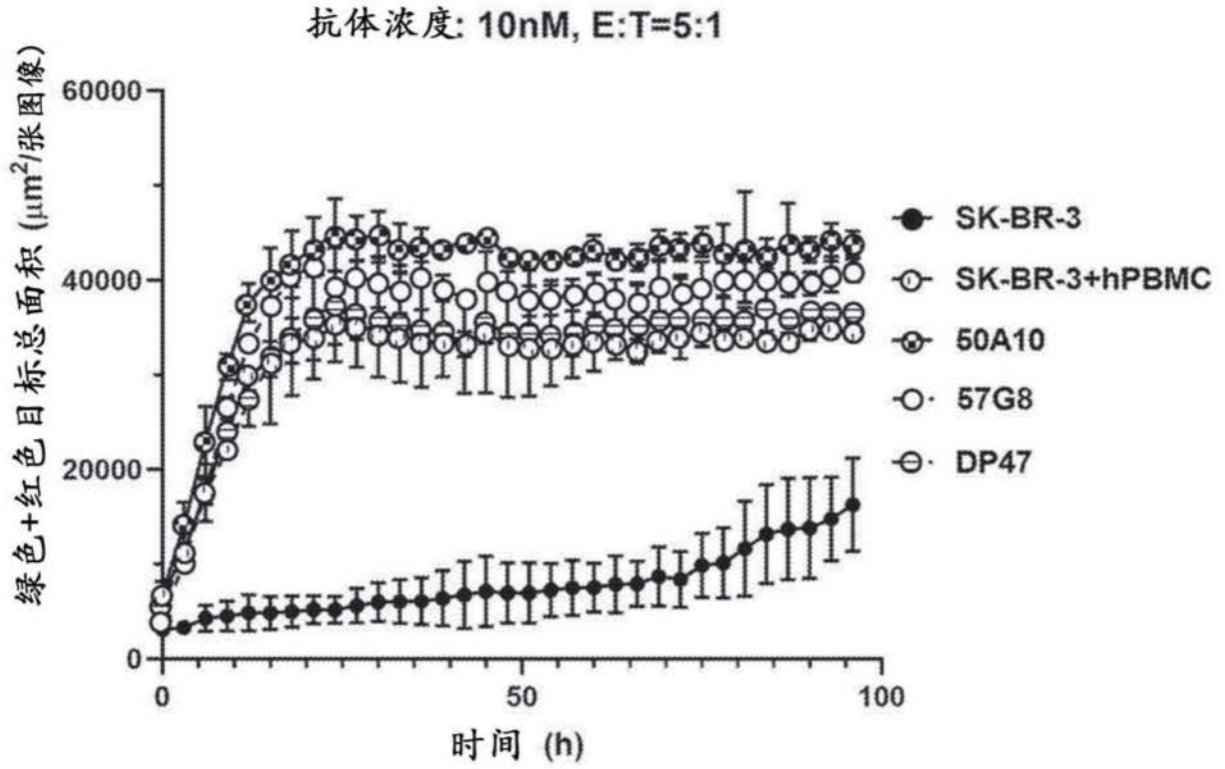


图21A

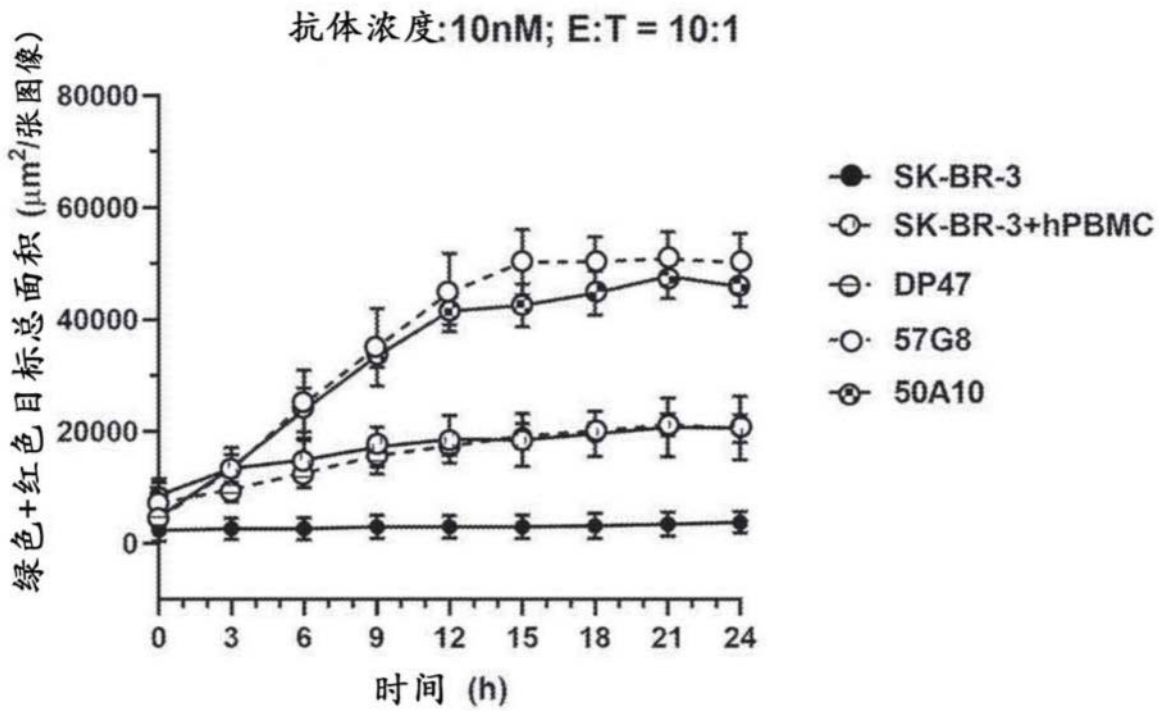


图21B

与hB7-H4-Fc结合

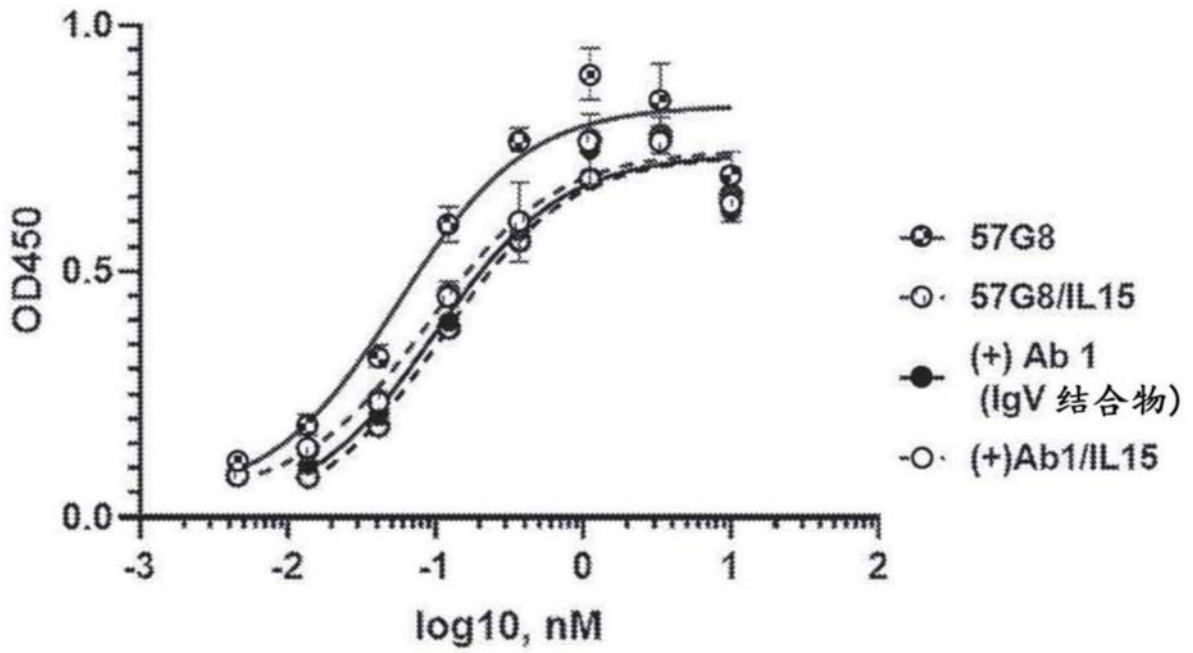


图22A

与hB7-H4- his结合

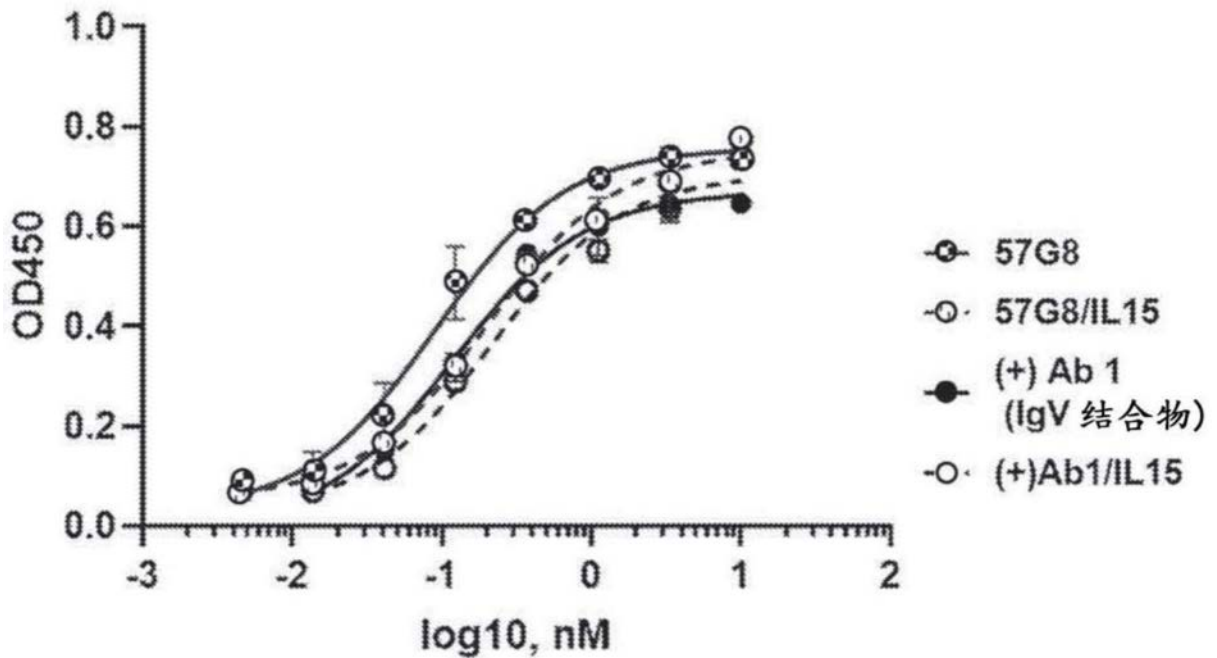


图22B

与hB7H4的IgV结构域结合

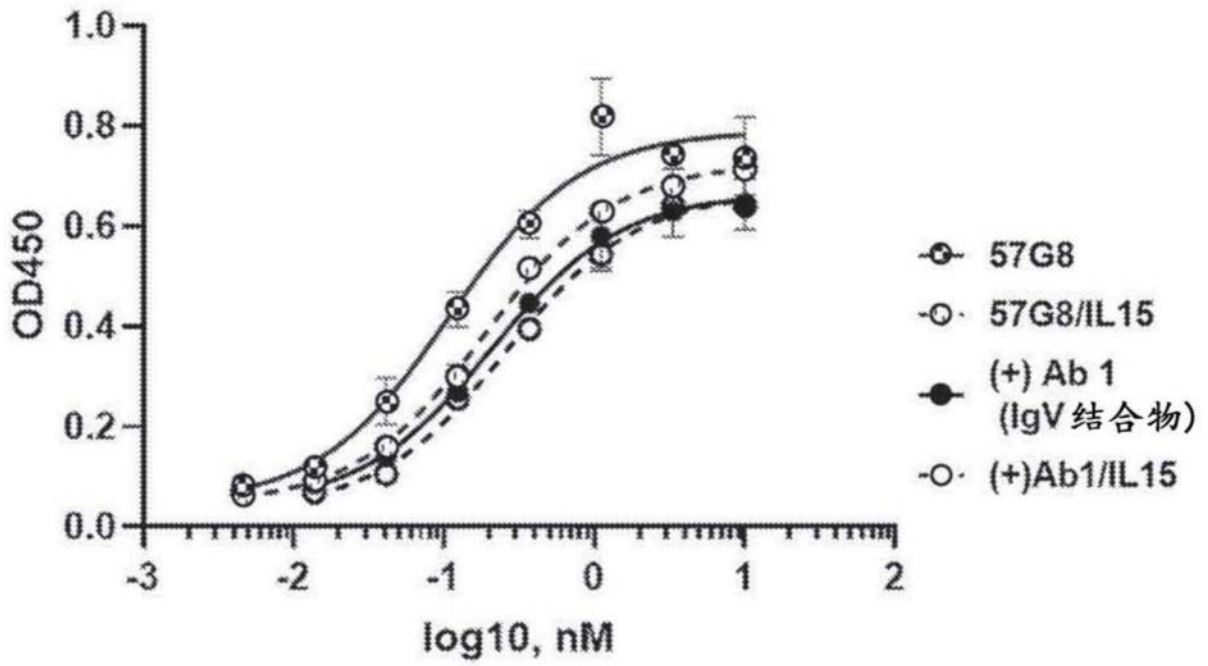


图22C

与mB7-H4-Fc结合

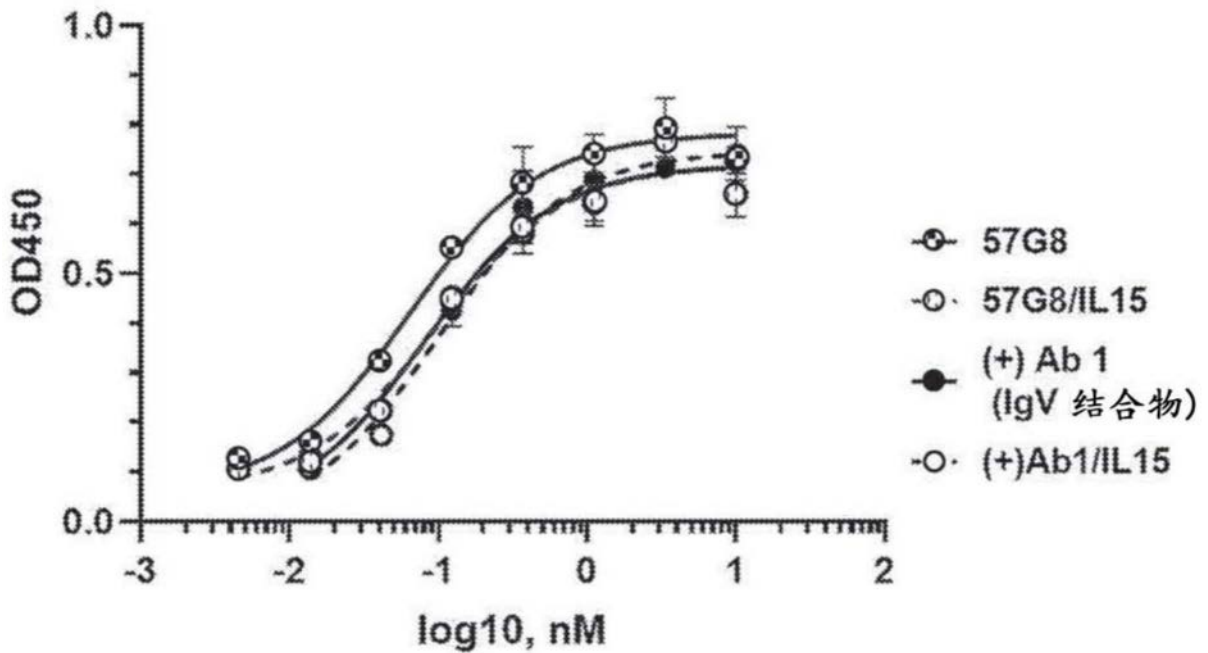


图22D

与mB7-H4- his结合

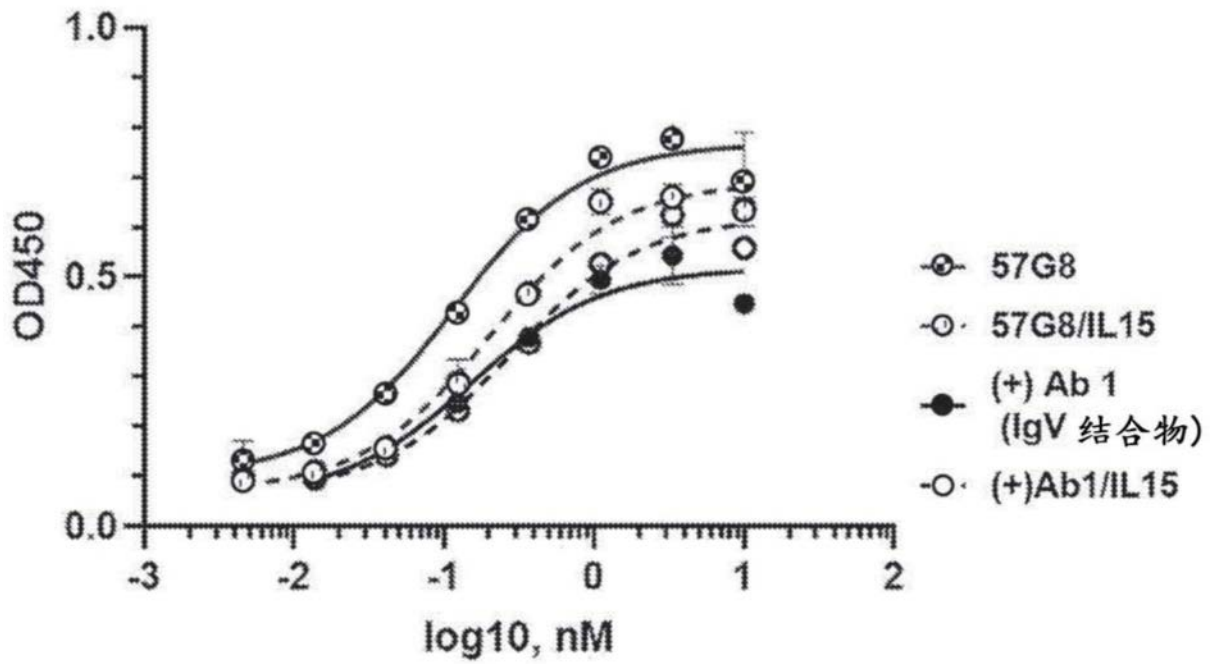


图22E

与mB7H4的IgV结构域结合

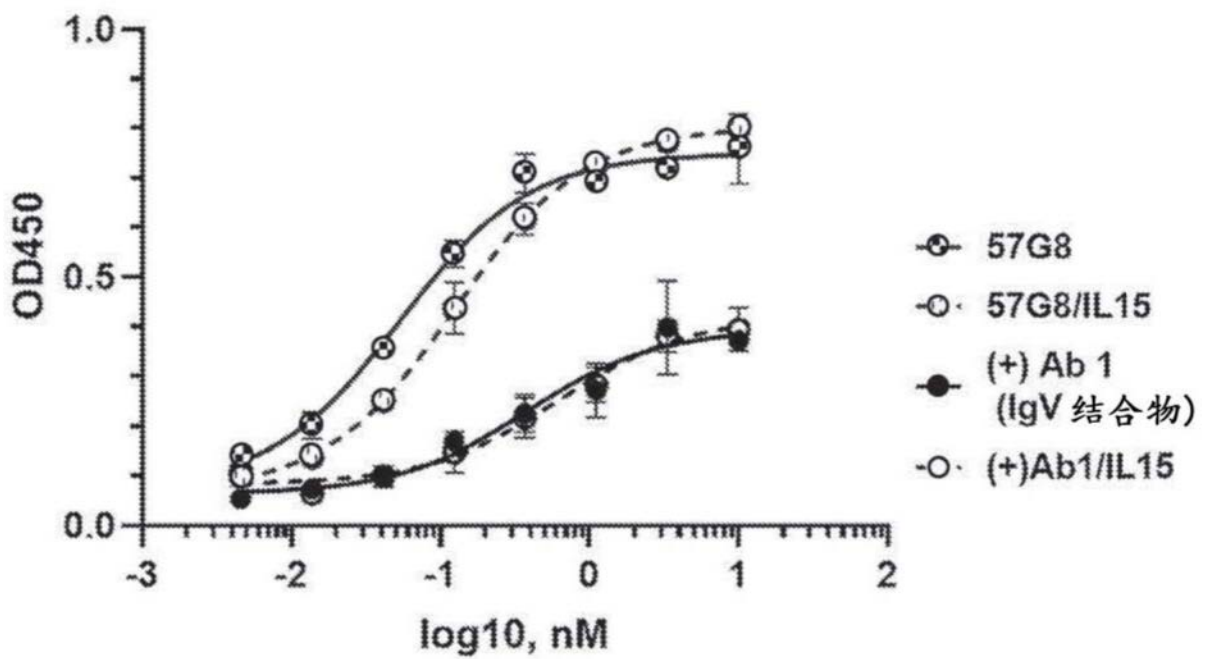


图22F

与hB7-H4-Fc结合

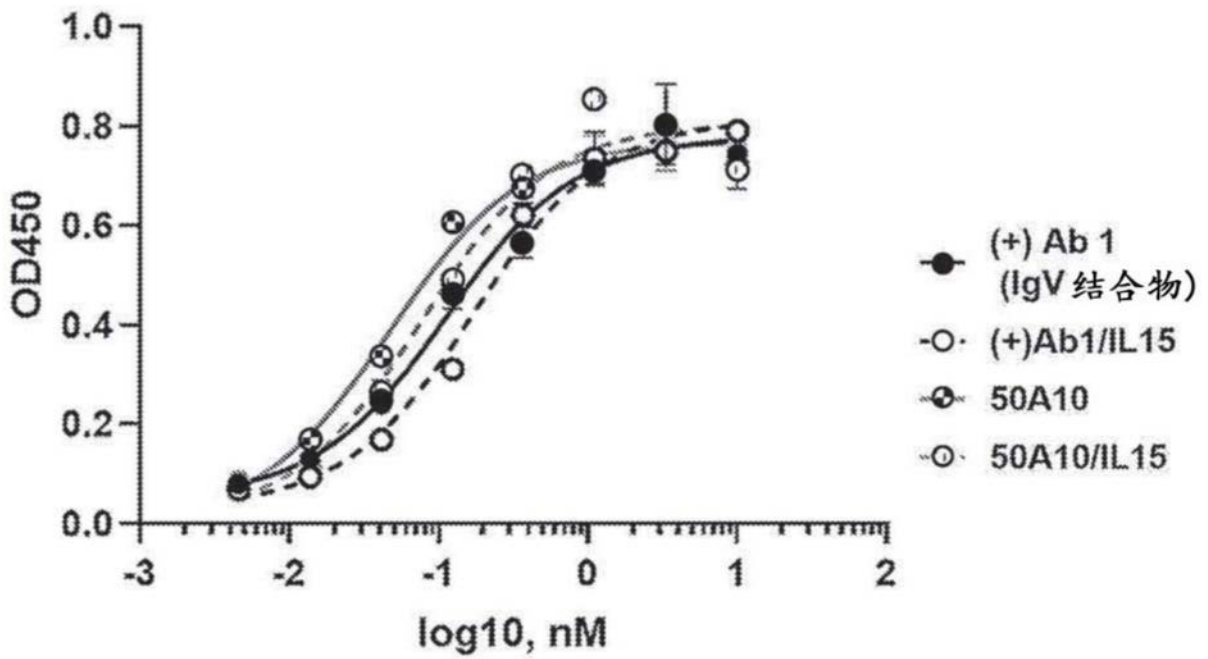


图23A

与hB7-H4-his结合

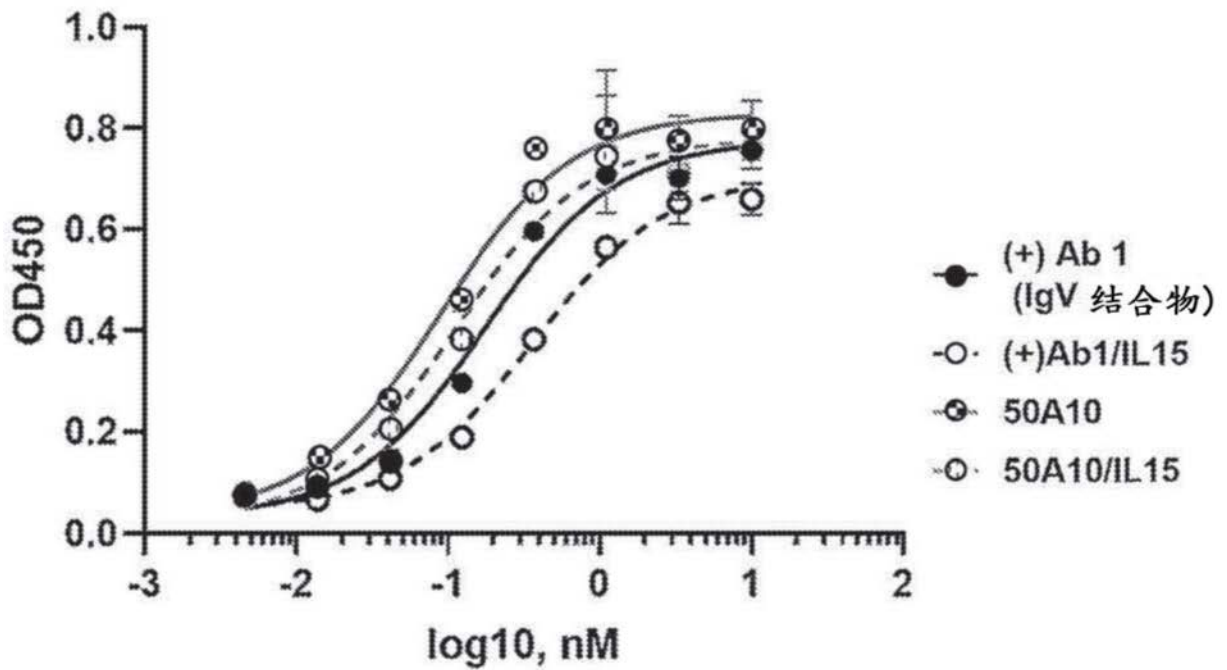


图23B

与hB7H4的IgV结构域结合

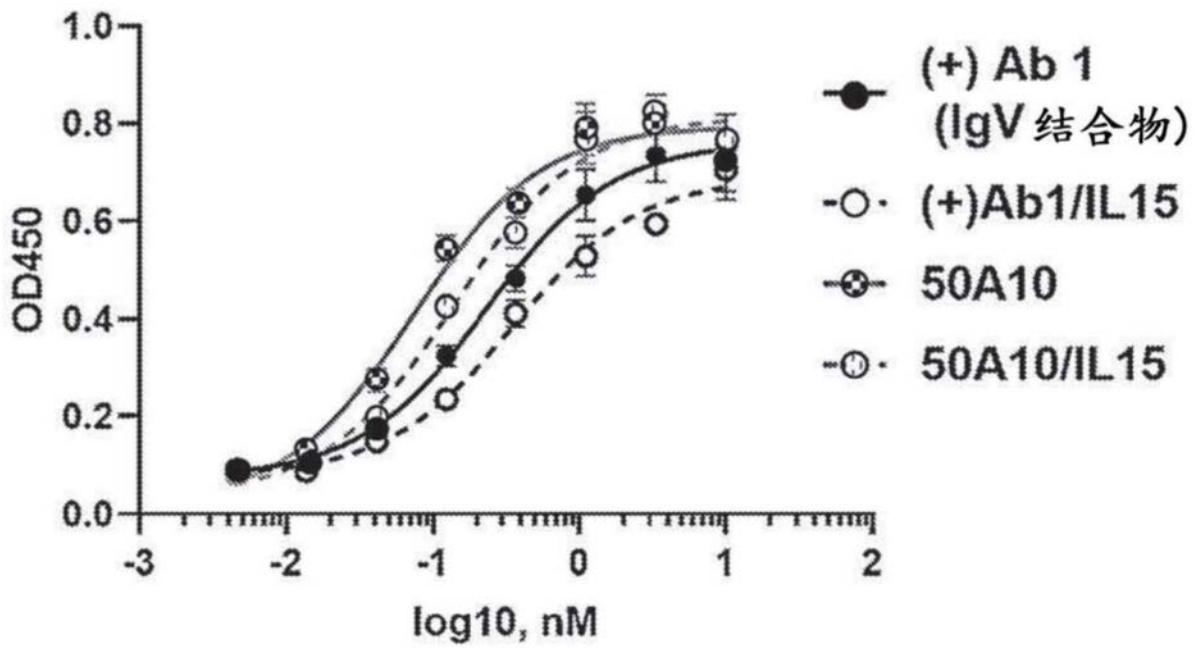


图23C

与mB7-H4-Fc结合

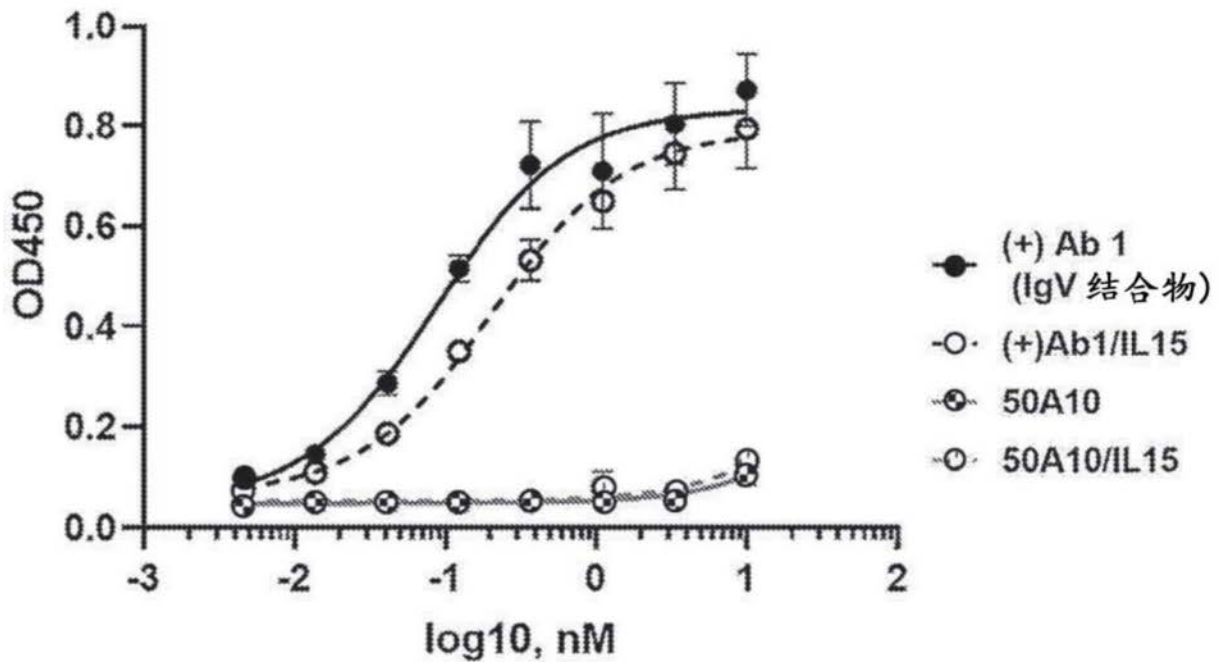


图23D

与mB7-H4- his结合

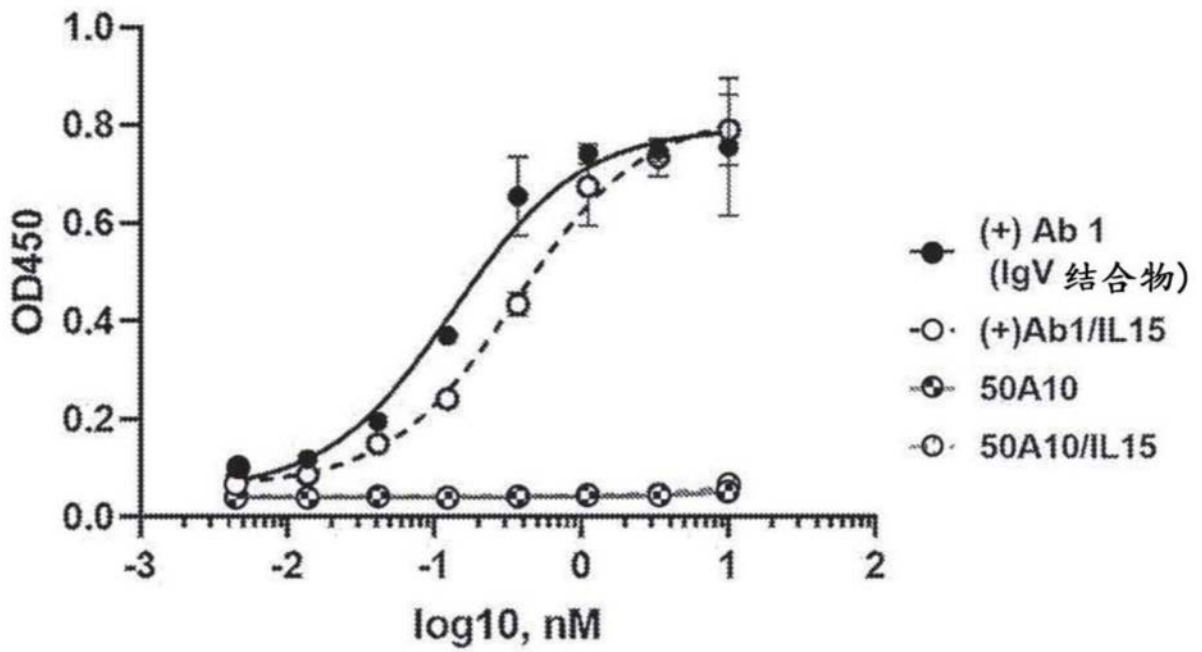


图23E

与mB7H4的IgV结构域结合

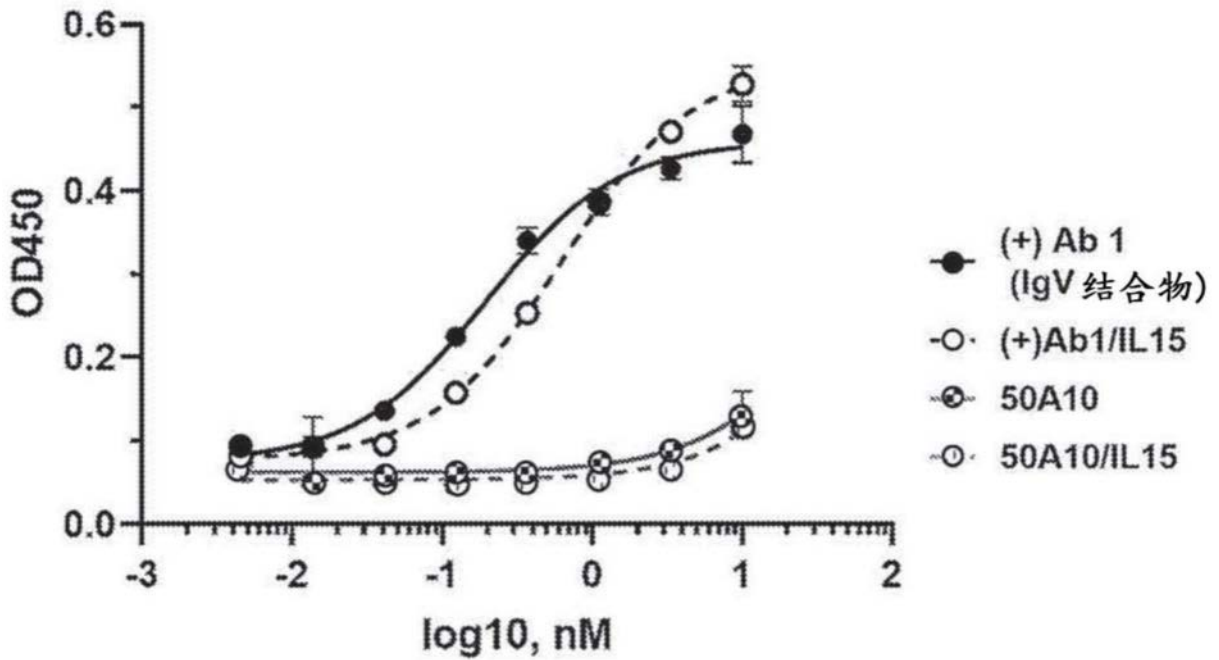


图23F

与SK-BR-3结合

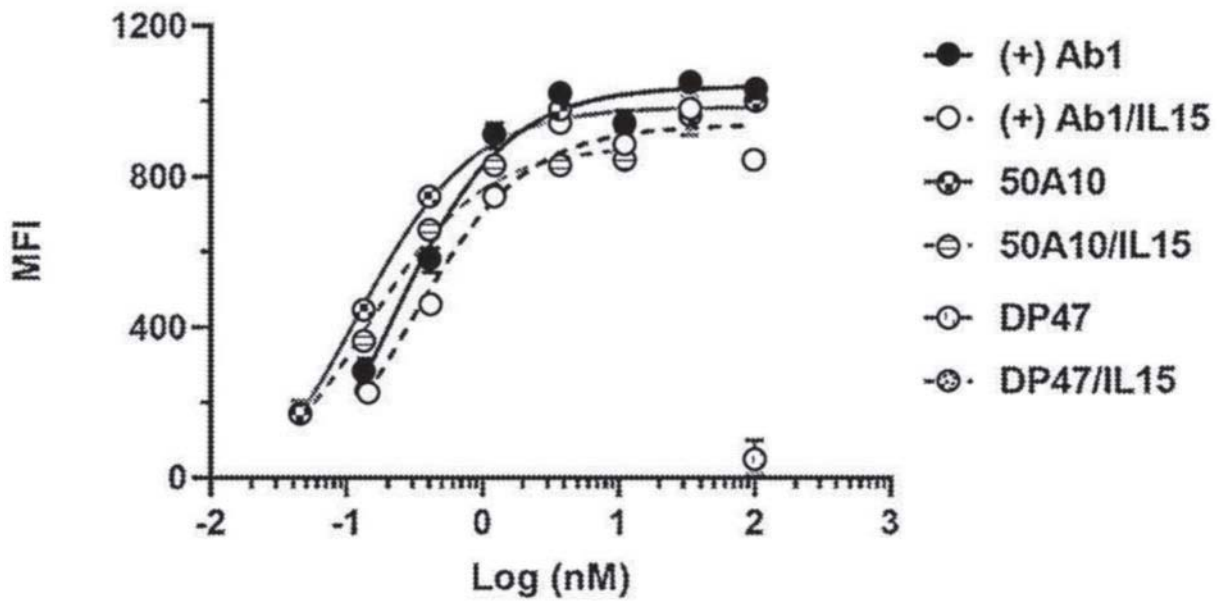


图24A

与SK-BR-3结合

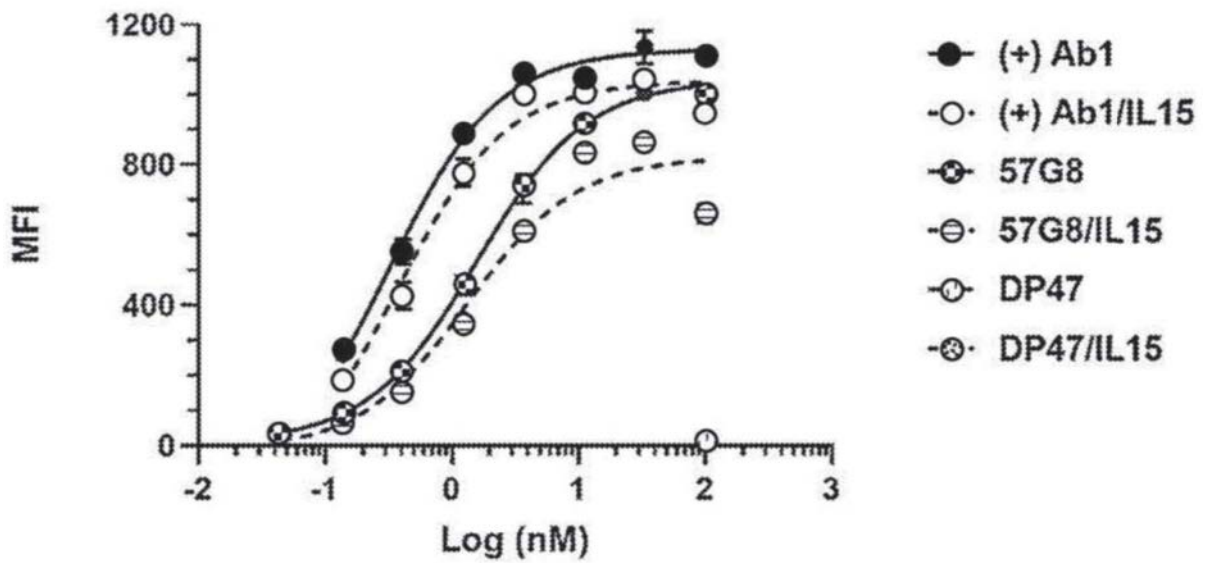


图24B

与mB7H4-CT26结合

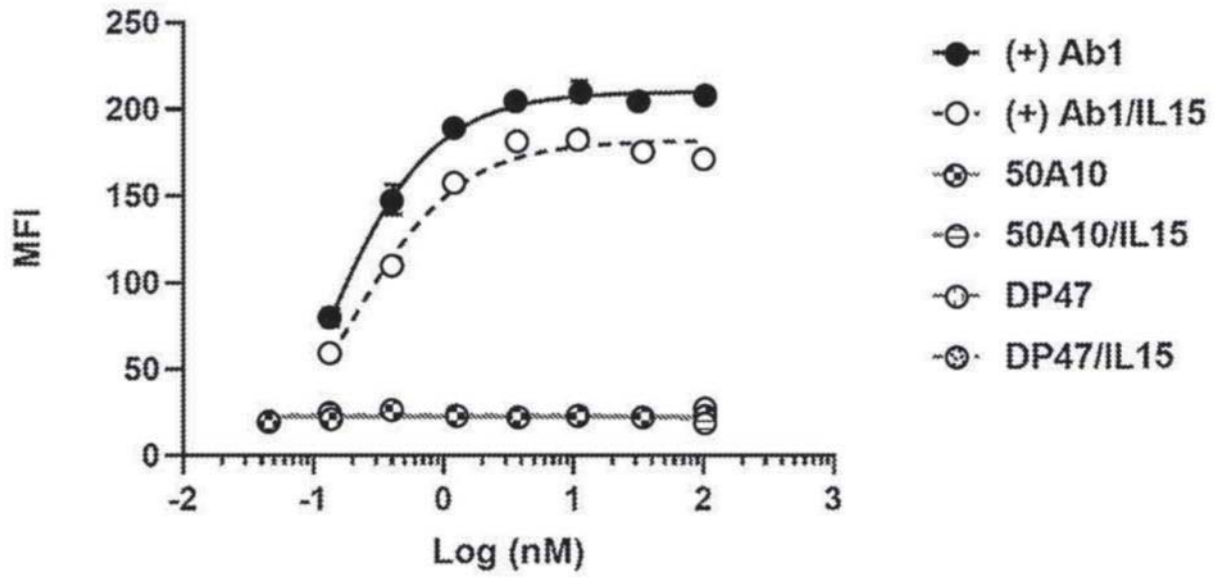


图24C

与mB7H4-CT26结合

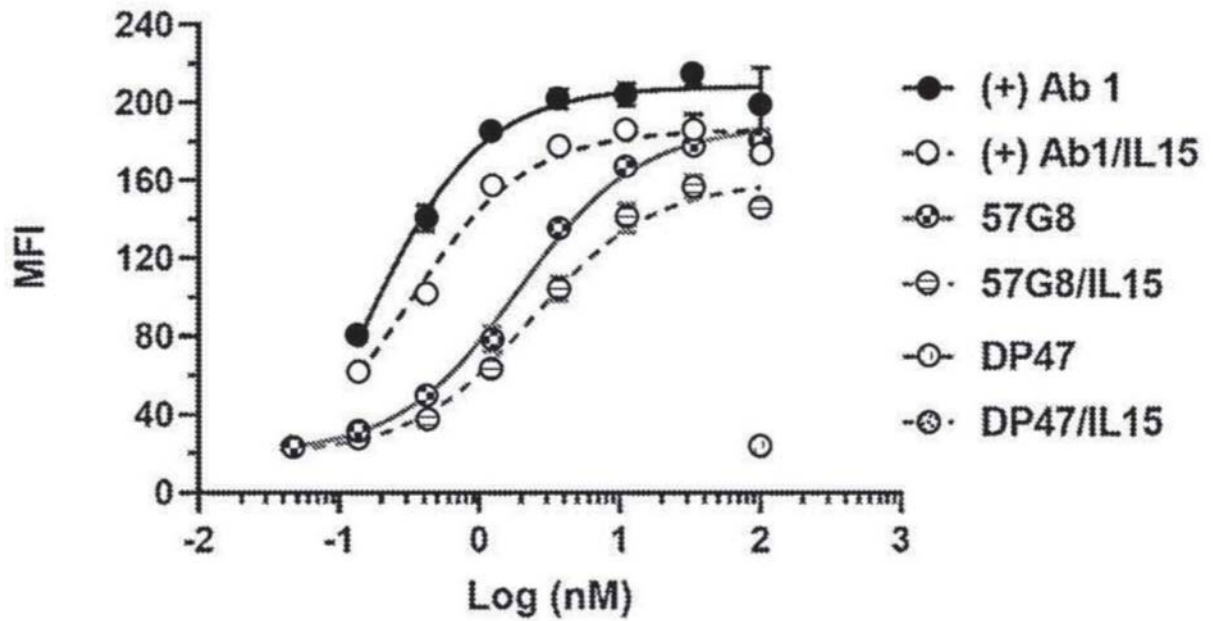


图24D

与MDA-MB-468结合

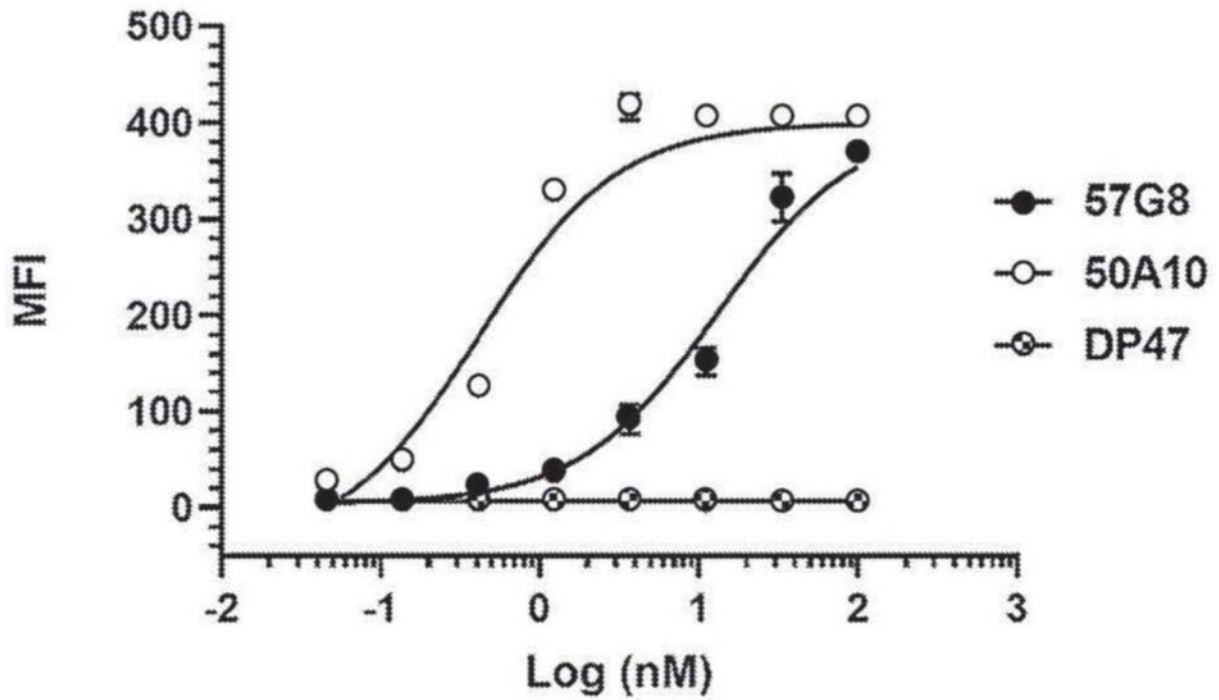


图25A

与MDA-MB-468结合

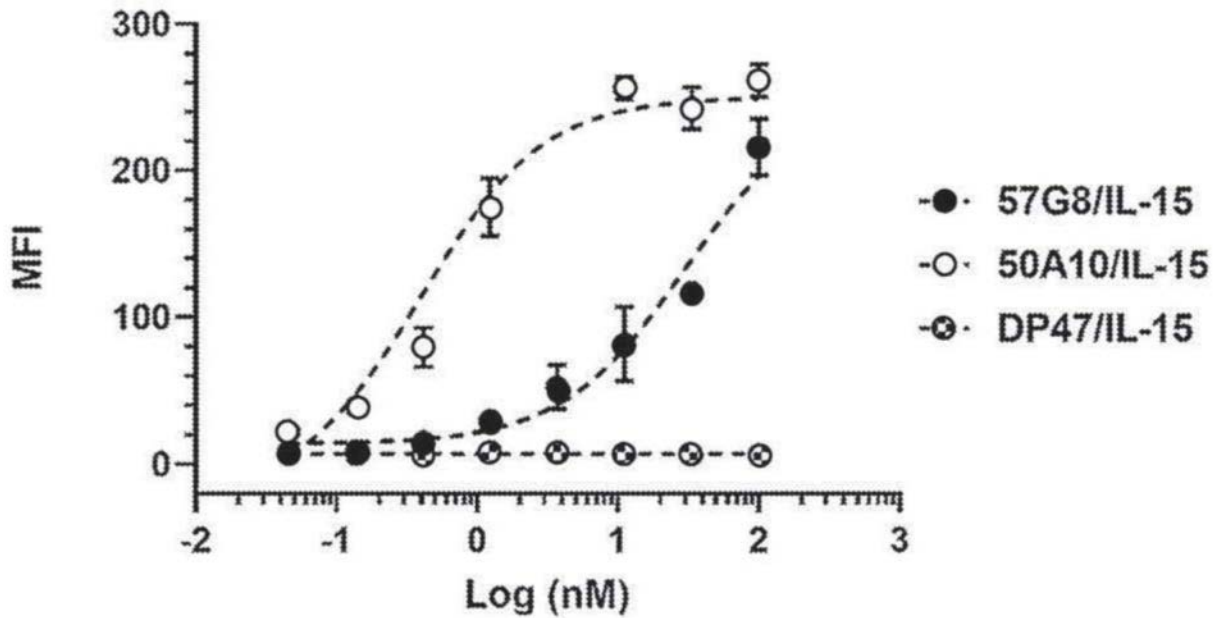


图25B

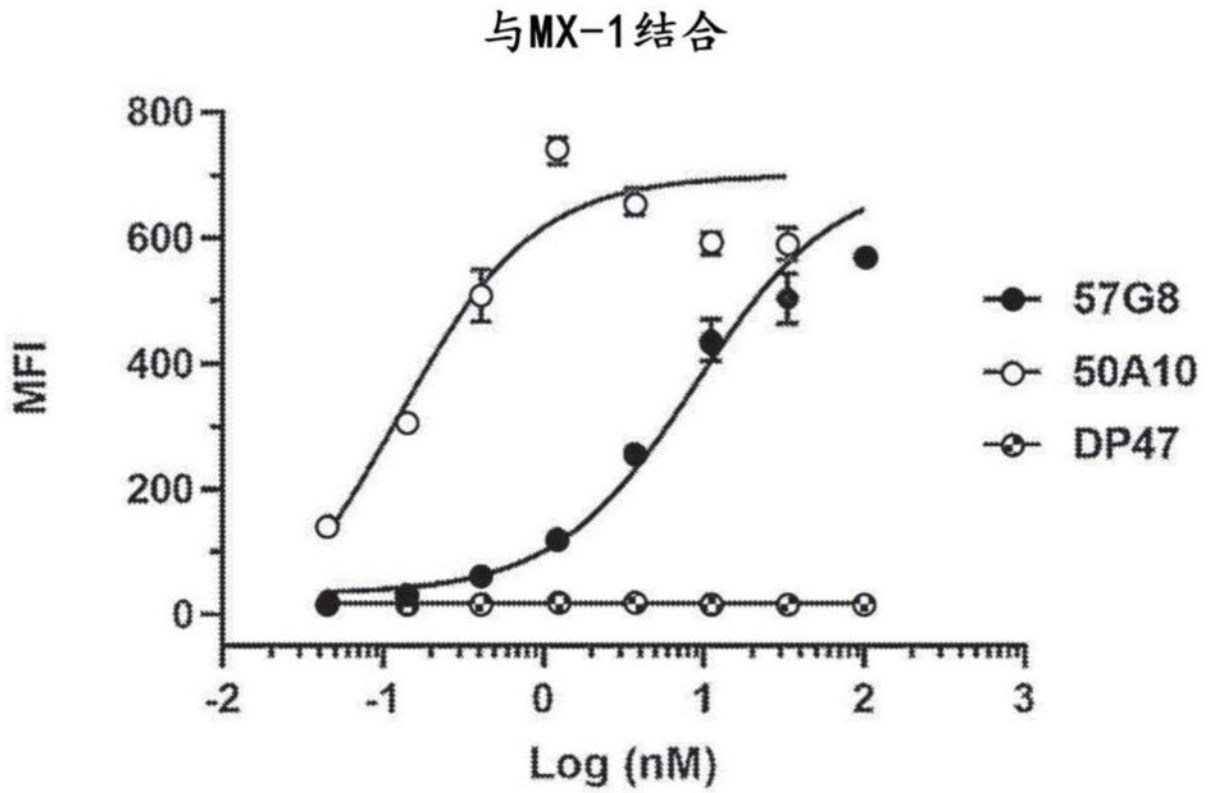


图25C

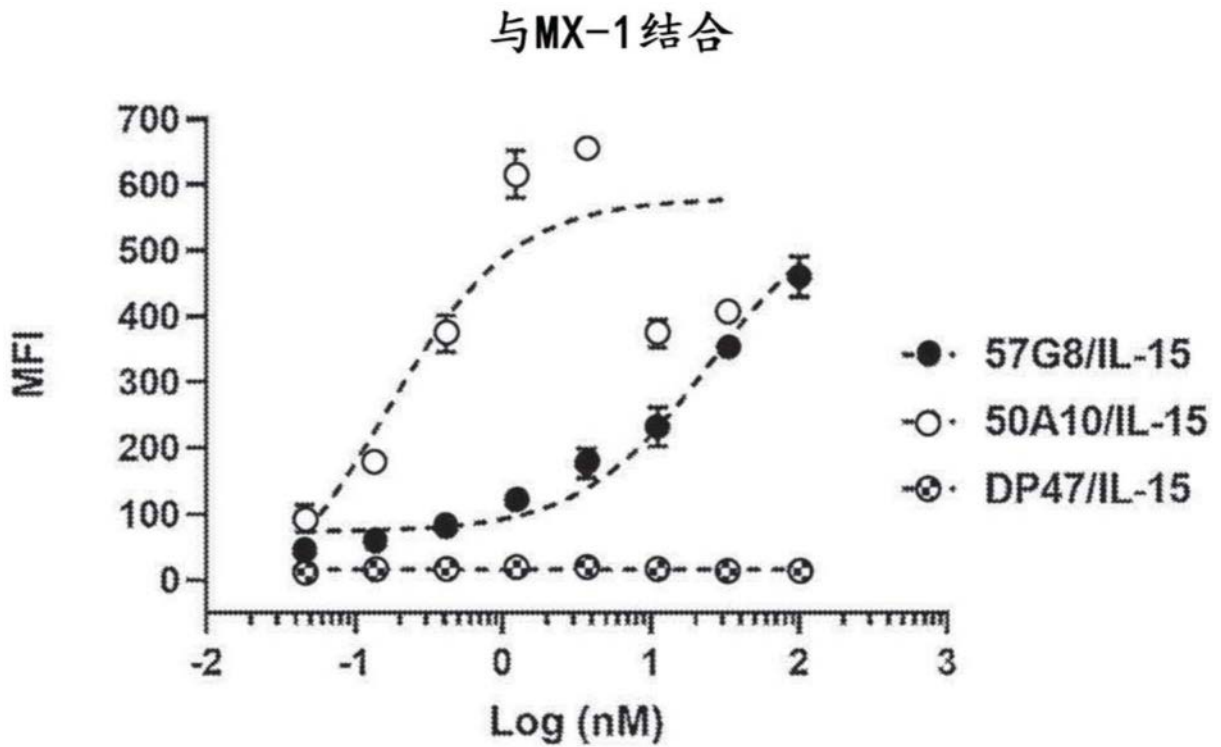


图25D

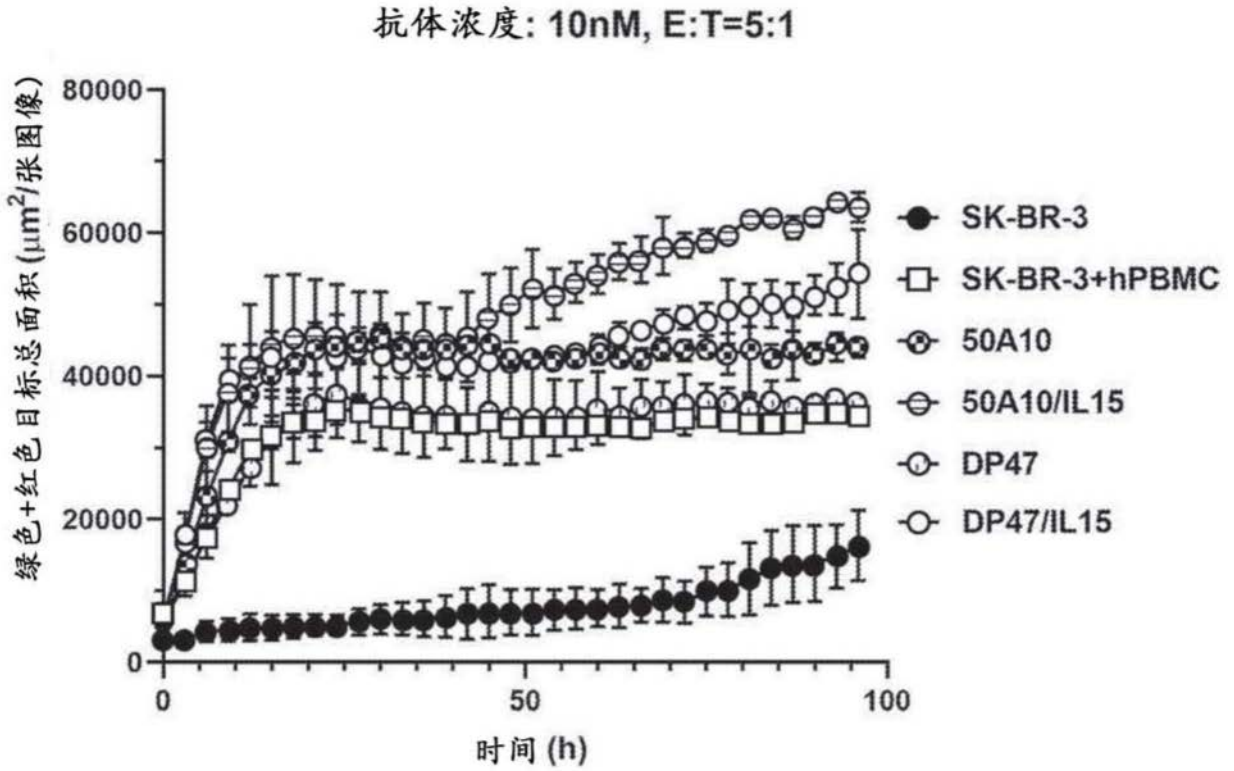


图26A

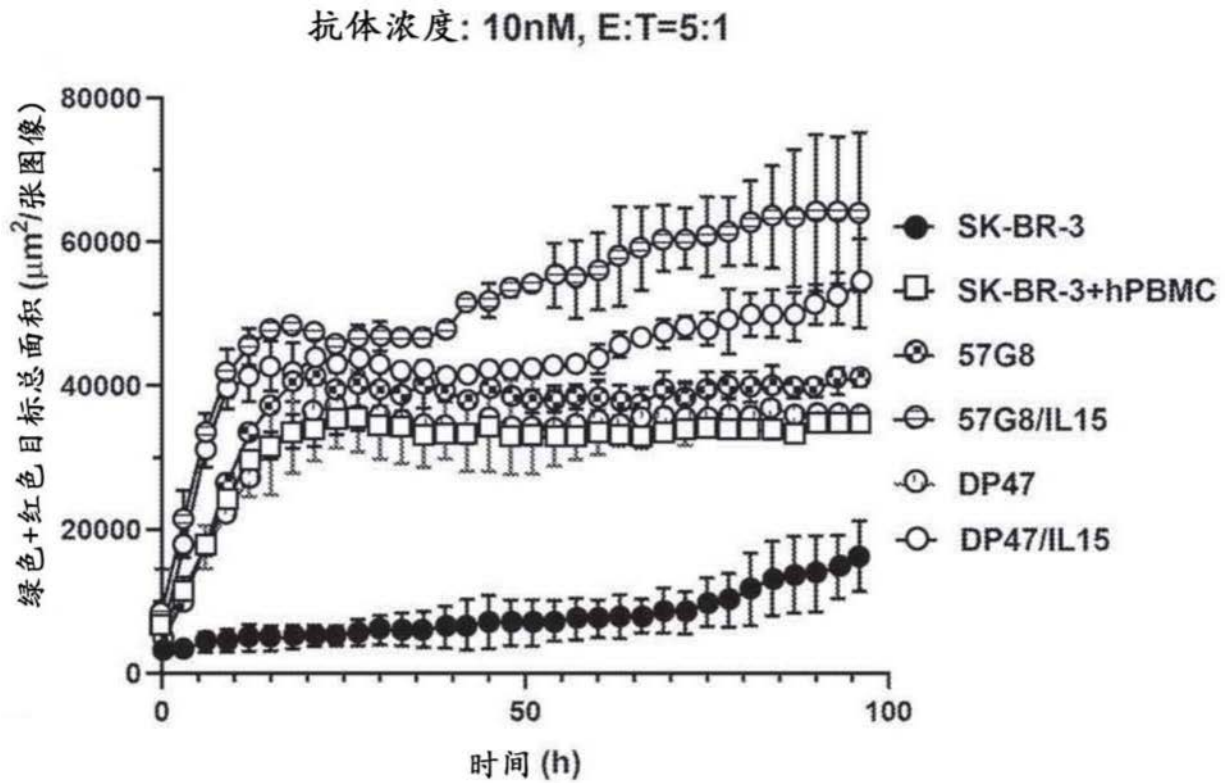


图26B

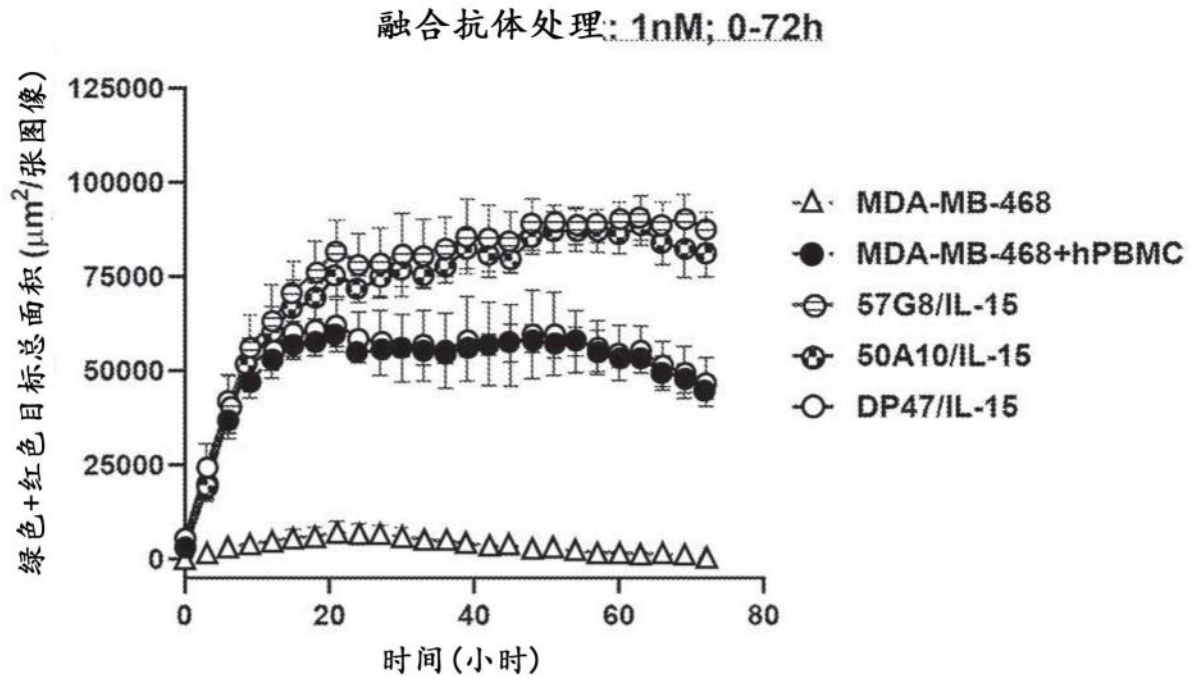


图26C

融合抗体处理:1nM, 72h

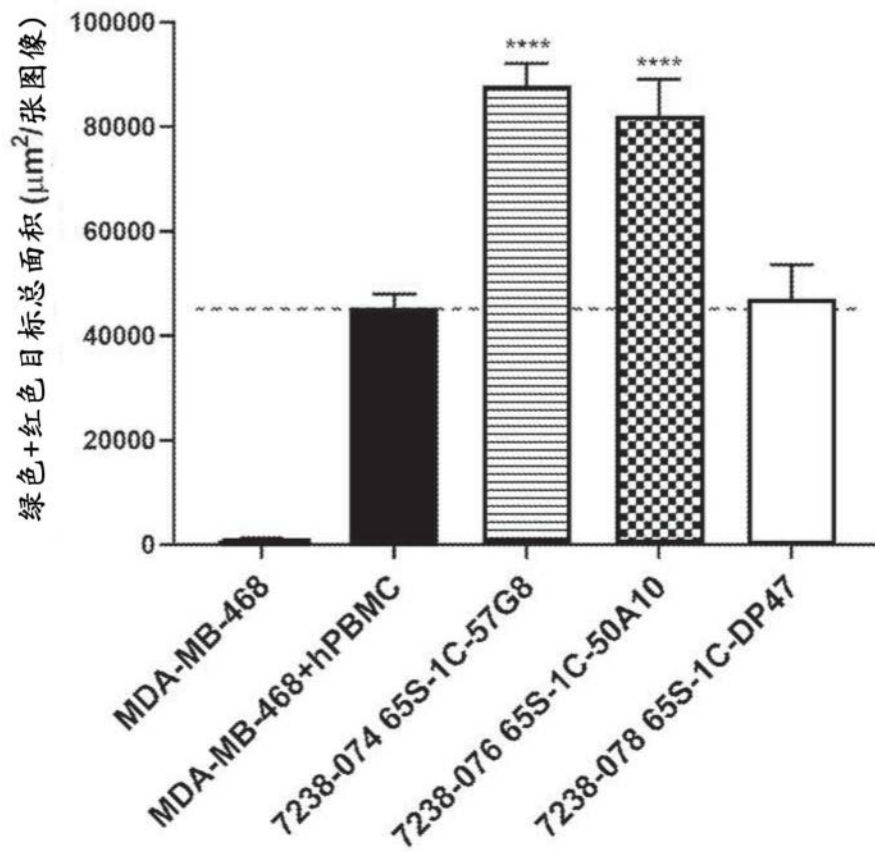


图26D

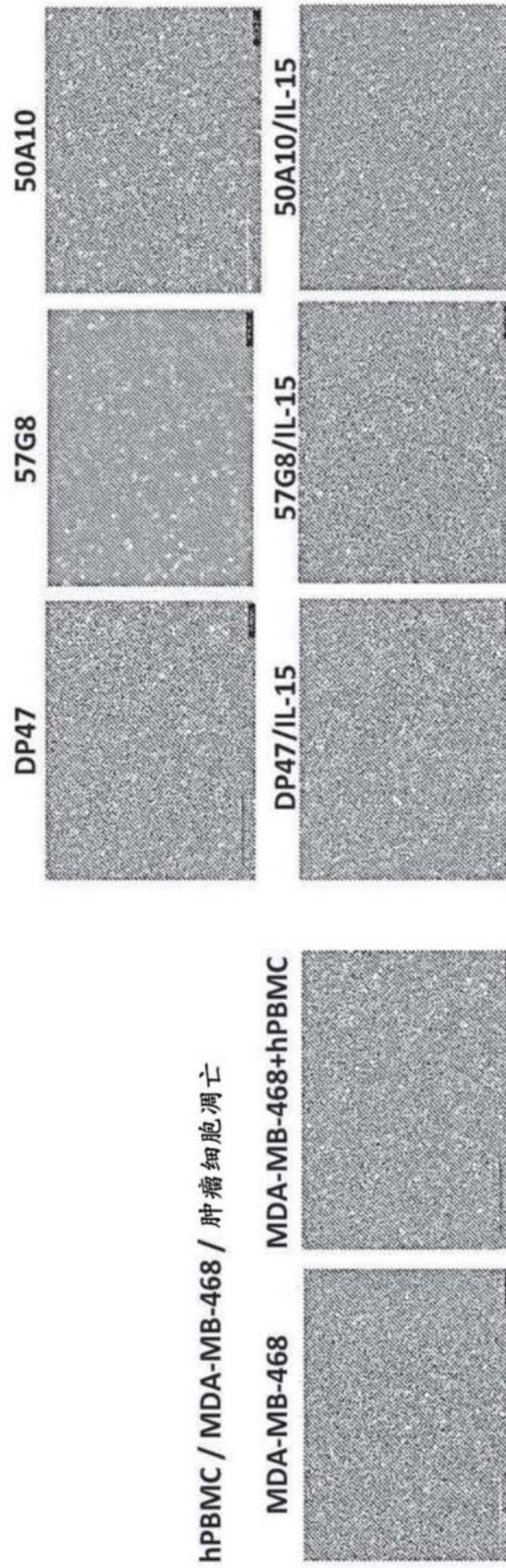


图26E

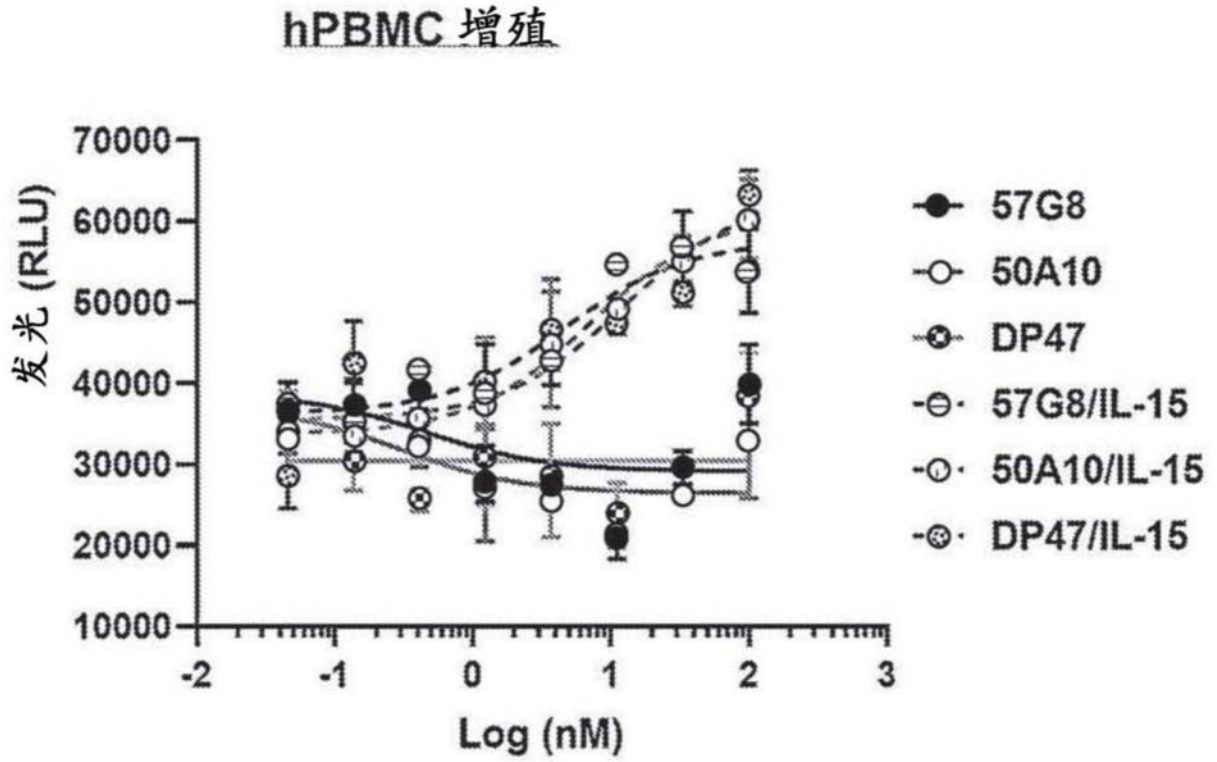


图27A

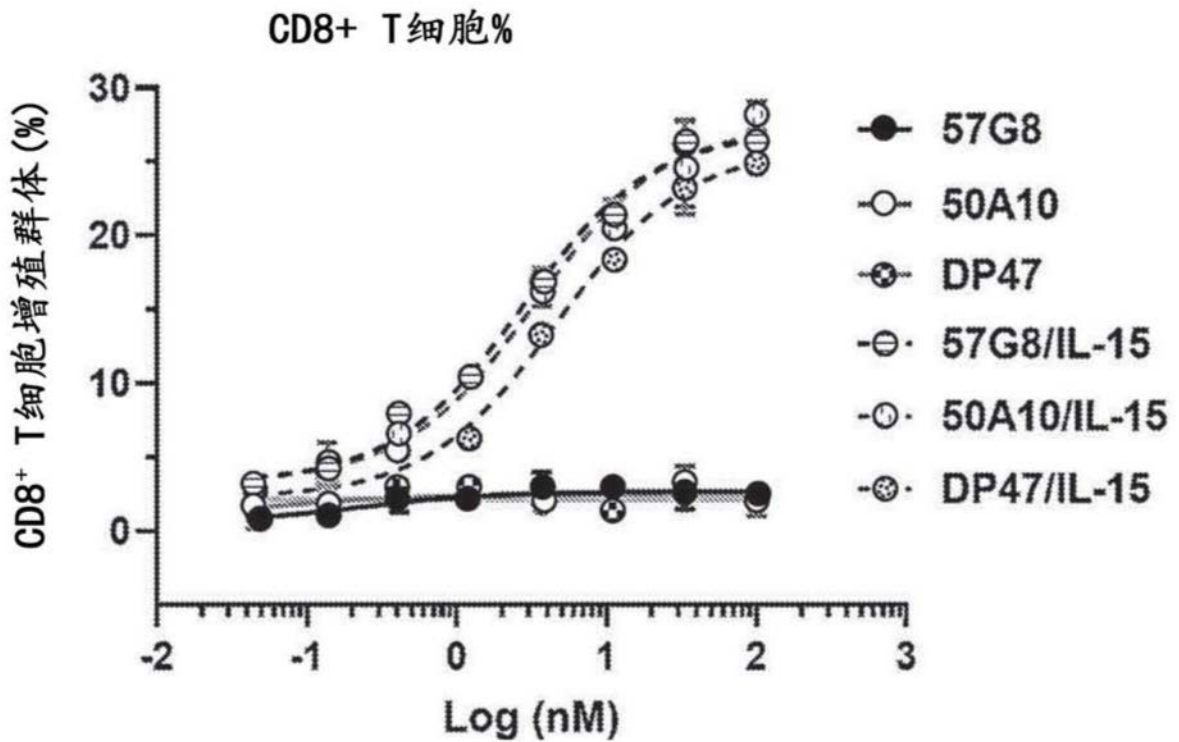


图27B

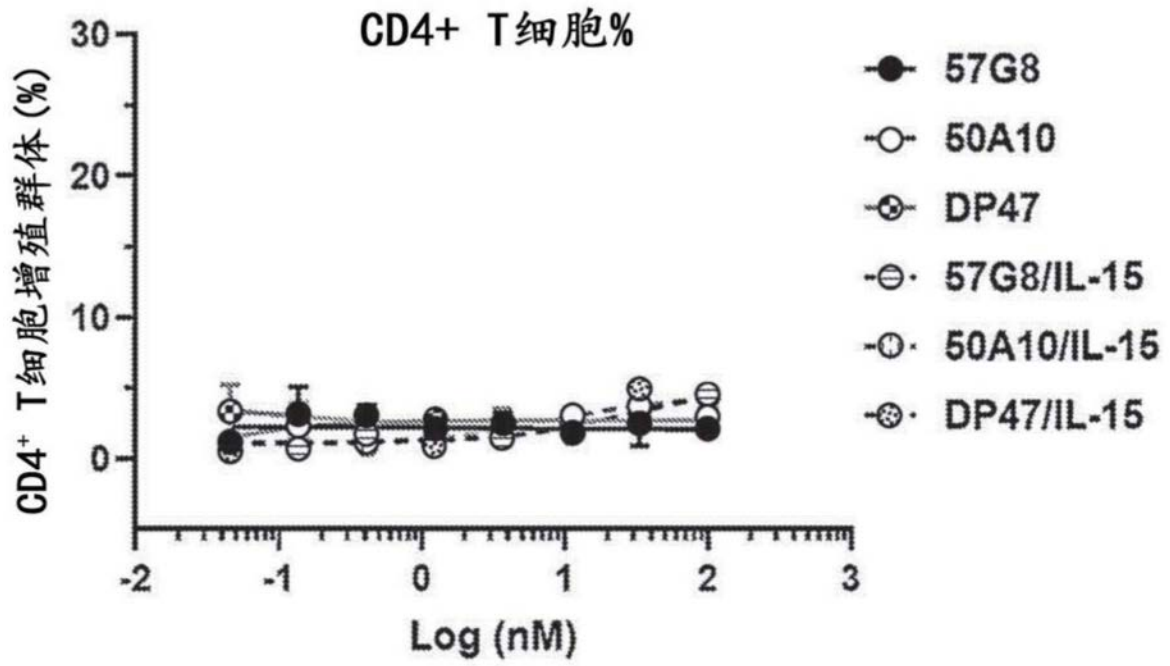


图27C

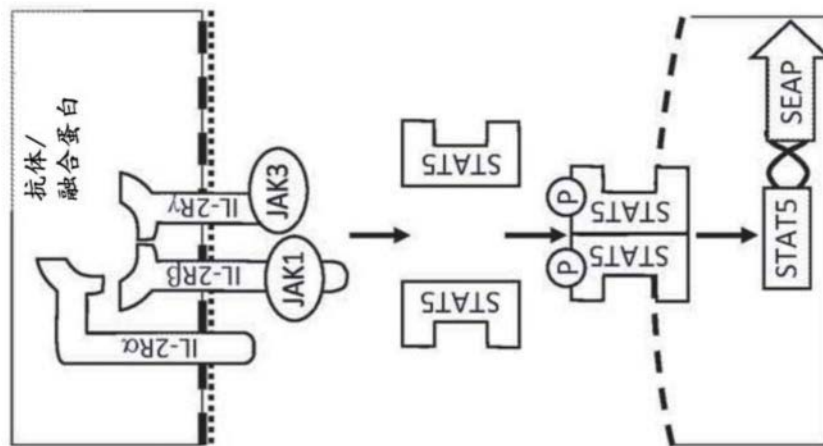


图28A

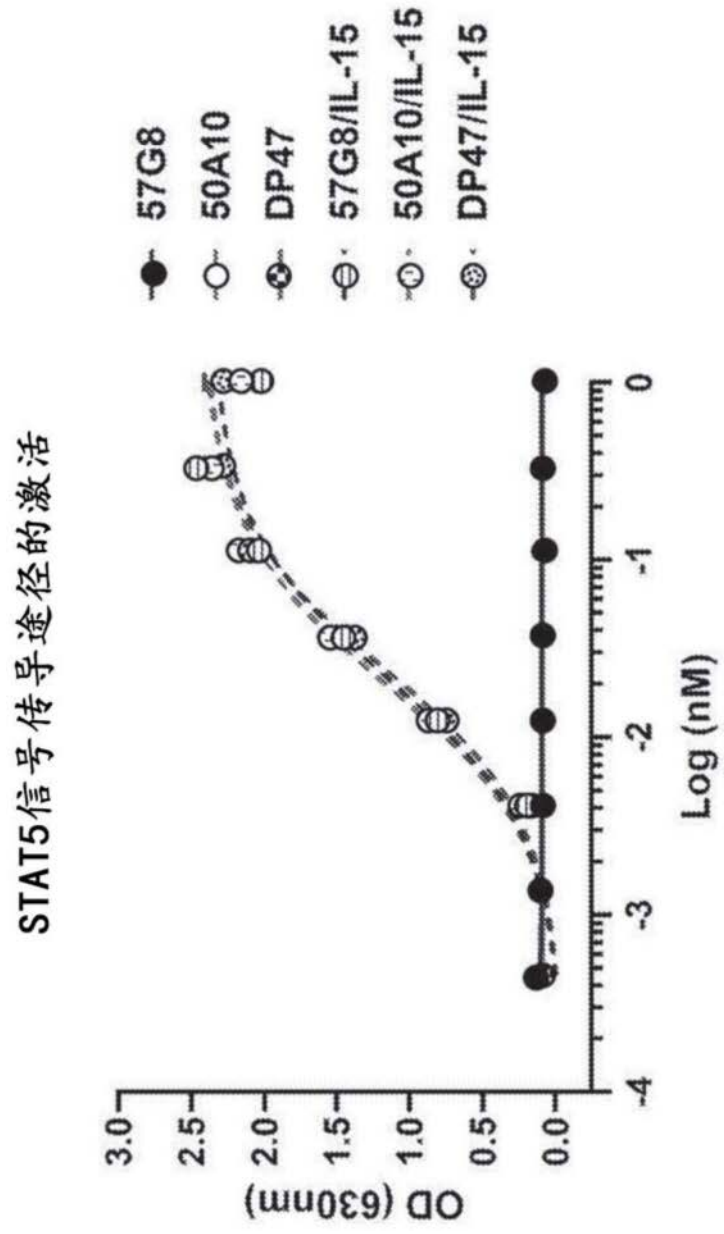


图28B

SK-BR-3中的ADCC, 效应子:靶标=5:1

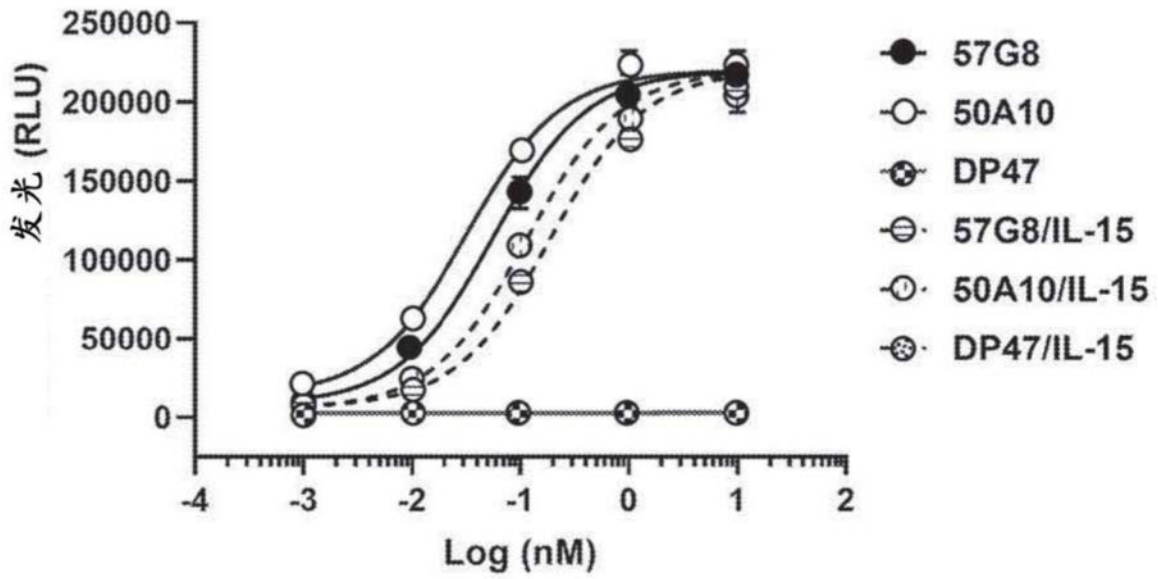


图29A

MDA-MB-468中的ADCC (E:T=5:1)

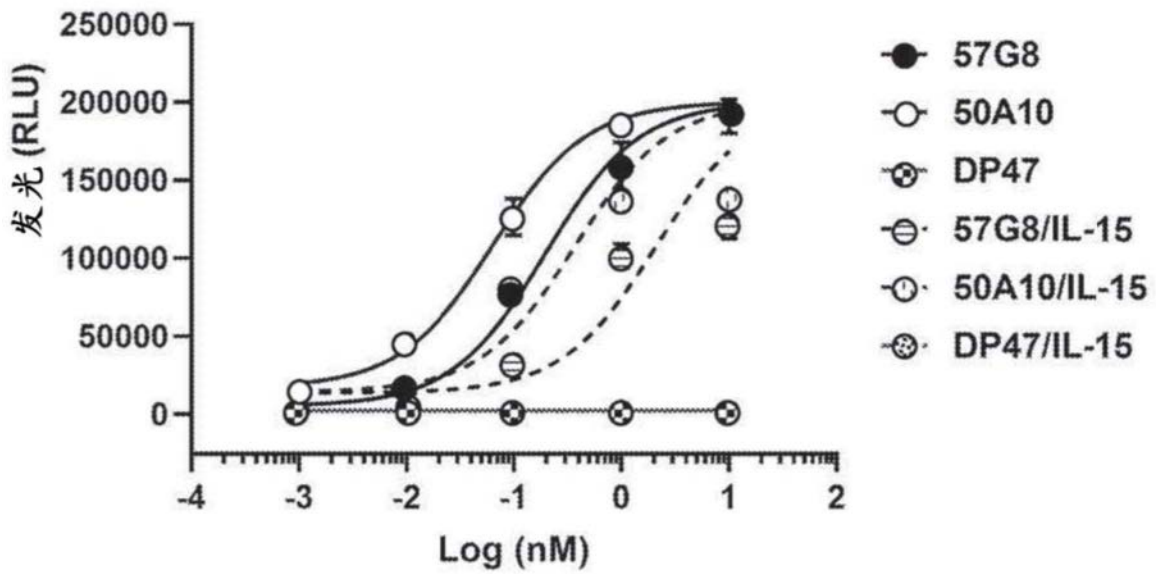


图29B

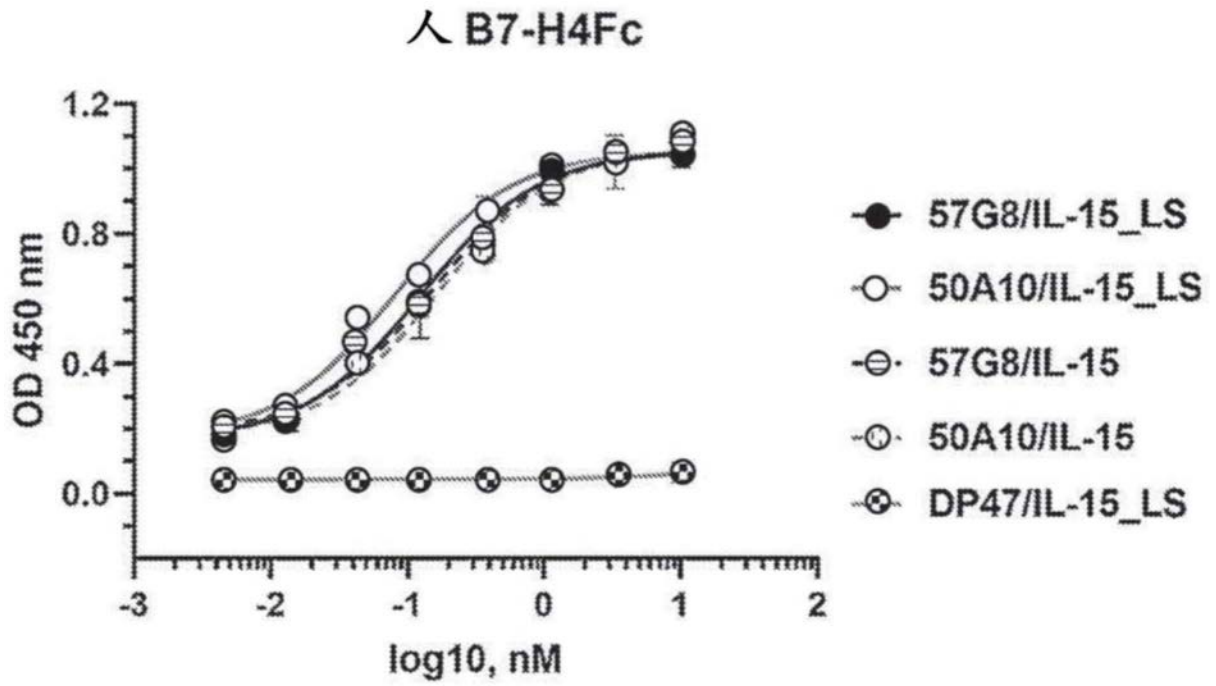


图30A

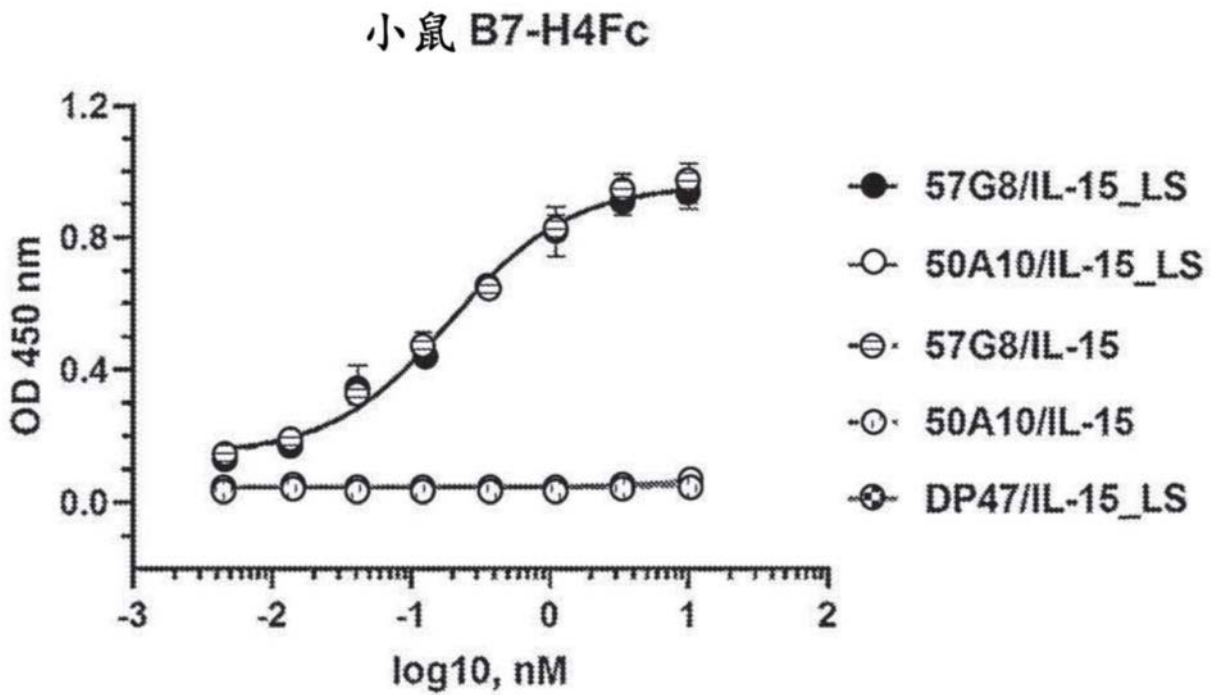


图30B

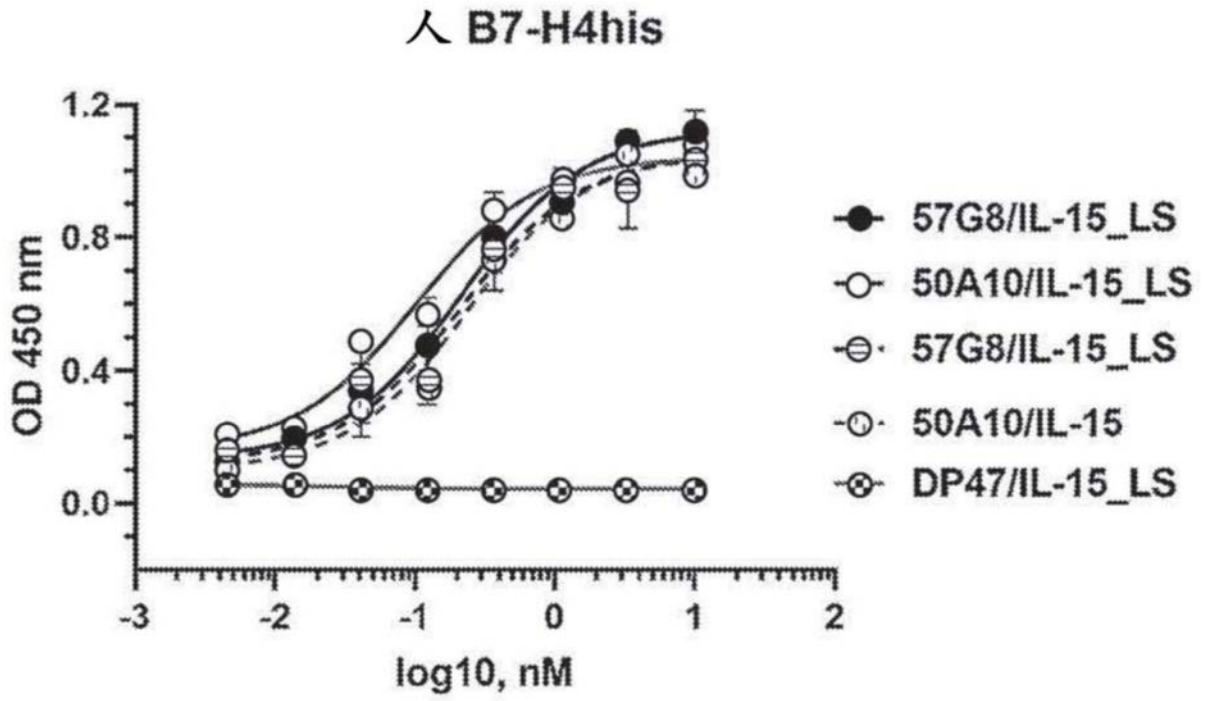


图30C

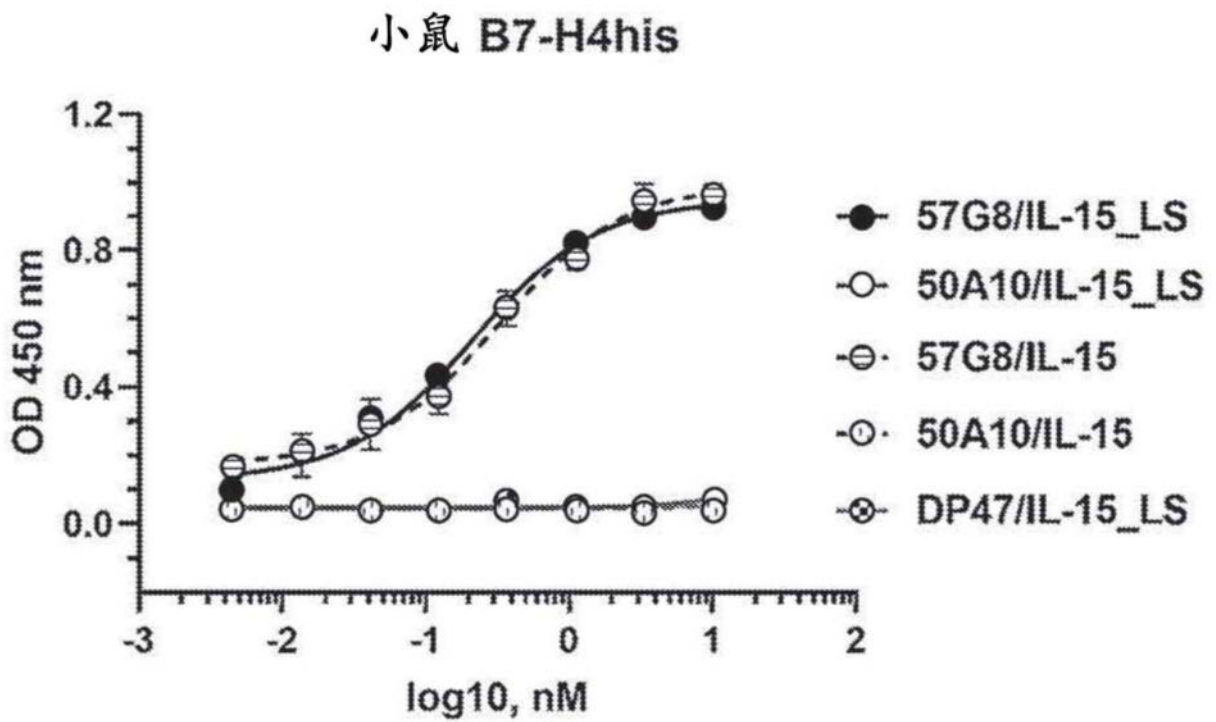


图30D

与SK-BR-3结合

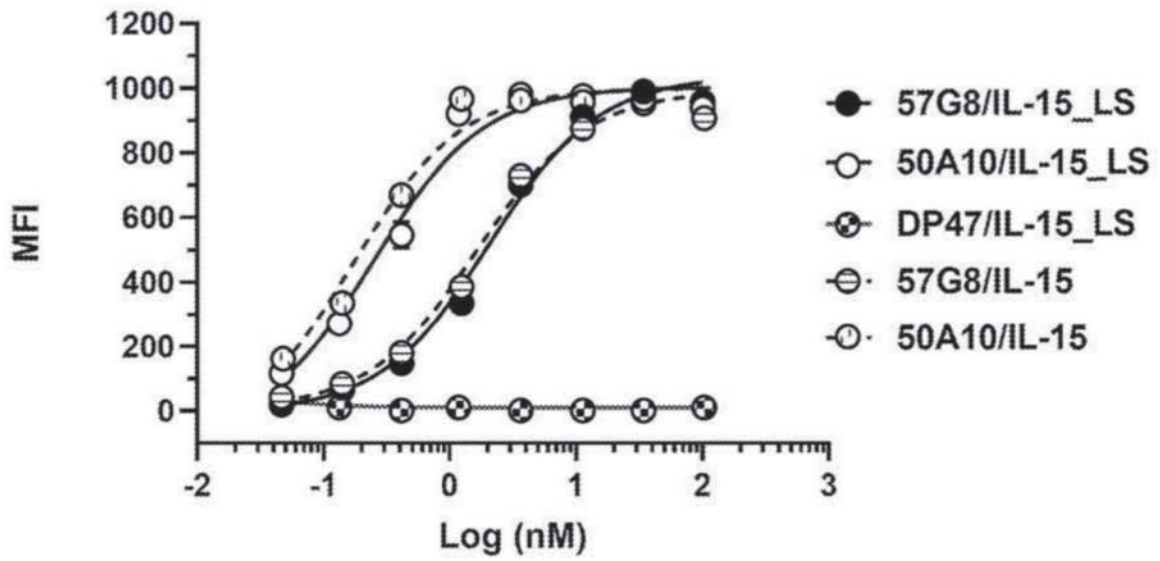


图31A

与mB7H4-CT26结合

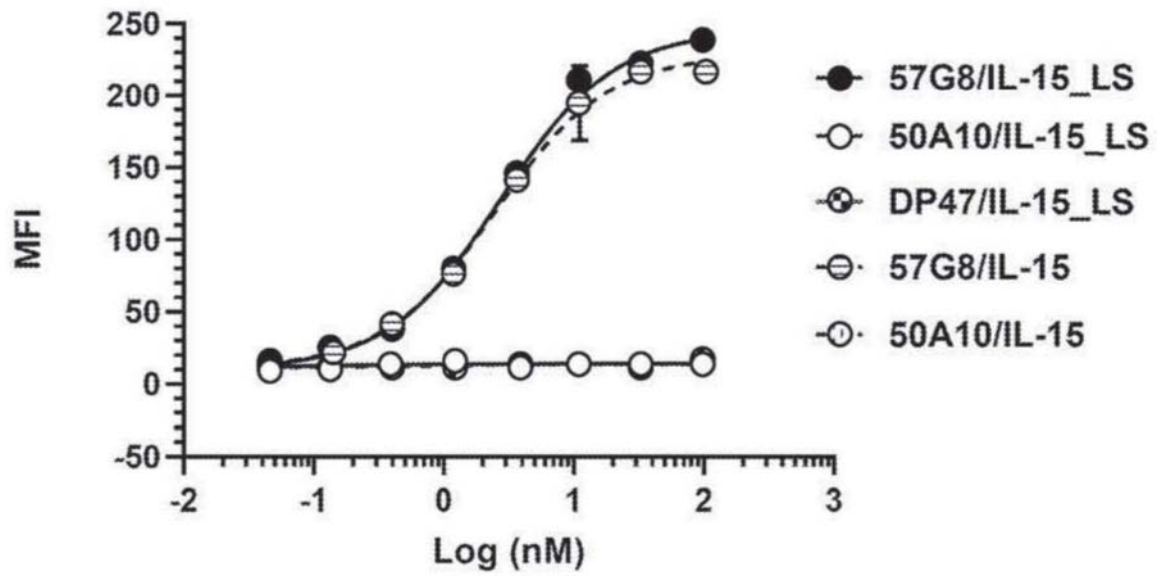


图31B

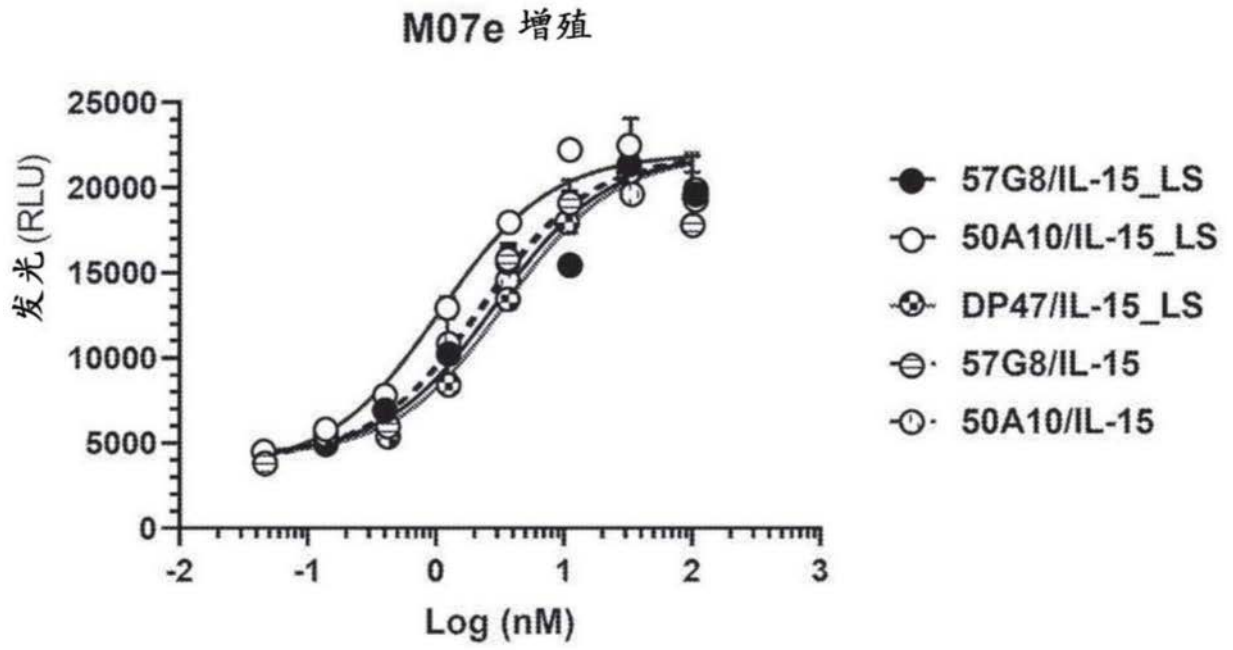


图32