(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 119451988 B
(45)授权公告日 2025.06.03

(21)申请号 202380049914.4
(22)申请日 2023.04.26
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 119451988 A
(43)申请公布日 2025.02.14
(66)本国优先权数据
PCT/CN2022/089391 2022.04.26 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.12.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2023/090822 2023.04.26
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/208034 EN 2023.11.02
(73)专利权人 乐普创一生物科技(上海)有限公司
地址 201112 上海市闵行区浦江镇联恒路651号4号楼3楼
专利权人 乐普生物科技股份有限公司
(72)发明人 曾鹏 曲志虎 蒋雯卿
(74)专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
专利代理师 水文钰 薛琦
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
(56)对比文件
CN 109912718 A,2019.06.21
CN 111944050 A,2020.11.17
审查员 高赟

权利要求书6页 说明书33页
序列表（电子公布） 附图6页

(54)发明名称

抗B7-H3抗体及其用途

(57)摘要

本披露提供了抗B7-H3抗体,包括鼠抗体、人源化抗体和人抗体,以及具有进一步优化的CDR序列的那些。这些抗体适用于治疗疾病,例如癌症。

CN 119451988 B

1.一种抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段对人B7-H3(CD276)蛋白具有特异性,并包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),该重链可变区包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,该轻链可变区包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,其中:

(a)该VH CDR1为SEQ ID NO:39的氨基酸序列;
该VH CDR2为SEQ ID NO:40的氨基酸序列;
该VH CDR3为SEQ ID NO:41、42、43、44、45或46的氨基酸序列;
该VL CDR1为SEQ ID NO:47、48或49的氨基酸序列;
该VL CDR2为SEQ ID NO:50的氨基酸序列;并且
该VL CDR3为SEQ ID NO:51的氨基酸序列,
(b)该VH CDR1为SEQ ID NO:52的氨基酸序列;
该VH CDR2为SEQ ID NO:53的氨基酸序列;
该VH CDR3为SEQ ID NO:54的氨基酸序列;
该VL CDR1为SEQ ID NO:55的氨基酸序列;
该VL CDR2为SEQ ID NO:56的氨基酸序列;并且
该VL CDR3为SEQ ID NO:57的氨基酸序列,
(c)该VH CDR1为SEQ ID NO:33的氨基酸序列;
该VH CDR2为SEQ ID NO:34的氨基酸序列;
该VH CDR3为SEQ ID NO:35的氨基酸序列;
该VL CDR1为SEQ ID NO:36的氨基酸序列;
该VL CDR2为SEQ ID NO:37的氨基酸序列;并且
该VL CDR3为SEQ ID NO:38的氨基酸序列,
(d)该VH CDR1为SEQ ID NO:25的氨基酸序列;
该VH CDR2为SEQ ID NO:26、27或28的氨基酸序列;
该VH CDR3为SEQ ID NO:29的氨基酸序列;
该VL CDR1为SEQ ID NO:30的氨基酸序列;
该VL CDR2为SEQ ID NO:31的氨基酸序列;并且
该VL CDR3为SEQ ID NO:32的氨基酸序列,
(e)该VH CDR1为SEQ ID NO:58的氨基酸序列;
该VH CDR2为SEQ ID NO:59的氨基酸序列;
该VH CDR3为SEQ ID NO:60的氨基酸序列;
该VL CDR1为SEQ ID NO:61的氨基酸序列;
该VL CDR2为SEQ ID NO:62的氨基酸序列;并且
该VL CDR3为SEQ ID NO:63的氨基酸序列,
(f)该VH CDR1为SEQ ID NO:64的氨基酸序列;
该VH CDR2为SEQ ID NO:65或66的氨基酸序列;
该VH CDR3为SEQ ID NO:67的氨基酸序列;
该VL CDR1为SEQ ID NO:68的氨基酸序列;
该VL CDR2为SEQ ID NO:69的氨基酸序列;并且
该VL CDR3为SEQ ID NO:70的氨基酸序列,

(g)该VH CDR1为SEQ ID NO:71的氨基酸序列;
该VH CDR2为SEQ ID NO:72、73或74的氨基酸序列;
该VH CDR3为SEQ ID NO:75的氨基酸序列;
该VL CDR1为SEQ ID NO:76的氨基酸序列;
该VL CDR2为SEQ ID NO:77的氨基酸序列;并且
该VL CDR3为SEQ ID NO:78的氨基酸序列,
(h)该VH CDR1为SEQ ID NO:79的氨基酸序列;
该VH CDR2为SEQ ID NO:80的氨基酸序列;
该VH CDR3为SEQ ID NO:81的氨基酸序列;
该VL CDR1为SEQ ID NO:82的氨基酸序列;
该VL CDR2为SEQ ID NO:83的氨基酸序列;并且
该VL CDR3为SEQ ID NO:84的氨基酸序列,
(i)该VH CDR1为SEQ ID NO:85的氨基酸序列;
该VH CDR2为SEQ ID NO:86或87的氨基酸序列;
该VH CDR3为SEQ ID NO:88的氨基酸序列;
该VL CDR1为SEQ ID NO:89的氨基酸序列;
该VL CDR2为SEQ ID NO:90的氨基酸序列;并且
该VL CDR3为SEQ ID NO:91的氨基酸序列,
(j)该VH CDR1为SEQ ID NO:92的氨基酸序列;
该VH CDR2为SEQ ID NO:93、94、95或96的氨基酸序列;
该VH CDR3为SEQ ID NO:97的氨基酸序列;
该VL CDR1为SEQ ID NO:98的氨基酸序列;
该VL CDR2为SEQ ID NO:99或100的氨基酸序列;并且
该VL CDR3为SEQ ID NO:101的氨基酸序列,
(k)该VH CDR1为SEQ ID NO:102的氨基酸序列;
该VH CDR2为SEQ ID NO:103的氨基酸序列;
该VH CDR3为SEQ ID NO:104的氨基酸序列;
该VL CDR1为SEQ ID NO:105的氨基酸序列;
该VL CDR2为SEQ ID NO:106的氨基酸序列;并且
该VL CDR3为SEQ ID NO:107的氨基酸序列,
(l)该VH CDR1为SEQ ID NO:108的氨基酸序列;
该VH CDR2为SEQ ID NO:109的氨基酸序列;
该VH CDR3为SEQ ID NO:110、111或112的氨基酸序列;
该VL CDR1为SEQ ID NO:113、114或115的氨基酸序列;
该VL CDR2为SEQ ID NO:116的氨基酸序列;并且
该VL CDR3为SEQ ID NO:117的氨基酸序列,或
(m)该VH CDR1为SEQ ID NO:182的氨基酸序列;
该VH CDR2为SEQ ID NO:183、184、185或186的氨基酸序列;
该VH CDR3为SEQ ID NO:187的氨基酸序列;

该VL CDR1为SEQ ID NO:188、189、190或191的氨基酸序列;

该VL CDR2为SEQ ID NO:192的氨基酸序列;并且

该VL CDR3为SEQ ID NO:193的氨基酸序列。

2.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

(c)该VH CDR1为SEQ ID NO:39的氨基酸序列;

该VH CDR2为SEQ ID NO:40的氨基酸序列;

该VH CDR3为SEQ ID NO:41、42、43、44、45或46的氨基酸序列;

该VL CDR1为SEQ ID NO:47、48或49的氨基酸序列;

该VL CDR2为SEQ ID NO:50的氨基酸序列;并且

该VL CDR3为SEQ ID NO:51的氨基酸序列。

3.根据权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

该VH CDR1为SEQ ID NO:39的氨基酸序列;

该VH CDR2为SEQ ID NO:40的氨基酸序列;

该VH CDR3为SEQ ID NO:41的氨基酸序列;

该VL CDR1为SEQ ID NO:47的氨基酸序列;

该VL CDR2为SEQ ID NO:50的氨基酸序列;并且

该VL CDR3为SEQ ID NO:51的氨基酸序列。

4.根据权利要求3所述的抗体或其抗原结合片段,其中该VH包含选自由SEQ ID NO:5和159-162组成的组的氨基酸序列,并且该VL包含选自由SEQ ID NO:6和163-166组成的组的氨基酸序列。

5.根据权利要求3所述的抗体或其抗原结合片段,其中该VH包含SEQ ID NO:159的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:165的氨基酸序列。

6.根据权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

该VH CDR1为SEQ ID NO:39的氨基酸序列;

该VH CDR2为SEQ ID NO:40的氨基酸序列;

该VH CDR3为SEQ ID NO:41的氨基酸序列;

该VL CDR1为SEQ ID NO:48或49的氨基酸序列;

该VL CDR2为SEQ ID NO:50的氨基酸序列;并且

该VL CDR3为SEQ ID NO:51的氨基酸序列。

7.根据权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其中该VH包含SEQ ID NO:159的氨基酸,并且该VL包含SEQ ID NO:178的氨基酸序列。

8.根据权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其中该VH包含SEQ ID NO:159的氨基酸,并且该VL包含SEQ ID NO:179的氨基酸序列。

9.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

该VH CDR1为SEQ ID NO:52的氨基酸序列;

该VH CDR2为SEQ ID NO:53的氨基酸序列;

该VH CDR3为SEQ ID NO:54的氨基酸序列;

该VL CDR1为SEQ ID NO:55的氨基酸序列;

该VL CDR2为SEQ ID NO:56的氨基酸序列;并且

该VL CDR3为SEQ ID NO:57的氨基酸序列。

10.根据权利要求9所述的抗体或其抗原结合片段,其中该VH包含选自由SEQ ID NO:7和167-169组成的组的氨基酸序列,并且该VL包含选自由SEQ ID NO:8和170-173组成的组的氨基酸序列。

11.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

该VH CDR1为SEQ ID NO:33的氨基酸序列;

该VH CDR2为SEQ ID NO:34的氨基酸序列;

该VH CDR3为SEQ ID NO:35的氨基酸序列;

该VL CDR1为SEQ ID NO:36的氨基酸序列;

该VL CDR2为SEQ ID NO:37的氨基酸序列;并且

该VL CDR3为SEQ ID NO:38的氨基酸序列。

12.根据权利要求11所述的抗体或其抗原结合片段,其中该VH包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

13.一种抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段对人B7-H3(CD276)蛋白具有特异性,并包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),该重链可变区包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,该轻链可变区包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,其中:

(a)该VH CDR1为SEQ ID NO:149的氨基酸序列;

该VH CDR2为SEQ ID NO:150、151或152的氨基酸序列;

该VH CDR3为SEQ ID NO:153或154的氨基酸序列;

该VL CDR1为SEQ ID NO:155的氨基酸序列;

该VL CDR2为SEQ ID NO:156的氨基酸序列;并且

该VL CDR3为SEQ ID NO:157或158的氨基酸序列,

(b)该VH CDR1为SEQ ID NO:126的氨基酸序列;

该VH CDR2为SEQ ID NO:127或128的氨基酸序列;

该VH CDR3为SEQ ID NO:129、130或131的氨基酸序列;

该VL CDR1为SEQ ID NO:132的氨基酸序列;

该VL CDR2为SEQ ID NO:133的氨基酸序列;并且

该VL CDR3为SEQ ID NO:134的氨基酸序列,

(c)该VH CDR1为SEQ ID NO:135的氨基酸序列;

该VH CDR2为SEQ ID NO:136或137的氨基酸序列;

该VH CDR3为SEQ ID NO:138的氨基酸序列;

该VL CDR1为SEQ ID NO:139的氨基酸序列;

该VL CDR2为SEQ ID NO:140的氨基酸序列;并且

该VL CDR3为SEQ ID NO:141的氨基酸序列,或

(d)该VH CDR1为SEQ ID NO:142的氨基酸序列;

该VH CDR2为SEQ ID NO:143的氨基酸序列;

该VH CDR3为SEQ ID NO:144的氨基酸序列;

该VL CDR1为SEQ ID NO:145的氨基酸序列;

该VL CDR2为SEQ ID NO:146的氨基酸序列;并且

该VL CDR3为SEQ ID NO:147或148的氨基酸序列。

14.根据权利要求13所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

该VH CDR1为SEQ ID NO:149的氨基酸序列;

该VH CDR2为SEQ ID NO:150、151或152的氨基酸序列;

该VH CDR3为SEQ ID NO:153或154的氨基酸序列;

该VL CDR1为SEQ ID NO:155的氨基酸序列;

该VL CDR2为SEQ ID NO:156的氨基酸序列;并且

该VL CDR3为SEQ ID NO:157或158的氨基酸序列。

15.根据权利要求14所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

该VH CDR1为SEQ ID NO:149的氨基酸序列;

该VH CDR2为SEQ ID NO:150的氨基酸序列;

该VH CDR3为SEQ ID NO:153的氨基酸序列;

该VL CDR1为SEQ ID NO:155的氨基酸序列;

该VL CDR2为SEQ ID NO:156的氨基酸序列;并且

该VL CDR3为SEQ ID NO:157的氨基酸序列。

16.根据权利要求15所述的抗体或其抗原结合片段,其中该VH包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列。

17.根据权利要求13所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

该VH CDR1为SEQ ID NO:126的氨基酸序列;

该VH CDR2为SEQ ID NO:127或128的氨基酸序列;

该VH CDR3为SEQ ID NO:129、130或131的氨基酸序列;

该VL CDR1为SEQ ID NO:132的氨基酸序列;

该VL CDR2为SEQ ID NO:133的氨基酸序列;并且

该VL CDR3为SEQ ID NO:134的氨基酸序列。

18.根据权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中该VH包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列。

19.根据权利要求13所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

该VH CDR1为SEQ ID NO:135的氨基酸序列;

该VH CDR2为SEQ ID NO:136或137的氨基酸序列;

该VH CDR3为SEQ ID NO:138的氨基酸序列;

该VL CDR1为SEQ ID NO:139的氨基酸序列;

该VL CDR2为SEQ ID NO:140的氨基酸序列;并且

该VL CDR3为SEQ ID NO:141的氨基酸序列。

20.根据权利要求19所述的抗体或其抗原结合片段,其中该VH包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列。

21.根据权利要求13所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

该VH CDR1为SEQ ID NO:142的氨基酸序列;

该VH CDR2为SEQ ID NO:143的氨基酸序列;

该VH CDR3为SEQ ID NO:144的氨基酸序列;

该VL CDR1为SEQ ID NO:145的氨基酸序列;

该VL CDR2为SEQ ID NO:146的氨基酸序列;并且

该VL CDR3为SEQ ID NO:147或148的氨基酸序列。

22.根据权利要求21所述的抗体或其抗原结合片段,其中该VH包含SEQ ID NO:122的氨基酸序列,并且该VL包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列。

23.根据权利要求1-22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段是二价Fab抗体,或选自由F(ab')2、F(ab)2、Fab'、Fab、Fv和scFv组成的组的片段。

24.一种多特异性抗体,其包含根据权利要求1-23中任一项所述的抗原结合片段和一种或多种对非B7-H3靶抗原具有结合特异性的抗体或抗原结合片段。

25.一种嵌合抗原受体(CAR),其包含根据权利要求1-23中任一项所述的抗原结合片段、跨膜结构域、共刺激结构域和CD3ξ细胞内结构域。

26.一种或多种多核苷酸,其编码根据权利要求1-23中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求24所述的多特异性抗体或根据权利要求25所述的CAR。

27.根据权利要求26所述的一种或多种多核苷酸,其是一种或多种mRNA。

28.根据权利要求27所述的一种或多种多核苷酸,其中该mRNA被化学修饰。

29.一种细胞,其包含根据权利要求26-28中任一项所述的一种或多种多核苷酸。

30.一种抗体-药物缀合物,其包含:

(a)根据权利要求1-23中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求24所述的多特异抗体;以及

(b)缀合到该抗体或其抗原结合片段的缀合部分,其中该缀合部分选自:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶或其组合。

31.一种组合物,其包含根据权利要求1-23中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求24所述的多特异性抗体、根据权利要求25所述的CAR、根据权利要求26-28中任一项所述的一种或多种多核苷酸、根据权利要求29所述的细胞或根据权利要求30所述的抗体-药物缀合物,以及药学上可接受的载体。

32.根据权利要求1-23中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求24所述的多特异性抗体、根据权利要求25所述的CAR、根据权利要求26-28中任一项所述的一种或多种多核苷酸、根据权利要求29所述的细胞或根据权利要求30所述的抗体-药物缀合物用于制备治疗癌症的药物的用途;所述的癌症为非小细胞肺癌、肾癌、尿路上皮癌、结直肠癌、前列腺癌、多形性胶质母细胞瘤、卵巢癌和/或胰腺癌。

抗B7-H3抗体及其用途

背景技术

[0001] B7是在激活的抗原呈递细胞(APC)上发现的整合膜蛋白家族。当与T细胞上的CD28或CD152(CTLA-4)表面蛋白配对时,B7蛋白可以产生共刺激信号或共抑制信号,以分别增强或降低APC和T细胞之间MHC-TCR信号的活性。APC的B7与T细胞的CTLA-4的结合导致T细胞活性的抑制。

[0002] B7蛋白主要有两种类型:B7-1或CD80,以及B7-2或CD86。蛋白CD28和CTLA-4(CD152)各自与B7-1和B7-2二者相互作用。该家族中的其他蛋白包括B7-DC(PD-L2)、B7-H1(PD-L1)、B7-H2(ICOSLG)、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、B7-H5(VISTA)、B7-H6和B7-H7。

[0003] B7-H3是一种I型跨膜蛋白,其含有细胞外免疫球蛋白样可变区(IgV)和恒定区(IgC)、跨膜区和短细胞质区。B7-H3有两个剪接变体——B7-H3a和B7-H3b。B7-H3a的细胞外结构域包括IgV-IgC的两个免疫球蛋白结构域(也称为2IgB7-H3),而B7-H3b的细胞外结构域由IgV-IgC-IgV-IgC的四个免疫球蛋白结构域组成(也称为4IgB7-H3)。4IgB7-H3是人类的主要同种型,而2IgB7-H3是小鼠的唯一同种型。

[0004] B7-H3蛋白在正常组织和细胞中不表达或低表达,但在各种肿瘤组织中高表达,并且与肿瘤进展、患者生存和预后密切相关。临床报道,B7-H3在多种类型的癌症中过表达,尤其是在非小细胞肺癌、肾癌、尿路上皮癌、结直肠癌、前列腺癌、多形性胶质母细胞瘤、卵巢癌和胰腺癌中。此外,文献中还报道,在前列腺癌中,B7-H3的表达水平与临床病理恶性肿瘤和癌症进展呈正相关。同样,在多形性胶质母细胞瘤中,B7-H3表达与无事件生存期呈负相关,而在胰腺癌中,B7-H3表达与淋巴结转移和病理进展相关。因此,B7-H3是合适的潜在治疗靶标。已经证明,靶向B7-H3的抗体可以增强肿瘤中浸润性CD8阳性T细胞并抑制肿瘤生长。

发明内容

[0005] 在各种实施例中,本披露提供了对人B7-H3蛋白具有特异性的抗体和抗原结合片段。已经鉴定出鼠抗体及其人源化对应物和全人抗体。这些抗体通常具有优于基准抗体MGA017(宏基公司(MacroGenics))的特性。这些抗体以及由其衍生的分子,例如嵌合抗原受体(CAR)、多特异性抗体,可以适当地用于治疗疾病,例如癌症。

[0006] 相应地,本披露的一个实施例提供了抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段对人B7-H3(CD276)蛋白具有特异性,并包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),该重链可变区包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,该轻链可变区包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

[0007] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:26、27或28的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0008] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ

ID NO:34的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列。

[0009] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:41、42、43、44、45或46的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:47、48或49的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列。

[0010] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列。

[0011] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列。

[0012] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:65或66的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列。

[0013] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:72、73或74的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列。

[0014] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列。

[0015] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:86或87的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ IDNO:90的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列。

[0016] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:93、94、95或96的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:99或100的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列。

[0017] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列。

[0018] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:110、111或112的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:113、114或115的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列。

[0019] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:182的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:183、184、185或186的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:187的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:188、189、190或191的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:192的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:193的氨基酸序列。

[0020] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施例中,VH包含选自由SEQ ID NO:5和159-162组成的组的氨基酸序列,并且VL包含选自由SEQ ID NO:6和163-166组成的组的氨基酸序列。在一些实施例中,VH包含SEQ ID NO:159的氨基酸序列,并且VL包含SEQ ID NO:165的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:48或49的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列。

[0023] 在一些实施例中,VH包含SEQ ID NO:159的氨基酸,并且VL包含SEQ ID NO:178的氨基酸序列。在一些实施例中,VH包含SEQ ID NO:159的氨基酸,并且VL包含SEQ ID NO:179的氨基酸序列。

[0024] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列。

[0025] 在一些实施例中,VH包含选自由SEQ ID NO:7和167-169组成的组的氨基酸序列,并且VL包含选自由SEQ ID NO:8和170-173组成的组的氨基酸序列。

[0026] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列。

[0027] 在一些实施例中,VH包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,并且VL包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0028] 在一个实施例中,还提供了抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段对人B7-H3(CD276)蛋白具有特异性,并包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),该重链可变区包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,该轻链可变区包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

[0029] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:126的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:127或128的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:129、130或131的氨基酸序

列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列。

[0030] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:136或137的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列。

[0031] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:147或148的氨基酸序列。

[0032] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:150、151或152的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:153或154的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:155的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:156的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:157或158的氨基酸序列。

[0033] 在一些实施例中,该VH CDR1包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列;该VH CDR2包含SEQ ID NO:150的氨基酸序列;该VH CDR3包含SEQ ID NO:153的氨基酸序列;该VL CDR1包含SEQ ID NO:155的氨基酸序列;该VL CDR2包含SEQ ID NO:156的氨基酸序列;以及该VL CDR3包含SEQ ID NO:157的氨基酸序列。

[0034] 在一些实施例中,VH包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列,并且VL包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列。

[0035] 在一些实施例中,VH包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列,并且VL包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列。

[0036] 在一些实施例中,VH包含SEQ ID NO:122的氨基酸序列,并且VL包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列。

[0037] 在一些实施例中,VH包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列,并且VL包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列。

[0038] 在一些实施例中,抗体或其片段是二价Fab抗体,或选自由F(ab')2、F(ab)2、Fab'、Fab、Fv和scFv组成的组的片段。

[0039] 还提供了多特异性抗体,其包含本披露的抗原结合片段和一种或多种对非B7-H3靶抗原具有结合特异性的抗体或抗原结合片段。

[0040] 仍进一步提供了嵌合抗原受体(CAR),其包含本披露的抗原结合片段、跨膜结构域、共刺激结构域和CD3ξ细胞内结构域。又进一步提供了一种或多种编码本披露的抗体或其抗原结合片段或CAR的多核苷酸。在一些实施例中,多核苷酸是一种或多种mRNA。

[0041] 还提供了用于治疗诸如癌症的疾病的方法和用途。

附图说明

[0042] 图1显示了所测试抗体与A375肿瘤细胞上B7-H3蛋白的结合。除AHP05564、AHP06331、AHP06345和AHP06358外,所有测试的抗体均显示出比临床基准MGA017更好的结合。

[0043] 图2显示了所测试抗体对A375肿瘤细胞的内化效力。

[0044] 图3显示了B7-H3 ADC对RKO肿瘤细胞的体外杀伤功效。

[0045] 图4显示了人源化抗体与A375肿瘤细胞上表达的B7-H3的结合。

[0046] 图5显示了去除潜在PTM位点后嵌合抗体对A375肿瘤细胞上表达的B7-H3的结合活性。

[0047] 图6显示了去除PTM的人源化抗体与A375肿瘤细胞的结合活性。

具体实施方式

[0048] 定义

[0049] 应注意,术语“一个/种(a或an)”实体是指一个/种或多个/种实体;例如,“抗体”被理解为代表一种或多种抗体。因此,术语“一个/种(a或an)”、“一个/种或多个/种”和“至少一个/种”在本文中可以互换使用。

[0050] 如本文所用,“抗体”或“抗原结合多肽”是指特异性识别和结合抗原的多肽或多肽复合物。抗体可以是完整抗体和任何抗原结合片段或其单链。因此,术语“抗体”包括任何含有包含具有与抗原结合的生物活性的免疫球蛋白分子的至少一部分的分子的蛋白或肽。这样的实例包括但不限于重链或轻链的互补决定区(CDR)或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框架(FR)区或其任何部分、或结合蛋白的至少一部分。

[0051] 本文使用的术语“抗体片段”或“抗原结合片段”是抗体的一部分,例如F(ab')2、F(ab)2、Fab'、Fab、Fv、scFv等。无论结构如何,抗体片段都会与完整抗体识别的相同抗原结合。术语“抗体片段”包括适配体、spiegeleisen和双特异抗体。术语“抗体片段”还包括任何合成或基因工程化蛋白质,这些蛋白质通过与特定抗原结合形成复合物而起到抗体的作用。

[0052] 术语抗体包括可以通过生化方式区分的各种广泛类别的多肽。本领域技术人员将认识到,重链被分类为γ、μ、α、δ或ε,其中有一些亚类(例如γ1-γ4)。正是这条链的性质决定了抗体的“类别”分别为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。

[0053] 免疫球蛋白亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG5等,被充分表征,并且已知赋予功能特化。鉴于本披露,本领域技术人员容易辨别这些类别和同种型中的每一个的修改版本,并且相应地,它们在本披露的范围内。所有免疫球蛋白类别显然都在本披露的范围内,以下讨论通常将涉及免疫球蛋白分子的IgG类别。关于IgG,标准免疫球蛋白分子包括两个分子量约23,000道尔顿的相同的轻链多肽和两个分子量53,000-70,000道尔顿的相同的重链多肽。这四条链通常通过二硫键以“Y”构型连接,其中轻链从“Y”的开口处开始、一直延伸到可变区来包围重链。

[0054] 本披露的抗体、其抗原结合多肽、变体或衍生物包括但不限于多克隆、单克隆、多特异性、人、人源化、灵长化或嵌合抗体,单链抗体,表位结合片段例如Fab、Fab'和F(ab')2,Fd,Fv,单链Fv(scFv),单链抗体,二硫键连接的Fv(sdFv),包含VK或VH结构域的片段,Fab表达文库产生的片段,以及抗独特型(抗Id)抗体(包括例如本文披露的针对LIGHT抗体的抗Id抗体)。本披露的免疫球蛋白或抗体分子可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。

[0055] 如本文所用,术语“嵌合抗体”将被认为是指任何抗体,其中免疫反应区或位点获

得或衍生自第一物种,恒定区(可以是完整的、部分的或根据本披露进行修饰的)获得自第二物种。在某些实施例中,靶结合区或位点将来自非人类来源(例如小鼠或灵长类动物),并且恒定区是人类恒定区。

[0056] 本文披露的抗体可以来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物。优选地,抗体是人、鼠、驴、兔、山羊、豚鼠、骆驼、美洲驼、马或鸡抗体。在一些实施例中,可变区可能是软骨鱼纲(condricthoid)来源(例如,来自鲨鱼)。

[0057] 如本文所用,术语"重组的"涉及多肽或多核苷酸时,是指天然不存在的多肽或多核苷酸形式,其非限制性实例可以通过组合通常不会一起出现的多核苷酸来产生。

[0058] 杂交瘤技术可以在不同的"严格性"条件下进行。一般来说,低严格性杂交反应在约40℃下在约10x SSC或等效离子强度/温度的溶液中进行。中等严格性杂交通常在约50℃下在约6x SSC中进行,高严格性杂交反应通常在约60℃下在约1x SSC中进行。杂交反应也可以在本领域技术人员熟知的"生理条件"下进行。生理条件的非限制性实例是通常在细胞中发现的温度、离子强度、pH和Mg2+浓度。

[0059] 抗B7-H3抗体

[0060] 如所附实验实例中所示,本发明人能够产生抗B7-H3抗体35A12B11、62H9H5、72D1D11、81C8A1、97E6B2、106A5B3、126C10B10、216E7A9、227E12D1、294A3C4、312E1E2和429H9F10(表1),所有这些抗体对人B7-H3蛋白的结合亲和力都高于基准抗体MGA017(MacroGenics)。

[0061] 同时,从定制的噬菌体抗体文库中鉴定出全人抗体,包括AHP05564、AHP06331、AHP06345和AHP06358(表2)。这些人抗体还具有对MGA017而言独特的特性,突显了这些人抗体的前景。

[0062] 可能归因于结合亲和力的提高,当用A375细胞评估时,所有嵌合版本的鼠抗体都导致比MGA017更高的细胞内化(图2A)。令人惊讶的是,两种全人抗体AHP06331和AHP06358在高浓度下也大大优于MGA017,尽管它们在较低浓度下的表现相对适中(图2B)。

[0063] 还制备并测试了这些抗体的抗体-药物缀合物(ADC)。同样,至少72D1D11、81C8A1、62H9H5、106A5B3、126C10B10和227E12D的ADC优于vc-MMAE缀合的MGA017(图3),进一步证实了这些新抗体的优越特性。

[0064] 根据结合竞争测定,将抗体分类为五个不同的表位分仓组,Aα、Aβ、Aγ、B和C,如表3B所示。Aα组包括MGA017,以及62H9H5、81C8A1、106A5B3、216E7A9和227E12D1,而大多数抗体不属于该组。Aβ组包括72D1D11、97E6B2、126C10B10和429H9F10;Aγ组包括35A12B11、294A3C4和AHP06358;B组包括312E1E12和AHP06345;以及C组包括AHP06331和AHP05564。

[0065] 因此,根据本披露的一个实施例,提供了抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段对人B7-H3蛋白具有结合特异性。在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),该重链可变区包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,该轻链可变区包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

[0066] 在一个实施例中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3是本文鉴定的任何抗体的那些VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,例如35A12B11、62H9H5、72D1D11、81C8A1、97E6B2、106A5B3、126C10B10、216E7A9、227E12D1、294A3C4、312E1E2和429H9F10,或AHP05564、AHP06331、AHP06345和AHP06358中的任一种。

[0067] 在一些实施例中,关于抗体72D1D11,VH CDR1包括SEQ ID NO:39的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:40的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:41的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:47的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:50的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:51的氨基酸序列。

[0068] 抗体或片段可以是鼠的、嵌合的或人源化的。示例抗体包括表5中所示的那些。在一些实施例中,抗体或片段具有VH,其氨基酸序列为SEQ ID NO:5(鼠)、159、160、161或162(人源化)。在一些实施例中,抗体或片段具有VL,其氨基酸序列为SEQ ID NO:6(鼠)、163、164、165或166(人源化)。示例VH/VL序列配对如表5B所示。例如,在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:159的VH和SEQ ID NO:165的VL。在另一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:159的VH和SEQ ID NO:163的VL。

[0069] 序列分析揭示,VH CDR3序列(SEQ ID NO:41)和VL CDR1序列(SEQ ID NO:47)包括可能在翻译后被修饰的残基。为了避免翻译后修饰(PTM)风险并因此简化制造,本披露设计并测试了VH CDR3的某些去风险版本,包括SEQ ID NO:42、43、44、45和46,以及VL CDR1的去风险版本,包括SEQ ID NO:48和49。

[0070] 因此,在一些实施例中,提供了具有CDR序列的抗体和片段,其中VH CDR1包括SEQ ID NO:39的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:40的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:41、42、43、44、45或46的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:47、48或49的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:50的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:51的氨基酸序列。

[0071] 在一些实施例中,VH CDR1包括SEQ ID NO:39的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:40的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:41的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:47、48或49的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:50的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:51的氨基酸序列。

[0072] 还提供了具有或不具有PTM去风险的CDR的示例抗体序列。如表9所示。在一些实施例中,抗体或片段具有VH,其氨基酸序列为SEQ ID NO:159、174、175、176或177。在一些实施例中,抗体或片段具有VL,其氨基酸序列为SEQ ID NO:165、178或179。示例VH/VL序列配对如表8所示。例如,在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:159的VH和SEQ ID NO:178的VL。在另一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:159的VH和SEQ ID NO:179的VL。

[0073] 在一些实施例中,还提供了与72D1D11结合B7-H3上相同表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中,还提供了与72D1D11竞争结合B7-H3的抗体及其抗原结合片段。

[0074] 在一些实施例中,关于抗体81C8A1,VH CDR1包括SEQ ID NO:52的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:53的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:54的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:55的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:56的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:57的氨基酸序列。

[0075] 抗体或片段可以是鼠的、嵌合的或人源化的。示例抗体包括表6中所示的那些。在一些实施例中,抗体或片段具有VH,其氨基酸序列为SEQ ID NO:7(鼠)、167、168或169(人源化)。在一些实施例中,抗体或片段具有VL,其氨基酸序列为SEQ ID NO:8(鼠)、170、171、172或173(人源化)。示例VH/VL序列配对如表6B所示。例如,在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:167的VH和SEQ ID NO:172的VL。在另一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ

ID NO:167的VH和SEQ ID NO:173的VL。在另一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:168的VH和SEQ ID NO:171的VL。在另一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:168的VH和SEQ ID NO:172的VL。在另一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:168的VH和SEQ ID NO:173的VL。

[0076] 在一些实施例中,还提供了与81C8A1结合B7-H3上相同表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中,还提供了与81C8A1竞争结合B7-H3的抗体及其抗原结合片段。

[0077] 在一些实施例中,关于抗体35A12B11,VH CDR1包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:26的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:29的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:30的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:31的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0078] 序列分析揭示,VH CDR2序列(SEQ ID NO:26)包括可能在翻译后被修饰的残基。为了避免翻译后修饰(PTM)风险并因此简化制造,本披露设计并测试了VH CDR2的某些去风险版本,包括SEQ ID NO:27和28。

[0079] 因此,在一些实施例中,提供了具有CDR序列的抗体和片段,其中VH CDR1包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:26、27或28的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:29的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:30的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:31的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0080] 在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:1的VH和SEQ ID NO:2的VL。在一些实施例中,还提供了与35A12B11结合B7-H3上相同表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中,还提供了与35A12B11竞争结合B7-H3的抗体及其抗原结合片段。

[0081] 在一些实施例中,关于抗体62H9H5,VH CDR1包括SEQ ID NO:33的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:35的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:36的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:37的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:38的氨基酸序列。

[0082] 在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:3的VH和SEQ ID NO:4的VL。在一些实施例中,还提供了与62H9H5结合B7-H3上相同表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中,还提供了与62H9H5竞争结合B7-H3的抗体及其抗原结合片段。

[0083] 在一些实施例中,关于抗体97E6B2,VH CDR1包括SEQ ID NO:58的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:59的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:60的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:61的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:62的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:63的氨基酸序列。

[0084] 在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:9的VH和SEQ ID NO:10的VL。在一些实施例中,还提供了与97E6B2结合B7-H3上相同表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中,还提供了与97E6B2竞争结合B7-H3的抗体及其抗原结合片段。

[0085] 在一些实施例中,关于抗体106A5B3,VH CDR1包括SEQ ID NO:64的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:65的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:67的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:68的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:69的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:70的氨基酸序列。

[0086] 序列分析揭示,VH CDR2序列(SEQ ID NO:65)包括可能在翻译后被修饰的残基。为

了避免翻译后修饰(PTM)风险并因此简化制造,本披露设计并测试了VH CDR2的某些去风险版本,包括SEQ ID NO:66。

[0087] 因此,在一些实施例中,提供了具有CDR序列的抗体和片段,其中VH CDR1包括SEQ ID NO:64的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:65或66的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:67的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:68的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:69的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:70的氨基酸序列。

[0088] 在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:11的VH和SEQ ID NO:12的VL。在一些实施例中,还提供了与106A5B3结合B7-H3上相同表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中,还提供了与106A5B3竞争结合B7-H3的抗体及其抗原结合片段。

[0089] 在一些实施例中,关于抗体126C10B10,VH CDR1包括SEQ ID NO:71的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:72的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:75的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:76的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:77的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:78的氨基酸序列。

[0090] 序列分析揭示,VH CDR2序列(SEQ ID NO:72)包括可能在翻译后被修饰的残基。为了避免翻译后修饰(PTM)风险并因此简化制造,本披露设计并测试了VH CDR2的某些去风险版本,包括SEQ ID NO:73和74。

[0091] 因此,在一些实施例中,提供了具有CDR序列的抗体和片段,其中VH CDR1包括SEQ ID NO:71的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:72、73或74的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:75的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:76的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:77的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:78的氨基酸序列。

[0092] 在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:13的VH和SEQ ID NO:14的VL。在一些实施例中,还提供了与126C10B10结合B7-H3上相同表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中,还提供了与126C10B10竞争结合B7-H3的抗体及其抗原结合片段。

[0093] 在一些实施例中,关于抗体216E7A9,VH CDR1包括SEQ ID NO:79的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:80的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:81的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:83的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:84的氨基酸序列。

[0094] 在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:15的VH和SEQ ID NO:16的VL。在一些实施例中,还提供了与216E7A9结合B7-H3上相同表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中,还提供了与216E7A9竞争结合B7-H3的抗体及其抗原结合片段。

[0095] 在一些实施例中,关于抗体227E12D1,VH CDR1包括SEQ ID NO:85的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:86的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:88的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:89的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:90的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:91的氨基酸序列。

[0096] 序列分析揭示,VH CDR2序列(SEQ ID NO:86)包括可能在翻译后被修饰的残基。为了避免翻译后修饰(PTM)风险并因此简化制造,本披露设计并测试了VH CDR2的某些去风险版本,包括SEQ ID NO:87。

[0097] 因此,在一些实施例中,提供了具有CDR序列的抗体和片段,其中VH CDR1包括SEQ ID NO:85的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:86或87的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ

ID NO:88的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:89的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:90的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:91的氨基酸序列。

[0098] 在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:17的VH和SEQ ID NO:18的VL。在一些实施例中,还提供了与227E12D1结合B7-H3上相同表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中,还提供了与227E12D1竞争结合B7-H3的抗体及其抗原结合片段。

[0099] 在一些实施例中,关于抗体294A3C4,VH CDR1包括SEQ ID NO:92的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:93的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:97的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:98的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:99的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:101的氨基酸序列。

[0100] 序列分析揭示,VH CDR2序列(SEQ ID NO:93)和VL CDR2(SEQ ID NO:99)包括可能在翻译后被修饰的残基。为了避免翻译后修饰(PTM)风险并因此简化制造,本披露设计并测试了VH CDR2的某些去风险版本,包括SEQ ID NO:94、95和96,以及VL CDR2的去风险版本,包括SEQ ID NO:100。

[0101] 因此,在一些实施例中,提供了具有CDR序列的抗体和片段,其中VH CDR1包括SEQ ID NO:92的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:93、94、95或96的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:97的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:98的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:99或100的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:101的氨基酸序列。

[0102] 在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:19的VH和SEQ ID NO:20的VL。在一些实施例中,还提供了与294A3C4结合B7-H3上相同表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中,还提供了与294A3C4竞争结合B7-H3的抗体及其抗原结合片段。

[0103] 在一些实施例中,关于抗体312E1E2,VH CDR1包括SEQ ID NO:102的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:103的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:104的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:105的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:106的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:107的氨基酸序列。

[0104] 在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:21的VH和SEQ ID NO:22的VL。在一些实施例中,还提供了与312E1E2结合B7-H3上相同表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中,还提供了与312E1E2竞争结合B7-H3的抗体及其抗原结合片段。

[0105] 在一些实施例中,关于抗体429H9F10,VH CDR1包括SEQ ID NO:108的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:109的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:110的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:113的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:116的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:117的氨基酸序列。

[0106] 序列分析揭示,VH CDR3序列(SEQ ID NO:110)和VL CDR1(SEQ ID NO:113)包括可能在翻译后被修饰的残基。为了避免翻译后修饰(PTM)风险并因此简化制造,本披露设计并测试了VH CDR3的某些去风险版本,包括SEQ ID NO:111和112,以及VL CDR1的去风险版本,包括SEQ ID NO:114和115。

[0107] 因此,在一些实施例中,提供了具有CDR序列的抗体和片段,其中VH CDR1包括SEQ ID NO:108的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:109的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:110、111或112的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:113、114或115的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:116的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:117的氨基酸序列。

[0108] 在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:23的VH和SEQ ID NO:24的VL。在一些实施例中,还提供了与429H9F10结合B7-H3上相同表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中,还提供了与429H9F10竞争结合B7-H3的抗体及其抗原结合片段。

[0109] 在一些实施例中,关于抗体43G8A9,VH CDR1包括SEQ ID NO:182的氨基酸序列;VH CDR2包括SEQ ID NO:183的氨基酸序列;VH CDR3包括SEQ ID NO:187的氨基酸序列;VL CDR1包括SEQ ID NO:188的氨基酸序列;VL CDR2包括SEQ ID NO:192的氨基酸序列;以及VL CDR3包括SEQ ID NO:193的氨基酸序列。

[0110] 序列分析揭示,VH CDR2序列(SEQ ID NO:183)和VL CDR1(SEQ ID NO:188)包括可能在翻译后被修饰的残基。为了避免翻译后修饰(PTM)风险并因此简化制造,本披露设计并测试了VH CDR2的某些去风险版本,包括SEQ ID NO:184、185和186,以及VL CDR1的去风险版本,包括SEQ ID NO:188、189、190和191。

[0111] 因此,在一些实施例中,提供了具有CDR序列的抗体和片段,其中VH CDR1包括SEQ ID NO:182的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:183、184、185或186的氨基酸序列;VH CDR3包括SEQ ID NO:187的氨基酸序列;VL CDR1包括SEQ ID NO:188、189、190或191的氨基酸序列;VL CDR2包括SEQ ID NO:192的氨基酸序列;以及VL CDR3包括SEQ ID NO:193的氨基酸序列。

[0112] 在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:180的VH和SEQ ID NO:181的VL。在一些实施例中,还提供了与43G8A9结合B7-H3上相同表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中,还提供了与43G8A9竞争结合B7-H3的抗体及其抗原结合片段。

[0113] 在一些实施例中,关于抗体AHP05564,VH CDR1包括SEQ ID NO:126的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:127的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:129的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:132的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:133的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:134的氨基酸序列。

[0114] 序列分析揭示,VH CDR2(SEQ ID NO:127)和VH CDR3序列(SEQ ID NO:129)包括可能在翻译后被修饰的残基。为了避免翻译后修饰(PTM)风险并因此简化制造,本披露设计并测试了VH CDR2的某些去风险版本,包括SEQ ID NO:128,以及VH CDR3的去风险版本,包括SEQ ID NO:130和131。

[0115] 因此,在一些实施例中,提供了具有CDR序列的抗体和片段,其中VH CDR1包括SEQ ID NO:126的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:127或128的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:129、130或131的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:132的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:133的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:134的氨基酸序列。

[0116] 在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:118的VH和SEQ ID NO:119的VL。在一些实施例中,还提供了与AHP05564结合B7-H3上相同表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中,还提供了与AHP05564竞争结合B7-H3的抗体及其抗原结合片段。

[0117] 在一些实施例中,关于抗体AHP06331,VH CDR1包括SEQ ID NO:135的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:136的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:138的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:139的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:140的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:141的氨基酸序列。

[0118] 序列分析揭示,VH CDR2(SEQ ID NO:136)包括可能在翻译后被修饰的残基。为了

避免翻译后修饰(PTM)风险并因此简化制造,本披露设计并测试了VH CDR2的某些去风险版本,包括SEQ ID NO:137。

[0119] 因此,在一些实施例中,提供了具有CDR序列的抗体和片段,其中VH CDR1包括SEQ ID NO:135的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:136或137的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:138的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:139的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:140的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:141的氨基酸序列。

[0120] 在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:120的VH和SEQ ID NO:121的VL。在一些实施例中,还提供了与AHP06331结合B7-H3上相同表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中,还提供了与AHP06331竞争结合B7-H3的抗体及其抗原结合片段。

[0121] 在一些实施例中,关于抗体AHP06345,VH CDR1包括SEQ ID NO:142的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:143的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:144的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:145的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:146的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:147的氨基酸序列。

[0122] 序列分析揭示,VL CDR3(SEQ ID NO:147)包括可能在翻译后被修饰的残基。为了避免翻译后修饰(PTM)风险并因此简化制造,本披露设计并测试了VL CDR3的某些去风险版本,包括SEQ ID NO:148。

[0123] 因此,在一些实施例中,提供了具有CDR序列的抗体和片段,其中VH CDR1包括SEQ ID NO:142的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:143的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:144的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:145的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:146的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:147或148的氨基酸序列。

[0124] 在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:122的VH和SEQ ID NO:123的VL。在一些实施例中,还提供了与AHP06345结合B7-H3上相同表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中,还提供了与AHP06345竞争结合B7-H3的抗体及其抗原结合片段。

[0125] 在一些实施例中,关于抗体AHP06358,VH CDR1包括SEQ ID NO:149的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:150的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:153的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:155的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:156的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:157的氨基酸序列。

[0126] 序列分析揭示,VH CDR2(SEQ ID NO:150)、VH CDR3(SEQ ID NO:153)和VL CDR3(SEQ ID NO:157)包括可能在翻译后被修饰的残基。为了避免翻译后修饰(PTM)风险并因此简化制造,本披露设计并测试了VH CDR2的某些去风险版本,包括SEQ ID NO:151和152,VH CDR3的去风险版本,包括SEQ ID NO:154,以及VL CDR3的去风险版本,包括SEQ ID NO:158。

[0127] 因此,在一些实施例中,提供了具有CDR序列的抗体和片段,其中VH CDR1包括SEQ ID NO:149的氨基酸序列,VH CDR2包括SEQ ID NO:150、151或152的氨基酸序列,VH CDR3包括SEQ ID NO:153或154的氨基酸序列,VL CDR1包括SEQ ID NO:155的氨基酸序列,VL CDR2包括SEQ ID NO:156的氨基酸序列,以及VL CDR3包括SEQ ID NO:157或158的氨基酸序列。

[0128] 在一个实施例中,抗体或其片段包括SEQ ID NO:124的VH和SEQ ID NO:125的VL。在一些实施例中,还提供了与AHP06358结合B7-H3上相同表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中,还提供了与AHP06358竞争结合B7-H3的抗体及其抗原结合片段。

[0129] 在一些实施例中,还提供了抗体和抗原结合片段,其包括衍生自本披露的CDR序列

的CDR序列,具有一个、两个或三个氨基酸取代、缺失和/或添加。

[0130] 在一些实施例中,抗B7-H3抗体是修饰的mAb,其包含修饰的重链恒定区,例如去岩藻糖基化重链,与未修饰的mAb相比,其以更高的亲和力结合激活Fcγ受体,该激活Fcγ受体介导增强的ADCC。在一些实施例中,抗B7-H3抗体包含人IgG1变体的重链,其包括增强ADCC功能的L234Y、L235Q、G236W、S239D/M、F243L、H268D、D270E、R292P、S298A、Y300L、V305I、K326D、A330L/M、I332E、K334A/E、P396L中的单个或组合(均为EU编号)。

[0131] 抗体-药物缀合物

[0132] 体外和体内数据显示,衍生自新型抗体的抗体-药物缀合物(ADC)比基准抗体MGA017具有更高的抗肿瘤活性,使其适用于ADC。

[0133] 在一些实施例中,抗体或片段可以与治疗剂、前药、肽、蛋白质、酶、病毒、脂质、生物反应调节剂、药物试剂或PEG缀合。

[0134] 在一个实施例中,本披露的抗体或片段共价附接到药物部分。药物部分可以是或被修饰以包括与抗体上的缀合点反应的基团。例如,药物部分可以通过烷基化(例如,在抗体的ε-氨基赖氨酸或N-末端)、氧化碳水化合物的还原胺化、羟基和羧基之间的酯交换、氨基或羧基的酰胺化以及与硫醇缀合来附接。

[0135] 在一些实施例中,每个抗体分子缀合的药物部分数p平均为1至8;1至7、1至6、1至5、1至4、1至3或1至2。在一些实施例中,p平均为2至8、2至7、2至6、2至5、2至4或2至3。在其他实施例中,p平均为1、2、3、4、5、6、7或8。在一些实施例中,p平均为约1至约20、约1至约10、约2至约10、约2至约9、约1至约8、约1至约7、约1至约6、约1至约5、约1至约4、约1至约3或约1至约2。在一些实施例中,p为约2至约8、约2至约7、约2至约6、约2至约5、约2至约4或约2至约3。

[0136] 例如,当蛋白质的化学激活导致游离硫醇基团形成时,蛋白质可以与巯氢基反应剂缀合。在一方面,该试剂对游离硫醇基团具有实质特异性。这样的试剂包括,例如,马来酰亚胺、卤代乙酰胺(例如,碘、溴或氯)、卤代酯(例如,碘、溴或氯)、卤代甲基酮(例如,碘、溴或氯)、苄基卤化物(例如,碘化物、溴化物或氯化物)、乙烯基砜和吡啶硫。

[0137] 药物可以通过接头与抗体或片段连接。合适的接头包括,例如,可裂解和不可裂解的接头。可裂解的接头通常在细胞内条件下易于裂解。合适的可裂解接头包括,例如,可被细胞内蛋白酶裂解的肽接头,例如被溶酶体蛋白酶或内体蛋白酶裂解。在示例性实施例中,接头可以是二肽接头,例如缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)、苯丙氨酸-赖氨酸(phe-lys)接头或马来酰亚胺己酸-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基(mc-Val-Cit-PABA)接头。另一种接头是磺基琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸酯(smcc)。磺基-smcc缀合通过与巯氢基(硫醇,-SH)反应的马来酰亚胺基团发生,而其磺基-NHS酯对伯胺有反应性(如赖氨酸和蛋白质或肽N-末端中出现的)。又另一种接头是马来酰亚胺基己酰基(mc)。其他合适的接头包括可在特定pH或pH范围内水解的接头,例如腙接头。其他合适的可裂解接头包括二硫化物接头。接头可以与抗体共价结合到这样的程度,使得抗体必须在细胞内降解才能释放药物,例如mc接头等。

[0138] 接头可以包括用于连接到抗体的基团。例如,接头可以包括氨基、羟基、羧基或巯氢基反应性基团(例如,马来酰亚胺、卤代乙酰胺(例如,碘、溴或氯)、卤代酯(例如,碘、溴或氯)、卤代甲基酮(例如,碘、溴或氯)、苄基卤化物(例如,碘化物、溴化物或氯化物)、乙烯基砜和吡啶硫)。

[0139] 在一些实施例中,药物部分是细胞毒性或细胞抑制剂、免疫抑制剂、放射性同位素、毒素等。缀合物可用于抑制肿瘤细胞或癌细胞的增殖,引起肿瘤或癌细胞凋亡,或用于治疗患者的癌症。因此,缀合物可用于各种治疗动物癌症的场景。缀合物可用于将药物递送到肿瘤细胞或癌细胞。在不受理论束缚的情况下,在一些实施例中,缀合物与表达GPC3的癌细胞结合或缔合,并且缀合物和/或药物可以通过受体介导的内吞作用被摄取在肿瘤细胞或癌细胞内。

[0140] 一旦进入细胞,缀合物内的一个或多个特异性肽序列(例如,在接头中)被一种或多种肿瘤细胞或癌细胞相关蛋白酶水解切割,导致药物释放。然后,释放的药物在细胞内自由迁移,并诱导细胞毒性或细胞抑制或其他活性。在一些实施例中,药物在肿瘤细胞或癌细胞外从抗体切割,并且药物随后穿透细胞,或作用于细胞表面。

[0141] 药物部分或有效载荷的实例选自由以下组成的组:DM1(美登素,N2'-脱乙酰基-N2'-(3-巯基-1-氧代丙基)-或N2'-脱乙酰基-N2'-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素)、mc-MMAD(6-马来酰亚胺己酰基-单甲基澳瑞他汀-D或N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(1S,2R)-2-甲氧基-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[[(1S)-2-苯基-1-(2-噻唑基)乙基]氨基]丙基]-1-吡咯烷基]-1-[(1S)-1-甲基丙基]-4-氧代丁基]-N-甲基-(9Cl)-L-缬氨酰胺)、mc-MMAF(马来酰亚胺己酰基-单甲基澳瑞他汀F或N-[6-(2,5-二氢-2,5-二氧代-1H-吡咯-1-基)-1-氧代己基]-N-甲基-L-缬氨酰基-L-缬氨酰基-(3R,4S,5S)-3-甲氧基-5-甲基-4-(甲氨基)庚酰基-(αR,βR,2S)-β-甲氧基-α-甲基-2-吡咯烷丙酰基-L-苯丙氨酸)以及mc-Val-Cit-PABA-MMAE(6-马来酰亚胺己酰基-ValcCit-(对氨基苄氧基羰基)-单甲基澳瑞他汀E或N-[[[4-[[N-[6-(2,5-二氢-2,5-二氧代-1H-吡咯-1-基)-1-氧代己基]-L-缬氨酰基-N5-(氨基羰基)-L-鸟氨酰基]氨基]苯基]甲氧基]羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[(1R,2S)-2-羟基-1-甲基-2-苯乙基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]-1-吡咯烷基]-2-甲氧基-1-[(1S)-1-甲基丙基]-4-氧代丁基]-N-甲基-L-缬氨酰胺)。DM1是微管蛋白抑制剂美登素的衍生物,而MMAD、MMAE和MMAF是澳瑞他汀衍生物。在一些实施例中,药物部分选自由mc-MMAF和mc-Val-Cit-PABA-MMAE组成的组。在一些实施例中,药物部分是美登木素或澳瑞他汀。

[0142] 抗体或片段可以与治疗剂缀合或融合,治疗剂可以包括可检测的标记(诸如放射性标记)、免疫调节剂、激素、酶、寡核苷酸、光活性治疗剂或诊断剂、细胞毒性剂(其可以是药物或毒素)、超声增强剂、非放射性标记、其组合以及本领域已知的其他这样的试剂。

[0143] 抗体可以通过将其与化学发光化合物偶联被可检测地标记。然后通过检测化学反应过程中产生的发光的存在来确定化学发光标记的抗原结合多肽的存在。特别有用的化学发光标记化合物的实例是鲁米诺、异鲁米诺、热敏吖啶酯(theromatic acridinium ester)、咪唑、吖啶盐和草酸酯。

[0144] 抗体也可以使用荧光发射金属如^{152}Eu或其他镧系元素金属被可检测地标记。这些金属可以使用二乙烯三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)等金属螯合基团附接到抗体上。将各种部分与抗体缀合的技术是众所周知的,参见例如,Arnon等人,"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy[用于癌症治疗中药物免疫靶向的单克隆抗体]",于Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy[单克隆抗体和癌症治疗],Reisfeld等人(编辑),第243-56页(Alan R.里斯公司(Liss,Inc.)(1985);

Hellstrom等人,“Antibodies For Drug Delivery[用于药物递送的抗体]”,于Controlled Drug Delivery[受控药物递送](第2版),Robinson等人,(编辑),马塞尔·德克尔公司(Marcel Dekker,Inc.),第623-53页(1987);Thorpe,“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:AReview[癌症治疗中细胞毒性剂的抗体载体:综述]”,于Monoclonal Antibodies'84:Biological And Clinical Applications[单克隆抗体'84:生物学和临床应用],Pinchera等人(编辑),第475-506页(1985);“Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy[癌症治疗中放射性标记抗体的治疗用途的分析、结果和未来前景]”,于Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy[用于癌症检测和治疗的单克隆抗体],Baldwin等人(编辑),学术出版社第303-16页(1985),以及Thorpe等人,“The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates[抗体-毒素缀合物的制备和细胞毒性特性]”,Immunol.Rev.[免疫学评论](52:119-58(1982))。

[0145] 多功能分子

[0146] 多功能分子,其包括对B7-H3具有特异性的抗体或抗原结合片段,例如本文披露的那些,以及一种或多种对第二抗原具有特异性的抗体或抗原结合片段。

[0147] 在一些实施例中,第二抗原是在免疫细胞上表达的蛋白质,例如T细胞、B细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞、吞噬细胞、自然杀伤细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞。

[0148] 在一些实施例中,第二抗原是CD3、CD47、PD1、PD-L1、LAG3、TIM3、CTLA4、VISTA、CSFR1、A2AR、CD73、CD39、CD40、CEA、HER2、CMET、4-1BB、OX40、SIRPA、CD16、CD28、ICOS、CTLA4、BTLA、TIGIT、HVEM、CD27、VEGFR或VEGF。

[0149] 还提供了不同形式的双特异性抗体。在一些实施例中,抗B7-H3片段和第二片段中的每一种各自独立地选自Fab片段、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体。在一些实施例中,双特异性抗体还包括Fc片段。

[0150] 还提供了不仅包括抗体或抗原结合片段的双功能分子。作为肿瘤抗原靶向分子,特异于B7-H3的抗体或抗原结合片段(如本文所述的那些)可以任选地通过肽接头与免疫细胞因子或配体组合。连接的免疫细胞因子或配体包括但不限于IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、GM-CSF、TNF-α、CD40L、OX40L、CD27L、CD30L、4-1BBL、LIGHT和GITRL。这些双功能分子可以将免疫检查点阻断作用与肿瘤部位局部免疫调节相结合。

[0151] 嵌合抗原受体

[0152] 在一个实施例中,还提供了嵌合抗原受体(CAR),其包括本披露的抗体或其片段作为靶向单元。在一些实施例中,CAR包括本披露的抗体或其片段、跨膜结构域、共刺激结构域和CD3ξ细胞内结构域。

[0153] 跨膜结构域可以被设计为与包括抗体或片段的细胞外结构域融合,任选地通过铰链结构域。它同样可以与细胞内结构域融合,例如共刺激结构域。在一些实施例中,跨膜结构域可以包括共刺激结构域的天然跨膜区(例如,作为共刺激结构域的CD28T或4-1BB的TM区)或铰链区的天然跨膜结构域(例如,作为铰链结构域的CD8α或CD28T的TM区)。

[0154] 在一些实施例中,跨膜结构域可以包括跨越细胞膜但延伸到细胞的细胞质和/或

细胞外空间的序列。例如,跨膜可以包括跨膜序列,其本身还可以包括延伸到细胞细胞质和/或细胞外空间的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸。因此,跨膜结构域包括跨膜区,但可以进一步包含延伸到膜本身的内表面或外表面之外的一个或多个氨基酸;这样的序列仍然可以被认为是“跨膜结构域”。

[0155] 在一些实施例中,跨膜结构域通过短接头与细胞质结构域融合。任选地,长度优选在2至10个氨基酸之间的短肽或多肽接头可以在嵌合受体的跨膜结构域和近端细胞质信号传导结构域之间形成连接。甘氨酸-丝氨酸双联体(GS)、甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸三联体(GSG)或丙氨酸-丙氨酸-丙氨酸三联体(AAA)提供了合适的接头。

[0156] 在一些实施例中,CAR还包括共刺激结构域。在一些实施例中,共刺激结构域位于跨膜结构域和激活结构域之间。示例共刺激结构域包括但不限于CD2、CD3δ、CD3ε、CD3γ、CD4、CD7、CD8a、CD8、CD11a(ITGAL)、CD11b(ITGAM)、CD11c(ITGAX)、CD11d(ITGAD)、CD18(ITGB2)、CD19(B4)、CD27(T FRSF7)、CD28、CD28T、CD29(ITGB1)、CD30(TNFRSF8)、CD40(TNFRSF5)、CD48(SLAMF2)、CD49a(ITGA1)、CD49d(ITGA4)、CD49f(ITGA6)、CD66a(CEACAM1)、CD66b(CEACAM8)、CD66c(CEACAM6)、CD66d(CEACAM3)、CD66e(CEACAM5)、CD69(CLEC2)、CD79A(B细胞抗原受体复合物相关α链)、CD79B(B细胞抗原受体复合物相关β链)、CD84(SLAMF5)、CD96(触觉)、CD 100(SEMA4D)、CD 103(ITGAE)、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD150(SLAMF1)、CD158A(KIR2DL1)、CD158B1(KIR2DL2)、CD158B2(KIR2DL3)、CD158C(KIR3DP1)、CD158D(KIRDL4)、CD158F1(KIR2DL5A)、CD158F2(KIR2DL5B)、CD158K(KTR3DL2)、CD160(BY55)、CD162(SELPLG)、CD226(DNAM1)、CD229(SLAMF3)、CD244(SLAMF4)、CD247(CD3-ζ)、CD258(LIGHT)、CD268(BAFFR)、CD270(T FSF14)、CD272(BTLA)、CD276(B7-H3)、CD279(PD-1)、CD314(KG2D)、CD319(SLAMF7)、CD335(K-p46)、CD336(K-p44)、CD337(K-p30)、CD352(SLAMF6)、CD353(SLAMF8)、CD355(CRTAM)、CD357(TNFRSF 18)、诱导型T细胞共刺激物(ICOS)、LFA-1(CD 11a/CD 18)、KG2C、DAP-10、ICAM-1、Kp80(KLRF1)、IL-2Rβ、IL-2Rγ、IL-7Rα、LFA-1、SLAMF9、LAT、GADS(GrpL)、SLP-76(LCP2)、PAG1/CBP、CD83配体、Fcγ受体、MHC 1类分子、MHC 2类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白、细胞因子受体、整合素、激活NK细胞受体、Toll配体受体及其片段或组合。

[0157] 在一些实施例中,CAR的细胞质部分还包括信号传导/激活结构域。在一个实施例中,信号传导/激活结构域是CD3ξ结构域,或者其氨基酸序列与CD3ξ结构域具有至少约80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性。

[0158] 多核苷酸、mRNA和表达或制备抗体的方法

[0159] 本披露还提供了编码本披露的抗体、其变体或衍生物或CAR的多核苷酸或核酸分子。本披露的多核苷酸可以在同一多核苷酸分子上或在单独的多核苷酸分子上编码抗原结合多肽、其变体或衍生物的整个重链和轻链可变区。此外,本披露的多核苷酸可以在同一多核苷酸分子上或在单独的多核苷酸分子上编码抗原结合多肽、其变体或衍生物的重链和轻链可变区的部分。

[0160] 在一些实施例中,多核苷酸是mRNA分子。在一些实施例中,可以将mRNA引入靶细胞以表达抗体或其片段。

[0161] mRNA可以根据各种已知方法中的任一种合成。例如,mRNA可以通过体外转录(IVT)合成。简而言之,IVT通常使用含有启动子的线性或环状DNA模板、核糖核苷酸三磷酸池、可

能包括DTT和镁离子的缓冲系统以及适当的RNA聚合酶(例如T3、T7或SP6 RNA聚合酶)、DNA酶I、焦磷酸酶和/或RNA酶抑制剂进行。确切的条件将根据具体应用而变化。

[0162] 在一些实施例中,为了制备编码抗体的mRNA,在体外转录DNA模板。合适的DNA模板通常具有用于体外转录的启动子,例如T3、T7或SP6启动子,随后是编码所需抗体(例如,编码重链或轻链)mRNA的所需核苷酸序列和终止信号。

[0163] 可以使用标准方法确定编码所需抗体(例如,编码重链或轻链)mRNA序列并将其掺入DNA模板中。例如,从所需氨基酸序列(例如,所需重链或轻链序列)开始,基于简并遗传密码进行虚拟反向翻译。然后,可以使用优化算法来选择合适的密码子。通常,一方面可以优化G/C含量以实现尽可能高的G/C含量,另一方面根据密码子使用尽可能地考虑到tRNA频率。例如,可以借助适当的显示设备建立和显示优化的RNA序列,并将其与原始(野生型)序列进行比较。还可以分析二级结构以计算RNA的稳定和去稳定特性或相应区域。

[0164] mRNA可以合成为未修饰或修饰的mRNA。通常,mRNA被修饰以增强稳定性。mRNA的修饰可以包括例如RNA核苷酸的修饰。因此,修饰的mRNA可以包括例如骨架修饰、糖修饰或碱基修饰。在一些实施例中,编码抗体的mRNA(例如,编码重链和轻链的mRNA)可以由天然存在的核苷酸和/或核苷酸类似物(修饰的核苷酸)合成,包括但不限于嘌呤(腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G))或嘧啶(胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)、尿嘧啶(U)),以及嘌呤和嘧啶的修饰核苷酸类似物或衍生物,例如1-甲基-腺嘌呤、2-甲基-腺嘌呤、2-甲硫基-N-6-异戊烯基-腺嘌呤、N6-甲基-腺嘌呤、N6-异戊烯基-腺嘌呤、2-硫代-胞嘧啶、3-甲基-胞嘧啶、4-乙酰基-胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、1-甲基-鸟嘌呤、2-甲基-鸟嘌呤、2,2-二甲基-鸟嘌呤、7-甲基-鸟嘌呤、肌苷、1-甲基-肌苷、假尿嘧啶(5-尿嘧啶)、二氢-尿嘧啶、2-硫代-尿嘧啶、4-硫代-尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代-尿嘧啶、5-(羧基羟甲基)-尿嘧啶、5-氟-尿嘧啶、5-溴-尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-尿嘧啶、5-甲基-2-硫代-尿嘧啶、5-甲基-尿嘧啶,N-尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、5-甲氨基甲基-尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫代-尿嘧啶、5'-甲氧基羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基-尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、1-甲基-假尿嘧啶、辫苷(queosine)、13-D-甘露糖基-辫苷、怀丁氧苷和磷酸酰胺、硫代磷酸酯、肽核苷酸、甲基膦酸酯、7-脱氮鸟苷、5-甲基胞嘧啶和肌苷。本领域技术人员已知这样的类似物的制备,例如来自美国专利号4,373,071、4,401,796、4,415,732、4,458,066、4,500,707、4,668,777、4,973,679、5,047,524、5,132,418、5,153,319、5,262,530和5,700,642,其披露内容在此通过引用包含在其全部范围内。

[0165] 在一些实施例中,mRNA(例如,编码重链和轻链的mRNA)可能含有RNA骨架修饰。通常,骨架修饰是其中RNA中包含的核苷酸骨架的磷酸酯被化学修饰的修饰。示例性骨架修饰通常包括但不限于来自由甲基膦酸酯、甲基氨基磷酸酯、氨基磷酸酯、硫代磷酸酯(例如胞苷5'-O-(1-硫代磷酸酯))、硼磷酸酯、带正电荷的胍基团等组成的组的修饰,这意味着用其他阴离子、阳离子或中性基团取代磷酸二酯键。

[0166] 在一些实施例中,mRNA(例如,编码重链和轻链的mRNA)可能含有糖修饰。典型的糖修饰是对其所含核苷酸的糖进行的化学修饰,包括但不限于选自由以下组成的组的糖修饰:2'-脱氧-2'-氟-寡核苷酸(2'-氟-2'-脱氧胞苷5'-三磷酸、2'-氟-2'-脱氧尿苷5'-三磷酸)、2'-脱氧-2'-脱胺-寡核苷酸(2'-氨基-2'-脱氧胞苷5'-三磷酸、2'-氨基-2'-脱氧尿苷5'-三磷酸)、2'-O-烷基寡核糖核苷酸、2'-脱氧-2'-C-烷基寡核糖核苷酸(2'-O-甲基胞苷

5'-三磷酸、2'-甲基尿苷5'-三磷酸)、2'-C-烷基寡核糖核苷酸及其异构体(2'-阿糖胞苷5'-三磷酸、2'-阿糖尿苷5'-三磷酸)或叠氮三磷酸(2'-叠氮基-2'-脱氧胞苷5'-三磷酸、2'-叠氮基-2'-脱氧尿苷5'三磷酸)。

[0167] 在一些实施例中,mRNA(例如,编码重链和轻链的mRNA)可以含有核苷酸碱基的修饰(碱基修饰)。含有碱基修饰的修饰核苷酸也称为碱基修饰的核苷酸。这种碱基修饰的核苷酸的实例包括但不限于2-氨基-6-氯嘌呤核苷5'-三磷酸、2-氨基腺苷5'-三磷酸、2-硫胞苷5'-三磷酸、2-硫尿苷5'-三磷酸、4-硫尿苷5'-三磷酸、5-氨基烯丙基胞苷5'-三磷酸、5-氨基烯丙基尿苷5'-三磷酸、5-溴胞苷5'-三磷酸、5-溴尿苷5'-三磷酸、5-碘胞苷5'-三磷酸、5-碘尿苷5'-三磷酸、5-甲基胞苷5'-三磷酸、5-甲基尿苷5'-三磷酸、6-氮杂胞苷5'-三磷酸、6-氮杂尿苷5'-三磷酸、6-氯嘌呤核苷5'-三磷酸、7-脱氮杂腺苷5'-三磷酸、7-脱氮杂鸟苷5'-三磷酸、8-氮杂腺苷5'-三磷酸、8-叠氮腺苷5'-三磷酸、苯并咪唑核苷5'-三磷酸、N1-甲基腺苷5'-三磷酸、N1-甲基鸟苷5'-三磷酸、N6-甲基腺苷5'-三磷酸、O6-甲基鸟苷5'-三磷酸、假尿苷5'-三磷酸、嘌呤霉素5'-三磷酸或黄苷5'-三磷酸。

[0168] 通常,mRNA合成包括在N端(5')添加"帽",在C端(3')添加"尾"。帽的存在对于提供对大多数真核细胞中发现的核酸酶的抗性是重要的。"尾"的存在有助于保护mRNA免受核酸外切酶降解。

[0169] 因此,在一些实施例中,mRNA(例如,编码重链和轻链的mRNA)包括5'帽结构。5'帽通常如下添加:首先,RNA末端磷酸酶从5'核苷酸中去除一个末端磷酸基团,留下两个末端磷酸;然后通过鸟苷基转移酶将鸟苷三磷酸(GTP)添加到末端磷酸,产生5'5'5三磷酸连接;然后鸟嘌呤的7-氮被甲基转移酶甲基化。帽结构的实例包括但不限于m7G(5')ppp(5'(A,G(5')ppp(5)A和G(5)ppp(5')G。

[0170] 在一些实施例中,mRNA(例如,编码重链和轻链的mRNA)包括3'聚(A)尾结构。mRNA3'末端的聚A尾通常包括约10至300个腺苷核苷酸(例如,约10至200个腺苷核苷酸、约10至175个腺苷核苷酸、约10至150个腺苷核苷酸、约10至125个腺苷核苷酸、10至100个腺苷核苷酸、约10至75个腺苷核苷酸、约20至70个腺苷核苷酸、或约20至60个腺苷核苷酸)。在一些实施例中,编码抗体的mRNA(例如,编码重链和轻链的mRNA)包括3'聚(C)尾结构。mRNA3'末端的合适的聚C尾通常包括约10至200个胞嘧啶核苷酸(例如,约10至150个胞嘧啶核苷酸、约10至100个胞嘧啶核苷酸、约20至70个胞嘧啶核苷酸、约20至60个胞嘧啶核苷酸或约10至40个胞嘧啶核苷酸)。聚C尾可以添加到聚A尾或可以替代聚A尾。

[0171] 在一些实施例中,mRNA(例如,编码重链和轻链的mRNA)包括5'和/或3'非翻译区。在一些实施例中,5'非翻译区包括一个或多个影响mRNA稳定性或翻译的元件,例如铁反应元件。在一些实施例中,5'非翻译区的长度可以在约50至500个核苷酸之间(例如,长度约50至400个核苷酸、长度约50至300个核苷酸、长度约50至200个核苷酸、或长度约50至100个核苷酸)。

[0172] 在一些实施例中,mRNA(例如,编码重链和轻链的mRNA)的5'区包括编码信号肽的序列,如本文所述的那些。在特定实施例中,将衍生自人生长激素(hGH)的信号肽掺入5'区。通常,信号肽编码序列在N末端直接或间接地连接到重链或轻链编码序列。

[0173] 本技术可用于递送本领域已知的任何抗体以及可以使用标准方法针对所需抗原产生的抗体。本发明可用于递送单克隆抗体、多克隆抗体、抗体混合物或鸡尾酒、人或人源

化抗体、嵌合抗体或双特异性抗体。

[0174] 制备抗体的方法在本领域中是众所周知的,并在本文中进行了描述。在某些实施例中,本披露的抗原结合多肽的可变区和恒定区都是完全人的。可以使用本领域所述和本文所述的技术制备完全人抗体。例如,可以通过将抗原施用于转基因动物来制备针对特定抗原的完全人抗体,该转基因动物已被修饰以响应于抗原攻击产生这样的抗体,但其内源性基因座已被禁用。美国专利6,150,584、6,458,592、6,420,140中描述了可用于制备这样的抗体的示例性技术,其全部内容通过引用并入。

[0175] 治疗和用途

[0176] 如本文所述,本披露的抗体、变体、抗体-药物缀合物、嵌合抗原受体(CAR)和CAR细胞、编码多核苷酸或衍生物可用于某些治疗和诊断方法。

[0177] 本披露进一步涉及基于抗体的疗法,其涉及向患者如动物、哺乳动物和人类施用本披露的抗体或片段、抗体-药物缀合物、嵌合抗原受体(CAR)和CAR细胞、编码多核苷酸或衍生物,以治疗本文所述的一种或多种障碍或病症。本披露的治疗分子或细胞包括但不限于本披露的抗体(包括本文所述的其变体和衍生物)、抗体-药物缀合物、嵌合抗原受体(CAR)和CAR细胞、以及编码本披露的抗体(包括本文所述的其变体和衍生物)的核酸或多核苷酸。

[0178] 本披露的分子或细胞也可用于治疗或抑制癌症。如上所述,B7-H3可在肿瘤细胞中过表达,特别是肝、胃、胰腺、食管、卵巢和肺肿瘤。抑制B7-H3已被证明可用于治疗肿瘤。

[0179] 因此,在一些实施例中,提供了用于治疗有需要的患者的癌症的方法。在一个实施例中,该方法需要向患者施用有效量的本披露的分子或细胞。在一些实施例中,患者中的至少一种癌细胞(例如,基质细胞)过表达B7-H3。

[0180] 本披露还提供了细胞疗法,例如嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法。可以使用合适的细胞,其用编码CAR的载体转导或与CAR接触,该CAR包含本披露的抗B7-H3抗体(或可替代地被工程化以表达本披露的抗B7-H3抗体)。在这种接触或工程化后,然后可以将细胞引入需要治疗的癌症患者。癌症患者可能患有本文披露的任何类型的癌症。细胞(例如T细胞)可以是例如肿瘤浸润性T淋巴细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞或其组合,但不限于此。

[0181] 在一些实施例中,从癌症患者自身分离细胞。在一些实施例中,细胞由供体或细胞库提供。当细胞从癌症患者中分离时,不期望的免疫反应可以被最小化。

[0182] 癌症的非限制性实例包括膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、头颈癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、胰腺癌、前列腺癌和甲状腺癌。在一些实施例中,癌症是胃癌、胰腺癌、食管癌、卵巢癌和肺癌中的一种或多种。

[0183] 可以用本披露的抗体或其变体或衍生物治疗、预防、诊断和/或预后的与细胞存活增加相关的其他疾病或病症包括但不限于恶性肿瘤和相关障碍的进展和/或转移,例如白血病(包括急性白血病(例如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病(包括成髓细胞、早幼粒细胞、髓单核细胞、单核细胞和红白血病))和慢性白血病(例如慢性髓细胞(粒细胞)白血病和慢性淋巴细胞白血病))、真性红细胞增多症、淋巴瘤(例如霍奇金病和非霍奇金病)、多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症、重链病和实体瘤,包括但不限于肉瘤和癌,例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵

巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、肾母细胞瘤、宫颈癌、睾丸瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质瘤、血管瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤。任何特定患者的具体剂量和治疗方案将取决于各种因素,包括所使用的特定抗体、其变体或衍生物、患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食、以及施用时间、排泄率、药物组合和所治疗特定疾病的严重程度。医疗护理人员对这样的因素的判断在本领域技术人员的范围内。该量还将取决于要治疗的个体患者、施用途径、配制品类型、所用化合物的特性、疾病的严重程度和所需的效果。所用的量可以通过本领域熟知的药理学和药代动力学原理来确定。

[0184] 施用抗体或片段的方法包括但不限于皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。抗原结合多肽或组合物可以通过任何方便的途径进行施用,例如通过输注或推注注射,通过上皮或粘膜皮肤内衬(例如,口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,并且可以与其他生物活性剂一起施用。因此,含有本披露的抗原结合多肽的药物组合物可以经口、直肠、肠胃外、脑池内、阴道内、腹膜内、局部(如通过粉剂、软膏、滴剂或透皮贴剂)、颊或者作为口或鼻喷雾剂进行施用。

[0185] 如本文所用,术语“肠胃外”是指包括静脉内、肌内、腹膜内、胸骨内、皮下以及关节内注射和输注在内的施用模式。

[0186] 施用可以是全身的或局部的。另外,可取的是通过任何合适的途径将本披露的抗体引入到中枢神经系统,途径包括脑室内注射和鞘内注射;脑室内注射可以通过例如附接至储器(如Ommaya储器)的脑室内导管来促进。也可以采用肺部施用,例如,通过使用吸入器或喷雾器,以及含有雾化剂的配制品。

[0187] 可取的是,将本披露的抗原结合多肽或组合物局部施用至需要治疗的区域;这可以通过例如但不限于以下方式来实现:手术期间的局部输注、局部应用(例如,与手术后的创伤敷料相联合)、通过注射、借助导管、借助栓剂或借助植入物,所述植入物是多孔、无孔或胶质材料,包括膜,诸如硅橡胶弹性膜(sialastic membrane)或纤维。优选地,当施用本披露的蛋白质(包括抗体)时,必须注意使用蛋白质不吸收的材料。

[0188] 可以通过标准临床技术确定有效治疗、抑制和预防炎性、免疫或恶性疾病、障碍或病症的本披露的抗体或片段的量。此外,可以任选地采用体外测定来帮助确定最佳剂量范围。配制品中将要使用的精确剂量还将取决于施用途径以及疾病、病症或病况的严重性,并且应根据医师的判断和每个患者的情况来决定。有效剂量可以从源自体外或动物模型试验系统的剂量-反应曲线中推断出来。

[0189] 作为一般的建议,向患者施用的本披露的抗体或片段的剂量通常是0.001mg/kg至100mg/kg患者体重,在0.01mg/kg与20mg/kg患者体重之间,或者在0.5mg/kg与10mg/kg患者体重之间。一般而言,由于对外源多肽的免疫反应,人抗体在人体内的半衰期比来自其他物种的抗体的半衰期更长。因此,通常可以降低人抗体的剂量和减少施用频率。此外,本披露的抗体的施用剂量和频率可以通过修饰(例如,脂化)增强抗体的摄取和组织渗透(例如,进入大脑)来减少。

[0190] 在另外的实施例中,将本披露的组合物与细胞因子组合施用。可与本披露的组合

物一起施用的细胞因子包括但不限于IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、抗CD40、CD40L和TNF-α。

[0191] 在另外的实施例中,将本披露的组合物与其他治疗或预防方案(例如放射疗法)组合施用。

[0192] 组合物

[0193] 本披露还提供了药物组合物。这样的组合物包含有效量的抗体或片段、抗体-药物缀合物、嵌合抗原受体(CAR)和CAR细胞、编码多核苷酸或衍生物以及可接受的载体。在一些实施例中,组合物还包括第二抗癌剂(例如,免疫检查点抑制剂)。

[0194] 在特定实施例中,术语“药学上可接受的”是指经联邦或州政府监管机构批准,或列在美国药典或其他公认的药典中,用于动物,更特别是人类。此外,“药学上可接受的载体”通常是无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料或任何类型的配制助剂。

[0195] 术语“载体”是指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。这种药物载体可以是无菌液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当药物组合物静脉内施用时,水是优选的载体。盐水溶液和右旋糖和甘油水溶液也可以用作液体载体,特别是用于注射溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐。还考虑了抗细菌剂,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;以及用于调节张力的试剂,例如氯化钠或右旋糖。这些组合物可以采取溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、缓释配制品等形式。组合物可以配制成栓剂,含有传统的粘合剂和载体,例如甘油三酯。口服配制品可以包括标准载体,例如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。E.W.Martin在Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药学]中描述了合适的药物载体的实例,其通过引用并入本文。这样的组合物将含有治疗有效量的抗原结合多肽,优选纯化形式,以及适量的载体,以便为患者提供用于适当施用的形式。配制品应适合施用模式。胃肠外制剂可以封装在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0196] 在实施例中,根据常规程序将组合物配制为适合静脉内施用给人的药物组合物。通常,用于静脉内施用的组合物是无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时,组合物还可包括增溶剂和局部麻醉剂,例如利多卡因,以缓解注射部位的疼痛。通常,成分单独或以单位剂型混合在一起提供,例如,作为干燥冻干粉或无水浓缩物,装在指示活性剂的量的密封容器(例如安瓿或小袋)中。当组合物通过输注施用时,可以用含有无菌药用级水或盐水的输液瓶分配。当组合物通过注射施用时,可以提供无菌注射用水或盐水的安瓿,以便在施用前混合成分。

[0197] 本披露的化合物可以配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括与阴离子形成的盐,例如衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的盐,以及与阳离子形成的盐,例如衍生自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的盐。

[0198] 实例

[0199] 实例1.小鼠抗人B7-H3抗体的产生和测试

[0200] 本实例描述了使用杂交瘤技术产生小鼠抗人B7-H3单克隆抗体。

[0201] 抗原:人B7-H3(4Ig)His标签蛋白。通过皮下注射(s.c.)和腹膜内注射(i.p.)进行蛋白质免疫。

[0202] 免疫:为了产生针对人B7-H3的单克隆抗体,用人B7-H3(4Ig)蛋白免疫Balb/c小鼠、C57BL/6小鼠、SJL小鼠和A/J小鼠。为了监测免疫反应,通过ELISA和流式细胞术筛选小鼠的滴定血清,如下所述。通过与人B7-H3蛋白和B7-H3过表达的CHO-K1细胞系以及不表达B7-H3的阴性对照CHO-K1细胞系结合的抗体筛选血清。在杂交瘤融合之前,选择具有足够ELISA滴度和阳性细胞系(B7-H3过表达的CHO-K1细胞)与阴性细胞系(仅表达载体的CHO-K1)的FACS结合比的动物,用B7-H3蛋白进行最终加强。

[0203] 细胞融合和杂交瘤筛选:如上所述,从最终加强的小鼠中分离脾脏。杂交瘤是通过基于电场的电融合与永生化小鼠骨髓瘤细胞的细胞融合而产生的。将融合细胞铺板在96平底微量滴定板中,用于选择杂交瘤。使用过表达B7-H3的CHO-K1和阴性对照细胞系,通过ELISA和FACS进行表位分仓筛选上清液。

[0204] 亚克隆和筛选:通过限制稀释对每种融合中具有不同表位的阳性原代克隆进行亚克隆,以确保亚克隆衍生自单个亲本细胞。以与原代克隆相同的方法筛选亚克隆,此外,为了确认抗体的结合效力,通过在A375细胞上进行FACS测试阳性克隆的培养上清液。

[0205] 选择杂交瘤克隆用于进一步分析。可变区的氨基酸序列如下表1A中提供。

[0206] 表1A.抗体可变区序列

[0207]

名称	序列（根据 Kabat 系统的 CDR 加下划线）	SEQ ID NO:
35A12B11 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT**SYWMH**WVKQRPGQGLEWIG**MIHPNSGTTNYNEKFKN**KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYFTR**NGNPRWCFDV**WGTGTTVTVSS	1
35A12B11 VL	ENVLTQSPAIMSASPGEKVTVTC**SASSSVSYMH**WYQQKSSTSPKLWIY**DTSKLAS**GVPGRFSGSGSGNSYSLTISSMEAEDVATYYC**FQGSGYPFT**FGSGTKLEIK	2
62H9H5 VH	QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFT**NYWIH**WVKQRPGQGLEWIG**YISPSTGYTEYNQKFKG**KATLTAVKSSSTAFMQLSSLTSEDSAVYFCAR**GTGY**WGQGTTLTVSS	3
62H9H5 VL	DIQMTQSPASLSASVGESVTITC**RASENIYSFFA**WYQQKEGKSPQLLVY**NAKTLEE**GVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYC**QHNYVSPFT**FGSGTKLEIK	4
72D1D11 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFT**NLGLN**WVKQAPGKGLKWMG**WINTAGGQPTYAEDFKG**RCAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCAR**DDGYYYTMDY**WGQGTSVTVSS	5
72D1D11 VL	DIVMTQTPLSLPVSLGDQASISC**RSSQSLVHSNGKTYLH**WYLQKPGQSPKLLIY**KVSNRFS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC**SQSTHVPWT**FGGGTKLEIK	6
81C8A1 VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLS**TSGMGVS**WIRQPPGKGLEWLA**HIYWDDDRRYNPSLKS**RLTISRDTSRNQVFLQITTVDTADTATYYCAR**SPYGSEAY**WGQGTLVIVSA	7
81C8A1 VL	MQIVLSQSPTILSAFPGEKVTMTC**RASSSVSFIQ**WYQQKSGSSPKPWIY**SPSNLAS**GVPTRFSGSGSGTSYSLTIGRVEAEDAATYYC**QQWSSYPWT**FGGGTKVEIK	8
97E6B2 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT**SYWIT**WVKQRPGQGLEWIG**DIYPGSNNTYYNEKFKS**KATLTVDTSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCAR**LIMSLFDY**SGQGTTLTVSS	9
97E6B2 VL	ENVLTQSPANMSASPGEKVTMTC**SVSSSVSYIH**WYQQKSSTSPTLWIY**DTSKLAS**GVPGRFSGSGSGNSYALTISSMEAEDVATYYC**FQGSAYPLT**FGAGTKLELK	10
106A5B3 VH	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFS**SYGMS**WVRQTPDKRLEWVA**TISSGGSYIYYPDSMKG**RFTISRDNAKNTLYLQMSSLQSEDTAIYYCAS**DYGSRYFDY**WGQGTTLTVSS	11
106A5B3 VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTC**SASSSVIYMS**WYKQKPGSSPRLLIY**DTSNLAS**GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYC**QQWSSYPRT**FGGGTKLEIK	12
126C10B10 VH	GVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIK**DPYIH**WVKQRPEQGLEWIG**RIDPANGNTKYGPRFQG**RATMTADTSSNTANLQLSSLTSEDTAVYYCTT**WNYYLSRGFDY**WGQGTTLTVSS	13
126C10B10 VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTC**SARSSVTYMH**WYQQKSGTSPKRWIY**DTSKLAS**GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC**QQWTSNPLT**FGAGTKLELK	14
216E7A9 VH	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFS**SFGMH**WVRQAPEKGLEWVA**YISSGSSTIYYADTVRG**RFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCAR**GGDYYYALDY**WGQGTSVTVSS	15

[0208]

216E7A9 VL	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITC**RASENIHSNLE**WYQQKQGKSPQ LLVYA**ATNLAD**GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYC**QH FWGTPFT**FGSGTKLEIK	16
227E12D1 VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFS**SYGMS**WVRQTPEKR LEWVA**TISGGGTYTYYPDSVKG**RFTISRDNAKNNLYLQMSSLRS DDTALYYCAR**HEGLVMDY**WGQGTSVTVSS	17
227E12D1 VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC**RASENIYSYLA**WYQQKQGKSPQ LVVY**NAKTLAE**GVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGTYYC**QH HYGPPPYT**FGGGTKLEIK	18
294A3C4 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT**SYWMH**WVKQRPGQ GLEWIG**MFHPNSGTTNYNEKFKS**KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTS EDSAVYYCAR**RLGIFFDY**WGQGTTLTVSS	19
294A3C4 VL	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSC**RSSQSLLNSGNQKNYLT**WYQQ KPGQPPKLLIY**WASTRDS**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQTEDLA VYYC**QTDYSYPFT**FGSGTKLEIK	20
312E1E2 VH	QVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKGSGYTFT**DYAMH**WVKQSHAKS LEWIG**IVSTHYGNTNYNQNFKG**KATMTVDKSSSTVYMELARLTS EDSAIYYCAR**SEGLRLDWFAH**WGQGTLVTVSA	21
312E1E2 VL	DIQMTQSPASLSASVGEIVTITC**RASENIYSYLA**WYQQKQGKSPH LLVY**NAKTLAE**GVPSRFSGSGSGTQFSLKISRLQPEDFGSYYC**QN HYVFPFT**FGSGTKLEIK	22
429H9F10 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFT**YYGLN**WVKQAPGKG LRWMG**WINTSSGVPTYADDFKG**RFAISLESSASTVFLEISNLKNE DTAAYFCAK**DDGYFYTMDH**WGQGTSVTVSS	23
429H9F10 VL	DIVMTQPPLSLPVSLGDQASISC**RSSQSLVHNNGKTYLH**WYLQK PGQSPKLLIY**KVSNRFS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVETEDLGV YFC**SQSTQVPWT**FGGGTKLEIK	24
43G8A9 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT**SYWMH**WVNQRPGQ GLEWIG**MIHPNSGSTNYNEKFKS**KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTS EDSAVYYCAR**NYGRYFDY**WGQGTTLTVSS	180
43G8A9 VL	MDFQVQIFSFLLISVSVIMSRGQIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTC**SA NSSVSSSSLY**WYQQKPGSSPKLWIY**STSNLAS**GVPARFSGSGSGTS YSLTISSMEAEDAASYFC**HQWSSYPLT**FGAGTKLELK	181

[0209] 这些抗体的CDR序列(根据Kabat系统)列于下表1B中。还显示了它们的变体,其中翻译后修饰(PTM)的潜在位点突变为生物等效物(例如,NG＝>NA、NG＝>QG、NS＝>NA、NS＝>QS、NS＝>YS、DG＝>DA、DG＝>EG和DS＝>DA)。考虑这些取代以保留抗体的生物活性,同时防止PTM,以促进制造。

[0210] 表1B.CDR序列(具有任选突变以避免PTM,Kabat编号)

[0211]

抗体	VH CDR1	SEQ ID NO:	VH CDR2	SEQ ID NO:	VH CDR3	SEQ ID NO:
35A12B 11	SYWMH	25	MIHPNSGTTNYNEKFKN MIHP**Q**SGTTNYNEKFKN MIHP**Y**SGTTNYNEKFKN	26 27 28	NGNPRWCFDV	29
62H9H5	NYWIH	33	YISPSTGYTEYNQKFKG	34	GTGY	35
72D1D1 1	NLGLN	39	WINTAGGQPTYAEDFKG	40	DDGYYYTMDY DD**A**YYYTMDY	41 42

[0212]

					DEGYYYTMDY DRGYYYTMDY DLGYYYTMDY DAGYYYTMDY	43 44 45 46
81C8A1	TSGMG VS	52	HIYWDDDRRYNPSLKS	53	SPYGSEAY	54
97E6B2	SYWIT	58	DIYPGSNNTYYNEKFKS	59	LIMSLFDY	60
106A5B 3	SYGMS	64	TISSGGSYIYYPDSMKG TISSGGSYIYYPDAMKG	65 66	DYGSRYFDY	67
126C10 B10	DPYIH	71	RIDPANGNTKYGPRFQG RIDPAQGNTKYGPRFQG RIDPANANTKYGPRFQG	72 73 74	WNYYLSRGFDY	75
216E7A 9	SFGMH	79	YISSGSSTIYYADTVRG	80	GGDYYYALDY	81
227E12 D1	SYGMS	85	TISGGGTYTYYPDSVKG TISGGGTYTYYPDAVKG	86 87	HEGLVMDY	88
294A3C 4	SYWMH	92	MFHPNSGTTNYNEKFKS MFHPNAGTTNYNEKFKS MFHPQSGTTNYNEKFKS MFHPYSGTTNYNEKFKS	93 94 95 96	RLGIFFDY	97
312E1E2	DYAMH	102	IVSTHYGNTNYNQNFKG	103	SEGLRLDWFAH	104
429H9F1 0	YYGLN	108	WINTSSGVPTYADDFKG	109	DDGYFYTMDH DDAYFYTMDH DEGYFYTMDH	110 111 112
43G8A9	SYWMH	182	MIHPNSGSTNYNEKFKS MIHPNAGSTNYNEKFKS MIHPQSGSTNYNEKFKS MIHPYSGSTNYNEKFKS	183 184 185 186	NYGRYFDY	187

[0213] 粗体/加下划线残基指示避免PTM的突变

[0214]

抗体	VL CDR1	SEQ ID NO:	VL CDR2	SEQ ID NO:	VL CDR3	SEQ ID NO:
35A12B11	SASSSVSYMH	30	DTSKLAS	31	FQGSGYPFT	32
62H9H5	RASENIYSFFA	36	NAKTLEE	37	QHNYVSPFT	38
72D1D11	RSSQSLVHSNGKTYLH RSSQSLVHSNAKTYLH RSSQSLVHSQGKTYLH	47 48 49	KVSNRFS	50	SQSTHVPWT	51
81C8A1	RASSSVSFIQ	55	SPSNLAS	56	QQWSSYPWT	57
97E6B2	SVSSSVSYIH	61	DTSKLAS	62	FQGSAYPLT	63
106A5B3	SASSSVIYMS	68	DTSNLAS	69	QQWSSYPRT	70
126C10B1 0	SARSSVTYMH	76	DTSKLAS	77	QQWTSNPLT	78
216E7A9	RASENIHSNLE	82	AATNLAD	83	QHFWGTPFT	84
227E12D1	RASENIYSYLA	89	NAKTLAE	90	QHHYGPPPY T	91
294A3C4	RSSQSLLNSGNQKNYL T	98	WASTRDS WASTRD A	99 100	QTDYSYPFT	101
312E1E2	RASENIYSYLA	105	NAKTLAE	106	QNHYVFPFT	107
429H9F10	RSSQSLVHNNGKTYLH RSSQSLVHNNAKTYLH RSSQSLVHNQGKTYLH	113 114 115	KVSNRFS	116	SQSTQVPWT	117
43G8A9	SANSSVSSSSLY SANASVSSSSLY SAQSSVSSSSLY SAYSSVSSSSLY	188 189 190 191	STSNLAS	192	HQWSSYPLT	193

[0215] 实例2:全人天然(Naïve)噬菌体文库淘选和筛选

[0216] 本实例从人天然噬菌体文库中筛选全人抗B7-H3抗体。

[0217] 抗原:人B7-H3(2Ig)-Avi-生物素、人B7-H3(4Ig)His标签、人B7-H3(4Ig)-Avi-生物素-His。

[0218] 全人天然噬菌体文库的制备:噬菌体文库是通过使用由从健康人受试者的PBMC扩增的抗体基因片段组成的噬菌粒载体构建的。文库形式为Fab噬菌体文库。文库大小为1.04×10^{11}。

[0219] 针对人B7-H3蛋白的噬菌体文库的固相和溶液淘选:对于溶液淘选,首先通过与BSA包被的链霉亲和素Dynabeads一起孵育对噬菌体文库进行阴性筛选。将所得噬菌体与生物素化B7-H3-His标签蛋白一起孵育,并用Kingfisher磁珠系统洗涤。结合物用胰蛋白酶洗脱。对于固相淘选,噬菌体文库首先用补充了5%牛奶的PBS封闭。将所得噬菌体与B7-H3 His标签蛋白一起孵育,并用PBST洗涤。结合物用胰蛋白酶洗脱。

[0220] 随后测试洗脱的噬菌体结合抗原的滴度,并与大肠杆菌共培养。进行了四轮淘选和筛选。输出3和输出4的滴度显著增加。

[0221] 从输出3和4中挑取单个克隆,然后在96孔深板中培养。对培养上清液进行IgG浓度和抗原结合滴度评估。共选择232个阳性克隆并进行测序。序列后分析鉴定了65个独特序列。对所有这些克隆进行ELISA结合分析,强结合物的序列如下表2A中所示。

[0222] 表2A.抗体可变区序列

[0223]

克隆	序列(根据 Kabat 系统的 CDR 加下划线)	SEQ ID NO:
AHP05564 VH	EVQLVETGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS**SSGMH**WVRQAPGKGL EWVA**VISYDVTNKYYVDSVKG**RFTISRDNSENTLYLQMNSLRAED TGVYYCVR**DGGPRWLGWYFDL**WGRGTLVTVSS	118
AHP05564 VL	NIQMTQSPSSQSASVGDRVTITC**RANQAIANSLA**WYQQKPGKAPK LLLF**GTSLLHS**GVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDDFGTYYC**QQYF SFPRT**FGQGTQVDVY	119
AHP06331 VH	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYAMS**WVRQAPGKGL EWVS**AISGSGGSTYYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**DRYYDILTGTFGY**WGQGTLVTVSS	120
AHP06331 VL	EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTITC**RASQSIGSSLH**WYQQKPDQSPKL LIK**HASQPIS**GVPSRFSGSGSGTVFTLTIQSLEAEDAATYYC**QQSSR LPT**FGGGTKVEIQ	121
AHP06345 VH	QVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFT**SYWIS**WVRQMPGKGL EWMG**RIDPSDSYTNYSPSFQG**HVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCAR**HTGYYGSGIGMDV**WGQGTLVTVSS	122
AHP06345 VL	HVILTQPPSVSAAPGQKVTISC**SGSSSNIGNNYVS**WYRQLPGTAPKL LIY**DNNQRPS**GIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC**ATWD SSLGVVV**FGGRTKLTVL	123
AHP06358 VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYGIS**WVRQAPGQGL EWMG**WISAYNGNTNYAQKLQG**RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD	124

[0224]

	DTAVYYCAR**DSPLQIAVAGYYYGMDV**WGQGTTVTVSS	
AHP06358 VL	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISC**TRSSGSIVSGYVQ**WYQQRPGSAPS TVIY**EHNQRPS**GVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLRTEDEADYYC**QS YDSRNMI**FGGGTKLTVL	125

[0225] 这些抗体的CDR序列(根据Kabat系统)列于下表2B中。还显示了它们的变体,其中翻译后修饰(PTM)的潜在位点突变为生物等效物(例如,NG=>NA、NG=>QG、NS=>NA、NS=>QS、NS=>YS、DG=>DA、DG=>EG和DS=>DA)。考虑这些取代以保留抗体的生物活性,同时防

止PTM,以促进制造。

[0226] 表2B.CDR序列(具有任选突变以避免PTM,Kabat编号)

[0227]

抗体	VH CDR1	SEQ ID NO:	VH CDR2	SEQ ID NO:	VH CDR3	SEQ ID NO:
AHP05564	SSGMH	126	VISYDVTNKYYVDSVKG VISYDVTNKYYVD**A**VKG	127 128	DGGPRWLGWYFDL D**A**GPRWLGWYFDL **E**GGPRWLGWYFDL	129 130 131
AHP06331	SYAMS	135	AISGSGGSTYYADSVKG AISGSGGSTYYAD**A**VKG	136 137	DRYYDILTGTFGY	138
AHP06345	SYWIS	142	RIDPSDSYTNYSPSFQG	143	HTGYYGSGIGMDV	144
AHP06358	SYGIS	149	WISAYNGNTNYAQKLQG WISAY**Q**GNTNYAQKLQG WISAYN**A**NTNYAQKLQG	150 151 152	DSPLQIAVAGYYYGMDV D**A**PLQIAVAGYYYGMDV	153 154

[0228] 粗体/加下划线残基指示避免PTM的突变

[0229]

抗体	VL CDR1	SEQ ID NO:	VL CDR2	SEQ ID NO:	VL CDR3	SEQ ID NO:
AHP05564	RANQAIANSLA	132	GTSLLHS	133	QQYFSFPRT	134
AHP06331	RASQSIGSSLH	139	HASQPIS	140	QQSSRLPT	141
AHP06345	SGSSSNIGNNYVS	145	DNNQRPS	146	ATWDSSLGVVV ATWD**A**SLGVVV	147 148
AHP06358	TRSSGSIVSGYVQ	155	EHNQRPS	156	QSYDSRNMI QSYD**A**RNMI	157 158

[0230] 实例3.与人B7-H3抗原的结合活性

[0231] 本实例测试了抗体与人B7-H3抗原的结合活性。

[0232] 3.1与人B7-H3基于细胞的结合

[0233] 为了评估克隆的结合活性,将测试抗体在A375或A375.S2细胞上进行FACS测试。

[0234] 简而言之,首先将总共4×10^4个A375细胞与3倍或5倍连续稀释的抗体在4℃下在FACS缓冲液中孵育30分钟。用FACS缓冲液洗涤后,向每个孔中加入荧光染料缀合的抗人IgG抗体,并在4℃下孵育30分钟。将样品用FACS缓冲液洗涤两次。通过MACSQuant Analyzer 16评估几何平均荧光强度(MFI)。

[0235] 如图1所示,在所有这些杂交瘤克隆中,43G8A9显示出与MGA017相当的结合,其他显示出比阳性参考MGA017更好的结合活性。衍生自人天然噬菌体文库的四种抗体显示出比MGA017更弱的结合活性。

[0236] 3.2与人B7-H3-4Ig的动力学活性

[0237] 使用捕获方法,用Biacore测试测试抗体与人B7-H3(4Ig)蛋白(his标签)的结合。通过蛋白A芯片捕获mAb。将人B7-H3蛋白的连续稀释液以30μL/min的流速注射到捕获的抗体上,持续3分钟。使抗原解离600s。所有实验均在Biacore T200上进行。通过Biacore T200评估软件根据1:1模型拟合结合迹线,以计算缔合(ka)和解离(kd)速率常数以及平衡常数(KD)。结果如下表3所示。

[0238] 表3.通过Biacore测量的动力学结果

[0239]

Ab	人 B7H3α-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
MGA017	7.37×10^5	1.32×10^{-3}	1.79×10^{-9}
35A12B11	5.29×10^5	2.01×10^{-3}	3.81×10^{-9}
62H9H5	3.46×10^5	1.60×10^{-4}	4.64×10^{-10}
72D1D11	3.74×10^5	1.80×10^{-4}	4.82×10^{-10}
81C8A1	5.67×10^5	1.11×10^{-4}	1.96×10^{-10}
97E6B2	6.47×10^5	4.81×10^{-4}	7.43×10^{-10}
106A5B3	8.33×10^5	3.96×10^{-4}	4.76×10^{-10}
126C10B10	4.38×10^5	3.67×10^{-4}	8.37×10^{-10}
216E7A9	3.31×10^5	8.24×10^{-4}	2.49×10^{-9}
227E12D1	5.95×10^5	3.68×10^{-4}	6.19×10^{-10}
294A3C4	4.63×10^5	1.35×10^{-3}	2.92×10^{-9}
AHP05564	1.66×10^6	8.62×10^{-4}	5.20×10^{-10}
AHP06331	9.06×10^4	3.72×10^{-3}	4.11×10^{-8}
AHP06345	1.73×10^5	2.54×10^{-4}	1.47×10^{-9}
AHP06358	5.37×10^6	3.96×10^{-3}	7.38×10^{-10}

[0240] 3.3测试抗体的结合表位

[0241] 使用Octet通过表位分仓测定来表征测试抗体的结合表位。

[0242] 简而言之,在传感器上捕获浓度为100nM的人B7-H3蛋白,产生了0.3nm的信号。然后,将传感器转移到100nM竞争抗体(72D1D11、AHP05562、AHP06345、CA84D)中,将其注射到传感器中用于抗原饱和并缔合120s。然后,注射测试抗体进行抗原竞争测试,再持续120s。在基线步骤后,将传感器转移到100nM测试抗体中,持续120s。使用Octet Analysis Studio 12.2软件进行数据分析。测试抗体和竞争抗体之间的结合抑制比率如下表4A中所示。根据结果,可以将测试抗体的结合表位分类为仓Aα、Aβ、Aγ、B和C,如表4B中所示。

[0243] 表4A.通过Octet测试的抑制比率

[0244]

竞争性 Ab / 测试 Ab	72D1D11	AHP05562	AHP06345	CA84D
MGA017	98.91%	91.49%	-0.09%	3.65%
35A12B11	3.44%	92.01%	-7.09%	-9.56%

[0245]

62H9H5	95.55%	90.21%	-7.10%	-6.07%
72D1D11	96.14%	-9.17%	-5.22%	-5.46%
81C8A1	95.40%	90.64%	-12.05%	-6.30%
97E6B2	99.65%	-7.80%	-1.18%	-3.99%
106A5B3	96.77%	89.58%	-13.04%	-15.75%
126C10B10	96.60%	-22.23%	-5.98%	-9.58%
216E7A9	98.03%	92.30%	1.99%	5.28%
227E12D1	97.11%	89.98%	-5.22%	-5.46%
294A3C4	-5.00%	89.96%	-7.53%	-12.01%
312E1E12	-32.57%	-24.39%	89.96%	-18.26%
429H9F10	98.86%	-22.36%	-11.54%	-8.00%
43G8A9	-0.01%	91.22%	-0.02%	-0.02%
AHP05564	未测试	-3.53%	5.92%	80.14%
AHP06331	-8.37%	-11.83%	-13.00%	82.66%
AHP06345	未测试	-6.36%	91.81%	-3.77%
AHP06358	-13.90%	91.72%	-10.55%	-13.62%

[0246] 表4B.表位分仓结果

[0247]

仓	抗体
Aα	MGA017、62H9H5、81C8A1、106A5B3、216E7A9、227E12D1
Aβ	72D1D11、97E6B2、126C10B10、429H9F10
Aγ	35A12B11、294A3C4、AHP06358、43G8A9
B	312E1E12、AHP06345
C	AHP06331、AHP05564

[0248] 实例4.测试抗体的内化

[0249] 本实例表征了A375细胞中测试抗体的内化。

[0250] pHAb硫醇染料是pH敏感性染料,其在pH>7时具有非常低的荧光,并且当其内化到pH分别为约6.3或4.7的内体或溶酶体中时,荧光会急剧增加。简而言之,将pHAb巯基染料标记的α-hIgG二抗(10nM)与从5-50nM开始的连续稀释抗体一起孵育30min。并且将混合物加入96孔测定板中,每个孔中预先接种2×10^4个A375细胞。培养48小时后,在多模式读板器(Envision®2105)或Operetta上捕获荧光信号。

[0251] 如图2所示,几乎所有杂交瘤克隆都显示出比MGA017更好的内化。在衍生自人天然噬菌体文库的抗体中,AHP06331和AHP06358在较低浓度下的内化程度低于MGA017,但在较高浓度下,AHP06331和AHP06358的内化程度远强于MGA017,通过测定中更高EC50和更高顶值(top value)表明。AHP05564和AHP05346的内化低于MGA017。

[0252] 实例5.B7-H3 ADC的体外细胞毒性

[0253] 本实例表征了vc-MMAE标记的B7-H3 ADC对RKO肿瘤细胞的杀伤功效。

[0254] B7-H3前导命中用vc-MMAE(L1-D1)标记,其中药物与抗体比率(DAR)为约4.0。在RKO细胞上测试B7-H3 ADC的细胞毒性。简而言之,将2×10^4个RKO细胞接种在96孔板的每个孔中过夜。将连续稀释的B7-H3 ADC加入细胞培养物中,并将混合物在CO_2培养箱中在37℃下孵育72小时或96小时。孵育结束时,加入100μLCellTiter-Glo反应试剂,并将混合物在室温下孵育10分钟。通过多模式读板器(Envision®2105)获得发光信号。

[0255] 如图3所示,与MGA017相比,72D1D11、81C8A1、62H9H5、106A5B3、126C10B10和227E12D1介导了对RKO细胞杀伤的更强的细胞毒性。AHP06358显示出与MGA017相当的细胞杀伤。

[0256] 实例6.B7-H3抗体的人源化

[0257] 使用抗体72D1D11和81C8A1的可变区基因以产生人源化mAb。将72D1D11和81C8A1的VH和VK的氨基酸序列与现有的人Ig基因序列数据库进行比较,以找到总体上最匹配的人种系Ig序列。

[0258] 对于72D1D11的轻链,IGKV2-40*01和IGKV2-28*01是最佳拟合的种系,对于72D1D11的重链,选择IGHV7-4-1*02作为人源化骨架。然后设计人源化72D1D11CDR移植抗体,其中将CDR-L1、L2和L3移植到IGKV2-40*01和IGKV2-28*01的框架序列上,并将CDR-H1、H2和H3移植到IGHV7-4-1*02的框架序列上。然后生成3D模型以确定原始小鼠框架区中对于抗体结合和构象至关重要的氨基酸。基于分析,对移植抗体进行回复突变,从而产生4条额外的人源化重链和4条额外的轻链。

[0259] 对于81C8A1的轻链,IGKV6-21*01是最佳拟合的种系,对于81C8A1的重链,选择

IGHV2-70*04作为人源化骨架。然后设计人源化81C8A1 CDR移植抗体,其中将CDR-L1、L2和L3移植到IGKV6-21*01的框架序列上,并将CDR-H1、H2和H3移植到IGHV2-70*04的框架序列上。然后生成3D模型以确定原始小鼠框架区中对于抗体结合和构象至关重要的氨基酸。基于分析,对移植抗体进行回复突变,从而产生3条额外的人源化重链和4条额外的轻链。

[0260] 所得人源化序列的序列列于表5-6中。

[0261] 表5A.72D1D11的人源化

[0262]

名称	序列	SEQ ID NO:
72D1D11 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFT**NLGLN**WVKQAPGKGLKWMG**WINTAGGQPTYAEDFKG**RCAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCAR**DDGYYYTMDY**WGQGTSVTVSS	5
72D1D11 VH.V1 (移植)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**NLGLN**WVRQAPGQGLEWMG**WINTAGGQPTYAEDFKG**RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR**DDGYYYTMDY**WGQGTTVTVSS	159
72D1D11 VH.V2	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**NLGLN**WVRQAPGQGLEWMG**WINTAGGQPTYAEDFKG**R***C***VFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR**DDGYYYTMDY**WGQGTTVTVSS	160
72D1D11 VH.V3	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**NLGLN**WVRQAPGQGL***K***WMG**WINTAGGQPTYAEDFKG**R***C***VFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVY***F***CAR**DDGYYYTMDY**WGQGTTVTVSS	161
72D1D11 VH.V4	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**NLGLN**WV***K***QAPGQGL***K***WMG**WINTAGGQPTYAEDFKG**R***C***VFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVY***F***CAR**DDGYYYTMDY**WGQGTTVTVSS	162
72D1D11 VL	DIVMTQTPLSLPVSLGDQASISC**RSSQSLVHSNGKTYLH**WYLQKPGQSPKLLIY**KVSNRFS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC**SQSTHVPWT**FGGGTKLEIK	6
72D1D11 VL.V1 (移植)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLVHSNGKTYLH**WYLQKPGQSPQLLIY**KVSNRFS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**SQSTHVPWT**FGGGTKLEIK	163
72D1D11 VL.V2	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLVHSNGKTYLH**WYLQKPGQSPQLLIY**KVSNRFS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY***F***C**SQSTHVPWT**FGGGTKLEIK	164
72D1D11 VL.V3 (移植)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLVHSNGKTYLH**WYLQKPGQSPQLLIY**KVSNRFS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**SQSTHVPWT**FGGGTKLEIK	165
72D1D11 VL.V4	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLVHSNGKTYLH**WYLQKPGQSPQLLIY**KVSNRFS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY***F***C**SQSTHVPWT**FGGGTKLEIK	166

[0263]

[0264] 表5B.来自72D1D11的人源化抗体

[0265]

VH \ VL	72D1D11 VL.V1	72D1D11 VL.V2	72D1D11 VL.V3	72D1D11 VL.V4
72D1D11 VH.V1	72D1D11-z1	72D1D11-z2	72D1D11-z3	72D1D11-z4
72D1D11 VH.V2	72D1D11-z5	72D1D11-z6	72D1D11-z7	72D1D11-z8
72D1D11 VH.V3	72D1D11-z9	72D1D11-z10	72D1D11-z11	72D1D11-z12
72D1D11 VH.V4	72D1D11-z13	72D1D11-z14	72D1D11-z15	72D1D11-z16

[0266] 表6A.81C8A1的人源化

[0267]

名称	序列	SEQ ID NO:
81C8A1 VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLS**TSGMGVS**WIRQPPGKG LEWLA**HIYWDDDRRYNPSLKS**RLTISRDTSRNQVFLQITTVDTA DTATYYCAR**SPYGSEAY**WGQGTLVIVSA	7
81C8A1 VH.V1 (移植)	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS**TSGMGVS**WIRQPPGK ALEWLA**HIYWDDDRRYNPSLKS**RLTISKDTSKNQVVLTMTNMD PVDTATYYCAR**SPYGSEAY**WGQGTLVTVSS	167
81C8A1 VH.V2	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS**TSGMGVS**WIRQPPGK ALEWLA**HIYWDDDRRYNPSLKS**RLTIS***R***DTSKNQVVLTMTNMD PVDTATYYCAR**SPYGSEAY**WGQGTLVTVSS	168
81C8A1 VH.V3	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS**TSGMGVS**WIRQPPGK **G**LEWLA**HIYWDDDRRYNPSLKS**RLTIS***R***DTSKNQVVLT***I***TNMDP VDTATYYCAR**SPYGSEAY**WGQGTLVTVSS	169
81C8A1 VL	MQIVLSQSPTILSAFPGEKVTMTC**RASSSVSFIQ**WYQQKSGSSPK	8

[0268]

	PWIY**SPSNLAS**GVPTRFSGSGSGTSYSLTIGRVEAEDAATYYC**QQ WSSYPWT**FGGGTKVEIK	
81C8A1 VL.V1	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC**RASSSVSFIQ**WYQQKPDQSPKL ***W***IK**SPSNLAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYC**QQW SSYPWT**FGQGTKVEIK	170
81C8A1 VL.V2	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC**RASSSVSFIQ**WYQQKPDQSPK***P*** ***W***IK**SPSNLAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYC**QQW SSYPWT**FGQGTKVEIK	171
81C8A1 VL.V3	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC**RASSSVSFIQ**WYQQKPDQSPK***P*** ***W***I***Y*****SPSNLAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYC**QQW SSYPWT**FGQGTKVEIK	172
81C8A1 VL.V4	EIVL***S***QSPDFQSVTPKEKVTITCRASSSVSFIQWYQQKPDQSPK***PW*** I***Y*****SPSNLAS**GVPSRFSGSGSGTD***Y***TLTINSLEAEDAATYYC**QQWSS YPWT**FGQGTKVEIK	173

[0269] 表6B.来自81C8A1的人源化抗体

[0270]

VH \ VL	81C8A1 VL.V1	81C8A1 VL.V2	81C8A1 VL.V3	81C8A1 VL.V4
81C8A1 VH.V1	81C8A1-z1	81C8A1-z2	81C8A1-z3	81C8A1-z4
81C8A1 VH.V2	81C8A1-z5	81C8A1-z6	81C8A1-z7	81C8A1-z8
81C8A1 VH.V3	81C8A1-z9	81C8A1-z10	81C8A1-z11	81C8A1-z12

[0271] 实例7.人源化抗体的结合活性

[0272] 进行流式细胞术以确认人源化抗体对A375细胞的结合活性。

[0273] 简而言之,首先将总共4×10^4个A375细胞与从30nM开始的3倍连续稀释的抗体在4℃下在FACS缓冲液中孵育30分钟。用FACS缓冲液洗涤后,向每个孔中加入PE缀合的抗人IgG抗体(eBioscience™,英杰公司(Invitrogen)),并在4℃下孵育30分钟。将样品用FACS缓冲液洗涤两次。通过MACSQuant Analyzer 16评估PE的几何平均荧光强度(MFI)。

[0274] 如图4所示,所有人源化72D1D11抗体在人B7-H3结合方面与嵌合抗体相当。对于人源化81C8A1抗体,81C8A1-z3、81C8A1-z4、81C8A1-z7、81C8A1-z8显示出与嵌合抗体相当的结合。

[0275] 实例8.嵌合72D1D11的PTM去除

[0276] 已经观察到,在72D1D11 VL CDR1上存在NG残基,在72D1D11 VH CDR3上存在DG残

基(Kabat编号),这些残基存在翻译后修饰(PTM)的风险,并对未来制造提出挑战。因此,本实例将VL CDR1的NG突变为QG或NA,将VH CDR3的DG突变为EG,以防止PTM。潜在PTM去除位点的序列列于表7中。

[0277] 表7.72D1D11的PTM去除

[0278]

VH \ VL	72D1D11 VL	72D1D11 VL NG-NA	72D1D11 VL NG-QG
72D1D11 VH	72D1D11	72D1D11-p1	72D1D11-p2
72D1D11 VH DG-EG	72D1D11-p3		

[0279] 如图5所示,72D1D11-p1/p2在A375细胞上显示与相应亲本抗体相当的人B7-H3结合。72D1D11-p3在A375细胞上显示人B7-H3结合略有损失。

[0280] 实例9.人源化72D1D11的PTM去除确认

[0281] 因此,本实例确认了去除潜在PTM位点(VL CDR1 NG突变为NA或QG;VH CDR3 DG突变为RG或LG或AG)的人源化72D1D11(72D1D11-z3)序列,并且序列列于表8中。

[0282] 表8A.去除潜在PTM位点的72D1D11人源化抗体

[0283]

VH \ VL	72D1D11 VL.V3 NG-NA	72D1D11 VL.V3 NG-QG
72D1D11 VH.V1	72D1D11-z3p1	72D1D11-z3p2
72D1D11 VH.V1 DG-RG	72D1D11-z3p6	
72D1D11 VH.V1 DG-LG	72D1D11-z3p7	
72D1D11 VH.V1 DG-AG	72D1D11-z3p8	

[0284] 表9.去除潜在PTM位点的72D1D11人源化

[0285]

名称	序列	SEQ ID NO:
72D1D11 VH.V1 (移植)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**NLGLN**WVR QAPGQGLEWMG**WINTAGGQPTYAEDFKG**RFVFSLDTSV STAYLQISSLKAEDTAVYYCAR**DDGYYYTMDY**WGQGTT VTVSS	159
72D1D11 VH.V1 DG-EG	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**NLGLN**WVR QAPGQGLEWMG**WINTAGGQPTYAEDFKG**RFVFSLDTSV STAYLQISSLKAEDTAVYYCAR**D*E*GYYYTMDY**WGQGTT VTVSS	174
72D1D11 VH.V1 DG-RG	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**NLGLN**WVR QAPGQGLEWMG**WINTAGGQPTYAEDFKG**RFVFSLDTSV STAYLQISSLKAEDTAVYYCAR**D*R*GYYYTMDY**WGQGTT VTVSS	175
72D1D11 VH.V1 DG-LG	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**NLGLN**WVR QAPGQGLEWMG**WINTAGGQPTYAEDFKG**RFVFSLDTSV STAYLQISSLKAEDTAVYYCAR**D*L*GYYYTMDY**WGQGTT VTVSS	176
72D1D11 VH.V1 DG-AG	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**NLGLN**WVR QAPGQGLEWMG**WINTAGGQPTYAEDFKG**RFVFSLDTSV STAYLQISSLKAEDTAVYYCAR**D*A*GYYYTMDY**WGQGTT VTVSS	177

[0286]

72D1D11 VL.V3 (移植)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLVHSNGKTYLH**W YLQKPGQSPQLLIY**KVSNRFS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYC**SQSTHVPWT**FGGGTKLEIK	165
72D1D11 VL.V3-NG-NA	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLVHSN*A*KTYLH**W YLQKPGQSPQLLIY**KVSNRFS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYC**SQSTHVPWT**FGGGTKLEIK	178
72D1D11 VL.V3-NG-QG	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLVHS*Q*GKTYLH**W YLQKPGQSPQLLIY**KVSNRFS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYC**SQSTHVPWT**FGGGTKLEIK	179

[0287] 如图6A所示,72D1D11-z3p1在A375细胞上显示与亲本抗体72D1D11-z3相当的人B7-H3结合。72D1D11-z3p2在A375细胞上显示人B7-H3结合略有损失。如图6B所示,72D1D11-z3p6、72D1D11-z3p7、72D1D11-z3p8在A375细胞上丧失了人B7-H3结合。

[0288] ***

[0289] 本披露的范围不受所描述的特别实施例的限制,这些特别实施例旨在作为本披露的各个方面的单一说明,并且功能上等效的任何组合物或方法都在本披露的范围内。对于本领域技术人员将显而易见的是,在不脱离本披露的精神或范围的情况下,可以对本披露的方法和组合物进行多种修改和变化。因此,本披露旨在覆盖本披露的修改和变化,只要它们在所附权利要求及其等同物的范围内。

[0290] 本说明书中提及的所有出版物和专利申请通过引用并入本文,其程度与每个单独的出版物或专利申请被特别和单独指示通过引用并入的程度相同。

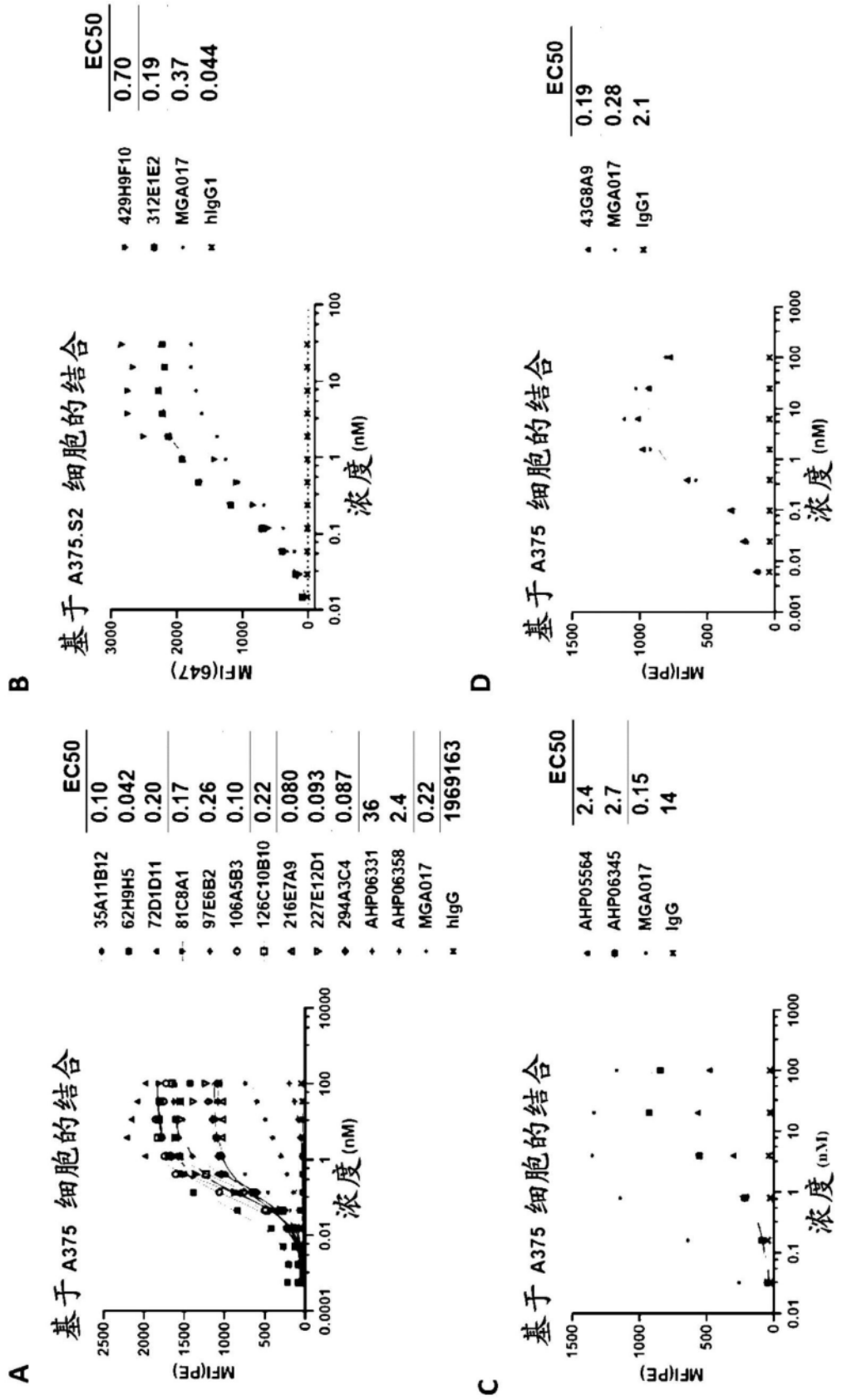

A
基于 A375 细胞的结合
MFI(PE)
浓度 (nM)
35A11B12 0.10
62H9H5 0.042
72D1D11 0.20
81C8A1 0.17
97E6B2 0.26
106A5B3 0.10
126C10B10 0.22
216E7A9 0.080
227E12D1 0.093
294A3C4 0.087
AHP06331 36
AHP06358 2.4
MGA017 0.22
hIgG 1969163
B
基于 A375.S2 细胞的结合
MFI(647)
浓度 (nM)
429H9F10 0.70
312E1E2 0.19
MGA017 0.37
hIgG1 0.044
C
基于 A375 细胞的结合
MFI(PE)
浓度 (nM)
AHP05564 2.4
AHP06345 2.7
MGA017 0.15
IgG 14
D
基于 A375 细胞的结合
MFI(PE)
浓度 (nM)
43G8A9 0.19
MGA017 0.28
IgG1 2.1

图1

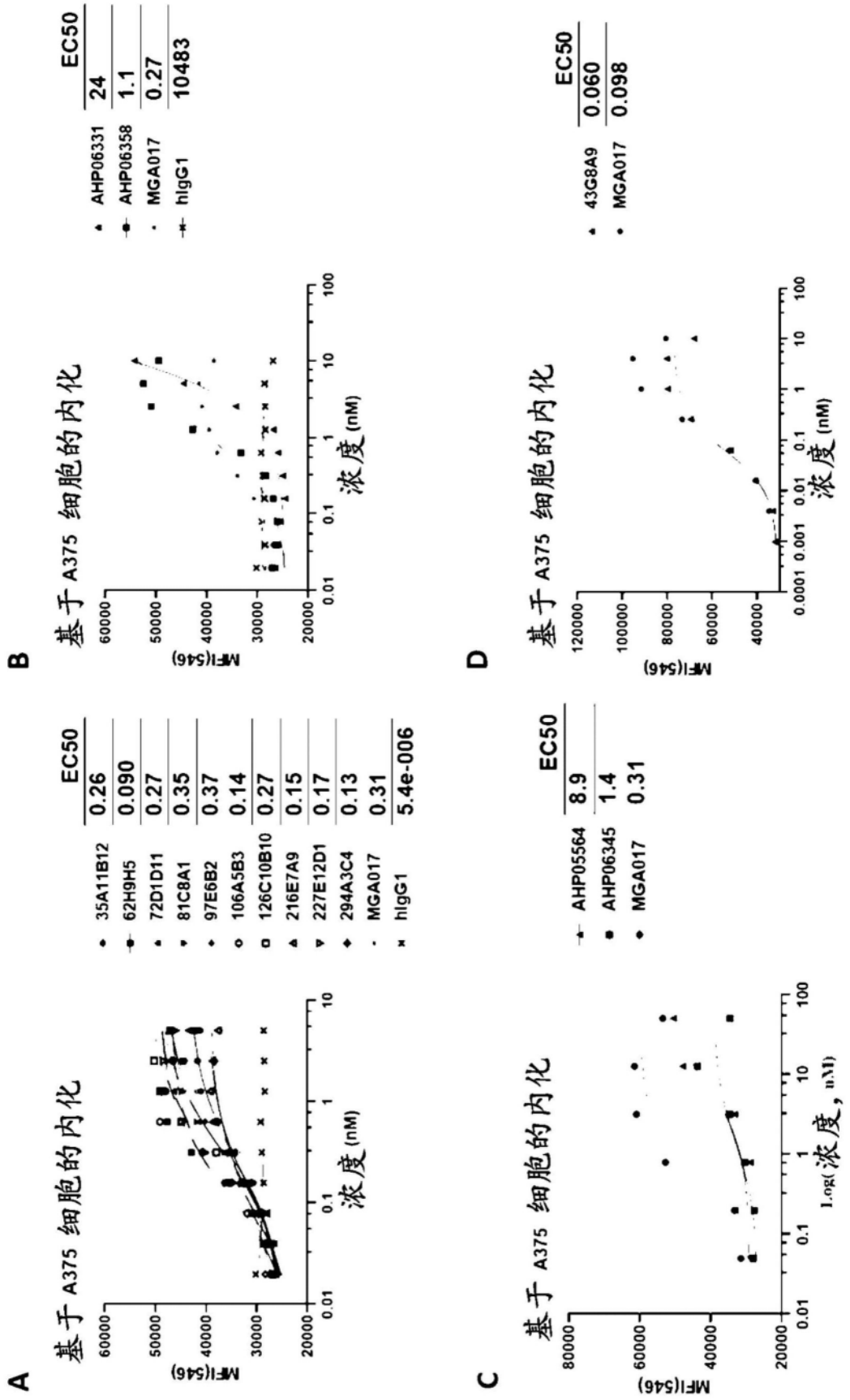

A
基于 A375 细胞的内化
MFI(546)
浓度(nM)
EC50
35A11B12 0.26
62H9H5 0.090
72D1D11 0.27
81C8A1 0.35
97E6B2 0.37
106A5B3 0.14
126C10B10 0.27
216E7A9 0.15
227E12D1 0.17
294A3C4 0.13
MGA017 0.31
hIgG1 5.4e-006
B
基于 A375 细胞的内化
MFI(546)
浓度(nM)
EC50
AHP06331 24
AHP06358 1.1
MGA017 0.27
hIgG1 10483
C
基于 A375 细胞的内化
MFI(546)
log(浓度, nM)
EC50
AHP05564 8.9
AHP06345 1.4
MGA017 0.31
D
基于 A375 细胞的内化
MFI(546)
浓度(nM)
EC50
43G8A9 0.060
MGA017 0.098

图2

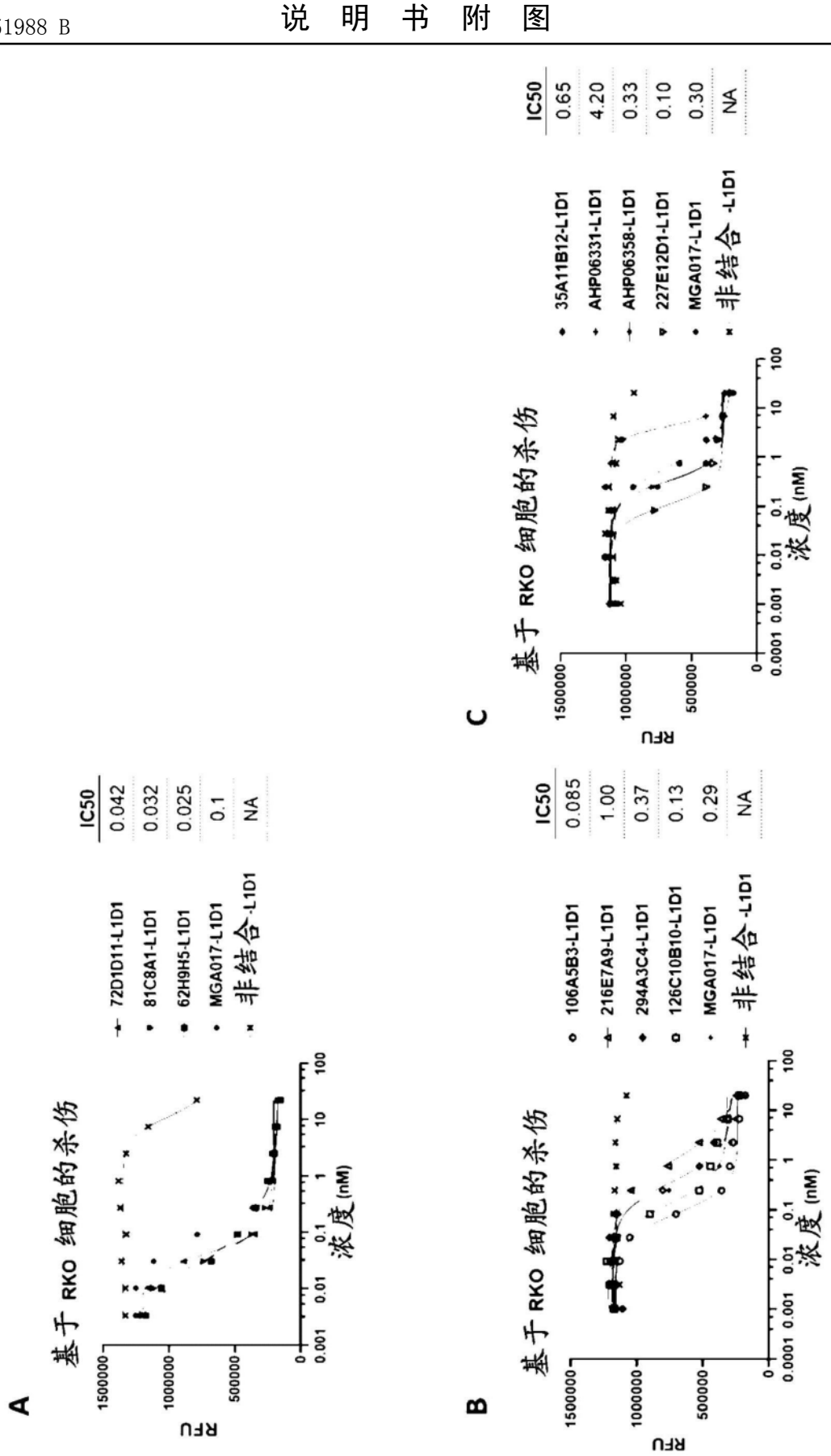

A
基于 RKO 细胞的杀伤
RFU
浓度 (nM)
IC50
72D1D11-L1D1 0.042
81C8A1-L1D1 0.032
62H9H5-L1D1 0.025
MGA017-L1D1 0.1
非结合-L1D1 NA
B
基于 RKO 细胞的杀伤
RFU
浓度 (nM)
IC50
106A5B3-L1D1 0.085
216E7A9-L1D1 1.00
294A3C4-L1D1 0.37
126C10B10-L1D1 0.13
MGA017-L1D1 0.29
非结合-L1D1 NA
C
基于 RKO 细胞的杀伤
RFU
浓度 (nM)
IC50
35A11B12-L1D1 0.65
AHP06331-L1D1 4.20
AHP06358-L1D1 0.33
227E12D1-L1D1 0.10
MGA017-L1D1 0.30
非结合-L1D1 NA

图3

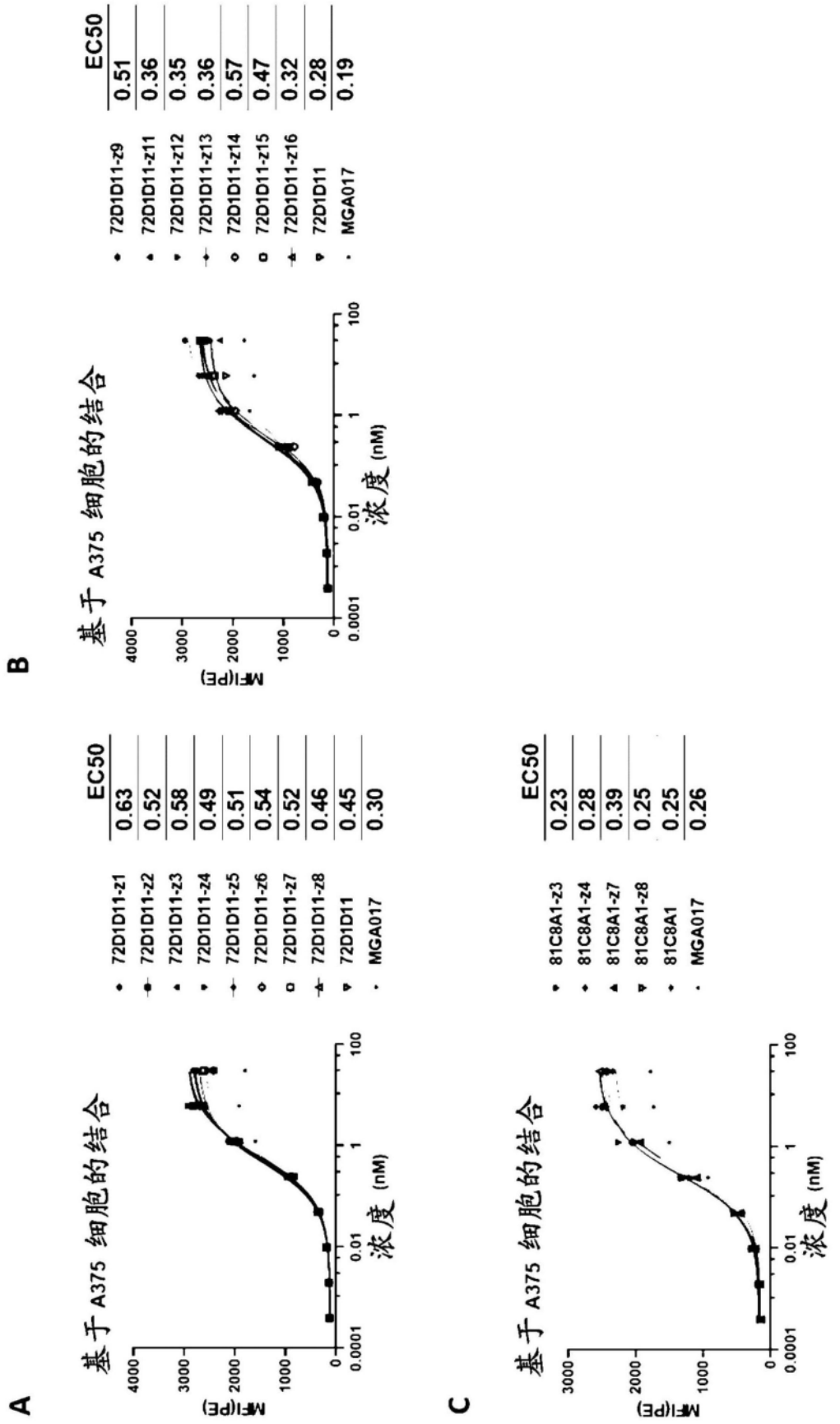

A
基于A375细胞的结合
MFI(PE)
浓度(nM)
72D1D11-z1 0.63
72D1D11-z2 0.52
72D1D11-z3 0.58
72D1D11-z4 0.49
72D1D11-z5 0.51
72D1D11-z6 0.54
72D1D11-z7 0.52
72D1D11-z8 0.46
72D1D11 0.45
MGA017 0.30
B
基于A375细胞的结合
MFI(PE)
浓度(nM)
EC50
72D1D11-z9 0.51
72D1D11-z11 0.36
72D1D11-z12 0.35
72D1D11-z13 0.36
72D1D11-z14 0.57
72D1D11-z15 0.47
72D1D11-z16 0.32
72D1D11 0.28
MGA017 0.19
C
基于A375细胞的结合
MFI(PE)
浓度(nM)
EC50
81C8A1-z3 0.23
81C8A1-z4 0.28
81C8A1-z7 0.39
81C8A1-z8 0.25
81C8A1 0.25
MGA017 0.26

图4

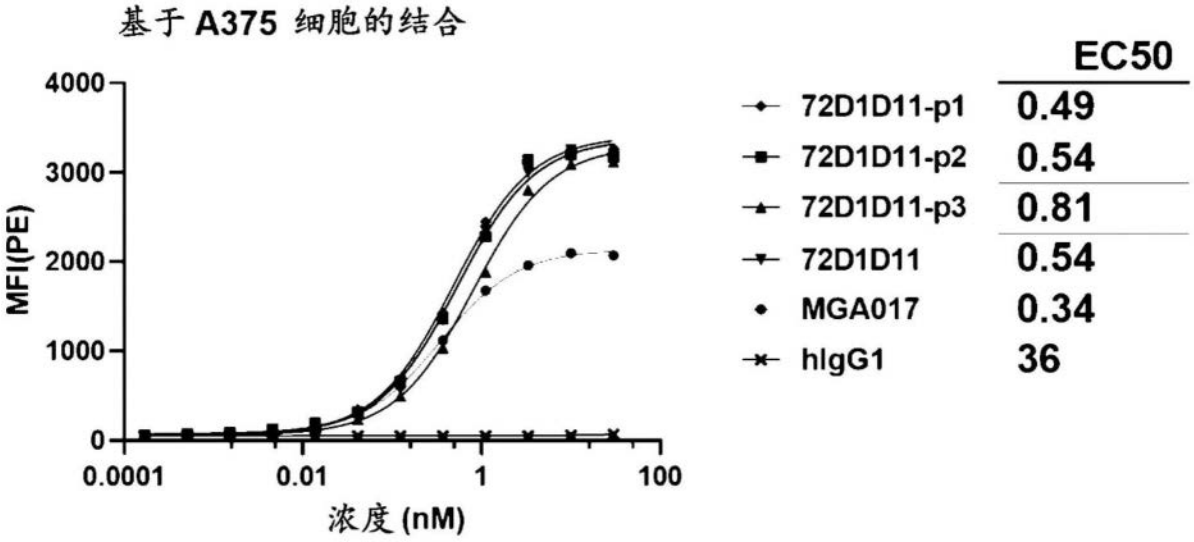

基于 A375 细胞的结合
MFI(PE)
4000
3000
2000
1000
0
0.0001
0.01
1
100
浓度 (nM)
EC50
72D1D11-p1 0.49
72D1D11-p2 0.54
72D1D11-p3 0.81
72D1D11 0.54
MGA017 0.34
hIgG1 36

图5

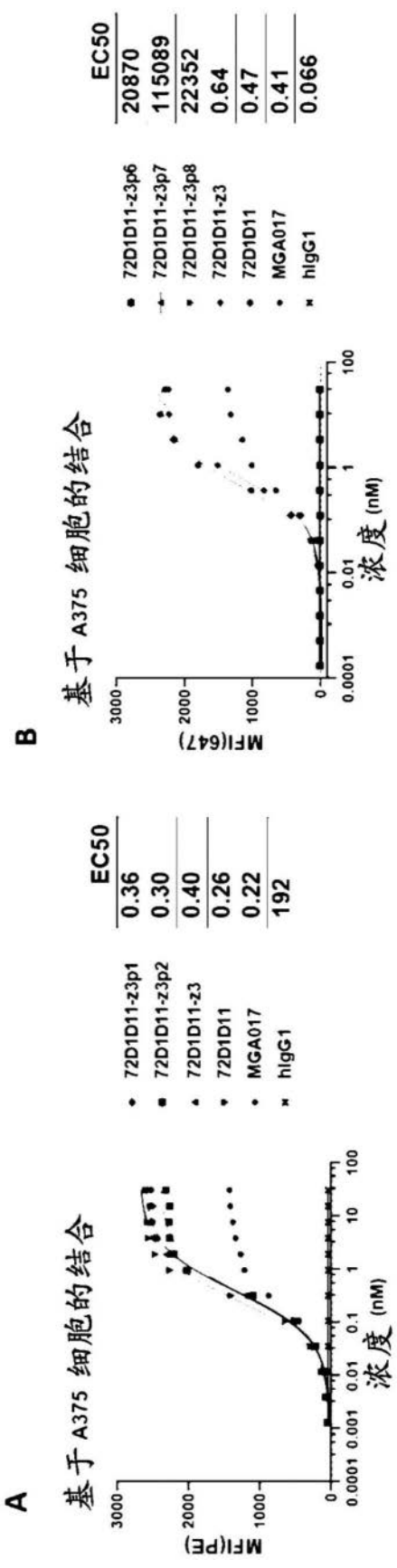

A
基于A375 细胞的结合
MFI(PE)
浓度 (nM)
72D1D11-z3p1
72D1D11-z3p2
72D1D11-z3
72D1D11
MGA017
hIgG1
EC50
0.36
0.30
0.40
0.26
0.22
192
B
基于A375 细胞的结合
MFI(647)
浓度 (nM)
72D1D11-z3p6
72D1D11-z3p7
72D1D11-z3p8
72D1D11-z3
72D1D11
MGA017
hIgG1
EC50
20870
115089
22352
0.64
0.47
0.41
0.066

图6